



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0607207-0 B1



(22) Data do Depósito: 11/01/2006

(45) Data de Concessão: 13/10/2021

(54) Título: MÉTODO PARA TRIAR COMPOSTOS E COMPOSTO PARA EVITAR MAU ODOR NO SUOR TENDO A CAPACIDADE DE REDUZIR O DESENVOLVIMENTO DE MAU ODOR E PARA METABOLIZAR UM COMPOSTO SOB CONDIÇÕES CONTROLADAS

(51) Int.Cl.: C07K 5/06; C07C 229/08; C07C 229/30; C07C 229/12; C12Q 1/02; (...).

(30) Prioridade Unionista: 31/01/2005 US 60/647777; 31/01/2005 EP 05100619.5.

(73) Titular(es): FIRMENICH S.A..

(72) Inventor(es): CHRISTIAN STARKENMANN; MYRIAM TROCCAZ; YVAN NICLASS; ANTHONY CLARK.

(86) Pedido PCT: PCT IB2006050098 de 11/01/2006

(87) Publicação PCT: WO 2006/079934 de 03/08/2006

(85) Data do Início da Fase Nacional: 30/07/2007

(57) Resumo: MÉTODO PARA TRIAR COMPOSTOS, COMPOSTO, USO DE BACTÉRIAS DA FAMÍLIA STAPHYLOCOCCI, MICROORGANISMOS, MÉTODOS PARA EVITAR MAU ODOR NO SUOR, PARA PREPARAR UM PRODUTO TENDO A CAPACIDADE DE REDUZIR O DESENVOLVIMENTO DE MAU ODOR E PARA METABOLIZAR UM COMPOSTO SOB CONDIÇÕES CONTROLADAS. A invenção refere-se a um método para triar compostos tendo a capacidade de evitar, tratar ou reduzir o desenvolvimento de mau odor em superfícies do corpo. Em particular, o método permite triar de maneira eficiente um composto tendo a capacidade de evitar o desenvolvimento de mau odor causado por compostos de enxofre voláteis (VSCs). A presente invenção é baseada na verificação do precursor direto de VSCs naturais, que está presente no suor de um humano e que vai ser metabolizado por staphylococci para VSCs.

**MÉTODO PARA TRIAR COMPOSTOS E COMPOSTO PARA EVITAR MAU
ODOR NO SUOR TENDO A CAPACIDADE DE REDUZIR O
DESENVOLVIMENTO DE MAU ODOR E PARA METABOLIZAR UM COMPOSTO
5 SOB CONDIÇÕES CONTROLADAS**

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um método para a triagem de compostos tendo a capacidade de evitar ou reduzir o desenvolvimento de mal odor em superfícies de corpos. A presente invenção também se refere a um composto de
10 formula (I), que é um precursor de compostos de enxofre voláteis malcheirosos. Em adição, a presente invenção refere-se a métodos para evitar mau odor e a métodos para preparar produtos tendo a capacidade de reduzir o desenvolvimento de mal odor.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO E PROBLEMA A SER SOLUCIONADO

15 A prevenção de mau odor axilar é um objetivo constante de emprenho científico. Foi reconhecido algumas vezes que suor, por si só, como é excretado da glândula sudorípara de apócrina abundantemente presente na pele debaixo do braço, é geralmente inodoro. O mau odor axilar se desenvolve essencialmente na atividade metabólica de certas cepas de bactérias que se procriam para viver neste ambiente
20 e que são bem adaptadas para crescer no coquetel peculiar de precursores inodoros encontrados em suor de apócrina.

Várias classes de substâncias malcheirosas foram isoladas, uma das quais é de origem esteroídica, outra classe engloba compostos de degradação bacteriana: ácidos graxos de cadeia curta como ácido (E/Z)-3-metil-2-hexenoico, descrito como
25 um constituinte de olfato predominante do mau odor do suor.

Uma terceira classe de compostos de enxofre foi verificada recentemente e foi descrita independentemente na WO 200403766, em Troccaz *et al.*, "3-Methyl-3-sulfanylhexas-1-ol as a Major Descriptor for the Human Axilla-Sweat Odour Profile" Chemistry & Biodiversity, Vol. 1 (2004); e em Natsch *et al.*, "Identification of Odoriferous Sulfanylalkanols in Human Axilla Secretions and Their Formation through Cleavage of Cysteine Precursors by a C-S Lyase Isolated from Axilla Bacteria", Chemistry & Biodiversity, Vol. 1 (2004).

Um espécime particularmente malcheiroso da classe de compostos de enxofre foi verificado ser 3-metil-3-sulfanil-hexan-1-ol (Troccaz *et al.*, seguido por Natsch *et al.* e Hasegawa *et al.* "Identification of New Odoriferous Compounds in Human Axillary Sweat" Chemistry and Biodiversity Vol. 1 (2004) 2042-50). O mesmo composto é também descrito na Patente U.S. 6.610.346, onde ele é usado como um flavor em alimentos e bebidas para fornecer notas de vegetais cozidos (cebola) e de alimentos para produtos alimentícios.

Hoje, o desenvolvimento de mau odor tem sido atacado de diferentes formas, por exemplo, pela aplicação de substâncias antibactericidas na pele das axilas, pelo fornecimento de composições de perfume capazes de mascarar mau odor, pelo aprisionamento de moléculas malcheirosas, por exemplo, pela aplicação de ciclodextrina, para inibir β -liases, por exemplo.

Com o objetivo de evitar a formação de compostos de enxofre voláteis (VSCs) como, por exemplo, S-3-metil-3-sulfanil-hexan-1-ol, é indispensável se elucidar sua via metabólica, e, em particular, seu precursor direto. Tal discernimento permitiria projetar a triagem para compostos tendo a capacidade de intervir na via e assim inibir a formação do VSC.

Com isso, Natsch *et al.* especularam que o conjugado de cisteína de VSCs (Cis-S-3-metil-3-sulfanil-hexan-1-ol) foi o precursor direto para VSCs e que a clivagem do precursor por uma C-S β -liase presente em

Corynebacterium spp. produziria diretamente o VSC.

Similarmente, *Lyon et al.* (US 5,213,791), descrevendo inibidores de β -liase de aminoácido como desodorantes, considerou que o conjugado Cis-S foi o precursor mais relevante na col. 2, linha 5-6. Esta verificação corresponde à via bem relatada de tióis e metabólitos de tiometil começando com conjugados de glutatona, que se submete à hidrólise enzimática seqüencial para produzir o tioéter de cisteína.

Um outro objetivo da presente invenção é identificar a espécie ou a cepa das bactérias, que são capazes de converter precursores não-odoríferos de suor humano em VSCs malcheirosos, permitindo um alveijamento mais preciso da origem do desenvolvimento de mau odor.

Com isso, *Natsch et al.* concluíram que precursores não-odoríferos de secreções axilares são transformados em substâncias voláteis por enzimas bacterianas presentes somente em *Corynebacterium spp.* e não em *staphylococci*.

Em vista da técnica anterior, o objetivo da presente invenção é encontrar outros precursores diretos de compostos de enxofre voláteis responsáveis por mau odor nas axilas. É um outro objetivo identificar outras cepas bacterianas responsáveis pela produção de compostos de enxofre voláteis. O conhecimento de precursores e cepas bacterianas na origem de compostos malcheirosos pode então ser usado para combater mais efetivamente o desenvolvimento de mau odor axilar em humanos, por exemplo, pelo fornecimento de métodos de triagem efetivos para compostos que inibem a formação de VSCs. Portanto, é um outro objetivo da presente invenção fornecer novos métodos ou formas para evitar o desenvolvimento de mau odor.

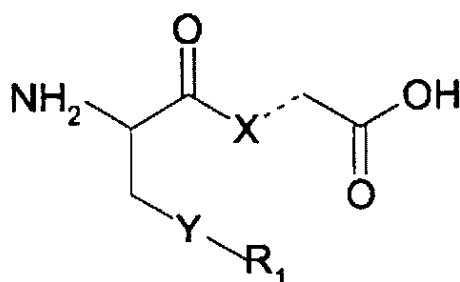
SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Os inventores da presente invenção verificaram, surpreendentemente, que o precursor direto de compostos de enxofre voláteis

(VSCs) é o conjugado de S de Cisteína-Glicina, e que o conjugado de Cisteína relatado da técnica anterior foi um precursor claramente menos eficiente de VSCs. Em outro contraste com o ensinamento da técnica anterior, as cepas de *Staphylococcus haemolyticus* são capazes de converter o conjugado Cys-Gly em VSCs com maior eficiência do que as cepas de *Corynebacterium* e *St. epidermidis*, todas verificadas nas axilas humanas. Com isso, a presente invenção fornece, em um primeiro aspecto, um método para triar compostos tendo a capacidade de evitar, tratar ou reduzir o desenvolvimento de mau odor em superfícies do corpo, o método compreendendo as etapas de:

- fornecer um meio compreendendo um composto a ser triado,
- adicionar ao meio pelo menos um composto precursor da fórmula (I),
- determinar o aumento de pelo menos um metabólito do precursor, e/ou o desaparecimento do precursor, e
- concluir, a partir da capacidade do composto de evitar o aumento de um metabólito do precursor, ou de evitar o desaparecimento dos precursores, a capacidade do composto de evitar o tratar o desenvolvimento de mau odor.

Em um segundo aspecto, a presente invenção fornece um composto da fórmula (I)



(I)

em que -Y define uma função de saída e -R₁ representa um resíduo C₁-C₂₀ para um composto ativo da fórmula HY-R₁, ou, em que Y-R₁ é OH ou SH, e

em que a linha tracejada representa uma ligação dupla, em

cujo caso X é selecionado dentre CR_4 e N, ou

em que a linha tracejada representa uma ligação simples, em cujo caso X é selecionado dentre NR_4 , CR_4R_5 , O e S, com R_4 e R_5 sendo, independentemente um do outro, selecionados dentre H e resíduos C_1-C_{10} alquil, alquenil ou alquinil.

Em um terceiro aspecto, a presente invenção fornece o uso de bactérias da família *Staphylococci* em métodos de triagem, ensaios ou métodos de pesquisa de desenvolvimento, inibição e/ou ocorrência de mau odor no corpo. De forma correspondente, a presente invenção fornece um método para elucidar o desenvolvimento de mau odor no corpo, o método compreendendo a etapa de aplicar *Staphylococci*, ou uma enzima derivada dele, a um composto precursor de mau odor.

Em um quarto aspecto, a presente invenção fornece os microorganismos *Staphylococcus haemolyticus* e *St. epidermidis* com números de depósito CNCM I-3357 e I-3356, respectivamente.

Em um quinto aspecto, a presente invenção fornece um método para evitar mau odor do suor, e o método compreendendo a etapa de aplicar a uma superfície do corpo, preferivelmente à pele das axilas, um composto capaz de inibir a conversão do composto (I) com $X = NH$, a linha tracejada sendo uma ligação simples, $Y = S$ e R_1 sendo um resíduo de C_4-C_{10} alquil portando um grupo hidroxila a um composto de enxofre volátil.

Em um sexto aspecto, a presente invenção fornece um método para preparar um produto tendo a capacidade de reduzir o desenvolvimento de mau odor, compreendendo a etapa de adicionar ao produto um composto capaz de inibir a conversão do composto (I) como definido acima (quinto aspecto) para um VSC.

Em um outro aspecto, a presente invenção fornece um método para metabolizar um composto da fórmula (I) sob condições controladas, o método compreendendo a etapa de expor o composto da fórmula (I) a um

microorganismo e/ou a um β -liase.

Em ainda outro aspecto, a presente invenção fornece um composto da fórmula (III) dada abaixo.

Nas figuras:

5 A Figura 1 mostra uma faixa de massa de HPLC-MS (Cromatografia Líquida de Alta Performance - Cromatogramas de Íon Total de Espectrometria de Massa) obtida de suor estéril (traço A) e frações de eluição diferentes de suor incubadas com *St. haemolyticus* (traço D) e não incubadas (traços B e C). Este cromatograma mostra o desaparecimento de
10 um composto precursor putativo tendo uma massa molecular de 293 após a incubação.

A Figura 2 mostra compostos de enxofre voláteis malcheirosos (1,2,3) e compostos precursores putativos (9, 10, 11), o composto 9 se transformou no precursor mais eficiente para o composto 1. As setas indicam
15 as etapas de síntese de precursores.

A Figura 3 mostra cromatogramas e espectros de massa obtidos por LC-MS do precursor encontrado na "zona 2" de suor estéril natural (A, B), e do precursor sintetizado 9 (CD).

A Figura 4 mostra a bioconversão dos compostos precursores
20 sintéticos 9 e 10 dos VCSs malcheirosos por cepas bacterianas de *St. haemolyticus*, *St. epiderrnidis* e *C. xerosis*. Pode ser visto que o precursor da presente invenção (9) foi eficientemente convertido por todas as cepas.

A Figura 5 mostra o sumário de vias sintéticas para um VSC maior (1) de precursores de suor estéreis. O composto (9) é uma forma de
25 realização do precursor a ser usado no método de triagem da presente invenção.

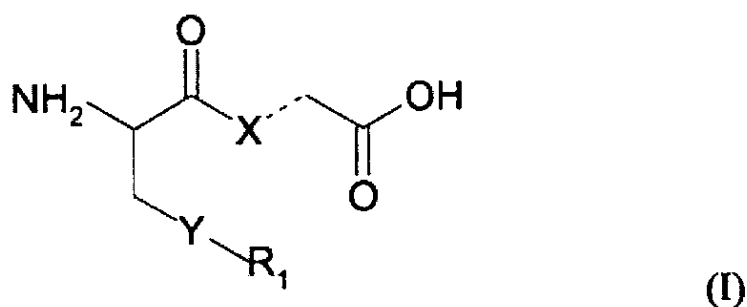
DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Dentro do contexto deste relatório, a palavra "compreende" deve significar "incluir, dentre outras coisas". Ela não deve ser vista como

"consiste somente de".

No contexto da presente invenção, as percentagens são percentagens em peso de matéria seca, a não ser que de outra forma estabelecido. Similarmente, se as proporções forem indicadas como partes, significa que são partes em peso de matéria seca.

A presente invenção fornece um composto precursor da fórmula (I)



em que -Y define uma função de saída e -R₁ representa um resíduo C₁-C₂₀ para um composto ativo da fórmula HY-R₁, ou em que -Y-R₁ é OH ou SH, e

- em que a linha tracejada representa uma ligação dupla, em cujo caso X é selecionado dentre CR₄, e N, ou,

- em que a linha tracejada representa uma ligação simples, em cujo caso X é selecionado dentre NR₄, CR₄R₅, O e S, com R₄ e R₅ sendo, independentemente um do outro, selecionados dentre H e resíduos C₁-C₁₀ alquil, alquenil ou alquinil.

O termo composto ativo para HY-R₁ se refere a um composto orgânico que pode ser usando nos métodos de triagem. Por exemplo, ele é um composto que pode ser facilmente detectado. Preferivelmente, HY-R₁ é um composto odorante. Alternativamente, HY-R₁ pode ser um composto fluorescente. Geralmente, HY-R₁ pode ser um composto que tem a qualidade de um marcador, por exemplo, em que ele tem diferentes propriedades físicas e químicas em relação ao composto (I), que podem facilmente ser quantificadas, por exemplo, por absorbância ou fluorescência, por exemplo. A

quantificação pode geralmente ser feita por ensaios espectrofotométricos para triagem de alta produção.

Preferivelmente, a função de saída -Y- é selecionada do grupo que consiste de S, O, NR_2 , $\text{N}^+\text{R}_2\text{R}_3$, OCO . Se -Y- for $\text{N}^+\text{R}_2\text{R}_3$, R_1 preferivelmente carrega uma carga negativa.

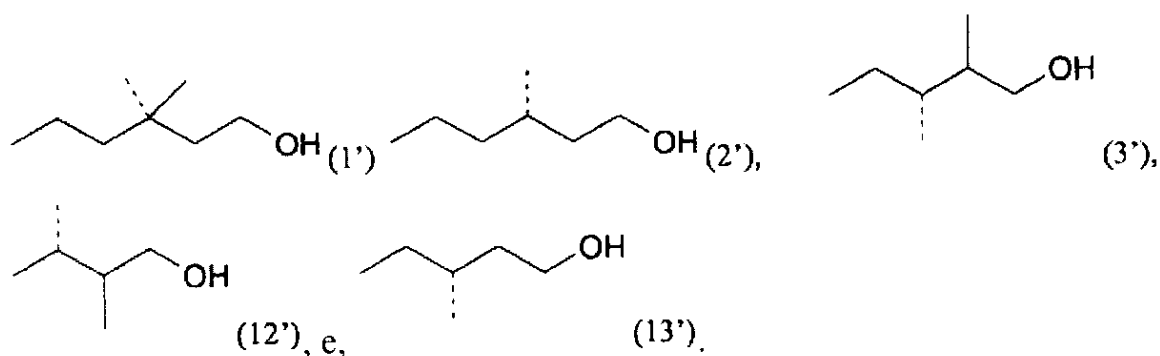
Mais preferivelmente, -Y- é selecionado dentre S e O, mais preferivelmente, ele é S.

Em uma forma de realização da presente invenção, R_1 é um composto de C_1 - C_{20} alquil, alquenil ou alquinil, opcionalmente portando um ou mais grupos funcionais selecionados dentre grupos hidróxi, carbonila, carboxila, amino, amida e átomos de halogênio.

Mais preferivelmente, R_1 é um resíduo orgânico C_3 - C_{16} , mais preferivelmente ele é um resíduo orgânico C_{5-10} .

Preferivelmente, R_1 é um alquil ou alquenil orgânico C_3 - C_{16} portando pelo menos um grupo funcional selecionado dentre o grupo de hidróxi, carbonila e carboxila. Mais preferivelmente, R_1 carrega um grupo hidróxi.

Preferivelmente, R_1 é selecionado do grupo que consiste dos compostos:



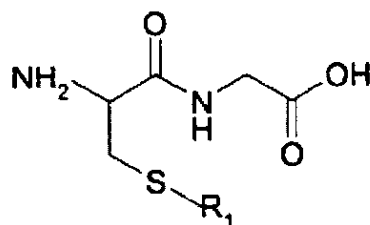
Os precursores com os resíduos acima $\text{R}_1 = 1', 2'$ ou $3'$, e $\text{Y} = \text{S}$ vão liberar, em atividade enzimática, VSCs correspondentes (1), (2), (3), ver Figura 2. Respectivamente, os precursores com os resíduos (12') e (13') vão liberar VSC em que a linha tracejada é substituída por uma ligação -S.

Preferivelmente, a linha tracejada na fórmula (I) representa

uma ligação simples com X selecionado dentre O, S, NR₄, CR₄R₅, com R₄ e R₅ sendo selecionados dentre S e O. Mais preferivelmente, X é selecionado dentre NH e CH₂. Mais preferivelmente, X é NH e Y é S.

Preferivelmente, no composto (I) acima, a linha tracejada representa uma ligação simples, Y é selecionado dentre O e S, e R₁ é um grupo C₃-C₁₆ alquil que porta um ou mais grupos funcionais selecionados dentre um grupo hidróxi, carbóxi e carbonila.

Portanto, em uma forma de realização preferida, o composto precursor da fórmula (I) corresponde ao composto da fórmula (I') abaixo:



(I')

em que R₁ é como definido acima para o composto (I).

O composto (I'), juntamente com os resíduos R₁ = (1'), (2'), (3'), (4'), (12'), ou (13'), corresponde ao precursor mais eficiente de VSCs encontrados em suor axilar, como os presentes inventores estabeleceram. Com base nesta verificação surpreendente, um método de triagem efetivo pode ser estabelecido.

Uma forma de realização preferida do precursor pode ser sintetizada após o esquema dado na Figura 2. Geralmente, em uma primeira etapa, cisteína protegida com N (N-Boc) pode ser adicionada pela adição 1,4 a um aldeído α,β -insaturado. A estrutura do aldeído é preferivelmente relacionada com o VCS correspondente, como descrito por *Natsch et al* (2004), esquema 1. Com isso, se hex-2-enal for selecionado como o aldeído α,β -insaturado inicial, um precursor da fórmula (I) com R = (2') acima é obtido. Em uma forma similar, para se obter um precursor com R = (1'), o precursor é sintetizado a partir de 3-metil-hex-2-enal. O conjugado cis pode ser diretamente obtido após a desproteção com TFA (ácido trifluoroacético),

preferivelmente em um solvente apropriado, por exemplo, CH_2Cl_2 .

Em uma outra etapa, Glicina pode ser acoplada ao conjugado de Cisteína protegido obtido acima (por exemplo, conjugado Boc-L-Cys). Esta etapa pode ser realizada com H-Gly-OBz ($\text{Bz} = -\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$) em CH_2Cl_2 na presença de Benztiazol-1-il-oxitripirridolidinofosfônio (PyBOP) e diisopropilamina (DIPEA) em condições padrão para a síntese de peptídeo (Troccaz et al. (2004)).

Em uma outra etapa, o grupo de proteção α -amino pode ser removido, por exemplo, em condições de CH_2Cl_2 e TFA.

Em ainda outra etapa, o grupo protetor de benzoíla pode ser removido por saponificação em água, etanol e hidróxido de sódio 2%, por exemplo, de forma a se obterem compostos da fórmula (I).

Os precursores de acordo com a presente invenção vão, na clivagem da ligação C-Y, liberar o composto da fórmula (II) abaixo



em que R_1 e Y são definidos acima para o composto (I).

Preferivelmente, o composto (II) é um VSC malcheiroso da fórmula SH-R_2 . A síntese dos compostos desta fórmula foi descrita por Troccaz et al. (2004), que é totalmente incorporada aqui como referência.

O método de triagem da presente invenção tem o propósito de determinar em uma maneira eficiente se um composto particular tem a capacidade de evitar, tratar ou reduzir o desenvolvimento de mau odor em superfícies do corpo. Em particular, o desenvolvimento de mau odor nas superfícies do corpo se refere a maus odores ligados a excreções de glândulas sudoríparas de humanos ou de animais. Em superfícies corpóreas, e especialmente nas axilas de humanos, estas excreções são expostas a uma flora diversa de microorganismos que metabolizam precursores não-odoríferos em compostos voláteis geralmente referidos como de mau odor ou

desagradáveis. Portanto, o termo "superfícies do corpo" geralmente se refere a partes da pele que contêm glândulas de excreção de suor, e especialmente à região das axilas de um humano. A capacidade de se evitar, tratar ou reduzir refere-se à capacidade de um dado composto de inibir de qualquer forma a ocorrência de mau odor. Por exemplo, esta capacidade pode consistir de simplesmente parar a outra liberação de mau odor que já tenha se desenvolvido fortemente, ou pode evitar mau odor desde o começo, por exemplo.

O termo mau odor se refere geralmente a mau odor associado com compostos voláteis produzidos na atividade microbiana no suor. Preferivelmente, no contexto da presente invenção, o termo mau odor se refere aos odores de compostos de enxofre voláteis (VSCs), que é geralmente referido como desagradável.

O método para triagem da presente invenção compreende a etapa de fornecer um meio compreendendo um composto a ser triado.

Principalmente, o meio pode ser qualquer líquido em que a reação enzimática pode ocorrer. Por exemplo, o meio pode simplesmente consistir de suor líquido coletado de indivíduos humanos ou animais. Mais praticamente, o meio é uma solução aquosa, opcionalmente compreendendo tampões e/ou nutrientes que suportam uma atividade metabólica rápida das enzimas ou sistemas biológicos do método de triagem.

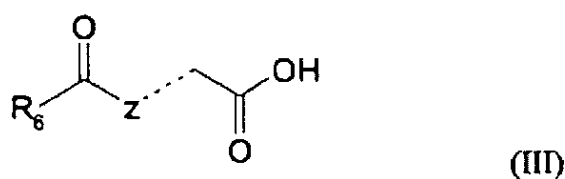
Dependendo do modo, a reação enzimática é controlada, um meio adequado pode ser selecionado. Por exemplo, se a reação enzimática for designada para ser realizada por um microorganismo, um meio permitindo viabilidade ou ainda crescimento do microorganismo deve ser selecionado. O tampão de fosfato, por exemplo, permite a sobrevivência de microorganismos, mas não contém qualquer outro nutriente e é, assim, um meio preferido para o método de triagem da presente invenção. Preferivelmente, 0,001 - 1 M, mais preferivelmente 0,05 - 0,5 M de tampão de fosfato é usado.

Preferivelmente, o pH do meio está na faixa de 3 - 9, mais preferivelmente 4 - 8, mais preferivelmente 5 - 7,5.

Se, por outro lado, for usada uma enzima isolada para catalisar a reação enzimática, o meio pode ser selecionado ou ajustado para permitir a atividade enzimática em dependência das preferências de enzimas. As variáveis típicas para ajustar uma solução para as condições ótimas para uma enzima incluem temperatura, pH, presença ou ausência de sais, BSA, agentes de tamponamento, EDTA, e outros, por exemplo.

Um composto a ser triado é adicionado ao meio. O composto a ser triado quanto à sua capacidade de evitar o desenvolvimento de mau odor pode ser aleatoriamente selecionado por alguém versado na técnica, ou pode ser selecionado de acordo com o critério estrutural, por exemplo. Inibidores conhecidos de β -liases são candidatos preferidos de compostos a serem triados. Surpreendentemente, contudo, *Staphylococcus* não é relatado para ter uma β -liase tendo similaridade significativa com β -liases conhecidas, e outros compostos podem assim provar que são inibidores eficientes.

Em uma forma de realização da presente invenção, o composto a ser triado é um composto da fórmula (III) abaixo:



em que R_6 é um resíduo de alquil, alquenil, alquinil ou aril linear, ramificado ou cíclico $\text{C}_2\text{-C}_{20}$, opcionalmente substituído ou opcionalmente compreendendo um ou mais heteroátomos, e

- em que a linha tracejada representa uma ligação dupla, em cujo caso Z é selecionado dentre CR_7 e N, ou

- em que a linha tracejada representa uma ligação simples, em cujo caso Z é selecionado dentre NR_7 , CR_7R_8 , O e S, com R_7 e R_8 sendo, independentemente um do outro, selecionado dentre H e resíduos $\text{C}_1\text{-C}_{10}$

alquil, alquenil e alquinil.

Preferivelmente, R_4 , se substituído, é substituído com um resíduo de alquil, alquenil, alquinil ou aril linear, ramificado ou cíclico C_1 - C_{10} , opcionalmente compreendendo um ou mais heteroátomos. Mais preferivelmente, R_6 , se substituído, é substituído com um grupo alquil, alcoxil, amina, álcool, tiol, carboxila, e/ou hidroxilamina, por exemplo.

Preferivelmente, o pelo menos um heteroátomo é selecionado dentre N, O, S, F, Cl, Br, I.

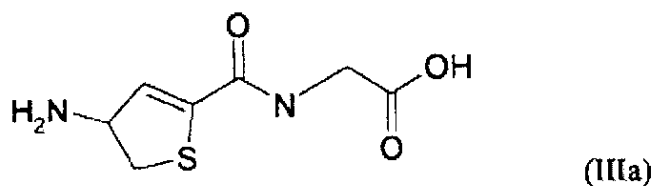
Preferivelmente, R_6 porta pelo menos um grupo amino.

Preferivelmente, R_6 é um resíduo de alquil, alquenil, alquinil ou aril linear, ramificado ou cíclico C_2 - C_{10} , opcionalmente compreendendo um ou mais heteroátomos.

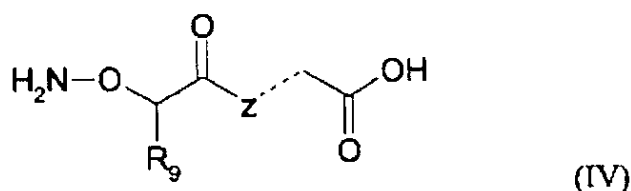
Preferivelmente, R_6 é um anel com 5 ou 6 membros opcionalmente substituído compreendendo um heteroátomo selecionado dentre O, N e S. Mais preferivelmente, R_6 é um anel com 5 ou 6 membros compreendendo S.

Preferivelmente, R_6 compreende um anel com 5 membros substituído com pelo menos um grupo amino.

De acordo com uma forma de realização preferida, o composto a ser triado tem a fórmula (IIIa)



Preferivelmente, R_6 é uma oxima linear ou ramificada. Neste caso, o composto a ser triado pode ter a fórmula (IV)



onde R_9 é hidrogênio, fenil ou C_1 - C_8 alquil, que é substituído

ou não substituído por um grupo fenil, um grupo hidróxi, um grupo carbóxi, um grupo benziloxi ou um grupo benziloxicarbonil, um átomo de halogênio ou um grupo amino, e onde Z e a linha tracejada são definidos na fórmula (III) acima.

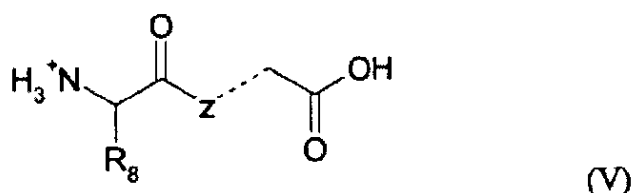
5 Alternativamente, R_6 pode ser um composto C_2-C_{10} ramificado, em que uma ramificação porta um grupo amino.

Por exemplo, a outra ramificação é selecionada dentre alquenil ou alquinil.

10 Como outro exemplo, uma ramificação porta um grupo amino e a outra ramificação é um halogeneto de alquil. Preferivelmente, ele é um halogeneto de alquil com o halogênio selecionado dentre Cl, Br e I.

Como um outro exemplo, a outra ramificação porta um grupo alquil, alquenil ou alquenil sulfonil.

15 Por exemplo, o composto a ser triado pode ser selecionado dentre o composto da fórmula (V) dada abaixo:



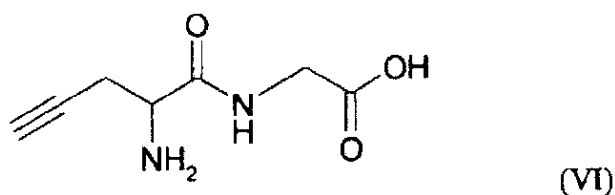
em que Z é definido acima para o composto (III), e R_8 é selecionado dentre o grupo que consiste de:

- um alquenil ou alquinil C_2-C_5 ,
- um halogeneto de alquil, alquenil ou alquinil C_1-C_5 ,
- 20 - um alquil sulfonil da fórmula $-\text{O}-\text{SO}_3-\text{R}_9$, com R_9 sendo selecionado dentre os resíduos de alquil, alquenil ou alquinil C_1-C_5 .

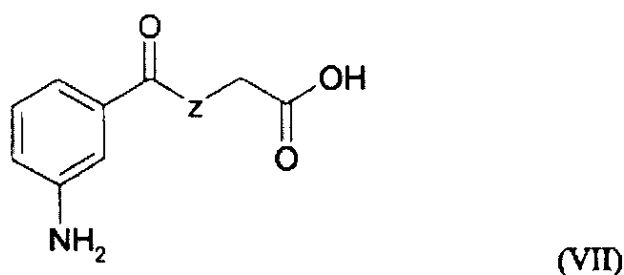
Preferivelmente, a linha tracejada nas fórmulas (III), (IV) e (V) representa uma ligação simples.

25 Preferivelmente, Z é selecionado dentre NR_7 , CR_7R_8 , com R_7 e R_8 sendo definidos na fórmula (III) acima. Mais preferivelmente, Z é selecionado dentre NH e CH_2 . Mais preferivelmente, ele é NH.

Preferivelmente, R_8 na fórmula (V) é um C_2 - C_{65} alquinil. Mais preferivelmente, ele é 2-propinil, fornecendo a fórmula (VI) abaixo:



Alternativamente, o composto a ser triado pode ser:



com Z sendo definido como no parágrafo acima. Na triagem do
 5 composto (VII), com z sendo NH, foi verificado, surpreendentemente, que
 este composto realmente não inibiu a formação de metabólitos como o
 composto II, mas, ao contrário, resultou em um aumento claro e confirmado
 de metabólitos. Isto torna o composto (VII) um composto útil para melhorar a
 produção de mau odor. O composto VII é assim útil como um modulador de
 10 produção de compostos voláteis nas superfícies do corpo ou *in vitro*, por
 exemplo, para testar os compostos potencialmente inibidores sob condições
 mais severas no método de triagem da presente invenção.

O método de triagem da presente invenção compreende a etapa
 de adicionar ao meio pelo menos um composto precursor. O precursor pode
 15 ser selecionado dentre os compostos da fórmula (I) dados acima.

Em uma forma de realização, o método de triagem da presente
 invenção também compreende as etapas de adicionar ao meio pelo menos
 uma cepa bacteriana selecionada dentre taxa *staphylococci*, *corynebacteria* e
bacilli, ou uma preparação compreendendo um β -liase funcional.
 20 Preferivelmente, a cepa é selecionada dentre a família de bactérias de
Staphylococcus spp. e/ou *Corynebacterium spp.* Preferivelmente, a cepa

bacteriana é selecionada dentre a família bacteriana de Staphylococci. Mais preferivelmente, a cepa é selecionada dentre o grupo que consiste de *St. epidermidis*, *St. haemolyticus*, *St. capitis* e *St. homidis*. Ainda mais preferivelmente, a cepa bacteriana é selecionada dentre *St. haemolyticus* e *St. epidermidis*. Mais preferivelmente, a cepa bacteriana é selecionada dentre *St. epidermidis* com número de depósito CNCM I-3357 e *St. haemolyticus* CNCM I-3356.

Como foi mencionado acima, os presentes inventores surpreendentemente verificaram que as cepas de *Staphylococcus* que colonizam a região das axilas de um humano liberam eficientemente VSCs. A técnica anterior é silente nestes aspectos e as cepas de *Staphylococcus* são assim preferivelmente usadas no método de triagem da presente invenção. Por outro lado, os presentes inventores também mostram que as cepas de *Corynebacterium* metabolizam eficientemente o novo composto precursor (I) e podem, assim, ser usadas de forma equivalente no método de triagem da presente invenção.

Preferivelmente, o microorganismo, antes da adição ao meio do método de triagem, é crescido em um meio nutritivo. Por exemplo, para microorganismos dos sexos *Staphylococcus* ou *Corynebacterium*, um caldo *Mueller-Hinton* (Difco) ou um caldo de soja Tríplica (Difco) pode ser usado, preferivelmente suplementado com 0,005 a 0,5% de Tween 80, por exemplo.

Preferivelmente, o microorganismo, antes da sua adição ao meio do método de triagem, é cultivado no meio de crescimento ante que o crescimento esteja exponencialmente aumentando e/ou até que o aumento de biomassa por tempo seja máximo. Preferivelmente, o meio de crescimento compreende $10^{0,5} - 10^{14}$ cfu/ml neste estágio. Depois, ele pode ser removido do meio de redução, opcionalmente lavado, e adicionado ao meio do método de triagem. O último preferivelmente tem poucos ou nenhum nutriente diferente do precursor da presente invenção, incitando, assim, o

microorganismo a metabolizar o precursor.

Alternativamente, o microorganismo pode ser substituído ou suplementado pela enzima funcional capaz de clivar o precursor na substância malcheirosa. A enzima pode se originar de uma preparação de enzima na base de microorganismos, por exemplo, ou pode ser uma enzima isolada. A enzima isolada pode ser obtida por engenharia genética e/ou biotecnologia.

A concentração dos constituintes do método de triagem da presente invenção é preferivelmente adaptada aos níveis que permitam uma quantificação por métodos analíticos padrão, por exemplo. Como VSCs potencialmente liberados do precursor geralmente são detectáveis pelo nariz humano em concentrações baixas, os precursores correspondentes podem ser usados em concentrações correspondentemente baixas.

Geralmente, o composto a ser triado é adicionado pelo menos em concentrações iguais ou superiores às do precursor.

Como um exemplo, o meio do método de triagem preferivelmente compreende 2-500, preferivelmente 3-200, mais preferivelmente 4-100 $\mu\text{mol/l}$, do composto a ser triado.

Preferivelmente, o precursor é adicionado em quantidades geralmente nas mesmas faixas indicadas para o composto a ser triado acima. Para aqueles versados na técnica, a relação do composto a ser triado e do precursor podem estar acima de 1, abaixo de 1 ou igual a 1. Por exemplo, o composto a ser triado pode ser adicionado em excesso.

O microorganismo está preferivelmente presente em quantidades de 10^2 - 10^4 , mais preferivelmente 10^5 - 10^{12} , mais preferivelmente 10^6 - 10^{10} cfu/ml.

No evento em que o microorganismo é substituído por uma preparação de enzima ou por uma enzima isolada, a quantidade de enzima a ser adicionada depende da atividade e da longevidade da enzima. Dependendo destes fatores, a preparação de enzima pode ser adicionada para fornecer

unidades de ação enzimática na faixa de 1-20.000.000.

A ordem na qual os constituintes diferentes do método de triagem são adicionados ao meio do método de triagem em geral não é decisiva, a não ser que o composto a ser triado seja adicionado por último e a atividade enzimática significativa já tenha levado à formação de VSCs ou de outros metabólitos. Portanto, o precursor é preferivelmente adicionado após o composto ser triado, e, mais preferivelmente, o precursor é adicionado após o composto ser triado, e após o microorganismo ou enzima. Para se imitar as condições das axilas, levando à formação de VCSs em suor, o precursor pode ser adicionado de 30 s a 2 horas após a adição do composto a ser triado e o microorganismo ou enzima ao meio.

O método de triagem da presente invenção compreende a etapa de incubar o precursor, um composto a ser triado e um microorganismo ou enzima em uma temperatura de 25 - 45°C, preferivelmente 30 - 40°C por de 1 a 48 horas, mais preferivelmente, por de 4 a 24 horas.

Em uma outra etapa, o método de triagem compreende a etapa de determinar o aumento dos metabólitos do precursor no meio, e/ou o desaparecimento do precursor. A concentração da substância de metabólito ou do precursor no meio pode ser analisada com um equipamento analítico padrão. Por exemplo, Cromatografia de Gás - Espectrômetro de Massa (GC-MS) acoplado a uma Detecção de Emissão Atômica (AED) pode ser empregado. Com isso, os metabólitos, que podem ser VSCs, são preferivelmente extraídos do meio, por exemplo com acetato de etila e injetados em uma coluna GC_{SPBI}. No caso de VSCs, o padrão interno pode ser ocatanotiol, adicionado a acetato de etila em 10 ppm com um volume de injeção de 1 µl, por exemplo.

Outros métodos analíticos podem ser empregados. Devido ao valor de percepção limite relativamente baixo de VSCs, estes metabólitos no meio do método da presente invenção podem ser convenientemente avaliados

por cheirada, por exemplo.

Se o composto precursor contiver um resíduo fluorescente, que se torna fluorescente ou, alternativamente, que perde fluorescência na clivagem do precursor, a concentração ou quantidade do metabólito pode ser determinada pela verificação da força fluorescente do meio após a incubação.

Em uma outra etapa, o método de triagem da presente invenção compreende a etapa de concluir, a partir da capacidade de o composto de evitar o aumento do metabólito ou evitar o desaparecimento dos precursores, da capacidade do composto de evitar ou tratar o desenvolvimento de mau odor. Logicamente, a conclusão de que um composto a ser triado tem a capacidade de evitar o desenvolvimento de mau odor pode ser tirada no caso em que a concentração de metabólitos encontrada no meio após a incubação seja 0 ou menor do que a concentração inicial do precursor adicionado ao meio, por exemplo. Similarmente, se a concentração do precursor permanecer constante durante a incubação do meio do método de triagem, o composto a ser triado tem uma forte capacidade de evitar o desenvolvimento de mau odor.

Opcionalmente, um controle negativo do método de triagem da presente invenção pode ser feito, o qual é desprovido do composto a ser triado mas que, de outra forma, tem os mesmos constituintes nas mesmas concentrações e as mesmas etapas de processo que o método de triagem da presente invenção. A partir do resultado analítico diferente de controle versus método de triagem, alguém versado na técnica pode concluir se o composto a ser triado pode inibir, eficientemente, o desenvolvimento de mau odor.

Os ajustes ou parâmetro experimentais diferentes podem ser considerados, com a consequência de que o resultado analítico (concentração de precursor ou metabólitos) pode ter que ser interpretado de formas diferentes. Contudo, alguém versado na técnica vai adaptar estes ajustes em uma forma tal que uma conclusão clara possa ser encontrada nos resultados analíticos.

A presente invenção fornece um método para evitar mau odor de suor. Com isso, os compostos que têm a capacidade de evitar o desenvolvimento de mau odor em superfícies de corpos podem ser identificados com o métodos de triagem da presente invenção. Estes compostos são capazes de inibir a conversão do composto (I) em VSCs. Para o propósito de administração ou aplicação à superfície do corpo, uma quantidade suficiente de pelo menos um composto pode então ser colocada em uma forma que possa ser facilmente administrada ou aplicada à pele.

Por exemplo, o composto para a prevenção de mau odor pode ser adicionado a um produto de cuidado do corpo, tal como uma loção de corpo, um desodorante, um ungüento, um sabão, um xampu, uma fragrância fina, por exemplo. O composto pode simplesmente ser adicionado a uma solução aquosa. Por exemplo, o composto pode ser adicionado a uma emulsão. Dependendo da solubilidade do composto, alguém versado na técnica vai selecionar a forma adequada de aplicação. Se o composto for hidrofílico, por exemplo, ele pode ser adicionado à fase aquosa de uma emulsão, que é então aplicada à superfície da pele. Se o composto for lipofílico, ele vai ser adicionado à fase oleosa de uma emulsão, ou a um ungüento à base de óleo, por exemplo.

Preferivelmente, o composto para prevenção de mau odor é adicionado em quantidades suficientes para inibir efetivamente a formação de VSCs na superfície do corpo. As concentrações necessárias no produto dependem da eficiência do composto e da forma do produto a ser administrado e podem, assim, ser estabelecidas por alguém versado na técnica como uma função destes parâmetros. Por exemplo, 10^{-12} a 10^{-4} mol, preferivelmente 10^{-11} a 10^{-5} mol do composto são administrados por cm^2 da superfície do corpo. A presente invenção fornece um método para preparar um produto tendo a capacidade de reduzir o desenvolvimento de mau odor, compreendendo a etapa de adicionar ao produto um composto capaz de inibir

a conversão do composto (I) a um composto de enxofre volátil. O produto pode ser selecionado, por exemplo, dentre os produtos de cuidado do corpo mencionados acima. O dito acima relativo à solubilidade e à concentração do composto no produto se aplica igualmente ao produto que tem a capacidade de reduzir o desenvolvimento de mau odor. Dependendo da quantidade usual administrada à pele, a concentração é adaptada para se obter eficiência suficiente. Por exemplo, se o produto for um desodorante aplicando um filme na pele de axilas humanas, o composto presente na concentração na faixa de 0,1 a 1000 mmol/l, mais preferivelmente de 1 a 500 mol/l, por exemplo.

A presente invenção fornece um método para metabolizar um composto da fórmula (I) sob condições controladas, o método compreendendo a etapa de expor o composto da fórmula (I) a um microorganismo e/ou a uma β -liase. O termo "condições controladas" se refere a condições diferentes das condições naturais na pele humana, especialmente da região das axilas. O termo "condição controlada", em contraste, se refere às condições nas quais a concentração do composto da fórmula (I) e/ou do microorganismo e/ou da β -liase pode ser determinada por alguém versado na técnica. Preferivelmente, o termo "condições controladas" se refere às condições verificadas em um laboratório, e/ou nas instalações de fabricação, por exemplo. O método de triagem descrito acima, por exemplo, representa uma condição controlada neste sentido. Preferivelmente, o termo "condições controladas" se refere ao fato de que o composto (I) é metabolizado dentro de um recipiente compreendendo o composto (I), e um microorganismo e/ou β -liase, todos dissolvidos ou suspensos em 5 μ l a 1000 l de água em quantidades e concentrações determinadas.

A presente invenção também fornece um líquido e/ou solução aquosa compreendendo o composto precursor (I) e 1 - 10, preferivelmente 1 - 5, mais preferivelmente 1 - 2 cepas bacterianas em concentrações de 10^1 - 10^{13} cfu/ml cada, ou para suplementar ou substituir as cepas bacterianas,

quantidades equivalentes de uma β -liase funcional. Estas são as formas de realização preferidas requeridas para metabolizar o composto precursor da fórmula (I).

5 A presente invenção também se refere ao uso de compostos da fórmula (I) e preferivelmente da fórmula (I') em métodos de triagem, ensaios ou métodos de pesquisa de desenvolvimento, inibição e/ou ocorrência de mau odor no corpo.

EXEMPLOS

10 Nos Exemplos 1 a 5 abaixo, o precursor direto de VSCs de mau odor do suor é identificado e as cepas bacterianas de *Streptococci* tendo a capacidade de produzir VSCs são relatadas. Isto é feito comparando-se análise HPLC de suor fermentado e não fermentado e pela exclusão da presença do precursor postulado na técnica anterior pela comparação de massas moleculares e tempos de retenção LC, sugerindo a presença de outro precursor no Exemplo 1. Nos Exemplos 2 e 3, a estrutura de VSCs obtida pela
15 atividade metabólica de cepas bacterianas é identificada. Nos Exemplos 4 e 5, é testado se o precursor proposto produz os mesmos VSCs que o precursor encontrado em suor natural, que é feito pela síntese dos presentes precursores e daqueles da técnica anterior (Exemplo 4) e os expondo a diferentes
20 microorganismos, seguido pela análise dos metabólitos.

No Exemplo 6, um método para a triagem de compostos tendo efeito de inibição de mau odor, devido à sua capacidade putativa para converter o precursor de mau odor nos VSCs malcheirosos.

Nos exemplos abaixo, GC Analítica é realizada em um
25 instrumento Agilent 6890 acoplado à Detecção de Emissão Atômica (AED da Jass, Alemanha); He como gás carreador; colunas capilares com sílica fundida OY1701, *DMePeBetacdx*[®], 10 m x 0,25 mm de d.i. com filme de 0,25 μ m (da Mega, Brechbühler A.G., Suíça). Sistema *EI-MS*: Agilent 6890-GC acoplado a espectrômetro de massa quadrupolos *HP-MSD-5973*; energia eletrônica ca.

70 eV; íons de fragmento m/z (rel. int. in% do pico de base, SPB-1, 30 m x 0,25 mm de d.i. com filme de 0,25 μm , todos da *Supelco*). Os índices de retenção (I) foram determinados em relação ao tempo de retenção (tR) de uma série de n-alcanos com interpolação linear por meio de um programa de temperatura GC padrão (50°C por 5 min, depois 5°C/min a 240°C e 20 min a 240°C) com uma precisão de 0,5%. ^1H -, ^{13}C -, espectrômetro Spectra Brucker-AMX-360; em CDCl_3 ; valores δ em ppm de Me Si (= 0 ppm), J em Hz; designações por experimentos de COSY45 e HMCQ.

As colunas de HPLC foram Nucleodur C18 Pyramid ® 250 mm x 2 mm de d.i., a coluna preparativa era Nucleodur C18 Pyramid ® 250 mm x 10 mm (da Machery-Nagel, Suíça).

As análises de HPLC-MS foram realizadas usando o sistema Agilent 1100 LC-MS equipado com uma bomba binária B1312A, um detector G1314A UV e um espectrômetro de massa G1946D com uma fonte de ionização química em pressão atmosférica (APCI). Os espectros de massa de modo de íon negativo (faixa de varredura 50-800 Da) foram gravados simultaneamente. As separações HPLC foram realizadas sob as mesmas condições descritas acima.

Alternativamente, a ionização química em pressão atmosférica positiva (APCI) de Thermo Finnigan foi realizada usando uma voltagem de aspersão de 4,5 kV, temperatura capilar a 200°C, gás N_2 em uma vazão de 55 (unidades arbitrárias de Finnigan) com uma vazão de gás auxiliar ajustada para ESI (unidades arbitrárias de Finnigan). Os solventes para eluição foram CH_3CN e água que continha ácido fórmico 0,1%. O gradiente LC iniciou em 100% de água por 5 minutos, depois aumentou de 0% de CH_3CN para 50% de CH_3CN em uma vazão de 0,25 ml/min e no modo preparativo, uma vazão de 6 ml/min foi usada.

As cepas bacterianas usadas nos experimentos abaixo são:

Staphylococcus epidermidis CNCM I-3356

Staphylococcus haemolyticus CNCM I-3357

Corynebacterium xerosis DSMZ 207 43

(correspondendo a ATCC 373) foi fornecida por DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemanha), conhecida como uma cepa de referência na literatura.

EXEMPLO 1

Sugestão de Precursor de mau odor pela Coleta e Fermentação de Suor

As secreções de apocrina e ecrina foram coletadas das axilas através de suor excessivo. Estas secreções foram imediatamente esterilizadas através de um filtro duplo que consiste de uma membrana de 1 µm, seguido por um filtro estéril de 0,2 µm e congeladas como relatado em M. Troccaz, C. Starkenmann, Y. Niclass, M. van de Waal, A. J. Clark, Chem. Biodiversity, 2004, 1, 1022-1035. Um total de 250 ml do suor axilar estéril foi liofilizado e então o sólido foi rediluído em água destilada, e percolado através de uma coluna Lobar RP-18 SiO₂. A eluição foi realizada com porções de 200 ml de água, então a proporção de etanol foi aumentada até 100%.

Uma pequena porção de cada fração (10%) foi tratada com *Staphylococcus haemolyfcus*. HPLC-MS (APCI⁺ e APCI⁻) foram gravadas antes e após a incubação. Os compostos voláteis extraídos do caldo fermentado foram injetados em uma coluna GC apolar acoplada a MS. Foi possível a partir destas medições se identificar um traço de 3-metil-3-sulfanil-hexan-1-ol na fração fermentada 3 (água:etanol = 4:1) e somente esta fração produziu um traço olfativo típico de suor sulfuroso de salva "sclary", cebola, toranja.

Uma separação preparação em HPLC da fração 3 foi realizada. Os três picos maiores foram coletados, bem como quatro zonas de eluição entre os picos (Figura 1, traço B). Então, a fração da "zona 2" (fermentada e não fermentada) foi re-injetada na coluna de HPLC acoplada a um espectrômetro de massa APCI (Figura 1, os traços C e D correspondem à zona

2 do traço B).

Todas as frações, zonas e picos foram tratados com *St. haemeolyticus* e a fração correspondente à "zona 2" (Figura 1, traço D) foi retida porque ela tinha o mau odor de suor típico. Após a incubação, estava
5 claro a partir do traço de HPLC que M+1 correspondente a 279 e M+1 correspondente a 293 foram transformados (ver setas na Figura 1, traço D). Todas as injeções foram realizadas no modo MS-3 no modo positivo e negativo. O composto principal em M+1 293 mostrou m/z 276, perda de NH₃, então m/z 179, interpretado como uma perda de 3-metil-hexanol, então m/z de
10 162, 144, 166 atribuído à perda de NH₃, H₂O e CO. No modo negativo, M-1 291 foi fragmentado em m/z 143 correspondente a uma eliminação β de 3-metil-3-sulfanil-hexan-1-ol.

A partir destas observações, foi possível se excluir a glutatão conjugada com S (M+1 422) ou a cisteína conjugada com S (M+1 236) para
15 serem precursores de 3-metil-3-sulfanil-hexan-1-ol, mas cisteína-glicina conjugada com S, de fórmula molecular C₁₂H₂₄N₂O₄S, que correspondem a um peso molecular de 292, foi portanto proposto para ser o precursor de 3-metil-3-sulfanil-hexan-1-ol (ver Figura 3).

EXEMPLO 2

Identificação de 3-S-cys-gly-3-metil-hexano-1-ol na fração 3

A fração 3 foi liofilizada (16 mg) e foi também purificada em HPLC preparativa. Foram coletadas conas entre os picos e os picos separados. Cada uma das frações e das zonas foi injetada em LCMS, extraída como descrito abaixo e injetada em CG-MS. A zona 2 (< 0,5 mg) tinha três sinais
25 APCI+: um sinal amplo de 19,5 a 21 min tendo M + 1 = 279 e em 21,5 min. M+1 = 293 seguindo em 22 min. M + 1 = 181. APCI- foram também gravados e MS 3 foram também automaticamente gravados. Após a incubação com *St. haemolyticus*, os sinais de LC-MS em 20 min e 21,5 min foram deixados seguir. A zona 2 produziu três compostos de enxofre visto em

GC-MS: 3 < 1 % : I *spB-1* 1080 , MS : 134 (40, M+), 100 (80), 74 (98), 71 (70), 55 (65), 41 (100); 2 = 5 %: I *spB-1* 1093, MS : 134 (5), 100 (50), 67 (40), 57 (60), 55 (100); 1 = 94 %: I *spB-1* 1149, MS : 148 (4), 114 (20), 97 (70), 71 (60), 55 (100). Injeção na coluna quiral GC_{DmepeBetacdx}: 1-S (rt. 17,6 min.) 62,4%, 1-R (rt. 17,62 min.) 16,2%, 1-RIS = 0.005 mg (+/- 0.001), ee de S = 65%. Composto 2-R (rt. 16,79 min), 2-S (rt. 16,80 min), 2-R/S = 14,7%, S-maior devido à sobreposição de picos, não quantificada. O Composto 3 quase não foi visto.

EXEMPLO 3

A Determinação da Estrutura de Compostos de Enxofre Voláteis encontrados em Suor Fermentado

A zona 2 da Fração 3 do caldo fermentado foi extraída com acetato de etil e injetada em uma coluna GC *SPB-1* acoplada a uma MS. Foi observado um ressaltado muito pequeno com m/z 134 em um índice de retenção correspondente a I *SPB-1* 1080 e com um padrão de fragmentação próximo de 2-metil-3-sulfanil-1-pentan-1-ol. Então, um pico maior com m/z 134 com um índice de retenção I *SPB-1* 1093, correspondente a 3-sulfanil-hexan-1-ol e o produto principal formado tendo m/z 148 em I *SPB-1* 1149 e, com isso, para o padrão de fragmentação MS foi atribuído para (R/S)-3-metil-3-sulfanil-hexan-1-ol. Foi também possível se estabelecer após uma injeção em uma coluna quiral, montada em uma CG equipada com uma Detecção de Emissão Atômica (AED), que o maior enantiômero formado foi o S-3-metil-3-sulfanil-hexan-1-ol S-1, com um excesso enantiomérico de 60%. No caso de (R/S)-3-metil-3-sulfanil-hexan-1-ol, não foi possível se medir precisamente a relação enantiomérica devido a uma má separação de ambos os enantiômeros, mas o enantiômero S-2 foi claramente o maior isômero formado.

Portanto, 2-metil-3-sulfanil-1-pentan-1-ol, 3-sulfanil-hexano-1-ol e (R/S)-3-metil-3-sulfanil-hexan-1-ol foram verificados ser importantes compostos de enxofre voláteis de suor metabolizados por *St. haemolyticus*.

EXEMPLO 4

Síntese de Derivados de Sulfanil e Derivados de Conjugados de Cisteína como Precursores de VSCs

A Figura 2 ilustra a síntese de vários derivados e o precursor de VSCs (Compostos 9, 10, 11). A preparação de compostos de enxofre voláteis foi descrita previamente (Troccaz et al, 2004). A adição 1,4 de cisteína com aldeídos α,β -insaturados foi realizada pela adição de t-butoxicarbonil (Boc)-L-cisteína a 3-metil-2-hexenal seguida pela redução com NaBH₄ (Natsch et al 2004) (etapa a). O A-Cys-Conjugado 11 foi obtido após a desproteção do composto 6 com TFA (ácido trifluoroacético em CH₂Cl₂ (etapa b). O acoplamento de H-Gly-OBz a 6 (etapa b) foi realizado em CH₂Cl₂ na presença de PyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il oxitripirrolidino-fosfônio) e DIPEA (diisopropilamina), em condições padrão para a síntese de peptídeo, para preparar 7. O grupo de proteção de α -amino de 7 foi removido em condições de CH₂Cl₂ e (TFA) (etapa c) para produzir 8. Não foi possível se remover o grupo protetor de benzoíla por hidrogenólise, mas foi possível se realizar uma saponificação em água, etanol e hidróxido de sódio 2% (etapa d) para preparar 9. O precursor mais provável de compostos de enxofre voláteis são conjugados de glutatão. Por esta razão, 8 foi acoplado a Boc-Glu-OBz como descrito para 7, grupos α -amino foram clivados em condições CH₂Cl₂, TFA e os ésteres de benzila foram hidrolisados em hidróxido de sódio aquoso e etanol para dar 10 (etapa e).

O protocolo exato para a preparação do composto 9 é dado abaixo:

(2R)-S-[1-(2-hidroxietil)-1-metilbutil]- tBoc-Cys (6), preparado de acordo com Natsch et al (2004), (679 mg, 2 mmol) foi diluído em CH₂Cl₂ (6 ml) e H-Gly-OBzl (741 mg, 2,2 mmol), Pybop (1,14 g, 2,2 mmol) na presença de diisopropiletilamina (774 mg, 6 mmol) foram agitados durante a noite à temperatura ambiente. Uma elaboração usual foi seguida

pela desproteção do grupo α -amino de (2R)-S-[1-(2-hidroxietil)-1-metilbutil]-tBoc-Cys-Gly-OBzl 7 em CH_2Cl_2 (6 ml), ácido trifluoroacético (9 ml) durante 1,3 horas à temperatura ambiente. O produto oleoso bruto 8 (1 g) foi diluído em água (70 ml), MeOH 50 ml e NaOH (2 g) e aquecido 1 horas a 60°C. O pH é então levado para 4 com HCl 1M. O metanol foi removido sob vácuo, e a mistura foi liofilizada. O sólido foi rediluído em água (1 ml) e cromatografado com vaporização em SiO_2 -RP18 (coluna de d.i. de 5 cm, altura de sílica de 12 cm). A eluição iniciou com água e o produto 9 foi eluído com água e etanol em uma relação de 4 para 1. Foi obtido 9 (340 mg, rendimento de 58%). HPLC, r.t. 22.2 min. APCI+ : M + 1 = 293, MS2 276, MS3 179, MS4 162, MS5 144, MS6 116, APCI- : M - 1 = 291, MS2 143, MS3 99, 58. $^1\text{H-NMR}$ in D_2O : 4.16-4.19 (m, 1 H, C(4)); 3.95 (d, J = 17.5 Hz, 1H, C(2)); 3.74 (t, J = 7 Hz, 2H, C(8)) ; 3.70 (d, J = 17.5 Hz, 1H, C(2)) ; 3.09 (dd, J = 13.5, 5.5 Hz, 1H, C(5)), 2.99 (dd, J = 13.5, 8.0 Hz, 1H, C(5)) ; 1.83 5 (t, J = 6.5 Hz, 2H, C(7)), 1.50-1.55 (m, 2 H, C (9)); 1.38 (m, 2 H, C (10)); 1.29 (s, 3 H, C(12)); 0.95 (t, J = 7 Hz, 3 H, C(11)). $^{13}\text{C-NMR}$: 178.8 (s, C(1)); 171.0 (s, C(3)) ; 61.1 (t, C(8)); 55.8 (d, C(4)); 51.9 (s, C(6)); 46.2 (t, C(2)); 44.8 (t, C(9)) ; 43.7 (t, C(7)) ; 30.6 (t, C(5)) ; 28.3 (q, C(12)), 19.9 (t, C(10)); 16.5 (q, C(11)).

EXEMPLO 5

Produção de (R/S)-3-metil-3-sulfanil-hexano-1-ol pela exposição de precursores sintetizados para *St. haemolyticus*, *C. xerosis* e *St. epidermidis*

Os inventores mostraram que na biodegradação de suor estéril com diferentes microorganismos, *St. haemolyticus* produziu o odor de suor sulfuroso mais típico, apesar do estabelecido na técnica anterior de que *staphylococci* e especificamente *St. epidermidis* não tiveram uma atividade de β -liase e somente *Corynebacterium spp.* foi capaz de liberar tióis da cisteína conjugada com S (Natsch et al. (2004)). Surpreendentemente, nos presentes experimentos, *C. xerosis* produziu um odor sulfuroso mais fraco quando

comparado com *St. haemolyticus* e foi interessante se verificar as diferenças entre estas três cepas, quando elas são incubadas com os precursores 9, 10 ou 11, em que o precursor 9 é uma forma de realização do composto (1) da presente invenção.

5 As bactérias crescidas aerobicamente (5 mL, 8×10^8 cfu/mL) foram incubadas com 0,1 mg de cada precursor a 35°C, durante um período de 18 horas. Os compostos de enxofre voláteis são extraídos com EtOAc e analisados em GC-AED em uma coluna quiral. Cada bioconversão foi repetida pelo menos três vezes, um branco continha somente a bactéria, e o
10 outro branco foi feito do meio de crescimento com o precursor sozinho. Nenhum composto de enxofre foi detectado nestes controles. Octano tiol foi usado como um padrão interno, as curvas de calibração mostraram que a melhor reprodução estava na faixa de 1 a 10 ppm, quando 1 µl foi injetado, com menos que 5% de variação. As variações da concentração observadas
15 para 1 foram correlacionadas com a variação da concentração de microorganismos nos 5 ml usados para a incubação, mas os resultados foram consistentes; 9 deu sempre um melhor rendimento químico quando comparado a 11. Os precursores foram preparados a partir de aminoácidos opticamente ativos naturais. O tipo de adição de Michael de Bos-cisteína a
20 E/Z-3-metil-2-hexenal não foi estereo-seletivo e, por esta razão, foi esperado se produzir uma mistura racêmica de 1 a partir de 9 com *St. haemolyticus* que foi confirmado. O derivado 10 nunca produziu qualquer traço de 1.

Os isolados de bactérias foram crescidos aerobicamente no meio líquido apropriado a 37°C até $OD_{600} = 1,0$. As células foram colhidas
25 por centrifugação a 3000 g, 10 min, lavadas uma vez com tampão de fosfato 0,1M estéril (pH 6,0) e ressuspensas em tampão fresco. A concentração de cepas individuais incubadas com o precursor de suor foi entre 1×10^8 e 1×10^{10} cfu/ml. Estas bactérias recém preparadas (5 ml) foram incubadas com 0,1 ml de precursores (5 mg em 10 ml de água), (ou a fração de suor, no Exemplo

1 acima), a 37°C pH 6 em um frasco fechado. Após o tempo de incubação de 1, 4 e 18 horas, 1 ml de acetato de etila contendo octanodiol e octadecano a 0,02 mg/ml foi adicionado e o caldo de fermentação foi centrifugado a 16.000 g. A fase orgânica foi diretamente injetada em uma coluna GC_{SPBI} acoplada a MS e em uma coluna quiral GC_{DMepeBetacdx} acoplada à detecção AED. Estes experimentos foram repetidos três vezes, dois brancos foram feitos com o microorganismo sem o precursor e um com o precursor no tampão de crescimento somente. Nenhuma formação de composto de enxofre foi detectada em brancos. O fator de resposta para 1 µl injetado de uma solução 0,01 mg/ml de octanotiol foi calculado em comparação de 1 µl injetado de uma solução racêmica de 0,01 mg/ml de 3-metil-3-sulfanil-hexano-1-ol. A adição de ambas as áreas de picos (R/S) deu 280 (± 5) e octanotiol 303 (± 3) picos em quatro injeções, com uma aproximação de um fator de resposta de 1. O fator de correlação para 1 µl injetado em ambas as colunas foi acima de 0,998 na faixa de 1 a 10 ppm de (R/S)-3-metil-3-sulfanil-hexano-1-ol.

Estes resultados mostram que o composto 9, que é uma forma de realização preferida do composto (I), é mais eficientemente convertido no composto malcheiroso 1, e é, assim, o precursor mais provável. O composto 11, contudo, que foi sugerido na técnica anterior como precursor potencial, deu um rendimento muito menor de 1, mesmo em *C. spp*, que foi considerado como sendo o único microorganismo liberando VSCs. Portanto, o composto 11 não pode ser considerado ser o precursor direto na via sintética principal de 1.

EXEMPLO 6

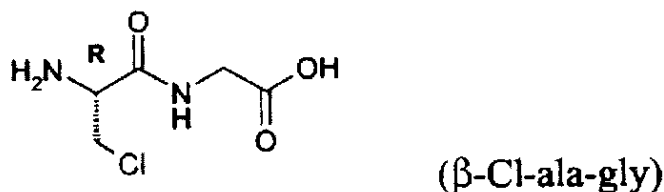
Triagem de Compostos de Inibição de mau odor pelo Método da Invenção

O efeito inibidor de β-Cl-ala-gly na formação de mau odor é avaliada neste exemplo.

Os microorganismos suspensos em tampão fresco (Exemplo 5, protocolo de fermentação detalhado) foram divididos em duas amostras X e Y

(controle negativo) de 5 ml.

Um composto a ser triado da fórmula



(obtido no Exemplo 9) foi adicionado à amostra X em uma concentração de 2 μ mol/l.

5 As amostras compreendendo microorganismos suspensos e o composto a ser triado foram incubados a 37°C por 30 min.

Depois, ambas as amostras foram também incubadas com 0,1 ml do precursor (2R)-S-[1-(2-hidroxietil)-1-metilbutil]-Cys-Gly (5 mg em 10 mL de água) (obtido no Exemplo 4), a 37°C pH 6 em um frasco fechado. Isto
10 corresponde a um total de 2 μ mol/l de precursor em ambas as amostras.

A concentração de cepas individuais incubadas com o precursor de mau odor é tipicamente entre $1,1 \times 10^8$ e $1,1 \times 10^{10}$ cfu/mL.

Após os tempos de incubação de 1, 4 e 18 horas, o aumento de substância malcheirosa (composto 1 na figura 2) é brevemente determinado
15 pela cheirada de uma pessoa treinada.

Se β -Cl-ala-gly tiver a capacidade de evitar ou tratar o desenvolvimento de mau odor, ele vai exibir menos ou nenhum gosto picante para o composto 1 na figura 2 (ver Exemplo 1).

Em adição, uma análise quantitativa de compostos de enxofre
20 no meio fermentado é realizado de forma a determinar a eficácia de β -Cl-ala-gly na prevenção de desenvolvimento de mau odor.

Com isso, 1 ml de acetato de etila contendo octanotiol e octadecano em 0,02 mg/ml são adicionados às amostras (X) e (Y) seguido por centrifugação em 16.000 g. A fase orgânica foi diretamente injetada em uma
25 coluna GC SPB1 acoplada a MS e em uma coluna quiral GC DMePeBetacdx acoplada à detecção AED.

Para o padrão interno, o fator de resposta para 1 µl injetado de uma solução de 0,01 mg/ml de octanotiol foi calculado em comparação de 1 µl injetado de uma solução racêmica de 0,01 mg/ml de 3-metil-3-sulfanil-hexano-1-ol. A adição de ambas as áreas de picos (R/S) deu 280 (±5) e octanotiol 303 (±3) para superfície de picos em injeções, com uma aproximação de um fator de resposta de 1. Para a amostra (X), o fator de correlação para 1 µl injetado em ambas as colunas foi acima de 0,998 na faixa de 1 a 10 ppm de (R/S)-3-metil-3-sulfanil-hexano-1-ol.

Estequiometricamente, 0,2 µmol de precursor produz 0,025 mg de VSC em 1 ml de acetato de etila, se todo o precursor for metabolizado. Se menos que 0,25 mg de VSC for medido na amostra X pelo sistema AED, o composto triado, β-Cl-ala-gly, tem a capacidade de reduzir o desenvolvimento de mau odor. Em outras palavras, nem todo o precursor é metabolizado. Quanto mais VSC for encontrado na amostra X, que também contém um inibidor putativo, menos composto tem propriedades inibidoras. O método da presente invenção permite a triagem efetiva de compostos quanto à sua capacidade de evitar ou tratar o desenvolvimento de mau odor em superfícies do corpo.

EXEMPLO 7

Síntese de N-{[(4R)-4-amino-4,5-diidro-2-tienilcarbonil} glicina (composto IIIa)

Etapa 1: Preparação de N-(terc-butoxicarbonil)-S-(2-etoxi-2-oxoetil cisteinato de etil 12.

A L-cisteína etil éster hidrocloreto ACROS (13,5 g, 72,8 mmol), CH₂Cl₂ 128 ml e di-terc-butilcarbonato (16,9 g, 77,5 mmol) foram adicionados a 0°C em gotas, seguido por trietil amina (39 ml, 279 mmol). O banho de gelo foi removido e a reação foi agitada durante 5 horas. Bromoacetato de etil (10,5 ml, 94,6 mmol) foi adicionado a 0°C. Após 30 min., o banho de gelo foi removido e a reação foi agitada 1 hora à temperatura

ambiente. O CH_2Cl_2 foi destilado; a mistura de reação foi rediluída com salmoura e extraída duas vezes com dietiléter. Após a concentração, o produto bruto (25,7 g) foi cromatografado com vaporização (diâmetro da coluna de 7,5 cm, SiO_2 com 15 cm de altura), eluição com ciclo-hexano-acetato de etila (75/25) para dar 13,76 g de (12) (rendimento de 56%).

Etapa 2: Preparação de (R-Etil-4-[(terc-butoxicarbonil)amino]tetraidro-3-oxo-2-tiofenocarboxilato 13.

NaH (1,64 g, 55%-65% Fluka, 41 mmol) lavado com pentano duas vezes foi suspenso em THF (20 ml), depois EtOH anidro (2,4 ml, 41 mmol) foi adicionado vagarosamente. Quando a produção de H_2 parou, mais THF (160 ml) foi adicionado e seguido por 12 (13,73 g, 41 mmol) em THF (20 ml). Após 40 min, ácido acético (4 ml) foi adicionado. O solvente foi removido sob vácuo. O produto bruto foi extraído com éter dietílico e lavado com salmoura. O produto bruto (12 g) foi cromatografado com vaporização (diâmetro da coluna de 7,5 cm, SiO_2 com 15 cm de altura), eluição com ciclo-hexano-acetato de etila (4/1) para dar 9,22 de 13 (rendimento de 78%).

Etapa 3: Preparação de ácido (R)-4-[(terc-butoxicarbonil)amino]-4,5-diidro-2-tiofenocarboxílico 14.

3.1: redução: O oxo-éster (13) (9,16 g, 31,7 mmol) em EtOH (90 ml) foi reduzido com NaBH_4 (844 mg, 22 mmol) adicionado em porções a -30°C . Após 30 min a -30°C , acetona (8,7 ml) seguida de ácido acético (11, ml) foram adicionados. A mistura bruta foi concentrada a 40°C sob 100 mbar, extraída com EtOAc e salmoura até pH 7. O solvente foi removido sob 0,1 mbar, para dar o produto bruto (9,20 g) (rendimento de 99%) de (R)-etil-4-[(terc-butoxicarbonil)amino]tetraidro-3-hidróxi-2-tiofenocarboxilato.

3.2: Eliminação: O hidróxi-éster (9,15 g, 31 mmol) foi diluído em CH_2Cl_2 (130 ml), na presença de trietilamina (17,5 ml). A 0°C , mesilcloreto (4,88 ml, 62,9 mmol) foi adicionado em gotas. Após 4 h de agitação, CH_2Cl_2 foi adicionado, e as fases orgânicas foram extraídas até a

neutralidade com salmoura. O solvente foi evaporado e o produto bruto (9,12 g) foi cromatografado com vaporização (diâmetro da coluna de 7,5 cm, SiO₂ com 15 cm de altura) e eluição com ciclo-hexano-acetato de etila (85/15) para dar 6,5 g (rendimento de 77%) de (R)-etil-4-[(tercbutoxicarbonil)amino]-4,5-diidro-2-tiofenocarboxilato.

3.3: Saponificação: O éster (6,5 g, 23,8 mmol) foi saponificado em solução em EtOH (76 ml). A 0°C, uma solução aquosa de LiOH 1N (32 ml) foi adicionada vagarosamente e a reação foi então agitada por 2 horas à temperatura ambiente. HCl (3 N) foi adicionada, o EtOH foi removido sob vácuo, então o produto foi extraído com Et₂O, 5,93 g de um pó marrom (14).

Etapa 4: Preparação do composto (IIIa)

4.1: Acoplamento: O ácido carboxílico protegido com N-boc (14) (2,45 g, 10 mmol) em solução em CH₂Cl₂ (30 ml) foi tratado com H-Gly-OBzl-p-tosilato (3,7 g, 11 mmol, *Novabiochem*) e diisopropiletilamina (3,88 g, 30 mmol) 16 horas à temperatura ambiente. A mistura foi extraída com CH₂Cl₂ e lavada com salmoura. O produto bruto (11 g) foi cromatografada com vaporização (diâmetro da coluna de 7,5 cm, SiO₂ com 15 cm de altura) e eluição com EtOAc, para dar 3,66 g de um sólido branco (rendimento de 93%) de N-({(4R)-4-[(terc-butoxicarbonil)amino]-4,5-diidro-2-tienil}carbonil) glicinato de benzil.

4.2: Desproteções: O composto protegido (3,60 g, 9,18 mmol) em solução em CH₂Cl₂ (12 ml) foi tratado com TFA (26 ml) 4 horas à temperatura ambiente. TFA foi destilado em modo azeotrópico pela adição de 3 porções de tolueno (3 x 80 ml). O produto bruto (3,11 g) foi diretamente dissolvido em água (55 ml), metanol (55 ml), hidróxido de sódio (2,2 g) e agitados à temperatura ambiente por 2 horas. Então, a reação foi resfriada a 0°C e HCl 3 M foi adicionado em pH 1. A mistura resultante foi concentrada a 10 mbar, 30°C e cromatografada (coluna 2,5 cm, 80 g de Dowex 50WX8) com o mesmo procedimento descrito acima. Foi obtido 1,2 g (rendimento de

65%) do composto IIIa.

APCI+ : $M + 1 = 202$, $^1\text{H-NMR}$ in D_2O : 6.37 (d, $J = 3.0$ Hz, 1 H, C(4)); 4.82-4.90 (m, 1 H, C(3)); 3.88-3.80 (m, 1 H, C(2)); 3.84 (s, 2 H, C(7)); 3.43 (dd, $J = 13.0, 3.0$, 1 H, C(7)), $^{13}\text{C-NMR}$: 179.0 (s, C(8)); 166.3 (s, C(6)); 148.0 (s, C(5)); 125.4 (d, C(4)); 61.3 (d, C(3)); 46.4 (t, C(7)); 38.6 (t, C(2)).

EXEMPLO 8

Síntese de Inibidor: Preparação de N-[(2S)-2-amino-4-pentinoil]glicina (composto VI)

A H-propargil-DL-gly-OH *Bachem* (25 mmol, 2,83 g) em NaOH 0.1 N (50 mL) e dioxano (50 mL) foi adicionado dicarbonato de di-tercbutil *Fluka* (75 mmol, 16,35 g) durante 10 min., e o pH foi mantido em 9,5 pela adição de NaOH 1N. Após 2 horas, o dioxano foi removido sob vácuo, a solução foi acidificada com HCl 1M, extraída com acetato de etila, lavada três vezes com KHSO_4 5%, seca em Na_2SO_4 , filtrada e concentrada sob vácuo. A mistura bruta (25 mmol, 5,4 g) em CH_2Cl_2 foi acoplada a H-gly-Obz-p tosilato com Pybop (27 mmol, 14 g) e diidopropil etilamina (75 mmol, 9,67 g) e agitada por 3 horas a 22°C . A mistura bruta foi então diluída com CH_2Cl_2 (700 ml) e lavada com salmoura duas vezes. A fase orgânica foi seca em Na_2SO_4 , filtrada e cromatografada com vaporização (SiO_2 , altura de 15 cm, em uma coluna de 7 cm de diâmetro), eluição com acetato de etila para dar 8,4 g. Este produto bruto (23 mmol, 8,3 g) foi tratado com CH_2Cl_2 (22 ml) e com TFA (50 ml). Após 2 horas, TFA foi removido por destilação azeotrópica com benzeno, três vezes (200 ml), para dar o produto bruto (6,5 g).

Somente metade deste produto bruto (12,5 mmol, 3,25 g) foi saponificada com NaOH (75 mmol, 3 g) em MeOH (75 ml) e água (75 ml). Após 2 horas, a mistura foi acidificada com HCl 1M, o solvente foi removido sob vácuo e o resíduo foi cromatografado por vaporização (SiO_2 - RP18, 15

cm de altura, diâmetro da coluna de 4,5 cm). A coluna foi eluída com EtOH/água 7:3, o solvente foi removido sob vácuo e o composto VI (1,36 g) foi obtido.

APCI+ : $M + 1 = 171$, $^1\text{H-NMR}$ em D_2O : 4,33-4,28 (m, 1 H, C(2)); 4,08 (m, 2 H, C(6)); 3,01-2,88 (m, 2 H, C(3)); 2,61 (dd, $J = 2$ Hz, 1 H, C(5)), $^{13}\text{C-NMR}$: 175,7 (s, C(7)), 171,6 (s, C(1)); 79,2 (s, C(5)), 77,4 (d, C(5)), 54,2 (d, C(2)), 44,2 (t, C(3)); 23,9 (t, C(4)).

EXEMPLO 9

Preparação de 3-Cloro-Ala-Gly (15)

10 Etapa 1: Acoplamento: N-Boc-R-cloro-Ala-OH *Bachem* (5 mmol, 1,12 g), em CH_2Cl_2 e HGly-Obz-p-tosilato *Novabiochem* (5,5 mmol, 1,85 g), PyBOP *Novabiochem* (5,5 mmol, 2,86 g), diisopropil etilamina (15 mmol, 1,94 g) são agitados por 16 horas a 22°C . A mistura bruta é então filtrada em SiO_2 , eluída com acetato de etila (50 ml) para dar um produto
15 bruto após uma concentração de 1,84 g (rendimento de 99%).

20 Etapa 2: Desproteção: O produto bruto obtido (4,8 mmol, 1,8 g) foi diluído em CH_2Cl_2 (9 ml), e TFA (20 ml) foi adicionado. A mistura foi agitada por 3 horas a 22°C e purificada por destilação azeotrópica com benzeno (3 x 100 ml) sob alto vácuo. O produto bruto (5 mmol, 1,7 g) foi
25 diluído em água (100 ml) mais etanol (20 ml) e halogenado com H_2 na presença de uma quantidade catalítica de Pd 5% em carvão ativo. Após 16 horas, a mistura foi filtrada em celite, rinsada duas vezes com água. O etanol foi removido sob vácuo e o produto bruto foi cromatografado em Dowex 50WX8 (coluna com 2,5 cm. de diâmetro, 80g). Ele foi carregado em 5 ml de
30 água, a coluna foi rinsada com 150 ml de água. A eluição foi feita com sucessivas porções de 100 ml de NH_4OH 0,4 M, 0,8 M, 1,2 M, 1,6 M, 2,0 M. A eluição foi seguida por HP-TLC (SiO_2 , *Merck* 1.05628.0001), fase móvel AcOH/tBuOH/ H_2O /AcOH 2/1/1/1. O composto 15 foi eluído com 1.6 M de amônia e, após a concentração, 730 mg de 15 fora, obtidos (rendimento:

81 %).

APCI+ : $M + 1 = 181$. $^1\text{H-NMR}$ em D_2O : 4,53-4,51 (m, 1 H, C(2)); 4,16-4,02 (m, 2 H, C(3)); 4,03 (d, $J = 8$ Hz, 1 H, C(4)); 3,98 (d, $J = 8$ Hz, 1 H, C(4)), $^{13}\text{C-NMR}$: 176,7 (s, C(5)), 169,9 (s, C(1)); 56,8 (d, C(2)), 45,4 (t, C(3)); 44,9 (t, C(4)).

EXEMPLO 10

Preparação de N-[3-amino-benzoil]glicina (composto VII)

Ao ácido 3-aminobenzóico 11 ABCR (6,85 g, 50 mmol) em CH_2Cl_2 (90 ml) foi adicionado dicarbonato de diterc-butil (11,66 g, 53,3 mmol) e a 0°C , trietilamina (27 ml, 193 mmol) em gotas. Após 4 horas de agitação a 22°C , água foi adicionada e o ácido N-boc-orto-aminobenzóico foi extraído com CH_2Cl_2 para dar o 11,94 g do produto bruto após a concentração. Ao produto bruto (5,93 g, 25 mmol) em CH_2Cl_2 (75 ml) foram adicionados H-Gly-Obz p-tosilato *Novabiochem* (14,3 g, 27,5 mmol), PyBOP (14,3 g, 27,5 mmol) e diisopropiletilamina (9,67g, 75 mmol). Esta mistura foi agitada durante a noite, então rediluída em água (200 ml), extraída com CH_2Cl_2 , seca em Na_2SO_4 anidro e concentrada. O produto bruto foi cromatografado em vaporização (diâmetro da coluna de 7,5 cm, SiO_2 com 15 cm de altura), eluição com ciclo-hexano-acetato de etila (2/3) para dar 4,19 g (rendimento de 43,6%). Estes (4,19 g, 10,9 mmol) foram rediluídos em CH_2Cl_2 (13 ml), e tratados com ácido trifluoroacético (26 ml). Após 3 horas, tolueno foi adicionado em três porções de 50 ml e o excesso de TFA foi removido por destilação azeotrópica sob vácuo. Foi obtido um produto bruto (3,57 g). Então, a saponificação foi realizada por hidrogenação catalítica com H_2 em Pd/C 5% em água (20 ml) e etanol (40 ml), durante 15 horas a 22°C . A mistura bruta foi filtrada em celite, concentrada sob vácuo e cromatografada com vaporização (diâmetro da coluna de 4,5 cm, SiO_2 -RP18 com altura de 15 cm), eluição com água (200 ml), água e etanol (4/1) (100 ml) deu 12 (1,4 g) (rendimento de 54,7%).

APCI+ : $M + 1 = 195$, $^1\text{H-NMR}$ em D_2O : 7,50-7,42 (m, 2H), 7,36-7,22 (m, 1H), 3,9 (s, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$: 179,1 (s), 172,9 (s); 143 (s), 137,8 (s), 133,05 (d), 125,2 (d); 124,5 (d), 120,3 (d), 46,3 (t).

EXEMPLO 11

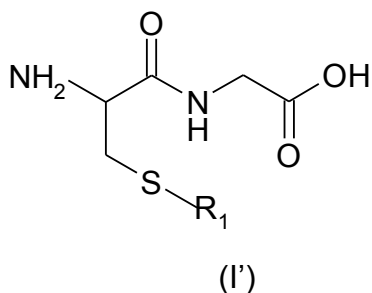
5 Efeito Inibidor dos compostos IIIa, VI; Efeito de aumento do composto VII

Os compostos IIIa, VI e VII foram testados de acordo com o procedimento do Exemplo 6. Os compostos foram adicionados em 2 μmol , os compostos IIIa e VI resultando em uma inibição de 25 a 75% de produção de (S)-3-metil-3-sulfanil-hexan-1-ol. Estes compostos são assim efetivos na inibição da produção de compostos voláteis malcheirosos a partir de precursores presentes no suor. O composto VII resultou em uma produção aumentada de (S)-3-metil-3-sulfanil-hexan-1-ol quando comparado ao controle.

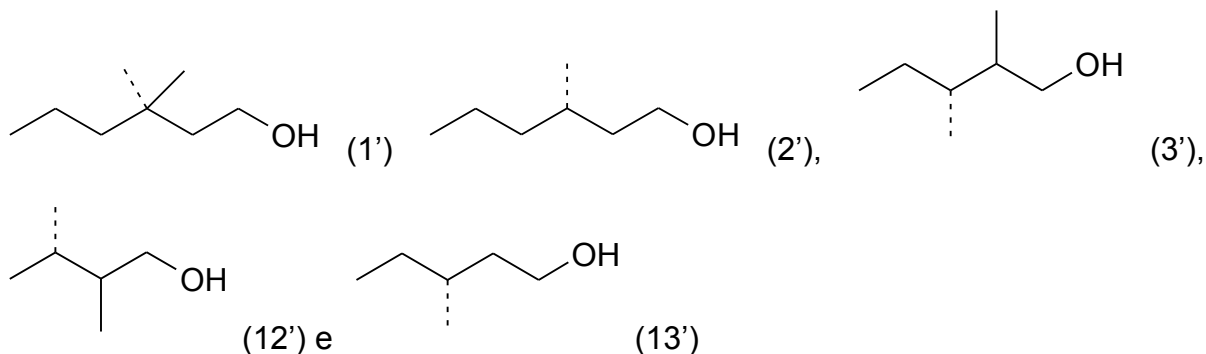
REIVINDICAÇÕES

1. Método de seleção de compostos que têm a capacidade de impedir ou reduzir o desenvolvimento de mau cheiro sobre as superfícies corporais, o método **caracterizado** por compreender as etapas de

- proporcionar um meio compreendendo um composto a ser triado e pelo menos uma enzima β -liase funcional ou uma cepa bacteriana do gênero *Staphylococcus* ou *Corynebacterium*,
- adicionar ao meio pelo menos um composto precursor da fórmula



em que R_1 é um resíduo selecionado dentre o grupo constituído por



a linha tracejada representando a posição da ligação de carbono ao átomo de enxofre;

- determinar o aumento de pelo menos um metabolito do precursor no meio e / ou o desaparecimento do precursor, onde dito metabolito do precursor é um composto da fórmula (II),



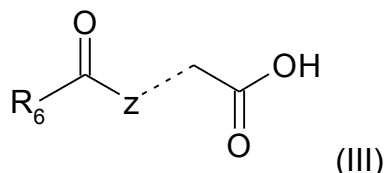
onde R_1 é definido acima, e,

- concluir, a partir da capacidade do composto a ser triado, de impedir o aumento de um metabolito do precursor no meio ou de impedir o desaparecimento dos precursores no meio, a capacidade do composto de impedir ou reduzir o desenvolvimento de mau

cheiro.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por o composto precursor ser adicionado ao meio após a cepa bacteriana ou a β -liase e o composto a ser triado serem adicionados ao meio.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por o composto a ser triado ser um composto de fórmula (III)

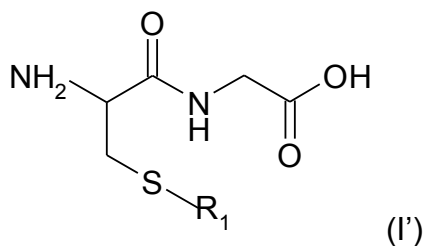


em que R_6 é um composto alquila, alcenila, alcinila ou arila C_2 - C_{20} , de cadeia linear, ramificada ou cíclica, opcionalmente substituído e opcionalmente compreendendo um ou mais heteroátomos e,

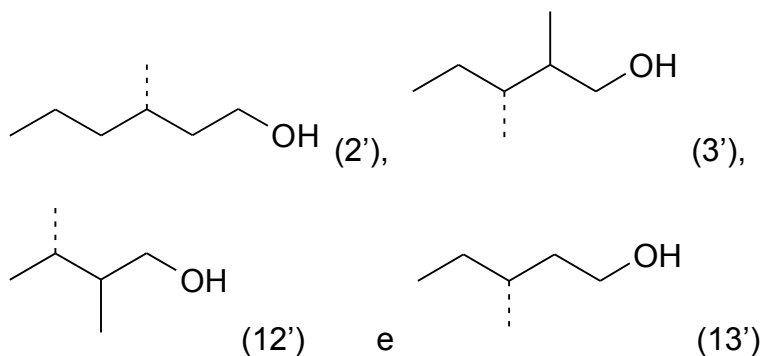
- em que a linha tracejada representa uma ligação dupla, neste caso Z é selecionado dentre CR_7 e N ou,

- em que a linha tracejada representa uma ligação simples, neste caso Z é selecionado dentre NR_7 , CR_7R_8 , O e S, com R_7 e R_8 sendo, independentemente um do outro, selecionados dentre H e resíduos alquila, alcenila e alcinila C_1 - C_{10} .

4. Composto de fórmula



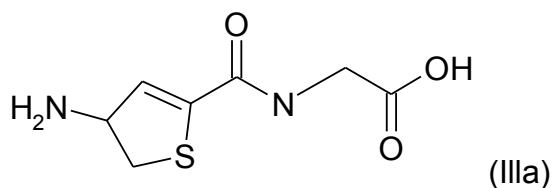
caracterizado por R_1 ser um resíduo selecionado dentre o grupo constituído por



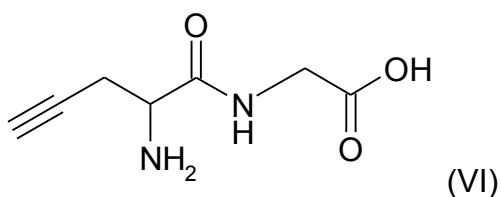
a linha tracejada representando a posição da ligação de carbono ao átomo de enxofre.

5. Método de prevenção do mau cheiro de suor **caracterizado** por compreender

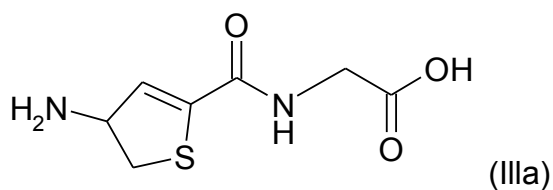
a etapa de aplicar a uma superfície corporal, de preferência, à pele axilar, um composto selecionado dentre o grupo que consiste dos compostos de fórmulas



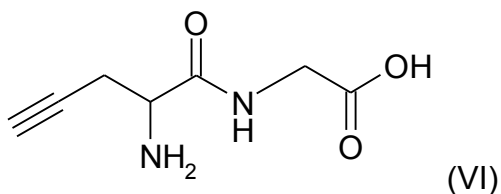
e



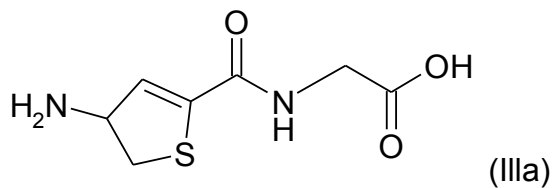
6. Método de preparo de um produto possuindo a capacidade de reduzir o desenvolvimento de mau cheiro, **caracterizado** por compreender a etapa de adicionar ao produto um composto capaz de inibir a conversão do composto (I') dentre o grupo que consiste nos compostos de fórmulas



e



7. Composto **caracterizado** por ser selecionado dentre o grupo que consiste nos compostos de fórmulas



e

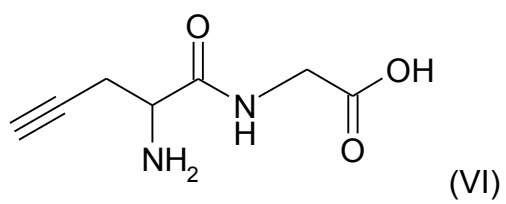


Figura 1

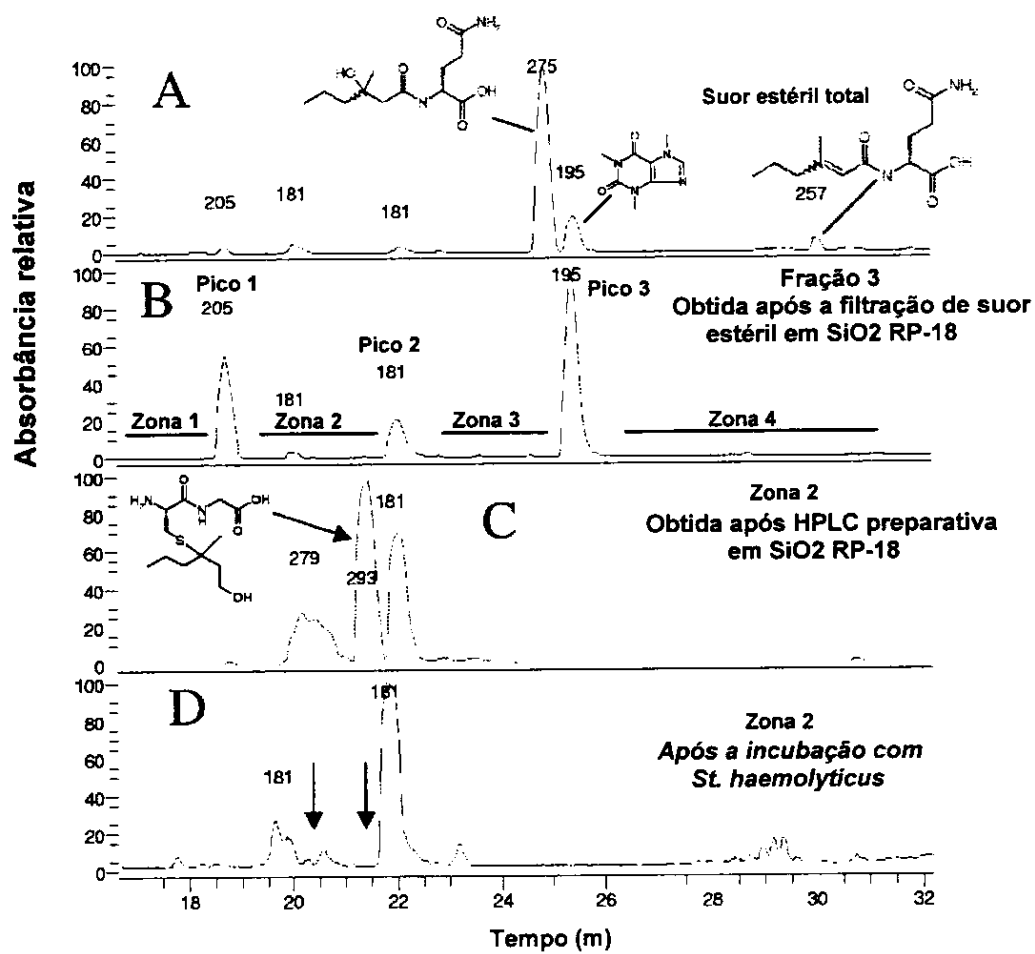
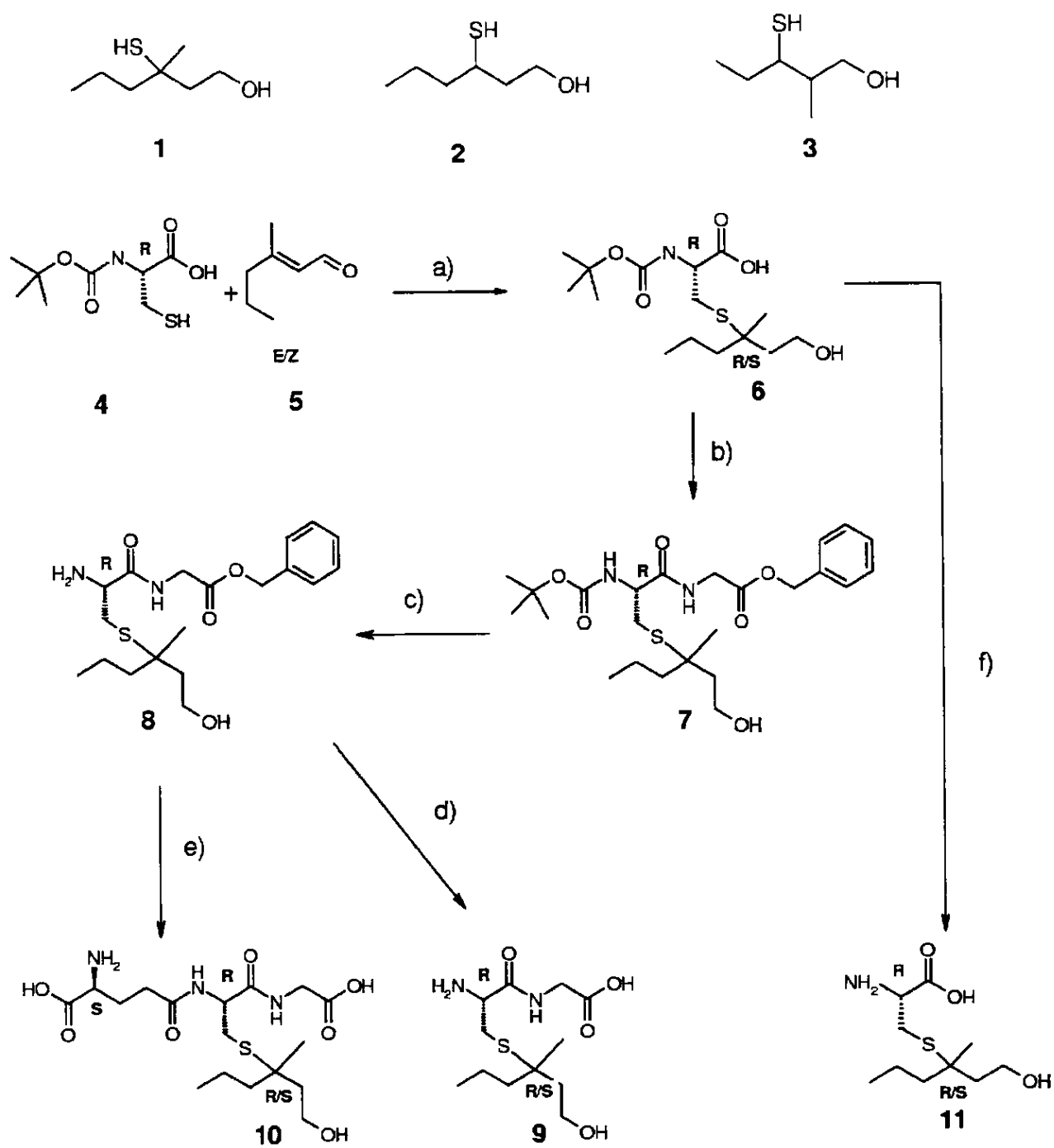
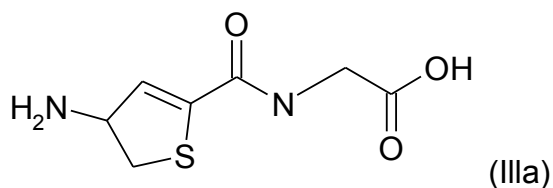


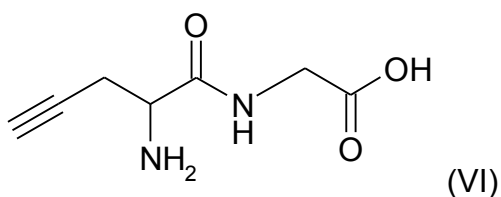
Figura 2



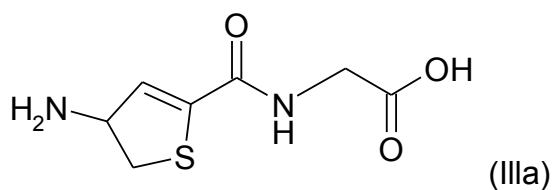
a etapa de aplicar a uma superfície corporal, de preferência, à pele axilar, um composto selecionado dentre o grupo que consiste dos compostos de fórmulas



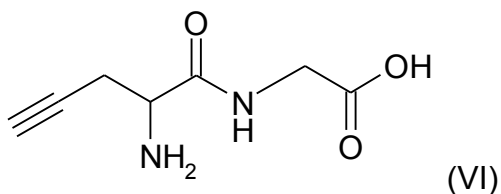
e



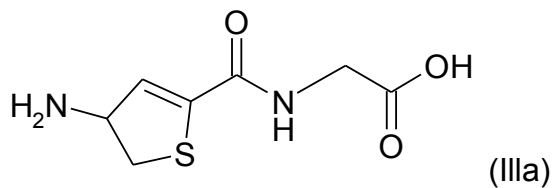
7. Método de preparo de um produto possuindo a capacidade de reduzir o desenvolvimento de mau cheiro, **caracterizado** por compreender a etapa de adicionar ao produto um composto capaz de inibir a conversão do composto dentre o grupo que consiste nos compostos de fórmulas



e



8. Composto **caracterizado** por ser selecionado dentre o grupo que consiste nos compostos de fórmulas



e

Figura 5

