

IRIS DOS SANTOS TEIXEIRA

Síntese enzimática de amins quirais via aminação redutiva

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química

Orientadora: Profa. Dra. Cíntia Duarte de Freitas Milagre  
Coorientador: Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre

Araraquara

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

T266s Teixeira, Iris dos Santos  
Síntese enzimática de aminas quirais via aminação reductiva / Iris dos Santos Teixeira. – Araraquara : [s.n.], 2018  
119 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química

Orientador: Cintia Duarte de Freitas Milagre

Coorientador: Humberto Márcio Santos Milagre

1. Biocatálise. 2. Síntese assimétrica. 3. Enzimas microbianas. 4. Análise enzimática. 5. Biologia molecular.

I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

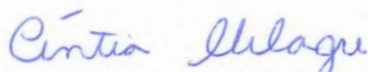
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Síntese enzimática de amins quirais via aminação redutiva"

AUTORA: IRIS DOS SANTOS TEIXEIRA

ORIENTADORA: CINTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE

COORDENADOR: HUMBERTO MÁRCIO SANTOS MILAGRE


Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



Profª. Drª. CINTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE  
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. IAN CASTRO GAMBOA  
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. LEANDRO HELGUEIRA DE ANDRADE  
Departamento de Química Fundamental / Instituto de Química - USP - São Paulo

Araraquara, 19 de fevereiro de 2018

## DADOS CURRICULARES

### Dados Pessoais

Nome: Iris dos Santos Teixeira  
Nome em citações bibliográficas: Teixeira, I.S.  
Filiação: Aparecido da Silva Teixeira  
Rosalina dos Santos Teixeira  
Data de nascimento: 02 de outubro de 1991  
Naturalidade: Americana/SP  
Nacionalidade: Brasileira

### Formação Acadêmica

-Curso de pós-graduação modalidade Mestrado em química, área de concentração: Química, Título: “Síntese enzimática de aminas quirais via aminação redutiva” sob a orientação da Profa. Dra. Cíntia Duarte de Freitas Milagre, no Instituto de Química, UNESP, Araraquara, no período de 2016 a 2018 com bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

-Graduada em Química pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), de 2011 a 2015.

### Formação complementar

- Curso de curta duração “Asymmetric synthesis of bioactive compounds”, com carga horária de 9 horas, na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, Brasil, 2017.

- Curso de curta duração “Química Medicinal”, com carga horária de 12 horas, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Araraquara, Brasil, 2013.

- Curso de curta duração “Química na elucidação de crimes: análises forenses”, com carga horária de 28 horas, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, São Paulo, Brasil, 2011.

### Estágios e Bolsas Auxílio

- Bolsa de mestrado no período de 2016 a 2018, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

- Programa de Estágio Docente na disciplina Química Orgânica Experimental I, do curso de graduação em química (BQ/BQT), sob a supervisão do Prof. Dr. Rafael Mafra de Paula Dias no Instituto de Química, UNESP, Araraquara, em 2016.

- Estágio em Iniciação Científica “Estrógenos em sedimento e material particulado em ambiente marinho: estudo analítico”, sob a orientação da Profa. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi, de 01/02/2014 a 01/01/2015, com bolsa da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo 2013/20877-4).

### Apresentação de trabalho em Congressos

- **TEIXEIRA, I. S.;** Milagre, CDF. Enzymatic synthesis of chiral amines and/or alcohols from ketones, Workshop CERSUSCHEM, São Pedro, 2017.

- **TEIXEIRA, I. S.**; GONCALVES, R. M.; MARCHI, M. R. R. D. Aplicação do método QUECHERS na determinação de estrógenos em sedimento marinho: dados iniciais, XXVI Congresso de Iniciação Científica (CIC), 2014.

#### **Participação em eventos**

Workshop CERSUCHEM, 2017

Pint of Science Brasil, 2017

Workshop Inovações em análise de Enantiômeros, 2016.

Workshop Mulheres na Ciência: o gênero na pós graduação, 2016.

XXVI Congresso de Iniciação Científica (CIC), 2014.

*Para meus pais,  
Rosalina e Aparecido*

## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Profa. Dra. Cintia Duarte de Freitas Milagre, pela convivência durante esses dois anos, pela confiança depositada em mim, pelo aprendizado, amizade, e conselhos dados.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre, pelas contribuições com esse trabalho, pela amizade e pelo aprendizado.

Ao Instituto de Química e Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, pela oportunidade e infraestrutura concedidas.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Ao CERSusChem e INCT-BioNat pelo auxílio financeiro ao grupo de pesquisa.

À CAPES pela manutenção do Portal de Periódicos, essencial para que essa pesquisa fosse realizada.

Aos amigos e colegas do grupo de pesquisa, cuja convivência diária tornaram o trabalho muito mais agradável.

Aos técnicos e funcionários do IQ, Naira, Alberto, Marquinhos, Nivaldo e Lucinéia.

Ao Prof. Dr. Uwe Bornscheuer do Instituto de Bioquímica (Departamento de Biotecnologia e Catálise Enzimática) da Universidade de Greifswald – Alemanha, pela colaboração e envio dos plasmídeos contendo as  $\omega$ -transaminases.

Ao Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos pela colaboração e envio de um dos substratos.

À Profa. Dra. Maria Célia Bertolini pela concessão de uso da centrífuga. Ao mestrando Jonatas Campanella pelo auxílio em manusear o equipamento.

À Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento pelas análises de HPLC-CD. À Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos pela coluna de HPLC emprestada. À mestranda Camila pelos auxílios com o equipamento.

À minha família, meus pais Rosalina e Aparecido e minha irmã Lara, pelo incentivo, apoio e por sempre acreditarem em mim.

Ao Matheus, cujo apoio, presença, carinho e companheirismo foram fundamentais durante esse período.

À minha segunda família, Mônica e vó Clemilde, pelo carinho, confiança e incentivo.

.

*“Abram os olhos e vejam o máximo que puderem,  
antes que eles se fechem para sempre.” Anthony Doerr*



## RESUMO

As  $\omega$ -transaminases são enzimas dependentes de piridoxal-5-fosfato (PLP) que catalisam a transferência de grupos amino para aldeídos e/ou cetonas. Quando as cetonas utilizadas são pró-quirais, elas produzem aminas opticamente ativas por meio de síntese assimétrica. Nesse trabalho foram estudadas as sínteses assimétricas de aminas primárias, a partir de cetonas proquirais. Cinco diferentes substratos foram avaliados perante alguns biocatalisadores contendo  $\omega$ -transaminases, entre eles enzimas comerciais, micro-organismos da Coleção Microbiana do Milagre Research Group e enzimas selvagens expressas heterologicamente em *E. coli*. As enzimas comerciais foram empregadas na otimização das condições reacionais e avaliação dos substratos, com conversões e ee maiores que 99%, para dois dos substratos estudados. Os dois micro-organismos selvagens avaliados não foram capazes de realizar a reação de síntese assimétrica de aminas. Entretanto, observou-se a ação de enzimas ene-redutases no micro-organismo MLH 51, e de cetoredutases em ambos. As conversões, apesar de modestas, possuíram bons excessos enantioméricos (78-98%). Por fim, os as enzimas expressas heterologicamente em *E. coli* apresentaram potencial para a aminação redutiva de substratos contendo anéis heterocíclicos e estruturas planares. Embora os valores de conversão observados não sejam ainda satisfatórios, os excessos enantioméricos obtidos quando usadas essas enzimas foram de bons a excelentes (84 a >99%). Com os substratos estudados foi possível avaliar a classe de compostos adequados para as  $\omega$ -transaminases, sendo que a presença de um grupo éter mostrou-se ligada a melhores valores de conversão quando usada essa classe de enzima.

**Palavras-chave: Biocatálise, aminas quirais, transaminases**

## ABSTRACT

$\omega$ -transaminases are pyridoxal-5-phosphate (PLP)-dependent enzymes that catalyse the transfer of an amino group from an amino donor to an aldehyde and/or ketone. When the starting ketones are prochiral, they produce optically active amines by asymmetric synthesis. In this work the asymmetric synthesis of primary amines was studied from prochiral ketones. Five different substrates were evaluated towards some biocatalysts containing  $\omega$ -transaminases, among them commercial enzymes, microorganisms from the Microbial Collection of the Milagre Research Group and wild enzymes expressed heterologously in *E. coli*. Commercial enzymes were employed in the optimization of the reaction conditions and evaluation of the substrates, with conversions and ee higher than 99%, for two of the evaluated substrates. The two wild-type microorganisms evaluated were not able to perform the reductive amination reaction. However, the action of ene-reductase enzymes in the microorganism MLH 51 and ketoreductases in both were observed. Conversions, although modest, had good enantiomeric excesses (78-98%). Finally, enzymes expressed heterologously in *E. coli* presented potential for reductive amination of substrates containing heterocyclic rings and planar structures. Although the observed conversion values are still not satisfactory, the enantiomeric excesses obtained when using these enzymes were great to excellent (84 to >99%). With the substrates studied, it was possible to evaluate the class of compounds suitable for the  $\omega$ -transaminases, and the presence of an ether group was shown to be bound to better conversion values when this class of enzyme was used.

**Keywords: Biocatalysis, chiral amines,  $\omega$ -transaminases.**

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fármacos contendo aminas quirais	18
Figura 2 Estratégias para obtenção de aminas quirais	19
Figura 3 Estrutura tridimensional da transaminase (R)-seletiva de <i>A. fumigatus</i> (THOMSEN et al., 2014)	28
Figura 4 Representação do sítio catalítico das $\omega$ -transaminases (HÖHNE et al., 2010)	28
Figura 5. Moléculas alvo desse estudo	29
Figura 6 Substratos estudados nesse trabalho	45
Figura 7 Fluxograma contendo a estratégia utilizada nas reações enzimáticas	46
Figura 8 Estrutura da 4-(2-furanil)-3-buten-2-ona <b>1d</b>	48
Figura 9 Estrutura da 4-(2-furanil)-2-butanona <b>1e</b>	49
Figura 10 Estrutura da 4-fenil-3-buten-2-amina <b>2b</b>	51
Figura 11 Estrutura da 4-fenil-2-butanamina <b>2c</b>	52
Figura 12 Estrutura da 4-(2-furanil)-3-buten-2amina <b>2d</b>	52
Figura 13 Estrutura da 4-(2-furanil)-2-butanamina <b>2e</b>	53
Figura 14 Espectro de massas (IE, 70 eV) da imina	55
Figura 15 Cromatograma obtido usando a isopropilamina como doador amino. *sinal presente nas reações enzimáticas usando essa enzima	56
Figura 16 Cromatograma da reação com a enzima a $\omega$ -transaminase comercial (R)-seletiva recombinante de <i>Aspergillus fumigatus</i> e composto <b>1c</b> . (Rosa: padrão racêmico da amina <b>2c</b> acetilada; em Preto: enantiômero <i>R</i> puro)	58
Figura 17 Cromatograma referente a reação do micro-organismo MLH 51 e composto <b>1d</b>	61
Figura 18 Espectro de massas (IE, 70 eV), do 4-fenil-2-butanol	61
Figura 19 Espectro de massas (IE, 70 eV) do 4-(2-furanil)-2-butanol	61
Figura 20 Curva Analítica - Ensaio de Bradford	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Condições de expressão das $\omega$ -transaminases	36
Tabela 2. Rendimentos e conversões obtidos nas reações de aminação redutiva	40
Tabela 3. Condições empregadas na reação teste	54
Tabela 4. Condições otimizadas para a reação de transaminação	55
Tabela 5. Conversões obtidas variando o doador amino	56
Tabela 6. Reações empregando a $\omega$ -transaminase comercial (R)-seletiva recombinante de <i>Aspergillus fumigatus</i>	58
Tabela 7. Reações empregando como biocatalisadores os micro-organismos MLH 15 e MLH 51	59
Tabela 8 Reações de formação do álcool com os micro-organismos MLH 15 e MLH 51	60
Tabela 9 Curva analítica do Ensaio de Bradford	62
Tabela 8 Concentração das proteínas totais presentes nos extratos enzimáticos pós diálise	63
Tabela 11 Reações usando extratos enzimáticos frente aos substratos <b>1a-e</b>	64

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 Etapa biocatalítica na síntese do Montelukaste	21
Esquema 2. Etapa biocatalítica da síntese da sitagliptina	22
Esquema 3 Etapas da reação de transaminação. Fonte: (MATHEW; YUN, 2012)	23
Esquema 4. Proposta mecanística de atuação de $\omega$ -transaminases. Fonte: (FUCHS; FARNBERGER; KROUTIL, 2015)	24
Esquema 5 Reações catalisadas pela $\omega$ -transaminase	25
Esquema 6 Métodos enzimáticos para remoção do piruvato	27
Esquema 7 Hidrogenação catalítica para síntese da 4-fenil-2-butanona <b>1c</b>	37
Esquema 8. Síntese da 4-(2-furanil)-3-buten-2-ona <b>1d</b>	38
Esquema 9 Síntese da 4-(2-furanil)-2-butanona <b>1e</b>	39
Esquema 10 Aminoação redutiva para síntese dos compostos <b>2b-2e</b>	40
Esquema 11. Reação modelo de aminoação redutiva	45
Esquema 12. Síntese da 4-fenil-2-butanona <b>1c</b>	47
Esquema 13. Síntese da 4-(2-furanil)-3-buten-2-ona <b>1d</b>	48
Esquema 14. Síntese da 4-(2-furanil)-2-butanona <b>1e</b>	49
Esquema 15. Aminoação redutiva para síntese dos padrões racêmicos das aminas	50
Esquema 16. Reação teste de biotransformação empregando as condições de Da Cruz	54
Esquema 17. Reação entre feniletilamina e composto <b>1a</b>	55
Esquema 18. Biotransformação empregando $\omega$ -transaminase (S)-seletiva recombinante de <i>E. coli</i> e composto <b>1b</b>	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$^{13}\text{C}$  RMN - Ressonância magnética nuclear de carbono 13

$^1\text{H}$  RMN - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

AlaDH – Alanina desidrogenase

ALS – acetolactato sintase

Amp – Ampicilina

ATR – *Attenuated total reflection* (Reflexão total atenuada)

BSA – *Bovine serum albumine* (Albumina do soro bovino)

Can – Kanamicina

CCD – Cromatografia em camada delgada

CCDP – Cromatografia em camada delgada preparativa

$\text{CDCl}_3$  – Clorofórmio deuterado

DMAP – 4-dimetilaminopiridina

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

DSC – *Dry silica chromatography* (Cromatografia *flash* em sílica seca)

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido etilenodiamino tetra-acético)

ee – excesso enantiomérico

FDH – Formato desidrogenase

GC-FID – *Gas chromatography with flame ionization detector* (Cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização em chama)

GC-MS – *Gas chromatography with mass spectrometer* (Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas)

GDH – Glicose desidrogenase

HPLC – *High pressure liquid chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

IPTG - Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosida

IUBMB – *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular)

IV – Infravermelho

$J$  – constante de acoplamento

KRED – *Ketoreductases* (Cetorreductase)

LB – *Luria Broth*

LDH – Lactato desidrogenase

*m/z* – razão massa carga

NAD(P)H - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NB – *Nutrient Broth*

Pd/C – Paládio suportado em carvão ativado

PDC – Piruvato descarboxilase

PLP – Piridoxal-5-fosfato

PMP – Piridoxamina-5-fosfato

PMSF – *phenylmethylsulfonyl fluoride* (fluoreto de fenilmetilsulfonila)

ppm – partes por milhão

q.s.p – Quantidade suficiente para

rpm – rotações por minuto

SOC - *Super Optimal Broth*

t.a. – temperatura ambiente

TMS – Tetrametilsilano

$\omega$ -TA -  $\omega$ -transaminases

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Aminas quirais	18
1.2. Enzimas e Biocatálise	19
1.3. Transaminases	22
2. OBJETIVOS	30
3. PARTE EXPERIMENTAL:	31
3.1. Considerações Gerais	31
3.1.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono (RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ )	31
3.1.2. Métodos Cromatográficos	31
3.1.3. Espectroscopia no Infravermelho - (IV)	33
3.1.4. Ponto de Fusão	33
3.1.5. Biocatalisadores	33
3.1.6. Plasmídeos e linhagem de <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> )	34
3.1.7. Meios de cultura e condições de crescimento	34
3.1.8. Tampões	34
3.1.9. Transformação utilizando <i>E. coli</i> quimicamente competente	35
3.1.10. Expressão das $\omega$ -transaminases	35
3.1.11. Lise celular	36
3.1.12. Diálise dos extratos enzimáticos	36
3.1.13. Quantificação das enzimas - Método de Bradford	37
3.2. Procedimento experimental e dados espectroscópicos dos compostos sintetizados	37
3.2.1. Procedimento de hidrogenação catalítica para síntese da 4-fenil-2-butanona 1c	37
3.2.2. Procedimento de reação aldólica para síntese da 4-(2-furanil)-3-buten-2-ona 1d	38
3.2.3. Procedimento de hidrogenação catalítica para síntese da 4-(2-furanil)-2-butanona 1e	39
3.2.4. Procedimento geral da aminação reductiva	40
3.2.5. Procedimento geral para reação de acetilação das aminas	42
3.2.6. Procedimento geral para reação de redução com $\text{NaBH}_4$ para síntese dos padrões racêmicos dos álcoois	42
3.3. Reações enzimáticas	43
3.3.1. Procedimento geral para reação com enzima $\omega$ -transaminase comercial	43



3.3.2.	Procedimento geral para reação com extratos enzimáticos dialisados	43
3.3.3.	Procedimento geral para reação utilizando micro-organismos	43
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO:	45
4.1.	Estratégia de trabalho	45
4.2.	Síntese dos substratos e padrões racêmicos	47
4.2.1.	Síntese da 4-fenil-2-butanona 1c	47
4.2.2.	Síntese da 4-(2-furânil)-3-buten-2-ona 1d	48
4.2.3.	Síntese da 4-(2-furânil)-2-butanona 1e	49
4.2.4.	Aminação redutiva para síntese dos compostos 2b-2e	50
4.3.	Reações enzimáticas	54
4.3.1.	Otimização das condições reacionais	54
4.3.2.	Reação com a enzima $\omega$ -transaminase (S)-seletiva recombinante de <i>E. coli</i> e substrato 1b	57
4.3.3.	Reação com $\omega$ -transaminase comercial (R)-seletiva recombinante de <i>Aspergillus fumigatus</i>	57
4.3.5.	Reações com extratos enzimáticos	61
5.	CONCLUSÕES	67
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
7.	ANEXOS	73

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Aminas quirais

As aminas enantiomericamente puras e seus derivados desempenham um importante papel nas indústrias química, agroquímica e farmacêutica, sendo blocos construtores chave na síntese de fármacos e pesticidas (ANDRADE; KROUTIL; JAMISON, 2014; BORNSCHEUER; DE SOUZA; MIRANDA, 2017; GHISLIERI; TURNER, 2014; LIU; WANG; ZHANG, 2013; MALIK; PARK; SHIN, 2012). É estimado que cerca de 40% dos fármacos possuem em sua estrutura um grupo amino quiral (GHISLIERI; TURNER, 2014). Na Figura 1 encontram-se representados alguns exemplos de fármacos contendo aminas quirais.

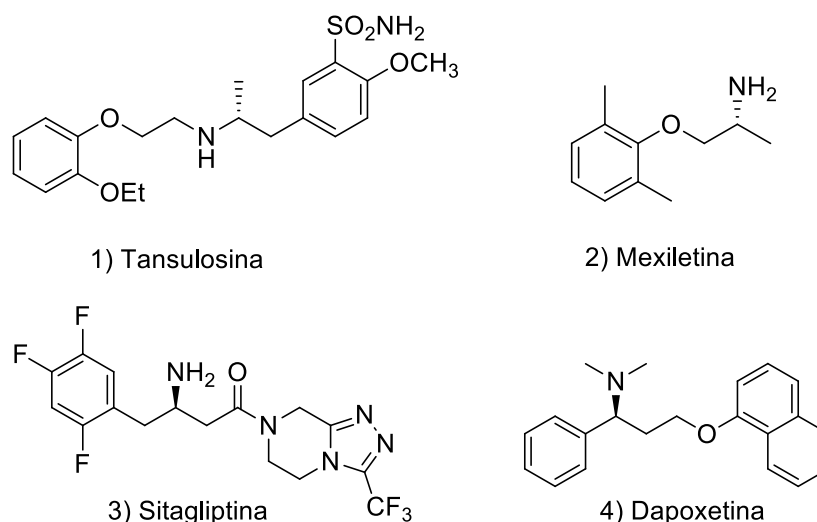


Figura 1 Fármacos contendo aminas quirais

Diversas abordagens são descritas para a obtenção de aminas quirais (Figura 2), como aminação C-H enantiosseletiva, adição nucleofílica à iminas, aminação redutiva assimétrica e redução enantiosseletiva de iminas ou enaminas. (GHISLIERI; TURNER, 2014, NUGENT *et al*, 2013). Além disto, devido a seu baixo custo, a cristalização diastereoisomérica de aminas racêmicas utilizando ácidos carboxílicos é uma estratégia de considerável importância na indústria farmacêutica, apesar do rendimento teórico máximo de 50% (GHISLIERI; TURNER, 2014; HÖHNE; BORNSCHEUER, 2009).

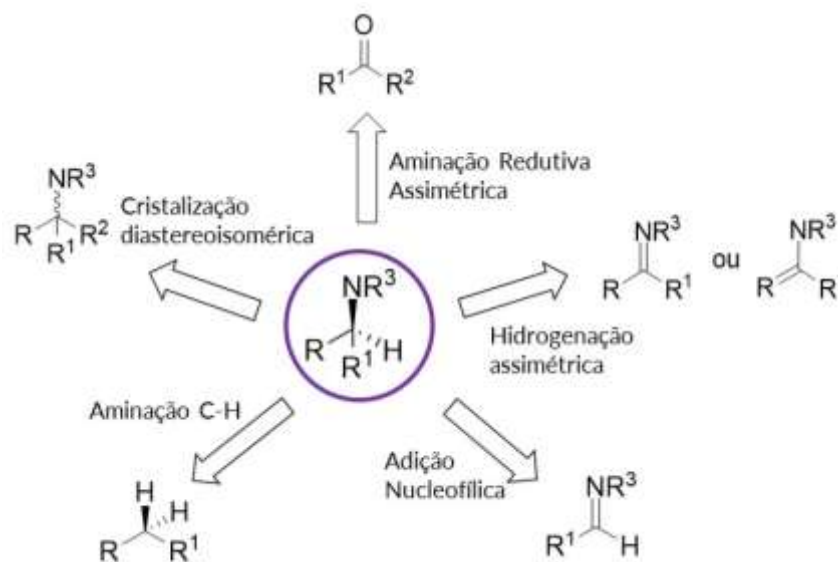


Figura 2 Estratégias para obtenção de aminas quirais

Além da síntese desses intermediários ou produtos quirais pelas vias químicas tradicionais, com o advento da tecnologia do DNA recombinante as vias biocatalíticas passaram a ser alternativas vantajosas.

## 1.2. Enzimas e Biocatálise

As enzimas são os catalisadores biológicos responsáveis para que as mais diversas reações que sustentam o metabolismo dos seres vivos aconteçam em tempo hábil, com condições brandas de temperatura e pH, além de alta especificidade (PORTER; RUSLI; OLLIS, 2016). Devido a essas características, o interesse em aplicá-las em síntese orgânica é crescente.

O uso das enzimas pelo ser humano remonta da antiguidade, onde micro-organismos eram empregados em processos fermentativos. No século XIX Pasteur empregou o fungo *Penicillium glaucum* na resolução cinética de uma solução do sal de ácido tartárico, tornando-se então um marco para a biocatálise (REETZ, 2013). Por volta de um século atrás o estudo das enzimas como catalisadores para a síntese orgânica teve início. Rosenthaler, em 1908, usou um extrato de amêndoas para sintetizar (*R*)-mandelonitrila a partir do benzaldeído (BEHRENS et al., 2011; BORNSCHEUER et al., 2012; REETZ, 2013).

Nos anos 50, pesquisadores nas grandes indústrias farmacêuticas, como Pfizer e Merck, utilizaram fungos para fazer a hidroxilação oxidativa da progesterona (BORNSCHEUER, U. T. et al., 2012; REETZ, 2013). Com o avanço das técnicas de

isolamento e purificação das enzimas, elas então passaram a ser empregadas em um escopo mais amplo de substratos não naturais (REETZ, 2013). Entre outros exemplos posteriores estão o uso da glicose isomerase para converter glicose em frutose e penicilina G acilase na fabricação de antibióticos semissintéticos. Esta fase foi denominada de primeira onda da biocatálise (BORNSCHEUER, U. T. *et al.*, 2012).

Nas décadas de 80 e 90 surgiu a segunda onda da biocatálise com os estudos de engenharia de proteínas, que possibilitaram aumentar o escopo de substratos aceitos pelas enzimas e assim aumentar seu uso na indústria farmacêutica e de química fina (BORNSCHEUER, U. T. *et al.*, 2012). A terceira e atual onda da biocatálise utiliza-se da tecnologia do DNA recombinante, da evolução dirigida, além de apoio de técnicas computacionais, para introduzir mutações nas enzimas, assim aperfeiçoando suas características, como: promiscuidade catalítica, estabilidade, tolerância à co-solventes, além de quimio, régio e enantiosseletividade (BORNSCHEUER; DE SOUZA; MIRANDA, 2017; BORNSCHEUER, U. T. *et al.*, 2012; DE OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009; REETZ, 2013). Com a ampliação de substratos aceitos pelas enzimas, a biocatálise oferece uma alternativa viável na síntese orgânica, frente à outras metodologias mais tradicionais existentes (TURNER; O'REILLY, 2013).

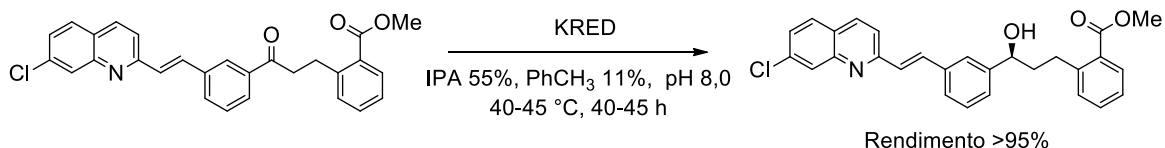
Os catalisadores comumente usados em reações orgânicas, (metálicos, organometálicos e organocatalisadores) muitas vezes exigem condições reacionais extremas (tais como temperaturas e pressões reacionais elevadas, longos tempos reacionais), podem gerar resíduos ambientais, além de serem custosos *per se*, sendo necessário tratamento do resíduo gerado. Outro fato a ser considerado é a alarmante escassez e finitude desses metais. (PORTER; RUSLI; OLLIS, 2016; SHELDON, 2017).

Devido à sua natureza quiral, as enzimas catalisam as reações de forma potencialmente quimio, régio e estereosseletiva, além de atuarem em condições reacionais brandas (pH fisiológico, temperatura e pressão ambientes), com economia de átomos, custos mais baixos e uso de solventes ambientalmente amigáveis. Elas ainda são oriundas de fontes renováveis, são biocompatíveis, biodegradáveis, e não são tóxicas ou perigosas (DE OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009; SHELDON, 2017; TURNER; O'REILLY, 2013).

Como exemplo do uso de biocatalisadores na indústria, é possível citar a síntese do Montelucaste. Montelucaste é um fármaco com ação antiasmática,

comercializado com o nome de Singulair® pela Merck (LIANG *et al.*, 2010; SHELDON; PEREIRA, 2017). Em uma das etapas de sua síntese foi empregada uma enzima cetorredutase (KRED), que converte cetonas e aldeídos nos respectivos álcoois. A reação está representada no Esquema 1.

Esquema 1 Etapa biocatalítica na síntese do Montelukaste



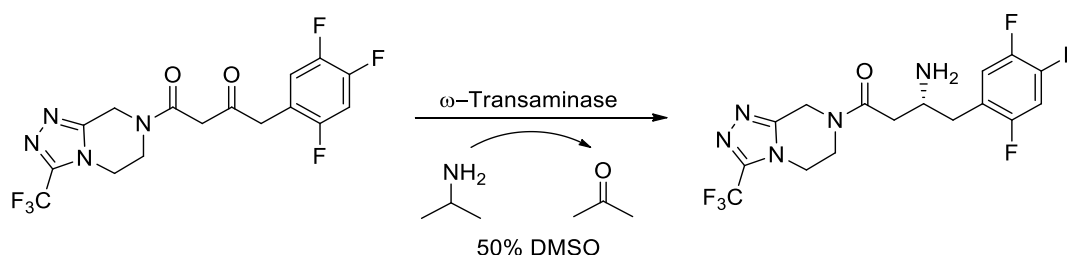
IPA= álcool isopropílico  
 PhCH<sub>3</sub> = tolueno

Primeiramente uma série de KREDs foram avaliadas, porém a baixa solubilidade do substrato em fase aquosa, mesmo quando adicionados cossolventes ao meio reacional, rendeu conversões baixas, com poucos excessos enantioméricos satisfatórios (SHELDON; PEREIRA, 2017). Pesquisadores da empresa Codexis realizaram então evolução dirigida na enzima KRED CDX-026, com foco em melhorar sua atividade e a estabilidade. Após cinco ciclos de mutações a atividade da enzima foi aumentada em 3000 vezes e o produto foi obtido com rendimento >95%, excessos enantioméricos 99,9% e 98,5% de pureza (LIANG *et al.*, 2010).

Outro exemplo de sucesso do emprego de um biocatalisador na indústria farmacêutica é a síntese da sitagliptina (estrutura 3, Figura 1). A sitagliptina é um fármaco usado no tratamento de diabetes tipo 2, comercializada sob o nome de Januvia® e Janumet® também pela Merck (CHOI; HAN; KIM, 2015). Pesquisadores da empresa Codexis, em colaboração com a Merck, trabalharam na modificação genética do sítio catalítico de uma enzima ω-transaminase (ATA-117) de *Arthrobacter* sp. de modo que ela aceitasse substratos maiores em seu sítio catalítico. Após 27 mutações, o sítio catalítico da enzima foi modificado de modo a acomodar a cetona pro-sitagliptina e converte-la em sitagliptina em uma etapa com 92% de rendimento e excesso enantiomérico > 99,95%, Esquema 2 (CHOI; HAN; KIM, 2015; GHISLIERI; TURNER, 2014; MALIK; PARK; SHIN, 2012; MATHEW; YUN, 2012; SAVILE, 2012; SHELDON; PEREIRA, 2017). Quando comparado com o catalisador quiral a base de ródio utilizado anteriormente para síntese da sitagliptina, foi observado um aumento de 10% no rendimento global, além de aumento na produtividade (kg/L por dia) de

53% (GHISLIERI; TURNER, 2014; SAVILE, 2012). Foi também observada 19% de eliminação de formação total de resíduos (MATHEW; YUN, 2012; SAVILE, 2012).

Esquema 2. Etapa biocatalítica da síntese da sitagliptina



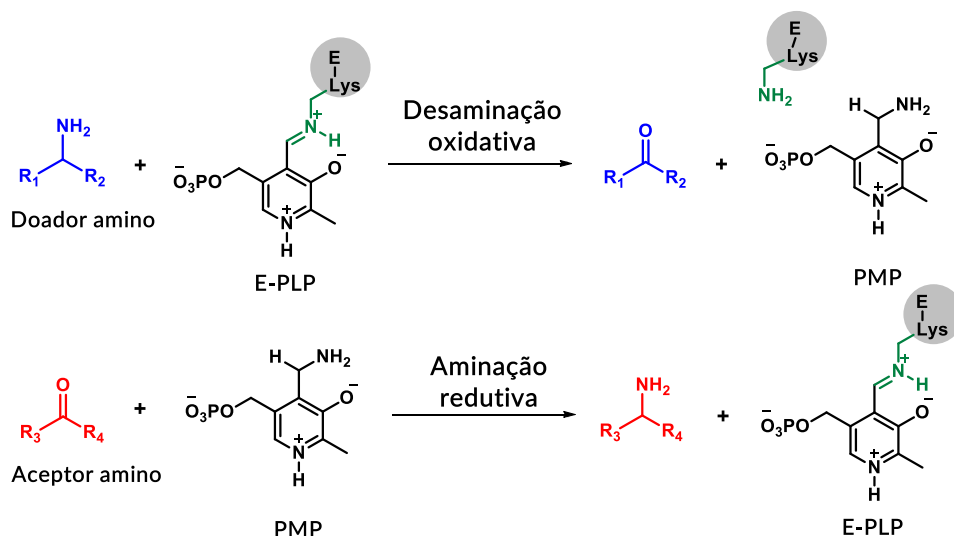
### 1.3. Transaminases

As transaminases (também denominadas aminotransferases), são enzimas cujo papel metabólico primário é catalisar a transferência de um grupo amino de um aminoácido para um  $\alpha$ -cetoácido (MALIK; PARK; SHIN, 2012; MATHEW; YUN, 2012; WILLIES *et al.*, 2016). De acordo com a nomenclatura para enzimas definida pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) elas são classificadas como 2.6.1.x, sendo a classe 2 designada para as transferases, na subclasse 6 para reações de transferência de grupos nitrogenados e no grupo 1 das transaminases (RUDAT; BRUCHER; SYLDATK, 2012).

Essas enzimas são ainda divididas em quatro subgrupos, sendo que as enzimas pertencentes aos subgrupos I, III e IV exclusivamente catalisam a transferência de um grupo amino ligado a um carbono  $\alpha$  de um aminoácido, sendo denominadas de  $\alpha$ -transaminases (MALIK; PARK; SHIN, 2012). Já as pertencentes ao subgrupo II possuem uma maior margem de atuação: elas conseguem transferir um grupo amino que não esteja necessariamente em um carbono  $\alpha$ , podendo aminorar não apenas  $\alpha$ -cetoácidos, mas também cetonas e aldeídos, tornando-as muito atrativas na síntese orgânica de aminas oticamente ativas. Estas enzimas são chamadas de  $\omega$ -transaminases (FUCHS; FARNBERGER; KROUTIL, 2015; HÖHNE *et al.*, 2010; MALIK; PARK; SHIN, 2012; MATHEW; YUN, 2012; RUDAT; BRUCHER; SYLDATK, 2012). Elas são ainda divididas de acordo com a enantiosseletividade, podendo ser (*R*)- ou (*S*)-seletivas, sendo que a maioria das  $\omega$ -transaminases existentes são (*S*)-seletivas (MATHEW; YUN, 2012).

Para a reação de transaminação a enzima requer como cofator o piridoxal-5-fosfato (PLP), que age como um intermediário na transferência do grupo amino (Esquema 3) (FUCHS; FARNBERGER; KROUTIL, 2015; SIMON *et al.*, 2014). A reação pode ser classificada como uma reação redox neutra, composta por duas meias reações: sendo que a primeira etapa é de desaminação oxidativa do doador amino, convertendo o PLP à sua forma reduzida PMP, seguida por uma aminação redutiva do acceptor amino, sendo que o PMP é novamente oxidado à PLP (MALIK; PARK; SHIN, 2012; MATHEW; YUN, 2012; RUDAT; BRUCHER; SYLDATK, 2012). Essa reação está representada no Esquema 3. Como o cofator é regenerado, ele é necessário apenas em quantidades catalíticas (SIMON *et al.*, 2014).

Esquema 3 Etapas da reação de transaminação. Fonte: (MATHEW; YUN, 2012)

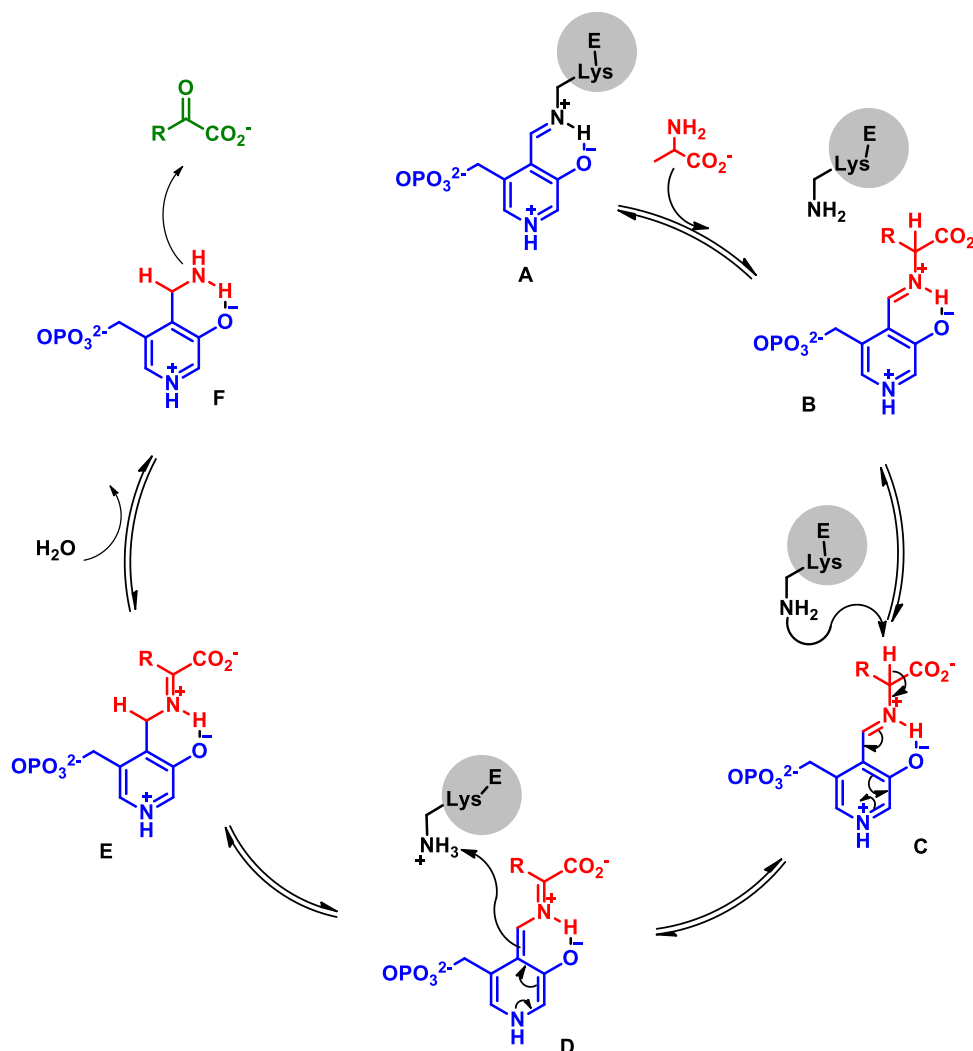


Na ausência do substrato o PLP encontra-se ligado covalentemente à um resíduo de lisina do sítio catalítico, como ilustrado no Esquema 4, formando a aldimina interna (A) (RUDAT; BRUCHER; SYLDATK, 2012). Com a presença do doador amino, o carbono da ligação C=N da base de Schiff sofre um ataque nucleofílico pelo par de elétrons do doador amino, neste caso uma alanina, formando uma imina entre o doador amino e o PLP (B), liberando o resíduo de lisina. Esse ataque é facilitado pelo oxigênio fenólico do PLP e por uma molécula de água do sítio ativo, que estabilizam o intermediário formado através de ligações de hidrogênio (FUCHS; FARNBERGER; KROUTIL, 2015).

O resíduo de lisina então abstrai um próton do carbono quaternário, que ficou mais ácido devido a formação da imina. Assistida pelo par de elétrons do anel

piridínico, os elétrons da ligação dupla abstraem um próton do resíduo de lisina, formando a cetimina E. A imina então é hidrolisada, liberando o doador amino, agora na forma de cetona, e o PLP é convertido na sua forma reduzida PMP (F), que por sua vez está pronta para transferir o grupo amino para uma cetona pelo caminho inverso da reação, já que todas as etapas são reversíveis (FUCHS; FARNBERGER; KROUTIL, 2015).

Esquema 4. Proposta mecanística de atuação de  $\omega$ -transaminases. Fonte: (FUCHS; FARNBERGER; KROUTIL, 2015)

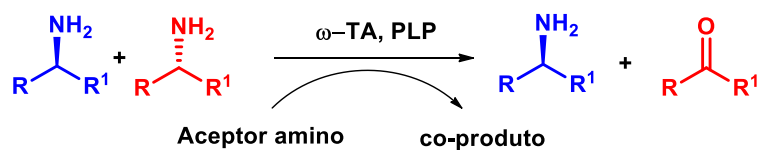


Entre as reações possíveis de serem catalisadas pelas  $\omega$ -transaminases se encontram a resolução cinética de amins racêmicas e a aminação redutiva assimétrica (MATHEW; YUN, 2012). No Esquema 5 estão representadas essas reações.

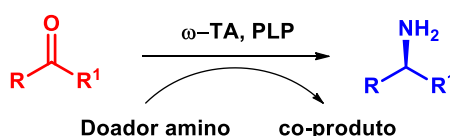


Esquema 5 Reações catalisadas pela  $\omega$ -transaminase

## A) Resolução cinética de amins racêmicas



## B) Aminoação reductiva assimétrica



O método da resolução cinética parte de quantidades estequiometricamente equivalentes dos reagentes (doador e aceptor amino) e é uma reação termodinamicamente favorável, com o equilíbrio deslocado no sentido da formação do produto carbonilado (KOSZELEWSKI *et al.*, 2010). Essa reação é capaz de converter amins racêmicas em amins opticamente puras com um rendimento teórico máximo de 50%. Entretanto, além do baixo rendimento possível, a grande desvantagem desse método é a inibição pela formação do produto carbonilado (HÖHNE *et al.*, 2010; KOSZELEWSKI *et al.*, 2010; MALIK; PARK; SHIN, 2012; MATHEW; YUN, 2012). Para contornar essa desvantagem é essencial a remoção do produto do meio reacional, sendo que para esse fim algumas estratégias foram desenvolvidas (MATHEW; YUN, 2012).

Uma das estratégias é a extração do produto do meio reacional com solventes orgânicos, conduzindo assim a reação em sistemas bifásicos (GUO; BERGLUND, 2016; MALIK; PARK; SHIN, 2012; MATHEW; YUN, 2012). Essa metodologia se mostrou bastante viável devido a sua simplicidade e altas conversões obtidas pelos pesquisadores (SHIN, J. S.; KIM, 1997). Com o objetivo de evitar o contato da enzima com o solvente orgânico foram posteriormente desenvolvidos reatores de enzima-membrana (GUO; BERGLUND, 2016; KOSZELEWSKI *et al.*, 2010; MATHEW; YUN, 2012; SHIN, J.-S.; KIM; SHIN, 2001). Outra metodologia empregada é realizar a reação sob pressão reduzida quando são usadas amins de baixa massa molecular, devido à volatilidade das cetonas formadas e sua fácil remoção do meio (KOSZELEWSKI *et al.*, 2010; MATHEW; YUN, 2012; YUN; CHO; KIM, 2004). Também como forma de remoção do coproduto foi reportado o acoplamento de

enzimas cetorredutases visando a redução da cetona formada no correspondente álcool (BEA *et al.*, 2011; KOSZELEWSKI *et al.*, 2010; MATHEW; YUN, 2012).

Por sua vez, a reação de síntese assimétrica é uma das mais importantes estratégias para obtenção de aminas quirais e vem sendo continuamente reportada devido à sua intrínseca vantagem de rendimento teórico de 100%, frente ao limitado 50% da resolução cinética (HÖHNE *et al.*, 2010; KOSZELEWSKI *et al.*, 2010; MALIK; PARK; SHIN, 2012; MATHEW; YUN, 2012). Nessa reação uma carbonila proquiral de cetona é convertida em uma amina com centro assimétrico definido. A principal desvantagem dessa metodologia, entretanto, é o equilíbrio termodinamicamente desfavorecido da reação, sendo que alternativas para contorna-lo vêm sendo bastante estudadas (MALIK; PARK; SHIN, 2012).

Para a síntese assimétrica ideal, os doadores e aceptores aminos devem ser mais reativos do que seus respectivos coprodutos, auxiliando assim no equilíbrio da reação (MATHEW; YUN, 2012). Além disso, a maneira mais fácil de se deslocar o equilíbrio na direção da formação dos produtos é usar um excesso do doador amino. Outra alternativa, ainda, é a remoção do coproduto formado do meio reacional (GUO; BERGLUND, 2016; KOSZELEWSKI *et al.*, 2010; MALIK; PARK; SHIN, 2012; MATHEW; YUN, 2012).

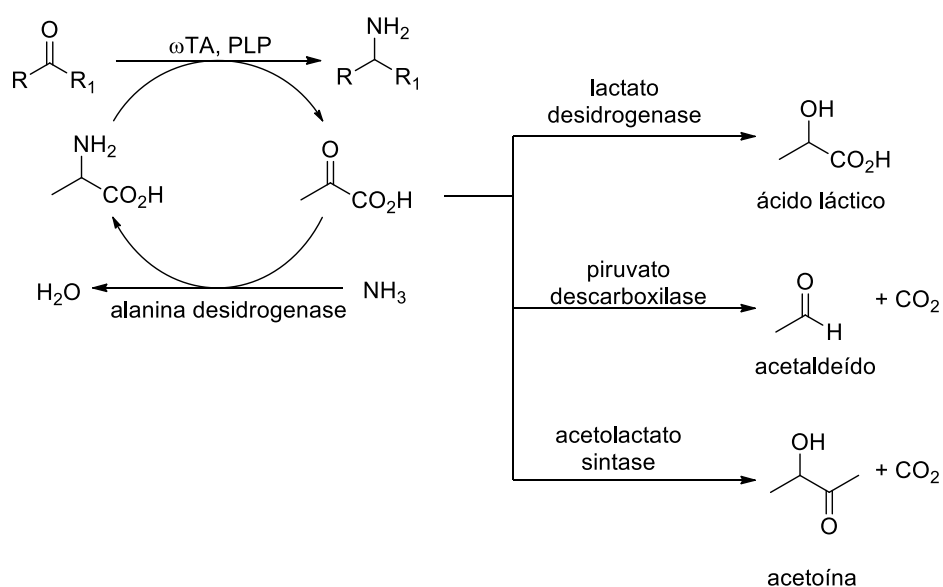
Aliado a isso, o uso de isopropilamina como doador amino têm se mostrado muito atrativo, devido a seu baixo custo, fácil obtenção e a alta volatilidade do coproduto formado (acetona), que é facilmente removido do meio reacional em pressões reduzidas (GUO; BERGLUND, 2016; KOSZELEWSKI *et al.*, 2010; MALIK; PARK; SHIN, 2012; MATHEW; YUN, 2012). Essa metodologia mostrou-se muito eficiente na síntese da sitagliptina (Esquema 2), onde a isopropilamina foi usada como doador amino e a acetona foi removida do reator com um fluxo de nitrogênio (MALIK; PARK; SHIN, 2012; SAVILE, 2012).

Outro doador amino que vem sendo comumente reportado nas reações de síntese assimétrica empregando transaminases é a alanina. Entretanto, quando ela é utilizada é necessária a remoção do piruvato (coproduto) do meio reacional, a fim de compensar o equilíbrio da reação, que é favorável para a formação da alanina (GUO; BERGLUND, 2016; KOSZELEWSKI *et al.*, 2010; MALIK; PARK; SHIN, 2012; MATHEW; YUN, 2012).

A degradação do piruvato pode ser realizada por meio de três enzimas (Esquema 6): lactato desidrogenase (LDH), piruvato descarboxilase (PDC) e

acetolactato sintase (ALS) que convertem o piruvato formado em lactato, acetaldeído e acetoína, respectivamente (GUO; BERGLUND, 2016; MATHEW; YUN, 2012; SIMON *et al.*, 2014). O uso da LDH é dependente do cofator NAD(P)H, portanto é necessária a regeneração do mesmo, sendo empregadas para isso, com bastante eficiência, as enzimas formato desidrogenase (FDH) ou glicose desidrogenase (GDH) (GUO; BERGLUND, 2016; MATHEW; YUN, 2012). Também é possível a conversão do piruvato de volta à alanina, com uso de alanina desidrogenases (AlaDH) (GUO; BERGLUND, 2016; MATHEW; YUN, 2012; SIMON *et al.*, 2014).

Esquema 6 Métodos enzimáticos para remoção do piruvato



Em relação à sua estrutura proteica tridimensional, as  $\omega$ -transaminases existem como um homodímero, com duas subunidades idênticas. Cada subunidade é composta por um domínio maior e um menor. Os dois sítios ativos se encontram na interface entre os dois domínios, como ilustrado na Figura 3. (ŁYSKOWSKI *et al.*, 2014; THOMSEN *et al.*, 2014).

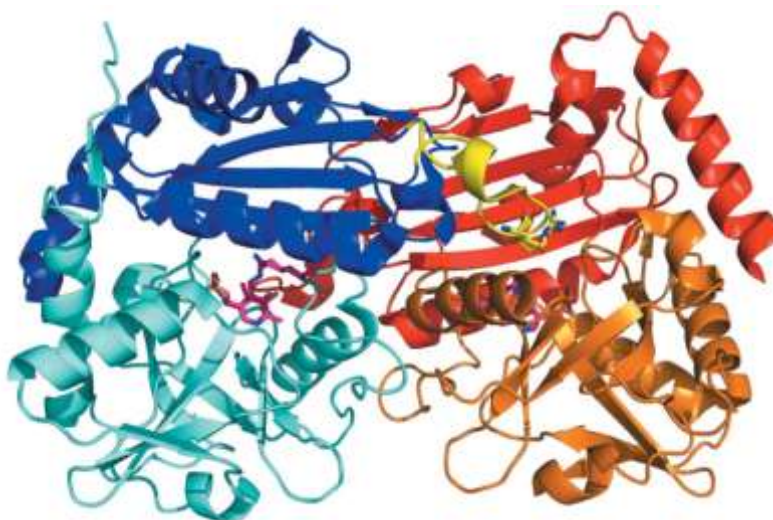


Figura 3 Estrutura tridimensional da transaminase (*R*)-seletiva de *A. fumigatus* (THOMSEN *et al.*, 2014)

Cada monômero está dividido por cores. Os domínios menores estão representados em azul escuro e vermelho, e o maiores em azul claro e laranja. O cofator PLP está ligado à Lys179 na interface dos domínios (mostrado em rosa).

O sítio catalítico de uma transaminase é constituído de dois bolsões, um maior e outro menor, como representado na Figura 4. A forma do sítio catalítico explica a especificidade e estereosseletividade que essas enzimas possuem em relação ao substrato. Quando o substrato se encontra no sítio catalítico, ocorre reconhecimento duplo dos grupos hidrofóbicos e carboxilato no bolsão maior, sendo que o grupo carboxilato sofre forte repulsão no bolsão menor. Bons substratos para a enzima são aqueles que possuem duas regiões de tamanhos distintos ao redor da carbonila, de modo que possam interagir efetivamente no sítio catalítico, sendo que o substituinte menor, vital no reconhecimento do substrato, não deve ser maior do que um grupo etila (MALIK; PARK; SHIN, 2012).

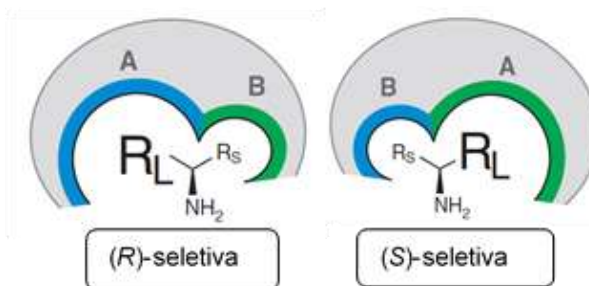


Figura 4 Representação do sítio catalítico das  $\omega$ -transaminases (HÖHNE *et al.*, 2010)

Os substratos selecionados para estudo, além de respeitarem a estrutura da enzima, considerando o tamanho dos substituintes ao redor da carbonila, são importantes blocos de construção na síntese de fármacos. Estas moléculas estão representadas na Figura 5.

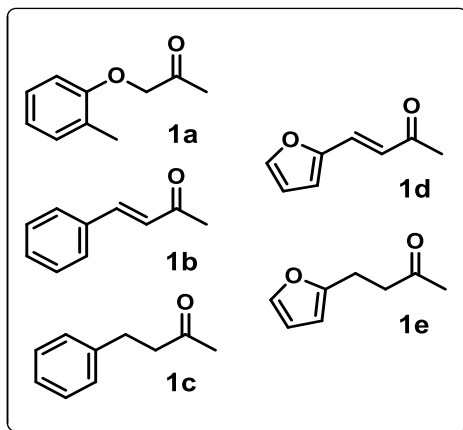


Figura 5. Moléculas alvo desse estudo

## 2. OBJETIVOS

Estudar a reação de aminação redutiva enzimática de cetonas pró-quirais, visando a síntese de blocos construtores quirais de interesse comercial. Para isso serão avaliados como biocatalisadores  $\omega$ -transaminases comerciais,  $\omega$ -transaminases selvagens expressas heterologicamente em *E. coli* e micro-organismos provenientes da Coleção do Milagre Research Group.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL:

#### 3.1. Considerações Gerais

##### 3.1.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono (RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ )

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  foram registrados no espectrômetro Bruker Fourier 300 ( $B_0$  7,1 T) operando a 300,19 MHz para o núcleo de hidrogênio e 75,48 MHz para o núcleo de carbono. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de hidrogênio foram registrados em ppm utilizando como referência interna tetrametilsilano (TMS,  $\delta = 0,00$ ) e referência externa  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta = 7,24$ ), e os sinais de deslocamentos químicos de carbono foram registrados em ppm, utilizando como referência externa  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta = 77,23$ ).

As constantes de acoplamento ( $J$ ) foram medidas em Hertz (Hz) e os sinais foram caracterizados como: duplete (d), duplo duplete (dd), multiplete (m), quarteto (q), simpleto (s), simpleto largo (sl), tripleto (t) e sexteto (st). As interpretações dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram realizadas com auxílio da técnica DEPT 135°.

##### 3.1.2. Métodos Cromatográficos

As análises cromatográficas em camada delgada (CCD), para monitoramento das reações e acompanhamento da purificação dos produtos, foram realizadas empregando-se cromatoplasmas de alumínio (20 x 20 cm), da marca Macherey Nagel, sobre suporte de alumínio com filme de sílica gel 60 com indicador  $\text{UV}_{254}$ .

A revelação dos compostos em cromatoplasmas foi feita por irradiação com lâmpada  $\text{UV}_{254}$  para os compostos que continham grupos cromóforos e/ou pulverização com solução de ácido fosfomolibdico e/ou anisaldeído, e subsequente aquecimento a 300°C com pistola de ar quente.

Nas purificações de compostos por DSC (cromatografia *flash* em sílica seca) foram utilizadas sílica gel 230-400 mesh da marca Macherey Nagel com gradiente de eluição em diclorometano/metanol.

As placas cromatográficas em camada delgada preparativa (CCDP) foram preparadas com sílica gel Kieselgel DF da marca Riedel-deHaën com 0,75 mm de espessura, sobre placas de vidro de 20 X 20 cm.

As análises por Cromatografia Gasosa Acoplada a Detector de Ionização de Chama (GC-FID) foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo gasoso modelo Shimadzu GC-2010 Plus equipado com injetor automático AOC-20i e acoplado a um detector de ionização de chama. Para as análises de rotina utilizou-se coluna capilar de sílica fundida Restek Rtx®-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, 5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano). O cromatógrafo foi mantido a um fluxo constante de gás H<sub>2</sub> de 1,22 mL/min, com temperatura do injetor igual a 260 °C e temperatura do detector igual a 300 °C. A programação de temperatura utilizada foi de 3 minutos a 80 °C, seguida de rampa de aquecimento 80-280 °C a 30 °C/min e mantido em 280 °C por 3 minutos. O volume de injeção das amostras foi de 1 µL na concentração de 0,5 – 1 mg mL<sup>-1</sup> no modo *split*. O tempo total da análise foi de 12,67 minutos.

As análises de GC-FID em fase quiral para determinação dos excessos enantioméricos (*ee*) das aminas foram realizadas utilizando-se coluna Hydrodex® β-3P (25 m x 0,25 mm x 0,25 µm; Macherey-Nagel). Foi mantido um fluxo constante de gás de 0,9 mL/min, com temperatura de 180 °C no injetor e 180 °C no detector. O volume de injeção das amostras foi de 1 µL na concentração de 0,5 – 1 mg/mL no modo *split*. A programação de temperatura utilizada, para o Método Hydrodex 1 (composto **2b**) foi de 5 minutos a 170 °C, 170-180 °C com taxa de 5 °C/min e mantido a 180 °C por 10 minutos. A programação de temperatura utilizada para o Método Hydrodex 2 (composto **2c**) foi de 155-175 °C com taxa de 1 °C/min, 175-180 °C com taxa de 10 °C/min e mantido a 180 °C por 10 minutos. A programação de temperatura utilizada para o Método Hydrodex 3 (compostos **2d** e **2e**) foi de 150-170 °C com taxa de 1 °C/min, 170-180 °C com taxa de 15 °C/min, e mantido a 180 °C por 10 minutos. A programação de temperatura utilizada, para o Método Hydrodex 4 (composto **3c**) foi de 110-140 °C com taxa de 1 °C/min, 140-180 °C com taxa de 50 °C/min, e mantido a 180 °C por 10 minutos. O tempo total das análises foi, para o Método 1 de 35 minutos, para o Método 2 de 30,50 minutos, para o Método 3 de 30,67 minutos e para o Método 4 de 40,80 minutos.

As análises por Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas (GC-MS) foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo gasoso GC/MS – Modelo 7890B – Agilent acoplado a um espectrômetro de massas Modelo 5977A cuja fonte de ionização por elétrons possui energia de ionização a 70 eV. O espectrômetro de massas foi operado na faixa de *m/z* 45-500. Para GC foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida HP-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 m, (5%-fenil)-metilpolisiloxano). O



cromatógrafo foi mantido com fluxo constante de gás He de 1,22 mL/min, temperatura do injetor igual a 260 °C e a temperatura da interface igual a 280 °C. As injeções das amostras foram de 1 µL na concentração de 0,5 – 1 mg/mL. A programação de temperatura utilizada foi de 3 minutos a 80 °C, seguida de rampa de aquecimento 80-280 °C a 30 °C/min e mantido em 280 °C por 3 minutos.

As análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) foram realizadas em um cromatógrafo JASCO® com controlador LC-NET II/ADC, detector de arranjo fotodiodos (DAD) modelo MD-2018 PLUS, bomba PU-2086 plus, injetor automático AS-2055 e detector de dicróismo circular (DC-2095). As injeções das amostras foram de 20 µL na concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup>. Utilizou-se a coluna Daicel® Chiralcel OD-H, de sílica encapada com celulose ligada a 3,5- dimetilfenilcarbamato (250 x 4,6 mm, 5 µm) e pré-coluna (10 x 4,6 mm, 5 µm). O cromatógrafo operou em modo isocrático com fase móvel composta por 90% hexano e 10% isopropanol, em um fluxo de 0,8 mL min e detecção em 274 nm.

### 3.1.3. Espectroscopia no Infravermelho - (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados em um espectrofotômetro Vertex 70 - Bruker, com transformada de Fourier, operando na região do infravermelho médio (400 a 4000 cm<sup>-1</sup>), por meio de reflexão total atenuada (ATR).

### 3.1.4. Ponto de Fusão

As medidas de ponto de fusão foram realizadas em um equipamento MQA PF 302 Microquímica equipamentos Ltda.

### 3.1.5. Biocatalisadores

Foram utilizados dois micro-organismos, MLH 15 e MLH 51, provenientes da Coleção de Micro-organismos do Milagre Research Group triados previamente para a presença de ω-transaminases (DA CRUZ, 2016). A ω-transaminase comercial (*S*)-seletiva e a ω-transaminase (*R*)-seletiva recombinante de *Aspergillus fumigatus* foram adquiridas junto à empresa Sigma- Aldrich®.

### 3.1.6. Plasmídeos e linhagem de *Escherichia coli* (*E. coli*)

Linhagens de *E. coli* Rosetta (DE3) pLys foram empregadas no processo de transformação e expressão enzimática. As células foram fornecidas pela professora Dra. Maria Célia Bertolini responsável pelo laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Química da UNESP. Os plasmídeos contendo genes sintéticos de linhagens selvagens de  $\omega$ -transaminases foram fornecidos pelo professor Dr. Uwe Bornscheuer do Instituto de Bioquímica (Departamento de Biotecnologia e Catálise Enzimática) da Universidade de Greifswald – Alemanha.

Foram fornecidos ao todo 8 plasmídeos, sendo 4 contendo genes que codificam  $\omega$ -transaminases (*R*)-seletivas provenientes dos micro-organismos *Aspergillus fumigatus* Af293; *Aspergillus terreus*; *Gibberella zeae*; *Mycobacterium vanbaalenii*; e 4 que codificam  $\omega$ -transaminases (*S*)-seletivas provenientes dos micro-organismos *Ruegeria pomeroyi*; *Rhodobacter sphaeroides*; *Vibrio fluvialis* JS17 e *Chromobacterium violaceum*. Vetores da série pET e pGASTON foram utilizados para a construção dos plasmídeos recombinantes.

### 3.1.7. Meios de cultura e condições de crescimento

Os meios de cultura Nutrient Broth (NB) e Luria Broth (LB) foram adquiridos junto a empresa Acumedia e Sigma-Aldrich®, respectivamente. Seu preparo foi realizado de acordo com instrução contida no rótulo.

Após o preparo, os meios de cultura foram esterilizados em autoclave vertical Quimis a 120 °C e 1 Kgf/cm<sup>2</sup>, por 15 minutos. A descontaminação do material biológico utilizado foi feita na autoclave vertical Quimis a 120 °C e 1 Kgf/cm<sup>2</sup>, por 45 minutos.

### 3.1.8. Tampões

#### Tampão Fosfato de Sódio pH 7,5; 50 mM

- 4 mL de solução 0,2 M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 21 mL de solução 0,2 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 75 mL Água destilada

#### Tampão de lise (DA CRUZ, 2016)

- Tampão fosfato pH 7,0; 20 mM
- 20  $\mu$ M de PLP
- 2 mM de EDTA

- 1 mM de PMSF
- 5 % de glicerol

#### **Tampão de diálise (DA CRUZ, 2016)**

- 20  $\mu$ M de PLP
- 1000 mL Tampão fosfato pH 7,5; 50 mM

#### **3.1.9. Transformação utilizando *E. coli* quimicamente competente**

Aproximadamente 50 ng de plasmídeos recombinantes foram adicionados a 100  $\mu$ L de células competentes e homogeneizados com movimentos circulares utilizando a ponta da micropipeta. As células foram mantidas em gelo durante 30 minutos e então submetidas a um choque térmico em banho seco a 42 °C por 2 minutos, e novamente incubadas em gelo por 2 minutos. Em seguida, 1 mL de meio SOC foi adicionado às células e estas foram incubadas a 37 °C por 1 hora sob agitação orbital a 350 rpm. Ao final de 1 hora, 200  $\mu$ L da suspensão celular foram pipetados e espalhados em placa contendo meio LB sólido suplementado com o antibiótico de resistência (ampicilina ou canamicina), e esta foi incubada a 37 °C *overnight* (12 a 16 horas). Após o crescimento das colônias transformadas, uma colônia foi inoculada em 5 mL de meio LB contendo o antibiótico de resistência e o inóculo foi incubado a 37 °C por 12 horas. Duas alíquotas de 1,5 mL da suspensão celular foram retiradas e armazenadas em tubos tipo eppendorf estéreis contendo 0,5 mL de glicerol puro. As amostras foram armazenadas em ultrafreezer a – 80 °C.

#### **3.1.10. Expressão das $\omega$ -transaminases**

Um pré-inóculo contendo 100 mL de meio LB com o antibiótico de resistência e 300  $\mu$ L de uma suspensão de células transformadas foi preparado e mantido a 37 °C sob agitação orbital a 130 rpm *overnight*. A partir do pré-inóculo, foram realizadas diluições obedecendo a proporção de 1:20 v/v (pré-inóculo: meio de cultura). Assim, alíquotas de 10 e 20 mL foram retiradas e adicionadas a 200 e 400 mL de meio suplementado com antibiótico, respectivamente.

Após a diluição, os meios de cultura foram incubados a 37 °C sob agitação orbital a 130 rpm, até atingir uma  $DO_{600}$  entre 0,6 - 0,8. Atingida a densidade ótica necessária, foi feita a indução utilizando IPTG (concentração final de 0,1 mM) ou ramnose (concentração final de 0,2%) dependendo do tipo de plasmídeo incorporado a cada célula. O tempo e a temperatura de indução variaram entre 6 e 16 horas, e 30

e 20 °C dependendo do gene a ser expresso, como apresentado na Tabela 1. Após a expressão, os cultivos celulares foram centrifugados a uma temperatura de 20 °C por 30 minutos a 4200 rpm. O sobrenadante foi desprezado e os pellets foram recolhidos e submetidos a lise celular.

Tabela 1 Condições de expressão das  $\omega$ -transaminases

<b>Espécie</b>	<b>Antibiótico</b>	<b>Indutor</b>	<b>Expressão</b>
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Can	IPTG	30 °C/overnight
<i>Aspergillus terreus</i>	Amp	Ramnose	20 °C/overnight
<i>Vibrio fluvialis JS17</i>	Can	IPTG	30 °C/overnight
<i>Mycobacterium vanbaalenii</i>	Amp	Ramnose	20 °C/overnight
<i>Ruegeria pomeroyi</i>	Amp	IPTG	30 °C/6 horas

### 3.1.11. Lise celular

Os pellets celulares obtidos após a centrifugação dos cultivos celulares foram ressuspensos em tampão de lise 20 mM pH 7,0 a 4 °C. As células foram lisadas por sonicador (Bandelin Sonopuls HD-2070), com 30-40% da potência máxima em 9 ciclos de 30 segundos com pulsação contínua, sendo que entre cada ciclo de lise foram realizados intervalos de 1 minuto. Todo procedimento foi realizado mantendo-se a suspensão celular em banho de gelo.

A suspensão formada após a lise foi centrifugada a 14000 rpm durante 20 minutos a 4 °C para remover os detritos celulares. O sobrenadante contendo as enzimas solúveis foi então coletado, e os extratos foram submetidos a pré-purificação por diálise.

### 3.1.12. Diálise dos extratos enzimáticos

Os extratos enzimáticos foram submetidos à uma pré-purificação por diálise em tubos de celulose semipermeável com tamanho de poro equivalente a 14000 Da. Cada 8 mL de extrato enzimático foi dialisado contra 250 mL de tampão de diálise durante 24 horas, à uma temperatura de 4 °C. Ao término do processo, foram preparadas alíquotas contendo 1,0 mL de extrato enzimático e 0,5 mL de glicerol 20%, e os extratos foram armazenados no freezer -20 °C.

### 3.1.13. Quantificação das enzimas - Método de Bradford

Para preparo do Reagente de Bradford, 25 mg de azul de brilhante Coomassie G-250 foram dissolvidos em 25 mL de etanol 95%. A essa solução foram adicionados 50 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85%. A solução resultante foi adicionada em 425 mL de água destilada e armazenada em geladeira.

Para a curva analítica, foi preparada uma solução 1 mg/mL de Soro Albumina Bovina (BSA) que foi diluída sucessivamente a 0,5, 0,125, 0,062 e 0,031 mg/mL. 20 µL da solução de BSA foram adicionados a 1,58 mL de água Milli-Q e 0,4 mL de reagente de Bradford, que foram incubados em temperatura ambiente por 10 minutos. Após o período de incubação foi medida a Absorbância em 595nm. As análises foram realizadas em triplicata. Para o branco, foi usado 1,6 mL de água Milli-Q e 0,4 mL de reagente de Bradford. Para quantificação das enzimas de interesse, foram utilizados 20 µL dos extratos enzimáticos (pós diálise).

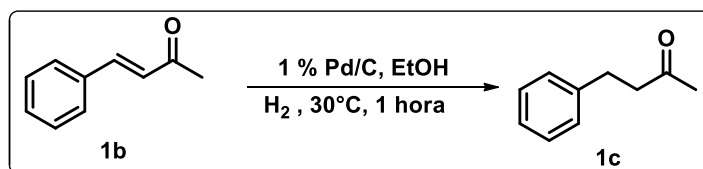
## 3.2. Procedimento experimental e dados espectroscópicos dos compostos sintetizados

O substrato 1-(2-metilfenoxi)-2-propanona **1a** foi cedido pelo Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos, da Universidade Federal do Ceará (UFC), enquanto que o substrato 4-fenil-3-buten-2-ona **1b** foi obtido comercialmente junto à empresa Sigma-Aldrich®.

Os demais substratos foram sintetizados de acordo com os procedimentos aqui descritos.

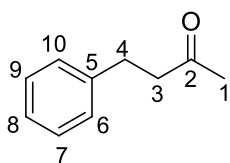
### 3.2.1. Procedimento de hidrogenação catalítica para síntese da 4-fenil-2-butanona **1c**

Esquema 7 Hidrogenação catalítica para síntese da 4-fenil-2-butanona **1c**



Em um balão de fundo redondo de duas bocas, 2,9 mg de Pd/C (10%) (1% em massa) foram dissolvidos em 12,0 mL de etanol anidro e mantidos sob atmosfera de H<sub>2</sub> (1 atm) por 30 minutos. Após este período adicionou-se 2 mmol (292,0 mg) de **1b** dissolvidos em 8,0 mL de etanol anidro. O sistema foi mantido sob agitação magnética a 30 °C por 1 hora para obtenção de **1c**. A mistura foi filtrada e o solvente evaporado

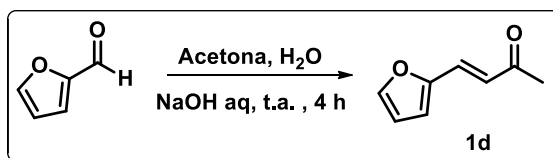
em rotaevaporador e analisada via GC-FID. O produto foi purificado por cromatografia em camada delgada preparativa (Hep/EtOAc 80%) ( $R_f = 0,2$ ), fornecendo um óleo incolor com 80% de rendimento.



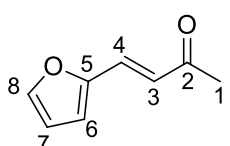
**4-fenil-2-butanona (1c).** (SHABBIR *et al.*, 2017), CAS Nr. 2550-26-7. **FM:**  $C_{10}H_{12}O$ . **MM:** 148. **EM- $m/z$  (%)**: 148(81), 133(16), 105(100), 91(73), 77(22), 65(12); **IV-** ( $\nu$  max) ( $cm^{-1}$ ): 3086, 3063, 3028, 2927, 1714, 1603, 1497, 1356, 1283, 1233, 1161, 1080, 1030; **RMN de  $^1H$ -** (300,19 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  2,14 (s, 3H, H1), 2,83 – 2,70 (m, 2H, H4), 2,96 – 2,83 (m, 2H, H3), 7,35 – 7,13 (m, 5H, H6-H10); **RMN de  $^{13}C$ -** (75,48 MHz,  $CDCl_3$ ): 29,94 ( $CH_2$ , C-3), 30,31 ( $CH_3$ , C-1), 45,41 ( $CH_2$ , C-4), 126,33 (CH, C-8), 128,51 (2 CH C7-C9), 128,71 (2 CH (C6-C10), 141,20 ( $C_o$ , C-5), 208,21 ( $C_o$ , C-2).

### 3.2.2. Procedimento de reação aldólica para síntese da 4-(2-furanil)-3-buten-2-ona 1d

Esquema 8. Síntese da 4-(2-furanil)-3-buten-2-ona 1d



Em banho de gelo, 52 mmol (5,0 g) de furfural foram adicionados em 10,0 mL de acetona/água (2:1), seguido de adição lenta de 2,5 mL de solução aquosa de NaOH 10%, de modo que a temperatura não ultrapassasse a temperatura ambiente em 5 °C. O sistema foi mantido sob agitação magnética à temperatura ambiente por 4 horas. Após esse período a reação foi interrompida por adição de HCl 4M gota a gota até pH 2-3. A solução foi então extraída com acetato de etila (2 x de 15 mL). As fases orgânicas foram combinadas e lavadas com solução saturada de  $NaHCO_3$  e NaCl (30 mL), secas com  $MgSO_4$  anidro e evaporadas em rotaevaporador. A reação foi analisada via GC-FID. O produto foi purificado por destilação à pressão reduzida, a 5 mbar, fornecendo um líquido amarelado que destilou a 88 °C, com 40% de rendimento. Após resfriamento o composto se tornou um sólido alaranjado.

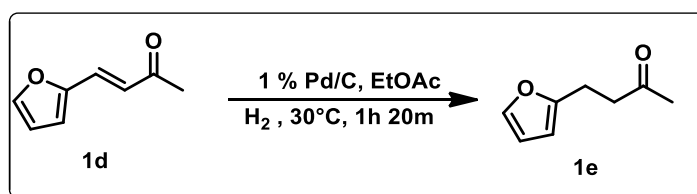


**4-(2-furanil)-3-buten-2-ona (1d).** (FERREIRA *et al.*, 2016), CAS NR. 41438-24-8. **FM:**  $C_8H_8O_2$ ; **MM:** 136; sólido amarelo; **P.F:** 36-37 °C; **EM-  $m/z$  (%)**: 136(71), 121 (100), 94(47), 65(53); **IV-** ( $\nu$  max) ( $cm^{-1}$ ):

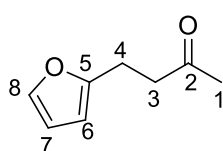
<sup>1</sup>): 3108, 1656, 1621, 1554, 1476, 1269, 1251, 763; **RMN de <sup>1</sup>H-** (300,19 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2,34 (s, 3H, H1), 6,49 (dd, *J*= 3,4 e *J*=1,8 Hz, 1H, H7), 6,62 (d, *J*=16,0 Hz, 1H, H3), 6,67 (d, *J*=3,4 Hz, 1H, H6), 7,28 (d, *J*= 16,0 Hz, 1H, H4), 7,51 (d, *J*= 1,8 Hz, 1H, H8); **RMN de <sup>13</sup>C-** (75,48 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 28,12 (CH<sub>3</sub>, C-1), 112,75 (CH, C7), 115,88 (CH, C6), 124,50 (CH, C4), 129,64 (CH, C3), 145,24 (CH, C8), 151,11 (C<sub>o</sub>, C-5), 198,10 (C<sub>o</sub>, C-1).

### 3.2.3. Procedimento de hidrogenação catalítica para síntese da 4-(2-furânil)-2-butanona **1e**

Esquema 9 Síntese da 4-(2-furânil)-2-butanona **1e**



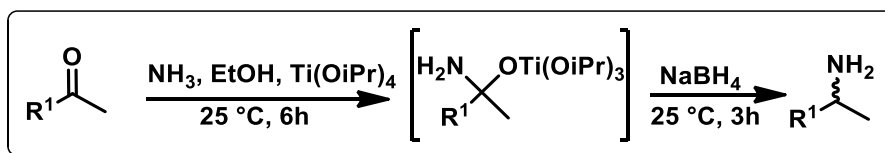
Em um balão de fundo redondo de duas bocas, 1,4 mg de Pd/C (10%) (1% em massa) foram dissolvidos em 6,0 mL de acetato de etila anidro e mantidos sob atmosfera de H<sub>2</sub> (1 atm) por 30 minutos. Após este período foi adicionado 1 mmol (136,0 mg) de **1d** dissolvidos em 4,0 mL de acetato de etila anidro. O sistema foi mantido sob agitação magnética a 30 °C por 1 hora e 20 minutos para obtenção de **1e**. A mistura foi filtrada e o solvente evaporado em rotaevaporador e a reação foi analisada via GC-FID. O produto foi purificado por cromatografia em camada delgada preparativa (Hep/EtOAc 40%) R<sub>f</sub> = 0,6, utilizando como revelador ácido fosfomolibdico, fornecendo um óleo amarelado com 35% de rendimento.



**4-(2-furânil)-2-butanona (1e)**. (CHEN; LU; CAI; 2015). CAS Nr. 699-17-2. **FM:** C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>; **MM:** 138; **EM-** *m/z* (%) 138 (96), 123 (14), 95 (90), 81 (100), 67 (30), 53 (24); **IV-** (ν max) (cm<sup>-1</sup>): 2917, 1710, 1362, 1154, 1006, 725; **RMN de <sup>1</sup>H-** (300,19 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2,17 (s, 3H, H1), 2,85 – 2,73 (m, 2H, H3), 2,92 (dd, *J* = 7,8, 7,1 Hz, 2H, H4), 5,99 (dd, *J* = 3,1, 0,7 Hz, 1H, H6), 6,27 (dd, *J* = 3,1, 1,9 Hz, 1H, H7), 7,29 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H, H8); **RMN de <sup>13</sup>C-** (75,48 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 22,37 (CH<sub>2</sub>, C4), 30,15 (CH<sub>3</sub>, C1), 41,91 (CH<sub>2</sub>, C3), 105,41 (CH, C6), 110,42 (CH, C7), 141,31 (CH, C8), 154,71 (C<sub>o</sub>, C5), 207,51 (C<sub>o</sub>, C2).

### 3.2.4. Procedimento geral da aminação reductiva

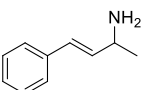
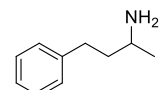
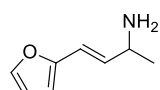
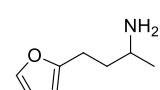
Esquema 10 Aminação reductiva para síntese dos compostos 2b-2e



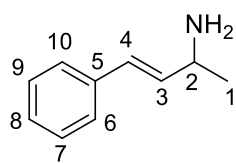
A 0,5 mmol da cetona precursora adicionou-se, sob atmosfera de nitrogênio, 1 mmol de isopropóxido de titânio (0,3 mL) e 2,5 mmol (1,25 mL) de solução 2M de amônia em etanol. O sistema foi mantido sob agitação magnética, à temperatura ambiente, e sob atmosfera inerte por 6 horas. Ao término desse período adicionou-se lentamente 0,75 mmol (28 mg) de borohidreto de sódio, e o sistema foi mantido sob agitação magnética por mais 3 horas.

Após esse período a reação foi terminada com adição de 2,0 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  2M. O precipitado inorgânico formado foi filtrado por filtração à vácuo e lavado abundantemente com acetato de etila. A fase aquosa foi extraída com acetato de etila (2 x de 5 mL) e as fases orgânicas foram combinadas, lavadas com solução saturada de  $\text{NaCl}$  e secas com  $\text{MgSO}_4$  anidro e depois evaporadas em rotaevaporador. A reação foi analisada via GC-FID. A amina **2b** foi purificada via cromatografia *flash* em sílica seca com fase móvel diclorometano/metanol 10% e para as demais não foi necessária purificação. Devido a formação do precipitado inorgânico, parte do produto obtido foi perdido, explicando alguns dos resultados obtidos.

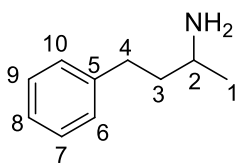
Tabela 2. Rendimentos e conversões obtidos nas reações de aminação reductiva

Composto	Rendimento (%)
 <b>2b</b>	66
 <b>2c</b>	39
 <b>2d</b>	99
 <b>2e</b>	31

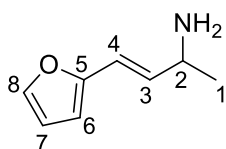




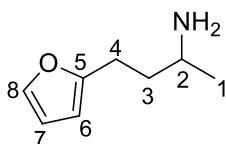
**4-fenil-3-buten-2-amina (2b).** (MIRIYALA; BHATTACHARYYA; WILLIAMSON, 2004), CAS Nr. 51616-91-2. **FM:** C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N; **MM:** 147; **EM-** *m/z* (%) :147 (69), 146 (49), 132 (100), 130 (25), 115 (63), 91 (24); **IV-** ( $\nu$  max) (cm<sup>-1</sup>): 3350, 3283, 2961, 1584, 969, 755, 680; **RMN de <sup>1</sup>H-** (300,19 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1,28 (d, *J* = 6,5 Hz, 3H, H1), 2,13 (sl, 2H, NH), 3,80 – 3,52 (m, 1H, H2), 6,21 (dd, *J* = 15,9, 6,7 Hz, 1H, H3), 6,48 (d, *J* = 15,9 Hz, 1H, H4), 7,42 – 7,15 (m, 5H, H6-H10); **RMN de <sup>13</sup>C-** (75,48 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 23,75 (CH<sub>3</sub>, C1), 49,57 (CH, C2), 126,50 (CH, C7-C9), 127,57 (CH, C3), 128,54 (CH, C4), 128,76 (CH, C6-C10), 135,56 (CH, C8), 137,25 (C<sub>o</sub>, C-5). **GC-FID** (após acetilação)- Coluna Hydrodex  $\beta$ -3P, Método 1, tempos de retenção = 26,307 min e 26,936 min.



**4-fenil-2-butanamina (2c).** (MIRIYALA; BHATTACHARYYA; WILLIAMSON, 2004), CAS Nr. 22374-89-6. **FM:** C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>N; **MM:** 149; **EM-** *m/z* (%) : 149 (3), 132 (65), 117 (44), 103 (12), 91 (100), 77 (26); **IV-**( $\nu$  max) (cm<sup>-1</sup>): 3412, 3331, 3027, 2924, 1561, 1451, 1362, 688; **RMN de <sup>1</sup>H-** (300,19 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1,12 (d, *J* = 6,3 Hz, 3H, H1), 1,68 (m, 4H, H3, NH), 2,78 – 2,55 (m, 2H, H4), 2,93 (st, *J* = 6,3, 6,3, 6,3, 6,3, 6,3 Hz, 1H, H2), 7,35 – 7,07 (m, 5H, H6-H10); **RMN de <sup>13</sup>C-** (75,48 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 24,05 (CH<sub>3</sub>, C1), 33,00 (CH<sub>2</sub>, C4), 41,87 (CH<sub>2</sub>, C3), 46,78 (CH, C2), 125,96 (CH, C8), 128,54 (CH, C7-C9), 128,57 (CH, C6-C10), 142,45 (C<sub>o</sub>, C-5). **GC-FID** (após acetilação)- Coluna Hydrodex  $\beta$ -3P, Método 2, tempos de retenção = 21,623 min e 22,066 min.



**4-(2-furanil)-3-buten-2-amina (2d).** CAS Nr. 1563831-02-6 **FM:** C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>NO; **MM:** 137; **EM-** *m/z* (%): 137 (100), 122 (96), 108 (43), 94 (59), 91 (30), 81 (42), 57 (31); **IV-**( $\nu$  max) (cm<sup>-1</sup>): 3368, 3279, 2975, 1576, 725; **RMN de <sup>1</sup>H-** (300,19 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1,24 (d, *J* = 6,5 Hz, 3H, H1), 1,50 (sl, 2H, NH), 3,69 – 3,50 (m, 1H, H2), 6,39 – 6,08 (m, 4H, H3-H7), 7,33 (d, *J* = 1,2 Hz, 1H, H8); **RMN de <sup>13</sup>C-** (75,48 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 24,06 (CH<sub>3</sub>, C1), 49,17 (CH, C2), 107,36 (CH, C3), 111,40 (CH, C6), 116,59 (CH, C7) 135,25 (CH, C4), 141,82 (CH, C8), 152,95 (C<sub>o</sub>, C-5). **GC-FID** (após acetilação)- Coluna Hydrodex  $\beta$ -3P, Método 3, tempos de retenção = 20,878 min e 21,218 min.



**4-(2-furanil)-2-butanamina (2e).** (KALAITZAKIS *et al.*, 2016), CAS Nr. 768-57-0. **FM:** C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>NO; **MM:** 139; **EM** *m/z* (%): 139 (22), 122 (100), 107 (64), 94 (18), 81 (85), 79 (42), 65 (14), 57 (26), 53 (39);

**IV-** ( $\nu$  max) (cm<sup>-1</sup>): 3353, 3286, 2961, 2931, 1561, 725; **RMN de <sup>1</sup>H-** (300,19 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1,11 (d, *J* = 6,3 Hz, 3H, H1), 1,67 (m, 1H, H3), 1,80 (sl, 3H, NH, H3), 2,69 (t, *J* = 7,8, 7,8 Hz, 2H, H4), 3,00 – 2,86 (m, 1H, H2), 5,99 (m, 1H, H6), 6,28 (dd, *J* = 3,1, 1,8 Hz, 1H, H7), 7,30 (dd, *J* = 1,8, 0,6 Hz, 1H, H8); **RMN de <sup>13</sup>C-** (75,48 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 23,98 (CH<sub>3</sub>, C1), 25,16 (CH<sub>2</sub>, C3), 38,28 (CH<sub>2</sub>, C4), 46,61 (CH, C2), 104,97 (CH, C6), 110,31 (CH, C7), 141,05 (CH, C8), 156,11 (C<sub>O</sub>, C-5). **GC-FID** (após acetilação)- Coluna Hydrodex  $\beta$ -3P, Método 3, tempos de retenção = 14,295 min e 14,793 min.

### 3.2.5. Procedimento geral para reação de acetilação das aminas

Em um tubo do tipo eppendorf, 1,0 mg da amina foi solubilizado em 1,0 mL de acetato de etila grau HPLC. Em seguida foram adicionados 10  $\mu$ L de anidrido acético e 1 cristal pequeno de 4-dimetilaminopiridina (DMAP). O sistema foi deixado sob agitação em termomixer à temperatura ambiente por 10 minutos. Após esse período a fase orgânica foi lavada com uma solução fracamente básica e seca com MgSO<sub>4</sub> anidro.

### 3.2.6. Procedimento geral para reação de redução com NaBH<sub>4</sub> para síntese dos padrões racêmicos dos álcoois

Em um balão de fundo redondo, 0,1 mmol da cetona precursora foram solubilizados em 1,5 mL de etanol absoluto e resfriados a 0 °C em banho de gelo. Adicionou-se lentamente 0,4 mmol (15 mg) de NaBH<sub>4</sub> o sistema permaneceu a 0 °C e sob agitação magnética vagarosa. Ao final da redução o solvente foi evaporado em rotaevaporador. O resíduo foi solubilizado em 1,5 mL de água acidificada (pH 5) e extraído com acetato de etila (3 x 1,5 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas com MgSO<sub>4</sub> anidro, e evaporadas em rotaevaporador.

### 3.3. Reações enzimáticas

#### 3.3.1. Procedimento geral para reação com enzima $\omega$ -transaminase comercial

Em um tubo do tipo eppendorf de 1,5 mL, 1,5 mg da cetona precursora foi solubilizado em 6  $\mu$ L DMSO (1% volume final), em seguida adicionou-se 0,5 mmol de PLP (7,5  $\mu$ L de uma solução 0,1M) e 150 mM de isopropilamina (0,112 mL de uma solução 0,2M). Foi adicionado tampão fosfato pH 7,5 100 mM q.s.p 0,6 mL e o pH do meio foi corrigido para 7 com adição de HCl 4M. Em seguida adicionou-se 2 mg da enzima ( $\geq 0.20$  U/mg). O tubo foi deixado sob agitação em termomixer a 30 °C e 850 rpm por 24 horas.

A reação foi interrompida com adição de HCl 4M até pH 3, seguida de extração com acetato de etila (2 x 0,6 mL). À fase aquosa foi adicionado NaOH 10M até pH 10-12 e extraiu-se com acetato de etila (4 x 0,6 mL). As fases orgânicas foram combinadas e secas com MgSO<sub>4</sub> anidro e evaporadas em rotaevaporador.

#### 3.3.2. Procedimento geral para reação com extratos enzimáticos dialisados

Em um tubo do tipo eppendorf de 2 mL, 20 mM da cetona precursora foram solubilizados em 15  $\mu$ L de DMSO (1% volume final), em seguida adicionou-se 1 mmol de PLP (15  $\mu$ L de uma solução 0,1M) e 300 mM (49  $\mu$ L) de isopropilamina. Foi adicionado extrato enzimático q.s.p 1,5 mL e o pH do meio foi corrigido para 7 com adição de HCl 4M. O tubo foi deixado sob agitação em termomixer a 30 °C e 850 rpm por 24 horas.

A reação foi interrompida com adição de NaOH 10M até pH 10-12 e extraiu-se com acetato de etila (2 x 1,5 mL). As fases orgânicas foram combinadas e secas com MgSO<sub>4</sub> anidro e evaporadas em rotaevaporador.

#### 3.3.3. Procedimento geral para reação utilizando micro-organismos

Ao tubo com ágar inclinado contendo os micro-organismos foi adicionado 2,0 mL de água destilada estéril. Foi formada uma suspensão com os micro-organismos e esta foi inoculada em 125,0 mL de meio NB. Os micro-organismos cresceram em incubadora do tipo *shaker* a 28 °C e 130 rpm por 12-16 horas. Após esse período o meio de cultura foi centrifugado por 15 minutos a 3200 rpm e a biomassa foi coletada. Para cada 5 g de biomassa úmida obtida foi utilizado 0,25 mmol de substrato. A

biomassa obtida foi ressuspensa em 30,0 mL de tampão fosfato pH 7,5 100 mM. Adicionou-se então o substrato, solubilizado em 1,5 mL de DMSO (5% do volume final), isopropilamina em excesso de 30 vezes (em relação ao substrato) e 1 mM de PLP. A reação foi mantida sob agitação orbital a 28 °C e 130 rpm por 24 horas.

Ao término da reação o meio reacional foi centrifugado por 15 minutos a 3200 rpm. O sobrenadante foi então acidificado com HCl 4M até pH 3, seguido de extração com acetato de etila (2 x 15 mL). À fase aquosa foi adicionado NaOH 10 M até pH 10-12 e extraiu-se com acetato de etila (4 x 15 mL). As fases orgânicas foram então combinadas e lavadas com solução saturada de NaCl e secas com MgSO<sub>4</sub> anidro. O solvente foi evaporado em rotaevaporador e o produto foi posteriormente analisado por GC-FID.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

### 4.1. Estratégia de trabalho

Nesse trabalho estudaremos a reação de aminação redutiva de cetonas, por vias enzimáticas e por via química (para síntese dos padrões racêmicos de aminas). A reação modelo utilizada encontra-se representada abaixo, no Esquema 11, e os substratos estudados nesse trabalho encontram-se representados na Figura 6.

Esquema 11. Reação modelo de aminação redutiva

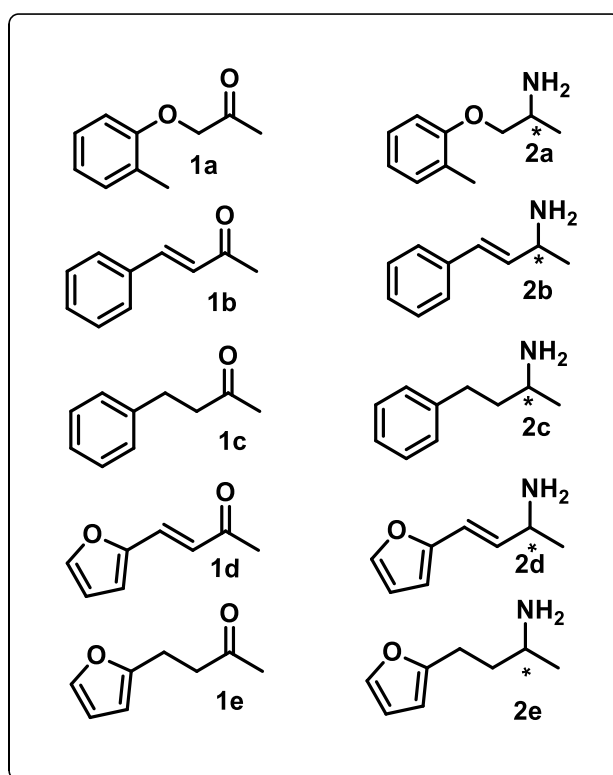
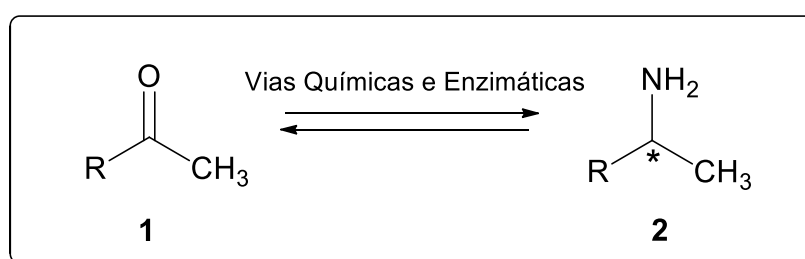


Figura 6 Substratos estudados nesse trabalho

Utilizando as cetonas precursoras **1a - 1e** representadas na Figura 5, foram avaliados um conjunto de biocatalisadores para a reação de aminação redutiva com  $\omega$ -transaminases. A estratégia de trabalho utilizada nas reações enzimáticas está

sumarizada no fluxograma da Figura 7. Primeiramente foi utilizada uma enzima comercial para otimização das condições reacionais, utilizando a cetona **1a** como composto modelo. Após a otimização das condições reacionais as cetonas precursoras foram avaliadas quanto à reação de aminação redutiva utilizando-se como biocatalisadores: enzimas comerciais, extratos enzimáticos contendo transaminases selvagens expressas heterologicamente em *E. coli* e dois micro-organismos, MLH 15 e MLH 51, pertencentes a coleção de Micro-organismos do Milagre Research Group, e que haviam previamente sido triados para a presença de  $\omega$ -transaminases.

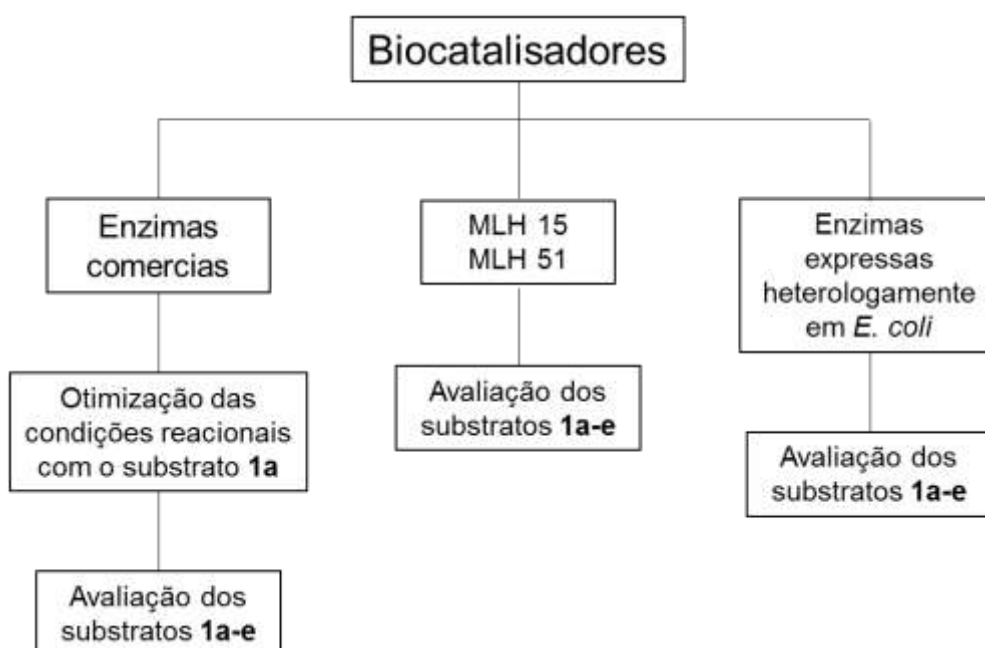


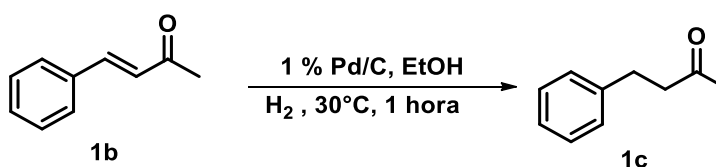
Figura 7 Fluxograma contendo a estratégia utilizada nas reações enzimáticas

## 4.2. Síntese dos substratos e padrões racêmicos

A primeira parte dessa discussão tratará da síntese das cetonas precursoras **1c-e** e das aminas racêmicas **2b-e**.

### 4.2.1. Síntese da 4-fenil-2-butanona **1c**

Esquema 12. Síntese da 4-fenil-2-butanona **1c**

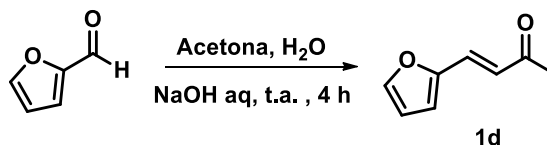


O composto **1c** foi sintetizado via hidrogenação catalisada por paládio da cetona precursora 4-fenil-3-buten-2-ona **1b**. A reação foi baseada na metodologia adaptada de Wei e colaboradores (WEI *et al.*, 2015). A reação foi monitorada via GC-FID e após 1 hora de reação observou-se total consumo do material de partida, gerando **1c** com 96% de conversão.

A cetona foi caracterizada via GC-MS, infravermelho e RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e DEPT 135. No espectro de massas (E16) nota-se o sinal íon molecular de *m/z* 148. No espectro no infravermelho (E17) foi observado estiramento da ligação C=O em 1714 cm<sup>-1</sup>. No espectro de RMN de <sup>1</sup>H (E18) nota-se o sinal único e intenso em 2,14 ppm integrando para 3H corresponde à metila ligada a C=O. É possível verificar em 2,83 – 2,70 ppm e 2,96 – 2,83 ppm os multipletos dos hidrogênios ligados ao C4 e C3, respectivamente, que não possuem equivalência magnética entre si, desdobrando-se então em multipletos. Os prótons do anel aromático possuem sinais em 7,35 - 7,13 ppm, em um multipletos. Observa-se, particularmente no espectro de DEPT 135 (E20), a presença de dois sinais com sinal negativo em 30 e 45 ppm, correspondendo aos CH<sub>2</sub> originários da redução da ligação dupla.

#### 4.2.2. Síntese da 4-(2-furanil)-3-buten-2-ona **1d**

Esquema 13. Síntese da 4-(2-furanil)-3-buten-2-ona **1d**



O composto **1d** foi sintetizado via reação aldólica clássica, seguindo metodologia de Ferreira e colaboradores (FERREIRA *et al.*, 2016b). A reação foi monitorada via GC-FID, e após 4 horas não havia mais pico referente ao material de partida. A caracterização foi realizada via GC-MS, infravermelho e RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. Na Figura 8 encontra-se representada a estrutura de **1d** com a numeração utilizada.

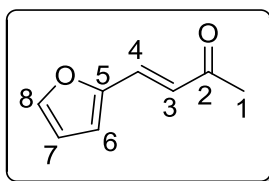


Figura 8 Estrutura da 4-(2-furanil)-3-buten-2-ona **1d**

No espectro de massas (E26) observa-se a presença de sinal íon molecular de  $m/z$  136. No espectro no infravermelho (E27) nota-se a banda  $1656\text{ cm}^{-1}$ , característica de estiramento C=O de carbonilas conjugadas a ligações duplas e em  $1621\text{ cm}^{-1}$  pode-se notar o estiramento C=C da ligação dupla.

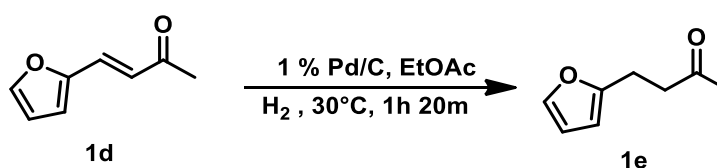
No espectro de RMN de <sup>1</sup>H (E28) observa-se um duplete em 6,62 com constante de acoplamento de 16,0 Hz, equivalente a H3, indicando que os hidrogênios H3 e H4 da ligação dupla estão orientados em *trans*. H4 por sua vez possui deslocamento em 7,28 ppm, acoplando com H3 em 16,0 Hz. Os valores de *J* encontrados para os hidrogênios do anel furânico estiveram de acordo com a literatura (PAVIA, *et al.*; 2015), e a atribuição foi realizada da seguinte maneira: o H7 apresenta deslocamento em 6,49 ppm e aparece na forma de um duplo duplete. Ele acopla com H6 com uma constante de 3,4 Hz e com H8 em 1,8 Hz. O H6 possui deslocamento em 6,67 ppm e aparece como um duplete, acoplando com H7 numa constante de 3,4 Hz. Já H8 possui deslocamento de 7,51 ppm e acopla com H7 numa constante de 1,8 Hz.



No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (E29) pode-se observar o sinal referente à carbonila em 198 ppm. Os carbonos C6, C7 e C8 do anel furânico aparecem em 115, 112 e 145 ppm, respectivamente, novamente de acordo com a literatura para essa classe de heterociclos (KATRITZKY, *et al*; 2010). O carbono quaternário C5 possui deslocamento em 151 ppm, confirmado pelo DEPT 135 (E30). Por fim os carbonos C3 e C4 da ligação dupla possuem deslocamento em 139 e 124 ppm, respectivamente.

#### 4.2.3. Síntese da 4-(2-furanil)-2-butanona **1e**

Esquema 14. Síntese da 4-(2-furanil)-2-butanona **1e**



O composto **1e** foi sintetizado via hidrogenação catalisada por paládio da cetona precursora 4-(2-furanil)-3-buten-2-ona **1d**. A reação foi baseada na metodologia adaptada de Robertson e colaboradores (ROBERTSON; NORTH; SADIG, 2011). A reação foi monitorada via GC-FID e após 1 hora e vinte minutos de reação observou-se total consumo do material de partida, gerando **1e** com 80% de conversão. A caracterização foi realizada via GC-MS, infravermelho e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Na Figura 9 encontra-se representada a estrutura de **1d** com a numeração utilizada.

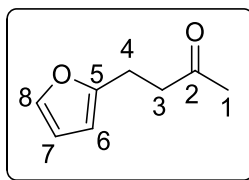


Figura 9 Estrutura da 4-(2-furanil)-2-butanona **1e**

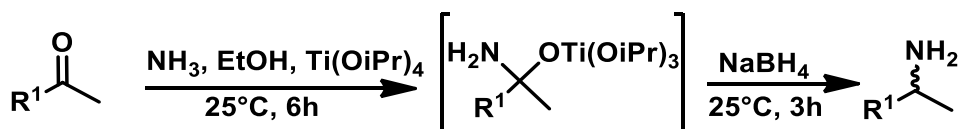
No espectro de massas (E36) observa-se o sinal íon molecular em  $m/z$  138. No espectro no infravermelho (E37) observa-se banda em  $1710\text{ cm}^{-1}$ , correspondendo ao estiramento C=O de cetonas alifáticas, um aumento em relação a mesma banda do composto **1d** (Seção 3.1.2). No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (E38) a atribuição dos hidrogênios do anel furânico foi feita da mesma maneira que para o composto **1d** (Seção 3.1.2). Os hidrogênios H3 e H4 dos CH<sub>2</sub> aparecem na forma de multipletos,

com os hidrogênios ligados ao mesmo carbono não possuindo equivalência magnética entre si. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (E39) a atribuição dos sinais referentes aos carbonos do anel furânico foi feita de maneira semelhante que para o composto **1d** (Seção 3.1.2). Nota-se, particularmente no espectro de DEPT 135 (E40) a presença de dois sinais invertidos em 22 e 42 ppm, correspondendo aos  $\text{CH}_2$  originários da redução da ligação dupla.

#### 4.2.4. Aminoação redutiva para síntese dos compostos 2b-2e

Foram realizadas reações de aminoação redutiva nas cetonas de modo a possuir o padrão racêmico das aminas primárias obtidas nas reações enzimáticas. Tal procedimento se fez necessário para que fosse desenvolvido um método de separação dos enantiômeros em colunas quirais do cromatógrafo gasoso, e, dessa maneira, determinar o excesso enantiomérico das reações enzimáticas. Foi seguido o procedimento otimizado por Miriyala e colaboradores (MIRIYALA; BHATTACHARYYA; WILLIAMSON, 2004a), de acordo com o esquema representado abaixo.

Esquema 15. Aminoação redutiva para síntese dos padrões racêmicos das aminas



Essa metodologia utilizada para síntese dos padrões racêmicos das aminas tratou-se uma aminoação redutiva, catalisada por titânio. Nessa reação o isopropóxido de titânio (IV) atua como um ácido de Lewis, se ligando à carbonila da cetona precursora e assim facilitando o ataque nucleofílico da amônia. É formada então uma imina, que é reduzida com a adição de borohidreto de sódio no meio reacional, gerando as aminas racêmicas.

As aminas foram caracterizadas via GC-MS, infravermelho e ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . De maneira geral, nos espectros de massas das aminas observa-se a presença de sinal íon molecular de massa ímpar, indicando a presença de nitrogênio. Nos espectros no infravermelho nota-se a ausência de bandas em torno de  $1700\text{ cm}^{-1}$  indicativas de estiramento  $\text{C}=\text{O}$ , e agora passam a existir duas bandas em torno de  $3300\text{ cm}^{-1}$ , características de estiramento  $\text{N-H}$  de aminas primárias, além de banda larga em torno de  $1560\text{ cm}^{-1}$ , características de dobramento

N-H. Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  também é possível ser observado simpleto largo, equivalente aos hidrogênios do grupo amino que não acoplam com os hidrogênios vicinais devido ao momento quadrupolar do nitrogênio. No RMN de  $^{13}\text{C}$  é observada a ausência de sinal referente à carbonila em torno de 200 ppm.

Para a 4-fenil-3-buten-2-amina **2b** (Figura 10) observa-se no espectro de massas (E11) o sinal íon molecular em  $m/z$  147. No espectro no IV (E12) as bandas em 3350 e 3283  $\text{cm}^{-1}$  são indicativas de estiramento N-H em amins primárias, além de ser possível observar em 1584  $\text{cm}^{-1}$  banda larga de dobramento N-H. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (E13) observa-se em 2,13 ppm simpleto largo, que equivale aos hidrogênios da amina. O H2 possui sinal em 3,80 - 3,52, na forma de um multipeto, acoplando com os três hidrogênios de H1 e com o hidrogênio de H3. Os hidrogênios H3 e H4 estão orientados em *trans*, sendo que H3 desdobra-se em um duplo dupeto em 6,21 ppm, acoplando com H4 em 15,9 Hz e com H2 com constante de 6,7 Hz, e H4 possui deslocamento em 6,48 ppm, na forma de um dupeto com constante de 15,9 Hz. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (E14) observa-se em 49,34 ppm o sinal referente ao C2.

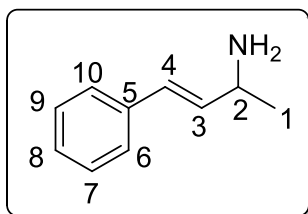


Figura 10 Estrutura da 4-fenil-3-buten-2-amina **2b**

Para a 4-fenil-2-butanamina **2c** (Figura 11) observa-se, no espectro de massas (E21), o sinal íon molecular em  $m/z$  149. No espectro no IV (E22) as bandas em 3412 e 3331  $\text{cm}^{-1}$  são indicativas de estiramento N-H em amins primárias, além de ser possível observar em 1561  $\text{cm}^{-1}$  banda larga referente ao dobramento N-H. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (E23) observa-se em 2,78-2,55 ppm um multipeto, onde coincidiram os sinais referentes aos hidrogênios do grupo amino e os localizados no carbono 3. O hidrogênio relativo a H2 possui deslocamento em 2,93 ppm, na forma de um sexteto, já que acopla com os 3H de H1 e os 2 hidrogênios em H4. Nota-se, particularmente no espectro de DEPT 135 (E25) a presença de dois sinais invertidos em 32,77 e 41,64 ppm, correspondendo aos  $\text{CH}_2$  de C4 e C3, respectivamente.

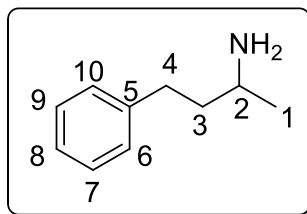


Figura 11 Estrutura da 4-fenil-2-butanamina **2c**

A 4-(2-furanil)-3-buten-2amina **2d** (Figura 12) possui em seu espectro de massas (E31) sinal íon molecular em  $m/z$  137. As bandas referentes a estiramento N-H, no espectro no IV (E32), são observadas em  $3368$  e  $3279$   $\text{cm}^{-1}$ , e a banda referente ao dobramento N-H em  $1576$   $\text{cm}^{-1}$ . No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (E33) o sinal referente aos hidrogênios da amina possui deslocamento em  $1,50$  ppm, na forma de um simpleto largo. Os hidrogênios H3 a H7 possuem deslocamento de  $6,39 - 6,08$  ppm, na forma de um multipeto, integrando para 4 hidrogênios. O hidrogênio H8, por sua vez, possui deslocamento em  $7,33$  ppm, sendo um dupeto de constante de acoplamento  $1,2$  Hz. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (E34) observa-se um sinal referente ao C2 em  $48,94$  ppm. Os sinais referentes aos carbonos C6, C7 e C8 do anel furânico aparecem em  $111,21$ ,  $116,36$  e  $141,59$  ppm, respectivamente, novamente de acordo com a literatura para essa classe de heterociclos (KATRITZKY, *et al*; 2010). O carbono quaternário C5 possui deslocamento em  $152,72$  ppm, confirmado pelo DEPT 135 (E35). Por fim os carbonos C3 e C4 da ligação dupla possuem deslocamento em  $107,13$ , e  $135,02$ , respectivamente.

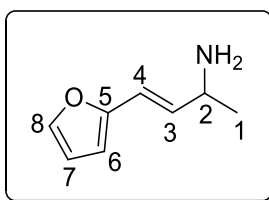


Figura 12 Estrutura da 4-(2-furanil)-3-buten-2amina **2d**

Por sua vez a 4-(2-furanil)-2-butanamina **2e** (Figura 13) apresentou em seu espectro de massas (E41) sinal íon molecular em  $m/z$  139. No espectro no IV (E42) as bandas de estiramento N-H são observadas em  $3353$  e  $3286$   $\text{cm}^{-1}$ , e de dobramento N-H em  $1561$   $\text{cm}^{-1}$ . No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (E43) observa-se um simpleto largo em  $1,80$  ppm, integrando para três hidrogênios, sendo os sinais referentes aos dois hidrogênios do grupo amino e um dos hidrogênios H3, cujo deslocamento provavelmente coincidiu com os da amina. Junto a esse sinal, em  $1,67$  ppm, há um

multiplete, integrando para um hidrogênio, sendo o deslocamento do outro hidrogênio H3. Já H4 possuiu um deslocamento de 2,69 ppm, sendo um tripleto que acopla com H3 com constante de 7,8 Hz. H2 foi observado na forma de um multiplete, em 3,00-2,86 ppm.

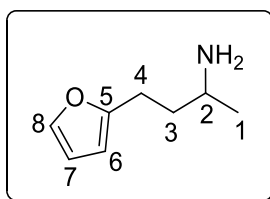


Figura 13 Estrutura da 4-(2-furanil)-2-butanamina **2e**

Quanto aos hidrogênios do anel furânico, H6 apresenta deslocamento em 5,99 ppm, na forma de um multiplete. O hidrogênio H7 apresenta deslocamento em 6,28 ppm e aparece na forma de um duplo duplete, acoplado com H8 com constante de 1,8 Hz e com H6 em 3,1 Hz. Já H8 possui deslocamento de 7,30 ppm e acopla com H7 numa constante de 1,8 Hz e com H6 em 0,6 Hz. As constantes de acoplamento observadas estão de acordo com a literatura para essa classe de compostos heterocíclicos (KATRITZKY, *et al*; 2010). No espectro de RMN de <sup>13</sup>C (E44), os sinais referentes aos carbonos C6, C7 e C8 do anel furânico aparecem em 104,74, 110,08 e 140,82 ppm, respectivamente, novamente de acordo com a literatura para essa classe de heterociclos (KATRITZKY, *et al*; 2010). O carbono quaternário C5 possui deslocamento em 155,88 ppm, confirmado pelo DEPT 135 (E45). Por fim os carbonos C2, C3 e C4 possuem deslocamento em 46,38, 24,93 e 38,05 ppm, respectivamente.

### 4.3. Reações enzimáticas

#### 4.3.1. Otimização das condições reacionais

Primeiramente foram testadas as condições reacionais utilizadas por DA CRUZ (DA CRUZ, 2016) neste grupo de pesquisa (Tabela 3). Para isso, foi utilizado como biocatalisador a enzima  $\omega$ -transaminase (S)-seletiva recombinante de *E. coli* adquirida da empresa Sigma-Aldrich® e como substrato a cetona 1-(2-metilfenoxi)-2-propanona **1a**. A reação encontra-se ilustrada no Esquema 16.

Esquema 16. Reação teste empregando as condições de DA CRUZ

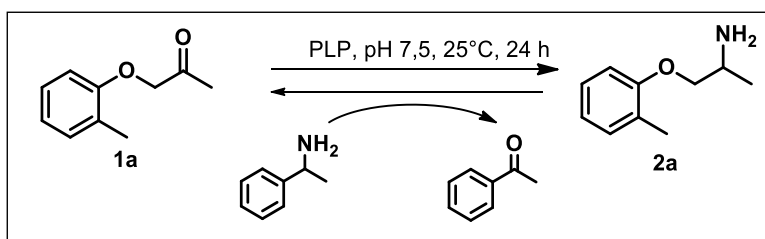


Tabela 3. Condições empregadas na reação teste

Condições	
Enzima	10 mg
Feniletilamina	100 mM
PLP	1 mM
Substrato	24 $\mu$ mol (4mg)
Tampão fosfato	100 mM, pH 7,5

Nessas condições reacionais não foi observada reação de aminação reductiva. Entretanto, observou-se a formação de uma imina, originada da reação entre a feniletilamina e o substrato **1a** (Esquema 17). Para confirmar que essa reação não foi catalisada pela enzima, foi realizada uma reação controle na ausência da mesma, e observou-se novamente a formação da imina. A caracterização foi feita através de GC-MS (Figura 8). Neste espectro é possível observar o sinal íon molecular de  $m/z$  267.

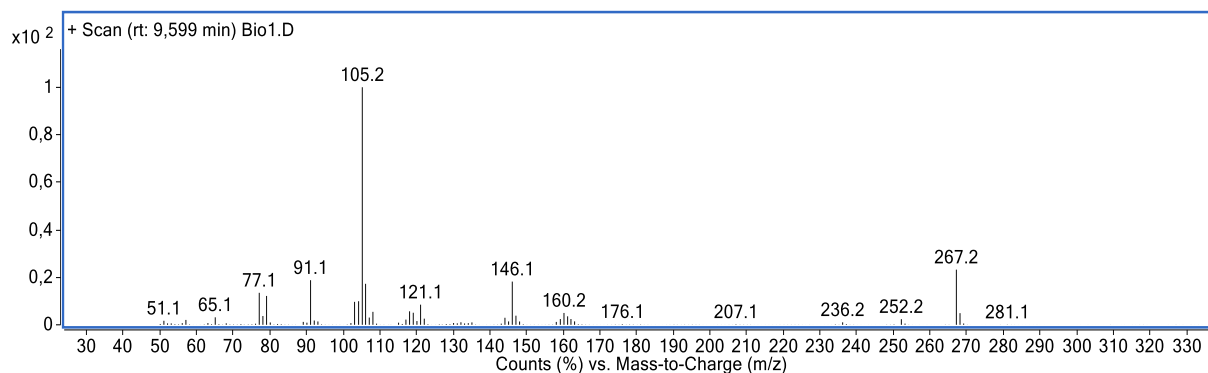
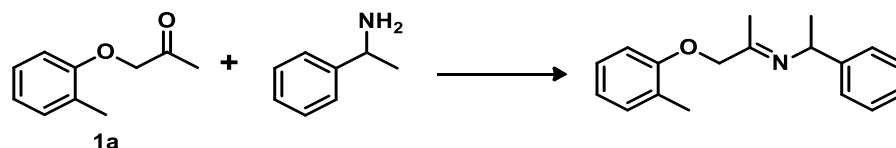
Esquema 17. Reação entre feniletilamina e composto **1a**

Figura 14 Espectro de massas (IE, 70 eV) da imina

Foram então testadas as condições de Fesko e de Mutti (FESKO *et al.*, 2013; MUTTI *et al.*, 2011) para as reações de aminação redutiva empregando  $\omega$ -transaminases. Foram também avaliados como doadores amino, além da feniletilamina, a isopropilamina e a *n*-butilamina. As condições utilizadas encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Condições otimizadas para a reação de transaminação

#### Condições

Enzima	5 mg
Doador amino <sup>a</sup>	200 ou 300 <sup>b</sup> mM
PLP	1 mM
Substrato	20 mM (4mg)
Tampão fosfato	100 mM, pH 7,5
DMSO (cosolvente)	1% v

a- Feniletilamina, isopropilamina ou *n*-butilamina; b- Para a isopropilamina foi utilizada condição de 300 mM, por ser um composto volátil.

Entre as mudanças inseridas destaca-se o uso de DMSO como cossolvente, necessário para a solubilização do substrato na fase aquosa. Foi também aumentada a quantidade de doador amino utilizada, deslocando assim o equilíbrio na direção de formação dos produtos. As conversões, medidas por GC-FID encontram-se na Tabela

5. Na Figura 15 é mostrado o cromatograma obtido quando usado a isopropilamina como doador amino.

Tabela 5. Conversões obtidas variando o doador amino

Doador amino	Conversão (%) <sup>a</sup>
Feniletilamina	25
Isopropilamina	87
<i>n</i> -butilamina	0

a-Determinada por GC-FID

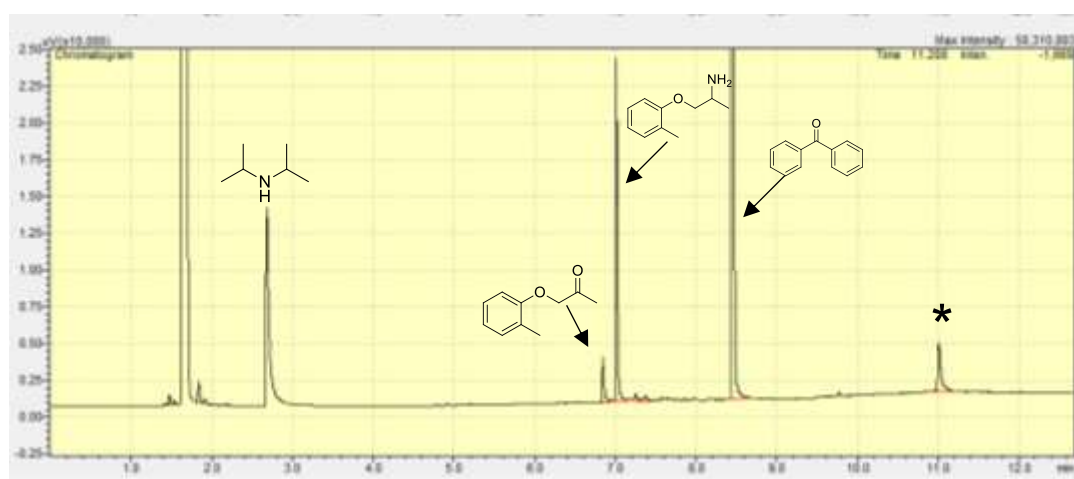


Figura 15 Cromatograma obtido usando a isopropilamina como doador amino. \*sinal presente nas reações enzimáticas usando essa enzima

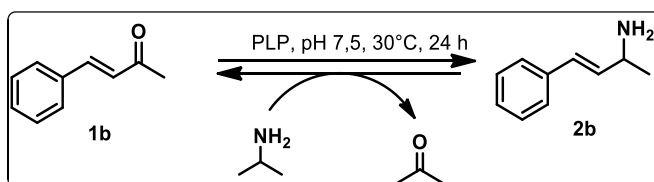
Na reação utilizando-se a feniletilamina foi observada novamente reação paralela entre a feniletilamina e o substrato, o que implicou na baixa conversão obtida. Quanto a *n*-butilamina, após busca na literatura verificou-se que o butanal, gerado na reação de transaminação, inativa a enzima (SLABU *et al.*, 2017), sugerindo o resultado obtido. A isopropilamina, por sua vez, apresentou o melhor resultado de conversão para o composto **1a**. Com vista nisso e como o coproduto oriundo da reação de aminação reductiva com a isopropilamina, acetona, é volátil, aliado ao seu baixo custo, optou-se por utiliza-la como doador amino nas reações futuras. As condições otimizadas utilizadas nos experimentos subsequentes estão apresentadas na Tabela 5.



#### 4.3.2. Reação com a enzima $\omega$ -transaminase (*S*)-seletiva recombinante de *E. coli* e substrato **1b**

Com as condições reacionais otimizadas foi realizada a reação com o substrato **1b**, utilizando a mesma enzima  $\omega$ -transaminase (*S*)-seletiva recombinante de *E. coli*.

Esquema 18. Reação empregando  $\omega$ -transaminase (*S*)-seletiva recombinante de *E. coli* e composto **1b**



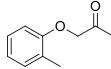
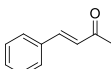
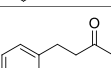
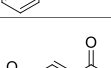

Com esse biocatalisador não foi observada conversão de **1b** na amina **2b**. Como o composto **1b** possui estrutura planar por conter quase que exclusivamente átomos de carbono  $sp^2$ , o acesso ao sítio catalítico da enzima pode ser dificultado, podendo explicar o resultado obtido. Como na literatura existem resultados positivos para a reação de aminação redutiva utilizando esse tipo de substrato com estrutura planar (PLANCHESTAINER *et al.*, 2017; SCHMIDT; SIMON; KROUTIL, 2015), é indicativo que a enzima utilizada não aceita esse substrato.

Após a reação com esse substrato a enzima disponível no laboratório acabou e, por sua comercialização ter sido descontinuada pela Sigma-Aldrich®, não puderam ser realizadas as reações com os demais substratos desse projeto.

#### 4.3.3. Reação com $\omega$ -transaminase comercial (*R*)-seletiva recombinante de *Aspergillus fumigatus*

Outro biocatalisador avaliado foi a enzima  $\omega$ -transaminase comercial (*R*)-seletiva recombinante de *Aspergillus fumigatus*. Com esse biocatalisador foram avaliados cinco diferentes substratos quanto a reação de síntese assimétrica de aminas. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6. Reações empregando a  $\omega$ -transaminase comercial (*R*)-seletiva recombinante de *Aspergillus fumigatus*

Substrato <sup>a</sup>	Conversão (%) <sup>b</sup>	Ee <sup>c</sup>
 <b>1a</b>	<b>99</b>	<b>&gt;99</b>
 <b>1b</b>	<b>0</b>	<b>-</b>
 <b>1c</b>	<b>99</b>	<b>&gt;99</b>
 <b>1d</b>	<b>0</b>	<b>-</b>
 <b>1e</b>	<b>0</b>	<b>-</b>

a- Condições: 20 mM substrato, 1% DMSO, 1 mM PLP, 100 mM tampão fosfato, pH 7,5, 30°C, 24 h. b- Determinada por GC-FID; c- Composto **2a** ee determinado por HPLC-UV coluna OD-H, Composto **2c** ee determinado por GC-FID coluna Hydrodex, Método Hydrodex 2

Frente aos substratos testados, a enzima mostrou excelente atividade para os compostos **1a** e **1c**, os convertendo nas respectivas aminas **2a** e **2c** com conversão maior que 99%. As reações com os compostos **1a** e **1c** foram posteriormente acetiladas, de modo a melhorar a resolução da separação cromatográfica, e assim foram determinados os excessos enantioméricos. Os ee foram maiores que 99% para ambos os compostos. Tendo em vista que a enzima é (*R*) seletiva, sugere-se que **2a** e **2c** foram obtidos com 99% de ee para o enantiômero (*R*). O cromatograma da análise do composto **2c** encontra-se na Figura 16.

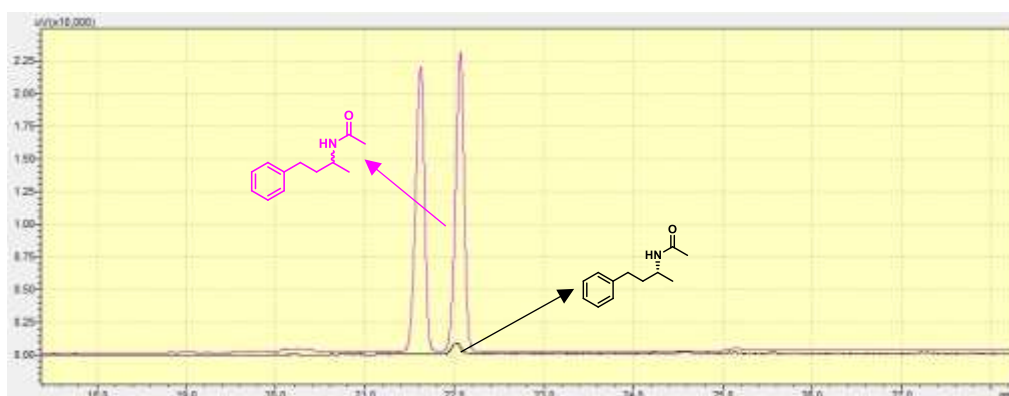


Figura 16 Cromatograma da reação com a enzima a  $\omega$ -transaminase comercial (*R*)-seletiva recombinante de *Aspergillus fumigatus* e composto **1c**. (Rosa: padrão racêmico da amina **2c** acetilada; em Preto: enantiômero *R* puro)

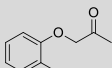
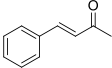
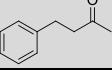
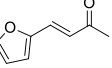
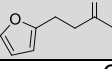
Já para o composto **1b**, que difere de **1c** pela presença de uma ligação dupla entre os carbonos 2 e 3, não foi observada conversão na respectiva amina, indicando não aceitação do substrato pela enzima utilizada. Em relação a **1d** e **1e**, esperava-se que o anel furânico pudesse auxiliar na ancoragem deles no sítio catalítico através de ligações de hidrogênio, entretanto também não foram observadas reações para esses compostos.

#### 4.3.4. Reações com micro-organismos da coleção do Milagre Research Group

Foram também avaliados como potenciais biocatalisadores para as reações de aminação redutiva os micro-organismos MLH 15 e MLH 51, da Coleção de Micro-organismos do Milagre Research Group. Eles foram previamente triados neste grupo de pesquisa para a presença de  $\omega$ -transaminases (DA CRUZ, 2016), utilizando acetofenona para verificação dos *hits* positivos. Na Tabela 7 estão relacionadas as reações catalisadas por esses micro-organismos frente aos substratos desse projeto.

Tabela 7. Reações empregando como biocatalisadores os micro-organismos MLH 15 e MLH

51

Substrato	Reações- Conversão (%) <sup>b</sup>					
	Aminação Redutiva		Redução C=C		Formação do álcool	
	MLH 15	MLH 51	MLH 15	MLH 51	MLH 15	MLH 51
 <b>1a</b>	0	0	-	-	0	0
 <b>1b</b>	0	0	0	9	0	0
 <b>1c</b>	0	0	-	-	22	5
 <b>1d</b>	0	0	0	0	0	0
 <b>1e</b>	0	0	-	-	39	5

a- Condições: 20 mM substrato, 1% DMSO, 1 mM PLP, 100 mM tampão fosfato, pH 7,5, 28 °C, 24 h; b- Conversões determinadas por GC-FID

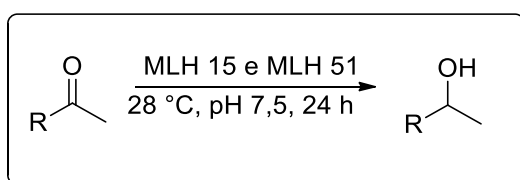
Como pode ser observado pela Tabela 7, nenhum dos micro-organismos avaliados foi capaz de realizar a reação de aminação redutiva frente aos substratos de interesse do projeto.

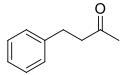
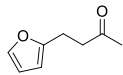
Foi possível observar para o substrato **1b**, quando utilizando o micro-organismo MLH 51, redução da ligação dupla C=C, gerando **1c** com 9% de conversão. Esse resultado sugere ação de enzimas ene-redutases, capazes de reduzir ligações duplas carbono-carbono. Esta reação não ocorreu com o composto **1d**, indicando que o anel furânico interferiu na ação dessas enzimas.

Quando foram realizadas as reações com os substratos **1c** e **1e** foi observada a conversão de ambos nos respectivos álcoois, 4-fenil-2-butanol e 4-(2-furânil)-2-butanol, para ambos os micro-organismos avaliados. Esse resultado sugere a ação de enzimas cetorredutases, que catalisam a redução de cetonas a álcoois secundários quirais. Como pode ser visualizado na Tabela 8, na reação com o MLH 15, **1c** foi convertido no 4-fenil-2-butanol com 22% de conversão e 90% de ee, e com o MLH 51 foi observada 5% de conversão e 78% de ee. Quanto a **1e**, na reação com o MLH 15 ele foi convertido no álcool 4-(2-furânil)-2-butanol com 39% de conversão e 98% de ee, e com o MLH 51 foi observada 5% de conversão e 98% de ee.

Os resultado obtidos com os micro-organismos MLH 15 e MLH 51 são interessantes e promissores, pois, apesar de não ter acontecido reação de aminação redutiva com os substratos avaliados, álcoois secundários com ee elevados são bastante relevantes industrialmente, sendo blocos construtores chave na indústria farmacêutica (GRUBER *et al.*, 2006) .

Tabela 8 Reações de formação dos álcoois com os micro-organismos MLH 15 e MLH 51



Substrato	MLH 15		MLH 51	
	Conversão <sup>a</sup> (%)	ee <sup>b</sup> (%)	Conversão <sup>a</sup> (%)	ee <sup>b</sup> (%)
 <b>1c</b>	22	90	5	78
 <b>1e</b>	39	98	5	98

a-Conversões determinadas por GC-FID; b-Determinados por GC-FID coluna Hydrodex, Método Hydrodex 4

O cromatograma referente a reação de **1e** com o micro-organismo MLH 15 encontra-se na Figura 17. Os álcoois foram caracterizados via GC-MS e os espectros

de massas encontram-se nas Figuras 18 e 19. Para o 4-fenil-2-butanol observa-se sinal íon molecular de baixa intensidade de  $m/z$  150. Quanto ao 4-(2-furanil)-2-butanol é possível observar no espectro sinal íon molecular de  $m/z$  140.

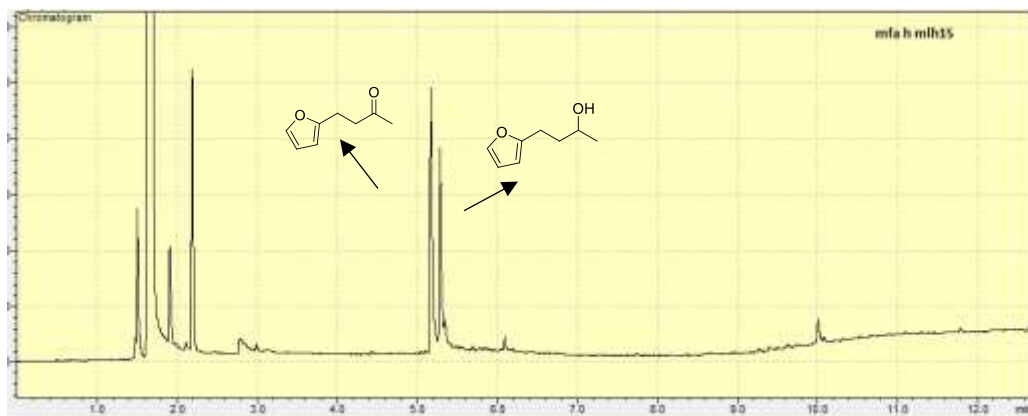


Figura 17 Cromatograma referente a reação do micro-organismo MLH 51 e composto **1d**

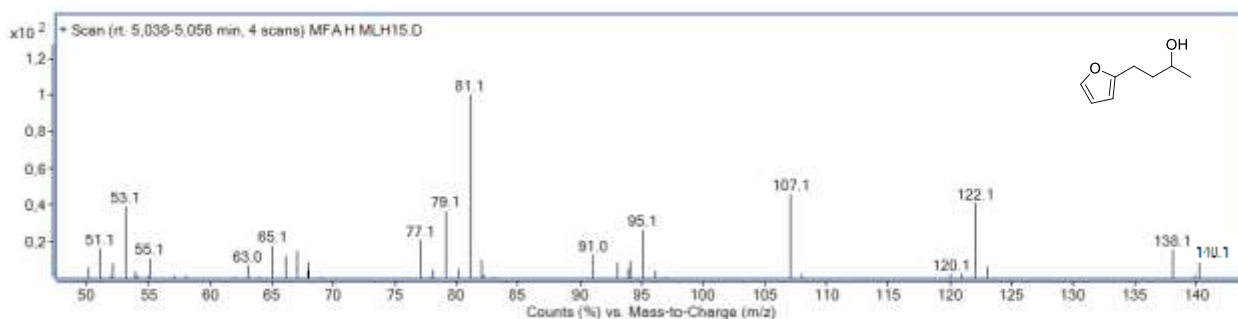


Figura 18 Espectro de massas (IE, 70 eV), do 4-(2-furanil)-2-butanol

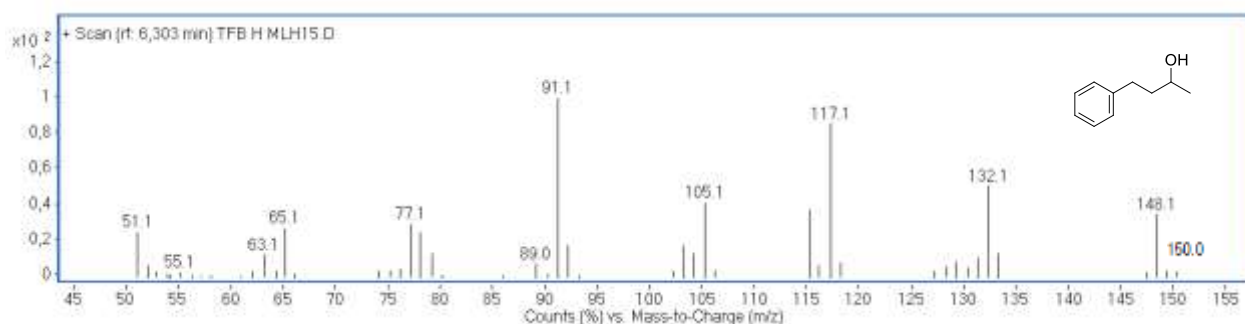


Figura 19 Espectro de massas (IE, 70 eV) do 4-fenil-2-butanol

#### 4.3.5. Reações com extratos enzimáticos

Por fim, foram avaliados como biocatalisadores cinco extratos enzimáticos contendo  $\omega$ -transaminases recombinantes expressas em *E. coli* e provenientes dos

micro-organismos *Chromobacterium violaceum*, *Aspergillus terreus*, *Vibrio fluvialis* JS17, *Mycobacterium vanbaalenii* e *Ruegeria pomeroyi*.

Primeiramente foi realizada uma dosagem da quantidade de proteínas totais presentes nos extratos produzidos, e em seguida eles foram avaliados quanto à reação de aminação redutiva com os cinco substratos do projeto.

#### 4.3.5.1. Dosagem das proteínas totais - Ensaio de Bradford

Foram realizadas as quantificações da quantidade de proteínas totais presentes nos extratos enzimáticos produzidos, de modo a ter uma estimativa da quantidade de enzima empregada nas reações de biocatálise usando esses extratos.

A metodologia escolhida foi o Ensaio de Bradford, desenvolvido em 1976 pela pesquisadora Marion Bradford (BRADFORD, 1976). O ensaio consiste de um teste colorimétrico que se baseia na mudança de absorvância do corante Azul Brilhante de Coomassie G-250 quando ligado às proteínas. É uma metodologia simples, rápida e de baixo custo, capaz de dosar a quantidade de proteínas totais presentes em solução.

Para construção da curva analítica foram usadas as concentrações de 0,031, 0,062, 0,125, 0,25, 0,5 e 1 mg mL<sup>-1</sup>. Todos os pontos foram feitos em triplicata. Na Tabela 9 se encontram as médias de Absorvância em 595 nm obtidas.

Tabela 9 Curva analítica do Ensaio de Bradford

Concentração (mg/mL)	Abs 595nm
0,031	0,025
0,062	0,032
0,125	0,045
0,25	0,050
0,5	0,116
1	0,140

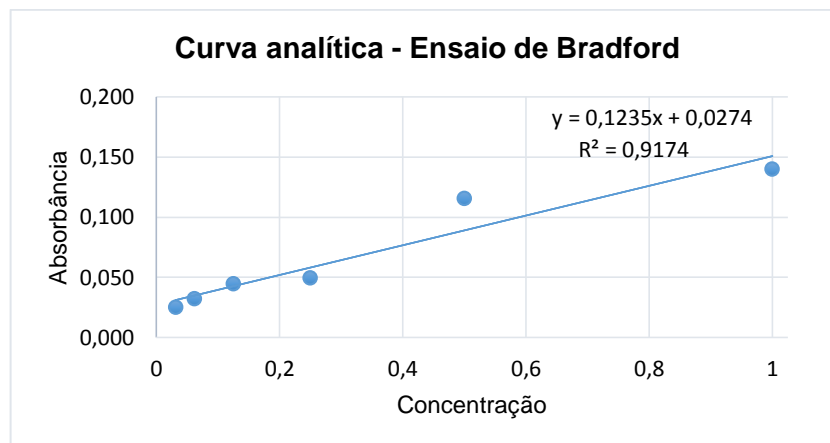


Figura 20 Curva Analítica - Ensaio de Bradford

Após a construção da curva analítica foram feitas as medidas da Abs 595nm dos extratos enzimáticos após diálise. As medidas foram realizadas em triplicata. Na Tabela 8 se encontram as médias das absorbâncias obtidas, bem como o valor de concentração encontrado quando as absorbâncias foram “interpoladas” na equação de reta da curva da Figura 20.

Tabela 10 Concentração das proteínas totais presentes nos extratos enzimáticos pós diálise

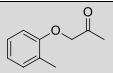
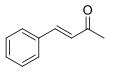
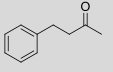
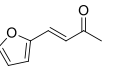
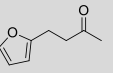
Extrato	Abs 595nm	Concentração (mg mL <sup>-1</sup> )
<i>C. violaceum</i>	0,08	0,426
<i>A. terreus</i>	0,022	n.d. <sup>a</sup>
<i>V. fluvialis</i>	0,042	0,118
<i>M. vanbaalenii</i>	0,032	0,033
<i>R. pomeroyi</i>	0,058	0,247

a- A medida do extrato contendo a transaminase de *Aspergillus terreus* foi inferior à concentração mínima utilizada para construção da curva analítica.

#### 4.3.5.2. Reações enzimáticas empregando os extratos enzimáticos

Em seguida, os extratos enzimáticos foram submetidos às reações de biotransformação frente aos substratos do projeto. Na Tabela 11 estão relacionadas as reações com esses extratos.

Tabela 11 Reações usando extratos enzimáticos frente aos substratos **1a-e**

Substrato	Extrato Enzimático									
	<i>C.violaceum</i>		<i>A.terreus</i>		<i>V.fluvialis</i>		<i>M.vanbaalenii</i>		<i>R. pomeroyi</i>	
	Conversão <sup>b</sup> (%)	ee <sup>c</sup> (%)	Conversão (%)	ee(%)	Conversão (%)	ee(%)	Conversão (%)	ee(%)	Conversão (%)	ee(%)
 <b>1a</b>	82	>99	57	>99	0	-	73	>99	100	>99
 <b>1b</b>	0	-	2,7	>99	0	-	3,5	>99	8,6	>99
 <b>1c</b>	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
 <b>1d</b>	2	>99	2,4	>99	0	-	2,6	>99	0	-
 <b>1e</b>	4,8	>99	2,4	84	0	-	1,3	>99	0	-

a- Condições: 20 mM substrato, 1% DMSO, 1 mM PLP, 100 mM tampão fosfato, pH 7,5, 30°C, 24 h, b-Conversões determinadas por GC-FID; c- Composto **2a** ee determinado por HPLC-UV coluna OD-H, Composto **2b-e** ee determinados por GC-FID coluna Hydrodex, Método Hydrodex 1 (**2b**) e Hydrodex 4( **2d** e **2e**)



Como pode ser observado na Tabela 11, não foi observada reação de aminação redutiva, frente aos substratos avaliados, com o extrato contendo a  $\omega$ -transaminase de *V. fluvialis*. Também pode ser ressaltado que, para o substrato **1c** não foi observada a reação com nenhum dos extratos enzimáticos avaliados.

O composto **1a** apresentou conversões de moderadas a ótimas (57-100) com quatro dos extratos enzimáticos avaliados, com excessos enantioméricos maiores que 99% para esse composto. Devido à baixa concentração de enzima empregada nas reações, de acordo com o Ensaio de Bradford (Seção 4.3.5.1.) realizado, os valores obtidos são bastante promissores, indicando a notável aceitação desse substrato pelas enzimas estudadas, que mesmo presentes em baixas concentrações foram capazes de exibir valores de conversão consideráveis, com ótimos excessos enantioméricos. Os resultados obtidos indicam que a presença de um grupo éter no composto **1a** mostrou-se relacionada a melhor aceitação do substrato pela enzima.

Nas reações catalisadas pela transaminase de *C. violaceum* não foi observada conversão de **1b** na amina, ao passo que **1d** que difere pela presença do anel furânico, apresentou conversão de 2%. Esse resultado pode sugerir que a presença do heterociclo auxiliou a ancoragem do substrato no sítio catalítico favorecendo a reação. Já **1e** apresentou conversão de 4,8% na sua respectiva amina, frente aos 2% de conversão de **1d**, indicando que a ausência da ligação dupla favoreceu a reação de aminação redutiva. Todos os ee foram maiores que 99% quando usada essa enzima.

Já nas reações catalisadas pela transaminase de *A. terreus* não foi observada diferença significativa nos valores das conversões de **1b**, **1d** e **1e** nas suas respectivas aminas. O substrato **1b** apresentou conversão de 2,7%, enquanto que os resultados para **1d** e **1e** foram de 2,4%, para ambos os substratos. Em relação aos excessos enantioméricos, as reações com **1b** e **1d** apresentaram ee maiores que 99%, enquanto que a reação com o substrato **1e** possuiu ee de 84%. Esse resultado pode sugerir que a ausência da ligação dupla em **1e**, e conseqüente maior rotação da molécula, pode diminuir a enantiosseletividade da enzima.

Com a transaminase de *M. vanbaalenii* o substrato **1b** apresentou 3,5% de conversão na respectiva amina, enquanto que **1d** e **1e** apresentaram 2,6% e 1,3%, respectivamente. A conversão ligeiramente menor de **1d** em relação a **1b** pode indicar que a presença do heterociclo interferiu negativamente na ação dessa enzima. Apesar

de não possuir ligação dupla, o que traz maior mobilidade para a molécula, **1e** apresentou conversão menor que **1d**. Ressalta-se que todos os excessos enantioméricos foram maiores que 99%, sendo esse um ponto de partida interessante para a otimização das condições reacionais, a fim de aumentar a conversão obtida.

Por fim, quando utilizada a transaminase de *R. pomeroyi*, não foram observadas conversões de **1d** e **1e** nas respectivas aminas, indicando que o anel furânico presente nessas estruturas interferiram na ação dessa enzima. Já na reação com o substrato **1b** foi observada conversão de 8,6% e ee maior que 99%.

Os baixos valores de conversão obtidos para os compostos **1b**, **1d** e **1e** podem ser explicados pela baixa concentração de proteínas totais obtidas no Ensaio de Bradford (Seção 4.3.5.1.). Posteriormente foi repetida a reação do substrato **1b** com o dobro do extrato contendo a transaminase de *M. vanbaalenii*, mantendo os demais parâmetros constantes, e a conversão aumentou de 3,5% para 7,2%, indicando que a baixa concentração da enzima presente influenciou nos resultados obtidos.

## 5. CONCLUSÕES

Na primeira etapa do trabalho foram sintetizados os substratos para as reações enzimáticas além dos padrões racêmicos das suas respectivas aminas. Todos os compostos foram caracterizados a partir de espectrometria de massas, espectroscopia no infravermelho, e ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Foram também desenvolvidos os métodos de separação em colunas quirais (de GC e HPLC) das aminas estudadas.

A reação de síntese assimétrica enzimática das aminas foi otimizada, e em seguida foram empregados como biocatalisadores duas enzimas de origem comercial, dois micro-organismos selvagens, além de cinco extratos enzimáticos contendo  $\omega$ -transaminases recombinantes expressas em *E. coli*. No escopo dos substratos utilizados foi avaliado a influência que a estrutura do composto tem na reação catalisada pela enzima, variando a presença de estruturas planares, heterocíclicas e presença de heteroátomos.

Os dois micro-organismos selvagens avaliados não foram capazes de realizar a reação de síntese assimétrica de aminas. Entretanto, observou-se a ação de enzimas ene-redutases no micro-organismo MLH 51, capaz de reduzir a dupla do substrato **1b** 4-fenil-3-buten-2-ona, com conversão de 9%. Foram também observadas enzimas cetorredutases, em ambos os micro-organismos, cuja conversão, apesar de modesta, possuiu bons excessos enantioméricos (78-98%). Ressalta-se que os compostos obtidos possuem interesse comercial, sendo blocos construtores nas indústrias química e farmacêutica.

Por fim, os extratos enzimáticos apresentaram potencial para a aminação redutiva de substratos contendo anéis heterocíclicos e estruturas planares, cuja conversão, apesar de modesta, mostrou-se ligada à baixa concentração de enzima presente nos extratos enzimáticos produzidos, de acordo com a dosagem realizada pelo Ensaio de Bradford. Embora os valores de conversão observados não sejam ainda satisfatórios, os excessos enantioméricos obtidos quando usadas essas enzimas foram de bons a excelentes (84 a >99%), sendo um bom ponto de partida para otimização das condições reacionais e futuro emprego desses biocatalisadores.

Além disso, com os substratos estudados também foi possível avaliar a classe de compostos adequados para as  $\omega$ -transaminases, sendo que a presença de um

grupo éter no composto **1a** mostrou-se relacionada a melhores valores de conversão quando usada essa enzima.

No decorrer desse trabalho foi possível estudar a reação de aminação redutiva assimétrica empregando enzimas  $\omega$ -transaminases de origem microbiana como biocatalisadores. A importância de estudos nessa área já é bastante conhecida, e o trabalho realizado demonstra como a biocatálise pode contribuir para fornecer alternativas eficientes e potencialmente quimio- e estereosseletivas para a transformação de compostos orgânicos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, L. H.; KROUTIL, W.; JAMISON, T. F. Continuous flow synthesis of chiral amines in organic solvents. **Organic letters**, v. 16, p. 6092–6095, 2014.
- BEA, H.-S.; PARK, H.-J.; LEE, S.-H.; YUN, H. Kinetic resolution of aromatic  $\beta$ -amino acids by  $\omega$ -transaminase. **Chemical Communications**, v. 47, n. 20, p. 5894–5896, 2011.
- BEHRENS, G. A. et al. Discovery and protein engineering of biocatalysts for organic synthesis. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 353, n. 13, p. 2191–2215, 2011.
- DE SOUZA, R. O. M. A.; MIRANDA, L. S. M.; BORNSCHEUER, U. A retrosynthesis approach for biocatalysis in organic synthesis. **Chemistry - A European Journal**, v.23, p. 12040–12063, 2017.
- BORNSCHEUER, U. T. et al. Engineering the third wave of biocatalysis. **Nature**, v. 485, n. 7397, p. 185–194, 2012.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- CHEN, S.-J.; LU, G.-P.; CAI, C. A base-controlled chemoselective transfer hydrogenation of  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketones catalyzed by  $[\text{IrCp}^*\text{Cl}_2]_2$  with 2-propanol. **RSC Advances**, v. 5, 13208–13211, 2015.
- CHOI, J.-M.; HAN, S.-S.; KIM, H.-S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 7, p. 1443–1454, 2015.
- DA CRUZ, R. S. **Síntese enantiosseletiva de  $\beta$  -aminoésteres quirais através de sistemas enzimáticos envolvendo transaminases**. 2016. 109 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.
- DE OLIVEIRA, L. G.; MANTOVANI, S. M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 742–756, 2009.
- FERREIRA, D. S. P. et al. Tuning lipase-catalysed kinetic resolution of 2-substituted thiophenes and furans: a scalable chemoenzymatic route to masked  $\gamma$ -bis-oxo-alcohols. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 126, p 37–45, 2016
- FESKO, K. et al. Investigation of one-enzyme systems in the  $\omega$ -transaminase-catalyzed synthesis of chiral amines. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 96, p. 103–110, 2013.
- FUCHS, M.; FARNBERGER, J. E.; KROUTIL, W. The industrial age of biocatalytic transamination. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2015, n. 32, p. 6965–6982, 2015.
- GHISLIERI, D.; TURNER, N. J. Biocatalytic approaches to the synthesis of enantiomerically pure chiral amines. **Topics in Catalysis**, v. 57, n. 5, p. 284–300, 2014.

GRUBER, C. C. et al. From a racemate to a single enantiomer: deracemization by stereoinversion. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 348, n. 14, p. 1789–1805, 2006.

GUO, F.; BERGLUND, P. Transaminase biocatalysis: optimization and application. **Green Chemistry**, v. 19, p. 333–360, 2016.

HÖHNE, M. et al. Rational assignment of key motifs for function guides in silico enzyme identification. **Nature Chemical Biology**, v.6, n. 11, p. 807–813, 2010.

HÖHNE, M.; BORNSCHEUER, U. T. Biocatalytic routes to optically active amines. **ChemCatChem**, v.1, n. 1, p. 42–51, 2009.

KALAITZAKIS, D.; et al. Photooxygenation of furylalkylamines: easy access to pyrrolizidine and indolizidine scaffolds. **Angewandte Chemie**, v. 55, p. 4605–4609, 2016.

KATRITZKY, A.R., et al. Handbook of heterocyclic chemistry. 3 edição, Amsterdam: Elsevier, 2010.

KOSZELEWSKI, D. et al.  $\omega$ -Transaminases for the synthesis of non-racemic  $\alpha$ -chiral primary amines. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 324–332, 2010.

LIANG, J. et al. Development of a biocatalytic process as an alternative to the (-) -DIP-Cl-mediated asymmetric reduction of a key intermediate of montelukast. **Organic Process Research & Development**, v. 14, p.193–198, 2010.

LIU, T.-L.; WANG, C.-J.; ZHANG, X. Synthesis of chiral aliphatic amines through asymmetric hydrogenation. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 32, p. 8416–8419, 2013.

ŁYSKOWSKI, A. et al. Crystal structure of an (*R*)-selective  $\omega$ -transaminase from *Aspergillus terreus*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e87350, 2014.

MALIK, M. S.; PARK, E. S.; SHIN, J. S. Features and technical applications of  $\omega$ -transaminases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 5, p. 1163–1171, 2012.

MATHEW, S.; YUN, H.  $\omega$ -Transaminases for the production of optically pure amines and unnatural amino acids. **ACS Catalysis**, v. 2, n. 6, p. 993–1001, 2012.

MIRIYALA, B.; BHATTACHARYYA, S.; WILLIAMSON, J. S. Chemoselective reductive alkylation of ammonia with carbonyl compounds: synthesis of primary and symmetrical secondary amines. **Tetrahedron**, v. 60, n. 7, p. 1463–1471, 2004.

MUTTI, F. G. et al. Stereoselectivity of four (*R*)-selective transaminases for the asymmetric amination of ketones. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 353, n. 17, p. 3227–3233, 2011.

NUGENT, T.C. Chiral Amine Synthesis: Methods, Developments and Applications. 1 edição, Brehan: Wiley-VCH, 2010.

PAVIA, D. L., et al. Introdução à Espectroscopia. 5 edição, São Paulo: Cengage Learning, 2015.

- PLANCHESTAINER, M. et al. Continuous flow biocatalysis: production and in-line purification of amines by immobilised transaminase from *Halomonas elongata*. **Green Chemistry**, v. 53, p. 3007–3048, 2017.
- PORTER, J. L.; RUSLI, R. A.; OLLIS, D. L. Directed evolution of enzymes for industrial biocatalysis. **ChemBioChem**, v. 2601, p. 197–203, 2016.
- REETZ, M. T. Biocatalysis in organic chemistry and biotechnology: past, present, and future. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, p.12480–12496, 2013.
- ROBERTSON, J.; NORTH, C.; SADIG, J. E. R. Asymmetric synthesis of the C(6-18) bis(tetrahydropyran)spiroacetal fragment of the litarines. **Tetrahedron**, v. 67, n. 27–28, p. 5011–5023, 2011.
- RUDAT, J.; BRUCHER, B. R.; SYLDATK, C. Transaminases for the synthesis of enantiopure beta-amino acids. **AMB Express**, v. 2, n. 1, p. 11, 2012.
- SAVILE, C. K. et al. Biocatalytic asymmetric synthesis of chiral amines from ketones applied to sitagliptin manufacture. **Science**, v. 239, p. 305-309, 2012.
- SHABBIR, S. et al. Pd nanoparticles on reverse phase silica gel as recyclable catalyst for Suzuki-Miyaura cross coupling reaction and hydrogenation in water. **Journal of Organometallic Chemistry**, v.846, p. 296-304, 2017.
- SCHMIDT, N. G.; SIMON, R. C.; KROUTIL, W. Biocatalytic asymmetric synthesis of optically pure aromatic propargylic amines employing  $\omega$ -transaminases. **Advanced Synthesis and Catalysis**, p. 1815–1821, 2015.
- SHELDON, R. A. The E factor 25 years on: the rise of green chemistry and sustainability. **Green Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 903–906, 2017.
- SHELDON, R. A.; PEREIRA, P. C. Biocatalysis engineering: the big picture. **Chemical Society Reviews**, v. 46, p. 2678-2691, 2017.
- SHIN, J.-S.; KIM, B.-G.; SHIN, D.-H. Kinetic resolution of chiral amines using packed-bed reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 4, p. 232–239, 2001.
- SHIN, J. S.; KIM, B. G. Kinetic resolution of  $\alpha$ -methylbenzylamine with  $\omega$ -transaminase screened from soil microorganisms: application of a biphasic system to overcome product inhibition. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 55, n. 2, p. 348–358, 1997.
- SIMON, R. C. et al. Recent developments of cascade reactions involving  $\omega$ -transaminases. **ACS Catalysis**, v. 4, n. 1, p. 129–143, 2014.
- SLABU, I. et al. *n*-Butylamine as an alternative amine donor for the stereoselective biocatalytic transamination of ketones. **Catalysis Today**, p. 3–8, 2017.
- THOMSEN, M. et al. Crystallographic characterization of the (*R*)-selective amine transaminase from *Aspergillus fumigatus*. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 70, n. 4, p. 1086–1093, 2014.
- TURNER, N. J.; O'REILLY, E. Biocatalytic retrosynthesis. **Nature Chemical Biology**, v. 9, n. 5, p. 285–288, 2013.

WEI, Z. Z. et al. Highly efficient and chemoselective hydrogenation of alpha,beta-unsaturated carbonyls over Pd/N-doped hierarchically porous carbon. **Catalysis Science & Technology**, v. 5, n. 1, p. 397–404, 2015.

WILLIES, S. C. et al. A stereospecific solid-phase screening assay for colonies expressing both (*R*)- and (*S*)-selective  $\omega$ -aminotransferases. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 374, n. 2061, p. 20150084, 2016.

YUN, H.; CHO, B. K.; KIM, B. G. Kinetic resolution of (*R,S*)-sec-butylamine using omega-transaminase from *Vibrio fluvialis* JS17 under reduced pressure. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 87, n. 6, p. 772–778, 2004.

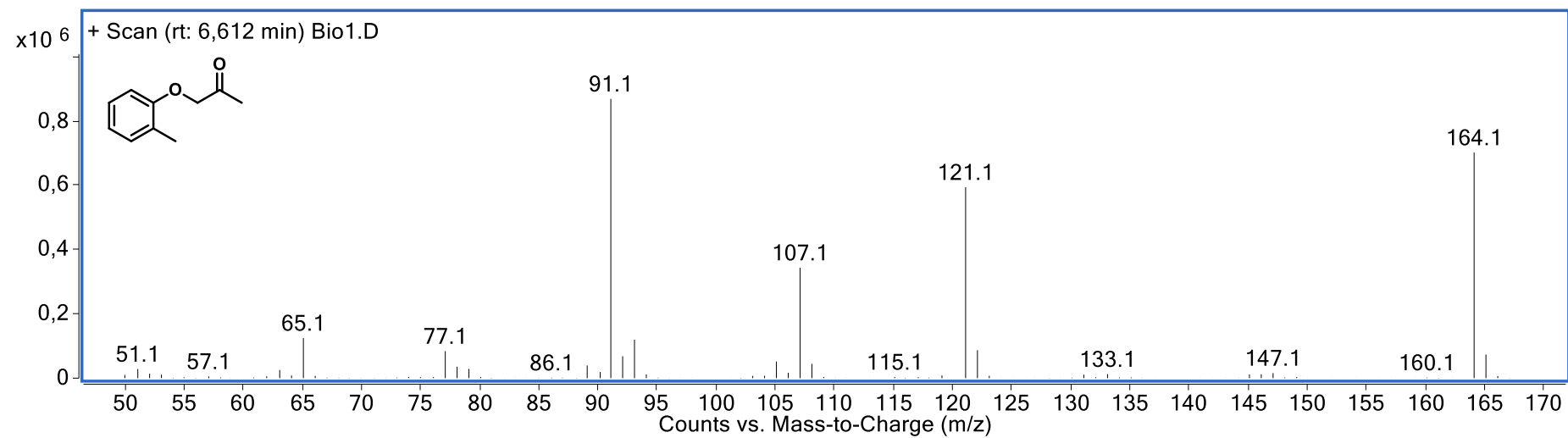


## 7. ANEXOS

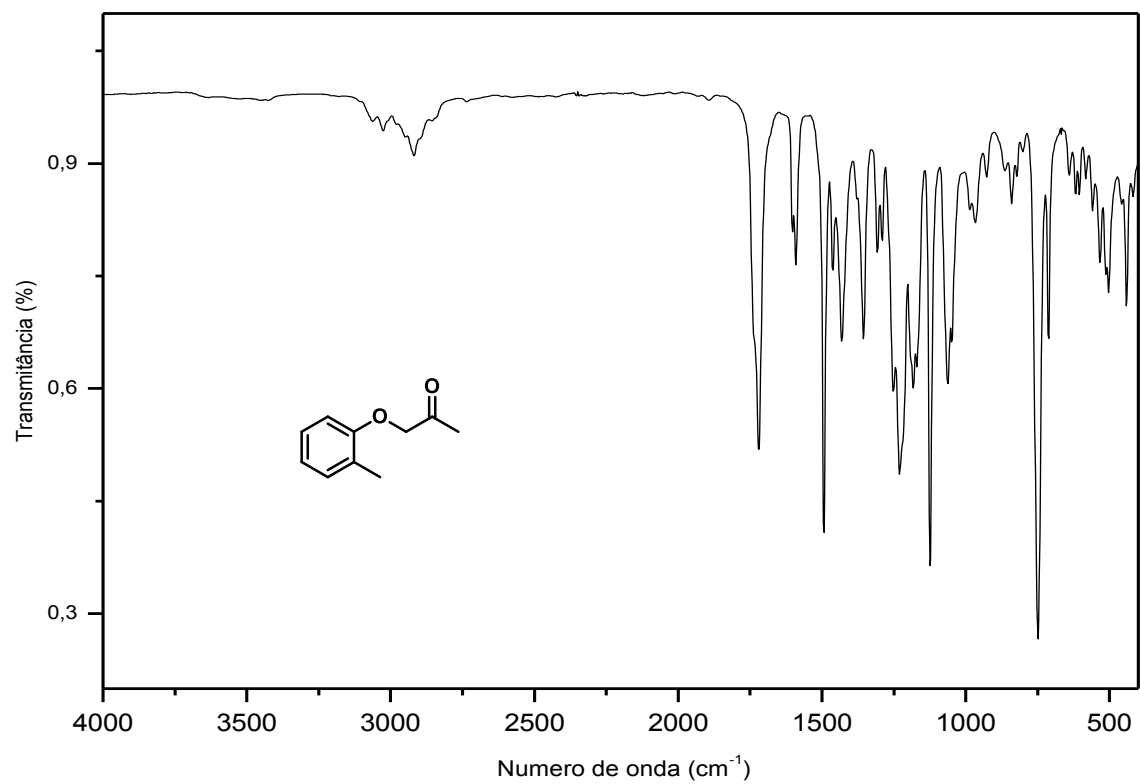
## LISTA DE ESPECTROS

E1. Espectro de massas (IE, 70 eV) da 1-(2-metilfenoxi)-2-propanona <b>1a</b>	75
E2. Espectro no IV (ATR) da 1-(2-metilfenoxi)-2-propanona <b>1a</b>	76
E3. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,19 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da 1-(2-metilfenoxi)-2-propanona <b>1a</b>	77
E4. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,48 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da 1-(2-metilfenoxi)-2-propanona <b>1a</b>	78
E5. Espectro DEPT 135 (75,48 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da 1-(2-metilfenoxi)-2-propanona <b>1a</b>	79
E6. Espectro de massas (IE, 70 eV) da 4-fenil-3-buten-2-ona <b>1b</b>	80
E7. Espectro no IV (ATR) da 4-fenil-3-buten-2-ona <b>1b</b>	81
E8. Espectro de RMN (300,19 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de $^1\text{H}$ da 4-fenil-3-buten-2-ona <b>1b</b>	82
E9. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,48 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da 4-fenil-3-buten-2-ona <b>1b</b>	83
E10. Espectro de RMN DEPT 135 (75,48 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da 4-fenil-3-buten-2-ona <b>1b</b>	84
E11. Espectro de massas (IE, 70 eV) da 4-fenil-3-buten-2-amina <b>2b</b>	85
E12. Espectro no IV (ATR) da 4-fenil-3-buten-3-amina <b>2b</b>	86
E13. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,19 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da 4-fenil-3-buten-2-amina <b>2b</b>	87
E14. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,48 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da 4-fenil-3-buten-2-amina <b>2b</b>	88
E15. Espectro de RMN DEPT 135 (75,48 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da 4-fenil-3-buten-2-amina <b>2b</b>	89
E16. Espectro de massas (IE, 70 eV) da 4-fenil-2-butanona <b>1c</b>	90
E 17. Espectro no IV (ATR) da 4-fenil-2-butanona <b>1c</b>	91
E18. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,19 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da 4-fenil-2-butanona <b>1c</b>	92
E19. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,48 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da 4-fenil-2-butanona <b>1c</b>	93
E20. Espectro de RMN DEPT 135 (75,48 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da 4-fenil-2-butanona <b>1c</b>	94
E21. Espectro de massas (IE, 70 eV) da 4-fenil-2-butanamina <b>2c</b>	95
E22. Espectro no IV (ATR) da 4-fenil-2-butanamina <b>2c</b>	96
E23. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,19 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da 4-fenil-2-butanamina <b>2c</b>	97
E24. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,48 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da 4-fenil-2-butanamina <b>2c</b>	98
E25. Espectro de RMN DEPT 135 (75,48 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da 4-fenil-2-butanamina <b>2c</b>	99
E26. Espectro de massas (IE, 70 eV) da 4-(2-furanil)-3-buten-2-ona <b>1d</b>	100
E27. Espectro no IV (ATR) da 4-(2-furanil)-3-buten-2-ona <b>1d</b>	101

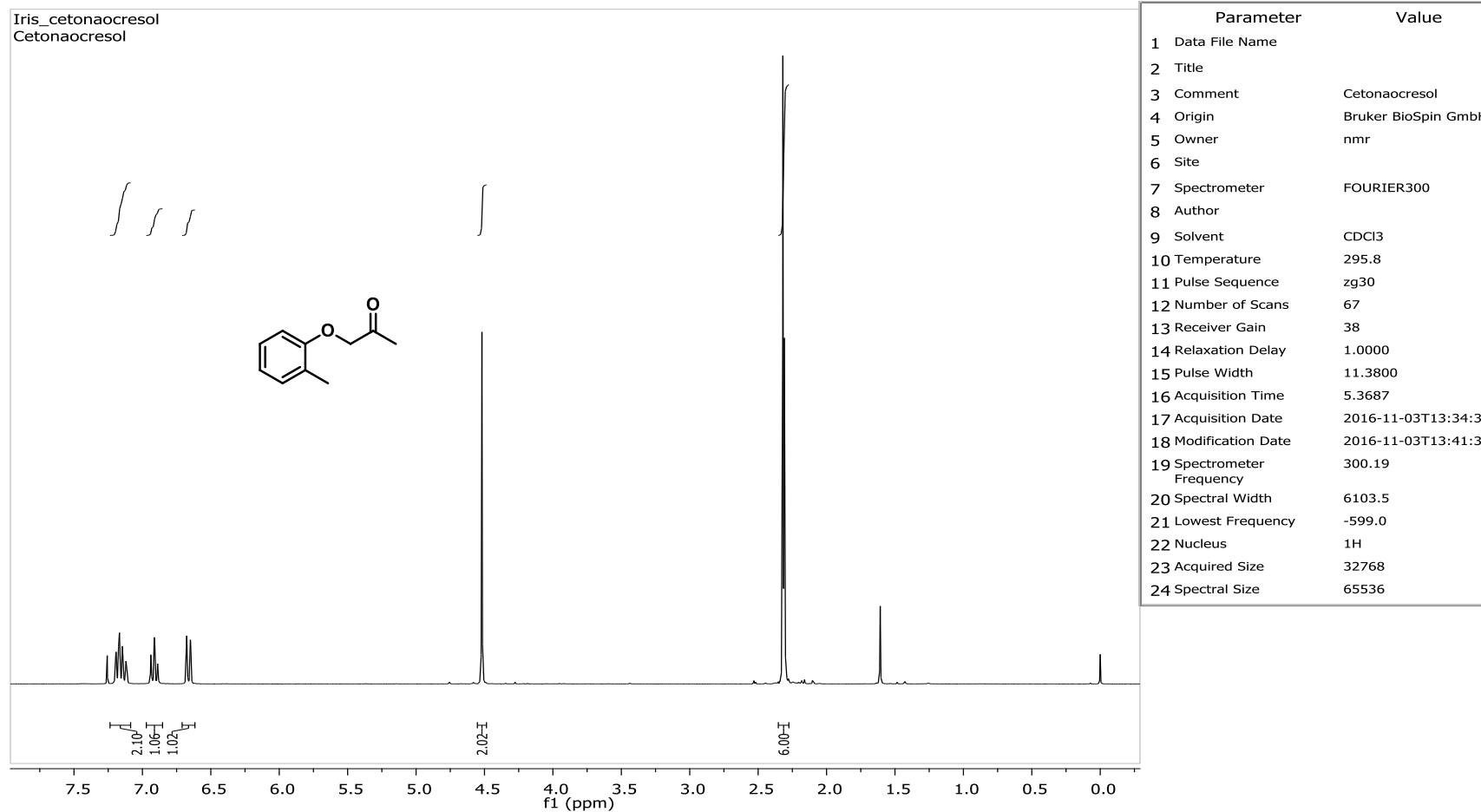
E28. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,19 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da 4-(2-furanil)-3-buten-2-ona <b>1d</b>	102
E29. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,48 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da 4-(2-furanil)-3-buten-2-ona <b>1d</b>	103
E30. Espectro de DEPT 135 (75,48 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da 4-(2-furanil)-3-buten-2-ona <b>1d</b>	104
E31. Espectro de massas (IE, 70 eV) da 4-(2-furanil)-3-buten-2-amina <b>2d</b>	105
E32. Espectro no infravermelho (ATR) da 4-(2-furanil)-3-buten-2-amina <b>2d</b>	106
E33. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,19 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da 4-(2-furanil)-3-buten-2-amina <b>2d</b>	107
E34. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,48 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da 4-(2-furanil)-3-buten-2-amina <b>2d</b>	108
E35. Espectro de RMN DEPT 135 (75,48 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da 4-(2-furanil)-3-buten-2-amina <b>2d</b>	109
E36. Espectro de massas (IE, 70 eV) da 4-(2-furanil)-2-butanona <b>1e</b>	110
E37. Espectro no IV (ATR) da 4-(2-furanil)-2-butanona <b>1e</b>	111
E38. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,19 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da 4-(2-furanil)-2-butanona <b>1e</b>	112
E39. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,48 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da 4-(2-furanil)-2-butanona <b>1e</b>	113
E40. Espectro de RMN DEPT 135 (75,48 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da 4-(2-furanil)-2-butanona <b>1e</b>	114
E41. Espectro de massas (IE, 70 eV) da 4-(2-furanil)-2-butanamina <b>2e</b>	115
E42. Espectro no IV (ATR) da 4-(2-furanil)-2-butanamina <b>2e</b>	116
E43. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,19 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da 4-(2-furanil)-2-butanamina <b>2e</b>	117
E44. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,48 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da 4-(2-furanil)-2-butanamina <b>2e</b>	119
E45. Espectro de RMN DEPT 135 (75,48 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da 4-(2-furanil)-2-butanamina <b>2e</b>	120



E1. Espectro de massas (IE, 70 eV) da 1-(2-metilfenoxi)-2-propanona **1a**

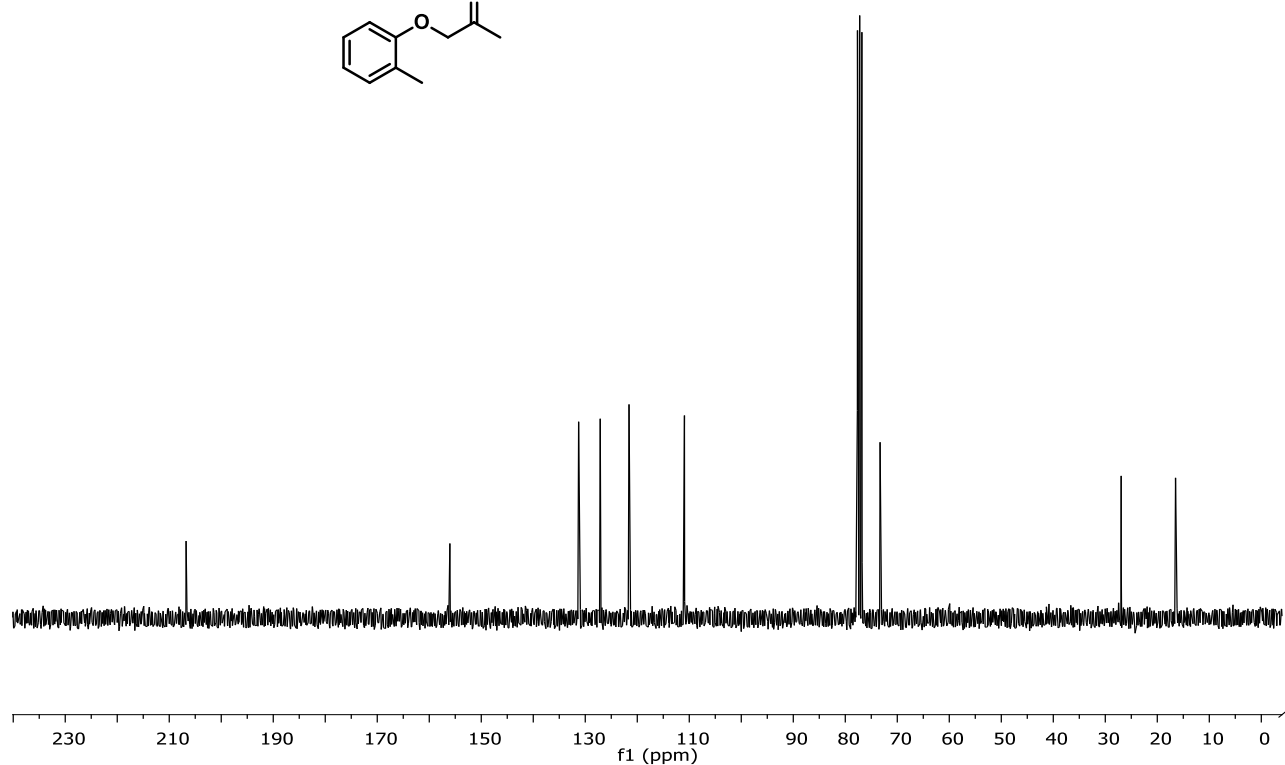
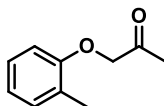


E2. Espectro no IV (ATR) da 1-(2-metilfenoxi)-2-propanona **1a**



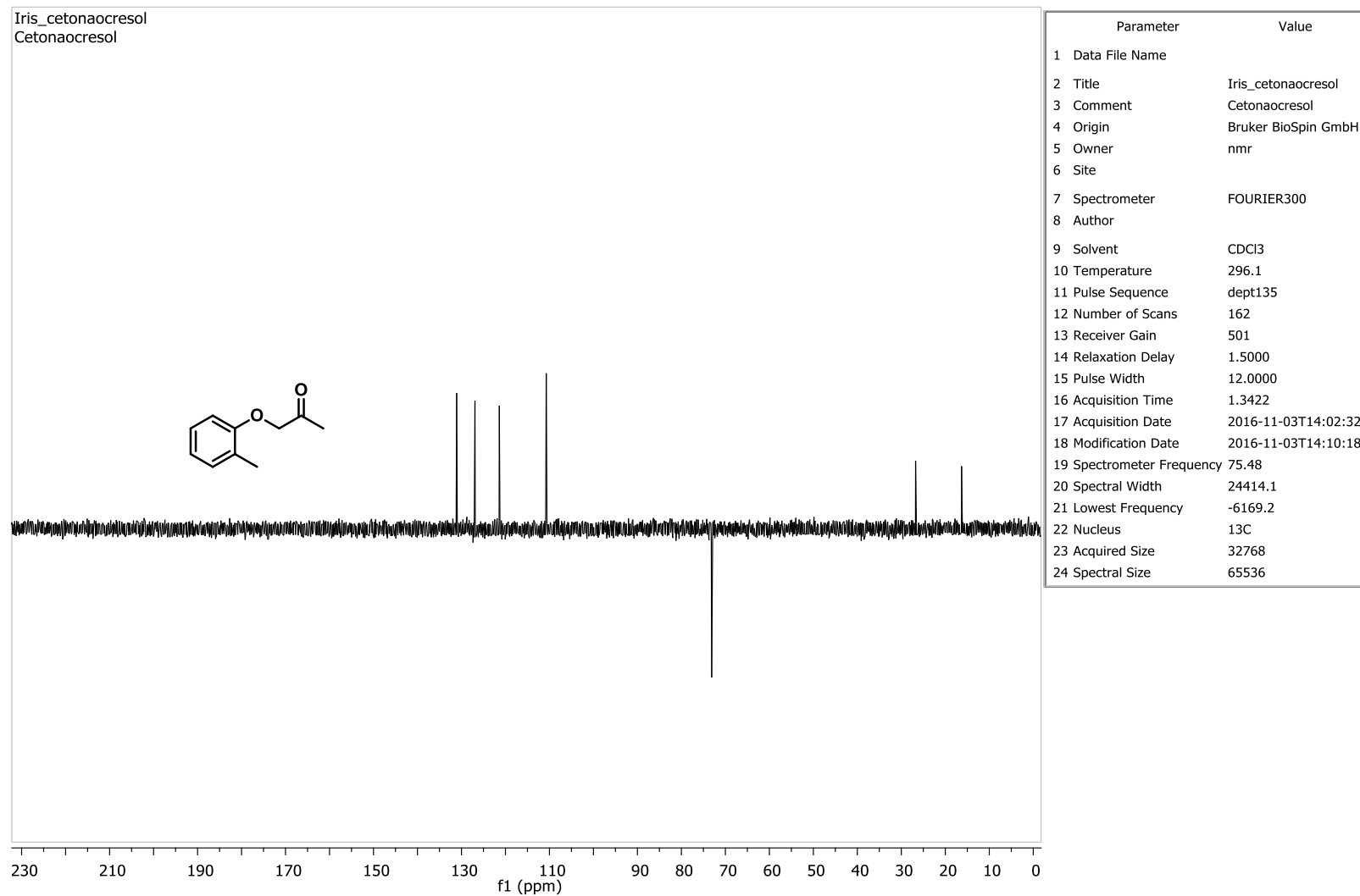
E3. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300,19 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 1-(2-metilfenoxi)-2-propanona **1a**

Iris\_cetonaocresol  
Cetonaocresol

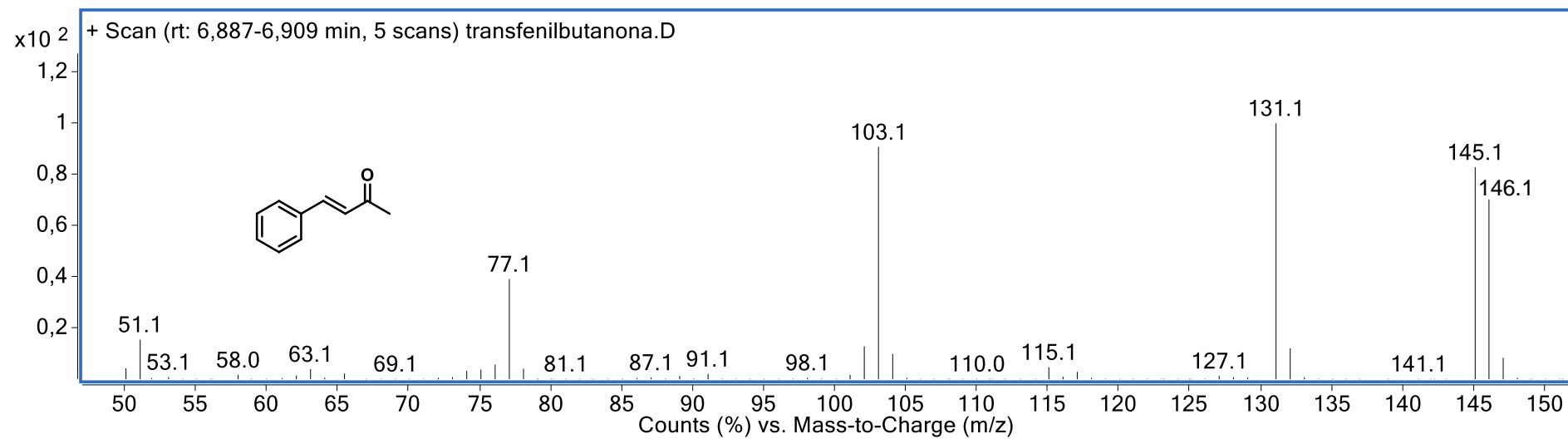


E4. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,48 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 1-(2-metilfenoxi)-2-propanona **1a**

Parameter	
1 Data File Name	
2 Title	Iris_cetonaocresol
3 Comment	Cetonaocresol
4 Origin	Bruker BioSpin GmbH
5 Owner	nmr
6 Site	
7 Spectrometer	FOURIER300
8 Author	
9 Solvent	$\text{CDCl}_3$
10 Temperature	295.9
11 Pulse Sequence	zgpg30
12 Number of Scans	309
13 Receiver Gain	501
14 Relaxation Delay	2.0000
15 Pulse Width	12.0000
16 Acquisition Time	1.3422
17 Acquisition Date	2016-11-03T13:43:31
18 Modification Date	2016-11-03T14:00:53
19 Spectrometer Frequency	75.48
20 Spectral Width	24414.1
21 Lowest Frequency	-4659.6
22 Nucleus	$^{13}\text{C}$
23 Acquired Size	32768
24 Spectral Size	65536

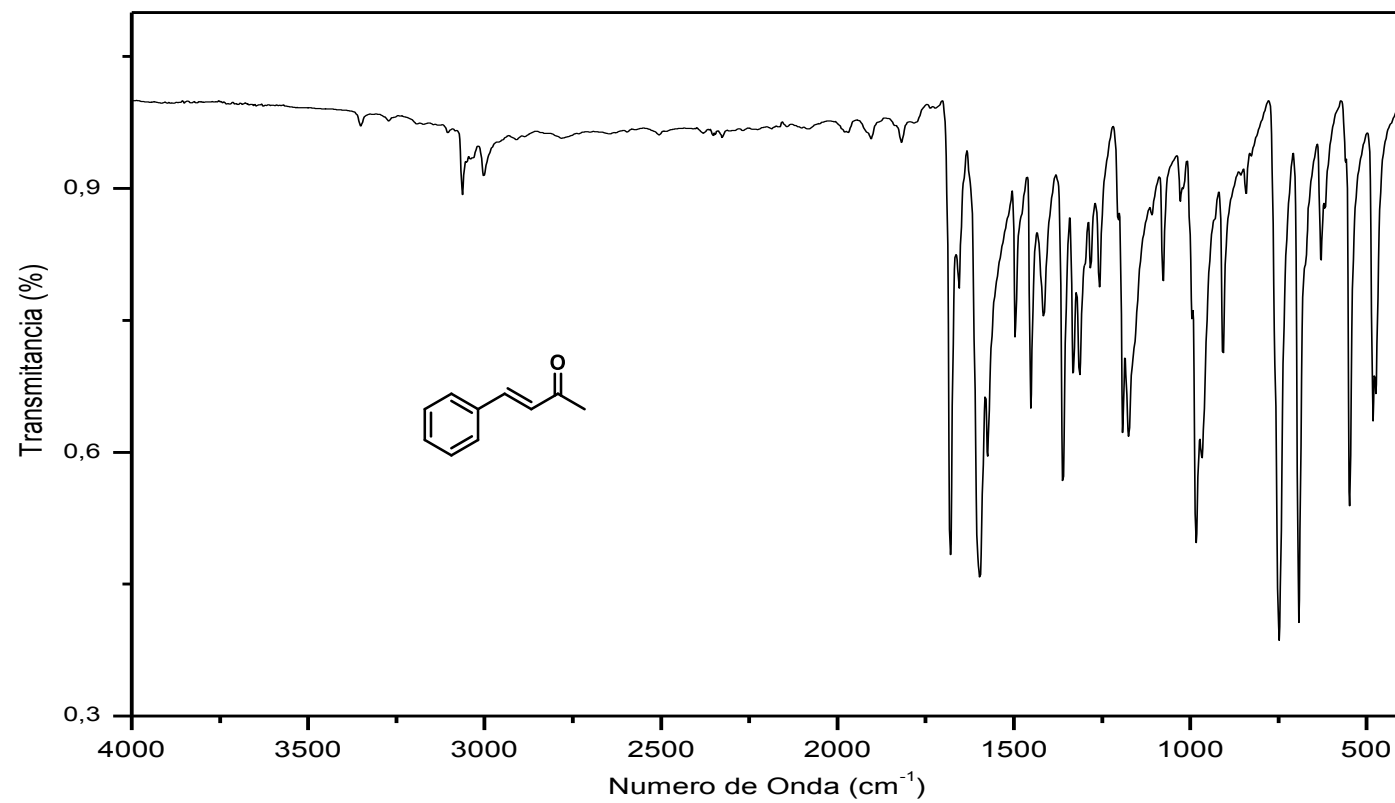


E5. Espectro DEPT 135 (75,48 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da 1-(2-metilfenoxi)-2-propanona **1a**



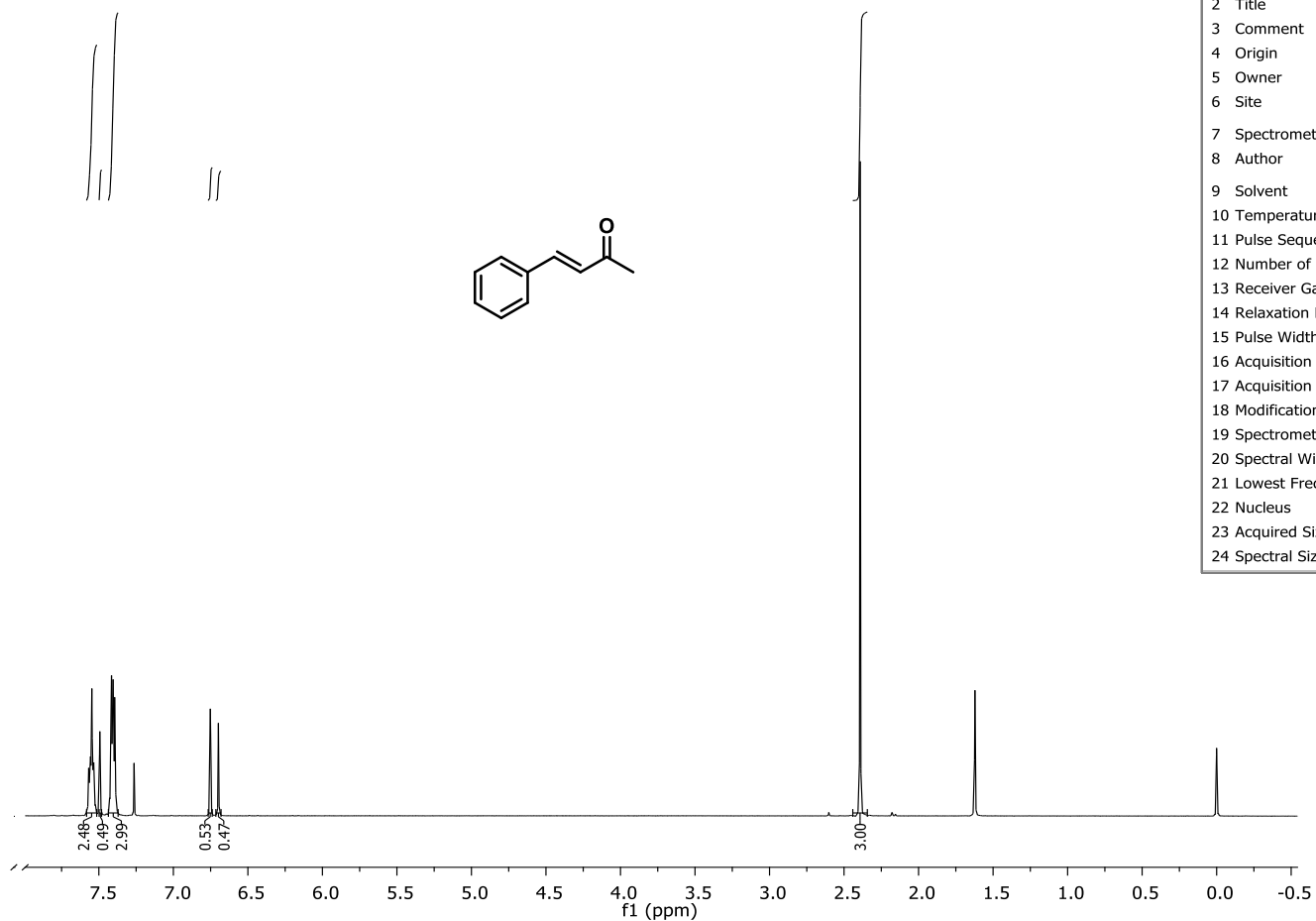
E6. Espectro de massas (IE, 70 eV) da 4-fenil-3-buten-2-ona **1b**





E7. Espectro no IV (ATR) da 4-fenil-3-buten-2-ona **1b**

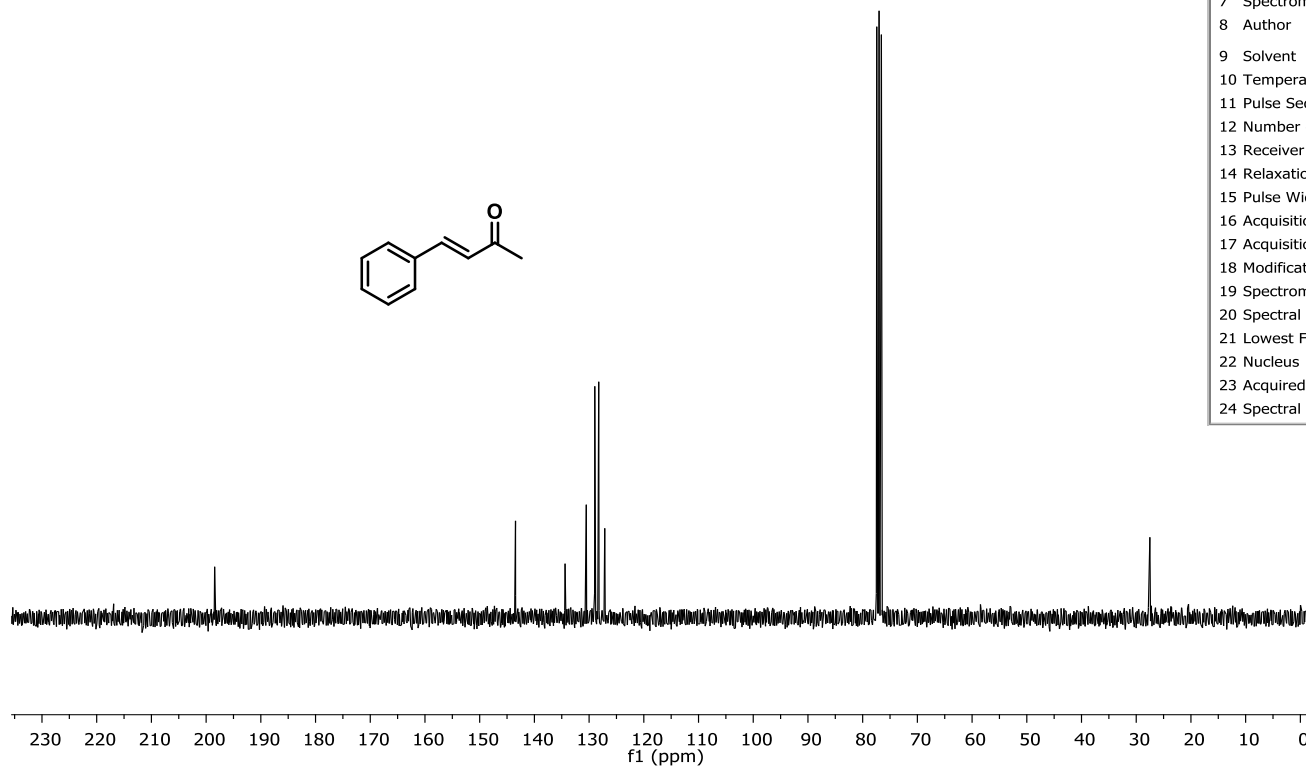
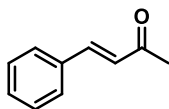
Iris\_TFB  
TFB



Parameter	Value
1 Data File Name	
2 Title	Iris_TFB
3 Comment	TFB
4 Origin	Bruker BioSpin GmbH
5 Owner	nmr
6 Site	
7 Spectrometer	FOURIER300
8 Author	
9 Solvent	CDCl3
10 Temperature	296.2
11 Pulse Sequence	zg30
12 Number of Scans	29
13 Receiver Gain	70
14 Relaxation Delay	1.0000
15 Pulse Width	11.3800
16 Acquisition Time	5.3687
17 Acquisition Date	2016-10-20T13:53:25
18 Modification Date	2016-10-20T13:56:26
19 Spectrometer Frequency	300.19
20 Spectral Width	6103.5
21 Lowest Frequency	-599.0
22 Nucleus	1H
23 Acquired Size	32768
24 Spectral Size	65536

E8. Espectro de RMN (300,19 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de <sup>1</sup>H da 4-fenil-3-buten-2-ona **1b**

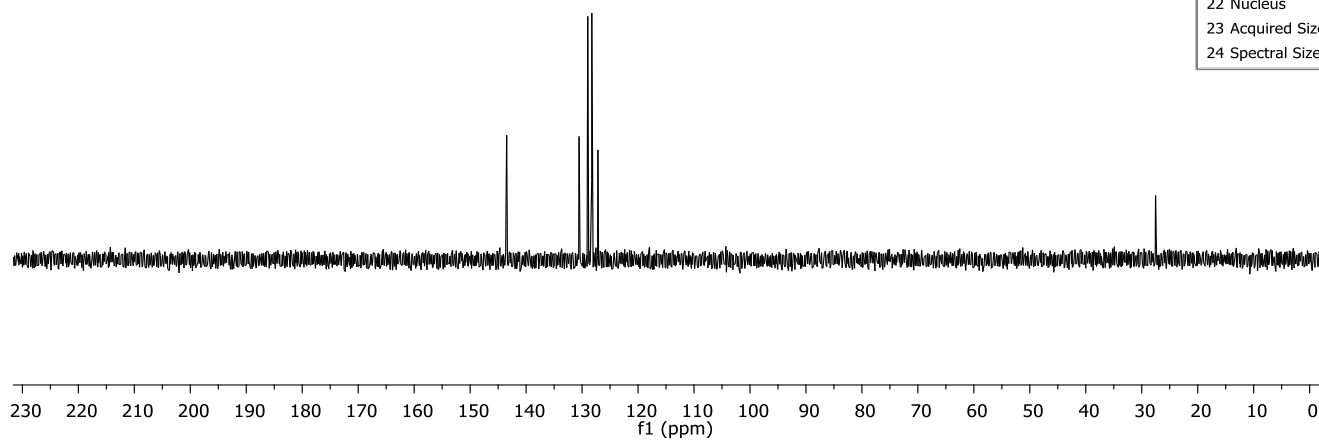
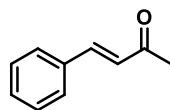
Iris\_TFB  
TFB



Parameter	Value
1 Data File Name	
2 Title	Iris_TFB
3 Comment	TFB
4 Origin	Bruker BioSpin GmbH
5 Owner	nmr
6 Site	
7 Spectrometer	FOURIER300
8 Author	
9 Solvent	CDCl3
10 Temperature	296.3
11 Pulse Sequence	zgpg30
12 Number of Scans	410
13 Receiver Gain	501
14 Relaxation Delay	2.0000
15 Pulse Width	12.0000
16 Acquisition Time	1.3422
17 Acquisition Date	2016-10-20T13:58:47
18 Modification Date	2016-10-20T14:21:50
19 Spectrometer Frequency	75.48
20 Spectral Width	24414.1
21 Lowest Frequency	-4659.6
22 Nucleus	13C
23 Acquired Size	32768
24 Spectral Size	65536

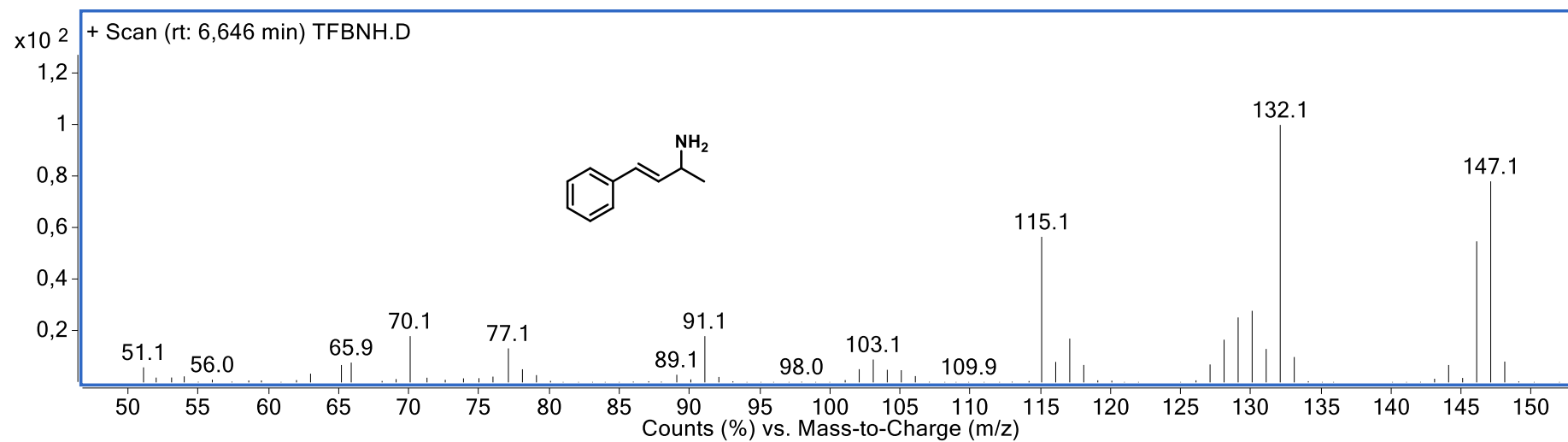
E9. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,48 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 4-fenil-3-buten-2-ona **1b**

Iris\_TFB  
TFB dept

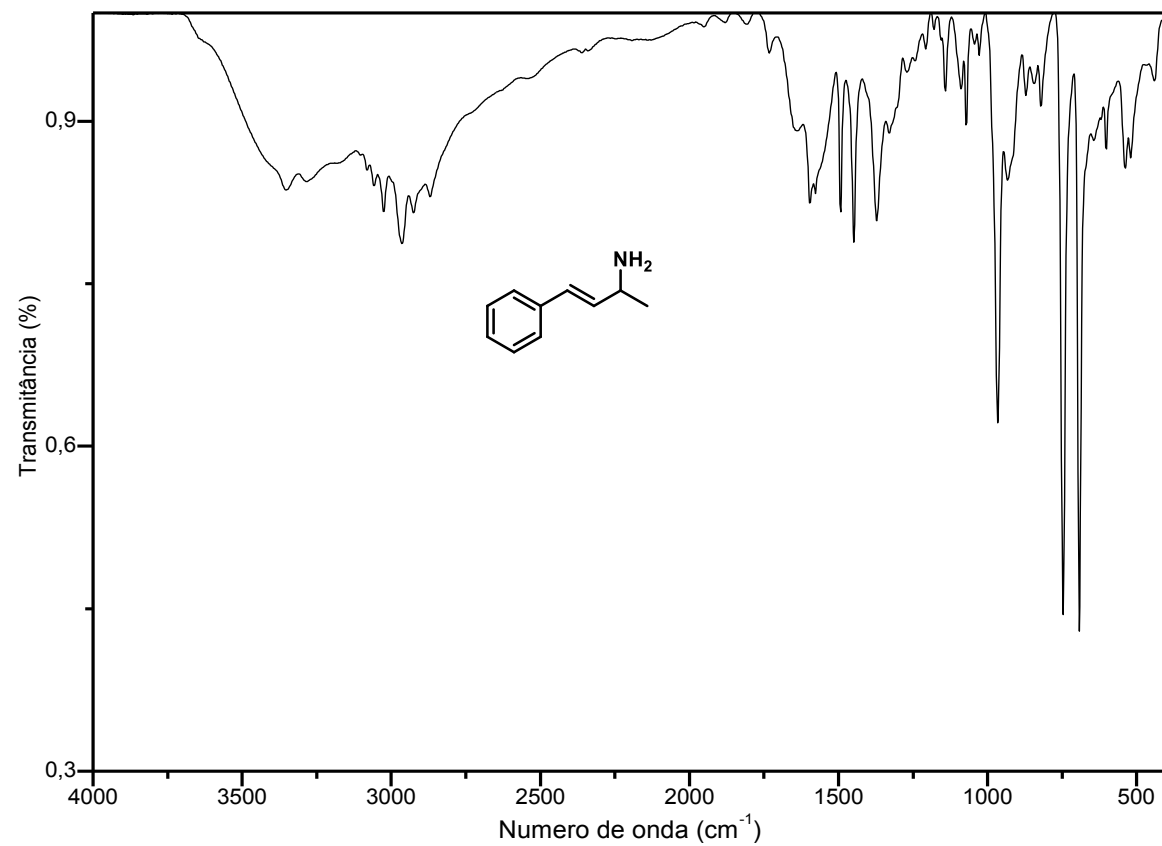


Parameter	Value
1 Data File Name	
2 Title	Iris_TFB
3 Comment	TFB dept
4 Origin	Bruker BioSpin GmbH
5 Owner	nmr
6 Site	
7 Spectrometer	FOURIER300
8 Author	
9 Solvent	CDCl3
10 Temperature	296.4
11 Pulse Sequence	dept135
12 Number of Scans	309
13 Receiver Gain	501
14 Relaxation Delay	1.5000
15 Pulse Width	12.0000
16 Acquisition Time	1.3422
17 Acquisition Date	2016-10-20T14:23:45
18 Modification Date	2016-10-20T14:38:39
19 Spectrometer Frequency	75.48
20 Spectral Width	24414.1
21 Lowest Frequency	-6169.2
22 Nucleus	13C
23 Acquired Size	32768
24 Spectral Size	65536

E10. Espectro de RMN DEPT 135 (75,48 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da 4-fenil-3-buten-2-ona **1b**

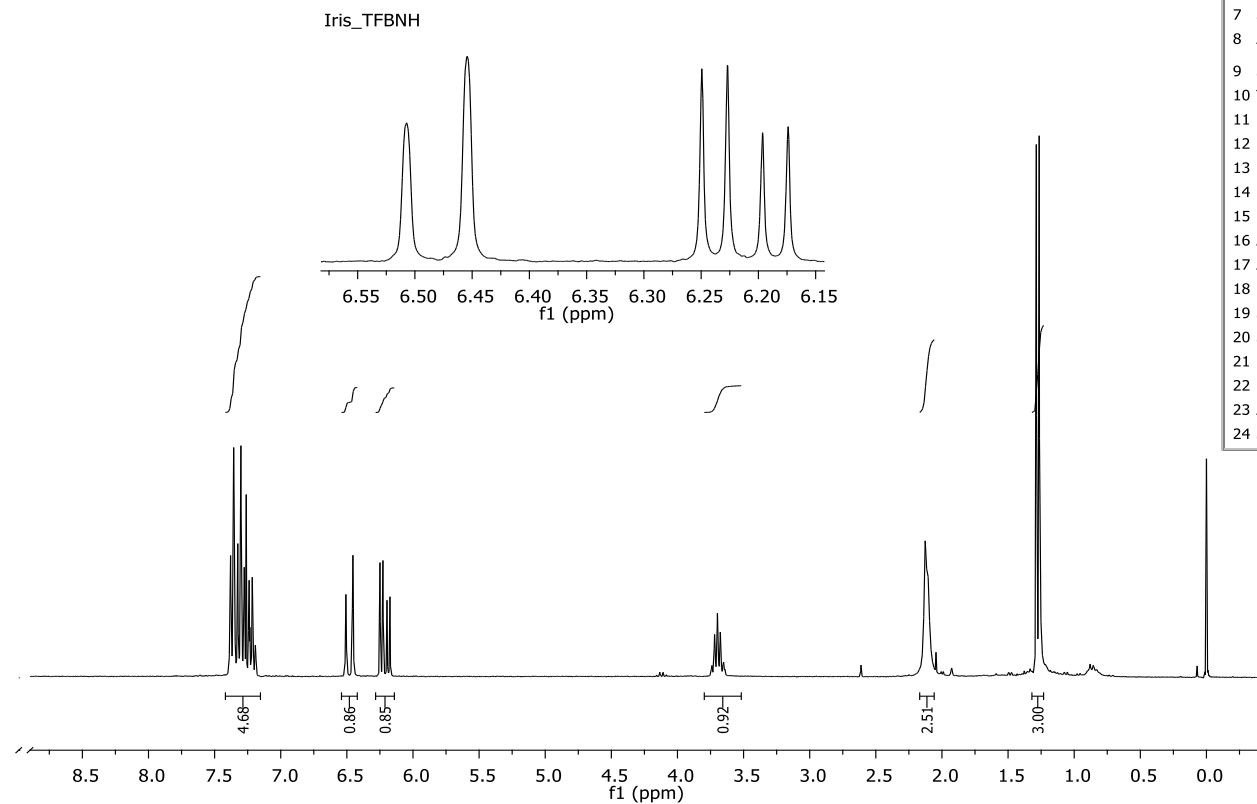
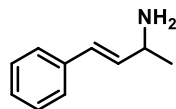


E11. Espectro de massas (IE, 70 eV) da 4-fenil-3-buten-2-amina **2b**



E12. Espectro no IV (ATR) da 4-fenil-3-buten-3-amina **2b**

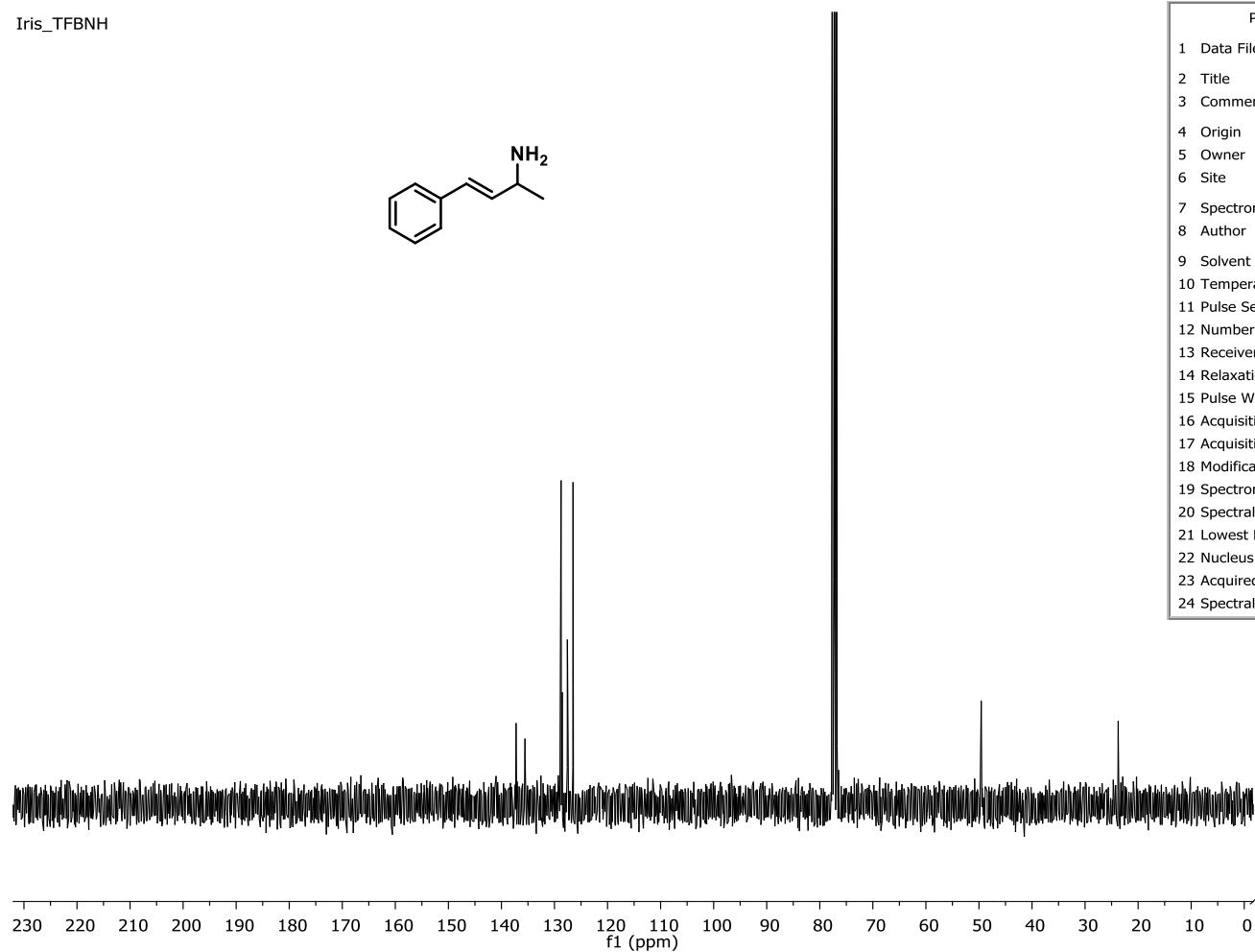
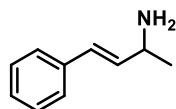
Iris\_TFBNH



Parameter	Value
1 Data File Name	Iris_TFBNH
2 Title	Iris_TFBNH
3 Comment	
4 Origin	Bruker BioSpin GmbH
5 Owner	nmr
6 Site	
7 Spectrometer	FOURIER300
8 Author	
9 Solvent	CDCl3
10 Temperature	296.7
11 Pulse Sequence	zg30
12 Number of Scans	18
13 Receiver Gain	69
14 Relaxation Delay	1.0000
15 Pulse Width	11.3800
16 Acquisition Time	5.3687
17 Acquisition Date	2017-04-13T08:28:30
18 Modification Date	2017-04-13T08:30:18
19 Spectrometer Frequency	300.19
20 Spectral Width	6103.5
21 Lowest Frequency	-603.2
22 Nucleus	1H
23 Acquired Size	32768
24 Spectral Size	65536

E13. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300,19 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 4-fenil-3-buten-2-amina **2b**

Iris\_TFBNH

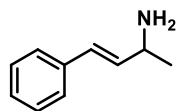


Parameter	Value
1 Data File Name	
2 Title	Iris_TFBNH
3 Comment	
4 Origin	Bruker BioSpin GmbH
5 Owner	nmr
6 Site	
7 Spectrometer	FOURIER300
8 Author	
9 Solvent	CDCl3
10 Temperature	296.8
11 Pulse Sequence	zgpg30
12 Number of Scans	271
13 Receiver Gain	501
14 Relaxation Delay	2.0000
15 Pulse Width	12.0000
16 Acquisition Time	1.3422
17 Acquisition Date	2017-04-13T08:32:20
18 Modification Date	2017-04-13T08:47:34
19 Spectrometer Frequency	75.48
20 Spectral Width	24414.1
21 Lowest Frequency	-4659.6
22 Nucleus	13C
23 Acquired Size	32768
24 Spectral Size	65536

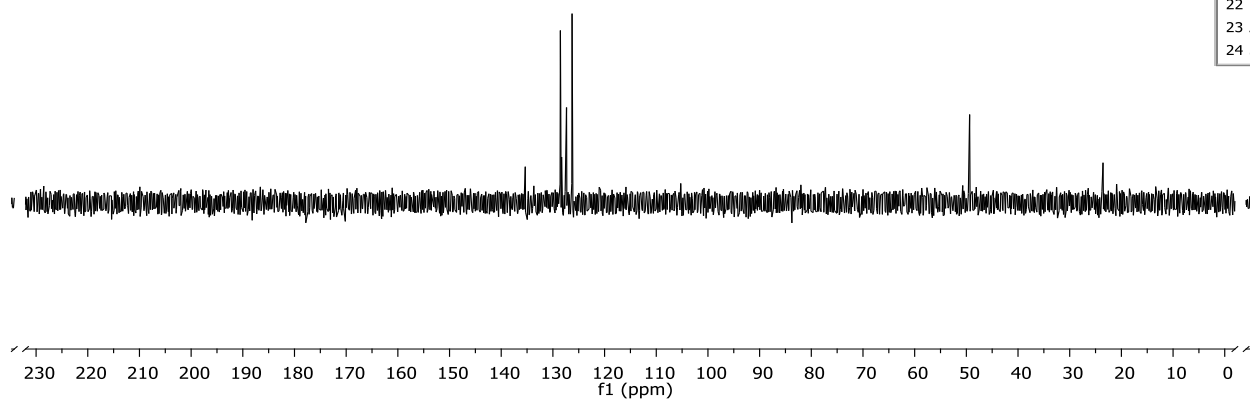
E14. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,48 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 4-fenil-3-buten-2-amina **2b**

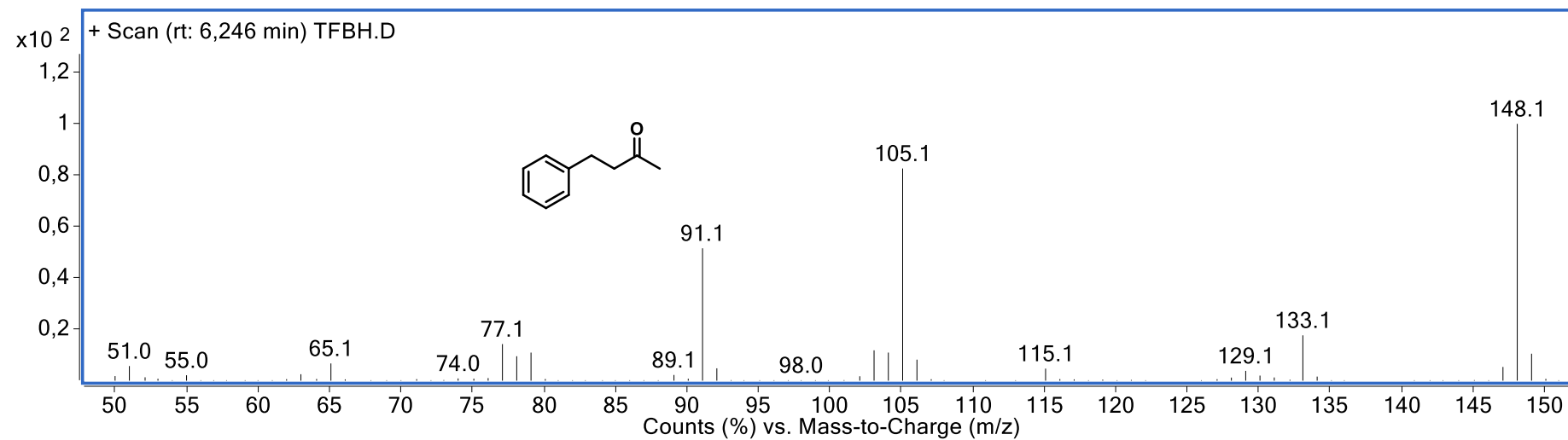


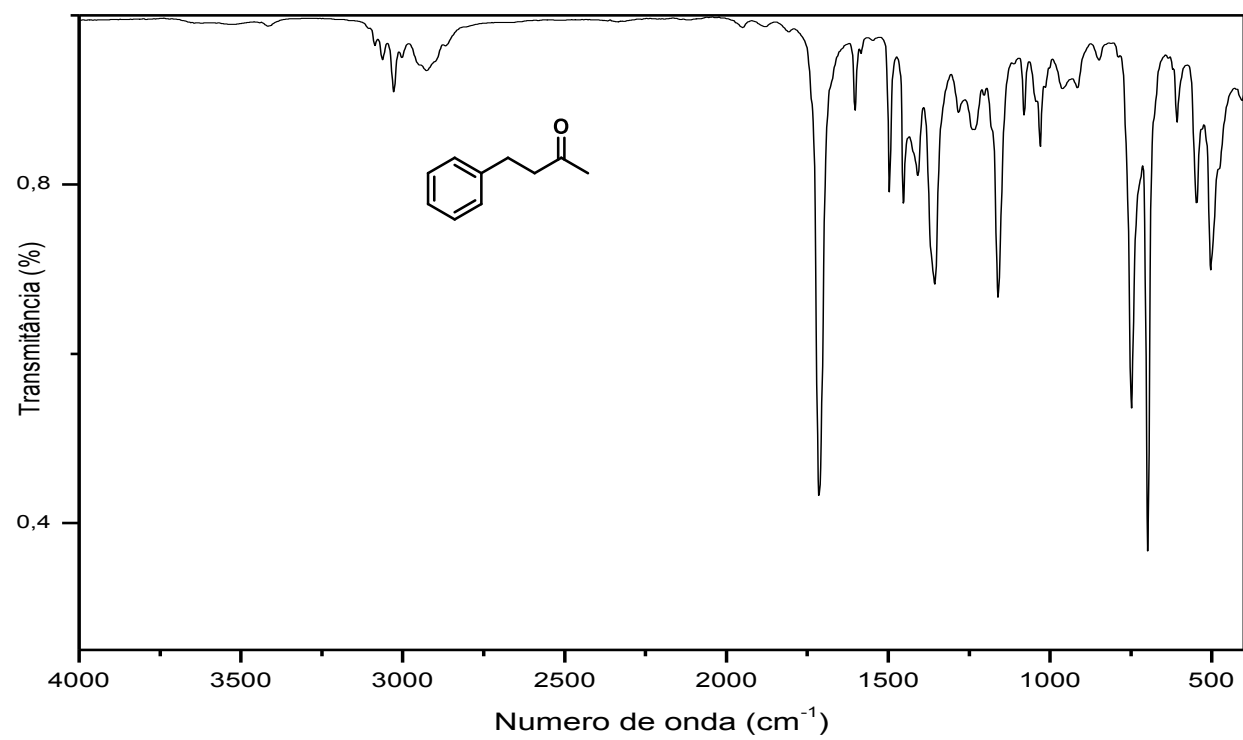
Iris\_TFBNH



Parameter	Value
1 Data File Name	
2 Title	Iris_TFBNH
3 Comment	
4 Origin	Bruker BioSpin GmbH
5 Owner	nmr
6 Site	
7 Spectrometer	FOURIER300
8 Author	
9 Solvent	CDCl3
10 Temperature	297.0
11 Pulse Sequence	dept135
12 Number of Scans	165
13 Receiver Gain	501
14 Relaxation Delay	1.5000
15 Pulse Width	12.0000
16 Acquisition Time	1.3422
17 Acquisition Date	2017-04-13T08:48:47
18 Modification Date	2017-04-13T08:56:42
19 Spectrometer Frequency	75.48
20 Spectral Width	24414.1
21 Lowest Frequency	-6169.2
22 Nucleus	13C
23 Acquired Size	32768
24 Spectral Size	65536

E15. Espectro de RMN DEPT 135 (75,48 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da 4-fenil-3-buten-2-amina **2b**

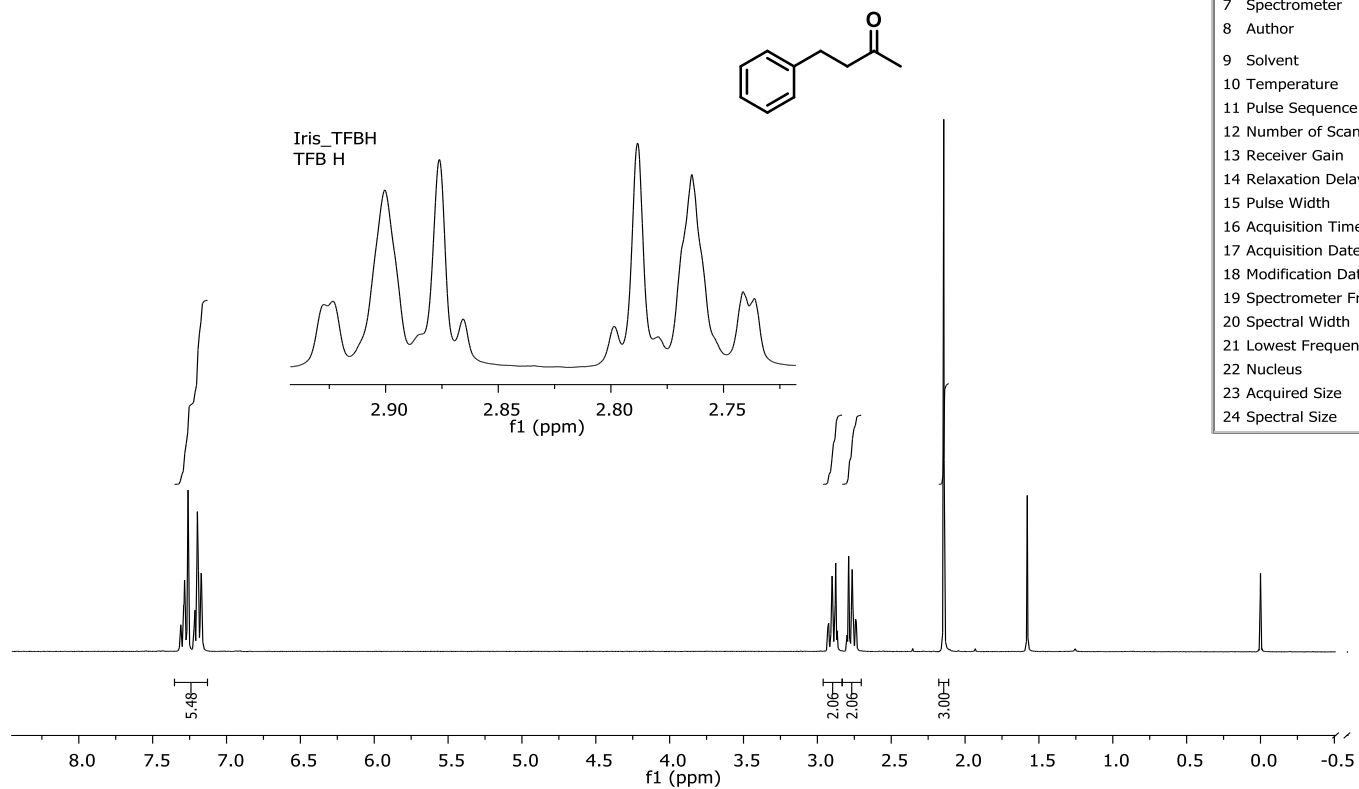
E16. Espectro de massas (IE, 70 eV) da 4-fenil-2-butanona **1c**



E 17. Espectro no IV (ATR) da 4-fenil-2-butanona **1c**

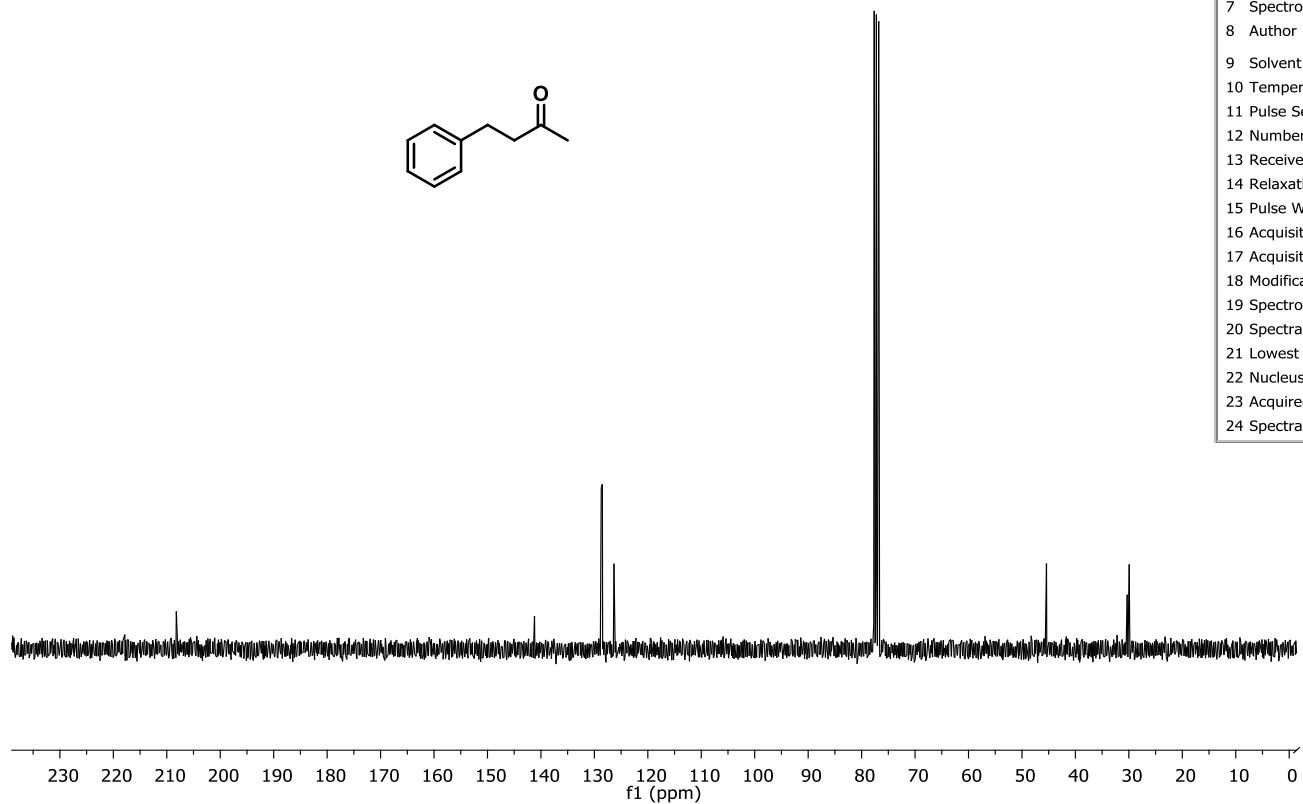
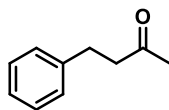
Iris\_TFBH  
TFB H

Parameter	Value
1 Data File Name	
2 Title	Iris_TFBH
3 Comment	TFB H
4 Origin	Bruker BioSpin GmbH
5 Owner	nmr
6 Site	
7 Spectrometer	FOURIER300
8 Author	
9 Solvent	CDCl3
10 Temperature	295.4
11 Pulse Sequence	zg30
12 Number of Scans	24
13 Receiver Gain	92
14 Relaxation Delay	1.0000
15 Pulse Width	11.3800
16 Acquisition Time	5.3687
17 Acquisition Date	2017-02-21T15:07:22
18 Modification Date	2017-02-21T15:09:50
19 Spectrometer Frequency	300.19
20 Spectral Width	6103.5
21 Lowest Frequency	-599.0
22 Nucleus	1H
23 Acquired Size	32768
24 Spectral Size	65536



E18. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300,19 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 4-fenil-2-butanona **1c**

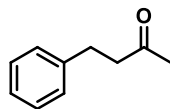
Iris\_TFBH  
TFB H



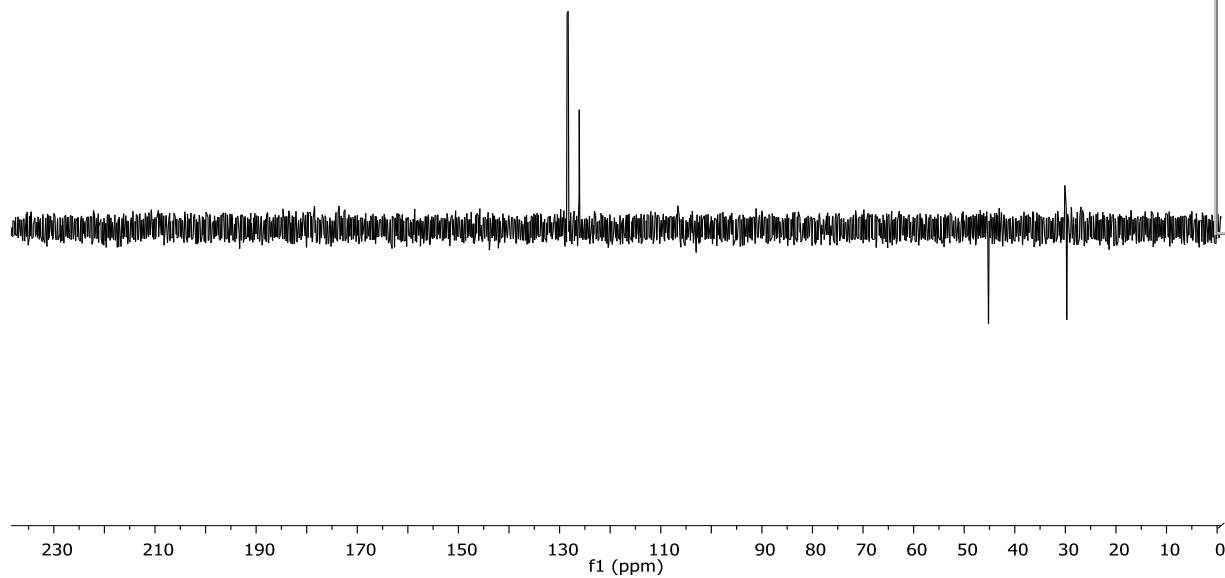
Parameter	Value
1 Data File Name	
2 Title	Iris_TFBH
3 Comment	TFB H
4 Origin	Bruker BioSpin GmbH
5 Owner	nmr
6 Site	
7 Spectrometer	FOURIER300
8 Author	
9 Solvent	CDCl3
10 Temperature	295.6
11 Pulse Sequence	zgpg30
12 Number of Scans	383
13 Receiver Gain	501
14 Relaxation Delay	2.0000
15 Pulse Width	12.0000
16 Acquisition Time	1.3422
17 Acquisition Date	2017-02-21T15:14:50
18 Modification Date	2017-02-21T15:36:23
19 Spectrometer Frequency	75.48
20 Spectral Width	24414.1
21 Lowest Frequency	-4659.6
22 Nucleus	13C
23 Acquired Size	32768
24 Spectral Size	65536

E19. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,48 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 4-fenil-2-butanona **1c**

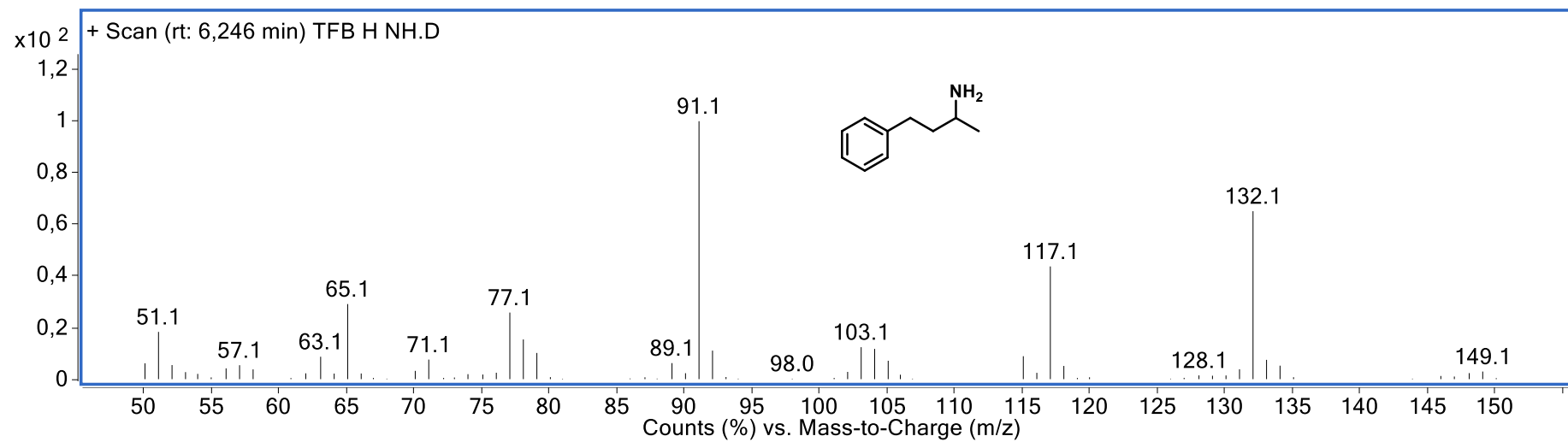
Iris\_TFBH  
TFB H



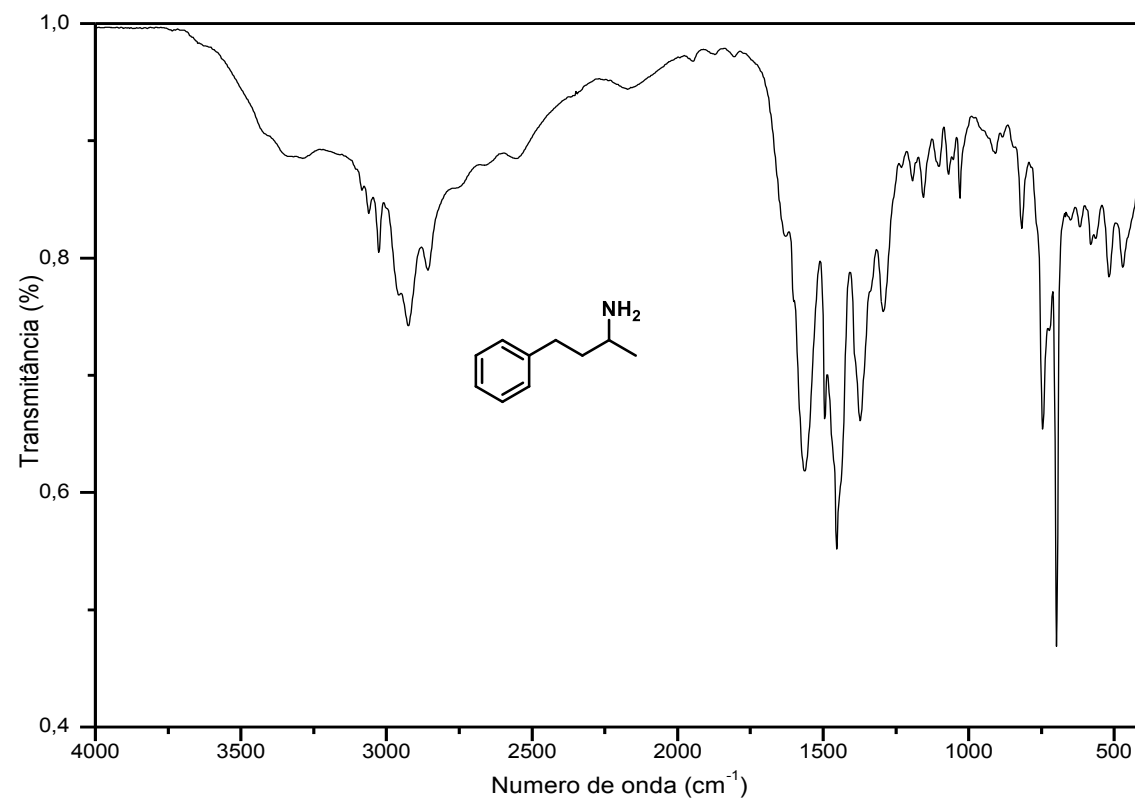
Parameter	Value
1 Data File Name	
2 Title	Iris_TFBH
3 Comment	TFB H
4 Origin	Bruker BioSpin GmbH
5 Owner	nmr
6 Site	
7 Spectrometer	FOURIER300
8 Author	
9 Solvent	CDCl3
10 Temperature	295.9
11 Pulse Sequence	dept135
12 Number of Scans	252
13 Receiver Gain	501
14 Relaxation Delay	1.5000
15 Pulse Width	12.0000
16 Acquisition Time	1.3422
17 Acquisition Date	2017-02-21T15:37:39
18 Modification Date	2017-02-21T15:49:45
19 Spectrometer Frequency	75.48
20 Spectral Width	24414.1
21 Lowest Frequency	-6169.2
22 Nucleus	13C
23 Acquired Size	32768
24 Spectral Size	65536



E20. Espectro de RMN DEPT 135 (75,48 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da 4-fenil-2-butanona **1c**



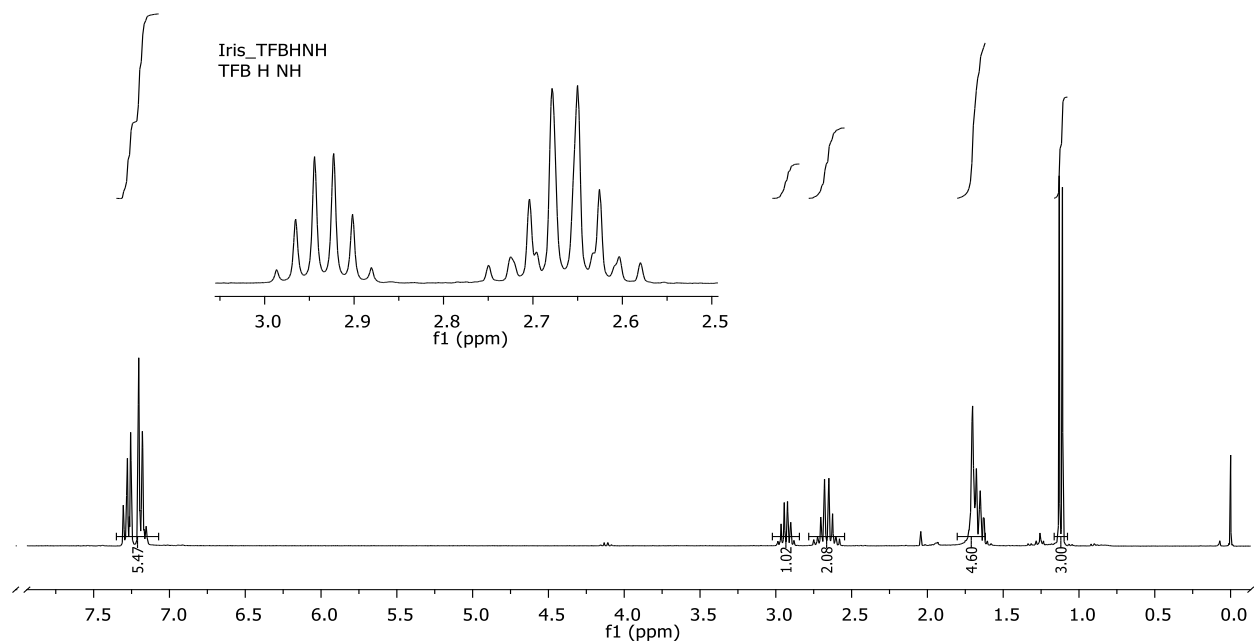
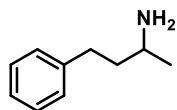
E21. Espectro de massas (IE, 70 eV) da 4-fenil-2-butanamina **2c**



E22. Espectro no IV (ATR) da 4-fenil-2-butanamina **2c**



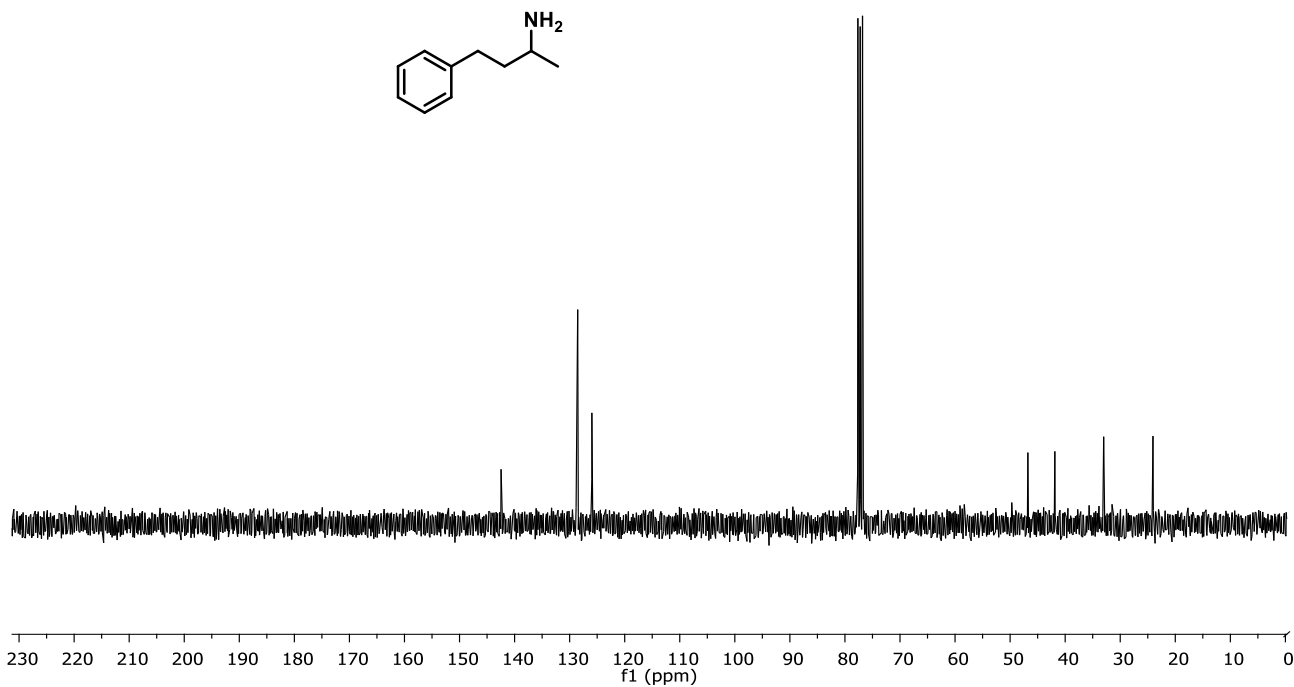
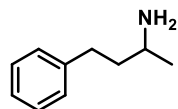
Iris\_TFBHNH  
TFB H NH



E23. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300,19 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 4-fenil-2-butanamina **2c**

Parameter	Value
1 Data File Name	C:/ Users/ Iris/ Google Drive/ Mestrado/ dados espectrometricos / RMN/ Iris_TFBHNH/ 10/ fid
2 Title	Iris_TFBHNH
3 Comment	TFB H NH
4 Origin	Bruker BioSpin GmbH
5 Owner	nmr
6 Site	
7 Spectrometer	FOURIER300
8 Author	
9 Solvent	$\text{CDCl}_3$
10 Temperature	297.0
11 Pulse Sequence	zg30
12 Number of Scans	21
13 Receiver Gain	38
14 Relaxation Delay	1.0000
15 Pulse Width	11.3800
16 Acquisition Time	5.3687
17 Acquisition Date	2017-04-05T14:36:56
18 Modification Date	2017-04-05T14:39:04
19 Spectrometer Frequency	300.19
20 Spectral Width	6103.5
21 Lowest Frequency	-593.3
22 Nucleus	$^1\text{H}$
23 Acquired Size	32768
24 Spectral Size	65536

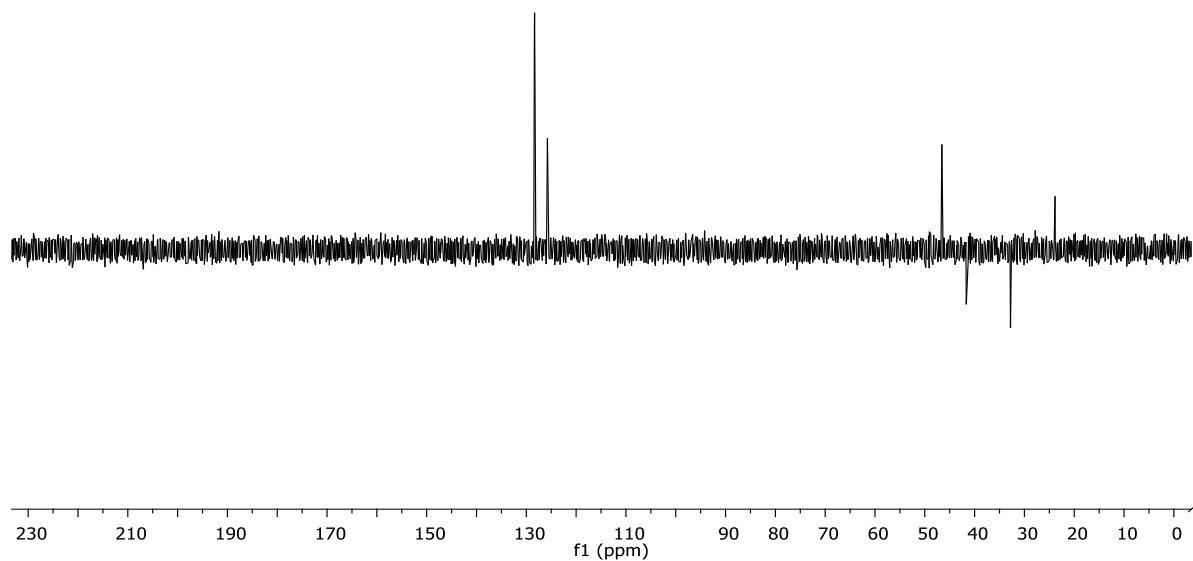
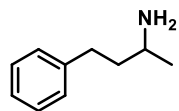
Iris\_TFBHNH  
TFB H NH



Parameter	Value
1 Data File Name	C:/ Users/ Iris/ Google Drive/ Mestrado/ dados espectrometricos/ RMN/ Iris_TFBHNH/ 20/ fid
2 Title	Iris_TFBHNH
3 Comment	TFB H NH
4 Origin	Bruker BioSpin GmbH
5 Owner	nmr
6 Site	
7 Spectrometer	FOURIER300
8 Author	
9 Solvent	CDCl3
10 Temperature	297.1
11 Pulse Sequence	zgpg30
12 Number of Scans	107
13 Receiver Gain	501
14 Relaxation Delay	2.0000
15 Pulse Width	12.0000
16 Acquisition Time	1.3422
17 Acquisition Date	2017-04-05T14:41:36
18 Modification Date	2017-04-05T14:47:34
19 Spectrometer Frequency	75.48
20 Spectral Width	24414.1
21 Lowest Frequency	-4649.4
22 Nucleus	13C
23 Acquired Size	32768
24 Spectral Size	65536

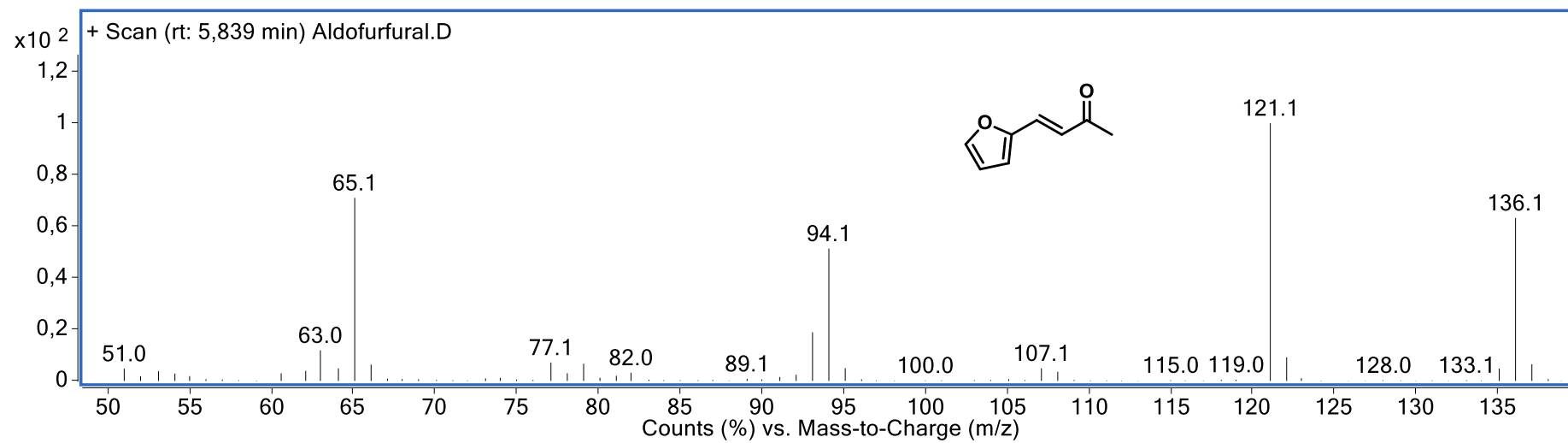
E24. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,48 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 4-fenil-2-butanamina **2c**

Iris\_TFBHNNH  
TFB H NH

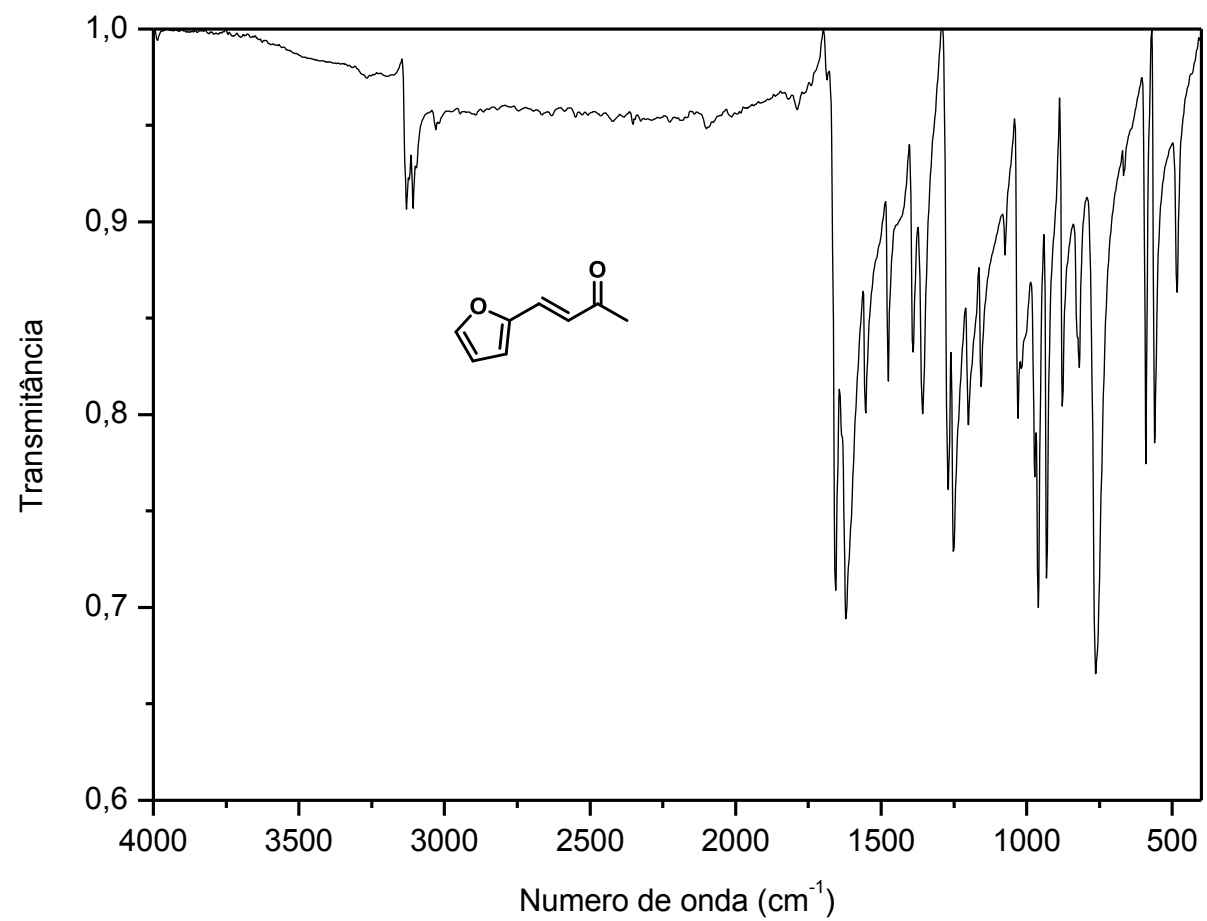


Parameter	Value
1 Data File Name	C:/ Users/ Iris/ Google Drive/ Mestrado/ dados espectrometricos/ RMN/ Iris_TFBHNNH/ 30/ fid
2 Title	Iris_TFBHNNH
3 Comment	TFB H NH
4 Origin	Bruker BioSpin GmbH
5 Owner	nmr
6 Site	
7 Spectrometer	FOURIER300
8 Author	
9 Solvent	CDCl3
10 Temperature	297.2
11 Pulse Sequence	dept135
12 Number of Scans	101
13 Receiver Gain	501
14 Relaxation Delay	1.5000
15 Pulse Width	12.0000
16 Acquisition Time	1.3422
17 Acquisition Date	2017-04-05T14:48:43
18 Modification Date	2017-04-05T14:53:34
19 Spectrometer Frequency	75.48
20 Spectral Width	24414.1
21 Lowest Frequency	-6169.2
22 Nucleus	13C
23 Acquired Size	32768
24 Spectral Size	65536

E25. Espectro de RMN DEPT 135 (75,48 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da 4-fenil-2-butanamina **2c**

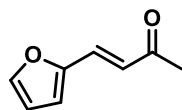


E26. Espectro de massas (IE, 70 eV) da 4-(2-furanil)-3-buten-2-ona **1d**

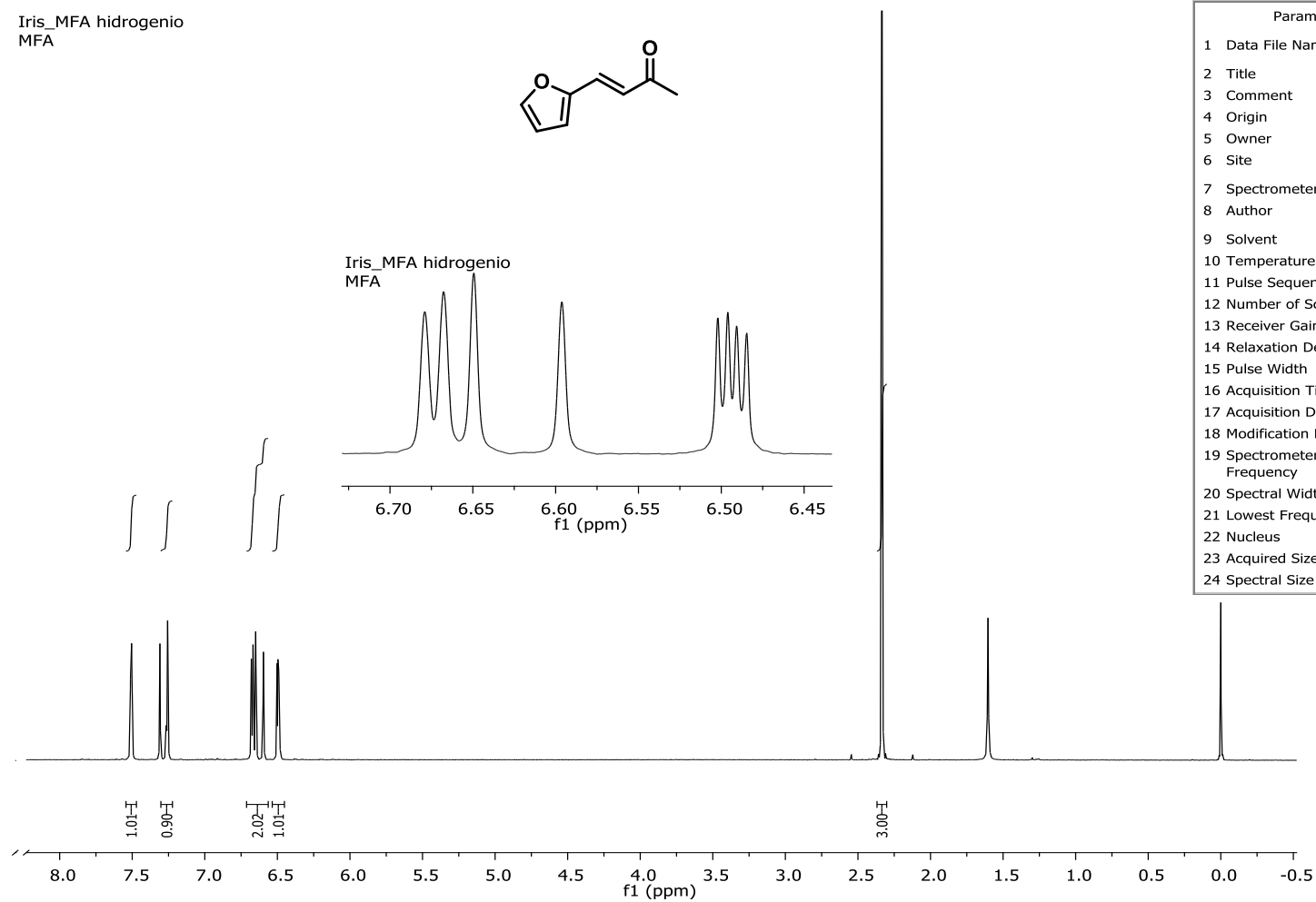


E27. Espectro no IV (ATR) da 4-(2-furânil)-3-buten-2-ona **1d**

Iris\_MFA hidrogenio  
MFA

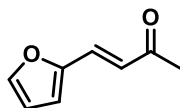


Parameter	Value
1 Data File Name	
2 Title	Iris_MFA hidrogenio
3 Comment	MFA
4 Origin	Bruker BioSpin GmbH
5 Owner	nmr
6 Site	
7 Spectrometer	FOURIER300
8 Author	
9 Solvent	CDCl <sub>3</sub>
10 Temperature	296.2
11 Pulse Sequence	zg30
12 Number of Scans	32
13 Receiver Gain	117
14 Relaxation Delay	1.0000
15 Pulse Width	11.3800
16 Acquisition Time	5.3687
17 Acquisition Date	2016-10-20T13:40:11
18 Modification Date	2016-10-20T13:43:29
19 Spectrometer Frequency	300.19
20 Spectral Width	6103.5
21 Lowest Frequency	-599.0
22 Nucleus	<sup>1</sup> H
23 Acquired Size	32768
24 Spectral Size	65536

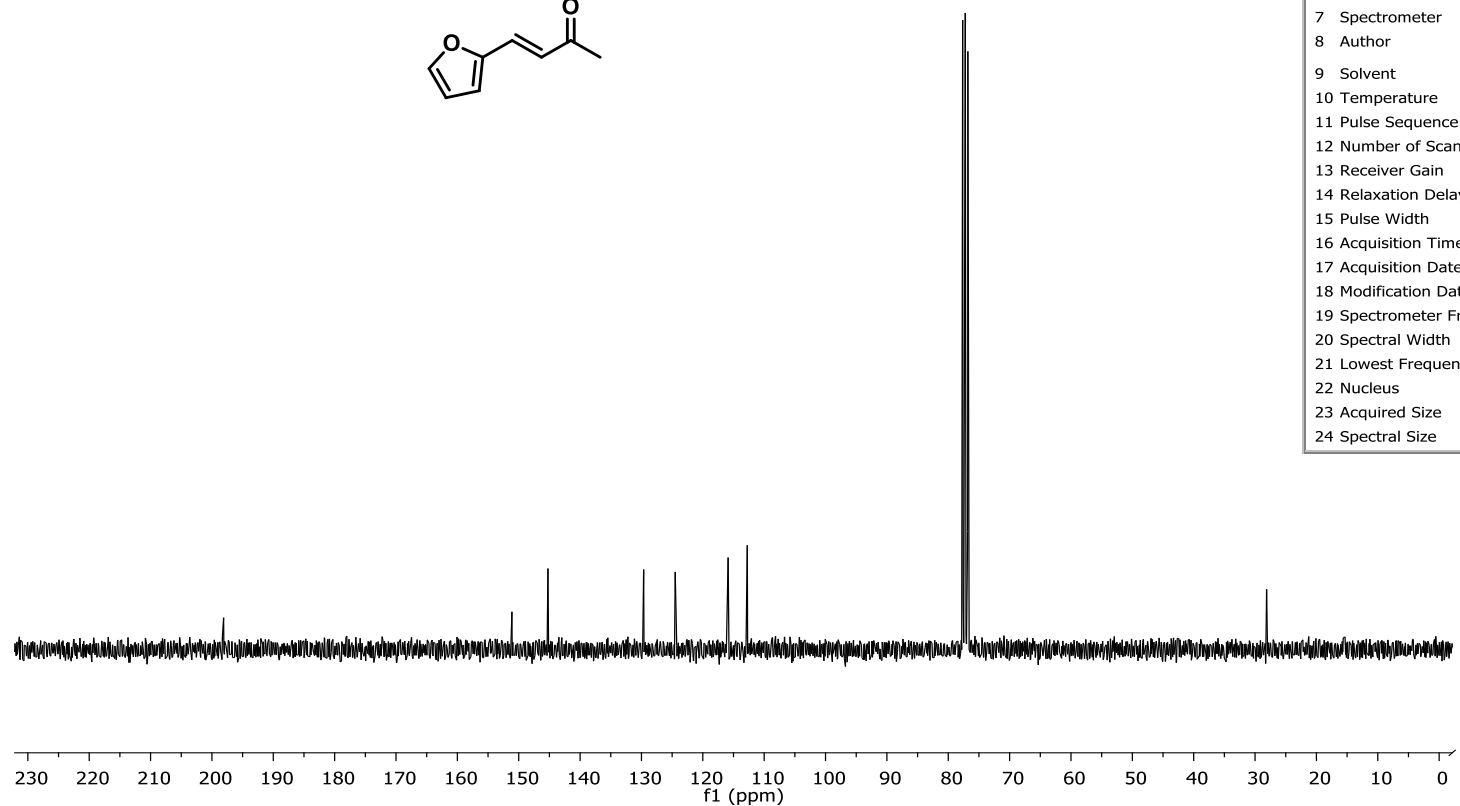


E28. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300,19 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da 4-(2-furanil)-3-buten-2-ona **1d**

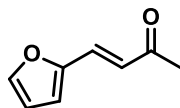
Iris\_MFA



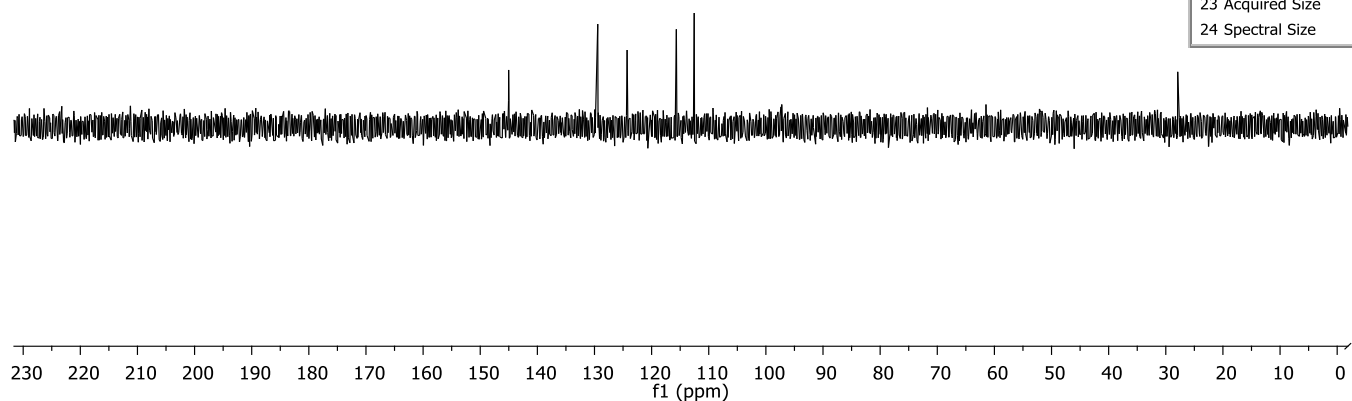
Parameter	Value
1 Data File Name	
2 Title	Iris_MFA
3 Comment	
4 Origin	Bruker BioSpin GmbH
5 Owner	nmr
6 Site	
7 Spectrometer	FOURIER300
8 Author	
9 Solvent	CDCl3
10 Temperature	296.1
11 Pulse Sequence	zgpg30
12 Number of Scans	535
13 Receiver Gain	501
14 Relaxation Delay	2.0000
15 Pulse Width	12.0000
16 Acquisition Time	1.3422
17 Acquisition Date	2016-09-29T08:38:51
18 Modification Date	2016-09-29T09:03:19
19 Spectrometer Frequency	75.48
20 Spectral Width	24414.1
21 Lowest Frequency	-4659.6
22 Nucleus	13C
23 Acquired Size	32768
24 Spectral Size	32768

E29. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,48 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 4-(2-furanil)-3-buten-2-ona **1d**

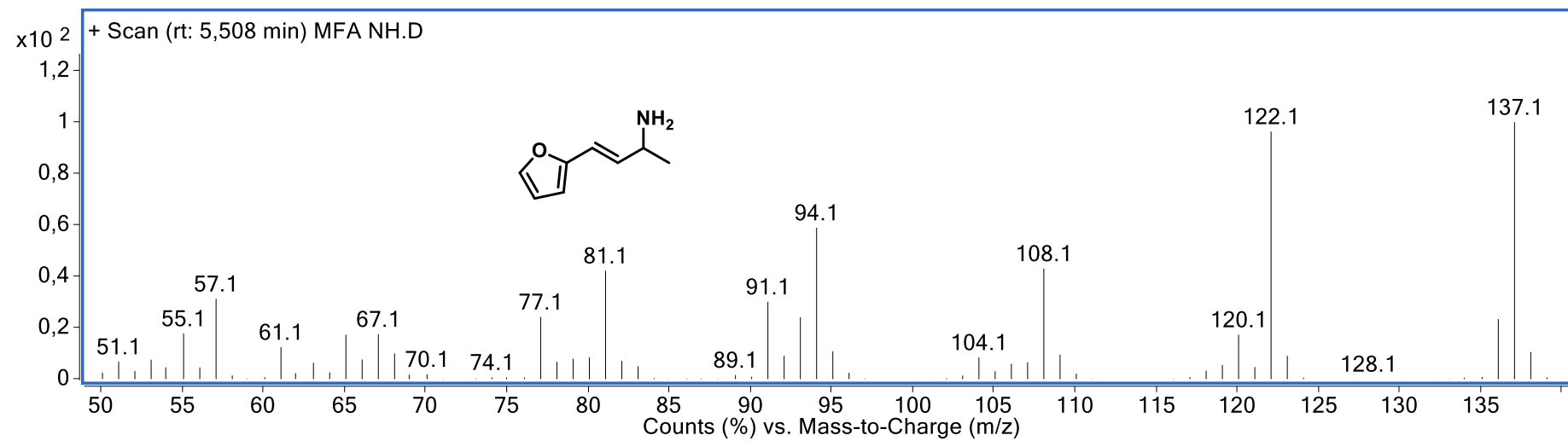
Iris\_MFA



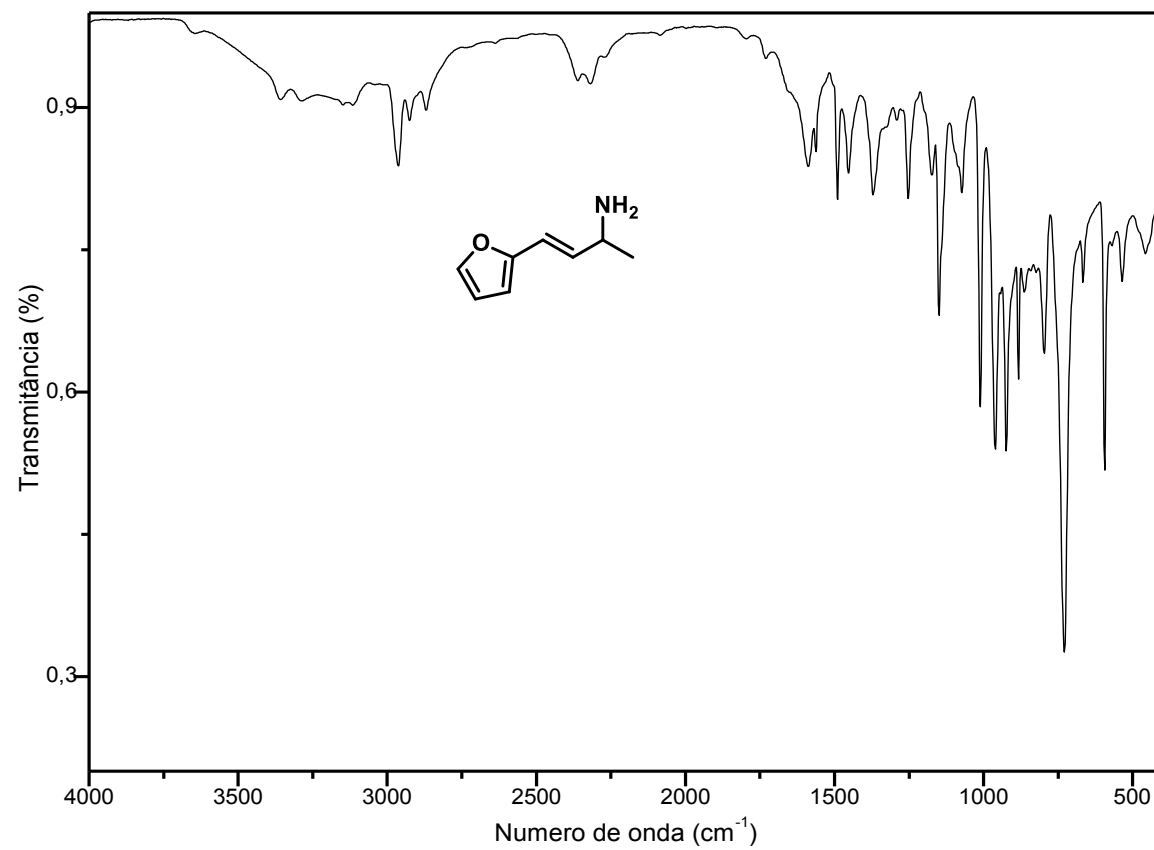
Parameter	Value
1 Data File Name	
2 Title	Iris_MFA
3 Comment	
4 Origin	Bruker BioSpin GmbH
5 Owner	nmr
6 Site	
7 Spectrometer	FOURIER300
8 Author	
9 Solvent	CDCl <sub>3</sub>
10 Temperature	295.9
11 Pulse Sequence	dept135
12 Number of Scans	208
13 Receiver Gain	501
14 Relaxation Delay	1.5000
15 Pulse Width	12.0000
16 Acquisition Time	1.3422
17 Acquisition Date	2016-09-29T09:15:33
18 Modification Date	2016-09-29T09:25:34
19 Spectrometer Frequency	75.48
20 Spectral Width	24414.1
21 Lowest Frequency	-6169.2
22 Nucleus	<sup>13</sup> C
23 Acquired Size	32768
24 Spectral Size	65536

E30. Espectro de DEPT 135 (75,48 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da 4-(2-furanil)-3-buten-2-ona **1d**



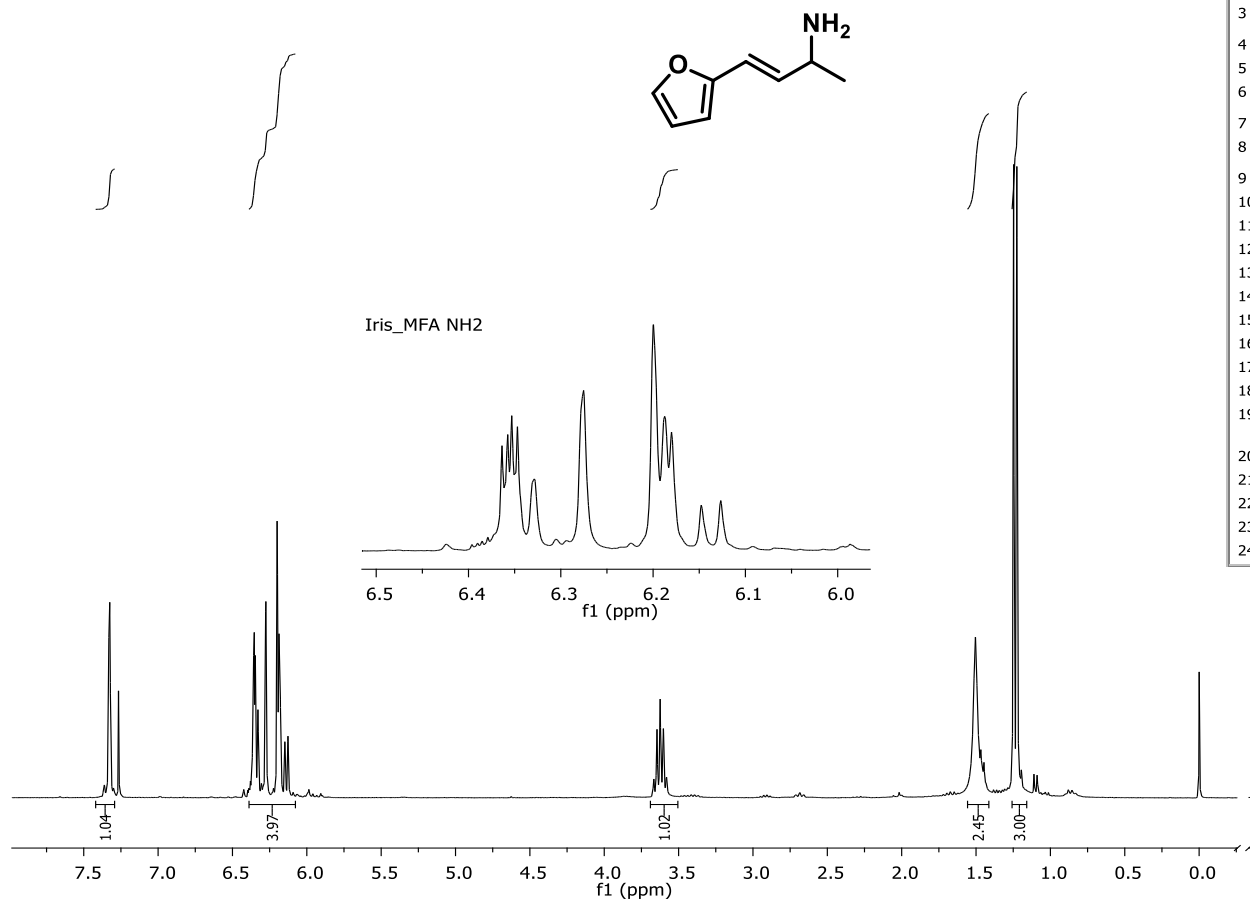


E31. Espectro de massas (IE, 70 eV) da 4-(2-furanil)-3-buten-2-amina **2d**



E32. Espectro no infravermelho (ATR) da 4-(2-furanil)-3-buten-2-amina **2d**

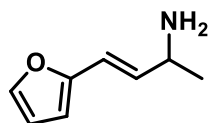
Iris\_MFA NH2



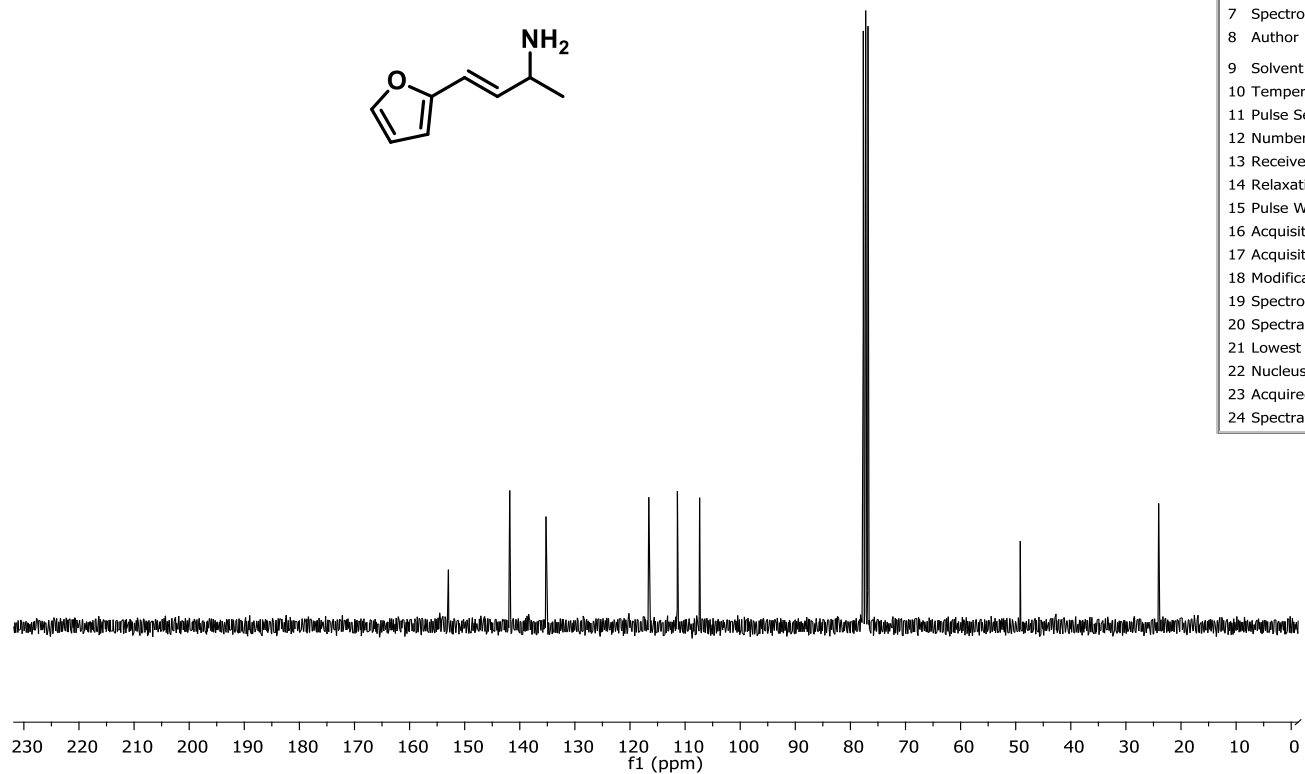
Parameter	Value
1 Data File Name	Iris_MFA NH2
2 Title	Iris_MFA NH2
3 Comment	
4 Origin	Bruker BioSpin GmbH
5 Owner	nmr
6 Site	
7 Spectrometer	FOURIER300
8 Author	
9 Solvent	CDCl3
10 Temperature	296.1
11 Pulse Sequence	zg30
12 Number of Scans	64
13 Receiver Gain	38
14 Relaxation Delay	1.0000
15 Pulse Width	11.3800
16 Acquisition Time	5.3687
17 Acquisition Date	2017-06-12T14:37:23
18 Modification Date	2017-06-12T14:44:05
19 Spectrometer Frequency	300.19
20 Spectral Width	6103.5
21 Lowest Frequency	-601.4
22 Nucleus	1H
23 Acquired Size	32768
24 Spectral Size	65536

E33. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300,19 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da 4-(2-furanil)-3-buten-2-amina **2d**

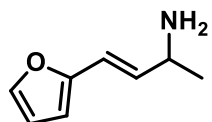
Iris\_MFA NH



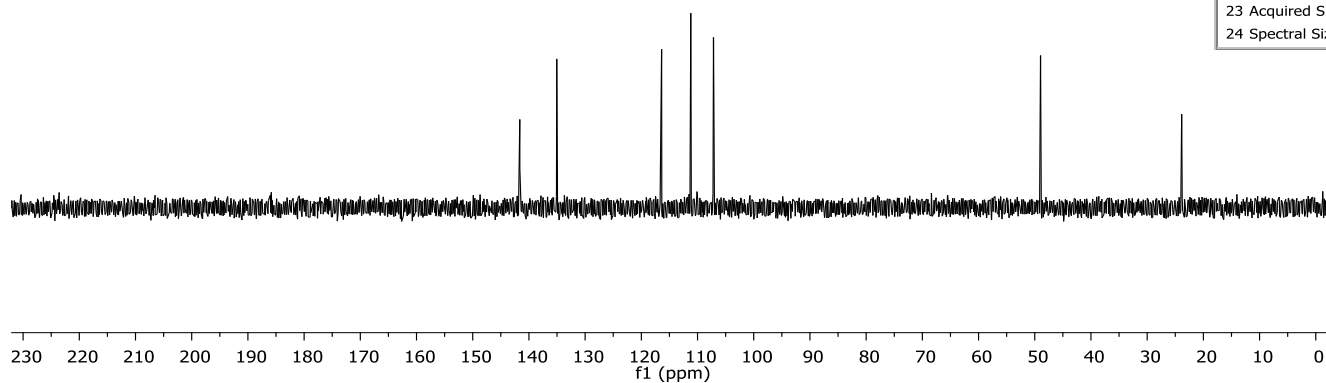
Parameter	Value
1 Data File Name	
2 Title	Iris_MFA NH
3 Comment	
4 Origin	Bruker BioSpin GmbH
5 Owner	nmr
6 Site	
7 Spectrometer	FOURIER300
8 Author	
9 Solvent	CDCl <sub>3</sub>
10 Temperature	296.1
11 Pulse Sequence	zgpg30
12 Number of Scans	512
13 Receiver Gain	501
14 Relaxation Delay	2.0000
15 Pulse Width	12.0000
16 Acquisition Time	1.3422
17 Acquisition Date	2017-06-12T13:38:44
18 Modification Date	2017-06-12T14:07:33
19 Spectrometer Frequency	75.48
20 Spectral Width	24414.1
21 Lowest Frequency	-4661.7
22 Nucleus	<sup>13</sup> C
23 Acquired Size	32768
24 Spectral Size	65536

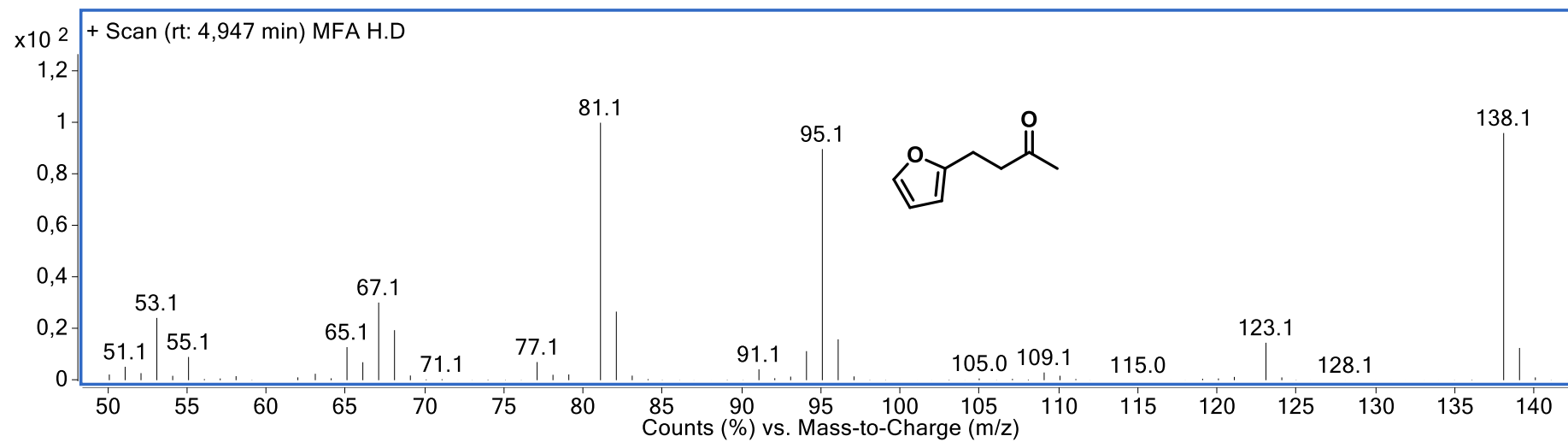
E34. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (75,48 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da 4-(2-furanil)-3-buten-2-amina **2d**

Iris\_MFA NH

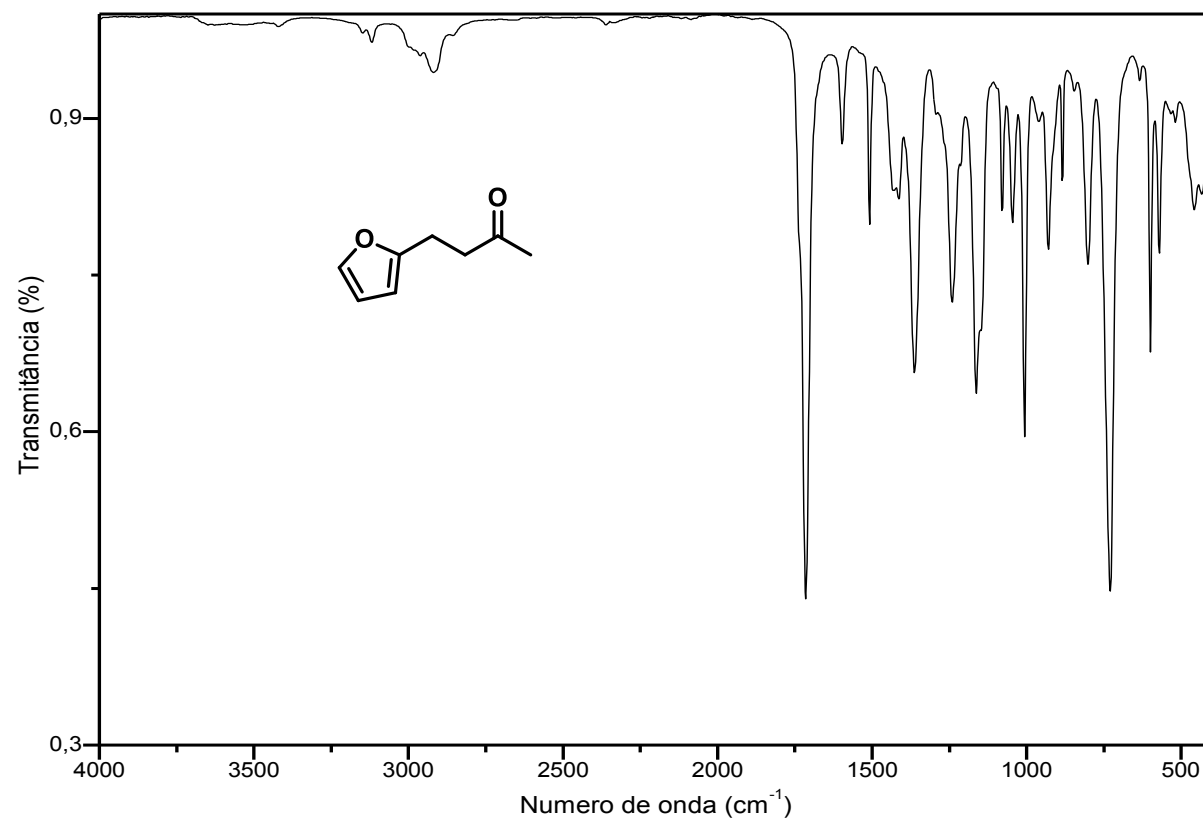


Parameter	Value
1 Data File Name	
2 Title	Iris_MFA NH
3 Comment	
4 Origin	Bruker BioSpin GmbH
5 Owner	nmr
6 Site	
7 Spectrometer	FOURIER300
8 Author	
9 Solvent	CDCl3
10 Temperature	296.2
11 Pulse Sequence	dept135
12 Number of Scans	512
13 Receiver Gain	501
14 Relaxation Delay	1.5000
15 Pulse Width	12.0000
16 Acquisition Time	1.3422
17 Acquisition Date	2017-06-12T14:09:16
18 Modification Date	2017-06-12T14:33:55
19 Spectrometer Frequency	75.48
20 Spectral Width	24414.1
21 Lowest Frequency	-6169.2
22 Nucleus	13C
23 Acquired Size	32768
24 Spectral Size	65536

E35. Espectro de RMN DEPT 135 (75,48 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da 4-(2-furanil)-3-buten-2-amina **2d**

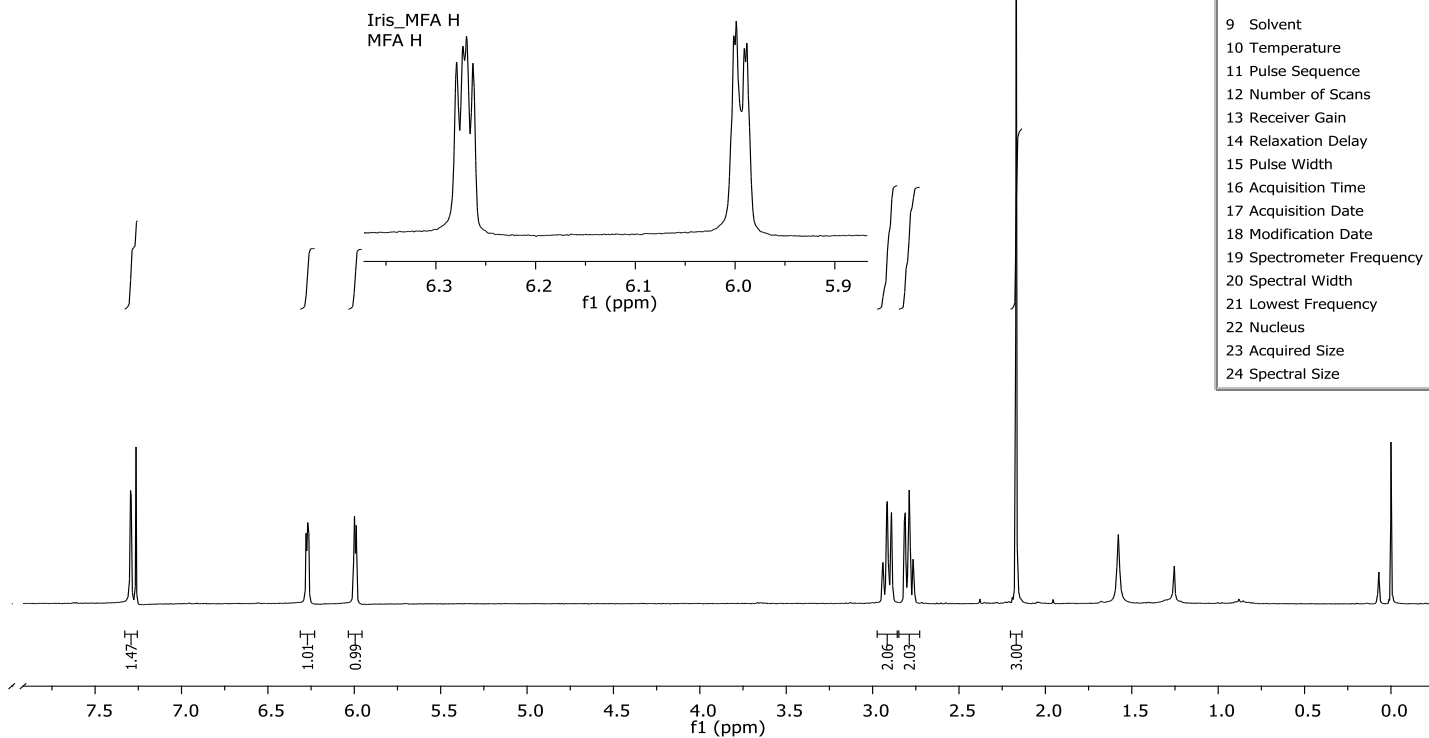
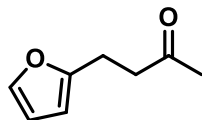


E36. Espectro de massas (IE, 70 eV) da 4-(2-furanil)-2-butanona **1e**



E37. Espectro no IV (ATR) da 4-(2-furânil)-2-butanona **1e**

Iris\_MFA H  
MFA H

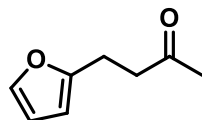


Parameter	Value
1 Data File Name	
2 Title	Iris_MFA H
3 Comment	MFA H
4 Origin	Bruker BioSpin GmbH
5 Owner	nmr
6 Site	
7 Spectrometer	FOURIER300
8 Author	
9 Solvent	CDCl3
10 Temperature	295.2
11 Pulse Sequence	zg30
12 Number of Scans	32
13 Receiver Gain	136
14 Relaxation Delay	1.0000
15 Pulse Width	11.3800
16 Acquisition Time	5.3687
17 Acquisition Date	2017-03-16T08:35:42
18 Modification Date	2017-03-16T08:39:00
19 Spectrometer Frequency	300.19
20 Spectral Width	6103.5
21 Lowest Frequency	-599.0
22 Nucleus	1H
23 Acquired Size	32768
24 Spectral Size	65536

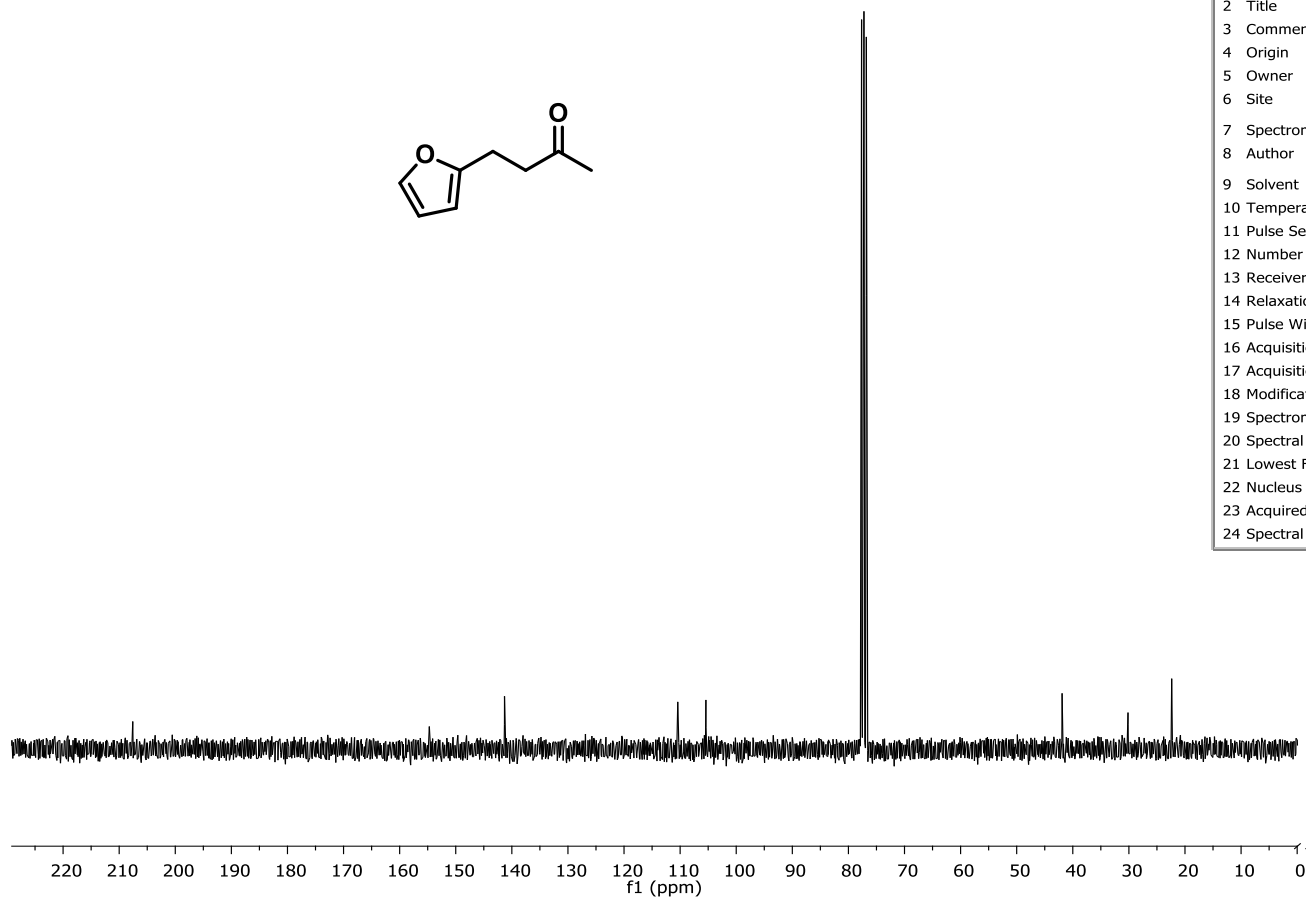
E38. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300,19 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 4-(2-furanil)-2-butanona **1e**



Iris\_MFA H  
MFA H

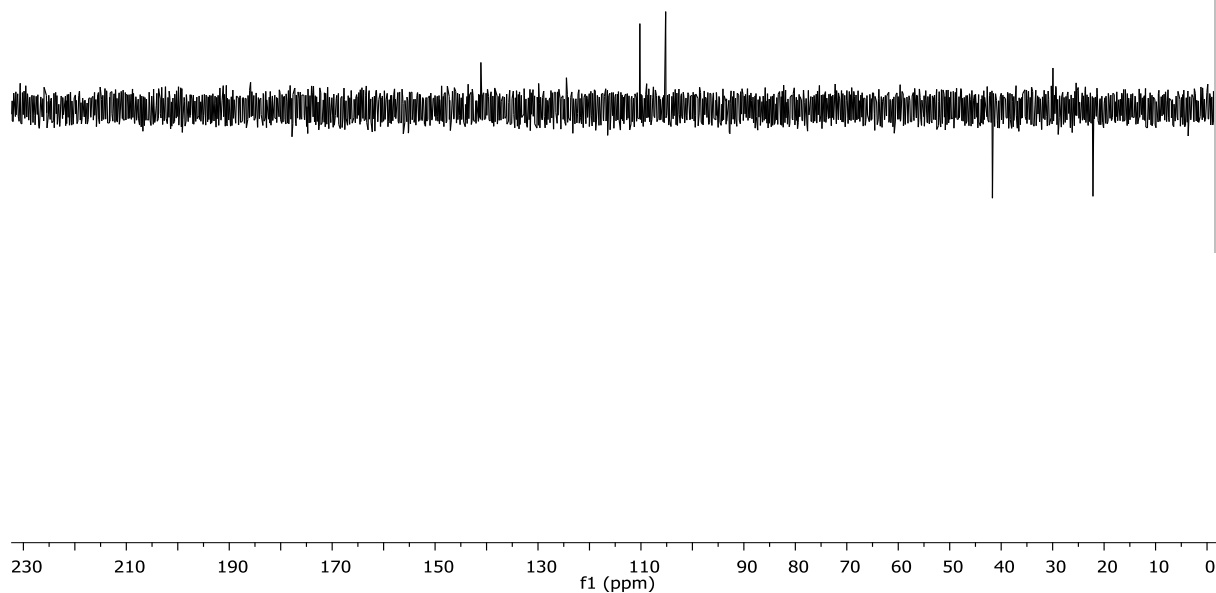
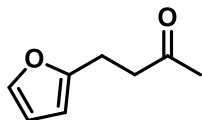


Parameter	Value
1 Data File Name	
2 Title	Iris_MFA H
3 Comment	MFA H
4 Origin	Bruker BioSpin GmbH
5 Owner	nmr
6 Site	
7 Spectrometer	FOURIER300
8 Author	
9 Solvent	CDCl3
10 Temperature	295.2
11 Pulse Sequence	zgpg30
12 Number of Scans	373
13 Receiver Gain	501
14 Relaxation Delay	2.0000
15 Pulse Width	12.0000
16 Acquisition Time	1.3422
17 Acquisition Date	2017-03-16T09:04:19
18 Modification Date	2017-03-16T09:25:18
19 Spectrometer Frequency	75.48
20 Spectral Width	24414.1
21 Lowest Frequency	-4659.6
22 Nucleus	13C
23 Acquired Size	32768
24 Spectral Size	65536



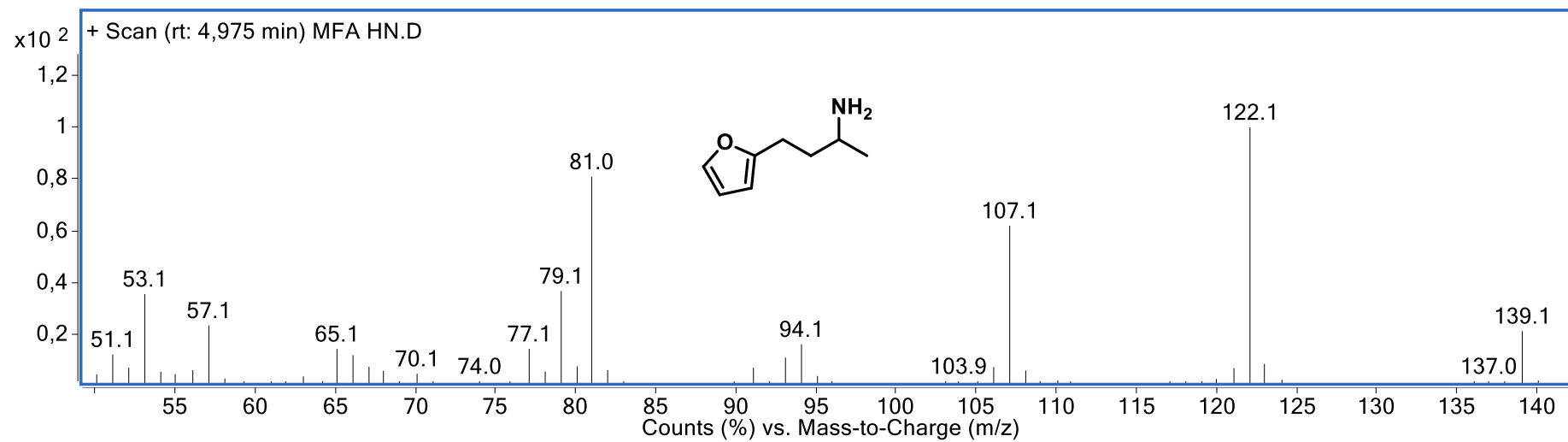
E39. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,48 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 4-(2-furânil)-2-butanona **1e**

Iris\_MFA H  
MFA H

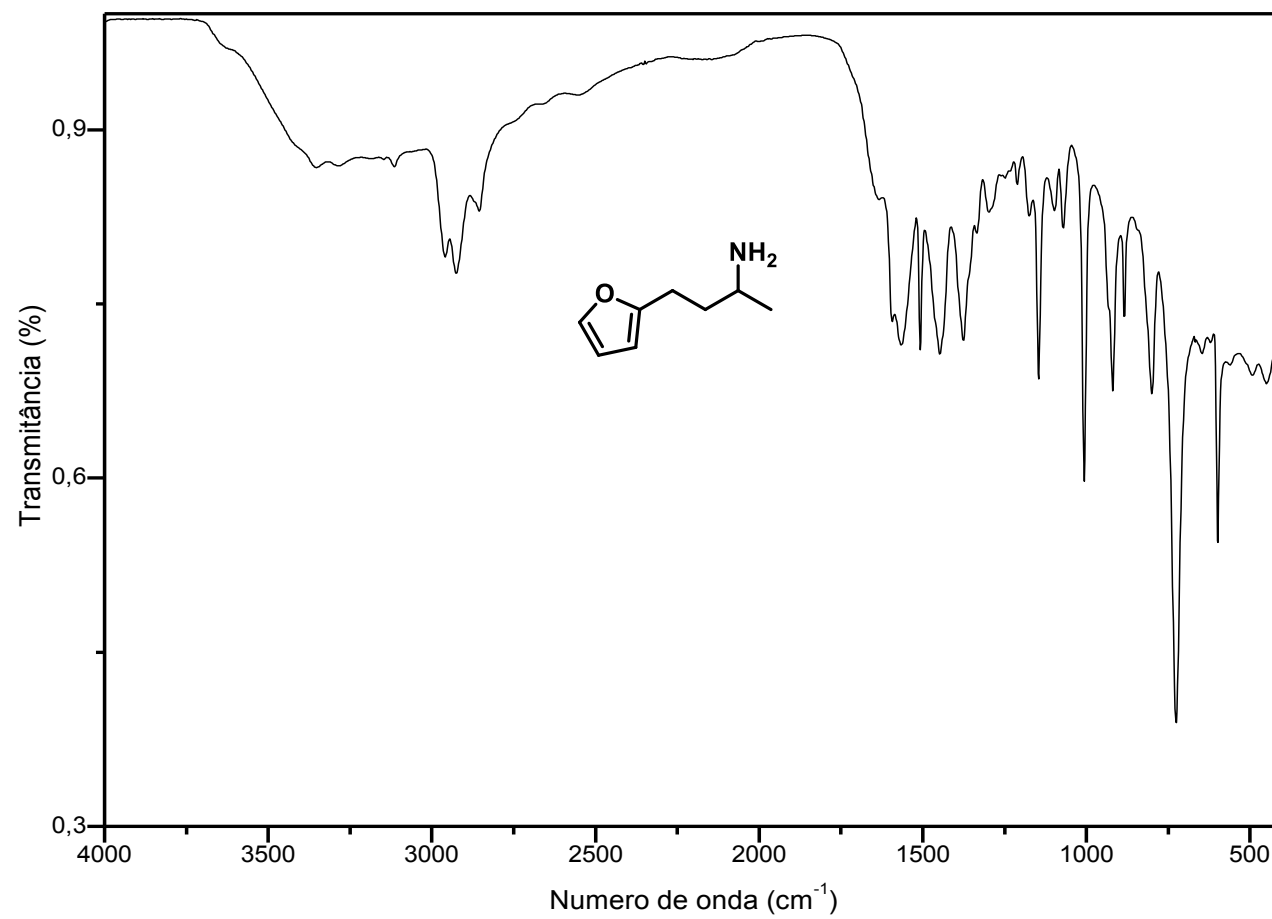


Parameter	Value
1 Data File Name	
2 Title	Iris_MFA H
3 Comment	MFA H
4 Origin	Bruker BioSpin GmbH
5 Owner	nmr
6 Site	
7 Spectrometer	FOURIER300
8 Author	
9 Solvent	CDCl3
10 Temperature	295.4
11 Pulse Sequence	dept135
12 Number of Scans	388
13 Receiver Gain	501
14 Relaxation Delay	1.5000
15 Pulse Width	12.0000
16 Acquisition Time	1.3422
17 Acquisition Date	2017-03-16T09:26:44
18 Modification Date	2017-03-16T09:45:24
19 Spectrometer Frequency	75.48
20 Spectral Width	24414.1
21 Lowest Frequency	-6169.2
22 Nucleus	13C
23 Acquired Size	32768
24 Spectral Size	65536

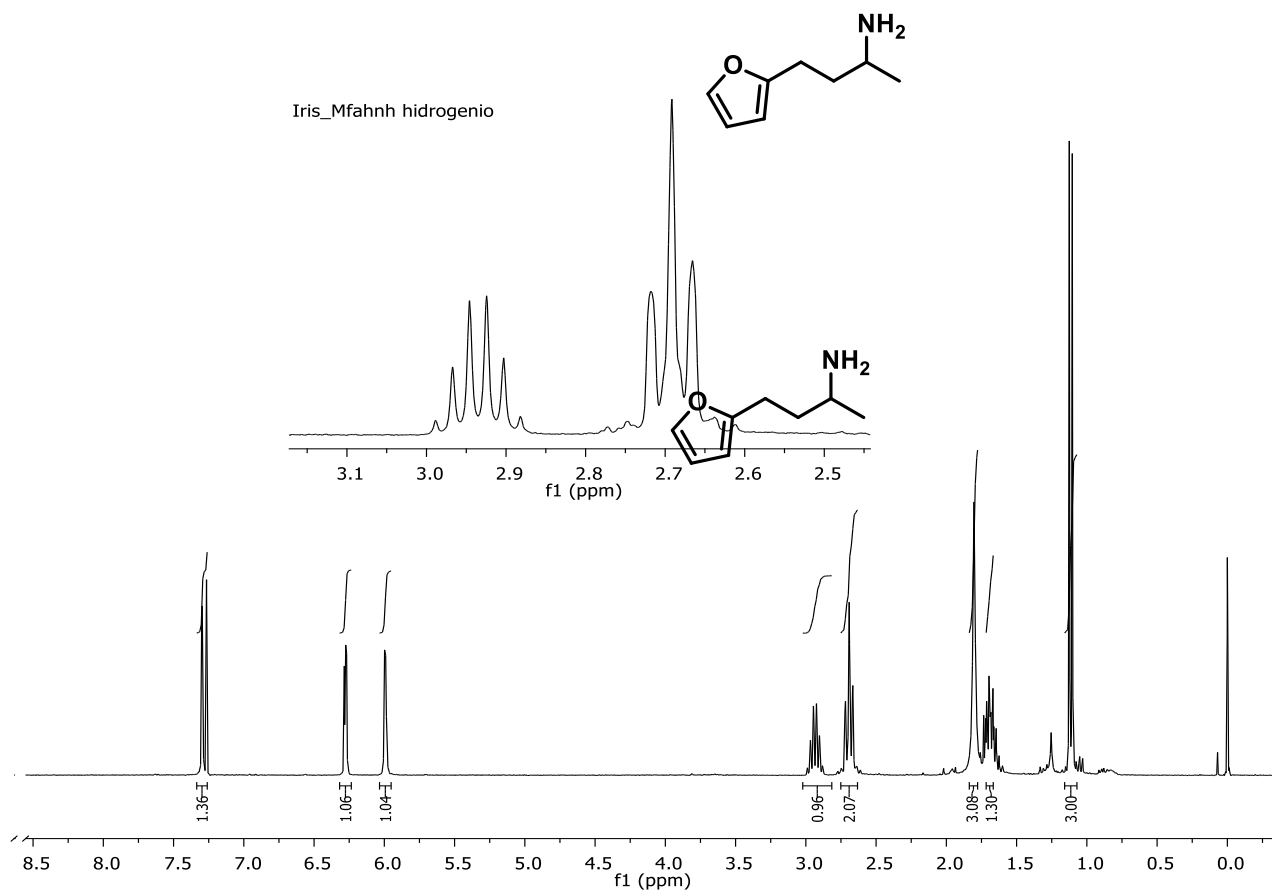
E40. Espectro de RMN DEPT 135 (75,48 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da 4-(2-furanil)-2-butanona **1e**



E41. Espectro de massas (IE, 70 eV) da 4-(2-furanil)-2-butanamina **2e**

E42. Espectro no IV (ATR) da 4-(2-furanil)-2-butanamina **2e**

Iris\_Mfahnh hidrogenio

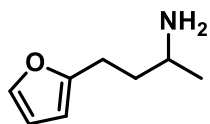


Parameter	Value
1 Data File Name	
2 Title	Iris_Mfahnh hidrogenio
3 Comment	
4 Origin	Bruker BioSpin GmbH
5 Owner	nmr
6 Site	
7 Spectrometer	FOURIER300
8 Author	
9 Solvent	CDCl3
10 Temperature	297.3
11 Pulse Sequence	zg30
12 Number of Scans	17
13 Receiver Gain	70
14 Relaxation Delay	1.0000
15 Pulse Width	11.3800
16 Acquisition Time	5.3687
17 Acquisition Date	2017-04-07T15:13:27
18 Modification Date	2017-04-07T15:15:09
19 Spectrometer Frequency	300.19
20 Spectral Width	6103.5
21 Lowest Frequency	-602.0
22 Nucleus	1H
23 Acquired Size	32768
24 Spectral Size	65536

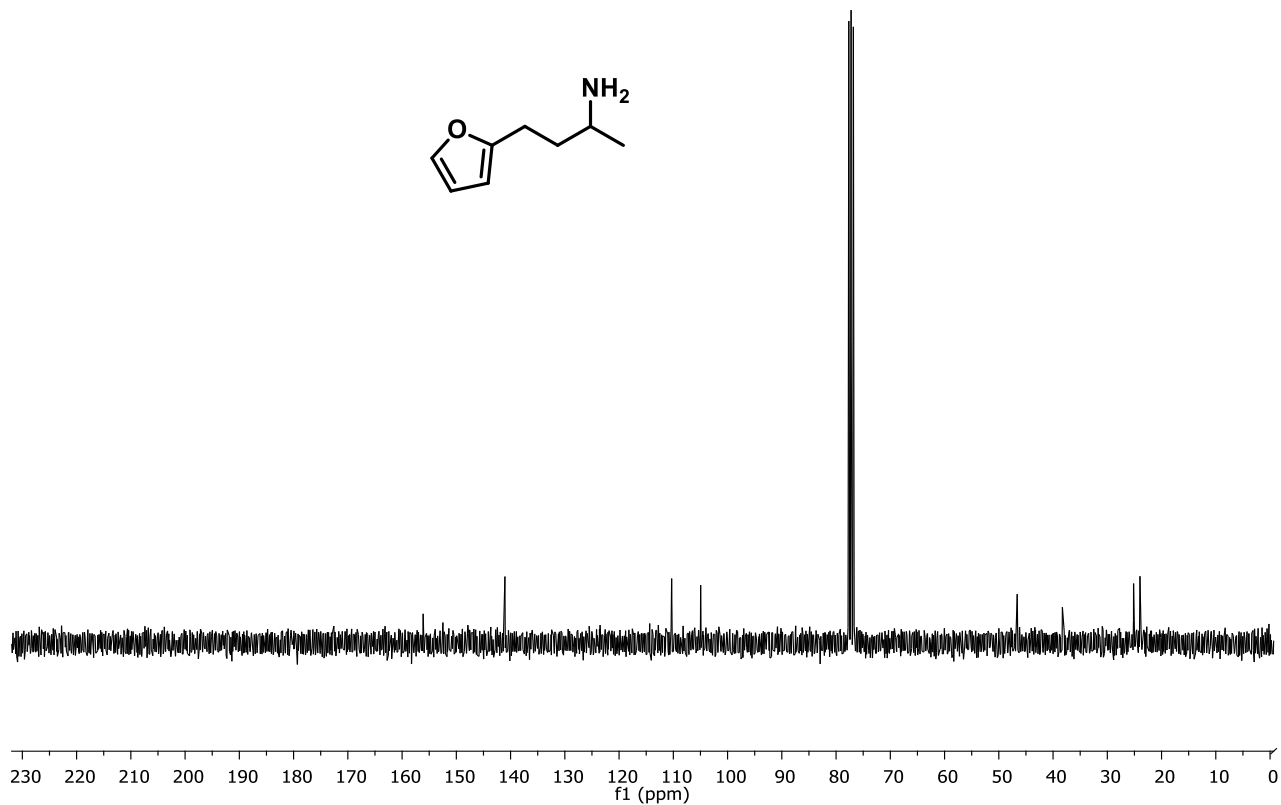
E43. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300,19 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 4-(2-furanil)-2-butanamina **2e**



Iris\_MFA H NH  
MFA H NH

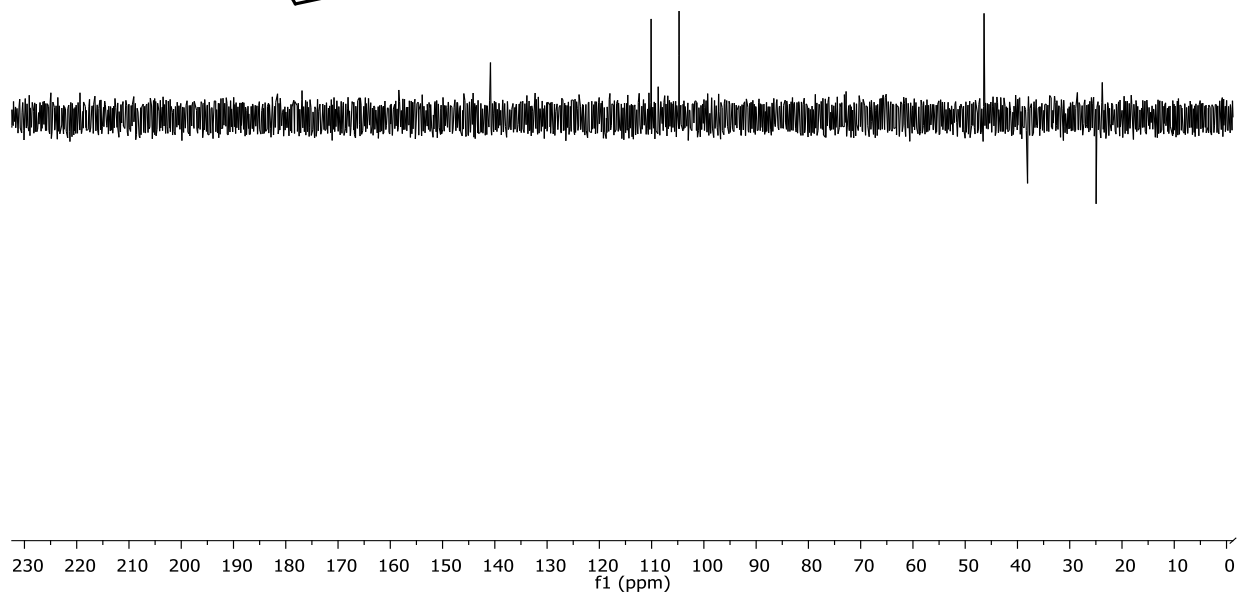
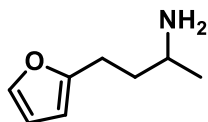


Parameter	Value
1 Data File Name	
2 Title	Iris_MFA H NH
3 Comment	MFA H NH
4 Origin	Bruker BioSpin GmbH
5 Owner	nmr
6 Site	
7 Spectrometer	FOURIER300
8 Author	
9 Solvent	CDCI3
10 Temperature	296.9
11 Pulse Sequence	zgpg30
12 Number of Scans	205
13 Receiver Gain	501
14 Relaxation Delay	2.0000
15 Pulse Width	12.0000
16 Acquisition Time	1.3422
17 Acquisition Date	2017-04-05T14:06:44
18 Modification Date	2017-04-05T14:18:15
19 Spectrometer Frequency	75.48
20 Spectral Width	24414.1
21 Lowest Frequency	-4660.6
22 Nucleus	13C
23 Acquired Size	32768
24 Spectral Size	65536



E44. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,48 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 4-(2-furanil)-2-butanamina **2e**

Iris\_MFA H NH  
MFA H NH



Parameter	Value
1 Data File Name	Iris_MFA H NH
2 Title	MFA H NH
3 Comment	Brucker BioSpin GmbH
4 Origin	nmr
5 Owner	
6 Site	
7 Spectrometer	FOURIER300
8 Author	
9 Solvent	CDCl3
10 Temperature	297.1
11 Pulse Sequence	dept135
12 Number of Scans	223
13 Receiver Gain	501
14 Relaxation Delay	1.5000
15 Pulse Width	12.0000
16 Acquisition Time	1.3422
17 Acquisition Date	2017-04-05T14:19:28
18 Modification Date	2017-04-05T14:30:10
19 Spectrometer Frequency	75.48
20 Spectral Width	24414.1
21 Lowest Frequency	-6169.2
22 Nucleus	13C
23 Acquired Size	32768
24 Spectral Size	65536

E45. Espectro de RMN DEPT 135 (75,48 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da 4-(2-furanil)-2-butanamina **2e**