**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Química

Biotransformação de Compostos Funcionalizados por Fungos
Basidiomicetos e Desmetilação/Desalquilação de Aminas Terciárias
por Fungos *Aspergillus terreus*.

Leandro Piovan

Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto

São Paulo

Data do Depósito do Trabalho na SPG: 06/07/2007
(Seis de julho de dois mil e sete)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

Biotransformação de Compostos Funcionalizados por Fungos
Basidiomicetos e Desmetilação/Desalquilação de Aminas Terciárias
por Fungos *Aspergillus terreus*.

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de **Mestre** em
Química (Química Orgânica)*

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto

Leandro Piovan

São Paulo
2007.

Que diferença faz uma estação!

Um homem tinha quatro filhos. Ele queria que seus filhos aprendessem a não julgar as coisas de modo apressado; por isso, ele mandou cada um em uma viagem, para observar uma pereira que estava plantada em um distante local. O primeiro filho foi lá no Inverno, o segundo na Primavera, o terceiro no Verão, e o quarto e mais jovem, no Outono. Quando todos eles partiram, e retornaram, ele os reuniu, e pediu que cada um descrevesse o que tinham visto.

O primeiro filho disse que a árvore era feia, torta e retorcida.

O segundo filho disse que não, que ela era recoberta de botões verdes, e cheia de promessas.

O terceiro filho discordou; disse que ela estava coberta de flores, que tinham um cheiro tão doce e eram tão bonitas, que ele arriscaria dizer que eram a coisa mais graciosa que ele jamais tinha visto.

O último filho discordou de todos eles; ele disse que a árvore estava carregada e arqueada, cheia de frutas, vida e promessas...

O homem então explicou a seus filhos que todos eles estavam certos, porque eles haviam visto apenas uma estação da vida da árvore...

Ele falou que não se pode julgar uma árvore, ou uma pessoa, por apenas uma estação, e que a essência de quem eles são, e o prazer, a alegria e o amor que vêm daquela vida podem apenas ser medidos ao final, quando todas as estações estão completas.

Se você desistir quando for Inverno, você perderá a promessa da Primavera, a beleza de seu Verão, a expectativa do Outono.

*Dedico este trabalho à minha querida e
amada esposa Thaís, e ao nosso filho
Heitor, fruto deste amor tão bonito...*

Agradecimentos

Ao Professor André Luiz Meleiro Porto pela orientação, pela liberdade, confiança e paciência oferecida para que este trabalho pudesse ser realizado. Torno público meu reconhecimento por sua imensa capacidade de se preocupar com o próximo. Sem dúvida, a pessoa mais humana que já conheci.

Ao Professor Leandro Helgueira de Andrade por permitir que este trabalho pudesse ser finalizado em seu laboratório. Agradeço também pela co-orientação, pela disponibilidade em me atender sempre que precisei e por todas as discussões sobre química que contribuíram para o meu desenvolvimento.

Ao Professor João Valdir Comasseto pelas raras, porém valiosas oportunidades que tive de discutir com ele assuntos em geral e especialmente química. Agradeço pelos conselhos, pela confiança e apoio que depositou em mim quando cheguei nesta Universidade.

À Fapesp pela bolsa de mestrado.

Aos amigos de laboratório do bloco zero: Roberto, Roberta, Thaís, Paulo, Edna, Adriana, Alexandre Vieira, Priscila, Jasquer, Thiago, Lya, Eliane, João, Henrique, Felipe, Camila e Caterina. Um agradecimento especial aos alunos de iniciação científica Jane, Paulo, Alexandre Shida e Mônica (que se autodenomina a double IC) que trabalharam comigo e me ensinaram (e ensinam) muita química com seus questionamentos indispensáveis.

Aos amigos do bloco 11: Alcindo (hoje professor na UFSCar), Cadu, Arthur, Fabiano, Bruno, Renan, Tico, Mulla, Jefferson, Amarelo, Fabrício, Crisitiano, Alexandre, Ivani e todos os demais que lá trabalham ou trabalharam que sempre me ajudaram prontamente.

Agradeço aos meus pais, Orlando e Cleuza, por todo amor e carinho. Sei que mesmo eu estando longe eles estiveram sempre comigo e tenho a certeza de que todos os dias oraram por mim. Não há dúvidas de que foram estas orações que me trouxeram até aqui, pois diversas vezes não tive forças nem para orar e se sobrevivi não foi por méritos meus. Amo vocês meus pais queridos. Obrigado por tudo.

Ao meu irmão Silvano pelas discussões "existenciais" que mantivemos sempre que fui ao Paraná. Este também orou por mim e me ajudou nesta caminhada. Aos meus avós, Luís, Inês, Sérgio e Neusa. A todos os meus tios e tias espalhados por esse Brasil afora.

À minha nova família que me acolheu sem ressalvas: meus sogros, Marlene e Carlos, minha cunhada Francielle. Obrigado pelo apoio, pela confiança e pelo amor. Um beijo carinhoso a vocês que me adotaram.

Ao Seu Olívio e Dona Lurdes, Aires, Margareth, Eder, Rita, e às "crianças", Guilherme, Isabela, Vitor e Natália.

À minha querida e amada esposa Thaís que sofreu comigo muito mais do que as adversidades deste trabalho. O meu reconhecimento por toda a sua dedicação, seu exemplo de bondade e respeito. Obrigado por todo amor e carinho que sente por mim. Obrigado pela paciência e por tudo o que você tem me ensinado desde que nos conhecemos. Obrigado pelo filho lindo e querido que temos. Um grande beijo Meu Amor. Eu te amo, muito, muito, muito... Você é tudo pra mim.

Ao meu filhote Heitor, por existir e por me ensinar que todos os problemas podem ser esquecidos quando ele me olha sorrindo e diz: Papai!!!

Aos meus eternos amigos da Universidade de Maringá que o destino espalhou mas a amizade mantêm sempre próximos: Rodolfo, Nojento (vulgo Adriano), Hércules, Lenilson (Fobia), Fran Shimizu, Alexandra, Roberta, Sílvia, Thiago (Backs), Débora e todos os outros que fizeram a graduação comigo.

Acima de tudo agradeço a Deus pela força, pelo discernimento, pela vontade, saúde e determinação que me deu. Agradeço por todas as bênçãos e mais ainda por todas estas pessoas (e muitas outras que não foram citadas) que Ele colocou no meu caminho, pois tenho certeza de que carrego comigo um pouco de cada uma destas pessoas. Todas elas passaram pelo caminho e me ajudaram a ser quem eu sou hoje. Obrigado meu Deus por mais esta conquista.

Índice

Resumo	01
Abstract	03
<i>Parte A</i>	05
1.0 - Introdução	06
1.1 - A biocatálise como ferramenta na obtenção de compostos quirais	06
1.2 – β -hidróxi-selenetos e β -hidróxi-sulfetos	10
1.2.1 – Aplicações dos β -hidróxi-selenetos e β -hidróxi-sulfetos em síntese orgânica	10
1.2.2 – Preparação dos β -hidróxi-selenetos e β -hidróxi-sulfetos	13
1.3 - Preparação dos β -hidróxi-selenetos e β -hidróxi-sulfetos via biocatálise	21
2.0 – Objetivos	23
3.0 – Resultados e Discussão	24
3.1 – Síntese dos compostos bifuncionalizados 1-4.	25
3.2 – Síntese dos padrões racêmicos	28
3.3 – Caracterização dos diastereoisômeros <i>cis</i> e <i>trans</i> dos álcoois racêmicos.	33
3.4 – Biotransformações utilizando fungos basidiomicetos	43
3.4.1 – Biotransformações utilizando o fungo <i>Trametes rigida</i> CCB 285	44
3.4.1.1 - Biotransformação dos compostos 1 e 2 com <i>Trametes rigida</i> CCB 285	45
3.4.1.2 - Biotransformação dos compostos 3 e 4 com <i>Trametes rigida</i> CCB 285	45
3.4.2 - Biotransformações utilizando o biocatalisador <i>Trametes versicolor</i> CCB 202	47
3.4.2.1 - Biotransformação dos compostos 1 e 2 com <i>Trametes versicolor</i> CCB 202.	48
3.4.2.2 - Biotransformação dos compostos 3 e 4 com <i>Trametes versicolor</i> CCB 202.	48
3.4.3 - Biotransformações utilizando o biocatalisador <i>Trametes byssogenum</i> CCB 203.	50
3.4.3.1 - Biotransformação dos compostos 1 e 2 com <i>Trametes byssogenum</i> CCB 203.	51
3.4.3.2 - Biotransformação dos compostos 3 e 4 com <i>Trametes byssogenum</i> CCB 203.	51
3.4.4 – Biotransformações utilizando o biocatalisador <i>Pycnoporus sanguineus</i> CCB 501.	52
3.4.4.1 - Biotransformação dos compostos 1 e 2 com <i>Pycnoporus sanguineus</i> CCB 501.	53
3.4.4.2 - Biotransformação dos compostos 3 e 4 com <i>Pycnoporus sanguineus</i> CCB 501	53
3.4.5 – Biotransformações utilizando o fungo <i>Irpex lacteus</i> CCB 196	54
3.4.5.1 – Biotransformação dos compostos 1 e 2 com <i>Irpex lacteus</i> CCB 196	55
3.4.5.2 – Biotransformação dos compostos 3 e 4 com <i>Irpex lacteus</i> CCB 196	57
3.5 – Acompanhamento da reação de degradação dos compostos 1-2 pelo fungo <i>I. lacteus</i> CCB 196 via Espectrometria de Massas.	59
3.6 – Estudo quantitativo utilizando os fungos <i>I. lacteus</i> CCB 196 e <i>T. rigida</i> CCB 285 como biocatalisadores.	70
3.6.1 – Compostos isolados nas reações com o fungo <i>I. lacteus</i>	72

CCB 196.	
3.6.2 – Compostos isolados nas reações com o fungo <i>T. rigida</i>	75
CCB 285.	
3.7 – Determinação da configuração absoluta para os álcoois <i>cis</i> -2a e <i>cis</i> -3a.	79
4.0 – Conclusões	82
5.0 - Materiais e métodos	83
5.1 - Síntese das moléculas bi-funcionalizadas	85
5.1.1- Síntese da 2-(<i>fenilseleno</i>)ciclopentanona (1) e 2-(<i>fenilseleno</i>)cicloexanona (2).	85
5.1.2 – Preparação da 2-(<i>feniltio</i>)ciclopentanona (3) e da 2-(<i>feniltio</i>)cicloexanona (4).	88
5.2 – Preparação dos padrões sintéticos utilizados nas análises	91
6.0 - Referências bibliográficas	101
Parte B	107
1.0 - Introdução	108
2.0 - Objetivos	109
3.0 - Resultados e Discussão	110
3.1 - Desmetilação da <i>N,N</i> -dimetil-anilina (1) por fungos <i>A. terreus</i> .	111
3.2 - Desmetilação da <i>m</i> -Metil- <i>N,N</i> -dimetil-anilina (2) por fungos <i>A. terreus</i>	113
3.3 - Desalquilação de aminas terciárias por fungos <i>A. terreus</i> .	115
4.0 - Conclusão	116
5.0 - Referências Bibliográficas	117
Anexos	118
Curriculum vitae	136

Resumo

Neste trabalho foi avaliado a seletividade de reações biocatalisadas por fungos basidiomicetos frente a compostos bifuncionalizados com os grupos cetona e seleneto (**1-2**) ou cetona e sulfeto (**3-4**). Os compostos **1-4** foram sintetizados de acordo com metodologias descritas na literatura (Esquema 1).

Na síntese dos padrões racêmicos dos β -hidróxi-selenetos **1a-2a** e β -hidróxi-sulfetos **3a-4a** observou-se que a redução química utilizando NaBH_4 levou a formação preferencial dos estereoisômeros *cis*-(**1a-4a**). Enquanto que a redução promovida na utilização dos fungos basidiomicetos levou a formação preferencial do estereoisômero *trans*-(**1a-4a**). Desta forma duas metodologias complementares para a preparação de β -hidróxi-selenetos e β -hidróxi-sulfetos foram estabelecidas.

Cinco linhagens destes fungos (*Irpelex lacteus* CCB 196, *Trametes rigida* CCB 285, *Pycnoporus sanguineus* CCB 501, *Trametes byssogenum* CCB 203, *Trametes versicolor* CCB 202) foram testadas visando à obtenção de β -hidróxi-selenetos (**1a-2a**) e β -hidróxi-sulfetos (**3a-4a**) na forma enantiomericamente pura ou enriquecida. Um estudo qualitativo indicou que o fungo *Trametes rigida* CCB 285 apresentou alta seletividade frente aos compostos utilizados levando aos

produtos *cis*-(1a-4a) e *trans*-(1a-4a) com elevados valores de excessos enantioméricos (e.e. 99 %). Posteriormente, um estudo quantitativo permitiu o isolamento dos produtos, a determinação dos rendimentos isolados e também a configuração absoluta para os compostos isolados (Esquema 2).

Na segunda parte deste trabalho avaliou-se a aplicação de fungos *Aspergillus terreus* em reações de desmetilação/desalquilação de aminas terciárias. Os resultados obtidos indicam que estes fungos apresentam grande potencial para reações de desmetilação de aminas terciárias aromáticas, sendo que as reações conduzidas em meio neutro (pH = 7) levaram aos produtos desmetilados com bons valores de conversão (Esquema 3). No entanto, não foram observadas reações de desalquilação com grupos etila nas condições utilizadas.

Abstract

In this work was evaluated the selectivity of reactions biocatalysed by basidiomycetes fungi with bifunctionalized compounds with ketone and selenide groups (**1-2**) or ketone and thio groups (**3-4**). The compounds **1-4** were prepared in according with methodologies from literature (Scheme 1).

During the synthesis of standard racemic β -hydroxiselenides **1a-4a** and β -hydroxisulfides **3a-4a** we observed that chemical reduction using NaBH_4 led to the preferential formation of the *cis*-(**1a-4a**) isomers. On the other hand, the bioreduction promoted by basidiomycetes fungi led to the preferential formation of *trans*-(**1a-4a**) isomers. Therefore, two complementary methodologies for preparation of β -hydroxiselenides and β -hydroxisulfides were established.

Five strains of basidiomycetes fungi (*Irpex lacteus* CCB 196, *Trametes rigida* CCB 285, *Pycnoporus sanguineus* CCB 501, *Trametes byssogenum* CCB 203, *Trametes versicolor* CCB 202) were evaluated in the preparation of β -hydroxiselenides and β -hydroxisulfides on the enantiomerically pure form. A qualitative study indicated that cells of *T. rigida* CCB 285 showed high selectivity

led to the products *cis*-(**1a-4a**) and *trans*-(**1a-4a**) in high enantiomeric excess (ca 99 %). After that, a quantitative study allowed us to determine the isolated yields and the absolute configuration for the compounds *cis*-(**1a-4a**) and *trans*-(**1a-4a**) (Scheme 2).

In the second part of this work was evaluated the application of *Aspergillus terreus* fungi in demethylation/dealkylation reactions by tertiary amines. The results indicated that those fungi showed a big potencial for demethylation reaction of aromatic tertiary amines. The reaction done on the pH = 7 led to the demethylated products with good values of conversion (Scheme 3). Dealkylation reactions were not observed.

Parte A

*Biotransformação de Compostos Funcionalizados por Fungos
Basidiomicetos*

1.0 – Introdução

1.1 - A biocatálise como ferramenta na obtenção de compostos quirais

Nos últimos anos, questões ambientais têm merecido destaque na mídia nacional e internacional, onde se observa uma crescente preocupação da população com o meio ambiente aumentando assim as reivindicações junto aos Chefes de Estado por ações no sentido de minimizar os impactos ambientais causados por atividades industriais, cobrando soluções no que diz respeito à emissão de poluentes e a crescente degradação ambiental. Esta preocupação com os impactos ambientais gerou um desconforto nos setores acadêmico e industrial que culminou na criação de uma nova forma de se pensar nas atividades químicas, como exemplo, a chamada Química Verde “*Green Chemistry*”¹.

Os paradigmas oriundos da Química Verde também estão inseridos na academia, onde se buscam novas metodologias que reduzam o uso de materiais, de energia, os riscos ao homem e ao meio ambiente, a geração de resíduos e o uso de fontes não-renováveis. Inserida nesse contexto, a biocatálise apresenta-se como uma importante ferramenta para o desenvolvimento dessa química benigna ao meio ambiente.

A biocatálise fundamenta-se basicamente na utilização de enzimas como biocatalisadores de reações químicas. As enzimas são biocatalisadores naturais que promovem as reações químicas nas células de todos os organismos vivos². Estes biocatalisadores podem ser utilizados em síntese orgânica a partir de células inteiras de animais, vegetais e microrganismos, ou na forma de enzimas isoladas destas fontes. Ainda, os biocatalisadores podem ser imobilizados em diversos suportes, sendo que este procedimento permite a recuperação do biocatalisador do meio reacional, e o aumento da sua estabilidade, agregando assim, importantes vantagens para a utilização destes catalisadores³⁻⁵.

Como em toda reação catalisada, as enzimas aumentam a velocidade e diminuem a energia de ativação das reações⁶ (Figura 1) sendo ainda, capazes

de catalisar reações exibindo grande enantiosseletividade e regioseletividade utilizando condições brandas de reações⁷. Com a utilização de enzimas os passos sintéticos de proteção e desproteção de grupos funcionais (comuns em etapas sintéticas) podem ser omitidos, e sem a necessidade de utilização de altas temperaturas e pressões comumente utilizadas em reações de síntese orgânica tradicional.

Muitas enzimas são nomeadas pela adição do sufixo-*ase* ao nome do substrato ou função química relacionada com a catálise promovida por esta enzima. De forma mais geral, enzimas são classificadas, pela “International Union of Biochemistry” em seis classes, de acordo com a reação química que catalisam (Tabela 1)^{2,8}.

Dentre as reações enantiosseletivas, a redução de compostos carbonilados pró-quirais que levam aos respectivos álcoois nas formas enantiomericamente pura ou enriquecidas podem ser realizadas utilizando-se a biocatálise. Álcoois quirais são de grande interesse especialmente na indústria de química fina, como a indústria farmacêutica, onde, especialmente na última, a pureza dos enantiômeros é de grande importância⁹⁻¹¹.

Tabela 1.1 – Classificação das enzimas.

Classe	Tipo de Reação Catalisada
1- Oxido-redutases	Oxidação-redução de C-H, C-C, C=C, remoção ou adição de hidretos.
2- Transferases	Transferência de grupos: Aldeídicos, cetônicos, acila, açúcares, etc.
3- Hidrolases	Formação e hidrólise de ésteres, amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, nitrilas, anidridos, etc.
4- Liases	Adição-eliminação de pequenas moléculas à C=C, CN, C=O.
5- Isomerases	Isomerização, como racemização e epimerização.
6- Ligases	Formação e clivagem de ligações C-O, C-S, C-N, C-C.

As enzimas óxido-redutases utilizadas nas reações para obtenção de álcoois, a partir de aldeídos e cetonas, são conhecidas por desidrogenases. Estas enzimas têm sido amplamente utilizadas não só na redução de aldeídos e cetonas, como também na redução de ligações duplas entre carbonos. No entanto, esse grande potencial de aplicação das desidrogenases é acompanhada pela necessidade da utilização da coenzima, o dinucleotídeo de adenosina e nicotinamida (NADH) o que muitas vezes inviabiliza o uso da enzima isolada devido ao elevado custo do NADH em escalas preparativas.

Mecanicamente, a função de uma enzima óxido-redutase, é fornecer o ambiente no qual a reação entre o substrato e a coenzima irá ocorrer (Esquema 1.1), já que a reação de transferência de um hidrogênio da posição 4 do anel piridínico do NADH, não se processa na ausência da enzima ¹².

Uma alternativa ao uso das enzimas desidrogenases isoladas, é o uso de microrganismos, os quais já possuem em seu metabolismo desidrogenases capazes de aceitar substratos não naturais, ou seja, substâncias que não fazem parte do seu metabolismo, e também as coenzimas necessárias para que o sistema redox de reações possa ocorrer. No entanto, muitas dessas enzimas estão localizadas no interior das células, sendo necessário que o substrato tenha que ultrapassar a parede celular, com posterior liberação do produto, fato que pode diminuir o rendimento, já que o produto pode ficar retido ou até mesmo sofrer novas reações no interior celular.

Outras desvantagens do uso de microrganismos em reações biocatalisadas podem ser: a toxicidade do substrato frente aos microrganismos; a grande quantidade de biomassa presente na reação o que pode ocasionar a excreção de metabólitos do próprio organismo para o meio reacional, o que dificulta o isolamento e purificação do produto; os diferentes comportamentos (seletividade, inibição) das várias espécies de microrganismos², frente ao mesmo substrato devido ao número elevado de enzimas.

1.2 – β -hidróxi-selenetos e β -hidróxi-sulfetos

1.2.1 – Aplicações dos β -hidróxi-selenetos e β -hidróxi-sulfetos em síntese orgânica

Os β -hidróxi-selenetos apresentam-se como compostos de alta versatilidade sintética dentro da química orgânica, podendo ser utilizados como intermediários sintéticos na preparação de um grande número de compostos.

Os β -hidróxi-selenetos podem ser utilizados como material de partida em diversas rotas sintéticas. Estes compostos podem ser reduzidos a álcoois, dentre outras metodologias¹⁴, mediante eliminação redutiva pela utilização de lítio em dietilamina (Esquema 1.2)¹⁵.

Os selenetos são facilmente oxidados a selenóxidos pela utilização de peróxido de hidrogênio ou ácido *meta*-cloro-perbenzóico (*m*-CPBA) e a eliminação *syn* de fenilselenóxido ocorre espontaneamente e de forma regioseletiva levando a formação de álcoois alílicos (Esquema 1.3)¹⁶.

Reações de substituição do grupo PhSe- podem ser realizadas para a introdução de grupamentos alquila levando a formação de álcoois alílicos substituídos (Esquema 1.4)¹⁷.

Os β -hidróxi-selenetos podem sofrer reações intramoleculares, onde a presença de um átomo nucleofílico (O, N) e o grupo PhSeO₂ (selenona **3**, Esquema 1.5), um bom grupo de partida, formado pela oxidação do seleneto a respectiva selenona, favorecem as reações nucleofílicas do tipo S_N2 intramoleculares¹⁵, levando a formação de epóxidos^{16,18}, e de 1,3-oxazolidin-2-onas, que posteriormente podem ser hidrolisadas levando a formação de amino-álcoois (Esquema 1.5)¹⁹.

De maneira análoga, β -hidróxi-sulfetos são compostos de grande interesse, especialmente porque podem ser facilmente oxidados aos sulfóxidos correspondentes, que além de serem espécies estáveis²⁰, despertam grande interesse sintético devido a possibilidade de existência de um centro estereogênico no átomo de enxofre, ou seja, sulfóxidos quirais (Esquema 1.6), que desta forma encontram uma variedade bastante ampla de aplicações na preparação de compostos biologicamente ativos²¹⁻²⁸.

1.2.2 – Preparação dos β -hidróxi-selenetos e β -hidróxi-sulfetos

Os β -hidróxi-selenetos e β -hidróxi-sulfetos são preparados majoritariamente por duas metodologias: i) abertura de epóxidos por uma espécie nucleofílica de selênio ou enxofre; ii) hidróxi-selenilação ou hidróxi-sulfenilação de olefinas (Esquema 1.7).

As reações de abertura de epóxidos por espécies nucleofílicas de selênio e enxofre na presença de ácidos de Lewis, são reações clássicas de preparação de β -hidróxi-selenetos³⁰⁻³⁵ e β -hidróxi-sulfetos³⁶⁻⁴⁷. A espécie nucleofílica de selênio mais utilizada em reações de abertura de epóxidos é o ânion fenilselenolato, PhSe^- , proveniente principalmente da redução do disseleneto de difenila, PhSeSePh , com NaBH_4 , ou da reação do fenilselenol, PhSeH com NaH (Esquema 1.8)⁴⁸⁻⁴⁹.

Analogamente, o ânion feniltiolato, PhS^- , é a espécie nucleofílica de enxofre mais utilizada na preparação de β -hidróxi-sulfetos, podendo ser obtida a partir da redução do dissulfeto de difenila, PhSSPh , com NaBH_4 , e também da reação do feniltiol, PhSH , com diferentes bases como NaH , K_2CO_3 , EtONa , etc (Esquema 1.8). A principal vantagem na preparação do feniltiolato em relação ao fenilselenolato, é a disponibilidade comercial do PhSH enquanto que o análogo de selênio, PhSeH , não é comercial e portanto precisa ser preparado e utilizado em seguida.

Procter e colaboradores⁴¹ utilizaram itérbio na clivagem de ligações calcogênio-calcogênio levando a formação de calcogelanatos de itérbio (III) que, posteriormente foram utilizados como nucleófilos na introdução dos grupos ArS-, ArSe- e ArTe- (Ar = Ph, *p*-Tol) em epóxidos (Esquema 1.9).

Diferentes metodologias de adição dos grupos PhSe- e PhS- em epóxidos foram desenvolvidas objetivando a otimização das condições reacionais para obtenção de β-hidróxi-selenetos e β-hidróxi-sulfetos. A aplicação de ácidos de Lewis na catálise deste tipo de reação foi, particularmente empregada na síntese de β-hidróxi-sulfetos e amplamente estudada ao longo dos últimos 20 anos levando a preparação de um grande número de novos compostos. Foram

utilizados complexos de lantanídeos (Sm, Ce, Eu)³⁶, sais de cobalto (CoCl₂)³⁷, índio (InCl₃, InI)^{42-43,47} e zinco (ZnCl₂)⁴⁴, além de compostos de bismuto⁴⁶ e lítio⁵⁰, e alumina⁵¹.

No caso dos β-hidróxi-selenetos, um amplo estudo a respeito da utilização de diferentes ácidos de Lewis foi realizado por Nishiyama e colaboradores³² que utilizaram o composto fenilselenolato de tributilestano (Bu₃SnSePh) como agente selenilante (Esquema 1.10). Os produtos obtidos foram majoritariamente β-hidróxi-selenetos provenientes da reação de adição regiosseletiva do grupo PhSe-. Para todos os ácidos de Lewis testados foi observada a mesma seletividade, sendo que o melhor resultado, em termos de rendimento, foi obtido para o composto BF₃.OEt₂ na reação conduzida em CH₂Cl₂ a -78 °C.

Chandrasekaran e colaboradores³³ realizaram a síntese *one pot* de β -hidróxi-selenetos e β -hidróxi-sulfetos utilizando abertura de epóxidos, onde as espécies nucleofílicas PhSe^- e PhS^- foram preparadas pela clivagem do PhSeSePh e PhSSPh , respectivamente, na presença de tetratiomolibdato de benziltriethylamônio ($[\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{NEt}_3]_2\text{MoS}_4$). Neste caso, a síntese envolvendo diversas reações em sequência (*multistep tandem reactions*), levou aos produtos com elevados rendimentos de aproximadamente 90 %, (Esquema 1.11)

Em 1998, Hou e colaboradores⁴⁰, utilizaram um complexo Salen-Ti(IV) quiral como catalisador na síntese assimétrica de β -hidróxi-sulfetos partindo de *meso*-epóxidos. Os produtos foram obtidos em altos rendimentos e moderados valores de excesso enantiomérico (e.e. 40-60%). Recentemente, Zhu e colaboradores³⁴ realizaram a síntese de β -hidróxi-selenetos tendo um sistema heterobimetálico Ti-Ga-Salen como catalisador. Neste caso, os β -hidróxi-selenetos foram obtidos bons valores de excesso enantioméricos, chegando, em alguns casos a mais de 90 % (Esquema 1.12). Estes trabalhos apresentam uma acentuada relevância do ponto de vista sintético, porque se tratam da abertura de *meso*-epóxidos levando a formação enantiosseletiva dos produtos, com apreciáveis valores de pureza óticas dos β -hidróxi-selenetos.

Reações utilizando como solvente polietilenoglicol³⁹ ou reações em suportes sólidos utilizando microondas^{42,45} também foram utilizadas na síntese de β-hidróxi-sulfetos via abertura de epóxidos. Outra importante metodologia foi desenvolvida por Rao e colaboradores^{35, 52} que utilizaram β-ciclodextrinas (β-CD) como catalisador na reação de abertura de epóxidos por fenilselenóis³⁵ e na adição de feniltióis a olefinas⁵². As reações foram conduzidas utilizando água como solvente, levando aos produtos com bons rendimentos (60-86 %).

Outra metodologia usual na preparação de β -hidróxi-selenetos é via inserção direta dos grupos $-\text{Br}$, $-\text{Cl}$ $-\text{OH}$ e PhSe- às ligações duplas de olefinas. Esta metodologia é conhecida como hidróxi-selenilação.

Em 1979, Denis e colaboradores⁵³ prepararam β -hidróxi-selenetos em duas etapas sintéticas. Inicialmente, foram preparados β -halo-selenetos pela reação de brometo de fenilselenilina, PhSeBr , com diferentes olefinas utilizando CH_2Cl_2 como solvente. Os β -halo-selenetos obtidos, foram então utilizados numa segunda etapa reacional de preparação de β -hidróxi-selenetos e β -azido-selenetos via reações do tipo $\text{S}_{\text{N}}2$ utilizando como nucleófilos H_2O e NaN_3 , respectivamente. Uemura e colaboradores⁵⁴⁻⁵⁵, conduziram a reação de cloreto de fenilselenilina, PhSeCl , com diferentes olefinas utilizando como meio reacional acetonitrila e água. As reações conduzidas à temperatura ambiente, levaram a formação dos β -hidróxi-selenetos em bons rendimentos (70-93 %) utilizando apenas uma etapa reacional. Nas duas metodologias há um β -halo-seleneto (1) como intermediário na preparação do β -hidróxi-seleneto, sendo que a principal observação para as duas metodologias é que o grupo PhSe- foi adicionado de forma regiosseletiva no carbono menos impedido das olefinas (Esquema 1.13).

Torii e colaboradores³¹ reportaram a selenilação direta de haletos de alquila e epóxidos utilizando o ânion fenilselenolato, PhSe^- , preparado via redução eletroquímica do PhSeSePh sem a necessidade de utilização de agentes redutores químicos, como o NaBH_4 . A mesma metodologia foi aplicada na preparação de β -hidróxi-selenetos a partir de olefinas⁵⁷ utilizando o mesmo agente selenilante. Por esta metodologia, um íon X^- , proveniente da adição de NaX ($\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$) ao meio reacional é oxidado a X^+ num eletrodo de platina. O PhSeSePh , na presença da espécie X^+ é oxidado levando a formação in situ do PhSeX que insere-se à ligação dupla da olefina, levando a formação de um β -halo-seleneto como intermediário da reação. Novamente, a formação do β -hidróxi-seleneto ocorre via reação do tipo $\text{S}_{\text{N}}2$ pelo ataque de um grupo ROH ($\text{R} = \text{Me}, \text{H}, \text{Ac}$) no carbono halogenado. O grupo de partida X^- é novamente oxidado a X^+ e o ciclo reacional pode ser reiniciado (Esquema 1.14).

Em 1987, Toru e colaboradores⁵⁶, foram os primeiros a reportar a síntese de β -hidróxi-selenetos cíclicos com configuração *cis*. Até então, todos os β -hidróxi-selenetos preparados, tanto por abertura de epóxido como via hidróxi-selenilação levaram impreterivelmente a formação dos produtos com configuração *trans*. A metodologia desenvolvida por Toru, envolveu o oximercuriação de olefinas, onde os produtos, *trans*-2-hidróxi e *trans*-2-metoximercurícos, foram irradiados com lâmpada de mercúrio (400 W), na presença do composto selenosulfato de Se-fenila e S-benzoíla, em benzeno, levando a formação de uma quantidade apreciável de β -hidróxi-selenetos com configuração *cis* (Esquema 1.15). Apesar de ser o primeiro relato da obtenção de *cis*- β -hidróxi-selenetos, a metodologia apresentou como desvantagem o uso de mercúrio e benzeno, cuja tendência atual é de eliminá-los das bancadas dos laboratórios.

1.3 - Preparação dos β -hidróxi-selenetos e β -hidróxi-sulfetos via biocatálise

A preparação de β -hidróxi-selenetos e β -hidróxi-sulfetos utilizando biocatálise foi pouco explorada e apenas poucos artigos são encontrados visando a obtenção destes compostos por esta metodologia.

O primeiro relato da utilização de microrganismo na preparação de β -hidróxi-sulfetos foi feito em 1978 por Crumbie e colaboradores⁵⁸ que utilizaram *Saccharomyces cerevisiae* na redução de cetonas α -sulfeniladas e obtiveram os produtos na forma enantiomericamente pura. No entanto, os autores relataram que além de baixos rendimentos, a reação ocorria muito lentamente, o que tornaria esta metodologia inadequada do ponto de vista prático.

Em 1991, Fujisawa e colaboradores⁵⁹ relataram a preparação de β -hidróxi-sulfetos cíclicos, utilizando o mesmo biocatalisador empregado anteriormente por Crumbie, com alta enantio- e diastereosseletividade levando a formação preferencialmente dos compostos com configuração *cis*.

Quanto a preparação de β -hidróxi-selenetos, Costa e colaboradores⁶⁰ e mais recentemente Grutadauria e colaboradores⁶¹ relataram a preparação de uma ampla gama destes compostos nas formas enantiomericamente puras ou enriquecidas, utilizando como estratégia sintética a resolução cinética enzimática partindo-se de misturas racêmicas. Nos dois trabalhos, as reações foram realizadas utilizando lipases em meio orgânico (hexano ou tolueno) e acetato de vinila como doador de acetila. As reações foram conduzidas em temperaturas entre 30-32 °C e os produtos foram obtidos com tempo reacional médio de 48 h. Por esta metodologia, a mistura racêmica de um determinado β -hidróxi-seleneto pôde ser resolvida, pois as transformações ocorreram de forma enantiosseletiva, sendo que apenas um dos enantiômeros foi acetilado e outro não (Esquema 1.16). Desta forma, obtiveram-se como produtos da reação um álcool e um éster que podem ser facilmente separados. A reação de hidrólise do éster obtido regenerou o álcool com configuração absoluta oposta ao álcool não acetilado. Estes trabalhos demonstram o grande potencial de

aplicação de enzimas na resolução de misturas racêmicas levando a preparação de compostos enantiomericamente puros.

2.0 – Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram:

i) Verificar se as enzimas presente no metabolismo de fungos basidiomicetos eram quimiosseletivas frente a compostos funcionalizados com grupos carbonila e sulfeto ou os grupos carbonila e seleneto (Esquema 2.1).

ii) Desenvolvimento de metodologia para obtenção de moléculas contendo dois centro estereogênicos, utilizando biocatálise.

3.0 – Resultados e Discussão

Para avaliarmos a estereosseletividade das reações catalisadas por fungos basidiomicetos, uma série de moléculas que contêm os grupamentos cetona e seleneto ou cetona e sulfeto foi sintetizada, compostos **1-4** (Figura 3.1).

Nosso objetivo foi avaliar se seria possível a obtenção de β -hidróxi-selenetos e β -hidróxi-sulfetos enantiomericamente puros ou enriquecidos por meio de reações de biocatálise. Estudos realizados anteriormente em nosso grupo, mostraram que, apesar da possibilidade de ocorrência de outras transformações (Esquema 3.1), as reações catalisadas por fungos basidiomicetos promoveram a redução do grupo carbonila dessas moléculas levando à formação dos respectivos β -hidróxi-selenetos e β -hidróxi-sulfetos, no entanto os valores dos excessos diastereoisomérico e enantiomérico não foram determinados, bem como as configurações absolutas⁶².

3.1 – Síntese dos compostos bifuncionalizados 1-4.

Reações que levam à α -selenilação e a α -sulfenilação de compostos carbonílicos são importantes transformações em síntese orgânica, pois o derivado α -funcionalizado pode ser empregado em reações posteriores, como por exemplo, na formação de ligações C=C, onde, por meio da oxidação do composto α -selenilado ou α -sulfenilado aos correspondentes selenóxidos e sulfóxidos seguida de uma eliminação *syn*, obtém-se um composto α,β -insaturado^{16,24,25,30,49,63,64} Esquema 3.2.

Dentre as diversas metodologias disponíveis para inserção de selênio na posição α -carbonila^{16,63,65-69}, a mais amplamente utilizada emprega enolatos dos compostos carbonílicos^{16,63}. Nesta abordagem, prepara-se inicialmente o diisopropilamideto de lítio (LDA) fazendo reagir diisopropilamina e *n*-butilítio, com posterior adição do composto carbonílico. Paralelamente uma espécie eletrofílica do agente selenilante, geralmente um haleto de fenilselenilina (PhSeBr ou PhSeCl), é preparada pela clivagem do disseleneto de difenila com Br₂ ou Cl₂. A solução do agente selenilante é rapidamente adicionada sobre a solução de enolato de lítio, levando a formação instantânea do derivado α -selenilado (Esquema 3.3).

No caso das reações de introdução de grupamentos contendo enxofre à moléculas orgânicas carboniladas, também há uma ampla disponibilidade de metodologias^{24,25,64}, no entanto a mais utilizada envolve uma reação do tipo S_N2 na qual um halogênio é substituído por uma espécie nucleofílica de enxofre, ou seja, um ânion tiolato, RS^- (Esquema 3.4). Esta reação é limitada apenas pela disponibilidade dos reagentes, ou seja, do composto carbonílico α -halogenado ao qual deseja-se introduzir o átomo de enxofre e também a existência tiolato com o grupo alquila ou arila adequado²⁴⁻²⁵.

Desta forma preparou-se os compostos **1-2** utilizando enolatos de lítio da ciclopentanona e ciclohexanona respectivamente, seguido da adição do agente selenilante, PhSeBr. Para a síntese dos compostos α -sulfenilados, à solução do tiolato, PhS⁻, formado pela reação de benzenotiol e K₂CO₃, foram adicionadas 2-cloro-ciclopentanona e 2-cloro-ciclohexanona levando aos produtos **3-4**, respectivamente, em bons rendimentos (Esquema 3.5). Os compostos sintetizados foram purificados utilizando-se cromatografia em coluna, tendo sílica como fase estacionária e a mistura hexano/acetato de etila (9:1 ou 8:2) como eluentes. Os compostos foram caracterizados por técnicas de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN de ¹H e ¹³C), espectrometria na região do infravermelho (IV) e espectrometria de massas de alta resolução (EMAR). Todas as análises foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, USP.

3.2 – Síntese dos padrões racêmicos

Antes de efetuarmos as reações com os biocatalisadores selecionados, foram sintetizados os padrões racêmicos (álcoois e acetatos) dos compostos **1-4**. Assim, realizou-se a redução das cetonas com NaBH_4 em etanol anidro. No entanto, obteve-se rendimentos muito baixos dos álcoois e uma alta formação de PhSeSePh para os compostos selenilados **1-2**. Resolveu-se investigar a formação de PhSeSePh , pois a formação deste composto é favorecida sob condições reacionais oxidantes, como descrito no Esquema 3.2. Portanto a formação deste subproduto numa reação cujo meio encontrava-se fortemente redutor devido a reação ter sido realizada com NaBH_4 , não era esperada.

Desta forma, através da técnica de Cromatografia Gasosa buscou-se identificar o segundo subproduto desta reação, que se esperava que fosse a ciclohexanona. Esta cetona seria obtida diretamente de um ataque nucleofílico de um íon hidreto no carbono selenilado levando a formação da ciclohexanona e do fenilselenolato, PhSe^- , que por vez poderia atuar como nucleófilo em uma segunda molécula da cetona α -selenilada, levando a formação do PhSeSePh , (Esquema 3.6).

Para identificação do segundo subproduto destas reações, selecionou-se a cetona **2**, pois a reação deste composto com NaBH_4 em metanol, apresentou rendimentos isolados inferiores a 50 %. A identificação dos produtos foi feita por comparação direta dos cromatogramas da reação com os padrões: cicloexanona, cicloexanol, cetona **2** e PhSeSePh (Figura 3.2).

Como pode ser observado no cromatograma E da Figura 3.2, a presença de um sinal em 26,5 minutos indicou a formação do PhSeSePh logo aos dois minutos de reação. Outro sinal em 6,0 minutos indicou a presença de cicloexanol no meio reacional. Este álcool pode ter sido gerado pela redução da cicloexanona. Esta poderia ter sido formada por uma reação do tipo S_N2 , onde um íon hidreto promove um ataque nucleofílico no carbono selenilado. A presença de íons hidretos no meio seria suficiente para efetuar a reação de redução desta cetona previamente obtida, Esquema 3.7. Com 30 minutos de reação, (cromatograma f), observou-se um aumento significativo na intensidade do sinal referente PhSeSePh indicando que a concentração deste composto aumentou no meio reacional. Esta observação sugere que a reação para formação deste composto continua ocorrendo no meio reacional, indicando que a reação de substituição promovida por um íon hidreto ao carbono selenilado pode estar ocorrendo no β -hidróxi-seleneto formado. Assim, a formação do cicloexanol como outro subproduto da reação poderia ser justificada por dois caminhos: i) pela redução da cicloexanona formada no ataque ao carbono selenilado da cetona **2**; ii) pelo ataque de um íon hidreto ao carbono selenilado do β -hidróxi-seleneto formado, levando diretamente a este composto, Esquema 3.7.

Desta forma, pode-se concluir que o grupo –SePh pode ser facilmente substituído por um hidreto, oferecendo assim uma alternativa nova e simples para remoção deste grupo sem a necessidade de uso de reagentes como Li em dietilamina (Esquema 1.2), empregado comumente na eliminação redutiva para este tipo de reação¹⁵.

A questão do baixo rendimento nas reações de redução dos compostos α -selenilados foi solucionada quando utilizamos a mistura de SiO₂/H₂O 30% e NaBH₄ onde se observou que além de melhores rendimentos, a formação de PhSeSePh para os compostos **1-2** foi minimizada. Para os compostos **3-4**, não foi observada a formação de PhSSPh e as reduções utilizando as duas metodologias^{17,18} forneceram bons rendimentos. Análises via cromatografia gasosa mostraram que as reações de reduções dos compostos **1-4** levaram aos álcoois *cis* e *trans* em diferentes proporções diastereoisoméricas (Figura 3.3).

No entanto a separação dos diastereoisômeros utilizando cromatografia em camada delgada analítica mostrou-se bastante trabalhosa, já que os mesmos apresentaram índices de retenção idênticos, mesmo quando diferentes misturas de eluentes e diferentes proporções foram utilizadas (hexano/ CHCl_3 9:1, 8:2, 7:3, hexano/ CH_2Cl_2 9:1, 8:2, 7:3, hexano/ $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 9:0,5:0,5, 8:1:1, hexano/ CH_2Cl_2 9:1, 8:2, 7:3). Somente após sucessivos processos cromatográficos, por cromatografia em coluna e cromatografia em placa preparativa foi possível separar parte dos diastereoisômeros utilizando-se as misturas hexano/ AcOEt 9,5:0,5 e 9:1 como eluentes.

Através da técnica de cromatografia em coluna foi purificado parte do diastereoisômero que se encontrava como produto majoritário na mistura. Em seguida, quando as proporções dos álcoois aproximaram-se de 1:1, os diastereoisômeros foram separados utilizando cromatografia em placa preparativa (eluente: hexano/ AcOEt 9,5:0,5), permitindo assim, a purificação do restante do álcool majoritário na mistura e o isolamento do outro diastereoisômero (Esquema 3.8).

Podemos concluir que a redução química levou a formação majoritária dos diastereoisômeros *cis*, tanto para os compostos α -selenilados **1-2** como para os α -sulfenilados **3-4**.

3.3 – Caracterização dos diastereoisômeros *cis* e *trans* dos álcoois racêmicos.

Após a separação dos diastereoisômeros utilizando-se cromatografia em coluna e em placa preparativa, houve a necessidade de caracterizá-los para que as atribuições das isomerias *cis* e *trans* pudessem ser feitas.

Inicialmente foi realizada uma busca dos dados disponíveis na literatura para os álcoois **1a-4a**. Após uma cuidadosa comparação dos dados de RMN de ^1H que nós possuíamos com aqueles encontrados na literatura^{34,55,58,70-73} foi possível concluir que pequenas diferenças nos deslocamentos químicos tornavam possível diferenciar os respectivos diastereoisômeros de cada álcool.

As análises dos espectros foram baseadas nas diferenças de deslocamento químicos dos hidrogênios carbinólicos e dos hidrogênios ligados ao átomo de carbono selenilado ou sulfenilado. Desta forma, as isomerias *cis* e *trans* foram atribuídas graças as diferentes disposições espaciais destes hidrogênios em relação aos grupos OH e SePh ou SPh, especialmente para os álcoois derivados dos compostos com anel de seis membros, cuja a conformação preferencial é a cadeira (Figura 3.4).

Na análise dos dados obtidos dos espectros de RMN de ^1H dos álcoois *cis-1a* e *trans-1a* verificou-se que para o diastereoisômero *trans-1a* o multipletto referente ao hidrogênio carbinólico ocorreu na faixa de 4,20-4,15 ppm e o multipletto do hidrogênio ligado ao carbono selenilado ocorreu na faixa de 3,40-3,39 ppm (Figura 3.5).

Figura 3.5 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz/ CDCl_3) do composto *trans 1a*.

Para o diastereoisômero *cis-1a* os valores de deslocamento químico para os mesmos multipletos ocorreram na faixa de 4,10-4,00 ppm para o hidrogênio carbinólico e 3,52-3,50 ppm para o hidrogênio ligado ao carbono selenilado (Figura 3.6).

Figura 3.6 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz/ CDCl_3) do composto *cis 1a*.

As análises para os álcoois *cis-2a* e *trans-2a* mostraram que para o diastereoisômero *trans-2a* os deslocamento químicos para os multipletos do hidrogênio carbinólico e aquele ligado ao carbono selenilado ocorrerem nas faixas de 3,39-3,30 e 2,95-2,90 ppm, respectivamente (Figura 3.7).

Figura 3.7 - Espectro de RMN de ¹H (500 MHz/CDCl₃) do composto *trans-2a*.

A faixa dos deslocamentos químicos para os multipletos do hidrogênio carbinólico e do hidrogênio do carbono selenilado do álcool *cis-2a*, situavam-se em faixas distintas aquelas observadas para o diastereoisômero *trans-2a*. Os valores de deslocamento químico ocorreram entre 3,73-3,70 ppm para multipletos do hidrogênio carbinólico e 3,53-3,50 ppm para o hidrogênio do carbono selenilado (Figura 3.8).

Figura 3.8 - Espectro de RMN de ¹H (500 MHz/CDCl₃) do composto *cis-2a*.

De maneira análoga, os diastereoisômeros dos álcoois sulfenilados **3a-4a** foram diferenciados de acordo com suas isomerias *cis* e *trans*.

A análise dos espectros de RMN de ^1H para o álcool *trans*-**3a** indicou que os multipletos referentes ao hidrogênio carbinólico e ao hidrogênio do carbono sulfenilado do situavam-se nas respectivas faixas de 4,2-4,10 ppm e 3,50-3,30 ppm respectivamente (Figura 3.9).

Figura 3.9 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz/ CDCl_3) do composto *trans* **3a**.

Os mesmos multipletos agora para o álcool *cis*-**3a** ocorrem com uma pequena diferença em relação aos mesmos sinais para o álcool *trans* **3a**, situando-se respectivamente nas faixas de 4,1-4,0 ppm para o hidrogênio carbinólico e 3,5-3,4 ppm para o hidrogênio do carbono sulfenilado (Figura 3.10).

Figura 3.10 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz/ CDCl_3) do composto *cis* **3a**.

Os diastereoisômeros dos álcoois *cis-4a* e *trans-4a* foram caracterizados graças aos diferentes valores no deslocamento químico dos hidrogênios carbonílicos e o hidrogênios dos carbonos sulfenilados de cada um dos estereoisômeros. Para o álcool *trans-4a* a ocorrência do multipletto referente ao hidrogênio carbinólico situava-se na faixa de 3,5-3,3 ppm e o multipletto para o hidrogênio do carbono sulfenilado na faixa de 2,9-2,4 ppm (Figura 3.11).

Figura 3.11 - Espectro de RMN de ¹H (500 MHz/CDCl₃) do composto *trans-4a*.

O diastereoisômero *cis-4a* por sua vez, apresentou os respectivos multipletos nas faixas de 4,0-3,6 ppm e 3,5-3,2 ppm para o hidrogênio carbinólico e para o hidrogênio do carbono sulfenilado (Figura 3.12).

Figura 3.12 - Espectro de RMN de ¹H (500 MHz/CDCl₃) do composto *cis-4a*

O que pôde ser observado é que os diastereoisômeros *cis*-(**1a-4a**) e *trans*-(**1a-4a**) diferem entre si nos valores dos deslocamentos químicos e essas diferenças, mesmo que pequenas, foram suficientes na identificação de cada um dos diastereoisômeros. No entanto, é importante notar que essas diferenças podem ocorrer devido a distribuição espacial dos grupos OH e SePh ou SPh nos estereoisômeros *cis* e *trans*, onde as interações de blindagem ou desblindagem do anel aromático afetam os deslocamentos químicos dos hidrogênios ligados ao carbono carbinólico e ao carbono ao qual está ligado o heteroátomo (Se, S).

Quando analisamos os espectros para os diastereoisômeros dos álcoois *cis*-(**1a** e **3a**) e *trans*-(**1a** e **3a**), os dois compostos com anel de cinco membros, observou-se que nos isômeros *trans*-(**1a** e **3a**) os hidrogênios carbinólicos estão um pouco mais desblindado do que os mesmos hidrogênios nos estereoisômeros *cis*-(**1a** e **3a**). Enquanto que o hidrogênio ligado ao carbono com o heteroátomo encontra-se mais desblindado nos isômeros *cis*-(**1a** e **3a**) do que nos isômeros *trans*-(**1a** e **3a**). Portanto, as diferentes interações destes hidrogênios com os grupos SePh ou SPh, mais especificamente com o anel aromático e seu cone de desblindagem, podem ocasionar estas diferenças.

O cone de desblindagem atuaria efetivamente sobre os hidrogênios situados no mesmo lado do anel que o grupo YPh (Y = Se, S), ou seja, quando trata-se da configuração *trans*-(**1a** e **3a**), esta relação espacial é estabelecida, logo, os hidrogênios carbinólicos para os diastereoisômeros *trans*-(**1a** e **3a**) possuem deslocamentos químicos maiores ($\delta = 4,2-4,15$ ppm) que os hidrogênios análogos para os diastereoisômeros *cis*-(**1a** e **3a**), ($\delta = 4,1-4,0$ ppm). Por outro lado, quando os grupos -YPh e -OH encontram-se no mesmo lado do anel, há a possibilidade de uma interação semelhante a uma ligação de hidrogênio entre os grupos -OH e o heteroátomo. Esta interação (Figura 3.13) deixaria o hidrogênio ligado ao carbono selenilado/sulfenilado mais desblindado, justificando assim, o valor ligeiramente maior nos deslocamentos químicos destes hidrogênios para os

diastereoisômero *cis*-(**1a** e **3a**), ($\delta = 3,5$ ppm) em relação aos análogos *trans*-(**1a** e **3a**), ($\delta = 3,4$ ppm).

Quando analisamos os espectros dos diastereoisômeros dos álcoois *cis*-(**2a** e **4a**) e *trans*-(**2a** e **4a**), os álcoois com anéis de seis membros, observou-se que ambos os hidrogênios carbinólicos e do carbono com heteroátomo possuem deslocamentos químicos maiores para os álcoois isoméricos *cis* do que os análogos dos diastereoisômeros *trans*. Novamente, podemos nos reportar nas interações entre estes átomos e o cone de desblindagem do anel aromático dos grupos SePh ou SPh, sendo que nos isômeros *cis* o cone de desblindagem do anel aromático atuaria de forma mais efetiva sobre o hidrogênio carbinólico e o hidrogênio do carbono com o heteroátomo, do que o cone de desblindagem do anel aromático na conformação *trans*-(**2a** e **4a**), (Figura 3.14).

Após as análises dos espectros de RMN de ^1H de todos os álcoois, os diastereoisômeros *cis*-(**1a-4a**) e *trans*-(**1a-4a**) puderam ser identificados e desta forma, pode-se definir qual o isômero do álcool que se encontrava como produto majoritário nas reduções dos compostos **1-4**. As reações de redução dos compostos α -selenilados **1-2** e α -sulfenilados **3-4** quando se utilizou a mistura $\text{NaBH}_4/\text{SiO}_2$ 30 %⁸¹, levaram a formação dos respectivos álcoois com diferentes proporções diastereoisoméricas *cis* e *trans*, sendo que o álcool com conformação *cis* prevaleceu em todas as reações na proporção de 85:15 para os compostos selenilados e de 75:25 para os compostos sulfenilados em relação ao álcool de conformação *trans*.

Essa diferença na formação dos diastereoisômeros *cis*-(**1a-4a**) e *trans*-(**1a-4a**) já era esperada, pois os compostos α -selenilados **1-2** e α -sulfenilados **3-4** são quirais e esta quiralidade pode dirigir a formação dos produtos, uma vez que as diferentes interações dos enantiômeros destas espécies com o agente redutor podem ter diferentes energias de ativação no estado de transição, sendo favorecida a interação de menor energia⁷⁴. Neste caso, a formação dos diastereoisômeros *cis*-(**1a-4a**) pode ser favorecida por um fator estérico, onde a transferência do íon hidreto se daria pela face oposta ao grupo YPh (Y = Se, Ph), ou seja, a face menos impedida estericamente, do que se a transferência ocorresse na mesma face do anel na qual está o grupo YPh que levaria aos diastereoisômeros *trans*-(**1a-4a**).

A diferença na proporção diastereoisomérica (85:15 para selênio e 75:25 para enxofre) pode ser atribuída ao volume dos átomos de selênio e enxofre. Observou-se que para os compostos selenilados a formação dos diastereoisômeros *trans*-(**1a-2a**) foi menor do que para os compostos sulfenilados, portanto o volume maior do átomo de selênio em relação ao átomo de enxofre pode ter uma influência estérica maior (impedimento estérico) direcionando a transferência do íon hidreto para a face oposta do anel a qual se encontra o grupo SePh, favorecendo a reação na outra face do anel levando a formação preferencial dos diastereoisômeros *cis* (Esquema 3.9).

Após a preparação dos álcoois racêmicos **1a-4a** e a separação dos diastereoisômeros, houve a necessidade da separação do par de enantiômeros de cada um diastereoisômeros *cis*-(**1a-4a**) e *trans*-(**1a-4a**) destes álcoois em colunas quirais para avaliar a enantiosseletividade das reações enzimáticas. No entanto, utilizando cromatografia gasosa mesmo com diferentes programações e vários tipos de colunas quirais de ciclodextrinas (Supelco - Alpha, Beta e Gamma DexTM (30m x 0,25mm x 0,25µm); Varian - CP-Chirasil-Dex CB (25m x 0,25mm)] não foi possível a separação enantiomérica. Devido a não separação dos enantiômeros dos álcoois, então optamos pela derivatização dos álcoois **1a-4a** para os respectivos acetatos **1b-4b**. Assim, através de reações de acetilação clássica, utilizando anidrido acético e piridina, os acetatos **1b-4b** foram obtidos com excelentes rendimentos.

Para os acetatos **1b-4b** a separação dos enantiômeros foi possível utilizando-se coluna quiral CP-Chirasil-Dex CB [Varian (25 m x 0,25mm)]. Os acetatos preparados (Esquema 3.10) mantiveram as mesmas proporções diastereoisoméricas dos álcoois utilizados, porém os diastereoisômeros *cis*-(**1b-4b**) e *trans*-(**1b-4b**) não foram separados. Estes acetatos foram empregados para posteriores determinações dos excessos enantioméricos durante o estudo qualitativo das reações de biocatálise com os fungos basidiomicetos. [Mais tarde, durante os estudos quantitativos, os enantiômeros foram separados utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e desta forma a análise dos álcoois pode ser realizada diretamente, sem a necessidade de posteriores acetilações].

3.4 – Biotransformações utilizando fungos basidiomicetos

As reações biocatalisadas por fungos basidiomicetos foram realizadas inicialmente em escala qualitativa, portanto os produtos não foram isolados. Porém, reações em escala quantitativas para os melhores biocatalisadores foram realizadas numa segunda etapa do trabalho. Nesta etapa houve a necessidade de efetuação de derivatizações para determinação dos excessos enantioméricos. Estas reações foram realizadas sem purificação dos álcoois obtidos nas reações com os fungos basidiomicetos.

Como biocatalisadores para as reações os seguintes fungos basidiomicetos foram selecionados:

Irpex lacteus CCB 196 (Ribeirão Grande – SP);

Trametes rigida CCB 285 (Miranda – MS);

Pycnoporus sanguineus CCB 501 (Mogi-Guaçu – SP);

Trametes byssogenum CCB 203 (Miranda – MS);

Trametes versicolor CCB 202 (Miranda – MS).

As reações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 40 mL de solução tampão fosfato (pH = 7, 0,1 M), 3g de células úmidas do fungo e 20 µL do composto orgânico. As biotransformações foram acompanhadas utilizando-se cromatografia gasosa por um período de 144h (6 dias), sendo coletadas alíquotas de 10 mL a cada 48h. Os compostos orgânicos foram extraídos de cada alíquota com 2 mL de acetato de etila e as análises foram realizadas pela injeção de 1 µL da fase orgânica.

3.4.1 – Biotransformações utilizando o fungo *Trametes rigida* CCB 285

Os dados obtidos das reações biocatalisadas com o fungo *T. rigida* CCB 285 e os substratos **1-4** são mostrados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Reações biocatalisadas com fungo basidiomiceto *T. rigida* CCB 285.

Composto Orgânico	Linha	Tempo (h)	Cetona (%) ^a	Álcoois (%) ^a		PhYYPh (%) ^a	e.d. (%) ^a	e.e. (%) ^b	
				<i>cis</i>	<i>trans</i>			<i>cis</i>	<i>trans</i>
1	1	48	25	5	70	-	87 <i>trans</i>	-	-
	2	96	16	-	77	7	99 <i>trans</i>	-	-
	3	144	13	-	36	51	99 <i>trans</i>	-	99
2	4	48	15	34	51	-	19 <i>trans</i>	-	-
	5	96	20	30	50	-	25 <i>trans</i>	-	-
	6	144	12	34	46	8	15 <i>trans</i>	99	99
3	7	48	-	16	84	-	68 <i>trans</i>	-	-
	8	96	-	17	83	-	65 <i>trans</i>	-	-
	9	144	-	17	83	-	65 <i>trans</i>	99	99
4	10	48	-	39	61	-	22 <i>trans</i>	-	-
	11	96	-	31	69	-	38 <i>trans</i>	-	-
	12	144	-	35	65	-	38 <i>trans</i>	99	99

% Valores determinados por Cromatografia Gasosa utilizando a = coluna aquiral, b = coluna quiral; Y = Se, S

3.4.1.1 - Biotransformação dos compostos 1 e 2 com *Trametes rigida* CCB 285

A biotransformação utilizando-se o fungo *T. rigida* CCB 285 foram obtidos os melhores resultados tanto na proporção diastereoisomérica, como em excesso enantioméricos dos álcoois *cis*-(1a-2a) e *trans*-(1a-2a), demonstrando a alta seletividade das enzimas presentes no metabolismo desse fungo.

Na reação do composto 1 com *T. rigida* CCB 285, observou-se que em 48h predominou no meio reacional o álcool *trans*-1a (Linha 1). No decorrer das 48h seguintes o álcool *cis*-1a não foi detectado no meio reacional (Linhas 2 e 3). O que se observou foi a formação de PhSeSePh numa pequena porcentagem (7%) com 96 h de reação (Linha 2). Com 144 h de reação apenas o álcool *trans*-1a foi detectado, mas agora numa porcentagem relativamente baixa (36%), sendo que a concentração majoritária (51 %) foi para PhSeSePh (Linha 3). No entanto, também observamos o consumo da cetona 1 ao longo do tempo reacional. O álcool *trans*-1a foi obtido na forma enantiomericamente pura com 99 % de excesso enantiomérico (Linha 3).

Para o composto 2, observou-se uma proporção menor entre os álcoois *cis*-2a e *trans*-2a, no entanto a concentração do álcool *trans*-2a foi superior ao longo das 144 h de reação, de forma que foi obtido para este álcool um excesso diastereoisomérico de 25% (Linha 5). Somente após 144h uma pequena formação de PhSeSePh (8%) foi detectada (Linha 6). Apesar da baixa proporção diastereoisomérica, os álcoois obtidos apresentaram 99 % de excessos enantioméricos.

3.4.1.2 - Biotransformação dos compostos 3 e 4 com *Trametes rigida* CCB 285

Quando o fungo *T. rigida* CCB 285 foi empregado como biocatalisador para os compostos 3 e 4, verificou-se que os mesmos foram reduzidos aos

respectivos álcoois nas primeiras 48h de reação (Linha 7 e 10). Observou-se novamente a formação preferencial dos diastereoisômeros *trans*-(**3a-4a**) e todos os álcoois foram obtidos com excessos enantioméricos de 99 %, demonstrando assim a alta seletividade das enzimas presentes no fungo *T. rigida* CCB 285.

Na reação para o composto **3**, o material de partida foi totalmente consumido em 48 h de reação e o perfil reação manteve-se sem alterações ao longo das 144 h. Os álcoois *cis*-**3a** e *trans*-**3a** foram obtidos com 99 % de excesso enantiomérico.

Na reação com o substrato **4**, a conversão foi completa em 48h (Linha 10), levando a formação dos álcoois com um elevado excesso enantiomérico (99 %) para os álcoois *cis* **4a** e *trans* **4a** (Linha 12). Após 48 h, nenhuma mudança significativa no perfil da reação foi observada. A reação levou a formação preferencial do álcool *trans* **4a** com 65 % de excesso diastereoisomérico (Linha 12).

3.4.2 - Biotransformações utilizando o biocatalisador *Trametes versicolor* CCB 202.

A Tabela 3.2 apresenta os resultados das biotransformações dos compostos **1-4** utilizando-se como biocatalisador o fungo *Trametes versicolor* CCB 202.

Tabela 3.2 - Reações biocatalisadas com fungo basidiomiceto *T. versicolor* CCB 202.

Composto Orgânico	Linha	Tempo (h)	Cetona (%) ^a	Álcoois (%) ^a		PhYYPh (%) ^a	e.d. (%) ^a	e.e. (%) ^b	
				<i>cis</i>	<i>trans</i>			<i>cis</i>	<i>trans</i>
1	1	48	63	-	18	19	99 <i>trans</i>	-	-
	2	96	17	-	14	69	99 <i>trans</i>	-	-
	3	144	-	-	-	100	-	-	-
2	4	48	100	-	-	-	-	-	-
	5	96	88	8	5	-	82 <i>cis</i>	-	-
	6	144	83	8	5	4	82 <i>cis</i>	-	-
3	7	48	81	15	4	-	58 <i>cis</i>	-	-
	8	96	75	20	4	-	67 <i>cis</i>	-	-
	9	144	70	26	4	-	73 <i>cis</i>	60	78
4	10	48	41	38	21	-	29 <i>cis</i>	-	-
	11	96	26	47	27	-	27 <i>cis</i>	-	-
	12	144	-	70	30	-	70 <i>cis</i>	70	75

% Valores determinados por Cromatografia Gasosa utilizando a = coluna aquiral, b = coluna quiral; Y = Se, S

3.4.2.1 - Biotransformação dos compostos 1 e 2 com *Trametes versicolor* CCB 202.

A reação do composto **1** tendo como biocatalisador o fungo *T. versicolor* CCB 202 apresentou alta seletividade, com formação do álcool *trans*-**1a** (Linhas 1 e 2). O álcool **1a** com isomeria *cis* não foi detectado e ao final das 144 h, o álcool *trans*-**1a** formado nas primeiras horas e todo o material de partida foram degradados (Linha 3). A comparação do tempo de retenção do produto majoritário obtido da biodegradação mostrou que o composto formado era o disseleneto de difenila, PhSeSePh. Esta identificação foi possível pela injeção do padrão. A formação de PhSeSeph será abordada em detalhes na discussão da reação com o fungo *I. lacteus* CCB 196 (Tópico 3.2.5).

Nenhuma transformação significativa foi observada quando o composto **2** foi colocado na presença do biocatalisador. Com 48 h de reação o único produto detectado foi o material de partida (Linha 4) e mesmo após decorridas 144 h ainda restavam no meio reacional 83 % da cetona **2** sem reagir (Linha 6).

3.4.2.2 - Biotransformação dos compostos 3 e 4 com *Trametes versicolor* CCB 202.

A análise da reação do composto **3** mostrou que a reação foi pouco eficiente e apenas cerca de 20 % do material de partida havia sido biotransformado (Linha 7). Após 144 h de reação, ainda permanecia no meio reacional 70 % do composto **3**. As proporções diastereoisoméricas e os excessos enantioméricos também foram pouco significativos, demonstrando neste caso uma baixa estereosseletividade na transformação do composto **3** em seus álcoois *cis*-**3a** e *trans*-**3a**.

A biotransformação do composto **4**, apresentou melhores valores de conversão e seletividade. No final de 144 h, o álcool *cis*-**4a** foi obtido com 70% de excesso diastereoisomérico em relação ao *trans*-**4a**. No entanto, os valores dos excessos enantioméricos foram na ordem de 70 a 75 %.

3.4.3 - Biotransformações utilizando o biocatalisador *Trametes byssogenum* CCB 203.

Os resultados obtidos das reações biocatalisadas com o fungo basidiomiceto *T. byssogenum* CCB 203, estão apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Reações biocatalisadas com fungo basidiomiceto *T. byssogenum* CCB 203.

Composto Orgânico	Linha	Tempo (h)	Cetona (%) ^a	Álcoois (%) ^a		PhYYPh (%) ^a	e.d. (%) ^a	e.e. (%) ^b	
				<i>cis</i>	<i>trans</i>			<i>cis</i>	<i>trans</i>
1	1	48	60	-	20	20	99 <i>trans</i>	-	-
	2	96	45	-	18	27	99 <i>trans</i>	-	-
	3	144	32	-	12	56	99 <i>trans</i>	-	68
2	4	48	43	20	37	-	30 <i>trans</i>	-	-
	5	96	41	21	38	-	29 <i>trans</i>	-	-
	6	144	30	26	44	-	26 <i>trans</i>	77	62
3	7	48	60	14	26	-	40 <i>trans</i>	-	-
	8	96	48	17	35	-	35 <i>trans</i>	-	-
	9	144	52	17	31	-	29 <i>trans</i>	80	75
4	10	48	-	35	65	-	30 <i>trans</i>	-	-
	11	96	-	35	65	-	30 <i>trans</i>	-	-
	12	144	-	35	65	-	30 <i>trans</i>	78	65

% Valores determinados por Cromatografia Gasosa utilizando a = coluna aquiral, b = coluna quiral; Y = Se, S

3.4.3.1 - Biotransformação dos compostos 1 e 2 com *Trametes byssogenum* CCB 203.

A biotransformação do composto **1** utilizando-se o fungo *T. byssogenum* CCB 203 levou a formação apenas do álcool trans-**1a**. No entanto, a baixa conversão e a degradação dos compostos, evidenciada pela presença do PhSeSePh no meio reacional, comprometeram a biotransformação. O álcool cis-**1a** não foi detectado ao longo da reação, no entanto, o álcool formado apresentou um modesto valor de excesso enantiomérico na ordem de 68 % (Linha 3).

O perfil da reação utilizando o composto **2** manteve-se praticamente inalterado ao longo das 144 h de reação. Baixos valores de conversão, proporção diastereoisomérica e excessos enantioméricos, demonstraram a baixa seletividade na transformação do composto **2**. No entanto, ao contrário dos demais fungos utilizados na transformação de compostos selenilados, não foi detectado nenhum produto de degradação no decorrer dessa reação.

3.4.3.2 - Biotransformação dos compostos 3 e 4 com *Trametes byssogenum* CCB 203.

A reação do composto **3** frente ao fungo *T. byssogenum* CCB 203 ocorreu com baixa conversão e seletividade. Com 48 h de reação, restavam no meio reacional 60 % do material de partida (Linha 7) e 52 % na análise realizada após 144 h de reação (Linha 9).

A transformação do composto **4** foi total logo nas primeiras 48 h (Linha 9). O composto foi convertido aos álcoois cis-**4a** e trans-**4a** com excesso de 30 % em favor do álcool trans-**4a**. Esta relação se manteve inalterada ao longo das 144 h. A derivatização para obtenção dos excessos enantioméricos mostrou valores moderados de 78 % para o álcool cis-**4a** e para o álcool trans-**4a** de 65 %.

3.4.4 – Biotransformações utilizando o biocatalisador *Pycnoporus sanguineus* CCB 501.

Os resultados obtidos das biotransformações utilizando o fungo *Pycnoporus sanguineus* CCB 501, estão apresentados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Reações biocatalisadas com fungo basidiomiceto *P. sanguineus* CCB 501.

Composto Orgânico	Linha	Tempo (h)	Cetona (%) ^a	Álcoois (%) ^a		PhYYPh (%) ^a	e.d. (%) ^a	e.e. (%) ^b	
				<i>cis</i>	<i>trans</i>			<i>cis</i>	<i>trans</i>
1	1	48							
	2	96	21	3	6	70	37 <i>cis</i>	-	-
	3	144	15	-	2	83	100 <i>cis</i>	-	-
2	4	48	14	-	-	86	-	-	-
	5	96	19	39	42	-	3 <i>trans</i>	-	-
	6	144	31	29	40	-	15 <i>trans</i>	-	-
3	7	48	19	30	37	14	10 <i>trans</i>	68	79
	8	96	55	13	32	-	43 <i>trans</i>	-	-
	9	144	54	15	31	-	35 <i>trans</i>	-	-
4	10	48	54	17	29	-	26 <i>trans</i>	85	99
	11	96	13	50	37	-	15 <i>cis</i>	-	-
	12	144	12	48	40	-	9 <i>cis</i>	-	-
			14	54	32	-	25 <i>cis</i>	80	99

% Valores determinados por Cromatografia Gasosa utilizando a = coluna aquiral, b = coluna quirai;

Y = Se, S

3.4.4.1 - Biotransformação dos compostos 1 e 2 com *Pycnopus sanguineus* CCB 501

Na reação do composto **1** com o fungo *P. sanguineus* CCB 501 apenas traços dos álcoois foram detectados de forma que o PhSeSePh apareceu como produto majoritário da reação de “degradação”. No entanto, mesmo após decorridas 144h, ainda detectou-se que 14 % composto **1** ainda encontrava-se no meio reacional (Linha 3).

Ao longo das 144 h da reação com o substrato **2** a concentração do álcool *trans*-**2a** obtido manteve-se com variações pouco significativas. Com 144 h de reação, as concentrações dos álcoois **2a** continuaram as mesmas, no entanto observou-se a formação PhSeSePh com uma concentração de 14% (Linha 6). O álcool *trans*-**2a** foi obtido preferencialmente com baixos valores excesso enantiomérico e de proporção diastereoisomérica em relação ao álcool *cis*-**2a**.

3.4.4.2 - Biotransformação dos compostos 3 e 4 com *Pycnopus sanguineus* CCB 501

Quando o composto **3** foi submetido a biotransformação com o fungo *P. sanguineus* CCB 501 observou-se uma baixa biotransformação do material de partida em seus respectivos produtos. Dos produtos obtidos, o álcool *trans*-**3a** apresentou uma moderada proporção diastereoisomérica em relação ao *cis* **3a**. O perfil da reação se manteve sem alterações significativas aos longo das 144 h de reação. Os álcoois *cis* **3a** e *trans* **3a** apresentaram 85 e 99 % de excesso enantiomérico respectivamente.

A biotransformação do composto **4**, foi a única reação que levou a formação preferencial do álcool *cis* **4a**. No entanto, a reação levou a formação dos álcoois com baixos valores de proporção diastereoisomérica. Mesmo com 144 h de reação, a cetona **4** não foi totalmente consumida (Linha 12). Os valores dos excessos enantioméricos foram de 99 % para *trans* **4a** e 80 % para o álcool *cis* **4a**.

3.4.5 – Biotransformações utilizando o fungo *Irpex lacteus* CCB 196

A Tabela 3.5 apresenta os resultados das análises realizadas para as reações biocatalisadas com o fungo *I. lacteus* CCB 196 com os substratos 1-4.

Tabela 3.5 – Reações biocatalisadas com o fungo basidiomiceto *I. lacteus* CCB 196.

Composto Orgânico	Linha	Tempo (h)	Cetona (%) ^a	Álcoois (%) ^a		PhYYPh (%) ^a	e.d. (%) ^a	e.e. (%) ^b	
				<i>cis</i>	<i>trans</i>			<i>cis</i>	<i>trans</i>
1	1	48	-	-	-	99	-	-	-
	2	96	-	-	-	99	-	-	-
	3	144	-	-	-	99	-	-	-
2	4	48	10	30	55	10	30 <i>trans</i>	-	-
	5	96	10	22	45	23	34 <i>trans</i>	-	-
	6	144	7	18	42	33	39 <i>trans</i>	73	68
3	7	48	33	27	40	-	20 <i>trans</i>	-	-
	8	96	36	20	44	-	36 <i>trans</i>	-	-
	9	144	38	16	46	-	50 <i>trans</i>	75	80
4	10	48	5	23	72	-	53 <i>trans</i>	-	-
	11	96	-	25	75	-	50 <i>trans</i>	-	-
	12	144	-	21	79	-	58 <i>trans</i>	99	68

% Valores determinados por Cromatografia Gasosa utilizando a = coluna aquiral, b = coluna quiral; Y = Se, S

3.4.5.1 – Biotransformação dos compostos 1 e 2 com *Irpex lacteus* CCB 196

Quando utilizamos como biocatalisador o fungo *I. lacteus* CCB 196, o composto selenilado **1** foi totalmente “degradado” logo nas primeiras 48h (Linha 1). A presença de um sinal em 17 minutos no cromatograma, indicou que o principal produto desta reação foi o disseleneto de difenila, PhSeSePh. A formação deste produto poderia ter ocorrido por dois caminhos:

i) Por uma via oxidativa levando a uma eliminação syn de fenilselenóxido. Compostos selenilados sofrem eliminação espontânea de fenilselenóxidos¹⁶, com a abstração de um hidrogênio β, levando a formação de um composto insaturado. Esta reação é uma das reações mais utilizadas na química dos compostos de selênio, exatamente pela possibilidade de formação de ligações C=C¹⁶, (Esquema 3.11).

Considerando-se as propriedades químicas e sabendo-se que selênio e enxofre pertencem a mesma família da Tabela Periódica, reações de oxidação para os compostos sulfenilados **3-4** também seriam esperadas. No entanto, nenhum produto de oxidação para estes compostos foi detectado, nem mesmo o PhSSPh. Quando realizou-se a redução dos compostos **1-4** utilizando NaBH₄ em metanol, para os compostos selenilados **1-2**, foi observado uma elevada formação do composto PhSeSePh (Tópico 3.1), no entanto, num meio fortemente redutor como aquele a oxidação do seleneto **1** ao selenóxido **1c** (produto que sofre eliminação *syn*), não pode ocorrer. Logo, a formação de PhSeSePh por uma via oxidativa seguida de eliminação *syn* seria desfavorecida.

Desta forma, o PhSeSePh, poderia estar se formando pela transferência do íon hidreto ao carbono α -carbonílico com expulsão do grupo PhSe⁻ (um bom grupo de partida) via uma reação de S_N2. Os íons selenóis, PhSe⁻, podem acoplar-se levando a formação do disseleneto de difenila, ou atuarem como nucleófilos sobre outro átomo de selênio levando ao PhSeSePh. Portanto, um outro caminho possível reação de formação do PhSeSePh utilizando microrganismo seria, *ii*) Por via redutiva, ocorrendo uma transfrência de hidreto do cofator NADH ao carbono selenilado via reação S_N2, (Esquema 3.12).

O PhSeSePh também foi observado quando o fungo *I. lacteus* CCB 196 foi empregado na biotransformação do composto **2** (Linhas 4-6). No entanto, essa reação ocorreu numa extensão muito menor. Para esse composto, a redução aos respectivos álcoois levou a formação preferencial do álcool *trans*-**2a** com uma pequena proporção diastereoisomérica. Logo nas 48 h iniciais, 90% do composto **2** já havia sido convertido (Linha 4). O perfil desta reação manteve-se praticamente inalterado ao longo de 144h. A análise dos acetatos obtidos dos respectivos álcoois *cis*-**2a** e *trans*-**2a** mostrou moderados excessos enantioméricos (Linha 6).

3.4.5.2 – Biotransformação dos compostos **3** e **4** com *Irpex lacteus* CCB 196

Na biotransformação do composto **3** utilizando o fungo *I. lacteus* CCB 196, obteve-se valores moderados de proporção diastereoisomérica e excesso enantioméricos. Mesmo com 144 h de reação 38 % do material de partida foram detectados no meio reacional (Linha 9). A reação levou a formação preferencial do álcool *trans*-**3a** em relação ao álcool *cis*-**3a** (Linha 10). O álcool *cis*-**3a** apresentou 99 % de excesso enantiomérico, enquanto o álcool *trans* **3a** apresentou um excesso enantiomérico de 68% (Linha 10).

Quando o composto **4** foi submetido à biotransformação com *I. lacteus* CCB 196, observou uma alta conversão aos álcoois *cis*-**4a** e *trans*-**4a** com 48 h . A proporção *cis*-**4a**:*trans*-**4a** foi de 1:3, o que implicou num excesso diastereoisomérico de 53% (Linha 10). Com 96h o material de partida havia sido totalmente consumido (Linha 11) e até 144 h o perfil da reação manteve-se sem alterações relevantes (Linha 12). A derivatização dos álcoois **4a** aos respectivos acetatos **4b**, mostrou que o álcool *cis*-**4a** havia sido obtido com 99 % de excesso enantiomérico contra 68% do álcool *trans*-**4a** (Linha 12).

Para os compostos sulfenilados **3-4**, nenhuma reação de oxidação foi observada na formação de sufóxidos ou a eliminação na produção de dissulfeto de difenila (PhSSPh).

3.5 – Acompanhamento da reação de degradação dos compostos 1-2 pelo fungo *I. lacteus* CCB 196 via Espectrometria de Massas.

Para investigarmos como ocorreu a “degração” dos compostos selenilados 1-2 em PhSeSePh, as reações com o fungo *I. lacteus* CCB 196 foram repetidas e as transformações acompanhadas utilizando a técnica ESI (*electron spray ionization*) da Espectrometria de Massas. Esta técnica foi escolhida porque a ionização dos compostos se dá de maneira branda, por diferença de potencial, de forma que a molécula não precisa ser volatilizada, o que poderia ocasionar a decomposição térmica do composto. Outra vantagem é a possibilidade de injeção direta da amostra, sem purificação prévia, o que possibilita a detecção de todas as espécies presentes na reação. O fungo *I. lacteus* CCB 196 foi selecionado porque apresentou um alto grau de “degradação” dos compostos selenilados (Tabelas 3.1-3.5), portanto, este estudo teve como objetivo elucidar como ocorreu a “degradação” dos compostos selenilados 1-2 com a identificação dos intermediários que levaram à formação do disseleneto de difenila, PhSeSePh.

Antes da realização das análises, foram esquematizados os possíveis intermediários e as rotas que levariam a formação do PhSeSePh, para que desta forma pudessem ser identificados e distinguidos. O Esquema 3.13 mostra as rotas com as transformações que levariam a formação do composto PhSeSePh a partir do composto 1.

No Esquema 3.13, estão apresentadas três possíveis rotas que levam à formação do composto PhSeSePh (**1h**). A rota via S_N2 é a mais direta e o composto **1h** (m/z 314) seria obtido numa única etapa reacional tendo a ciclopentanona (**1i**, m/z 84) como um importante produto da reação. Outra alternativa é por uma via oxidativa, onde o composto **1** é transformado no selenóxido **1c** (m/z 256) que sofre uma eliminação *syn* do fenilselenóxido **1f** (m/z 174), com a formação da ciclopentenona **1e** (m/z 82). O fenilselenóxido poderia ser oxidado ao ácido selenínico **1g** (m/z 190) e/ou reduzido ao disseleneto de difenila **1h**. Por fim, numa terceira via, o composto **1** poderia ser reduzido ao álcool **1a** (m/z 242) e em seguida uma reação de oxidação levaria ao selenóxido **1b** (m/z 258) que então sofre a reação de eliminação *syn* de fenilselenóxido com formação do álcool **1d** (m/z 84). O fenilselenóxido é então oxidado a ácido selenínico e/ou reduzido a disseleneto de difenila, como na via oxidativa. Depois de estabelecidos os possíveis intermediários das transformações que levariam ao PhSeSePh foram realizadas as análises utilizando ESI (Figura 3.14).

Figura 3.14 -Espectros de Massas (ESI) da reação do composto 1 com *I. lacteus* CCB 196.

Na análise dos espectros da reação do composto **1** com o fungo *I. lacteus* CCB 196 três sinais podem utilizados para identificarmos a possível rota enzimática de biotransformação desse composto, são eles: o pico com m/z 240,9 referente a massa do composto **1** mais um próton (**1**+1); o pico com m/z 279 que corresponde ao aduto de sódio do selenóxido (**1c**+23); e o terceiro pico com m/z 175 que corresponde ao composto **1f** acrescido de um próton (**1f**+1). O que podemos observar é que ao longo da reação o pico referente ao composto **1** (m/z 240,9) diminui simultaneamente ao aparecimento dos picos com m/z 279 e 175. Entre 12 e 18 h de reação, observou-se um aumento da intensidade do pico com m/z 279, enquanto os picos referentes ao composto e a espécie com m/z 175 diminuíram. Com 24 h de reação nenhuma mudança significativa foi observada em relação a estas três espécies. No entanto, com 36 h de reação os sinais referentes às espécies com m/z 240,9 e 279 diminuíram significativamente predominando no meio reacional a espécie **1f** com m/z 175.

O que se pôde sugerir baseando-se nestas observações é que o composto **1** foi transformado no selenóxido **1c**. O composto **1c** por sua vez sofreu eliminação *syn* do fenilselenóxido **1f** com m/z 175. Esta reação ocorreu gerando um segundo produto com m/z 82 que então pode ter sido reduzido por enzimas álcool desidrogenases presentes no meio reacional, levando ao álcool **1d** com m/z 84. Desta forma, a concentração dos compostos **1** e **1c** estão relacionada pela oxidação do primeiro no segundo, que se decompõe levando a formação da espécie com m/z 175 (Esquema 3.8) e por isso a concentração deste último mantém-se sempre elevada, pois trata-se do último intermediário da reação.

A proposta de via enzimática apresentada no Esquema 3.6 para de formação de PhSeSePh via uma reação S_N2 (Esquema 3.13) pode ser desconsiderada, pois a espécie com m/z 175 só poderia ser formada por uma reação de eliminação *syn* de fenilselenóxido. Por outro lado, não é possível afirmar se a reação ocorreu unicamente por oxidação do seleneto **1** (m/z 240) ao selenóxido **1c** (m/z 256), pois esta via levaria a um segundo produto, a ciclopentenona **1e** com m/z 82, para qual nenhuma espécie (fragmento ou intermediário) foi detectada. No entanto, na presença de enzimas álcool desidrogenases (ADH) a ciclopentenona **1e** poderia facilmente ser reduzida ao álcool **1d** (m/z 84). O álcool **1d** poderia se fragmentar com perda de uma molécula de água levando a um fragmento **1d-18** (m/z 66) e também a um fragmento **1d-28** (m/z 56) pela perda de uma molécula de CO. Análises de MS/MS para a espécie com m/z 85,2, mostraram que os picos com m/z 67,4 e 57,5 são filhos dessa espécie, portanto, o álcool **1d** e seus fragmentos puderam ser detectados, no entanto, não é possível afirmar qual via enzimática levou a formação desse composto. (Figura 3.15).

Além disso, dois picos apareceram nos espectros com intensidades elevadas, foram eles: o pico das espécies com m/z 205 e m/z 149. Não foi possível determinar quais eram estas espécies, no entanto, a análise MS/MS para o composto **1c+23** (m/z 279) mostrou que estas espécies (m/z 205 e 149) eram filhos desse composto (Figura 3.16).

Para os estudo da possível rota enzimática que levou a “degradação” do composto **2**, foi montado um outro esquema que continha os principais intermediários desta reação. No Esquema 3.15 estão apresentadas as principais rotas de transformação do composto **2** em PhSeSePh.

Como pode ser verificado na Tabela 3.4, o composto **2** não foi totalmente degradado. Após 144 h (Linha 6) foi detectado 40 % do PhSeSePh no meio reacional e ao contrário da reação com o composto **1**, o álcoois *cis*-**2a** e *trans*-**2a** foram detectados. As análises para o composto **2** via espectrometria de massas confirmaram as análises anteriores, como pode ser visto nos espectros da reação com o fungo *I. lacteus* CCB 196, apresentados na Figura 3.17.

A análise inicial (0 h) da reação mostrou que as espécies predominantes no meio eram aquelas com m/z 254,9 e 236,9. A análise de MS/MS mostrou que a espécie com m/z 236,9 é filha da espécie com m/z 254,9 que se trata do composto **2**, portanto o pico com m/z 236,9 pode ser identificado como sendo um fragmento do composto por uma diferença de 18 unidades, (**2-18**).

Após 24 h de reação, a principal espécie detectada referiu-se ao pico com m/z 238,9. Sugerindo a presença de um fragmento bastante estável do álcool **2a** (m/z 256) pela perda de uma molécula de água, portanto, o pico com m/z 238,9 refere-se a espécie **2a-18**. Além desses, foi observado o pico referente ao composto **2** (m/z 254,9) e também picos com m/z 279, 205, 149. A espécie com m/z 279 pode ser atribuída ao aduto de sódio do álcool, (**2a+23**), sendo as espécies com m/z 205 e 149 filhas da espécie com m/z 279. A ocorrência de picos com m/z iguais (279, 205 e 149) na reação do composto **1** (Figura 3.14) permitiu supor que estas espécies se formaram de forma similar nos dois compostos, possivelmente envolvendo um rearranjo do grupo -SePh, no entanto, essas espécies e os possíveis rearranjos não foram determinadas. A presença de metabólitos excretados pelo fungo pode ser descartada devido as reações de acompanhamento realizadas simultaneamente apenas com o fungo em água, sem a adição do composto **2**, onde não foram detectadas quantidades significativas dessas espécies.

Outro pico importante foi o com m/z 81,2 cuja análise de MS/MS mostrou ser filho da espécie com m/z 99,1. Logo, pode-se identificar a espécie com m/z 99,1 como sendo o álcool **2d**, que pela perda de uma molécula gera o fragmento com m/z 81,2 (**2d-18**), Figura 3.18.

Figura 3.18 - Espectro MS/MS para o pico com m/z 99,1 (**2d**).

picos referente ao álcool **2a** (m/z 279 e 238.9), indicando a transformação da cetona **2** no respectivo álcool **2a**. A presença com maior intensidade do pico com m/z 175 sugeriu a ocorrência da reação de eliminação do fenilselenóxido (**2f**), no entanto essa reação mostrou-se muito mais intensa na degradação do composto **1** do que para o composto **2**.

Com 96 h, a espécie **2a-18** (m/z 238.9) continuou a ser majoritária na reação, no entanto, observa-se um aumento acentuado na intensidade da espécie **2f** (m/z 175), demonstrando que a reação de eliminação está ocorrendo mais efetivamente. Este perfil reacional, sugere que a principal reação do composto **2** frente ao fungo *I. lacteus* CCB 196, é a redução do grupo carbonila e, ao contrário da reação com o composto **1**, a reação de eliminação de fenilselenóxido ocorre mais lentamente, com menor degradação do composto. Logo, o Esquema 3.15 ilustra a sugestão de via enzimática que governa a reação de transformação do composto **2** utilizando como biocatalisador o fungo basidiomiceto *I. lacteus* CCB 196.

Desta forma, conclui-se que a degradação do composto **1** ocorreu em aproximadamente 36 h devido a oxidação do composto **1** ao selenóxido **1c** (m/z 256) correspondente que então sofreu a reação de eliminação, não ocorrendo a formação do álcool **1a** (m/z 242), (Esquema 3.14). A reação do composto **2** (m/z 254), por sua vez, ocorreu primeiramente com a redução do grupo carbonila levando ao álcool **2a** (m/z 256), que posteriormente sofreu oxidação e eliminação do fenilselenóxido **2f** (m/z 175). Novamente, a formação de PhSeSePh via S_N2 pode ser descartada, primeiro pela manutenção do álcool **2a** ao longo da reação e segundo pela presença do fenilselenóxido **2f** que só se forma via reação de eliminação. Cabe salientar, que o composto PhSeSePh não foi detectado em nenhuma das análises, no entanto, o principal intermediário **2f** permitiu sugerir que a reação de eliminação está ocorrendo e portanto, a formação de PhSeSePh pode estar ocorrendo na etapa de extração, ou até mesmo, no interior da coluna cromatográfica durante as análises por cromatografia gasosa. As reações foram realizadas utilizando-se 3 g do fungo, 20 μ L do substrato em 40 mL de água destilada. As análises para o composto **1** foram realizadas durante as primeiras 48 h a fim de determinarmos o tempo necessário para a degradação total deste composto, já que a análise das primeiras 48 h de reação deste composto com o fungo *I. lacteus* CCB 196, o composto de partida não havia sido detectado (Tabela 3.5, Linha 1). As análises foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Em cada análise utilizou-se 1 μ L da mistura reacional que foi injetado diretamente sem qualquer purificação prévia.

3.6 – Estudo quantitativo utilizando os fungos *I. lacteus* CCB 196 e *T. rigida* CCB 285 como biocatalisadores.

Os ensaios quantitativos foram realizados mantendo as mesmas condições reacionais do estudo qualitativo anterior. Foram preparados 10 frascos reacionais para cada composto. As reações foram interrompidas com 48 h para as reações com o fungo *I. lacteus* CCB 196 e 96 h para as reações com o fungo *T. rigida* CCB 285. Estes tempos foram determinados de acordo com os resultados dos ensaios qualitativos (Tabelas 3.1 e 3.5). Após o tempo reacional os fungos foram filtrados e o compostos orgânicos extraídos com acetato de etila (3 x 200 mL). Todos os compostos isolados foram identificados por comparação de dados com amostras conhecidas dos compostos. Os rendimentos dos compostos isolados nas reações com os fungos *I. lacteus* CCB 196 e *T. rigida* CCB 285 estão apresentados na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 - Rendimentos isolados para os compostos isolados das reações com os fungos *I. lacteus* CCB 196 e *T. rigida* CCB 285.

Composto	Microrganismo	Cetona (%)	Álcoois (%)		PhYYPh (%)
			<i>cis</i>	<i>trans</i>
1	<i>Irpex lacteus</i> CCB 196	-	-	-	-
	<i>Trametes rigida</i> CCB 285	-	-	2	38
2	<i>Irpex lacteus</i> CCB 196	1	3	9	27
	<i>Trametes rigida</i> CCB 285	14	15	27	12
3	<i>Irpex lacteus</i> CCB 196	-	27	21	-
	<i>Trametes rigida</i> CCB 285	-	5	16	-
4	<i>Irpex lacteus</i> CCB 196	-	9	18	-
	<i>Trametes rigida</i> CCB 285	-	13	27	-

Durante a realização dos ensaios quantitativos os enantiômeros dos álcoois foram separados utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A coluna utilizada foi a CHIRACEL[®] OD-H (0,46 cm x 25 cm) e a fase móvel composta de diferentes mistura de hexano e isopropanol (*i*-PrOH).

3.6.1 – Compostos isolados nas reações com o fungo *I. lacteus* CCB 196.

Como já era conhecido, o composto **1** foi degradado na presença do fungo *I. lacteus* CCB 196, portanto, essa reação foi utilizada no estudo com espectrometria de massas.

Na reação do composto **2** foram isolados 6 mg (3 %) do álcool *cis*-**2a** e 18 mg (9 %) do álcool *trans*-**2a**. A pureza enantiomérica dos álcoois foram determinadas por análise em CLAE utilizando como fase móvel uma mistura de hexano/ *i*-PrOH 1%. Desta forma obteve-se o álcoois *cis*-**2a** e *trans*-**2a** com e.e. 99 %. Os dados de rotação ótica do álcool *trans*-**2a** foi comparado com os dados da literatura²⁰ e a configuração absoluta foi atribuída como sendo (1*S*, 2*S*). A configuração do álcool *cis*-**2a** foi determinada como sendo (1*R*, 2*S*) após derivatização (Esquema 3.16). A Figura 3.17 mostra os cromatogramas dos compostos isolados e os respectivos $[\alpha]_D$.

Os produtos isolados da reação com composto **3** foram os álcoois *cis*-**3a** (54 mg; 27 %), e *trans*-**3a** (42 mg; 21 %). A separação dos enantiômeros por CLAE foram realizadas utilizando como fase móvel a solução hexano/ *i*-PrOH 1% para o álcool *cis* e hexano/ *i*-PrOH 2% para o álcool *trans*-**3a**. A análises mostraram que o álcool *cis*-**3a** foi obtido com e.e > 95 %, enquanto o álcool *trans*-**3a** foi obtido com e.e de 60%. Os cromatogramas e os valores do $[\alpha]_D$ estão apresentados na Figura 3.18. A configuração absoluta do álcool *trans*-**3a** foi determinada por comparação com dados da literatura²¹. A configuração do álcool *cis*-**3a** foi determinada como sendo (1*R*, 2*S*) após derivatização (Esquema 3.17).

Na reação com composto **4** com o fungo *I. lacteus* CCB 196 foram isolados 18 mg (9%) do álcool *cis*-**4a** com e.e maior que 50% e 36 mg (18 %) para o álcool *trans*-**4a** com 90% de e.e. Os enantiômeros de ambos os diastereoisômeros foram analisados utilizando a mistura hexano/ *i*-PrOH 1 % (Figura 3.19) . Os valores da rotação ótica obtidos foram comparados com a literatura^{21,22} e as configurações absolutas foram atribuídas como sendo (1*R*, 2*S*) para o álcool *cis*-**4a** e (1*R*, 2*R*) para o álcool *trans*-**4a**.

Figura 3.19 - Cromatogramas dos álcoois *cis*-**4a** e *trans*-**4a** isolados da reação com *I. lacteus* CCB 196.

3.6.2 – Compostos isolados nas reações com *T. rigida* CCB 285.

A reação do composto **1** com o fungo *T. rigida* CCB 285 foram isolados apenas 4 mg (2 %) do álcool *trans*-**1a**, que apresentou e.e. 99 % de excesso enantiomérico e valor da rotação ótica foi de +1,2° (c 0,4; CHCl₃). A configuração absoluta (1*S*,2*S*) pode ser atribuída por comparação com dados da literatura²⁰. O álcool *cis*-**1a** não foi detectado (Tabela 3.4, Linha 2) e portanto não pode ser isolado. Além do álcool *trans*-**1a** foram isolados 76 mg (38 %) do PhSeSePh.

A reação do composto **2** levou ao isolamento de 30 mg (15 %) para o álcool *cis*-**2a** e 54 mg (27 %) para o álcool *trans*-**2a**. As análises por CLAE (Figura 3.20), utilizando hexano/ *i*-PrOH 1% mostraram que os álcoois foram obtidos com e.e. de 99 %. Os demais compostos isolados foram o material de partida **2** (28 mg; 14 %) e o PhSeSePh (24 mg; 12 %). Os dados de rotação ótica do álcool *trans*-**2a** foram comparados com os dados da literatura²⁰ e a configuração absoluta pode ser atribuída como sendo (1*S*, 2*S*). A configuração do álcool *cis*-**2a** foi determinada como sendo (1*R*, 2*S*) após derivatização (Esquema 3.16).

Os álcoois *cis*-**3a** e *trans*-**3a** da reação do composto **3** com o fungo *T. rigida* CCB 285 apresentaram 99 % de excesso enantiomérico (Figura 3.21). Foram isolados 10 mg (5 %) do álcool *cis*-**3a** e 32 mg (16 %) do álcool *trans*-**3a**. A configuração absoluta do álcool *trans*-**3a** foi determinada por comparação com dados da literatura²¹ como sendo (1*S*, 2*S*). A configuração do álcool *cis*-**3a** foi determinada como sendo (1*R*, 2*S*) após derivatização (Esquema 17).

Para a reação com o composto **4** foram isolados 26 mg (13 %) do álcool *cis*-**4a** e 54 mg (27 %) para o álcool *trans*-**4a**. Análises por CLAE (Figura 3.22), utilizando a mistura hexano/ *i*-PrOH 1 % e mostraram que os álcoois foram obtidos com 99 % de excesso enantiomérico. Os valores de rotação ótica obtidos foram comparados com a literatura^{21,22} e as configurações absolutas foram atribuídas como sendo (1*R*, 2*S*) para o álcool *cis*-**4a** e (1*S*, 2*S*) para o álcool *trans*-**4a**.

3.7 – Determinação da configuração absoluta para os álcoois *cis*-2a e *cis*-3a.

As configurações absolutas para os álcoois *cis*-2a e *cis*-3a foram determinadas por derivatização destes compostos aos respectivos selenóxido (*cis*-2c) e sulfóxido (*cis*-3c). Em seguida, a eliminação dos grupos fenilselenóxido e fenilsulfóxido levou a formação do (*R*)-cicloexanol e do (*R*)-ciclopentanol, respectivamente.

A reação do composto *cis*-2a utilizando H₂O₂ como agente oxidante, foi conduzida em CH₂Cl₂ à temperatura ambiente¹⁶. O selenóxido *cis*-2c não foi isolado, pois sofreu eliminação espontânea levando a formação do (*R*)-cicloexanol⁷⁵⁻⁷⁷ [(*R*)-2d] com 68 % de rendimento, (Esquema 3.16). O produto [(*R*)-2d] foi identificado via cromatografia gasosa por comparação direta com padrão previamente obtido.

Na reação de oxidação do composto *cis*-**3a** ao sulfóxido *cis*-**3c** foi utilizado *m*-CPBA como agente oxidante em CH₂Cl₂ à temperatura ambiente²³. Após o término da reação de oxidação, o solvente foi evaporado e adicionou-se tolueno ao frasco reacional. O sistema foi aquecido a 60 °C levando a formação do (*R*)-ciclopentanol⁷⁵⁻⁷⁷ [(*R*)-**3d**] com 55 % de rendimento, Esquema 3.17. O produto foi identificado via cromatografia gasosa por comparação direta com padrão previamente obtido.

Como já se sabia que os dois compostos **2a** e **3a** apresentavam configuração *cis* e agora conhecendo a configuração para um centro estereogênico (o carbono carbinólico), pode-se atribuir a configuração do segundo centro, ou seja, o carbono com o átomo de selênio (*cis*-**2a**) e o carbono sulfenilado (*cis*-**3a**). Desta forma as configurações foram atribuídas como sendo (1*R*, 2*S*) para os dois compostos, Figura 3.23.

Parte dos resultados obtidos neste trabalho resultou em um artigo que já foi aceito para publicação e atualmente encontra-se *in press*, (Anexo 33).

4.0 – Conclusões

Concluimos que a utilização dos fungos basidiomicetos *T. byssogenum* CCB 203, *T. versicolor* CCB 202, *P. sanguineus* CCB 501, *I. lacteus* CCB 196 e *T. rigida* CCB 285 frente aos compostos α -selenilados **1-2** e α -sulfenilados **3-4**, levaram a formação preferencial de álcoois de configuração *trans*, ao contrário das reações de reduções com NaBH₄, que levaram a formação preferencial dos álcoois com isomeria *cis*. Portanto, as reações de redução dos compostos **1-4** com NaBH₄ e com os fungos basidiomicetos são complementares na obtenção dos álcoois cíclicos *cis*-(**1a-4a**) e *trans*-(**1a-4a**), com a vantagem de que as reações biocatalisadas foram estereosseletivas.

Dentre os fungos Basidiomicetos utilizados, o *T. rigida* CCB 285 foi o que apresentou os melhores valores de estereosseletividade convertendo todos os compostos aos respectivos álcoois com excessos enantioméricos de 99 %.

As análises por ESI mostraram que “degradação” que ocorreu quando o composto 2-(fenilseleno)-ciclopentanona (**1**) foi adicionado na presença do fungo *I. lacteus* CCB 196 ocorreu segundo uma reação de eliminação *syn* de selenóxido e não por S_N2 como havia sido sugerido anteriormente por comparação à formação do PhSeSePh quando a reação foi conduzida com NaBH₄.

Através da biocatálise foi possível preparar álcoois com dois centros estereogênicos via reações de redução enzimática, produzindo compostos com valores de excesso enantioméricos de até 99%.

5.0 - Materiais e métodos

Os reagentes e solventes, quando necessário, foram secos e purificados conforme procedimentos descritos na literatura⁷⁸. A concentração do reagente de lítio utilizado foi determinada por titulação com uma solução 1 mol/L de isopropanol em benzeno seco, na presença de 1,10-fenantrolina⁷⁹.

As colunas cromatográficas (CC) foram realizadas utilizando-se sílica gel 60 (230-400 mesh) da Merck e cromatofolhas de sílica gel 60 F₂₅₄ da Merck para cromatografia em camada delgada (CCD) que foram observadas em uma câmara com luz UV (254 nm) e reveladas com solução alcoólica de vanilina ou anisaldeído.

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em um espectrofotômetro Bomem MB 100 em filmes de nujol e as frequências de absorção estão expressas em cm⁻¹.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C foram obtidos no aparelho Bruker DRX 500. O solvente utilizado foi o clorofórmio deuterado, CDCl₃ e os deslocamentos químicos (δ) estão expressos em parte por milhão (ppm) em relação ao padrão interno tetrametilsilano (TMS). A multiplicidade dos sinais observados está indicada pelas seguintes abreviações: s = singleto, d = dubleto, t = tripleto, m = multipletto, dd = duplo dubleto, dt = duplo tripleto.

Os espectros de massa de alta resolução foram obtidos em um aparelho Bruker Daltonics Micro TOF com analisador ESI-TOF (*electron spray ionization – time of flight*).

As análises de IV, RMN de ¹H e ¹³C e de EM foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da USP.

Os cromatogramas foram obtidos de um cromatógrafo gasoso CG-17A Shimadzu, disponível em nosso laboratório. As colunas utilizadas foram HP-5 [J & W Scientific HP-5 (30 m x 0,25 mm)] e CP-Chirasil-Dex CB [Varian (25 m x 0,25mm)].

As programações utilizadas foram:

Método 1 - gás carreador – H₂, 100 kPa; injetor 230 °C; detector 250 °C; coluna = início 50 °C até 250 °C com rampa de 10 °C/min.

Método 2 – gás carreador – H₂, 100 kPa; injetor 220 °C; detector 220 °C; coluna = isoterma 150 °C.

Método 3 – gás carreador – H₂, 100 kPa; injetor 220 °C; detector 220 °C; coluna = isoterma 160 °C.

Como biocatalisadores para essas reações os seguintes fungos basidiomicetos foram selecionados:

Irpex lacteus CCB 196 (Ribeirão Grande – SP);

Trametes rigida CCB 285 (Miranda – MS);

Pycnoporus sanguineus CCB 501 (Mogi-Guaçu – SP);

Trametes byssogenum CCB 203 (Miranda – MS);

Trametes versicolor CCB 202 (Miranda – MS).

As biotransformações foram feitas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 40 mL de solução tampão fosfato (pH = 7), 3g de células úmidas do fungo e 20 µL do composto orgânico. As biotransformações foram acompanhadas utilizando-se cromatografia gasosa por um período de 144h (6dias), sendo coletadas alíquotas a cada 48h.

5.1 - Síntese das moléculas bi-funcionalizadas

Para avaliarmos a seletividade dos fungos Basidiomicetos, uma série de moléculas que, em suas estruturas, continham os grupamentos cetona e seleneto ou cetona e sulfeto foi sintetizada (Figura 5.1). As sínteses dos compostos utilizados nas biotransformações seguiram metodologias bem estabelecidas e descritas na literatura^{16,26}.

5.1.1 Síntese da 2-(fenilseleno)ciclopentanona (1) e 2-(fenilseleno)cicloexanona (2).

As cetonas **1** e **2** contendo selênio ligado ao carbono α -carbonílico foram sintetizadas conforme Esquema 5.1.

Reagentes:

- Tetrahidrofurano (THF) seco
- Diisopropilamina
- *n*-Butilítio (1,2 mol/L em hexano)
- Ciclopentanona
- Cicloexanona
- Disseleneto de difenila (PhSeSePh)
- Bromo (Br₂)

*Procedimento*¹⁶:

Balão A: Adicionou-se, 16,0 mL de THF anidro a um balão de duas bocas, previamente resfriado com banho de gelo seco e acetona, onde uma das bocas do balão encontrava-se vedada com septo e a outra conectada a uma linha de N₂. Em seguida adicionou-se 1,4 mL de diisopropilamina (10,0 mmol). A mistura reacional permaneceu sob agitação magnética por 15 minutos. Adicionou-se lentamente 8,3 mL de *n*-butilítio (10,0 mmol) à mistura que ficou sob agitação magnética à – 78°C por 90 minutos. Após esse tempo 0,44 mL da ciclopentanona (10,0 mmol)/ 1,00 mL da cicloexanona (10,0 mmol) foram lentamente adicionados, permanecendo a solução sob agitação por mais 15 minutos.

Balão B: A um balão de duas bocas, onde uma delas encontrava-se conectado a uma linha de N₂ e a outra vedada com um septo, contendo 1,6g de PhSeSePh (5,0 mmol) adicionou-se 3,0 mL de THF anidro e em seguida 0,34 mL de Br₂ para obtenção do PhSeBr, caracterizado pela cor castanha escura.

O conteúdo do balão **B** foi rapidamente adicionado ao balão **A**, onde se observou a imediata descoloração da mistura até atingir uma cor amarela intensa. A mistura foi extraída com solução saturada de NaCl (2x5 mL). A fase

aquosa lavada com CH_2Cl_2 (2x10 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas com MgSO_4 seguida de evaporação do solvente.

O produto **1** foi purificado em coluna de sílica gel, utilizando como eluente a mistura hexano/AcOEt 20%, obtendo-se uma massa de 1,24 g (5,2 mmol), o que resultou num rendimento de 52%.

O produto **2** foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando como eluente hexano/AcOEt 10%, perfazendo uma massa de 1,2 g (4,75 mmol) com rendimento de 48%.

2-(fenilseleno)ciclopentanona

P. M. 239,17 g/mol

Rendimento: 52%

CG (Método 1 – coluna HP-5): $t_R = 14,24$ min. **IV** (filme): 3054 cm^{-1} , est C-H arom; 2963 cm^{-1} , est C-H Csp^3 ; 1728 cm^{-1} , est C=O, cetona. **RMN de ^1H** , δ (ppm): 7,6 (m, 2H); 7,2 (m, 2H); 3,7 (m, 1H); 2,5-1,9 (m, 6H). **RMN de ^{13}C** , δ (ppm): 214,5 (C_0 , C=O cetona); 135-127 (5 C arom); 46,4 (CH); 36,3 (CH_2); 30,7 (CH_2); 20,9 (CH_2). **EM** (ESI) m/z (%): 241,0129 ($\text{M}+1$). [Anexos 1 e 2].

2-(fenilseleno)cicloexanona

P. M. 253,20 g/mol

Rendimento: 48%; **CG** (Método 1 – coluna HP-5): $t_R = 15,55$ min. **IV** (filme): 3054 cm^{-1} , est C-H arom; $2940\text{--}2859\text{ cm}^{-1}$, est C-H Csp³; 1700 cm^{-1} , est C=O, cetona. **RMN de ¹H**, δ (ppm): 7,5 (m, 2H); 7,2 (m, 3H); 3,9 (t, 1H); 2,9 (m, 1H); 2,3-1,7 (m, 7H). **RMN de ¹³C**, δ (ppm): 207,8 (C₀, C=O cetona); 135-125 (6 C arom); 51,6 (CH); 38,5 (CH₂); 34,0 (CH₂); 26,8 (CH₂); 22,9 (CH₂). **EM** (ESI) m/z (%): 277,0099 (M+Na, 100); 255,0281 (M+1, 25,5). [Anexos 3 e 4].

5.1.2 – Preparação da 2-(feniltio)ciclopentanona (3) e da 2-(feniltio)cicloexanona (4).

As cetonas **3** e **4** que contém o átomo de enxofre ligado ao carbono α -carbonílico, foram sintetizadas conforme o Esquema 5.2.

Reagentes:

- Tetraidrofurano (THF) seco
- Carbonato de Potássio (K_2CO_3)
- Tiofenol (PhSH)
- 2-cloro-ciclopentanona
- 2-cloro-ciloexanona

Procedimento²⁶::

Em um balão de duas bocas de 125 mL, fez-se uma suspensão com 3,78g de K_2CO_3 (30 mmol) em 50,0 mL de THF, sobre a qual adicionou-se 1,02 mL de PhSH (10 mmol). Esta suspensão permaneceu sob forte agitação magnética, à temperatura ambiente por 30 minutos. Uma das bocas estava conectada a um sistema secante de $CaCl_2$ e a outra vedada com septo. Após esse tempo, adicionou-se 10 mmol 2-cloro-cetona correspondente. A reação permaneceu sob agitação magnética por 24 horas.

A mistura foi lavada com solução saturada de NaCl (2x5 mL). A fase aquosa foi extraída com CH_2Cl_2 (2x10 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas com $MgSO_4$ seguido de evaporação do solvente.

O produto **3** foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando como eluente a mistura hexano/AcOEt 10%, de onde aferiu-se uma massa de 1,2 g sendo o rendimento 63%.

O produto **4** foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando como eluente hexano/AcOEt 20%, perfazendo uma massa de 1,54 mg com rendimento de 75%.

2-(feniltio)ciclopentanona

P. M. 192,27 g/mol

Rendimento: 63%; **CG** (Método 1 – coluna HP-5): $t_R = 13,52$ min. **IV** (filme): 3059 cm^{-1} , est C-H arom; $2968\text{--}2881\text{ cm}^{-1}$, est Csp^3 ; 1739 cm^{-1} , est C=O, cetona. **RMN de ^1H** , δ (ppm): 7,4 (m, 2H); 7,3 (m, 3H); 4,1 (q, 1H, $J = 7,1$ Hz); 3,6 (m, 1H); 2,3 (m, 4H); 2,2–1,8 (m, 5H). **RMN de ^{13}C** , δ (ppm): 133–127 (C arom); 52,4 (CH); 36,6 (CH_2); 30,7 (CH_2); 20,3 (CH_2). **EM** (ESI), m/z (%): 193,0684 ($\text{M}+1$); 215,0501 ($\text{M}+\text{Na}$). [Anexos 5 e 6].

2-(feniltio)cicloexanona

P. M. 206,30 g/mol

Rendimento: 75%; **CG** (Método 1 – coluna HP-5): $t_R = 14,68$ min. **IV** (filme): 3057 cm^{-1} , est C-H arom; $2940\text{--}2863\text{ cm}^{-1}$, est Csp^3 ; 1708 cm^{-1} , C=O cetona. **RMN de ^1H** , δ (ppm): 7,4 (m, 2H); 7,3 (m, 2H); 7,2 (m, 1H); 3,8 (m, 1H); 2,9 (m, 1H); 2,3 (m, 2H); 1,9 (m, 2H); 1,8 (m, 2H); 1,7 (m, 2,7). **RMN de ^{13}C** , δ (ppm): 207,6 (C=O, cetona); 133,8 (C arom); 131,9 (C arom); 129,0 (C arom); 127,4 (C arom); 56,5 (CH); 39,0 (CH_2); 27,3 (CH_2); 22,6 (CH_2). **EM** (ESI), m/z (%): 207,0846 (M^+); 229,0680 ($\text{M}+\text{Na}$). [Anexos 7 e 8].

5.2 – Preparação dos padrões sintéticos utilizados nas análises

As reações biocatalisadas dos substratos **1-4** foram analisadas diretamente por cromatografia gasosa utilizando padrões preparados a partir dessas moléculas. Para isso foram preparados os respectivos álcoois **1a-4a** e acetatos **1b-4b** racêmicos (Esquema 5.3) a partir da redução das cetonas com boroidreto de sódio.

Os álcoois **1a-4a** foram preparados por redução com NaBH_4 em $\text{SiO}_2/\text{H}_2\text{O}$ 30% (m/m).

Reagentes:

- Etanol (EtOH) anidro
- Boroidreto de sódio (NaBH_4)
- Sílica gel (SiO_2)
- Água (H_2O) destilada
- Cetonas **1-4**

Procedimento^{80,81}:

Inicialmente utilizamos como procedimento a seguinte metodologia⁸⁰: Em um balão reacional de 15 mL contendo 2 mL de etanol anidro, adicionou-se 0,5 mmol da cetona correspondente (**1-4**). Em seguida adicionou-se lentamente 0,5 mmol de NaBH₄. A mistura permaneceu sob agitação magnética, a temperatura ambiente, por 3 horas. Após esse período, adicionou-se 2 mL de solução aquosa de HCl 10%. A solução resultante foi extraída com CH₂Cl₂ (2 x 5 mL). As fases orgânicas foram combinadas e lavadas com solução aquosa de NaHCO₃ 10% (2 x 5 mL) e com solução saturada de NaCl (5 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO₄, seguido da evaporação do solvente.

No entanto, estávamos obtendo rendimentos consideravelmente baixos, especialmente para os selenetos onde a redução da cetona **2** era obtida com rendimento em torno de 50%, e uma considerável produção de PhSeSePh como sub-produto da reação.

Diante desta circunstância, utilizamos o seguinte procedimento⁸¹ que forneceu melhores rendimentos e maiores velocidades nas reações: Em um balão de 5 mL adicionou-se 0,1 g de sílica e 0,03g de água. Essa mistura foi agitada, utilizando barra e agitador magnéticos pra produzir uma mistura sílica/água (SiO₂/H₂O) 30%. Em seguida, adicionou-se 1mmol da cetona correspondente, mantendo a agitação. Logo após, foram adicionados 0,5 mmol de NaBH₄. A reação foi completada em 5 minutos. O produto foi então extraído com CH₂Cl₂.

Os álcoois foram purificados em CC utilizando como eluente a mistura hexano/AcOEt 10%. Os produtos **1a** e **2a** foram isolados com rendimento de 88% (212 mg) e 80% (204 mg), respectivamente. Os produtos **3a** e **4a** foram isolados com rendimentos de 92% (179 mg) e 90% (200 mg), respectivamente.

2-(fenilseleno)ciclopentanolC₁₁H₁₄OSe

P.M. 241,2 g/mol

Rendimento: 88% (mistura diastereoisomérica).

CG (Método 1 – coluna HP-5): $t_R = 13,97$ min. **RMN de ¹H**, δ (ppm): 7,5 (m, 2H); 7,2 (m, 3H); 4,0 (m, 1H); 3,5 (m, 1H); 2,1 (m, 1H); 2-1,6 (m, 8H). **RMN de ¹³C**, δ (ppm): 134,2 (C arom); 133,7 (2 C arom); 129,1 (C arom); 127,5 (C arom); 72,5 (CH); 52,0 (CH); 32,0 (CH₂); 29,4 (CH₂); 22,0 (CH₂).

RMN de ¹H, δ (ppm): 7,5 (m, 2H); 7,2 (m, 3H); 4,0 (m, 1H); 3,5 (m, 1H); 2,2 (m, 1H); 2,1-1,6 (m, 8H). **RMN de ¹³C**, δ (ppm): 133,7 (C arom); 133,4 (2 C arom); 129,2 (C arom); 127,4 (C arom); 72,4 (CH); 52,0 (CH); 32,0 (CH₂); 29,4 (CH₂); 21,9 (CH₂). [Anexos 9 e 10].

RMN de ¹H, δ (ppm): 7,6 (m, 2H); 7,3 (m, 3H); 4,1 (m, 1H); 3,4 (m, 1H); 2,2 (m, 1H); 2,1-1,6 (m, 8H). **RMN de ¹³C**, δ (ppm): 134,1 (C arom); 129,2 (2 C arom); 129,0 (C arom); 127,4 (C arom); 78,0 (CH); 49,7 (CH); 32,8 (CH₂); 31,0 (CH₂); 22,0 (CH₂). [Anexos 11 e 12].

2-(fenilseleno)cicloexanol $C_{12}H_{16}OSe$

P.M. 255,2 g/mol

Rendimento: 80 % (mistura diastereoisomérica). **CG**

(Método 1 – coluna HP-5): t_R = 15,09 min e 15,28 min. **IV** (filme): 3448 cm^{-1} , est OH; 2932-2855 cm^{-1} , est Csp³. **EM** (ESI), m/z (%): 279,0256 (M+Na); **RMN de 1H** , δ (ppm): 7,6 – 7,2 (m, 5H); 4,1 (q, 2H, J = 7,1 Hz); 3,7 (m, 1H); 3,5 (m, 1H); 2,4 (s, 1H); 2,1–1,3 (m, 11H); 1,26 (t, 3H, J = 7,1 Hz). **RMN de ^{13}C** , δ (ppm): 136-127 (5 C arom.); 72,2 (CH); 68,2 (CH); 53,6 (CH); 33,8 (CH₂); 33,4 (CH₂); 32,4 (CH₂); 29,0 (CH₂); 26,9 (CH₂); 25,2 (CH₂); 24,5(CH₂); 20,9 (CH₂).

RMN de 1H , δ (ppm): 7,9 (m 2H), 7,3 (m, 3H); 3,7 (m, 1H); 3,5 (m, 1H); 2,0–1,3 (m, 9H); **RMN de ^{13}C** , δ (ppm): 134 (C arom), 129-127 (3 C arom.); 69,2 (CH); 53,7 (CH); 32,4 (CH₂); 29,0 (CH₂); 25,1 (CH₂); 20,9 (CH₂).[Anexos 13 e 14].

RMN de 1H , δ (ppm): 7,6 (m, 2H), 7,3 (m, 3H); 3,39 (m, 1H); 2,9 (s, 3H); 1,7- (m, 2H); 1,4-1,2 (m, 6H). **RMN de ^{13}C** , δ (ppm): 136 (C arom), 129-126,5 (4 C arom.); 72,2 (CH); 53,6 (CH); 33,8 (CH₂); 33,4 (CH₂); 26,8 (CH₂); 24,4(CH₂). [Anexo 15 e 16].

2-(feniltio)ciclopentanolC₁₁H₁₄OSP.M. 194,3 g/molRendimento: 92% (mistura diastereoisomérica). **CG**(Método 1 – coluna HP-5): t_R = 13,247 e 13,414 min. **IV** (filme): 3432 cm⁻¹,est OH; 2964-2870 cm⁻¹, est Csp³; **EM** (ESI), m/z (%): 217,0661 (M+Na)**RMN de ¹H**, δ (ppm): 7,4 (m, 2H); 7,3 (m, 3H); 4,1 (m, 1H); 3,4 (m, 1H);2,3-1,5 (m, 7H). **RMN de ¹³C**, δ (ppm): 130,2-126,0 (C arom); 71,2 (CH);53,9 (CH₂); 32,5 (CH₂); 28,2 (CH₂); 21,1 (CH₂). **RMN de ¹H**, δ (ppm): 7,7 (m, 2H); 7,3 (m, 3H); 4,1

(m, 1H); 3,4 (m, 1H); 2,3-2,0 (m, 2H), 1,9-1,2 (m,

6H). **RMN de ¹³C**, δ (ppm): 135,6-130,0-126,5 (3 Carom); 78,6 (CH); 54,0 (CH₂); 32,2 (CH₂); 30,9(CH₂); 21,7 (CH₂). [Anexos 17 e 18]. **RMN de ¹H**, δ (ppm): 7,5 (m, 2H); 7,3 (m, 3H); 4,1

(m, 1H); 3,4 (m, 1H); 2,2-2,0 (m, 1H), 2,0 (m,

2H), 1,7-1,6 (m, 5H). **RMN de ¹³C**, δ (ppm): 135,6-130,0-126,5 (3 C arom); 78,6 (CH); 54,0 (CH₂);32,2 (CH₂); 30,9 (CH₂); 21,7 (CH₂). [Anexos 19 e

20].

2-(feniltio)cicloexanol**C₁₂H₁₆OS**

P. M. 208,3 g/mol .

Rendimento: 90% (mistura diastereoisomérica); **CG**

(Método 1 – coluna HP-5): $t_R = 14,323$ e $14,458$ min. **IV** (filme): 3442 cm^{-1} , est OH; $2935\text{--}2857\text{ cm}^{-1}$, est Csp³. **EM** (ESI), m/z (%): 231,0815 (M+Na). **RMN de ¹H**, δ (ppm): 7,4 (m, 2H); 7,2 (m, 3H); 3,7 (m, 1H); 3,3 (m, 1H); 2,1–1,2 (m, 7H). **RMN de ¹³C**, δ (ppm): 136–127 (5 C arom), 72,2 (CH), 68,2 (CH), 53,6 (CH), 33,8 (CH), 33,4 (CH), 32,4 (CH₂), 29,0 (CH₂), 26,9 (CH₂), 24,5 (CH₂), 20,9 (CH₂).

RMN de ¹H, δ (ppm): 7,7 (m, 2H); 7,3 (m, 3H); 3,7 (m, 1H); 2,7 (m, 1H), 2,1 (m, 4H), 1,9–1,2 (m, 6H).

RMN de ¹³C, δ (ppm): 133,0–127,7 (3 C arom); 72,0 (CH); 56,5 (CH₂); 33,7 (CH₂); 32,6 (CH₂); 26,1 (CH₂), 24,2 (CH₂). [Anexos 21 e 22].

RMN de ¹H, δ (ppm): 7,5 (m, 2H); 7,3 (m, 3H); 3,3 (m, 1H); 2,7 (m, 1H), 2,1 (m, 4H), 1,7–1,2 (m, 6H).

RMN de ¹³C, δ (ppm): 133,0–127,7 (3 C arom); 72,0 (CH); 56,5 (CH₂); 33,8 (CH₂); 32,7 (CH₂); 26,2 (CH₂), 24,3 (CH₂). [Anexos 23 e 24].

Os acetatos **1b-4b** foram preparados pela reação dos respectivos álcoois com anidrido acético em piridina.

Reagentes

- Álcoois **1a-4a**
- Diclorometano (CH_2Cl_2)
- Anidrido acético (Ac_2O)
- Piridina (Py)

Procedimento⁸²:

Em um balão de 15 mL foi preparada uma solução com 0,5 mmol do respectivo álcool (**1a-4a**) em CH_2Cl_2 (1 mL), adicionando-se a seguir anidrido acético (0,2 mL) e piridina (0,2 mL). A reação permaneceu sob agitação magnética por 24h. Em seguida foi lavada com solução de CuSO_4 , seca com MgSO_4 , seguido de evaporação do solvente.

Os acetatos foram purificados em coluna cromatográfica utilizando como eluente a mistura hexano/acetato de etila 20%. O acetatos foram isolados com rendimentos de 85% (120mg) para **1b**, 75% (111mg) para **2b**, 88% (104mg) para o acetato **3b** e 90% (112,5 mg) para o acetato **4b**.

Acetato de 2-(fenilseleno)ciclopentila

P. M. 283,2 g/mol

Rendimento: 85%

IV (filme): 3056 cm^{-1} , est C arom; 2966-2871 cm^{-1} , est C sp^3 ; 1738,7 cm^{-1} , est C=O éster; 1240 cm^{-1} , est C-C(O)-O. **EM** (ESI), m/z (%): 307,0211 (M+Na, 76,1). [Anexos 25 e 26].

Acetato de 2-(fenilseleno)cicloexila

P. M. 297,3 g/mol

Rendimento: 78%

CG (Método 1 – coluna HP-5): $t_R = 16,5$ min. **IV** (filme): 2936-2858 cm^{-1} , est C sp^3 ; 1736 cm^{-1} , est C=O éster; 1237 cm^{-1} , est C-C(O)-O. **LC/MS** (ESI), m/z (%): 321,0367 (M+Na, 47,2), [Anexos 27 e 28]

Acetato de 2-(feniltio)ciclopentila

P. M. 236,3 g/mol

Rendimento: 88%

CG (Método 3 – coluna CP-Chirasil-Dex CB): $t_R = 9,3; 9,7; 10,9; 11,5$. **IV** (filme): 3058 cm^{-1} , est C-H arom; $2968\text{--}2873\text{ cm}^{-1}$, est Csp^3 ; 1738 cm^{-1} , est C=O, ester. [Anexos 29 e 30]

Acetato de 2-(feniltio)cicloexila

P. M. 250,4 g/mol

Rendimento: 90%

CG (Método 1 – coluna HP-5): $t_R = 15,9\text{ min}$. **IV** (filme): 3059 cm^{-1} , est C-H arom; $2939\text{--}2860\text{ cm}^{-1}$, est Csp^3 ; 1737 cm^{-1} , est C=O éster; 1236 cm^{-1} , est C-C(O)-O. [Anexos 31 e 32].

Referências bibliográficas

- ¹ Lenardão, E. J.; Freitag, R. A.; Dabdoub, M. J.; Batista, A. C. F.; Silveira, C. C. *Quim. Nova*, **2003**, 26, 123.
- ² Faber, K. *Biotransformations in Organic Synthesis*, **1997**, 3th edition, Springer, New York.
- ³ D'Souza, S. F. *Current Science*, **1999**, 77, 69.
- ⁴ Ragnitz, K.; Pietzsch, M.; Syldakt C. J. *Biotechnol.*, **2000**, 92, 179.
- ⁵ Cheon, Y.; Kim G.; Kim H. J. *Mol. Catal. B: Enzymatic*, **2000**, 11, 29.
- ⁶ Yamada, H.; Shimizu, S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1988**, 27, 622.
- ⁷ Ishige, T.; Honda, K.; Shimizu, S. *Curr. Opin. Chem. Bio.*, **2005**, 9, 174.
- ⁸ Lehninger A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Princípios e Bioquímica*, **1995**, 2^a edição, Sarvier, São Paulo – Brasil.
- ⁹ Griffin, D. R.; Gainer, J. L.; Carta, G. *Biotechnol. Prog.*, **2001**, 17, 304.
- ¹⁰ Bennett, G. N.; San, K. Y. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2001**, 55, 1.
- ¹¹ Katz, M.; Frejd, T.; Hahn-Hägerdal, B.; Gorwa-Grauslund, M. F. *Biotechnol. Bioeng.*, **2003**, 84, 573.
- ¹² Bruice, P.Y. *Organic Chemistry*, **1998**, Prentice Hall: New York.
- ¹³ Gruttadauria, M.; Meo, P.L.; Riela, S.; D'Anna, F.; Noto, R. *Tetrahedron:Asymmetry*, **2006**, 17, 2713.
- ¹⁴ a) Severin, M.; Van Ende, D.; Krief, A. *Tetrahedron Lett.*, **1976**, 2643. b) Clive, D. L. J.; Chittatu, G. J.; Farina, V.; Kiel, W. A.; Menchen, S. M.; Russel, C. G.; Singh, A.; Wong, C. K.; Curtis, N. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102, 4438.
- ¹⁵ Ceccherelli, P.; Curini, M.; Francesco, E.; Marcotullio, M. C.; Rosati, O. *Tetrahedron:Asymmetry*, **1998**, 9, 919.
- ¹⁶ Back, T. G. *Organoselenium Chemistry: A Pactical Aproach* **1999**, Oxford University Press, Londres.

- ¹⁷ Tiecco, M.; Testaferri, L.; Bagnoli, L.; Terlizzi, R.; Temperini, A.; Marini, F.; Santi, C.; Scarponi, C., *Tetrahedron:Asymmetry*, **2004**, 15, 1949.
- ¹⁸ Riela, S.; Aprile, C.; Gruttadauria, M.; Lo Meo, P.; Noto, R. *Molecules*, **2005**, 10, 383.
- ¹⁹ Tiecco, M.; Testaferri, L.; Temperini, A.; Bagnoli, L.; Marini, F.; Santi, C. *Chem. Eur. J.*, **2004**, 10, 1752.
- ²⁰ Page, P. *Organosulfur Chemistry*, **1998**, vol. 2, Academic Press, San Diego, USA.
- ²¹ Metzner, P.; Thuillier, A. *Sulfur Reagents in Organic Synthesis*, **1994**, Academic Press, San Diego, USA.
- ²² Belen'kii, L. I. *Chemistry of Organosulfur Compounds*, **1990**, Elis Horwood, New York.
- ²³ Trost, B. M.; Salzmann, T.; Hiroi, K. *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, 98, 4887.
- ²⁴ Trost, B. M. *Chem. Rev.*, **1978**, 78, 363.
- ²⁵ Trost, B. M. *J. Acc. Chem. Res.*, **1978**, 11, 453.
- ²⁶ Carreño, M. C. *Chem. Rev.*, **1995**, 95, 1717.
- ²⁷ Su, W.; Chen, J.; Whu, H.; Jin, C. *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 4524.
- ²⁸ Del Rio, R. E.; Wang, B.; Achab, S.; Bohe, L. *Org. Lett.*, **2007**, 9, 2265.
- ²⁹ Gamma, A. Flores-López, L. Z.; Aguirre, G.; Parra-Hake, M.; Hellberg, L. H.; Somanathan, R. *Arkivoc*, **2003**, (xi), 4.
- ³⁰ Paulmier, C. *Selenium Reagents and Intermediates in Organic Synthesis*, **1986**, vol. 4, Pergamon Press, New York.
- ³¹ Torii, S.; Inokuchi, T.; Asanuma, G.; Sayo, N.; Tanaka, H. *Chem. Lett.*, **1980**, 9, 867.
- ³² Nishiyama, Y.; Ohashi, H.; Itoh, K. Sonoda, N. *Chem. Lett.*, **1998**, 2, 159.
- ³³ Devan, N.; Sridhar, P. R.; Prabhu, K. R.; Chandrasekaran, S. *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 9417.

- ³⁴ Yang, M.; Zhu, C.; Yuan, F.; Huang, Y.; Pan, Y. *Org. Lett.*, **2005**, 7, 1927.
- ³⁵ Sridhar, R.; Srinivas, B.; Surenda, K.; Krishnaveni, S.; Rao, K. R. *Tetrahedron Lett.*, **2005**, 46, 8837.
- ³⁶ Vougioukas, A. E.; Kagan, H. B.; *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28 (48), 6065.
- ³⁷ Iqbal, J.; Pandey, A.; Shukla, A.; Srivastava, R. R.; Tripathi, S. *Tetrahedron*, **1990**, 46, 6423.
- ³⁸ Bhattacharyya, P.; Maiti, A.K.; Biswas, G. K. *J. Chem. Research*, **1993**, 8, 325.
- ³⁹ Bhattacharyya, P.; Maiti, A.K. *Tetrahedron*, **1994**, 50, 10483.
- ⁴⁰ Hou, X-L.; Wu, J.; Dai, L-X.; Xia, L-J.; Tang, M-H. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998**, 9, 3431.
- ⁴¹ Procter, D. J.; Dowsland, J.; McKerlie, F. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 4923.
- ⁴² Fringuelli, F.; Pizzo, F.; Tortoioli, S.; Vaccaro, L. *Adv. Synth. Catal.*, 2002, 344, 379.
- ⁴³ Fringuelli, F.; Pizzo, F.; Tortoioli, S.; Vaccaro, L. *Tetrahedron Lett.*, **2003**, 44, 6785.
- ⁴⁴ Fringuelli, F.; Pizzo, F.; Tortoioli, S.; Vaccaro, L. *J. Org. Chem.*, **2003**, 68, 8248.
- ⁴⁵ Mojtahedi, M. M.; Ghasemi, M. H.; Abaee, M. S. *Arkivoc*, **2005** (xv), 68.
- ⁴⁶ Khodaei, M. M.; Khosropour, A. R.; Ghozati, K. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2005**, 16, 673.
- ⁴⁷ Ranu, B.; Mandal, T. *Can. J. Chem.*, **2006**, 84, 762.
- ⁴⁸ Clive, D. L. *Tetrahedron*, **1978**, 34, 1049.
- ⁴⁹ Liotta, D. *Organoselenium Chemistry*, **1987**, Wiley-Interscience, New York-USA.
- ⁵⁰ Cossy, J.; Bellosta, V.; Hamoir, C.; Desmurs, J-R. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 7083.

- ⁵¹ Paknikar, S. K.; Rao, A.S.; Kirtane, J. G., *Tetrahedron*, **1983**, 39, 2323.
- ⁵² Surendra, K.; Krishnaveni, N. S.; Sridhar, R.; Rao, K. R. *J. Org. Chem.*, **2006**, 71, 5819.
- ⁵³ Denis, J. N.; Vicens, J.; Krief, A. *Tetrahedron Lett.*, **1979**, 29, 2697.
- ⁵⁴ Toshimitsu, A.; Aoai, T.; Owada, H.; Uemura, S.; Okano, M. *J. Am. Chem. Soc., Chem. Comm.*, **1980**, 9, 412.
- ⁵⁵ Toshimitsu, A.; Aoai, T.; Owada, H.; Uemura, S.; Okano, M. *Tetrahedron*, **1985**, 41 (22), 5301.
- ⁵⁶ Toru, T.; Yamada, Y.; Maekawa, E.; Ueno, Y. *Chem. Lett.*, **1987**, 1827.
- ⁵⁷ Torii, S.; Uneyama, K.; Ono, M. *Tetrahedron Lett.*, **1980**, 21, 2741.
- ⁵⁸ Crumbie, R. L.; Deol, B. S.; Nemorin, J. E.; Ridley, D. D. *Aust. J. Chem.*, **1978**, 31, 1965.
- ⁵⁹ Fujisawa, T.; Yamanaka, K.; Mobele, B. I.; Shimizu, M. *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 32, 399.
- ⁶⁰ Costa, C. E.; Clososki, G. C.; Barchesi, H. B.; Zanoto, S.; Nascimento, M. G.; Comasseto, J. V. *Tetrahedron Asymmetry*, **2004**, 15, 3945.
- ⁶¹ Gruttadauria, M.; Meo, P. L.; Riela, S.; D'Anna, F.; Noto, R. *Tetrahedron Asymmetry*, **2006**, 17, 2713.
- ⁶² Dissertação de Mestrado do Aluno Arthur Franz Keppler pela Universidade de São Paulo, Abril de 2005.
- ⁶³ Reich, H. J.; Renga, J. M.; Reich, I. L. *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, 97, 5434.
- ⁶⁴ Whitam, G. H. *Organosulfur Chemistry*, **1995**, Oxford, London.
- ⁶⁵ Miyoshi, N.; Yamamoto, T.; Kambe, N.; Murai, S.; Sonoda, N. *Tetrahedron Lett.*, **1982**, 23 (46), 4813.
- ⁶⁶ Magnus, P.; Rigollier, P. *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33 (41), 6111
- ⁶⁷ Engman, L. *J. Org. Chem.*, **1988**, 53, 4031.

- ⁶⁸ Houllemare, D.; Ponthieux, S.; Outurquin, F. Paulmier, C. *Synthesis*, **1996**, 101.
- ⁶⁹ Wang, J.; Li, H.; Mei, Y.; Lou, B.; Xu, B.; Xie, D.; Guo, H.; Wang, W. *J. Org. Chem.*, **2005**, 70, 5678.
- ⁷⁰ Whu, J.; Hou, X. L.; Dai, L. X.; Xia, L. J.; Tang, M. H. *Tetrahedron:Asymmetry*, **1998**, 9, 3431.
- ⁷¹ White, J. M.; Lambert, J. B.; Spiniello, M.; Jones, S., A.; Gable, R., W. *Chem. Eur. J.*, **2002**, 12, 2799
- ⁷² Patra, P. K.; Shanmugasundaram, K.; Matoba, M.; Nishide, K.; Kajimoto, T. *Synthesis*, **2005**, 3, 447.
- ⁷³ Cohen, T.; Ritter, R. H.; Oullette, D., *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, 104, 7142.
- ⁷⁴ Pinheiro, S.; Ferreira, V. F. *Quim. Nova*, **1998**, 21, 312.
- ⁷⁵ Fukazawa, T.; Hashimoto, T. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1993, 4, 2323.
- ⁷⁶ Gupta, A. K.; Kazlauskaz, R. J. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1993**, 879.
- ⁷⁷ Izumi, T.; Nakamura, T.; Eda, Y. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **1993**, 57, 175.
- ⁷⁸ Perrin, D. L.; Armarego, W. L.; Perrin, D. R. *Purification of Laboratory Chemicals*, **1996**, Pergamon Press, Oxford - UK.
- ⁷⁹ S. C. Watson, J. F. Eastham, *J. Organomet. Chem.* **1967**, 9, 165.
- ⁸⁰ Miyazawa, M.; Okamura, S.; Kameoka, H. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **1996**, 65, 171.
- ⁸¹ Zeynizadeh, B.; Behyar, T. *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, 16, 1200
- ⁸² Andrade, L. H.; Porto, A. L. M.; Keppler, A. F.; Comasseto, J. V. *J. Mol Catal. B: Enzymatic*, **2004**, 31, 129.

Parte B

Desmetilação/Desalquilação de Aminas Terciárias por Fungos

Aspergillus terreus

1.0 - Introdução

Aminas terciárias representam um importante grupo de elementos chave em muitos produtos naturais, especialmente em alcalóides e seus derivados¹, e também em fármacos. A remoção ou substituição de grupos *N*-alquila é frequentemente requerido em algum passo sintético do metabolismo de fármacos.

Quimicamente as reações oxidação de aminas incluem um número elevado de metodologias onde estas reações podem ser realizadas por BrCN (reação de von Braun)², *N*-iodosuccinamida³, reagentes sólidos como sílica gel⁴, catalisadores de rutênio⁵, iodo e óxido de cálcio⁶, iodozilbenzeno⁷, 1-cloroformiato⁸, ferro(II)⁹ e além destas metodologias, reações de oxidação de aminas terciárias podem ser realizadas via processos fitoquímicos¹⁰. De um modo geral, a oxidação por métodos químicos convencionais leva a formação de *N*-óxidos como sub-produto da reação¹¹.

Por outro lado, aminas terciárias podem ser desmetiladas por enzimas mono-oxigenases, envolvendo múltiplas reações enzimáticas, sendo que todas as reações envolvidas dependem de cofatores¹²⁻¹⁴. Desta forma, a natureza realiza elegantemente reações de desmetilação/desalquilação de aminas terciárias utilizando vias oxidativas conduzidas no citocromo P-450⁴. No entanto, o citocromo P-450 efetua reações de desalquilação de aminas terciárias com oxigênio molecular levando a formação de formaldeído e da amina secundária correspondente¹⁵, sem que haja formação de *N*-óxidos (Esquema 1).

2.0 - Objetivos

Nosso objetivo foi realizar reações de desmetilação e desalquilação de aminas terciárias, por meio de reações de biocatálise, utilizando fungos *Aspergillus terreus* (Esquema 2.1).

Esquema. 2.1 - Desmetilação de aminas terciárias utilizando fungos *Aspergillus terreus*

3.0 – Resultados e Discussão

As reações de desmetilação foram inicialmente realizadas utilizando-se três linhagens de fungos *Aspergillus terreus* (*A. terreus* SSP 1498, *A. terreus* URM 3571 e *A. terreus* URM 3371) frente as aminas **1** e **2**. Estas reações foram adotadas como reações modelos para esta transformação, conforme o Esquema 3.1.

As reações foram realizadas utilizando-se 5 g do fungo *A. terreus* e 5, 10 e 20 μL dos substratos sob condições neutras e básicas. As reações utilizando pH neutro foram realizadas em solução tampão fosfato (0,1 M, pH = 7), enquanto que as reações em meio básico foram realizadas em solução tampão borato (0,1 M, pH = 9). Condições alcalinas foram utilizadas para assegurar a existência das aminas na forma desprotonada.

Como pode ser verificado na Tabela 3.1, os três microrganismos utilizados foram eficientes na conversão da *N,N*-dimetil-anilina (**1**) na *N*-metil-anilina (**1a**) (Linhas 1,2,4,5,7 e 8) sendo que o valor da conversão aumentou no decorrer do tempo reacional. Após 10 dias de incubação, as conversões observadas foram relativamente altas, sendo que as conversões para as reações conduzidas em meio neutro foram ligeiramente superiores às realizadas em meio básico.

Aparentemente, a conversão foi independente do volume (5, 10 ou 20 μ L) de composto adicionado, pois para todos os sistemas reacionais, as conversões apresentaram valores superiores médios na ordem de 75-80 % de conversão no décimo dia de reação.

Os resultados mostraram que o fungo *A. terreus* URM 3371 apresentou melhores resultados quando a reação foi conduzida em pH = 7, onde obteve-se uma conversão de 100% para o tempo de 10 dias de reação. A reprodução das reações em escala quantitativa utilizando este fungo em pH = 7, levou ao isolamento do produto **1a**, em rendimentos moderados na ordem de 15 a 18 %. O produto foi purificado por cromatografia em coluna tendo sílica gel como fase estacionária. O acompanhamento das reações e a caracterização dos produtos foram realizadas via CG-MS (cromatografia gasosa associada a espectrometria de massas).

Os resultados obtidos para a biotransformação do composto *m*-metil-*N,N*-dimetil-anilina (**2**) em *m*-metil-*N*-metil-anilina (**2a**) indicam que as reações apresentaram comportamento análogos aqueles observados para a biotransformação do composto **1** (Linhas 2, 5 e 8). Novamente o valor da conversão aumentou no decorrer do tempo reacional e valores de conversão relativamente altos foram observados após 10 dias de incubação, sendo que, mais uma vez, as conversões para as reações conduzidas em meio neutro foram ligeiramente superiores às realizadas em meio básico.

Os resultados obtidos para as reações de desmetilação da amina **2** indicaram que o fungo *A. terreus* URM 3371 apresentou os melhores resultados, tanto para as reações realizadas em pH 7 como para as reações realizadas em pH 9. Quando a reação foi realizada utilizando-se 5 µL do substrato numa solução com pH 7, sendo que uma conversão de 100% foi obtida após o período de 10 dias.

3.3- Desalquilação de amins terciárias por fungos *A. terreus*.

Após os bons resultados obtidos nas reações de desmetilação das amins 1 e 2, decidimos estudar a desalquilação de amins terciárias. Para este estudo foram selecionada duas amins (Esquema 3.2).

Desta forma, a amins *N*-etil-*N,N*-dimetil (**3**) amina e *N,N*-dietil-anilina (**4**) também foram submetidas a reações biocatalisadas utilizando fungos *Aspergillus terreus*, porém, ao contrário das reações de desmetilação, nas condições utilizadas não se observou reações de desalquilação e/ou desmetilação para estes compostos.

4.0 – Conclusão

Os resultados obtidos indicaram que os fungos *Aspergillus terreus* apresentam grande potencial para reações de desmetilação de aminas terciárias aromáticas, sendo que as reações conduzidas em meio neutro (pH = 7) levaram aos produtos desmetilados com bons valores de conversão. No entanto, esse trabalho necessita de maiores investigações, inclusive com a utilização de novos compostos, porém estes resultados preliminares indicam que os fungos *A. terreus* podem ser utilizados neste tipo de reação.

5.0 – Referências Bibliográficas

- ¹ S.W. Pelletier, *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*, **1995**, vol. 10, Pergamon, New York-USA.
- ² von Braun, J., *J. Chem. Ber.* **1907**, 40, 3914.
- ³ Stenmark, H.G.; Brazzale, A.; Ma, Z. *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, 3875.
- ⁴ Rosenau, T.; Hoffinger, A.; Pothast, A.; Kosma, P. *Org. Lett.*, **2004**, 6, 541.
- ⁵ Murahashi, S-I.; Naota, T.; Yonemura, K. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 8256.
- ⁶ Acosta, K.; Cessac, J.W.; Rao, P.N.; Kim, H.K.; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 1985.
- ⁷ Baciocchi, E.; Lapi, A.; *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 40, 5425.
- ⁸ Pelander, A.; Ojanpera, I.; Hase, T.A.; *Forensic. Sci. Int.*, **1997**, 85, 193.
- ⁹ Monkovic, I.; Wong, H.; Bachand, C. *Synthesis*, **1985**, 8, 770.
- ¹⁰ Santamaria, J.; Ouchabane, R.; Ricaudy, J. *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30, 2927.
- ¹¹ Leising, R. A.; Ohman, J. S.; Acquare, J.H.; Takeuchi, K. J. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1989**, 905.
- ¹² Baciocchi, E.; Lapi, A. *Tetradedron Lett.*, **1999**, 40, 5425.
- ¹³ Macdonald, T. L.; Gutheim, W. G.; Martin, R. B.; Guengerich, F. P. *Biochemistry*, **1989**, 28, 2071.
- ¹⁴ Stenmark, H. G.; Brazzale, A.; Ma, Z. *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, 3875.
- ¹⁵ Ristau, O.; Wanerova, D. M.; Rein, H.; Ruckpaul, K. *J. Inorg. Biochem*, **1989**, 7, 111.

ANEXOS

Anexo 1 - Espectro RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) para o composto 1.

Anexo 2 - Espectro RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) para o composto 1.

Anexo 3 - Espectro RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) para o composto 2. Anexo 4 - Espectro RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) para o composto 2.

Anexo 5 - Espectro RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) para o composto 3.

Anexo 6 - Espectro RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) para o composto 3.

Anexo 7 - Espectro RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) para o composto 4.

Anexo 8 - Espectro RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) para o composto 4.

Anexo 9 - Espectro RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) para o composto *cis*-1a. Anexo 10 - Espectro RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) para o composto *cis*-1a.

Anexo 11 - Espectro RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) para o composto *trans*-1a.

Anexo 12 - Espectro RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) para o composto *trans*-1a.

Anexo 13 – Espectro RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) para o composto *cis*-2a.

Anexo 14 – Espectro RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) para o composto *cis*-2a.

Anexo 15 - Espectro RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) para o composto *trans*-2a.

Anexo 16 - Espectro RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) para o composto *trans*-2a.

Anexo 17 - Espectro RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) para o composto *cis*-3a.

Anexo 18 - Espectro RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) para o composto *cis*-3a.

Anexo 19 - Espectro RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) para o composto *trans*-3a.

Anexo 20 - Espectro RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) para o composto *trans*-3a.

Anexo 22 - Espectro RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) para o composto *cis*-4a.

Anexo 23 - Espectro RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) para o composto *trans*-4a.

Anexo 24 - Espectro RMN de ¹³C (500 MHz, CDCl₃) para o composto *trans*-4a.

Anexo 25 - Espectro na região do infravermelho para o composto 1b.

Anexo 26 - Espectro de Massas para o composto 1b.

Anexo 27 - Espectro na região do infravermelho para o composto 2b.

Anexo 28 - Espectro de Massas para o composto 2b.

Anexo 29 - Espectro na região do infravermelho para o composto 3b.

Anexo 30 - Espectro de Massas para o composto 3b.

Anexo 31 - Espectro na região do infravermelho para o composto 4b.

Anexo 32 - Espectro de Massas para o composto 4b.

TETASY 56745

14 June 2007 Disk used

ARTICLE IN PRESS

No. of Pages 5, Model Plus

ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Tetrahedron: *Asymmetry* xxx (2007) xxx–xxxTetrahedron:
Asymmetry

Biocatalytic reduction of a racemic selenocyclohexanone by Brazilian basidiomycetes

Leandro Piovan,^a Marina Capelari,^b Leandro H. Andrade,^a
João V. Comasseto^a and André L. M. Porto^{a,c,*}

^aInstituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, CEP 05508-900 São Paulo, SP, Brazil

^bSeção de Micologia e Liqueologia, Av. Miguel Estéfano, 3687, CEP 04301-902 São Paulo, SP, Brazil

^cInstituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador São-carlense, 400, CEP 13566-590 São Carlos-SP, Brazil

Received 10 April 2007; accepted 24 May 2007

Abstract—An efficient synthesis of the chiral cyclic secondary alcohols, *trans*-2-(phenylseleno)cyclohexanol **1a** and *cis*-2-(phenylseleno)cyclohexanol **1a**, was obtained by enzymatic reduction of 2-(phenylseleno)cyclohexanone **1** using whole fungal cells. Five strains of white-rot basidiomycetes were examined; *Irpex lacteus* CCB 196, *Pyrenopeziza sanguineus* CCB 196, *Trametes rigida* CCB 285, *Trametes versicolor* CCB 202 and *Trichaptum byssogenum* CCB 203. Cells of *T. rigida* CCB 285 gave alcohols *cis*-(*RS*)-**1a** and *trans*-(*SS*)-**1a** in high enantiomeric excesses (ca. 99%).

© 2007 Published by Elsevier Ltd.

Anexo 32 – Artigo aceito para publicação.

CURRICULUM VITAE

Nome: Leandro Piovan

Local de Nascimento: Cruzeiro D'Oeste – PR

Data de nascimento: 03 de outubro de 1981.

Educação

1998-2000 – Segundo Grau no Colégio Estadual Adolpho de Oliveira Franco, Astorga – PR.

2001-2005 – Licenciatura Plena em Química pela Universidade Estadual de Maringá – PR.

2005- Mestrado em Química Orgânica no Instituto de Química da Universidade de São Paulo, SP.

Publicações

1- Piovan, L.; Porto, A. L. M.; Andrade, L. H.; Capelari, M.; Comasseto, J. V. *Tetrahedron:Assymetry*, **2007**, *in press*.

Comunicações em Congressos

1- 11th Brazilian Meeting on Organic Synthesis – Agosto/Setembro, 2005 – Canela – RS.

Piovan, L.; Porto, A. L. M.; Andrade, L. H.; Comasseto, J. V.; Vale, J. “Demethylation of Tertuary Amines by *Aspergillus terreus*”

2- III Workshop de Biocatálise e II Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones – Fevereiro, 2006 – São Paulo – SP.

Piovan, L.; Porto, A. L. M.; Andrade, L. H.; Comasseto, J. V.; Vale, J.

“Desmetilação de Aminas Terciárias por *Aspergillus terreus*”.

3- 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – Maio, 2006 – Águas de Lindóia – SP.

Piovan, L.; Porto, A. L. M.; Andrade, L. H.; Comasseto, J. V.;

“Redução de cetonas α -seleniladas e α -sulfeniladas por *Pycnoporus sanguineus* CCB 501”

4- 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – Junho, 2007 – Águas de Lindóia – SP.

Piovan, L.; Porto, A. L. M.; Andrade, L. H.; Comasseto, J. V.;

“Redução de cicloalcanonas α -seleniladas e α -sulfeniladas por *Trametes rigida* CCB 285.”