

**UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA**

Lucas Lopes de Souza

**Melatonina: Estudo comparativo entre uma rota sintética industrial e
uma síntese biocatalítica**

**Araraquara
2021**

LUCAS LOPES DE SOUZA

Melatonina:
Estudo comparativo entre uma rota sintética industrial
e uma síntese biocatalítica

Monografia apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Química.

Orientadora: Prof. Dr. Cíntia D. F. Milagre

Araraquara

2021

LUCAS LOPES DE SOUZA

Melatonina: Estudo comparativo entre uma rota
sintética industrial e uma síntese biocatalítica

Monografia apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do grau de Bacharel em
Química.

Orientadora: Prof. Dr. Cíntia D. F. Milagre

Araraquara, 17 de janeiro de 2022

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Cíntia Duarte de Freitas Milagre
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profa. Dra. Fernanda Zanolli Freitas
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Nailton Monteiro do Nascimento Júnior
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Dedico este trabalho à minha mãe, que sempre me incentivou e lutou para eu chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dr. Cíntia Duarte de Freitas Milagre por toda orientação, conhecimento e paciência.

À minha mãe Cláudia e minha irmã Anna por todo o apoio, demonstração de carinho, preocupação, inspiração, força e por sempre acreditarem em mim, mesmo quando eu não acreditei.

Aos meus amigos de república, por todos esses anos em que compartilhamos momentos felizes e inesquecíveis, por toda ajuda nos tempos difíceis, todo conhecimento, apoio e incentivo.

A todas as amigas que cruzaram meu caminho durante todo meu período em Araraquara, por sempre ensinar algo e por todos os momentos em que estiveram ao meu lado, seja para rir ou chorar junto.

Ao Instituto de Química e à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” por toda infraestrutura e oportunidades que ofereceu.

Aos professores que contribuíram para a minha formação.

A todos que conheci nesses últimos anos e deixaram algum ensinamento na minha jornada.

*“Grandes coisas não se fazem por impulso, mas
pela junção de uma série de pequenas coisas.”*

Vincent Van Gogh

RESUMO

A melatonina é um hormônio natural presente em diversas classes de seres vivos, como animais, plantas, leveduras e bactérias. Seu isolamento e estudo ocorreram pela primeira vez em 1958, porém apenas nos anos 90 esse número se tornou expressivo, em decorrência do aumento do interesse por parte da comunidade científica para com essa molécula. Sua biossíntese e liberação ocorrem majoritariamente na glândula pineal, localizada no cérebro e dentre suas funções, a principal e mais conhecida é regular o ciclo circadiano humano, porém novas aplicações estão sendo descobertas nos últimos anos. Nesse contexto, o presente trabalho apresenta e discute uma rota sintética biocatalítica de melatonina e uma síntese industrial, comparando-as e evidenciando as vantagens que o uso da biocatálise proporciona, considerando o contexto atual do mundo em que pautas ambientais e o uso da química verde estão cada vez mais sendo necessárias.

Palavras-chave: Melatonina. Biocatálise. Síntese orgânica.

ABSTRACT

Melatonin is a natural hormone present in several classes of living beings, such as animals, plants, yeasts and bacteria. Its isolation and study occurred for the first time in 1958, but it was only in the 1990s that this number became significant, as a result of the increasing interest of the scientific community in this molecule. The biosynthesis and release occur mainly in the pineal gland, located in the brain. Among its functions, the main and best known is to regulate the human circadian cycle, but new applications have been discovered in recent years. In this context, the present work presents and discusses a biocatalytic synthetic route of melatonin and an industrial synthesis, comparing them and highlighting the advantages that the use of biocatalysis provides, considering the current context of the world in which environmental guidelines and the use of green chemistry is increasingly needed.

Keywords: Melatonin. Biocatalysis. Organic synthesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura molecular da melatonina.....	14
Figura 2: Número de citações e publicações a respeito da síntese de melatonina entre 1963 e 2021.	15
Figura 3: Estrutura da NAT humana determinada por modelagem homóloga (esquerda); Arranjo da tríade catalítica evidenciado no modelo de fita da NAT e as cargas superficiais (azul negativo e vermelho positivo) previstas a partir da estrutura tridimensional	22
Figura 4: Efeito do solvente/doador de acila na estabilidade da NAT livre e imobilizada	25
Figura 5: Efeito da temperatura na estabilidade do NAT livre e imobilizado	26
Figura 6: Estrutura química das matrizes testadas. Agarose (a), celulose (b), sílica funcionalizada com 3-aminopropil (c) e resina epóxi (d)	27
Figura 7: Imagens de microscopia eletrônica de varredura; (a) Agarose ativada antes da imobilização 60x;500x;1000x ampliação respectivamente. (b) Agarose ativada após imobilização da NAT (1 mg/g matriz) 60x;500x;1000x ampliação respectivamente.	28
Figura 8: Microscopia confocal de partículas de agarose imobilizando NAT (1 mg/g matriz) 20x ampliação	29
Figura 9: Representação esquemática do processo de reação	30
Figura 10: Estrutura molecular do acetato de etila (5) e acetato de vinila (6)	31
Figura 11: Mecanismo de reação da síntese biocatalítica da melatonina	33

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Rota biossintética da melatonina.....	15
Esquema 2: Principais rotas de síntese da melatonina.....	20
Esquema 3: Exemplo de síntese industrial da melatonina	21
Esquema 4: Síntese proposta da melatonina.....	23
Esquema 5: Síntese proposta dos análogos da melatonina	34
Esquema 6: Exemplo de síntese química de melatonina a partir da 5- metoxitriptamina.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Imobilização do NAT em diferentes matrizes.....	28
Tabela 2: Produção contínua de melatonina (24h) (0,5M, 95g/L reagente) em reator de fluxo. Volume do reator 1,2 mL, 5 minutos de tempo de reação	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAAD	Aminoácidos aromáticos descaboxilase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASMT	<i>N</i> -acetilserotonina O-metiltransferase
EtOAc	Acetato de etila
NAT	Acetiltransferase
SNAT	Serotonina <i>N</i> -acetiltransferase
TPH	5-hidroxitriptofano 5-hidrolase
VinilOAc	Acetato de Vinila

SUMÁRIO

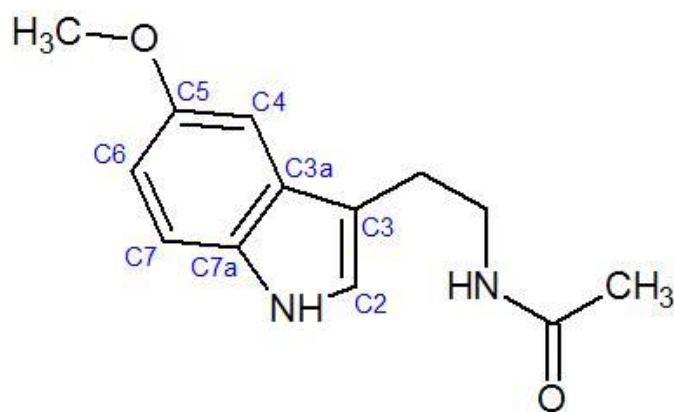
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Melatonina: Descoberta e interesse científico	14
1.2. Biossíntese da melatonina em animais	15
1.3. Melatonina: Diversidade de aplicações	17
1.4. Interesse comercial	17
2. SÍNTESE QUÍMICA.....	19
2.1. Diferentes formas de obtenção.....	19
2.2. Síntese industrial	20
2.3. Processos industriais e a biocatálise.....	21
2.4. Síntese biocatalítica e seus parâmetros.....	22
3. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ESTUDADOS POR CONTENTE et al	24
3.1. Atividade enzimática.....	24
3.2. Imobilização enzimática	27
3.3. Regime do processo.....	29
3.4. Avaliação do doador de grupo acila	30
3.5. Mecanismo da Reação.....	31
3.6. Síntese de análogos.....	34
3.7. Síntese química de melatonina a partir da 5-metoxitriptamina.....	34
4. CONCLUSÕES.....	36
5. REFERÊNCIAS	37

1. INTRODUÇÃO

1.1. Melatonina: Descoberta e interesse científico

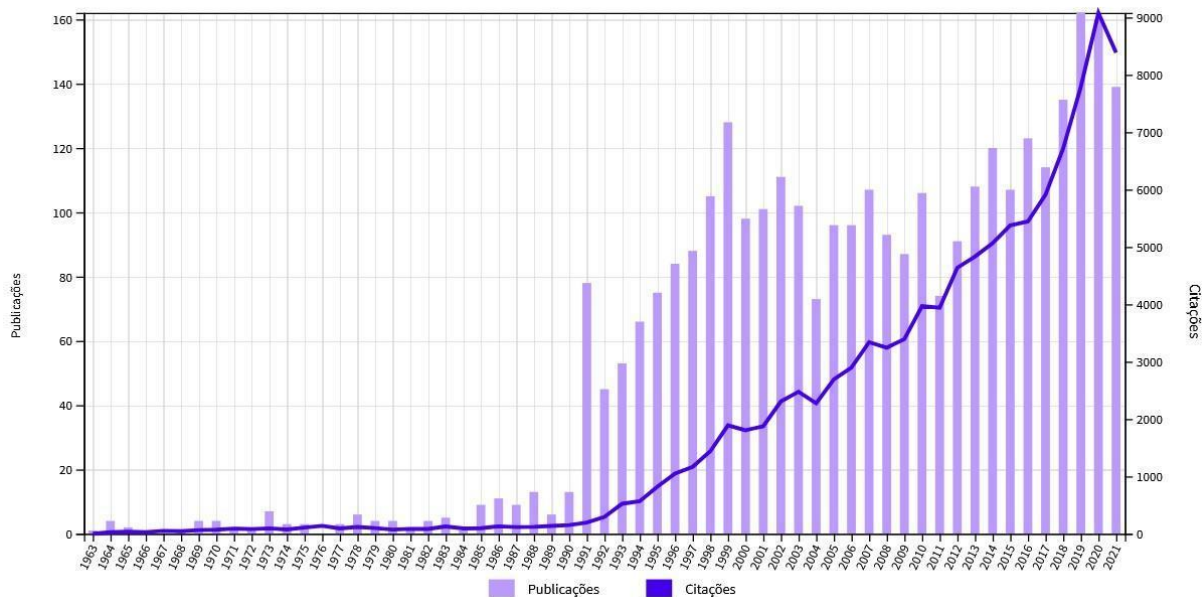
A *N*-acetil-5-metoxitriptamina (**Figura 1**), também conhecida como melatonina (**1**), foi isolada pela primeira vez da glândula pineal de animais em 1958 pelo dermatologista Aaron Lerner¹. Seu objetivo inicial era conhecer melhor sobre o vitiligo, doença caracterizada pela perda de pigmentação da pele. Foi descoberto que a melatonina causava um clareamento na pele de sapos, porém ao executar experimentos com mamíferos, o mesmo fenômeno não foi observado. Apenas algumas décadas depois, em 1995, o estudo da melatonina voltou ao interesse da comunidade científica, quando foi descoberta sua presença em diferentes segmentos das plantas, desde raízes, folhas, sementes e até mesmo frutos. Atualmente, sabe-se que essa substância pode ser encontrada em diversos seres vivos, como mamíferos, plantas, bactérias, leveduras e algas e apresenta inúmeras propriedades biológicas².

Figura 1: Estrutura molecular da melatonina



Fonte: Autoria própria

O levantamento bibliográfico realizado para o desenvolvimento deste TCC (Trabalho de Conclusão de Curso) mostra um grande número de publicações e citações quando pesquisado o tópico “melatonin synthesis” no site Web of Science (**Figura 2**), principalmente após os anos 90, demonstrando o crescente interesse científico para com essa molécula ao passo em que foram sendo descobertas novas aplicações.

Figura 2: Número de citações e publicações a respeito da síntese de melatonina entre 1963 e 2021.

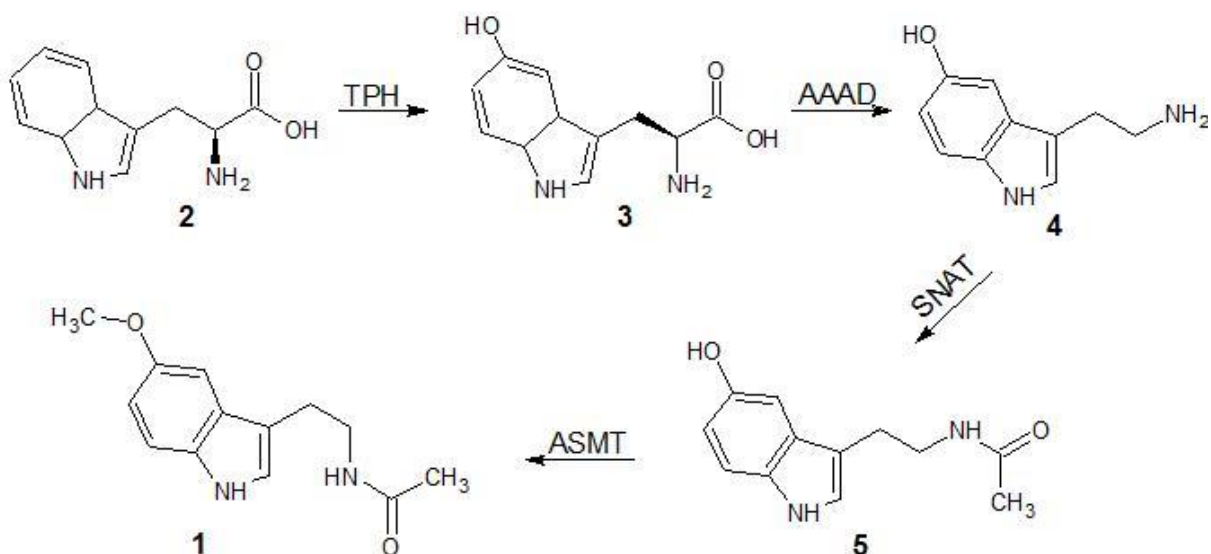
Fonte: Site Web of Science. Acessado em: 08 nov. 2021

Considerando então todo o cenário existente, é necessário desenvolver uma rota sintética nas melhores condições possíveis para suprir a demanda comercial e o atual trabalho busca comparar duas rotas e analisar mais profundamente uma delas.

1.2. Biossíntese da melatonina em animais

Sabe-se que diversas áreas do corpo humano produzem melatonina, porém sua produção em grande quantidade se dá na glândula pineal, órgão presente na região central do cérebro de animais³. No corpo humano ela é sintetizada a partir da hidroxilação do triptofano (**2**), seguida por uma descarboxilação catalisada pelas enzimas 5-hidroxitriptofano 5-hidrolase (TPH) e aminoácidos aromáticos descaboxilase (AAAD). No final desse processo, é gerada a serotonina (**4**), que por sua vez sofre uma acetilação pela enzima serotonina *N*-acetiltransferase (SNAT) e em seguida sofre uma metilação catalisada pela enzima *N*-acetilserotonina *O*-metiltransferase (ASMT), gerando por fim a melatonina⁴ (**Esquema 1**).

Esquema 1: Rota biossintética da melatonina



Fonte: adaptado de Tan *et al.* (TAN *et al.*, 2015)

Sua secreção em seres humanos varia tanto com a idade quanto com o momento do dia: em crianças, a melatonina se encontra em grande abundância, permanecendo em níveis estáveis até alcançar 35-40 anos, quando sua concentração no corpo diminui e alguns problemas referentes ao sono podem ser observados. Já a respeito do momento do dia, é conhecido que a luz inibe a síntese dessa molécula, portanto sua produção possui valores mais elevados em momentos noturnos, enquanto que durante o dia ou sob o efeito de luz será consideravelmente menor².

A melatonina interage com dois receptores presentes amplamente no corpo todo, porém principalmente no sistema nervoso central, sendo eles denominados MT1 e MT2. Pouco se sabe sobre a função certa envolvendo esses receptores e o que se tem na literatura são as diferenças de afinidade que ocorrem com análogos em relação a esses receptores⁵. Como é descrito por Wang, Shi e Laborda (2020, p. 2), há uma vasta variedade de compostos similares à melatonina que podem ser sintetizados, cada qual com uma afinidade diferente e que, possivelmente, pode expressar novas funções e que fornece uma abrangência de novos estudos, porém neste TCC será focada a síntese da melatonina.

1.3. Melatonina: Diversidade de aplicações

O estudo da melatonina com o passar do tempo tornou-se mais amplo e seu envolvimento foi observado em diversos meios e áreas. No que diz relação com as plantas, ela participa de diversos processos, variando desde a germinação da semente e formação das raízes, até mesmo o florescimento e crescimento dos frutos. Esse último papel, no entanto, é curioso já que é possível observar uma diferença na concentração da melatonina presente no fruto, aumentando durante o crescimento do fruto e diminuindo durante seu amadurecimento⁶.

Um dos principais papéis no organismo humano com o qual a melatonina é primeiramente associada é a regulação do ritmo biológico e consequentemente o ciclo circadiano, o mecanismo que faz com que as pessoas consigam acordar, ter fome e até mesmo dormir. Porém existem outras diversas aplicações sendo estudadas e descobertas a todo o momento: ela é um poderoso antioxidante⁷, podendo capturar até 10 espécies de oxigênios reativos; fornece auxílio no tratamento de doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e autismo⁸; tratamento de câncer, impedindo a ativação e multiplicação das células cancerígenas; tratamento de ansiedade e depressão⁹; e até mesmo possivelmente atuar como barreira para o coronavírus, em decorrência da melatonina presente nos pulmões¹⁰ (estudos clínicos e pré-clínicos são ainda necessários para se chegar em uma conclusão definitiva).

1.4. Interesse comercial

A abrangência de funções que possui, juntamente com o crescente aumento de problemas psicológicos gerados em decorrência da pandemia do coronavírus SARS-CoV-2¹¹ e que, de certa forma, a melatonina consegue fornecer um auxílio, propiciou um grande interesse comercial acerca de sua produção.

Por muito tempo houve divergências sobre sua distribuição comercial, enquanto em vários países do mundo, como nos países europeus, a melatonina era amplamente comercializada, aqui no Brasil esse fenômeno ocorreu apenas há

alguns anos e estamos em meio de uma nova etapa em seu comércio. Por muito tempo, essa substância só era possível de ser adquirida em nosso país por meio de importação ou por farmácias de manipulação e apenas no ano de 2021 foi autorizada pela Anvisa o comércio de melatonina em suplementos alimentares¹².

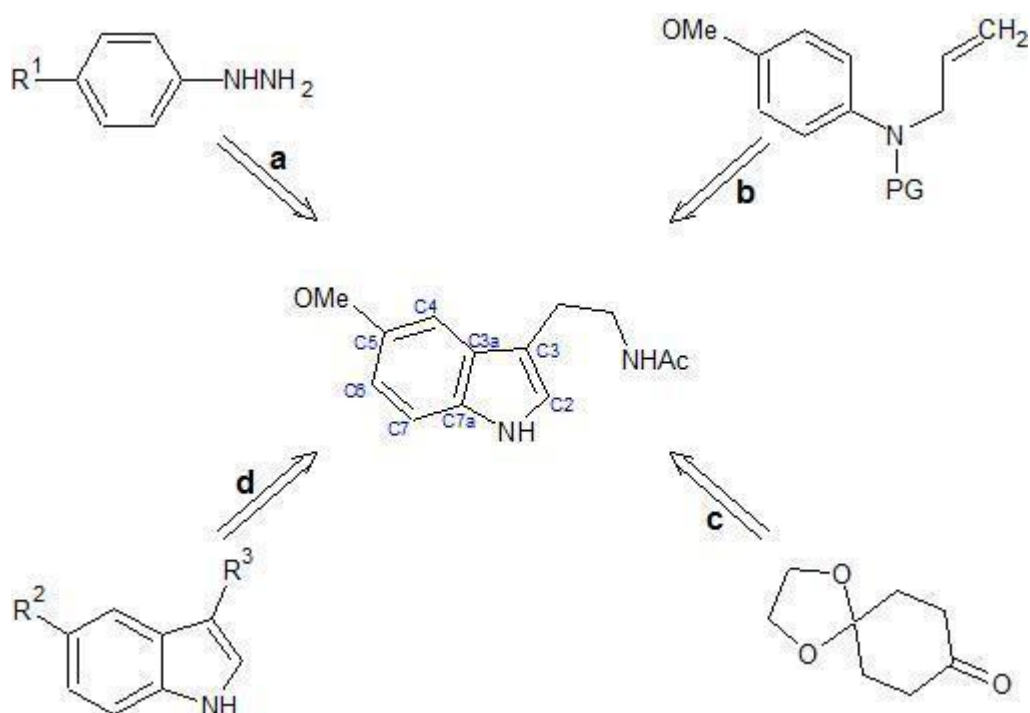
Com a crescente demanda mundial por melatonina, são necessários métodos eficientes e vantajosos de produção dessa substância, com boa eficiência, sem desperdícios ou liberação de subprodutos não desejados, possível de ser produzido em massa para atender a demanda do mercado e pautado em torno da química verde, para que esse processo não seja agressivo ao meio ambiente e nem com aqueles que estão presentes no processo de sua produção.

2. SÍNTESE QUÍMICA

2.1. Diferentes formas de obtenção

Ao longo dos anos, a fonte de obtenção comercial da melatonina variou com o avanço dos estudos existentes. Inicialmente a extração se dava a partir da glândula pineal de animais, como por exemplo, de porcos; porém esse método deixou de ser praticado por conta da recorrente contaminação do produto pelo tecido animal¹³. Uma alternativa encontrada foi a sua obtenção através da fermentação utilizando levedura *Saccharomyces cerevisiae*, entretanto o processo é lento, durando um período de 76 horas, e a concentração obtida da melatonina é da ordem de mg/L.¹⁴

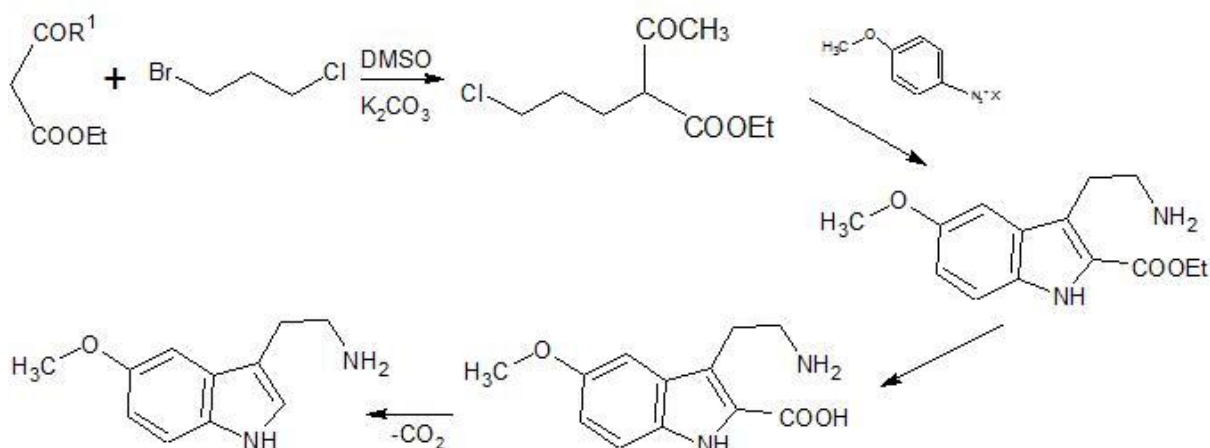
Com o avanço dos estudos químicos e o crescimento do mercado farmacológico, a síntese química de melatonina se mostrou como o método mais promissor para suprir a demanda existente. É notória uma vasta quantidade de rotas sintéticas para a produção da melatonina e seus análogos, de modo que são agrupadas em quatro estratégias principais partindo de materiais de partida diferentes para a construção do anel indólico (**Esquema 2**): a rota “a” consiste em uma reação de Fischer a partir de fenilhidrazinas *p*-substituídas a rota “b” compreende as reações de adição radicalar, cujo interesse é formar uma ligação entre C3 e C3a por meio da adição de um radical em metilenos terminais; a rota “c” refere-se a formação de um anel indólico a partir da 1,4-ciclohexanodiona monoprotetida e a rota “d” por fim, baseia-se no uso de indóis substituídos em C3 e C5 como material de partida para a síntese¹. Neste trabalho, será discutida a rota “d”.

Esquema 2: Principais rotas de síntese da melatonina

Fonte: adaptado de Wang *et al.* (WANG *et al.*, 2020)

2.2. Síntese industrial

Um exemplo de síntese industrial existente da melatonina utilizada pela Dr. Reddy's Research Foundation compreende uma diversidade de processos e etapas que podem ser observadas no Esquema 3. Os compostos de partida utilizados são o 1-bromo-3-cloropropano e um composto com metileno ativo¹⁵, no exemplo é considerado o uso de acetoacetato de etila. A síntese foi otimizada a partir de duas sínteses presentes no artigo analisado, o que confere à síntese algumas vantagens, como reduzir custos por conta da substituição de alguns reagentes, etapas da reação podem ser combinadas, o produto final já é produzido em condições farmacológicas aceitáveis com mais de 99% de pureza e ocorre um incremento no rendimento e pureza pelo uso de outros químicos baratos. A reação ocorre em 4 etapas, sendo notável o baixo rendimento a cada transformação, principalmente na etapa de formação do 2-carbetoxi-5-metoxitriptamina em que o rendimento obtido é de apenas 17%.

Esquema 3: Exemplo de síntese industrial da melatonina

Fonte: PRABHAKAR *et al.* (PRABHAKAR *et al.*, 1999)

Considerando esse ponto, já é possível deduzir que essa síntese não é vantajosa por conta que ao final de todos os processos, o rendimento global, obtido pela multiplicação dos rendimentos das sucessivas etapas, será muito baixo e, conseqüentemente, a quantidade total de produto final será baixa. Além dessa questão, muitos compostos utilizados nessa síntese possuem um grau de toxicidade elevado, como o próprio material de partida 1-bromo-3-cloropropano que além de ser cancerígeno, é altamente tóxico em contato com a pele e pode ser fatal quando ingerido ou inalado²⁶, distanciando essa rota sintética dos preceitos da química verde.

2.3. Processos industriais e a biocatálise

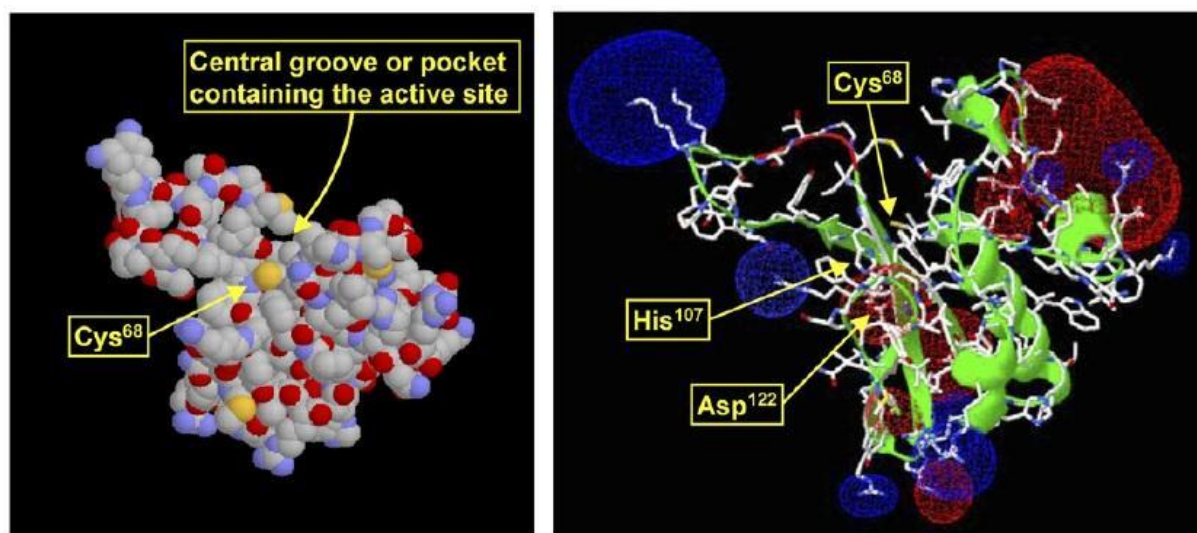
Do ponto de vista econômico, a síntese apresentada anteriormente é viável por conta do baixo preço dos reagentes, porém somando todos os pontos negativos apresentados é necessária a obtenção de um método alternativo e sustentável para a formação da melatonina. No caso é proposto o uso da biocatálise, um método que utiliza enzimas como os catalisadores da reação, permitindo assim substituir o uso dos tradicionais catalisadores metálicos¹⁶.

Em comparação com os catalisadores de diferentes naturezas, as enzimas oferecem diversas vantagens, como a alta eficiência e a possibilidade de ser

utilizada em baixas concentrações molares; são altamente seletivas, minimizando o risco de reações indesejadas, que consequentemente geram produtos secundários; não são prejudiciais para o meio ambiente por conta da sua biodegradabilidade e, por fim, as reações operam em condições de pH e temperatura brandas¹⁷.

O micro-organismo escolhido como fonte enzimática para auxiliar no processo de síntese da melatonina é o *Mycobacterium smegmatis*, descoberto inicialmente por conta da sua habilidade de acetilar álcoois²⁴. Desse modo, é proposto que a enzima *N*-acetiltransferase (NAT) existente nesse micro-organismo seja utilizada para sintetizar grupos amidas partindo de uma amina primária e ésteres de cadeia pequena em meio aquoso, utilizando da sua particular propriedade de permanecer com a atividade catalítica mesmo em altas concentrações de substrato¹³.

Figura 3: Estrutura da NAT humana determinada por modelagem homóloga (esquerda); Arranjo da tríade catalítica evidenciado no modelo de fita da NAT e as cargas superficiais (azul negativo e vermelho positivo) previstas a partir da estrutura tridimensional



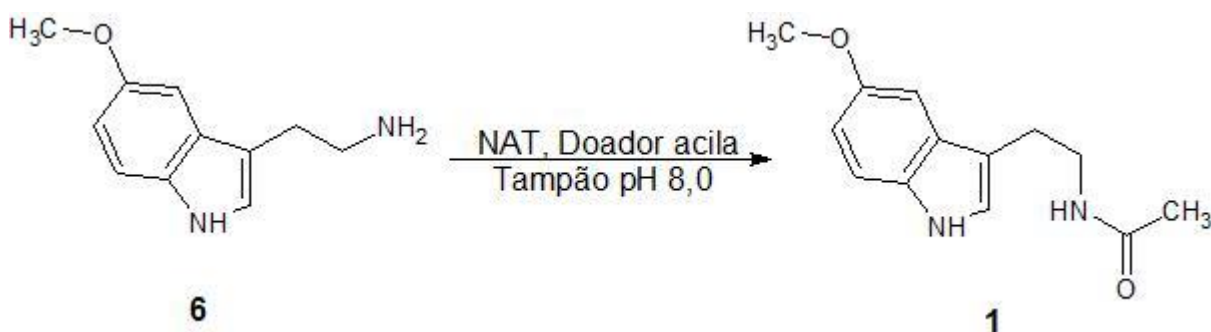
Fonte: MINCHIN *et al.* (MINCHIN *et al.*, 2015)

2.4. Síntese biocatalítica e seus parâmetros

A síntese proposta por Contente *et al* (2019) para a produção de melatonina, tendo como material de partida a 5-metoxitriptamina (**6**), ocorre em um período de cinco minutos, porém para título de comparação é importante elucidar que para a obtenção da amina primária utilizada são necessárias outras reações prévias,

portanto o tempo mencionado se refere apenas à etapa da rota em que a amina é convertida em melatonina. Através do controle de uma série de parâmetros, têm-se como resultado a produção da molécula de interesse de forma eficiente e sustentável (**Esquema 4**). Os fatores necessários para a síntese e que podem ser alterados de modo a atingir melhores valores de rendimento, estudados por Contente e colaboradores foram: formulação da enzima, podendo se encontrar nas formas livre ou imobilizada; a matriz utilizada para imobilizar a enzima; o grupo doador de acila, que nesse estudo foram os ésteres acetato de etila (EtOAc) e o acetato de vinila (VinilOAc); e o regime do processo, podendo ser em fluxo contínuo ou em batelada; porém outros parâmetros poderiam ser otimizados e estudados como temperatura, pH, solvente entre outros.

Esquema 4: Síntese proposta da melatonina



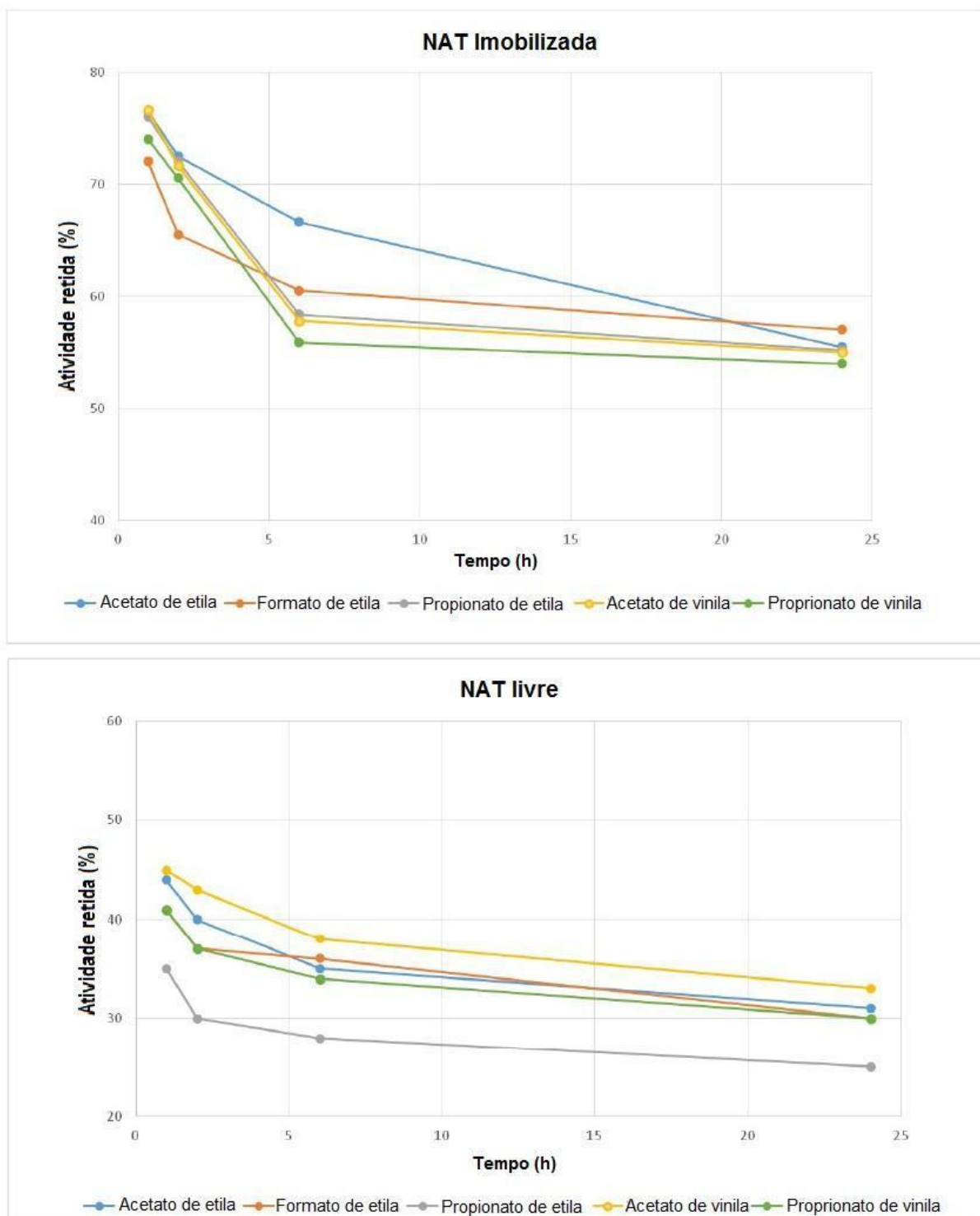
Fonte: adaptado de Contente *et al.* (CONTENTE *et al.*, 2019)

3. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ESTUDADOS POR CONTENTE et al

3.1. Atividade enzimática

Contente e colaboradores realizaram testes para analisar¹³, a permanência da atividade da enzima ao longo do tempo, variando as condições de temperatura, solvente e formulação da enzima. Os resultados da atividade enzimática livre e imobilizada são expressos em uma solução tampão de fosfato 0,1 M, pH 8,0 e concentração de 10% v/v do doador de acila utilizando diferentes ésteres como solvente (**Figura 4**). Pode-se observar que a atividade é maior inicialmente com a enzima imobilizada e também se mantém em níveis mais altos utilizando acetato de etila e vinila, obtendo valores acima de 55% na forma imobilizada após 25 horas.

Figura 4: Efeito do solvente/doador de acila na estabilidade da NAT livre e imobilizada

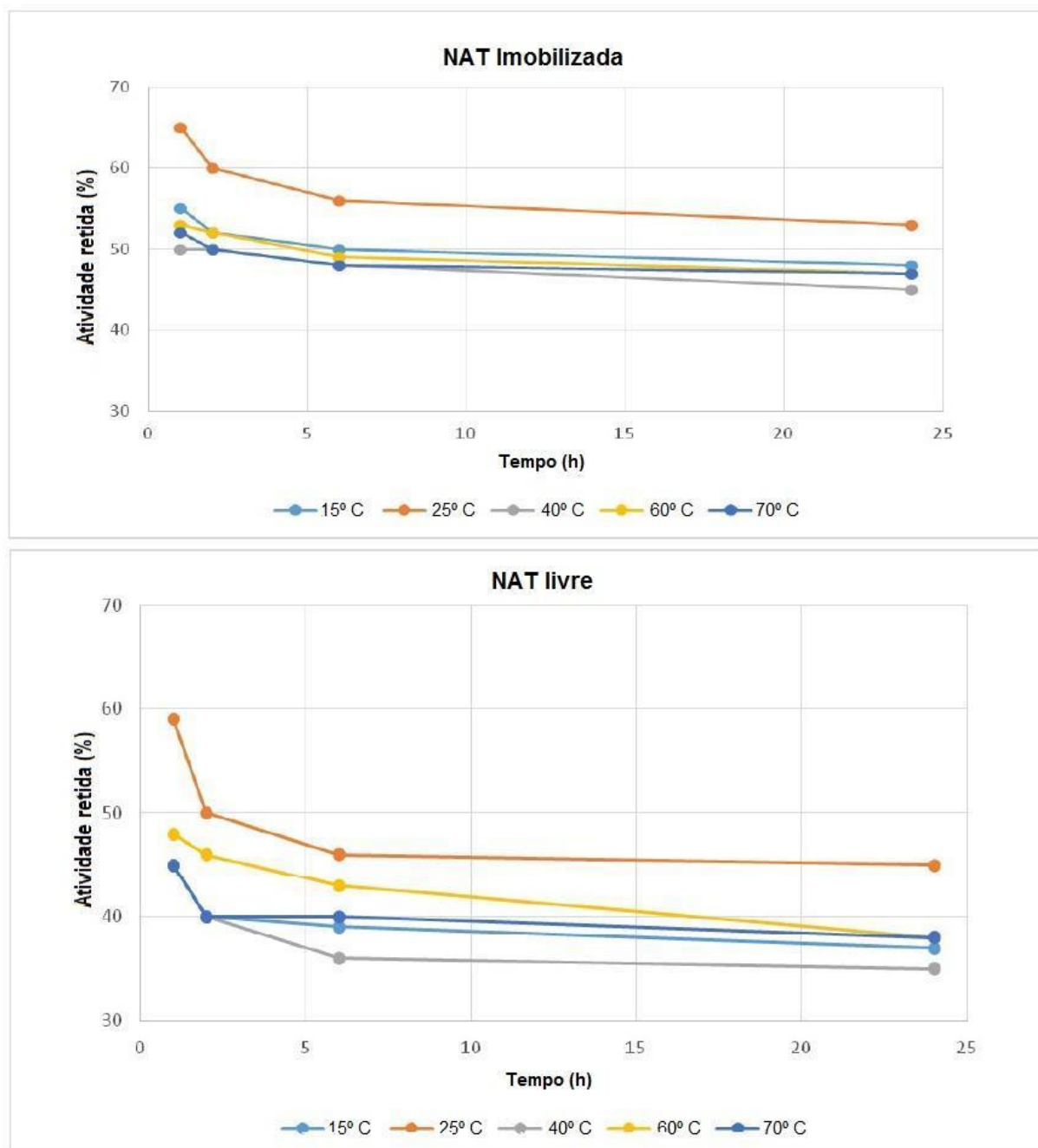


Fonte: Traduzido de CONTENTE *et al.*, 2019

Outro estudo foi realizado para avaliar a influência da temperatura na atividade enzimática, variando-a entre 15 a 70° C (**Figura 5**). Os dados obtidos expressam que a enzima imobilizada suporta muito mais a variação de temperatura e não

apresenta grande variação de atividade, enquanto que em sua forma livre, em pouco período de tempo, já há uma queda abrupta da atividade.

Figura 5: Efeito da temperatura na estabilidade do NAT livre e imobilizado

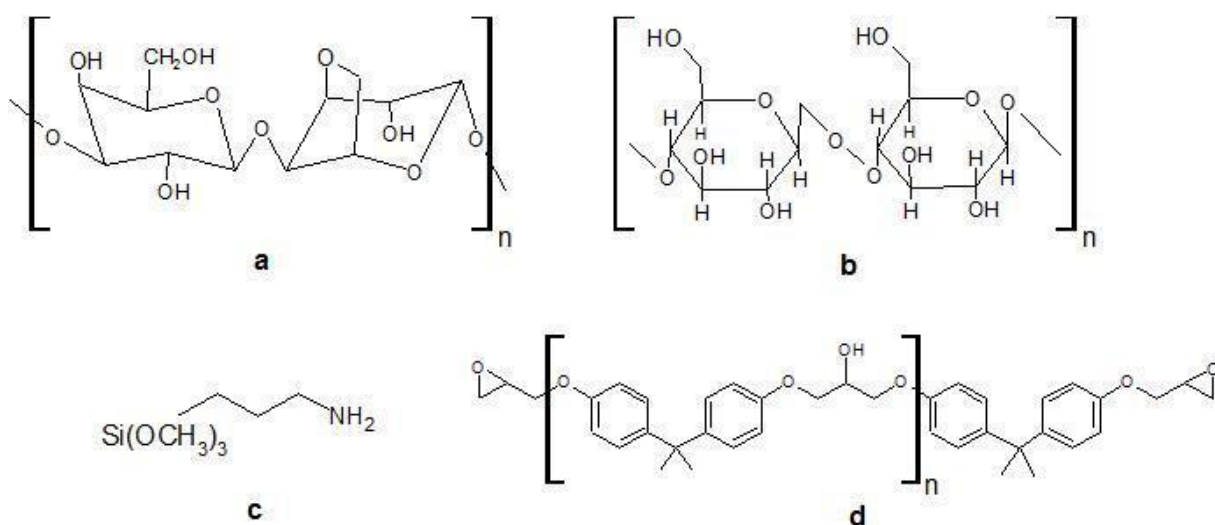


Fonte: Traduzido de CONTENTE *et al.*, 2019

3.2. Imobilização enzimática

O método inicial proposto de imobilização foi através de nanotubos de carbono em microreatores de sílica, porém as condições experimentais que implicam no uso dessa imobilização não são sustentáveis, requerendo o uso de ácido nítrico, alta temperatura, atmosfera inerte e tempos longos de reação¹³. Portanto foram feitos testes envolvendo diferentes matrizes capazes de realizar ligações covalentes com a enzima. É importante observar que a matriz deve ser hidrofílica, impedindo que existam reações com o solvente, para que a interação matriz-enzima não seja rompida e também para não serem formadas regiões hidrofóbicas na coluna, que podem impedir o contato entre enzima-substrato²⁵. Dessa forma, as espécies químicas estudadas para essa função foram a agarose, celulose, sílica funcionalizada com 3-aminopropil e resina epóxi (**Figura 6**).

Figura 6: Estrutura química das matrizes testadas. Agarose (a), celulose (b), sílica funcionalizada com 3-aminopropil (c) e resina epóxi (d)



Fonte: Autoria própria

Os parâmetros analisados para concluir qual a melhor matriz proposta foram a atividade média e estabilidade média expressa pela enzima em diferentes concentrações (**Tabela 1**).

Tabela 1: Imobilização do NAT em diferentes matrizes

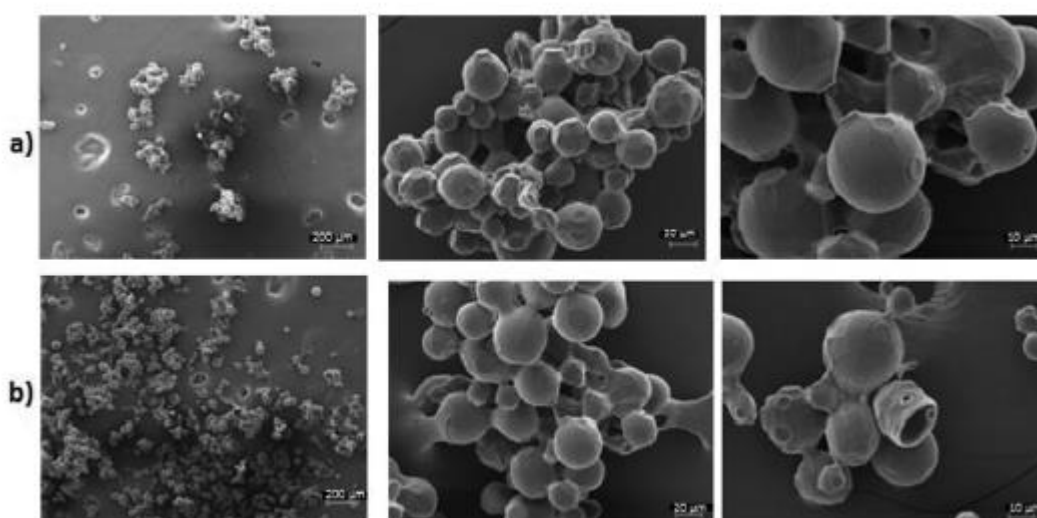
	1 mg/g matriz	Atividade Média (%)	Estabilidade Média (%)	5 mg/g matriz	Atividade Média (%)	Estabilidade Média (%)	10 mg/g matriz	Atividade Média (%)	Estabilidade Média (%)
Resinas Epóxi	Agarose	73	74	Agarose	20	19	Agarose	8	8
	EP403/S	28	26	EP403/S	5	6	EP403/S	3	3
	HFA403/S	30	28	HFA403/S	9	6	HFA403/S	6	5
	EC-HFA/S	24	26	EC-HFA/S	6	5	EC-HFA/S	3	4
	EC-EP/S	23	25	EC-EP/S	6	6	EC-EP/S	3	3
	Celulose	26	30	Celulose	17	17	Celulose	8	8
	Silica	15	13	Silica	6	6	Silica	4	3

Fonte: Adaptado de CONTENTE *et al.*, 2019

Em todos os casos analisados por Contente *et al* (2019), é possível concluir que a menor concentração de enzima fornece melhores valores de atividades, sendo o melhor deles expresso em agarose na concentração de 1mg enzima/ g matriz que, portanto, foi a condição ideal de matriz a ser utilizada.

Tendo a matriz ideal, foram feitas imagens de microscopias eletrônicas para analisar a imobilização a fim de verificar se ocorreram fenômenos de agregação (**Figura 7**) e se a enzima encontra-se realmente imobilizada na superfície das partículas de agarose (**Figura 8**).

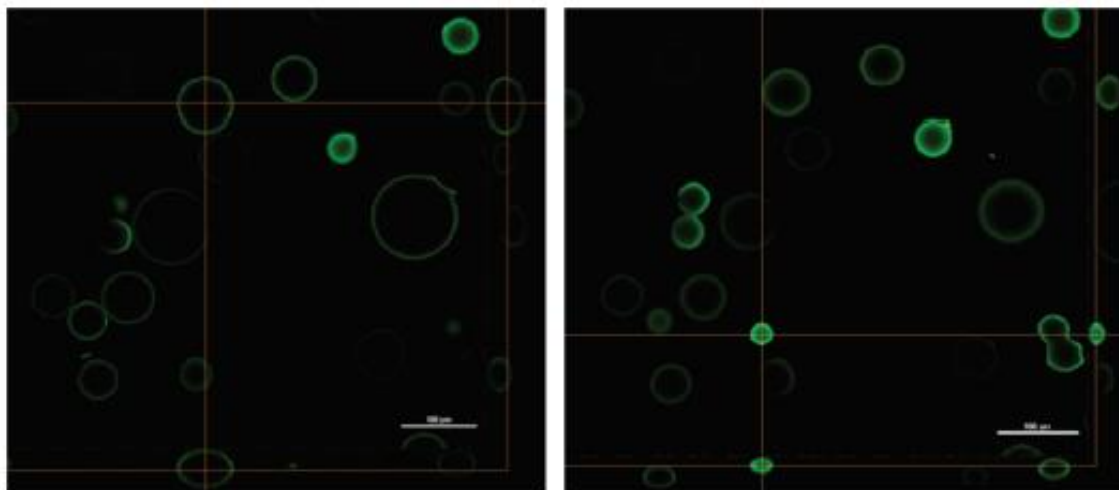
Figura 7: Imagens de microscopia eletrônica de varredura; (a) Agarose ativada antes da imobilização 60x;500x;1000x ampliação respectivamente. (b) Agarose ativada após imobilização da NAT (1 mg/g matriz) 60x;500x;1000x ampliação respectivamente.



Fonte: CONTENTE *et al.*, 2019

Como é possível observar na Figura 7, não houve nenhuma variação na superfície da matriz e não ocorreram fenômenos de agregação. A importância da ausência dessas ocorrências deve-se ao fato da manutenção da superfície de contato para a interação enzima-substrato.

Figura 8: Microscopia confocal de partículas de agarose imobilizando NAT (1 mg/g matriz) 20x ampliação



Fonte: CONTENTE *et al.*, 2019

Na Figura 8 a NAT imobilizada recebeu uma pigmentação fluorescente, confirmando sua presença na superfície da agarose.

3.3. Regime do processo

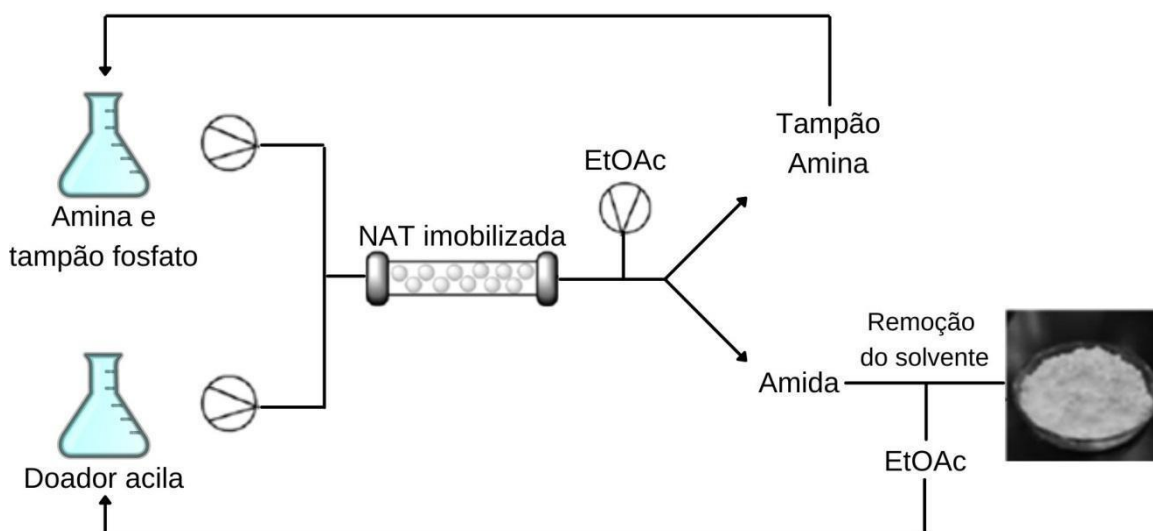
Uma síntese química pode ser realizada em dois regimes diferentes: batelada ou em fluxo contínuo. O primeiro se dá em reatores tipo tanque (escala industrial) ou balões volumétricos (escala laboratorial), onde os reagentes são inseridos em um mesmo recipiente, a reação é inicializada e após o tempo de reação o produto é extraído. Dessa forma, muitas vezes o produto requer purificação, por conta da possível presença de reagentes que não foram utilizados e formação de subprodutos. Outro inconveniente do regime de batelada é a necessidade de inserir todos os reagentes no reator novamente para a realização da síntese, resultando em um desperdício de tempo¹⁸.

O regime em fluxo contínuo ocorre em uma coluna, na qual se encontra a enzima que irá catalisar o processo. O reagente é inserido na coluna em uma vazão

controlada, dessa forma garante-se o tempo de reação desejado, o contato eficiente de todo o reagente com a enzima, além de existir a remoção constante do produto formado¹⁹, favorecendo o deslocamento do equilíbrio do sistema em relação à formação do produto, aumentando o rendimento da síntese e evitando possível inibição enzimática pelo substrato e/ou produto.

Sendo assim, o regime de fluxo contínuo mostra-se mais eficaz para a síntese desejada, pois o rendimento obtido poderá ser maior, a formação de produto é constante e a enzima pode ser reutilizada facilmente, pois ela permanecerá na coluna. É notório também que esse método permite que a reação ocorra em ciclo fechado (**Figura 9**), dessa forma os reagentes que não reagiram podem ser recuperados e utilizados novamente na reação.

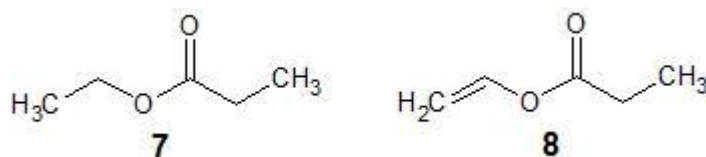
Figura 9: Representação esquemática do processo de reação



Fonte: Adaptado de CONTENTE *et al.*, 2019

3.4. Avaliação do doador de grupo acila

Os dois grupos doadores que expressaram melhores resultados em manutenção da atividade enzimática foram o acetato de etila e acetato de vinila (**Figura 10**), portanto os estudos mais aprofundados foram realizados com esses ésteres.

Figura 10: Estrutura molecular do acetato de etila (**7**) e acetato de vinila (**8**)

Fonte: Autoria própria

A reação foi realizada com **7** e **8**, utilizando como parâmetros 10% v/v de solvente, 0,5 M de amina, tampão fosfato 8.0 pH, enzima imobilizada em agarose e regime em fluxo. Os resultados obtidos (**Tabela 2**) indicam uma conversão molar de 62% utilizando **7** e 96% utilizando **8**, e em ambos os casos a pureza obtida foi maior que 95% e o rendimento correspondente a 92%. Dessa forma pode-se observar que **8** apresenta melhores resultados e, portanto, é o composto mais indicado para a realização da síntese. Porém, levando em conta o valor no mercado desses dois ésteres, é possível observar que **7** possui um preço menor em comparação ao outro composto, 1 mL de solução de acetato de etila pode ser encontrado no valor de R\$287,00²² enquanto que o preço de 1 mL de acetato de vinila é R\$347,00²³, o que pode resultar em diferenças na escolha do melhor éster a ser utilizado.

Tabela 2: Produção contínua de melatonina (24h) (0,5M, 95g/L reagente) em reator de fluxo. Volume do reator 1,2 mL, 5 minutos de tempo de reação

Doador Acila	Conversão Molar (%)	Produção de melatonina (g/dia)	Produtividade Catalítica (mmol/mg)
EtOAc	62	23,2	62
VinilOAc	96	36,9	99

Fonte: Adaptado de CONTENTE *et al.*, 2019

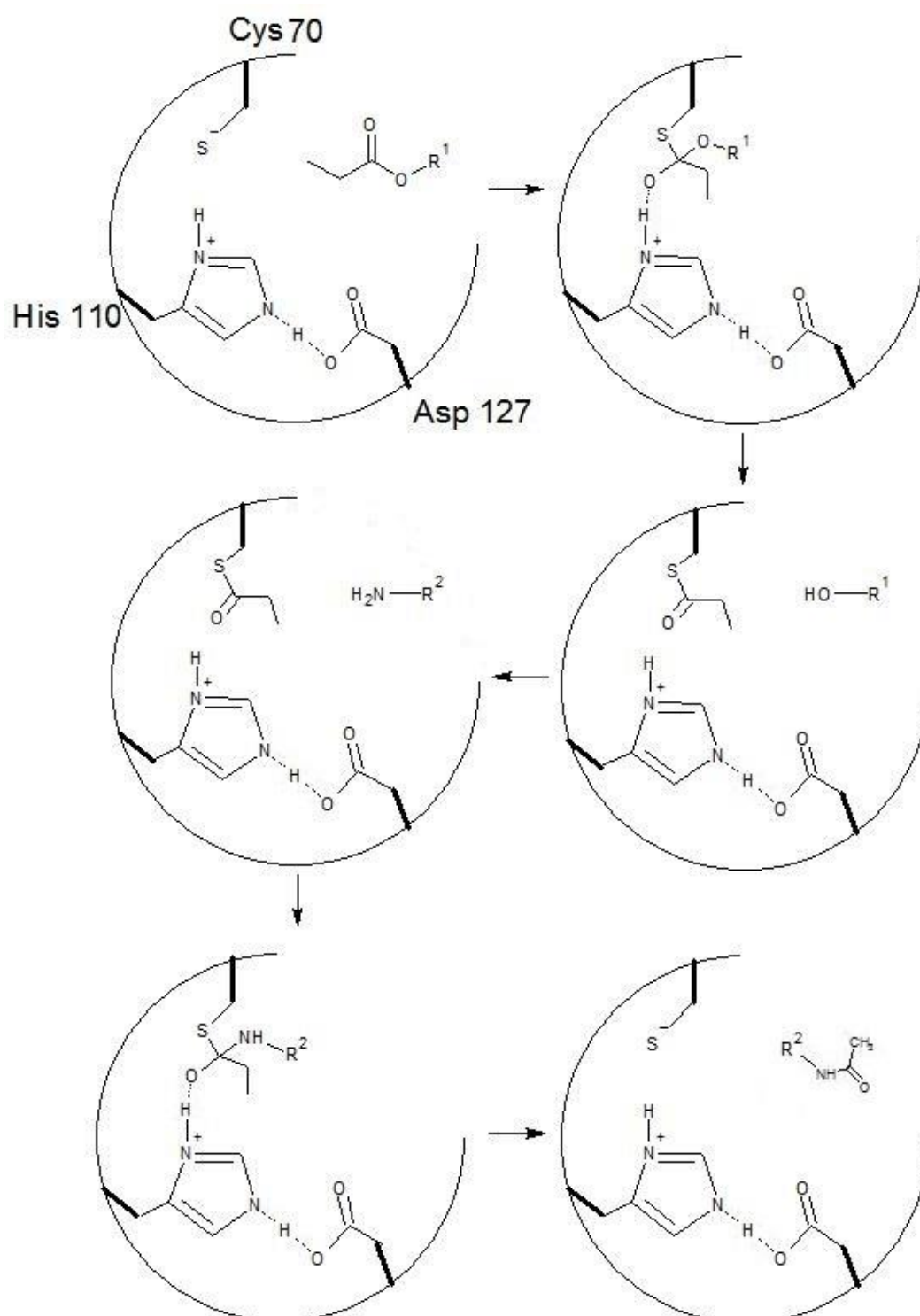
3.5. Mecanismo da Reação

A reação catalisada pela NAT ocorre no sítio ativo composto pelos resíduos de aminoácidos cisteína 70, histidina 110 e aspartato 127 (**Figura 10**). Inicialmente, o grupo carbonila do éster interage com as terminações da cisteína e histidina, formando um intermediário tetraédrico. Ao estabilizar as cargas, um fragmento da molécula será rompido, liberando um álcool como grupo abandonador. Em seguida,

a amina de interesse irá interagir com o novo intermediário formado, de modo que R_2 pode variar de acordo com o produto final desejado, mesmo que sempre tenha necessariamente um componente aromático. O nitrogênio da amina primária irá então formar uma ligação com a carbonila adicionada na terminação da cisteína, formando novamente um novo intermediário tetraédrico. Por fim, as ligações e interações existentes enzima-substrato serão desfeitas e o produto desejado é formado¹⁶.

A partir do estudo do mecanismo de reação, é possível atribuir o maior rendimento de reação quando utilizado o acetato de vinila como doador de acila em relação ao acetato de etila. Esse fato é justificado por conta do grupo vinila ser um grupo abandonador mais estável do que a etila, logo a estabilidade de R_1 interfere no rendimento final.

Figura 11: Mecanismo de reação da síntese biocatalítica da melatonina

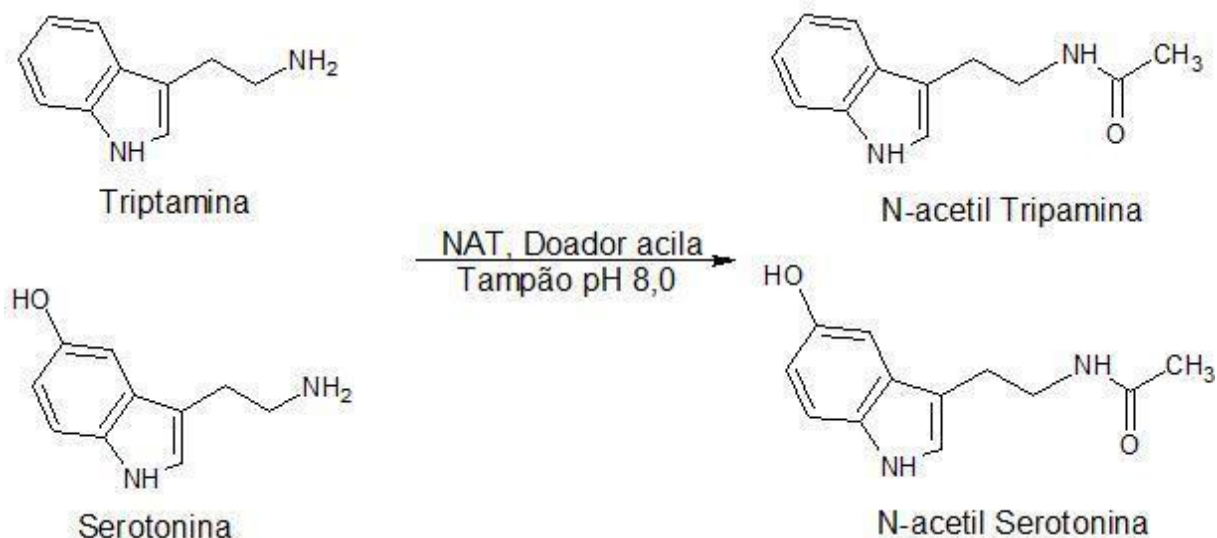


Fonte: Adaptado de Sim *et al.* (SIM *et al.*, 2012)

3.6. Síntese de análogos

Para a verificação da robustez dessa metodologia sintética, foi proposta a síntese de análogos da melatonina sob as mesmas condições otimizadas anteriormente.

Esquema 5: Síntese proposta dos análogos da melatonina

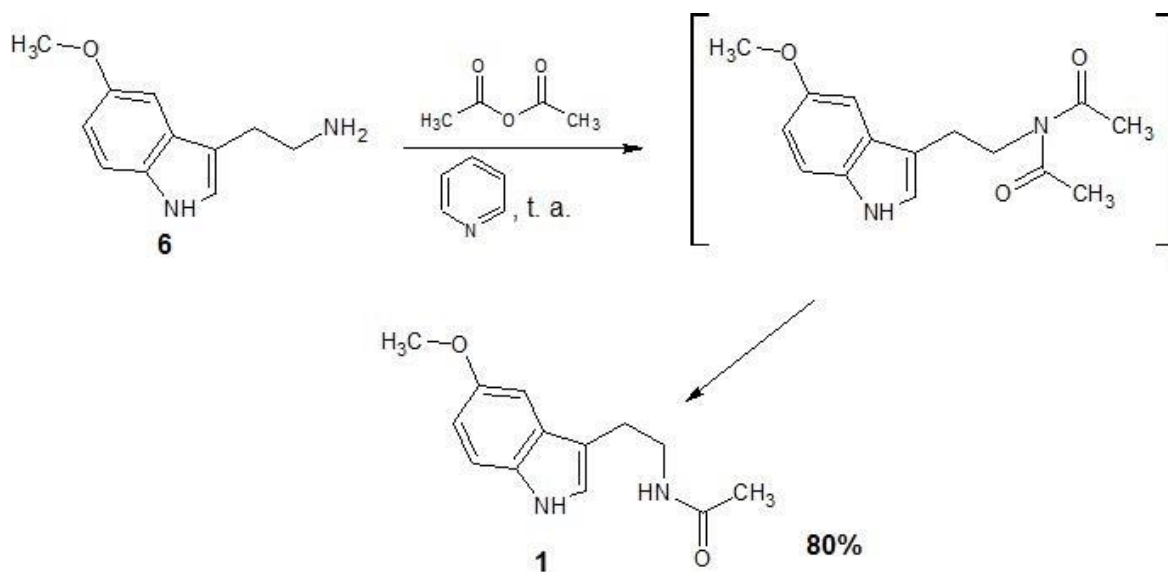


Fonte: Adaptado de CONTENTE *et al.*, 2019

O rendimento obtido na síntese da *N*-acetil triptamina e da *N*-acetil serotonina foi de 70% e 60% quando utilizado EtOAc, respectivamente, e 95% e 89% quando utilizado VinilOAc. Dessa forma, pode-se concluir que, mesmo na síntese de análogos, o acetato de vinila apresenta melhores resultados.

3.7. Síntese química de melatonina a partir da 5-metoxitriptamina

Considerando os dois exemplos de síntese já previamente apresentados, é possível também adotar uma rota sintética diferente, porém tendo como material de partida o mesmo reagente da rota biocatalítica, a 5-metoxitriptamina²⁰ (**Esquema 6**).

Esquema 6: Exemplo de síntese química de melatonina a partir da 5-metoxitriptamina

Fonte: Adaptado de HUGEL *et al.*, 1995

A síntese de modo geral possui um bom rendimento, cerca de 80%, porém considerando a toxicidade e os perigos de seus reagentes, esse método de produção é menos indicado considerando os preceitos da química verde, visto que a piridina é facilmente inflamável e nociva quando ingerida, inalada ou em contato com a pele; enquanto que o anidrido acético é prejudicial para a saúde de animais aquáticos e outros de pequeno porte. Portanto a rota mais indicada permanece sendo a biocatalítica.

4. CONCLUSÕES

A melatonina é uma molécula de grande importância no âmbito biológico. Ao longo dos anos muito foi descoberto a seu respeito e apenas recentemente esse composto químico recebeu sua devida atenção com o avanço das pesquisas científicas. Com o crescimento do interesse farmacológico, uma diversidade de sínteses foram criadas para suprir a demanda existente no mercado de melatonina, variando desde reações de Fischer e adições radicalares, até reações de substituição e, ao passo em que as pautas de química verde ganharam destaque, foram necessárias novas estratégias para as sínteses previamente existentes.

Foi possível comparar a síntese industrial e a biocatalítica, sendo a segunda uma grande aliada ao meio ambiente, por conta das condições brandas reacionais e a redução do uso de reagentes tóxicos, assim como também o baixo tempo de reação, enquanto que a síntese industrial possui muitas etapas, baixo rendimento e utiliza reagentes nocivos para o ambiente. A permanência da estrutura tridimensional da enzima utilizada, a *N*-acetiltransferase, juntamente com sua resistência a variação de temperatura e a retenção de atividade enzimática mesmo armazenada por mais de duas semanas corroboram para o uso da metodologia enzimática.

Conclui-se, também, que a realização da síntese em um reator de fluxo contínuo contribui para o alto rendimento obtido, além de permitir a reutilização da enzima. O uso do acetato de vinila fornece maiores valores de rendimento quando comparado com o acetato de etila, em decorrência da melhor estabilidade do grupo abandonador quando analisado os mecanismos da reação de acetilação em questão.

Por fim, pode-se afirmar que as condições alcançadas para a síntese de melatonina são aplicáveis, também, quando deseja-se sintetizar compostos análogos, mostrando-se como uma possibilidade nova a ser adotada pela indústria para sintetizar essas espécies químicas de modo sustentável e eficiente.

5. REFERÊNCIAS

- 1 WANG, SY.; SHI, XC.; LABORDA, P. Indole-based melatonin analogues: Synthetic approaches and biological activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 185, p. 1-49, 2020.
- 2 CHRUSTEK, A.; OLSZEWSKA-SLONINA, D. Melatonin as a powerful antioxidant. **Acta Pharmaceutica**, v. 71, p. 335-354, 2020.
- 3 LALANNE, S.; FOUGEROU-LEURENT, C.; ANDERSON, G. M.; SCHRODER, C. M.; NIR, T.; CHOKRON, S.; DELORME, R.; CLAUSTRAT, B.; BELLISSANT, E.; KERMARREC, S.; FRANCO, P.; DENIS, L.; TORDJMAN, S. Melatonin: From Pharmacokinetics to Clinical Use in Autism Spectrum Disorder. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, p. 1-21, 2021.
- 4 TAN, DX.; MANCHESTER, L. C.; ESTEBAN-ZUBERO, E.; ZHOU, Z.; REITER, R. J. Melatonin as a Potent and Inducible Endogenous Antioxidant: Synthesis and Metabolism. **Molecules**, v. 20, p. 18886-18906, 2015.
- 5 ETTAOUSSI, M.; PÉRÈS, B.; ERRAZANI, A.; BOUTIN, J. A.; CAIGNARD, D.; DELAGRANGE, P.; MELNYK, P.; BERTHELOT, P.; YOUS, S. Synthesis and pharmacological evaluation of dual ligands for melatonin (MT1/MT2) and serotonin 5-HT2C receptor subtypes (II). **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 90, p. 822-833, 2015.
- 6 WANG, SY.; SHI, XC.; WANG, R.; WANG, HL.; LIU, FQ.; LABORDA, P. Melatonin in fruit production and postharvest preservation: A review. **Food Chemistry**, v. 320, p. 1-9, 2020.
- 7 VELKOV, Z. A.; VELKOV, Y. Z.; GALUNSKA, B. T.; PASKALEV, D. N.; TADJER, A. V. Melatonin: Quantum-chemical and biochemical investigation of antioxidant activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 2834-2839, 2009.
- 8 WANG, J.; WANG, Z. Role of melatonin in Alzheimer-like neurodegeneration. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 27, p. 41-49, 2006.

- 9 FITZGERALD, L. R.; REED, J. E. Melatonin Agonists for the Treatment of Sleep Disorders and Major Depression. **Annual Reports in Medicinal Chemistry**, v. 39, p. 1-13, 2004.
- 10 FERNANDES, P. A.; KINKER, G. S.; NAVARRO, B. V.; JARDIM, V. C.; RIBEIRO-PAZ, E. D.; CÓRDOBA-MORENO, M. O.; SANTOS-SILVA, D.; MUXEL, S. M.; FUJITA, A.; NAKAYA, H. I.; BUCKERIDGE, M. S.; MARKUS, R. P. Melatonin-Index as a biomarker for predicting the distribution of presymptomatic and asymptomatic SARS-CoV-2 carriers. **Melatonin Research**, v. 4, p. 189-205, 2021.
- 11 Saúde mental e a pandemia de Covid-19. **Biblioteca Virtual em Saúde**, 2020. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/saude-mental-e-a-pandemia-de-covid-19/>. Acesso em: 07 jul. 2021.
- 12 Anvisa autoriza melatonina na forma de suplemento alimentar. **Gov**, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2021/anvisa-autoriza-a-melatonina-na-forma-de-suplemento-alimentar>. Acesso em: 15 nov. 2021.
- 13 CONTENTE, M. L.; FARRIS, S.; TAMBORINI, L.; MOLINARI, F.; PARADISI, F. Flow-based enzymatic synthesis of melatonin and other high value tryptamine derivatives: a five-minute intensified process. **Green Chemistry**, v. 21, p. 3263-3266, 2019.
- 14 GERMANN, S. M.; JACOBSEN, S. A. B.; SCHNEIDER, K.; HARRISON, S. J.; JENSEN, N. B.; CHEN, X.; STAHLHUT, S. G.; BORODINA, I.; LUO, H.; ZHU, J.; MAURY, J.; FORSTER, J. Glucose-based microbial production of the hormone melatonin in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Journal**, v. 11, p. 717-724, 2016.
- 15 PRABHAKAR, C.; KUMAR, V.; REDDY, M. R.; SARMA, M. R.; REDDY, G. O. Process Research and Development of Melatonin. **Organic Process Research & Development**, v. 3, p. 155-160, 1999.
- 16 SIM, E.; FAKIS, G.; LAURIERI, N.; BOUKOUVALA, S. Arylamine N-Acetyltransferases – from Drug Metabolism and Pharmacogenetics to Identification of Novel Targets for Pharmacological Intervention. **Advances in Pharmacology**, v. 63, p. 169-205, 2012.

- 17 ARROYO, M.; ACEBAL, C.; DE LA MATA, I. Biocatalysis and biotechnology. **Arbor-ciencia Pensamento Y Cultura**, v. 190, 2014.
- 18 KWON, W. H.; RYU, K. H.; HWANG, JA.; KIM, K. H.; LEE, J. H.; SUNG, S. W. Development of batch proportional-integral-derivative controller. **Korean Jornal Of Chemical Engineering**, v. 35, p. 1240-1246, 2018 .
- 19 ARRUDA, M. A. Z.; COLLINS, C. H. Information essential for characterizing a flow-based analytical system. **Química Nova**, v. 28, p. 739-742, 2005.
- 20 HUGEL, H. M.; KENNAWAY, D. J. Synthesis and chemistry of melatonin and of related compounds. A review. **Organic Preparations and Procedures International: The New Journal for Organic Synthesis**, v. 27, p. 1-31, 1995.
- 21 MINCHIN, R. F.; HANNA, P. E.; DUPRET, JM.; WAGNER, C. R.; RODRIGUES-LIMA, F.; BUTCHER, N. J. Arylamine *N*-acetyltransferase I. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 1999-2005, 2007.
- 22 MERCK, (Alemanha). **Brazil | Sigma-Aldrich**. [S. I.], 2021. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/search/etyl-acetate?focus=products&page=1&perPage=30&sort=relevance&term=etyl%20acetate&type=product>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- 23 MERCK, (Alemanha). **Brazil | Sigma-Aldrich**. [S. I.], 2021. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/search/vinyl-acetate?focus=products&page=1&perPage=30&sort=relevance&term=vinyl%20acetate&type=product>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- 24 LAND, H.; HENDIL-FORSSELL, P.; MARTINELLE, M.; BERGLUND, P. One-pot biocatalytic amine transaminase/acyltransferase cascade for aqueous formation of amides from aldehydes or ketones. **Catalysis Science & Technology**, v. 6, p. 2897-2900, 2016.
- 25 GUISAN, J. M. **Immobilization of Enzymes and Cells**. 2. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2006.
- 26 MERCK, (Alemanha). **Brazil | Sigma-Aldrich**. [S. I.], 2021. Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/aldrich/b62404?gclid=Cj0KCQiA-qGNBhD3ARIsAO_o7ylxKFpdW8rQ3VuINdrKEu8AS0CD8IZvxFIDQcCpFeT9t_88gJ

EliGgaAttXEALw_wcBqGNBhD3ARIsAO_o7ylxKFpdW8rQ3VuINdrKEu8AS0CD8IZv
xFIDQcCpFeT9t_88gJEliGgaAttXEALw_wcB. Acesso em: 8 nov. 2021.