

## UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE QUÍMICA

JONAS HENRIQUE COSTA

# TRIAGEM DE MONOAMINA OXIDASE E TRANSAMINASE EM FUNGOS ISOLADOS DA PELE HUMANA

CAMPINAS 2016

## JONAS HENRIQUE COSTA

## TRIAGEM DE MONOAMINA OXIDASE E TRANSAMINASE EM FUNGOS ISOLADOS DA PELE HUMANA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Química na área de Química Orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO JONAS HENRIQUE COSTA, E ORIENTADO PELA PROFA. DRA. ANITA JOCELYNE MARSAIOLI.

> CAMPINAS 2016

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca do Instituto de Química Camila Barleta Fullin - CRB 8462

Costa, Jonas Henrique, 1989-

C823t Triagem de monoamina oxidase e transaminase em fungos isolados da pele humana. / Jonas Henrique Costa. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Anita Jocelyne Marsaioli.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Biocatálise. 2. Monoamina oxidase. 3. Transaminase. 4. Triagem de alto desempenho. I. Marsaioli, Anita Jocelyne, 1946-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

#### Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Screening of monoamine oxidase and transaminase in fungi isolated from human skin. Palavras-chave em inglês: Biocatalysis Monoamine oxidase Transaminase High-throughput screening Área de concentração: Química Orgânica Titulação: Mestre em Química na área de Química Orgânica Banca examinadora: Anita Jocelyne Marsaioli [Orientador] Caroline da Costa Silva Gonçalves Paulo José Samenho Moran Data de defesa: 22-07-2016 Programa de Pós-Graduação: Química

## **BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli (Orientadora)

Profa. Dra. Caroline da Costa Silva Gonçalves (UNILA-Foz do Iguaçu)

Prof. Dr. Paulo José Samenho Moran (IQ-UNICAMP)

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do(a) aluno(a).

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pelo aluno **JONAS HENRIQUE COSTA**, aprovada pela Comissão Julgadora em 22 de julho de 2016. DEDICATÓRIA



"PEANUTS" por Charles M. Schulz, publicado em 13 de maio de 1988.

Dedico essa dissertação aos meus pais e minha irmã que estiveram ao meu lado nos momentos mais difíceis e sempre me apoiaram em meus estudos. Espero, um dia, poder lhes retribuir à altura.

### AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Paulo e Sandra, e minha irmã Beatriz.

À minha orientadora Anita Marsaioli por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório. Por ter confiado em meu trabalho e ter me oferecido a oportunidade de ampliar meu conhecimento, me ensinando e prestando todo o auxílio sempre que necessário.

Aos meus colegas do LaBioSin: Michel, Maria Lair, Katherine, Matheus Eraldo, André, Bruna, Arnaldo, Lilian, Marília, Bárbara, Lucas, Júlia, Eduarda, Renato, Priscila, Ricardo e Simone. Obrigado por todo o ensinamento e ajuda. Vocês se tornaram mais que meros colegas de trabalho; vocês se tornaram meus amigos!

À Natália e Isabela que foram minhas primeiras companhias na Unicamp. Obrigado pela amizade e pelas risadas.

Ao professor Fernando Coelho pelo empréstimo do equipamento de hidrogenação e por todo suporte oferecido durante meu PED.

Ao Instituto de Química que me acolheu durante esses dois anos.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

A todos os alunos, funcionários e professores da Unicamp que de alguma maneira contribuíram pela minha passagem pela universidade.

# MUITO OBRIGADO!!! Jonas

#### RESUMO

# TRIAGEM DE MONOAMINA OXIDASE E TRANSAMINASE EM FUNGOS ISOLADOS DA PELE HUMANA

Palavras-chave: biocatálise, monoamina oxidase, transaminase, triagem de alto desempenho

Este trabalho focou na detecção das atividades de monoamina oxidase (MAO) e transaminase (TA) em fungos isolados da pele humana, aplicando a técnica de triagem de alto desempenho (HTS).

No primeiro capítulo, a técnica de HTS foi utilizada em 39 fungos, utilizando uma sonda fluorogênica (7-(3-aminopropóxi)cumarina) sintetizada em nosso laboratório. A atividade enzimática detectada através de fluorescência permitiu selecionar 5 fungos (9M1 - *Epicoccum sp.*, 23M1-IS4 - *Scolecobasidium sp.*, 28M5 - *Massarina sp.*, 37M-IS2 - *Marasmius sp.* e 43M1- NI) que apresentaram a partir de 30 % de atividades MAO e/ou TA.

No segundo capítulo, os microrganismos pré-selecionados nos ensaios de HTS foram submetidos a ensaios de biocatálise utilizando um análogo racêmico de solenopsina como substrato. O fungo 37M-IS2 (*Marasmius sp.*) apresentou atividade MAO sobre a 2-metil-6-pentilpiperidina transformando-a em piperideína, com conversão de 38 % e levando a um excesso enantiomérico de 73 %, mostrando o potencial desse microrganismo na desracemização de 2-metil-6-alquilpiperidinas. Este resultado representa um grande avanço na descoberta de novas monoamina oxidases, uma vez que existem poucos relatos na literatura sobre novas MAOs além a de *Aspergillus niger*, que é a mais conhecida e estudada. O sequenciamento genético do fungo *Marasmius sp.*, visando detectar o gene responsável pela atividade encontrada, será feito futuramente.

### ABSTRACT

# SCREENING OF MONOAMINE OXIDASE AND TRANSAMINASE IN FUNGI ISOLATED FROM HUMAN SKIN

**Keywords:** biocatalysis, high-throughput screening, monoamine oxidase, transaminase.

This research aimed at the detection of monoamine oxidase (MAO) and transaminase (TA) activities in fungi isolated from human skin applying high-throughput screening (HTS) methodologies.

In the first chapter, HTS was performed in 39 fungi using a fluorogenic probe (7-(3-aminopropoxy)coumarin) synthesized in our laboratory. The enzymatic activity detected by fluorescence allowed the selection of 5 fungi (9M1 - *Epicoccum sp.*, 23M1-IS4 - *Scolecobasidium sp.*, 28M5 - *Massarina sp.*, 37M-IS2 - *Marasmius sp.* and 43M1- NI) that showed from 30 % of MAO and/or TA activities.

In the second chapter, the preselected microorganisms with HTS technique were evaluated to resolve a racemic solenopsine analogue (2-methyl-6-pentylpiperidine). The 37M-IS2 fungus (*Marasmius sp.*) revealed MAO activity by transforming 2-methyl-6-pentylpiperidine into piperideíne in 38 % yield and 73 % of enantiomeric excess, showing the potential of this microorganism to deracemize 2-methyl-6-alkylpiperidines. This result represents a great advance in the discovery of new monoamine oxidases, as there are few reports on new MAOs besides that of *Aspergillus niger* which is the best known and studied. A genetic sequencing of the fungus *Marasmius sp.*, aiming at detecting the gene responsible for this activity, will be achieved in the near future.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Exemplos de moléculas obtidas industrialmente em larga escala com o uso
de biocatálise
Figura 2. Tipos de triagem enzimática21
Figura 3. Exemplo de aminas quirais em composto farmacêuticos22
Figura 4. Cromóforos e fluoróforos mais utilizados em HTS
Figura 5. Exemplo da diversidade de espécies fúngicas encontradas na pele
humana
Figura 6. Ensaio de HTS a) no tempo 0h e b) no tempo 96h indicando atividade
enzimática através da fluorescência nos ensaios A-D da coluna 1
Figura 7. Estrutura das solenopsinas
Figura 8. Estereoisômeros de solenopsinas
Figura 9. Estrutura da 2-metil-6-pentilpiperidina
Figura 10. Cromatogramas de CG-DIC em coluna quiral para a discriminação dos
dois pares de enantiômeros obtidos para a) 2-metil-6-undecilpiperidina por Pianaro
(2012) <sup>25</sup> e b) 2-metil-6-pentilpiperidina41
Figura 11. Espectros de RMN de <sup>1</sup> H para a) 2-metil-6-undecilpiperidina obtido por
Pianaro (2012) <sup>30</sup> (499,88 MHz, CDCI <sub>3</sub> , TMS) e b) 2-metil-6-pentilpiperidina (22)
(400,18 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS) <b>42</b>
Figura 12. Estrutura da $\alpha$ -metilbenzilamina43
Figura 13. Cromatogramas de CLAE para a) (±) $\alpha$ -metilbenzilamina e b) (S) $\alpha$ -
metilbenzilamina43
Figura 14. Cromatogramas de CG-EM das biotransformações realizadas por a)
28M5 e b) 43M1 sobre o substrato ±30 com 21 dias. Nota-se a formação do produto
34 <b>46</b>
Figura 15. Cromatogramas de CLAE das biotransformações realizadas por a) 28M5
e b) 43M1 sobre o substrato ±30 com 21 dias. Nota-se a preferência pela
biotransformação do enantiômero S46
Figura 16. Espectro de massas obtido por EI (70 Ev) do composto 3447
Figura 17. Cromatograma de CG-EM da biotransformação realizada pelo fungo
37M-IS2 sobre o substrato ±22 com 21 dias. Nota-se a formação do produto 3348

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Conversões enzimáticas (%), determinadas por fluorimetria, dos fungos
isolados da pele humana frente a sonda 9 <b>34</b>
Tabela 2. Razões estereoisoméricas obtidas para a ±2-metil-6-pentil-piperidina40
Tabela 3. Resultados obtidos nos ensaios de biocatálise para o substrato ±30 após
21 dias
Tabela 4. Resultados obtidos nos ensaios de biocatálise para o substrato ±22 após21 dias

# LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BSA	Bovine Serum Albumin – Albumina de Soro Bovina
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CD <sub>3</sub> OD	Metanol deuterado
<b>CDCI</b> <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
CG-DIC	Cromatografia Gasosa acoplada à Detector de Ionização de Chama
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
ee	Excesso Enantiomérico
eV	elétrons-volt
EI	Electron Impact – Impacto de Elétron
EM	Espectrometria de Massas
ESI	Electrospray Ionization – Ionização por Electrospray
F.M.	Fórmula Molecular
HTS	High-Throughput Screening – Triagem de Alto Desempenho
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamento
M·+	Íon molecular
ΜΑΟ	Monoamina Oxidase
MEA	<i>Malt Extract Agar</i> – Ágar Extrato de Malte
MHz	Megahertz
ММ	Massa Molar
m/z	Razão massa carga
R <sub>f</sub>	Fator de retenção
rpm	Rotação por minuto
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ТА	Transaminase
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico em partes por milhão

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Ação de uma enzima19
Esquema 2. Ação enzimática da transaminase por: a) resolução cinética e b) síntese
assimétrica23
Esquema 3. Mecanismo catalítico da transaminase24
Esquema 4. Ação enzimática da monoamina oxidase25
Esquema 5. Mecanismo nucleofílico polar concertado proposto para MAO26
Esquema 6. Rota sintética da sonda fluorogênica 9 para detecção de transaminase
e/ou monoamina oxidase <b>30</b>
Esquema 7. Ensaio enzimático utilizando a sonda fluorogênica 9 para triagem de
MAO e TA
Esquema 8. Processo químio-enzimático para a síntese de 2-metil-6-
alquilpiperidinas quirais
Esquema 9. Síntese da 2-metil-6-pentilpiperidina a partir da 2,6-lutidina
Esquema 10. Trifluoracetilação de 2-metil-6-pentilpiperidina40
Esquema 11. Biotransformações esperadas para os compostos 22 e 3044
Esquema 12. Domesticação do Marasmius sp. frente a 2-metil-6-pentilpiperidina49

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400,18 MHz, CDCI <sub>3</sub> ) de terc-butil-3-
cloropropilcarbamato (7)66
Anexo 2. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (100,63 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de terc-butil-3-
cloropropilcarbamato (7)66
Anexo 3. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C DEPT 135º (100,63 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <i>terc</i> -butil-3-
cloropropilcarbamato (7)66
Anexo 4. Espectro de massas obtido por El (70 eV) de terc-butil-3-
cloropropilcarbamato (7)67
Anexo 5. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400,18 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de <i>terc</i> -butil [3-[(2-oxo-2H-
cromen-7-il)oxi]propil]carbamato (8)67
Anexo 6. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (100,63 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de <i>terc</i> -butil [3-[(2-oxo-2H-
cromen-7-il)oxi]propil]carbamato (8)68
Anexo 7. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C DEPT 135º (100,63 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de terc-butil
[3-[(2-oxo-2H-cromen-7-il)oxi]propil]carbamato (8)
Anexo 8. Espectros de massas obtido por ESI (+) para terc-butil [3-[(2-oxo-2H-
cromen-7-il)oxi]propil]carbamato (8)69
Anexo 9. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (600,17 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de 7-(3-
aminopropóxi)cumarina (9) <b>70</b>
Anexo 10. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (150,91 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de 7-(3-
aminopropóxi)cumarina (9) <b>70</b>
Anexo 11. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C DEPT 135º (150,91 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de 7-(3-
aminopropóxi)cumarina (9) <b>71</b>
Anexo 12. Espectros de massas obtido por ESI (+) para Síntese de 7-(3-
aminopropóxi)cumarina (9)71
Anexo 13. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400,18 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 2-metil-6-pentilpiridina
(25) <b>72</b>
Anexo 14. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (100,63 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 2-metil-6-pentilpiridina
(25) <b>72</b>
Anexo 15. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C DEPT 135º (100,63 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 2-metil-6-
pentilpiridina (25)73
Anexo 16. Espectro de massas obtido por EI (70 eV) de 2-metil-6-pentilpiridina (25)

 Anexo 17. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400,18 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 2-metil-6 

 pentilpiperidina (22)

 Anexo 18. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (100,63 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 2-metil-6 

 pentilpiperidina (22)

 74

 Anexo 19. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C DEPT 135<sup>o</sup> (100,63 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 2-metil-6 

 pentilpiperidina (22)

 74

 Anexo 20. Espectro de massas obtido por El (70 eV) de de 2-metil-6-pentilpiperidina (22)

 74

 Anexo 21. Espectro de massas obtido por El (70 eV) de 2,2,2-trifluor-1-(2-metil-6-pentilpiperidin-1-il)etanona (26-29)

# SUMÁRIO

# 1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Enzimas, Biocatálise e Triagem Enzimática	19
1.2 Aminas Quirais	22
<b>1.3</b> Transaminase (TA)	23
1.4 Monoamina Oxidase (MAO)	25

# 2 CAPÍTULO I: Triagem de Alto Desempenho Utilizando Sonda Fluorogênica

<b>2.1</b> INTRODUÇÃO	.27
2.2 OBJETIVOS	.29
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	.30
2.3.1 Síntese de sonda fluorogênica	.30
2.3.2 Ensaios de HTS para detecção de transaminase e/ou monoamina oxidase e	em
fungos isolados da pele humana	.31

# 3 CAPÍTULO II: Ensaios de Biocatálise Utilizando 2-metil-6-alquilpiperidinas

3.1 INTRODUÇÃO
3.2 OBJETIVOS
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO
3.3.1 Síntese e separação dos estereoisômeros da 2-metil-6-pentilpiperidina39
<b>3.3.2</b> Separação dos enantiômeros da α-Metilbenzilamina43
3.3.3 Ensaios de biocatálise convencional44
3.3.4 Domesticação do fungo 37M-IS2 (Marasmius sp.) frente a 2-metil-6
alquilpiperidinas49

4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	5	1
-----------------------------	---	---

# **5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

5.1 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	52
5.1.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	52
5.1.2 Cromatografia em Coluna (CC)	52
5.1.3 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)	52
5.1.4 Cromatografia Gasosa acoplada à Detector de Ionização de Chama (	(CG-
DIC)	53

5.1.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	53
5.2 MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS	54
5.2.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	54
5.2.2 Espectrometria de Massa com Ionização por Electrospray (ESI-EM)	54
5.3 MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS DE FLUORESCÊNCIA	55
5.3.1 Leitor de Microplacas	55
5.4 REAGENTES E SOLVENTES	55
5.5 HIDROGENADOR	55
5.6 PROCEDIMENTOS GERAIS ADOTADOS NO LABORATÓF	RIO DE
BIOCATÁLISE	56
5.7 MICRORGANISMOS UTILIZADOS	56
5.7.1 Coleção de Fungos da Pele	56
5.7.2 Cultivo dos Microrganismos	57
5.8 PREPARO DE SOLUÇÕES	57
5.8.1 Solução Tampão SØrensen (pH 7,0)	57
5.8.2 Solução Tampão Borato (pH 7,4 e 20 mmol/L)	57
5.8.3 Solução da Sonda Fluorogênica 9 (2 mmol/L)	
5.8.4 Solução de Albumina de Soro Bovino (BSA) (5 mg/mL)	
5.9 ENSAIOS DE TRIAGEM DE ALTO DESEMPENHO (HTS)	
5.10 ENSAIOS DE BIOCATÁLISE CONVENCIONAIS	59
5.11 PROCEDIMENTOS SINTÉTICOS	60
5.11.1 Terc-butil-3-cloropropilcarbamato (7)	60
5.11.2 Terc-butil [3-[(2-oxo-2H-cromen-7-il)oxi]propil]carbamato (8)	61
5.11.3 7-(3-aminopropóxi)cumarina (9)	62
5.11.4 2-metil-6-pentilpiridina (25)	63
5.11.5 2-metil-6-pentilpiperidina (22)	64
5.11.6 2,2,2-trifluor-1-(2-metil-6-pentilpiperidin-1-il)etanona (26-29)	65

ANEXOS
--------

## **INTRODUÇÃO GERAL**

### 1.1 Enzimas, Biocatálise e Triagem Enzimática

As enzimas são uma classe de macromoléculas presentes nos seres vivos constituídas por uma ou mais cadeias de aminoácidos em uma estrutura tridimensional e com capacidade de efetuar transformações químicas em seu sítio ativo. Atuam como biocatalisadores acelerando, na maioria das vezes, as reações químicas e apresentando alta especificidade pelos substratos (Esquema 1)<sup>1,2</sup>.



Esquema 1. Ação de uma enzima.

As reações biocatalisadas são, na maioria das vezes, entantio e regiosseletivas evitando produtos secundários e a necessidade de ativação de grupos funcionais e atuam sob condições reacionais brandas. Assim, a biocatálise está totalmente inserida nos conceitos de "química verde" que surgiram a partir dos anos 90<sup>3,4</sup>. Os doze conceitos da "química verde" incluem, por exemplo, catálise seletiva, produtos químicos degradáveis e de baixa toxicidade, baixo risco de acidente, entre outros<sup>5</sup>.

Por oferecer uma alternativa mais verde do que a síntese orgânica tradicional, a biocatálise vem sendo especialmente utilizada nas indústrias, onde a alta seletividade das reações também é crítica como na indústria alimentícia e farmacêutica. Vários compostos de interesse industrial são obtidos a partir de reações de biocatálise, sendo esse ramo uma ativa área de pesquisa<sup>3,4</sup>.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Nelson, D.L; Cox, M.M. *Lehninger: Principles of Biochemistry*, 5<sup>a</sup> ed. W.H. **2008**.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>Bommarius, A. S. Annu. Rev. Chem. Biomol, **2015**, v. 6, p. 319–45.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup>Schimdt, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B. Nature, **2001**, p. 258-268.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Alcalde, M; Ferrer, M; Plou, F. J.; Ballesteros, A. *Trends in Biotechnology*, **2006**, v. 24, n.6, p. 281-287.

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup>Lenardao, E. J. *et al. Quím. Nova*, **2003**, v. 26, n.1, p. 123-129.

As aplicações industriais da biocatálise em larga escala incluem, por exemplo, a síntese catalisada pela termolisina do adoçante de baixa caloria aspartame, a produção de acrilamida, a síntese do não-cancerígeno edulcorante isomaltulose e a produção de biopolímeros como o ácido poliláctico<sup>4</sup>. Na Figura 1, encontram-se exemplos de moléculas obtidas na indústria através do emprego da biocatálise.



**Figura 1**. Exemplos de moléculas obtidas industrialmente em larga escala com o uso de biocatálise. Fonte: Adaptado de Alcalde, M; *et al. Trends in Biotechnology*, **2006**, v. 24, n.6<sup>4</sup>.

De acordo com uma pesquisa realizada pela BCC Research, no ano de 2012 o mercado mundial de enzimas foi de quase US\$ 4,5 bilhões e aproximadamente US\$ 4,8 bilhões em 2013. Espera-se que até 2018 o mercado alcance US\$ 7,8 bilhões, uma taxa de crescimento anual de 8,2 %<sup>6</sup>.

Várias enzimas promovem a transformação de substratos em produtos que dificilmente são obtidos por rotas químicas convencionais ou atuam em reações nas quais não existem alternativas químicas viáveis, por isso são muito valiosas para a indústria<sup>7</sup>.

Nesse contexto, há uma grande demanda pela busca de novas enzimas ou aprimoramento das enzimas existentes. Os microrganismos são fontes acessíveis de enzimas; assim realiza-se a triagem em bibliotecas de microrganismos de forma a

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> Enzymes in Industrial Applications: <u>http://www.bccresearch.com/report/BIO030H.html</u>

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> Oliveira, L. G.; Mantovani, S. M. *Quim. Nova,* **2009**, v. 32, n. 3, p. 742-756.

se rastrear as enzimas com as propriedades desejadas<sup>8</sup>.

Várias indústrias investiram em programas para a identificação de novos biocatalisadores por processo de triagem microbiana em busca das atividades desejadas. A BASF e a Chirotech são exemplos de empresas que utilizaram metodologias de triagem para a obtenção de linhagens produtoras de nitrilases e γlactamases, respectivamente<sup>7</sup>.

Ainda assim é possível afirmar que os biocatalisadores utilizados na atualidade representam uma fração pequena da diversidade microbiana. O Brasil possui uma vantagem territorial que torna o processo de triagem de novas enzimas, para aplicação em processos catalíticos, extremamente atrativo, além de necessário para conhecermos a diversidade enzimática da nossa microbiota<sup>7</sup>.

Existem vários métodos para triagem de microrganismos na literatura. Porém, a metodologia utilizada deve ser planejada de acordo com a atividade enzimática que se deseja encontrar<sup>7</sup>. A Figura 2 apresenta, de maneira geral, três formas distintas de se realizar triagem enzimática<sup>9</sup>.



Figura 2. Tipos de triagem enzimática. Fonte: Adaptado de Marsaioli & Porto, 2010<sup>9</sup>.

A triagem com células em crescimento somente revela a presença da atividade enzimática e é usada para a avaliação de grandes bibliotecas (10<sup>10</sup> indivíduos). Os testes em microplacas são realizados em bibliotecas de até 10<sup>5</sup> indivíduos, fornecendo o parâmetro de conversão do substrato avaliado no produto de interesse. Visando avaliar um substrato de interesse, são feitos ensaios convencionais utilizando de 1 a 10 mg de substrato, sendo a reação monitorada por CG, RMN, EM e outros<sup>9</sup>.

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup> Reymond, J; Wahler, D. Current Opinion in Chemical Biology, 2001, v. 5, p. 152–158.

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup> Marsaioli, A. J.; Porto, A. L. M. *Biocatálise e Biotransformação: Fundamentos e Aplicações.* Editora Schoba, **2010**.

#### **1.2 Aminas Quirais**

As aminas encontram-se entre os intermediários químicos mais utilizados para a produção de produtos farmacêuticos, agroquímicos, polímeros, corantes, agentes plastificantes e outros<sup>10</sup>.

Aminas quirais são importantes intermediários para a síntese de vários compostos de interesse farmacêutico e são encontradas em numerosos compostos biologicamente ativos<sup>11</sup>. Como exemplo, um terço de todos os ingredientes farmacêuticos ativos contem aminas quirais<sup>11</sup>. No ano de 2010, 80 % dos 200 medicamentos mais prescritos nos Estados Unidos continham nitrogênio e em 40 % desses compostos o grupo amino se localizava adjacente a um grupo quiral (Figura 3)<sup>12</sup>.



Figura 3. Exemplo de aminas quirais em composto farmacêuticos<sup>12</sup>.

Percebe-se então que a configuração dos centros estereogênicos é crucial para a interação com biomoléculas, de maneira que a síntese de aminas enantiomericamente puras é algo valioso para as indústrias. É nesse cenário que surge o grande interesse pelo uso da biocatálise empregando enzimas que atuam sobre o grupo amina como, por exemplo, a monoamina oxidase (MAO) e transaminase (TA) que são as enzimas alvo de estudo desse trabalho.

<sup>&</sup>lt;sup>10</sup> Mutti, F. G.; Knaus, T.; Scrutton N. S.; Breuer M.; Turner, N. J. *Science*, **2015**, v. 349, n. 6255, p. 1525-1529.

<sup>&</sup>lt;sup>11</sup> Koszelewski, D. *et. al. Trends in Biotechnology*, **2010**, v. 6, n. 28, p. 324–332.

<sup>&</sup>lt;sup>12</sup> Mack, D.J., Weinrich, M.L., Vitaku, E. & Njardarson, J.T., *Top 200 Brand Name Drugs by Total US Prescriptions in 2010* (University of Arizona, Arizona; 2011).

### 1.3 Transaminase (TA)

As TAs são enzimas que dependem do cofator piridoxal-5-fosfato (PLP) e catalisam reações de transaminação entre um doador de grupo amina (amina ou aminoácido) para um aceptor de grupo amina (cetona ou α-cetoácido), desempenhando papel fundamental no metabolismo de aminoácidos nos organismos de bactérias e animais. Elas também são utilizadas na síntese de aminoácidos não naturais e aminas opticamente puras<sup>13</sup>. A ação da transaminase pode ocorrer de duas maneiras, conforme apresentado no Esquema 2.

 Resolução cinética (Esquema 2 a): aminas racêmicas sofrem oxidação por uma TA enantiosseletiva, de forma a se obter aminas enantiomericamente puras. Um composto carbonílico, por exemplo o piruvato, recebe o grupo amino proveniente da oxidação de um enantiômero da amina racêmica<sup>11</sup>.

- Síntese assimétrica (Esquema 2 b): partindo-se de cetonas e de um doador de grupo amina, por exemplo a alanina, pode-se obter 100 % de rendimento da amina enantiomericamente pura desejada; entretanto, essa reação está com equilíbrio deslocado para a formação da cetona, sendo necessária a remoção do co-produto (piruvato) para o deslocamento do equilíbrio no sentido da formação da amina<sup>11</sup>.



Esquema 2. Ação enzimática da transaminase por: a) resolução cinética e b) síntese assimétrica<sup>11</sup>.

<sup>&</sup>lt;sup>13</sup> Hwang, B.Y. Kim, B.G. Enzyme and Microbial Technology, **2004**, v. 34, p. 429–436.

O mecanismo catalítico da transaminase pode ser dividido em duas meias-reações em formato ping-pong. Na primeira reação a aldimina interna, formada entre um resíduo lisina da proteína e o grupo aldeído do PLP, é substituída por uma aldimina externa, formada entre um doador amino e o PLP. Uma série de rearranjos e uma hidrólise levam a formação da piridoxamina-5-fosfato (PMP) e do produto ceto que é liberado. Na segunda reação um grupo receptor de amina, reage com o PMP, regenerando o PMP em PLP e liberando o produto amina<sup>14</sup>. O mecanismo catalítico da transaminase é apresentado no Esquema 3.



Esquema 3. Mecanismo catalítico da transaminase. Fonte: Adaptado de Turner & Truppo, 2013<sup>14</sup>.

<sup>&</sup>lt;sup>14</sup> Turner, N.J.; Truppo, M.D. *In: Sustainable Catalysis: Challenges and Practices for the Pharmaceutical and Fine Chemical Industries.* Dunn, P.J.; Hii, K.K.; Krische, M.J.; Williams, M.T., eds.; John Wiley & Sons: New York, **2013**, cap. 3.

### 1.4 Monoamina Oxidase (MAO)

As MAOs são enzimas dependentes de flavina ou de um cofator metálico que catalisam a oxidação de aminas em iminas, as quais são hidrolisadas pela água gerando aldeídos ou cetonas, com consumo de oxigênio e formação de peróxido de hidrogênio<sup>15</sup>, conforme apresentado no Esquema 4.



Esquema 4. Ação enzimática da monoamina oxidase.

A MAO é encontrada em bactérias, fungos, plantas e animais, estando envolvida em várias vias metabólicas como no metabolismo de aminoácidos e na biossíntese de alcaloides<sup>16</sup>. Nos eucariotos inferiores, a MAO fornece nitrogênio para as células<sup>16</sup>; nos humanos, é foco intenso de estudo, uma vez que é responsável pelo metabolismo de neurotransmissores como serotonina e dopamina, além de estar associada a várias doenças como alcoolismo, desordens degenerativas (doença de Parkinson) e até mesmo inibição e progressão do câncer<sup>16</sup>.

Nos últimos anos, a MAO de *Aspergillus niger* é alvo de estudo em biocatálise, sendo a mais conhecida na literatura. A MAO de *A. niger* foi isolada pela primeira vez em 1995<sup>16</sup>. Neste fungo são encontradas a amina oxidase do tipo I (dependente de cobre) e outra do tipo II (monoamina oxidase dependente de flavina, nomeada MAO-N) que gera iminas livres que podem ser substratos para outras reações químicas, o que a torna uma enzima altamente desejável para aplicação em processos biocatalíticos<sup>16,18</sup>.

<sup>&</sup>lt;sup>15</sup> Brzozowski, A. M. *et al. J. Mol. Biol.* **2008**, v. 384, p. 1218–1231.

<sup>&</sup>lt;sup>16</sup> Schilling, B. Lerch, K. *Biochimica et Biophysics Acta*, **1995**, v. 1243, p. 529-537.

<sup>&</sup>lt;sup>17</sup> Valley, M.P *et al.* Anal. Biochem., **2006**, v. 359, p. 238–246.

<sup>&</sup>lt;sup>18</sup> Grogan, G. et. al. Acta Cryst., **2008**, seção F6, p. 182–185.

Na literatura vários mecanismos foram propostos para a ação da MAO como, por exemplo, mecanismo de transferência de um único elétron, mecanismo de transferência de hidreto e mecanismo nucleofílico polar concertado, sendo o último mecanismo o considerado em maior acordo com os dados obtidos experimentalmente<sup>19</sup>.

O mecanismo nucleofílico polar concertado propõe que o átomo de nitrogênio (N<sub>5</sub>) da flavina atue como uma base, removendo um hidrogênio alfa da amina. A oxidação se inicia com o ataque nucleofílico concertado do nitrogênio da amina na flavina. Por fim, ocorre uma eliminação que leva ao produto imina protonado e a flavina reduzida que será reoxidada por oxigênio, conforme mostra o Esquema 5<sup>19</sup>.



Esquema 5. Mecanismo nucleofílico polar concertado proposto para MAO<sup>19</sup>.

<sup>&</sup>lt;sup>19</sup> Edmondson, D. E.; Miler, J. R. *Biochemistry*, **1999**, v. 38, p. 13670-13683.

## **CAPÍTULO I**

### "Triagem de Alto Desempenho Utilizando Sonda Fluorogênica"

### 2.1 INTRODUÇÃO

A transformação química catalisada por uma enzima pode ser evidenciada através de um ensaio enzimático, no qual a transformação do substrato em produto pode ser indicada por mudança de cor do ensaio, precipitação, produção de calor e outros. A biotransformação pode ser monitorada também através de métodos analíticos como, por exemplo, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN), porém o uso dessas técnicas quando se tem um grande número de amostras é impraticável, uma vez que são lentas e caras<sup>20</sup>. Assim, o desenvolvimento de métodos rápidos e simples para a detecção de atividades enzimáticas é uma área em contínua expansão<sup>21</sup>.

Dessa maneira, a Triagem de Alto Desempenho (*High Throughput Screening* - HTS) surgiu devido ao grande interesse no desenvolvimento de ensaios enzimáticos rápidos e práticos. A HTS é definida como uma técnica de alta rapidez que permite avaliar de 1000 a 8000 amostras por dia, aplicando o princípio de análise em paralelo de forma a reduzir o tempo análise em relação aos métodos convencionais<sup>22</sup>.

Existem várias metodologias de HTS, sendo a maioria delas realizadas em microplacas de 96 poços com substratos modificados ou não modificados. Os ensaios com substratos modificados (sondas fluorogênicas ou cromogênicas) são os utilizados mais frequentemente pois revelam se a reação enzimática ocorreu por sinais do cromóforo ou fluoróforo, produtos da reação enzimática<sup>21</sup>. Os ensaios no formato de microplacas de 96 poços são bastante interessantes, pois fornecem resultados quantitativos e podem ser automatizados pelo uso de sistemas robotizados e leitoras de microplaca para aquisição de dados<sup>7</sup>.

<sup>&</sup>lt;sup>20</sup> Reymond, J.L. C*himia*, **2001**, v. 55, p. 1049-1052.

<sup>&</sup>lt;sup>21</sup> Reymond, J.L. *Enzyme Assays: High-Throughput Screening, Genetic Selection and Fingerprint.* Wiley-VCH, **2006**.

<sup>&</sup>lt;sup>22</sup> Reetz, M. T. Angew. Chem. Int. Edit., **2002**, v. 41, p. 1335-1338.

Dentre os substratos mais utilizados, encontram-se os derivados do ânion nitrofenolato (1), que apresentam cor amarela após ação enzimática, e os derivados de ânions fluorescentes de umbeliferona (2), resorufina (3) e fluoresceína (4) que fluorescem no azul, vermelho e verde respectivamente (Figura 4). Muitos desses substratos modificados são comercialmente disponíveis<sup>21</sup>.



Figura 4. Cromóforos e fluoróforos mais utilizados em HTS<sup>21</sup>.

Os ensaios fundamentados na emissão de fluorescência são muito aplicados devido à simplicidade e rapidez dos ensaios; eles apresentam elevada sensibilidade e utilizam pequena concentração de substrato sendo, portanto, de grande interesse<sup>23</sup>. Marsaioli e colaboradores foram pioneiros no país em implantar metodologias de triagem enzimática rápida adaptadas a células íntegras utilizando sondas fluorogênicas derivadas da umbeliferona<sup>7</sup>.

<sup>28</sup> 

<sup>&</sup>lt;sup>23</sup> Reymond, J.L. Ann. N.Y. Acad. Sci., **2008**, v. 1130, p. 12-20.

### 2.2 OBJETIVOS

Síntese de sonda fluorogênica e implementação da técnica de triagem de alto desempenho (HTS) para detecção de atividade enzimática de transaminase e/ou monoamina oxidase em fungos isolados da pele humana.

#### 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 2.3.1 Síntese de sonda fluorogênica

Para a implementação dos ensaios de HTS foi sintetizada uma sonda fluorogênica cujo grupo funcional é uma amina primária de cadeia curta acoplada à umbeliferona. Optou-se por essa estrutura uma vez que monoamina oxidases de microrganismos selvagens mostram-se ser mais ativas com aminas de cadeias lineares e simples como a pentilamina e baixa atividade com aminas mais impedidas estericamente<sup>24</sup>. Já a escolha pela umbeliferona como fluoróforo deve-se ao fato de que é um dos fluoróforos mais conhecidos e empregados na literatura, sendo também muito utilizado em nosso grupo pesquisa para a síntese de outras sondas e totalmente compatível com o meio biológico<sup>20,25</sup>. A sonda sintetizada não é inédita na literatura, foi utilizada por Zhu e colaboradores<sup>26</sup> para a detecção de atividade de monoamina oxidases humanas (MAO-A e MAO-B) porém, não se encontrou nenhum trabalho na literatura utilizando-a para a triagem em microrganismos. A rota sintética utilizada é mostrada no Esquema 6 e foi feita em colaboração com a Dr.<sup>a</sup> Bruna Zucoloto da Costa, pós-doutoranda do nosso grupo de pesquisa.



**Esquema 6.** Rota sintética da sonda fluorogênica **9** para detecção de transaminase e/ou monoamina oxidase.

<sup>&</sup>lt;sup>24</sup> Turner, N. J. *et al* Angew. Chem. Int. Ed., **2003**, v. 42, p. 4807–4810.

<sup>&</sup>lt;sup>25</sup> Marsaioli, A. J. et al. J. Braz. Chem. Soc., 2004, v. 15, n. 6, p. 911-916.

<sup>&</sup>lt;sup>26</sup> Zhu, Q. et al Chinese Chemical Letters, 2008, v. 19, p. 947–950.

A primeira etapa consiste na proteção do grupo amino do cloridrato de 3cloropropilamina (5) com *tert*-butiloxicarbonilo (BOC), formando o produto 7 com 83 % de rendimento. Na segunda etapa, ocorre o acoplamento de 7 com umbeliferona, que é facilitado pela adição de iodeto de sódio ao meio reacional, uma vez que o iodo é um grupo de saída melhor que o cloro, levando ao composto 8 com 89 % de rendimento. Por fim, na terceira etapa tem-se a remoção do grupo protetor BOC, formando a sonda 7-(3-aminopropóxi)cumarina (9) com rendimento quantitativo. Os produtos obtidos nas três etapas foram devidamente caracterizados.

# 2.3.2 Ensaios de HTS para detecção de transaminase e/ou monoamina oxidase em fungos isolados da pele humana

O ensaio enzimático proposto para a sonda 9 está representado no Esquema 7. Após a ação da MAO, o grupo amina da sonda 9 é transformado na imina 10 que sofre uma hidrólise espontânea no meio reacional, sendo transformada no aldeído 11. O hidrogênio  $\alpha$  ao aldeído sofre ataque da albumina de soro bovino (BSA) adicionada ao meio reacional, levando a uma  $\beta$ -eliminação que culmina na liberação do ânion umbeliferila (2) no meio reacional. O ânion umbeliferila (2) é fluorescente e pode ser facilmente detectado por fluorescência a 460 nm, indicando a ação da enzima. No caso da TA, a sonda 9 já é convertida diretamente ao composto 11, levando também a posterior liberação do ânion 2.



Esquema 7. Ensaio enzimático utilizando a sonda fluorogênica 9 para triagem de MAO e TA.

Os ensaios de HTS foram realizados na coleção de fungos isolados da pele humana disponível em nosso laboratório. Optou-se por triar esses microrganismos pois apresentam grande diversidade, como ilustrado na Figura 5, e principalmente pelo fato de que a maioria das atividades de monoamina oxidase descritas na literatura provém de fungos<sup>16</sup>. Todo o processo de coleta, isolamento e identificação dos fungos foi feito por Carla Porto da Silva durante seu doutoramento em nosso grupo de pesquisa e encontra-se detalhado em sua tese<sup>27</sup>.



Rhodotorula sp.Cladosporium sp.Alternaria sp.Phoma sp.Scolecobasidium sp.Figura 5.Exemplo da diversidade de espécies fúngicas encontradas na pele humana.

Os experimentos de HTS foram montados em microplacas de polipropileno de 96 poços, sendo todos os ensaios realizados em quadruplicatas e os controles em duplicatas, conforme descrito a seguir:

- Ensaio (E) (linhas A-D): 10 μL de solução da sonda 9 (2 mmol/L), 80 μL de solução de BSA (5,0 mg/mL),10 μL de tampão borato (pH 7,4 e 20 mmol/L) e 100 μL de suspensão celular (1,0 mg/mL).
- Controle Negativo (CN) (linhas E-F): 10 μL de solução da sonda 9 (2 mmol/L), 80 μL de solução de BSA (5,0 mg/mL) e 110 μL de tampão borato (pH 7,4 e 20 mmol/L).
- Controle Positivo (CP) (linhas G-H): 10 μL de solução de umbeliferona (2 mmol/L), 80 μL de solução de BSA (5,0 mg/mL),10 μL de tampão borato (pH 7,4 e 20 mmol/L) e 100 μL de suspensão celular (1,0 mg/mL).

<sup>&</sup>lt;sup>27</sup> Silva C.P. Potencial enzimático da microbiota da pele humana e sua ação sobre insumos de fragrâncias, *Tese de doutorado*, Instituto de Química, Unicamp, **2012**.

A Figura 6 ilustra um ensaio de HTS no tempo zero e após 96 h, onde podese observar um resultado positivo para a atividade enzimática.



**Figura 6.** Ensaio de HTS a) no tempo 0 h e b) no tempo 96 h indicando atividade enzimática através da fluorescência nos ensaios A-D da coluna 1.

O acompanhamento foi realizado a partir das leituras de emissão de fluorescência realizadas em 0, 24, 48, 72 e 96 horas após a montagem dos ensaios.

Os resultados obtidos para os 39 fungos triados encontram-se na Tabela 1. Os resultados foram expressos em porcentagem de conversão da sonda (%), obtida através da Equação 1. Para cada leitura sempre se descontou de (E) e (CN) os valores obtidos no tempo 0h (fluorescência inicial).

$$\% = \frac{(E - CN)}{CP} \times 100$$

Equação (1)

A partir de 24 h já é possível observar atividades enzimáticas frente a sonda **9** em alguns fungos, com destaque para o 23M1-IS4 que apresentou uma conversão de 43 %. Com 96 horas de ensaio, 50 % dos fungos (19) apresentaram atividades maiores que 10 %.

**Tabela 1.** Conversões enzimáticas (%), determinadas por fluorimetria, dos fungos isolados da pele humana frente a sonda **9**.

CÓDIGO	IDENTIFICAÇÃO	CONVERSÃO (%)			
		24h	48h	72h	96h
2M2-IS1	Alternaria sp.	19	23	24	11
3M1	Alternaria sp.	13	17	19	13
6M2	Epicoccum sp.	0	0	0	0
7M1	Epicoccum sp.	6	14	19	21
8M1	Cladosporium sp.	1	1	2	3
9M1	Epicoccum sp.	18	23	27	31
9M3	Cladosporium sp.	0,5	1	1	2
10M	Exophiala sp.	6	6	10	13
18M	Cladosporium sp.	0,5	1	1	1
23M1-IS1	Cladosporium sp.	2	3	4	5
23M1-IS2	Cladosporium sp.	3	4	6	7
23M1-IS4	Scolecobasidium sp.	43	60	60	60
27M1	Fusarium sp.	2	3	4	5
28M1	Epicoccum sp.	15	21	23	25
28M2	Epicoccum sp.	10	15	17	20
28M3-IS1	Phoma sp.	6	8	9	11
28M3-IS2	Epicoccum sp.	13	16	16	20
28M4	Phoma sp.	9	12	14	19
28M5	Massarina sp.	9	13	16	30
28M6	Aureobasidium sp.	5	6	9	10
28M7-IS1	Cladosporium sp.	0	1	1	1
28M7-IS2	Rhodotorula sp.	0	0	0	1
30M1-IS1	Phoma sp.	12	16	22	25
30M1-IS2	Aureobasidium sp.	16	18	19	22
30M2-IS1	Phoma sp.	4	5	7	10
30M2-IS2	Phoma sp.	0	0	1	2
33M3	Penicillium sp.	1	1	2	3
35M1	Penicillium sp.	1	2	2	4
35M2	Penicillium sp.	1	2	3	3
37M-IS1	Penicillium sp.	1	1	2	2
37M-IS2	Marasmius sp.	22	29	35	40
39M1	Hypocrea sp.	1	1	1	1
39M3	Coprinellus sp.	2	2	3	3
42M	Cladosporium sp.	2	4	6	7
43M1	NI	17	20	24	32
44M	Cladosporium sp.	3	4	5	6
45M	Penicillium sp.	4	7	9	12
48M	Aureobasidium sp.	1	2	3	4
51M	Cytospora sp.	2	3	4	5

NI = Não Identificado

É notável que há uma relação entre o perfil enzimático e os gêneros dos fungos, podendo os ensaios de HTS serem utilizados também como ferramenta na classificação preliminar de microrganismos junto com outras técnicas. Os fungos dos gêneros *Cladosporium e Penicillium* apresentaram os piores resultados com atividades menores que 12 %, o gênero *Epicoccum* entre 20 – 30 %, e o *Alternaria* 20 – 25 %. O gênero *Alternaria* também apresentou como característica a redução da intensidade da fluorescência a partir de 72h de ensaio; essa redução foi notada em todas as quadruplicatas do ensaio. Pode-se sugerir que os fungos desse gênero consomem o ânion umbeliferila (**2**) utilizando-o como substrato ou liberam alguma substância que altera a fluorescência do meio reacional, porém nada foi encontrado na literatura.

Os melhores resultados (destacados em vermelho) foram apresentados por 12,5 % dos fungos (5), se encontram na faixa de 30 – 60 % de conversão e pertencem aos microrganismos 9M1 (*Epicoccum sp.*), 23M1-IS4 (*Scolecobasidium sp.*), 28M5 (*Massarina sp.*), 37M-IS2 (*Marasmius sp.*) e 43M1 (NI). Esses microrganismos foram encaminhados a testes de biocatálise convencional frente a aminas de interesse, como mostra o Capítulo 2.

## **CAPÍTULO II**

### "Ensaios de Biocatálise Utilizando 2-metil-6-alquilpiperidinas"

### 3.1 INTRODUÇÃO

Há anos, as 2-metil-6-alquilpiperidinas (**13**) são tema de pesquisa em nosso grupo. Esses alcaloides são conhecidos também como solenopsinas devido ao fato de serem o principal constituinte do veneno das formigas do gênero *Solenopsis* (formigas lava-pés)<sup>28</sup>. A estrutura das solenopsinas consiste em uma porção piperidínica com substituintes metila na posição 2 do anel e uma longa cadeia alquílica na posição 6, como mostra a Figura 7.



Figura 7. Estrutura das solenopsinas.

Os dois estereocentros das solenopsinas permitem a existência de quatro estereoisômeros (**14** - **17**), conforme mostra a Figura 8. No veneno das *Solenopsis* são encontrados majoritariamente os diastereoisômeros *trans* (2*R*, 6*R*) e *cis* (2*R*, 6*S*), sendo que a proporção entre os estereoisômeros varia entre formigas operárias e rainhas, podendo-se questionar sobre o papel das configurações absolutas na comunicação e organização das formigas dentro do ninho<sup>28</sup>.



Figura 8. Estereoisômeros de solenopsinas<sup>28</sup>.

<sup>&</sup>lt;sup>28</sup> Pianaro, A.; Fox, E.G.P.; Bueno, O.C.; Marsaioli, A.J.; *Tetrahedron: Asymm.*, **2012**, n. 23, v. 635-642.
Como a configuração dos estereocentros está intimamente ligada à atividade biológica, a sínteses desses alcaloides enantiomericamente puros através da biocatálise possibilitaria relacionar as atividades biológicas desses alcaloides, como inseticida, fungicida, bactericida e hemolítica a cada um dos estereoisômeros<sup>28</sup>.

Turner e colaboradores<sup>29</sup> desenvolveram um processo quimio-enzimático para a síntese de pirrolidinas quirais 2,5-dissubstituídas utilizando transaminase e monoamina oxidase de *Apergillus niger* (MAO-N). O processo obteve excelente enantio- e diastereosseletividade (99 % de excesso enantiomérico), podendo ser adaptado para as 2-metil-6-alquilpiperidinas. As reações envolvem a transaminação de dicetonas (**18**) por uma transaminase seletiva, levando a formação de aminocetonas (**19**). As aminocetonas sofrem uma ciclização espontânea, se convertendo em iminas (**20**). As iminas são reduzidas por um agente redutor não seletivo, formando dois estereoisômeros de aminas (**21a e 21b**). Uma monoamina oxidase seletiva oxida apenas um dos estereoisômeros (**21b**) novamente em imina (**20**), de forma a acumular somente uma das aminas (**21a**) no meio reacional. Todo o processo encontra-se ilustrado no Esquema 8.



Esquema 8. Processo químio-enzimático para a síntese de 2-metil-6-alquilpiperidinas quirais<sup>29</sup>.

Neste contexto, esse trabalho tem como objetivo encontrar um microrganismo com atividade monoamina oxidase sobre 2-metil-6-alquilpiperidinas que possa futuramente ser empregado em um processo químio-enzimático na síntese de solenopsinas ou de outros compostos piperidínicos quirais.

<sup>&</sup>lt;sup>29</sup> Turner, N.J. et. al. Angew. Chem. Int., **2014**, v. 53, p. 2447 - 2450.

# **3.2 OBJETIVOS**

Montar ensaios de biocatálise convencional para a triagem dos fungos pré-selecionados por HTS no Capítulo 1 que possuam atividade MAO sobre 2-metil-6-alquilpiperidinas e atividade MAO ou TA sobre α-metilbenzilamina, com intuito de verificar a capacidade de desracemização de aminas dos microrganismos selecionados.

#### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Síntese e separação dos estereoisômeros da 2-metil-6-pentilpiperidina

Para os ensaios de biocatálise convencional, sintetizou-se um análogo das solenopsinas, a 2-metil-6-pentilpiperidina (**22**), cuja a única diferença em relação às solenopsinas é a cadeia alquílica menor (5 carbonos) ligada ao carbono 6 do anel, como ilustrado na Figura 9.



Figura 9. Estrutura da 2-metil-6-pentilpiperidina.

A rota sintética é composta por duas etapas, como ilustra o Esquema 9. A primeira etapa consiste na reação entre 2,6-lutidina (**23**) com butillítio, formando o intermediário carbânion **24** que posteriormente ataca o bromobutano, formando o produto **25** com 60 % de rendimento. Na segunda etapa, o composto **25** é hidrogenado utilizando-se carvão ativado com Pt 10 % como catalisador e pressão de 60 bar de H<sub>2</sub>, gerando a 2-metil-6-pentilpiperidina (**22**) com 95 % de rendimento. Os produtos obtidos nas duas etapas foram devidamente caracterizados.



Esquema 9. Síntese da 2-metil-6-pentilpiperidina a partir da 2,6-lutidina.

A separação dos enantiômeros foi possível após trifluoracetilação do composto **22** com piridina e anidrido trifluoracético e uso de cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização de chama (CG-DIC) com coluna quiral Chrompack CP-chirasil-Dex CB, levando a discriminação dos quatros estereoisômeros (**26 – 29**), conforme apresenta o Esquema 10.



Esquema 10. Trifluoracetilação de 2-metil-6-pentilpiperidina.

A separação obtida (Figura 10B) foi semelhante à que Pianaro e colaboradores<sup>28</sup> obtiveram para a 2-metil-6-undecilpiperidina sintetizada com a mesma metodologia (Figura 10A). Faz-se então uma extrapolação, sugerindo as mesmas configurações absolutas para o composto **22**, uma vez que seu estereoisômeros tiveram o mesmo comportamento cromatográfico. Pode-se concluir que a hidrogenação catalítica de 2-metil-6-alquilpiperidinas favorece a formação dos enantiômeros *cis*. Com as configurações absolutas sugeridas, pode-se ter ideia da seletividade das monoamina oxidases triadas.

As razões estereoisoméricas do padrão sintético foram obtidas a partir da integração das áreas dos picos do cromatograma (Figura 4B) e são apresentados na Tabela 2.

<i>trans</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>cis</i>
(2 <i>R</i> ,6 <i>R</i> )	(2 <i>S</i> ,6 <i>S</i> )	(2 <i>R</i> ,6 <i>S</i> )	(2 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )
2	2	48	48



**Figura 10.** Cromatogramas de CG-DIC em coluna quiral para a discriminação dos dois pares de enantiômeros obtidos para a) 2-metil-6-undecilpiperidina por Pianaro (2012)<sup>25</sup> e b) 2-metil-6-pentilpiperidina (**22**).

Os espectros obtidos para o composto **22** através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), também indicam a formação do isômero *cis*. Os hidrogênios ligados a posição 2 e 6 da porção piperidínica possuem sinais característicos próximo de 3 ppm que se distinguem para os diastereoisômeros *cis* e *trans*. No espectro de RMN de <sup>1</sup>H obtido por Pianaro<sup>30</sup> para a 2-metil-6-undecilpiperidina observa-se 4 sinais, enquanto para o composto **22** há somente 2 sinais, conforme apresenta a Figura 11.

<sup>&</sup>lt;sup>30</sup> Pianaro A. Ecologia Química de *Melipona quadrifasciata* LEPELETIER, *Scaptotrigona* aff. *Depilis* MOURE E *Solenopsis saevissima* SMITH, *Tese de doutorado*, Instituto de Química, Unicamp, **2012**.



**Figura 11.** Espectros de RMN de <sup>1</sup>H para a) 2-metil-6-undecilpiperidina obtido por Pianaro (2012)<sup>30</sup> (499,88 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS) e b) 2-metil-6-pentilpiperidina (**22**) (400,18 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS).

# 3.3.2 Separação dos enantiômeros da α-Metilbenzilamina

A  $\alpha$ -metilbenzilamina (**30**) (Figura 12) é um dos substratos mais utilizados na triagem de transaminases.<sup>31,32</sup> Assim, para os ensaios de biocatálise convencional também se utilizou uma  $\alpha$ -metilbenzilamina (**30**) racêmica e comercial como substrato.



**Figura 12.** Estrutura da  $\alpha$ -metilbenzilamina (**30**).

A separação enantiomérica foi obtida com o uso da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com coluna quiral Chiralcel OD-H. Para a discriminação dos enantiômeros foram feitas corridas utilizando a mistura racêmica (Figura 13A) e o enantiômero *S* (Figura 13B). Como pode-se perceber, o enantiômero R elui primeiro ( $t_R = 14.1$  min) que o enantiômero *S* ( $t_R = 15.6$  min).



**Figura 13.** Cromatogramas de CLAE para a) (±)  $\alpha$ -metilbenzilamina e b) (*S*)  $\alpha$ -metilbenzilamina.

<sup>&</sup>lt;sup>31</sup> Clay, D. *et. al. Tetrahedron:* Asymmetry, **2010**, v. 21, p. 2005-2009.

<sup>&</sup>lt;sup>32</sup> Mathew, S.; Shin, G.; Shon, M.; Yun, H. *Biotecnology and Bioprocess Engineering*, **2013**, v. 18, p. 1-7.

#### 3.3.3 Ensaios de biocatálise convencional

Utilizando os compostos ±22 e ±30 como substratos, espera-se observar as biotransformações representadas no Esquema 11.



Esquema 11. Biotransformações esperadas para os compostos 22 e 30.

Os ensaios de biocatálise foram realizados em duplicata, em tampão Sørensen pH 7,0, na presença de células integras e dos substratos a serem testados, também foi montado um controle contendo apenas o substrato. As reações foram interrompidas e analisadas durante o período de 21 dias, sendo extraídas com acetato de etila, acrescidas de um padrão interno (benzofenona) e analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).

As conversões enzimáticas (% C) foram determinadas utilizando as áreas dos picos cromatográficos do padrão interno e do reagente (Equação 2). Onde Apic e Apir são as áreas dos picos do padrão interno no controle e na reação respectivamente, e Arc e Arr são as áreas dos picos do reagente no controle e na reação reagente.

$$\%C = 100 - 100 \ x \ \frac{Ar_r \ x \ Api_c}{Ar_c \ x \ Api_r}$$

Equação 2

Os valores de excesso enantiomérico (% *ee*) foram calculados com base nas áreas de cada enantiômero (Equação 3).

$$\% ee = rac{diferença \, das \, cute{areas}}{soma \, das \, cute{areas}} \; x \; 100$$

Equação 3

Os resultados obtidos para as reações com a α-Metilbenzilamina (±30) encontram-se na Tabela 3.

Seletividade Microrganismo **Produto** % Conversão % ee 28M5 27 16 S 43M1 47 22 (34) 9M1 23M1-IS4 ND 37M-IS2

 Tabela 3. Resultados obtidos nos ensaios de biocatálise para o substrato ±30 após 21 dias.

ND = Não Detectado

Os microrganismos 9M1, 23M1-IS4 e 37M-IS2 não foram capazes de biotransformar o substrato  $\pm$ 30, sendo que apenas dois dos microrganismos selecionados (28M5 e 43M1) apresentaram essa capacidade; o produto 34 foi detectado no meio reacional a partir de 72 h de reação. Ao final de 21 dias o fungo 28M5 apresentou 27 % de conversão, enquanto o 43M1 converteu 47 % do substrato  $\pm$ 30. Porém, o produto formado (34) não era o esperado. Essa é uma das desvantagens de se utilizar células íntegras em biocatálise: uma enzima diferente pode atuar sobre o substrato fornecido, levando a um produto não desejado. Em relação aos excessos enantioméricos, os fungos não apresentaram boa capacidade de desracemização, de forma que os excessos ficaram na faixa dos 20 %, sendo que ambos os fungos apresentam maior conversão sobre o enantiômero *S*. As Figuras 14 e 15 apresentam os cromatogramas das reações biocatalisadas pelos fungos 28M5 e 43M1.



**Figura 14.** Cromatogramas de CG-EM das biotransformações realizadas por a) 28M5 e b) 43M1 sobre o substrato ±**30** com 21 dias. Nota-se a formação do produto **34**.



**Figura 15.** Cromatogramas de CLAE das biotransformações realizadas por a) 28M5 e b) 43M1 sobre o substrato ±**30** com 21 dias. Nota-se a preferência pela biotransformação do enantiômero *S*.



A Figura 16 ilustra o espectro de massas obtido para o produto 34.



Os resultados obtidos para as reações com a 2-metil-6-pentilpiperidina (±22) encontram-se na Tabela 4.

Microrganismo	Produto	Seletividade	% Conversão	% <b>ee</b>
37M-IS2	(33)	6 <i>R</i>	13	24
9M1	ND	-	-	-
23M1-IS4				
28M5				
43M1				

Tabela 4. Resultados obtidos nos ensaios de biocatálise para o substrato ±22 após 21 dias.

ND = Não Detectado

Um dos cinco microrganismos triados, o 37M-IS2 (*Marasmius sp.*), apresentou atividade monoamina oxidase sobre o substrato  $\pm 22$ , formando como produto, exatamente o composto desejado, a piperideína **33**. O composto **33** foi detectado no meio reacional a partir de 10 dias de reação. A conversão do substrato foi de 13 %, levando a um excesso enantiomérico de 24 %, levantando a hipótese que o microrganismo é *R* seletivo na posição 6 do anel piperidínico. As Figuras 17 e 18 apresentam os cromatogramas da reação biocatalisada pelo fungo 37M-IS2.



**Figura 17.** Cromatograma de CG-EM da biotransformação realizada pelo fungo 37M-IS2 sobre o substrato ±22 com 21 dias. Nota-se a formação do produto **33**.



**Figura 18.** Cromatograma de CG-FID da biotransformação realizada pelo fungo 37M-IS2 sobre substrato ±22 com 21 dias. Nota-se a preferência pela biotransformação do estereoisômero (2*S*, 6*R*).

A formação do produto **33** foi confirmada através de espectrometria de massas, uma vez que piperideínas 2,6-dissubstituídas possuem como característica um sinal intenso do íon molecular m/z 111, proveniente de um rearranjo de McLafferty, como mostra o espectro de massas da Figura 19.



Figura 19. Espectro de massas obtido por El (70 Ev) do composto 33.

# 3.3.4 Domesticação do fungo 37M-IS2 (*Marasmius sp.*) frente a 2-metil-6alquilpiperidinas

Visando uma maior conversão, e consequentemente desracemização, adicionou-se o substrato ±22 ao meio líquido de crescimento do fungo 37M-IS2, deixando as células crescerem por 48 h. Após o período de crescimento, as células foram lavadas com o tampão Sørensen pH 7,0 e os ensaios foram montados na presença do substrato ±22. Ao final de 21 dias, as células presentes nos ensaios foram inoculadas novamente em meio líquido na presença do substrato 22. Esse processo foi feito repetidamente, sem interrupções, por três vezes, conforme ilustrado no Esquema 12.



Esquema 12. Domesticação do Marasmius sp. frente a 2-metil-6-pentilpiperidina.

A adição do substrato ao meio de crescimento teve como objetivo induzir a maior expressão da enzima responsável pela atividade detectada; esse ciclo de exposição das células ao substrato levou a maior formação do produto **33**, de forma que podemos dizer que o microrganismo foi "domesticado" para realizar a biotransformação do substrato ±**22**.

Durante o terceiro ciclo de ensaio, o produto **33** foi detectado no meio reacional a partir de 96 h de reação. Ao final de 21 dias, a conversão do substrato  $\pm$ **22** foi de 38 %, resultando em um excesso enantiomérico de 73 %. As Figuras 20 e 21 apresentam os cromatogramas da reação biocatalisada pelo fungo 37M-IS2 ao final de 21 dias do terceiro ciclo de ensaio. Não se observou maior conversão do substrato  $\pm$ **22** a partir do quarto ciclo de ensaio.



**Figura 20.** Cromatograma de CG-EM da biotransformação realizada pelo fungo 37M-IS2 sobre o substrato ±22 ao final de 21 dias do terceiro ciclo de ensaio. Nota-se a maior formação do produto 33.



**Figura 21.** Cromatograma de CG-FID da biotransformação realizada pelo fungo 37M-IS2 sobre substrato ±22 ao final de 21 dias do terceiro ciclo de ensaio. A biotransformação levou a um excesso enantiomérico de 73 %.

# 4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este trabalho conseguiu cumprir os objetivos estabelecidos. A síntese de uma sonda fluorogênica para a detecção de transaminases e monoamina oxidases e a implementação de um ensaio de HTS para triagem de fungos foi feita com sucesso (Capítulo 1). A técnica de triagem de alto desempenho foi bastante útil, uma vez que nos permitiu selecionar 5 de 39 fungos. Um dos fungos pré-selecionados (37M-IS2 – *Marasmius sp.)* apresentou atividade monoamina oxidase frente a compostos do tipo 2-metil-6-alquilpiperidina, confirmando a eficiência da técnica de HTS e da sonda sintetizada na triagem de microrganismos.

Após uma técnica de "domesticação", o fungo 37M-IS2 apresentou conversão de 38 % sobre a 2-metil-6-pentilpiperidina, levando a um excesso enantiomérico de 73 %. Nota-se que esse microrganismo possui potencial para desracemização de piperidinas (Capítulo 2).

Futuramente, será feito o sequenciamento genético do fungo *Maramius sp.*, a fim de se rastrear a enzima responsável pela atividade encontrada. Expressando e purificando a enzima desejada, tem-se como perspectiva empregá-la em um processo quimio-enzimático para a síntese de 2-metil-6-alquilpiperidinas quirais. Com a enzima em mãos, será possível triar a atividade sobre outras aminas de interesse, abrindo o caminho para novos trabalhos.

#### **PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS**

# 5.1 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

#### 5.1.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As análises cromatográficas em camada delgada, para monitoramento das reações e acompanhamento das purificações dos produtos, foram realizadas empregando-se cromatofolhas de alumínio (folha padrão 20 x 20 cm), recobertas com sílica gel com indicador de fluorescência (Merck). A revelação dos compostos foi realizada por irradiação com lâmpada UV<sub>254nm</sub>, seguida de pulverização com solução reveladora de ácido fosfomolíbdico (10 % m/v de ácido fosfomolíbdico em etanol), solução reveladora de *p*-anisaldeído (*p*-anisaldeído, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ácido acético e etanol na razão de 1:2:1:100) ou reagente de Dragendorff (0,85 g de nitrato de bismuto (III), 10 g de ácido tartárico, 16 g de iodeto de potássio e 80 mL de água destilada) com posterior aquecimento a 300 °C com pistola aquecedora.

#### 5.1.2 Cromatografia em Coluna (CC)

As purificações dos compostos sintetizados foram realizadas por cromatografia "flash" em coluna, sendo utilizada sílica gel 60 µm (ACROS – 0,035-0,070 mm com poros de 6 nm) como fase estacionária e solventes destilados como eluentes. As dimensões das colunas e o volume coletados nas frações eram adequados aos compostos a serem separados. As frações coletadas foram comparadas por CCD e agrupadas por perfil de semelhança.

#### 5.1.3 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

As análises de CG-EM foram realizadas em cromatógrafo *Agilent 6890* com injetor automático *Agilent 7683B* e acoplado a detector seletivo de massas *HP 5973* que opera por impacto de elétrons (EI) com energia de ionização de 70 eV, na faixa de m/z 50-500. Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) com 5 % de fenilmetilsiloxano para a separação dos compostos analisados. As análises foram realizadas em fluxo constante de He (1 mL/min), com injetor a 250 °C, detector a 230 °C e injeções em modo "*splitless*" utilizando 1,0 µL da solução a ser analisada.

Os seguintes programas de temperatura de forno (rampas de aquecimento) foram utilizados:

**Programa 1:** Forno com temperatura inicial de 50 °C com incremento de temperatura de 20 °C/min até 290 °C. – Utilizado para análise do composto **7** e para a análise das extrações das reações de biocatálise.

**Programa 2:** Forno com temperatura inicial de 50 °C com incremento de temperatura de 25°C/min até 290°C. – Utilizado para análise do composto **25**.

**Programa 3:** Forno com temperatura inicial de 50 °C com incremento de temperatura de 5 °C/min até 150 °C, posteriormente incremento de 20 °C/min até 290 °C e 5 minutos isotermicamente a 290 °C – Utilizado para análise dos compostos 22, 26-29.

# 5.1.4 Cromatografia Gasosa acoplada à Detector de Ionização de Chama (CG-DIC)

A discriminação dos estereoisômeros **26-29** foram realizadas no cromatógrafo a gás *Agilent Technologies 6850*, com amostrador líquido automático *Agilent 6850 series* para 27 frascos, equipado com coluna capilar de sílica fundida *Chrompack®*, de fase quiral *Chirasil-β-ciclodextrina* (25 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Hidrogênio altamente puro foi empregado como gás de arraste. As análises foram realizadas com o injetor e o detector operando a 180 °C e a 150 °C, respectivamente. Um volume de 1 µL foi injetado no modo "*splitless*" e o fluxo do gás de arraste foi mantido constante em 2,0 mL/min. O programa da temperatura do forno utilizado para as trifluoroacetamidas foi de 120 °C com incremento de temperatura de 0,8 °C/min até 180 °C.

# 5.1.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A separação e o excesso enantiomérico do composto **30** foram obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência em 210 nm, utilizando equipamento *Agilent 1200 series* e coluna *Chiralpak* OD-H (250 x 4.6 mm) com fluxo constante de 1 mL/min (Hexano:Etanol - 90:10) e volume de injeção de 2 uL para os padrões e 7 uL para os extratos das reações de biocatálise.

# 5.2 MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS

#### 5.2.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetros *Bruker Avance III* 600 ( $B_0 = 14,1$  T) operando a 600,17 MHz para o <sup>1</sup>H e 150,91 MHz para o <sup>13</sup>C, ou *Bruker Avance III* 400 ( $B_0 = 9,4$  T) operando a 400,13 MHz para o <sup>1</sup>H e 100,63 MHz para o <sup>13</sup>C; todos equipados com sondas de 5 mm.

As amostras foram analisadas em tubos de ressonância de 5 mm de diâmetro. Os valores de deslocamentos químicos foram expressos em parte por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento em Hertz (Hz). Clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>, 7,23 ppm), metanol deuterado, (CD<sub>3</sub>OD 3,35 ppm e 4,78 ppm) e tetrametilsilano (TMS 0,0 ppm) foram utilizados como solventes e padrão de referência interna. As análises foram realizadas em temperatura ambiente. A multiplicidade dos sinais de <sup>1</sup>H foi indicada conforme a convenção: s, singleto; d, dubleto; t, tripleto; quin, quinteto; m, multipleto; dd, duplo dubleto.

Como dados auxiliares foram obtidos espectros de RMN de <sup>13</sup>C de DEPT-135 e DEPT-90. Os espectros de DEPT-135 apresentam carbonos de metila (CH<sub>3</sub>) e de metino (CH) como sinais positivos, enquanto os carbonos metilenos (CH<sub>2</sub>) aparecem como sinais negativos. Os carbonos quaternários não aparecem neste espectro. Os espectros DEPT-90 apresentam apenas sinais positivos para os carbonos CH.

Os espectros foram processados utilizando o programa ACD NMR Processor Academic Edition.

#### 5.2.2 Espectrometria de Massa com Ionização por Electrospray (ESI-EM)

Todos os experimentos foram realizados em espectrômetro de massas *Micromass Quattro Micro TM API*, com fonte de ionização por electrospray e analisador triplo quadrupolo (*Waters*). Nitrogênio gasoso foi utilizado para nebulização e dessolvatação. As amostras dos compostos **8** e **9** foram preparadas em uma concentração de 10,0 µg/mL em metanol. As amostras foram submetidas a infusão direta no espectrômetro de massas, empregando vazão da amostra de 50 µL/min e fluxo auxiliar de MeOH com 0,1 % de ácido fórmico (v/v) em uma vazão de 0,1 mL/min. As análises no modo positivo foram realizadas utilizando os seguintes parâmetros: voltagem do capilar: 3 KV, voltagem do cone: 25 V, voltagem do

extrator: 3 V, RF Lens 0,5 V, temperatura da fonte: 150 °C, temperatura de dessolvatação: 200 °C, fluxo do gás de dessolvatação: 800 L/h, fluxo do gás do cone: 50 L/h.

## 5.3 MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS DE FLUORESCÊNCIA

#### 5.3.1 Leitor de Microplacas

As medidas de fluorescência dos ensaios de HTS foram realizadas em Leitor de Microplacas *PerkinElmer EnSpire*. Para os ensaios, foram utilizados fonte de excitação em  $\lambda_{ex}$  = 360 nm e leitura de emissão em  $\lambda_{em}$  = 460 nm. As leituras foram feitas em 30 °C e em triplicata. Entre cada leitura, as microplacas foram agitadas por 5 segundos em modo orbital a 60 rpm.

#### **5.4 REAGENTES E SOLVENTES**

Foram utilizados reagentes e solventes de grau P.A, todos comprados comercialmente, sendo sempre tratados, quando necessário, conforme procedimentos descritos na literatura.

A piridina, o diclorometano, o éter etílico, e a 2,6-lutidina foram tratados com hidreto de cálcio. O tetrahidrofurano (THF) foi tratado com sódio metálico e benzofenona. Os solventes foram destilados ou bidestilados antes do uso.

As reações sensíveis à umidade foram realizadas em atmosfera inerte de nitrogênio.

#### 5.5 HIDROGENADOR

A hidrogenação do composto **25** foi realizada em um equipamento de hidrogenação marca Parr, série 3926, tipo *shaker*. Conforme ilustrado na Figura 22.



Figura 22. Hidrogenador Parr

# 5.6 PROCEDIMENTOS GERAIS ADOTADOS NO LABORATÓRIO DE BIOCATÁLISE

Todos os meios de cultura, soluções e materiais a serem utilizados diretamente com os microrganismos foram esterilizados a 121 °C, 1,5 Pa, por 20 minutos em autoclave.

Todas manipulações microbiológicas foram realizadas em capelas de fluxo laminar. Soluções de etanol 70 % (v/v) e hipoclorito (1 %) foram utilizadas para desinfetar as bancadas de trabalho e as capelas de fluxo laminar.

Todo material que esteve em contato direto com os microrganismos foi autoclavado antes de ser descartado.

# 5.7 MICRORGANISMOS UTILIZADOS

# 5.7.1 Coleção de Fungos da Pele

Os microrganismos avaliados nesse trabalho vieram da coleção de fungos isolados da pele humana disponível em nosso laboratório. Todo o processo de coleta, isolamento, identificação e preservação dos fungos foi feito por Carla Porto da Silva durante seu doutoramento em nosso grupo de pesquisa e encontra-se detalhado em sua tese<sup>27</sup>.

#### 5.7.2 Cultivo dos Microrganismos

Os microrganismos foram cultivados em placas de Petri descartáveis de poliestireno contendo meio de cultura MEA. Os microrganismos foram deixados em crescimento por 72 h à 30 °C. Para os ensaios de HTS, as células foram raspadas diretamente da placa de Petri.

Para os ensaios de biocatálise convencional, os microrganismos foram passados da placa de Petri para um *Erlenmeyer* de 500 mL contendo 200 mL de meio líquido ME, onde foram mantidos a 30 °C, com agitação de 200 rpm, por 48 h. Posteriormente, as células a serem utilizadas foram filtradas à vácuo.

 Meio MEA: extrato de malte e peptona Composição: extrato de malte (20 g), peptona (1 g), glicose (20 g), ágar (20 g) e água destilada (1 L).

# 5.8 PREPARO DE SOLUÇÕES

#### 5.8.1 Solução Tampão SØrensen (pH 7,0)

Preparou-se soluções estoques de 0,1 mol/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, dissolvendo-se 1,42 g deste sal em 100 mL de água destilada, e de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, dissolvendo-se 1,36 g deste sal em 100 mL de água destilada. A solução tampão com pH 7,0 foi preparada misturando-se 60 mL da solução de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 40 mL da solução de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Os valores de pH foram ajustados em pHmetro de bancada (Quimis Q400AS).

#### 5.8.2 Solução Tampão Borato (pH 7,4 e 20 mmol/L)

Preparou-se soluções estoques de 0,2 mol/L de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, dissolvendo-se 1,24 g desse ácido em 100 mL de água destilada, e 0,05 mol/L de bórax (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O) dissolvendo-se 1,91g desse sal em 100 mL de água destilada. A solução tampão com pH 7,4 foi preparada através da mistura de 1 mL da solução de bórax e 25 mL da solução de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>. A solução obtida foi então diluída para o volume de 100 mL. Os valores de pH foram ajustados em pHmetro de bancada (Quimis Q400AS).

# 5.8.3 Solução da Sonda Fluorogênica 9 (2 mmol/L)

Solução estoque da sonda fluorogênica **9** foi preparada a uma concentração de 20 mmol/L em acetonitrila. Posteriormente, a mesma foi diluída a uma concentração de 2,0 mmol/L em àgua:acetonitrila (1:1), constituindo a solução de trabalho. As soluções foram estocadas sob refrigeração.

# 5.8.4 Solução de Albumina de Soro Bovino (BSA) (5 mg/mL)

A solução de BSA foi preparada dissolvendo-se 5,0 mg de BSA em 1,0 mL de tampão borato pH 7,4. A mistura foi agitada suavemente para evitar a formação de espuma. Esta solução foi sempre preparada momentos antes da realização dos ensaios de HTS.

# 5.9 ENSAIOS DE TRIAGEM DE ALTO DESEMPENHO (HTS)

Os microrganismos foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura MEA e foram deixados em crescimento por 72 h à 30 ºC.

As células foram raspadas diretamente da placa de Petri, transferidas para *Eppendorf* estéril, pesadas e suspensas em tampão borato (pH 7,4 20 mmolar) até a concentração de 1 mg/mL.

Os experimentos de HTS foram montados e microplacas de polipropileno de 96 poços, sendo todos os ensaios realizados em quadruplicatas e os controles em duplicatas, conforme descrito a seguir:

- Ensaio (E) (linhas A-D): 10 μL de solução da sonda 9 (2 mmol/L), 80 μL de solução de BSA (5,0 mg/mL),10 μL de tampão borato (pH 7,4 e 20 mmol/L) e 100 μL de suspensão celular (1,0 mg/mL).
- Controle Negativo (CN) (linhas E-F): 10 μL de solução da sonda 9 (2 mmol/L), 80 μL de solução de BSA (5,0 mg/mL) e 110 μL de tampão borato (pH 7,4 e 20 mmol/L).
- Controle Positivo (CP) (linhas G-H): 10 μL de solução de umbeliferona (2 mmol/L), 80 μL de solução de BSA (5,0 mg/mL),10 μL de tampão borato (pH 7,4 e 20 mmol/L) e 100 μL de suspensão celular (1,0 mg/mL).

As microplacas foram embaladas em papel alumínio e saco plástico, armazenadas em *shaker* a temperatura de 30 °C e com agitação de 200 rpm.

O acompanhamento foi realizado a partir das leituras de emissão de fluorescência realizadas em 0, 24, 48, 72 e 96 horas após a montagem dos ensaios.

# 5.10 ENSAIOS DE BIOCATÁLISE CONVENCIONAIS

Para os ensaios de biocatálise, os microrganismos foram passados da placa de Petri para um *Erlenmeyer* de 500 mL contendo 200 mL de meio líquido ME, onde foram mantidos a 30 °C, com agitação de 200 rpm, por 48 h. Posteriormente, as células foram filtradas à vácuo e lavadas com tampão SØrensen pH 7,0.

Para a realização dos ensaios, pesou-se 1g de célula (peso úmido), que foi adicionada em 20 mL de tampão SØrensen pH 7,0 em frascos de *Erlenmeyer* de 25 mL. A esta suspensão foi adicionada 10 mg do substrato em avaliação. A solução resultante foi mantida sob agitação constante de 200 rpm a 30 °C, sendo monitorada durante 21 dias. Cada ensaio foi montado em duplicata, sendo montado também um ensaio controle (sem a presença das células), conforme ilustra a Figura 23.



Figura 23. Ensaios de biocatálise.

Para o monitoramento das reações, foram retiradas alíquotas de 1 mL que foram saturadas com NaCl e acrescidas de 100 µL de NaOH 5M. As soluções foram extraídas com acetato de etila (2 x 0,5 mL), sendo centrifugadas a 14.000 rpm para a separação da fase aquosa e fase orgânica. A fase orgânica foi recolhida, acrescida de padrão interno (benzofenona) e analisada por CG-EM (Programa 1).

# 5.11 PROCEDIMENTOS SINTÉTICOS

#### 5.11.1 Terc-butil-3-cloropropilcarbamato (7)



Dissolveu-se o cloridrato de 3-cloropropilamina (1,30 g, 10 mmol) em diclorometano (4,5 mL), adicionando-se a solução resultante em um balão de fundo redondo de duas bocas com agitação. Em seguida, a trietilamina (1,67 mL, 12 mmol) foi adicionada gota a gota no balão; a solução foi mantida sob agitação durante 15 min.

Di-*terc*-butil dicarbonato (2,18 g, 10 mmol) dissolvido em diclorometano (4,5 mL) foi adicionado gota a gota no balão reator durante um período de 1h. Manteve-se a reação por 18h, sob agitação e temperatura ambiente.

A reação foi diluída com diclorometano (10 mL), lavada com HCl 1 M (1 x 10 mL), água destilada (2 x 5 mL), solução aquosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (1 x 10 mL) e solução aquosa saturada de NaCl (1 x 10 mL). A fase orgânica foi separada e seca com MgSO<sub>4</sub> anidro. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida, sendo obtido como produto 1,60 g de óleo incolor do composto **7**, com 83 % de rendimento. Não foi necessária purificação.

**CCD** (Sílica, Acetato de Etila, Revelador: Ácido Fosfomolíbdico)  $R_f = 0,6$  **RMN de** <sup>1</sup>**H** (400,18 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta_{TMS} 0,00$ ):  $\delta 3,59$  (2H, t, J = 6 Hz, H-1), 3,28 (2H, q, J = 6 Hz, H-3), 1,97 (2H, quint, J = 6 Hz, H-2), 1,44 (9H, s, H-6, H-7, H-8). **RMN de** <sup>13</sup>**C** (100,63 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta_{CDCl_3}$  77,0):  $\delta$  155,9 (C, C-4), 79,4 (C, C-5), 42,3 (CH<sub>2</sub>, C-1), 37,9 (CH<sub>2</sub>, C-3), 32,6 (CH<sub>2</sub>, C-2), 28,4 (CH<sub>3</sub>, C-6, C-7, C-8). **IE/EM (70 eV)** *m/z* (intensidade relativa): 193 (M<sup>.+</sup>, ausente), 140 (14), 138 (41), 137 (4), 134 (5), 94 (5), 93 (4), 59 (48), 58 (7), 57 (100), 56 (11).

#### 

#### 5.11.2 *Terc*-butil [3-[(2-oxo-2H-cromen-7-il)oxi]propil]carbamato (8)

8

Umbeliferona (0,325 g, 2 mmol) dissolvida em acetona (10 mL), foi adicionada a um balão de fundo redondo de duas bocas com agitação e sob atmosfera de nitrogênio. A solução foi resfriada a 0 °C e adicionou-se ao balão *terc*-butil-3-cloropropilcarbamato (0,956 g, 5 mmol), carbonato de potássio (0,47 g, 3,5 mmol) e iodeto de sódio (0,45 g, 3,0 mmol), respectivamente.

A reação foi mantida por 18h em refluxo a 60  $^{\circ}$ C, sob agitação e atmosfera de nitrogênio. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O produto bruto (1,527 g) foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel (eluente hexano:acetato de etila, 2:1, v/v), sendo obtido ao final 0,57 g de sólido branco do composto **8**, com 89 % de rendimento.

**CCD** (Sílica, Hexano:Acetato de Etila, 1:1, v/v, Revelador: Ácido Fosfomolíbdico)  $R_{f}=0,4$ 

**RMN de** <sup>1</sup>**H** (400,18 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta_{CD3OD}$  4,87 ppm):  $\delta$  7,86 (1H, d, J = 9 Hz, H-3), 7,51 (1H, d, J = 9 Hz, H-9), 6,92 (1H, dd, J = 9 e 2 Hz, H-8), 6,88 (1H, d, J = 2 Hz, H-6), 6,23 (1H, d, J = 9 Hz, H-2), 4,10 (2H, t, J = 6 Hz, H-10), 3,24 (2H, q, J = 6 Hz, H-12), 1,97 (2H, quint, J = 6 Hz, H-11), 1,42 (9H, s, H-15,H-16, H-17).

**RMN de** <sup>13</sup>**C** (100,63 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ<sub>CD3OD</sub> 49,2 ppm): δ 164,1 (C, C-7), 163,5 (C, C-1), 158,7 (C, C-13), 157,2 (C, C-5), 145,9 (CH, C-3), 130,6 (CH, C-9), 114,4 (CH, C-8), 114,1 (C, C-4), 113,5 (CH, C-2), 102,4 (CH, C-6), 80,1 (C, C-14), 67,5 (CH<sub>2</sub>, C-10), 38,4 (CH<sub>2</sub>, C-12), 30,7 (CH<sub>2</sub>, C-11), 28,9 (CH<sub>3</sub>, C-15, C-16, C17).

**ESI+**/**EM**: 358,1 ( $C_{17}H_{20}NO_5K^+$ ), 342,1 ( $C_{17}H_{20}NO_5Na^+$ ), 320,1 ( $C_{17}H_{21}NO_5H^+$ ).

MM.: 319,35 g/mol

# 5.11.3 7-(3-aminopropóxi)cumarina (9)



*Terc*-butil [3-[(2-oxo-2H-cromen-7-il)oxi]propil]carbamato (**8**) (160 mg, 0,5 mmol), foi dissolvido, dentro de um balão de duas bocas, em uma solução de ácido trifluoracético (10 mL, 50 % v/v), diclorometano (10 mL) e triisopropilsilano (20 uL). A reação foi mantida sob agitação, em temperatura ambiente, por 30 minutos. O produto bruto obtido (0,1626 g) foi purificado em cartucho Sep-Pak (fase reversa, C18, 3 cc, Waters) utilizando MeOH como eluente. Após purificação, obteve-se 0,125 g do composto **9** na forma de um sólido branco, levemente acinzentado (rendimento quantitativo).

**CCD** (Sílica, Hexano:Acetato de Etila, 1:1, v/v, Revelador: Ácido Fosfomolíbdico)  $R_{f}=0,2$ 

**RMN de** <sup>1</sup>**H** (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ<sub>CD3OD</sub> 4,87 ppm): δ 7,91 (1H, d, *J* = 9 Hz, H-3), 7,58 (1H, d, *J* = 9 Hz, H-9), 6,98 (1H, dd, *J* = 9 e 2,4 Hz, H-8), 6,96 (1H, d, *J* = 2,4 Hz, H-6), 6,28 (1H, d, J = 9 Hz, H-2), 4,23 (2H, t, *J* = 6 Hz, H-10), 3,19 (2H, q, *J* = 6 Hz, H-12), 2,20 (2H, quint, *J* = 6 Hz, H-11).

**RMN de** <sup>13</sup>**C** (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ<sub>CD3OD</sub> 49,2 ppm): δ 163,5 (C, C-7), 163,4 (C, C-1), 157,2 (C, C-5), 145,8 (CH, C-3), 130,7 (CH, C-9), 114,7 (C, C-4), 114,2 (CH, C-8), 113,9 (CH, C-2), 102,6 (CH, C-6), 67,0 (CH<sub>2</sub>, C-10), 38,6 (CH<sub>2</sub>, C-12), δ 28,3 (CH<sub>2</sub>, C-11).

**ESI+**/**EM**: 220,3 (C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>H<sup>+</sup>).

# 5.11.4 2-metil-6-pentilpiridina (25)



A 2,6-lutidina (1,1 mL, 1 equivalente) previamente tratada, foi solubilizada em THF seco (10 ml), sob atmosfera de nitrogênio com agitação magnética e banho de gelo (0 °C). Uma solução de *n*-butillítio (7 mL, 1,2 equivalente) foi adicionada lentamente a mistura reacional. Após a adição do *n*-butillítio, retirou-se o banho de gelo e manteve-se a reação em temperatura ambiente por 15 minutos. A mistura reacional foi colocada em refluxo (35-40 °C) por 15 minutos em banho de glicerina. Em seguida, colocou-se novamente a mistura reacional em banho de gelo e adicionou-se lentamente 1-bromobutano (1 mL,1,2 equivalente). A reação foi mantida por 18 horas sob agitação magnética e parada com pedaços de gelo. O produto foi extraído a adição de água destilada (25 mL) e acetato de etila (2 x 20 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O produto bruto (1,8 g) foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel (eluente hexano:acetato de etila, 9:1, v/v), sendo obtido ao final 0,87 g de um óleo amarelo do composto **25**, com 60 % de rendimento.

**CCD** (Sílica, Hexano:Acetato de Etila, 8:2, v/v, Revelador: Anisaldeído)  $R_f = 0,64$ **RMN de** <sup>1</sup>**H** (400,18 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta_{TMS}$  0,00):  $\delta$  7,47 (1H, t, J = 7,6 Hz, H-4), 6,95 (2H, dd, J = 3,3 e 7,6 Hz, H-3, H-5), 2,74 (2H, t, J = 7,8 Hz, H-7), 2,53 (3H, s, H-12), 1,70 (2H, quin, J = 5,3 Hz, H-8), 1,35 (4H, m, H-9, H-10), 0,89 (3H, t, J = 6,9 Hz, H-11).

**RMN de** <sup>13</sup>**C** (100,63 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>CDCl3</sub> 77,0): δ 161,9 (C, C-2), 157,6 (C, C-6), 136,4 (CH, C-4), 120,3 (CH, C-3), 119,4 (CH, C-5), 38,6 (CH<sub>2</sub>, C-7), 31,7 (CH<sub>2</sub>, C-8), 29,9 (CH<sub>2</sub>, C-9), 24,5 (CH<sub>3</sub>, C-12), 22,5 (CH<sub>2</sub>, C-10), 14,0 (CH<sub>2</sub>, C-11).

**IE/EM (70 eV)** *m/z* (intensidade relativa): 163 (M<sup>.+</sup>, presente), 134 (28), 132 (3), 121 (6), 120 (27), 108 (9), 107 (100), 106 (7), 92 (4), 77 (5), 65 (4).

# 5.11.5 2-metil-6-pentilpiperidina (22)



A 2-metil-6-pentilpiridina (0,5 g) foi solubilizada em metanol (8 mL) e ácido acético glacial (40 mL). Posteriormente, foi adicionado Pt/C 10 % (100 mg). A reação de hidrogenação foi mantida em pressão de 60 bar de H<sub>2</sub> com agitação de 500 rpm durante 48 horas. A mistura reacional foi filtrada em funil de Buchner com placa porosa com Celite 545 (2 g), eluído com metanol (50 mL). O solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado com por cromatografia em coluna de sílica gel (eluente: metanol). Após purificação, obteve-se 0,5 g de óleo amarelo do composto **22** com rendimento quantitativo.

**CCD** (Sílica, Metanol/Clorofórmio (5 %), Revelador: Dragendorff)  $R_f = 0.5$ 

**RMN de** <sup>1</sup>H (400,18 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>TMS</sub> 0,00): δ 3.05 (1H, m, H-2), 2,88 (1H, s, H-6), 2,00-1,25 (18H, m), 0,87 (3H, t, *J* = 8 Hz, H-11)

**RMN de** <sup>13</sup>**C** (100,63 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>CDCl3</sub> 77,0): δ 57,4 (CH, C-2), 53,4 (CH, C-6), 33,3 (CH<sub>2</sub>, C-7), 31,4 (CH<sub>2</sub>, C-3), 30,8 (CH<sub>2</sub>, C-5), 27,9 (CH<sub>2</sub>, C-4), 25,0 (CH<sub>2</sub>, C-8), 23,0 (CH<sub>2</sub>, C-9), 22,8 (CH<sub>3</sub>, C-12), 22,5 (CH<sub>2</sub>, C-10), 19,2 (CH<sub>2</sub>, C-11).

**IE/EM (70 eV)** *m/z* (intensidade relativa): 169 (M<sup>+</sup>, presente), 168 (3), 154 (7), 126 (2), 99 (7), 98 (100), 81 (2), 70 (4), 69 (2), 56 (3), 55 (3).



#### 5.11.6 2,2,2-trifluor-1-(2-metil-6-pentilpiperidin-1-il)etanona (26-29)

Solubilizou-se 2-metil-6-pentilpiperidina (22) (2 mg) em éter étilico seco (1 mL). Em seguida, adicionou-se lentamente à reação piridina tratada com hidreto de cálcio (0,8 mL) e anidrido trifluoracético (200 µL), com agitação magnética e banho de glicerina a 30 °C. A reação foi mantida por 30 minutos e, posteriormente, diluída com acetato de etila (4 mL) e lavada com solução aquosa saturada de sulfato de cobre (4 x 4 mL). A fase orgânica foi separada e seca com MgSO4 anidro. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida, sendo obtido como produto 2,3 mg de óleo levemente esverdeado dos compostos **26-29**, com rendimento quantitativo. Não foi necessária purificação.

**CCD** (Sílica, Hexano:Dicloro metano, 8:2, v/v, Revelador: Anisaldeído) R<sub>f</sub>= 0,7 **IE/EM (70 eV)** *m/z* (intensidade relativa): 265 (M<sup>.+</sup>, presente), 222 (2), 196 (4), 195 (10), 194 (100), 152 (3), 140 (9), 81 (12), 69 (4), 67 (2), 55 (15).

# 6. ANEXOS



Anexo 1. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400,18 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de *terc*-butil-3-cloropropilcarbamato (7).



Anexo 2. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (100,63 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de *terc*-butil-3-cloropropilcarbamato (7).



Anexo 3. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C DEPT 135<sup>o</sup> (100,63 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de *terc*-butil-3cloropropilcarbamato (7).



Anexo 4. Espectro de massas obtido por EI (70 eV) de terc-butil-3-cloropropilcarbamato (7).



**Anexo 5.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400,18 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de *terc*-butil [3-[(2-oxo-2H-cromen-7-il)oxi]propil]carbamato (8).



**Anexo 6.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (100,63 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de *terc*-butil [3-[(2-oxo-2H-cromen-7-il)oxi]propil]carbamato (8).



**Anexo 7.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C DEPT 135<sup>o</sup> (100,63 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de *terc*-butil [3-[(2-oxo-2H-cromen-7-il)oxi]propil]carbamato (**8**).



**Anexo 8.** Espectros de massas obtido por ESI (+) para *terc*-butil [3-[(2-oxo-2H-cromen-7-il)oxi]propil]carbamato (8).



Anexo 9. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (600,17 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de 7-(3-aminopropóxi)cumarina (9).



Anexo 10. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (150,91 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de 7-(3-aminopropóxi)cumarina (9)



**Anexo 11.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C DEPT 135<sup>o</sup> (150,91 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de 7-(3-aminopropóxi)cumarina (9).



Anexo 12. Espectros de massas obtido por ESI (+) para Síntese de 7-(3-aminopropóxi)cumarina (9).



Anexo 13. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400,18 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 2-metil-6-pentilpiridina (25).



Anexo 14. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (100,63 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 2-metil-6-pentilpiridina (25).


Anexo 15. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C DEPT 135º (100,63 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 2-metil-6-pentilpiridina (25).



Anexo 16. Espectro de massas obtido por El (70 eV) de 2-metil-6-pentilpiridina (25).



Anexo 17. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400,18 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 2-metil-6-pentilpiperidina (22).



Anexo 18. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (100,63 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 2-metil-6-pentilpiperidina (22).



Anexo 19. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C DEPT 135<sup>o</sup> (100,63 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 2-metil-6-pentilpiperidina (22).



Anexo 20. Espectro de massas obtido por El (70 eV) de de 2-metil-6-pentilpiperidina (22).



**Anexo 21.** Espectro de massas obtido por EI (70 eV) de 2,2,2-trifluor-1-(2-metil-6-pentilpiperidin-1-il)etanona (**26-29**).