

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE QUÍMICA

MATHEUS RODRIGUES BOFINGER

SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA APLICADA A PRODUTOS NATURAIS DE IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA

CAMPINAS 2019

MATHEUS RODRIGUES BOFINGER

SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA APLICADA A PRODUTOS NATURAIS DE IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA

Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli

O arquivo digital corresponde à versão final da Tese defendida pelo aluno Matheus Rodrigues Bofinger e orientada pela Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli.

> CAMPINAS 2019

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

Bofinger, Matheus Rodrigues, 1990-Síntese de peptídeos em fase sólida aplicada a produtos naturais de importância biológica / Matheus Rodrigues Bofinger. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.
Orientador: Anita Jocelyne Marsaioli. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.
1. Peptídeos - Síntese química. 2. Peptídeo não ribossomal. 3. Dicetopiperazinas. 4. Lipopeptídeos. I. Marsaioli, Anita Jocelyne, 1946-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Solid-phase peptide synthesis applied to natural products of biological importance Palavras-chave em inglês: Peptides - Chemical synthesis Nonribosomal peptide Diketopiperazines Lipopeptides Área de concentração: Química Orgânica Titulação: Doutor em Ciências Banca examinadora: Anita Jocelyne Marsaioli [Orientador] Célio Fernando Figueiredo Angolini Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva Luciana Gonzaga de Oliveira Taicia Pacheco Fill Data de defesa: 29-11-2019 Programa de Pós-Graduação: Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a) - ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0002-0802-4352

⁻ Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/4570127606089856

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli (Orientadora)

Prof. Dr. Célio Fernando Figueiredo Angolini (CCNH – UFABC)

Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva (DQ – UFSCar)

Profa. Dra. Luciana Gonzaga de Oliveira (IQ-UNICAMP)

Profa. Dra. Taicia Pacheco Fill (IQ-UNICAMP)

A Ata da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado defendida pelo aluno Matheus Rodrigues Bofinger, aprovada pela Comissão Julgadora em 29 de novembro de 2019.

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese de doutorado aos meus pais, Silvana e Claudiney. Obrigado pelo amor incondicional, pelo incentivo e ajuda em tudo o que precisei, só estou onde quero pois vocês tornaram tudo isso possível. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sequer por um segundo me deixou desistir ou esmorecer, me levantando todo dia com a certeza de que minha escolha foi por Ele prometida.

À minha mãe, Silvana, e a meu pai, Claudiney, por nunca me deixarem desistir e por terem sempre "perfumado o caminho" para que eu pudesse chegar até aqui – vocês são meus modelos, e sou muito grato por cada dia mais me parecer com vocês. Que eu seja capaz de retribuir um dia tudo que fizeram e fazem por mim. Agradeço também às minhas irmãs, Emmy e Milena por todo amor e carinho, aos meus avós, tias, tios e primos.

À minha queridíssima orientadora, Prof^a. Anita J. Marsaioli, por ter me recebido em seu laboratório com todo o entusiasmo, por ter me contagiado com a sua curiosidade e determinação. Por ter me ensinado ciência, etiqueta e elegância, obrigado por toda a confiança e por ter me transmitido esse brilho no olhar que você tem pela química orgânica.

A todos os amigos e parceiros do LaBioChem, Katherine, Charlene, Bonatto, Eraldo, Ricardo e a agregada Gaby, obrigado por sempre estarem lá e me ajudarem sem titubear. Agradeço especialmente ao Fábio, por toda ajuda, todo o carinho e disponibilidade para me ajudar, você vai longe. Um agradecimento, também especial à Bruna Zucoloto por ser tão amiga, tão parceira, tão acolhedora, tão compreensiva e tão amável. Agradecimento especial ao Arnaldinho que é a pessoa mais amável, afável e querida do mundo. Outro tão especial quanto ao Professor e amigo Felipe Wouters por todo o apoio e amizade a mim despendida.

Às Professoras Luciana Gonzaga e Taícia Fill por me acompanharem ao longo desses 4 anos, sempre presentes em minhas bancas, vocês contribuíram muito para este trabalho e já me desculpo pelas dicas que não fui capaz de seguir. Ao Professor Célio pela ajuda e incentivo ao longo desses anos e por ter aceito ser parte da minha banca. À Professora Maria Fátima por ter aceitado estar em minha banca.

Aos Professores Fernando Coelho, Wanda Pereira e Júlio Pastre, pelas amplas conversas, conselhos, divagações etílicas e acolhimento por mim despendidos, vocês são joias raras nesse instituto. Ao anjo da guarda Lucas Zeoly que foi mais que um amigo durante esse período, que esteve comigo todos os dias me fazendo rir, pensar, esbravejar e tornando meus dias muito especiais. Obrigado por toda a ajuda, conselhos, festas, jantares e vinhos. Que o destino nos coloque juntos por muito mais vezes.

Ao técnico e amigo Gustavo Shimamoto pela ajuda com os experimentos de RMN e toda a amizade que tivemos em tão pouco tempo de convívio, você é um queridão.

Aos amigos do Pili Group, especialmente Marcela e Thiago com quem tive boas conversas, boas risadas e sentirei falta com toda a certeza. Aos amigos do LSPNF, especialmente Sâmia e Hugo por todo o carinho e por me aguentarem falando pelos cotovelos, obrigado pela amizade. Aos amigos do Jurberg Group, especialmente Alessandra com quem me identifiquei rapidamente e foi uma grande amiga e conselheira.

A todos os técnicos e funcionários do IQ por sempre darem seu melhor para fazer a ciência funcionar, mesmo quando já não se é valorizada como deveria.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

"Se as coisas são inatingíveis...Ora! Não é motivo para não querê-las... Que tristes os caminhos, se não fora a presença distante das estrelas!" Mário Quintana

RESUMO

Peptídeos são produtos naturais de grande ocorrência e possuem uma vasta gama de aplicações no campo biológico. A maneira mais prática de se obter um peptídeo em laboratório é a síntese em fase sólida (SPFS), que garante um maior grau de pureza, despendendo menos tempo. As bactérias do gênero Bacillus possuem grande destaque na produção de peptídeos com atividade biológica. Bacillus cereus e Cronobacter sakazakii são conhecidas por compartilharem do mesmo nicho industrial, estando presentes na indústria de leite em pó e cereais. Estudos preliminares deste grupo mostraram que quando em co-cultivo, as mesmas não inibiam o crescimento uma da outra, porém, observou-se que *B. cereus* promovia a depleção do mecanismo principal de comunicação de C. sakazakii, hidrolisando moléculas de acilhomosserinalactonas utilizando hidrolases. Neste contexto, este estudo visou elucidar os mecanismos de comunicação alternativos utilizado por ambas as espécies em cultivos individuais e em co-cultivo. Observou-se que ambas as bactérias produziam o dipeptídeo cíclico ciclo(L-Pro-L-Leu), confirmado após síntese de seus 4 isômeros por SPFS. Os dipeptídeos cíclicos ciclo(L-Pro-L-Leu) e ciclo(D-Pro-D-Leu) foram testados em um experimento de RMN-STD para avaliar a interação das mesmas com as bactérias em questão. A partir dos mapas dos epitopos montados observou-se que há interação efetiva das moléculas de ciclo(L-Pro-L-Leu) e não houve interação efetiva das moléculas de ciclo(D-Pro-D-Leu) com as bactérias. Paralelamente, observou-se em bactérias do gênero Bacillus a presença de biossurfactantes lipopeptídicos, sendo os mais conhecidos a surfactina (*B. subtilis*), a liquenisina (*B. licheniformis*) e iturina (*B. amyloliquefaciens*), sendo a surfactina a mais estudada dentre seus semelhantes. Buscando contribuir com o estudo dessa classe de compostos, este trabalho visou sintetizar epímeros da Liguenisina-A e avaliar diferentes estratégias de macrociclização químicas e enzimáticas. Além disso, buscou-se observar as diferentes regiosseletividades das reações de macrolactonização. Todas as estratégias testadas foram eficientes e mostraram diferentes padrões de regiosseletividades, produzindo enantiômeros da Liquenisina-A e um par de enantiômeros de um coproduto ciclizado no ácido aspártico. A síntese da Liguenisina-A permitirá avaliar a atividade desses quatro novos produtos, além de abrir precedente quanto às estratégias de ciclização.

ABSTRACT

Peptides are naturally occurring products with a wide range of applications in the biological field. The most practical way to obtain a peptide in the laboratory is solid phase synthesis (SPPS), which guarantees a higher degree of purity, taking less time. The bacteria of the genus *Bacillus* have great prominence in the production of peptides with biological activity. Bacillus cereus and Cronobacter sakazakii are known to share the same industrial niche, being present in the powdered milk and cereals industry. Preliminary studies of this group showed that when in co-culture, they did not inhibit the growth of each other, however, it was observed that *B. cereus* promoted the depletion of the main mechanism of communication of C. sakazakii, hydrolyzing acylhomoserine lactones molecules using hydrolases. In this context, this study aimed to elucidate the alternative communication mechanisms used by both species in individual crops and in co-cultivation. It was observed that both bacteria produced the cyclic dipeptide cycle (L-Pro-L-Leu), confirmed after synthesis of its 4 isomers by SPPS. Cyclo (L-Pro-L-Leu) and cyclo (D-Pro-D-Leu) were both tested in an NMR-STD experiment to evaluate their interaction with the bacteria. From the maps of the assembled epitopes it was observed that there is effective interaction of the cyclo(L-Pro-L-Leu) molecules and there was no effective interaction of the cyclo(D-Pro-D-Leu) molecules with the bacteria. At the same time, the presence of lipopeptide biosurfactants was observed in bacteria of the genus Bacillus, with surfactin (B. subtilis), lichenysin (B. licheniformis) and iturin (B. amyloliquefaciens) being the most widely studied. In order to contribute to the study of this class of compounds, this work aimed to synthesize Lichenysin-A epimers and evaluate different chemical and enzymatic macrocyclization strategies. In addition, we sought to observe the different regioselectivities of macrolactonization reactions. All tested strategies were efficient and showed different patterns of regioselectivities, producing enantiomers of Lichenysin-A and a pair of enantiomers of an aspartic acid cyclized by-product. The synthesis of Lichenysin-A will allow us to evaluate the activity of these four new products, in addition to setting precedents for cyclization strategies.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Aminoácido

ATP – Adenosina trifosfato

Boc – (do inglês: *tert-butyloxycarbonyl*) – Grupo protetor *tert*-butiloxicarbonila

CALB - Lipase B de Candida antarctica

UPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

DCM - diclorometano

DIC – N,N'-diisopropilcarbodiimida

DMAP – *N*,*N*-Dimetilaminopiridina

DMF - N, N-dimetilformamida

DNA - (do inglês: Deoxyribonucleic acid) - Ácido Desoxirribonucleico

ESI - (do inglês: Electrospray ionization) - Ionização por eletrospray

Fmoc – (do inglês: *Fluorenylmethyloxycarbonyl*) - grupo protetor fluorenilmetiloxicarbonila

HOBt – 1-hidróxibenzotriazol

NRPS – (do inglês: Nonribosomal peptide synthase) - Peptídeo sintases não ribossomais

PCP - (do inglês: peptidyl carrier protein) - proteína peptidil-carreadora

QqQ – detector Triplo Quadrupolo

Q-ToF – (do inglês: Quadrupole – Time of Flight) - detector triplo quadrupolo com analisador por tempo de voo

SIR – (do inglês: *Selected Ion Recording*) – Experimento de monitoramento de íon seletivo

SPFS – Síntese de peptídeos em fase sólida

TFA - (do inglês: trifluoroacetic acid) Ácido trifluoracético

THF – Tetrahidrofurano

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 . Aminoácidos principais decodificados pelo DNA humano, suas abreviaturase códigos de uma letra. 229
Tabela 2. Vantagens e desvantagens das estratégias Boc/benzil e Fmoc/t-butil emsíntese de peptídeos em fase sólida (Adaptado de Jensen, Shelton e Pedersen, 2013).131338
Tabela 3. Influência das DKPs em fenótipos dependentes de quorum sensing54
Tabela 4. Massa dos cultivos de B. cereus, C. sakazakii e co-cultivo. 56
Tabela 5. Deslocamentos de RMN de 1H e 13C relativos à ciclo(Pro-Leu) pertencente ao cultivo de <i>B. cereus</i> .
Tabela 6. Rotação óptica específica para os isômeros de ciclo(Pro-Leu). 59
Tabela 7. Tempo de retenção, tempo de retenção relativo e quantidade relativa e paraos diasteroisômeros sintéticos de ciclo(Pro-Leu).63
Tabela 8. Quantificação relativa e rotação óptica das ciclo(Pro-Leu) de origem natural. 64
Tabela 9. Cepas de <i>B. licheniformis</i> e suas fontes de isolamento
Tabela 10. Variações conhecidas de liquenisina produzidas por Bacillus sp.87,90,92.77
Tabela 11. Fontes das lipases utilizadas nos experimentos de ciclização daLiquenisina-A105
Tabela 12. Cepas de Bacilli monitoradas para a presença de liquenisinas. 108
Tabela 13. Condições experimentais de obtenção dos espectros de STD120

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplos de peptídeos não ribossomais apresentando variedades estruturais. ⁴
Figura 2. Estratégias de proteção e suas respectivas metodologias de desproteção.
Figura 3. Tipos de resinas mais utilizadas na síntese de peptídeos em fase sólida. 40
Figura 4. Principais linkers utilizados para SPFS: (a) Resina Wang; (b) Resina Rink;
(c) Resina PAM; (d) Resina de Merrifield. ¹ 41
Figura 5. Eletrófilos, nucleófilos e combinações utilizadas para a ativação de
aminoácidos. ^{1,20} 43
Figura 6. Grupos protetores novos e modificados utilizados em SPFS. ^{16,22} 45
Figura 7. Exemplos de organofosforado (DPPA) e triazina (CDMT) mais comuns em
síntese de peptídeos em fase sólida. ¹⁶ 46
Figura 8. Circuito de quorum sensing simplificado para uma célula Gram-negativa. ²⁵
Figura 9. Moléculas comuns no quorum sensing de bactérias. ^{30–32}
Figura 10. Sistema de quorum sensing em bactérias Gram-positivas com as
possíveis rotas intra e extracelular. ^{33–35}
Figura 11. Cromatogramas dos extratos brutos dos cultivos de (a) meio LB sem
cultivo (branco), (b) B. cereus, (c) C. sakazakii e (d) co-cultivo de ambas57
Figura 12. (a) Estrutura do dipeptídeo ciclo(Pro-Leu) e (b) conformação barco
torcido atribuída por Borthwick (2010)58
Figura 13. Cromatograma (CG-FID) dos isômeros de ciclo(Pro-Leu) utilizando
coluna quiral Lipodex [®] -E63
Figura 14. Correlação da intensidade de nOe e rOe em função de $\omega_{ m o au_c}$ para uma
análise em RMN operando em 11,75 T. (Adaptado de Sedaghat Doost <i>et al.</i> , 2019).
⁷⁵ 65
Figura 15. Ilustração do fenômeno de difusão da magnetização de uma
macromolécula para um ligante, consequente saturação de seus sinais e perda de
saturação para estudo de interações por RMN-STD66
Figura 16. A) Espectro de RMN (400.18 MHz, D ₂ O/DMSO-d ₆ – Referência H ₂ O
residual em 4,7 ppm e tampão Fosfato pH 7,0) da molécula ciclo(L-Pro-L-Leu) [10

mmol. L⁻¹] e células de *Bacillus cereus* [16 mg]. B) Espectro controle (irradiando em 30 ppm). C) Espectro de STD (irradiando em -0,5 ppm)......67 Figura 17. A) Espectro de RMN (400.18 MHz, D₂O/DMSO-d₆ – Referência H₂O residual em 4,7 ppm e tampão fosfato pH 7,0) da molécula ciclo(L-Pro-L-Leu) [10 mmol. L⁻¹] e células de *Cronobacter sakazakii* [16 mg]. B) Espectro controle (irradiando em 30 ppm). C) Espectro de STD (irradiando em -0,5 ppm)......68 Figura 18. A) Espectro de RMN (400.18 MHz, D₂O/DMSO-d₆ - Referência H₂O residual em 4,7 ppm e tampão fosfato pH 7,0) da molécula ciclo(D-Pro-D-Leu) [10 mmol. L⁻¹] e células de Bacillus cereus [16 mg]. B) Espectro controle (irradiando em 30 ppm). C) Espectro de STD (irradiando em -0,5 ppm)......69 Figura 19. A) Espectro de RMN (400.18 MHz, D₂O/DMSO-d₆ – Referência H₂O residual em 4,7 ppm e tampão fosfato pH 7,0) da molécula ciclo(D-Pro-D-Leu) [10 mmol. L⁻¹] e células de Cronobacter sakazakii [16 mg]. B) Espectro controle (irradiando em 30 ppm). C) Espectro de STD (irradiando em -0,5 ppm)......70 Figura 20. Estrutura de alguns lipopeptídeos produzidos por Bacillus sp. (a) surfactina, (b) liquenisina, (c) iturina, (d) fengicina.⁸⁵74 Figura 22. Representação da bicamada lipídica de glóbulos vermelhos na (a) ausência e (b) presença de liquenisina nos interstícios. Adaptado de (Coronel et al., Figura 23. Cromatograma de CG-MS da resolução cinética de 3-Figura 24. Cromatograma de CG-FID utilizando coluna quiral de 3hidróxitetradecanoato de etila e 3-acetóxitetradecanoato de etila......82 Figura 25. Forma linear da Liquenisina-A (MM 1039).86 Figura 26. (a) cromatograma de íons extraídos e (b) espectro de massas (ESI(+)-Figura 27. Representação da etapa de ciclização da 3-hidroxi-acil-heptapeptidil-O-Figura 28. Detalhe do espectro do bruto reacional da macrolactonização de Yamaguchi ESI(+)-QqQ).90 Figura 29. Espectros de ESI(-)-QqQ em modo negativo das alíquotas da etapa de ciclização da Liquenisina-A utilizando DIC e HOBt em THF.91

Figura 30. Espectros de ESI(-)-QqQ em modo negativo das alíquotas da etapa de
ciclização da Liquenisina-A utilizando DIC e HOBt em anisol
Figura 31. Espectros de ESI(-)-QqQ em modo negativo das alíquotas da etapa de
ciclização da Liquenisina-A utilizando DIC e DMAP em THF94
Figura 32. Espectros de ESI(-)-QqQ em modo negativo das alíquotas da etapa de
ciclização da Liquenisina-A utilizando DIC e DMAP em anisol
Figura 33. Produtos formados a partir da ciclização do lipopeptídeo correspondente
(m/z 1020), sendo (a) Liquenisina-A e (b) co-produto obtido da ciclização da hidroxila
no ácido aspártico95
Figura 34. Diastereoisômeros detectáveis nos produtos de reação (6) e (7)96
Figura 35. Cromatograma do experimento SIR da m/z 1021 dos experimentos de
ciclização da Liquenisina-A (ESI(+)-QqQ)97
Figura 36. (a) Cromatograma do experimento SIR da <i>m/z</i> 1021 nos isômeros de
Liquenisina-A com ácido (R)-3-tetradecanóico. (b) Espectros de massas em alta
resolução dos picos em 1,2 min e 1,7 min respectivamente (ESI(+)-Q-ToF). Razão
entre eles é de 1,1 para do isômero 1,7 min para o 1,2 min, tomando como base
suas intensidades absolutas98
Figura 37. Espectro de fragmentação (ESI(+)-Q-ToF) da amostra natural de
Liquenisina-A obtida no cultivo de Bacillus licheniformis NVH 1115. (Adaptado de
Rønning et al., 2015). ⁸⁷
Figura 38. Esquema de fragmentação para peptídeos e seus respectivos fragmentos
internos. O exemplo utiliza os fragmentos de n=2 para ilustrar as fragmentações. 100
Figura 39. Espectros e padrão de fragmentação (ESI(+)-Q-ToF - CID 40 V) dos
isômeros (R) de Liquenisina-A com tempo de retenção de (a) 1,2 min e (b) 1,7min.
Figura 40. Espectros de fragmentação (ESI(+)-QToF - CID 40 V) dos quatro
isômeros sintetizados (DMAP/DIC em THF), correspondendo aos picos de (a) 1,0
min (S-(7)); (b) 1,2 min (R-(7)); (c) 1,5 min (S-(6)) e (d) 1,7 min (R-(6)). Picos
característicos de m/z 667 destacados em vermelho102
Figura 41. (a) Fragmento diagnóstico de m/z 667 da Liquenisina-A (6) e (b) ausência
da possibilidade no co-produto (7)103
Figura 42. Espectro com aproximação de ESI(-)-QqQ dos ensaios de ciclização
enzimática da Liquenisina-A. Em destaque os íons quasimoleculares pertencentes à
Liquenisina-A106

Figura 43. Cromatogramas de SIR (ESI(-)-QqQ) da m/z 1019,7 das reações de	
ciclização enzimática da Liquenisina-A1	07
Figura 44. SIR (ESI(+)-Q-ToF) da m/z 1021 do extrato bruto do cultivo de Bacillus	
licheniformis1	09
Figura 45. Cromatograma e referidos espectros de massas (ESI(+)-Q-ToF) dos	
cultivos de Bacillus sp. (Entrada 3)1	10
Figura 46. Cromatograma e referidos espectros de massas (ESI(+)-Q-ToF) dos	
cultivos de Bacillus sp. (Entrada 13)1	10
Figura 47. Reator de vidro utilizado para síntese de peptídeos em fase sólida1	26

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 6. Fluxograma básico de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS).¹.36

Esquema 7. Mecanismo de racemização de aminoácidos *via* oxazolona.¹²42

Esquema 8. Reação de acoplamento utilizando DIC e HOBt. ¹⁹ 42
Esquema 9. Ativação de aminoácido utilizando reagente misto de eletrófilo com nucleófilo embutido (HBTU). ¹ 44
Esquema 10. Síntese de ciclo(Pro-Leu) utilizando SPFS, estratégia Fmoc, DIC e HOBt como reagentes de acoplamento
Esquema 11. Estereoisômeros de ciclo(Pro-Leu) e produtos de interconversão.69.62
Esquema 12 . Reações de hidrólise alcalina dos produtos de resolução cinética (a) (S)-acetilado e (b) (R)-hidróxi82
Esquema 13 . Mecanismo de acoplamento do primeiro aminoácido (L-IIe) em resina Wang utilizando DIC e DMAP como reagentes de acoplamento
Esquema 14. Reação de desproteção da porção N-terminal da L-lle acoplada à resina Wang utilizando 4-metilpiperidina
Esquema 15. (a) Mecanismo da reação do teste de Kaiser ¹⁰⁰ para observação de
aminas livres em peptídeos acoplados em resina e (b) ilustração do resultado do teste
quando negativo e positivo, respectivamente85

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Autorização da Comissão de Biossegurança para manipulação de microrganismos
Anexo 2. Cromatograma do extrato bruto do meio LB (branco)
Anexo 3. Cromatograma da ciclo(Pro-Leu) de Bacillus cereus após purificação151
Anexo 4. Espectro de massas (EI, 70 eV) da ciclo(Pro-Leu) de Bacillus cereus151
Anexo 5. Espectro de RMN de ¹ H (400,18 MHz, CD ₃ OD) da ciclo(Pro-Leu) de Bacillus cereus. Acima: espectro completo; Abaixo: Expansões
Anexo 6. Espectro de RMN de ¹³ C (100,63 MHz, CD ₃ OD) da ciclo(Pro-Leu) de Bacillus cereus
Anexo 7 . Mapa de contorno de RMN 2D de correlações ¹ H, ¹ H COSY (400,18 MHz, CD ₃ OD) ciclo(Pro-Leu) de Bacillus cereus
Anexo 8. Mapa de contorno de RMN 2D de correlações ¹ H (400,18 MHz) e ¹³ C (100,63 MHz) ^{3,4} J HMBC da ciclo(Pro-Leu) de Bacillus cereus
Anexo 9. Mapa de contorno de RMN 2D de correlações ¹ H (400,18 MHz) e ¹³ C (100,63 MHz) ¹ J HSQC da ciclo(Pro-Leu) de Bacillus cereus154
Anexo 10 . Cromatograma da ciclo(Pro-Leu) de Cronobacter sakazakii após purificação155
Anexo 11. Espectro de massas (EI, 70 eV) da ciclo(Pro-Leu) de Cronobacter sakazakii
Anexo 12. Espectro de RMN de ¹ H (400,18 MHz, CD ₃ OD) da ciclo(Pro-Leu) de Cronobacter sakazakii. Acima: espectro completo; Abaixo: Expansões
Anexo 13. Espectro de RMN de ¹³ C (100,63 MHz, CD ₃ OD) da ciclo(Pro-Leu) de Cronobacter sakazakii

Anexo 14. Mapa de contorno de RMN 2D de correlações ¹ H, ¹ H COS	SY (400,18 MHz,
CD ₃ OD) ciclo(Pro-Leu) de Cronobacter sakazakii	

Anexo 17. Cromatograma da ciclo(Pro-Leu) do co-cultivo após purificação.159

Anexo 18. Espectro de massas (EI, 70 eV) da ciclo(Pro-Leu) do co-cultivo......159

Anexo 24. Cromatograma do padrão sintético de ciclo(L-Pro-L-Leu) após purificação.

Anexo 25. Espectro de massas (EI, 70 eV) do padrão sintético de ciclo(L-Pro-L-Leu).

Anexo 31. Cromatograma do padrão sintético de ciclo(D-Pro-L-Leu) após purificação.

Anexo 32. Espectro de massas (EI, 70 eV) do padrão sintético de ciclo(D-Pro-L-Leu).

Anexo 38. Cromatograma do padrão sintético de ciclo(L-Pro-D-Leu) após purificação.

Anexo 39. Espectro de massas (EI, 70 eV) do padrão sintético de ciclo(L-Pro-D-Leu).

Anexo 45. Cromatograma do padrão sintético de ciclo(D-Pro-D-Leu) após purificação.

Anexo 46. Espectro de massas (EI, 70 eV) do padrão sintético de ciclo(D-Pro-D-Leu).

Anexo 54. Cromatograma de CG-FID em coluna quiral Lipodex-E[®] da ciclo(Pro-Leu) de Cronobacter sakazakii......179 Anexo 55. Cromatograma de CG-FID em coluna quiral Lipodex-E[®] da ciclo(Pro-Leu) 56. Cromatograma e espectro de massas (IE - 70 eV) do 3-Anexo hidroxitetradecanoato de etila......180 Anexo 57. Cromatograma e espectro de massas (IE - 70 eV) do 3acetóxitetradecanoato de etila......180 **Anexo 58.** Espectro de RMN de ¹H (400,18 MHz, CDCl₃) do 3-hidróxitetradecanoato Anexo 59. Espectro de RMN de ¹³C (100,63 MHz, CDCl₃) do 3-hidróxitetradecanoato Anexo 60. Espectro de RMN de ¹H (400,18 MHz, CD₃OD) do ácido 3-Anexo 61. Espectro de RMN de ¹³C (100,63 MHz, CD₃OD) do ácido 3-Anexo 62. Espectro de RMN de ¹H (400,18 MHz, CDCl₃) do 3-acetóxitetradecanoato Anexo 63. Espectro de RMN de ¹³C (100,63 MHz, CDCl₃) do 3-acetóxitetradecanoato Anexo 64. (a) Cromatograma de UPLC-Q-ToF e (b) experimento SIR da ciclização da Liquenisina-A linear por Steglich modificado em THF......184 Anexo 65. (a) Cromatograma de UPLC-Q-ToF e (b) experimento SIR da ciclização da (R)-Liquenisina-A linear por Steglich modificado em THF......185

SUMÁRIO

1.	IN	ΓRΟ	DUÇÃO	.29
1	.1.	PE	PTÍDEOS NÃO RIBOSSOMAIS	.29
1	.2.	SÍN	ITESE DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA (SPFS)	.35
1.2.1.		2.1.	Estratégias de Proteção	.36
1.2.2.		2.2.	Resinas e Ligantes	.39
	1.2	2.3.	Ativação e Acoplamento	.41
	1.2	2.4.	Atualidades em SPFS	.45
2.	OE	BJE1	TIVOS	.47
2	.1	OB	JETIVOS GERAIS	.47
2	.2	Ca	oítulo 1	.47
2	.3	Ca	oítulo 2	.47
3.	CA	PÍT	ULO 1	.49
3	.1.	CO	NSIDERAÇÕES GERAIS	.49
	3.1	.1.	Quorum Sensing Bacteriano	.49
	3.1	.2.	Papel das 2,5-Dicetopiperazinas no Quorum Sensing Bacteriano	.53
3	.2.	OB	JETIVOS ESPECÍFICOS	.54
3	.3.	RE	SULTADOS E DISCUSSÃO	.55
	3.3	8.1.	Cultivos de Bacillus cereus, Cronobacter sakazakii e Co-Cultivo	.55
	3.3	8.2.	Caracterização do Peptídeo Cíclico Extraído das Culturas	.58
	3.3	8.3.	Síntese dos Padrões Isoméricos da Ciclo(Pro-Leu)	.60
	3.3	8.4.	Separação Enantiomérica dos Padrões de Ciclo(Pro-Leu)	.61
	3.3	8.5.	RMN-STD para Mapeamento do Epitopo de Ciclo(L-Pro-L-Leu) e Ciclo	ס(D-
	Pro	o-d-l	eu) em sua Interação com Células Íntegras das Bactérias	.64
3	.4.	CO	NCLUSÕES PARCIAIS	.70
4.	CA	ΡÍΤ	ULO 2	.73

4.	1. CC	NSIDERAÇÕES GERAIS	73			
	4.1.1. Biossurfactantes Lipopeptídicos Produzidos por Bacillus sp					
4.1.2. <i>Bacillus sp.</i> e Liquenisinas						
4.	4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS					
4.	4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO					
	4.3.1.	Síntese da Liquenisina-A	79			
	4.3.1.1	Síntese e resolução cinética do ácido 3-hidroxitetradecanóico	80			
	4.3.1.2. Síntese em fase sólida do lipoheptapeptídeo linear					
4.3.2. Ciclização Química e Enzimática da Liquenisina-A						
	4.3.2.1	. Ciclização química	88			
	4.3.2.1	.1. Ciclização de Yamaguchi	89			
	4.3.2.1	.2. Ciclização utilizando DIC/HOBt	90			
	4.3.2.1	.3. Esterificação de Steglich modificada	92			
	4.3.2.1	.4. Análise dos produtos das reações de ciclização	95			
	4.3.2.2	. Ciclização enzimática	104			
	4.3.3.	Ocorrência da Liquenisina-A em Espécies de Bacillus sp	108			
4.	4. CC	NCLUSÕES PARCIAIS	111			
5.	PROC	EDIMENTO EXPERIMENTAL	114			
5.	1. CA	PÍTULO 1	114			
	5.1.1.	Procedimentos Gerais Adotados no Laboratório de Biocatálise	114			
	5.1.2.	Condições de cultura	114			
	5.1.3.	Extração de 2,5-dicetopiperazinas	114			
	5.1.4.	Síntese dos Padrões de Estereoisômeros	115			
	5.1.5.	Cromatografia gasosa - espectrometria de massa (GC-EM)	117			
	5.1.6.	Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H e ¹³ C	118			
	5.1.7. FID)	Cromatografia Gasosa com Detecção por Ionização em Chama (0 118	CG-			

	5.2.15. Massas 5.2.16. Massas 5.2.17.	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Acoplada a Espectrometria de 5 – Baixa Resolução
	5.2.15. Massas 5.2.16. Massas	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Acoplada a Espectrometria de 5 – Baixa Resolução
	5.2.15. Massas 5.2.16.	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Acoplada a Espectrometria de - Baixa Resolução
	5.2.15. Massas	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Acoplada a Espectrometria de - Baixa Resolução
		Oremeteerefie Liquide de Liller Eficiêncie Acemiente - Espectation de la
	5.2.14.	Espectrometria de Massas por Infusão Direta128
	5.2.13.	Ciclização da Surfactina Utilizando Lipase de Diferentes Fontes128
	5.2.12.	Ciclização da Liquenisina Utilizando DIC/HOBt e Steglich Modificada 127
	/ -	
	5.2.11.	Ciclização da Liquenisina Utilizando Macrolactonização de Yamaguchi
	5.2.10.	Teste de Kaiser127
	5.2.9.	Síntese em Fase Sólida do Lipoheptapeptídeo Linear125
	5.2.8.	Protocolo para Quantificar a Carga da Isoleucina em Resina Wang125
	5.2.7.	Adição do Primeiro Aminoácido à Resina Wang124
	5.2.6. FID)	Cromatografia Gasosa com Detecção por Ionização em Chama (CG- 124
	5.2.5.	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM) .
	5.2.4.	Rotação Óptica123
	5.2.3.	Resolução Cinética do 3-hidroxitetradecanoato de etila122
	5.2.2.	Hidrólise Alcalina do 3-hidroxitetradecanoato de etila121
	5.2.1.	Síntese do 3-hidroxitetradecanoato de etila120
5.	2. CAI	>ÍTULO 2
	5.1.9.	Experimento de STD (<i>Saturation Transfer Difference</i>)
	5.1.6.	nolação oplica

XOS150



Introdução Geral



1. INTRODUÇÃO

1.1. PEPTÍDEOS NÃO RIBOSSOMAIS

Aminoácidos são moléculas que carregam consigo dois ou mais grupos reativos (ácido carboxílico, amina e grupos laterais R reativos), sendo de extrema importância para os processos biológicos existentes no planeta. Vinte deles são diretamente decodificados pelo DNA humano e estão relacionados na Tabela 1. Quando há interconexão de dois deles, utilizando desses sítios reativos, uma ligação do tipo amida é formada (ligação peptídica) e a nova molécula passa a se chamar peptídeo (Esquema 1).¹

Tabela 1.	Aminoácidos	essenciais	codificados	pelo DN	A humano,	suas	abreviaturas
e códigos	de uma letra.	2					

Estrutura	Nome	Abrev.	Código	Estrutura	Nome	Abrev.	Código
	Glicina	Gly	G	HO NH2	Tirosina	Tyr	Y
	Alanina	Ala	А	HO O NH2			
HO NH2	Valina	Val	V	, s	Metionina	Met	М
				HO NH2 HS	Cisteína	Cys	С
•	Leucina	Leu	L		Serina	Ser	S
HO NH2	Isoleucina	lle	I		Glutamato	Glu	F
но	Prolina	Pro	Р	одон			L
HO NH ₂	Fenilalanina	Phe	F	HO NH2	Glutamina	GIn	Q
	Treonina	Thr	Т	HO ^{NH} 2 NH2	Lisina	Lys	К
	Aspartato	Asp	D		Histidina	His	н
HU' L	Triptofano	Trp	W				
	Asparagina	Asn	Ν		Arginina	Arg	R



Esquema 1. Reação de condensação de aminoácidos e formação de um peptídeo.²

Peptídeos possuem inúmeras funções biológicas relevantes, agindo como neurotransmissores, moléculas estruturais em tecidos, hormônios, analgésicos, anticorpos, fatores de crescimento, antimicrobianos, comunicação intracelular entre outros.^{3,4} Além disso, constituem o primeiro passo para a construção de proteínas e, apesar de não haver um limite que especifique claramente quando um peptídeo se torna uma proteína, uma definição funcional aceitável as classificam como peptídeos com mais de 40 aminoácidos.⁵

Peptídeos ribossomais são assim chamados quando são produzidos pelo ribossomo a partir de uma interpretação biológica do código genético em série, sendo o processo natural que origina as proteínas.⁵ Alternativamente a este processo, existe uma rota biossintética conhecida como não ribossomal, onde os peptídeos são sintetizados enzimaticamente em um processo totalmente dependente da especificidade de tais enzimas. A essas enzimas multifuncionais damos o nome de peptídeo não ribossomal sintetases (NRPS – do inglês *non-ribosomal peptide synthetases*), ocorrendo sem uma predeterminação da sequência de aminoácidos por ácidos nucleicos. A sequência de aminoácidos do peptídeo resultante é totalmente dependente da sequência de módulos da enzima em questão.

A partir da síntese não ribossomal de peptídeos é possível se obter produtos com maior diversidade, como peptídeos com alta quantidade de D-aminoácidos, *N*-metilados, porções heteroatômicas não usuais, estruturas cíclicas e

porções *N*- e *C*-terminais modificadas. A Figura 1 exemplifica e ilustra algumas das variedades citadas.^{3,5}



Figura 1. Exemplos de peptídeos não ribossomais apresentando variedades estruturais.⁴

Apesar de apresentar uma grande variedade de estruturas, a biossíntese de peptídeos não ribossomais acontece por um mesmo mecanismo modelo baseado em tioesterificação. O mecanismo se dá, basicamente, por complexos multienzimáticos, que possuem módulos, com domínios dentro de si, responsáveis pelo reconhecimento de um substrato, seguido por sua ativação, incorporação, modificação, alongamento e liberação para o meio.^{3,5,6}

Em um módulo de alongamento, observa-se o domínio (A), responsável pelo reconhecimento do aminoácido, que promove a ativação do aminoácido, o domínio (PCP), que se trata de uma proteína carreadora de peptidila, realizando o intermédio entre a ativação e a condensação do novo aminoácido, promovida pelo domínio (C), sendo a ordem C-A-PCP a mais típica. ^{3,5}

A adenilação e o transporte para a proteína carreadora de peptídeos acontece como mostrado no Esquema 2 (I), onde há ativação de um aminoácido a partir de um ATP que é atacado pelo carboxilato do aminoácido e após abandono do grupo difosfato, se encontra na forma de aminoacil-adenosinamonofosfato (Aminoacil-AMP).^{5,7} Com a ativação do aminoácido pelo grupo AMP, ocorre o ataque nucleofílico do grupo tiol-enzima (Esquema 2(II)), migrando para o domínio (PCP). Estando dois diferentes aminoácidos ligados à dois diferentes grupos (PCP), um de cada módulo, ocorre o ataque nucleofílico de um dos aminoácidos a outro, sendo esse ataque catalisado pelo domínio de condensação (C). Com o ataque, ocorre um desprendimento do aminoácido do módulo 1 que passa a fazer parte do peptídeo presente no módulo 2, que assim segue-se até completa incorporação do peptídeo, como indica o Esquema 3.^{3,7}



Esquema 2. Mecanismo de ativação e promoção de um aminoácido do domínio (A) para o domínio (PCP). **I.** Reação geral de ativação e promoção do aminoácido; **II.** Mecanismo de ativação de aminoácido a partir de ATP formando aminoacil-AMP e

ataque nucleofílico do grupo tiol-enzima; **III.** Detalhe da ligação do sítio da enzima pertencente ao domínio (PCP) onde o ácido pantotênico se liga a uma cisteamina formando a pantoteína tornando-se um nucleófilo ligado à enzima.⁵



Esquema 3. Módulos e domínios de inserção de aminoácidos em cadeia peptídica de origem não ribossomal. ⁵

Ao atingir o tamanho pré-moldado pelas enzimas que o sintetizam, o peptídeo encontra, ao fim do último módulo, uma enzima tioesterase (Esquema 4) que promove o rompimento da ligação tioéster e formação de uma ligação éster, a qual poderá gerar, basicamente, dois produtos, um cíclico quando há o ataque da porção *N*-terminal do próprio peptídeo ao éster, ou um peptídeo linear, resultado do ataque de água, que promove a hidrólise do mesmo para o meio.



Esquema 4. Fase de clivagem e liberação do peptídeo formado pela biossíntese não ribossomal de peptídeos.^{5,8}

Outra observação comum em peptídeos de origem não ribossomal, é a presença de D-aminoácidos incorporados em sua cadeia, que confere a eles atividade biológica peculiar.⁹ Existem duas maneiras efetivas de se incorporar aminoácidos com configuração D-, sendo elas a ativação de um D-aminoácido produzido externamente por uma racemase utilizando o domínio de adenilação (A), ou ainda, uma epimerização *in situ* de um L-aminoácido já acoplado em um domínio (PCP).¹⁰

A rota mais comum é a que possui a racemase, sendo normalmente realizada por um domínio de epimerização (E), com aproximadamente 450 aminoácidos, o qual acredita-se possuir uma estrutura parecida com o domínio de condensação (C). O lipopeptídeo Surfactina, por exemplo, é produzido por espécies de *Bacillus sp.* e apresenta dois domínios (E), sendo um no módulo 3 e outro no módulo 6, onde são produzidas D-leucinas. O Esquema 5 demonstra o fenômeno da epimerização nos módulos contendo o domínio (E).^{5,10}



Esquema 5. Processo de epimerização de L- para D-aminoácidos na construção de peptídeos não ribossomais. (a) Etapas de incorporação de aminoácidos onde (1) corresponde à etapa de adenilação e consequente ativação do aminoácido que está entrando (AA); (2) corresponde ao ataque nucleofílico do grupo tiol que incorpora o aminoácido (AA) no domínio (PCP); (3) corresponde ao ataque de AA a um outro aminoácido (AA_x), incorporando-o; (4) corresponde ao ataque da Histidina da

racemase, promovendo a epimerização do aminoácido AA, que torna-se um Daminoácido e (5) corresponde à passagem do peptídeo para o próximo módulo para continuação ou terminação do peptídeo. (b) Detalhe do mecanismo de epimerização de uma L-leucina para uma D-leucina, como no processo (4).^{4,5} Adição de ácidos graxos, outros metabólitos, ou ainda ciclizações heteronucleares ocorrem de forma similar, utilizando outros domínios específicos, tornando possível a síntese de peptídeos não ribossomais com uma vasta gama de atividade biológica e importância ecológica.¹⁰ (Adaptado de Sieber e Marahiel, 2005)

1.2. SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA (SPFS)

Devido ao fato de possuírem tamanha riqueza em diversidade e aplicações, os peptídeos chamam, desde sempre, a atenção de pesquisadores do mundo todo. Não obstante disso, Robert Bruce Merrifield, buscando entender melhor o papel dos peptídeos na nutrição animal, realizou em 1963 pela primeira vez a síntese de tetrapeptídeos utilizando uma matriz sólida como suporte, alegando que a síntese clássica de peptídeos em solução havia, até então, sido uma maneira muito efetiva de se obter peptídeos de cadeia curta, porém, a síntese dos mesmos quando em cadeia longa, não era viável por tal técnica. Para tanto, acoplou aminoácidos de maneira segmentada em uma matriz polimérica de poliestireno na busca de sobrepujar as limitações da técnica clássica.¹¹

Desta maneira, surgiu a síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS), tornando viável a preparação de longas cadeias peptídicas com um maior grau de pureza e uma razoável facilidade de execução. A síntese em fase sólida foi alvo de muitos experimentos na época e evoluiu muito até chegar aos dias de hoje, sendo encontrados muitos protocolos diversificados de acordo com o tipo de peptídeo e reagentes que o usuário deseja utilizar.^{1,11}

Comparada à síntese clássica, a síntese em fase sólida é altamente recomendada, pois os intermediários desejados são facilmente separados dos reagentes por simples lavagem do suporte com solventes e filtrações em placa porosa, tornando desnecessárias as operações de extração e cristalização.¹²

O processo de planejamento de uma SPFS começa com a escolha do suporte polimérico. O mesmo tendo sido escolhido, deve-se acoplar o primeiro aminoácido na resina, e então seguir os protocolos de desproteção e acoplamento de novos aminoácidos (Esquema 6). Dependendo da sequência de aminoácidos, não é aconselhável que se exceda 10 aminoácidos devido ao início da formação de α -hélices.^{1,12}





1.2.1. Estratégias de Proteção

Uma das bases da SPFS é a utilização de grupos protetores para que não haja reações indesejáveis e formação de subprodutos de difícil separação do produto de interesse. Como mostrado anteriormente, existem dois tipos de proteção a que um aminoácido é submetido, a proteção da porção *N*-terminal e a proteção do grupamento R lateral. Para tanto, existem duas estratégias de proteção muito utilizadas atualmente, a estratégia de proteção com 9-fluorenilmetiloxicarbonila (**Fmoc** – *N*-terminal) e *tert*-butila (R lateral) e a estratégia *tert*-butiloxicarbonila (**Boc** – *N*-terminal) e benzila (R lateral) (Figura 2).


Figura 2. Estratégias de proteção e suas respectivas metodologias de desproteção.

Dentre as estratégias acima descritas, a mais difundida é a Fmoc, por sua ortogonalidade quanto à desproteção da porção *N*-terminal e da desproteção dos grupamentos laterais R e, concomitantemente, clivagem do peptídeo da resina. A estratégia Fmoc utiliza para desproteção (*N*-terminal) meio fortemente alcalino, enquanto para a desproteção de grupamentos R e clivagem da resina utiliza ácidos fortes e concentrados. Essa ortogonalidade garante que não haja desproteções e clivagens indesejadas durante o processo de síntese dos peptídeos. O grupamento utilizado para a proteção de cadeias laterais R é o *tert*-butila (Figura 2), um grupo lábil em meio ácido que sofre clivagem no mesmo instante que a clivagem final do peptídeo da resina. Outras vantagens da metodologia Fmoc é a utilização de ácido trifluoroacético (TFA) como agente de clivagem e desproteção, sendo este um bom solvente para o peptídeo final e passível de utilização em vidraria comuns de laboratório, sendo volátil e podendo ser facilmente evaporado.

Já a estratégia Boc utiliza TFA para desproteção *N*-terminal, o que não é compatível com o uso do grupo *tert*-butila para proteção da cadeia lateral R. Por este motivo, a proteção de R é realizada por um grupo benzila, o qual é lábil somente na presença de ácidos fortes altamente nucleofílicos, como o ácido fluorídrico (HF) anidro. No entanto, a utilização de HF demanda vidrarias especiais e tratamentos de retirada da água. A Tabela 2 traz as vantagens e desvantagens de cada metodologia. Apesar de antiga, tendo sido usada por Merrifield em 1963, a estratégia Boc ainda é utilizada quando o peptídeo a ser sintetizado é sensível a meios alcalinos, como

depsipeptídeos esterificados ou tioesterificados, onde consequentemente a estratégia Fmoc não seria compatível.

Tabela 2. Vantagens e desvantagens das estratégias Boc/benzila e Fmoc/*t*-butila em síntese de peptídeos em fase sólida (Adaptado de Jensen, Shelton e Pedersen, 2013).¹³

	Boc/Benzila	Fmoc/ <i>t</i> Bu
Requer equipamentos especiais	Sim	Não
Custo dos reagentes	Baratos	Caros
Solubilidade dos peptídeos	Maior	Menor
Eficiência de desproteção	Alta	Pode ser baixa
Pureza dos peptídeos hidrofóbicos	Alta	Pode ser baixa
Problemas de agregação	Menos frequente	Mais frequente
Tempo de síntese	~20 min/AA	~20 – 60 min/AA
Desproteção final	HF	TFA
Segurança	Potencialmente perigoso	Relativamente seguro
Ortogonalidade	Não	Sim

Além disso, devido às particularidades das funções orgânicas presentes nos aminoácidos, diferentes grupos protetores das cadeias laterais R podem ser utilizados a fim de garantir o sucesso da síntese de um peptídeo (Figura 4).



Figura 4. Grupos protetores comuns para cadeias laterais R de aminoácidos. Á esquerda os grupos podem ser removidos utilizando TFA e à direita são removidos como indicam as respectivas legendas. *t*-Bu: *tert*-butila; **Boc**: *tert*-butiloxicarbonila; **Trt**: tritila; **Pbf**: 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonila; **Acm**: Acetamidometila.

1.2.2. Resinas e Ligantes

Existem alguns requisitos para a escolha da matriz polimérica que suporta os aminoácidos que comporão o peptídeo de interesse. Dentre eles, salienta-se que o suporte deve ser permeável e facilmente solvatado por solventes polares apróticos para minimizar interferências na reação, devendo o mesmo também ser insolúvel em todos os solventes utilizados.¹

Atualmente, existe no mercado uma grande variedade de resinas para a SPFS, porém todas podem ser divididas basicamente em três subgrupos. As mais clássicas são as de poliestireno (PS), seguidas por polietilenoglicol (PEG) e as de polietilenoglicol de ligação cruzada (PEG-CL).^{1,14}



Figura 3. Tipos de resinas mais utilizadas na síntese de peptídeos em fase sólida.

As cargas de acoplamento dos aminoácidos nas resinas giram em torno de 0,5 a 0,8 mmol de AA/g de resina. Porém, existem alguns casos especiais, como peptídeos que contém maior número de aminoácidos com interações significativas entre seus grupamentos R livres ou com uma complexidade maior, em que é necessário resinas especiais com carga entre 0,1 e 0,2 mmol/g.^{1,15}

Ao final da cadeia polimérica das resinas existem ligantes (do inglês *linkers*) que serão os ganchos que ligam a resina aos peptídeos de interesse. Trata-se de uma molécula bifuncional, que atua tanto ligando o peptídeo à resina, como também como um grupo protetor. A maioria das resinas comercialmente disponíveis já possuem os ligantes pré-instalados, podendo, inclusive, já acompanhar o primeiro aminoácido acoplado.^{1,12,15}

Ao planejar-se a síntese de um peptídeo, é necessário que se opte incialmente se é desejado um ácido ou uma amida livre na porção *C*-terminal após a clivagem do mesmo da resina. Na estratégia Fmoc, para obtenção de um peptídeo com terminação ácido carboxílico, comumente se utiliza a resina Wang (4-alcoxibenzil álcool) (Figura 4 a), a qual possui maior labilidade frente a ácidos. A utilização de álcoois 4-alcoxibenzílicos promove um fácil acoplamento e não induzem a epimerização do aminoácido quando da adição do mesmo à resina. ^{1,16}

Quando se almeja obter um peptídeo com a porção *C*-terminal na forma de amida, a resina de maior destaque é a Rink, que é um tipo benzidrilamina (Figura 3 b), sendo também muito utilizada para a obtenção de peptídeos onde se necessita modificar o grupamento *C*-terminal para outras funções, como por exemplo aldeído-peptídeos ou amido-peptídeos. ^{1,16,17}

A estratégia Boc demanda mais atenção quanto ao planejamento dos ligantes que estarão na resina a ser utilizada. Devido ao método de desproteção ácida (mesmo utilizado para a clivagem do peptídeo da resina), é necessário que se

disponha de ligantes com menor labilidade frente a ácidos. Alguns exemplos de resinas utilizadas para a estratégia Boc são a fenilacetamidometila (PAM) e a resina de Merrifield (clorometil) (Figura 3 c e d).¹



Figura 4. Principais *linkers* utilizados para SPFS: (a) Resina Wang; (b) Resina Rink; (c) Resina PAM; (d) Resina de Merrifield.¹

1.2.3. Ativação e Acoplamento

Para que a ligação peptídica seja formada em um sistema de SPFS, é necessário que se promova a ativação da carbonila que irá ser atacada pelo grupo *N*-terminal do aminoácido ou peptídeo previamente ligado à resina. Para tanto, existem mais de uma estratégia, estando estas ligadas a fatores como a natureza das espécies a serem ativadas, a sequência de peptídeos que já está ligado a resina, entre outros. ^{15,17,18}

Duas metodologias podem ser utilizadas para a ativação de aminoácidos, a *in situ*, onde reagentes ativadores são adicionados à solução onde está a resina, ou o uso de aminoácidos que já são comercializados na forma de ésteres ativados, não sendo necessário reagentes adicionais.¹ A ativação *in situ*, comumente utilizando carbodiimidas, como diciclohexanocarbodiimida (DCC) ou diisopropilcarbodiimida (DIC), é a metodologia mais utilizada, sendo o uso de DIC preferido, pois o mesmo é líquido e o seu sub-produto derivado de uréia é solúvel em DMF, podendo ser removido do meio facilmente. Contudo, a utilização de carbodiimidas, exclusivamente, pode levar à uma superativação dos aminoácidos por meio da formação de oxazolonas, e levando à posterior epimerização do aminoácido (Esquema 7), processo comumente indesejado.^{12,15}



Esquema 7. Mecanismo de racemização de aminoácidos via oxazolona.¹²

Para contornar tal problema, são utilizados nucleófilos auxiliares, como benzotriazóis, os quais convertem rapidamente os aminoácidos em ésteres ativados não-epimerizáveis, garantindo a integridade do centro estereogênico. O Esquema 8 ilustra a reação de ativação completa de um aminoácido usando DIC e 1-hidroxibenzotriazol (HOBt).^{12,19}



Esquema 8. Reação de ativação de um aminoácido utilizando DIC e HOBt.¹⁹

Outros reagentes podem ser utilizados para tal ativação (Figura 5), sendo eles eletrófilos (carbodiimidas), nucleófilos auxiliares (benzotriazóis e oximas), além de eletrófilos com nucleófilos embutidos.^{1,19,20}



HBTU: N-[(1H-benzotriazol-1-il)(dimetilamino)metileno]-N-metilmetanamínio hexafluorofosfato N-óxido; HATU: N-[(dimetilamino)- 1H-1,2,3-triazol[4,5-b]piridina-1-ilmetileno]-N-metilmetanamínio hexafluorofosfato N-óxido;

BOP: 1-benzotriazoloxi-tris-N-dimetilfosfonio hexafluorofosfato;

PyBOP: 1-benzotriazoloxi-tris-pirrolidinofosfonio hexafluorofosfato;

COMU: 1-[(1-(Ciano-2-etoxi-2-oxoetilideneaminooxi)-dimetilamino-morfolino-metileno)] metanamínio hexafluorofosfato)

Figura 5. Eletrófilos, nucleófilos e combinações utilizadas para a ativação de aminoácidos.^{1,20}

Os eletrófilos com nucleófilos embutidos atuam em meio alcalino, havendo o ataque inicial do aminoácido ao eletrófilo, com eliminação do nucleófilo embutido, o qual reage com o aminoácido protegido intermediário para formar o aminoácido protegido final, como demonstra o Esquema 10.¹



Esquema 9. Ativação de aminoácido utilizando reagente misto de eletrófilo com nucleófilo embutido (HBTU).¹

O tempo necessário para a reação de ativação é dependente da natureza da espécie ativada, da sequência dos peptídeos que já estão ligados à resina e da concentração dos reagentes. Após a ativação, como indicado nos Esquemas 8 e 9, independente do agente ativador, ocorre a reação de acoplamento, onde o *N*-terminal do aminoácido ou peptídeo ligado à resina ataca a carbonila ativada do aminoácido livre e forma-se uma ligação peptídica. O aminoácido antes livre, agora encontra-se acoplado ao peptídeo ainda ligado à resina, seguindo-se para a posterior desproteção do novo *N*-terminal e acoplamento de um novo aminoácido ou clivagem do peptídeo e recuperação do mesmo.^{19,21}

A clivagem do peptídeo já foi descrita anteriormente e consiste da utilização de um ácido forte e não nucleofílico, como o ácido trifluoroacético (TFA). O peptídeo é desacoplado da resina na forma de ácido ou amida e estará livre sobrenadante, sendo então possível precipitá-lo através do uso de solventes apróticos em baixas temperaturas ou simplesmente evaporando o TFA.^{1,15}

1.2.4. Atualidades em SPFS

Aproximadamente um século separam a síntese do primeiro peptídeo dos dias atuais, e quase seis décadas da primeira síntese utilizando síntese de peptídeos em fase sólida. Durante esse tempo, muitos reagentes foram testados e muitas alternativas surgiram, não extinguindo as metodologias que aqui foram descritas, mas abrindo um leque ainda maior de opções que suprem as demandas dos novos tipos de peptídeos que estão sendo sintetizados, da produção industrial dos mesmos em larga escala para uso como medicamento e da necessidade de se diminuírem os custos agregados à produção.^{12,16}

A grande preocupação dos cientistas da área ainda é a racemização do aminoácido que será acoplado à cadeia peptídica, o que explica os avanços em grupos protetores e agentes ativadores que previnam tais fenômenos. Como mostrado anteriormente (Esquema 7), a superativação dos reagentes de acoplamento leva à ciclização do aminoácido ativado e consequente epimerização do centro estereogênico.¹²

Observa-se que quando se possuem grupos retiradores de elétrons na porção *N*-terminal, a chance de formação das oxazolonas é menor. Para tanto, grupos protetores antigos foram adaptados, como o **Dtb-Fmoc** (2,7-di-*tert*-butil-9fluorenilmetiloxicarbonil) e **Bts-Fmoc** (2,7-bis(trimetilsilil)-9-fluorenilmetiloxicarbonil), assim como novos surgiram, sendo alguns deles o **Bsmoc** (1,1-dioxobenzo[*b*]tiofen-2-ilmetiloxicarbonil), **Bspoc** (2-(*tert*-butilsulfonil)-2-propiloxicarbonil) e **Mspoc** (2metilsulfonil-3-fenil-1-prop-2-eniloxicarbonil) como mostra a Figura 6.^{16,22}



Dtb-Fmoc; X = CMe₃ **Bts-Fmoc;** X = SiMe₃



Como discutido anteriormente, hidroxilaminas são utilizadas para remover a porção carbodiimida dos aminoácidos ativados em uma velocidade efetiva e assim evitar a racemização. No entanto, quanto às hidroxilaminas pouca coisa foi mudada em vinte anos, visto que HOBt já se tratava de um ótimo agente formador de ésteres ativados. Contudo, houve um aumento nos estudos quanto às oximas, já que essas são uma alternativa verde ao uso de hidroxilaminas triazólicas aromáticas. O grande desafio quanto às oximas é conseguir um bom grupo retirador de elétrons que a torne um nucleófilo ainda melhor e aumente a velocidade da reação, uma vez que a lentidão pode provocar a racemização do aminoácido.^{16,20}

Outras opções utilizando sais de fosfônio e sais de amínio também surgiram, sendo que estas modificações foram realizadas para suprir problemas pontuais no que tange a estabilidade e prevenção da formação de sub-produtos gerados por reações das cadeiras laterais R, como formação de δ -lactama por argininas, cianoderivados por asparagina ou glutamina, ou formação de ácido α -aminocrotônico por treonina. Além disso surgiram novos tipos de reagentes de acoplamento, como os organofosforados (derivados de azida difenilfosfórica, DPPA) e as triazinas (mais comum: clorodimetóxitriazina, CDMT), como mostram os exemplos da Figura 7.^{12,16,17,19}



Figura 7. Exemplos de organofosforado (DPPA) e triazina (CDMT) mais comuns em síntese de peptídeos em fase sólida.¹⁶

Outra técnica incorporada à SPFS é a utilização de micro-ondas para aumentar a velocidade e a eficiência da síntese tanto na desproteção, quanto no acoplamento do novo aminoácido. A essa técnica foi dado o nome de SPFS de alta eficiência, tendo surgido no fim do século XX quando os primeiros experimentos utilizando micro-ondas já demonstravam resultados promissores. Atualmente, o uso de micro-ondas se mostrou um grande aliado para a síntese rápida e com alto índice de pureza de grandes peptídeos.²³

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos fundamentais deste trabalho consistem na utilização da síntese de peptídeos em fase sólida para a síntese de produtos naturais com funções distintas e atividades biológicas diversas buscando compreendê-los de forma minuciosa e abrir precedentes para a síntese de outros produtos naturais similares e análogos.

2.2 Capítulo 1

Síntese em fase sólida dos quatro estereoisômeros de um dipeptídeo cíclico, originalmente isolado da comunicação bacteriana de *Bacillus cereus* e *Cronobacter sakazakii*, visando a elucidação da configuração absoluta da molécula natural, a fim de uma melhor compreensão da coexistência amigável de ambos em indústrias alimentícias. Adicionalmente, estudar por Ressonância Magnética Nuclear as interações dos dipeptídeos sintetizados com as células íntegras de ambas as bactérias para a determinação do mapa do epítopo utilizando a técnica de STD (*Saturation Transfer Difference*).

2.3 Capítulo 2

Seguindo na mesma linha, o segundo capítulo traz como objetivo a síntese de isômeros de um lipodepsipeptídeo produzido por *Bacillus licheniformis* conhecido como Liquenisina-A, visando a elucidação da configuração absoluta do 3-hidroxiácido graxo existente na cadeia peptídica. Tal ácido graxo promove a ciclização do peptídeo, permitindo que a molécula seja utilizada como biossurfactante pela bactéria e tendo também conhecida atividade antimicrobiana. Além disso, objetivou-se avaliar a regiosseletividade de diferentes estratégias de ciclização para a molécula.



Capítulo 1

"Ciclo(L-Pro-L-Leu) como comunicação cruzada entre *Bacillus cereus* e *Cronobacter sakazakii*"



3. CAPÍTULO 1

3.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

3.1.1. Quorum Sensing Bacteriano

Ao contrário do que se esperava, bactérias são seres complexos, coloniais e com capacidade de captar informações originadas por plantas e principalmente por outras bactérias. Esse tipo de comunicação é possível através da produção e captação de moléculas pelas células e são capazes de induzir a regulação da expressão gênica dependentes da densidade celular. A esse processo de secreção e captação de sinais químicos damos o nome de *quorum sensing*. Fenômenos como formação de biofilme, secreção de fatores de virulência, bioluminescência, produção de antibióticos, esporulação e competência para absorção de DNA são descritos como resultado de comunicação bacteriana.^{24–26}

Muitos gêneros de bactérias já foram estudados, nos quais este sistema de comunicação foi identificado, apresentando-se como uma capacidade de monitoramento da presença de outras bactérias ao redor, a partir da produção e incorporação das moléculas sinalizadoras, também conhecidas como autoindutores. Autoindutores são excretados por todos os indivíduos, o que gera um gradiente na concentração do mesmo no meio em que as bactérias estão crescendo. Esse aumento na concentração atinge um limite e as moléculas então permeiam as células vizinhas promovendo uma ação celular conjunta. As células estão assim agindo como um grande organismo multicelular, organizando respostas unificadas que favorecem a sobrevivência de toda a população. A Figura 8 demonstra um esquema simplificado do sistema de *quorum sensing*. ^{24,25,27,28}

Os genes envolvidos são os estruturais (*protX*), que podem gerar os fenômenos descritos (virulência, bioluminescência, etc.), e os genes regulatórios (*protI* e *protR*), que atuam no processo regulatório de todo o sistema coletivo. Na Figura 8 observam-se as proteínas de síntese do autoindutor (ProtI) e proteínas receptoras dos autoindutores (ProtR). Conforme a densidade celular aumenta, a concentração do autoindutor aumenta dentro e fora da célula.^{25,28}



Figura 8. Circuito de quorum sensing simplificado para uma célula Gram-negativa.²⁵

A ProtR se liga ao autoindutor, quando este se encontra em concentração crítica, e o complexo autoindutor-ProtR se liga ao promotor *protX* e *protI* e ativa a transcrição desse operon, levando a um aumento exponencial da síntese do autoindutor pelo aumento da transcrição do gene *protI* e a um aumento exponencial da produção de fenômenos pela transcrição do gene *protX*. O complexo ProtR-autoindutor também se liga ao promotor do gene *protR*, mas nesse caso o complexo reprime a transcrição de *protR*, num mecanismo de compensação da elevação da transcrição de *protX*. ^{25,29}

Em bactérias com fenômenos fenotípicos mais complexos pode haver mais de um autoindutor liberados, captados e diferentes promotores ativados ao mesmo tempo. Após o estudo e a elucidação do tipo de comunicação de vários grupos de bactérias, o desafio é entender as comunicações interespécies das células procarióticas e eucarióticas, tornando mais fácil a compreensão de situações simbióticas, associações e compartilhamento de nichos.^{29,30} O caso mais famoso de *quorum sensing* em bactérias Gram-negativas envolve a simbiose da bactéria *Vibrio fischeri* com um molusco da espécie *Euprymna scolopes*, onde foi observada a bioluminescência do último e descobriu-se que a mesma era gerada pelas bactérias que compunham sua superfície e intestino. Estudos *in vitro* demonstraram que o fenômeno da bioluminescência não ocorria em cultivos isolados de *V. fischeri*, indicando dependência dos metabólitos do molusco, além da comunicação em si.³⁰

As proteínas R (ProtR) receptoras são específicas para os sinais que as proteínas I (ProtI) irão sintetizar, os tipos de autoindutores variam com o gênero, espécie e tipo da membrana celular das bactérias envolvidas. Essas moléculas podem ser subdivididas em 4 categorias ou modelos,^{30–32} e podem ser observadas na Figura 9:

- Autoindutor-1 (AI-1): Mais utilizado por Gram-negativas, compreende moléculas derivadas de ácidos graxos e atua no mecanismo intraespécies. Aqui se encontram as *N*-acil homoserinas lactonas (AHLs);
- Autoindutor-2 (AI-2): Comum em Gram-negativas e Gram-positivas para comunicação intra e interespécies. Trata-se do furanosil borato diéster;
- iii) Autoindutor-3 (AI-3): Possui estrutura ainda desconhecida, mas sabe-se que é aromática, e não possui furano, o que o diferencia do AI-2. São similares à epinefrina e norepinefrina;^{24,28–30}
- iv) Aminoácidos e pequenos peptídeos utilizados por Gram-positivas, principalmente na comunicação intraespécies.



Figura 9. Moléculas comuns no quorum sensing de bactérias.^{30–32}

O mecanismo de *quorum sensing* de bactérias Gram-positivas é um tanto quanto mais complexo, pois as mesmas trabalham com peptídeos em um mecanismo de maturação de feromônios que são secretados e, então, detectados através de dois mecanismos, como demonstra a Figura 10. Na rota 'extracelular' ocorre a interação dos feromônios na superfície da membrana da bactéria com uma histidina quinase (HK), que promove a fosforilação de um regulador de resposta (RR) e este regulador ativado então, modula a expressão dos genes alvos produzindo os produtos fenotípicos. Outra rota é a 'intracelular' onde ocorre a migração dos peptídeos para o interior da célula por transporte intermembrana, com sequente ativação dos reguladores transcricionais, que podem então modular a expressão de genes de interesse, ou ainda inibir a enzima aspartil-fosfato fosfatase (RAP), o que, consequentemente, modifica o estado de fosforilação dos reguladores e juntamente a expressão de genes alvos. No caso de feromônios não necessariamente é atingido uma concentração crítica como no *quorum sensing*, apenas ocorre um dos mecanismos descritos acima.^{29,33,34}





A importância de se entender os mecanismos de *quorum sensing* reside na preocupação de se entender os processos celulares e se evitar proliferação de bactérias nas indústrias, hospitais, entre outros, possibilitando também a busca por alternativas aos antibióticos convencionais. Outro grande problema é a produção de biofilme bacteriano, um mecanismo de defesa que dificulta a extirpação das colônias

de superfícies, facilitando a comunicação e a virulência das bactérias, fenômeno este, que pode ser contornado elucidando-se as moléculas que estão envolvidas no *quorum sensing* e as mitigando.^{31,32,35}

3.1.2. Papel das 2,5-Dicetopiperazinas no Quorum Sensing Bacteriano

As 2,5-dicetopiperazinas (DKPs) são dipeptídeos cíclicos encontrados em 90% das bactérias Gram-negativas e presente em parte das Gram-positivas, fungos, e organismos mais complexos. Foram descobertas por volta de 1880 por Emil Fischer e, inicialmente, foram subestimadas uma vez que se acreditava serem meros produtos de degradação de proteínas. Suas atividades biológicas são as mais variadas possíveis, podendo ser antifúngicas, fitotóxicas, sideróforas, bactericidas, antitumorais, antivirais e imunosupressivas. A biossíntese de DKPs pode ter origem nas sintases de peptídeos não ribossomais ou nas ciclodipeptídeos sintases.^{32,36}

Apesar de ser pouco descrita na literatura como parte de *quorum sensing*, alguns estudos mostraram a influência e ação das DKPs na comunicação bacteriana. O surgimento da hipótese ocorreu quando pesquisadores observaram DKPs em cultivos de bactérias Gram-negativas, as isolaram, identificaram e testaram suas ações em bactérias geneticamente modificadas para atuarem como biossensores na presença de acil homosserina lactonas. A ativação da cepa de *Escherischia coli* (pSB401), frente a ação de ciclo(L-Phe-L-Pro), promoveu bioluminescência, indicando uma modulação agonista nos receptores de AHLs, em um mecanismo de mimetização, ligando-se aos receptores (LuxR – Proteína receptora responsável pela bioluminescência) de AHLS e promovendo o início da regulação dos genes alvo e excreção dos produtos.

Quando não são agonistas dos biossensores, as DKPs funcionam como antagonistas dos mesmos, o que indica que as mesmas possuem afinidade pelas proteínas receptoras e podem inclusive antagonizar o processo de *quorum sensing* de AHLs, se ligando à proteína e evitando a expressão dos genes alvo. A Tabela 3 foi retirada da publicação de Holden e colaboradores (1999) e mostra os diferentes tipos de bactérias utilizadas como biossensores, como a *E. coli* (pSB401) que bioluminesce, *Chromobacterium violaceum* CV026 que excreta um corante violeta, *Serratia liquefaciens* MG1 que perde a motilidade ao captar AHLs e *Agrobacterium tumefaciens* NT1(pDCl41E33) que excreta uma protease característica. ^{37–39}

	<i>E. c</i> JM109(p	<i>coli C. violaceum</i> SB401) CV026		<i>S. liquefaciens</i> MG1	A. tumefaciens NT1(pDCl41E33)	
DKP	Ativação	Inibição	Ativação	Inibição	Inibição	Ativação
Ciclo(∆Ala-L-Val)	+	+	-	-	+	-
Ciclo(L-Pro-L-Tyr)	+	+	-	-	+	+
Ciclo(L-Phe-L-Pro)	+	+	-	-	-	-
Ciclo(L-Ala-L-Pro)	-	+	-	-	-	-
Ciclo(L-Leu-L-Pro)	-	+	-	-	-	+
Ciclo(L-Met-L-Pro)	+	+	-	-	-	+
Ciclo(L-Pro-L-Val)	-	+	+	+	-	-

Tabela 3. Influência das DKPs em fenótipos dependentes de quorum sensing.

+ indica atividade; - indica nenhuma atividade.

(Adaptado de Holden et al, 1999).37

Os experimentos de Holden e colaboradores (1999) foram repetidos por outros pesquisadores utilizando os mesmos biossensores e outras DKPs e tiveram resultados semelhantes.^{38–40}Observa-se que a interação das DKPs com as proteínas receptoras utilizadas para comunicação não segue uma linha definida, sendo dependente do tipo da DKP e da espécie a ser avaliada.^{37–40}

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Este capítulo tem como objetivo a elucidação do mecanismo de comunicação existente entre as bactérias *Cronobacter sakazakii* e *Bacillus cereus,* que coexistem na indústria de leite em pó e cereais, sendo ambas patógenas ao ser humano. Para tanto, pretende-se:

- Identificar e caracterizar a molécula responsável pela comunicação interespécies;
- Caracterizar a molécula por CG-EM e RMN 1D e 2D;
- Sintetizar padrões para comparação e investigação da configuração absoluta da mesma;

- Caracterizar os padrões sintetizados para avaliar a eficiência da síntese;
- Avaliar a interação dos padrões com as células íntegras das bactérias utilizando experimento de STD-RMN, possibilitando a análise do mapa do epítopo da molécula nas células.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Cultivos de Bacillus cereus, Cronobacter sakazakii e Co-Cultivo

Bacillus cereus é uma bactéria Gram-positiva, formadora de esporo, com uma vasta distribuição ambiental, colonizando principalmente matéria orgânica em decomposição, águas doces e salgadas, vegetais e o trato intestinal de invertebrados. Trata-se de uma bactéria patógena que se aloja principalmente, mas não exclusivamente, no intestino e lá libera toxinas como hemolisinas, fosfolipases, enterotoxinas e citotoxinas.^{41,42} Quando fora do intestino, é encontrado principalmente atacando recém-nascidos dependentes de drogas injetáveis e em feridas cirúrgicas. Seu *quorum sensing* baseia-se na utilização de peptídeos, sendo os mais encontrados pentapeptídeos como LPFE(F/Y), LPFEH, MPFEF e VP(F/Y)E(F/Y), sendo estes os responsáveis pela ativação da proteína receptora PIcR responsável por promover os genes de virulência. ^{41,43}

Cronobacter sakazakii, previamente identificada como *Enterobacter sakazakii*, compreende uma classe de bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas, presentes em variados ambientes como currais, residências, indústria de alimentos como leite em pó, arroz, comida desidratada, água e suplementos infantis.^{44,45} Sua epidemiologia inclui infecções intestinais por meio de enterotoxinas, e produção de proteases de membrana associadas a meningite de recém-nascidos.⁴⁴ Seu *quorum sensing*, como a maioria das bactérias Gram-negativas, baseia-se na liberação de acil-homosserina lactonas, principalmente (*S*)-*N*-heptanoil-HSL, (*S*)-*N*-dodecanoil-HSL e (*S*)-*N*-tetradecanoil-HSL.⁴⁶

Algo em comum entre ambas é a presença conjunta nas indústrias de cereais e leite em pó, onde são um grande problema devido à capacidade de *B. cereus* de produzir biofilmes.³⁰ A coexistência de mais de um microrganismo nos biofilmes motivou a investigação dos mecanismos de comunicação entre as espécies citada acima. Araújo e colaboradores (2012) investigaram o *quorum sensing* de *C. sakazakii*

e observaram que em co-cultivo com *B. cereus* havia uma depleção das AHLs por meio de enzimas hidrolíticas produzidas pela espécie Gram-positiva. Entretanto, esse fenômeno não inibia o crescimento da bactéria, o que levantou o questionamento acerca de um outro mecanismo comunicação com potencial interespécies ocorrendo no nicho industrial e nos cultivos.⁴⁶

Buscando compreender os mecanismos citados, as bactérias foram cultivadas, isoladamente ou em co-cultivo, em meio Luria-Bertani líquido por 24 horas e os cultivos assim obtidos foram submetidos à partição líquido/líquido utilizando acetato de etila (1:1 em relação ao meio) e monitorados por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM) com maior enfoque nos metabólitos de baixa massa molecular. Foi possível observar que o pico de maior intensidade pertencia ao dipeptídeo cíclico ciclo(Pro-Leu), como mostra a Figura 11 ($T_R = 16,7$ min), o qual foi então isolado utilizando cromatografia em coluna e as massas isoladas para os cultivos de 1 L se encontram na Tabela 4.

Cultivo	Massa (mg)	extrato	bruto	Massa isolada (mg)	ciclo(Pro-Leu)
Bacillus cereus	90			0,8	
Cronobacter sakazakii	80			1,2	
Co-cultivo	70			3,1	

Tabela 4. Massa dos cultivos de *B. cereus*, *C. sakazakii* e co-cultivo.

Com o cromatograma e os espectros de massas (Figura 11), foi possível sugerir a estrutura da molécula isolada, uma vez que a literatura já havia apresentado dados dessas moléculas em cultivos de outros microrganismos.^{39,47} A razoável quantidade desta molécula produzida nos cultivos permitiu uma fácil separação e isolamento, como demonstram os dados da Tabela 4. Logo após o isolamento passouse a fase de caracterização da molécula por RMN de ¹H e ¹³C.



Figura 11. Cromatogramas dos extratos brutos dos cultivos de (a) meio LB sem cultivo (branco), (b) *B. cereus*, (c) *C. sakazakii* e (d) co-cultivo de ambas.

3.3.2. Caracterização do Peptídeo Cíclico Extraído das Culturas

Como dito anteriormente, após análise minuciosa dos metabólitos encontrados nos extratos brutos, observou-se que o sinal de maior intensidade presente no cromatograma de CG-EM era relacionado a um dipeptídeo cíclico, composto pelos aminoácidos prolina e leucina (ciclo(Pro-Leu)), ilustrada na Figura 13.



Figura 12. (a) Estrutura do dipeptídeo ciclo(Pro-Leu) e (b) conformação barco torcido atribuída por Borthwick (2010).

A molécula identificada foi observada em ambos os cultivos e no co-cultivo, a mesma foi isolada por cromatografia em coluna, e a caracterização foi realizada por RMN de ¹H e ¹³C uni e bidimensional (ANEXOS 5 a 23) e comparado com dados da literatura.^{48,49} A Tabela 5 relaciona os sinais da molécula no espectro de RMN de ¹H e ¹³C

Tabela 5. Deslocamentos de RMN de ¹H e ¹³C relativos à ciclo(Pro-Leu) pertencente ao cultivo de *B. cereus*.



Átomo	δ ¹³ C	δ ¹ Η
C10	40.3	1,50 (2 of 3H, m)
C11	24.6	1,50 (1 of 3H, m)
C12	22.3	0,81 <i>J</i> 2.3 Hz (3 of 6H, d)
C13	20.7	0,78 J 2.3 Hz (3 of 6H, d)

Levando em consideração dados da literatura que descreviam a presença de ciclo(L-Pro-D-Leu) em cultivos de *B. cereus* associados a um nematoide entomopatogênico, decidiu-se por investigar a configuração absoluta da molécula isolada nos cultivos em questão.⁴⁹ No intuito de determinar a configuração absoluta da molécula natural, foram realizadas análises de rotação óptica [α]_D. A molécula produzida por *B. cereus* apresentou um [α]_D de -28, enquanto a de *C. sakazakii* obteve um [α]_D de -21 e o [α]_D da cultura mista foi de -27. Infelizmente, devido à discrepância dos resultados obtidos com os dados da literatura que também variam em uma escala expressiva, como mostra a Tabela 6, não foi possível definir com precisão a configuração absoluta dos isômeros da ciclo(Pro-Leu) natural utilizando somente a rotação óptica.

DKPs	[α] ⊳(°)	Solvente	Referências
ciclo(L-Pro-L-Leu)	-109	EtOH	50
ciclo(L-Pro-L-Leu)	-124	EtOH	50
ciclo(L-Pro-L-Leu)	-143	EtOH	51
ciclo(L-Pro-L-Leu)	-142	EtOH	52
ciclo(L-Pro-L-Leu)	-88	EtOH	47
ciclo(L-Pro-L-Leu)	-133	EtOH	53
ciclo(L-Pro-L-Leu)	-156	NaOH in MeOH/H ₂ O 1:1	54
ciclo(L-Pro-L-Leu)	-89	MeOH	49
ciclo(L-Pro-L-Leu)	-105.8	MeOH	55
ciclo(L-Pro-L-Leu)	-91.3	H ₂ O	56
ciclo(L-Pro-L-Leu)	-25	EtOH	57
ciclo(L-Pro-D-Leu)	-78	EtOH	58
ciclo(L-Pro-D-Leu)	-185	EtOH	59
ciclo(L-Pro-D-Leu)	-78.3	MeOH	60
ciclo(L-Pro-D-Leu)	-91.2	NaOH in MeOH/H ₂ O 1:1	54
ciclo(L-Pro-D-Leu)	-38	MeOH	61
ciclo(L-Pro-D-Leu)	-6	EtOH	57
ciclo(D-Pro-L-Leu)	+35	EtOH	62
ciclo(D-Pro-L-Leu)	+34	CHCl₃	63
ciclo(D-Pro-L-Leu)	+19	EtOH	57
ciclo(D-Pro-D-Leu)	+152	EtOH	50
ciclo(D-Pro-D-Leu)	+28	EtOH	57

Tabela 6. Rotação óptica específica para os isômeros de ciclo(Pro-Leu).

Como alternativa à essas análises de elucidação de configuração absoluta, buscando-se também uma maior precisão dos dados, optou-se por sintetizar os quatro diasteroisômeros, uma vez que não são comercialmente disponíveis, utilizando a síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS), sendo eles ciclo(L-Pro-L-Leu), ciclo(D-Pro-L-Leu), ciclo(L-Pro-D-Leu), ciclo(D-Pro-D-Leu).

3.3.3. Síntese dos Padrões Isoméricos da Ciclo(Pro-Leu)

Os dipeptídeos cíclicos já possuem síntese descrita na literatura, sendo que muitos exemplares já foram sintetizados para fins de utilização como padrões analíticos, como descreve Borthwick (2012). ⁶⁴ Porém a maioria dos autores opta pela síntese clássica em solução, pois trata-se de um peptídeo pequeno de fácil purificação.^{65–67} Neste trabalho optou-se por utilizar a síntese de peptídeos em fase sólida, vista que esta permite a síntese de peptídeos e sua fácil ciclização e com apenas uma etapa de purificação, quando necessária.⁶⁸

A síntese em fase sólida (Esquema 10), como descrita anteriormente, consiste no acoplamento de um aminoácido à um grupo reativo de uma resina, e sucessivas adições de aminoácidos, utilizando reagentes de acoplamento até que se atinja o número desejado. Após atingido o número de aminoácidos na cadeia, promove-se a clivagem do peptídeo da resina, passando-se então para a fase de evaporação do solvente e análise do mesmo.⁶⁸

A resina escolhida foi a resina Wang, visto que o objetivo era obter um produto com a parte *C*-terminal livre, facilitando a ciclização espontânea da molécula.⁶⁸ A estratégia escolhida foi a Fmoc, por disponibilizar maior quantidades de reagentes comerciais disponíveis a custos mais acessíveis. Os reagentes de acoplamento escolhidos foram DIC e HOBt, visto que não se tratava da adição de nenhum aminoácido com grupamento R lateral complexo ou reativo que demandasse utilização de reagentes especiais.





A pureza foi primariamente analisada utilizando CG-EM, onde observou-se tempo de retenção (16,9 min) parecido com os naturais e padrão de fragmentação no espectrômetro de massas idêntico (*m/z* 210, 154 e 70). Foi possível observar, também, que realmente houve a ciclização espontânea do dipeptídeo, obtendo-se majoritariamente o produto puro. As análises de RMN de ¹H e ¹³C e os espectros de RMN 2D confirmaram a estrutura cíclica dos peptídeos (ANEXO).

3.3.4. Separação Enantiomérica dos Padrões de Ciclo(Pro-Leu)

Para a separação dos isômeros, escolheu-se a cromatografia gasosa quiral com detecção por ionização de chama (CG-FID) utilizando a coluna capilar quiral de sílica fundida Lipodex®-E. Essa é uma alternativa rápida e prática para separação enantiomérica e permitiu uma eficiente separação dos isômeros desejados.

Como discutido anteriormente, um dos maiores gargalos da síntese em fase sólida é a ocorrência de epimerização.^{6,69} A estratégia selecionada deve levar em consideração os aminoácidos a serem adicionados para uma menor incidência desse fenômeno. Contudo, ainda não foi descrita uma metodologia livre da ocorrência da

epimerização, o que resulta na necessidade de se relatar os percentuais de cada epímero presente. Não obstante do explicitado, os padrões sintéticos sofreram epimerização como indica o Esquema 11.



Esquema 11. Estereoisômeros de ciclo(Pro-Leu) e produtos de interconversão.⁷⁰

ocorre А epimerização preferencialmente nos hidrogênios αcarboxílicos^{69,70} e moléculas contendo prolina tem maior incidência de tal fenômeno.⁶⁹ Observou-se que a epimerização de ciclo (L-Pro-L-Leu) era maior (21%), seguida por ciclo (L-Pro-D-Leu), (D-Pro-L-Leu) e ciclo (D-Pro-D-Leu) (11%). A Figura 13 mostra o cromatograma de CG-FID utilizando coluna Lipodex® quiral, onde pode-se observar que os enantiômeros cis ((L-Pro-L-Leu) e (D-Pro-D-Leu)) tiveram maior dificuldade de separação que os trans ((L-Pro-D-Leu) e (D-Pro-L-Leu)), levando a uma longa duração de corrida cromatográfica (85 min). Apesar da epimerização dos padrões sintéticos, foi possível determinar os tempos de retenção (ANEXOS 53 a 55) de cada estereoisômero com base no pico principal (Tabela 7).



Figura 13. Cromatograma (CG-FID) dos isômeros de ciclo(Pro-Leu) utilizando coluna quiral Lipodex[®]-E.

Para padronizações mais confiáveis e reprodutíveis, utilizou-se o tempo de retenção relativo (TRR, Equação 1), que supera a incerteza da identidade da substância analisada.⁷¹ Assim, os quatro isômeros de ciclo(Pro-Leu) foram injetados com um padrão de tricosano (C₂₃H₄₈) e o cálculo de TRR foi realizado, dando origem aos dados na Tabela 7.

$$Tempo \ de \ Retenção \ Relativo \ (TRR) = \frac{Retenção \ do \ Padrão \ (min)}{Retenção \ da \ Amostra(min)}$$
(Equação 1)

Tabela 7. Tempo de retenção, tempo de retenção relativo e quantidade relativa para os diasteroisômeros sintéticos de ciclo(Pro-Leu).

Padrão	Tempo de	Tempo d retenção relativo ^{a,c}	de	Ciclo(Pro-Leu) relativa				Bond
	retenção (min) ^{a,b}			(L-L) (%)	(L-D) (%)	(D-L) (%)	(D-D) (%)	(%)
ciclo(L-Pro-L-Leu)	64.47	1.064		79	7	14	0	54
ciclo(L-Pro-D-Leu)	69.59	0.982		1	90	4	5	45
ciclo(D-Pro-L-Leu)	70.83	0.970		0	2	82	16	79
ciclo(D-Pro-D-Leu)	64.19	1.069		0	9	2	89	45

^aTempo de retenção e tempo de retenção relativos aos maiores picos do cromatograma; ^bMedidas dos padrões parcialmente epimerizados; ^cRelativo ao pico do tricosano (C₂₃H₄₈);

Com a separação cromatográfica, pôde-se determinar a configuração absoluta do ciclo(Pro-Leu) produzida por esses microrganismos. *C. sakazakii* produziu quantidades mais elevadas de ciclo(L-Pro-L-Leu) em comparação com ciclo(D-Pro-D-Leu) e ciclo(D-Pro-L-Leu), enquanto *B. cereus* produziu ciclo(L-Pro-L-Leu) e ciclo(D-Pro-L-Leu). O co-cultivo mostrou que ambas as culturas mantiveram o mesmo padrão

de produção das moléculas, como pode ser observado na Tabela 8 (Anexos 52 a 55). A presença dos mesmos enantiômeros em culturas bacterianas diferentes pode ser atribuída à utilização natural de D-aminoácidos pelos microrganismos ou à epimerização. As porcentagens de epimerização de *C. sakazakii* e co-cultura foram semelhantes às do padrão ciclo(L-Pro-L-Leu) (14 e 17%), indicando uma possível epimerização da ciclo(Pro-Leu) de *C. sakazakii* e não uma ocorrência natural.

	Ciclo ^ª				
Cultivo L-Pro-L-Leu L (%)	L-Pro-D-Leu (%)	D-Pro-L-Leu D-Pro-D-Leu (%) (%)		(°)°	
B. cereus	95	0	5	0	-28
C. sakazakii	86	0	12	2	-21
Co-cultivo	83	0	12	5	-27

Tabela 8. Quantificação relativa e rotação óptica das ciclo(Pro-Leu) de origem natural.

^aMedidas dos padrões parcialmente epimerizados; ^b EtOH, 20 °C, 1 g/100 mL.

Observamos que (i) o estereoisômero mais abundante nos extratos bacterianos foi o ciclo (L-Pro-L-Leu), e (ii) com epimerização similar para os padrões sintéticos e os produtos naturais. Baseado nos resultados obtidos, pode-se propor que o sinal de comunicação cruzada responsável por um segundo sistema de comunicação entre *C. sakazakii* e *B. cereus* é possivelmente relacionado a produção da ciclo(L-Pro-L-Leu).

3.3.5. RMN-STD para Mapeamento do Epitopo de Ciclo(L-Pro-L-Leu) e Ciclo(D-Pro-D-Leu) em sua Interação com Células Íntegras das Bactérias

Visando investigar a interação da ciclo(Pro-Leu) com as células de *C. sakazakii* e *B. cereus* foi utilizada a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), a qual possui uma vasta gama de experimentos, podendo ser estendida à compreensão de interações de caráter supramolecular. ⁷².

O experimento RMN-STD (do inglês *Saturation Transfer Difference*) é baseado em nOe (do inglês *nuclear Overhouser effect*) e foi desenhado por Mayer e Meyer (1999) especialmente para o estudo das interações de proteínas e ligantes. ⁷³ A Figura 14 mostra o gráfico de intensidade de nOe e rOe em função do produto do tempo de correlação (τ_c) e da frequência de Larmor do núcleo observado (ω_o).

Observa-se que para moléculas menores (massa < 500 Da) o raio hidrodinâmico é baixo, tendo o produto $\omega_{0}\tau_{c}$ menor que 1 e valores de nOe positivos. Em contrapartida para moléculas com raio hidrodinâmico grande e produto $\omega_{0}\tau_{c}$ maior que 1, o nOe é menor que 0. Em moléculas com massa entre 500 e 2000 Da a intensidade de nOe é \cong 1, impossibilitando este tipo de análise. Essa diferença de comportamento entre grandes e pequenas moléculas no nOe/rOe permite que se façam irradiações seletivas e observação apenas dos ¹H das moléculas que interagem com a macromolécula, fornecendo dados de mapas de epitopo, comuns em STD. ^{74,75}



Figura 14. Correlação da intensidade de nOe e rOe em função de $\omega_0 \tau_c$ para uma análise em RMN operando em 11,75 T. (Adaptado de Sedaghat Doost *et al.*, 2019).⁷⁵

O processo de STD em si trata da irradiação seletiva no formato de um trem de pulsos de radiofrequência (rf) em uma macromolécula (*on resonance*) em uma frequência onde se encontram apenas os sinais do receptor (por volta de -1,0 a 0 ppm para proteínas). Essa magnetização se difunde para todos os núcleos de hidrogênio via difusão de *spin* por caminhos de relaxação cruzada intramolecular (¹H-¹H), processo este eficiente devido à alta massa molecular das moléculas receptoras. A magnetização é, então, transferida para o ligante pelo mecanismo de difusão de *spin* intermolecular agindo na interface proteína-ligante tornando os sinais da molécula ligante saturados, como demonstra a Figura 15. Para se obter um resultado efetivo,

há a necessidade também de se realizar uma irradiação fora da janela espectral (*off resonance*), onde nenhum sinal é saturado. A partir desses dados, os experimentos *on* e *off resonance* são subtraídos e a variação da intensidade dos sinais destaca os que interagiram com a macromolécula. ^{72,76}



Figura 15. Ilustração do fenômeno de difusão da magnetização de uma macromolécula para um ligante, consequente saturação de seus sinais e perda de saturação para estudo de interações por RMN-STD.

O principal objetivo de se realizar um experimento de STD é entender qual dos hidrogênios de uma molécula de interesse mais interagem com a macromolécula. Para tanto, faz-se o mapa do epitopo da molécula, que é a porcentagem relativa (ao sinal mais saturado) da saturação de cada um dos hidrogênios saturados no experimento. A saturação é calculada com base na Equação 2 e a porcentagem normalizada em relação ao pico mais saturado.⁷⁷

$$A = \frac{\Delta I}{Ioff}$$
 Equação 2.

Onde: A= Quantidade relativa de saturação;

ΔI = diferença das integrais absolutas do experimento *on* e *off-resonance;*

loff = Integral absoluta do experimento *off-resonance*.

Apesar de ter sido desenvolvido para entender a interação entre proteínas e ligantes, a técnica de RMN-STD foi previamente utilizada para estudo da interação de células íntegras e ligantes, demonstrando a disponibilidade desta técnica. ^{77–79} No caso da *Bacillus cereus* interagindo com a molécula ciclo(L-Pro-L-Leu) (Figura 16), podemos observar que a maior interação pertence aos hidrogênios H-4 e H-5b que se sobrepõe e estão próximos no plano. Também há um alto valor de saturação relativa para os hidrogênios H-5a, H-3a e H-3b, indicando que possivelmente a maior interação ocorra pela porção da prolina nas células deste microrganismo.



Figura 16. A) Espectro de RMN (400.18 MHz, D₂O/DMSO-d₆ – Referência H₂O residual em 4,7 ppm e tampão Fosfato pH 7,0) da molécula ciclo(L-Pro-L-Leu) [10 mmol. L⁻¹] e células de *Bacillus cereus* [16 mg]. B) Espectro controle (irradiando em 30 ppm). C) Espectro de STD (irradiando em -0,5 ppm).

Para as células de *Cronobacter sakazakii* interagindo com a ciclo(L-Leu-L-Pro) (Figura 17) observa-se um comportamento ligeiramente distinto. Primeiramente, o hidrogênio que mais sofre a saturação é o H-9, além disso, os valores de saturação são mais baixos do que os observados para as células de *B. cereus*. Isso pode estar associado ao fato de que a bactéria *C. sakazakii* se comunica, prioritariamente, por acil-homoserina lactonas,⁵⁷ utilizando as 2,5-dicetopiperazinas apenas como uma comunicação secundária, não sendo o objetivo dessa comunicação secundária elucidado até o presente momento. Apesar disso, ainda se observa saturação em quantidade suficiente para observarmos que há interação intensificada também na molécula como um todo, com diferença para o sinal do H-9 que não demonstra interação para a célula de *B. cereus*.



Figura 17. A) Espectro de RMN (400.18 MHz, $D_2O/DMSO-d_6$ – Referência H₂O residual em 4,7 ppm e tampão fosfato pH 7,0) da molécula ciclo(L-Pro-L-Leu) [10 mmol. L⁻¹] e células de *Cronobacter sakazakii* [16 mg]. B) Espectro controle (irradiando em 30 ppm). C) Espectro de STD (irradiando em -0,5 ppm).

A molécula de ciclo(D-Leu-D-Pro) (Figura 18) não mostrou interações detectáveis, sendo possível apenas observar o H-12 e H-13 interagindo, que podem ser interações com a membrana das células, por tratar-se de uma das porções apolares da molécula. Quanto às células de *C. sakazakii* (Figura 19), observa-se, além do H-12 e H-13, uma interação dos H-10 e H-11, indicando uma possível interação mais efetiva da ciclo(D-Leu-D-Pro), porém, apenas demonstra a mesma porção da molécula interagindo, podendo ser uma interação com a membrana, uma vez que as interações com a ciclo(L-Leu-L-Pro) se mostraram expressivamente mais intensas.

Estes dados demonstram que existem interações da ciclo(L-Leu-L-Pro) com as células, uma vez que as mesmas produzem esta molécula para utilização na comunicação intra e inter-espécies e não interajam significativamente com a ciclo(D-Pro-D-Leu), o enantiômero não envolvido no processo descrito.



Figura 18. A) Espectro de RMN (400.18 MHz, D₂O/DMSO-d₆ – Referência H₂O residual em 4,7 ppm e tampão fosfato pH 7,0) da molécula ciclo(D-Pro-D-Leu) [10 mmol. L⁻¹] e células de *Bacillus cereus* [16 mg]. B) Espectro controle (irradiando em 30 ppm). C) Espectro de STD (irradiando em -0,5 ppm).



Figura 19. A) Espectro de RMN (400.18 MHz, D₂O/DMSO-d₆ – Referência H₂O residual em 4,7 ppm e tampão fosfato pH 7,0) da molécula ciclo(D-Pro-D-Leu) [10 mmol. L⁻¹] e células de *Cronobacter sakazakii* [16 mg]. B) Espectro controle (irradiando em 30 ppm). C) Espectro de STD (irradiando em -0,5 ppm).

3.4. CONCLUSÕES PARCIAIS

DKPs são importantes sinais químicos na comunicação entre *Cronobacter* sakazakii e Bacillus cereus. A ciclo(L-Pro-L-Leu) produzida como um segundo mecanismo de comunicação não é destruído por Bacillus sp., que inclusive, compartilha dessa comunicação, o que finalmente, explica a coexistência de ambos no mesmo ambiente industrial. A configuração absoluta ciclo(L-Pro-L-Leu) foi determinada por cromatografia à gás quiral, o que proporciona uma nova ferramenta para a configuração absoluta dos quatro isômeros de ciclo(Pro-Leu) como uma alternativa à aplicações conjuntas de RMN e outros métodos.

O estudo realizado permitiu uma visão privilegiada do mapa do epitopo da interação de dois enantiômeros enquanto ligantes em células de *B. cereus* e *C. sakazakii*. Pode-se observar que as moléculas de ciclo(L-Leu-L-Pro) interagiram com maior eficácia com as células de ambos os microrganismos, corroborando com a

descoberta de que ambas se comunicavam utilizando as moléculas com essa configuração absoluta. Também é possível reconhecer que a interação das moléculas na forma de ciclo(D-Pro-D-Leu) é mínima, mostrando apenas uma interação com um lado da molécula que possui caráter de interação puramente superficial entre superfícies apolares (lipídios de membrana e parte alquílica da leucina).

Este estudo se mostra importante, pois dá continuidade a um estudo acerca da convivência entre as duas bactérias, contaminantes de indústrias de leite em pó e cereais, que mesmo interagindo de forma não pacífica, ainda são capazes de conviver no mesmo nicho. Também, pode ajudar no desenvolvimento de produtos capazes de regular tanto o crescimento quanto a produção de biofilme das mesmas, evitando assim problemas com órgãos regulatórios da vigilância sanitária.



Capítulo 2

"Síntese e caracterização de isômeros da Liquenisina-A por espectrometria de massas"


4. CAPÍTULO 2

4.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

4.1.1. Biossurfactantes Lipopeptídicos Produzidos por Bacillus sp.

Biossurfactantes constituem um grupo de metabólitos com diversidade estrutural, sendo produzidos por bactérias, fungos e leveduras. Assim como os surfactantes comuns, possuem características anfifílicas e propriedades detergentes, diminuindo as tensões superficiais e interfaciais de soluções. Suas porções hidrofóbicas são compostas por ácidos graxos saturados ou insaturados e as porções hidrofílicas por aminoácidos ou peptídeos, di- ou polissacarídeos, ânions ou cátions. Além disso, possuem atividade antimicrobiana, antiviral, hemolítica, inseticida, antagonista entre outras.^{80,81}

Os lipopeptídeos são um dos mais importantes biossurfactantes, possuindo capacidade de formação de micelas. As micelas são observadas dependendo do balanço das porções hidrofílica/hidrofóbica das moléculas, assim como, das interações entre as unidades peptídicas. Em sua maioria, apresentam cadeia peptídica cíclica, sendo este um artefato que promove uma maior estabilidade da molécula *in vivo* uma vez que dificulta a metabolização da mesma por outros microrganismos.^{81,82}

O gênero *Bacillus sp.* é popularmente conhecido por produzir lipopeptídeos com uma considerável diversidade estrutural, possuindo cadeias que diferem na composição da porção lipídica, assim como nos tipos, números e configurações da cadeia peptídica. Os lipopeptídeos de *Bacillus sp.* estão divididos em três principais categorias, as surfactinas, as iturinas e as fengicinas, sendo que cada família possui suas variantes, que por sua vez apresentam muitos homólogos de diferentes tamanhos e isomerias da porção lipídica. A Figura 20 apresenta exemplos de lipopeptídeos excretados por microrganismos do gênero *Bacillus sp.* e que possuem atividades biológicas notáveis. ^{83,84}



Figura 20. Estrutura de alguns lipopeptídeos produzidos por *Bacillus sp.* (a) surfactina, (b) liquenisina, (c) iturina, (d) fengicina. ⁸⁵

A família das surfactinas compreende variantes heptapeptídicos, como esperinas, liquenisinas, pumilacidinas e surfactinas em si. As iturinas possuem as iturinas A e C, bacilomicinas D, F e L e micosubtilinas. As fengicinas podem ser A e B, também existem nessa família as plipastatinas. Surfactinas e fengicinas são anéis lactônicos ciclizados por um 3-hidroxiácido graxo (fengicina possui 3-hidroxiacido graxo, mas cicliza a partir de uma tirosina) que pode ser iso, anteiso ou linear (Figura 21). Já as iturinas são ciclizadas por 3-aminoácidos graxos, sendo assim, lactamas.^{80,83,86}



Figura 21. Isoformas da cadeia lipídica de lipopeptídeos de Bacillus sp.

4.1.2. Bacillus sp. e Liquenisinas

Como dito anteriormente, integrantes do gênero *Bacillus sp.* são grandes produtores de lipopeptídeos com uma vasta gama de atividades. Além disso, os membros desse gênero são encontrados na maioria dos ambientes, podendo viver em condições pouco favoráveis na forma de endósporos. ⁸⁷

Certas espécies de *Bacillus* são capazes de produzir e excretar alguns tipos de biossurfactantes, sendo a liquenisina uma delas. A liquenisina assim se chama por ter sido primeiramente reportada na espécie *Bacillus licheniformis*, porém já foi observada sua presença em *B. mojavensis.* ⁸⁸ É sintetizada pelas NRPSs, no *cluster* biossintético *lchA*, que consiste de quatro quadros abertos de leitura (ORFs), *lchAA, lchAB, lchAC* e *lchA-TE* codificando as liquenisinas sintetases LchAA, LchAB, LchAC e a tioesterase LchA-TE, respectivamente. Cada módulo das três primeiras enzimas reconhece, ativa e incorpora L-Gln (ou L-Glu), L-Leu (ou L-Ile), D-Leu, L-Val (ou L-Ile), L-Asp, D-Leu e L-Ile (ou L-Val, ou L-Leu), nesta ordem. Por último a LchA-TE promove a ciclização e liberação do lipopeptídeo e induz a biossíntese de novas moléculas.⁸⁸

Como dito anteriormente, mais de 50 cepas de *Bacillus licheniformis* foram testadas para a presença de liquenisinas, sendo as principais destacadas na Tabela 10. Além disso, muitas outras cepas estão sendo desenvolvidas por engenharia genética e resultaram em aumento da produção de liquenisina. ⁸⁹

Cepa de <i>B. licheniformis</i>	Fonte	Referência
749	Industrial	
S172	Desconhecido	
LMG 17659	Sangue equino	
S170	Desconhecido	
ATCC 14580	Tipo selvagem	
ATCC 9945A	Industrial	
ATCC 8480	Desconhecido	
LMG7 559	Alimento	
LMG7 633	Fezes de chinchila	
LMG7 558	Industrial	
NCTC 6346	Industrial	
NCTC 962	Alimento	
B3 17	Aborto ovino	
CCUG26008	Alimento	
ATCC 10716	Industrial	
NVH1 090	Industrial	
NVH1 077	Aborto Ovino	
NVH1 112	Aborto bovino	
LMG6 934	Solo	
MB1	Ar	
553/1	Intoxicação alimentar fatal	
NVH1 111	Aborto bovino	
CCUG44767	Sangue humano	92
NVH1 032	Alimento	
NVH622	Desconhecido	
NVH1 109	Aborto bovino	
NVH1 078	Aborto ovino	
NVH1 079	Aborto bovino	
NVH1 113	Aborto bovino	
F23 1	Intoxicação alimentar	
NVH800	Alimento	
B3 16	Aborto bovino	
B3 57	Agua	
LMG1 /661	Alimento	
C CUG41412	Alimento	
M3	Ar	
M46	Ar	
NVH1 023	Alimento	
	Industrial	
CCUG43 512 A		
	Ar	
しししほう にうちち	AUUA	

Tabela 9. Cepas de *B. licheniformis* e suas fontes de isolamento.

Cepa de <i>B. licheniformis</i>	Fonte	Referência
Koskio52	Aborto bovino	
F287	Alimento	
M23	Ar	92
CCUG43486	Água	
NVH1 123	Aborto bovino	
NVH1 115	Aborto bovino	
AL1.1	Sedimentos	90
IM 1307	Desconhecido	91
WX-02	Modificado da CCTC 208065	92
BAS50	Alimento	91

Como pode ser observado, as cepas podem ser encontradas em uma variada gama de lugares, sendo que as descritas acima foram todas investigadas e apresentaram diferentes tipos de lipopeptídeos, sendo as principais as liquenisinas e outras variantes da surfactina. A Tabela 10 relaciona os diferentes isômeros de liquenisina produzidas por *B. licheniformis*.

Entrada	Posição da sequência de aminoácidos				Ácido Gravo			
Entraua	1	2	3	4	5	6	7	
Liquenisina A	L-GIn	L-Leu	D-Leu	∟-Val	L-Asp	D-Leu	L-lle	C ₁₂ a C ₁₇ , <i>i</i> C ₁₅
Liquenisina B	∟-Glu	L-Leu	D-Leu	∟-Val	L-Asp	D-Leu	L-Leu	<i>n, i, ai</i> C ₁₅
Liquenisina C	∟-Glu	L-Leu	D-Leu	∟-Val	L-Asp	D-Leu	∟-lle	<i>n, i</i> C14, <i>ai</i> C15
Liquenisina D	L-GIn	L-Leu	D-Leu	∟-Val	L-Asp	D-Leu	L-lle	-
							L-Leu	
							∟-Val	
Liquenisina G	L-GIn	L-Leu	D-Leu	∟-Val	L-Asp	D-Leu	L-lle	<i>i,ai</i> C _{13,}
		∟-lle		∟-lle			L-Leu	
		L-Leu		∟-lle			∟-lle	

Tabela 10. Variações conhecidas de liquenisina produzidas por Bacillus sp.88,91,93

Assim como os lipopeptídeos citados no tópico acima, as liquenisinas possuem propriedades antimicrobianas, hemolíticas, inseticidas, entre outras. Testes da influência e atuação das liquenisinas em glóbulos vermelhos demonstraram que sua atividade hemolítica se dá pela formação de poros nos mesmos a partir da entrada de liquenisinas na parte apolar da bicamada lipídica, permitindo a permeação de outras substâncias para dentro e para fora da célula, causando morte da mesma. A interação pode ser observada na Figura 22, onde observa-se a bicamada lipídica com e sem a presença de liquenisina. ^{80,94,95}



Figura 22. Representação da bicamada lipídica de glóbulos vermelhos na (a) ausência e (b) presença de liquenisina nos interstícios. Adaptado de (Coronel *et al., 2015*). ⁹⁵

A elucidação estrutural dos biossurfactantes lipopeptídicos é realizada comumente utilizando o método de Marfey, que consiste na hidrólise ácida dos mesmos, obtendo-se os aminoácidos correspondentes e então identificando-os por cromatografia líquida utilizando padrões enantiomericamente puros dos aminoácidos individualmente. Apesar de ser uma técnica efetiva, Marfey possui uma etapa que demanda técnica apurada e manuseio de ácidos concentrados, além de preparo de amostra para injeção em equipamentos de análise. ⁹⁶

Os dados de elucidação estrutural, como as descritas acima, permitiram que atualmente se utilizassem de técnicas hifenadas mais robustas e precisas de elucidação, como a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS e HPLC-MS/MS). Os dados da literatura apresentam um rico arsenal quando se trata de técnicas de espectrometria de massas com ionização em modo positivo, com dados de massa exata, fragmentação e experimentos específicos

de SIR e MRM. Contudo, os dados de massas em modo negativo são extremamente escassos, não sendo comum aparecerem análises utilizando dessa técnica.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Este capítulo tem como objetivo a investigação da configuração absoluta do 3-hidroxiácido da molécula de liquenisina produzida por bactérias do gênero *Bacillus,* bem como a contribuição para a literatura com dados de espectrometria de massas de liquenisinas enantiomericamente enriquecidas. Assim, entre os objetivos específicos, destacam-se:

- Sintetizar o ácido 3-hidroxitetradecanóico em sua forma racêmica;
- Promover a resolução cinética do mesmo, permitindo o isolamento dos enântiomeros;
- Sintetizar o lipopeptídeo aberto referente ao precursor da Liquenisina-A racêmico e enantiomericamente enriquecido, utilizando síntese de peptídeos em fase sólida para comparação e investigação da configuração absoluta da mesma;
- Caracterizar a molécula utilizando UPLC-MS de alta e baixa resolução para identificação de cada um dos isômeros de Liquenisina-A;
- Avaliar a ocorrência da Liquenisina-A em espécies de *Bacillus* presentes na coleção do LaBioSin, a fim de encontrar a configuração absoluta das mesmas.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Síntese da Liquenisina-A

Após análise dos lipopeptídeos produzidos pelas cepas de *B. licheniformis*, verificou-se que as liquenisinas de massa 1020 (Liquenisina-A e D (L-Val7))^{87,89} são as mais abundantes na maioria dos cultivos. Neste contexto, decidiu-se por prosseguir-se a síntese da Liquenisina-A com a cadeia graxa de 14 carbonos, estando a síntese dos isômeros descrita nos próximos tópicos.

4.3.1.1 Síntese e resolução cinética do ácido 3-hidroxitetradecanóico

Para a síntese da Liquenisina-A- nC_{14} ([M + H]⁺ = 1021) faz-se necessária a utilização do ácido 3-hidroxitetradecanóico em sua forma linear. Devido ao alto valor do produto comercial (R\$ 2137,00 – 50 mg), promoveu-se a síntese do mesmo, sendo a reação de Reformatski⁹⁷ a estratégia escolhida. Para tanto utilizou-se dodecanal (1 eq.), bromoacetato de etila (1 eq.) e zinco metálico em pó (1 eq), como demonstra o Esquema 4.



Esquema 4. Reação de Reformatski para o dodecanal e bromoacetato de etila usando Zn metálico em pó.

Após a síntese do (*rac*)-3-hidróxitetradecanoato de etila (**1**), o mesmo foi hidrolisado utilizando 1:9 de uma solução metanólica de NaOH 0,2 M em diclorometano por 1 hora (Esquema 5), obtendo-se assim, por precipitação, o ácido (*rac*)-3-hidroxitetradecanóico, que foi então acoplado à sequência de aminoácidos produzidas por SPFS.





No processo de hidrólise alcalina, há a precipitação do ácido devido ao excesso de diclorometano, tornando a purificação do produto desnecessária. Após secagem do produto, o mesmo estava pronto para incorporação nos peptídeos de Liquenisina-A.

Paralelamente, o éster (1) foi submetido à resolução cinética utilizando a lipase B de *Candida antarctica* (CALB) imobilizada em resina (Sigma-Aldrich) (Esquema 6). A resolução cinética tem como característica a derivatização de pares enantioméricos aproveitando-se da especificidade da enzima em questão. ⁹⁸ Nesse caso, deixa-se a resolução acontecendo, até que haja 50% de conversão e então interrompe-se a reação e analisa-se o excesso enantiomérico da mesma. Os produtos da reação podem ser observados na Figura 23.

Após isolamento dos produtos da resolução cinética e buscando comprovar a enantiopreferência da CALB, realizou-se a leitura do desvio da luz polarizada ([α]_D) do produto não acetilado (t_{retenção} = 12,7 min), obtendo-se um valor de -4 (1 g/100 mL, CH₂Cl₂, 20 °C), que segundo a literatura é pertencente ao enantiômero *R* (-6,1, 1 g/100 mL, CH₂Cl₂, 20 °C). ⁹⁹ Sendo assim, a enantiopreferência da CALB neste caso foi em acetilar o enantiômero *S*.



Esquema 6. Reação de resolução cinética catalisada por CALB em 3hidroxitetradecanoato de etila.



Figura 23. Cromatograma de CG-MS da resolução cinética de 3hidróxitetradecanoato de etila utilizando CALB e acetato de vinila.

Após 49% de conversão, a reação foi interrompida e realizou-se uma análise de CG-FID utilizando coluna quiral (Hydrodex[®]) para avaliação do excesso enantiomérico do produto acetilado e do hidroxiácido remanescente,, mostrando que a resolução cinética forneceu um produto com 70% de excesso enantiomérico para o hidróxiacido e >99 % do acetilado (Figura 24).



Figura 24. Cromatograma de CG-FID utilizando coluna quiral de 3hidróxitetradecanoato de etila e 3-acetóxitetradecanoato de etila.

Após caracterização por RMN das moléculas isoladas (ANEXOS 30 e 31), promoveu-se a hidrólise alcalina das mesmas, buscando-se obter o ácido correspondente para futuro acoplamento com o peptídeo e ciclização do mesmo. A fração que continha o ((*S*)-**3**) sofreu eliminação (Esquema 12), tendo a maior parte de seu produto se tornado um ácido α , β -insaturado.Devido ao baixo rendimento do produto hidrolisado na forma (*S*) empregou-se apenas o enantiômero (*R*) para acoplamento com a cadeia peptídica.



Esquema 12. Reações de hidrólise alcalina dos produtos de resolução cinética (a) (*S*)-acetóxi e (b) (*R*)-hidróxi.

4.3.1.2. Síntese em fase sólida do lipoheptapeptídeo linear

Após a síntese dos ácidos 3-hidroxitetradecanóicos racêmico e enantioméricamente enriquecidos, promoveu-se a síntese do heptapeptídeo que constitui a Liquenisina-A. Como mostrado anteriormente, a mesma é constituída da sequência L-IIe, D-Leu, L-Asp, L-Val, L-Leu, D-Leu e L-GIn. A síntese em fase sólida se iniciou com o acoplamento da L-IIe à resina Wang, que foi escolhida pela facilidade de manuseamento e alta disponibilidade comercial.

A adição da L-Ile à resina é realizada utilizando DIC e DMAP à temperatura ambiente e ocorre como destacado no Esquema 13.



Esquema 13. Mecanismo de acoplamento do primeiro aminoácido (L-IIe) em resina Wang utilizando DIC e DMAP como reagentes de acoplamento.

Após acoplamento do primeiro aminoácido à resina, analisou-se a carga da molécula que foi efetivamente acoplada. Para tanto, separou-se 1 mg de resina, a qual foi submetida a uma solução de 20% de 4-metilpiperidina em DMF para desproteção do grupo Fmoc do aminoácido e este, então, passa a absorver na região do UV (301 nm).¹⁰⁰ A resina trabalhada possuía capacidade de 0,6 mmol/gres e a carga de aminoácido para este experimento foi de 0,58 mmol/gres. A resina então foi submetida ao procedimento para recapeamento dos sítios livres, através de reação de acetilação das hidroxilas benzílicas utilizando anidrido acético e piridina.

Com a L-lle efetivamente acoplada na resina, pode-se dar continuidade no processo de síntese do lipopeptídeo linear seguindo o protocolo de desproteção, ativação e acoplamento e testes de Kaiser para avaliar a efetividade do acoplamento. Para a etapa de desproteção, foi também utilizada a solução 20% de 4-metilpiperidina em DMF com agitações orbitais durante 20 min, como indica o Esquema 14.



Esquema 14. Reação de desproteção da porção *N*-terminal da L-lle acoplada à resina Wang utilizando 4-metilpiperidina.

Após a desproteção da porção *N*-terminal do aminoácido acoplado à resina, realiza-se o teste de Kaiser afim de se observar se todo o material está desprotegido e passível de reação de acoplamento com o próximo aminoácido, evitando-se assim a formação incompleta do peptídeo desejado. ¹² O teste de Kaiser baseia-se em uma reação com ninidrina (2,2-diidroxi-hidrindeno-1,3-diona), e revela a presença de aminas primárias livres. O Esquema 15 traz a reação que ocorre e os possíveis resultados do teste.



Esquema 15. (a) Mecanismo da reação do teste de Kaiser ¹⁰¹ para observação de aminas livres em peptídeos acoplados em resina e (b) ilustração do resultado do teste quando negativo (cor amarela) e positivo (cor azul), respectivamente.

Após observar-se o resultado positivo do teste de Kaiser, promove-se a ativação do novo aminoácido que irá se acoplar ao já existente, dando início à cadeia peptídica. Para tanto, existe uma grande variedade de reagentes, como mostrado na seção 1.5. Na síntese em questão, foram utilizados os mais comuns, sendo eles a diisopropilcarbodiimida (DIC) e o 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), sendo a reação explicitada no Esquema 8, seção 1.5.

HOBt e DIC são indicados para sínteses utilizando resina Wang e com grupos protetores Fmoc e Boc pois são solúveis nos reagentes após ativação e acoplamento dos aminoácidos. ^{15,19} Após decorrido o tempo de acoplamento, é realizado novamente o teste de Kaiser devendo este dar negativo (permanecer amarelo) e então, foram realizadas novamente as etapas de desproteção e acoplamento de outro aminoácido, até que se tivesse o heptapeptídeo completo. Ao fim da adição dos peptídeos, promoveu-se mais uma etapa de desproteção e adicionou-se o ácido 3-hidroxitetradecanóico (racêmico ou enantiomericamente enriquecido). Com o ácido adicionado e após teste de Kaiser negativo, promoveu-se a etapa de clivagem do peptídeo utilizando ácido trifluoroacético (TFA), triisopropilsilano (TIS) e água deionizada, sendo os últimos utilizados como "scavengers", ou seja, estabilizadores de cargas dos possíveis produtos de hidrólise das desproteções ocasionadas pela adição do ácido.

Após a clivagem e precipitação do lipopeptídeo aberto (Figura 25), pode-se observar sua massa utilizando infusão direta em espectrômetro de massas com detecção por triplo quadrupolo, como mostrado na Figura 26.



Figura 25. Forma linear da Liquenisina-A (MM 1039).



Figura 26. (a) cromatograma de íons extraídos e (b) espectro de massas (ESI(+)-QqQ) resultante da Liquenisina-A linear.

Com a confirmação da obtenção da molécula em sua forma não-ciclizada, foi possível iniciar as estratégias de ciclização da molécula.

4.3.2. Ciclização Química e Enzimática da Liquenisina-A

A descrição da biossíntese da Liquenisina-A sugere que a etapa de ciclização é uma etapa espontânea, onde, logo após a hidrólise, o peptídeo até então conectado a um resíduo de cistina, sofre a ação de uma tioesterase e se liga a um resíduo de serina, sofrendo então lactonização.¹⁰² Há também casos onde a molécula é hidrolisada na forma de 3-hidroxi-acil-heptapeptidil-*O*-serina e é ciclizada por um domínio de tioesterase de aproximadamente 28 kDa com seu sítio ativo na forma de uma cavidade hidrofóbica em formato de tigela, tornando a ciclização desse intermediário favorável. A Figura 27 mostra um esquema de ciclização proposto por Bruner e colaboradores (2002) para surfactinas e seus análogos. ¹⁰³



Figura 27. Representação da etapa de ciclização da 3-hidroxi-acil-heptapeptidil-O-Serina pelo domínio da tioesterase (Adaptado de Bruner *et al.,* 2002). ¹⁰³

Após detectar a presença da molécula desejada através do sinal *m/z* 1039, pode-se prosseguir para as etapas de ciclização, onde três estratégias foram aplicadas, baseando-se no fato de a ciclização ser uma reação de esterificação (lactonização).

4.3.2.1. Ciclização química

Como dito anteriormente, a ciclização da Liquenisina-A é um processo de lactonização em um macroanel de 25 membros. Lactonizações com essas características ainda não foram reportadas na literatura para esse tipo de molécula, porém algumas estratégias já foram utilizadas para lactonização de grandes anéis, como a macrolactonização de Yamaguchi, e a utilização de reagentes de acoplamento para a facilitação das lactonizações quando existem agentes desativadores na molécula.¹⁰⁴

O meio reacional das reações de ciclização é muito diluído buscando baixa interação das moléculas com seus pares. Outra estratégia utilizada é a utilização de

adição particionada dos reagentes, evitando que as reações intermoleculares sobreponham as intramoleculares. ¹⁰⁵

4.3.2.1.1. Ciclização de Yamaguchi

Das metodologias escolhidas para a ciclização, a de Yamaguchi já foi utilizada para a síntese de depsipeptídeos, como demonstra o trabalho de Cochrane e colaboradores (2006 e 2012). Os autores testaram diferentes condições para a ciclização do pentapeptídeo LI-F04a, um depsipeptídeo da família dos LI-Fs, produzidos pela cepa L-1129 de *Paenibacillius polymyxa* e conhecidos por sua vasta atividade antimicrobiana em cepas resistentes de *Candida albicans, Cryptococcus neoformans, Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus*. Seus experimentos demonstraram sucesso na ciclização do pentapeptídeo por lactonização, sendo a metodologia utilizando Et₃N, DMAP e cloreto de 2,4,6-triclorobenzoíla em tolueno, com adição lenta do peptídeo linear, a que demonstrou melhor rendimento (58%).¹⁰⁶

Seguindo essa linha, Narayanaswamy e colaboradores (2011) promoveram a ciclização do hetapeptídeo análogo à Depsidomicina, isolado da cepa MI951-62F2 de *Streptomyces lavendofoliae*, com ação antimicrobiana e imunossupressora, atingindo 81% de ciclização nas condições descritas acima, porém utilizando THF como solvente.¹⁰⁷ Ademais, Wang e colaboradores (2015) utilizaram a metodologia de lactonização de Yamaguchi na síntese da Itralamida B, um depsipeptídeo com atividade citotóxica em células cancerígenas encontrada em cianobactérias da espécie *Lyngbya majuscula*, onde a metodologia descrita por Cochrane (2011) foi utilizada em tolueno, porém com adição lenta de DMAP, ao invés do peptídeo, com rendimento de 45%. ¹⁰⁸

A macrolactonização de Yamaguchi para a Liquenisina-A, foi realizada utilizando THF, cloreto de 2,4,6-triclorobenzoíla, Et₃N e DMAP sendo que o resultado após 2 horas de reação, em ESI(+)-QToF é mostrado na Figura 28.



Figura 28. Detalhe do espectro do bruto reacional da macrolactonização de Yamaguchi ESI(+)-QqQ).

O espectro mostra a formação do produto, de [M+H] 1021 e também uma quantidade do material de partida de [M+H]⁺ 1039. Observa-se então que houve a formação do produto desejado.

4.3.2.1.2. Ciclização utilizando DIC/HOBt

O 1-hidroxi-1H-benzotriazol (HOBt) foi descrito inicialmente por König e Geiger (1970) como um aditivo à reações de acoplamento e esterificação utilizando carbodiimidas como agentes ativadores, com ótimos rendimentos e baixos índices de epimerização.¹⁰⁹ Seu mecanismo de ação já foi descrito no tópico 1.5 e sua desvantagem é a geração de coprodutos. Não foram encontrados na literatura exemplos de macrociclizações utilizando especificamente DIC/HOBt, sendo essa combinação utilizada vastamente em reações de acoplamento e lactamização. ¹¹⁰ No entanto, foram encontrados dois registros do uso de HOBt e uma carbodiimida similar (1-etil-3-(3-dimetillaminopropil)carbodiimida), DIC. chamada EDC ao uma carbodiimida com capacidade de formar um sal com HCI, sendo muito utilizada em reações em meio aquoso ou solventes bastante polares.

Dentre esses trabalhos, Ohyama e colaboradores (1994) promoveram a lactonização de um octapeptídeo PF1022A, isolado da cepa PF1022 de um fungo estéril chamado *Mycelia sterilia*, com atividade anti-helmíntica, onde foi obtido um rendimento de 80% quando utilizado *N*-metilmorfolina como co-solvente.¹¹¹ Similarmente, Morales-Serna e colaboradores (2010) utilizaram os mesmos reagentes, porém, com auxílio de DMAP para sintetizar a Sansalvamida-A, um

pentapeptídeo cíclico isolado de fungos do gênero *Fusarium* com propriedades antitumorais contra células de câncer do cólon, obtendo 70% de rendimento. ¹¹²

As ciclizações utilizando a metodologia DIC/HOBt para a Liquenisina-A foram realizadas de maneira similar, utilizando THF como solvente e um experimento alternativo, utilizando anisol, buscando substituir o tolueno em reações similares, pois o anisol é considerado por Alder e colaboradores (2016) da empresa GSK[®] como um solvente sustentável.¹¹³ As reações foram, portanto, monitoradas por 120 horas, sendo que a cada 24 horas retirava-se uma alíquota e em seguida adicionava-se mais 1 equivalente dos reagentes de acoplamento. Os resultados da infusão direta das alíquotas em um espectrômetro de massas com detecção por triplo quadrupolo são apresentados nas Figuras 29 e 30, sendo que neste caso as análises foram realizadas em modo negativo pois demonstraram melhor ionização e com erro de massa +2 Da devido à calibração do equipamento. Foi possível detectar sinais de íons quasimoleculares de *m/z* [M-H]⁻ 1021 (produto) junto com material de partida (*m/z* [M-H]⁻ 1039).



Figura 29. Espectros de ESI(-)-QqQ em modo negativo das alíquotas da etapa de ciclização da Liquenisina-A utilizando DIC e HOBt em THF.



Figura 30. Espectros de ESI(-)-QqQ em modo negativo das alíquotas da etapa de ciclização da Liquenisina-A utilizando DIC e HOBt em anisol.

Ao se observar o andamento das reações, é perceptível que quando se utiliza THF como solvente, ocorre uma formação gradual do produto e que após 96 horas ocorre uma estagnação da mesma. Isso pode ser causado devido à não solubilização dos co-produtos derivados dos reagentes de acoplamento que se formam após a ciclização. Quanto à reação utilizando anisol como solvente, observamos que o produto ciclizado nunca supera, em quantidade relativa, o peptídeo linear.

4.3.2.1.3. Esterificação de Steglich modificada

Dentre as metodologias de esterificação, uma das mais utilizadas foi desenvolvida por Neises e Steglich em 1978, utilizando DCC (*N*,*N*-diisociclohexanocarbodiimida) e DMAP.¹¹⁴ As carbodiimidas sozinhas eram pouco usadas para esse tipo de reação, uma vez que promovem a formação de *N*-aciluréias, um subproduto indesejado. No caso do uso de DCC, a diciclohexiluréia formada é insolúvel na maioria dos solventes orgânicos e persiste, no meio reacional, dificultando

a purificação. No entanto, o uso de DIC (N,N-diisopropilcarbodiimida) pode resolver este impasse, resultando em uma uréia solúvel na maioria dos solventes orgânicos, mesmo na presença de aditivos. Já a utilização do DMAP se deve à sua alta velocidade de reação e sua fácil solubilização em solventes orgânicos, tendo sido utilizada vastamente na síntese de depsipeptídeos. ^{115–118}

Não obstante disso, Pelay-Gimeno e colaboradores (2013), promoveram a síntese total de um undecapeptídeo depsipeptídico cíclico chamado Pipecolidepsina A, um potente agente antitumoral encontrado em uma esponja marinha da espécie *Homophymia lamelosa.* A reação ocorreu com a utilização de DIC e DMAP em DCM/DMF atingindo 98% de rendimento na ciclização. Muitas outras reações utilizando Steglich modificada são encontradas, mas somente essa correlacionada à lactonização de um ciclodepsilipopeptídeo. ¹¹⁹

Buscando tornar ainda mais vasta a biblioteca de compostos e metodologias de macrolactonização, foi utilizada a esterificação de Steglich modificada para a ciclização da Liquenisina-A. Da mesma maneira explicitada anteriormente, testou-se THF e anisol como solventes, e a reação foi acompanhada por 120 h, com adição a cada 24 h de 1 equivalente dos reagentes e recolhimento de alíquotas. Os dados de infusão direta das amostras em espectrômetro de massas com análise por triplo quadrupolo mostraram o andamento da reação são mostrados nas Figuras 31 e 32.



Figura 31. Espectros de ESI(-)-QqQ em modo negativo das alíquotas da etapa de ciclização da Liquenisina-A utilizando DIC e DMAP em THF.



Figura 32. Espectros de ESI(-)-QqQ em modo negativo das alíquotas da etapa de ciclização da Liquenisina-A utilizando DIC e DMAP em anisol.

Como pode-se observar, existem diferenças expressivas quando se alteram os solventes utilizados. A metodologia mais eficiente foi a que utilizou DMAP e DIC em THF, onde em apenas 24 horas de reação observou-se que aproximadamente 90% do material de partida havia sido consumido, e em 48 h todo ele já havia desaparecido. No entanto, quando se utiliza anisol como solvente, ocorre um acúmulo dos subprodutos da reação e a intensidade dos picos começa a decair em detrimento do aumento de reagentes no meio reacional. Outra observação importante é que nesse caso a esterificação não é favorecida, e os intermediários peptidil-DIC são mantidos por mais tempo em reação, como pode-se observar pela presença da Liquenisina-A linear de m/z 1165 e produtos de oligomerização. Mas, apesar da baixa conversão da reação utilizando anisol, ambas foram submetidas a posteriores análises.

4.3.2.1.4. Análise dos produtos das reações de ciclização

Ao se observar as possibilidades de ciclização da Liquenisina-A linear, é instintiva a observação de dois sítios de esterificação, uma vez que ao ser clivada da resina a molécula é privada dos grupos de proteção das cadeias laterais *R* pela hidrólise ácida ocorrida. Assim, a Liquenisina-A linear possui dois sítios de esterificação gerando os compostos cíclicos 6 ou 7 (Figura 33), onde a ciclização ocorre entre a hidroxila do ácido 3-hidroxitetradecanóico e o C-terminal da isoleucina (6) ou ao ácido aspártico (7) (Figura 33 a e b).



Figura 33. Produtos formados a partir da ciclização do lipopeptídeo correspondente (m/z 1020), sendo (a) Liquenisina-A e (b) co-produto obtido da ciclização da hidroxila no ácido aspártico.

Nota-se também que os aminoácidos possuem uma configuração conservada, uma vez que apenas são adicionados enantiômeros puros dos mesmos ao peptídeo. Desconsiderando-se a ocorrência de epimerização, observa-se que os peptídeos ao se ciclizarem com os ácidos 3-hidróxitetradecanóicos racêmicos, gerarão diastereoisômeros *cis* e *trans* em relação ao aminoácido diretamente ligado à carbonila que será esterificada. A Figura 34 apresenta os diastereoisômeros possíveis quando ocorre tal reação.



Figura 34. Diastereoisômeros detectáveis nos produtos de reação (6) e (7).

Caso ambos os produtos sejam sintetizados, são esperados, no mínimo, quatro picos em uma corrida cromatográfica utilizando colunas não-quirais. A fim de se observar a formação ou não dos co-produtos pela reação de ciclização química, realizou-se uma análise cromatográfica utilizando cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a um espectrômetro de massas com ionização por eletrospray e triplo quadrupolo (UPLC-ESI(+)-QqQ) em fase reversa utilizando da ferramenta SIR da massa de interesse (m/z 1021). As corridas para cada uma das metodologias utilizadas são apresentadas na Figura 35.



Figura 35. Cromatograma do experimento SIR da *m/z* 1021 dos experimentos de ciclização da Liquenisina-A (ESI(+)-QqQ).

É possível analisar que, realmente, as metodologias resultaram nos quatro produtos esperados. Além disso, observa-se que eles aparecem em proporções diferentes de acordo com a metodologia empregada. As amostras ciclizadas com HOBt mostraram respostas semelhantes para os 4 diastereoisômeros, enquanto as ciclizadas com DMAP demonstraram perfis semelhantes no detector, indicando que o agente ativador escolhido pode gerar perfis distintos de diastereoisômeros.

A fim de caracterizar os tempos de retenção dos diastereoisômeros (R) e (S) e os regioisômeros 6 e 7, foi realizada a síntese das moléculas utilizando o ácido (R)-3-hidroxitetradecanóico (produto (R)-2). A Figura 36 apresenta o cromatograma utilizando o experimento SIR para o produto (R)-2, o qual foi ciclizado utilizando a metodologia DMAP/DIC em THF.



Figura 36. (a) Cromatograma do experimento SIR da m/z 1021 nos isômeros de Liquenisina-A com ácido (*R*)-3-tetradecanóico. (b) Espectros de massas em alta resolução dos picos em 1,2 min e 1,7 min respectivamente (ESI(+)-Q-ToF). Razão entre eles é de 1,1 para do isômero 1,7 min para o 1,2 min, tomando como base suas intensidades absolutas.

Como esperado, foram observados apenas 2 picos para o produto ciclizado obtido utilizando o hidroxiácido enantiomericamente enriquecido, observando-se que aparentemente um dos produtos obteve preferência na ciclização quando da utilização da metodologia DMAP/DIC em THF. Esses resultados também foram observados nos cromatogramas e espectros em alta resolução (ANEXO I), salientando-se que as colunas utilizadas eram diferentes e a ordem dos produtos apresentaram-se de maneiras distintas.

Com a identificação dos produtos enantiomericamente enriquecidos, foi possível identificar os isômeros de liquenisina com o ácido graxo em configuração *R* e então confrontou-se os dados de fragmentação dos produtos obtidos com os de

Rønning e colaboradores (2015) que realizaram o estudo da Liquenisina-A natural e observaram os dados apresentados na Figura 37.⁸⁷



Figura 37. Espectro de fragmentação (ESI(+)-Q-ToF) da amostra natural de Liquenisina-A obtida no cultivo de *Bacillus licheniformis* NVH 1115. (Adaptado de Rønning et al., 2015).⁸⁷

A Figura 37 demonstra os padrões de fragmentação da Liquenisina-A natural de *Bacillus licheniformis* NVH 1115 com m/z 1021,68 e energia de colisão de 40 V. Como pode-se observar existem designações para as massas oriundas da fragmentação de peptídeos, sendo que essas denominações são um consenso da fragmentação de peptídeos e podem ser observadas na Figura 38.



Figura 38. Esquema de fragmentação para peptídeos e seus respectivos fragmentos internos. O exemplo utiliza os fragmentos de n=2 para ilustrar as fragmentações.

Como pode-se observar, essas fragmentações são nomeadas de acordo com a ligação que clivam e com os fragmentos que geram. Em clivagens entre a carboxila e o carbono que contém o grupamento lateral R, a clivagem é designada a_n (sendo n o número da posição do aminoácido que está para o lado *N*-terminal). O fragmento oposto a este é denominado x_n , seguindo as mesmas regras, exceto que o fragmento é voltado à parte *C*-terminal da cadeia peptídica. Quando a fragmentação está ocorrendo na ligação peptídica, as denominações são b_n (fragmento '*N*-terminal') e y_n (fragmento '*C*-terminal'). Uma vez que a fragmentação ocorre entre o nitrogênio e o carbono detentor da cadeia R lateral a fragmentação é denominada c_n e z_n , sendo para os fragmentos com *N*- e *C*-terminal, respectivamente. ^{120,121}

Os fragmentos gerados por tais fragmentações também estão apresentados na Figura 38, onde também é possível observar fragmentações menos comuns que ocorrem nas cadeias R laterais e podem ser **d**_n, **w**_n, e **v**_n, de acordo com o tipo de fragmentação e a qual porção (*N*- ou *C*-terminal) o fragmento pertence. ^{120,121}

Com o conceito de fragmentação peptídica em mente, pode-se observar as fragmentações dos dois isômeros da Liquenisina-A sintetizados com o ácido (*R*)-3-hidróxitetradecanóico. A Figura 39 apresenta os espectros de fragmentação dos dois produtos mostrados na Figura 36.



Figura 39. Espectros e padrão de fragmentação (ESI(+)-Q-ToF - CID 40 V) dos isômeros (*R*) de Liquenisina-A com tempo de retenção de (a) 1,2 min e (b) 1,7min.

As fragmentações permitiram observar a semelhança com a molécula de origem natural produzida pela cepa NVH 1115 reportado por Rønning e colaboradores (2015), e outras liquenisinas presentes na literatura permitindo assumir que se obteve sucesso na síntese da molécula pretendida, sendo necessária apenas a caracterização estrutural por RMN. ^{87,92,122}

Ao se analisar as fragmentações de ambos os isômeros, o único pico que os diferencia é o m/z 667. Observa-se que quando fragmenta-se os quatro isômeros (Figura 40), apenas os dois primeiros picos (1,0 e 1,2 min) não possuem o fragmento 667, o que nos leva a crer que na cromatografia, saem os dois enantiômeros de um dos isômeros, e os dois picos seguintes (1,5 e 1,7 min) pertencem aos enantiômeros do outro isômero.



Figura 40. Espectros de fragmentação (ESI(+)-QToF - CID 40 V) dos quatro isômeros sintetizados (DMAP/DIC em THF), correspondendo aos picos de (a) 1,0 min (*S*-(**7**)); (b) 1,2 min (*R*-(**7**)); (c) 1,5 min (*S*-(**6**)) e (d) 1,7 min (*R*-(**6**)). Picos característicos de m/z 667 destacados em vermelho.



Figura 41. (a) Fragmento diagnóstico de m/z 667 da Liquenisina-A (6) e (b) ausência da possibilidade no co-produto (7).

Nesse caso, observa-se nos cromatogramas dos quatro isômeros, que quando se realiza a reação se utilizando de DMAP, os enantiômeros do co-produto (7) tendem a ser sintetizados, porém quando se utiliza HOBt como agente ativador, os enantiômeros da Liquenisina-A são os favorecidos.

Ademais, isso nos leva a cogitar o co-produto (**7**) como produto cinético e a Liquenisina-A como produto termodinâmico, uma vez que a reação utilizando DIC e DMAP acontece com tempo consideravelmente menor (24 h) que as utilizando HOBt, onde ao fim de 120 horas não haviam reagido totalmente. Akaji e colaboradores (1994, 1997 e 2001) fizeram uma série de estudos aplicando DMAP, HOBt e um novo agente de acoplamento clorado (CIP) e observaram que para todos os acoplamentos, a ordem de reatividade era CIP>DMAP>HOBt, comprovando a maior velocidade de reação do DMAP sobre o HOBt. ^{123–125}

Além disso, outros estudos envolvendo esses dois reagentes de acoplamento demonstraram menor taxa de epimerização por parte do HOBt, porém maior formação de co-produtos, sendo o oposto verdadeiro para DMAP. ¹¹⁰ Essa hipótese se torna aceitável, uma vez que o ácido aspártico possui maior proximidade da hidroxila do ácido 3-hidroxitetradecanóico do que a isoleucina, facilitando a formação do anel de 20 membros (**7**) em detrimento do anel de 25 membros (**6**), pertencente à Liquenisina-A. Contudo, essa hipótese necessitaria de estudos muito mais aprofundados.

A fim comprovar essa hipótese, foram realizadas tentativas de isolamento dos isômeros utilizando-se técnicas cromatográficas preparativas, como cromatografia em camada delgada em fases comuns e reversas, coluna aberta em fase normal, coluna aberta em fase reversa, cromatografia líquida de alta eficiência preparativa em fase reversa e cromatografia por exclusão utilizando gel de sefarose Sephadex[®] G-25 e LH-20 não se obtendo sucesso em nenhuma dessas técnicas para a separação dos isômeros.

As técnicas utilizadas foram baseadas em isolamentos da literatura de moléculas semelhantes, como liquenisinas e surfactinas, porém a limitação da quantidade de amostra obtida e a particularidade dos isômeros obtidos pode ter impedido o sucesso do isolamento e caracterização total por Ressonância Magnética Nuclear. Contudo, este ainda é um objetivo do grupo e está nos planos de experimentos futuros.

4.3.2.2. Ciclização enzimática

Levando-se em consideração ciclização biossintética da surfactina e seus análogos, considerou-se ciclizar a molécula utilizando-se da bactéria *Bacillus licheniformis* ATCC 14580, sendo que assim se atestaria que a molécula não é estranha ao microrganismo. As tentativas de ciclização não obtiveram sucesso, uma vez que quando se retirava o meio de cultura e se adicionava o tampão com o substrato, havia morte celular das mesmas, não sendo possível observar ciclização. Após observarmos que a ciclização ocorria através da tioesterase, percebeu-se que haveria a necessidade de se modificar a molécula, convertendo-a em um tioéster a fim de se obtê-la em sua forma ciclizada.

Contudo, ao nos atentarmos ao fato de que haveria a necessidade de uma macrolactonização entre um álcool e um ácido carboxílico, abriram-se caminhos para observações da ação de lipases sobre as moléculas. As lipases enzimas pertencentes à classe das hidrolases (E.C.3.1) com atuação sobre ligações éster (E.C.3.1.1), porém não se limitam à um tipo de reação, atuando em esterificações, transesterificações, aminólises e lactonizações. ¹²⁶

Quando se trata de lactonizações, algumas lipases se mostraram eficientes na ciclização de grandes anéis, também chamadas de macrolactonizações. Baseado em Gatfield (1984), que foi o primeiro a promover esse tipo de ciclização utilizando lipases de *Mucor miehei* para ciclizar o ácido 15-hidroxipentadecanóico, Antczak e colaboradores (1991) utilizaram lipases de diferentes fontes, como lipozyme IM-20, *Mucor javanicus* L46, *Mucor racemosus* L45 e *Candida cylindracea* tipo VII para ciclizar os ácidos 15-hidroxipentadecanóico e 16-hidroxihexadecanóico.¹²⁷ Ainda em 1991, Ihara e colaboradores identificaram, clonaram e caracterizaram uma lipase de *Pseudomonas sp.*, observando que hidróxiésteres metílicos graxos com cadeia de até 8 carbonos eram apenas hidrolisados a ácidos, com 8 a 11 carbono eram convertidos em dímeros lactônicos e entre 11 e 18 carbonos a ciclização em uma lactona era o produto principal.¹²⁸

Posteriormente, Gargouri, Drouet e Legoy (2002) também realizaram a macrolactonização por intraesterificação do ácido (+)-coriólico, formando um anel de 14 membros com lipases de *Candida antarctica*.¹²⁹ Da mesma maneira, Fortunati e colaboradores (2015) sintetizaram macrolactonas de musk utilizando lipase B de *Candida antarctica*, formando anéis de até 16 membros.¹³⁰

No intuito de se observar a ação das lipases frente aos lipopeptídeos abertos, utilizou-se do kit de lipases da empresa Sigma-Aldrich[®] e outras, em experimentos baseados na literatura supracitada. A Tabela 11 reúne as lipases que foram utilizadas na tentativa de ciclizar-se as liquenisinas.

Fontes das lipases				
	Candida antarctica liofilizadaª			
	Candida antarctica imobilizada			
	Candida antarctica livre			
Bactérias	Candida rugosaª			
	Candida cylindraceaª			
	Pseudomonas cepaciaª			
	Pseudomonas fluorescens ^a			
	Aspergillus sp. ª			
_	Mucor mieheiª			
Fungos	Rhizopus arrhizusª			
	Rhizopus niveus ^a			
	Pâncreas de porco 1ª			
Animais	Pâncreas de porco 2ª			

Tabela 11. Fontes das lipases utilizadas nos experimentos de ciclização da Liquenisina-A

Fontes das lipases

Comerciais

Lipozyme TLIM^b Lipozyme RMIM^c

^a Pertencentes ao Kit de lipases da Sigma-Aldrich[®]; ^bLipase de *Thermomyces lanuginosus*; ^c Lipase de *Rhizomucor miehei*

As 15 lipases foram testadas durante 36 horas em meio orgânico e as lipases que apresentaram sinais de m/z 1019 (ESI -) estão mostradas abaixo, na Figura 42.



Figura 42. Espectro com aproximação de ESI(-)-QqQ dos ensaios de ciclização enzimática da Liquenisina-A. Em destaque os íons quasimoleculares pertencentes à Liquenisina-A.

Os outros organismos testados não apresentaram os sinais de liquenisina após as 36 horas de reação. É interessante observar que os microrganismos citados

nos trabalhos acima como agentes ciclizantes de ácidos graxos de cadeia longa estão dentro dos que forneceram produtos com a *m/z* esperada. *Candida antarctica, Mucor miehei* e *Pseudomonas* foram investigadas e mostraram resultados promissores, assim como *Rhizomucor miehei* que foi testado em ácidos graxos e foi igualmente efetivo.¹²⁹ Contudo, é a primeira vez que se reporta uma macrolactonização por *Rhizopus arrhizus, Rhizomucor miehei* e *Thermomyces lanuginosus*. Após as análises dos ensaios de ciclização da Liquenisina-A, realizou-se a investigação dos isômeros da molécula, a partir da cromatografia líquida com espectrometria de massas. A Figura 43 mostra os padrões de formação dos isômeros da liquenisina apresentados pelas enzimas.



Figura 43.Cromatogramas de SIR (ESI(-)-QqQ) da m/z 1019,7 das reações de ciclização enzimática da Liquenisina-A.

Levando-se em consideração a hipótese da fragmentação apresentada no tópico anterior, observa-se que há uma diferença nas proporções de ciclização dos isômeros ciclizados pelas enzimas também, assim como os experimentos químicos. Com exceção da lipase de *P. fluorescens* o isômero mais sintetizado é o de t_R 1,7 min, isômero (*R*)-**6**, onde a ciclização ocorreu no ácido aspártico, com configuração (*R*). No caso da lipase de *P. fluorescens* observa-se que o produto majoritário também

possui configuração (*R*), porém, trata-se da Liquenisina-A, o que seria promissor, uma vez que se obteria a molécula de interesse em maior quantidade. Esses dados indicam uma possível enantiopreferência pelas lipases pela configuração (*R*), necessitandose, também, de um estudo mais aprofundado com isolamento e caracterização por RMN.

4.3.3. Ocorrência da Liquenisina-A em Espécies de Bacillus sp.

Como foi discutido anteriormente, as liquenisinas foram primeiramente observadas em cultivos de *B. licheniformis*, porém, após a varredura de outras espécies de *Bacilli*, constatou-se a presença das mesmas em outras culturas, bem como descobriram-se diferentes moléculas com propriedades semelhantes. Junto a isso, o fato de se haver encontrado liquenisinas em mais de 50 cepas de *B. licheniformis*, incita a necessidade da investigação de diversas cepas presentes em coleções institucionais.

Seguindo esta linha, 14 cepas de *Bacilli* foram investigadas para observação da presença de Liquenisina-A, presença de outras liquenisinas ou ainda presença de outros lipopeptídeos semelhantes. As cepas testadas estão descritas na Tabela 12.

Os cultivos seguiram o procedimento reportado por Qiu e colaboradores (2014), que utilizava meio mínimo de Cooper, que consiste, basicamente, de sais minerais e glicose. ⁹² Após diversas precipitações e rediluições com alteração de pH, obteve-se o extrato bruto com predominância de peptídeos, os quais foram submetidos a UPLC-Q-ToF para avaliação da presença de Liquenisina-A.

Entrada	Cepas de <i>Bacilli</i>	Código
1	Bacillus licheniformis	ATCC14580
2	Bacillus sp.	
3	Bacillus sp.	
4	Bacillus cereus	CCT 4060
5	Bacillus megaterium	
6	Bacillus pumilus	
7	Bacillus pumilus	
8	Bacillus pumilus	
9	Bacillus pumilus	
10	Bacillus sp.	
11	Bacillus sp.	

Tabela 12. Cepas de Bacilli monitoradas para a presença de liquenisinas.
Entrada	Cepas de Bacilli	Código
12	Bacillus sp.	
13	Bacillus sp.	
14	Bacillus subtilis	ATCC 6633

Os dados de UPLC-Q-ToF nos permitem observar que houve a produção de lipopeptídeos por algumas das cepas (ANEXO I), porém, apenas as cepas de *Bacillus licheniformis* apresentavam o íon pseudomolecular [M+H] de m/z 1021 (ESI(+)-QToF) (Figura 44) em sua composição, sendo que apenas ela produziu liquenisinas. Contudo, observa-se que mais de um tipo de liquenisina possui a massa 1020, e como foi discutido anteriormente, muitas vezes mudam-se a ordem dos peptídeos, variando entre Val, lle ou Leu ou o número de carbonos das cadeias do ácido graxo, que vão entre 13 e 15 carbonos, além de poderem ser ramificadas ou lineares, mantendo-se as massas e alterando-se dados, como o tempo de retenção. Finalmente, foi observada a presença de lipopeptídeos com massa similar às da Liquenisina-A, porém, não com o mesmo tempo de retenção nos cromatogramas, ainda que nas mesmas condições de operação.



Figura 44. SIR (ESI(+)-Q-ToF) da *m/z* 1021 do extrato bruto do cultivo de *Bacillus licheniformis.*

As bactérias *Bacillus sp.* (Entrada **3**) e *Bacillus sp.* (Entrada **13**) apresentaram apenas variedades de surfactinas (Figuras 45 e 46).



Figura 45. Cromatograma e referidos espectros de massas (ESI(+)-Q-ToF) dos cultivos de *Bacillus sp.* (Entrada 3)



Figura 46. Cromatograma e referidos espectros de massas (ESI(+)-Q-ToF) dos cultivos de *Bacillus sp.* (Entrada 13)

Como dito anteriormente, as liquenisinas são uma subclasse das surfactinas, tendo propriedades semelhantes, sendo potenciais substitutos ou ainda, possuírem atividades maiores ou mais específicas do que as próprias surfactinas. Não é difícil se encontrar surfactinas nas mais variadas espécies de *Bacillus*, fato este que levou ao alto índice de surfactinas nos cultivos.

4.4. CONCLUSÕES PARCIAIS

Liquenisinas são biossurfactantes com grande potencial de aplicações, como na redução da tensão superficial, capacidade antibiótica, antitumoral, entre outras. Sua síntese permite a obtenção de informações valiosas acerca da natureza de suas atividades, bem como ajuda a ampliar seu escopo de aplicações.

A síntese do ácido 3-hidroxitetradecanóico de cadeia longa utilizando a reação de Reformatski mostrou-se efetiva, tornando possível a obtenção de um produto oneroso em quantidade expressiva. Também, com a síntese do mesmo, nos foi permitido realizar a resolução cinética, observando dados de enantiopreferência da lipase B de *Candida antarctica* para moléculas desse tipo, bem como avaliar as reações laterais, como a eliminação indesejada do grupamento acetila e formação do éster α , β -insaturado. Esta metodologia abriu precedentes para a síntese dos mais de 20 compostos da família da surfactina e outros compostos similares.

A estratégia escolhida para a síntese de peptídeos em fase sólida permitiu o acesso a 4 diferentes isômeros de liquenisina, que viabilizará o estudo das moléculas isoladamente em estudos posteriores, assim como avaliar o efeito sinérgico das mesmas. Adicionalmente, será possível avaliar a atividade biológica do lipopeptídeo ciclizado no ácido aspártico (7), o qual é uma molécula inédita na literatura.

Este estudo permitiu, também, a avaliação de 4 diferentes técnicas para ciclização da molécula, sendo duas delas inéditas para peptídeos, abrindo precedente para o uso das técnicas em outros ciclolipodepsipeptídeos a serem sintetizados no futuro. Nos foi permitido, também, observar os diferentes padrões nas proporções dos isômeros da molécula, analisando de perto as diferenças e tornando possível a utilização de diferentes técnicas condicionadas à necessidade de quem as sintetiza. Outra informação relevante foi a impossibilidade técnica de se substituir solventes já utilizados por anisol, uma vez que o mesmo promove uma maior contaminação e torna a reação mais lenta e passível de formação de subprodutos.

A síntese dos isômeros enantiomericamente enriquecidos permitiu que se levantasse uma hipótese acerca da identidade de cada pico do cromatograma, hipótese essa, que será investigada minuciosamente para posterior publicação dos resultados.

Ademais, observou-se que lipases de diferentes fontes foram capazes de ciclizar a molécula, sendo um feito inédito, que permite adicionar uma classe de moléculas à promiscuidade dessas enzimas já tão versáteis e analisar suas regiopreferências frente à tais substratos.



5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1. CAPÍTULO 1

5.1.1. Procedimentos Gerais Adotados no Laboratório de Biocatálise

Todo o trabalho foi realizado no Laboratório de Biocatálise e Síntese Orgânica (LaBioSin) com creditação para trabalhar com micro-organismos das classes de risco I e II.

Todos os meios de cultura, soluções e materiais a serem utilizados em contato direto com os micro-organismos foram esterilizados a 121ºC, 1,5 Pa, por 15 minutos em autoclave.

Soluções de álcool 70% (v/v) e hipoclorito 1% (v/v) foram utilizadas para desinfetar bancadas de trabalho e fluxo laminar. A manipulação dos microorganismos foi sempre realizada em câmara de fluxo laminar.

Todos os materiais e meios que tiveram contato direto com os microorganismos foram autoclavados antes de serem descartados.

5.1.2. Condições de cultura

Bacillus cereus CCT4060 e *Cronobacter sakazakii* CCT4821 foram cultivados a 30°C em ágar nutritivo (NA) (pó "Lab-Lemco" 0,1%, extrato de levedura 0,2%, peptona 0,5%, NaCl 0,5%, agar 1,5% e pH inicial 7,4). Cultivos líquidos foram realizados a 30°C e 200 rpm em meio de crescimento Luria-Bertani (triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1% e pH inicial 7,0) durante 24 horas para as bactérias isoladas e em co-cultivo.

5.1.3. Extração de 2,5-dicetopiperazinas

Após 24 horas de cultivo, as células foram removidas por centrifugação a 3500 rpm durante 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi extraído com acetato de etila (3 x 300 mL), e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida (Büchi Rotaevaporador R-200). O extrato bruto foi submetido à cromatografia em coluna utilizando sílica gel e eluído com um gradiente de

hexano:acetato de etila (partindo de hexano 100 % a 50%). As frações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) e CG-EM. Frações que apresentam fragmentação DKP características da ciclo(Pro-Leu): *m/z* 154, 86, 70 com pureza adequada foram reunidas, e o solvente evaporado.

5.1.4. Síntese dos Padrões de Estereoisômeros

A síntese das 2,5-dicetopiperazinas ciclo(L-Pro-L-Leu), ciclo(L-Pro-D-Leu), ciclo(D-Pro-L-Leu) e ciclo (D-Pro-D-Leu) foi realizada utilizando protocolos de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) pela estratégia Fmoc (cloreto de 9-fluorenilmetiloxicarbonil). Um total de 300 mg de resina Wang (Sigma-Aldrich) já acoplado com L- ou D-leucina-Fmoc-OH (0,7 e 0,6 mmol/g_{resina}, respectivamente) foram submersos em 3 mL de diclorometano (DCM) durante 20 minutos para dilatação. Em seguida, verteu-se 3 mL de 4-metilpiperidina no frasco reacional e agitou-se durante 20 minutos duas vezes. Após filtração a vácuo, a resina foi lavada com 3 mL de metanol e 3 mL de DCM três vezes cada. Os solventes foram removidos com filtração a vácuo.

Adicionou-se L- ou D-Prolina-Fmoc-OH (Sigma Aldrich) ao sistema em equivalência de 3:1 mmol em relação a L-Leucina-Fmoc. Adicionaram-se ao sistema o hidrato de 1-hidroxibenzotriazole (HOBt - Sigma-Aldrich[®]) e *N*,*N*diisopropilcarbodiimida (DIC – Sigma-Aldrich[®]) dissolvido em 3 mL de *N*,*N*dimetilformamida (DMF) numa proporção de 6:1 relativos à quantidade de aminoácido acoplada à resina (mmol). O sistema foi agitado durante 4 horas à temperatura ambiente e, em seguida, foi filtrado a vácuo. O procedimento de desproteção da prolina foi repetido para assegurar a disponibilidade da parte amino terminal para ciclização.

Após filtração a vácuo, adicionou-se ao sistema 3 mL de coquetel de clivagem (95% de ácido trifluoroacético (TFA – Sigma-Aldrich[®]), 2,5% de triisopropilsilano (TIS – Sigma-Aldrich[®]) e 2,5% de água destilada) e agitou-se durante 4 horas à temperatura ambiente. A filtração e a evaporação (Büchi Rotaevaporador R-200) forneceu óleo incolor que foi dissolvido em metanol e analisado por CG-EM.

Ciclo (L-Pro-L-Leu) – 54% de rendimento

CCD (hexano: acetato de etila: metanol (25:70:5), solução reveladora: Ácido fosfomolíbdico (10% m/v em etanol) R_f 0,25.

[α]_D -25 (c 0,1 g/100 mL, 20°C, MeOH);

¹H RMN(400,18 MHz, CD₃OD, δ_{CD3OD} 3,31 ppm): δ 4,45 (1H, dd, *J* 9,7 e 5,5 Hz, H-6), 4,31 (1H, dd, *J* 8,6 e 6,3 Hz, H-9), 3,42 (1H, m, H-3a), 3,34 (1H, m, H-3b), 2,45 (1H, m, H-5b), 2,15 (1H, m, H-5a), 2,05 (2H, m, H-4), 1,73 (1H, m, H-11), 1,65 (2H, m, H-10), 0,98 (3H, d, *J* 6.3 Hz, H-12), 0,94 (3H, d, *J* 6,2 Hz, H-13). ¹³C RMN (100,63 MHz, CD₃OD, δ_{CD3OD} 49.15 ppm): δ175,5 (C, C-7), 170,0 (C, C-1), 61,1 (CH, C-6), 52,6 (CH, C-9), 47,6 (CH₂, C-3), 41,4 (CH₂, C-10), 31,1 (CH₂, C-5), 26,2 (CH, C-11), 25,0 (CH₂, C-4), 23,5 (CH₃, C-12), 21,8 (CH₃, C-13).

Ciclo (L-Pro-D-Leu): 45% de rendimento

CCD (Hexano: Acetato de etila: Metanol (25:70:5), solução reveladora: Ácido Fosfomolíbdico (10% m/v em etanol) R_f 0,25.

[α]_D -6 (c = 0.1 g/100 mL, 20°C, MeOH);

¹**H RMN** (400,18 MHz, CD₃OD, δ_{CD3OD} 3,31 ppm): δ 4,45 (1H, m, H-6), 4,29 (1H, m, H-9), 3,38 (2H, m, H-3a e 3b), 2,47 (1H, m, H-5b), 2,03 (3H, m, H-5a e 4), 1,68 (3H, m, H-10 e 11), 0,98 (3H, d, *J* 6,0 Hz, H-12), 0,93 (3H, d, *J* 6, 1 Hz, H-13).

¹³**C RMN** (100,63 MHz, CD₃OD, δ_{CD3OD} 49,15 ppm): δ175,6 (C, C-7), 169,9 (C, C-1), 61,3 (CH, C-6), 52,5 (CH, C-9), 47,5 (CH₂, C-3), 41,6 (CH₂, C-10), 31,4 (CH₂, C-5), 26,4 (CH, C-11), 25,2 (CH₂, C-4), 23,5 (CH₃, C-12), 21,8 (CH₃, C-13).

Ciclo (D-Pro-L-Leu): 79% de rendimento

CCD (Hexano: Acetato de etila: Metanol (25:70:5), solução reveladora: Ácido Fosfomolíbdico (10 % m/v em etanol) R_f 0,25.

[α]_D +19 (c 0,1 g/100 mL, 20°C, MeOH);

¹**H RMN**(400,18 MHz, CD₃OD, δ_{CD3OD} 3,31 ppm): δ 4,45 (1H, m, H-6), 4,30 (1H, dd, *J* 8,8 e 7, 1 Hz, H-9), 3,38 (2H, m, H-3), 2,45 (1H, m, H-5b), 2,03 (3H, m, H-4 e 5a), 1,68 (3H, m, H-10 e 11), 0,98 (3H, d, *J* 6,1 Hz, H-12), 0,93 (3H, d, *J* 6,2 Hz, H-13).

¹³**C RMN** (100,63 MHz, CD₃OD, δ_{CD3OD} 49,15 ppm): δ175,6 (C, C-7), 169,9 (C, C-1), 61,3 (CH, C-6), 52,5 (CH, C-9), 47,5 (CH₂, C-3), 41,6 (CH₂, C-10), 31,4 (CH₂, C-5), 26,4 (CH, C-11), 25,2 (CH₂, C-4), 23,5 (CH₃, C-12), 21,8 (CH₃, C-13).

Cyclo (D-Pro-D-Leu): 45% de rendimento

CCD (Hexano: Acetato de etila: Metanol (25:70:5), solução reveladora: Ácido fosfomolíbdico (10% m/v em etanol) R_f 0.28.

[α]_D +28 (c 0,1 g/100 mL, 20°C, MeOH);

¹**H RMN**(400,18 MHz, CD₃OD, δ_{CD3OD} 3,31 ppm): δ 4, 45 (1H, dd, *J* 9,7 e 5,4 Hz, H-6), 4,31 (1H, dd, *J* 8,6 e 6,4 Hz, H-9), 3,42 (1H, m, H-3a), 3,35 (1H, m, H-3b), 2,45 (1H, m, H-5b), 2,15 (1H, m, H-5a), 2,04 (2H, m, H-4), 1,68 (3H, m, H-10 e 11), 0,98 (3H, d, *J* 6,3 Hz, H-12), 0,94 (3H, d, *J* 6,1 Hz, H-13).

¹³**C NMR** (100,63 MHz, CD₃OD, δ_{CD3OD} 49,15 ppm): δ 175,5 (C, C-7), 170,0 (C, C-1), 61,1 (CH, C-6), 52,6 (CH, C-9), 47,6 (CH₂, C-3), 41,4 (CH₂, C-10), 31,1 (CH₂, C-5), 26,2 (CH, C-11), 25,0 (CH₂, C-4), 23,5 (CH₃, C-12), 21,8 (CH₃, C-13).

5.1.5. Cromatografia gasosa - espectrometria de massa (GC-EM)

A CG-EM foi realizada em um cromatógrafo a gás Agilent 6890 (Santa Clara, CA, EUA) acoplado com um espectrômetro de massas Hewlett-Packard 5973, equipado com uma coluna capilar de sílica fundida HP-5-MS (espessura de 30 x 0,25 mm x 0,25 μ m) em modo "split" 10:1. A temperatura do injetor foi de 270 °C, e o fluxo de gás de suporte (He) foi de 1 mL.min⁻¹. Injetaram-se amostras de 1 μ L (1 mg / mL) em acetato de etila. O programa de temperatura do forno foi o seguinte: temperatura inicial de 150 °C durante 3 minutos; aumentando-se a temperatura de 150 a 275 °C a 25 °C.min⁻¹, e temperatura de 275 °C durante 10 minutos. A energia de ionização para a EM foi de 0,7 kV. A análise foi realizada em modo de varredura total (m/z 40-400). A interpretação espectral foi auxiliada pela biblioteca espectral do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST) 05 armazenada na unidade de controlador GC-MS.

5.1.6. Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C

Os espectros de RMN de ¹H foram registrados em espectrômetros Bruker Avance III 400 (B₀ = 9,4 T) operando a 400,17 MHz para o ¹H e 100,63 MHz para o ¹³C. Os experimentos unidimensionais de RMN de ¹H e de ¹³C foram realizados utilizando as condições típicas pré-definidas nos *softwares* dos equipamentos. Espectros de RMN de ¹³C de DEPT 135^o e DEPT 90^o, além de algumas técnicas de RMN em duas dimensões (COSY, HSQC e HMBC) foram utilizados, quando necessário, para elucidação estrutural dos compostos sintetizados.

As amostras foram analisadas em tubos de ressonância de 5 mm de diâmetro. O sinal de deutério do solvente foi utilizado como trava do campo e ajuste da homogeneidade do campo magnético.

Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em partes por milhão (ppm), tomando-se como padrão de referência interna tetrametilsilano (TMS, 0,0 ppm) ou o próprio solvente da solução.

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

5.1.7. Cromatografia Gasosa com Detecção por Ionização em Chama (CG-FID)

Uma coluna capilar de sílica fundida Lipodex®-E quiral (octakis- (3-Obutiril-2,6-di-On-pentil)-y-ciclodextrina) (28 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro, espessura de filme de 12 µm) foi instalada em um CG-FID Agilent Modelo 6850. O ensaio iniciou-se a 120°C durante 5 minutos e depois se elevou 1°C.min⁻¹ até 180°C e manteve-se durante 20 min. O cromatógrafo operou a um fluxo constante de gás H₂ de 1,22 mL min⁻¹. A temperatura do injetor igual a 200 °C, temperatura do detector igual a 250 °C. O volume de injeção das amostras foi de 1 µL na concentração de 0,5 – 1 mg mL⁻¹ no modo "split" de 10:1. Os quatro padrões estereoisoméricos, bem como as amostras de cada cultura e co-cultura, foram injetados a concentração de 1 mg/mL. Os enantiômeros foram também injetados separadamente para determinar o tempo de retenção. O Tempo de Retenção Relativo (RRT) foi realizado co-injetando tricosano (C23H48, RT: 68,649 min).

5.1.8. Rotação óptica

As rotações ópticas foram medidas a 20 °C num polarímetro PerkinElmer 341 a 589 nm utilizando cubetas PerkinElmer de 10 mm. As concentrações (c) são expressas em g/100 mL.

5.1.9. Experimento de STD (Saturation Transfer Difference)

Após 24 horas de cultivo, as células de *B. cereus* e *C. sakazakii* os foram centrifugadas, 16 mg de células úmidas de cada microrganismo foram pesadas e então ressuspensas em tampão fosfato pH 7,0 preparado em D₂O. Junto à suspensão de microrganismo, foram adicionadas quantidades suficientes de uma solução das 2,5-dicetopiperazinas enantiomericamente puras a fim de que estivessem com concentração final de 10 mM. Os tubos foram agitados em *vortex* por 2 minutos e então submetidos à RMN.

Os experimentos de STD *on resonance* foram realizados com irradiação seletiva dos sinais de bactéria em -0,5 ppm. Os experimentos *off resonance* foram realizados com irradiação seletiva fora da janela espectral, em 30 ppm. A sequência utilizada para obtenção destes espectros foi a stddiffgp.19 que suprime o sinal residual de HDO com WATERGATE. Os espectros foram processados com o comando *stdsplit* para separação dos FIDs dos experimentos *on e off resonance*. Em seguida estes FIDs foram subtraídos dando origem ao espectro de diferença de transferência de saturação. As intensidades dos picos deste espectro foram comparadas às intensidades do espectro *off resonance* para calcular a quantidade de nOe observado. Os detalhes experimentais estão apresentados na Tabela 13.

Parâmetros	
Janela espectral (sw)	8 kHz
Pontos de aquisição (td)	16 k
Pontos de processamento (si)	32 k
Tempo de aquisição (aq)	1 s
Tempo de espera (d1)	5 s
Número de transientes (ns)	32
Tempo de saturação	2 s
Trava de <i>spin</i>	50 ms
Pulso seletivo de saturação	Gauss, 50 ms, 0,1 mW

Tabela 13. Condições experimentais de obtenção dos espectros de STD

5.2. CAPÍTULO 2

5.2.1. Síntese do 3-hidroxitetradecanoato de etila



20 mL de THF foram colocados em um balão de fundo redondo e em manta de agitação com um condensador de bolas acoplado. O THF puro foi aquecido sob agitação até ebulição. Ergueu-se por um momento o condensador e colocou-se 714 mg de Zn (2 eq. – 10,8 mmol) em pó ao solvente em ebulição. Rapidamente, adicionaram-se 1 g do dodecanal (1 eq. – 5,4 mmol) e 1,81 g (2 eq. – 10,8 mmol) de bromoacetato de etila. Recolocou-se o condensador e a reação refluxou por aproximadamente 1 min. Retirou-se, então o aquecimento e deixou-se agitar à temperatura ambiente por 20 minutos. Após comprovação do final da reação, evaporou-se o THF em rotaevaporador e colocou-se 10 mL de hexano, e em seguida, 10 mL de água destilada formando um precipitado amarelo. A mistura foi filtrada e a fase orgânica lavada com 10 mL de água

destilada, em seguida duas vezes de 10 mL de solução de HCI 1 M, mais 10 mL de água destilada e por fim, 10 mL de salmoura. O composto foi então seco com Na₂SO₄ e o solvente evaporado, gerando um óleo transparente isolado com 61 % de rendimento após coluna cromatográfica utilizando sílica gel como fase estacionária e Hexano: Acetato de etila (8:2) como fase móvel.

CCD (Hexano: Acetato de etila (90:10), solução reveladora: Ácido fosfomolíbdico (10 % m/v em etanol) R_f 0.18.

¹**H RMN** (400,18 MHz, CDCl₃) δ 4,15 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 3,98 (qt, J = 8,0, 3,2 Hz, 1H), 2,48 (dd, J = 16,3, 3,2 Hz, 1H), 2,37 (dd, J = 16,4, 8,9 Hz, 1H), 1,52 – 1,46 (m, 1H), 1,44 – 1,37 (m, 2H), 1,32 – 1,19 (m, 21H), 0,86 (t, J = 6,8 Hz, 3H). ¹³**C NMR** (100,63 MHz, CDCl₃) δ 173,0, 68,0, 60,6, 41,3, 36,5, 31,9, 29.63, 29,6, 29,5, 29,5, 29,5, 29,5, 29,3, 25,4, 22,6, 14,0.

5.2.2. Hidrólise Alcalina do 3-hidroxitetradecanoato de etila



rend. 64 %

À uma solução de (1) (300 mg –1 eq – 1,1 mmol) em uma mistura de 9:1 de CH₂Cl₂/CH₃OH foi adicionada uma solução metanólica de NaOH 2 M (2 eq – 2,2 mmol) a fim de se obter uma concentração de NaOH final de 0,2 M. Após 2-3 minutos de agitação, a solução se tornou turva e o sal do ácido carboxílico começou a precipitar. A mistura foi filtrada em papel filtro e lavada 3 vezes com CH₂Cl₂ e então dissolvida em água destilada. Após dissolução, a amostra teve seu pH ajustado para 2 e o precipitado foi filtrado da mesma maneira, e lavado com água destilada pH 2. O sólido branco foi recuperado e obteve-se 64% de rendimento.

CCD (Hexano: Acetato de etila (90:10), solução reveladora: Ácido fosfomolíbdico (10 % m/v em etanol) R_f 0.05.

¹**H RMN**(400,18 MHz, CD₃OD, δ_{CD3OD} 3,31 ppm): δ 3,98 (qt, *J* = 9,4, 4,7 Hz, 1H), 2,41 (qd, *J* = 15,2, 6,5 Hz, 2H), 1,48 (d, *J* = 6,3 Hz, 2H), 1,30 (d, *J* = 6,7 Hz, 18H), 0,90 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H).

¹³**C NMR** (100,63 MHz, CD₃OD, δ_{CD3OD} 49,15 ppm): δ 174,3, 67,9, 41,8, 36,7, 31,6, 29,4, 29,3, 29,3, 29,3, 29,3, 29,0, 25,2, 22,3, 13,0.

5.2.3. Resolução Cinética do 3-hidroxitetradecanoato de etila



Em um balão de fundo chato, foram adicionados 100 mg de (1) (1 eq. – 0,37 mmol), juntamente com 300 mg de CALB imobilizada em resina (2000 U/g) e ambos foram suspensos em 10 mL de acetato de vinila (108 mmol) e mantidos sob agitação orbital a 28 $^{\circ}$ C e 200 rpm durante 5 dias, com monitoramento diário utilizando CG-EM. Após a reação atingir 50% de conversão, a solução foi filtrada, o solvente evaporado em rotaevaporador e os produtos foram ressuspensos em hexano e separados utilizando coluna cromatográfica de sílica gel como fase estacionária e hexano/acetato de etila (9:1) como fase móvel. Os produtos apresentaram-se como óleos transparentes, sendo que se recuperou o produto (*S*)-3 com 60% de rendimento e o produto (*R*)-1 com 92%. A conversão dos acetóxiésteres em hidroxiácidos foi realizada da mesma forma descrita no tópico 6.2.2.

CCD (Hexano: Acetato de etila (90:10), solução reveladora: Ácido fosfomolíbdico (10 % m/v em etanol) R_f 0.33.

[α]_D -4 (c 1 g/100 mL, 20 °C, CH₂Cl₂);

¹**H RMN** (400,18 MHz, CDCl₃) δ 5,20 (qt, J = 7,2, 5,5 Hz, 1H), 4,12 (m, 2H), 2,50 (m, 2H), 2,02 (s, 3H), 1,59 (m, 2H), 1,24 (d, J = 2,5 Hz, 21H), 0,86 (m, 3H). ¹³**C NMR** (100,63 MHz, CDCl₃) δ 170,4, 170,3, 70,5, 60,5, 39,3, 34,0, 31,8, 29,6, 29,5, 29,5, 29,4, 29,3, 29,3, 25,1, 22,6, 21,0, 14,1, 14,0.

5.2.4. Rotação Óptica

As rotações ópticas foram medidas a 20 °C num polarímetro PerkinElmer 341 a 589,3 nm utilizando cubetas PerkinElmer de 10 mm. As concentrações (c) são expressas em g/100 mL.

5.2.5. Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM)

A CG-EM foi realizada em um cromatógrafo a gás Agilent 6890 (Santa Clara, CA, EUA) acoplado com um espectrômetro de massas Hewlett-Packard 5973, equipado com uma coluna capilar de 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 µm de filme, revestida com sílica em modo *splitless*. A temperatura do injetor foi de 270 °C, e o fluxo de gás de suporte (He) foi de 1 mL.min⁻¹. Injetaram-se amostras de 1 µL (1 mg/mL) em acetato de etila. O programa de temperatura do forno foi o seguinte: temperatura inicial de 150 °C durante 3 minutos; aumentando-se a temperatura de 150 a 275 °C a 25 °C.min⁻¹, e temperatura de 275 °C durante 10 minutos. A energia de ionização para a EM foi de 0,7 kV. A análise foi realizada em modo de varredura total (m/z 40-400). A interpretação espectral foi auxiliada pela biblioteca espectral do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST) 05 armazenada na unidade de controlador GC-MS.

5.2.6. Cromatografia Gasosa com Detecção por Ionização em Chama (CG-FID)

Uma coluna capilar de sílica fundida Hydrodex ® β -3P ((25 m x 0,25 mm x 0,25 µm; Macherey-Nagel) foi utilizada em um CG-FID Agilent Modelo 6850. O ensaio iniciou-se a 120 °C durante 5 minutos e depois se elevou 2 °C.min⁻¹ até 180 °C e manteve-se durante 20 min. O cromatógrafo operou a um fluxo constante de gás H₂ de 1,22 mL.min⁻¹. A temperatura do injetor igual a 200 °C, temperatura do detector igual a 250 °C. O volume de injeção das amostras foi de 1 µL na concentração de 0,5 – 1 mg.mL⁻¹ no modo split 10:1.

5.2.7. Adição do Primeiro Aminoácido à Resina Wang

Em um balão de fundo redondo, 500 mg de resina Wang (0,7 mmol de capacidade por g de resina) foi coberta por DMF (10 mL) e deixada expandir por 30 minutos. Em outro balão de fundo redondo, 662 mg (6 eq – 1,9 mmol) de isoleucina protegida com Fmoc foi dissolvida em CH₂Cl₂ seco sob atmosfera de N₂. Uma pequena quantidade de DMF seco foi utilizado para ajudar na dissolução. A solução foi resfriada a 0 °C e 232 µL de DIC (5 eq – 1,5 mmol) foram adicionados lentamente. A mistura foi agitada por 20 minutos à mesma temperatura e o DCM foi então, evaporado. O resíduo foi dissolvido em uma quantidade mínima de DMF e adicionado à suspensão da resina seguido por 3 mg (0,1 eq – 0,03 mmol). A suspensão foi agitada à temperatura ambiente por 1 h e após decorrido o tempo, 1 mg de resina foi retirada, lavada com CH₂Cl₂, MeOH e DMF para ser utilizada na avaliação da quantidade de aminoácido acoplado à resina.

Após a quantificação da carga de acoplamento, promoveu-se a etapa de capeamento dos sítios não ocupados. Para tanto, 57 μ L de anidrido acético (2 eq. – 0,6 mmol) e 48 μ L de piridina (2 eq – 0,6 mmol) foram adicionados ao meio reacional e a mesma foi agitada à temperatura ambiente por mais 30 min. A resina foi filtrada e lavada três vezes com DMF, CH₂Cl₂ e MeOH e então seca.

5.2.8. Protocolo para Quantificar a Carga da Isoleucina em Resina Wang

Uma cubeta de vidro medindo 10 mm foi preenchida com 3 mL de uma solução 20% de 4-metilpiperidina em DMF e utilizada para zerar o equipamento no comprimento de onda de 290 nm. Aproximadamente 1 mg de resina previamente lavada e seca foi adicionada à cubeta contendo a solução supracitada e o meio reacional foi agitado por 5 minutos. Após agitação, a mesma foi mantida estática para que a resina decantasse e então foi realizada a leitura da mesma a 290 nm em triplicata. O valor estimado da carga de aminoácido é calculado através da Equação 2.

$$Carga Fmoc = \frac{mmol \, de \, AA}{g \, resina} = \frac{[101 \, x \, Abs \, da \, amostra]}{(7,8 \, x \, mg \, de \, resina)} \qquad \text{Equação 2}$$

5.2.9. Síntese em Fase Sólida do Lipoheptapeptídeo Linear

Pesou-se 300 mg de resina Wang com Fmoc-L-Ile-OH já acoplada (0,58 mmol de aminoácido acoplado/g de resina), colocou-se a resina em reator com base de vidro poroso (Figura 47) e seguiu-se expandindo a resina com 3 mL de diclorometano (DCM) por 20 min. Após decorrido o tempo de expansão da resina, a mesma foi tratada seguindo Protocolo I. Terminado os ciclos do Protocolo I passou-se para o Protocolo II seguindo a ordem de aminoácidos (Fmoc-aa-OH): Fmoc-D-Leu-OH (222 mg), Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH (260 mg), Fmoc-L-Val-OH (234 mg), Fmoc-L-Leu-OH (222 mg), Fmoc-D-Leu-OH (222 mg), Fmoc-L-Gln(OtBu)-OH (270 mg), ácido 3-hidróxi-tetradecanóico (45 mg). O Protocolo II foi seguido até o acoplamento do ácido 3-hidroxitetradecanóico.



Figura 47. Reator de vidro utilizado para síntese de peptídeos em fase sólida.

Tratamento	Ciclo
4-metilpiperidina em DMF (80%)	1 x 3 mL / 15 min (Agitação)
	1 x 3 mL / 15min (Agitação)
Metanol	3 x 3 mL (entre cada período)
DCM	3 x 3 mL (entre cada período)

Protocolo I. Desproteção de grupamento *N*-terminal e lavagem

Protocolo II. Adição de aminoácidos e ácido graxo à cadeia

Tratamento	Ciclo
Fmoc-aa-OH (3x excesso) + DIC (6x excesso) + HOBt (6x excesso) em DMF	3 mL x 4 h (agitação orbital a temperatura ambiente)
Metanol DCM	3 x 3mL 3 x 3 mL
DCM	3 x 3 mL

Após o acoplamento do ácido 3-hidroxitetradecanóico (racêmico ou enantiomericamente enriquecido), seguiu-se para a etapa de clivagem, onde adicionou-se 3 mL do coquetel de clivagem (2,97 mL de ácido trifluoroacético, 0,015 mL de triisopropilsilano e 0,015 mL de água destilada) e deixou-se em agitação orbital por 4 horas. Recolheu-se o sobrenadante da reação, onde foram adicionados 5 mL de éter dietílico gelado. Secou-se em rotaevaporador (Buchi R-200) e obteve-se 86 mg de produto (49% de rendimento).

5.2.10. Teste de Kaiser

<u>Reagente A</u>: 1:49 de solução aquosa 0,01 M de KCN/piridina; <u>Reagente B:</u> Solução 5% (m/v) de ninidrina em *n*-butanol; <u>Reagente C:</u> Solução 21 M de fenol em *n*-butanol.

Em um tubo do tipo *eppendorf* com capacidade para 0,5 mL, foi adicionada uma pequena quantidade de resina e adicionados 10 μ L do Reagente A, 30 μ L do Reagente B e 10 μ L do Reagente C. O tubo foi agitado e aquecido a 110 °C por 5 minutos. Cor azul indica a presença de grupamento amina livre e cor amarela ausência de grupamento amina livre. Aminoácidos com grupamento amina secundários, como prolina adquirem cor acastanhada em caso positivo.

5.2.11. Ciclização da Liquenisina Utilizando Macrolactonização de Yamaguchi

Aproximadamente 10 mg de liquenisina aberta (10,4 µmol) foram reagidos com 5 mg (1,2 eq. – 12 µmol) de cloreto de triclorobenzoíla em 500 µL de DMSO e 15 µL (1,2 eq. – 12 µmol) de trietilamina. Após 2 horas de reação, foram adicionados 25 mL de tolueno ao sistema, bem como 5 mL de uma solução 6 M de DMAP em tolueno, e deixou-se refluxar por 8 horas. Decorrido o tempo de reação, a mesma foi lavada com 20 mL de uma solução saturada de Na₂HCO₃ por três vezes, seca com Na₂SO₄ e evaporada sob pressão reduzida.

5.2.12. Ciclização da Liquenisina Utilizando DIC/HOBt e Steglich Modificada

Em 4 diferentes balões de fundo redondo, 10 mg (10,4 µmol) de liquenisina aberta foram diluídos em uma quantidade mínima de DMF. Após total dissolução, as 4 reações foram montados de acordo com o esquema a seguir:

Balão I – 5 µL de DIC, 5 de DMAP em 25 mL de THF;

Balão II – 5 μ L de DIC, 5 mg de DMAP em 25 mL de anisol; **Balão III –** 5 μ L de DIC, 5 mg de HOBt em 25 mL de THF; **Balão IV –** 5 μ L de DIC, 5 mg de HOBt em 25 mL de anisol.

Os quatro balões foram deixados agitando à temperatura ambiente por 120 horas, sendo que a cada 24 horas, se adicionavam mais 5 μ L de DIC e 5 mg de HOBt ou DMAP, totalizando 30 μ L de DIC (18,5 eq. – 0,192 mmol) e 30 mg de DMAP (24 eq. – 0,246 mmol) e HOBt (20 eq. – 0,212 mmol) ao final da reação. A cada 24 recolheram-se alíquotas de 500 μ L para monitoramento. Ao término da reação, evaporou-se o solvente com o auxílio de pressão reduzida e os produtos foram ressuspensos em H₂O/ACN 1:1.

5.2.13. Ciclização da Surfactina Utilizando Lipase de Diferentes Fontes

Adicionaram-se a 5 mg (4,8 μmol) de liquenisina aberta diluída em 200 μL de DMF, 5 mL de tolueno e 5 mg de lipase de *Pseudomonas cepacia, Pseudomonas fluorescens,* pâncreas de porco 1, pâncreas de porco 2, *Rhizopus niveus, Mucor miehei, Rhizous arrhizus, Candida cylindracea, Candida rugosa* e *Aspergillus sp.,* Lipozyme TLIM (*Thermomyces lanuginosus*), Lipozyme RMIM (*Rhizomucor miehei*) liofilizadas e *Candida antarctica* imobilizada, *Candida antarctica* livre. Deixou-se agitar por 36 horas a 35 °C e 250 rpm. Após o término da reação, a mesma foi filtrada e o sobrenadante analisado por ESI(-) - CLAE-QqQ.

5.2.14. Espectrometria de Massas por Infusão Direta

Procedeu-se a análise das diferentes alíquotas de reação por meio da infusão direta de soluções contendo 10 μ L da amostra filtrada em 1 mL de ACN:H₂O:ácido fórmico 80:19,9:0,1 (v/v/v) no espectrômetro de massas Waters, modelo Quattro Micro-API, em uma vazão de 100 μ L min⁻¹. A caracterização foi realizada com ionização por *electrospray* no modo negativo (ESI(-)-MS), com voltagens de capilar e cone de 4,5 kV e 30 V respectivamente, utilizando N₂ como gás de dessolvatação, a 400 °C, em uma vazão de 800 L h⁻¹ e no modo *full scan*,

com varredura do espectro entre 150 e 1200 unidades de massa. Os picos de razão massa/carga (m/z) de interesse foram fragmentados a uma energia de colisão de 30 eV, utilizando-se argônio a 120 L h⁻¹ como gás de colisão. Os dados foram analisados usando o software MassLynx versão 4.1.

5.2.15. Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas – Baixa Resolução

Para caracterização dos peptídeos foi realizada a cromatografia líquida de ultra eficiência utilizando um cromatógrafo Waters modelo TQD Quattro Micro API, contendo bomba binária. A separação foi realizada em uma coluna Acquity UHPLC BEH C18 com 1,7 μm (50 × 2,1 mm d.i.) da Waters (Waters Corporation, Milford, MA, USA). A fase móvel A consistia de água MilliQ e 0,1% de ácido fórmico (Sigma-Aldrich[®]) e a fase B consistia de ACN grau HPLC (Lichrosolv, Merck[®]) e ácido fórmico 0,1%. O fluxo foi ajustado para 0,3 mL.min⁻ ¹ com gradiente isocrático de 80% de B por 15 minutos.

A caracterização foi realizada em espectrômetro de massas Waters, modelo Quattro Micro-API com ionização por *eletrospray* no modo negativo (ESI(-)-MS) e positivo (ESI(+)-MS), utilizando experimento de varredura, e também SIR (do inglês, *selected ion recording*) com voltagens de capilar e cone de 4,5 kV e 30 V respectivamente, utilizando N₂ como gás de dessolvatação, a 400 °C, em uma vazão de 800 L h⁻¹ e no modo *full scan*, com varredura do espectro entre 900 e 1200 unidades de massa. Os picos de razão massa/carga (*m/z*) de interesse foram fragmentados a uma energia de colisão de 25 eV, utilizando-se argônio a 120 L h⁻¹ como gás de colisão. Os dados foram analisados usando o software MassLynx versão 4.1.

5.2.16. Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas – Alta Resolução

Para uma melhor identificação, foi empregada análise das amostras utilizando cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada em espectrometria de massas com alta resolução. Para tanto, realizaram-se leituras em modo varredura e modo SIR (do inglês, selected ion recording). A coluna cromatográfica empregada foi a Coluna: Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1 x 50mm, 1,8um) da Agilent (Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA) em um quadrupolo com detecção por tempo de vôo (Q-ToF) da marca Agilent, modelo 6545. As condições de análise otimizadas foram: volume de injeção: 5 μL; vazão da fase móvel: 0,30 mL min⁻¹; eluição isocrática (80% B): fase móvel A consistindo de H₂O 0,1% (v/v) ácido fórmico e B sendo ACN 0,1% (v/v) ácido fórmico. As análises foram realizadas com ionização por *eletrospray* no modo positivo (ESI(+)-MS), com voltagens de capilar e cone de 4,5 kV e 30 V, respectivamente, utilizando N2 como gás de dessolvatação, a 325 °C, em uma vazão de 11 L.min⁻¹ e varrendo-se (full scan) o espectro entre 900 e 1200 unidades de massa. Os picos de razão massa/carga (m/z) de interesse foram fragmentados a uma energia de colisão de 25 eV, utilizando-se argônio a 120 L h⁻¹ como gás de colisão.

5.2.17. Condições de Cultivo das Espécies de Bacillus

As espécies de *Bacillus sp.* foram cultivadas, primeiramente, em placas de Petri contendo ágar nutriente a 37 °C por 24 h. Após total crescimento, uma colônia foi selecionada e colocada em pré-inóculo de 5 mL de meio nutriente a 37 °C por 7 horas. Após decorrido o tempo de pré-inóculo, as mesmas foram transferidas para um *Erlenmeyer* de 2000 mL, contendo 1000 mL de meio mínimo de Cooper, que consistia de:

- 20 g.L⁻¹ de glicose anidra;
- 4 g.L⁻¹ de NH4NO3;
- 30 mM de KH₂PO₄;
- 40 mM de Na₂HPO₄;

- 0,3 mM de FeSO4.7H₂O;
- 0,2 mM de MnSO₄.H₂O;
- 0,8 mM de MgSO₄.7H₂O;
- 7 μM de CaCl₂;
- 4 μM de Na₂-EDTA.

Tendo sido o pH ajustado para 7,0 e o cultivo mantido a 240 rpm e 37 °C por 48 horas.

5.2.18. Extração dos Peptídeos Naturais dos Cultivos de Bacillus

Decorridas as 48 horas do cultivo, o pH do meio foi ajustado para 8,0 utilizando NaOH 10M, garantindo-se assim a completa dissolução dos peptídeos em água. O cultivo todo foi centrifugado a 8000 rpm por 15 min e 4 ºC para sedimentação das células. Após a centrifugação, separou-se o sobrenadante, o qual teve seu pH novamente ajustado para 2,0 para precipitação dos peptídeos. O mesmo foi deixado em geladeira a 4 ºC *overnight*. Após completa precipitação, centrifugou-se novamente a amostra a 8000 rpm por 15 minutos e 4 ºC e o precipitado foi ressuspendido em metanol. Essa solução foi novamente centrifugada nas mesmas condições supracitadas e o sobrenadante metanólico foi rotaevaporado. Após a evaporação do solvente, adicionou-se água destilada pH 8,0 e liofilizou-se.



Considerações Finais



6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A comunicação bacteriana ocorre de diversas formas, permitindo que espécies de bactérias se multipliquem e cumpram o dever a que foram designadas. Entender essa comunicação permite ao ser humano se prevenir de sérias doenças e contaminações a que pode estar exposto. Pensando nisso, o isolamento e a caracterização das moléculas utilizadas pelo quorum sensing das bactérias C. sakazakii e B. cereus permitiu que se observasse a interação que ambas possuem e o convívio pacífico a que estão submetidas, explicando o compartilhamento do nicho em que estão inseridas. Também agui, a síntese de peptídeos em fase sólida se mostrou uma eficiente técnica mesmo para a síntese de produtos de baixa massa molecular, como os dipeptídeos cíclicos, permitindo que diastereoisômeros com elevado grau de pureza fossem sintetizados, tornando a elucidação da configuração absoluta das ciclo(Pro-Leu) naturais possível. Também é importante destacar a utilização do experimento de STD-RMN para observar a interação que as moléculas possuem com as células bacterianas, podendo ser uma potente técnica para a diferenciação enantiomérica existente em enzimas de células procariotas (Capítulo 1).

Não obstante disso, é igualmente interessante observar a biossíntese de lipodepsipeptídeos por bactérias do gênero *Bacillus*, uma vez que estas moléculas possuem versáteis aplicações e as mais variadas atividades biológicas demonstradas ao longo de suas investigações. A síntese de peptídeos em fase sólida permitiu que, não somente as moléculas similares às naturais, mas também seus isômeros com potencial atividade, fossem sintetizados e analisados, abrindo precedentes para caracterizações mais minuciosas e avaliação de outras atividades ainda não exploradas.

Este trabalho contribuiu, portanto, de forma eficaz com uma específica biblioteca de informações acerca de peptídeos não-ribossomais, em termos espectrométricos, espectroscópicos e de inovação quanto a reações para etapas complexas de ciclização e obtenção de macrociclos peptídicos e lipopeptídicos.



Referências



7. REFERÊNCIAS

- 1. Jensen, K. J., Shelton, P. T. & Pedersen, S. L. *Peptide synthesis and applications. Methods in Molecular Biology* **1047**, (Humana Press, 2013).
- 2. David L. Nelson & Cox, M. M. *Principles of Biochemistry*. (W. H. Freeman and Company, 2005).
- Sewald, N. & Jakubke, H.-D. *Peptides: Chemistry and Biology*. (Wiley-VCH, 2009). doi:10.1002/9783527626038
- Sieber, S. A. & Marahiel, M. A. Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: Approaches to new antibiotics. *Chem. Rev.* 105, 715–738 (2005).
- 5. Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products*. (Wiley, 2009).
- Sieber, S. a & Marahiel, M. a. Molecular Mechanisms Underlying Nonribosomal Peptide Synthesis: Approaches to New Antibiotics. *Chem. Rev.* 105, 715–738 (2005).
- Roderich, D. S. & Mainz, A. Nonribosomal Peptide Synthesis Principles and Prospects Angewandte. 3770–3821 (2017). doi:10.1002/anie.201609079
- Kent, S. B. H. Total chemical synthesis of proteins. *Chem. Soc. Rev.* 38, 338–351 (2009).
- 9. Yoshimura, T., Nishikawa, T. & Homma, H. D Amino Acids.
- Hur, G. H., Vickery, C. R. & Burkart, M. D. Explorations of catalytic domains in non-ribosomal peptide synthetase. 1074–1098 (2012). doi:10.1039/c2np20025b
- Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of. J. Am. Chem. Soc. 85, 2149 (1963).

- Amblard, M., Fehrentz, J.-A., Martinez, J. & Subra, G. Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis. *Mol. Biotechnol.* 33, 239–254 (2006).
- Marquardt, M. & Eifler-Lima, V. L. A síntese orgânica em fase sólida e seus suportes poliméricos mais empregados. *Quim. Nova* 24, 846–855 (2001).
- Moss, J. Guide for Resin and Linker Selection in Solid-Phase Peptide Synthesis. in *Current Protocols in Protein Science* 18, 1–19 (2005).
- Coin, I., Beyermann, M. & Bienert, M. Solid-phase peptide synthesis : from standard procedures to the synthesis of difficult sequences. *Nat. Protoc.* 2, 3247–3256 (2007).
- Behrendt, R., White, P. & Offer, J. Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. *J. Pept. Sci.* 22, 4–27 (2016).
- Chan, W. C. & White, P. D. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis A* Practical Approach. (Oxford University Press, 2000).
- Pattabiraman, V. R. & Bode, J. W. Rethinking amide bond synthesis. *Nature* 480, 471–479 (2011).
- El-faham, A. & Albericio, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chem. Rev.* 111, 6557–6602 (2011).
- El-faham, A. & Albericio, F. COMU : A third generation of uronium-type. *J. Pept. Sci.* 16, 6–9 (2010).
- Albericio, F., Isidro-Ilobet, A. & Mercedes, A. Amino Acid-Protecting Groups. *Chem. Rev.* 2455–2504 (2009).
- 22. Al-warhi, T. I. Recent development in peptide coupling reagents. *J. Saudi Chem. Soc.* **16**, 97–116 (2012).
- Collins, J. M., Porter, K. A., Singh, S. K. & Vanier, G. S. High-E ffi ciency Solid Phase Peptide Synthesis (HE -SPPS). *Org. Lett.* 16, 940–943

(2014).

- Rajput, A., Kaur, K. & Kumar, M. SigMol : repertoire of quorum sensing signaling molecules in prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* 44, 634–639 (2016).
- 25. Miller, M. B. & Bassler, B. L. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 165–199 (2001).
- Papenfort, K. & Bassler, B. L. Quorum sensing signal response systems in Gram-negative bacteria. *Nat. Publ. Gr.* 14, 576–588 (2016).
- Lasarre, B. & Federle, M. J. Exploiting Quorum Sensing To Confuse Bacterial Pathogens. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77, 73–111 (2013).
- Papenfort, K. & Bassler, B. L. Quorum sensing signal response systems in Gram-negative bacteria. *Nat. Publ. Gr.* 14, 576–588 (2016).
- 29. Ng, W. & Bassler, B. L. Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 197–222 (2009).
- Sola, M. C.; Oliveira, A. P.; Feistel, J. C.; Rezende, C. S. M. Mecanismos de quorum sensing e sua relevância na microbiologia de alimentos. *Enciclopédia Biosf.* 8, 1419–1441 (2012).
- Dickschat, J. S. Quorum sensing and bacterial biofilms. *Nat. Prod. Rep.* 27, 343–369 (2010).
- de Carvalho, M. P. & Abraham, W. R. Antimicrobial and biofilm inhibiting diketopiperazines. *Curr. Med. Chem.* **19**, 3564–3577 (2012).
- Monnet, V., Juillard, V., Gardan, R., Juillard, V. & Gardan, R. Peptide conversations in Gram-positive bacteria Peptide. *Crit. Rev. Microbiol.* 42, 339–351 (2016).
- Rocha-estrada, J. & Aceves-diez, A. E. The RNPP family of quorumsensing proteins in Gram-positive bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 913–923 (2010).

- 35. Kova, T., Kuipers, O. P. & Abee, T. Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* **22**, 172–179 (2011).
- Gu, B., He, S., Yan, X. & Zhang, L. Tentative biosynthetic pathways of some microbial diketopiperazines. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 8439– 8453 (2013).
- Holden, M. T. *et al.* Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from Pseudomonas aeruginosa and other gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* 33, 1254–66 (1999).
- Degrassi, G. *et al.* Plant Growth-Promoting Pseudomonas putida WCS358 Produces and Secretes Four Cyclic Dipeptides : Cross-Talk with Quorum Sensing Bacterial Sensors. *Curr. Microbiol.* 45, 250–254 (2002).
- Wang, J., Quan, C. & Qi, X. Determination of diketopiperazines of Burkholderia cepacia CF-66 by gas chromatography – mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **396**, 1773–1779 (2010).
- Brack, C., Mikolasch, A. & Schauer, F. 2,5-Diketopiperazines Produced by Bacillus pumilus During Bacteriolysis of Arthrobacter citreus. *Mar. Biotechnol.* 16, 385–395 (2014).
- Rutherford, S. T. & Bassler, B. L. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, 1–26 (2012).
- Bottone, E. J. Bacillus cereus, a Volatile Human Pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 382–398 (2010).
- Slamti, L. & Lereclus, D. Specificity and polymorphism of the PlcR-PapR quorum-sensing system in the Bacillus cereus group. *J. Bacteriol.* 187, 1182–7 (2005).
- 44. Yan, Q., Power, K. A., Tall, B. D. & Fanning, S. Cronobacter spp. (formerly Enterobacter sakazakii). in *Guide to Foodborne Pathogenics* 241–256 (2013).

- Lehner, A.; Riedel, K.; Eberl, L.; Breeuwer, P.; Diep, B.; Stephan, R. Biofilm Formation, Extracellular Polysaccharide Production, and Cell-to-Cell Signaling in Various Enterobacter sakazakii Strains: Aspects Promoting Environmental Persistence. *J. Food Prot.* **11**, 2287–2294 (2005).
- Araújo, F. D. D. S., Esper, L. M. R., Kuaye, A. Y., Sircili, M. P. & Marsaioli, A. J. N-acyl-homoserine lactones from Enterobacter sakazakii (Cronobacter spp.) and their degradation by Bacillus cereus enzymes. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 585–92 (2012).
- He, R. *et al.* Cyclodipeptides from metagenomic library of a Japanese marine sponge. *J. Braz. Chem. Soc.* 24, 1926–1932 (2013).
- 48. Ren, S. *et al.* Two novel alkaloids from the South China Sea marine sponge Dysidea sp . *J. Antibiot. (Tokyo).* **63**, 699–701 (2010).
- 49. Kumar, S. N., Mohandas, C., Siji, J. V., Rajasekharan, K. N. & Nambisan,
 B. Identification of antimicrobial compound, diketopiperazines, from a Bacillus sp. N strain associated with a rhabditid entomopathogenic nematode against major plant pathogenic fungi. *J. Appl. Microbiol.* **113**, 914–924 (2012).
- Yan, P., Song, Y., Sakuno, E. & Nakajima, H. Cyclo (I-LeucyI-I-ProlyI) Produced by Achromobacter xylosoxidans Inhibits Aflatoxin Production by Aspergillus parasiticus Cyclo (L -LeucyI-L -ProlyI) Produced by Achromobacter xylosoxidans Inhibits Aflatoxin Production by Aspergillus parasiticus. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 7466–7473 (2004).
- Stierle, D. B. & Faulkner, D. J. Antimicrobial N-methylpyridinium salts related to the xestamines from the Caribbean sponge Calyx podatypa. *J. Nat. Prod.* 54, 1134–6 (1991).
- Johnson, J. L., Jackson, W. G. & Eble, T. E. Isolation of L-Leucyl-L-Proline anhydride from microbiological fermentations. *J. Am. Chem. Soc* 73, 2947–2948 (1951).

- Pedras, M. S. C., Yu, Y., Liu, J. & Tandron-Moya, Y. A. Metabolites produced by the phytopathogenic fungus Rhizoctonia solani: Isolation, chemical structure determination, syntheses and bioactivity. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 60, 5–10 (2005).
- 54. Siemion, I. Z. Nmr-untersuchungen bei prolin- enthaltenden diketopiperazinen. *Org. Magn. Reson.* **3**, 545–550 (1971).
- Dong, Y. *et al.* Activation of dormant secondary metabolite production by introducing neomycin resistance into the deep-sea fungus, Aspergillus versicolor ZBY-3. *Mar. Drugs* 12, 4326–4352 (2014).
- Loffet, A. Peptides. in *Peptides 1976. Proceedings of the fourteenth European Peptide Symposium* 641–646 (Ed de l'Université de Bruxelles, 1976).
- Bofinger, M. R., Sousa, L. S. De, Fontes, J. E. N. & Marsaioli, A. J. Diketopiperazines as Cross-Communication Quorum - Sensing Signals between Cronobacter sakazakii and Bacillus cereus. ACS Omega 2, 1003–1008 (2017).
- Fischer, E. & Reif, G. Derivate des Prolins. *Lieb. Ann. Chem.* 363, 118 (1908).
- Kumar, S. N., Mohandas, C. & Nambisan, B. Purification of an antifungal compound, cyclo(I-Pro-d-Leu) for cereals produced by Bacillus cereus subsp. thuringiensis associated with entomopathogenic nematode. *Microbiol. Res.* 168, 278–88 (2013).
- 60. Huang, R. M. *et al.* A new 1,4-diazepine from South China sea marine sponge Callyspongia species. *Molecules* **15**, 871–877 (2010).
- Gao, Y., Yu, L., Peng, C., Li, Z. & Guo, Y. Diketopiperazines from two strains of South China Sea sponge-associated microorganisms. *Biochem. Syst. Ecol.* 38, 931–934 (2010).
- 62. Wegerski, C. J., France, D., Cornell-Kennon, S. & Crews, P. Using a

kinase screen to investigate the constituents of the sponge Stelletta clavosa obtained from diverse habitats. *Bioorganic Med. Chem.* **12**, 5631–5637 (2004).

- Mangamuri, U. K. *et al.* Chemical characterization & bioactivity of diketopiperazine derivatives from the mangrove derived Pseudonocardia endophytica. *Egypt. J. Aquat. Res.* 42, 169–175 (2016).
- Borthwick, A. 2, 5-Diketopiperazines: synthesis, reactions, medicinal chemistry, and bioactive natural products. *Chem. Rev.* 112, 3641–3716 (2012).
- Sun, X., Rai, R., Mackerell, A. D., Faden, A. I. & Xue, F. Facile one-step synthesis of 2,5-diketopiperazines. *Tetrahedron Lett.* 55, 1905–1908 (2014).
- Dinsmore, C. J. & Beshore, D. C. Recent advances in the synthesis of diketopiperazines. *Tetrahedron* 58, 3297–3312 (2002).
- Pettersson, M. *et al.* Design, synthesis and evaluation of 2,5diketopiperazines as inhibitors of the MDM2-p53 interaction. *PLoS One* **10**, 1–19 (2015).
- Lambert, J. N., Mitchell, J. P. & Roberts, K. D. The synthesis of cyclic peptides. *J. Chem. Soc. Perkin* 1 471–484 (2001). doi:10.1039/b001942i
- Ishizu, T., Tsutsumi, H., Yokoyama, E., Kawamoto, H. & Yokota, R. Conformational Change and Epimerization of Diketopiperazines Containing Proline Residue in Water. *Chem. Pharm. Bull. Pharm. Bull.* 65, 598–602 (2017).
- Eguchi, C.; Kakuta, A. Studies on cyclic dipeptides. I. Thermodynamics of the cis-trans isomerization of the side chains in cyclic dipeptides. *J. Am. Chem. Soc* 96, 3985 (1974).
- 71. Jenke, D. & Liu, N. Chromatographic considerations in the standardization of liquid chromatographic methods used for extractables

screening. J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 6076, 1–7 (2016).

- Viegas, A., Manso, J., Nobrega, F. L. & Cabrita, E. J. Saturation-transfer difference (STD) NMR: A simple and fast method for ligand screening and characterization of protein binding. *J. Chem. Educ.* 88, 990–994 (2011).
- Mayer, M. & Meyer, B. Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 38, 1784–1788 (1999).
- Efimov, S. V. *et al.* Detailed NOESY/T-ROESY analysis as an effective method for eliminating spin diffusion from 2D NOE spectra of small flexible molecules. *J. Mol. Struct.* **1104**, 63–69 (2016).
- Sedaghat Doost, A., Akbari, M., Stevens, C. V., Setiowati, A. D. & Van der Meeren, P. A review on nuclear overhauser enhancement (NOE) and rotating-frame overhauser effect (ROE) NMR techniques in food science: Basic principles and applications. *Trends Food Sci. Technol.* 86, 16–24 (2019).
- Venkitakrishnan, R. P., Benard, O., Max, M., Markley, J. L. & Assadiporter, F. M. Membrane Protein Structure and Dynamics. **914**, 47–63 (2012).
- Milagre, C. D. F., Cabeça, L. F., Martins, L. G. & Marsaioli, A. J. STD NMR spectroscopy: A case study of fosfomycin binding interactions in living bacterial cells. *J. Braz. Chem. Soc.* 22, 286–291 (2011).
- Benie, A. J., Moser, R., Bäuml, E., Blaas, D. & Peters, T. Virus-ligand interactions: Identification and characterization of ligand binding by NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 14–15 (2003).
- 79. Claasen, B., Axmann, M., Meinecke, R. & Meyer, B. Direct observation of ligand binding to membrane proteins in living cells by a saturation transfer double difference (STDD) NMR spectroscopy method shows a significantly higher affinity of integrin αIIbβ 3 in native platelets than in

liposomes. J. Am. Chem. Soc. 127, 916–919 (2005).

- Mnif, I. & Ghribi, D. Review lipopeptides biosurfactants: Mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. *Biopolymers* 104, 129–147 (2015).
- Ashis K. Mukherjee; Kishore Das. Microbial Surfactants and Their Potential Applications: An Overview. in *Molecular Biology* 54–64 (2010). doi:https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5979-9
- Saha, P. & Rao, K. V. B. Biosurfactants- A Current Perspective on Production and Applications Key Words : *Nat. Environ. Pollut. Technol.* 16, 181–188 (2017).
- Raaijmakers, J. M., Bruijn, I. De, Nybroe, O. & Ongena, M. Natural functions of lipopeptides from Bacillus and Pseudomonas : more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 1037–1062 (2010).
- Sarwar, A. *et al.* Qualitative analysis of biosurfactants from Bacillus species exhibiting antifungal activity. *PLoS One* **13**, 1–15 (2018).
- Hamley, I. W. Lipopeptides: from self-assembly to bioactivity. *Chem. Commun.* 51, 8574–8583 (2015).
- Ongena, M. & Jacques, P. Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16, 115–125 (2008).
- Rønning, H. T., Madslien, E. H. & Asp, T. N. Food Additives & Contaminants : Part A Identification and quantification of lichenysin – a possible source of food poisoning. *Food Addit. Contam. Part A* 32, 2120–2130 (2015).
- Nerurkar, A. S. Structural and Molecular Characteristics of Lichenysin and Its Relationship with Surface Activity. (2010).
- Madslien, E. H. *et al.* Lichenysin is produced by most Bacillus licheniformis strains. *J. Appl. Microbiol.* n/a-n/a (2013).

doi:10.1111/jam.12299

- Coronel-León, J., Marqués, A. M., Bastida, J. & Manresa, A. Optimizing the production of the biosurfactant lichenysin and its application in biofilm control. *J. Appl. Microbiol.* n/a-n/a (2015). doi:10.1111/jam.12992
- Grangemard, I., Bernillon, J., Peypoux, F., Bonmatin, J.-M. & Das, B. C. Lichenysins G, a novel family of lipopeptide biosurfactants from Bacillus licheniformis IM 1307: Production, isolation and structural evaluation by NMR and mass spectrometry. *J. Antibiot. (Tokyo).* **52**, 363–373 (1999).
- Qiu, Y., Xiao, F., Wei, X., Wen, Z. & Chen, S. Improvement of lichenysin production in Bacillus licheniformis by replacement of native promoter of lichenysin biosynthesis operon and medium optimization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 8895–8903 (2014).
- Domingos, D. F. *et al.* Genomic and chemical insights into biosurfactant production by the mangrove-derived strain Bacillus safensis CCMA-560. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 3155–3167 (2015).
- Gordillo, M. A. & Maldonado, M. C. Purification of Peptides from Bacillus Strains with Biological Activity. in *Chromatography and Its Applications* (ed. Dhanarasu, S.) 201–224 (Intech, 2009).
- Coronel, J. R. *et al.* Kinetic and Structural Aspects of the Permeabilization of Biological and Model Membranes by Lichenysin. *Langmuir* **32**, 78–87 (2016).
- Marfey, P. Determination of D-amino acids. II. Use of a bifunctional reagent, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene. *Carlsberg Res. Commun.* 49, 591–596 (1984).
- Sailer, M., Dubicki, K. I. & Sorensen, J. L. The synthesis of mediumchain-length β-hydroxy esters via the reformatsky reaction. *Synth.* 47, 79– 82 (2015).
- 98. Chênevert, R., Pelchat, N. & Morin, P. Lipase-mediated enantioselective
acylation of alcohols with functionalized vinyl esters: acyl donor tolerance and applications. *Tetrahedron Asymmetry* **20**, 1191–1196 (2009).

- Karamé, I. *et al.* Highly enantioselective hydrogenation of β-alkyl and β-(ω-chloroalkyl) substituted β-keto esters. *Synth. Commun.* 37, 1067–1076 (2007).
- Muriel Amblard, Jean-Alain Fehrentz, Jean Martinez, G. S. Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis. *Mol. Biotechnol.* 33, (2006).
- Palomo, J. M. Solid-phase peptide synthesis: An overview focused on the preparation of biologically relevant peptides. *RSC Adv.* 4, 32658–32672 (2014).
- Cao, S., Yang, Y., Ng, N. L. J. & Guo, Z. Macrolactonization catalyzed by the terminal thioesterase domain of the nonribosomal peptide synthetase responsible for lichenysin biosynthesis. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 15, 2595–2599 (2005).
- Bruner, S. D.; Weber, T.; Kohli, R. M.; Schwarzer, D.; Marahiel, M. A.; Walsh, C. T.; Stubbs, M. Structural Basis for the Cyclization of the Lipopetide Antibiotic Surfactin by the Thioesterase Domain SrfTE. *Structure* **10**, 301–310 (2002).
- Martí-Centelles, V., Pandey, M. D., Burguete, M. I. & Luis, S. V. Macrocyclization reactions: The importance of conformational, configurational, and template-induced preorganization. *Chem. Rev.* 115, 8736–8834 (2015).
- Bédard, A. C., Régnier, S. & Collins, S. K. Continuous flow macrocyclization at high concentrations: Synthesis of macrocyclic lipids. *Green Chem.* 15, 1962–1966 (2013).
- 106. Cochrane, J. R., McErlean, C. S. P. & Jolliffe, K. A. Total synthesis and assignment of the side chain stereochemistry of LI-F04a: An antimicrobial

cyclic depsipeptide. Org. Lett. 12, 3394-3397 (2010).

- 107. Narayanaswamy, V. K. *et al.* Total synthesis of a depsidomycin analogue by convergent solid-phase peptide synthesis and macrolactonization strategy for antitubercular activity. *J. Pept. Sci.* **17**, 683–689 (2011).
- Wang, X. *et al.* Studies toward the total synthesis of itralamide B and biological evaluation of its structural analogs. *Mar. Drugs* 13, 2085–2104 (2015).
- König, W. & Geiger, R. Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxy-benzotriazolen. *Chem. Ber.* **103**, 788–798 (1970).
- Tsakos, M., Schaffert, E. S., Clement, L. L., Villadsen, N. L. & Poulsen, T.
 B. Ester coupling reactions-an enduring challenge in the chemical synthesis of bioactive natural products. *Nat. Prod. Rep.* 32, 605–632 (2015).
- Ohyama, M., Iinuma, K., Isogai, A. & Suzuki, A. Total Synthesis of the Anthelmintic Cyclodepsipeptide, PF1022A. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58, 1193–1194 (1994).
- Morales-Serna, J. A. *et al.* Highly efficient macrolactonization of ωhydroxy acids using benzotriazole esters: Synthesis of Sansalvamide A. *Org. Biomol. Chem.* 8, 4940–4948 (2010).
- 113. Alder, C. M. *et al.* Updating and further expanding GSK's solvent sustainability guide. *Green Chem.* **18**, 3879–3890 (2016).
- Neises, B.; Steglich, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. Angew. Chemie Int. Ed. English 17, 522–524 (1978).
- Stawikowski, M. & Cudic, P. A novel strategy for the solid-phase synthesis of cyclic lipodepsipeptides. *Tetrahedron Lett.* 47, 8587–8590 (2006).

- Seo, H. & Lim, D. Total synthesis of halicylindramide A. *J. Org. Chem.* 74, 906–909 (2009).
- 117. Kuisle, O., Quiñoá, E. & Riguera, R. A general methodology for automated solid-phase synthesis of depsides and depsipeptides.
 Preparation of a valinomycin analogue. *J. Org. Chem.* 64, 8063–8075 (1999).
- Lopez-Macia, A., Jimenez, J. C., Royo, M., Giralt, E. & Albericio, F. Kahalalide B. synthesis of a natural cyclodepsipeptide. *Tetrahedron Lett.* 41, 9765–9769 (2000).
- Pelay-Gimeno, M. *et al.* The first total synthesis of the cyclodepsipeptide pipecolidepsin A. *Nat. Commun.* 4, 1–10 (2013).
- Wysocki, V. H., Resing, K. A., Zhang, Q. & Cheng, G. Mass spectrometry of peptides and proteins. *Methods* 35, 211–222 (2005).
- Palzs, B. & Suhal, S. Fragmentation pathways of protonated peptides. Mass Spectrom. Rev. 24, 508–548 (2005).
- Yakimov, M. M., Abraham, W. R., Meyer, H., Laura Giuliano & Golyshin, P. N. Structural characterization of lichenysin A components by fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1438, 273–280 (1999).
- Akaji, K., Kuriyama, N. & Kiso, Y. Efficient coupling of α,α-dimethyl amino acid using a new chloro imidazolidium reagent, CIP. *Tetrahedron Lett.* 35, 3315–3318 (1994).
- Akaji, K., Tamai, Y. & Yoshiaki, I. Efficient Synthesis of Peptaihol Coupling using a Chloroimidazolidium CIP. *Tetrahedron* 53, 567–584 (1997).
- 125. Akaji, K. & Aimoto, S. Synthesis of MEN11420, a glycosylated bicyclic peptide, by intramolecular double cyclization using a chloroimidazolinium coupling reagent. *Tetrahedron* 57, 1749–1755 (2001).

- 126. Singh, R. S., Singh, T. & Pandey, A. *Microbial Enzymes—An Overview*. *Advances in Enzyme Technology* (Elsevier B.V., 2019). doi:10.1016/b978-0-444-64114-4.00001-7
- Antczak, U., Góra, J., Antczak, T. & Galas, E. Enzymatic lactonization of 15-hydroxypentadecanoic and 16-hydroxyhexadecanoic acids to macrocyclic lactones. *Enzyme Microb. Technol.* **13**, 589–593 (1991).
- Ihara, F., Kageyama, Y., Hirata, M., Nihira, T. & Yamada, Y. Purification, characterization, and molecular cloning of lactonizing lipase from Pseudomonas species. *J. Biol. Chem.* 266, 18135–18140 (1991).
- Gargouri, M., Drouet, P. & Legoy, M. D. Synthesis of a novel macrolactone by lipase-catalyzed intra-esterification of hydroxy-fatty acid in organic media. *J. Biotechnol.* 92, 259–266 (2002).
- Fortunati, T., D'Acunto, M., Caruso, T. & Spinella, A. Chemoenzymatic preparation of musky macrolactones. *Tetrahedron* 71, 2357–2362 (2015).



ANEXOS

Anexo 1. Autorização da Comissão de Biossegurança para manipulação de microrganismos.

COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE QUÍMICA Cx. Postal 6154 - Campinas - 13083-970 SP - BRASIL UNICAME http://www.igm.unicamp.br Solicitação/Protocolo: AJMa2015-2 Nome do (a) aluno (a): Matheus Rodrigues Bofinger. Nivel: Pós - doutorado. Periodo: Fevereiro/2015 a fevereiro/2019. Nome do (a) orientador (a): Anita Jocelyne Marsaloli. Titulo: "Produção e identificação da estrutura absoluta de lipopolipeptídeos de microrganismos oriundos do petróleo" Resumo: Os biosurfactantes são divididos por classes, de acordo com o modelo genérico da estrutura, as principais são as surfactinicas, as iturinicas e as fengicinicas. A identificação estrutural é facilmente realizada utilizando técnicas de espectroscopia e espectrometría de massas acoplada a cromatógrafos, porém não se chega à quiralidade da molécula utilizandose dessas técnicas. Para tanto, algumas técnicas destrutivas são utilizadas, incluindo hidrólises, digestões e tratamento com Daminoácido oxidase para identificação de enantiômeros D. Esse trabalho visa à identificação da estrutura absoluta de lipopolipeptideos utilizandose da produção do padrão das mesmas em fase sólida e a comparação de biosurfactantes oriundos de microorganismos com esses padrões utilizando de técnicas espectroscópicas, espectrométricas e de cromatografia. Para tanto serão utilizados dois microorganismos oriundos de poços de petróleo, sendo eles Bacillus subtilis e Bacillus pumillus, ambos de fator de risco 1. Os microorganismos serão cultivados em Agar nutriente (NA) e ágar marinho (AM) de biossurfactantes. Após a produção de biossurfactantes este serão analisados estruturalmente e comparados com padrões sintetizados em laboratório dando ênfase aos centros assimétricos. Após o término as culturas serão autoclavadas (120°C, 1 atm por 15 min.). O projeto de pesquisa acima descrito, a ser conduzido pelo (a) aluno (a) Matheus Rodrigues Bofinger de pós - doutorado recebeu autorização desta Comissão Interna de Biossegurança. Presidente ém gixercicio da CIBio-IQ: Carlos H. I. Rannos cibio@igm.unicamp.br Fone: 55-19-3521-3001



Anexo 2. Cromatograma do extrato bruto do meio LB (branco).



Anexo 3. Cromatograma da ciclo(Pro-Leu) de Bacillus cereus após purificação.



Anexo 4. Espectro de massas (EI, 70 eV) da ciclo(Pro-Leu) de Bacillus cereus.







Anexo 6. Espectro de RMN de ¹³C (100,63 MHz, CD₃OD) da ciclo(Pro-Leu) de *Bacillus cereus*



Anexo 7. Mapa de contorno de RMN 2D de correlações ¹H,¹H COSY (400,18 MHz, CD₃OD) ciclo(Pro-Leu) de *Bacillus cereus*



Anexo 8. Mapa de contorno de RMN 2D de correlações ¹H (400,18 MHz) e ¹³C (100,63 MHz) ^{3,4}J HMBC da ciclo(Pro-Leu) de *Bacillus cereus.*



Anexo 9. Mapa de contorno de RMN 2D de correlações ¹H (400,18 MHz) e ¹³C (100,63 MHz) ¹J HSQC da ciclo(Pro-Leu) de *Bacillus cereus.*

Abundar	nce				
1	80-				
1	60-				
	40-				
	20-				
Time>	0 4, , , , , , , , , , , , , , , , , , 	10.00	 20.00	25.00	30.0

Anexo 10. Cromatograma da ciclo(Pro-Leu) de *Cronobacter sakazakii* após purificação.



Anexo 11. Espectro de massas (EI, 70 eV) da ciclo(Pro-Leu) de *Cronobacter* sakazakii.



Anexo 12. Espectro de RMN de ¹H (400,18 MHz, CD₃OD) da ciclo(Pro-Leu) de *Cronobacter sakazakii.* Acima: espectro completo; Abaixo: Expansões.



Anexo 13. Espectro de RMN de ¹³C (100,63 MHz, CD₃OD) da ciclo(Pro-Leu) de *Cronobacter sakazakii.*



Anexo 14. Mapa de contorno de RMN 2D de correlações ¹H,¹H COSY (400,18 MHz, CD₃OD) ciclo(Pro-Leu) de *Cronobacter sakazakii.*



Anexo 15. Mapa de contorno de RMN 2D de correlações ¹H (400,18 MHz) e ¹³C (100,63 MHz) ^{3,4}J HMBC da ciclo(Pro-Leu) de *Cronobacter sakazakii.*



Anexo 16. Mapa de contorno de RMN 2D de correlações ¹H (400,18 MHz) e ¹³C (100,63 MHz) ¹J HSQC da ciclo(Pro-Leu) de *Cronobacter sakazakii.*

Abundan	4	
8		
6		
4		
2		
Time>	4.00 6.00 8.00 10.00 12.00 14.00 16.00	18.00 20.00 22.00

Anexo 17. Cromatograma da ciclo(Pro-Leu) do co-cultivo após purificação.



Anexo 18. Espectro de massas (EI, 70 eV) da ciclo(Pro-Leu) do co-cultivo.



Anexo 19. Espectro de RMN de ¹H (400,18 MHz, CD₃OD) da ciclo(Pro-Leu) do co-cultivo. Acima: espectro completo; Abaixo: Expansões.



Anexo 20. Espectro de RMN de ¹³C (100,63 MHz, CD₃OD) da ciclo(Pro-Leu) do co-cultivo.



Anexo 21. Mapa de contorno de RMN 2D de correlações ¹H,¹H COSY (400,18 MHz, CD₃OD) ciclo(Pro-Leu) do co-cultivo.



Anexo 22. Mapa de contorno de RMN 2D de correlações ¹H (400,18 MHz) e ¹³C (100,63 MHz) 3,4J HMBC da ciclo(Pro-Leu) do co-cultivo.



Anexo 23. Mapa de contorno de RMN 2D de correlações ¹H (400,18 MHz) e ¹³C (100,63 MHz) ¹J HSQC da ciclo(Pro-Leu) do co-cultivo.

Abundanc	e									
80	4									
60	4									
40	4									
20							A			
Time>	4.00	6.00	8.00	10.00	12.00	14.00	16.00	18.00	20.00	22.00

Anexo 24. Cromatograma do padrão sintético de ciclo(L-Pro-L-Leu) após purificação.



Anexo 25. Espectro de massas (EI, 70 eV) do padrão sintético de ciclo(L-Pro-L-Leu).



Anexo 26. Espectro de RMN de ¹H (400,18 MHz, CD₃OD) do padrão sintético de ciclo(L-Pro-L-Leu). Acima: espectro completo; Abaixo: Expansões.



Anexo 27. Espectro de RMN de ¹³C (100,63 MHz, CD₃OD) do padrão sintético de ciclo(L-Pro-L-Leu).



Anexo 28. Mapa de contorno de RMN 2D de correlações ¹H,¹H COSY (400,18 MHz, CD₃OD) do padrão sintético de ciclo(L-Pro-L-Leu).



Anexo 29. Mapa de contorno de RMN 2D de correlações ¹H (400,18 MHz) e ¹³C (100,63 MHz) ^{3,4}J HMBC do padrão sintético de ciclo(L-Pro-L-Leu).



Anexo 30. Mapa de contorno de RMN 2D de correlações ¹H (400,18 MHz) e ¹³C (100,63 MHz) ¹J HSQC do padrão sintético de ciclo(L-Pro-L-Leu).



Anexo 31. Cromatograma do padrão sintético de ciclo(D-Pro-L-Leu) após purificação.



Anexo 32. Espectro de massas (EI, 70 eV) do padrão sintético de ciclo(D-Pro-L-Leu).



Anexo 33. Espectro de RMN de ¹H (400,18 MHz, CD₃OD) do padrão sintético de ciclo(D-Pro-L-Leu). Acima: espectro completo; Abaixo: Expansões.



Anexo 34. Espectro de RMN de ¹³C (100,63 MHz, CD₃OD) do padrão sintético de ciclo(D-Pro-L-Leu).



Anexo 35. Mapa de contorno de RMN 2D de correlações ¹H,¹H COSY (400,18 MHz, CD₃OD) do padrão sintético de ciclo(D-Pro-L-Leu).



Anexo 36. Mapa de contorno de RMN 2D de correlações ¹H (400,18 MHz) e ¹³C (100,63 MHz) ^{3,4}J HMBC do padrão sintético de ciclo(D-Pro-L-Leu).



Anexo 37. Mapa de contorno de RMN 2D de correlações ¹H (400,18 MHz) e ¹³C (100,63 MHz) ¹J HSQC do padrão sintético de ciclo(D-Pro-L-Leu).



Anexo 38. Cromatograma do padrão sintético de ciclo(L-Pro-D-Leu) após purificação.



Anexo 39. Espectro de massas (EI, 70 eV) do padrão sintético de ciclo(L-Pro-D-Leu).



Anexo 40. Espectro de RMN de ¹H (400,18 MHz, CD₃OD) do padrão sintético de ciclo(L-Pro-D-Leu). Acima: espectro completo; Abaixo: Expansões.



Anexo 41. Espectro de RMN de ¹³C (100,63 MHz, CD₃OD) do padrão sintético de ciclo(L-Pro-D-Leu).



Anexo 42. Mapa de contorno de RMN 2D de correlações ¹H,¹H COSY (400,18 MHz, CD₃OD) do padrão sintético de ciclo(L-Pro-D-Leu).



Anexo 43. Mapa de contorno de RMN 2D de correlações ¹H (400,18 MHz) e ¹³C (100,63 MHz) ^{3,4}J HMBC do padrão sintético de ciclo(L-Pro-D-Leu).



Anexo 44. Mapa de contorno de RMN 2D de correlações ¹H (400,18 MHz) e ¹³C (100,63 MHz) ¹J HSQC do padrão sintético de ciclo(L-Pro-D-Leu).



Anexo 45. Cromatograma do padrão sintético de ciclo(D-Pro-D-Leu) após purificação.



Anexo 46. Espectro de massas (EI, 70 eV) do padrão sintético de ciclo(D-Pro-D-Leu).



Anexo 47. Espectro de RMN de ¹H (400,18 MHz, CD₃OD) do padrão sintético de ciclo(D-Pro-D-Leu). Acima: espectro completo; Abaixo: Expansões.



Anexo 48. Espectro de RMN de ¹³C (100,63 MHz, CD₃OD) do padrão sintético de ciclo(D-Pro-D-Leu).



Anexo 49. Mapa de contorno de RMN 2D de correlações ¹H,¹H COSY (400,18 MHz, CD₃OD) do padrão sintético de ciclo(D-Pro-D-Leu).



Anexo 50. Mapa de contorno de RMN 2D de correlações ¹H (400,18 MHz) e ¹³C (100,63 MHz) ^{3,4}J HMBC do padrão sintético de ciclo(D-Pro-D-Leu).



Anexo 51. Mapa de contorno de RMN 2D de correlações ¹H (400,18 MHz) e ¹³C (100,63 MHz) ¹J HSQC do padrão sintético de ciclo(D-Pro-D-Leu).



Anexo 52. Cromatograma de CG-FID em coluna quiral Lipodex-E[®] dos quatro diastereoisômeros dos padrões sintéticos de ciclo(Pro-Leu).



Anexo 53. Cromatograma de CG-FID em coluna quiral Lipodex-E[®] da ciclo(Pro-Leu) de *Bacillus cereus.*



Anexo 54. Cromatograma de CG-FID em coluna quiral Lipodex-E[®] da ciclo(Pro-Leu) de *Cronobacter sakazakii.*



Anexo 55. Cromatograma de CG-FID em coluna quiral Lipodex-E[®] da ciclo(Pro-Leu) do co-cultivo.



Anexo 56. Cromatograma e espectro de massas (IE - 70 eV) do 3hidroxitetradecanoato de etila.






Anexo 60. Espectro de RMN de ¹H (400,18 MHz, CD₃OD) do ácido 3hidróxitetradecanóico.



Anexo 61. Espectro de RMN de ¹³C (100,63 MHz, CD₃OD) do ácido 3hidróxitetradecanóico.



acetóxitetradecanoato de etila.



acetóxitetradecanoato de etila.



Anexo 64. (a) Cromatograma de UPLC-Q-ToF e (b) experimento SIR da ciclização da Liquenisina-A linear por Steglich modificado em THF.



Anexo 65. (a) Cromatograma de UPLC-Q-ToF e (b) experimento SIR da ciclização da (R)-Liquenisina-A linear por Steglich modificado em THF.