
Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química
Departamento de Química Orgânica



Dissertação de Mestrado

**“TÉCNICAS DE RMN DE ^1H APLICADAS À
METABOLÔMICA DE *THEOBROMA CACAO* E ÀS
INTERAÇÕES PROTEÍNAS - LIGANTES”**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Campinas, como parte das exigências do programa de pós-graduação do Instituto de Química, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Lucas Gelain Martins

Orientadora: Profa. Dra. Anita J. Marsaioli

20 de fevereiro de 2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

M366t Martins, Lucas Gelain.
Técnicas de RMN de ^1H aplicadas à metabolômica
de *Theobroma cacao* e às interações proteínas -
ligantes / Lucas Gelain Martins. -- Campinas, SP:
[s.n], 2009.

Orientador: Anita Jocelyne Marsaioli.

Dissertação - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. *Theobroma cacao*. 2. Interações
supramoleculares. 3. RMN de ^1H . 4. Metabolômica.
I. Marsaioli, Anita Jocelyne. II. Universidade Estadual
de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: ^1H NMR techniques applied to *Theobroma cacao* metabolomics
and to protein - ligands interactions

Palavras-chaves em inglês: *Theobroma cacao*, Supramolecular interaction, ^1H
NMR, Metabolomics

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Orgânica

Banca examinadora: Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli (orientadora), Prof. Dr.
Cláudio Francisco Tormena (IQ-UNICAMP), Prof. Dr. Fabio Ceneviva Lacerda
Almeida (IBqM-UFRJ)

Data de defesa: 20/02/2009

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”

Antoine de Saint-Exupéry

Agradecimentos

A Deus, pelo direito de viver, pelas pessoas maravilhosas que colocou em minha vida e por todas as oportunidades;

Aos meus maravilhosos pais, Rose e Dirceu, que com muito esforço e dedicação me ajudaram a chegar até aqui;

À Prof. Dra. Anita J. Marsaioli, pela orientação, amizade inestimável e dedicação inigualável à pesquisa;

Aos colaboradores deste trabalho, Prof. Dra. Raquel M. Braga, Prof Dr. Horácio Pezoa-Garcia, Prof. Dr. Roberto Rittner, Dr. Cleverson C. Bocca, Dra Cíntia Milagre, Maria do Socorro S. Silva e Priscila Efraim por todo o trabalho realizado em colaboração;

Ao Prof. Fred Y. Fujiwara, por toda ajuda prestada junto ao equipamento INOVA500 e pela agradável companhia no laboratório de RMN;

Aos meus colegas de laboratório, Adriana, Armando, Cabeça, Carlinha, Diana, Luciana (FEA), Georgiana, Simone, Pedro, Giedre, Cíntia Milagre, Cíntia Harumi, Marcela e Célio, por todos os momentos vividos juntos;

Aos colegas atuais e antigos do laboratório de RMN, Soninha, Paula, Anderson, Tiago, Fábio, Prof. Dr. Cláudio, Prof. Dr. Alvicler e Prof. Dr. Fred, pela companhia sempre agradável e pela presteza com que fazem a manutenção do laboratório;

À Maíra, pelos bons momentos juntos, pelo amor, compreensão, apoio e incentivo sempre;

À minha irmã, Thays, pela amizade, apoio e acima de tudo por ser minha irmã;

À Dona Maria, pelo companheirismo no laboratório e pela eficiência com que nos ajuda quando precisamos;

Aos amigos Florângela, Maria Helena, Wilian, Hioka, Isis, Valéria e Silvia, pelo apoio em todos os momentos;

Aos amigos de Campinas Zeca e Lauren, Suzan e André, Rafa e Lisa, Lu, pessoal dos laboratórios de síntese, pessoal da graduação, que sempre tornaram a vida em Campinas mais fácil e divertida;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos durante todo o mestrado;

Aos funcionários do Instituto de Química, que direta ou indiretamente contribuiriam para a realização desse trabalho;

À UNICAMP e em especial Instituto de Química, por toda infraestrutura disponibilizada;

Muito Obrigado!

Curriculum Vitae

1. Dados pessoais

Nome: Lucas Gelain Martins **Nascimento:** 05/09/1984 - Taquarituba/SP - Brasil **Filiação:** Dirceu Martins e Rosemeire de Fátima Gelain Martins **RG:** 409933326 ssp/sp - SP - 20/09/2000 **CPF:** 30877220816 **Endereço:** Rua Luciano Venere Decourt, n 290 **Bairro:** Cidade Universitária – Distrito de Barão Geraldo **Cidade:** Campinas – SP **CEP:**13083-740 **Telefone:** 19 97660001 **E-mails:** lucasgelain@yahoo.com.br ou lucasmartins@iqm.unicamp.br.

2. Formação Acadêmica (Graduação e Pós-Graduação)

- 2.1. Graduação em Química (Bacharelado, 2003-2006). Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringa, Brasil. **Título da monografia:** Interações de Orbitais e seus Efeitos no Acoplamento $^3J_{HH}$ em halocicloexanos: Um Estudo Teórico e Experimental. **Orientador:** Prof. Dr. Ernani Abicht Basso **Instituição:** Universidade Estadual de Maringá – Maringá – PR. **Bolsista :** Programa de Educação Tutorial - SESu/MEC – Período: 01/05/2004 a 31/01/2007.
- 2.2. Mestrado em Química (2007-2009). Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil. **Título:** Estudo da matabolômica de *Theobroma cacao* e de interações supramoleculares por RMN de 1H . **Orientadora:** Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli. **Bolsista do(a):** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes. **Áreas do conhecimento :** Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

1. Resumo do trabalho científico apresentado em congresso

- 3.1. MARTINS, L. G., MARSAIOLI, A. J., SILVA, M. S. S., BRAGA, R. M. Interação Acetilcolinesterase e Alcalóides Monitorados Por RMN de 1H . X Jornada Brasileira de Ressonância Magnética Nuclear – 2008. Local: Universidade Federal Fluminense. Niterói – RJ.
- 3.2. MARSAIOLI, A. J., MILAGRE, C. D. F., CABECA, L. F., MARTINS, L. G. Drug-Protein-Liposome-Cyclodextrin Complexes: 1H NMR, Topology end Drug Delivery. EUOMAR – 2008. Local: St. Petersburg – Rússia.
- 3.3. MARTINS, L. G., MARSAIOLI, A. J., EFRAIM, P., PEZOA-GARCIA, N. H. Teores de Teobromina e Cafeína em Amostras de *Theobroma cacao*

- por RMN de ^1H . 31º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – 2008. Local: Águas de Lindóia – SP.
- 3.4. MARTINS, L. G., BASSO, Ernani Abicht, FIORIN, Barbara C. Cálculos de Densidade Eletrônica e Interações de Orbitais no Estudo Teórico do Equilíbrio Conformacional de Acetamidas. XV Encontro Anual de Iniciação Científica – EAIC – 2006. Local: Universidade Estadual de Ponta Grossa - Ponta Grossa – PR.
- 3.5. Oliveira, P.R., MARTINS, L. G., Caldato, M., BASSO, Ernani Abicht, Rittner, R. Diferença entre Ligação de Hidrogênio Intramolecular NH---O e OH---N no Equilíbrio Conformacional de alguns Cicloexanos 1,3 Dissubstituídos. 29º Reunião da Sociedade Brasileira de Química – 2006. Local: Águas de Lindóia - SP.
- 3.6. BASSO, E. A., MARTINS, L. G., FIORIN, B. C. Estudo do Equilíbrio Conformacional da N, N - Dimetilmetiltioacetamida através de Cálculos Teóricos e Espectroscopia na Região do Infravermelho. 57º Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência – 2005. Local: Fortaleza – Ce.
- 3.7. BASSO, E. A., FIORIN, B. C., PONTES, R. M., MARTINS, L. G. Estudo Teórico sobre o Efeito Estérico e a Delocalização Eletrônica no Equilíbrio Conformacional de alfa-Haloacetaldéidos. 28º Reunião da Sociedade Brasileira de Química – 2005. Local: Poços de Caldas – MG.
- 3.8. DIAS, Susiane A, ORTEGA, Ana Claudia, VEIBER, Renata E., MARTINS, L. G., WARTHA, Edson J, KIOURANIS, Neide M. M. Uma Abordagem Contextualizada no Ensino da Função Álcool. 28º Reunião da Sociedade Brasileira de Química – 2005. Local: Poços de Caldas – MG.

2. Artigo elabora e a ser submetido

Cíntia D. F. Milagre, Luís F. Cabeça, Lucas G. Martins and Anita J. Marsaioli
Fosfomycin Binding Events in Living Bacterial Cells observed by NMR Spectroscopy.

5- Artigo em elaboração

1. Artigo em elaboração

Lucas G. Martins, Priscila Efraim, Anita J. Marsaioli, Horácio Pezoa-Garcia.
Metabolomic of ten *Theobroma cacao* varieties studied during the fermentation process by ^1H NMR.

RESUMO

TÉCNICAS DE RMN DE ^1H APLICADO À METABOLÔMICA DE *THEOBROMA CACAO* E ÀS INTERAÇÕES PROTEÍNAS - LIGANTES.

Técnicas de RMN de ^1H foram aplicadas no estudo de metabolômica de *Theobroma cacao* e interações proteínas – ligantes. Esses dois tópicos são reportados em dois capítulos. O primeiro descreve a análise quantitativa por RMN de ^1H de 8 metabolitos de *Theobroma cacao* endógenos ou produzidos durante a fermentação de 10 diferentes variedades resistentes ao fungo *Moniliophthora perniciosa*. Os espectros foram obtidos de extratos aquosos saturando o sinal da água com pressaturação. Os metabólitos monitorados foram: glicose, sacarose, frutose, etanol, cafeínas e os ácidos acético, lático e succínico. O teor dos metabólitos presentes em 7 dessas variedades são similares àqueles de *T. cacao* comum e análise sensorial selecionou aquelas com maior teor de cafeína como as melhores. O segundo capítulo descreve as interações acetilcolinesterase/alcalóides de Amaryllidaceae e proteína de membrana bacteriana/fosfomicina, com os mapas de epitopo de interação dos ligantes com as macromoléculas determinados por RMN de ^1H – STD (Saturation Transfer Difference). O mapa de epitopo para acetilcolinesterase/fisostigmina foi confirmado por cálculos de “docking” molecular. A constante de dissociação aparente da fisostigmina com acetilcolinesterase foi obtida através das medidas de T_1 seletivo. Interação entre células integras de *Escherichia coli* CCT 5050, *Serratia liquefaciens* CCT 7262 e fosfomicina indicaram que microrganismo resistente ao antibiótico (*Serratia liquefaciens*) não apresentaram sinais no experimento de RMN de ^1H – STD enquanto que o microrganismo não resistente (*Escherichia coli*) apresenta sinais no mesmo experimento. Esses resultados certamente contribuirão para a elucidação do mecanismo de ação da fosfomicina.

ABSTRACT

¹H NMR TECHNIQUES APPLIED TO *THEOBROMA CACAO* METABOLOMICS AND TO PROTEIN-LIGANDS INTERACTIONS

¹H NMR techniques were applied to study *Theobroma cacao* metabolomics and protein-ligand supramolecular interactions. These two topics are reported in two chapters. First chapter describes the ¹H NMR quantitative analysis of 8 *Theobroma cacao* secondary metabolites which are endogenous or produced during the fermentation process of 10 different varieties resistant to the *Moniliophthora perniciosa* fungus. The spectra were obtained from the aqueous extracts saturating the water signal with the PRESAT technique. The monitored metabolites were: glucose, saccharose, fructose, ethanol, caffeine and the acids acetic, lactic and succinic. The abundance of the metabolites present in 7 of these varieties were similar to those in common *T. Cacao* and sensory analysis selected those with high caffeine content as the best. The second chapter describes the supramolecular interactions of acetylcholinesterase/Amaryllidaceae alkaloids and bacterial membrane protein /fosfomicine, with the epitope mapping of the interactions of the ligands to the macromolecules obtained by ¹H NMR STD (saturation transfer difference). The epitope mapping of acetylcholinesterase/Amaryllidaceae alkaloids was confirmed by molecular docking calculations. The apparent dissociation constant of the fisostigmine which is an acetylcholinesterase inhibitor was obtained by applying selective T_1 . Interactions of *Escherichia coli* CCT 5050, *Serratia liquefaciens* CCT 7262 whole cells and fosfomicin indicated that microorganisms resistant to this antibiotic (*Serratia liquefaciens*) did not show signal in the ¹H NMR STD experiment while non resistant microorganism (*Escherichia coli*) showed signals in the same experiment. This data will certainly contribute to the elucidation of fosfomicin action mechanism.

Índice

Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xvii
Lista de Tabelas.....	xix
Lista de Figuras	xx
Lista de Espectros.....	xxiv
Introdução Geral	1

Capítulo I

“Técnicas de RMN de ^1H Aplicadas à Metabolômica de *Theobroma cacao*”

1. Introdução.....	5
1.1. Theobroma cacao	5
1.2. Fermentação do cacau.....	6
1.3. Detecção de metabólitos	6
2. Objetivos.....	11
3. Resultados e discussão	13
4. Conclusões.....	29

Capítulo II

“Técnicas de RMN de ^1H Aplicadas às Interações Proteínas - Ligantes”

1. Introdução.....	33
2. Objetivos.....	41

3. Resultados e discussão	43
3.1. Inibição de acetilcolinesterase	43
3.2. Interação de fosfomicina na parede celular de microrganismos.....	55
4. Conclusões.....	61
Parte experimental Capítulo I.....	65
Preparo de amostras	65
Experimentos de RMN de ^1H	66
Parte experimental Capítulo II.....	71
Preparo de amostras	71
Experimentos de RMN de ^1H	72
Anexos.....	75

Lista de Abreviaturas e Símbolos

α	
β	
τ_c	tempo de correlação para reorientação molecular
ΔR^{sel}	variação de relaxação longitudinal seletiva
$[L]$	concentração de ligante
$[P]$	concentração de proteína
A_{comp}	Área do composto
A_{TPSA}	Área do padrão de referência interna
CEPEC	Centro de Pesquisa do Cacau
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
d1	tempo de espera para reciclagem
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	“Desoxyribonucleic Acid”
DOSY	“Diffusion Ordered SpectroscopY”
EPC	“egg phosphatidilcoline”
FDA	“Food and Drug Administration”
H	umidade
HDO	óxido de hidrogênio e deutério
HSA	“human serum albumin”
ITAL	Instituto de Tecnologia de Alimentos
K_{int}	constante de interação aparente
lb	“line broadening”
$M_{amostra}$	massa de amostra por mL de solução após extração
MM_{comp}	massa molar do composto
NB	“nutrient broth”

nOe	“ nuclear Overhauser effect”
NOESY	“nuclear Overhauser effect spectroscopy” (experimento bidimensional de RMN empregado para avaliar os incrementos dos sinais devido ao efeito Overhauser)
PEP	“phospho-enol-pyruvate”
ρ_{livre}	fração de moléculas livres
ρ_{compl}	fração de moléculas complexadas
rf	radiofrequência
$R_{\text{obs}}^{\text{sel}}$	relaxação longitudinal seletiva observada
$R_{\text{livre}}^{\text{sel}}$	relaxação longitudinal de moléculas livres
$R_{\text{compl}}^{\text{sel}}$	relaxação longitudinal de moléculas complexadas
RNA	“RiboNucleic Acid”
STD	“Saturation Transfer Difference”
T_1	Tempo de relaxação longitudinal
$T_{1\text{sel}}$	Tempo de relaxação longitudinal seletivo
$Teor_{\text{comp}}$	Teor de composto na amostra
TSPA	“Trimethylsilylpropionic acid sodium salt” (referência interna de quantificação)
WATERGATE	“ WATER supression by GrAdiente Tailored Excitation ” (experimento de supressão de sinal com gradient de campo)
WaterLOGSY	“ Water Ligand Observation with Gradient Spectroscopy”

Lista de Tabelas

Tabela 1. Teores de umidade das dez variedades de <i>Theobroma cacao</i> durante o processo de fermentação.....	16
Tabela 2. Concentração final de cada amostra de <i>Theobroma cacao</i> , dado em mg.g ⁻¹ após a extração em diferentes tempos de fermentação.....	16
Tabela 3. Análise quantitativa por RMN de ¹ H de extrato aquoso de sementes de <i>Theobroma cacao</i> , monitorando açúcares durante o processo de fermentação e secagem (mg.g ⁻¹).....	18
Tabela 4. Análise quantitativa por RMN de ¹ H de extratos aquosos das sementes de <i>Theobroma cacao</i> , monitorando ácidos orgânicos, etanol e cafeína durante o processo de fermentação, secagem e líquido (mg.g ⁻¹).....	23
Tabela 5. Valores de distâncias entre a enzima e a fisostigmina no sítio ativo, calculados por “docking” molecular	38
Tabela 6. Avaliação de atividade epóxido hidrolase em microrganismos.....	49

Lista de Figuras

- Figura 1.** Sequência de pulsos de um experimento de RMN de ^1H com pré-saturação do sinal da água.....7
- Figura 2.** Sequência de pulsos para um experimento de RMN de ^1H com supressão do sinal do solvente (água) utilizando a técnica WATERGATE.....8
- Figura 3.** Espectros de RMN de ^1H , a 499,8828 MHz, faixa entre 4,45 e 5,55 ppm (com sinais dos hidrogênios anoméricos da glicose e sacarose), à 25° C. a) Saturação do sinal da água com PRESAT; b) Saturação do sinal da água com WET; c) Saturação do sinal da água com WATERGATE.....11
- Figura 4.** Espectros de RMN de ^1H , a 499,8828 MHz com pré-saturação de água (PRESAT) , faixa entre -0,50 e 4,30 ppm para a amostra 792 após 96 horas de fermentação, à 25° C, d1=18 s e variação em d2 para cálculo de T_1 . a) d2=32 s; b) d2=16 s; c) d2=8 s; d) d2=4 s; e) d2=2 s; f) d2=1 s; g) d2=0,5 s; h) d2=0,25 s; i) d2=0,125 s e j) d2=0,0625.....11
- Figura 5.** Espectro de RMN de ^1H , a 499,8828 MHz. Ampliação da região entre 3.3 e 4.3 ppm à 25° C. a) Espectro da frutose; b) Espectro da sacarose; c) Espectro da glicose; d) Espectro de cacau da variedade comum antes da fermentação. Abaixo dos espectros encontram-se as estruturas dos açúcares em questão12
- Figura 6.** Estrutura dos ácidos orgânicos, etanol e cafeína monitorados durante o processo fermentativo. O ácido cítrico (8) foi apenas detectado,

porém não quantificado.....	13
Figura 7. Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz , D_2O , [TPSA] = 0,50 mmol/L, 25° C) de <i>Theobroma cacao</i> , da variedade comum, fermentado por 48 horas, indicando os sinais utilizados para cada metabólito na quantificação.....	14
Figura 8. Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz , D_2O , [TPSA] = 0,50 mmol/L, 25° C) de <i>Theobroma cacao</i> , da variedade comum (faixa entre -0.60 e 5.60 ppm) . a) Espectro de cacau seco após fermentação; b) espectro de cacau após 144 horas de fermentação; c) espectro de cacau após 48 horas de fermentação; d) espectro de cacau antes da fermentação.....	14
Figura 9. Primeira fase da glicolise, quando ocorre a isomerização da glicose-6-fosfato para frutose-6-fosfato e posteriormente a frutose 1,6-bifosfato.....	20
Figura 10. Estrutura da galantamina (10)	28
Figura 11. Estrutura da fosfomicina (11)	29
Figura 12. Sequência de pulsos do experimento de RMN de ^1H – STD com uma sequência adicional WATERGATE para eliminar sinal residual de HDO.....	30
Figura 13. Estruturas dos alcalóides colinesterasicos de Amaryllidaceae.....	34
Figura 14. Espectro de RMN de ^1H – STD (499,8828 MHz, [tampão fosfato] = 1 mmolL ⁻¹ , pH=8,0, $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 25° C) para uma solução de	

acetilcolinesterase com fisostigmina (**12**). (a) diferença entre os experimentos “em ressonância” e “fora de ressonância”; (b) experimento “fora de ressonância”. Acima estão demonstradas duas estruturas da fisostigmina. Uma delas com os valores de nOe observados enquanto que a outra mostra o epitopo normalizado de ligação do alcalóide com acetilcolinesterase.....37

Figura 15. Estrutura da fisostigmina (**12**) devidamente numerada.....39

Figura 16. Disposição da fisostigmina frente aos resíduos de aminoácidos mais próximos a ela no sítio ativo da acetilcolinesterase. A) Imagem frontal; B) Imagem lateral.....39

Figura 17. Espectro de RMN de ^1H – STD (499,8828 MHz, [tampão fosfato] = 1 mmolL⁻¹, pH=8,0, D₂O/DMSO, 25° C) para uma solução de acetilcolinesterase com Ambelina (**13**). (a) diferença entre os experimentos “em ressonância” e “fora de ressonância”; (b) experimento “fora de ressonância”. Acima está apresentada uma estrutura da Ambelina com a devida numeração dos hidrogênios.....40

Figura 18. Espectro de RMN de ^1H – STD (499,8828 MHz, [tampão fosfato] = 1 mmolL⁻¹, pH=8,0, D₂O/DMSO, 25° C) para uma solução de acetilcolinesterase com Crinina (**14**), (expansão de 5,40 a 7,40 ppm). (a) diferença entre os experimentos “em ressonância” e “fora de ressonância”; (b) experimento “fora de ressonância”. Acima está apresentada uma estrutura da Crinina com a devida numeração dos hidrogênios.....41

Figura 19. Curva para $1/\Delta R^{sel}$ versus concentração para fisostigmina (**12**).....43

Figura 20. Espectro de RMN de ^1H – STD (499,8828 MHz, [tampão fosfato] = 1 mmolL⁻¹, pH=8,0, D₂O/DMSO, 25° C) para uma solução de acetilcolinesterase com crinina, ambelina e fisostigmina. (a) diferença entre os experimentos “em ressonância” e “fora de ressonância”; (b) experimento “fora de ressonância”. Acima estão demonstradas as estruturas dos alcalóides e o hidrogênio utilizado para comparação.....44

Figura 21. Espectros de RMN de ^1H –STD da fosfomicina (**16**) (499,8828 MHz, [tampão fosfato] = 1 mmol.L⁻¹, pH=7.4, D₂O, 25° C) A) Espectro de RMN de ^1H ; B) Espectro de STD “fora de ressonância” da fosfomicina em lipossoma; C) Diferença dos espectros de STD “em ressonância” e “fora de ressonância” para fosfomicina em lipossoma; D) Espectro de STD “fora de ressonância” da fosfomicina em HSA; E) Diferença dos espectros de STD “em ressonância” e “fora de ressonância” para fosfomicina em HSA. No topo, o epitopo de ligação da fosfomicina em HSA.....46

Figura 22. Seleção de atividade epóxido hidrolase. A) Controle positivo: Agar contendo meio NB e B) Agar contendo meio NB e 0,83g.L⁻¹ de fosfomicina mostrando que apenas *Serratia liquefaciens* é resistente e apresenta atividade epóxido hidrolase.....49

Figura 23. Espectros de RMN de ^1H – STD (499,8828 MHz, [tampão fosfato] = 1 mmol.L⁻¹, pH=7.4, D₂O, 25° C). A) Espectro de RMN de ^1H ; B) Espectro de STD “fora de ressonância” da fosfomicina na presença de *E. coli*; C) Diferença dos espectros de STD “em ressonância” e “fora de ressonância” para fosfomicina na *E. coli*; D) Espectro de STD “fora de ressonância” da fosfomicina na presença de *Serratia liquefaciens*; E) Diferença dos espectros de STD “em ressonância” e “fora de ressonância” para fosfomicina na

presença de *Serratia liquefaciens*. No topo, o epitopo de ligação da fosfomicina em *E. coli*.....50

Lista de Espectros

E 1: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; [TPSA] = $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade 516 de *Theobroma cacao* antes da fermentação.....62

E 2: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; [TPSA] = $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade 565 de *Theobroma cacao* antes da fermentação.62

E 3: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; [TPSA] = $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade 654 de *Theobroma cacao* antes da fermentação.63

E 4: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; [TPSA] = $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade 774 de *Theobroma cacao* antes da fermentação.63

E 5: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; [TPSA] = $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade 792 de *Theobroma cacao* antes da fermentação.....64

E 6: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; [TPSA] = $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade 1188 de *Theobroma cacao* antes da fermentação.64

- E 7:** Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $[\text{TPSA}] = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade 656 de *Theobroma cacao* antes da fermentação.65
- E 8:** Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $[\text{TPSA}] = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade cepec de *Theobroma cacao* antes da fermentação.65
- E 9:** Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $[\text{TPSA}] = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade comum de *Theobroma cacao* antes da fermentação.66
- E 10:** Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $[\text{TPSA}] = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade EET de *Theobroma cacao* antes da fermentação.66
- E 11:** Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $[\text{TPSA}] = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade 516 de *Theobroma cacao* após 48 horas de fermentação.67
- E 12:** Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $[\text{TPSA}] = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade 565 de *Theobroma cacao* após 48 horas de fermentação.67
- E 13:** Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $[\text{TPSA}] = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade 654 de *Theobroma cacao* após 48 horas de fermentação.68
- E 14:** Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $[\text{TPSA}] = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade 656 de

<i>Theobroma cacao</i> após 48 horas de fermentação.	68
E 15: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; [TPSA] = $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade 774 de <i>Theobroma cacao</i> após 48 horas de fermentação.	69
E 16: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; [TPSA] = $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade 792 de <i>Theobroma cacao</i> após 48 horas de fermentação.	69
E 17: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; [TPSA] = $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade 1188 de <i>Theobroma cacao</i> após 48 horas de fermentação.	70
E 18: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; [TPSA] = $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade cepec de <i>Theobroma cacao</i> após 48 horas de fermentação.	70
E 19: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; [TPSA] = $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade comum de <i>Theobroma cacao</i> após 48 horas de fermentação.	71
E 20: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; [TPSA] = $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade EET de <i>Theobroma cacao</i> após 48 horas de fermentação.	71
E 21: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; [TPSA] = $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade 516 de <i>Theobroma cacao</i> após 96 horas de fermentação.	72

- E 22:** Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $[\text{TPSA}] = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 565 de *Theobroma cacao* após 96 horas de fermentação.72
- E 23:** Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $[\text{TPSA}] = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 654 de *Theobroma cacao* após 96 horas de fermentação.73
- E 24:** Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $[\text{TPSA}] = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 656 de *Theobroma cacao* após 96 horas de fermentação.73
- E 25:** Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $[\text{TPSA}] = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 774 de *Theobroma cacao* após 96 horas de fermentação.74
- E 26:** Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $[\text{TPSA}] = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 792 de *Theobroma cacao* após 96 horas de fermentação.74
- E 27** Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $[\text{TPSA}] = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 1188 de *Theobroma cacao* após 96 horas de fermentação.75
- E 28:** Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $[\text{TPSA}] = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade cepec de *Theobroma cacao* após 96 horas de fermentação.75
- E 29:** Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $[\text{TPSA}] = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade comum

de <i>Theobroma cacao</i> após 96 horas de fermentação.	76
E 30: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; [TPSA] = $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade EET de <i>Theobroma cacao</i> após 96 horas de fermentação.	76
E 31: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; [TPSA] = $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade 516 de <i>Theobroma cacao</i> após 144 horas de fermentação.	77
E 32: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; [TPSA] = $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade 565 de <i>Theobroma cacao</i> após 144 horas de fermentação.....	77
E 33: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; [TPSA] = $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade 654 de <i>Theobroma cacao</i> após 144 horas de fermentação.	78
E 34: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; [TPSA] = $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade 656 de <i>Theobroma cacao</i> após 144 horas de fermentação.	78
E 35: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; [TPSA] = $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade 774 de <i>Theobroma cacao</i> após 144 horas de fermentação.	79
E 36: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; [TPSA] = $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade 792 de <i>Theobroma cacao</i> após 144 horas de fermentação.	79

- E 37:** Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $[\text{TPSA}] = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 1188 de *Theobroma cacao* após 144 horas de fermentação.80
- E 38:** Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $[\text{TPSA}] = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade cepec de *Theobroma cacao* após 144 horas de fermentação.80
- E 39:** Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $[\text{TPSA}] = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade comum de *Theobroma cacao* após 144 horas de fermentação.81
- E 40:** Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $[\text{TPSA}] = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade EET de *Theobroma cacao* após 144 horas de fermentação.81
- E 41:** Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $[\text{TPSA}] = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 516 de *Theobroma cacao* após secagem ao sol.82
- E 42:** Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $[\text{TPSA}] = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 565 de *Theobroma cacao* após secagem ao sol.82
- E 43:** Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $[\text{TPSA}] = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 654 de *Theobroma cacao* após secagem ao sol.83
- E 44:** Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $[\text{TPSA}] = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 656 de

<i>Theobroma cacao</i> após secagem ao sol.	83
E 45: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; [TPSA] = $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade 774 de <i>Theobroma cacao</i> após secagem ao sol.	84
E 46: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; [TPSA] = $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade 792 de <i>Theobroma cacao</i> após secagem ao sol.	84
E 47: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; [TPSA] = $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade 1188 de <i>Theobroma cacao</i> após secagem ao sol.	85
E 48: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; [TPSA] = $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade cepec de <i>Theobroma cacao</i> após secagem ao sol.	85
E 49: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; [TPSA] = $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade comum de <i>Theobroma cacao</i> após secagem ao sol.	86
E 50: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; [TPSA] = $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade EET de <i>Theobroma cacao</i> após secagem ao sol.	86
E 51: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; [TPSA] = $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade 516 de <i>Theobroma cacao</i> após torração (impurezas incorporadas durante preparação da amostra – etanol e acetona).....	87

- E 52:** Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $[\text{TPSA}] = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 565 de *Theobroma cacao* após torração (impurezas incorporadas durante preparação da amostra – etanol e acetona).87
- E 53:** Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $[\text{TPSA}] = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 654 de *Theobroma cacao* após torração (impurezas incorporadas durante preparação da amostra – etanol e acetona).88
- E 54:** Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $[\text{TPSA}] = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 656 de *Theobroma cacao* após torração (impurezas incorporadas durante preparação da amostra – etanol e acetona).88
- E 55:** Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $[\text{TPSA}] = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 774 de *Theobroma cacao* após torração (impurezas incorporadas durante preparação da amostra – etanol e acetona).89
- E 56:** Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $[\text{TPSA}] = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 792 de *Theobroma cacao* após torração (impurezas incorporadas durante preparação da amostra – etanol e acetona).89
- E 57:** Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $[\text{TPSA}] = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 1188 de *Theobroma cacao* após torração (impurezas incorporadas durante preparação

da amostra – etanol e acetona).	90
E 58: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; [TPSA] = $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade cepec de <i>Theobroma cacao</i> após torração (impurezas incorporadas durante preparação da amostra – etanol e acetona).	90
E 59: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; [TPSA] = $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade comum de <i>Theobroma cacao</i> após torração (impurezas incorporadas durante preparação da amostra – etanol e acetona).	91
E 60: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; [TPSA] = $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade EET de <i>Theobroma cacao</i> após torração.....	91
E 61: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; $\delta_{\text{H}_2\text{O}}$ 4,68 ppm; 25° C) da fisostigmina. Acima expansões das regiões de 1,10 e 3,38 ppm e 5,52 e 7,04ppm.	92
E 62: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; $\delta_{\text{H}_2\text{O}}$ 4,68 ppm; 25° C) da crinina. Acima expansões das regiões de 1,54 e 4,45 ppm e 5,72 e 7,16 ppm.....	93
E 63: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; $\delta_{\text{H}_2\text{O}}$ 4,68 ppm; 25° C) da ambelina. Acima expansões das regiões de 1,50 e 4,49 ppm e 5,71 e 6,78 ppm.....	94

Introdução Geral

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica espectroscópica amplamente utilizada em estudos estruturais e dinâmicos de moléculas, podendo ainda ser aplicada como uma técnica analítica quantitativa. Isso tudo é possível devido à grande evolução dos equipamentos e técnicas de RMN nas últimas décadas.

Os primeiros fenômenos de RMN em fase condensada foram observados em 1945-1946, por Felix Bloch¹ e Edward Purcell², os quais observaram como os núcleos de hidrogênio da água e da parafina absorviam radiofrequência e por isso em 1952 receberam o prêmio Nobel de Física. Desde então, este núcleo vem sendo o mais estudado não só na Química e na Física, mas também na Medicina, Biologia, Agricultura, Ciência de Alimentos entre outras áreas.

Nos anos 60 o avanço tecnológico dos espectrômetros impulsionou o aparecimento de novas técnicas de RMN tais como a RMN multinuclear e o núcleo de ¹³C ganhou destaque especial.³ Nos anos 70 e 80 as técnicas bidimensionais, inicialmente propostas por Jean Jeener, possibilitaram análises estruturais apuradas e o estudo detalhado da dinâmica molecular.⁴

Atualmente, a RMN de ¹H tem sido muito utilizada para o estudo de metabólitos produzidos por organismos vivos (plantas, animais, fungos, bactérias, etc.) e nos estudos de interações supramoleculares, as quais são essenciais para as reações biossintéticas.⁵

¹ Bloch, F.; *Phys. Rev.* **1946**, 70, 460-474.

² Purcell, E. M.; Torrey, E. C.; Pound, R. V.; *Phys. Rev.* **1946**, 69, 37-38.

³ a. Lauterbur, P. C. *J. Chem. Phys.* **1957**, 26, 217-218; b. Holm, C. H. J. *Chem. Phys.* **1957**, 26, 707-709.

⁴ a. Grant, D. M.; Harris, R. K. "Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance" **Vol. 1, Historical Perspectives**, John Wiley & Sons, New York, **1996**; b. Ernst, R.R.; Aue, W. P.; Bartholdi, E. *J. Chem. Phys.* **1976**, 64, 2229-2246; c. Ernst, R. R.; Kumar, A.; Müller, L. *J. Chem. Phys.* **1975**, 63, 5490-5491.

⁵ Carlomagno, T. *Annu. Ver. Biophys. Biomol. Struct.* **2005**, 34, 245-266.

Nesse contexto, este trabalho aborda o monitoramento e quantificação de metabólitos secundários de clones selecionados de *Theobroma cacao*, os quais apresentaram resistência ao fungo *Moniliophthora perniciosa*, e interações supramoleculares entre proteínas, células e ligantes. Tais tópicos serão apresentados em dois capítulos.

Capítulo I

“Técnicas de RMN de ^1H Aplicadas à Metabolômica de

***Theobroma cacao*”**

1. Introdução

1.1. *Theobroma cacao*

O cacaueiro (*Theobroma cacao*) é uma pequena árvore pertencente à família Sterculiaceae e nativa das Américas, na região Amazônica. É cultivado em regiões tropicais do mundo e o interesse de cultivo está nas suas sementes que são utilizadas na produção de manteiga de cacau e chocolate.⁶

Durante a década de 70 o cacau foi de extrema importância para a economia brasileira, sendo que cerca de 90% da produção era destinada à exportação. Nessa época, o principal produtor brasileiro de cacau era o estado da Bahia, responsável por cerca de 80% da produção nacional.⁷ A partir de 1989 um dos principais problemas no cultivo de cacau na Bahia foi a doença vassoura-de-bruxa devido à propagação do fungo patogênico *Moniliophthora perniciosa* (conhecida anteriormente como *Crinipellis perniciosa*), o qual foi responsável pela devastação de 85% das árvores de cacau na Bahia causando uma grande perda econômica para o país. Esse fato motivou pesquisa com o intuito de selecionar variedades mais resistentes à vassoura-de-bruxa. Um dos centros que desenvolvem esse tipo de pesquisa é o CEPEC (Centro de Pesquisa do Cacau), o qual está localizado no município de Ilhéus - BA.^{6,8}

A seleção de clones resistentes à *Moniliophthora perniciosa* é muito importante para a atividade agrícola, porém seu real valor econômico está nas plantas que produzem cacau de boa qualidade, relacionado ao aroma de

⁶ PIRES, J. L. Universidade Federal de Viçosa, **2003**. (Tese de Doutorado).

⁷ Alves, S. A. M.; Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, **2002**. (Dissertação de Mestrado)

⁸ PEREIRA, J. L. In *Proceedings of the 12th International Cocoa Research Conference*. Salvador, Brasil. **1996**, 287-292.

chocolate desenvolvido durante o processo de fermentação.⁹ Grandes diferenças no sabor são atribuídas à presença de ácidos orgânicos (ácidos láctico, acético e succínico) no produto final, de forma que o monitoramento destes é de extremo interesse.¹⁰

1.2. Fermentação do cacau

As sementes de *Theobroma cacao* são fermentadas, tradicionalmente, em caixas quadradas de madeira com orifícios nas laterais e na parte inferior, os quais possibilitam o escoamento da polpa liquefeita. Tal polpa, que acompanha as sementes desde a extração do fruto, se liquefaz durante o processo de fermentação. Esse processo ocorre durante aproximadamente 6 dias, sendo que a partir de 48 horas as sementes devem ser revolvidas para homogeneização e oxigenação do processo fermentativo. Terminada a fermentação, as sementes são secas ao sol durante 5 a 7 dias até redução significativa da umidade¹¹.

1.3. Detecção de metabólitos

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido a ferramenta analítica mais utilizada para quantificar esses ácidos orgânicos, cafeína, teobromina, açúcares e álcoois.^{12, 13} Como uma alternativa a essa técnica, encontram-se metodologias de RMN de ^1H e ^{13}C de alta resolução^{14,15,16,17}

⁹ Zoumas, B. L.; Kreiser, W. R.; Martin, R. A. *Journal of Food Science*, **1980**, 45, 314-316.

¹⁰ Holm, C.S.; Aston, J.W. *J. Sci. Food Agric.*, **1993**, 61, 65-71.

¹¹ BAREL, M.A. Café, Cacao, Thé. **1987**, 31, 141-150.

¹² Tomlins, K. I.; Baker, D. M.; McDowell, I. J. *Chromatographia*, **1990**, 29, 557-561.

¹³ Jinap, S.; Dimick, P. S. *Pertanika*, **1990**, 13, 107-111.

¹⁴ Valverde, J.; This, H. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 314-320.

aplicadas a misturas complexas que proporcionam informações qualitativas e quantitativas. Atualmente, experimentos de RMN 1 e 2D são utilizados para estudar a localização e identificação de compostos fenólicos em *Theobroma cacao*.¹⁸

Como exemplo bem sucedido pode-se tomar a quantificação de vários metabólitos (taurina, creatina, ácido γ -aminobutírico, *N*-acetilaspártato, succinato, glutamina, glutamato, acetato, alanina e lactato) em extratos aquosos de tecidos cerebrais utilizando RMN de ^1H de alta resolução onde foi utilizado pré-saturação do sinal da água¹⁹.

Outra aplicação da RMN de ^1H de alta resolução em metabolômica é a quantificação de metabólitos em urina. Nesse caso, o sinal da água no espectro de RMN de ^1H foi eliminado com pré-saturação utilizando irradiação contínua por 3s durante o período esperado para relaxação²⁰, ou ainda utilizando outras técnicas de supressão de sinal, tais como WATERGATE e WET²¹.

A pré-saturação foi inicialmente utilizada para aplicações biológicas e bioquímicas em amostras com grande quantidade de água. Essa metodologia não é adequada para amostras que contenham hidrogênios lábeis, tal como NH. Os sinais destes desaparecem no espectro quando se usa pré-saturação da água, devido à troca química dos hidrogênios, sendo necessário utilizar outras metodologias para eliminação do sinal da mesma. O experimento consiste na irradiação seletiva, portanto de baixa potência, do sinal a ser eliminado seguido

¹⁵ Figueiredo, I. M.; Pereira, N. R.; Efraim, P.; Garcia, N. H. P.; Rodrigues, N. R.; Marsaioli Junior, A.; Marsaioli, A. J. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 4101-4106.

¹⁶ Pauli, G. F.; Jaki, B. U.; Lankin, D. C. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 133-149.

¹⁷ Sobolev, A. P.; Brosio, E.; Gianferri, R.; Segre, A. L. *Magn. Reson. Chem.* **2005**, 43, 625-638.

¹⁸ Alemanno, L.; Ramos, T.; Gargadenec, A.; Andary, C.; Ferriere N. *Annals of Botany*. **2003**, 92, 613-623.

¹⁹ Chen Chang; Goh Chung Chen; Taichang Jang. *Neuroscience Letters*, **1995**, 196, 134-136.

²⁰ Lee, M. B.; Storer, M. K.; Blunt, J. W.; Lever, M. *Clinica Chimica Acta*, **2006**, 365, 264-269.

²¹ Weljie, A. M.; Newton, J.; Mercier, P.; Slupsky, C. M. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 4430-4442.

de um pulso não seletivo de 90° em toda a amostra, conforme está representado na **Figura 1**²².

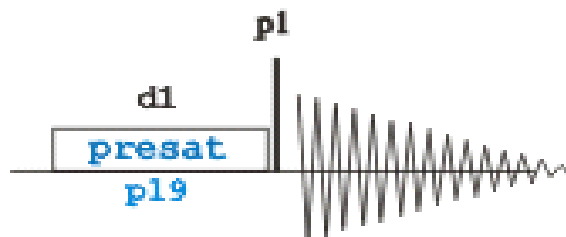


Figura 1. Sequência de pulsos de um experimento de RMN de ^1H com pré-saturação do sinal da água.

A técnica denominada WATERGATE utiliza pulso de gradiente de campo, como pode ser visto na **Figura 2**. A sequência de pulsos nada mais é que um experimento do tipo de eco de spin e gradiente no qual uma sequência binomial de pulsos equivalentes a um pulso de 180° está localizado entre dois pulsos de gradiente de campo. Toda essa parte da sequência de pulsos sucede um pulso duro de 90° que transfere toda a magnetização da amostra para o plano xy . Em seguida um pulso de gradiente de campo é aplicado fazendo com que as magnetizações percam a coerência. A sequência binomial de pulsos é responsável por atingir todas as frequências da janela espectral exceto aquela que deve ser eliminada do espectro (no caso a água). Em seguida, outro pulso de gradiente de campo reconstrói a coerência dos sinais da amostra e proporciona maior perda de coerência do sinal da água. A frequência a ser eliminada é posicionada sobre a frequência de *offset* ($k/d2$, no qual k é um número inteiro)

²² Berger, S.; Kalinowski, H.-O.; Braun, S. *150 and More Basic NMR Experiments*. 1998, Ed. Wiley-VCH, New York, pgs 205-207

de forma que o tempo d2 não seja maior que 300 μs para que as demais frequências a serem eliminadas caiam fora da janela espectral²³.

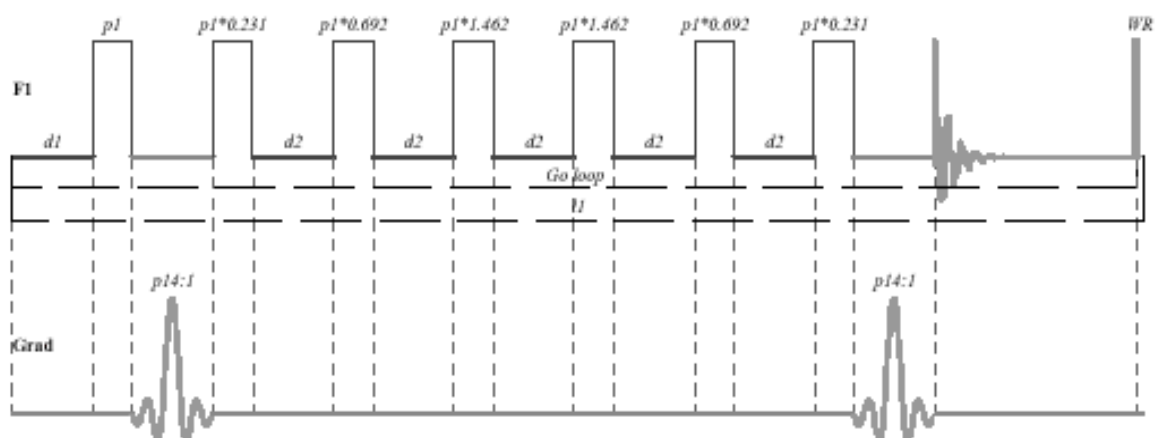


Figura 2. Sequência de pulsos para um experimento de RMN de ^1H com supressão do sinal do solvente (água) utilizando a técnica WATERGATE.

²³ Berger, S.; Kalinowski, H.-O.; Braun, S. *150 and More Basic NMR Experiments*. 1998, Ed. Wiley-VCH, New York, pgs 470-472.

2. Objetivos

O presente capítulo visa o monitoramento do processo de fermentação e torração de dez clones de variedades diferentes de *Theobroma cacao* resistentes à *Moniliophthora perniciosa* por RMN de ^1H avaliando simultaneamente a variação de açúcares, cafeína, etanol e ácidos orgânicos.

3. Resultados e discussão

As amostras previamente fermentadas, secas e extraídas foram gentilmente cedidas por Priscila Efraim, do Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, de Campinas – SP.

Após preparação, as amostras continham cerca de 33% de H_2O e 66% de D_2O , sendo necessário eliminar o sinal do HDO do espectro para realização da quantificação. Tal sinal, cujo deslocamento químico é de 4,68 ppm nos espectros de RMN de ^1H , foi saturado aplicando técnicas de supressão de sinal, tais como pré-saturação²², “WATERGATE”²³ e “WET”²⁴. Dentre estas, a pre-saturação proporcionou melhores resultados quantitativos (**Figura 3**) ao eliminar parcialmente o sinal da água sem perturbar os sinais dos hidrogênios anoméricos da glicose (**1**) (5,23 e 4,64 ppm) e sacarose (**2**) (5,41 ppm) que têm frequências próximas ao sinal da água (4,68 ppm). Uma solução padrão contendo sacarose, glicose e frutose (**3**) foi utilizada para a otimização da saturação da água, garantindo assim que a potência de -17 dBm por 18,0 s não interfere na quantificação dos açúcares.

Um parâmetro extremamente importante em RMN é o tempo de relaxação longitudinal (T_1) dos hidrogênios cujos sinais são utilizados para quantificação. É necessário que todos os sinais tenham relaxado completamente para que as análises sejam quantitativas. Para tanto, é estipulado um intervalo entre as repetições dos experimentos com valores compreendidos entre 3 e 5 vezes o valor de T_1 determinado pelo experimento de inversão-recuperação²⁵, permitindo assim que todo o sistema de spins relaxe antes de um novo experimento ser iniciado (**Figura 4**).

²⁴ Berger, S.; Braun, S. *200 and More NMR Experiments*. 2004, Ed. Wiley-VCH, New York, pgs 512-514.

²⁵ Berger, S.; Braun, S. *200 and More NMR Experiments*. 2004, Ed. Wiley-VCH, New York, pgs 160-163.

O intervalo entre as repetições dos espectros foi de 21s ($d_1=18\text{s}$ e tempo de aquisição 3s) calculado a partir do tempo de relaxação longitudinal do sinal do trimetilsililpropionato de sódio (TPSA, 0,00 ppm), o qual foi usado como referência interna para a quantificação e apresentou sinal com maior tempo de relaxação ($T_1 = 4\text{s}$) (**Figura 4**). Para a quantificação da glicose utilizou-se a soma das áreas dos hidrogênios anoméricos α e β , enquanto que para sacarose apenas a forma α foi encontrada. O H5 (3,99 ppm) da frutose foi utilizado para quantificação por ser o único sinal sem superposição. (**Figura 5**).

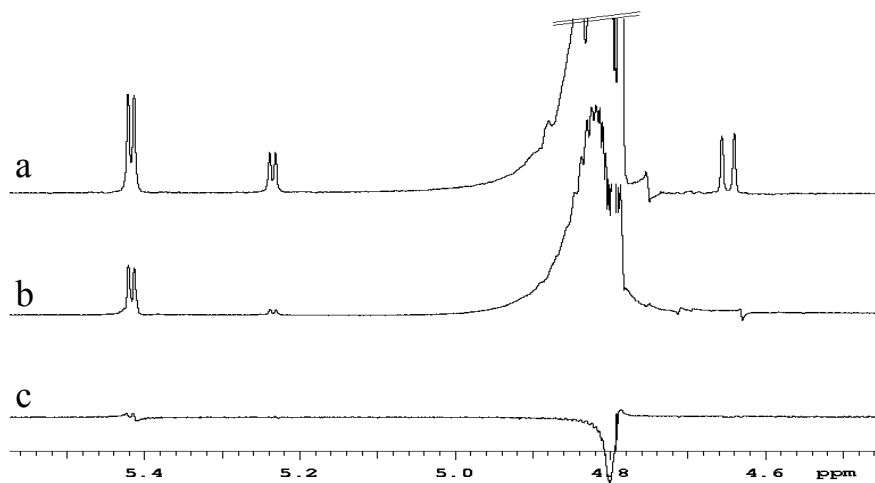


Figura 3. Espectros parciais de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $[\text{TPSA}] = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, 25°C), faixa entre 4,45 e 5,55 ppm (com sinais dos hidrogênios anoméricos da glicose e sacarose). a) Supressão do sinal da água com PRESAT; b) Supressão do sinal da água com WET; c) Supressão do sinal da água com WATERGATE.

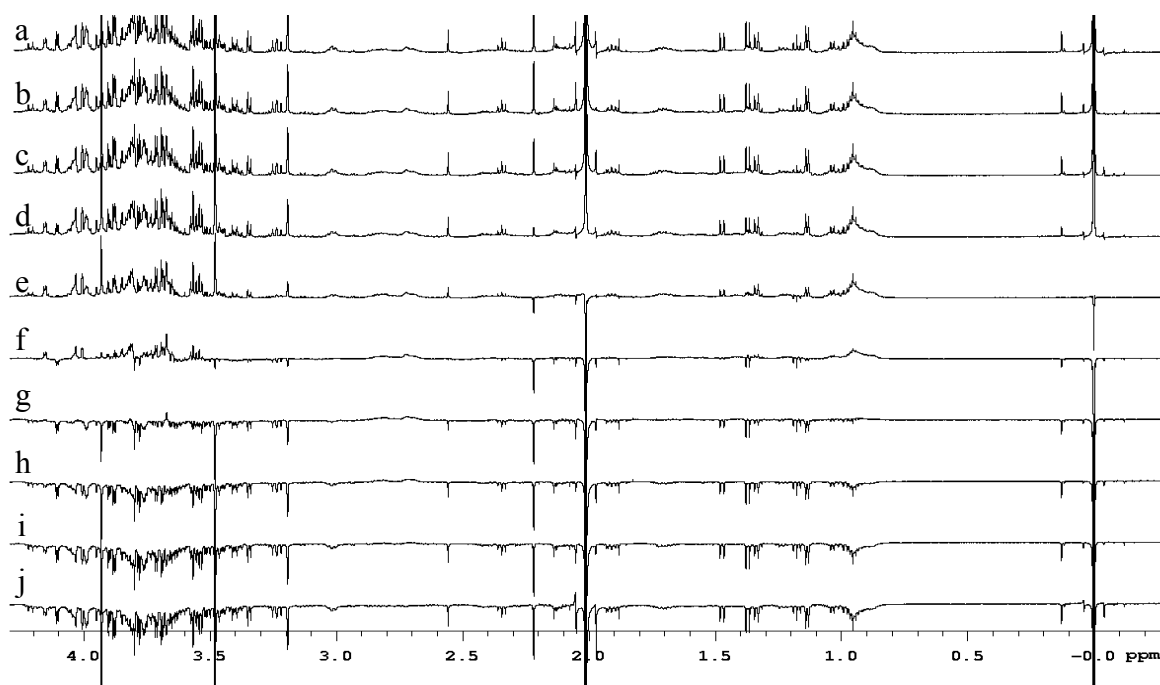


Figura 4. Espectros parciais de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $[\text{TPSA}] = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, 25°C) com pré-saturação de água (PRESAT), faixa entre -0,50 e 4,30 ppm para a amostra 792 após 96 horas de fermentação, à 25°C , $d_1=18 \text{ s}$ e variação em d_2 para cálculo de T_1 (seqüência inversão-recuperação²⁵). a) $d_2=32 \text{ s}$; b) $d_2=16 \text{ s}$; c) $d_2=8 \text{ s}$; d) $d_2=4 \text{ s}$; e) $d_2=2 \text{ s}$; f) $d_2=1 \text{ s}$; g) $d_2=0,5 \text{ s}$; h) $d_2=0,25 \text{ s}$; i) $d_2=0,125 \text{ s}$ e j) $d_2=0,0625$.

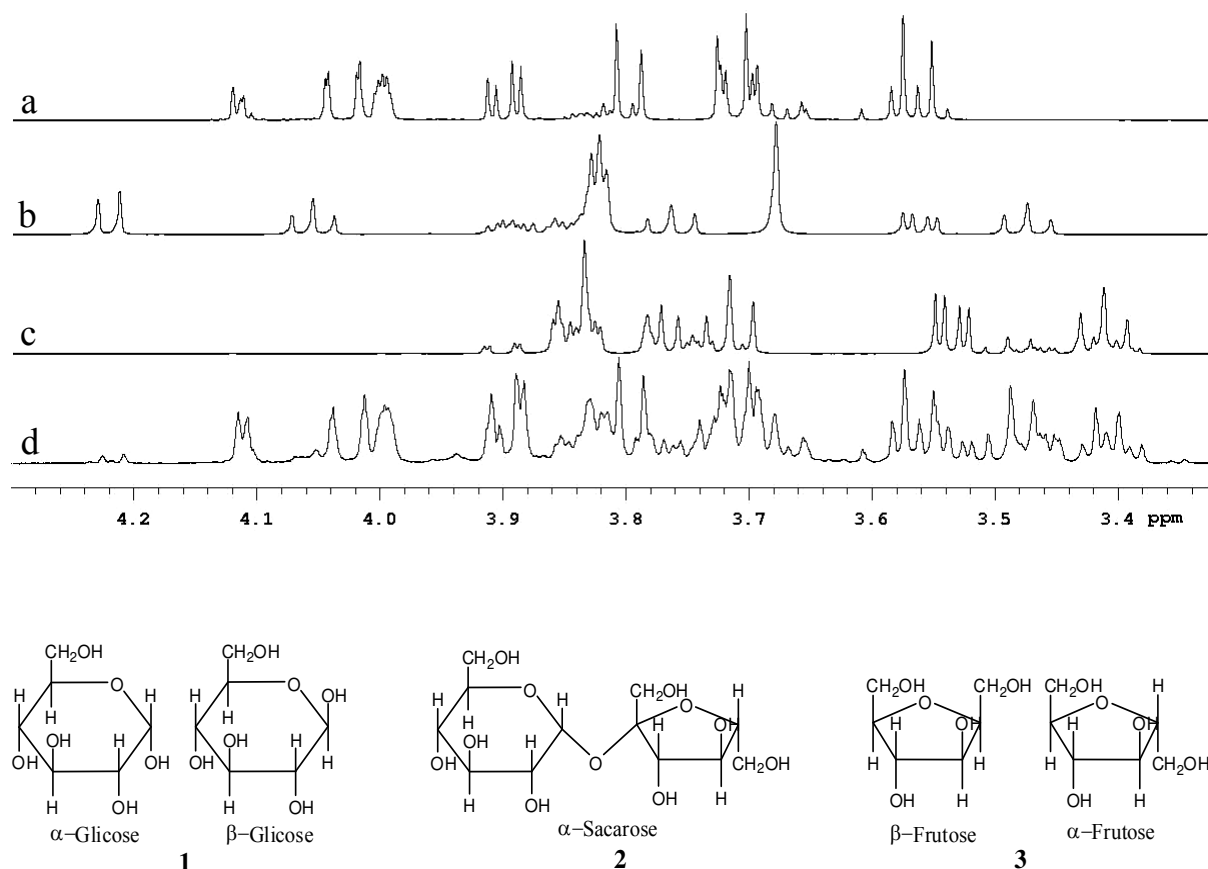


Figura 5. Espectro parcial de RMN de ^1H , (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $[\text{TPSA}] = 0,50 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$, 25°C). Ampliação da região entre 3.30 e 4.30 ppm à 25°C . a) Espectro da frutose; b) Espectro da sacarose; c) Espectro da glicose; d) Espectro de amêndoas de cacau, com resíduo de polpa, da variedade comum antes da fermentação. Abaixo dos espectros encontram-se as estruturas dos açúcares em questão.

Os principais metabólitos foram identificados por comparação com os deslocamentos químicos encontrados na literatura e confirmados adicionando padrões comerciais das amostras (ácido cítrico, ácido acético, ácido succínico, ácido láctico)¹⁵. Os deslocamentos químicos dos sinais utilizados para quantificação de cada metabólito juntamente com a respectiva multiplicidade foram: etanol (**4**) (1,28 ppm, tripleto), ácido succínico (**5**) (2,50 ppm, simpleto),

ácido acético (**6**) (1,96 ppm, simpleto) e ácido láctico (**7**) (1,33 ppm, duplete), (**Figuras 6 e 7**). A cafeína (**9**) (3,20 ppm, simpleto) só aparece no espectro após a fermentação. Antes disso, seus picos são encobertos pelos sinais dos açúcares.

Os perfis espectrais dos 10 clones de *Theobroma cacao* selecionados no estado da Bahia mostram os metabólitos produzidos e consumidos ao longo da fermentação (0, 48, 96 e 144 h) e licores (**Figura 8**).

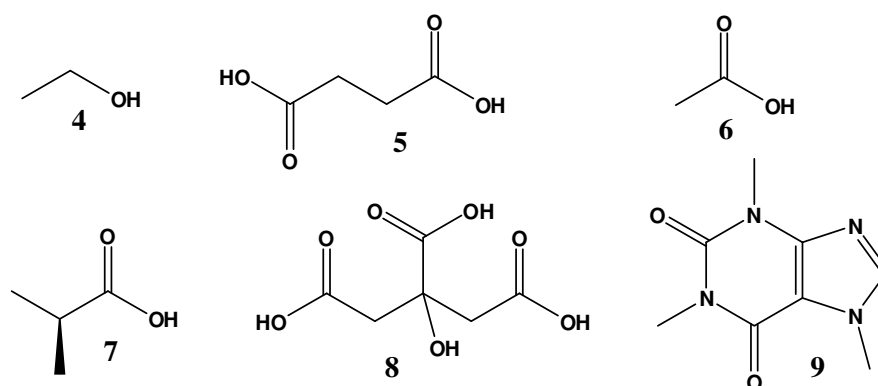


Figura 6. Estrutura dos ácidos orgânicos [ácidos succínico (**5**), acético (**6**), láctico (**7**) e cítrico (**8**)], etanol (**4**) e cafeína (**9**) monitorados durante o processo fermentativo. O ácido cítrico (**8**) foi apenas detectado, porém não quantificado.

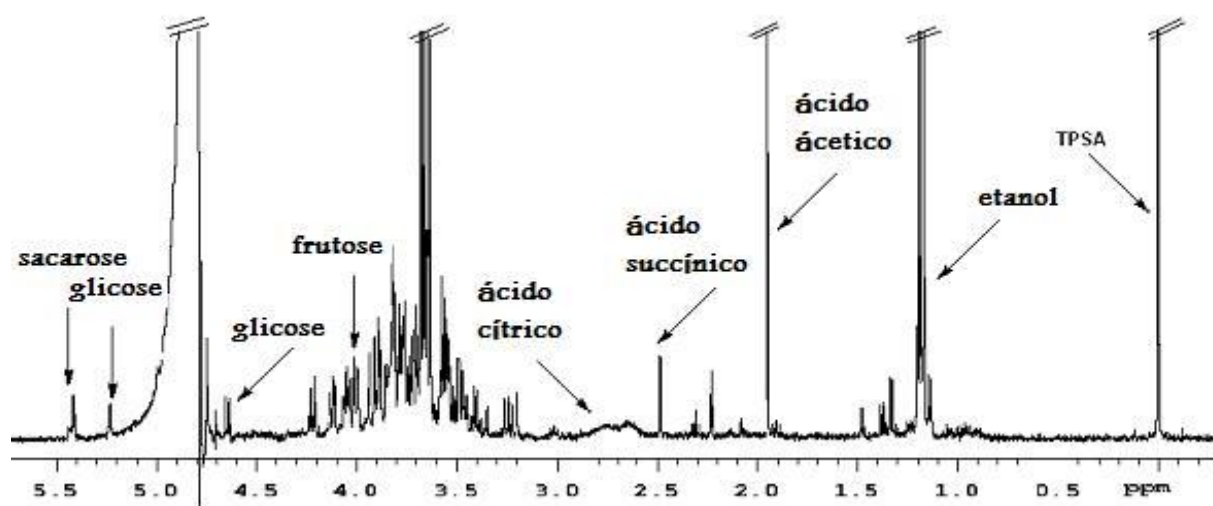


Figura 7. Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $[\text{TPSA}] = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, 25°C) de amêndoas de *Theobroma cacao*, da variedade

comum, fermentado por 48 horas, indicando os sinais utilizados para cada metabólito na quantificação.

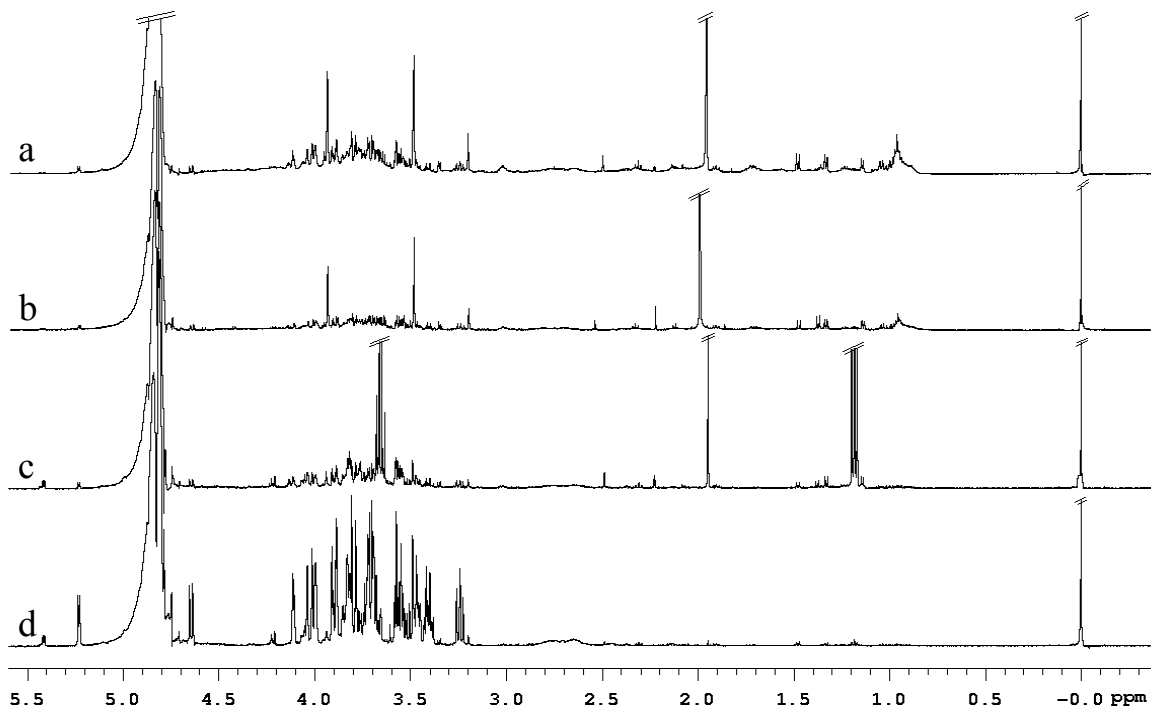


Figura 8. Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, 25°C) de *Theobroma cacao*, da variedade comum (faixa entre -0.60 e 5.60 ppm) . a) Espectro de amêndoas de cacau seco após fermentação; b) espectro de cacau após 144 horas de fermentação; c) espectro de cacau após 48 horas de fermentação; d) espectro de amêndoa de cacau antes da fermentação.

A quantificação foi obtida através de uma relação direta entre os valores integrados dos sinais selecionados (**Figura 7**), divididos pelo número de hidrogênios correspondentes a cada sinal, e os valores da integral da referência interna ($[\text{TPSA}] = 0,5 \text{ mmol L}^{-1}$). Os teores dos metabólitos ainda foram corrigidos levando em consideração a umidade (H) da amostra segundo a **Equação 1**.

$$Teor_{comp} = \frac{\frac{A_{comp} / n(^1H)}{A_{TPSA} / 9} \times 0,5 \cdot 10^{-3} \times 3 \times MM_{comp} \times 10^{-3}}{M_{amostra.}} \cdot \frac{100}{(100 - H)} \quad \textbf{Equação 1.}$$

Na equação, A_{comp} é a área referente ao pico do composto que está sendo analisado, e o valor é dividido pelo número de hidrogênios que se referem a este sinal. A_{TPSA} é a área do padrão interno que é dividido por nove (referente aos nove hidrogênios das três metilas da referência). MM_{comp} é a massa molecular do composto analisado e $M_{amostra}$ é a massa de amostra por mL de extrato. H representa a umidade da amostra (%). A equação tem ainda duas constantes, $0,5 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ que é a concentração do padrão interno na amostra final e o fator “3” que atua como um fator de correção devido a diluição ocorrida pela adição de água deuterada na preparação da amostra para o RMN. A **Tabela 1** mostra os valores de umidade para cada amostra em cada tempo de fermentação, enquanto a **Tabela 2** apresenta os valores de concentrações finais das amostras após a extração, em g mL^{-1} . É possível observar que tanto o teor de umidade quanto a concentração final das amostras sofrem grandes variações, justificando as correções introduzidas na **Equação 1**.

Tabela 1. Teores de umidade das dez variedades de *Theobroma cacao* durante o processo de fermentação.

Amostras	UMIDADE (%)				
	Tempo de fermentação (horas)				Secas ao sol
	0	48	96	144	
CEPEC 42	58,15 ± 1,09	55,38 ± 1,01	54,46 ± 0,15	44,24 ± 0,57	6,10 ± 0,02
COMUM	53,83 ± 0,88	52,50 ± 0,25	47,74 ± 0,09	44,02 ± 0,64	6,60 ± 0,36
EET 397	56,21 ± 1,16	51,61 ± 0,89	51,29 ± 0,95	46,81 ± 0,76	5,80 ± 0,01
TSA 654	52,95 ± 0,55	52,98 ± 0,61	48,79 ± 0,21	41,90 ± 0,71	6,63 ± 0,08
TSA 656	53,68 ± 0,63	53,13 ± 0,79	50,18 ± 2,16	46,13 ± 3,08	6,09 ± 0,03
TSAN 792	57,29 ± 0,84	50,63 ± 1,13	50,47 ± 0,77	44,98 ± 0,47	6,48 ± 0,02
TSH 516	54,73 ± 0,59	52,90 ± 1,05	52,73 ± 0,45	42,87 ± 0,26	6,74 ± 0,54
TSH 565	57,19 ± 1,11	51,18 ± 0,93	51,55 ± 0,34	47,22 ± 0,80	6,78 ± 0,16
TSH 774	57,78 ± 0,52	55,91 ± 1,12	55,18 ± 0,90	44,88 ± 0,73	5,92 ± 0,04
TSH 1188	56,21 ± 0,97	54,14 ± 0,59	52,54 ± 1,87	40,12 ± 1,09	6,28 ± 0,01

Tabela 2. Concentração final de cada amostra de *Theobroma cacao*, dado em gmL^{-1} após a extração em diferentes tempos de fermentação.

CONCENTRAÇÃO FINAL (g amostra/mL água)						
Amostras	tempo 0	48 h	96 h	144 h	seco	liquor
TSH 516	0,1291	0,1277	0,1345	0,1285	0,1180	0,1605
TSH 565	0,1234	0,1059	0,1080	0,1075	0,1000	0,1583
TSA 654	0,1266	0,1277	0,1326	0,1321	0,1001	0,1654
TSA 656	0,1282	0,1361	0,1265	0,1386	0,1121	0,1603
TSH 774	0,1288	0,1286	0,1128	0,1321	0,1011	0,1602
TSA 792	0,1282	0,1244	0,1277	0,1318	0,1196	0,1733
Cepec 42	0,1342	0,1003	0,1350	0,1308	0,1180	0,1617
Comum	0,1313	0,1376	0,1091	0,1242	0,1022	0,1643
TSH 1188	0,1264	0,1258	0,1281	0,1327	0,1330	0,1708
EET 397	0,1313	0,1313	0,1319	0,1067	0,1013	0,1656

A **Tabela 3** apresenta os teores calculados a partir da **Equação 1** para sacarose, glicose e frutose, nos diferentes tempos de fermentação para as dez variedades de cacau analisadas. A quantificação dos açúcares no líquido, correspondente às amostras secas e torradas, foi impossibilitada por apresentarem teores muito baixos, dificultando assim a detecção.

As análises não foram feitas em duplicatas e, portanto, não foi possível calcular o desvio padrão.

Nas primeiras 48 horas de fermentação pode-se perceber que a frutose e a glicose são rapidamente consumidas pelo processo de glicólise, enquanto que a sacarose permanece quase inalterada. Algumas variações nas quantidades de sacarose nesse período da fermentação, como no caso do cacau de variedade comum, foram atribuídas às condições da fermentação que não foram rigorosamente controladas.

Tabela 3. Análise quantitativa por RMN de ^1H de extrato aquoso de sementes de *Theobroma cacao*, monitorando açúcares durante o processo de fermentação e secagem (mg g^{-1}).

Amostras	Processo de fermentação (horas)														
	Sacarose					Glicose					Frutose				
	0 h	48 h	96 h	144 h	Secas ao sol	0 h	48 h	96 h	144 h	Secas ao sol	0 h	48 h	96 h	144 h	Secas ao sol
TSH 516	8,68	8,77	2,22	1,00	0,40	31,3	5,41	5,73	4,62	1,32	38,6	14,3	28,4	9,17	3,92
TSH 565	12,7	12,02	3,38	2,33	1,38	49,6	9,46	4,64	4,70	1,84	50,2	13,1	7,53	7,29	8,32
TSA 654	ND	9,04	1,29	0,88	ND	20,7	4,10	4,02	3,48	0,63	16,6	7,66	6,46	8,28	2,77
TSA 656	6,70	6,36	1,50	0,54	ND	37,5	16,9	8,23	4,34	1,99	45,1	20,1	16,8	8,02	7,55
TSH 774	7,50	6,36	3,41	1,14	0,60	47,7	4,25	9,46	4,39	3,60	43,0	13,2	14,9	6,17	12,2
TSA 792	10,8	10,7	2,04	1,16	ND	48,7	12,2	7,73	4,34	ND	47,5	15,8	17,3	6,05	4,20
TSH 1188	12,6	12,3	1,56	0,88	ND	55,7	6,06	3,10	3,61	2,20	46,7	11,5	8,03	5,18	5,72
EET 397	8,50	6,63	1,87	ND	ND	59,0	10,3	7,82	5,68	2,60	63,5	17,5	17,1	9,91	6,86
Cepec 42	9,60	9,38	ND	0,91	ND	58,2	13,2	5,16	4,89	2,00	63,9	23,7	5,33	13,0	7,67
Comum	9,10	5,83	0,76	1,11	ND	50,7	6,65	4,04	3,39	3,58	49,6	12,90	5,93	5,52	9,43

ND = não detectado.

É possível ainda perceber que enquanto os teores de glicose diminuem em aproximadamente cinco vezes, a frutose diminui em aproximadamente duas vezes, o que tem duas justificativas prováveis. Uma delas é que na fermentação as leveduras metabolizam preferencialmente a glicose, fazendo com que o teor desse metabólito diminua mais rapidamente em relação à frutose. A outra justificativa plausível seria que durante a segunda etapa da glicólise ocorre uma isomerização catalisada pela enzima Fosfoexose isomerase, que converte glicose-6-fosfato em frutose-6-fosfato (**Figura 9**). Essa por sua vez, apresenta H-5 com deslocamento químico igual ao H-5 da frutose. Em sequência, a frutose-6-fosfato é fosforilada pela enzima Fosfofrutose-quinase-1, dando origem à frutose 1,6-bifosfato, que também apresenta H5 com o mesmo deslocamento químico da frutose. Portanto, não é possível diferenciar frutose de frutose-6-fosfato e frutose 1,6-bifosfato utilizando o deslocamento químico do H5 em RMN de ^1H . Outros sinais poderiam ser utilizados para diferenciar essas espécies químicas, no entanto, tais sinais apresentam superposição com outros metabólitos do meio. Portanto, ao monitorar a frutose é possível que ocorra o monitoramento simultâneo de frutose-6-fosfato e frutose 1,6-bifosfato provenientes da glicólise.^{26,27} Nas etapas subsequentes da glicólise, uma aldolase cliva a frutose 1,6-bifosfato, originando gliceraldeído-3-fosfato e diidroxiketona fosfato, sendo que o primeiro é convertido a piruvato.²⁷

²⁶ Voet, D.; Voet, J.G.; Pratt, C.W. *Fundamentos de Bioquímica. A Vida em nível Molecular*. Artmed, 2nd Ed., Porto Alegre, **2008**, pg. 448-456.

²⁷ Nelson, D.L.; Cox, M.M. *Lehninger. Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, 4th ed., New York, **2005**, pg. 522-545.

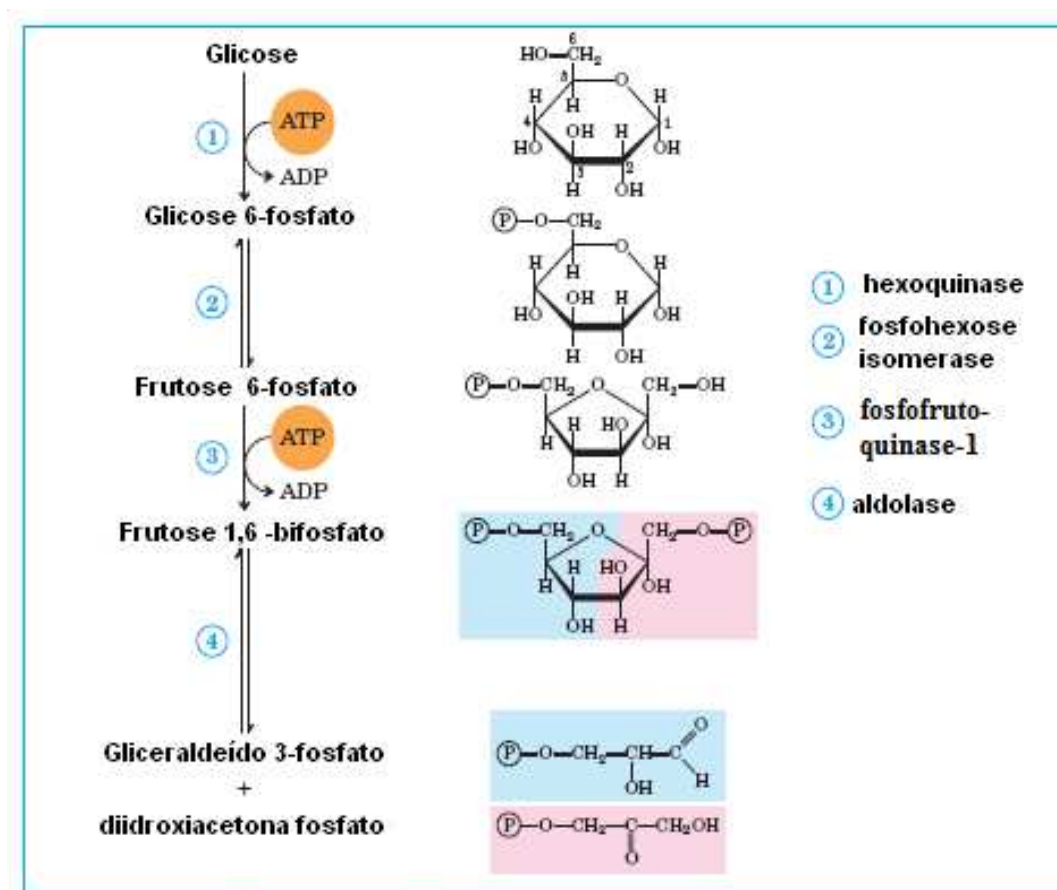


Figura 9. Primeira fase da glicólise, quando ocorre a isomerização da glicose-6-fosfato para frutose-6-fosfato e posteriormente a frutose 1,6-bisfosfato.

Após 96 horas de fermentação, a sacarose começa ser clivada originando mais frutose e glicose, as quais são utilizadas pelas leveduras como substrato. No final do processo fermentativo, após 144 horas de fermentação e secagem ao sol, as quantidades de açúcares presentes são bastante reduzidas, assim nas amostras secas a sacarose praticamente não é detectada e os teores de frutose e glicose são baixos em relação aos do início da fermentação.

Devemos destacar os baixos teores de glicose, sacarose e frutose para a variedade TSA 654, tanto no início da fermentação quanto no final da mesma, comparados aos teores desses açúcares encontrados para as demais variedades. A menor disponibilidade de açúcar para a fermentação dessa variedade poderá

proporcionar uma variação nas quantidades dos metabólitos provenientes da fermentação, sugerindo uma baixa formação de piruvato.

O piruvato formado durante a glicólise dá origem ao etanol e aos ácidos orgânicos que são formados durante o processo fermentativo, com exceção do ácido succínico. Na **Tabela 4** estão apresentadas as concentrações dos ácidos orgânicos, etanol e cafeína para os produtos fermentados dos dez clones de diferentes variedades de cacau.

Concomitante ao grande consumo de glicose e frutose observado nas primeiras 48 horas de fermentação há formação de uma grande quantidade de etanol, proveniente da redução do piruvato resultante do processo de glicólise na etapa de fermentação alcoólica. O piruvato é também convertido em pequena quantidade de ácido láctico por bactérias do gênero *Bacillus*. O ácido succínico produzido simultaneamente ao etanol, provem da fase oxidativa do ciclo de Krebs de forma que o α -cetoglutarato se transforma em succinil-CoA e, posteriormente, em ácido succínico.²⁸

Simultaneamente à fermentação alcoólica ocorre a fermentação acética, na qual o etanol é oxidado pela ação de bactérias do gênero *Acetobacter*, dando origem a uma quantidade significativa de ácido acético. No entanto, a fermentação acética tem seu ápice após o final da fermentação alcoólica, no período de 96 horas de fermentação, quando a concentração de ácido acético é máxima, enquanto que as quantidades dos ácidos succínico e láctico já começam diminuir.²⁹

A partir daí, a quantidade de ácido acético também diminui, tendo em vista que a fermentação acética chegou ao fim.

²⁸ Doyle, M.P.; Beuchat, L.R.; Montville, T.J. *Food Microbiol. Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, 2nd ed., Washington, **2001**, pg. 724-726

²⁹ a) Nielsen, D.S.; Teniola, O.D.; Ban-Koffi, L.; Owusu, M.; Andersson, T.S.; Holzapfel, W.H. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, 114, 168-186. b) Gálvez, S.L.; Loiseau, G.; Paredes, J.L.; Barel, M.; Guiraud, J.P. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, 114, 124-130.

O ácido cítrico foi detectado nas amostras com o auxílio de adição de padrão em algumas delas. No entanto, tal metabólito aparece no espectro de RMN de ^1H nas amostras de *Theobroma cacao* como dois sinais alargados em 2,52 e 2,65 ppm, quando deveria aparecer como dois dupletos nessa mesma região. Esse alargamento pode ser justificado pela diminuição do tempo de relaxação longitudinal desses hidrogênios, o que pode ser o resultado da complexação do ácido cítrico com outros metabólitos ou macromoléculas, fazendo com que a substância se comporte como uma molécula grande apresentando tempos de relaxação longitudinal curtos e, portanto, sinais alargados. Por este motivo, não foi realizada quantificação de tal metabólito.

A cafeína, por sua vez, foi monitorada apenas no líquido (onde os teores de açúcares são reduzidos), devido à superposição de seus sinais com os dos carboidratos.

Mais uma vez vale ressaltar o baixo teor de ácidos orgânicos para a variedade TSA 654, o que já era esperado tendo em vista que essa variedade apresentou menores teores de açúcares e, portanto, menor potencial para fermentação. Além disso, o teor de cafeína para essa variedade também se apresentou menor se comparados com as demais variedades.

Tabela 4. Análise quantitativa por RMN de ^1H de extratos aquosos das sementes de *Theobroma cacao*, monitorando ácidos orgânicos, etanol e cafeína durante o processo de fermentação, secagem e líquido (mg.g $^{-1}$).

Amostras	Ácido acético					Ácido láctico					Ácido succínico				Etanol	Cafeína
	48 h	96 h	144 h	Secas so sol	Liquor	48 h	96 h	144 h	Secas so sol	Liquor	48 h	96 h	144 h	Secas so sol	48h	Liquor
TSH 516	3,88	11,8	6,27	3,68	2,87	2,38	0,57	0,73	0,47	0,51	0,36	0,34	0,26	0,20	5,56	1,08
TSH 565	3,21	22,6	10,7	6,94	3,47	3,07	0,76	1,14	1,05	ND	0,43	0,29	0,23	0,21	8,34	0,85
TSA 654	14,7	13,0	5,33	3,36	2,23	1,02	0,90	0,70	0,32	0,32	0,34	ND	0,17	0,11	7,17	0,55
TSA 656	7,21	11,5	6,79	3,82	2,95	2,90	1,04	1,56	1,11	0,65	0,40	0,24	0,22	0,27	5,05	0,86
TSH 774	6,99	7,29	8,05	7,60	3,27	0,67	1,47	0,63	0,79	0,51	0,42	0,31	0,16	0,22	2,37	1,07
TSA 792	3,26	19,3	8,18	3,52	5,32	1,36	0,91	0,73	0,92	0,57	0,45	0,32	0,18	0,11	6,35	1,24
TSH 1188	2,68	17,5	7,78	4,44	4,22	0,74	1,47	1,23	0,68	1,46	0,41	0,29	0,22	0,19	9,33	1,45
EET 397	7,44	11,8	6,28	4,28	1,47	4,98	0,80	2,14	1,40	0,19	0,33	0,31	0,38	0,30	5,66	ND
Cepec 42	3,02	17,5	11,5	8,68	0,54	1,37	0,33	1,38	0,80	0,76	0,02	0,15	0,23	0,21	7,69	1,27
Comum	2,27	15,2	7,91	6,56	3,62	0,74	0,75	0,86	0,68	0,84	0,40	0,23	0,20	0,21	8,27	1,17

Outra variedade que se destaca é a EET 397 por apresentar quantidade não detectável de cafeína no líquido enquanto as variedades CEPEC 42, TSH 1188 e TSA 792 apresentaram altos teores de cafeína e as restantes apresentaram teores de cafeína semelhantes ao do cacau comum.

Para aumentar a acurácia dos resultados obtidos foram realizados experimentos com padrão de cafeína, a qual foi quantificada em valores mais baixos de concentração ($149 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) se comparado com o valor de cafeína para a amostra TSA 654 ($159 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$, antes da conversão em mg.g^{-1}).

Contudo, a avaliação final da qualidade do chocolate produzido pelos clones necessita da análise sensorial, pois embora a quantidade e variedade de ácidos orgânicos tenham papel relevante no produto final, traços de outras substâncias não avaliadas podem ter uma atuação significativa nas propriedades degustativas.

4. Conclusões

A RMN de ^1H se mostrou uma técnica analítica eficiente, que permitiu o monitoramento simultâneo de oito metabólitos secundários endógenos do cacau ou produzidos na fermentação de dez clones de variedades diferentes de *Theobroma cacao* resistentes a *Moniliophthora perniciosa*.

Além disso, as análises foram em média quatro vezes mais rápidas do que aquelas realizadas por CLAE, técnica de referência para esse tipo de análise. No entanto, esse trabalho não tem o interesse de comparar a eficiência das duas metodologias, visto que a validação da metodologia utilizando RMN já foi realizada comparando com CLAE anteriormente.¹⁵

Concluiu-se ainda que sete variedades avaliadas de *Theobroma cacao* se mostraram muito similares a variedade comum, cultivada no estado da Bahia. As variações dos metabólitos secundários durante todo o processo fermentativo dessas variedades foram muito semelhantes, o que significa que tais clones tiveram o mesmo comportamento durante a fermentação e com base nisso, todos podem ser utilizados para produção de chocolate.

Duas variedades porem, se mostraram diferentes da variedade comum durante o processo fermentativo frente aos metabólitos analisados, sendo elas EET 397 e TSA 654 com menores teores de cafeína e a variedade TSH 1188 apresentou o maior teor de cafeína, sendo esta a variedade com melhor aceitação na análise sensorial realizada pela doutoranda Priscila Efraim.

Capítulo II

“Técnicas de RMN de ^1H Aplicadas às Interações

Proteínas - Ligantes”

1. Introdução

Interações intermoleculares entre ligantes e receptores macromoleculares participam da maioria dos processos biológicos³⁰ e estudar estas interações por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) permite detectar e quantificar as interações fracas sem a necessidade do conhecimento estrutural e funcional das macromoléculas.³¹ O monitoramento destas interações pode ser feito através dos deslocamentos químicos das macromoléculas, entretanto esta técnica é difícil sem marcação isotópica sendo que observar as propriedades dos ligantes (moléculas pequenas) é bastante atraente, pois as moléculas pequenas fornecem espectros de RMN mais simplificados e resolvidos. Mapear a região de interação entre o receptor (macromolécula) e o ligante (molécula pequena) é importante para interpretar a atividade catalítica, bem como mecanismos de inibição. Um bom exemplo disso é o caso da galantamina (**10**) (**Figura 10**), um alcalóide encontrado em plantas da família Amaryllidaceae, que apresenta diversas atividades biológicas, entre elas a inibição reversível da enzima acetilcolinesterase. Esta substância foi aprovada recentemente pelo “Food and Drug Administration” (FDA) para uso medicinal, sob o nome de Reminyl®, e está servindo de protótipo para desenvolvimento de novos fármacos anticolinesterásicos.³²

³⁰ Otting, G. *Curr. Op. Struct. Biol.* **1993**, 3, 760.

³¹ Meyer, B.; Peters T. *Angew. Chem. Int. Edn. Engl.* **2003**, 42, 864.

³² Viegas JR., C.; Bolzani, V. S.; Furlan, M. *Quim. Nova*, **2004**, 27, 655-660

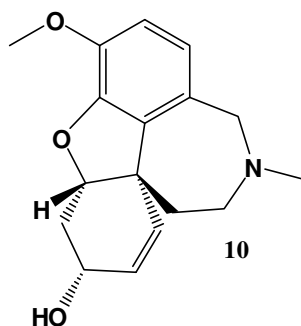


Figura 10. Estrutura da galantamina (**10**).

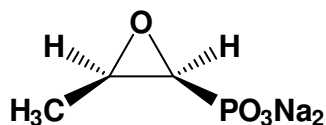
Outro grupo de compostos interessantes são os epóxidos, substâncias altamente reativas frente a metabólitos intermediários de DNA, RNA e proteínas, sendo assim classificadas como substâncias tóxicas, mutagênicas e cancerígenas.³³ Alguns organismos, contudo, exibem atividade epóxido hidrolase que catalisa a abertura do anel epóxido, formando o diol vicinal correspondente, que por sua vez não é tóxico.³⁴ A fosfomicina (**11**) (**Figura 11**) é um antibiótico que tem sua atividade atribuída ao epóxido presente em sua estrutura. Esse antibiótico age de forma a bloquear a biossíntese da parede celular dos microrganismos, inativando irreversivelmente a enzima MurA (piruvato transferase) através de uma alquilação da cisteína 115 do sítio ativo.³⁵ MurA é a proteína que catalisa a condensação de fosfoenolpiruvato (PEP) e UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GLC-Nac) para formar UDP-GlcNAc-enolpiruvato, o principal peptidoglicano da parede celular bacteriana.³⁶ Entender como ocorre a interação desses substratos com a parede celular dos microorganismos não resistentes é fundamental para a elucidação do mecanismo de ação do mesmo.

³³ a) Jerina, D. M.; Daly, J. W. *Science* **1974**, 185, 573-582. b) Wade, D. R.; Airy, S. C.; Sinsheimer, J. E. *Mutat. Res.* **1978**, 58, 217-223. c) Fretland, A. J.; Omiecinski, C. J. *Chem. Biol. Interact.* **2000**, 129, 41-59.

³⁴ Heetz, M. T.; Wang, L. W. *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2006**, 9, 295-299.

³⁵ a) Marquardt, J. L.; Brown, E. D.; Lane, W. S.; Haley, T. M.; Ichikawa, Y.; Wong, C. H.; Walsh, C. T. *Biochemistry* **1994**, 33, 10646-10651; b) Kim, D. H.; Lees, W. J.; Kempell, K. E.; Lane, W. S.; Duncan, K.; Wash, C. T. *Biochemistry*, **1996**, 35, 4923-4928.

³⁶ Chandrakala, B.; Elias, B. C.; Mehra, U.; Umaphathy, N. S.; Dwarkanath, P.; Balganes, T. S.; Desousa, S. M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, 45, 768-775.



11

Figura 11. Estrutura da fosfomicina (11).

Os métodos de RMN que permitem observar o epitopo de interação dos substratos com macromoléculas são: 1) Diferença da Transferência de Saturação (*Saturation Transfer Difference*, STD)^{37,38,39}; 2) Observação da Água do Ligante com Espectroscopia de Gradiente (*Water Ligand Observation with Gradient Spectroscopy*, WaterLOGSY)⁴⁰ e 3) Bombeamento de NOE (NOE pumping)^{41,42}, entre outros.

O experimento de STD^{37, 38, 39} como o nome já diz consiste na diferença entre dois experimentos. No primeiro experimento, denominado experimento em ressonância, satura-se o receptor (proteína) através de um trem de pulsos seletivos de rádio frequência (*rf*). Esses pulsos são aplicados na frequência de ressonância dos núcleos do receptor e não do ligante. A saturação se propaga através dos hidrogênios do receptor via um processo denominado difusão de spin, que é um mecanismo eficiente devido à grande massa molecular do receptor. A saturação é transferida aos compostos ligados por relaxação cruzada intermolecular para a interface receptor-ligante, durante um determinado tempo de mistura. As pequenas moléculas dissociam-se do receptor, mas permanecem num estado “*saturado*” devido aos seus longos tempos de relaxação quando livres. A **Figura 12** mostra a seqüência de pulsos

³⁷ Mayer, M.; Meyer, B. *Angew. Chem. Int. Edn. Engl.* **1999**, 38, 1784.

³⁸ Klein, J.; Meinecke, R.; Mayer, M.; Meyer, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 5336.

³⁹ Mayer, M.; Meyer, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 6108.

⁴⁰ Dalvit, C. J. *Biomol. NMR* **2000**, 18, 65.

⁴¹ Chen, A.; Shapiro, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 10258.

⁴² Chen, A.; Shapiro, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 414.

de um experimento de RMN de ^1H com transferência de saturação (RMN de ^1H – STD).

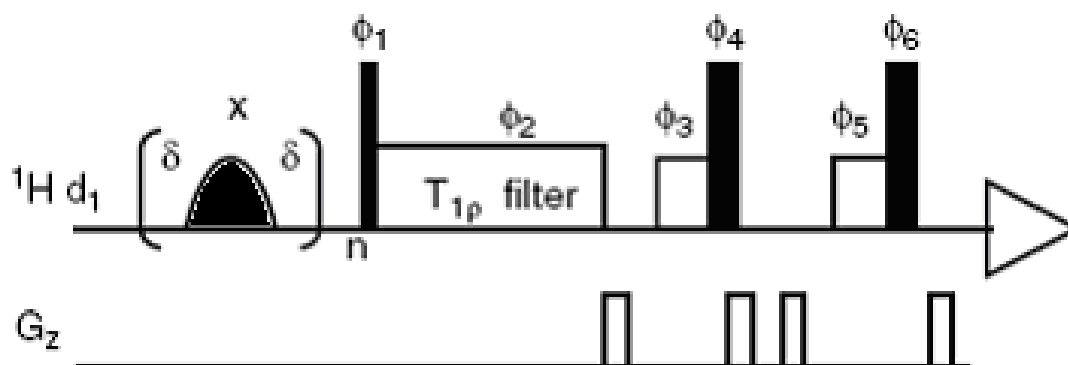
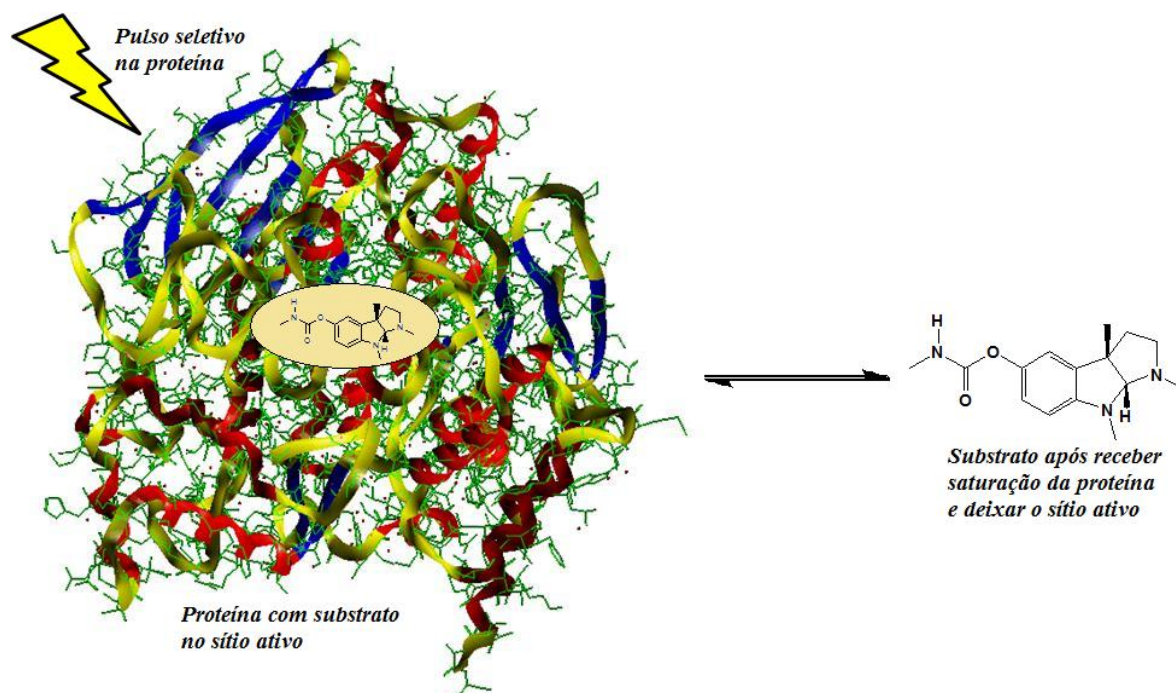


Figura 12. Sequência de pulsos do experimento de RMN de ^1H – STD com uma sequência adicional WATERGATE para eliminar sinal residual de HDO.

Logo, realiza-se um segundo experimento, denominado experimento fora de ressonância, no qual um trem de pulsos de radiofrequência (*rf*) idêntico ao primeiro é aplicado fora da faixa espectral. A subtração desses dois experimentos fornece um espectro com apenas os sinais dos hidrogênios dos ligantes que interagiram com o receptor.^{5,31} No experimento em ressonância as proteínas são irradiadas em torno de -0,50 ppm, pois normalmente os ligantes não possuem sinais nessa região, enquanto que as proteínas maiores possuem. Pulsos seletivos são empregados para excitar os sinais da proteína. O **Esquema 1** demonstra o que acontece no experimento.



Esquema 1. Representação esquemática do experimento de STD. Quando a proteína torna-se saturada, os ligantes que estão ligados a ela tornam-se saturados também.

Os métodos citados acima fornecem a interação dos ligantes isolados e em competição, entretanto para sondar um conjunto de ligantes atuando num mesmo sítio ativo é necessário utilizar outras metodologias, uma delas é INPHARMA⁴³. Esta nada mais é que um espectro de RMN de 2D do tipo NOESY obtido para sistemas com K_D (constante de dissociação) na faixa de micromol/litro a milimol/litro. Nestes casos a informação passa de um ligante para a macromolécula e para outro ligante através de uma relaxação entrecruzada. Assim os sinais de correlação entre dois ligantes distintos significam um compartilhamento de sítio ativo.

Finalmente para se obter o valor da constante de dissociação aparente (K_D ou K_{int}) é necessário realizar experimentos adicionais tais como difusão

⁴³ Sanchez-Pedregal, V. M.; Reese M.; Meiler J.; Blommers M. J. J.; Griesinger C.; Carlomagno T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 4172-4175.

(diffusion ordered spectroscopy, DOSY), obtenção de tempos de correlação τ_c e/ ou medidas de T_1 seletivos ($T_{1\text{sel}}$) com o ligante e a proteína.⁴⁴ Portanto, estas técnicas fornecem informações complementares referente às interações proteína/ligantes.

É conhecido que macromoléculas relaxam mais rapidamente que moléculas pequenas.⁵ Nesse contexto, quando ocorre uma complexação entre uma proteína e um ligante, este adquire características semelhantes à macromolécula, tal como, tempo pequeno de relaxação. Monitorando, portanto, esse fenômeno é possível avaliar a interação entre substrato e proteína. Uma das formas de se avaliar essa interação é utilizando a medida de tempo de relaxação spin-rede, ou relaxação longitudinal seletiva ($T_{1\text{sel}}$), pois para moléculas pequenas ($\omega_0\tau_c < 1$, entre 0 e 700 g mol^{-1}) T_1 é maior ou igual a T_2 .⁴⁴ Essa técnica, denominada inversão-recuperação²⁵, consiste em excitar seletivamente com um pulso de 180° , o sinal relativo ao hidrogênio que apresenta maior interação com a proteína seguido de um pulso de 90° com um intervalo variável entre eles. Os pulsos têm a mesma fase, de forma que inicialmente se obtêm espectros com sinais negativos, apresentando intensidades menores a medida que aumenta o intervalo entre os pulsos. Quando tal intervalo for igual a T_1 ($1,44^{-1}$) a resultante do vetor da magnetização macroscópica em $-z$ será nula no instante em que o pulso de 90° for aplicado. Portanto, o espectro obtido nestas condições não apresentará nenhum sinal. A vantagem de utilizar excitação seletiva no lugar de pulsos duros é que os efeitos de relaxação cruzada ocasionados pela presença de spins excitados nas proximidades do sistema de spins em questão são

⁴⁴ Delfini, M; Cocco, M. E.; Piccioni, F.; Porcelli, F.; Borioni, A.; Rodomonte, A.; Giudice, M. R.; *Bioorg. Chem.* **2007**, 35, 243-257.

anulados, evidenciando apenas o efeito da complexação na relaxação do hidrogênio a ser analisado.

No entanto, na ocasião em que se tem uma mistura de macromolécula e substrato que se complexam, o T_1 observado é uma média ponderada do T_1 do substrato livre com o T_1 do substrato complexado (**Equação 2**). Os efeitos da complexação serão abordados em termos da taxa de relaxação spin-rede ($R=1/T_1$) ao invés de tempo de relaxação spin-rede (T_1) apenas para facilitar os cálculos.

$$R_{obs}^{sel} = p_{livre} R_{livre}^{sel} + p_{compl} R_{compl}^{sel} \quad \textbf{Equação 2.}$$

Na qual p_{livre} é a fração molar do ligante livre e p_{compl} é a fração molar do ligante complexado.

Como a concentração de enzima utilizada nestes experimentos é no mínimo cem vezes menor que a concentração de substrato, pode-se fazer a seguinte aproximação:

$$p_{livre} = 1 - p_{compl} \approx 1, \text{ logo } R_{obs}^{sel} - R_{livre}^{sel} = \Delta R^{sel} = p_{compl} R_{compl}^{sel}$$

Construindo um gráfico de $1/\Delta R^{sel}$ versus a concentração do ligante, é possível obter a constante K_{int} quando $1/\Delta R^{sel}=0$ (**Equação 3**)

$$\frac{1}{\Delta R^{sel}} = \left\{ \frac{1}{K_{int}} + [L] \right\} \frac{1}{R_{compl}^{sel} [P]} \quad \textbf{Equação 3.}$$

De forma que ΔR^{sel} é a variação na taxa de relaxação spin-rede entre as formas livre e complexada, R_{compl}^{sel} é a taxa de relaxação spin-rede da forma complexada, $[L]$ é a concentração de ligante, $[P]$ é a concentração da proteína

que é constante durante todo o experimento e K_{int} é a constante de dissociação aparente.⁴⁴

2. Objetivos

O objetivo desse capítulo foi comparar as interações da acetilcolinesterase com três alcalóides de plantas da família Amaryllidaceae (ambelina **13**, crinina **14** e fisostigmina **12**, **Figura 13**) utilizando técnicas de RMN, determinando K_{int} e epitopo de ligação dos mesmos com a proteína, utilizando para tanto RMN de ^1H – STD e medidas de $T_{1\rho}$. Em um segundo momento, verificar o tipo de interação da estrutura **11** [ácido L-(cis)-1,2-epoxipropilfosfonico] com microorganismos resistentes e não resistentes à sua atividade biológica utilizando RMN de ^1H – STD.

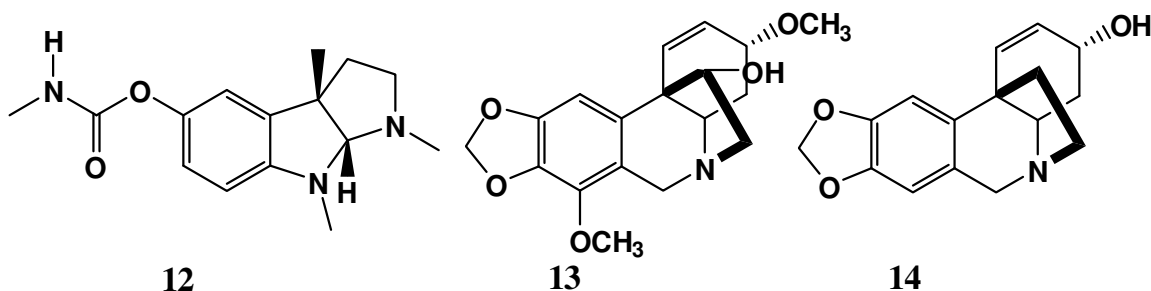


Figura 13. Estruturas dos alcalóides colinesterasicos de Amaryllidaceae.

3. Resultados e discussão

3.1. Inibição de acetilcolinesterase

A fisostigmina, um dos alcalóides utilizados nesse trabalho, é comercial. Os demais alcalóides (crinina e ambelina) foram isolados e elucidados estruturalmente por Maria do Socorro S. Silva, durante a realização de sua tese de doutorado, orientada pela professora Doutora Raquel Marques Braga do Instituto de Química da UNICAMP.

O epitopo de ligação de **12** foi determinado utilizando STD³⁹ numa solução de acetilcolinesterase $6,96 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ (SIGMA-ALDRICH) contendo $1,92 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ de ligante em solução tampão fosfato pH=8.0 (D_2O). A **Figura 14** mostra o epitopo de ligação da fisostigmina com a proteína, com valores observados de nOe e normalizados tomando o valor do hidrogênio com maior interação como 100%, além dos espectros de RMN de ^1H (STD) com saturação fora de ressonância e a diferença entre os experimentos fora de ressonância e em ressonância. O número de ciclos foi otimizado variando entre 50, 100 e 150 ciclos. O valor de 100 ciclos apresentou melhor resultado. Da mesma forma o tempo de mistura foi otimizado para 10 ms, resultando no desaparecimento total do sinal da proteína.

A fim de aumentar a credibilidade dos resultados obtidos para o epitopo de ligação entre fisostigmina e acetilcolinesterase medido por RMN de ^1H (STD) foi realizado um cálculo modelagem molecular ou “docking” molecular para o sistema fisostigmina – acetilcolinesterase, utilizando o programa

Autodock 4.0⁴⁵, e a estrutura da enzima isolada de *Electrophorus electricus* (mesma enzima usada no experimento de RMN de ^1H - STD). A estrutura do alcalóide passou por uma otimização computacional com cálculos de frequência, realizada pelo programa Gaussian 03⁴⁶, com nível de teoria B3lyp/aug-cc-pvdz. O cálculo do “docking” molecular foi realizado com um *grid* de 126 Å³ (valor máximo a ser utilizado), com uma resolução de 0,28 Å. O número de estruturas avaliadas foi 100 e o número de avaliações de energias foi de um milhão para cada estrutura avaliada.

Os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima (histidina 447, glutamato 202 e serina 203), além do triptofano 86, foram deixados livres durante o cálculo para que pudesse assumir a conformação mais estável apresentando um menor valor de energia para o sistema.

Todas as etapas teóricas foram feitas pelo Dr. Cleverson C. Bocca, o qual realiza seu pós-doutorado no Instituto de Química da UNICAMP sob supervisão do Professor Dr. Roberto Rittner Neto.

Os cálculos de “docking” fornecem além da forma que o substrato encontra-se no sítio ativo da enzima, interações do tipo ligação de hidrogênio que são de extrema importância para a estabilização do sistema. Além disso, é possível calcular as distâncias de qualquer átomo do substrato com quaisquer

⁴⁵ Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K. and Olson, A. J., *J. Comput. Chem.* **1998**, 19, 1639-1662.

⁴⁶ Gaussian 03, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2004**.

átomos da enzima, desde que este esteja dentro da grade (*grid*), uma espécie de caixa que delimita as regiões consideradas no cálculo.

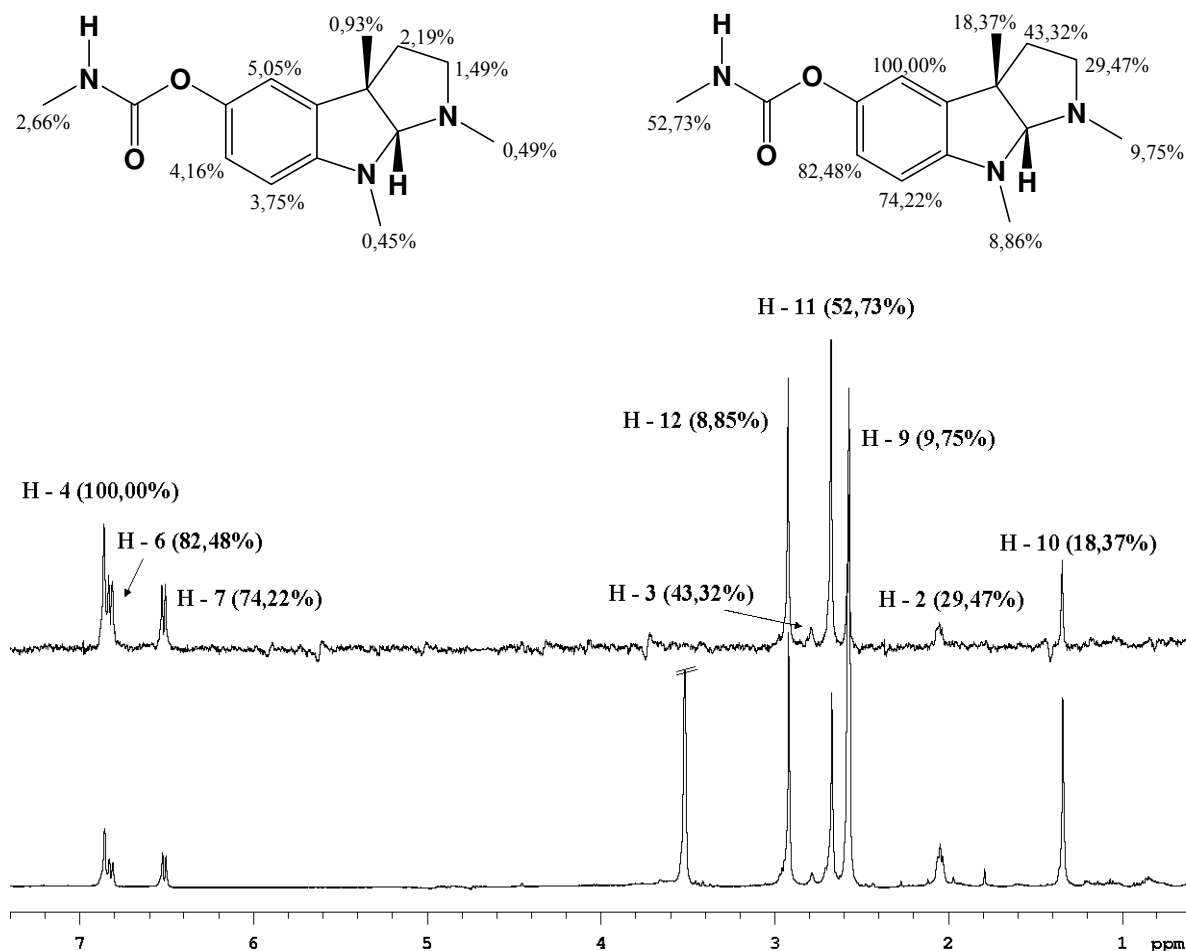
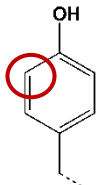
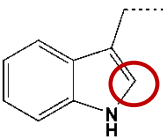
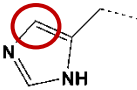
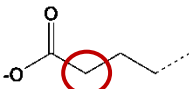
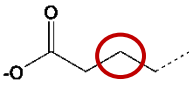
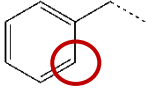


Figura 14. Espectro de RMN de ^1H – STD (499,8828 MHz, [tampão fosfato] = 1mmolL^{-1} , pH=8,0, $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 25°C e tempo de saturação = 2,05 s) para uma solução de acetilcolinesterase com fisostigmina (**12**). (a) diferença entre os experimentos “em ressonância” e “fora de ressonância”; (b) experimento “fora de ressonância”. Acima estão demonstradas duas estruturas da fisostigmina. Uma delas com os valores de nOe observados enquanto que a outra mostra o epitopo normalizado de ligação do alcalóide com acetilcolinesterase.

Na **Tabela 5** estão apresentados os valores das distâncias calculadas entre os hidrogênios da fisostigmina (**Figura 15**) e alguns hidrogênios dos resíduos de aminoácidos mais próximos ao alcalóide no sítio ativo da enzima, conforme apresentado na **Figura 16**. A energia de estabilização pela complexação obtida através dos cálculos do “docking” molecular foi de -12,06 kcalmol⁻¹.

Tabela 5. Valores de distâncias entre a acetilcolinesterase e a fisostigmina (**12**) no sítio ativo, calculados por “docking” molecular.

		Distâncias entre os hidrogênios da fisostigmina (12) e resíduos de aminoácidos da acetilcolinesterase (Å)					
Resíduos de aa	Hidrogênios dos aas	H - 4	H - 6	H - 7	H - 11	H - 2	H - 3
Tirosina 337		3,8	4,8	4,8	5,6	3,4	3,1
Triptofano 86		3,7	6,0	6,4	4,9	6,0	4,5
Histidina 447		5,8	3,5	3,7	8,0	8,0	7,8
Glutamato 202		8,1	6,9	7,6	9,6	12,1	11,2
Glutamato 202		7,9	6,4	7,2	9,2	11,9	11,0
Serina 203		5,5	4,1	3,9	9,2	8,3	7,7
Fenilalanina 338		7,4	6,7	5,9	10,3	5,7	6,7
Somatória		42,2	38,4	39,5	56,8	55,7	52

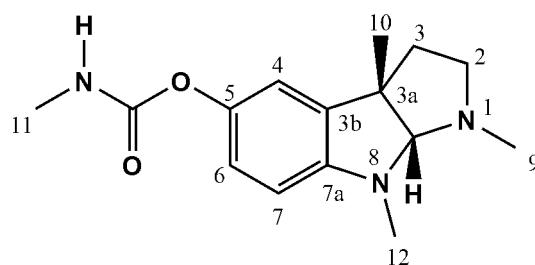


Figura 15. Estrutura da fisostigmina (**12**) devidamente numerada.

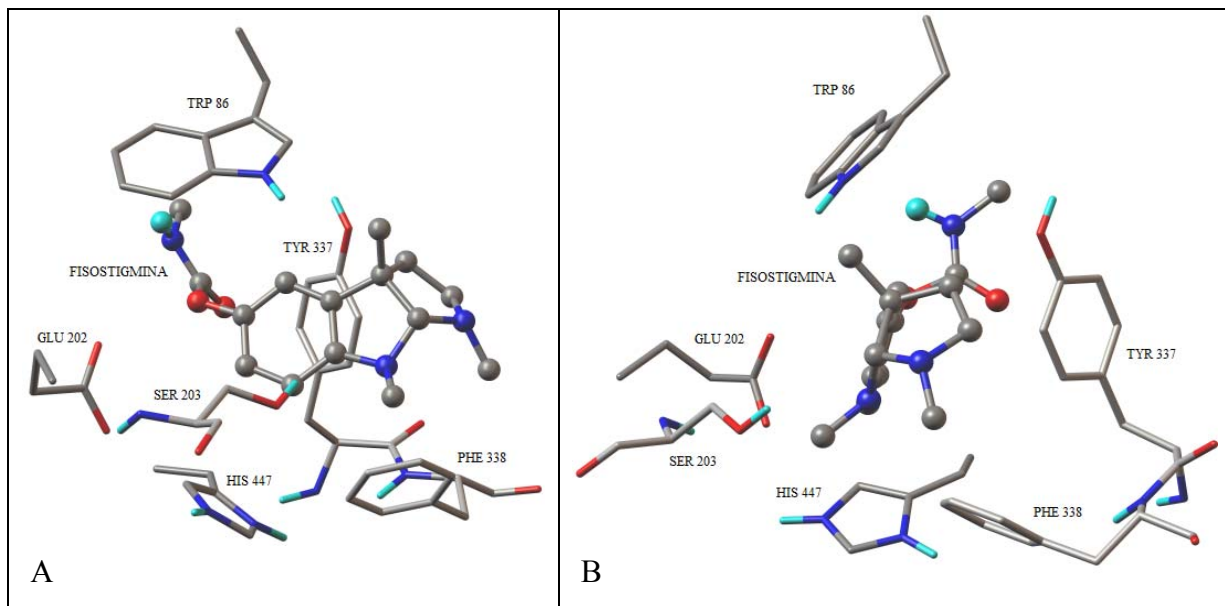


Figura 16. Disposição da fisostigmina frente aos resíduos de aminoácidos mais próximos a ela no sítio ativo da acetilcolinesterase. A) Imagem frontal; B) Imagem lateral.

Avaliando a somatória das distâncias dos resíduos de aminoácidos da acetilcolinesterase e os hidrogênios do alcalóide, é possível notar distâncias menores entre a porção aromática deste se comparado com os demais hidrogênios da molécula, o que é perfeitamente justificado se tomarmos por base o fato do efeito Overhouser nuclear (nOe) observado no experimento de RMN de ^1H (STD), está diretamente relacionado com a relaxação e esta

depende inversamente da distância entre os núcleos elevada a 6^a potência ⁴⁷. Isso resulta em valores maiores de nOe para distâncias menores entre núcleos.

O epitopo de ligação de **13** foi determinado utilizando STD³⁹ numa solução de acetilcolinesterase $6,96 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ (SIGMA-ALDRICH) contendo $6,75 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ de ligante em solução tampão fosfato pH=8.0 (D_2O). Os resultados das análises de RMN para a interação entre a ambelina com acetilcolinesterase estão na **Figura 17**, bem como o epitopo de ligação do alcalóide.

Da mesma forma, foi determinado o epitopo de ligação do alcalóide **14** com a acetilcolinesterase. A concentração da enzima mais uma vez foi mantida igual a dos experimentos anteriores e a concentração do alcalóide desta vez foi de $4,55 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$. O epitopo de ligação entre a crinina e acetilcolinesterase está na **Figura 18**, juntamente com os espectros de RMN de ^1H (STD).

⁴⁷ Derome, A. E.; Modern NMR Techniques for Chemistry Research. **1987**. Ed. Pergamon Press, Oxford – England , pgs 98-105.

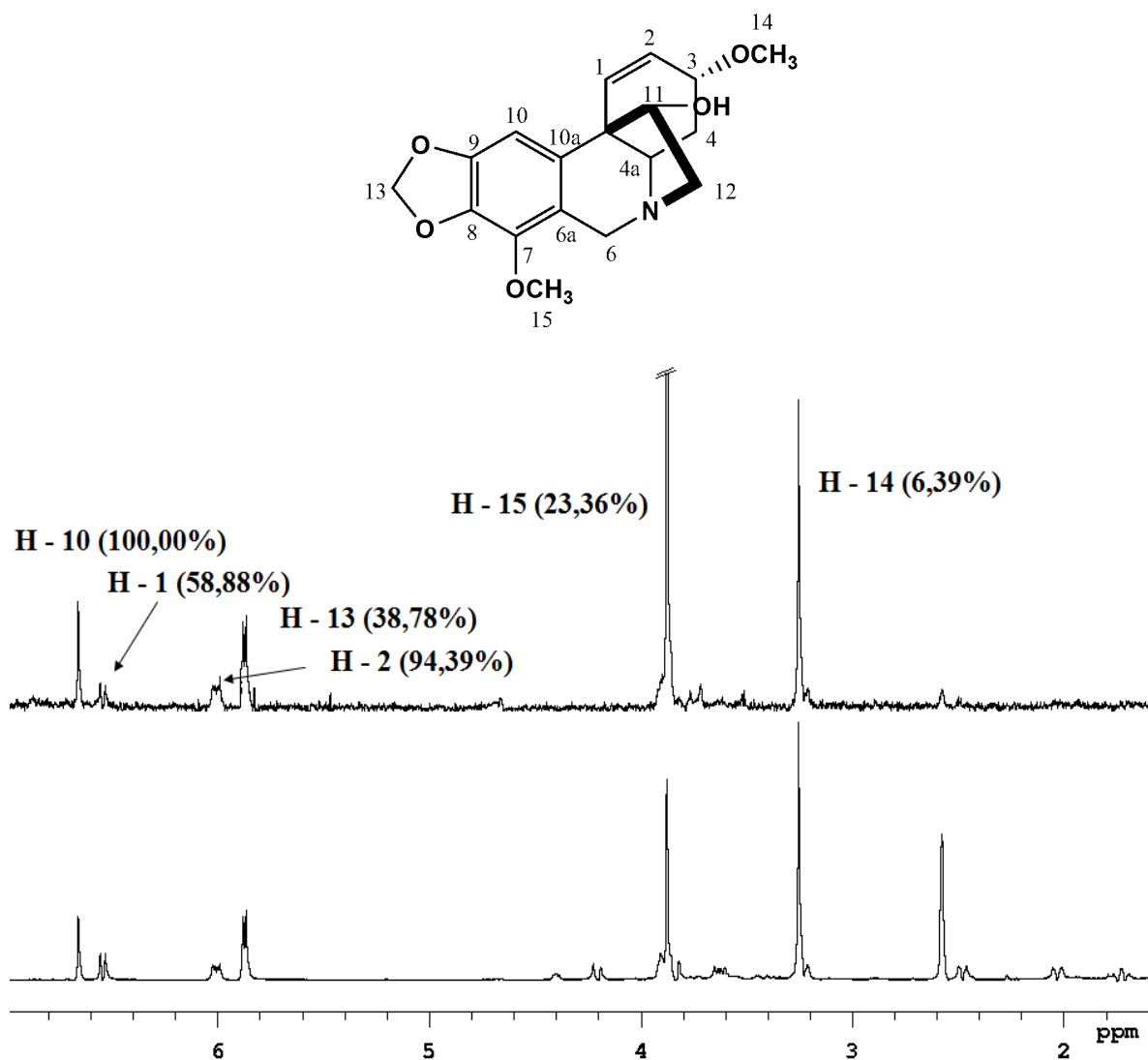


Figura 17. Espectro de RMN de ^1H – STD (499,8828 MHz, tampão fosfato pH=8,0, 1 mmolL $^{-1}$, D $_2$ O/DMSO, 25° C e tempo de saturação = 2,05 s) para uma solução de acetilcolinesterase com Ambelina (**13**). (a) diferença entre os experimentos “em ressonância” e “fora de ressonância”; (b) experimento “fora de ressonância”. Acima está apresentada uma estrutura da Ambelina com a devida numeração dos hidrogênios.

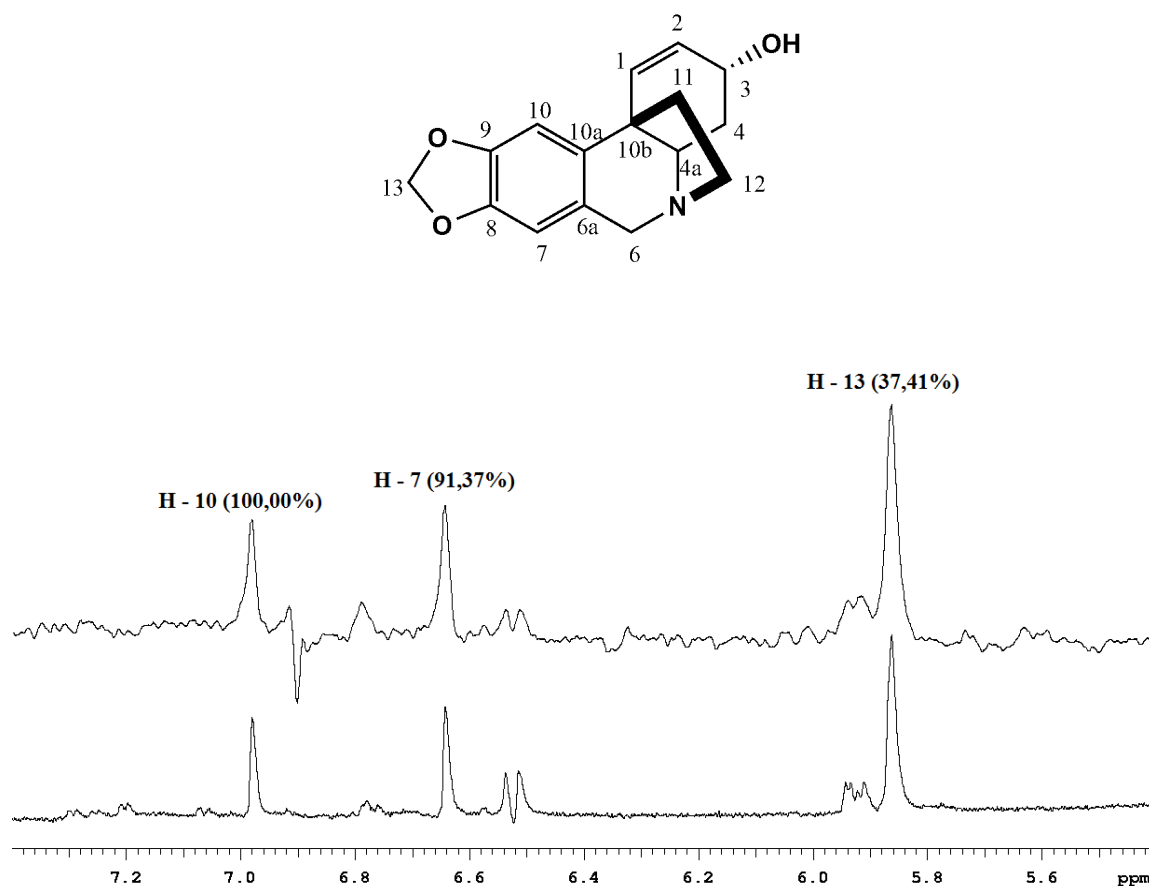


Figura 18. Espectro de RMN de ^1H – STD (499,8828 MHz, tampão fosfato pH=8,0, 1 mmolL $^{-1}$, D $_2$ O/DMSO, 25° C e tempo de saturação = 2,05 s) para uma solução de acetilcolinesterase com Crinina (**14**), (expansão de 5,40 a 7,40 ppm). (a) diferença entre os experimentos “em ressonância” e “fora de ressonância”; (b) experimento “fora de ressonância”. Acima está apresentada uma estrutura da Crinina com a devida numeração dos hidrogênios.

Apenas a região dos hidrogênios aromáticos e o grupo metilenodioxí da crinina permitiram que o epitopo fosse calculado com confiabilidade. Os demais sinais do espectro de RMN de ^1H relativos aos outros hidrogênios da molécula ficaram muito alargados não podendo ser diferenciados, ou apresentaram interações muito pequenas com a enzima resultando em sinais próximos ao do ruído, impossibilitando a avaliação dos mesmos.

Uma vez conhecido o epitopo de ligação dos alcalóides em questão deu-se início à determinação da constante de dissociação aparente (K_{int}) para a fisostigmina.

De acordo com a **Equação 4** o gráfico de $1/\Delta R^{sel}$ versus a concentração de fisostigmina, forneceu a constante K_{int} quando $1/\Delta R^{sel}=0$.

Foram realizadas quatro titulações sendo, $0,64 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$, $0,96 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$, $1,28 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ e $1,60 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ em relação ao ligante. Contudo, as medidas de T_1 para a concentração de $1,28 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ não foram coerentes, pois variação na taxa de relação longitudinal (ΔR^{sel}) encontrada para essa amostra foi maior que a encontrada para a concentração de $0,96 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, o que deveria ser contrário pois a quantidade de fisostigmina livre é maior na concentração de $1,28 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ apresentando dessa forma uma contribuição maior de R_{livre}^{sel} na R_{obs}^{sel} , o que diminui a diferença entre essas taxas. Mesmo com apenas três pontos, a curva apresentou um coeficiente de correlação bom ($R = 0,97453$), o que fez com que considerássemos esse resultado em nossas análises.

A **Figura 19** mostra o gráfico de $1/\Delta R^{sel}$ versus concentração de fisostigmina. As diferenças entre ΔR^{sel} vão diminuindo conforme aumenta a concentração de fisostigmina e, portanto, $1/\Delta R^{sel}$ aumenta. A equação para esta curva esta apresentada abaixo.

$$1/\Delta R^{sel} = 1,07857 + 0,95759 \cdot [\text{fisostigmina}] \quad \text{Equação 4.}$$

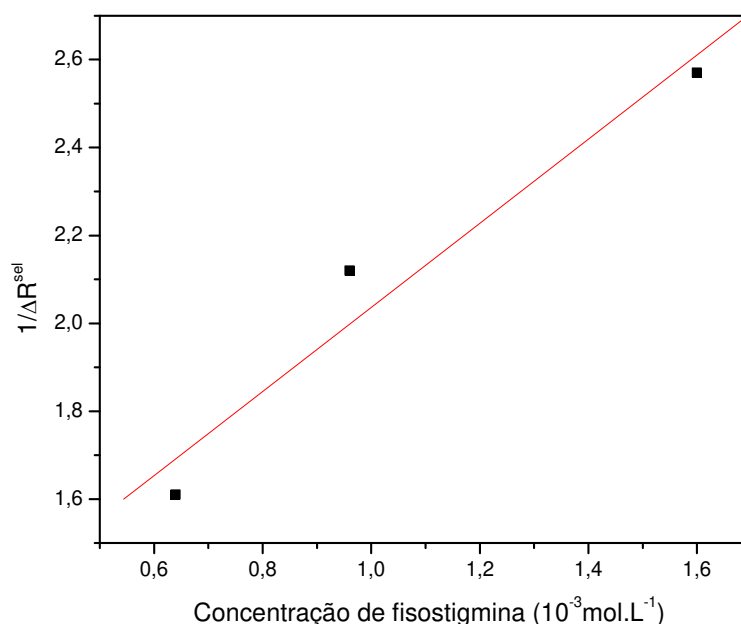


Figura 19. Curva para $1/\Delta R^{\text{sel}}$ versus concentração para fisostigmina (12).

O valor de K_{int} calculado foi de $887,8 (\text{molL}^{-1})^{-1}$ para a fisostigmina. Com relação à crinina e a ambelina, não foi possível aplicar essa mesma metodologia pelo fato desses alcalóides não serem solúveis em água a esse pH. A mudança de pH implicaria numa variação da atividade da enzima o que não seria recomendado.

A constante de interação (K_{int}) é dada em $(\text{molL}^{-1})^{-1}$, segundo Delfini⁴⁴, e está relacionada com a quantidade de ligante que se complexou com a proteína, sendo portanto, uma constante de associação K_A .



Onde P é a proteína, L o ligante e PL o complexo proteína – ligante.

Assim para obter os K_A da crinina e da ambelina relativos ao da fisostigmina fez-se o experimento de RMN de ^1H com transferência de

saturação – STD, utilizando uma mistura dos três alcalóides com a mesma concentração ($1,92 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) e acetilcolinesterase.

Na **Figura 20** estão apresentados os espectros de RMN de ^1H (STD) para a proteína e os três alcalóides, além das estruturas dos mesmos onde é possível observar os hidrogênios utilizados para se fazer a comparação. Foram obtidas as relações de 1:0,83:0,67 para fisostigmina:ambelina:crinina pelo experimento de STD e conseqüentemente transportando estas relações para os K_A destes alcalóides com acetilcolinesterase, pode se deduzir que as constantes de associação em competição são $887,8 (\text{molL}^{-1})^{-1}$, $736,9 (\text{molL}^{-1})^{-1}$, $594,8 (\text{molL}^{-1})^{-1}$ respectivamente. Os resultados obtidos por RMN - STD têm como respaldo experimentos de inibição realizados pela doutoranda Maria do Socorro S. Silva, utilizando uma outra metodologia, os quais apontam a fisostigmina como inibidor mais potente, o que é resultado de uma maior interação com a enzima e, portanto, maior valor de K_A .

Estes dados são inéditos e constituem uma contribuição para a literatura do gênero. Essa relação é válida desde que as constantes de velocidade para associação (k_1) sejam as mesmas para os três alcalóides.

Contudo, as interações proteínas – ligantes são descritas na literatura sempre em função das constantes de dissociação. O valor da constante de dissociação K_D corresponde ao inverso do valor da constante de associação K_A . Nesse sentido, a constante de dissociação para o sistema fisostigmina – acetilcolinesterase nas condições em que os experimentos foram realizados tem o valor de $1,13 \text{ mmolL}^{-1}$, enquanto que para ambelina e crinina os valores são de $1,36$ e $1,69 \text{ mmolL}^{-1}$, respectivamente.

Todavia, se considerarmos que os três alcalóides atuam no mesmo sítio da acetilcolinesterase, os valores com relação à interação obtidos referem-se à interação em competição, o que difere da interação individual desses

alcalóides com a enzima. Contudo, mesmo em competição, é possível afirmar que a fisostigmina tem maior interação que os demais substratos.

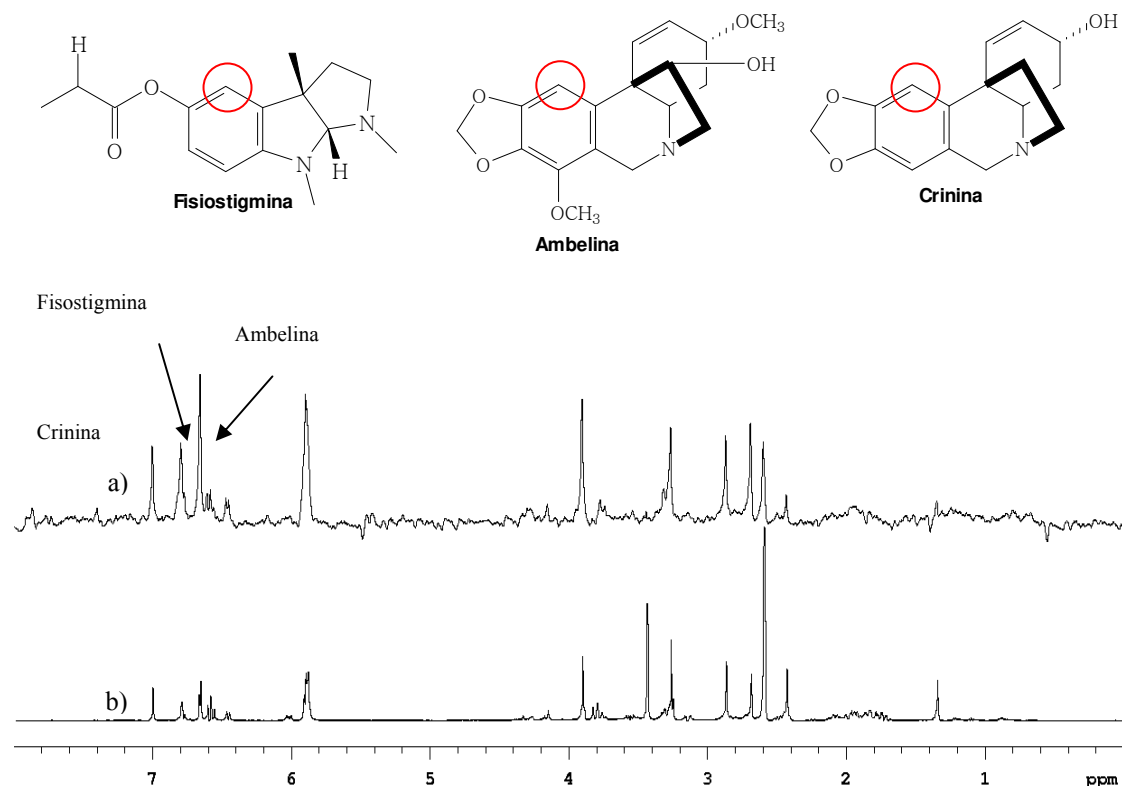


Figura 20. Espectro de RMN de ^1H – STD (499,8828 MHz, tampão fosfato pH=8,0, 1 mmolL^{-1} , $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 25°C e tempo de saturação = 2,05 s) para uma solução de acetilcolinesterase com crinina (**14**), ambelina (**13**) e fisostigmina (**12**). (a) diferença entre os experimentos “em ressonância” e “fora de ressonância”; (b) experimento “fora de ressonância”. Acima estão demonstradas as estruturas dos alcalóides e o hidrogênio utilizado para comparação.

3.2. Interação de fosfomicina na parede celular de microrganismos

De acordo com o mecanismo de ação da fosfomicina descrito anteriormente na introdução, as cepas de microrganismos resistentes são aquelas que produzem epóxido hidrolases que atuam sobre o epóxido do antibiótico **11** transformando-o num diol, impedindo a ligação covalente entre o antibiótico e a proteína de membrana bacteriana, MurA. Diferenciar as interações entre ligantes e os fosfolipídeos ou as proteínas de membranas de microrganismos resistentes e não resistentes não é trivial. Assim, foi proposto estudar a interação da fosfomicina com lipossomas de fosfolipídios (400 nm) que seriam modelos da parte lipídica das membranas. Portanto lipossomas de fosfolipídios com fosfomicina em solução tampão fosfato D_2O foram estudados por RMN de ^1H – STD, entretanto não observamos nenhuma alteração na amplitude dos sinais da fosfomicina (**11**) (**Figura 21C**), indicando que esta não interage com os lipossomas. A afinidade da fosfomicina com proteínas foi avaliada utilizando RMN de ^1H – STD e solução de fosfomicina e HSA (albumina de soro humano) como um modelo de proteína. Houve alteração da amplitude dos sinais da fosfomicina indicando a interação da fosfomicina com a macromolécula, como pode ser visualizado na **Figura 21E**, juntamente com o epítipo. O H-1 da fosfomicina é o hidrogênio mais fortemente ligado à proteína (100%, valor normalizado), seguido do H-2 (90%), indicando que estes hidrogênios estão saturados devido à sua estreita interação com HSA enquanto uma resposta mais fraca é observada para os hidrogênio metílicos (47%), indicando que esse grupamento está menos próximo das proteínas receptoras.

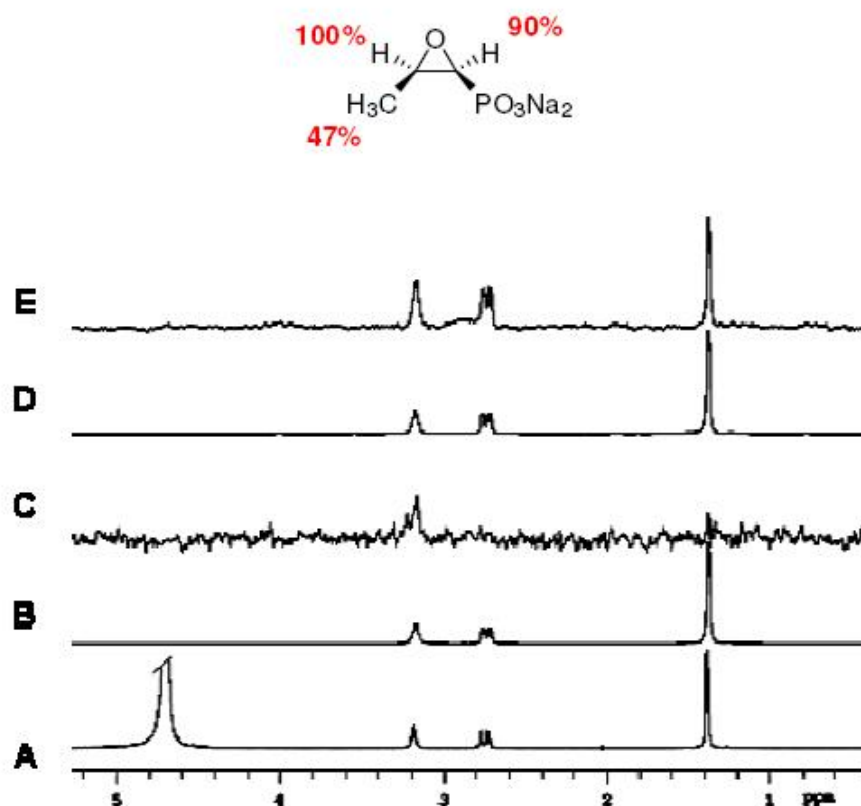


Figura 21. Espectros de RMN de ^1H –STD da fosfomicina (16). (499,8828 MHz, tampão fosfato, pH=7.4, 1 mmol.L $^{-1}$, D $_2$ O, 25° C e tempo de saturação = 2,05 s). A) Espectro de RMN de ^1H ; B) Espectro de STD “fora de ressonância” da fosfomicina em lipossoma; C) Diferença dos espectros de STD “em ressonância” e “fora de ressonância” para fosfomicina em lipossoma; D) Espectro de STD “fora de ressonância” da fosfomicina em HSA; E) Diferença dos espectros de STD “em ressonância” e “fora de ressonância” para fosfomicina em HSA. No topo, o epitopo de ligação da fosfomicina em HSA.

Motivados por esses dois experimentos de STD, um controle negativo (fosfomicina + lipossomas) e controle positivo (fosfomicina + HSA), fomos conduzidos a investigar melhor e caracterizar a interação da fosfomicina com cepas distintas de células bacterianas resistentes e não resistentes a fosfomicina. Para tanto foi necessário fazer uma triagem de microorganismos

para selecionar os resistentes e não resistentes ao antibiótico. Estes ensaios foram feitos pela Dra Cíntia Milagre a qual inoculou *Escherichia coli* CCT 5050, *Bacillus pumillus* CBMAI8, *Pseudomonas oleovorans* CCT 1969, *Samonella triphymurium* CCT 528, *Serratia liquefaciens* CCT 7262 em placas de Petri com agar nutriente (meio NB) e $0,83\text{g.L}^{-1}$ de fosfomicina. Após 24 h de incubação observou-se que *Serratia liquefaciens* (CCT 7262), foi resistente ao antibiótico crescendo neste meio (**Tabela 6, Figura 22**), portanto este microorganismo foi usado nos experimentos de RMN de ^1H - STD. Observou-se que as amplitudes dos sinais da fosfomicina não sofreram alteração indicando ausência de efeito nOe e portanto ausência de sinais no RMN – STD (**Figura 23E**), corroborando com a hipótese da presença de epóxido hidrolase produzida pela bactéria impedindo a inativação da proteína MurA pela interação da fosfomicina. Os sinais que aparecem na **Figura 23E** são referentes aos resíduos de substâncias encontradas no meio de cultura das células.

Este experimento isoladamente poderia ser contestado necessitando demonstrar que microrganismos não resistentes interagiriam com a fosfomicina levando a morte dos mesmos. No experimento de triagem de atividade foi visto que o crescimento de *Escherichia coli* era afetado pela presença da fosfomicina e, portanto ideal para observar as diferenças de interação da fosfomicina com células bacterianas não resistentes, por RMN.

O experimento de RMN de ^1H - STD com células de *E. coli* e fosfomicina⁴⁸ **Figura 23C**, indica que a fosfomicina interage fortemente com *E. coli* (H-1 100% e H-2 94%) sendo que os hidrogênios da metila possuem uma interação mais seletiva com as células de *E. coli* (71%) do que com HSA (47%).

⁴⁸ Smit, M. S.; Labuschagne, M. Diversity of Epoxide Hydrolase Biocatalyst. *Curr. Org. Chem.* **2006**, *10*, 1145-1161.

A partir deste estudo preliminar pudemos concluir que microorganismos que induzem sinais da fosfomicina nos experimento de RMN de ^1H -STD seriam as espécies não resistentes e nestas a fosfomicina permeia a membrana bacteriana através de proteínas carreadoras num processo em equilíbrio rápido onde não ocorre ligação química. Uma vez permeada a membrana a fosfomicina encontra a proteína MurA ocorrendo a inativação por ligação covalente num processo mais lento. Estas conclusões levam em consideração que a interação com célula bacteriana vista por RMN é semelhante à interação com HSA e distinta da interação com lipossomas.

Estamos consciente que um maior número de experimentos deverão ser realizados para confirmar tal fato mas temos plena consciência de que estes fatos contribuíram para o melhor entendimento da ação da fosfomicina.

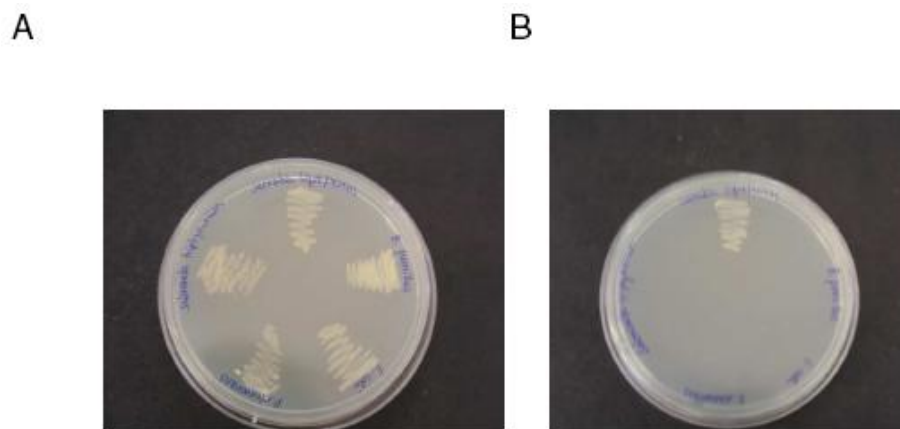


Figura 22. Seleção de atividade epóxido hidrolase. A) Controle positivo: Agar contendo meio NB e B) Agar contendo meio NB e $0,83\text{g.L}^{-1}$ de fosfomicina mostrando que apenas *Serratia liquefaciens* é resistente e apresenta atividade epóxido hidrolase.

Tabela 6. Avaliação de resistência à fosfomicida em microrganismos.

Microorganismo	Coleção/código	Resistência à fosfomicina
<i>Escherichia coli</i>	CCT 5050	-
<i>Bacillus pumillus</i>	CBMAI8	-
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	CCT 1969	-
<i>Samonella triphymurium</i>	CCT 528	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	CCT 7262	+

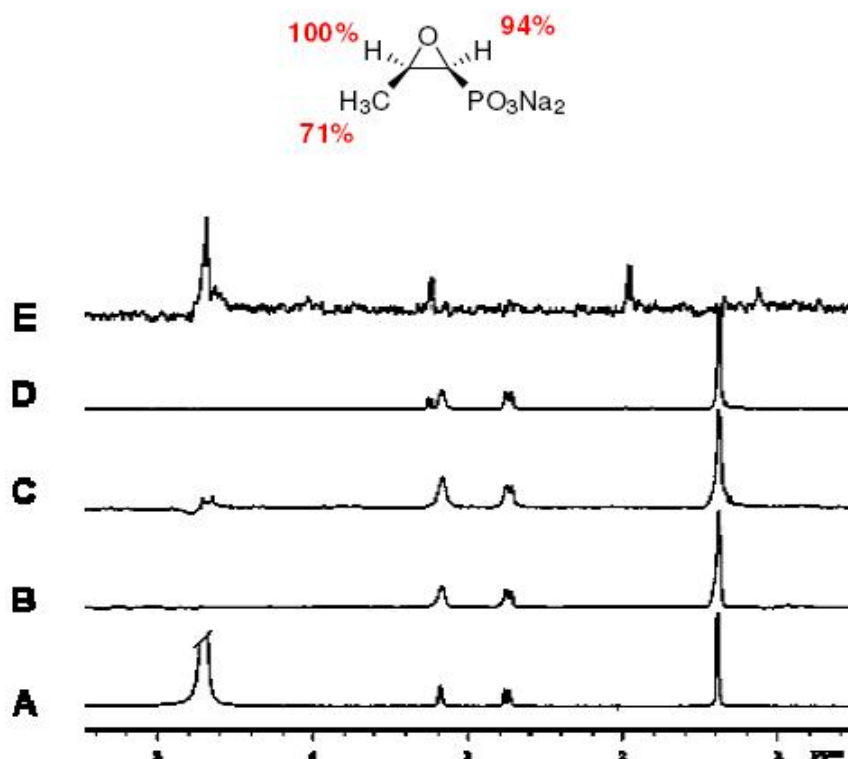


Figura 23. Espectros de RMN de ^1H STD (499,8828 MHz, tampão fosfato, pH=7.4, 1 mmol.L $^{-1}$, D $_2$ O, 25° C e tempo de saturação = 2,05 s). A) Espectro de

RMN de ^1H ; B) Espectro de STD “fora de ressonância” da fosfomicina na presença de *E. coli*; C) Diferença dos espectros de STD “em ressonância” e “fora de ressonância” para fosfomicina na *E. coli*; D) Espectro de STD “fora de ressonância” da fosfomicina na presença de *Serratia liquefaciens*; E) Diferença dos espectros de STD “em ressonância” e “fora de ressonância” para fosfomicina na presença de *Serratia liquefaciens*. No topo, o epitopo de ligação da fosfomicina em *E. coli*.

4. Conclusões

Com relação à inibição de acetilcolinesterase com alcalóides de plantas da família Amaryllidaceae, foi possível observar o epitopo de interação da fisostigmina com a enzima, o que é de fundamental importância para a investigação e comprovação do mecanismo de atuação do inibidor. Além disso, a técnica de *TI* possibilitou obter a constante de dissociação aparente desse alcalóide com a acetilcolinesterase, mas não se pôde utilizar do mesmo experimento para a crinina e ambelina devido às questões de solubilidade. Contudo, por comparação, foram determinadas as constantes de dissociação relativas da crinina e ambelina em competição com a fisostigmina utilizando técnica de RMN de ^1H - STD.

No que diz respeito à interação de fosfomicina com as proteínas de membrana de células bacterianas, pôde-se concluir que os experimentos de RMN de ^1H – STD foram completamente coerentes frente à ação epóxido hidrolase da *Serratia liquefaciens*, não apresentando qualquer interação da fosfomicina com as membranas das células. Por outro lado, quando o experimento foi realizado com *E. coli* o resultado foi exatamente oposto, corroborando com a toxicidade da fosfomicina para este microrganismo. É preciso salientar ainda que a utilização de lipossoma e HSA como modelos de macromoléculas foi crucial para o melhor entendimento da ação da fosfomicina na parede celular.

Parte experimental: Capítulo I

Parte experimental

Preparo de amostras:

Sementes de *Theobroma cacao* (50 kg) foram fermentadas por seis dias em caixas de madeira perfuradas (50 centímetros x 50 centímetros x 50 cm)¹¹. A fermentação foi acompanhada extraindo amostras nos tempos 0, 48, 96 e 144 h de fermentação. Após 144 h, as amêndoas foram secas ao sol até chegarem a um teor de umidade em torno de 8% e posteriormente foram torradas. Os extratos aquosos de cacau utilizados para os experimentos de RMN foram obtidos moendo 2 g de amêndoas em um moinho analítico refrigerado (IKA - UNIVERSAL) para evitar a volatilização de alguns componentes. Os metabólitos foram extraídos com 20 mL de água utilizando um agitador por 3 minutos. As amostras foram, então, filtradas através de papel Whatman n ° 1, de 45 milímetros e, em seguida, através do filtro Millipore de 20 mm. A umidade foi medida de acordo com a metodologia de Horwitz 31.1.03 com um equipamento Titrolina Alpha Shott, modelo TZ1282.⁴⁹ As amostras foram processadas por Priscila Efraim, do Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL de Campinas – SP colaboradora deste trabalho.

As amostras para os experimentos de RMN de ¹H foram preparadas com 200 mL do extrato aquoso de cacau e 400 mL de D₂O contendo 0,75 mmolL⁻¹ de d₄-trimetilsililpropionato de sódio (TPSA). Este último teve a dupla função de referência interna e padrão de quantificação.

⁴⁹ HORWITZ, W ed. AOAC Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 18^a ed., 2005.

Experimentos de RMN de ^1H :

Os experimentos foram realizados em um espectrômetro de RMN (Varian, INOVA-500), que opera com um campo magnético de 11,7 T, e equipado com uma sonda “ $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/^{31}\text{P}$ (^1H) 5 milímetros e gradiente de campo pulsado em z (PFG) Penta Probe” (mantida a 25 ° C) e um “software” VNMR 6.1c.

A princípio foi realizado a homogeneização do campo magnético no decorrer da amostra. O pulso de 90° para a sonda utilizada foi calibrado para o hidrogênio, realizando uma sequência de espectros com valores diferentes de largura de pulso, variando de 8,0 μs até 18,0 μs , numa taxa de 1,0 μs de acréscimo de um espectro para outro. Tomou-se o cuidado de deixar um intervalo de 10s entre os experimentos para não haver saturação do sinal. A ausência de sinal, resultado de um pulso de 180°, ocorreu entre os espectros cuja variação de largura de pulso foi de 16,0 a 17,0. Para refinar o valor da largura de pulso de 180°, uma nova sequência de espectros foi realizada, variando a largura de pulso entre 16,0 e 17,0 μs , numa taxa de 0,1 μs , obtendo como resultado o valor de 16,4 μs . Portanto, o pulso de 90° para essas amostras foi de 8,2 μs .

O sinal da água foi suprimido aplicando a sequência de pulsos “PRESAT”, do pacote “WATER” da Varian.⁵⁰ Os parâmetros de aquisição otimizados foram: tempo de espera entre as repetições foi de 18,0 s com base no valor médio de T_1 , obtido com a sequência PRESAT para saturação da água, tempo de aquisição (3,0 s), número de transientes ou de repetições variou de 8 a 32 de acordo com as amostras, largura espectral (12000 Hz). A

⁵⁰ Gray, G., VARIAN, Palo Alto and Hoffmann, E., VARIAN, Darmstadt: País, 1999.

saturação do sinal da água foi obtida através da irradiação seletiva da frequência do sinal de HDO (aproximadamente 4,68 ppm) por 18,0 s com uma potência de -17 dBm, considerando que a eficiência dessa na sonda tem coeficiente igual a 1. O preenchimento de zeros ampliou o número de pontos adquiridos de 64 k para 128 k durante o processamento e o decaimento livre da indução, o “FID”, foi multiplicado por uma função exponencial complexa do software VNMR J da Varian utilizando largura da linha igual a 0.3 Hz ou $\text{lb} = 0,3 \text{ Hz}$, para melhor resolução digital antes da transformada de Fourier.

Análises quantitativas de vários metabólitos (etanol, ácido acético, ácido láctico, ácido cítrico, succínico, frutose, glicose, sacarose e cafeína) foram realizadas simultaneamente pela primeira vez, selecionando um sinal sem sobreposições e comparando os valores das áreas dos picos com a área do pico de TSPA ($0,5 \text{ mmolL}^{-1}$).

As integrais foram obtidas por deconvolução dos picos. Para tanto, os sinais a serem deconvoluidos foram selecionados, delimitando os mesmos com um traço (*threshold*). Em seguida, a deconvolução foi visualizada através dos comandos “Main Menu”, “Analyze” e “Deconvolution”. Uma vez na área da deconvolução, foi necessário solicitar a utilização da listagem de picos selecionados anteriormente através do comando (na barra de comandos) “Use Line List”. Com base nessa listagem o comando “Fit” realiza os cálculos das áreas dos picos. O resultado obtido foi uma listagem com as frequências dos sinais utilizados, as larguras dos mesmos e a área referente a cada um dos sinais deconvoluidos.

Parte experimental: Capítulo II

Parte experimental

Preparo de amostras

As amostras dos alcalóides com acetilcolinesterase utilizadas nos experimentos foram realizadas em tampão fosfato pH = 8,0, sendo que primeiramente os alcalóides foram solubilizados em um pouco de DMSO e posteriormente em D₂O. Esse procedimento facilitava a solubilização das substâncias em D₂O. A fisostigmina se apresentou como alcalóide mais solúvel, sendo possível obter uma solução $1,92 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. A Ambelina se mostrou menos solúvel ainda, com concentração de $6,75 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, enquanto que a solução de Crinina apresentou concentração de $4,55 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, sendo o alcalóide menos solúvel. A concentração de acetilcolinesterase em todos os experimentos foi a mesma, $6,96 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

As células de microrganismos foram cultivadas pela Doutora Cintia Milagre em meio de cultura NB. Após cultivos, as células foram centrifugadas e para todos os microrganismos foram utilizados 15 mg de célula úmida. A concentração de fosfomicina para os experimentos foi de $10 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. No caso dos experimentos com HSA, a concentração da proteína foi de $90 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

Os lipossomas foram preparados a partir de uma solução estoque de fosfatilcolina de ovo em clorofórmio. Após evaporação total do solvente, os lipídeos foram solubilizados em 0,4 mL de tampão fosfato pH=7,4 (D₂O, 99,9%), formando lipossomas multilamelares. Para formação de lipossomas bilamelares, foi realizado extrusão da solução em questão, utilizando

membranas com poros de 400 nm de diâmetro. A concentração final de lipídeos foi de $5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

Experimentos de RMN de ^1H :

Os experimentos foram realizados em um espectrômetro de RMN (Varian, INOVA-500), que opera com um campo magnético de 11,7 T, e equipado com uma sonda “ $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/^{31}\text{P}$ (1H) 5 milímetros com gradiente de campo pulsado em z ,PFG , Penta Probe” (mantida a 25°C) e um “software” VNMR 6.1c.

A princípio foi realizado a homogeneização do campo magnético no decorrer da amostra. O pulso de 90° para a sonda utilizada foi calibrado, realizando uma sequência de espectros com valores diferentes de largura de pulso, variando de $8,0 \mu\text{s}$ até $18,0 \mu\text{s}$, numa taxa de $1,0 \mu\text{s}$ de acréscimo de um espectro para outro. A ausência de sinal, resultado de um pulso de 180° , ocorreu entre os espectros cuja variação de largura de pulso foi de $16,0$ a $18,0$. Para refinar o valor da largura de pulso de 180° , uma nova sequência de espectros foi realizada, variando a largura de pulso entre $16,0$ e $18,0 \mu\text{s}$, numa taxa de $0,1 \mu\text{s}$, obtendo como resultado o valor de $17,0 \mu\text{s}$. Portanto, o pulso de 90° para essas amostras foi de $8,5 \mu\text{s}$.

O sinal água foi suprimido aplicando a sequência de pulsos “PRESAT”, do pacote “WATER” da Varian⁵¹ e o deslocamento da frequência do transmissor (*tof*) foi anotado. Em seguida a frequência do transmissor foi deslocada para $0,50 \text{ ppm}$ (onde a macromolécula foi saturada). Para realização

⁵¹ Gray, G., VARIAN, Palo Alto and Hoffmann, E., VARIAN, Darmstadt: País, 1999.

do experimento de RMN de ^1H – STD, o qual já resulta na diferença entre os experimentos em ressonância e fora de ressonância alguns parâmetros precisam ser substituídos sobre um experimento de STD realizado anteriormente: colocar o deslocamento do transmissor (*tof*) encontrado anteriormente, digitar *satfreq=tof*, *selfrq=tof*, *selfrq=off set to*, *cycles1=100* (valor otimizado), *mix=0.010* (valor otimizado), *d1=1.5*, *pw=pw90*. Para saber quanto de incremento relativo cada sinal teve, é necessário realizar um experimento controle, da mesma forma que o anterior, contudo substituindo *selfrq=selfrq1* (frequência fora da janela espectral). Esse segundo experimento precisa ter a metade de repetições em relação ao primeiro experimento.

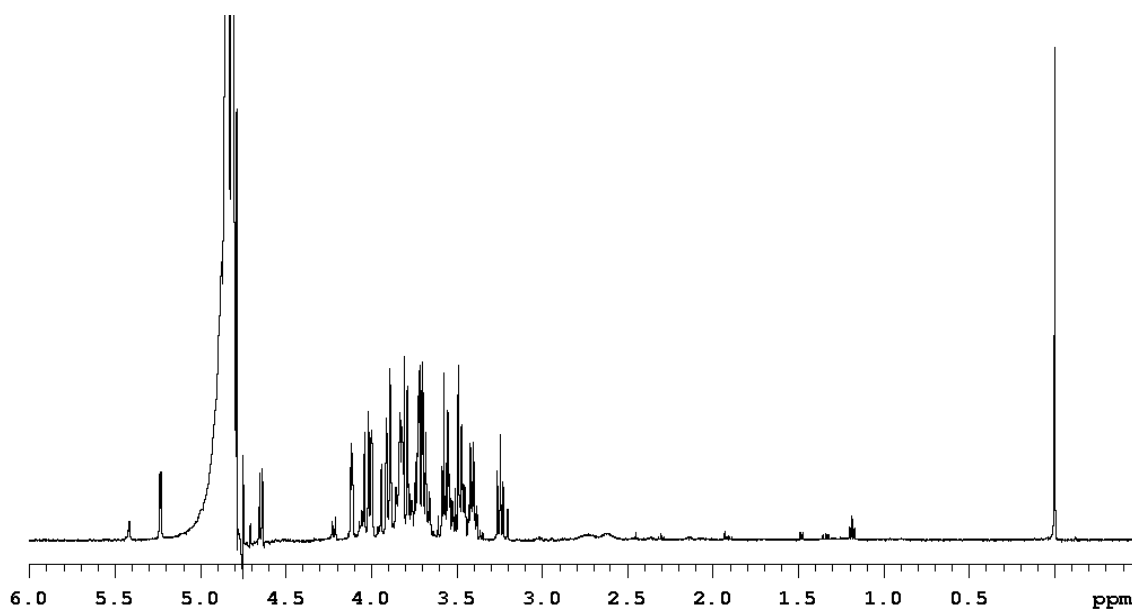
O preenchimento de zeros ampliou o número de pontos adquiridos de 64 k para 128 k durante o processamento e o decaimento livre da indução, o “FID”, foi multiplicado por uma função exponencial complexa do software VNMR J da Varian utilizando largura da linha igual a 0.3 Hz ou $\text{lb} = 0,3 \text{ Hz}$, para melhor resolução digital antes da transformada de Fourier. Os experimentos de RMN – STD e os experimentos controle precisam ser processados com a mesma escala vertical, “vs”. As áreas foram calculadas por deconvolução dos sinais, como descrito na parte experimental do Capítulo I. Os sinais obtidos no experimento de RMN – STD deve ser dividido pelo obtido pelo controle para cada pico, e posteriormente, normalizado.

Para realização das medidas de T_1 seletivo, primeiramente foi obtido um espectro de RMN de ^1H . Em seguida foi carregado o experimento de T_1 com o comando “dot1”, o qual gerou uma lista de dez espectros a serem realizados com os seguintes valores de tempo de espera entre os pulsos de 180° e 90° (d_2): $d_2=0,0625 \text{ s}$; $d_2=0,125 \text{ s}$; $d_2=0,25 \text{ s}$; $d_2=0,50 \text{ s}$; $d_2=1,00 \text{ s}$; $d_2=2,00 \text{ s}$; $d_2=4,00 \text{ s}$; $d_2=8,00 \text{ s}$; $d_2=16,00 \text{ s}$ e $d_2=32,00 \text{ s}$. O valor mínimo esperado foi estabelecido como 0,5 s e o valor máximo como 8, 0 s, com um tempo total

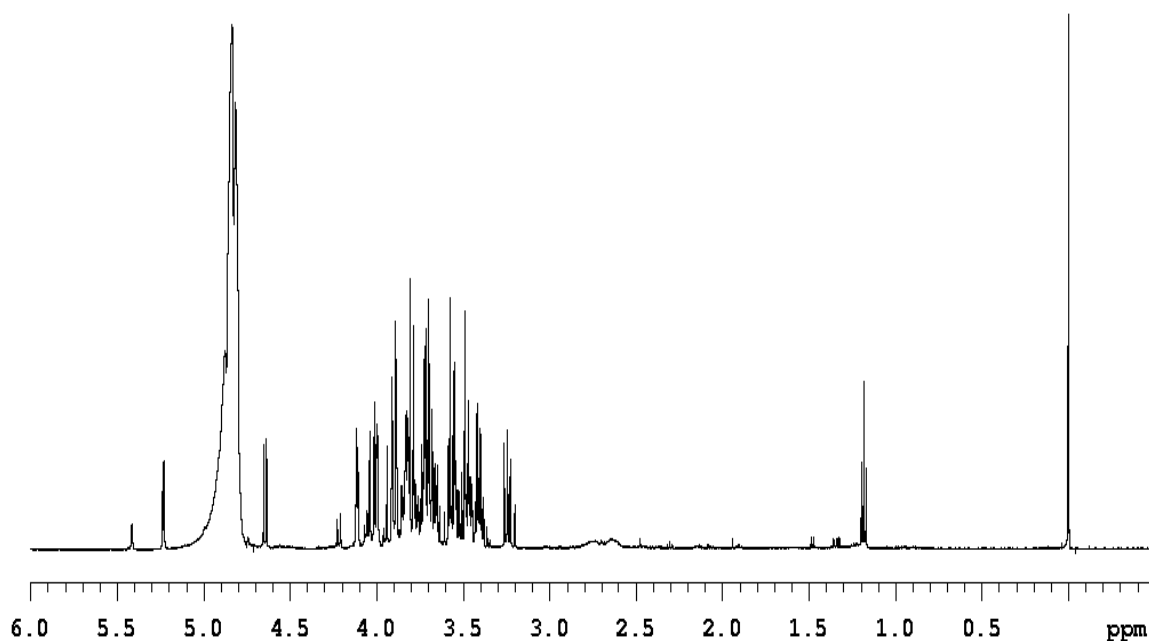
em horas que o experimento deveria levar de 0,1 h. Alguns parâmetros foram modificados, tais como: largura de pulso ($p_w=8,5$); largura de pulso de 90° ($p_{w90}=p_w$); número de acumulações ($n_t=1$); iniciar experimento (ga).

Após finalizado experimento, o cálculo do T_I se procedeu visualizando o ultimo espectro obtido com o comando “ds(8)”, selecionando os sinais para os quais os quais o T_I deveria ser calculado, e finalmente solicitando a realização do cálculo com o comando “fp dll t1s”.

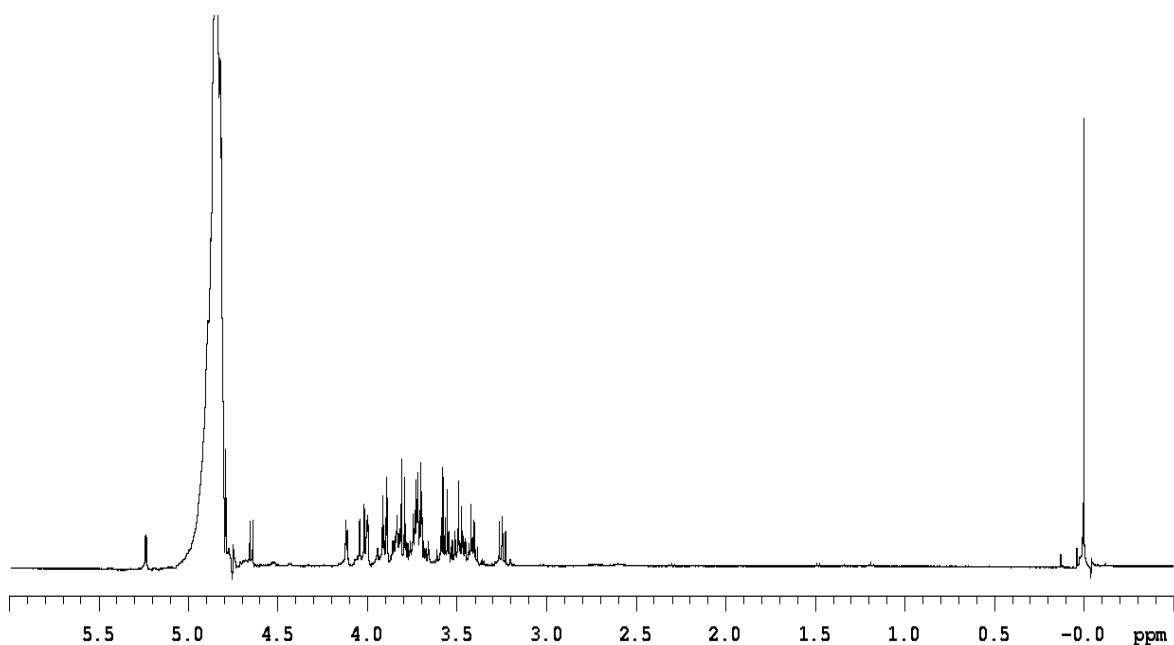
Anexos



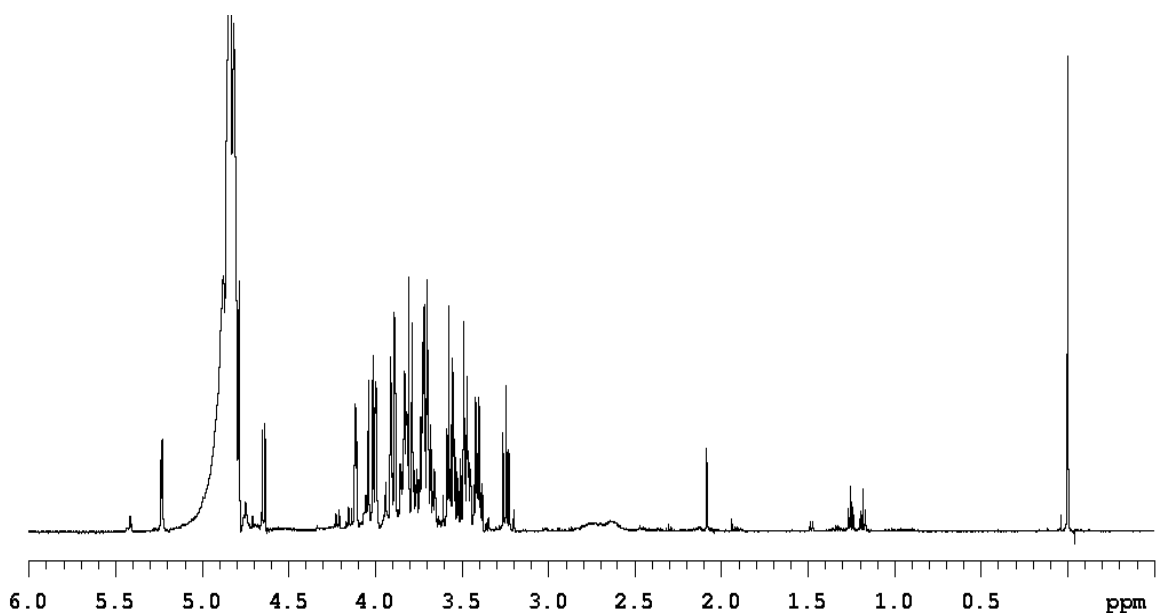
E 1: Espectro de RMN de ¹H (499,8828 MHz; D₂O; δ_{TPSA} 0,00 ppm; TPSA = 0,50x10⁻³ mol.L⁻¹, 25° C) de extrato aquoso da variedade 516 de *Theobroma cacao* antes da fermentação.



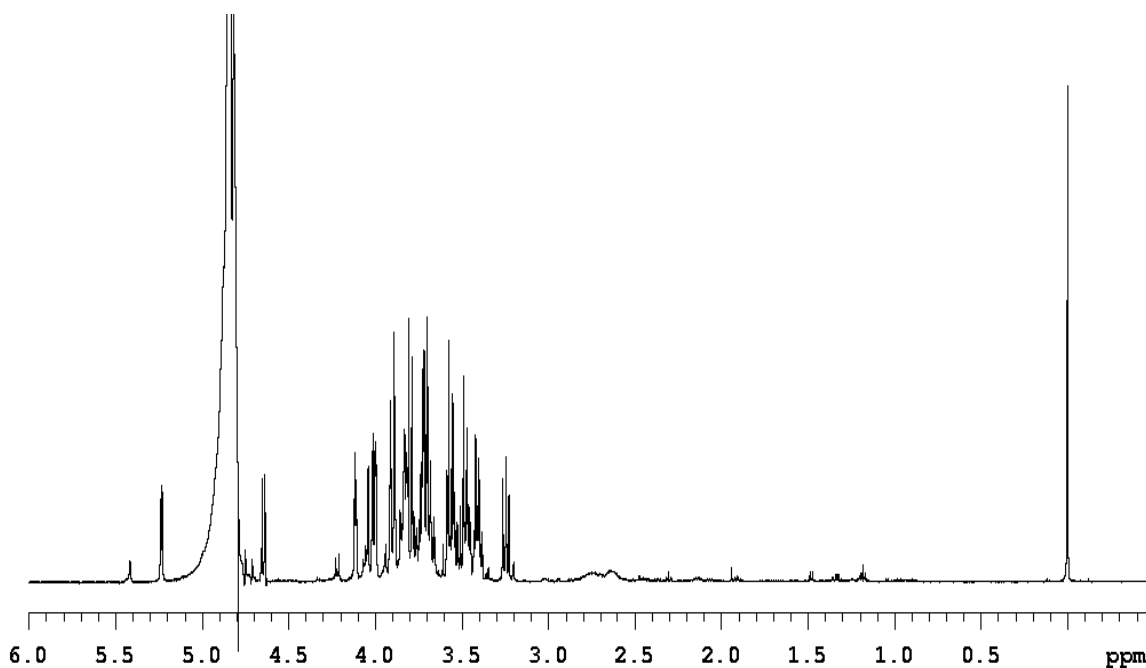
E 2: Espectro de RMN de ¹H (499,8828 MHz; D₂O; δ_{TPSA} 0,00 ppm; TPSA = 0,50x10⁻³ mol.L⁻¹, 25° C) de extrato aquoso da variedade 565 de *Theobroma cacao* antes da fermentação.



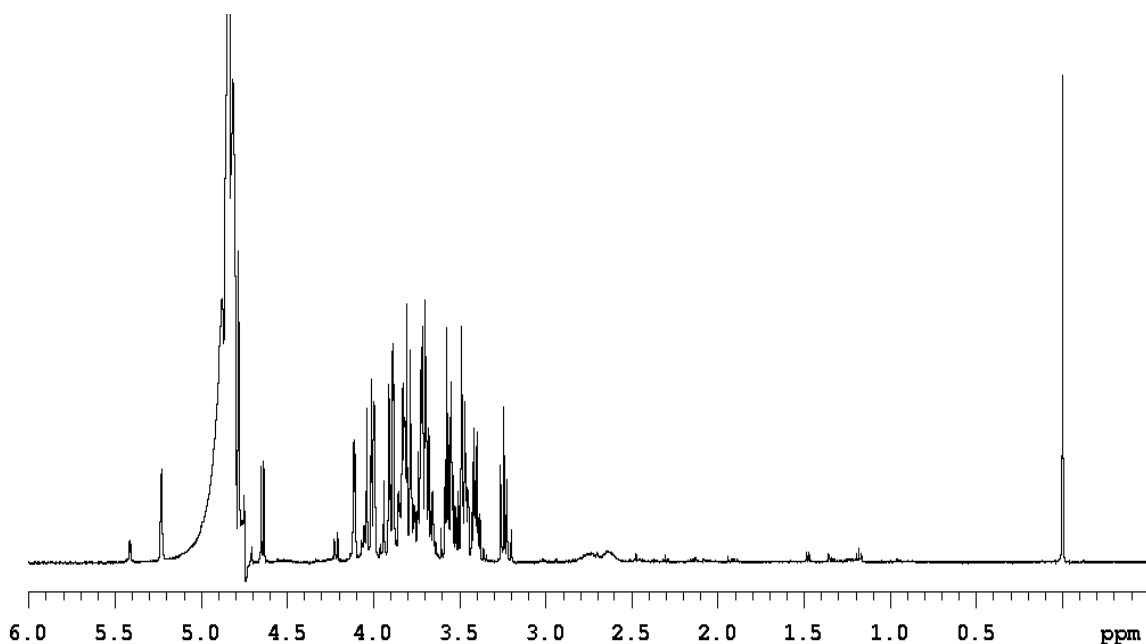
E 3: Espectro de RMN de ¹H (499,8828 MHz; D₂O; δ_{TPSA} 0,00 ppm; TPSA = 0,50x10⁻³ mol.L⁻¹, 25° C) de extrato aquoso da variedade 654 de *Theobroma cacao* antes da fermentação.



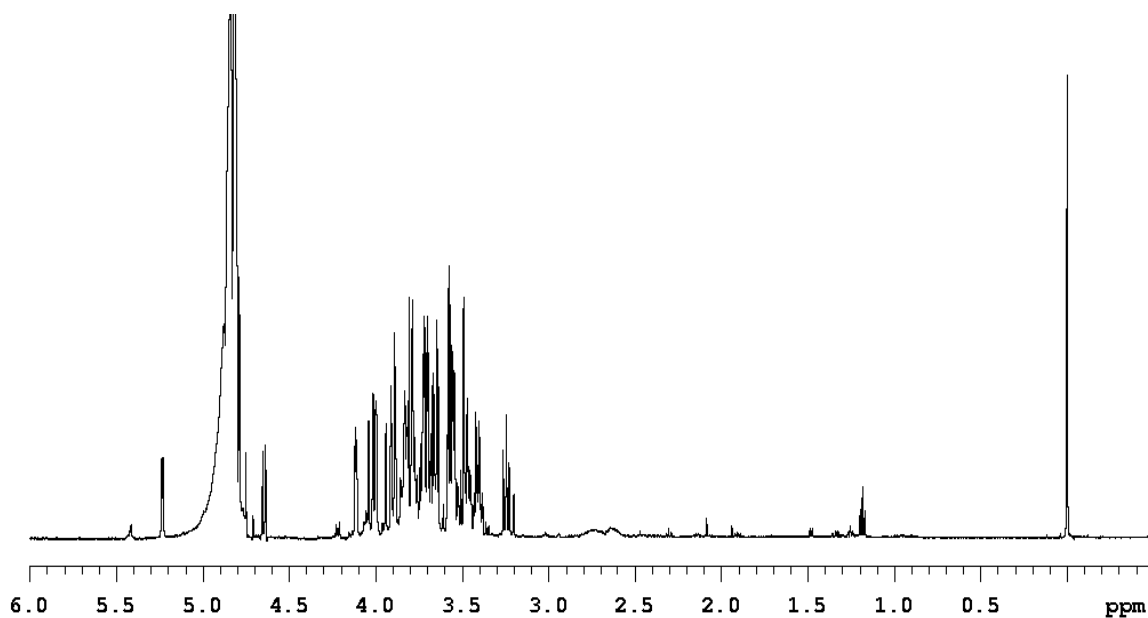
E 4: Espectro de RMN de ¹H (499,8828 MHz; D₂O; δ_{TPSA} 0,00 ppm; TPSA = 0,50x10⁻³ mol.L⁻¹, 25° C) de extrato aquoso da variedade 774 de *Theobroma cacao* antes da fermentação.



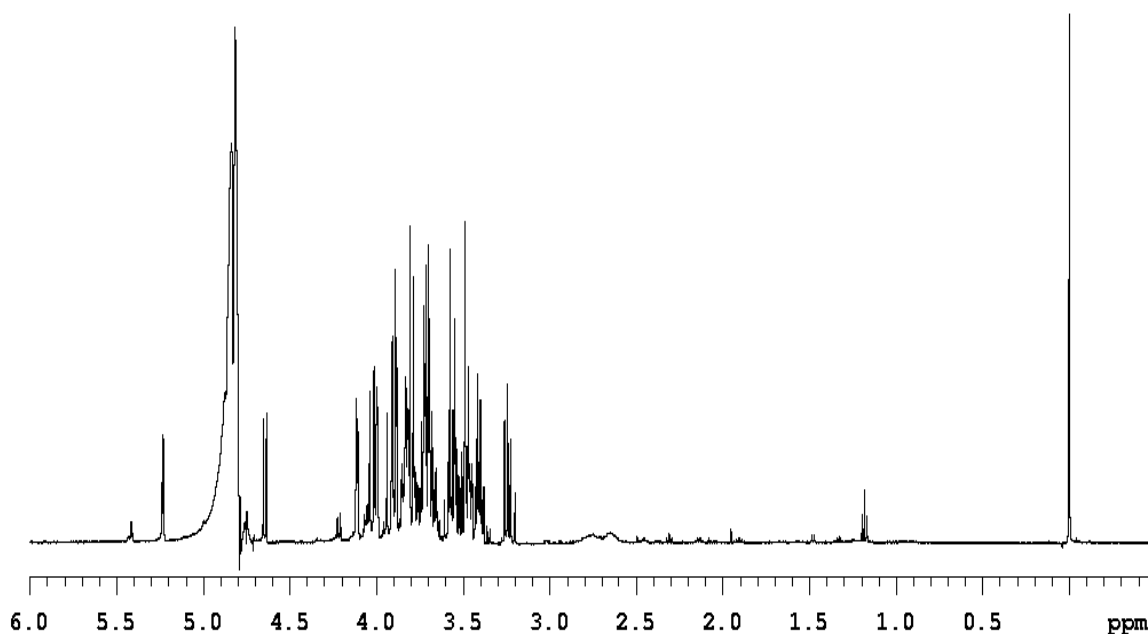
E 5: Espectro de RMN de ¹H (499,8828 MHz; D₂O; δ_{TPSA} 0,00 ppm; TPSA = 0,50x10⁻³ mol.L⁻¹, 25° C) de extrato aquoso da variedade 792 de *Theobroma cacao* antes da fermentação.



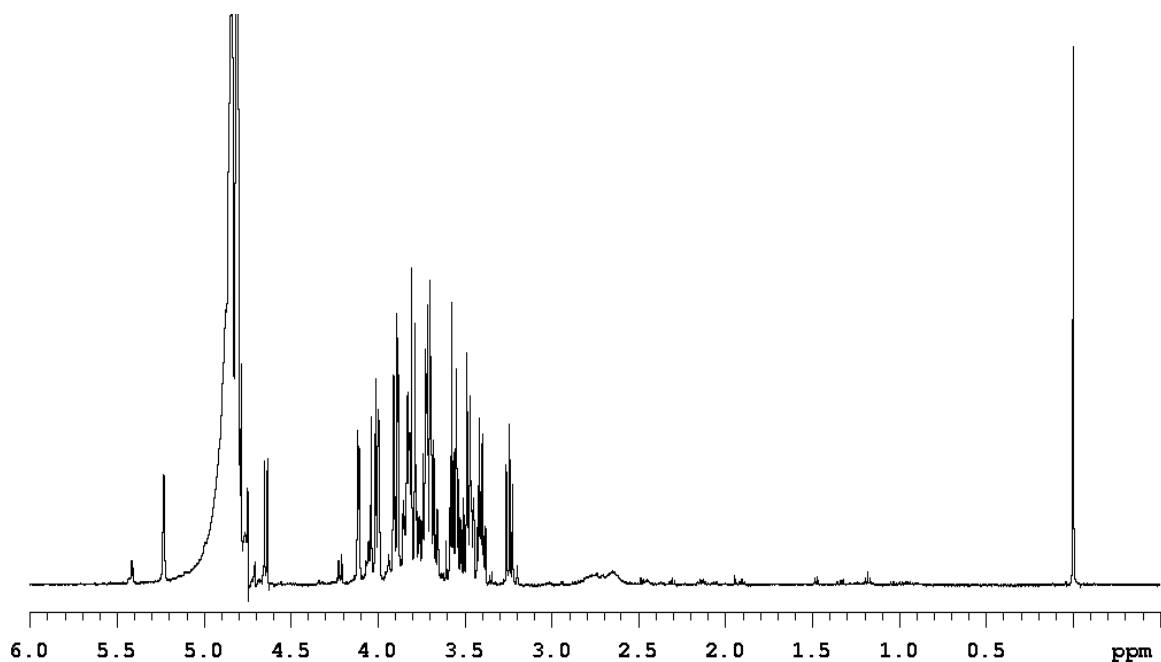
E 6: Espectro de RMN de ¹H (499,8828 MHz; D₂O; δ_{TPSA} 0,00 ppm; TPSA = 0,50x10⁻³ mol.L⁻¹, 25° C) de extrato aquoso da variedade 1188 de *Theobroma cacao* antes da fermentação.



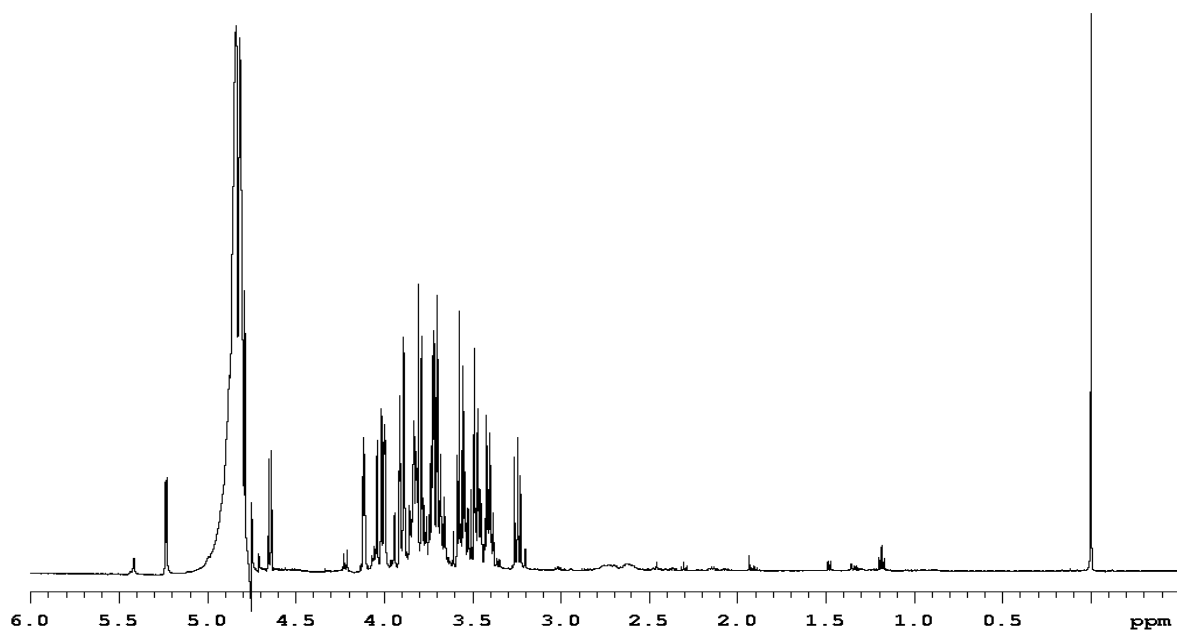
E 7: Espectro de RMN de ¹H (499,8828 MHz; D₂O; δ_{TPSA} 0,00 ppm; TPSA = 0,50x10⁻³ mol.L⁻¹, 25° C) de extrato aquoso da variedade 656 de *Theobroma cacao* antes da fermentação.



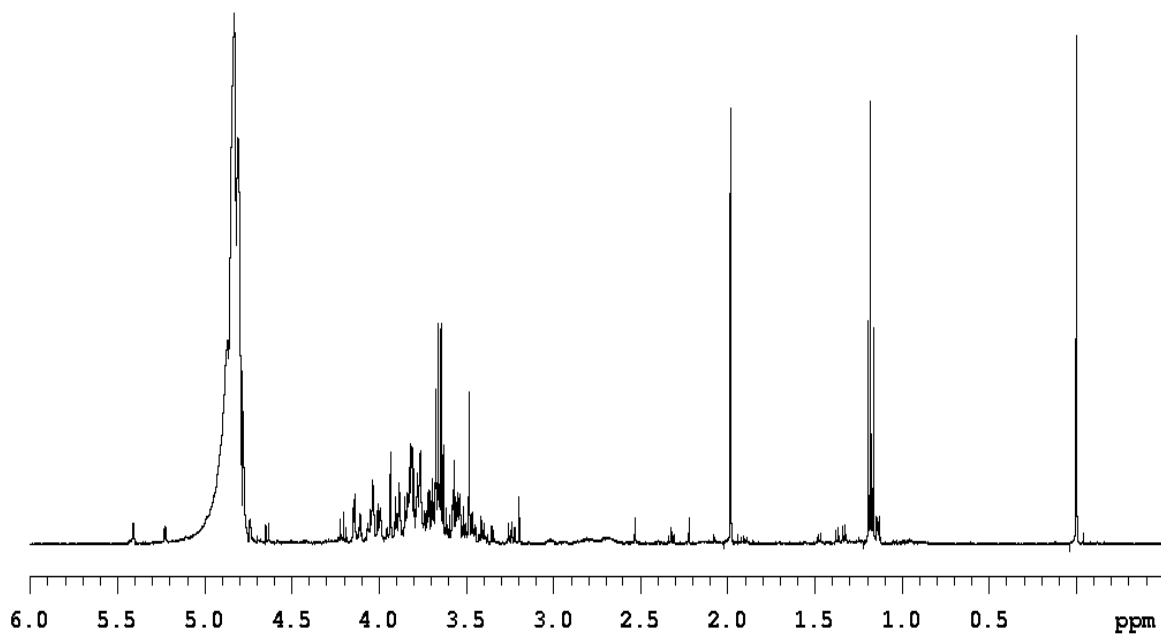
E 8: Espectro de RMN de ¹H (499,8828 MHz; D₂O; δ_{TPSA} 0,00 ppm; TPSA = 0,50x10⁻³ mol.L⁻¹, 25° C) de extrato aquoso da variedade cepec de *Theobroma cacao* antes da fermentação.



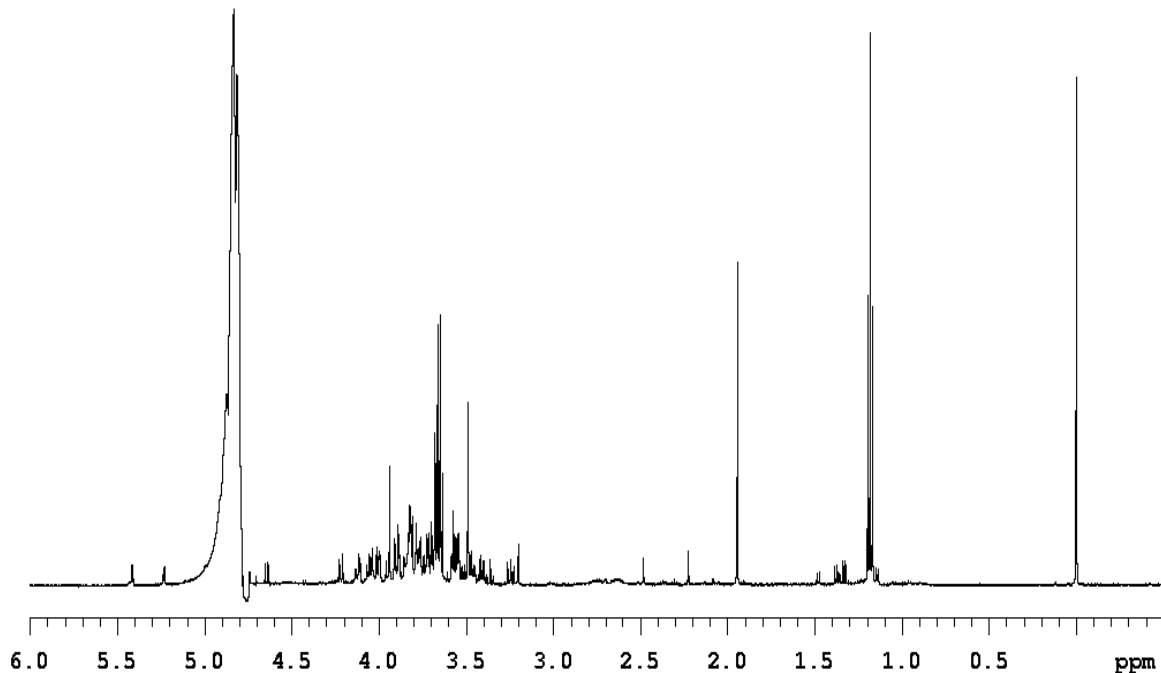
E 9: Espectro de RMN de ¹H (499,8828 MHz; D₂O; δ_{TPSA} 0,00 ppm; TPSA = 0,50x10⁻³ mol.L⁻¹, 25° C) de extrato aquoso da variedade comum de *Theobroma cacao* antes da fermentação.



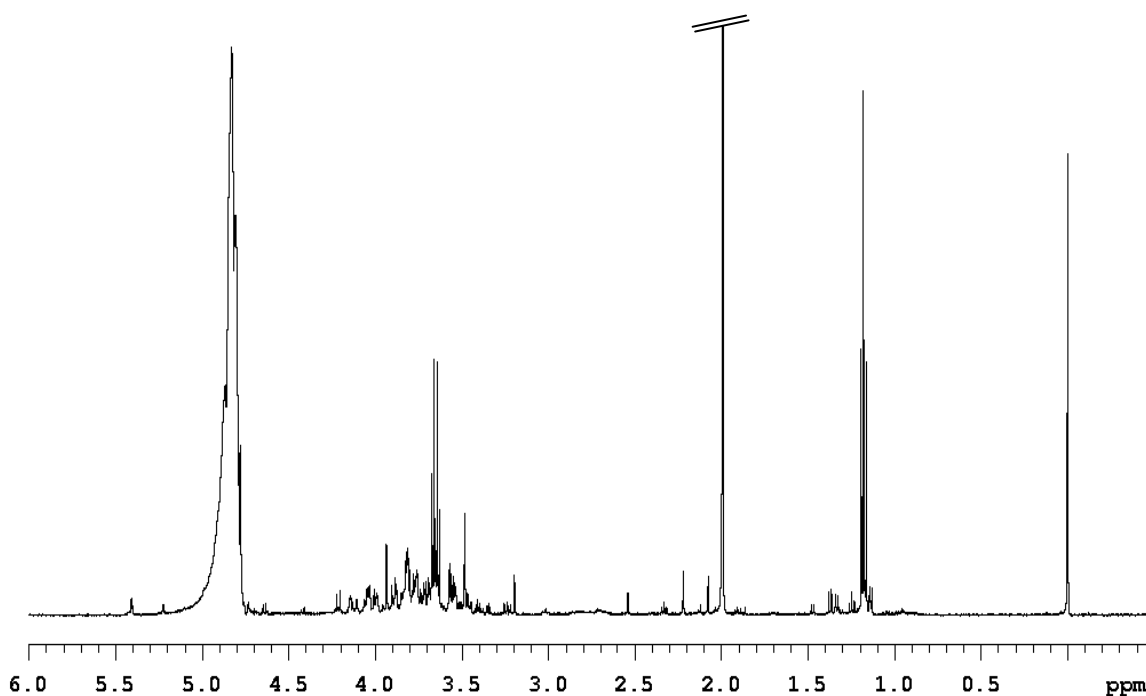
E 10: Espectro de RMN de ¹H (499,8828 MHz; D₂O; δ_{TPSA} 0,00 ppm; TPSA = 0,50x10⁻³ mol.L⁻¹, 25° C) de extrato aquoso da variedade EET de *Theobroma cacao* antes da fermentação.



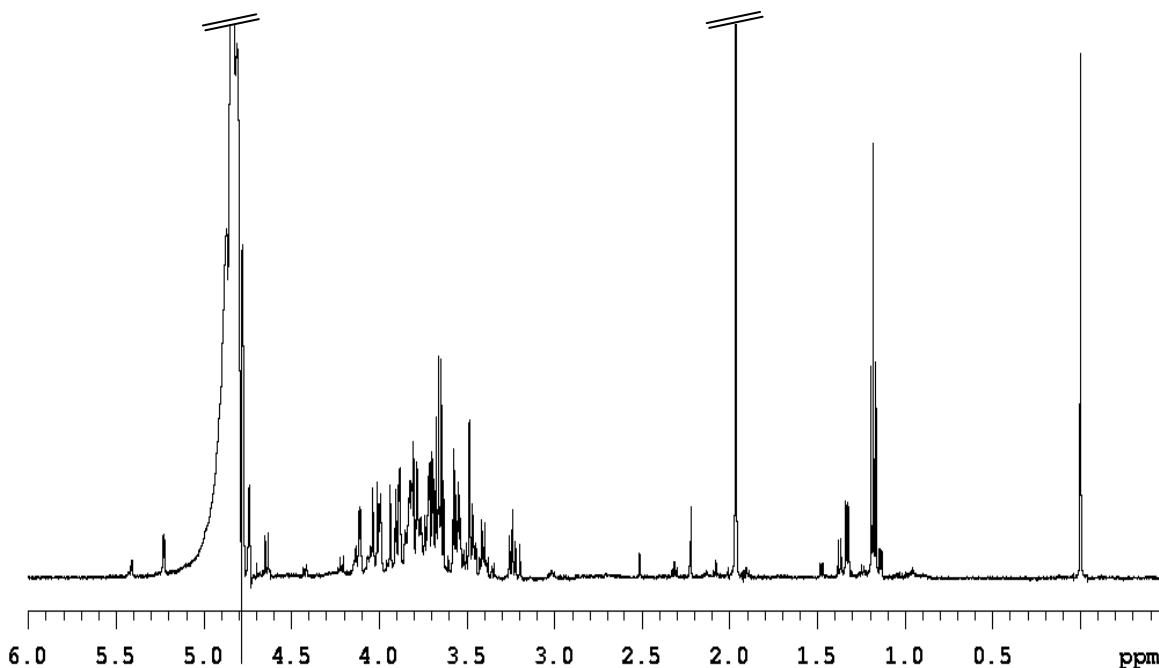
E 11: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 516 de *Theobroma cacao* após 48 horas de fermentação.



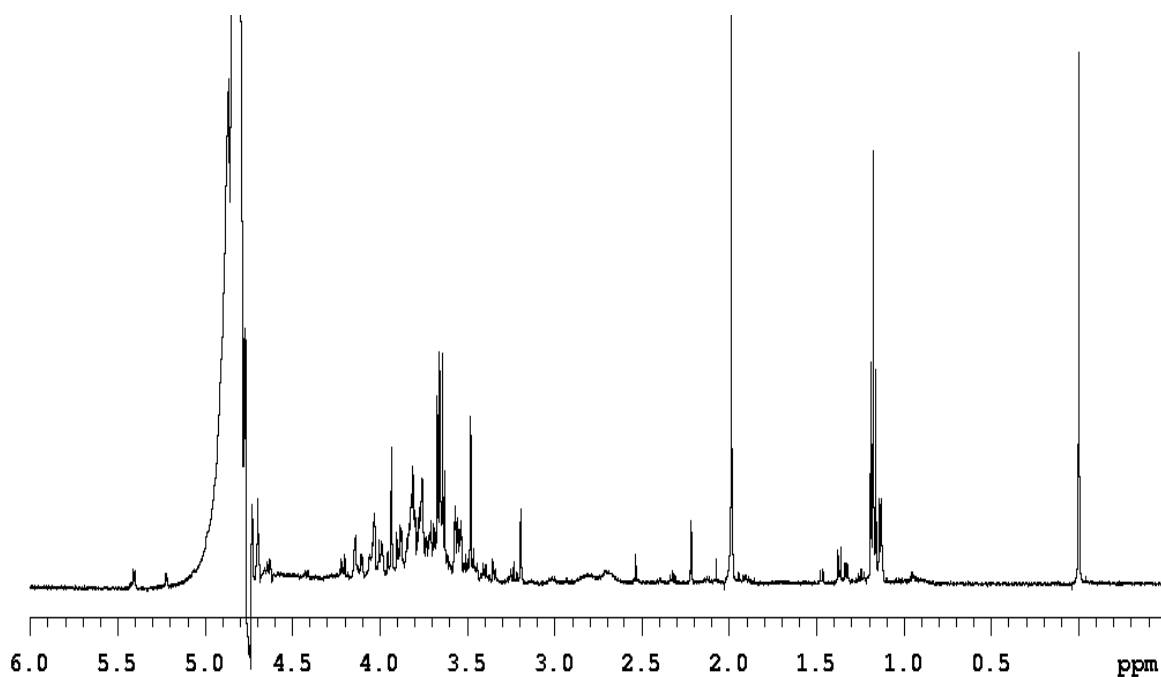
E 12: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 565 de *Theobroma cacao* após 48 horas de fermentação.



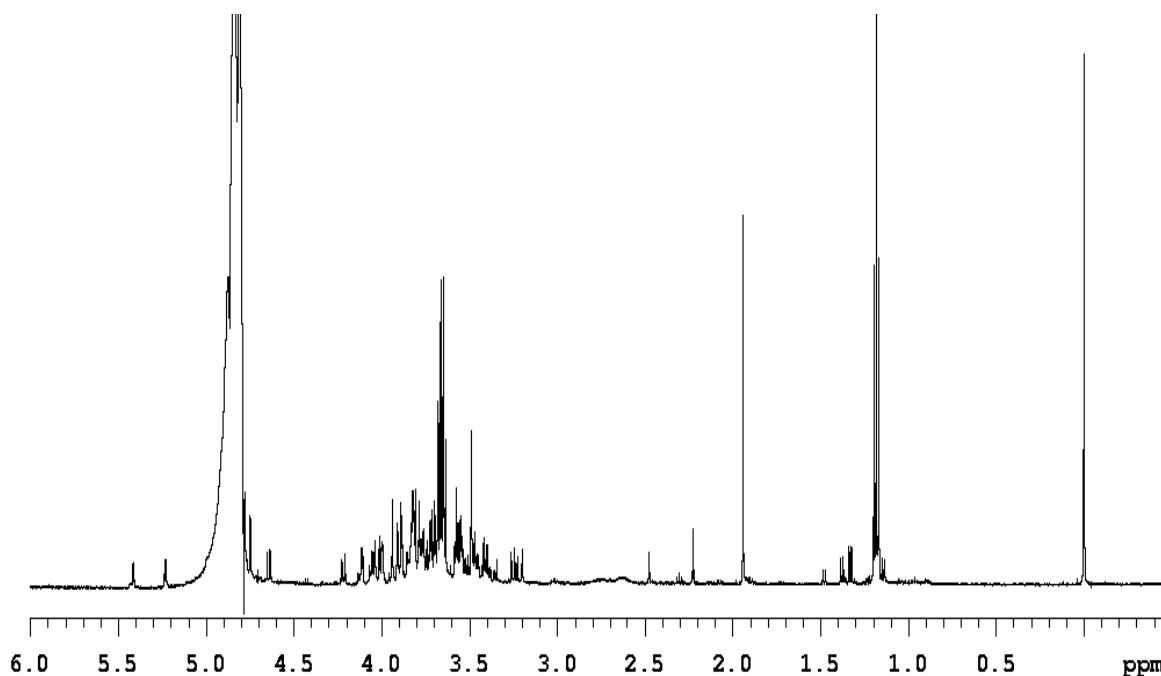
E 13: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3}$ mol.L $^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade 654 de *Theobroma cacao* após 48 horas de fermentação.



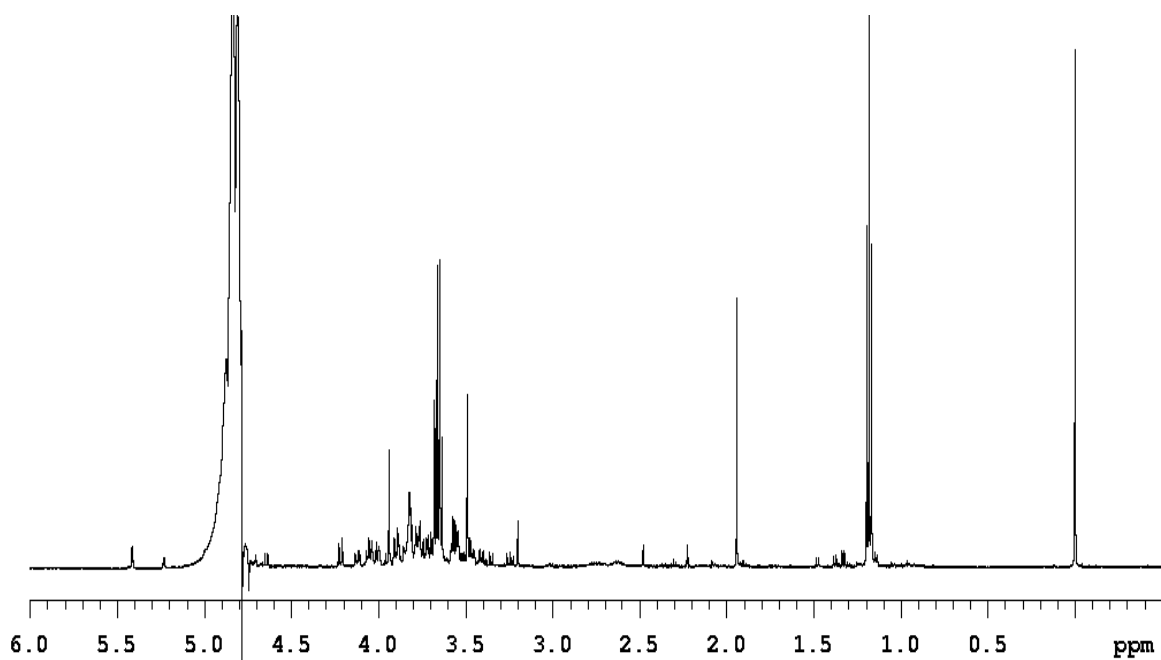
E 14: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3}$ mol.L $^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade 656 de *Theobroma cacao* após 48 horas de fermentação.



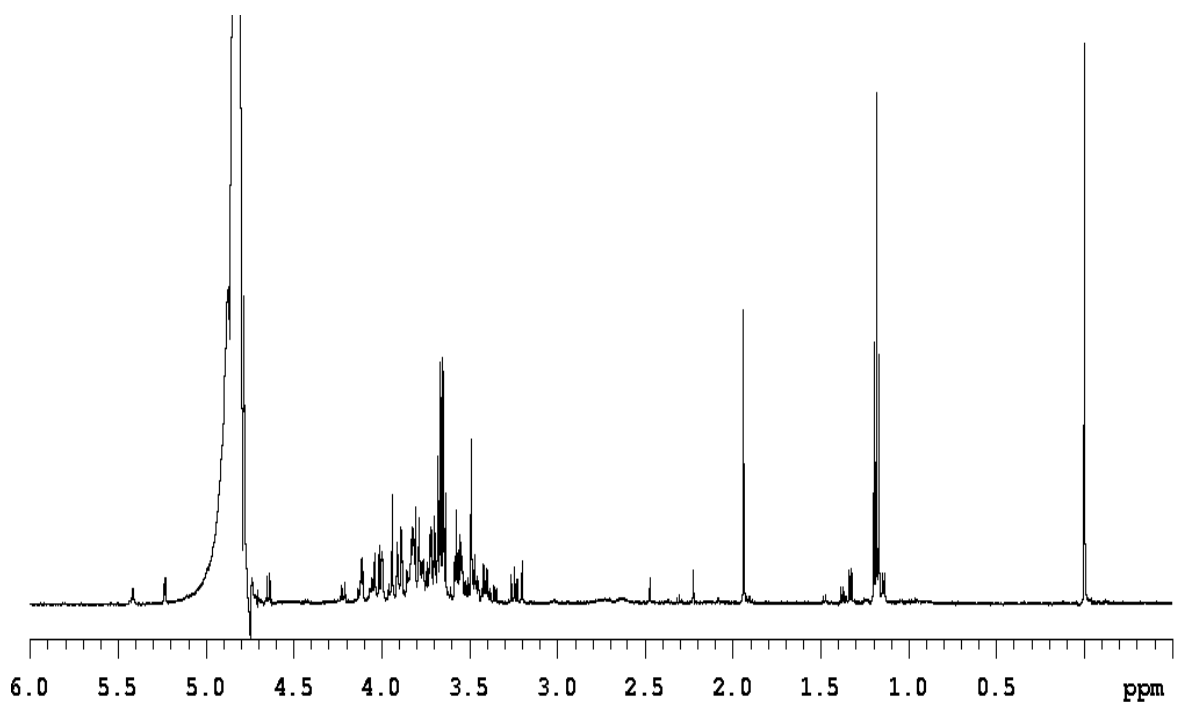
E 15: Espectro de RMN de ¹H (499,8828 MHz; D₂O; δ_{TPSA} 0,00 ppm; TPSA = 0,50x10⁻³ mol.L⁻¹, 25° C) de extrato aquoso da variedade 774 de *Theobroma cacao* após 48 horas de fermentação.



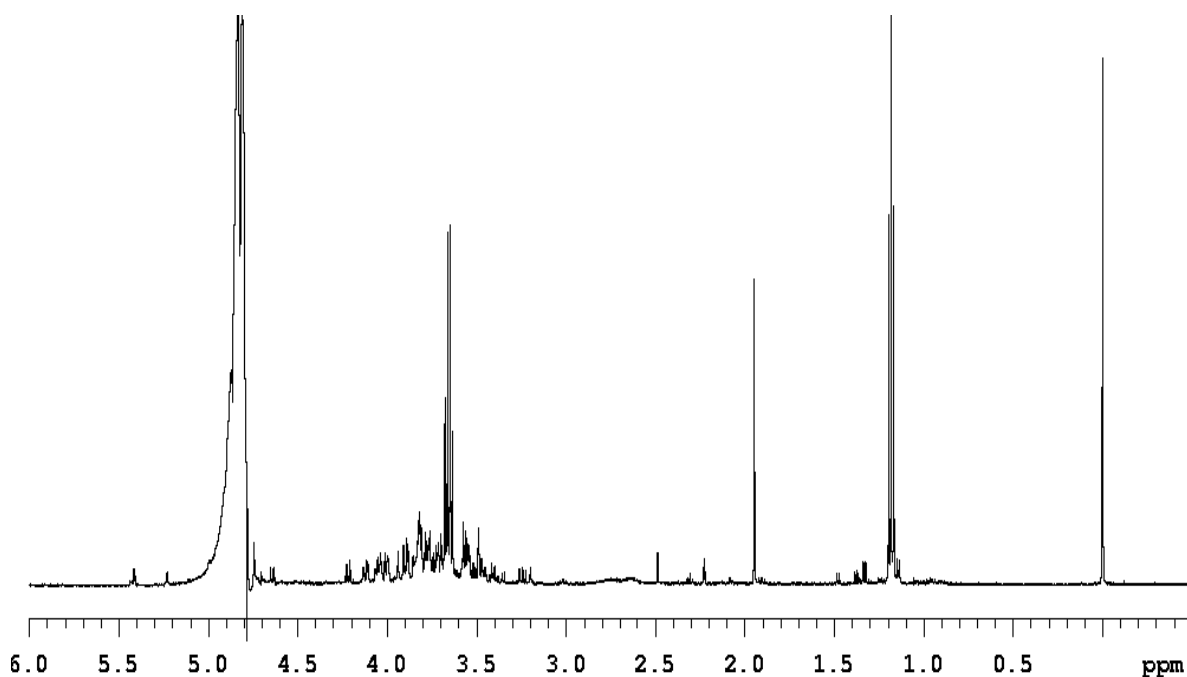
E 16: Espectro de RMN de ¹H (499,8828 MHz; D₂O; δ_{TPSA} 0,00 ppm; TPSA = 0,50x10⁻³ mol.L⁻¹, 25° C) de extrato aquoso da variedade 792 de *Theobroma cacao* após 48 horas de fermentação.



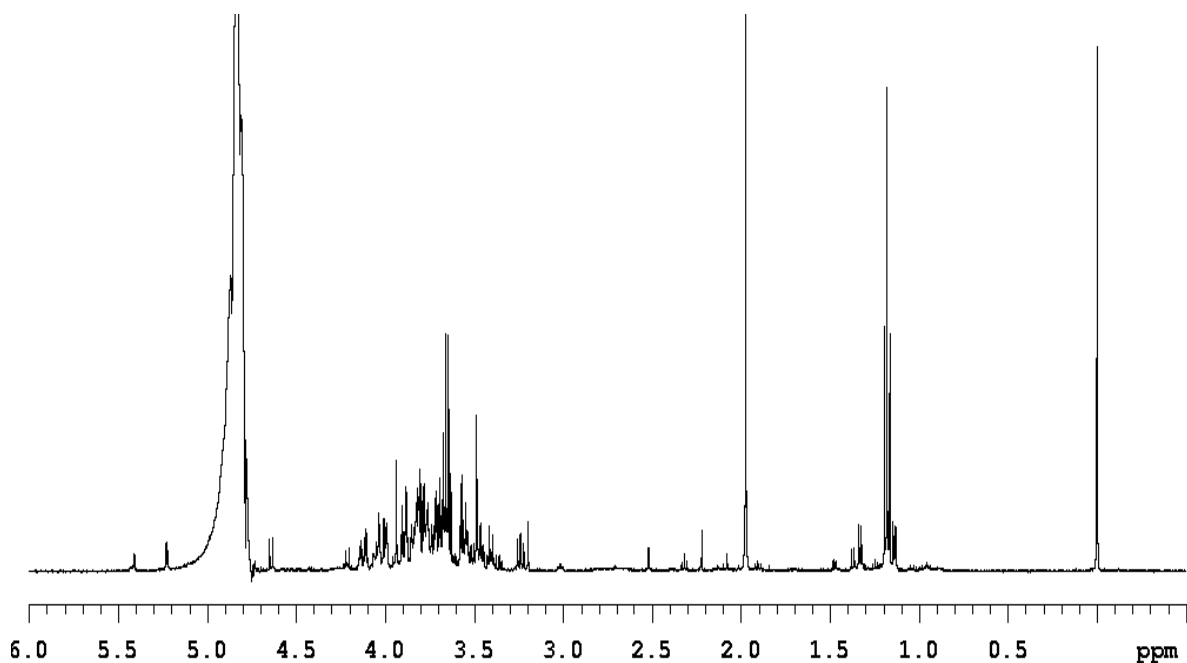
E 17: Espectro de RMN de ¹H (499,8828 MHz; D₂O; δ_{TPSA} 0,00 ppm; TPSA = 0,50x10⁻³ mol.L⁻¹, 25° C) de extrato aquoso da variedade 1188 de *Theobroma cacao* após 48 horas de fermentação.



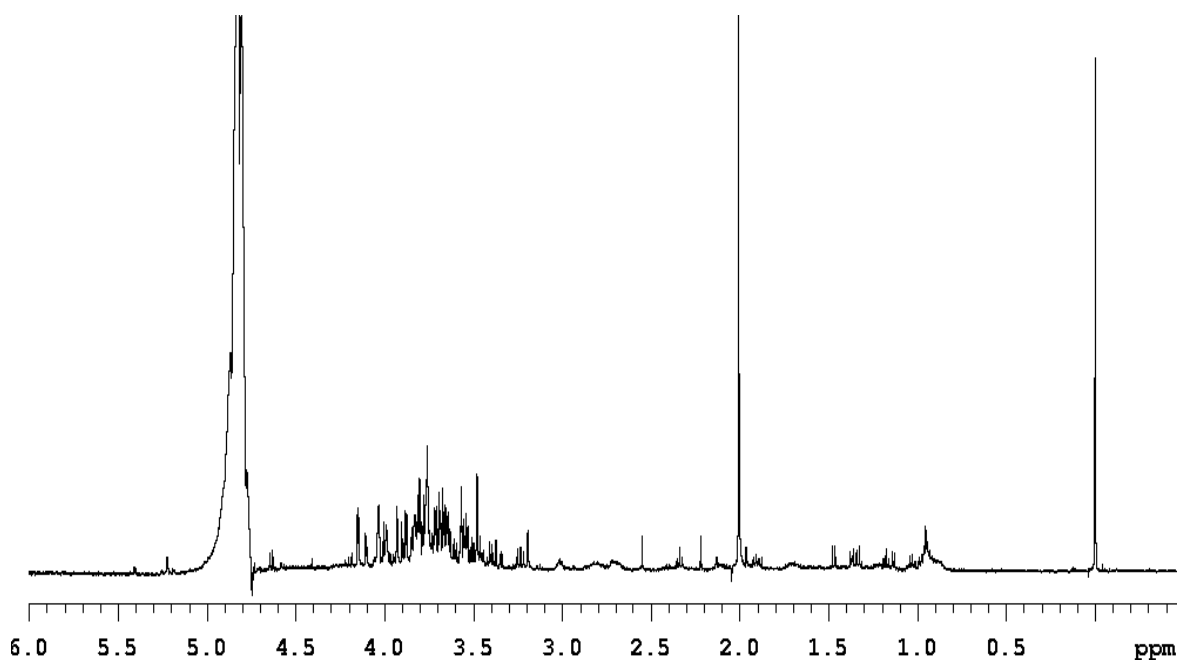
E 18: Espectro de RMN de ¹H (499,8828 MHz; D₂O; δ_{TPSA} 0,00 ppm; TPSA = 0,50x10⁻³ mol.L⁻¹, 25° C) de extrato aquoso da variedade cepec de *Theobroma cacao* após 48 horas de fermentação.



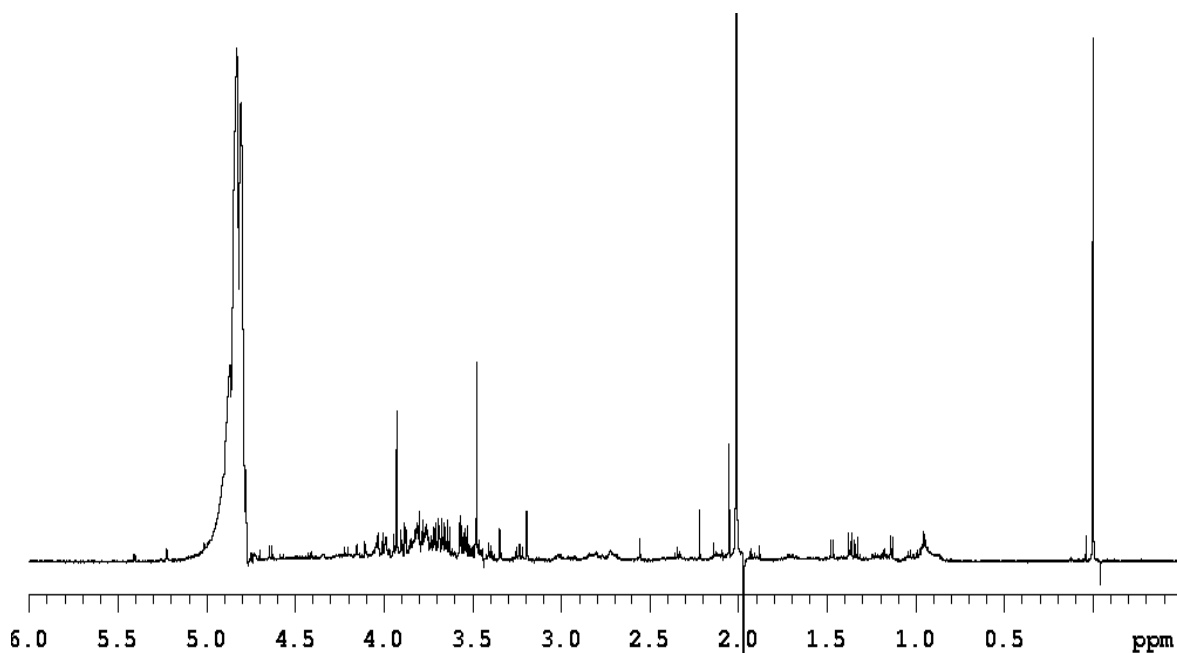
E 19: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade comum de *Theobroma cacao* após 48 horas de fermentação.



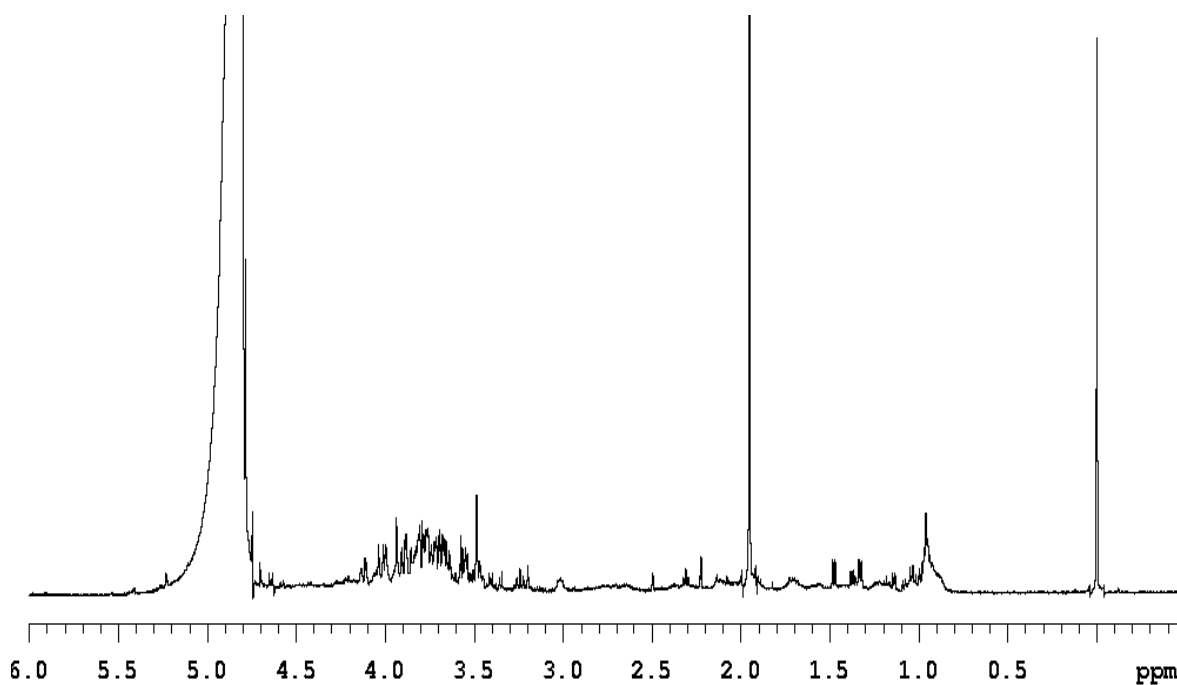
E 20: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade EET de *Theobroma cacao* após 48 horas de fermentação.



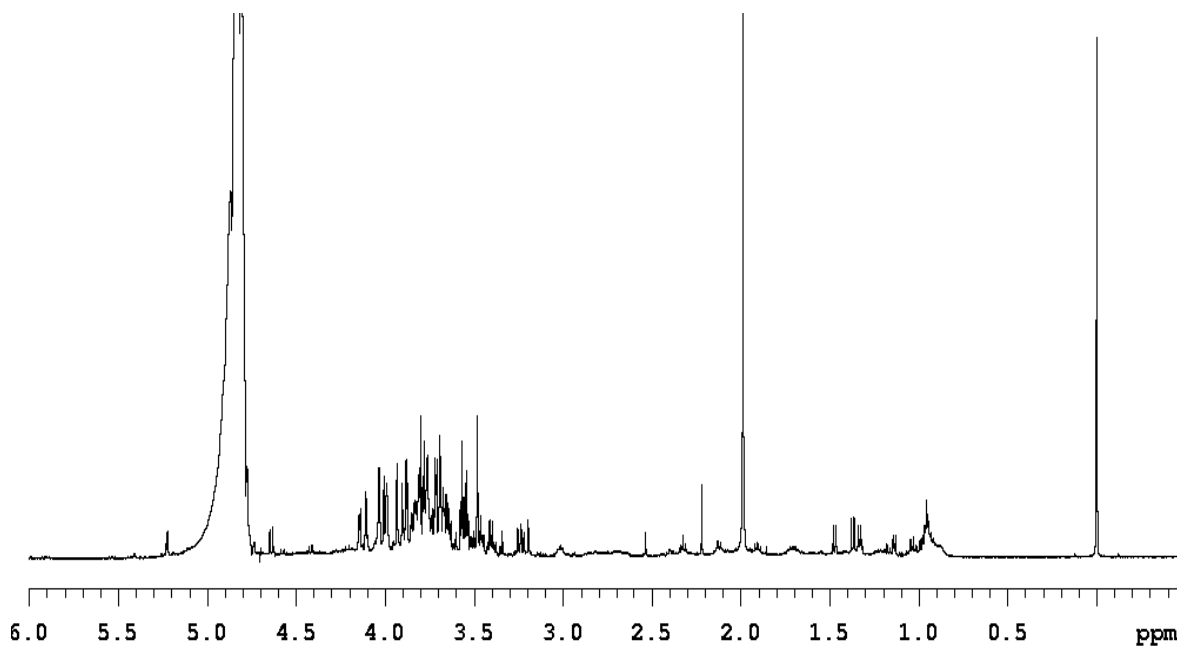
E 21: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 516 de *Theobroma cacao* após 96 horas de fermentação.



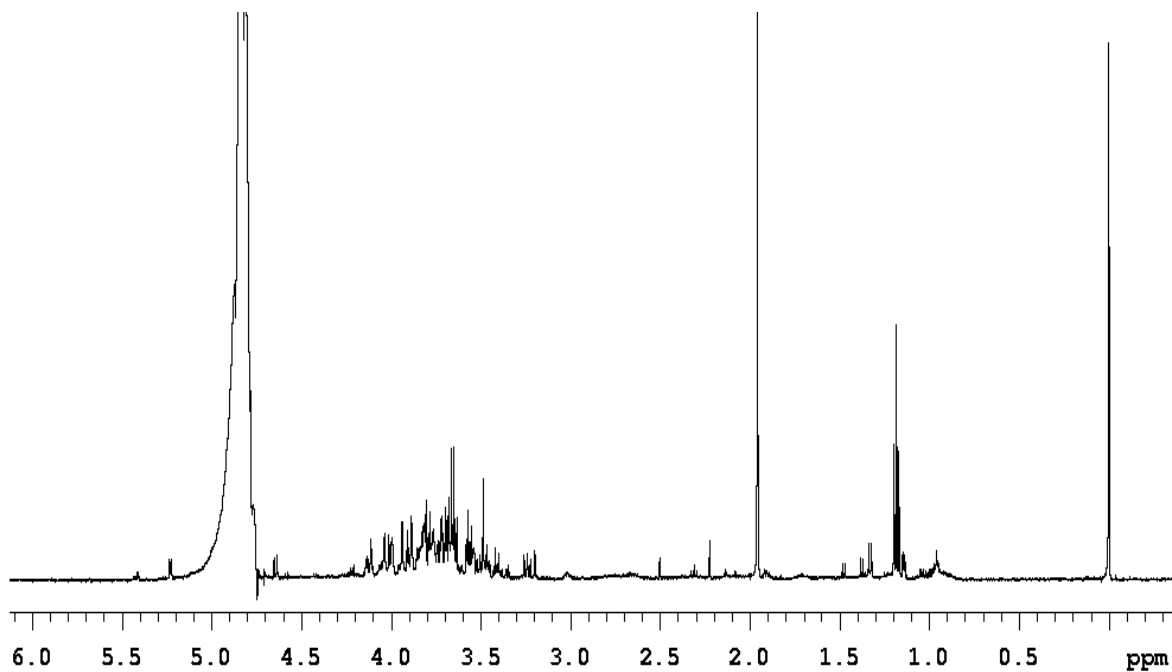
E 22: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 565 de *Theobroma cacao* após 96 horas de fermentação.



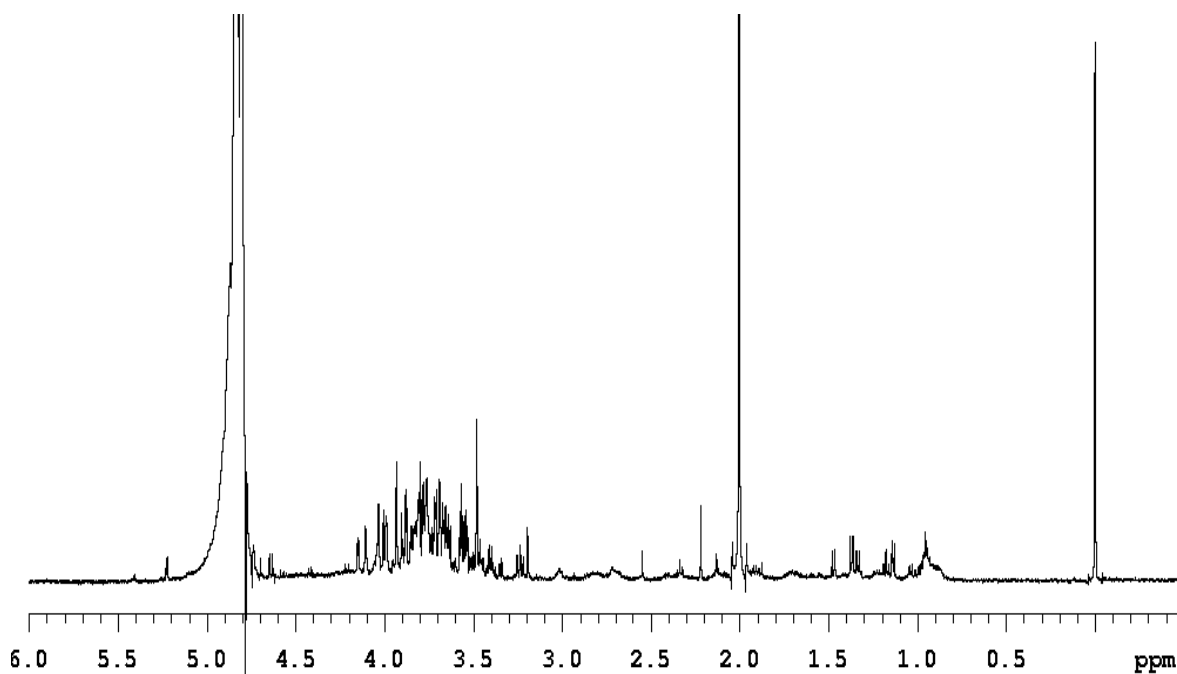
E 23: Espectro de RMN de ¹H (499,8828 MHz; D₂O; δ_{TPSA} 0,00 ppm; TPSA = 0,50x10⁻³ mol.L⁻¹, 25° C) de extrato aquoso da variedade 654 de *Theobroma cacao* após 96 horas de fermentação.



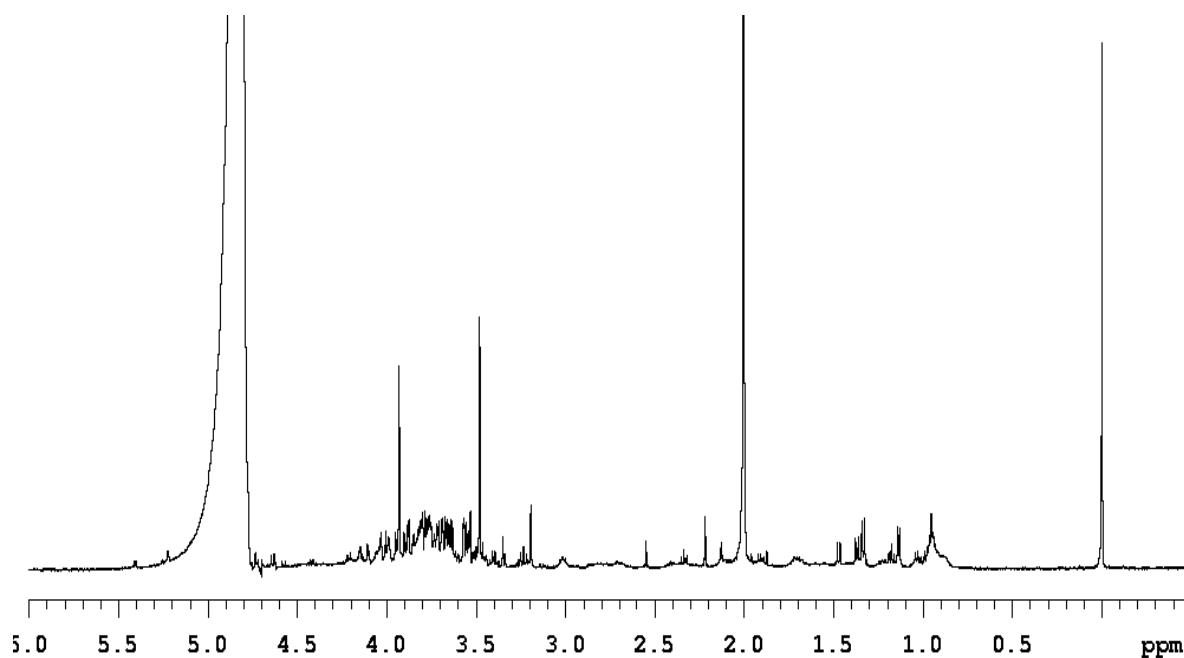
E 24: Espectro de RMN de ¹H (499,8828 MHz; D₂O; δ_{TPSA} 0,00 ppm; TPSA = 0,50x10⁻³ mol.L⁻¹, 25° C) de extrato aquoso da variedade 656 de *Theobroma cacao* após 96 horas de fermentação.



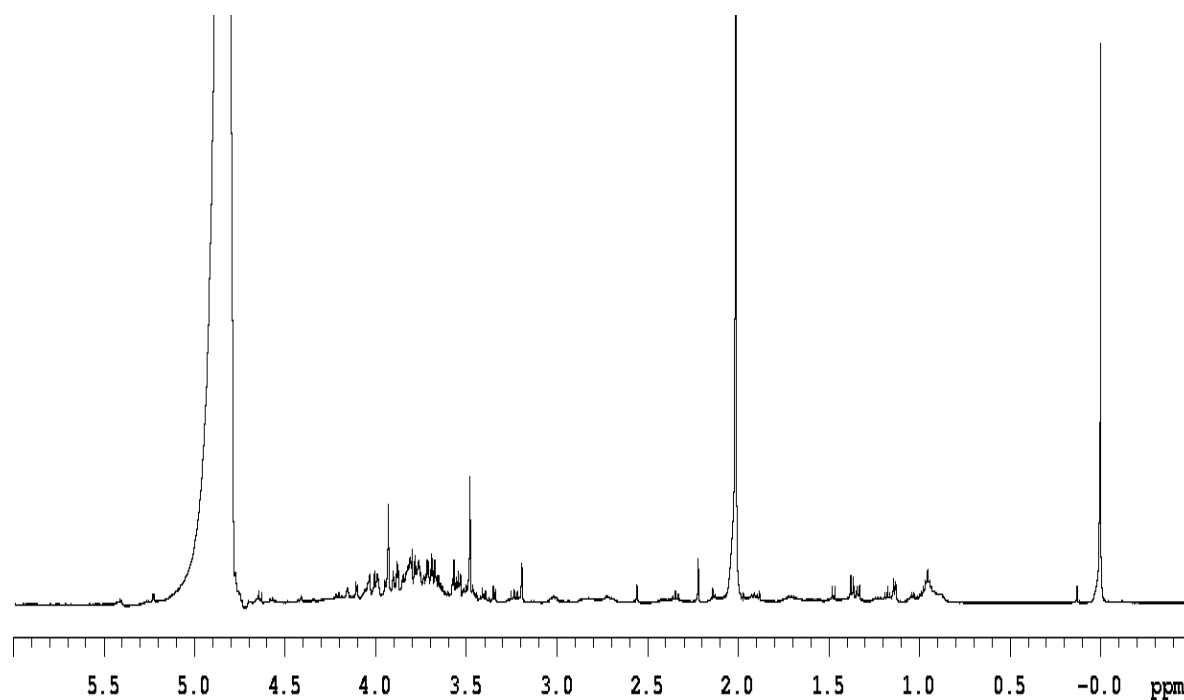
E 25: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 774 de *Theobroma cacao* após 96 horas de fermentação.



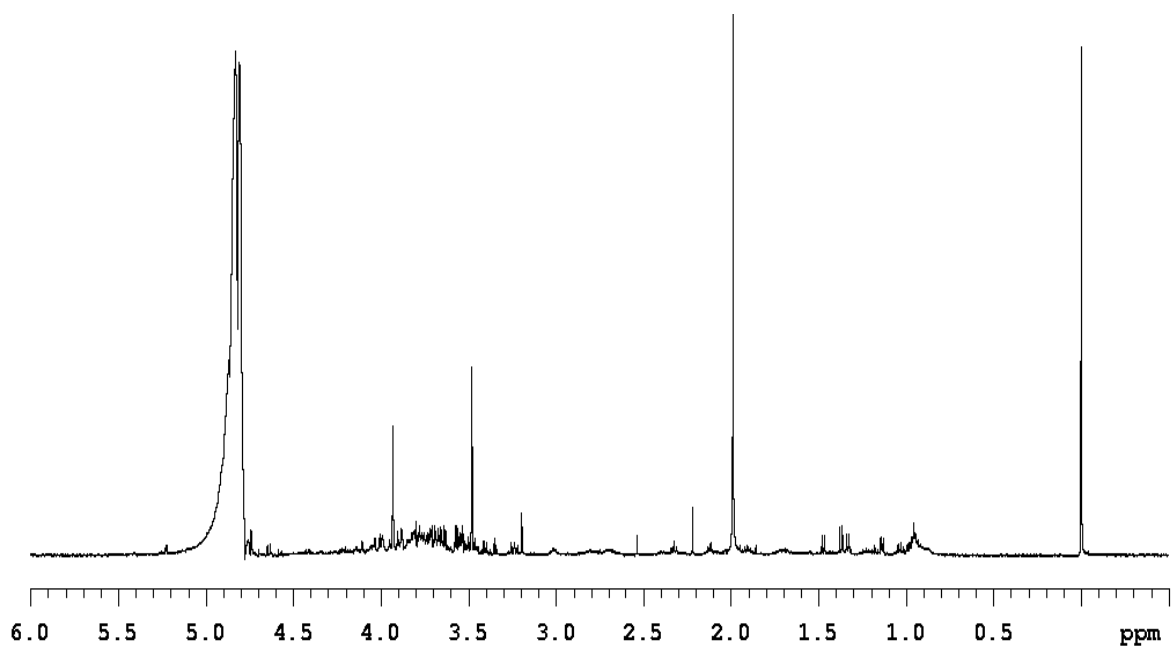
E 26: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 792 de *Theobroma cacao* após 96 horas de fermentação.



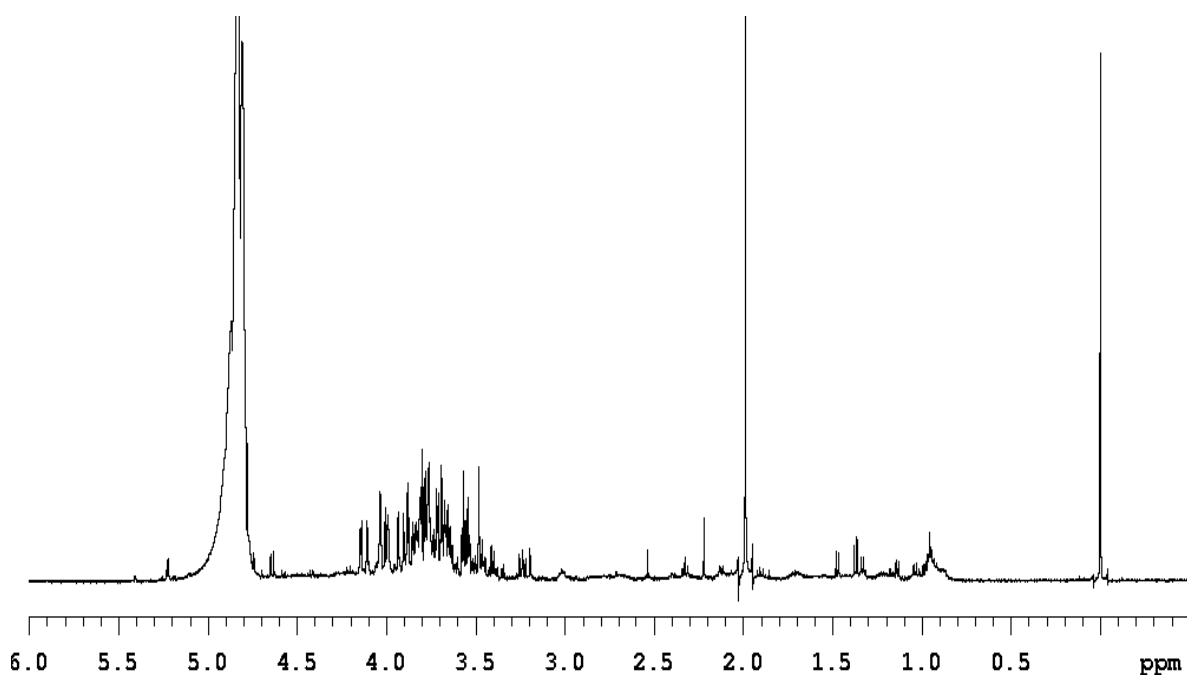
E 27: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 1188 de *Theobroma cacao* após 96 horas de fermentação.



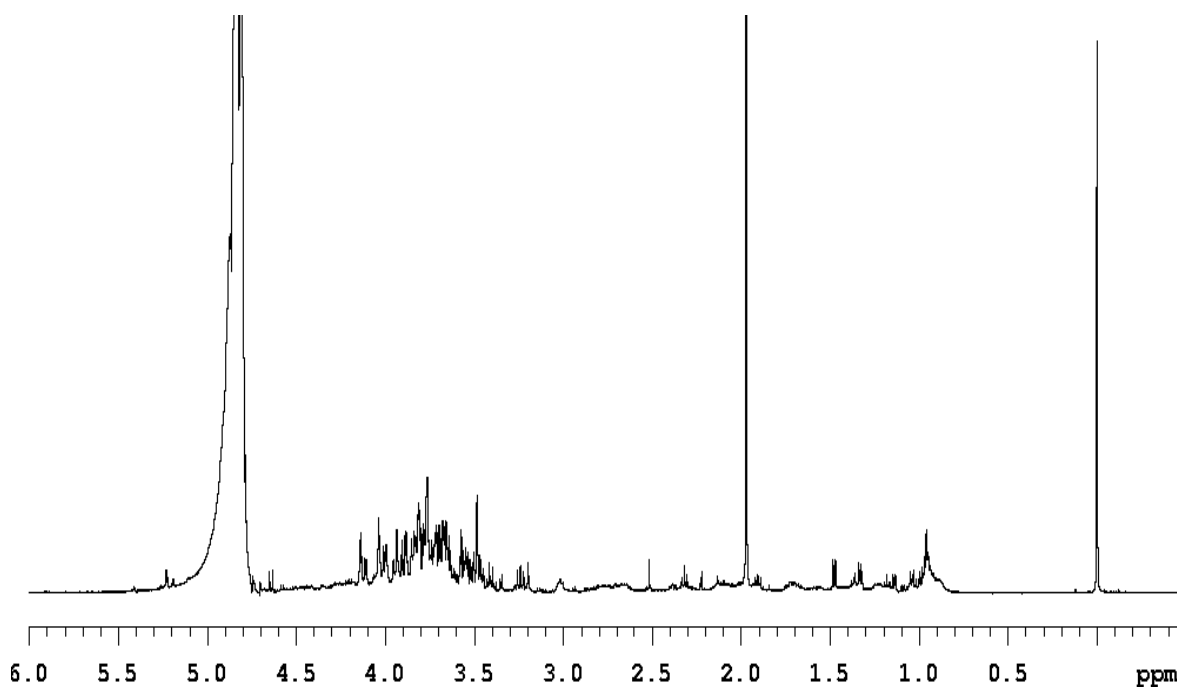
E 28: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade cepec de *Theobroma cacao* após 96 horas de fermentação.



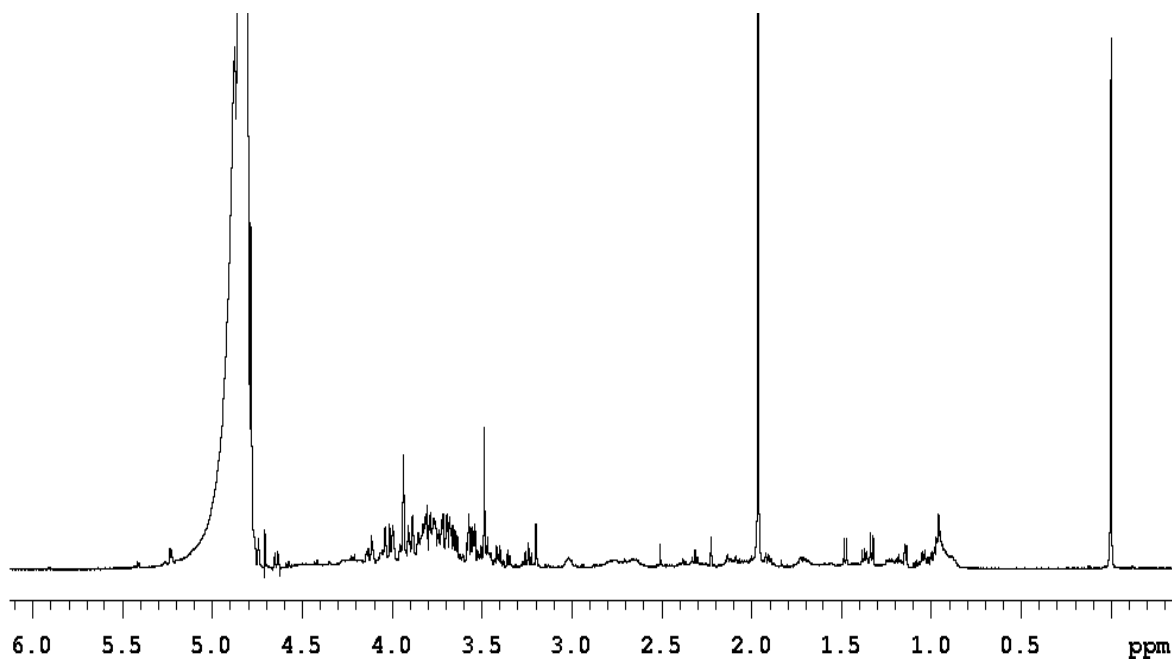
E 29: Espectro de RMN de ¹H (499,8828 MHz; D₂O; δ_{TPSA} 0,00 ppm; TPSA = 0,50x10⁻³ mol.L⁻¹, 25° C) de extrato aquoso da variedade comum de *Theobroma cacao* após 96 horas de fermentação.



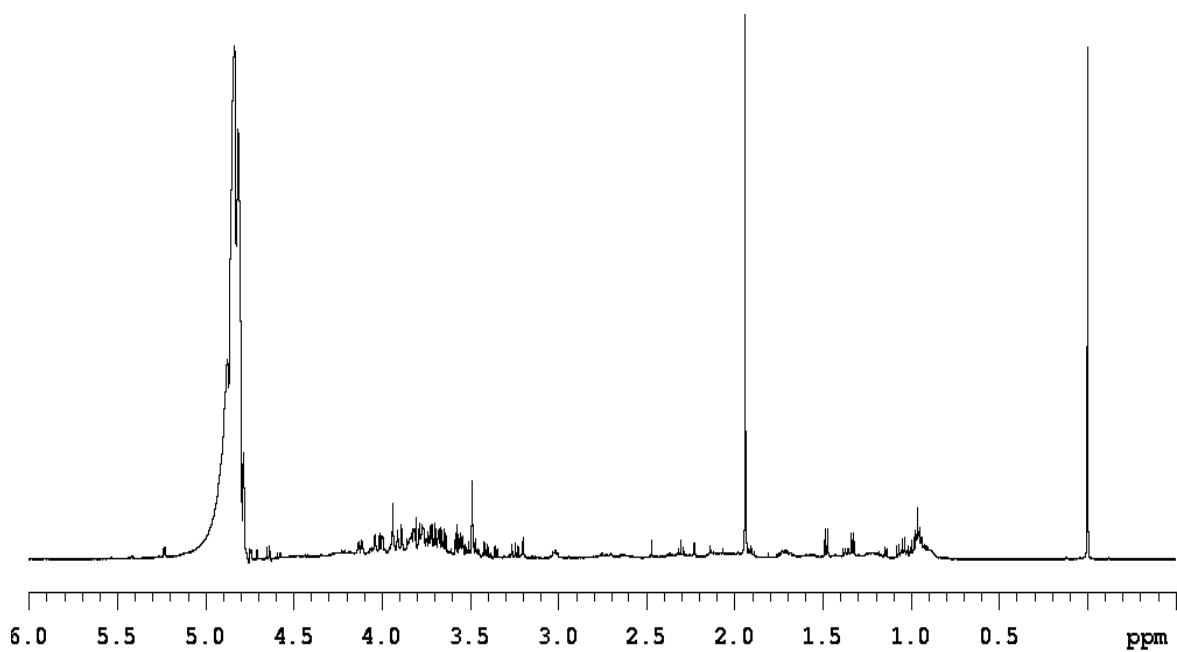
E 30: Espectro de RMN de ¹H (499,8828 MHz; D₂O; δ_{TPSA} 0,00 ppm; TPSA = 0,50x10⁻³ mol.L⁻¹, 25° C) de extrato aquoso da variedade EET de *Theobroma cacao* após 96 horas de fermentação.



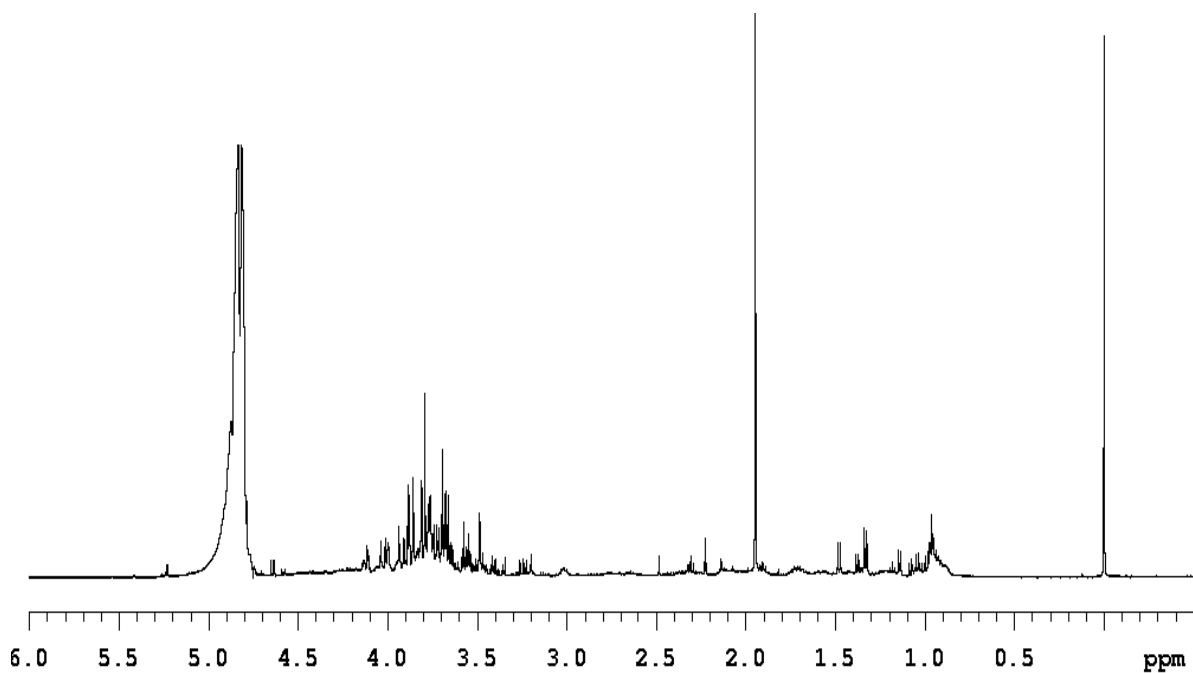
E 31: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 516 de *Theobroma cacao* após 144 horas de fermentação.



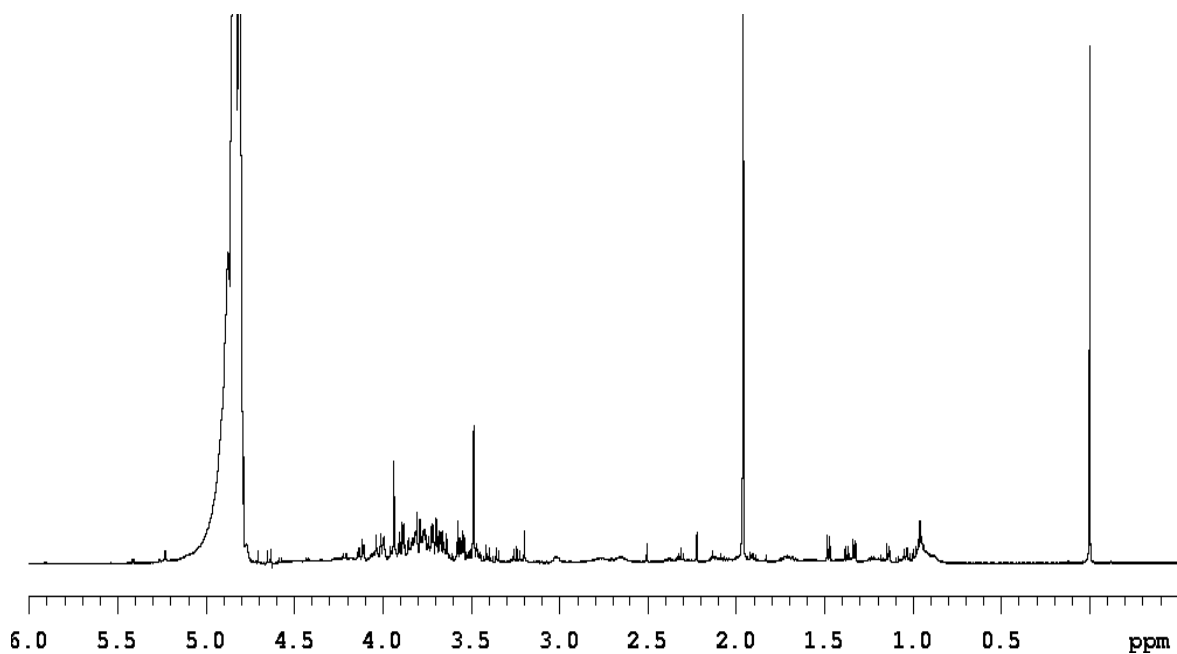
E 32: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 565 de *Theobroma cacao* após 144 horas de fermentação.



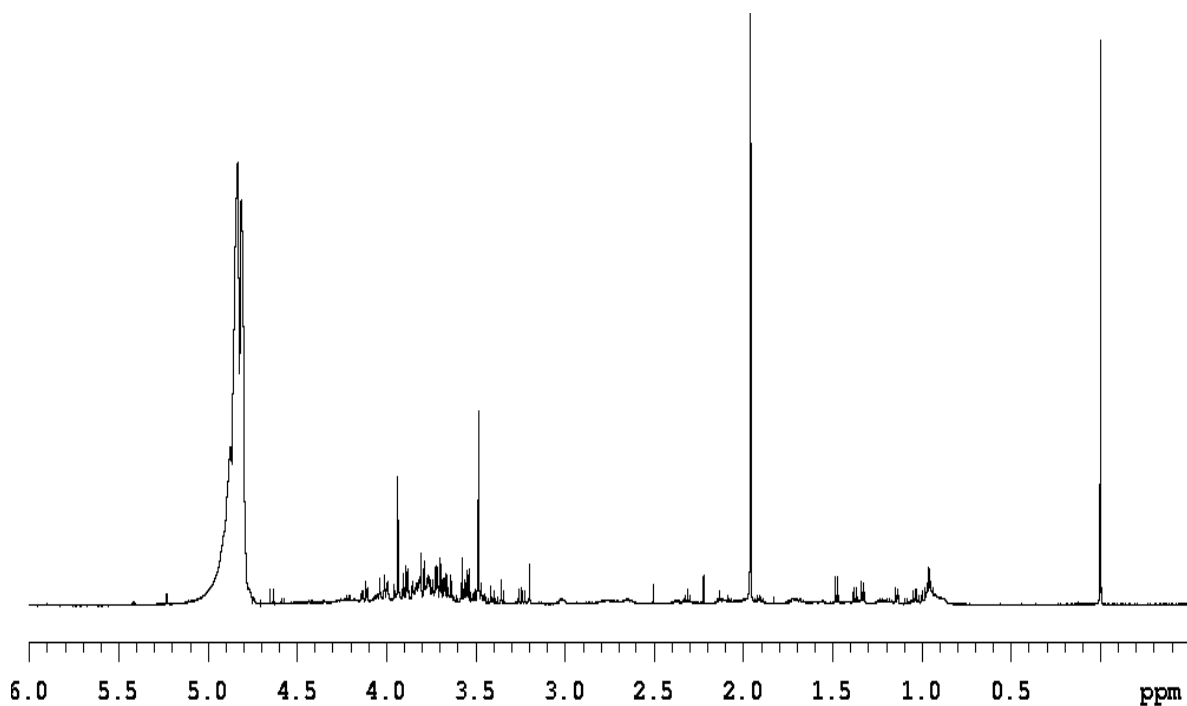
E 33: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 654 de *Theobroma cacao* após 144 horas de fermentação.



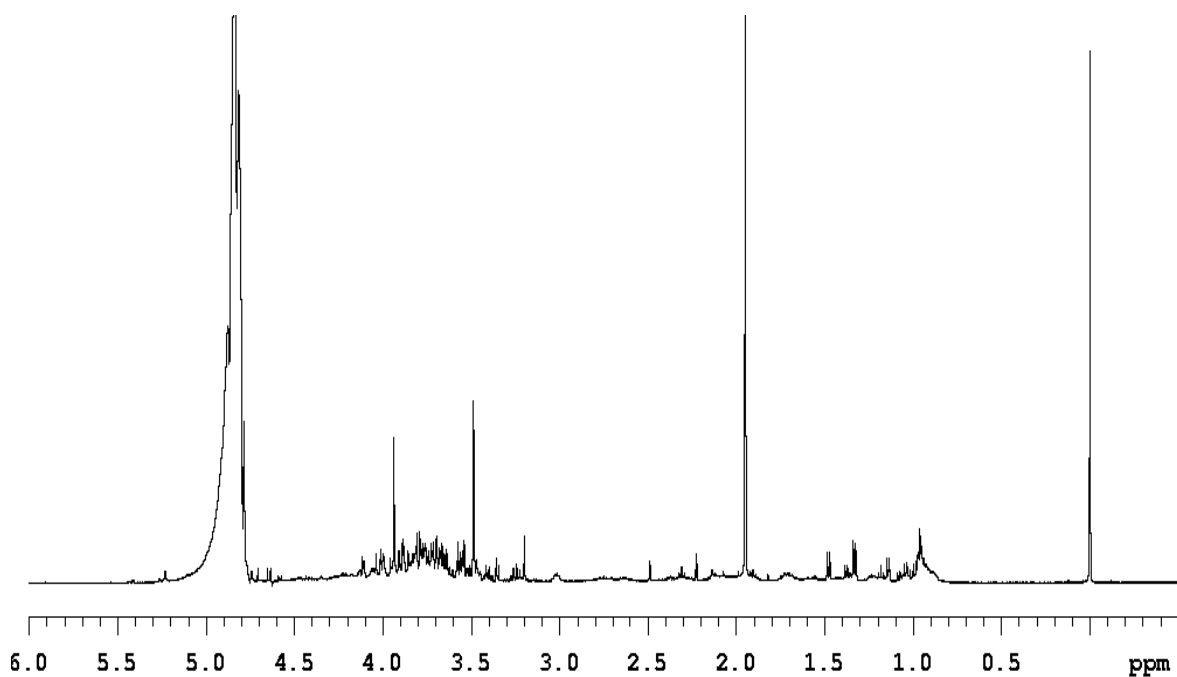
E 34: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 656 de *Theobroma cacao* após 144 horas de fermentação.



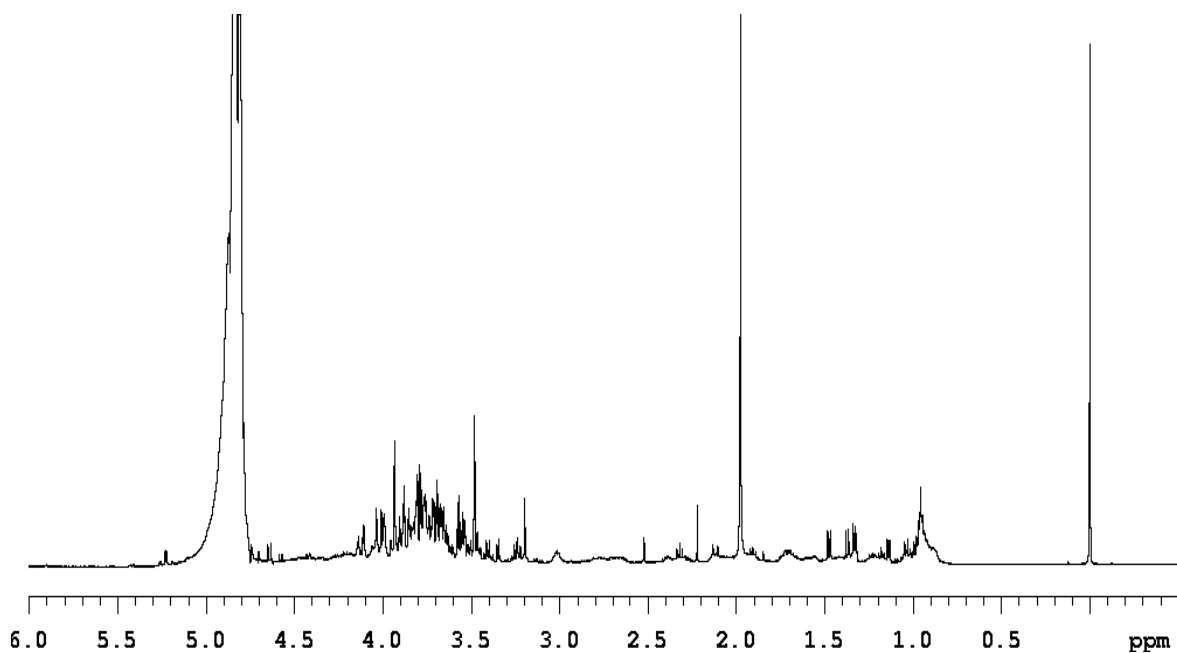
E 35: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 774 de *Theobroma cacao* após 144 horas de fermentação.



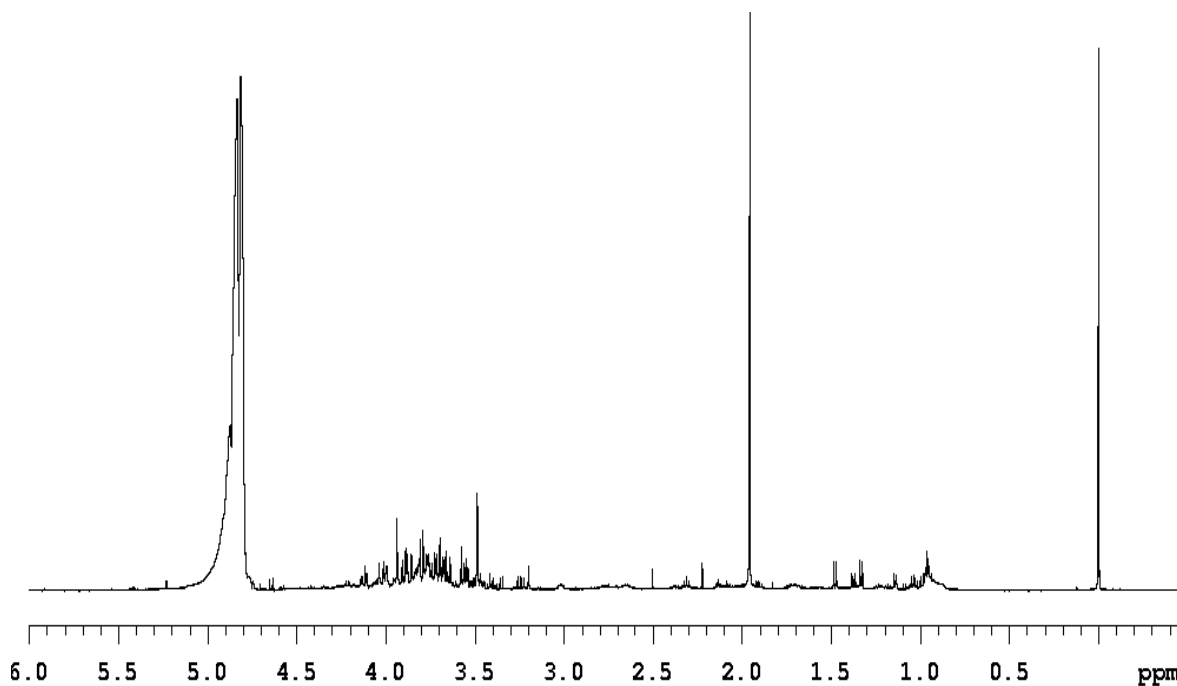
E 36: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 792 de *Theobroma cacao* após 144 horas de fermentação.



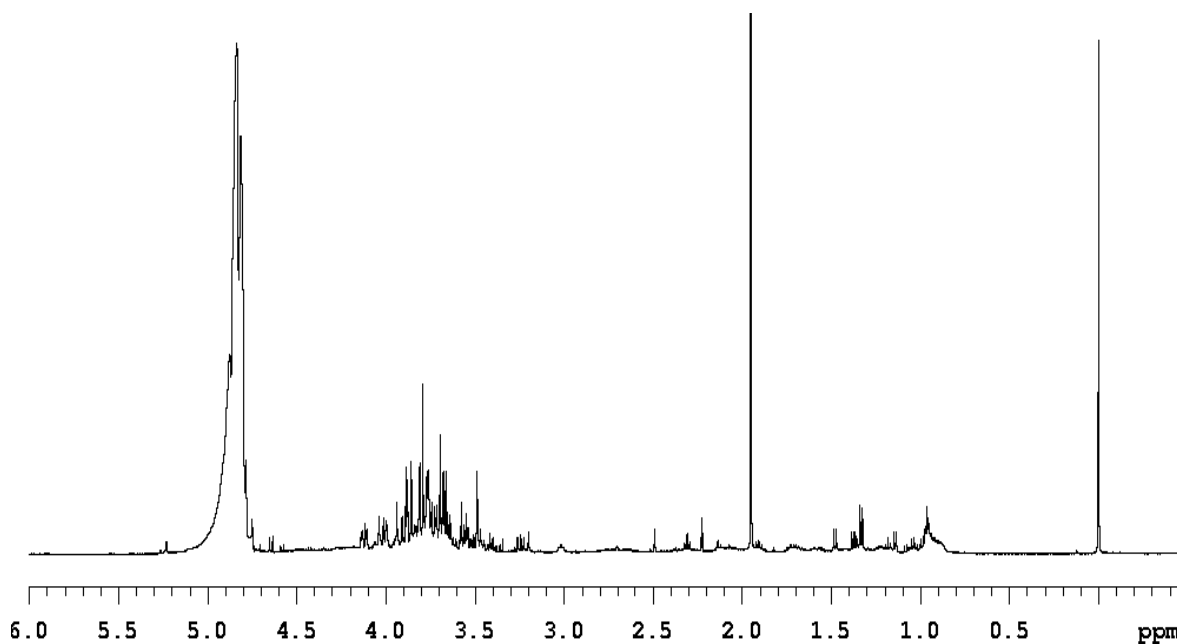
E 37: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 1188 de *Theobroma cacao* após 144 horas de fermentação.



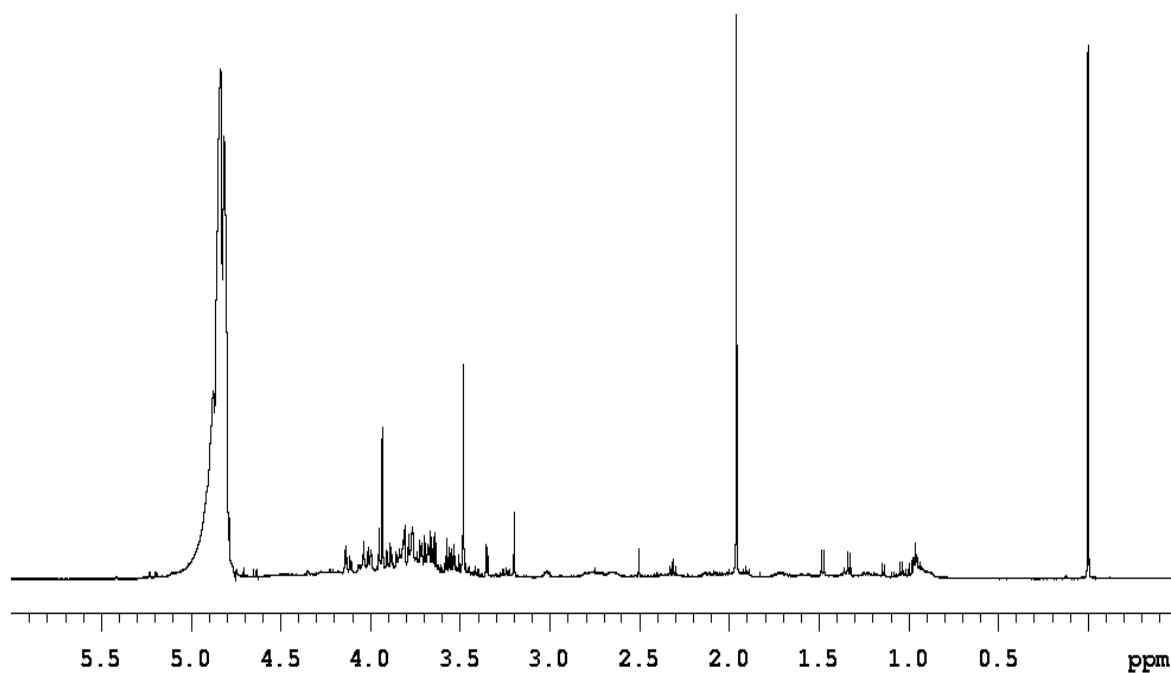
E 38: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade cepec de *Theobroma cacao* após 144 horas de fermentação.



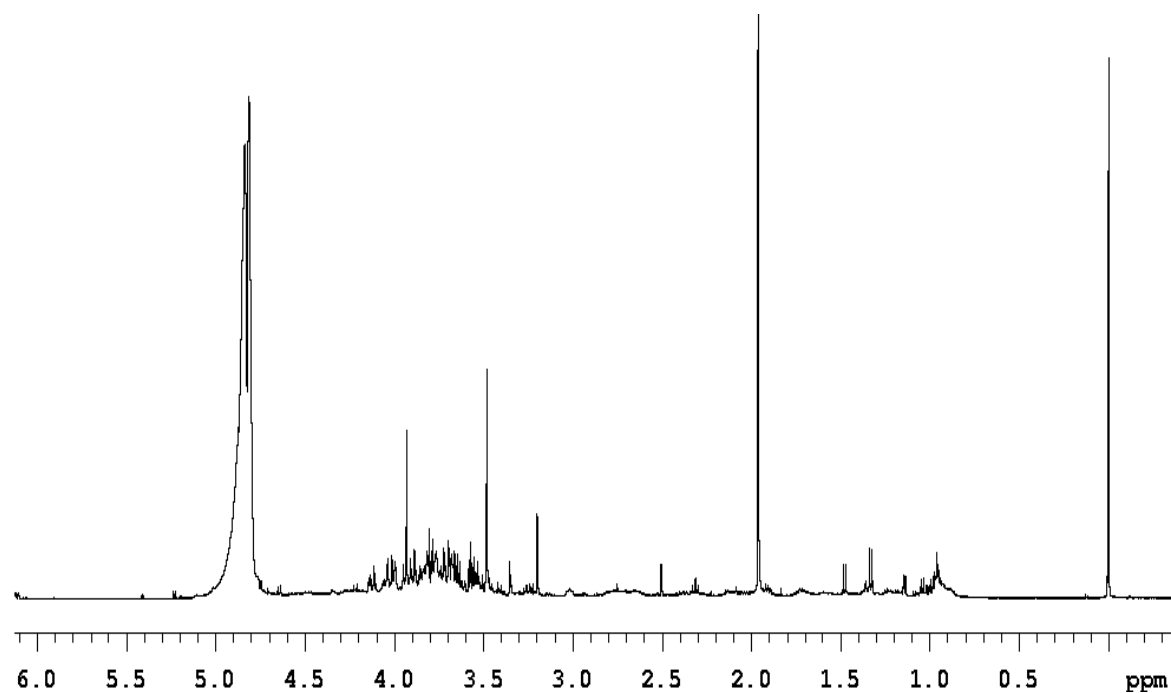
E 39: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3}$ mol.L $^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade comum de *Theobroma cacao* após 144 horas de fermentação.



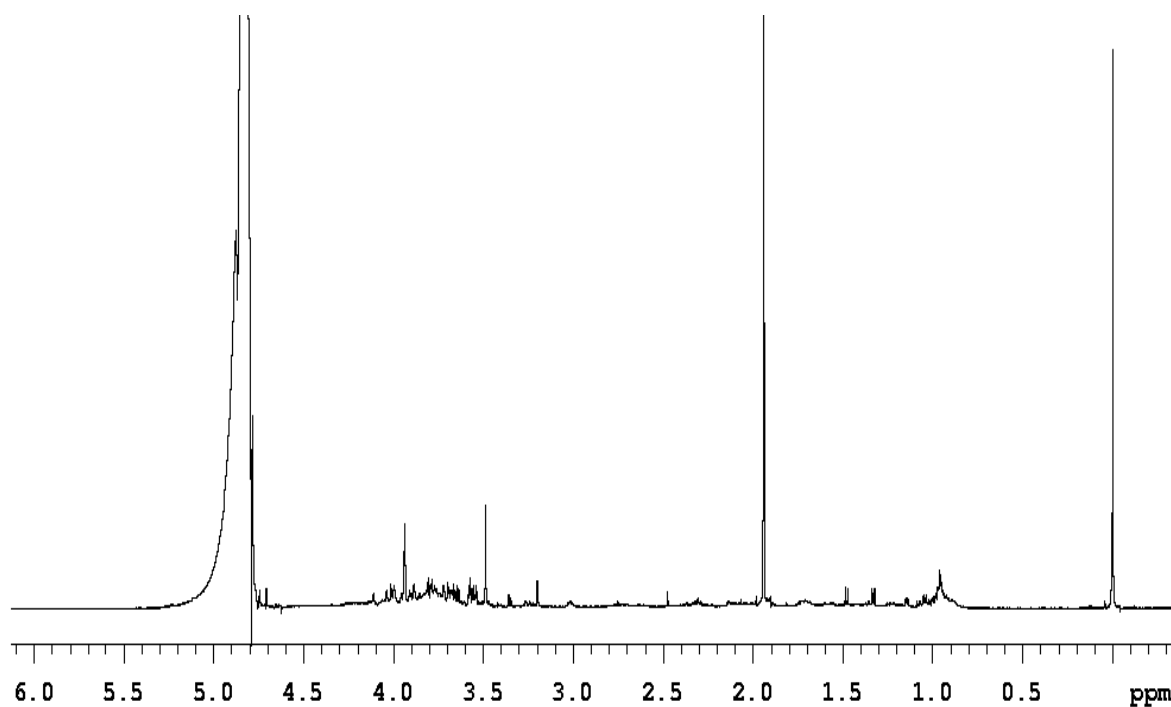
E 40: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3}$ mol.L $^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade EET de *Theobroma cacao* após 144 horas de fermentação.



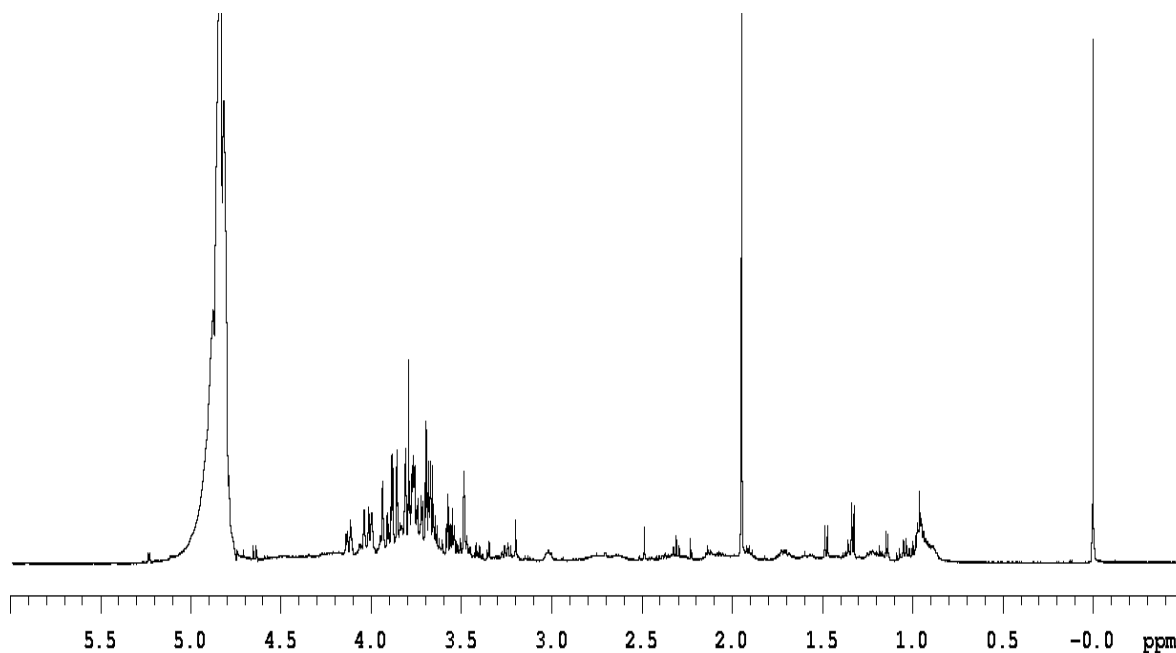
E 41: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 516 de *Theobroma cacao* após secagem ao sol.



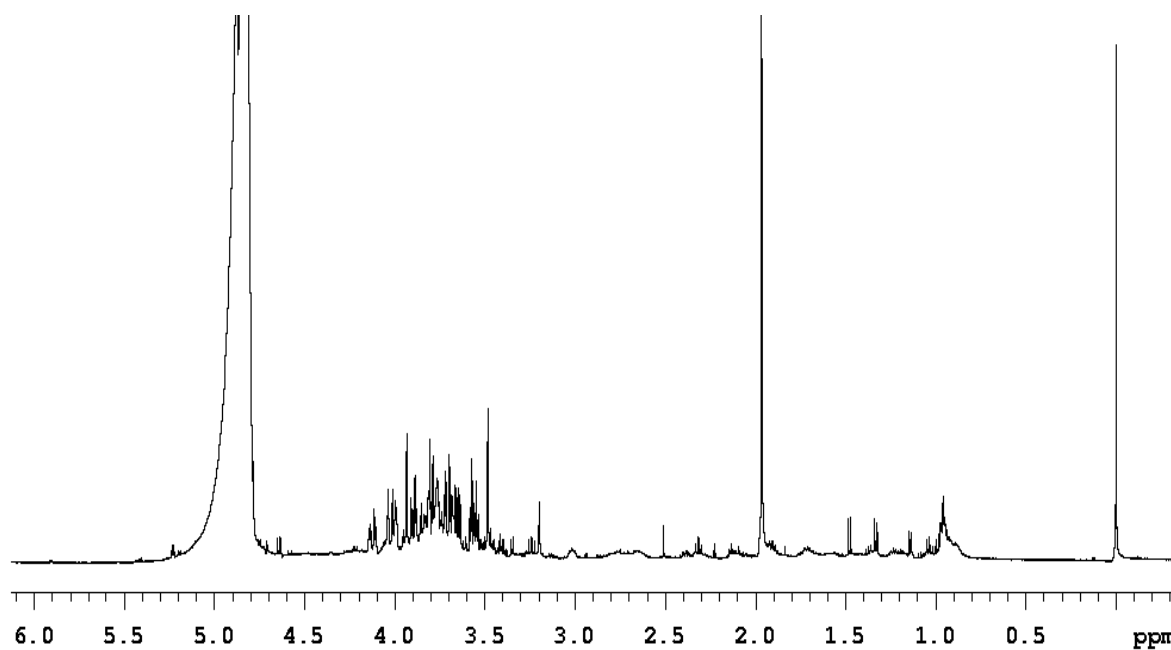
E 42: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 565 de *Theobroma cacao* após secagem ao sol.



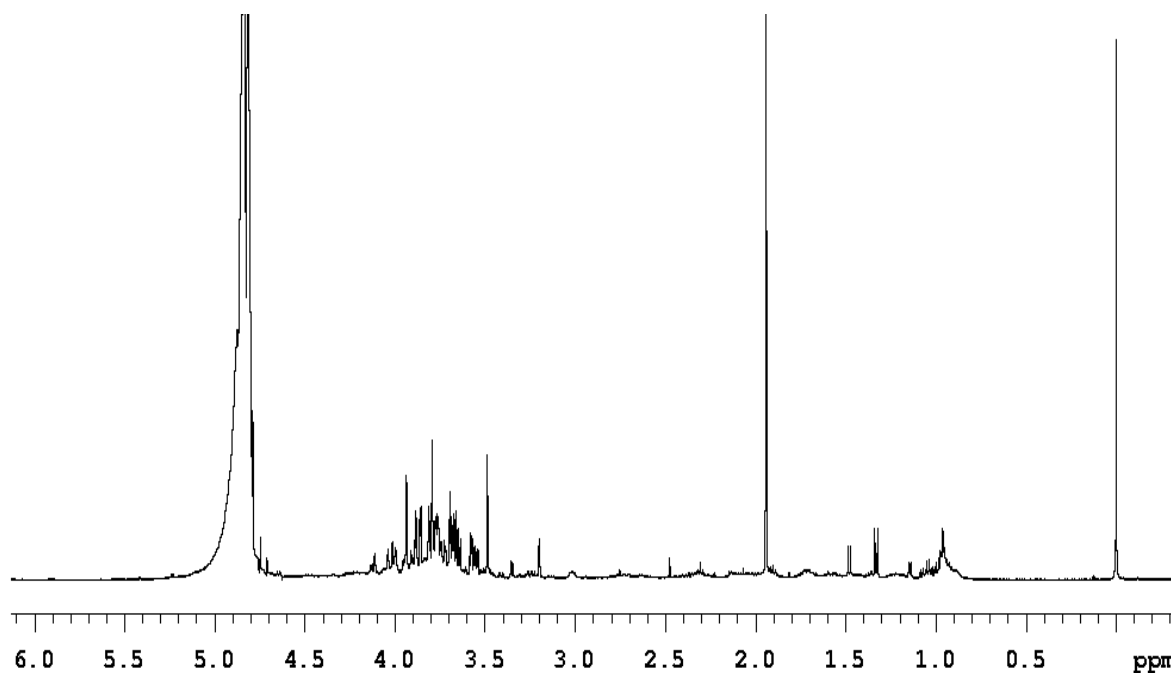
E 43: Espectro de RMN de ¹H (499,8828 MHz; D₂O; δ_{TPSA} 0,00 ppm; TPSA = 0,50x10⁻³ mol.L⁻¹, 25° C) de extrato aquoso da variedade 654 de *Theobroma cacao* após secagem ao sol.



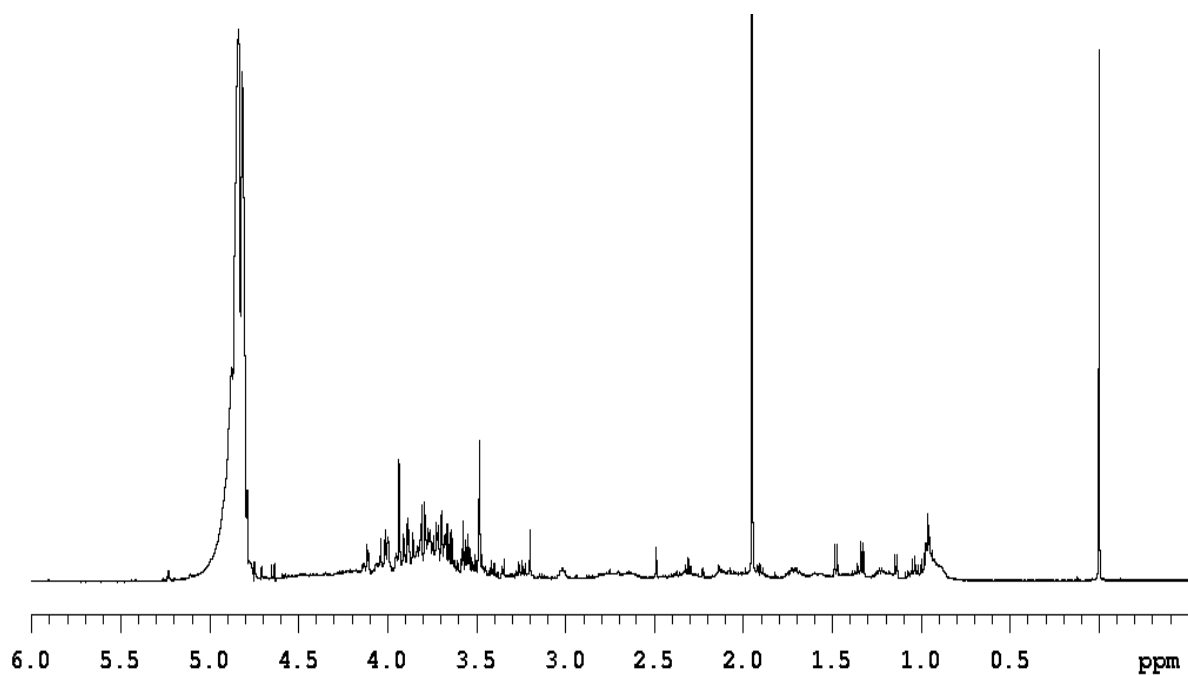
E 44: Espectro de RMN de ¹H (499,8828 MHz; D₂O; δ_{TPSA} 0,00 ppm; TPSA = 0,50x10⁻³ mol.L⁻¹, 25° C) de extrato aquoso da variedade 656 de *Theobroma cacao* após secagem ao sol.



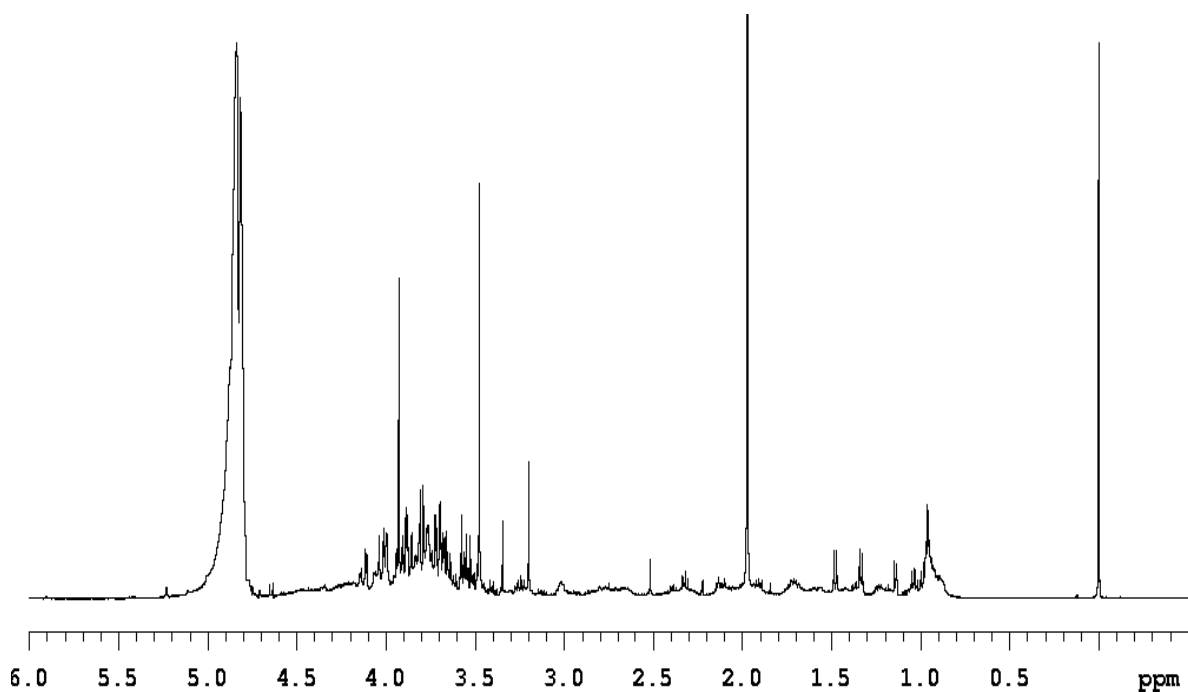
E 45: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 774 de *Theobroma cacao* após secagem ao sol.



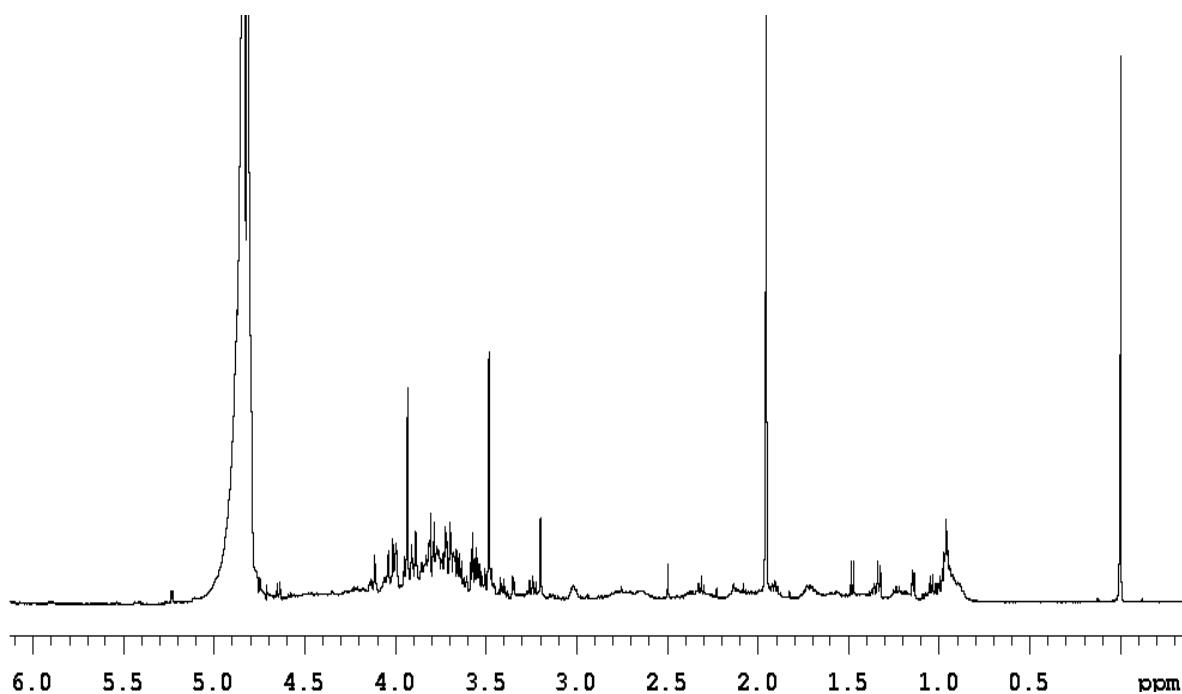
E 46: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 792 de *Theobroma cacao* após secagem ao sol.



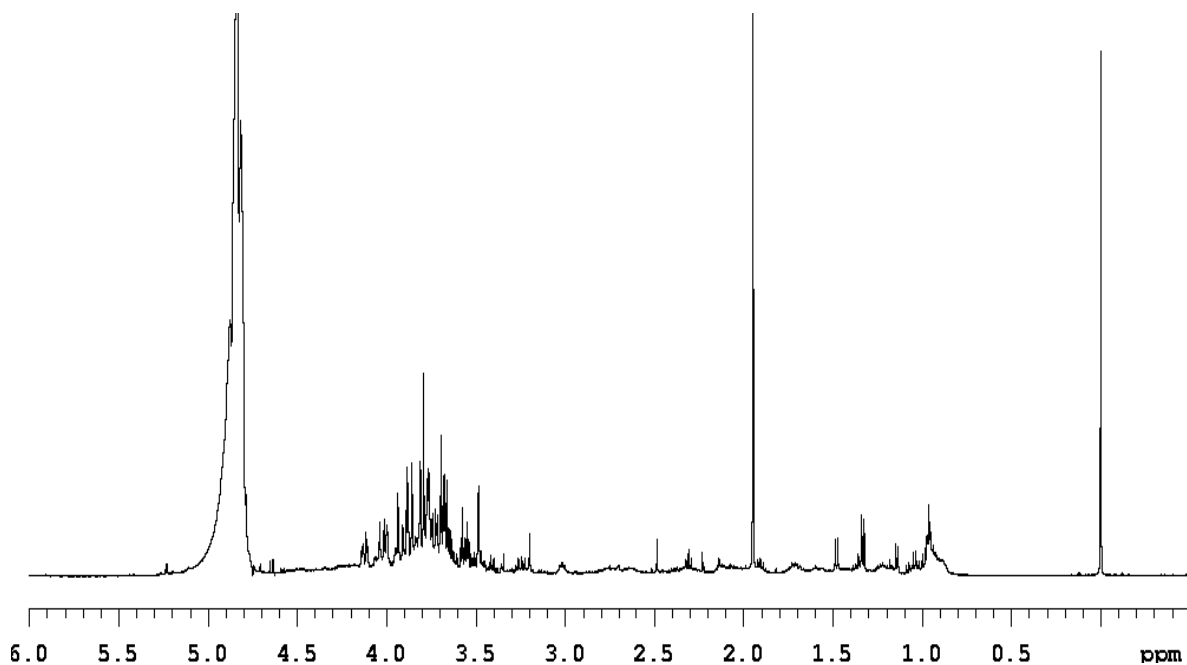
E 47: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3}$ mol.L $^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade 1188 de *Theobroma cacao* após secagem ao sol.



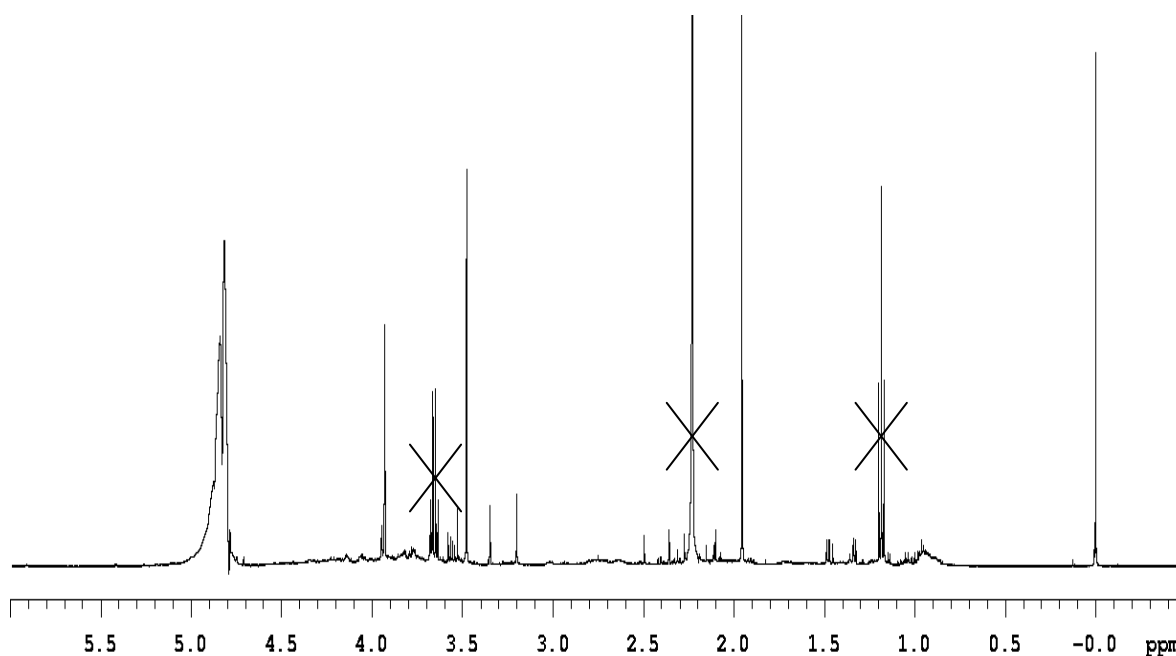
E 48: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3}$ mol.L $^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade cepec de *Theobroma cacao* após secagem ao sol.



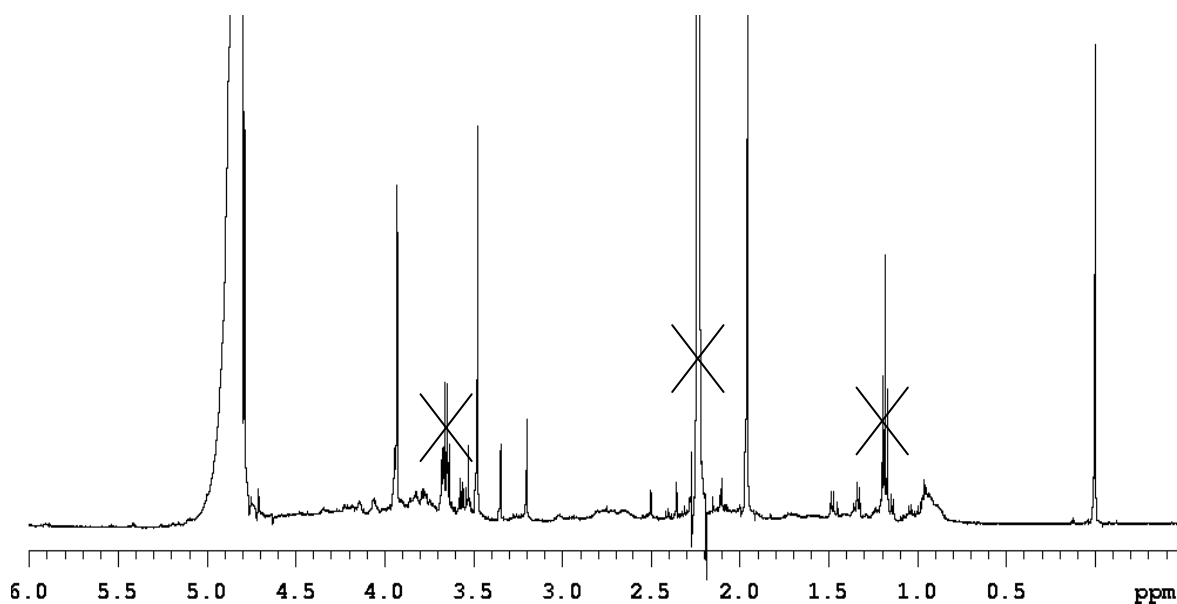
E 49: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade comum de *Theobroma cacao* após secagem ao sol.



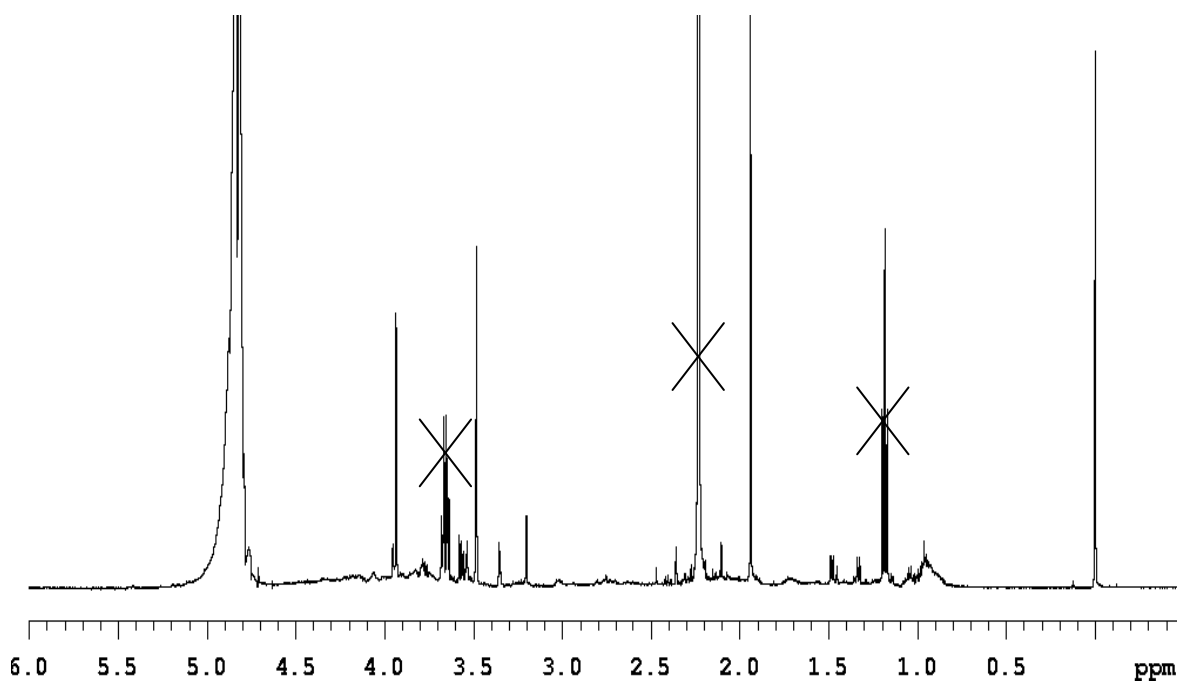
E 50: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade EET de *Theobroma cacao* após secagem ao sol.



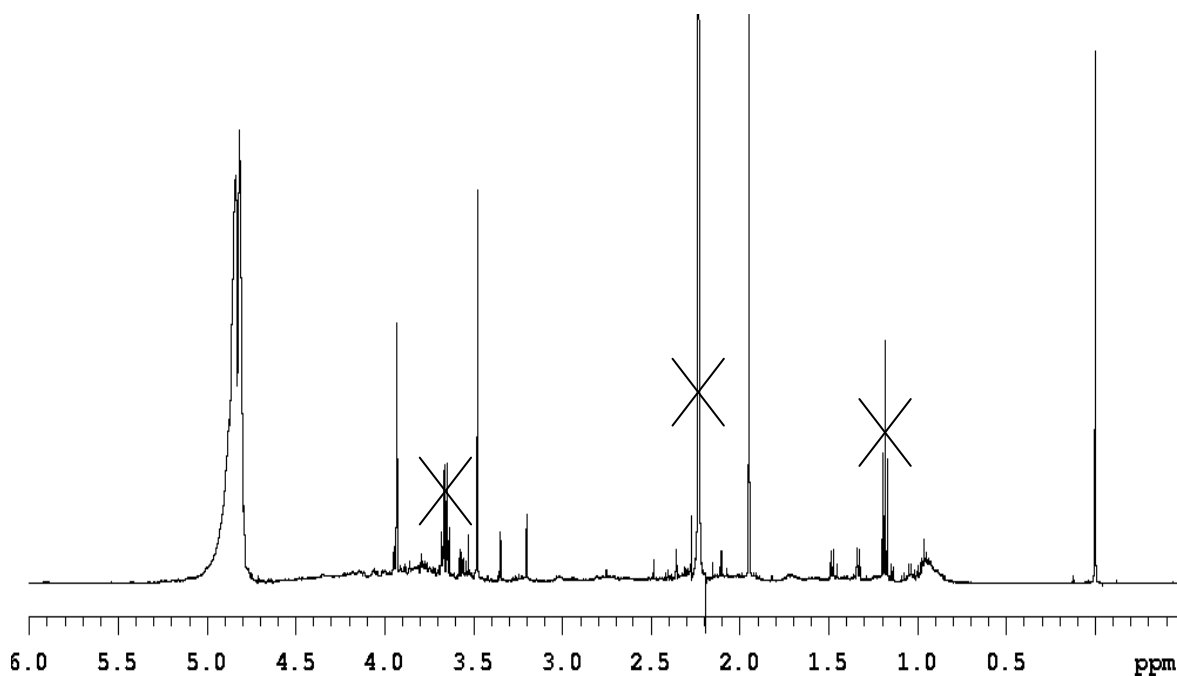
E 51: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 516 de *Theobroma cacao* após torração (impurezas incorporadas durante preparação da amostra – etanol e acetona).



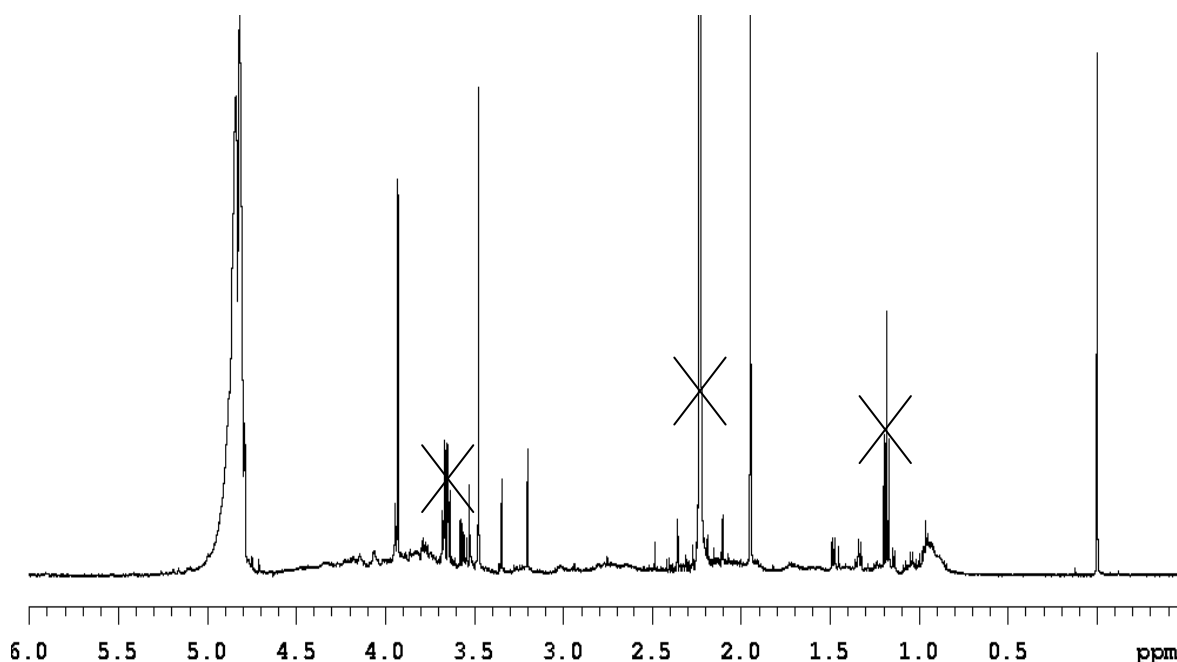
E 52: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 565 de *Theobroma cacao* após torração (impurezas incorporadas durante preparação da amostra – etanol e acetona).



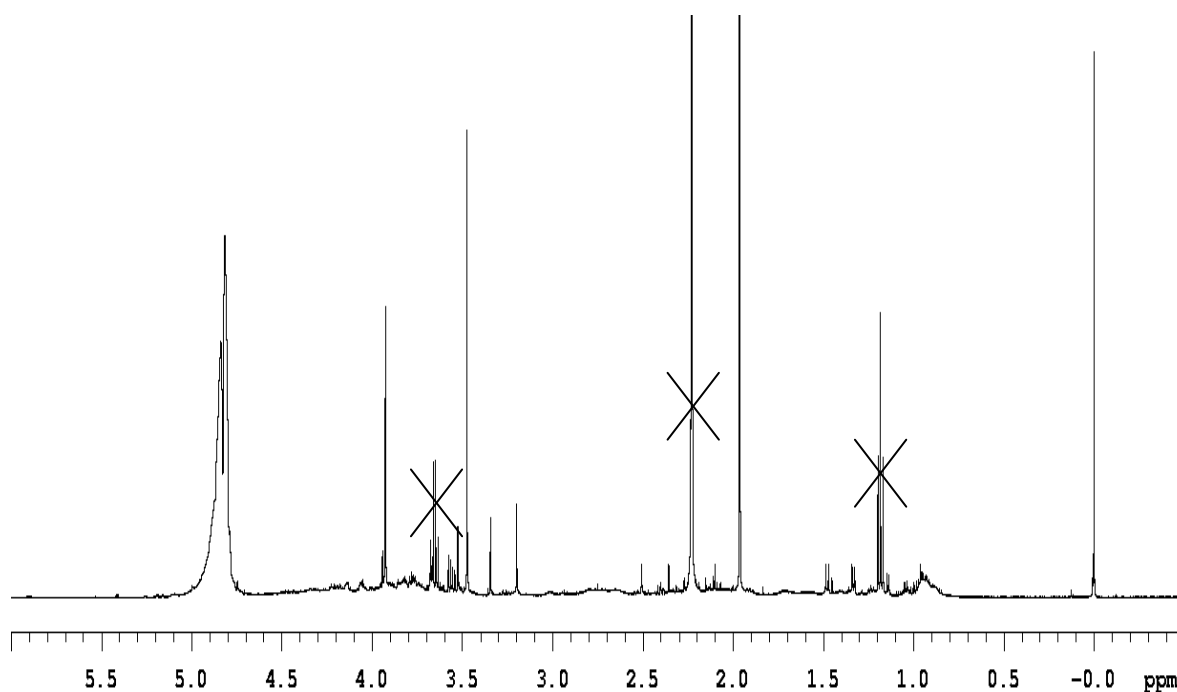
E 53: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 654 de *Theobroma cacao* após torração (impurezas incorporadas durante preparação da amostra – etanol e acetona).



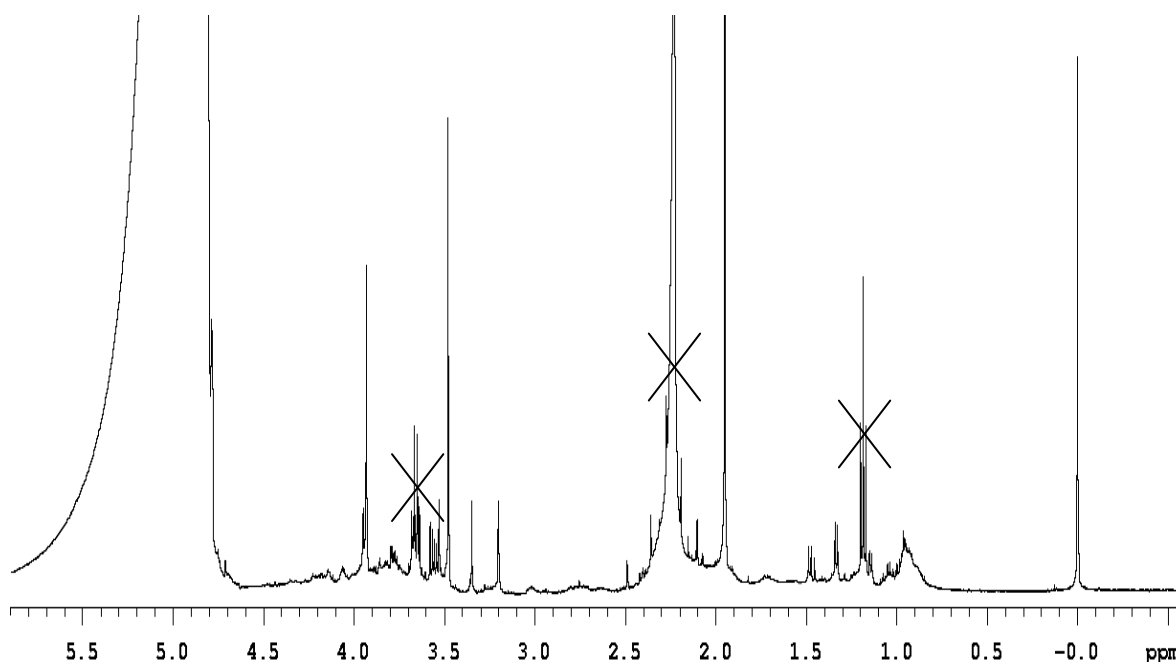
E 54: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 656 de *Theobroma cacao* após torração (impurezas incorporadas durante preparação da amostra – etanol e acetona).



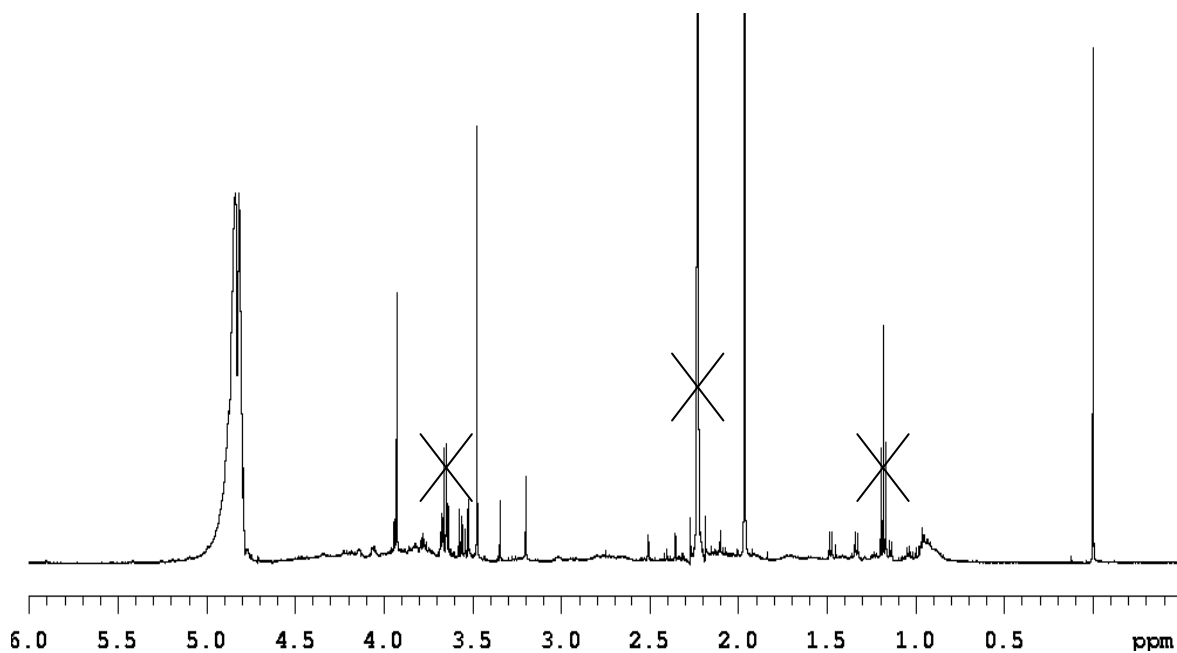
E 55: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 774 de *Theobroma cacao* após torração (impurezas incorporadas durante preparação da amostra – etanol e acetona).



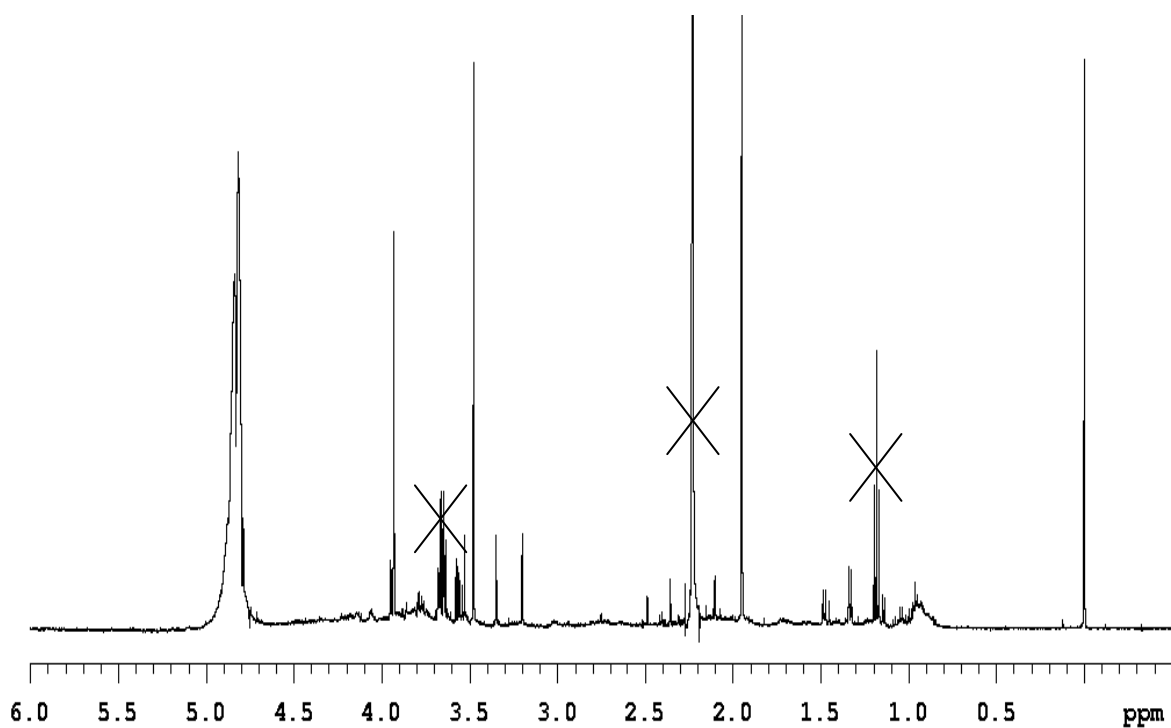
E 56: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 792 de *Theobroma cacao* após torração (impurezas incorporadas durante preparação da amostra – etanol e acetona).



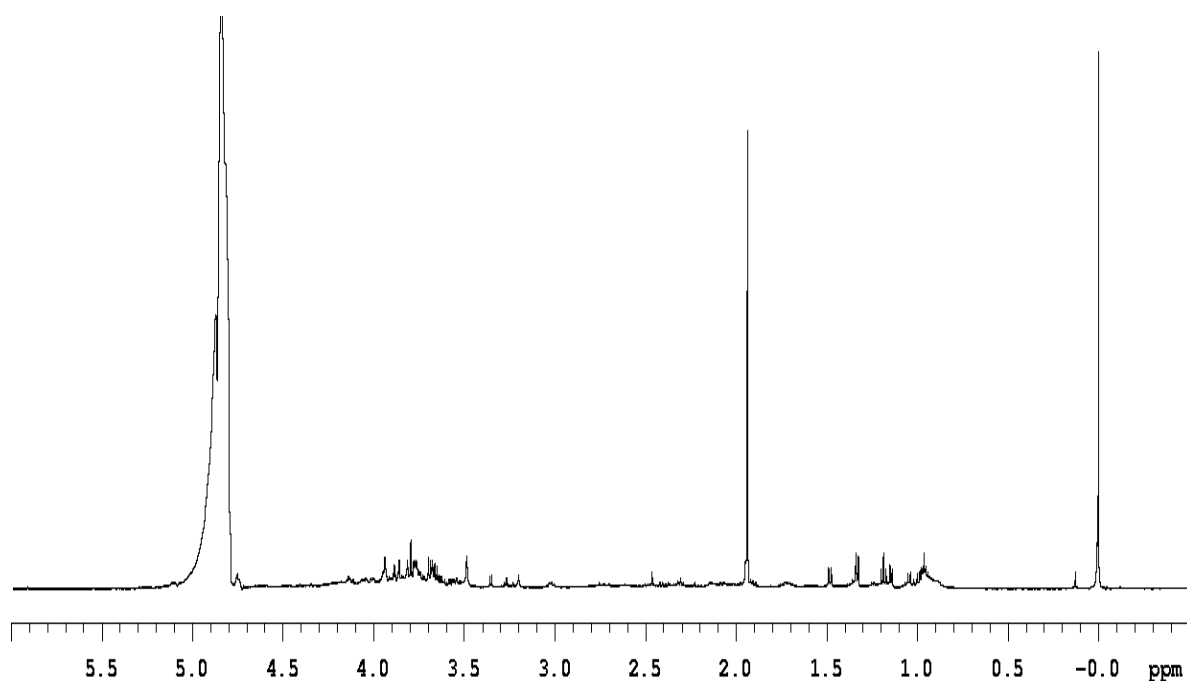
E 57: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade 1188 de *Theobroma cacao* após torração (impurezas incorporadas durante preparação da amostra – etanol e acetona).



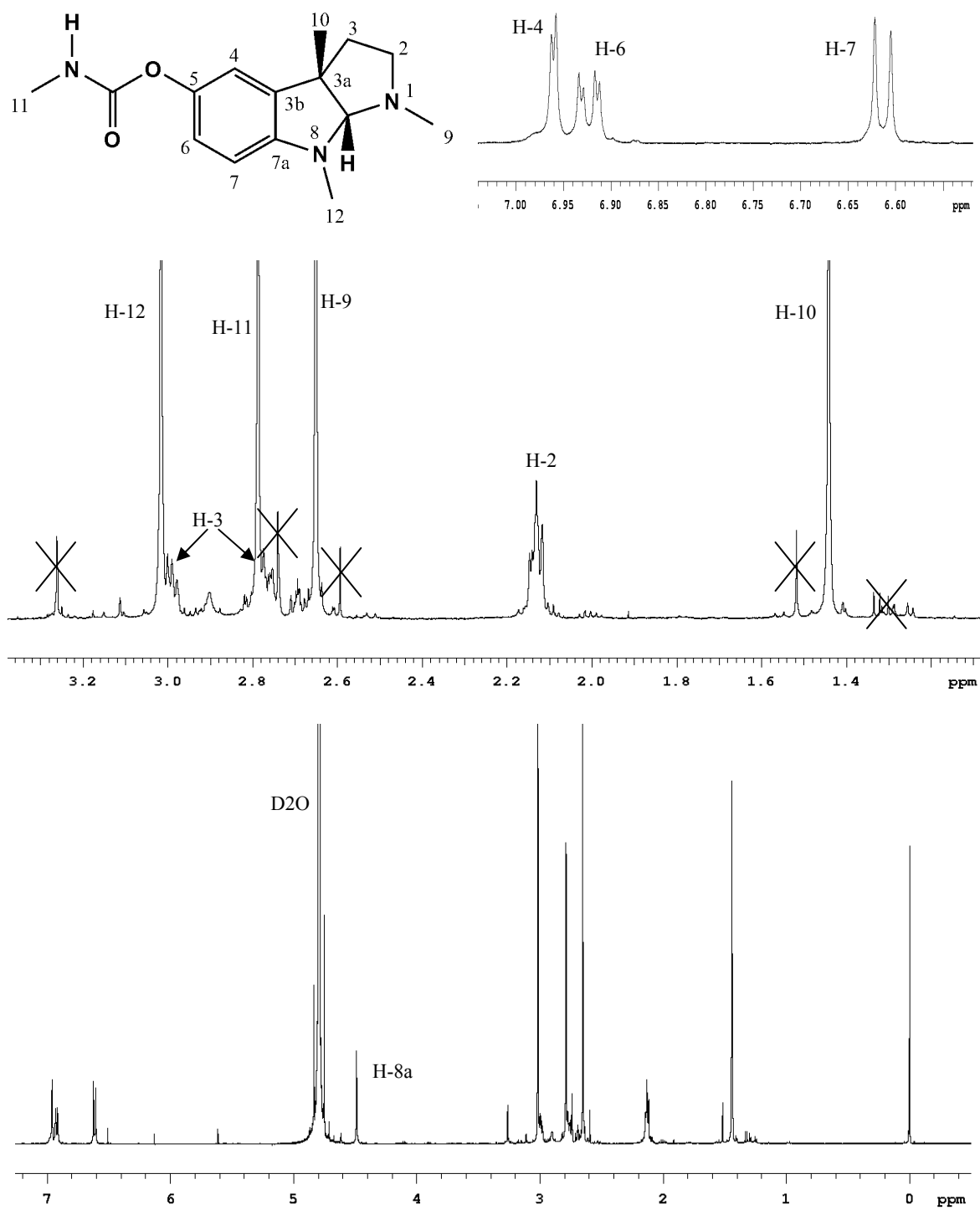
E 58: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C) de extrato aquoso da variedade cepec de *Theobroma cacao* após torração (impurezas incorporadas durante preparação da amostra – etanol e acetona).



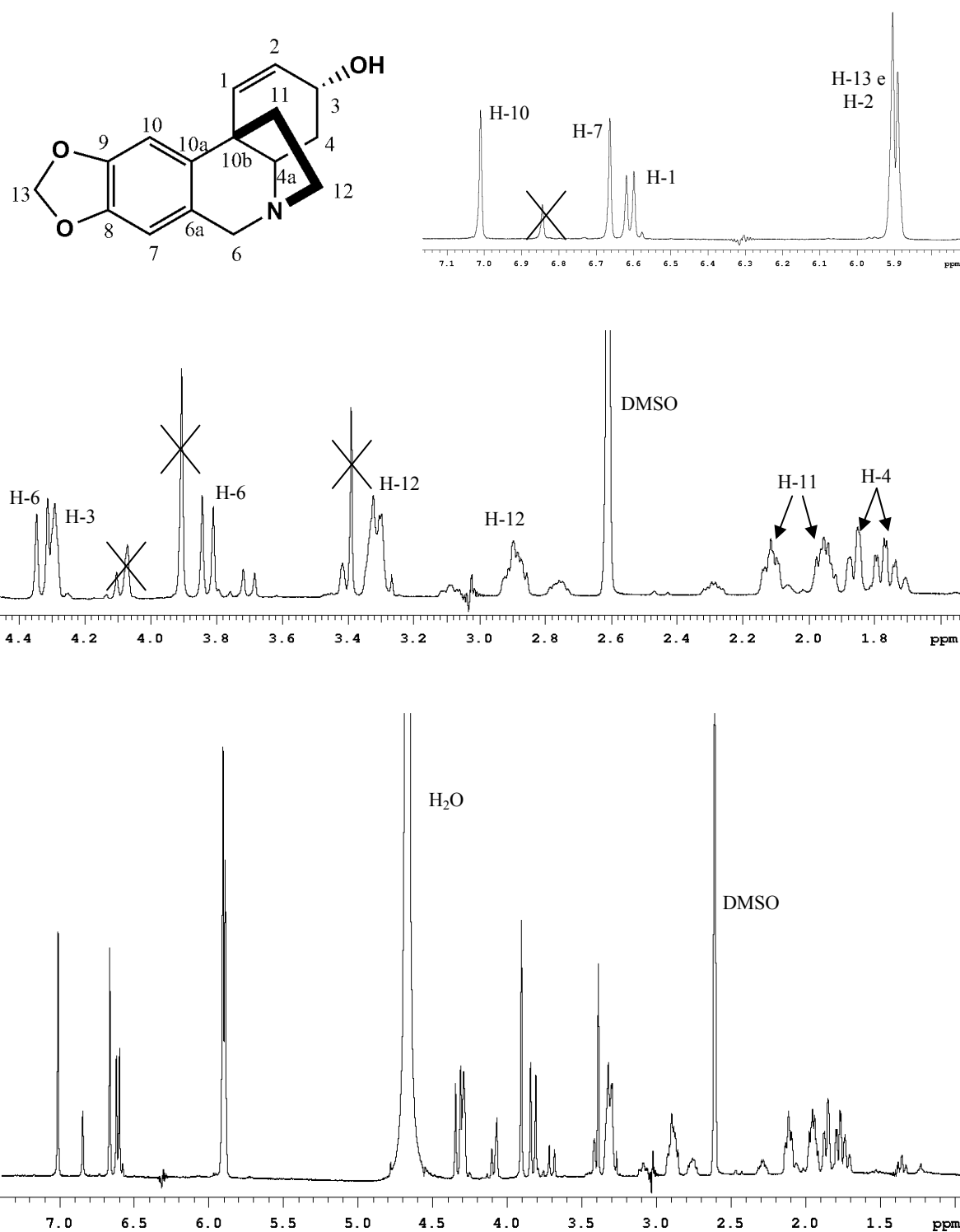
E 59: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3}$ mol.L $^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade comum de *Theobroma cacao* após torração (impurezas incorporadas durante preparação da amostra – etanol e acetona).



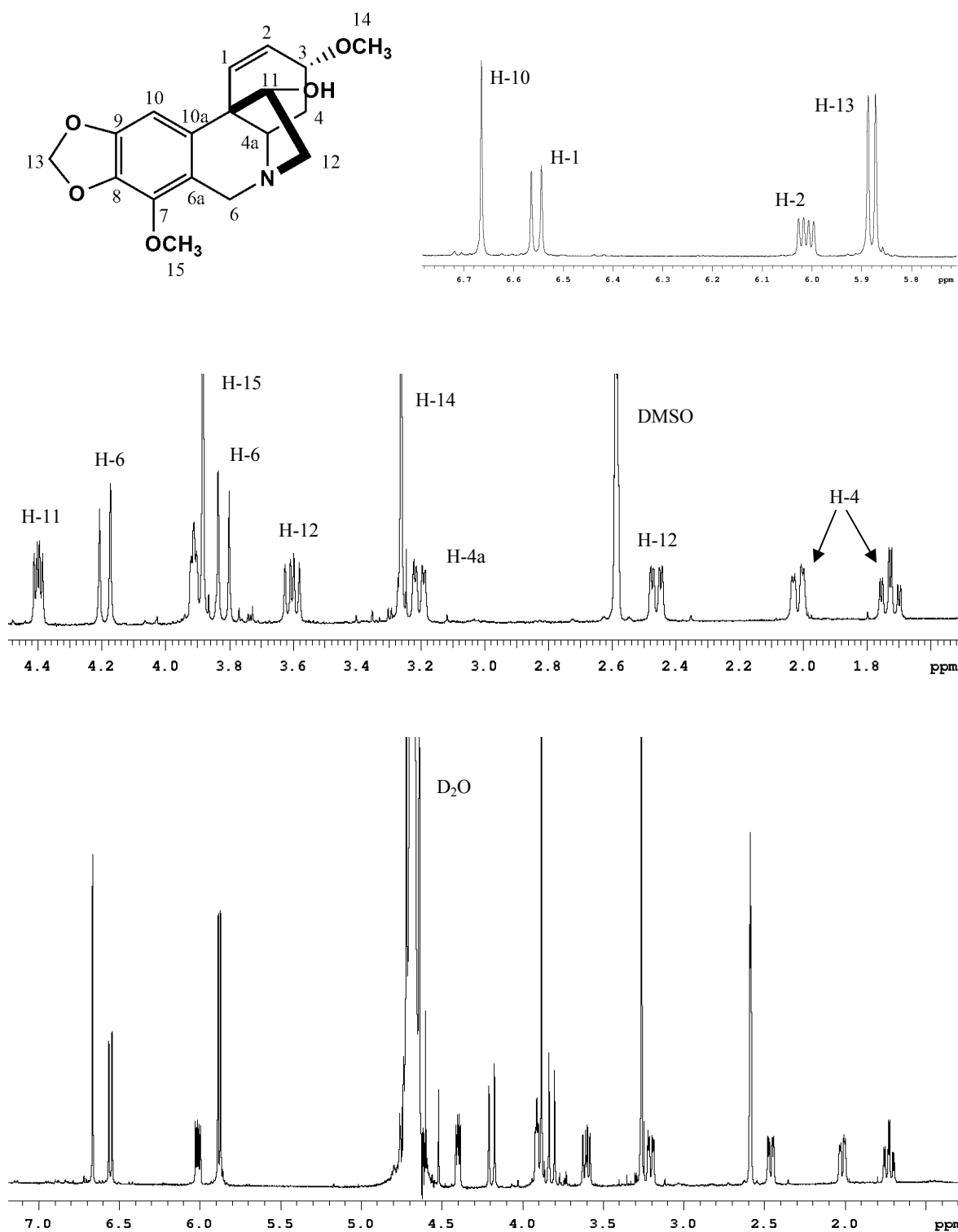
E 60: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; δ_{TPSA} 0,00 ppm; $\text{TPSA} = 0,50 \times 10^{-3}$ mol.L $^{-1}$, 25° C) de extrato aquoso da variedade EET de *Theobroma cacao* após torração.



E 61: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; $\delta_{\text{H}_2\text{O}}$ 4,68 ppm; 25° C) da fisostigmina. Acima expansões das regiões de 1,10 e 3,38 ppm e 5,52 e 7,04ppm.



E 62: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; $\delta_{\text{H}_2\text{O}}$ 4,68 ppm; 25° C) da crinina. Acima expansões das regiões de 1,54 e 4,45 ppm e 5,72 e 7,16 ppm.



E 62: Espectro de RMN de ^1H (499,8828 MHz; D_2O ; $\delta_{\text{H}_2\text{O}}$ 4,68 ppm; 25° C) da ambelina. Acima expansões das regiões de 1,50 e 4,49 ppm e 5,71 e 6,78 ppm.

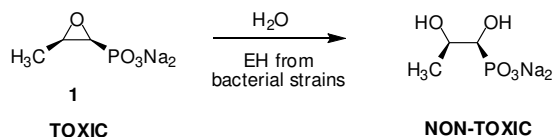
Fosfomycin Binding Events in Living Bacterial Cells observed by NMR Spectroscopy**

*Cíntia D. F. Milagre, Luís F. Cabeça, Lucas G. Martins and Anita J. Marsaioli**

Recent decades have experienced a technological revolution in drug discovery. However, finding effective drugs is difficult. A powerful approach in drug development consists on rational drug design, which uses structural information about drug targets or their natural ligands as a basis for the design of effective drug candidates.^[1] Therefore defining specific targets is crucial for successful drug discovery processes. In the search for new antimicrobial drugs, the fungal and bacterial cell wall, a structure with no mammalian counterpart, is an attractive therapeutic target as inhibition of the synthesis of a particular cell wall component will have no effect in their hosts and consequently no collateral drug effects.^[2] Most of the relevant biomedical proteins are membrane-bound. However, handling is problematic because the aggregation behavior of membrane proteins is unpredictable; they can lose their structure and functionality when removed from their natural membrane environment.^[3] Furthermore, it's difficult to know if the event is occurring with the membrane lipidic moiety or with membrane-bound proteins. On this basis, the use of STD NMR spectroscopy permits direct observation of biomacromolecule-ligand interactions at the molecular level and *in situ*, i.e. in their natural environment.^[4] In addition, STD NMR does not require any labeling or immobilization of either the ligand or the receptor and runs under close to the physiological conditions.^[5]

Herein we demonstrate that the direct interaction between the ligand and bacterial membrane-bound protein may be easily detected by simple STD NMR experiments with living cell suspensions, without isolating the protein receptor. This evidence enlarges the horizon of the NMR techniques applied in the drug discovery process.^[6] NMR experiments with fosfomycin [L-(cis)-1,2-epoxypropylphosphonic acid] and bacteria whole cell suspensions were used to differentiate a resistant strain from a non resistant strain. Control experiments were performed with liposomes and albumin to mimick lipid membrane and membrane-bound protein interactions, respectively.

Epoxides are highly reactive metabolic intermediates which react with DNA, RNA and proteins, thus classified as toxic, mutagenic and carcinogenic compounds.^[7] In nature, epoxide detoxification involves epoxide hydrolases (EC 3.3.2.3) that catalyze the ring-opening to the corresponding non-toxic vicinal diol. This characteristic was applied to screen epoxide hydrolases in bacteria by visual inspection of agar plates observing growth of epoxide hydrolases producing bacteria.^[8]



Scheme 1. Detoxification mechanism of epoxide hydrolases

Table 1. Microorganisms evaluated in epoxide hydrolase activity

Microorganism	Collection/Code	EH activity ^[b]
<i>Escherichia coli</i>	CCT/5050	-
<i>Bacillus pumillus</i>	CBMAI/8	-
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	CCT/1969	-
<i>Salmonella triphymurium</i>	CCT/528	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	CCT/7262	+

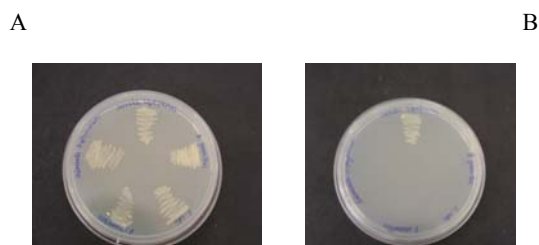


Figure 1. Selection for epoxide hydrolase activity: (A) positive control: agar plates containing NB media and (B) growth inhibition assay: agar plates containing NB media + 0.83 g L⁻¹ of fosfomycin with the fosfomycin-resistant strain *Serratia liquefaciens*

The fosfomycin mechanism of action is well known and involves blocking bacteria cell wall biosynthesis through irreversible inactivation of MurA (UDP-GlcNAc enoylpyruvyl transferase) by covalent alkylation of an active site Cys 115 residue.^[9] MurA is the protein

which catalyzes the condensation of phosphoenolpyruvate (PEP) and UDP-N-acetylglucosamine (UDP-Glc-Nac) to form UDP-GlcNAc-enolpyruvate, the main peptidoglycan of the bacterial cell wall.^[10] Therefore, according to this mechanism of action, our toxicity based assay could be rationalized as strains surviving fosfomycin exudate epoxide hydrolases, thus avoiding epoxide covalent binding to the bacterial membrane-bond protein.

Differentiating fosfomycin binding events with bacterial membranes and membrane-bond protein is not obvious. However model systems could be used to rationalize these interactions. Thus 400 nm liposomes of phospholipids were used as membrane models and were mixed with fosfomycin in phosphate/biphosphate buffer -D₂O solution, revealing no signal enhancement in the STD NMR experiment (Figure 2C), indicating that fosfomycin does not interact with the liposomes. This confirmed that indeed fosfomycin's first binding event is on a membrane-bond protein.^[11] A second STD experiment was performed with fosfomycin using HSA (human serum albumin) as a model protein which provided distinct signal enhancements for fosfomycin protons depicted in Figure 2E, together with the binding epitope. The H-1 protons of fosfomycin shows strong STD effects (100%) followed by H-2 protons (90%) indicating that these protons are saturated due to their close interaction with HSA while a weaker response is observed for CH₃ protons (47%) indicating that this ligand moiety is not in close proximity to the protein receptor.

Motivated by these two STD NMR experiments, one negative (fosfomycin + liposome) and the other positive (fosfomycin + HSA), we were driven to further investigate and characterize the fosfomycin binding specificity using whole bacterial cells. *Serratia liquefaciens* (CCT 7262), fosfomycin resistant as selected in our toxicity based screening (Table 1, Figure 1), was used in STD NMR experiments providing no signal enhancements (Figure 3E), thus corroborating our toxicity-based assay with epoxide hydrolases preventing the fosfomycin binding to the membrane-bond protein and providing a negative response in the STD experiment. To reinforce the parallelism between the toxicity assay and the STD response we have performed a second experiment with whole cells of *Escherichia coli*, a microorganism lacking epoxide hydrolases.^[12] As shown in Figure 3C fosfomycin strongly binds to *E. coli* membrane proteins (H-1 100% and H-2 94%) with the CH₃ protons showing a better interaction with the *E.coli* cells (71%) than with HSA (47%).

No STDD NMR^[13] was necessary in the whole cell experiment as the spin lock or $T_{1\rho}$ efficiently suppressed the large molecule signals. Observing binding of ligand to membrane-bound proteins in their natural environment can afford valuable information about these binding events especially because the membrane-bound proteins are quite difficult to deal with, frequently losing their structure and function when removed from their natural membrane environment.

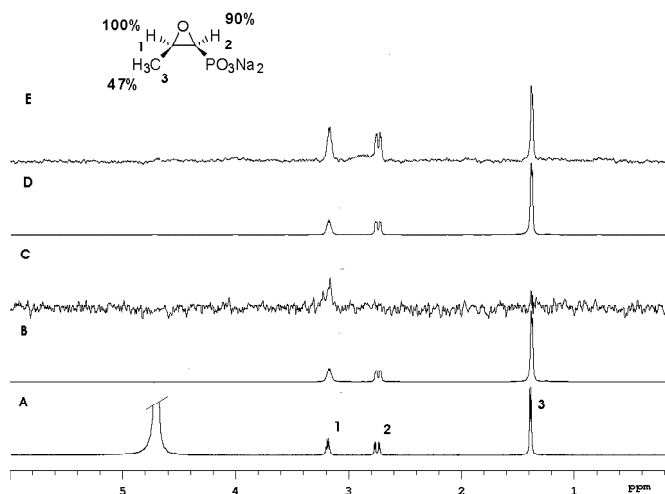


Figure 2. A) ^1H NMR spectra of fosfomycin; B) The off-resonance STD spectrum of fosfomycin in EPC liposomes (400 nm); C) The on-resonance STD spectrum of fosfomycin in EPC liposomes (400 nm). D) The off-resonance STD spectrum of fosfomycin + HSA; E) The on-resonance STD spectrum of fosfomycin + HSA. Top: fosfomycin structure and the relative degree of saturation transfer of the individual.

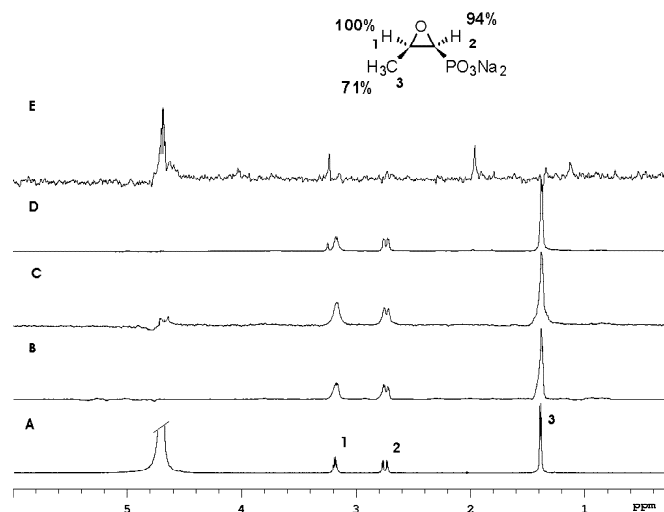


Figure 3. A) ^1H NMR spectra of fosfomycin; B) The off-resonance STD spectrum of fosfomycin + *Escherichia coli*; C) The on-resonance STD spectrum of fosfomycin + *Escherichia coli*; D) The off-resonance STD spectrum of fosfomycin + *Serratia liquefaciens*; E) The on-resonance STD spectrum of fosfomycin + *Serratia liquefaciens*. Top: fosfomycin structure and the relative degree of saturation transfer of the individual protons.

Saturation transfer difference NMR spectroscopy was employed to characterize epitopes of fosfomycin, a bactericidal broad-spectrum antibiotic, bound to intact whole bacterial cells, albumin and liposomes. Correlating the toxicity assay to the STD NMR interactions between a ligand and membrane-bound protein of living bacterial cells opens new possibilities in pharmaceutical research. These results have a unique bias of linking toxicity to membrane binding events thus providing an insight into a drug's mode of action in complex biological systems.

Experimental Section

Fosfomycin disodium salt was purchased from Sigma-Aldrich. Deuterated water (D_2O , 99.9%) was purchased from Acros Organics. HSA (fraction V) was purchased from Calbiochem and used without further purification. Egg phosphatidyl choline (EPC) was obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The microorganisms were

supplied by the Tropical Culture Collection (CCT) of the André Tosello Foundation, Campinas, SP, Brazil (<http://www.fat.org.br>).

Preparation of the Selection Agar Plates: a solution of fosfomycin in water (toxic concentration 0.50 mg/mL) was prepared and mixed homogenously with Nutrient Broth medium (1.5 % agar).

Selection for Epoxide Hydrolase Activity: five gram negative bacteria were plated on freshly made NB agar medium containing fosfomycin (epoxide). They were incubated at 30 °C until detectable cell growth was observed (approximately 24 hours). Active bacteria from the reference plate were picked for NMR studies.

Culture conditions: the pure cultures of the selected strains were inoculated with a loop into the NB media. A working volume of 30 mL (NB media after inoculation) in 125 mL Erlenmeyer flasks were cultivated in an orbital shaker at 30 °C, 150 rpm. The cells were harvested by centrifuging the 36 h culture broth. The wet biomass was used for NMR experiments.

Liposomes preparation: liposomes were obtained by evaporating stock chloroform solutions of EPC under a nitrogen stream. The samples were left under vacuum for 2 h to remove residual solvent.⁷ The lipids were then suspended in 0.4 mol L⁻¹ phosphate/biphosphate buffer solution, pH 7.4, producing large EPC multilamellar vesicles (MLV). The EPC (MLV) was extruded through Nucleopore polycarbonate membranes of 0.4 µm pore diameters (12 cycles), to form a suspension of 400 nm liposomes vesicles. The total lipid concentration was 5 mmol L⁻¹.

Sample preparation: 1) **Liposome experiment:** Fosfomycin solution was prepared in phosphate/biphosphate buffer solution in deuterated water (D₂O, 99.9 %) at pH 7.4 and added to the liposomes to reach 10 mmol L⁻¹ as the final concentration. 2) **HSA experiment:** Fosfomycin solution (10 mmol L⁻¹) was prepared in phosphate/biphosphate buffer solution in deuterated water (D₂O, 99.9 %) at pH 7.4. HSA (90 mmol L⁻¹) was added to the antibiotic solution and gently mixed to avoid foam formation. 3) **Whole cells suspensions experiments:** Fosfomycin solution (10 mmol L⁻¹) was prepared in phosphate/biphosphate buffer solution in deuterated water (D₂O, 99.9 %) at pH 7.4. Bacterial wet biomass (16 mg) was added to the antibiotic solution and mixed.

NMR measurements: All NMR experiments were performed at 298 K on a Varian INOVA-500 spectrometer operating at 11.74 Tesla, observing ^1H at 499.89 MHz. The spectrometer was equipped with a 5 mm penta resonance (^{15}N , ^{13}C , ^1H , ^{31}P) inverse detection probe with z-gradient. The ^1H NMR chemical shifts are given in ppm (parts per million) related to the residual HDO signal at 4.68 ppm. In all saturation transfer experiments a train of Gaussian pulses was set either at -0.5 ppm (on-resonance) or at 30 ppm (off-resonance) for the STD and STD-control experiments respectively. Appropriate phase cycling produced the subtraction after every scan. The length of the selective pulse at - 0.5 ppm was 50 ms and the delay between the pulses was 1 ms. The duration of presaturation of 2.55 s was adjusted using $n=100$ cycles. The STD spectrum provide group epitope mapping (GEM) with values obtained from the individual signal intensities in the STD spectrum (I_{STD}) and in the reference NMR spectrum (I_0). The ratios of the intensities I_{STD}/I_0 are normalized using the largest STD effect as reference.^[5]

Keywords: drug interactions – fosfomycin – human serum albumin – liposomes – NMR spectroscopy

- [1] a) S. M. Keena, J. A. Geyer, W. J. Welsh, S. T. Prigge, N. C. Waters, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2005**, 8, 27-38; b) J. W. Liebeschuetz, S. D. Jones, P. J. Morgan, C. W. Murray, A. D. Rimmer, J. M. E. Roscoe, B. Waszkowycz, P. M. Welsh, W. A. Wylie, S. C. Young, H. Martin, J. Mahler, L. Brady, K. Wilkinson, *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 1221–1232.
- [2] N. H. Georgopapadakou, J. S. Tkacz, *Trends Microbiol.* **1995**, 3 (3), 98-104.
- [3] R. Meinecke, B. Meyer, *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 3059-3065
- [4] a) T. Haselhorst, J. C. Wilson, R. J. Thomson, S. McAtamney, J. G. Menting, R. L. Coppel, M. Itzstein, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2004**, 56, 346-353; b) A. J. Benie, R. Moser, E. Baumi, D. Blaas, T. Peter, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14-15.
- [5] a) M. Mayer, B. Meyer, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 1902-1906, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1784-1788; b) M. Mayer, B. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 6108-6117; c) B. Meyer, T. Peters, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 890-918, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 864-890.
- [6] S. Mari, D. Serrano-Gómez, F. J. Cañada, A. L. Corbí, J. Jiménez-Barbero, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 300-302, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 296-298.
- [7] a) D. M. Jerina, J. W. Daly, *Science* **1974**, 185, 573-582; b) D. R. Wade, S. C. Airy, J. E. Sinsheimer, *Mutat. Res.* **1978**, 58, 217-223; c) A. J. Fretland, C. J. Omiecinski, *Chem. Biol. Interact.* **2000**, 129, 41-59.
- [8] M. T. Reetz, L. W. Wang, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2006**, 9, 295-299 and references cited herein.
- [9] a) J. L. Marquardt, E. D. Brown, W. S. Lane, T. M. Haley, Y. Ichikawa, C. H. Wong, C. T. Walsh, *Biochemistry* **1994**, 33, 10646-10651; b) D. H. Kim, W. J. Lees, K. E. Kempell, W. S. Lane, K. Duncan, C. T. Wash, *Biochemistry* **1996**, 35, 4923-4928.
- [10] B. Chandrakala, B. C. Elias, U. Mehra, N. S. Umapathy, P. Dwarkanath, T. S. Balganes, S. M. Desousa, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, 45, 768-775.
- [11] F. M. Kahan, J. S. Kahan, P. J. Cassidy, H. Kropp, *Ann. NY Acad. Sci.* **1974**, 235, 364-386.
- [12] M. S. Smit, M. Labuschagne, *Curr. Org. Chem.* **2006**, 10, 1145-1161.
- [13] B. Claasen, M. Axmann, R. Meinecke, B. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 916-919.
- [14] C. M. S. Cereda, D. R. Araújo, G. B. Brunetto, E. de Paula, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **2004**, 7, 235-240.