

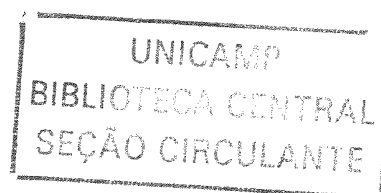
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA

**Reações de oxidação e hidrólise por Microrganismos nos métodos de
Biocatálise e de Biorremediação**

Tese apresentada pelo aluno do curso de doutorado
em química, **LUIZ ANTONIO MENDONÇA ALVES DA
COSTA**, ao Instituto de Química da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do título de
"Doctor Scientiae"

Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli
Orientadora

CAMPINAS
SÃO PAULO - BRASIL
MARÇO 2005



UNIDADE	UC
Nº CHAMADA	
+1/UNICAMP	
C823r	
V	EX
TOMBO BC	65243
PROC.	16-P-00086-05
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	11/08/05
Nº CPD	

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
DA UNICAMP

8181D-360434

C823r

Costa, Luiz Antonio Mendonça Alves da.
Reações de oxidação e hidrólise por
microrganismos nos métodos de biocatálise e de
biorremediação. — Campinas, SP: [s.n], 2005.

Orientador: Anita Jocelyne Marsaioli.

Tese – Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. Actinomicetos. 2. Fungos. 3. Sulfóxido. 4.
Sulfinato. I. Marsaioli, Anita Jocelyne. II. Instituto
de Química. III. Título.

Título em inglês: Reaction of oxidation and hydrolysis for microorganisms in
methods of biocatalysis and bioremediation

Palavras-chave em inglês: Actinomycetes; Fungi; Sulfoxide; Sulfinate.

Área de concentração: Química Orgânica.

Titulação: Doutor em Química Orgânica.

Banca examinadora: Maria da Graça Nascimento (UFSC); Brás Heleno de
Oliveira (UFPR); Ljubica Tasic (UNICAMP); Sebastião Ferreira Fonseca
(UNICAMP).

Data de defesa: 07/03/2005.

Ao amor da minha vida,
Adriana

Aos meus pais pelo
carinho, apoio e incentivo
durante o período do
doutorado.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus profundos agradecimentos a todos aqueles que colaboraram e compartilharam com o desenvolvimento deste trabalho.

Inicialmente a Profa. Dra. Anita, minha orientadora, pelo aprendizado, apoio e confiança em mim depositada.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida

Aos Doutores Gilson e Lara pela excelente colaboração.

Aos colegas e amigos do grupo (da época, antigos e novos) pelos diversos momentos dentro e fora do laboratório Bira, Paulo, Gelson, Laverde, Samisia, Marisa, Denise, André, Regina, Claudio, Bia, Mariza, Isis, Fernando, Eduardo, Mirele, Lu Chen, Lucimar, Suzan, Armando, Adriana e Diego.

Aos colegas e amigos de outros grupos de pesquisa: Valéria, Mirian, Mary Angela, Jair, Conceição, Maurício, Valéria, Antonio, Alex, Luiz, Luciana, Pilar, Paulo, Rosana, Regina, Marinaldo, Barbosa, Carlos, André, Catarina, Inês, Sidney, Marcelo dentre outros que infelizmente não poderei citar todos.

Aos colegas Ricardo, Sergio, Paulo, Bira, Virgu, Juliano, Júlio, Marcão e Rato pelos memoráveis momentos regados por cervejas geladas.

Aos professores do IQ-UNICAMP que direta ou indiretamente contribuíram ao meu aprendizado.

Aos funcionários do IQ-UNICAMP que contribuíram de maneira direta ou indireta para o desenvolvimento e conclusão do meu trabalho, em especial, a dedicada técnica D. Maria.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal de Roraima pelo apoio e minha liberação o que permitiu a conclusão deste trabalho.

CURRICULUM VITAE

Luiz Antonio Mendonça Alves da Costa

Naturalidade: Fortaleza – CE
Nacionalidade: Brasileira
e-mail: lacosta@dqui.ufrr.br

Formação Acadêmica

Graduação

Curso: Química industrial
Instituição: Universidade Federal do Ceará
Grau: Bacharel
Obtenção: 1995

Pós-Graduação

Curso: Mestrado em Química Orgânica
Instituição: Universidade Federal do Ceará
Orientadora: Dra. Profa. Selene Maia de Moraes
Dissertação: “Contribuição ao Conhecimento Químico de Plantas do Nordeste do Brasil: *Alpinia zerumbet* (Pers.) B. L. Burttet Smith”
Obtenção: 1999

Produção Científica

19 trabalhos apresentados de 1992 – 2004 dos quais os apresentados durante o doutorado são:

Porto, C.; da Costa, L.A.M.A. e Marsaioli, A. J. – **“Obtenção de sulfóxidos quirais por biocatálise”** – II Workshop de Biocatálise – II Biocat – Campinas, São Paulo, Brasil, 16 a 18 fevereiro de 2004.

da Costa, L.A.M.A. e Marsaioli, A. J. – **“Biocatalytic production and synthetic application of chiral sulfoxides”** – 10th Brazilian Meeting on Organic Synthesis – São Pedro, São Paulo, Brazil, 24 a 28 agosto, 2003.

da Costa, L.A.M.A. e Marsaioli, A. J. – **“Enantioselective oxidation of sulfides and sulfinic acid ester with the aid of Brazilian microorganisms”** - VI International Symposium on Biocatalysis and Biotransformation – Olomouc, Czech Republic, 28 junho a 3 julho, 2003.

Marsaioli, A. J.; Chen, L. S.; Pinheiro, L.; da Costa, L.A.M.A. e Bicalho, B. – **“Multi bioreaction screening, a tool to discover new enzymatic activities”**- VI

International Symposium on Biocatalysis and Biotransformation – Olomouc, Czech Republic, 28 junho a 3 julho, 2003.

da Costa, Luiz Antonio M. A e Marsaioli, A. J. -**“Estudo de oxidação enantiosseletiva de sulfinatos de alquila por microorganismos brasileiros”**- 26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – Poços de Caldas, 26 a 29 de maio de 2003.

da Costa, Luiz Antonio M. A. e Marsaioli, A. J. -**“Otimização para obtenção de sulfóxidos quirais com microorganismos brasileiros”**- 26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – Poços de Caldas, 26 a 29 de maio de 2003.

da Costa, Luiz Antonio M. A.; Sette, L. D.; Manfio, G. P. e Marsaioli, A. J. - **“Degradação de Alachlor por Actinomicetos do solo”**- 24ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – Poços de Caldas, 28 a 31 de maio de 2001.

Prêmio Recebido

1º Lugar no II Encontro de Bolsistas de Extensão - UFC - Fortaleza, novembro de 1993.

Publicações

Sette, L. D.; Da Costa, L.A.M.A. ;.Manfio, G.P. e Marsaioli, A. J. -**“Biodegradation of alachlor by soil Streptomyces”**- *Applied and Microbiology Biotechnology*, 2004, 64, 712-717.

Da Costa, L.A.M.A; De Moraes, S. M.; Dantas, M. C. B. R.; Lobo, R. A. C. M. e Fonteles, M. C. -**“Flavonóides com atividade hipotensora de *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt et Smith (colônia)”**- *Revista Brasileira de Farmácia*, 1998, 79, 96-98.

De Sousa, M. A.A.e Marques, E. D. – *Guia para Preparo de Apresentações Químicas* – 3ª edição, Fortaleza, 1998 – pg 88-91 (escrita por Luiz Antonio M. Alves da Costa)

RESUMO

Reações de oxidação e hidrólise por Microrganismos nos métodos de Biocatálise e de Biorremediação

Luiz Antonio Mendonça Alves da Costa
Orientadora : Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli

Palavras-chave: biorremediação, Actinomicetos, fungos, sulfóxido, sulfinato e alachlor.

O presente trabalho foi dividido em dois projetos: a avaliação do potencial biocatalítico de microrganismos isolados da abelha *Trigonna sp* e o estudo de biorremediação de ambiente contaminado por Alachlor®.

A atividade catalítica de oxidação de sulfeto e a hidrólise de éster sulfinico de 12 linhagens de fungos foi avaliada durante a primeira parte deste trabalho, dentre dentre das quais, 8 linhagens foram isoladas do corpo da abelha *Trigonna sp* em trabalhos anteriores do nosso grupo. Os melhores microrganismos na oxidação enantiosseletiva do etil fenil sulfeto foram os Fungo CCT 5553 e *Cladosporium sp.* CBMAI 0210 que produziram o (S)-etil-fenil-sulfóxido (ee > 99%) e (R)-etil-fenil-sulfóxido (ee 97%), respectivamente. O (S)-etil-fenil-sulfóxido (ee > 92%) foi aplicado na síntese da S-(+)-4-metil-3-heptanona, feromônio de alarme da formiga do gênero *Atta*, mas uma racemização durante a eliminação do grupo sulfinila impossibilitou a síntese total.

Para a resolução enzimática de (±)-benzenossulfinato de cicloexila foi selecionado os fungos *Penicillium sp.* CBMAI 0208 e *Aspergillus ochraceus* CBMAI 0211 ambos fornecendo os produtos com excessos enantioméricos > 99 %.

Na segunda etapa, avaliou-se a capacidade de degradação do pesticida Alachlor® de 6 linhagens de bactérias (*Streptomyces sp.*) e as estruturas dos produtos de degradação foram sugeridas baseados em seus padrões de fragmentação. Entre esses 8-etil-quinolina e N-metil-8-etil-indol nunca foram citados nos estudos de biodegradação do Alachlor®.

ABSTRACT

Reaction of oxidation and Hydrolysis for Microorganisms in methods of Biocatalysis and Bioremediation

Luiz Antonio Mendonça Alves da Costa
Adviser : Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli

Key words: bioremediation, Actinomycetes, fungi, sulfoxide, sulfinate and alachlor.

The work presented in this thesis is divided into two projects: the evaluation of the biocatalytic potential of microorganisms isolated from *Trigonna* bee and those deposited in two brazilian collections and bioremediation of Alachlor contaminated soil.

The sulfide oxidation and sulfinic esters hydrolysis catalytic activity was screened using 12 different fungi strains, 8 of which were previously isolated from a *Trigonna* sp. bee. The best microorganisms for the enantioselective oxidation of ethyl phenyl sulfide were Fungus CCT 5553 and *Cladosporium* sp. CBMAI 0210 which produced (*R*)-ethyl phenyl sulfoxide (ee 97%) and (*S*)- ethyl phenyl sulfoxide (ee > 99%) respectively. The chiral (*S*)- ethyl phenyl sulfoxide which was applied in the synthesis of *S*-(+)-4-methyl-3-heptanone, ant alarm pheromone (genus *Atta*), of but racemization during sulfinyl group elimination step precluded the total asymmetric synthesis.

For the enzymatic resolution of the cyclohexyl ($\pm$)-benzenosulfinate we have selected *Penicillium* sp. CBMAI 0208 and *Aspergillus ochraceus* CBMAI 0211 both with the capacity of resolving the sulfinate in over 99 enantiomeric excess.

In the second part, the Alachlor[®] degradation potential of 6 bacterium strains (*Streptomyces* sp.) was evaluated and the structures of biodegradation products were suggested based on their mass fragmentation patterns. Among these 8-ethyl-quinoline and *N*-methyl-8-ethyl-indole have never been mentioned as Alachlor biodegradation products before.

SUMÁRIO

	página
Lista de Figuras.....	xix
Lista de Tabelas.....	xxi
Lista de Fluxogramas.....	xvi
Lista de Gráficos.....	xxi
Lista de Esquemas.....	xxiii
Lista de Espectros.....	xxvii
Lista de Cromatogramas.....	xxxi
Lista de Símbolos e Abreviaturas.....	xxxix
01. INTRODUÇÃO.....	01
02. OBJETIVOS.....	07
03. BIOCATÁLISE.....	08
3.1. Introdução à Biocatálise.....	08
3.1.1. Oxidorredutase.....	10
3.1.2. Transferases.....	14
3.1.3. Hidrolases.....	16
3.1.4. Liases.....	20
3.1.5. Isomerases.....	21
3.1.6. Ligases.....	24
3.2. Aspectos Termodinâmicos das Reações Enzimáticas.....	26
04. BIOCATÁLISE DE ORGANOSSULFURADOS.....	28
4.1. Organossulfurados em Síntese.....	28
4.2. Sulfóxidos quirais por biocatálise.....	32
4.2.1. Resultados e discussão.....	40
4.2.1.1. Preparação dos padrões para seleção de microrganismos.....	41
4.2.1.2. Seleção de microrganismos pela oxidação do etil-fenil-sulfeto.....	44

	página
4.2.1.3. Obtenção do 3-tio-fenóxi-1-cicloexanona 128 e o sulfóxido correspondente 3-fenil-sulfinil-1-cicloexanona 129.....	55
4.2.1.4. Obtenção do 2-tio-fenil-acetato de metila 130 e o sulfóxido correspondente 2- fenil-sulfinil-acetato de metila 131.....	57
4.2.1.5. biooxidação dos compostos 128 e 130 com <i>A. terreus</i> CCT 3320....	58
4.3. Aplicação de sulfóxidos quirais obtidos por biocatálise.....	59
4.3.1 Síntese de Silverstein.....	61
4.3.2 Planejamento da Síntese.....	62
4.3.3. Resultados e discussão.....	65
4.3.3.1. Preparo do éster, do haleto de alquila e do níquel de Raney W-2....	65
4.3.3.2. Síntese do (±)-2-fenil-sulfinil-3-pentanona 152a.....	67
4.3.3.3. Síntese do (±)-4-metil-4-fenil-sulfinil-3-heptanona 147a.....	68
4.3.3.4. Dessulfurização do (±)-4-metil-4-fenil-sulfinil-3-heptanona 147a.....	69
4.3.3.5. Obtenção do (S)-etil-fenil-sulfóxido enriquecido por biocatálise.....	71
4.3.3.6. Síntese da (S)-4-metil-3-heptanona 141.....	72
4.4. Sulfinatos Quirais por biocatálise.....	74
4.4.1. Resultados e discussão.....	77
4.4.1.1. Síntese do substrato e padrão.....	78
4.4.1.2. Avaliação de microrganismos na resolução do sulfinato 158.....	81
4.4.1.3. Otimização da resolução do sulfinato 158.....	84
4.4.1.4. Preparação de sulfóxido quiral a partir de sulfinato quiral obtido por biocatálise.....	91
4.4.1.4.1. Determinação da configuração absoluta do benzenossulfinato de cicloexila 158.....	91
4.5. Conclusão Parcial.....	94
05. BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO.....	95
5.1. Introdução à Biorremediação.....	95
5.2. Resultados e Discussão.....	104

	página
5.2.1. Otimização da obtenção dos extratos.....	104
5.2.2. Biodegradação do Alachlor pelas linhagens de <i>Streptomyces</i>	106
5.2.2.1. Biodegradação dos produtos de hidrólise do Alachlor.....	106
5.2.2.2. Biodegradação do Alachlor pela linhagem LS182.....	117
5.3. Conclusão Parcial.....	122
06. CONCLUSÃO.....	123
07. Experimental.....	124
7.1. Notas Gerais.....	124
7.2. Microrganismos.....	126
7.3. Crescimento dos Microrganismos para as Reações de Biocatálise com Organossulfurados.....	127
7.4. Crescimento dos Microrganismos e reação de Biodegradação com alachlor Hidrolisado.....	128
7.5. Crescimento dos Microrganismos e reação de Biodegradação com alachlor.....	128
7.6. Obtenção das amostras a serem analisadas.....	129
7.7. Meios de Cultura e Solução Tampão.....	129
7.8. Esterilização.....	131
7.9. Outros.....	132
7.10. Procedimento experimental e dados espectroscópicos dos compostos sintetizados.....	132
7.10.1. Etil-fenil-sulfeto (105).....	132
7.10.2. (±)-Etil-fenil-sulfóxido (106).....	133
7.10.3. 3-tiofenóxi-1-cicloexanona (128).....	134
7.10.4. 3-fenilsulfinil-1-cicloexanona (129).....	135
7.10.5. 2-tiofenil-acetato de metila (130).....	136
7.10.6. 2-fenil-sulfinil-acetato de metila (131).....	137
7.10.7. Propionato de etila (155).....	138

	página
7.10.8. Iodeto de <i>n</i> -propila (157).....	139
7.10.9. (±)-2-fenil-sulfinil-3-pentanona (152a).....	139
7.10.10. (±)-4-metil-4-fenil-sulfinil-3-heptanona (147a).....	140
7.10.11. (±)-4-metil-3-heptanona (141).....	141
7.10.12. benzenossulfinato de cicloexila (158).....	142
7.10.13. Benzenossulfinato de metila (159).....	143
7.10.14. Determinação da configuração absoluta do benzenossulfinato de cicloexila (158).....	144
ANEXO 1.....	145
ESPECTROS.....	148
CROMATOGRAMAS.....	171

LISTA DE FIGURAS

	página
Figura 1 Louis Pasteur e os balões com gargalos longos e dobrados.....	02
Figura 2 Representação filogenética derivada da análise de sequências do ácido ribonucleico ribossomal (rRNA).....	03
Figura 3 Desenhos dos aspectos de <i>Streptomyces sp.</i>	04
Figura 4 Morfologia das hifas (A) não-septadas; (B) septadas com células mononucleares; (C) septadas com células multinucleares	05
Figura 5 Tipos de compostos produzidos utilizando processos biotecnológicos (baseado em 134 processos).....	06
Figura 6 Coenzimas dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD ⁺) e seu homólogo fosforilado (NADP ⁺).....	13
Figura 7 Coenzimas mononucleotídeo de flavinas (FMN) e o dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD).....	14
Figura 8 Trifosfato de adenosina.....	15
Figura 9 Representação do sítio catalítico da carboxipeptidase A.....	19
Figura 10 O grupo grande (G) e médio (M) no álcool primário e no ácido carboxílico e o ponto de quiralidade na posição α ao ponto de hidrólise.....	19
Figura 11 Diagrama de energia da reação com catalisador e sem catalisador. S = substrato, P = produto, E = enzima, E•S = complexo enzima – substrato, $\Delta G^\ddagger$ = energia livre de ativação e $\ddagger$ denota o estado de transição.....	26
Figura 12 Representações de sulfóxidos.....	30
Figura 13 Estado de transição proposto por Kagan.....	31
Figura 14 Biotina e (-)-S-óxido-biotina.....	33
Figura 15 (a) Estrutura da porfirina e (b) Protoporfirina IX.....	37
Figura 16 Produto de hidroxilação do tioanisol pelo citocromo P-450.....	39
Figura 17 Produtos de transformação do alachlor detectados no solo e água.....	99

	página
Figura 18 Crescimento em placa das linhagens LS153, LS151 e LS143 (<i>Streptomyces sp</i>).....	103
Figura 19 Crescimento em placa das linhagens LS166, LS177 e LS182 (<i>Streptomyces sp</i>).....	103
Figura 20 Extração do meio reacional por microcoluna de C-18.....	109
Figura 21 Oalachlor 167 e seus derivados detectados pela hidrólise espontânea no experimento controle.....	110
Figura 22 Derivados doalachlor 167 detectados pela biodegradação pelo <i>Streptomyces sp</i>	112
Figura 23 a) Espectro de massas do composto 193 e b) Espectro de massas do composto 194	114
Figura 24 Técnica de diluições para contagem em placas.....	147

LISTA DE TABELAS

		página
Tabela 1	Classificação das enzimas.....	09
Tabela 2	Principais compostos organossulfurados divalente, tricoordenado e tetracoordenado.....	29
Tabela 3	Biotransformação de aril e benzil sulfetos por <i>A. niger</i>	34
Tabela 4	Reações de oxidação enzimática do sulfeto com células de fungos.....	47
Tabela 5	Resolução cinética do sulfinato ($\pm$)- 158 com células de fungos.....	82
Tabela 6	Resolução enzimática do sulfinato ($\pm$)- 158 com <i>A. terreus</i> CCT 3320.....	85
Tabela 7	Produtos de transformação do alachlor detectados no solo e água.....	100
Tabela 8	Produtos de degradação do alachlor 167 detectados pela análise de CG-EM.....	113
Tabela 9	Principais fragmentos e abundâncias relativas de alguns produtos de biodegradação do alachlor 167	115
Tabela 10	Linhagens e seus registros nas coleções.....	127
Tabela 11	Solução tampão de Sorensen.....	131

LISTA DE FLUXOGRAMAS

		página
Fluxograma 1	Esquema de preparação das amostras a serem analisadas.....	108
Fluxograma 2	Esquema de isolamento das 6 linhagens.....	145

LISTA DE GRÁFICOS

		página
Gráfico 1	Gráfico das reações nas resoluções enzimáticas de 158 com células em repouso de <i>A. terreus</i> CCT 3320 a) pH = 7,00 e b) pH = 7,2.....	88

LISTA DE ESQUEMAS

		página
Esquema 1	Reação de oxigenação enzimática no átomo de enxofre...	10
Esquema 2	Reações típicas catalisadas pelas monooxigenases.....	12
Esquema 3	Comparação das reações realizadas pela fosfatase, fosfodiesterase e quinase.....	15
Esquema 4	Mecanismo para o piruvatoquinase (ATP é representado como POPOPOAdo).....	16
Esquema 5	Reações típicas catalisadas pelas hidrolases.....	17
Esquema 6	Mecanismo da reação de hidrólise catalisada pela serina-hidrolase.....	18
Esquema 7	Mecanismos de aldolases: Tipo I e o Tipo II.....	20
Esquema 8	(A) mecanismo da racemização (epimerização) com a partição de uma base, (B) mecanismo da racemização (epimerização) com a partição de duas bases.....	22
Esquema 9	Mecanismo da reação <i>cis</i> -enodiol catalisada pela aldose-cetose isomerase.....	23
Esquema 10	Mecanismo de transferência de hidrogênio pela aldose-cetose isomerase.....	23
Esquema 11	Reações típicas catalisadas pelas isomerases através da migração [1,3]. (A) tautomerase, (B) alil isomerase e (C) acetoacetato isomerase.....	23
Esquema 12	Proposta do mecanismo da reação catalisada pela retinol isomerase.....	24
Esquema 13	Reações típicas catalisadas pelas ligações para formação da ligação C-N. (A) amônia ligase, (B) peptídeo sintetase e (C) ciclo ligase.....	25
Esquema 14	Mecanismo de racemização de sulfóxidos alílicos.....	29
Esquema 15	Representação da reação de oxidação de 82 realizada com o sistema Kagan-Modena.....	30

	página
Esquema 16	Obtenção de sulfóxido quiral pelo método de Andersen.... 31
Esquema 17	Obtenção do (-)-(S)- <i>p</i> -toluenossulfonato de mentila..... 32
Esquema 18	Oxidação de metil- <i>p</i> -toluil-sulfeto 100 por <i>Helminthosporium</i> <i>sp.</i> obtendo o enantiômero <i>S</i> do sulfóxido 86 35
Esquema 19	Oxidação de etil-fenil-sulfeto 105 por <i>Helminthosporium</i> <i>sp.</i> NRRL 4671 e <i>Mortierella isabellina</i> NRRL 1757..... 35
Esquema 20	Proposta do mecanismo de oxidação do sulfeto pelo CYT P-450..... 38
Esquema 21	Proposta do mecanismo para S-desalquilação do sulfeto pelo citocromo P-450..... 38
Esquema 22	Proposta do mecanismo de oxidação do sulfeto por MOs dependentes de flavo-proteínas..... 39
Esquema 23	Obtenção do sulfeto 105 42
Esquema 24	Obtenção do sulfóxido 106 43
Esquema 25	Reação de biotransformação do sulfeto 105 45
Esquema 26	Biooxidação dos sulfetos 105 , 121 e 124 pela linhagem de <i>A. terreus</i> CCT 3320..... 54
Esquema 27	Preparação do sulfeto 128 55
Esquema 28	Obtenção do sulfóxido 129 56
Esquema 29	Obtenção do sulfeto 130 57
Esquema 30	Preparação do sulfeto 131 58
Esquema 31	Reações de sulfetos com complexo Co(II)-O ₂ 59
Esquema 32	Grupos funcionais acessíveis a partir de sulfóxidos quirais..... 60
Esquema 33	Síntese de Silverstein do feromônio de alerta da formiga <i>Atta texana</i> 62
Esquema 34	Análise retróssintética para (S)-(+)-4-metil-3-heptanona 141 62

	página
Esquema 35	Esquema da dialquilação..... 63
Esquema 36	Modelo proposto por Ogura e colaboradores..... 63
Esquema 37	Reação tipo aldol realizada por Kosugi..... 64
Esquema 38	Proposta de síntese do feromônio da formiga <i>Atta texana</i> . 64
Esquema 39	Obtenção do propionato de etila..... 65
Esquema 40	Obtenção do iodeto de <i>n</i> -propila 157 66
Esquema 41	Obtenção do composto 152a racêmico..... 67
Esquema 42	Obtenção do composto 147a racêmico..... 68
Esquema 43	Obtenção do feromônio 141 racêmico..... 69
Esquema 44	(i) hidrólise e (ii) oxidação do sulfinato por microrganismo. 75
Esquema 45	Resolução cinética de sulfinatos de <i>n</i> -alquilas com células de <i>C.equi</i> IFO 3730..... 75
Esquema 46	Resolução cinética de α -sulfinil-acetatos de metila com células de <i>C.equi</i> IFO 3730..... 76
Esquema 47	Proposta para a obtenção de sulfóxido quiral a partir do sulfinato de alquila..... 77
Esquema 48	Esquema da resolução cinética dinâmica (RCD)..... 78
Esquema 49	Obtenção do ($\pm$)-benzenossulfinato de cicloexila 158 78
Esquema 50	Obtenção do ($\pm$)-benzenossulfinato de metila 159 80
Esquema 51	Resolução enzimática de ($\pm$)- 158 84
Esquema 52	Proposta para epimerização do sulfinato pela oxidação e redução do enxofre..... 88
Esquema 53	Proposta para a resolução cinética dinâmica do benzenossulfinato de cicloexila ($\pm$)- 158 com células de <i>A. terreus</i> CCT 3320..... 89
Esquema 54	Proposta para a racemização do ácido sulfínico..... 90
Esquema 55	Reação de obtenção do sulfóxido 106 pela reação com Grignard..... 92

		página
Esquema 56	Proposta do Mecanismo de reação do tipo S _N 2.....	93
Esquema 57	Esquema da degradação do alachlor pelo <i>C. globosum</i>	98
Esquema 58	Proposta para a biotransformação do alachlor 167 e da formação do mercapturato 190 e da cisteína conjugada 191	101
Esquema 59	Proposta de MacLean para a fragmentação do produto de transformação 193	115
Esquema 60	Proposta de fragmentação do produto de transformação 194	116
Esquema 61	Proposta da rota de biotransformação do alachlor 167	120
Esquema 62	Proposta do mecanismo da ciclização por "Horseradish peroxidase".	120

LISTA DE ESPECTROS

	página
E 01 Espectro de massas (IE, 70 eV) do etil-fenil-sulfeto 105	148
E 02 Espectro de RMN de ^1H (300,07 MHz, CDCl_3) do etil-fenil-sulfeto 105	148
E 03 Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) do etil-fenil-sulfeto 105	149
E 04 Espectro DEPT 90 e 135° (75,45 MHz, CDCl_3) do etil-fenil-sulfeto 105	149
E 05 Espectro de massas (IE, 70 eV) do etil-fenil-sulfóxido 106	150
E 06 Espectro de RMN de ^1H (300,07 MHz, CDCl_3) do etil-fenil-sulfóxido 106	150
E 07 Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) do etil-fenil-sulfóxido 106	151
E 08 Espectro DEPT 90 e 135° (75,45 MHz, CDCl_3) do etil-fenil-sulfóxido 106	151
E 09 Espectro de massas (IE, 70 eV) do 3-tiofenóxi-1-cicloexanona 128	152
E 10 Espectro de RMN de ^1H (300,07 MHz, CDCl_3) do 3-tiofenóxi-1-cicloexanona 128	152
E 11 Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) do 3-tiofenóxi-1-cicloexanona 128	153
E 12 Espectro DEPT 90 e 135° (75,45 MHz, CDCl_3) do 3-tiofenóxi-1-cicloexanona 128	153
E 13 Espectro de RMN de ^1H (300,07 MHz, CDCl_3) do 3-fenil-sulfinil-1-cicloexanona 129	154
E 14 Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) do 3-fenil-sulfinil-1-cicloexanona 129	154
E 15 Espectro DEPT 90 e 135° (75,45 MHz, CDCl_3) do 3-fenil-sulfinil-1-cicloexanona 129	155

	página
E 16 Espectro de massas (IE, 70 eV) do 2-tiofenil-acetato de metila 130	156
E 17 Espectro de RMN de ^1H (300,07 MHz, CDCl_3) do 2-tiofenil-acetato de metila 130	156
E 18 Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) do 2-tiofenil-acetato de metila 130	157
E 19 Espectro DEPT 90 e 135° (75,45 MHz, CDCl_3) do 2-tiofenil-acetato de metila 130	157
E 20 Espectro de massas (IE, 70 eV) do 2-fenil-sulfinil-acetato de metila 131	158
E 21 Espectro de RMN de ^1H (300,07 MHz, CDCl_3) do 2-fenil-sulfinil-acetato de metila 131	158
E 22 Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) do 2-fenil-sulfinil-acetato de metila 131	159
E 23 Espectro DEPT 90 e 135° (75,45 MHz, CDCl_3) do 2-fenil-sulfinil-acetato de metila 131	159
E 24 Espectro de massas (IE, 70 eV) do propionato de etila 155	160
E 25 Espectro de massas (IE, 70 eV) do iodeto de <i>n</i> -propila 157	160
E 26 Espectro de RMN de ^1H (300,07 MHz, CDCl_3) do iodeto de <i>n</i> -propila 157	161
E 27 Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) do iodeto de <i>n</i> -propila 157	161
E 28 Espectro de RMN de ^1H (300,07 MHz, CDCl_3) do ($\pm$)-2-fenil-sulfinil-3-pentanona 152a	162
E 29 Espectro de RMN de ^1H (300,07 MHz, CDCl_3) do ($\pm$)-4-metil-4-fenil-sulfinil-3-heptanona 147a	162
E 30 Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) do ($\pm$)-4-metil-4-fenil-sulfinil-3-heptanona 147a	163

		página
E 31	Espectro de massas (IE, 70 eV) do (±)-4-metil-3-heptanona 141	163
E 32	Espectro de massas (IE, 70 eV) do (±)-benzenossulfonato de cicloexila 158	164
E 33	Espectro de RMN de ¹ H (300,07 MHz, CDCl ₃) do (±)-benzenossulfonato de cicloexila 158	164
E 34	Espectro de RMN de ¹³ C (75,45 MHz, CDCl ₃) do (±)-benzenossulfonato de cicloexila 158	165
E 35	Espectro DEPT 90 e 135° (75,45 MHz, CDCl ₃) do (±)-benzenossulfonato de cicloexila 158	165
E 36	Espectro de massas (IE, 70 eV) do (±)-benzenossulfonato de metila 159	166
E 37	Espectro de RMN de ¹ H (300,07 MHz, CDCl ₃) do (±)-benzenossulfonato de metila 159	166
E 38	Espectro de RMN de ¹³ C (75,45 MHz, CDCl ₃) do (±)-benzenossulfonato de metila 159	167
E 39	Espectro DEPT 90 e 135° (75,45 MHz, CDCl ₃) do (±)-benzenossulfonato de metila 159	167
E 40	Espectro de massas (IE, 70 eV) doalachlor 167	168
E 41	Espectro de massas (IE, 70 eV) do 2-cloro-2',6'-dietilacetanilida 168	168
E 42	Espectro de massas (IE, 70 eV) do 2,6-dietilanilina 170	168
E 43	Espectro de massas (IE, 70 eV) do 1-cloroacetil-2,3-diidro-7-etilindol 171	168
E 44	Espectro de massas (IE, 70 eV) do N-(2',6'-dietil-fenil)-metileneamina 172	169
E 45	Espectro de massas (IE, 70 eV) do 7-etil-indol 173	169
E 46	Espectro de massas (IE, 70 eV) do 2',6'-dietil-acetanilida 175	169

	página
E 47 Espectro de massas (IE, 70 eV) do 2-hidroxi-2',6-dietil- <i>N</i> -(metoxi-metil)-acetanilida 181	169
E 48 Espectro de massas (IE, 70 eV) do 7-etil-2-metoxi-3-metil-indol 192	170
E 49 Espectro de massas (IE, 70 eV) do 7-etilquinolina 193	170
E 50 Espectro de massas (IE, 70 eV) do 7-etil- <i>N</i> -metil-indol 194	170

LISTA DE CROMATOGRAMAS

	página
C 01 Cromatogramas (GC-FID) equipado com coluna capilar quiral (2,6-dimetil-3-pentil)- β -ciclodextrina (25 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), detector 220 °C, injetor 200 °C, gás de arraste (H ₂ , 10 psi) do padrão do a) etil-fenil-sulfeto 105, b) etil-fenil-sulfóxido 106 e c) etil-fenil-sulfona 107.....	44
C 02 Cromatogramas (GC-FID) obtidos pela reação enzimática com células em repouso de fungos. a) <i>Penicillium</i> sp. CBMAI 0208 com 24 hs e b) <i>Penicillium</i> sp. CBMAI 0208 com 48 hs.....	45
C 03 Cromatogramas (GC-FID) obtidos pela reação enzimática com células em repouso de fungos. a) Fungo CCT 5553 com 24 hs, b) Fungo CCT 5553 com 48 hs, c) Fungo CCT 5553 com 72 hs, d) Fungo CCT 5553 com 96 hs, e) <i>Cladosporium</i> sp. CBAMAI 0210 com 24 hs, f) <i>Cladosporium</i> sp. CBAMAI 0210 com 48 hs, g) <i>Cladosporium</i> sp. CBAMAI 0210 com 72 hs e h) <i>Cladosporium</i> sp. CBAMAI 0210 com 96 hs.....	46
C 04 Cromatogramas (GC-FID) obtidos pela reação enzimática com células em repouso de fungos. a) <i>Aspergillus</i> sp. CBMAI 0207 com 24 hs, b) <i>Aspergillus</i> sp. CBMAI 0207 com 48 hs, c) <i>Aspergillus</i> sp. CBMAI 0207 com 72 hs e d) <i>Aspergillus</i> sp. CBMAI 0207.....	48
C 05 Cromatogramas (GC-FID) obtidos pela reação enzimática com células em repouso de fungos. a) <i>G. candidum</i> CCT 1205 com 24 hs, b) <i>G. candidum</i> CCT 1205 com 72 hs, c) <i>G. candidum</i> CCT 1205 com 96 hs, d) <i>A. niger</i> CCT 1435 com 24 hs, e) <i>A. niger</i> CCT 1435 com 48 hs, f) <i>A. niger</i> CCT 1435 com 72 hs e g) <i>A. niger</i> CCT 1435 com 96 hs.....	50

	página
C 06 Cromatogramas (GC-FID) obtidos pela reação enzimática com células em repouso de fungos. a) <i>R. oryzae</i> CCT 4964 com 24 hs, b) <i>R. oryzae</i> CCT 4964 com 48 hs, c) <i>R. oryzae</i> CCT 4964 com 72 hs, d) <i>Trichoderma</i> sp. CCT 5551 com 24 hs, e) <i>Trichoderma</i> sp. CCT 5551 com 48 hs, f) <i>Trichoderma</i> sp. CCT 5551 com 72 hs e g) <i>Trichoderma</i> sp. CCT 5551 com 96 hs.....	51
C 07 Cromatogramas (GC-FID) obtidos pela reação enzimática com células em repouso de fungos. a) <i>Nodulisporium</i> sp. CCT 5552 com 24 hs, b) <i>Nodulisporium</i> sp. CCT 5552 com 48 hs, c) <i>Nodulisporium</i> sp. CCT 5552 com 72 hs, d) <i>Nodulisporium</i> sp. CCT 5552 com 96 hs, e) Fungo de abelha CBMAI 0209 com 48 hs, f) <i>Trichoderma</i> sp. CCT 5551 com 72 hs, g) <i>Penicillium</i> sp. CBMAI 0209 com 96 hs e h) <i>Penicillium</i> sp. CBMAI 0209 com 96 hs.....	52
C 08 Cromatogramas (GC-FID) obtidos pela reação enzimática com células em repouso de fungos. a) <i>A. ochraceus</i> CBMAI 0211 com 24 hs, b) <i>A. ochraceus</i> CBMAI 0211 com 48 hs e c) <i>A. ochraceus</i> CBMAI 0211 com 96 hs.....	53
C 09 Cromatograma de íon totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida HP-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), da reação de dessulfurização do composto (±)-147a.....	70
C 10 Cromatograma de íon totais (CG-EM) equipado com coluna capilar quiral Chrompack CD-chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 µm), detector 280 °C, injetor 150 °C, gás de arraste (He ,10 psi) obtido da reação de dessulfurização do composto (±)-147a.....	70
C 11 Cromatograma (GC-FID) obtido pela reação enzimática em escala analítica com células em repouso de <i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 0210 com 96hs de reação.....	71

	página
C 12 Cromatograma de íon totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida HP-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), da reação de dessulfurização do composto 147 enriquecido.....	73
C 13 Cromatograma de íon totais (CG-EM) equipado com coluna capilar quiral Chrompack CD-chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 µm), detector 280 °C, injetor 150 °C, gás de arraste (He ,10 psi) obtido da reação de dessulfurização do composto 147 enriquecido.....	74
C 14 Cromatogramas (GC-FID) equipado com coluna capilar quiral (2,6-dimetil-3-pentil)- β -ciclodextrina (25 m x 0,25 mm x 0,25 µm), detector 220 °C, injetor 200 °C, gás de arraste (H ₂ ,10 psi) do padrão do a) benzenossulfonato de metila 159 e b) benzenossulfonato de cicloexila 158 .	81
C 15 Cromatogramas (GC-FID) obtidos pela reação enzimática com células em repouso de fungos. a) <i>G. candidum</i> CCT 1205, b) <i>A. niger</i> CCT 1435, c) <i>R. oryzae</i> CCT 4964, d) <i>Trichoderma</i> sp. CCT 5551, e) <i>Nodulisporium</i> sp. CCT 5552, f) Fungo CCT 5553, g) <i>Aspergillus</i> sp. CBMAI 0207, h) Fungo CBMAI 0205, i) <i>Penicillium</i> sp. CBMAI 0208, j) <i>Penicillium</i> sp. CBMAI 0209, l) <i>A. terreus</i> CCT 3320 e m) <i>A. ochraceus</i> CBMAI 0211.....	83
C 16 Cromatogramas (GC-FID) obtidos pela reação enzimática com células em repouso de <i>A. terreus</i> CCT 3320. a) 3 horas (pH = 7,0), b) 6 horas (pH = 7,0), c) 9 horas (pH = 7,0), d) 12 horas (pH = 7,0), e) 24 horas (pH = 7,0) e f) 3 horas (pH = 7,2), g) 6 horas (pH = 7,2), h) 9 horas (pH = 7,2), i) 12 horas (pH = 7,2) e j) 24 horas (pH = 7,2).....	86-87
C 17 Cromatograma (GC-FID) obtido pela reação enzimática em escala analítica com células em repouso de <i>A. terreus</i> CCT 3320 com 12hs de reação em pH = 7,0.....	91

	página
C 18 Cromatograma (GC-FID) obtido pela reação com Grignard na obtenção do etil-fenil-sulfóxido 106	92
C 19 a) alachlor comercial dissolvido em CH ₂ Cl ₂ b) extrato CH ₂ Cl ₂ da solução aquosa de alachlor comercial (125 µL. L ⁻¹).....	104
C 20 a) Fração 1 de CH ₂ Cl ₂ em sílica-gel b) Fração 2 de CH ₂ Cl ₂ em sílica-gel.....	105
C 21 CIT do teste de extração por C-18 da biotransformação do alachlor por pela linhagem LS 182.....	106
C 22 Cromatogramas de íons totais (representativos) de a: Alachlor comercial dissolvido em CH ₂ Cl ₂ b: controle do alachlor hidrolisado c: Produtos da biotransformação da amostra 1 pelas linhagens de <i>Streptomyces</i> . Os números de picos são relacionados aos derivados do alachlor relacionados nas Figuras 21 e 23 . Condições cromatográficas: coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He,10 psi).....	111
C 23 Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He,10 psi) da amostra controle CAH A7.....	171
C 24 Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He,10 psi) da amostra controle CAH A8.	171
C 25 Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He,10 psi) da amostra controle CAH B2.....	171

	página
C 26 Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He,10 psi) da amostra controle CAH B6.....	172
C 27 Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He,10 psi) da amostra AHLS143A.....	172
C 28 Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He,10 psi) da amostra AHLS143B.....	172
C 29 Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He,10 psi) da amostra AHLS151A.....	173
C 30 Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He,10 psi) da amostra AHLS151B.....	173
C 31 Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He,10 psi) da amostra AHLS153A.....	173
C 32 Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He,10 psi) da amostra AHLS153B.....	174

	página
C 33 Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He,10 psi) da amostra AHLS166A.....	174
C 34 Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He,10 psi) da amostra AHLS166B.....	174
C 35 Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He,10 psi) da amostra AHLS177A.....	175
C 36 Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He,10 psi) da amostra AHLS177B.....	175
C 37 Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He,10 psi) da amostra AHLS182A.....	175
C 38 Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He,10 psi) da amostra AHLS182B.....	176

	página
C 39 Cromatogramas de íons totais (representativos) de a: controle do alachlor b: Produtos de biotransformação da amostra 2 pela linhagem Ls182. Os números de picos são relacionados aos derivados do alachlor relacionados nas Figuras 21 e 23. Condições cromatográficas: coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He,10 psi).....	118
C 40 Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He,10 psi) da amostra CA_1.....	176
C 41 Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He,10 psi) da amostra CB_1.....	176
C 42 Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He,10 psi) da amostra ALS182A.....	177
C 43 Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He,10 psi) da amostra ALS182B.....	177

Abreviaturas, Siglas e Símbolos

CG	cromatografia gasosa
EM	espectrometria de massas
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
IR	índice de retenção
IK	índice de Kovats
FID	"flame ionization detector"
eV	elétons-volt
Hz	Hertz
IE	impacto eletrônico
m/z	razão entre a massa e o fragmento e sua respectiva carga elétrica
M ⁺ .	íon molecular
RMN	ressonância magnética nuclear
RMN de ¹ H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ¹³ C	ressonância magnética nuclear de carbono treze
DEPT	"Distortionless Enhancement by Polarization Transfer"
MHz	megahertz
<i>J</i>	constante de acoplamento
δ	deslocamento químico em partes por milhão
CDCl ₃	clorofórmio deuterado
CCT	Coleção de Culturas Tropicais
CBMAI	Coleção Brasileira de Microrganismos do Ambiente e da Indústria
IFO	Institute for Fermentation of Osaka
PBT	Produtos de biotransformação
CAH	Amostra controle do alachlor hidrolisado.
CA	Amostra do alachlor
DEA	Dietilanilina
<i>t</i> _½	Meia-vida

AHLS143	Amostra do alachlor e seus produtos de hidrólise submetida a linhagem LS 143
AHLS151	Amostra do alachlor e seus produtos de hidrólise submetida a linhagem LS 151
AHLS153	Amostra do alachlor e seus produtos de hidrólise submetida a linhagem LS 153
AHLS166	Amostra do alachlor e seus produtos de hidrólise submetida a linhagem LS 166
AHLS177	Amostra do alachlor e seus produtos de hidrólise submetida a linhagem LS 177
AHLS182	Amostra do alachlor e seus produtos de hidrólise submetida a linhagem LS 182
ALS182	Amostra do alachlor submetida a linhagem LS 182
EC	"Enzyme Nomenclature"
IUBMB	"International Union of Biochemistry and Molecular Biology"
MOs	monooxigenases
DOs	Dioxigenases
rRNA	ácido ribonucléico ribossomal
NAD	dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NADP	dinucleotídeo de nicotinamida e adenina fosforilado
FMN	mononucleotídeo de flavina
FAD	dinucleotídeo de flavina e adenina
ATP	trifosfato de adenosina
Ph	Fenil
AMCPB	ácido <i>m</i> -cloro-perbenzóico
LDA	diisopropilamideto de lítio
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
ee	excesso enantiomérico
CCD	cromatografia em camada delgada

01.INTRODUÇÃO GERAL

Os microrganismos existem há mais de 3 bilhões de anos, superando qualquer outra forma de vida e são encontrados em praticamente todos os lugares da natureza, desde as camadas superiores da atmosfera até nos sedimentos do fundo do mar. Eles estão presentes nos alimentos que ingerimos como também no nosso próprio organismo.

Entretanto, devido à visão humana não perceber objetos com diâmetro inferior a cerca de 0,1 milímetros, os menores organismos, aqueles constituídos de uma única célula, os organismos unicelulares, são invisíveis aos olhos humanos. Por essa razão, a própria existência dos microrganismos só foi reconhecida quando, do progresso científico, resultou a invenção do microscópio, instrumento ótico que serve para ampliar objetos próximos tão pequenos que não podem ser vistos nitidamente pelo olho “desarmado”, seja qual for à proximidade em que sejam colocados.

O descobridor do mundo dos organismos microscópicos foi um holandês, Antony van Leeuwenhoek (1632-1723)¹, que combinava uma rara destreza na construção de microscópios simples a uma também rara habilidade como observador e intérprete científico. Após haver revelado aos olhos humanos o vasto mundo das criaturas microscópicas existentes na água e em extratos orgânicos os cientistas começaram a indagar sobre a origem dessas formas de vida criando duas linhas de pensamento. Alguns acreditavam que os microrganismos se formam espontaneamente a partir da matéria não viva presente em infusões, enquanto outros acreditavam em “sementes” ou “germes” destas criaturas microscópicas sempre presentes no ar, de onde ganham acesso às infusões e ali crescem. Aristóteles (384 a.c.), filósofo grego que escreveu extensamente sobre história natural, foi um dos primeiros adeptos da geração espontânea ou abiogênese.²

¹ Dubowsky, N. *American Biology Teacher*. 1996, 58, 242.

² Wilson, G. Os Grandes Homens da Ciência. 4ª ed, Ed. Nacional, São Paulo, 1963, p.27.

Por volta de 1860, alguns cientistas começavam a compreender que existia uma “relação casual” entre o desenvolvimento de microrganismos em extratos orgânicos e as alterações químicas causadas por essas criaturas. O pioneiro destes estudos foi Louis Pasteur (1822-1895).³ Pasteur realizou experimentos com extratos que permaneciam estéreis usando balões com gargalos longos e dobrados para baixo que impediam a ascensão. Esse experimento silenciou de vez por todas as críticas baseadas nos possíveis efeitos do próprio ar como agente ativador para o desenvolvimento de vida (Figura 1).



Figura 1 - Louis Pasteur e os balões com gargalos longos e dobrados

Microorganismo congrega grupos variados de seres vivos de dimensões microscópicas, que vivem na natureza como células isoladas ou em agregados celulares, incluindo os grupos: bactérias, arqueas, fungos filamentosos e leveduras, protozoários e vírus.

Na classificação atual dos seres vivos, os microrganismos estão distribuídos nos três domínios: Bacteria, Archea e Eucarya⁴ (Figura 2, pág. 3). O comprimento das linhas que separam estes três grupos pode nos fornecer uma idéia da “distância genética” entre os domínios. Pode-se observar, também, que as bactérias são microrganismos procarióticos enquanto que os fungos são eucarióticos.

³ Schwartz, M. J. *Appl. Microbiol.* 2001, 91, 597.

⁴ Olsen, G. J. and Woese, C. R. *FASEB J.* 1993, 7, 113.

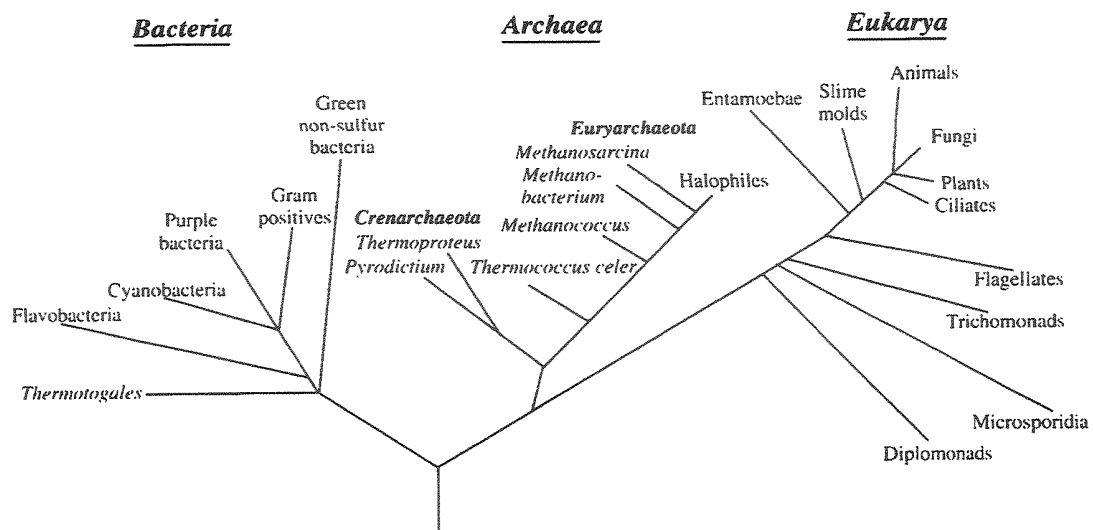


Figura 2 – Representação filogenética derivada da análise de sequências do ácido ribonucléico ribossomal (rRNA).⁴

As bactérias se apresentam nas mais diversas formas de vida da Terra e são agrupadas em mais de 1 milhão de espécies.⁵ Somente uma fração destas espécies foi identificada e uma parte desta fração estudada ou incluída em coleções de culturas. Por uma estimativa, somente 1-10% das espécies de bactérias foram identificadas, nos deixando com uma vasta porção da biota desconhecida e, portanto, não estudadas. A grande diversidade das bactérias tornam estes organismos uma fonte inexorável de informações genéticas a serem exploradas fornecendo informações sobre o processo da vida e a evolução.

As bactérias são o mais numeroso grupo de microrganismos do solo, mas devido a seu pequeno tamanho, 1-10µm, ocupa menos da metade do total da biomassa do solo. Possuem metabolismo diversificado e usam diferentes fontes de carbono e energia. Elas são tradicionalmente classificadas pelas suas principais fontes de carbono e energia: fototróficas, quimiotróficas, autotróficas e quimiolitotróficas.

As bactérias da ordem *Actinomycetales* são chamadas genericamente de actinomicetos e estão presentes principalmente no solo em populações de 10⁶-

⁵ Kennedy, A. C. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 1999, 74, 65.

10^9 células por grama, compreendendo mais de 30% do total da microbiota do solo. Devido aos actinomicetos do gênero *Actinomyces* e *Streptomyces* possuírem a habilidade de germinar a partir de esporos e crescer como filamentos, formando os micélios, foram por algum tempo classificados como fungos. Os actinomicetos são tipicamente aeróbios, possuem uma diversidade de metabolismos e são hábeis no uso de diferentes fontes de carbono e energia.⁶

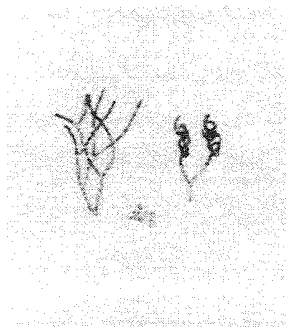


Figura 3 – Desenhos dos aspectos de *Streptomyces* sp.

Entre as principais características das bactérias estão as suas dimensões, forma, estrutura e arranjo. Devido ao reduzido tamanho das células bacterianas a sua razão superfície/volume é extremamente elevada em comparação aos organismos maiores, sendo esta característica responsável pelo seu alto índice de crescimento e metabolismo.

Os fungos são organismos heterotróficos, obtendo a sua alimentação a partir de matéria orgânica inanimada ou nutrindo-se como parasitas de seres vivos e são divididos em bolores e leveduras. As leveduras são geralmente unicelulares, de forma esférica, elíptica ou filamentosa. Os bolores (fungos filamentosos) são multicelulares (cenócitos) e formam tubos, chamados de hifas. O conjunto de hifas recebe a denominação de micélio. A parede das hifas é semi-rígida, e os bolores podem apresentar três tipos morfológicos de hifas (Figura 4, pág. 5). É importante salientar que os compartimentos das hifas septadas não são separados por uma membrana, embora sejam chamados de células.⁷

⁶ McCarthy, A. J. and Williams, S. T. *Gene*. 1992, 115, 189.

⁷ Soares, J. B., De Casimiro, A. R. S.; Albuquerque, L. M. B. *Microbiologia Básica*. 2ª ed, EUFC, Fortaleza, 1991, p.70.

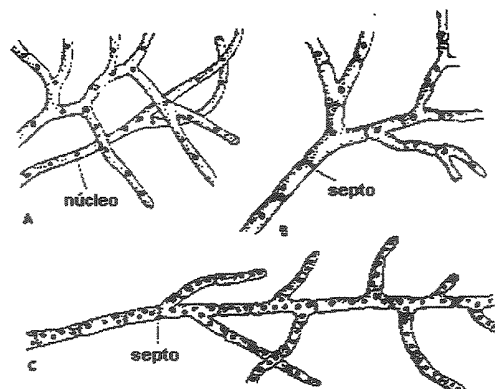


Figura 4 – Morfologia da hifas (A) não-septadas; (B) septadas com células mononucleares; (C) septadas com células multinucleares.

A maioria dos fungos filamentosos é estritamente aeróbia e seu crescimento é estimulado pelo fornecimento abundante do oxigênio. Desenvolvem-se numa ampla faixa de temperatura, com um ótimo de 22 a 30 °C para a maioria das espécies.

Os microrganismos são aplicados na produção de alimentos, bebidas, medicamentos, tratamento de água e solo, e possuem papel importante na biotransformação de compostos orgânicos.

Em poucos anos a aplicação de microorganismos transpôs os limites da pesquisa acadêmica para a sua aplicação industrial. Hoje a biotecnologia se desenvolve de maneira impressionante, impulsionada pelos avanços na evolução molecular, biologia computacional, descobertas de novas fontes de enzimas, metodologias combinatórias, engenhamento genético, alta capacidade de avaliação (*high-throughput screening*) biocatalítica e otimizações dos processos.

A biotecnologia é aplicada na transformação de substratos, na obtenção de metabólitos bioativos, produção de alimentos, bebidas, fragrâncias, medicamentos, tratamento de água e solo. Os biocatalisadores mais empregados são as hidrolases (44%) e oxidoredutases (30%) os quais geram 89% de produtos quirais aplicados na química fina ⁸ (Figura 5). Estes processos podem envolver o uso de enzimas isoladas, células íntegras ou de ambas, livres ou imobilizadas.

⁸ Straathof, A. J. J.; Panke, S. and Schmid, A. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 548.

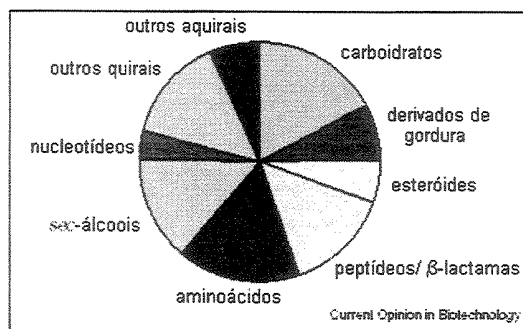


Figura 5- Tipos de compostos produzidos utilizando processos biotecnológicos (baseado em 134 processos).⁸

02. OBJETIVOS

A palavra "química" ainda hoje aparece como referência a tóxico, poluente, insalubre, quando não de algo ainda mais sinistro e perverso. A preocupação com este inconveniente pode ser claramente observada pois, nos últimos anos, cresce continuamente a pressão sobre as indústrias químicas, tanto através da sociedade civil, como das autoridades governamentais, no sentido de aprimorar o desenvolvimento de processos, que sejam cada vez menos prejudiciais ao meio ambiente. A Química Verde⁹ é um movimento recente, que utiliza de forma provocatória a aparente contradição dos termos. O presente trabalho pretende investigar novas fontes de catalisadores biológicos para o seu emprego em uma química "limpa".

Os objetivos deste trabalho foram:

- a) seleção de linhagens de microrganismos isolados no território brasileiro com elevada atividade enzimática de oxidação e de hidrólise de derivados de enxofre;
- b) aplicação de intermediários sintéticos com elevada pureza enantiomérica obtidos por biocatálise;
- c) estudo da biorremediação de solo empregando microrganismos isolados no território brasileiro.

⁹ Warner, J. C.; Cannon, A. S. and Dye, K. M. *Environ. Impact Assessm. Review* **2004**, *24*, 775.

03. BIOCATÁLISE

3.1. Introdução à biocatálise

A biotransformação e biocatálise são termos empregados indistintamente na literatura para a utilização de sistemas biológicos, como células intactas, extrato de enzimas ou enzimas isoladas, na catálise e transformação de compostos orgânicos.

Recentemente Michel Spegno, da Rhodia, resolveu distingui-los através de uma diferença sutil. De acordo com Spegno a biocatálise envolve apenas uma etapa de transformação enquanto que na biotransformação um substrato simples é transformado numa molécula complexa em uma série de reações no mesmo pote reacional.¹⁰

As reações químicas que caracterizam a vida não se processariam de forma espontânea sem a presença das enzimas, base do metabolismo de todos os organismos vivos. As enzimas são biopolímeros, seja uma proteína ou RNA, que catalisam reações químicas com grande especificidade e aumento de velocidade. A natureza química das enzimas até 20 anos atrás era dita ser de proteínas, mas essa idéia foi modificada depois que Altman e colaboradores mostraram que RNA também catalisa reações biológicas.¹¹

Entretanto, devido a maioria das enzimas conhecidas serem de natureza protéica iniciaremos apresentando uma visão geral sobre as proteínas.

As proteínas são macromoléculas compostas de uma ou mais cadeias polipeptídicas, cada uma com uma sequência característica de aminoácidos conectados por ligações peptídicas. A produção das proteínas é determinada pelo genoma, ou seja, toda informação genética codificada numa célula.¹² As enzimas protéicas proporcionam excelentes resultados em processos industriais realizando conversões biocatalíticas de forma elegante, econômica e eficiente.

¹⁰ Rouhi, A. M. *Chemical and Engineering News*. 2003, 81, 50.

¹¹ Guerrier-Takada, C. and Altman, S. *Science* 1984, 223, 286.

¹² Nelson, D. L. and Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 2000, 3^a ed, Worth Publishers, New York, p. G-5.

As enzimas são identificadas pela comissão de enzimas (EC) da União Internacional de Bioquímica (IUB) pelo prefixo E.C. seguido por 4 números separados por pontos (EC A.B.C.D). Elas são classificadas pelas reações químicas que catalisam (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação das enzimas* (Faber, 1995) ¹³				
Classes de enzimas	Número classificado	Número disponível	Tipo de reação	Utilidade*
1. Oxidorredutases	650	90	Oxidação-redução: oxigenação de ligação C-H, C-C, C=C, remoção ou adição total de átomos de hidrogênio ou íons hidreto (transferência de elétrons)	+++ 25%
2. Transferases	720	90	Transferência de grupos: aldeídico, cetônico, acil, açúcar, fosforil ou metil	+ <5%
3. Hidrolases	636	150	Reações de hidrólise e formação: ésteres, amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, nitrilas, anidridos e glicosídeos (transferência de grupos funcionais para a água)	+++ 65%
4. Liasas	255	35	Adição-eliminação de moléculas pequenas nas ligações C=C, C=N e C=O	++ 5%
5. Isomerases	120	6	Isomerizações atuando através da racemização, epimerização e rearranjo.	± <5%
6. Ligases	80	5	Formação-clivagem de ligações C-O, C-S, C-N e C-C seguida da clivagem de trifosfato	± <5%

* classe de enzima estimada para transformar substratos não naturais, (+++) muito utilizada, ± pouco utilizada, * período de 1987-8.

Existem seis principais classes de enzimas que constituem o primeiro número do código das enzimas: (1) oxidorredutases, (2) transferases, (3) hidrolases, (4) liasas, (5) isomerases e (6) ligases.

Estas classes sofrem uma sub-divisão:

B - representa a sub-classe, indicando o grupo doador (nas oxirredutases) ou grupo transferido (nas transferases) etc.

C - representa a sub-sub-classes de acordo com o grupo receptor (nas oxirredutases), o tipo de grupo transferido (nas transferases) etc.

D - o último número garantirá a identidade única da enzima. (p.ex. EC 1.14.15.6 – nome recomendado para o colesterol monooxigenase).

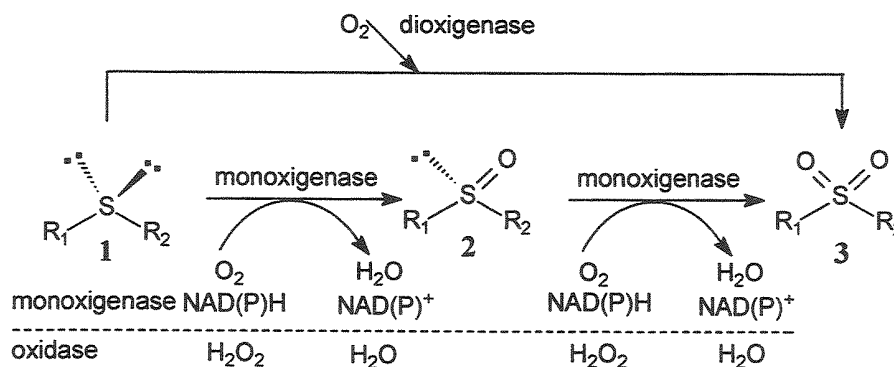
Finalmente o número 99 é usado quando a informação não for completa.

¹³ Faber, K. *Biotransformation in Organic Chemistry: a Textbook*, 4ª ed., Berlin, Germany: Springer-Verlag, 2000, p. 22.

3.1.1. Oxidorredutases

As oxidorredutases são responsáveis pela oxidação e redução de compostos orgânicos e sendo o foco do nosso interesse utilizaremos esta classe de enzimas para exemplificar o acima exposto. Estas enzimas são sub-divididas em desidrogenases (redutase), oxidases e oxigenases. Esta sub-divisão está relacionada ao tipo de grupo doador que sofrerá a oxidação. O nome oxidase é somente usado quando o O_2 é o receptor de elétrons (número 3, no terceiro dígito, p.ex. EC 1._.3._) e as oxigenases quando ocorre a incorporação do oxigênio nas moléculas orgânicas. As oxigenases podem ser divididas em duas categorias: monooxigenases (MOs) e dioxigenases (DOs), dependendo se um ou dois oxigênios são incorporados na molécula. (números 13 ou 14, no segundo dígito, p.ex. EC 1.13._._). As MOs requerem dois elétrons para reduzir o segundo átomo de oxigênio para formar água (**Esquema 1**).

Como já mencionado nas oxidorredutases o terceiro dígito está relacionado ao grupo receptor de elétrons, p.ex. EC 1._.1._ (NAD^+ ou $NADP^+$), EC 1._.2._ (citocromo), EC 1._.3._ (oxigênio molecular), EC 1._.8._ (flavoproteínas), etc .



Esquema 1 - Reação de oxigenação enzimática no átomo de enxofre.¹⁴

As oxidorredutases realizam a introdução e remoção de oxigênio de forma estereo-, regio- e quimiosseletiva. As oxidações de álcoois primários e

¹⁴ Faber, K. *Biotransformation in Organic Chemistry: a Textbook*, 4ª ed., Berlin, Germany: Springer-Verlag, 2000, p. 240.

secundários são catalisadas pelas desidrogenases fornecendo aldeídos e cetonas, respectivamente. Estas reações são também realizadas pelos métodos sintéticos clássicos sem algum problema sendo assim pouco citados. Entretanto, as correspondentes reações de redução empregando desidrogenases em microrganismos¹⁵ ou isoladas¹⁶ são amplamente discutidas.

As reações de oxidação enzimática pela incorporação de átomos de oxigênio são particularmente interessantes e o foco principal deste trabalho. As reações típicas catalisadas pelas monooxigenases^{17,18} estão apresentadas no **Esquema 2** (pág. 12). Todas estas reações podem ser explicadas pela ação de uma espécie de hidroperóxido, mas algumas podem utilizar mais de uma espécie oxidante. As monooxigenases internas catalisam a oxigenação do substrato sem utilizar um agente redutor externo (o substrato é o próprio agente redutor) e as monooxigenases externas precisam de um agente redutor externo para ativar a enzima.

Uma reação em particular, a hidroxilação de centros “não ativados” em hidrocarbonetos, é considerada como a mais útil de todas as biotransformações¹⁹, seguida das epoxidações e sulfoxidações. Estas enzimas são melhores empregadas na síntese de compostos não acessíveis por rotas químicas, o caso de muitos esteróides hidroxilados. Entretanto, a remoção das enzimas do seu ambiente natural (célula) não oferece vantagens, ou pior, gera conseqüências adversas para a enzima, principalmente para as oxigenases, as quais dependem de co-fator para realizarem reações e desta forma merecem uma atenção particular, pois são mais difíceis de serem realizadas sem a presença do complexo enzimático celular.

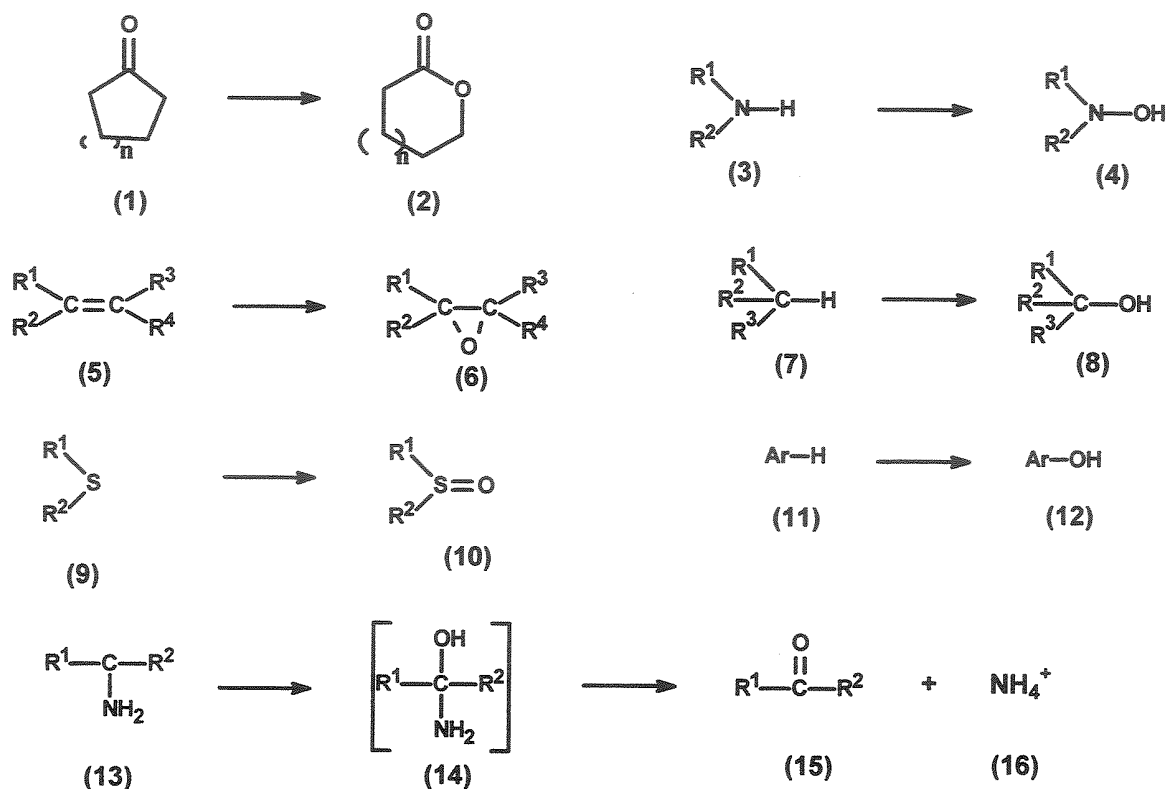
¹⁵ Czsuk, C. and Glänzer, B. I. *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 49.

¹⁶ Carrea, G. and Riva, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2226.

¹⁷ Sono, M.; Roach, M. P.; Coulter, E. D. and Dawson, J. H. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2841.

¹⁸ Kamerbeek, N. M.; Janssen, D. B.; van Berkel, W. J. H. and Fraaije, M. W. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 667.

¹⁹ H.G. Davies, R.H. Green, D.R. Kelly and Stanley M. Roberts. *Biotransformation in preparative organic chemistry*, Academic press, London, UK. **1989**.



Esquema 2 – Reações típicas catalisadas pelas monooxigenases.

Os co-fatores podem se apresentar de diferentes formas: elementos inorgânicos como Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Zn^{2+} , ou moléculas orgânicas e complexos organometálicos chamados de coenzimas. Algumas enzimas necessitam de mais de uma coenzima ou de um ou mais metais. A coenzima ou íon metálico firmemente ligado à cadeia polipeptídica é chamado grupo prostético.

As reações catalisadas pelas MOs são capazes de utilizar as formas reduzidas das coenzimas dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD^+) e seu homólogo fosforilado (NADP^+) como doadores de elétrons (Figura 6). Os dois elétrons derivados a partir do NAD(P)H podem ser transferidos para as MOs por enzimas transportadoras de elétrons como as flavinas e os “clusters” ferro-enzofre.

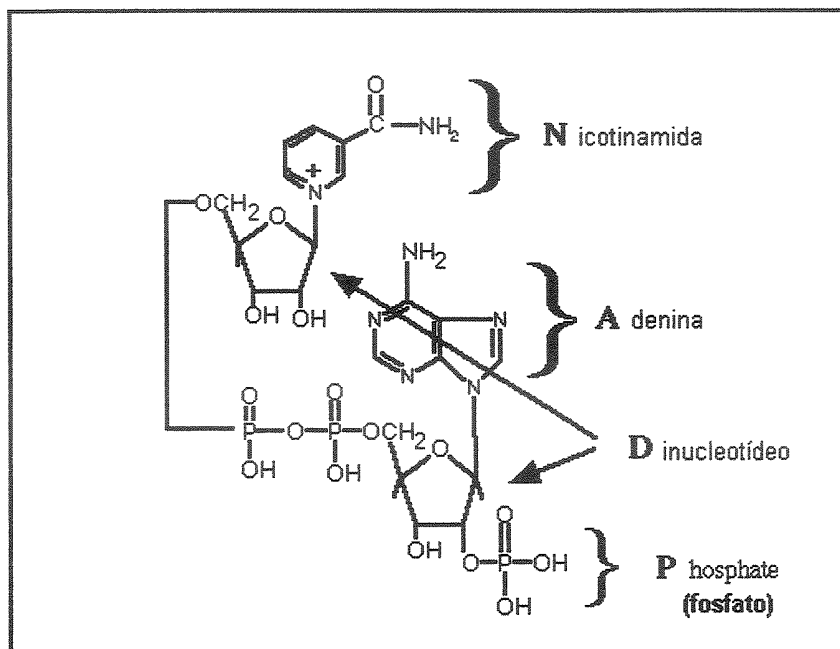


Figura 6 – Coenzimas dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD⁺) e seu homólogo fosforilado (NADP⁺).

As famílias das nicotinamidas são compostas por dois grupos nucleotídeos ligados por grupos fosfatos. Esta família de coenzima também é chamada nucleotídeo de piridina. A porção nucleotídeo é responsável pelas interações da coenzima com o sítio ativo.

As flavinas existem de diferentes formas derivadas das riboflavinas. Os exemplos mais representativos são o mononucleotídeo de flavina (FMN) e o dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD) (**Figura 7**). Estas flavinas possuem ligações relativamente fortes e em algumas enzimas (p. ex. desidrogenase succinato) são covalentemente ligadas.

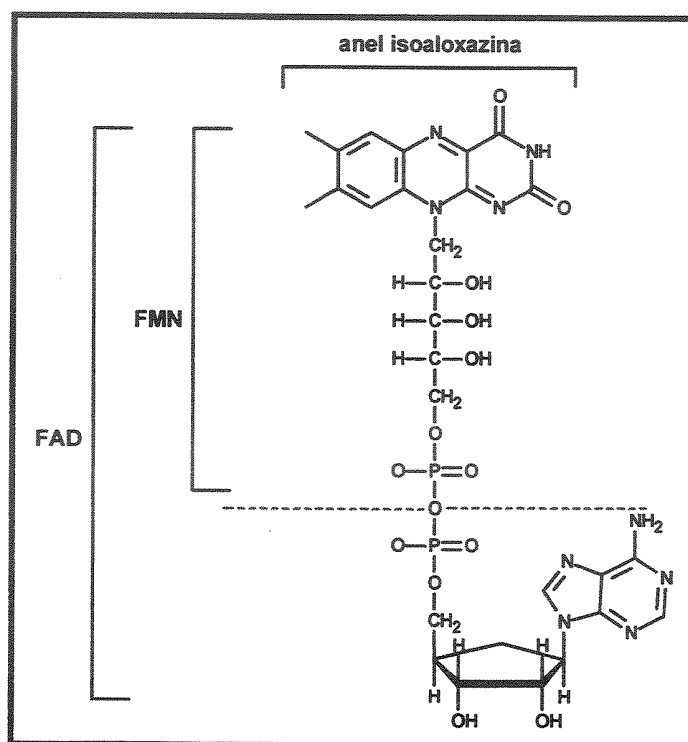


Figura 7 – Coenzimas mononucleotídeo de flavinas (FMN) e o dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD).

3.1.2. Transferases

As transferases são enzimas que realizam transferência de um grupo (p. ex. metil ou glicosil) para um outro composto chamados de receptores. Como já foi citado anteriormente a classificação está baseada na relação doador-receptor. Os nomes comuns são normalmente formados como 'receptor-transferase' ou 'doador-transferase' sendo o doador em muitos casos um co-fator.

As famílias de transferase mais importantes são: fosfotransferases, sulfotransferases, metiltransferases, aciltransferases, glicosiltransferases, nucleotidiotransferases, transaminase e alquil/ariltransferases.

Três grupos de transferases possuem um potencial prático para síntese de compostos quirais, as glicosiltransferases, aminotransferases (transaminases)

e as quinases (fosfotransferases). A galactosiltransferase é aplicada na síntese de um oligossacarídeo²⁰, enquanto que a hexoquinase²¹ e a glicerolquinase²¹ são aplicadas em várias fosforilações, embora as enzimas que são dependentes do trifosfato de adenosina 20 (ATP, Figura 8) tornam as sínteses em larga escala bastante dispendiosas.

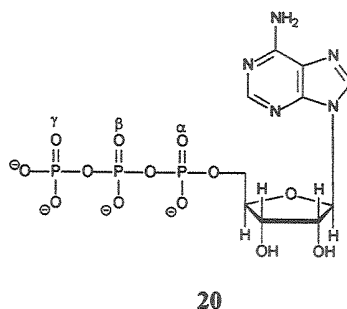


Figura 8 – Trifosfato de adenosina.

Gostaríamos de chamar a atenção sobre as três principais enzimas que catalisam a reação de transferência de grupo fosforila : fosfatase, fosfodiesterase e as quinases. Entretanto somente a quinase é uma “verdadeira” transferase. A quinase transfere o grupo γ , β ou α -fosforila do ATP para um receptor.

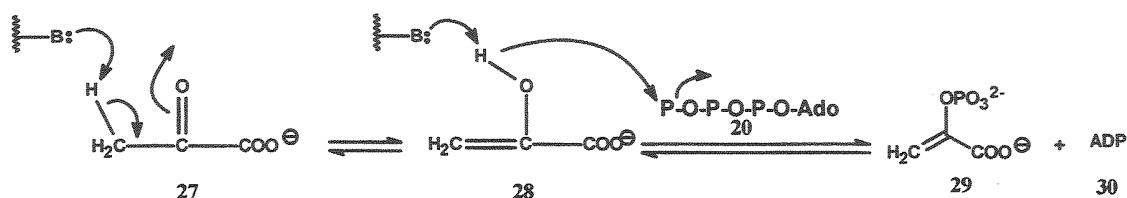
eletrófilo	nucleófilo	produto	família de enzima	tipo de reação
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{O}-\text{P}-\text{O}^{\ominus} \\ \\ \text{O}^{\ominus} \end{array}$ 21	+ H ₂ O	$\rightleftharpoons \text{ROH} + \text{P}_i$ 22	fosfatase	hidrólise
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{O}-\text{P}-\text{OR}' \\ \\ \text{O}^{\ominus} \end{array}$ 23	+ H ₂ O	$\rightleftharpoons \text{ROPO}_3^{2-} + \text{R}'\text{OH}$ 24	fosfodiesterase	hidrólise
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{X}-\text{P}-\text{O}^{\ominus} \\ \\ \text{O}^{\ominus} \end{array}$ 25	+ Y [⊖]	$\rightleftharpoons \text{Y}-\text{PO}_3^{2-} + \text{X}^-$ 26	quinase	transferência

²⁰ Schultz, M.; Kunz, H. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 5319.

²¹ Ludwig, J.; Eckstein, F. *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 5860.

Esquema 3 – Reações realizadas pela fosfatase, fosfodiesterase e quinase.

Um exemplo da importância desta enzima é a catálise da transferência do grupo γ -fosforila do ATP para o piruvato fornecendo fosfoenolpiruvato (PEP) (Esquema 4).



Esquema 4 – Mecanismo para o piruvatoquinase (ATP é representado como POPOPOAdo)²²

3.1.3. Hidrolases

As enzimas que catalisam reações de hidrólise e esterificação envolvendo ligações das porções ésteres ou amidas são chamadas de hidrolases. Estas reações são muito fáceis de serem realizadas dispensando aparatos especiais existindo uma grande variedade destas enzimas disponíveis comercialmente. As hidrolase são divididas em proteases, esterases e lipases e não necessitam de co-fatores adicionais.

A definição clássica de lipases as descreve como enzimas que atuam sobre ligações de éster presentes em acilgliceróis como glicerol éster hidrolases, liberando ácidos graxos e glicerol.²³ As esterases são enzimas largamente distribuídas na natureza e sua atividade enzimática está restrita à hidrólise de ligações éster em substratos solúveis em água.²⁴

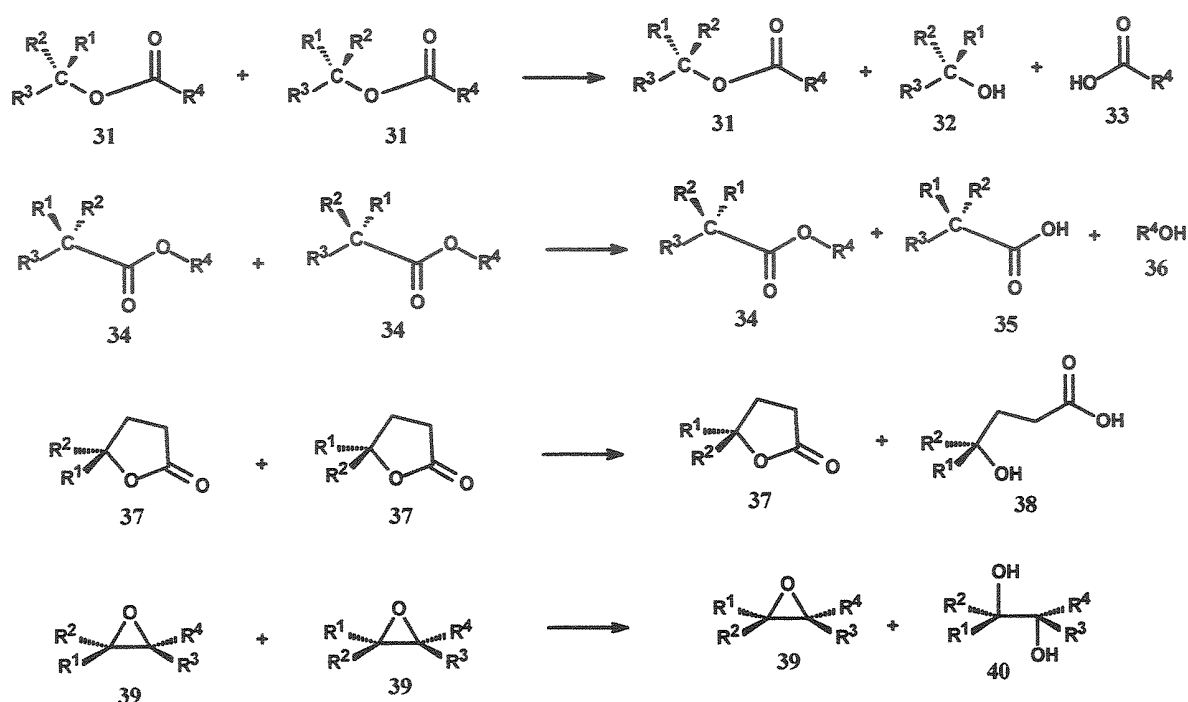
As lipases pertencem a um grupo de enzimas interessantes, não apenas pela capacidade de atuarem sobre substratos insolúveis em água, mas também pela capacidade de catalisarem diferentes reações, como as reações de hidrólise, esterificação, interesterificação, alcoólise, acidólise e aminólise. A diversidade de

²² (a) Seeholzer, S. H.; Jaworowski, A. and Rose, I. A. *Biochemistry*. **1991**, *30*, 727. (b) Rose, I. A. *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 1170. (c) Wimmer, M. J. and Rose, I. A. *Ann. Rev. Biochem.* **1978**, *47*, 1031.

²³ Jaeger, K. E.; Ransak, S.; Koch, H. B.; Ferrato, F.; Dukstra, B. W. *FEMS Microbiol. Rev.* **1994**, *15*, 29.

²⁴ Alvarez-Macarie, E.; Augier-Magro; Guzzo, J.; Baratti, J. *Biotechnol. Lett.*, **1999**, *21*, 313.

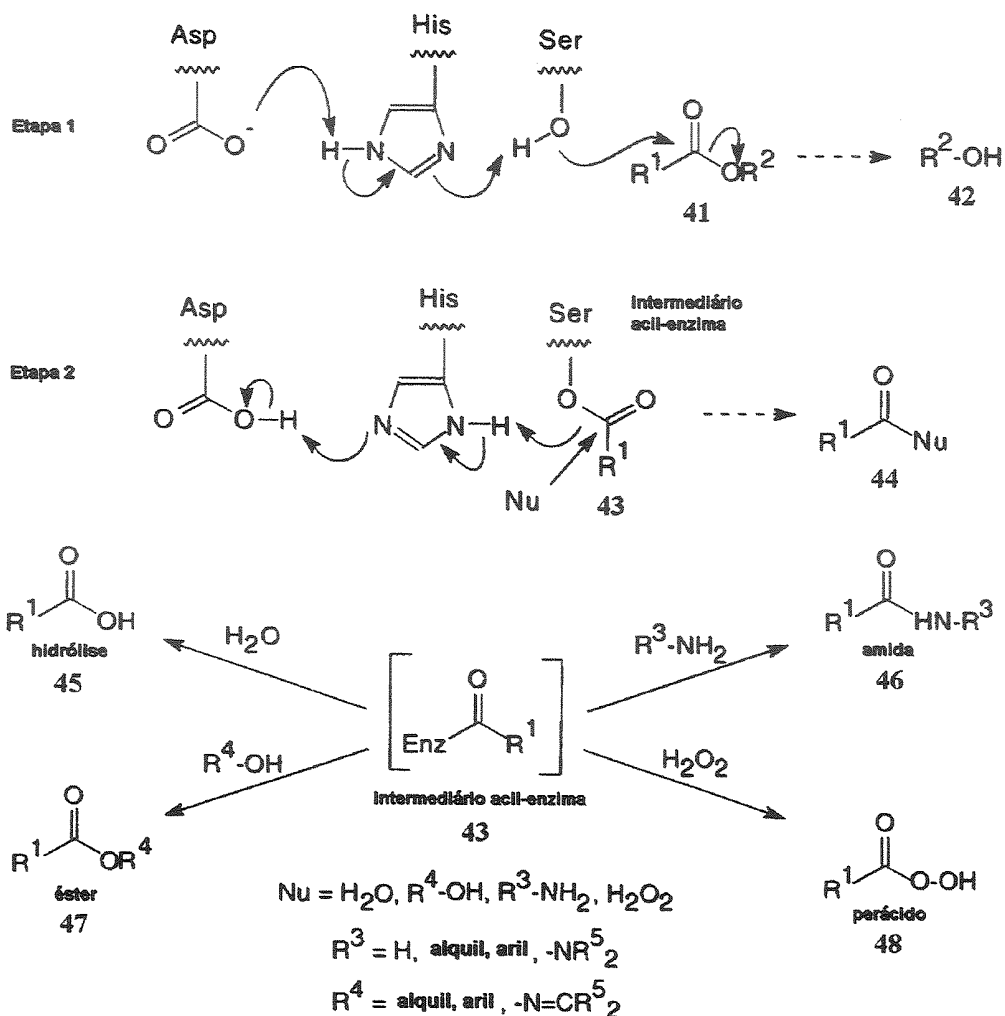
propriedades das lipases propicia a utilização destas enzimas em diferentes campos de aplicação.²⁵ Estas enzimas podem catalisar reações de hidrólise de ésteres quando o centro estereogênico se encontra na porção alquila (31) ou na porção acila (34), além de hidrolisarem lactonas (37) e epóxidos (39) de maneira estereosseletiva (Esquema 5).



Esquema 5 – Reações típicas catalisadas pelas hidrolases.

O mecanismo de hidrólise realizada por estas enzimas é similar ao descrito pela hidrólise química por uma base. A maioria destas enzimas, especialmente as lipases e esterases, possuem um resíduo de serina como parte de uma “triade catalítica” de aminoácidos dentro do sítio catalítico da enzima (Esquema 6).

²⁵ Pandey, A.; Benjamin, S.; Soccol, C. R.; Nigam, P.; Krieger, N.; Soccol, V. T. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 1999, 29, 119.



Esquema 6 – Mecanismo da reação de hidrólise catalisada pela serina-hidrolase.²⁶

O arranjo espacial dos resíduos que compõe a tríade é afetado pela diminuição do pH permitindo o ataque nucleofílico do resíduo Ser ao carbono carbonílico. Este resíduo é acilado pelo éster **41** e a porção álcool **42** é liberada na solução. Após o ataque nucleofílico ao intermediário acil-enzima **43**, a enzima é regenerada liberando o derivado carboxílico **44**. Quando a enzima opera em ambiente com baixa concentração de água outro nucleófilo compete pelo

²⁶ Faber, K. *Biotransformation in Organic Chemistry: a Textbook*, 4^a ed., Berlin, Germany: Springer-Verlag, 2000, p. 30.

intermediário acil-enzima **43** levando a um número de transformações sintéticas possíveis (Esquema 6).

Em 1990, Chistianson e Alexander apresentaram uma nova “tríade catalítica” formada pelos resíduos de aspartato e histidina com a participação de zinco (Asp - - -His - - -> Zn^{2+}) encontrada na carboxipeptidase A.²⁷

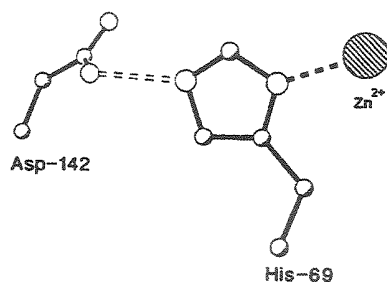


Figura 9 – Representação do sítio catalítico da carboxipeptidase A.²⁷

Vale aqui ainda alguns comentários sobre os elementos de quiralidade que dão origem a estereosseletividade das hidrolases. Nos ésteres de ácidos carboxílicos o(s) elemento(s) de quiralidade da molécula pode(m) estar na porção acila **49** ou alquila **50**. A maior seletividade ocorre quando o elemento de quiralidade encontra-se situado na posição α ou β a carbonila (**Figura 10**).

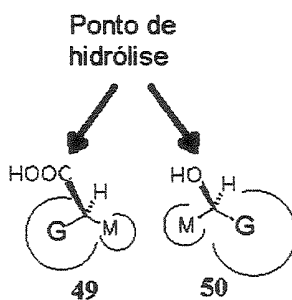


Figura 10 – O grupo grande (G) e médio (M) no álcool primário e no ácido carboxílico e o ponto de quiralidade na posição α ao ponto de hidrólise.²⁸

²⁷ Christianson, D. W. and Alexander, R. S. *Nature*. **1990**, 346, 225.

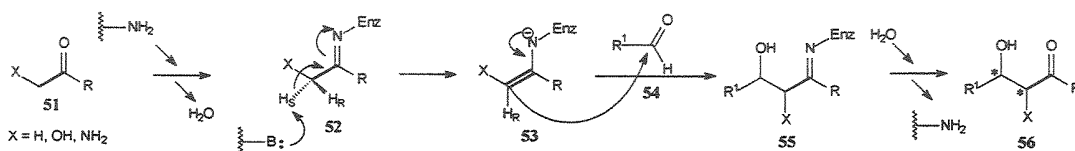
²⁸ (a) Kazlauskas, R. J., Weissfloch, A. N. E.; Rappaport, A. T. and Cuccia, L. A. *J.Org. Chem.* **1991**, 56, 2656. (b) Derewenda, Z. S. and Wei, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 2104.

3.1.4. Liases

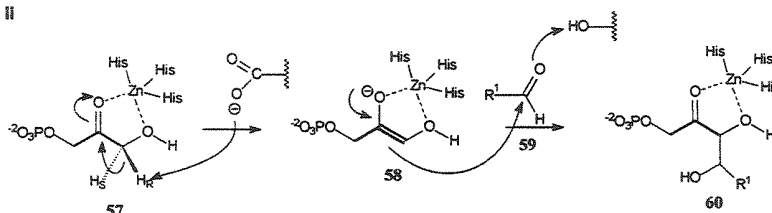
Liases são enzimas que catalisam a formação estereosseletiva de ligação C-C, entretanto a sua função natural é de degradação, principalmente de carboidratos. Estas enzimas estão envolvidas nos metabolismos de carboidratos, aminoácidos ou hidroxiácidos.

As aldolases são um grupo específico de liases que catalisam a adição reversível de enolato (proveniente de cetona ou aldeído) a um aldeído (receptor). As aldolases foram classificadas como tipo I e tipo II de acordo com o mecanismo de reação (**Esquema 7**).

Aldolase do tipo I



Aldolase do tipo II



Esquema 7 - Mecanismos de aldolases: Tipo I ²⁹ e o Tipo II ³⁰.

As aldolases do tipo I ocorrem predominantes em plantas superiores e animais, não precisam de co-fatores e catalisam a reação aldólicas através da formação de uma base de Schiff.²⁹ O doador é covalentemente ligado à enzima através do grupo amino de um resíduo de lisina onde ocorre a formação da base de Schiff **52** (**Esquema 7**). Um resíduo de aminoácido básico retira o hidrogênio pró-(S) formando uma espécie de enamina **53** que ataca nucleofílicamente o grupo carbonílico do receptor aldeídico **54** de forma assimétrica. A estereoquímica do carbono na ligação formada depende do tipo de enzima. Finalmente ocorre a hidrólise liberando a enzima.

²⁹ Gefflaut, T.; Blonski, C.; Perie, J. and Willson, M. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1995**, 63, 301.

As aldolases do tipo II são predominantes em bactérias e fungos, e são dependentes de Zn^{2+} . O átomo essencial de Zn^{2+} no sítio ativo, coordenado por três átomos de nitrogênio do resíduo de histidina, coordena com a molécula doadora através da hidroxila e do grupo carbonila **57**. Isso facilita a retirada do hidrogênio *pró-(R)* por um resíduo básico (glutamato) formando um enolato **58** que ataca nucleofilicamente o grupo carbonílico do receptor aldeídico **59** de forma assimétrica. Com poucas exceções, a estereoquímica da ligação formada é controlada pela enzima e não depende do substrato³⁰ (**Esquema 7**).

As liases também são capazes de catalisar reações para formação de ligações C-X (O, N, S e halogênio) através da adição de pequenas moléculas (H_2O , NH_3 , HCN , etc.) a uma ligação dupla com elevada estereosseletividade e regiosseletividade.

3.1.5. Isomerases

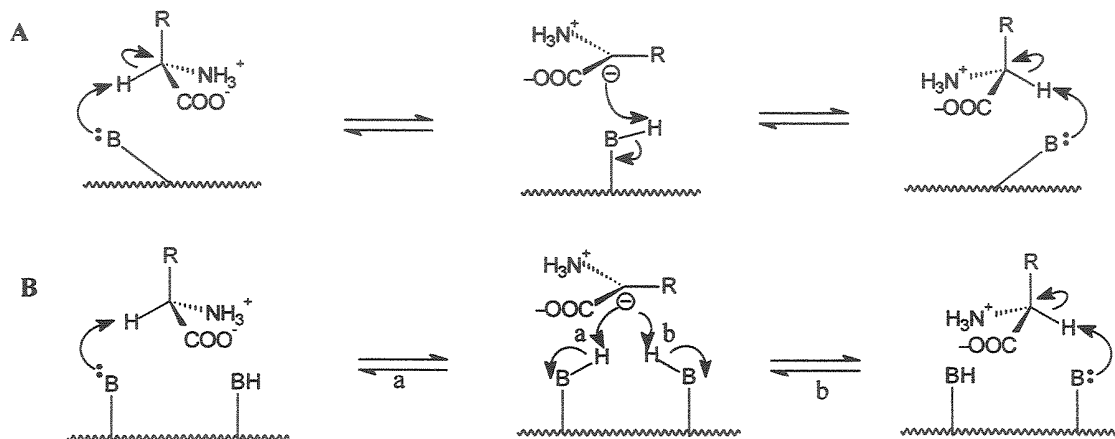
As isomerases são classificadas em racemase e epimerase, *cis-trans* isomerases, oxidoredutase intramolecular, transferase intramolecular, liase intramolecular e outras isomerases.³¹ A isomerização envolve a conversão de uma molécula em outra com a mesma fórmula molecular. Algumas enzimas provocam o movimento de elétrons em diferentes posições com a concomitante migração de hidrogênio.

As enzimas que realizam migração [1,1] de hidrogênio podem ser divididas em racemase (somente um centro estereogênico) e epimerase (mais de um centro estereogênico). No primeiro caso, o sítio ativo utiliza apenas um resíduo de aminoácido atuando na remoção e doação de hidrogênio (**Esquema 8, A**). No segundo caso uma base do sítio ativo remove o hidrogênio de um dos centros estereogênicos a partir do substrato e o ácido conjugado da segunda base do mesmo sítio adiciona o hidrogênio na face oposta (**Esquema 8, B**). Os mecanismos propostos foram confirmados realizando a reação na presença de

³⁰ (a) Dreyer, M.K., Schulz, G.E. *J. Mol. Biol.* **1993**, 231, 549. (b) Dreyer, M.K., Schulz, G.E. *J. Mol. Biol.* **1996**, 259, 458.

³¹ Dixon, M. and Webb, E. C. *Enzymes* **1979**, 3^o ed., Academic press, New York, p.434-456.

solvente deuterado.³² O deutério foi apenas adicionado na reação onde o sítio ativo tem a participação de dois resíduos de aminoácidos.

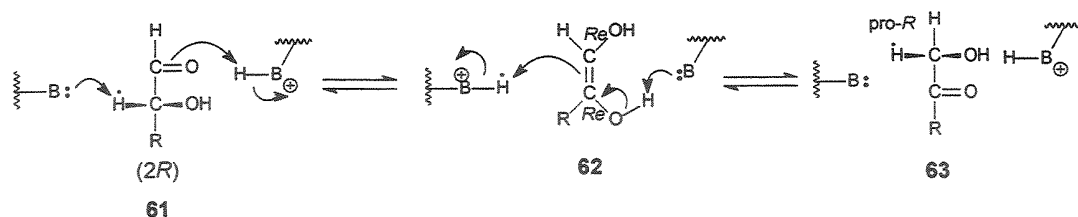


Esquema 8 – (A) mecanismo da racemização (epimerização) com a participação de uma base, (B) mecanismo da racemização (epimerização) com a participação de duas bases.³²

As oxidorreduções intramoleculares (ou internas) realizam oxidação em uma porção da molécula com a correspondente redução de outra porção da mesma molécula. No caso da aldose-cetose isomerase ocorre uma reação redox interna onde dois mecanismos são considerados.³³ O primeiro mecanismo é o *cis*-enodiol (**Esquema 9**, pág. 23). A configuração do intermediário enodiol **62** para todas as aldose-cetose isomerases é sempre *cis*. A isomerase captura o hidrogênio da (*R*)-2-aldose **61** formando o intermediário enodiol **62**. Este hidrogênio é posteriormente transferido para o intermediário enodiol **62** pela face *Re-Re* sendo responsável pelo o hidrogênio *pró-R* na posição C-1 da cetose **63**. Este mecanismo foi elucidado através de experimentos com hidrogênio marcado. Percebeu-se que apenas algumas moléculas do produto estavam isotopicamente marcadas, indicando que houve troca do hidrogênio com o solvente.

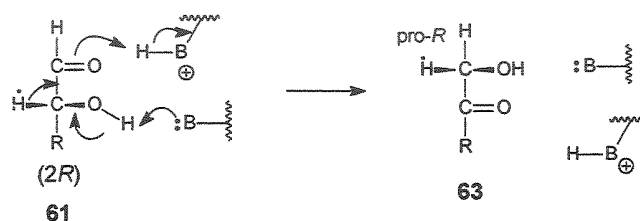
³² Rose, I. A. *Annu. Rev. Biochem.* 1966, 35, 23.

³³ Rose, I. A. *Adv. Enz. Rel. Áreas Mol. Biol.* 1975, 43, 491.



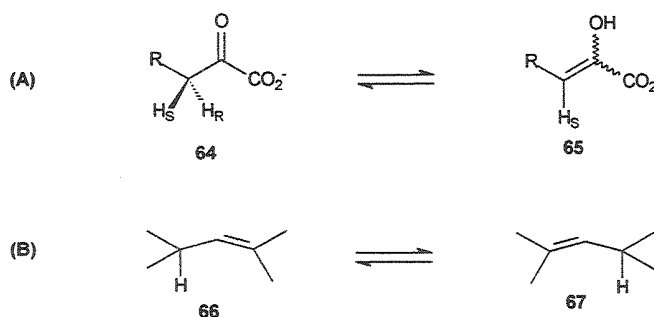
Esquema 9 – Mecanismo da reação *cis*-enodiol catalisada pela aldose-cetose isomerase.³³

No segundo mecanismo ocorre uma migração [1,2] de hidrogênio e no experimento com hidrogênio marcado todo o deutério pode ser incorporado no produto, provando que neste caso não ocorre troca deste hidrogênio com o solvente (Esquema 10).



Esquema 10 – Mecanismo de transferência de hidrogênio pela aldose-cetose isomerase.³³

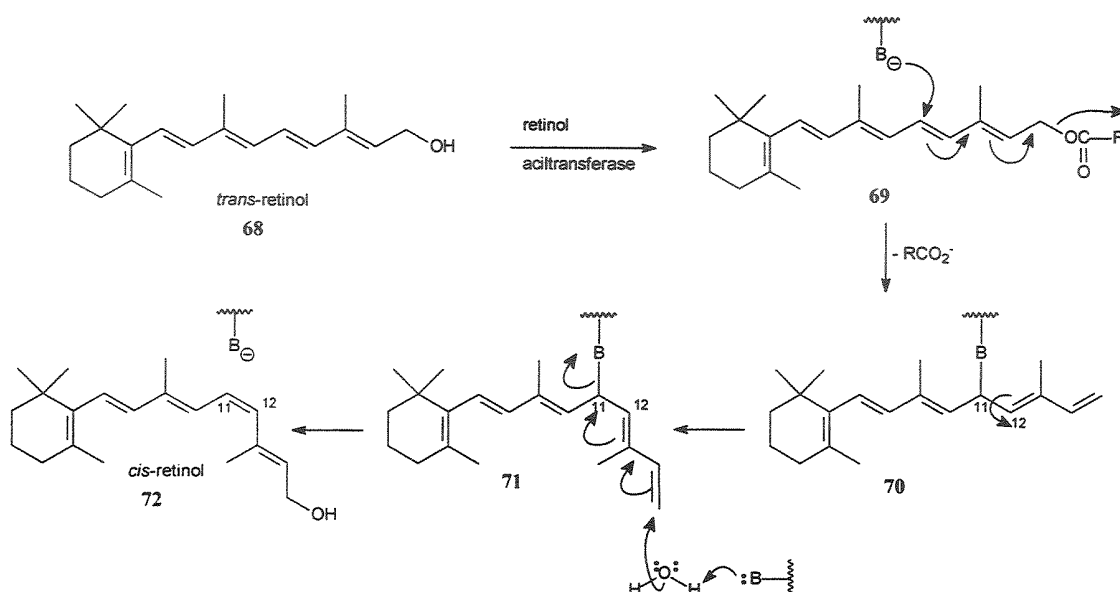
As enzimas tautomerases e alil isomerases promovem uma migração [1,3] de hidrogênio (Esquema 11).



Esquema 11 – Reações típicas catalisadas pelas isomerases através da migração [1,3]. (A) tautomerase e (B) alil isomerase.

Um exemplo clássico da classe das *cis-trans* isomerases é o retinol isomerase responsável pela mudança de configuração *trans/cis*. A retina dos animais é rica em retinol e seus derivados responsáveis pela nossa visão. Todo o

trans-retinol **68** é convertido para *cis*-retinol **72** pela retinol isomerase em um processo covalente. A perda do oxigênio do *trans*-retinol **68** durante o processo é observado em experimentos utilizando ^{18}O (Esquema 12). O primeiro passo é realizado pela retinol aciltransferase seguido de um ataque nucleofílico formando ligação covalente com o resíduo de aminoácido do sítio ativo. Desta forma é permitido ocorrer uma rotação entre C-11 e C-12 seguida de uma adição tipo Michael formando o *cis*-retinol **72**.³⁴



Esquema 12 – Proposta do mecanismo da reação catalisada pela retinol isomerase.³⁴

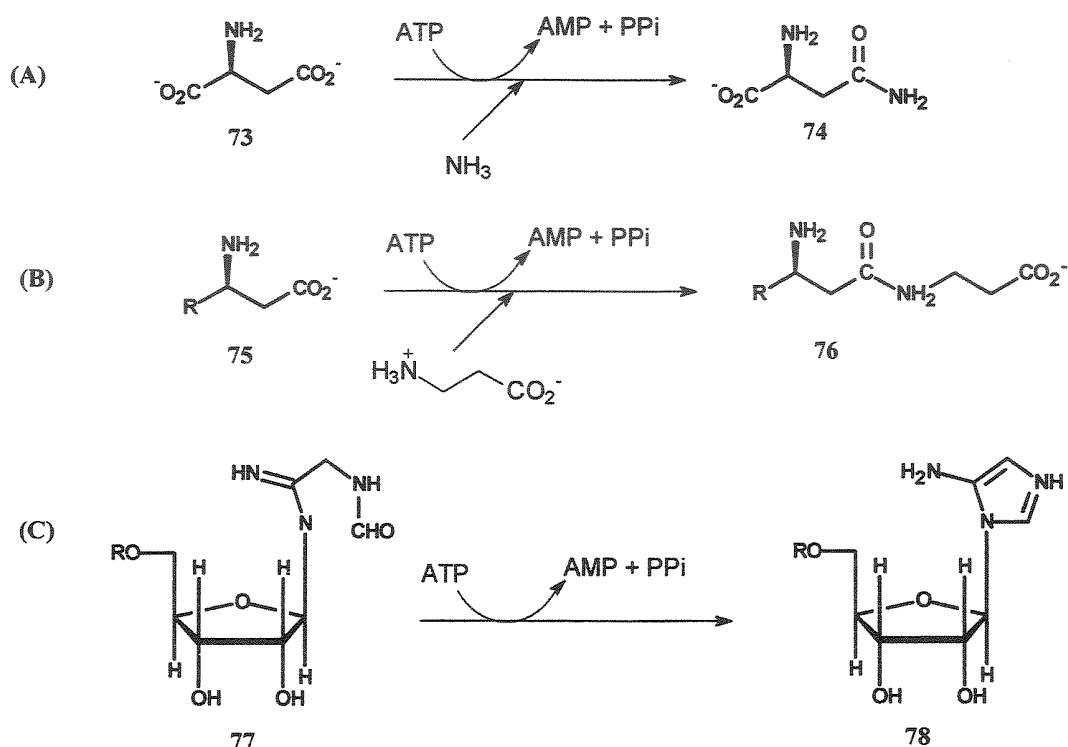
3.1.6. Ligases

As ligases são enzimas que catalisam a união de duas moléculas com concomitante hidrólise da ligação fosfato do ATP ou um trifosfato similar. 'Ligase' é o nome comum normalmente usado, mas em alguns casos podem ser usados 'sintase' ou 'carboxilase'. 'Sintetase' pode ser usado no lugar de 'sintase' em algumas classes de enzimas.³⁵

³⁴ Deigner, P. S.; Law, W. C.; Cañada, F. J. and Rando, R. R. *Science*. **1989**, 244, 968.

³⁵ Dixon, M. and Webb, E. C. *Enzymes* **1979**, 3ª ed., Academic press, New York, p. 230.

Estas enzimas são capazes de catalisar a formação das ligações de C-C, C-N, C-S e C-O. As ligases podem catalisar a formação da ligação C-N através de moléculas simples (amônia ligase) até uma molécula mais complexa (peptídeo sintetase) ou promover a formação da ligação C-N por ciclização (ciclo ligase). (Esquema 13) Uma característica importante é a necessidade de co-fator para a realização das reações.



Esquema 13 – Reações típicas catalisadas pelas ligases para formação da ligação C-N. (A) amônia ligase, (B) peptídeo sintetase e (C) ciclo ligase.

AMP – monofosfato de adenosina e PPi – difosfato.

Uma família importante das ligases são as ciclases, responsáveis pela formação dos cicloalcanos encontrados em animais, vegetais e microrganismos por uma série de reações do tipo S_N2 a partir do fosfato de isopentenila. Uma grande variedade de produtos naturais com as mais diversas estruturas

(monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, etc.) pode ser obtidas pela catálise desta família de enzimas.³⁶

3.2. Aspectos catalíticos nas reações enzimáticas

Existem vários estudos que pretendem explicar o poder catalítico das enzimas de uma forma mais aprofundada. Um consenso entre os pesquisadores é que a enzima (E) acelera a reação baixando a barreira de energia entre o substrato (S) e o produto (P). Linus Pauling em 1946 propôs que a diminuição da energia de ativação em catálise enzimática origina-se da afinidade da enzima pelo substrato na formação de um estado de transição. Esta proposta ganhou popularidade e tornou-se a base para os estudos sobre inibidores e indutores da atividade catalítica em vários modelos moleculares.³⁷

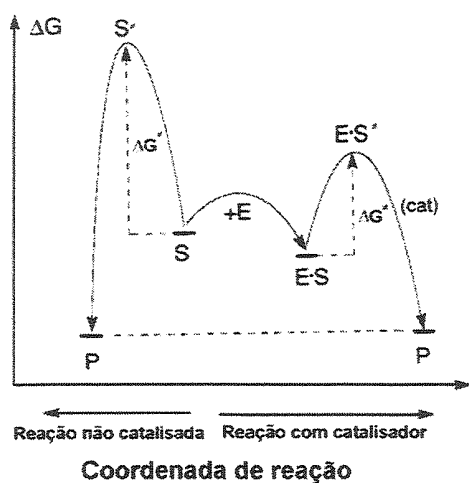


Figura 11 – Diagrama de energia da reação com catalisador e sem catalisador. S=substrato, P=produto, E=enzima, E•S = complexo enzima – substrato, ΔG = energia livre de ativação e ‡ denota o estado de transição.³⁸

As reações dentro do complexo enzima-substrato (E•S) exibem uma semelhança com as reações intramoleculares onde existe uma maior aproximação dos “reagentes”. O efeito da aproximação resulta em valores da velocidade de

³⁶ Torssell, K. B. G. *Natural Product Chemistry – A mechanistic, biosynthetic and ecological approach* 1997, 2ª ed., apotekarsocieteten, Atockholm, p.251.

³⁷ Bruice, T. C. and Benkovic, S. J. *Biochemistry*. 2000, 39, 6267.

³⁸ Faber, K. *Biotransformation in Organic Chemistry: a Textbook*, 4ª ed., Berlin, Germany: Springer-Verlag, 2000, p. 19.

reação muito superiores aos encontrados em reações bimoleculares correspondentes, na ordem de 10^8 .³⁹



A enzima pode utilizar uma variedade de mecanismos para catalisar a conversão do substrato em produto. Além da aproximação, pode ocorrer uma catálise covalente, catálise ácido/base, catálise eletrostática, dessolvatação e a torção e distorção. Esses processos são responsáveis pela estabilização do estado de transição ou desestabilização do estado fundamental.

³⁹ Bruice, T. C. and Lightstone, F. C. *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32, 127.

04. BIOCATÁLISE DE ORGANOSSULFURADOS

4.1. Organossulfurados em síntese

Tendo exposto nos capítulos anteriores sobre a importância e os fundamentos da biocatálise, assim sobre as diversas classes de enzimas e o estudo dos mecanismos enzimáticos passaremos a discorrer sobre a aplicação de biocatalisadores na obtenção de organossulfurados opticamente enriquecidos, especialmente em produtos de oxidação (sulfóxidos) e hidrólise (sulfinatos) que fazem parte dos objetivos a e b de nossa tese (pág. 7).

Os organossulfurados podem ser divididos em compostos de enxofre divalente, tricoordenado e tetracoordenado representados na **Tabela 2** (pág. 29). Dentre os derivados de enxofre nosso foco foi dirigido para os sulfóxidos e sulfinatos quirais.

Os sulfóxidos quirais são grupos versáteis que exercem um estereocontrole nas sínteses assimétricas.⁴⁰ Trata-se de um dos grupos de organossulfurados mais importante devido a sua fácil preparação, incorporação e eliminação.⁴¹

A incorporação do grupo sulfinila em uma molécula orgânica aumenta a acidez dos hidrogênios presentes no carbono adjacente devido a sua eletronegatividade. A acidez do hidrogênio α ao grupo sulfinila é maior do que o hidrogênio benzílico e menor do que o hidrogênio α a uma função carbonilada. Desta forma, o grupo sulfinila exerce um efeito de estabilização do carbânion formado.⁴²

A configuração piramidal do sulfóxido faz do átomo de enxofre um centro estereogênico, com isso os sulfóxidos R^1R^2SO com dois substituintes diferentes são quirais. Estes compostos possuem uma barreira de inversão significativamente alta (36-38 kcal/mol) e na ausência de ácidos, a racemização só é possível a temperaturas próximas a 200°C.⁴³ O rearranjo do tipo [2,3]-

⁴⁰ Hua, D. H.; Bharathi, S. N.; Panangadan, J. A. K. and Tsujimoto, A. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 6998.

⁴¹ Solladié, G. *Synthesis*. **1981**, 185.

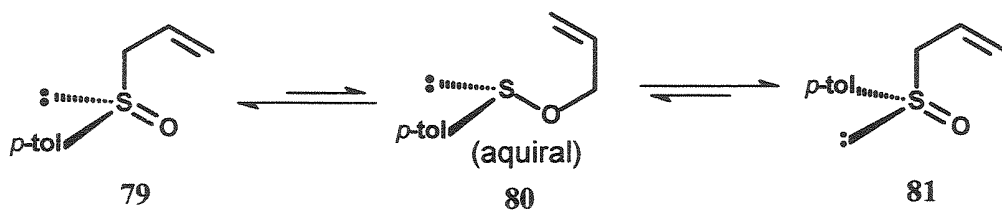
⁴² Speers, P.; Laidig, K. E. and Streitwieser, J. *Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9257.

⁴³ Jenks, W. S.; Matsunaga, N. and Gordon, M. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1275.

sigmatrópico é responsável pela racemização de sulfóxidos alílicos opticamente ativos em temperaturas modestas (50-70°C)⁴⁴ (Esquema 14).

Tabela 2 – Principais compostos organossulfurados divalente, tricoordenado e tetracoordenado.

Enxofre divalente		Enxofre tricoordenado		Enxofre tetracoordenado	
RSH	tiol	R ₃ S ⁺	sulfônio	R ₄ S	sulfurano
	tioéster	R ₂ S=O	sulfóxido		sulfona
RSR ¹	sulfeto ou tioéter	R ₂ S=NR ¹	sulfimida		sulfoximida
	tiirano ou episulfeto		ácido sulfinico		ácido sulfônico
(RS) ₂ CR ¹ ₂	ditioacetal		cloreto de sulfinila		cloreto de sulfonila
RSOH	ácido sulfênico		sulfinato		sulfonato
RSX	haletosulfenila		sulfinamida		sulfonamida
RSOR ¹	sulfenato		tiosulfinato		tiosulfonato
RSSR ¹	dissulfeto		sulfito		
R ₂ C=S	tiocetona				
	tiona				



Esquema 14 - Mecanismo de racemização de sulfóxidos alílicos.

⁴⁴ Bickart, P.; Carson, F. W.; Jacobus, J.; Miller, E. G. and Mislow, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 4869.

Existem na literatura algumas representações comumente utilizadas para sulfóxidos (Figura 12). Normalmente utilizamos a representação (a), apesar das possíveis implicações em consideração aos orbitais d. Entretanto (b) e (c) enfatizam a natureza polar da ligação, sendo usadas por conveniência em muitos casos.

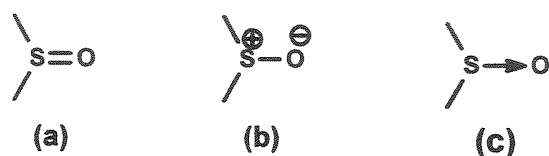
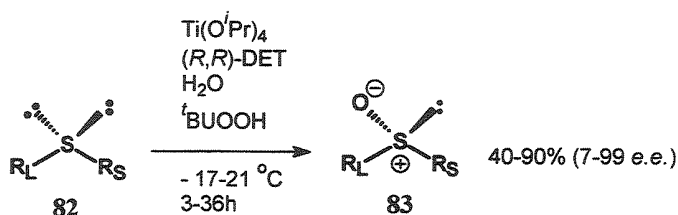


Figura 12 - Representações de sulfóxidos.

A oxidação assimétrica do sulfeto é a forma mais conveniente de obtenção de sulfóxido, até então dependente do ambiente quiral⁴⁵ e limitada pela especificidade do substrato ou pela formação de moderados ou baixos excessos enantioméricos. Um novo horizonte foi vislumbrado pelos grupos de Kagan⁴⁶ e Modena⁴⁷ que independentemente realizaram modificações ao reagente de epoxidação de Sharpless. A epoxidação enantiosseletiva de álcoois alílicos (e.e. > 95%) foi realizada usando o sistema hidroperóxido de *t*-butila/ tetraisoperóxido de titânio/ (+) ou (-)-tartrato de dietila (DET).⁴⁸ Os dois grupos utilizaram a combinação $\text{Ti}(\text{O}^i\text{-Pr})_4$ / (*R,R*)- DET/ H_2O = 1 : 2: 1 ou $\text{Ti}(\text{O}^i\text{-Pr})_4$ / (*R,R*)- DET = 1 : 4 para controlar a oxidação de sulfeto **82** por hidroperóxidos obtendo e.e. > 95 (Esquema 15).



Esquema 15 - Representação da reação de oxidação de **82** realizada com o sistema Kagan-Modena.⁴⁸

⁴⁵ Carreño, M. C. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 1717.

⁴⁶ Pichen, P.; Kagan, H. B. *Tetrahedron lett.* **1984**, *25*, 1953.

⁴⁷ Di Fúria, F.; Modena, G. and Seraglia, R. *Synthesis*. **1984**, 325.

⁴⁸ Katsuki, T.; Sharpless, K. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5974.

O grupo de Kagan propôs o estado de transição (**Figura 13**) para explicar a origem da enantiosseletividade quando se utiliza o sistema $\text{Ti}(\text{O}^i\text{-Pr})_4$ / (*R,R*)-DET/ H_2O = 1 : 2: 1. O aumento de ciclos catalíticos foi obtido pela presença de peneira molecular e isopropanol ao invés de água.

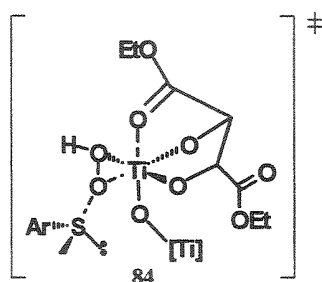
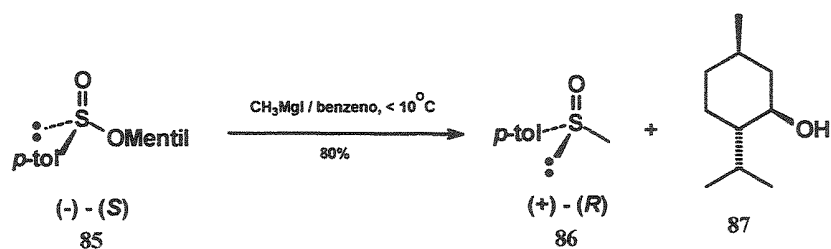


Figura 13 – Estado de transição proposto por Kagan.⁴⁹

Outra opção para obtenção de sulfóxidos quirais é o método de Andersen. Este método é um dos mais eficientes na produção de sulfóxidos opticamente ativos em larga escala. Este método utiliza-se da reação do sulfinato de mentila diastereomericamente enriquecido **85** com um reagente de Grignard. Esta reação é do tipo $\text{S}_{\text{N}}2$, portanto o produto formado **86** possui inversão na configuração inicial⁵⁰ (**Esquema 16**).



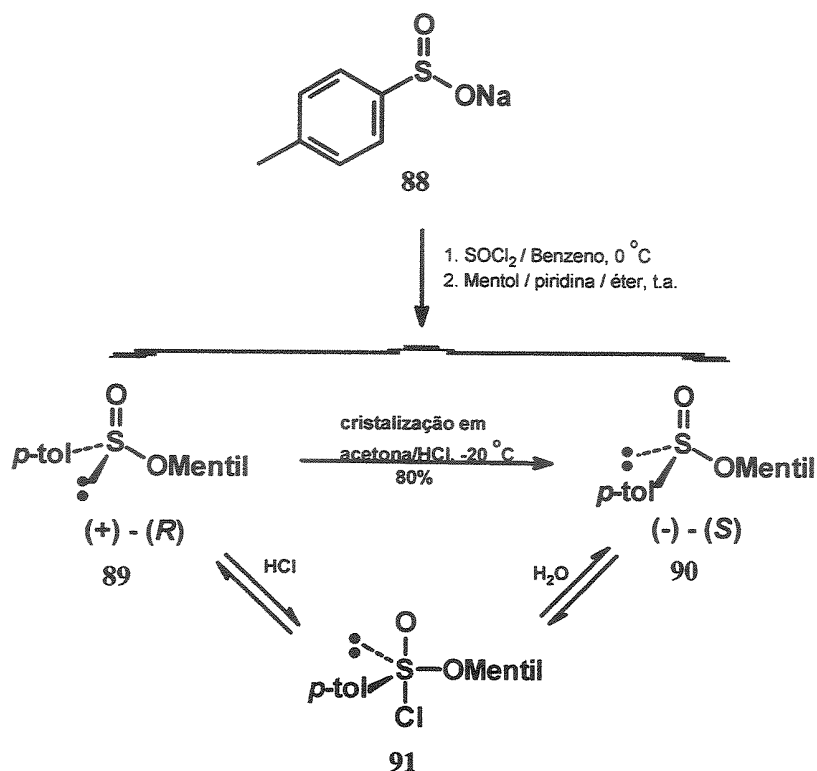
Esquema 16 – Obtenção de sulfóxido quiral pelo método de Andersen.⁵⁰

O sulfinato de mentila com altos excessos diastereoméricos é obtido a partir da esterificação do ácido *p*-toluenossulfínico **88** com 1-mentol **87** enantiomericamente puro. Os diastereoisômeros em meio ácido, sofrem epimerização levando para uma predominância do isômero menos solúvel, (-)-(S)-

⁴⁹ Potvin, P. G. and Fieldhouse, B. G. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 1661.

⁵⁰ Andersen, K. K. *Tetrahedron Lett.* **1962**, *29*, 1953.

p-toluenossulfinato de mentila **90**, o qual é obtido em 90% de rendimento a partir do ácido *p*-toluenossulfínico ⁵¹ (Esquema 17).



Esquema 17 – Obtenção do (-)-(S)-*p*-toluenossulfinato de mentila.⁵¹

A eficiência de sulfóxidos como auxiliares quirais em reações diastereosseletivas é principalmente devido às diferenças estereoeletrônicas existentes entre os grupos ligados ao átomo de enxofre estereogênico: (i) um par de elétrons, (ii) um átomo de oxigênio e (iii) dois grupos alquilas diferentes.

4.2. Sulfóxidos quirais por biocatálise

A biossulfoxidação é uma alternativa “natural” para a produção de sulfóxidos com altos excessos enantioméricos.⁵² A primeira indicação que culturas de fungos eram capazes de oxidar tioéteres para sulfóxidos foi observada quando

⁵¹ Solladié, G.; Hutt, J. and Girardin, A. *Synthesis*. 1987, 173.

⁵² Holland, H. L. *Chem. Rev.* 1988, 88, 473.

adicionada biotina **92** em meio de cultura contendo *Aspergillus niger* resultando na formação de um novo composto identificado como biotina-S-óxido **93**.⁵³

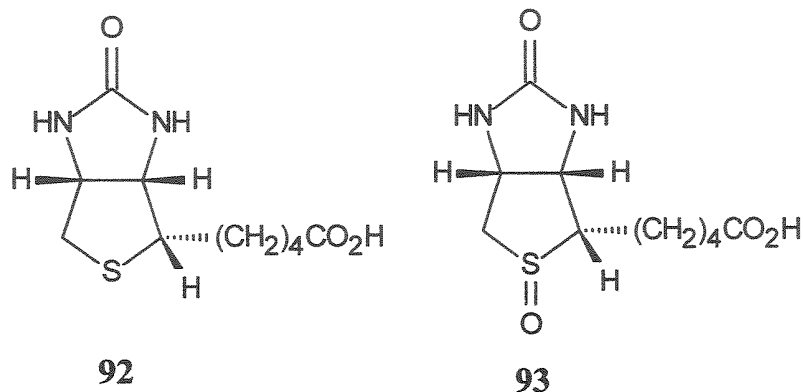


Figura 14 – Biotina e (-)-S-óxido-biotina.

O uso de células intactas de microrganismos para preparação de sulfóxidos quirais pela oxidação de sulfetos pró-quirais foi primeiramente citada por Dodson e colaboradores.⁵⁴ Desde então este método tornou-se uma poderosa ferramenta na obtenção destes compostos, existindo uma maior variedade de fungos estudados com essa propriedade do que bactérias.⁵⁵

Trabalhos com fungo *A. niger* avaliaram uma série de aril e benzil sulfetos como candidatos promissores a biotransformação. De um modo geral os di-aril-sulfetos foram recuperados após o período de incubação, mas os derivados alquil-aril-sulfetos apresentaram resultados animadores fornecendo sulfóxidos com bons excessos enantioméricos (60-100%) e rendimentos moderados (20-50%)⁵² (Tabela 3, pág. 34).

Desde então, iniciou-se uma procura sistemática por microrganismos capazes de oxidar de forma enantiosseletiva derivados alquil-aril-sulfetos. Em 1978, Sih e colaboradores publicaram a conversão de metil-*p*-toluil-sulfeto **100** por *Helminthosporium sp.* obtendo o enantiômero *S* do sulfóxido **86** com 100% de excesso enantiomérico e 50% de rendimento⁵⁶ (Esquema 18, pág. 35).

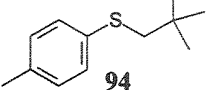
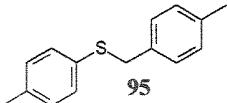
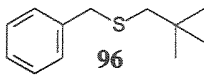
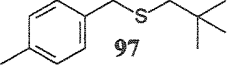
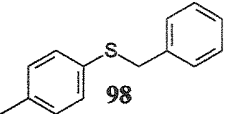
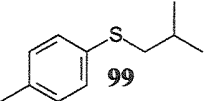
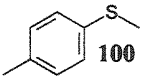
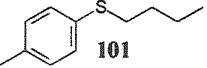
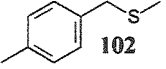
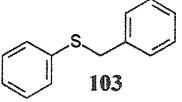
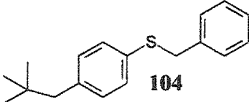
⁵³ Wright, L. D.; Cresson, E. L.; Valiant, J.; Wolf, D. E.; Folkers, K. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 4163.

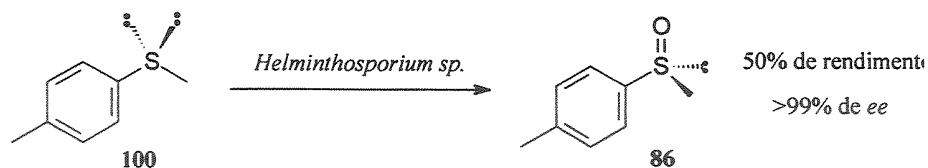
⁵⁴ Dodson, R. M.; Newman, N. and Tsuchiya. *J. Org. Chem* **1962**, *27*, 2707.

⁵⁵ Holland, H. L. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 171.

⁵⁶ Abushanab, E.; Reed, D.; Suzuki, F.; Sih, C. J. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *37*, 3415.

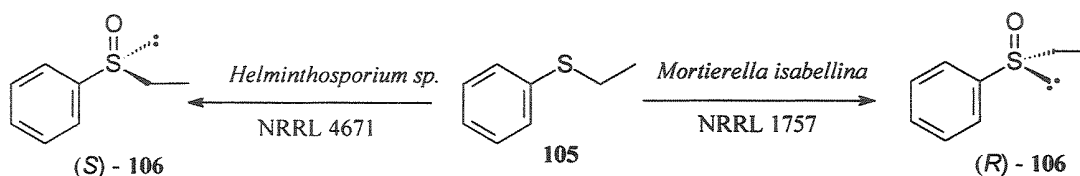
Tabela 3 – Biotransformação de aril e benzil sulfetos por *A. niger* (1988).⁵²

Substrato	SULFÓXIDO		
	Rend (%)	ee (%)	Config
 94	20-25	91-100	S
 95	4-12	88-100	R
 96	24-65	77-91	S
 97	44-49	78-88	S
 98	3-26	56-82	R
 99	7-12	69-71	R
 100	7-48	32-87	R
 101	5-11	30-34	R
 102	18	25-46	R
 103	9-35	4-27	S
 104	8	13	R



Esquema 18 – Oxidação de metil-*p*-toluil-sulfeto **100** por *Helminthosporium sp.* obtendo o enantiômero S do sulfóxido **86**.⁵⁶

O grupo do Prof. Holland utilizou os fungos *Helminthosporium sp.* NRRL 4671⁵⁷ e *Mortierella isabellina* NRRL 1757⁵⁸ na oxidação do derivado etil-fenil-sulfeto **105** para obtenção de (S)-etil-fenil-sulfóxido **106** com rendimentos de 40% e 84% ee e (R)-etil-fenil-sulfóxido **106** com 70% e 84% ee, respectivamente. Estes resultados mostraram a versatilidade deste método na obtenção do enantiômero de interesse.



Esquema 19 – Oxidação de etil-fenil-sulfeto **105** por *Helminthosporium sp.* NRRL 4671⁵⁷ e *Mortierella isabellina* NRRL 1757⁵⁸.

O mesmo substrato foi examinado na presença das bactérias mutantes *Pseudomonas putida* UV4 e *Pseudomonas putida* NCIMB 8859⁵⁹ fornecendo (R)-**106** com 64% de rendimento e ee acima de 98%; (S)-**106** com 27% de rendimento e 84% ee, respectivamente. Finalmente linhagens de *E. coli* recombinadas com *Pseudomonas putida* NCIMB 9816 forneceram (S)-**106** com 87% de rendimento e 86% ee.⁶⁰

Em geral, os compostos organossulfurados, como qualquer outro xenobiótico, são oxidados *in vitro* e *in vivo* por um ou mais tipo de monooxigenases (MOs) e dioxigenases (DOs).

⁵⁷ Holland, H. L.; Brown, F. M.; Lakshmaiah, G.; Larsen, B. G. and Patel, M. *Tetrahedron : Asymmetry* **1997**, 8, 683.

⁵⁸ Holland, H. L. and Carter, I. M. *Can. J. Chem.* **1982**, 60, 2420.

⁵⁹ Boyd, D. R.; Sharma, N. D.; Haughey, S. A.; Kennedy, M. A.; McMurray, B. T.; Sheldrake, G. N.; Allen, C. C. R.; Dalton, H. and Sproule. *J. Chem. Soc., Perkins Trans. I*, **1998**, 1929.

⁶⁰ Kerridge, A.; Willetts, A. and Holland, H. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1999**, 6, 59.

A cicloexanona monooxigenase (CMO)⁶¹, a cloroperoxidase (CPO)⁶², a bromoperoxidase (BPO)⁶³, tolueno dioxigenase (TDO)⁵⁹, naftaleno dioxigenase (NDO)⁵⁹, monooxigenase dependente de citocromo P-450 (CYT P-450)⁶⁴ são exemplos de enzimas capazes de oxidar sulfetos a sulfóxidos estereo- e enantiosseletivamente.

A utilização destas enzimas em reações de larga escala é inviável devido ao seu alto custo. A reciclagem dos co-fatores não é um problema quando células íntegras de microrganismos são utilizadas em reações redox por biocatálise, pois a regeneração dos co-fatores ocorre naturalmente no próprio complexo celular dos microrganismos.⁶⁵

Apesar dos diversos trabalhos com a utilização de células íntegras faz-se necessária uma maior investigação da capacidade de biooxidação de sulfetos, o grau de estereosseletividade e configuração absoluta dos sulfóxidos obtidos por parte das diversas linhagens, visto que, estes fatores são altamente influenciados pelas linhagens e espécies de microrganismos usados.⁶⁶

Embora os fungos sejam uma fonte rica em citocromo P-450⁶⁷ e capazes de realizar reações oxidativas análogas às enzimas microssomais do fígado de mamíferos, as dificuldades do isolamento de quantidades suficiente de enzimas oxidativas ativas a partir de fungos tem frustrado seu estudo e sua completa caracterização. Entretanto, artigos citam a ocorrência de monooxigenases dependentes de flavinas (FMO) em fungos.⁶⁸ Portanto, qualquer proposta sobre as enzimas responsáveis pela oxidação de sulfetos sem o seu prévio isolamento e caracterização é especulativa.

O citocromo faz parte da grande família de hemoproteínas, um grupo de proteínas que contém um grupo prostético do tipo hemo firmemente ligado à

⁶¹ Colonna, S.; Gaggero, N.; Pasta, P. and Ottolina, G. *Chem. Commun.* **1996**, 2303.

⁶² Spret, N.; Germani, R.; Incani, A. and Savelli, G. *Biotechnol. Prog.* **2004**, *20*, 96.

⁶³ Andersson, M. A. and Allenmark, S. G. *Tetrahedron.* **1998**, *54*, 15293.

⁶⁴ Baciochi, E.; Lanzalunga, O. And Pirozzi, B. *Tetrahedron.* **1997**, *53*, 12287.

⁶⁵ Alphaland, V. Furstoss, R. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1306.

⁶⁶ Auret, B. J.; Boyd, D. R.; Henbest, H. B. ; Watson, C. G. ; Balenovic, K.; Polak, V.; Johanides, V. ; Divjak, S. *Phytochemistry* **1974**, *13*, 65.

⁶⁷ van den Brink, H. (J.) M.; van Gorcom, R. F. M.; van den Hondel, C. A. M. J. J. and Punt, P. J. *Fungal Genetics and Biology* **1998**, *23*, 1.

⁶⁸ Carbaleira, J. D.; Álvarez, E. and Sinisterra, J. V. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, *28*, 25.

cadeia polipeptídica. O grupo hemo contém um anel protoporfirínico IX (Figura 15b), uma porfirina (Figura 15a) substituída por grupos metila, vinila e $-(CH_2)_2-COOH$. Os quatro nitrogênios do anel porfirínico aparecem coordenados com o íon ferroso com geometria octaédrica. O grupo hemo dos citocromos funciona como um transportador de elétrons durante o processo de oxidorredução.

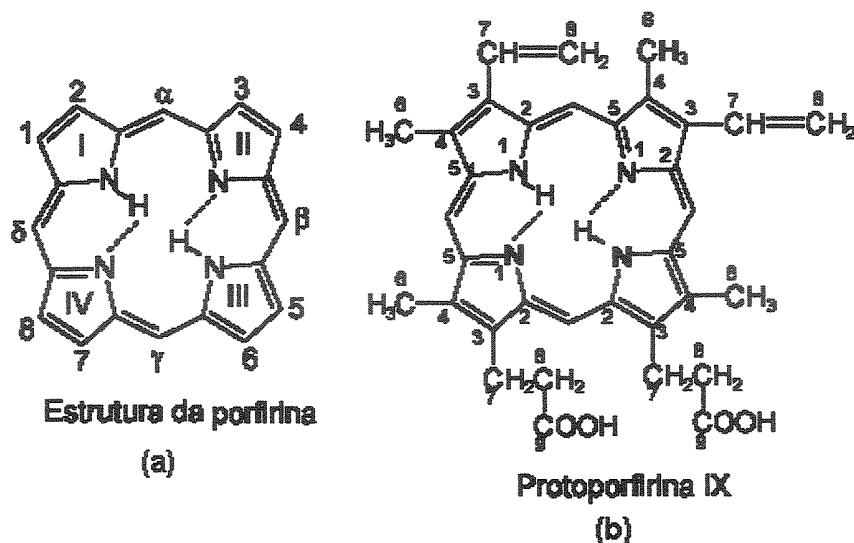


Figura 15 – (a) estrutura da porfirina e (b) protoporfirina IX.

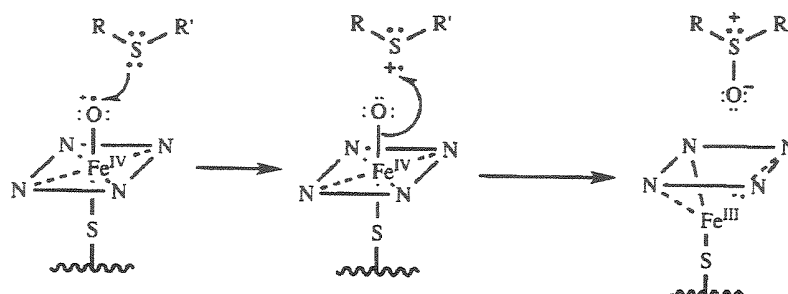
O citocromo P-450_{CAM} catalisa diversas reações oxidativas em uma grande variedade de substratos orgânicos incluindo substratos com ligações C-H não ativadas.⁶⁹ Entretanto, diferentemente das outras enzimas, a aproximação do substrato ao sítio ativo de enzimas contendo o grupo prostético não é tão evidente pelas análises de raios-X. Além disso, muitos programas usam um substrato rígido e uma enzima rígida que não levam em conta as mudanças de conformação para se adequar a uma aproximação perfeita.⁷⁰

As oxidações promovidas pelas monooxigenases dependentes do citocromo P-450 foram bastante estudadas nos últimos anos. Seu ciclo catalítico foi originalmente proposto pelo estudo da cânfora hidroxilase da *Pseudomonas putida* (CYT-P-450_{CAM}). Em geral é proposto que oxidações de sulfetos sejam

⁶⁹ Sono, M; Roach, M. P.; Coulter, E. D. and Dawson, J. H. *Chem. Rev.* 1996, 96, 2841.

⁷⁰ Kazlauskas, R. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2000, 4, 81.

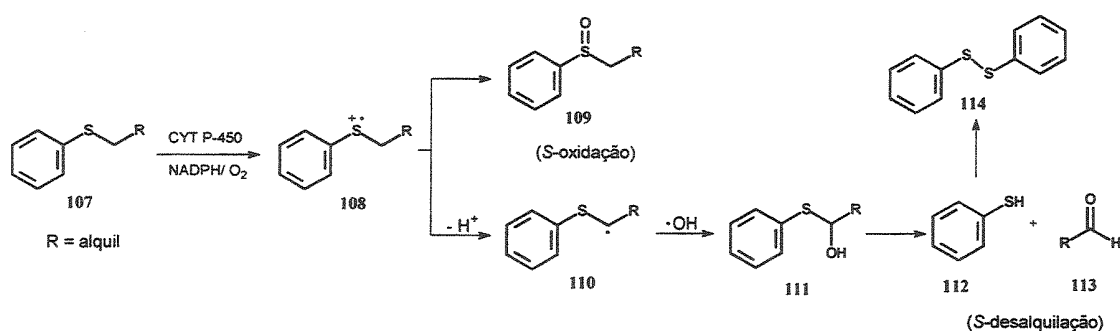
iniciadas pela transferência de um elétron do sulfeto para a espécie oxo-Fe(IV) cátion-radicalar ⁷¹ (Esquema 20).



Esquema 20 – Proposta do mecanismo de oxidação do sulfeto pelo CYT P-450.⁷¹

Surpreendentemente, apesar de excelentes conversões e excessos enantioméricos com baixa ou nenhuma formação de sulfona os rendimentos isolados verificados na literatura são apenas moderados e pouco explicados.

O sulfeto **107** é oxidado ao correspondente sulfóxido **109** e em alguns casos para sulfona, além de sofrer, alternativamente, uma S-desalquilação na presença de hidrogênios ácidos na posição α do substrato. A estabilidade do intermediário cátion-radicalar **108** ⁷² possui um papel importante na determinação do caminho da reação (Esquema 21).



Esquema 21 – Proposta do mecanismo para S-desalquilação do sulfeto pelo citocromo P-450.⁷²

⁷¹ Baciochi, E.; Lanzalunga, O. And Pirozzi, B. *Tetrahedron*. **1997**, *53*, 12287.

⁷² Watanabe, Y.; Oae, S. and Iyanagi, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1982**, *55*, 188.

Os estudos de sulfoxidação de tioanisol pelo CYT-P-450_{CAM} mostraram ainda a formação parcial de um produto de hidroxilação (composto **115**, Figura 16).⁷³

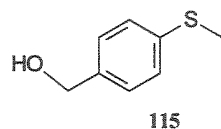
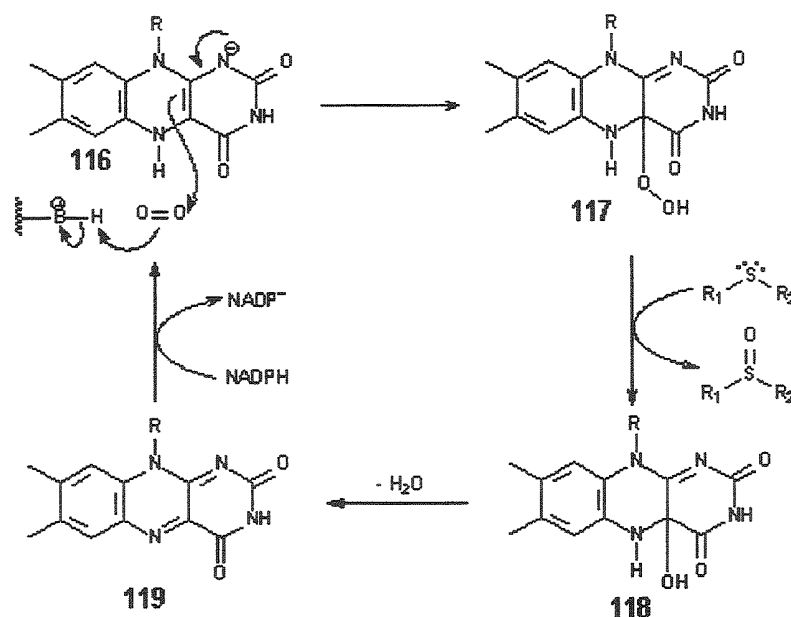


Figura 16 – Produto de hidroxilação do tioanisol pelo citocromo P-450.

A sulfoxidação pelas monooxigenases dependentes de flavinas segue um mecanismo diferente do utilizado pelas MOs dependentes de citocromo. Inicialmente, a flavina **116**, reduzida pelo NADH, reage com o oxigênio molecular formando o intermediário hidroperóxido de flavina **117**. O intermediário **117** promove um ataque eletrofílico ao sulfeto transferindo um átomo de oxigênio e formando a hidroxi-flavina **118**⁷⁴ (Esquema 22). Entretanto não há estudos sobre os possíveis produtos laterais na reação de oxidação de sulfetos por essas flavoenzimas.



Esquema 22 – Proposta do mecanismo de oxidação do sulfeto por MOs dependentes de flavo-proteínas.⁷⁴

⁷³ Fruetel, J.; Chang, Y.-T.; Collins, J.; Loew, G. and de Montellano, P. R. O. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11643.

⁷⁴ Kamerbeek, N. M.; Janssen, D. B.; van Berkel, W. J. H. and Fraaije, M. W. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 667.

Objetivando contribuir com a propagação da biocatálise como uma ferramenta de grande utilidade em síntese orgânica assimétrica, o interesse de nosso grupo de pesquisas tem sido direcionado para o uso de metodologias que levem a maiores rendimentos e elevados excessos enantioméricos dos produtos de oxidação de xenobióticos por microrganismos, tendo em vista sua produção e obtenção de compostos quirais biologicamente ativos.

4.2.1. Resultados e discussão

O nosso grupo de pesquisa vem estudando a capacidade oxidativa (sulfoxidação, Baeyer-Villiger, hidroxilação), redutiva, hidrolítica (epóxiidrolase) e de isomerização de diversas linhagens de microrganismos (fungos e bactérias).⁷⁵

Este trabalho pioneiro no IQ/UNICAMP envolvendo a avaliação do potencial biocatalítico de microrganismos (células integras) foi muito importante na determinação da estrutura, treinamento em técnicas microbiológicas e em equipamentos para esterilização, cultivo e manutenção de linhagens, já que a utilização destes equipamentos e metodologias se restringiam ao Departamento de Biologia.

Durante este período foi otimizada a determinação do número de células viáveis por litro de meio de crescimento dependente da idade da cultura, a composição do meio de crescimento (parâmetros nutricionais, marca e lote), tempo de crescimento e condições físicas (temperatura e rotação) para fungos, leveduras e bactérias para reprodutividade do experimento.

Além disso, os compostos xenobióticos podem ser tóxicos aos microrganismos, inclusive em baixas concentrações. Desta forma, foi otimizado uma razão 20 mg(substrato) em 25 mL de solução tampão fosfato obtendo uma concentração de 0,5 g L⁻¹ para 2 g de célula úmida, ou seja, uma proporção de 100 vezes em relação ao substrato, esperando não atingir a concentração mínima inibitória (MIC) para o microrganismo.

⁷⁵ (a) Porto, A. L. M. *Isolamento e Seleção de Microrganismos Brasileiros para Reações de Biocatálise e Produção de Metabólitos*. Tese de Doutorado, Unicamp, 2002. (b) Gonçalves, R. A. C. *Intermediários Sintéticos Versáteis, Enantiomericamente Puros, Obtidos por Biocatálise*. Tese de Doutorado, Unicamp, 2002.

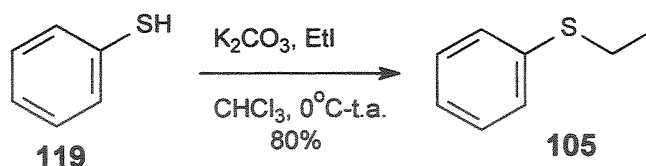
Não foi nosso objetivo estudar modelos para predição da estereosseletividade da oxidação do sulfeto, nem mesmo a obtenção de sulfóxidos em escala preparativa, e sim, avaliar linhagens de bancos brasileiros de microrganismos em reações de oxidação enantiosseletiva de sulfetos visando sua utilização na obtenção de intermediários pivô para sínteses assimétricas. Não foram avaliadas as enzimas comerciais e microrganismos da literatura, pois tinha-se como objetivo avaliar o potencial enzimático de microrganismos preservados na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (<http://www.cpqba.unicamp.br/cbmai>) e na Coleção de Culturas Tropicais (<http://www.cct.org.br/>).

Em contraste aos métodos sintéticos de preparação de sulfóxidos quirais, a biocatálise de organossulfurados, não é extensivamente empregada com propósitos sintéticos. Com o aumento do emprego de sulfóxidos quirais em sínteses assimétricas, verificamos a necessidade de um método microbiológico adequado para a preparação tanto de (*R*) como de (*S*)-alquil-fenil-sulfóxido, *sintons* importante para uma variedade de intermediários sintéticos. O etil-fenil-sulfeto **105** foi selecionado como modelo de investigação de biooxidação pelas diversas linhagens. Nos trabalhos anteriores do nosso grupo foi obtido o etil-fenil-sulfóxido **106** apenas com a configuração *S* pelas três linhagens testadas. O fungo *Aspergillus terreus* CCT 3320 forneceu o melhor resultado na conversão (100%) e excesso enantiomérico >99%.

4.2.1.1. Preparação dos padrões para seleção de microrganismos

Para a avaliação das linhagens foi sintetizado o etil-fenil-sulfeto **105**. Conforme mostrado no **Esquema 23**, o tioéter **105** foi obtido pela reação nucleofílica do tiofenol **119** com excesso de iodeto de etila.⁷⁶ Inicialmente uma solução de tiofenol foi vigorosamente agitada à 0°C quando foi adicionado carbonato de potássio. Depois de homogeneizada a mistura adicionou-se o iodeto de etila. O progresso da reação foi acompanhado por CCD.

⁷⁶ Russell, G. A.; Pecoraro, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 3331.



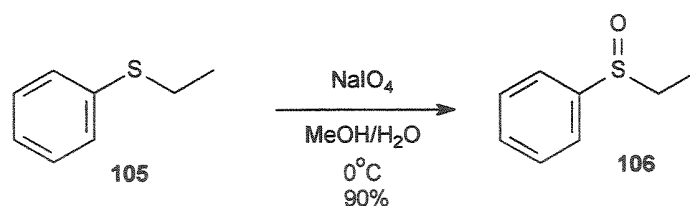
Esquema 23 – Obtenção do sulfeto 105.

Após a purificação do produto bruto por cromatografia em coluna obteve-se **105** com 80% de rendimento. A caracterização deste composto foi feita com base na análise de seus dados espectroscópicos (RMN ^1H e ^{13}C) e espectrométricos (EM). Pelo espectro de RMN ^1H , a porção alquílica do etil-fenil-sulfeto **105** foi confirmada pelo tripleto ($J = 7,3$ Hz) em δ_{H} 1,31 e o quarteto ($J = 7,3$ Hz) em δ_{H} 2,93, e porção aromática pelos sinais entre δ_{H} 7,15 a δ_{H} 7,40. O grupo tioetil é responsável pelo aumento da densidade eletrônica nas posições *orto* e *para* do anel aromático e pela blindagem do hidrogênio na posição *meta* formando um sistema de spin do tipo AA'BB' (**E 02**). No espectro de massas observou-se a ocorrência do íon molecular em m/z 138 (100%) e picos característicos, correspondentes à perda do radical metila (m/z 123, 62%) e perda do radical etila (m/z 110, 60%) (**E 01**).

Sulfetos podem ser oxidados aos sulfóxidos correspondentes por uma variedade de agentes oxidantes. O tratamento de sulfetos com perácidos, peróxido de hidrogênio ou peróxidos de alquila produzem facilmente sulfóxidos racêmicos. A formação de sulfona nestas reações é muito favorecida. Para a obtenção do sulfóxido racêmico **106** utilizamos o método de Leonard e Johnson⁷⁷. A oxidação pelo *meta*-periodato de sódio é extremamente branda e oferece elevados rendimentos de sulfóxidos, livre de sulfetos ou sulfonas. Entretanto, seu custo é mais elevado que outros reagentes oxidantes (p.e. peróxido de hidrogênio) tornando o seu uso menos aconselhável quando se trata de reações em larga escala. A oxidação de aril-sulfetos com *meta*-periodato pode ser realizada à temperatura ambiente, porém um banho de gelo previne uma super-oxidação. Este procedimento poderá sofrer pequenas modificações dependendo das

⁷⁷ Leonard, N. J. and Johnson, C. R. *J. Org. Chem.*, 1962, 27, 282.

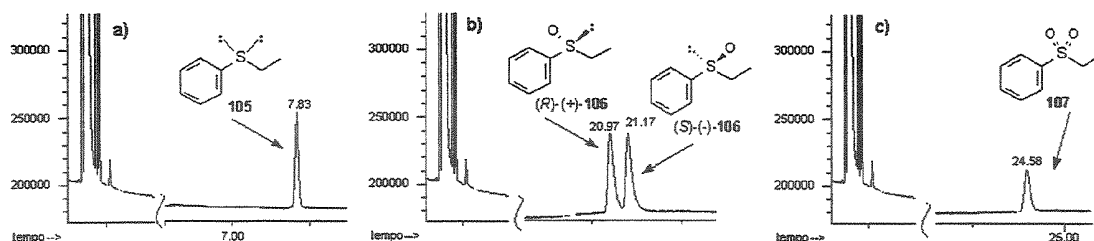
propriedades físicas do sulfeto e do sulfóxido em questão. O sulfeto **105** é insolúvel em água, necessitando a utilização de um co-solvente. Utilizamos a mistura água-metanol na proporção de 1:1. Após duas horas, a suspensão resultante foi filtrada e tratada com clorofórmio e a mistura água-clorofórmio foi separada. A fase aquosa foi ainda submetida à extração com clorofórmio. Depois da purificação do produto bruto por cromatografia em coluna obteve-se **106** com 90% de rendimento (**Esquema 24**).



Esquema 24 – Obtenção do sulfóxido **106**.

A obtenção do composto **106** foi caracterizada pela observação, no espectro de massas (**E 05**), do pico referente ao íon molecular em m/z 154 (24%) e pico correspondentes à perda do radical etila (m/z 126, 63%), enquanto que pelo espectro de RMN ^1H (**E 06**), a ocorrência de dois duplos quartetos ($J = 13,6$ Hz e $J = 7,5$ Hz) em δ_{H} 2,78 e δ_{H} 2,90 foi atribuída a ressonância dos hidrogênios metilênicos diastereotópicos da molécula. O padrão de acoplamento da porção aromática do sulfóxido **106** é ainda mais complexa do que o sulfeto **105**, onde agora o hidrogênio da posição *orto* é mais desprotegido pelo efeito anisotrópico dos elétrons π do grupo sulfinila. O padrão do etil-fenil-sulfona **120** havia sido sintetizado pelo nosso grupo e encontra-se disponível no nosso laboratório.

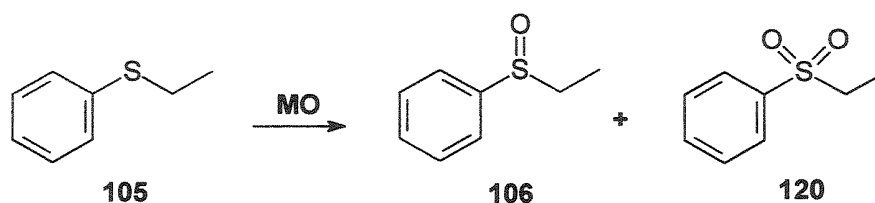
Com os padrões em mãos realizamos a otimização da análise dos compostos (**C01**). As análises foram realizadas no cromatógrafo gasoso (FID) HP-6890 equipado com uma coluna capilar quiral (2,6-dimetil-3-pentil)- β -ciclodextrina (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm). Desta forma, confirmou-se a presença do etil-fenil-sulfeto **105**, etil-fenil-sulfóxido **106** e etil-fenil-sulfona **120**, e identificou-se a configuração do sulfóxido e o excesso enantiomérico pela análise dos padrões em GC-FID equipado com a coluna capilar quiral utilizada nos experimentos de biooxidação do sulfeto.



C 01 – Cromatogramas (GC-FID) equipado com coluna capilar quiral (2,6-dimetil-3-pentil)- β -ciclodextrina (25 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), detector 220 $^{\circ}$ C, injetor 200 $^{\circ}$ C, gás de arraste (H_2 , 10 psi) do padrão do a) etil-fenil-sulfeto **105**, b) etil-fenil-sulfóxido **106** e c) etil-fenil-sulfona **107**.

4.2.1.2. Seleção de microrganismos pela oxidação do etil-fenil-sulfeto

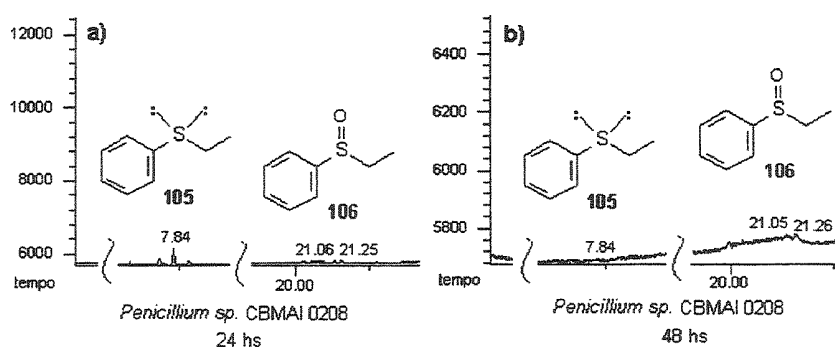
As linhagens de microrganismos encontravam-se conservadas em tubos inclinados na geladeira do Laboratório de Biocatálise e Síntese (LABIOSIN) da Unicamp. Portanto, inicialmente foram inoculados e cultivados em meio de extrato de malte (ME) em tubos inclinados previamente esterilizados e mantidos em estufa a 28 $^{\circ}$ C para obtenção de células “frescas”. Após 3 dias, as linhagens foram inoculadas em erlenmeyer (500 mL) contendo 100 mL de meio líquido (ME) e colocados num agitador rotativo a 28 $^{\circ}$ C e rotação de 120 rpm. Depois de mais 3 dias, os meios contendo as células crescidas foram filtrados sob vácuo e as células úmidas (2g) foram ressuspensas em erlenmeyer (125 mL) contendo 40 mL de solução tampão fosfato (0,1 M) com pH $\approx$ 7,0. Em seguida, adicionou-se 20 μ L do etil-fenil-sulfeto **105** e novamente levados ao agitador rotativo a 28 $^{\circ}$ C e rotação de 120 rpm e monitorados a cada 24 horas.



Esquema 25 – Reação de biotransformação do sulfeto **105**.

Para o monitoramento retirou-se alíquotas de 0,5 mL da mistura reacional que foram extraídas com 2 mL de acetato de etila. A fração orgânica foi seca sobre sulfato de sódio e evaporada sob fluxo de nitrogênio até aproximadamente 50 μ L. Desta solução foi injetado 1 μ L para análise em cromatografia gasosa acoplada ao detector por ionização de chama (GC-FID) equipado com uma coluna capilar quiral (2,6-dimetil-3-pentil)- β -ciclodextrina (25 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). As reações foram acompanhadas durante 96 horas e os resultados estão apresentados na **Tabela 4** (pág. 47).

A análise cromatográfica revelou que em quatro experimentos obtivemos sulfóxido com configuração *S* e em sete experimentos obtivemos a configuração *R*. No experimento 9 (C 02) não houve excesso enantiomérico. Nos experimentos observou-se pouca ou nenhuma formação de sulfona o que pode favorecer um melhor rendimento na obtenção de sulfóxidos em biooxidações em escala preparativa (**Tabela 4**).

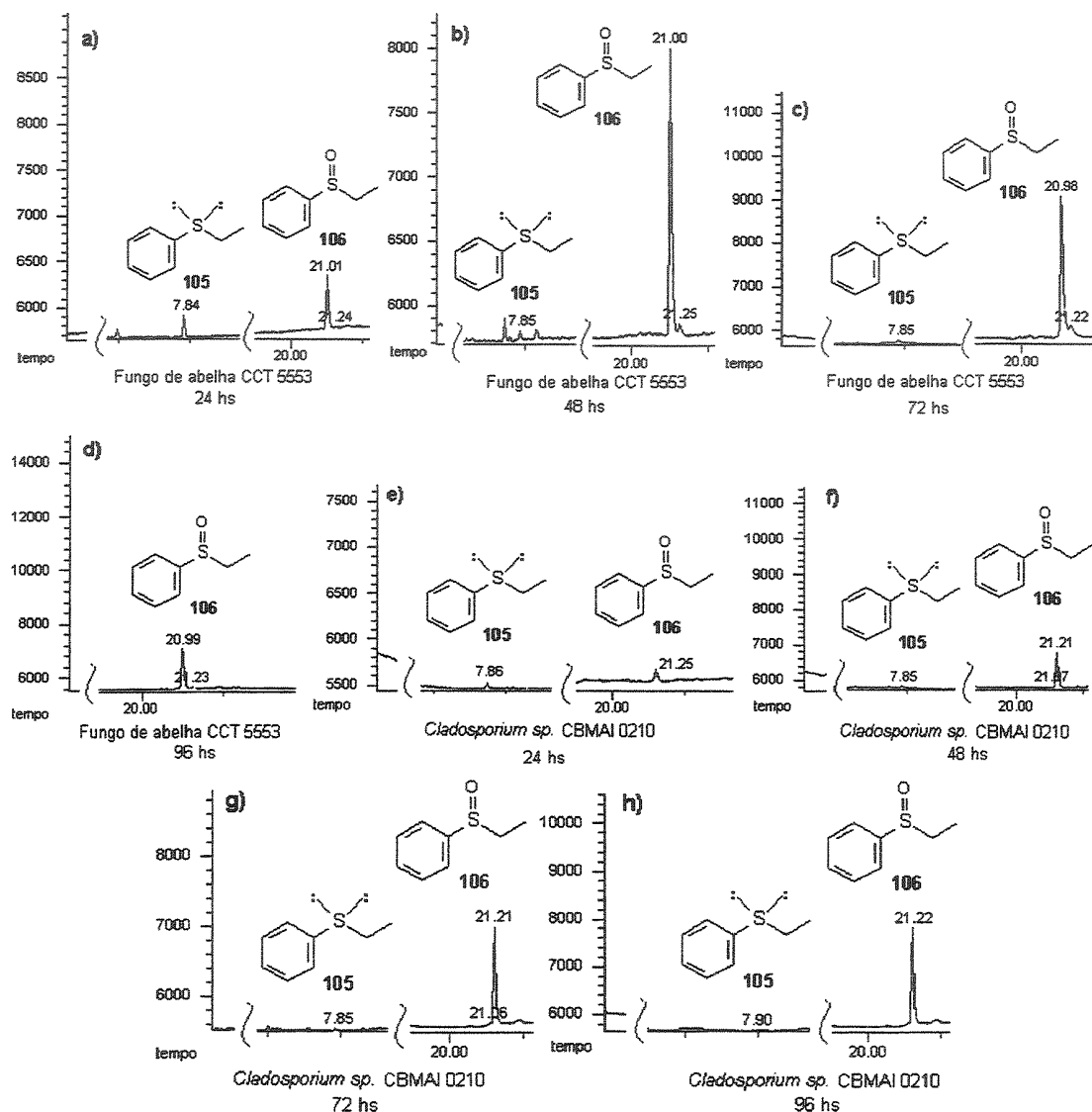


C 02 – Cromatogramas (GC-FID) obtidos pela reação enzimática com células em repouso de fungos. a) *Penicillium sp.* CBMAI 0208 com 24 hs e b) *Penicillium sp.* CBMAI 0208 com 48 hs.

O melhor resultado na obtenção de (*R*)-106 foi observado na reação com o fungo CCT 5553 (C 03, a - d) e na obtenção de (*S*)-106 foi observado com *Cladosporium sp.* CBMAI 0210 (C 03, e - h), ambos isolados do corpo da abelha *Trigona sp.*⁷⁸. Apenas no experimento 9 (C 02) e 11 não houve a conversão completa do sulfeto (C 03, e - h) após 48 horas e 96 horas, respectivamente.

⁷⁸ Bicalho, B.; Gonçalves, R. A. C.; Zibordi, A. P. M.; Manfio, G. P. and Marsaioli, A. J..Z. *Naturforsch., C: J. Biosci.* **2003**, 58, 746.

Estes dados são bastante importantes tendo em vista a enantiocomplementaridade dos microrganismos.



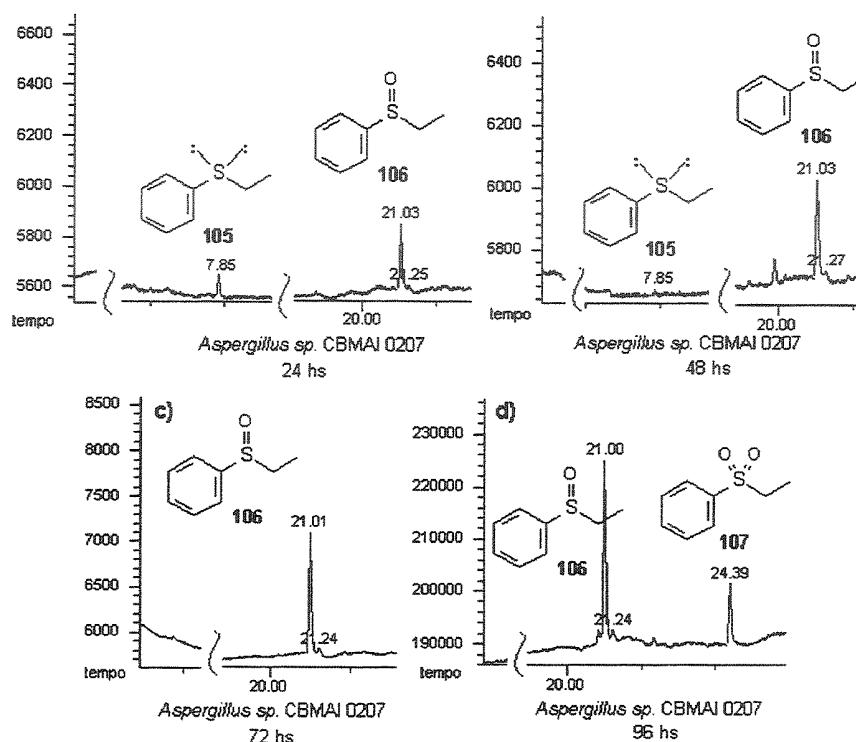
C 03 – Cromatogramas (GC-FID) obtidos pela reação enzimática com células em repouso de fungos. a) Fungo CCT 5553 com 24 hs, b) Fungo CCT 5553 com 48 hs, c) Fungo CCT 5553 com 72 hs, d) Fungo CCT 5553 com 96 hs, e) *Cladosporium* sp. CBMAI 0210 com 24 hs, f) *Cladosporium* sp. CBMAI 0210 com 48 hs, g) *Cladosporium* sp. CBMAI 0210 com 72 hs e h) *Cladosporium* sp. CBMAI 0210 com 96 hs.

Tabela 4. Reações de oxidação enzimática do etil-fenil-sulfeto **105** com células de fungos

t (h) ¹	c ²	Sulfóxido(%)	Sulfona(%)	ee (%) ³	Configuração ⁴
01	<i>Geotrichum candidum</i> CCT 1205				
24	91	91	-	39	S
72	100	41	59	65	S
96	100	-	100	-	-
02	<i>Aspergillus niger</i> CCT 1435				
24	42	42	-	42	S
48	73	73	-	28	S
72	100	100	-	0	-
96	100	34	66	76	R
03	<i>Rhizopus oryzae</i> CCT 4964				
24	55	55	-	13	R
48	76	76	-	0	-
72	100	100	-	0	-
04	<i>Trichoderma sp.</i> CCT 5551				
24	91	91	-	65	R
48	96	96	-	68	R
72	98	98	-	63	R
96	100	95	5	59	R
05	<i>Nodulisporium sp.</i> CCT 5552				
24	71	71	-	10	NC
48	96	96	-	32	R
72	100	100	-	45	R
06	Fungo da abelha CCT 5553				
24	26	26	-	97	R
48	93	93	-	82	R
72	97	97	-	91	R
96	100	100	-	92	R
07	<i>Aspergillus sp.</i> CBMAI 0207				
24	83	83	-	86	R
48	97	97	-	79	R
72	100	100	-	93	R
96	100	76	24	89	R
08	Fungo da abelha CBMAI 0205				
24	0	-	-	-	-
48	100	100	-	79	S
09	<i>Penicillium sp.</i> CBMAI 0208				
24	14	14	-	0	-
48	80	80	-	0	-
10	<i>Penicillium sp.</i> CBMAI 0209				
48	93	93	-	46	R
72	100	100	-	53	R
11	<i>Cladosporium sp.</i> CBMAI 0210				
24	77	77	-	>99	S
48	97	97	-	96	S
72	98	98	-	97	S
96	99	99	-	>99	S
12	<i>Aspergillus ochraceus</i> CBMAI 0211				
24	34	34	-	33	S
48	100	100	-	37	S
96	100	87	13	40	S

t: tempo; c: conversão determinada por CG; ee: excesso enantiomérico; Config.: configuração absoluta. NC: não confiável.

Com relação aos excessos enantioméricos os melhores valores foram obtidos nos experimentos 6 (C 03, a - d), 7 (C 04) e 11 (C 03, e - h). O fungo 5553 (C 03, a - d) e *Aspergillus sp.* CBMAI 0207 (C 04) apresentaram a mesma seletividade em relação ao etil-fenil-sulfeto **105** e produziram o sulfóxido com a configuração *R*, enquanto que *Cladosporium sp.* CBMAI 0210 (C 03, e - h) produziu a sua antípoda.



C 04 – Cromatogramas (GC-FID) obtidos pela reação enzimática com células em repouso de fungos. a) *Aspergillus sp.* CBMAI 0207 com 24 hs, b) *Aspergillus sp.* CBMAI 0207 com 48 hs, c) *Aspergillus sp.* CBMAI 0207 com 72 hs e d) *Aspergillus sp.* CBMAI 0207.

A obtenção dos sulfóxidos enantiomericamente puros, (*R*) - **106** ou (*S*) - **106** pode ser alcançado de duas formas: a) oxidação enantiosseletiva do sulfeto **105** e b) formação não-estereosseletiva do ($\pm$)-sulfóxido **106**, seguida de oxidação enantiosseletiva do sulfóxido para sulfona **120** (resolução cinética do racemato).

Os experimentos, de modo geral, apresentaram comportamentos distintos. Todos experimentos apresentaram a formação do sulfóxido a partir do primeiro dia e sem a formação de sulfona. Durante este período inicial, os

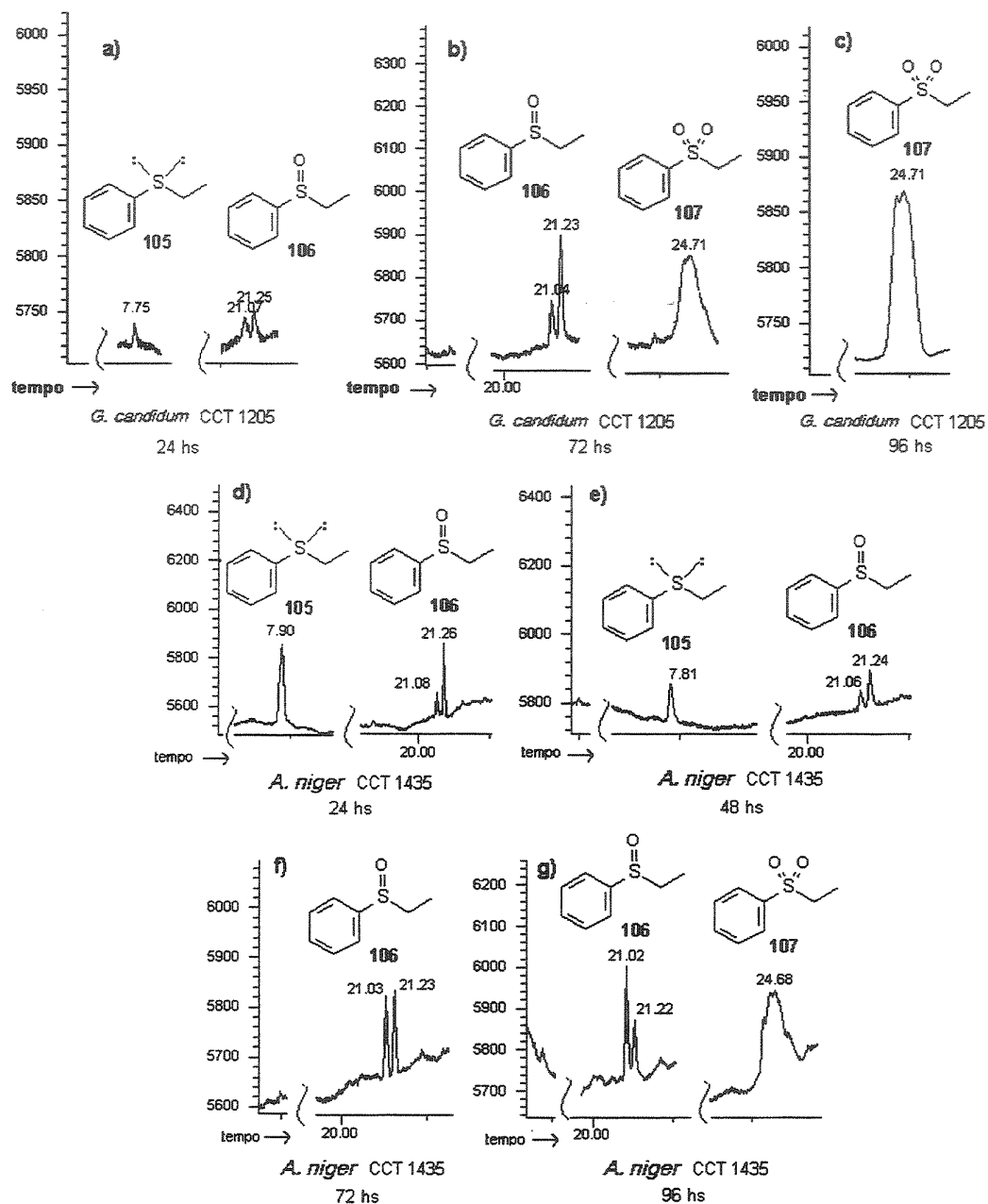
experimentos 6 (C 03, a - d), 7 (C 04) e 11 (C 03, e - h) já forneceram bons excessos enantioméricos.

Não foi observada nenhuma relação da maior ou menor oxidação do sulfeto 105 no primeiro dia com o melhor ou pior resultado nos excessos enantioméricos. Nos experimentos 1 (C 05, a - c), 4 (C 06, d - g), 5 (C 07, a - d) e 10 (C 07, e - h) houve uma conversão maior do que 70% e os excessos enantioméricos foram ruins ou moderados. Nos experimentos 7 (C 04) e 11 (C 03, e - h) houve uma conversão maior do que 70% e os excessos foram bons ou excelentes.

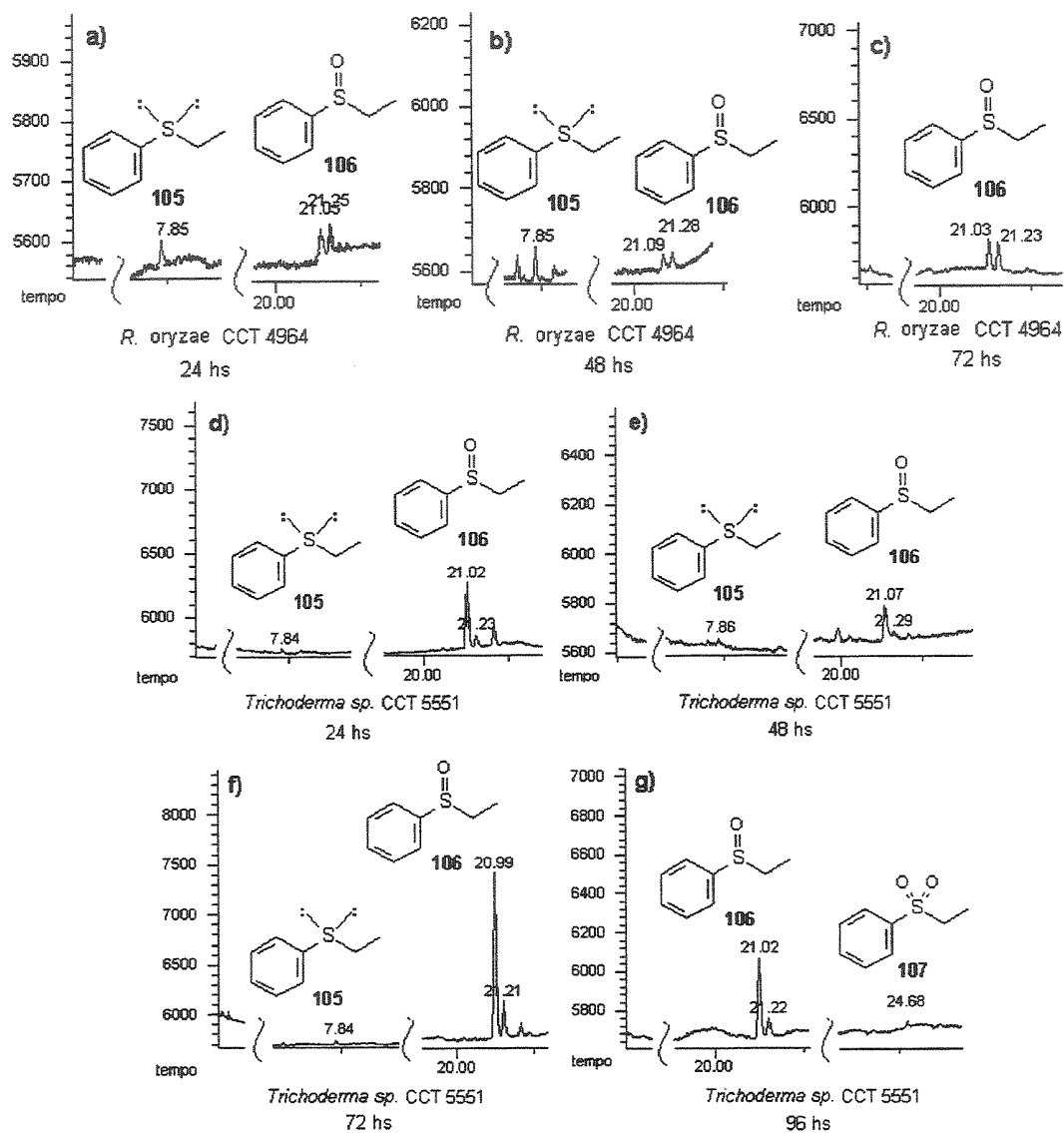
No segundo dia, ocorreu uma pequena melhora dos excessos enantioméricos nos experimentos 2 (C 05, d - g) e 12 (C 08) decorrente a oxidação enantiosseletiva do sulfóxido, ao contrário dos experimentos 4 (C 06, d - g) e 7 (C 04), onde houve uma suave perda no excesso. Os excelentes excessos enantioméricos dos experimentos 6 (C 03, a - d) e 11 (C 03, e - h) observados no final do período de 96 horas resultaram da oxidação enantiosseletiva do sulfeto.

No experimento 2 (C 05, d - g) ocorreu um fenômeno interessante. A reação iniciou com a oxidação enantiosseletiva formando o (S)-sulfóxido com 42 % de ee. À medida que o sulfeto era consumido, o excesso enantiomérico foi diminuindo, indicando uma atividade enantiocomplementar produzindo a substância antipodal até completa racemização quando o sulfeto foi completamente convertido. Depois da completa conversão do sulfeto o (S)-sulfóxido foi oxidado para sulfona e o (R)-sulfóxido foi obtido com 76 % de ee.

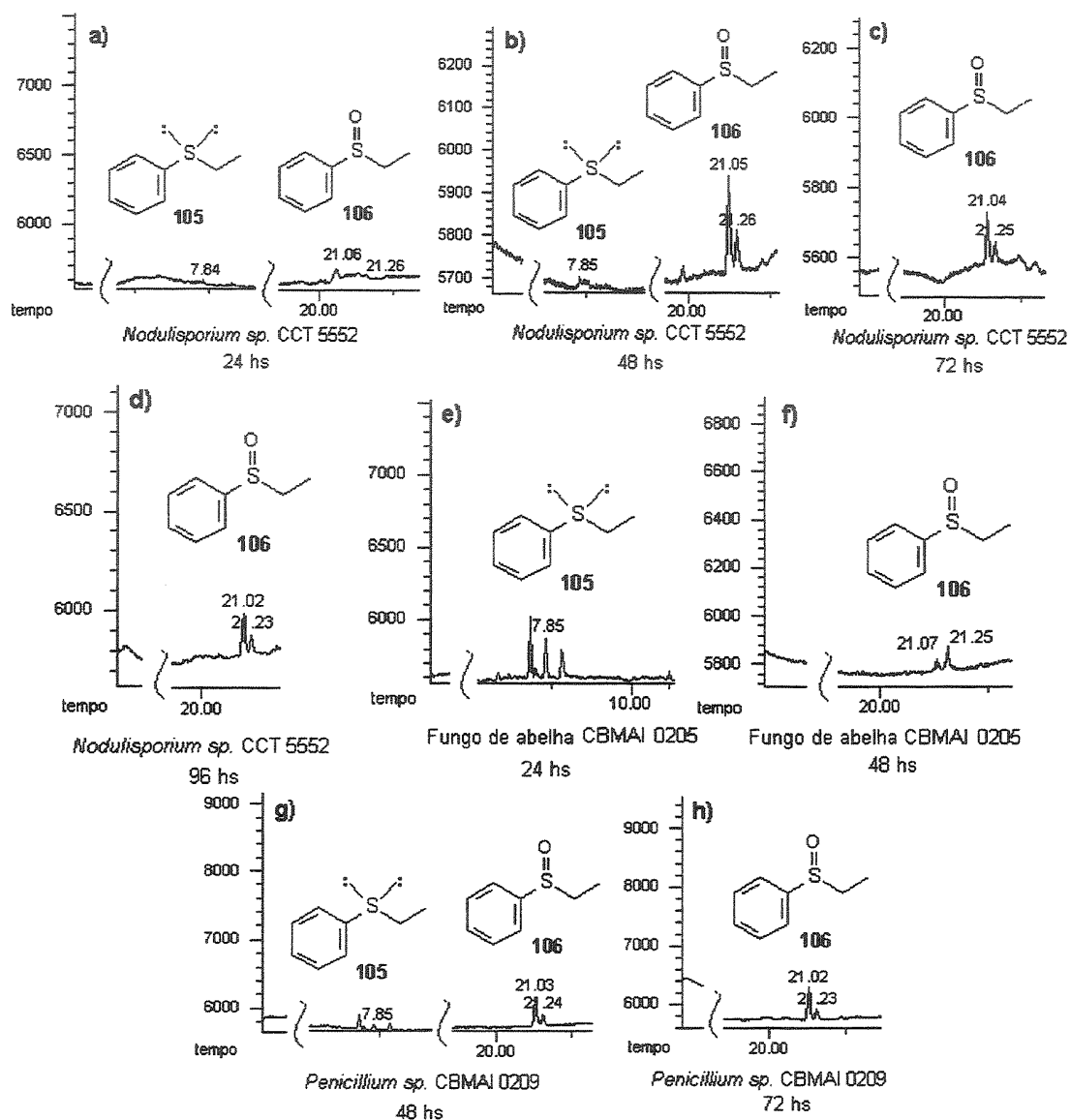
A biocatálise em escala analítica é importante para caracterizar a natureza da atividade enzimática em microrganismos, incluindo aspectos estereoquímicos. A complexidade das reações biológicas, especialmente em sistemas envolvendo enzimas limitadas por membranas e substratos pouco solúveis em água, como é o caso do presente estudo, oferece alguns valores confiáveis no que se diz respeito à análise e interpretação do valor de ee.



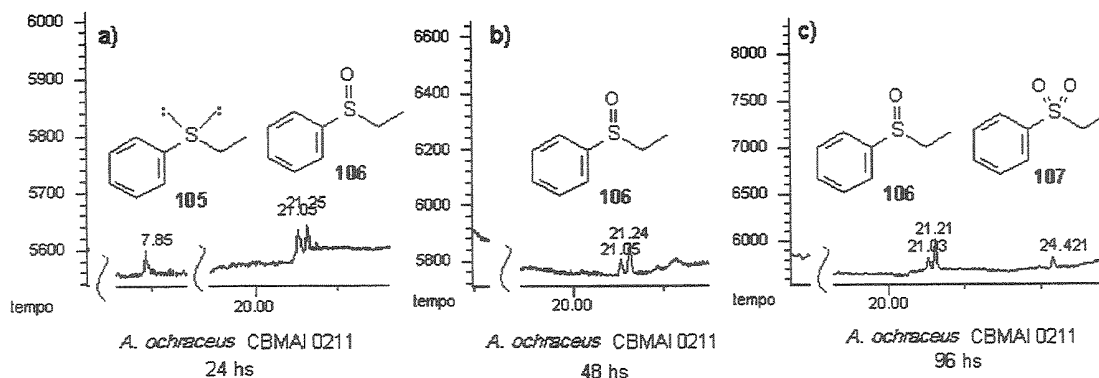
C 05 – Cromatogramas (GC-FID) obtidos pela reação enzimática com células em repouso de fungos. a) *G. candidum* CCT 1205 com 24 hs, b) *G. candidum* CCT 1205 com 72 hs, c) *G. candidum* CCT 1205 com 96 hs, d) *A. niger* CCT 1435 com 24 hs, e) *A. niger* CCT 1435 com 48 hs, f) *A. niger* CCT 1435 com 72 hs e g) *A. niger* CCT 1435 com 96 hs.



C 06 – Cromatogramas (GC-FID) obtidos pela reação enzimática com células em repouso de fungos. a) *R. oryzae* CCT 4964 com 24 hs, b) *R. oryzae* CCT 4964 com 48 hs, c) *R. oryzae* CCT 4964 com 72 hs, d) *Trichoderma* sp. CCT 5551 com 24 hs, e) *Trichoderma* sp. CCT 5551 com 48 hs, f) *Trichoderma* sp. CCT 5551 com 72 hs e g) *Trichoderma* sp. CCT 5551 com 96 hs.



C 07 – Cromatogramas (GC-FID) obtidos pela reação enzimática com células em repouso de fungos. **a)** *Nodulisporium sp.* CCT 5552 com 24 hs, **b)** *Nodulisporium sp.* CCT 5552 com 48 hs, **c)** *Nodulisporium sp.* CCT 5552 com 72 hs, **d)** *Nodulisporium sp.* CCT 5552 com 96 hs, **e)** Fungo de abelha CBMAI 0209 com 48 hs, **f)** *Trichoderma sp.* CCT 5551 com 72 hs, **g)** *Penicillium sp.* CBMAI 0209 com 96 hs e **h)** *Penicillium sp.* CBMAI 0209 com 96 hs.



C 08 – Cromatogramas (GC-FID) obtidos pela reação enzimática com células em repouso de fungos. a) *A. ochraceus* CBMAI 0211 com 24 hs, b) *A. ochraceus* CBMAI 0211 com 48 hs e c) *A. ochraceus* CBMAI 0211 com 96 hs.

Deve-se considerar, nestes experimentos, a presença de isoenzimas, enzimas que realizam a mesma reação, mas diferem apenas na seqüência de alguns aminoácidos, afinidade de substrato, V_{max} , etc.⁷⁹ Estas enzimas podem ser enantiocomplementares com seu substrato natural.

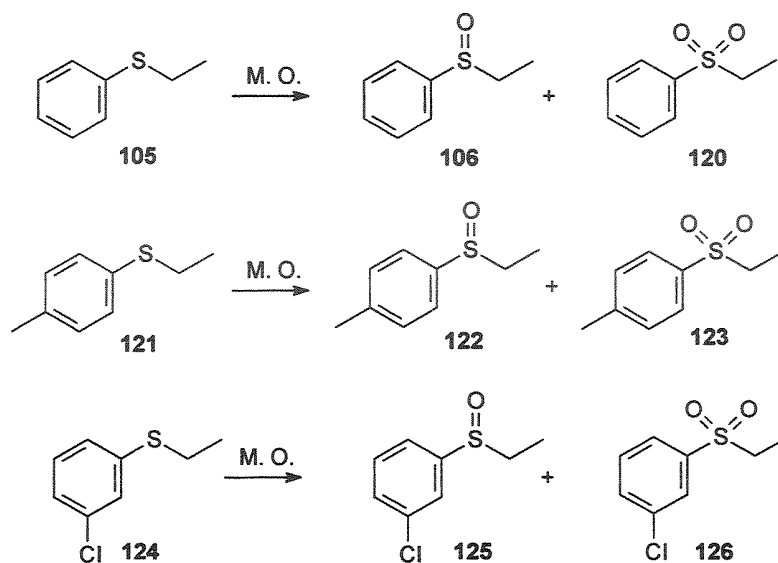
Não obtivemos informações sobre qual tipo de sulfoxidase está atuando, tópico complexo, uma vez que ambas as enzimas do tipo P-450 ou flavinas são capazes de oxidar sulfetos. Além disso, enzimas da mesma família apesar de possuírem sítios ativos semelhantes, possuem diferentes apoenzimas⁸⁰, maiores responsáveis pela especificidade do substrato e do regio- e estereocontrole da biorreação, ou seja, a variação desta porção na enzima é responsável pela especificidade da enzima.

Apesar dos excelentes resultados na oxidação estereosseletiva do etil-fenil-sulfeto **105** é necessário identificar novos substratos e novos microrganismos para obtenção de uma maior variedade de sulfóxidos quirais e intermediários sintéticos. Nos estudos anteriores do nosso grupo, além do etil-fenil-sulfeto **105** foram oxidados análogos contendo substituintes em meta ou para com grupos metílicos e cloro pela cepa de *Aspergillus terreus* CCT 3320.

⁷⁹ Nelson, D. L. and Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 2000, 3ª ed, Worth Publishers, New York, p. 555.

⁸⁰ Apoenzima é a porção protéica de uma enzima, excluídos quaisquer grupos prostéticos ou co-fatores orgânicos ou inorgânicos que possam ser requeridos para a atividade catalítica. (Nelson, D. L. and Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 2000, 3ª ed, Worth Publishers, New York, p. G-1)

Assim, a oxidação do sulfeto **105** forneceu o (S)-sulfóxido **106** com excesso enantiomérico > 99% e conversão de 76%. A oxidação do sulfeto **121** forneceu o (S)-sulfóxido **122** com excesso enantiomérico 95% e conversão de 66%, enquanto que a oxidação do sulfeto **124** forneceu o sulfóxido **125** com excesso enantiomérico > 99% e 59% de conversão, mas a sua configuração não foi determinada.⁸¹



Esquema 26 – Biooxidação dos sulfetos **105**, **121** e **124** pela linhagem de *A. terreus* CCT 3320.⁸¹

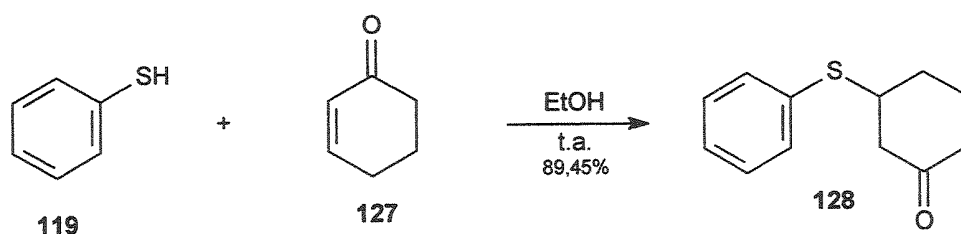
No presente trabalho, optamos em manter a porção fenílica da molécula e alterar o substituinte etila por grupo de demanda eletrônica e estérica distinto para observarmos a ação do *A. terreus* CCT 3320 e compararmos os resultados com os anteriores.

⁸¹ Porto, A. L. M. *Isolamento e Seleção de Microrganismos Brasileiros para Reações de Biocatálise e Produção de Metabólitos*. Tese de Doutorado, Unicamp, 2002.

4.2.1.3. Obtenção do 3-tio-fenóxi-1-cicloexanona 128 e o sulfóxido correspondente 3-fenil-sulfinil-1-cicloexanona 129

Os sulfetos di-aril-substituídos já se mostraram ineficientes nas biooxidações.⁵² Desta forma, sintetizamos substratos com substituintes ainda não citados na literatura. Para testarmos a biooxidação de uma outra variedade de sulfetos, obteve-se facilmente o 3-tio-fenóxi-1-cicloexanona 128 pelo método descrito por Carreño⁸² a partir da adição nucleofílica do tiofenol a 2-cicloexen-1-ona 127 (Esquema 27). Adicionou-se tiofenol a uma solução alcoólica de 2-cicloexen-1-ona a qual foi submetida à agitação constante por 16 horas à temperatura ambiente. A mistura reacional foi evaporada a pressão reduzida e o produto bruto foi purificado por cromatografia, fornecendo o sulfeto 128.

Apesar de adições 1,4 a compostos carbonílicos α,β -insaturados serem favorecidas pela temperatura reacional mais elevada, para reação com o tiofenol 119 isso não é necessário, pois os tióis são excelentes nucleófilos, e apesar de análogos aos álcoois, não necessitam de ácido ou base como catalisador, e favorecem a formação do produto cinético.⁸³



Esquema 27 – Preparação do sulfeto 128.

A caracterização do sulfeto 128 foi realizada pela observação no espectro de RMN de ^1H da ausência dos sinais de hidrogênio olefínicos do material de partida (composto 127) e do surgimento do hidrogênio tipo carbinólico em δ_{H} 3,42.

⁸² Carreño, M. C.; Ruano, J. L. G.; Urbano, A.; Remor, C. Z. and Arroyo, Y. *Tetrahedron Asymmetry*. **1999**, *10*, 4357.

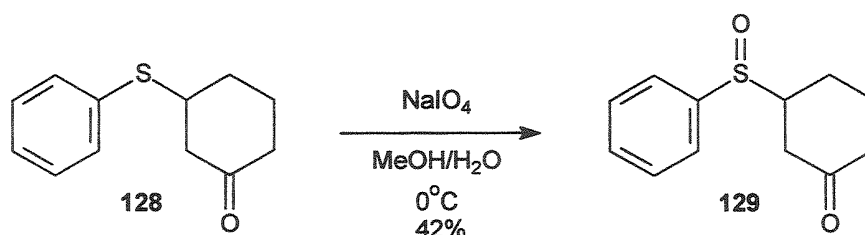
⁸³ Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S. and Wothers, P. *Organic Chemistry*. Oxford University Press, New York, **2001**, p. 237.

(E 10). Observou-se também um conjunto de sinais entre δ_H 2,70 e 1,85, atribuídos aos outros hidrogênios da porção cicloexanona. A presença inequívoca da carbonila cetônica foi destacada no espectro de ^{13}C pelo deslocamento típico em δ_C 208,33, enquanto que em δ_C 132,97, observou-se um sinal típico de carbono aromático sem hidrogênio (E 11).

No espectro de massas observamos a ocorrência do íon molecular em m/z 206 (69%) e a contribuição dos isótopos do enxofre para os picos $M + 1$ (associada a contribuição $M + 1$ dos carbonos) e $M + 2$ e, com frequência, para picos correspondentes aos fragmentos contendo enxofre, facilita a identificação de compostos organossulfurados (E 09). O pico m/z 110 (38%) correspondente ao cátion radical tiofenol característico para estes compostos. O pico de m/z 55 (42%) é característico da presença de cetonas cíclicas.

A porção aromática da molécula foi confirmada pela presença dos sinais entre δ_H 7,20 a δ_H 7,47 no espectro de RMN de 1H (E 10) e os sinais entre δ_C 127 a δ_C 133 no espectro de RMN de ^{13}C (E 11).

O padrão 129 para o acompanhamento da biooxidação do sulfeto 128 foi obtido pela oxidação de 3-tiofenóxi-1-cicloexanona 128 com $NaIO_4$ (Esquema 28). Entretanto, a oxidação deste sulfeto ofereceu uma mistura de produtos e um baixo rendimento (42 %). Decidimos tentar a oxidação com o ácido *meta*-cloro-perbenzóico (AMCPB), mas o resultado foi ainda pior.



Esquema 28 – Obtenção do sulfóxido 129.

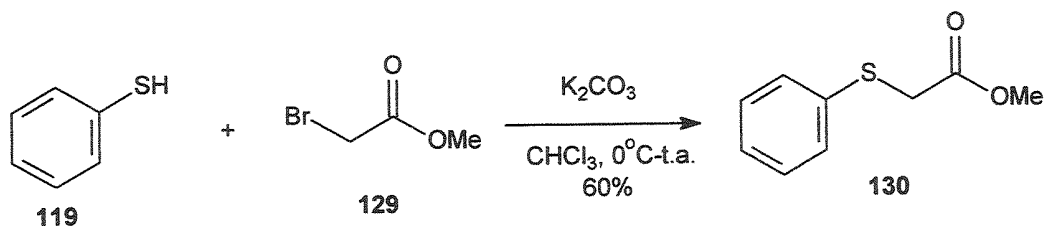
Além disso, 3-fenil-sulfinil-1-cicloexanona 129 sofre degradação espontânea dificultando a sua purificação. A análise deste composto por CG-EM não foi possível, pois o analito sofria decomposição térmica no injetor. Entretanto,

pudemos confirmar a formação do sulfóxido pela oxidação com NaIO_4 através dos dados de RMN de ^1H (E 13).

Observamos em δ_{H} 3,32 o efeito de blindagem do grupo sulfinila sobre o hidrogênio α e entre δ_{H} 7,57 a 7,72 os hidrogênio *meta* e *para* do anel aromático, enquanto que os hidrogênios *orto* desblindados estão entre em δ_{H} 7,86 a 7,92. No espectro de RMN de ^{13}C (E 14) podemos confirmar a presença do carbono carbonílico em δ_{C} 206.

4.2.1.4. Obtenção do 2-tio-fenil-acetato de metila 130 e o sulfóxido correspondente 2- fenil-sulfinil-acetato de metila 131

Um outro substrato para o teste de biooxidação foi o 2-tiofenil-acetato de metila, decorrente da alquilação do bromo-acetato de metila com tiofenol (Esquema 29).

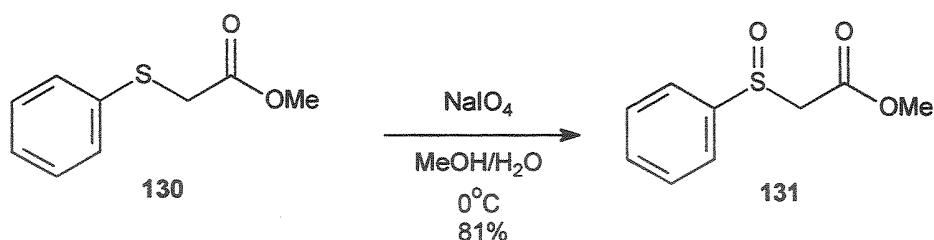


ESQUEMA 29 – Obtenção do sulfeto 130.

O procedimento utilizado foi o mesmo para a obtenção do etil-fenil-sulfeto 105, porém o rendimento obtido foi de apenas 60%. A obtenção de 130 foi caracterizada pela observação, no espectro de massas, íon molecular em m/z 182 (77%) e a contribuição dos isótopos do enxofre para os picos $M + 1$ (associada à contribuição $M + 1$ dos carbonos) e $M + 2$ (E 16). Em ésteres metílicos ocorrem dois picos característicos em $M - 31$ e $M - 59$. O primeiro é decorrente a perda do radical $^{\bullet}\text{OMe}$ (m/z 151, 1) e neste composto foi menos importante, enquanto que a perda do radical $^{\bullet}\text{COOMe}$ é responsável pelo pico base (m/z 123). A análise do espectro de RMN de ^1H (E 17), nos revelou um singlete intenso em δ_{H} 3,60 referente aos hidrogênios da metoxila e um singlete em δ_{H} 3,70 dos hidrogênios

metilênicos, enquanto que o carbono carbonílico de éster foi confirmado pelo sinal em δ_C 169,87 (E 18).

O padrão oxidado do sulfeto **130** foi obtido pelo método de Leonard e Johnson⁷⁷ e obteve-se o 2-fenil-sulfinil-acetato de metila **131** com 81% de rendimento. O produto foi confirmado por RMN de 1H , RMN de ^{13}C e EM (Esquema 30).



Esquema 30 – Preparação do sulfeto **131**.

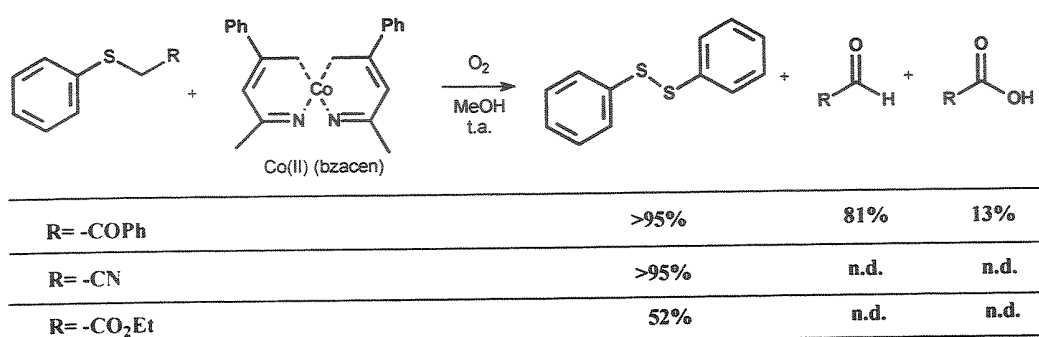
A presença do grupamento sulfinila modifica significativamente a fragmentação éster metílico em comparação ao seu análogo bivalente. Os picos em $M - 31$ e $M - 59$, são menos importantes, e observou-se o pico base de m/z 125 característico de derivados sulfinil benzenos (E 20).

No espectro de RMN de 1H observa-se um singlete intenso referente aos hidrogênios da metoxila em δ_H 3,71 e dois dubletos ($J = 14,0$ Hz) em δ_H 3,69 e δ_H 3,84 atribuídos aos hidrogênios metilênicos diastereotópicos da nova molécula (E 21).

4.2.1.5. Biooxidação dos compostos **128** e **130** com *A. terreus* CCT 3320

Os novos substratos mantêm o grupamento arila e substitui o grupamento alquila por grupamentos contendo uma porção carbonílica de diferente demanda estereo-eletrônica. Os substratos se mostraram bastante estáveis em solução tampão fosfato (0,1 M) com $pH \approx 7,0$. Efetuou-se o acompanhamento preliminar das biooxidações por CCD, entretanto, na presença de 2 g de células úmidas da

linhagem de *Aspergillus terreus* CCT 3320 os sulfetos **128** e **130** foram completamente degradados e não foi verificada a formação dos respectivos sulfóxidos. Fazendo uma analogia com alguns estudos sobre a oxidação de sulfetos verifica-se que a presença de grupos retiradores de elétrons, PhSCH₂X (X= grupo retirador de elétrons), favorece a desprotonação, através de uma espécie cátion-radicalar, fornecem quase que exclusivamente a clivagem oxidativa da ligação C-S do sulfeto⁸⁴ (**Esquema 31**). Portanto não demos seqüência ao uso destes substratos em sulfoxidações.



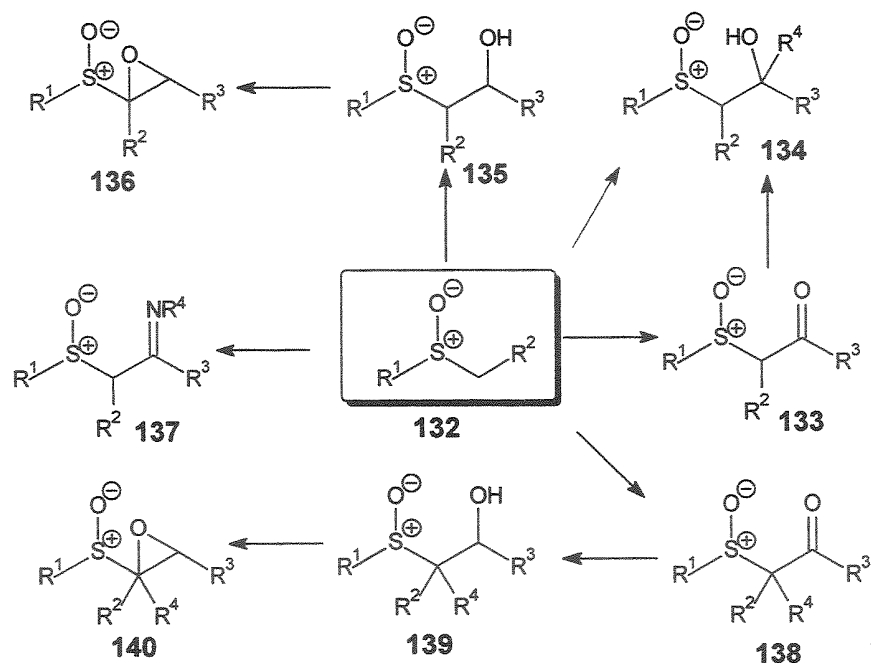
Esquema 31 – Reações de sulfetos com complexo Co(II)-O₂.

4.3. Aplicação de sulfóxidos quirais obtidos por biocatálise

A síntese orgânica moderna necessita de um arsenal de metodologias para ter acesso a um maior número de compostos enantiomericamente puros e carbógenos⁸⁵ quirais contendo o grupo sulfinila que são intermediários versáteis em sínteses assimétricas. Particularmente, o sulfóxido quiral **132** dá origem a compostos pivô contendo uma função álcool **135**, epóxido **136**, cetona **133** ou imina **137**, etc, importantes intermediários em sínteses assimétricas (**Esquema 32**).

⁸⁴ Watanabe, Y.; Numata, T. and. Oae, S *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1982**, *55*, 1915.

⁸⁵ Os termos *carbógenos* e *carbogênica* são considerados como sinônimos dos termos tradicionais *compostos orgânicos* e *orgânica*. (Corey, E. J. and Cheng, X, -M. *The Logic of Chemical Synthesis* **1995**, 2^a ed, Wiley-Interscience, New York, p. 96)



Esquema 32 – Grupos funcionais acessíveis a partir de sulfóxidos quirais

Muitos trabalhos apresentam uma visão geral da utilização dos sulfóxidos, entretanto, não focalizam a sua importância na síntese de produtos naturais e de compostos biologicamente ativos. Além disso, encontramos apenas um trabalho de utilização direta em síntese de sulfóxido quiral obtido por biooxidação empregando microrganismos,⁸⁶ mas a metodologia utilizada forneceu apenas 17% de excesso enantiomérico.

Nesta etapa deste estudo realizamos a produção do etil-fenil-sulfóxido **106** enriquecido por biocatálise e sua aplicação na obtenção de intermediários β-ceto-sulfóxidos **133**. Desta forma objetivamos a aplicação do sulfóxido **106** na obtenção de cetonas quirais. O nosso alvo foi o (S)-(+)-4-metil-3-heptanona **141**, principal feromônio de alarme de formigas do gênero *Atta*. Os feromônios são biomoléculas responsáveis pela comunicação entre indivíduos da mesma espécie e de espécies diferentes. Esta cetona foi identificada na formiga cortadeira (*Atta*

⁸⁶ Abushanab, E.; Reed, D.; Suzuki, F.; Sih, C. J. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *37*, 3415.

texana) e em outra espécie do mesmo gênero, a *Atta cephalotes*.⁸⁷ A síntese desta cetona já foi realizada por Silverstein.

4.3.1 Síntese de Silverstein

O grupo de pesquisa do Prof. Silverstein realizava estudos sobre os compostos que participam do sistema de comunicação das formigas do gênero *Atta* quando atacadas por fungos. Estes compostos são opticamente ativos e a determinação de sua configuração absoluta e pureza enantiomérica apenas é viável após o emprego de uma amostra de referência sintetizada com a configuração absoluta e pureza enantiomérica determinadas.

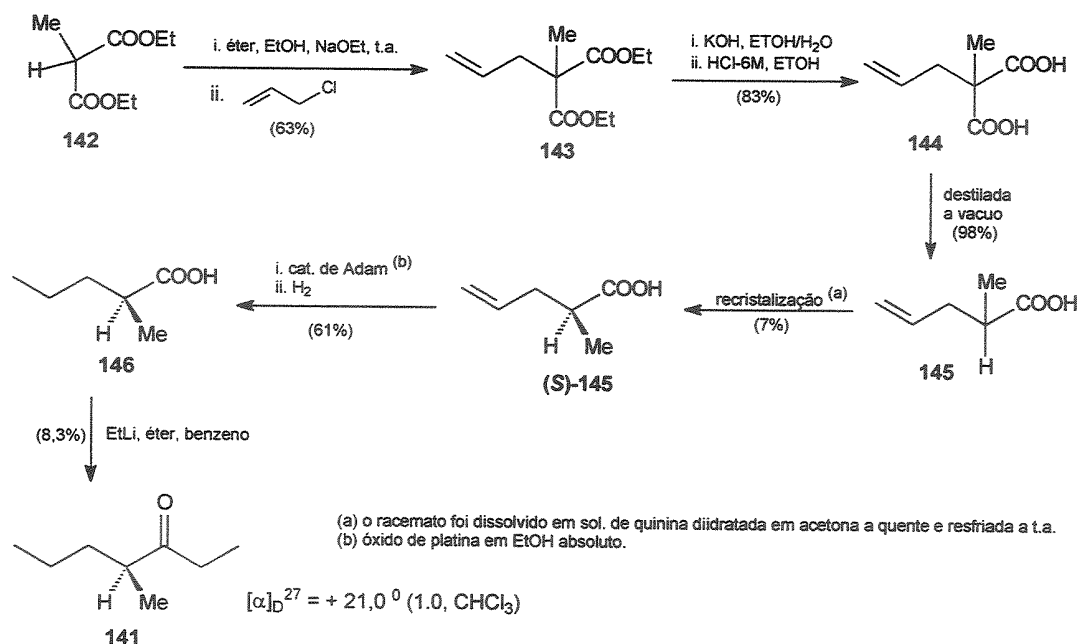
Desta forma, o grupo de Silverstein partiu para a síntese da cetona quiral **141**, inicialmente pela resolução do ácido 2-metil-pentanóico na presença do α -metil-benzilamina seguida pela alquilação com etil-lítio. Infelizmente, a solubilidade dos sais diastereoméricos dificultaram a sua separação. Assim, empregaram uma síntese mais longa a partir do metilmalonato de dietila **142**, e também pouco elegante, onde a etapa determinante para o excesso enantiomérico é uma resolução química⁸⁸ (**Esquema 33**).

O metilmalonato de dietila **142** foi alquilado com cloreto de alila formando o alil-metil-malonato de dietila **143** (63 %). O di-éster foi hidrolisado (83 %) e o di-ácido descarboxilado produzindo o ácido 2-metil-4-pentenóico **145** (98%). A resolução cinética do ácido **145** foi promovida pela reação com quinina diidratada fornecendo o (S)-(+)-ácido 2-metil-4-pentenóico **145** com apenas 7% de rendimento. O ácido **145** foi hidrogenado sob catalisador de Adams⁸⁹ fornecendo o (S)-(+)-ácido 2-metil-4-pentanóico **146** (61 %). Finalmente, o (S)-(+)-4-metil-3-heptanona **141** foi obtida pelo tratamento do ácido enriquecido com 2 equivalentes do etil-lítio (78%).

⁸⁷ Riley, G.; Silverstein, R. M. and Moser, J. C. *Science*. 1974, 183, 760.

⁸⁸ Riley, G. and Silverstein, R. M. *Tetrahedron*. 1974, 30, 1171.

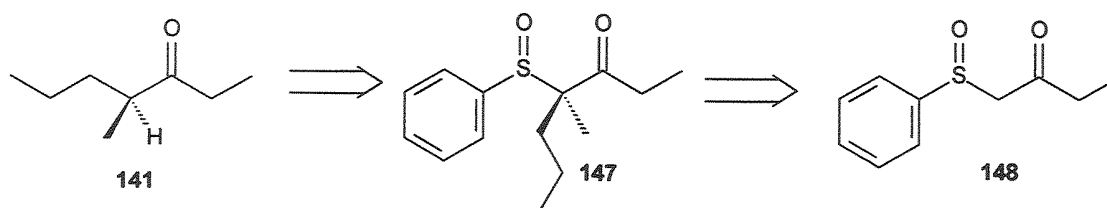
⁸⁹ A hidrogenação catalisada com óxido de platina (PtO₂) minimiza a redução da cetona.



Esquema 33 – Síntese de Silverstein do feromônio de alerta da formiga *Atta texana*.⁸⁸

4.3.2 Planejamento da Síntese

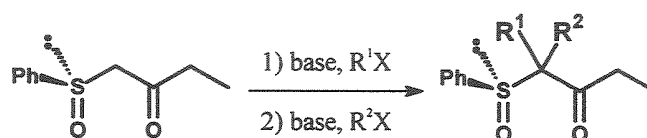
Quando focalizamos a cetona quiral **141** e elaboramos sua análise retrossintética, pensamos nas metodologias preparativas mais comumente usadas com carbogénos contendo grupo sulfinila.



Esquema 34 – Análise retrossintética para (S)-(+)-4-metil-3-heptanona **141**.

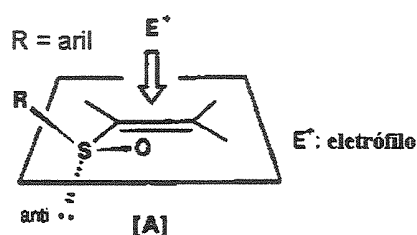
Nossa análise retrossintética da cetona **141** nos indicou que a eliminação reductiva do grupo sulfinila do composto **147** levaria a formação da metil cetona **141**. A configuração S no carbono quaternário no β-ceto-sulfóxido **147** é derivada

da dialquilação do β -ceto-sulfóxido **148**. Isso seria possível pela metilação seguida pela propanação ou vice-versa (**Esquema 35**).



Esquema 35 - Esquema da dialquilação.

Ogura e colaboradores reportaram que a segunda alquilação ocorre preferencialmente pelo lado do anel aromático. Assim, o grupo fenila ligado ao enxofre exerce um controle estereoeletrônico na alquilação⁹⁰ produzindo compostos dialquilados com razões diastereoisoméricas variando de 60 - 99% (**Esquema 36**).



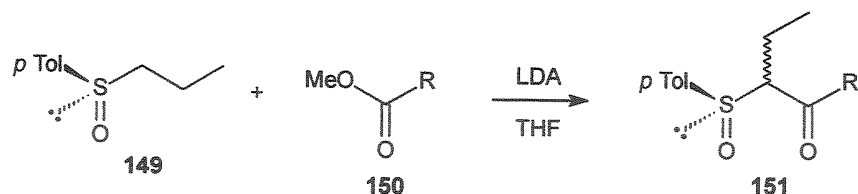
Esquema 36 – Modelo proposto por Ogura e colaboradores.⁹⁰

Entretanto, Kosugi e colaboradores reportaram o baixo rendimento da mono-alquilação (30 %) atribuído à formação de produtos de di-alquilação e O-alquilação.⁹¹ Desta forma, optaram pela metodologia de Kunieda⁹² para obtenção de β -ceto-sulfóxidos acíclicos pela condensação tipo aldol do sulfóxido com um éster o qual produziu uma mistura diastereomérica (1:1) do produto mono-alquilado (**Esquema 37**).

⁹⁰ Fujita, M.; Lida, M.; Manako, K.; Sato, K.; Ogura, K. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 645.

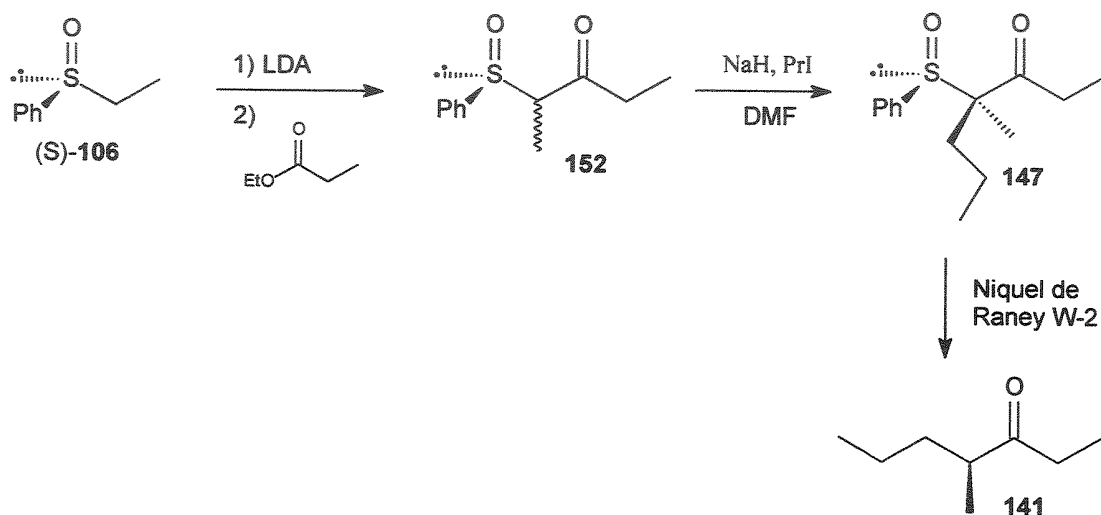
⁹¹ Kosugi, H.; Kanno, O. and Uda, H. *Tetrahedron: Asymmetry*. **1994**, *5*, 1139.

⁹² Kunieda, N.; Nokami, J. and Kinoshita, M. *Chem. Lett.* **1974**, 369.



Esquema 37 – Reação tipo aldol realizada por Kosugi.

A rota sintética proposta no presente trabalho possui somente três etapas onde a primeira etapa envolve o método de Kunieda⁹² realizando a condensação de um sulfóxido com um éster levando a formação de um β -ceto-sulfóxido **152** mono-alquilado (Esquema 38).



Esquema 38 – Proposta de síntese do feromônio da formiga *Atta texana*.

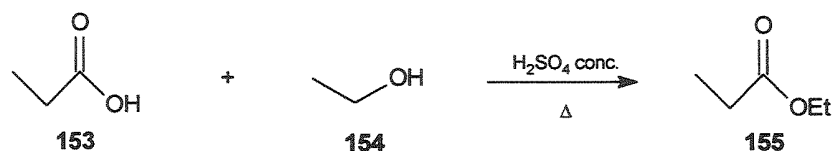
A segunda etapa envolve a alquilação de **152** com iodeto de *n*-propila na presença de hidreto de sódio (NaH) em di-metil-formamida (DMF). Por fim, o produto será submetido a uma eliminação redutiva do grupo sulfinila com níquel de Raney (W-2) produzindo o feromônio.

4.3.3. Resultados e discussão

4.3.3.1. Preparação do éster, do haleto de alquila e do níquel de Raney W-2

Para a obtenção da cetona quiral **141**, realizamos inicialmente a versão racêmica da reação para testarmos a metodologia e ganhar intimidade com os métodos a serem empregados.

Para tanto, produziu-se o propionato de etila pela esterificação do ácido propiônico. Utilizamos o método tradicional de esterificação catalisada por ácido. Adicionamos num balão o ácido propiônico, o álcool etílico bidestilado e o catalisador, ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi levada ao refluxo por 12 horas e depois destilada. Na primeira fração da destilação retiramos o excesso de álcool e na segunda fração, o éster. Esta fração foi tratada com água e seca, fornecendo o éster (89 %) (**Esquema 39**). O éster foi tratado de acordo com o procedimento de Perrin.⁹³ A produção do éster foi confirmada pela espectrometria de massas (**E 24**) e a biblioteca Wiley 275.



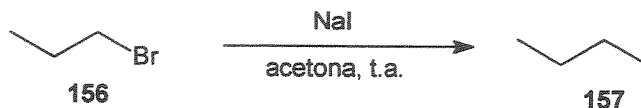
Esquema 39 – Obtenção do propionato de etila.

O iodeto de *n*-propila foi preparado a partir do brometo de *n*-propila em acetona na presença do iodeto de sódio para promover uma substituição nucleofílica (**Esquema 40**). Em solventes apróticos com constante dielétrica moderada as reações nucleofílicas com alquil haletos primários se processam pelo mecanismo bimolecular levando ao produto majoritário.⁹⁴ Depois de evaporado o

⁹³ Perrin, D. D. and Armarego, L. F. *Purification of Laboratory Chemicals*. Pergamon Press, 2^a ed, New York, 1980, p. 555.

⁹⁴ Smith, M. B. *Organic Synthesis*. McGraw-Hill, 2^a ed, New York, 2002, p. 100.

solvente, o resíduo foi tratado fornecendo 1,89 g (70%). O produto foi confirmado por RMN de ^1H (E 25), RMN de ^{13}C (E 26) e EM (E 27).



Esquema 40 – Obtenção do iodeto de *n*-propila 157.

O pico do íon molecular de iodeto alifáticos é mais intenso dentre todos os halogenetos (m/z 170). Como o iodo é mono-isotópico, não há nenhum pico de isótopo característico. No espectro de RMN de ^1H os hidrogênios α metilênicos em δ_{H} 3,18 (*t*, *J* 7,0 Hz) são mais protegidos do que se esperaria para o seu análogo bromado. No espectro de RMN de ^{13}C o chamado “efeito do átomo pesado” é muito mais acentuado na presença do iodo, desta forma observamos os carbono α e γ em δ_{H} 9,65 e 15,36, respectivamente.

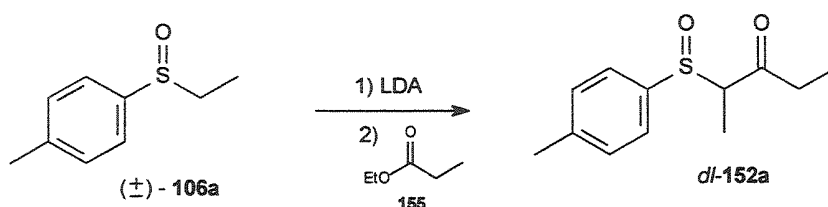
Por fim, preparou-se o níquel de Raney a partir de uma liga de níquel-alumínio. Existem muitos tipos de níquel de Raney, diferindo basicamente no seu modo de preparo. Esses métodos essencialmente determinam o hidrogênio contido como também a reatividade de cada tipo de níquel de Raney. O mais popular tipo deste reagente é o “W” que pode ser preparado de sete maneiras diferentes. O tipo de níquel de Raney empregado na dessulfurização de uma variedade de carbogénos sulfurados é do tipo W-2. A diferença básica destes tipos de liga está na concentração da solução de hidróxido de sódio e a forma de neutralização.

A liga de níquel-alumínio foi tratada com a solução de NaOH-25% à temperatura ambiente. Durante a adição da liga, a solução é mantida em banho de gelo. Ao iniciar a evolução do gás a solução é retirada do banho de gelo até atingir a temperatura ambiente quando colocamos a solução em banho de óleo para manter a temperatura de 30 °C por 12 horas, garantindo a permanência da evolução do gás hidrogênio. Em seguida, a agitação é interrompida para decantação do níquel que é lavado com solução de NaOH-10% e depois

sucessivamente com água destilada até a neutralização. O níquel é lavado com etanol e guardado em etanol absoluto.⁹⁵

4.3.3.2. Síntese do (±)-2-fenil-sulfinil-3-pentanona 152a

A otimização da síntese racêmica do feromônio foi efetuada utilizando o etil-*p*-toluil-sulfóxido **106a** devido a sua maior disponibilidade em relação ao etil-fenil-sulfóxido **106**. Com todos reagentes à mão, iniciou-se a síntese racêmica do feromônio pela adição de uma espécie carboniônica gerada a partir do sulfóxido racêmico **106a** ao éster propiônico **155**. Para tanto, utilizamos o diisopropilamideto de lítio (LDA), uma base forte, proveniente do tratamento da diisopropilamina com butil-lítio. O LDA foi preparado *in situ* pela adição de butil-lítio a uma solução homogeneizada de diisopropilamina em THF à – 78 °C em atmosfera inerte. Depois de completa adição a temperatura do meio reacional foi elevada a 0 °C, onde permaneceu durante 30 minutos quando a temperatura da reação foi conduzida novamente para – 78 °C para a adição de uma solução de (±)-etil-*p*-toluil-sulfóxido **106a**. Em seguida, a temperatura reacional foi elevada a 0 °C e esta adquiriu uma coloração amarela intensa revelando a formação do ânion sulfóxido. Depois de 30 minutos a temperatura da reação foi levada novamente à – 78 °C e finalmente foi adicionado o propionato de etila **155**. Após a adição do éster a temperatura reacional foi elevada a 0 °C e a coloração da mistura imediatamente tornou-se amarela clara e depois incolor, indicando o consumo do ânion sulfóxido. A reação foi acompanhada por CCD durante 1 hora quando foi adicionada uma solução saturada de cloreto de amônio (**Esquema 41**).



Esquema 41 – Obtenção do composto **152a** racêmico.

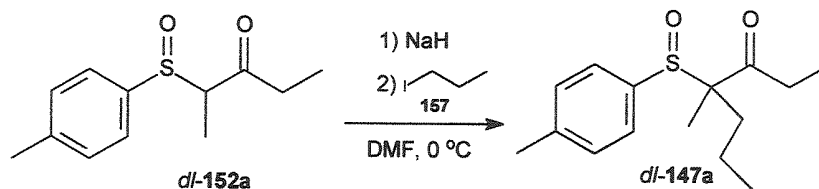
⁹⁵ Mozingo, R. *Organic Syntheses*, 1941, Collective vol. 3, 20-29, p 181.

Após a purificação do produto bruto por cromatografia em camada delgada obteve-se ($\pm$)-**152a** com 90% de rendimento. A análise por CG-EM não foi possível devido à decomposição do produto no injetor, em uma possível retro-aldol. Desta forma sua caracterização foi feita com base na análise de seus dados espectroscópicos.

Pelo espectro de RMN de ^1H (**E 28**), a porção cetônica da molécula foi confirmada pelo duplo tripleto ($J = 7,3$ Hz) em δ_{H} 0,96 e o quarteto ($J = 7,3$ Hz) em δ_{H} 2,46. O duplo quarteto (J 6,9 Hz) em δ_{H} 3,77 corresponde à duplicidade de sinal do hidrogênio α aos grupos carbonila e sulfinila, e o duplo dubleto (J 6,9 Hz) em δ_{H} 1,28 confirmando a formação do produto de condensação aldólica.

4.3.3.3. Síntese do ($\pm$)-4-metil-4-fenil-sulfinil-3-heptanona **147a**

Como passo seguinte, promoveu-se uma reação de alquilação em condições típicas adicionando o iodeto de *n*-propila a uma solução do β -ceto-sulfóxido **147a** e NaH em DMF a 0 °C (**Esquema 42**).



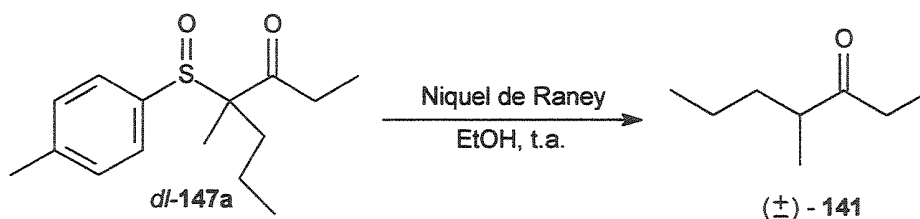
Esquema 42 – Obtenção do composto **147a** racêmico.

Depois de tratada com água, a solução foi extraída com acetato de etila, seca sobre Na_2SO_4 , evaporada sob pressão reduzida e purificada em placa preparativa fornecendo 99,9 mg (83%). O produto da reação foi analisado por CG-EM, mas houve total degradação térmica no injetor. Além disso, ao analisá-lo no dia seguinte por CCD observamos o surgimento de várias manchas indicando a decomposição do composto. Repetimos as duas etapas reacionais e obtivemos o composto **147a** dialquilado para imediata confirmação pelos métodos espectroscópicos (RMN de ^1H e de ^{13}C), entretanto não conseguimos uma purificação eficiente.

Pelo espectro de RMN de ^1H (E 29), foi confirmado pelos sinais em δ_{H} 0,90 dos hidrogênios metílenos e em δ_{H} 1,90 e δ_{H} 1,95 correspondente aos hidrogênios metilênicos da porção alquílica proveniente da alquilação. O produto formado também foi confirmado pelo espectro de RMN de ^{13}C (E 29) pelos sinais em δ_{C} 16,20, δ_{C} 26,00 e δ_{C} 28,14, referente ao carbono metílico e aos dois carbonos metilênicos, respectivamente.

4.3.3.4. Dessulfurização do ($\pm$)-4-metil-4-fenil-sulfinil-3-heptanona 147a

Concluindo a síntese racêmica do feromônio, promoveu-se a dessulfurização do produto bruto da síntese do composto 147 já que este se decompõe rapidamente. O produto dialquilado foi dissolvido em etanol absoluto e depois adicionado o níquel de Raney W-2 (Esquema 43).

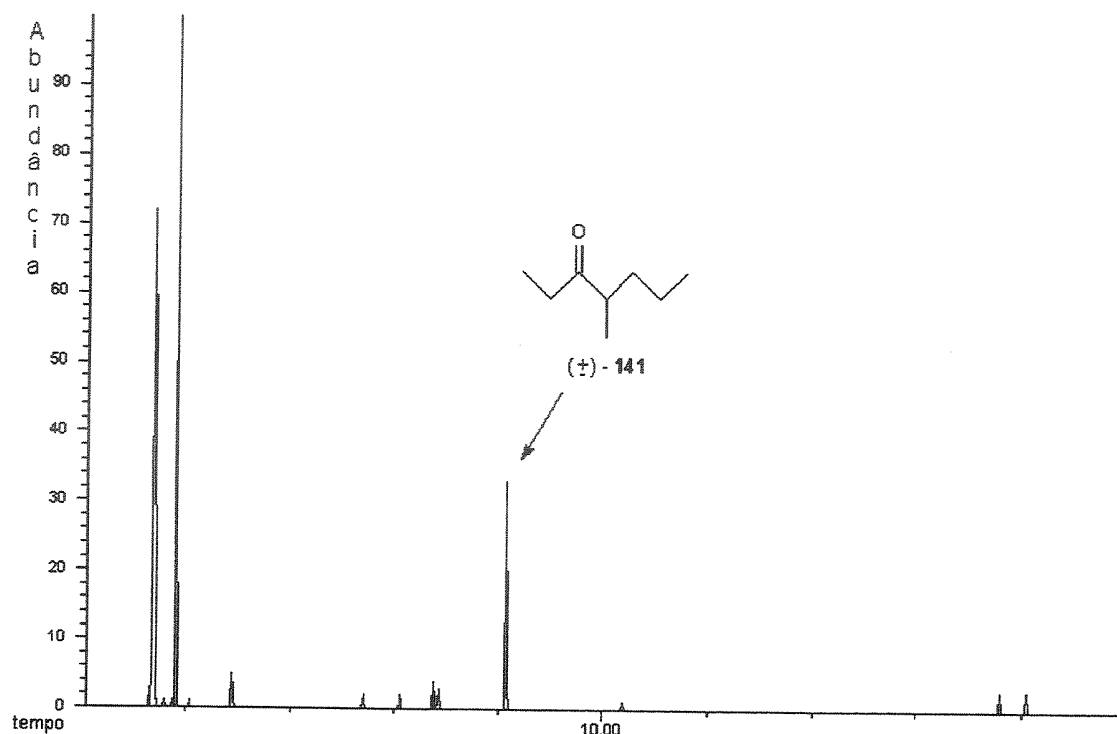


Esquema 43 – Obtenção do feromônio 141 racêmico.

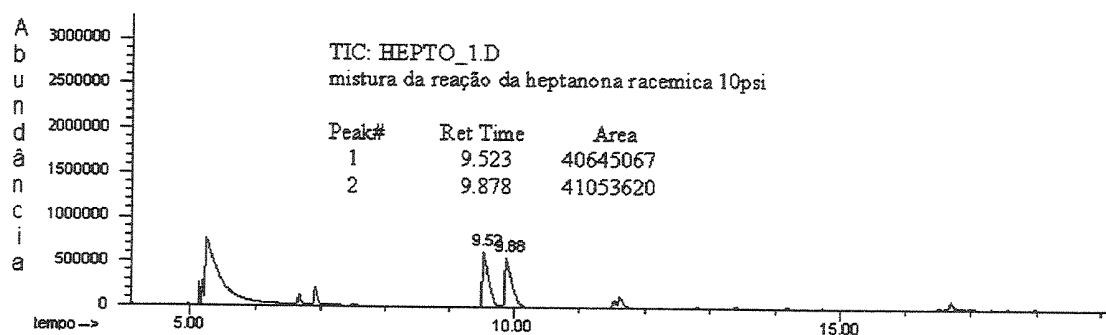
Acoplou-se ao balão um condensador de refluxo com sistema de refrigeração a 0 °C para minimizar a perda do feromônio volátil. A mistura permaneceu desta forma durante 12 horas e após este tempo foi filtrada em celite.

Nos trabalhos de Silverstein no isolamento da cetona quiral a partir das formigas do gênero *Atta* e da purificação da cetona quiral proveniente de síntese foi utilizado cromatografia gás (CG) preparativa. Não dispúnhamos deste equipamento para o isolamento do feromônio produzido em nosso laboratório. Desta forma, analisamos por CG-EM (C 9) o *headspace* do frasco contendo a mistura reacional e observou-se a formação do produto de interesse pela análise espectrométrica, confirmada pela biblioteca Wiley 275 (E 31). Otimizou-se a

análise da cetona racêmica **141** em CG-EM equipada com coluna capilar quiral (Chrompack CD-chirasil, 25 m x 25 mm x 0,25 μ m) (C 10).



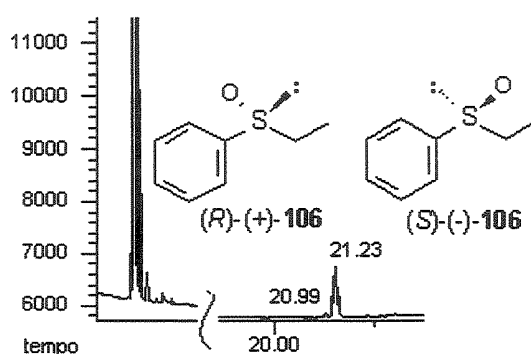
C 9 – Cromatograma de íon totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida HP-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), da reação de dessulfurização do composto ($\pm$)-**147a**.



C 10 – Cromatograma de íon totais (CG-EM) equipado com coluna capilar quiral Chrompack CD-chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), detector 280 $^{\circ}$ C, injetor 150 $^{\circ}$ C, gás de arraste (He, 10 psi) obtido da reação de dessulfurização do composto ($\pm$)-**147a**.

4.3.3.5. Obtenção do (S)-etil-fenil-sulfóxido enriquecido por biocatálise

Para a obtenção do sulfóxido quiral decidiu-se utilizar o fungo *Cladosporium sp.* CBMAI 0210 devido a sua eficiência na biooxidação (Tabela 4, p. 47). A linhagem mantida a 4 °C foi inoculada em 3 tubos inclinados contendo meio sólido de extrato de malte-agar 20% e mantido por 4 dias a 28 °C. Em seguida, 10 erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de caldo nutritivo de extrato de malte foram inoculados com as células frescas dos 3 tubos invertidos e mantidos em agitador rotativo por 72 horas a 28 °C e rotação de 120 rpm. Após o período de crescimento, as células foram filtradas e ressuspensas em 10 erlenmeyer de 125 mL contendo 40 mL de solução tampão fosfato (0,1 M) com pH $\approx$ 7,0. Posteriormente foi adicionado 20 μ L do etil-fenil-sulfeto **105** em cada erlenmeyer e novamente levados ao agitador rotativo a 28 °C e rotação de 120 rpm por 96 horas. As células e o meio aquoso foram separados por filtração e o meio aquoso submetido à extração contínua com diclorometano por 72 hs. O extrato obtido foi submetido à purificação por cromatografia obtendo 93 mg (47 %) do sulfóxido com 92 % de excesso enantiomérico (**C 11**).



C 11 – Cromatograma (GC-FID) obtido pela reação enzimática em escala analítica com células em repouso de *Cladosporium sp.* CBMAI 0210 com 96hs de reação.

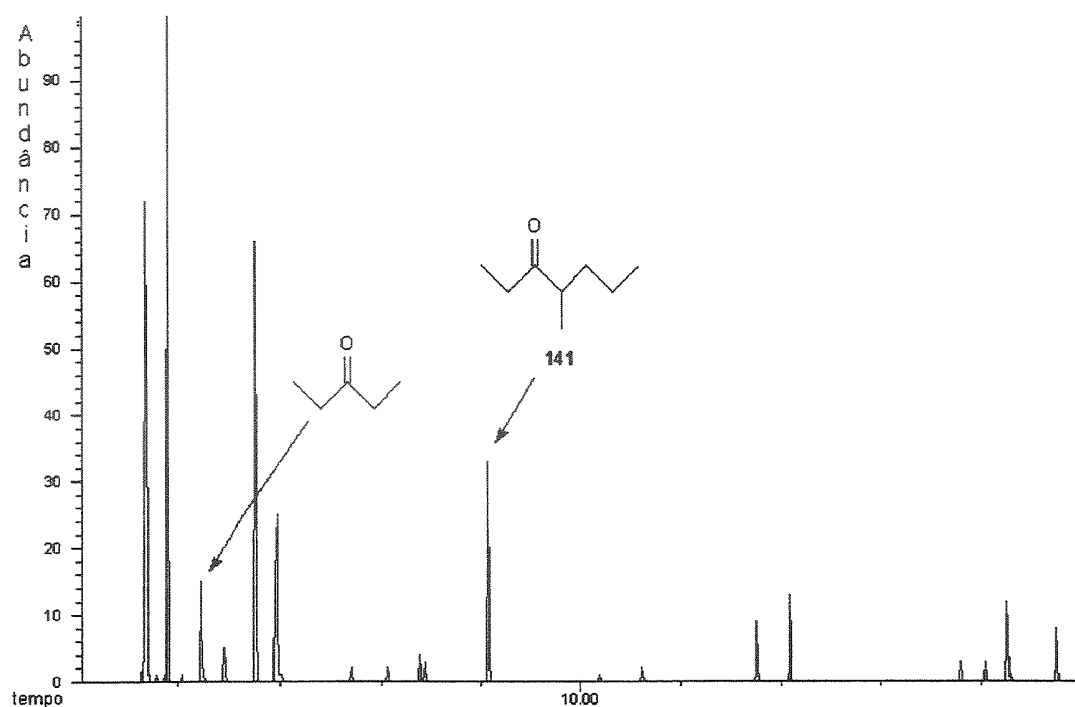
O menor excesso enantiomérico obtido pode ter sido ocasionado pela diferente eficiência da reação em cada erlenmeyer cujo acompanhamento foi feito por amostragem e não de todos frascos.

O rendimento isolado não corresponde à conversão observada nos experimentos descritos na **Tabela 4** (pág. 47). Alguns fatores podem ser citados como responsáveis por esse resultado. No primeiro dia de biooxidação foi notório o forte odor do sulfeto na sala onde ficava o Shaker podendo haver perda por volatilização. Além disso, o substrato é bastante hidrofóbico e o sulfóxido mais solúvel em água, sendo diferente a homogeneização dos compostos em água, podendo mascarar uma boa conversão cromatográfica. Observamos posteriormente que quando as células filtradas eram submetidas à extração com acetona sob ultra-som, a quebra da membrana celular proporcionava a recuperação de sulfóxido, indicando a perda de material que ficava retido no interior das células. E finalmente, não se pode descartar que ocorra competição da oxidação do sulfeto com o processo de S-desalquilação (**Esquema 21**).

4.3.3.6. Síntese da (S)-4-metil-3-heptanona 141

Depois da otimização da metodologia, decidimos realizar a síntese assimétrica da cetona quiral **141**. Diante da pequena quantidade de (S)-sulfóxido **106** enriquecido (93 mg) decidimos primeiramente testar a eficiência da rota sintética que propusemos. Desta forma, iniciamos promovendo a condensação aldólica do (S)-etil-fenil-sulfóxido **106** com o propionato de etila **150**. (**Esquema 41**, pág. 67) O progresso da reação foi acompanhado pelas alterações de colorações da mistura reacional, variando de uma cor clara para um amarelo intenso e laranja quando foi adicionado o sulfóxido ao LDA e no final da reação de amarelo claro para incolor, quando foi adicionado o éster. Depois da análise por CCD, purificamos o produto bruto e submetemos a alquilação com iodeto de *n*-propila sobre NaH (**Esquema 42**, pág. 68). Devido à instabilidade comprovada do produto de reação efetuamos imediatamente a eliminação reductiva do produto bruto de alquilação com níquel de Raney (**Esquema 43**, pág. 69). Para nosso

contentamento, o *headspace* do produto de reação nos indicou a formação do 4-metil-3-heptanona **141** (C 12, E 31).

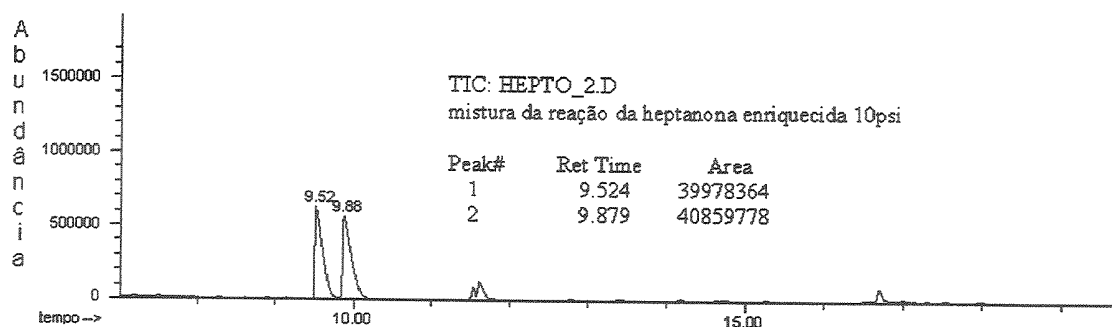


C 12 – Cromatograma de íon totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida HP-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), da reação de dessulfurização do composto **147** enriquecido.

Entretanto, ao efetuar a análise do composto por CG-EM acoplada a coluna quiral observamos uma mistura racêmica (C 13). Esse fato nos intrigou bastante. É conhecido que a condensação aldólica leva a baixas razões diastereoisoméricas do β -ceto-sulfóxido mono-alkilado (1:1)⁹⁶, mas na segunda etapa da síntese, durante a formação do carbânio, este centro é destruído. Como já discutimos a alquilação é conhecidamente estereosseletiva.⁹⁷ Restaria apenas a última etapa. Uma possibilidade seria uma enantiomerização no centro estereogênico do carbono quartenário durante o processo de dessulfurização.

⁹⁶ Kosugi, H.; Kanno, O. and Uda, H. *Tetrahedron: Asymmetry*. **1994**, 5, 1139.

⁹⁷ Fujita, M.; Lida, M.; Manako, K.; Sato, K. and Ogura, K. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 645.



C 13 – Cromatograma de íon totais (CG-EM) equipado com coluna capilar quiral Chrompack CD-chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 µm), detector 280 °C, injetor 150 °C, gás de arraste (He, 10 psi) obtido da reação de dessulfurização do composto **147** enriquecido.

Uma investigação na literatura nos levou ao trabalho de Bonner,⁹⁸ o qual descreve a enantiomerização de compostos que possuem o grupo sulfinila adjacente ao centro estereogênico pela ação do níquel de Raney.

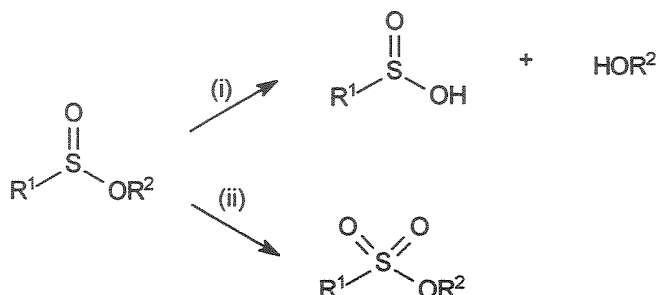
Além do período do doutoramento ter sido ultrapassado, um outro fato nos impediu de repetir a biooxidação para aumentar a quantidade de sulfóxido enriquecido e realizar outra proposta sintética. Os microrganismos são muito sensíveis a marca e lote do meio de cultura. Desta forma, depois que terminou o extrato de malte da Merck, outro lote ou outra marca não reproduziram os resultados obtidos anteriormente. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de meio sintético e otimização para produção em larga escala do material de partida para fins sintéticos.

4.4. Sulfinatos Quirais por biocatálise

Tínhamos como objetivo realizar testes para a obtenção de outros síntons através de biocatálise a fim de testar o poder enzimático dos microrganismos brasileiros. Escolhemos como substrato ésteres sulfinicos, pois existem poucos estudos sobre reações enzimáticas com essa classe de composto contendo enxofre.

⁹⁸ Bonner, W. A. *J. Am. Chem. Soc.* 1952, 74, 5089.

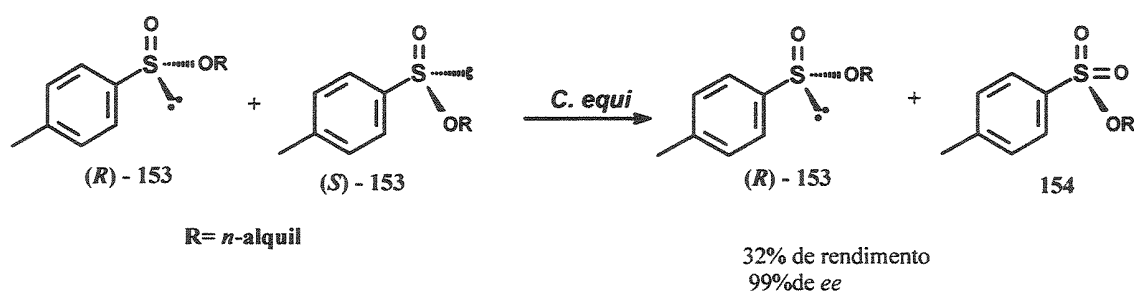
Dois tipos de reações são possíveis quando se trata de biotransformação com células integras: (i) hidrólise em ácido sulfinico e álcool e (ii) oxidação para sulfonato (**Esquema 44**).



Esquema 44 – (i) hidrólise e (ii) oxidação do sulfonato por microrganismo.

Já fizemos alguns comentários sobre os elementos de quiralidade que dão origem a estereosseletividade das hidrolases. Os ésteres sulfinicos possuem um elemento de quiralidade intrínseco, o grupo sulfinila, o que levaria à hidrólise em posição adjacente ao elemento de quiralidade, o que é pouco comum.

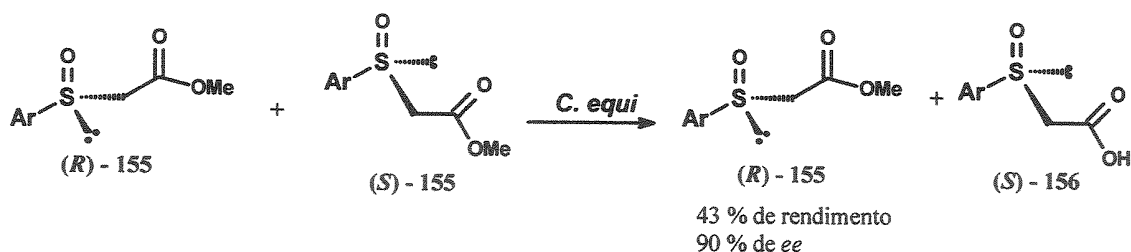
A atividade oxidativa de *Corynebacterium equi* IFO 3730 foi avaliada por Ohta frente a sulfonatos de alquila, onde esperava-se que a sulfoxidase pudesse discriminar o centro estereogênico do éster sulfinico como ocorre no caso da resolução de sulfóxidos. Nesta investigação foram utilizados sulfonatos de *n*-alquila e o melhor resultado foi de 32% rendimento e *ee* > 99⁹⁹ (**Esquema 45**).



Esquema 45 – Resolução cinética de sulfonatos de *n*-alquilas com células de *C. equi* IFO 3730.

⁹⁹ Kawasaki, T.; Watanabe, N. Sugai, T. and Ohta, H. *Chem. Lett.* **1992**, 1611.

O grupo de Ohta resolveu utilizar esta cepa neste trabalho devido a sua comprovada atividade hidrolítica frente à α -sulfinil-acetatos, onde era esperado que a esterase pudesse discriminar o éster sulfinílico em virtude do centro estereogênico propiciado pelo enxofre. Neste caso, os experimentos forneceram α -sulfinil-acetatos com rendimentos de 43% e excesso enantiomérico de 90%¹⁰⁰ (Esquema 46).

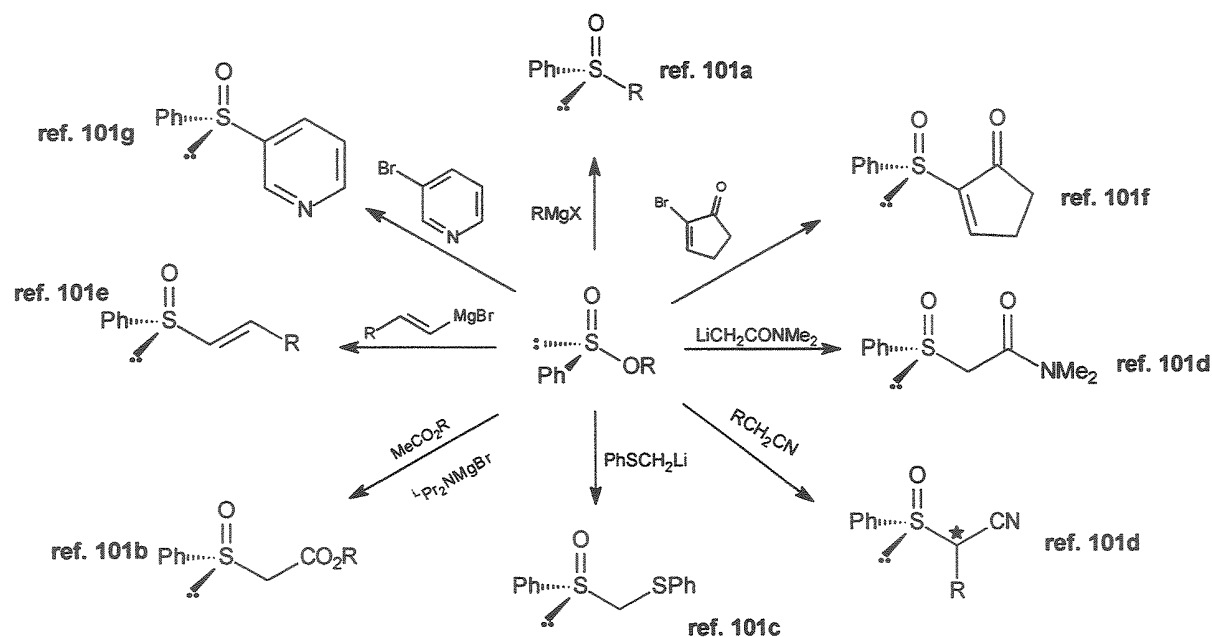


Esquema 46 – Resolução cinética de α -sulfinil-acetatos de metila com células de *C.equi* IFO 3730.

Visualizamos a possibilidade de se realizar a resolução enzimática de ésteres sulfinicos usando células de fungos oferecendo mais uma alternativa “natural” para obtenção de sulfóxidos quirais. A obtenção dos sulfóxidos dificultada pela biooxidação direta do sulfeto pode ser contornada pelo Método de Andersen a partir de sulfinatos quirais obtidos por biocatálise. Este método permitiria a preparação de uma variedade de sulfóxidos quirais de difícil acesso por biocatálise¹⁰¹ (Esquema 47).

¹⁰⁰ Ohta, H.; Kato, Y. and Tsuchihashi, G., -I. *Chem. Lett.* **1986**, 217.

¹⁰¹ (a) Andersen, K. K. *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 1953. (b) Mioskowski, C. and Solladié, G. *Tetrahedron Lett.* **1975**, 3341. (c) Colombo, L.; Gennari, C. And Narisano, E. *Tetrahedron Lett.* **1978**, 3861. (d) Annuziata, R.; Cinquina, M.; Colonna, S. and Cozzi, F. *J. Chem. Soc. Perkins Trans 1.* **1981**, 614. (e) Abbott, D. J.; Colonna, S. and Stirling, J. M. *J. Chem. Soc.* **1971**, 471. (f) Poster, G. H.; Mallamo, J. P.; Hulce, M. and Frye, L. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 4180. (g) Imanishi, T.; Obika, S.; Nishiyama, T.; Nishimoto, M.; Hamano, Y.; Miyashita, K. and Iwata, C. *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, 44, 267.



Esquema 47 - Proposta para a obtenção de sulfóxido quiral a partir do sulfinato de alquila.

4.4.1. Resultados e discussão

Como já citamos anteriormente, o nosso grupo de pesquisa estudou além da sulfoxidase, a atividade hidrolítica e de isomerização de diversas linhagens de microrganismos, entretanto a atividade hidrolítica mais extensivamente estudada está relacionada as epóxiidrolases. No único trabalho de resolução de ésteres sulfinicos, Ohta estudou a biorresolução de sulfinatos de *n*-alquila por oxidação.

De regra, a resolução cinética fornece apenas 50% do enantiômero desejado. Este processo é impraticável nas resoluções em larga escala. Entretanto esta limitação pode ser contornada se a resolução cinética for dinâmica, ou seja, combinada com uma racemização *in situ* do enantiômero indesejável. Desta forma, todo o substrato pode ser convertido em apenas um enantiômero fornecendo até 100% de rendimento. A utilização da atividade enzimática no seu ambiente natural (célula) tem suas vantagens, pois duas ou

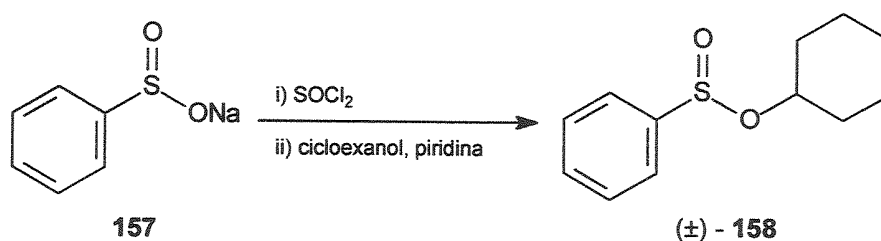
mais enzimas podem estar atuando para gerar um melhor rendimento final com excelentes excessos.



Esquema 48 – Esquema da resolução cinética dinâmica (RCD).

4.4.1.1. Síntese do substrato e padrão

O grupo de Ohta utilizou sulfinatos contendo a porção álcool linear e a oxidação foi predominante, mas houve suspeita da ação hidrolítica pelo microrganismo. Para testar a atividade hidrolítica dos microrganismos propusemos a síntese do sulfinato de alquila ($\pm$)-**158** obtida a partir da esterificação do ácido benzenossulfínico **157** com cicloexanol (**Esquema 49**).



Esquema 49 – Obtenção do ($\pm$)-benzenossulfinato de cicloexila **158**.

Os ácidos sulfínicos são moderadamente instáveis e portanto são comercializados na forma de sal. Desta forma, inicialmente preparou-se o cloreto de ácido pela adição do benzenossulfinato de sódio a uma solução de cloreto de tionila em benzeno anidro a 0°C. Devido a liberação do ácido clorídrico conectamos ao balão um borbulhador contendo solução básica. Após a adição, conduzimos a mistura reacional à temperatura ambiente. Imediatamente trocamos o borbulhador por um condensador e a solução foi concentrada a ¼ do volume

pela destilação do benzeno e excesso do cloreto de tionila. O resíduo foi diluído com éter anidro formando uma mistura branca densa a qual foi esfriado a 0°C com o auxílio de um banho de gelo. Conectamos ao balão um funil de adição contendo uma solução de cicloexanol em piridina. Adicionada lentamente à solução com a mistura reacional em agitação vigorosa. Após o fim da adição, a mistura resultante foi agitada por uma hora a temperatura ambiente. Depois efetuamos a adição de água em banho de gelo e a fase orgânica foi lavada sucessivamente com uma solução de ácido clorídrico – 10% e uma solução de salmoura com o auxílio de um funil de separação. A fase orgânica foi seca sobre Na₂SO₄ e concentrada sob pressão reduzida.

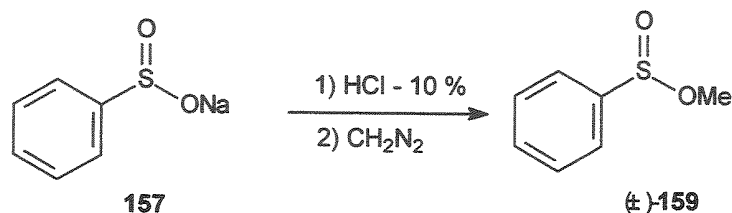
Após a purificação do produto bruto por cromatografia em coluna obtivemos ($\pm$) - **158** com 77% de rendimento. A caracterização deste composto foi feita com base na análise de seus dados espectroscópicos (RMN de ¹H e de ¹³C) e espectrométricos (EM). Pelo espectro de RMN ¹H, a porção alquílica do benzenossulfinato de cicloexila **158** foi confirmada por uma série de multipletos entre δ_H 1,25 e 2,10 com integração correspondente a 10 hidrogênios da porção cicloexila (**E 33**). Em δ_H 4,34 encontramos um multipeto correspondente ao hidrogênio carbinólico confirmando a formação do éster sulfínico. A porção aromática foi confirmada pelos sinais entre δ_H 7,47 a δ 7,76.

Confirmamos a presença da porção cicloexílica pela presença de sinais correspondentes a carbonos metilênicos entre δ_C 23,80 e 33,65, e do carbono metínico em δ_C 77,94. (**E 34**)

No espectro de massas não observamos a ocorrência do íon molecular de m/z 224, mas verificamos o pico de m/z 143 (100 %) e dos correspondentes isótopos do enxofre proveniente da eliminação da porção alquílica da molécula (**E 32**). Também podemos confirmar o produto de esterificação pelo pico de m/z 83 (46 %) proveniente da perda do radical benzenossulfinato.

O monitoramento do ácido sulfínico, produto de hidrólise, foi possível após tratar as alíquotas com diazometano. Para acompanhar o produto de hidrólise preparamos o ácido sulfínico metilado. Inicialmente tratamos o benzenossulfinato de sódio **157** com solução de ácido clorídrico – 10 % para a

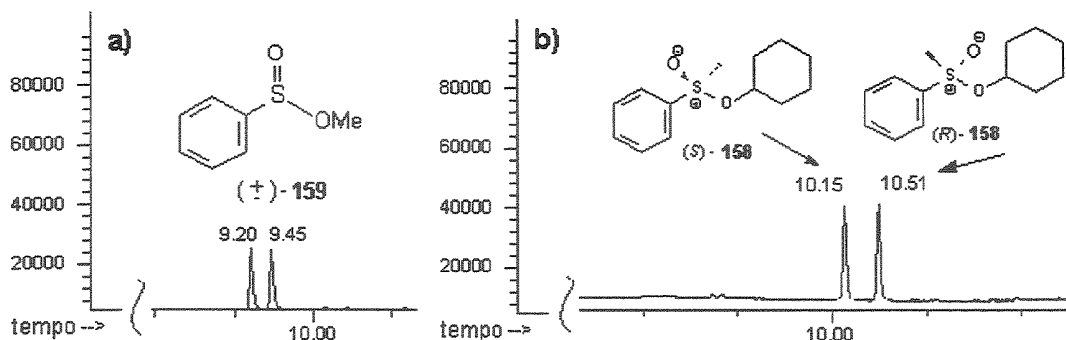
formação do ácido benzenossulfínico e a solução foi extraída com éter. A fase orgânica foi seca sobre Na₂SO₄ e evaporada sob pressão reduzida. O ácido benzenossulfínico foi metilado com diazometano produzindo o benzenossulfinato de metila **159** (Esquema 50).



Esquema 50 – Obtenção do (±)-benzenossulfinato de metila **159**.

Depois da purificação do produto bruto por cromatografia em coluna obtivemos (±)-**159** com 95% de rendimento. A obtenção do éster metílico foi caracterizada pela observação, no espectro de massas (E 36), do pico referente ao íon molecular de m/z 156 (82 %) e pico correspondentes à perda do radical metila (m/z 141, 12%), enquanto que pelo espectro de RMN de ¹H (E 37), a ocorrência do singlete em δ_{H} 3,47 correspondente os hidrogênios metílicos da metoxila e confirmado no espectro de RMN de ¹³C (E 38) pelo sinal em δ_{C} 49,63. Os dois multipletos entre δ_{H} 7,53 e 7,72 são atribuídos aos hidrogênios aromáticos da molécula.

Em seguida passamos para a otimização da análise dos compostos (C14). As análises foram realizadas no cromatógrafo gasoso (FID) HP-6890 equipado com uma coluna capilar quiral (2,6-dimetil-3-pentil)-β-ciclodextrina (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm). Desta forma, confirmamos a presença do benzenossulfinato de cicloexila **158** e do benzenossulfinato de metila **159**, e o excesso enantiomérico pela análise dos padrões em GC-FID equipado com a coluna capilar quiral utilizada nos experimentos de biorreação do sulfinato.



C 14 – Cromatogramas (GC-FID) equipado com coluna capilar quiral (2,6-dimetil-3-pentil)- β -ciclodextrina (25 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), detector 220 $^{\circ}$ C, injetor 200 $^{\circ}$ C, gás de arraste (H_2 , 10 psi) do padrão do a) benzenossulfonato de metila **159** e b) benzenossulfonato de cicloexila **158**.

4.4.1.2. Avaliação de microrganismos na resolução do sulfonato **158**.

Utilizamos nesta avaliação as linhagens de microrganismos utilizadas na avaliação biooxidativa, entretanto substituímos a linhagem de *Cladosporium* sp. CBMAI 0210 que demonstrou capacidade oxidativa seletiva (Experimento 11, Tabela 4, pág. 47) pela linhagem de *Aspergillus terreus* CCT 3320 que em trabalhos anteriores de nosso grupo, efetuou uma resolução cinética eficiente do etil-fenil-sulfóxido **106** na produção do (S)-etil-fenil-sulfóxido **106** com e.e. > 99 %.¹⁰²

As linhagens foram inoculadas e cultivadas em meio de extrato de Malte (ME) em tubos inclinados previamente esterilizados e mantidos em estufa a 28 $^{\circ}$ C para obtenção de células “frescas”. Após 3 dias, as linhagens foram inoculadas em erlenmeyer (500 mL) contendo 100 mL de meio líquido (ME) e colocadas num agitador rotativo à 28 $^{\circ}$ C e rotação de 120 rpm. Depois de mais 3 dias, os meios contendo as células crescidas foram filtradas sob vácuo e as células úmidas (2g) foram ressuspensas em erlenmeyer (125 mL) contendo 40 mL de solução tampão fosfato (0,1 M) com pH $\approx$ 7,0. Em seguida, adicionou-se 20 μ L do

¹⁰² Porto, A. L. M.; Cassiola, F.; Dias, S. L. P.; Joekes, I.; Gushikem, Y.; Rodrigues, J. A. R.; Moran, P. J.S., Manfio, G. P.; Marsailoi, A. J. J. *Mol. Catal B: Enzymatic* **2002**, 1-8, 810.

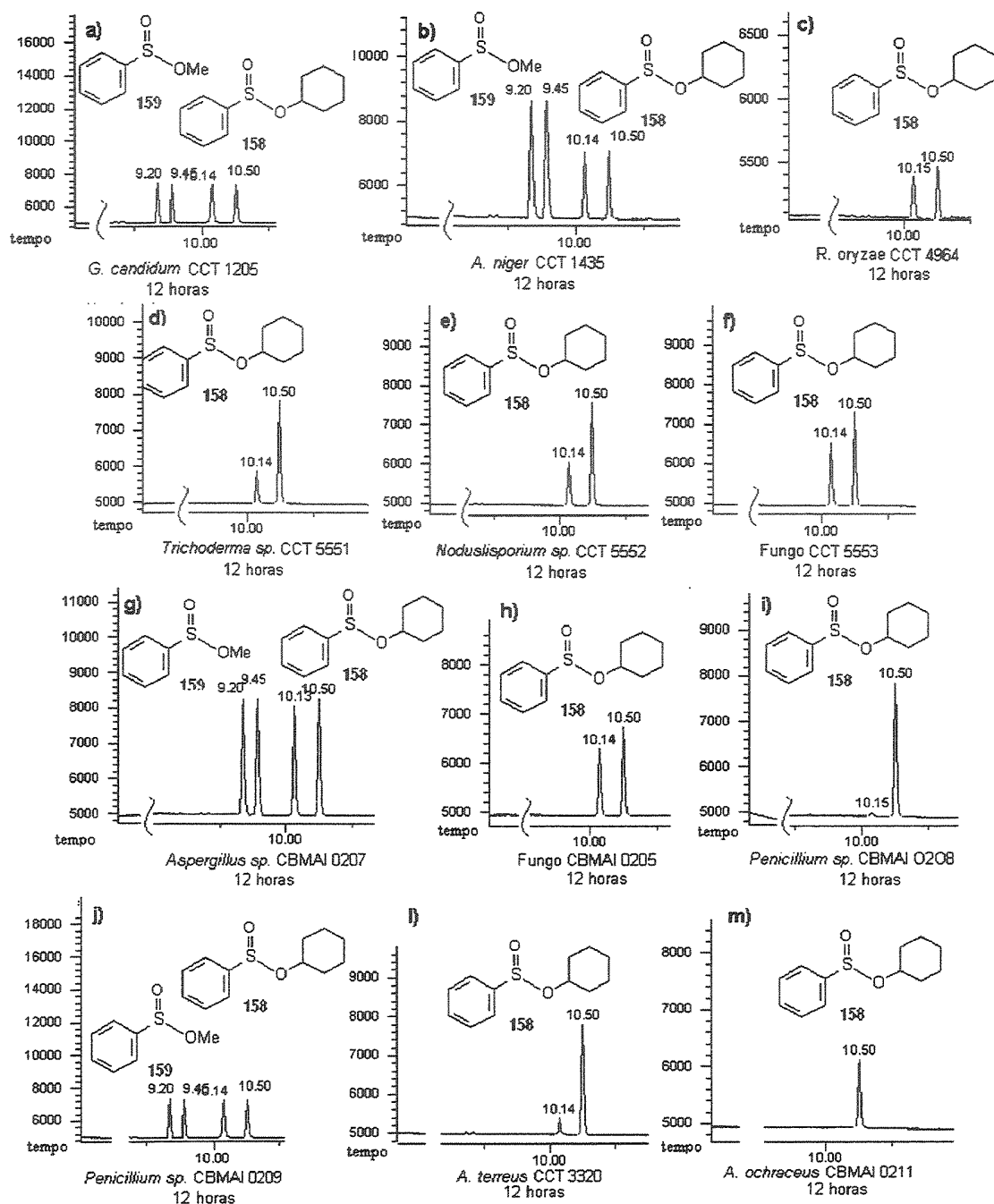
benzenossulfonato de cicloexila **158** e novamente levados ao agitador rotativo a 28 °C e rotação de 120 rpm e analisado após 12 horas.

Para o monitoramento retiraram-se alíquotas de 0,5 mL da mistura reacional que foram extraídas com 2 mL de acetato de etila. A fração orgânica foi seca sobre sulfato de sódio e evaporada sob fluxo de nitrogênio. As amostras foram tratadas com 1 mL de solução etérea de diazometano e depois evaporada sob fluxo de nitrogênio. Adicionou-se 50 µL de acetato de etila e desta solução foi injetado 1 µL para análise em cromatografia gasosa acoplada ao detector por ionização de chama (GC-FID) equipado com uma coluna capilar quiral (2,6-dimetil-3-pentil)-β-ciclodextrina (25 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (Tabela 5).

Tabela 5 – Resolução cinética do sulfonato (±)-**158** com células de fungos em 12 horas.

	Microrganismos	158 ee (%)	Configuração	159 ee (%)
1	<i>Geotrichum candidum</i> CCT 1205	0	-	0
2	<i>Aspergillus niger</i> CCT 1435	0	-	0
3	<i>Rhizopus oryzae</i> CCT 4964	11	S	-
4	<i>Trichoderma</i> sp. CCT 5551	51	S	-
5	<i>Nodulisporium</i> sp. CCT 5552	40	S	-
6	Fungo CCT 5553	18	S	-
7	<i>Aspergillus</i> sp. CBMAI 0207	0	-	0
8	Fungo CBMAI 0205	13	S	-
9	<i>Penicillium</i> sp. CBMAI 0208	99	S	-
10	<i>Penicillium</i> sp. CBMAI 0209	0	-	0
11	<i>Aspergillus terreus</i> CCT 3320	95	S	-
12	<i>Aspergillus ochraceus</i> CBMAI 0211	99	S	-

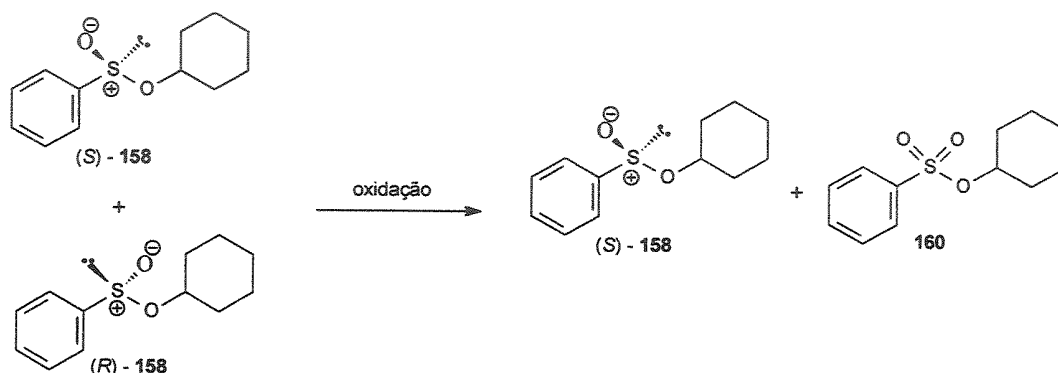
Os experimentos de resolução foram monitorados após 12 horas e nos experimentos 9 (C 15, i) e 12 (C 15, m) observamos no final apenas um enantiômero. A análise cromatográfica revelou que em quatro experimentos não houve resolução e o restante dos experimentos apresentaram resolução com a mesma enantiosseletividade. Entretanto, em apenas três houve excelente excesso enantiomérico produzindo preferencialmente o enantiômero S.



C 15 – Cromatogramas (GC-FID) obtidos pela reação enzimática com células em repouso de fungos. a) *G. candidum* CCT 1205, b) *A. niger* CCT 1435, c) *R. oryzae* CCT 4964, d) *Trichoderma* sp. CCT 5551, e) *Nodulisporium* sp. CCT 5552, f) Fungo CCT 5553, g) *Aspergillus* sp. CBMAI 0207, h) Fungo CBMAI 0205, i) *Penicillium* sp. CBMAI 0208, j) *Penicillium* sp. CBMAI 0209, l) *A. terreus* CCT 3320 e m) *A. ochraceus* CBMAI 0211.

Nos experimentos 1 (C 15, a), 2 (C 15, b), 7 (C 15, g) e 10 (C 15, j) não houve resolução e observou-se a formação do ácido sulfinico, através do seu derivado metilado. No restante dos experimentos observou-se a predominância do sulfinato (S) -158. A determinação da configuração absoluta do sulfinato foi determinada e será explicada a seguir.

Os fungos *Aspergillus ochraceus* CBMAI 0211 (C 15, m), *Aspergillus terreus* CCT 3320 (C 15, l) e *Penicillium sp.* CBMAI 0208 (C 15, i) forneceram os melhores excessos enantioméricos (>95%). Nestes experimentos não foi observada a formação do produto de hidrólise nos fazendo acreditar na oxidação seletiva do sulfinato (R) -158 para sulfonato 160, o qual não dispúnhamos de padrão.



Esquema 51 - Resolução enzimática de (±)-158.

4.4.1.3. Otimização da resolução do sulfinato 158.

Decidimos realizar o estudo da resolução enzimática do sulfinato com a variação do pH acompanhando o rendimento cromatográfico da biorresolução. Para este experimento foi alterada a concentração do substrato pela diminuição do volume do meio reacional de 40 mL para 25 mL, mantendo a mesma massa de células úmidas na reação. A elevada hidrofobicidade do substrato pode induzir a atividade hidrolítica da linhagem em relação a sua atividade oxidativa. Gostaríamos de verificar se resolução enzimática seria mais eficiente pela combinação da hidrólise e esterificação enzimática seletiva aliada com a racemização do ácido sulfinico.

Assim, passou-se à otimização dos resultados no que se refere aos e.e. pela reação de ($\pm$)-**158** com *A. terreus* CCT 3320 em solução tampão fosfato neutra (pH=7,0) e levemente básica (pH=7,2). As reações foram monitoradas por CG-FID equipado com uma coluna capilar quiral (2,6-dimetil-3-pentil)- β -ciclodextrina (25 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) com padrão interno (acetofenona **161**) para obtenção de rendimento cromatográfico (Tabela 6).

Tabela 6 - Resolução enzimática do sulfinato ($\pm$)-**158** com *A. terreus* CCT 3320

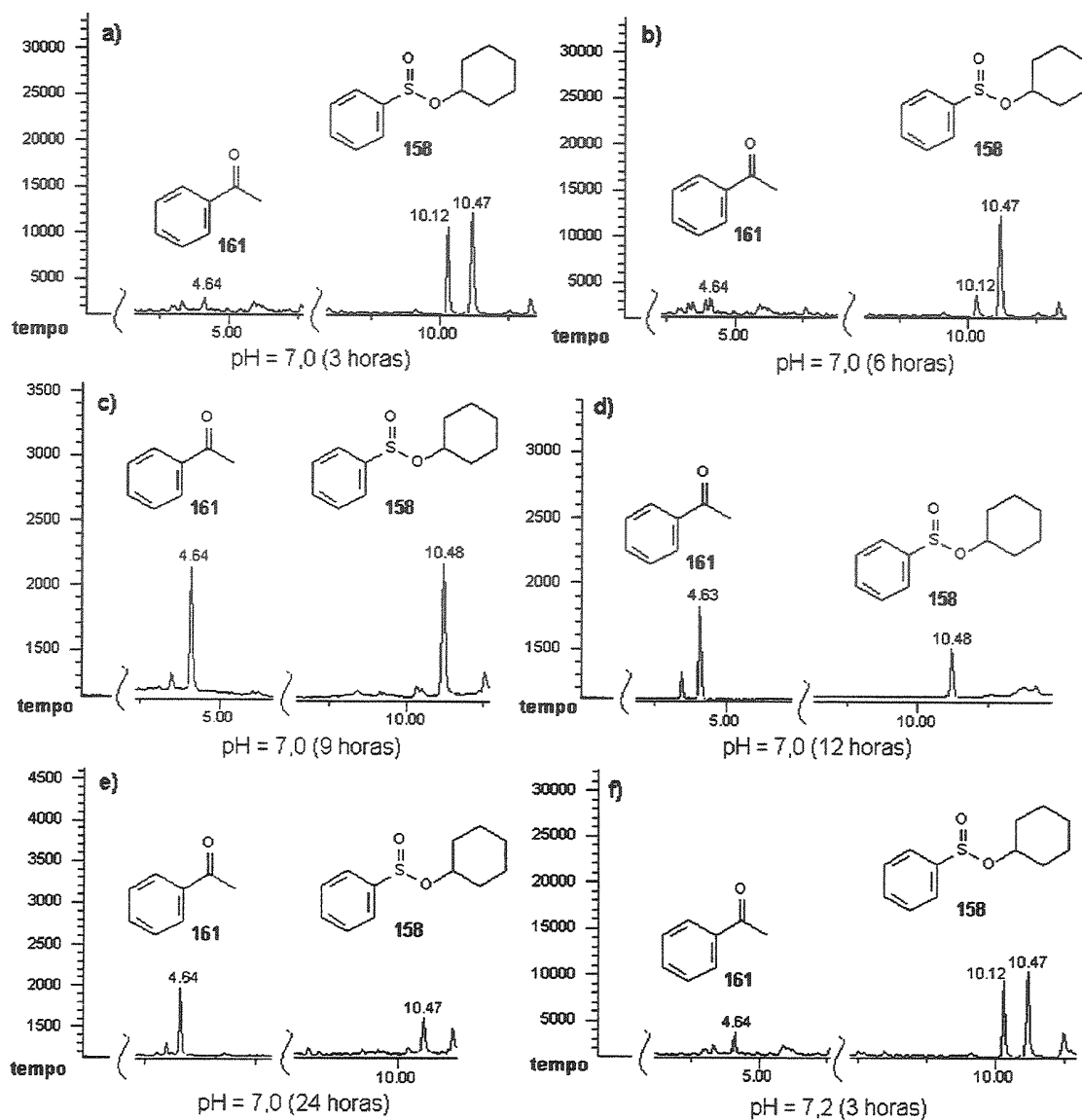
Tempo(h)	pH 7,0		pH 7,2	
	ee (%) ^a	C (%) ^b	ee (%) ^a	C (%) ^b
3	28	7	19	12
6	70	12	51	27
9	>99	34	63	28
12	>99	36	80	32
24	>99	37	86	32

^a excesso enantiomérico determinado por CG-FID

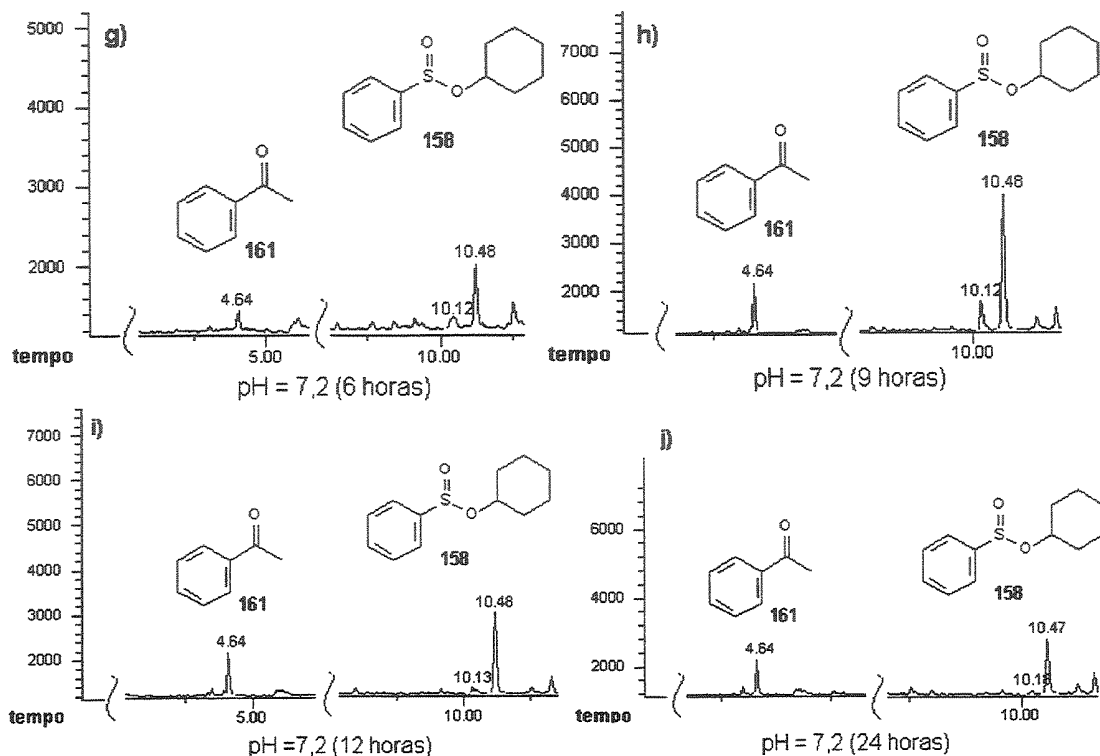
^b conversão cromatográfica com padrão interno

Retiramos alíquotas de 1 mL da mistura reacional que foram extraídas com 2 mL de acetato de etila. A fração orgânica foi seca sobre sulfato de sódio e evaporada sob fluxo de nitrogênio. As amostras foram tratadas com 1 mL de solução etérea de diazometano e depois evaporada sob fluxo de nitrogênio. Adicionou-se 100 μ L de solução de acetofenona **161** em acetato (C= 0,005 mg/mL) e desta mistura foi injetado 1 μ L para análise em cromatografia gasosa acoplada ao detector por ionização de chama (GC-FID) (C 16, a-j).

Nos dois experimentos não foi observado produto de hidrólise. No que diz respeito a conversão, observamos que na reação em pH = 7,0, o sulfinato é convertido mais suavemente e depois de 6 horas de reação ocorre um consumo rápido, enquanto que na reação em pH = 7,2, o sulfinato é convertido velozmente até 6 horas de reação em seguida à velocidade da reação diminui dramaticamente (Tabela 6 e Gráfico 1).

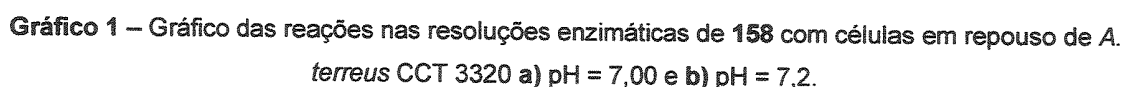


C 16 – Cromatogramas (GC-FID) obtidos pela reação enzimática com células em repouso de *A. terreus* CCT 3320. a) 3 horas (pH = 7,0), b) 6 horas (pH = 7,0), c) 9 horas (pH = 7,0), d) 12 horas (pH = 7,0), e) 24 horas (pH = 7,0) e f) 3 horas (pH = 7,2).



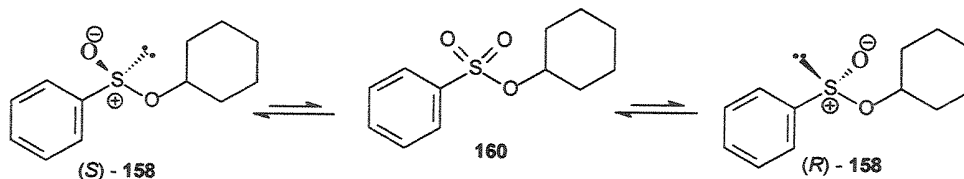
C 16 (continuação) – Cromatogramas (GC-FID) obtidos pela reação enzimática com células em repouso de *A. terreus* CCT 3320. **g)** 6 horas (pH = 7,2), **h)** 9 horas (pH = 7,2), **i)** 12 horas (pH = 7,2) e **j)** 24 horas (pH = 7,2).

No que se refere aos excessos enantioméricos, verificou-se que na reação em pH = 7,0 a reação seguiu para elevados excessos enantioméricos, enquanto em pH = 7,2 houve um aumento gradativo atingindo até o final da reação atingindo 86 % de e.e. Portanto, no experimento em pH 7,0 houve um incremento do excesso enantiomérico em relação ao experimento 11 (Tabela 5, pág. 82) enquanto que no experimento em pH 7,2 o excesso diminuiu para 86 %.



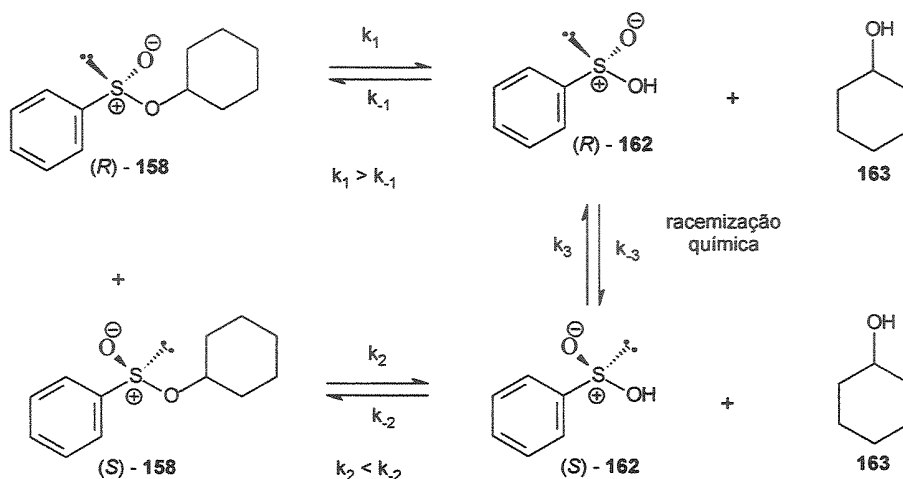
Espera-se para e.e. acima de 99% uma conversão de aproximadamente 50%, ou seja, à medida que a reação ocorre um dos enantiômeros é consumido muito mais rapidamente que o outro, onde praticamente um enantiômero é destruído, o que seria uma resolução cinética convencional. No presente caso o substrato atingiu e.e. > 99 % com uma conversão de apenas 37 % que implica numa resolução cinética dinâmica o que só poderia ser explicado por uma racemização *in situ*.

Para explicar esse fenômeno inicialmente propusemos a presença de enzimas oxidativas atuando com enantiosseletividade e velocidades diferentes produzindo o sulfonato **160**, mas esta atividade oxidativa não explicaria o rendimento > 50%. Não existem relatos da redução de sulfonatos em condições aeróbias e portanto sendo descartada a possibilidade de uma redução enantiosseletiva promovendo a inversão do centro quiral (**Esquema 52**).



Esquema 52 – Proposta para epimerização do sulfinato pela oxidação e redução do enxofre.

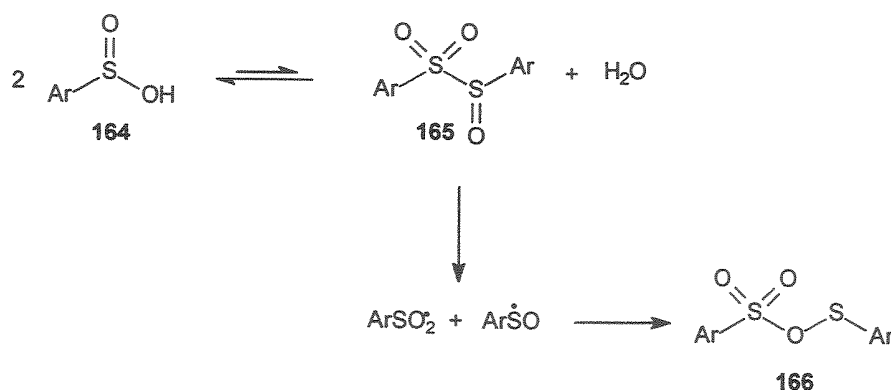
Alternativamente a hidrólise enantiosseletiva do benzenossulfonato de cicloexila **158** formaria o ácido benzenossulfínico quiral **162** e o cicloexanol **163**. Os ácidos sulfínicos sofrem racemização ($k_3=k_{-3}$) em meio aquoso e uma segunda enzima poderia promover uma esterificação enantiosseletiva. Desta forma, teríamos uma racemização *in situ* o que promoveria uma resolução cinética dinâmica desde que $k_1 > k_2$ e $k_{-1} < k_{-2}$ (Esquema 53).



Esquema 53 – Proposta para a resolução cinética dinâmica do benzenossulfonato de cicloexila (±)-**158** com células de *A. terreus* CCT 3320.

Considerando uma resolução cinética dinâmica eficiente efetuada por uma hidrolase do *A. terreus* CCT 3320, para promover a formação de 100 % de rendimento de (S)-**158** com excesso enantiomérico > 99%, seria resultado de $k_1 \gg k_2$ e $k_{-1} < k_{-2}$. Associando estas constantes de velocidades com uma rápida racemização $k_3=k_{-3}$ teríamos a formação de (S)-**158** com os rendimentos acima de 50%. Entretanto o rendimento de 63% (Tabela 6) indica que a resolução cinética dinâmica não foi eficiente. Estamos levando em consideração a impossibilidade de inversão de centro do sulfonato por uma invertase ou por uma redutase atuando no sulfonato formado.

O mecanismo de racemização do ácido sulfinico foi proposto por Kice¹⁰³ e envolve um equilíbrio inicial entre 2 moléculas de ácido sulfinico **164** e 1 molécula de uma instável sulfinil-sulfona **165** seguido de uma decomposição térmica formando um sulfenil-sulfonato **166** (**Esquema 54**).



Esquema 54 – Proposta para a racemização do ácido sulfinico.¹⁰³

Entretanto, os dados extensivos relacionados com a cinética desta racemização foram obtidos em ácido acético – água – ácido sulfúrico em diversas proporções, mas com o aumento da concentração molar de água na mistura o equilíbrio é deslocado para a formação do ácido sulfinico **164**.

Portanto a nossa proposta envolve uma hidrólise seletiva seguida pela racemização do ácido sulfinico com uma concomitante esterificação formando o produto com rendimento > 50% (**Esquema 53**, pág. 87). Não descartamos a possibilidade da competição entre as hidrolases e sulfoxidases. Como o sulfinato mostrou-se estável no meio reacional e controlamos a apenas a presença do produto de hidrólise, sugerimos que a oxidação do sulfinato compete com a hidrólise justificando a resolução cinética dinâmica não eficiente. A resolução ainda é sensível à natureza nucleofílica do álcool e a velocidade de racemização do ácido sulfinico.

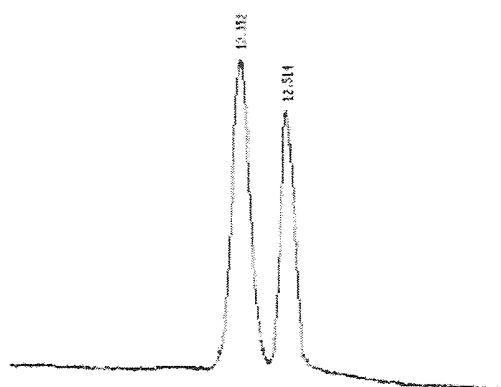
¹⁰³ Kice, J. L.; Guaraldi, G. and Venier, C. G. *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 3561.

4.4.1.4. Preparação de sulfóxido quiral a partir de sulfinato quiral obtido por biocatálise

Esta etapa foi importante na determinação da configuração absoluta do sulfinato enriquecido obtido por biocatálise. Não encontramos na literatura dados sobre este sulfinato sugerindo que a síntese do benzenossulfinato de cicloexila é inédita. Optamos por empregar a metodologia de Andersen (Esquema 16, pág. 31) para a obtenção do etil-fenil-sulfóxido **106**, um sulfóxido bem conhecido por nós. Para tanto passamos inicialmente para obtenção do benzenossulfinato enriquecido por biocatálise.

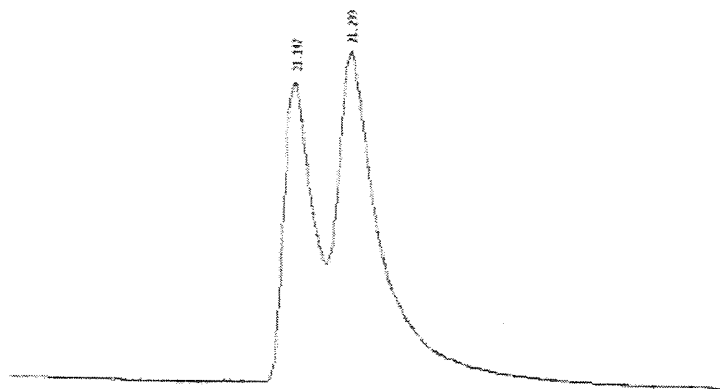
4.4.1.4.1. Determinação da configuração absoluta do benzenossulfinato de cicloexila **158**

O benzenossulfinato de cicloexila enriquecido foi obtido pela biorresolução com células úmidas de *A. terreus* CCT 3320 pela união de várias biocatálises analíticas e os produtos foram combinados e purificados por cromatografia fornecendo 147 mg (73 %) do sulfinato com 20 % de excesso enantiomérico (**C 17**).

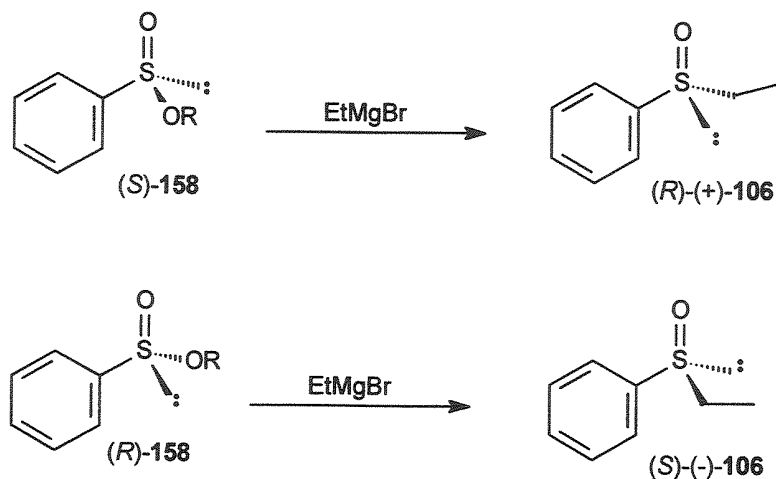


C 17 – Cromatograma (GC-FID) obtido pela reação enzimática em escala analítica com células em repouso de *A. terreus* CCT 3320 com 12hs de reação em pH = 7,0.

O EtMgBr recém preparado foi adicionado a uma solução de benzenossulfonato enriquecido a 0 °C. Depois da adição a mistura reacional foi conduzida a temperatura ambiente retirando o banho de gelo. A reação foi acompanhada por CCD e depois de 1 h 30 min foi adicionada uma solução saturada de cloreto de amônio. Após a purificação do produto bruto por cromatografia em coluna obtivemos 59,3 mg (60 %) e 20 % de ee do etil-fenil-sulfóxido **106** (**C 18**).

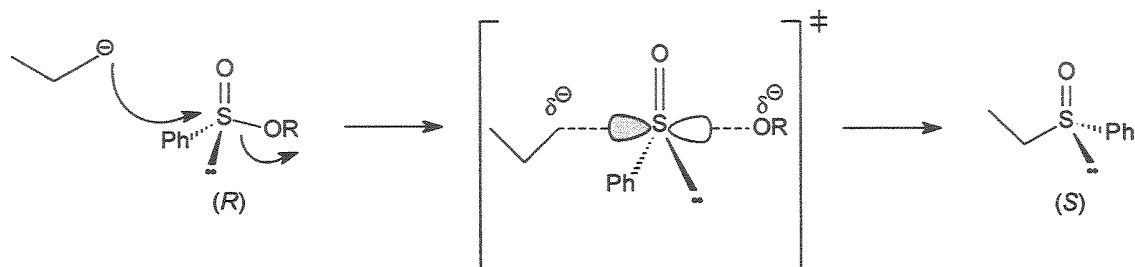


C 18 – Cromatograma (GC-FID) obtido pela reação com Grignard na obtenção do etil-fenil-sulfóxido **106**.



Esquema 55 – Reação de obtenção do sulfóxido **106** pela reação com Grignard.

A rotação óptica do sulfóxido em clorofórmio $[\alpha]_D^{20} = + 46^\circ$ (c 0,13, CHCl_3) nos permitiu indicar a configuração *R* por comparação com os valores da literatura, onde o (S)-etil-fenil-sulfóxido 106 apresenta $[\alpha]_D^{20} = - 104^\circ$ (c 0,41, CHCl_3) para o ee > 99%.¹⁰⁴ Desta forma, considerando os trabalhos de Andersen sobre a natureza da reação de Grignard com sulfinatos,¹⁰⁵ observa-se uma inversão da configuração do átomo de enxofre, podendo ou não resultar numa alteração do discritor *R* ou *S* se houver uma mudança na ordem de prioridade dos grupos após a adição nucleofílica (Esquema 56).



Esquema 56 – Proposta do Mecanismo de reação do tipo S_N2 .

Portanto, o benzenossulfinato fornecido por biocatálise, com excesso enantiomérico de 99 %, possui configuração *S* e sob análise da rotação óptica forneceu $[\alpha]_D^{20} = - 111^\circ$ (c 1,58, CHCl_3).

¹⁰⁴ Porto, A. L. M. *Isolamento e Seleção de Microrganismos Brasileiros para Reações de Biocatálise e Produção de Metabólitos*. Tese de Doutorado, Unicamp, 2002.

¹⁰⁵ Andersen, K. K.; Gaffield, W.; Papanikolaou, N. E.; Foley, J. W. and Perkins, R. I. *J. Am. Chem. Soc.* 1964, 86, 5637.

4.5. Conclusão Parcial

O fato dos microrganismos possuírem diversos tipos de enzimas propicia a oportunidade de se efetuar reações em cascata sobre um dado substrato, o que em algumas situações pode ser uma desvantagem.

Como as reações de biooxidação realizadas com células íntegras podem ser catalisadas pelas oxigenases e as oxidases, a natureza destas enzimas e limitadas informações sobre as suas estruturas, freqüentemente restringem a sua aplicação preparativa dificultando predizer o substrato adequado e os produtos de reação.

Os microrganismos apresentaram habilidade em oxidar o enxofre enantiosseletivamente com baixa ou nenhuma formação de sulfona. Entretanto o método enzimático não fornece altos rendimentos na preparação do sulfóxido **106**, mas é versátil na obtenção de ambos enantiômeros com altos excessos enantioméricos. No caso dos substratos **128** e **130** a utilização de células do fungo *Aspergillus terreus* CCT3320 não se mostrou eficiente merecendo futuras avaliações devido às publicações recentes de oxidação de β -ceto-sulfetos.

Por outro lado, a resolução cinética dinâmica de sulfinatos por microrganismos apresentou-se como uma versátil metodologia para a obtenção de sulfóxidos, como por exemplo, **129** e **131** que não foram possíveis pela oxidação dos sulfetos **128** e **130**.

Por fim, a proposta sintética de obtenção da (S)-(+)-4-metil-3-heptanona **141** representava uma rota rápida e de rendimentos quantitativos. Entretanto, a enantiomerização do centro estereogênico invalidou esta metodologia. Isso nos alertou para as limitações da metodologia de eliminação estereosseletiva de grupos sulfinilas adjacente ao centro estereogênico.

05. BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO

5.1. Introdução à Biorremediação

Existem dois enfoques gerais para purificação de solos contaminados: (1) da engenharia e (2) o ecológico. O primeiro se utiliza de métodos externos para restauração do solo, enquanto o segundo envolve a manipulação inerente ao solo para mobilizar, imobilizar, transformar ou degradar os contaminantes. Esta manipulação inclui a fermentação ou adubação do solo, revegetação e o uso de corretivos orgânicos para estimular a atividade biológica no solo. A biorremediação é baseada na atuação dos microrganismos tornando-se um método eficiente e ambientalmente seguro.

As técnicas de biorremediação utilizam a bioestimulação e/ou bioinóculo na degradação dos vários contaminantes nocivos. O bioinóculo envolve a adição de microrganismos ao solo contaminado, enquanto a bioestimulação envolve a correção, adição e/ou manipulação mecânica para estimular a população de microrganismos nativos.¹⁰⁶

A biorremediação tem várias aplicações, incluindo a limpeza de terrenos encobertos por águas, solos, lagoas, lamas e fluxo de dejetos de processos industriais.¹⁰⁷ Esta técnica é freqüentemente aplicada em ambientes multifásicos e heterogêneos como o solo, onde o contaminante presente está associado às partículas minerais e orgânicas, dissolvido em água e ar presentes no solo. Devido a essa complexidade, a biorremediação é multidisciplinar, envolvendo a microbiologia, engenharia do solo, ecologia, geologia e química.

A maior produtividade agrícola dos tempos atuais pode ser associada ao uso de produtos químicos, como fertilizantes e pesticidas. O termo “pesticida” é definido como qualquer substância ou mistura de substâncias destinadas a prevenção, destruição ou controle de alguma peste, inclusive vetores humanos ou doença de animais, não provocando danos às plantas ou animais durante seu

¹⁰⁶ Haimi, J. *Environ Pollution*. 2000, 107, 233.

¹⁰⁷ Boopathy, R. *Bioresource tech*. 2000, 74, 63.

uso.¹⁰⁸ O emprego de pesticidas é bem antigo. Existem citações na Bíblia do uso de substâncias inorgânicas, como o cobre para controle de insetos e doenças.¹⁰⁹ O primeiro pesticida sintético organoclorado foi desenvolvido em meados da década de 40 e desde então, novos pesticidas foram produzidos para controle de ervas daninhas, pestes e doenças.

O primeiro problema de poluição causado por pesticidas com os organoclorados tal como o DDT [1,1,1-tricloro-2,2-bis(*p*-clorofenil)etano], que foi banido devido a sua persistência no solo e pela bioacumulação através da cadeia alimentar, observada pela danificação da formação dos ovos de pássaros.

Existem algumas classificações de pesticidas empregadas. Uma delas classifica-os de acordo com a peste que ele destrói, por exemplo, acaricida, bactericida, fungicida, herbicida, inseticida, algicida, nematocida, etc. Os herbicidas são os pesticidas mais empregados, constituindo mais de 40% do total utilizado, enquanto os inseticidas são 30% e os fungicidas 20%.¹¹⁰

Os pesticidas compreendem uma grande variedade de compostos químicos com diferentes estruturas, conseqüentemente, com largas diferenças em seus modos de ação e eliminação. Estes compostos no solo podem sofrer degradação por microrganismos, degradação química (p.ex. hidrólise), absorção pelos componentes minerais e orgânicos do solo, deposição nas raízes das plantas, volatilização e diluição por águas de processo ou chuva.¹¹¹

Muitos destes compostos possuem toxicidade elevada, efeito residual de longa duração, dificuldade de degradação, podendo apresentar, muitas vezes, propriedades carcinogênicas e/ou teratogênicas. Existem aproximadamente 600 pesticidas químicos com seus ingredientes ativos registrados para uso na agricultura.¹¹² Portanto associado aos benefícios destes pesticidas existe a preocupação em conhecer e controlar os impactos ambientais causados por esses compostos.

¹⁰⁸ Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1986. International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticide. Rome, FAO, 1986.

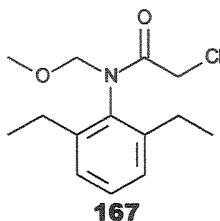
¹⁰⁹ Hester, R. E. and Harrison, R. M. *Agricultural Chemicals and the Environment*, Issues in Environmental Science and technology, The Royal Society of Chemistry, UK, 1996.p. 43.

¹¹⁰ Younes, M. and Galal-Gorchev, H. *Food Chem. Toxic.* 2000, 38, S87.

¹¹¹ Van der Werf, H. M. G. *Agric. Ecosyst. Environ.* 1996, 60, 81.

¹¹² Richardson, M. *Wat. Sci. Tech.* 1998, 37, 19.

Alachlor[®], 2-cloro-2',6'-dietil-N-(metoximetil) acetanilida **167**, é utilizado como um herbicida sistêmico de ação pré-emergente, pertencente à família dos cloroacetanilídicos, ativos contra gramíneas anuais e algumas espécies de folhas largas que invadem as culturas de soja, amendoim, milho, algodão, girassol, café e cana-de-açúcar.



É estável em condições normais de armazenamento e apresenta $t_{1/2}$ (meia vida) de 7 a 14 dias em diversos tipos de solo. O composto é um sólido cristalino, inodoro, de cor creme e ponto de fusão de 40 a 41°C. Decompõe-se a 105°C. É pouco solúvel em água (240 ppm a 25°C) e solúvel em acetona, benzeno, clorofórmio, etanol e acetato de etila. Possui densidade, em g/mL, de 1,33 e pressão de vapor de 2.2×10^{-5} mmHg a 20°C. Apresenta um coeficiente de partição octanol: água de 430.^{113,114}

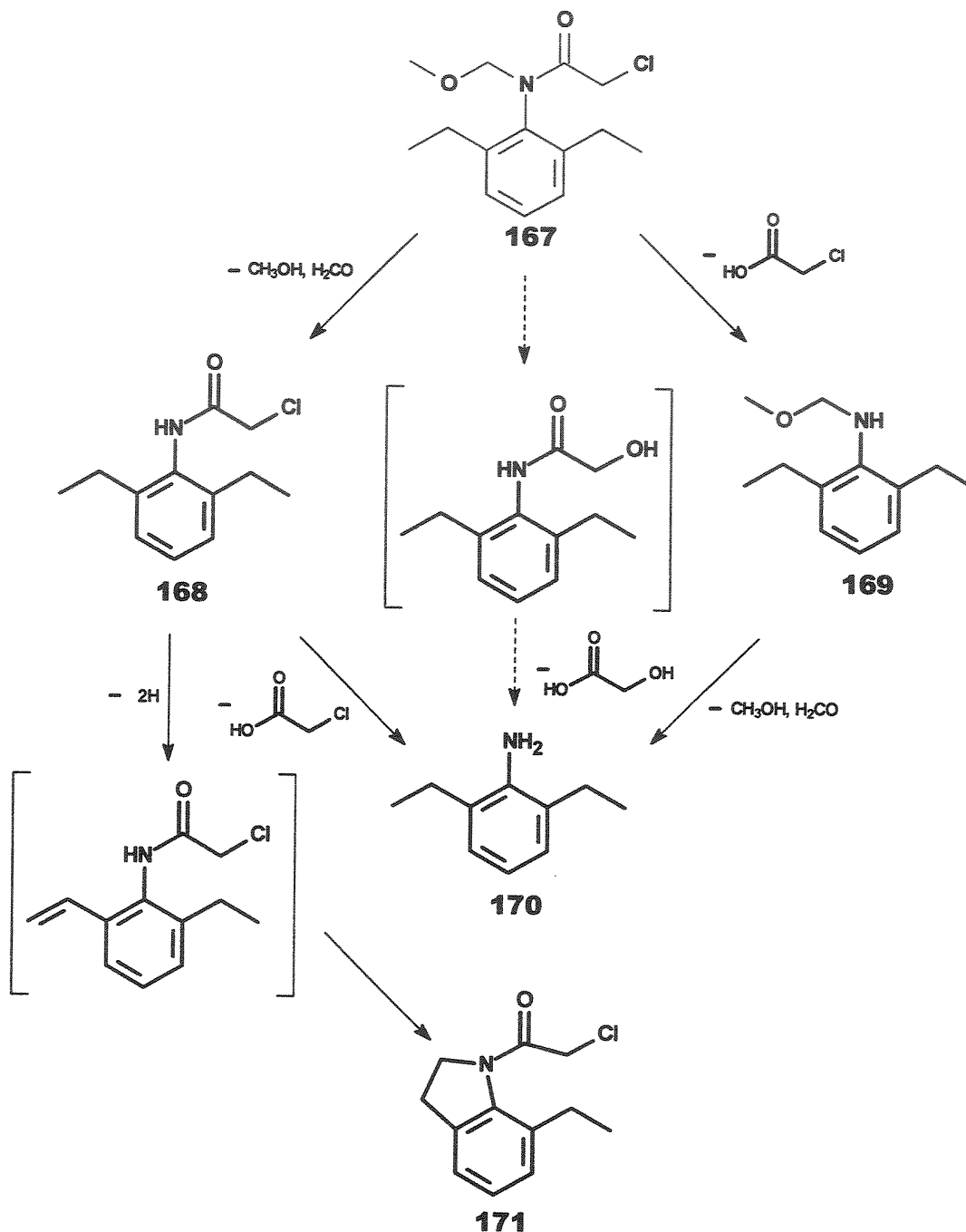
Existem vários estudos de transformação do alachlor **167** em ambientes bióticos e abióticos, nos quais foram identificados diferentes compostos, dependendo das condições experimentais. A série de produtos de biotransformação (PBT) deste herbicida produzidos durante estudos *in vitro* ou *in vivo* em plantas e animais é igualmente muito amplo. Foram realizados estudos de isolamento de fungos do solo capazes de degradar o alachlor **167**, sugerindo que este herbicida é rapidamente biodegradado, ocorrendo a liberação de íons cloreto e pequena conversão de CO₂.¹¹⁵ Quatro produtos de biotransformação foram identificados no tratamento com cultura de *Chaetomium globosum*: 2-cloro-2',6'-dietilacetanilida **168**, 2,6-dietil-N-(metoxi-metil)anilina **169**, 2,6-dietilanilina **170** e 1-

¹¹³ Larini, L. , *Toxicologia dos praguicidas*, Editora Manole, São Paulo, 1ª ed., 1999.

¹¹⁴ Zangorc-Koncan, J., *Wat. Sci. Tech.*, **1996**, 33, 181.

¹¹⁵ Tiedje, J. M. and Hagedorn, M. L. *J. Agric. Food Chem.* **1975**, 23, 77.

cloroacetil-2,3-diidro-7-etilindol **171**. Baseado nos produtos identificados foi proposto o esquema para a degradação do Alachlor (**Esquema 56**).



Esquema 57- Esquema da degradação do alachlor pelo *C. globosum*.¹¹⁵

Em recente revisão, Stamper e Tuovinen¹¹⁶, apresentaram outros compostos já detectados no solo e na água contaminados pelo herbicida (**Figura 17**). Os correspondentes nomes químicos estão listados na **TABELA 7** (pág. 100).

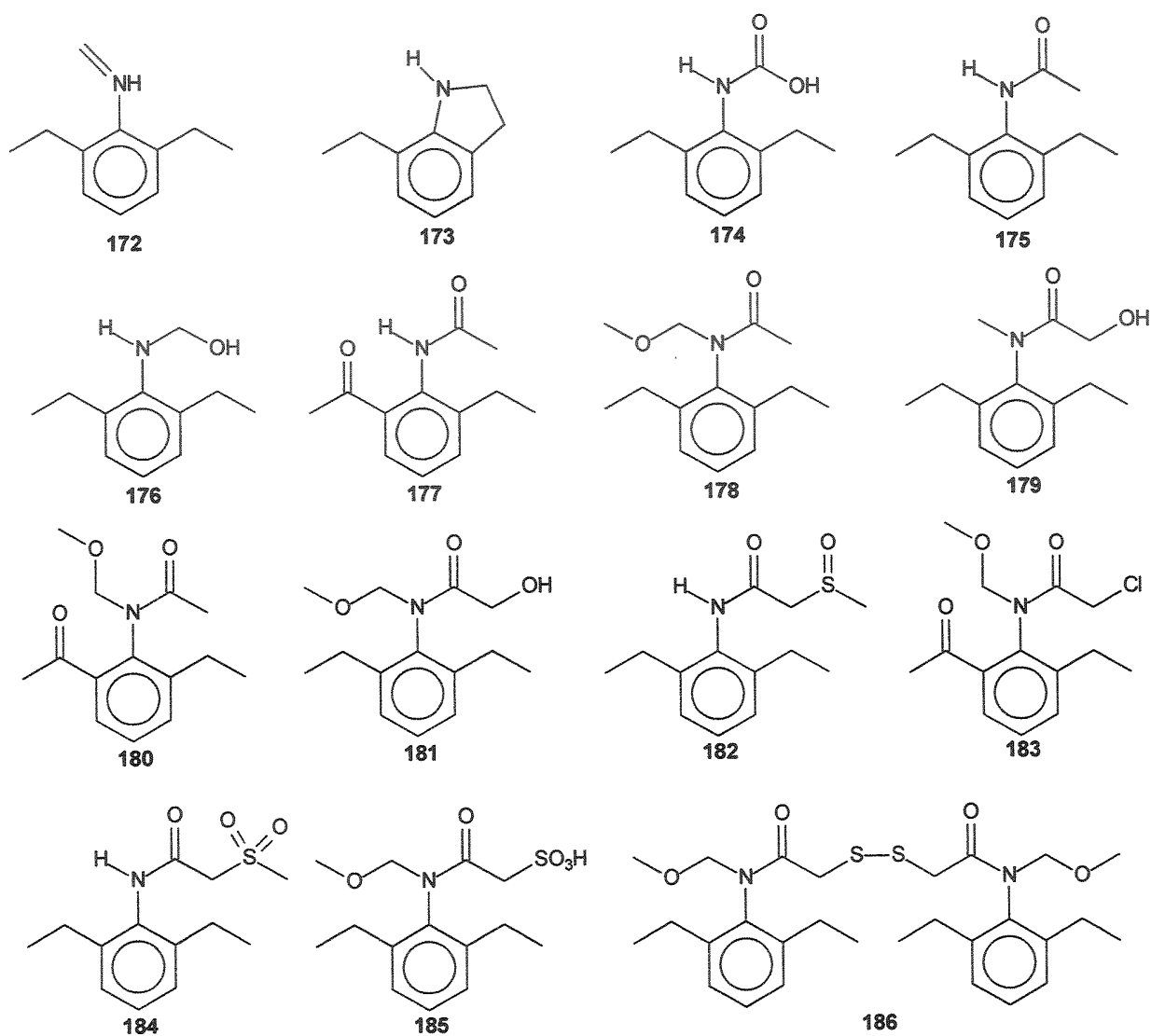


Figura 17 – Produtos de transformação do alachlor detectados no solo e água.

¹¹⁶ Stamper, D. M. and Tuovinen, O.H. *Crit Rev Microbiol.* **1998**, 24, 1.

O alachlor 167 é considerado carcinogênico para o homem, enquanto que seus produtos de transformação formam uma mistura complexa, sendo apenas conhecidas às propriedades ambientais e toxicológicas de alguns dos seus componentes.¹¹⁷

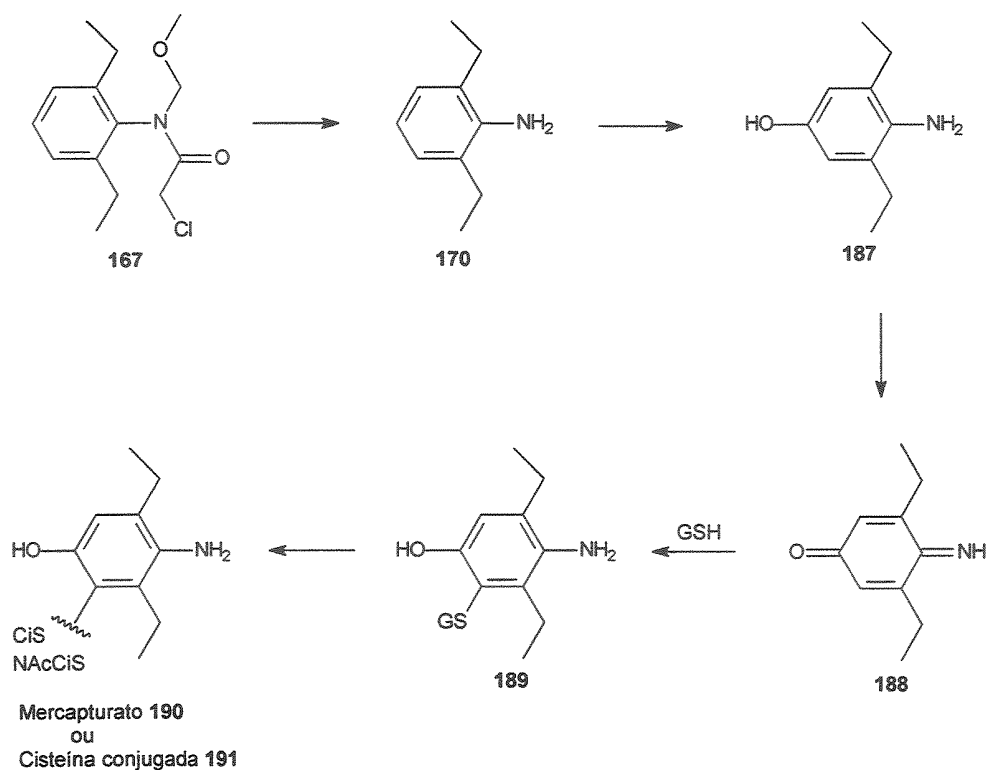
TABELA 7 - Produtos de transformação do alachlor detectados no solo e água.

Composto	Nome Químico
172	<i>N</i> -(2',6'-dietil-fenil)-metil-eneamina
173	7-etil-indol
174	2',6'-dietil-formanilida
175	2',6'-dietil-acetanilida
176	α
177	2'-acetil-6'-etil-acetanilida
178	<i>N</i> -(2',6'-dietil-fenil)- <i>N</i> -(metoxi-metil)-acetamida
179	2-hidroxi-2',6'-dietil- <i>N</i> -metil-acetanilida
180	2'-acetil-6'-etil- <i>N</i> -(metoxi-metil)-acetamida
181	2-hidroxi-2',6'-dietil- <i>N</i> -(metoxi-metil)-acetanilida
182	2-metil-sulfinil- <i>N</i> -(2',6'-dietil)-acetanilida
183	2-cloro-2'-acetil-6'-etil- <i>N</i> -(metoxi-metil)-acetanilida
184	2-metil-sulfonil- <i>N</i> -(2',6'-dietil)-acetanilida
185	2-sulfonil-2',6'-dietil- <i>N</i> -(metoxi-metil)-acetanilida
186	<i>Bis</i> -2-tio-2',6'-dietil- <i>N</i> -(metoxi-metil)-acetanilida

A oncogenicidade dos herbicidas cloroacetanilínicos revelou a indução seletiva de tumor nasal em ratos. Este processo é favorecido pela dietilbenzoquinonimina 188, intermediário formado “*in vivo*”, que se liga a macromoléculas, incluindo proteínas celulares¹¹⁸ (Esquema 57).

¹¹⁷ Lyons, C. D.; Katz, S. E. and Bartha, R. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1985**, 35, 696.

¹¹⁸ Jefferies, P. R.; Quistad, G. B. and Casida, J. E. *Chem Res Toxicol.* **1998**, 11, 353.



Esquema 58 - Proposta para a biotransformação do Alachlor **167** e da formação do mercapturato **190** e da cisteína conjugada **191**.

A formação *in vitro* de dietilbenzoquinonimina (DEBQ) **188** foi observada pela incubação da dietilanilina (DEA) **170** com microsomo de fígado de rato e NADP(H). A DEBQ **188**, um intermediário instável, não foi analisado diretamente, mas pela reação com cisteína sendo excretado pela urina o mercapturato **190** e a cisteína conjugada **191**.

Os estudos existentes com bactérias mostram que ocorre apenas uma degradação parcial do alachlor em condições aeróbias e geralmente acontecem através do co-metabolismo, ou seja, na presença de outra fonte de carbono. As bactérias são muito sensíveis aos distúrbios, como os causados pela agricultura tradicional, poluição e outras formas de "stress". O estudo do efeito destes distúrbios à diversidade das bactérias do solo e suas funções neste ambiente

podem contribuir para a qualidade do solo e para o desenvolvimento de um agroecossistema sustentável.¹¹⁹

Com o objetivo de contribuir ao conhecimento do mecanismo enzimático de degradação desta classe de compostos resolvemos realizar estudo de biodegradação do alachlor por microrganismos, identificar diferenças e semelhanças no mecanismo de degradação entre as linhagens, adquirindo informações sobre as possíveis atividades enzimáticas.

Esta etapa foi realizada em colaboração com a Doutora Lara Durões Sette e Doutor Gilson Paulo Manfio.¹²⁰ Os microrganismos utilizados no presente trabalho foram selecionados dentre 53 linhagens extraídas do solo previamente contaminado pelo herbicida. As linhagens foram submetidas a ensaios de resistência ao alachlor 167 sendo selecionadas 6 linhagens que obtiveram crescimento ótimo frente a diversas concentrações do pesticida em placa de Petri contendo meio de cultura (ANEXO 1).

As 6 linhagens foram caracterizadas como Actinomicetos (*Streptomyces* sp.),¹²¹ (Figura 18 e Figura 19, pág. 103) um grupo de bactérias abundante no solo que possuem atividade degradativa de amplo espectro, secretando uma série de enzimas extracelulares com capacidade de biotransformar diversas classes recalcitrantes e xenobióticas. Eles possuem atividade proteolítica e função em decomposição de quitina, celulose e amido¹²², além de produzirem antibióticos para controle de doenças em homens e animais.¹²³

¹¹⁹ Thomas, V. G. and Kevan, P. G. *J. Agric. Environ.* **1993**, 5, 1.

¹²⁰ Sette, L. D.. "Isolamento e Sistemática de Actinomicetos Degradadores de Pesticidas. Unicamp, Campinas, 2001.

¹²¹ Sette, L. D.; Oliveira, V. M. and Manfio, G. P. *Antonie Van Leeuwenhoek*, in press

¹²² Holmalahti, J.; von Wright, A. and Raatikainen, A. O. *Lett Appl Microbiol.* **1994**, 18, 1544.

¹²³ Bush, J. A.; Long, B. H.; Catino, J. J. and Bradner, W. T. *J. Antibiotics.* **1987**, XL, 668.

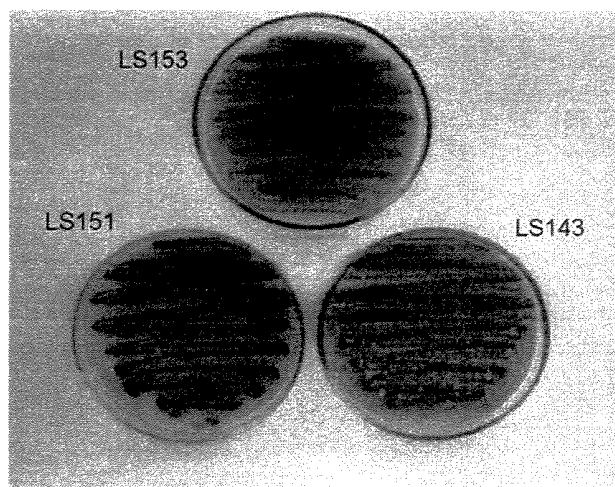


Figura 18 - Crescimento em placa das linhagens LS153, LS151 e LS143 (*Streptomyces sp*)

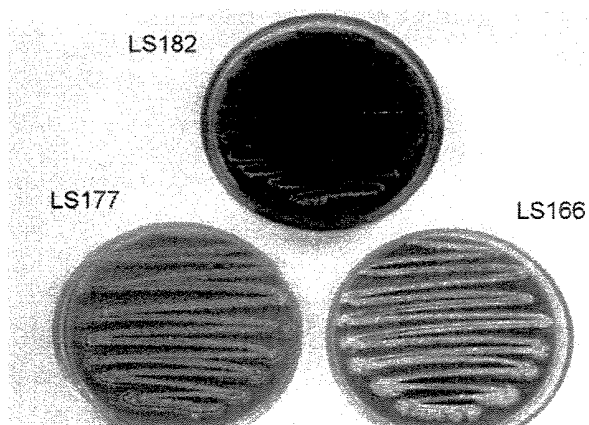
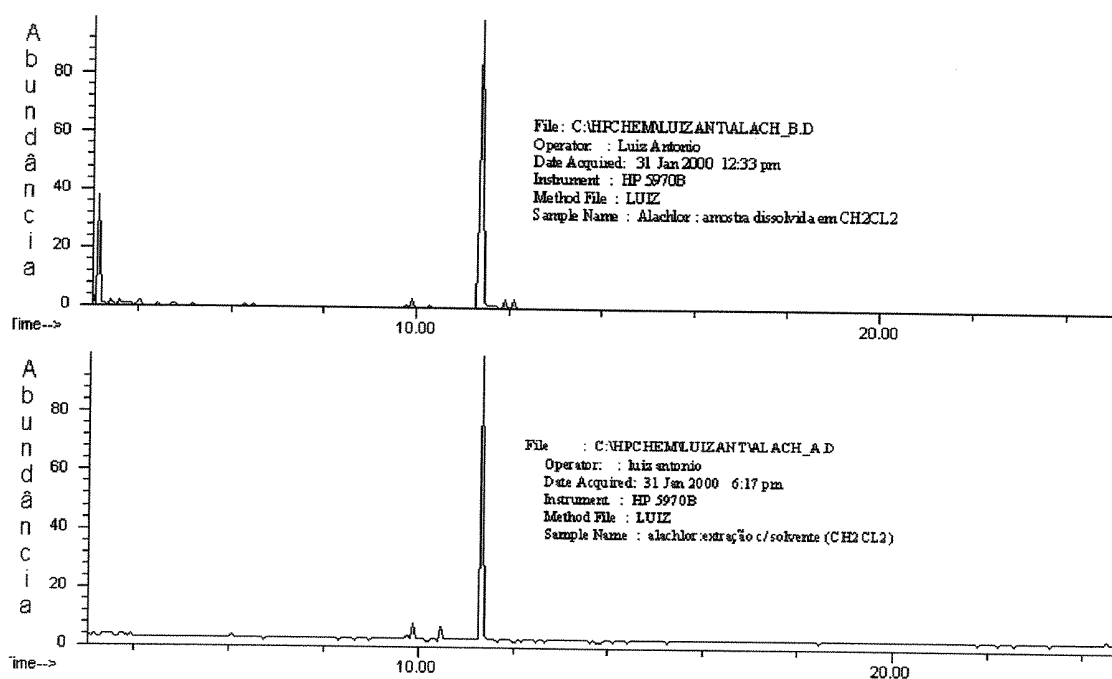


Figura 19 - Crescimento em placa das linhagens LS166, LS177 e LS182 (*Streptomyces sp*)

5.2. Resultados e discussão

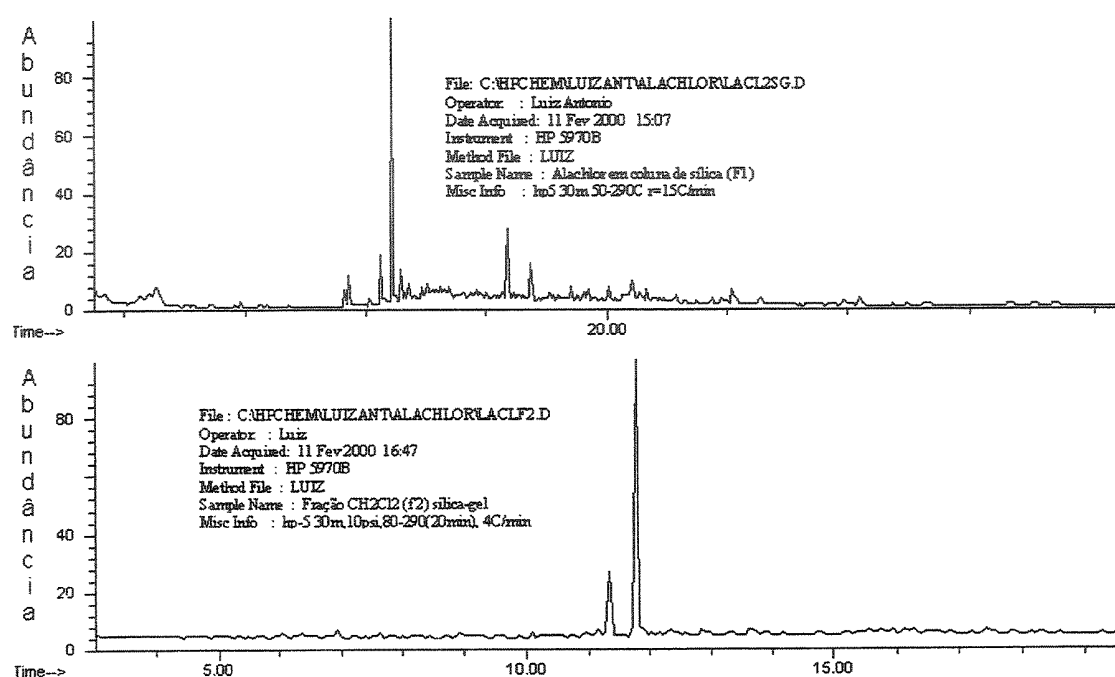
5.2.1. Otimização da obtenção dos extratos

A primeira parte de nossa investigação diz respeito à otimização de um método de captura dos produtos de biotransformação do Alachlor e usou-se para isso uma solução aquosa de alachlor comercial. Com base em técnicas comuns de laboratório, a nossa primeira alternativa foi a extração líquido líquido com 3 x 20 mL de diclorometano. Além da formação de emulsão, tivemos que realizar concentração da amostra do herbicida em rota-evaporador para conseguir analisar 1 μL por CG-EM e a comparação com a análise de Alachlor dissolvido em diclorometano nos fez desistir deste método por não ser reprodutível (C 19 a e b).



C 19 – a) alachlor comercial dissolvido em CH_2Cl_2 b) extrato CH_2Cl_2 da solução aquosa de alachlor comercial ($125 \mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$).

Nossa segunda tentativa objetivava o emprego de uma menor quantidade possível de solvente, mas com maior eficiência. Liofilizamos o meio reacional da linhagem LS182, dissolvemos uma porção do liofilizado em diclorometano e submetemos a agitação magnética. Filtramos a solução numa pequena coluna cromatográfica em sílica-gel. Esse extrato foi concentrado e analisado por CG-EM (C 20 a). Depois eluimos com metanol a coluna cromatográfica, concentramos e analisamos o extrato (C 20 b). Observamos que ficou retido material na coluna.



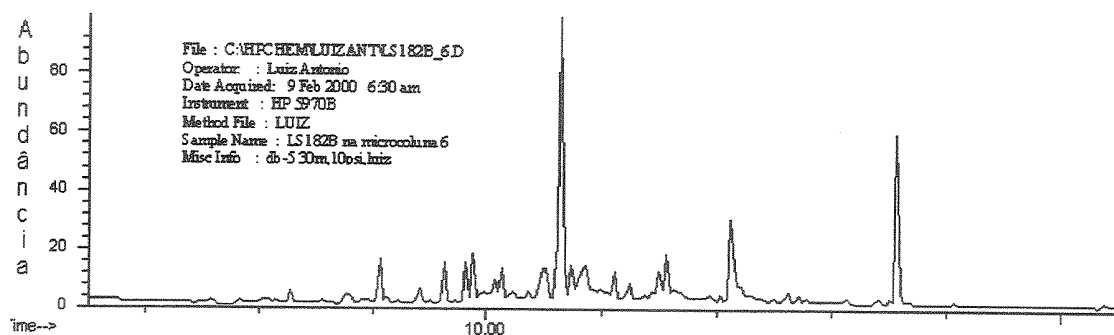
C 20 – a) Fração 1 de CH₂Cl₂ em sílica-gel b) Fração 2 de CH₂Cl₂ em sílica-gel.

A necessidade de efetuar várias extrações e com uma metodologia que reproduzisse os resultados, fez-nos desistir desta metodologia trabalhosa (liofilização, solubilização, cromatografia em sílica-gel, concentração e análise por CG-EM).

O nosso grupo, em trabalhos anteriores, utilizou-se de microcoluna de C-18 da Waters para obtenção de extratos do metabolismo de antibiótico *in vitro*.¹²⁴ A vantagem desta técnica seria a aplicação direta no meio reacional centrifugado e a

¹²⁴ Degterev, I. A.; Nogueira, P. C. L.; Marsaioli, A. J. and Verces, A. E. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 1999, 24, 15.

necessidade de pouco solvente. Para o teste, ressuspendemos o liofilizado em água destilada e aplicamos 10 mL na microcoluna. Os compostos sorvidos na microcoluna foram extraídos com 1 mL de diclorometano e depois de seca sobre Na₂SO₄, e 1 µL do extrato foi analisado por CG-EM (C 75).



C 21 – CIT do teste de extração por C-18 da biotransformação do Alachlor por pela linhagem LS 182.

Esta técnica apresentou-se bastante prática e seu resultado satisfatório, pois tínhamos intenção de realizar várias extrações e análises em apenas um dia para garantir as mesmas condições cromatográficas de análise. Como finalmente encontrarmos uma metodologia passamos para a próxima etapa, que foi a realização dos experimentos de biodegradação.

5.2.2. Biodegradação do alachlor pelas linhagens de *Streptomyces*

5.2.2.1. Biodegradação dos produtos de hidrólise do alachlor

Em estudo prévio, as linhagens LS143 e LS153 apresentaram baixa degradação do herbicida, enquanto que foi observado 70% de degradação para as linhagens LS151 e LS166, e degradação acima de 80% para as linhagens LS177 e LS182.¹²⁵ Entretanto, não havia nenhuma informação sobre a classe e variedade

¹²⁵ Sette, L. D. "Isolamento e Sistemática de Actinomicetos Degradadores de Pesticidas". Unicamp, Campinas, 2001.

de produtos de transformação produzidos nestas condições. Diante da excelente biodegradação do alachlor por alguma das linhagens selecionadas, focalizou-se a nossa atenção para dois experimentos: (a) adição de alachlor comercial hidrolisado e (b) adição de alachlor comercial.

O primeiro experimento representaria o tratamento de um ambiente contaminado pelo herbicida, tentando mimetizar uma situação real, pois nos trabalhos de degradação *in vitro* do herbicida é adicionado o 2-cloro-2',6'-dietil-*N*-(metoximetil) acetanilida **167** purificado, sem a presença do solvente. O Alachlor® utilizado nos nossos experimentos foi obtido da Monsanto do Brasil (Jacareí-SP) na sua formulação comercial (480 g L⁻¹), onde o composto está dissolvido numa mistura de solventes derivados do benzeno (C 20 a, pág. 105).

Para tanto, preparamos uma solução aquosa de alachlor com água estéril e a mantivemos estocada por 6 meses na presença de luz ambiente para mimetizar a hidrólise espontânea na natureza, mas em condições abióticas (amostra 1). Embora seja citada constantemente a resistência do herbicida a decomposição fotolítica,¹²⁶ existem alguns estudos sobre fotodecomposição.¹²⁷

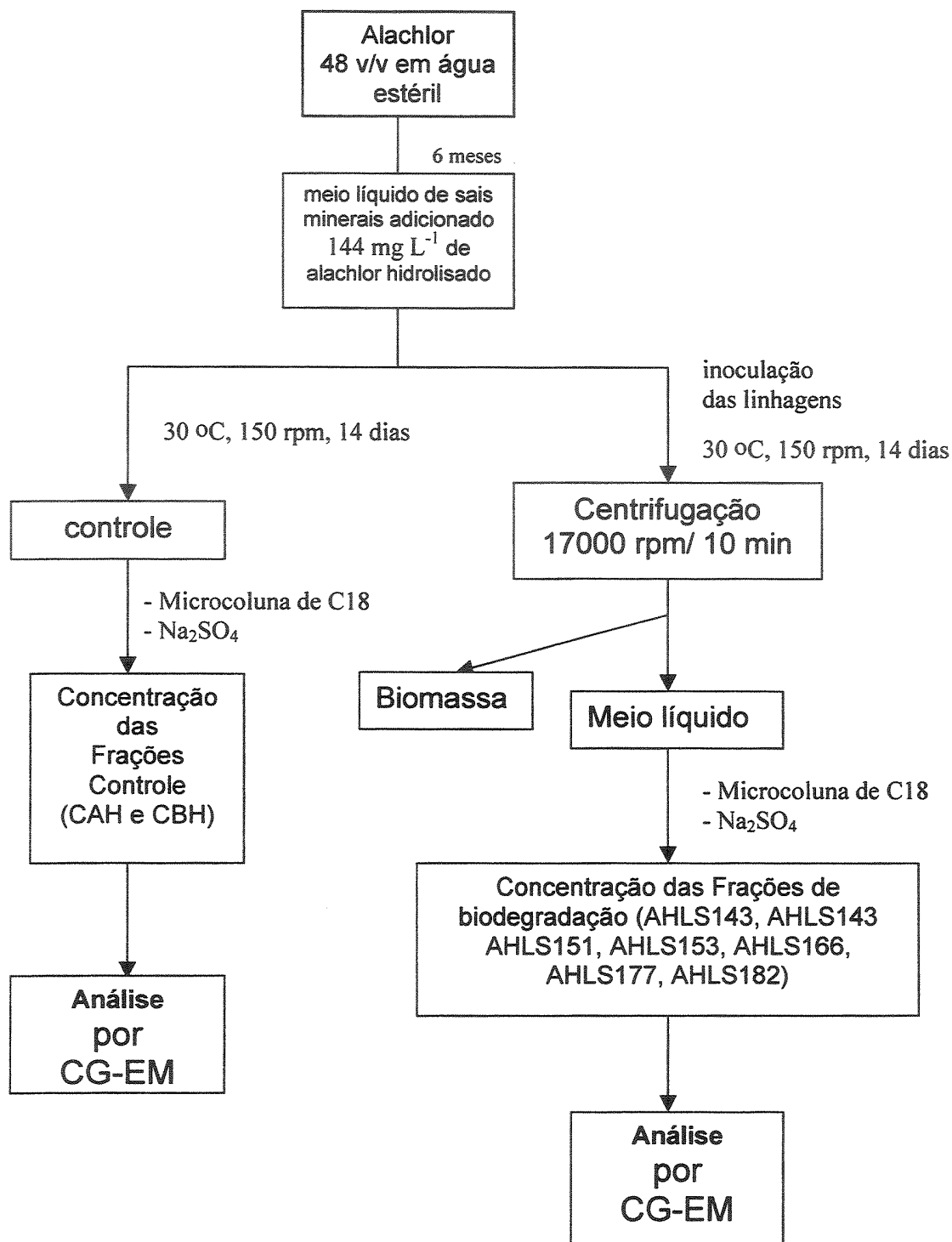
As linhagens (LS143, LS151, LS153, LS166, LS177 e LS182) previamente selecionadas foram inoculadas em placas de petri contendo meio sólido para obtenção de células frescas. Após 3 dias de crescimento¹²⁸ foram repicadas em meio pobre de sais minerais¹²⁹ acrescido de 0,5% de glicose e mantido por 48 horas à 30°C com agitação (150 rpm). Os experimentos foram conduzidos usando erlenmeyer (150 mL) contendo 30 mL de meio de sais minerais acrescido da solução aquosa de Alachlor hidrolisado (144 mg L⁻¹). Cada frasco foi inoculado com meio de cultura crescida (10 mL) de cada linhagem (Fluxograma 1).

¹²⁶ Stamper, D. M. and Tuovinen, O.H. *Crit Rev Microbiol.* **1998**, 24, 1.

¹²⁷ (a) Chiron, S.; Abian, J.; Ferrer, M.; Sanchez-Baeza, F.; Messeguer, A. and Barceló, D. *Environ. Toxicol. Chem.* **1995**, 14, 1287. (b) Somich, C.L.; Kearney, P.C.; Muldoon, M. T. and Elsasser, S. J. *Agric. Food. Chem.* **1988**, 36, 1322.

¹²⁸ O termo crescimento, como é usado em microbiologia, refere-se ao aumento da população, e não de um indivíduo isoladamente. O crescimento microbiano pode ser definido em termos, tanto da massa, como também do número de células.

¹²⁹ 2 g Na₂SO₄; 0.2 g MgSO₄.7H₂O; 0.65 g K₂HPO₄; 1 g NH₄Cl; 1 g KNO₃; 0.01g FeSO₄.7H₂O e 0.1% extrato de levedura em 1 litro de água destilada, pH 7.3



Fluxograma 1 – Esquema de preparação das amostras de biodegradação do alachlor hidrolisado a serem analisadas.

Desta forma, teríamos o alachlor e seus produtos de hidrólise como única fonte de carbono. Os frascos foram encubados por 14 dias à 30°C com agitação (150 rpm). Os controles foram conduzidos em erlenmeyer (150 mL) contendo 40 mL de meio de sais minerais acrescido da solução aquosa de alachlor hidrolisado (144 mg L⁻¹) e encubados por 14 dias à 30°C com agitação (150 rpm). Depois de concluído o período de reação, os meios foram centrifugados (17000 rpm/ 10 min) para separação da biomassa do meio líquido (40mL).

As amostras foram extraídas com auxílio de microcolunas de C-18 (Waters, SEP-PAK® cartridge). Adaptamos a entrada da microcoluna em uma coluna de vidro (50 mL) para facilitar o manuseio das amostras a serem extraídas (Figura 20).

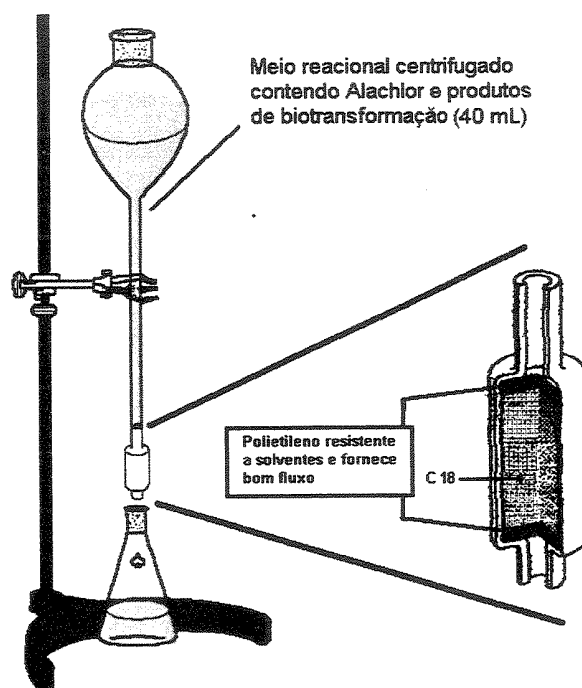


Figura 20 - Extração do meio reacional por microcoluna de C-18.

A fase de C-18 foi tratada com éter etílico e ativada com metanol-água (1:1). A solução de metanol-água é responsável pela modificação do arranjo da fase dentro da microcoluna. Como teríamos de efetuar a análise de 16 amostras,

optamos por substituir o diclorometano usado na extração teste pelo éter etílico. Após a passagem de cada amostra, a microcoluna foi lavada com água destilada (6 mL) para carrear resíduos dos sais impregnados na coluna. Os compostos adsorvidos na fase foram eluídos com éter etílico (3mL). Finalmente os extratos (CAH, CBH, AHLS143, AHLS151, AHLS153, AHLS166, AHLS177 e AHLS182) foram concentrados sob um fluxo de nitrogênio para 0,05-0,5 mL e injetado (1µL) no CG-EM (*splitless*) para análise, cujos cromatogramas de íons totais (representativos) obtidos encontram-se na C 22 (pág. 111). Os experimentos foram realizados em duplicatas e com amostras controle (frascos não inoculados) (C 23-42).

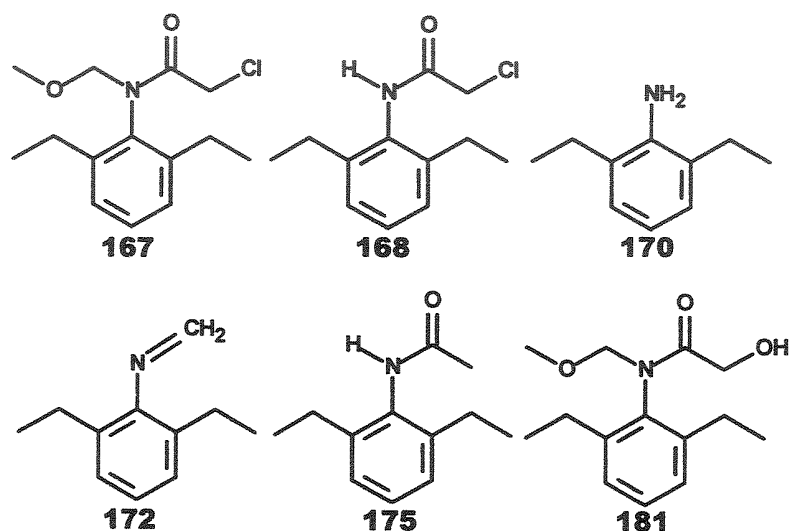
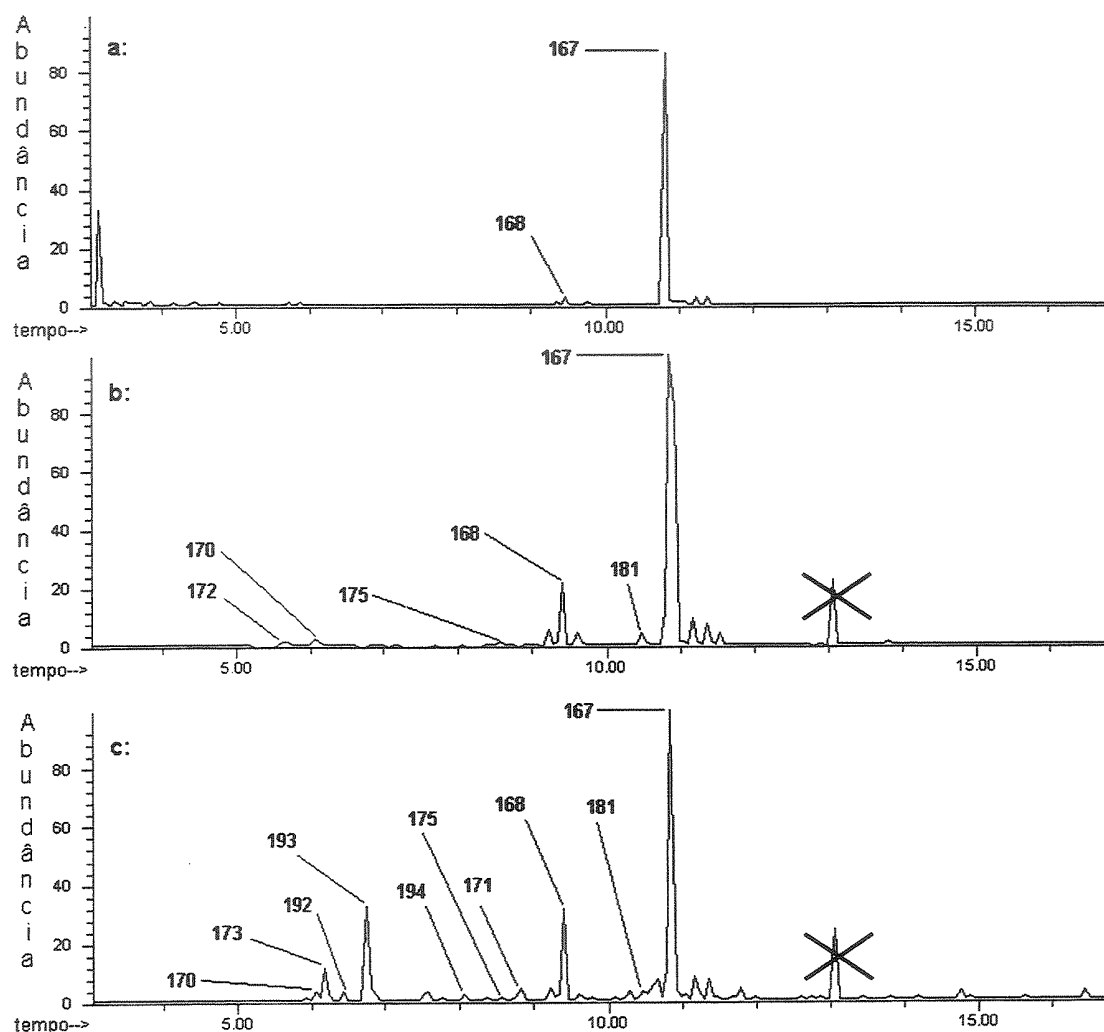


Figura 21 - Alachlor 167 e seus derivados detectados pela hidrólise espontânea no experimento controle.

A análise dos experimentos controle (CAH) (C 23-26) realizados com da solução contendo o Alachlor hidrolisado foi usado para a identificação dos produtos de hidrólise do alachlor revelando a presença de 2-cloro-2',6'-dietilacetanilida 168, 2,6-dietilanilina 170, N-(2,6-dietilfenil)-metileneamina 172, 2,6-dietilacetanilida 175 e 2-hidroxi-2',6'-dietil-N-acetanilida 181 (Figura 21 e C 22b) já descritos na literatura.¹³⁰ Entretanto a literatura não deixa evidente a

¹³⁰ Stamper, D. M. and Tuovinen, O.H. *Crit Rev Microbiol.* 1998, 24, 1

formação destes produtos pela degradação em condições abióticas, causando uma certa confusão sobre produtos de degradação abiótica e produtos de degradação biótica.



C 22 - Cromatogramas de íons totais (representativos) de a: Alachlor comercial dissolvido em CH_2Cl_2 b: controle do alachlor hidrolisado c: Produtos da biotransformação da amostra 1 pelas linhagens de *Streptomyces*. Os números de picos são relacionados aos derivados do alachlor relacionados nas Figuras 21 e 23. Condições cromatográficas: coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He, 10 psi).

Os cromatogramas de íons totais das amostras AHLS143, AHLS151, AHLS153, AHLS166, AHLS177 e AHLS182 a partir dos seis experimentos usando as linhagens de *Streptomyces* revelaram grande similaridade entre os produtos de biodegradação obtidos (C 27-38, Tabela 8) sugerindo que as linhagens utilizam o mesmo mecanismo enzimático.

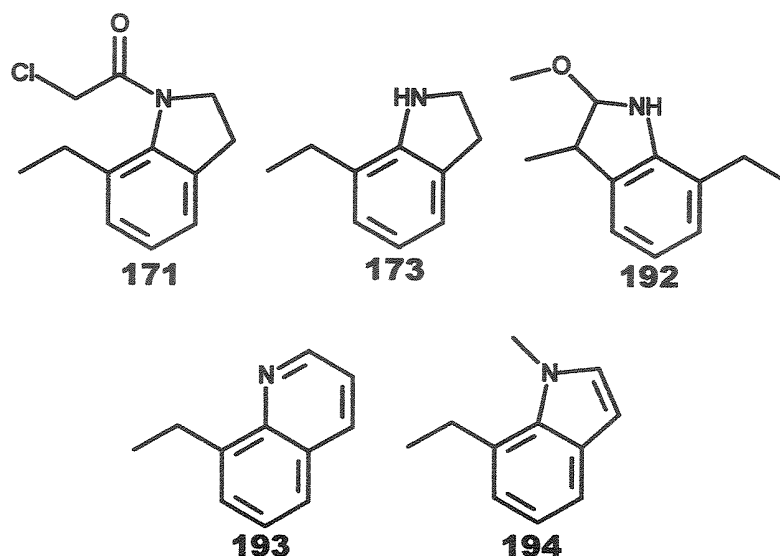


Figura 22 - Derivados do alachlor 167 detectados pela biodegradação pelo *Streptomyces* sp.

Os produtos de transformação identificados possuem massas moleculares inferiores ao do alachlor 167, podendo ser obtidos por reações hidrolíticas e oxidativas promovidas pelos microrganismos.

A comparação entre os cromatogramas obtidos da biotransformação (C 22, c) apresentou diferenças significativas em relação aos dos controles. Os produtos de hidrólise em condições abióticas (Figura 21) são derivados de anilina di- e mono-alquiladas que favorecem a formação da 2,6-dietilanilina 170 (DEA), intermediário de um composto carcinogênico.¹³¹

¹³¹ Coleman S, Linderman R, Hodgson E and Rose RL. *Environ Health Perspect.* 2000, 108,: 1151.

Tabela 8 – Produtos de degradação do alachlor 167 detectados pela análise de CG-EM.

Composto	MM ^a	TR ^b	IK ^c	LS 143	LS 151	LS 153	LS 166	LS 177	LS 182
				Abundância Relativa %					
167	269	10,84	1918	71.69	51.61	55.95	48.18	52.07	44.77
168	225	9,39	1716	10.63	8.19	11.05	9.90	10.44	6.30
170	149	6,05	1117	2.32	3.88	>0.1	4.54	5.20	1.20
171	223	8,83	1646	-	1.23	2.05	-	-	1.99
172	161	5,61	1081	1.53	0.79	1.19	0.93	1.21	0.44
175	191	8,57	1629	2.00	1.55	2.23	1.45	1.81	0.77
181	251	10,46	1889	6.44	3.90	2.05	5.48	1.51	>0.1
173	147	6,18	1344	-	1,90	2.80	1.30	1,10	6.90
192	191	6,34	1360	-	-	0.90	-	0.77	1.33
193	156	6,75	1395	>0.1	2.71	8.36	4.92	10.01	12.11
194	159	8,07	1481	-	-	0.63	-	-	1.18

^a massa molecular ^b tempo de retenção ^c índice relativo calculado (Kovats)

Os compostos **193** e **194** (Figura 22 e Tabela 9) nunca foram citados na literatura como produtos de biotransformação doalachlor **167** e suas estruturas foram sugeridas baseadas em seus espectros de massas (Figura 23) e padrão de fragmentação, os quais foram consistentes com as fragmentações de metil-indóis¹³² e quinolinas da literatura.¹³³

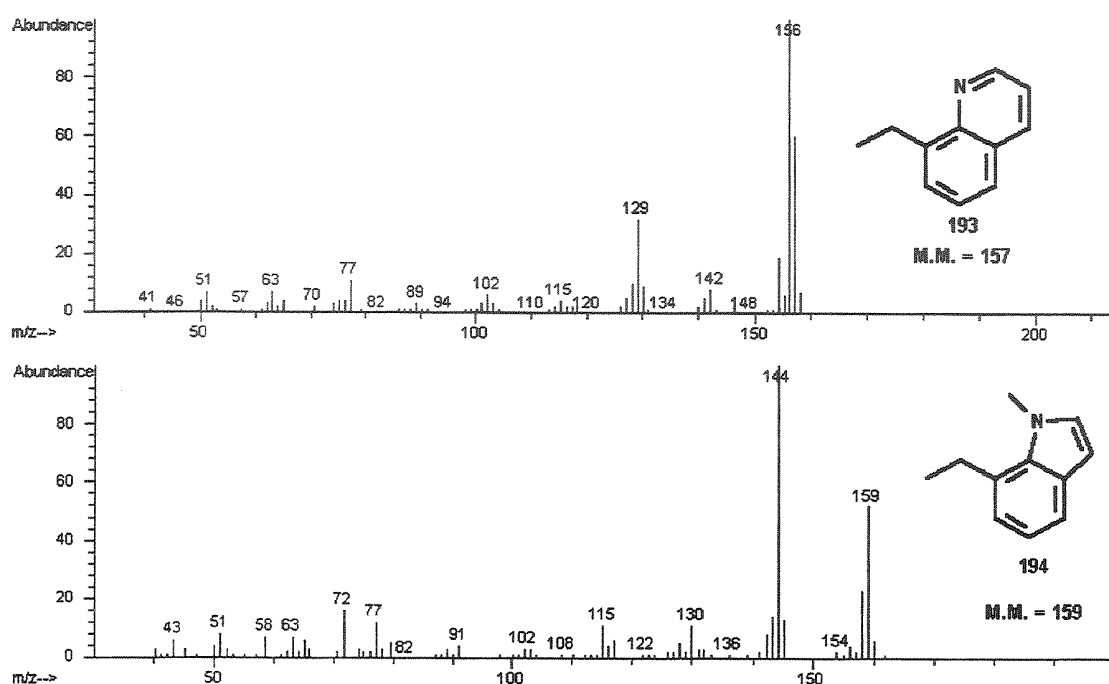


Figura 23 – a) espectro de massas do composto 193 e b) espectro de massas do composto 194.

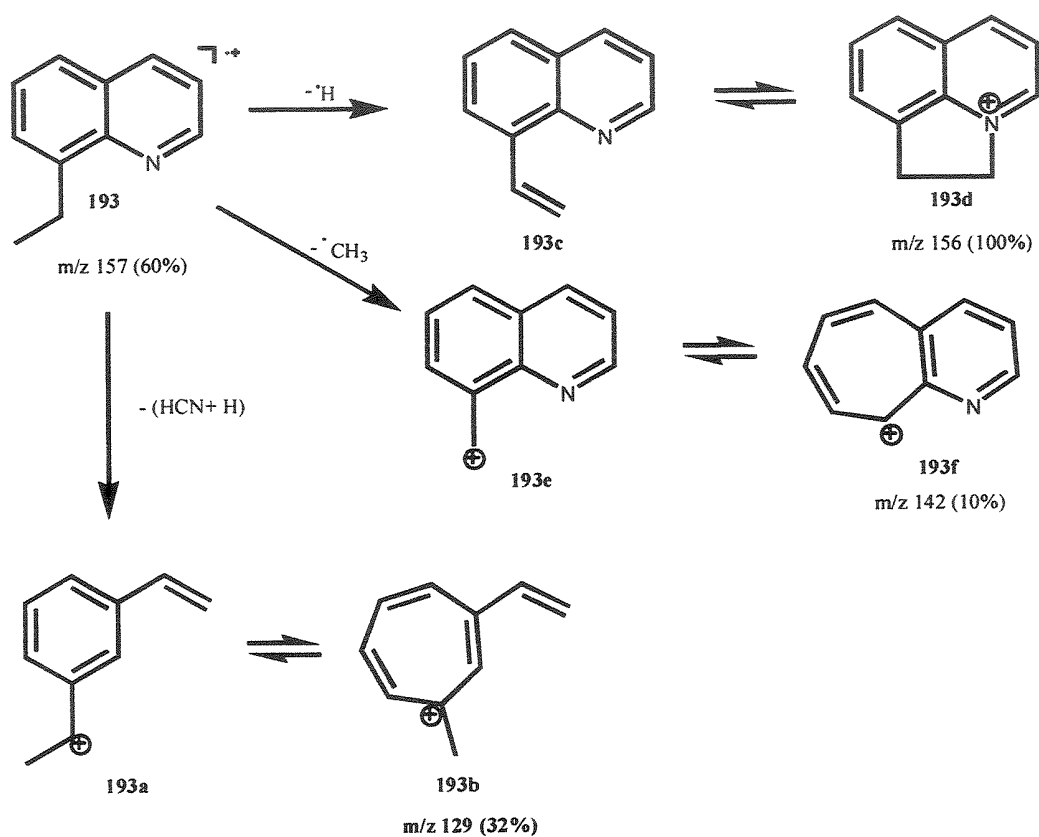
O espectro de massas de 8-etilquinolina **193** apresentou um índice de similaridade de 96% com os dados da biblioteca Wiley 275 e a proposta de sua fragmentação foi sugerida por MacLean (Esquema 59, pág. 115).¹³⁷

¹³² Marx, M. and Djerassi, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 678.

¹³³ Draper, P.M. and MacLean, D.B. *Can. J. Chem.* **1968**, *46*, 1487.

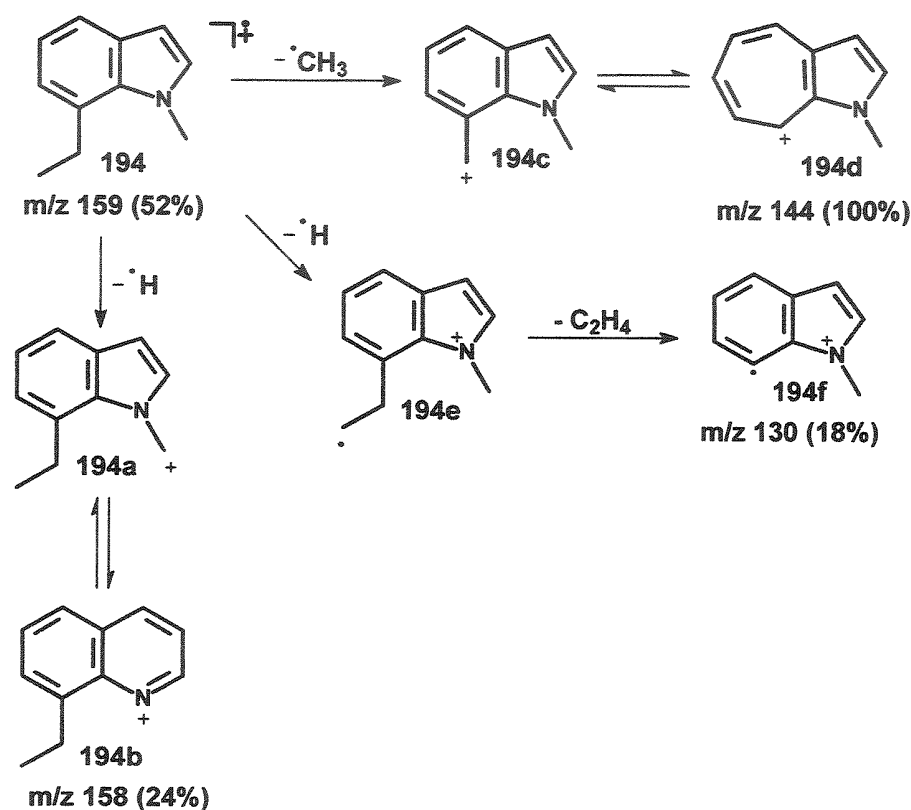
Tabela 9 – Principais fragmentos e abundâncias relativas de alguns produtos de biodegradação doalachlor 167.

Compostos	Íons principais e abundâncias relativas
171	223(M ^{•+} , 12) 208(16) 174(40) 146(100)
173	147(M ^{•+} , 60) 132(100) 117(60) 77(16)
192	191(M ^{•+} , 20) 160(100) 144(24) 132(60)
193	157(M ^{•+} , 60) 156(100) 142(10) 129(32)
194	159(M ^{•+} , 52) 158(24) 144(100) 130(12)



Esquema 59 – Proposta de MacLean para a fragmentação do produto de transformação 193.

A nossa proposta estrutural para o 7-etil-*N*-metil-indol **194** baseou-se na sugestão da biblioteca Willey 275 e está de acordo com a proposta de fragmentação, característica de *N*-metil-indóis (**Esquema 60**). O espectro de massas do composto **194** (**Figura 23b**, pág. 123) apresenta uma fragmentação relativamente pequena e possui como pico base o íon de *m/z* 144. A fragmentação proveniente da perda de uma unidade de massa a partir do íon molecular não é muito comum em espectrometria de massas, entretanto é bastante observada em *N*-metil-indóis sendo responsável pela formação do cátion **194a** (*m/z* 158).



Este fato foi bem documentado por Djerassi com moléculas marcadas.¹⁴³ O cátion **194a** pode sofrer um rearranjo envolvendo a migração do grupo metil exocíclico formando uma espécie de íon quinolinio **194b**. Em *N*-metil-indóis é comum a perda de HCN a partir do íon $M^+ - 1$, entretanto não foi observada. Isto

está de acordo com as observações de Draper e MacLean¹³⁷ que indicavam uma menor tendência na perda de HCN quando se trata de derivados quinolínicos com substituintes no anel benzênico de quinolinas (5-, 6-, 7- e 8-metil-quinolinas).

O pico base m/z 144 é proveniente da perda de 15 u.m.a. a partir do íon molecular e sua estrutura sofre um rearranjo análogo à conversão do cátion benzílico para o íon tropílio **194d** proposto por Meyerson.¹³⁴ Portanto, o caminho proposto de fragmentação para 7-etil-*N*-metil-indol **194** está coerente com os dados da literatura para compostos análogos.

Os outros produtos de biotransformação **171**, **173** e **192** foram citados por Mangiapan.¹³⁵ Os compostos são provenientes da *N*-desalquilação e hidrólise seguida de ciclização formando compostos *N*-heteroaromáticos.

5.2.2.2. Biodegradação do Alachlor pela linhagem LS182

Sentimos a necessidade de realizar um estudo comparativo sobre o Alachlor hidrolisado e o Alachlor previamente adicionado em água. Isso porque não está claro se os compostos inéditos nos estudos de degradação do Alachlor são provenientes da direta degradação do Alachlor ou de seus produtos de hidrólise espontânea, além de nos permitir um melhor entendimento da atividade enzimática destas linhagens e compreendermos a seu mecanismo enzimático. Como as linhagens apresentaram o mesmo padrão de degradação optamos por realizar neste estudo apenas a linhagem LS182 devido ao seu maior poder degradativo (> 80 %).¹³⁶

Seguimos o mesmo protocolo utilizado no experimento anterior, no que se refere ao crescimento do microrganismo, inoculação, reação e extração das amostras. Entretanto este experimento foi conduzido usando erlenmeyer (150 mL) contendo 30 mL de meio de sais minerais acrescido da solução aquosa de

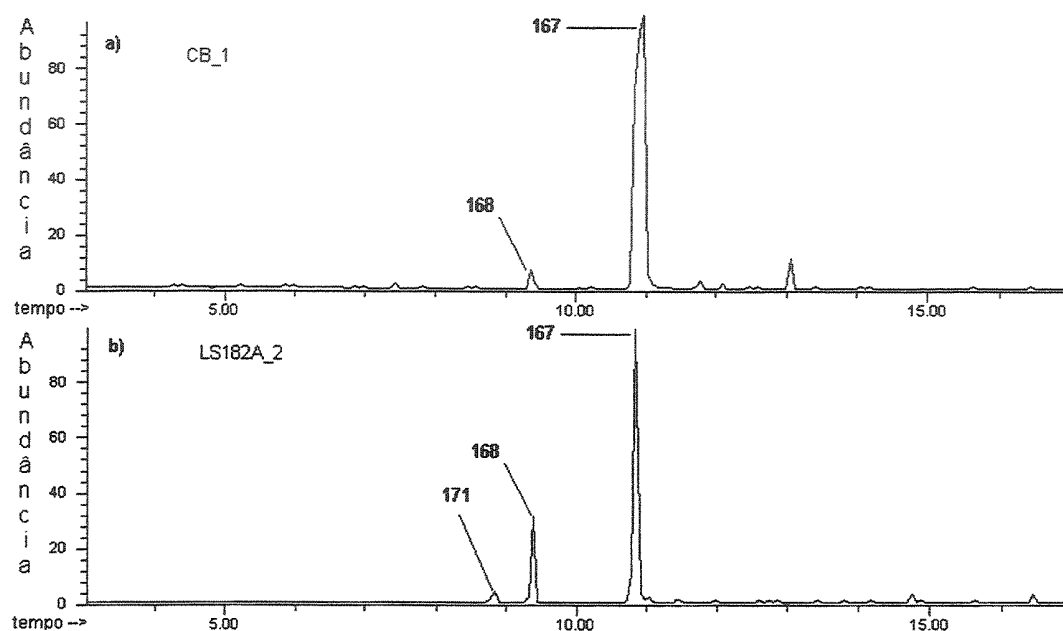
¹³⁴ Rylander, P. N.; Meyerson, S. and Grubb, H. M. *J. Am. Chem. Soc.* 1957, 79, 842.

¹³⁵ Mangiapan, S., et al., *Environ. Sci. Technol.*, 1997, 31, 3637.

¹³⁶ Sette, L. D. "Isolamento e Sistemática de Actinomicetos Degradadores de Pesticidas". Unicamp, Campinas, 2001.

Alachlor (144 mg L^{-1}) (**amostra 2**) preparada instantes antes a sua adição. Desta forma, teríamos o Alachlor como única fonte de carbono.

Os extratos dos controles (CA e CB) e da biodegradação (ALS182A e LS182B) foram concentrados sob um fluxo de nitrogênio para 0,05-0,5 mL e injetado ($1 \mu\text{L}$) no CG-EM (*splitless*) para análise, cujos cromatogramas de íons totais (representativos) obtidos encontram-se na **C 39**. Os experimentos foram realizados em duplicatas e com amostras controle (frascos não inoculados) (**C 40-43**).



C 39 - Cromatogramas de íons totais (representativos) de a: controle do Alachlor b: Produtos de biotransformação da amostra 2 pela linhagem Ls182. Os números de picos são relacionados aos derivados do alachlor relacionados nas **Figuras 21 e 23**. Condições cromatográficas: coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He, 10 psi).

A análise dos experimentos controle (CA e CB) (**C 40-41**) realizados com da solução de Alachlor (**amostra 2**) foi usado para a identificação dos produtos de hidrólise do alachlor revelando apenas a presença de 2-cloro-2',6'-dietilacetanilida **168**, contaminante de Alachlor comercial, indicando que os 14 dias não foram suficientes para a formação dos produtos de hidrólise encontrados na **amostra 1**.

As análises dos cromatogramas obtidos a partir do controle (CAH) da **amostra 1** e dos controles (CA e CB) da **amostra 2** nos revelaram que a formação do DEA 170 ocorre pela hidrólise do herbicida em condições abióticas e que nos experimentos de biotransformação (AHLS143, AHLS151, AHLS153, AHLS166, AHLS177 e AHLS182) da **amostra 1** e quanto maior a degradação do Alachlor, menor a proporção relativa deste composto (**Tabela 7**).

A biotransformação do Alachlor da **amostra 2** pela linhagem LS182 mostra um aumento na formação do 2-cloro-2',6'-dietilacetanilida 168 sugerindo que o *Streptomyces* catalisa esta reação. Entretanto, ocorre a formação do composto 171, não encontrado nos controles da **amostra 1** (alachlor hidrolisado) e **amostra 2** (alachlor), e que aparece somente nos experimentos de biodegradação da **amostra 1** pelas diversas linhagens.

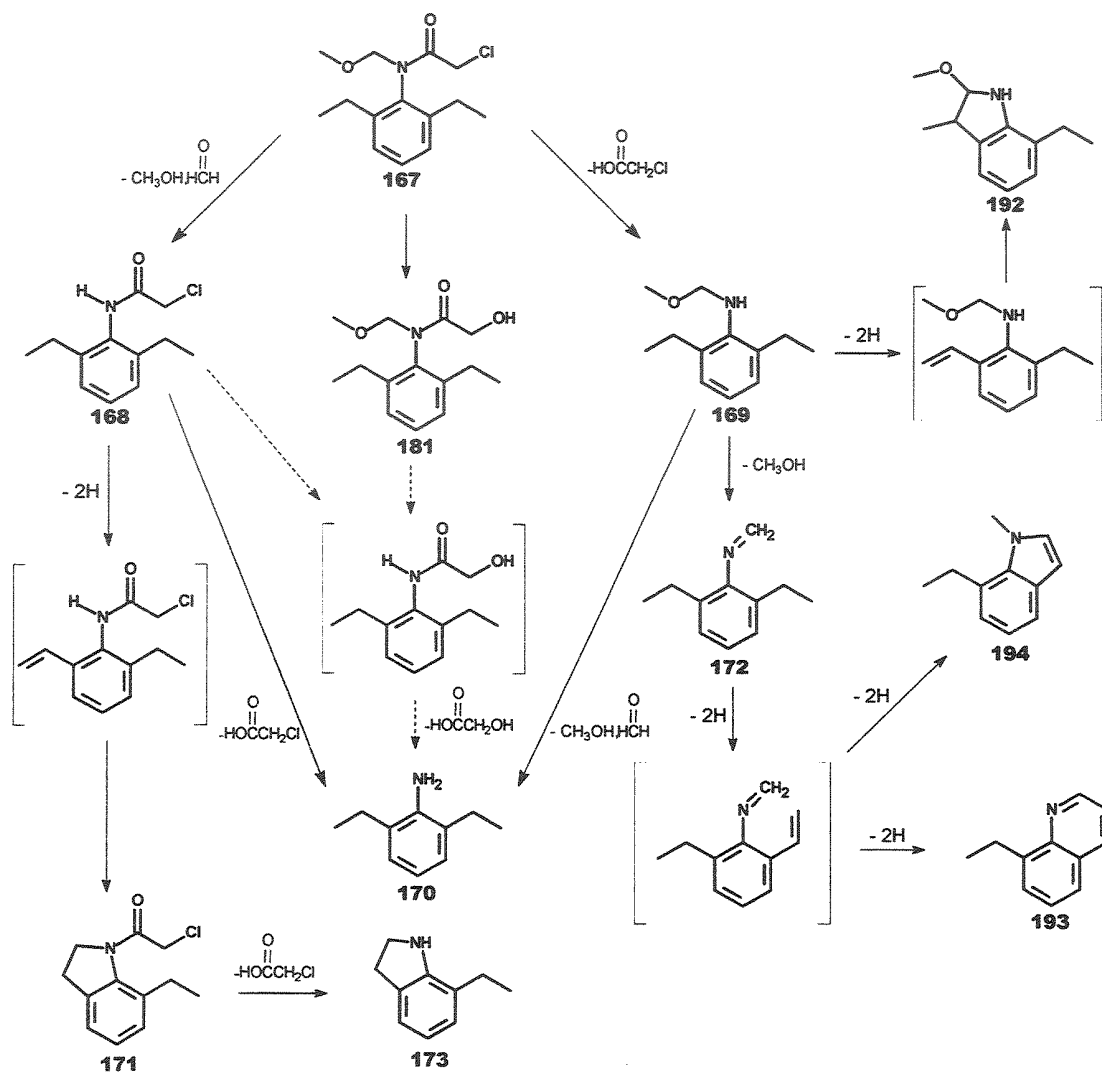
Tiedje e Hagedorn formularam uma proposta para biotransformação do composto 167 em 169 e 171, onde a formação deste último explica perfeitamente a formação do composto 173.¹³⁷ Com base nesta proposta sugerimos a formação dos outros produtos (**Esquema 61**, pág. 120). Propomos também que o composto 172, produto de hidrólise do Alachlor, na presença das linhagens é biotransformado nos compostos 193 e 194. , ou seja, não seria produzido pela biodegradação do Alachlor e o composto hidroxi-alachlor 181 é produto da desalogenação do Alachlor por hidrólise espontânea. Para maior credibilidade das nossas propostas foi realizado um levantamento das reações de ciclização de *N*-alquil-anilinas promovidas por enzimas, entretanto poucos dados relacionados foram encontrados.

Recentemente foi publicado sobre a ciclização de *N*-alquilanilina promovida pela "horseradish peroxidase" (HRP).¹³⁸ Os resultados mostram que depois da oxidação por um elétron a espécie cátion-radicalar promove uma rápida abertura do ciclopropano formando uma espécie cátion-radicalar distônica levando a ciclização intramolecular e formação de derivados quinolínicos (**Esquema 62**).

¹³⁷ Tiedje, J. M. and Hagedorn, M. L. *J. Agric. Food Chem.* **1975**, *23*, 77.

¹³⁸ Shaffer, C. L.; Morton, M. D. and Hanzlik, R. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8502.

Entretanto, não podemos descartar uma concomitante atuação de enzimas hidrolíticas que venham acelerar o processo de hidrólise espontânea.



Esquema 61 – Proposta da rota de biotransformação do alachlor 167.



Esquema 62 – Proposta do mecanismo da ciclicação por "Horseradish peroxidase".¹³⁸

Não avaliamos neste estudo limitação nutricional, desta forma o Alachlor não foi a única fonte de nitrogênio, portanto não consideramos a atividade de enzimas amidases e deamidases, e diferentemente a outros trabalhos não avaliamos a produção de CO₂ e Cl⁻.

Culturas de bactérias puras nunca foram citadas como capazes de completa mineralização do herbicida ou de seu derivado sulfonado quando realizado em condições anaeróbicas. Como não conseguimos identificar possíveis produtos de clivagem do anel aromático não podemos afirmar a sua presença ou ausência. Os microrganismos foram capazes que crescer tendo o alachlor como a única fonte de carbono, mas acreditamos que inicialmente ocorra N-desalquilações fornecendo compostos suscetíveis a novas clivagens.

Temos que analisar os resultados deste estudo por dois prismas. Primeiramente verificamos que a biotransformação produz compostos menos recalcitrantes para subsequente biodegradação. Os produtos de biotransformação detectados no nosso estudo são relativamente solúveis em água e possuem baixa absorção no solo e na matéria orgânica.¹³⁹ A sorção na argila e matéria orgânica do solo afeta diretamente na biodisponibilidade dos compostos, retardando esses compostos no sub-solo.

Os indóis e quinolinas são potencialmente degradados pelos microrganismos na natureza, enquanto que o alachlor é pouco solúvel em água (240 ppm a 25°C) e apresenta um t_{1/2} de 7 a 14 dias em diversos tipos de solo.

^{140,141}

¹³⁹ Fetzner, S. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, 49, 237.

¹⁴⁰ Larini, L., *Toxicologia dos praguicidas*, Editora Manole, São Paulo, 1ª ed., 1999.

¹⁴¹ Zangorc-Koncan, J., *Wat. Sci. Tech.* **1996**, 33, 181.

5.3. Conclusão Parcial

Demonstramos a biotransformação do alachlor *in vitro* pelas seis linhagens de *Streptomyces* ssp., formando principalmente derivados desclorados indólicos e quinolínicos. Somente o composto **168** manteve o átomo de cloro associado na molécula, indicando a capacidade destes microrganismos de descloração do herbicida e seus derivados. Portanto, as linhagens LS166, LS177 e LS182, que forneceram elevadas taxas de degradação, podem ser empregadas potencialmente no desenvolvimento biotecnológico e nos processos de biorremediação de ambientes, atuando principalmente na etapa inicial da biotransformação do alachlor.

06. CONCLUSÃO

A biocatálise como metodologia para obtenção de sulfóxidos quirais mostrou-se versátil, mas como toda a metodologia possui as suas restrições. Os fungos apresentaram habilidade em oxidar o enxofre enantiosseletivamente com baixa ou nenhuma formação de sulfona. O método enzimático é versátil na obtenção de ambos enantiômeros com altos excessos enantioméricos, mas não forneceu altos rendimentos para a preparação do sulfóxido **106**.

Por outro lado à resolução cinética dinâmica de sulfinatos por biocatálise forneceu resultados bastante interessantes. Identificamos um tipo de resolução cinética dinâmica fornecendo excelente excesso enantiomérico e merece maiores investigações para otimização dos valores. Trata-se uma alternativa "natural" para obtenção de sulfóxidos quirais. Este método permitirá a preparação de uma variedade de sulfóxidos quirais de difícil acesso por biocatálise.

Quanto a proposta sintética, a obtenção de cetonas quirais enriquecidas pela rota sugerida não se mostrou eficiente devido à enantiomerização ocorrida durante a eliminação redutiva do grupo sulfinila. O que representava uma rota rápida e de rendimentos quantitativos nos alertou para as dificuldades em sínteses de cetonas quirais quando o centro formado está adjacente ao grupo sulfinila.

A biorremediação é um simples e importante fator de controle da dissipação de herbicidas em ambientes aeróbicos e anaeróbicos. Os microrganismos possuem diversos tipos de enzimas o que permite efetuar reações em cascata sobre o herbicida, formando compostos menos recalcitrantes o que facilitaria a eliminação total de seus resíduos.

Este trabalho proporcionou uma visão ampla na área de biotecnologia com o emprego de microrganismos de coleções brasileiras e seu potencial em aplicações sintéticas.

07. Experimental

7.1. Notas Gerais

- Os espectros de RMN ^1H foram obtidos no espectrômetro Gemini 300P – Varian Instruments (300 MHz). Os deslocamentos químicos foram registrados em δ , tomando-se como padrões de referência interna o tetrametilsilano (TMS, δ 0,00) ou o CHCl_3 (δ 7,27). Os sinais obtidos foram caracterizados como: *s* = singleto, *sl* = singleto largo, *d* = dubleto, *dl* = dubleto largo, *t* = tripleto, *q* = quarteto, *quint.* = quinteto, *sext* = sexteto, *hept* = hepteto, *m* = multipeto, *dd* = duplo dubleto, *dm* = duplo multipeto, *dt* = duplo tripleto, *dq* = duplo quarteto, *td* = triplo dubleto, *tl* = tripleto largo, *tt* = triplo tripleto, *ddd* = duplo duplo dubleto. As constantes de acoplamento (*J*) foram citadas em Hz.
- Os espectros de RMN ^{13}C foram registrados nos espectrômetros Gemini 300P – Varian Instruments (75,45 MHz). Os deslocamentos químicos foram registrados em δ , tomando-se como padrões de referência interna o tetrametilsilano (TMS, δ 0,00) ou o CDCl_3 (δ 77,00).
- O número de hidrogênios ligados aos átomos de carbono foi determinado através dos espectros de RMN ^{13}C , com o auxílio das técnicas de RMN ^{13}C -DEPT (90 e 135, onde CH_3 / CH = sinal positivo, CH_2 = sinal negativo e $\text{C}0$ = ausente).
- As análises por CG de amostras quirais foram realizadas empregando-se um cromatógrafo Hewlett Packard 6890, com detector de ionização em chama (FID), equipado com uma coluna capilar de sílica fundida, com a fase quiral (2,6-dimetil-3-pentil)- β -ciclodextrina (25 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 μm de espessura do filme), usando-se H_2 como gás de arraste (ca. 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$). O volume injetado das amostras, adequadamente diluídas foi ca. 1 μL .
- As análises por CG-EM dos experimentos comalachlor foram realizadas empregando-se um cromatógrafo Hewlett Packard 5890B SERIES II,

acoplado a um detector seletivo de massas HP 5970 e Hewlett Packard 6870, acoplado a um detector seletivo de massas HP 5973 , operando com uma fonte de elétrons com energia de ionização de 70 eV. O espectrômetro de massas operou com velocidade de 0,84 scans.seg.⁻¹ na faixa de m/z 40-550. A coluna capilar de sílica fundida empregada foi J & W Scientific DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). A pressão do gás de arraste (He) na cabeça da coluna foi de 10mL/min. A temperatura utilizada para a interface foi de 240°C e injetor de 260°C a fluxo constante do gás de arraste (He) de 0,8 mL/min. O programa de temperatura do forno foi de 80°C até 290°C à 15°C/min (modo "splitless").

- As análises por CG-EM dos outros compostos foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo Hewlett Packard 6890 acoplado a um detector seletivo de massas HP 5973 operando com uma fonte de elétrons com energia de ionização de 70 eV. O espectrômetro de massas operou com velocidade de 0,77 scans.seg.⁻¹ na faixa de m/z 40-600. No CG foi utilizado uma coluna capilar de sílica fundida HP-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). O cromatógrafo operou com fluxo constante do gás de arraste (He) de 1 mL / min. A programação utilizada na maioria dos casos foi: temperatura inicial (50°C ou 80°C), velocidade de aquecimento (10°C ou 20°C/min, temperatura final (290°C/10 min), temperatura do injetor (220 °C), temperatura da interface foi de 280°C.
- As separações de compostos por cromatografia em coluna ("flash"), foram feitas utilizando-se sílica gel 60 (Merck, 0,040-0,063 mm, 230-400 mesh ASTM) e solventes destilados.
- As cromatografias em camada delgada (CCD) analíticas, para o monitoramento das reações e acompanhamento da purificação dos produtos por cromatografia em coluna, foram realizadas empregando-se cromatofolhas de alumínio (4 x 1 cm), recobertas com sílica gel com indicador de fluorescência em UV₂₅₄, da Merck (Darmstadt) (folha padrão, 20 x 20 cm).

- A revelação dos compostos nas placas cromatográficas foi feita por irradiação com lâmpada UV₂₅₄ seguida da imersão das mesmas geralmente em uma solução de *p*-anisaldeído¹⁴² (preparada pela mistura de *p*-anisaldeído, H₂SO₄, HOAc e EtOH, na proporção de 1:2:1:100 em volumes, respectivamente) e subsequente aquecimento a 300 °C, com pistola aquecedora.
- Os reagentes foram, em geral, empregados como adquiridos, e os solventes anidros, preparados conforme as metodologias descritas por Perrin & Armarego¹⁴³. O Alachlor® foi obtido através da empresa Monsanto do Brasil (Jacareí-SP).
- Os valores de rotação óptica foram determinados em um polarímetro Perkin Elmer modelo 341, com lâmpada de sódio e precisão de 0,001°, empregando-se CHCl₃ como solvente. A rotação óptica específica, em função do comprimento de onda da raia D do sódio, foi obtida conforme as seguintes conversões recomendadas pelo fabricante:

$\alpha_{Na}^{20} = \alpha_{Na}^T \cdot [1 - 0,000143 \cdot (T-20)]^{-1}$, conversão da rotação obtida com a lâmpada de sódio à temperatura ambiente T para 20 °C.

$[\alpha]_D^{20} = \alpha_{Na}^{20} \cdot (c \cdot l)^{-1}$, rotação óptica específica.

T = rotação óptica lida no aparelho, à temperatura T.

c = concentração da amostra em g mL⁻¹.

l = comprimento da cela (dm).

7.2. Microrganismos

Todos os microrganismos (fungos) utilizados nos estudos de biocatálise de organossulfurados foram adquiridos da Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (<http://www.cpqba.unicamp.br/cbmai>), do Centro Pluridisciplinar de Pesquisa Química, Biológica e Agrícola (CPQBA) da UNICAMP,

¹⁴² Casey, M.; Leonard, J.; Lygo, B.; Procter, G. *Advanced practical organic chemistry*. New York, Chapman & Hall, 1990, p. 264.

¹⁴³ Perrin, D. D.; Armarego, W. L. *Purification of laboratory chemicals*. 3ed, New York, Pergamon, 1988.

localizado na Vila Betel, Paulínia e da Coleção de Culturas Tropicais (<http://www.cct.org.br/>), da Fundação André Tosello, no Parque Taquaral, Campinas, ambos em São Paulo.

Os microrganismos (bactérias) utilizados nos experimentos de biodegradação do Alachlor (*Streptomyces sp.*) foram adquiridos no Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP pela colaboração com a Doutora Lara Durões Sette orientada pelo Doutor Gilson Paulo Manfio. As linhagens foram depositadas na CBMAI (<http://www.cpqba.unicamp.br/cbmai>) e na coleção da Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (<http://www.dsmz.de>), Braunschweig, Alemanha.

TABELA 9 – Linhagens e seus registros nas coleções

Linhagem	CBMAI	DSM
LS 143	0001	41805
LS 151	0002	41806
LS 153	0003	41807
LS 166	0004	41808
LS 177	0005	41809
LS 182	0006	41810

7.3. Crescimento dos Microrganismos para as Reações de Biocatálise com Organossulfurados

Os fungos utilizados nas reações de biocatálise foram cultivados em 100 mL de caldo nutritivo de extrato de malte 2 % em erlenmeyer de 500 mL por 72 h em agitador rotativo, a 28 °C e rotação de 120 rpm. Após este período de crescimento, as células dos fungos foram filtradas sob vácuo, em peneiras de 200 mesh e em seguida ressuspensas em 40 mL de solução tampão fosfato (Na_2HPO_4 / KH_2PO_4 , 0,1 M, pH 7), em erlenmeyer de 125 mL. Posteriormente adicionou-se

20 μL de substrato para 2,0 g de células úmidas de fungo. As reações foram realizadas por 96 horas em agitador rotativo a 28 °C, 120 rpm e monitoradas à cada 24 horas.

7.4. Crescimento dos Microrganismos e reação de Biodegradação com Alachlor Hidrolisado (Fluxograma 1, pág. 108)

Os actinomicetos utilizados nos experimentos de biodegradação com Alachlor hidrolisado foram cultivados em 100 mL de caldo nutritivo de extrato de malte e levedura em erlenmeyer de 500 mL por 48 h em agitador rotativo, a 30 °C e rotação de 120 rpm. Após este período de crescimento, as células foram centrifugadas (17000 rpm/ min) e em seguida ressuspensas em 40 mL de solução meio mineral (2.0 g Na_2SO_4 ; 0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.65 g K_2HPO_4 ; 1.0 g NH_4Cl ; 1.0 g KNO_3 ; 0.01g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0.1% extrato de levedura em 1 litro de água destilada, incluindo 288 mL de uma solução aquosa de 500 mg L^{-1} de Alachlor hidrolisado, pH 7.3), em erlenmeyer de 125 mL contendo 144 mg L^{-1} de Alachlor hidrolisado. A solução aquosa de Alachlor hidrolisada (500 mg L^{-1}) foi preparada pela diluição de Alachlor comercial em água destilada esterilizada e que permaneceu encubada por 6 meses. Os ensaios foram realizados em agitador rotativo a 30 °C, 120 rpm por 14 dias. Depois do período de reação os meios foram centrifugados (17000 rpm/ min) para separação da biomassa do meio líquido (40 mL).

7.5. Crescimento dos Microorganismos e reação de Biodegradação com Alachlor (Fluxograma 1, pág. 108)

A linhagem LS 182 utilizada nos experimentos de biodegradação com Alachlor foi cultivada em 100 mL de caldo nutritivo de extrato de malte e levedura em erlenmeyer de 500 mL por 48 h em agitador rotativo, a 30 °C e rotação de 120 rpm. Após este período de crescimento, as células foram centrifugadas (17000

rpm/ min) e em seguida ressuspensas em 40 mL de solução meio mineral (2.0 g Na_2SO_4 ; 0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.65 g K_2HPO_4 ; 1.0 g NH_4Cl ; 1.0 g KNO_3 ; 0.01g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0.1% extrato de levedura em 1 litro de água destilada, incluindo 288 mL de uma solução aquosa de 500 mg L^{-1} de Alachlor, pH 7.3), em erlenmeyer de 125 mL. A solução aquosa de Alachlor não hidrolisado (500 mg L^{-1}) foi previamente preparada utilizando água destilada esterilizada. O experimento foi realizado em agitador rotativo a 30 °C, 120 rpm por 14 dias. Depois do período de reação os meios foram centrifugados (17000 rpm/ min) para separação da biomassa do meio líquido (40 mL).

7.6. Obtenção das amostras a serem analisadas (Fluxograma 1, pág. 108)

Depois de centrifugados e separados da biomassa, os meios reacionais foram submetidos à extração em microcolunas de C-18 tratadas previamente com éter etílico e com metanol-água (1:1). Após a passagem das amostras na microcoluna foi eluída com água destilada (6 mL) e, depois, com éter etílico (3 mL). As frações foram evaporadas sob nitrogênio, secou-se sobre Na_2SO_4 e alíquotas de 1 μL foram analisadas por CG-EM (splitless).

7.7. Meios de Cultura e Solução Tampão

Meios de cultura Líquido

O meio de cultura é a associação qualitativa e quantitativa de substâncias que permitem o cultivo de microrganismos fora do seu *habitat* natural. Os meios de culturas são esterilizados e livres de outras formas de vida e preparados, segundo a sua fórmula, são distribuídos em frascos de erlenmeyer ou tubos de

ensaio sendo então tamponados com algodão não adsorvente para evitar a contaminação pelo ar.

Extrato de Malte – “Malt Extract”-ME

É um meio de cultura para o cultivo de fungos. O extrato de malte é uma infusão de malte seco e moído, sob condições que conservam ativas sua característica diastática. Para o meio de cultura líquido foram utilizados 20 g de extrato de malte e água destilada suficiente para completar 1 L de solução.

Extrato de Malte e Levedura - “Yeast Malt Extract” - YME

É um meio de cultura elaborado para o cultivo de leveduras, mas eficientemente empregado para actinomicetos. O extrato de levedo microbiológico é uma fonte de vitamina B e de outras substâncias que promovem o crescimento de leveduras. A glicose é uma fonte de carbono e energia; alta concentração permite o crescimento de fungos, mas inibe o desenvolvimento de bactérias. Para o meio de cultura líquido foram utilizados 10 g de extrato de malte, 4,0 g de extrato de levedura, 4,0 g de glicose e água destilada suficiente para completar 1 L de solução.

Meios de cultura Sólido

Os meios de culturas sólidos que foram destinados aos crescimentos e repiques dos microrganismos foram preparados de modo idêntico aos meios líquidos sendo que nestes casos foram adicionados 2 % de ágar-ágar. O ágar não constitui alimento para os microrganismos sendo apenas um agente solidificante. Os meios precisam ser vertidos em placas de Petri ou em tubos inclinados (“slantes”) ainda quentes enquanto se encontram liquefeitos.

Para os fungos o meio sólidos de ME foi vertido em tubos inclinados (“slantes”), mas para os actinomicetos (bactérias) o meio sólido de YME foi vertido em placas de Petri por serem aeróbicos restritos.

Preparação de Solução Tampão de Sorensen (Na_2HPO_4 – KH_2PO_4)¹⁴⁴

Inicialmente preparamos uma solução de Na_2HPO_4 dissolvendo 11.876 g do sal monoácido em água destilado o suficiente para completar 1 L de solução e uma solução de KH_2PO_4 dissolvendo 9.078 g do sal previamente desidratado em água destilado o suficiente para completar 1 L de solução.

A solução tampão com o pH desejado foi preparada de acordo com a Tabela 10, abaixo.

Tabela 11 - Solução Tampão de Sorensen.

pH	Na_2HPO_4 M / 15 (mL)	KH_2PO_4 M / 15 (mL)	pH	Na_2HPO_4 M / 15 (mL)	KH_2PO_4 M / 15 (mL)
5,288	0,25	9,75	6,813	5,0	5,0
5,589	0,5	9,5	6,979	6,0	4,0
5,906	1,0	9,0	7,168	7,0	3,0
6,239	2,0	8,0	7,318	8,0	2,0
6,468	3,0	7,0	7,731	9,0	1,0
6,643	4,0	6,0	8,043	9,5	0,5

7.8. Esterilização

Todos os meios de cultura, soluções, placas de Petri, tubos de ensaio, pipetas e outros materiais utilizados em contato direto com os microrganismos foram autoclavados (120 °C, 15 min, 1,5 Pa) ou então esterilizados em chama de bico de Bunsen ou sob radiação UV ou em soluções de etanol 70% ou hipoclorito de sódio 0,2%.

¹⁴⁴ Morita, T. and Assumpção, R. M. V. *Manual de Soluções, Reagentes e Solventes: Padronização, Preparação e Purificação*, 2ª ed, Ed Edgard Blücher, São Paulo, 1972, p. 276.

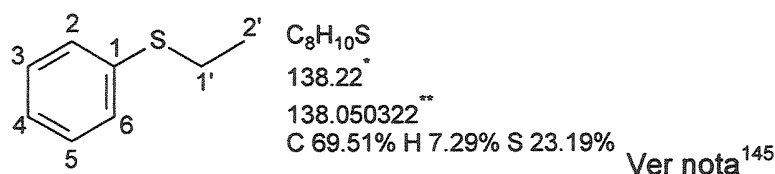
7.9. Outros

Placas de Petri, tubos de ensaio (vários diâmetros com ou em tampa), pipeta automática, pipeta Pasteur, ponteiras, agulha de inoculação, alça de platina (calibre 24 a 26 cm, haste de 6,5 cm), lâminas de vidro, lápis estereográfico ou dermatológico, “plugs” de metal, pinças.

Autoclave Vac Cicloman, Forno microondas – BRASTEMP, Capela de fluxo laminar VECO, Estufa incubadora B.O.D., Geladeira e refrigerador Cônsul, Incubadora refrigerada (Shaker) da Marconi modelo MA 420 e MA 820.

7.10. Procedimento experimental e dados espectroscópicos dos compostos sintetizados.

7.10.1. Etil-fenil-sulfeto (105)



À solução de tiofenol (1,076g, 9,772 mmol) em diclorometano (3 mL) sob banho de gelo, adicionou-se, sob agitação, K_2CO_3 (2,90 g, 29,31 mmol) e trietilamina em quantidades catalíticas. Após 5 minutos de agitação foi adicionado iodeto de etila (1,829g, 11,724 mmol) e retirou-se o banho de gelo. Ao fim da adição, a mistura reacional foi agitada por doze horas. A mistura resultante foi lavada sucessivamente com água (3 x 20 mL). Secou-se sobre Na_2SO_4 e concentrou-se sob pressão reduzida. Purificação do produto bruto por cromatografia “flash” em coluna de sílica gel (hexano – AcOEt, 9:1) forneceu 1,09g (80,74%) do etil-fenil-sulfeto (105).

¹⁴⁵ * massa molecular. ** massa molecular exata calculada (isotópica).

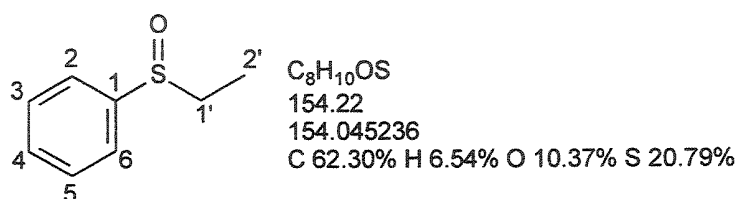
Aspecto físico: líquido ligeiramente amarelo

EM m/z (%) 138 (M^+ , 100), 123 (63), 110 (61), 77 (12), 66 (15), 65 (17), 51 (12).

RMN de ^1H (300,07 MHz, CDCl_3) δ : 1,31 (*t*, *J* 7,3 Hz, 3H, Me), 2,93 (*q*, *J* 7,3 Hz, 2H, CH_2), 7,15 (*m*, 1H, H-4), 7,40 – 7,33 (*m*, 4H, H-2, H-3, H-5 e H-6).

RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) δ : 14,45 (CH_3), 27,70 (CH_2), 125,62 (CH, C-4), 128,70 (2 CH, C-2 e C-6), 128,90 (2CH, C-3 e C-5), 136,50 (Co, C-1).

7.10.2. ($\pm$)-Etil-fenil-sulfóxido (**106**)



À solução de etil-fenil-sulfeto (500mg, 3,62 mmol) em metanol-água (5 mL, 1:1) sob banho de gelo e agitação magnética, adicionou-se NaIO_4 (774 mg, 3,62 mmol). Ao fim da adição, a mistura reacional foi agitada por duas horas. Após estas duas horas, a mistura reacional foi filtrada com o auxílio de um funil de Buchner, lavada com água (20 mL) e clorofórmio (20 mL). A água-mãe foi extraída com clorofórmio (3 x 10 mL). Secou-se a fase orgânica sobre Na_2SO_4 e concentrou-se sob pressão reduzida. Purificação do produto bruto por cromatografia “flash” em coluna de sílica gel (hexano – AcOEt 50%), forneceu 503mg (90,14%) do etil-fenil-sulfóxido (**106**)

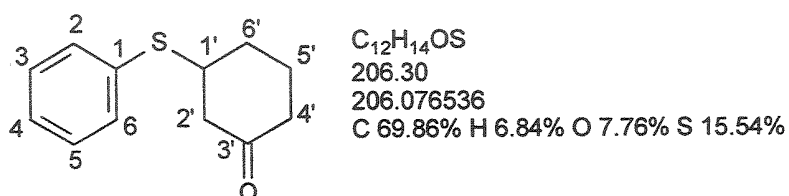
Aspecto físico: líquido incolor.

EM m/z (%) 154 (M^+ , 23), 126 (64), 125 (20), 97 (14), 78 (100), 77 (27), 51 (24).

RMN de ^1H (300,07 MHz, CDCl_3) δ : 1,20 (*t*, *J* 7,5 Hz, 3H, Me), 2,78 (*dq*, *J* 13,6 Hz e 7,5 Hz, 1H, H-1'a), 2,90 (*dq*, *J* 13,6 Hz e 7,5 Hz, 1H, H-1'b), 7,48 – 7,63 (*m*, 5H, H-2, H-3, H-4, H-5 e H-6).

RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) δ : 5,83 (CH_3 , C-2'), 50,13 (CH_2 , C-1'), 124,03 (2CH, C-2 e C-6), 129,01 (2CH, C-3 e C-5), 130,81 (CH, C-4), 143,09 (C_0 , C-1).

7.10.3. 3-tiofenóxi-1-cicloexanona (**128**)



À solução de 2-cicloexen-1-ona (199 mg, 2,066 mmol) em etanol (5 mL), adicionou-se, sob agitação e a temperatura ambiente, tiofenol (228 mg, 6,066 mmol). Após o fim da adição, a mistura resultante foi agitada por 16 horas. A solução foi concentrada sob pressão reduzida e o produto bruto purificado por cromatografia “flash” em coluna de sílica gel (hexano – AcOEt 9:1), fornecendo 178 mg (41,69%) do sulfeto (**128**).

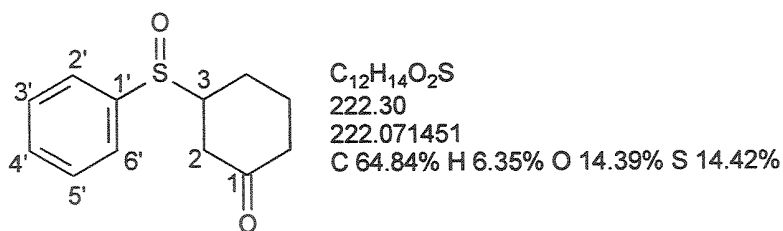
Aspecto físico: líquido amarelo

EM m/z (%) 206 (M^+ , 69), 110 (77), 109 (32), 97 (55), 96 (21), 77 (12), 69 (100), 68 (54), 66 (19), 65 (21), 55 (42), 51 (13).

RMN de ^1H (300,07 MHz, CDCl_3) δ : 1,85 (*m*, 2H, H-6'), 2,15 (*m*, 2H, H-4'), 2,65 (*m*, 2H, H-2'), 2,70 (*m*, 2H, H-5'), 3,42 (*m*, 1H, H-1'), 7,20 - 7,38 (*m*, 3H, H-2, H-4 e H-6), 7,40 – 7,47 (*m*, 2H, H-3 e H-5).

RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) δ : 23,39 (CH_2 , C-5'), 31,16 (CH_2 , C-6'), 40,81 (CH_2 , C-4'), 46,01 (CH, C-1'), 47,67 (CH_2 , C-2'), 127,54 (CH, C-4), 128,84 (2 CH, C-3 e C-5), 132,97 (C_0 , C-1), 132,80 (2 CH, C-2 e C-6), 208,33 (C_0 , C-3').

7.10.4. 3-fenilsulfinil-1-cicloexanona (**129**)



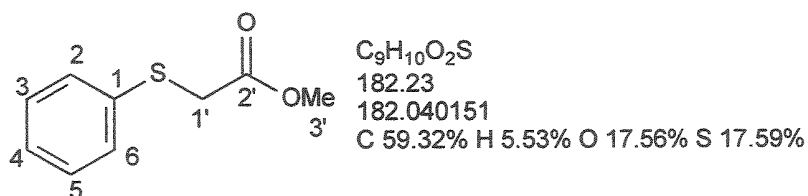
À solução de 3-tiofenóxi-1-cicloexanona (50mg, 0,243 mmol) em metanol-água (4 mL, 1:1) sob banho de gelo e agitação magnética, adicionou-se NaIO_4 (52mg, 0,243 mmol). Ao fim da adição, a mistura reacional foi agitada por duas horas. A mistura reacional foi filtrada com o auxílio de um funil de Buchner, lavada com água (3 x 10 mL) e clorofórmio (3 x 10 mL). A água-mãe foi extraída com clorofórmio (3 x 10 mL). Secou-se a fase orgânica sobre Na_2SO_4 e concentrou-se sob pressão reduzida. Purificação do produto bruto por cromatografia "flash" em coluna de sílica gel (hexano – AcOEt 50%), forneceu 23mg (42,60%) do 3-tiofenóxi-1-cicloexanona-S-óxido (**129**)

Aspecto físico: líquido amarelo claro

RMN de ^1H (300,07 MHz, CDCl_3) δ : 1,63 -2,60 (*m*, 8H, H-6', H-4', H-2', H-5'), 3,32 (*m*, 1H, H-1'), 7,60 - 7,92 (*m*, 5H, H-2, H-3, H-4, H-5 e H-6).

RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) δ : 23,30 (CH_2 , C-5'), 23,54 (CH_2 , C-6'), 37,10 (CH_2 , C-6'), 37,10 (CH_2 , C-2'), 40,34 (CH_2 , C-4'), 62,23 (CH, C-1'), 128,94 (2 CH, C-2 e C-6), 129,45 (2 CH, C-3 e C-5), 134,23 (CH, C-4), 134,52 (C_0 , C-1), 206,0 (C_0 , C-3').

7.10.5. 2-tiofenil-acetato de metila (130)



À solução de tiofenol (1,076g, 9,772 mmol) em diclorometano (3 mL) sob banho de gelo, adicionou-se, sob agitação, K_2CO_3 (2,90 g, 29,31 mmol) e trietilamina em quantidades catalíticas. Após 5 minutos de agitação foi adicionado bromo-acetato de metila (1,794g, 11,724 mmol) e retirou-se o banho de gelo. Ao fim da adição, a mistura reacional foi agitada por doze horas. A mistura resultante foi lavada sucessivamente com água (3 x 20 mL). Secou-se sobre Na_2SO_4 e concentrou-se sob pressão reduzida. Purificação do produto bruto por cromatografia “flash” em coluna de sílica gel (hexano – AcOEt 9:1) forneceu 1,068 g (60%) do 2-tiofenil-acetato de metila (130).

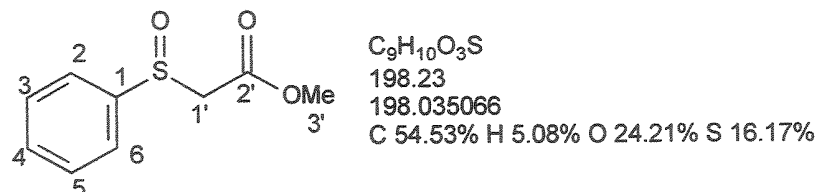
Aspecto físico: líquido líquido laranja

EM m/z (%) 182 (M^+ , 77), 151 (1), 123 (100), 109 (13), 77 (11), 65 (8)

RMN de 1H (300,07 MHz, $CDCl_3$) δ : 3,60 (s, 3H, H-3'), 3,70 (s, 2H, H-1'), 7,19 – 7,35 (m, 3H, H-3, H-4 e H-5), 7,37 – 7,43 (m, 2H, H-2 e H-6).

RMN de ^{13}C (75,45 MHz, $CDCl_3$) δ : 36,70 (CH_2 , C-1'), 52,49 (CH_3 , C-3'), 126,75 (CH, C-4), 128,89 (2 CH, C-3 e C-5), 129,70 (2 CH, C-2 e C-6), 133,22 (C_0 , C-1), 169,87 (C_0 , C-2')

7.10.6. 2-fenil-sulfinil-acetato de metila (131)



À solução de 2-tiofenil-acetato de metila (248 mg, 1,362 mmol) em metanol-água (4 mL, 1:1) sob banho de gelo e agitação magnética, adicionou-se $NaIO_4$ (291 mg, 1,362 mmol). Ao fim da adição, a mistura reacional foi agitada por duas horas. A mistura reacional foi filtrada com o auxílio de um funil de Buchner, lavada com água (3 x 10 mL) e clorofórmio (3 x 10 mL). A água-mãe foi extraída com clorofórmio (3 x 10 mL). Secou-se a fase orgânica sobre Na_2SO_4 e concentrou-se sob pressão reduzida. Purificação do produto bruto por cromatografia “flash” em coluna de sílica gel (hexano – AcOEt 50%), forneceu 214 mg (81%) do 2- fenil-sulfinil-acetato de metila (131)

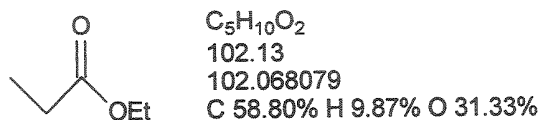
Aspecto físico: líquido líquido laranja

EM m/z (%) 198 (M^+ , 29), 182 (22), 167 (1), 125 (100), 123 (33), 97 (23), 77 (27), 51 (17).

RMN 1H (300,07 MHz, $CDCl_3$) δ : 3,69 (*d*, 1H, *J* 14,0 Hz, H-1'), 3,84 (*d*, 1H, *J* 14,0 Hz, H-1'), 3,71 (*s*, 3H, H-3'), 7,53 – 7,59 (*m*, 3H, H-3, H-4 e H-5), 7,65 – 7,72 (*m*, 2H, H-2 e H-6).

RMN ^{13}C (75,45 MHz, $CDCl_3$) δ : 52,70 (CH_3 , C-3'), 61,42 (CH_2 , C-1'), 123,90 (2 CH, C-2 e C-6), 129,24 (2 CH, C-3 e C-5), 131,62 (CH, C-4), 142,71 (C_0 , C-1), 164,92 (C_0 , C-2').

7.10.7. Propionato de etila (155)



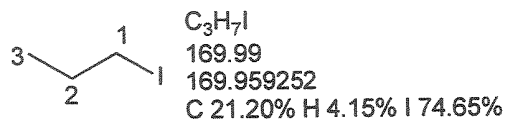
Em um balão de 100 mL adicionou-se ácido propiônico (24,98 g, 0,34 mols), álcool etílico bidestilado (20 g, 0,43 mols) e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi levada a refluxo por 12 horas e depois submetida a destilação simples, com temperatura de aproximadamente 78 °C foi destilado o excesso de álcool etílico. A temperatura do sistema foi aumentada gradativamente, sem manter nenhum ponto, até atingir 100 °C, quando foi destilada a segunda fração. Esta fração foi tratada com água (3 x 2 mL) e separada com auxílio do funil de separação, obtendo um volume igual à 35 mL (89 %). O éster foi submetido a um tratamento com solução de $NaHCO_3$ – 5% (2 x 5 mL), solução saturada de $NaCl$ (2 x 5 mL) e água destilada e seca sobre Na_2SO_4 .

Aspecto físico: incolor

EM m/z (%) 102 (M^+ , 15), 75 (17), 74 (16), 73 (9), 57 (100).

Ponto de ebulição: 99 °C ¹⁴³

7.10.8. Iodeto de *n*-propila (152)



À solução de brometo de *n*-propila (2 g, 16,260 mmol) em acetona e agitação magnética, adicionou-se NaI (2,93 g, 19,51 mmol) em uma porção. Ao fim da adição, a mistura reacional foi agitada por 12 horas. A mistura reacional foi evaporada sob vácuo e tratada com água (3 x 10 mL). A fração orgânica foi tratada com uma solução de Na₂S₂O₃ – 5% e seca sobre Na₂SO₄ fornecendo 1,89 g (70 %).

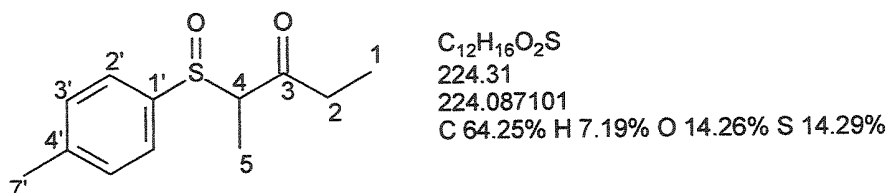
Aspecto físico: líquido líquido incolor.

EM m/z (%) 170 (M⁺, 100), 155 (5), 141 (10), 127 (66).

RMN de ¹H (300,07 MHz, CDCl₃) δ: 0,98 (t, *J* 7 Hz, 3H, H-3), 1,83 (sex, *J* 7,0 Hz, 2H, H-2), 3,18 (t, *J* 7,0 Hz, 2H, H-1).

RMN de ¹³C (75,45 MHz, CDCl₃) δ: 9,65 (CH₂, C-1), 15,36 (CH₃, C-3), 26,92 (CH₂, C-2).

7.10.9. (±)-2-fenil-sulfinil-3-pentanona (152a)



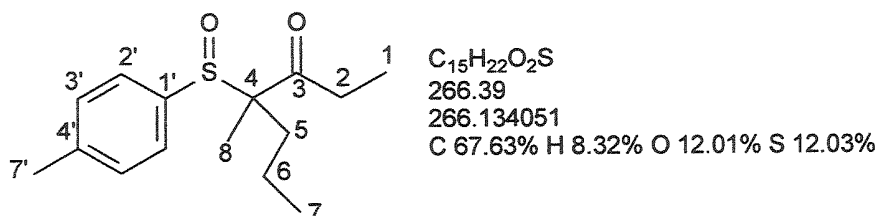
Em um balão de 25 mL flambado, sob atmosfera inerte (Ar) e em banho de gelo seco e etanol (- 78 °C) foi adicionado THF seco (1 mL). Em seguida foi adicionado diisopropilamida (172 µL, 0,818 mmol). Depois de homogeneizada foi adicionada a

solução de butil-lítio (1,3 M, 915 μ L, 1,190 mmol) gota a gota. A mistura foi conduzida à 0 °C com auxílio de um banho de gelo e mantida agitação por 30 minutos quando foi retornada a temperatura de - 78 °C para a adição lenta de uma solução do ($\pm$)-etil-*p*-toluil-sulfóxido (100 mg, 0,595 mmol) em THF seco (5 mL). Ao elevar a temperatura da reação à 0 °C a mistura reacional adquiriu uma coloração amarela intensa e depois laranja. Depois de 30 minutos, novamente a temperatura da reação foi conduzida para - 78 °C quando foi adicionado lentamente o propionato de etila (78,8 μ L, 0,595 mmol). Em seguida a temperatura reacional foi elevada à 0 °C e a solução tornou-se amarela clara e depois incolor. A reação foi acompanhada por CCD e depois de 1 hora foi adicionada uma solução concentrada de NH₄Cl saturada para “matar” a reação. A purificação do produto bruto por cromatografia em placa preparativa (hexano – AcOEt 50%), forneceu 122 mg (90%) do ($\pm$)-2-fenil-sulfinil-3-pentanona (**152a**).

Aspecto físico: líquido amarelo claro.

RMN ¹H (300,07 MHz, CDCl₃) δ : 0,96 (*t*, *J* 7,3 Hz, 3H, H-1), 1,28 (*dd*, *J* 6,9 Hz, 3H, H-5), 2,38 (*s*, 3H, H-7'), 2,46 (*q*, 2H, H-2), 3,77 (*dq*, *J* 6,9 Hz, 1H, H-4), 7,27 – 7,43 (*m*, 4H, H-2', H-3', H-4' e H-5').

7.10.10. ($\pm$)-4-metil-4-fenil-sulfinil-3-heptanona (**148a**)



Em um balão de 10 mL flambado, sob atmosfera inerte (Ar) e em banho de gelo (0 °C) foi adicionado DMF seco (3 mL). Em seguida, com auxílio de um sino, foi

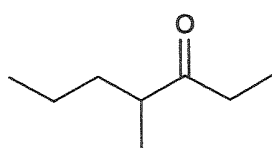
adicionado NaH (11,5 mg, 0,476 mmol). Depois de homogeneizada foi adicionada a solução de (±)-2-fenil-sulfinil-3-pentanona (100 mg, 0,476 mmol) gota a gota. Após a formação do derivado de sódio observado pela reação total do NaH adicionou-se o agente alquilante (87 μ L, 0,892 mmol). A reação foi acompanhada por CCD e depois de 1 hora a mistura reacional foi tratada com água e extraída com acetato de etila (3 x 3 mL). A purificação do produto bruto por cromatografia em placa preparativa (hexano – AcOEt 20%), forneceu 99,9 mg (83%) do (±)-4-metil-4-fenil-sulfinil-3-heptanona (**148a**).

Aspecto físico: líquido amarelo claro.

RMN de ^1H (300,07 MHz, CDCl_3) δ : 0,90 (3H, H-7), 1,1 (3H, H-1), 1,90 (2H, H-6), 1,95 (2H, H-5), 2,05 (3H, H-8), 2,40 (3H, H-7'), 2,54 (2H, H-2), 7,44 – 7,62 (*m*, 4H, H-2', H-3', H-5' e H-6').

RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) δ : 8,62 (CH_3 , C-1), 14,08 (CH_3 , C-8), 16,20 (CH_3 , C-7), 21,00 (CH_3 , C-7'), 26,00 (CH_2 , C-6), 28,14 (CH_2 , C-5), 30,23 (CH_2 , C-2), 61,05 (C_O , C-4), 124,47 (2CH, C-2' e C-6'), 128,73 (2CH, C-3' e C-5'), 140,48 (CH, C-1'), 141,70 (CH, C-4'), 205,8 (C_O , C-3).

7.10.11. (±)-4-metil-3-heptanona (**141**)



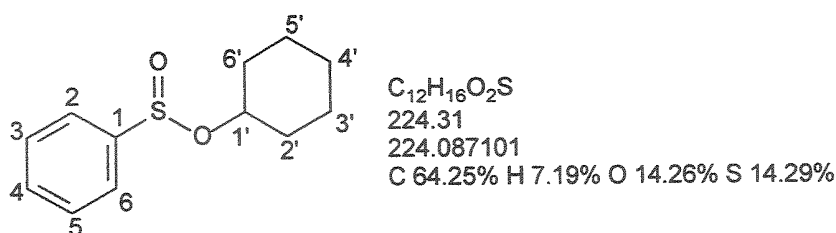
$\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}$
128.21
128.120115
C 74.94% H 12.58% O 12.48%

Em um balão de 10 mL foi adicionada uma solução do produto bruto da reação de alquilação (100 mg, 0,397 mmol) em etanol absoluto (1 mL) e foi submetida a agitação magnética. Em seguida foi adicionado o níquel de Raney W-2 ($\cong$ 200 mg). Foi acoplamos ao balão um condensador de refluxo em banho de 0 $^\circ\text{C}$ para minimizar a perda do feromônio e a mistura reacional permaneceu em

agitação por 12 horas. Depois a mistura foi filtrada em celite e o *head-space* da mistura foi analisado por CG-EM.

EM m/z (%) 128 (M^+ , 2), 99 (10), 86 (55), 71 (81), 57 (100), 43 (67).

7.10.12. benzenossulfinato de cicloexila (**158**)



À solução de cloreto de tionila (3,622g, 30,45 mmol) em benzeno anidro (15 mL) a 0°C e sob agitação, adicionou-se, em porções, o benzenossulfinato de sódio (1g, 6,09 mmol). Após o fim da adição, permitiu-se à mistura reacional atingir a temperatura ambiente. A solução foi concentrada a ¼ do volume pela destilação do benzeno e excesso do cloreto de tionila. O resíduo foi diluído com éter anidro (15 mL) e esfriado a 0°C. Uma solução de cicloexanol (707µL, 6,6 mmol) foi, então, adicionada lentamente. Após o fim da adição, a mistura resultante foi agitada por uma hora a temperatura ambiente e hidrolisada com água (20 mL) em banho de gelo. A fase orgânica foi lavada sucessivamente com uma solução de ácido clorídrico – 10% (3 x 20 mL) e uma solução de salmoura (3 x 20 mL). Secou-se sobre Na_2SO_4 e concentrou-se sob pressão reduzida. Purificação do produto bruto por cromatografia “flash” em coluna de sílica gel (hexano – AcOEt, 9:1), forneceu 160mg (77%) do benzenossulfinato de cicloexila (**158**).

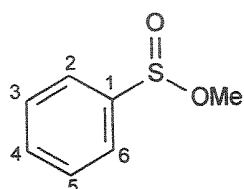
Aspecto físico: líquido incolor

EM m/z (%) 224 (M^+ , 0), 143 (100), 125 (21), 83 (46), 77 (23), 55 (38)

RMN ¹ H (300,07 MHz, CDCl₃) δ: 1,25-2,10 (*m*, 10H, H-2', H-3', H-4', H-5' e H-6'), 4,34 (*m*, 1H, H-1'), 7,47 – 7,55 (*m*, 2H, H-2 e H-5), 7,67 – 7,76 (*m*, 3H, H-3, H-4 e H-5).

RMN ¹³ C (75,45 MHz, CDCl₃) δ: 23,80 (2 CH₂, C-3'e C-5'), 25,11 (CH₂, C-4'), 33,65 (2 CH₂, C-2'e C-6'), 77,94 (CH, C-1'), 124,86 (2 CH, C-2 e C-6), 128,71 (2 CH, C-3 e C-5), 131,64 (CH, C-4), 145,59 (C₀, C-1).

7.10.13. benzenossulfinato de metila (**159**)



C₇H₈O₂S
156.19
156.024501
C 53.83% H 5.16% O 20.49% S 20.53%

O benzenossulfinato de sódio (150 mg, 0,9 mmol) foi tratado com solução de ácido clorídrico – 10% (20mL). A mistura foi extraída com éter etílico. Secou-se sobre Na₂SO₄ e concentrou-se sob pressão reduzida. Observou-se a formação de cristais brancos que foram tratados com diazometano e concentrado sob pressão reduzida fornecendo 136 mg (95%) do benzenossulfinato de metila (**159**)

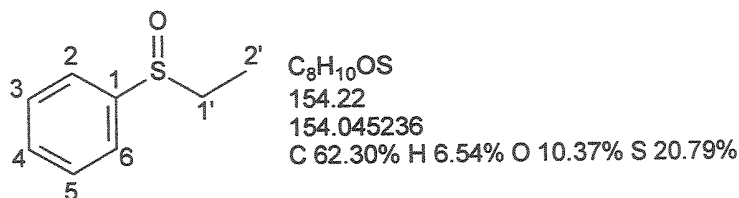
Aspecto físico: líquido incolor

EM m/z (%) 156 (M⁺, 82), 141 (12), 125 (100), 77 (86).

RMN ¹ H (300,07 MHz, CDCl₃) δ: 3,47 (*s*, 3H), 7,53 – 7,58 (*m*, 2H, H-2 e H-6), 7,69 – 7,72 (*m*, 3H, H-3, H-4 e H-5)

RMN ¹³ C (75,45 MHz, CDCl₃) δ: 49,63 (CH₃, C-1'), 125,23 (2 CH, C-2 e C-6), 128,90 (2 CH, C-3 e C-5), 132,04 (CH, C-4), 143,67 (C₀, C-1).

7.10.14. Determinação da configuração absoluta do benzenossulfonato de cicloexila (**158**)



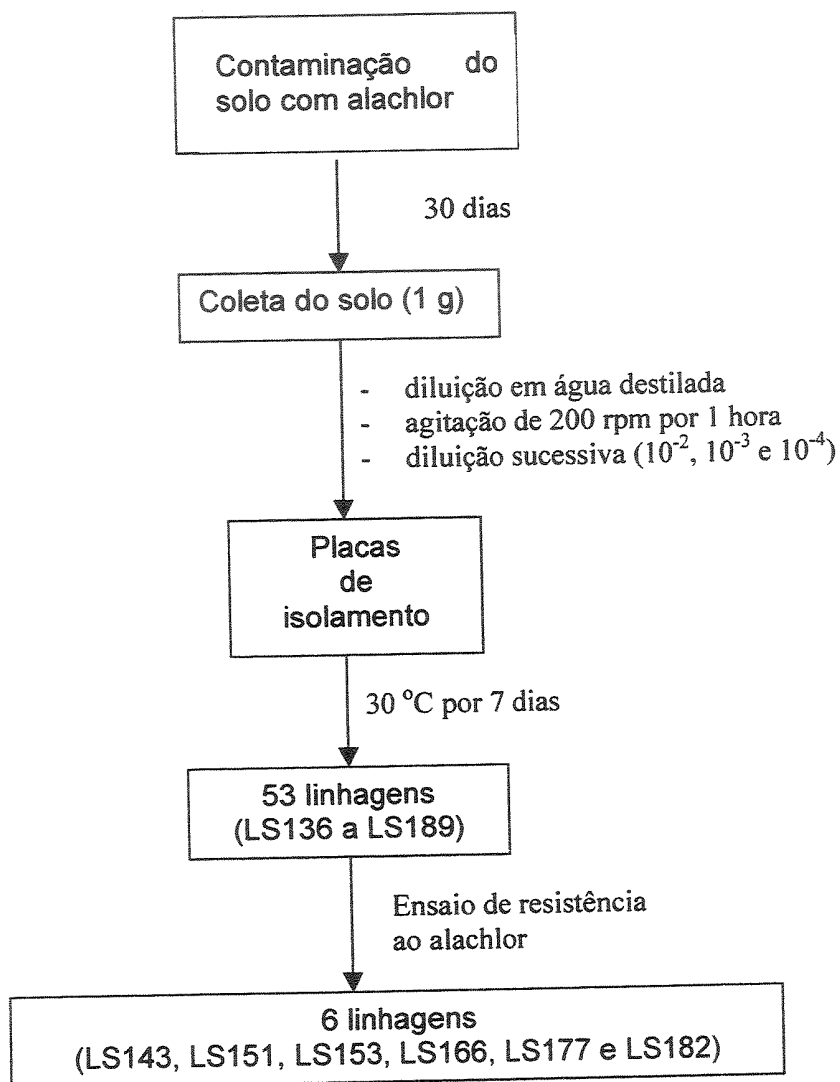
O magnésio (1g, 41,14 mmol) foi previamente lavado com solução aquosa de HCl - 10% (3x) seguida de acetona (4x) e submetido a alto vácuo. Foram pesados 130 mg de magnésio (5,348 mmol) e colocado em um sistema com balão (10 mL) de duas bocas com barra magnética conectado a um condensador de refluxo e a um borbulhador. O sistema foi flambado com ar quente e esfriado sob pressão positiva de argônio. 2 mL de THF seco foi adicionado ao balão. Em seguida foi adicionado brometo de etila (700 mg, 6,42 mmol) lentamente. A mistura foi colocada sob banho de 40 °C. Em 15 minutos o magnésio foi totalmente consumido. A mistura apresentou uma aparência de um líquido metálico. Adicionamos a outro balão flambado (10 mL) e contendo barra magnética foi adicionada uma solução de benzenossulfonato enriquecido (ee = 20 %, 100 mg, 0,446 mmol) em benzeno e o balão submetido a banho de gelo. Em seguida foram transferidos 0,3 mL da solução de EtMgBr (2,7 M) previamente preparada para o balão contendo a solução do sulfinato e a mistura reacional foi conduzida a temperatura ambiente retirando o banho de gelo. A reação foi acompanhada por CCD e depois de 1 h 30 min foi adicionada uma solução saturada de cloreto de amônio. A mistura foi extraída com éter e a fase orgânica foi tratada com solução salubre, seca sob Na_2SO_4 e evaporada sob pressão reduzida. A purificação do produto bruto por cromatografia “flash” em coluna de sílica gel (hexano – AcOEt, 1:1), forneceu 59,3 mg (60 %) do etil-fenil-sulfóxido (**106**).

$$[\alpha]_D^{20} = + 46^\circ (c\ 0,13, CHCl_3), (R) - \mathbf{106} (ee = 20\ %)$$

ANEXO 1

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, pela Doutora Lara Durões Sette e pelo Doutor Gilson Paulo Manfio.

146



Fluxograma 2 – Esquema de isolamento das 6 linhagens

¹⁴⁶ Sette, L. D. "Isolamento e Sistemática de Actinomicetos Degradores de Pesticidas. Unicamp, Campinas, 2001.

ANEXO 1

A coleta das amostras de solo tratada com alachlor foi realizada 30 dias após a aplicação em área teste na Fundação André Tosello, Campinas (SP). As amostras foram coletadas na porção superficial do solo à aproximadamente 20 cm de profundidade. Foram realizadas várias amostragens em parcelas de 1 m² em diferentes pontos das áreas de aplicação do pesticida. As amostras foram homogeneizadas e imediatamente utilizadas para isolamento das linhagens bacterianas. Foram tomadas amostras de 1g de solo, as quais foram diluídas em 9 mL de água destilada estéril. O solo diluído foi colocado sob agitação de 200 rpm e após 1 hora foram realizadas diluições sucessivas (10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}), das quais foram tomadas alíquotas de 100 µL para inoculação nos meios de cultivos.¹⁴⁷ (Figura 24, pág. 147) As placas de isolamento foram incubadas a 30 °C por 7 dias. Foram adicionadas aos meios de isolamento diferentes concentrações de Alachlor 3, 30 e 300 µL (dosagem comercial = 6 L/ha), equivalentes a 1 X, 10 X e 100 X, respectivamente, as concentrações recomendadas para aplicação no solo.

Durante o período de incubação as colônias¹⁴⁸ foram transferidas para placas contendo meio Bennett's modificado¹⁴⁹ para purificação das linhagens sendo isoladas 53 linhagens neste procedimento. As linhagens purificadas foram preservadas por congelamento a -20 °C em suspensão de glicerol a 20%.

¹⁴⁷ Os seguintes meios de cultura foram utilizados para o isolamento seletivo:

- ✓ Meio ágar mineral (conc./L): KNO₃ (1,0 g), K₂HPO₄ (0,5 g), MgSO₄ (0,5 g), NaCl (0,5 g), FeSO₄ (10,0 mg), ágar (20,0 g) e solução de microelementos (1 mL).
- ✓ Solução estoque de microelementos (conc./L): CuSO₄.5H₂O (1,0 g), MnCl₂.2H₂O (1,25 g) e ZnSO₄.7H₂O (240,0 mg).
- ✓ Meio amido caseína (conc./L): amido solúvel (10,0 g), caseína (0,3 g), KNO₃ (2,0 g), NaCl (2,0 g), MgSO₄.7H₂O (0,05 g), CaCO₃ (0,02 g), FeSO₄.7H₂O (0,01 g), ágar (12,0 g) e solução de estoque de K₂HPO₄ (10 mL) (estoque a 20%), após autoclavagem.
- ✓ Foi adicionado aos meios 50 µg/mL do antifúngico cicloexamida (actidiona).
- ✓ O pH dos meios foi ajustados para 7,0-7,3.

¹⁴⁸ Chama-se de colônia o resultado da multiplicação de uma única célula sobre um meio sólido resultando em um aglomerado de células que permanecem juntas.

¹⁴⁹ extrato de levedura, 1,0 g; Lab-Lemco, 0,8 g; bacto-casitona, 2,0 g; glicose, 10,0 g; ágar, 15 g; em 1 litro de água destilada

ANEXO 1

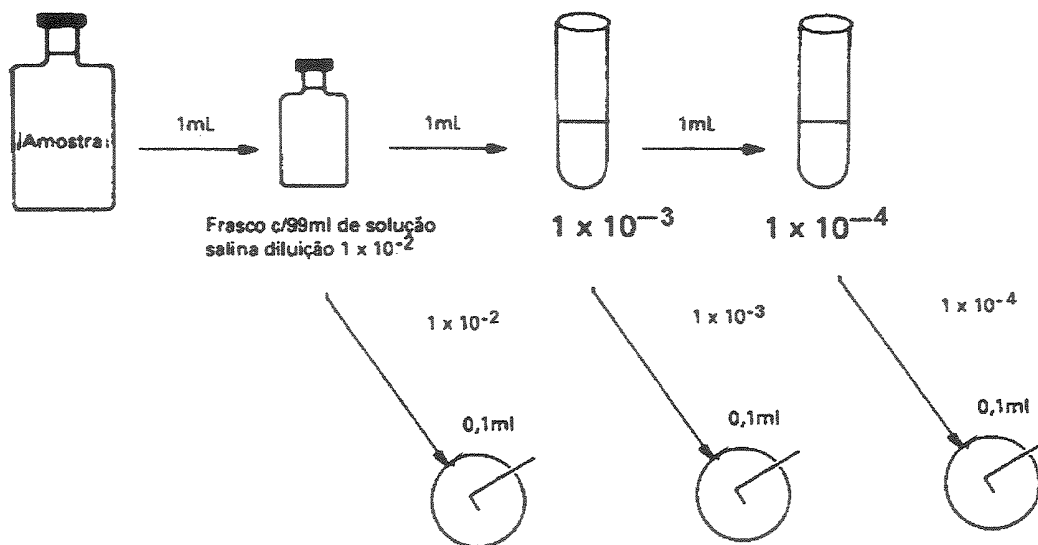
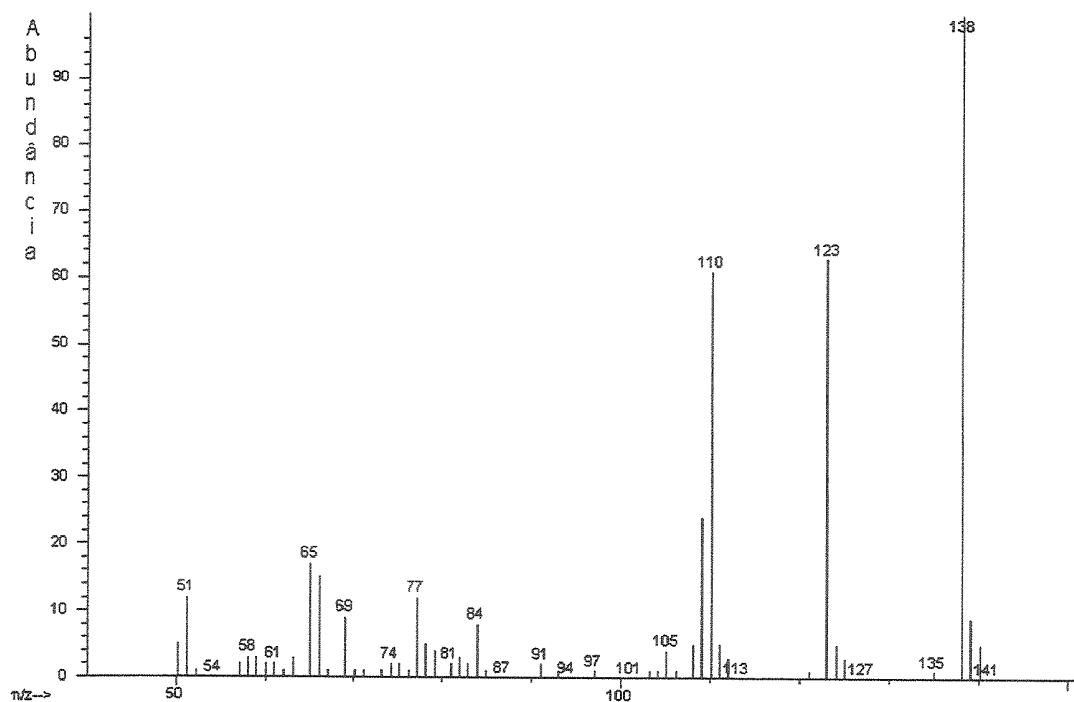


Figura 24 – Técnica de diluições para contagem em placas.¹⁵⁰

As linhagens isoladas foram posteriormente submetidas a teste de crescimento e resistência a níveis de crescentes do Alachlor em meio de cultivo sólido. Os ensaios foram realizados em placas de Petri contendo meio Bennett's acrescidos de concentrações variáveis dos pesticidas durante um período de 7 dias, a 30 °C. Os resultados de crescimento foram comparados com placas controle sem adição do Alachlor. Desta forma foram selecionadas 6 linhagens para os ensaios de degradação que apresentaram bom crescimento em níveis elevados do pesticida. As 6 linhagens foram caracterizadas como Actinomicetos (*Streptomyces sp.*) (Figura 18 e Figura 19, pág. 103)

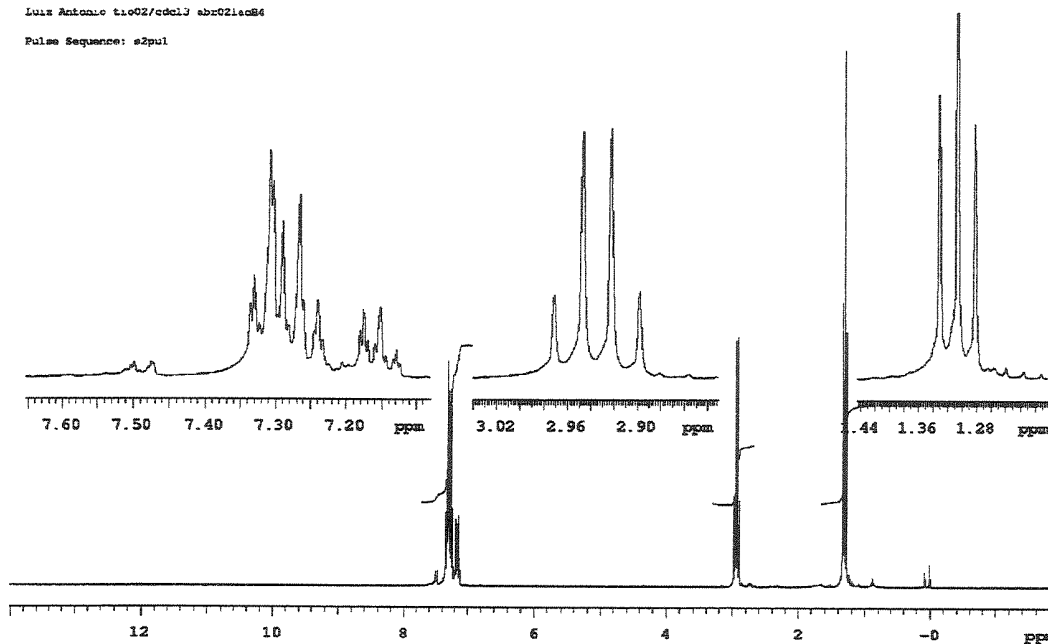
¹⁵⁰ Soares, J. B., De Casimiro, A. R. S.; Albuquerque, L. M. B. *Microbiologia Básica*. 2ª ed, EUFC, Fortaleza, 1991.

ESPECTROS



E 01 – Espectro de massas (IE, 70 eV) do etil-fenil-sulfeto **105**.

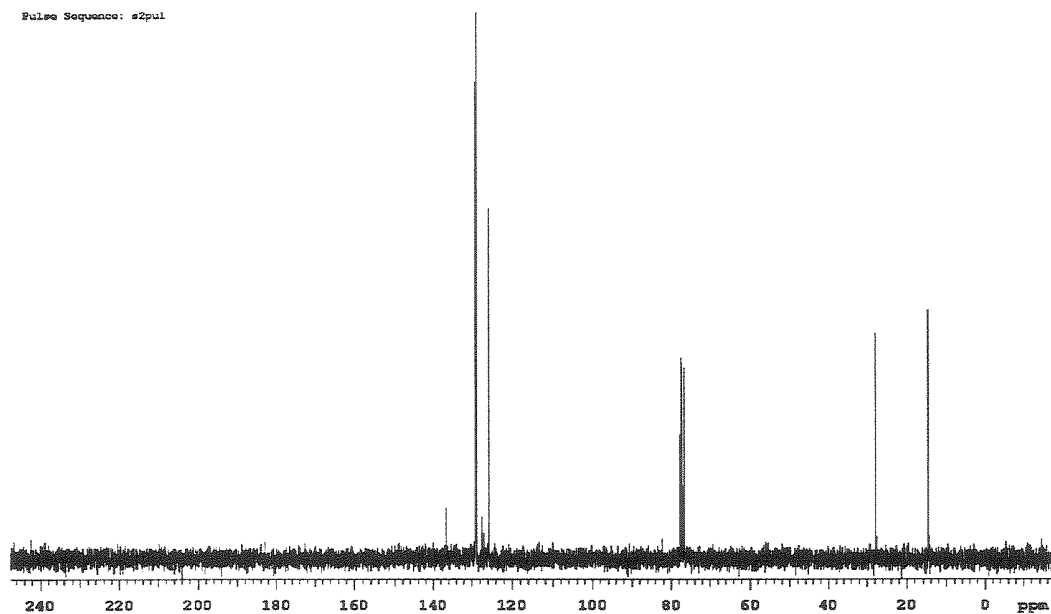
Luis Antonio tio02/cdcl3 abz02isc04
Pulse Sequence: s2pul



E 02 – Espectro de RMN de ^1H (300,07 MHz, CDCl_3) do etil-fenil-sulfeto **105**.

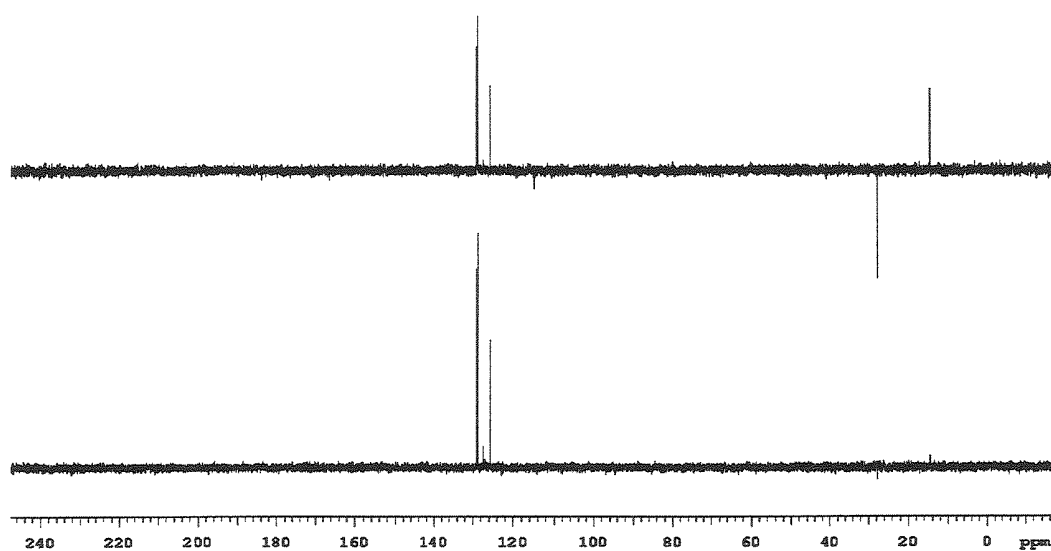
ESPECTROS

Luiz Antonio tia02/cdel3 abr02lac04
Pulse Sequence: e2pul



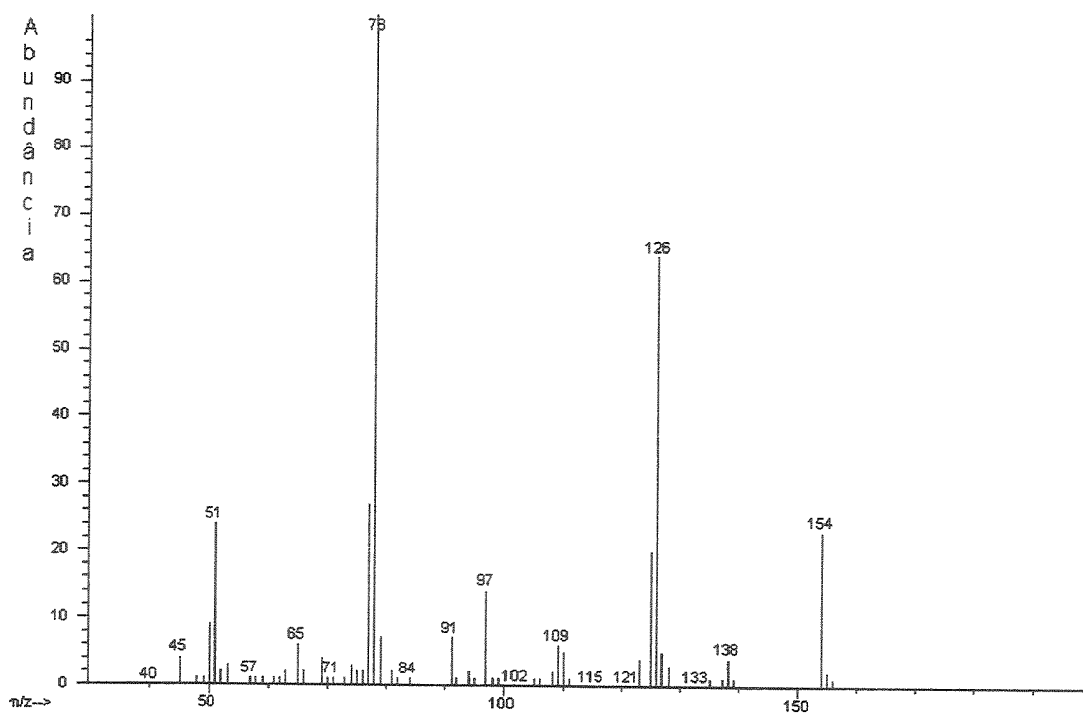
E 03 – Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) do etil-fenil-sulfeto 105.

Luiz Antonio tia02/cdel3 abr02lac04
Pulse Sequence: dept

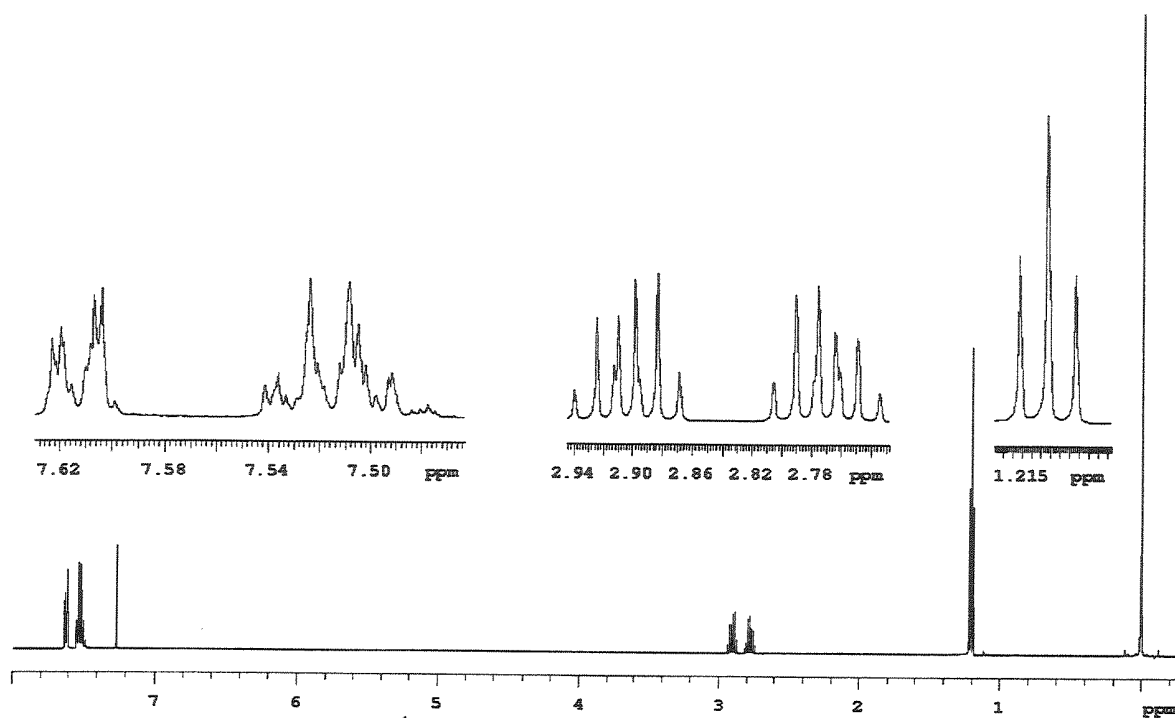


E 04 – Espectro DEPT 90 e 135° (75,45 MHz, CDCl_3) do etil-fenil-sulfeto 105.

ESPECTROS



E 05 – Espectro de massas (IE, 70 eV) do etil-fenil-sulfóxido 106.

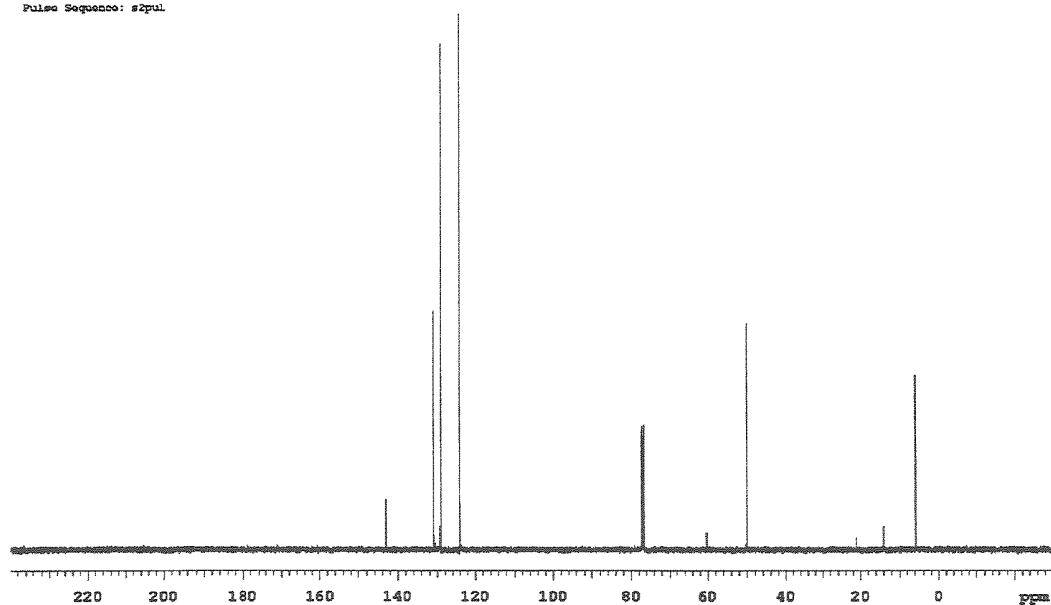


E 06 – Espectro de RMN de ¹H (300,07 MHz, CDCl₃) do etil-fenil-sulfóxido 106.

ESPECTROS

L Antonio f1e003 edel3/bb105 jul151ae01

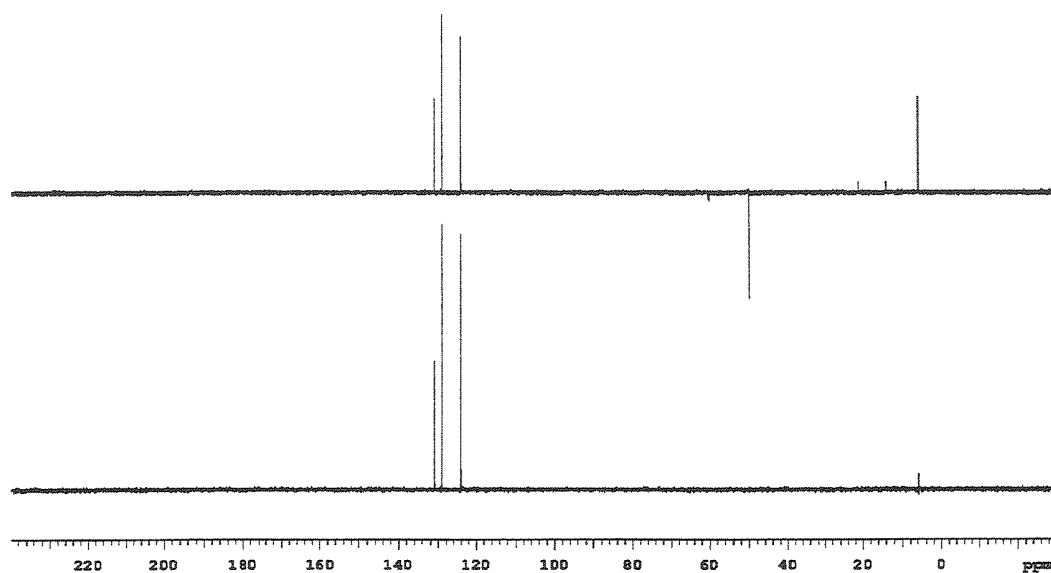
Pulse Sequence: s2pul



E 07 – Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) do etil-fenil-sulfóxido **106**.

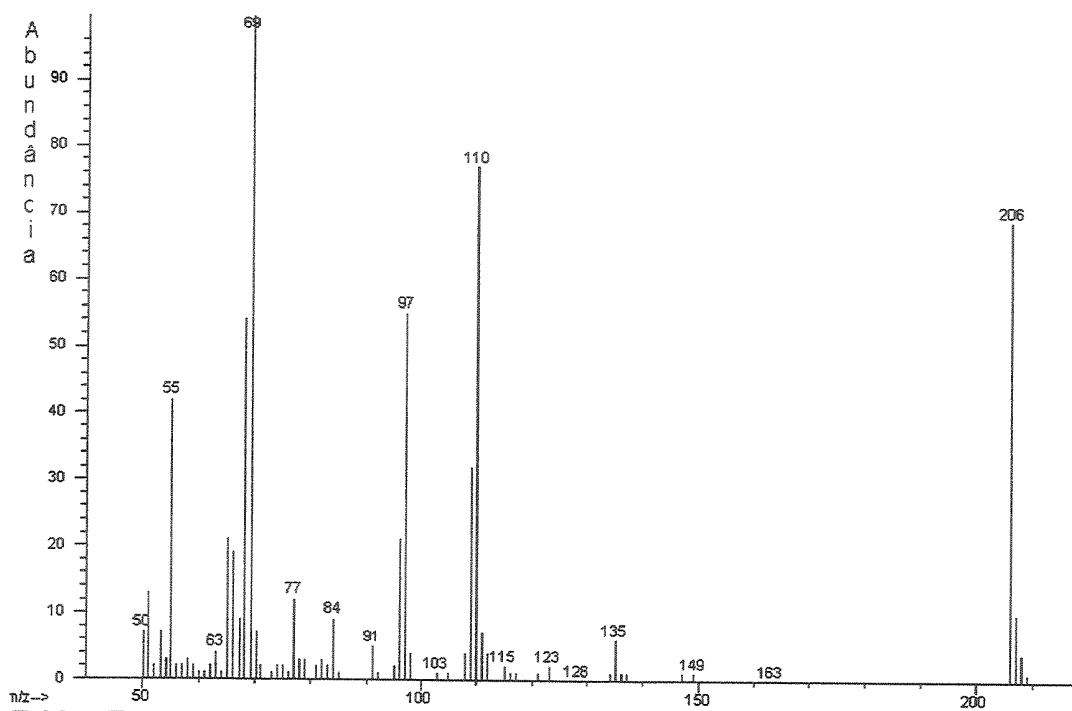
L Antonio f1e003 edel3/bb105 jul151ae01

Pulse Sequence: dept

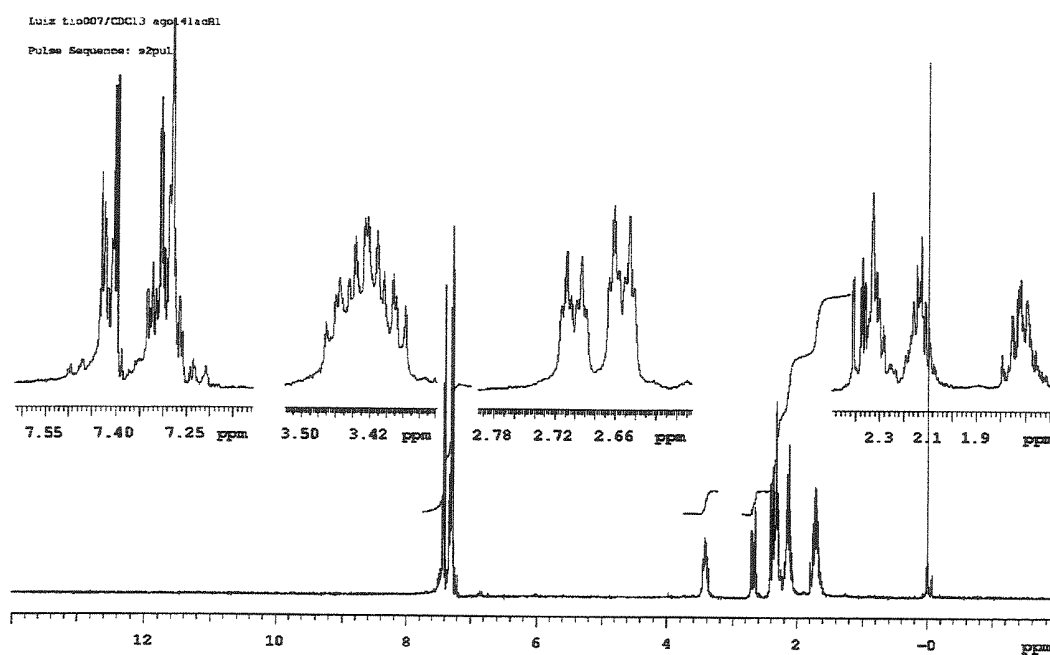


E 08 – Espectro DEPT 90 e 135° (75,45 MHz, CDCl_3) do etil-fenil-sulfóxido **106**.

ESPECTROS



E 09 – Espectro de massas (IE, 70 eV) do 3-tiofenóxi-1-ciclohexanona **128**.

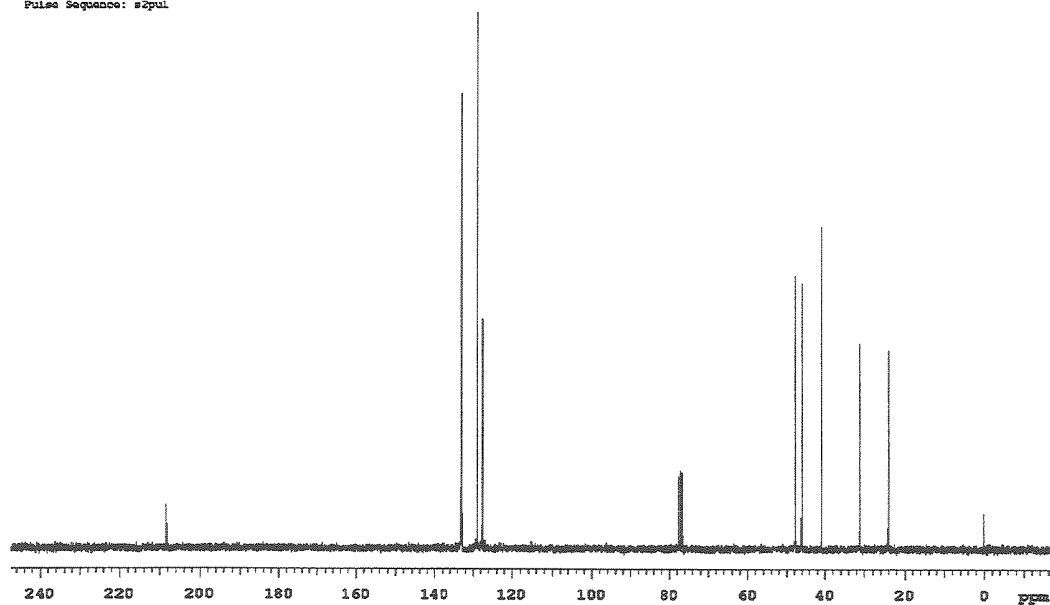


E 10 – Espectro de RMN de ¹H (300,07 MHz, CDCl₃) do 3-tiofenóxi-1-ciclohexanona **128**.

ESPECTROS

Luis tio007/CDCl3 egol41acCl

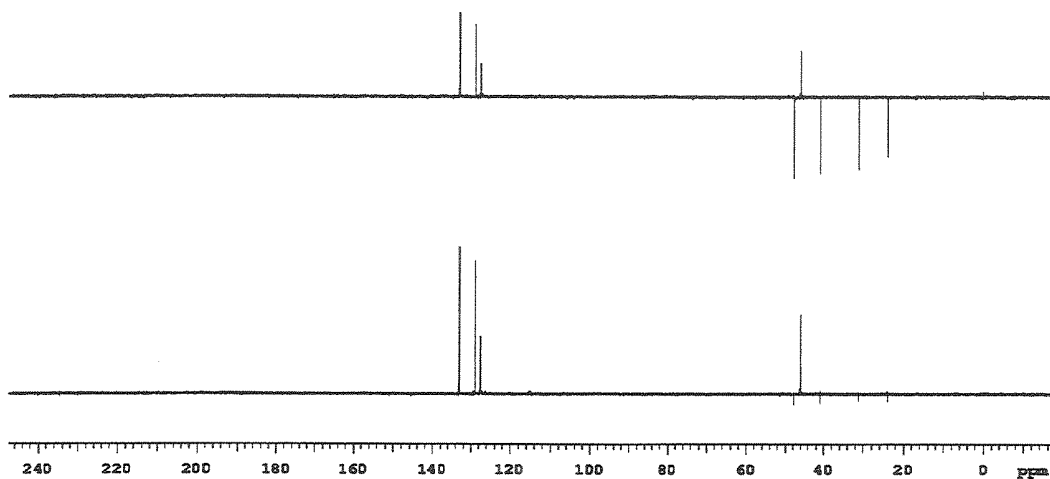
Pulse Sequence: s2pul



E 11 – Espectro de RMN de ¹³C (75,45 MHz, CDCl₃) do 3-tiofenóxi-1-cicloexanona 128.

Luis tio007/CDCl3 egol41acCl

Pulse Sequence: dept

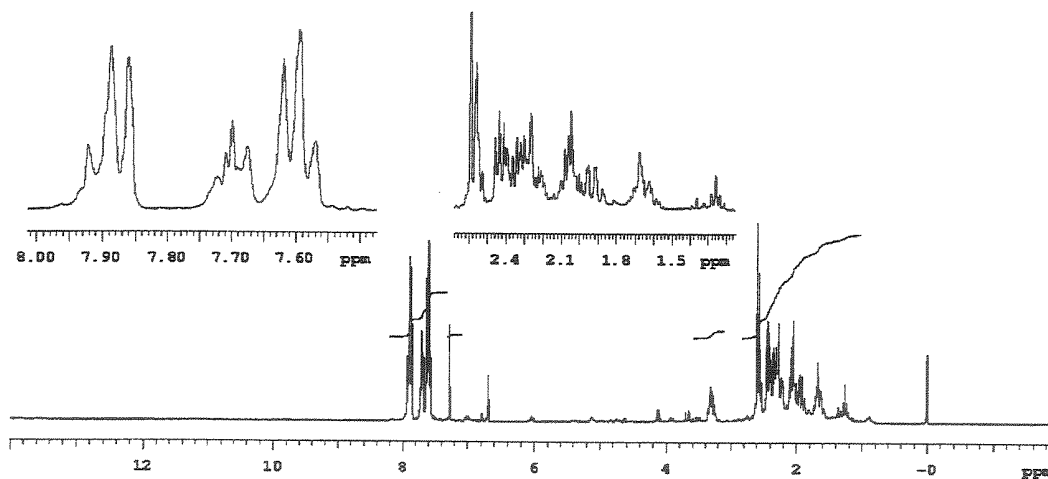


E 12 – Espectro DEPT 90 e 135° (75,45 MHz, CDCl₃) do 3-tiofenóxi-1-cicloexanona 128.

ESPECTROS

L. Antonio t1c013/CDCl3 jui131acB2

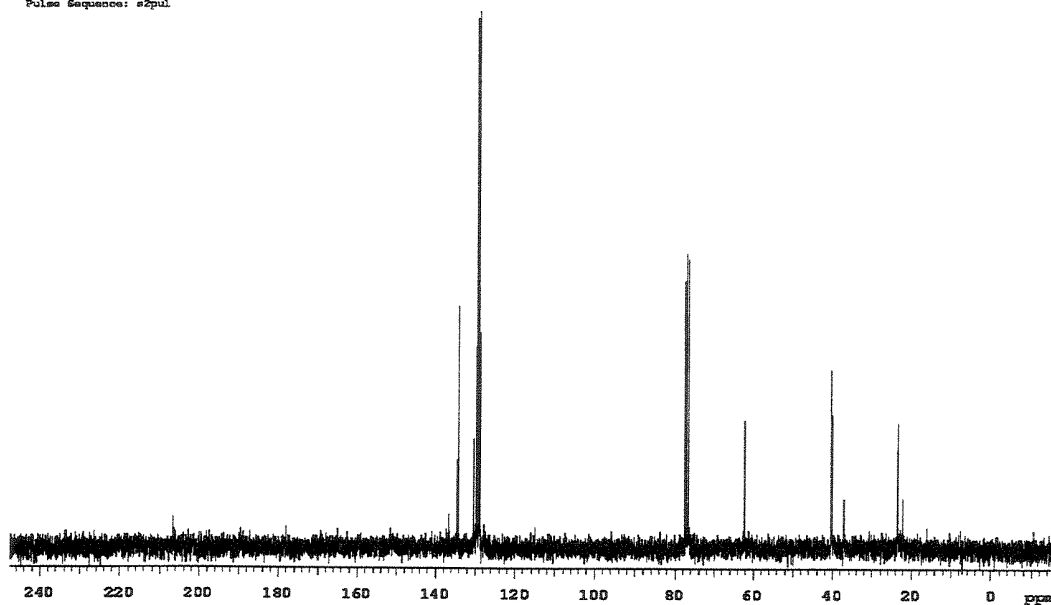
Pulse Sequence: s2pul



E 13 – Espectro de RMN de ¹H (300,07 MHz, CDCl₃) do 3-fenil-sulfinil-1-cicloexanona 129.

L. Antonio t1c013/CDCl3 jui131acC2

Pulse Sequence: s2pul

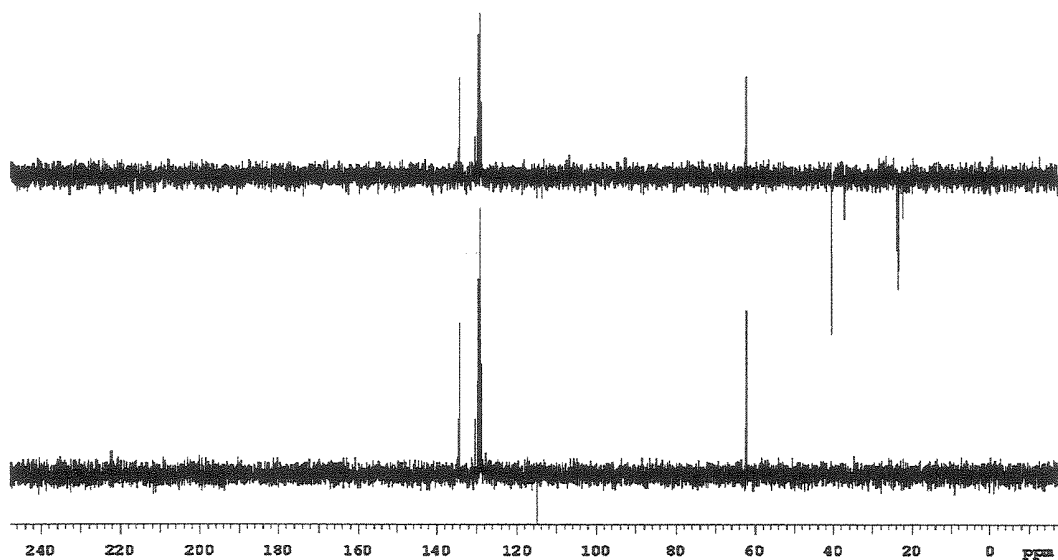


E 14 – Espectro de RMN de ¹³C (75,45 MHz, CDCl₃) do 3-fenil-sulfinil-1-cicloexanona 129.

ESPECTROS

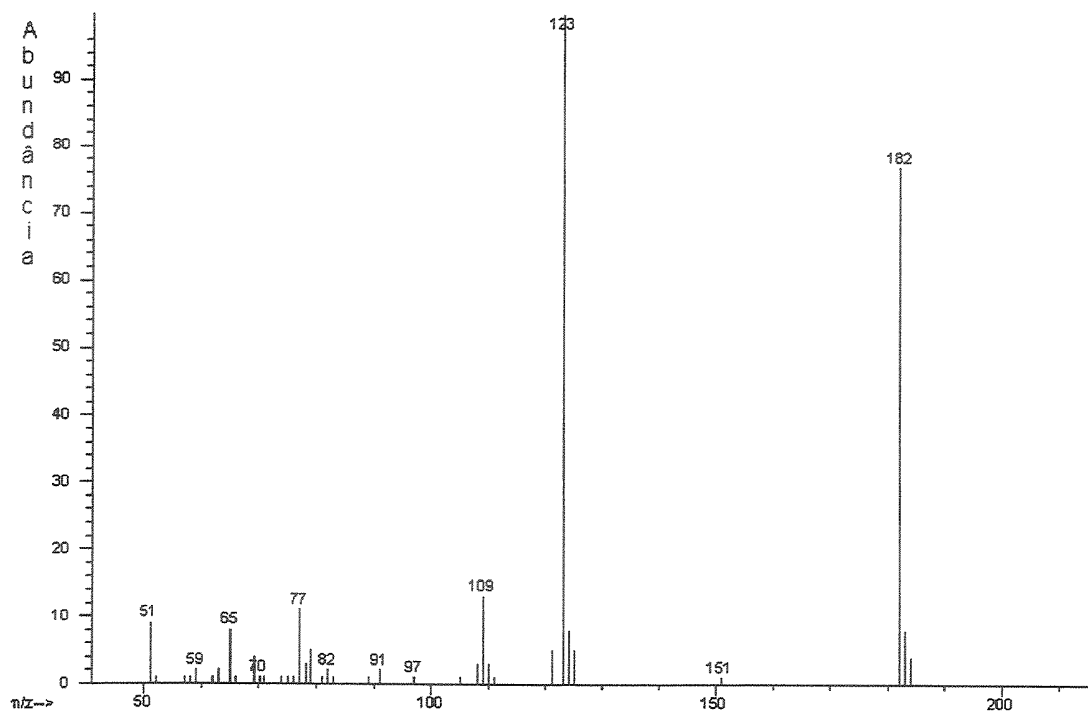
L. Antonio t:0013/CDCl₃ jul13lac02

Pulse Sequence: dept

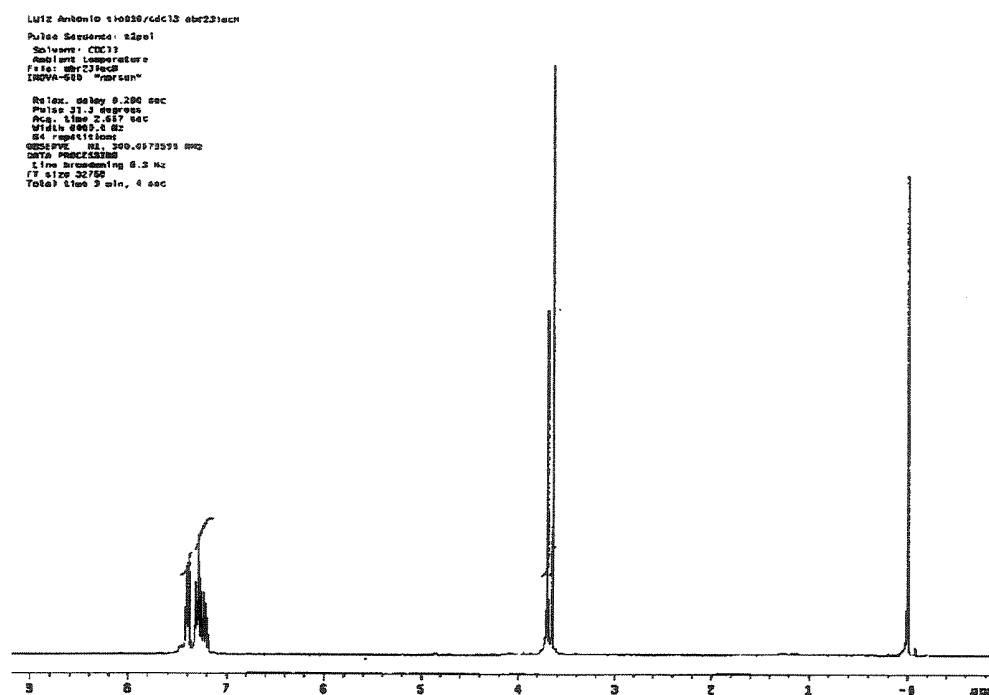


E 15 – Espectro DEPT 90 e 135° (75,45 MHz, CDCl₃) do 3-fenil-sulfinil-1-cicloexanona **129**.

ESPECTROS



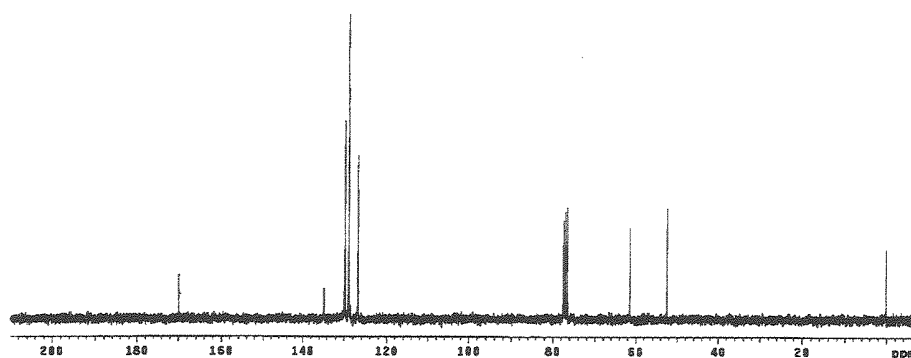
E 16 – Espectro de massas (IE, 70 eV) do 2-tiofenil-acetato de metila 130.



E 17 – Espectro de RMN de ^1H (300,07 MHz, CDCl_3) do 2-tiofenil-acetato de metila 130.

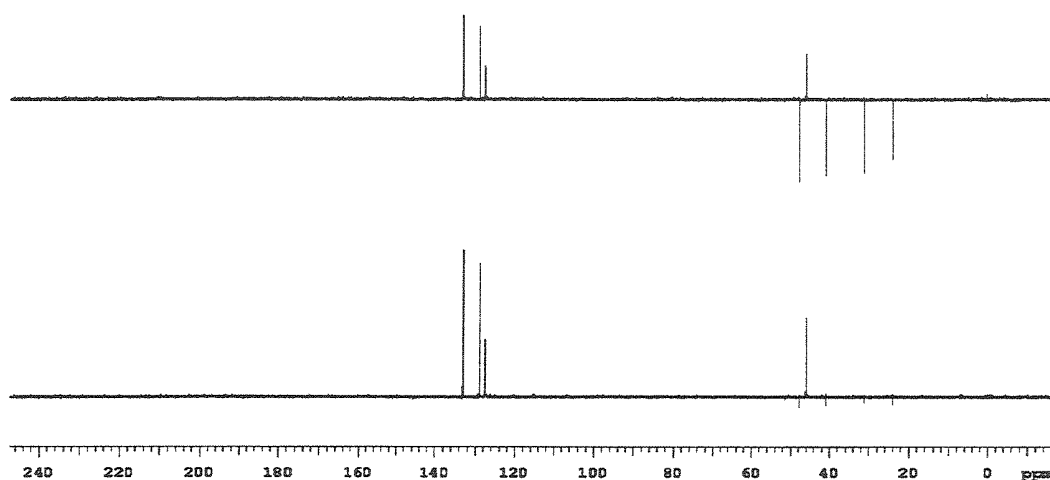
ESPECTROS

Lutz Antonio tio016/ccl3 abr23lacC
Pulse Sequence: zgpg30
Solvent: CDCl3
ambient temperature
File: abr23lacC
INSTRUMENT: spect
Relax. delay 2.500 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 0.050 sec
Width 20000.0 Hz
204 repetitions
OBSERVE C13, 75.4526850 MHz
DECOUPLE H1, 399.008578 MHz
Power 41.00
continuously on
Waltz-16 modulated
DATA PROCESSING
line broadening 1.0 Hz
FT size 32768
Total time 3 hr, 54 min, 4 sec



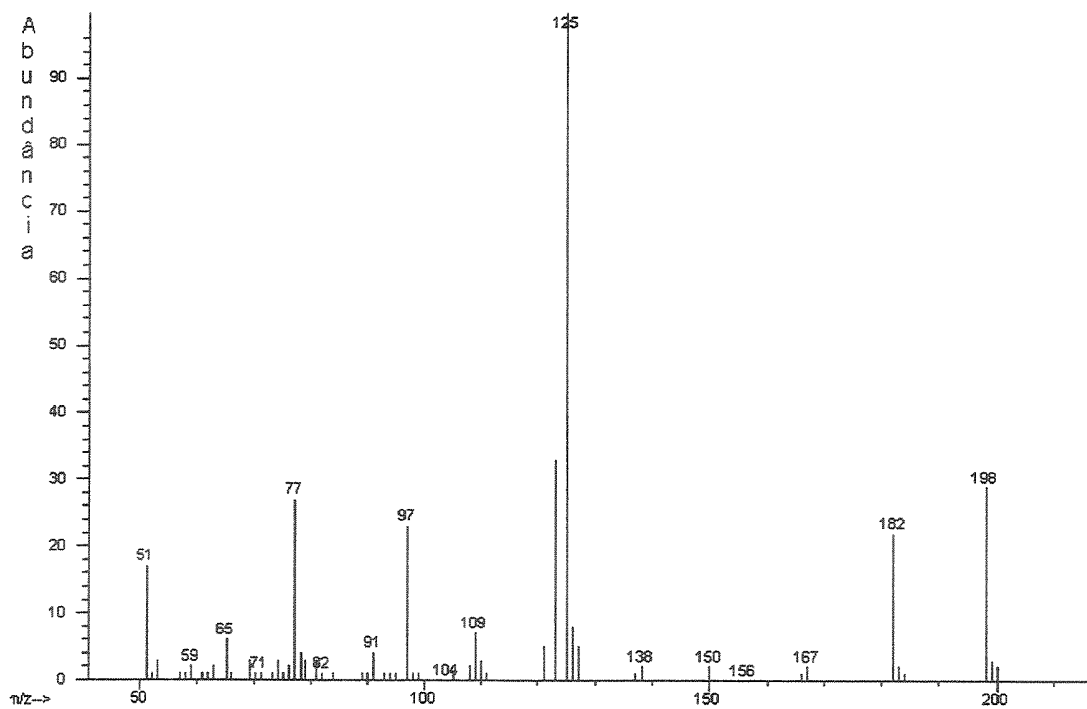
E 18 – Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) do 2-tiofenil-acetato de metila 130.

Lutz tio007/CDCl3 ago14lacD1
Pulse Sequence: dept

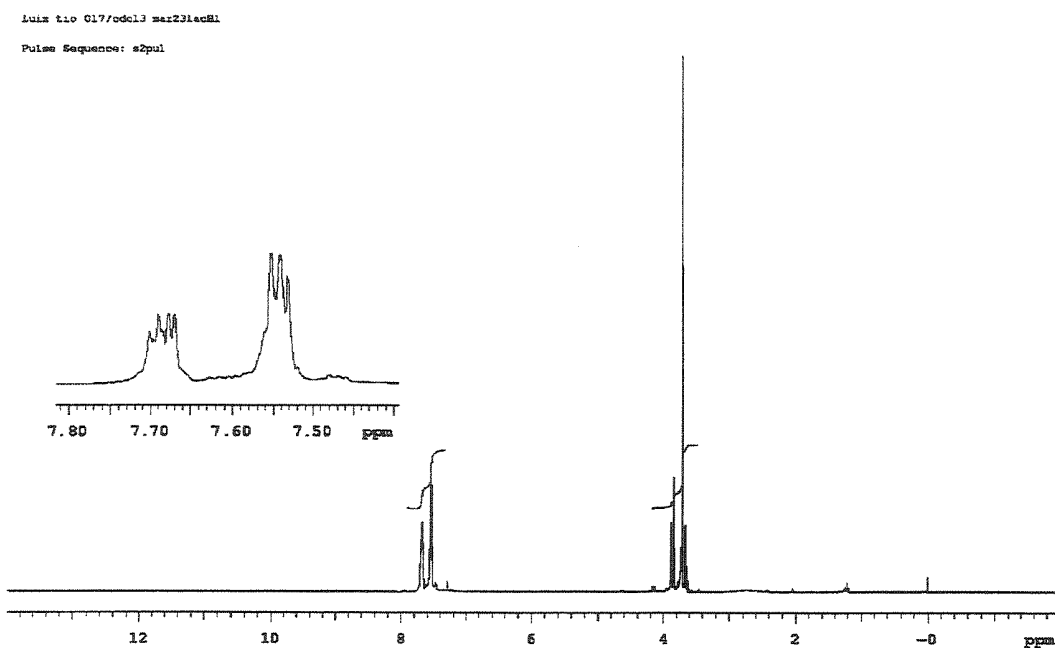


E 19 – Espectro DEPT 90 e 135° (75,45 MHz, CDCl_3) do 2-tiofenil-acetato de metila 130.

ESPECTROS



E 20 – Espectro de massas (IE, 70 eV) do 2-fenil-sulfinil-acetato de metila 131.

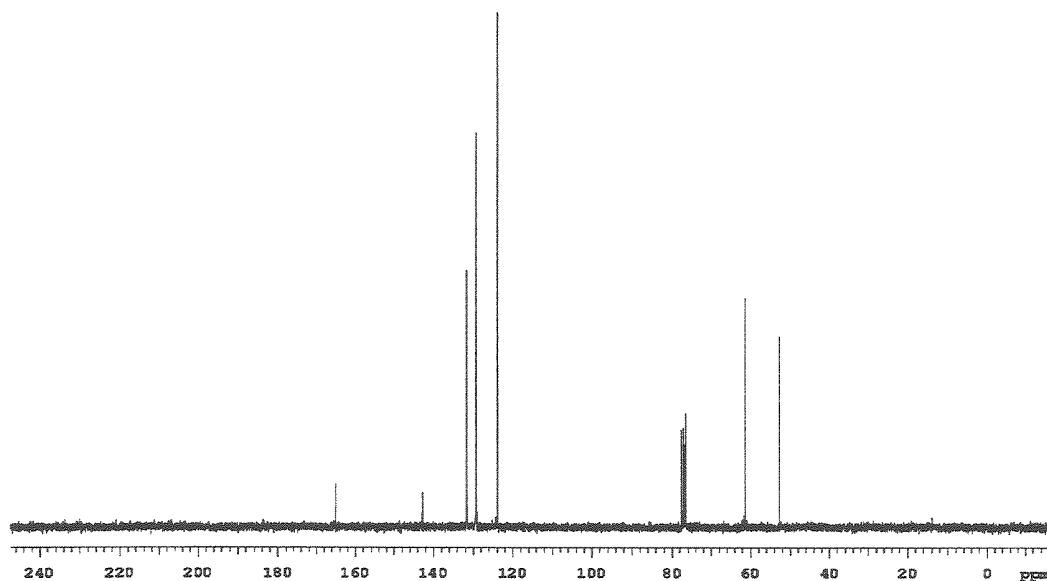


E 21 – Espectro de RMN de ^1H (300,07 MHz, CDCl_3) do 2-fenil-sulfinil-acetato de metila 131.

ESPECTROS

Luis tto 017/cdc13 mar23lac01

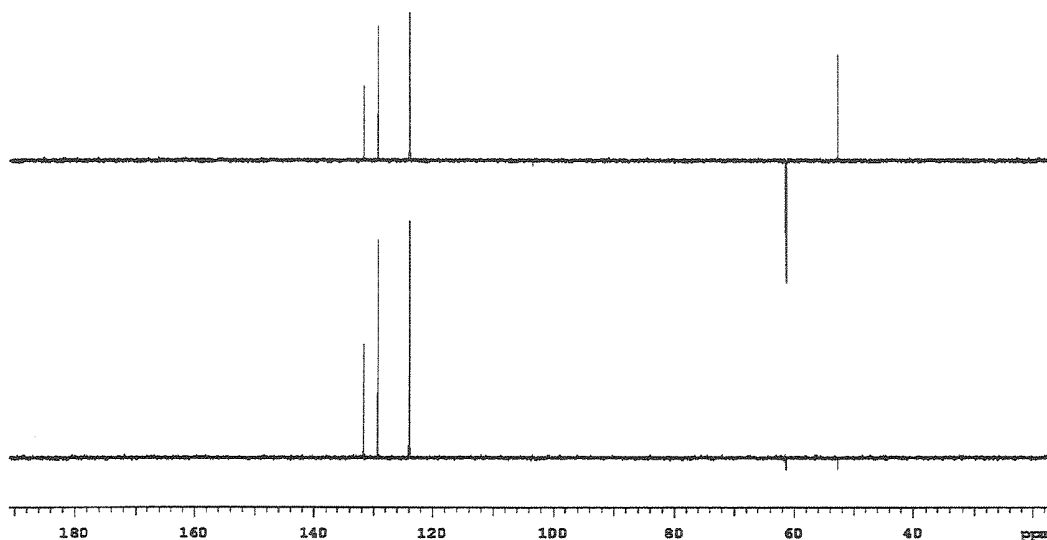
Pulse Sequence: zgpg30



E 22 – Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) do 2-fenil-sulfinil-acetato de metila 131.

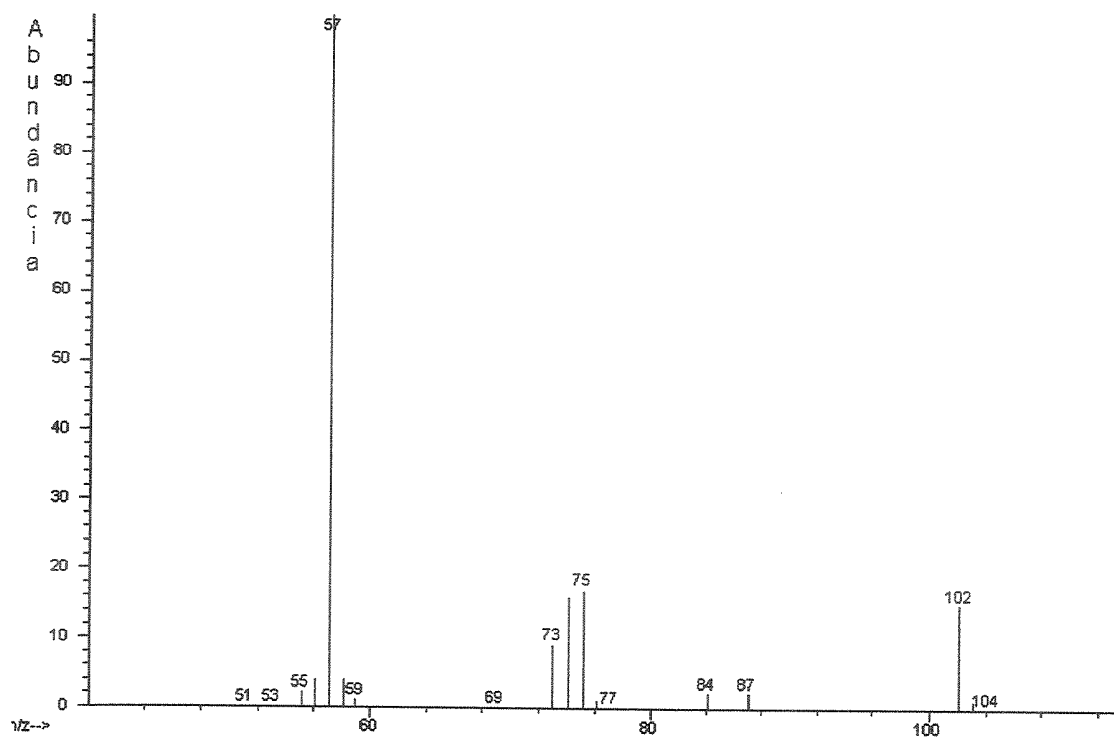
Luis tto 017/cdc13 mar23lac01

Pulse Sequence: dept

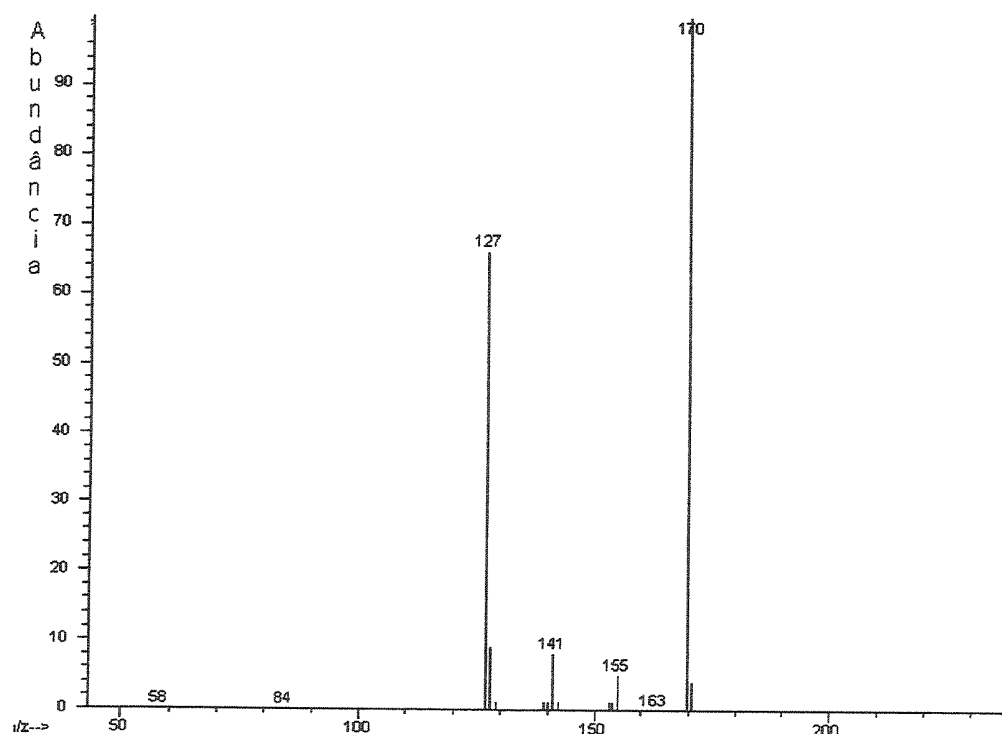


E 23 – Espectro DEPT 90 e 135° (75,45 MHz, CDCl_3) do 2-fenil-sulfinil-acetato de metila 131.

ESPECTROS



E 24 – Espectro de massas (IE, 70 eV) do propionato de etila 155.

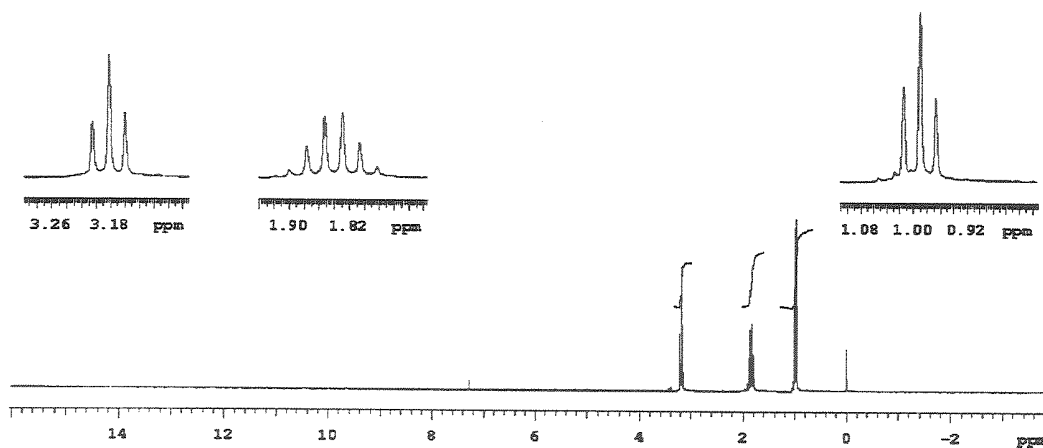


E 25 – Espectro de massas (IE, 70 eV) do iodeto de *n*-propila 157.

ESPECTROS

Luiz Antonio fern003/cdc13 ago23lec92

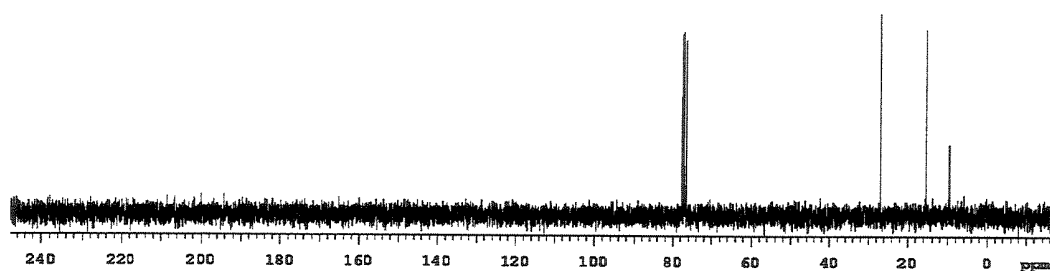
Pulse Sequence: s2pul



E 26 – Espectro de RMN de ¹H (300,07 MHz, CDCl₃) do iodeto de *n*-propila **157**.

Luiz Antonio fern003/cdc13 ago23lec02

Pulse Sequence: s2pul

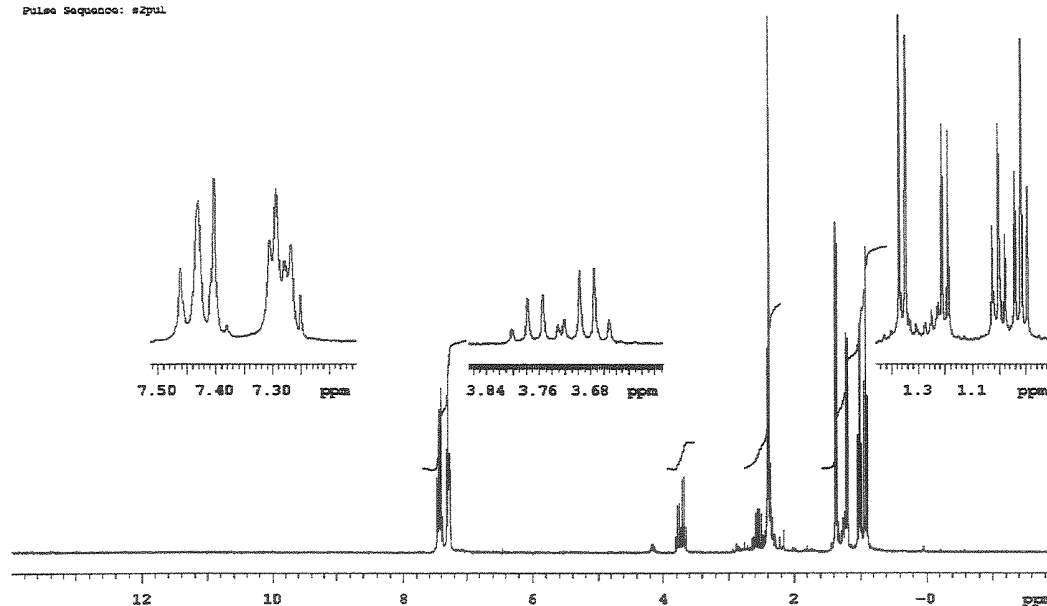


E 27 – Espectro de RMN de ¹³C (75,45 MHz, CDCl₃) do iodeto de *n*-propila **157**.

ESPECTROS

Luiz Antonio LOAS-S jul311acB

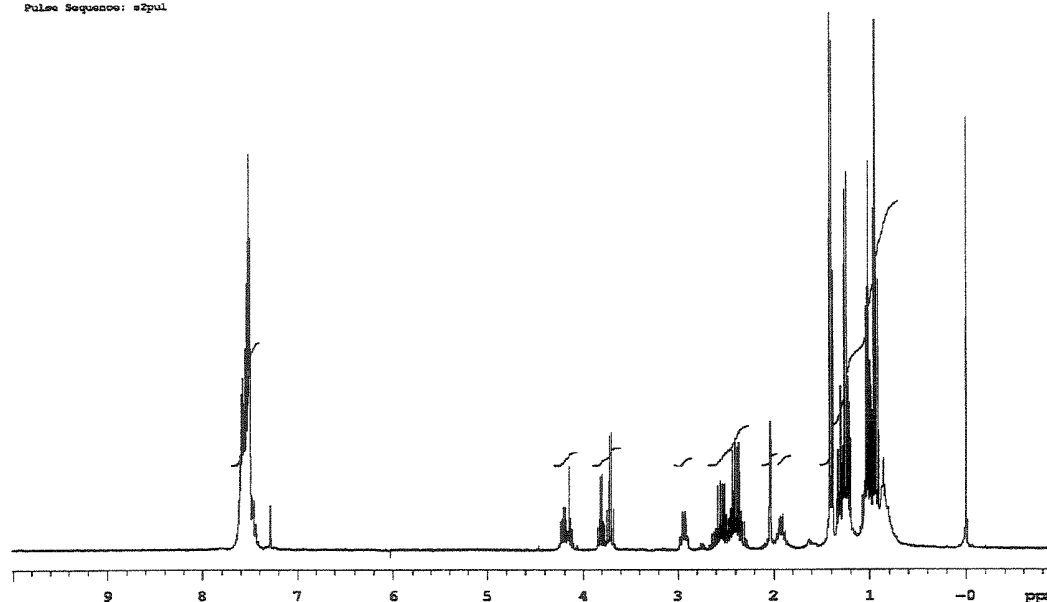
Pulse Sequence: s2pul



E 28 – Espectro de RMN de ^1H (300,07 MHz, CDCl_3) do ($\pm$)-2-fenil-sulfinil-3-pentanona **152a**.

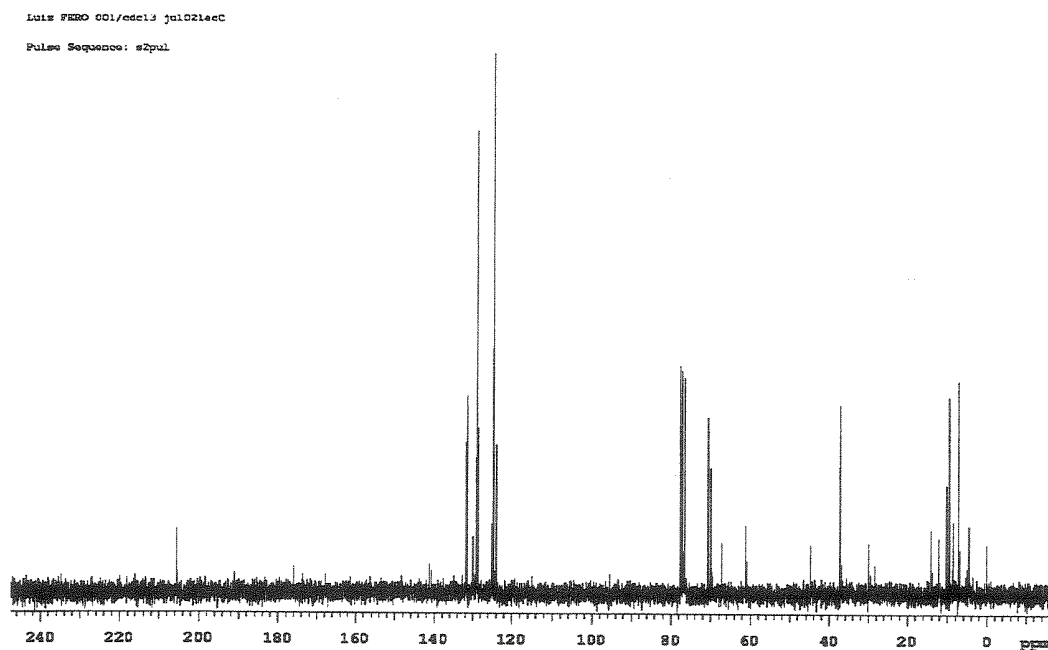
Luiz FERN 001/cdc13 jul021acB

Pulse Sequence: s2pul

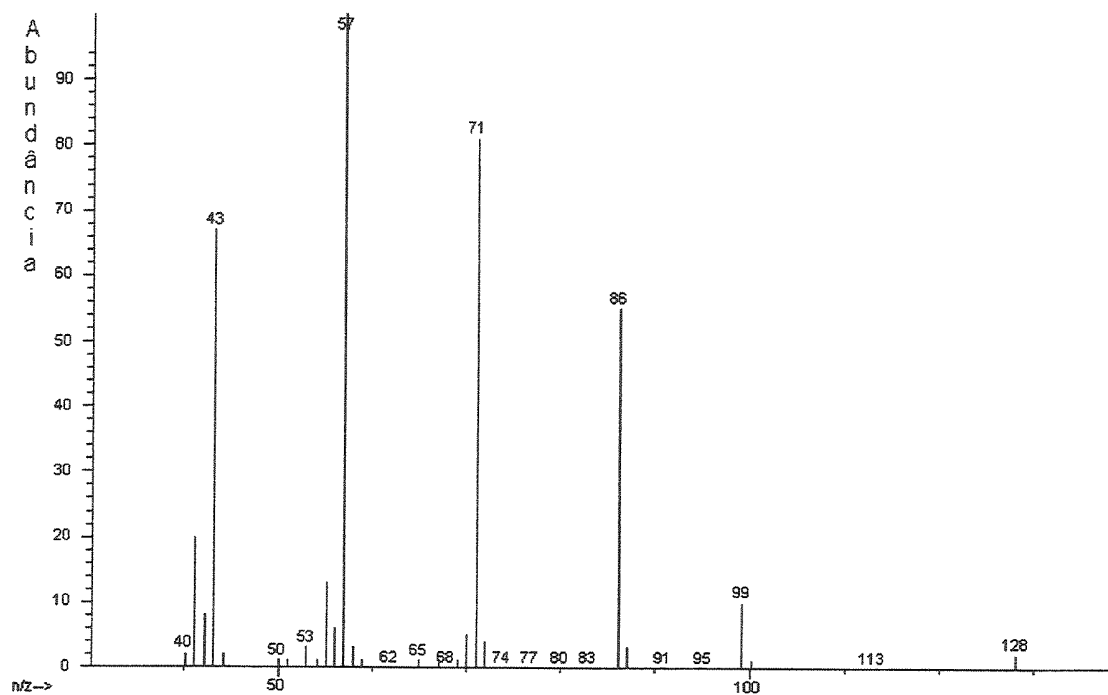


E 29 – Espectro de RMN de ^1H (300,07 MHz, CDCl_3) do ($\pm$)-4-metil-4-fenil-sulfinil-3-heptanona **147a**.

ESPECTROS

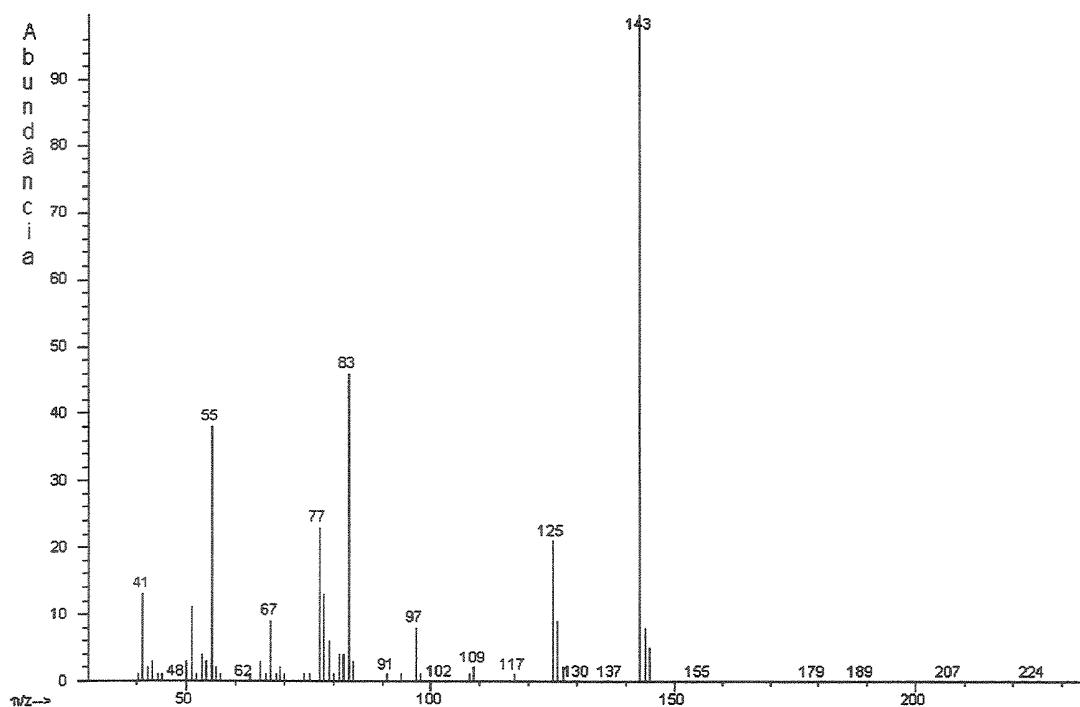


E 30 – Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) do (±)-4-metil-4-fenil-sulfinil-3-heptanona **147a**.

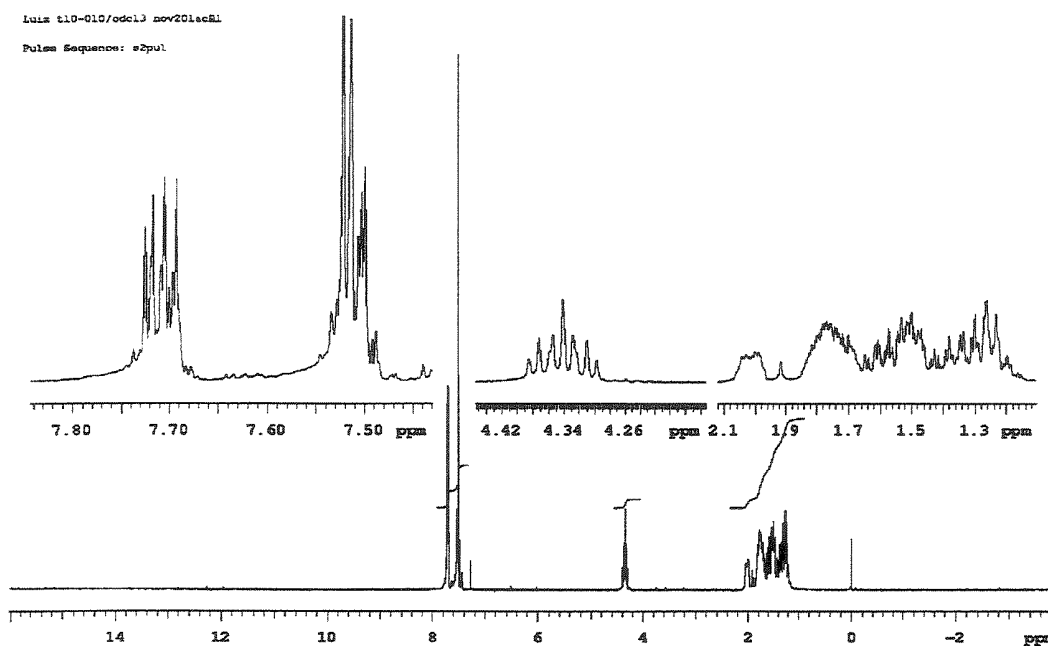


E 31 – Espectro de massas (IE, 70 eV) do (±)-4-metil-3-heptanona **141**.

ESPECTROS



E 32 – Espectro de massas (IE, 70 eV) do (±)-benzenossulfinato de cicloexila 158.

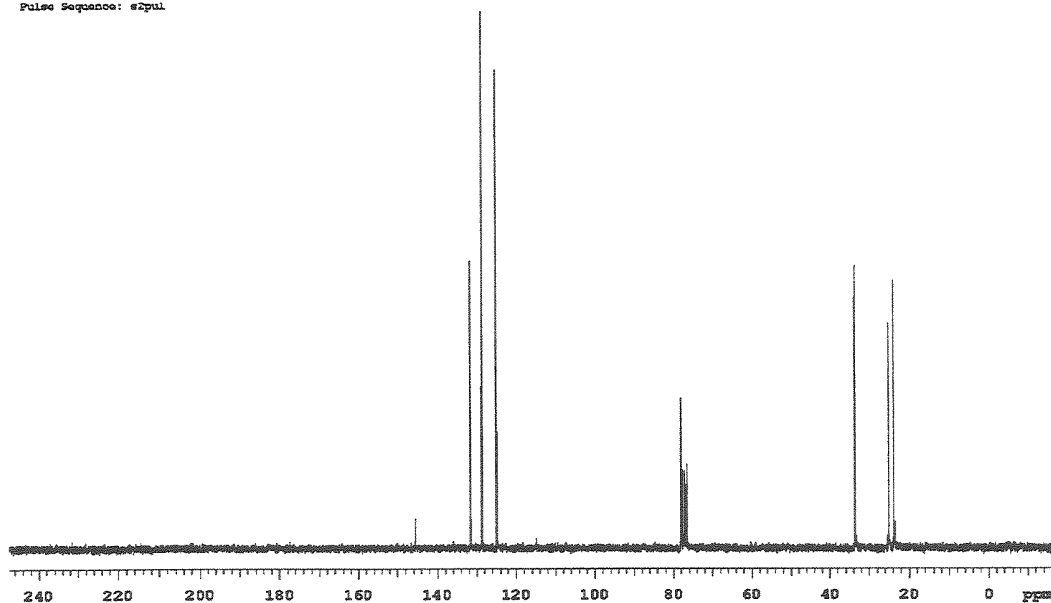


E 33 – Espectro de RMN de ¹H (300,07 MHz, CDCl₃) do (±)-benzenossulfinato de cicloexila 158.

ESPECTROS

Luiz t10-010/cdc13 nov201ac01

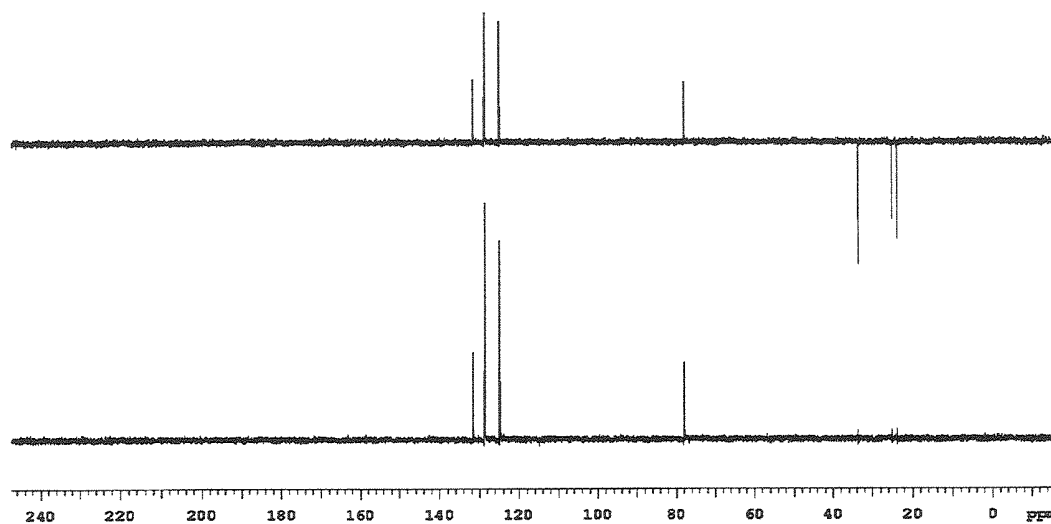
Pulse Sequence: s2pul



E 34 – Espectro de RMN de ¹³C (75,45 MHz, CDCl₃) do (±)-benzenossulfonato de cicloexila 158.

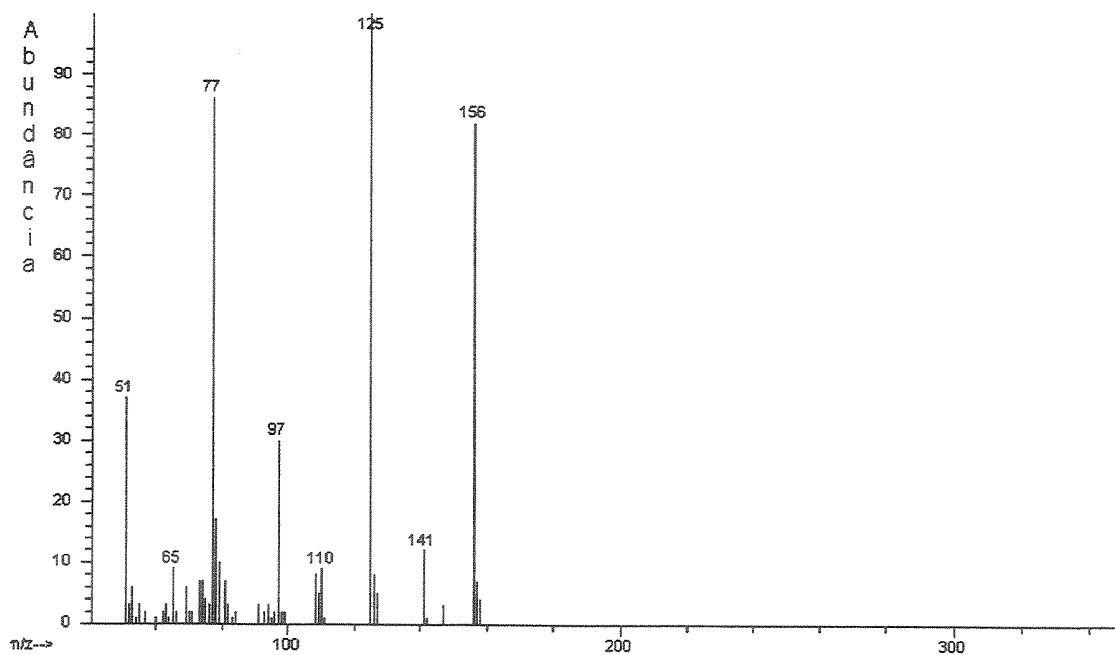
Luiz t10-010/cdc13 nov201ac01

Pulse Sequence: dept

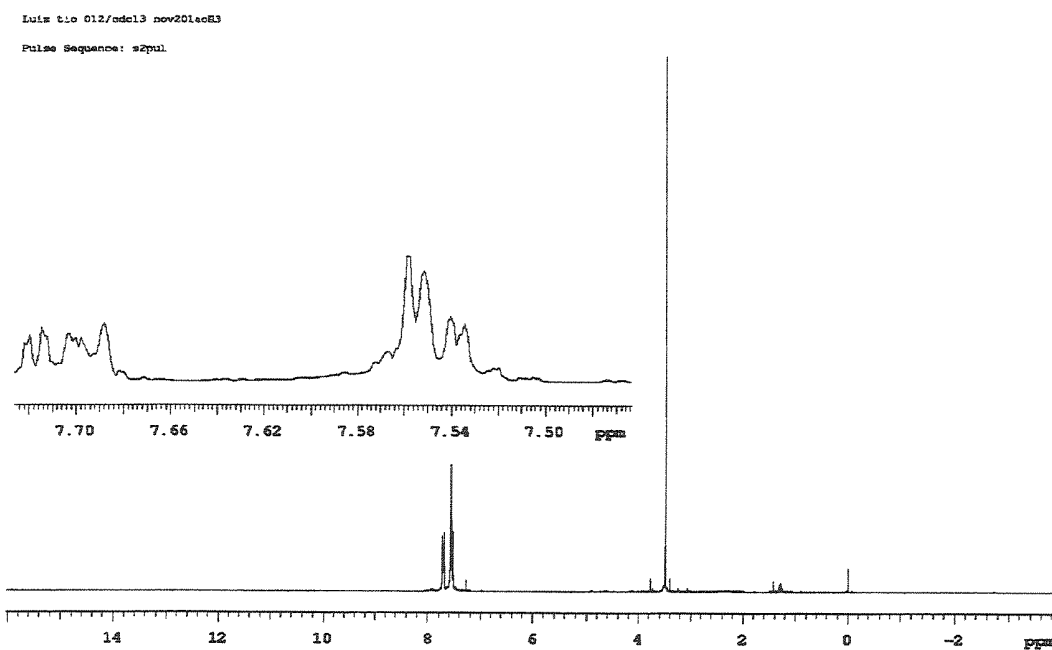


E 35 – Espectro DEPT 90 e 135° (75,45 MHz, CDCl₃) do (±)-benzenossulfonato de cicloexila 158.

ESPECTROS



E 36 – Espectro de massas (IE, 70 eV) do (±)-benzenossulfonato de metila **159**.

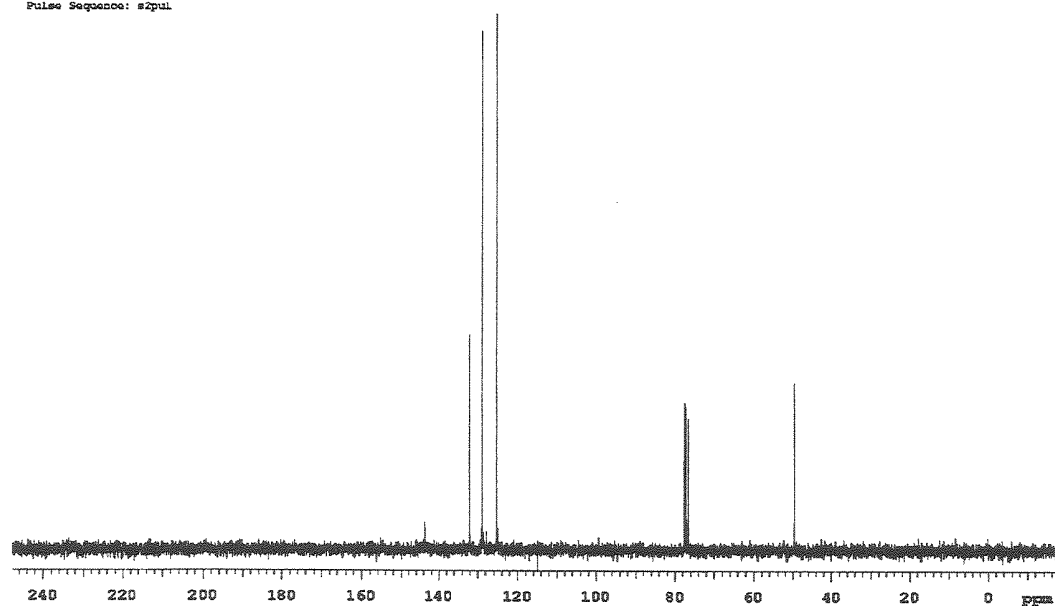


E 37 – Espectro de RMN de ¹H (300,07 MHz, CDCl₃) do (±)-benzenossulfonato de metila **159**.

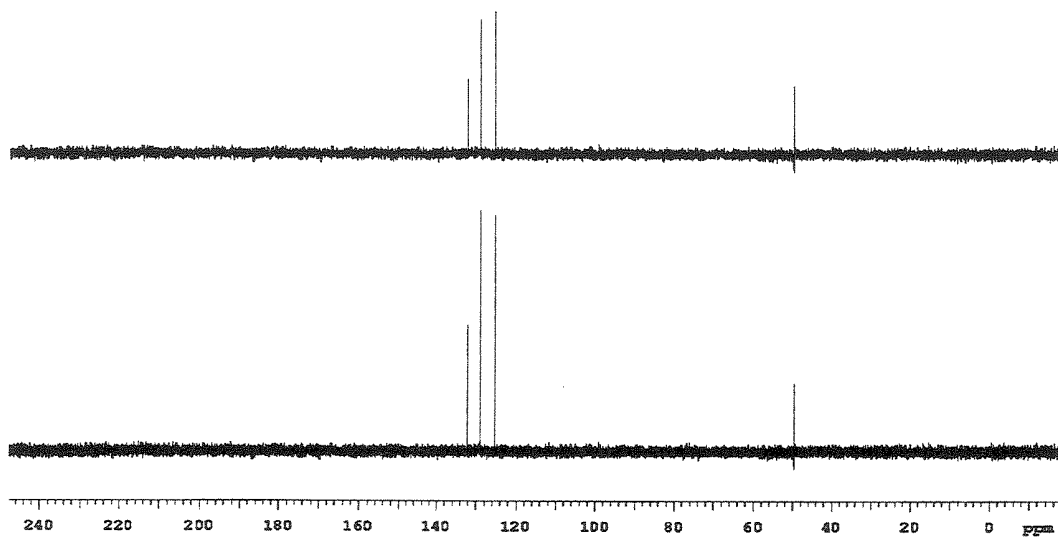
ESPECTROS

Luiz tio 012/cdc13 nov201ac03

Pulse Sequence: s2pul

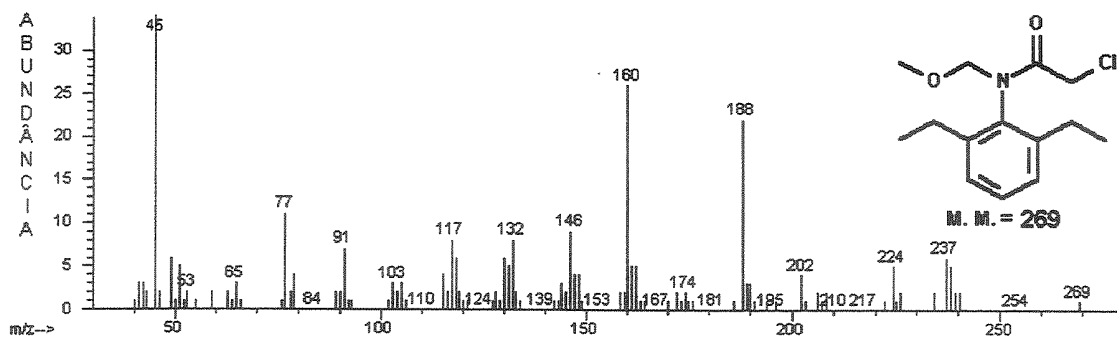


E 38 – Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) do ($\pm$)-benzenossulfinato de metila 159.

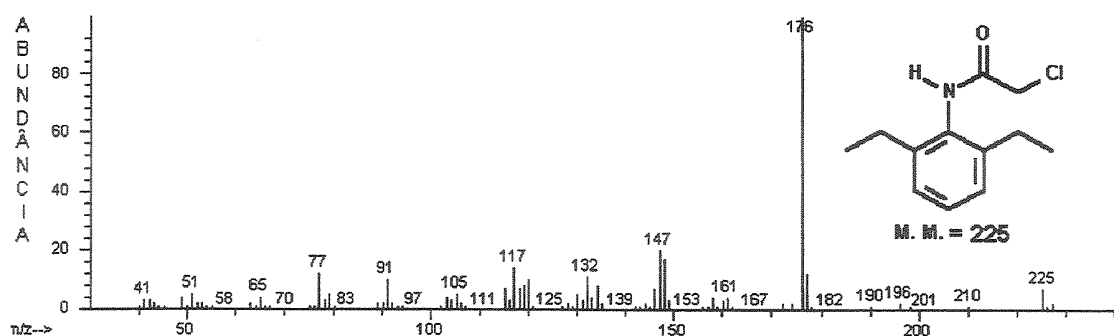


E 39 – Espectro DEPT 90 e 135° (75,45 MHz, CDCl_3) do ($\pm$)-benzenossulfinato de metila 159.

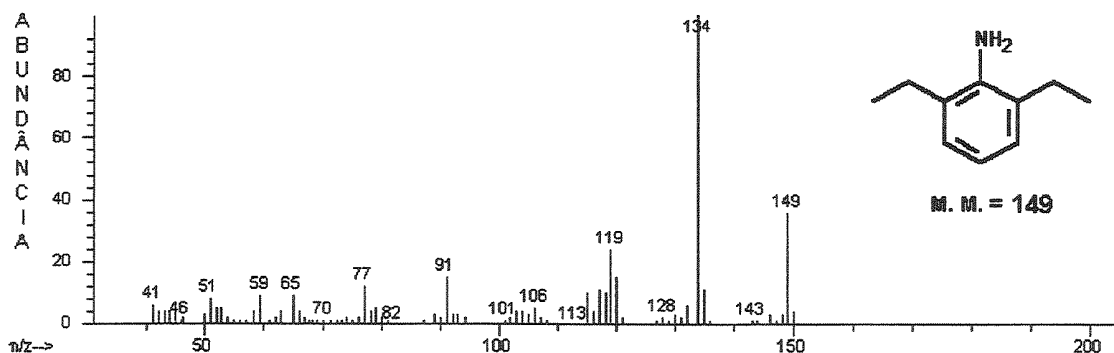
ESPECTROS



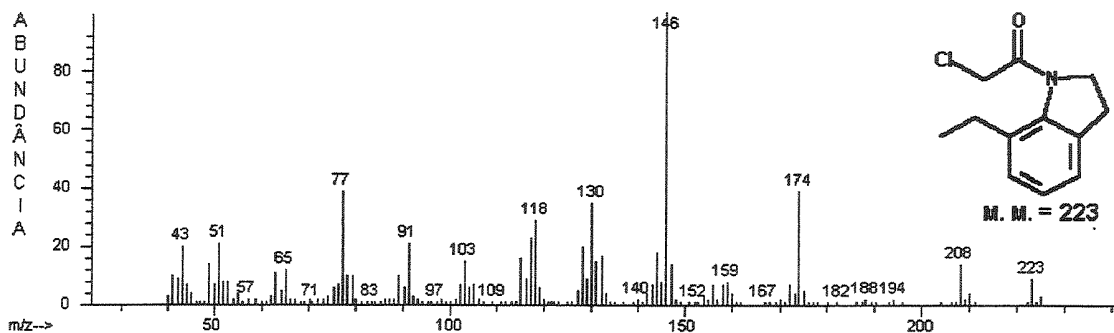
E 40 – Espectro de massas (IE, 70 eV) do Alachlor 167.



E 41 – Espectro de massas (IE, 70 eV) do 2-cloro-2',6'-dietilacetanilida 168.

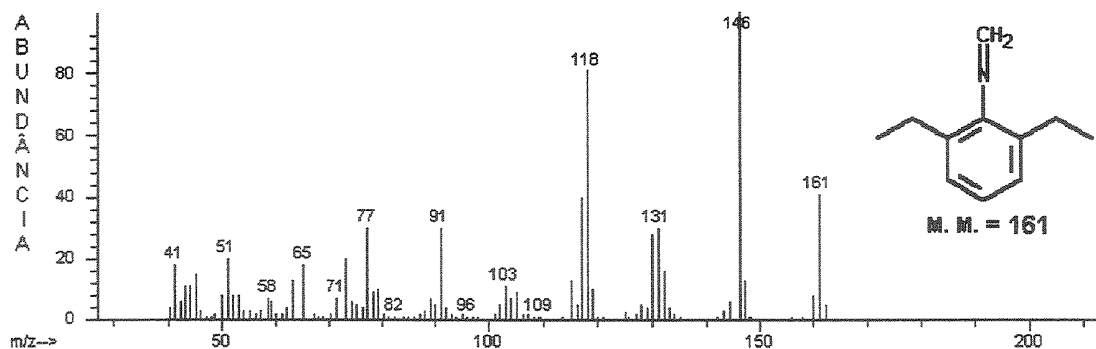


E 42 – Espectro de massas (IE, 70 eV) do 2,6-dietanilina 170.

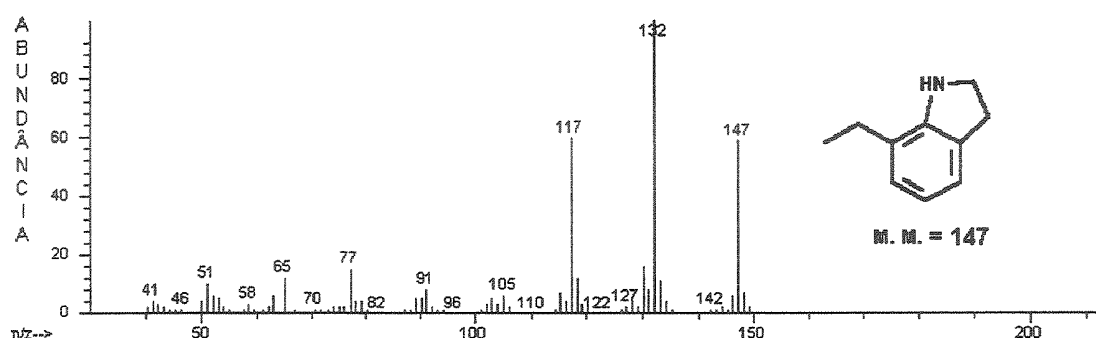


E 43 – Espectro de massas (IE, 70 eV) do 1-cloroacetil-2,3-diidro-7-etilindol 171.

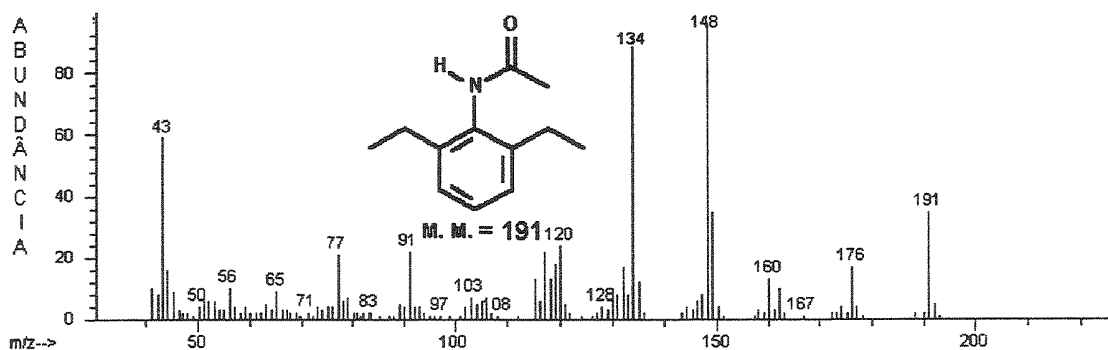
ESPECTROS



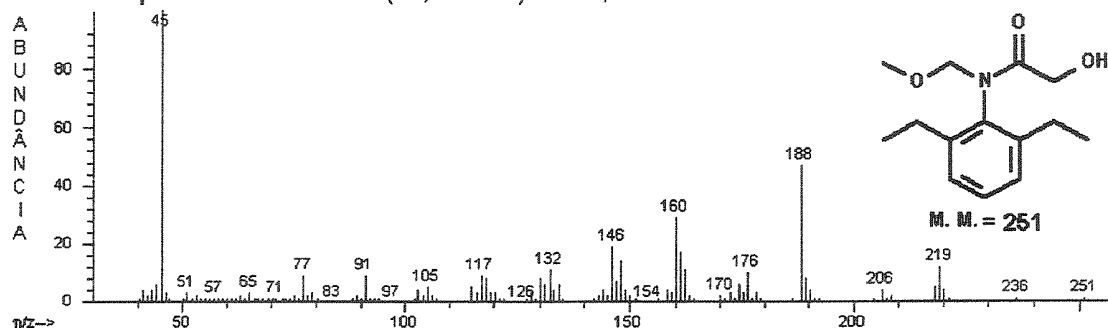
E 44 – Espectro de massas (IE, 70 eV) do *N*-(2',6'-dietil-fenil)-metil-eneamina 172.



E 45 – Espectro de massas (IE, 70 eV) do 7-etil-indol 173.

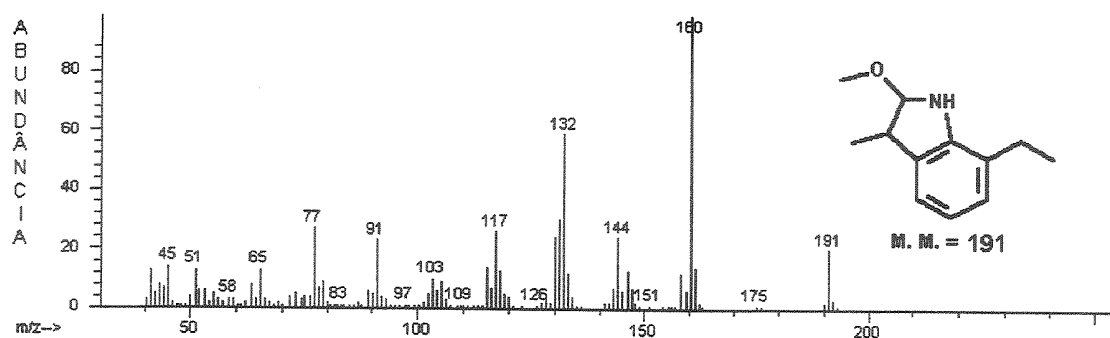


E 46 – Espectro de massas (IE, 70 eV) do 2',6'-dietil-acetanilida 175.

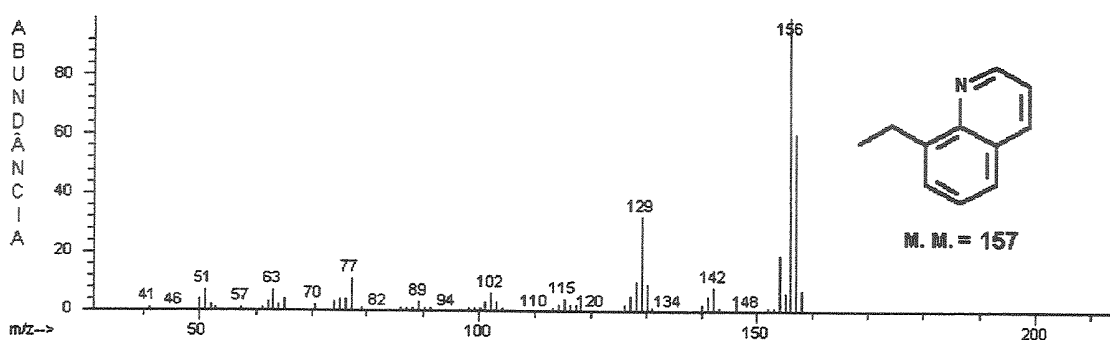


E 47 – Espectro de massas (IE, 70 eV) do 2-hidroxi-2',6'-dietil-*N*-(metoxi-metil)-acetanilida 181.

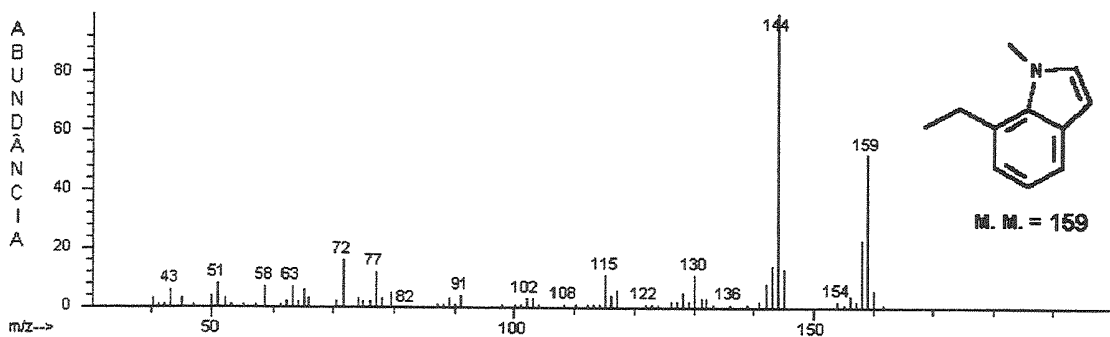
ESPECTROS



E 48 – Espectro de massas (IE, 70 eV) do 7-etil-2-metoxi-3-metil-indol 192.

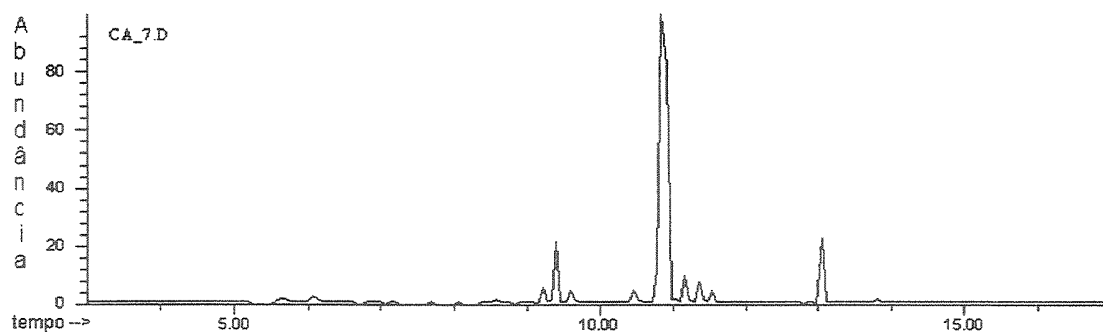


E 49 – Espectro de massas (IE, 70 eV) do 7-etilquinolina 193.

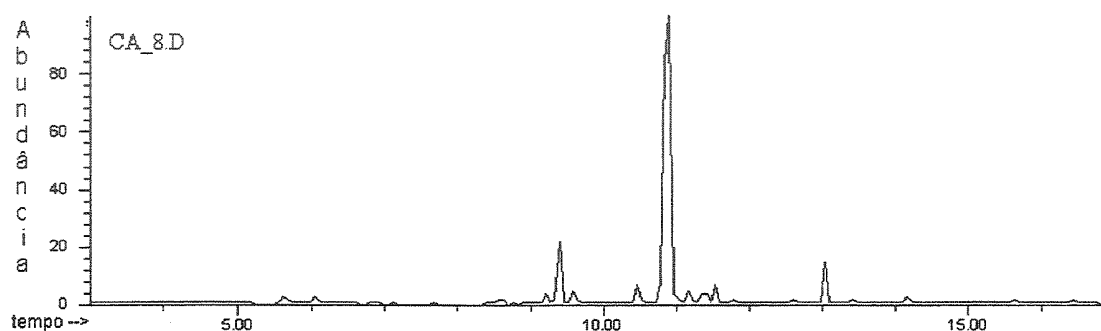


E 50 – Espectro de massas (IE, 70 eV) do 7-etil-N-metil-indol 194.

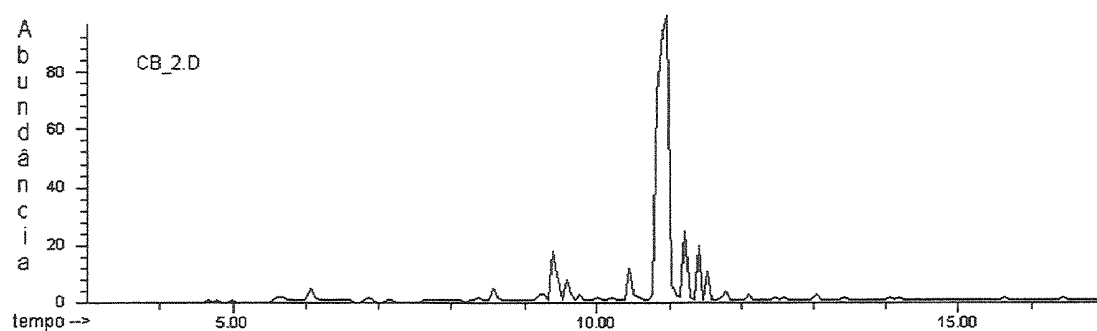
CROMATOGRAMAS



C 23 – Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He, 10 psi) da amostra controle CAH A7.

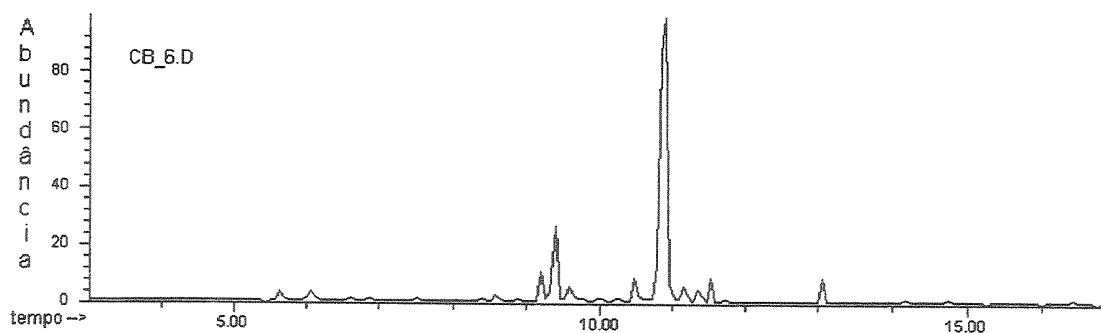


C 24 – Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He, 10 psi) da amostra controle CAH A8.

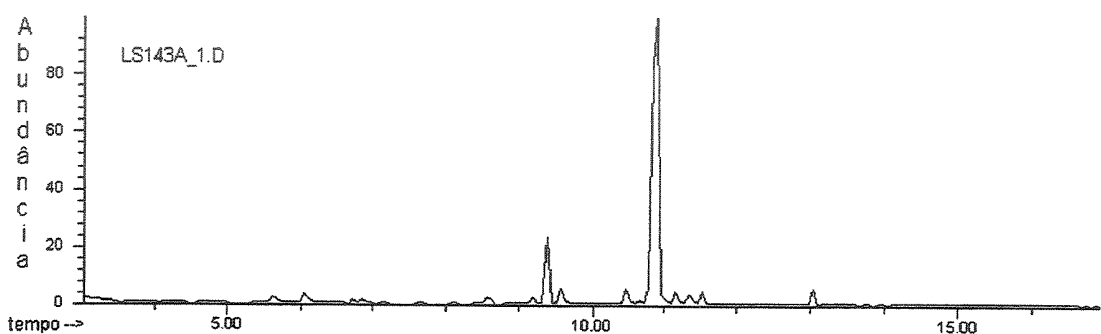


C 25 – Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He, 10 psi) da amostra controle CAH B2.

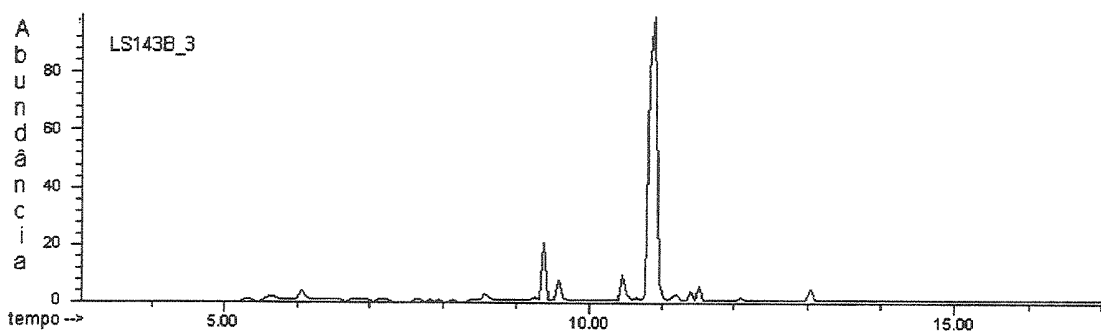
CROMATOGRAMAS



C 26 – Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He, 10 psi) da amostra controle CAH B6.

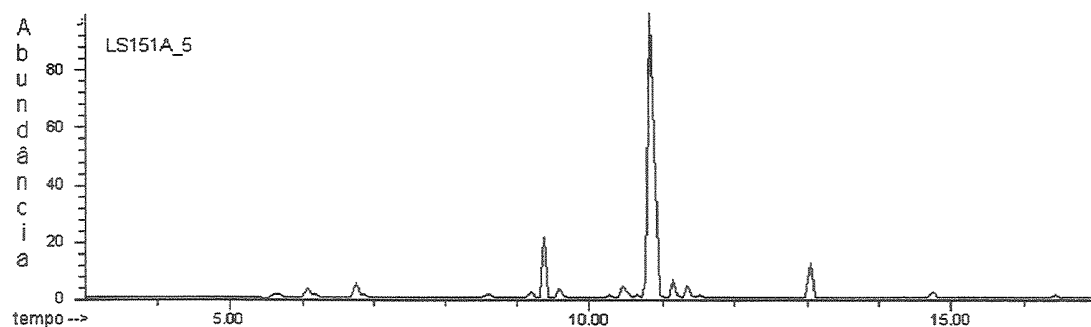


C 27 – Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He, 10 psi) da amostra AHLS143A.

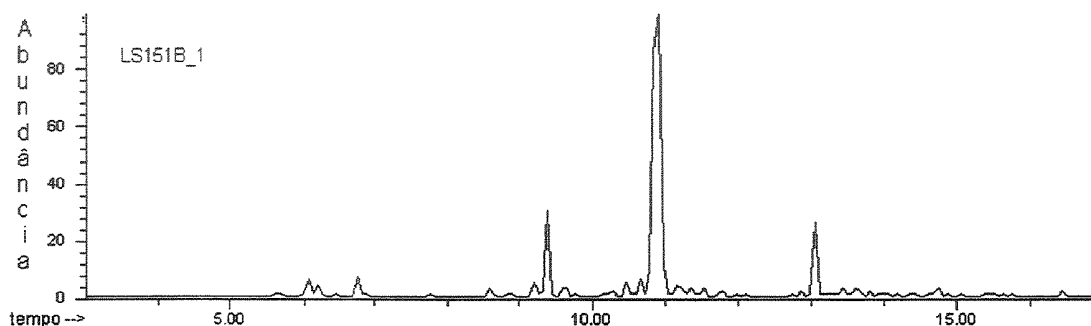


C 28 – Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He, 10 psi) da amostra AHLS143B.

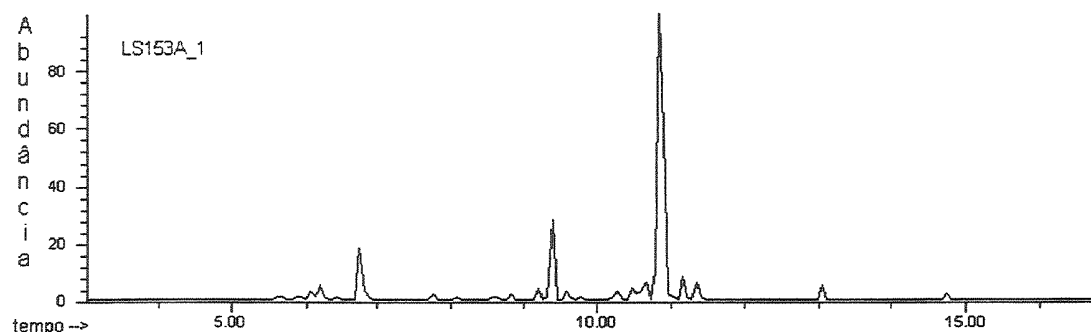
CROMATOGRAMAS



C 29 – Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He, 10 psi) da amostra AHLS151A.

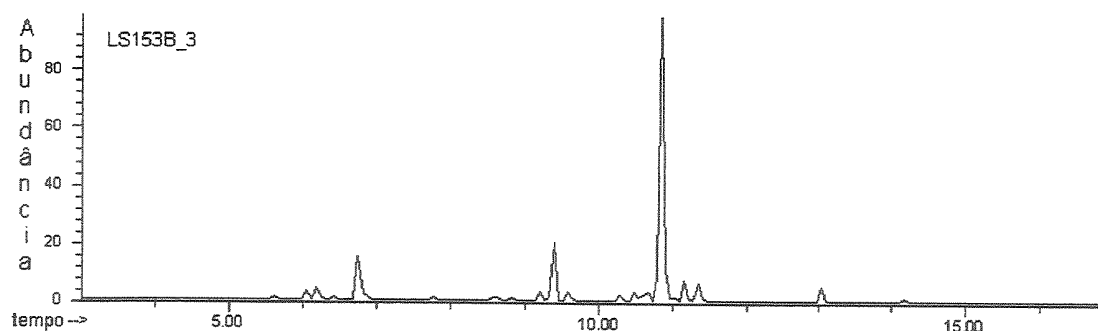


C 30 – Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He, 10 psi) da amostra AHLS151B.

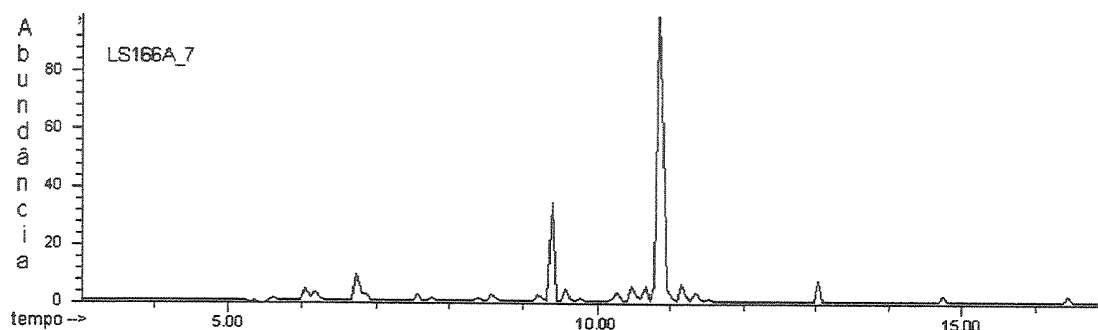


C 31 – Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He, 10 psi) da amostra AHLS153A.

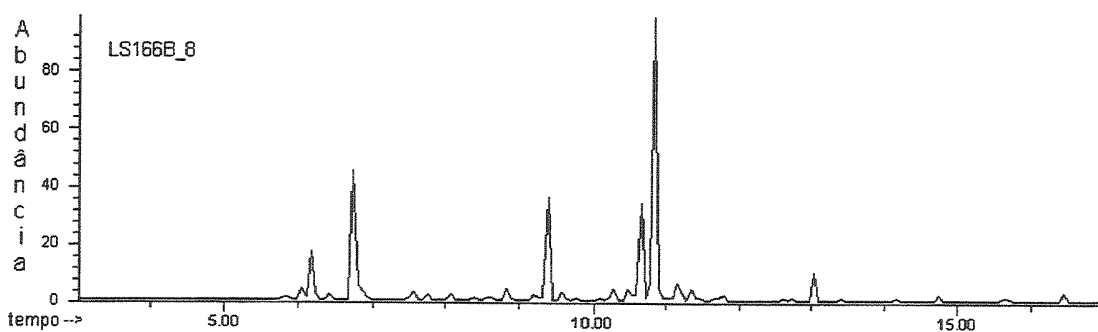
CROMATOGRAMAS



C 32 – Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He, 10 psi) da amostra AHLS153B.

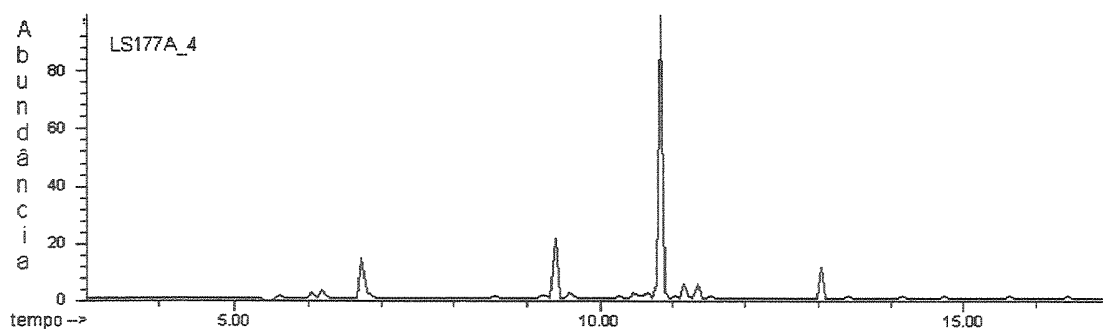


C 33 – Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He, 10 psi) da amostra AHLS166A.

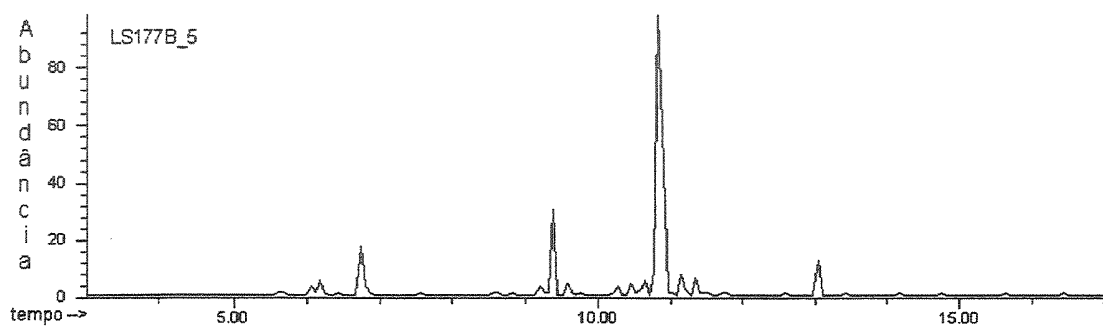


C 34 – Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He, 10 psi) da amostra AHLS166B.

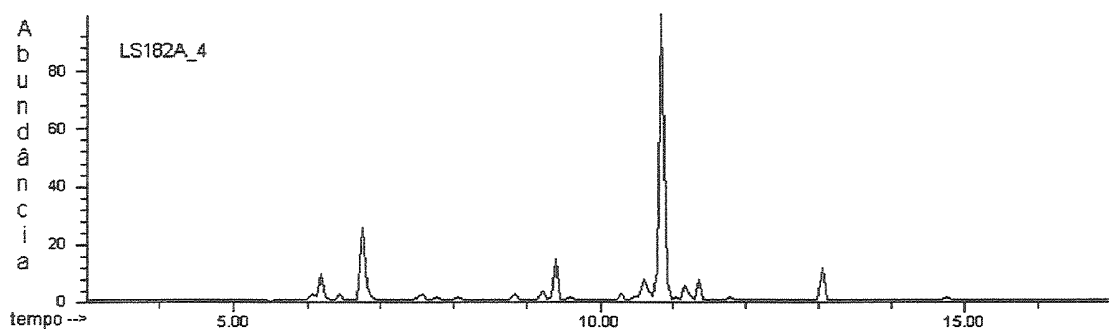
CROMATOGRAMAS



C 35 – Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He, 10 psi) da amostra AHLS177A.

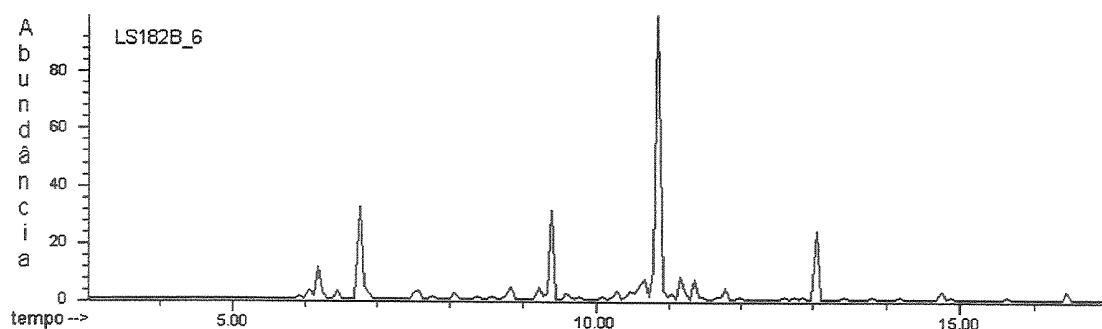


C 36 – Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He, 10 psi) da amostra AHLS177B.

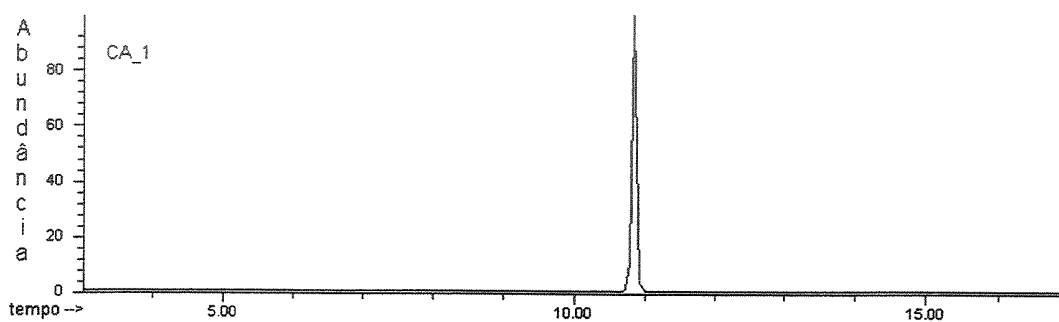


C 37 – Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He, 10 psi) da amostra AHLS182A.

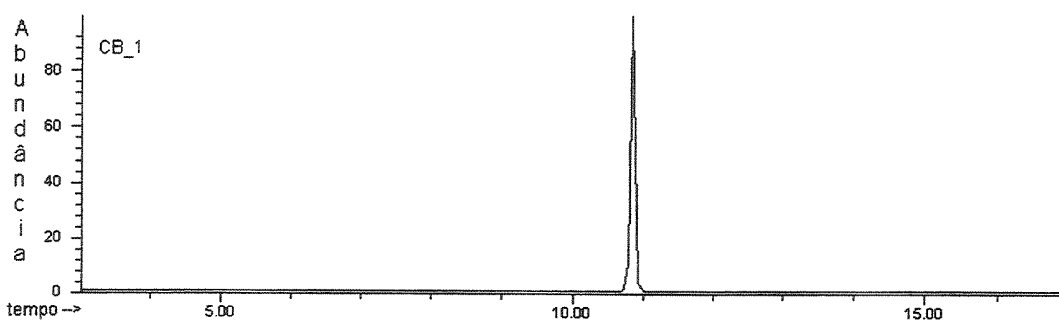
CROMATOGRAMAS



C 38 – Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He,10 psi) da amostra AHLS182B.

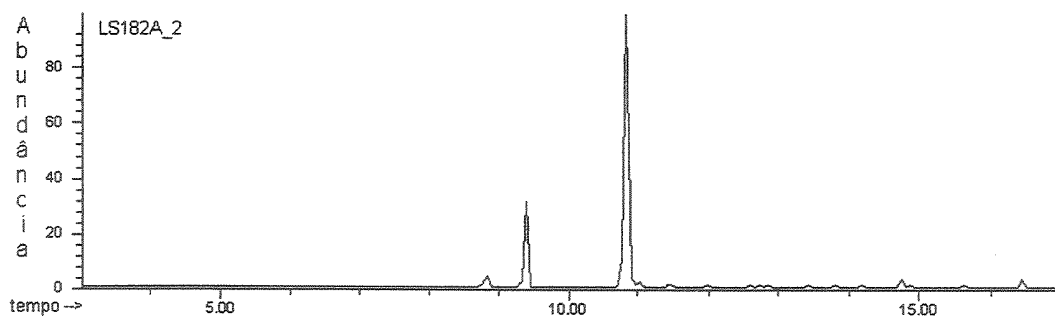


C 40 – Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He,10 psi) da amostra CA_1.

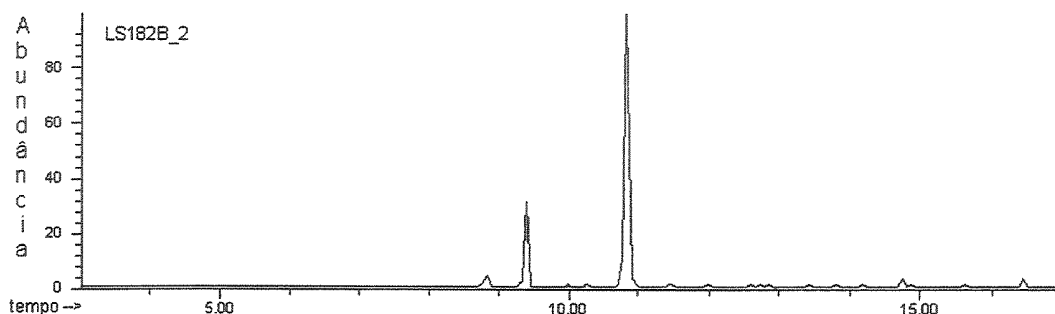


C 41 – Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He,10 psi) da amostra CB_1.

CROMATOGRAMAS



C 42 – Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He, 10 psi) da amostra ALS182A.



C 43 – Cromatogramas de íons totais (CG-EM) equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m), energia de ionização 70 eV, detector 280 °C, injetor 220 °C, gás de arraste (He, 10 psi) da amostra AHLS182B.

ANEXO 2

Código de depósito	Informações da linhagem
CBMAI 0001	Sette, L.D.; LS 143 (=DSM 41805). Depositado por: Lara Durães Sette, CPQBA/UNICAMP. Recebido como: <i>Streptomyces sp.</i> Isolado de: Solo contaminado com herbicida Alachlor. Isolado por Lara Durães Sette, em 1998 (solo de jardim, Campinas SP Brasil). Degradação de herbicida Alachlor Produção de pigmento difusível, coloração: amarelo-marrom; produção de melanina (em ISP 6 e ISP 7); coloração do micélio: marrom; coloração dos esporos: cinza, branco e verde; ornamentação dos esporos: liso; morf. de cadeia de esporos: rectiflexível [Sequência 16S e árvore filogenética] Condições de cultivo: [Oat Agar] 30°C Tempo de incubação: 7 dias pH: 7,2 Riscos e restrições: I.. Referências taxionômicas: Shirling EB;Gottlieb D; Methods for characterization os <i>Streptomyces</i> species. 1996.
CBMAI 0002	Sette, L.D.; LS151 (=DSM 41806). Depositado por: Lara Durães Sette, CPQBA/UNICAMP. Recebido como: <i>Streptomyces sp.</i> Isolado de: Solo contaminado com herbicida Alachlor. Isolado por Lara Durães Sette, em 1998 (solo de jardim, Campinas SP Brasil). Degradação de herbicida AlachlorProdução de pigmento difusível: ausente; produção de melanina (em OA); coloração do micélio: marrom; coloração dos esporos: cinza, amarelo e branco; ornamentação dos esporos: espinhoso; morfologia de cadeia de esporos: espiral [Sequência 16S e árvore filogenética] Condições de cultivo: [Oat Agar] 30°C Tempo de incubação: 7 dias pH: 7,2 Imagens: [Microscopia eletrônica de varredura][Microscopia eletrônica de varredura][Microscopia otica][Placa de petri] Riscos e restrições: I.. Referências taxionômicas: Shirling EB;Gottlieb D; Methods for characterization os <i>Streptomyces</i> species. 1996.
CBMAI 0003	Sette, L.D.; LS 153 (=DSM 41807). Depositado por: Lara Durães Sette, CPQBA/UNICAMP. Recebido como: <i>Streptomyces sp</i> Isolado de: Solo contaminado com herbicida Alachlor. Isolado por Lara Durães Sette, em 1998 (solo de jardim, Campinas SP Brasil). Degradação de herbicida AlachlorProdução de pigmento difusível, coloração: amarelo-marrom; produção de melanina (em OA); coloração do micélio: marrom; coloração dos esporos: cinza, branco e verde; ornamentação dos esporos: liso; morfologia de cadeia de esporos: rectiflexível [Sequência 16S e árvore filogenética] Condições de cultivo: [Oat Agar] 28°C Tempo de incubação: 7 dias pH: 7,2 Riscos e restrições: I.. Referências taxionômicas: Shirling EB;Gottlieb D; Methods for characterization os <i>Streptomyces</i> species. 1996.

ANEXO 2

Código de depósito	Informações da linhagem
CBMAI 0004	< Sette, L.D.; LS166 (=DSM 41808). Depositado por: Lara Durães Sette, CPQBA/UNICAMP. Recebido como: <i>Streptomyces sp.</i> Isolado de: Solo contaminado com herbicida Alachlor. Isolado por Lara Durães Sette, em 1998 (solo de jardim, Campinas SP Brasil). degradação herbicida Alachlor; produção de antibióticoProdução de pigmento difusível, coloração:amarelo-marrom e violeta; produção de melanina (em OA); coloração do micélio:violeta; coloração dos esporos:amarelo, branco e verde; ornamentação dos esporos:liso; morfologia de cadeia de esporos:rectilflexível [Sequência 16S e árvore filogenética] Condições de cultivo: [Oat Agar] 30°C Tempo de incubação: 7 dias Riscos e restrições: I.. Referências taxionômicas: Shirling EB;Gottlieb D; Methods for characterization os Streptomyces species. 1996.
CBMAI 0005	Sette, L.D.; LS 177 (=DSM 41809). Depositado por: Lara Durães Sette, CPQBA/UNICAMP. Recebido como: <i>Streptomyces sp</i> Isolado de: Solo contaminado com herbicida Alachlor. Isolado por Lara Durães Sette, em 1998 (solo de jardim, Campinas SP Brasil). Produz antibiótico; Degrada herbicida Alachlor Produção de pigmento difusível, coloração:amarelo-marrom e violeta; produção de melanina (em OA); coloração do micélio:violeta; coloração dos esporos:amarelo, branco e verde; ornamentação dos esporos:liso; morfologia de cadeia de esporos:rectilflexível Condições de cultivo: [Oat Agar] 30°C Tempo de incubação: 7 dias Riscos e restrições: I.. Referências taxionômicas: Shirling EB;Gottlieb D; Methods for characterization os Streptomyces species. 1996.
CBMAI 0006	Sette, L.D.; LS182 (=DSM 41810). Depositado por: Lara Durães Sette, CPQBA/UNICAMP. Recebido como: <i>Streptomyces sp.</i> Isolado de: Solo contaminado com herbicida Alachlor. Isolado por Lara Durães Sette em 1998 (solo de jardim, Campinas SP Brasil). Produção de antibiótico; degrada herbicida Alachlor. Produção de pigmento difusível, coloração:amarelo-marrom e violeta; produção de melanina; coloração do micélio:violeta; coloração dos esporos:amarelo, branco e verde; ornamentação dos esporos: liso; morfologia de cadeia de esporos: rectilflexível [Sequência 16S e árvore filogenética] Condições de cultivo: [Oat Agar] 30°C Tempo de incubação: 7 dias Riscos e restrições: I.. Referências taxionômicas: Shirling EB;Gottlieb D; Methods for characterization os Streptomyces species. 1996.

ANEXO 2

Código de depósito	Informações da linhagem
CBMAI 0205	não catalogado
CBMAI 0207	não catalogado
CBMAI 0208	não catalogado
CBMAI 0209	não catalogado
CBMAI 0210	não catalogado
CBMAI 0211	não catalogado
CBMAI 0211	Depositado por: Anita Marsaioli, Instituto de Química - UNICAMP CPQBA. Recebido como: <i>Aspergillus ochraceus</i> Isolado de: abelha <i>Trigona sp.</i> isolado por Ana Paula Macedo Zibordi (Fazenda Santa Cecília Campinas SP Brasil). Condições de cultivo: [Malt Extract Agar 2%] 28°C tempo de incubação: 7 dias
CCT 1205	IMI 321760; =CCT 1966 =CCT 2877 . Contaminated industrial metal working fluid .Preston, UK . Biodeteriogen; potencial challenge organism. Medium MA2, OA, PDA; 24C - LY; -80° T09/01/F1-5 Referência taxonômica: Domsch, K.H., Gams, W. & Anderson, T.H., 1980. Compendium of soil fungi. Academic Press London, Vol. I + II.
CCT 1435	ATCC 16404; =IMI 149007 =IFO 9455 . Blueberry . North Carolina, USA . Antimicrobial preservative testing [300]. Medium MEA; 24C - LY; -80° T09/10/I1-5 Domsch, K.H., Gams, W. & Anderson, T.H., 1980. Compendium of soil fungi. Academic Press London, Vol. I + II.
CCT 4964	Costa, A.S., 04/96 . Fermented Manihot esculenta . Chapadinha MA, Brazil . Medium MA2; 24C - LY; -80° T19/04/D1-5 Domsch, K.H., Gams, W. & Anderson, T.H., 1980. Compendium of soil fungi. Academic Press London, Vol. I + II.
CCT 5551	não catalogado
CCT 5552	não catalogado
CCT 5553	não catalogado