



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Instituto de Química

Luan Alves Martinho

**Exploração da reação de ciclização de moléculas baseadas  
nas solonamidas com potencial ação inibidora de *quorum*  
*sensing* de *Staphylococcus aureus***

Brasília-DF

1º/2019

Luan Alves Martinho

**Exploração da reação de ciclização de moléculas baseadas nas solonamidas com potencial ação inibidora de *quorum sensing* de *Staphylococcus aureus***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química, pelo Curso de Química Bacharel do Instituto de Química da Universidade de Brasília.

Orientador: Dr. Angelo Henrique de Lira Machado

Co-orientador: MSc. José Feliciano Brango Vanegas

Brasília-DF

1º/2019

Luan Alves Martinho

**Exploração da reação de ciclização de moléculas baseadas nas solonamidas com potencial ação inibidora de *quorum sensing* de *Staphylococcus aureus***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química, pelo Curso de Química Bacharel do Instituto de Química da Universidade de Brasília.

Orientador: Dr. Angelo Henrique de Lira Machado

Co-orientador: MSc. José Feliciano Brango Vanegas

Aprovado em 28/06/2019.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Guilherme Dotto Brand

---

Prof. Dr. Wender Alves da Silva

*“Rien ne se perd, rien ne se  
crée, tout se transforme.”*

*- Lavoisier, Antoine*

*“Dedico este trabalho à minha  
mãe Vanilza, razão da minha vida.”*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar aos meus pais, Vanilza e Aurelindo, por todo o apoio e carinho oferecido aos longos destes anos, e por não deixar eu desistir dos meus sonhos, mesmo em horas difíceis.

Agradeço à minha irmã, Larissa, por todo o apoio e por sempre acreditar em mim.

Agradeço à minha família, por sempre acreditarem tanto em mim, muitas vezes até mais do que eu mesmo acredito.

Agradeço aos meus orientadores, Angelo Machado e José Brango, por sempre se interessarem e estarem disponíveis as minhas dúvidas, pela paciência, pelo apoio, incentivo e dedicação, e por compartilharem seu conhecimento.

Agradeço aos Laboratórios de Isolamento e Transformação de Moléculas Orgânicas (LITMO) e de Química Metodológica e Orgânica Sintética (LaQMOS), pelo acolhimento, pela ótima convivência e pelas trocas de conhecimento. Um agradecimento especial à Fernanda, por me ajudar na rotina do laboratório e pelas análises feitas de RMN.

Agradeço ao Grupo de Automação, Quimiometria e Química Ambiental (AQQUA), em especial a professora Dra. Ana Cristi, e suas estudantes de doutorado, Fabiana e Camila, por todo o aprendizado e por terem mudado meu olhar sobre a Ciência.

Agradeço aos professores, Dra. Márcia Murta, Dra. Aline Oliveira, Dra. Talita Fernandes, Dr. Rafael Rocha, Dr. Alexandre Fonseca, Dr. Carlos Infante, Dra. Marly Eiko, Dra. Valéria Bellotto, Dr. Davi Alexsandro, Dr. Kleber Mundim, e a Dra. Cláudia Gatto, pela contribuição na minha formação acadêmica.

Agradeço ao Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada (NuPMIA), em especial ao professor Dr. José Roberto, a Andreanne, e ao Dr. Daniel, por terem me cedido o uso do HPLC.

Agradeço ao Dr. Éder Barbosa e ao Laboratório de Espectrometria de Massa (LEM) da Embrapa Recursos Energéticos e Biotecnologia pelas análises de massas.

Agradeço à Central Analítica, em especial ao Alan, pelas análises de CG-EM.

Agradeço à minha banca, os professores Dr. Wender Alves e Dr. Guilherme Dotto, pelas contribuições neste trabalho.

À UnB e ao Instituto de Química.

## RESUMO

As solonamidas são substâncias naturais inibidoras do *quorum sensing* de *Staphylococcus aureus*. Neste trabalho, foram estudadas as reações de ciclização de moléculas análogas aos produtos naturais, por meio de uma reação de substituição nucleofílica viníloga ( $S_N2'$ ), entre um grupo tiol ou um grupo álcool da cadeia lateral de resíduos de aminoácidos e o acetato alílico proveniente de um resíduo de adutos de Morita-Baylis-Hillman. Inicialmente, foram sintetizados os adutos de Morita-Baylis-Hillman, seguido de uma reação de hidrólise básica, para a obtenção dos ácidos carboxílicos  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados. Estes ácidos foram acoplados à porção *N*-terminal de tetrapeptídeos que contêm resíduo de cisteína ou serina como a porção *C*-terminal, ainda ligados à resina Rink-amida empregada na síntese em fase sólida. Em seguida, foram exploradas as reações de ciclização  $S_N2'$  sob a resina, cujos resultados empregando o grupo sulfidril a possibilitaram uma redução considerável na quantidade de solvente empregado na síntese com equivalente desempenho para a obtenção das moléculas análogas às solonamidas quando comparado ao resultado da reação de ciclização em solução.

**Palavras chave:** Solonamidas, adutos de Morita-Baylis-Hillman, macrociclização.



## ABSTRACT

The solonamides are natural substances with inhibitory activity against the quorum sensing of *Staphylococcus aureus*. In this work, the macrocyclization based on nucleophilic substitution reaction ( $S_N2'$ ) reaction to affords molecules analogous to these natural products were studied. This strategy was based on the reaction between a terminal sulfhydryl or an alcohol group found at the amino acid residues side chains and the allylic acetate of Morita-Baylis-Hillman adduct residues. Initially, the adducts of Morita-Baylis-Hillman were synthesized, followed by its basic hydrolysis reaction, to obtain  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated carboxylic acids. Then, these acids were introduced to the C-terminus of tetrapeptides containing cysteine or serine residues as *N*-terminus still linked to Rink-amide resin. The on-resin macrocyclization was explored and, where the sulfhydryl containing peptidomimetics were reacted, the desired analogues were afforded in the same yield and considerable reduction in the amount of solvent used.

**Key words:** Solonamides, Morita-Baylis-Hillman adducts, macrocyclization.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>XVI</b>
<b>LISTA DE ESQUEMAS</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>XX</b>
<b>1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
1.1 INTRODUÇÃO .....	22
1.2 OBJETIVOS .....	23
1.2.1 Objetivo geral .....	23
1.2.2 Objetivos específicos .....	23
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>24</b>
2.1 O mecanismo <i>quorum sensing</i> de comunicação .....	25
2.2 O <i>quorum sensing</i> em bactérias Gram-negativas .....	26
2.3 O <i>quorum sensing</i> em bactérias Gram-positivas .....	29
2.3.1 O <i>quorum sensing</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	30
2.4 O sistema de <i>quorum sensing</i> baseado no LuxS/AI-2 .....	33
2.5 Inibidores de <i>quorum sensing</i> .....	34
2.5.1 Síntese de moléculas baseadas nos PAI's com potencial ação inibidora de <i>quorum sensing</i> em <i>S. aureus</i> .....	36
<b>3. SÍNTESE DOS ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN E SEUS RESPECTIVOS ÁCIDOS</b> .....	<b>40</b>
3.1 METODOLOGIAS .....	41
3.1.1 Síntese dos adutos de Morita-Baylis-Hillman .....	41
3.1.2 Síntese dos ácidos carboxílicos $\alpha$ , $\beta$ -insaturados a partir dos adutos de Morita-Baylis-Hillman .....	42
3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	43
3.2.1 Síntese dos adutos de Morita-Baylis-Hillman .....	43

3.2.2	Síntese dos ácidos carboxílicos $\alpha$ , $\beta$ -insaturados a partir dos adutos de Morita-Baylis.....	52
3.3	PARTE EXPERIMENTAL .....	60
3.3.1	Reagentes, solventes e soluções .....	60
3.3.2	Síntese dos adutos de Morita-Baylis-Hillman.....	61
3.3.3	Síntese dos ácidos carboxílicos $\alpha$ , $\beta$ -insaturados a partir dos adutos de Morita-Baylis-Hillman.....	61
3.3.4	Caracterização dos produtos por CG-EM e RMN .....	62
3.4	CONCLUSÕES DO CAPÍTULO.....	62
<b>4.</b>	<b>EXPLORAÇÃO DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO PARA A SÍNTESE DE MOLÉCULAS BASEADAS NAS SOLONAMIDAS .....</b>	<b>63</b>
4.1	METODOLOGIAS.....	64
4.1.1	Síntese das moléculas baseadas nas solonamidas em fase sólida .....	64
4.1.2	Reação de ciclização sob a resina.....	68
4.1.3	Quantificação espectrofotométrica por UV-VIS de trifenilmetano gerado na reação de desproteção do grupo sulfidríla do resíduo de aminoácido cisteína ligado à resina .....	71
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	72
4.2.1	Desenho racional dos peptidomiméticos macrocíclicos baseadas nas solonamidas .....	72
4.2.2	Síntese das moléculas baseadas nas solonamidas em fase sólida .....	73
4.2.3	Desproteção seletiva do grupo <i>tert</i> -butil e tentativa de macrociclização sob a resina.....	75
4.2.4	Desproteção seletiva do grupo tritila e tentativa de macrociclização sob a resina .....	79
4.2.5	Determinação espectrofotométrica por UV-VIS de trifeniltamento pelo método de curva analítica .....	83
4.2.6	Eficiência da reação de macrociclização, empregando o DBU como base ....	85
4.2.7	Reação de macrociclização sob a resina por aquecimento assistido por micro-ondas .....	89
4.3	PARTE EXPERIMENTAL .....	91
4.3.1	Reagentes, solventes e materiais .....	91

4.3.2	Síntese das moléculas baseadas nas solonamidas em fase sólida .....	91
4.3.3	Desproteção seletiva do grupo <i>terc</i> -butil e tentativa de macrociclicização .....	92
4.3.4	Desproteção seletiva do grupo tritila e tentativa de macrociclicização sob a resina .....	92
4.3.5	Reação de macrociclicização em solução .....	93
4.3.6	Reação de macrociclicização sob a resina por aquecimento assistido por micro-ondas .....	93
4.3.7	Determinação espectrofotométrica por UV-VIS de trifeniltamento pelo método de curva analítica .....	94
4.3.8	Purificação por Cromatografia Líquida de alta eficiência.....	95
4.3.9	Espectros de Massas .....	95
4.4	CONCLUSÕES DO CAPÍTULO.....	96
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>97</b>
5.1	CONCLUSÕES GERAIS .....	98
5.2	PERSPECTIVAS .....	98
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>100</b>
<b>ANEXOS</b> .....		<b>105</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ABC:** *ATP-binding cassette*

**ACP:** Proteína carreadora de acila

**agr:** *accessory gene regulator*

**AHL:** *N*-acil homoserina lactona

**AI:** Autoindutor

**AMBH:** Aduto de Morita-Baylis-Hillman

**Ar:** Argônio

**ATP:** Adenosina trifosfato

**CCD:** Cromatografia em Camada Delgada

**CDCl<sub>3</sub>:** Clorofórmio deuterado

**CG-EM:** Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas

**CHCA:** Ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico

***d*:** duplete

**DABCO:** 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octano

**DBU:** 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno

**DCM:** Diclorometano

**DIC:** *N,N'*-Diisopropilcarbodiimida

**DIPEA:** *N,N*-diisopropiletilamina

**DMF:** Dimetilformamida

**EI:** Ionização por elétrons

**EM:** Espectro de Massa

**ESI:** *Electrospray ionization*

**Et<sub>3</sub>N:** Trietilamina

**eV:** elétron volts

**Fmoc:** Fluorenilmetiloxycarbonil

**GRE:** Grupo Retirador de Elétrons

**HPLC:** *High performance liquid chromatography*

**H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:** Ácido fosfórico

**HRMS:** *High Resolution Mass Spectrometry*

**Hz:** Hertz

**IQS:** Inibidor de *Quorum Sensing*

**J:** Constante de acoplamento

**LiOH:** Hidróxido de Lítio

**M:** Concentração mol/L

**MALDI:** *Matrix-assisted laser desorption/ionization*

**MeOH:** Metanol

**Mmt:** Monometoxtrítala

**MO:** Micro-Ondas

**MTA:** Metiltioadenosina

**MTR:** Metitioribose

**m/z:-** Razão massa-carga

**oct:** octeto

**PAI:** Peptídeo Autoindutor

**ppm:** partes por milhão

**q:** quadrupeto

**QS:** *Quorum Sensing*

**RMN:** Ressonância magnética nuclear

**s:** Simpleto

**SAM:** S-Adenosil Metionina

**SAR:** *Structure–Activity Relationship*

**SARM:** *Staphylococcus aureus* resistente à metilina

**SARV:** *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina

**t:** tripleto

**t.a.:** Temperatura ambiente

**t-Bu:** *terc*-Butil

**TEA:** Trietilamina

**TFA:** *Trifluoroacetic acid*

**THF:** Tetraidrofurano

**TIS:** Triisopropilsilano

**TMS:** Tetrametilsilano

**TOF:** *Time-of-flight*

**Trt:** Tritila

**UV-VIS:** Espectroscopia no ultravioleta-visível

**δ:** deslocamento químico

## LISTA DE FIGURAS

<b>CAPÍTULO 2: REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>24</b>
<b>Figura 2.1.</b> Estruturas dos peptídeos autoindutores (PAI's) cíclicos que atuam no QS de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	32
<b>Figura 2.2.</b> Exemplos de AHL's com efeito IQS, A - Sintéticos e B – Naturais .....	35
<b>Figura 2.3.</b> Estruturas das solonamidas A e B isoladas da bactéria marinha <i>Photobacterium sp</i> .....	36
<b>Figura 2.4.</b> SAR de três análogos de PAI's com agrC-I, -II e -IV .....	37
<b>Figura 2.5.</b> SAR de lactamas híbridas como um potencial antagonista em <i>S. aureus</i> .....	38
<b>CAPÍTULO 3: SÍNTESE DOS ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN E SEUS RESPECTIVOS ÁCIDOS</b> .....	<b>40</b>
<b>Figura 3.1.</b> Estruturas dos adutos de Morita-Baylis-Hillman escolhidos para serem sintetizados neste TCC .....	42
<b>Figura 3.2.</b> Cromatograma e espectro de massa para o AMBH <b>1a</b> .....	44
<b>Figura 3.3.</b> Cromatograma e espectro de massa para o AMBH <b>1b</b> .....	45
<b>Figura 3.4.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) para o aduto <b>1a</b> .....	47
<b>Figura 3.5.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) para o aduto <b>1b</b> .....	48
<b>Figura 3.6.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) para o aduto <b>1a</b> .....	49
<b>Figura 3.7.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) para o aduto <b>1b</b> .....	50
<b>Figura 3.8.</b> Cromatograma e espectro de massa para o ácido carboxílico α, β-insaturado <b>2a</b> , advindo do AMBH <b>1a</b> .....	53
<b>Figura 3.9.</b> Cromatograma e espectro de massa para o ácido carboxílico α, β-insaturado <b>2b</b> , advindo do AMBH <b>1b</b> .....	54
<b>Figura 3.10.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) para o ácido carboxílico α, β-insaturado <b>2a</b> .....	56
<b>Figura 3.11.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) para o ácido carboxílico α, β-insaturado <b>2b</b> .....	57
<b>Figura 3.12.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) para o ácido carboxílico α, β-insaturado <b>2a</b> .....	58



<b>Figura 3.13.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) para o ácido carboxílico $\alpha$ , $\beta$ -insaturado <b>2b</b> .....	59
--	----

#### **CAPÍTULO 4: EXPLORAÇÃO DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO PARA A SÍNTESE DE MOLÉCULAS BASEADAS NAS SOLONAMIDAS ..... 63**

<b>Figura 4.1.</b> Moléculas sintetizadas neste TCC, seguindo a metodologia da síntese em fase sólida sob a resina Rink Amide.....	74
--	----

<b>Figura 4.2.</b> Espectro de HRMS-ESI, realizado sobre amostra não purificada, para a tentativa de macrociclização sob a resina da molécula <b>3a</b> .....	77
---	----

<b>Figura 4.3.</b> Espectro de HRMS-ESI(MS/MS) para o ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ 576,3130 Da, correspondente a estrutura linear da molécula <b>3a</b> .....	77
--	----

<b>Figura 4.4.</b> Estrutura do DBU e do produto da sua adição ao ácido carboxílico $\alpha$ , $\beta$ -insaturado .....	78
--	----

<b>Figura 4.5.</b> Espectro de MALDI-MS para a tentativa de macrociclização sob a resina da molécula <b>4a</b> , empregando a trietilamina como base de reação.....	81
---	----

<b>Figura 4.6.</b> Espectro de MALDI-MS para a tentativa de macrociclização sob a resina da molécula <b>4aa</b> , empregando o DBU como base de reação.....	82
---	----

<b>Figura 4.7.</b> Espectro de MALDI-MS/MS para o aduto de sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ da molécula <b>4aa</b> ...	82
--	----

<b>Figura 4.8.</b> Espectro de UV-VIS para os padrões de trifenilmetano .....	84
---	----

<b>Figura 4.9.</b> Curva analítica para a determinação de trifenilmetano.....	85
---	----

<b>Figura 4.10.</b> Semelhança entre a estrutura da solonamida com a molécula <b>4bb</b> .....	85
--	----

<b>Figura 4.11.</b> Espectro de MALDI-MS para o trifenilmetano referente à molécula <b>4bb</b> .....	86
--	----

<b>Figura 4.12.</b> Espectro de MALDI-MS para molécula <b>4bb</b> .....	87
---	----

<b>Figura 4.13.</b> Espectro de MALDI-MS/MS para a molécula <b>4bb</b> .....	88
--	----

<b>Figura 4.14.</b> Rendimentos obtidos para as moléculas <b>4bb</b> sintetizadas na resina e em solução .....	88
--	----

<b>Figura 4.15.</b> Espectro de MALDI-MS (Não purificado) para a molécula <b>4a</b> , reação sob a resina assistida por Micro-ondas .....	90
---	----

<b>Figura 4.16.</b> Espectro de MALDI-MS/MS para a molécula <b>4a</b> , sob a resina assistida por Micro-ondas .....	90
--	----

## LISTAS DE ESQUEMAS

<b>CAPÍTULO 2: REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>24</b>
<b>Esquema 2.1.</b> Representação geral para a sequência de sinalização do QS de uma bactéria .....	25
<b>Esquema 2.2.</b> Representação da sequência de sinalização do QS de uma bactéria Gram-negativa .....	27
<b>Esquema 2.3.</b> Mecanismo da síntese de molécula autoindutora AHL e seus subprodutos..	28
<b>Esquema 2.4.</b> Representação da sequência de sinalização do QS de uma bactéria Gram-positiva.....	29
<b>Esquema 2.5.</b> Representação da sequência de sinalização do QS da bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> .....	31
<b>Esquema 2.6.</b> Representação da sequência de sinalização do QS da bactéria <i>Vibrio harveyi</i> .....	34
<b>CAPÍTULO 3: SÍNTESE DOS ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN E SEUS RESPECTIVOS ÁCIDOS</b> .....	<b>40</b>
<b>Esquema 3.1.</b> Reação de Morita-Baylis-Hillman .....	41
<b>Esquema 3.2.</b> Proposta de mecanismo para a fragmentação dos adutos <b>1a</b> e <b>1b</b> .....	46
<b>Esquema 3.3.</b> Proposta de mecanismo para a fragmentação dos ácidos carboxílicos $\alpha$ , $\beta$ -insaturado <b>2a</b> e <b>2b</b> .....	55
<b>CAPÍTULO 4: EXPLORAÇÃO DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO PARA A SÍNTESE DE MOLÉCULAS BASEADAS NAS SOLONAMIDAS</b> .....	<b>63</b>
<b>Esquema 4.1.</b> Síntese de peptídeos em fase sólida .....	64
<b>Esquema 4.2.</b> Mecanismo para a desproteção do grupo Fmoc.....	65
<b>Esquema 4.3.</b> Formação do composto colorimétrico para o teste de Kaiser.....	66
<b>Esquema 4.4.</b> Mecanismo para o acoplamento de aminoácidos, utilizando o método de DIC/Oxyma <sup>®</sup> .....	67
<b>Esquema 4.5.</b> Mecanismo para a reação de transesterificação do grupo hidroxila do AMBH .....	67

<b>Esquema 4.6.</b> Mecanismo para a reação de ciclização, por meio de uma substituição nucleofílica vinílica ( $S_N2'$ ).....	68
<b>Esquema 4.7.</b> Resultados obtidos por Li e colaboradores, para a remoção do grupo <i>terc</i> -butil de serinas .....	69
<b>Esquema 4.8.</b> Condições reacionais e resultados obtidos por Derbel e colaboradores, para a desproteção do grupo sulfidril e ciclização sob a resina .....	69
<b>Esquema 4.9.</b> Condições reacionais e resultados obtidos por Sutherland e colaboradores, para a desproteção do grupo sulfidril e ciclização sob a resina.....	70
<b>Esquema 4.10.</b> Condições reacionais e resultados obtidos por Grieco e Colaboradores, para a desproteção do grupo sulfidril e ciclização sob a resina, empregando o Micro-ondas....	70
<b>Esquema 4.11.</b> Formação de trifetilmetano a partir da remoção do grupo tritila da cisteína ... ..	71
<b>Esquema 4.12.</b> Planejamento racional dos peptidomiméticos macrocíclicos baseados nas solonamidas.....	72
<b>Esquema 4.13.</b> Síntese em fase sólida dos tetrapeptídeos sob a resina Rink Amide .....	73
<b>Esquema 4.14.</b> Condições experimentais empregadas para a tentativa de macrociclização sob a resina, envolvendo o grupo hidroxila .....	76
<b>Esquema 4.15.</b> Proposta de mecanismo para a fragmentação para a estrutura linear da molécula <b>3a</b> .....	78
<b>Esquema 4.16.</b> Produto inesperado obtido por Lammers e colaboradores.....	79
<b>Esquema 4.17.</b> Condições experimentais empregadas para a tentativa de macrociclização sob a resina, envolvendo o grupo sulfidril. ....	80
<b>Esquema 4.18.</b> Proposta de mecanismo para a fragmentação do aduto de sódio $[M+Na]^+$ da molécula <b>4aa</b> .....	83
<b>Esquema 4.19.</b> Condições experimentais empregadas para a macrociclização em solução .....	87
<b>Esquema 4.20.</b> Condições experimentais para a macrociclização sob a resina assistida por Micro-ondas.....	89

## LISTA DE TABELAS

<b>CAPÍTULO 2: REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>24</b>
<b>Tabela 2.1.</b> Exemplos de QS em bactérias Gram-negativas.....	28
<b>Tabela 2.2.</b> Exemplos de QS em bactérias Gram-positivas .....	30
<b>CAPÍTULO 3: SÍNTESE DOS ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN E SEUS RESPECTIVOS ÁCIDOS</b> .....	<b>40</b>
<b>Tabela 3.1.</b> Resultados obtidos por Mateus e colaboradores, para a hidrólise de alguns AMBH's .....	42
<b>Tabela 3.2.</b> Resultados obtidos para a síntese dos AMBH's.....	43
<b>Tabela 3.3.</b> Atribuição dos sinais observados nos espectros de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para o aduto <b>1a</b> .....	51
<b>Tabela 3.4.</b> Atribuição dos sinais observados nos espectros de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para o aduto <b>1b</b> .....	51
<b>Tabela 3.5.</b> Resultados obtidos para a síntese dos ácidos carboxílicos $\alpha$ , $\beta$ -insaturado a partir dos AMBH's.....	52
<b>Tabela 3.6.</b> Atribuição dos sinais observados nos espectros de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para o ácido carboxílico $\alpha$ , $\beta$ -insaturado <b>2a</b> .....	60
<b>Tabela 3.7.</b> Atribuição dos sinais observados nos espectros de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para o ácido carboxílico $\alpha$ , $\beta$ -insaturado <b>2b</b> .....	60
<b>CAPÍTULO 4: EXPLORAÇÃO DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO PARA A SÍNTESE DE MOLÉCULAS BASEADAS NAS SOLONAMIDAS</b> .....	<b>63</b>
<b>Tabela 4.1.</b> Massas moleculares previstas para as moléculas sintetizadas neste TCC.....	77
<b>Tabela 4.2.</b> Dados obtidos de absorvância em função da concentração de trifenilmetano através de um espectrofotômetro .....	83
<b>Tabela 4.3.</b> Dados para a construção da curva analítica para determinação de trifenilmetano .....	92

# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**

## 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

### 1.1 INTRODUÇÃO

No passado, acreditava-se que as unidades celulares das bactérias eram seres vivos independentes, e não havia a comunicação celular entre elas. Todavia, com a descoberta do processo de bioluminescência desenvolvido pela espécie bacteriana *Vibrio fischeri*, essa visão mudou. Este mecanismo para a produção de luz é decorrente de um processo químico dependente da densidade celular da colônia de bactérias, chamado de *Quorum Sensing* (QS).

O QS está envolvido na regulação de uma série de processos, por exemplo, formação de biofilme, biossíntese de proteases, produção de toxinas, mobilidade, etc. Este sistema consiste basicamente em três etapas: produção de moléculas sinalizadoras, acúmulo dessas moléculas de acordo com o crescimento populacional, e ligação destas moléculas ao sítio receptor de uma enzima responsável também pela transcrição e expressão gênica.

Com base nas entidades envolvidas nos processos de comunicação, podem-se mencionar três grupos principais de QS, o primeiro é o baseado nas proteínas LuxI/LuxR comuns em bactérias Gram-negativas, o segundo baseado num duplo componente de detecção, comuns em bactérias Gram-positivas. E por último, o sistema LuxS/AI-2, considerado como um sistema universal de comunicação.

Atualmente, o aparecimento de bactérias super-resistentes aos antibióticos comerciais tem se tornado um problema de saúde pública. Dessa forma, novos métodos de tratamento estão sendo desenvolvidos. Desses métodos, o estudo da inibição de *quorum sensing* é um exemplo, tendo em vista que o QS é responsável por um grande número de manifestações de virulência.

Como as moléculas sinalizadoras são a base de um sistema de QS, pesquisas direcionadas para a síntese de moléculas com a finalidade de um tratamento de antivirulência tem se tornado frequente. Com destaque para o estudo da relação entre estrutura-atividade, com o propósito de verificar a relação entre a estrutura dessas moléculas e o seu efeito agonista/antagonista ao sítio receptor do QS.

Dessa forma, um dos trabalhos promissores nesta área é a síntese de moléculas análogas às solonamidas, substâncias naturais inibidoras do QS de *Staphylococcus aureus*, bactérias que apresentam cada vez mais resistência aos tratamentos com antibióticos. As solonamidas apresentam similaridade estrutural com as moléculas sinalizadoras das cepas desta bactéria.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

- Explorar a reação de ciclização de moléculas baseadas em cadeias tetrapeptídicas sobre um suporte em fase sólida, respeitando as relações de estrutura/atividade já conhecidas para inibidores do QS de *S. aureus* como as solonamidas

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Empregando a síntese em fase sólida, acoplar os resíduos de aminoácidos para a produção de tetrapeptídeo;
- Acoplar o resíduo do aduto de Morita-Baylis-Hillman à porção *N*-terminal do tetrapeptídeo;
- Explorar a ciclização do tetrapeptídeo modificado por meio da reação de  $S_N2'$  entre os grupos -SH ou -OH, presentes na porção *C*-terminal, e o grupo acetato alílico do resíduo de AMBH, presente na porção *N*-terminal;
- Purificar e caracterizar os produtos sintetizados.

# **CAPÍTULO 2**

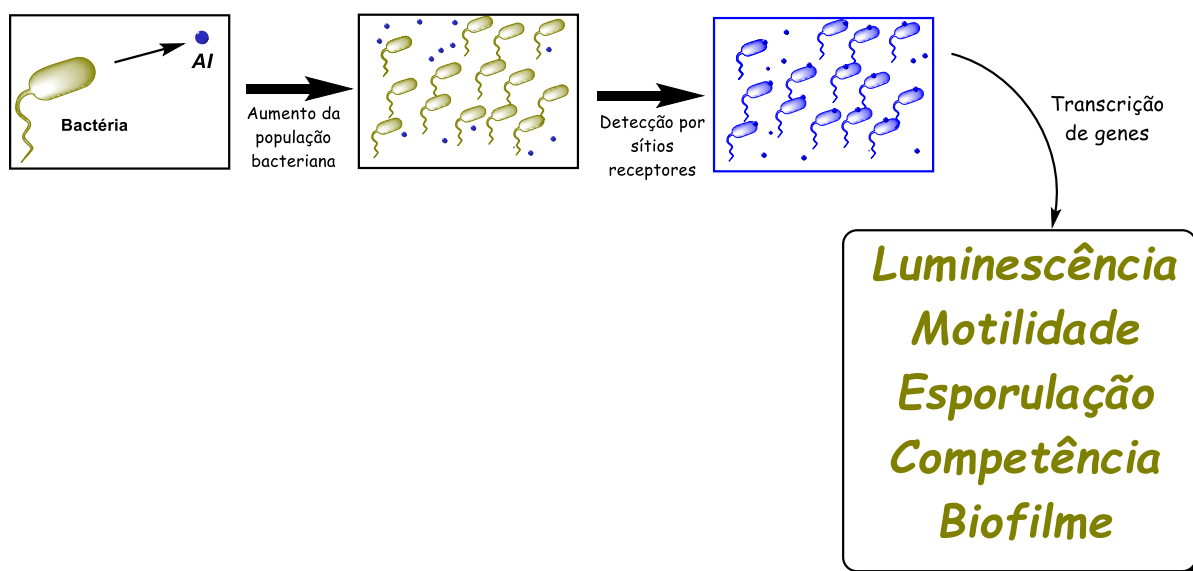
## **REVISÃO DA LITERATURA**



## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 O mecanismo *quorum sensing* de comunicação

O *Quorum Sensing* (QS) é a forma de comunicação célula-célula entre bactérias, fazendo-as agirem como seres multicelulares.<sup>1</sup> Por meio deste processo, as bactérias regulam sua expressão gênica em resposta à mudança na sua densidade celular. Conforme sua densidade populacional cresce, aumenta-se a concentração extracelular de moléculas químicas sinalizadoras, chamadas de autoindutores (AI's). Quando é atingido um limite crítico de concentração dessas moléculas, elas se tornam detectáveis por sítios receptores extra ou intracelulares, responsáveis por ativar a transcrição de genes envolvidos numa série de processos biológicos, por exemplo, luminescência, produção de antibióticos, transferência de plasmídeos, motilidade, esporulação, competência, e formação de biofilme, passando assim, a agirem como seres multicelulares (**Esquema 2.1**).<sup>2,3</sup>



**Esquema 2.1.** Representação para a sequência de sinalização do QS de uma bactéria, adaptado<sup>1,2,3</sup>.

Atualmente, encontram-se três classes bem definidas de moléculas que servem como paradigmas para a sinalização química em bactérias: *N*-acil homoserina lactonas (AHL), oligopeptídeos, e o LuxS/autoindutor-2 (AI-2).<sup>1</sup> O processo de QS é

<sup>1</sup> Keller, L; Surette, M.G. *Nat. Rev. Microbiol.* 2006, 4, 249-58.

<sup>2</sup> Waters, C.M; Bassler, B.L. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2005, 21, 319-46.

<sup>3</sup> Zhang, L.H; Dong, Y.H. *Mol. Microbiol.* 2004, 1563-71.

comum tanto em bactérias Gram-negativas quanto em bactérias Gram-positivas, embora difiram no mecanismo de sinalização, como em termos de moléculas indutoras ou circuito de resposta.<sup>4</sup>

## 2.2 O quorum sensing em bactérias Gram-negativas

As primeiras bactérias a terem o QS analisado foram as Gram-negativas, por *Nealson e Hastings*<sup>5</sup>, no que tange ao processo de bioluminescência das bactérias marinhas *Vibrio fischeri*, e sua associação simbiótica com hospedeiros eucarióticos. Em geral, a bactéria fornece bioluminescência e o hospedeiro oferece nutrientes imprescindíveis para o seu crescimento celular. A título de exemplo, a lula da espécie *Euprymna scolopes*, usufrui da luz contra a iluminação noturna, possibilitando assim, sua sobrevivência em frente à predadores, e o peixe *Monocentris japonica*, emprega a luz para propósitos de procriação.<sup>6</sup>

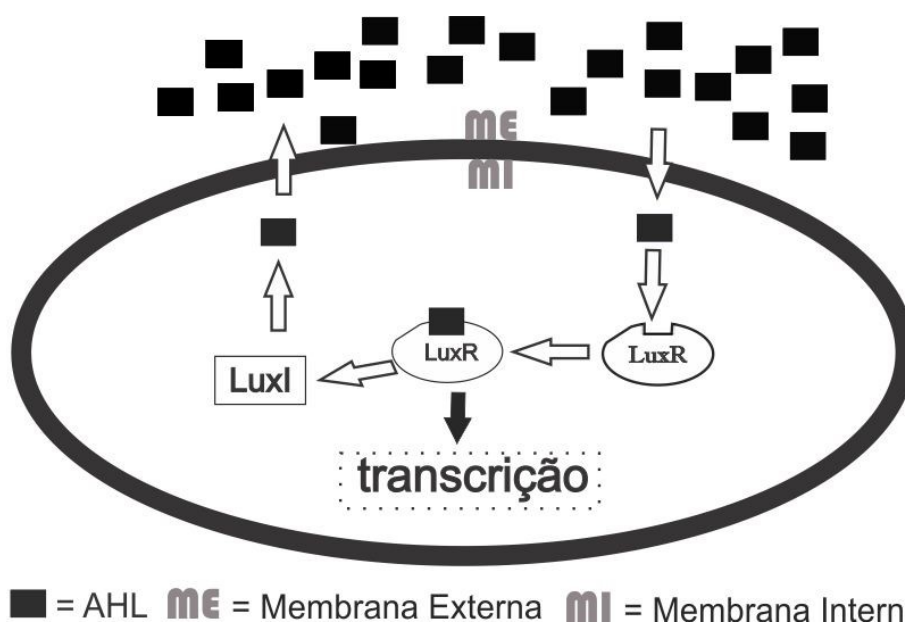
O mecanismo para a formação de bioluminescência é normalmente o exemplo mais comum de QS para as bactérias do tipo Gram-negativa. De modo geral, o QS é regulado pelas proteínas do tipo LuxR/LuxI, no qual, as proteínas LuxI e seus homólogos são as responsáveis pela síntese das moléculas autoindutoras de *N*-acil-homoserina lactona (AHL), e as proteínas LuxR e seus homólogos são as receptoras das moléculas sinalizadoras e encarregadas pela ativação transcricional. O **Esquema 2.2**, sintetiza a sequência generalizada de sinalização do QS de uma bactéria Gram-negativa. Após a produção de AHL pela proteína de LuxI, as moléculas de AHL se difundem livremente para dentro e para fora da célula, e tem o aumento da sua concentração no meio extracelular consoante com o aumento da densidade celular da colônia bacteriana. Quando é atingido um limiar crítico de concentração dessas moléculas, se tornam detectáveis pela proteína LuxR, formando um complexo que ativa a transcrição gênica; nas bactérias marinhas *Vibrio fischeri*, a LuxR tem dois domínios, um amino terminal envolvido na ligação ao AHL e outro na região carboxila terminal, envolvido na ligação ao DNA e posterior transcrição, neste caso é ativado o

<sup>4</sup> Banerjee, G; Ray, A.K. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 2017;64(4), 439-3.

<sup>5</sup> Nealson, K.H; Hastings, J.W. *Microbiol. Rev.* 1979, 43, 496-518.

<sup>6</sup> Miller, M. B; Bassler, B.L. *Annu. Rev. Microbiol.* 2001, 55, 1, 165-99.

*operon* luciferase, responsável pelo início da biossíntese desta enzima requerida para a produção de luz.<sup>6,7</sup>



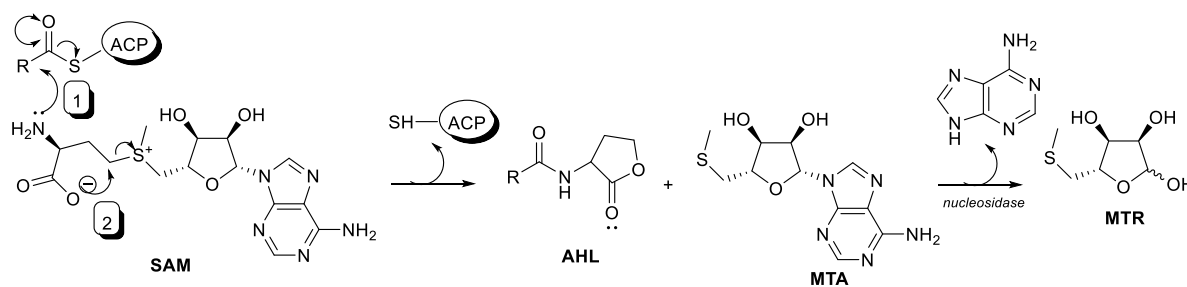
**Esquema 2.2.** Representação da sequência de sinalização do QS de uma bactéria Gram-negativa, adaptado<sup>8</sup>.

Conforme já citado anteriormente, as proteínas LuxI e seus homólogos são as responsáveis pela síntese das moléculas sinalizadoras, um provável mecanismo para a síntese dessas moléculas, se encontra no **Esquema 2.3**. A síntese de AHL se processa primeiro pela *N*-acilação da *S*-Adenosil Metionina (SAM), por meio de um ataque nucleofílico do grupo amina da SAM ao carbono do grupo tioéster da acil-ACP (1), uma proteína carreadora de acila intermediária na biossíntese de ácidos graxos. Em seguida, ocorre a etapa de lactonização (2), originada do ataque nucleofílico do carboxilato ao carbono  $\gamma$  da molécula de SAM, formando a AHL e metiltioadenosina (MTA). O subproduto MTA é tóxico, logo, a enzima nucleosidase é a responsável pela sua clivagem, gerando adenina e metiltioribose (MTR), produtos não tóxicos.<sup>6,9</sup>

<sup>7</sup> Waters, C.M; Bassler, B.L. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2005, 21:1, 319-46.

<sup>8</sup> Schauder, S; Bassler, B.L. *Genes & Dev.* 2001, 15, 1468-80.

<sup>9</sup> Bassler, B.L. *Cell.* 2002, 109, 421-24.



**Esquema 2.3.** Mecanismo da síntese de molécula autoindutora AHL e seus subprodutos, adaptado<sup>6,9</sup>.

Sistemas homólogos ao LuxI/LuxR já foram identificados em mais de 70 espécies de bactérias Gram-negativas.<sup>2</sup> O grupo **R**, representado no **Esquema 2.3**, denota que as moléculas de AHL se diferem apenas nas suas respectivas cadeias laterais do grupo acil, advindas dos derivados de ácidos graxos. Este fato sugere ainda que o grupo **R** de uma AHL pode ser específico para o QS de cada organismo. A **Tabela 2.1**, exhibe algumas moléculas de AHL mais comumente encontradas na literatura, com seus grupos representativos e as funções biológicas reguladas por estas moléculas.<sup>6,9</sup>

**Tabela 2.1.** Exemplos de QS em bactérias Gram-negativas\*.

Organismo	LuxI/LuxR homólogos	n	X	Fenótipo expressado
<i>Vibrio fischeri</i>	LuxI/LuxR	1	≡O	Bioluminescência
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	TraI/TraR	4	—H	Conjugação bacteriana
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LasI/LasR	8	≡O	Produção de toxina A e biofilme
	RhII/RhIR	4	—H	Síntese de raminolipídeos
<i>Vibrio anguillarum</i>	VanR/VanI	1	≡O	Protease
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	CerR/CerI	5	—H	Impedir a agregação bacteriana

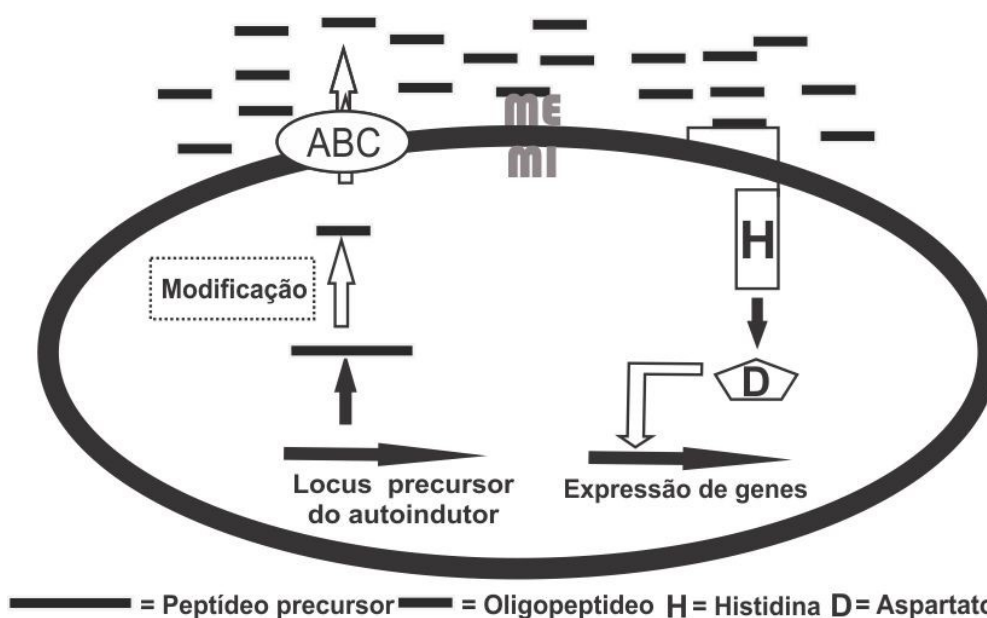
\*Adaptado<sup>6,10</sup>.

<sup>10</sup> Fuqua, C; Parsek, M.R; Greenberg, E.P. *Annu. Rev. Genet.* 2001, 35, 439-68.

### 2.3 O quorum sensing em bactérias Gram-positivas

Em bactérias Gram-positivas, a comunicação célula-célula sucede-se pelo mecanismo conservado de sinal-resposta, por meio de oligopeptídeos modificados na qualidade de moléculas sinalizadoras. Esses AI's têm entre 5 a 17 resíduos de aminoácidos. As modificações podem advir pela formação de lactonas, tiolactonas, lactamas e isoprenil de um peptídeo precursor.<sup>8,11</sup>

O mecanismo, em via de regra, para o QS de uma bactéria Gram-positiva é representado no **Esquema 2.4**, os oligopeptídeos são sintetizados a partir da modificação de um peptídeo precursor, o AI é secretado para o meio extracelular por via de transportadores dependentes de ATP ou transportadores ABC (do inglês, *ATP-binding cassette*). O sensor responsável pelo reconhecimento dos AI's, quando o limite crítico da concentração dessas moléculas é atingido, é composto de um receptor de membrana histidina quinase de dois componentes. Por meio de um processo de fosforilação/desfosforilação, a informação é retransmitida para dentro da célula, causando a expressão genica.<sup>8</sup>



**Esquema 2.4.** Representação da sequência de sinalização do QS de uma bactéria Gram-positiva, adaptado<sup>8</sup>.

O *quorum sensing* em bactérias Gram-positivas é o responsável pela regulação de uma série de funções biológicas. Tendo como exemplo, a análise do

<sup>11</sup> Camilli, A; Bassler, B.L. *Science*. 2006, 311, 1113-16.

sistema de competência nos organismos de *Streptococcus mutans*, baseado nos AI's CSP/XIP, e o sistema de competência e esporulação nos organismos da *Bacillus subtilis*, fundamentado nos AI's ComX/CSF. A **Tabela 2.2**, resume alguns exemplos de bactérias Gram-positivas, suas moléculas sinalizadoras e os fenótipos expressados.<sup>4,6</sup>

**Tabela 2.2.** Exemplos de QS em bactérias Gram-positivas\*.

Organismo	Molécula sinalizadora	Fenótipos expressados
<i>Bacillus subtilis</i>	ComX/CSF	Competência, esporulação, e biofilme
<i>Streptococcus mutans</i>	CSP/XIP	Competência e virulência
<i>S. pneumoniae</i>	CSF	Competência
<i>Listeria monocytogenes</i>	PAI	Virulência
<i>Staphylococcus aureus</i>	PAI	Virulência

\*Adaptado<sup>4,6</sup>.

Atualmente, pesquisas promissoras com ênfase no tratamento antivirulência das bactérias têm se tornado habituais, tendo como destaque as bactérias da espécie *Staphylococcus aureus*, causa da morte de milhares de pessoas que se encontram em Unidade de Terapia Intensiva, cujo QS é regido pelo sistema *agr*.<sup>4,6,7,8</sup>

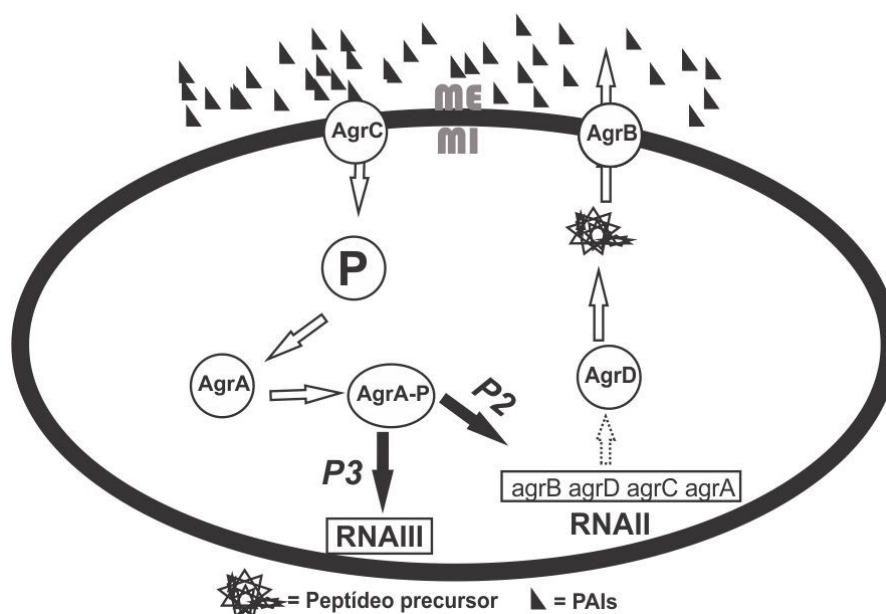
### 2.3.1 O quorum sensing de *Staphylococcus aureus*

A *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva responsável por diversas infecções bacterianas em seres humanos. Esse patógeno vive, normalmente, na pele e nas narinas de um ser humano saudável, no entanto, quando ele penetra o tecido, é responsável por diversas doenças, como infecção de pele, endocardite, pneumonia, choque séptico e intoxicação alimentar.<sup>12</sup>

A maioria das infecções bacterianas motivadas pela *S. aureus* são controladas pelo seu QS. Consoante com o **Esquema 2.5**, este QS se baseia no gene regulador acessório *agr* (do inglês, *accessory gene regulator*). O *agr* tem dois promotores, P2 e P3; no qual o promotor P2 produz o sistema QS (*agrB*, *D*, *C*, *A*), e o P3 produz o RNAlII. O processo se inicia com um peptídeo precursor codificado por *AgrD*,

<sup>12</sup> Diekema, D.J.; et al. *Clin. Infect. Dis.* 2001, 32, 114-32.

contendo 46 aminoácidos, seguida da sua modificação pela proteína AgrB. Esta acontece por meio de uma reação de ciclização do grupo -SH da cisteína a um carbono C-terminal, implicando na formação de um peptídeo autoindutor (PAI), uma molécula macrocíclica de tiolactona com uma cauda exocíclica N-terminal. AgrB também é a responsável pela secreção extracelular dos PAI's, quando essas moléculas sinalizadoras atingem um limite crítico de concentração. O sistema de detecção é formado por duas proteínas receptoras, a primeira detecção dá-se pela proteína AgrC (uma proteína transmembrana do tipo histidina quinase), formando um complexo com o PAI, que fosforila e ativa um regulador de respostas, AgrA. A proteína AgrA fosforilada (AgrA-P) leva a alterações conformacionais que permitem sua ligação aos dois promotores P2 e P3, para autoinduzir o sistema *agr* e a transcrição do RNAIII, respectivamente. O RNAIII, quando ativado, é o encarregado pela expressão dos fatores de virulência, como a produção de toxinas extracelulares como as  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\delta$  - hemolisinas, proteases e formação de biofilme.<sup>4,6,7,13</sup>

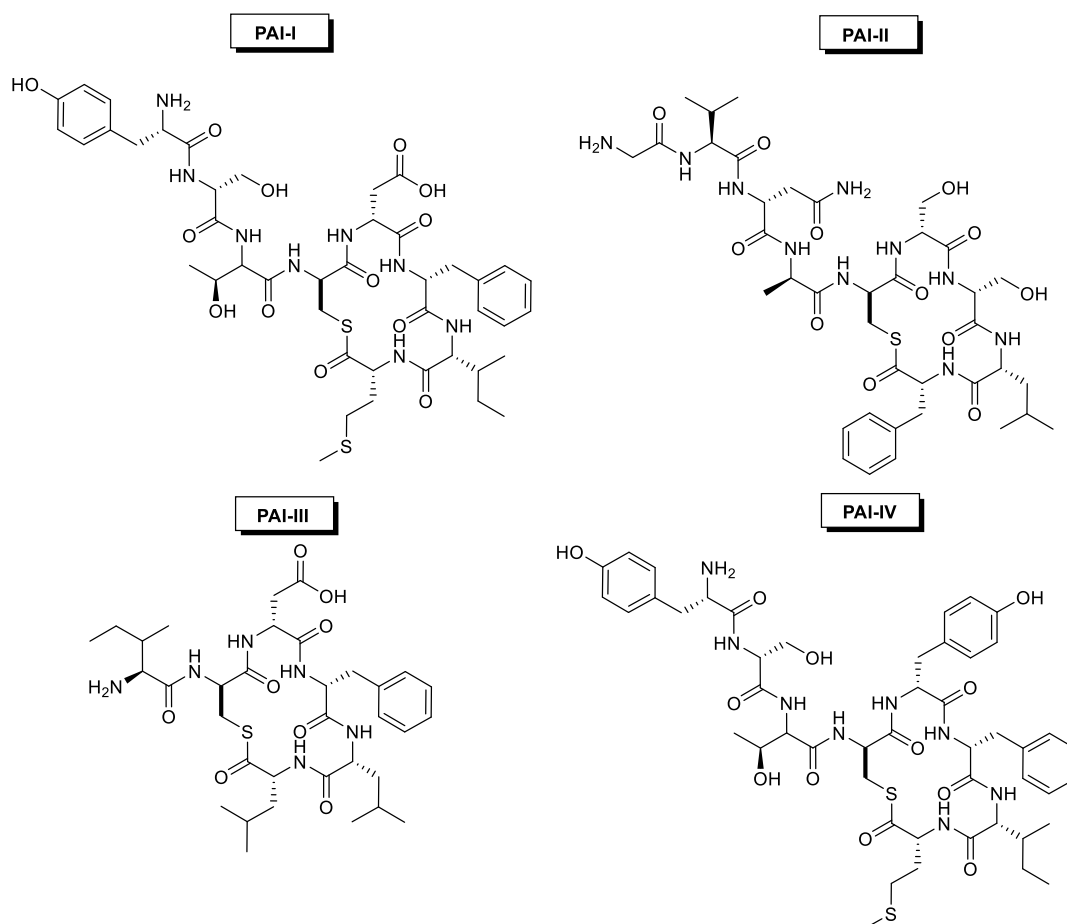


**Esquema 2.5.** Representação da sequência de sinalização do QS da bactéria *Staphylococcus aureus*, adaptado<sup>4</sup>.

O sistema *agr* é variável de acordo com as diferentes cepas de *S. aureus*, mantendo uma interação específica com seu PAI. Dessa forma, as cepas de *S. aureus* são classificadas em quatro grupos de acordo com seu PAI específico. Em geral, as moléculas dos PAI's contêm uma tiolactona macrocíclica de 16 átomos, se

<sup>13</sup> Chan, W.C; Coyle, B.J; Williams, P. J. *Med. Chem.* 2004, 4719, 4633-41.

diferenciando entre si na sequência dos resíduos de aminoácidos do macrociclo e da cauda exocíclica *N*-terminal. As estruturas químicas das quatro moléculas dos PAI's estão demonstradas na **Figura 2.1**. Esses grupos também podem estar diretamente relacionados a doenças específicas, como os PAI's I e II a doenças invasivas, e PAI-IV a síndromes.<sup>7,13</sup> Dado que cada PAI tem um receptor específico no gene *agrC*, em consequência, é capaz de atuar como antagonista, por meio de um processo de desativação, mediante a ligação competitiva com o agonista pelo sítio receptor. Dessa forma, agindo como um inibidor do *quorum sensing* (IQS).<sup>14</sup>



**Figura 2.1.** Estruturas dos peptídeos autoindutores (PAI's) cíclicos que atuam no QS de *Staphylococcus aureus*, adaptado<sup>14</sup>.

O tratamento para as infecções causadas pelas bactérias *S. aureus* foram iniciadas com a penicilina, no entanto, cepas de *S. aureus* resistentes à metilina (SARM) fizeram com que o tratamento usando os  $\beta$ -lactâmicos fossem interrompidos. Com os recentes antibióticos baseados na vancomicina, já é crescente o

<sup>14</sup> Gorske, B.C; Blackwell, H.E. *Org. Biomol. Chem.* 2006;4(8),1441-5.



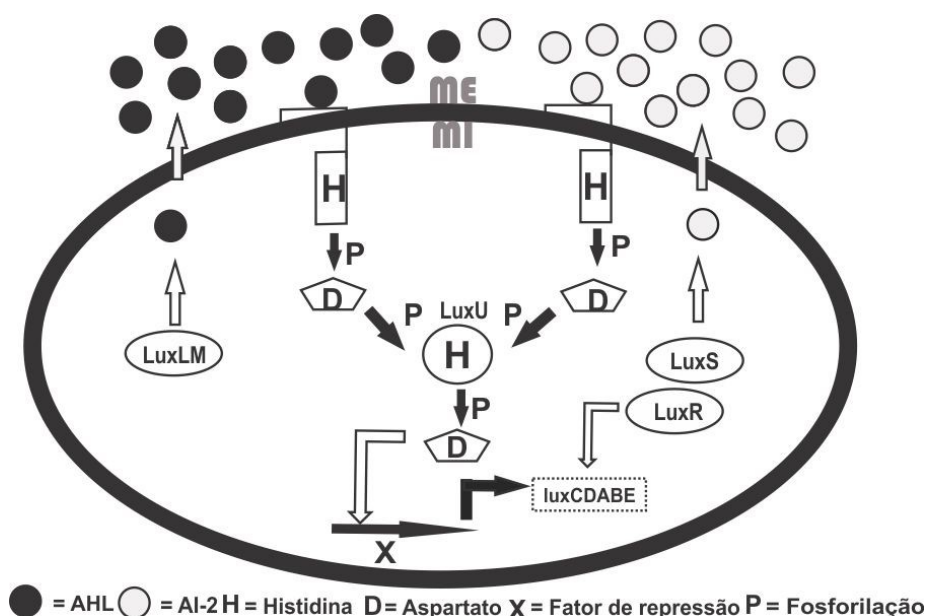
aparecimento de cepas resistentes a esta nova classe (SARV). Com isso, aspirando que novas cepas resistentes aos atuais antibióticos são cada vez mais comuns, o estudo de inibição do *quorum sensing*, baseado no uso de PAI's com a finalidade antagonista fez com que diversos pesquisadores propusessem o emprego de homólogos/análogos das quatro cepas de PAI's, na qualidade de um tratamento de antivirulência, isto é, abordar uma terapia não bactericida, visando assim, “desarmar” o patógeno, facilitando sua morte pela defesa própria do hospedeiro, representando um processo de tratamento com menor pressão seletiva para a população de bactérias.<sup>15</sup>

## 2.4 O sistema de *quorum sensing* baseado no LuxS/AI-2

O sistema de QS baseado no LuxS/AI-2 é um híbrido entre o sistema de uma bactéria Gram-negativa com de uma bactéria Gram-positiva. Sua descoberta decorreu-se do processo de bioluminescência das bactérias *Vibrio harveyi*. Conforme o **Esquema 2.6**, o processo se inicia pela produção de dois AI's, AI-1 e AI-2, pelas proteínas LuxLM e LuxS, respectivamente. O AI-1 é um homólogo das moléculas sinalizadoras encontradas nas bactérias Gram-negativas (AHL) ao passo que as moléculas de AI-2 tiveram sua estrutura desconhecida por bastante tempo, no entanto, estudos sugerem que se trata de um furanoborato.<sup>8</sup> Quando é atingida a concentração limite, os receptores responsáveis por sua detecção, as proteínas LuxN e LuxQ, promovem a fosforilação da proteína LuxU, transferindo a resposta para uma proteína reguladora LuxO, cuja função é induzir a expressão de um repressor do *operon* da luciferase (*luxCDABE*). Para ativar a transcrição, a proteína LuxR, diferente daquela encontrada num QS de Gram-negativa, é requerida.<sup>6</sup>

---

<sup>15</sup> Assis, L.M.; Nedeljković, M.; Dessen, A. *Drug Resist. Updat.* 2017;31, 1-14.



**Esquema 2.6.** Representação da sequência de sinalização do QS da bactéria *Vibrio harveyi*, adaptado<sup>8</sup>.

Em contraste com as moléculas sinalizadoras de AHL's e PAI's, que mantêm uma relação exclusiva com o sítio receptor de uma única espécie bacteriana. Estudos demonstram que as moléculas de AI-2 não mantêm essa especificidade, sendo empregadas para a comunicação interespecie, por exemplo, com a finalidade de visualizar o crescimento populacional de outras bactérias.<sup>8</sup>

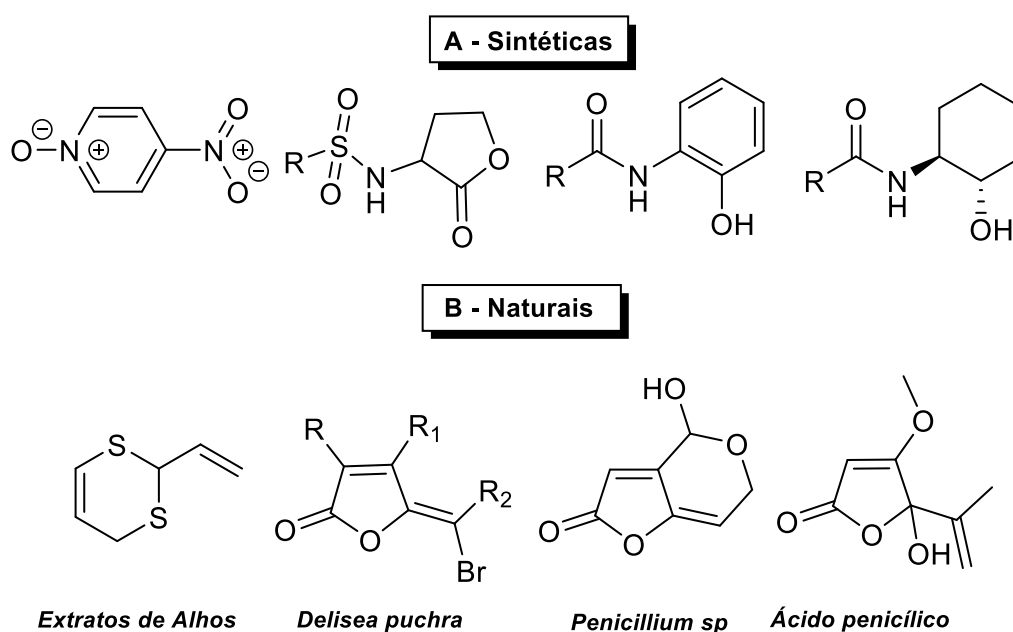
## 2.5 Inibidores de *quorum sensing*

Recentemente, o aumento de bactérias multirresistentes se tornou um problema de saúde pública. Infecções para as quais eram possíveis o tratamento, não são mais possíveis. Os tratamentos atuais visam eliminar a bactéria, por exemplo, evitando o crescimento de biofilme. Este processo, faz com que as bactérias desenvolvam novas cepas resistentes a tais antibióticos.<sup>15</sup>

Entretanto, pesquisas que têm como alvo a inibição da virulência estão se tornando promissoras, tendo em vista que as bactérias infectantes podem, provavelmente, não se adaptar ao hospedeiro/ambiente e estabelecer uma infecção.

Como o QS é o responsável pela maioria das manifestações de virulência, sua inibição seria uma forma de tratamento alternativo.<sup>15,16,17,18</sup>

Compreendendo que o mecanismo de QS é baseado em três etapas chave: produção de AI's, acréscimo de AI's, e reconhecimento dos AI's, uma solução para a inibição do QS seria a produção de moléculas sinalizadoras antagonistas, por exemplo, por meio do uso de análogos de SAM em sínteses das moléculas de AHL's, com substituições do grupo carbonila por sulfonil, cadeia acila por compostos aromáticos, e o anel da lactona por um ciclo-álcool ou ciclo-cetona, contendo ou 5 ou 6 átomos. Outra alternativa, seria a síntese de enzimas que degradem os AI's, como uma reação de abertura das lactonas. Por fim, o uso de moléculas que tenham o efeito antagonista com o sítio receptor do QS.<sup>16</sup> Alguns exemplares de moléculas inibidoras de QS (IQS) para as bactérias Gram-negativas estão expostas na **Figura 2.2**.



**Figura 2.2.** Exemplares de AHL's com efeito IQS, **A** – Sintéticos e **B** – Naturais, adaptado<sup>16</sup>

Conforme já discutido, após descoberta de que o QS é o responsável pelo processo de virulência e patogênese em uma gama de bactérias, tornou-se comum a aplicação de moléculas que possam ter um efeito antagonista ao sistema de sinalização. Dentre elas, a sínteses de molécula com potencial IQS para as bactérias

<sup>16</sup> Rasmussen, T.B; Givskov, M. *Int. J. Med. Microbiol.* 2006;296(2-3),149-61.

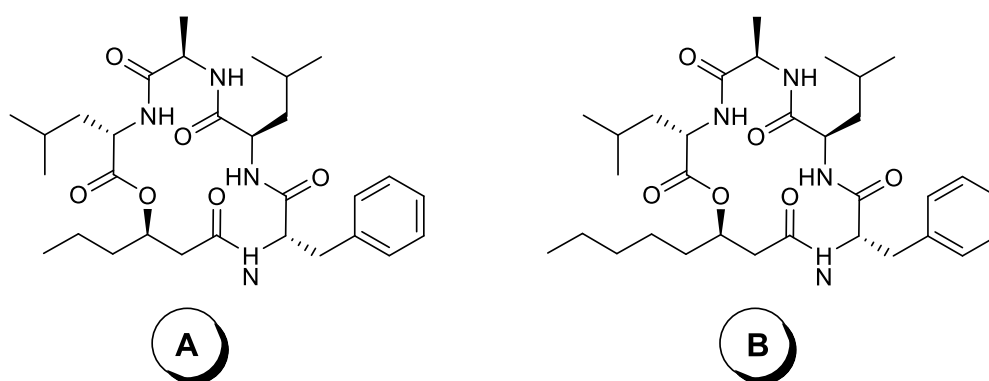
<sup>17</sup> Rutherford, S.T; Bassler, B.L. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012;2(11), a012427.

<sup>18</sup> Cegelski, L; Marshall, G.R; Eldridge, G.R; Hultgren, S.J. *Nat. Rev. Microbiol.* 2008, 1,.:17-27.

Gram-positiva *S. aureus* tem se destacado, por ser a causa da morte de milhares de pacientes que se encontram em ambiente hospitalar, tendo em conta que o surgimento de novas cepas resistentes aos antibióticos é corriqueiro. Assim, se ressaltam o estudo da Relação Estrutura-Atividade, SAR (do inglês, *Structure–Activity Relationship*), a fim de se encontrar uma relação entre a estrutura de um composto e a sua atividade agonista/antagonista num processo biológico.

### 2.5.1 Síntese de moléculas baseadas nos PAI's com potencial ação inibidora de *quorum sensing* em *S. aureus*

As pesquisas envolvendo a síntese de análogos/homólogos de moléculas com potencial ação inibidora de QS em *S. aureus* têm ganhado destaque, entre eles, se destacam as sínteses de análogos/homólogos às solonamidas. As solonamidas são substâncias naturais encontradas nas bactérias marinhas Gram-negativas *Photobacterium sp.* Mansson e colaboradores<sup>19</sup> foram os responsáveis por isolar e elucidar suas estruturas, consistindo num ciclo-depsipeptídeo com quatro resíduos de aminoácidos (*L*-fenilalanina, *D*-alanina, *D*-leucina e *L*-leucina), além de conter uma cadeia exocíclica de ácido graxo. As estruturas foram denominadas de A e B, se diferenciando entre si na cadeia exocíclica de ácido graxo (**Figura 2.3**).



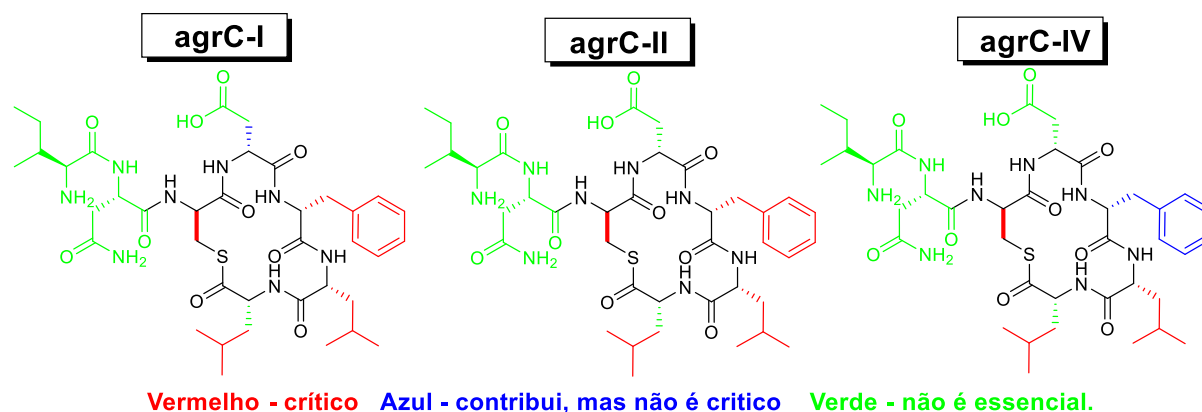
**Figura 2.3** Estruturas das solonamidas A e B isoladas da bactéria marinha *Photobacterium sp.*, adaptado<sup>19</sup>.

*Mansson e seus colaboradores*, também monitoraram a influência dessas substâncias recém descobertas nos genes *hla* (hemólise  $\alpha$ ), *RNAIII* e *spa* (síntese da proteína A), encarregadas pela virulência da *S. aureus*. Os resultados demonstraram

<sup>19</sup> Mansson, M; et al. *Mar. Drugs*. 2011, 9(12), 2537-52.

que as solonamidas A e B têm efeitos diferentes como potencial IQS. A solonamida B reduziu a expressão de hla e RNAlII, no entanto, aumentou a expressão do spa. Em parte, a solonamida A também aumentou a expressão do spa, todavia, teve pouco efeito na redução do hla e do RNAlII. Esse efeito antagônico das solonamidas no QS, podem estar relacionadas à sua similaridade estrutural com as moléculas dos PAI's (**Figura 2.1**). Similarmente, as outras pesquisas envolvendo IQS em *S. aureus*, também verificou-se que os resíduos de fenilalanina e leucina (hidrofóbicos) são importantes para a inibição da resposta do gene *agr*.<sup>14</sup> Além disso, a estrutura cíclica se afirmou essencial para a inibição do QS, tendo em vista que as estruturas lineares não mostraram nenhuma atividade de ativação ou inibição do QS.<sup>19</sup>

Na análise de SAR e sua associação como potencial IQS em *S. aureus*, *Gan e seus colaboradores*<sup>20</sup>, estudaram a influência do PAI-III como potencial inibidor de três cepas da *S. aureus* responsivas aos PAI's: I, II e IV. Como é simplificado na **Figura 2.4**, foram sintetizados três análogos de PAI's, e foram verificados quais resíduos de aminoácidos são essenciais para o processo de antagonismo. Dessa forma verificou-se que a cauda exocíclica não exerce nenhuma atividade de antagonismo, e os resíduos de *D*-fenilalanina e *L*-leucina são críticos para esse processo, conforme constatado também por *Manson e colaboradores*<sup>19</sup>.



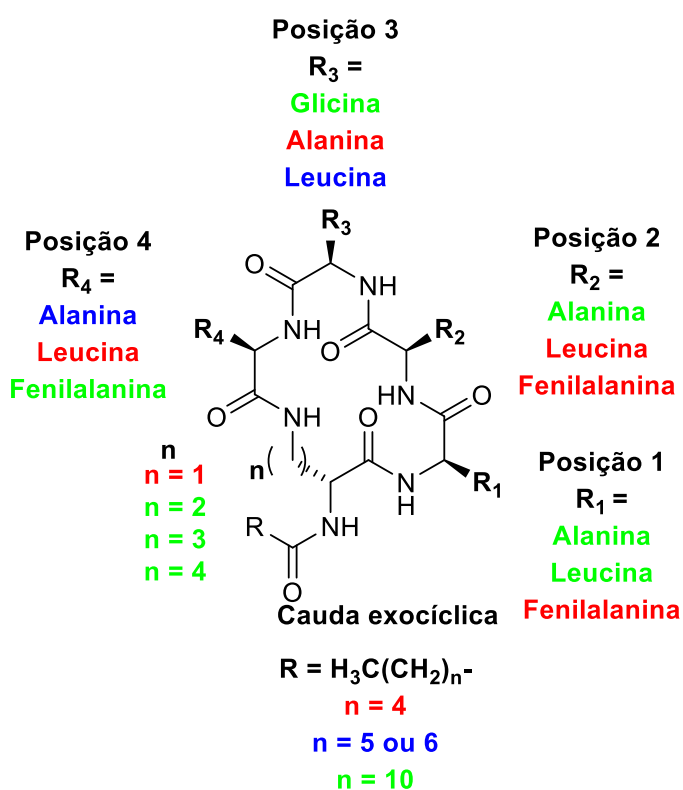
**Figura 2.4.** SAR de três análogos de PAI's com AgrC-I, -II e -IV, adaptado<sup>20</sup>.

Recentemente, o estudo do potencial antagonista em *S. aureus* de análogos da solonamida B baseado em uma lactama híbrida foi apresentado por *Hansen e colaboradores*<sup>21</sup>. Os dados obtidos para os 25 análogos sintetizados e testados

<sup>20</sup> Tal-Gan, Y; et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2013;135(21), 7869-82.

<sup>21</sup> Hansen, A.M; et al. *Eur. J. Med. Chem.* 2018, 152, 370-76.

encontram-se resumidos na **Figura 2.5**. O estudo SAR os levaram às seguintes conclusões: (a) o tamanho do anel deve ser idêntico ao presente nos PAI's; (b) A cauda exocíclica deve ser curta; (c) os resíduos de fenilalanina na posição 1 e leucina na posição 4 parecem cruciais para a inibição do QS; (d) os resíduos nas posições 2 e 3 apresentaram dados inconclusivos. Sobre a influência da estereoquímica dos resíduos de aminoácidos, *Hansen e colaboradores* perceberam que as moléculas com a sequência de aminoácidos contendo a mesma estereoquímica, asseguraram resultados de inibição do QS mais satisfatórios que aquelas com moléculas de estereoquímicas aleatórias, sendo que os resultados das moléculas com resíduos de aminoácidos *D* foram superiores aos de aminoácidos *L*.



Vermelho - crítico Azul - contribui, mas não é crítico Verde - não é essencial.

**Figura 2.5.** SAR de lactamas híbridas como um potencial antagonista em *S. aureus*, adaptado<sup>21</sup>.

As pesquisas em relação à influência do tamanho do anel na atividade do PAI são vagas. Cabe destacar o trabalho de Johnson e seus colaboradores<sup>22</sup>, os quais analisaram a mudança no tamanho do macrociclo e sua influência na resposta do

<sup>22</sup> Johnson, J.G; et al. *Chembiochem*, 2015, 7(16), 1093-1100.

agrC-I da *S. aureus*. Para a expansão do macrociclo, foi substituída a *L*-cisteína pela homocisteína, e para a redução, foram removidos o grupo fenilalanina e leucina, em que, baseados em estudo prévios com a alanina, atestaram não serem essências para a atividade do PAI. Diferentemente, o aspartato não foi excluído da segunda posição, por ser considerada importante para a atividade do PAI. Os resultados obtidos demonstraram que a adição de um grupo metileno inibiu a atividade agonista do receptor agrC, levando-os a concluir que o agonismo é suscetível à mudança na estrutura dos PAI's, e o antagonismo, não é suscetível.

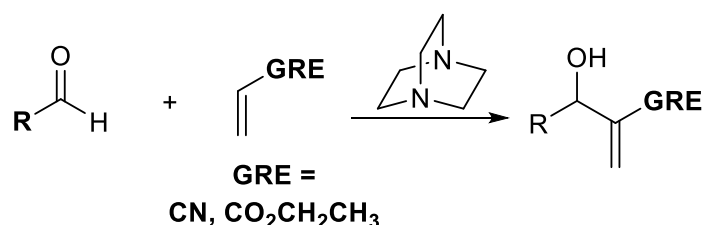
## **CAPÍTULO 3**

### **SÍNTESE DOS ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN E SEUS RESPECTIVOS ÁCIDOS**



### 3. ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN

Os adutos de Morita-Baylis-Hillman (AMBH's) já vêm sendo empregado com sucesso no grupo de pesquisa do nosso laboratório<sup>23,24,25</sup>. Em geral, a formação destes adutos ocorrem por meio de uma reação de adição de um alceno ativado para adições nucleofílicas ao carbono  $sp^2$  eletrofílico de um composto carbonílico, geralmente aldeídos, sob a ação de catalisadores nucleofílicos, sendo o DABCO o catalisador mais utilizado (**Esquema 3.1**).<sup>26,27</sup>



**Esquema 3.1.** Reação de Morita-Baylis-Hillman, adaptado<sup>27</sup>.

### 3.1 METODOLOGIAS

#### 3.1.1 Síntese dos adutos de Morita-Baylis-Hillman

Os adutos de Morita-Baylis-Hillman, escolhidos para serem explorados neste TCC foram os derivados do acetaldeído e do isobutiraldeído (**Figura 3.1**). O aduto de acetaldeído, já se encontrava sintetizado no laboratório. Já para a síntese do aduto de isobutiraldeído, foi seguido o procedimento experimental de Silva e colaboradores<sup>25</sup>, no qual foram postos para reagir 22,4 mmol de isobutiraldeído com 34,0 mmol de acrilato de etila e 3,20 mmol de DABCO, durante 21 dias a 0°C.

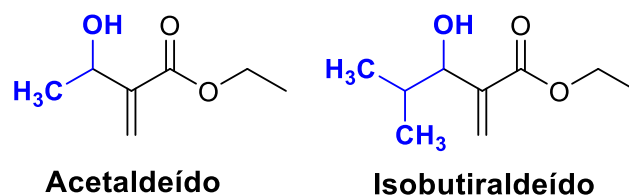
<sup>23</sup> Rodrigues, T. *Rearranjo de Claisen em adutos de Morita-Baylis-Hillman*. 2014. xiii, 121 f., il. *Dissertação (Mestrado em Química)—Universidade de Brasília, Brasília, 2014.*

<sup>24</sup> Silva, V. *Avaliação do efeito estereo no rearranjo de Hurd-Claisen em adutos de Morita-Baylis-Hillman*. 2017. xvi, 202 f., il. *Dissertação (Mestrado em Química) —Universidade de Brasília, Brasília, 2017.*

<sup>25</sup> Silva, V.; Silva, T.; Rodrigues, T.; Santos, F.; Machado, D.; Silva, W. A.; Oliveira, H. C. B.; Machado, A. H. L.; *Org. Biomol. Chem.* 2019, 17, 4498–4511.

<sup>26</sup> Baylis, A. B.; Hillman, M. E. D.; *German Patent 2155113, 1972, Chem. Abstr.* 1972, 77, 34174q.

<sup>27</sup> Coelho, F.; Almeida, W. P. *Química Nova*. 2000, 23(1), 98-101.



**Figura 3.1.** Estruturas dos adutos de Morita-Baylis-Hillman escolhidos para serem sintetizados neste TCC.

### 3.1.2 Síntese dos ácidos carboxílicos $\alpha,\beta$ -insaturados a partir dos adutos de Morita-Baylis-Hillman

Os adutos de Morita-Baylis-Hillman são moléculas multifuncionais, com alto poder sintético, conforme citado por Coelho e Almeida<sup>27</sup>, e são usados em síntese estereosseletiva de olefinas, hidrogenação catalítica homogênea, reações de Diels-Alder, etc. Como este trabalho tem como objetivo a transformação dos AMBH's em ácidos carboxílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados, para o acoplamento ao um grupo *N*-terminal de um aminoácido. Foi seguido o esquema proposto por Mateus e colaboradores<sup>28</sup>, para a obtenção destes ácidos, em que, por meio de hidrólise básica, seguida de acidificação, foram obtidos bons rendimentos de reação. Os resultados obtidos por Mateus e colaboradores para a hidrólise de alguns AMBH's estão resumidos na **Tabela 3.1**.

**Tabela 3.1.** Resultados obtidos por Mateus e colaboradores<sup>28</sup>, para a hidrólise de alguns AMBH's.

R	Condição reacional	Tempo, h	Rendimento, %
	I	18	61
	II	24	95
	II	20	70

Condições: I = LiOH, H<sub>2</sub>O/THF, 0° C --> t.a., 18 h; II = LiOH, H<sub>2</sub>O/THF 0° C, então, MeOH, 0° C --> t.a., 20-24 h.

<sup>28</sup> Mateus, C. R.; et al. *Tetrahedron*. 2001, 57, 6901.

## 3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.2.1 Síntese dos adutos de Morita-Baylis-Hillman

O aduto de acetaldeído **1a**, já se encontrava sintetizado no laboratório. Na síntese do aduto de isobutiraldeído **1b**, foi seguido o procedimento experimental de Silvia e colaboradores<sup>25</sup>, no entanto, a mistura reacional foi mantida sob a temperatura de 0°C. Com o fim da reação verificado por meio de CCD, e a purificação do produto por meio de uma cromatografia em coluna de sílica gel, empregando 10% de acetato de etila em hexano como eluente. O rendimento obtido para este aduto foi somente de 20%, valor abaixo daquele encontrado na literatura<sup>23,25</sup>.

**Tabela 3.2.** Resultados obtidos para a síntese dos AMBH's.

Aduto	R	Temperatura, °C	Tempo, dias	Rendimento, %
<b>1a</b>		Ambiente	7	-
<b>1b</b>		0°	21	20

Com o intuito de verificar a pureza dos adutos, foi feita a cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa, CG-EM, (**Figuras 3.2 e 3.3**), na qual a pureza foi estimada em ~99,2 % para o aduto **1a**, e ~99,9 % para o aduto **1b**. Os espectros de massas, certificaram a presença destes adutos, uma vez que os íons previstos estão de acordo com os valores encontrados também por Rodrigues<sup>23</sup>. Analisando em detalhes os dois espectros de massas, foi notado um provável mecanismo padrão de fragmentação, comum para os AMBH's, empregando o acrilato de etila. O **Esquema 3.2**, exemplifica o provável mecanismo de fragmentação para estes adutos. Considerando, que foi comum a perda do grupo **R**, característico de cada aldeído, gerando o íon de razão  $m/z$  129. De outra forma, por meio de um rearranjo de hidrogênio inicial, há a perda de uma molécula de etileno que, seguido de um segundo rearranjo de hidrogênio, leva a perda do grupo **R**, formando o íon de  $m/z$  101. Com a subsequente, eliminação de uma molécula de água, leva a produção do íon de razão  $m/z$  83, o pico base do espectro.

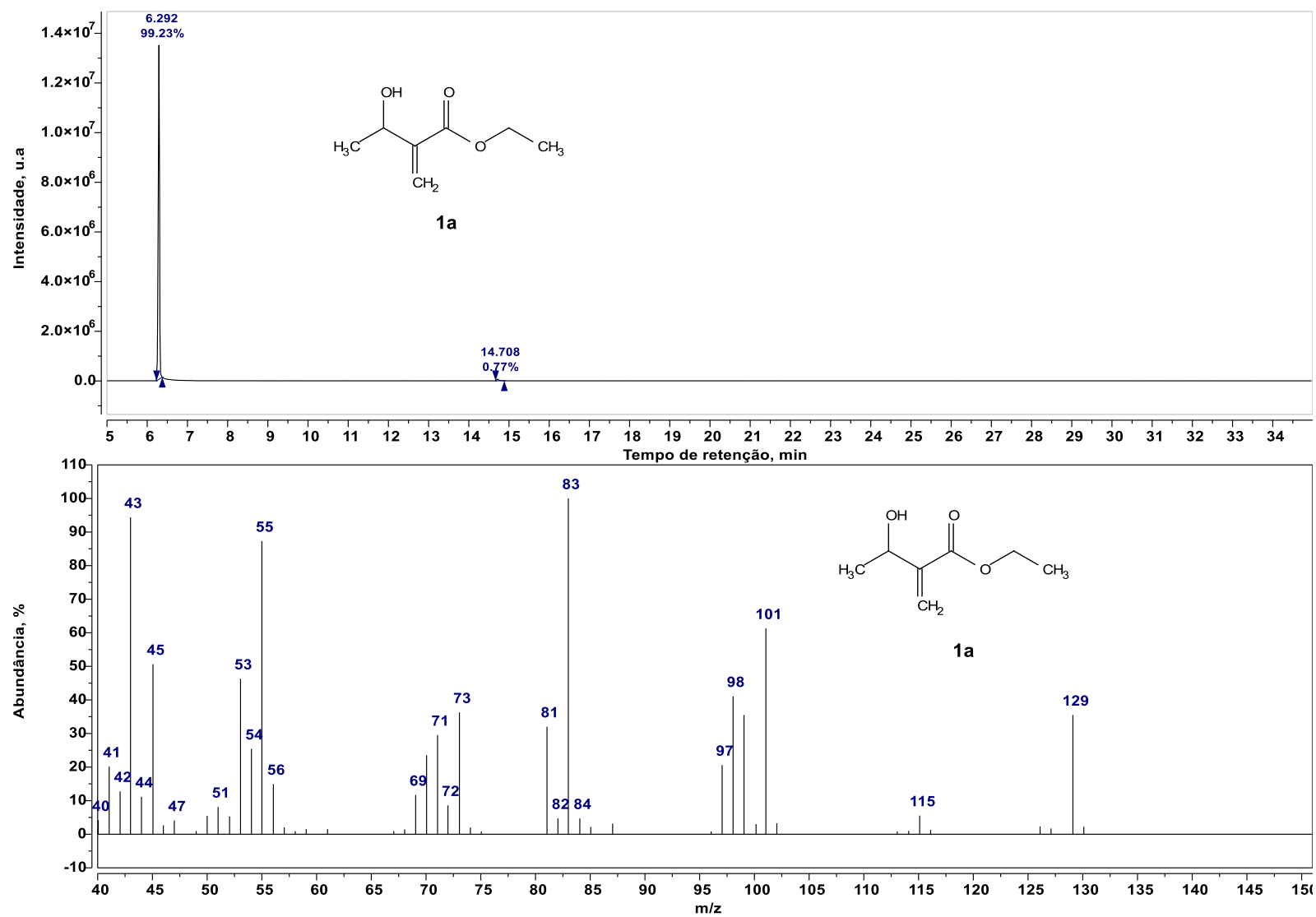


Figura 3.2. Cromatograma e espectro de massa para o AMBH 1a.

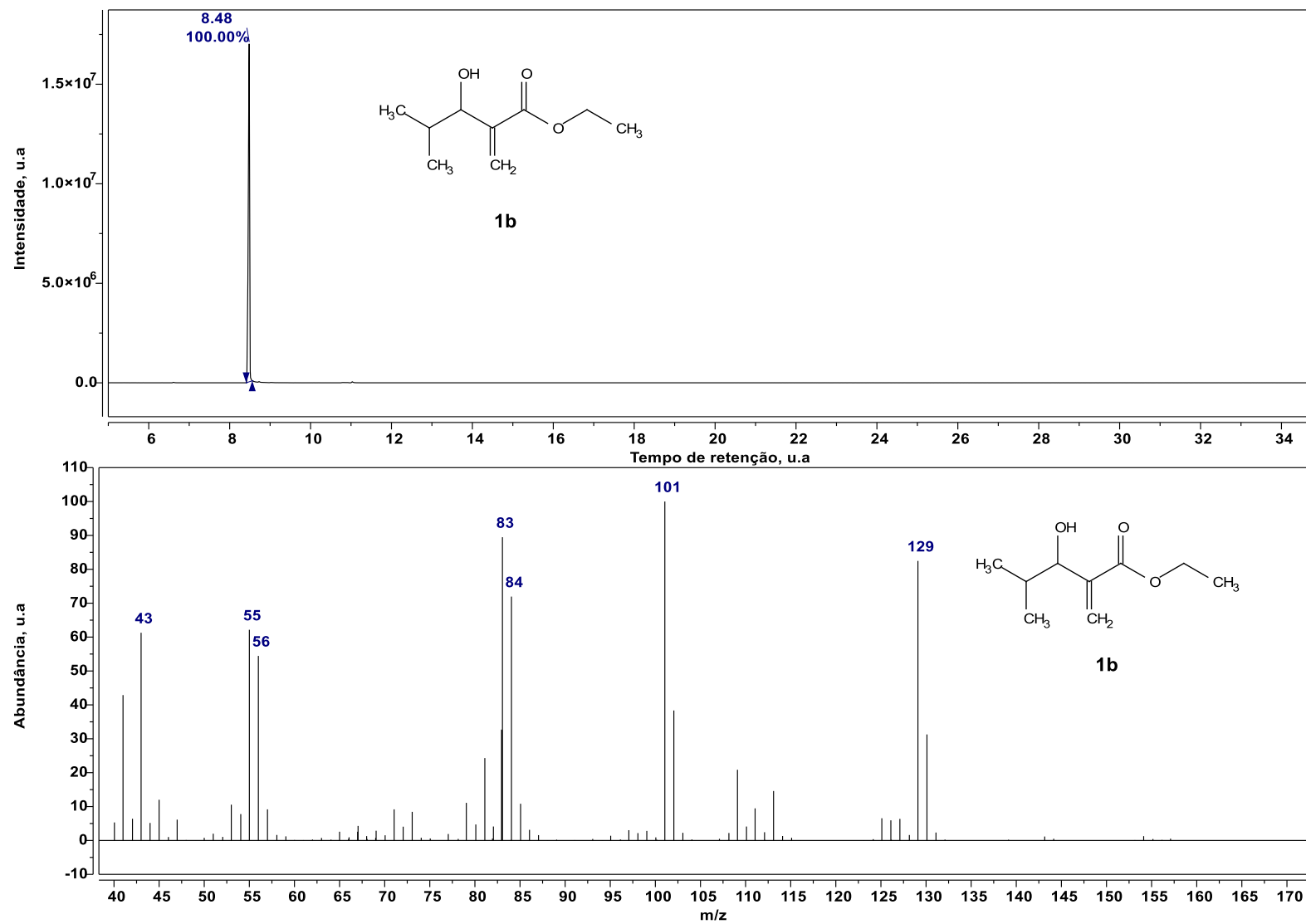
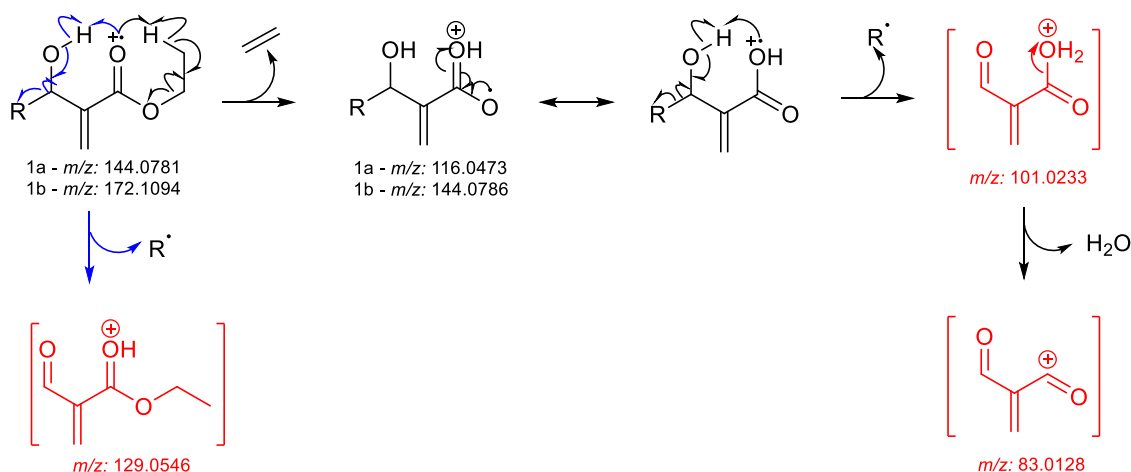


Figura 3.3. Cromatograma e espectro de massa para o AMBH **1b**



### Esquema 3.2. Proposta de mecanismo para a fragmentação dos adutos **1a** e **1b**.

Com a finalidade de confirmar as estruturas destes compostos, foram feitos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , em que estão de acordo com o esperado<sup>23,24,25</sup>. Nas **Figuras 3.4** e **3.5**, estão apresentados os espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , dentre os principais picos, que confirmaram o êxito da reação de adição do acrilato de etila ao isobutiraldeído, estão o tripleto em 4,05 ppm, referente ao hidrogênio advindo do aldeído, o octeto em 1,92 ppm, integrando para 1 hidrogênio, com uma constante de acoplamento  $J$  no valor de 6,8 Hz. Este H está acoplado com os hidrogênios dos grupos metilas, e do carbono ligado ao grupo hidroxila.

Contrastando os espectros do aduto **1a** com **1b**, foram observados sinais comuns para ambos, os dupletos em ~6,20 ppm e tripletos em ~5,70 ppm referentes ao carbono insaturado, com hidrogênios acoplado com constante de acoplamento  $J$  de ~1,0 Hz, valor típico para hidrogênio germinal. Do mesmo modo, o sinal do quarteto na faixa de 4,22 – 4,60 ppm, integrando para 2 hidrogênios, com  $J$  de ~7 Hz, referente ao grupo  $-\text{CH}_2$ , ligado ao grupo oxigênio do grupo éster.

Observando os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (**Figuras 3.6** e **3.7**), também foi notado, sinais para 7 e 9 carbonos, para os adutos **1a** e **1b**, respectivamente. Sendo os principais sinais, os deslocamentos químicos em ~166 ppm, ~ 141 – 143 ppm e ~ 123 - 125 ppm, e ~67 - 78 e ~60 ppm, referentes aos carbonos carbonílicos, vinílicos, e ligados a um átomo de oxigênio, respectivamente.

As **Tabelas 3.3** e **3.4**, resumem as atribuições dos sinais observados nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para os adutos **1a** e **1b**.

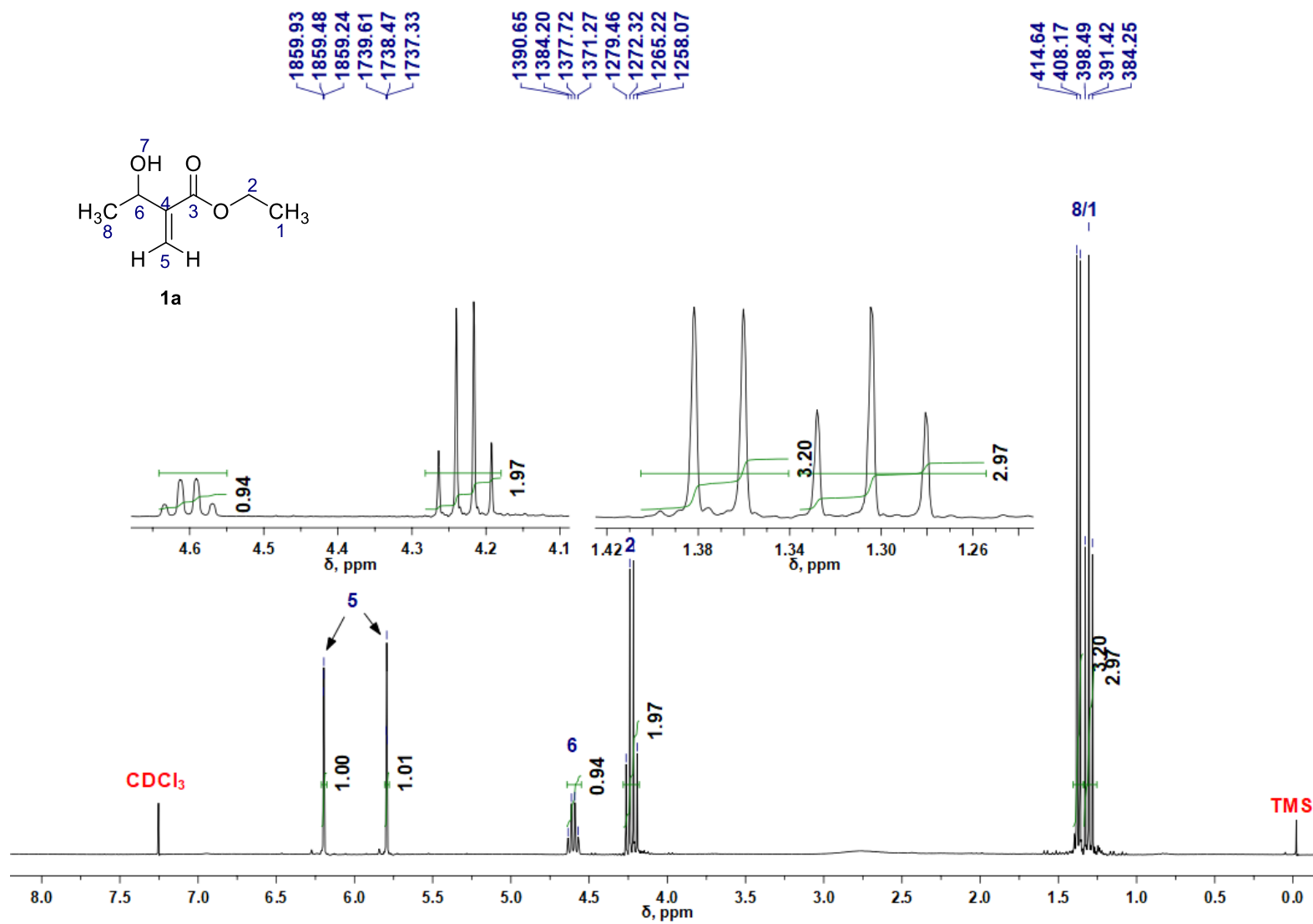


Figura 3.4. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para o aduto **1a**.

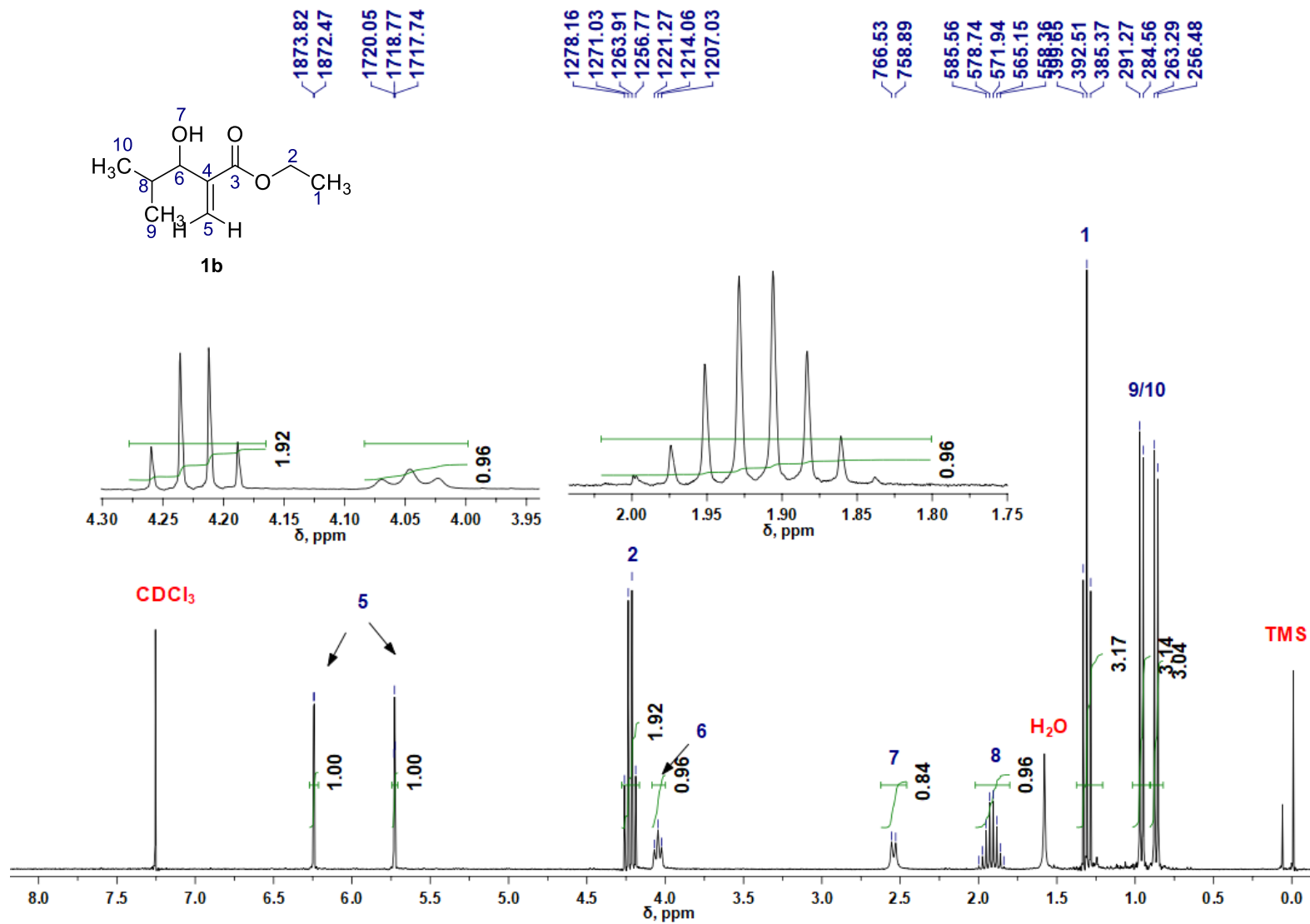


Figura 3.5. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) para o aduto **1b**.



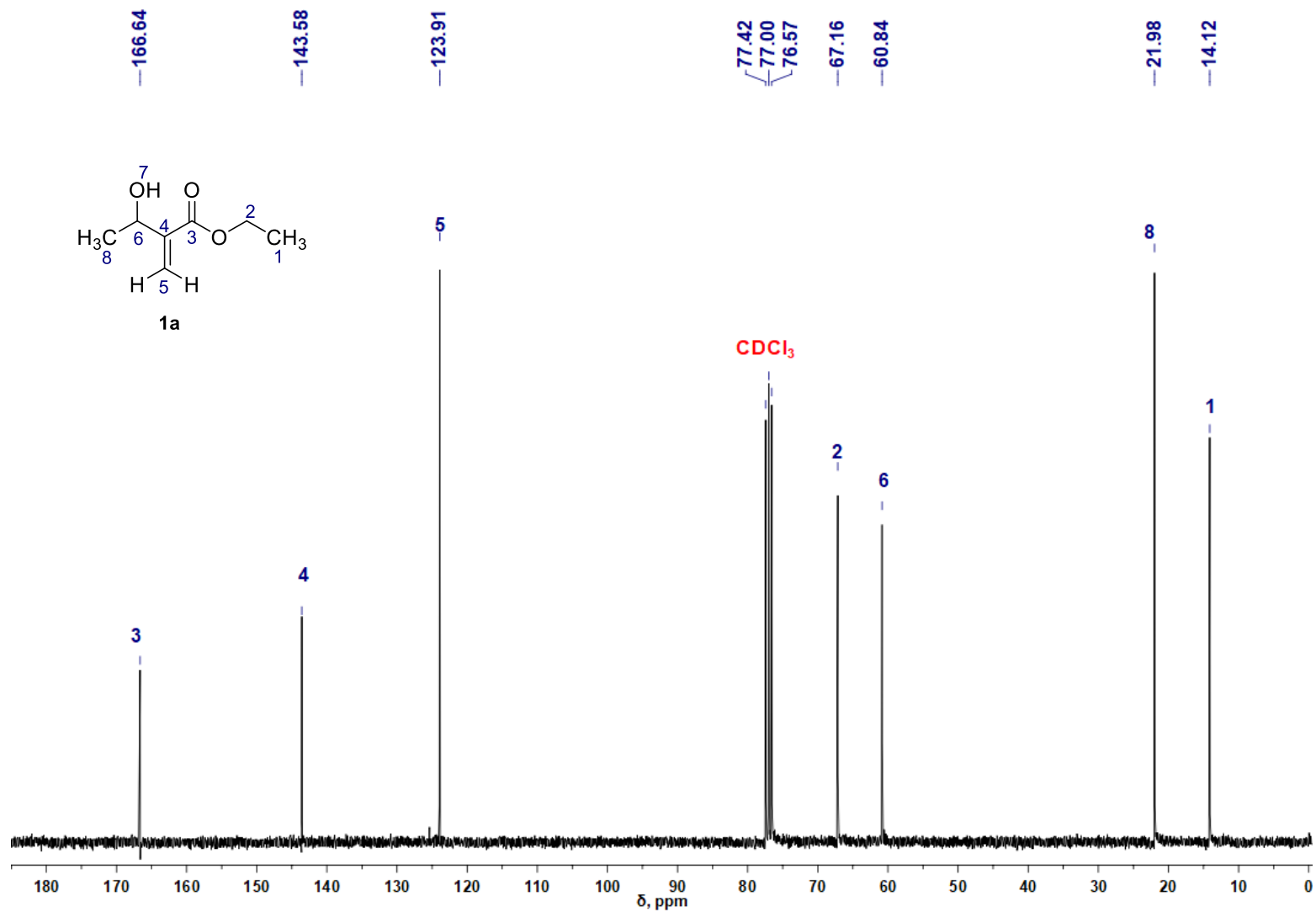


Figura 3.6. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para o aduto **1a**.

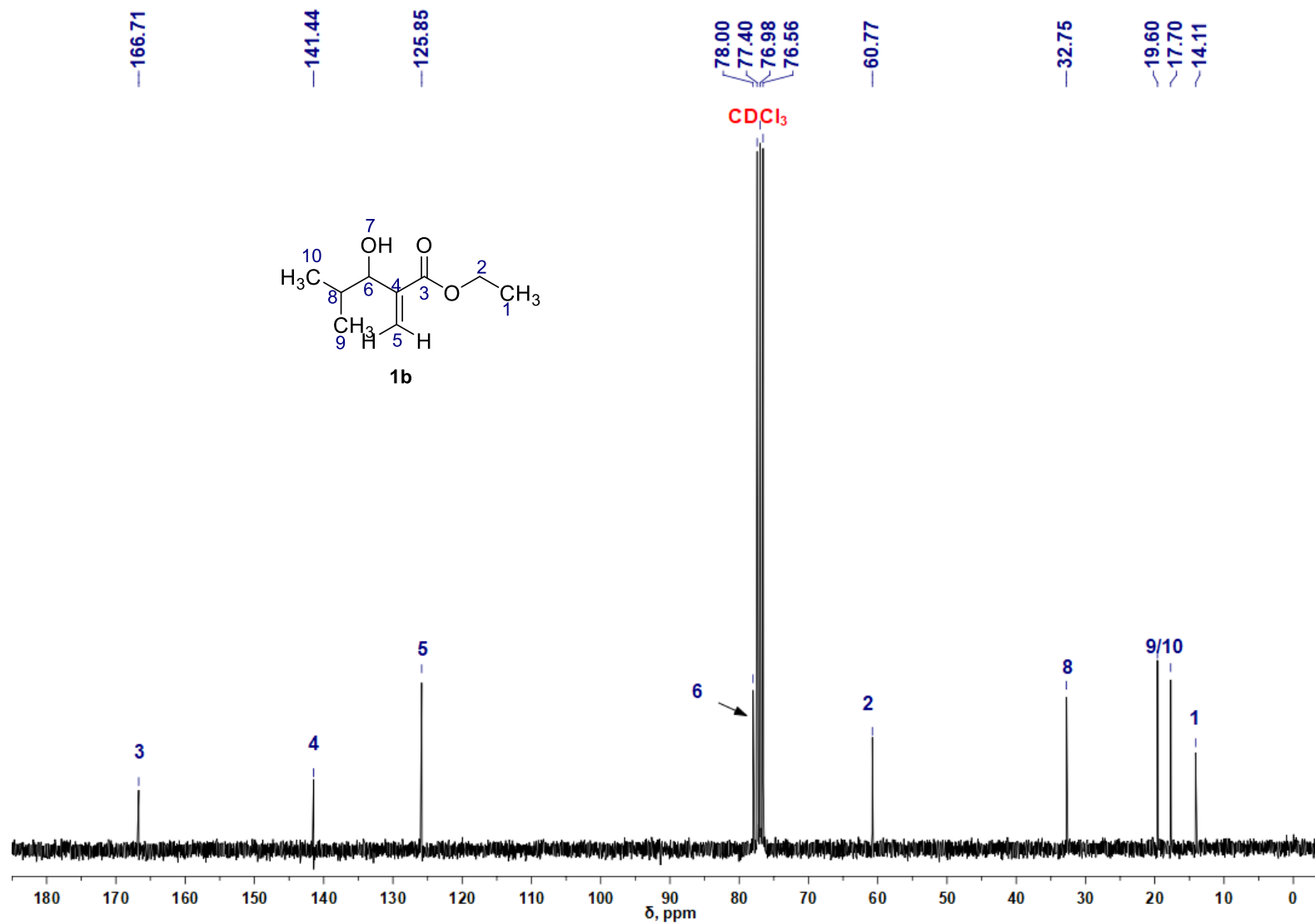
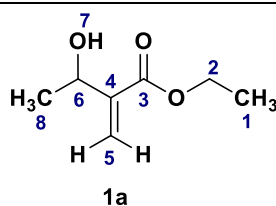
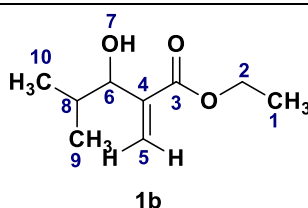


Figura 3.7. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para o aduto **1b**.

**Tabela 3.3.** Atribuição dos sinais observados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para o aduto **1a**.

Núcleo	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm), mult, $J$ (Hz), n° de H	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)
<b>1</b>	1,30; t; 7,1; 3H	14,1
<b>2</b>	4,21; q; 7,1; 2H	67,2
<b>3</b>	-	166,6
<b>4</b>	-	143,6
<b>5</b>	5,79; t; 1,1; 1H 6,20; d; 0,4; 1H	123,9
<b>6</b>	4,60; q; 6,4; 1H	60,8
<b>7</b>	-	-
<b>8</b>	1,37; d; 6,5; 3H	22,0

**Tabela 3.4.** Atribuição dos sinais observados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para o aduto **1b**.

Núcleo	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm), mult, $J$ (Hz), n° de H	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)
<b>1</b>	1,31; t; 7,1; 3H	14,1
<b>2</b>	4,22; q; 7,1; 2H	60,8
<b>3</b>	-	166,7
<b>4</b>	-	141,4
<b>5</b>	6,24; d; 1,3; 1H 5,73; t; 1,3; 1H	125,8
<b>6</b>	4,05; t; 7,2; 1H	78,00
<b>7</b>	2,54; d; 6,6; 1H	-
<b>8</b>	1,92; oct; 6,8; 1H	32,7
<b>9/10</b>	0,95; d; 6,7; 3H 0,86; d; 6,8; 3H	19,6 17,7

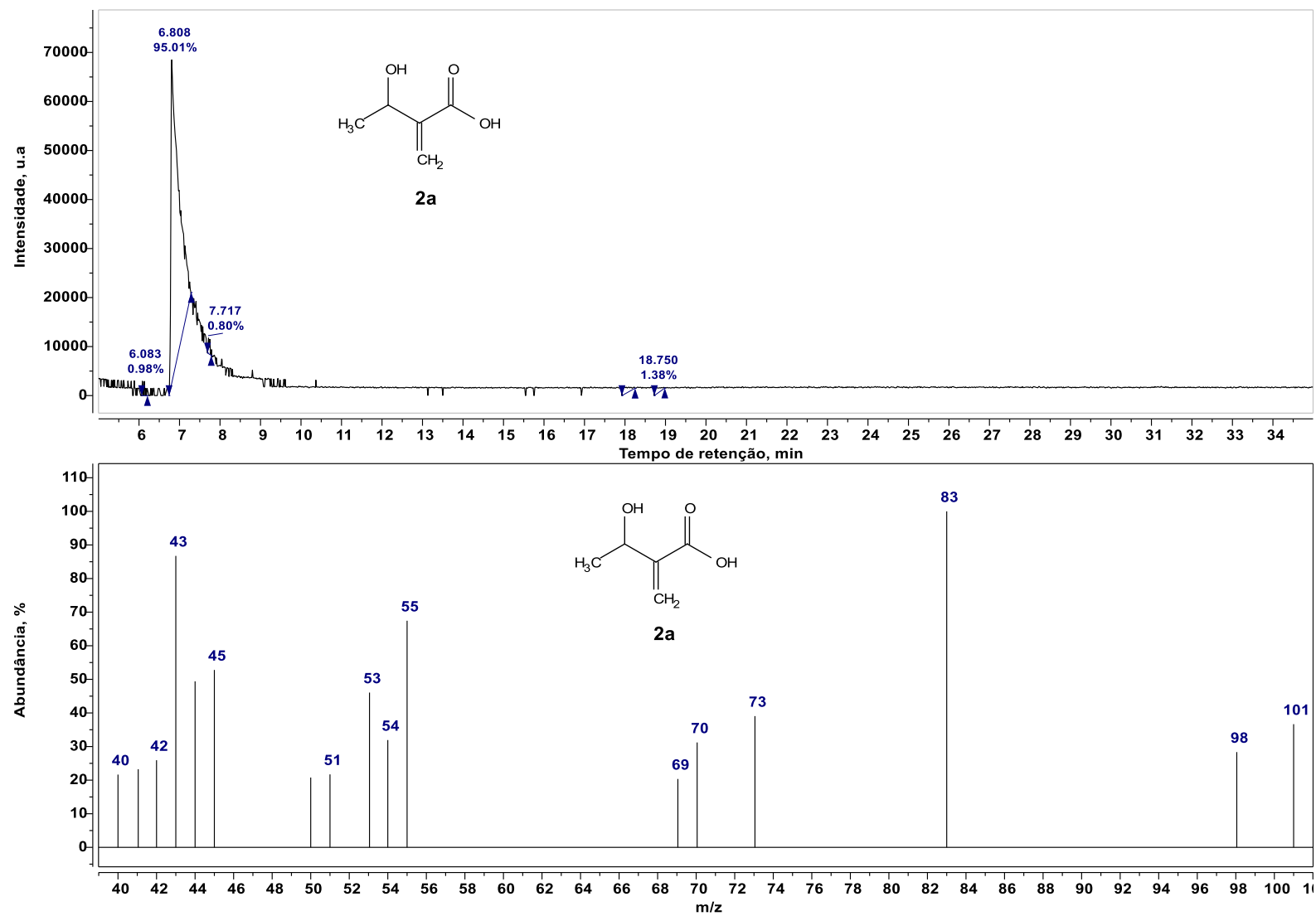
### 3.2.2 Síntese dos ácidos carboxílicos $\alpha$ , $\beta$ -insaturados a partir dos adutos de Morita-Baylis-Hillman

Com a confirmação da pureza e caracterização, os adutos **1a** e **1b** foram submetidos à reação de hidrólise, para a obtenção dos ácidos carboxílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados, **2a** e **2b**. A reação foi baseada no procedimento de Mateus e colaboradores<sup>28</sup>, no qual empregando a condição reacional II com modificações, 5,81 mmol dos AMBH's, foram hidrolisados com uma solução de LiOH (4,0 M) em H<sub>2</sub>O/THF, sob agitação por 24 h a t.a., seguida de acidificação do carboxilato intermediário. Esta reação se mostrou bastante eficiente, em vista que foram obtidos rendimentos de 72% para a hidrólise do aduto **1a**, e 95 % para o aduto **1b**. Os resultados obtidos, estão resumidos na **Tabela 3.5**.

**Tabela 3.5. Resultados obtidos para a síntese dos ácidos carboxílicos  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados a partir dos AMBH's.**

	R	Rendimento, %
<b>2<sup>a</sup></b>		72
<b>2<sup>b</sup></b>		95

Novamente, para a verificação da pureza dos ácidos carboxílicos, foram feitos CG-EM (**Figuras 3.8 e 3.9**), nos quais as purezas foram estimadas em ~95,0 % e ~96,5%, para os ácidos **2a** e **2b**, respectivamente. Os espectros de massas confirmaram a hidrólise dos adutos, em vista ter sido comum a perda de uma molécula de água em ambos os espectros, gerando íons moleculares [M-H<sub>2</sub>O]. Além de serem observados novamente, os íons com as razões  $m/z$  101 e 83. O **Esquema 3.3**, exemplifica o provável mecanismo de fragmentação para a formação desses íons. Sendo que, a formação do íon de  $m/z$  101, foi provavelmente, decorrente de um rearranjo de hidrogênio, seguido da eliminação do grupo **R**, característico de cada aldeído. Já a formação do íon de  $m/z$  83, presumivelmente, ter sido decorrente da perda de água do íon de  $m/z$  101, ou da perda do grupo **R**, anterior a perda de uma molécula de água.



**Figura 3.8.** Cromatograma e espectro de massa para o ácido carboxílico  $\alpha,\beta$ -insaturado **2a**, advindo do AMBH **1a**.

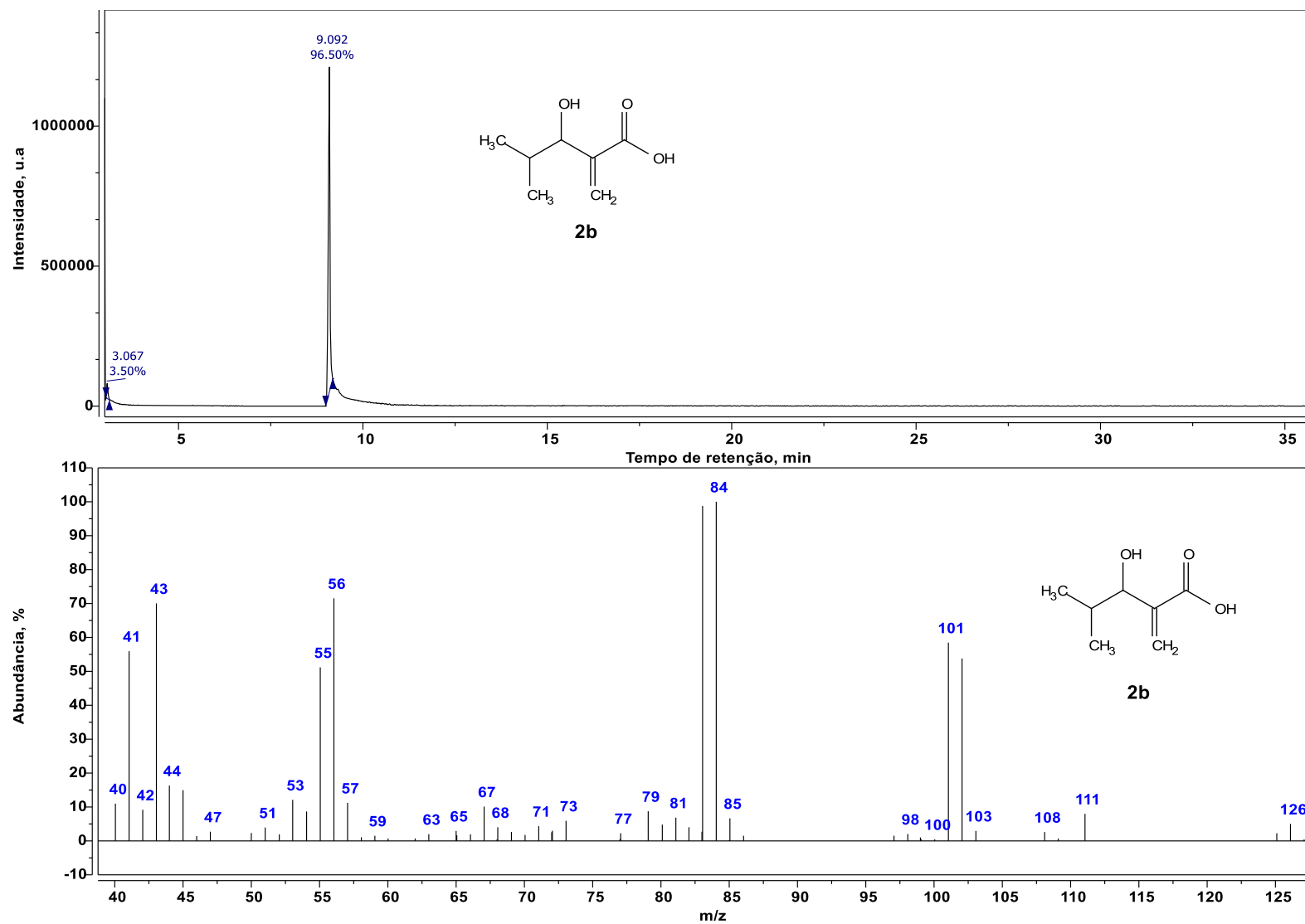
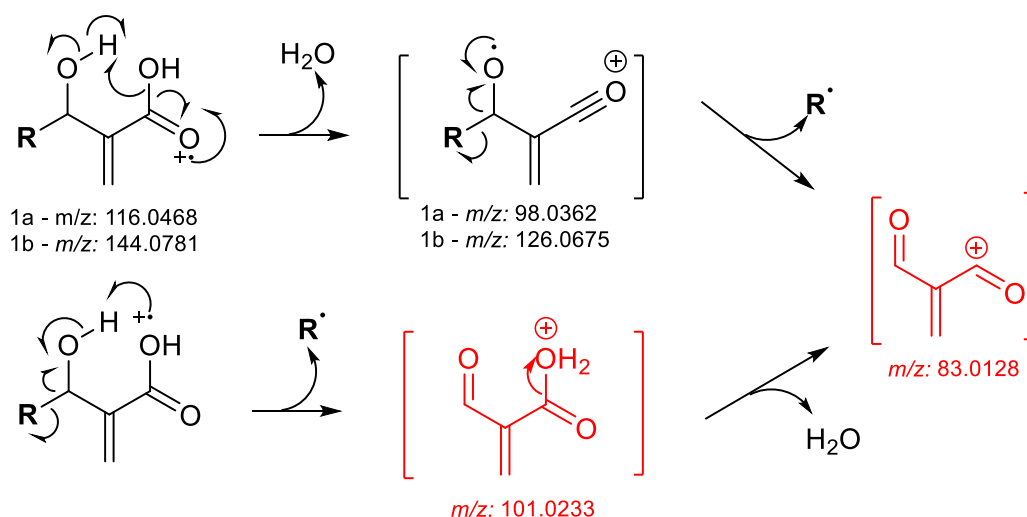


Figura 3.9. Cromatograma e espectro de massa para o ácido carboxílico  $\alpha,\beta$ -insaturado **2b**, advindo do AMBH **1b**.



**Esquema 3.3.** Proposta mecanística de fragmentação para os ácidos carboxílicos  $\alpha,\beta$ -insaturado **2a** e **2b**.

Com o objetivo de atestar a perda do grupo éster, foram feitos os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , para os ácidos carboxílicos **2a** e **2b**. Nas **Figuras 3.10** e **3.11** são apresentados os espectros obtidos de RMN de  $^1\text{H}$ , em ambos espectros foram observados a ausência dos quartetos na faixa de 4,22 – 4,60 ppm, integrando para 2 hidrogênios, referentes aos grupos éster, confirmando a eficiência da reação de hidrólise. De modo semelhante aos espectros do AMBH's sem hidrolisar, foram comuns os dupletos em  $\sim 6,30$  ppm e tripletos em  $\sim 5,90$  ppm, referentes ao carbono insaturado, com hidrogênios acoplado com constante de acoplamento  $J$  de  $\sim 1,0$  Hz, valor típico para hidrogênio germinal. Assim, como no espectro de RMN  $^1\text{H}$ , a ausência dos sinais de carbonos, relacionados ao grupo éster no RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figuras 3.12** e **3.13**) foram analisados, como a perda de dois sinais, sendo observados sinais para 5 e 7 carbonos, para os ácidos carboxílicos **2a** e **2b**, respectivamente. Sendo esses sinais referentes aos carbonos carbonílicos, vinílicos, e ligados a um átomo de oxigênio do grupo hidroxila.

As **Tabelas 3.6** e **3.7**, resumem as atribuições dos sinais observados nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para os ácidos carboxílicos  $\alpha,\beta$ -insaturado **2a** e **2b**.

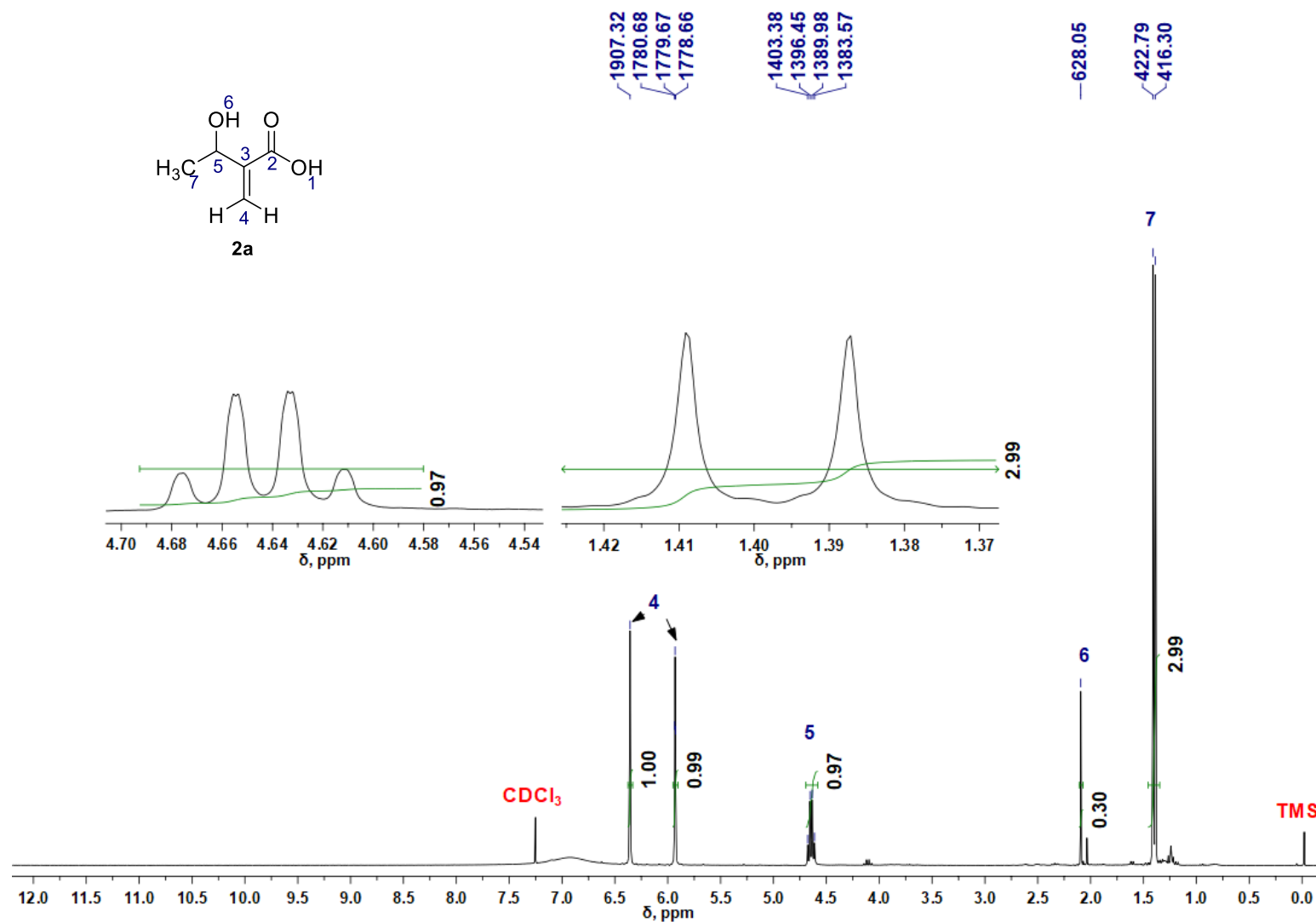


Figura 3.10. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para o ácido carboxílico  $\alpha,\beta$ -insaturado **2a**.



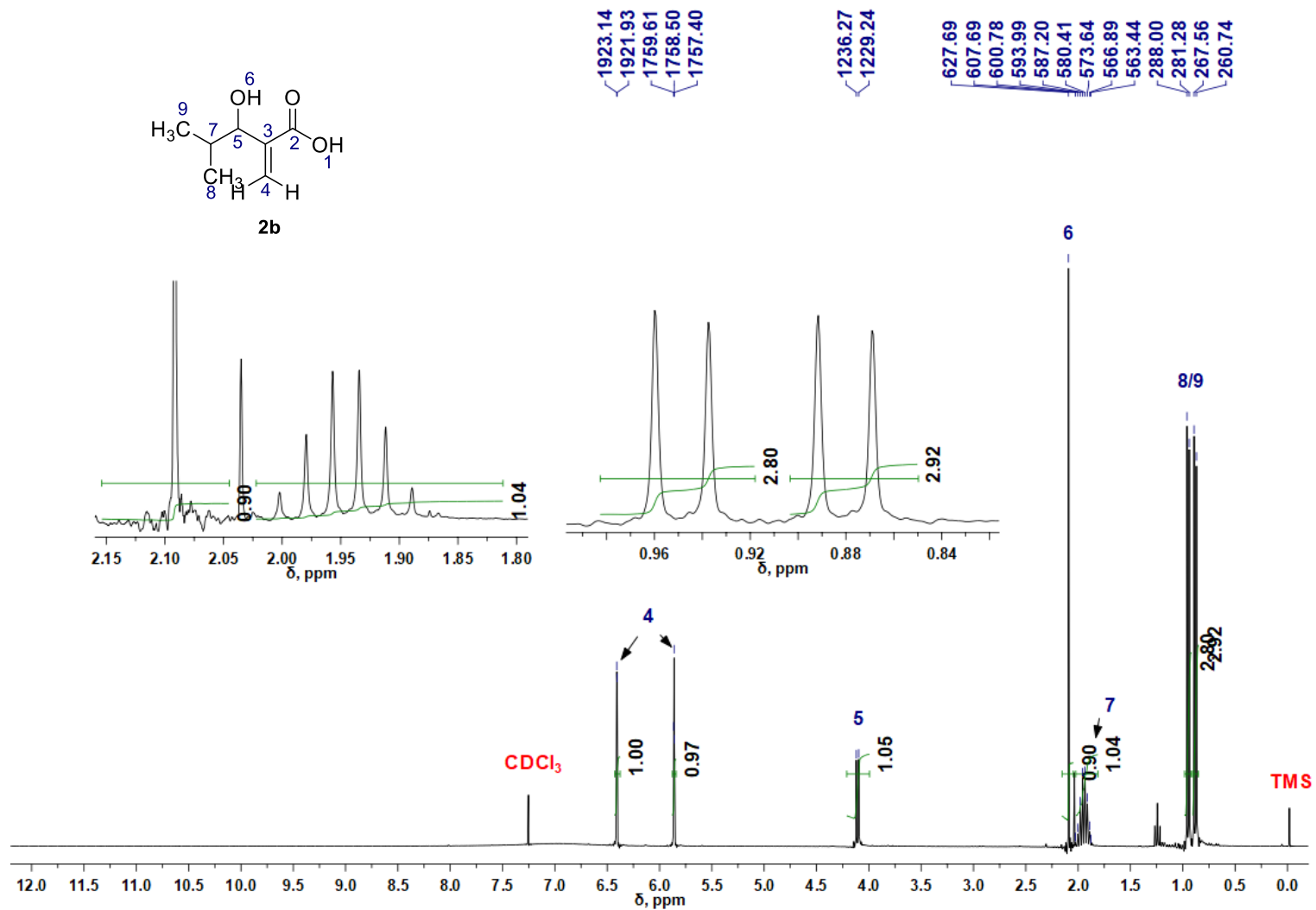


Figura 3.11. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) para o ácido carboxílico α, β-insaturado **2b**.

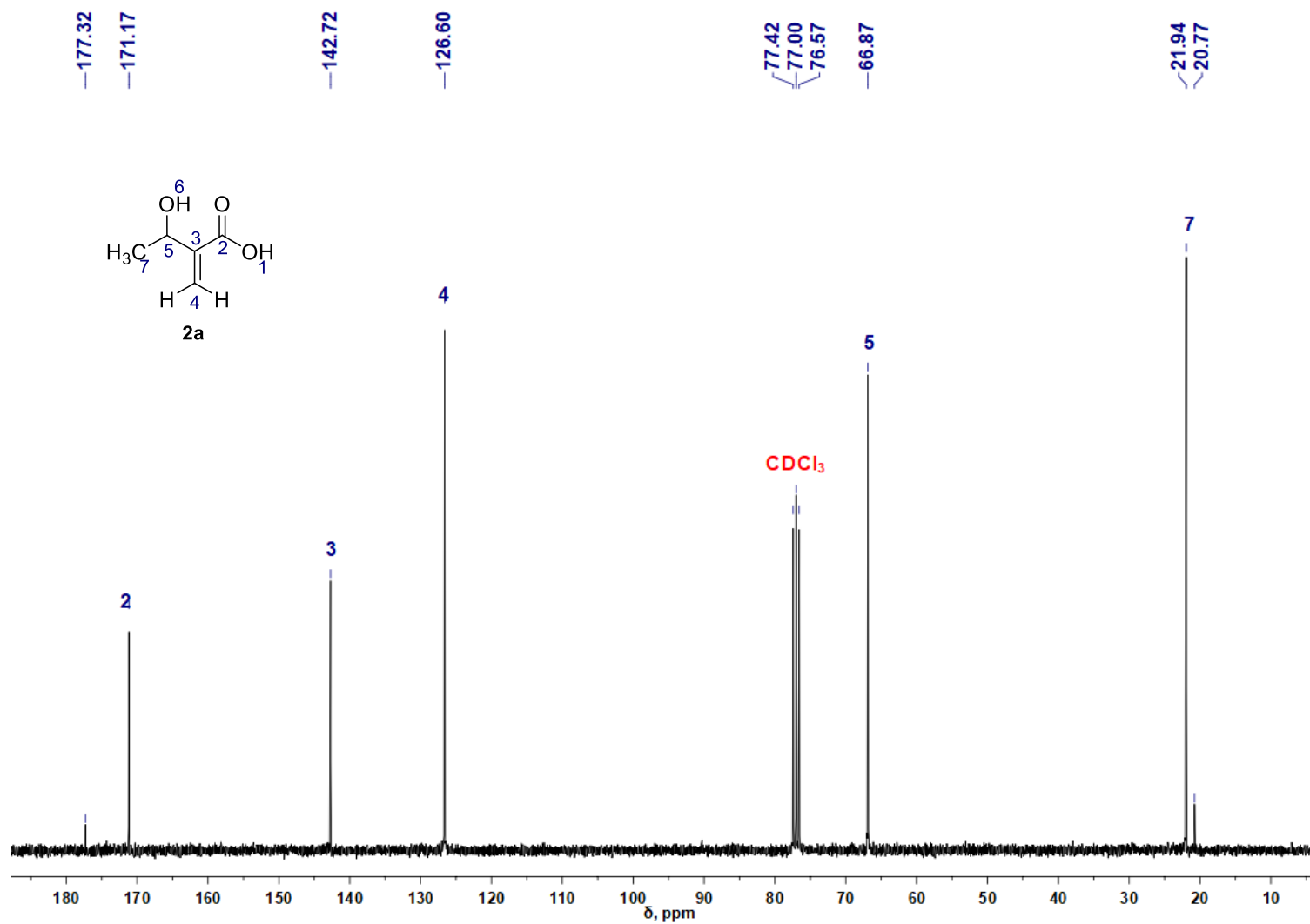


Figura 3.12. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para o ácido carboxílico  $\alpha, \beta$ -insaturado **2a**.

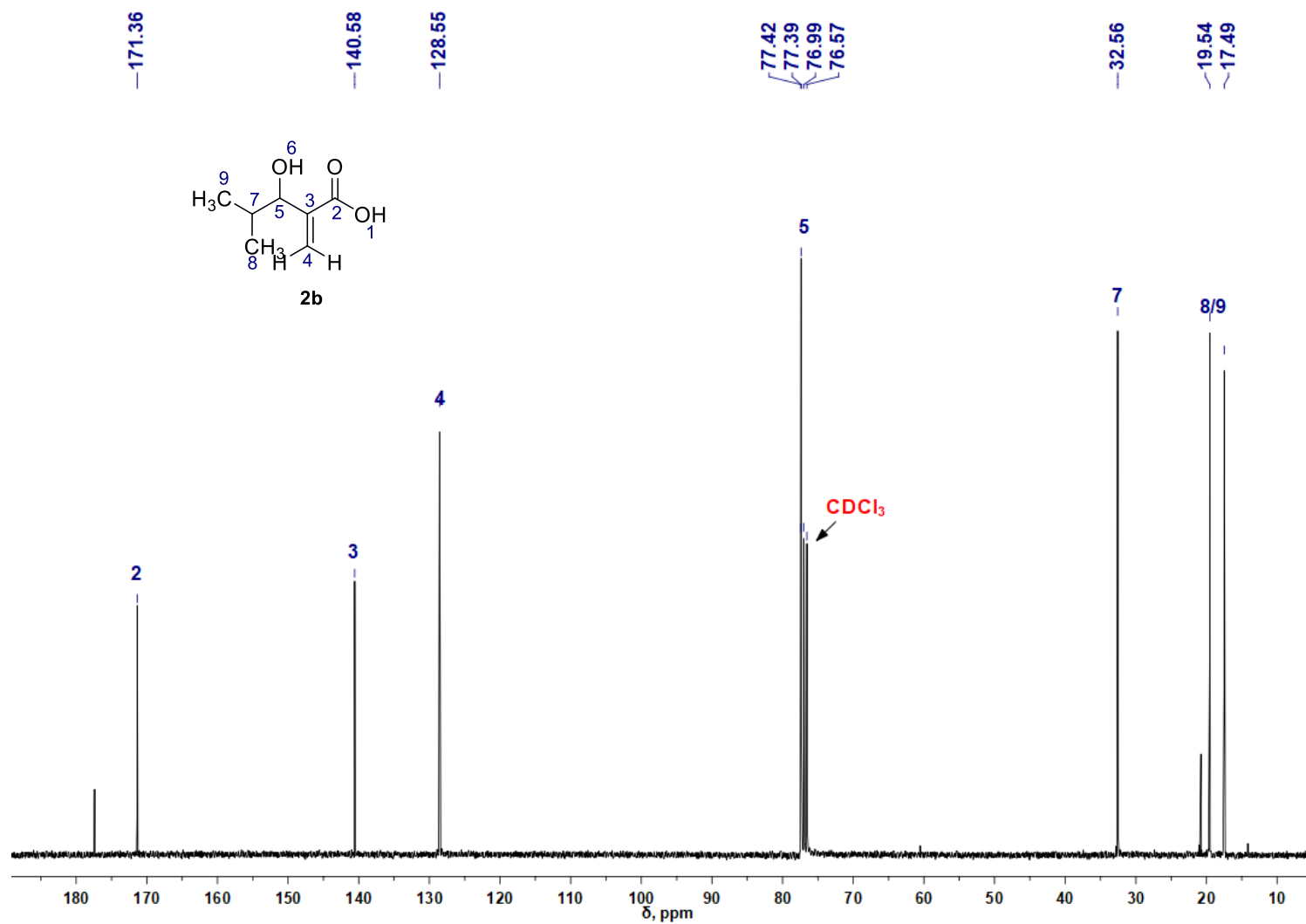
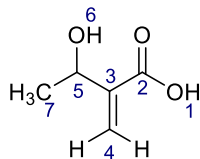
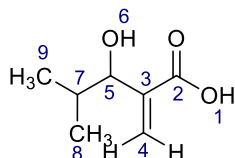


Figura 3.13. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para o ácido carboxílico  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado **2b**.

**Tabela 3.6.** Atribuição dos sinais observados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para o ácido carboxílico  $\alpha, \beta$ -insaturado **2a**.

Núcleo	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm), mult, $J$ (Hz), n $^\circ$ de H	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)
1	-	-
2	-	171,2
3	-	142,7
4	6,36, s, 1H 5,93, t, 1,0, 1H	126,6
5	4,64, q, 6,0, 1H	66,9
6	2,09, s, 1H	-
7	1,40, d, 6,5, 3H	21,9

**Tabela 3.7.** Atribuição dos sinais observados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para o ácido carboxílico  $\alpha, \beta$ -insaturado **2b**.

Núcleo	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm), mult, $J$ (Hz), n $^\circ$ de H	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)
1	-	-
2	-	171,4
3	-	140,6
4	6,40, d, 1,2, 1H 5,86, t, 1,1, 1H	128,5
5	4,11, d, 7,0, 1 H	77,4
6	2,09, s, 1H	-
7	1,93, octeto, 6,8, 1H	32,6
8/9	0,95, d, 6,7, 3H 0,88, d, 6,8, 3H	19,5 e 17,5

### 3.3 PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.3.1 Reagentes, solventes e soluções

O isobutiraldeído foi purificado por meio de uma destilação simples antes de ser utilizado. O acrilato de etila não foi purificado antes do uso. Os reagentes DABCO e  $\text{CDCl}_3$ , e a sílica gel do tipo comum (70-230 mesh), foram adquiridos comercialmente

da Sigma Aldrich<sup>®</sup>. O sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) foi adquirido da Dinâmica<sup>®</sup>. Os solventes hexano, acetato de etila, foram purificados antes do uso. As placas de análise de CCD de alumínio revestida de sílica gel 60 F-254, foram adquiridas da Merck<sup>®</sup>. A solução de 4 M de LiOH, foi feita solubilizando 19,55 g em 200 mL de água Milli-Q<sup>®</sup>.

### 3.3.2 Síntese dos adutos de Morita-Baylis-Hillman

O aduto de acetaldeído **1a** já se encontrava sintetizado no laboratório. O aduto **1b** foi feito usando um balão de fundo redondo, no qual foram adicionados 22,4 mmol de isobutiraldeído com 34,0 mmol de acrilato de etila e 3,20 mmol de DABCO. A mistura foi mantida sob a temperatura de 0°, durante 21 dias, o fim da reação foi verificado por meio da análise de CCD, usando uma solução de vanilina sulfúrica com aquecimento para revelação das placas. Com a verificação do fim da reação, foi usado um rotaevaporador para a retirada de acrilato de etila remanescente. Com o propósito de retirar o DABCO e outros resíduos, o produto foi purificado por cromatografia em coluna, utilizando sílica gel do tipo comum (70-230 mesh), empregando 10% de acetato de etila em hexano como eluente.

### 3.3.3 Síntese dos ácidos carboxílicos $\alpha$ , $\beta$ -insaturados a partir dos adutos de Morita-Baylis-Hillman

Para a obtenção dos ácidos carboxílicos **2a** e **2b**, 5,81 mmol dos adutos **1a** e **1b**, sob a temperatura ambiente, foram hidrolisados com 15 mL de LiOH (4,0 M) com 10 mL de THF, sob agitação por 24 h. Depois, foi usado um rotaevaporador para a retirada do THF. Depois, foi adicionado 15 mL de água Milli-Q<sup>®</sup> a solução remanescente, e lavado com acetato de etila (5mL, 3x). A fase aquosa foi acidificada com uma solução de HCl (1 M) até o pH 1, para a extração foi usado acetato de etila (10 mL, 3x). A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), depois foi filtrada e a amostra foi concentrada num rotaevaporador.

### 3.3.4 Caracterização dos produtos por CG-EM e RMN

Para verificação da pureza e obtenção dos espectros de massas dos produtos, foram adquiridos num CG-EM (Shimadzu® - GCMS-QP2010), equipado com autoinjeter AOC-5000 e coluna Restek Rtx-5MS® (30 m x 0.25 mm) e detector GCMS-QP5050A do tipo impacto de elétron 70eV. No método utilizado, o injetor opera no modo split a 250 °C e o uso do gás hélio como gás carregador com vazão de 1,0 mL/min, com programação de temperatura foi feita com uma rampa de temperatura de 20 °C/min, iniciando em 50 °C. Os dados obtidos foram analisados usando o programa Shimadzu® - GCMS Postrun analysis.

Os espectros de ressonância magnética nuclear – RMN - de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, foram obtidos utilizando um Espectrômetro de RMN de 300 MHz (Varian®, Magneto Oxford YH300) com campo magnético de aproximadamente 7T, equipado com sonda Varian 5mm ATB, empregando o clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>) como solvente, e o tetrametilsilano (TMS) como referência. Os dados obtidos foram analisados utilizando o programa MestReNova®, versão 6.0.

## 3.4 CONCLUSÕES DO CAPÍTULO

- O aduto **1b** foi obtido com somente 20% de rendimento. Este resultado, provavelmente está relacionado à mudança da temperatura reacional;
- A reação de hidrólise dos AMBH's, proposta por Mateus e Colabores<sup>28</sup>, se demonstrou bastante eficiente, tendo em vista que foram obtidos bons resultados de rendimento.
- Os espectros de massas e de RMN confirmaram a formação dos  $\alpha,\beta$ -insaturados, a partir dos adutos de Morita-Baylis-Hillman;
- Os ácidos carboxílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados, sintetizados neste capítulo, serão acoplados ao grupo *N*-terminal de um aminoácido, a fim de realizar uma reação de ciclização intramolecular, entre os grupos nucleofílicos de hidroxila e sulfidrilas ao carbono *C*-terminal.

# **CAPÍTULO 4**

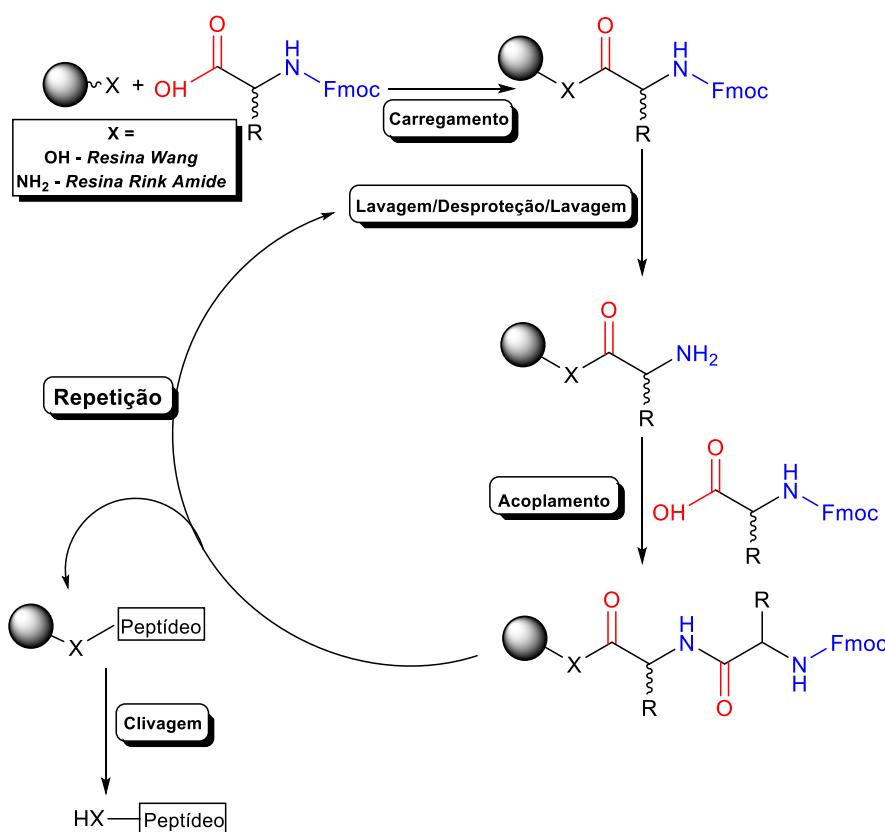
## **EXPLORAÇÃO DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO PARA A SÍNTESE DE MOLÉCULAS BASEADAS NAS SOLONAMIDAS**

## 4. EXPLORAÇÃO DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO PARA A SÍNTESE DE MOLÉCULAS BASEADAS NAS SOLONAMIDAS

### 4.1 METODOLOGIAS

#### 4.1.1 Síntese de peptídeos em fase sólida

Como este trabalho teve como proposta a síntese de tetrapeptídeos, a metodologia mais adequada para este objetivo é a síntese em fase sólida. Conforme o **Esquema 4.1**, em geral, este modo de síntese é constituído por uma etapa de acoplamento de um *N*-Fmoc aminoácido à resina, seguida da remoção deste grupo de proteção, para o acoplamento do próximo aminoácido. Depois de concluída a sequência dos aminoácidos de interesse, a última etapa é a clivagem da ligação que une a resina ao peptídeo<sup>29</sup>.

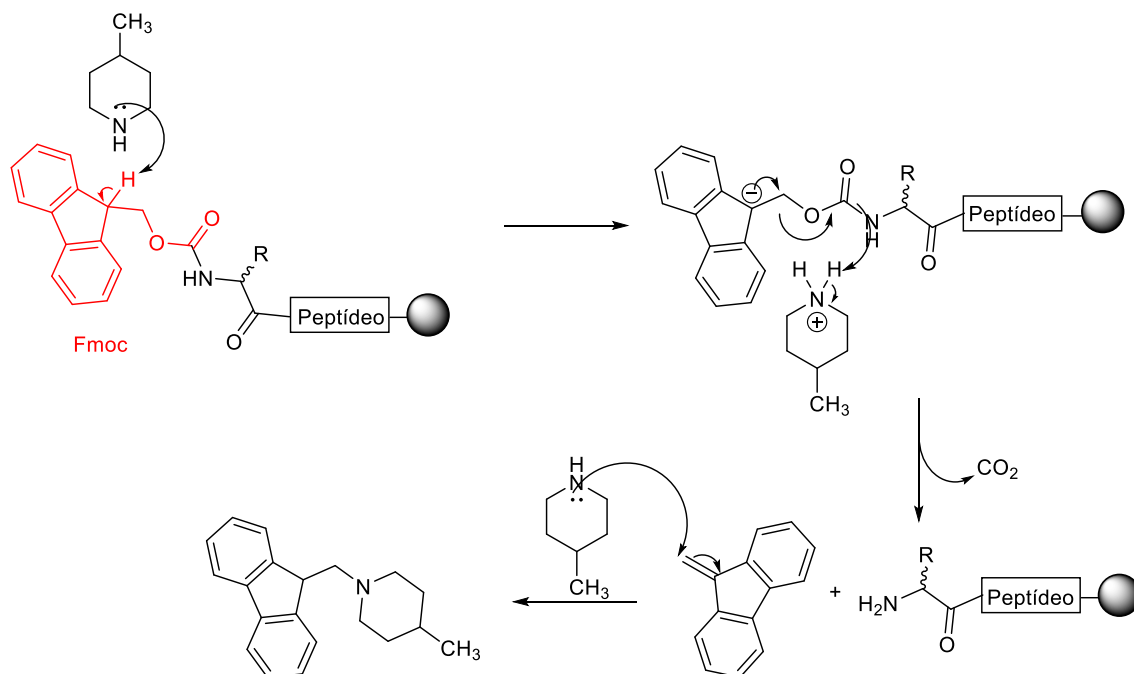


**Esquema 4.1.** Síntese de peptídeos em fase sólida, adaptado<sup>29</sup>

<sup>29</sup> aapptec, *Practical Guide to Solid Phase Peptide Synthesis*, <http://www.aapptec.com/>.



O mecanismo para a remoção do grupo de proteção Fmoc (**Esquema 4.2**) acontece pela abstração do hidrogênio ácido do anel fluorenila que conduz, por meio de uma  $\beta$ -eliminação, à liberação do grupo *N*-terminal e a formação de dibenzofulveno e dióxido de carbono. Como o dibenzofulveno se trata de um eletrófilo, e tendo potencial de reagir com o grupo *N*-terminal, a 4-metil-piperidina se adiciona, inativando-o.<sup>29</sup>

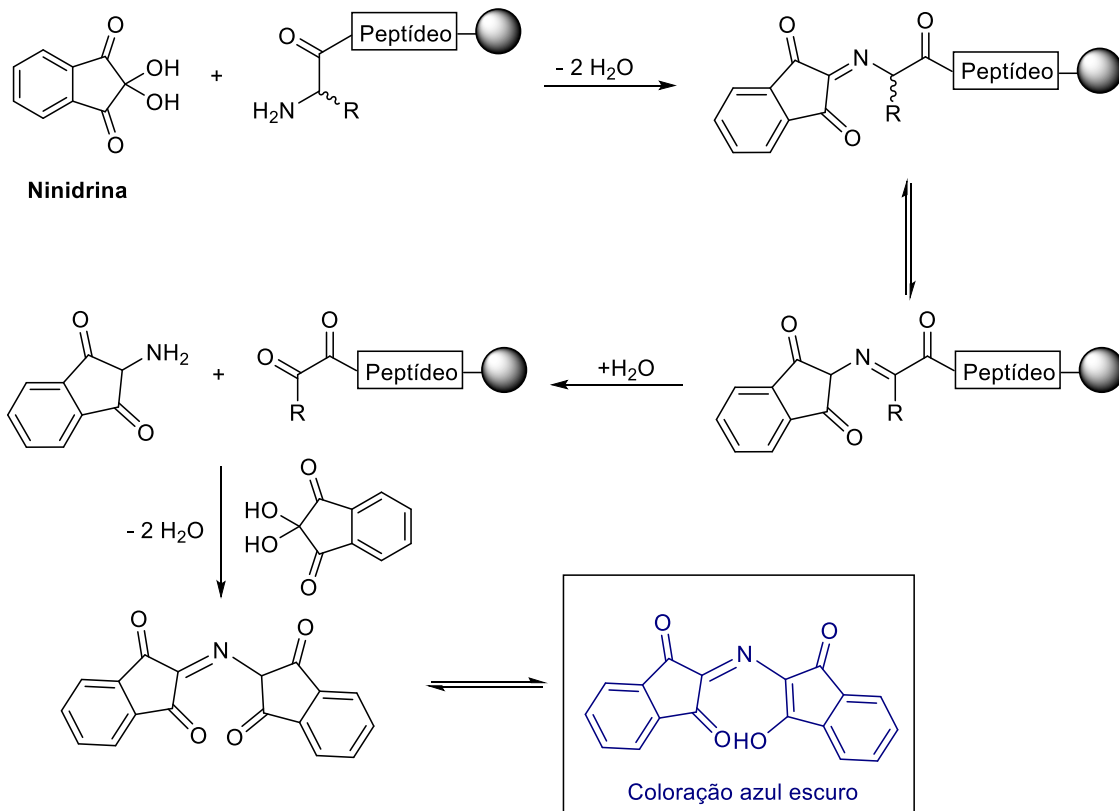


**Esquema 4.2.** Mecanismo para a desproteção do grupo Fmoc<sup>29</sup>.

Para confirmar a desproteção do grupo *N*-terminal, foi feito o teste de Kaiser, um teste colorimétrico, no qual são usados 3 reagentes:

- Reagente A: Solução de 2% (v/v) de KCN em piridina
- Reagente B: Solução de 5% (m/v) de ninidrina em n-butanol
- Reagente C: Solução de 2 % (m/v) de fenol em n-butanol.

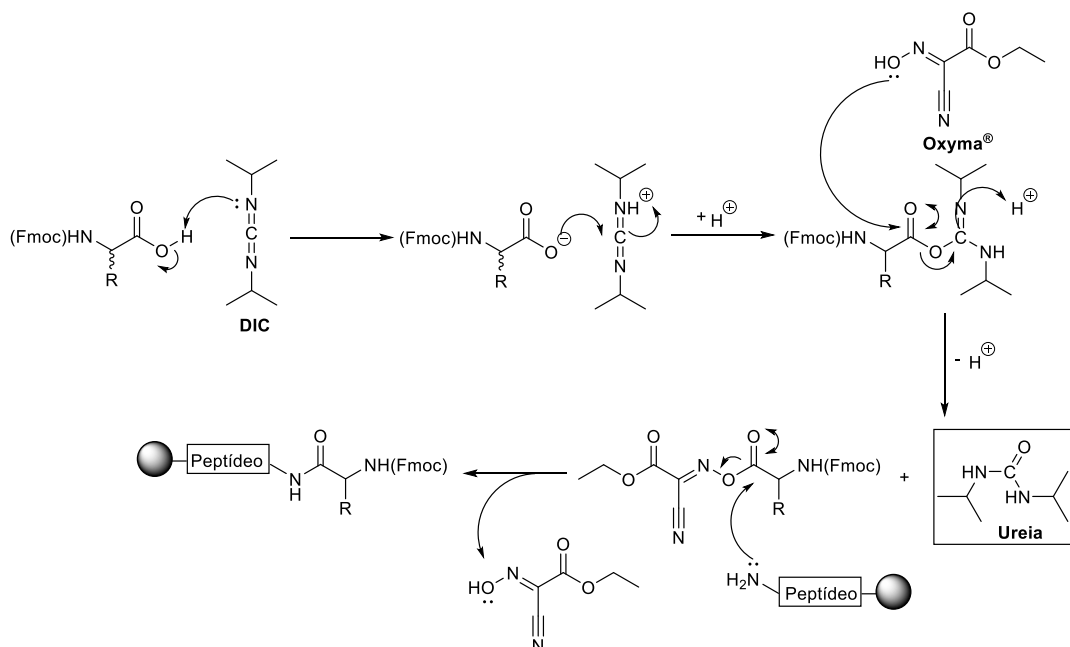
Para fazer o teste, foram adicionadas 2 gotas dos reagentes A, B e C uma pequena quantidade da resina contida num tubo de ensaio e, com posterior aquecimento do tubo a 110 °C por 5 min, a coloração da resina muda para azul intenso se a desproteção estiver completa. Se a coloração da resina permanecer incolor ou azul fraco, a desproteção não ocorreu ou foi incompleta. O **Esquema 4.3**, resume a formação deste composto colorimétrico.



**Esquema 4.3.** Formação do composto colorimétrico para o teste de Kaiser<sup>30</sup>.

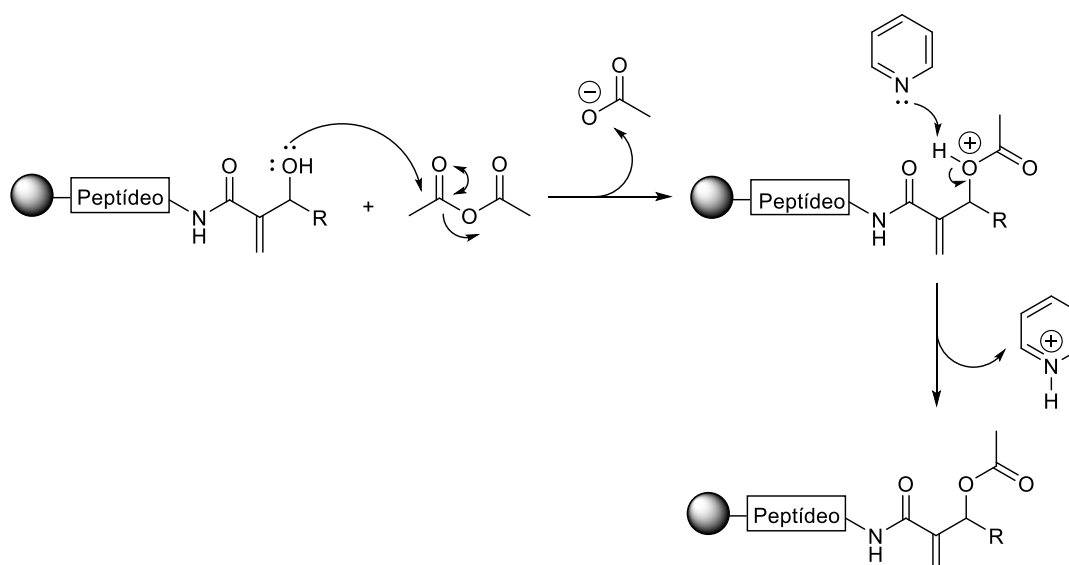
Com a desproteção conferida, a resina ficou disponível para o acoplamento do aminoácido. No qual, o primeiro aminoácido acoplado foi a cisteína com o grupo -SH protegido com a tritila, ou a serina, com o grupo -OH protegido com *tert*-Butil. Com subsequente, acoplamento de três aminoácidos, dentre fenilalanina, leucina e alanina, com a configuração absoluta *L* ou *D* para o seu centro estereogênico. Depois de acoplados os resíduos de aminoácidos pretendidos, e a desproteção do grupo amina *N*-terminal, foram acoplados os resíduos de ácidos carboxílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados, provenientes dos AMBH's, sintetizados no capítulo anterior. Para os acoplamentos entre o resíduo aminoácido *N*-terminal e ácidos carboxílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados, a ativação do ácido carboxílico foi realizada pelo método DIC/Oxyma<sup>®</sup>. O DIC, por ser um excelente eletrófilo, sofre ataque nucleofílico do ácido carboxílico, ativando-o para a adição de Oxyma<sup>®</sup>, o que leva, por meio de uma reação de eliminação, à formação de diisopropilureia. O produto da adição de Oxyma<sup>®</sup>, se torna apto para reagir com o grupo amina do resíduo *N*-terminal.<sup>29</sup> O mecanismo para essa reação está proposto no **Esquema 4.4**.

<sup>30</sup> Sarin, V. K et al. *Analytical Biochemistry*, 117(1), 147–57.



**Esquema 4.4.** Mecanismo para o acoplamento de aminoácidos, utilizando o método de DIC/Oxyma<sup>®</sup>, adaptado<sup>29</sup>.

Afim de tornar o grupo hidroxila contido no resíduo de AMBH em um bom grupo de saída para as reações de substituição nucleofílica vinílica ( $S_N2'$ ), foi feita a reação de acetilação deste grupo, utilizando uma solução de anidrido acético com piridina (**Esquema 4.5**).<sup>31</sup>

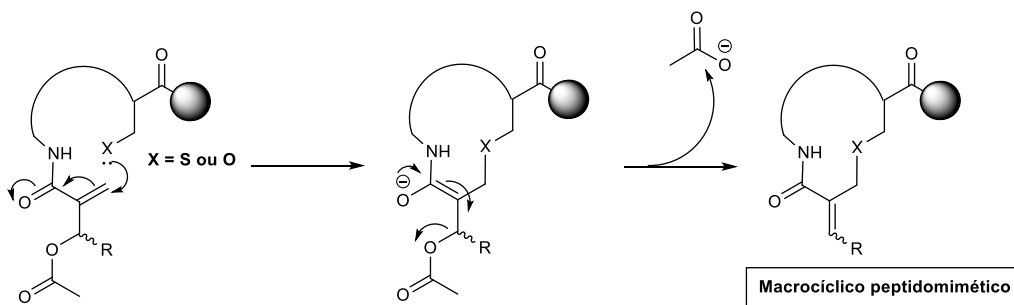


**Esquema 4.5.** Mecanismo para a reação de transesterificação do grupo hidroxila do resíduo de AMBH, adaptado<sup>31</sup>.

<sup>31</sup> Hayashi, N.; Tsuboi, S. *Tetrahedron Asymmetry*. 1998, 9, 3825–30.

#### 4.1.2 Reação de ciclização sob a resina

Dado que o objetivo principal deste trabalho foi a exploração das reações de ciclização sob a resina, envolvendo a reação de substituição nucleofílica vinílica ( $S_N2'$ ), entre o grupo nucleofílico, sulfidril ou hidroxila, da cadeia lateral do resíduo de aminoácido  $C$ -terminal e o acetato alílico de um resíduo de AMBH da porção  $N$ -terminal do resíduo de ácido carboxílico  $\alpha,\beta$ -insaturado (**Esquema 4.6**).

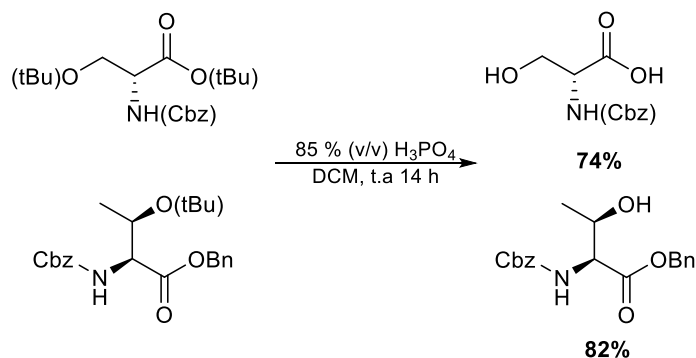


**Esquema 4.6.** Mecanismo para a reação de ciclização, por meio de uma substituição nucleofílica vinílica ( $S_N2'$ ).

Entretanto, esses grupos nucleofílicos, pertencentes às cadeias laterais de resíduos de aminoácidos, vem com grupos de proteção, a fim de se evitar reações secundárias. Por consequência, inicialmente, foi feita a remoção destes grupos de proteção, antes da reação de ciclização sob a resina. Como tratam-se de grupos lábeis em meio ácido, foi necessário o cuidado com a condição ácida de remoção, para que não houvesse a clivagem da ligação entre o peptídeo e a resina nesta etapa, tendo em vista que o link que conectam peptídeo e a resina também é lábil em meio ácido.<sup>29</sup>

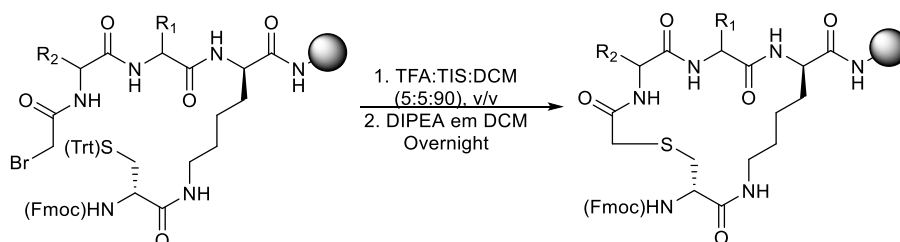
Para a remoção do grupo *tert*-butil do resíduo de aminoácido serina, foi adotada uma solução aquosa de 85% (v/v) de ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ), conforme empregado por Li e colaboradores<sup>32</sup>. O uso desta solução se mostrou efetivo na remoção do grupo *tert*-butil de aminoácido  $N$ -Cbz protegidos sem que houvesse a remoção do Cbz, em rendimentos superiores a 70%.

<sup>32</sup> Li, B.; et al. *J. Org. Chem.* 2006, 71, 24, 9045-50.



**Esquema 4.7.** Resultados obtidos por Li e colaboradores, para a remoção do grupo *tert*-butil de aminoácido N-CBZ protegidos, adaptado<sup>32</sup>.

De forma semelhante, a cisteína nos peptídeos contém o grupo sulfidril geralmente protegido com o grupo tritila. Para a remoção deste grupo sem clivar o peptídeo da resina, foi seguido o procedimento experimental de Derbel e colaboradores<sup>33</sup>, os quais empregaram 5% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA, do inglês, *Trifluoroacetic acid*), com 5% (v/v) de triisopropilsilano (TIS), em diclorometano (DCM), para a liberação do grupo -SH, com a finalidade de uma reação de S<sub>N</sub>2 intramolecular sob a resina, como se mostra no **Esquema 4.8**.



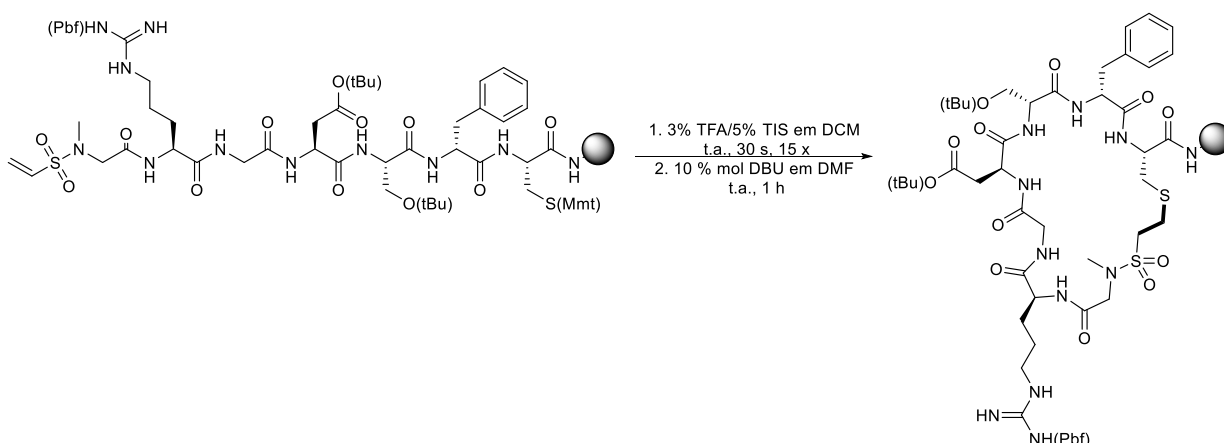
**Esquema 4.8.** Condições reacionais e resultados obtidos por Derbel e colaboradores, para a desproteção do grupo sulfidril e ciclização sob a resina, adaptado<sup>33</sup>.

Para a reação de macrociclicização sob a resina testada neste trabalho de conclusão de curso, o procedimento foi baseado na proposta de Sutherland e colaboradores<sup>34</sup>, experimento feito sob a resina, usando vinilsulfonamidas como aceptor de Michael. Eles inicialmente removeram o grupo monometoxitritila (Mmt) do grupo sulfidril da cisteína, com uma solução de 3% (v/v) de TFA com 5% (v/v) de TIS em DCM, por 15 vezes de 30 s. Na etapa de ciclização, empregaram 10% mol de DBU

<sup>33</sup> Derbel, S.; et al. *Tetrahedron Letters*. 2010, 51,28, 3607-09.

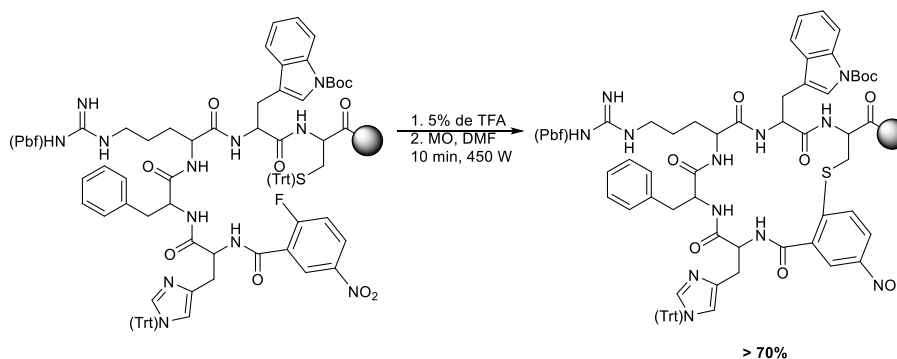
<sup>34</sup> Sutherland, B.P.; et al. *Bioconjug. Chem.* 2018; 29(12), 3987-92.

em DMF. A reação ocorreu em somente 1 h, e foram obtidos rendimentos superiores a 95 %.



**Esquema 4.9** Condições reacionais e resultados obtidos por Sutherland e colaboradores, para a desproteção do grupo sulfidril e ciclização sob a resina, adaptado<sup>34</sup>.

Por fim, uma metodologia aqui empregada para a reação de ciclização de uma sequência contendo cisteína, foi a proposta por Grieco e Colaboradores<sup>35</sup>, na qual uma reação de substituição nucleofílica aromática envolvendo o grupo sulfidril emprega o micro-ondas, em 5 mL de DMF, sem o uso de base, e 10 minuto de reação. Eles usaram também 5% de TFA para a remoção do grupo tritila numa etapa previa à ciclização. Os resultados obtidos de conversão foram superiores a 70% dos peptídeos lineares em peptídeos cíclicos, sem que ocorresse a decomposição dos produtos.



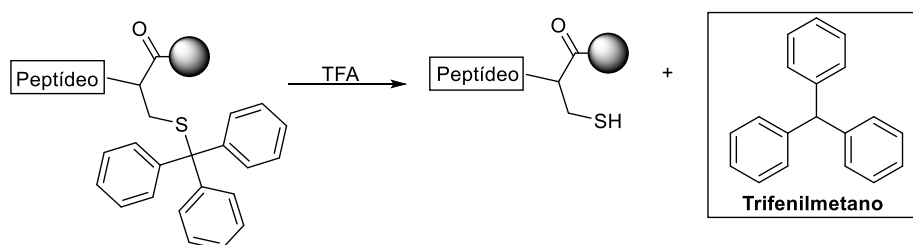
**Esquema 4.10.** Condições reacionais e resultados obtidos por Grieco e Colaboradores, para a desproteção do grupo sulfidril e ciclização sob a resina, empregando o Micro-ondas, adaptado<sup>35</sup>.

<sup>35</sup> Grieco, P.; et al. *J. Med. Chem.* 2008; 51(9), 2701-7.

#### 4.1.3 Quantificação espectrofotométrica por UV-VIS de trifenilmetano gerado na reação de desproteção do grupo sulfidril do resíduo de aminoácido cisteína ligado à resina

Conforme citado anteriormente, em reações envolvendo a ciclização sob a resina com grupos de cisteína protegida com tritila usa-se comumente solução contendo 5% de TFA. No entanto, não é citado, nos artigos que usam esta metodologia, o tempo necessário para sua desproteção.

Para otimizar o tempo reacional da reação de desproteção da tritila, foi desenvolvido um método de quantificação do trifenilmetano, produto da reação de desproteção, por espectrofotometria UV-VIS. Para tal, foi construída uma curva analítica com o monitoramento a 270 nm, comprimento de onda em que o trifenilmetano absorve no ultravioleta, segundo dados de Demirtas e colaboradores<sup>36</sup>.



**Esquema 4.11.** Formação de trifenilmetano a partir da remoção do grupo tritila da cisteína.

Para a construção da curva analítica, sucedeu a verificação se este composto seguia, na faixa de concentração estudada, a Lei de Beer, pela qual a absorvância é diretamente proporcional à concentração do analito, dada uma constante de proporcionalidade. Confirmando o cumprimento desta Lei, uma curva analítica foi construída, com a medida da absorvância de soluções de concentrações conhecidas. Com esses dados, foi feito o registro de um gráfico que relaciona a absorvância com a concentração do trifenilmetano, que seguindo uma tendência linear. A regressão linear dos dados permitiu seu ajuste à uma equação de reta do tipo:  $Y = a + bX$ . Com base neste procedimento, foi possível verificar a concentração de trifenilmetano em amostras do meio reacional ao longo da reação de desproteção do grupo sulfidril.<sup>37,38</sup>

<sup>36</sup> Demirtas, I; et al. *Turk. J. Chem.* 2002, 889 – 96.

<sup>37</sup> Swinehart, D. F. *J. Chem. Educ.* 1962, 39, 7, 333.

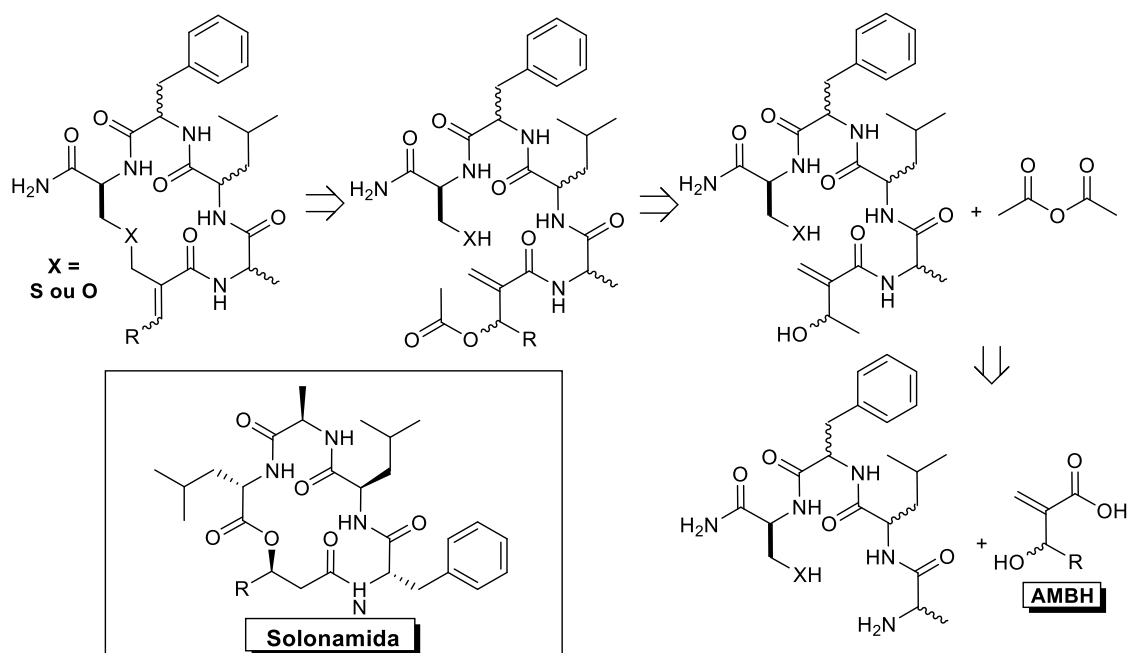
<sup>38</sup> Barros, B.N; et al. *Quim. Nova.* 2002, 25, 5, 856-65.

## 4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.2.1 Desenho racional dos peptidomiméticos macrocíclicos baseadas nas solonamidas.

No planejamento racional da síntese teve como pretensão:

- 1) Sintetizar uma sequência peptídica  $\text{NH}_2\text{-Ala-Leu-Phe-CO}_2\text{H}$ , inversa à observada nas solonamidas,  $\text{NH}_2\text{-Phe-Leu-Ala-Leu-CO}_2\text{H}$ , baseados em resultados obtidos pelo estudante José Feliciano Brango Vanegas, discente do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade de Brasília.
- 2) Substituir a porção dos ácidos 3-hidroxicarboxílicos saturados nas solonamidas pelo uso de ácidos carboxílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados, por meio do acoplamento de ácidos carboxílicos advindos dos adutos de Morita-Baylis-Hillman (AMBH) à porção *N*-terminal do tetrapeptídeo.
- 3) A etapa de ciclização foi planejada por uma reação de substituição nucleofílica vinílica ( $\text{S}_{\text{N}}2'$ ), entre o enxofre terminal  $-\text{SH}$  ou o oxigênio terminal  $-\text{OH}$ , grupos nucleofílicos, e o grupo álcool alílico da porção *C*-terminal de tetrapeptídeos modificados.

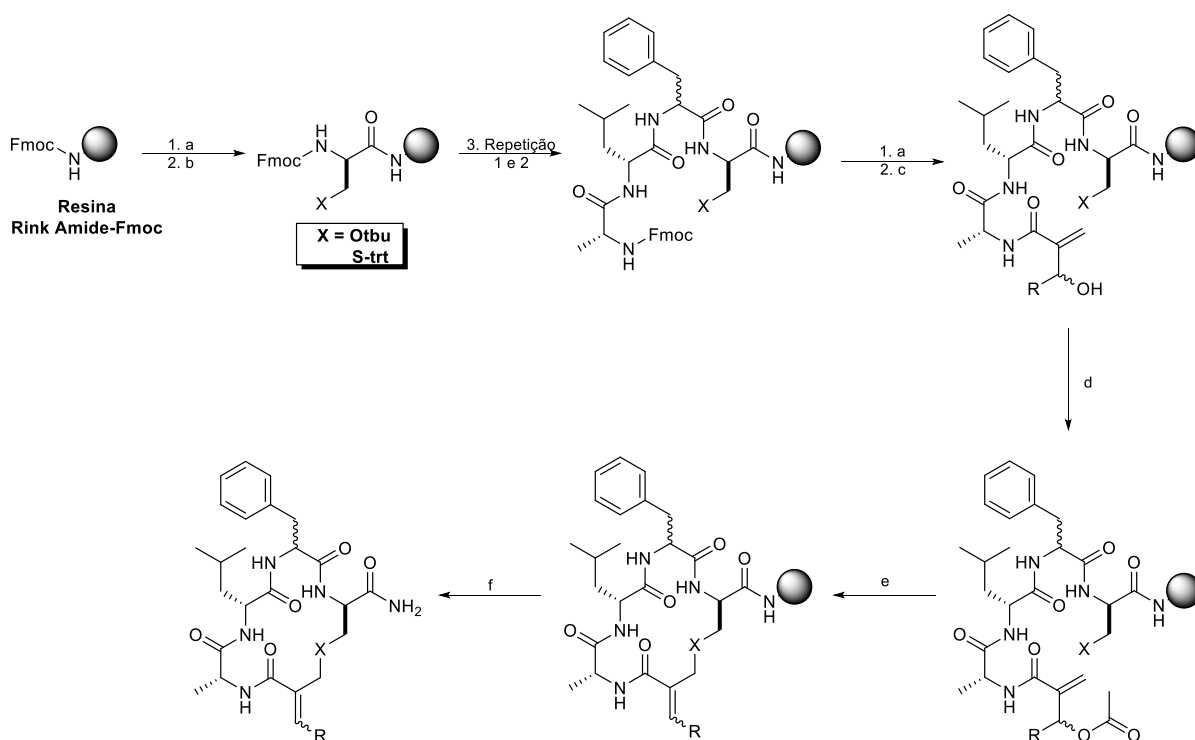


**Esquema 4.12.** Planejamento racional dos peptidomiméticos macrocíclicos baseados nas solonamidas.



#### 4.2.2 Síntese das moléculas baseadas nas solonomidas em fase sólida

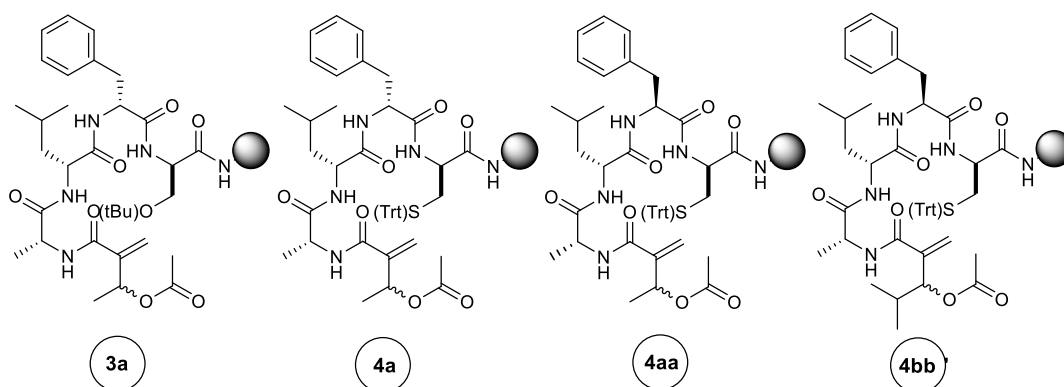
A estratégia utilizada para a síntese dos tetrapeptídeos baseado nas solonomidas foi a fase sólida, seguindo o esquema proposto na seção 4.1.1. Em geral, essa metodologia se demonstrou bastante eficaz por ter etapas de lavagem a cada acoplamento, diminuindo a perda de produtos, e conseqüentemente, decréscimo no rendimento final da reação. No entanto, foi averiguado, um grande consumo de reagentes. Acentua-se que essas moléculas já veem sendo sintetizadas no nosso grupo de pesquisa e veem demonstrando resultados promissores como potencial inibidor de *quorum sensing* de *S. aureus*.



**Esquema 4.13.** Síntese em fase sólida dos tetrapeptídeos sob a resina Rink Amide. Reagentes e condições: a- desproteção 20 % 4-metilpiperidina/DMF (t.a, 15 min, 2x). b) acoplamento Fmoc-AA-OH (1,95 mmol), DIC (1,95 mmol), Oxyma pure (1,95 mmol), DIPEA (6,5 mmol) e DMF (t.a 1,5 h). c) **2a** e **2b** (3,25 mmol), DIC (3,25 mmol), Oxyma pure (3,25 mmol), DIPEA (6,5 mmol) e DMF (t.a 1,5 h). d) Acetilação, anidrido acético/piridina (t.a, 45 min, 2x). e) Ciclização sob a resina em condições adversas. f) Clivagem, TFA:TIS:DCM (90:1,5:8,5) por 1,5 h, sob agitação, com posterior 100 % de TFA (5 mL, 45 min, 2x).

A síntese dessas moléculas vem sendo empregada com sucesso em solução, de forma a expandir outras formas de ciclização, 4 moléculas foram sintetizadas neste TCC, conforme mostrado na **Figura 4.1**. Em especial, foi explorada a síntese da

sequência peptídica NH<sub>2</sub>-Ala-Leu-Phe-CO<sub>2</sub>H, inversa à observada nas solonomidas, NH<sub>2</sub>-Phe-Leu-Ala-Leu-CO<sub>2</sub>H. Sendo que as numerações **3** e **4**, são referentes à diferença do primeiro aminoácido acoplado a resina, no qual o **3** é referente ao acoplamento de serina e **4** ao de cisteína. As letras **a** e **b**, indicam a procedência dos ácidos carboxílicos α,β-insaturados, sendo que **a** é referente ao acetaldeído, e **b** ao isobutilraldeído. A duplicação destas letras, **aa** e **bb**, denotam o emprego de *D*-Fenilalanina, ao invés do estereoisômero *L*.

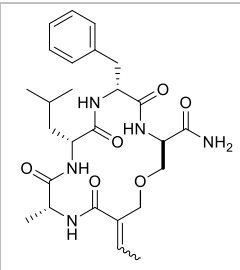
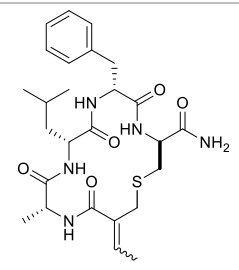
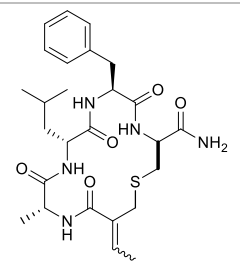
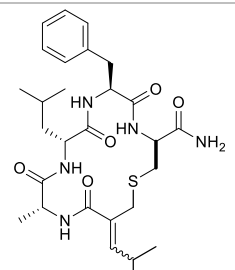
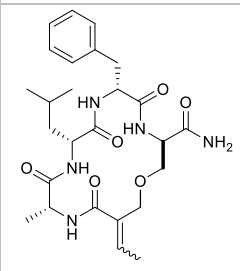
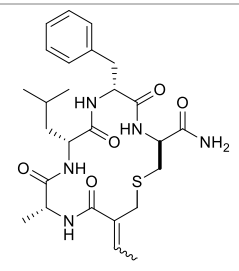
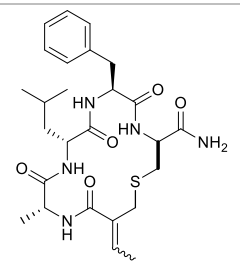
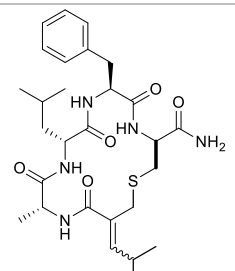


**Figura 4.1.** Moléculas sintetizadas neste TCC, seguindo a metodologia da síntese em fase sólida sob a resina Rink Amide.

Dado que a principal técnica de caracterização empregada para as moléculas sintetizadas neste TCC foi a espectrometria de massa, a **Tabelas 4.1** resume as massas moleculares previstas para a moléculas acíclicas e cíclicas.

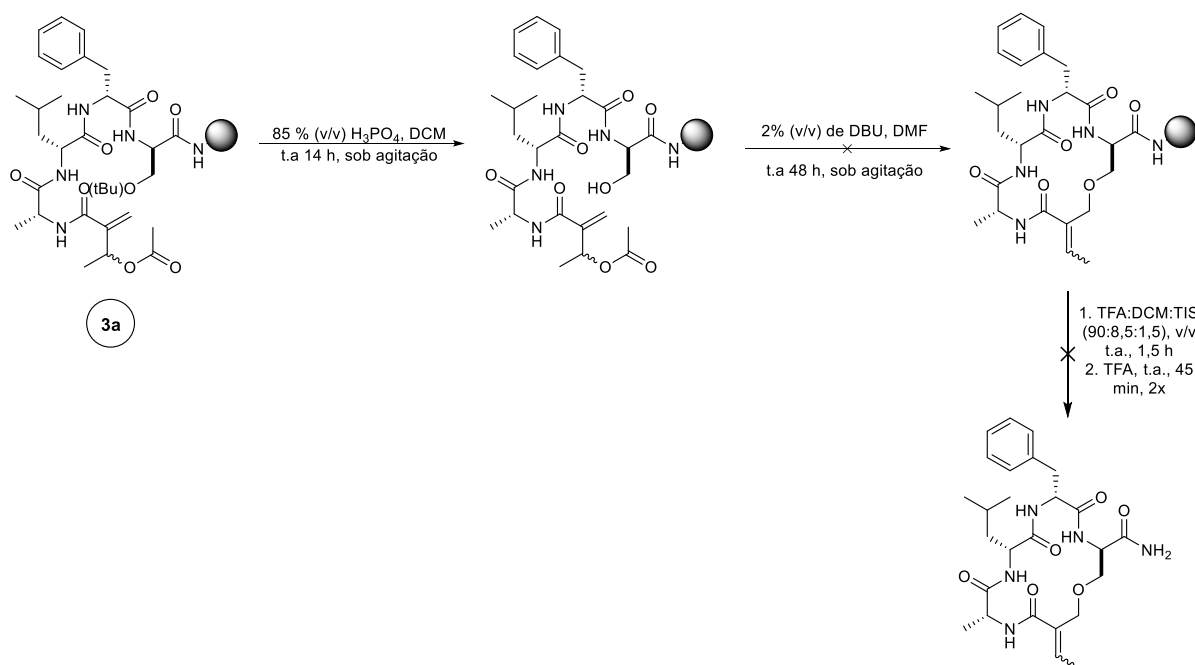
**Tabela 4.1.** Massas moleculares previstas para as moléculas sintetizadas neste TCC.

Molécula	<b>3<sup>a</sup></b>	<b>4<sup>a</sup></b>	<b>4<sup>aa</sup></b>	<b>4<sup>bb</sup></b>
<b>Acíclica</b>				
<b>M</b>	575,6630	591,7240	591,7240	619,7780
<b>[M+H]<sup>+</sup></b>	576,6705	592,7315	592,7315	620,7855
<b>[M+Na]<sup>+</sup></b>	598,6522	614,7132	614,7132	642,7672
<b>[M+K]<sup>+</sup></b>	614,7608	630,8218	630,8218	658,8758

<b>Cíclica</b>				
<b>M</b>	515,6110	531,6720	531,6720	559,7260
<b>[M+H]<sup>+</sup></b>	516,6185	532,6795	532,6795	560,7335
<b>[M+Na]<sup>+</sup></b>	538,6002	554,6612	554,6612	582,7152
<b>[M+K]<sup>+</sup></b>	554,7088	570,7698	570,7698	598,8238
<b>Cíclica</b>				

#### 4.2.3 Desproteção seletiva do grupo *terc*-butil e tentativa de macroclicização sob a resina

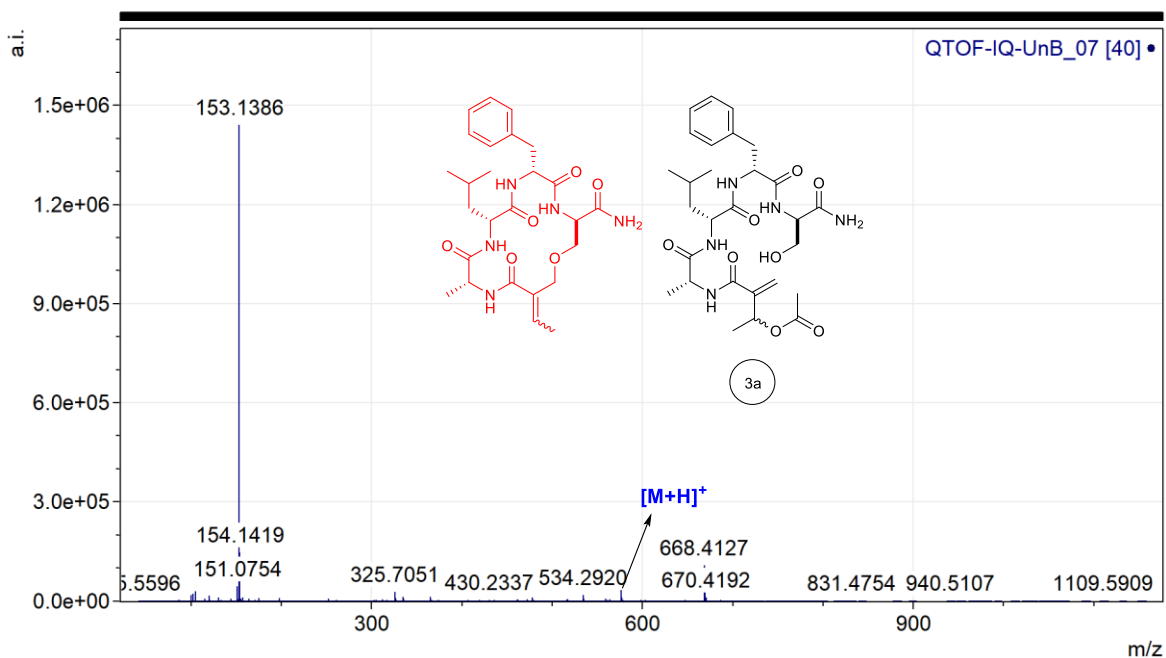
Inicialmente, nos ensaios da reação de macroclicização das moléculas baseadas nas solonamidas, foi averiguada a reação de substituição nucleofílica vinílica ( $S_N2'$ ), entre o grupo hidroxila do resíduo de aminoácido serina e o grupo acetato alílico do resíduo de AMBH. Dessa forma, foi sintetizada a molécula **3a** em fase sólida (**Esquema 4.13**), na qual, o primeiro resíduo de aminoácido acoplado foi a *L*-serina, com o grupo -OH protegido pelo *terc*-butil. Visto que o objetivo era a reação de ciclicização sob a resina, foi seguido a proposta de Li e colaboradores<sup>32</sup> para a remoção do grupo *terc*-butil, sem a clivagem do peptídeo da resina. Para tal, a molécula **3a** foi posta sob agitação por 14 h, com uma solução aquosa de 85% (v/v) de ácido fosfórico em diclorometano. Em seguida, foi colocada numa solução de 2% (v/v) de DBU em DMF, por 48 h, para que transcorresse a macroclicização. A escolha dessa base se deu pelos resultados obtidos por Sutherland e colaboradores<sup>34</sup>. Em seguida, para a obtenção do produto, a resina foi submetida às condições de clivagem. O **Esquema 4.14** resume as condições experimentais empregadas, para a tentativa de macroclicização sob a resina, envolvendo o grupo hidroxila.



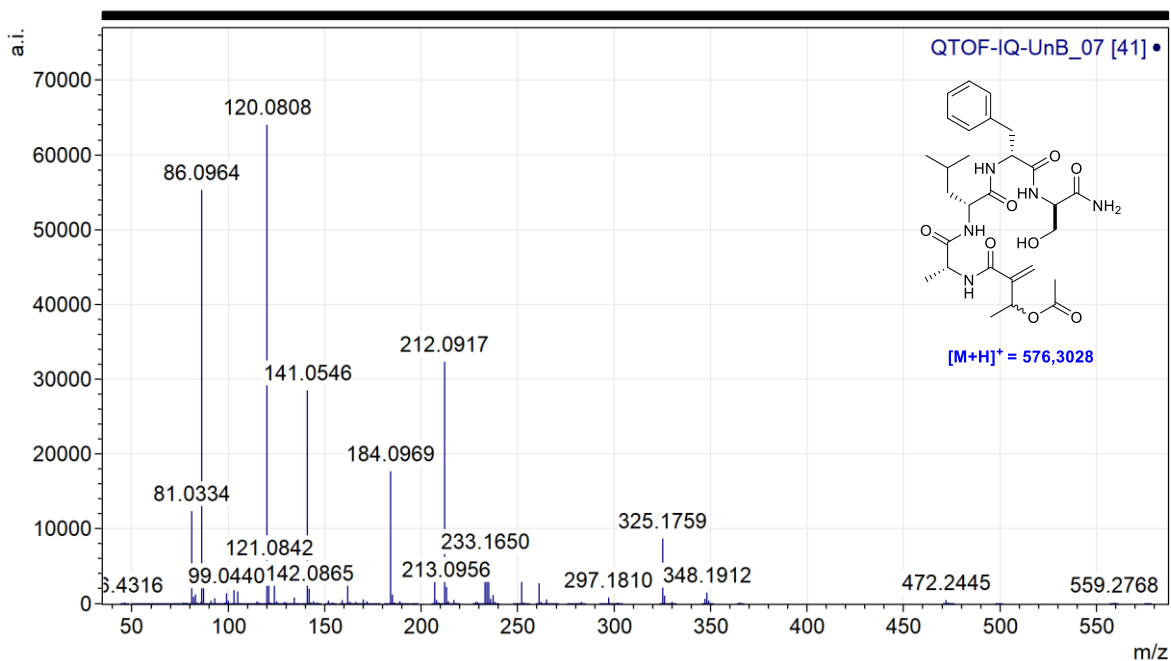
**Esquema 4.14.** Condições experimentais empregadas para a tentativa de macroclicização sob a resina, envolvendo o grupo hidroxila.

Com o propósito de confirmar se a reação de ciclização intramolecular se sucedeu, foi feita análise por HRMS/ESI adquirido em modo positivo, (**Figura 4.2**), em que foi observada a presença do íon de  $m/z$  576,3130, atribuído ao  $[\text{M}+\text{H}]^+$  da estrutura linear. E a ausência do íon  $m/z$  516,6185 esperado para a estrutura cíclica sugere que, nas condições reacionais testadas, não ocorreu a reação de ciclização. A fim de confirmar se o íon de  $m/z$  576,3130 se tratava da estrutura linear, este íon foi submetido a fragmentação, que forneceu o espectro HRMS-ESI-MS/MS apresentado na **Figura 4.3**. A observação da fragmentação típica para um peptídeo linear<sup>39</sup> confirmando a estrutura linear para a molécula **3a**. O mecanismo para a fragmentação deste íon molecular e a formação dos íons filho estão propostos no **Esquema 4.15**.

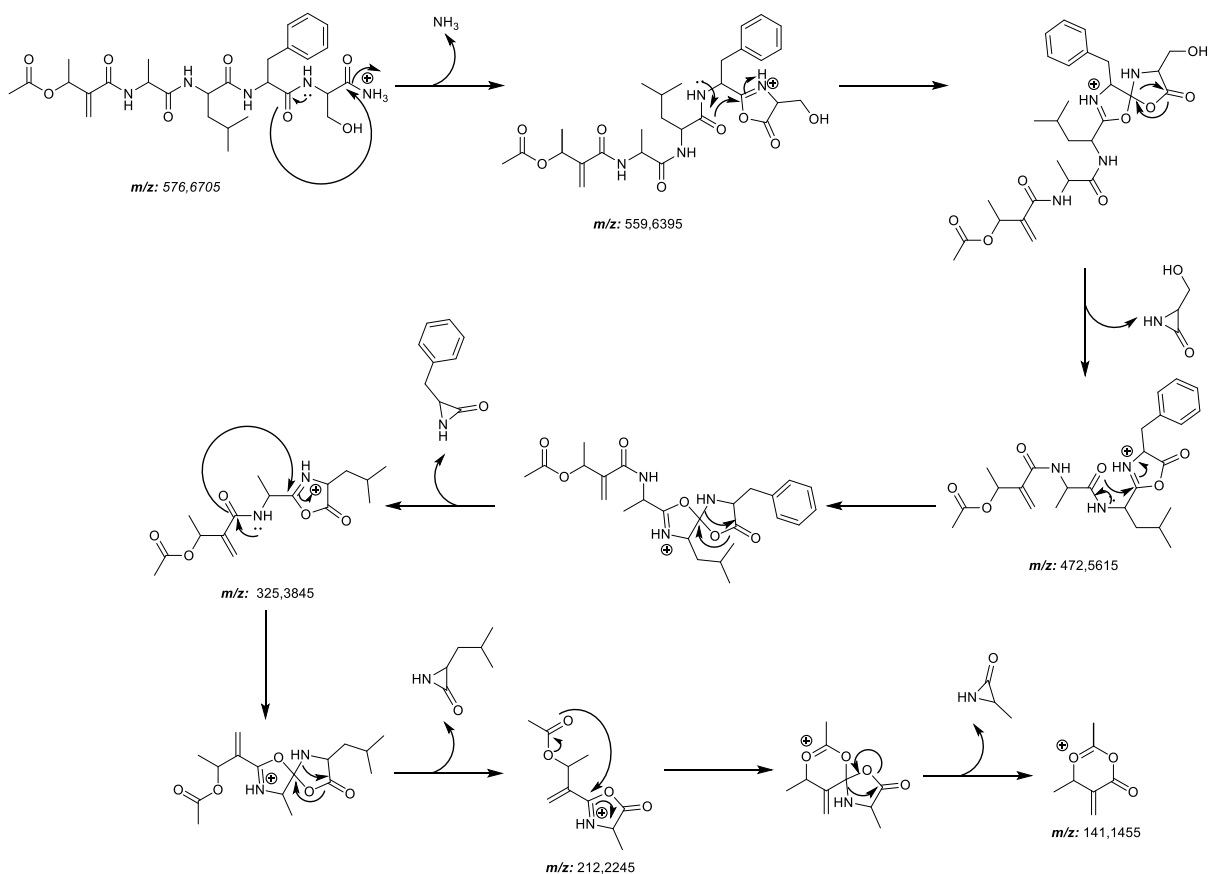
<sup>39</sup> Chong, K.F.; Leong, H. *Journal of bioinformatics and computational biology*. 2012, 10, 6, 1231002-1-38.



**Figura 4.2.** Espectro de HRMS-ESI-MS, realizado sobre amostra não purificada, uma vez realizada a tentativa de macroclicização sob a resina da molécula **3a**.

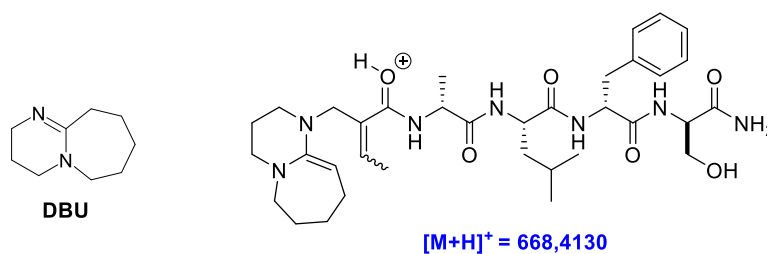


**Figura 4.3.** Espectro de HRMS-ESI-MS/MS para o íon  $[M+H]^+$  576,3130 Da, correspondente a estrutura linear da molécula **3a**.



**Esquema 4.15.** Proposta de mecanismo para a fragmentação da estrutura linear da molécula 3a.

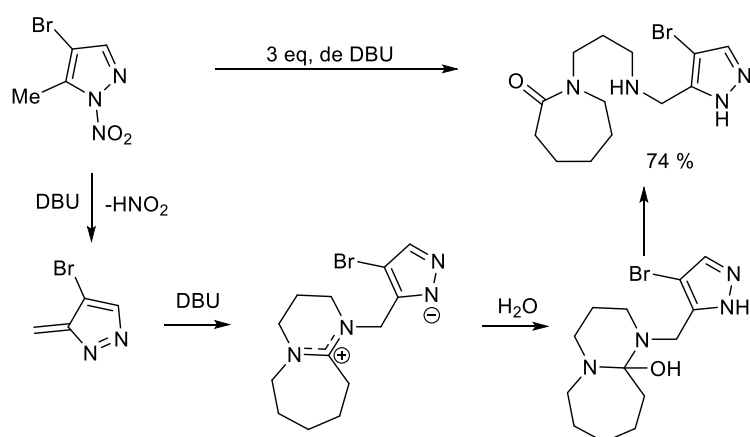
Ainda de acordo com o espectro da **Figura 4.2**, foi constatado a provável formação de um produto inesperado, referente a adição da molécula de DBU ao carbono C-terminal do resíduo de ácido carboxílico  $\alpha,\beta$ -insaturado, fornecendo o íon  $m/z$  668,4172.



**Figura 4.4.** Estrutura do DBU e do produto da sua adição ao ácido carboxílico  $\alpha,\beta$ -insaturado.

A provável explicação para a formação deste inesperado produto, pode ter sido a alta concentração de DBU empregado, tendo em vista que também Lammers e

colaboradores<sup>40</sup> obtiveram produtos, em bons rendimentos, relacionados à adição de DBU à uma solução de 4-halo-3,5-dimetil-1-nitro-1-pirazol.



**Esquema 4.16.** Produto inesperado obtido por Lammers e colaboradores, adaptado<sup>41</sup>.

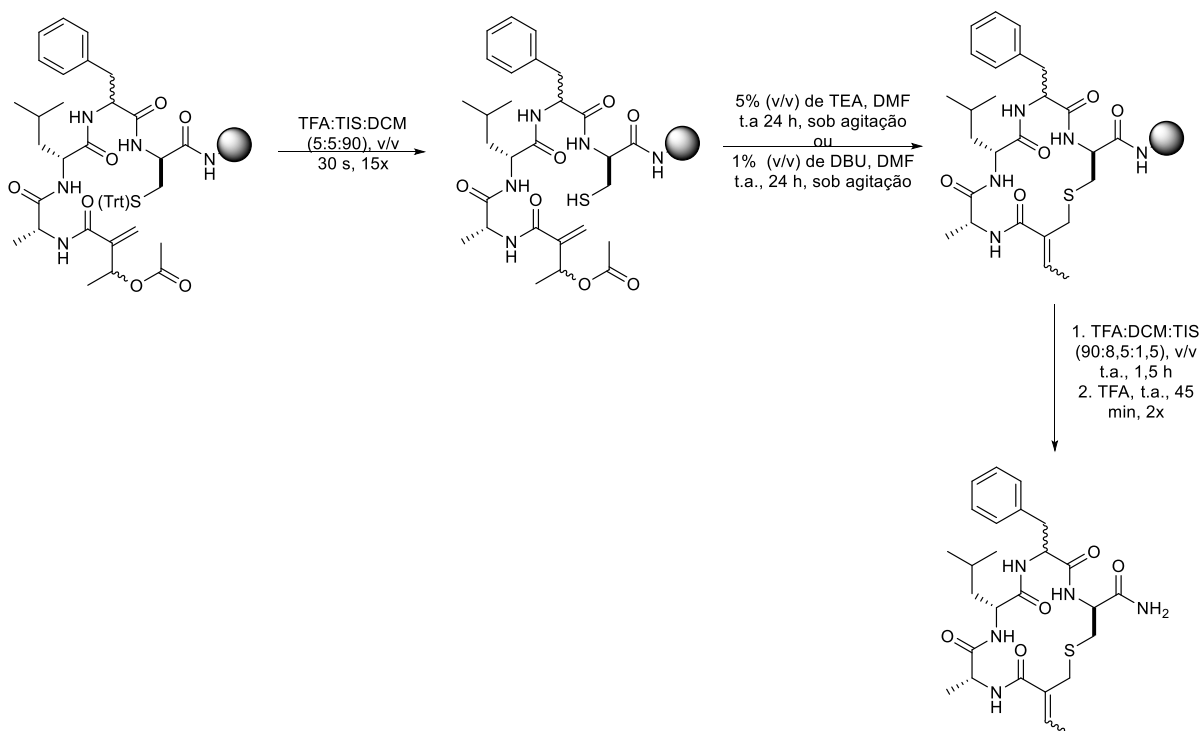
#### 4.2.4 Desproteção seletiva do grupo tritila e tentativa de macrociclização sob a resina

Dado que a reação de macrociclização, envolvendo o grupo hidroxila com o acetato alílico do resíduo de AMBH, sob a resina, não forneceu os resultados esperados, foram realizados testes empregando o grupo sulfidril como nucleófilo de reação. Com isso, os testes iniciais foram de caráter qualitativo, empregando soluções contendo 5% (v/v) de trietilamina (TEA) ou 1% (v/v) de DBU, em 10 mL de DMF, por 24 h. Entretanto, para a realização destes ensaios, inicialmente, se tornou necessária a remoção do grupo tritila da cisteína, para a liberação do grupo sulfidril. Dado que a remoção deste grupo ocorre em condições que igualmente permitem clivar o peptídeo da resina, o método experimental escolhido foi a proposta por Derbel e colaboradores<sup>33</sup>. Esta se baseia no uso de uma solução de 5% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA), com 5% (v/v) de triisopropilsilano (TIS), utilizando diclorometano como solvente, o tempo empregado foi 15 vezes de 30 segundos. Em relação à reação de macrociclização sob a resina, foi escolhida a molécula **4a** (**Figura 4.1**). Para esta transformação, inicialmente, foi utilizada a solução de TEA em DMF, por ser uma

<sup>40</sup> Lammers, H; et. al. *Tetrahedron*, 1994, 50(3), 865–70.

<sup>41</sup> Taylor, J.E; et. al. *Chem. Soc. Rev.*, 2012., 41, 2109–21.

condição de reação já empregada com sucesso no grupo de pesquisa do laboratório. A condição de ciclização utilizando a solução de DBU em DMF foi testada na molécula **4aa**, com uma sequência peptídica e estereoquímica inversa aquela observada nas solonamidas. A redução da concentração de DBU, de 2% para 1%, se deu em virtude dos resultados obtidos para a reação envolvendo o grupo hidroxila, afim de evitar a formação do produto de sua adição (**Figura 4.4**). As condições experimentais empregadas para a tentativa de macrociclização sob a resina, envolvendo o grupo sulfidril como nucleófilo, estão resumidos no **Esquema 4.17**.



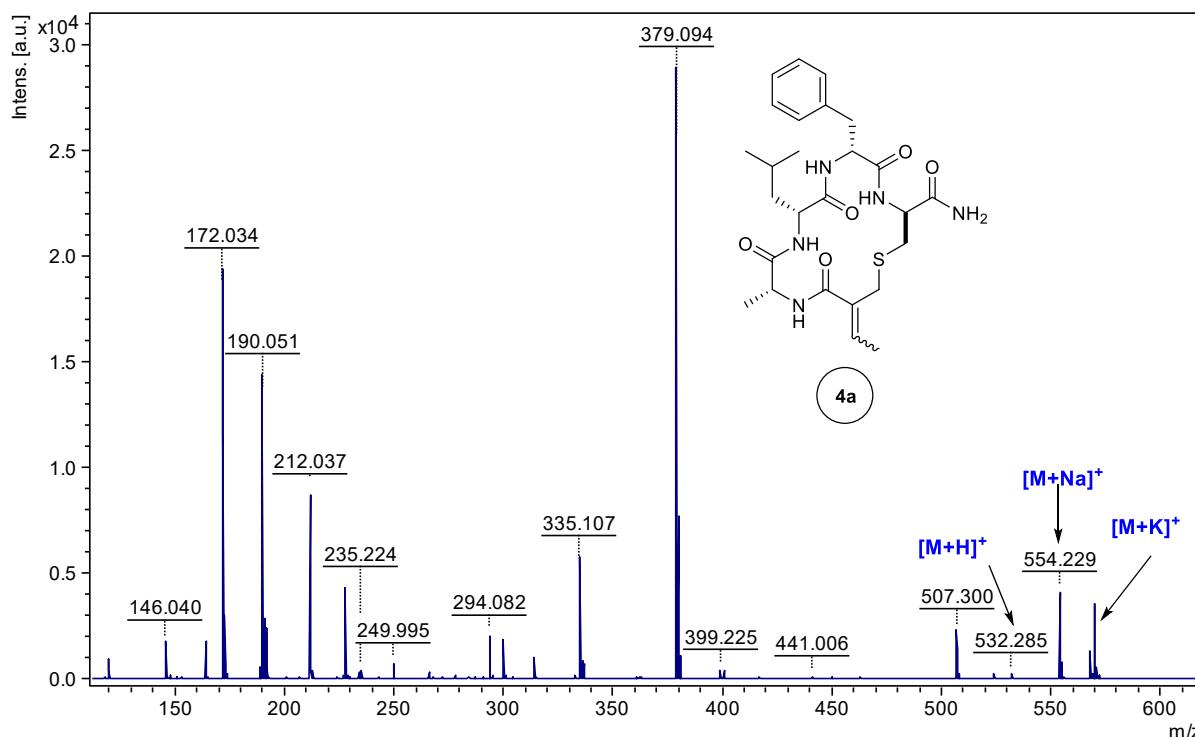
**Esquema 4.17.** Condições experimentais empregadas para a tentativa de macrociclização sob a resina, envolvendo o grupo sulfidril.

Para confirmar se as reações foram bem-sucedidas sob a resina, os peptídeos foram clivados, e purificados num HPLC semi-preparativo de fase reversa. Depois, foram adquiridos espectro de MALDI-MS (**Figuras 4.5 e 4.6**), pelos quais pode-se atestar o êxito para o emprego do grupo sulfidril como nucleófilo de reação, tanto para o uso da solução de TEA, como para o DBU, tendo em vista que foi observada a presença do íon  $m/z$  554,229, atribuído à estrutura ciclizada sodiada.

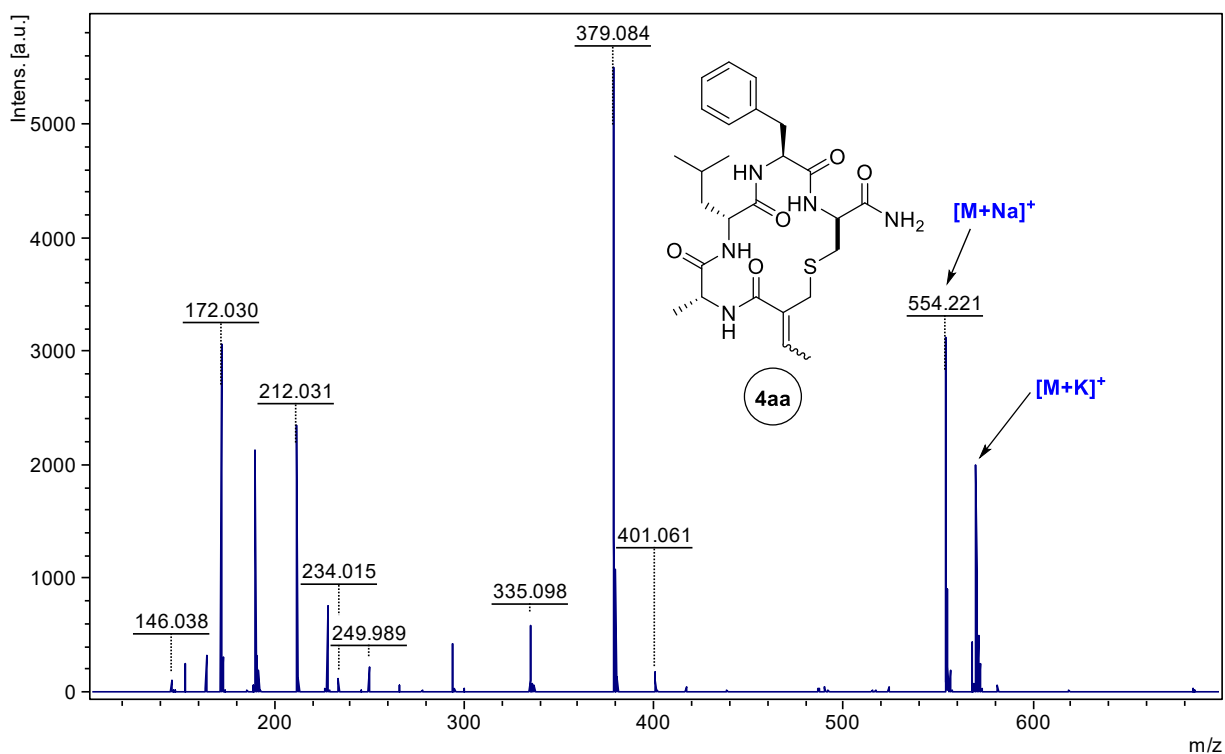
A confirmação da estrutura para o íon proposto  $[M+Na]^+$  foi realizada pela sua seleção para se fragmentar, fornecendo o espectro de MALDI-MS/MS (**Figura 4.7**).



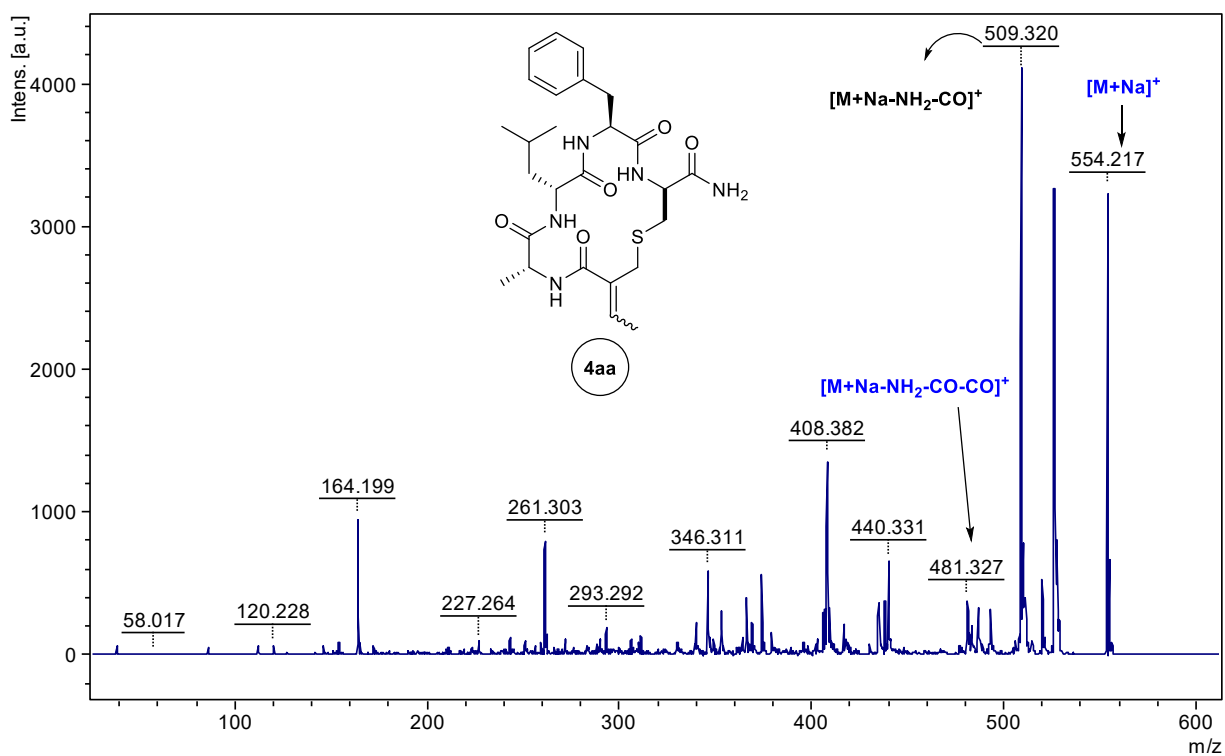
Examinando este espectro, foi notada a formação do íon base, formado pelas perdas sucessivas dos grupos  $\text{NH}_2$  e  $\text{CO}$ , com  $m/z = 509,320$ . Este dado está em linha com os resultados previamente observados em nosso grupo de pesquisa, tendo em vista que a ausência da fragmentação característica de peptídeos lineares sugere a estrutura cíclica esperada para o produto<sup>39</sup>. O mecanismo para a fragmentação deste íon está proposto no **Esquema 4.18**.



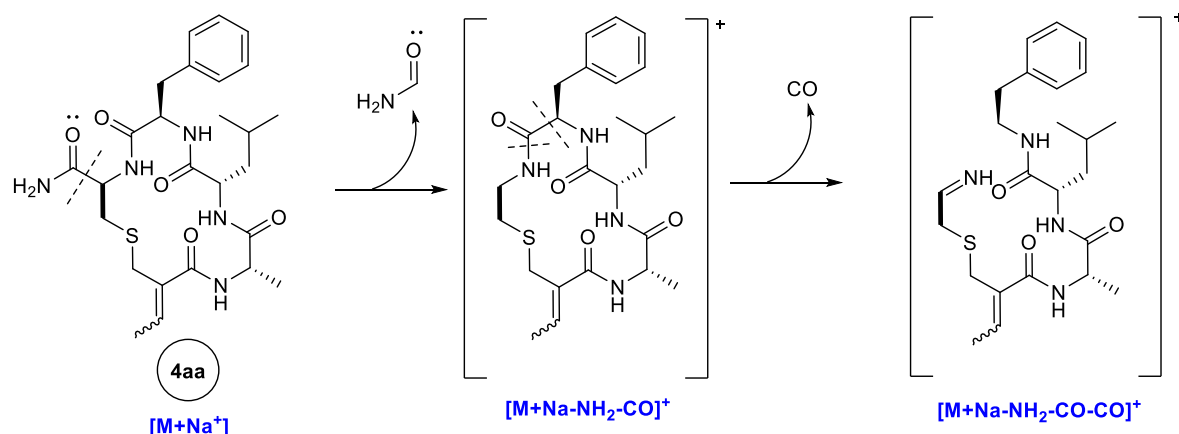
**Figura 4.5.** Espectro de MALDI-MS para a tentativa de macrociclização sob a resina da molécula **4a**, empregando a trietilamina como base de reação.



**Figura 4.6.** Espectro de MALDI-MS para a tentativa de macroclicização sob a resina da molécula **4aa**, empregando o DBU como base de reação.



**Figura 4.7.** Espectro de MALDI-MS/MS para o aduto de sódio [M+Na]<sup>+</sup> da molécula **4aa**.



**Esquema 4.18.** Proposta de mecanismo para a fragmentação do aduto de sódio  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  da molécula **4aa**.

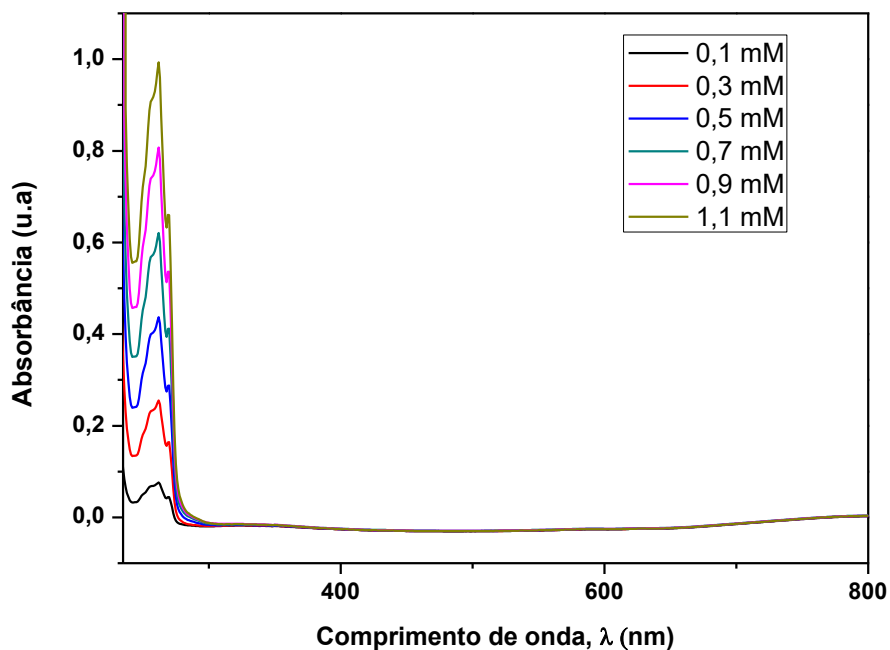
#### 4.2.5 Determinação espectrofotométrica por UV-VIS de trifeniltamento pelo método de curva analítica

O tempo necessário para a retirada do grupo tritila, sem clivar o peptídeo da resina, foi uma incógnita. Inicialmente, foi empregada a proposta de Sutherland e colaboradores<sup>34</sup> para a remoção do grupo Mmt.

Como o trifenilmetano, um composto que contém grupos funcionais cromóforos que promovem absorção no comprimento de onda 270 nm,<sup>36</sup> é o produto formado da remoção de tritila do resíduo de cisteína, foi usado um espectrofotômetro para a monitorar a reação. Além do comprimento de onda de absorção do trifenilmetano, foi monitorada a região de 216 nm, referente à absorção da ligação peptídica, respetivamente. Neste estudo, foi tomado o tempo de 30 minutos como o ideal para remoção deste grupo, sem a clivagem do peptídeo da resina Rink Amide MBHA.

Com o objetivo de quantificação por meio de um espectrômetro, foi construída uma curva analítica, empregando o método de calibração por adição de padrão externo, usando 6 soluções de concentrações conhecidas de trifenilmetano (0,1 – 1,1 mM), para as quais foram adquiridos os espectros de UV-VIS (**Figura 4.8**). Observando estes espectros, foi notado que a Lei de Beer foi obedecida, ou seja, houve uma relação linear entre absorbância e concentração de trifenilmetano. Outro dado fornecido por meio deste espectro foi a verificação do comprimento de onda

máximo de  $\lambda_{\text{máx}} = 262 \text{ nm}$  para o trifenilmetano, diferentemente, daquele usado por Demirtas e colaboradores<sup>36</sup>.



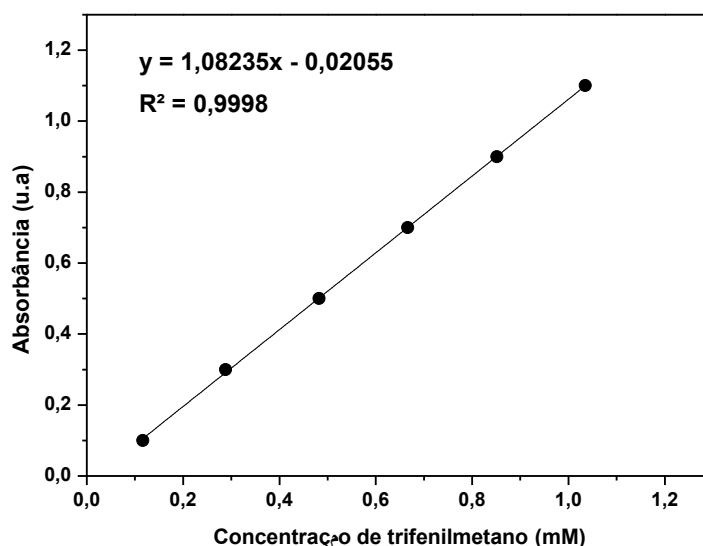
**Figura 4.8.** Espectro de UV-VIS para padrões de trifenilmetano.

Como os espectros de UV-VIS demonstraram uma dependência da absorbância com a concentração, foram medidas a absorbância para os 6 padrões de trifenilmetano, empregando o comprimento de onda máximo igual  $\lambda_{\text{máx}}$  a 262 nm, no qual foram obtidos os dados resumidos na **Tabela 4.2**.

**Tabela 4.2.** Dados obtidos de absorbância em função da concentração de trifenilmetano através de um espectrofotômetro.

Padrões	Concentração de trifenilmetano, mM	Absorbância, $\lambda_{\text{máx}} = 262 \text{ nm}$
1	0,1	0,1166
2	0,3	0,2882
3	0,5	0,4821
4	0,7	0,6666
5	0,9	0,8515
6	1,1	1,035

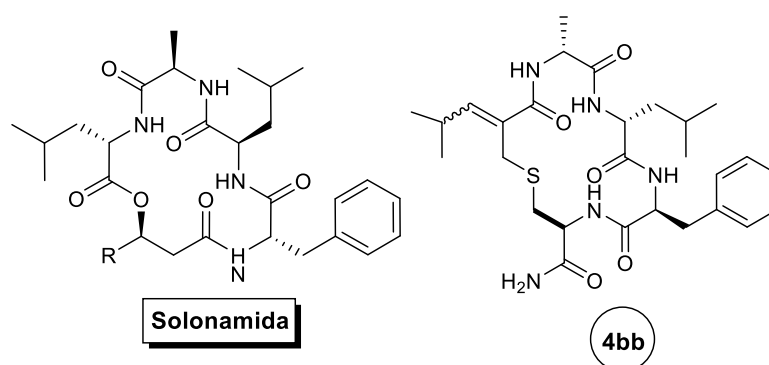
Com os dados obtidos da **Tabela 4.2**, foi plotado um gráfico relacionando à concentração de trifetilmetano com a absorbância. Por meio de uma regressão linear, foi obtida a curva analítica exposta na **Figura 4.9**, na qual a linearidade entre essas duas variáveis foi comprovada pelo valor do coeficiente de correção  $R^2$  próximo de 1.



**Figura 4.9.** Curva analítica para a determinação de trifetilmetano.

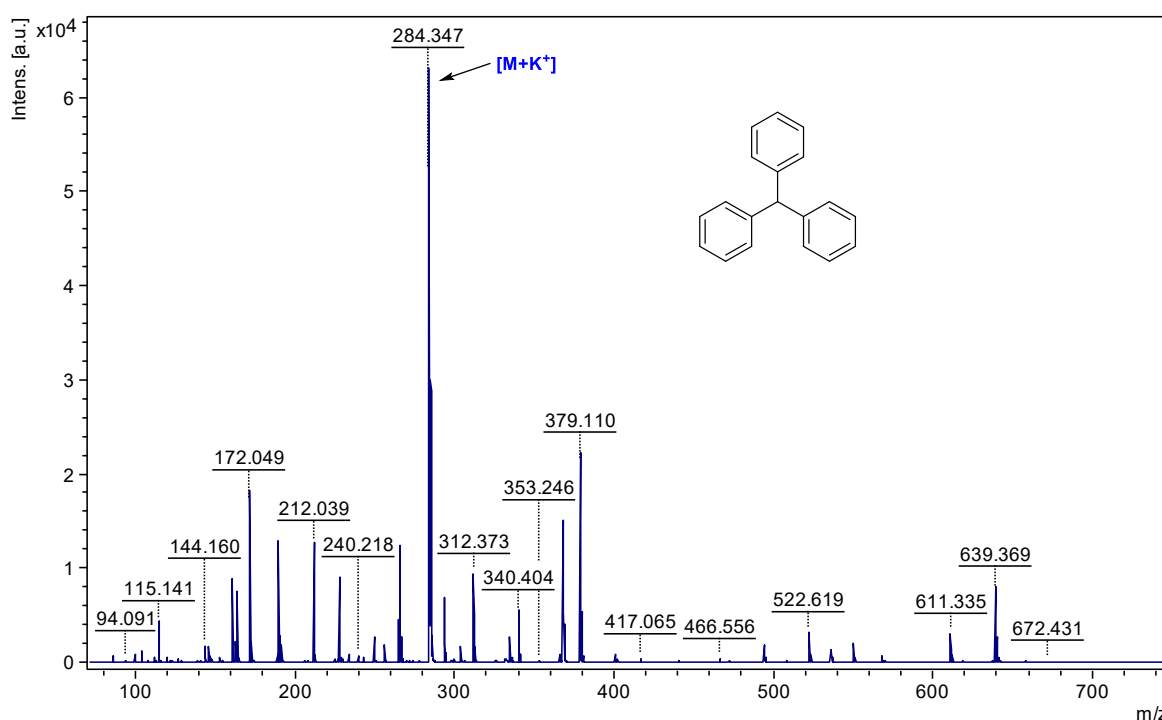
#### 4.2.6 Eficiência da reação de ciclização, empregando o DBU como base

Com o objetivo de verificar a eficiência do uso de DBU como base nas reações de macrociclização, e sua eficiência sob a resina, foram feitas as reações de ciclização sob a resina e em solução da molécula **4bb**. A escolha desta molécula se deu por ser mais próxima estruturalmente à das solonamidas.



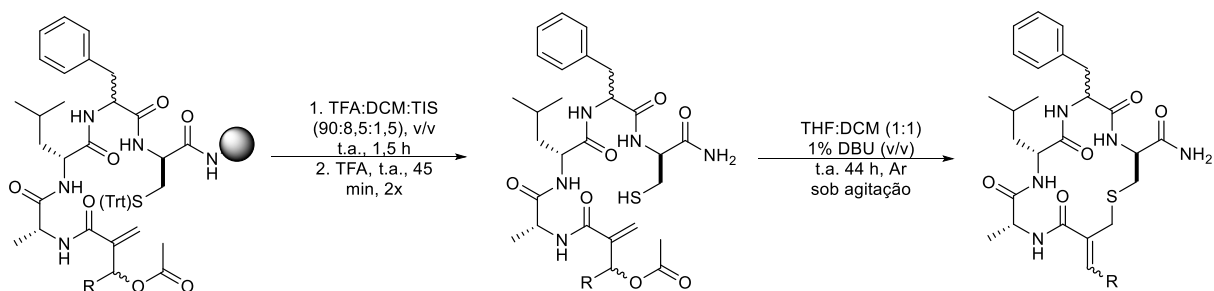
**Figura 4.10.** Semelhança entre a estrutura da solonamida com a molécula **4bb**.

Com a finalidade de quantificação, foi feita a síntese da molécula **4bb** sob a resina, empregando o **Esquema 4.17**, o qual se baseia no uso de solução com 1% de DBU em 10 mL de DMF para a ciclização. A desproteção do grupo tritila foi estimada em 85%, com base na equação linear da curva analítica (**Figura 4.9**) para um período de 30 minutos. Para confirmar se a desproteção estava sendo seletiva sem a clivagem do peptídeo da resina, foi feito um espectro de MALDI-MS do sobrenadante da solução de clivagem. Neste experimento foi observado um íon  $m/z$  284, referente ao aduto entre o íon molecular de trifenilmetano e o cátion potássio  $[M+K]^+$ , além de ser ausente o íon relacionado a à presença da molécula **4bb** livre da resina, conforme os dados fornecidos na **Tabelas 4.1**.



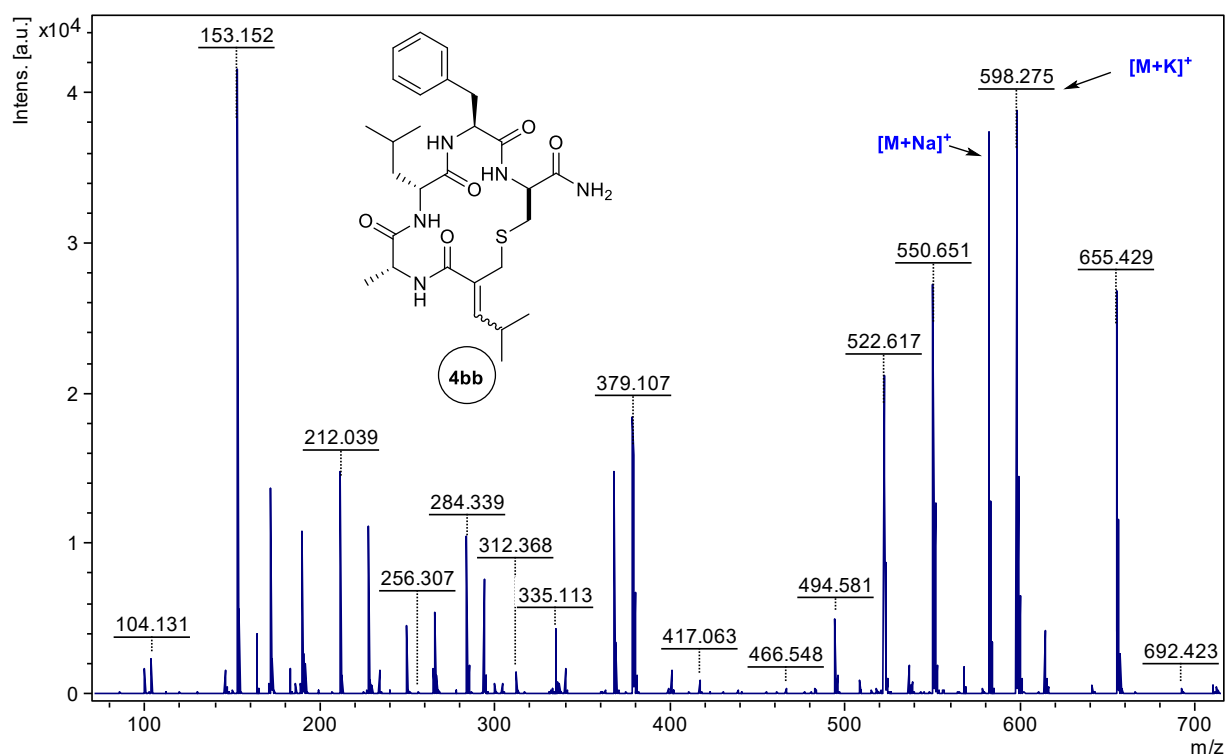
**Figura 4.11.** Espectro de MALDI-MS para o trifenilmetano referente à molécula **4bb**.

A fim de comparar o desempenho da reação de ciclização na resina e a feita em solução, foi realizado um experimento em que, primeiramente, foi feita a reação de clivagem do peptídeo da resina seguida de sua exposição à condição de ciclização promovida pela solução de 250 mL de THF:DCM, na proporção de 1:1 (v/v) com 1 % (v/v) de DBU, sob agitação por 44 h.



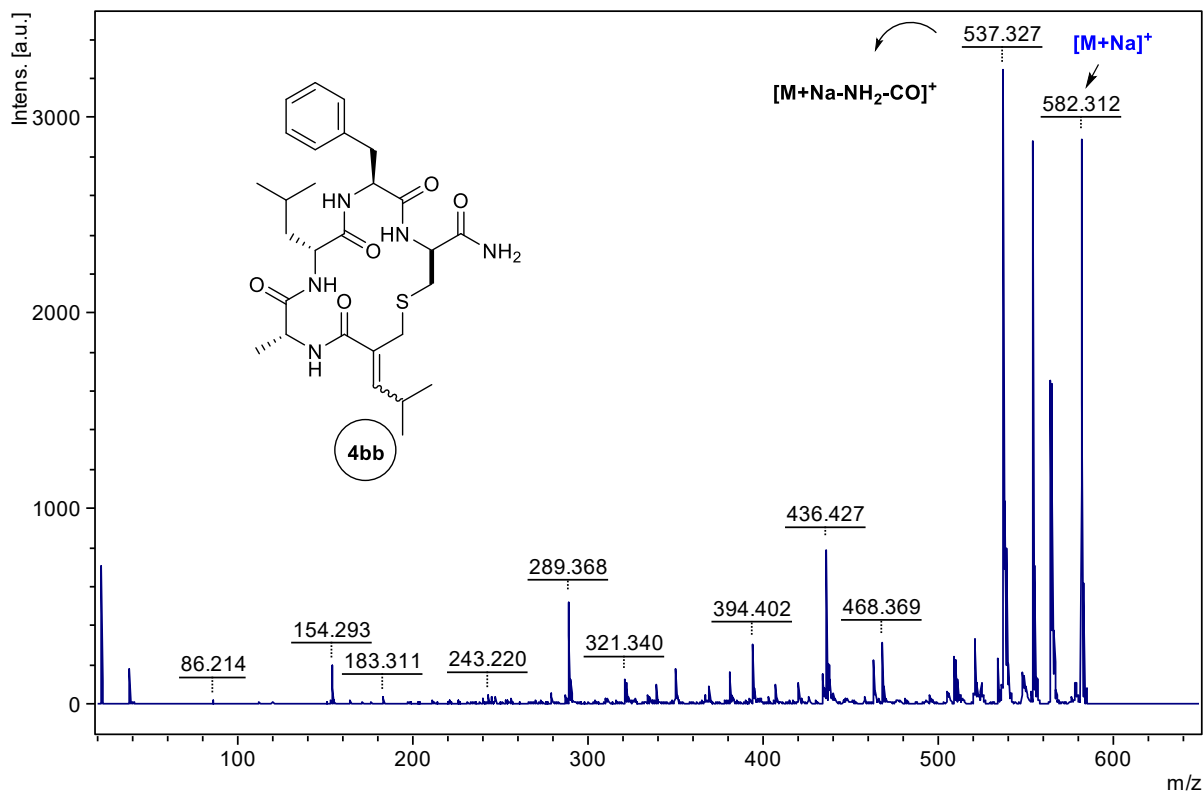
**Esquema 4.19.** Condições experimentais empregadas para a macroclicização em solução.

Os peptídeos obtidos nos experimentos na resina e em solução foram purificados por HPLC semi-preparativo de fase reversa, e analisados por meio dos espectros de MALDI-MS. Estes espectros foram semelhantes ao mostrado na **Figura 4.12**, em que foi verificado os íons moleculares  $[M+Na]^+$  e  $[M+K]^+$ , referentes à molécula **4bb** ciclizada.



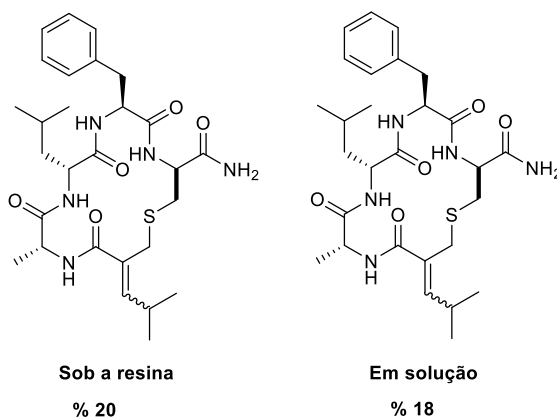
**Figura 4.12.** Espectro de MALDI-MS para molécula **4bb**.

Para o espectro MALDI-MS/MS do íon  $[M+Na]^+$ , foi observada fragmentação semelhante àquela observada para a molécula **4aa**, ou seja, foi comum a formação do íon referente as perdas dos grupos  $NH_2$  e  $CO$ , com  $m/z = 537,331$ .



**Figura 4.13.** Espectro de MALDI-MS/MS para a molécula **4bb**.

Depois de confirmada a natureza dos peptídeos, as amostras foram liofilizadas para a retirada de água, sendo obtidos rendimentos de 20 e 18 %, para as moléculas sintetizadas na resina e em solução, respectivamente, indicando bons valores de rendimentos. Como os valores obtidos são parecidos, indica que a reação sob a resina foi mais favorável, por este usar 96% menos de solvente para a reação.

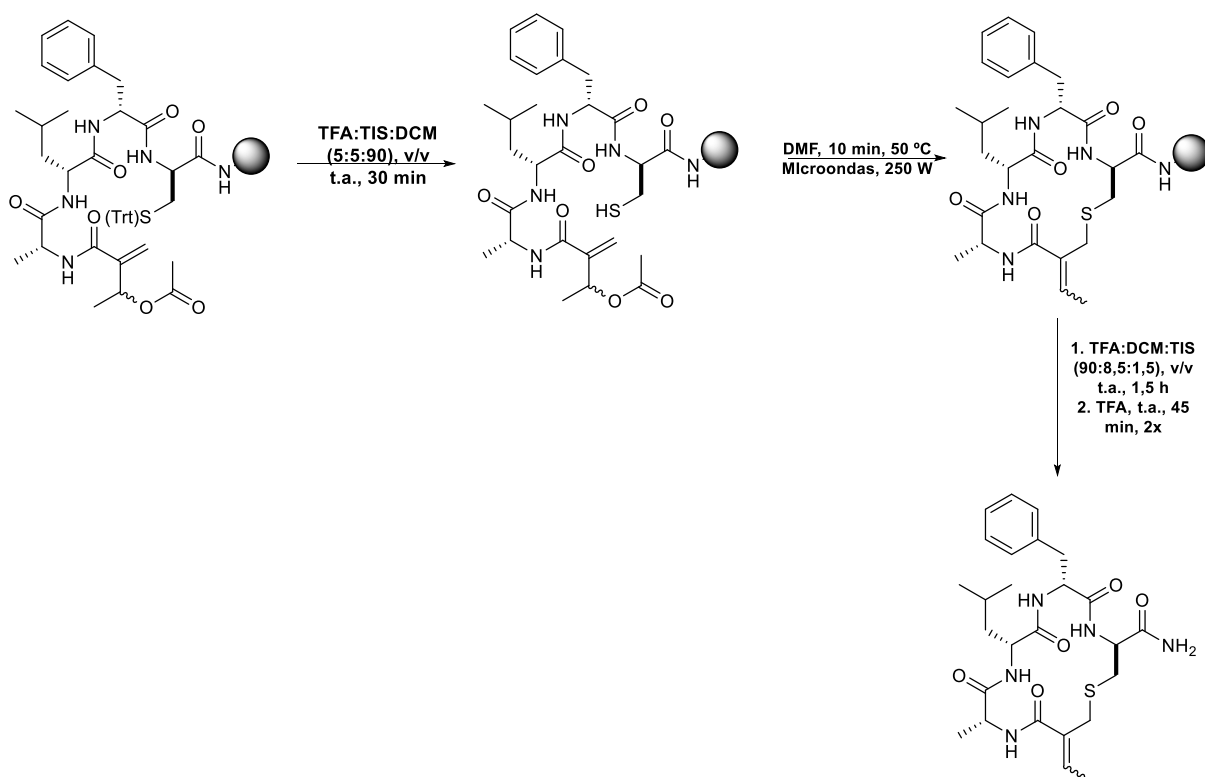


**Figura 4.14.** Rendimentos obtidos para a molécula **4bb**, sintetizada na resina e em solução.



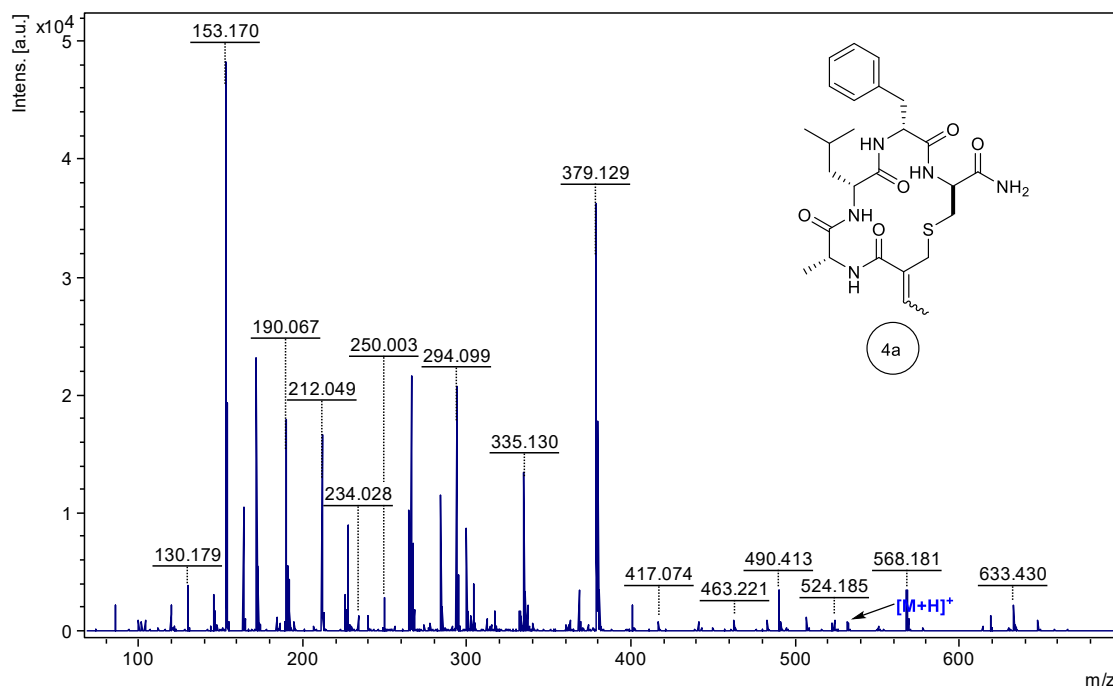
#### 4.2.7 Reação de macrociclicização sob a resina por aquecimento assistido por micro-ondas

Baseado nos estudos de Grieco e Colaboradores<sup>36</sup>, foi feita uma tentativa de macrociclicização da molécula **4a** em condição de aquecimento assistido por micro-ondas seguindo as condições experimentais demonstrada no **Esquema 4.20**.

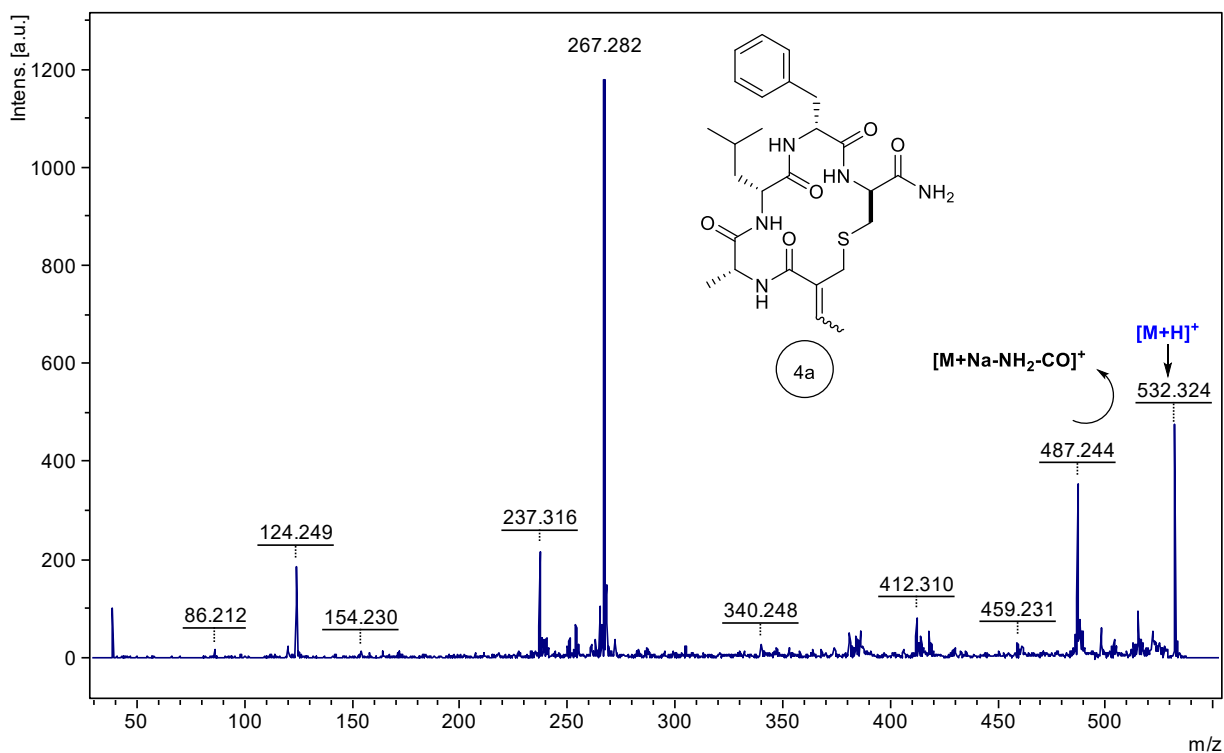


**Esquema 4.20.** Condições experimentais empregadas para a macrociclicização sob a resina assistida por micro-ondas.

Para atestar a formação bem sucedida da ciclicização do análogo da solonamida, foi adquirido espectro de MALDI-MS/MS, em que foi observado o íon  $m/z = 532$ , referente à molécula cíclica protonada  $[M+H]^+$ , no espectro de fragmentação deste íon molecular, houve a formação de íons moleculares, semelhantes aos observados anteriormente.



**Figura 4.15.** Espectro de MALDI-MS (Não purificado) para a molécula **4a**, reação sob a resina assistida por Micro-ondas.



**Figura 4.16.** Espectro de MALDI-MS/MS para a molécula **4a**, sob a resina assistida por Micro-ondas.

Vale salientar que o rendimento de ciclização obtido por meio desta metodologia ainda está em processo de análise.

## 4.3 PARTE EXPERIMENTAL

### 4.3.1 Reagentes, solventes e materiais

A resina Rink Amide MBHA e o aminoácido Fmoc-*D*-fenilalanina-OH foram adquiridos da P3 BioSystems®. Os aminoácidos Fmoc *L*-cisteína, *L*-serina, *L*-fenilalanina, *L*-leucina e *L*-alanina, e os reagentes 4-metil-piperidina, DIC, *Oxyma*®, DIPEA, TIS, TFA, DBU, piridina e anidrido acético, foram adquiridos pela Sigma Aldrich®. O TEA e o TFA grau HPLC foram adquiridos da Dinâmica®. O DMF usado foi adquirido da Scharlau®. Os solventes THF e DCM foram purificados antes do uso, com sódio metálico/benzofenona e hidreto de cálcio, respectivamente. O acetonitrila grau HPLC foi adquirido da J.T.Baker®. O gás argônio utilizado foi adquirido da White Martins®.

### 4.3.2 Síntese das moléculas baseadas nas solonamidas em fase sólida

Para a síntese dos tetrapeptídeos, foram utilizados balões com fundo redondo, empregando a resina Rink Amide MBHA 0,65 mmol/g, como suporte em fase sólida. Antes de iniciar a síntese do peptídeo, a resina foi lavada por 15 min com DCM (5 mL, 2x) e 10 min com DMF (5 mL, 1x), seguida da desproteção do grupo Fmoc, usando uma solução de 20% (v/v) de 4-metil-piperidina em DMF, por 15 min (5mL, 2x), para a retirada de impurezas, a resina foi lavada com DCM (5 mL, 2x), DMF (5 mL, 2x) e DCM (5mL, 2x). Para confirmar a desproteção do *N*-terminal, foi feito o teste de Kaiser, no qual são usados 3 reagentes:

- Reagente A: Solução de 2% (v/v) de KCN (0,66 M em H<sub>2</sub>O) em piridina.
- Reagente B: Solução de 5% (m/v) de ninidrina em *n*-butanol.
- Reagente C: Solução de 2 % (m/v) de fenol em *n*-butanol.

Para fazer o teste, foi tomado uma pequena quantidade da resina num tubo de ensaio, e adicionado 2 gotas dos reagentes A, B e C, com posterior aquecimento do tubo a 110 °C por 5 min. Com a desproteção conferida, a resina foi posta para secar numa bomba a vácuo por 30 min. Para o acoplamento, foi feita uma solução, consistindo com 1,95 mmol de *L*-cisteína/serina, 1,95 mmol de DIC, 1,95 mmol de *Oxyma pure*, e 6,5 mmol de DIPEA, com DMF como solvente de reação. A mistura foi posta num

shaker para reagir por 1,5 h, depois a resina foi lavada com DCM (5mL, 2x), DMF (5 mL, 2x) e DCM (5mL, 2x). A verificação do acoplamento foi feita com o teste de Kaiser. Confirmada o acoplamento, foi seguido a desproteção do grupo Fmoc, e acoplamento de 1,95 mmol dos próximos aminoácidos, dentre *L/D*-fenilalanina, *L*-leucina e *L*-alanina, respectivamente. Seguidamente, para o acoplamento dos ácidos carboxílicos **2a** e **2b**, advindos dos AMBH, foi desprotegido o grupo Fmoc, e 3,25 mmol destes ácidos foram postos a reagir com 3,25 mmol de DIC e 3,25 mmol de *Oxyma Pure*, e 6,5 mmol de DIPEA. Confirmado o acoplamento dos adutos, foram feitas duas vezes a acetilação do grupo -OH com anidrido acético em piridina, na proporção de 1:2 (v/v), por 45 min. Depois da exploração da reação de ciclização, o peptídeo foi clivado num coquetel consistindo em 90% de TFA com 8,5% de DCM e 1,5% de TIS, por 1,5 h, sob agitação, com posterior 100% de TFA (5 mL, 45 min, 2x). O TFA foi retirado por meio de um rotoevaporador.

#### **4.3.3 Desproteção seletiva do grupo *terc*-butil e tentativa de macrociclização sob a resina**

A resina foi posta numa solução aquosa de 85 % (v/v) de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> em DCM durante 14 h, sob agitação. Depois a resina foi lavada com DCM (5mL, 3X), DMF (5mL, 3x) e DCM (5mL, 3x), posteriormente seca numa bomba a vácuo. Depois de seca, para a reação de ciclização, a resina foi posta numa solução de 10 mL de DMF com 2% (v/v) de DBU, durante 48 h, sob agitação. Depois a resina foi lavada com DMF (5mL, 3x), MeOH (5mL, 1x) e DCM (5mL, 3x). Por fim, a resina foi clivada num coquetel consistindo em 90% de TFA com 8,5% de DCM e 1,5% de TIS, por 1,5 h, sob agitação, com posterior 100% de TFA (5 mL, 45 min, 2x). O TFA foi retirado por meio de um rotoevaporador.

#### **4.3.4 Desproteção seletiva do grupo *trít*ila e tentativa de macrociclização sob a resina**

Inicialmente, foi utilizado uma solução de 5% (v/v) de TFA com 5% (v/v) de TIS e 90% (v/v) para a desproteção do grupo *trít*ila da cisteína, sob agitação, durante 30 min. Depois a resina, foi lavada com 5% (v/v) de TEA em DCM (5mL, 1x), MeOH (5mL,

1x), DMF (5mL, 3x) e DCM (5mL, 1x). Depois de confirmado a retirada do grupo tritila, foi feita a exploração da reação de ciclização sob a resina, usando 5% (v/v) de TEA em 10 mL DMF, ou 1% (v/v) de DBU em 10 mL DMF, durante 24 h. Depois a resina foi lavada com DMF (5mL, 3x), MeOH (5mL, 1x) e DCM (5mL, 3x). Depois de lavada e seca, a resina foi clivada num coquetel consistindo em 90% de TFA com 8,5% de DCM e 1,5% de TIS, por 1,5 h, sob agitação, com posterior 100% de TFA (5 mL, 45 min, 2x). O TFA foi retirado por meio de um rotoevaporador.

#### **4.3.5 Reação de macrociclização em solução**

Para a reação em solução, primeiro foi feito a clivagem do peptídeo da resina, num coquetel consistindo em 90% de TFA com 8,5% de DCM e 1,5% de TIS, por 1,5 h, sob agitação, com posterior 100 % de TFA (5 mL, 45 min, 2x). O TFA foi retirado por meio de um rotoevaporador. Depois o produto da clivagem foi posto para ciclar numa solução de 250 mL de THF:DCM na proporção de 1:1 (v/v) com 1% (v/v) de DBU, sob agitação por 44 h, na atmosfera de argônio. Depois, o solvente da reação foi retirado por meio de um rotaevaporador.

#### **4.3.6 Reação de macrociclização sob a resina por aquecimento assistido por micro-ondas**

Para a reação de macrociclização de moléculas baseadas nas solonamidas sob a resina assistida por Micro-ondas foi empregando um equipamento de Micro-ondas da CEM Discover®, no qual foram utilizados os seguintes parâmetros de operação: temperatura de 50 °C, pressão de 350 psi, potência de 250 W, e 10 min de reação, empregando 2 mL de DMF como solvente. Por fim, a resina foi clivado num coquetel consistindo em 90 % de TFA com 8,5 % de DCM e 1,5 % de TIS, por 1,5 h, sob agitação, com posterior 100 % de TFA (5 mL, 45 min, 2x). O TFA foi retirado por meio de um rotoevaporador.

#### 4.3.7 Determinação espectrofotométrica de trifeniltamento pelo método de curva analítica

Para a construção da curva analítica de trifenilmetano, foi pesado 0,24433 g de trifenilmetano num balão volumétrico de 10 mL, empregando acetonitrila como solvente. A partir dessa solução, foram feitas diluições sucessivas, empregando balões de 10 mL, de acordo com a **Tabela 4.3**.

**Tabela 4.3.** Dados para a construção da curva analítica para determinação de trifenilmetano.

Solução	Volume da solução estoque de trifenilmetano, $\mu\text{L}$	Concentração de trifenilmetano, mM
1	10	0,1
2	30	0,3
3	50	0,5
4	70	0,7
5	90	0,9
6	110	1,1

Nos preparos das amostras, primeiro o sobrenadante da desproteção do grupo tritila da cisteína, teve o solvente retirado num rotaevaporador, e seco numa bomba a vácuo, depois o produto resultante foi transferido quantitativamente para um balão volumétrico, de acordo com a concentração esperada para o grupo tritila, e completado com acetonitrila

Para a realização das leituras espectrofotométricas foi usado um Espectrofotômetro ultravioleta-visível e infravermelho próximo (Varian<sup>®</sup> - Cary 5000), dispendo de sistema de simples e duplo feixe. Para a obtenção dos espectros UV, os padrões e as amostras foram analisadas usando o modo de duplo feixe: No qual foram definidos os seguintes parâmetros: faixa de escaneamento 800-200 nm; *Ave time* 0,1 s; *Data interval* 1,0 nm; *Source changeover* 350 nm; *Detector changeover* 800; *Grating changeover* 800 nm; *Baseline None*. A amostra de referência (acetonitrila) foi inserido na porta amostra referente ao segundo feixe. Para a construção da curva analítica foi utilizado o modo de feixe simples, por este modo apresentar resultados mais preciso da relação entre absorbância e concentração. Dessa forma, os parâmetros definidos foram: comprimento de onda: 262 nm; *Ave time* 0,1 s; *Data interval* 1,0 nm; *Source changeover* 350 nm; *Detector changeover* 800; *Grating changeover* 800 nm; *Baseline Correction*. Para a análise dos dados foi utilizado o programa Origin<sup>®</sup>, versão 8.0.

#### 4.3.7 Purificação por Cromatografia líquida de alta eficiência

Os peptídeos obtidos por meio da síntese em fase sólida foram purificados num HPLC semi-preparativo (Shimadzu®), equipado com duas bombas independentes e com detector tipo DAD (SPD-M20A), com comprimentos de ondas  $\lambda = 216$  e  $280$  nm, usando como modo de eluição um gradiente com vazão de  $2,5$  mL/min, consistindo em dois solventes A,  $0,2\%$  de TFA em água, e B,  $0,2\%$  de TFA em acetonitrila. Com a corrida iniciando com  $24\%$  da solução B por  $2$  min, depois foi feito um gradiente até  $50\%$  por  $40$  min, seguindo de um gradiente até  $100\%$  de B por  $2$  min, para depois realizar uma eluição isocrática por  $5$  min, retornando à concentração de B inicial ( $24\%$ ) por  $2$  min. A coluna utilizada para a purificação foi a Vydac C18 ( $250$  mm(L)x $10$  mm(di),  $5$   $\mu$ m,  $300$  Å).

#### 4.3.8 Espectros de Massas

Os espectros de dados de HRMS-ESI, foram adquiridos em um Triplo ToF 5600 Sciex®, por análise de injeção em fluxo utilizando um cromatógrafo Eksigent® UltraLC 100 Sciex ajustado para uma velocidade de fluxo de  $0,3$  mL/min. Uma fonte DuoSpray Ion Source (ESI) foi utilizada e os espectros de EM foram adquiridos no modo positivo, empregando calibração externa, na escala de  $100 - 1000$  Da. Os parâmetros de aquisição foram: TEM  $450$ , GS1  $45$ , CUR  $25$ , GS2  $50$ , ISVF  $5500$  e DP  $80$ . Os dados foram analisados usando o software mMass 5.5.0.

Os espectros de MALDI-MS/MS foram obtidos no equipamento UltraFlex 3, Bruker Daltonics®, no qual foi utilizado uma solução de  $10$  g/L de CHCA em  $50\%$  de acetonitrila e  $0,3\%$  de TFA (v/v), para a aplicação na placa foi utilizada  $1$   $\mu$ L da amostra e  $3$   $\mu$ L da solução matriz. A calibração do equipamento ocorreu com o depósito de calibrantes externos (peptide calibration standard II Bruker) com a matriz. A análise ocorreu no modo refletor positivo e íon de massa/carga de cada peptídeo foi então fragmentado, via LIFT para a confirmação da estrutura. Os dados foram analisados no programa computacional FlexAnalysis Bruker Daltonics®, versão 3.3.

#### 4.4 CONCLUSÕES DO CAPÍTULO

- ✓ A reação de macrociclicização envolvendo o grupo hidroxila não conduziu aos resultados esperados, tendo em vista que o DBU agiu como o nucleófilo de reação;
- ✓ A solução aquosa de ácido fosfórico se mostrou efetiva para a retirada do grupo *terc*-butil;
- ✓ A reação de macrociclicização, envolvendo o grupo sulfidril, revelou o enxofre como um bom nucleófilo para a reação de  $S_N2'$  com o acetato alílico do resíduo de AMBH.
- ✓ O uso de DBU, como base de reação, se mostrou promissor, tendo em vista que foram obtidos bons rendimentos de reação,
- ✓ A reação sob a resina demonstrou ser vantajosa, por se usar pouco volume de solvente.
- ✓ A reação de macrociclicização sob a resina com aquecimento assistido por micro-ondas mostrou resultados promissores, em decorrência de não necessitar o uso de base, e de ser necessária somente 10 min de reação.



# **CAPÍTULO 5**

## **CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS**

## 5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

### 5.1 CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ Os adutos de Morita-Baylis-Hillman foram bastante versáteis como sítio eletrofílico para a macrociclicização de peptídomiméticos;
- ✓ A mudança de temperatura para a síntese do aduto de isobutiraldeído se mostrou insatisfatória, em vista da obtenção de baixo rendimento;
- ✓ A reação de hidrólise para os adutos de Morita-Baylis-Hillman, proposta por Mateus e colaboradores, se afirmou bastante eficaz, haja vista que foram obtidos bons rendimentos de reação;
- ✓ A síntese em fase sólida para as moléculas baseadas na solonamida provou ser uma metodologia bastante produtiva, no entanto, houve um consumo grande de reagentes;
- ✓ A reação de macrociclicização, envolvendo o grupo serina, não ocorreu devido à competição com o DBU na reação de  $S_N2'$  com o acetato alílico do resíduo de AMBH.
- ✓ A reação sob a resina aconteceu em bons resultados, tendo em vista que há um menor consumo de solvente.
- ✓ A reação sob a resina, empregando o aquecimento assistido por micro-ondas, se atestou como um método promissor, por necessitar de pouco solvente, não precisar de base, e de ser exigido somente 10 min de reação.

### 5.2 PERSPECTIVAS

- ✓ Empregar outros AMBH's como cadeia exocíclica para síntese de novas moléculas baseadas nas solonamidas;
- ✓ Empregar outra base com baixo poder nucleofílico na reação de macrociclicização envolvendo o grupo hidroxila da serina;
- ✓ Otimizar o tempo necessário para a reação de macrociclicização sob a resina;
- ✓ Otimizar a concentração de DBU para a reação de macrociclicização sob a resina em que há o grupo sulfidril da cisteína;
- ✓ Otimizar a reação com aquecimento assistido por micro-ondas, assim como verificar a influência do solvente, o tempo e temperatura de operação;

- ✓ Fazer testes biológicos com as moléculas baseadas na solonamidas, e verificar seu potencial efeito no *quorum sensing* na bactéria *Staphylococcus aureus*.

# **CAPÍTULO 6**

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] KELLER, L.; SURETTE, M.G; *Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. Nature Reviews Microbiology*, v.4, n.11, p.249–258, **2006**.
- [2] HENKE, J.M; BASSLER, B.L; *Bacterial social engagements. Trends in Cell Biology*, v. 14, p.648-656, nov. **2004**.
- [3] ZHANG, L.H; DONG, Y.H; *Quorum sensing and signal interference: diverse implications. Molecular Microbiology*, v.53, n.6, p.1563-1571, **2004**.
- [4] BANERJEE, G; RAY, A. K; *QUORUM-SENSING NETWORK-ASSOCIATED GENE REGULATION IN GRAM-POSITIVE BACTERIA. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, **2017**.
- [5] NEALSON, K.H; HASTINGS, J.W; *Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. Microbiology Reviews*, v.43, n.4, p.496-518, dez. **1979**.
- [6] MILLER M.B; BASSLER, B.L; *Quorum sensing in bacteria. Annual Review of Microbiology*, v.55, n.4, p. 165-199, dez. **2001**.
- [7] WATERS, C.M; BASSLER, B.L; *Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v.21, n.4, p.319-346, **2005**.
- [8] SCHAUDER S; BASSLER, B.L; *The languages of bacteria. Genes and Development*, v.15, n.12, p.1468-1480, jun. **2015**.
- [9] BASSLER, B.L; *Small Talk: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. Cell*, v.109, n.4, p.421-424, maio **2002**.
- [10] FUQUA, C; PARSEK, M.R; GREENBERG, E.P; *Regulation of Gene Expression by Cell-to-Cell Communication: Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing*, v.35, p. 439-468, dez. **2001**.
- [11] CAMILLI, A; BASSLER, B.L; *Bacterial Small-Molecule Signaling Pathways. Science*, v.311, p. 1113–1116; fev. **2006**.
- [12] DIEKEMA, D.J; PFALLER, M.A; SCHMITZ, F.J; SMAYEVSKY, J; BELL, J; JONES R.N; BEACH, M; *Survey of infections due to Staphylococcus species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. Clin Infect Dis.*, p. 114–132; **2001**.
- [13] CHAN, W.C; COYLE, B.J; WILLIAMS, P; *Virulence regulation and quorum sensing in staphylococcal infections: competitive AgrC antagonists as quorum sensing inhibitors. Journal of Medicinal Chemistry*, v.47, n.19, p.4633-4641; set. **2004**.
- [14] GORSKEA, B.C; BLACKWELL H; E. *Interception of quorum sensing in Staphylococcus aureus: a new niche for peptidomimetics. Journal: Organic & Biomolecular Chemistry*, n.4, p.1441-1445; **2006**.

- [15] ASSIS, L.M; NEDELJKOVIĆ, M; DESSEN, A; *New strategies for targeting and treatment of multi-drug resistant Staphylococcus aureus. Drug Resistance Updates*, v.31, p.1-14; mar. **2017**.
- [16] RASMUSSEN, T.B; GIVSKOV, M; *Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. International Journal of Medical Microbiology*, p.149-161; **2006**.
- [17] RUTHERFORD, S.T; BASSLER, B.L; *Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, pii: a012427.; nov. **2012**.
- [18] CEGELSKI, L; MARSHALL, G. R; ELDRIDGE, G. R; HULTGREN, S. J; *The biology and future prospects of antivirulence therapies. Nat Rev Microbiol*, p.17-27; jan. **2008**.
- [19] MANSSON, M; NIELSEN, A; KJÆRULFF, L; GOTFREDSEN, C.H; WIETZ, M; INGMER, H; GRAM, L; LARSEN, T.O; *Inhibition of virulence gene expression in Staphylococcus aureus by novel depsipeptides from a marine photobacterium. Marine Drugs*, n.12, p.2537-2552; dez. **2011**.
- [20] TAL-GAN, Y; STACY, D.M; FOEGEN, M.K; KOENIG, D.W; BLACKWELL, H.E; *Highly potent inhibitors of quorum sensing in Staphylococcus aureus revealed through a systematic synthetic study of the group-III autoinducing peptide. Journal of the American Chemical Society*, v.135, n.21, p.7869-7882; **2013**.
- [21] Hansen, A.M; Peng, P; Baldry, M; Perez-Gassol, I; Christensen, S.B; Vinther, J.M.O; Ingmer, H; Franzyk, H; *Lactam hybrid analogues of solonamide B and autoinducing peptides as potent S. aureus AgrC antagonists. European Journal of Medicinal Chemistry*, v.152, p.370-376; **2018**.
- [22] Johnson, J.G; Wang, B; Debelouchina, G.T; Novick, R.P; Muir, T.W; *Lactam hybrid analogues of solonamide B and autoinducing Increasing AIP Macrocyclic Size Reveals Key Features of agr Activation in Staphylococcus aureus. Chembiochem*, v.16, n.7, p.1093-1100; **2015**.
- [23] RODRIGUES, Tiago da Costa Alves da Fontoura. *Rearranjo de Claisen em adutos de Morita-Baylis-Hillman*. 2014. xiii, 121 f., il. *Dissertação (Mestrado em Química)—Universidade de Brasília, Brasília, 2014*.
- [24] SILVA, Vinicius Sobral. *Avaliação do efeito estérico no rearranjo de Hurd-Claisen em adultos de Morita-Baylis-Hillman*. 2017. xvi, 202 f., il. *Dissertação (Mestrado em Química)—Universidade de Brasília, Brasília, 2017*.
- [25] SILVA, V; SILVA, T; RODRIGUES, T; SANTOS, F; MACHADO, D; SILVA, W. A; OLIVEIRA, H.C.B; MACHADO, A.H.L.. *Unprecedented E-stereoselectivity on sigmatropic Hurd-Claisen rearrangement of Morita-Baylis-Hillman adducts: A Joint Experimental-Theoretical Study. ORGANIC & BIOMOLECULAR CHEMISTRY*, v. 17, p. 4498-4511, **2019**.
- [26] BAYLIS, A.B; HILLMAN, M.E.D; *German Patent 2155113, 1972, Chem. Abstr.* **1972**, 77, 34174q.
- [27] COELHO, F.; ALMEIDA, W.P; *REAÇÃO DE BAYLIS-HILLMAN: UMA ESTRATÉGIA PARA A PREPARAÇÃO DE INTERMEDIÁRIOS MULTIFUNCIONALIZADOS PARA SÍNTESE ORGÂNICA. Química Nova*, v.23, n.1, p.98-101; **2015**.

- [28] MATEUS, C. R; FELTRIN, M.P; COSTA, A.M; COELHO, F; ALMEIDA, W.P; Diastereoselectivity in heterogeneous catalytic hydrogenation of Baylis–Hillman adducts. Total synthesis of ( $\pm$ )-sitophilate. *Tetrahedron*, v.57, n.32, p. 6901-6908, **2001**.
- [29] aapptec, *Practical Guide to Solid Phase Peptide Synthesis*, <http://www.aapptec.com/>.
- [30] Sarin, V.K; Kent, S.B; Tam, J.P; Merrifield, R.B; Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction. *Analytical Biochemistry*, v. 117, n.1 p.147-157, **1981**.
- [31] HAYASHI, N; YANAGIHARA, K; TSUBOI, S; Lipase-catalyzed kinetic resolution of Baylis–Hillman products. *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 9, n. 21, p.3825-3830; nov. **1998**.
- [32] Li, B; Berliner, M; Buzon, R; Chiu, C.K; Colgan, S.T; Kaneko, T; Keene, N; Kissel, W; Le, T; Leeman, K.R; Marquez, B; Morris, R; Newell, L; Wunderwald, S; Witt, M; Weaver, J; Zhang, Z; Zhang, Z; Aqueous phosphoric acid as a mild reagent for deprotection of tert-butyl carbamates, esters, and ethers. *Journal of the American Chemical Society*, v. 71, n. 24, p. 9045-9050; nov. **2006**.
- [33] Derbel, S; Ghedira, K; Nefzi, A; Parallel synthesis of 19-membered ring macro-heterocycles via intramolecular thioether formation. *Tetrahedron Letters*, v. 51, n. 28, p. 3607-3609, jul. **2010**.
- [34] Sutherland, B.P; El-Zaatari, B.M; Halaszynski, N.I; French, J.M; Bai, S; Kloxin, C.J; On-Resin Macrocyclization of Peptides Using Vinyl Sulfonamides as a Thiol-Michael “Click” Acceptor. *Bioconjugate Chem*, v. 29, n. 12, p. 3987-3992; nov. **2018**.
- [35] Grieco, P; Cai, M; Liu, L; Mayorov, A; Chandler, K; Trivedi, D; Lin, G; Campiglia, P; Novellino, E; Hruby, V.J; Design and microwave-assisted synthesis of novel macrocyclic peptides active at melanocortin receptors: discovery of potent and selective hMC5R receptor antagonists. *Journal of the American Chemical Society*, v. 51, n. 9, p. 2701-2707; **2008**.
- [36] DEMIRTAS I; BUYUKKIDAN, B; ELMASTAS, M; The Selective Protection and Deprotection of Ambident Nucleophiles with Parent and Substituted Triarylmethyls. *Turk J Chem*, v. 26, p. 889 – 896; **2002**.
- [37] Swinehart, D. F; The Beer-Lambert Law, v. 39, n. 7, p. 333; **1962**.
- [38] BARROS, B.N; PIMENTEL, M.F; ARAUJO, M.C.U; Recomendações para calibração em química analítica: parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). *Química Nova*, v. 25, n. 5, p. 856-865; **2002**.
- [39] CHONG, K. F; LEONG, H.W; TUTORIAL ON DE NOVO PEPTIDE SEQUENCING USING MS/MS MASS SPECTROMETRY. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, v.10, n. 6, p. 1231002-1-38, **2012**.
- [40] Lammers, H; Cohen-Fernandes, P; Habraken, C.L Nucleophilic behaviour of DBU and DBN in reactions with 4-halo-3,5-dimethyl-1-nitro-1H-pyrazoles. *Tetrahedron*, v. 50, n. 3, p. 865–870; **1994**.

[41] Taylor, E.J; Bull, S.D; Williams, J.M.J; *Amidines, isothioureas, and guanidines as nucleophilic catalysts. Chem. Soc. Rev, v. 41, p. 2109–2121; 2012.*



# ANEXOS

## A-1. CROMATOGRAMAS

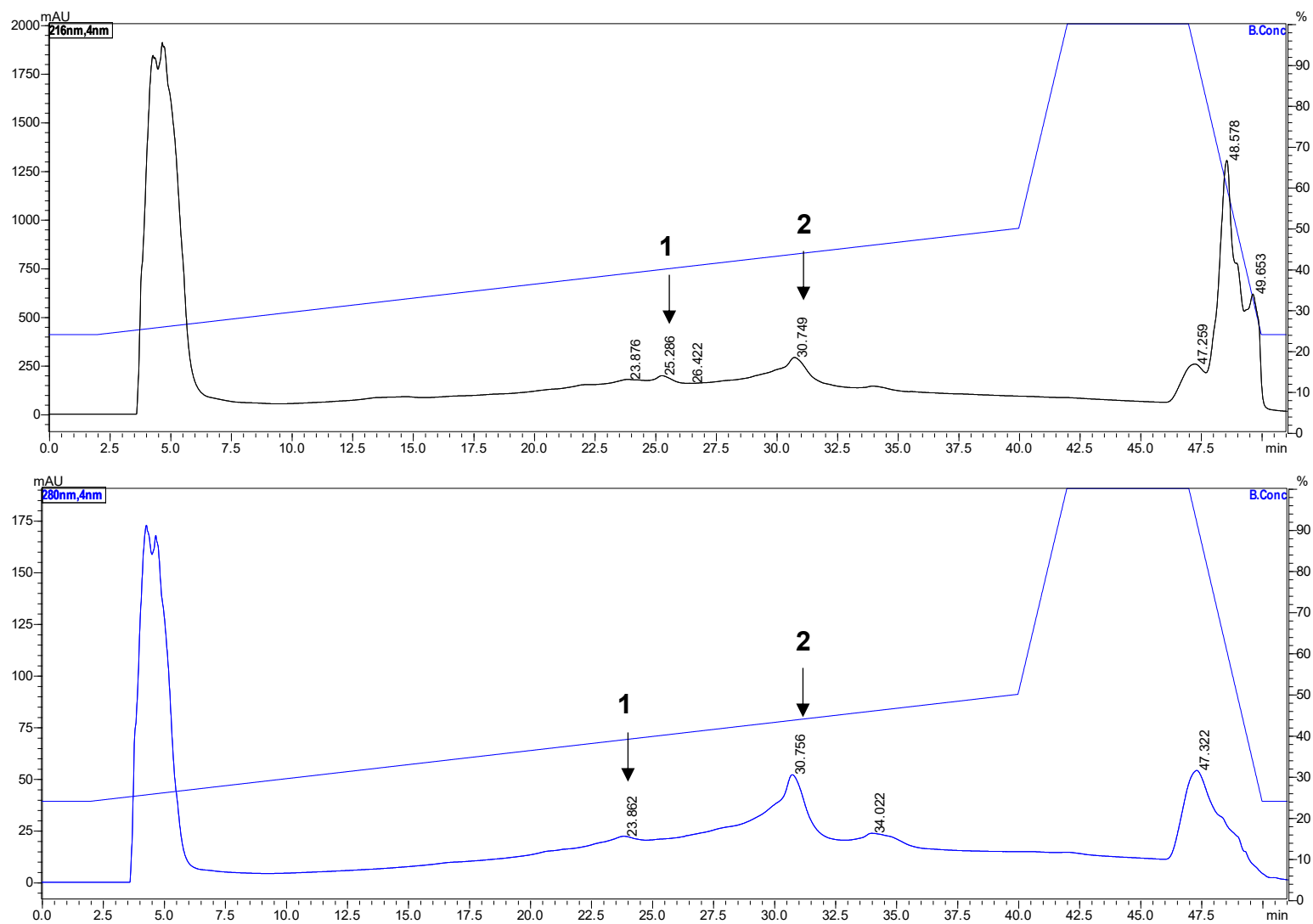
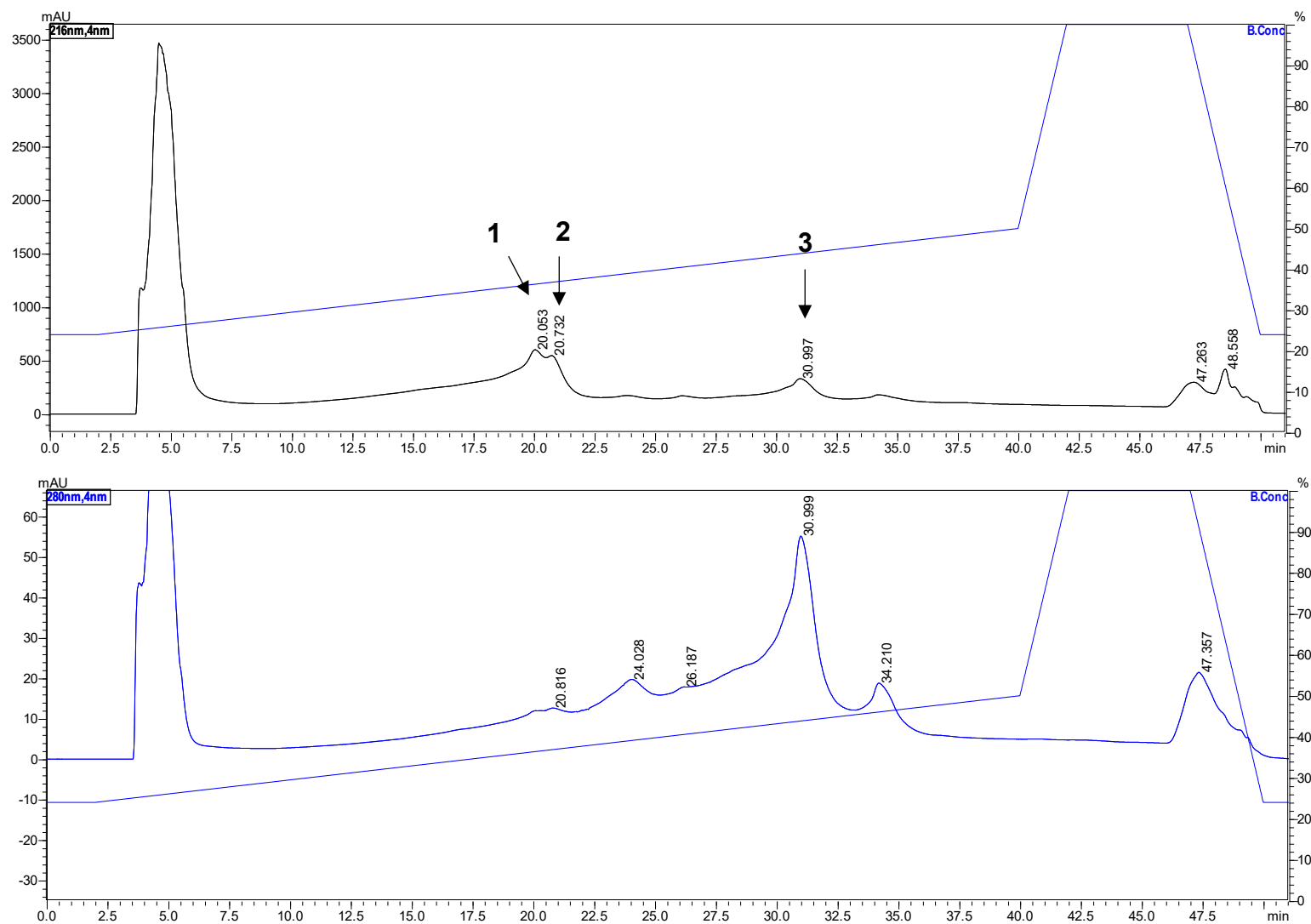


Figura A-1.1. Cromatogramas para a molécula 4a, empregando TEA como base de reação,  $\lambda = 216$  e 280 nm, respectivamente.



**Figura A-1.2.** Cromatogramas para a molécula 4aa, empregando o DBU como base de reação,  $\lambda = 216$  e 280 nm, respectivamente.

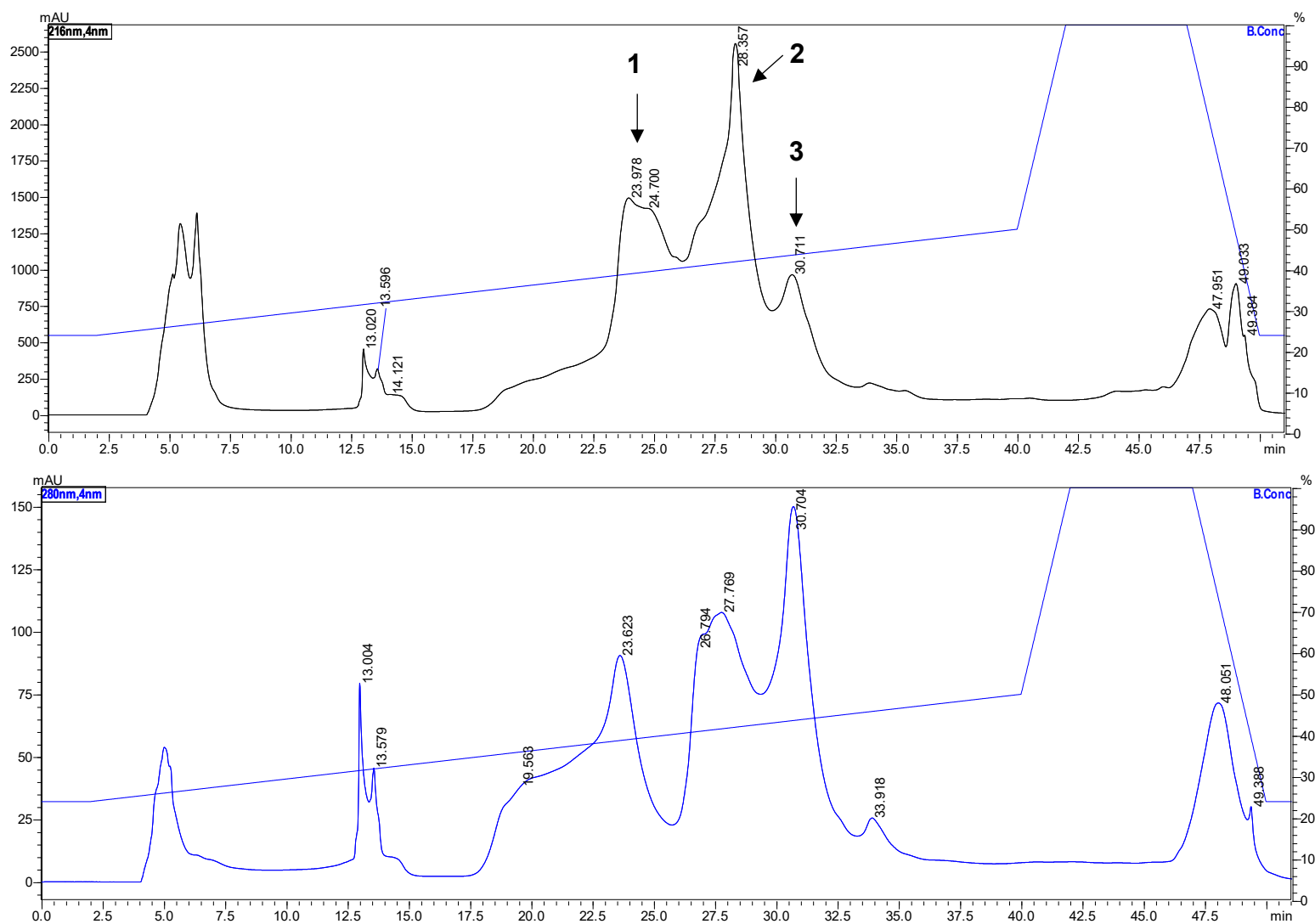


Figura A-1.3. Cromatogramas para a molécula **4bb**, reação sob a resina,  $\lambda = 216$  e  $280$  nm, respectivamente.

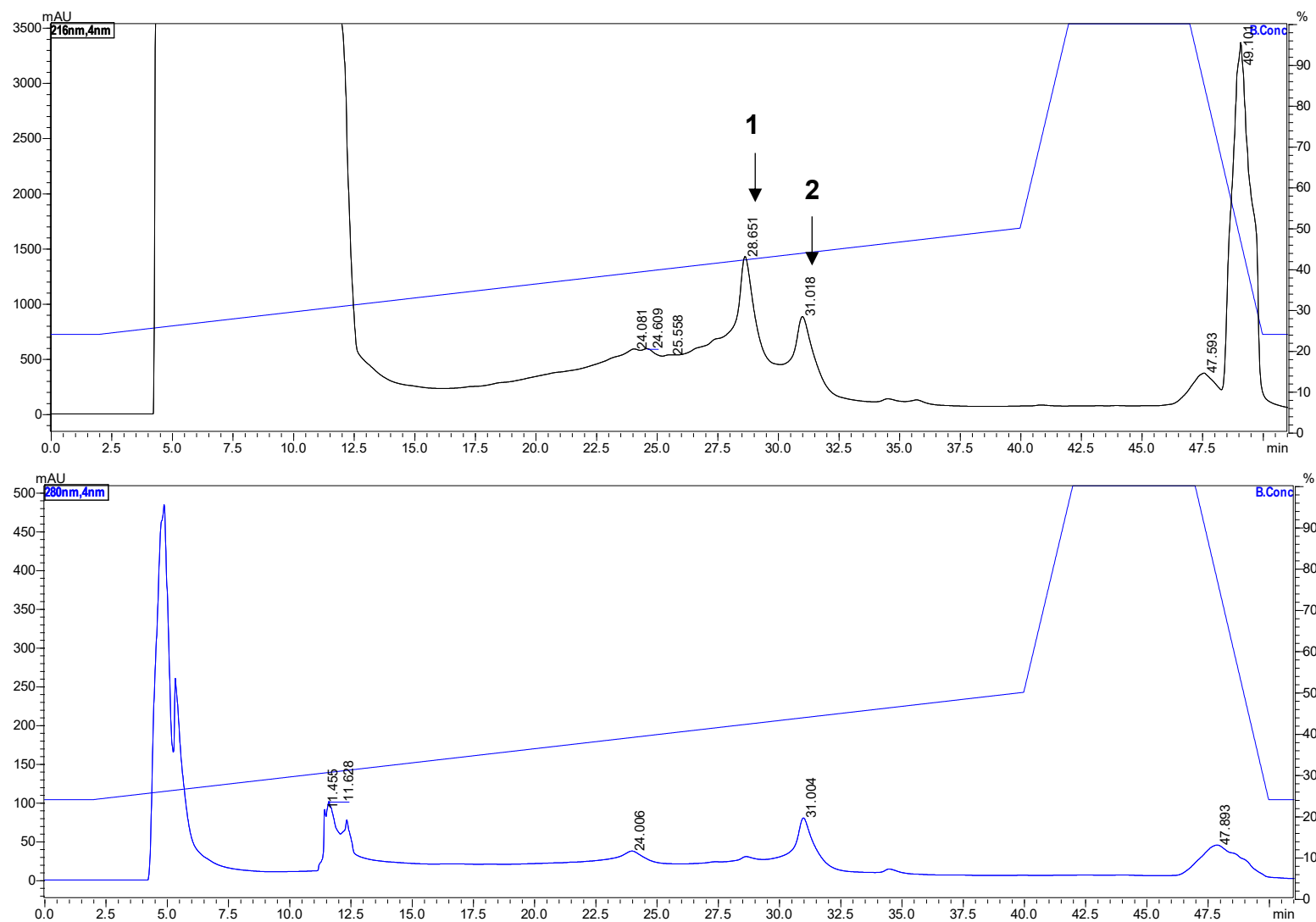


Figura A-1.4. Cromatogramas para a molécula **4bb**, reação em solução,  $\lambda = 216$  e  $280$  nm, respectivamente.

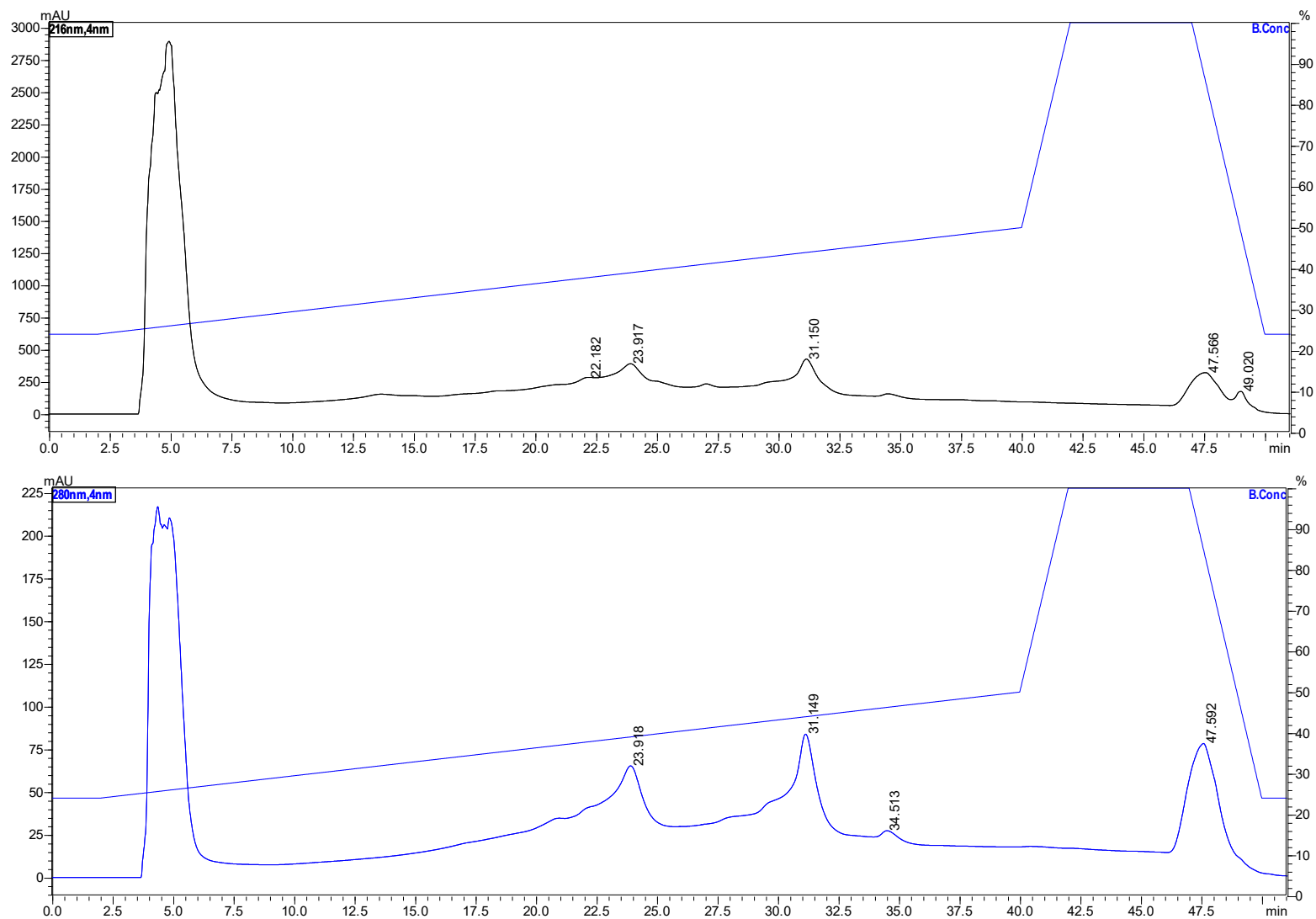


Figura A-1.5. Cromatogramas para a molécula 4a, reação em Micro-ondas,  $\lambda = 216$  e 280 nm, respectivamente.

## A-2. ESPECTROS DE MASSAS

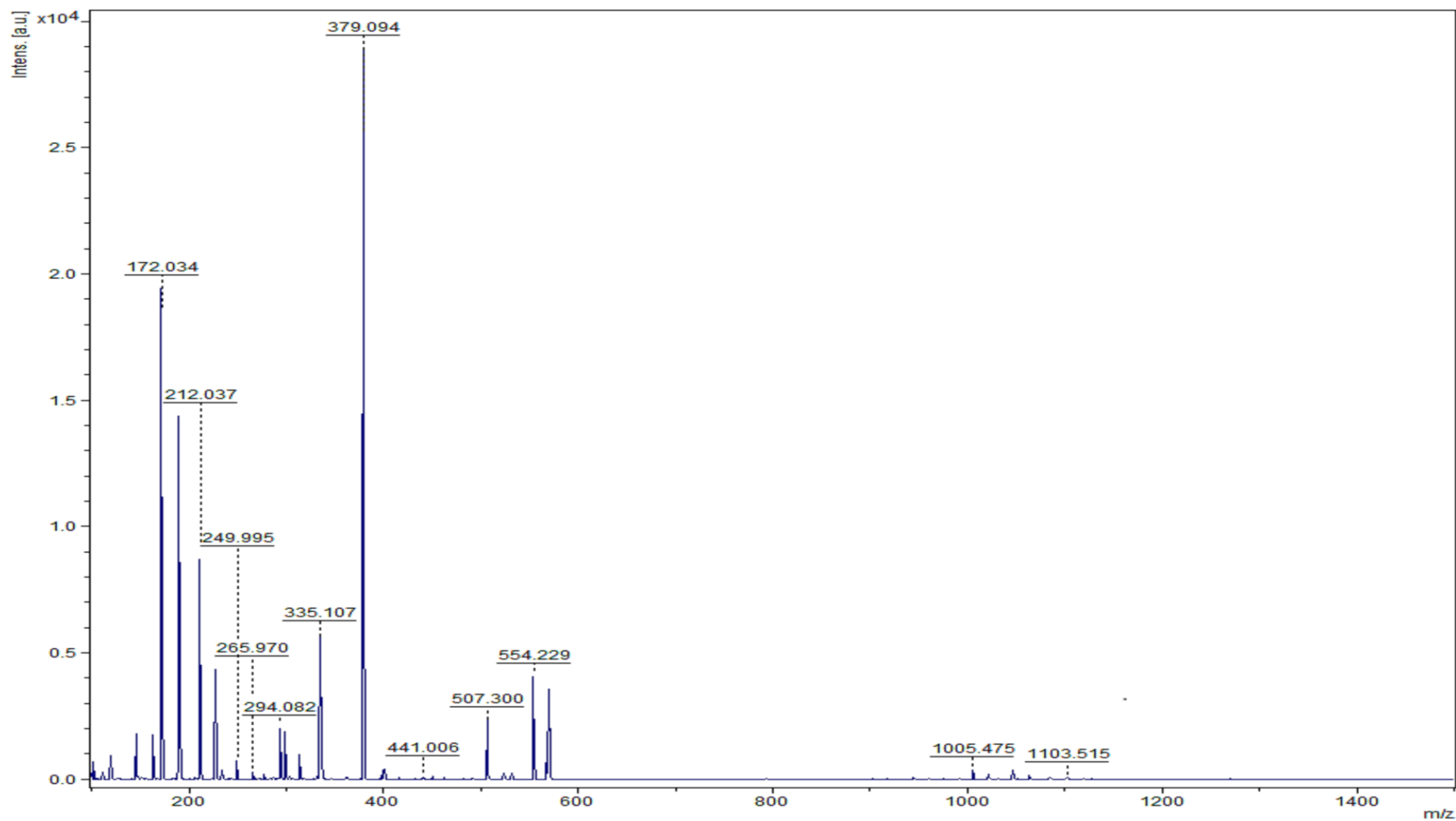


Figura A-2.1. Full-scan de MALDI-TOF para a molécula **4a**, empregando TEA, referente ao pico 1.

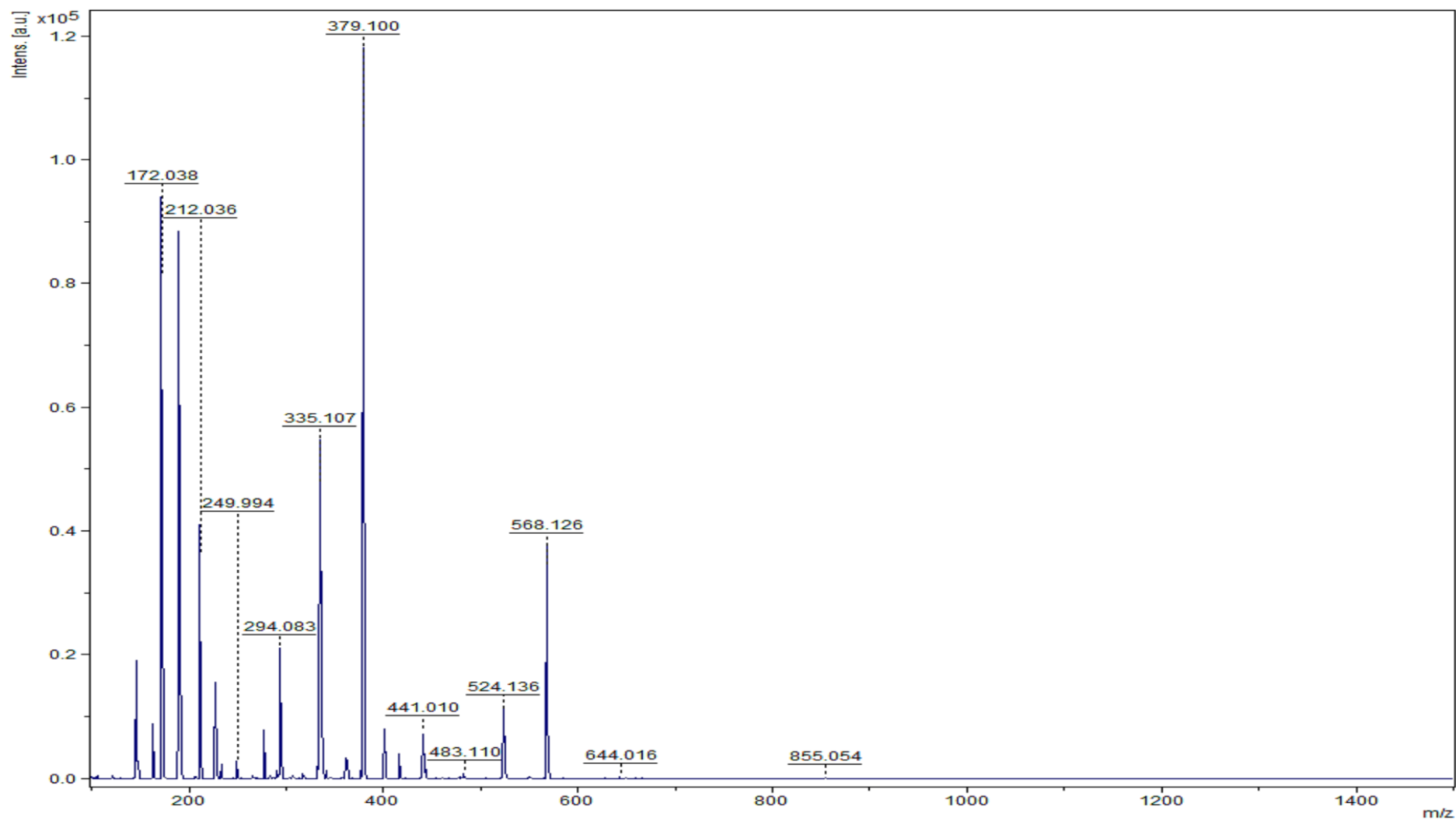
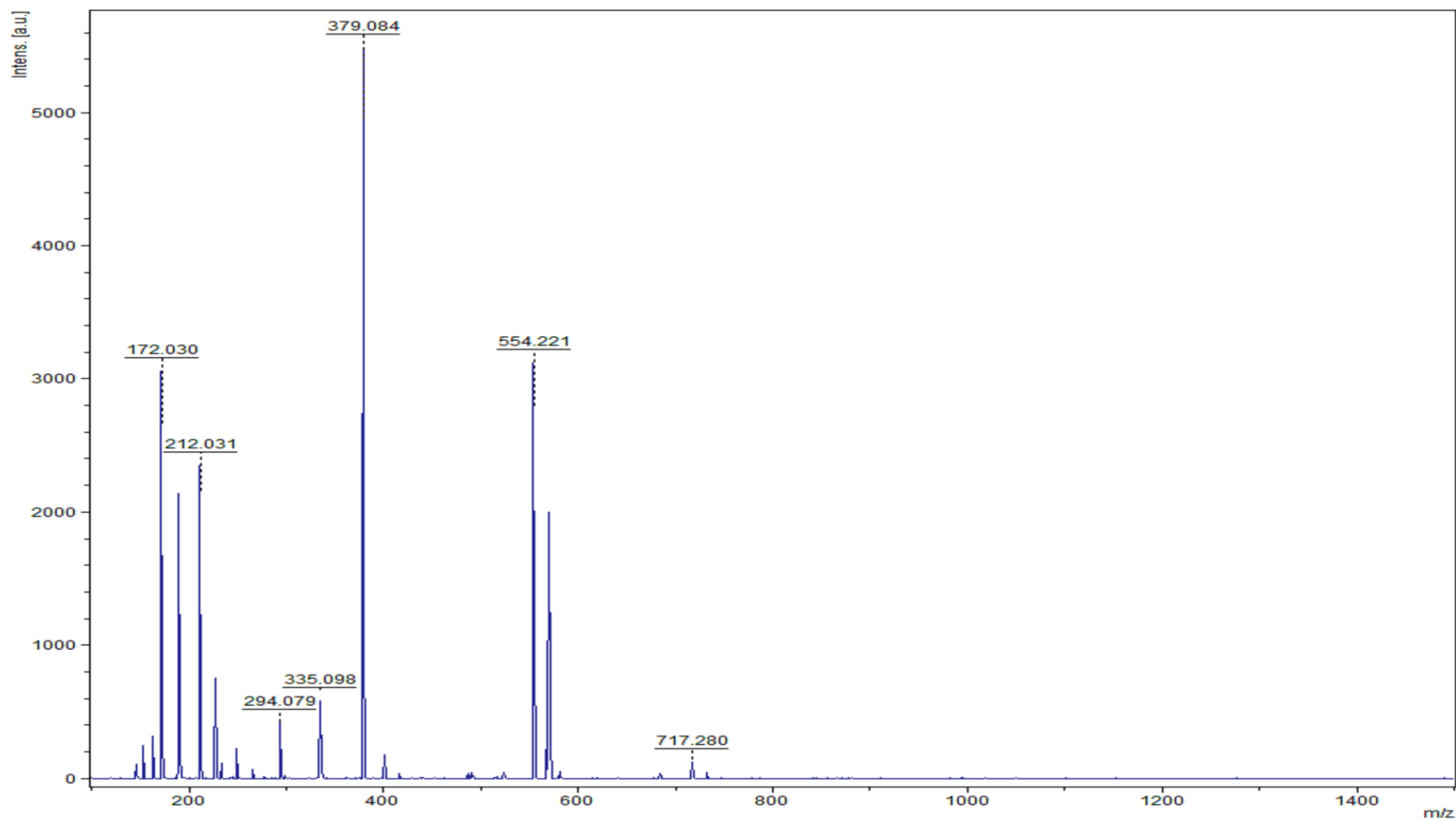
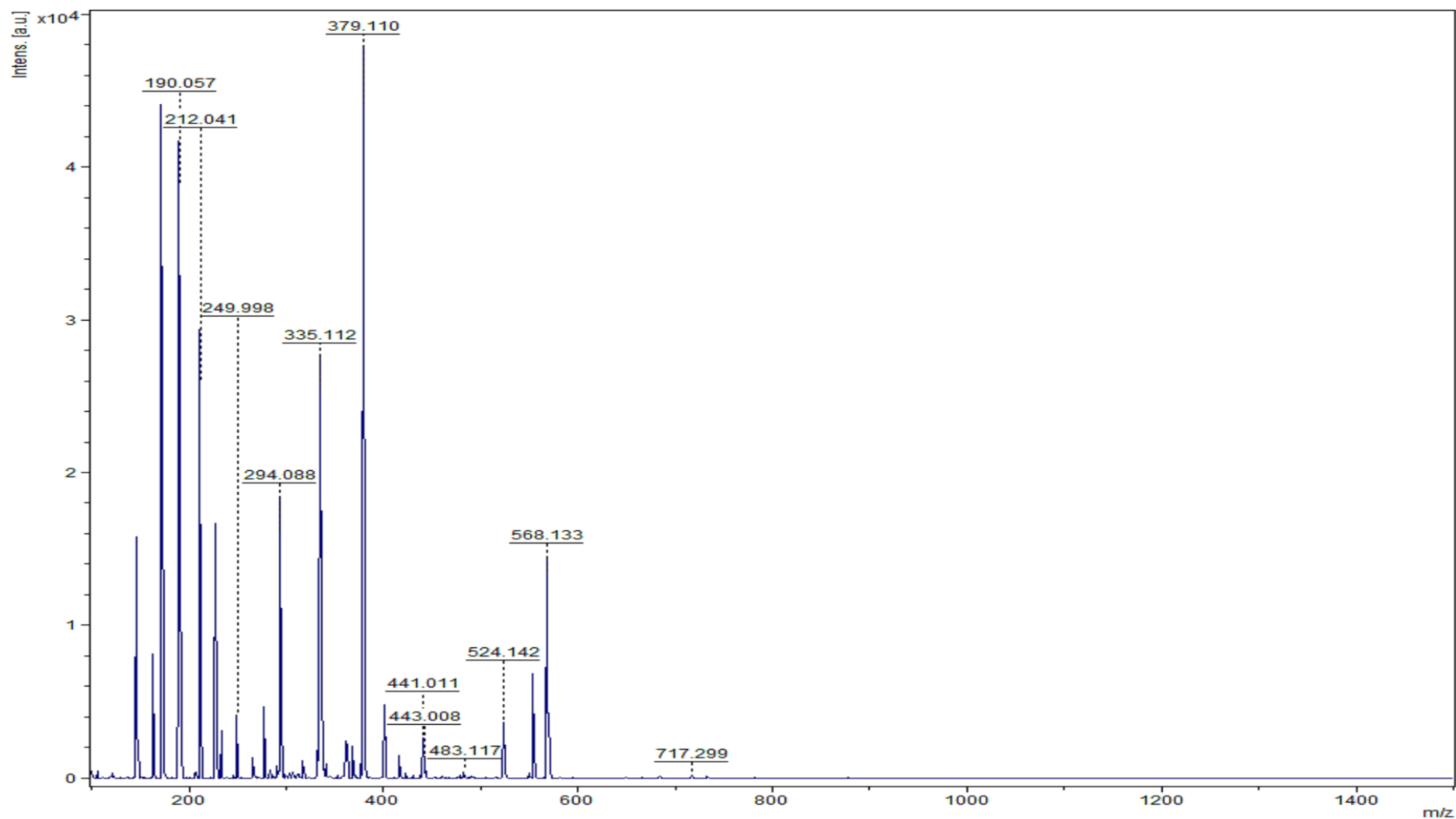


Figura A-2.2. Full-scan de MALDI-TOF para a molécula **4a**, empregando TEA, referente ao pico 2.

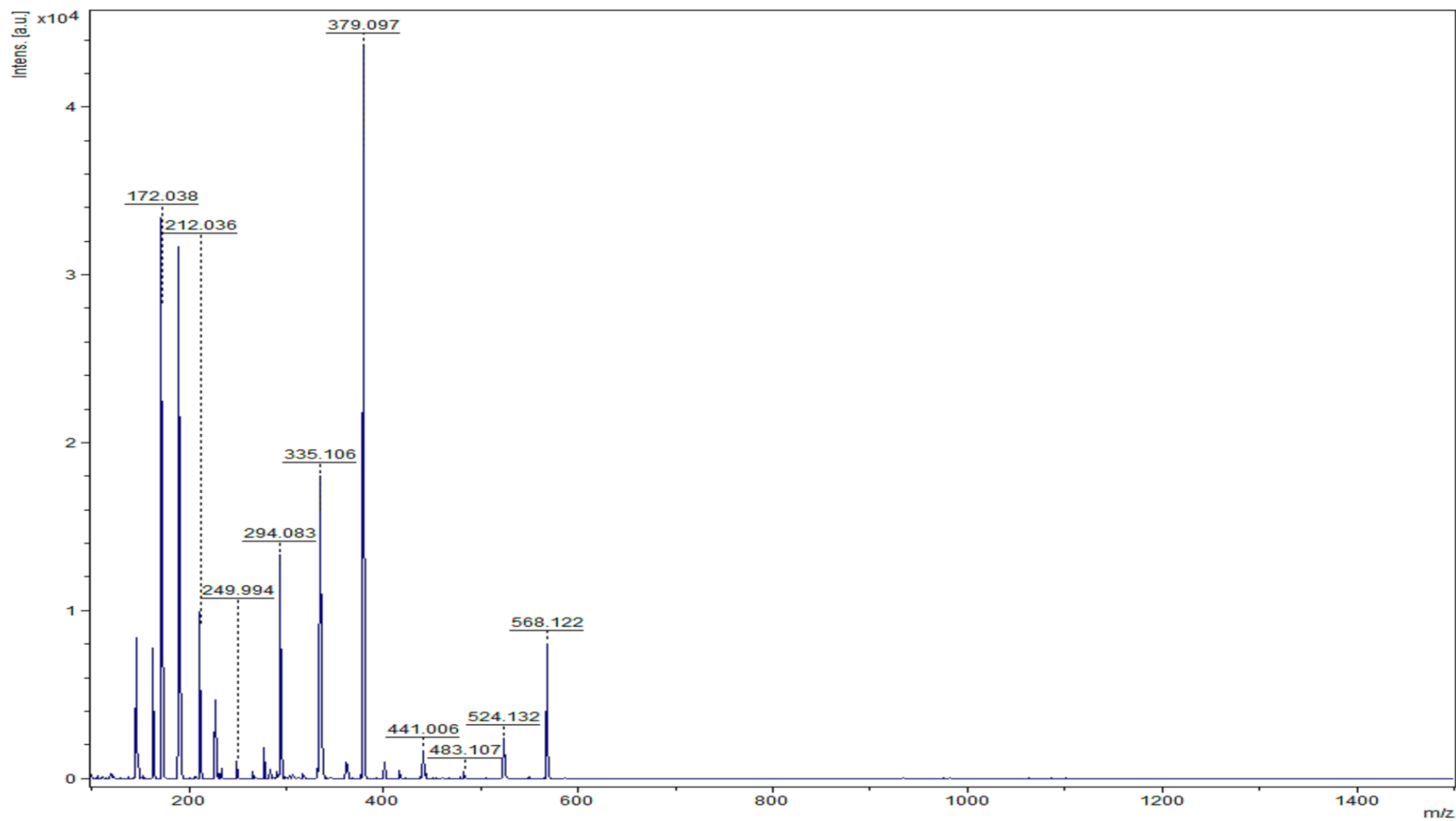




**Figura A-2.3.** Full-scan de MALDI-TOF para a molécula **4aa**, empregando DBU, referente ao pico 1.



**Figura A-2.4.** Full-scan de MALDI-TOF para a molécula **4aa**, empregando DBU, referente ao pico 2.



**Figura A-2.5.** Full-scan de MALDI-TOF para a molécula **4aa**, empregando DBU, referente ao pico 3.

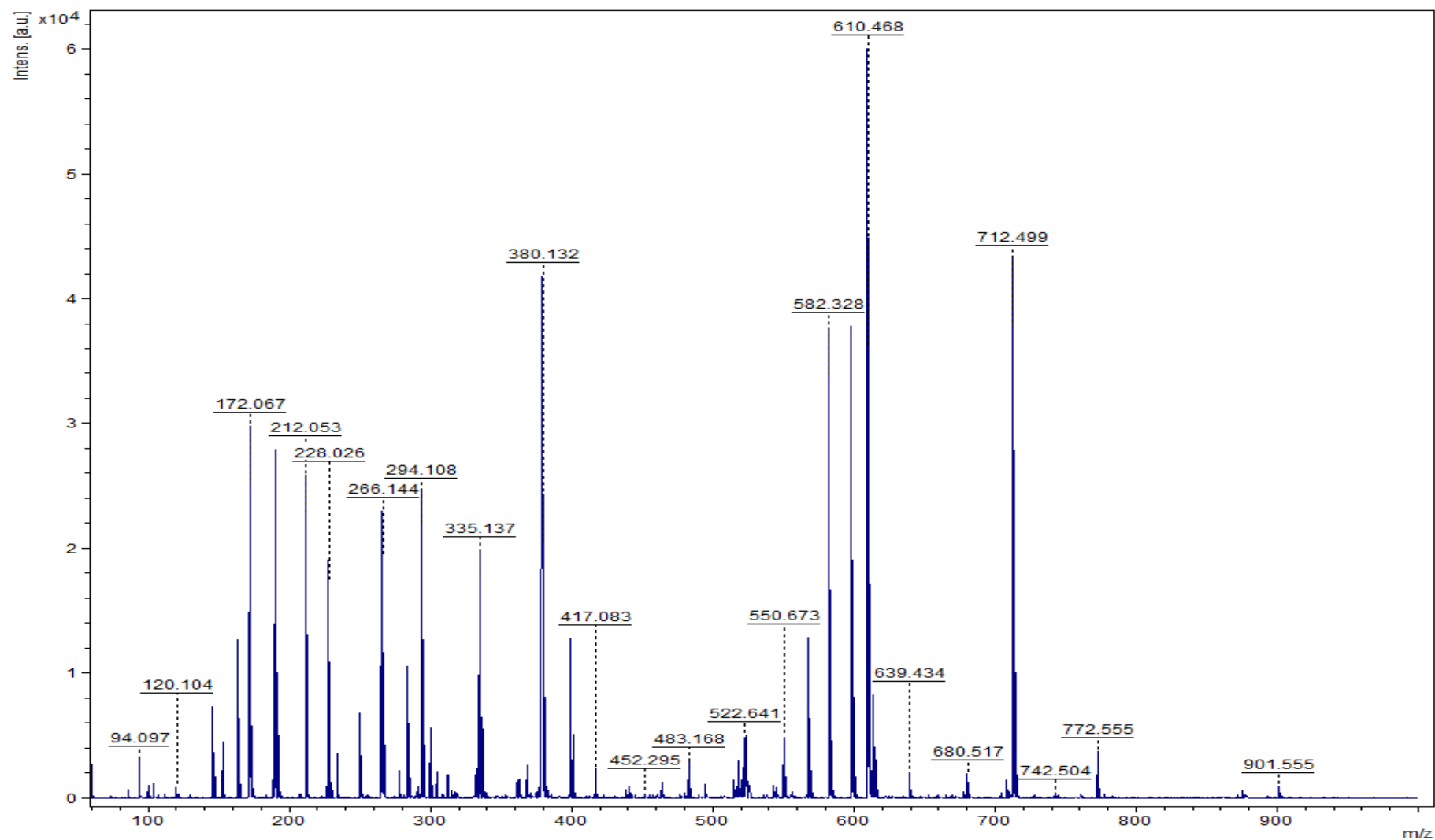


Figura A-2.6. Full-scan de MALDI-TOF para a molécula **4bb**, sob a resina, referente ao pico 1.

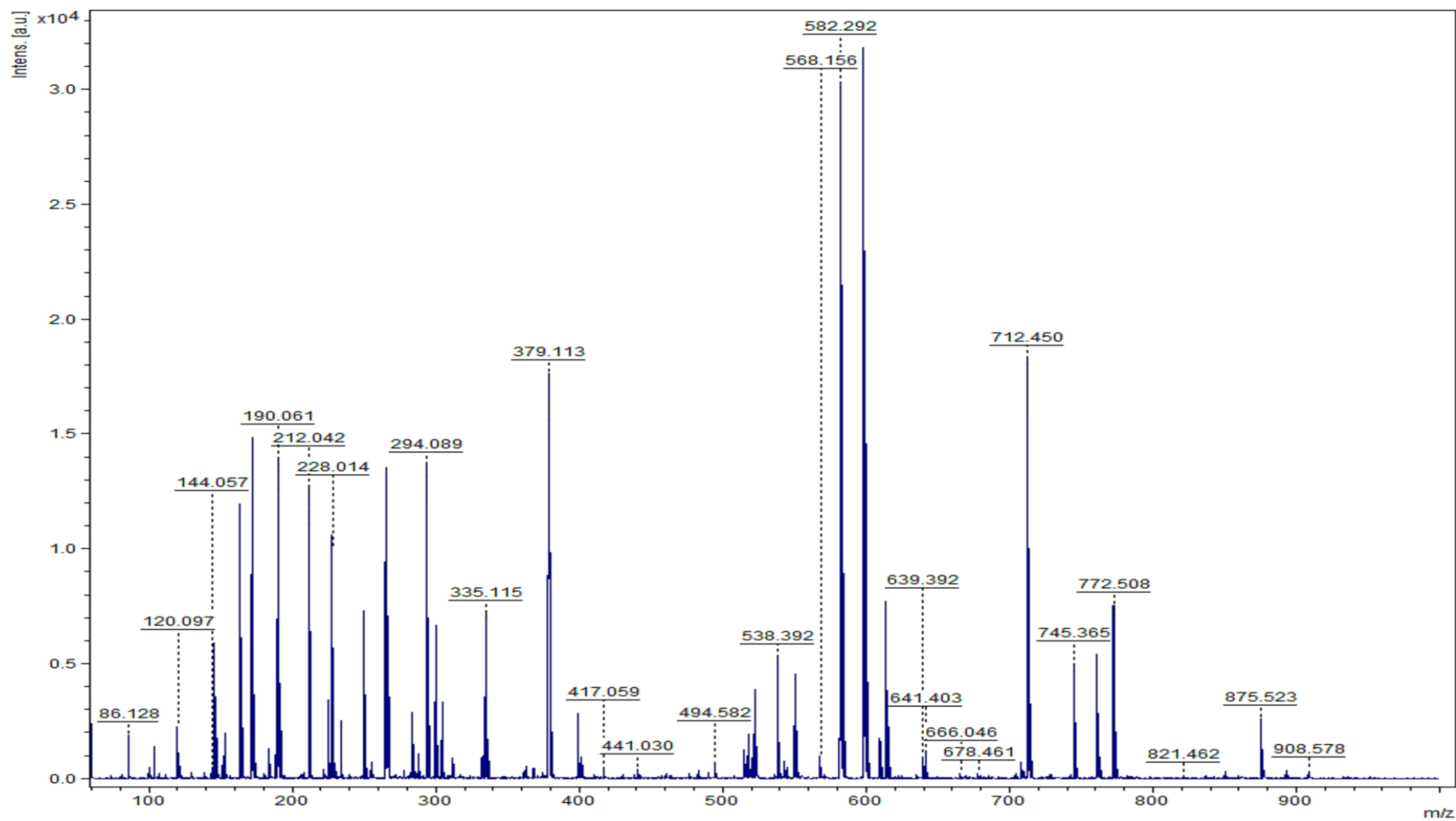


Figura A-2.7. Full-scan de MALDI-TOF para a molécula **4bb**, sob a resina, referente ao pico 2.

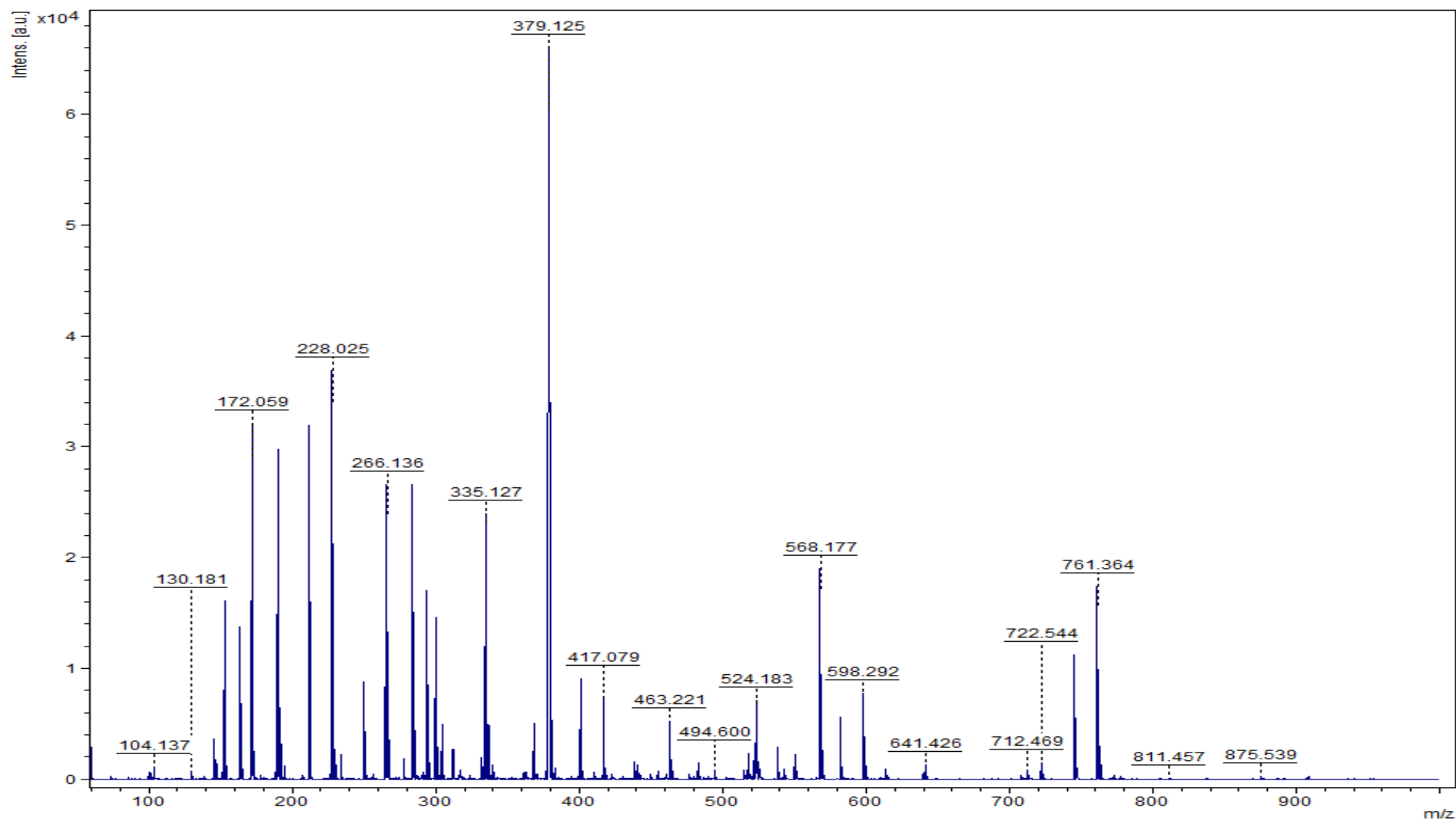


Figura A-2.8. Full-scan de MALDI-TOF para a molécula **4bb**, sob a resina, referente ao pico 3.

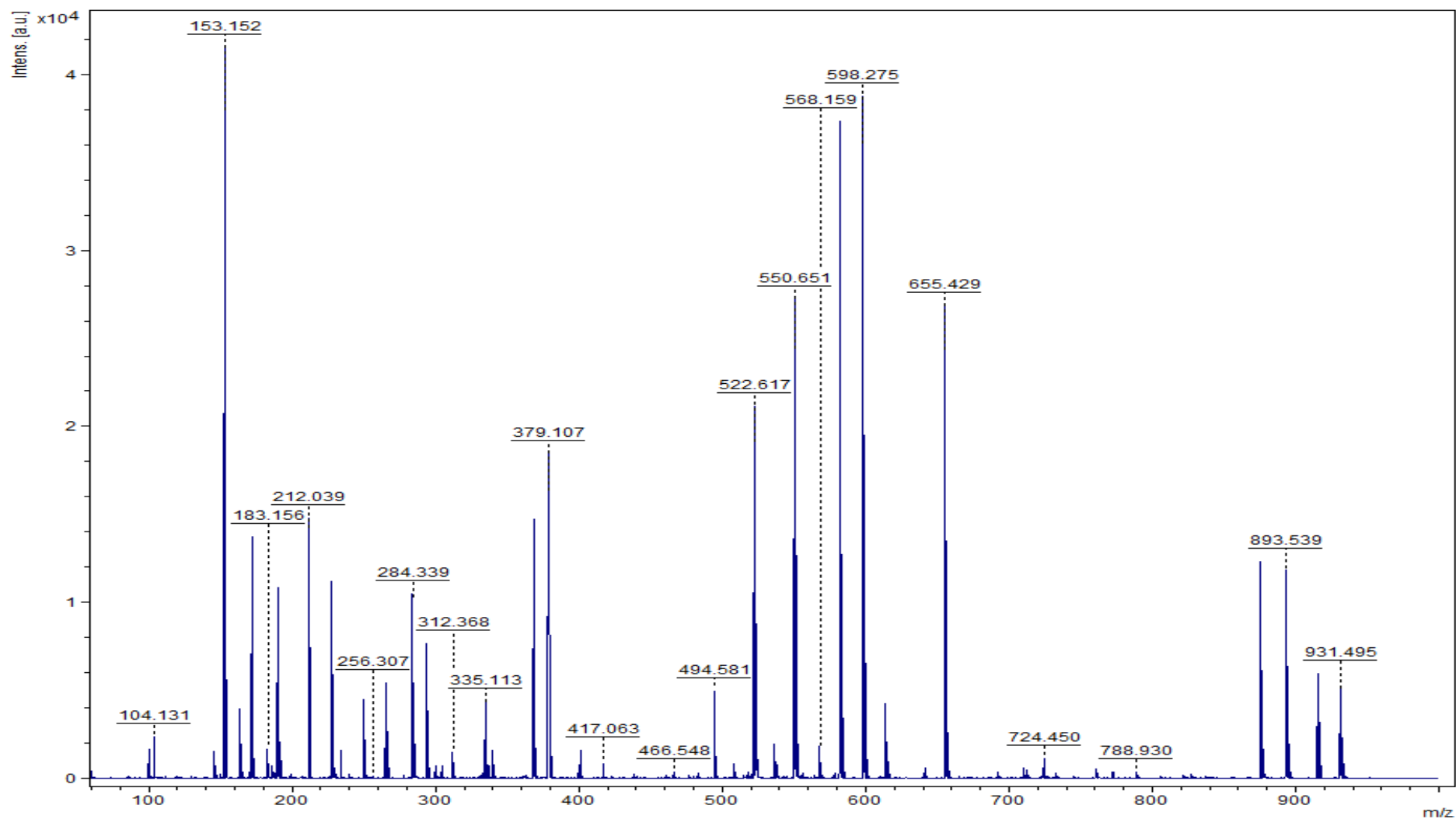


Figura A-2.9. Full-scan de MALDI-TOF para a molécula **4bb**, em solução, referente ao pico 1.

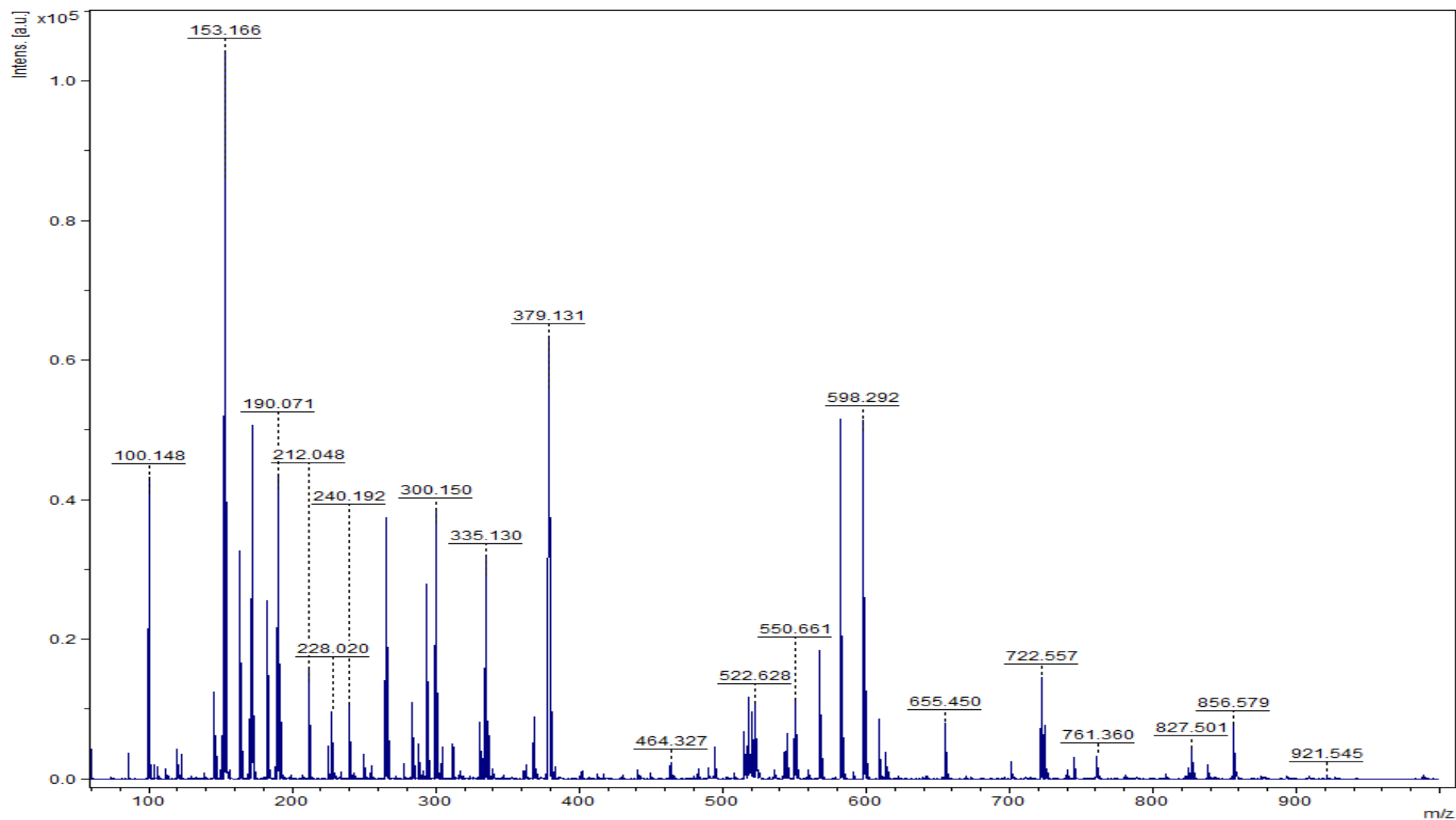


Figura A-2.10. Full-scan de MALDI-TOF para a molécula **4bb**, em solução, referente ao pico 2.



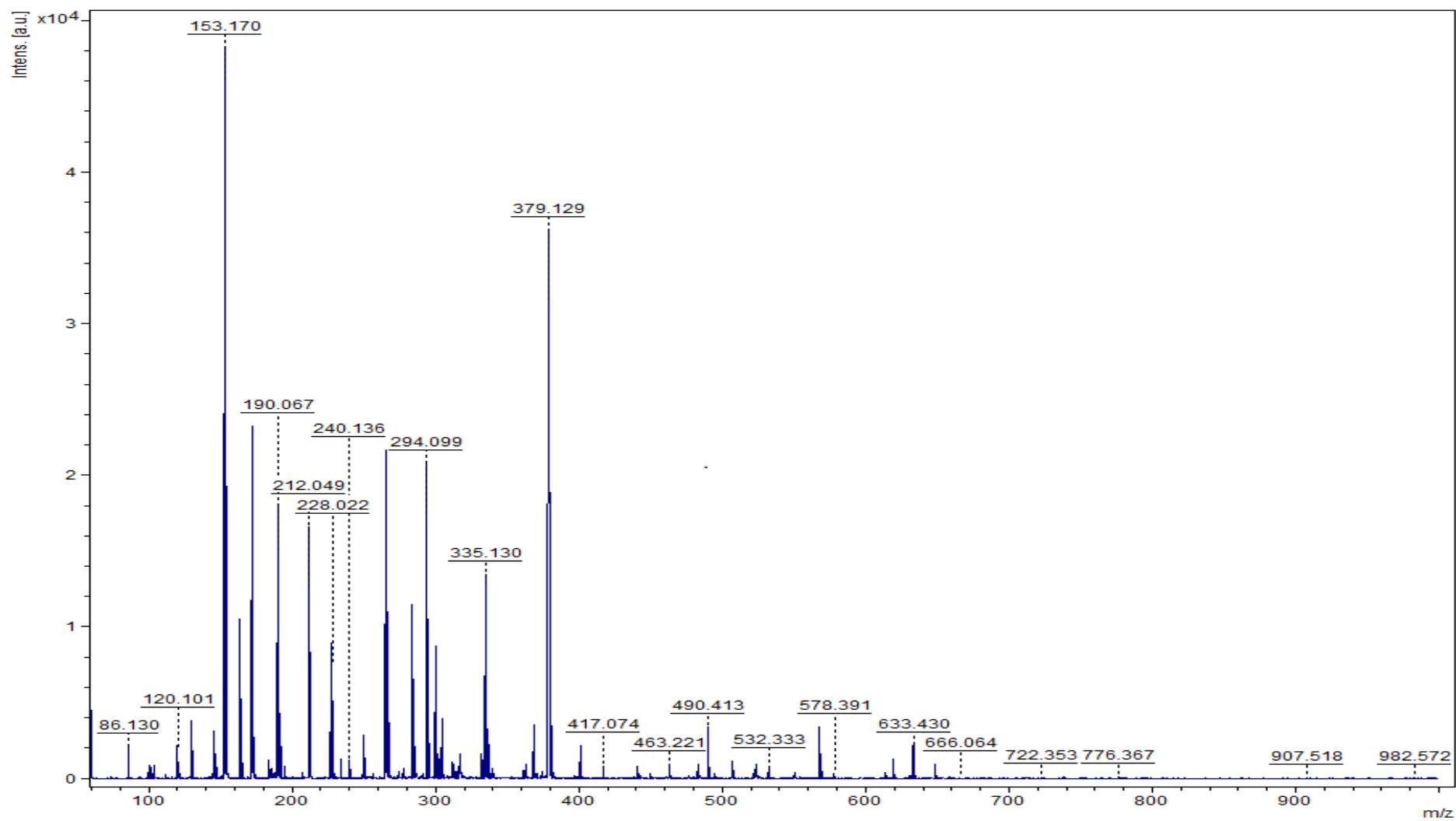


Figura A-2.11. Full-scan de MALDI-TOF (Não purificado) para a molécula **4a**, em Micro-ondas.

## A-3- Espectros UV-VIS

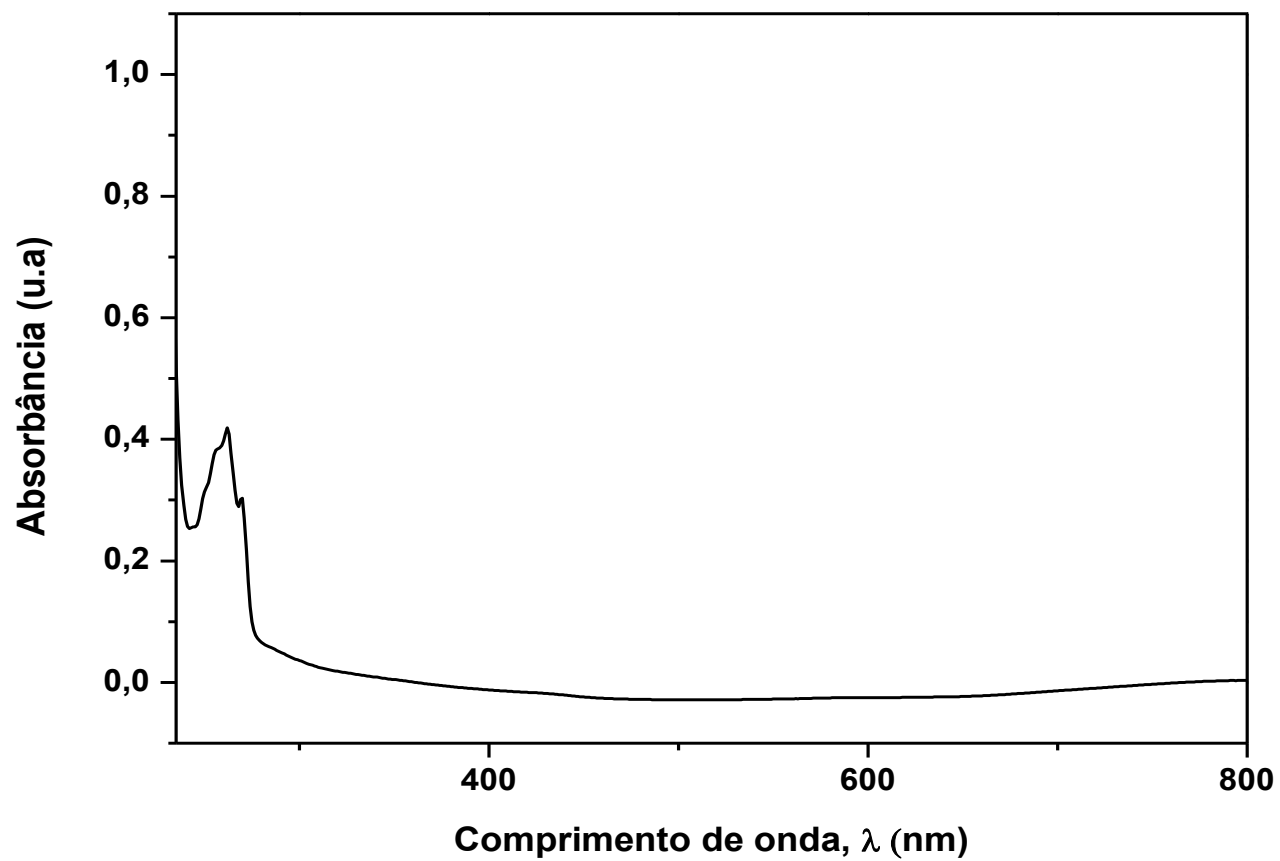


Figura A-3.1. Espectro UV-VIS para o trifenilmetano da molécula **4bb**, reação sob a resina.

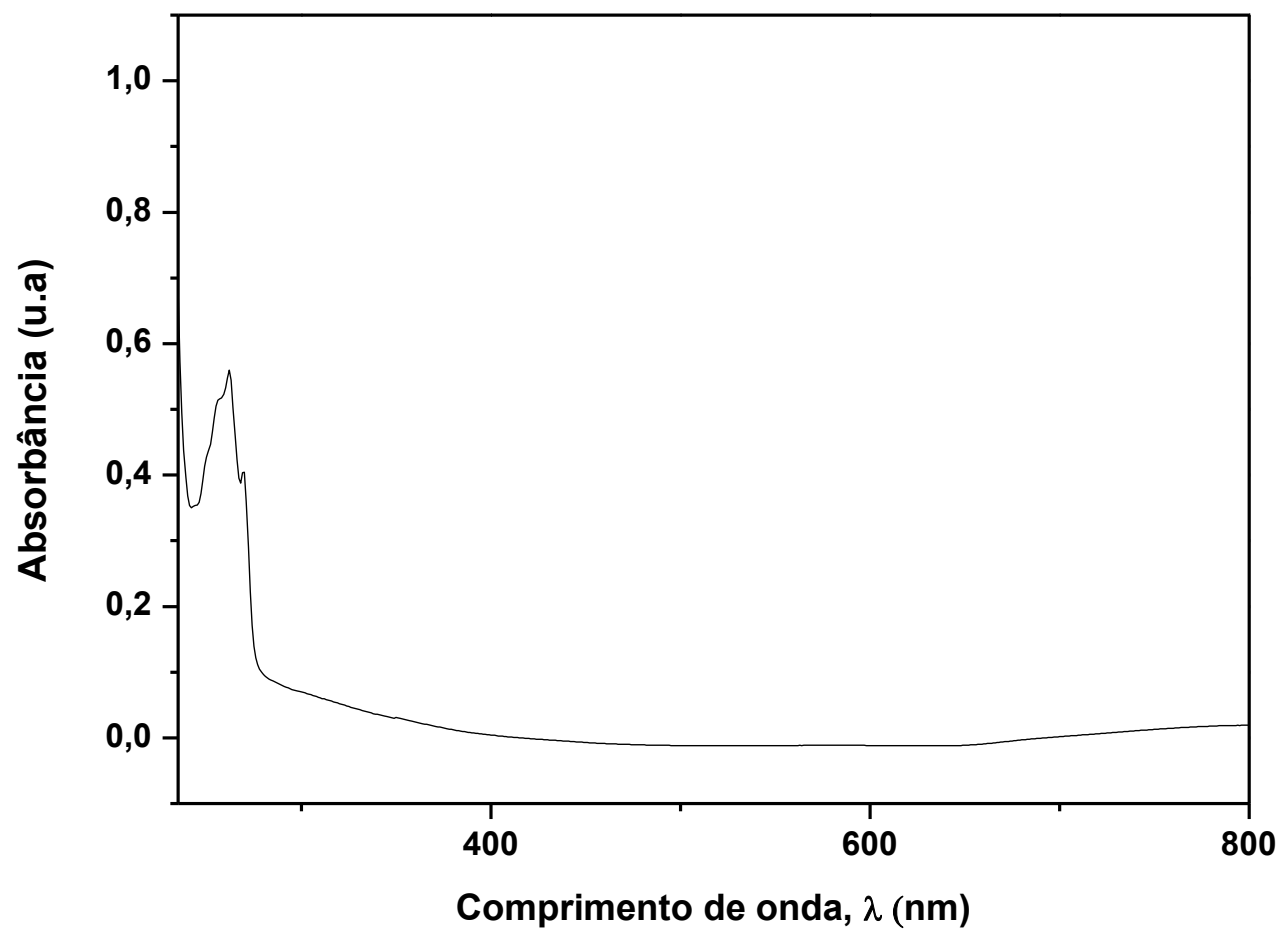


Figura A-3.2. Espectro UV-VIS para o trifenilmetano da molécula **4a**, reação em micro-ondas.