



Universidade de Brasília

Instituto de Química

Avaliação da atividade modulatória de diferentes classes químicas frente a expressão de fenótipos de *Quorum Sensing* de uma cepa de *Chromobacterium*.

Fernanda Favero

Tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Angelo Henrique de Lira Machado

Co-orientador: Prof. Dr. Alex Leite Pereira

Brasília

Junho de 2023

Universidade de Brasília
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Avaliação da atividade modulatória de diferentes classes químicas frente a expressão de fenótipos de *Quorum Sensing* de uma cepa de *Chromobacterium*.

Fernanda Favero

Tese apresentada como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Angelo Henrique de Lira Machado
Co-orientador: Prof. Dr. Alex Leite Pereira

Área de concentração: Química Orgânica

心臓を捧げよ

“Shinzō wo sasageyo”

Tradução oficial: Dedique-se de corpo e alma.

Hajime Isayama – Ataque dos Titãs

Agradecimentos

A Deus e a todos os espíritos de luz que me guiaram neste caminho.

A minha família, meus pais, irmãos, cunhadas, sobrinhos, tios e primos pelo suporte e carinho. Em especial minha mãe Lita e meu irmão Gabriel que me acompanharam ativamente nesta jornada. Como diria Isaac Newton se vi mais longe foi por estar sobre ombros de gigantes. A rede de apoio de vocês foi fundamental para a conclusão desse trabalho. Ao meu esposo maravilhoso Iago que foi minha força nesses ultimos tempos, foi minhas pernas quando precisei, e sempre ao meu lado, me animando e me fazendo progredir. Aos meus gatos Fumaça e Nina pelo amor, ronrons e lambejos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Angelo Machado por ter me aceito como aluna, pela orientação e cooperação nesses mais de 10 anos de parceria. Obrigada por ter sido o meu guia nas estradas tortuosas da pesquisa sempre acreditando no meu potencial e me fazendo expandir os meus horizontes. Obrigada por sempre tratar os assuntos com leveza e por confiar em mim todas as vezes que precisei.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Alex Leite Pereira pela orientação e por me mostrar um outro lado da ciência cheio de desafios e muito divertido. Quando entrei na pós-graduação não imaginava que sairia tão apaixonada pela microbiologia, por isso e por tudo mais, muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Werner Treptow que ajudou na orientação dessa tese. Suas contribuições foram muito “poderosas” para o andamento do trabalho e para a escrita dos artigos. Mesmo estando em outro país sempre conseguia um tempinho para contribuir.

Aos meus amigos Luís e Raquel, companheiros da graduação que agora são para a vida toda, muito obrigada por todo o apoio, carinho e por fazerem essa jornada mais leve. Não poderia deixar de agradecer ao Thyago e Thomé também.

Aos amigos da química que perpassaram as barreiras físicas dos laboratório e de estados: Gabi, Michele, Veronica, Gisele e Julia. Em especial a Thaissa e ao Felipe por todo apoio, risadas, organizações de festas, doces, hamburques e muito mais. Como ja foi dito Acadêmicos da orgânica foi a maior conquista desse doutorado.

Ao Saulo um amigo que a pós-graduação me deu. Ele quem me ensinou a maioria dos procedimentos do laboratório, as minúcias, os pulos-do-gato, quem fez inúmeros espectros, testes biológicos, extrações, quantificações e muito mais. Obrigada pelas inumeras caronas, pelos almoços, por ter se aventurado no mundo da biologia comigo.

Para ser sincera um simples obrigada não expressa a minha gratidão pela sua amizade e auxílio nesse tese, um pedaço dela também é sua. Gratuluz!

Aos colegas, antigos e novos, e professores do Litmo. Obrigada por todo o apoio, conversar com café, ajudas, conselhos e muito mais,

Aos técnicos da FCE: Nara e Elias que me auxiliaram muito e abriram portas, vocês fizeram muito mais que o trabalho de vocês.

Aos técnicos da CAIQ: Lennine, Alan, Cleber e Luiz, pelas análises.

A UnB e ao Instituto de Química pelos recursos fornecidos.

A CAPES pela concessão de bolsa de estudos, presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Resumo

Quorum Sensing (QS) é um processo de comunicação bacteriana responsável por controlar a expressão de diversos fenótipos como bioluminescência, produção de metabólitos, ativação de mecanismo de defesa, entre outros. Ele acontece por meio de autoindutores (AI), que podem se apresentar como moléculas pequenas ou como peptídeos. Dessa forma, a manipulação dessa comunicação é estudada a fim de se obter respostas desejadas de comportamentos bacterianos. A cepa CV026 é um conhecido modelo de comunicação bacteriana e foi escolhida para a execução deste trabalho devido à resposta visual de seu fenótipo controlado por QS, a produção de violaceína. No capítulo 1 desse trabalho, foram implementados experimentos biológicos com CV026 que permitiram avaliar a modulação do seu QS: a quantificação de produção de violaceína e o consumo de quitina, ambos fenótipos controlado por QS em CV026. Experimentos voltados a se entender o mecanismo de ação de moléculas moduladoras desses fenótipos também foram implementados: ensaio de competição pela proteína receptora do autoindutor de CV026, a CviR; e ensaio de quantificação de genes controlados por QS. No capítulo 2 foram estudadas *N*-(2-hidroxietil)amidas e morfolinamidas planejadas racionalmente como simplificação estrutural do autoindutor do QS da cepa CV026 e de um conhecido inibidor deste QS. De forma geral, as *N*-(2-hidroxietil)amidas e as morfolinamidas inibiram em até 50% a produção de violaceína em uma concentração de 1,25 mM e 2,5 mM respectivamente. Ensaio computacionais de docking molecular do complexo entre essas moléculas e a CviR mostraram que elas se posicionam preferencialmente no domínio de ligação do AI em uma pose semelhante ao AI. *N*-(2-hidroxietil)amidas e morfolinamidas baseadas na estrutura do inibidor utilizado como controle positivo de inibição apresentaram uma perda considerável de sua inibição. Duas moléculas baseadas na hibridização molecular entre a *N*-(2-hidroxietil)amida mais ativa e o controle positivo de inibição apresentam resultados similares aos apresentados pelas suas moléculas originais. As duas moléculas deste capítulo que apresentaram os melhores resultados de inibição tiveram seu mecanismo de ação estudado. Apesar de não apresentarem inibição do consumo de quitina, no experimento de competição pelo sítio ativo da proteína, as duas moléculas conseguiram manter 50% de inibição da produção de violaceína mesmo com a duplicação da concentração do AI, porém a síntese de violaceína foi reestabelecida em concentrações acima de 200 µM. O experimento de RT-qPCR permitiu confirmar que a inibição apresentada por essas moléculas acontece em nível transcricional. No capítulo 3, foi estudada uma cromenona anteriormente identificada como inibidora do QS em *Vibrio harveyi* bem como algumas impurezas relacionadas à sua síntese e degradação. A cromenona e uma impureza de síntese apresentaram resultados iguais de inibição na mesma concentração de teste, 65% a 625 µM. No teste de competição pela CviR, a cromenona apresentou a melhor inibição da síntese de violaceína mesmo com o aumento da concentração do AI. Não foi observada diminuição no consumo de quitina. Contudo, o experimento de RT-qPCR permitiu confirmar que a inibição observada acontece em nível transcricional. Por fim, no capítulo 4, algumas δ-valerolactonas foram estudadas frente ao QS de CV026. A molécula mais ativa apresentou 85% de inibição de síntese de violaceína em 625 µM. O experimento computacional de docking molecular apresentou esta molécula no domínio de ligação do AI, mas invertida com relação à pose do AI. Esta substância também apresentou o melhor resultado no experimento de competição mantendo 50% de inibição de violaceína mesmo com o aumento de 2000 vezes da concentração de AI, além de inibir o consumo de quitina. Por fim, o experimento de RT-qPCR permitiu confirmar que essa molécula inibe o QS de CV026 em nível transcricional.

Palavras-chave: quorum sensing, CV026, simplificação estrutural, cromenona, δ-valerolactonas.

Abstract

Quorum Sensing (QS) is a bacterial communication process responsible for controlling the expression of several phenotypes such as bioluminescence, metabolite production, and defense mechanism activation. It happens through autoinducers (AI), which can be presented as small molecules or as peptides. Thus, this communication's manipulation is studied to obtain desired responses of bacterial behaviour. CV026 is a well-known model of bacterial communication and was chosen for this work due to the visual response of its QS-controlled phenotype, the production of violacein. In Chapter 1, biological experiments were implemented with CV026 that allowed the evaluation of its QS modulation: the quantification of violacein production and chitin consumption, both phenotypes controlled by QS in CV026. Experiments aimed at understanding the mechanism of action of molecules that modulate these phenotypes were also implemented: competition assay for the CV026 autoinducer receptor protein, the CviR; and QS-controlled gene quantification assay. In Chapter 2, rationally designed *N*-(2-hydroxyethyl)amides and morpholinamides were studied as a structural simplification of the QS autoinducer of the CV026 strain and of a known inhibitor of this QS. In general, *N*-(2-hydroxyethyl)amides and morpholinamides inhibited violacein production by up to 50% at a concentration of 1.25 mM and 2.5 mM, respectively. Molecular docking assays of the complex between these molecules and the CviR showed that they preferentially position themselves in the AI binding domain in an AI-like pose. *N*-(2-hydroxyethyl)amides and morpholinamides based on the structure of the inhibitor used as a positive inhibition control showed a considerable loss of inhibition. Two molecules based on molecular hybridization between the most active *N*-(2-hydroxyethyl)amide and the positive inhibition control showed results similar to those presented by their original molecules. The two molecules in this chapter that showed the best inhibition results had their mechanism of action studied. Although they did not appear to inhibit chitin consumption, in the competition experiment for the active site of the protein, the two molecules managed to maintain a 50% inhibition of violacein production even with the doubling of the AI concentration, but violacein synthesis was reestablished in concentrations above 200 μ M. The RT-qPCR experiment confirmed that the inhibition presented by these molecules occurs at the transcriptional level. In Chapter 3, a chromenone previously identified as a QS inhibitor in *Vibrio harveyi* was studied, as well as some impurities related to its synthesis and degradation. Chromenone and a synthetic impurity showed equal inhibition results at the same test concentration, 65% at 625 μ M. In the CviR competition test, chromenone showed the best inhibition of violacein synthesis even with the increase in AI concentration. No decrease in chitin consumption was observed. However, the RT-qPCR experiment confirmed that the observed inhibition occurs at the transcriptional level. Finally, in Chapter 4, some δ -valerolactones were studied against the QS of CV026. The most active molecule showed 85% inhibition of violacein synthesis at 625 μ M. The computational molecular docking experiment showed this molecule in the AI binding domain but inverted when compared to the AI pose. This substance also showed the best result in the competition experiment, maintaining 50% of violacein inhibition even with a 2000-fold increase in AI concentration and inhibiting chitin consumption. Finally, the RT-qPCR experiment confirmed that this molecule inhibits CV026 QS at the transcriptional level.

Keywords: quorum sensing, CV026, structural simplification, chromenone, δ -valerolactones.

Sumário

Índice de Figuras.....	XII
Índice de Esquemas.....	XVI
Índice de Tabelas	XVII
Capítulo 1 – Desenvolvimento de testes biológicos para avaliação de interação em Quorum Sensing em CV026	1
1.1.Introdução	2
1.1.1. <i>Quorum Sensing</i>	2
1.1.2. <i>Quorum Quenching</i>	11
1.1.3. Biossíntese de violaceína em <i>Chromobacterium</i>	14
1.1.4. Mecanismo de ação de QS em espécies de <i>Chromobacterium</i>	15
1.1.5. QQ em CV026	18
1.2. Objetivos	21
1.2.1. Objetivos específicos	21
1.3.Resultados e Discussão	22
1.3.1. Síntese do inibidor conhecido 56	22
1.3.2. Testes Biológicos	25
1.3.2.1.Desenvolvimento de teste em caldo de cultivo para expressão de violaceína em CV026	25
1.3.2.2.Teste de competição	28
1.3.2.3.Teste de hidrólise de quitina	29
1.3.2.4. RT-qPCR	32
1.4.Conclusões	35
Capítulo 2 – Simplificação estrutural do autoindutor e de um inibidor conhecido de CV026.....	36
2.1. Introdução.....	37
2.1.1. <i>N</i> -(2-hidroxi)etil)amidas.....	38
2.1.2. Síntese de <i>N</i> -(2-hidroxi)etil)amidas.....	39
2.1.3. <i>N</i> -(2-hidroxi)etil)amidas como inibidores de QS em CV026.....	40
2.1.4. Morfolinas	42
2.1.5. Síntese de morfolinas	43
2.2. Objetivos.....	46
2.2.1. Objetivos específicos.....	46
2.3. Resultados e Discussão.....	47
2.3.1. Síntese de derivados de morfolina.....	47
2.3.2. Teste de inibição de síntese de violaceína pela ação das <i>N</i> -(2-hidroxi)etil)amidas e das morfolinamidas.....	52
2.3.3. Docking molecular dos complexos entre <i>cviR</i> de CV026 e as <i>N</i> -(2-hidroxi)etil)amidas e as morfolinamidas	55
2.3.4 Simplificação estrutural do inibidor 56	60

2.3.5. Prospecção de novos possíveis inibidores	63
2.3.6. Teste de competição pelo sítio de ligação da proteína CviR.....	71
2.3.7. Teste de hidrólise de quitina.....	72
2.3.8 RT-qPCR	73
2.4. Conclusões	75
Capítulo 3 – Estudo de cromenonas como possíveis inibidores de <i>Quorum Sensing</i> em CV026.....	77
3.1. Introdução	78
3.2. Objetivos.....	82
3.2.1. Objetivos Específicos	82
3.3. Resultados e Discussão.....	83
3.3.1. Teste de inibição de síntese de violaceína em CV026.....	83
3.3.2. Docking Molecular	85
3.3.3. Teste de competição de sítio de ligação da proteína CviR.....	88
3.3.4. Teste de hidrólise de quitina.....	89
3.3.5. RT-qPCR.....	90
3.4. Conclusões	92
Capítulo 4 – Estudo sobre as 2-alquenil- δ -valerolactonas como possíveis inibidores de Quorum Sensing em CV026	94
4.1. Introdução	95
4.1.1. 2-alquenil- δ -valerolactonas.....	97
4.2. Objetivos.....	99
4.2.1. Objetivos Específicos	99
4.3. Resultados e Discussão	100
4.3.1. Avaliação de inibição de síntese de violaceína em CV026.....	100
4.3.2. Docking molecular das 2-alquenil- δ -valerolactonas	102
4.3.3. Avaliação comparativa entre os resultados de percentual de inibição obtidos para as 2-alquenil- δ -valerolactonas e as energias de interação calculadas para seu complexo com CviR.....	104
4.3.4 Teste de competição de sítio de ligação da proteína CviR	108
4.3.5. Teste de hidrólise de quitina em CV026	109
4.3.6. Ensaios de RT-qPCR para análise de expressão do operon <i>vioABCDE</i>	110
4.4. Conclusões	112
Conclusões gerais.....	114
Parte experimental	117
Materiais e métodos	117
Procedimentos e dados espectrométricos.....	118
Bibliografia	133
Apêndices	149

Lista de Abreviaturas e Acrônimos

AHL – *N*-acil-homoserinalactona

AI – autoindutores

AIP – peptídeos autoindutores

CCD – cromatografia em camada delgada

d – duplete

dd – duplo duplete

ddd – duplo duplo duplete

dddd – duplo duplo duplo duplete

DIC – *N,N'*-diisopropilcarbodiimida

DFT – teoria do funcional de densidade

DMF – dimetilformamida

DMSO – dimetilsufóxido

DPD – 4,5-dihidroxi-2,3-pentanodiona

DPO – 3,5-dimetilpirazin-2-ol

DBD – *DNA binding domain*

EDC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

CG-EM – cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massas

Hz – Hertz

IV – infravermelho

J – constante de complemento

LBD – ligand binding domain

MTA – 5'-*S*-metil-5'-tioadenosina

ppm – partes por milhão

q – quarteto

QS – *quorum sensing*

qt – quarteto de tripleto

qPCR – reação em cadeia da Polimerase quantitativa

RMN de ¹³C – ressonância magnética nuclear de carbono 13.

RMN de ¹H – ressonância magnética nuclear de hidrogênio 1.

SAM – *S*-adenosilmetionina

SHA – *S*-adenosil-*L*-homocisteína

SRH – *S*-ribosehomocisteína

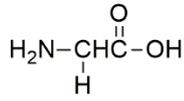
s – simpleto

t – tripleto

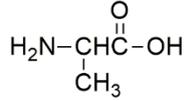
ta – temperatura ambiente

δ – deslocamento químico

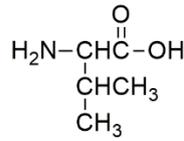
Lista de Aminoácidos



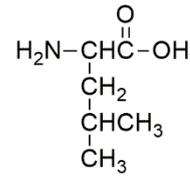
Glicina
(Gly - G)



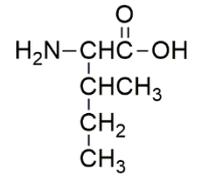
Alanina
(Ala - A)



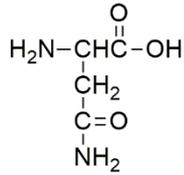
Valina
(Val - V)



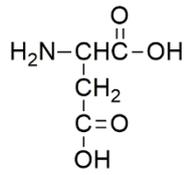
Leucina
(Leu - L)



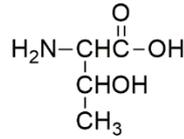
Isoleucina
(Ile - I)



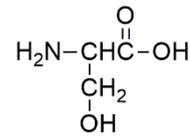
Asparagina
(Asn - N)



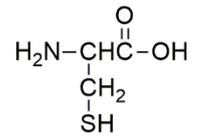
Ácido aspártico
(Asp - D)



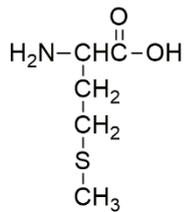
Treonina
(Thr - T)



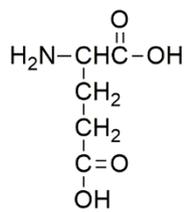
Serina
(Ser - S)



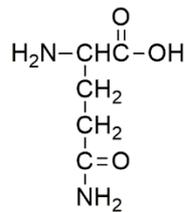
Cisteína
(Cys - C)



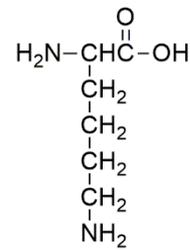
Metionina
(Met - M)



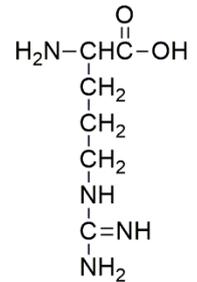
Ácido glutâmico
(Glu - E)



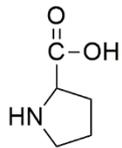
Glutamina
(Gln - Q)



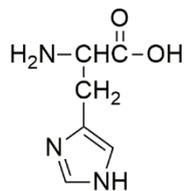
Lisina
(Lys - K)



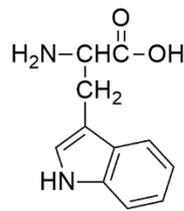
Arginina
(Arg - R)



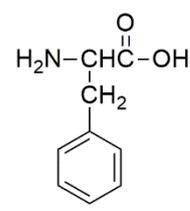
Prolina
(Pro - P)



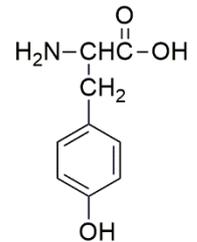
Histidina
(His - H)



Triptofano
(Trp - W)



Fenilalanina
(Phe - F)



Tirosina
(Tyr - Y)

Índice de Figuras

Figura 1.1- Exemplos de AI's de diferentes bactérias Gram-negativas.....	4
Figura 1.2 – AIP's sintetizados por cepas de <i>S. aureus</i>	7
Figura 1.3 – Estrutura química de Fator A, autoindutor de <i>S. griseus</i>	10
Figura 1.4 – Estruturas ativas do AI-3, 25 e 26 , e da epinefrina, 27 , e norepinefrina, 28	10
Figura 1.5 – Moléculas estudadas por Shoham e colaboradores	12
Figura 1.6 – Solanamida B e seu peptídeomimético, 32 , estudos por Machado e colaboradores.....	13
Figura 1.7 – Estrutura química da Violaceína e da Deoxiviolaceína	14
Figura 1.8 - Estrutura do complexo CviR:Cl resolvida por Raio X. CL é um antagonista de QS de <i>C. violaceum</i> . Em azul e laranja são mostrados os monômeros em sua forma cruzada	17
Figura 1.9 – A: Interação da CviR com seu autoindutor C6-AHL, molécula em azul; B: Interação da CviR com um autoindutor com 8 carbonos, C8-AHL, molécula em roxo; C: Interação da CviR com um autoindutor com 10 carbonos, C10-AHL, molécula em laranja.....	17
Figura 1.10 – Interações entre a proteína CviR e C6-AHL observadas na estrutura cristalográfica obtida por Raio-X. Distância em angstroms representada ao lado das linhas tracejadas	18
Figura 1.11 – Polímero estudado por Sheperd e colaboradores.....	19
Figura 1.12 - Os compostos 54 e 55 são exemplos das moléculas altamente inibidoras estudadas por Farallelo e Manner	19
Figura 1.13 – Composto 46 inibidor estudado por Bassler e colaboradores.....	20
Figura 1.14 – Espectro de RMN ¹ H da molécula 56	24
Figura 1.15 – Gráfico de inibição para a molécula 56	28
Figura 1.16 – Teste de competição entre o AI e a molécula 56	29
Figura 1.17 – Teste preliminar de consumo de quitina. Em (A) o meio como um todo foi suplementado com 51 ; Em (B) apenas o inóculo bacteriano foi suplementado com 51 ; Em (C) e (D) a alíquota de inóculo bacteriano foi de 5µL, enquanto, em (A) e (B) a alíquota foi de 10 µL	31
Figura 1.18 - Teste de consumo de quitinas (A): Controle positivo (CP) com 24 horas de incubação, mostrando halo de crescimento microbiano e síntese de violaceína; (B): Molécula 46 com 24 horas de incubação, apenas halo de crescimento bacteriano visualizado (C) Controle Negativo (CN – bactéria sem presença de 51), apenas halo de crescimento bacteriano observado com 24 horas de incubação; (D): CP com 72 horas de incubação, halo de crescimento bacteriano, produção de violaceína e consumo de quitina observado; (E): Molécula 56 com 72 horas de incubação, apenas halo de crescimento bacteriano observado.(F) CN com 72 horas de incubação, apenas halo de crescimento bacteriano observado.....	32
Figura 1.19 – Gráfico de expressão relativa dos genes <i>vioA</i> e <i>vioC</i> na presença ou não da molécula 56 ..	34
Figura 2.1 - <i>Pladienolide B</i> e seus análogos	37
Figura 2.2 – Exemplos de NAE's com funções biológicas.....	38
Figura 2.3 - Resultados apresentados por Machado e colaboradores no estudo da ação de <i>N</i> -(2-hidroxi)etil)amidas, derivados de 2-oxazolininas e ácidos carboxílicos frente a QS de CV026.....	41
Figura 2.4 – (A) Moléculas estudadas por Machado e colaboradores apresentaram interferência no QS de CV026. (B) Placa de controle, sem adição de 51 . (C) Placa de inibição de violaceína. (1) Poço referente à molécula 98 ; (2) Poço referente à molécula 97 ; (3) Poço referente à molécula 95 ; (4) Poço referente à molécula 96	42
Figura 2.5 – Exemplos de estruturas com funções biológicas contendo um anel morfolínico	43
Figura 2.6 – C6-AHL, 51 , e suas simplificações <i>N</i> -(2-hidroxi)etil)hexanamida e 1-morfolinahexanona ...	46
Figura 2.7 – Espectro de RMN de ¹ H da 1-morfolinanonona 119 em DMSO.....	50
Figura 2.8 . – Sobreposição dos espectros de RMN de ¹ H da 1-morfolinanonona 119 a 25°C (vermelho) e a 60°C (azul)	51
Figura 2.9 – Gráfico de inibição de biossíntese de violaceína para <i>N</i> -(2-hidroxi)etil)decamida 121 (A) <i>N</i> -(2-hidroxi)etil)benzamida 123 (B) no ensaio em fase líquida	54
Figura 2.10 – Gráfico de inibição de biossíntese de violaceína para 127 (A) 131 (B)	55

Figura 2.11 – Interações importantes entre a proteína CviR e a molécula 56	56
Figura 2.12 - Sobreposição da conformação de 56 advinda do experimento de difração de raio-X (modelo tubular) e do re-ancoramento molecular (modelo bola-bastão)	57
Figura 2.13 - (A) Sobreposição entre o autoindutor cognato 51 e a etanolamida 121 . (B) Interações entre a etanolamida 121 e os resíduos de aminoácidos no sítio de ligação do AI. (C) Sobreposição entre autoindutor cognato 51 e a morfolinamida 127 . (B) Interações entre 127 e os resíduos de aminoácidos no sítio de ligação do AI	58
Figura 2.14 - (A) Sobreposição o autoindutor cognato 51 e a etanolamida 123 . (B) Interações entre 123 e os resíduos de aminoácidos no sítio de ligação do AI. (C) Sobreposição o autoindutor cognato 51 e a morfolinamida 131 . (D) Interações entre 131 e os aminoácidos no sítio de ligação do AI	59
Figura 2.15 - Ensaio de inibição de violaceína para a (A) etanolamida 134 e para a (B) morfolinamida 135	61
Figura 2.16 - (A) Sobreposição da etanolamida 134 com o inibidor 56 no sítio de ligação do AI de CviR de CV026 (B) Interações entre a molécula 134 e os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação da proteína receptora CviR	62
Figura 2.17 - (A) Sobreposição da morfolinamida 135 com o inibidor 56 no sítio de ligação do AI de CviR de CV026 (B) Interações entre a morfolinamida 135 e os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação do AI no monômero da CviR que apresentou menor energia	63
Figura 2.18 – Planejamento racional de novos inibidores de biossíntese de violaceína em CV026 baseados no inibidor 56 e na etanolamida 123	64
Figura 2.19 - (A) Sobreposição entre 51 e 13628 . (B) Interações entre 136 e os aminoácidos no sítio de ligação do 51 . (C) Sobreposição entre 51 e 137 . (D) Interações entre 137 e os aminoácidos no sítio de ligação do 51 . (E) Sobreposição entre 51 e 138 . (F) Interações entre 138 e os aminoácidos no sítio de ligação do 51	65
Figura 2.20 - Cromatograma de uma das tentativas de bromação do composto 123 . O primeiro pico tem $m/z=122$, característico do ácido benzoico, sugerindo a hidrólise da amida de 123 com uma proporção de 92%. Já o segundo pico corresponde ao produto bromado (8%).....	67
Figura 2.21 - Cromatograma (CG/EM) da reação entre a molécula 136 e o p-clorofenol, observa-se 2 picos um referente ao p-clorofenol e o outro à oxazolina 140	68
Figura 2.22 - Observação do íon m/z 148,01759 como evidência da formação de oxazolina 132 por EMAR (ESI modo positivo).....	70
Figura 2.23 - (A) Ensaio de inibição de violaceína para 136 . (B) Ensaio de inibição de violaceína para 138	71
Figura 2.24 - Ensaio de competição para as moléculas (A) 123 na concentração de 500 μ M. e (B) 134 na concentração de 625 μ M.....	72
Figura 2.25 - Ensaio para detectar inibição da atividade quitinolítica e da síntese de violaceína: (A) Controle positivo de consumo de quitina e da síntese da violaceína (CP). (B) experimento com a molécula 113 na presença do AI 51 (C) experimento com a molécula 126 na presença do AI 51 . (D) Controle negativo para a inibição do consumo de quitina e da síntese da violaceína (CN), o halo de crescimento se encontra na parte superior do poço. (E) experimento de validação da resposta inibitório com o inibidor 56 na presença do AI 51 , o halo de crescimento de encontra na parte superior do poço.....	73
Figura 2.26 - Gráfico da expressão relativa, em comparação ao gene 16S, dos genes <i>vioA</i> e <i>vioC</i> na presença dos inibidores 123 e 134	74
Figura 3.1 - Estrutura da cromenona, 142 , flavona, 143 , isoflavona, 144 , e tetrahidrocromenonas, 145	78
Figura 3.2 - Estrutura dos compostos 146 e 147 utilizados, comercialmente, como antiasmáticos	78
Figura 3.3 - Estrutura do composto 148 , molécula que teve o melhor resultado como diurético no estudo de Supran e colaboradores	79
Figura 3.4 - Estrutura do composto 149 , única molécula que apresentou dupla inibição dos alvos testados por Gutschow	79
Figura 3.5 - Estrutura da molécula 150 , melhor resultado do trabalho de Matsson e colaboradores, sendo citotóxico contra três tipos de células cancerígenas.....	79
Figura 3.6 - Estrutura das moléculas 151 e 152 estudadas como possíveis drogas anticâncer	80
Figura 3.7 - Estrutura das moléculas 145 e 153 estudadas por Santos e colaboradores	80

Figura 3.8 - Estrutura da moléculas 154 inibidora de QS de <i>V. harveyi</i> estudada por Machado e colaboradores.....	81
Figura 3.9 - Estrutura 155 a 157 forma atribuídas a impurezas de degradação forçada da tetrahydrocromenona 154 , e estruturas 158 e 1598 foram atribuídas a impurezas de síntese da moléculas 154	81
Figura 3.10 - Equilíbrio em meio ácido entre as moléculas 154 e 158	83
Figura 3.11 - Gráficos de inibição de síntese de violaceína para as moléculas: (a) 154 e (b) 158	84
Figura 3.12 - Sobreposição, dentro do LDB, da molécula 51 com a : (a) (R)- 154 (b) (S)- 154 , (c) (R)- 155 e (d) (S)- 155	86
Figura 3.13 - Sobreposição, dentro do LBD, da molécula 51 com a: (a) (R)- 156 e (b) (S)- 156 . Sobreposição, dentro do LBD, da molécula 56 com a (c) (R)- 156 . (d) Sobreposição entre (R)- 156 e (S)- 156 dentro do LBD, essa última aparece de forma mais transparente.	87
Figura 3.14 - Sobreposição, dentro do LDB, da molécula 51 com a : (a) (R)- 157 , (b) (S)- 157 , . (c) 158 e (d) 159	88
Figura 3.15 - Gráficos de competição pelo sítio de ligação para as moléculas: (a) 154 e (b) 158	89
Figura 3.16 - Ensaios de consumo de quitina: (a) Controle positivo (CP); (b) 154 ; (c) 158 ; (d) controle negativo (CN) e (e) 56 . Os arcos em azul demarcam o tamanho do poço de teste, os em verde demarcam o halo de consumo de quitina do controle positivo e os em rosa demarcam o crescimento das colônias bacteriana onde não há presença de 51	90
Figura 3.17 - Expressões relativas dos genes <i>vioA</i> e <i>vioC</i> sem QSI e nas presenças das moléculas 154 e 158 , utilizando <i>gyrB</i> como referência.....	91
Figura 4.1 - Estruturas gerais das α , β , γ , δ e ω -lactonas	95
Figura 4.2 - Estrutura da Vibrilactona, 160 ; Obafluorina, 161 , e da Tetrahidrolipstatina, 162	95
Figura 4.3 - Estrutura representativa de uma <i>N</i> -acil-homoserinalactona.....	96
Figura 4.4 - Estruturas das moléculas 163 , 164 e 165	96
Figura 4.5 - Estruturas das moléculas 166 , 167 e 168	97
Figura 4.6 - Estruturas das moléculas Vermixocina A, 169 , e (+)-cefalosporolide B, 170	97
Figura 4.7 - Estruturas das moléculas 171 a 173	98
Figura 4.8 . Gráficos de inibição de síntese de violaceína para (A) 176E e (B) 179E e o autoindutor 51 (HHL)	100
Figura 4.9 . Sobreposição das estruturas obtidas por <i>docking molecular</i> do autoindutor 51 e as moléculas (A) 176E , (B) 179E , (C) 180E e (D) 183E	103
Figura 4.10 – (A) Estrutura do controle negativo de inibição; (B) Complexo, obtido pelo docking cego, entre a CviR: 184 , a estrutura 184 se encontra em azul. Já o autoindutor (51) é mostrado em amarelo para marcar o local do bolsão de interação. (C) Docking forçado utilizando uma caixa que contemplava apenas o sítio de interações. Novamente, é possível observar que a 184 não se encaixa no bolsão de interações	105
Figura 4.11 – (A) Gráfico 3D da análise dos parâmetros das 2-alquenil- δ -valerolactonas. (B) Gráfico Energia relativa contra Inibição das 2-alquenil- δ -valerolactonas	107
Figura 4.12 – Ensaio de competição dentre 179E e autoindutor 51 (HHL).....	109
Figura 4.13 – Experimento de consumo de quitina: (A) controle negativo (CN); (B) controle positivo (CP); (C) inibidor 56 e (D) 179E . Os arcos em verde demarcam o tamanho do poço de teste, os em azul claro demarcam o halo de consumo de quitina do controle positivo	110
Figura 4.14 – Gráfico de expressão relativa de <i>vioABCDE</i> em ensaios de RT-PCR verificada por sondagem dos <i>loci</i> <i>vioA</i> e <i>vioC</i> na ausência (controle) ou presença da molécula 179E	111

Índice de Esquemas

Esquema 1.1 – Desenho esquemático do controle de bioluminescência por QS em <i>V. Fischeri</i> em simbiose com lula <i>E. scolopes</i>	3
Esquema 1.2 - Ciclo enzimático de síntese de AHL.....	4
Esquema 1.3 – Representação de sistema de QS em <i>P. aeruginosa</i>	5
Esquema 1.4 – Modelo simplificado do mecanismo de QS em <i>S. aureus</i>	7
Esquema 1.5 – Sistema de QS em <i>V. harveyi</i>	8
Esquema 1.6 – Síntese do DPD a partir da SAM	9
Esquema 1.7 – Síntese do S-THMF-borato a partir do DPD.....	9
Esquema 1.8 – Biossíntese da violaceína e deoxivioalceína	15
Esquema 1.9 – Mecanismo de QS em <i>Chromobacterium ssp.</i> , em que a estrela lilás corresponde a 51 ou 52	16
Esquema 1.10 – Esquema de síntese do inibidor 46, utilizando a metodologia de Bassler modificada.....	22
Esquema 1.11 - Experimento de quantificação de violaceína	27
Esquema 2.1 - Uma das rotas de biossíntese das NAE's proposta por Van der Slegt e colaboradores.....	39
Esquema 2.2 - Síntese de <i>N</i> -(2-hidroxietil)amidas realizada por Moaddel e Ameri	39
Esquema 2.3 - Síntese de <i>N</i> -(2-hidroxietil)amida realizada por Movassaghi e colaboradores.....	39
Esquema 2.4 - Síntese de <i>N</i> -(2-hidroxietil)amidas realizada por Jamieson e colaboradores.....	40
Esquema 2.5 - Síntese de <i>N</i> -(2-hidroxietil)benzamida feita por Firouzadabi e colaboradores.....	40
Esquema 2.6 - Diversas formas de síntese do anel morfolínico apresentado por Kourounakis	43
Esquema 2.7 - Síntese da molécula 91 por Blagg e colaboradores.....	44
Esquema 2.8. - Síntese da morfolina funcionalizada 114 apresentada por MacMillan e colaboradores	45
Esquema 2.9 - Acoplamento da etanolamina 78 (A) e da morfolina 117 (B) com o ácido 60	60
Esquema 2.10 - Síntese da molécula 126 a partir do éster 59 e da etanolamina 78	60
Esquema 2.11 - Síntese da molécula 136	66
Esquema 2.12 - Proposta sintética para a molécula 129	67
Esquema 2.13 - Rota sintética da molécula 138	68

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Atribuições de sinais para o espectro para a molécula 56	23
Tabela 2.1 – Rendimentos das sínteses das morfolinamidas 118	48
Tabela 2.2 - Atribuições de sinais para os espectros de RMN ^1H e ^{13}C para a 1-morfolina-decanona 119	49
Tabela 2.3 – Inibição máxima para as <i>N</i> -(2-hidroxietil)amidas obtidas no ensaio em fase líquida.....	53
Tabela 2.4 - Resultados dos dockings moleculares	57
Tabela 2.5 - Atribuições de sinais para os espectros de RMN ^1H e ^{13}C para as moléculas 134 e 135	61
Tabela 2.6 - Atribuições de sinais para os espectros de RMN ^1H e ^{13}C para as moléculas 136	66
Tabela 2.7 - Atribuições de sinais para os espectros de RMN ^1H e ^{13}C para as moléculas 138	69
Tabela 3.1 – Teste de quantificação de violaceína para as moléculas 154 a 159	84
Tabela 3.2 – Energia e resíduos de aminoácidos da proteína CviR que interagem com as moléculas 154 a 159 . As informações para o autoindutor cognato HHL (51) e o inibidor 56 também forma apresentadas para permitir uma melhor análise comparativa.....	85
Tabela 4.1 . Porcentagem máxima de inibição para as 2-alquenil- δ -valerolactonas 174 a 183	101
Tabela 4.2 – Energias de interação e interações mais importante dos complexos formados entre a CviR e as estruturas 168 a 177	102
Tabela 4.3 - Parâmetros utilizados para análise 3D das 2-alquenil- δ -valerolactonas	106

Capítulo 1

*Desenvolvimento de testes biológicos para
avaliação de interação em Quorum Sensing em
CV026*

1.1. Introdução

1.1.1. Quorum Sensing

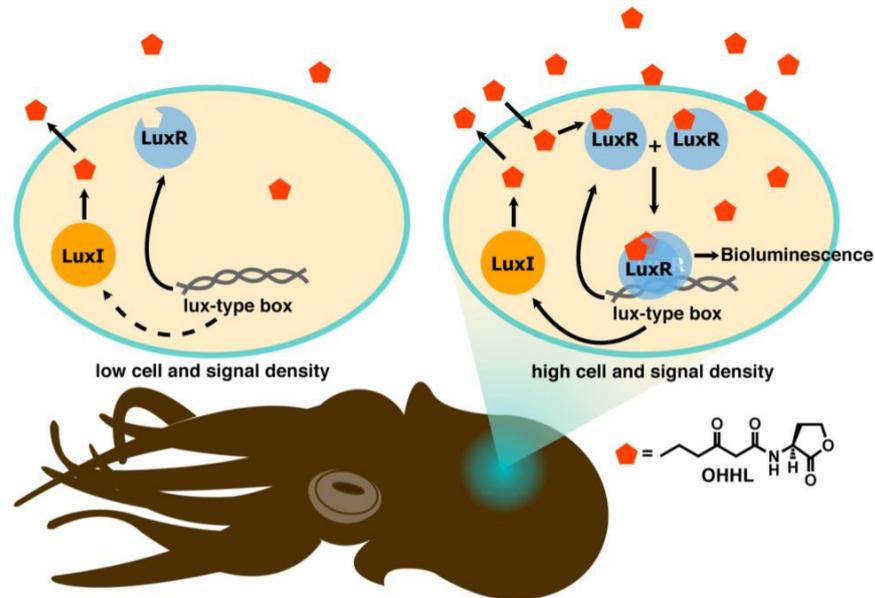
A comunicação entre indivíduos é uma atividade de fundamental importância para a sobrevivência dos seres vivos. O exemplo mais simples de comunicação pode ser observado quando um indivíduo produz um sinal que é recebido por outro indivíduo de forma a mudar seu comportamento.¹ Sabe-se da importância da comunicação para a formação e desenvolvimento de estruturas sociais. Para seres unicelulares, devido à sua simplicidade estrutural, sistemas de comunicação não parecia possível. Bactérias eram creditadas como populações de seres individuais que agiam de forma independente. Porém, a diversa produção de metabólitos secundários, sensíveis às mudanças ambientais, já era conhecida.²

Em 1964, Tomasz e Hotchkiss publicaram a primeira referência de um metabólito secundário capaz de regular a expressão gênica em resposta à densidade populacional.³ Já em 1970, Nealson, Platt e Hastings evidenciaram que a produção de bioluminescência em animais marinhos estava sob controle e coordenação da expressão genética da bactéria simbiote *Vibrio fischeri* através de um fenômeno de autoindução.⁴ Nos dois trabalhos, os autores supuseram que esses eventos ocorreriam em resposta a algum metabólito secundário, ainda desconhecido na época.

Inicialmente descrito em bactérias, o controle da expressão genética em decorrência do aumento de um metabólito (formação de quórum) foi chamado de *Quorum Sensing* (QS). Bactérias utilizam sinais químicos, chamados de autoindutores (AI), para sondar o aumento da população. Quando esse sinal químico atinge uma concentração limite, bactérias mudam o padrão de sua expressão gênica em escala populacional, ativando ou reprimindo genes que beneficiam a sobrevivência da comunidade.⁵ Vários processos biológicos importantes foram descritos como sendo regulados por QS; tais como, a produção de bioluminescência, a expressão de virulência, a síntese de toxinas e de antibióticos, a esporulação, a transferência de DNA, entre outros.⁶ É importante ressaltar que a ativação desses genes é fundamental para a vigilância, sobrevivência e adaptação às mudanças ambientais.⁷

O primeiro mecanismo de QS descrito foi o de *V. fischeri* na relação simbiote com a lula *Euprymna scolopes*.⁸ Duas proteínas controlam a expressão do operon *lux* (*luxICDABE*) (Esquema 1.1), responsável pela luminescência bacteriana. LuxI é a proteína responsável pela síntese do AI do tipo *N*-acil-homoserinalactona (AHL, sigla do inglês *N-acyl homoserine lactone*) nomeado de 3-oxo-C6-AHL (OHHL); e LuxR é seu receptor citoplasmático. Esse AI pode difundir livremente pelo envelope celular da bactéria, de forma que sua concentração

extracelular é proporcional à densidade populacional. Quando a concentração extracelular crítica do AI é atingida, ocorre aumento de sua concentração intracelular, aumentando a concentração intracelular e estabilização do complexo LuxR:AI. Esse complexo se organiza como homodímeros que atuam como ativador transcricional do *operon luxICDABE*. A transcrição de *luxICDABE* estimula a síntese do AI correspondente que, por sua vez, retroalimenta o ciclo de QS.⁶⁻⁸



Esquema 1.1 – Desenho esquemático do controle de bioluminescência por QS em *V.*

fischeri em simbiose com a lula *E. scolopes*.⁵

O mecanismo de QS pode ser dividido em três categorias baseadas na espécie química de autoindutor e seu sistema de detecção. Bactérias Gram negativas, normalmente, possuem sistema de QS parecidos com o modelo LuxI/R de *V. fischeri*, no qual os autoindutores são moléculas derivadas de AHL's que interagem com receptores citoplasmáticos.⁷ A especificidade existente entre as proteínas LuxR e seus respectivos AI's capacita sistemas LuxI/R para comunicação intraespecífica. Essa singularidade é dada pela grande variedade estrutural de AHL, na qual a porção lactona homoserina é mantida, mas diferentes cadeias acila são inseridas pelas respectivas enzimas LuxI. Esta variação estrutural permite que isoformas da LuxR características de cada espécie bacteriana consigam diferenciar as AHL's cognatas. As AHL's possuem cadeias acilas que variam de 4 a 16 carbonos, podendo ter o carbono C3 oxidado. Todavia, já foram relatados AI's com cadeia aromática ou ramificada (Figura 1.1).⁹⁻¹³

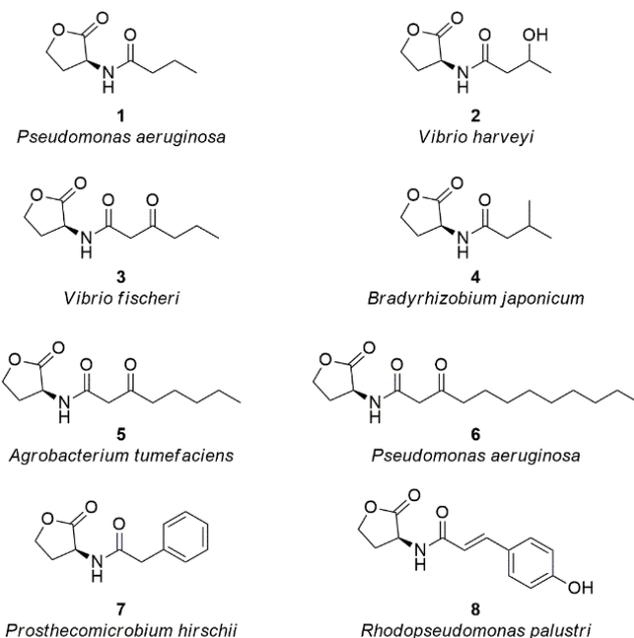
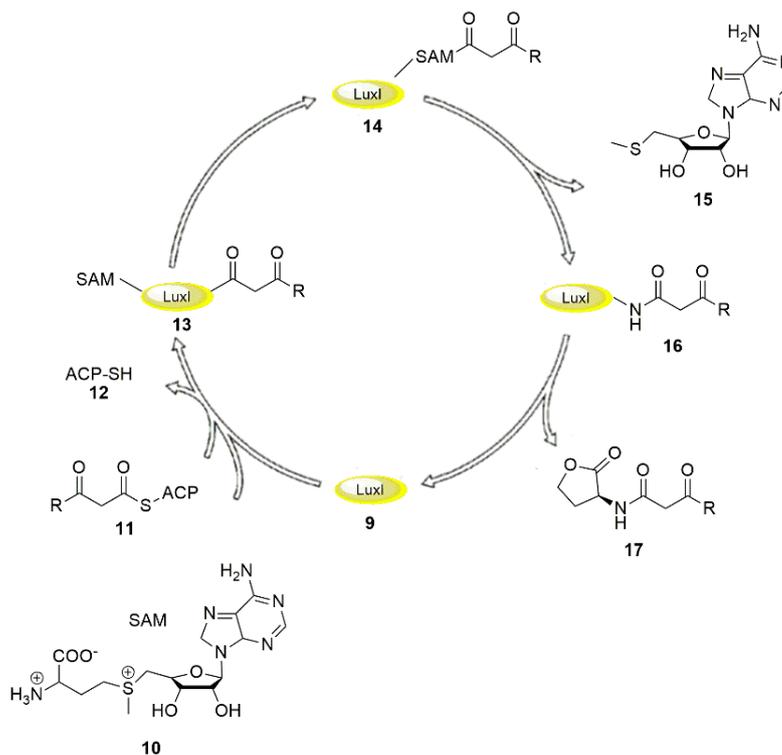


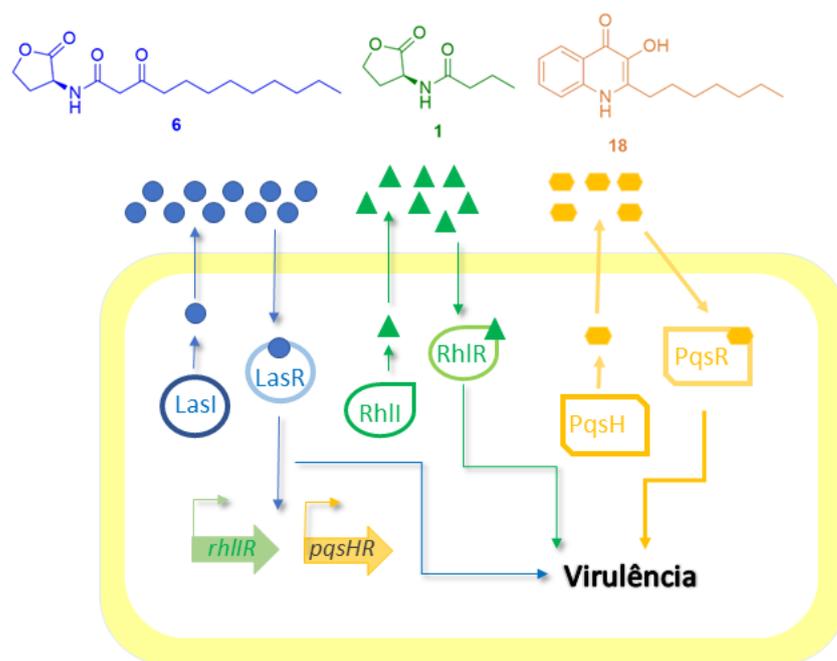
Figura 1.1- Exemplos de AI's de diferentes bactérias Gram-negativas.⁹⁻¹³

Os autoindutores do tipo AHL são produzidos com o auxílio da LuxI, como já comentado. A LuxI, **9**, é responsável por aproximar a *S*-adenosilmetionina (SAM), **10**, e um derivado de ácido graxo, **11**, advindo de uma proteína carreadora de acila (ACP sigla do inglês *acyl carrier protein*), e também conduz à ciclização entre eles, originando a AHL e 5'-*S*-metil-5'-tioadenosina (**15**) (Esquema 1.2).^{14,15}



Esquema 1.2 - Ciclo enzimático de síntese de AHL.

Como pode ser visto na Figura 1.1, *Pseudomonas aeruginosa* possui dois autoindutores do tipo AHL. QS em *P. aeruginosa* funciona de uma forma hierárquica (Esquema 1.3). Além desses dois sinais químicos, *P. aeruginosa* ainda utiliza a 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona **18**, (PQS, da sigla em inglês *Pseudomonas Quinolone Signal*) para controlar genes responsáveis pela formação de biofilme e expressão de virulência, importantes para sua sobrevivência e êxito como patógeno oportunista.⁵ O primeiro conjunto de proteínas LasI/R sintetiza e reconhece 3-oxo-C₁₂-AHL (**6**). O complexo dimerizado LasR:AHL estimula a expressão dos genes, *rhli* e *pqsh*, responsáveis pela síntese das outras moléculas sinalizadoras C₄-AHL (**1**) e PQS (**18**). As proteínas receptoras desses sinalizadores, por sua vez, iniciam a expressão dos fatores de virulência e formação de biofilme (Esquema 1.3). É importante ressaltar que foi encontrada em *P. aeruginosa* outra proteína receptora (QscR) responsável por inibir esse sistema de comunicação, mostrando assim o refinamento dessa linguagem. É estimado que 6% do genoma de *P. aeruginosa* sejam controlados por QS.^{5,16}



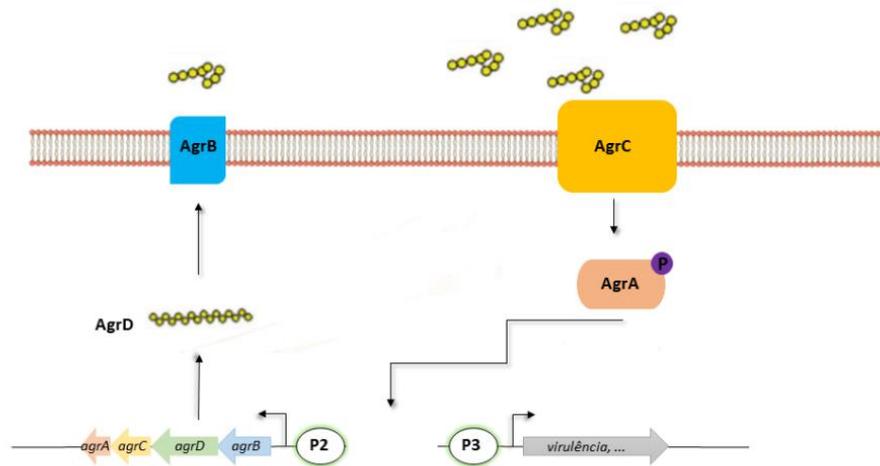
Esquema 1.3 – Representação de sistema de QS em *P. aeruginosa*.

Sobre a influência das propriedades físico-químicas de autoindutores, nos eventos de QS, é importante pontuar que a anfifilicidade da AHL facilita sua difusibilidade pelo envelope celular. Isso é observado para AHL's com cadeias de até seis carbonos. AHL com um número de carbonos maior que seis em sua porção acila necessitam de transporte ativo. Blackwell e colaboradores estudaram a ocorrência de aglomerados entre as AHL.

Aqueles com cadeias acila de 12 e 14 carbonos mostraram a possibilidade de formação de micelas ou aglomerações do tipo bicamada, o que facilitaria sua passagem por membranas lipídicas. Esse estudo foi realizado por meio de dinâmica molecular das AHL, assim como a observação dos aglomerados por microscopia eletrônica de varredura.¹⁷

A segunda categoria de QS é utilizada por bactérias Gram positivas, que utilizam oligopeptídeos modificados como autoindutores. Esses oligopeptídeos são, normalmente, derivados de peptídeos precursores citoplasmáticos cuja exportação é acoplada ao processamento e clivagem dos peptídeos sinais. Essa modificação pode envolver ciclização em lactonas ou tiolactonas, inserção de lantanídeos ou de grupos isopreno. Os sistemas de QS em bactérias Gram positivas, frequentemente, utilizam peptídeos autoindutores que são secretados e simultaneamente modificados por transportadores ativos de membrana. Esses peptídeos operam a sinalização por meio de transdução de sinal utilizando receptores de membrana. Essa cadeia de comunicação ocorre, pois esses sinalizadores não se difundem livremente pelo envelope celular.¹⁸

O modelo de QS apresentado por *Staphylococcus aureus* é simples, quando comparado ao de outras bactérias Gram positivas, e seu entendimento pode ajudar na compreensão de sistemas de QS mais complexos (Esquema 1.4). *S. aureus* é uma espécie comensal da pele humana, mas comporta-se como patógeno oportunista quando invade tecidos mais internos, podendo causar pneumonia, endocardite, meningite, entre outras infecções.¹⁹ O sistema de comunicação de *S. aureus* funciona de forma que, quando a densidade populacional está baixa, são ativados genes de colonização e adesão; e quando a densidade populacional está alta, os genes ativados são aqueles relacionados com proteases e mecanismos de liberação de toxinas. O peptídeo autoindutor AIP (sigla do inglês para *autoinducer peptide*) de *S. aureus* é transcrito do gene *agrD* como um propeptídeo (AgrD) que sofre modificações pós-traducionais durante o processo de secreção. AgrD é exportado por AgrB, uma endopeptidase transmembrana que promove sua ciclização. Quando o AIP se encontra em concentração crítica, ele se liga à AgrC. Este evento promoverá a fosforilação do AgrA, regulando a expressão gênica dos mecanismos de proteólise e demais fatores de virulência, pela indução dos promotores P2 e P3. Outrossim, AgrA induz a expressão de mais precursores AgrD que retroalimenta o sistema de QS em *S. aureus*.¹³



Esquema 1.4 – Modelo simplificado do mecanismo de QS em *S. aureus*.

São conhecidos quatro grupos de *S. aureus*, os quais produzem diferentes AIPs (19–22) (Figura 1.2). O AIP de um grupo ativa seu AgrC cognato, e inibe por antagonismo AgrC dos outros grupos. Nesse caso de competição intraespecífica, ganha o grupo que iniciar seu sistema de QS primeiro.^{20,21}

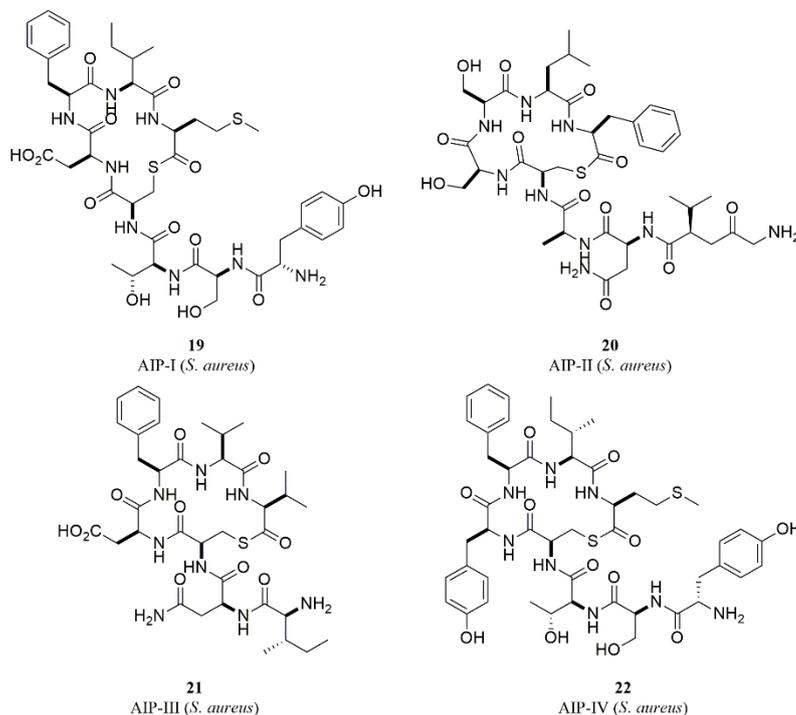
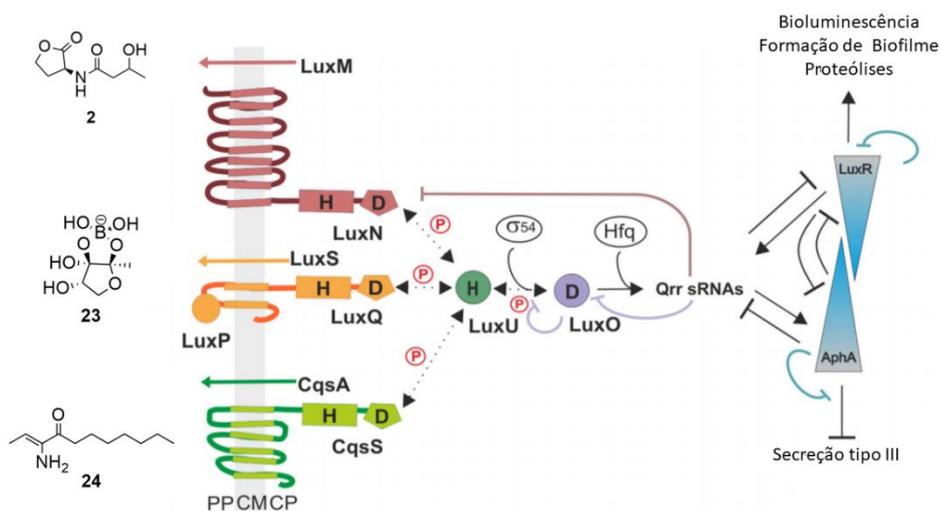


Figura 1.2 – AIP's sintetizados por cepas de *S. aureus*.²

No começo dos anos 90, em estudos com a bactéria bioluminescente *Vibrio harveyi*, cuja luminescência é ativada por QS, observou-se a existência de um segundo circuito de QS independente da presença de AHL. O estudo utilizava uma variedade de cepas geneticamente modificadas e constatou que, mesmo nas cepas mutantes para a sintetase de AHL, cepas de *V.*

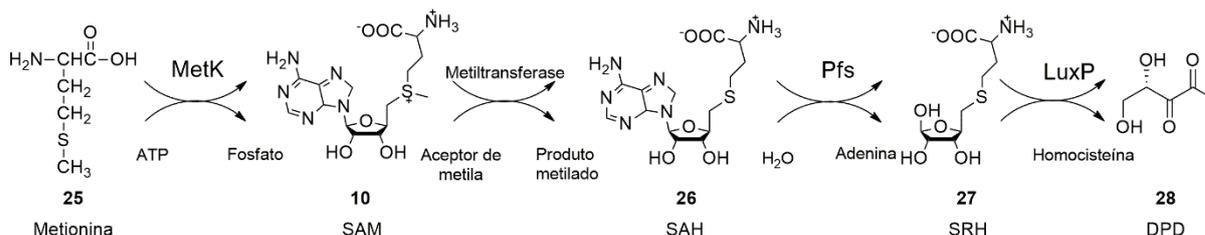
harveyi continuavam produzindo luminescência. Tal fato sugeriu que um segundo circuito de QS, com outro autoindutor, fosse responsável por tal propriedade. Esse novo autoindutor foi designado AI-2, sendo AI-1 os autoindutores do tipo AHL.²² No caso em *V. harveyi*, cada autoindutor é reconhecido por uma proteína específica que, quando ativada, envia informações para uma mesma proteína, LuxU, compartilhada pelos dois sistemas de QS (Esquema 1.5).²³



Esquema 1.5 – Sistema de QS em *V. harveyi*.²³

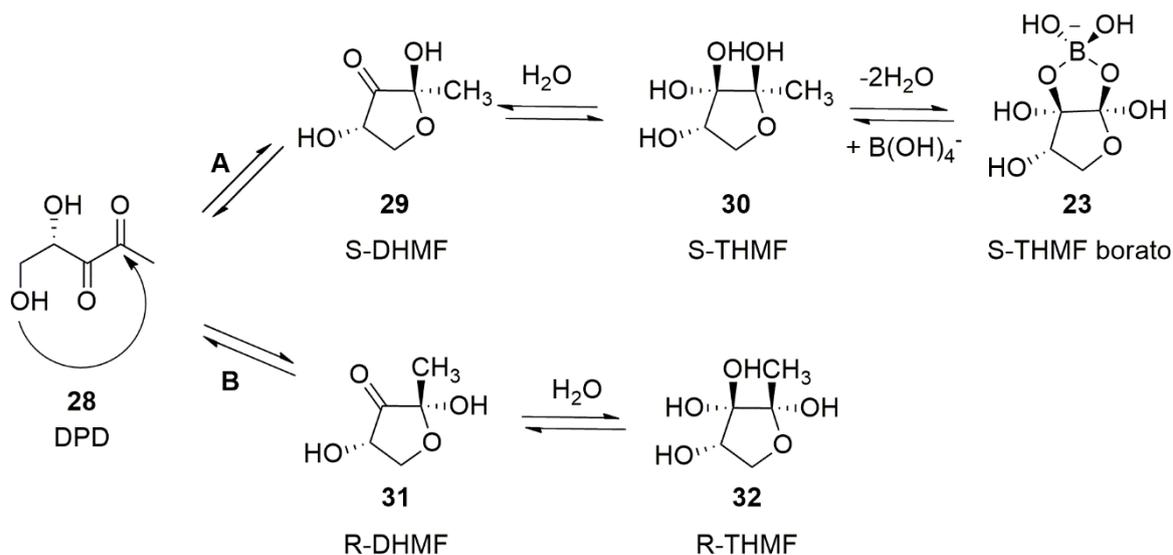
Em baixa densidade populacional, a cascata de fosforilação termina por fosforilar LuxO que, junto com sRNAs, desestabilizam a transcrição de *luxR*, gene do ativador transcricional responsável pela bioluminescência, formação de biofilme entre outros eventos. Já em alta densidade populacional, a interação dos autoindutores com as proteínas LuxN e LuxPQ impedem que a cascata de fosforilação ocorra. Dessa forma, a síntese da LuxR é estimulada, o que acarreta a transcrição dos genes de interesse.²⁴

O interessante sobre o AI-2 é que sua síntese também é dependente de SAM, **10**, assim como nos AI-1 (Esquema 1.6). SAM é, normalmente, responsável por transferir o grupo metila em sistemas biológicos. Quando essa transferência é feita, ela se torna tóxica na forma de *S*-adenosil-*L*-homocisteína **26** (SAH, sigla do inglês para *S*-adenosyl homocysteine). Por isso, é prontamente convertida em *S*-ribosehomocisteína **27** (SRH, sigla do inglês *S*-ribosyl homocysteine) que, por sua vez, é modificada pela LuxS em homocisteína e 4,5-dihidroxi-2,3-pentanodiona, **28** (DPD, da sigla em inglês *4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione*). Essa última molécula é a precursora do AI-2.²⁴



Esquema 1.6 – Síntese do DPD a partir da SAM.²⁴

A estrutura química da forma ativa do AI-2 foi determinada pelas técnicas de espectrometria de massas e cristalografia de raio-X de um cristal do complexo LuxP:AI-2 de *V. harveyi*. Neste caso, AI-2 se apresenta na forma de *S*-THMF (sigla do inglês para *(2S,4S)*-2-methyl-2,3,3,4-tetrahydroxytetrahydrofune borate **23**). O DPD **28** espontaneamente cicliza para **29**, depois é hidratado, formando **30**. Na presença de ácido bórico, muito comum na água dos oceanos, *habitat* da *V. harveyi*, forma-se a estrutura ativa do AI-2 **23**, conforme mostrado no caminho **A** do Esquema 1.7.²⁵ Em outro trabalho, Hughson e colaboradores mostraram que a *Salmonella typhimurium* reconhece o isômero do DPD, *R*-THMF **32**, como seu AI-2. Nesse caso, a ciclização do DPD ocorre pela outra face da carbonila, caminho **B** do Esquema 1.7, gerando o isômero *R*-DHMF **31** que, após a *S. typhimurium* habita o intestino humano, onde não há boro de forma abundante.²⁵ Estudos buscam determinar se outros isômeros do DPD são formas ativas de AI-2 em bactérias. hidratação, forma o *R*-THMF **32** Essa segunda possibilidade encontra respaldo no fato de



Esquema 1.7 – Síntese do S-THMF-borato a partir do DPD.²⁵

Ainda no trabalho de Hughson e colaboradores fez-se um ensaio simples, no qual

colocou-se *V. harveyi* e *S. typhimurium* no mesmo meio e com excesso de AI-2. Com a adição de borato, rapidamente, o equilíbrio deslocou para o caminho **A** e a *V. harveyi* luminesceu; e a *S. typhimurium* teve seu QS inibido. Contudo, quando o borato foi sequestrado desse equilíbrio, por um agente quelante, o equilíbrio rapidamente foi descolado pelo caminho **B**, a *S. typhimurium* expressou seu QS e a *V. harveyi* deixou de luminescer.

No esquema 1.5 (página 8), é possível observar que existe, para *V. harveyi*, um outro autoindutor e proteína receptora, a CAI-1 (**24**) e CqsS, respectivamente. Assim como em *P. aeruginosa* existe a PQS, **18**, existem outras classes de moléculas químicas que também se apresentam como moléculas sinalizadoras em QS específicos. A *Streptomyces griseus* sintetiza a 2-isocaprioloil-3*R*-hidroximetilbutirolactona **33**, também chamada de Fator A que, em pequenas concentrações, induz a bactéria para diferenciações fisiomorfológicas, como produção de metabólicos secundários com funções antibióticas, como a estreptomicina, e mecanismo de esporulação.^{26,27}

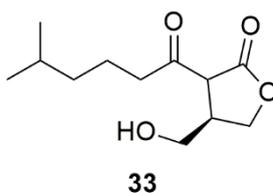


Figura 1.3 – Estrutura química de Fator A, autoindutor de *S. griseus*

Uma nova classe de autoindutores foi caracterizada recentemente, é o chamado AI-3. Pappenfort e colaboradores,²⁸ descreveram o 3,5-dimetilpirazin-2-ol (DPO), **34**, como ligante de VqmR, um homólogo de LuxR órfã de LuxI encontrada em *V. cholerae*. A VqmR é responsável por reprimir genes necessários à formação de biofilme e expressão de fatores de virulência.²⁹ Crawford e colaboradores estudaram a patogenicidade para uma cepa de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC, sigla do inglês *enterohemorrhagic E. coli*) e descobriram que VqmR está relacionada à interação dos receptores QseBC com o AI-3, em uma outra estrutura ativa, **35**.³⁰ Essa interação induz a expressão do sistema de secreção do tipo III que leva à colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica, causando falha renal.

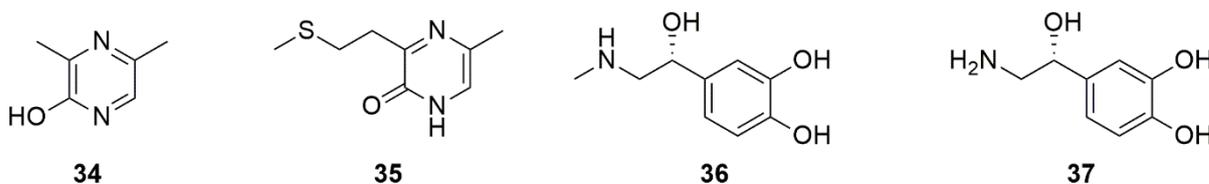


Figura 1.4 – Estruturas ativas do AI-3, **34** e **35** e da epinefrina, **36**, e norepinefrina, **37**.

Assim como a VqmR, existem outras LuxR órfãs. Em uma revisão de Pongor e colaboradores,³¹ relata-se que, em uma pesquisa no Centro Nacional de Informação para Biotecnologia (NCBI, do inglês *National Center for Biotechnology Information*), 3550 genes de LuxR foram encontrados. Desses, 884 participaram de sistemas com AHL, mas 2698 eram LuxR órfãs. As LuxR órfãs, normalmente, não são responsivas a AHL, o que sugere uma evolução diferente do QS.

1.1.2. Quorum Quenching

A caracterização de sistemas de QS e seus autoindutores levaram ao entendimento de que sistemas de sinalização podem ser modulados para obter respostas desejadas de fenótipos bacterianos. Por exemplo, *Streptomyces griseus*, que sintetiza o antibiótico estreptomicina via sistema de QS pode ter esta síntese favorecida pela ação de moléculas agonista de seu QS.³² Blackwell e colaboradores estudaram o efeito de análogos de autoindutores do tipo 1 sobre a *Arabidopsis thaliana*, planta modelo utilizada para auxiliar o desenvolvimento de cultivares cada vez mais resistentes, adaptados e produtivos.³³ Os derivados foram capazes de induzir o crescimento da raiz, mostrando a importância que esse tipo de molécula pode ter na interação da simbiose entre planta e bactéria. Meijler e colaboradores estudaram a capacidade que alguns produtos naturais tinham de estimular ou inibir o QS da *Agrobacterium tumefaciens*.³⁴ Eles encontraram bons candidatos para os dois casos, tendo como máxima do trabalho a redução em 90% da formação de tumores induzida por QS.

O crescente número de cepas patogênicas resistentes a antibiótico é visto com preocupação pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Estima-se que morram 700.000 pessoas por ano devido a infecções provocadas por bactérias multirresistentes. A OMS estima que se nenhuma ação for tomada esse número pode chegar a 10 milhões de mortes por ano em 2050.³⁵ Uma alternativa complementar ao uso de antibióticos que vem sendo muito estudada são as chamadas drogas antivirulência. Esse tipo de terapia consiste em empregar substâncias que impeçam a expressão de genes de virulência. Esse tipo de terapia já foi empregado em 1893, mas o pouco conhecimento a época sobre virulência dificultou o seu desenvolvimento.³⁶ As possíveis vantagens dessa terapia são a baixa pressão seletiva sobre as bactérias, o menor impacto sobre a microbiota do hospedeiro, a inativação rápida do alvo, entre outros. As desvantagens para emprego das terapias antivirulência são os múltiplos caminhos de virulência e a necessária identificação do patógeno.³⁶ Wuest e Shaw relataram a necessidade de terapias antivirulência, em conjunto

com antibióticos, no enfrentamento de cepas resistentes de *P. aeruginosa*.³⁷ Ravi e colaboradores observaram a ação inibitória de alguns produtos naturais (fenóis e flavonoides) frente a uma cepa de *Serratia marcescens* (SP1), espécie patogênica intrinsecamente resistente a antibióticos, e resistente a efetores imunitários do soro humano (soro resistente).³⁸ A presença de compostos inibidores de QS reverteu a resistência à soro da cepa testada.

Intervenções em sistemas de QS é coletivamente chamada de *Quorum Quenching* (QQ) e pode ocorrer de três formas.¹⁸ A primeira é o uso de proteínas como lactanases e acilases para degradação dos AI;³⁹ a segunda é a interrupção da biossíntese dos autoindutores;⁴⁰ e a terceira é o uso de antagonistas das proteínas receptoras de QS.

Em uma revisão, Haque e colaboradores trazem diversas moléculas antagonistas e agonistas de QS.⁴¹ Já uma revisão de Chbib mostra como as alterações em moléculas de AHL podem alterar a atividade do QS.⁴² Para as bactérias Gram positivas, os inibidores podem ser compostos miméticos do AIP ou não, como é o caso do trabalho de Shoham e colaboradores, que estudaram inibidores de AgrC em *S. aureus*. Eles encontram 2 compostos com inibição tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Apesar de **38** ter tido melhor resultado *in vitro*, a molécula **39** é que tem melhor resultado *in vivo*. Todos os ratos tratados com **39** sobreviveram enquanto os ratos não tratados tiveram uma mortalidade de 70% quando infectados (Esquema 1.5).⁴³

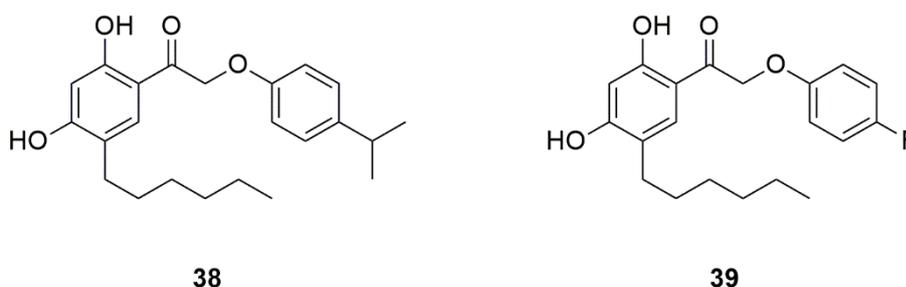


Figura 1.5 – Moléculas estudadas por Shoham e colaboradores.⁴³

Já Machado e colaboradores estudaram a síntese de peptideomiméticos análogos a Solanamida B, **40**, produto natural com conhecida ação inibitória frente a QS, através de uma reação de S_N2' em um derivado de aduto de Morita-Baylis-Hillman para formação do peptideomimético macrocíclico, **41**, (Esquema 1.6).⁴⁴ O grupo testou os compostos frente a cepas de *S. aureus* e obtiveram bons resultados na inibição da atividade hemolítica desta cepa, com inibições que variaram entre 40 e 80%, em concentrações na faixa de 10 a 20 μ M. Além desta atividade inibidora, os autores verificaram para as duas moléculas mais potentes que ambas não apresentam citotoxicidade frente fibroblastos

humanos nesta faixa de concentração.

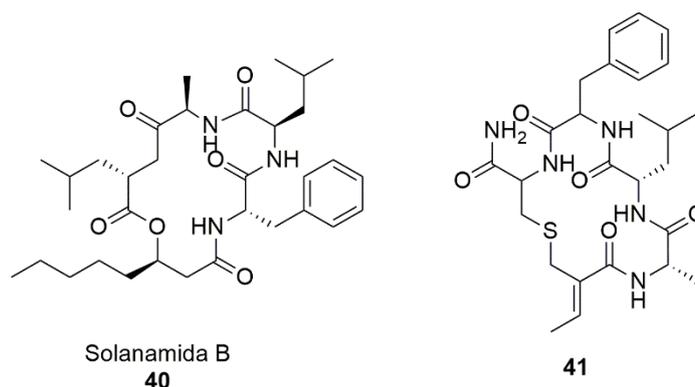


Figura 1.6 – Solanamida B e seu peptídeomimético, **32**, estudos por Machado e colaboradores.⁴⁴

Bassler e colaboradores estudaram o efeito de alguns flavonoides frente a QS de *P. aeruginosa* e relataram cinco possíveis mecanismos de inibição de QS.⁴⁵ A primeira seria a dificuldade de estabilizar/solubilizar a proteína receptora; o segundo seria a interrupção da dimerização da proteína receptora; a terceira seria a competição pelo sítio de ligação; a quarta seria a dificuldade de interação com o DNA; e por último seria a interferência na ligação/ancoramento da RNA polimerase. Para testar por qual mecanismo a interferência de QS ocorreria, os autores realizaram diversos testes. Para o primeiro caso, eles testaram se, na ausência do autoindutor, os flavonoides conseguiam solubilizar a proteína, o que não ocorreu, mas os flavonoides também não foram capazes de diminuir a solubilidade da proteína na presença de AI. Para testar o segundo mecanismo, os autores colocaram a LasR na presença de seu autoindutor cognato e dos flavonoides, e purificaram a proteína na sequência. Em todos os casos, a proteína se mostrou na forma de dímero. Para o terceiro caso, foi realizado um experimento de competição do sítio de ligação, no qual a concentração dos flavonoides não foi alterada, mas houve o aumento da concentração do autoindutor. Nesse caso a inibição era a mesma, independente da concentração do AI. Para o quarto caso, os autores relataram que, na presença dos flavonoides, a proteína não conseguia se ligar ao promotor do gene *lasB*. Devido a esse resultado, não foi necessário testar o quinto e último mecanismo. Com isso os autores relatam que os flavonoides inibem o QS em *P. aeruginosa* por ligação em um sítio alostérico da proteína LasR, prevenindo que ela se ligue ao DNA.

Vale a pena ressaltar que QQ acontece na natureza. Gordon e colaboradores mostraram que em modelo animal com diarreia crônica causada por *V. cholerae* ocorre o aumento expressivo de *Ruminococcus obeum* que por sua vez, restringe a colonização e virulência de *V. cholerae* em função do aumento de expressão de AI-2.⁴⁶ Os autores sugeriram o uso de bactérias

produtoras de AI-2 em populações com saneamento básico precário em uma tentativa de diminuir a colonização intestinal por *V. cholerae*.

Apesar de ser uma técnica promissora, a inibição de QS já enfrenta duras críticas sobre sua eficiência. Krzyżekf comenta três pontos questionáveis na terapia com QQ.⁴⁷ A primeira seria a seletividade dos compostos. Alguns artigos mostram que inibidores de AI-2 também podem influenciar a microbiota do hospedeiro. O segundo ponto é que alguns artigos mostram que quando alguns mecanismos de virulência são inibidos por QS, outros fatores de virulência podem ser estimulados. O terceiro ponto é que o autor não acredita que as bactérias não serão capazes de evoluir frente a esse tipo de inibição. Ele relata que um artigo fez o estudo de simulação computacional no qual colônias foram capazes de executar contrarresposta a inibidores de QQ.

1.1.3. *Biossíntese de violaceína em Chromobacterium.*

Chromobacterium violaceum é uma espécie de bactéria Gram negativa comumente encontrada no solo e água de regiões tropicais. Devido ao seu nicho ambiental, ela é capaz de sintetizar diversos metabolitos para sua adaptação ao meio.⁴⁸ Um de seus metabólitos mais importantes é a violaceína, **42**. Em uma recente revisão, Durán e colaboradores relatam que a violaceína tem atividade antimicrobiana, antiparasitária, antiviral, efeito imunomodulador, além de potencial atividade antitumoral.⁴⁹ A produção de violaceína não é exclusiva da *C. violaceum* e já foi descrita em mais de seis espécies de bactérias.⁴⁹

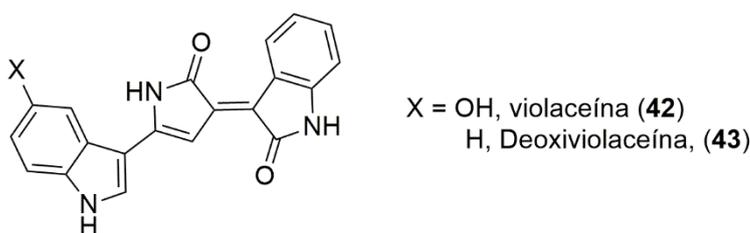
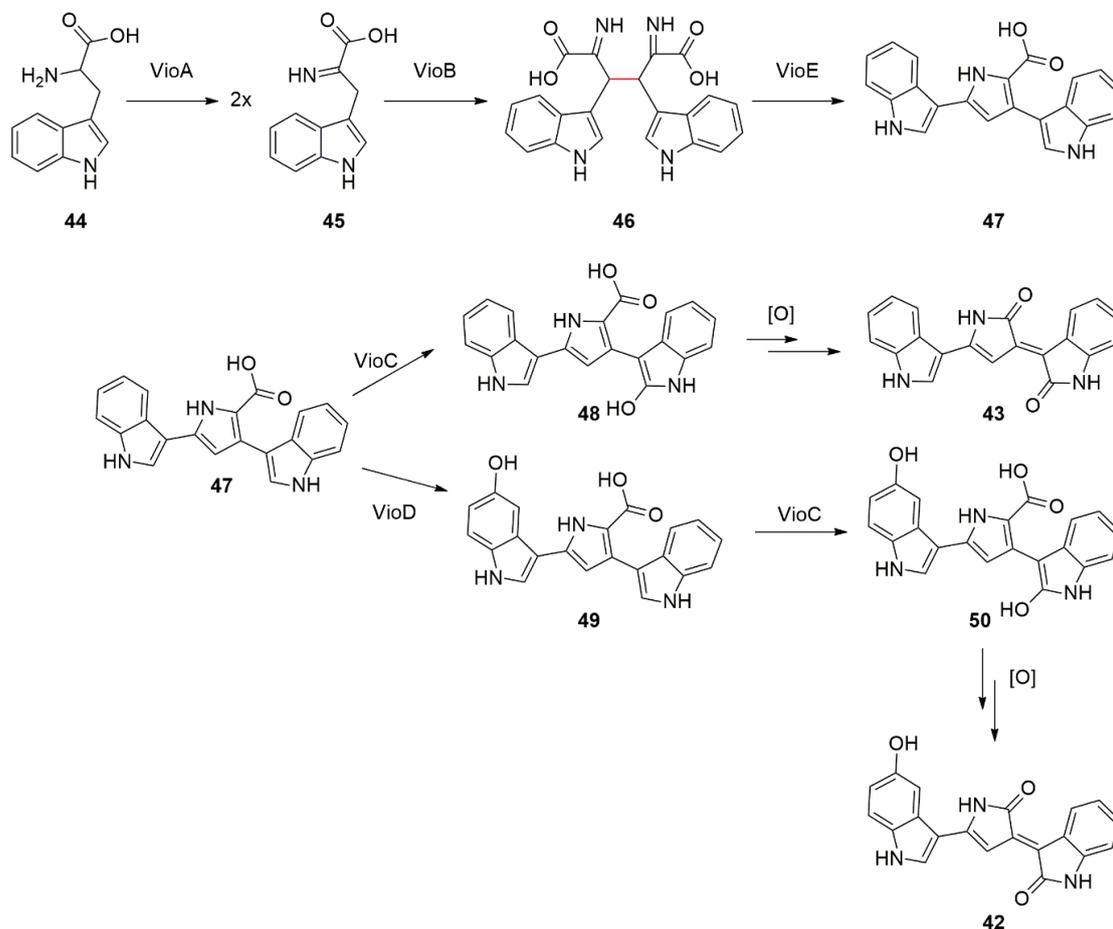


Figura 1.7 – Estrutura química da Violaceína e da Deoxiviolaceína.

Em *C. violaceum*, a biossíntese da violaceína se dá pela expressão dos genes que compõem o operon *vioABCDE* sob controle de QS. Durante a síntese de violaceína, também é formado seu análogo deoxiviolaceína, **34**, cujas atividades biológicas são semelhantes às da violaceína.⁵⁰ Sua síntese passa por seis etapas, cinco enzimáticas e uma não enzimática (Esquema 1.8). Tudo começa pela transformação do L-triptofano, **44**, no intermediário **45** pela VioA. Logo em seguida, duas moléculas do intermediário **45** são unidas pela VioB em um composto bisindol ainda sem estrutura definida, **46**, que é modificado pela VioE em prodeoxiviolacein, **47**. O composto **47** pode seguir 2 caminhos, sendo que um leva à síntese de violaceína e o outro à síntese de

deoxiviolaceína. Se o composto **47** for modificado diretamente pela VioC, ocorre a síntese de deoxiviolaceína, **43**, após uma etapa oxidativa. Mas, se o composto **47** for modificado em **49** pela VioD, e depois modificado pela VioC, ocorre a formação do ácido violaceínico, **50**, que após oxidação não enzimática se transforma em violaceína, **42**.



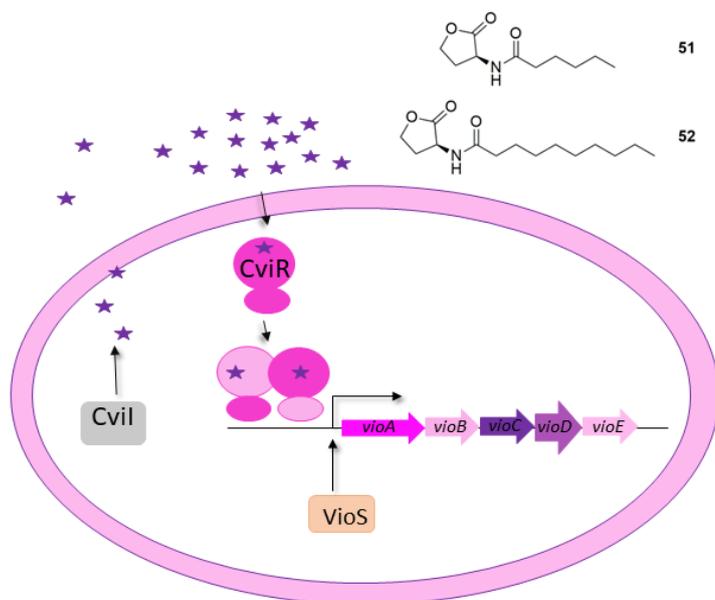
Esquema 1.8 – Biossíntese da violaceína e deoxiviolaceína.⁵⁰

1.1.4. Mecanismo de ação de QS em espécies de *Chromobacterium*.

O mecanismo de síntese de violaceína em espécies de *Chromobacterium* é controlado por QS (Esquema 1.9). ATCC31532 e ATCC12472 são duas cepas de *Chromobacterium* amplamente utilizadas em ensaios relacionados a QS que produzem, respectivamente, C₆-AHL, **51**, e C₁₀-HLS, **52**, como AIs. Até bem pouco tempo atrás, ambas cepas ATCC eram classificadas como *Chromobacterium violaceum*. Contudo, Soby e colaboradores reclassificaram a cepa ATCC31532, também denominada de CV026, como *Chromobacterium subtsugae*, devido a sua aproximação genética dentro desse clado.⁵¹ Segundo os autores, existem pelo menos 22 características diferentes a nível bioquímico, formológico, entre outros,, fato que endossou a reclassificação da espécie. Não obstante a essas diferenças, o mecanismo de ação de QS é conservado nas

duas cepas ATCC.

A interação entre CviR e sua AHL cognata promove a dimerização do complexo que age como fator transcricional do *operon* *vioABCDE*.⁵² Além da produção de violaceína, esse *operon* codifica a produção e degradação de cianeto, produção de quitinase, entre outros.⁵³ No genomas de *Chromobacterium spp.* existem outros 32 *operons* controlados por CviR:AHL, incluindo *operons* de virulência como o sistema de secreção do tipo III (codificado pelo gene CV_1432).^{48,54}



Esquema 1.9 – Mecanismo de QS em *Chromobacterium spp.*, em que a estrela lilás corresponde a **51** ou **52**.

Willians e colaboradores estudaram o efeito de produção de violaceína da CV026 frente a vários AHL's e observaram que uma cadeia acila com quatro carbonos foi capaz de induzir a produção de violaceína.⁵⁵ Em contrapartida, AHL's com cadeia acila com mais de dez carbonos se mostraram inibidoras. A cadeia com oito carbonos se mostrou dual, induzindo fracamente o QS, quando não havia o autoindutor presente e, quando havia, foi capaz de inibir seu efeito.

Hughson e colaboradores analisaram esse mesmo efeito, observando as cristalografias da proteína receptora e diversos autoindutores.⁵² Eles observaram que a CviR é um homodímero no qual os monômeros contêm um domínio para a interação com autoindutor, o LBD (sigla do inglês para *ligand binding domain*), e outro domínio para a interação com o DNA, DBD (sigla do inglês para *DNA binding domain*). Porém, para essa proteína, os domínios interagem de forma cruzada e essa interação é de extrema importância para a conformação correta que leva à transcrição do DNA (Figura 1.8).⁵²

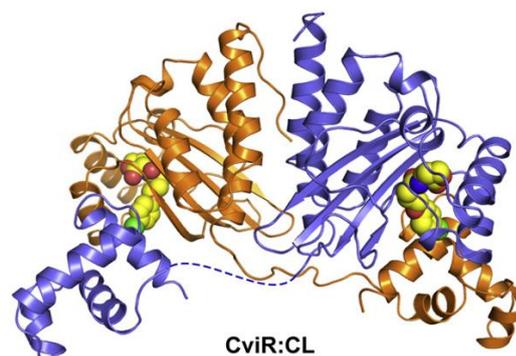


Figura 1.8 - Estrutura do complexo CviR:Cl resolvida por Raio X. CL é um antagonista (em amarelo – referente à estrutura **56**) de QS de *C. violaceum*. Em azul e laranja são mostrados os monômeros em sua forma cruzada. ⁵²

O posicionamento do resíduo Met89 é o fator conformacional que determina a inibição de QS na cepa CV026, segundo os autores (Figura 1.9). Quando o C6-AHL está complexada com CviR, a cadeia curta deste AI permite o posicionamento do resíduo Met89 numa conformação do complexo CviR:C6-AHL que admite a interação com o DNA. Em contrapartida, quando a cadeia acila dos outros AHL's estudados apresentavam oito ou mais carbonos, o complexo com CviR mostrava uma diferença no posicionamento da Met89 e, com isso, o complexo adota uma conformação que impede a interação com o DNA, fato que inibe o QS (Figura 1.8).

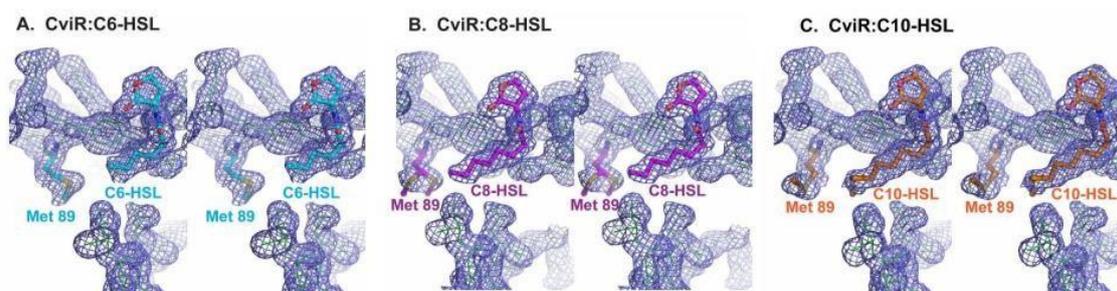


Figura 1.9 – A: Interação da CviR com seu autoindutor C6-AHL, molécula em azul; B: Interação da CviR com um autoindutor com 8 carbonos, C8-AHL, molécula em roxo; C: Interação da CviR com um autoindutor com 10 carbonos, C10-AHL, molécula em laranja. ⁵²

As interações entre o AI e o bolsão de interações da proteína receptora também são de extrema importância para o sucesso da ativação de CviR. A análise da estrutura de raio-X da proteína CviR complexada com **51** apresenta interações nas quais o N-H da amida atua como doador de ligação de hidrogênio e as carbonilas interagem comoceptoras de ligação de hidrogênio (Figura 1.10).

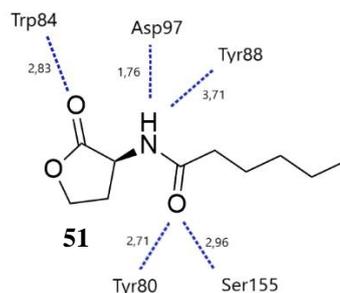


Figura 1.10– Interações entre a proteína CviR e C6-AHL (**51**) observadas na estrutura cristalográfica obtida por Raio-X. Distância em angstroms representada ao lado das linhas tracejadas.

Apesar desse mecanismo de QS parecer simples, Venturi e colaboradores relatam a importância de uma outra enzima nesse mecanismo. A VioS regularia a afinação do fenótipo de QS, muito mais pela interação com o promotor da VioA do que regulando a expressão de CviI/R. Os autores relatam que o mecanismo molecular de repressão da VioS ainda não é conhecido, mas até o momento o gene *vioS* só foi encontrado para *C. subtsugae* e *C. violaceum*.⁵⁶

1.1.5. QQ em CV026.

Para os ensaios de QQ em *C. violaceum* normalmente se usa a cepa CV026, uma vez que ela é deletada para o gene de síntese do autoindutor cognato, *cviI*, e para o gene do repressor *vioS*.⁵⁵ Essa cepa é considerada um modelo para testes de QQ, pois o efeito de inibição de QS é visual. O ensaio é feito em pares, controle e teste, sendo que no ensaio controle se adiciona a molécula a ser testada e não se adiciona o AI, dessa forma podendo verificar possíveis efeitos inibitórios sobre o crescimento da densidade populacional sem a interferência da violaceína. Já o ensaio teste é feito na presença do AI cognato adicionado exogenamente e do provável inibidor, com possibilidade de observação de redução da síntese de violaceína.

Hwang e colaboradores estudaram a inibição da produção de violaceína em CV026 por extrato de baunilha.⁵⁷ A inibição de violaceína se mostrou dependente da concentração e, na concentração mais alta testada 2% m/v, foi observada 98% de inibição. Já Sheperd e colaboradores estudaram o efeito de polímeros altamente ramificados de *N*-propilacrilamida funcionalizados com a lactona do tipo homoserina (Figura 1.11).⁵⁸ Eles observaram a redução de mais de 50% da expressão do gene *vioA* na presença do polímero. Os autores sugeriram que a inibição ocorreu devido a uma interação entre proteína e polímero que dificultou a dimerização da proteína, interrompendo o papel transcricional dela, porém esse mecanismo ainda não foi comprovado.

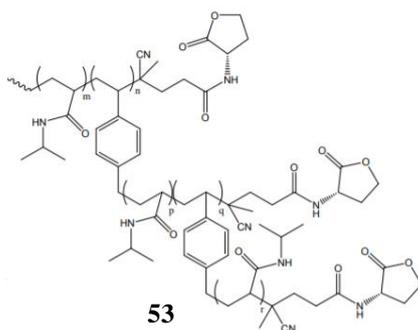


Figura 1.11 – Polímero estudado por Sheperd e colaboradores.⁵⁸

Farallelo e Manner realizaram uma busca por moléculas capazes de inibir a produção de violaceína em cepas selvagens de *C. subtsugae* e em CV026. Eles encontraram diversos compostos com atividade inibitória, com 9 deles apresentando atividade proeminente (inibição maior que 90%), sendo cinco moléculas dessas flavonóides com destaque para as estruturas **54** e **55** (Figura 1.12).⁵⁹

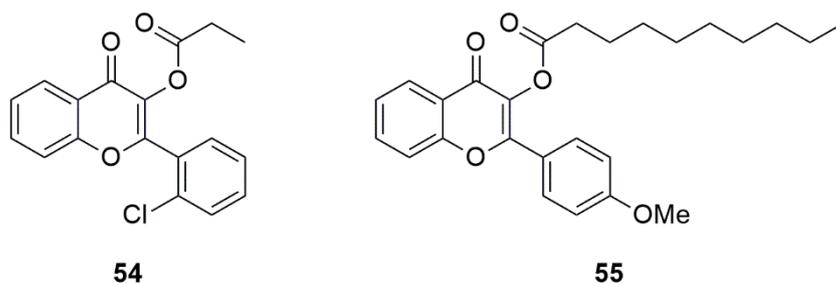
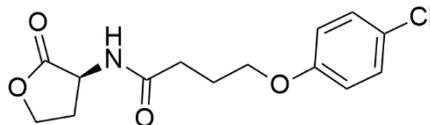


Figura 1.12 - Os compostos **54** e **55** são exemplos das moléculas altamente inibidoras estudadas por Farallelo e Manner.⁵⁹

Bassler e colaboradores estudaram a forma como inibidores se ligam à proteína receptora CviR em *C. subtsugae*.⁵² Entre as AHL's testadas, C₆-AHL ativou a transcrição na menor concentração testada. C₁₀-AHL conseguiu se ligar ao sítio de ligação, porém, apesar de o complexo formando ainda conseguir interagir com o DNA, sua conformação impediu que a RNA polimerase se liga-se ao DNA. Já as AHL's com 12 e 14 carbonos na cadeia acila, assim como outros inibidores, quando ligados a CviR impediram sua interação com o DNA. A molécula testada neste estudo que apresentou o melhor perfil de inibição foi aquela denominada pelos autores como CL, **56**, (Figura 1.12). Ela apresentou IC₅₀ de 1,2 μM e, em ensaio de competição, se mostrou tão fortemente ligada à CviR que, nem mesmo em concentrações muito acima daquelas observadas em nível fisiológico para o AI cognato, este não foi capaz de deslocá-la.⁶⁰



56

Figura 1.13 – Composto 46 inibidor estudado por Bassler e colaboradores.⁵²

Esse mesmo grupo de pesquisa testou a modulação de patogenicidade da *C. subtsugae* em uma infecção com *C. elegans* frente ao inibidor **56**. O nematódeo *C. elegans* tem uma estimativa de vida de 18 dias em laboratório. Na presença de *C. subtsugae* selvagem, essa estimativa foi reduzida para 3 dias. Ação semelhante foi observada com cepa CV026, com a estimativa de vida do nematódeo caindo de 12 dias, na ausência da CV026, para 4 dias na sua presença. Quando o inibidor **56** foi testado com a CV026 e com a cepa selvagem, a estimativa de vida de *C. elegans* aumentou para 12 e 7 dias, respectivamente, mostrando que esse inibidor foi capaz de minimizar a patogenicidade de *C. subtsugae*.⁶⁰

1.2. Objetivos

Nesse capítulo, o objetivo geral foi estabelecer teste de inibição da biossíntese de violaceína em CV026 e buscar ferramentas que comprovem o mecanismo de ação desta inibição.

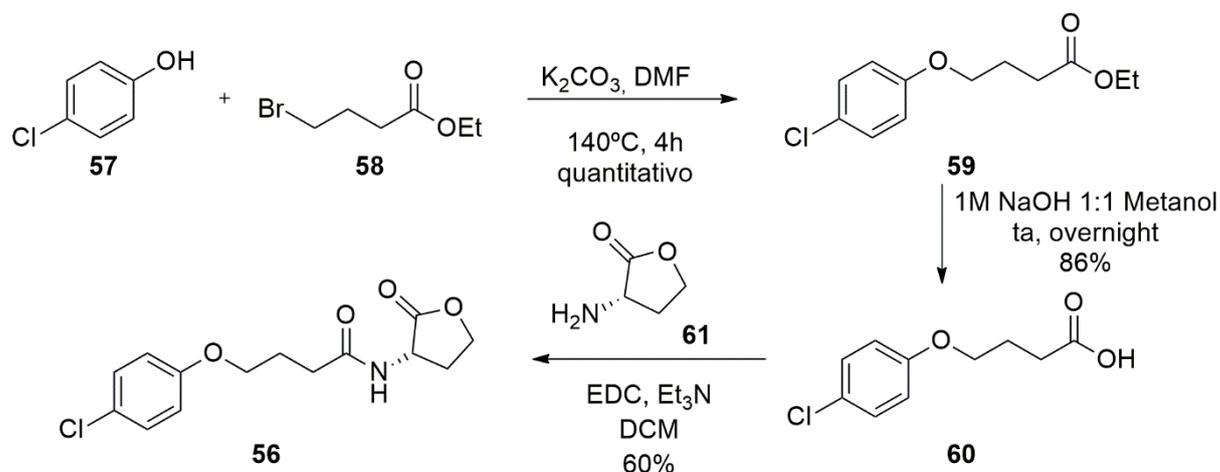
1.2.1. Objetivos Específicos.

- 1) Implementar um teste rápido e reprodutível baseado na expressão de violaceína para avaliar a inibição do QS em CV026;
- 2) Implementar teste de competição pelo sítio de ligação da CviR de CV026;
- 3) Implementar teste rápido para a análise de degradação de quitina, outro fenótipo controlado por QS em CV026;
- 4) Avaliar, utilizando a técnica de RT-qPCR, se a inibição de violaceína pelas moléculas testadas ocorre em nível transcricional por meio da quantificação de expressão do *operon vioABCDE*.

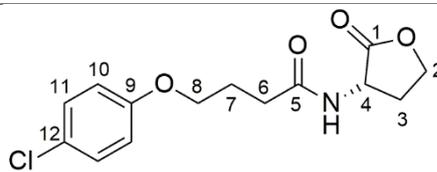
1.3. Resultados e Discussão

1.3.1. Síntese do inibidor conhecido (56).

Antes de começar os testes biológicos, foi necessário sintetizar um antagonista conhecido de QS para *C. subtsugae*, que foi utilizado como controle positivo de inibição para validar o teste biológico. O inibidor escolhido foi a molécula **56**, desenvolvida por Bassler e colaboradores. Ela foi preparada com base na síntese relatada por Bassler, com alteração do agente de acoplamento para a obtenção de **56** (Esquema 1.10), isso se deu pela falta do reagente original no laboratório.⁶⁰ A etapa de substituição nucleofílica entre **57** e **58** ocorreu de modo quantitativo. Já a hidrólise de **59** ocorreu com 86% de rendimento. A etapa de acoplamento da lactona **61** com o ácido **60** foi um pouco mais trabalhosa. Foi testado o uso de *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC) juntamente com etil(hidroximino)cianoacetato, Oxyma Pure®, de forma a se evitar o uso de DCC, cuja literatura associada relata dificuldades na remoção da *N,N'*-diisopropiluréia do produto de acoplamento. Porém o uso dessa condição de acoplamento proporcionou a formação de diisopropilureia que, apesar dos esforços, não foi removida totalmente da amostra do produto **56** após as tentativas de purificação por coluna cromatográfica em gel de sílica. A troca por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e trietilamina (Et₃N) resolveu o problema na purificação observado anteriormente, resultando no produto **56**, obtido como um sólido branco com 60% de rendimento. A sua estrutura pode ser confirmada por ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C (Figura 1.14 e Tabela 1.1), assim como por CG-EM.



Esquema 1.10 – Esquema de síntese do inibidor 46, utilizando a metodologia de Bassler modificada.⁶⁰

Tabela 1.1 - Atribuições de sinais para o espectro para a molécula **56**.*(S)*-4-(4-clorofenoxi)-*N*-(2-oxotetrahidrofuran-3-yl)butanamida**56**

Posição	δ (ppm), n° de H, m	δ (ppm) ^{13}C
1	-	175,4
2	4,56 (ddd, J = 11,6; 8,6; 6,1 Hz; 1H) 4,28 (ddd, J = 11,2; 9,3; 5,9 Hz; 1H)	66,0
3	2,81 (dddd, 12,6; 8,6; 6,0; 1,1 Hz; 1H) 2,20 – 2,07 (m, 3H (2 x H7 + 1 x H3)).	30,4
4	4,46 (td, J = 9,1; 1,1 Hz; 1H)	49,2
5	-	172,9
6	2,47 (t; 7,4 Hz; 2H)	32,3
7	2,20 – 2,07 (m, 3H (2 x H7 + 1 x H3)).	24,8
8	3,98 (td; 6,1; 1,5 Hz; 2H)	67,0
9	-	157,3
10	6,86 – 6,77 (m, 2H)	115,7
11	7,25 – 7,19 (m, 2H)	129,3
12	-	125,7
N-H	6,23 (d, J = 5,4 Hz, 1H)	-

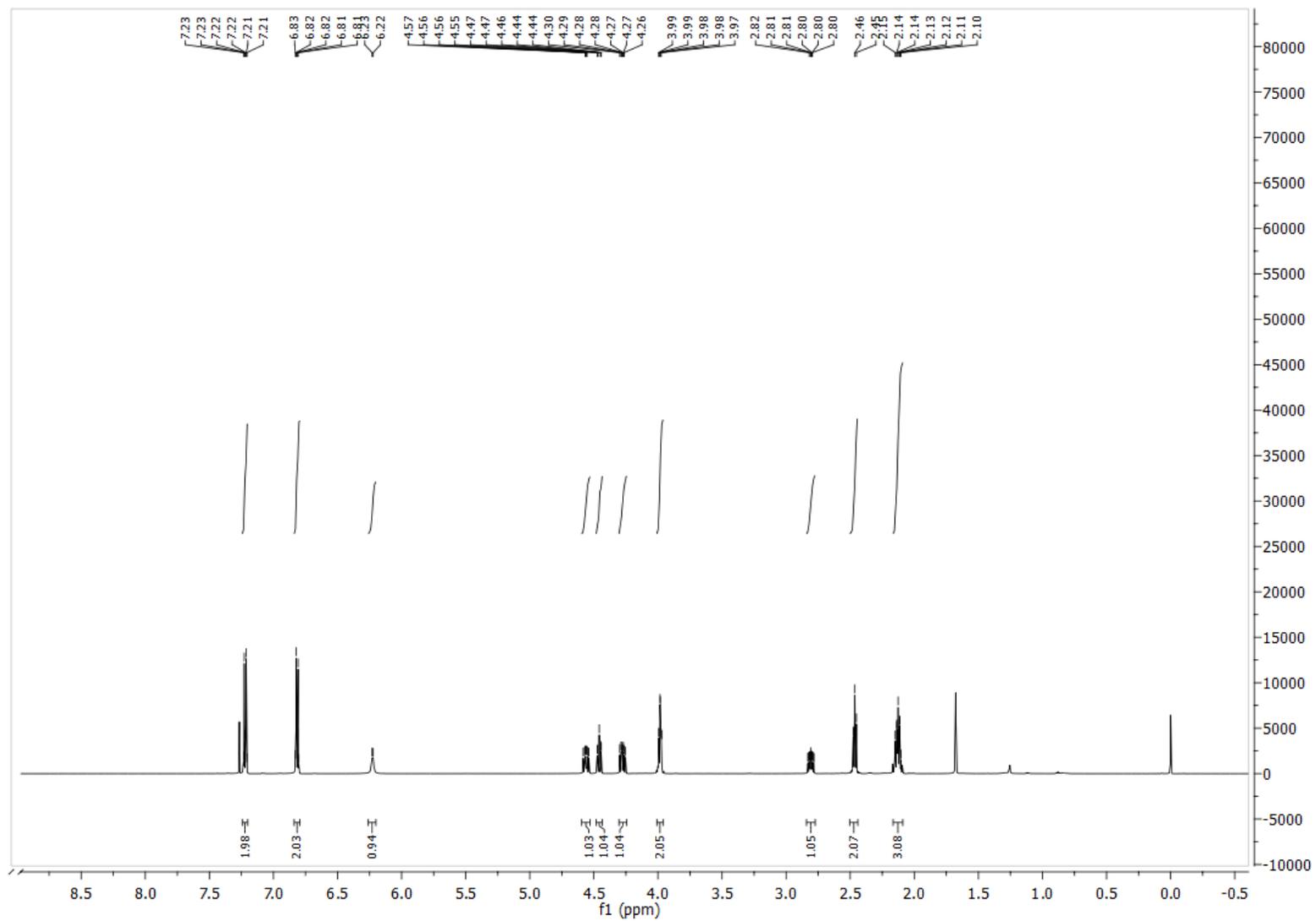


Figura 1.14 – Espectro de RMN ^1H (600 MHz – CDCl_3) da molécula **56**.

1.3.2. Testes Biológicos

1.3.2.1. Desenvolvimento de teste em caldo de cultivo para expressão de violaceína em CV026.

Em meu mestrado, realizei testes de inibição de violaceína em CV026 explorando cultivos em meio sólido (ágar). Apesar dos resultados terem sido interessantes, nos quais foi observada atividade bactericida para algumas das moléculas testadas, possivelmente capazes de interferir no QS de CV026, não tínhamos total confiança nesse modelo de teste. Primeiramente, pela falta de um inibidor conhecido para concretizar os dados de inibição, o que motivou a síntese da molécula **56**. Outra dificuldade observada no teste em ágar era a baixa solubilidade das moléculas de cadeias maiores no solvente utilizado, o que poderia influenciar na difusibilidade da molécula pelo ágar. Isso, potencialmente, poderia levar ao aumento localizado da contração da molécula testada, o que conduziria a uma potencialização da ação observada. Uma solução para esse problema foi realizar testes em caldo de cultivo com agitação, desenho experimental que, na nossa avaliação, minimizaria os problemas de solubilidade e difusibilidade previamente relatados.

Antes de realizar os testes, foi necessário ajustar alguns parâmetros. Primeiro, foi a escolha do recipiente do teste. As placas de 96 poços foram a primeira alternativa, mas logo se mostraram ineficientes, pois a agitadora/incubadora do teste não permitia a acomodação da placa de forma que não ocorresse contaminação entre os poços. A placa de 24 poços também foi ineficiente nesse quesito. Recipientes em formato de tubo foram testados, assim como a quantidade de caldo de cultivo nos testes foi alterada. Tubos tipo “Falcon” de 15 mL com 2 mL de caldo de teste foi o arranjo que demonstrou o melhor resultado nas condições laboratoriais disponíveis.

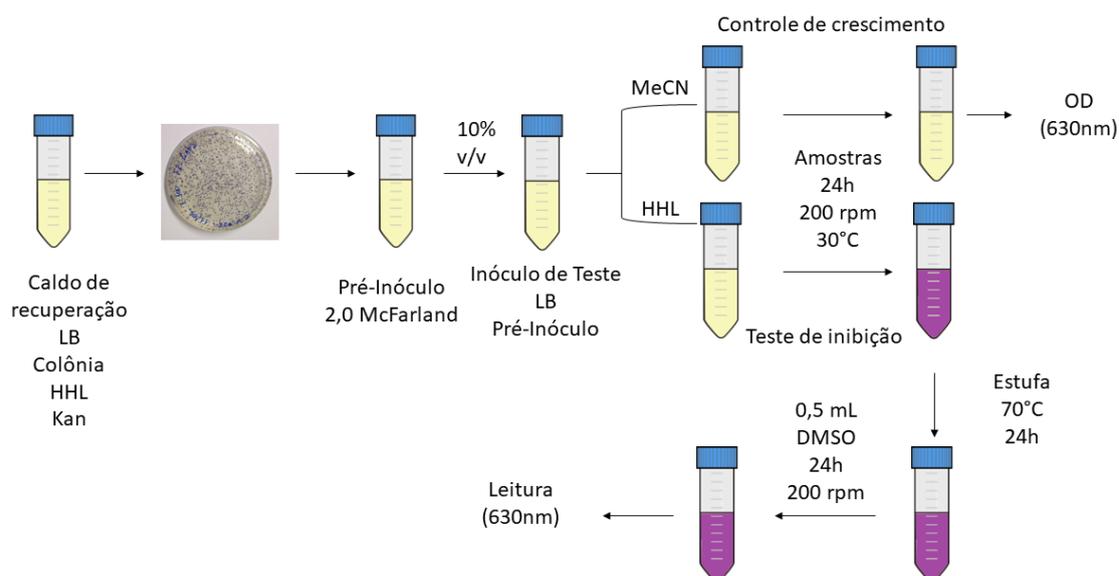
Além disso, foi necessário ajustar a quantidade de inóculo (suspensão de micro-organismos) adicionado ao caldo de teste, pois era desejável que, em 24 horas de incubação, a população bacteriana fosse suficiente para induzir o QS e produzir quantidades de violaceína visíveis a olho nu, o que permitiria a sua quantificação. Todos os testes foram realizados utilizando inóculo ajustado para nível 2,0 da escala de McFarland ($\sim 6 \times 10^8$ bactérias/mL), por meio da homogeneização de colônias coletadas diretamente da placa de cultivo.

O próximo passo foi escolher o solvente para a solubilização das moléculas teste, pois devido às suas estruturas apolares, não foi possível solubilizá-las apenas em água. Essa escolha foi feita de maneira muito cuidadosa pois, como relatado por Plakunov e colaboradores, o uso de DMSO em cepas selvagens pode aumentar a biossíntese de violaceína.⁶¹ O teste em placa de ágar foi realizado utilizando etanol (40% em água) porém, nos testes líquidos, essa solução

inibiu o crescimento bacteriano. As soluções aquosas de acetona (25%) e acetonitrila (20%) não apresentaram diminuição da densidade populacional bacteriana, sendo então aceitas para os testes.

Para garantir o poder estatístico do estudo, os testes foram conduzidos em triplicatas biológicas. Em química, estamos acostumados a realizar replicatas técnicas, ou seja, a medição repetida da mesma amostra. Já para a replicata biológica, usam-se ensaios independentes, montados e realizados em momentos diferentes, o que permite considerar a variabilidade intrínseca de populações bacterianas submetidas a ciclos de cultivo.

Como utilizamos a cepa CV026, foi necessária a adição do autoindutor exógeno, para que a cepa pudesse produzir violaceína e então possibilitar a visualização de possível inibição quando do ensaio com a molécula teste. Por isso, os testes foram realizados sempre em dois experimentos paralelos, um chamado de “controle” que consistia em caldo Luria-Bertani (LB), inóculo bacteriano e solvente (com ou sem as moléculas de teste), de forma a monitorar o crescimento bacteriano. Já o experimento chamado “teste” consistiu em caldo LB, inóculo, autoindutor e solvente (com ou sem as moléculas de teste), de forma a monitorar a inibição da biossíntese de violaceína. Após 24 horas dos experimentos incubados em agitadora à 30°C e 200 rpm, as amostras “controle” forneceram os valores de densidade ótica (OD) pela leitura das amostras em espectrofotômetro a 630 nm para monitorar o crescimento bacteriano. Já o experimento “teste” foi colocado em estufa a 70°C para evaporação do caldo, ficando apenas a violaceína, insolúvel em água. A essa amostra seca foram adicionados 0,5 mL de DMSO e esse meio foi deixado sob agitação (200 rpm) por 24 horas. Após esse tempo as OD's das amostras foram aferidas em espectrofotômetro (630 nm). O Esquema 1.11 representa o procedimento realizado para o experimento de inibição de violaceína.



Esquema 1.11 - Experimento de quantificação de violaceína.

Para que a possibilidade de inibição de QS fosse considerada ao final do teste, a densidade bacteriana (média da densidade óptica - OD 630 nm) na amostra “controle” molécula e na amostra “controle” solvente deveria ser estatisticamente igual [teste T de Student com nível de significância ($p > 0,05$)]. A porcentagem de inibição foi dada pela fórmula abaixo, para cada concentração testada.

$$\% (\textit{inibição}) = (\mu OD_{\text{teste}_{\text{solvente}}} - \mu OD_{\text{teste}_{\text{molécula}}}) / \mu OD_{\text{teste}_{\text{solvente}}} \times 100$$

Para a molécula **56** (Figura 1.15), as concentrações testadas foram: 125; 62,5; 31,25 e 15,75 μM ; enquanto as inibições de violaceína foram de, respectivamente, 95%, 90%, 89% e 72%. Para as concentrações de 125 e 62,5 μM houve diminuição do crescimento bacteriano ($p < 0,05$) e não consideraremos esses valores de inibição para o trabalho. Em relato da literatura, 1,2 μM da molécula **56** inibiu 50% da produção de violaceína.⁵² Tendo em vista o valor da literatura e o obtido pelos nossos testes, foi desenvolvido um teste fácil que produz resultados reprodutíveis e compatíveis com os resultados produzidos por outros autores.

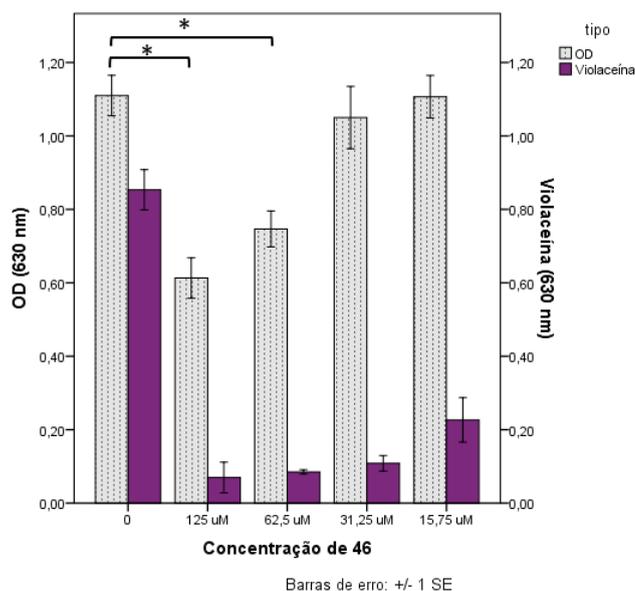


Figura 1.15 – Gráfico de inibição para a molécula **56**.

Além do inibidor **56**, também foram testados os seus intermediários de síntese, nas concentrações de 2,5 mM, 1,25 mM, 625 µM e 312 µM. O ácido **60** foi o que apresentou melhor atividade antimicrobiana (Figura S16 – anexo). Mas na concentração de 312 µM não houve morte celular e a inibição de violaceína foi de 30%. Para o éster **59**, a inibição foi de 50% a 1,25 mM (Figura S15 – anexo). Isso mostra a importância da lactona homoserina para o resultado desejado de inibição.

1.3.2.2. Teste de competição.

O teste de competição foi feito nas mesmas condições do teste de inibição de violaceína, porém, nesse teste a concentração da molécula **56** se manteve constante em 31,5 µM e variou-se a concentração do **51** (HHL) de 10 nM à 1 mM.

Como resultado, foi possível observar que a síntese da violaceína foi restaurada apenas após o uso de concentrações do AI cognato milhares de vezes maior do que as necessárias para induzir a produção de violaceína na ausência do inibidor **56**. Esse resultado se mostrou em linha com aquele previamente relatado por Bassler e colaboradores, que inferiu sobre a maior afinidade entre CviR e **56** em relação a outras AHLs com base na medida do tempo de meia-vida do complexo CviR:Ligante em condição de proteólise.⁵² Cabe salientar que o experimento de competição realizado nesta tese é tecnicamente mais simples do que o experimento de proteólise relatado por Bassler, e complementa o conhecimento sobre a estabilidade de complexos entre CviR e ligantes baseados em AHL's (Figura 1.16).

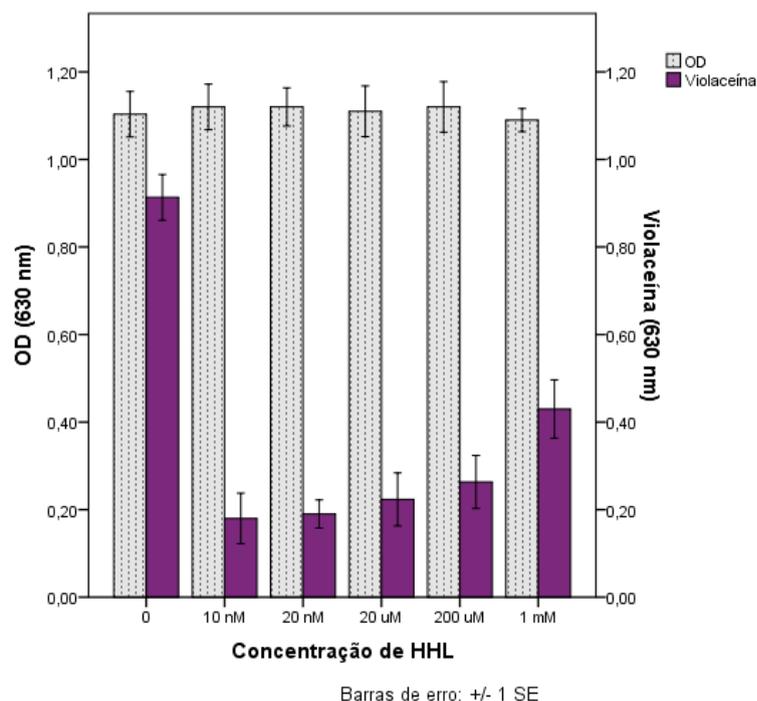


Figura 1.16 – Teste de competição entre o AI e a molécula **56** e autoindutor **51** (HHL)

1.3.2.3. Teste de hidrólise de quitina.

Segundo o trabalho de Chernin e colaboradores, a atividade quitinolítica em CV026 é um fenótipo controlado por QS.⁵³ À vista disso, este trabalho se esforçou para desenvolver um teste que permitisse avaliar a inibição da atividade quitinolítica em CV026 e, com isso, pudesse complementar o conhecimento sobre o mecanismo de inibição de violaceína para as moléculas posteriormente estudadas nesta tese de doutorado.

O trabalho de Chernin e colaboradores utilizava um meio semimínimo que continha 10% de sacarose (m/v), 10% de meio LB (v/v), 0,2% de quitina coloidal (m/v) e 1,5% de ágar (m/v). Nessas condições, não houve consumo de quitina, mesmo após 72 horas, tempo descrito no artigo desses autores (Figura 1.17).⁵³ Isso deve ter ocorrido pela presença de sacarose no meio, uma fonte de carbono mais facilmente metabolizada pela bactéria do que a quitina. Dessa forma, elaborou-se o meio sem sacarose no qual foi possível a visualização da hidrólise de quitina.

Outra preocupação que se teve na realização das primeiras tentativas deste ensaio foi sobre a forma como o experimento era conduzido. A escolha do recipiente certo para o experimento foi motivo de investigação. Placas de 6, 24 e 96 poços, além de placas de Petri foram avaliadas para o procedimento. As placas de 96 e 24 poços permitiam uma visualização muito ruim do consumo de quitina. Em contrapartida, a placa de petri e a de 6 poços se mostraram adequadas para uma visualização clara do consumo de quitina. Para que não

houvesse qualquer tipo de contaminação cruzada entre os experimentos realizados paralelamente, foi utilizada a placa de 6 poços, na qual cada molécula seria testada em um poço individual.

Outro problema previamente vislumbrado para o uso da placa de Petri foi que, no teste de inibição de violaceína usou-se a suplementação de **51** do meio como um todo. Porém, numa placa de Petri, para se obter um meio de ensaio adequado, seriam necessários pelo menos 15 mL de meio. Dessa forma, seria gasta uma grande quantidade de **51** que é um insumo caro. A placa de 6 poços também demandaria o uso de quantidades consideravelmente grandes de **51**. Contudo, a placa de 6 poços permitiu uma adaptação do experimento de forma à se reduzir consideravelmente a quantidade de **51** empregada nesses ensaios. Na Figura 1.17-A foi testada a suplementação do meio como um todo. Já na Figura 1.17-B foi testada apenas a suplementação do inóculo bacteriano. Como é possível observar pela figura, não houve diferença no crescimento e coloração da colônia, o que permitiu suplementar apenas o inóculo bacteriano. Na Figura 1.17-C e D foi utilizada uma alíquota menor do inóculo bacteriano (5 μ L). O crescimento da colônia e sua coloração foram satisfatórios, porém, para que a visualização do efeito de consumo de quitina fosse clara, escolheu-se uma alíquota de 10 μ L, como na Figura 1.17-A ou B.

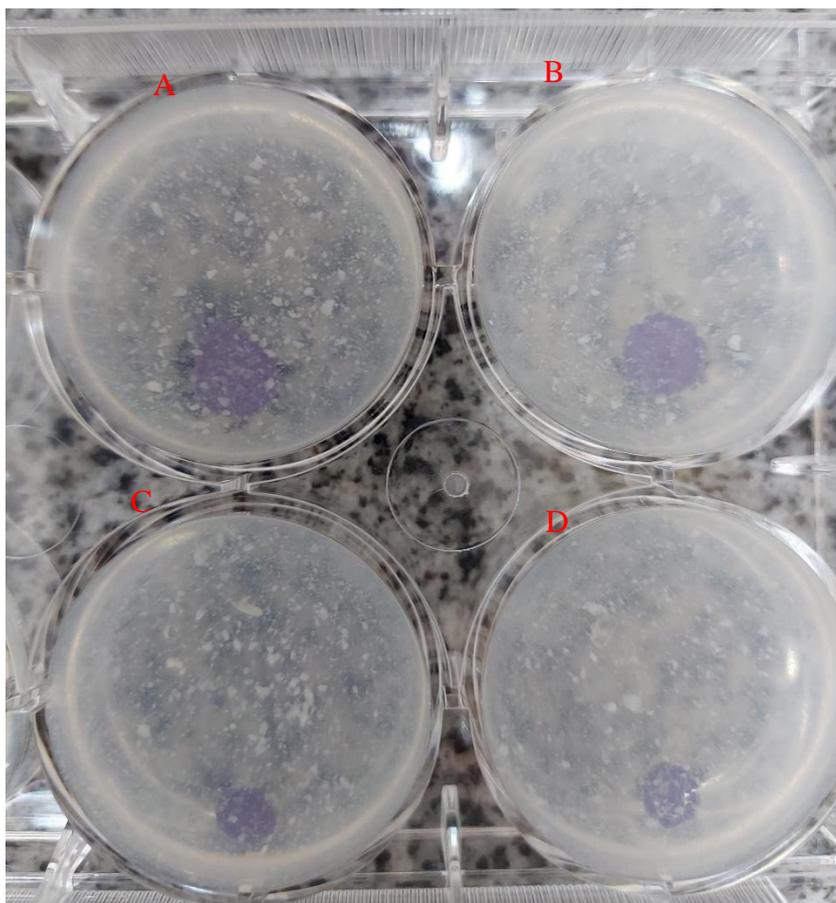


Figura 1.17 – Teste preliminar de consumo de quitina. Em (A) o meio como um todo foi suplementado com **51**; Em (B) apenas o inóculo bacteriano foi suplementado com **51**; Em (C) e (D) a alíquota de inóculo bacteriano foi de 5µL, enquanto, em (A) e (B) a alíquota foi de 10 µL.

Esse mesmo raciocínio foi seguido para o controle positivo de inibição **56**. Se a suplementação fosse do meio como um todo, haveria um consumo de grande quantidade dessa molécula. Por isso, a colônia de bactéria foi suspensa em uma solução de NaCl 0,9% (pré-inóculo), depois foi transferida uma alíquota adequada, na proporção de 1:10 (v/v), para o inóculo de teste, cuja composição foi igual à do meio, menos o ágar. Para o controle positivo de consumo de quitina (CP), foi colocado a bactéria e **51** no inóculo de teste. Para demonstrar que a atividade quitinolítica foi dependente do **51**, foi feito um controle negativo de consumo de quitina (CN), em que o inóculo de teste consistia apenas em bactéria. Para o inóculo de inibição de violaceína, o inóculo consistia na suspensão bactéria, **51** e molécula **56** (concentração final de 31 µM). No trabalho de Chernin e colaboradores, os experimentos ficavam 72 horas incubados. Na Figura 1.18-A, B e C tem-se 24 horas de incubação para CP, CN e molécula **56**, respectivamente. É possível observar a formação de colônia bacteriana em todos os poços, porém apenas CP mostrou presença de violaceína. Já na Figura 1.18-D, E e F tem-se 72 horas de incubação e nela é possível observar a formação de halo de consumo de

quitina em CP. Em CN, sem a presença de **51** não há consumo de quitina. Já a molécula **56** inibe a produção de violaceína e o consumo de quitina. Portanto, esse trabalho corrobora que a atividade quinolítica é controlada por mecanismo de QS. Vale ressaltar que os experimentos em D, E e F são uma replicata dos em A, B e C. Por isso, as imagens não são exatamente iguais.

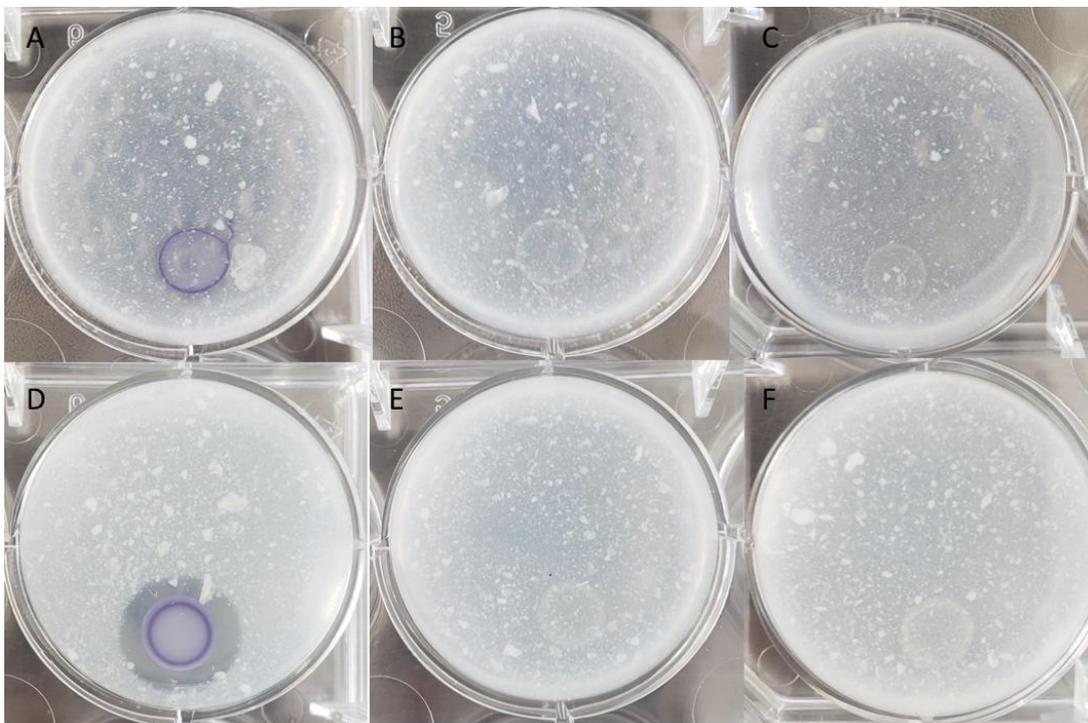


Figura 1.18 - Teste de consumo de quitinas (A): Controle positivo (CP) com 24 horas de incubação, mostrando halo de crescimento microbiano e síntese de violaceína; (B): Molécula 46 com 24 horas de incubação, apenas halo de crescimento bacteriano visualizado (C) Controle Negativo (CN – bactéria sem presença de **51**), apenas halo de crescimento bacteriano observado com 24 horas de incubação; (D): CP com 72 horas de incubação, halo de crescimento bacteriano, produção de violaceína e consumo de quitina observado; (E): Molécula 46 com 72 horas de incubação, apenas halo de crescimento bacteriano observado.(F) CN com 72 horas de incubação, apenas halo de crescimento bacteriano observado.

1.3.2.4. RT-qPCR.

A inibição concomitante da biossíntese de violaceína e de consumo de quitina em CV026 sugere que a molécula testada interfere no QS desta cepa de *Chromobacterium subtsugae*. Desta forma, fez-se necessário analisar se a inibição desses fenótipos ocorria por ação antagonista das moléculas anti-QS testadas sobre o ativador transcricional.

É sabido que a biossíntese de violaceína em CV026 está codificada por genes, localizados em um local de 8-kb de DNA, agrupado como um único *operon* (*vioABCDE*). A expressão desse *operon*, controlado pela CviR, produz um único transcrito policistrônico de RNA que codifica a tradução das proteínas necessárias à produção de violaceína.^{50,62}

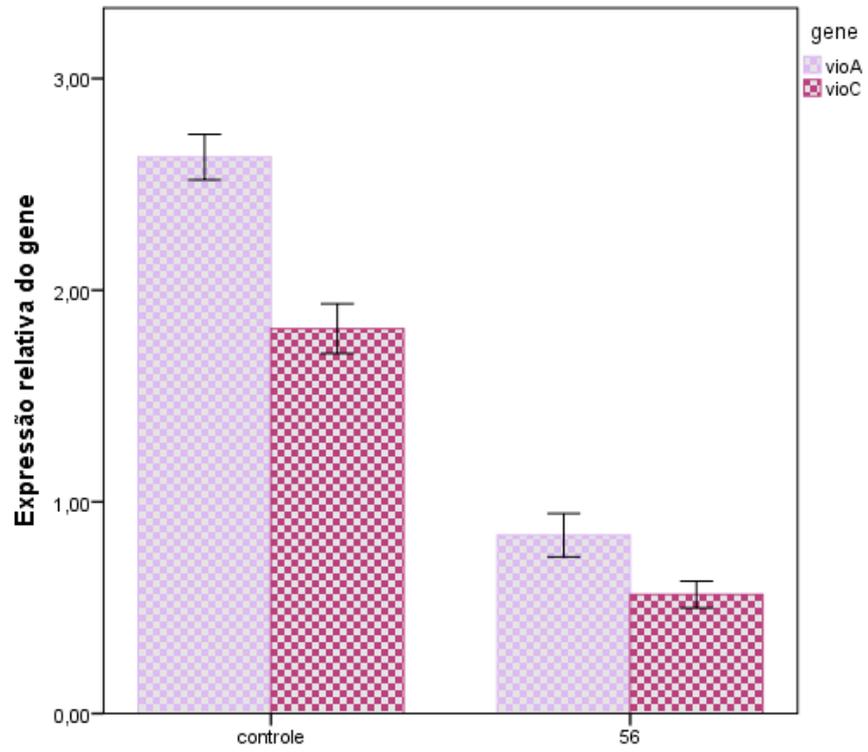
A técnica de RT-qPCR foi escolhida com o intuito de testar a premissa de interferência na transcrição. A PCR, sigla do inglês para Reação em Cadeia da Polimerase, é uma técnica de biologia molecular amplamente utilizada para analisar a presença ou não de um gene no DNA. A técnica consiste em amplificar o material genético desejado tendo em vista uma reação em cadeia controlada. Para tal utiliza-se uma enzima capaz de duplicar o DNA, os primers (pequenos moldes de DNA que se anexam no começo do gene de interesse) e, por fim, o DNA em análise. Esse mix de elementos submetido a ciclos de altas e baixas temperatura é capaz de multiplicar de forma exponencial o pedaço de DNA de interesse.⁶³

No caso do estudo relatado nesta tese, o interesse está na transcrição do gene e por isso utilizar-se a RT-PCR. Nesta técnica, o material genético em apreço é o mRNA que por sua vez é utilizado de molde pela transcriptase reversa para sintetizar um cDNA, que é então amplificado pela técnica de PCR. Além disso, essa técnica está associada à PCR quantitativa (qPCR), que permite mensurar o quanto um gene este sendo transcrito. Essa avaliação pode ser feita de duas formas: quantificação absoluta, envolvendo uma curva de padrões, ou quantificação relativa, em que as alterações de expressão da amostra são comparadas com um padrão externo ou gene de referência.⁶⁴

O RNA total foi extraído das células CV026 nas mesmas condições do ensaio de quantificação de violaceína, usando um kit de extração conforme indicado pelas instruções do fabricante. O fabricante comenta que para uma extração de RNA efetiva, quatro passos são essenciais: a lise da célula, a desnaturação de complexos proteína/núcleo, inativação de Rnases exógenas e remoção de contaminantes. Por isso, toda a estação de trabalho foi minuciosamente desinfetada, além de se passar uma solução de RNase e Dnase, para que não houvesse interferência na extração.

As amostras de RNA foram quantificadas utilizando-se de um espectrofotômetro (NanoDrop[®]) e as concentrações normalizadas em 150 ng/μL. A reação de RT-qPCR de passo foi realizada utilizando o RNA normalizado como material de partida. Apesar do operon *vioABCDE* gerar apenas 1 mRNA, optou-se por avaliar a expressão sondando dois *loci* do transcrito, *vioA* e *vioC*. O gene *gyrB* foi utilizado como gene de referência para a quantificação relativa.⁶⁴ Esses dois locais também foram avaliados por Sheperd e colaboradores.⁵⁸

Para a molécula **56** houve uma redução de 68% e 70% na expressão de *vioA* e *vioC*, respectivamente (Figura 1.19). Essa informação comprova novamente que a inibição de produção de violaceína provocada por **56** se dá pela inibição da transcrição de *vioABCDE*, como já havia sido relatado por Bassler.⁵²



Barras de erro: ± 1 SE

Figura 1.19 – Gráfico de expressão relativa dos genes *vioA* e *vioC* na presença ou não da molécula 56.

1.4. Conclusões

Considerando os objetivos desse capítulo, pode-se afirmar que eles foram atingidos. A síntese de um reconhecido inibidor de biossíntese de violaceína foi realizada com rendimento global de 52% em três etapas.

A elaboração de um teste robusto de inibição de síntese de violaceína em caldo demandou tempo, mas se deu com sucesso. Ele poderá ser reproduzido na testagem de novos QSI. Para entender um pouco mais sobre a interação do inibidor, foi-se então pensado um experimento pelo sítio de ligação da proteína CviR. O resultado foi de encontro ao da literatura, mostrando que a interação da molécula **56** com a proteína receptora é muito efetiva. A produção de violaceína apenas foi retomada quando se utilizou valores de concentração do **51**, AI cognato de CV026, milhares de vezes maiores que o necessário para a indução na ausência do inibidor **56**.

Um ensaio que permitisse avaliar a capacidade do controle positivo de inibição de inibir a degradação de quitina, outro fenótipo controlado por QS em CV026, foi realizado com sucesso. A metodologia descrita por Chernin e colaboradores não se mostrou plenamente reprodutível e demandou ajustes para que pudesse ser realizada em nosso laboratório. Contudo, já está estabelecida e pode ser repetida para análise de outros possíveis QSI.

Por fim, a análise de RT-qPCR segmenta que as inibições observadas para o controle positivo de inibição **56** são devido à interferência no QS de CV026 em nível transcricional, isso porque a interação CviR:46 impede que o operon *vioABCDE* seja transcrito de forma regular.⁶⁰

Desta forma, os avanços relatados neste capítulo servirão como base para se testar novas moléculas com potencial ação QSI sintetizados pelo Grupo de Transformação em Síntese Orgânica (GTSO).

Capítulo 2

Simplificação estrutural do autoindutor e de um
inibidor conhecido de CV026

2.1.Introdução

Produtos naturais sempre foram parte importante na produção de medicamentos.⁶⁵ Entre os quais, pode-se citar os fitoterápicos, na forma de extratos, e os fitofármacos, nos quais o princípio ativo está isolado.⁶⁶ Ademais, os produtos naturais são grande fonte de inspiração para novas moléculas com potencial biofarmacológico. De acordo com a revisão de Sheng e colaboradores, das drogas aprovadas pelo FDA (U.S. Food and Drug Administration), entre 1981 e 2014, para testes clínicos, mais de 50% eram derivadas de produtos naturais.⁶⁷

Os produtos naturais são moléculas biologicamente pré-validadas, pois elas são produtos de um processo de evolução molecular e biológico. Outrossim, muitas delas têm caminhos facilitados para adentrar a célula e interagir com enzimas. Dessa forma, é válido pensar que os derivados de produtos naturais também terão esses caminhos facilitados, o que pode levar a uma resposta biológica similar ou melhorada em comparação ao produto natural.⁶⁷

Exemplo disso é a molécula *Pladienolide B*, **62**, um substrato produzido pela *Streptomyces platenses* que apresenta ação antitumoral contra câncer de colón.⁶⁸ Diversos grupos de pesquisas propuseram diversas alterações na estrutura de **62**, algumas produziram bons resultados e outras infelizmente não. As substâncias **66**, **67**, **68** e **69** foram aquelas que apresentaram os melhores resultados das muitas testadas.^{67,69-72}

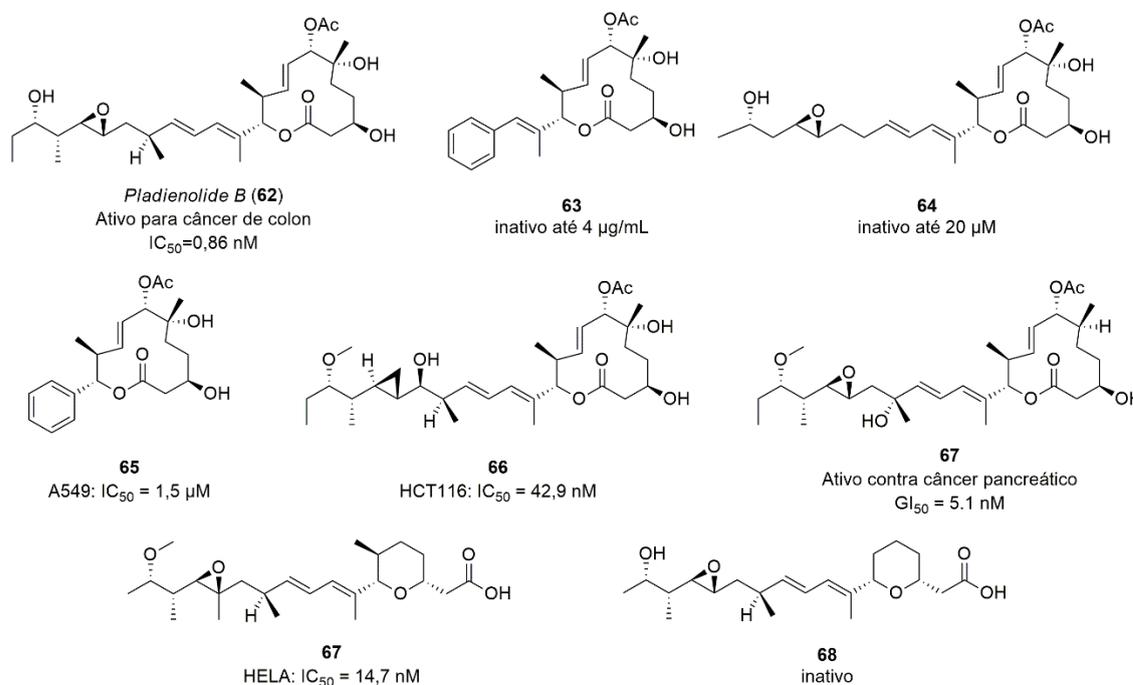


Figura 2.1 - *Pladienolide B* e seus análogos.^{67,69-72}

Normalmente, os análogos de produtos naturais tendem a ser simplificações estruturais visando uma rota de síntese mais simples, com menos átomos e centros quirais, sem que haja perda ou alteração da atividade biológica pretendida.⁷³ A presença de centros quirais faz com

que haja a necessidade do uso de estratégias assimétricas que normalmente encarecem o processo de síntese do produto natural ou de análogos.⁶⁷ Na tentativa de se otimizar os esforços na busca por análogos de produtos naturais que preservam a atividade pretendida, muitos grupos de pesquisas utilizam de ferramentas como SAR (sigla do inglês para estudo da relação entre estrutura e atividade) baseadas em *docking* molecular.^{74,75}

O *docking* ou ancoragem molecular consiste em um procedimento computacional que busca prever a melhor posição e orientação que um ligante adota ao interagir com uma biomolécula, formando um complexo estável.⁷⁶ Geralmente, é empregado para proteínas ou enzimas como receptores, mas pode ser utilizado para complexos que contêm ácidos nucleicos ou carboidratos, por exemplo. Vários trabalhos trazem o *docking* molecular entre uma proteína e uma molécula alvo como forma de se prever o mecanismo de ação molecular de uma dada substância.⁷⁷

2.1.1. *N*-(2-hidroxiethyl)amidas

As *N*-(2-hidroxiethyl)amidas, NAE's (sigla do inglês para *N-acylethanolamines*), são moléculas derivadas de ácidos graxos com importantes propriedades biológicas, uma vez que elas participam na regulação de diversas funções fisiológicas.²⁹ A mais conhecida é a anandamina (20:4), **70**, ligante endógeno dos receptores endocanabinoídes de cérebro de mamíferos (Figura 2.2). A *N*-(2-hidroxiethyl)palmitamida (16:0), **71**, apresenta funções analgésicas e anti-inflamatórias. A *N*-(2-hidroxiethyl)oleidamida (18:1), **72**, está relacionada com a percepção de saciedade. A sinaptinamida (22:6), **73**, ajuda na neurogênese, na fertilidade entre outras funções.^{78,79}

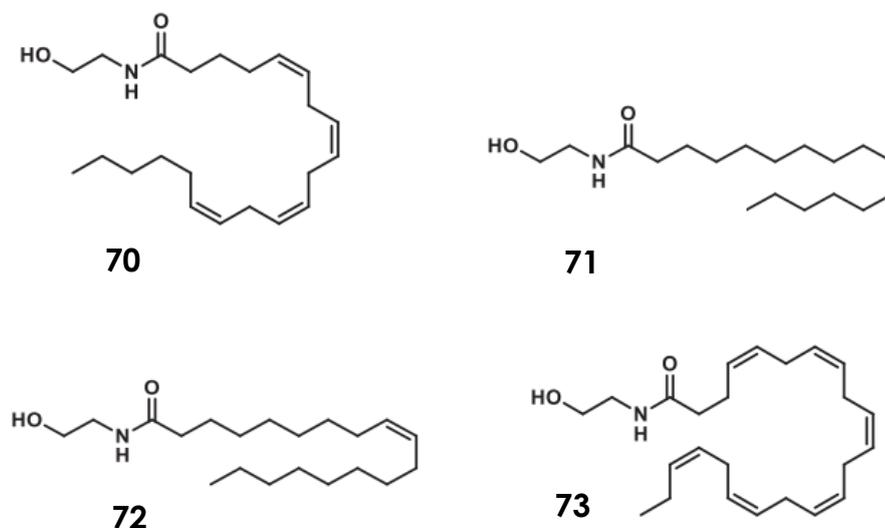
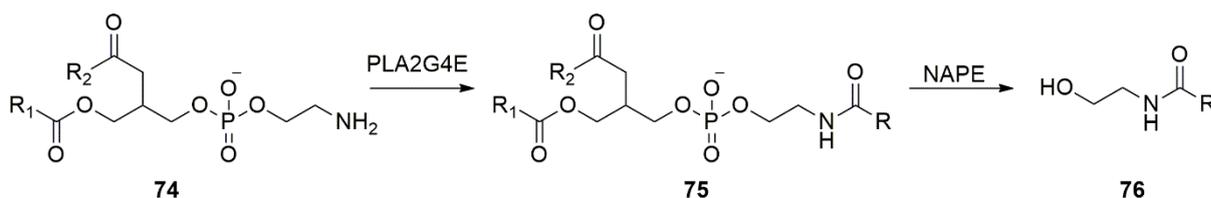


Figura 2.2 – Exemplos de NAE's com funções biológicas.⁷⁹

Na revisão de Chapman e colaboradores são mostradas as funções biológicas das NAE's em plantas.⁸⁰ Os autores comentam sobre a conservação dessa classe de moléculas entre reinos e de seu papel como sinalizadores químicos. Normalmente as NAE's com menos insaturações apresentam as maiores atividades biológicas, como as moléculas **71** e **72**, e já foram caracterizadas como ativadores de genes de defesa, no desenvolvimento do cloroplasto e no crescimento da planta.

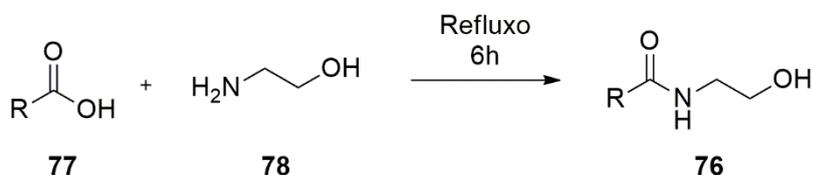
2.1.2. Síntese de *N*-(2-hidroxi)amidas.

Van der Slegt e colaboradores relatam que há pelo menos quatro caminhos pelos quais a biossíntese das NAEs pode ocorrer. Uma dessas rotas começa pela acilação da fosfatidiletanolamina, glicofosfolípídeo encontrado especialmente no cérebro – **74**, mediada pela enzima PLA2G4E. Sequencialmente, o intermediário **75** é modificado pela enzima NAPE, o que leva à formação das NAE's (Esquema 2.1).⁷⁹



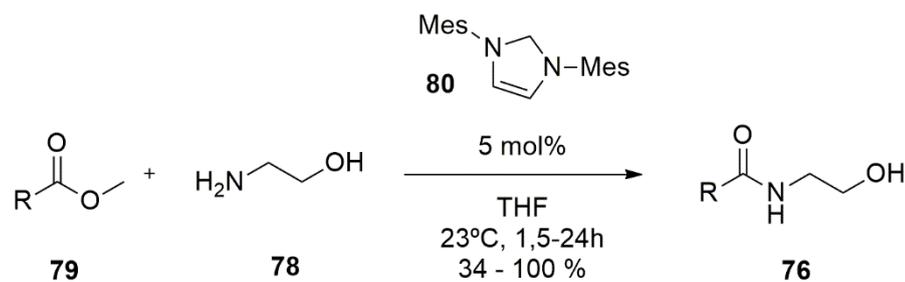
Esquema 2.1 - Uma das rotas de biossíntese das NAE's proposta por Van der Slegt e colaboradores.⁷⁹

Quimicamente, a síntese de *N*-(2-hidroxi)amidas pode ocorrer por diversas metodologias. Partindo de um ácido carboxílico como **77**, a amidação pode ocorrer diretamente sob refluxo ou passando por um intermediário ativado, como cloretos de ácido (Esquema 2.2).^{81,82}



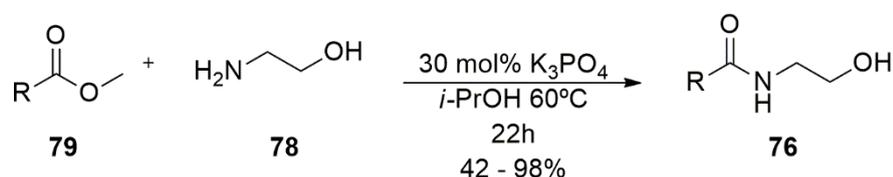
Esquema 2.2 - Síntese de *N*-(2-hidroxi)amidas realizada por Moaddel e Ameri.⁸¹

Movassaghi e colaboradores realizaram a síntese a partir de derivados de ésteres metálicos inativos, **79**, com o auxílio de um catalisador, **80**, e obtiveram amidações com rendimentos que variaram de 34 a 100%. (Esquema 2.3).⁸³



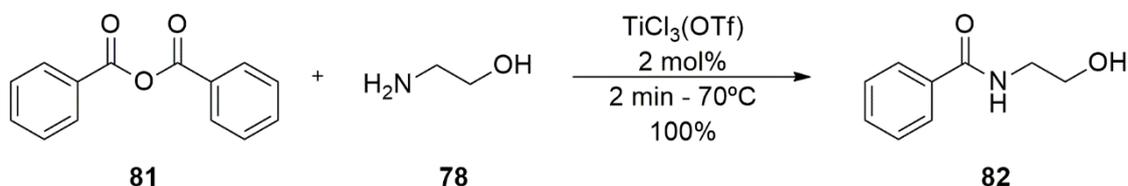
Esquema 2.3 - Síntese de *N*-(2-hidroxiethyl)amida realizada por Movassaghi e colaboradores.⁸³

Jamieson e colaboradores buscaram realizar amidações de uma forma mais sustentável, utilizando 30 mol% de fosfato de potássio em álcool isopropílico. Os autores obtiveram rendimentos que variaram de 42 a 98% (Esquema 2.4).⁸⁴



Esquema 2.4 - Síntese de *N*-(2-hidroxiethyl)amidas realizada por Jamieson e colaboradores.⁸⁴

Firouzadabi e colaboradores promoveram a amidação de um anidrido, **81**, com a etanolamina, **78**, na presença de 2 mol% de um catalisador de titânio com 100% de conversão para o composto **86** em apenas 2 minutos de reação (Esquema 2.5).⁸⁵



Esquema 2.5 - Síntese de *N*-(2-hidroxiethyl)benzamida feita por Firouzadabi e colaboradores.⁸⁵

2.1.3. *N*-(2-hidroxiethyl)amidas como inibidores de QS em CV026.

Machado e colaboradores realizaram o estudo do efeito de *N*-(2-hidroxiethyl)amidas, derivados de 2-oxazolininas e ácidos graxos frente a QS de CV026.⁸⁶ Os testes preliminares ocorreram em placa de ágar e foi obtida uma ampla gama de respostas. Todos os ácidos carboxílicos testados não apresentaram qualquer ação mensurável frente à modulação da síntese de violaceína em CV026. Contudo, seis deles apresentaram ação antimicrobiana **83-88** (Figura 2.6). Das várias 2-oxazolininas testadas, três, **89-91**, apresentaram ação bactericida, assim como três *N*-(2-hidroxiethyl)amidas, **92-94**, apresentaram esse mesmo efeito, mostrando o espectro de aplicação das moléculas. (Figura 2.6).

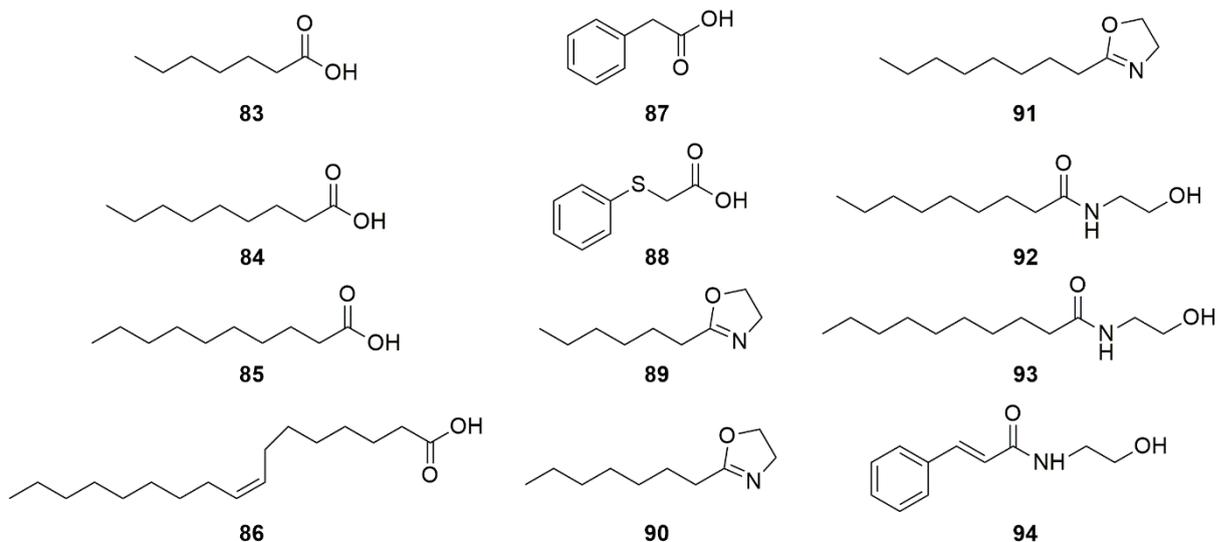
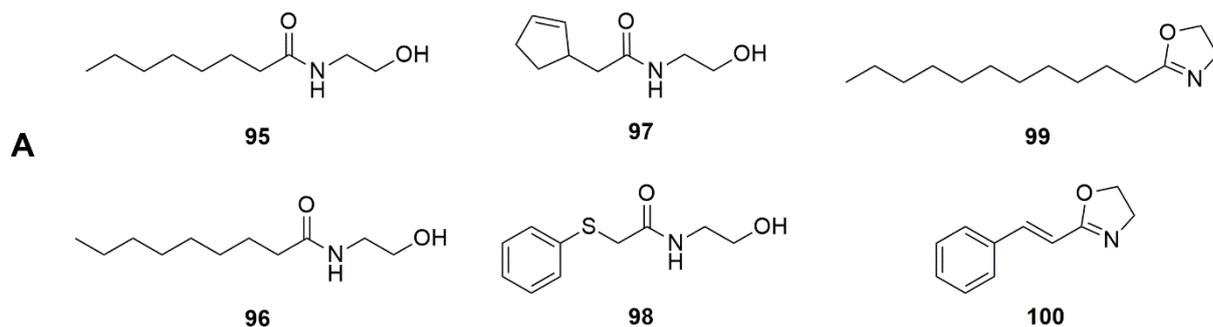


Figura 2.3. Resultados apresentados por Favero no estudo da ação de *N*-(2-hidroxi)etil)amidas, derivados de 2-oxazolinas e ácidos carboxílicos frente a QS de CV026.⁸⁶

Das 36 estruturas estudadas, 6 apresentaram interferência no QS de CV026. As *N*-(2-hidroxi)etil)amidas derivadas do ácido heptanóico **95** e do ácido 2-(ciclopent-2-en-1-il) acético **97** apresentaram indução de síntese de violaceína na placa na ausência do autoindutor (Figura 2.4-A). Os derivados do ácido octanóico **96**, ácido 2-(feniltio)acético e do **98** apresentaram inibição de síntese de violaceína. Além disso, as estruturas **99** e **100** também apresentaram efeito de inibição de síntese de violaceína, porém de forma menos pronunciada.

Nesse estudo, pelo fato de os experimentos terem sido realizados em placa, surgiram alguns questionamentos sobre os resultados. Observou-se dificuldade na solubilização dos compostos, o que poderia afetar os valores de concentração efetivamente utilizados nos testes. Além disso, esse fato poderia afetar a difusibilidade dos compostos no ágar, o que poderia levar a um efeito local de concentração das amostras testadas e levar resultados equivocados da modulação síntese de violaceína em CV026. Para dirimir este evento, postulou-se a necessidade do desenvolvimento de testes em meio líquido. Um fato vantajoso para esta nova proposta de tese é que ela possibilitaria a quantificação da inibição de síntese de violaceína.



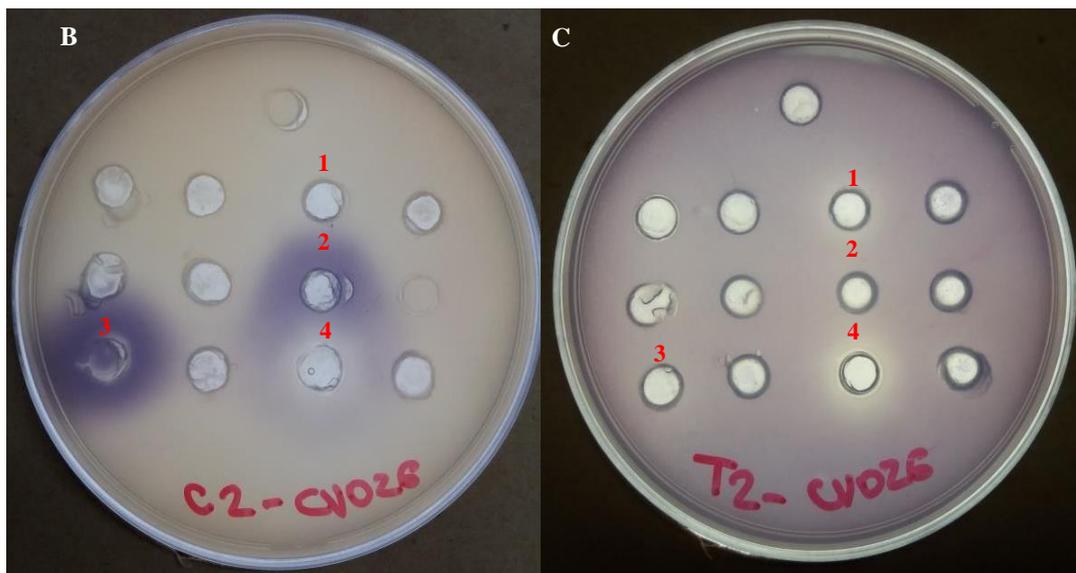


Figura 2.4 – (A) Moléculas estudadas pro Machado e colaboradores apresentaram interferência no QS de CV026. (B) Placa de controle, sem adição de **51**. (C) Placa de inibição de violaceína. (1) Poço referente à molécula **98**; (2) Poço referente à molécula **97**; (3) Poço referente à molécula **95**; (4) Poço referente à molécula **96**.

2.1.4. Morfolinas

As morfolinas são estruturas amplamente exploradas na química medicinal devido às suas propriedades físico-químicas, biológicas e metabólicas. A presença do oxigênio e do nitrogênio são interessantes, pois podem fazer ligações de hidrogênio com os receptores alvos. Além disso, essas estruturas, quando metabolizadas, levam a metabólitos não tóxicos, normalmente pela abertura do anel morfolínico.⁸⁷ Alguns exemplos são a Moclobemida, **100**, e a Pravadolina, **101** (Figura 2.5). A primeira é um antidepressivo reversível da IMAO, que atua como inibidor da degradação de noradrenalina, serotonina, dopamina, entre outros.⁸⁸ Já a segunda atua como agonista dos receptores CB1 e CB2 do sistema endocanabinoide e se apresenta como um agente analgésico, anti-inflamatório não esteroide. ⁸⁹ Berg e colaboradores sintetizaram a estrutura **102** para ser um agonista seletivo de serotonina. ⁹⁰ A molécula **103** é candidata à agonista dos receptores de dopamina e pode ser usada no tratamento de doenças psiquiátricas. ^{91,92}

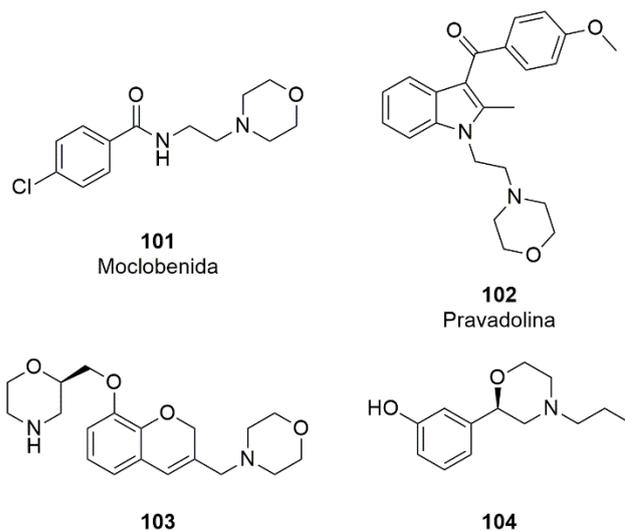
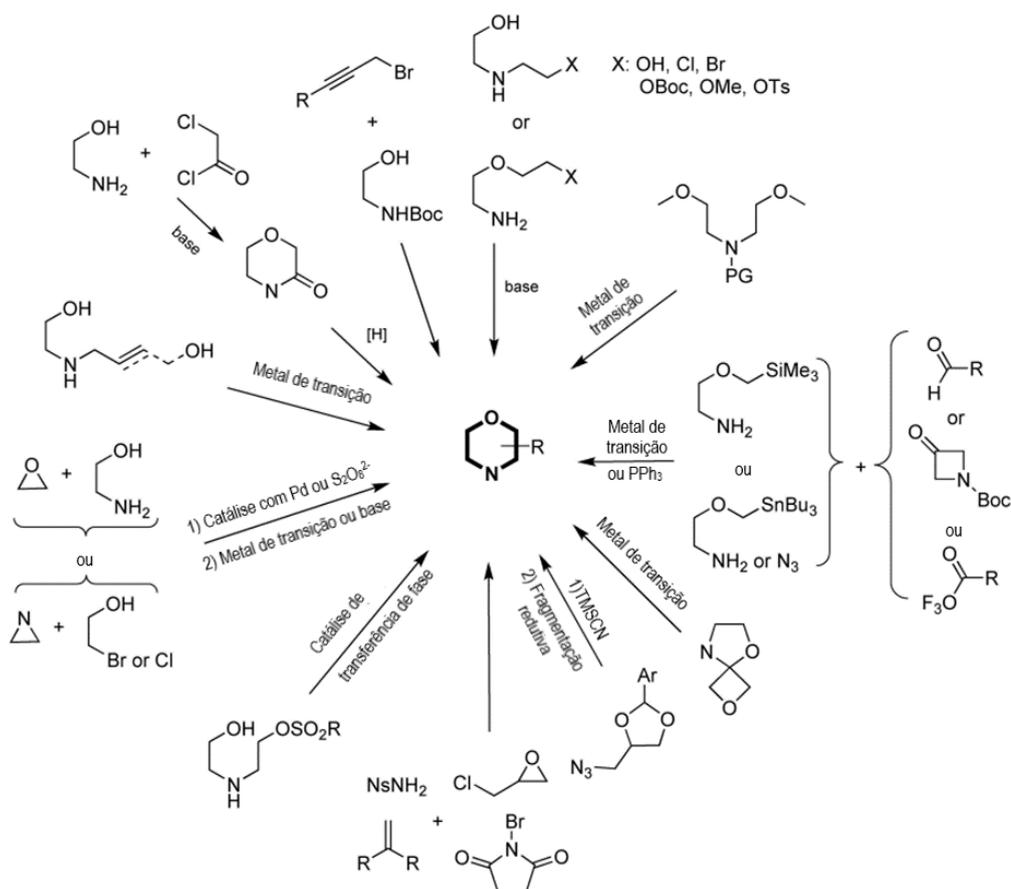


Figura 2.5 – Exemplos de estruturas com funções biológicas contendo um anel morfolínico. ^{87,88,90,91}

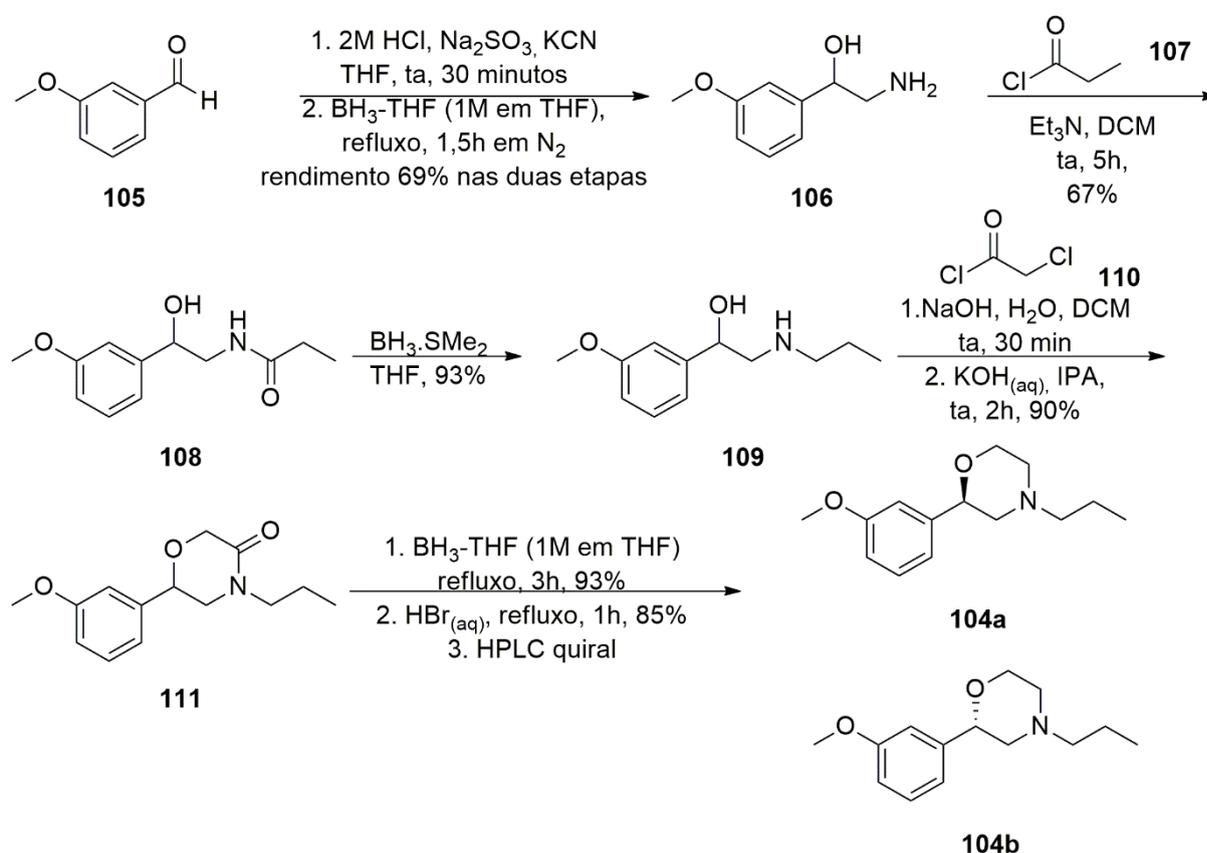
2.1.5. Síntese de morfolinas.

Em uma recente revisão, Kourounakis e colaboradores abordaram a síntese do anel morfolínico assim como a sua funcionalização (Esquema 2.6).⁹³ A ciclização intramolecular pode ocorrer em diversas condições de reação - ácidas, básicas, com ou sem auxílio de metais.



Esquema 2.6 - Diversas formas de síntese do anel morfolínico apresentado por Kourounakis.⁹³

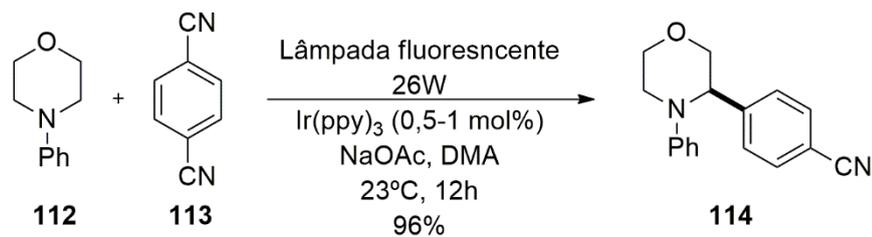
Blagg e colaboradores sintetizaram a molécula **104** a partir do 2-metoxibenzaldeído, **105**. A adição do grupo amino se dá pela adição de cianeto à carbonila com posterior redução, formando o composto **106**. O grupo amino é então acilado com o cloreto **107**, e a amida **108** foi reduzida formando o aminoálcool **109**. Ocorre então uma nova acilação seguida de ciclização intramolecular gerando o composto **111**, que é reduzido para formar a estrutura de interesse **104**. Essa então foi separada por HPLC quiral e o composto **104a** se mostrou um agonista mais eficiente para os receptores D₃, receptores de dopamina, na faixa de EC₅₀ = 36 nM; enquanto o composto **104b** apresentou atividade biológica na faixa de 10 μM de concentração (Esquema 2.7).



Esquema 2.7 - Síntese da molécula **91** por Blagg e colaboradores.⁹¹

Em química medicinal, é comum sintetizar-se um acervo de moléculas para avaliar sua atividade biológica.⁹⁴ Com isso, a funcionalização das estruturas se torna uma ferramenta indispensável. A revisão de Kourounakis comenta que, apesar dos acoplamentos do tipo sp²-sp² terem grande importância para construção de moléculas, eles inserem planaridade na molécula, o que nem sempre é biologicamente interessante.⁹³ Dessa forma, um acoplamento do tipo sp³-sp³ ou sp³-sp² seria mais apropriado para a funcionalização de morfolinás.⁹⁵ MacMillan e colaboradores então propuseram um acoplamento C-H fotoredox na posição α de aminas,

como a *N*-fenil morfolina (**112**), com o auxílio de complexo Ir(ppy)₃.⁹⁶ O mecanismo da reação fotoredox se dá pela transferência de um único elétron (SET – sigla do inglês para *single electron transfer*) do composto de irídio para o *p*-dicianobenzeno (**113**) que, por sua vez, é transferido para o grupo *N*-arila, o que resulta no acoplamento sp³-sp² formando o composto **114** (Esquema 2.8).



Esquema 2.8. - Síntese da morfolina funcionalizada **114** apresentada por MacMillan e colaboradores.⁹⁶

2.2. Objetivos

Nesse capítulo, o objetivo geral foi sintetizar um acervo de *N*-(2-hidroxiethyl)amidas e morfolinamidas e testar sua capacidade de interferir na expressão de fenótipos controlados por QS em CV026, tais como a biossíntese violaceína e a sua atividade quitinolítica. A hipótese de que estas moléculas sejam capazes de promover este resultado se baseia na similaridade estrutural entre essas moléculas e o autoindutor cognato de CV026, **51**. Tais modificações resultam na simplificação estrutural de **51** e, verificada a ação pretendida, abre caminho para a síntese de novos inibidores do QS de bactérias Gram-negativas com estrutura química mais simples e de melhor acesso sintético.

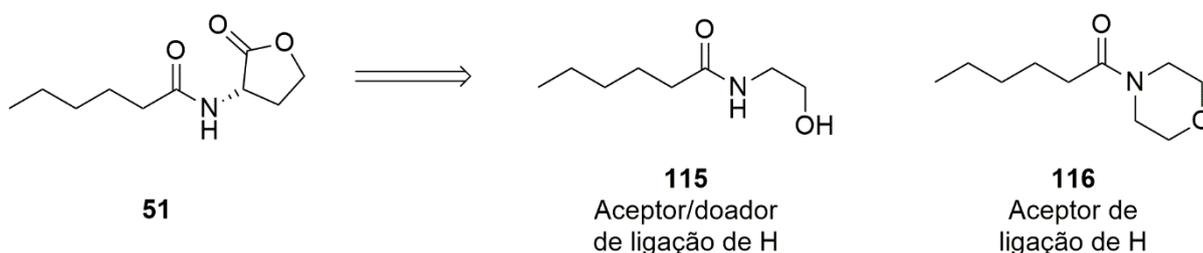


Figura 2.6 – C6-AHL, **51**, e suas simplificações *N*-(2-hidroxiethyl)hexanamida e 1-morfolinahexanona.

2.2.1. Objetivos Específicos.

- 1) Sintetizar *N*-2-hidroxiethylamidas e morfolinamidas análogas ao autoindutor **51** e ao inibidor **56**
- 2) Testar se as *N*-2-hidroxiethylamidas e morfolinamidas sintetizadas interferem na biossíntese de violaceína de CV026;
- 3) Realizar experimentos de ancoragem molecular a fim de se entender se existe interação entre o ativador transcricional do QS de CV026, CviR, e as moléculas testadas que apresentaram melhor interferência na biossíntese de violaceína de CV026;
- 4) Planejar racionalmente e sintetizar novas moléculas inspiradas nos resultados anteriores de inibição da biossíntese de violaceína de CV026;
- 5) Testar as moléculas que tiveram melhor desempenho nos ensaios anteriores para inibição de consumo de quitina, fenótipo do QS de CV026;
- 6) Avaliar, utilizando a técnica de RT-qPCR, se a inibição de violaceína ocorre em nível transcricional por meio da quantificação de expressão do *operon vioABCDE*.

2.3. Resultados e discussão

2.3.1. Síntese de derivados de morfolininas.

Este capítulo se iniciou na perspectiva de tentar responder as novas perguntas que surgiram após os resultados de inibição das *N*-(2-hidroxietil)amidas e 2-oxazolininas em QS de CV026 obtidos no meu mestrado, discutido melhor na seção 2.1.3 da introdução.⁸⁶ As *N*-(2-hidroxietil)amidas foram planejadas como simplificações das AHL's, por isso, para entender melhor a interação dos inibidores com o sítio de ligação, foi pensada uma nova classe de moléculas nas quais algumas das interações supramoleculares potencialmente importantes para fossem suprimida (Figura 2.6). Como primeiro passo nesse capítulo, buscou-se analisar se as interações de doador/aceptor de hidrogênio advindas do resíduo de etanolamina são importantes para a atividade biológica observada em CV026. Para transformar a hidroxila em metoxila diretamente a partir da etanolamina, teríamos trabalho árduo de síntese envolvendo potencialmente etapas de proteção e desproteção, uma vez que o pKa da ligação N-H amida tem valor muito próximo ao da ligação O-H de um álcool. A utilização de morfolininas foi pensada de forma a retirar a possibilidade de doação de ligação de hidrogênio, mas manter a possibilidade de recepção de ligação de hidrogênio nesta região da molécula. Além de apresentar uma estrutura mais rígida, o que não permitirá muita movimentação dentro do domínio de ligação do autoindutor da CviR.

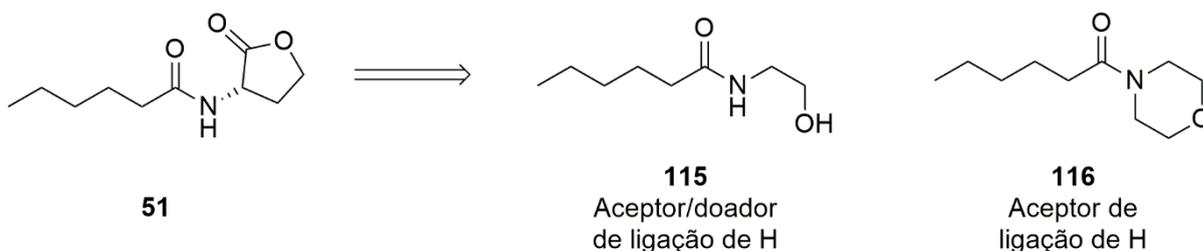
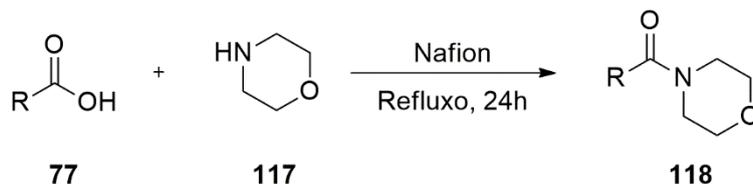


Figura 2.6 – *N*-(hidroxietil)hexanamida e 1-morfolinahexanona como propostas de simplificação estrutural do autoindutor cognato do QS de CV026, a C6-AHL (**51**).

A síntese dos derivados de morfolininas foi realizada com a mistura de um ácido carboxílico, morfolina e Nafion[®], sob refluxo por 24 horas, em condições semelhantes às utilizadas para a síntese das *N*-(2-hidroxietil)amidas,^{81,86} permitindo a obtenção das moléculas desejadas em rendimentos que variaram de moderado à bom (Tabela 2.1). Nesse momento, como se buscava apenas uma pequena amostra dessas moléculas, para se testar a interferência em QS de CV026, não houve preocupação em se otimizar os rendimentos obtidos.

Tabela 2.1 – Rendimentos das sínteses das morfolinamidas **118**.



Entrada	Ácido Carboxílico	Rendimento (%)
1		69
2		60
3		50
4		56
5		70
6*		40
7		30
8		80
9		32
10		50

* Assim como descrito na síntese de N-(hidroxi-etil)benzamida,⁸⁶ para a síntese desse derivado de morfolina foi utilizado o benzoato de metila.

As estruturas das várias moléculas sintetizadas são semelhantes, e isso pode ser observado nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Anexo S22-S82). O espectro de RMN ^1H da 1-morfolina-nonanona, **119**, pode ser observado na Figura 2.7, com ampliação dos sinais entre δ

3,35 e 3,60; esses são os sinais referentes aos hidrogênios da morfolina. A Tabela 2.2 contém as atribuições de sinais para o espectro da 1-morfolina-nonanona **119**.

Tabela 2.2 - Atribuições de sinais para os espectros de RMN ^1H e ^{13}C para a 1-morfolina-decanona **119**.

1-morfolinanonanona.		
119		
Posição	δ (ppm), n ^o de H, m	δ (ppm) ^{13}C
1	-	171,8
2	2,27 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H)	32,9
3	1,55 – 1,42 (m, 2H)	32,2
4	1,33 – 1,22 (m, 10H)	29,8
5		29,7
6		25,6
7		25,6
8		23,0
9		0,86 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H)
10	3,42 (m, 4H)	46,4; 42,3
11	3,5 (m, 4H)	67,1; 67,1

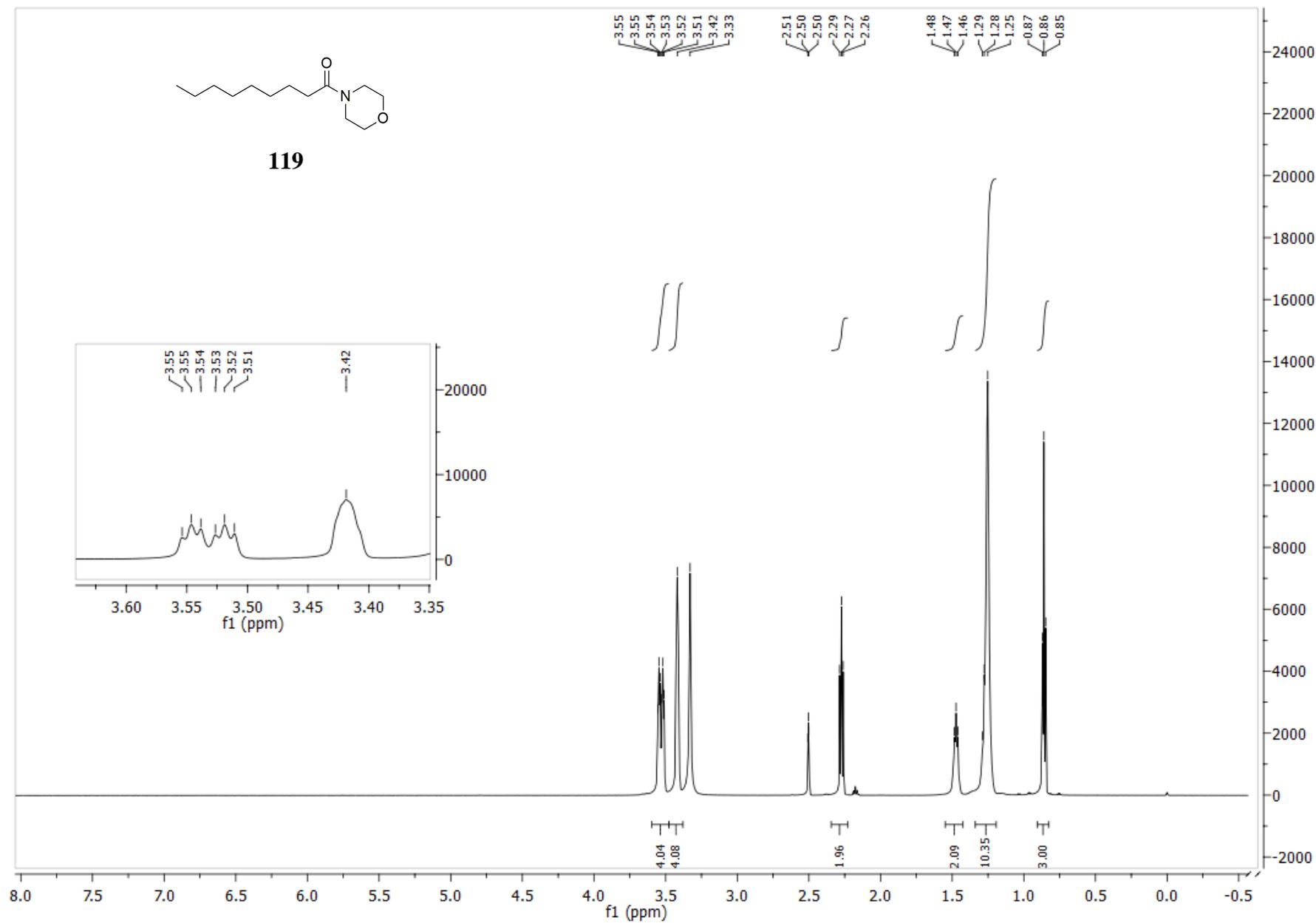


Figura 2.7 – Espectro de RMN (600 MHz) de ^1H da 1-morfolinanonanona **119** em DMSO.

Uma particularidade dessas estruturas derivadas de morfolininas foi a observação de sinais de rotâmeros nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C . As amidas apresentam alta barreira rotacional na ligação C(O)-N.⁹⁷ Essa barreira é a energia necessária para a interconversão entre os rotâmeros, e que pode levar a sinais pouco definidos ou duplicados nos espectros de RMN. Para confirmar se os sinais adicionais observados nos experimentos de RMN não se tratavam de impurezas, a pureza dessas amostras foi avaliada por cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massas (CG-EM). Adicionalmente, foi possível detectar os íons moleculares das espécies analisadas. Todas as amostras apresentaram elevada pureza ao CG-EM. Para confirmar a observação de rotâmeros, foi realizado o experimento de Ressonância Magnética Nuclear de temperatura variável, técnica aplicada à identificação de rotâmeros, uma vez que em altas temperaturas (superiores a 50°C) a velocidade de interconversão entre os isômeros conformacionais aumenta, resultando em um espectro com sinais únicos e melhor definidos. Portanto, foi realizado o experimento à 60°C em DMSO a fim de verificar se os sinais coalesciam.^{98,99}

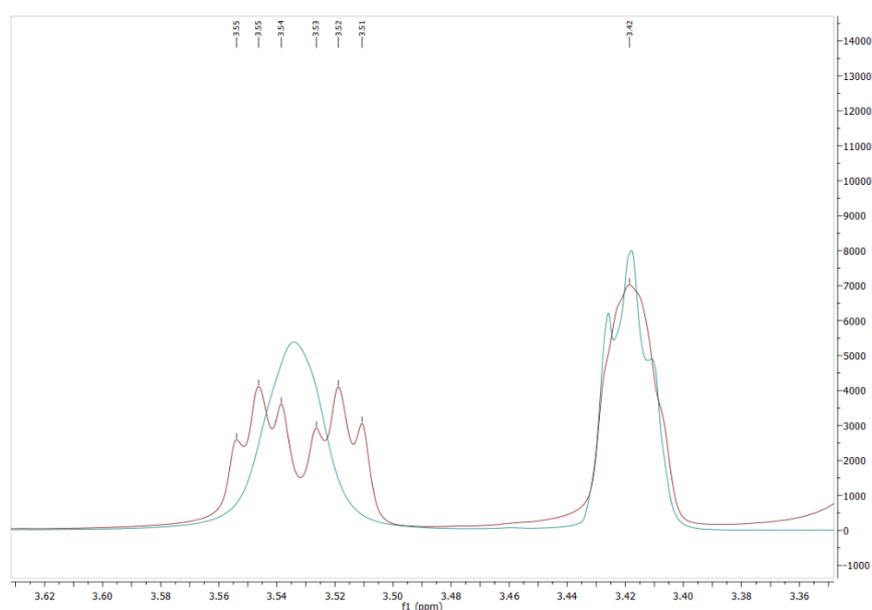


Figura 2.8. – Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H da 1-morfolinanonona **119** a 25°C (vermelho) e a 60°C (azul).

A Figura 2.8 contém a sobreposição dos sinais dos hidrogênios pertencentes ao resíduo de morfolina de **107** a temperatura ambiente (sinais em vermelho) e a 60 °C (sinais em azul). É possível observar que os sinais na região entre δ 3,50 e 3,57 coalescem quando a temperatura permite a livre interconversão desses rotâmeros.

Para completar a série das *N*-(2-hidroxietil)amidas previamente preparadas,³¹ a *N*-(2-hidroxietil)hexanamida **115** foi sintetizada de forma similar à descrita para as outras *N*-(2-

hidroxietil)amidas, com rendimento de 50%. Sua estrutura foi confirmada pelos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e pelo espectro de infravermelho, além de sua pureza ter sido verificada por CG-EM (Figura S17-S21) Ela apresenta o mesmo tamanho de cadeia do autoindutor cognato da *C. subtsugae* e sua presença entre as amostras é importante para observar se ela será capaz de induzir a produção de violaceína.

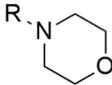
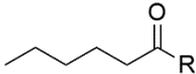
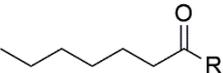
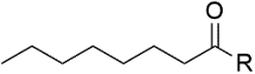
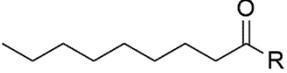
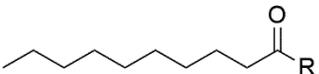
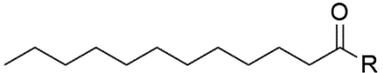
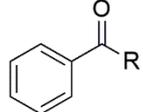
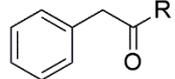
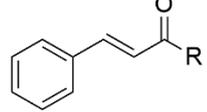
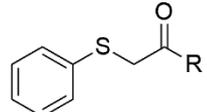
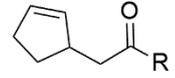
2.3.2. – Teste de inibição de síntese de violaceína em CV026 pela ação das *N*-(2-hidroxietil)amidas e das morfolinamidas.

O intuito desse teste foi comparar os resultados obtidos no teste em placa com aqueles obtidos no teste em caldo de cultivo.

Os resultados de inibição máxima para as *N*-(2-hidroxietil)amidas encontram-se na Tabela 2.3. As *N*-(2-hidroxietil)amidas de cadeias alifáticas foram testadas nas concentrações de 2,5 mM, 1,25 mM, 625 μM e 312 μM . Já as *N*-(2-hidroxietil)amidas de cadeia aromática foram testadas nas concentrações de 1 mM, 500 μM , 250 μM e 125 μM . Essa diferença nas concentrações testadas se deu pela solubilidade das moléculas, em que as aromáticas se mostraram menos solúveis que as alifáticas. Os gráficos de inibição se encontram no anexo (Figura S83-S93).

Os testes com as morfolinamidas foram realizados da mesma forma que para as *N*-(2-hidroxietil)amidas. Cabe ressaltar que, por falta do ácido octanóico, não foi possível realizar a síntese e avaliação da inibição de violaceína em CV026 da morfolinamida correspondente. Os resultados de máxima inibição para os derivados de morfolinas encontram-se na Tabela 2.3. As concentrações testadas foram 2,5 mM, 1,25 mM, 625 μM e 312 μM . Os gráficos de inibição de violaceína se encontram no anexo (S94 – S103).

Tabela 2.3 – Inibição máxima para as *N*-(2-hidroxi)amidas e morfolinamidas obtidas no ensaio em fase líquida.

Molécula		$\text{R-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$ Inibição (%) Concentração		 Inibição (%) Concentração
	115	38 312 μM	116	27 2,5 mM
	95	45 2,5 mM	126	20 1,25 mM
	96	53 1,25 mM	-	-
	120	60 1,25 mM	119	46 2,5 mM
	121	43 1,25 mM	127	60 2,5 mM
	122	42 1,25 mM	128	54 2,5 mM
	123	50 500 μM	129	50 2,5 mM
	124	50 1 mM	130	38 2,5 mM
	98	40 1 mM	131	57 2,5 mM
	125	40 1 mM	132	38 2,5 mM
	97	34 1 mM	133	32 1,25 mM

O interessante para o teste em caldo foi a possibilidade de observar outras inibições, não detectadas no teste em placa. Quando a inibição foi avaliada em placa, apenas duas moléculas **96** e **98** apresentaram inibição visível de produção de violaceína. Esta observação está em linha com a hipótese previamente levantada de que as *N*-(2-hidroxi)amidas com cadeias mais longas tinham maior dificuldade de se difundir pelo ágar sólido o que pode ter causado uma concentração local maior, resultando em uma ação antimicrobiana.³¹ Nos testes em caldo, foram observados valores moderados para as inibições causadas pelas *N*-(2-hidroxi)amidas. Entre as amidas de cadeia alifática, o maior valor de inibição foi observado para a *N*-(2-hidroxi)decamida **121**, com 63% de inibição a 1,25 mM (Figura 2.9-A).

Já entre as cadeias aromáticas, a *N*-(2-hidroxi)benzamida **123** apresentou 50% de inibição a 500 µM (Figura 2.9-B). A primeira concentração testada [1mM] resultou em diminuição estatisticamente significativa da densidade populacional e por isso não foi considerada como inibição de síntese de violaceína. Para a molécula **123** foi possível observar que a inibição de violaceína segue padrão dose-dependente. Diferente do que ocorreu nos testes em ágar sólido, não foi detectada a ocorrência de indutores de QS nos ensaios em caldo. A ocorrência desta divergência ainda está sob investigação.

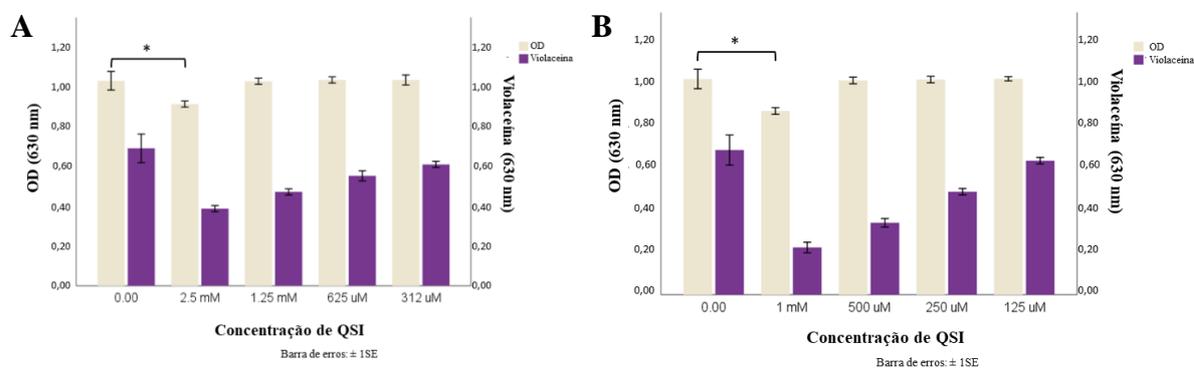


Figura 2.9 – Gráfico de inibição de biossíntese de violaceína para *N*-(2-hidroxi)decamida **121**(A) *N*-(2-hidroxi)benzamida **123** (B) no ensaio em fase líquida.

Observando a tabela 2.3 (página 53), fica claro que a mudança para uma estrutura sem a possibilidade de doação de ligação de hidrogênio diminui o efeito inibitório sobre a biossíntese de violaceína das morfolinamidas. Apesar de porcentagens de inibição moderadas, as concentrações necessárias para atingir tal efeito são altas, quando comparadas às concentrações observadas para as etanolamidas. Para as moléculas alifáticas a que teve a maior inibição, assim como para as *N*-(2-hidroxi)amidas, foi a com 10 carbonos, **127**, com 60% de inibição à 2,5 mM (Figura 2.10-A). Já para as aromáticas, a molécula **131** foi a que teve a maior inibição da série com 57% a 2,5 mM (Figura 2.10-B).

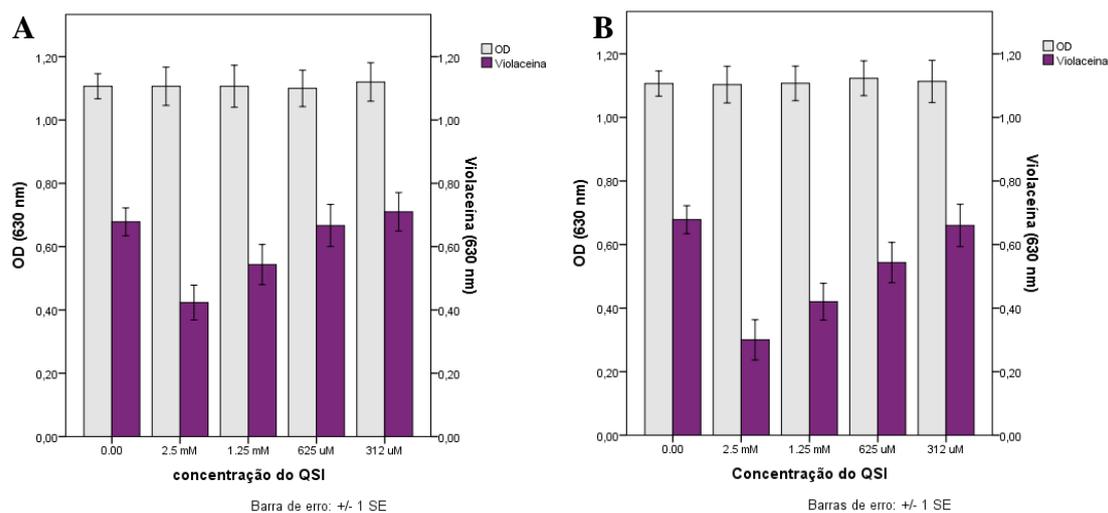


Figura 2.10 – Gráfico de inibição de biossíntese de violaceína para **127** (A) **131** (B).

2.3.3. Docking molecular dos complexos entre CviR de CV026 e as *N*-(2-hidroxietil)amidas e morfolinamidas.

Como já comentado anteriormente, a necessidade de se entender como ocorre a inibição de biossíntese de violaceína se mostrou como um dos pilares desse trabalho. A atividade biológica de um composto está diretamente ligada as interações deste com o sistema biológico.¹⁰⁰ Uma das alternativas para se entender esse mecanismo nos nossos ensaios se deu pelo uso de ancoragem molecular.

A ancoragem molecular é uma das ferramentas de planejamento racional de medicamento baseado na estrutura química das moléculas envolvidas, ligante e receptor biológico. Ensaios de ancoragem molecular são extensamente utilizados em virtude da sua capacidade de sugerir interações não-covalentes entre um ligante e uma proteína. Os programas de ancoragem molecular exploram as possibilidades de conformação do ligante, assim como a função de pontuação que classifica a afinidade das interações associadas a cada pose.¹⁰¹ Essa ferramenta vem sendo cada vez mais utilizada em estudos de inibição de QS. A ideia norteadora é que, ao se interromper a interação entre o autoindutor e o ativador transcricional CviR, a transcrição do operon *vioABCDE* é severamente diminuída, afetando também a expressão de outros genes sob controle de CviR (*regulon* CviR). A proteína CviR já foi cristalografada e por isso é muito utilizada em estudos de ancoragem molecular para QS. Li e colaboradores buscaram, em um banco de dados contendo 4687 compostos naturais, possíveis ligantes para CviR e inibidores de QS.¹⁰² Após essa busca, os autores utilizaram as interações dadas pelo programa de ancoragem molecular para escolher os melhores candidatos ao teste biológico.

Outros autores utilizam das interações entre ligante e proteína advindas da ancoragem molecular para estabelecer mecanismo de inibição.^{103–105}

O programa de ancoragem molecular utilizado nesse trabalho foi o AutoDock Vina, devido a sua interface simples e boa capacidade de prever a conformação do ligante dentro do sítio ativo.^{106,107} Antes desse experimento computacional, as moléculas foram otimizadas utilizando Teoria do Funcional de Densidade (DFT – B3LYP, 6-31G**) por meio do programa Gaussian 6.06. A proteína escolhida foi a CviR complexada com a molécula **56** (PDB :3qp5) pois, nesse caso, a proteína adota uma conformação “fechada” que é incapaz de interagir com o DNA, dessa forma, inativando a transcrição dos genes da biossíntese de violaceína (*vioABCDE*). Além disso, esse complexo foi cristalografado na forma de dímero, o que se assemelha com a realidade.

Analisando a conformação do inibidor **56**, advinda da estrutura de raio-X dentro do sítio de ligação, é possível observar algumas interações importantes (Figura 2.11). As ligações de hidrogênio entre o inibidor e os resíduos de aminoácido Serina 155, Ácido Aspártico 97, Triptofano 84 posicionam a molécula **56** dentro do sítio. Existem também interações do tipo π - π entre o anel aromático do inibidor e da Tirosina 88, além de uma proximidade com a Metionina 89, já discutida por Bassler e colaboradores, como uma possível interação estérea que impõe a mudança conformacional em CviR responsável por promover inibição da transcrição.⁶⁰

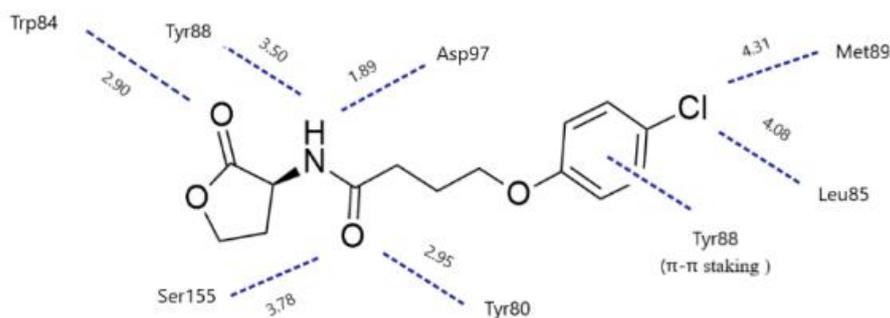


Figura 2.11 – Interações importantes entre a proteína CviR e a molécula **56**.

De posse desta informação oriunda dos estudos de difração de raio-X, realizamos um experimento de re-ancoramento molecular do inibidor **56** e a CviR. Este procedimento teve como objetivo validar, por comparação, o experimento de ancoragem molecular. Pela sobreposição da conformação do inibidor **56** obtida pelo re-ancoramento molecular com aquela obtida pela difração de raio-X, (Figura 2.12), foi possível observar que as regiões polares de **56** estão sobrepostas, havendo apenas um desvio na posição do anel aromático. Como a ancoragem

molecular visa imitar as interações polares, consideramos a metodologia de ancoragem molecular como satisfatória para prever as conformações dentro do sítio de ligação.

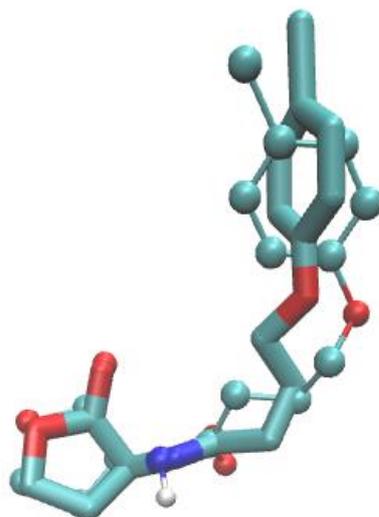


Figura 2.12 - Sobreposição da conformação de **56** advinda do experimento de difração de raio-X (modelo tubular) e do re-ancoramento molecular (modelo bola-bastão).

Passada a etapa de validação, a ancoragem molecular foi realizada para todas as moléculas testadas (Tabela 2.4). Como era de se esperar, a interação entre o inibidor **56** e a proteína receptora apresentou a menor energia de interação para o complexo CviR:**56**, o que corrobora com a capacidade do inibidor deslocar o autoindutor cognato do sítio de ligação e inibir a expressão de *vioABCDE* e de outros fenótipos sob controle de QS em CV026.

Tabela 2.4 - Resultados dos dockings moleculares.

Molécula	Afinidade de ligação (kcal/mol)	Interações Hidrofílicas (Ligação de H)	Interações hidrofóbicas
HHL - 51	-7.0	Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97, Ser155	-
56	-8.8	Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97, Ser155	Tyr88
115	-5.8	Tyr80, Tyr88, Asp97, Ser155	-
95	-5.7	Tyr80, Tyr88, Asp97, Trp111	-
96	-5.8	Trp84, Tyr80, Tyr88, Asp97, Trp111, Met135	-
120	-6.6	Trp84, Tyr80, Tyr88, Asp97, Ser155	-
121	-6.6	Trp84, Tyr80, Asp97, Trp111, Met135	-
122	-6.2	Tyr80, Tyr88, Asp97, Met89, Trp111	-
123	-7.3	Tyr80, Tyr88, Asp97, Thr140 , Ser155	Trp111
124	-7.3	Tyr80, Tyr88, Asp97, Ser155	Trp111
98	-6.5	Tyr80, Tyr88, Asp97, Ser155	Trp111
125	-7.0	Tyr80, Tyr88, Asp97, Ser155	Tyr88
97	-6.5	Tyr80, Tyr88, Asp97, Ser155	Trp111
116	-6.4	Trp84, Tyr80, Tyr88, Asp97	-
126	-6.3	Trp84, Tyr88, Asp97, Trp111	-

119	-5.1	Trp84, Tyr88, Asp97	-
127	-6.4	Tyr88, Asp97, Ser155	-
128	-6.7	Tyr88, Asp97, Met135	-
129	-8.1	Tyr80, Tyr88, Asp97, Ser155	Trp111
130	-8.1	Tyr88, Asp97, Ser155	Trp111
131	-8.2	Tyr80, Tyr88, Asp97, Ser155	-
132	-7.7	Tyr80, Trp84	Trp111
133	-7.8	Trp84, Tyr88, Asp97	Trp111

Comparando as interações de CviR com o autoindutor cognato **51** e aquelas com o inibidor **121**, foi possível observar que a interação com a Ser155 foi perdida e que a interação com o Trp84 foi alongada (Figura 2.13-A), o que pode justificar a diminuição de energia obtida pela ancoragem molecular. É possível ver que a cadeia carbônica ocupa a região desejada, em direção a Met89. Se compararmos com o derivado de morfolina **127** com mesmo tamanho de cadeia, é possível observar o alongamento das interações, o que poderia justificar o aumento da energia do complexo, o que causaria sua instabilidade e justificaria a diminuição de inibição. (Figura 2.13 – CD). A sobreposição com a molécula **127** mostra que o derivado de morfolina está dentro do sítio de ligação, porém a molécula falha em fazer interações importantes, como a interação com o Trp84.

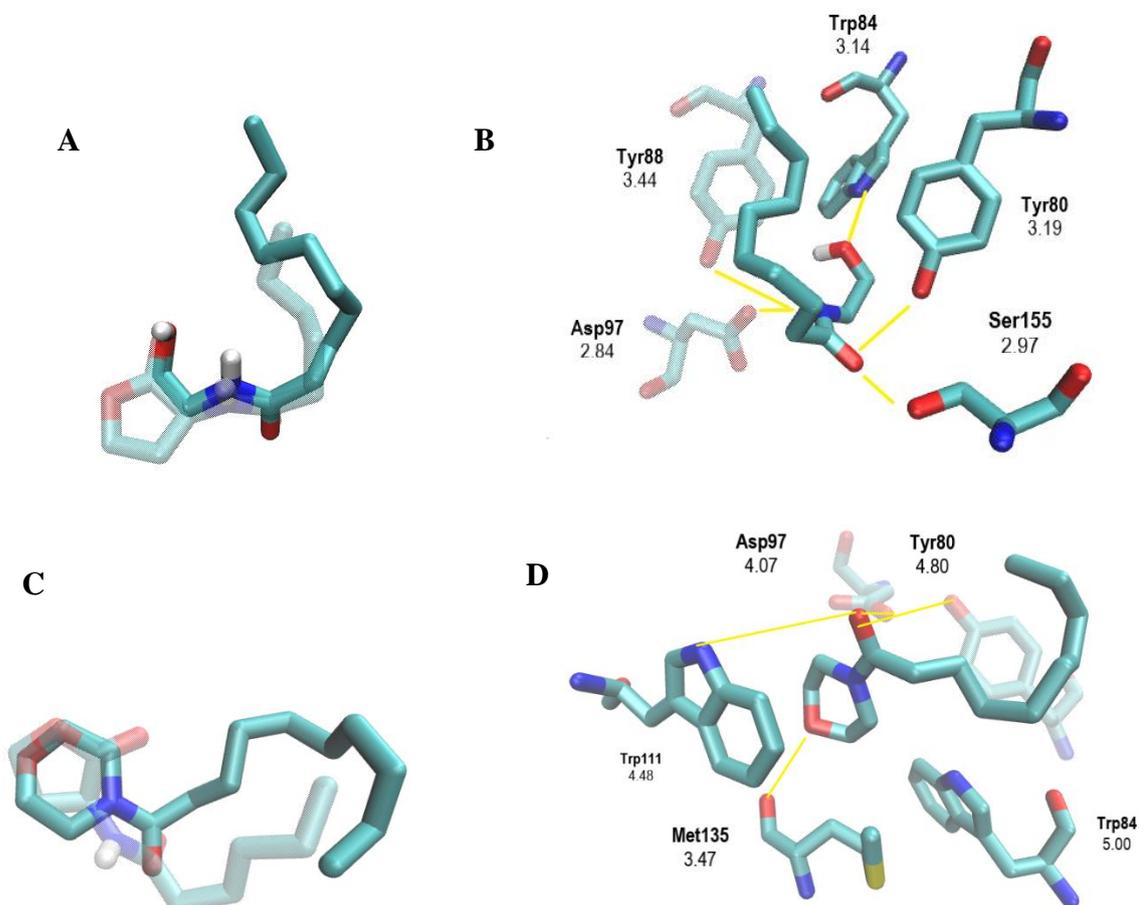


Figura 2.13 - (A) Sobreposição entre o autoindutor cognato **51** e a etanolamida **121**. (B) Interações entre a etanolamida **121** e os resíduos de aminoácidos no sítio de ligação do AI. (C) Sobreposição entre autoindutor cognato **51** e a morfolinamida **127**. (D) Interações entre **127** e os resíduos de aminoácidos no sítio de ligação do AI.

Comparando as cadeias alifáticas e aromáticas percebe-se uma menor energia de interação com CviR para as moléculas com porções aromáticas. Isso pode se dar pelo fato que os anéis aromáticos podem interagir entre si por interações do tipo π - π . Esse tipo de interação acontece tanto para **123** quanto **131**, e parece ser tão decisiva na ancoragem que ocasiona uma mudança dentro do sítio de ligação. Tanto **123** quanto **131**, estão invertidas dentro do sítio de ligação se comparadas com **121** e **127**. Uma possível justificativa para essa inversão seria porque nessa conformação o anel aromático da molécula tem uma melhor sobreposição com o anel aromático do resíduo Trp111 em CviR (Figura 2.14 – B e D). Logo, essa interação seria a responsável pelo posicionamento da molécula dentro do sítio de ligação. Apesar dessa mudança, **123** e **131**, são capazes de manter as interações com Asp97, Ser155 e Tyr80. Outrossim, essas duas moléculas são as que tem menor energia de interação e tem os melhores resultados de inibição de violaceína.

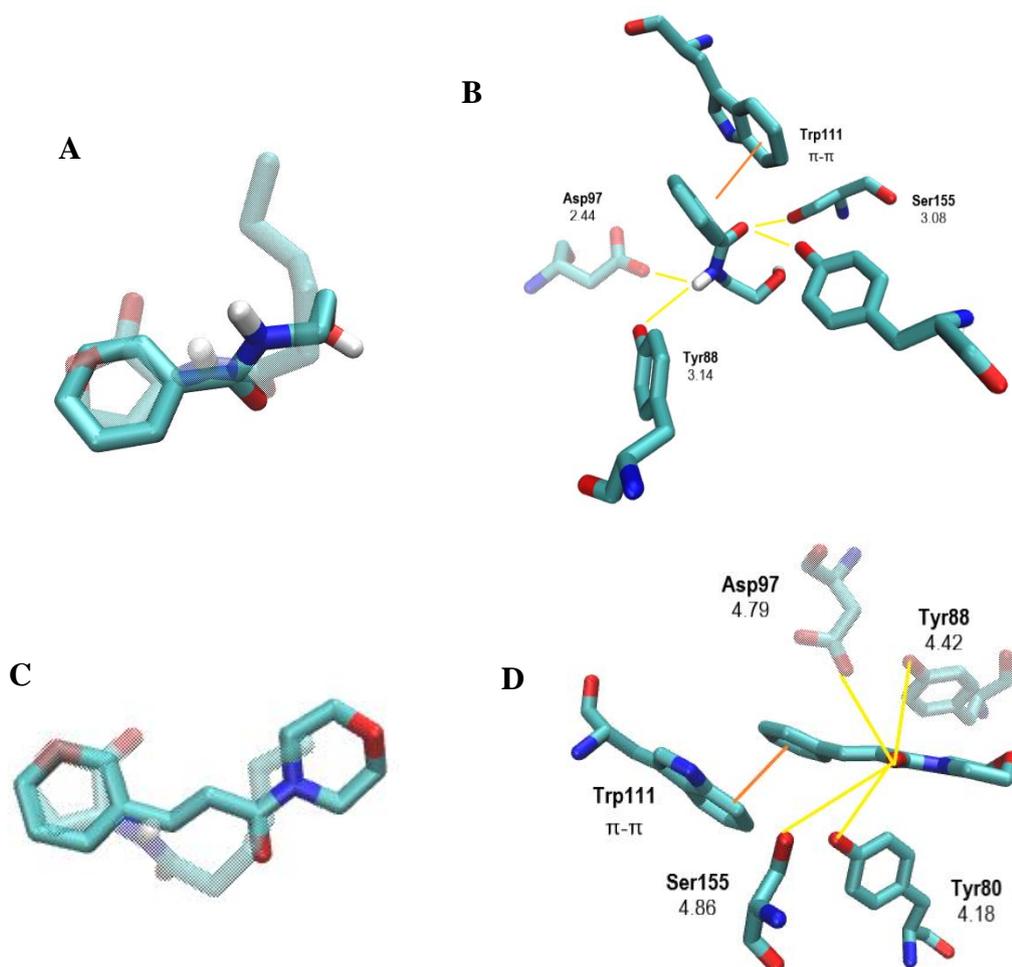
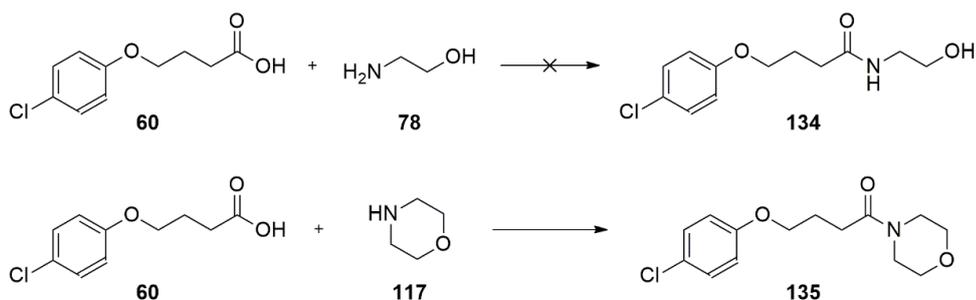


Figura 2.14 - (A) Sobreposição o autoindutor cognato **51** e a etanolamida **123**. (B) Interações entre **123** e os resíduos de aminoácidos no sítio de ligação do AI. (C) Sobreposição o autoindutor cognato **51** e a morfolinamida **131**. (D) Interações entre **131** e os aminoácidos no sítio de ligação do AI.

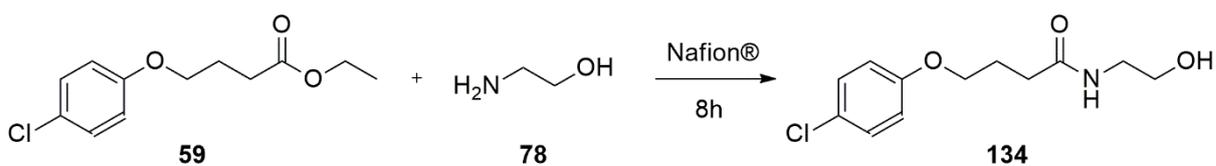
2.3.4. Simplificação estrutural do inibidor **56**.

Além das simplificações estruturais do agonista cognato **51**, foram planejadas racionalmente duas simplificações estruturais para o inibidor **56**. Seguindo o mesmo raciocínio, substituindo a lactona do inibidor pelo derivado *N*-(2-hidroxi)etilamida e pelo anel morfolínico. Saindo do ácido **60** realizou-se o acoplamento do mesmo com a etanolamina **78** e com a morfolina **117** utilizando-se as mesmas condições do acoplamento para a lactona **61**. A síntese do composto **135** aconteceu sem problemas com 86% de rendimento. A síntese de **134**, porém, não aconteceu por esse procedimento, mesmo com três tentativas.



Esquema 2.9 - Acoplamento da etanolamina **78** (A) e da morfolina **117** (B) com o ácido **60**.

Como alternativa, foi tentada a formação da amida de acordo com o procedimento proposto por Imai e colaboradoras, na qual se utiliza de um intermediário anidrido misto ácido para que ocorra a amidação.¹⁰⁸ Infelizmente, a síntese novamente não aconteceu por esse procedimento. O acoplamento do ácido **60** com a glicina também foi realizado com a finalidade de sintetizar a molécula **134** que, após uma etapa de redução do grupo ácido, poderia levar à etanolamida desejada. Contudo, o acoplamento não foi observado. Como na síntese da molécula **123**, na qual a reação de formação da amida desejada não ocorreu, utilizou-se o éster **59** para a reação de aminólise com a etanolamina, procedimento idêntico ao da síntese das *N*-(2-hidroxi)etilamida (Esquema 2.10). A formação ocorreu sem problema com rendimento de 54%.

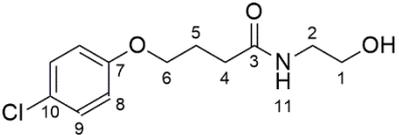
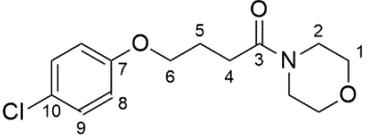


Esquema 2.10 - Síntese da molécula **126** a partir do éster **59** e da etanolamina **78**.

Ambas as moléculas passaram por processo de purificação e foram caracterizadas a partir dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C e de infravermelho (Figuras S125-S134). A pureza foi

aferida com o auxílio de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (Figuras S128 e S133). A Tabela 2.5 contém as atribuições de sinais para o espectro das estruturas **134** e **135**.

Tabela 2.5 - Atribuições de sinais para os espectros de RMN ^1H e ^{13}C para as moléculas **134** e **135**.

134			135		
					
Posição	δ (ppm), n ^o de H, m	δ (ppm) ^{13}C	Posição	δ (ppm), n ^o de H, m	δ (ppm) ^{13}C
1	3.42 (q, J=5.5Hz, 2H)	62.0	1	3.72 – 3.56 (m, 4H)	66.9
2	3.78– 3.68 (m, 2H),	42.4	2	3.54 – 3.31 (m, 4H)	41.9
3	-	173.5	3	-	170.9
4	2.41 (t, J = 7.3 Hz, 2H)	32.8	4	2.51 (t, J = 7.2 Hz, 2H)	29.1
5	2.12 (qt, J = 7.3 Hz, 2H)	25.1	5	2.20 – 2.05 (qt, J = 7.2 Hz, 2H)	24.7
6	3.97 (t, J = 6.0 Hz, 2H)	67.2	6	4.00 (t, J = 7.2 Hz, 1H)	67.2
7	-	157.4	7	-	157.4
8	6.83 – 6.79 (m, 2H)	129.3	8	6.89 – 6.62 (m, 2H)	129.3
9	7.24 – 7.20 (m, 2H)	115.7	9	7.27 – 7.13 (m, 2H)	115.7
10	-	125.6	10	-	125.5
11	6.12 (s, 1H)	-	-	-	-

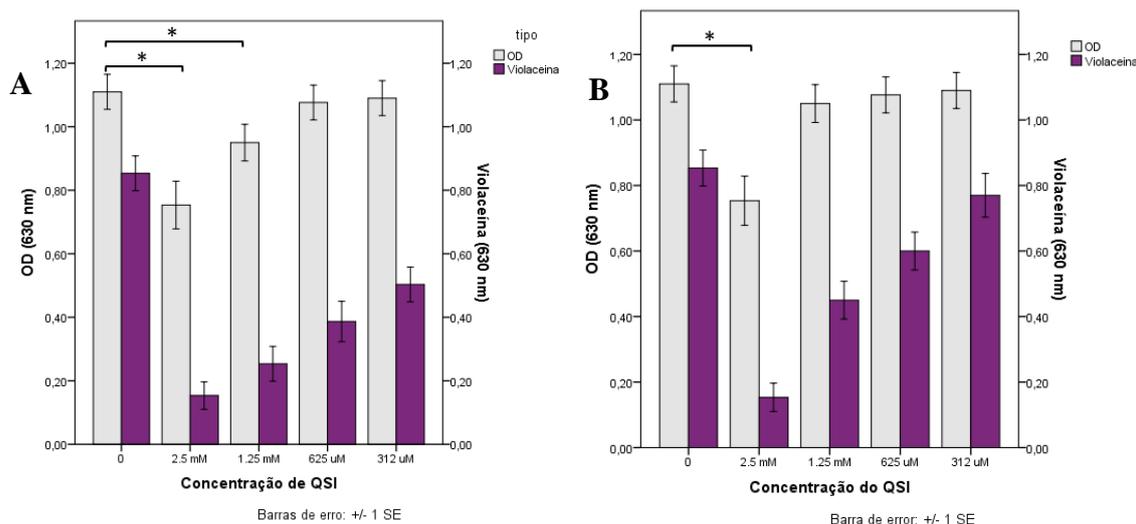


Figura 2.15 - Ensaio de inibição de violaceína para a (A) etanolamida **134** e para a (B) morfolinamida **135**.

Apesar de apresentarem inibições moderadas de 50% nas concentrações de 625µM e 1,25mM para as moléculas **134** e **135** (Figura 2.15), fica clara que a retirada da lactona diminui muito a potência dessas estruturas. Lembrando que a molécula **56** apresenta uma inibição de 95% a 32,5 µM.

Na tentativa de entender melhor o porquê dessa diminuição, o experimento de *docking* molecular foi realizado a fim de analisar as posições das moléculas dentro do sítio de ligação. De início, é possível observar um aumento da energia de interação entre as estruturas estudadas o que demonstra a sua menor interação com CviR. Para a molécula **134** a energia de interação foi de -6,8 kcal/mol enquanto para a **135** foi de -7,8 kcal/mol. Isso caracteriza um aumento de 2 e de 1 kcal/mol, respectivamente. Porém como já dito anteriormente, a técnica de *docking* não calcula de forma precisa a energia de interação, logo, esse dado juntamente com o de inibição aponta para que essa diferença na inibição apresenta correlação com o aumento da energia de interação.

Analisando as interações que ocorrem no sítio de ligação do AI para o complexo de CviR com essas moléculas, foi possível observar que **134** ocupa uma posição muito semelhante à das estruturas do AI **51** e do inibidor **56** descrito por Bassler. As interações com os aminoácidos Asp97, Tyr80, Tyr88, Ser155 foram mantidas, além de preservar a interação do tipo π - π com o aminoácido Tyr88 (Figura 2.16).

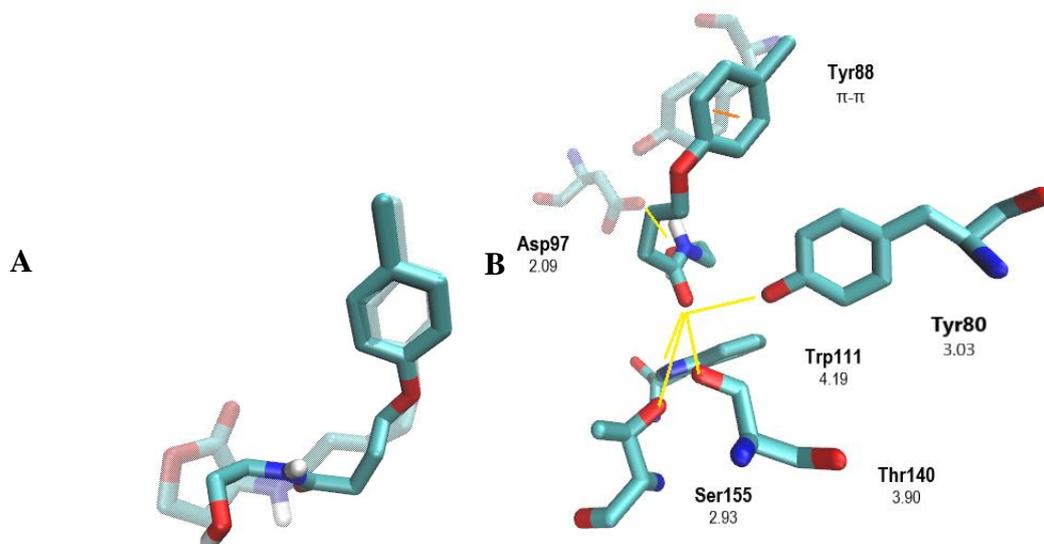


Figura 2.16 - (A) Sobreposição da etanolamida **134** com o inibidor **56** no sítio de ligação do AI de CviR de CV026 (B) Interações entre a molécula **134** e os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação da proteína receptora CviR.

Já a molécula **135** apresentou conformações diferentes dentro do dímero da CviR. Para a posição de menor energia, é interessante se observar que a molécula se encontra invertida dentro do sítio de ligação, em comparação à molécula **56** (Figura 2.17-A). Nessa conformação, as interações estão todas alongadas, Figura 2,17-B, o que demonstra uma menor interação. Já no outro monômero a conformação se mostra similar com a encontrada para a molécula **56**, contudo, a um aumento de energia para $-6,4$ kcal/mol, valor próximo do encontrado para a molécula **134**.

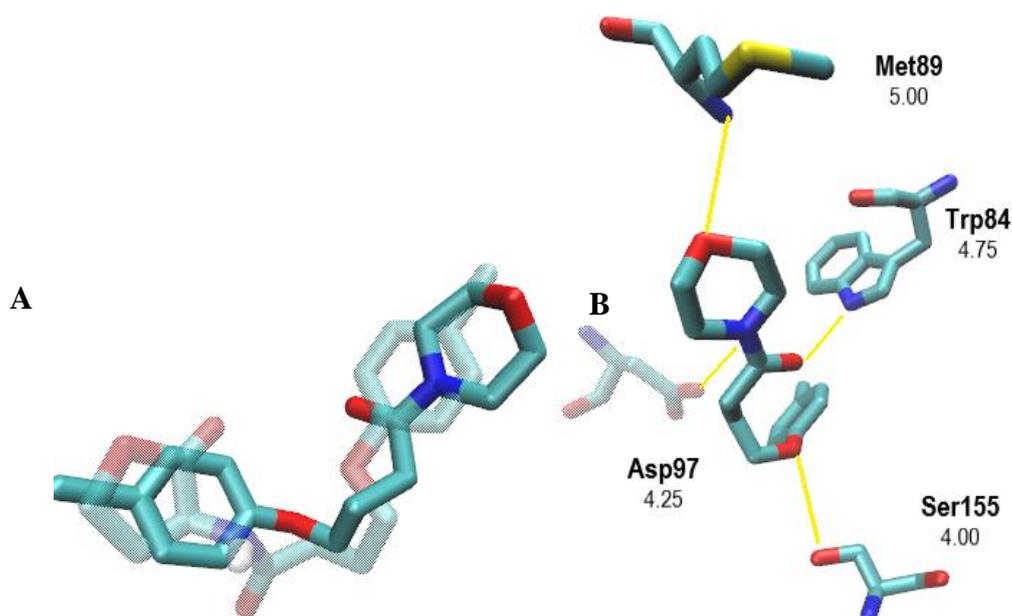


Figura 2.17 - (A) Sobreposição da morfolinamida **135** com o inibidor **56** no sítio de ligação do AI de CviR de CV026 (B) Interações entre a morfolinamida **135** e os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação do AI no monômero da CviR que apresentou menor energia.

2.3.5. Prospecção de novos possíveis inibidores de QS em CV026.

Tendo em vista os resultados obtidos até agora, novas moléculas foram pensadas a fim de melhorar a inibição de violaceína. A molécula escolhida para as derivatizações foi a molécula **123**, pois ela apresentou a melhor inibição na concentração de 500 μM . Foram pensadas duas modificações, a primeira seria a inserção de um grupo acetila na estrutura, **136**, a segunda seria a inserção do grupo *p*-clorofenoxila, **137**, tentando-se imitar parte da estrutura do inibidor **56**. A molécula **138** também se mostrou viável e um derivado promissor, no qual a cadeia que conecta a amida ao grupo *p*-clorofenila é um homólogo superior deste mesmo conector em **129** (Figura 2.18).

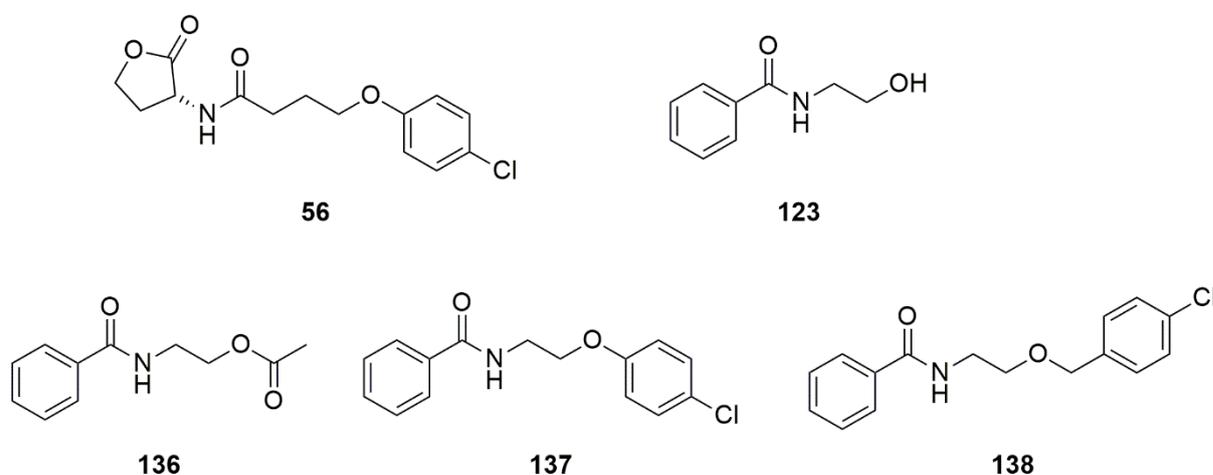


Figura 2.18 – Planejamento racional de novos inibidores de biossíntese de violaceína em CV026 baseados no inibidor **56** e na etanolamida **123**.

A molécula **136** apresentou energia de interação de -7,7 kcal/mol no experimento de docking cego, enquanto as moléculas **137** e **138** apresentaram energias de -9,5 e -9,6 kcal/mol respectivamente. Essas energias de interação são melhores que a encontrada para a molécula **123**, o que torna a sua síntese promissora. As moléculas se encontram posicionadas com a carbonila da amida sobreposta à carbonila do autoindutor cognado **51** (Figura 2.19-A, C e E). Nesse posicionamento, o anel aromático sem substituintes ocupa o mesmo espaço que a lactona. Esse tipo de posicionamento já havia sido observado em outras moléculas aromáticas. Outrossim, as interações hidrofílicas com os aminoácidos Asp97, Ser155, Tyr88 e Tyr80 são mantidos. A molécula **137** e **138** está posicionada de uma forma em que ela é capaz de ter interações do tipo π - π com o Trp111 e o Tyr88, isso deve explicar a sua energia de interação (Figura 2.19-D e F).

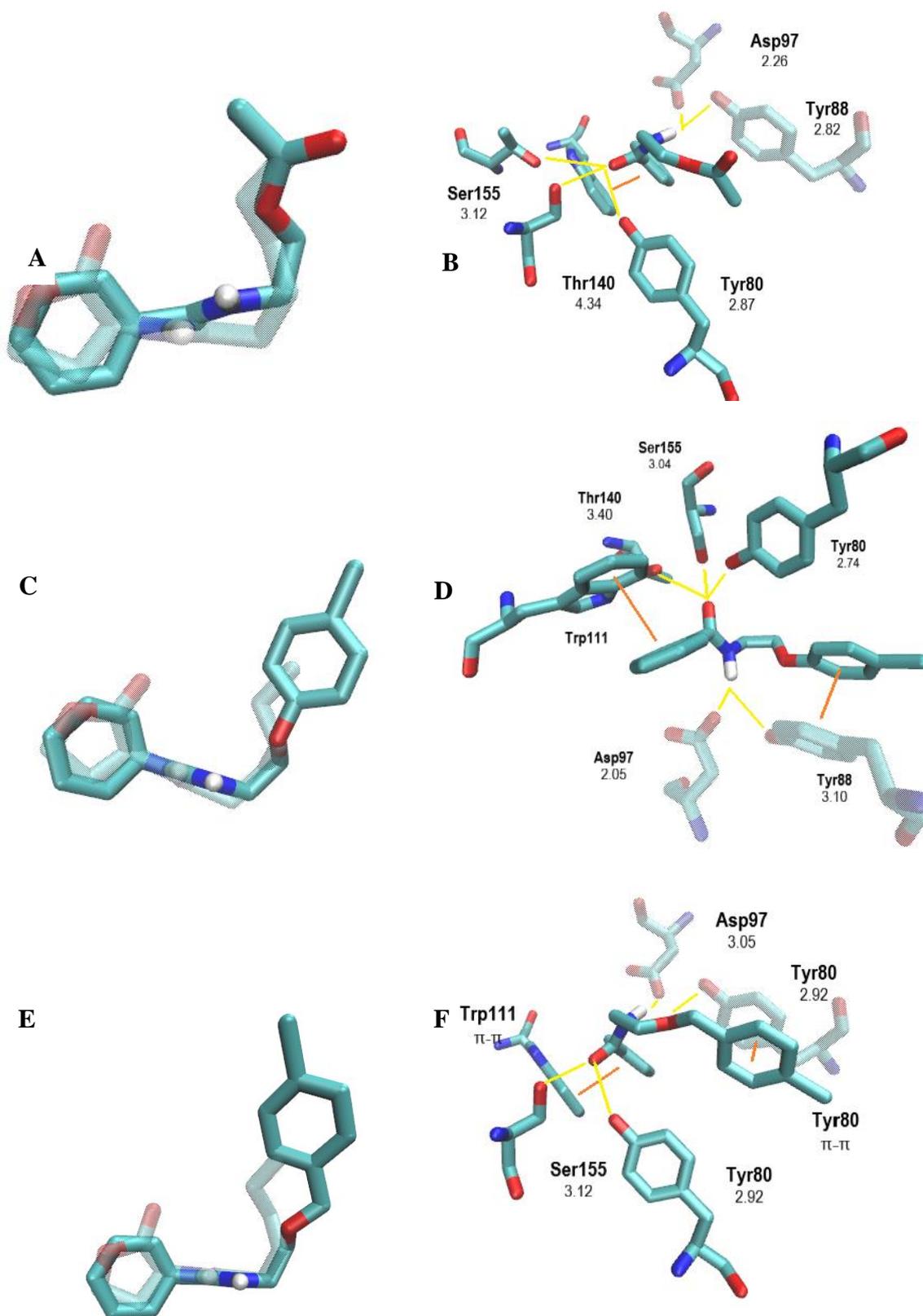
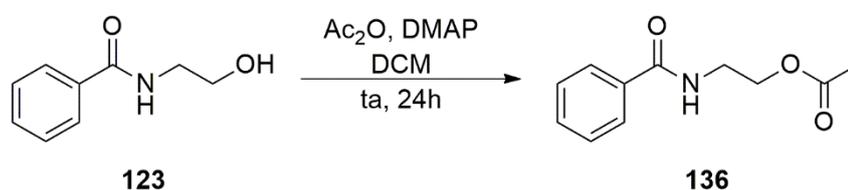


Figura 2.19 - (A) Sobreposição entre 51 e 136. (B) Interações entre 136 e os aminoácidos no sítio de ligação do 51. (C) Sobreposição entre 51 e 137. (D) Interações entre 137 e os aminoácidos no sítio de ligação do 51. (E) Sobreposição entre 51 e 138. (F) Interações entre 138 e os aminoácidos no sítio de ligação do 51.

Diante desses resultados animadores de docking partiu-se para a síntese dos compostos. A síntese de **136** ocorreu por meio da metodologia de Orelli e colaboradores, com poucas modificações.¹⁰⁹ A metodologia em si consiste em se colocar a molécula **123** na presença de anidrido acético e DMAP em temperatura ambiente. Para os substratos do artigo de Orelli, foram necessárias 5 horas, porém para a conversão completa da molécula **123**, a mistura reacional foi deixada sob agitação por 24 horas em temperatura ambiente. O rendimento após purificação foi de 57%. A estrutura foi confirmada por RMN de ¹H e ¹³C. No espectro de hidrogênio foi possível observar o aparecimento de um simpleto referente ao grupo metílico do grupo acetila em 2,21 ppm. As descrições se encontram na Tabela 2.6 e os espectros se encontram no anexo (Figura S135-139)



Esquema 2.11 - Síntese da molécula **136**.

Tabela 2.6 - Atribuições de sinais para os espectros de RMN ¹H e ¹³C para as moléculas **136**.

136		
Posição	δ (ppm), n ^o de H, m	δ (ppm) ¹³ C
1	2,08 (s,3=[H])	20,9
2	-	171,5
3	4,29 (t, J = 5,5, 2H)	63,3
4	3,72 (q, J = 5,5, 2H)	39,5
5	-	167,6
6	-	134,2
7	7,78 (m,2H)	128,6
8	7,47 (m,3H)	126,9
9		131,6
10	6,7 (s,1H);	-

Para a síntese da molécula **137** era necessário tornar o grupo hidroxila em um bom grupo de saída, para uma reação de S_N2 com o clorfenol. A primeira tentativa foi a de realizar a reação de bromação na molécula **123**, segundo a metodologia de Norris e colaboradores que consistia em se colocar esta etanolamida com o ácido bromídrico e deixar sob refluxo por 2 horas.¹¹⁰ Apesar dos esforços a síntese desse derivado, não foi contemplada em quantidades mensuráveis, mesmo quando a reação foi acompanhada por TLC, com quantidades maiores e menores do ácido, entre outras tentativas que foram realizadas. Uma observação constantemente realizada na análise por CG/EM do bruto desta reação era a presença do ácido benzoico, o que sugere a hidrólise ácida da amida de **123** (Figura 2.20).

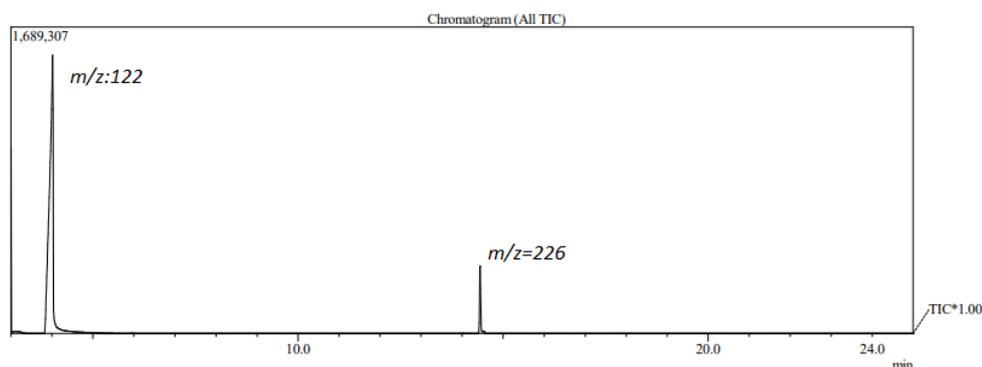
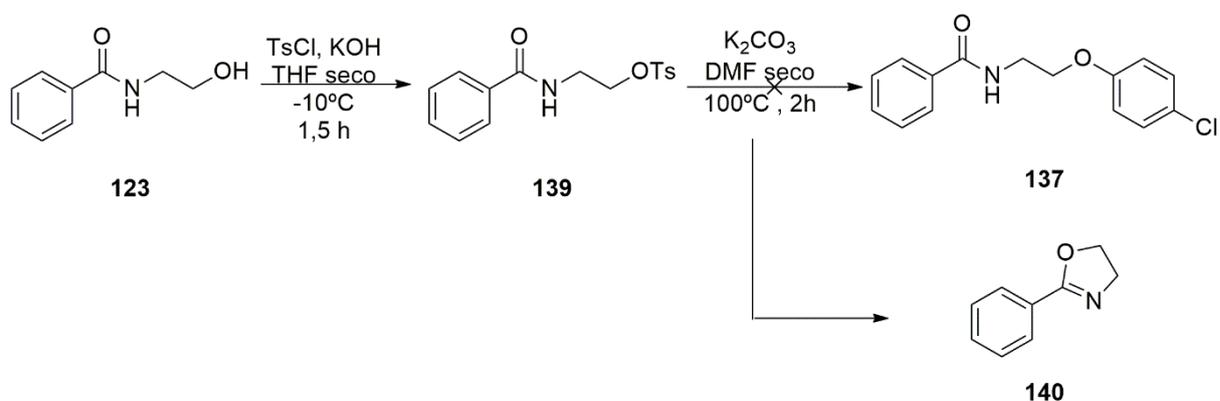


Figura 2.20 - Cromatograma de uma das tentativas de bromação do composto **123**. O primeiro pico tem $m/z=122$, característico do ácido benzoico, sugerindo a hidrólise da amida de **123** com uma proporção de 92%. Já o segundo pico corresponde ao produto bromado (8%)

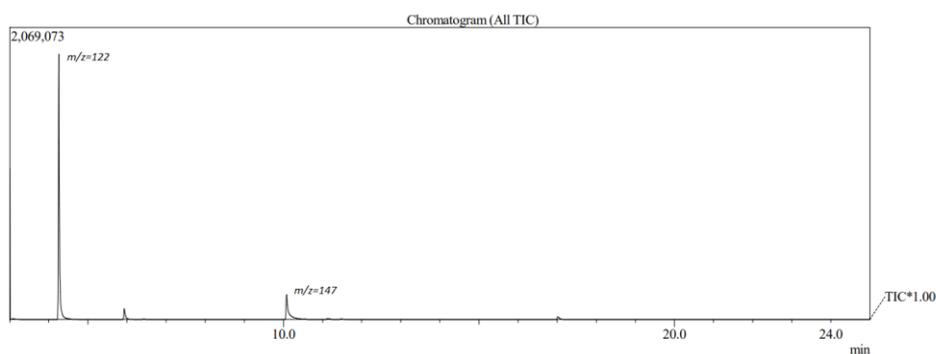
Numa segunda tentativa, o grupo toсила foi escolhido como grupo de saída. A reação ocorreu conforme desejado seguindo a metodologia de Resck e de Souza.¹¹¹ O intermediário produto **139** foi confirmado por LC/MS (Anexo – Figura S143), pela detecção do íon com m/z 342 [M+Na]. Já é possível observar a formação de um subproduto, **140**, advindo da ciclização intramolecular do intermediário **139**.



Esquema 2.12 - Proposta sintética para a molécula **129**.

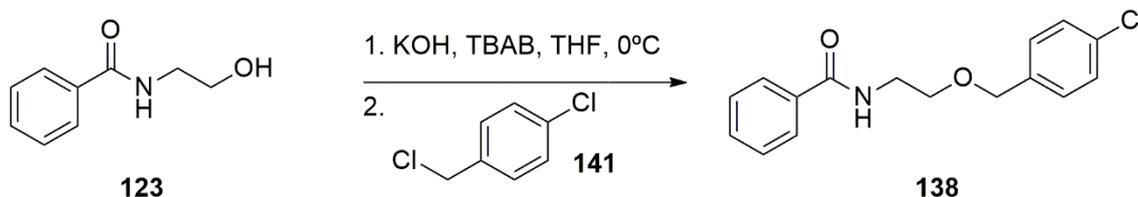
Continuando a síntese do composto **137**, para a reação de substituição foi escolhido a metodologia de Bassler e colaboradores,⁶⁰ pois o clorofenol seria o nucleófilo como na síntese do inibidor **56** (Esquema 2.12). Infelizmente a reação não ocorreu como planejado. O espectro de massas do bruto reacional mostra uma mistura entre a oxazolina **140** e o produto tosilado **139** (Figura 2.21), além de ausência do pico correspondente ao produto **137** desejado [M+Na = 295]. O que parece acontecer é que mesmo que a reação tenha ocorrido, a molécula **137** apresenta um bom grupo de saída e nas condições reacionais testadas o produto favorecido foi a oxazolina **140**.

Uma outra tentativa foi fazer a reação com o substrato **136**, tendo como grupo de saída o grupo acetato. Novamente, pela análise do CG/EM, mostra grande presença do *p*-clorofenol e da oxazolina **140** (Figura 2.22). Devido a essas dificuldades, a síntese da molécula **137** foi abandonada.



. **Figura 2.22** - Cromatograma (CG/EM) da reação entre a molécula **136** e o *p*-clorofenol, observa-se 2 picos um referente ao *p*-clorofenol e o outro à oxazolina **140**.

Para a síntese da **138** seguindo-se uma metodologia do nosso grupo de pesquisa, na qual um álcool atua como nucleófilo, a reação ocorreu sem problemas (esquema 2.13) com rendimento de 40% após purificação.¹¹² As descrições se encontram na Tabela 2.7 e os espectros no anexo (Figura S144-148)



Esquema 2.13 - Rota sintética da molécula **138**.

Tabela 2.7 - Atribuições de sinais para os espectros de RMN ^1H e ^{13}C para as moléculas **138**.

138		
Posição	δ (ppm), n° de H, m	δ (ppm) ^{13}C
1	-	134,5
2	7.34 -7.30 (m, 2H),	128,9
3	7,45-7,40 (m, 4H),	129,1
4	-	136,4
5	4.51 (s, 2H),	72,4
6	3,70-3,64 (m, 4H)	69,0
7		39,7
8	-	167,5
9	-	133,7
10	7,74 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H),	128,6
11	4,43 (t, $J = 7,7$, 2H)	126,9
12	7,50 (tt, $J = 7,5$ e 1,4 Hz, 1H)	131,5
13	6.52 (s, 1H),	-

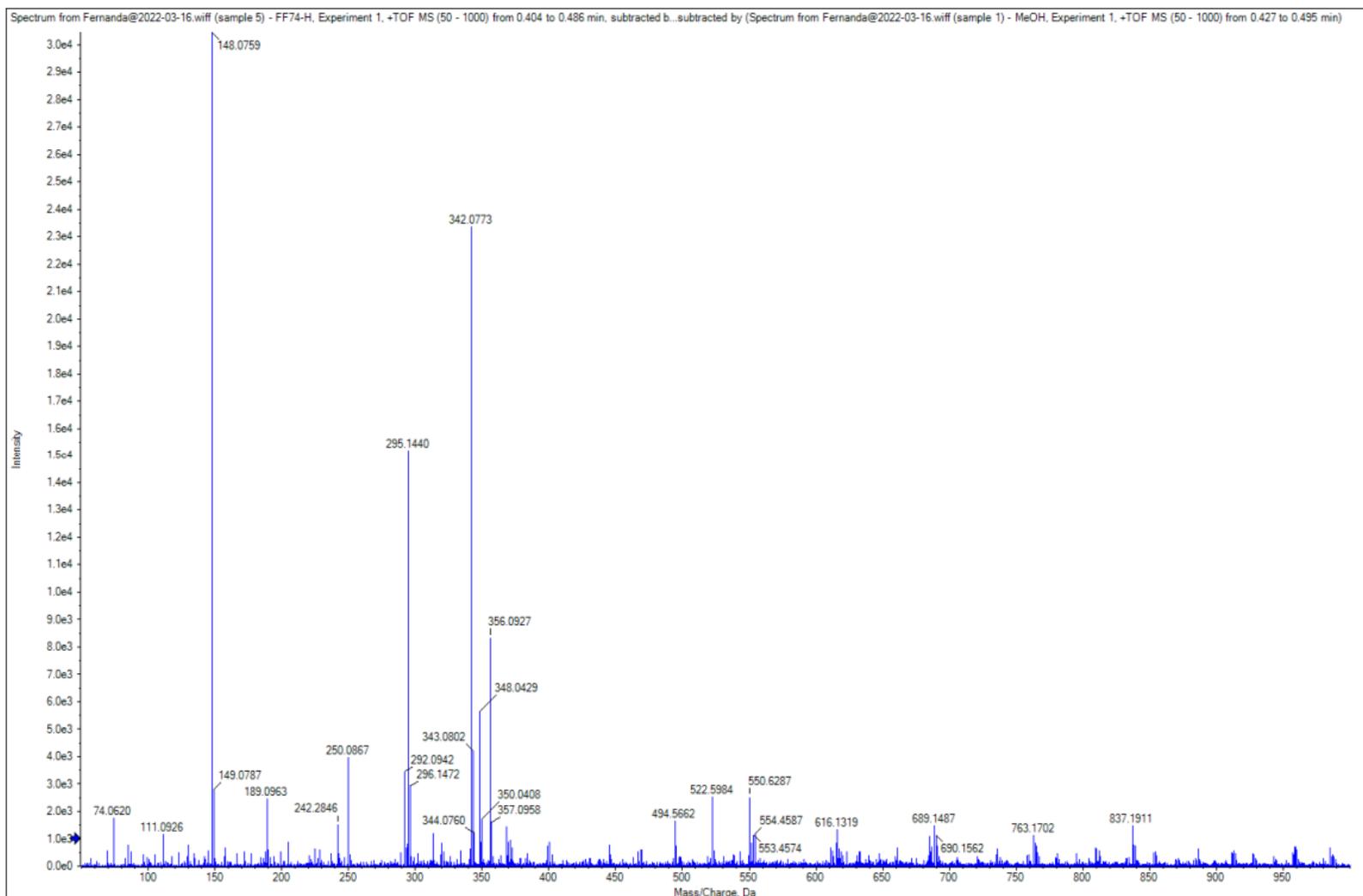


Figura 2.21 - Observação do íon m/z 148,01759 como evidência da formação de oxazolina **132** por EMAR (ESI modo positivo)

Passando às análises biológicas, o docking molecular parecia apontar para um resultado de inibição de violaceína melhor em comparação aos já apresentados neste capítulo. Infelizmente, a molécula **138** apresentou caráter bactericida nas duas primeiras concentrações testadas e apresentou uma inibição de apenas 30% na concentração de 625 μM , resultado muito aquém do esperado (Figura 2.23 -B). A molécula **136** apresentou 45% de inibição na concentração de 1,25 mM (Figura 2.23 -A). Dessa forma, é pertinente salientar que a perda das interações decorrentes da hidroxila diminuiu o efeito inibitório sobre a síntese de violaceína. Outra conclusão plausível é que a energia de *docking* não é um bom preditor do valor de inibição de biossíntese de violaceína para esta série de etanolamidas e morfolinamidas.

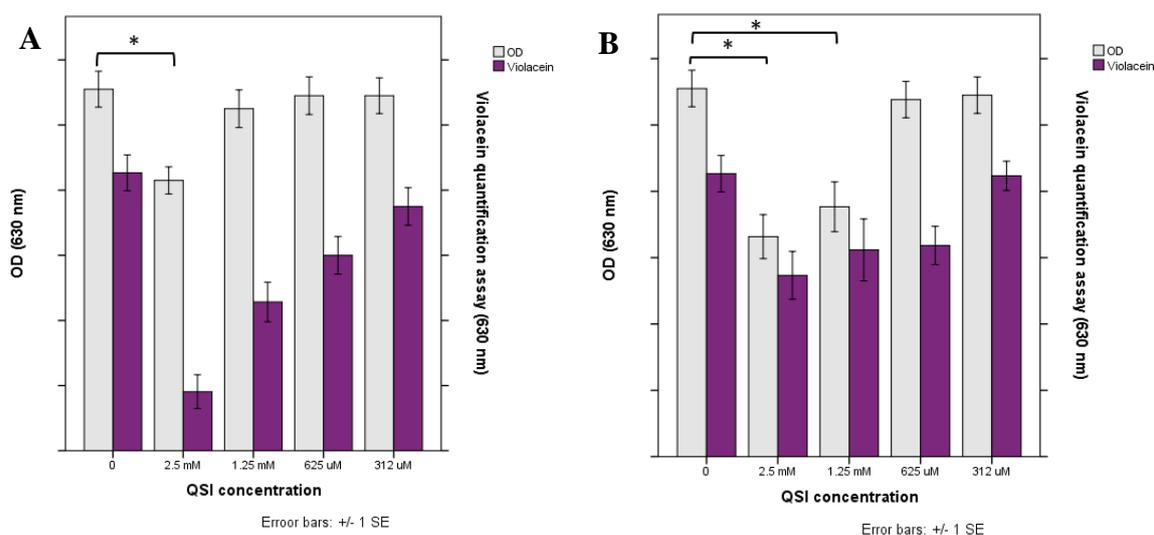


Figura 2.23 - (A) Ensaio de inibição de violaceína para 136. (B) Ensaio de inibição de violaceína para 138.

2.3.6. – Teste de competição pelo sítio de ligação da proteína CviR.

Analisando todos os resultados de inibição da síntese violaceína em CV026 obtidos para as etanolamidas e morfolinamidas propostas como simplificação estrutural do AI **51** e do inibidor **56**, as etanolamidas **123** e **134** foram escolhidas para novos testes na expectativa de se investigar o mecanismo dessa inibição. Inicialmente, essas moléculas foram submetidas ao teste de competição pelo sítio de ligação da proteína CviR. O teste é feito de forma semelhante ao teste de inibição de violaceína, contudo, agora a concentração do QSI é mantida constante e ocorre o aumento gradual da concentração do autoindutor **51**. Dessa forma, espera-se que a molécula **51**, em concentrações compatíveis com às apresentadas pelos QSI, seja capaz de reestabelecer a biossíntese de violaceína. A molécula **134** apresentou um resultado um pouco melhor do que a **123**, pois essa substância consegue manter a inibição de violaceína numa faixa de 50-40% mesmo com uma concentração mais alta de **51** (10nM a 20 μM - Figura 2.24-B). Mas com a concentração na mesma faixa dos inibidores, o autoindutor é capaz de reestabelecer

a biossíntese de violaceína aos valores em que os inibidores estão ausentes. Esses resultados sugerem que a competição entre o AI **51** e as etanolamidas **123** e **134** é um dos possíveis mecanismos que estas etanolamidas têm para a inibição da síntese de violaceína observada em CV026.

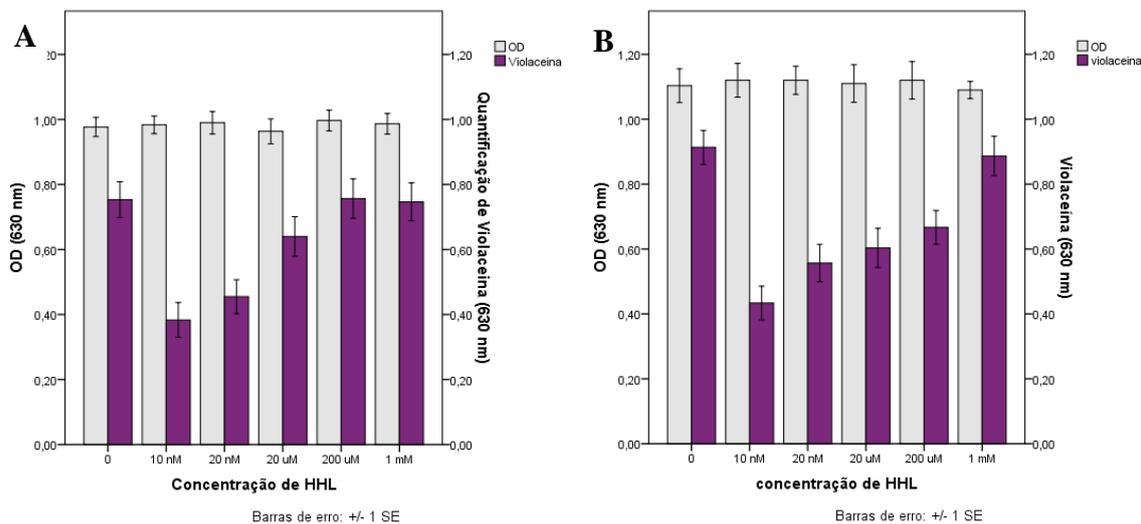


Figura 2.24 - Ensaio de competição para as moléculas (A) **123** na concentração de 500 µM. e (B) **134** na concentração de 625 µM.

2.3.7. Teste de hidrólise de quitina.

Um outro teste realizado foi o de hidrólise de quitina. Em CV026, a produção de quitinases é controlada por QS.⁵³ Logo, a observação da inibição da síntese de violaceína e da atividade quitinolítica em CV026 é um indício adicional de que uma dada substância está inibindo a ação transcricional de CviR e a expressão de diferentes genes sob controle de QS. Para a realização desta avaliação em CV026, se fez necessário um teste controle positivo de consumo de quitina concomitante à síntese de violaceína (CP) realizado com a adição do AI **51** (Figura 2.24-A). Também foi necessário um teste controle negativo (CN), o qual na falta de **51** CV026 não hidrolisa quitina e nem produz violaceína (Figura 2.25-D). Para validar a resposta inibitória nesse ensaio, o inibidor **56** foi adicionado a um ensaio contendo o AI **51**. Neste ensaio, foi possível verificar que **56** inibe a produção de violaceína juntamente com o consumo de quitina (Figura 2.25-E). Infelizmente, o ensaio com as moléculas **123** e **134** não apresentaram uma clara inibição desses fenótipos nem mudança no tamanho da colônia (Figura 2.25 – B e C, respectivamente). Percebe-se uma tênue redução no halo violeta, sugerindo uma fraca inibição deste fenótipo.

Uma possível explicação para tal resultado é que o teste de consumo de quitina em placa é um teste visual e por isso precisa de uma porcentagem de inibição alta que permita a percepção

visual de alguma mudança. Uma conclusão tirada dos testes de hidrólise de quitina realizados nesta tese é que, neste ensaio, é necessária uma inibição superior a 70% de síntese de violaceína para que haja uma mudança perceptível a olho nu na hidrólise de quitina.

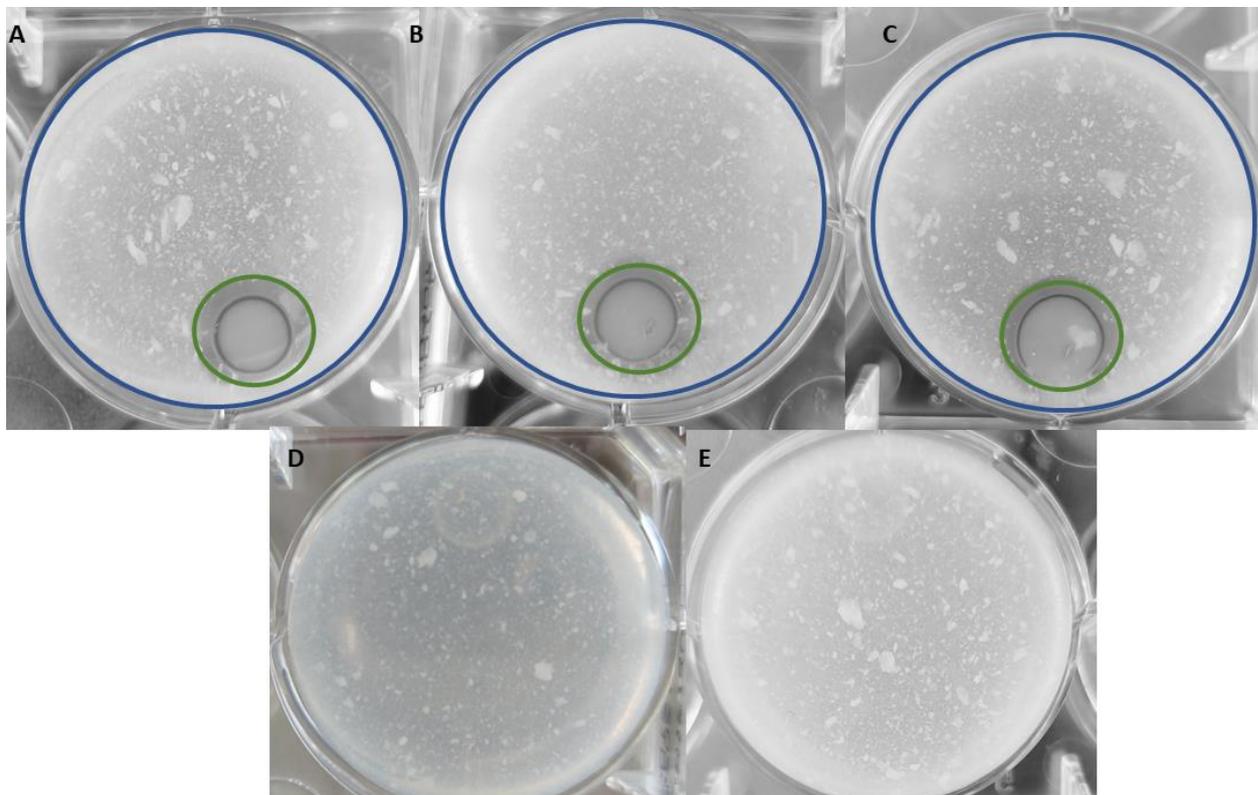


Figura 2.25 - Ensaio para detectar inibição da atividade quitinolítica e da síntese de violaceína: (A) Controle positivo de consumo de quitina e da síntese da violaceína (CP). (B) experimento com a molécula **113** na presença do AI **51** (C) experimento com a molécula **126** na presença do AI **51**. (D) Controle negativo para a inibição do consumo de quitina e da síntese da violaceína (CN), o halo de crescimento se encontra na parte superior do poço. (E) experimento de validação da resposta inibitório com o inibidor **56** na presença do AI **51**, o halo de crescimento de encontra na parte superior do poço.

2.3.8. RT-qPCR.

Por fim, para finalizar o estudo dos inibidores **123** e **134**, foi realizado o experimento de RT-qPCR na perspectiva de confirmar que a inibição de violaceína ocorria devido a uma interferência na transcrição do operon *vioABCDE*. Como a interação da proteína receptora CviR com o autoindutor cognato **51** promove a indução da transcrição do operon *vioABCDE* e de outros genes relacionado ao QS de CV026, a interferência nessa interação ocasiona diminuição da transcrição dos referidos genes. Os experimentos de RT-qPCR foram realizados em triplicata biológica verificando a transcrição de *vioABCDE* por sondagem de dois *loci* (*vioA* e *vioC*). Como pode ser visto na Figura 2.26, a presença dos inibidores testados reduziu a expressão relativa de *vioA* em aproximadamente 50% para ambas as moléculas. Esses dados são

condizentes com os valores de inibição de violaceína. Esse experimento também confirma que as inibições ocorrem em níveis transcricionais, ou seja, os inibidores interferem na interação do autoindutor com a CviR.

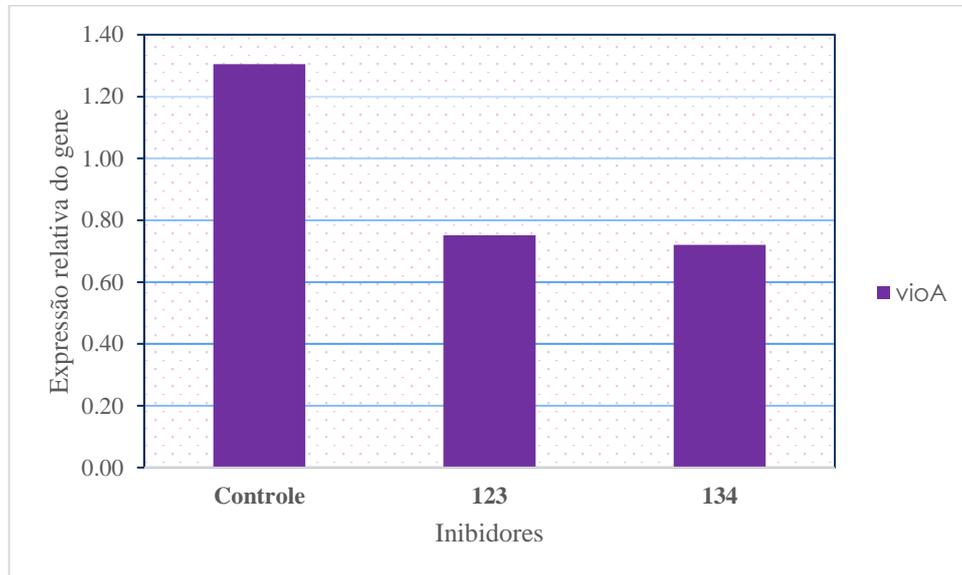


Figura 2.26- Gráfico da expressão relativa, em comparação ao gene 16S, do gene *vioA* na presença dos inibidores **123** e **134**.

2.4. Conclusões

Nesse capítulo, foram abordadas as simplificações estruturais do autoindutor cognato **51** e do inibidor **56**, além da prospecção de novos inibidores derivados desses. Primeiramente, foram realizadas as sínteses das simplificações inspiradas nas morfolinas, que seriam estruturas que impossibilitam interações do tipo doação de ligação de hidrogênio previamente possíveis nas etanolamidas. Os rendimentos variaram de moderados a bons, porém como foi explicado no texto, nesse primeiro momento de teste, não foi priorizada a otimização das sínteses.

Depois, os experimentos de inibição de violaceína foram realizados para os derivados das etanolamidas e das morfolinamidas. De forma a se permitir a comparação entre essas substâncias, 50% de inibição foi tomada como valor mínimo para se considerar uma boa atividade inibitória da síntese de violaceína em CV026, numa dada concentração. Desta forma, as substâncias que apresentaram inibição maior ou igual a 50% em concentrações mais baixas foram consideradas as mais eficientes. Partindo-se desta premissa, de forma geral, os compostos aromáticos apresentaram concentrações de inibição mais baixas, destaque para a molécula **123** que apresentou 50% de inibição numa concentração de 500 μM . Outra conclusão pertinente foi de que os derivados de *N*-2-hidroxi-etilamidas apresentaram concentrações de inibição menores do que as morfolinamidas. Isso sugere que as interações do tipo doação de ligação de hidrogênio na região polar dessas moléculas é importante para a atividade inibitória dessas moléculas.

Além disso, experimentos de ancoragem molecular foram realizados para entender como os QSI preparados nesse capítulo se comportam frente à proteína receptora CviR. Para as moléculas com cadeia alifática, a parte da morfolina e da etanolamina ocupam o mesmo espaço ocupado pela lactona do AI **51**. Porém, para as moléculas aromáticas, ocorre a inversão da posição dentro do sítio. Dessa forma, o anel aromático se encontra no espaço ocupado pela lactona do autoindutor. Outrossim, essa posição permite que as estruturas contendo aromático possam apresentar interações do tipo π - π com o Triptofano 111, o que parece ser o motivo da inversão dentro do sítio.

A simplificação estrutural do inibidor **56** também foi proposta e as moléculas análogas **134** e **135** foram preparadas com rendimento de 54% e 86%, respectivamente. Ambas as moléculas apresentam uma inibição de produção de violaceína de 50% nas concentrações de 625 μM e 1,25 mM, respectivamente para **134** e **135**. A molécula **134** ocupa posição similar ao inibidor **56** no experimento de ancoragem molecular com energia de interação de -6,8 kcal/mol. Já a molécula **135** apresenta uma interação com energia de -7,7 kcal/mol em um dos monômeros, porém a sua posição se encontra invertida dentro do sítio de ligação. No outro monômero a posição similar ao inibidor apresenta energia de -6,4 kcal/mol.

Analisando os resultados obtidos até o momento, três novas moléculas foram propostas como otimização da molécula **123**, aquela que apresentou o melhor resultado das classes de moléculas inicialmente testadas nesse capítulo. Dessas, duas foram sintetizadas com sucesso, **136** e **138**, com rendimentos de 57% e 40% após purificação. A síntese da molécula **137** se mostrou um desafio devido à ciclização intramolecular que gera a oxazolina **140** e foi abandonada devido à similaridade estrutural com a **138**, que foi efetivamente preparada. Apesar de os experimentos de ancoragem molecular resultar em energias de interação para os complexos entre CviR e as moléculas **136** e **138** melhores do que a calculada para a molécula **123**, os resultados dos testes de inibição não foram animadores. A molécula **136** apresentou inibição de 45% na concentração de 1,25 mM, apontando para a necessidade da presença da hidroxila para o efeito biológico. Já a molécula **138** se mostrou bactericida nas duas concentrações mais altas testadas e uma inibição de 30% na concentração de 625 µM.

Para finalizar o estudo dos inibidores advindos das simplificações estruturais propostas neste capítulo, as moléculas **123** e **134** foram escolhidas para outros testes que visavam entender o seu mecanismo de inibição. O primeiro teste realizado foi o de competição pelo sítio de interação. Nesse experimento os inibidores tiveram sua concentração mantida constante enquanto se variou a concentração do autoindutor, a fim de observar se o AI **51** era capaz de reestabelecer a biossíntese de violaceína na presença de **123** ou de **134**. Esta última resistiu melhor ao aumento de concentração do autoindutor, porém quando o autoindutor atingiu a concentração de 1mM, ele foi capaz de reestabelecer a produção de violaceína para as duas moléculas testadas.

Outro experimento realizado foi o de consumo de quitina, fenótipo que, assim como a síntese de violaceína, também é controlado por QS. As moléculas **123** e **134** não foram capazes de inibir o consumo de quitina nas condições do testadas. Para que tal consumo seja afetado parece ser necessário que a inibição de violaceína seja superior a 70%, o que não ocorreu em nenhuma das moléculas testadas.

Por fim, o experimento de RT-qPCR foi realizado para confirmar as evidências apresentadas até aqui de que a inibição das moléculas **123** e **134** ocorreria pela interferência na transcrição do operon *vioABCDE*. Ambas as moléculas apresentaram inibição relativa de aproximadamente 50% do gene *vioA*. Logo, fica evidente de que as inibições ocorrem a nível transcricional. Com isso, podemos caracterizar as etanolamidas **123** e **134** como inibidores da síntese de violaceína por um mecanismo de inibição competitiva da interação do AI cognato **51** que resulta na inibição da expressão de fenótipos de QS em nível transcricional na CV026.

Capítulo 3

Estudo de cromenonas como possíveis inibidores de
Quorum Sensing em CV026

3.1. Introdução

A cromenona **142** é um composto heterobifíclico comumente encontrado na estrutura química de duas importantes subclasses de metabólitos secundários, as flavonas, como a representada pela estrutura **143**, e isoflavonas, aqui representada pela estrutura **144**. Estas pertencem à classe dos flavonoides e são substâncias naturais normalmente extraídas de plantas. Também são encontrados na natureza, com menor frequência, outros metabólitos secundários como **145**, um sistema bicíclico denominado tetrahydrocromenona, já que o heterobifíclico tem o anel carbocíclico não aromático (Figura 3.1).¹¹³⁻¹¹⁵

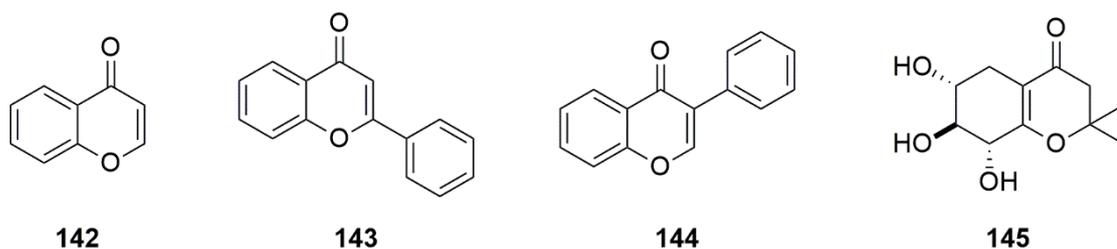


Figura 3.1 - Estrutura da cromenona, **142**, flavona, **143**, isoflavona, **144**, e tetrahydrocromenonas, **145**.¹¹³⁻

115

Silva e colaboradores revisaram a atividade anti-inflamatória das cromenonas.¹¹³ Os autores destacam que essa estrutura é frequentemente encontrada em inibidores de ciclo-oxidases (COX), em inibidores de lipo-oxidases (LOX), em inibidores do radical livre óxido nítrico (*NO) e em inibidores de anti-interleucina-5, todos envolvidos em processos inflamatórios. Exemplo disso seria a nedocromila, **146**, utilizada como fármaco anti-asmático e anti-histamínico (Figura 3.2).^{116,117} Contendo uma unidade molecular de cromenona, a molécula **147** também está comercialmente disponível para o tratamento de asma.¹¹⁸

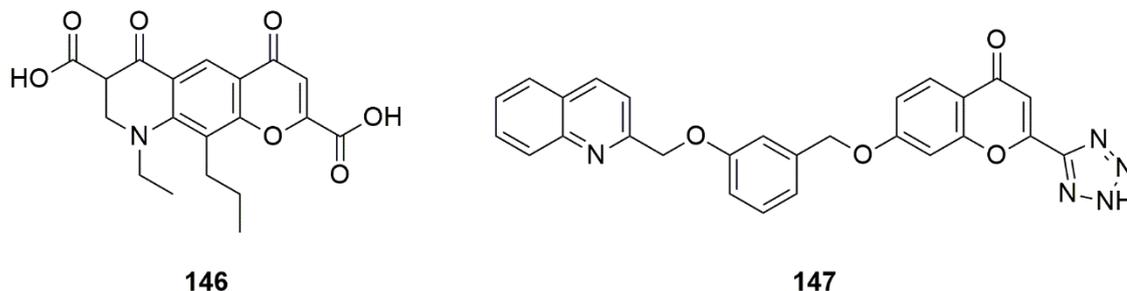
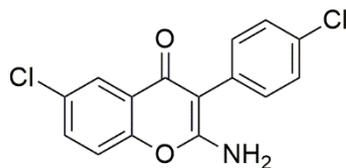


Figura 3.2 - Estrutura dos compostos **146** e **147** utilizados, comercialmente, como anti-asmáticos.¹¹⁶⁻¹¹⁸

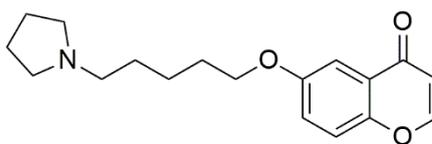
Supuran e colaboradores estudaram os efeitos de cromenonas, flavonoides e cumarinas frente à anidrose carbônica que resultam em ação diurética, com a molécula **148** sendo citada como um dos destaques do artigo (Figura 3.3).¹¹⁹ Lamb e Cushine revisaram as ações antibióticas, antifúngicas e antivirais de diversos flavonoides.¹²⁰ Já Cahyana e Adiyanti revisaram a ação dos flavonoides como agentes antidiabéticos.¹²¹



148

Figura 3.3 - Estrutura do composto **148**, molécula que teve o melhor resultado como diurético no estudo de Supran e colaboradores.¹¹⁹

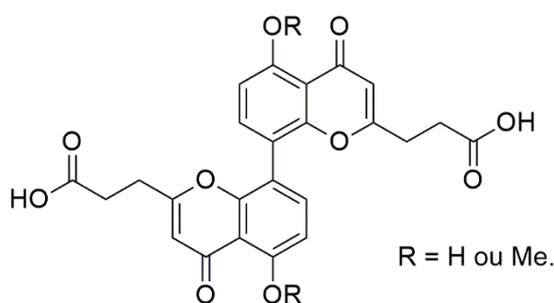
Gutschow e colaboradores estudaram o efeito de algumas cromenonas como drogas de múltiplos alvos. Esse tipo de direcionamento vem empregando compostos como inibidores de diversos alvos de doenças neurodegenerativas. Três moléculas se destacaram como inibidores de alguns dos alvos desejados em concentração micromolares, porém a molécula **149** (Figura 3.4) foi a única que apresentou dupla inibição nas enzimas acetilcolinesterase (AChE), que apresenta papel importante na propagação do impulso nervoso, e na inibição da monoamina oxidase (IMAO). Por isso, **149** apresenta finalidades terapêuticas para transtornos psiquiátricos.¹²²



149

Figura 3.4 - Estrutura do composto **149**, única molécula que apresentou dupla inibição dos alvos testados por Gutschow.¹²²

Mattson e colaboradores realizaram um estudo visando à simplificação estrutural de cromenonas diméricas naturais. Algumas estruturas pesquisadas, em especial a molécula **150**, se mostraram citotóxicas contra três tipos de células cancerígenas em concentração micromolar (Figura 3.5).¹²³



150

Figura 3.5 - Estrutura da molécula **150**, melhor resultado do trabalho de Mattson e colaboradores, sendo citotóxico contra três tipos de células cancerígenas.¹²³

Cromenonas vêm sendo muito estudadas devido à atividade anticâncer. Kwon e colaboradores estudaram os efeitos da molécula **151** como inibidor da topo-isomerase (figura 3.6). Esse tipo de inibidor interrompe a transcrição e replicação de DNA inibindo a divisão celular.¹²⁴ Lin e colaboradores desenharam, sintetizaram e avaliaram os efeitos de derivados de cromenonas frente a células de carcinoma coloretal humano (HCT116) e obtiveram bons resultados, em especial com a molécula **152**.¹²⁵

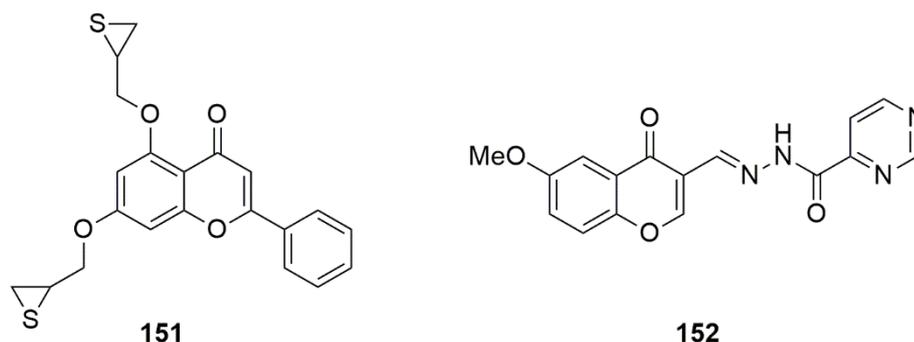


Figura 3.6 - Estrutura das moléculas **151** e **152** estudadas como possíveis drogas anticâncer.^{124,125}

As substâncias derivadas de cromenonas **54** e **55** (Figura 1.12 – página 19) também foram descritas como moduladores do QS de *C. violaceum*.⁶⁰ Santos e colaboradores estudaram as tetrahidrocromenonas extraídas dos fungos endofíticos das folhas da *Paepalanthus planifolius* (Eriocaulaceae).¹¹⁵ Esse tipo de fungo coloniza a parte interna do tecido das plantas e é tido como um grande produtor de metabólitos bioativos.¹²⁶ As substâncias **145** e **146** foram extraídas e caracterizadas pelos autores (Figura 3.7). Outrossim, essas moléculas foram testadas frente a bactérias e fungo e tiveram resultado positivo de ação microbicida para *Salmonella setubal* e *Candida albicans* em concentrações micromolares.

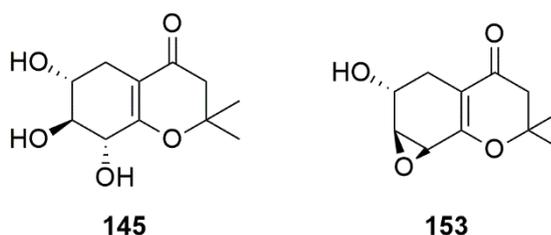


Figura 3.7 - Estrutura das moléculas **145** e **153** estudadas por Santos e colaboradores.¹¹⁵

Paralelamente, Machado e colaboradores sintetizaram a molécula **154** e avaliaram sua atividade moduladora de bioluminescência de *Vibrio harveyi*, fenótipo controlado por QS¹²⁷ Ela promoveu mais de 60% de inibição de bioluminescência na cepa selvagem BB120 (responsiva aos sistemas AI-1 e AI-2) e foi seletiva para a inibição do sistema AI-1 da cepa mutante BB886 (responsiva apenas a AI-1) (Figura 3.8). Este resultado chamou a atenção para o potencial desse tipo de estrutura como inibidor de QS em bactérias Gram negativas.

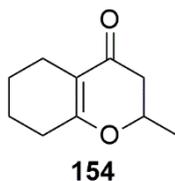


Figura 3.8 - Estrutura da molécula **154** inibidora de QS de *V. harveyi* estudada por Machado e colaboradores.¹²⁷

Sob a orientação de Machado, Cavalcante otimizou o processo de síntese da molécula **154** buscando a robustez na sua preparação aliada ao controle da formação das impurezas neste processo. A tetrahidrocromenona foi preparada com alto grau de pureza (99,9%), respeitando-se os princípios das boas práticas de fabricação de insumo farmacêutico ativo.¹²⁸

Ademais, também foi estudado os processos de degradação forçada da molécula em ambientes ácidos, básicos, térmicos e fotoquímicos. A molécula **154** não sofreu degradação em condições ácidas. Ela sofreu degradação nas outras condições testadas e, infelizmente, não foi possível caracterizar a estrutura química dos produtos de degradação gerados pela degradação básica. As estruturas **155**, **156** e **157** foram atribuídas às impurezas de degradação oxidativa. Além das impurezas de degradação, Cavalcante chama a atenção para a substância **158**, que é uma substância intermediária no processo de síntese de **154**, bem como para a estrutura **159** que foi atribuída a uma impureza produzida neste processo de síntese.

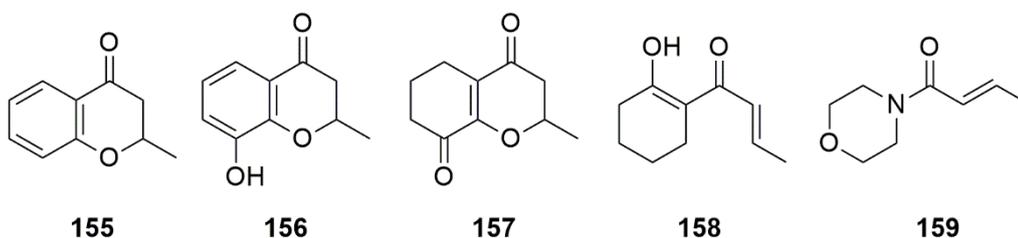


Figura 3.9 - Estrutura **155** a **157** são forma atribuídas a impurezas de degradação forçada da tetrahidrocromenona **154**, e estruturas **158** e **159** foram atribuídas a impurezas de síntese da moléculas **154**.¹²⁸

3.2. Objetivos

Nesse capítulo, o objetivo geral foi testar a molécula **154** e suas impurezas (moléculas **148 a 152**) no modelo de QS de CV026 e estudar o seu mecanismo de inibição.

3.2.1. Objetivos Específicos.

1) Testar a **154** e suas impurezas (moléculas **155 a 159**) em ensaio de inibição da síntese de violaceína em CV026 em meio líquido;

2) Realizar experimentos de ancoragem molecular afim de entender se existe interação entre a estrutura de CviR e a estrutura das moléculas testadas e que apresentaram os melhores resultados de inibição da síntese de violaceína em CV026;

3)

Realizar teste de competição pelo sítio ativo da proteína receptora CviR para as substâncias que apresentarem os melhores resultados de inibição da síntese de violaceína em CV026;

4) Testar possível inibição sobre atividade quitinolítica de CV026 com as substâncias que apresentaram os melhores resultados de inibição da síntese de violaceína em CV026;

5) Avaliar, utilizando a técnica de RT-qPCR, se a inibição de violaceína ocorre em nível transcricional por meio da quantificação de expressão do *operon vioABCDE*.

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Teste de inibição de síntese de violaceína em CV026.

As moléculas de **154** a **159** foram obtidas no acervo de moléculas do nosso grupo de pesquisa e tiveram sua atividade moduladora sobre a síntese de violaceína em CV026 avaliada. Os dados de máxima inibição obtidos nestes ensaios se encontram na Tabela 3.1 e no anexo S150-S155. É possível observar que apenas a substância 148 apresentou percentual de inibição abaixo de 50%. Com exceção da molécula 148 com inibição de 35%, todas as substâncias testadas apresentaram inibição superior a 50%. As moléculas **156**, **157**, e **159** apresentaram ações inibitórias de 50-55% em concentrações milimolares, o que aponta para sua baixa eficiência como inibidores da expressão de violaceína.

A tetrahidrocromenona **154** inibiu a síntese de violaceína em 65% a 625 μM . Este resultado se equipara ao obtido previamente para a inibição da bioluminescência de *V. harveyi*. Caba salientar que no ensaio para *V. harveyi*, a comparação entre o resultado com a cepa selvagem e aqueles com as cepas mutantes permitiu concluir que **154** modula a expressão de bioluminescência inibindo prioritariamente o circuito de QS AI-1. A análise conjunta destes resultados é o primeiro indício de que esta tetrahidrocromenona inibe a síntese de violaceína pela interferência no mecanismo de QS, apesar de o receptor de QS em CV026 ser citoplasmático e o equivalente em *V. harveyi* ser um receptor transmembrana.

A substância **158** é o último intermediário não isolado na rota de síntese de **154**. É interessante observar que ambas as substâncias apresentaram a mesma porcentagem máxima de inibição na mesma concentração testada (Figura 3.10). Durante o processo de síntese de **154**, **158** passa por uma reação de ciclização *in situ* por meio de catálise ácida para a formação da tetrahidrocromenona. Isso suscitou a possibilidade de que o efeito modulatório observado pudesse estar envolvido no equilíbrio químico entre essas substâncias.

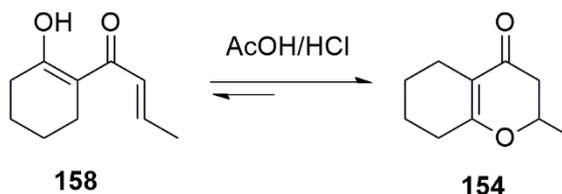
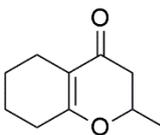
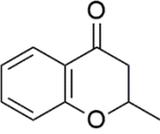
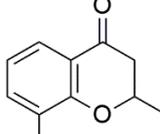
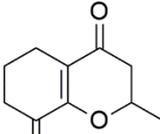
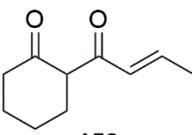
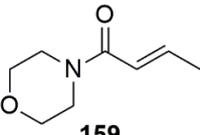


Figura 3.10 - Equilíbrio em meio ácido entre as moléculas **154** e **158**.

Tabela 3.1 – Teste de quantificação de violaceína para as moléculas **154** a **159**.

Molécula	Inibição (%)	Concentração
 154	65	625 μ M
 155	35	2,5 mM
 156	52	2,5 mM
 157	50	1,25 mM
 158	65	625 μ M
 159	55	2,5 mM

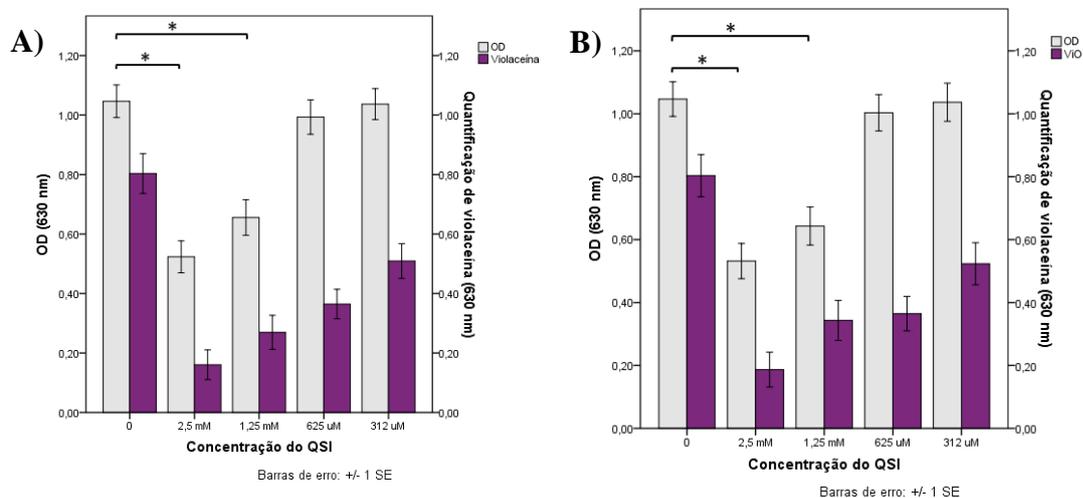


Figura 3.11 - Gráficos de inibição de síntese de violaceína para as moléculas: (a) **154** e (b) **158**.

3.3.2. Docking Molecular

De forma a entender melhor como essas estruturas se comportam dentro do sítio de interação da proteína receptora CviR, docking molecular cego foi realizado para todas as substâncias de **154** a **158** e em ambas as formas enantioméricas. O docking cego foi realizado utilizando uma caixa que abrangeu todo o dímero da proteína, de forma a analisar por qual região da CviR essas moléculas teriam maior afinidade. Todas elas apresentaram-se preferencialmente posicionadas no sítio de interação do autoindutor (LBD – *ligant binding domain*, sigla do inglês).

A análise comparativa dos dados apresentados na tabela permite verificar que nem todas as interações feitas pelo HHL **51**, e pelo inibidor **56** foram observadas para as moléculas estudadas nesse capítulo. Há também diferença de energia de interação entre os estereoisômeros, porém esse valor não chega a 1 kcal/mol, valor inferior ao erro quântico e que nos permite afirmar que esta é uma diferença de energia não significativa. Vale reforçar que o docking não é um bom preditor de energia, mas é um bom preditor de posicionamento.¹⁰⁷ Por conseguinte, analisaremos o posicionamento de cada uma das moléculas, dentro do LBD, em comparação com o autoindutor **51** (Figura 3.11).

Tabela 3.2 – Energia e resíduos de aminoácidos da proteína CviR que interagem com as moléculas 154 a 159. As informações para o autoindutor cognato HHL (51) e o inibidor 56 também foram apresentadas para permitir uma melhor análise comparativa.

Molécula	Energia de interação (kcal/mol)	Interações
HHL (51)	-7,1	Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97, Ser155
56	-8,8	Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97, Ser155
(R)-154	-7,9	Trp84, Asp97, Ser155,
(S)-154	-7,9	Tyr80, Trp84, Asp97, Ser155
(R)-155	-8,3	Tyr80, Trp84, Ser155, Trp111
(S)-155	-7,6	Tyr88, Asp97
(R)-156	-7,0	Tyr80, Trp84, Asp97, Ser155, Trp111
(S)-156	-6,5	Trp84, Asp97, Ser155, Trp111
(R)-157	-7,0	Tyr80, Trp84, Asp97, Ser155
(S)-157	-6,5	Tyr80, Trp84, Asp97, Ser155
158	-7,1	Tyr80, Trp84, Ser155, Met135

159	-6,2	Trp84, Tyr88, Asp97
------------	------	---------------------

A estrutura dos enantiômeros de **154** se posicionaram de forma muito semelhante no LBD (Figura 3.12- A e B), com a porção carboxídica localizada na mesma região em que se observa a lactona do auto indutor **51**. O mesmo posicionamento foi observado para ambos os isômeros da molécula **155** (Figura 3.12- C e D). Esse tipo de posicionamento já havia sido observado em estruturas contendo anel aromático previamente discutidas nesta tese, como as estruturas **123** e **121** do capítulo anterior. O que chamou a atenção nos resultados relativos a **155**, é que a carbonila do enantiômero (*R*)-**155** estava orientada de forma invertida quando comparam à carbonila do enantiômero (*S*)-**155** e os enantiômeros de **157**, e por isso faz interações com diferentes aminoácidos.

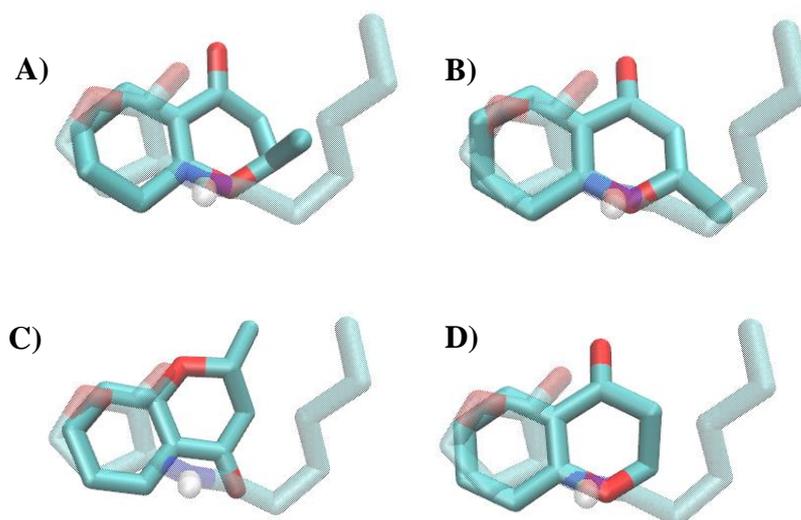


Figura 3.12 - Sobreposição, dentro do LBD, da molécula **51** com a : (a) (*R*)-**154** (b) (*S*)-**154**, (c) (*R*)-**155** e (d) (*S*)-**155**.

As estruturas enantioméricas de **156** foram as que se posicionaram mais afastadas da posição do autoindutor **51** (Figura 3.3 - A e B). Contudo, olhando-se a sobreposição com o inibidor **56**, parece que o anel aromático da estrutura **156** tenta se aproximar do posicionamento do anel aromático daquele inibidor (Figura 3.13- C). A sobreposição entre os isômeros *R* e *S*, (Figura 3.12- D), mostra que ambos os anéis aromáticos estão no mesmo posicionamento. Isso sugere que esses enantiômeros têm preferência por interagir com a Tirosina 88, da mesma forma que acontece com o inibidor **56**.

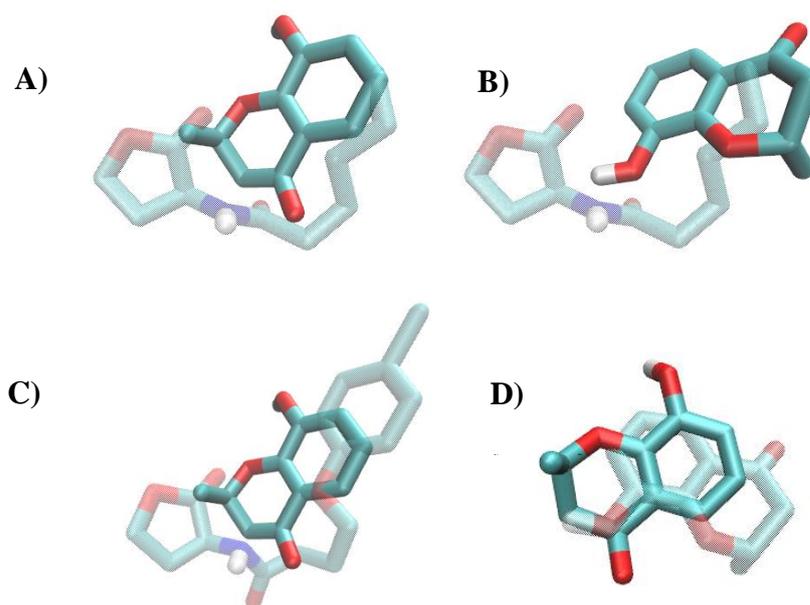


Figura 3.13 - Sobreposição, dentro do LBD, da molécula **51** com a: (a) **(R)-156** e (b) **(S)-156**. Sobreposição, dentro do LBD, da molécula **56** com a (c) **(R)-156**. (d) Sobreposição entre **(R)-156** e **(S)-156** dentro do LBD, essa última aparece de forma mais transparente.

Os enantiômeros de **157** tiveram posicionamentos bem diferentes entre si (Figura 3.14 - A e B). O isômero *R* se mostrou mais próximo do posicionamento do autoindutor enquanto o isômero *S* teve posicionamento semelhante ao observado para a molécula **156**. Entre os isômeros, há uma diferença de apenas 0,5 kcal/mol o que sugere que ambas as posições são possíveis. O resultado de inibição para essa estrutura foi bom, com 50% de inibição, porém em escala de concentração milimolar.

A substância **158** é um isômero acíclico de **154** e é possível notar que ambas parecem se posicionar de forma semelhante (Figura 3.12- A e B e Figura 3.14-C), com a carbonila ocupando a mesma região na qual se observa a carbonila da lactona do autoindutor **51**, mimetizando interações importantes com o Triptofano 84. A estrutura da molécula **158** ainda coloca a carbonila da cetona exocíclica em posicionamento próximo daquele em que se encontra posicionada a carbonila da amida no autoindutor, novamente mimetizando interações importantes. A diferença de energia entre **158** e **154** é 0,8 kcal/mol, o que não aponta para uma resposta mais clara sobre qual das estruturas apresenta a forma ativa que resulta na inibição de QS.

Por fim, a estrutura **159** apresenta a menor energia de interação. A sobreposição com o autoindutor revela que a carbonila tenta se posicionar de forma similar à carbonila da lactona do autoindutor (Figura 3.13-D). Esse posicionamento se mostra díspar em relação aos outros derivados da **154**, todavia, se mostra semelhante ao posicionamento ocupado pelos derivados

de morfolina de cadeia com até sete carbonos estudados no capítulo anterior (Figura S115 e S116).

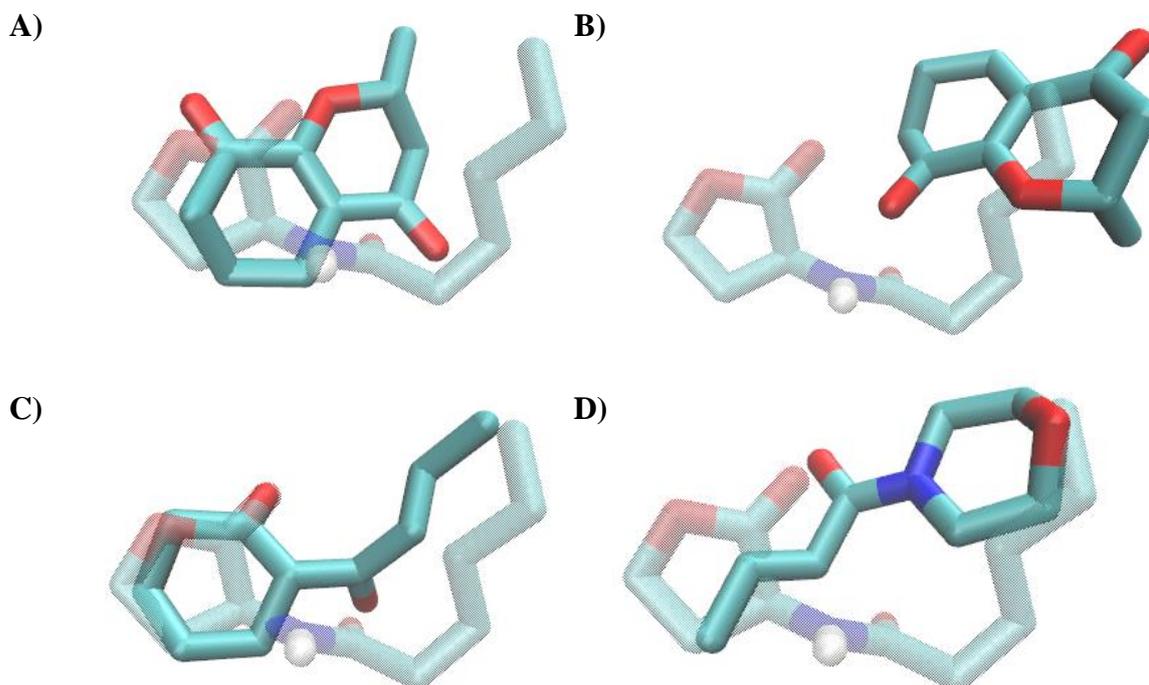


Figura 3.14 - Sobreposição, dentro do LDB, da molécula **51** com a : (a) *(R)*-**157**, (b) *(S)*-**157**, (c) **158** e (d) **159**.

3.3.4. Teste de competição pelo sítio de ligação da proteína CviR.

As moléculas **154** e **158** se mostraram as melhores moléculas dessa coleção e por isso foram escolhidas como modelo para tentar entender o mecanismo de inibição. O primeiro teste realizado com elas foi o de competição pelo sítio de ligação de CviR. O teste em si é realizado de forma parecida com o de inibição de violaceína, contudo nesse experimento, a concentração da molécula testada é mantida constante enquanto a concentração do autoindutor é aumentada. Dessa forma, é possível observar se a interação entre a molécula teste e a proteína é mantida ou se o autoindutor cognato **51** consegue reestabelecer a síntese de violaceína. Os gráficos de inibição se encontram na Figura 3.15. Na Figura 3.15-A é interessante notar que a inibição da síntese de violaceína promovida por **154** é mantida por um intervalo de concentração maior de **51** (10 nM, 20 nM e 20µM), enquanto na Figura 3.15-B, que corresponde à atividade da molécula **158**, o reestabelecimento da síntese de violaceína ocorre em um padrão dose-dependente. Outra observação pertinente é que em ambos os casos o **51** foi capaz de reverter a inibição, o que sugere a interação das moléculas **154** e **158** não ocorre de maneira definitiva.

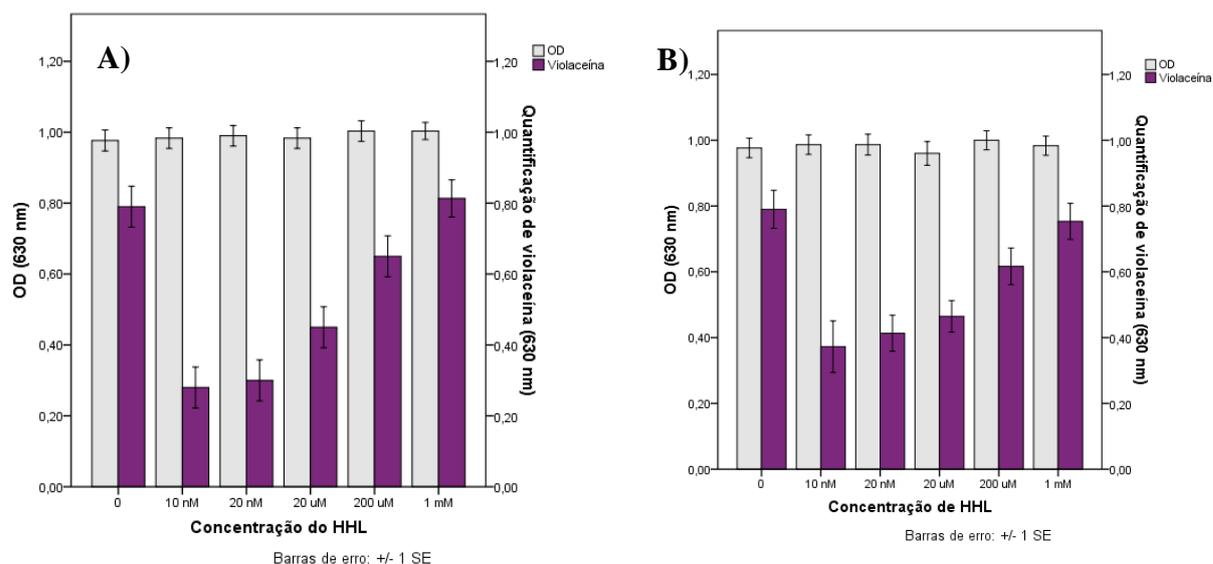


Figura 3.15 - Gráficos de competição pelo sítio de ligação para as moléculas: (a) **154** e (b) **158** e o autoindutor **51** (HHL).

3.3.4. Teste de hidrólise de quitina.

Como já comentado anteriormente, a hidrólise de quitina também é um fenótipo controlado por QS em CV026. Dessa forma, testar se as moléculas **154** e **158** modulam outro fenótipo de QS ajudaria a entender como ocorre a inibição. Para tal teste, foi necessário um controle positivo de consumo de quitina (CP – Figura 3.16-A), que foi ensaiado com CV026 na presença de **51**; um controle negativo de consumo de quitina (CN – Figura 3.16-D), ensaiado com CV026 unicamente; e por um controle de inibição, dado pela adição do inibidor de QS **56** no teste, o que ocasionou a inibição de violaceína e impediu o consumo de quitina (Figura 3.16-E). Por se tratar de um teste visual, ficou claro que a porcentagem de inibição do consumo de quitina precisa ser alta para que se possa ver a diferença a olho nu. Logo, as moléculas **154** e **158** não foram capazes de interferir visualmente no consumo de quitina visto que sua inibição chega a 65% como pode ser visto na Figura 3.16-B e C respectivamente. O halo de hidrólise de quitina, assim como a dimensão da colônia bacteriana que é delimitado visualmente pela violaceína, se manteve igual para o CP e para os experimentos com as moléculas **154** e **158**.

É importante frisar que não se pode dizer que as estruturas não inibem o consumo de quitina, mas que essa inibição não foi visual. Um teste em meio líquido seria melhor para, de fato, elucidar sobre a inibição.

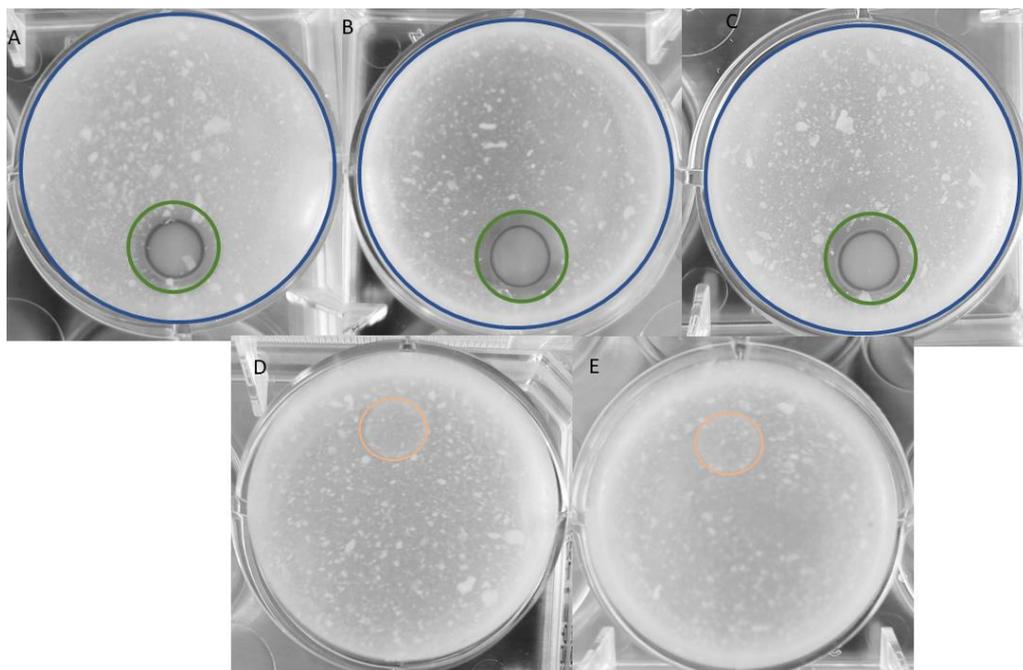


Figura 3.16 - Ensaio de consumo de quitina: (a) Controle positivo (CP); (b) **154**; (c) **158**; (d) controle negativo (CN) e (e) **56**. Os arcos em azul demarcam o tamanho do poço de teste, os em verde demarcam o halo de consumo de quitina do controle positivo e os em rosa demarcam o crescimento das colônias bacteriana onde não há presença de **51**.

3.3.5. RT-qPCR

Até o momento as evidências apontam para uma inibição em nível transcricional, ou seja, os QSI's testados devem induzir mudança conformacional em CviR que é parcialmente incapaz de interagir com o DNA para ativar transcrição. Para confirmar essa teoria, testes de RT-qPCR foram realizados e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 3.17. As moléculas **154** e **158** mostraram inibir a transcrição do operon *vioABCDE*. Quando os ensaios de RT-PCR sondaram o *locus vioA* do transcrito a inibição alcançou 44% e 50% para as moléculas **154** e **158**, respectivamente. Quando testado o *locus vioC* a inibição foi calculada em 41% e 50%, respectivamente. Por conseguinte, fica claro que a inibição de violaceína ocorre em nível transcricional.

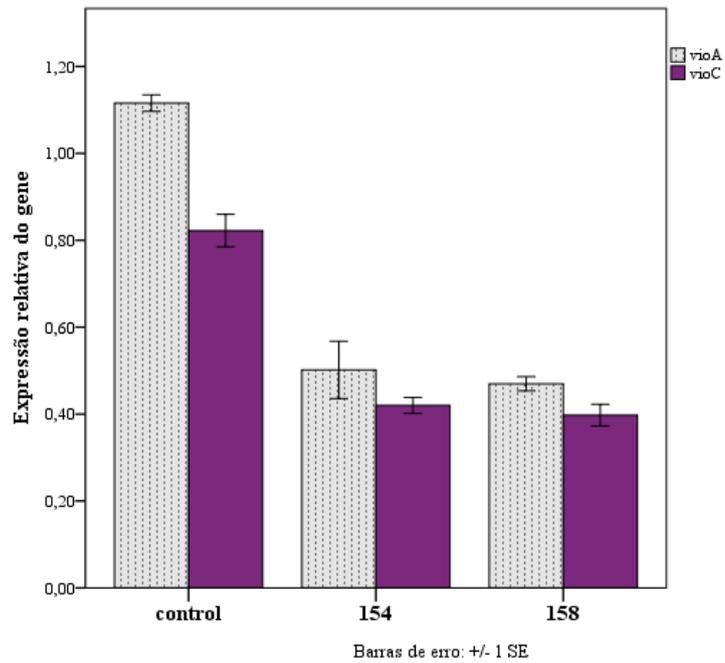


Figura 3.17 - Expressões relativas dos genes *vioA* e *vioC* sem QSI e nas presenças das moléculas **154** e **158**, utilizando *gyrB* como referência.

3.4. Conclusões

Nesse capítulo foram abordados os testes biológicos para avaliação da atividade modulatória das moléculas **154** a **159** em QS de CV026. A molécula **154** já tinha sua atividade anti-QS para *V. harveyi* relatada na literatura e agora foi possível mostrar que ela também inibe QS de CV026. Além disso, suas impurezas de degradação e síntese também foram testadas e apresentam boa porcentagem de inibição de violaceína de 35 a 65%, porém as concentrações variaram muito de 2,5 mM a 625 µM, sugerindo que sua presença em baixas concentrações numa amostra de **154** não teriam impacto significativo na atividade modulatória de **154** neste QS. A estrutura **158**, que é a forma acíclica da molécula **154**, apresentou resultados muito semelhantes aos desta última.

O *docking molecular* foi utilizado para entender como as substâncias estudadas interagem supramolecularmente com a proteína receptora CviR. O experimento de *docking* cego teve como melhor resultado para todas as moléculas testadas seu posicionamento dentro do sítio de interações (LDB). As interações dos possíveis QSI's se mostraram também semelhantes em grandeza de energia de interação (variação de ± 1 kcal/mol) quando comparadas a do complexo CviR:**51**. Estes resultados são mais um forte indício de que a interação de **154** e **158** com CviR é responsável pelo efeito de inibição de violaceína. Segundo o modelo de Bassler, Hodgson e colaboradores, a interação de um inibidor do QS de CV026 promove uma mudança conformacional em CviR que impede que esta proteína atue como ativador transcricional, inibindo a expressão do conjunto de genes sob controle de CviR em CV026.

Uma análise mais detalhada das poses obtidas para ambos os enantiômeros de **154**, em ambos os isômeros, bem como as obtidas para **158**, permitiu verificar que suas poses no LBD se mantiveram mais próximas do posicionamento do autoindutor **51**. Talvez isso justifique o seu melhor desempenho no teste de inibição. Ambos enantiômeros de **155** apresentou o anel aromático no mesmo posicionamento da lactona do autoindutor, fenômeno já observado em outras estruturas aromáticas. Os enantiômeros de **156** foram posicionados de forma mais distante do local de posicionamento do autoindutor. As formas enantioméricas de **157** se mostraram duais no seu posicionamento, com o enantiômero *R* se posicionando na região em que se encontra a lactona do autoindutor, e com o enantiômero *S* se posicionando na região em que se encontra a cadeia alquílica do autoindutor. A substância **159** mimetizou o posicionamento dos derivados de morfolina discutidos no Capítulo 2.

Para os outros testes na elucidação do mecanismo de inibição, apenas as moléculas **154** e **159** foram utilizadas, visto que apresentaram a maior inibição percentual na menor

concentração. O teste de competição pelo sítio de ligação mostrou que a **154** consegue manter a inibição por um intervalo maior de concentração de **51**, quando comparado a **158**. O aumento da concentração do autoindutor neste experimento restabeleceu a síntese de violaceína, sugerindo fortemente que ambas as moléculas foram deslocadas do LBD de CviR.

Para o teste de hidrólise de quitina, o resultado não foi o esperado. Infelizmente parece ser necessária uma inibição muito pronunciada para que se possa ver o resultado a olho nu. O desenvolvimento de um teste de consumo de quitina em meio líquido também fica como perspectiva desse capítulo.

Por fim, as evidências de que a inibição de violaceína acontecem a nível transcricional foram confirmadas por testes de RT-qPCR. A expressão relativa do transcrito *vioABCDE*, dos genes quando testado em dois loci (*vioA* e *vioC*) diminuiu em 40% a 50% para as moléculas **154** e **158**.

Capítulo 4

Estudo sobre as 2-alquenil- δ -valerolactonas como
possíveis inibidores de Quorum Sensing em
CV026

4.1. Introdução

Lactonas são ésteres cíclicos de grande importância biológica. Uma rápida pesquisa no *Web of Science* mostrou que existem mais de 600 revisões publicadas de 2020 a 2022 contendo lactonas como tópico central. Diaz-Munhoz e colaboradores publicaram uma revisão ampla sobre as lactonas, suas classificações, rotas de sínteses e atividades biológicas.¹²⁹ Os autores as apresentaram como α , β , γ , δ e ω -lactonas, classificação baseada no tamanho dos anéis, contendo respectivamente 3, 4, 5, 6 e 7 membros (Figura 4.1). Além dessas, há ainda as macrolactonas com anéis contendo um número ainda maior de átomos no ciclo. As α -lactonas são moléculas muito reativas e de rápida polimerização.¹³⁰ As β -lactonas são também muito reativas e servem de intermediários sintéticos versáteis.¹³¹ As γ e δ -lactonas são as mais abundantes devido à estabilidade estrutural. É estimado que existam mais de 3000 γ -lactonas na natureza.^{129,132}

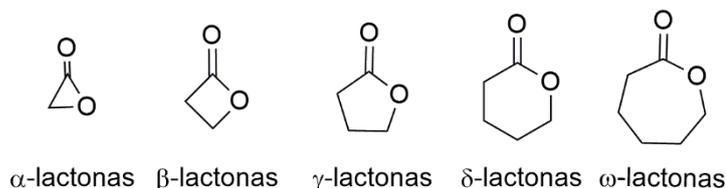


Figura 4.1 - Estruturas gerais das α , β , γ , δ e ω -lactonas.

Mazur e Maslowiec publicaram uma recente revisão sobre as atividades antimicrobianas das lactonas. Além disso, chamaram a atenção para as outras atividades biológicas creditadas a essas estruturas como atividade citotóxica, anti-inflamatória, anticâncer, antiviral, antiplasmodial, anti-hipertensiva entre outras.¹³³

Como exemplo de β -lactona, pode-se citar a Vibrallactona, **160** (Figura 4.2); uma molécula que apresenta um ciclo de 4 membros fundido a um de 5 membros, produzida por *Boreostereum vibrans* e excelente inibidor da lipase pancreática (IC_{50} de $0,4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).¹³⁴ A Obafluorina, **161**, é um metabólito da *Pseudomonas fluorescens* e apresenta ação antimicrobiana.¹³⁵ Já a Tetrahidrolipstatina, **162**, é um produto natural obtido da cultura de *Streptomyces toxytricini* e que é utilizado como medicamento para tratar a obesidade.¹³⁶

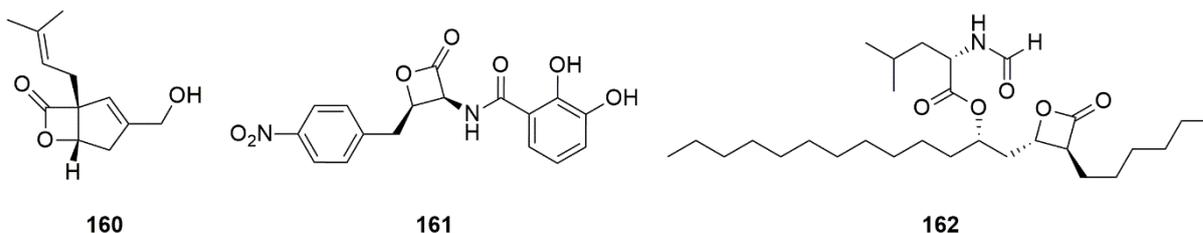


Figura 4.2 - Estrutura da Vibrallactona, **160**; Obafluorina, **161**, e da Tetrahidrolipstatina, **162**.¹³⁴⁻¹³⁶

N-acil-homoserinalactona (AHL, sigla do inglês *N*-acyl homoserine lactone) são substâncias químicas com estrutura baseadas em γ -lactona, e que são exploradas como autoindutores em sistemas de QS de bactérias Gram negativas. Um exemplo é a molécula **51** responsável pela comunicação da bactéria *Chromobacterium subtsugae* (Figura 4.3). A cadeia acila presente no esqueleto das moléculas AHL é responsável pela especificidade de sinalização intra-espécie apresentada por diferentes autoindutores.⁵²

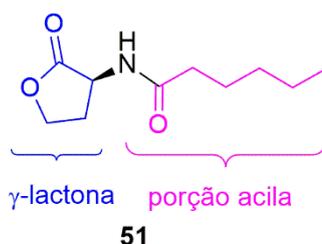


Figura 4.3 - Estrutura do autoindutor cognato de *C. subtsugae* e representante da classe *N*-acil-homoserinalactona.

Outro exemplo de γ -lactonas com relevante atividade biológica está associado à busca por um tratamento para a esquistossomose, uma doença tropical negligenciada que apresenta apenas um medicamento comercializado desde 1980, o Praziquantel, **163**.¹³⁷ Devido ao processo evolutivo pelo qual passa o parasita, existe um receio de que esse medicamento perca seu efeito, por isso é importante a procura por novos compostos ativos. Tendo isso em vista, Hoffmann e colaboradores estudaram o efeito de algumas γ -lactonas contra o parasita em sua fase jovem e adulta. As moléculas **164** e **165** foram as que tiveram as melhores ações inibitórias, com EC_{50} que variaram de 4,7 a 8,3 μ M para a molécula **164** e variaram de 0,5 a 4,8 μ M para a molécula **165** na fase jovem e adulta respectivamente.¹³⁸ Os autores também testaram se ocorreria alguma mudança na ação biológica se o composto **164** fosse testado em suas formas enantiomericamente puras *R* e *S*. O isômero *R* teve sua ação mantida enquanto para *S* a ação biológica foi perdida. Outrossim, os autores observaram a semelhança dessas estruturas com as AHL's e as testaram frente a *S. aureus* e *E. coli* e, para tal atividade, a molécula **165** teve melhor desempenho.

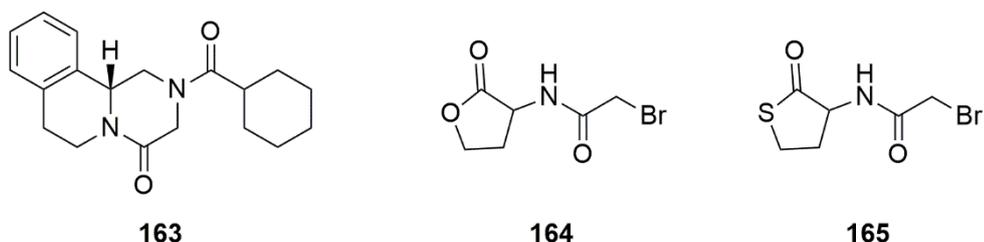


Figura 4.4- Estruturas das moléculas **163**, **164** e **165**.^{137,138}

As δ -lactonas também são encontradas em diversos produtos naturais (Figura 4.5). A cumarina, **166**, por si só, e seus derivados têm múltiplas atividades biológicas que foram

revisadas por Catto e colaboradores.¹³⁹ A molécula **167** é um metabólito secundário da *Hyptis ovalifolia*, conhecida como malva-do-cerrado, e apresenta acentuada ação antifúngica que variou de 7,8 a 125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ contra quatro espécies de dermatófitos (isolados clínicos).¹⁴⁰ A Pironetina, **168**, é um composto altamente citotóxico que atua como inibidor da tubulina e afeta a divisão celular, por isso, é estudada como possível droga anticâncer.¹⁴¹

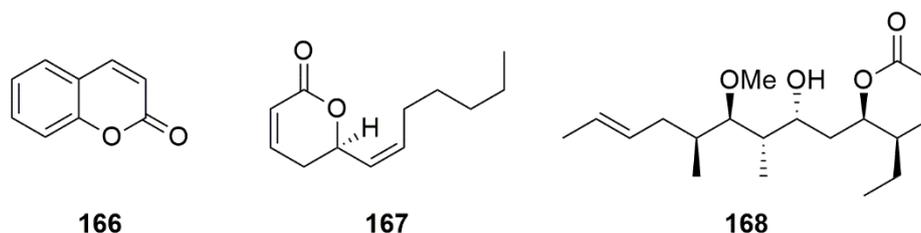


Figura 4.5- Estruturas das moléculas **166**, **167** e **168**¹³⁹⁻¹⁴¹

Longo e colaboradores publicaram uma revisão sobre a ocorrência natural, atividade biológica e síntese da macrolactonas com anéis de 8, 9, 10 e 11 membros.¹⁴² Um exemplo dessas substâncias é a Vermixocina A, **169**, substância isolada do *Penicillium* sp. cuja ação inibitória afeta os receptores de ocitocina (Figura 4.6).¹⁴³ Hanson e colaboradores elucidaram diversas estruturas produzidas pela fermentação do fungo *Cephalosporin aphidicola* como a estrutura **170**.¹⁴⁴

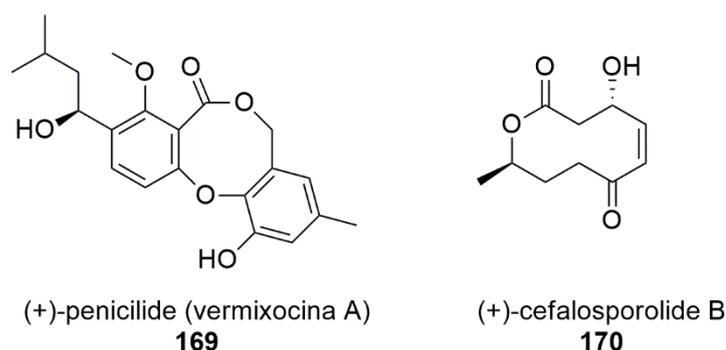


Figura 4.6- Estruturas das moléculas Vermixocina A, **169**, e (+)-cefalosporolide B, **170**.^{143,144}

4.1.1. 2-alquenil- δ -valerolactonas.

2-alquenil- δ -valerolactonas são δ -lactonas com uma ligação dupla no carbono α à carbonila. Apesar do grande interesse sintético por essas estruturas, suas atividades biológicas são pouco conhecidas. A última revisão publicada foi em 2011 por Janecki e colaboradores apenas cita algumas atividades biológicas, enquanto foca no leque de possíveis rotas sintéticas para sua preparação.¹⁴⁵

A molécula **171**, Figura 4.7, cuja estrutura se assemelha à uma estrutura esteroidal, se mostrou eficaz contra células de carcinoma nasofaríngeo (KB) em concentração abaixo de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.¹⁴⁶ A estrutura **172** que foi isolada da *Pseudoplexaura porosa* apresentou atividade

antibiótica e se mostrou citotóxica contra células do carcinoma epidermóide humano nasofaríngeo em uma concentração de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.¹⁴⁷ A molécula **173** e seus derivados se mostraram eficientes contra células de câncer de rato e dois tipos de células de leucemia humana.¹⁴⁸ Os autores compararam esses resultados com os obtidos para as γ -lactonas correspondentes e notaram que o tamanho do anel não era importante para a atividade citotóxica.

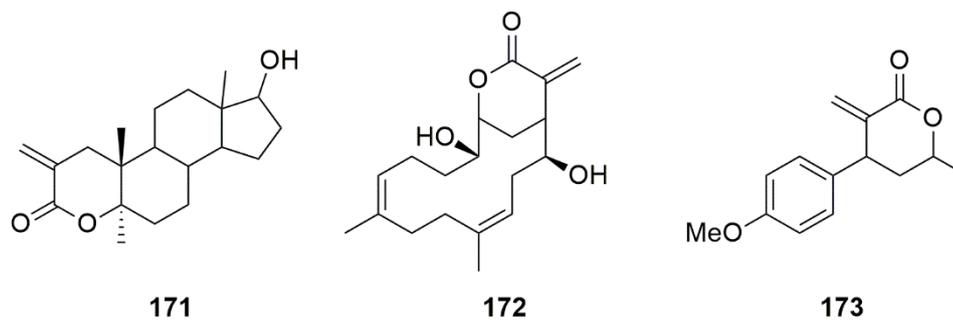


Figura 4.7- Estruturas das moléculas **171** a **173**.¹⁴⁶⁻¹⁴⁹

4.2. Objetivos

Nesse capítulo o objetivo geral foi testar se as 2-alquenil- δ -valerolactonas são moduladores de QS em CV026 e estudar o seu mecanismo de inibição.

2.2.1. Objetivos Específicos.

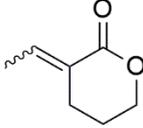
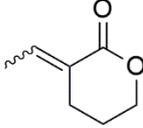
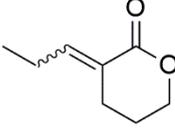
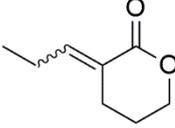
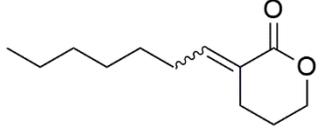
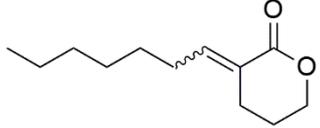
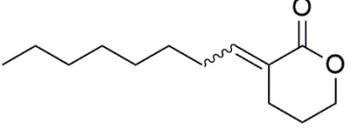
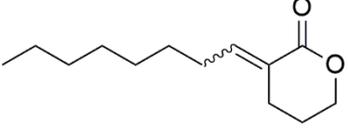
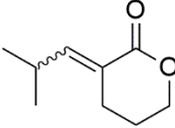
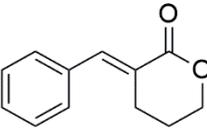
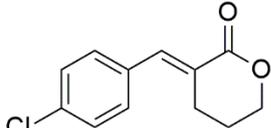
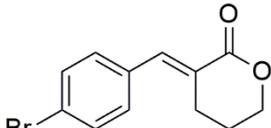
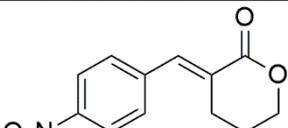
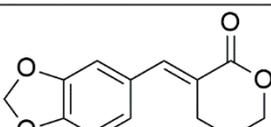
- 1) Testar as 2-alquenil- δ -valerolactonas frente à modulação da síntese de violaceína em CV026 em meio líquido;
- 2) Realizar experimentos de ancoragem molecular afim de entender se existe interação entre os melhores inibidores e a CviR;
- 3) Realizar teste de competição pelo sítio ativo da proteína receptora CviR;
- 4) Testar para inibição de hidrólise de quitina a melhor molécula dentre as testadas para inibição de violaceína;
- 5) Avaliar, utilizando a técnica de RT-qPCR, se a inibição de violaceína ocorre em nível transcricional por meio da quantificação de expressão do *operon vioABCDE*.

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Avaliação de inibição de síntese de violaceína em CV026.

As 2-alquenil- δ -valerolactonas estudadas neste capítulo faziam parte do acervo molecular do nosso grupo de pesquisa.¹⁵⁰ Elas tiveram sua atividade moduladora da síntese de violaceína em CV026 testada inicialmente.¹²⁸ Os dados de máxima inibição de síntese de violaceína se encontram na Tabela 4.1 e no anexo S166-S179. Vale ressaltar que, até o momento, não existe na literatura a avaliação desse tipo de estrutura frente a QS. As estruturas com cadeia aromática promoveram uma maior inibição de síntese de violaceína e, em concentrações menores, as estruturas alifáticas conduziram a inibições que variaram de 35 a 52%, sendo a estrutura **176E** foi a que promoveu a maior inibição de síntese de violaceína (Figura 4.8-A). Já as aromáticas apresentaram inibições entre 45 e 85%. A molécula **179E** apresentou a maior porcentagem de inibição 85% em 625 μ M (Figura 4.8-B), sendo está a maior dentro todas testadas nesta tese. Quando a concentração dessa molécula é reduzida pela metade, 312 μ M (Figura 4.8-B), a inibição de produção de violaceína é de 70%, um valor ainda alto considerando as inibições das outras estruturas testadas nesta classe de moléculas.

Tabela 4.1. Porcentagem máxima de inibição para as 2-alquenil- δ -valerolactonas **174** a **183**.

Molécula	Inibição (%)	Concentração
	174E 40	2.5 mM
	174Z 40	2.5 mM
	175E 40	2.5 mM
	175Z 45	1.25 mM
	176E 52	1.25 mM
	176Z 42	625 μ M
	177E 42	1.25 mM
	177Z 40	625 μ M
	178E 35	1.25 mM
	179E 85	625 μ M
	180E 63	1.25 mM
	181E 60	625 μ M
	182E 56	1.25 mM
	183E 45	1.25 mM

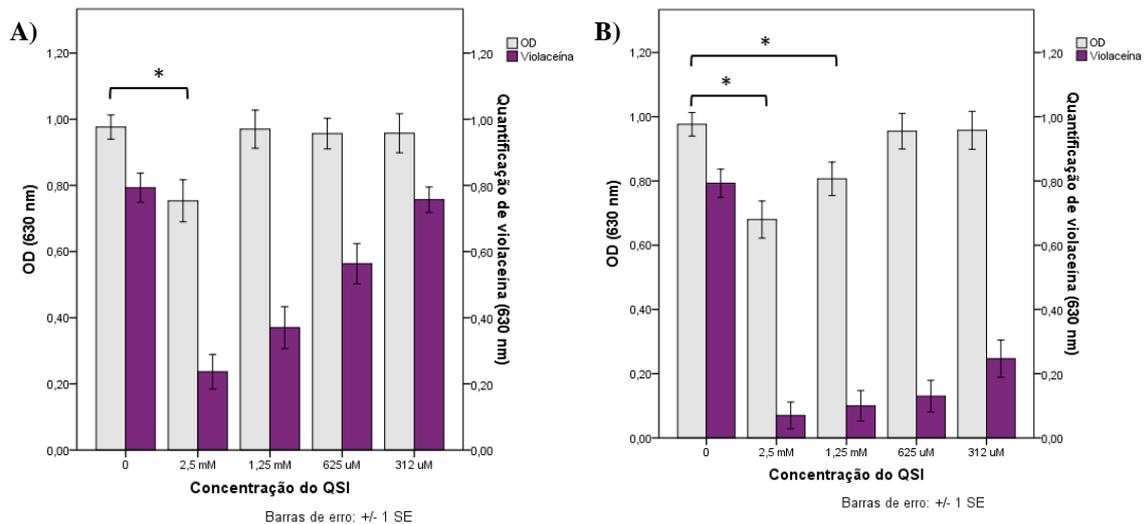


Figura 4.8. Gráficos de inibição de síntese de violaceína para (A) **176E** e (B) **179E** e o autoindutor **51** (HHL).

4.3.2. Docking molecular das 2-alquenil- δ -valerolactonas.

Mais uma vez, na tentativa de entender se as 2-alquenil- δ -valerolactonas estudadas neste capítulo seriam capazes de interagir com a CviR, *docking molecular* cego foi realizado para todas as estruturas testadas. Todas as moléculas apresentaram-se preferencialmente localizadas no LBD de CviR. Os seus valores de energia de interação e os resíduos de aminoácido de CviR que apresentaram as interações mais importantes se encontram na Tabela 4.2. Essa tabela também contém estes mesmos dados para o autoindutor **51** e para o inibidor **56**. As interações entre as estruturas e os resíduos de aminoácidos com até 5 angstroms estão no anexo (Figuras S180-S193).

Tabela 4.2 – Energias de interação e interações mais importante dos complexos formados entre a CviR e as estruturas **168** a **177**.

Molécula	Energia de Interação (kcal/mol)	Interações Hidrofílicas (Ligação de H)*	Interações Hidrofóbicas
HHL (51)	-7.0	Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97, Ser155	-
56	-8.8	Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97, Ser155	Tyr88
174E	-6.2	Trp84, Asp97, Ser155	-
174Z	-6.4	Trp84, Asp97, Ser155	-
175E	-6.5	Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97, Ser155	-
175Z	-6.3	Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97, Ser155	-
176E	-7.0	Tyr80, Trp84, Ser155	-
176Z	-7.4	Tyr80, Trp84, Asp97	-
177E	-7.4	Tyr80, Trp84, Asp97	-
177Z	-7.5	Tyr80, Trp84, Asp97	-
178E	-6.5	Tyr80, Asp97, Ser155, Trp111 , Thr140	-
179E	-8.4	Tyr80, Tyr88, Asp97, Ser155	Trp111
180E	-8.3	Tyr88, Asp97, Ser155, Trp111	Tyr88
181E	-8.1	Tyr88, Asp97, Ser155, Leu85** , Trp111	Tyr88
182E	-8.5	Trp84, Asp97, Asn77	-
183E	-8.0	Trp84, Asp97, Asn77	-

*- As interações com os aminoácidos destacados não são comuns às interações que o autoindutor 51 faz.

**-Interação de Hidrogênio não convencional.

Pela análise comparativa dos dados contidos na tabela acima foi possível notar que as energias de interações são menores para os compostos aromáticos. Outrossim, os compostos aromáticos como **179E**, **180E** e **181E** apresentaram interação π - π com os aminoácidos Triptofano 111 e Tirosina 88. Essa interação foi observada apenas para o inibidor **56** e talvez seja a grande responsável pelo aumento da estabilidade dos complexos CviR:lactonas simulados. Os valores de energia de interação entre as moléculas alifáticas e CviR se encontram próximas do valor de interação entre CviR:**51**. Já os complexos entre CviR e as moléculas contendo aromáticos apresenta valor mais próximo do encontrado para o complexo CviR:**56**.

De uma forma geral, pode-se citar quatro formas de ocupação espacial dentro do sítio de interações observadas para essas lactonas. Os compostos alifáticos se comportam como a estrutura **176E** na qual as carbonilas das lactonas se sobrepõem perfeitamente e as cadeias alifáticas se acomodam de forma semelhante à do autoindutor **51** (Figura 4.9-A e Figura S180-S188). A molécula **179E** apresenta uma inversão dentro do LBD, assim como em outras estruturas contendo apenas o anel aromático estudadas nesta tese, a saber **123** e **131**. O anel aromático dessa estrutura ocupa a região ocupada pela lactona do autoindutor **51** (Figura 4.9-B). As estruturas **180** a **183**, apesar de apresentarem anéis aromáticos, não fazem a inversão encontrada para a estrutura **179E**. As estruturas **180E** e **181E** se encontram posicionadas de forma similar dentro do bolsão de interações, com a carbonila da lactona buscando o mesmo posicionamento da carbonila da amida do autoindutor **51** (Figura 4.9-C e Figura S190-191). Contudo, para as moléculas **182E** e **183E**, as carbonilas das lactonas se posicionam próximas à carbonila da lactona do autoindutor **51** (Figura 4.9-D e Figura S192-193).

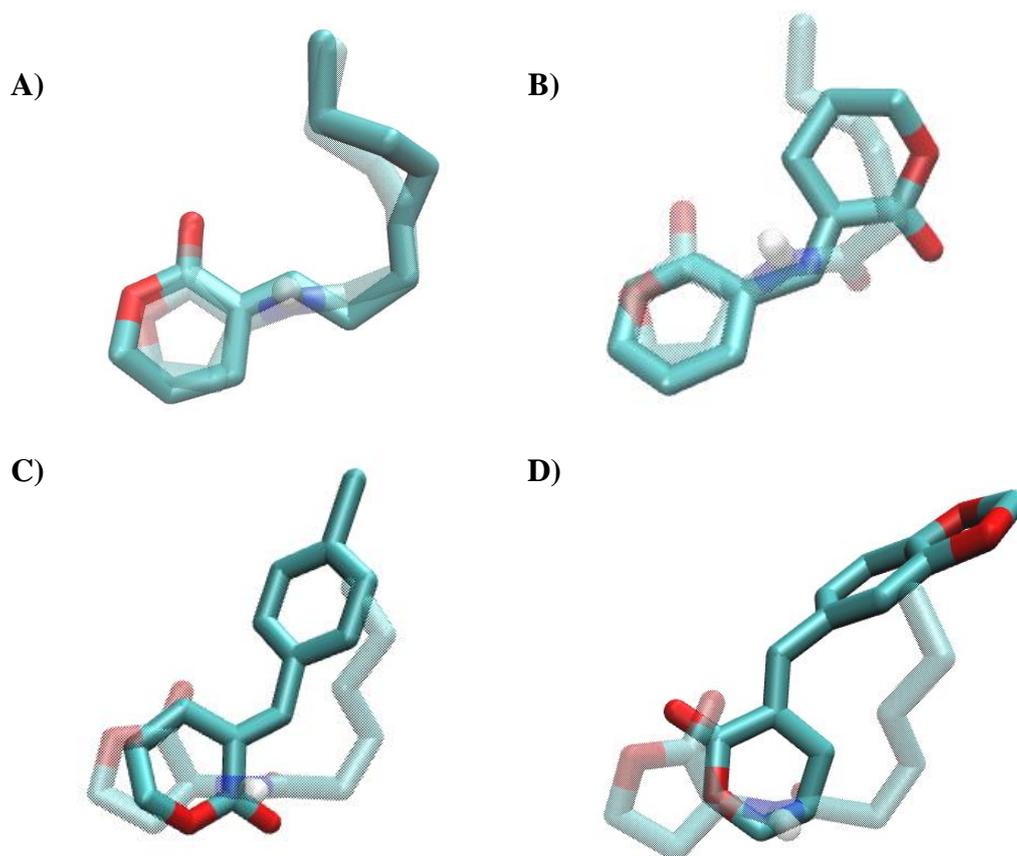
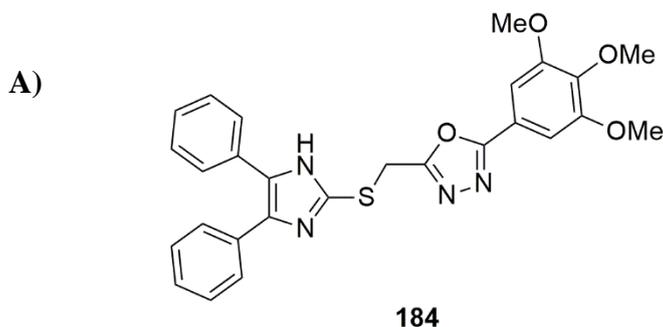


Figura 4.9. Sobreposição das estruturas obtidas por *docking molecular* do autoindutor **51** e as moléculas (A) **176E**, (B) **179E**, (C) **180E** e (D) **183E**.

4.3.3. Avaliação comparativa entre os resultados de percentual de inibição obtidos para as 2-alquenil- δ -valerolactonas e as energias de interação calculadas para seu complexo com CviR

Na tentativa de correlacionar os dados de inibição percentual e as energias de interação calculadas por *docking molecular* para o complexo entre as 2-alquenil- δ -valerolactonas, foi realizado um agrupamento dos dados de energia de interação, porcentagem de inibição e logP. LogP é um valor comumente associado com a capacidade de entrada na célula bacteriana. Valores menores que cinco, normalmente, caracterizam estruturas com facilidade de transitar pelo envelope celular bacteriano.¹⁵¹ Os valores de logP das estruturas **56**, **174** a **183** se encontram na tabela 4.3.

Além disso, para melhor entender estes dados, procurou-se na literatura uma molécula que pudesse transitar pelo envelope bacteriano, mas incapaz de interagir com circuito de QS em CV026, ou seja, uma molécula com logP abaixo de 5, sem interação com o LBD de CviR e sem ação inibitória sobre a síntese de violaceína (controle molecular negativo para interação com QS de CV026). A busca por estruturas que se encaixavam nesses parâmetros conduziu ao trabalho de Fallarero e Manner. Eles buscaram por compostos capazes de inibir o QS de CV026 em meio a um significativo acervo molecular que continha moléculas sintéticas e produtos naturais, em sua maioria flavonoides. Foram necessárias mais de 50 análises de *docking molecular* para encontrar a molécula controle negativo no acervo publicado por estes autores. Por fim, a estrutura **184** apresentou todas as características necessárias (Figura 4.10-A), com logP de 4,6 e nenhuma interação na região do LBD (Figura 4.10-B), mesmo quando essa interação foi forçada com a utilização de uma caixa de ancoragem do tamanho do bolsão de interações (Figura 4.10-C).



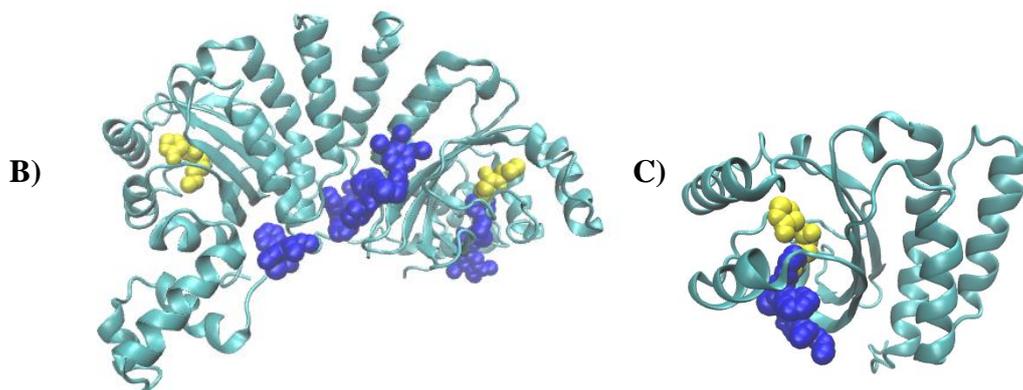


Figura 4.10 – (A) Estrutura do controle negativo de inibição; (B) Complexo, obtido pelo docking cego, entre a CviR:184, a estrutura 184 se encontra em azul. Já o autoindutor (51) é mostrado em amarelo para marcar o local do bolsão de interação. (C) Docking forçado utilizando uma caixa que contemplava apenas o sítio de interações. Novamente, é possível observar que a 184 não se encaixa no bolsão de interações.

De posse de todos esses dados, e para uma melhor comparação entre eles, resolveu-se utilizar a porcentagem de inibição observada no ensaio das moléculas estudadas na concentração de 625 μ M. Além disso, os valores de energia de interação foram normalizados utilizando a energia do inibidor 56 como referência de máximo de percentual de inibição. Dessa forma, os parâmetros e os dados utilizados se encontram na Tabela 4.3 e estão agrupados na forma de um gráfico de dispersão 3D na Figura 4.11-A. As planificações desse gráfico se encontram no anexo Figura S194-S197. O gráfico de energia relativa por inibição se encontra na Figura 4.14-B e será discutido adiante.

Tabela 4.3 - Parâmetros utilizados para análise 3D das 2-alquenil- δ -valerolactonas.

Molécula	Inibição a 625 μM (%)	Energia Relativa	logP
56	95*	1	1.474
174E	10	0,74	1.665
174Z	10	0,72	1.665
175E	15	0,74	2.110
175Z	20	0,72	2.110
176E	42	0,72	3.444
176Z	42	0,84	3.888
177E	30	0,84	4.333
177Z	40	0,85	4.333
178E	18	0,72	2.397
179E	85	0,95	2.882
180E	55	0,94	3.486
181E	60	0,92	3.651
182E	35	0,94	2.526
183E	35	0,90	2.505
184	-	-	4,600

*- A molécula 56 tem 95% de inibição a 32 μ M.

A)

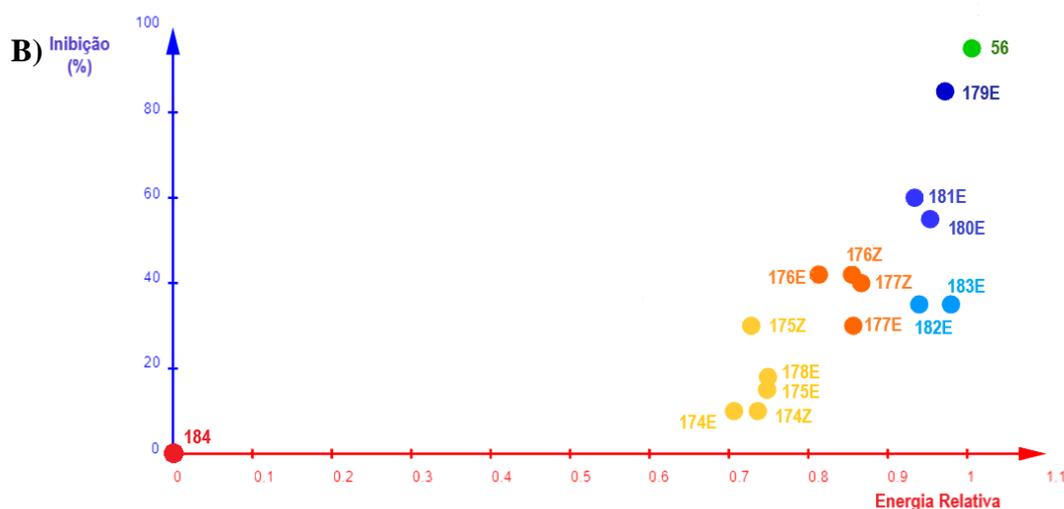
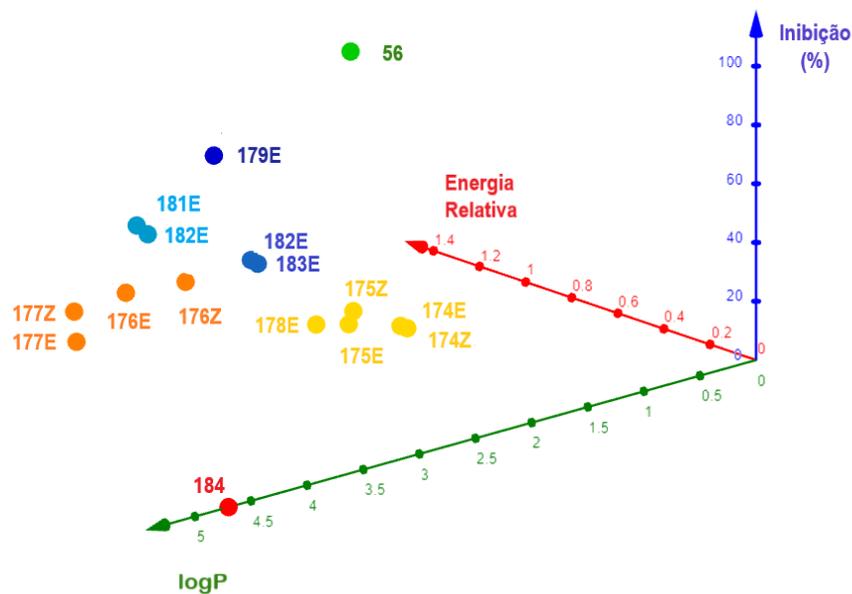


Figura 4.11 – (A) Gráfico 3D da análise dos parâmetros das 2-alquenil- δ -valerolactonas. (B) Gráfico Energia relativa contra Inibição das 2-alquenil- δ -valerolactonas.

Pela análise dos gráficos da Figura 4.11 é possível notar que o logP não apresentou correlação com os outros dois parâmetros avaliados e, por isso, não é um descritor relevante. Em contrapartida, foi observada uma clara tendência de melhoria da porcentagem de inibição à medida que se caminha para uma maior estabilidade do complexo entre as moléculas testadas e CviR. Esse efeito foi evidenciado quando houve a troca da cadeia alifática pela aromática. O caráter doador/retirador de elétrons dos substituintes do grupo fenila não parece imprimir uma tendência em meio a esses dados. A lactona **179E**, que não apresenta substituintes no grupo fenila, foi a que apresentou melhor resultado de inibição da síntese de violaceína e a maior

estabilização para o complexo com CviR, sugerindo que a presença de substituintes nas posições 3 e 4 do grupo fenila desestabilizam o complexo das lactonas com a CviR.

Esses dados reforçam a hipótese de que as 2-alquenil- δ -valerolactonas promovem a inibição da síntese de violaceína ao atuarem como inibidores competitivos da formação do complexo CviR:autoindutor, que é o responsável pela ativação da transcrição de *vioABCDE* via QS e consequente síntese de violaceína em CV026.

4.3.4. – Teste de competição pelo sítio de ligação da proteína CviR.

De forma a se validar a hipótese de que as 2-alquenil- δ -valerolactonas são inibidores competitivos em nível transcricional do QS em CV026, a lactona **179E** foi submetida a outros testes tendo em vista a elucidação de seu mecanismo de ação. De forma geral, a inibição de síntese de violaceína pode ocorrer de duas formas: inibição total ou parcial da transcrição do operon *vioABCDE*, ou inibição do funcionamento de alguma das enzimas responsáveis pela síntese de violaceína em CV026 (VioA-E). Para tal, pensou-se em um teste que mostrasse a possibilidade de retomada da síntese de violaceína. Dessa forma, evidenciara-se que a interação entre o inibidor **179E** e a proteína receptora CviR ocorre, mas não de forma irreversível.

Assim, o teste de competição pelo sítio de ligação foi desenvolvido. Nesse experimento, a concentração do inibidor foi mantida e a concentração do autoindutor **51** foi alterada. Os resultados do experimento de competição entre **179E** e **51** se encontram na Figura 4.12. Pela análise dos dados contidos nessa figura, fica claro que a interação entre a molécula **179E** e a proteína foi mantida nas concentrações de 10 nM, 20 nM e 200 μ M do autoindutor **51**. O reestabelecimento da síntese de violaceína só ocorreu quando a concentração de **51** (200 μ M) se aproximou da concentração do inibidor **179E**. Esse resultado aponta para uma inibição reversível dada pela competição para ligação ao LDB de CviR.

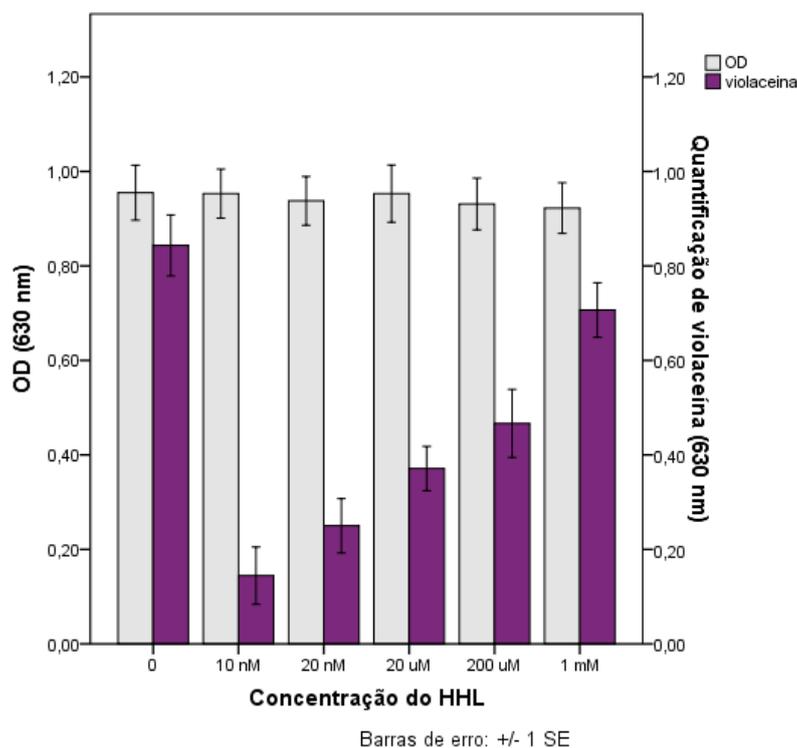


Figura 4.12 – Ensaio de competição entre **179E** e autoindutor **51** (HHL).

4.3.5. - Teste de hidrólise de quitina em CV026.

Outro experimento realizado foi o teste de consumo de quitina, um outro fenótipo controlado por QS em CV026.⁵³ O experimento foi realizado com base em três condições de teste para controle dos resultados: um controle negativo de consumo de quitina (CN – Figura 4.12-A), que foi produzido pelo crescimento de CV026 sem acréscimo do autoindutor **51**; um controle positivo de consumo de quitina (CP – Figura 4.12-B), que foi produzido pelo crescimento de CV026 na presença de **51**; e por um controle de inibição, dado pelo crescimento de CV026 na presença do inibidor **56** que ocasionou a inibição de violaceína e impediu a hidrólise de quitina (Figura 4.13-C). A Figura 4.13-D mostra o resultado para a avaliação da 2-alquenil- δ -valerolactona **179E**, e sua presença no meio de teste resulta em diminuição da síntese de violaceína e diminuição do halo de hidrólise de quitina. Essa molécula foi a única dentre as testadas neste trabalho de doutorado que foi capaz de mostrar um efeito visual da inibição de hidrólise de quitina. A hipótese lançada seria de que para ocorrer uma mudança visual, a porcentagem de inibição deveria ser superior a 75%. Diante desses resultados, os experimentos endossam que **179E** inibe QS em CV026 afetando a ação de seu regulador principal (CviR), levando a inibição de fenótipos diferentes sob controle de CviR: síntese de violaceína e hidrólise de quitina.

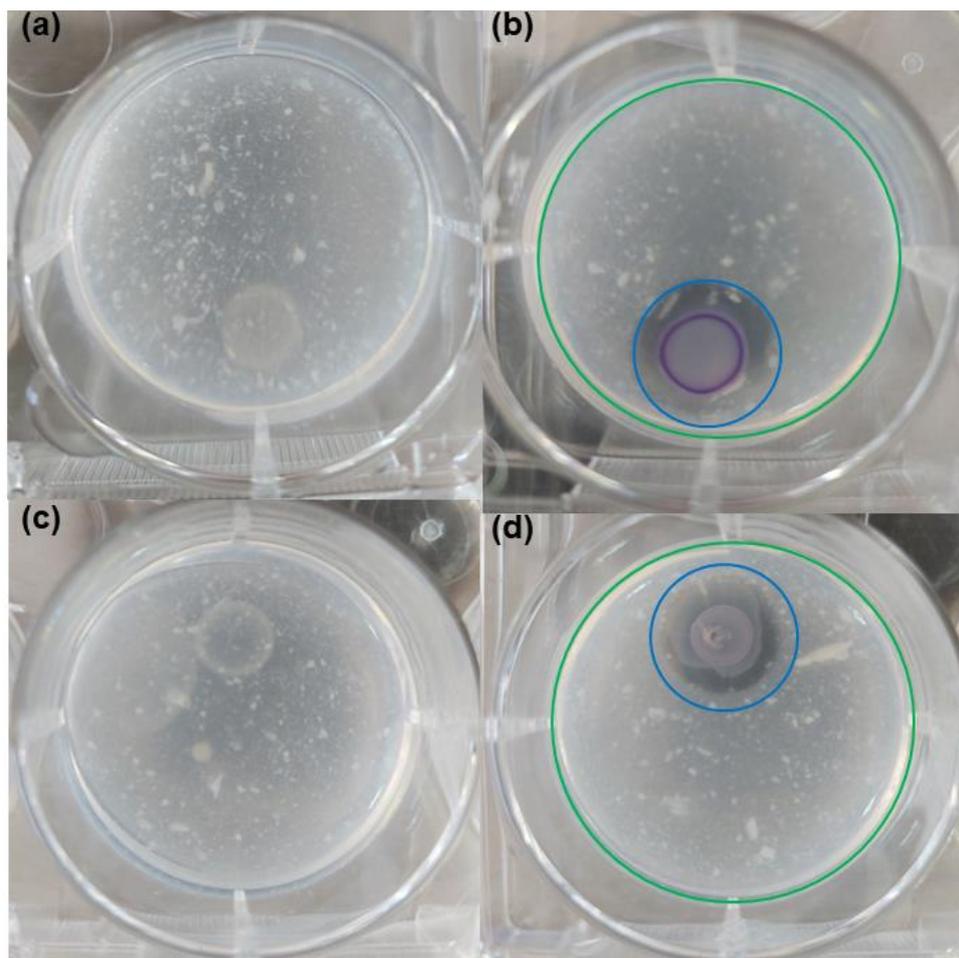


Figura 4.13 – Experimento de consumo de quitina: (A) controle negativo (CN); (B) controle positivo (CP); (C) inibidor **56** e (D) **179E**. Os arcos em verde demarcam o tamanho do poço de teste, os em azul claro demarcam o halo de consumo de quitina do controle positivo.

4.3.6. Ensaio de RT-qPCR para análise de expressão do operon *vioABCDE*.

Tendo em vista a se confirmar o mecanismo de inibição da síntese de violaceína promovida pela lactona **179E**, foi avaliado o efeito dessa substância na expressão do operon *vioABCDE*, por meio da quantificação do transcrito *vioABCDE* sondando dois *loci* (*vioA* e *vioC*) em experimentos de RT-qPCR (Figura 4.14). A redução da expressão do operon *vioABCDE* foi calculada em 68% e 80% quando sondado os *loci* *vioA* e *vioC*. Logo, fica claro que o mecanismo de inibição da molécula **179E** se dá pela inibição transcricional do operon *vioABCDE*. Por fim, considerando os resultados de ancoragem molecular, pode-se estender esse entendimento para as outras 2-alquenil- δ -valerolactonas estudadas nesse capítulo, ou seja, elas possivelmente inibem QS de CV026 em nível transcricional em virtude da interação com CviR.

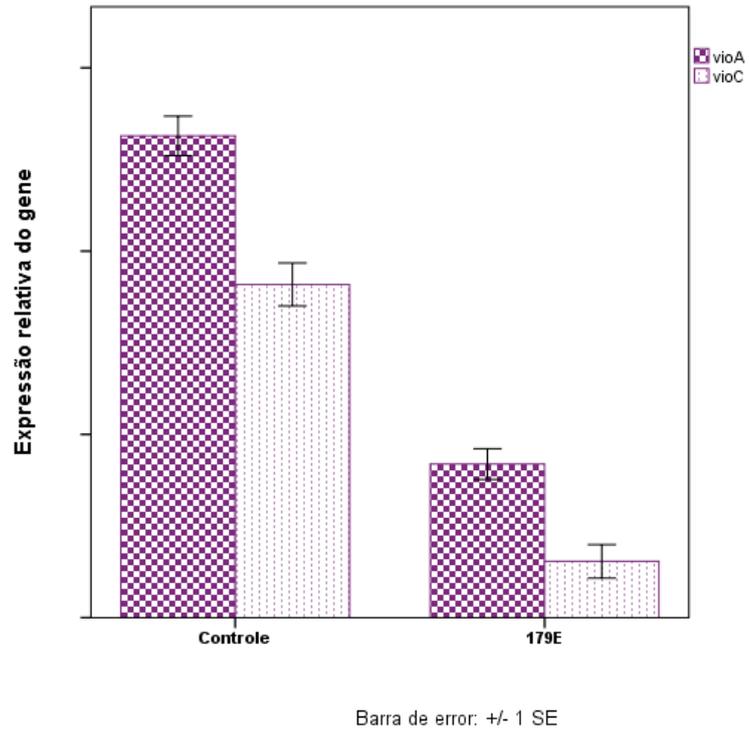


Figura 4.14 – Gráfico de expressão relativa de *vioABCDE* em ensaios de RT-PCR verificada por sondagem dos *loci* *vioA* e *vioC* na ausência (controle) ou presença da molécula **179E**.

4.4. Conclusões

Nesse capítulo foram abordados os testes biológicos para comprovação da atividade inibitória sobre QS de CV026 das moléculas **174** a **183**. As porcentagens de inibição variaram de 35 a 85% (Tabela 4.1). Foi possível notar que as moléculas contendo grupo arila renderam valores de inibição superiores aos das moléculas que apresentam cadeia alifática. Para efeitos de comparação, os valores de inibição a 625 μ M foram apresentados na Tabela 4.3, na qual pode-se observar que apenas as moléculas aromáticas sem substituinte e com halogênios conseguiram manter porcentagens de inibição acima de 50%.

Na busca pelo entendimento do mecanismo de inibição, as moléculas foram submetidas a cálculos de *docking* molecular cego utilizando toda a extensão da CviR como espaço de busca. Em todos os experimentos, as moléculas apresentam o posicionamento dentro do sítio de interações como o posicionamento de menor energia, ou seja, maior interação. De forma geral, busca-se por valores de energia de *docking* e interações com os resíduos de aminoácidos de CviR parecidas com a do inibidor **56**, pois essas interações produzem uma conformação que impede que CviR se ligue ao DNA e atue como ativador transcricional. Apesar do *docking* molecular não ser um bom preditor de valores de energia, a molécula **179E** foi aquela que mais se aproximou nesses parâmetros do inibidor **56**. Essa molécula apresentou inversão de posicionamento dentro do sítio de interações, porém mantendo as interações importantes. De forma geral, as moléculas com cadeia alifáticas se posicionam de maneira parecida ao do autoindutor **51** (Figura 4.9-A). Já dentre as aromáticas, a carbonila da lactona ou se posicionaram com a carbonila da amida (Figura 4.9-C) ou se posicionam com a carbonila da lactona do autoindutor (Figura 4.9-D).

Para fins de comparação, foi feita uma análise em três dimensões dos parâmetros porcentagem de inibição a 625 μ M, energia de *docking* relativa e logP (Figura 4.11). Essa análise corrobora para o melhor resultado das moléculas aromáticas, mesmo em concentrações menores. Considerando apenas energia relativa e porcentagem de inibição, ficou clara a ordem de aperfeiçoamento das estruturas: alifáticas de cadeia curta, alifáticas de cadeia mais longa, aromáticos com grupos puramente retiradores ou doadores, aromáticos com grupos retiradores de densidade e doadores por ressonância, e por fim, aromático sem substituinte.

Retomando a busca pelo mecanismo de ação, a molécula **179E** foi submetida a novos testes. O teste de competição pelo sítio de ligação mostrou que **179E** consegue manter a inibição quando a concentração do autoindutor varia de 10 nM a 200 μ M, contudo, o autoindutor foi capaz de restabelecer a interação com a proteína e a síntese de violaceína foi restaurada quando sua concentração estava na mesma ordem de grandeza da concentração do inibidor.

No teste de hidrólise de quitina, a molécula **179E** foi capaz de reduzir o halo de consumo de quitina, assim como diminuir a produção de violaceína pela colônia. Essa foi a única molécula, dentre todas as testadas nessa tese, que foi capaz de produzir esse efeito visual no consumo de quitina. A hipótese é de que para produzir tal efeito visual é necessário que a molécula teste apresente inibição de violaceína superior a 75% e a molécula **179E** possui tal característica.

Por fim, as evidências de que a inibição de violaceína acontece em nível transcricional foram confirmadas em ensaios de RT-qPCR. A expressão relativa do operon *vioABCDE* foi reduzida de 68% (*loci* sondado *vioA*) a 80% (*loci* sondado *vioC*). Em conclusão, essa classe de moléculas se mostra promissora para aperfeiçoamento de inibidores de QS em bactérias Gram negativas e para teste em bactérias com maior interesse farmacêutico.

Conclusões gerais

Esta tese teve como objetivos principal desenvolver uma metodologia para avaliar a capacidade de algumas classes químicas em modular a expressão de fenótipos de QS em CV026, uma cepa modelo para tal fenômeno.

Para tal, foi necessário desenvolver e validar um experimento de averiguação dos fenótipos estudados, síntese de violaceína e hidrólise de quitina. O capítulo então traz o arcabouço teórico e experimental do modelo a ser estudado. Inicialmente foi necessário sintetizar um inibidor conhecido e validado pela literatura, a molécula **56** foi escolhida como esse inibidor. Sua síntese aconteceu como reportado na literatura com um rendimento em três etapas de 51%. A avaliação biológica começa pela busca por um experimento de quantificação de síntese de violaceína que fosse de fácil execução e que seu resultado fosse visualizado após 24 horas de incubação. Após esse período a violaceína é extraída com DMSO e quantificada. Vale a pena ressaltar que nesse experimento não foi aceito nenhuma redução do crescimento bacteriano de forma a aumentar a robustez do mesmo. A molécula **56** apresenta inibição relatada de 1,2 μM (IC_{50}) e em nossa metodologia apresentou uma inibição 95% a 32 μM , o que foi considerado dentro do esperado. Tendo em vista observar a restauração da síntese de violaceína a concentração da molécula **56** foi 32 μM e a concentração do autoindutor cognato **51** (HHL) foi explorada nas concentrações de 10 nM, 20 nM, 20 μM , 200 μM e 1 mM. Mesmo com o aumento de 10^6 vezes a inibição de violaceína foi mantida em 50%, o que mostra a força da interação do inibidor com a proteína receptora CviR (Figura 1.16). Outro fenótipo estudado foi a hidrólise de quitina, também controlado por QS. Após alguns ajustes, foi observado que a molécula **56** é capaz de inibir a hidrólise de quitina (Figura 1.18). Por fim, foi realizada a análise da expressão do operon *vioABCDE* sondando em dois loci *vioA* e *vioC* por RT-qPCR. A figura 1.19 traz os resultados e mostra que há a redução de 68 e 70% dos genes *vioA* e *vioC* respectivamente.

Com a metodologia de avaliação biológica ajustada, passou-se a análise da primeira classe química estudada por essa tese. O estudo acompanha a avaliação biológica de duas simplificações estruturais do autoindutor cognato. O autoindutor apresenta um arranjo em que se tem uma distância de quatro átomos entre a carbonila da amida e um oxigênio e a análise do complexo CviR:**51** mostra que essa estrutura é responsável pelo ancoramento da molécula na proteína receptora. Por isso, as simplificações estruturais escolhidas mantiveram essa distância entre carbonila e oxigênio na tentativa de manter as interações necessárias dentro da CviR. As

N-(2-hidroxi)amidas foram escolhidas por sua estrutura apresentar maior grau de liberdade em sua movimentação e sua síntese ser simples, já as morfolinamidas foram escolhidas por apresentarem uma restrição conformacional um pouco maior, porém sua síntese também é de fácil execução. As *N*-(2-hidroxi)amidas já haviam sido sintetizadas em meu mestrado e as morfolinamidas foram sintetizadas com rendimentos que variam de bons a ótimos vide tabela 2.1. as *N*-(2-hidroxi)amidas e as morfolinamidas inibiram em até 60% a produção de violaceína em uma concentração de 1,25 mM e 2,5 mM respectivamente (Tabela 2.3). Dentre todas a molécula **123** foi a que apresentou a maior inibição na menor concentração testada, 50% em 500 μ M. De forma a entender se essas moléculas podiam interagir com a CviR, experimentos de *docking* molecular foram realizados. Estes se deram de forma cega o que consiste em procurar a melhor pose de interação entre a CviR e a molécula utilizando toda a extensão da proteína. Todas as estruturas estudadas nesse capítulo apresentaram como melhor pose de interação aquela dentro do bolsão de interação do autoindutor com energias semelhantes (Tabela 2.4). A tabela 2.4 traz as interações entre as moléculas estudadas e a CviR e é possível observar que de forma geral as interações são mantidas mesmo com a simplificação da estrutura. As estruturas alifáticas se posicionam como o autoindutor (Figura 2.13 A e C), já as aromáticas se posicionam de forma contrária ao autoindutor (Figura 2.14 A e C). Apesar dessa diferença é necessário ressaltar que as interações com a proteína são mantidas o que abre caminho para uma outra pose de inibição. A simplificação do inibidor **56** também foi realizada. A molécula **134** teve 54% de rendimento e a **135** teve 86%. Contudo, a simplificação estrutural reduziu em muito o poder de inibição. As inibições foram de 50% a 625 μ M e 1,25 mM para as moléculas **134** e **135** (Figura 2.15), valores muito maiores que os encontrados para a molécula **56** (95% a 32,5 μ M). Nos experimentos de *docking* molecular a estrutura **134** se composta como o autoindutor (Figura 2.16A), já a estrutura **135** se apresenta invertida dentro do sítio de interações (Figura 2.15A). Foi realizada a prospecção de novas moléculas inspiradas pelos resultados obtidos até o momento, das três idealizadas duas tiveram a sua síntese realizada. Infelizmente, apesar dos bons resultados obtidos nos experimentos de *docking*, a inibição da síntese de violaceína foi menor que para as moléculas de origem. As moléculas **123** e **134** foram submetidas ao experimento de competição pela proteína CviR, nos dois casos o autoindutor é capaz de reestabelecer a síntese de violaceína com uma concentração de 200 μ M. O teste de hidrólise de quitina não apresentou inibição visual. Entretanto, o experimento de RT-qPCR mostrou que a inibição se dá em nível transcricional com redução da expressão de *vioA* em 50% para as duas estruturas testadas.

O capítulo 3 aborda a avaliação biológica da cromenonas **154** e de suas impurezas **155** a **159**. A estrutura **154** já havia se mostrado inibidora de QS em *V. harveyi* e sua avaliação em CV026 foi realizada. A molécula **154** e **158** apresentaram resultados iguais de inibição na mesma concentração de teste, 65% a 625 μ M (Tabela 3.1). Porém no teste de competição pela CviR, a molécula **158** manteve a inibição próxima dos 50% nas concentrações de 10 nM, 20 nM e 20 μ M do autoindutor **51**, já a molécula **154** manteve apenas nas concentrações de 10 nM e 20 nM. Novamente o teste de hidrólise de quitina não apresentou resultados visíveis. Os ensaios de RT-qPCR sondaram o *locus vioA* do transcrito a inibição alcançou 44% e 50% para as moléculas **154** e **158**, respectivamente. Quando testado o *locus vioC* a inibição foi calculada em 41% e 50%, respectivamente. Por conseguinte, fica claro que a inibição de violaceína ocorre em nível transcricional.

Algumas 2-alquenil- δ -valerolactonas tiveram a sua avaliação biológica frente a QS de CV026 detalhada no capítulo 4. A estrutura **179E** apresentou a maior inibição de síntese de violaceína de toda a tese, 85% a 625 μ M. No experimento de docking molecular as lactonas alifáticas se comportam de forma similar ao autoindutor (Figura 4.9-A), já as aromáticas variam um pouco. A estrutura **179E** se mostra de forma invertida dentro do sítio de interações; já a estrutura **180E** apresenta sua carbonila próxima da carbonila da amida do autoindutor; e a estrutura **183E** apresenta a sua carbonila próxima a carbonila da lactona do autoindutor. Apesar das variações, as interações com os resíduos de aminoácidos são mantidas. O teste de competição pela CviR se mostrou dose dependente (Figura 4.12) com o reestabelecimento da síntese de violaceína com concentrações do autoindutor próximas a 1 mM. A molécula **179E** mostrou inibição da hidrólise de quitina (Figura 4.13) o que mostrou que para que ocorra a visualização do efeito de inibição de hidrólise de quitina é necessária uma redução expressiva da síntese de violaceína. A redução da expressão do operon *vioABCDE* foi calculada em 68% e 80% quando sondado os *loci vioA* e *vioC*. Logo, fica claro que o mecanismo de inibição da molécula **179E** se dá pela inibição transcricional do operon *vioABCDE*.

Por fim, fica claro que essa tese teve seus objetivos atingidos, com o desenvolvimento de um experimento de avaliação biológica dos fenótipos controlados por QS da CV026. Esse experimento foi validado e utilizado para avaliar três classes químicas quanto a esse tipo de inibição.

Parte Experimental

I. Métodos e equipamentos utilizados

Os solventes obtidos a partir de fontes comerciais foram tratados, antes de serem utilizados, de acordo com procedimentos previamente descritos na literatura. O diclorometano (CH_2Cl_2) e a trietilamina (Et_3N) foram ambos tratados utilizando hidreto de cálcio e destilados previamente. O DMF anidro foi adquirido da Sigma-Aldrich em frasco do tipo sure-seal.

As análises de cromatografia em camada delgada foram realizadas utilizando cromatoplasas em alumínio revestidas em sílica gel 60 F 254 (Aldrich®) com filme de 0.2 mm de espessura. As placas cromatográficas com indicador de fluorescência contendo as amostras foram inicialmente reveladas utilizando uma lâmpada UV e posteriormente, embebidas em solução etanólica de ácido fosfomolibídico 5% e aquecidas.

As purificações por cromatografia de adsorção foram realizadas utilizando sílica gel comum (70-230 mesh). Os eluentes empregados foram acetato de etila e hexano e as concentrações das soluções eluentes estão descritas nos procedimentos experimentais a seguir.

Os experimentos de ressonância magnética nuclear foram realizados nos seguintes aparelhos: Varian Mercury Plus (300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C) 7,04 T e Bruker Ascend (600 MHz para ^1H 150 e MHz para ^{13}C) 14,1 T. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm). As constantes de acoplamento estão expressas em Hertz (Hz). As amostras analisadas foram dissolvidas em clorofórmio deuterado (CDCl_3). Para os espectros de RMN de ^1H foi utilizado como referência interna o tetrametilsilano TMS (0,0 ppm) e para os espectros de RMN de ^{13}C , o clorofórmio deuterado (77,00 ppm) ou o DMSO deuterado (40,45 ppm). Os espectros foram processados no programa MestreNova 6.0.

Os experimentos de espectrometria de massas EI foram obtidos em aparelho de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (GCMS), utilizando cromatógrafo Shimadzu 7890 A, com coluna capilar 5%-fenil-95%-metilsiloxano (HP5, 30 mm x 0,32 mm x 0,25 μm) e hélio como gás carreador (1,0 $\mu\text{m}/\text{min}$). A temperatura do forno foi programada de 100 a 200 $^\circ\text{C}$, a uma taxa de aquecimento de 3 $^\circ\text{C}/\text{min}$. Um miligrama de amostra foi dissolvido em 1,5 mL de diclorometano ou acetato de etila e 1,0 μL da solução foi injetada no modo com divisão de fluxo (1:50). Os dados foram analisados usando o software GCMSsolution.

Os testes de inibição da síntese de violaceína em CV026 foram realizados na

Faculdade de Ceilândia (FCE-UnB) no laboratório do Prof^o. Alex Leite Pereira. Todos os recipientes e solventes utilizados nos testes biológicos foram autoclavados à 121 °C por vinte minutos, seguindo o padrão de autoclavagem do laboratório.

A cepa CV026 foi doada pela Prof.^a Dr.^a Lídia Maria Pepe de Moraes do Instituto de Biologia-IB-UnB. Ela é um duplo mutante da *Chromobacterium subtsugae* ATCC31532 na qual os genes da proteína responsável por sintetizar o autoindutor, C6-AHL, *cviI*, e os genes da *vioS* foram deletados.

As análises estatísticas foram realizadas no software SPSS20.0. As médias foram comparadas utilizando o teste T independente, levando em consideração o teste de Levene. Os resultados com $P \leq 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

II. Procedimentos e dados espectroscópicos

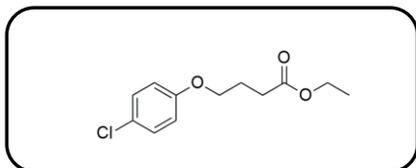
Procedimento Empregado Para a Síntese do inibidor 46.

Em um balão de 100 mL flambado, para a retirada de resíduos de umidade, foram adicionados 1,8 g de *p*-clorofenol (14 mmol), **47**, e 3,8 g de carbonato de potássio (28 mmol). A atmosfera foi trocada por N₂ e então foram adicionados 2,0 mL de 4-bromobutanoato de etila (14 mmol), **48**, e 40 mL de DMF seco. O balão foi fechado com condensador de refluxo conectado a tubo de cloreto de cálcio e a reação então foi submetida ao aquecimento de 140°C por 4 horas. Depois de resfriada, a reação foi diluída com 100 mL de água destilada e extraída com 4 x 30 mL de hexano. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e o solvente foi removido em evaporador rotatório, resultando em 3,38 g (14 mmol, rendimento quantitativo) de um óleo caracterizado como o éster **49**. Duas gramas do produto formado foram saponificados com 34 mL de uma solução de Metanol e 1M NaOH (1:1 v/v), sob agitação por 18 horas à temperatura ambiente. Na sequência, a reação foi acidificada até pH 1 e o sólido branco foi filtrado em funil de Buchner, rendendo 1,72 g (8 mmol, 86% de rendimento) de um sólido caracterizado como o ácido **50**.

2,3 mol ácido juntamente com o 2,3 mmol 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) foram adicionados a um balão de 50 mL, flambado, para troca de atmosfera e adição de 20 mL de diclorometano seco, deixado sob agitação por 5 minutos a 0°C. A essa mistura foram adicionados a 2,3 mmol da lactona, **51**, e 1,3 mL de Et₃N (9,3 mmol). A reação foi deixada sob agitação por 1 hora a 0°C e mais 18 horas a temperatura ambiente. A reação então foi lavada com 5x20 mL de HCl (1M), 5x20 mL de uma solução saturada de NaHCO₃, a fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e o solvente foi removido em evaporador rotatório. A purificação foi feita por cromatografia em coluna de sílica gel (Diclorometano 4 : 1acetado de etila). As frações

foram reunidas e rotaevaporadas. Em seguida, o material foi submetido à bomba de alto-vácuo para retirada de qualquer solvente residual, rendendo 410 mg (1,3 mmol, 61% de rendimento) de um sólido caracterizado como a lactona **46**.

4-(4clorofenoxi)butanoato de etila (49)



Rendimento: quantitativo

Aparência: óleo amarelado.

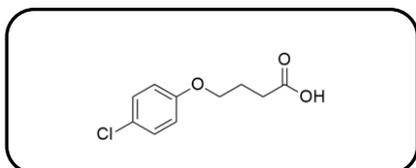
$^1\text{H RMN}$ (600 MHz, CDCl_3 , 25°C) δ 7,25 – 7,18 (m, 2H); 6,82 – 6,72 (m, 2H); 4,1 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H); 3,9 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H); 2,5 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H); 2,1 (qt, $J = 7,3$ Hz, 2H); 1,25 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C RMN}$ (151 MHz, CDCl_3 , 25°C) δ 173,1; 157,4; 129,2; 125,5; 115,5; 67,0; 60,4; 30,7; 24,5; 14,1.

EM (70 eV) m/Z: 156(100)

IR (ATR) cm^{-1} : 1728; 1492; 1273; 1248; 1180, 1170; 668.

Ácido 4-(4clorofenoxi)butanóico (50)



Rendimento: 86%

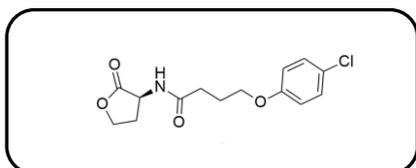
Aparência: sólido branco

$^1\text{H RMN}$ (600 MHz, CDCl_3 , 25°C) δ 7,26 -7,2 (m, 2H), 6,85 – 6,81 (m, 2H); 4,0 (t, $J = 6,1$ Hz, 2H); 2,60 (qt, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,1 (qt, $J = 6,2$ Hz, 2H),

$^{13}\text{C RMN}$ (151 MHz, CDCl_3 , 25°C) δ 178,9; 157,3; 129,3; 125,7; 115,7; 66,8; 30,4; 24,3.

EM (70 eV) m/Z: 156(100).

(S)-4-(4-clorofenoxi)-N-(2-oxotetrahidrofurano-3-il)butanamida (46)



Rendimento: 61%

Aparência: sólido branco

$^1\text{H RMN}$ (600 MHz, CDCl_3 , 25°C) δ 7,24 – 7,20 (m, 2H), 6,84 – 6,79 (m, 2H), 6,23 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H), 4,56 (ddd, $J = 11,6; 8,6; 6,1$ Hz, 1H), 4,48 – 4,44 (m, 1H), 4,28 (ddd, $J =$

11,2; 9,3; 5,9 Hz, 1H), 3,98 (td, $J = 6,1; 1,5$ Hz, 2H), 2,84 – 2,77 (m, 1H), 2,47 (dd, $J = 10,8; 4,1$ Hz, 2H), 2,13 (ddd, $J = 13,3; 7,2; 6,2$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (151 MHz, CDCl_3 , 25°C) δ 175,4; 172,9; 157,3; 129,3; 125,7; 115,7; 67,0; 66,0; 49,2; 32,3; 30,4; 24,8.

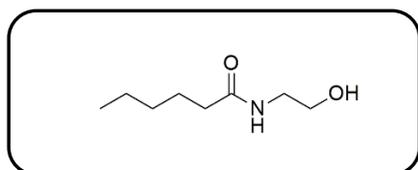
EM (70 eV) m/Z: 170(100).

IR (ATR) cm^{-1} : 3291, 1767, 1643, 1540, 1493, 1243, 1189, 660.

Procedimento Empregado Para a Síntese de N(2-hidroxietil)hexanamida;

Em um frasco reacional (do tipo schlenck) sob atmosfera inerte (N_2), foram adicionados barra de agitação magnética, 300 mg de ácido hexanóico (3,00 mmol) a 0,5 mL de etanolamina (8 mmol) e uma fração de malha de Nafion® com aproximadamente 0,5 mm^2 . O frasco foi fechado e a mistura reacional foi aquecida a 190°C por 18h.⁶⁵ O Nafion® foi separado da mistura reacional e foi, então, diluída em 20 mL de acetato de etila e lavada sucessivamente com porções de 10 mL de HCl 5% até que não houvesse etanolamina na fase orgânica, verificado por CCD. A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 e o solvente foi removido em evaporador rotatório. A purificação foi feita por cromatografia em coluna de sílica gel (AcOEt :Hexano 80:20). As frações foram reunidas e rotaevaporadas. Em seguida, o material foi submetido a alto-vácuo para retirada de qualquer solvente residual, alcançando rendimento de 50%.

N-(2-hidroxietil)hexanamida (115)



Rendimento: 50%

Aparência: óleo amarelado.

^1H RMN (600 MHz, CDCl_3 , 25°C) δ 3,70 (t, $J = 5,2$ Hz, 2H); 3,40 (q, $J = 5,5$ Hz, 2H); 2,20 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H); 1,60 (qt, $J = 7,5$ Hz, 2H); 1,38 -1,21 (m, 4H); 0,90 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (151 MHz, CDCl_3 , 25°C) δ 174,6; 62,6; 42,4; 36,6; 31,4; 25,4; 22,4; 13,9.

EM (70 eV) m/Z: 128(M), 43(100).

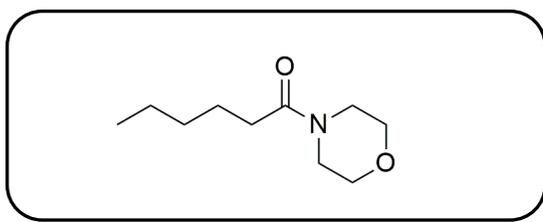
(ATR) cm^{-1} : 3296, 2919, 1643, 1559, 1057.

Procedimento empregado para a síntese dos derivados de morfolina.

Em um frasco reacional (do tipo Schlenck), sob atmosfera inerte (N_2), foram

adicionados barra para agitação magnética, 3 mmol de ácido carboxílico ou de benzoato de metila, 11 mmol de morfolina e uma fração de malha de Nafion® com aproximadamente 0,5 mm². O frasco foi fechado e a mistura reacional permaneceu em agitação sob refluxo por 18 horas.⁶⁵ O Nafion® foi separado da mistura reacional que foi, então, diluída com 20 mL de acetato de etila e lavada sucessivamente com porções de 10 mL de HCl 5% até que não houvesse morfolina na fase orgânica, verificado por CCD. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e o solvente foi removido em evaporador rotatório. A purificação foi feita por cromatografia em coluna de sílica gel (AcOEt :Hexano 80:20). As frações foram reunidas e rotaevaporadas. Em seguida, o material foi submetido a alto-vácuo para retirada de qualquer solvente residual, alcançando rendimentos que variam de 30- 80%.

1-morfolinahexan-1-ona (116)



Rendimento: 69%

Aparência: óleo amarelado.

¹H RMN (600 MHz, DMSO, 25°C): δ 3,60 – 3,49 (m, 4H); 3,43 – 3,40 (m, 4H); 2,27 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 1,53 (qt, *J* = 7,5 Hz, 2H); 1,36 – 1,18 (m, 4H); 0,86 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H).

¹H RMN (600 MHz, DMSO, 60°C): δ 3,54 (s, 4H); 3,47 – 3,40 (m, 4H); 2,27 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H); 1,53 (qt, *J* = 7,5 Hz, 2H); 1,35 – 1,20 (m, 4H); 0,86 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H).

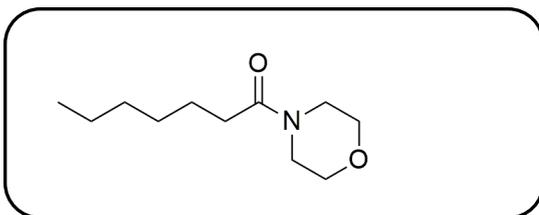
¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 3,6 (t, *J* = 5,5 Hz, 4H); 3,6 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H); 3,4 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H); 2,3 (t, *J* = 7,6, 2H); 1,6 (qt, *J* = 7,6 Hz, 2H); 1,4 – 1,2 (m, 4H); 0,90 (t, *J* = 8,4 Hz, 3H).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 171,9; 66,9; 66,7; 46,1; 41,8; 33,1; 31,6; 24,9; 22,4; 13,9.

EM (70 eV) m/Z: 185(M), 125(100)

IR (ATR) cm⁻¹: 2975, 2830, 1641, 1457, 1115.

1-morfolinaheptan-1-ona (126)



Rendimento: 60%

Aparência: óleo amarelado.

¹H RMN (600 MHz, DMSO, 25°C) δ: 3,70 – 3,50 (m, 4H); 3,47 – 3,38 (m, 4H); 2,30 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H); 1,48 (qt, *J* = 7,4 Hz, 2H); 1,40 – 1,20 (m, 6H); 0,90 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H).

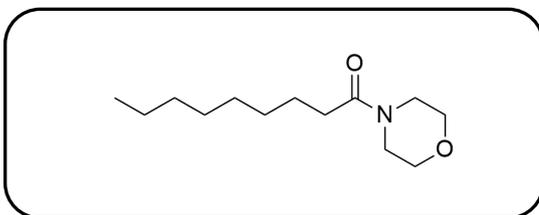
¹³C RMN (151 MHz, DMSO, 25°C) δ 171,3; 66,6; 45,9; 41,9; 41,8; 32,5; 31,6; 29,0; 25,1; 22,5; 14,4.

¹H RMN (600 MHz, DMSO, 60°C) δ 3,57 – 3,50 (m, 4H); 3,40 – 3,30 (m, 4H); 2,30 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H); 1,50 – 1,40 (m, 2H); 1,30 – 1,20 (m, 6H); 0,90 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H).

EM (70 eV) m/Z: 199(M), 129(100).

IR (ATR) cm⁻¹: 2955, 2895, 2855, 1643, 1457, 1430, 1115.

1-morfolinanonan-1-ona (119)



Rendimento: 50%

Aparência: óleo amarelado.

¹H RMN (600 MHz, DMSO, 25°C): δ 3,7 (m, 4H); 3,42 (m, 4H); 2,27 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H); 1,55 – 1,42 (m, 2H); 1,33 – 1,22 (m, 10H); 0,86 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H).

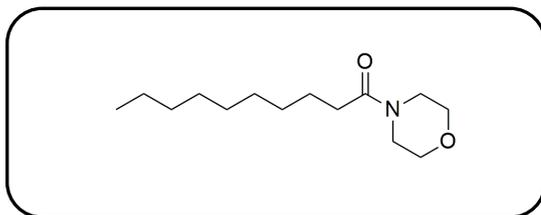
¹³C RMN (151 MHz, DMSO, 25°C): δ 171,8; 67,1; 67,1; 46,4; 42,3; 32,9; 32,2; 29,8; 29,7; 29,6; 25,6; 23,0; 14,9.

¹H RMN (600 MHz, DMSO, 60°C): δ 3,60 (s, 4H); 3,50 – 3,40 (m, 4H); 2,03 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H); 1,6 – 1,40 (m, 2H); 1,30 – 1,22 (m, 10H); 0,90 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H).

EM (70 eV) m/Z: 227(M), 129(100).

IR (ATR) cm⁻¹: 2923, 2853, 1646, 1455, 1430, 1115.

1-morfolinadecan-1-ona (127)



Rendimento: 56%

Aparência: óleo amarelado.

^1H RMN (600 MHz, DMSO, 25°C): δ 3,70 (m, 4H); 3,57 – 3,49 (m, 4H); 3,45 – 3,35 (m, 4H); 2,27 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 1,55 – 1,39 (m, 2H); 1,33 – 1,19 (m, 12H); 0,86 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H).

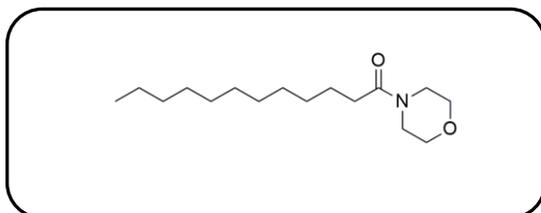
^{13}C RMN (151 MHz, DMSO, 25°C): δ 171,3; 66,7; 45,9; 41,8; 32,5; 31,7; 29,5; 29,3(6); 29,3(6); 29,1; 25,2; 14,4.

^1H RMN (600 MHz, DMSO, 60°C): δ 3,57 – 3,50 (m, 4H); 3,40 (t, $J = 5,0$, 4H); 2,27 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 1,55 – 1,39 (m, 2H); 1,33 – 1,19 (m, 12H); 0,86 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H).

EM (70 eV) m/Z: 241(M), 129(100).

IR (ATR) cm^{-1} : 2955, 2923, 2853, 1647, 1457, 1429, 1115.

1-morfolinadodecan-1-ona (128)



Rendimento: 70%

Aparência: óleo amarelado.

^1H RMN (600 MHz, DMSO, 25°C): δ 3,50 – 3,47(m, 4H); 3,40 (s, 4H); 2,20 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H); 1,50 – 1,40 (m, 2H); 1,30 – 1,20 (m, 16H); 0,90 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H).

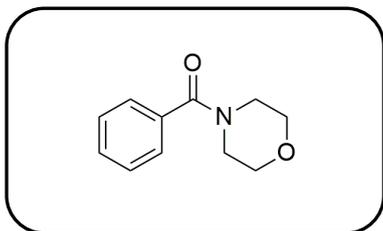
^{13}C RMN (151 MHz, DMSO, 25°C): δ 171,7; 67,1; 46,3; 42,3; 32,9; 32,2; 29,9(4); 29,9(2); 29,8; 29,7; 29,6(3); 25,6; 23,0; 14,9.

^1H RMN (600 MHz, DMSO, 60°C): δ 3,60 – 3,50 (m, 4H); 3,48 – 3,36 (m, 4H); 2,26 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H); 1,60 – 1,40 (m, 2H); 1,33 – 1,19 (m, 16H); 0,90 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H).

EM (70 eV) m/Z: 269(M), 129(100).

IR (ATR) cm^{-1} : 2955, 2922, 2852, 1648, 1457, 1428, 1115.

Morfolinafenilmetanona (129)



Rendimento: 40%

Aparência: óleo amarelado.

¹H RMN (600 MHz, DMSO, 25°C) δ: 7,6 – 7,3 (m, 5H); 3,75 – 3,35 (3, 8H).

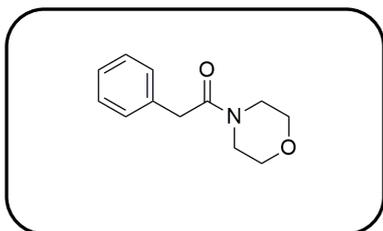
¹³C RMN (151 MHz, DMSO, 25°C) δ 7,6– 7,2 (m, 3H); 3,7 -3,3 (m, 8H).

¹H RMN (600 MHz, DMSO, 60°C) δ 169,5; 136,1; 130,0; 128,9; 127,5; 66,5; 47,7; 42,0.

EM (70 eV) m/Z: 191(M); 114(100).

IR (ATR) cm⁻¹: 1630, 1454; 1434, 1113, 727.

1-morfolina-2-feniletanona (130)



Rendimento: 30%

Aparência: óleo amarelado.

¹H RMN (600 MHz, DMSO, 25°C) δ: 7,30 – 7,27 (m, 2H), 7,27 – 7,19 (m, 3H), 3,70 (s, 2H), 3,5 – 3,5 (m, 2H), 3,5 – 3,4 (m, 2H).

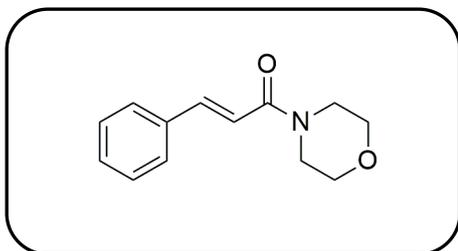
¹³C RMN (151 MHz, DMSO, 25°C) δ 170,0; 136,7; 130,3; 129,9; 129,3; 129,1; 127,3; 69,0; 67,0; 46,9; 42,6; 41,7.

¹H RMN (600 MHz, DMSO, 60°C) δ 7,3 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H); 7,22 (d, *J* = 7.6 Hz, 3H); 3,70 (s, 2H); 3,5 (s, 1H), 3,5 (m, 7H).

EM (70 eV) m/Z: 205(M), 114(100).

IR (ATR) cm⁻¹: 1630, 1454, 1434, 1113, 727, 698.

(E)-1-morfolina-3-fenilprop-2-en-1-ona (131)



Rendimento: 32%

Aparência: óleo amarelado.

¹H RMN (600 MHz, DMSO, 25°C) δ 7,7 – 7,67 (m, 2H); 7,5 (d, *J* = 15,4 Hz, 1H); 7,4 – 7,3 (m, 3H); 7,3 (d, *J* = 15,4 Hz, 1H); 3,7 (s, 2H); 3,7(s, 2H); 3,6 (s, 6H); 3,6 (s, 2H).

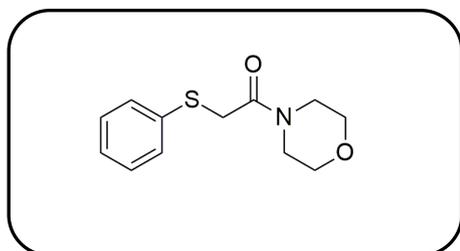
¹³C RMN (151 MHz, DMSO, 25°C) δ 165,0; 142,1; 135,6; 130,0; 129,2; 128,5; 118,4; 66,8; 66,6; 46,1; 45,6.

¹H RMN (600 MHz, DMSO, 60°C) δ 7,7 - 7,65 (m, 2H); 7,5 (d, *J* = 15,5 Hz, 2H); 7,46 – 7,34 (m, 4H); 7,2 (d, *J* = 15,3 Hz, 2H), 3,6 (s, 8H).

EM (70 eV) m/Z: 217(M), 131(100).

IR (ATR) cm⁻¹: 1647, 1599, 1455, 1228, 1113, 763

1-morfolina-2-(tiofenil)etanona (132)



Rendimento: 32%

Aparência: óleo amarelado.

¹H RMN (600 MHz, DMSO, 25°C) δ 7,40 – 7,30 (m, 2H); 7,30 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H); 7,20 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H); 4,00 (s, 2H); 3,60 – 3,50 (m, 2H); 3,55 – 3,51 (m, 2H); 3,51 – 3,48 (m, 2H); 3,45 – 3,41 (m, 2H).

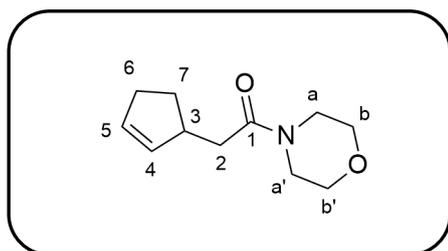
¹³C RMN (151 MHz, DMSO, 25°C) δ 167,3; 136,6; 129,8; 129,4; 126,9; 66,9(7); 66,9(5); 47,0; 42,7; 36,1.

¹H RMN (600 MHz, DMSO, 60°C) δ 7,40 – 7,30 (m, 2H); 7,30 (m, 2H); 7,20 – 7,10 (m, 1H); 3,90 (s, 2H); 3,50 (s, 4H); 3,4 (m, 4H).

EM (70 eV) m/Z: 237(M), 114(100).

IR (ATR) cm⁻¹: 1639, 1458, 1437, 1112, 741, 691.

.2-(ciclopent-2-en-1-il)-1-morfolinaetanona (133)



Rendimento: 56%

Aparência: óleo amarelado.

¹H RMN (600 MHz, DMSO, 25°C) δ 1H NMR (600 MHz, DMSO) δ 5,76 – 5,70 (m, 1H (H4 ou 5)), 5,70 – 5,65 (m, 1H (H4 ou 5)), 3,58 – 3,50 (m, 4H (Ha e a')), 3,46 – 3,39 (m, 4H (Hb e b')), 3,04 – 2,89 (m, 1H (H3)), 2,38 (dd, *J* = 15,5; 6,9 Hz, 1H (H2)), 2,28 (dd, *J* = 15,5; 7,6 Hz, 1H (H2)), 2,34 – 2,13 (m, 2H (H6)), 2,07 – 1,98 (m, 1H (H7)), 1,44 – 1,34 (m, 1H (H7)).

¹³C RMN (151 MHz, DMSO, 25°C) δ 170,5; 135,3; 130,9; 66,6; 46,0; 42,1; 38,65; 31,8; 29,9.

¹H RMN (600 MHz, DMSO, 60°C) δ

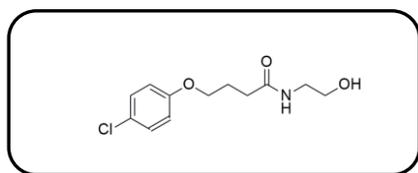
EM (70 eV) m/Z: 195(M), 67(100).

IR (ATR) cm⁻¹: 1640, 1457, 1432, 1114.

Procedimento Empregado Para a Síntese de 4-(4-clorofenoxi)-*N*-(2-hidroxi)butanamida (134).

Em um frasco reacional (do tipo schlenck) sob atmosfera inerte (N₂), foram adicionados barra de agitação magnética, 480 mg de 4-(4clorofenoxi)butanoato de etila (2,00 mmol) a 0,6 mL de etanolamina (10 mmol), em excesso, e uma fração de malha de Nafion® com aproximadamente 0,5 mm². O frasco foi fechado e a mistura reacional foi aquecida a 190°C por 18h.⁶⁵ O Nafion® foi separado da mistura reacional e foi, então, diluída em 20 mL de acetato de etila.. A purificação foi feita por cromatografia em coluna de sílica gel (AcOEt : MeOH 95:5). As frações foram reunidas e rotaevaporadas. Em seguida, o material foi submetido a alto-vácuo para retirada de qualquer solvente residual, alcançando rendimento de 54%.

4-(4-clorofenoxi)-*N*-(2-hidroxi)butanamida (134).



Rendimento: 54%

Aparência: sólido branco.

¹H RMN (600 MHz, CDCl₃, 25°C) δ 7.24 – 7.20 (m, 2H), 6.83 – 6.79 (m, 2H), 6.12 (s, 1H), 3.97 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.72 – 3.68 (m, 2H), 3.42 (dd, *J* = 10.3, 5.5 Hz, 2H), 2.41 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.15 – 2.09 (qt, *J* = 7.3 Hz, 2H).

¹³C RMN (151 MHz, CDCl₃, 25°C) δ 173.6, 157.4, 129.3, 125.6, 115.7, 67.2, 62.02, 42.4, 32.8, 25.1.

EM (70 eV) m/Z: 239(M), 85(100).

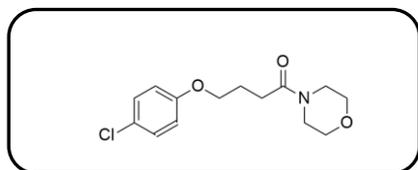
(ATR) cm⁻¹: 1650, 1550, 1500, 1200, 1000, 850, 650.

PF: 85 °C

Procedimento Empregado Para a Síntese de 4-(4-clorofenoxi)-1-morfolinobutan-1-ona (135).

1 mmol ácido **50** juntamente com o 1 mmol 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) foram adicionados a um balão de 50 mL, flambado, para troca de atmosfera e adição de 12 mL de diclorometano seco, deixado sob agitação por 5 minutos a 0°C. A essa mistura foram adicionados a 0,1 mL de morfolina (1mmol) e 0,4 mL de Et₃N (1 mmol). A reação foi deixada sob agitação por 1 hora a 0°C e mais 18 horas a temperatura ambiente. A reação então foi lavada com 5x20 mL de HCl (1M), 5x20 mL de uma solução saturada de NaHCO₃, a fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e o solvente foi removido em evaporador rotatório. A purificação foi feita por cromatografia em coluna de sílica gel (Diclorometano 4 : 1acetado de etila). As frações foram reunidas e rotaevaporadas. Em seguida, o material foi submetido à bomba de alto-vácuo para retirada de qualquer solvente residual, rendendo 140 mg (86% de rendimento) de um sólido caracterizado como a molécula 127.

4-(4-clorofenoxi)-1-morfolinobutan-1-ona (135)



Rendimento: 86%

Aparência: sólido branco.

¹H RMN (600 MHz, CDCl₃, 25°C) δ 7.27 – 7.13 (m, 2H), 6.89 – 6.62 (m, 2H), 4.00 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 3.72 – 3.56 (m, 4H), 3.54 – 3.31 (m, 4H), 2.51 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.20 – 2.05 (qt, J = 7.2 Hz, 2H).

¹³C RMN (151 MHz, CDCl₃, 25°C) δ 170.9, 157.4, 129.3, 125.5, 115.7, 67.2, 66.9, 41.9, 29.1, 24.7.

EM (70 eV) m/Z: 156(100).

(ATR) cm⁻¹: 3300, 1800, 1650, 1500, 1100, 1000.

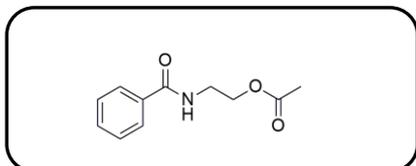
PF: 95 °C

Procedimento Empregado Para a Síntese de Acetato de 2-benzamidoetil 128.

Em um balão de 5 mL foram colocados 200 mg da N-(2hidroxietil)benzamida (1,2 mmol), 0,2 mL de anidrido acético (2,5 mmol) e 6 mg de DMAP (0,05 mmol), juntamente com 2mL de DCM. A mistura reacional ficou sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas para conversão completa. A purificação foi feita por cromatografia em coluna de sílica gel

(Diclorometano 1 : 1 acetado de etila). As frações foram reunidas e rotaevaporadas. Em seguida, o material foi submetido à bomba de alto-vácuo para retirada de qualquer solvente residual, rendendo 140 mg (57% de rendimento) de um sólido caracterizado como a molécula 128.

Acetato de 2-benzamidoetil 136.



Rendimento: 57%

Aparência: sólido branco.

¹H RMN (600 MHz, CDCl₃, 25°C) δ 7.78 (m,2H); 7,47 (m,3H); 6,7 (s,1H); 4.29 (t, J = 5,5, 2H); 3,72 (q, J = 5,5, 2H); 2,08((s,2H).

¹³C RMN (151 MHz, CDCl₃, 25°C) δ 171.5, 167.6, 134.2, 131.6, 128.6, 126.9, 63.3, 39.5, 20.9.

EM (70 eV) m/Z: 207 (M), 105(100).

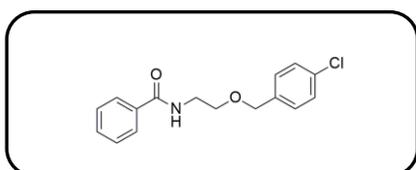
(ATR) cm⁻¹: 3300, 1750, 1650, 1550, 1200, 1000.

PF: 60°C

Procedimento Empregado Para a Síntese de N-(2-((4-clorobenzil)oxi)etil)benzamida 138

Em um balão de 25 mL foram colocados 250 mg da N-(2hidroxietil)benzamida (1,5 mmol), 168 mg de hidróxido de potássio (3 mmol), 100 mg de Brometo de tetra-n-butilamônio (TBAB – 0,3 mmol) em 8 mL de THF seco. Essa Mistura foi colocado em banho de gelo por 20 minutos. Depois, 0,2 mL de cloreto de 4-clorobenzil foi adicionado à mistura e a deixado sob agitação magnética por 1 hora em banho de gelo. Depois a reação foi retirada do gelo e deixada À temperatura ambiente por 5 horas. A purificação foi feita por cromatografia em coluna de sílica gel (Hexano 6 : 4 acetado de etila). As frações foram reunidas e rotaevaporadas. Em seguida, o material foi submetido à bomba de alto-vácuo para retirada de qualquer solvente residual, rendendo um sólido caracterizado como a molécula 130 (57% de rendimento).

N-(2-((4-clorobenzil)oxi)etil)benzamida 138



Rendimento: 57%

Aparência: sólido branco.

¹H RMN (600 MHz, CDCl₃, 25°C) δ 7.75 (dt, J = 8.4, 1.7 Hz, 6H), 7.53 – 7.49 (m, 3H), 7.43 (tt, J = 6.7, 1.3 Hz, 6H), 7.34 – 7.30 (m, 6H), 7.29 – 7.24 (m, 7H), 6.52 (s, 3H), 4.51 (s, 6H), 3.72 – 3.63 (m, 13H), 1.67 (s, 5H).

¹³C RMN (151 MHz, CDCl₃, 25°C) δ 167.5, 136.4, 134.5, 133.7, 131.5, 129.1, 128.7, 128.7, 128.7, 128.6, 126.9, 72.4, 69.01, 39.8.

EM (70 eV) m/Z: 105(100).

EMAR: [M+Na] = 312,0764.

(ATR) cm⁻¹: 1750, 1550, 1500, 1150, 1110, 900, 700, 650.

PF: 100°C

Procedimento Empregado Para Teste Biológico.

Cepa de *Chromobacterium subtsugae* e condições de cultivo

As cepas de *C. subtsugae* CV026 (genótipo: cviI ::mini-Tn5 derivada da cepa ATCC 31532, Kmr, AHL-) foi mantida sob criopreservação (-80°C) em 50% glicerol, 50% meio LB. A cepa CV026 foi recuperada com canamicina (50 µg/mL) e cultivada em caldo LB (pH 7,2) sob agitação de 200 rpm por 24 horas a 28°C. Dessa colônia, uma alíquota de 10 µL foi utilizada para semear superfície de ágar LB acondicionado em placa de Petri.

Ensaio de quantificação de violaceína.

Colônias isoladas de CV026 de ágar LB (48 horas à 28°C) foram utilizadas para um fazer uma suspensão bacteriana em meio LB com turbidez ajustada em nível 2 da escala de McFarland. Dessa suspensão, uma quantidade adequada foi retirada para inocular o meio de teste em uma proporção de 10% v/v. O meio teste então foi suplementado com o autoindutor cognato (*N*-hexanoil-*L*-homoserina lactona 96%, Sigma Aldrich), numa concentração final de 10 µM. Uma alíquota de 1,95 mL dessa cultura foi transferida para um tubo cônico tipo falcon (v = 15 ml) e suplementada com 50µL das moléculas testadas em diferentes concentrações finais (2,5 mM, 1,25 mM, 625 µM e 312 µM). Os ensaios foram mantidos sob agitação de 200 rpm à 30°C por 24 horas. As mesmas condições experimentais foram repetidas, em paralelo, na ausência do autoindutor cognato (“branco”) para análise de crescimento microbiano aferindo a turbidez (630 nm) ao final de 24 horas sob agitação de 200 rpm e 30°C em espectrofotômetro de placa (Biotek - ELx808™). Para determinação de produção de violaceína, o experimento “teste” foi completamente seco (24h à 60°C) e 0,5 mL de DMSO foi utilizado para extrair a violaceína, ficando sob agitação de 200 rpm a 30°C por 24 horas. A absorvância (630nm) produzida pelo extrato de DMSO foi utilizado para estimar a produção de violaceína. Esse experimento foi sempre realizado em triplicata.

Ensaio de competição.

O ensaio de competição foi feito de forma similar ao de quantificação de violaceína, contudo, neste teste a concentração do inibidor **46** foi mantido em 32 μ M enquanto a concentração do autoindutor foi variada de 10 nM até 1 mM. Experimento realizado em triplicata.

Ensaio de consumo de quitina.

Em CV026 a hidrólise de quitina é controlada por QS. O teste de averiguação de consumo de quitina foi feito de acordo com a metodologia de Chernin e colaboradores com poucas modificações.⁵³ As colônias isoladas de CV026 foram usadas para fazer uma suspensão bacteriana ajustada para 2.0 McFarland em 0,9% NaCl (m/m). Dessa suspensão, uma quantidade adequada foi retirada para inocular o meio de teste em uma proporção de 10% (v/v) e suplementadas ou não com **51**. Em uma placa de 6 poços foi vertido um meio semimínimo contendo 10% de meio LB (vol/vol), 0,2% de quitina coloidal (m/vol) e 0,5% de ágar (m/v), 2 mL para cada poço. Com a placa seca, foi colocada em um poço uma alíquota de suspensão bacteriana suplementada com **51** (controle positivo); em outro poço a suspensão, o **51** e a molécula **46**; e em outro poço apenas a suspensão bacteriana (Controle negativo). A placa foi incubada em estufa à 28°C por 72h para clara formação de halo de consumo de quitina no controle positivo.

RT-qPCR.

O RNA total foi extraído das células CV026 nas mesmas condições do ensaio de quantificação de violaceína usando o ReliaPrep™ RNA Miniprep System (Promega), conforme indicado pelas instruções do fabricante.

As amostras de RNA tiveram sua qualidade avaliada (relação A260/A230) e as concentrações normalizadas em 150 ng/ μ L. O RNA normalizado total foi usado como modelo para a reação de transcrição reversa usando o GoTaq® 1-Step RT-qPCR System (Promega). O RT-qPCR foi realizado em uma etapa de acordo com o protocolo do fabricante. A mistura de reação (20 μ L) foi composta da seguinte forma: 10 μ l de GoTaq® qPCR Master Mix, 2,5 μ l de primers direto e reverso (150 nM), 0,4 μ l de GoScript™ RT Mix para 1-Step RT-qPCR e 4 μ l do RNA modelo (20 ng). A RT-qPCR foi realizada usando o sistema de PCR em tempo real Applied Biosystems Quant Studio™ 3 (Applied Biosystems Inc., CA, EUA). As condições da reação são as seguintes: reação de transcriptase reversa a 37 °C por 15 minutos, inativação da enzima RT a 95 °C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 10 s, anelamento a 54 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 30 seg. A expressão relativa do transcrito de RNA *vioABCDE* foi calculada usando o método $\Delta\Delta$ Ct. Dois loci em *vioABCDE* (*vioA* e

vioC) foram avaliados para determinar a expressão relativa do transcrito *vioABCDE*. O gene de referência *gyrB* foi usado como controle interno para normalização dos dados. Esses experimentos foram conduzidos independentemente 3 vezes. Primers para *vioA*, *vioC* e *gyrB* (Tabela 1) foram projetados usando a ferramenta baseada na web Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).

Tabela1. Sequência dos primers utilizados na rt-PCR.

Primer	Sequence
<i>vioA-F</i>	ATCCGGAAATCCAGAGCTTC
<i>vioA-R</i>	ACTTGTCGCCCTTGAAGTAG
<i>vioC-F</i>	GCCTTTTTTCGACCGTTACTTC
<i>vioC-R</i>	CTATGCATGTAGCGGGTGTA
<i>gyrB-F</i>	TCACCATCAATCCGGACAAC
<i>gyrB-R</i>	TCTTGTTGCGGTTTCATGTATTC

Procedimento Empregado Para Ancoragem Molecular.

A ferramenta metodológica computacional foi a de ancoragem molecular, tomando como ponto de partida a estrutura cristalográfica da proteína CviR complexada com o inibidor **46** disponível no banco de dados Protein Data Bank (PDB) sob o código 3QP5. A resolução da estrutura cristalográfica depositada no PDB é de 3,5Å .

Os ligantes foram desenhados com o auxílio do programa Avogadro e depois suas geometrias foram otimizadas no programa Gaussian6.06. (DFT-B3LYP-6,31**).

O ancoramento foi realizado através do pacote computacional AutoDock Vina,⁸¹ que, além de ser de livre acesso, tem boa capacidade de prever a conformação de interação entre ligante e proteína. O procedimento adotado foi o de ancoramento com a proteína rígida (sem mudanças nas posições dos átomos) e ligantes flexíveis.

O programa atribui as coordenadas do receptor e do ligante ao arquivo pdbqt, um tipo de arquivo mais simples que o PDB. O AutoDock Vina em seu arquivo pdbqt usa os hidrogênios polares para atribuir o estado de ligação dos heteroátomos, mas eles não são explícitos durante a ancoragem; tipo de átomo, sem levar em consideração a carga dos mesmos. Já a função de pontuação é altamente aproximada com potenciais de ligação de hidrogênio simetricamente esféricas, hidrogênios implícitos e sem contribuição eletrostática. Mesmo com suas simplificações já foi mostrando ter boa desempenho para interações proteína-ligante.¹⁵²

Os parâmetros utilizados foram o padrão do programa, com exceção da exaustividade que foi aumentada para 200. O aumento nesse parâmetro permite que o programa aumente o tempo de procura de encaixe e a quantidade de conformações do ligante. O espaço de busca de soluções no programa é chamado de grid. O grid utilizado foi uma caixa com dimensões de 60 x 90 x 100 Å³, tendo como centro o centro da proteína. Após o resultado da ancoragem, as conformações dentro do sítio ativo foram analisadas manualmente pelo VMD (Visual Molecular Dynamics) um software de análise gráfica 3D.¹⁵³

Bibliografia

- (1) Wiley, R. H. Communication as a Transfer of Information: Measurement, Mechanism and Meaning. *Anim. Commun. Theory Inf. Infl.* **2011**, No. 1951, 113–132. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139003551.007>.
- (2) Keller, L.; Surette, M. G. Communication in Bacteria: An Ecological and Evolutionary Perspective. *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4* (4), 249–258. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1383>.
- (3) Tomasz, A.; Hotchkiss, R. D. REGULATION OF THE TRANSFORMABILITY OF PNEUMOCOCCAL CULTURES BY MACROMOLECULAR CELL PRODUCTS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1964**, *51* (3), 480–487. <https://doi.org/10.1073/pnas.51.3.480>.
- (4) Nealson, K. H.; Platt, T.; Hastings, J. W. Cellular Control of the Synthesis and Activity of the Bacterial Luminescent System. *J. Bacteriol.* **1970**, *104* (1), 313–322. <https://doi.org/10.1128/jb.104.1.313-322.1970>.
- (5) Mattmann, M. E.; Blackwell, H. E. Small Molecules That Modulate Quorum Sensing and Control Virulence in *Pseudomonas Aeruginosa*. *J. Org. Chem* **2010**, *75* (20), 6737–6746. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jo101237e>.
- (6) Lixa, C.; Mujo, A.; Anobom, C. D.; Pinheiro, A. S. A Structural Perspective on the Mechanisms of Quorum Sensing Activation in Bacteria. *Ann. Brazilian Acad. Sci.* **2015**, *87* (4), 2189–2203. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201520140482>.
- (7) Hawver, L. A.; Jung, S. A.; Ng, W. L. Specificity and Complexity in Bacterial Quorum-Sensing Systemsa. *FEMS Microbiol. Rev.* **2016**, *40* (5), 738–752. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw014>.
- (8) Visick, K. L.; Foster, J.; Doino, J.; McFall-Ngai, M.; Ruby, E. G. *Vibrio Fischeri* Lux Genes Play an Important Role in Colonization and Development of the Host Light Organ. *J. Bacteriol.* **2000**, *182* (16), 4578–4586. <https://doi.org/10.1128/JB.182.16.4578-4586.2000>.
- (9) Eberhard, A.; Burlingame, A. L.; Eberhard, C.; Kenyon, G. L.; Nealson, K. H.; Oppenheimer, N. J. Structural Identification of Autoinducer of *Photobacterium Fischeri* Luciferase. *Biochemistry* **1981**, *20* (9), 2444–2449. <https://doi.org/10.1021/bi00512a013>.
- (10) Schaefer, A. L.; Greenberg, E. P.; Oliver, C. M.; Oda, Y.; Huang, J. J.; Bittan-Banin, G.; Peres, C. M.; Schmidt, S.; Juhaszova, K.; Sufrin, J. R.; Harwood, C. S. A New Class of

- Homoserine Lactone Quorum-Sensing Signals. *Nature* **2008**, 454 (7204), 595–599. <https://doi.org/10.1038/nature07088>.
- (11) Liao, L.; Schaefer, A. L.; Coutinho, B. G.; Brown, P. J. B.; Peter Greenberg, E. An Aryl-Homoserine Lactone Quorum-Sensing Signal Produced by a Dimorphic Prosthecate Bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, 115 (29), 7587–7592. <https://doi.org/10.1073/pnas.1808351115>.
- (12) Lang, J.; Faure, D. Functions and Regulation of Quorum-Sensing in *Agrobacterium Tumefaciens*. *Front. Plant Sci.* **2014**, 5 (JAN), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00014>.
- (13) Bogino, P. C.; Nievas, F. L.; Giordano, W. A Review: Quorum Sensing in *Bradyrhizobium*. *Applied Soil Ecology*. 2015, pp 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.04.016>.
- (14) Fuqua, C.; Greenberg, E. P. Self Perception in Bacteria: Quorum Sensing with Acylated Homoserine Lactones. *Curr. Opin. Microbiol.* **1998**, 1 (2), 183–189. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(98\)80009-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(98)80009-X).
- (15) Watson, W. T.; Minogue, T. D.; Val, D. L.; Von Bodman, S. B.; Churchill, M. E. A. Structural Basis and Specificity of Acyl-Homoserine Mactone Signal Production in Bacterial Quorum Sensing. *Mol. Cell* **2002**, 9 (3), 685–694. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00480-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00480-X).
- (16) Abelyan, N.; Grabski, H.; Tiratsuyan, S. In Silico Screening of Flavones and Its Derivatives as Potential Inhibitors of Quorum-Sensing Regulator LasR of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Mol. Biol. (Mosk)*. **2020**, 54 (1), 153–163. <https://doi.org/10.31857/S0026898420010024>.
- (17) Gahan, C. G.; Patel, S. J.; Boursier, M. E.; Nyffeler, K. E.; Jennings, J.; Abbott, N. L.; Blackwell, H. E.; Van Lehn, R. C.; Lynn, D. M. Bacterial Quorum Sensing Signals Self-Assemble in Aqueous Media to Form Micelles and Vesicles: An Integrated Experimental and Molecular Dynamics Study. *J. Phys. Chem. B* **2020**, 124 (18), 3616–3628. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c00496>.
- (18) Piewngam, P.; Chiou, J.; Chatterjee, P.; Otto, M. Alternative Approaches to Treat Bacterial Infections: Targeting Quorum-Sensing. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2020**, 18 (6), 499–510. <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1750951>.
- (19) dos Santos, A. L.; Santos, D. O.; Freitas, C. C.; Ferreira, Bruno ALves Rodrigues, C. R.; Castro, H. C. *Staphylococcus Aureus* : Visitando Uma Cepa de Importância Hospitalar. *J. Bras. Patol. Med. lab.* **2007**, 43 (6), 413–423. <https://doi.org/10.1590/S1676->

- 24442007000600005.
- (20) Lin, Y. H.; Xu, J. L.; Hu, J.; Wang, L. H.; Leong Ong, S.; Renton Leadbetter, J.; Zhang, L. H. Acyl-Homoserine Lactone Acylase from *Ralstonia* Strain XJ12B Represents a Novel and Potent Class of Quorum-Quenching Enzymes. *Mol. Microbiol.* **2003**, *47* (3), 849–860. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03351.x>.
- (21) Lyon, G. J.; Mayville, P.; Muir, T. W.; Novick, R. P. Rational Design of a Global Inhibitor of the Virulence Response in *Staphylococcus Aureus*, Based in Part on Localization of the Site of Inhibition to the Receptor-Histidine Kinase, AgrC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97* (24), 13330–13335. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.24.13330>.
- (22) Bassler, B. L.; Wright, M.; Stiverman, M. R. Multiple Signalling Systems Controlling Expression of Luminescence in *Vibrio Harveyi*: Sequence and Function of Genes Encoding a Second Sensory Pathway. *Mol. Microbiol.* **1994**, *13* (2), 273–286. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00422.x>.
- (23) Lorenz, N.; Shin, J. Y.; Jung, K. Activity, Abundance, and Localization of Quorum Sensing Receptors in *Vibrio Harveyi*. *Front. Microbiol.* **2017**, *8* (APR), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00634>.
- (24) Chen, X.; Schauder, S.; Potier, N.; Van Dorsselaer, A.; Pelczer, I.; Bassler, B. L.; Hughson, F. M. Structural Identification of a Bacterial Quorum-Sensing Signal Containing Boron. *Nature* **2002**, *415* (6871), 545–549. <https://doi.org/10.1038/415545a>.
- (25) Miller, S. T.; Xavier, K. B.; Campagna, S. R.; Taga, M. E.; Semmelhack, M. F.; Bassler, B. L.; Hughson, F. M. *Salmonella Typhimurium* Recognizes a Chemically Distinct Form of the Bacterial Quorum-Sensing Signal AI-2. **2004**, *15*, 677–687.
- (26) Horinouchi, S.; Ohnishi, Y.; Kang, D. K. The A-Factor Regulatory Cascade and CAMP in the Regulation of Physiological and Morphological Development in *Streptomyces Griseus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *27* (3), 177–182. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000068>.
- (27) Chater, K. F.; Horinouchi, S. Signalling Early Developmental Events in Two Highly Diverged *Streptomyces* Species. *Mol. Microbiol.* **2003**, *48* (1), 9–15. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03476.x>.
- (28) Papenfort, K.; Silpe, J. E.; Schramma, K. R.; Cong, J. P.; Seyedsayamdost, M. R.; Bassler, B. L. A *Vibrio Cholerae* Autoinducer-Receptor Pair That Controls Biofilm Formation. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13* (5), 551–557. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2336>.

- (29) Huang, X.; Duddy, O. P.; Silpe, J. E.; Paczkowski, J. E.; Cong, J.; Henke, B. R.; Bassler, B. L. Mechanism Underlying Autoinducer Recognition in the *Vibrio Cholerae* DPO-VqmA Quorum-Sensing Pathway. *J. Biol. Chem.* **2020**, *295* (10), 2916–2931. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.012104>.
- (30) Kim, C. S.; Gatsios, A.; Cuesta, S.; Lam, Y. C.; Wei, Z.; Chen, H.; Russell, R. M.; Shine, E. E.; Wang, R.; Wyche, T. P.; Piizzi, G.; Flavell, R. A.; Palm, N. W.; Sperandio, V.; Crawford, J. M. Characterization of Autoinducer-3 Structure and Biosynthesis in *E. Coli*. *ACS Cent. Sci.* **2020**, *6* (2), 197–206. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b01076>.
- (31) Hudaiberdiev, S.; Choudhary, K. S.; Vera Alvarez, R.; Gelencsér, Z.; Ligeti, B.; Lamba, D.; Pongor, S. Census of Solo LuxR Genes in Prokaryotic Genomes. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2015**, *5* (MAR), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00020>.
- (32) Matselyukh, B.; Mohammadipanah, F.; Laatsch, H.; Rohr, J.; Efremenkova, O.; Khilya, V. N-Methylphenylalanyl-Dehydrobutyrine Diketopiperazine, an A-Factor Mimic That Restores Antibiotic Biosynthesis and Morphogenesis in *Streptomyces Globisporus* 1912-B2 and *Streptomyces Griseus* 1439. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2015**, *68* (1), 9–14. <https://doi.org/10.1038/ja.2014.86>.
- (33) Palmer, A. G.; Senechal, A. C.; Haire, T. C.; Mehta, N. P.; Valiquette, S. D.; Blackwell, H. E. Selection of Appropriate Autoinducer Analogues for the Modulation of Quorum Sensing at the Host-Bacterium Interface. *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13* (11), 3115–3122. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00676>.
- (34) David, S.; Mandabi, A.; Uzi, S.; Aharoni, A.; Meijler, M. M. Mining Plants for Bacterial Quorum Sensing Modulators. *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13* (1), 247–252. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00859>.
- (35) Bryan-Wilson, J. No Time to Wait. *Artforum Int.* **2016**, *54* (10), 113–114.
- (36) Dickey, S. W.; Cheung, G. Y. C.; Otto, M. Different Drugs for Bad Bugs: Antivirulence Strategies in the Age of Antibiotic Resistance. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16* (7), 457–471. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.23>.
- (37) Shaw, E.; Wuest, W. M.; Wuest, W. M. Virulence Attenuating Combination Therapy: A Potential Multi-Target Synergy Approach to Treat: *Pseudomonas Aeruginosa* Infections in Cystic Fibrosis Patients. *RSC Med. Chem.* **2020**, *11* (3), 358–369. <https://doi.org/10.1039/c9md00566h>.
- (38) Annapoorani, A.; Parameswari, R.; Pandian, S. K.; Ravi, A. V. Methods to Determine Antipathogenic Potential of Phenolic and Flavonoid Compounds against Urinary Pathogen *Serratia Marcescens*. *J. Microbiol. Methods* **2012**, *91* (1), 208–211.

- <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.06.007>.
- (39) Chen, F.; Gao, Y.; Chen, X.; Yu, Z.; Li, X. Quorum Quenching Enzymes and Their Application in Degrading Signal Molecules to Block Quorum Sensing-Dependent Infection. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14* (9), 17477–17500. <https://doi.org/10.3390/ijms140917477>.
- (40) Nakayama, J.; Uemura, Y.; Nishiguchi, K.; Yoshimura, N.; Igarashi, Y.; Sonomoto, K. Ambuic Acid Inhibits the Biosynthesis of Cyclic Peptide Quormones in Gram-Positive Bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53* (2), 580–586. <https://doi.org/10.1128/AAC.00995-08>.
- (41) Haque, S.; Ahmad, F.; Dar, S. A.; Jawed, A.; Mandal, R. K.; Wahid, M.; Lohani, M.; Khan, S.; Singh, V.; Akhter, N. Developments in Strategies for Quorum Sensing Virulence Factor Inhibition to Combat Bacterial Drug Resistance. *Microb. Pathog.* **2018**, *121*, 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.05.046>.
- (42) Chbib, C. Impact of the Structure-Activity Relationship of AHL Analogues on Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria. *Bioorganic Med. Chem.* **2020**, *28* (3), 115282. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.115282>.
- (43) Greenberg, M.; Kuo, D.; Jankowsky, E.; Long, L.; Hager, C.; Bandi, K.; Ma, D.; Manoharan, D.; Shoham, Y.; Harte, W.; Ghannoum, M. A.; Shoham, M. Small-Molecule AgrA Inhibitors F12 and F19 Act as Antivirulence Agents against Gram-Positive Pathogens. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32829-w>.
- (44) Brango-Vanegas, J.; Martinho, L. A.; Bessa, L. J.; Vasconcelos, A. G.; Plácido, A.; Pereira, A. L.; Leite, J. R. S. A.; Machado, A. H. L. Synthesis of Novel Sulfide-Based Cyclic Peptidomimetic Analogues to Solonomides. *Beilstein J. Org. Chem.* **2019**, *15* (Figure 1), 2544–2551. <https://doi.org/10.3762/bjoc.15.247>.
- (45) Paczkowski, J. E.; Mukherjee, S.; McCready, A. R.; Cong, J. P.; Aquino, C. J.; Kim, H.; Henke, B. R.; Smith, C. D.; Bassler, B. L. Flavonoids Suppress *Pseudomonas Aeruginosa* Virulence through Allosteric Inhibition of Quorum-Sensing Receptors. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292* (10), 4064–4076. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.770552>.
- (46) Hsiao, A.; Ahmed, A. M. S.; Subramanian, S.; Griffin, N. W.; Drewry, L. L.; Petri, W. A.; Haque, R.; Ahmed, T.; Gordon, J. I. Members of the Human Gut Microbiota Involved in Recovery from *Vibrio Cholerae* Infection. *Nature* **2014**, *515* (7527), 423–426. <https://doi.org/10.1038/nature13738>.
- (47) Krzyżek, P. Challenges and Limitations of Anti-Quorum Sensing Therapies. *Front. Microbiol.* **2019**, *10* (OCT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02473>.

- (48) Ciprandi, A.; Da Silva, W. M.; Santos, A. V.; De Castro Pimenta, A. M.; Carepo, M. S. P.; Schneider, M. P. C.; Azevedo, V.; Silva, A. Chromobacterium Violaceum: Important Insights for Virulence and Biotechnological Potential by Exoproteomic Studies. *Curr. Microbiol.* **2013**, *67* (1), 100–106. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0334-5>.
- (49) Durán, N.; Justo, G. Z.; Durán, M.; Brocchi, M.; Cordi, L.; Tasic, L.; Castro, G. R.; Nakazato, G. Advances in Chromobacterium Violaceum and Properties of Violacein-Its Main Secondary Metabolite: A Review. *Biotechnol. Adv.* **2016**, *34* (5), 1030–1045. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.06.003>.
- (50) Hoshino, T. Violacein and Related Tryptophan Metabolites Produced by Chromobacterium Violaceum: Biosynthetic Mechanism and Pathway for Construction of Violacein Core. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *91* (6), 1463–1475. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3468-z>.
- (51) Harrison, A. M.; Soby, S. D. Reclassification of Chromobacterium Violaceum ATCC 31532 and Its Quorum Biosensor Mutant CV026 to Chromobacterium Subtsugae. *AMB Express* **2020**, *10* (1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01140-1>.
- (52) Chen, G.; Swem, L. R.; Swem, D. L.; Stauff, D. L.; O’Loughlin, C. T.; Jeffrey, P. D.; Bassler, B. L.; Hughson, F. M. A Strategy for Antagonizing Quorum Sensing. *Mol. Cell* **2011**, *42* (2), 199–209. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.04.003>.
- (53) Chernin, L. S.; Winson, M. K.; Thompson, J. M.; Haran, S.; Bycroft, B. W.; Chet, I.; Williams, P.; Stewart, G. S. A. B. Chitinolytic Activity in Chromobacterium Violaceum: Substrate Analysis and Regulation by Quorum Sensing. *J. Bacteriol.* **1998**, *180* (17), 4435–4441. <https://doi.org/10.1128/jb.180.17.4435-4441.1998>.
- (54) Kothari, V.; Sharma, S.; Padia, D. Recent Research Advances on Chromobacterium Violaceum. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2017**, *10* (8), 744–752. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.07.022>.
- (55) McClean, K. H.; Winson, M. K.; Fish, L.; Taylor, A.; Chhabra, S. R.; Camara, M.; Daykin, M.; Lamb, J. H.; Swift, S.; Bycroft, B. W.; Stewart, G. S. A. B.; Williams, P. Quorum Sensing and Chromobacterium Violaceum: Exploitation of Violacein Production and Inhibition for the Detection of N-Acylhomoserine Lactones. *Microbiology* **1997**, *143* (12), 3703–3711. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-12-3703>.
- (56) Devescovi, G.; Kojic, M.; Covaceuszach, S.; Cámara, M.; Williams, P.; Bertani, I.; Subramoni, S.; Venturi, V. Negative Regulation of Violacein Biosynthesis in Chromobacterium Violaceum. *Front. Microbiol.* **2017**, *8* (MAR), 1–11.

- <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00349>.
- (57) Choo, J. H.; Rukayadi, Y.; Hwang, J. K. Inhibition of Bacterial Quorum Sensing by Vanilla Extract. *Lett. Appl. Microbiol.* **2006**, *42* (6), 637–641. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01928.x>.
- (58) Shepherd, J.; Swift, T.; Chang, C. Y.; Boyne, J. R.; Rimmer, S.; Martin, W. H. C. Highly Branched Poly(N-Isopropyl Acrylamide) Functionalized with an Inducer Molecule Suppresses Quorum Sensing in *Chromobacterium violaceum*. *Chem. Commun.* **2019**, *55* (66), 9765–9768. <https://doi.org/10.1039/c9cc02524c>.
- (59) Manner, S.; Fallarero, A. Screening of Natural Product Derivatives Identifies Two Structurally Related Flavonoids as Potent Quorum Sensing Inhibitors against Gram-Negative Bacteria. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (5). <https://doi.org/10.3390/ijms19051346>.
- (60) Swem, L. R.; Swem, D. L.; O’Loughlin, C. T.; Gatmaitan, R.; Zhao, B.; Ulrich, S. M.; Bassler, B. L. A Quorum-Sensing Antagonist Targets Both Membrane-Bound and Cytoplasmic Receptors and Controls Bacterial Pathogenicity. *Mol. Cell* **2009**, *35* (2), 143–153. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.05.029>.
- (61) Mart’yanov, S. V.; Letarov, A. V.; Ivanov, P. A.; Plakunov, V. K. Stimulation of Violacein Biosynthesis in *Chromobacterium violaceum* Biofilms in the Presence of Dimethyl Sulfoxide. *Microbiol. (Russian Fed.)* **2018**, *87* (3), 437–440. <https://doi.org/10.1134/S0026261718030050>.
- (62) August, P. R.; Grossman, T. H.; Minor, C.; Draper, M. P.; MacNeil, I. A.; Pemberton, J. M.; Call, K. M.; Holt, D.; Osburne, M. S. Sequence Analysis and Functional Characterization of the Violacein Biosynthetic Pathway from *Chromobacterium violaceum*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, *2* (4), 513–519.
- (63) Bustin, S. A.; Benes, V.; Garson, J. A.; Hellemans, J.; Huggett, J.; Kubista, M.; Mueller, R.; Nolan, T.; Pfaffl, M. W.; Shipley, G. L.; Vandesompele, J.; Wittwer, C. T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* **2009**, *55* (4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.
- (64) Yuan, J. S.; Reed, A.; Chen, F.; Stewart, C. N. Statistical Analysis of Real-Time PCR Data. *BMC Bioinformatics* **2006**, *7*, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-85>.
- (65) Gragg, G. M.; Newman, D. J. Natural Products: A Continuing Source of Novel Drug Leads. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **2013**, *1830*, 3670–3695. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>.
- (66) Yunes, R. A.; Pedrosa, R. C.; Cechinel Filho, V. Fármacos e Fitoterápicos: A

- Necessidade Do Desenvolvimento Da Indústria de Fitoterápicos e Fitofármacos No Brasil. *Quim. Nova* **2001**, *24* (1), 147–152.
- (67) Wang, S.; Dong, G.; Sheng, C. Structural Simplification of Natural Products. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (6), 4180–4220. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00504>.
- (68) Mizui, Y., Sakai, T., Iwata, M., Uenaka, T., Okamoto, K., Shimizu, H., Yamori, T., Yoshimatsu, K., Asada, M. Pladienolides, New Substances from Culture of *Streptomyces Platensis* Mer-11107. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2004**, *57* (3), 188–196.
- (69) Kumar, V. P.; Chandrasekhar, S. Enantioselective Synthesis of Pladienolide B and Truncated Analogues as New Anticancer Agents. *Org. Lett.* **2013**, *15* (14), 3610–3613. <https://doi.org/10.1021/ol401458d>.
- (70) Villa, R.; Kashyap, M. K.; Kumar, D.; Kipps, T. J.; Castro, J. E.; La Clair, J. J.; Burkart, M. D. Stabilized Cyclopropane Analogs of the Splicing Inhibitor FD-895. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (17), 6576–6582. <https://doi.org/10.1021/jm400861t>.
- (71) Arai, K.; Buonamici, S.; Chan, B.; Corson, L.; Endo, A.; Gerard, B.; Hao, M. H.; Karr, C.; Kira, K.; Lee, L.; Liu, X.; Lowe, J. T.; Luo, T.; Marcaurelle, L. A.; Mizui, Y.; Nevalainen, M.; O’Shea, M. W.; Park, E. S.; Perino, S. A.; Prajapati, S.; Shan, M.; Smith, P. G.; Tivitmahaisoon, P.; Wang, J. Y.; Warmuth, M.; Wu, K. M.; Yu, L.; Zhang, H.; Zheng, G. Z.; Keaney, G. F. Total Synthesis of 6-Deoxypladienolide D and Assessment of Splicing Inhibitory Activity in a Mutant SF3B1 Cancer Cell Line. *Org. Lett.* **2014**, *16* (21), 5560–5563. <https://doi.org/10.1021/ol502556c>.
- (72) Lagisetti, C.; Yermolina, M. V.; Sharma, L. K.; Palacios, G.; Prigaro, B. J.; Webb, T. R. Pre-mRNA Splicing-Modulatory Pharmacophores: The Total Synthesis of Herboxidiene, a Pladienolide-Herboxidiene Hybrid Analog and Related Derivatives. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9* (3), 643–648. <https://doi.org/10.1021/cb400695j>.
- (73) Sparks, T. C.; Duke, S. O. Structure Simplification of Natural Products as a Lead Generation Approach in Agrochemical Discovery. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69* (30), 8324–8346. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c02616>.
- (74) Dinarvand, M.; Spain, M. Identification of Bioactive Compounds from Marine Natural Products and Exploration of Structure-Activity Relationships (SAR). *Antibiotics* **2021**, *10* (3), 1–24. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/antibiotics10030337>.
- (75) Abdolmaleki, A.; Ghasemi, J.; Ghasemi, F. Computer Aided Drug Design for Multi-Target Drug Design: SAR /QSAR, Molecular Docking and Pharmacophore Methods. *Curr. Drug Targets* **2017**, *18* (5), 556–575. <https://doi.org/10.2174/1389450117666160101120822>.

- (76) Agrawal, P.; Singh, H.; Srivastava, H. K.; Singh, S.; Kishore, G.; Raghava, G. P. S. Benchmarking of Different Molecular Docking Methods for Protein-Peptide Docking. *BMC Bioinformatics* **2019**, *19* (Suppl 13). <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2449-y>.
- (77) Bodede, O.; Shaik, S.; Chenia, H.; Singh, P.; Moodley, R. Quorum Sensing Inhibitory Potential and in Silico Molecular Docking of Flavonoids and Novel Terpenoids from *Senegalia Nigrescens*. *J. Ethnopharmacol.* **2018**, *216*, 134–146. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.01.031>.
- (78) Tsuboi, K.; Uyama, T.; Okamoto, Y.; Ueda, N. Endocannabinoids and Related N-Acylethanolamines: Biological Activities and Metabolism Makoto Murakami. *Inflamm. Regen.* **2018**, *38* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s41232-018-0086-5>.
- (79) Mock, E. D.; Gagestein, B.; van der Stelt, M. Anandamide and Other N-Acylethanolamines: A Class of Signaling Lipids with Therapeutic Opportunities. *Prog. Lipid Res.* **2022**, *89* (July 2022), 101194. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2022.101194>.
- (80) Blancaflor, E. B.; Hou, G.; Chapman, K. D. Elevated Levels of N-Lauroylethanolamine, an Endogenous Constituent of Desiccated Seeds, Disrupt Normal Root Development in *Arabidopsis Thaliana* Seedlings. *Planta* **2003**, *217* (2), 206–217. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-0985-8>.
- (81) Moaddel, H.; Ameri, R. Synthesis of Poly(N-Acylethylenimine)S. *Iran. Polym. J.* **2005**, *14* (10), 849–854.
- (82) Kronek, J.; Nedelčev, T.; Mikulec, M.; Kleinová, A.; Lustoň, J. Synthesis of Cinnamic Acid-Derived 4,5-Dihydrooxazoles. *Chem. Pap.* **2013**, *67* (11), 1424–1432. <https://doi.org/10.2478/s11696-013-0405-x>.
- (83) Movassaghi, M.; Schmidt, M. A. N-Heterocyclic Carbene-Catalyzed Amidation of Unactivated Esters with Amino Alcohols. *Org. Lett.* **2005**, *7* (12), 2453–2456. <https://doi.org/10.1021/ol050773y>.
- (84) Caldwell, N.; Jamieson, C.; Simpson, I.; Watson, A. J. B. Development of a Sustainable Catalytic Ester Amidation Process. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2013**, *1* (10), 1339–1344. <https://doi.org/10.1021/sc400204g>.
- (85) Firouzabadi, H.; Iranpoor, N.; Farahi, S. Solid Trichlorotitanium(IV) Trifluoromethanesulfonate TiCl₃(OTf) Catalyzed Efficient Acylation of -OH and -SH: Direct Esterification of Alcohols with Carboxylic Acids and Transesterification of Alcohols with Esters under Neat Conditions. *J. Mol. Catal. A Chem.* **2008**, *289* (1–2), 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2008.04.010>.
- (86) Favero, F. Síntese de Etanolamidas e 2-Oxazolinias Substituídas Para Avaliação de Sua

- Ação Em Quorum Sensing Microbiano, Universidade de Brasília, 2017.
- (87) Kourounakis, A. P.; Xanthopoulos, D.; Tzara, A. Morpholine as a Privileged Structure : A Review on the Medicinal Chemistry and Pharmacological Activity of Morpholine Containing Bioactive Molecules. *Med. Res. Rev.* **2019**, *40* (2), 709–752. <https://doi.org/10.1002/med.21634>.
- (88) Mayersohn, M.; Guentert, T. W. Clinical Pharmacokinetics of the Monoamine Oxidase-A Inhibitor Moclobemide. *Clin. Pharmacokinet.* **1995**, *29* (5), 292–332. <https://doi.org/10.2165/00003088-199529050-00002>.
- (89) Haubrich, D. R.; Ward, S. J.; Baizman, E.; Bell, M. R.; Ferrari, R.; Miller, M.; Perrone, M.; Pierson, A. K.; Saelens, J. . Pharmacology of Pravadoline: A New Analgesic Agent. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1995**, *255* (2), 511–522.
- (90) Berg, S.; Larsson, L.; Re, L.; Ross, S. B.; Thorberg, S. (R) - (+) -2- [[3- (Morpholinomethyl) -2 H -Chromen-8-Yl] Oxy] Methyl] Morpholine Methanesulfonate : A New Selective Rat 5-Hydroxytryptamine 1B Receptor Antagonist. *J. Med. Primatol.* **1998**, *41*, 1934–1942.
- (91) Blagg, J.; Allerton, C. M. N.; Batchelor, D. V. J.; Baxter, A. D.; Burring, D. J.; Carr, C. L.; Cook, A. S.; Nichols, C. L.; Phipps, J.; Sanderson, V. G.; Verrier, H.; Wong, S. Design and Synthesis of a Functionally Selective D3 Agosnist and Its in Vivo Delivery via the Intranasal Route. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6691–6696.
- (92) Van Vliet, L. A.; Rodenhuis, N.; Dijkstra, D.; Wikström, H.; Pugsley, T. A.; Serpa, K. A.; Meltzer, L. T.; Heffner, T. G.; Wise, L. D.; Lajiness, M. E.; Huff, R. M.; Svensson, K.; Sundell, S.; Lundmark, M. Synthesis and Pharmacological Evaluation of Thiopyran Analogues of the Dopamine D3 Receptor-Selective Agonist (4aR,10bR)-(+)-Trans-3,4,4a,10b- Tetrahydro-4-n-Propyl-2H,5H-[1]Benzopyrano[4,3-b]-1,4-Oxazin-9-Ol (PD 128907). *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (15), 2871–2882. <https://doi.org/10.1021/jm0000113>.
- (93) Tzara, A.; Xanthopoulos, D.; Kourounakis, A. P. Morpholine As a Scaffold in Medicinal Chemistry: An Update on Synthetic Strategies. *ChemMedChem* **2020**, *15* (5), 392–403. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201900682>.
- (94) Brown, D. G.; Boström, J. Analysis of Past and Present Synthetic Methodologies on Medicinal Chemistry: Where Have All the New Reactions Gone? *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (10), 4443–4458. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01409>.
- (95) Lovering, F.; Bikker, J.; Humblet, C. Escape from Flatland: Increasing Saturation as an Approach to Improving Clinical Success. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (21), 6752–6756.

- <https://doi.org/10.1021/jm901241e>.
- (96) McNally, A.; Prier, C. K.; MacMillan, D. W. C. Discovery of an α -Amino C-H Arylation Reaction Using the Strategy of Accelerated Serendipity. *Science* (80-.). **2011**, 334 (6059), 1114–1117. <https://doi.org/10.1126/science.1213920>.
- (97) Liebman, J. F.; Greenberg, A. The Origin of Rotational Barriers in Amides and Esters. *Biophys. Chem.* **1974**, 1, 222–226.
- (98) Hu, D. X.; Grice, P.; Ley, S. V. Rotamers or Diastereomers? An Overlooked NMR Solution. *J. Org. Chem.* **2012**, 77 (11), 5198–5202. <https://doi.org/10.1021/jo300734r>.
- (99) Frank, J. H.; Powder-George, Y. L.; Ramsewak, R. S.; Reynolds, W. F. Variable-Temperature ¹H-NMR Studies on Two C-Glycosylflavones. *Molecules* **2012**, 17 (7), 7914–7926. <https://doi.org/10.3390/molecules17077914>.
- (100) Muratov, E. N.; Bajorath, J.; Sheridan, R. P.; Tetko, I. V.; Filimonov, D.; Poroikov, V.; Oprea, T. I.; Baskin, I. I.; Varnek, A.; Roitberg, A.; Isayev, O.; Curtalolo, S.; Fourches, D.; Cohen, Y.; Aspuru-Guzik, A.; Winkler, D. A.; Agrafiotis, D.; Cherkasov, A.; Tropsha, A. QSAR without Borders. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, 49 (11), 3525–3564. <https://doi.org/10.1039/d0cs00098a>.
- (101) Ferreira, L. G.; Dos Santos, R. N.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D. *Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies*; 2015; Vol. 20. <https://doi.org/10.3390/molecules200713384>.
- (102) Ravichandran, V.; Zhong, L.; Wang, H.; Yu, G.; Zhang, Y.; Li, A. Virtual Screening and Biomolecular Interactions of CviR-Based Quorum Sensing Inhibitors against *Chromobacterium Violaceum*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2018**, 8 (SEP), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00292>.
- (103) Gnanendra, S.; Anusuya, S.; Natarajan, J. Molecular Modeling and Active Site Analysis of SdiA Homolog, a Putative Quorum Sensor for *Salmonella Typhimurium* Pathogenicity Reveals Specific Binding Patterns of AHL Transcriptional Regulators. *J. Mol. Model.* **2012**, 18 (10), 4709–4719. <https://doi.org/10.1007/s00894-012-1469-1>.
- (104) Singh, S.; Wanjari, P. J.; Bhatia, S.; Sonwane, V. C.; Chakraborti, A. K.; Bharatam, P. V. Design, Synthesis, Biological Evaluation and Toxicity Studies of N,N-Disubstituted Biguanides as Quorum Sensing Inhibitors. *Med. Chem. Res.* **2015**, 24 (5), 1974–1987. <https://doi.org/10.1007/s00044-014-1255-y>.
- (105) Zhuang, X.; Zhang, A.; Chu, W. Anti-Quorum Sensing Activity of Forsythia Suspense Extract against *Chromobacterium Violaceum* by Targeting CviR Receptor. *Int. Microbiol.* **2020**, 23 (2), 215–224. <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00091-3>.

- (106) Trott, O.; Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J. Comput. Chem.* **2009**, *31* (2), NA-NA. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
- (107) Nguyen, N. T.; Nguyen, T. H.; Pham, T. N. H.; Huy, N. T.; Bay, M. Van; Pham, M. Q.; Nam, P. C.; Vu, V. V.; Ngo, S. T. Autodock Vina Adopts More Accurate Binding Poses but Autodock4 Forms Better Binding Affinity. *J. Chem. Inf. Model.* **2020**, *60* (1), 204–211. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00778>.
- (108) Ezawa, T.; Kawashima, Y.; Noguchi, T.; Jung, S.; Imai, N. Amidation of Carboxylic Acids via the Mixed Carbonic Carboxylic Anhydrides and Its Application to Synthesis of Antidepressant (1S,2R)-Tranlylcypromine. *Tetrahedron Asymmetry* **2017**, *28* (12), 1690–1699. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2017.10.015>.
- (109) Mollo, M. C.; Bisceglia, J. A.; Kilimciler, N. B.; Mancinelli, M.; Orelli, L. R. Microwave-Assisted Synthesis of 2-Substituted 2-Thiazolines and 5,6-Dihydro-4H-1,3-Thiazines. *Synth.* **2020**, *52* (11), 1666–1679. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1690822>.
- (110) Norris, J. F.; Watt, M.; Thomas, R. The Reaction between Alcohols and Aqueous Solutions of Hydrochloric and Hydrobromic Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **1916**, *38* (5), 1071–1079. <https://doi.org/10.1021/ja02262a014>.
- (111) De Sousa, A. L.; Resck, I. S. Asymmetric Synthesis of Exo-Isobrevicomin and Exo-Brevicomin via Conjugated Addition of Primary Alkyl Iodides to α , β -Unsaturated Ketones. *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, *13* (2), 233–237. <https://doi.org/10.1590/s0103-50532002000200015>.
- (112) Silva, J. V. S. Estudo Investigativo Da Ativação de Ligação Csp³-H Em Oxamacrociclos Insaturados Visando à Construção de Sistemas Oxapolicíclicos, Universidade de Brasília, 2014.
- (113) Silva, C. F. M.; Pinto, D. C. G. A.; Silva, A. M. S. Chromones: A Promising Ring System for New Anti-Inflammatory Drugs. *ChemMedChem* **2016**, *11* (20), 2252–2260. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600359>.
- (114) Machado, Hussen; Nagem, Tanus; Peters, Vera; Fonseca, Cristiane; Oliveira, T. Flavonóides e Seu Potencial Terapêutico. *Bol. do Cent. Biol. da Reprodução* **2008**, *27* (1/2), 33–39.
- (115) De Amorim, M. R.; Somensi, A.; Araujo, A. R.; Bonifácio, B. V.; Bauab, T. M.; Santos, L. C. D. Compounds of *Anthostomella Brabeji*, an Endophytic Fungus Isolated from *Paepalanthus Planifolius* (Eriocaulaceae). *J. Braz. Chem. Soc.* **2016**, *27* (6), 1048–1054. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150362>.

- (116) Ahluwalia, P.; McGill, J. I.; Church, M. K. Nedocromil Sodium Inhibits Histamine-Induced Itch and Flare in Human Skin. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, *132* (3), 613–616. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703852>.
- (117) Thomson, N. C. Nedocromil Sodium: An Overview. *Respir. Med.* **1989**, *83* (4), 269–276. [https://doi.org/10.1016/S0954-6111\(89\)80195-7](https://doi.org/10.1016/S0954-6111(89)80195-7).
- (118) Bernstein, P. R. Chemistry and Structure-Activity Relationships of Leukotriene Receptor Antagonists. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1998**, *157* (6 II SUPPL.). <https://doi.org/10.1164/ajrccm.157.6.mar-3>.
- (119) Balboni, G.; Congiu, C.; Onnis, V.; Maresca, A.; Scozzafava, A.; Winum, J. Y.; Maietti, A.; Supuran, C. T. Flavones and Structurally Related 4-Chromenones Inhibit Carbonic Anhydrases by a Different Mechanism of Action Compared to Coumarins. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (9), 3063–3066. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.03.071>.
- (120) Cushnie, T. P. T.; Lamb, A. J. Antimicrobial Activity of Flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2005**, *26* (5), 343–356. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002>.
- (121) Cahyana, Y.; Adiyanti, T. Review: Flavonoids as Antidiabetic Agents. *Indones. J. Chem.* **2021**, *21* (2), 512–526. <https://doi.org/10.22146/ijc.58439>.
- (122) Lemke, C.; Christmann, J.; Yin, J.; Alonso, J. M.; Serrano, E.; Chioua, M.; Ismaili, L.; Martínez-Grau, M. A.; Beadle, C. D.; Vetman, T.; Dato, F. M.; Bartz, U.; Elsinghorst, P. W.; Pietsch, M.; Müller, C. E.; Iriepa, I.; Wille, T.; Marco-Contelles, J.; Gütschow, M. Chromenones as Multineurotargeting Inhibitors of Human Enzymes. *ACS Omega* **2019**, *4* (26), 22161–22168. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03409>.
- (123) Ali, R.; Guan, Y.; Leveille, A. N.; Vaughn, E.; Parelkar, S.; Thompson, P. R.; Mattson, A. E. Synthesis and Anticancer Activity of Structure Simplified Naturally-Inspired Dimeric Chromenone Derivatives. *European J. Org. Chem.* **2019**, *41*, 6917–6929. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201901026>.Synthesis.
- (124) Park, S.; Hwang, S. Y.; Shin, J.; Jo, H.; Na, Y.; Kwon, Y. A Chromenone Analog as an ATP-Competitive, DNA Non-Intercalative Topoisomerase II Catalytic Inhibitor with Preferences toward the Alpha Isoform. *Chem. Commun.* **2019**, *55* (85), 12857–12860. <https://doi.org/10.1039/c9cc05524j>.
- (125) Shin, S. Y.; Lee, J.; Ahn, S.; Yoo, M.; Lee, Y. H.; Koh, D.; Lim, Y. Design, Synthesis, and Evaluation of 4-Chromenone Derivatives Combined with N-Acylhydrazone for Aurora Kinase A Inhibitor. *Appl. Biol. Chem.* **2021**, *64* (1). <https://doi.org/10.1186/s13765-021-00596-4>.
- (126) Zhang, H. W.; Song, Y. C.; Tan, R. X. Biology and Chemistry of Endophytes. *Nat. Prod.*

- Rep.* **2006**, *23* (5), 753–771. <https://doi.org/10.1039/b609472b>.
- (127) Cavalcante, R. A. F.; Silva, F. L.; Favero, F.; Resck, I. S.; Pereira, A. L.; Machado, A. H. L. Quantitative ¹H NMR Spectroscopy (QNMR) in the Early Process Development of a New Quorum Sensing Inhibitor. *Magn. Reson. Chem.* **2020**, *58* (1), 31–40. <https://doi.org/10.1002/mrc.4906>.
- (128) Cavalcante, R. A. F. Desenvolvimento Do Processo de Síntese, Com Ênfase Em Boas Práticas de Fabricação (BPF), Estudos de Degradação e Polimorfismo de Uma Cromenona Inibidora de Quorum Sensing Microbiano, Universidade de Brasília, 2019.
- (129) Sartori, S. K.; Diaz, M. A. N.; Diaz-Muñoz, G. Lactones: Classification, Synthesis, Biological Activities, and Industrial Applications. *Tetrahedron* **2021**, *84*. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2021.132001>.
- (130) Buchanan, J. G.; Charlton, M. H.; Mahon, M. F.; Robinson, J. J.; Ruggiero, G. D.; Williams, I. H. Experimental and Computational Studies of α -Lactones: Structure and Bonding in the Three-Membered Ring. *J. Phys. Org. Chem.* **2002**, *15* (9), 642–646. <https://doi.org/10.1002/poc.526>.
- (131) Robinson, S. L.; Christenson, J. K.; Wackett, L. P. Biosynthesis and Chemical Diversity of β -Lactone Natural Products. *Nat. Prod. Rep.* **2019**, *36* (3), 458–475. <https://doi.org/10.1039/c8np00052b>.
- (132) Koziol, A.; Mroczko, L.; Niewiadomska, M.; Lochyński, S. Γ -Lactones With Potential Biological Activity. *Polish J. Nat. Sci.* **2017**, *32* (3), 495–511.
- (133) Mazur, M.; Masłowiec, D. Antimicrobial Activity of Lactones. *Antibiotics* **2022**, *11* (10). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101327>.
- (134) Liu, D. Z.; Wang, F.; Liao, T. G.; Tang, J. G.; Steglich, W.; Zhu, H. J.; Liu, J. K. Vibralactone: A Lipase Inhibitor with an Unusual Fused β -Lactone Produced by Cultures of the Basidiomycete *Boreostereum Vibrans*. *Org. Lett.* **2006**, *8* (25), 5749–5752. <https://doi.org/10.1021/ol062307u>.
- (135) Tymiak, A. A.; Culver, C. A.; Malley, M. F.; Gougoutas, J. Z. Structure of Obaf fluorin: An Antibacterial θ -Lactone from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Org. Chem.* **1985**, *50* (8), 5491–5495.
- (136) Mulzer, M.; Tiegs, B. J.; Wang, Y.; Coates, G. W.; O'Doherty, G. A. Total Synthesis of Tetrahydrolipstatin and Stereoisomers via a Highly Regio- and Diastereoselective Carbonylation of Epoxyhomoallylic Alcohols. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (30), 10814–10820. <https://doi.org/10.1021/ja505639u>.
- (137) Couto, F. F. B.; Coelho, P. M. Z.; Araújo, N.; Kusel, J. R.; Katz, N.; Jannotti-Passos, L.

- K.; Mattos, A. C. A. Schistosoma Mansoni: A Method for Inducing Resistance to Praziquantel Using Infected Biomphalaria Glabrata Snails. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2011**, *106* (2), 153–157. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000200006>.
- (138) Whiteland, H.; Crusco, A.; Bloemberg, L. W.; Tibble-Howlings, J.; Forde-Thomas, J.; Coghlan, A.; Murphy, P. J.; Hoffmann, K. F. Quorum Sensing N-Acyl Homoserine Lactones Are a New Class of Anti-Schistosomal. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2020**, *14* (10), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008630>.
- (139) Stefanachi, A.; Leonetti, F.; Pisani, L.; Catto, M.; Carotti, A. *Coumarin: A Natural, Privileged and Versatile Scaffold for Bioactive Compounds*; 2018; Vol. 23. <https://doi.org/10.3390/molecules23020250>.
- (140) Silva, L. .; Tauhata, S. B. .; Baeza, L. C.; de Oliveira, C. . A.; Kato, L.; Borges, C. L.; Soares, C. M. .; Pereira, M. Argentinolactone Molecular Targets in Paracoccidioides Brasiliensis Identified by Chemoproteomics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62* (11), 1–13.
- (141) Roldán, S.; Cardona, A.; Conesa, L.; Murga, J.; Falomir, E.; Carda, M.; Marco, J. A. Synthesis and Biological Evaluation of Simplified Pironetin Analogues with Modifications in the Side Chain and the Lactone Ring. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15* (1), 220–232. <https://doi.org/10.1039/c6ob01585a>.
- (142) Ferraz, H. M. C.; Bombonato, F. I.; Sano, M. K.; Longo, L. S. Natural Occurrence, Biological Activities and Synthesis of Eight-, Nine-, and Eleven-Membered Ring Lactones. *Quim. Nova* **2008**, *31* (4), 885–900. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000400029>.
- (143) Tomoda, H.; Nishida, H.; Masuma, R.; Cao, J.; Okuda, S.; Omura, S. Purpactins New Inhibitors of Acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase Produced by Penicillium Purpurogenum. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1991**, *44* (2), 136–143.
- (144) Ackland, M. J.; Hanson, J. R.; Hitchcock, P.; Ratcliffe, A. H. Structures of the Cephalosporolides B-F, A Group of C., Lactones from Cephalosporium Aphidico. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* **1985**, No. 12, 843–847.
- (145) Albrecht, A.; Koszuk, J. F.; Modranka, J.; Rózsalski, M.; Krajewska, U.; Janecka, A.; Studzian, K.; Janecki, T. Synthesis and Cytotoxic Activity of γ -Aryl Substituted α -Alkylidene- γ -Lactones and α -Alkylidene- γ -Lactams. *Bioorganic Med. Chem.* **2008**, *16* (9), 4872–4882. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.03.035>.
- (146) Dehal, S. S.; Marples, B. A.; Stretton, R. J.; Traynor, J. R. Steroidal Alpha-Methylene - DeltaLactones as Potential Antitumor Agents. *J. Med. Chem.* **1980**, *23*, 90–92.

- <https://doi.org/10.1002/jps.2600571125>.
- (147) Mcmurry, J. E.; Dushin, R. G. Titanium-Induced Carbonyl Coupling. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6942–6949.
- (148) Albrecht, Ł.; Wojciechowski, J.; Albrecht, A.; Wolf, W. M.; Janecka, A.; Studzian, K.; Krajewska, U.; Rózsalski, M.; Janecki, T.; Krawczyk, H. Synthesis and Cytotoxic Evaluation of β -Alkyl or β -Aryl- δ -Methyl- α -Methylene- δ -Lactones. Comparison with the Corresponding γ -Lactones. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45* (2), 710–718. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.11.018>.
- (149) Kumar, V.; Mahajan, A.; Chibale, K. Synthetic Medicinal Chemistry of Selected Antimalarial Natural Products. *Bioorganic Med. Chem.* **2009**, *17* (6), 2236–2275. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.10.072>.
- (150) Tolentino, T. A. Utilização de Produtos Do Rearranjo de Hurd-Claisen de Adutos de Morita-Baylis-Hillman Na Síntese de 2-Alquenil Delta-Valerolactonas Com Atividade Inibitória Do Quorum Sensing de Chromobacterium Violaceum, Universidade de Brasília, 2019.
- (151) Vranka, C.; Nics, L.; Wagner, K. H.; Hacker, M.; Wadsak, W.; Mitterhauser, M. LogP, a Yesterday's Value? *Nucl. Med. Biol.* **2017**, *50*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2017.03.003>.
- (152) Forli, S.; Huey, R.; Pique, M. E.; Sanner, M.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. Computational Protein-Ligand Docking and Virtual Drug Screening with the AutoDock Suite. *Nat Protoc* **2016**, *11* (5), 905–919. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.051>. Computational.
- (153) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual Molecular Dynamics. 1996, pp 33–38. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).

Apêndices

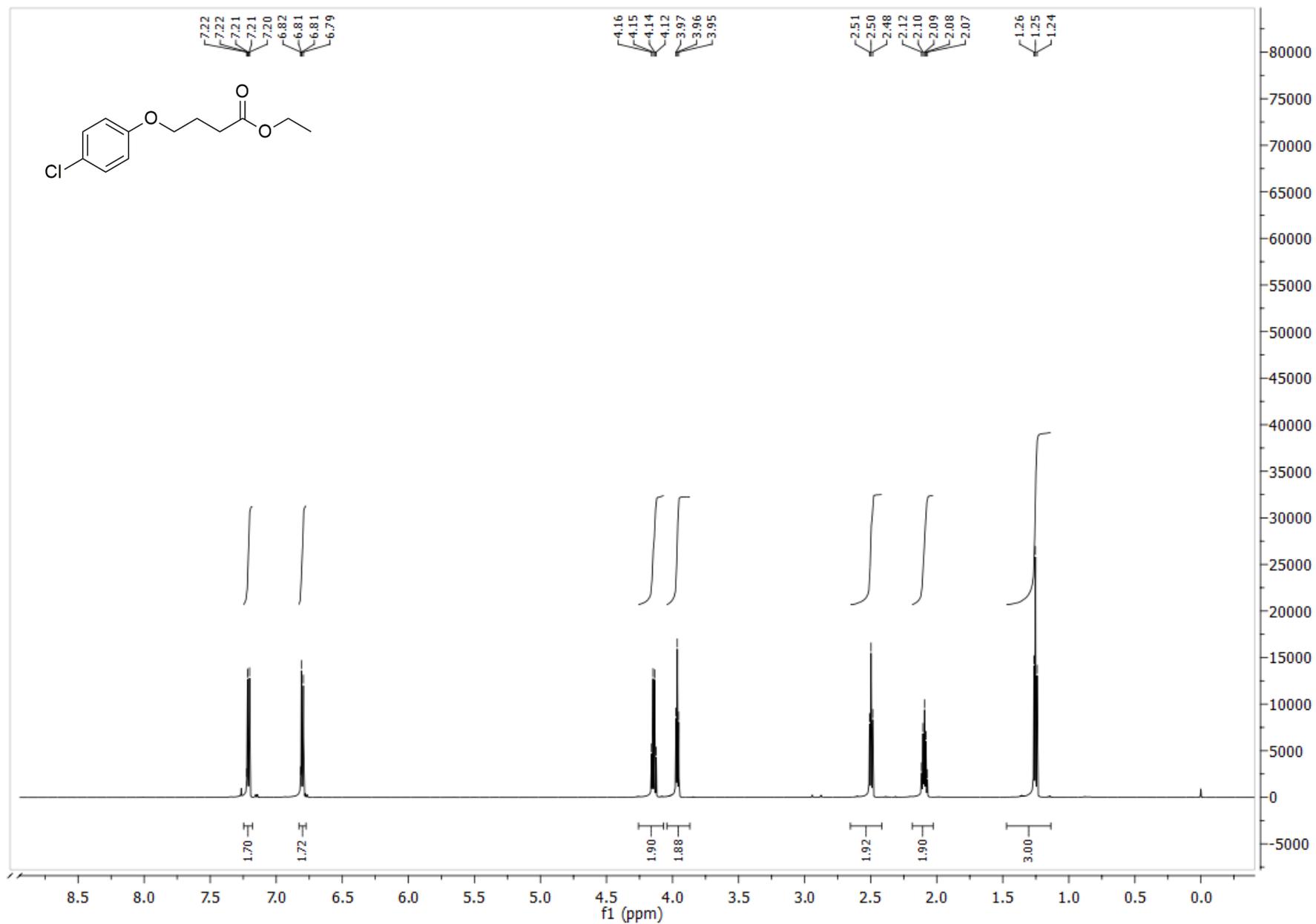


Figura S1 - Espectro (RMN de ^1H 600 MHz, CDCl_3) – 4-(4clorofenoxi)butanoato de etila **59**.

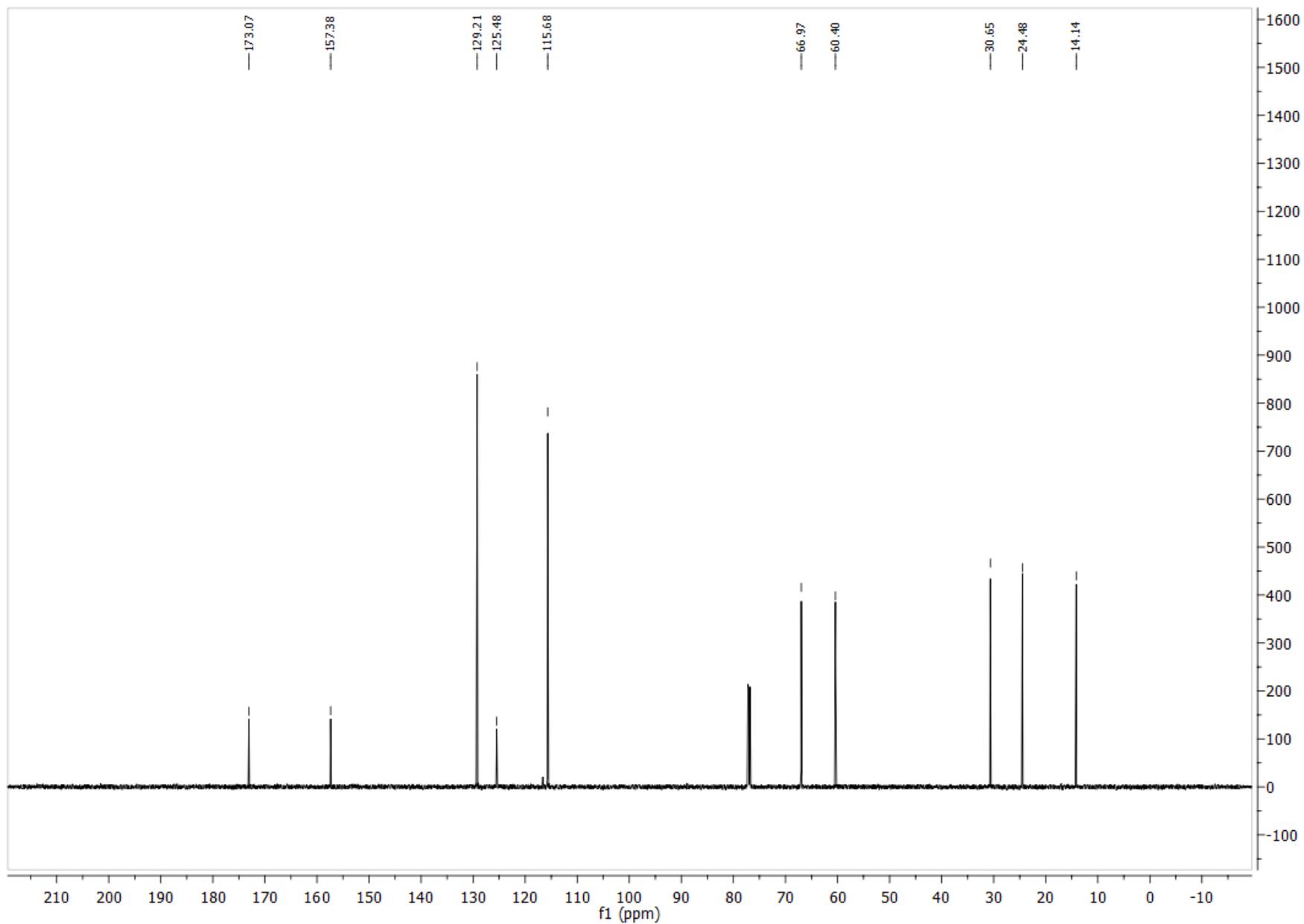


Figura S2 - Espectro (RMN de ¹³C 151 MHz, CDCl₃) – 4-(4clorofenoxi)butanoato de etila **59**.

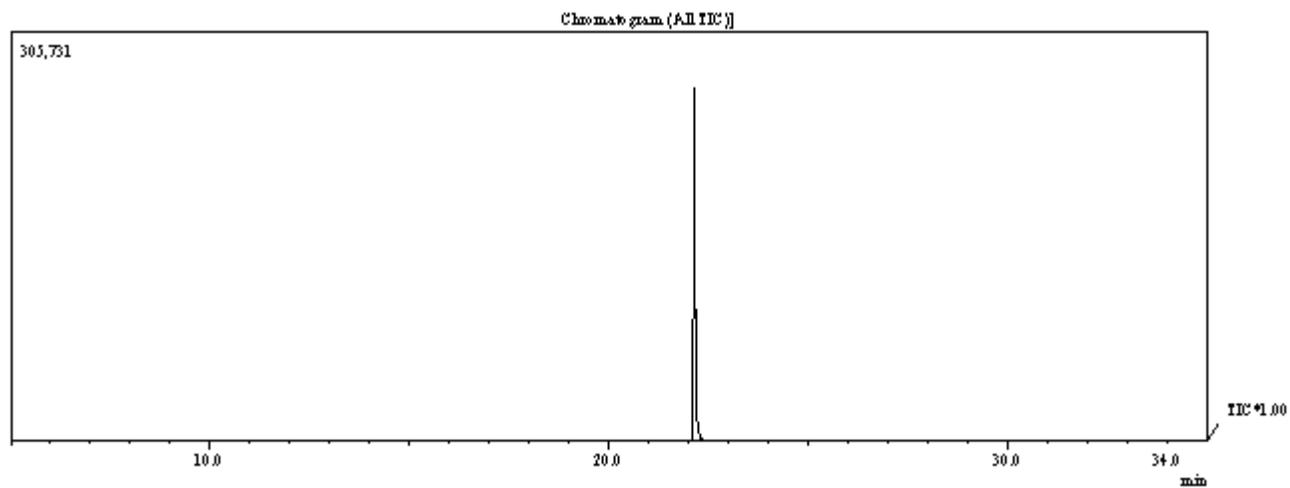


Figura S3 - Cromatograma da 4-(4clorofenoxi)butanoato de etila **59**.

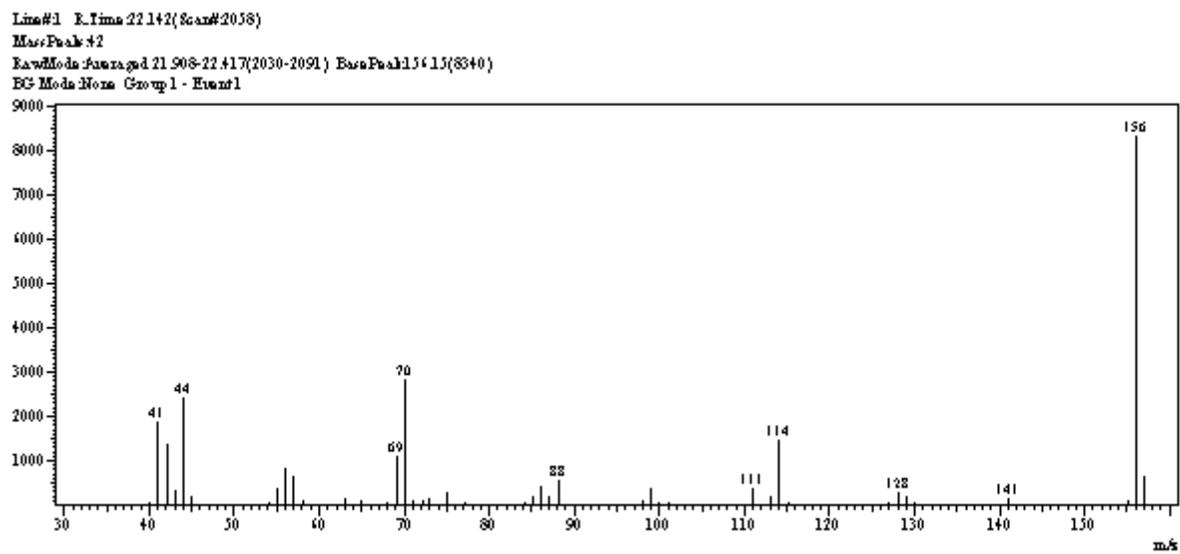


Figura S4 - Espectro (EM 70 eV m/z) – 4-(4clorofenoxi)butanoato de etila **59**.

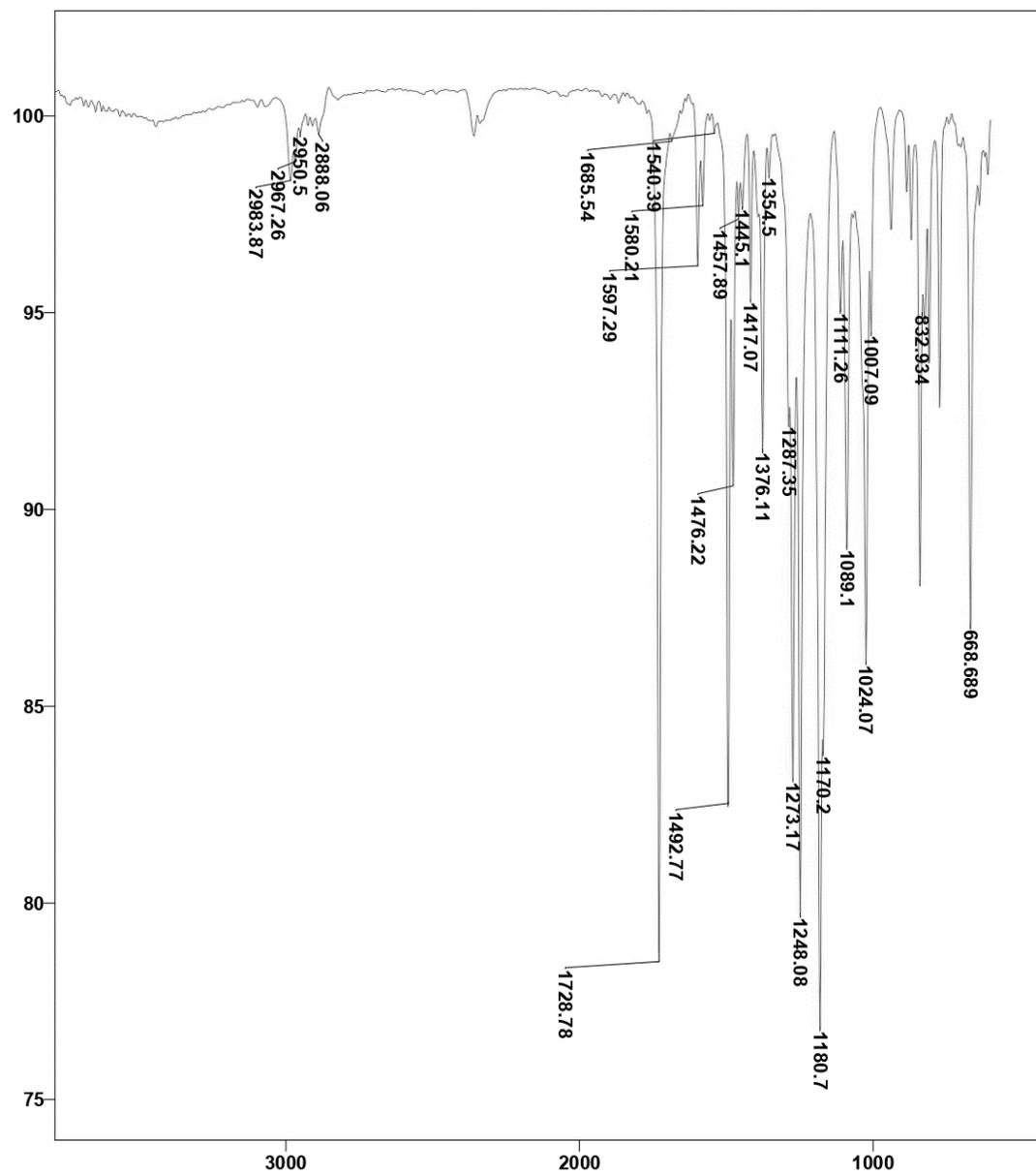


Figura S5 - Espectro de Infravermelho (ATR) -4-(4clorofenoxi)butanoato de etila **59**.

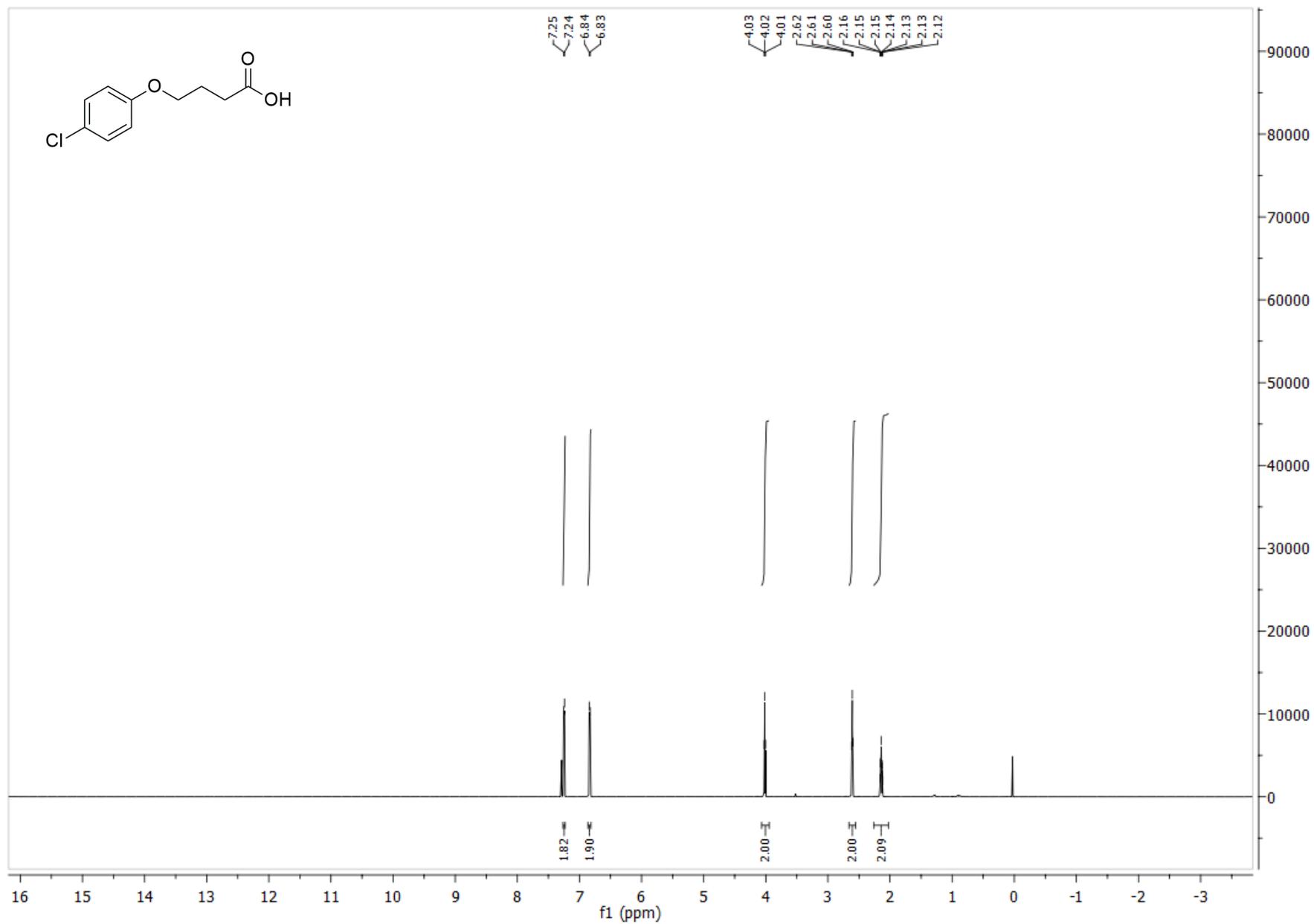


Figura S6 - Espectro (RMN de ^1H 600 MHz, CDCl_3) – Ácido 4-(4clorofenoxi)butanóico **60**.

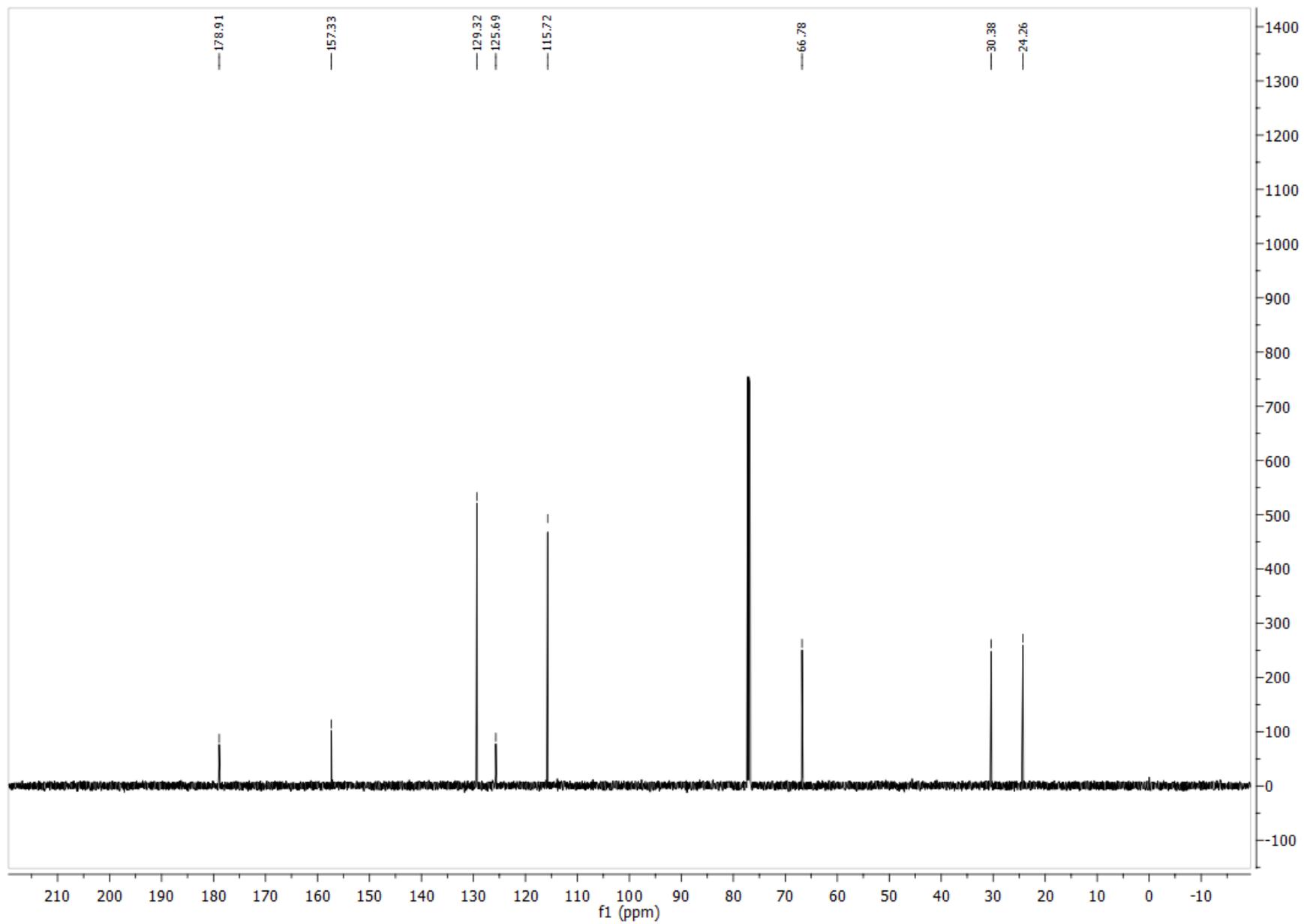


Figura S7 - Espectro (RMN de ^{13}C 151 MHz, CDCl_3) – Ácido 4-(4clorofenoxi)butanóico **60**.

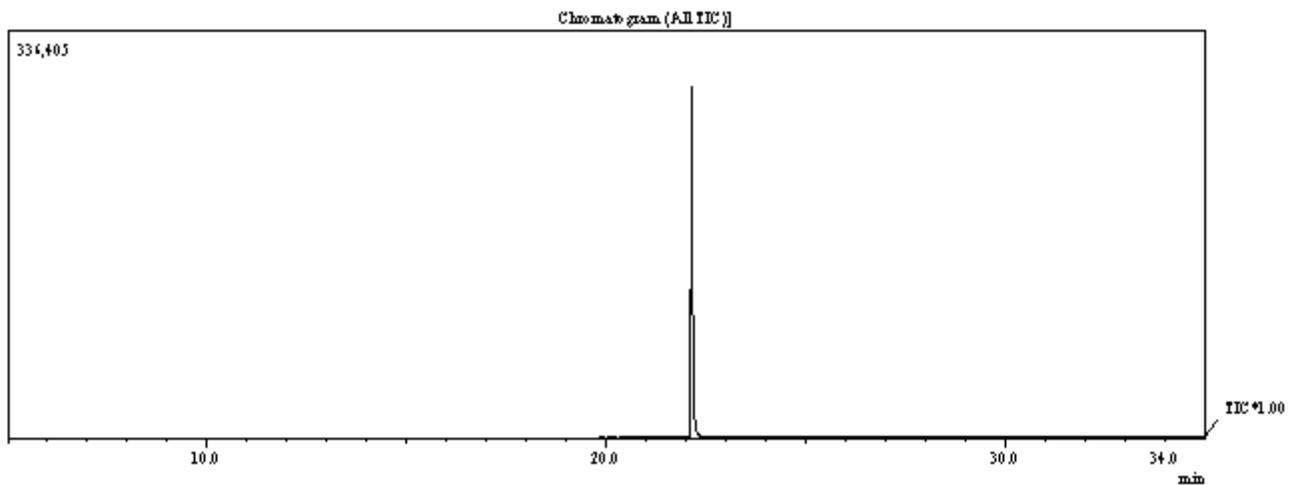


Figura S8 - Cromatograma do Ácido 4-(4clorofenoxi)butanóico 60.

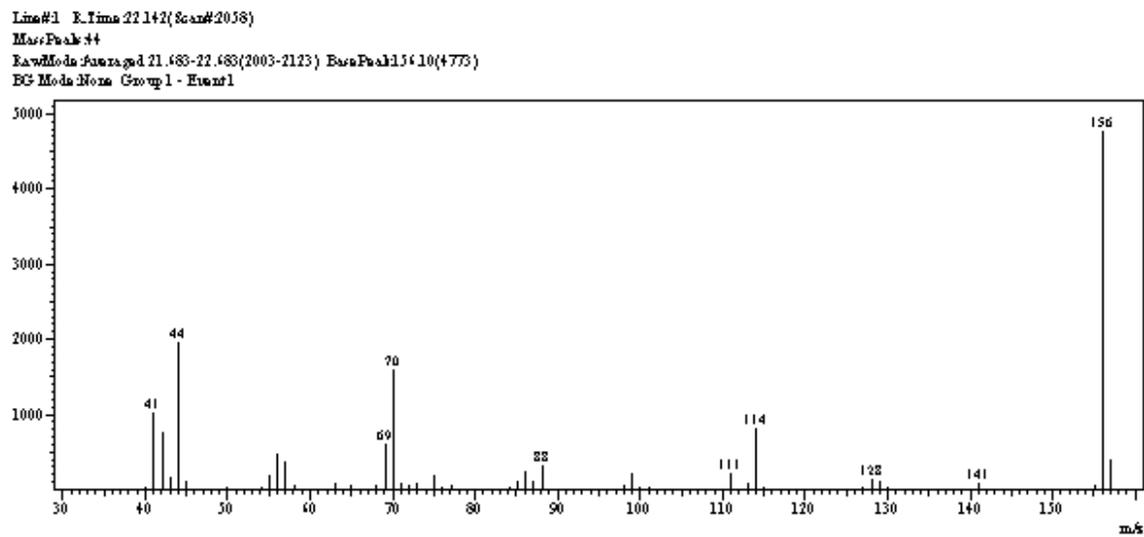


Figura S9 - Espectro (EM 70 eV m/z) – Ácido 4-(4clorofenoxi)butanóico 60.

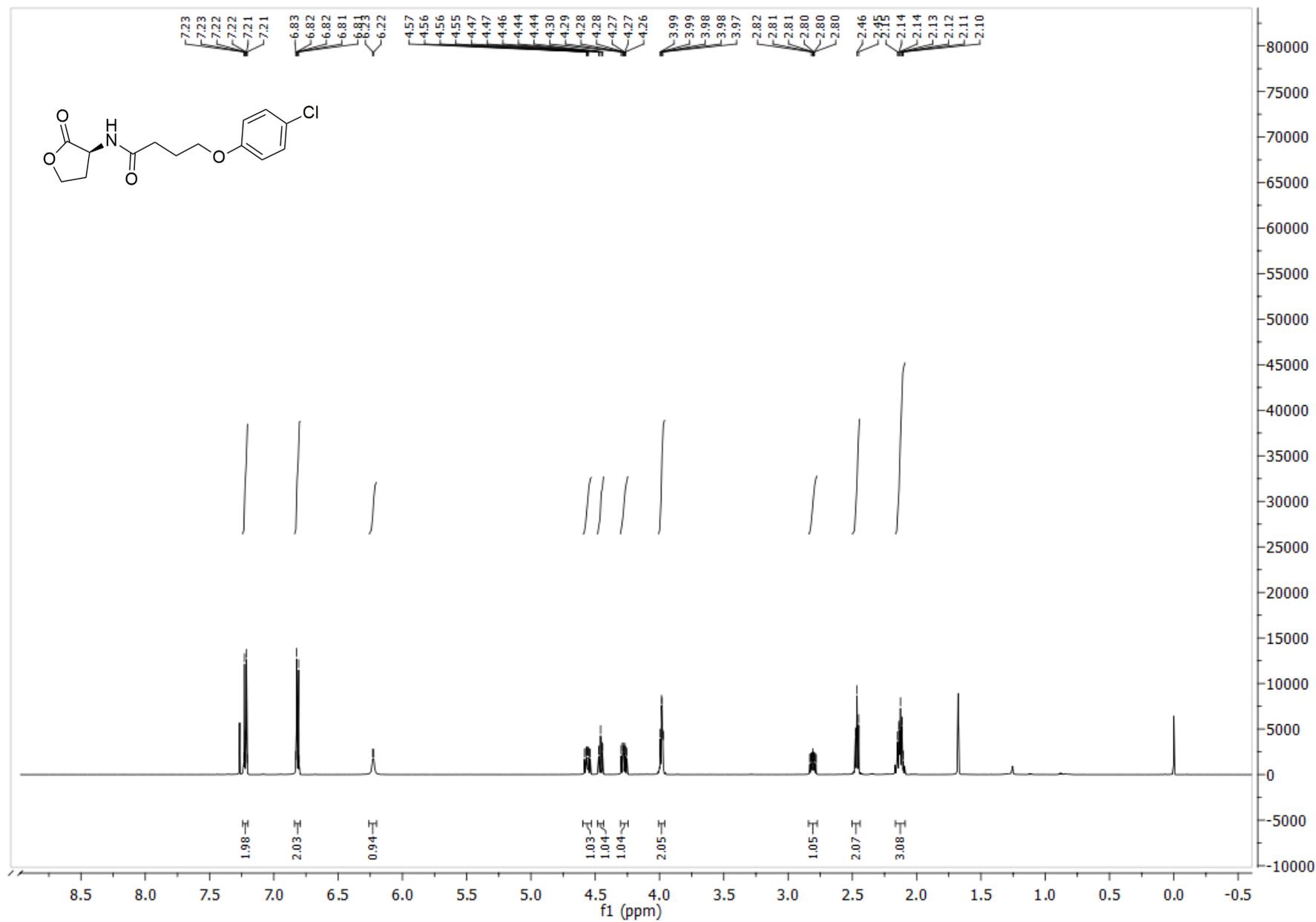


Figura S10 - Espectro (RMN de ^1H 600 MHz, CDCl_3) – (*S*)-4-(4-clorofenoxi)-*N*-(2-oxotetrahidrofuran-3-il)butanamida **56**.

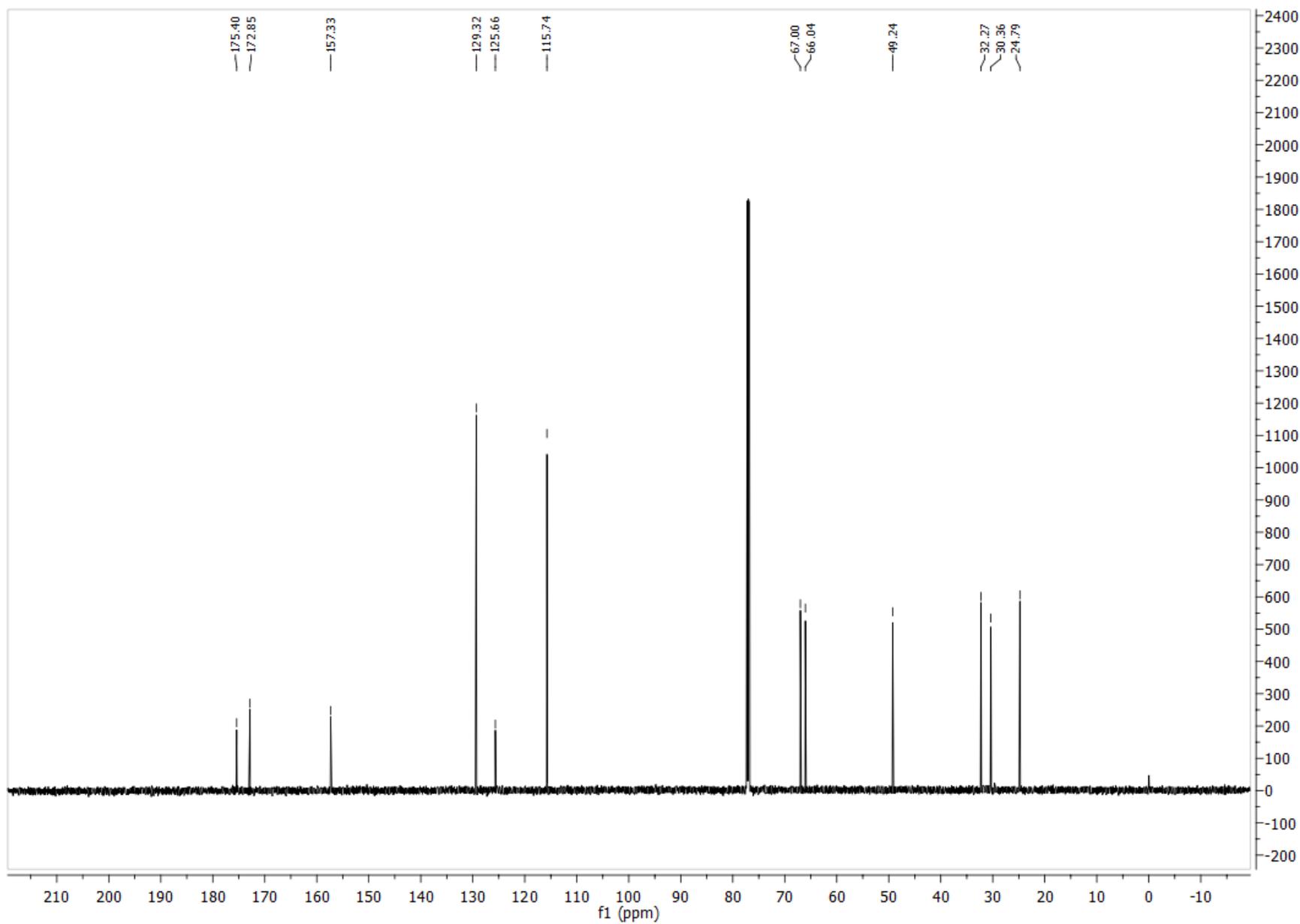


Figura S11 - Espectro (RMN de ^{13}C 151 MHz, CDCl_3) – (*S*)-4-(4-clorofenoxi)-*N*-(2-oxotetrahidrofuran-3-il)butanamida **56**.

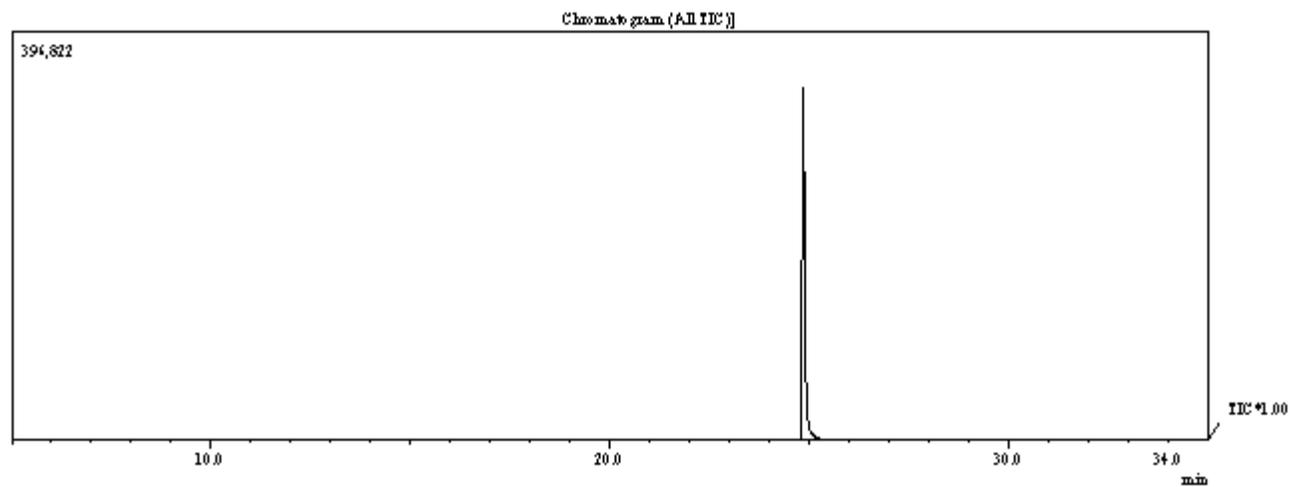


Figura S12 - Cromatograma da (*S*)-4-(4-clorofenoxi)-*N*-(2-oxotetrahidrofuran-3-il)butanamida **56**.

Line#1 E.Time 24.858(Scan#2384)
 MassPeak:52
 RawMode:Averaged 24.758-24.950(2372-2395) BasePeak:170.10(24145)
 ESI Mode:None Group:1 - Event:1

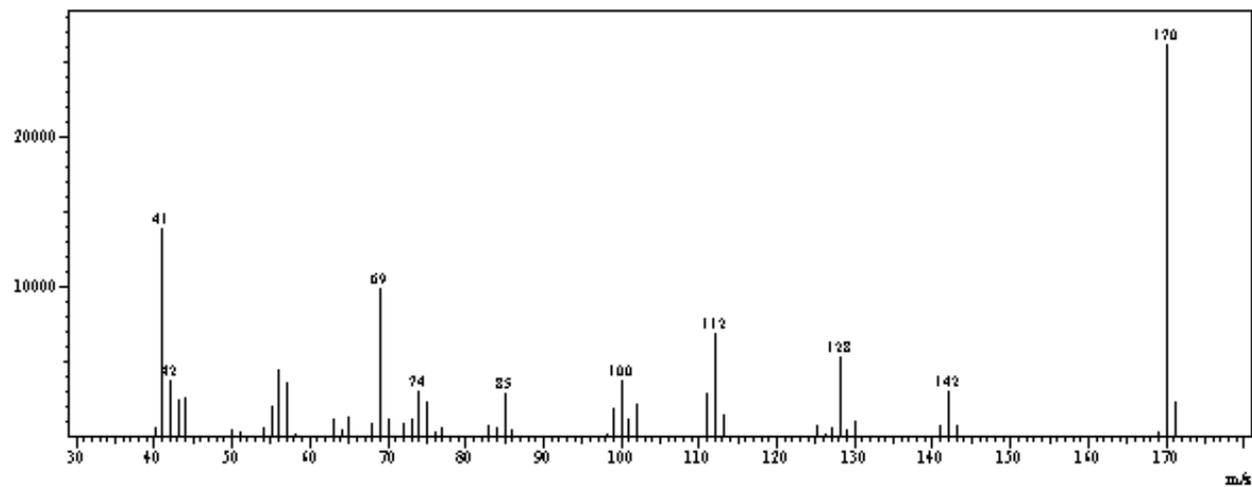


Figura S13 - Espectro (EM 70 eV m/z) – (*S*)-4-(4-clorofenoxi)-*N*-(2-oxotetrahidrofuran-3-il)butanamida **56**.

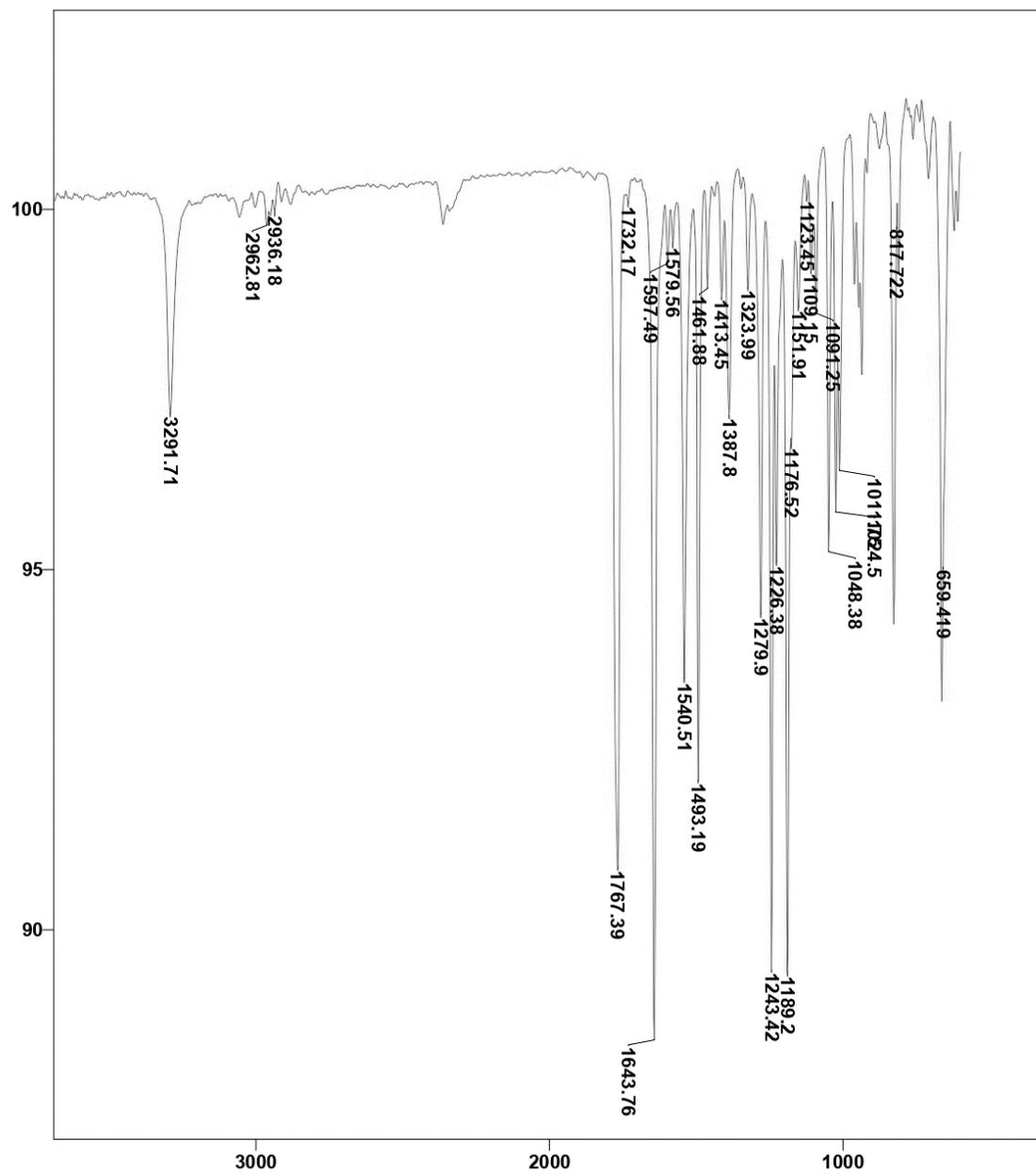


Figura S14- Espectro de Infravermelho (ATR) – (S)-4-(4-clorofenoxi)-N-(2-oxotetrahydrofuran-3-il)butanamida **56**.

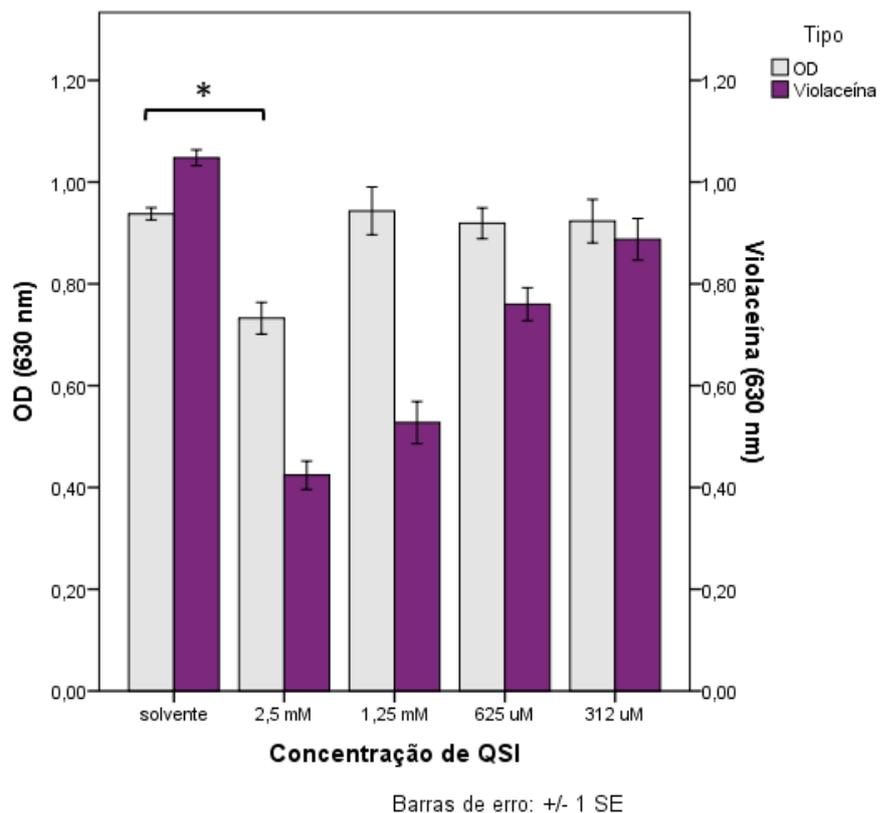


Figura S15- Gráfico de inibição de violaceína da molécula 4-(4clorofenoxi)butanoato de etila **59**.

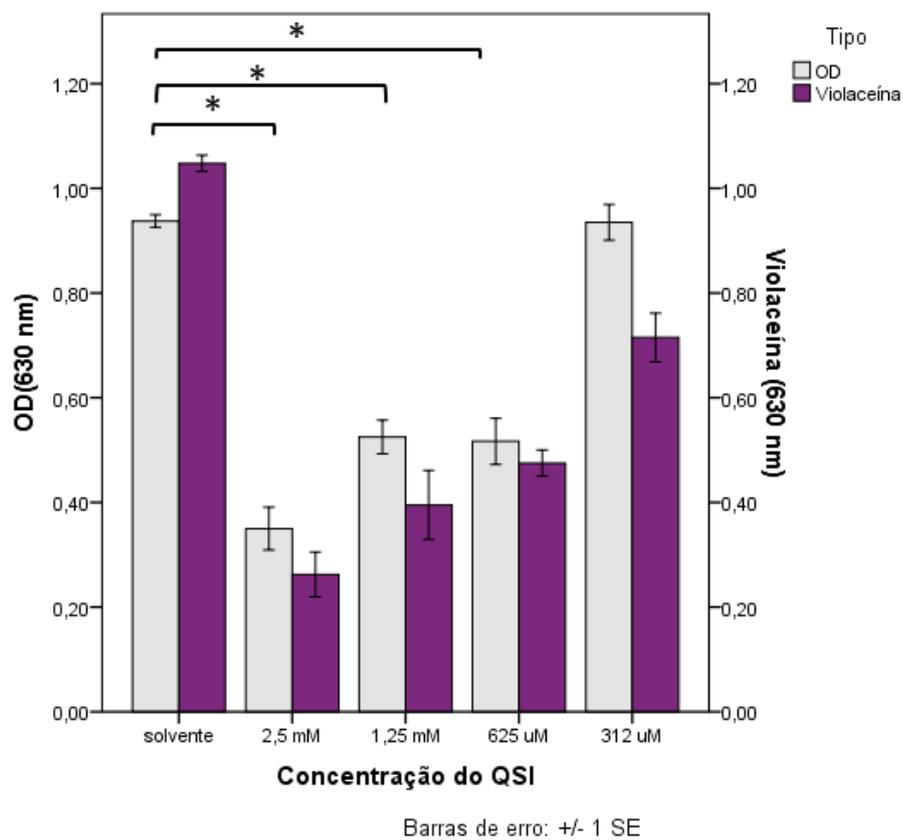


Figura S16- Gráfico de inibição de violaceína do Ácido 4-(4clorofenoxi)butanóico **60**.

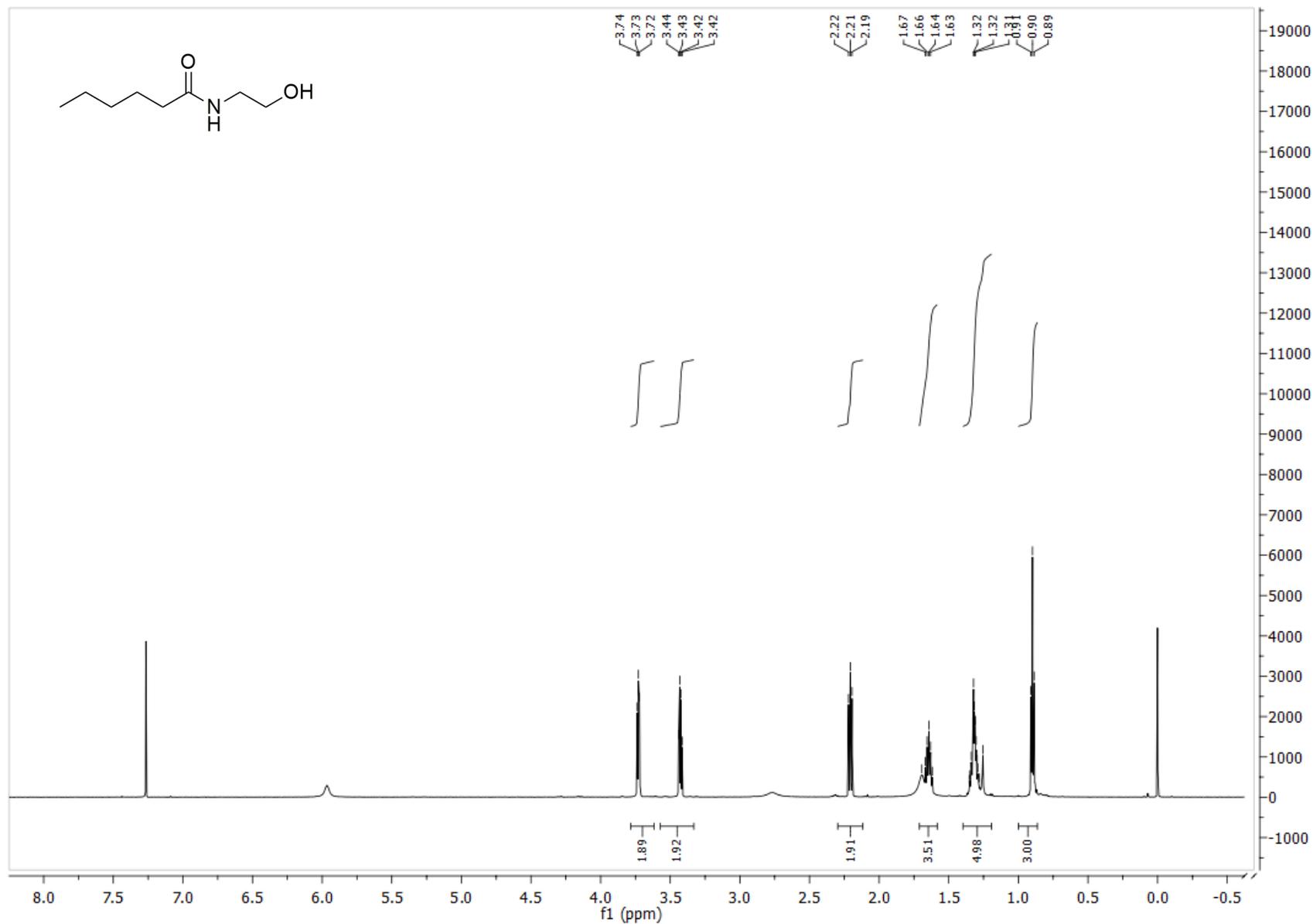


Figura S17- Espectro (RMN de ^1H 600 MHz, CDCl_3) – *N*-(2-hidroxiel)hexanamida **115**.

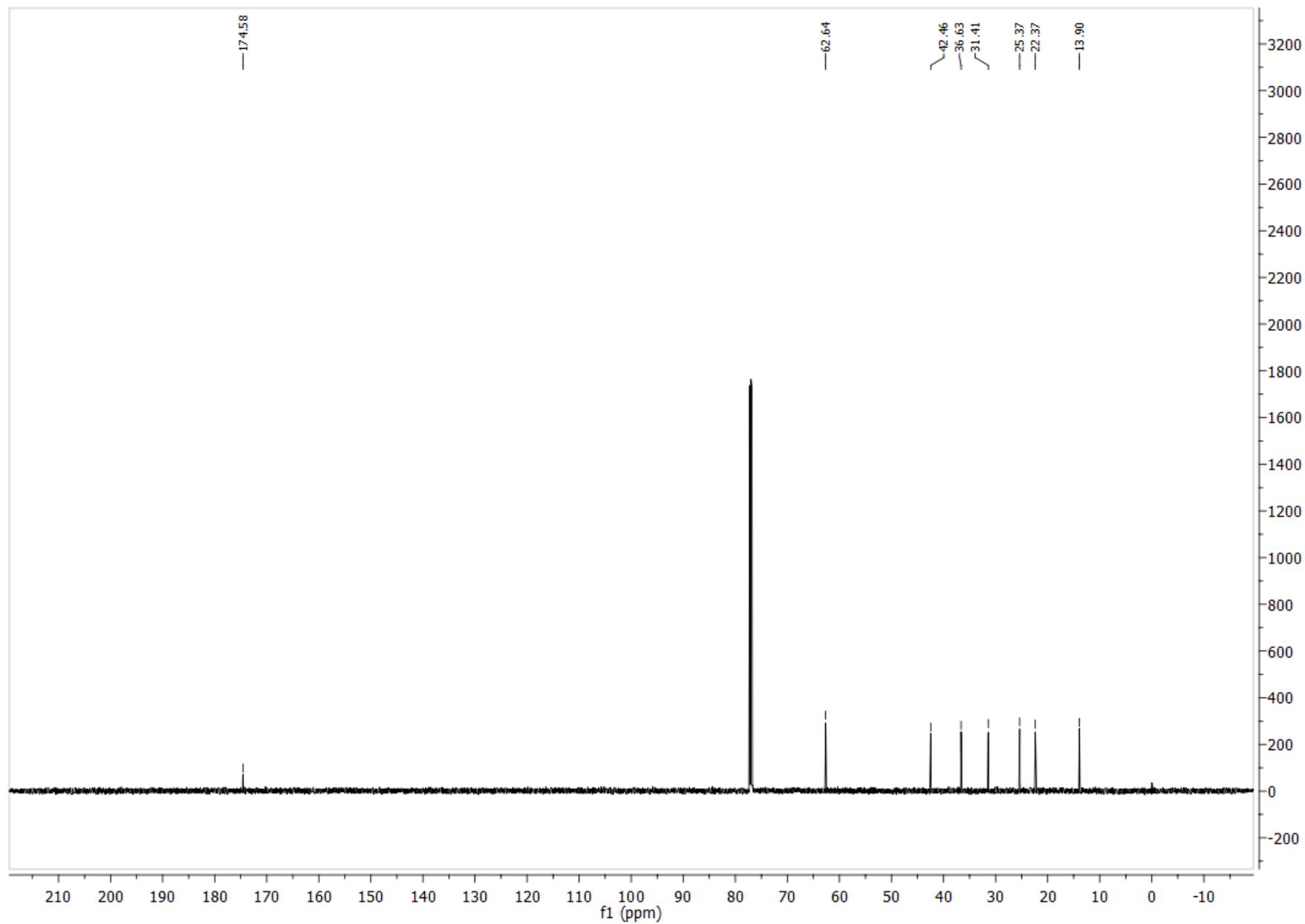


Figura S18 - Espectro (RMN de ¹³C 151 MHz, CDCl₃) – *N*-(2-hidroxietyl)hexanamida **115**.

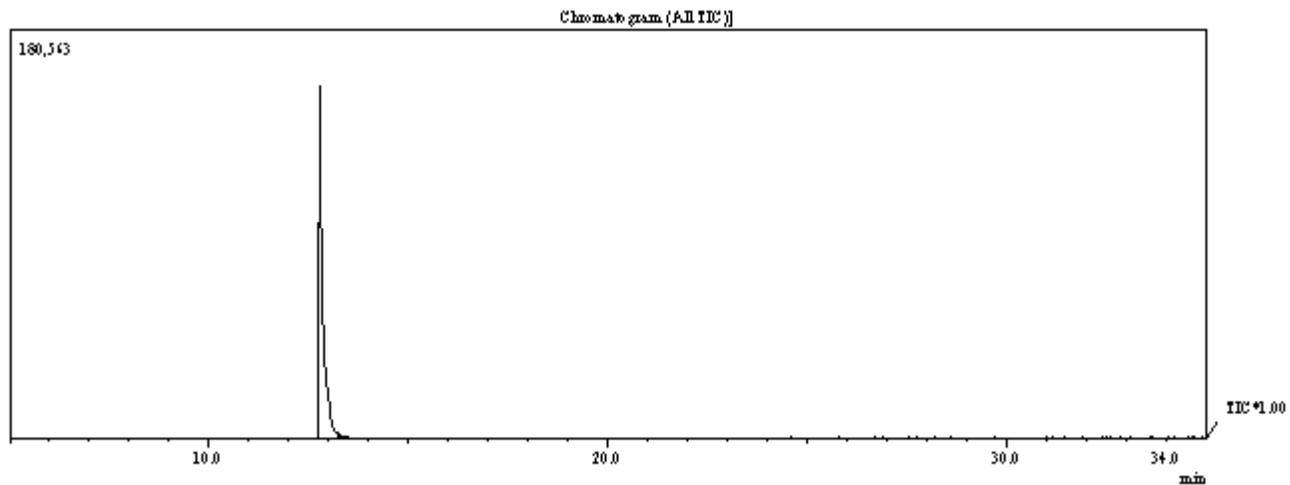


Figura S19 - Cromatograma da *N*-(2-hidroxietil)hexanamida **115**.

Line#1 E.Time:12.775(Scan#934)
 Mass:Peak 29
 RawMode: Averaged 12.708-13.017(924-943) BasePeak:3.05(10092)
 EG: Mode:None Group:1 - Event:1

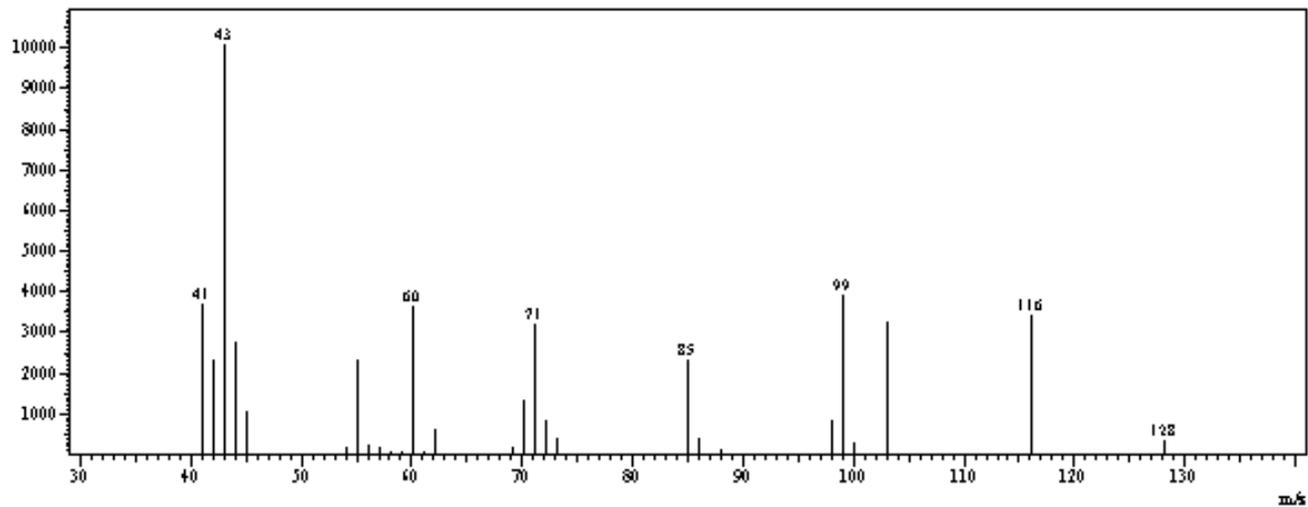


Figura S20 - Espectro (EM 70 eV m/z) – *N*-(2-hidroxietil)hexanamida **115**.

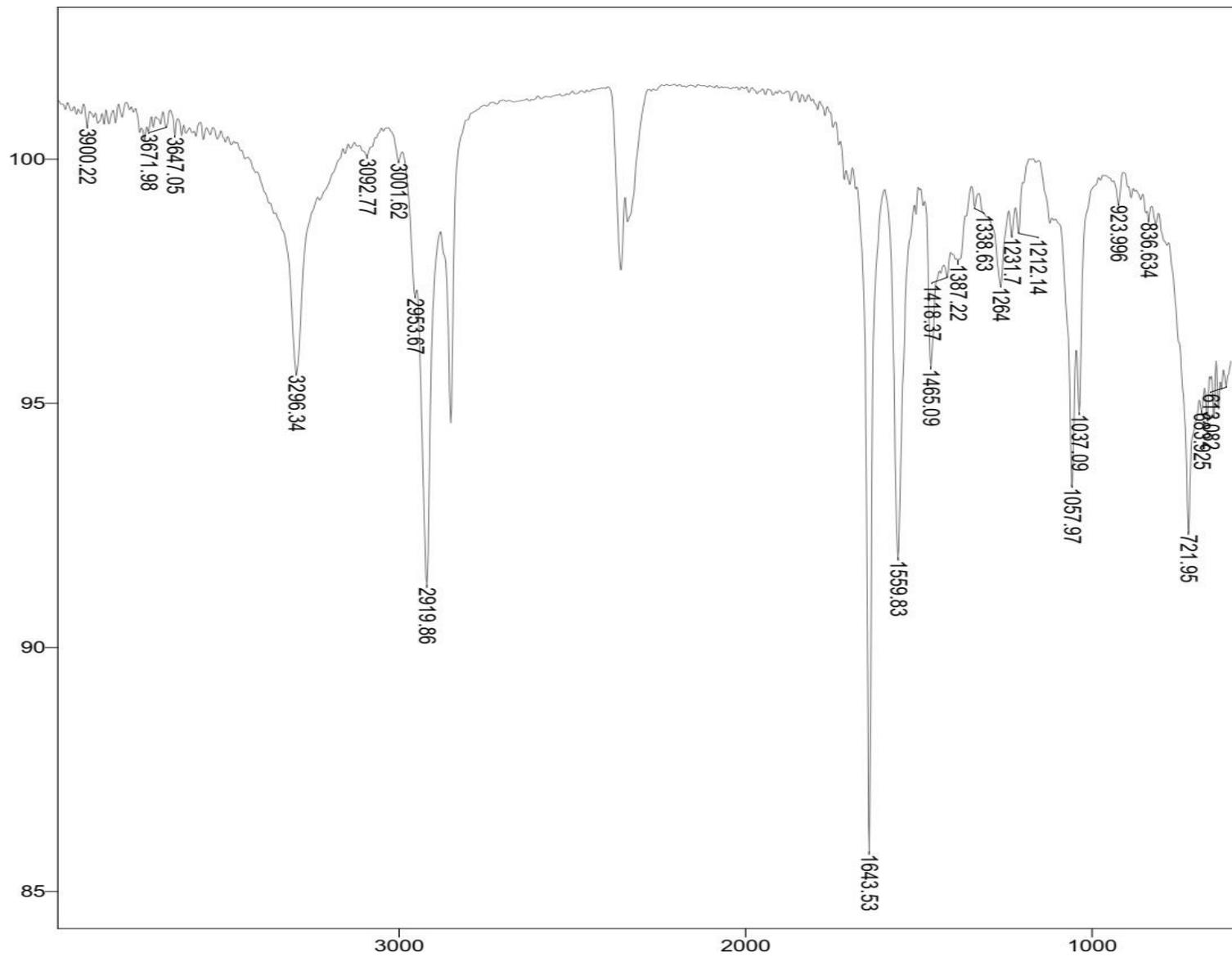


Figura S21 - Espectro de Infravermelho (ATR) – 2-hidroxiethylhexamida **115**.

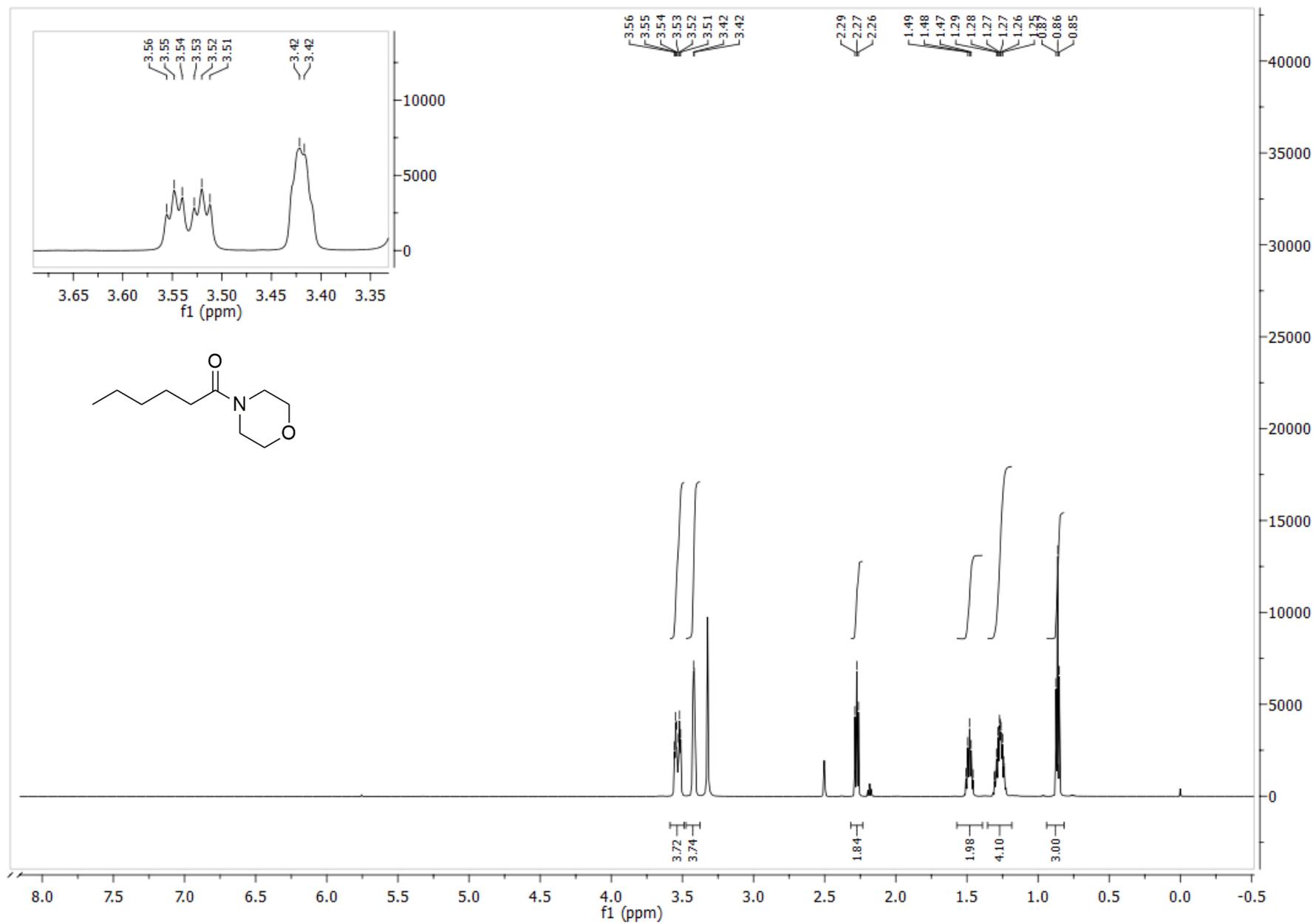


Figura S22 - Espectro (RMN de ^1H 600 MHz, DMSO, 25°C) – 1-morfolinahexan-1-ona **116**.

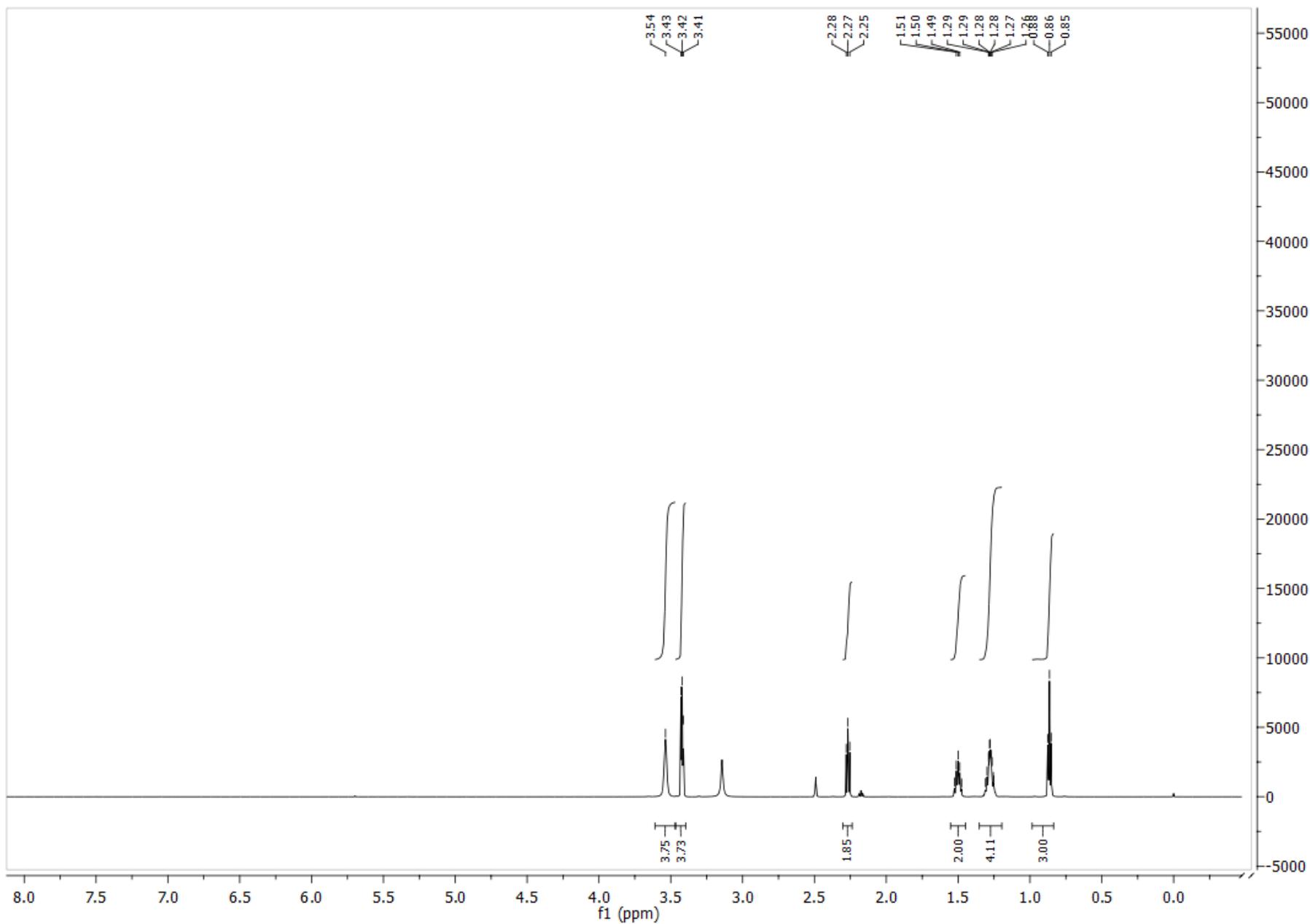


Figura S23 - Espectro (RMN de ¹H 600 MHz, DMSO, 60°C) – 1-morfolinahexan-1-ona **116**.

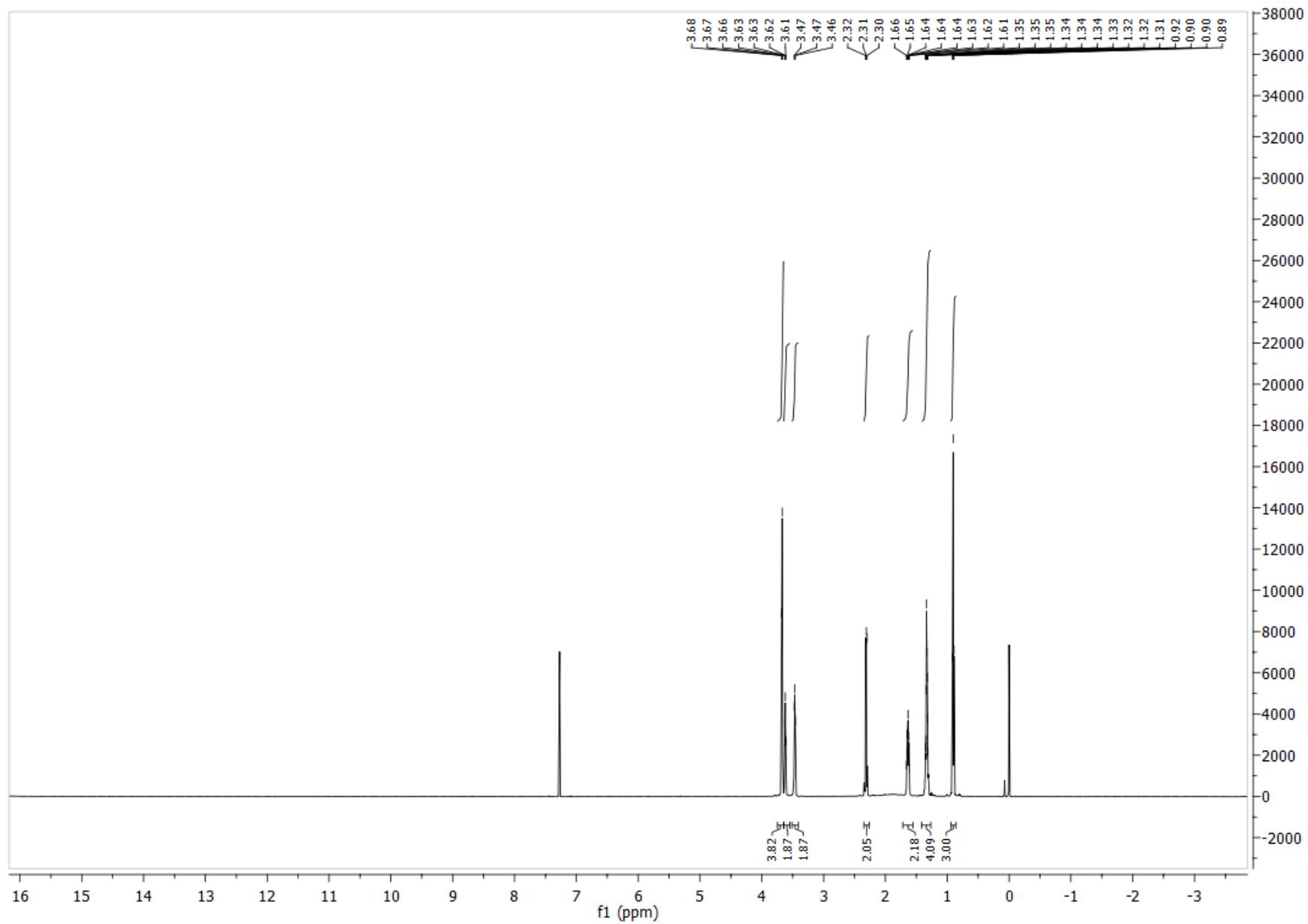


Figura S24 - Espectro (RMN de ^1H 600 MHz, CDCl_3 , 25°C) – 1-morfolinahexan-1-ona **116**.

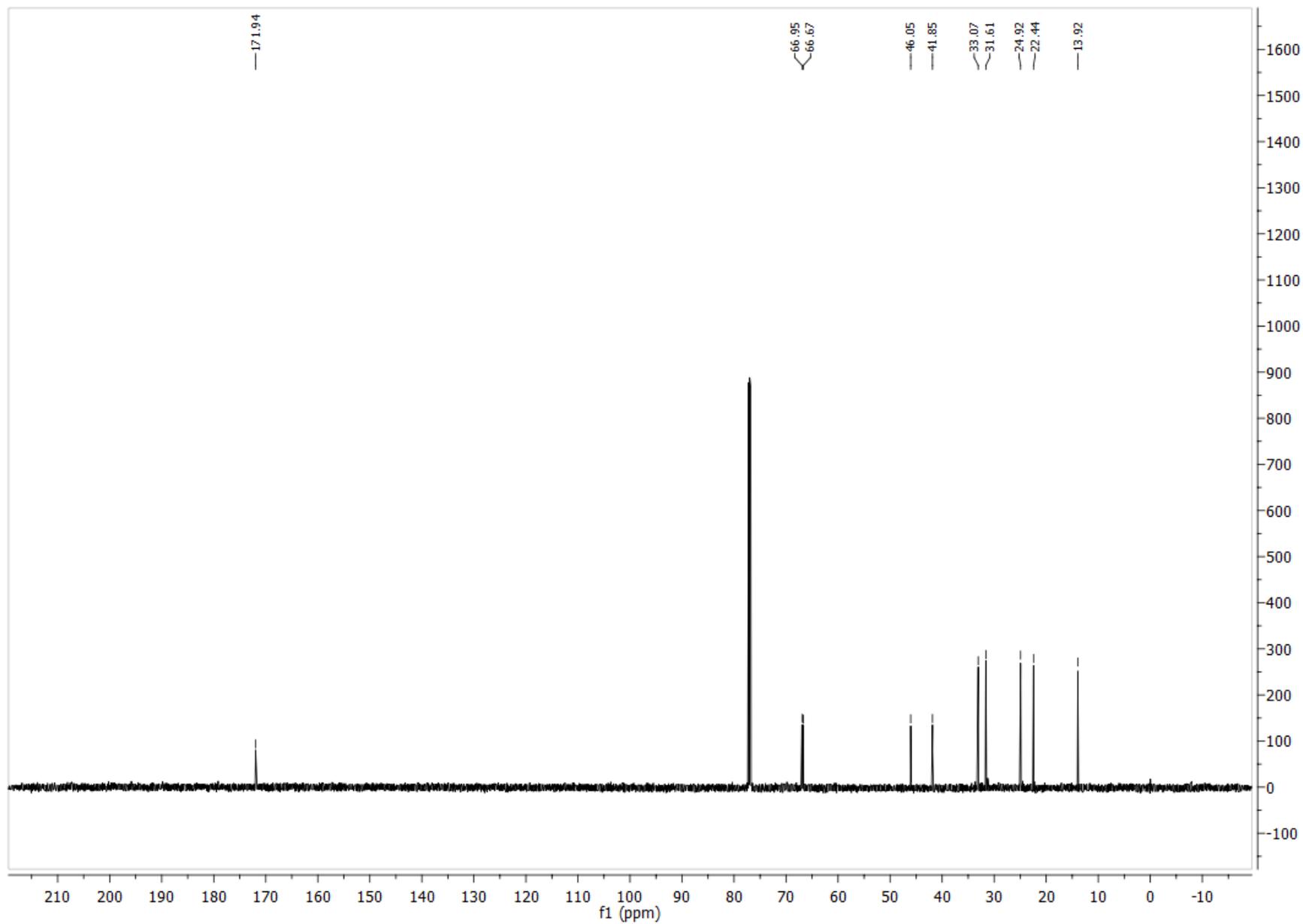


Figura S25 - Espectro (RMN de ^{13}C 151 MHz, DMSO) – 1-morfolinahexan-1-ona **116**.

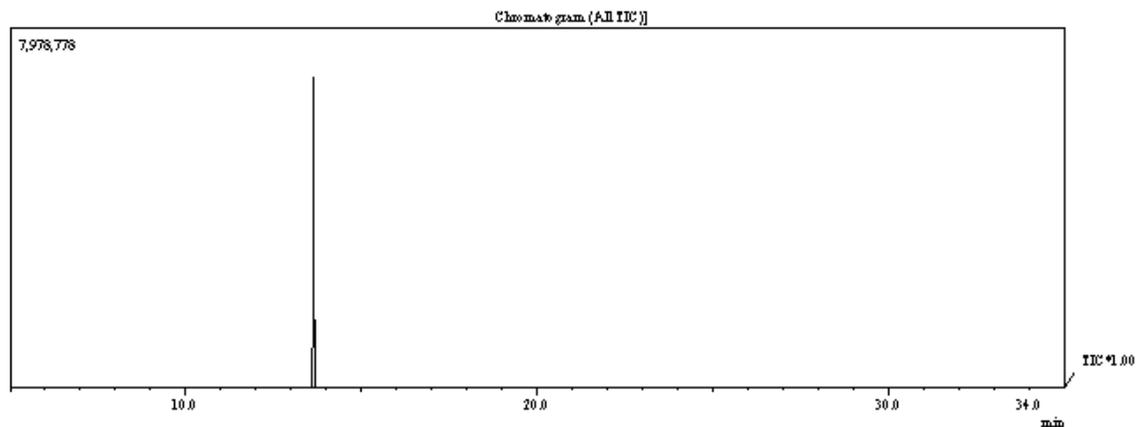


Figura S26 - Cromatograma da 1-morfolinahexan-1-ona **116**.

Line#1 R.Time:13.442(Scan#1038)
 Mass:Peak:73
 RawMode:Average:13.592-13.683(1032-1043) BasePeak:3.03(248727)
 EQ Mode:None Group:1 - Event:1

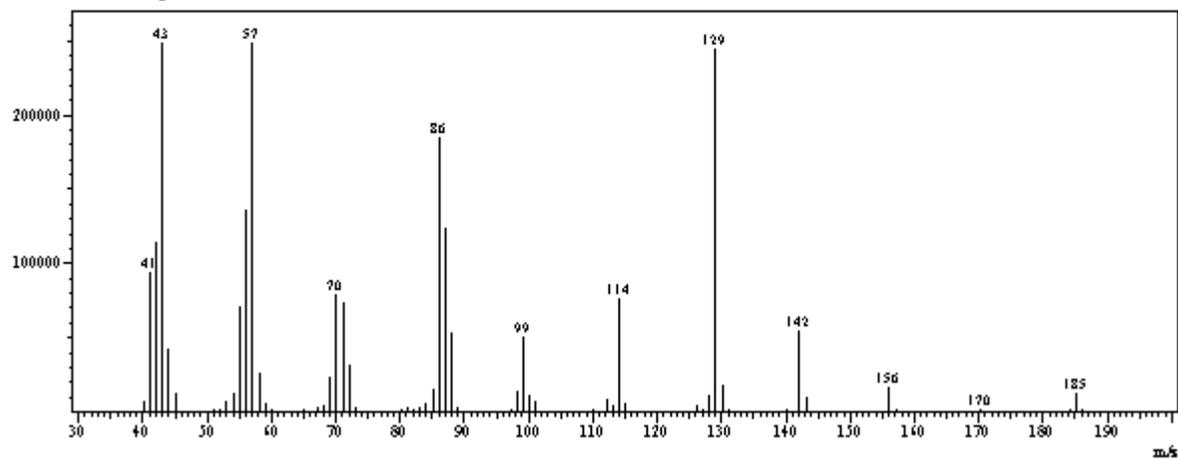


Figura S27 - Espectro (EM 70 eV m/z) – 1-morfolinahexan-1-ona **116**.

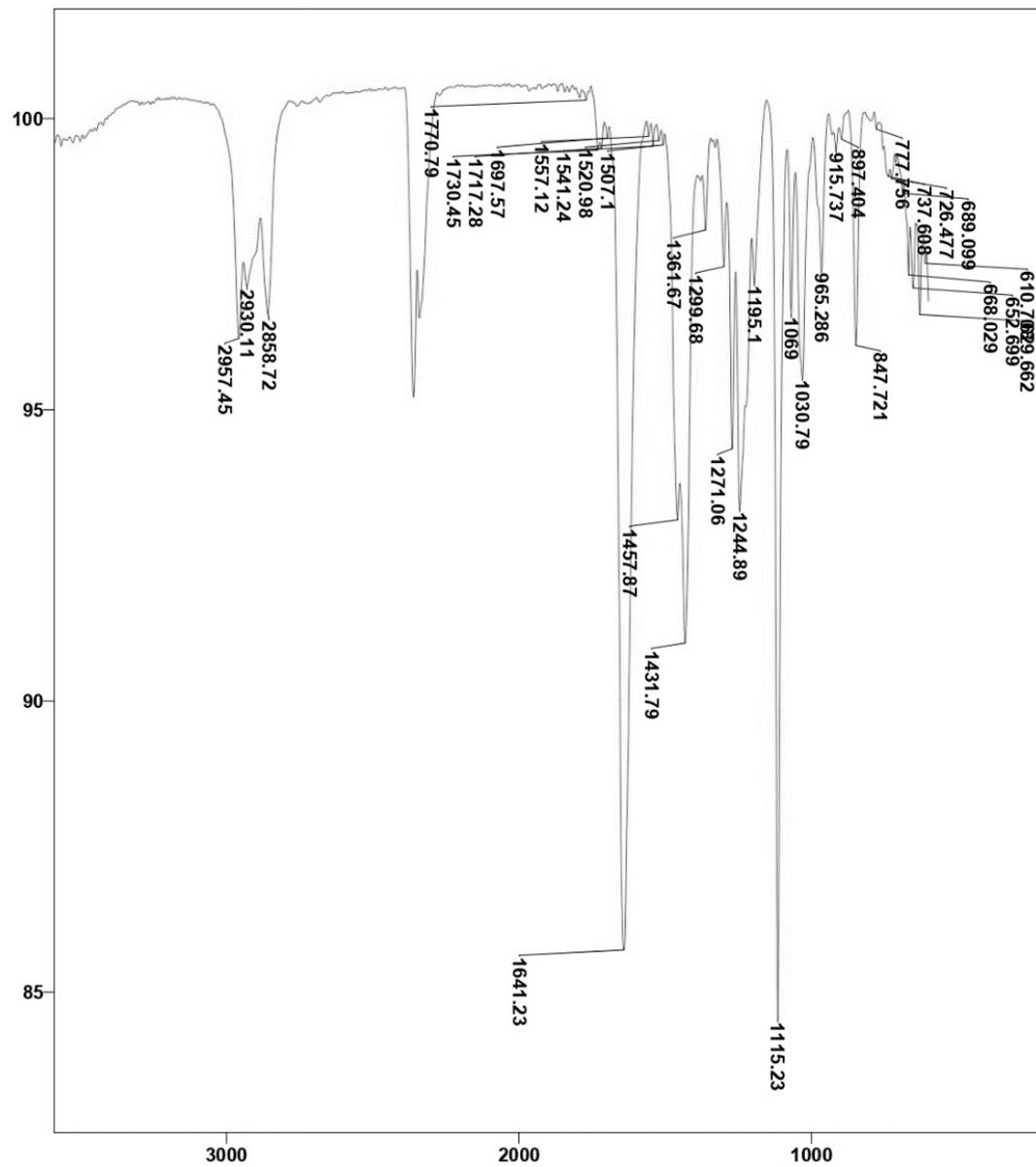


Figura S28 - Espectro de Infravermelho (ATR) – 1-morfolinahexan-1-ona **116**.

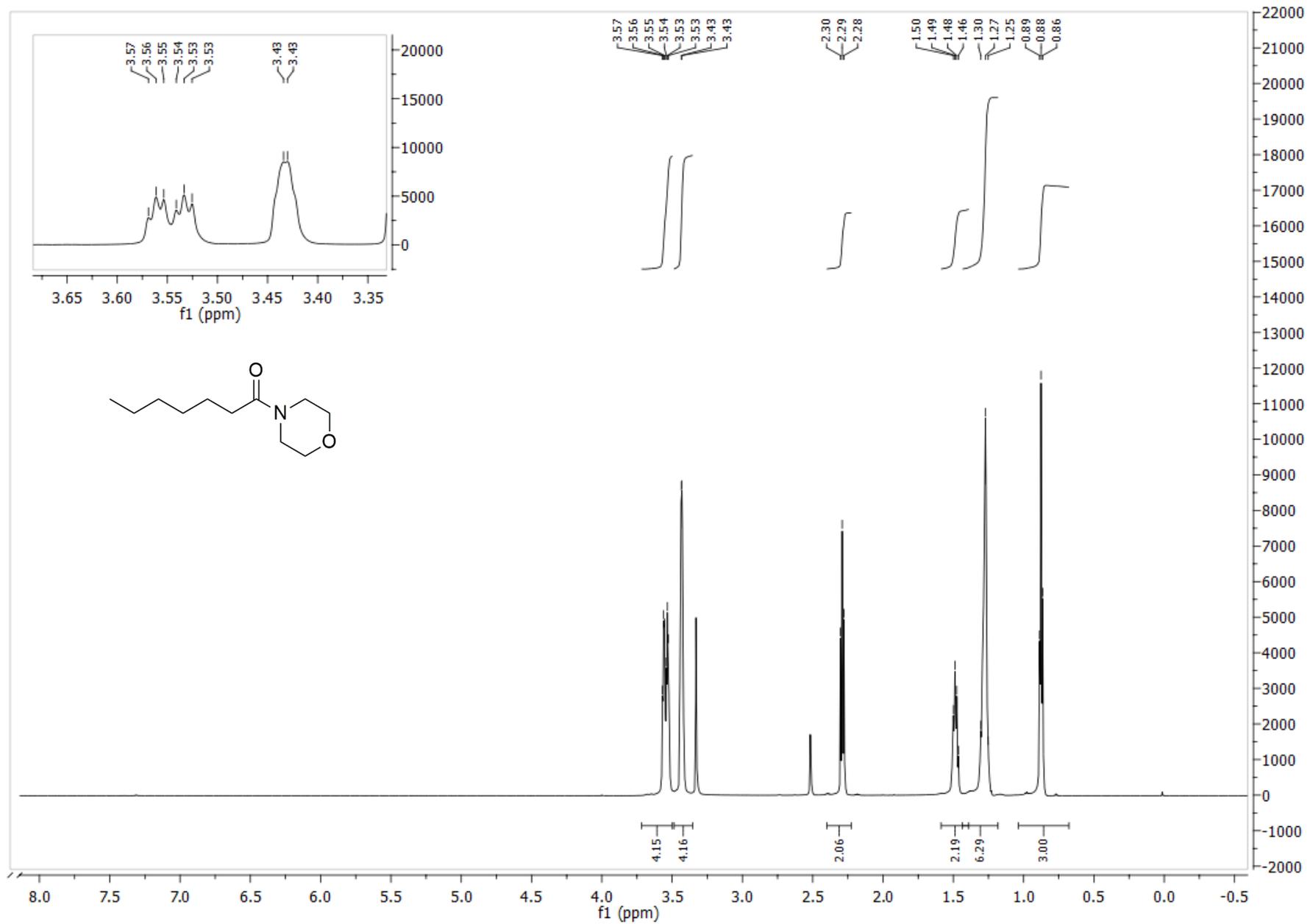


Figura S29 - Espectro (RMN de ^1H 600 MHz, DMSO , 25°C) – 1-morfolinaheptan-1-ona **126**.

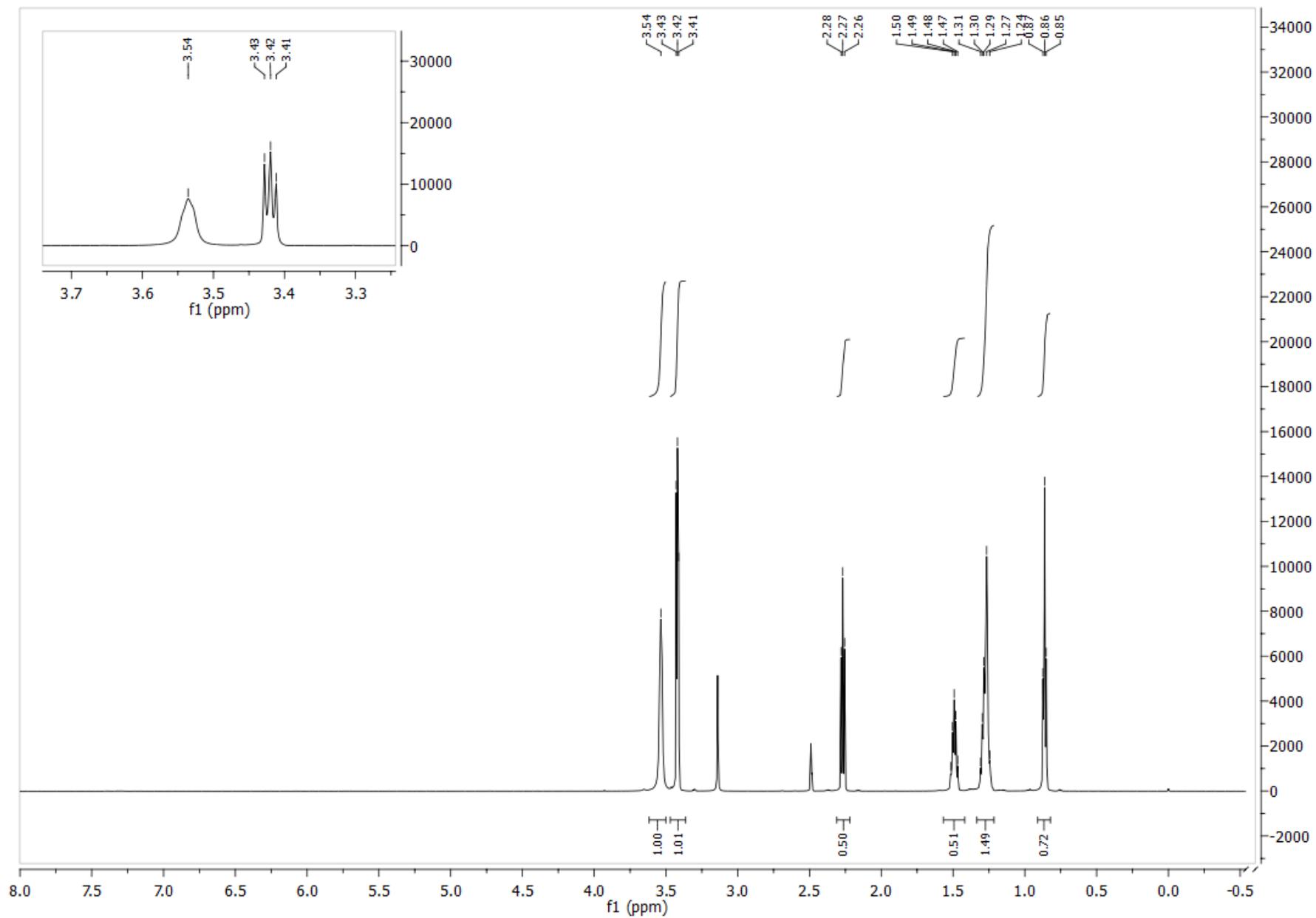


Figura S30 - Espectro (RMN de ^1H 600 MHz, DMSO, 60°C) – 1-morfolinaheptan-1-ona **126**.

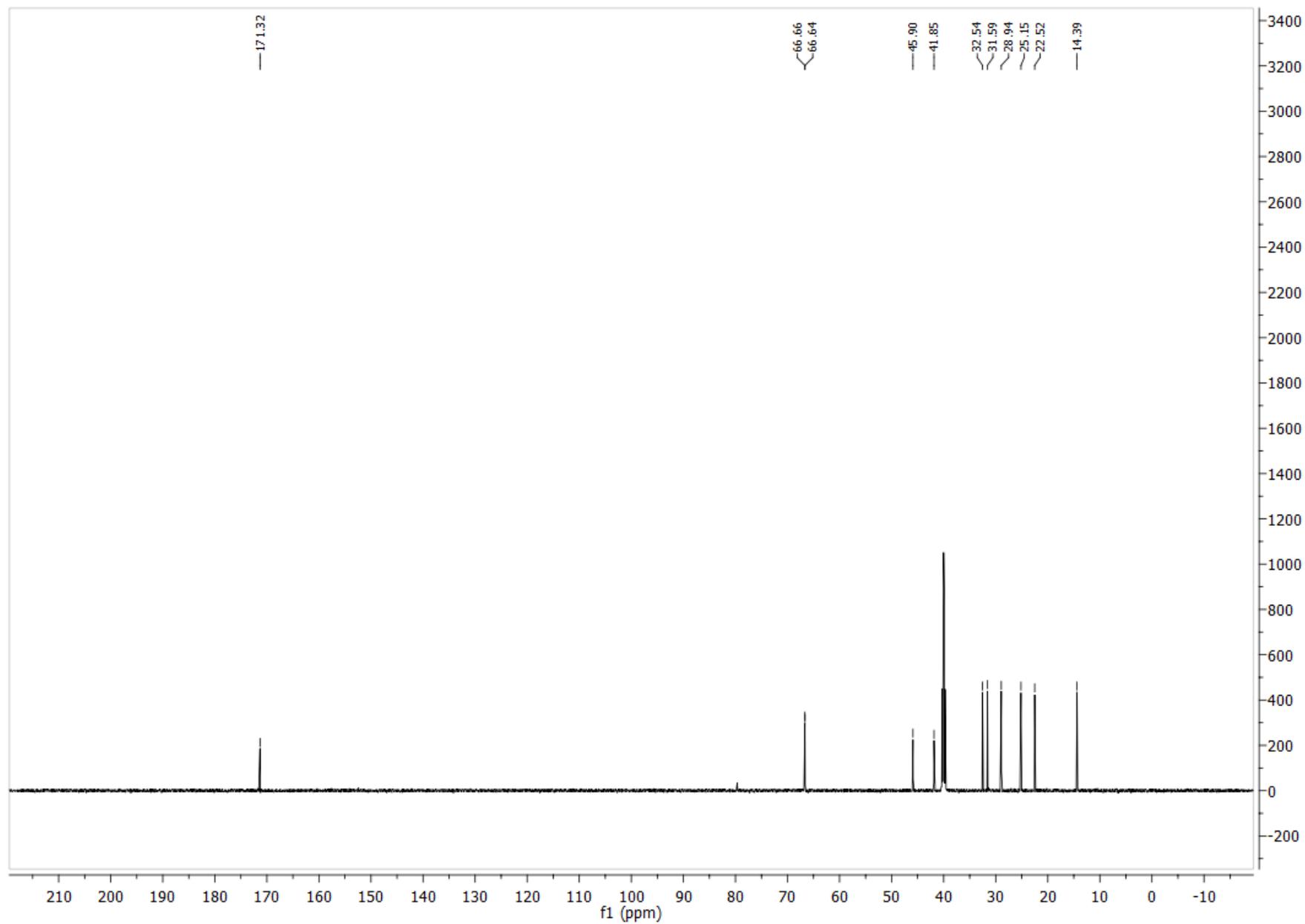


Figura S31 - Espectro (RMN de ¹³C 151 MHz, DMSO) – 1-morfolinaheptan-1-ona **126**.

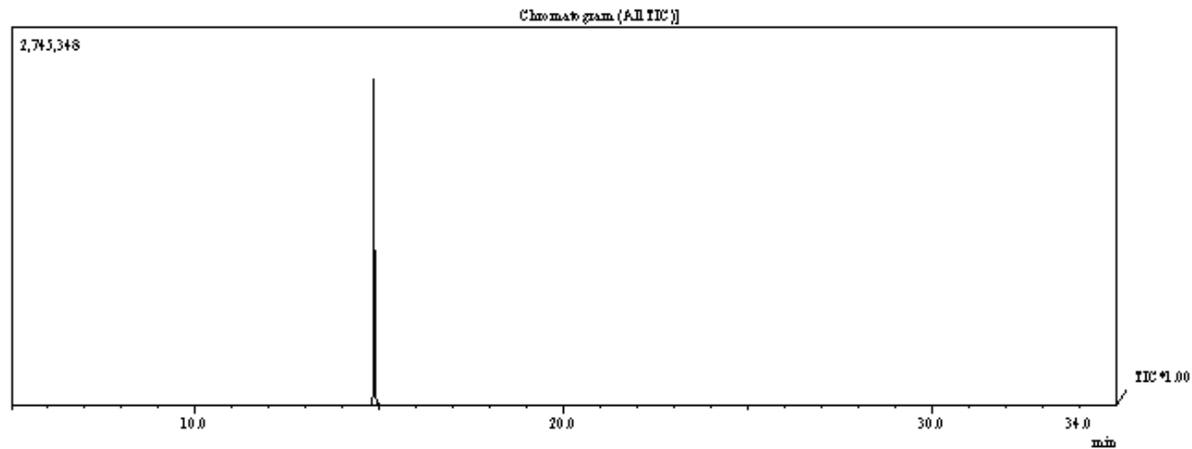


Figura S32 - Cromatograma da 1-morfolinaheptan-1-ona 126.

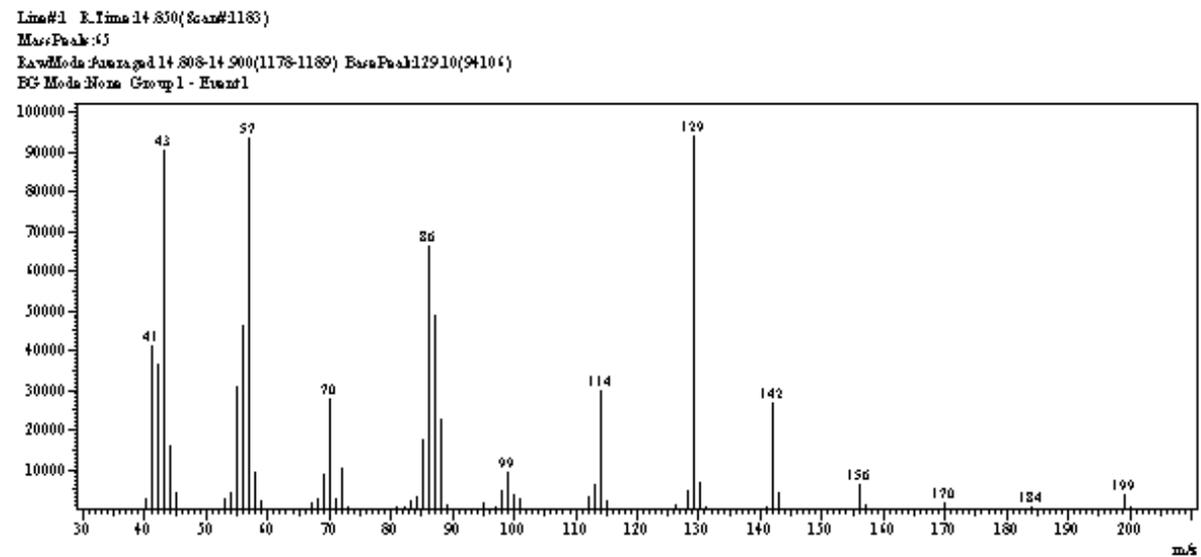


Figura S33 - Espectro (EM 70 eV m/z) – 1-morfolinaheptan-1-ona 126.

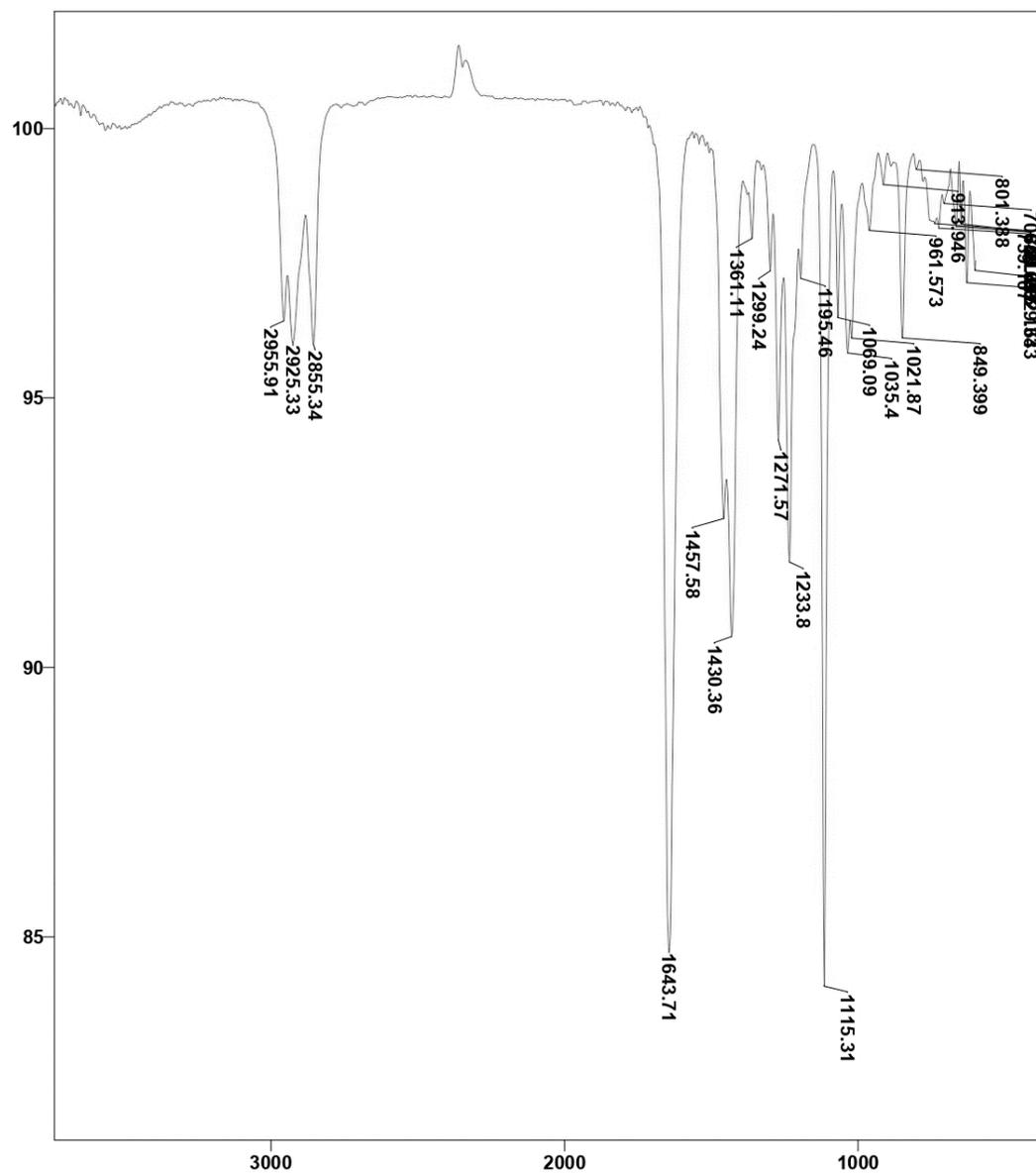


Figura S34 - Espectro de Infravermelho (ATR) – 1-morfolinaheptan-1-ona **126**.

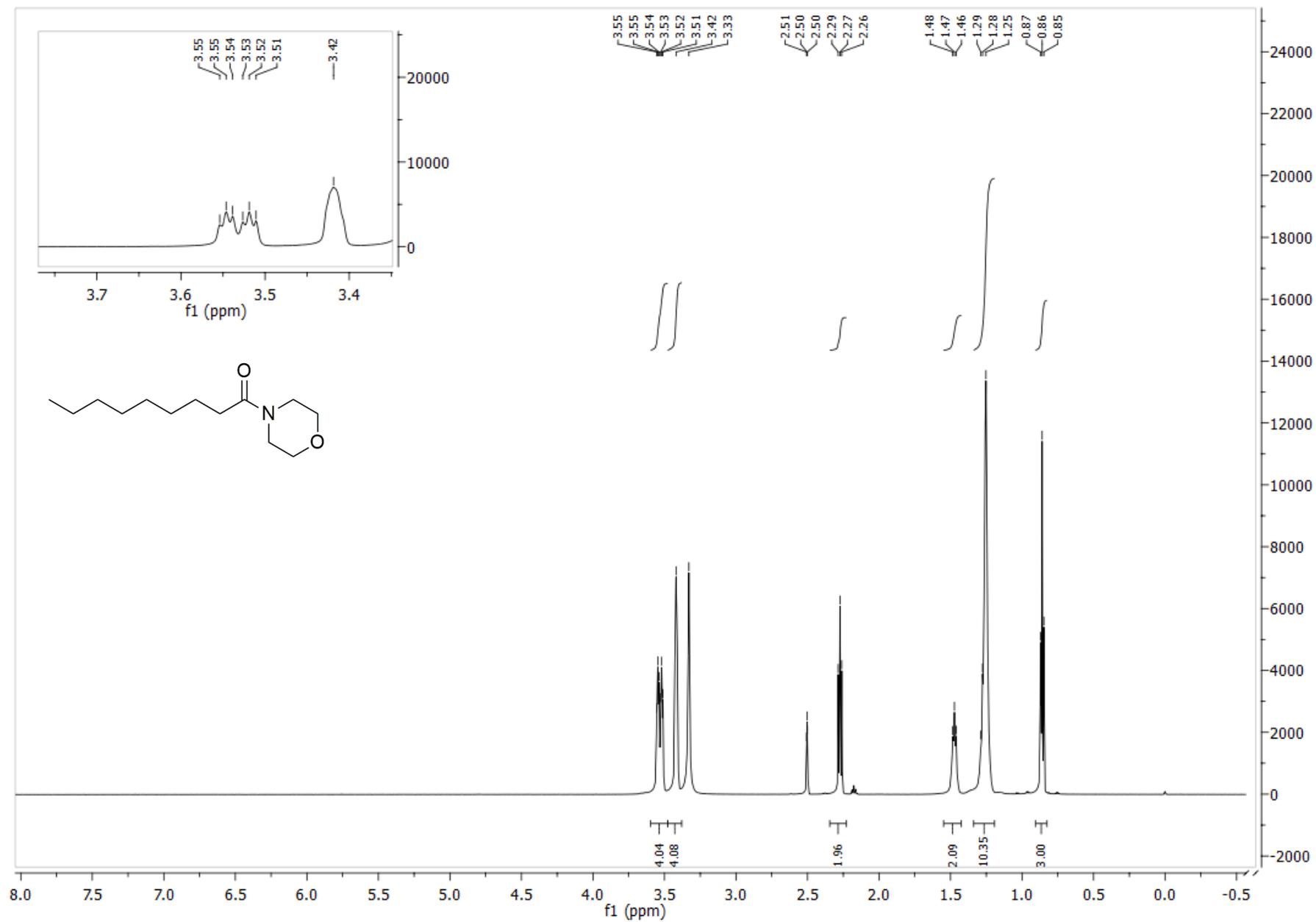


Figura S35 - Espectro (RMN de ^1H 600 MHz, DMSO, 25°C) – 1-morfolinanonan-1-ona **119**.

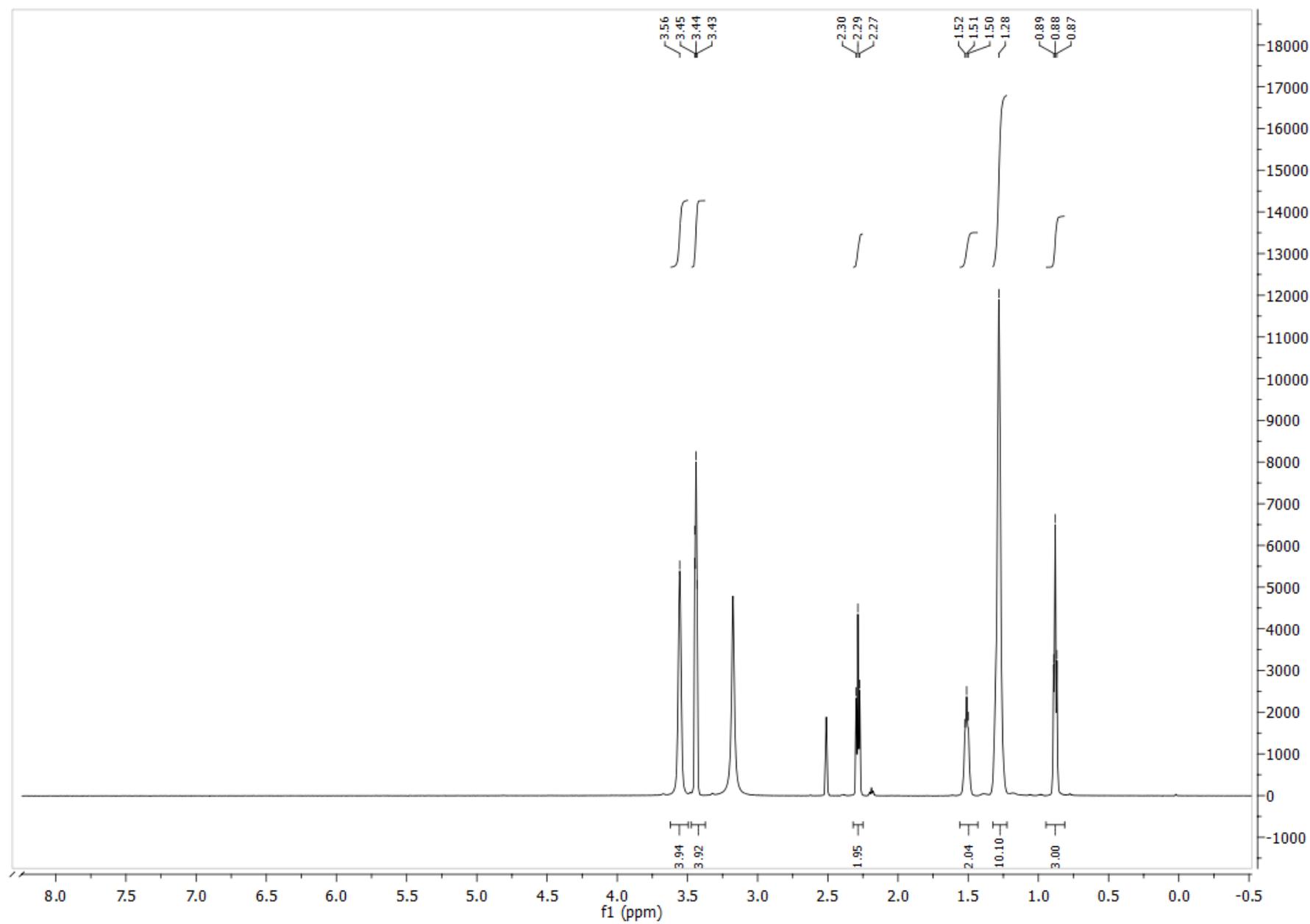


Figura S36 - Espectro (RMN de ¹H 600 MHz, DMSO, 60°C) – 1-morfolinanonan-1-ona **119**.

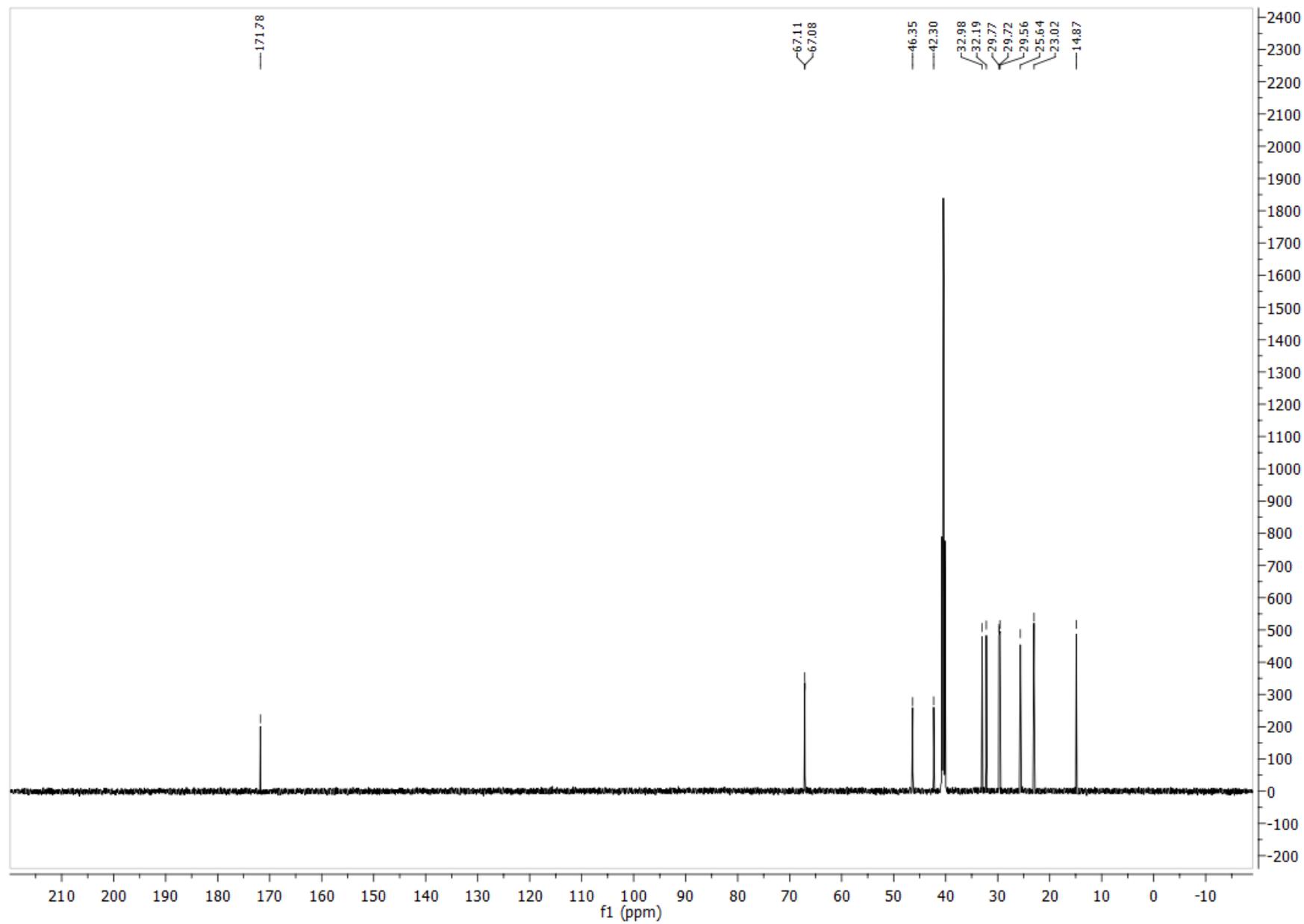


Figura S37 - Espectro (RMN de ^{13}C 151 MHz, DMSO) – 1-morfolinanonan-1-ona **119**.

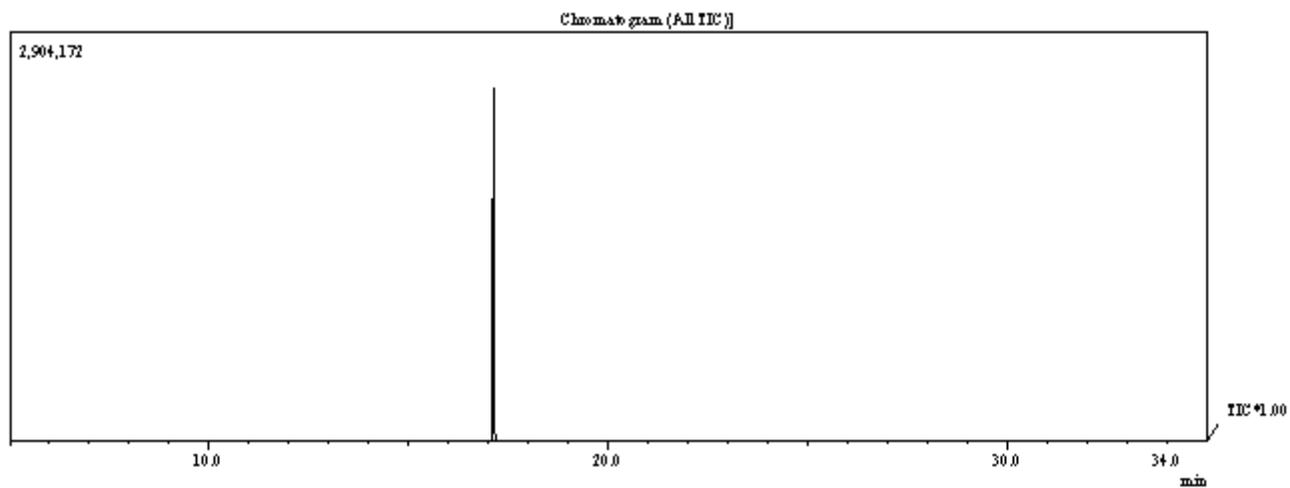


Figura S38 - Cromatograma da 1-morfolinanonan-1-ona **119**.

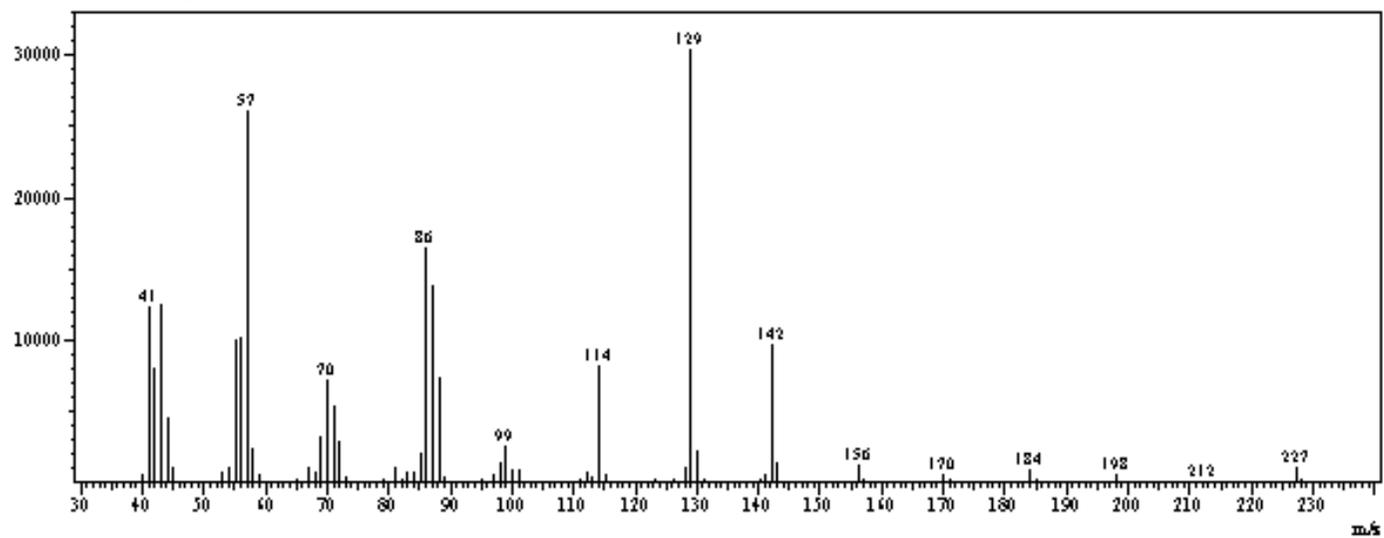


Figura S39 - Espectro (EM 70 eV m/z) – 1-morfolinanonan-1-ona **107**.

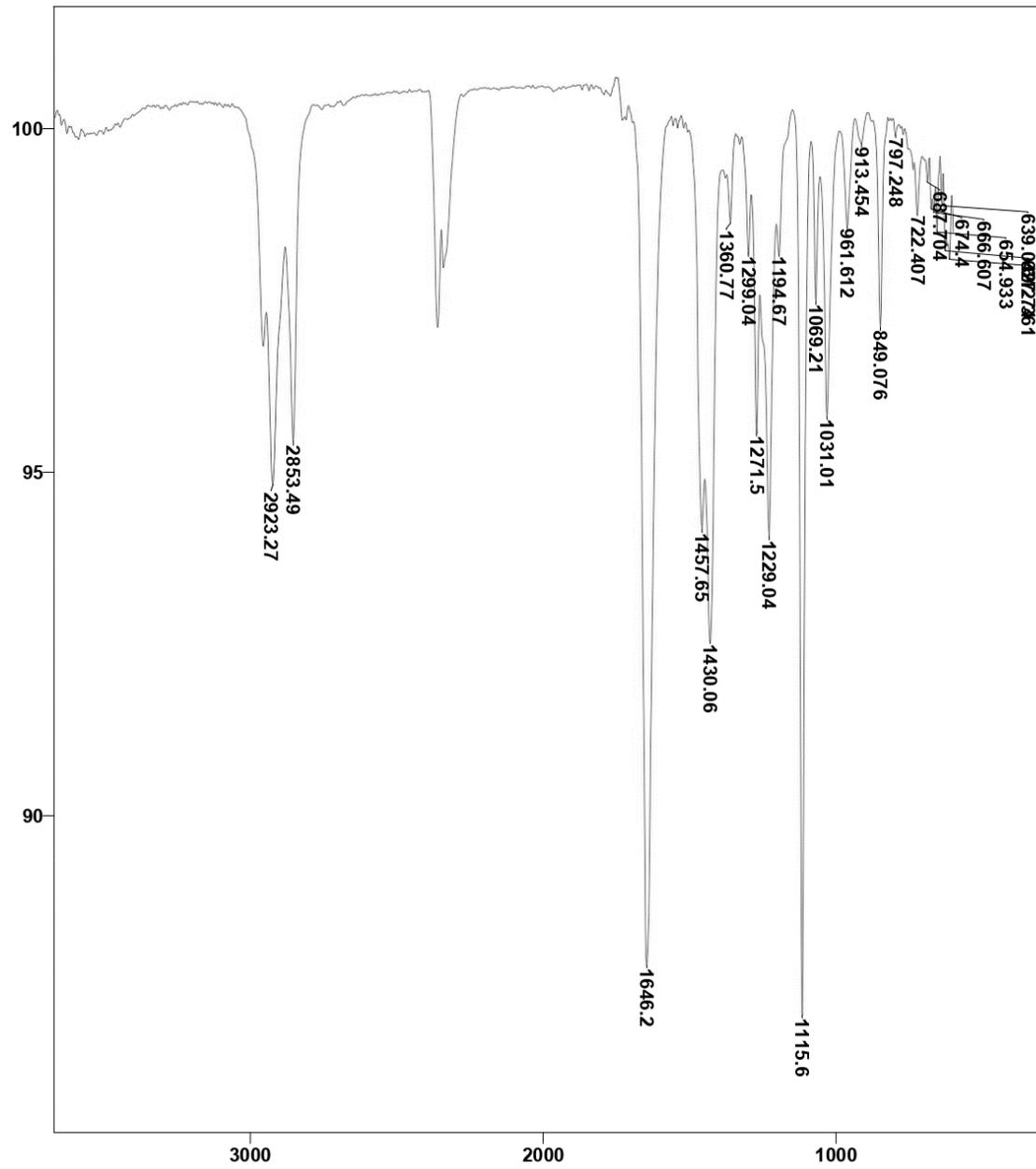


Figura S40 - Espectro de Infravermelho (ATR) – 1-morfolinanonan-1-ona **119**.

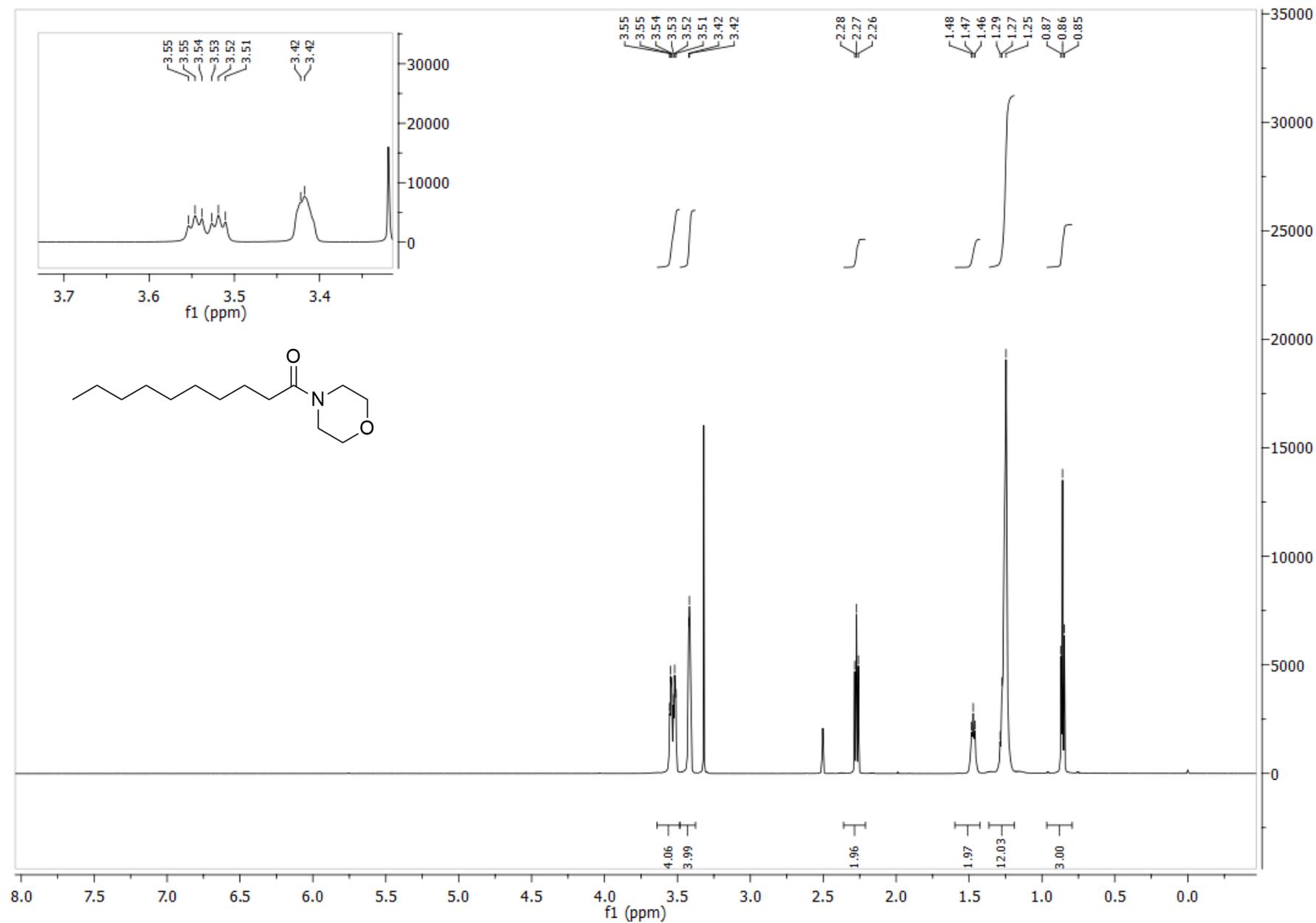


Figura S41 - Espectro (RMN de ¹H 600 MHz, DMSO, 25°C) – 1-morfolinadecan-1-ona **127**.

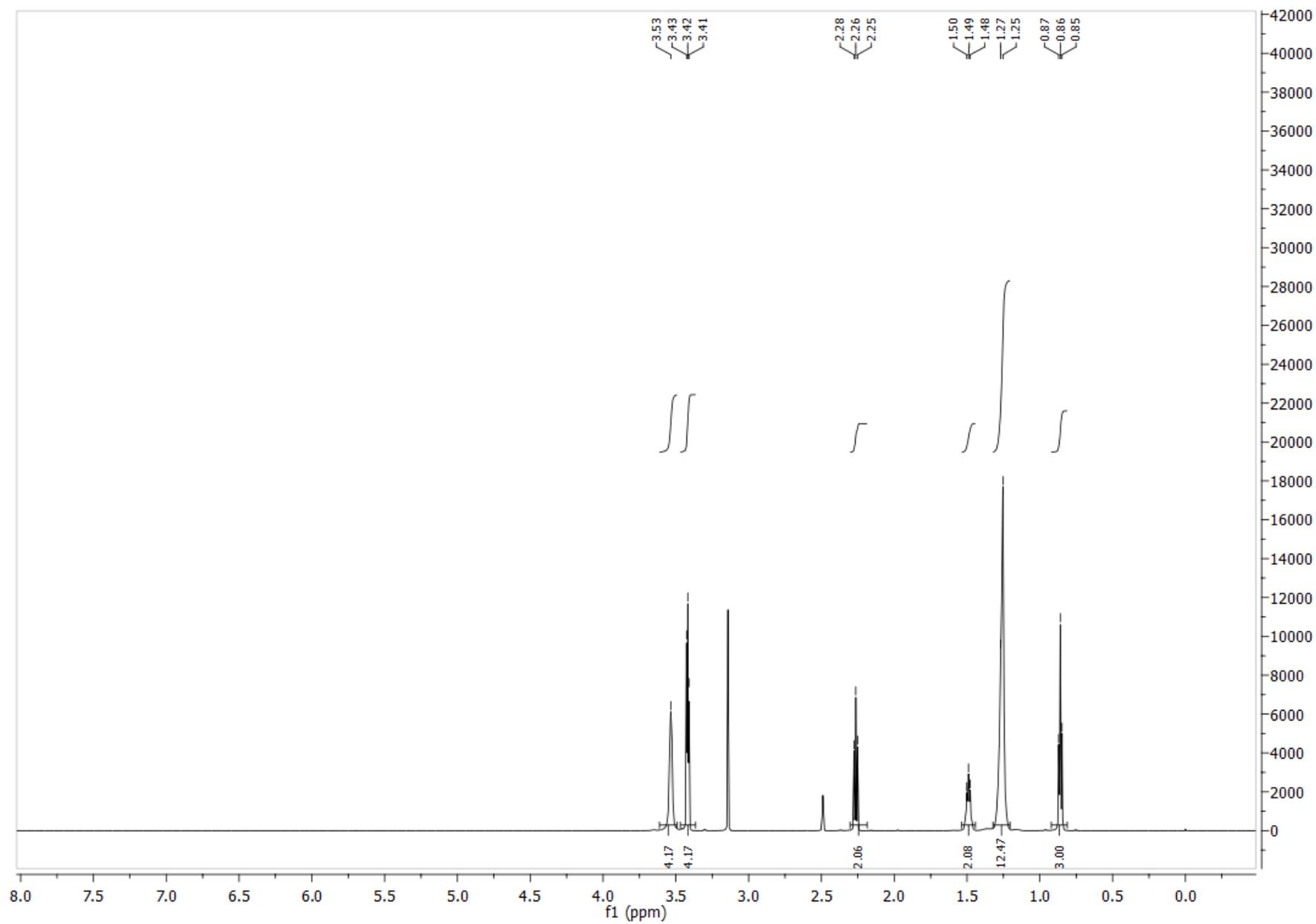


Figura S42 -Espectro (RMN de ^1H 600 MHz, DMSO, 60°C) – 1-morfolinadecan-1-ona **127**.

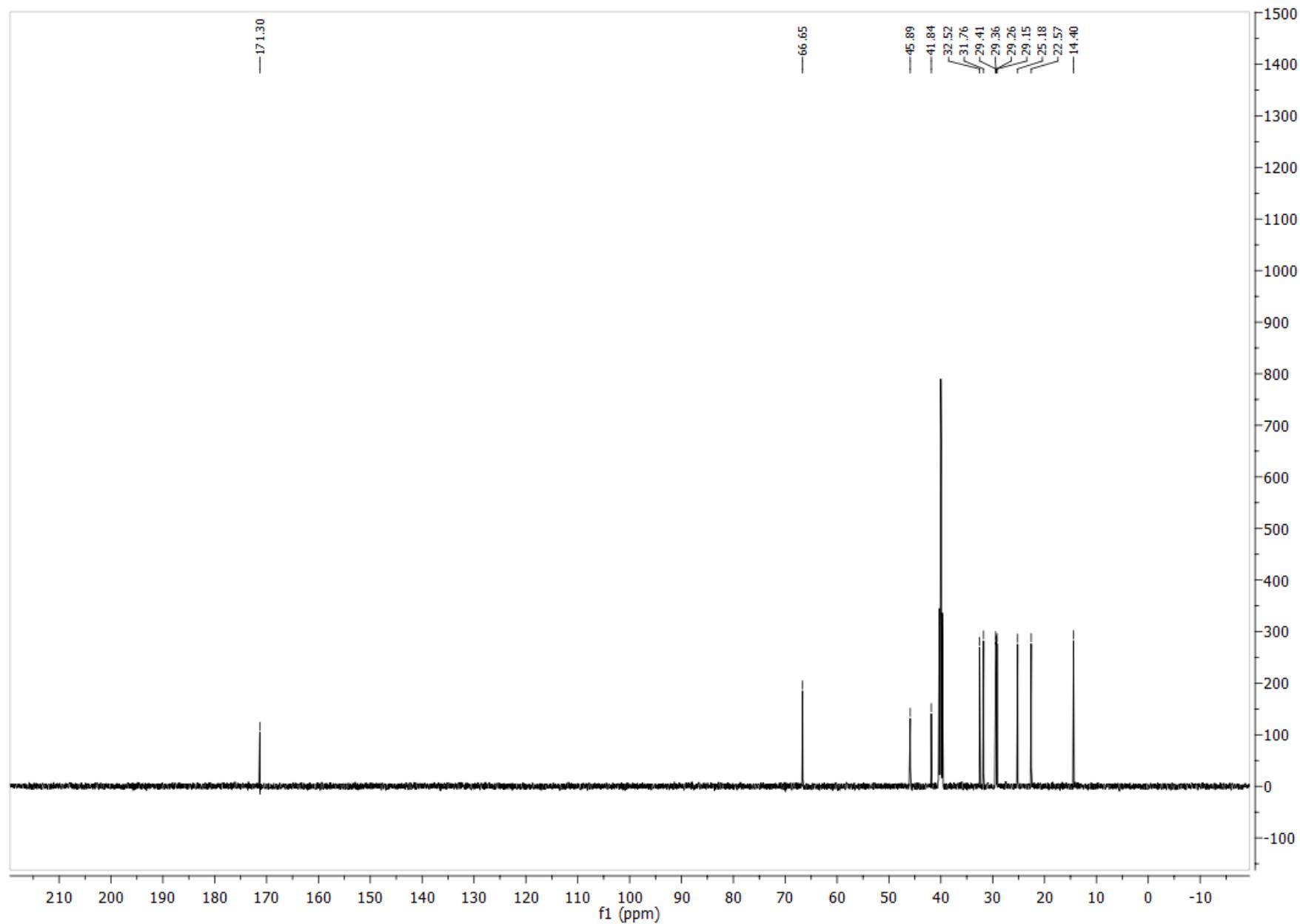


Figura S43 - Espectro (RMN de ^{13}C 151 MHz, DMSO) – 1-morfolinadecan-1-ona **127**

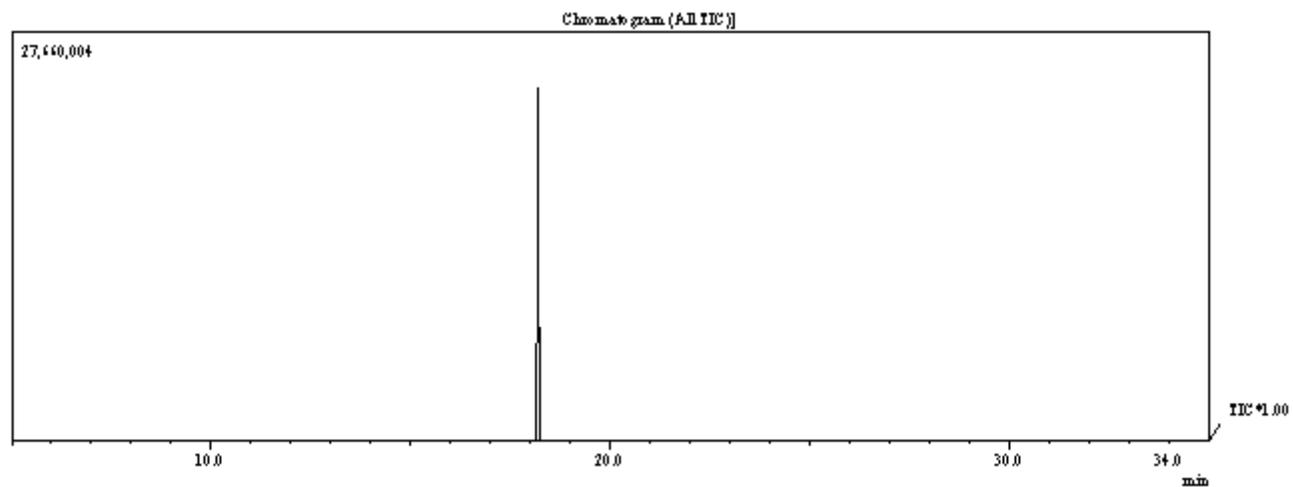


Figura S44 - Cromatograma da 1-morfolidecan-1-ona 127.

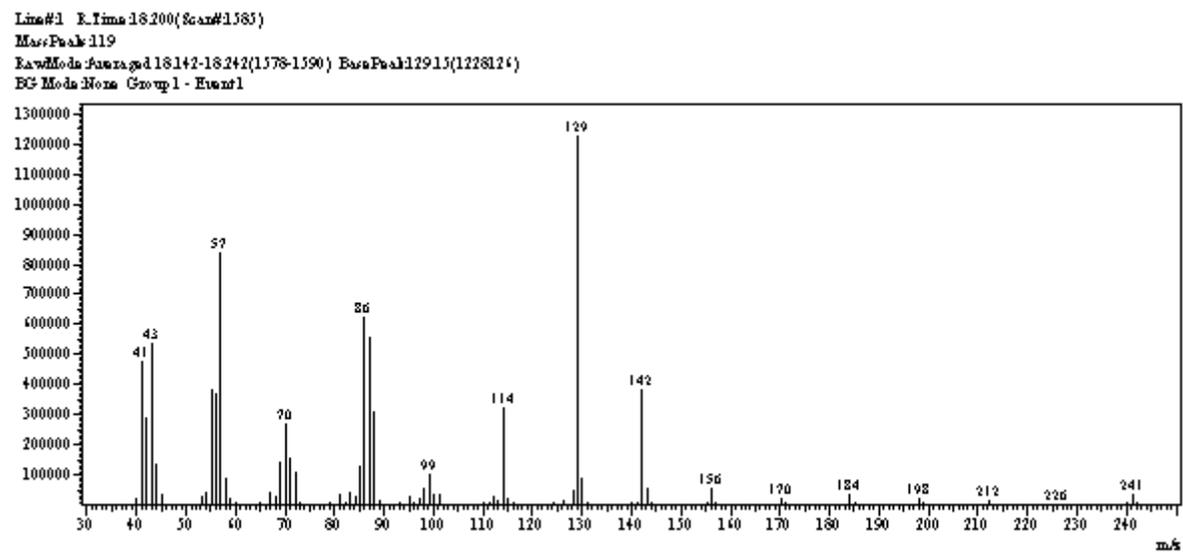


Figura S45 - Espectro (EM 70 eV m/z) – 1-morfolidecan-1-ona 127.

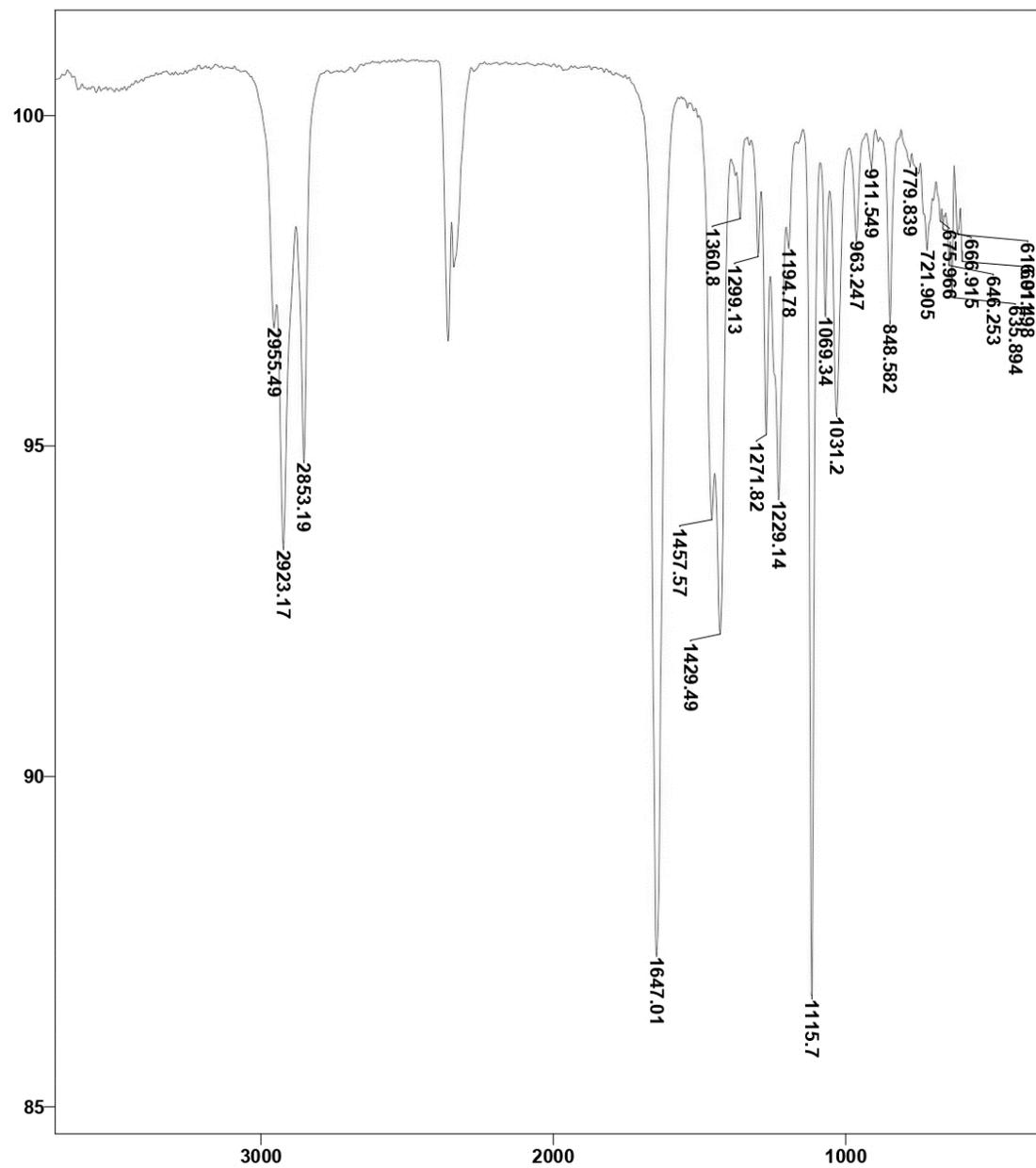


Figura S46 - Espectro de Infravermelho (ATR) – 1-morfolidecan-1-ona **127**.

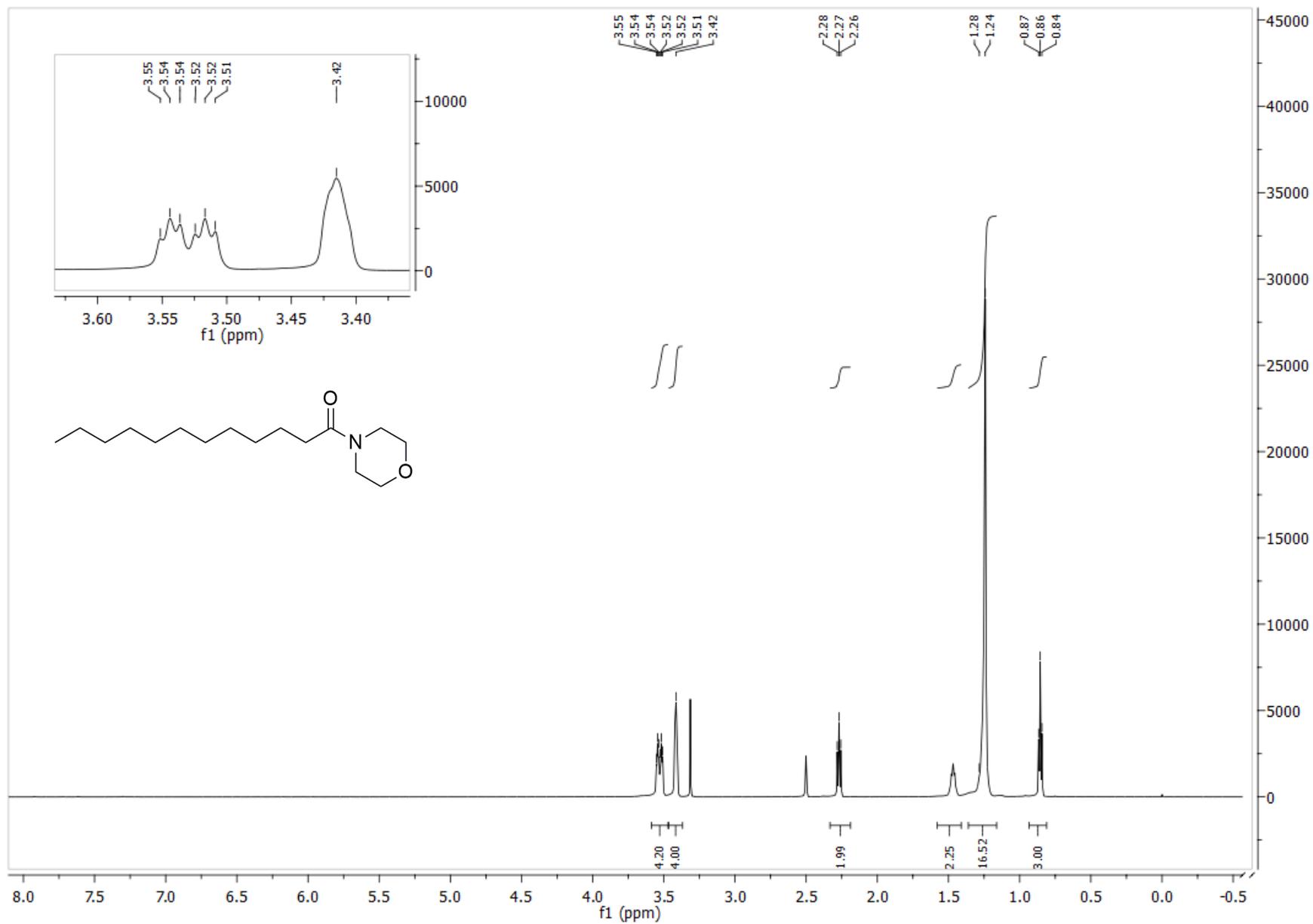


Figura S47 - Espectro (RMN de ¹H 600 MHz, DMSO, 25°C) – 1-morfolinadodecan-1-ona **128**.

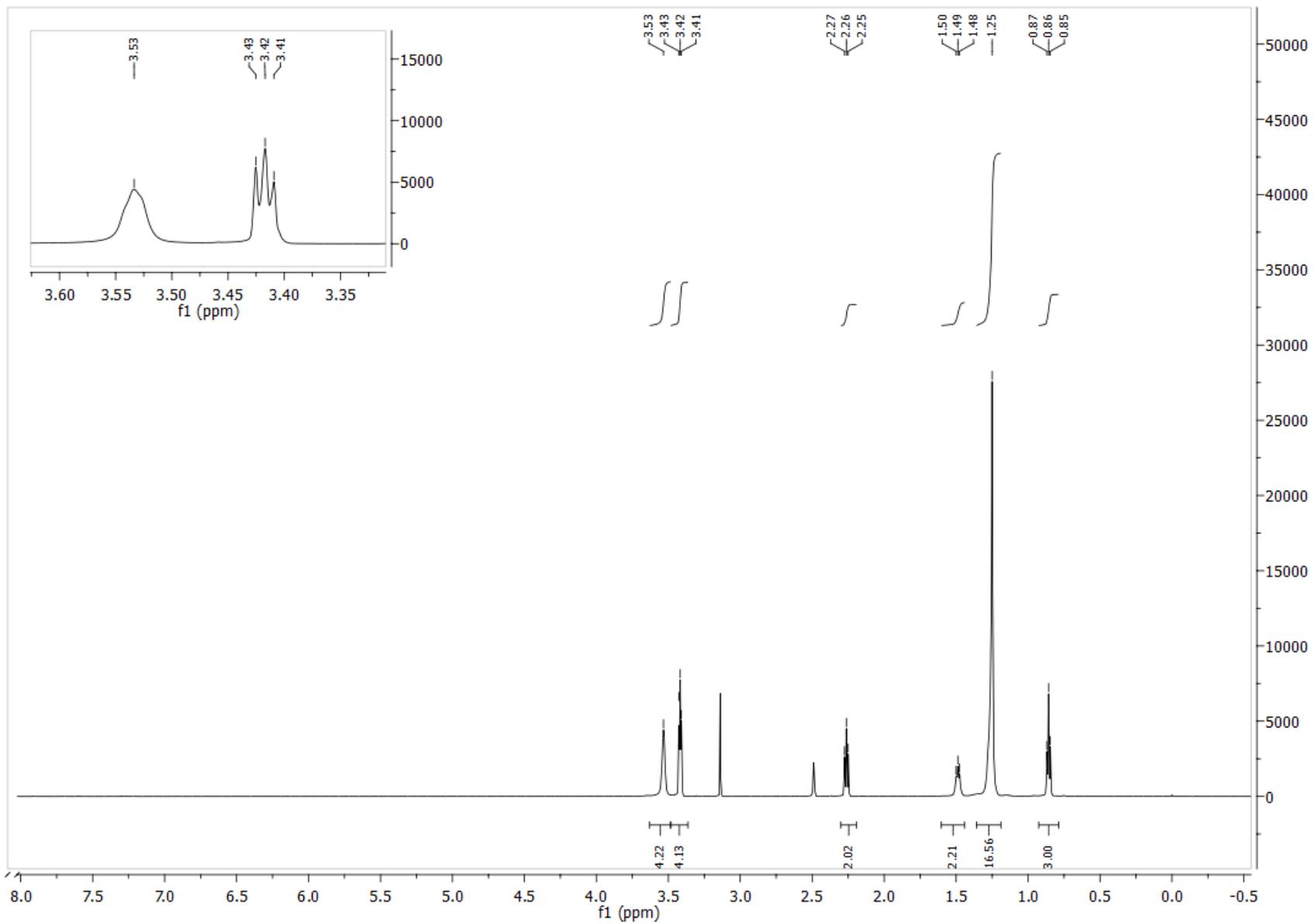


Figura S48 - Espectro (RMN de ^1H 600 MHz, DMSO, 60°C) – 1-morfolinadodecan-1-ona **128**.

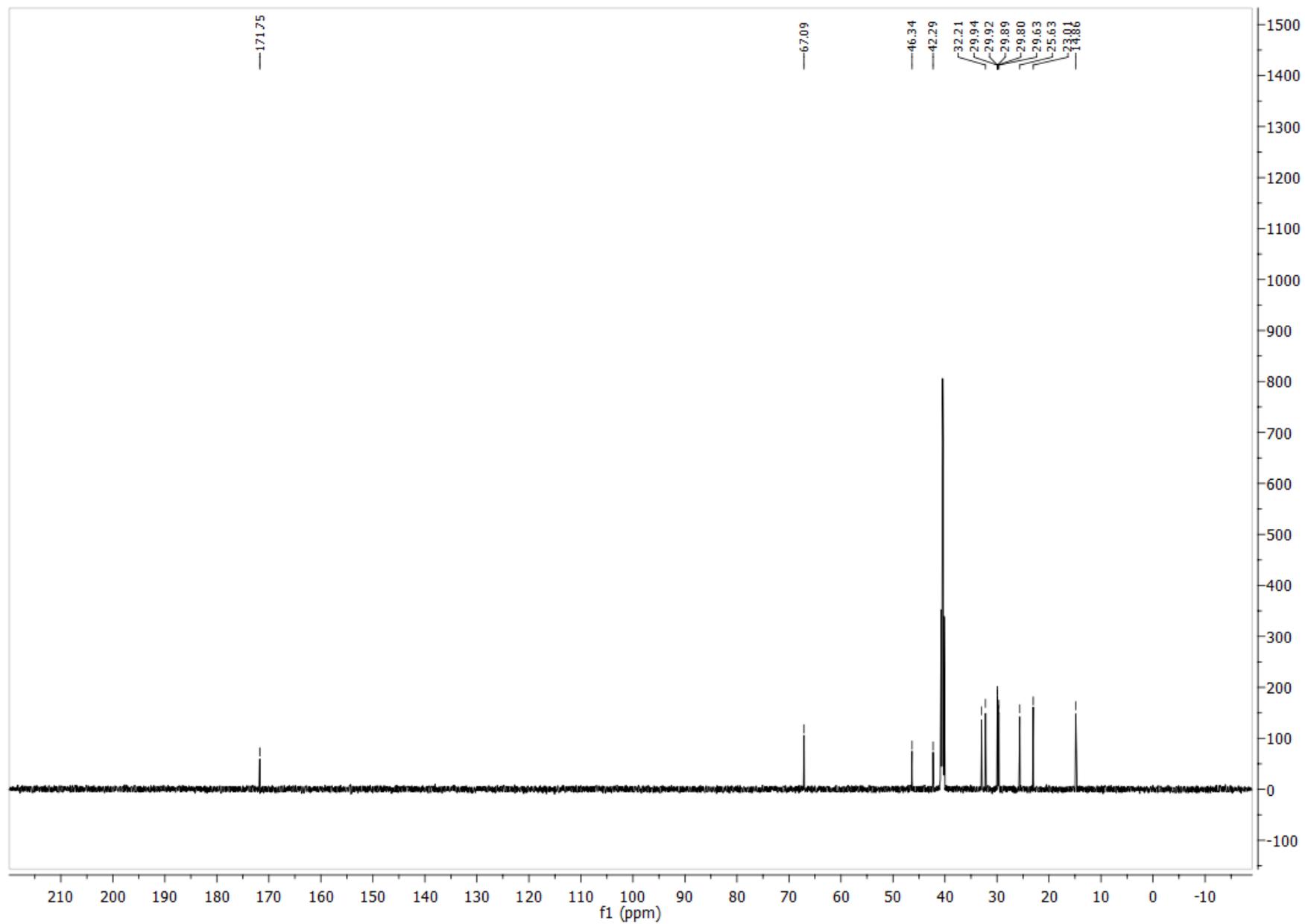


Figura S49 - Espectro (RMN de ^{13}C 151 MHz, DMSO, 60°C) – 1-morfolinadecan-1-ona **128**.

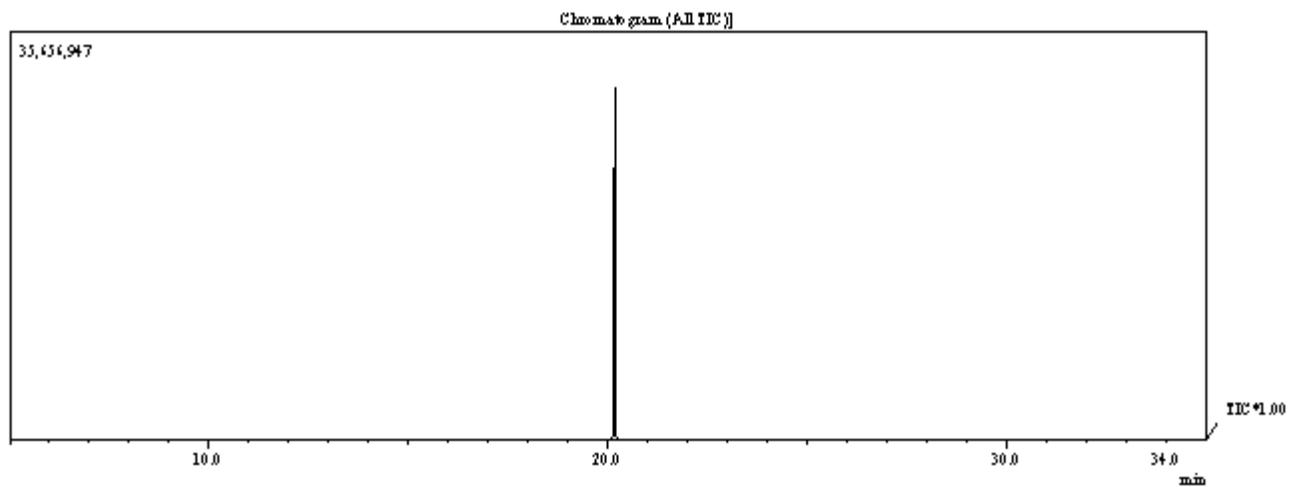


Figura S50 - Cromatograma da 1-morfolinadodecan-1-ona **128**.

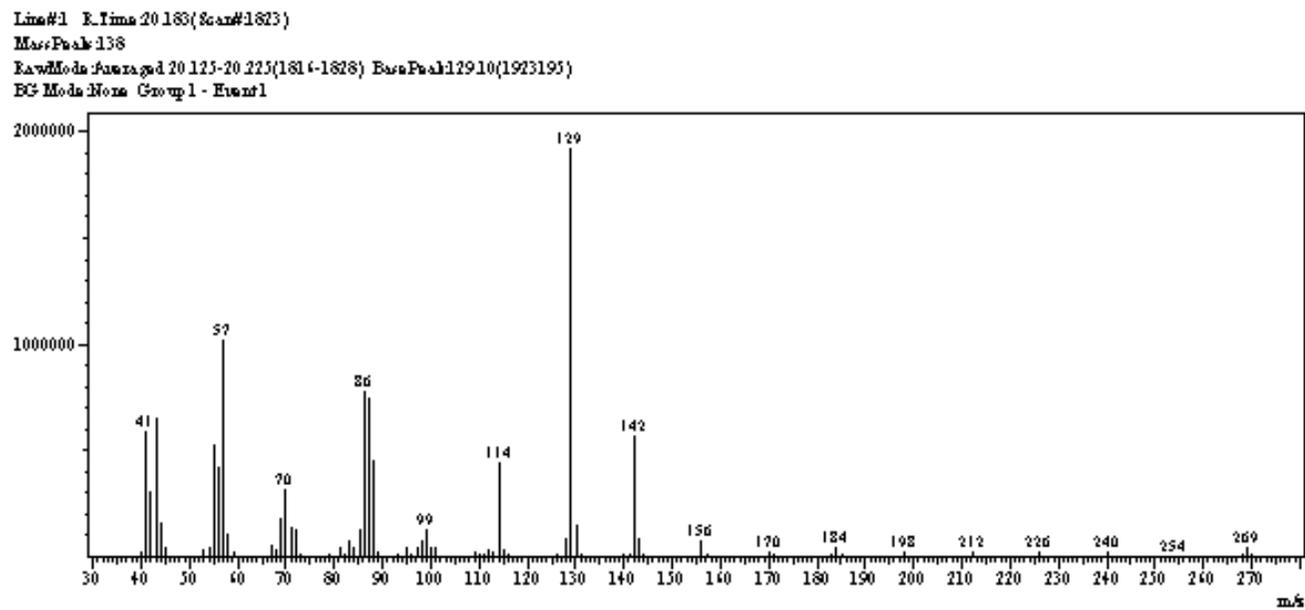


Figura S51 - Espectro (EM 70 eV m/z) – 1-morfolinadodecan-1-ona **128**.

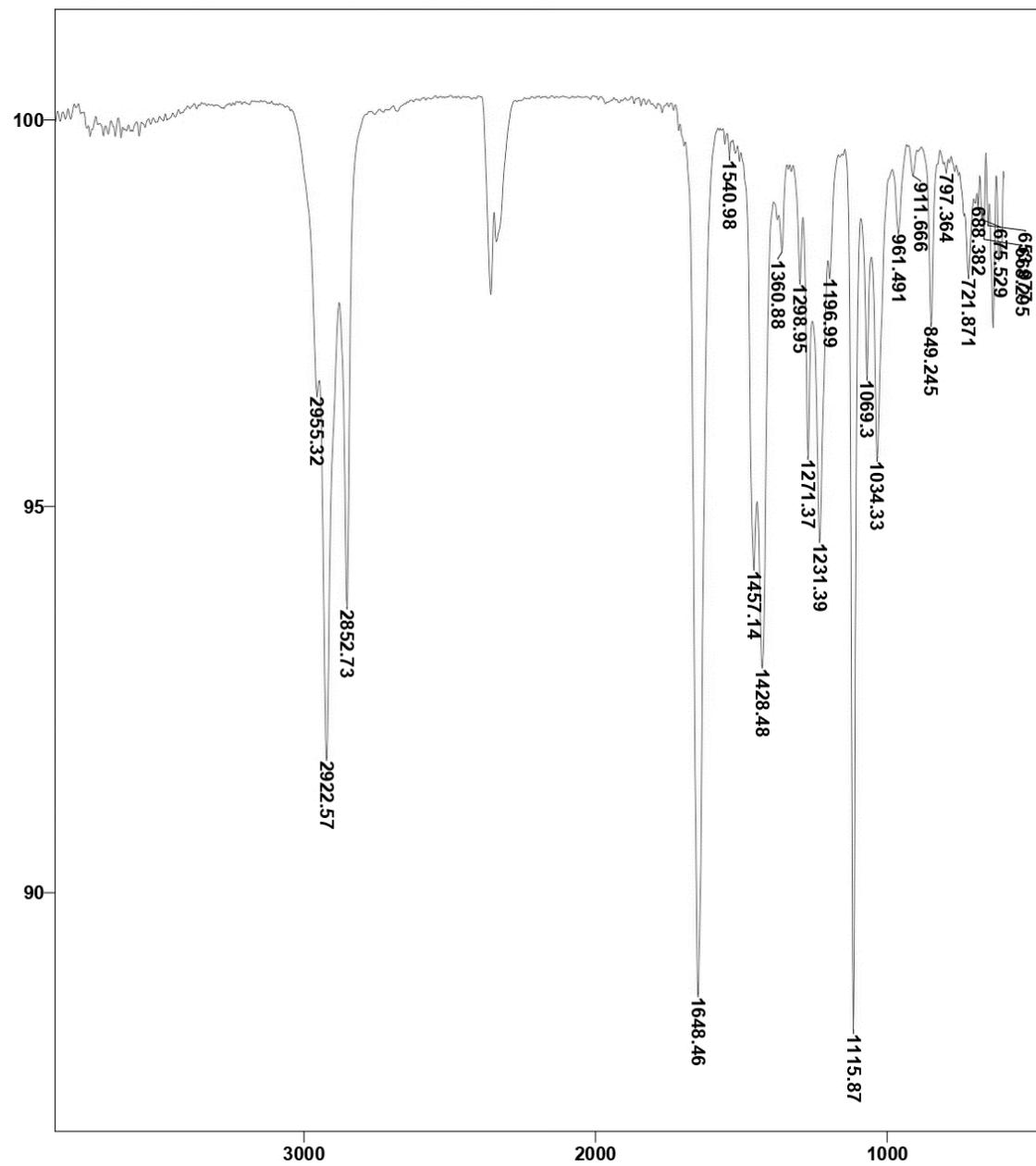


Figura S52 - Espectro de Infravermelho (ATR) – 1-morfolinadodecan-1-ona **128**.

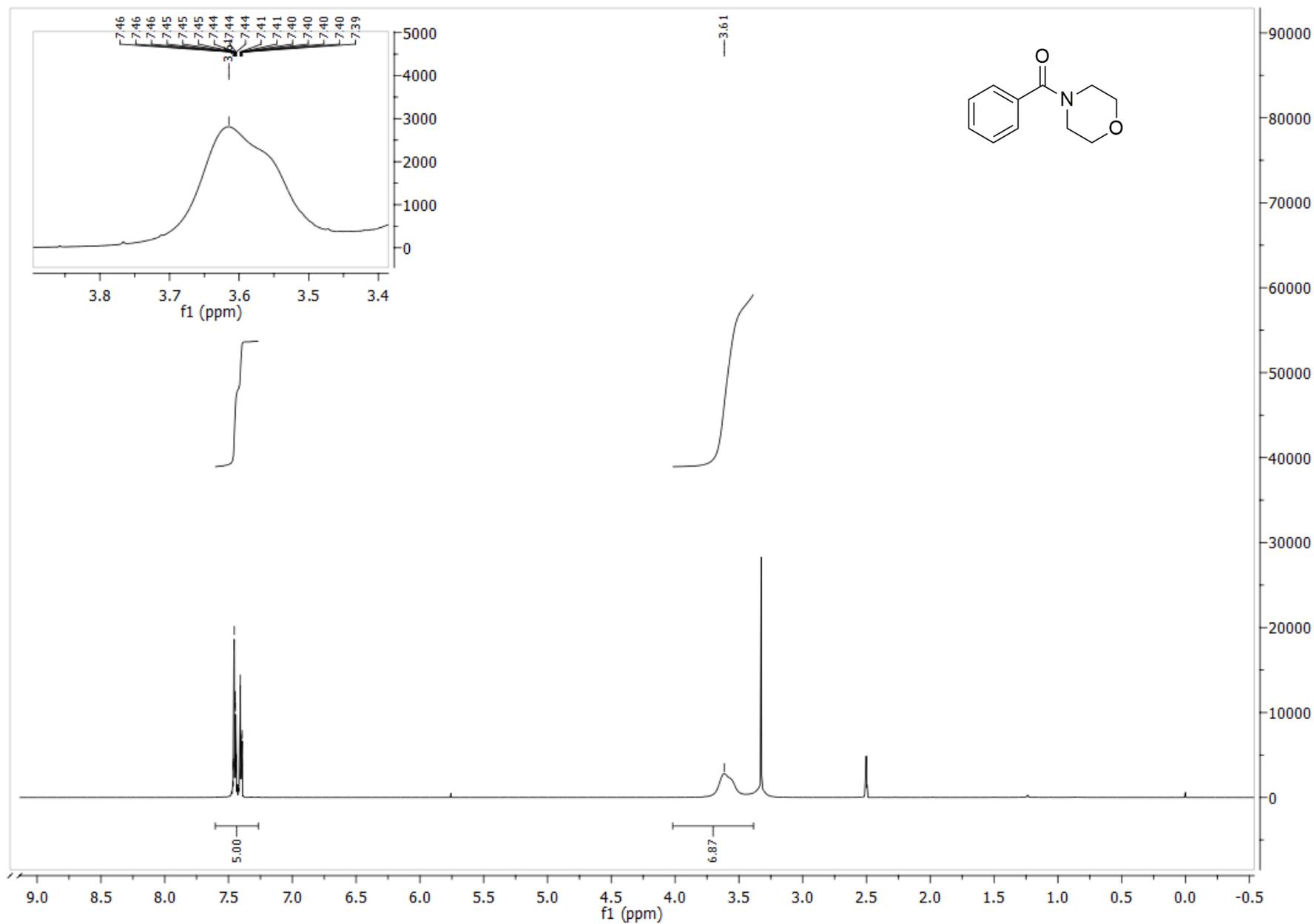


Figura S53 - Espectro (RMN de ^1H 600 MHz, DMSO , 25°C) – morfolinafenilmetanona **129**.

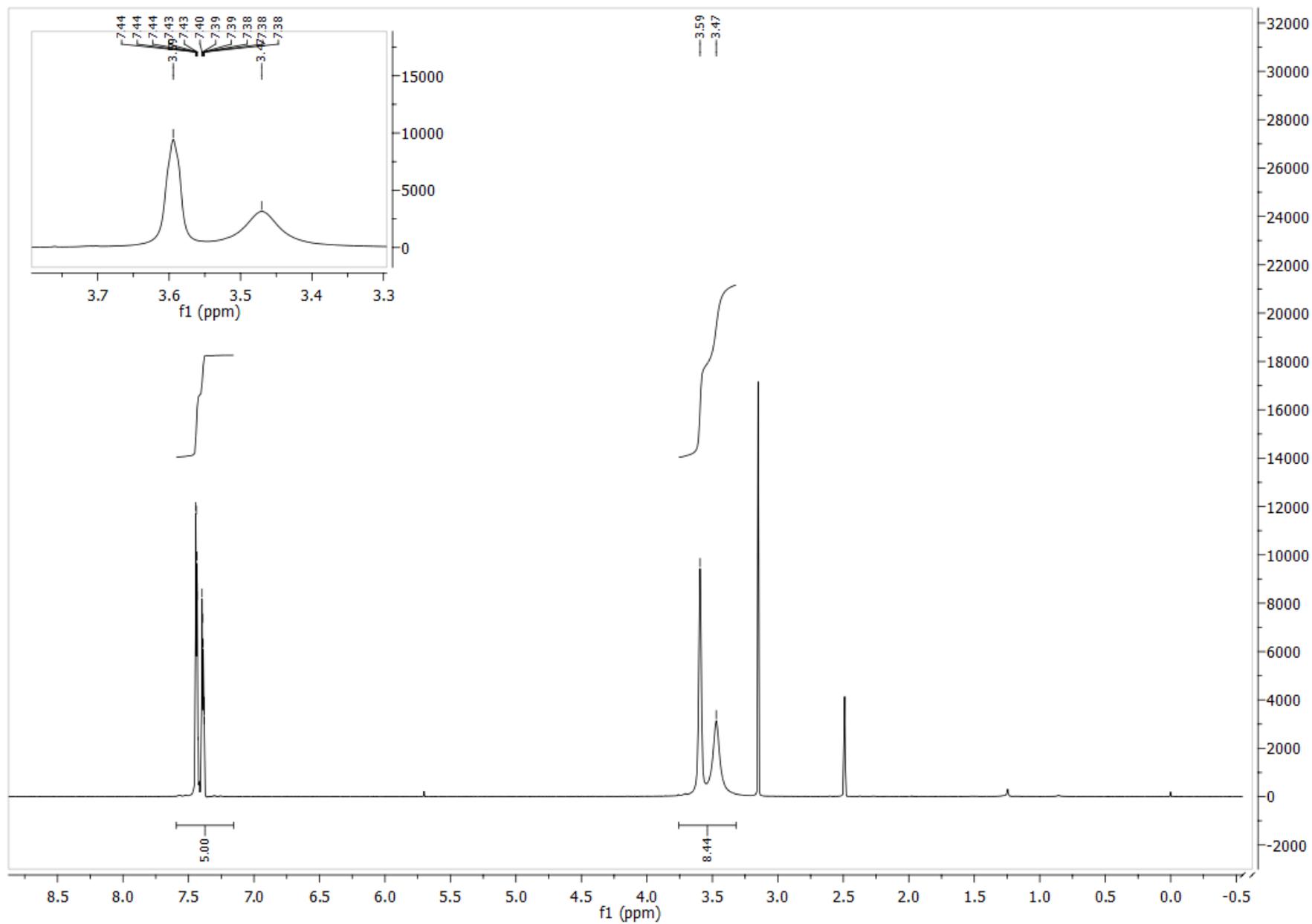


Figura S54 - Espectro (RMN de ^1H 600 MHz, DMSO, 60°C) – morfolinafenilmetanona **129**.

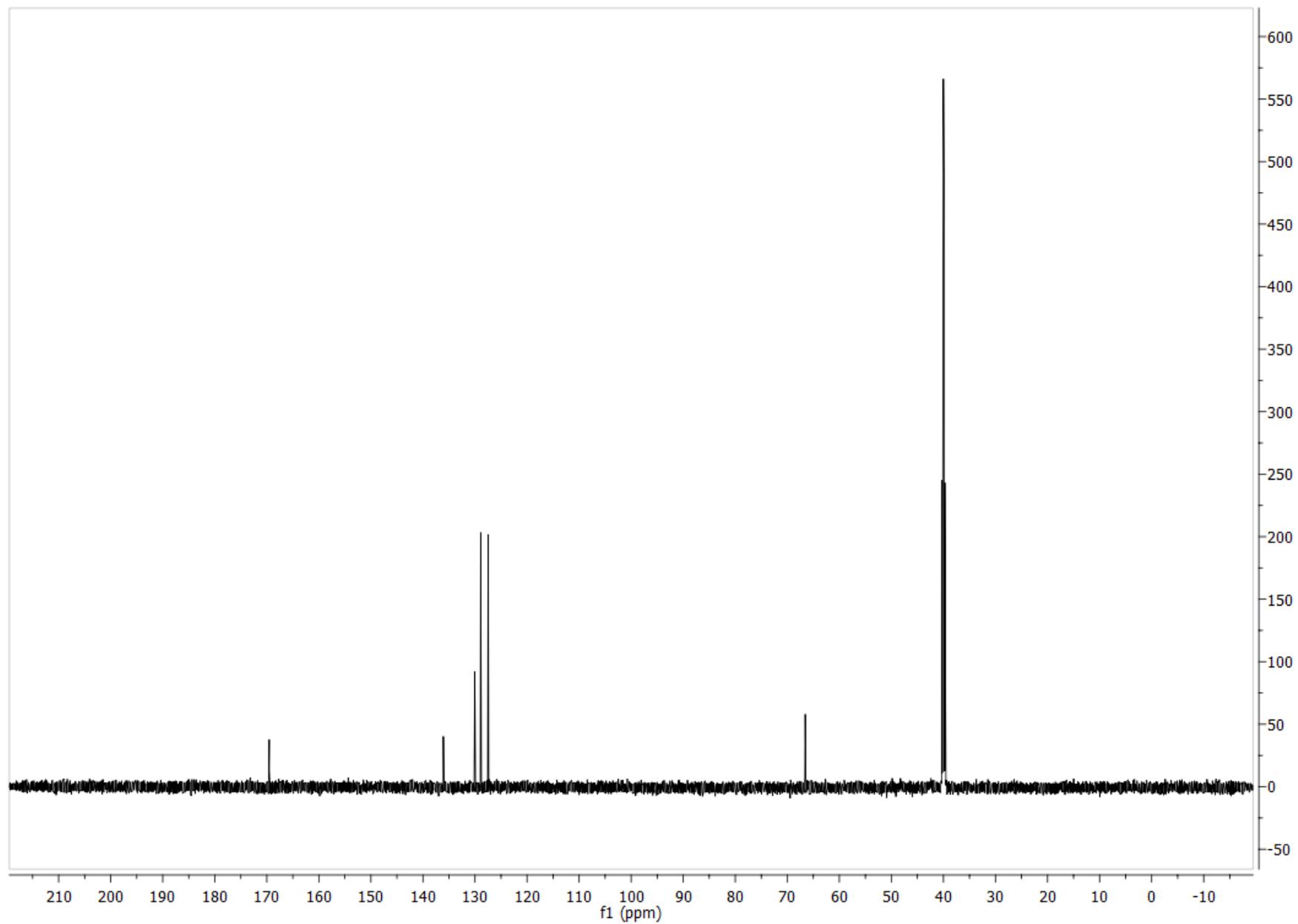


Figura S55 - Espectro (RMN de ^{13}C 151 MHz, DMSO, 60°C) – morfolinafenilmetanona **129**.

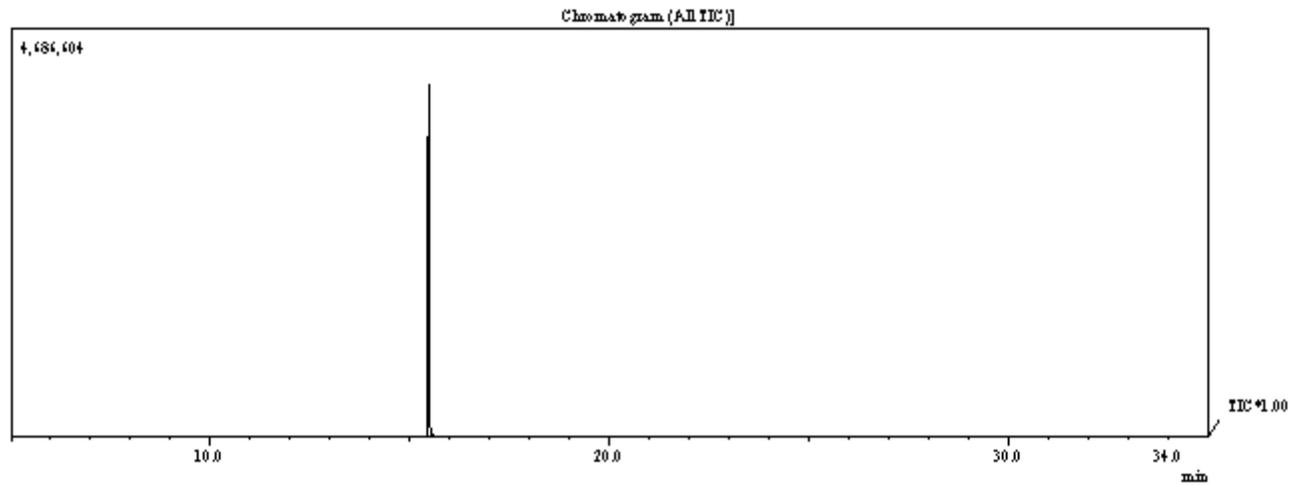


Figura S56 - Cromatograma da morfolinafenilmetanona **129**.

Line#1 E.Time:15.447(Scan#1257)
 Mass:Peak:78
 RawMode:Average(15.408-15.533(1250-1265) BasePeak:105.05(349384)
 BG Mode:None Group:1 - Event:1

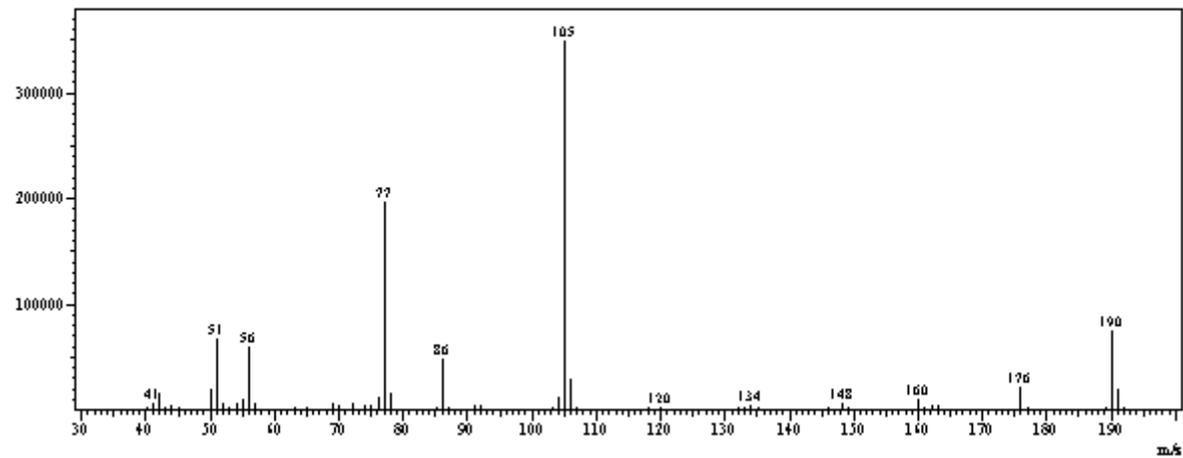


Figura S57 - Espectro (EM 70 eV m/z) – morfolinafenilmetanona **129**.

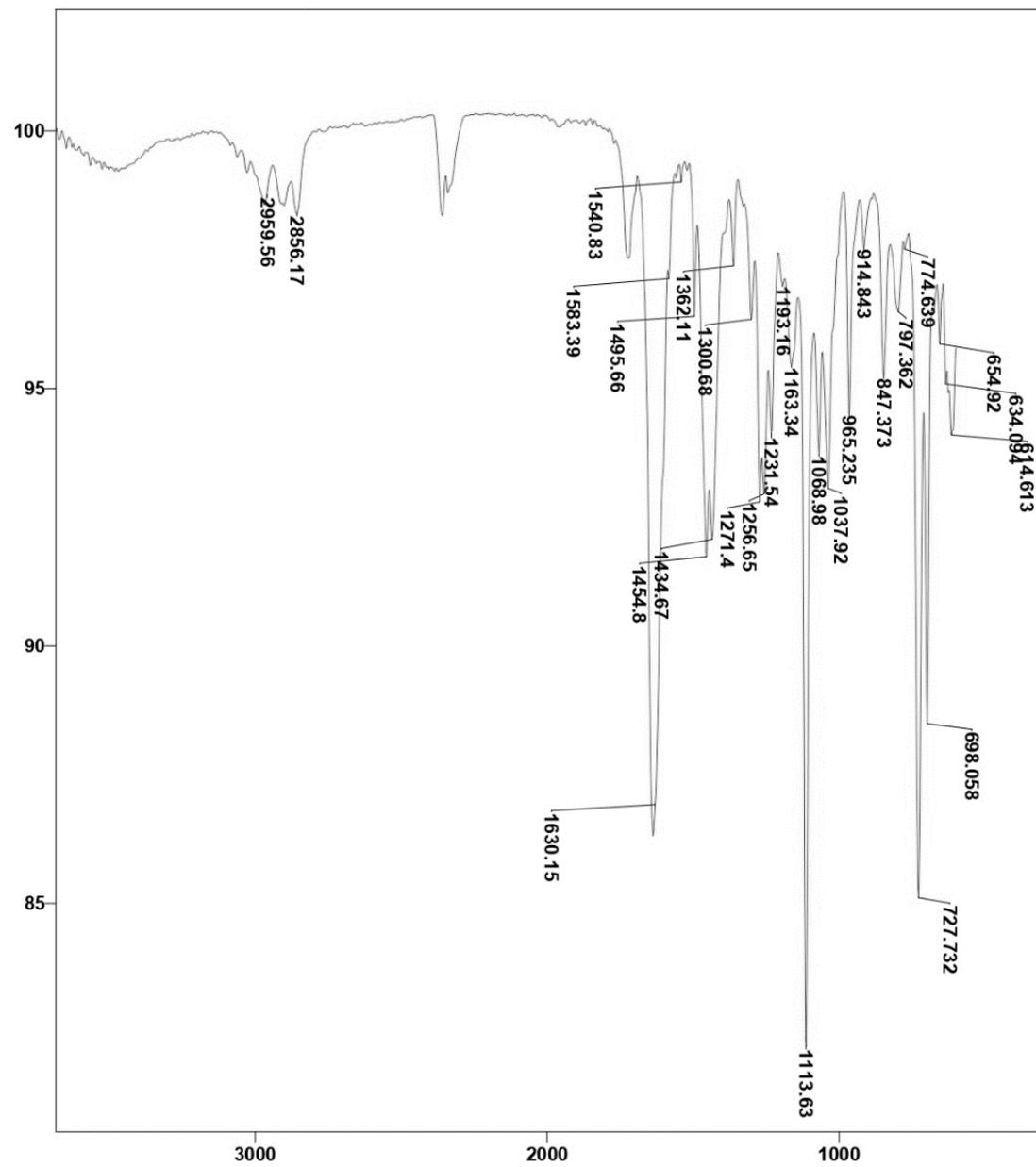


Figura S58 - Espectro de Infravermelho (ATR) – morfolinafenilmetanona **129**.

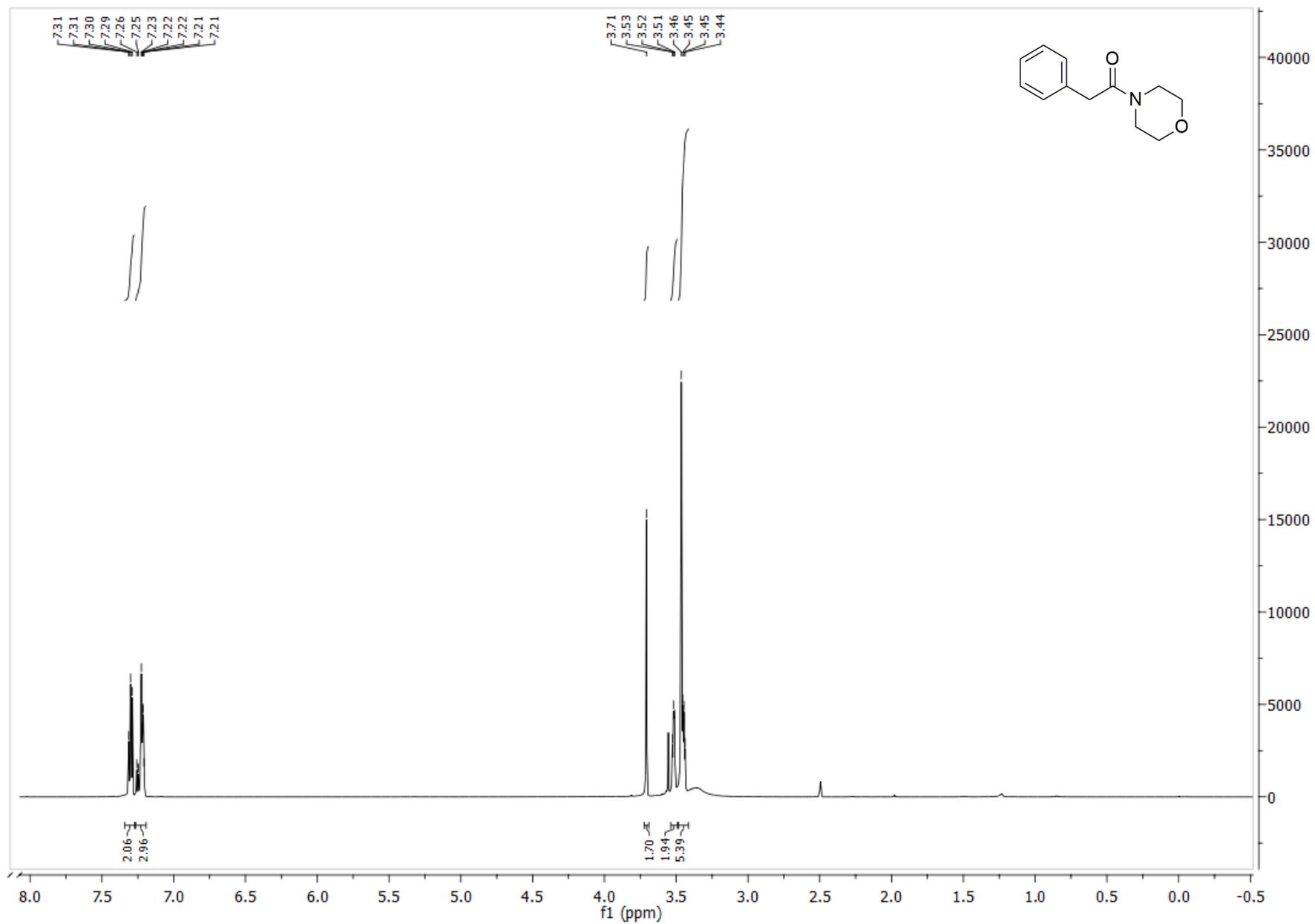


Figura S59 - Espectro (RMN de ^1H 600 MHz, DMSO, 25°C) – 1-morfolina-2-fenilmetanona **130**.

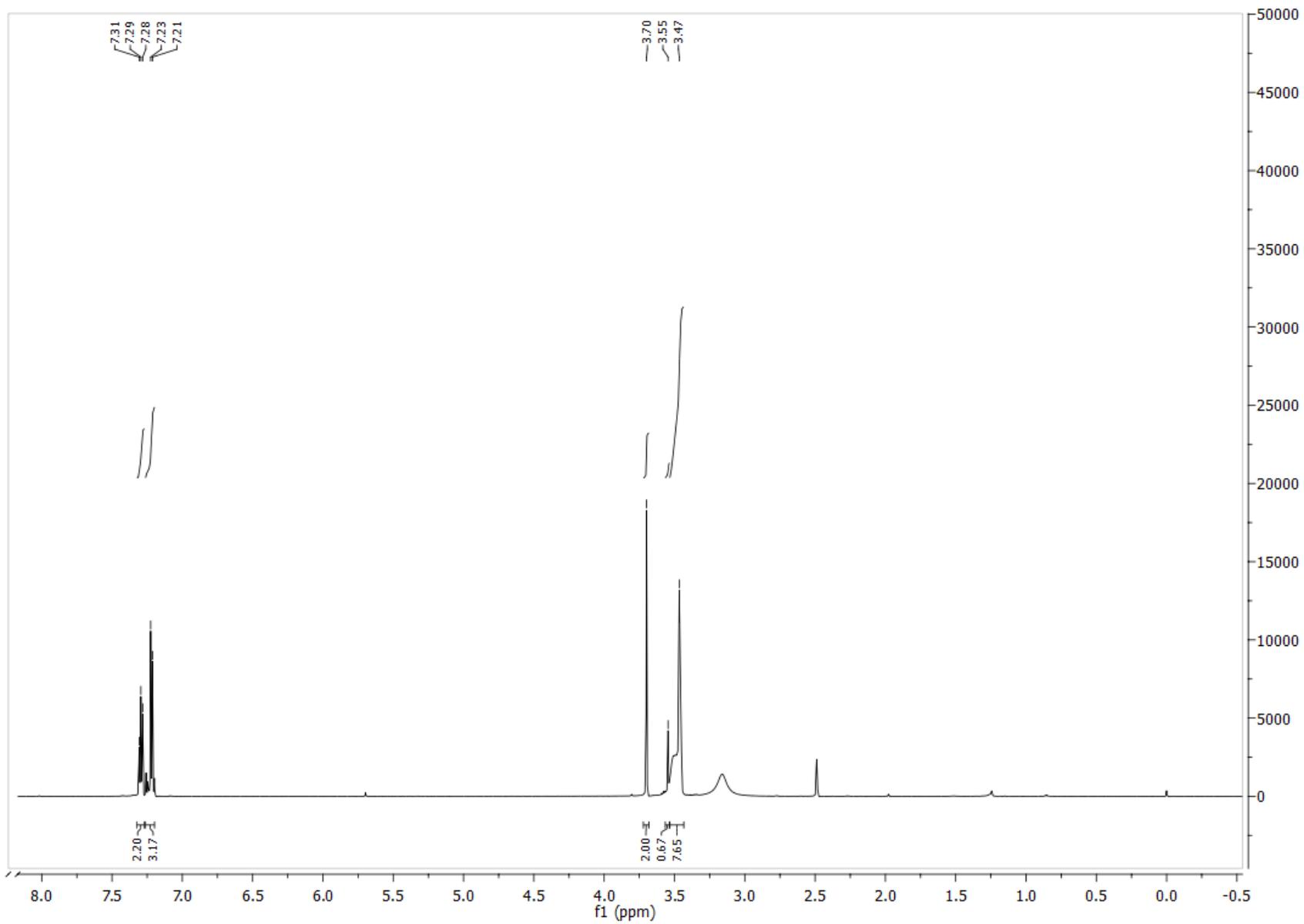


Figura S60 - Espectro (RMN de ¹H 600 MHz, DMSO, 60°C) – 1-morfolina-2-fenilmetanona **130**.

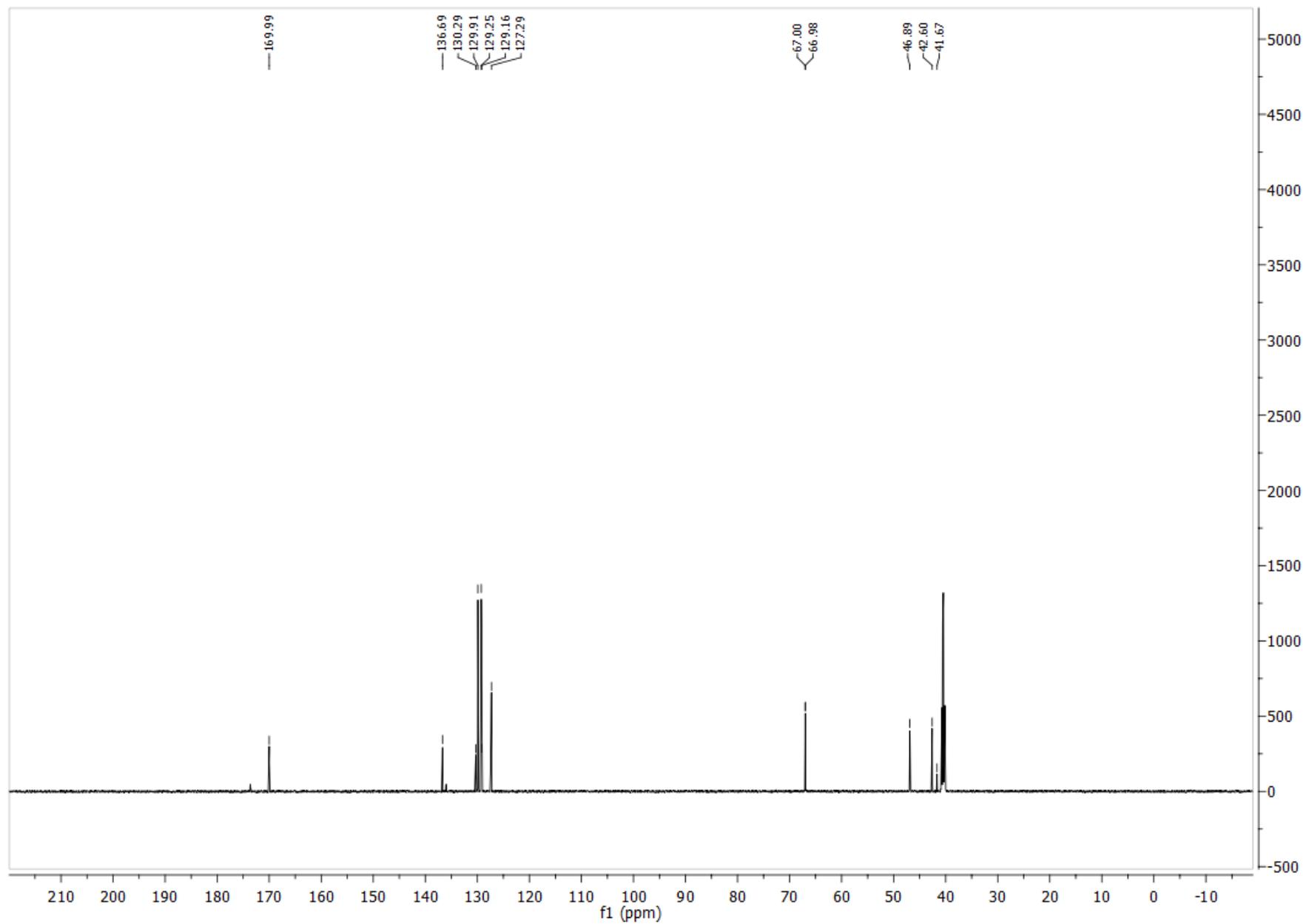


Figura S61 - Espectro (RMN de ^{13}C 151 MHz, DMSO, 60°C) – 1-morfolina-2-fenilmetanona **130**.

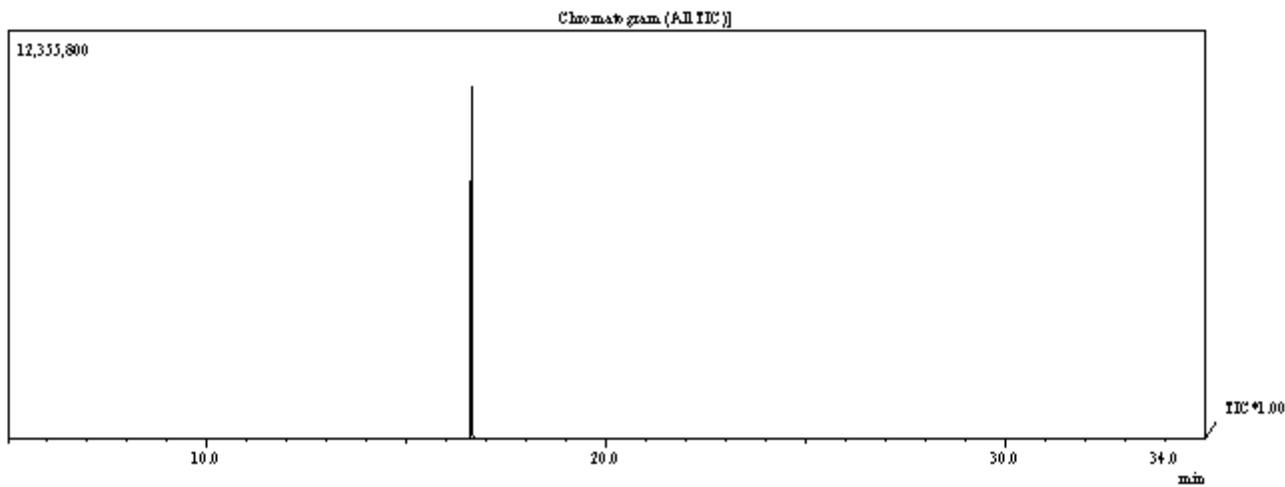


Figura S62 - Cromatograma da 1-morfolina-2-fenilmetanona **130**.

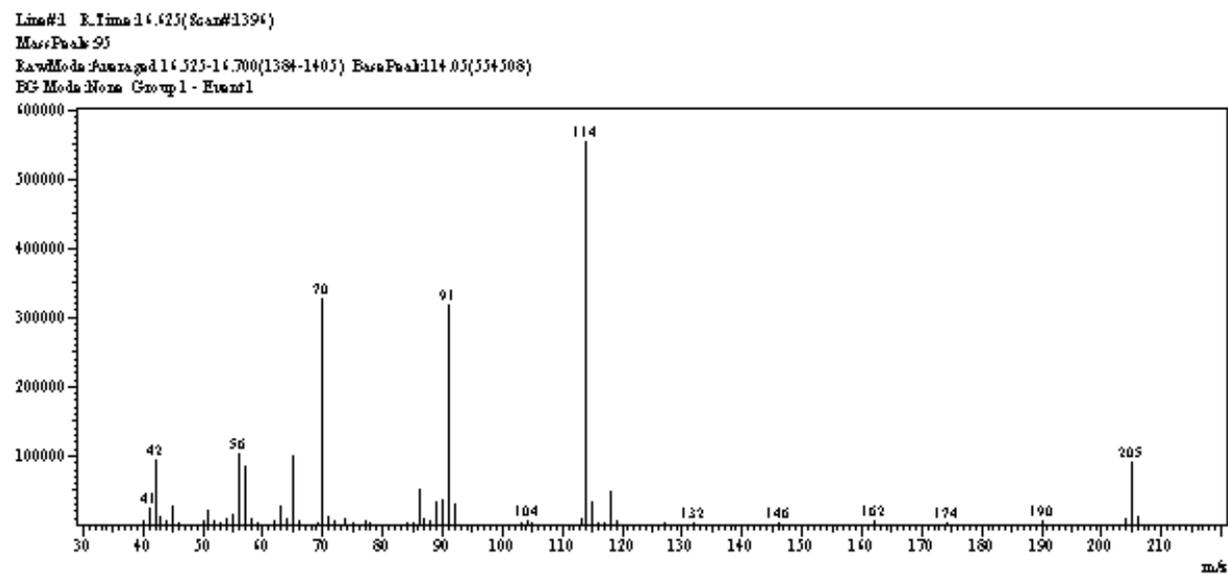


Figura S63 - Espectro (EM 70 eV m/z) – 1-morfolina-2-fenilmetanona **130**.

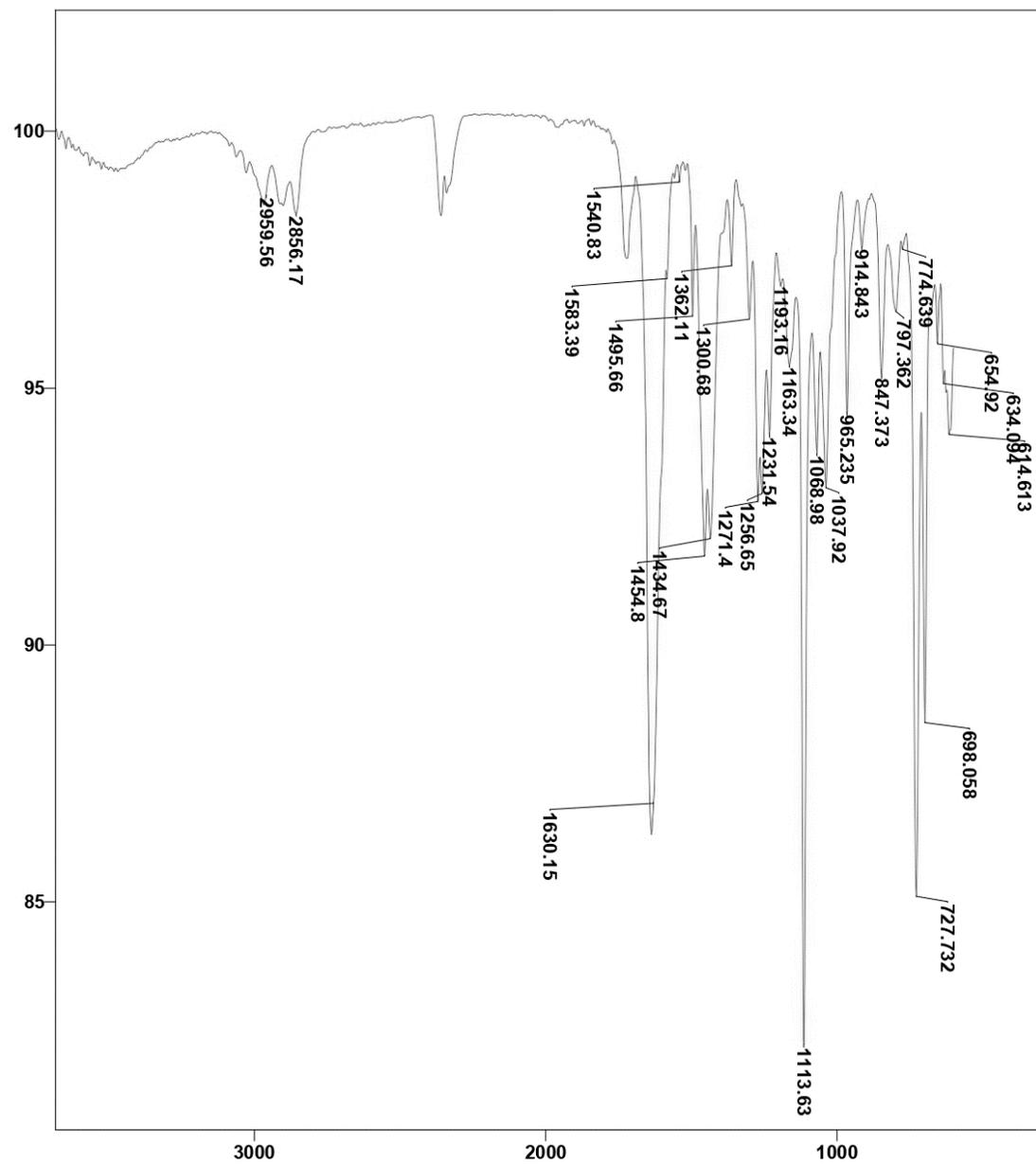


Figura S64 - Espectro de Infravermelho (ATR) – 1-morfolina-2-feniletanona **130**.

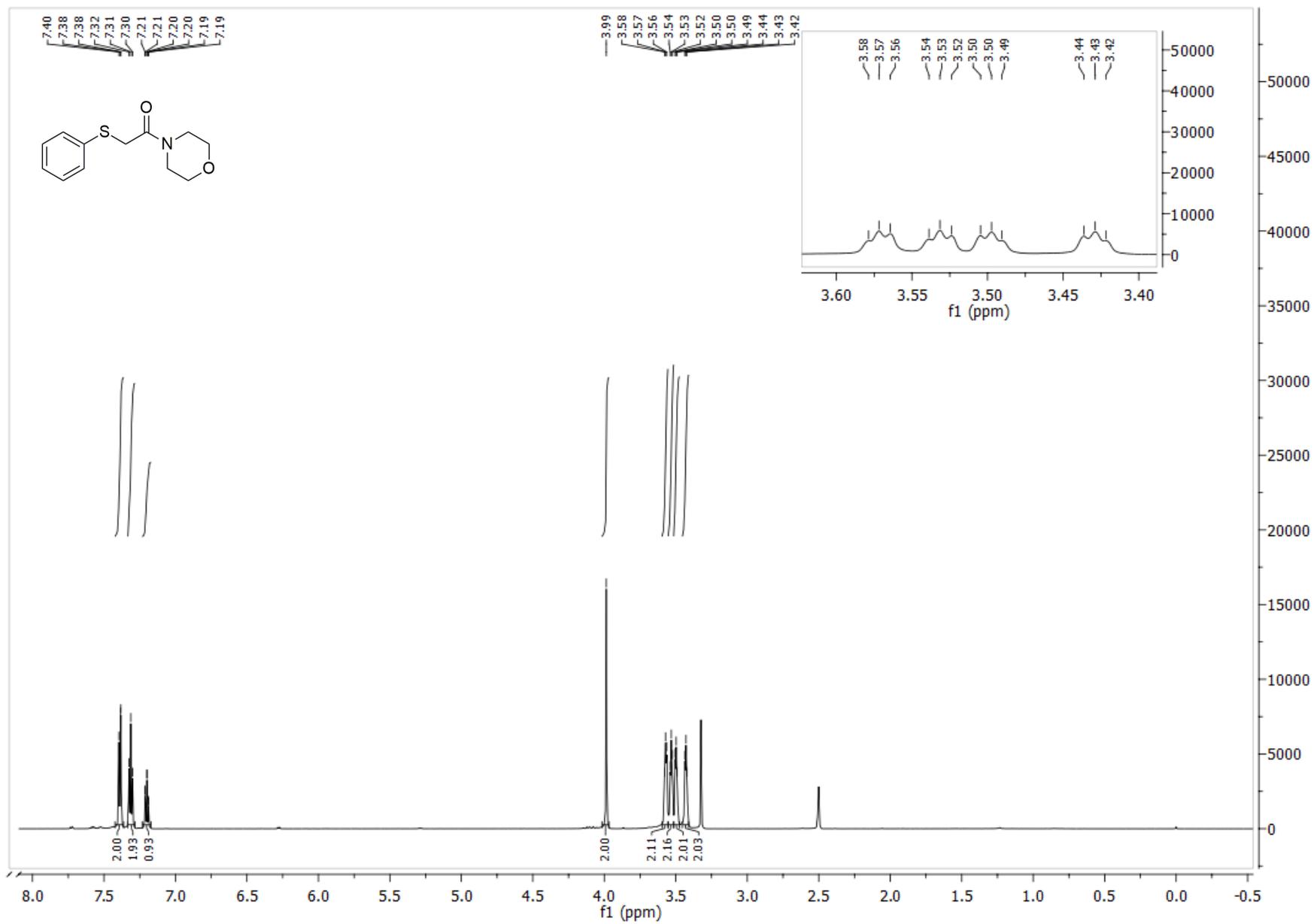


Figura S65 - Espectro (RMN de ¹H 600 MHz, DMSO, 25°C) – 1-morfolina-2-(tiofenil)etanona **131**.

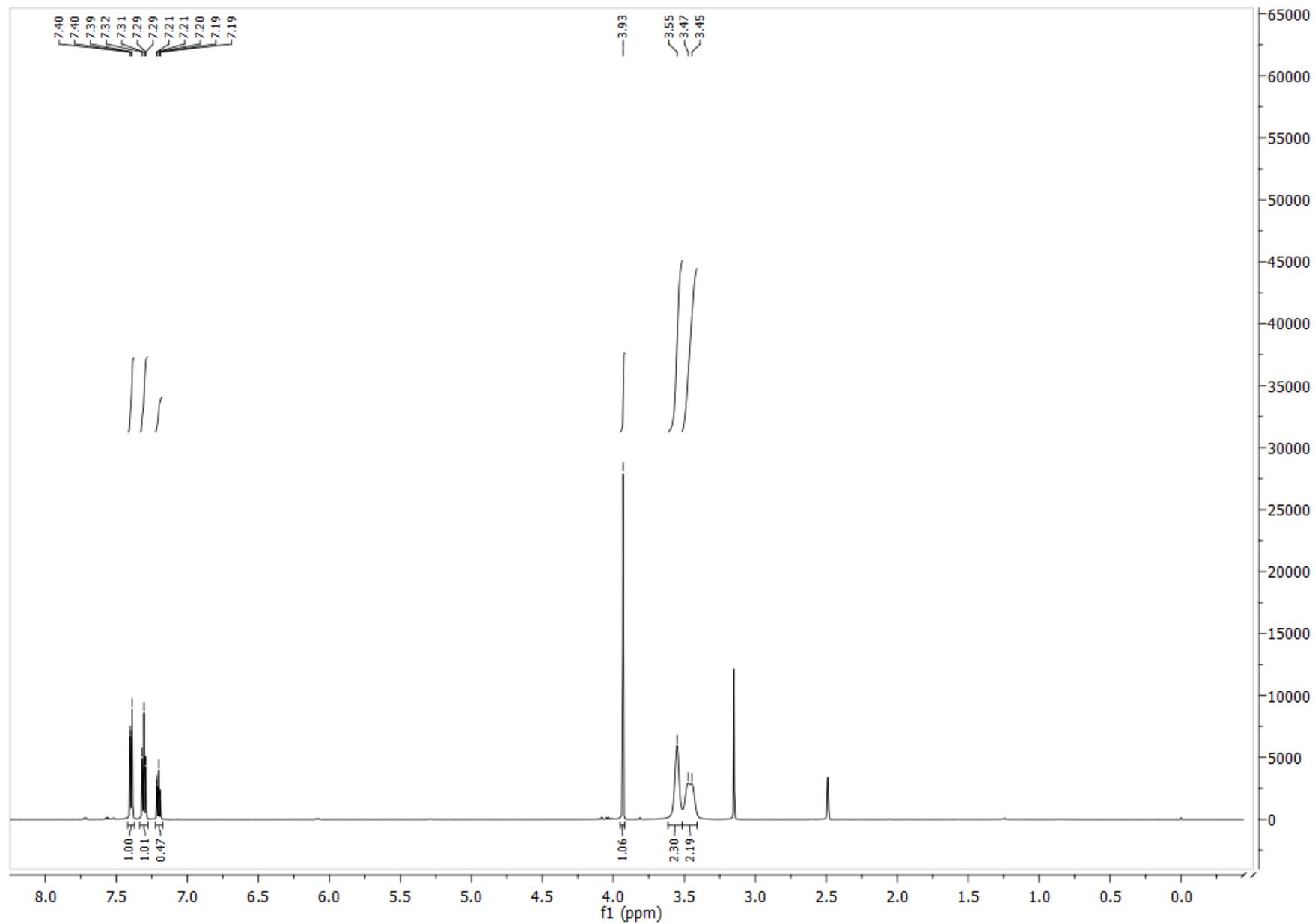


Figura S66 - Espectro (RMN de ^1H 600 MHz, DMSO, 60°C) – 1-morfolina-2-(tiofenil)etanona **131**.

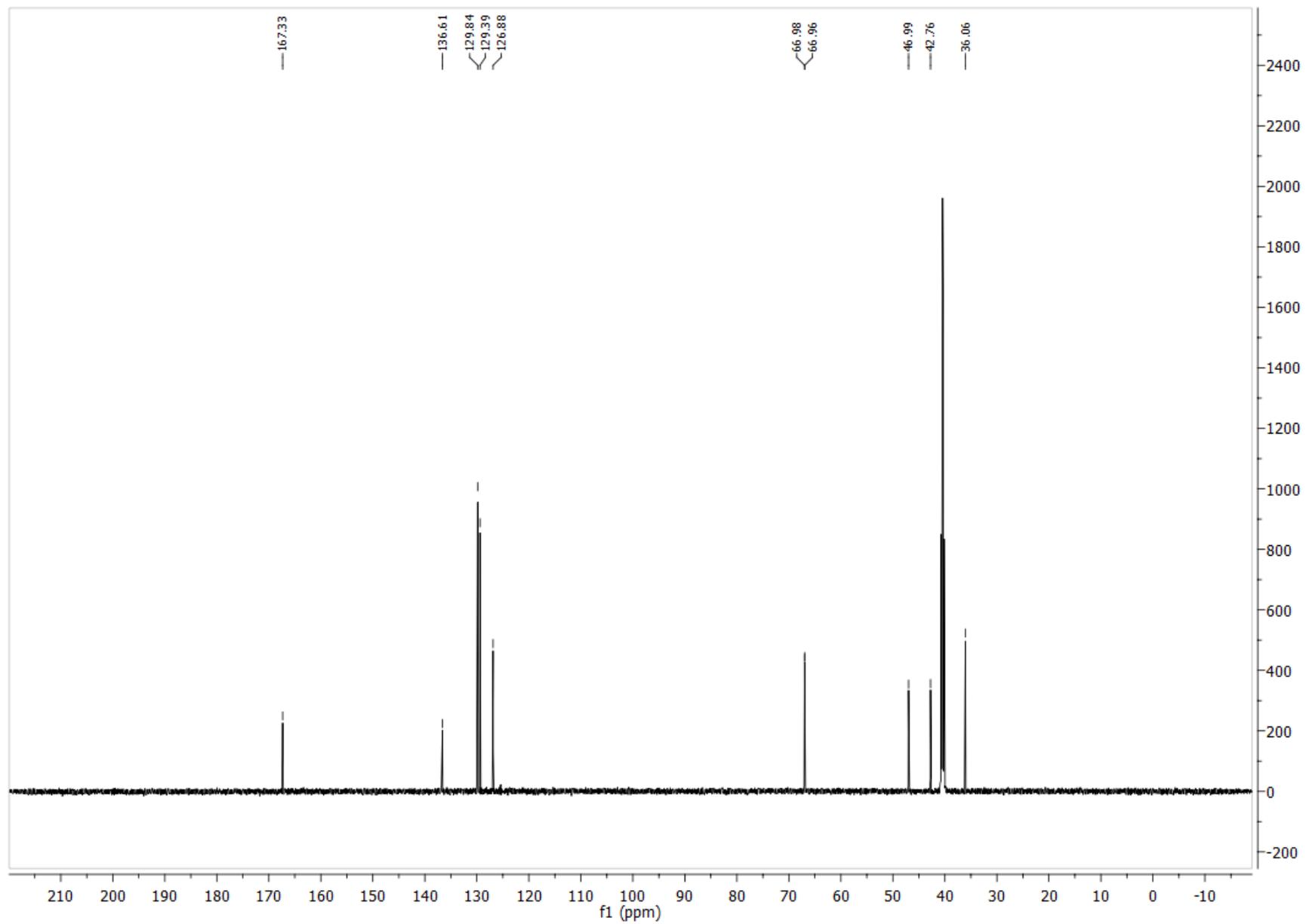


Figura S67 - Espectro (RMN de ^{13}C 151 MHz, DMSO, 25°C) – 1-morfolina-2-(tiofenil)etanona **131**.

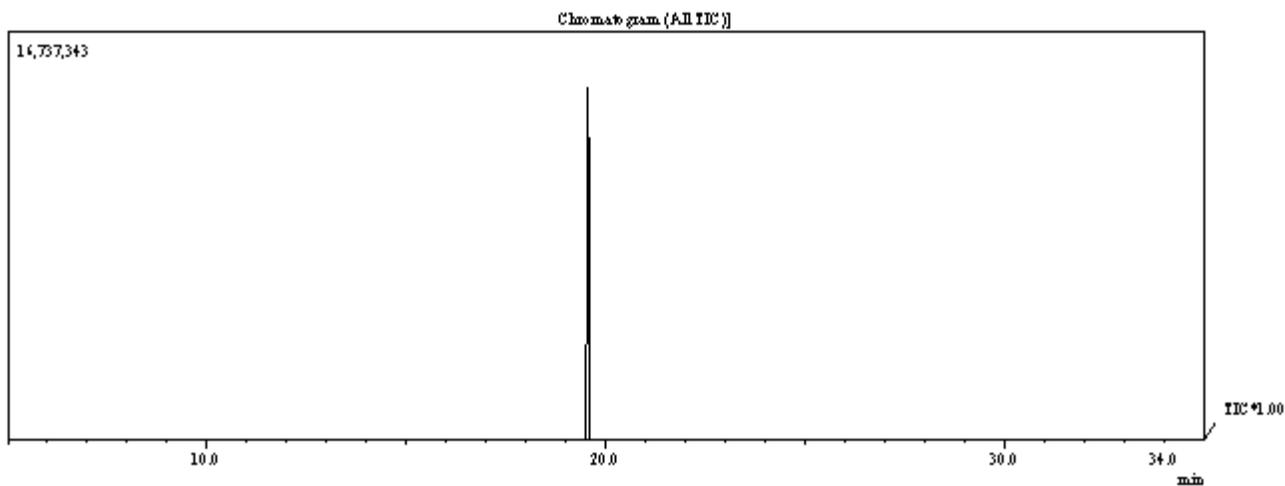


Figura S68 - Cromatograma da 1-morfolina-2-(tiofenil)etanona **131**.

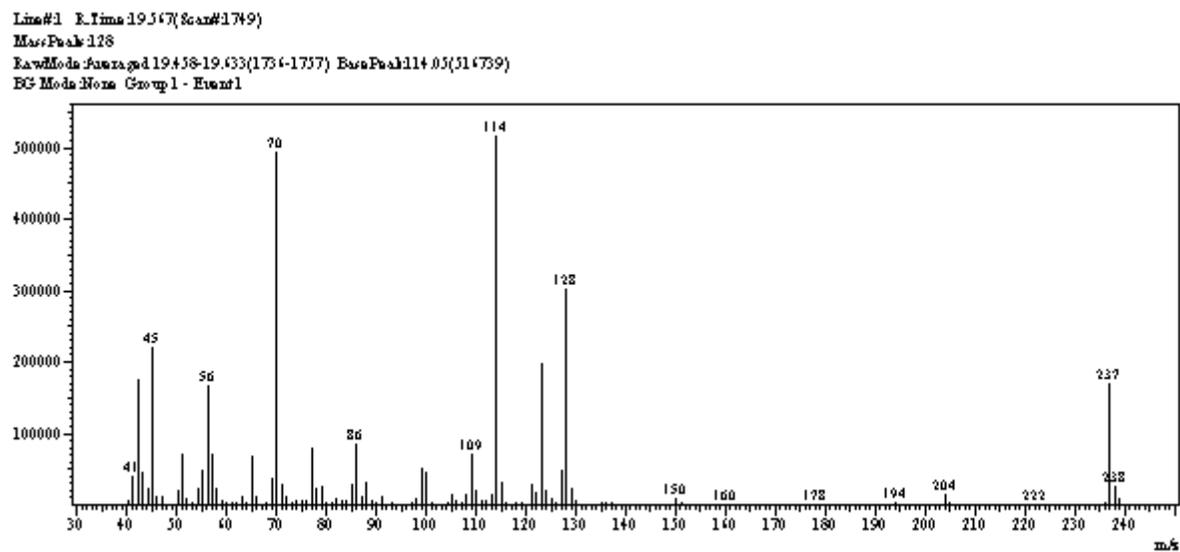


Figura S69 - Espectro (EM 70 eV m/z) – 1-morfolina-2-(tiofenil)etanona **131**.

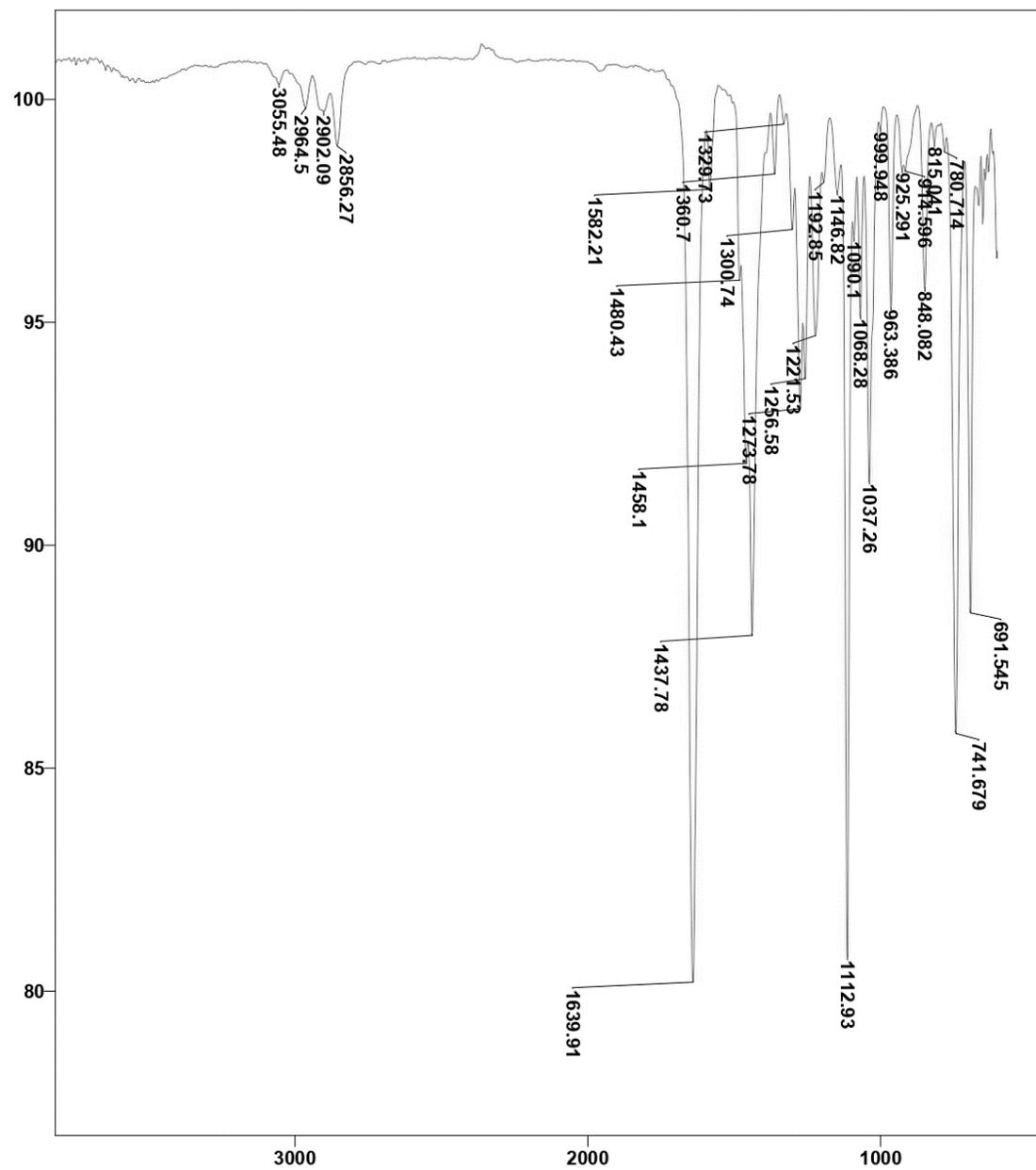


Figura S70 - Espectro de Infravermelho (ATR) – 1-morfolina-2-(tiofenil)etanona **131**.

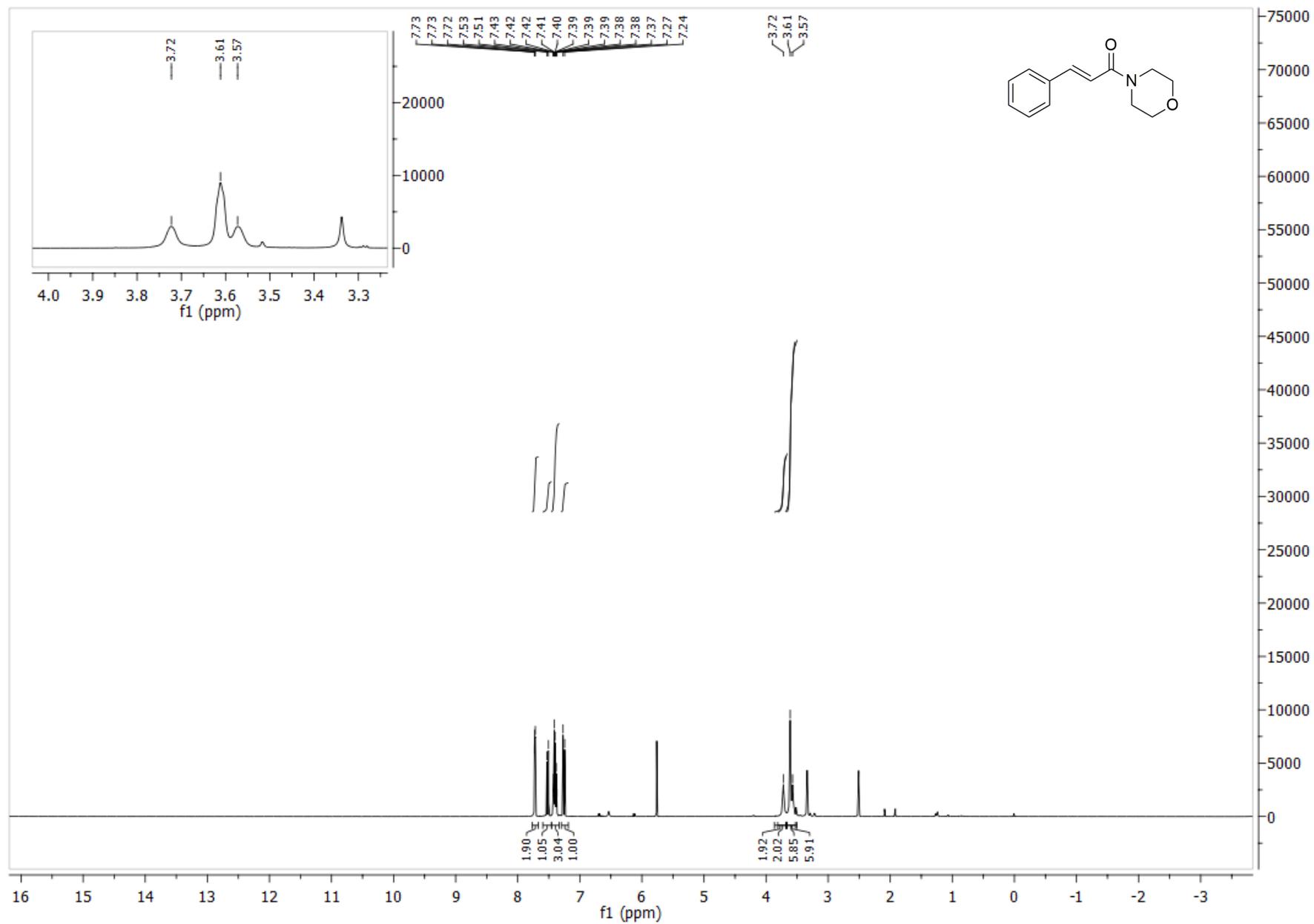


Figura S71 - Espectro (RMN de ¹H 600 MHz, DMSO, 25°C) – (E)-1-morfolina-3-fenilprop-2-en-1-ona **132**.

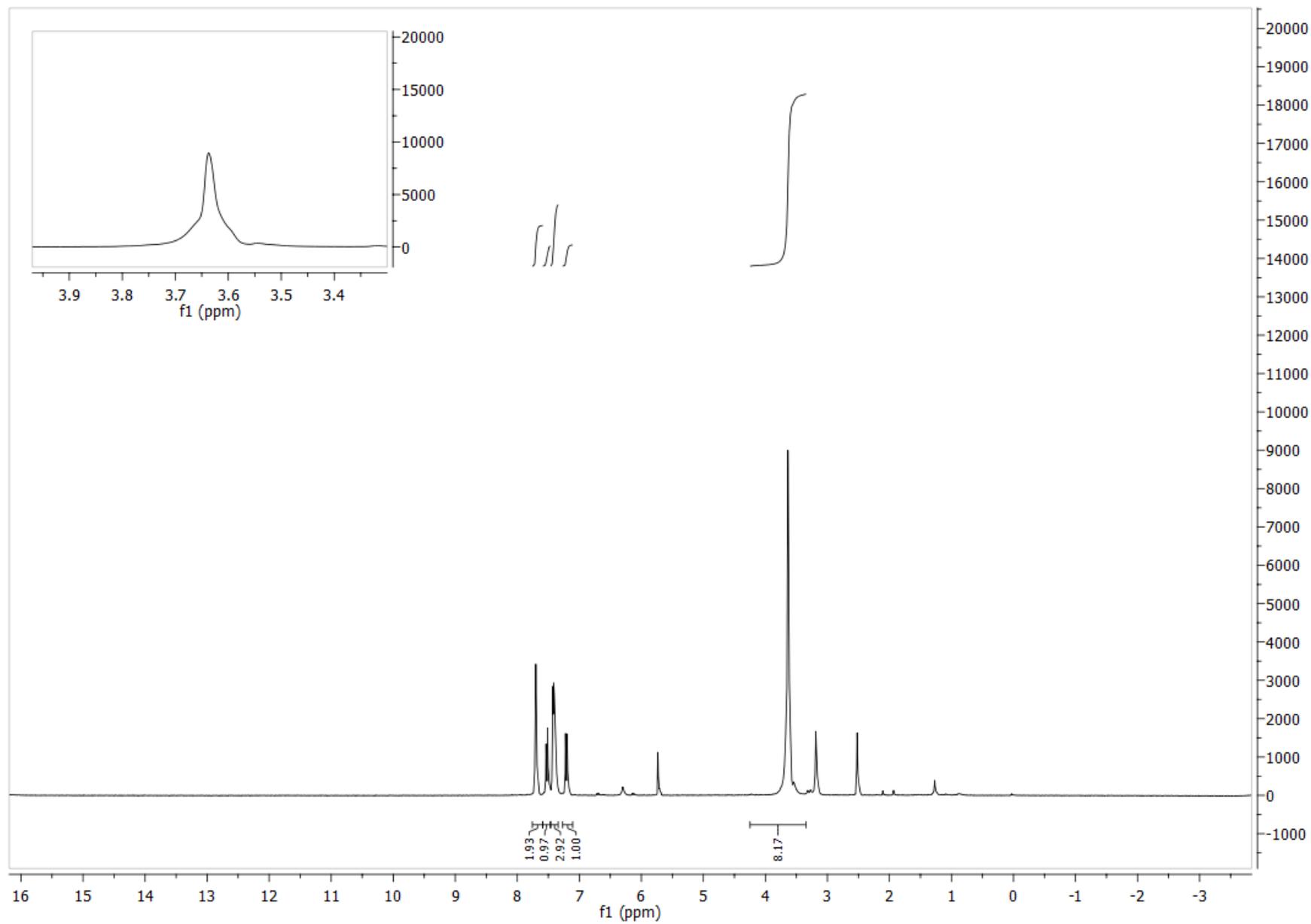


Figura S72 - Espectro (RMN de ^1H 600 MHz, DMSO, 60°C) – (*E*)-1-morfolina-3-fenilprop-2-en-1-ona **132**.

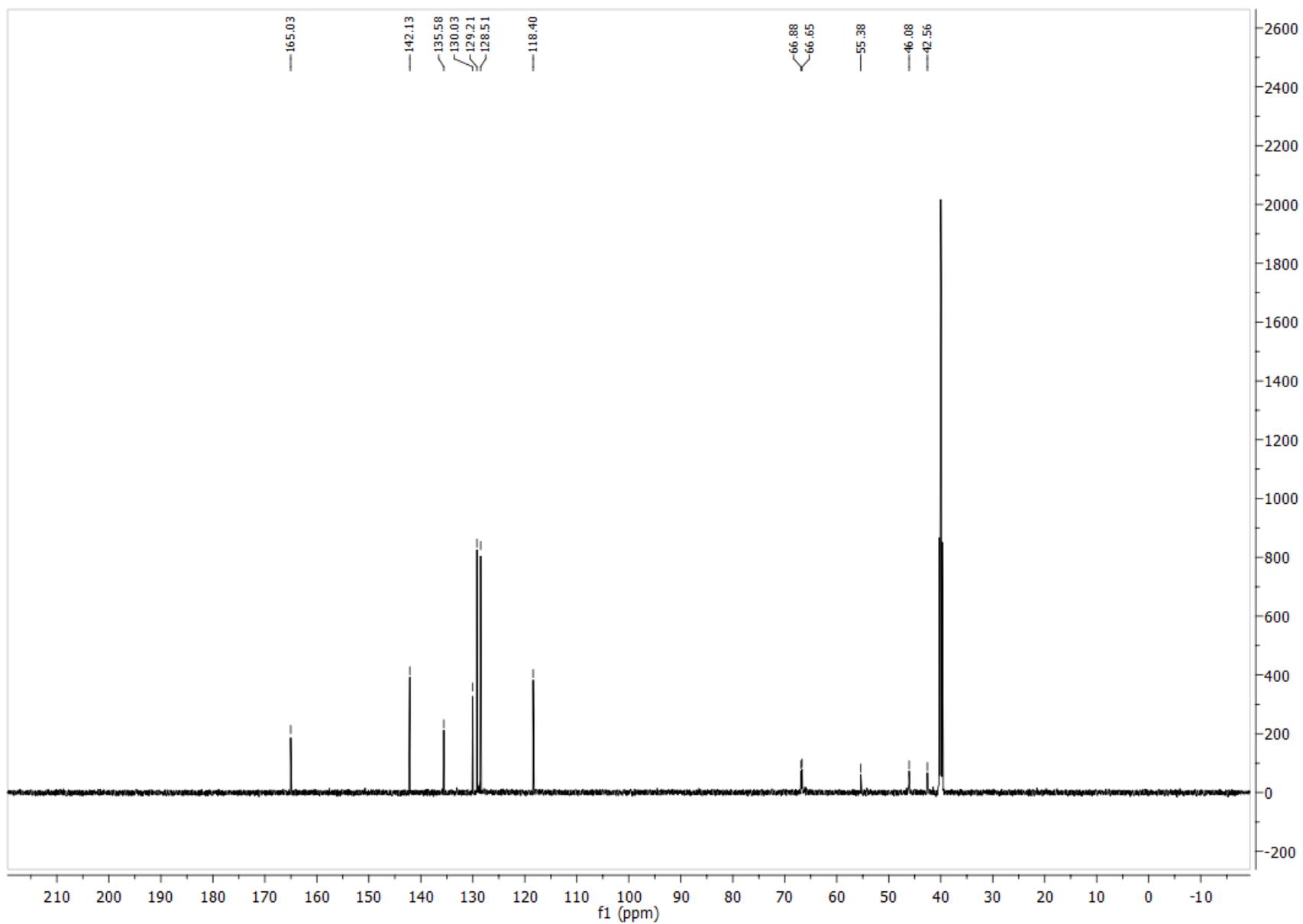


Figura S73 - Espectro (RMN de ^{13}C 151 MHz, DMSO, 25°C) – (*E*)-1-morfolina-3-fenilprop-2-en-1-ona **132**.

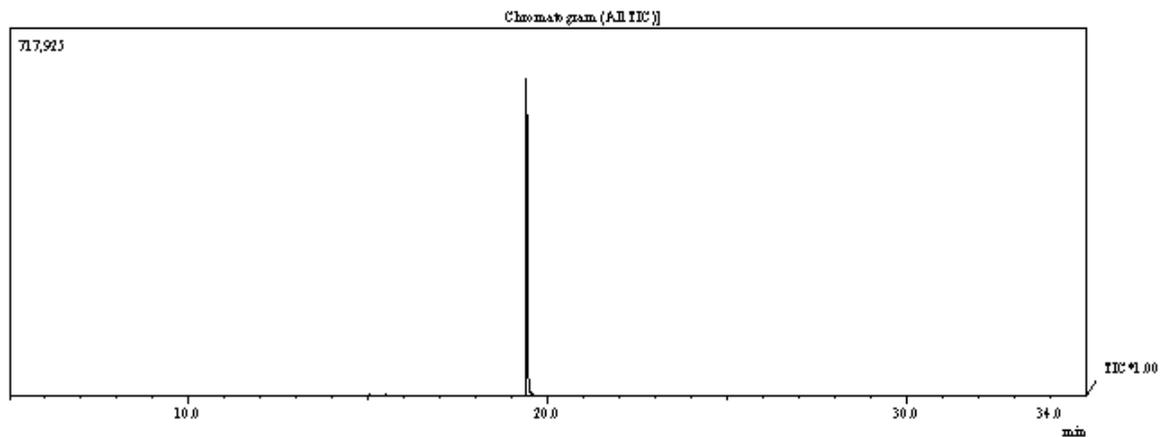


Figura S74 - Cromatograma da (*E*)-1-morfolina-3-fenilprop-2-en-1-ona **132**.

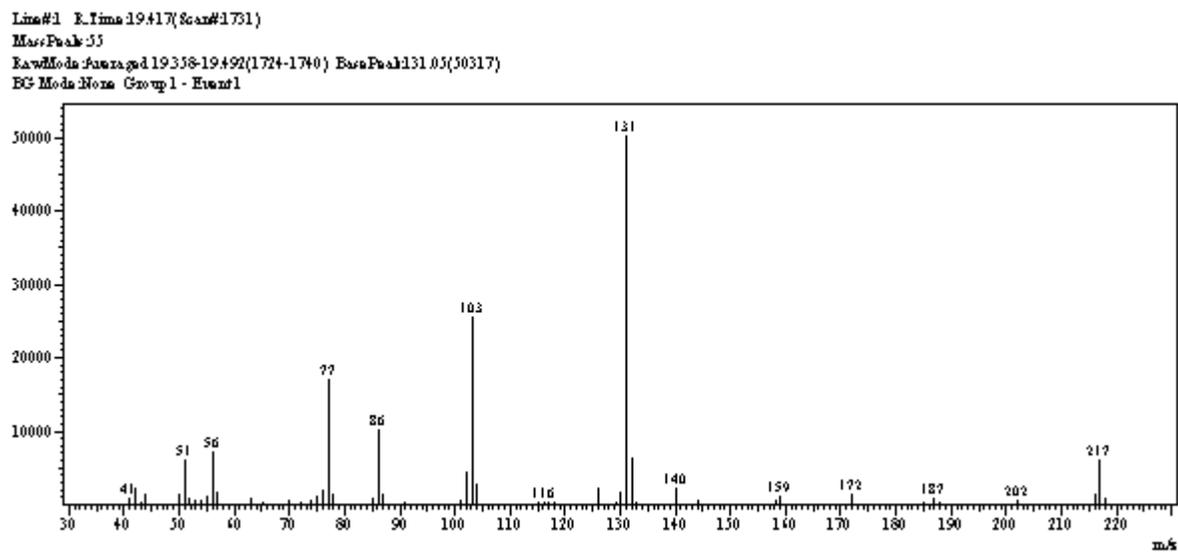


Figura S75 - Espectro (EM 70 eV m/z) – (*E*)-1-morfolina-3-fenilprop-2-en-1-ona **132**.

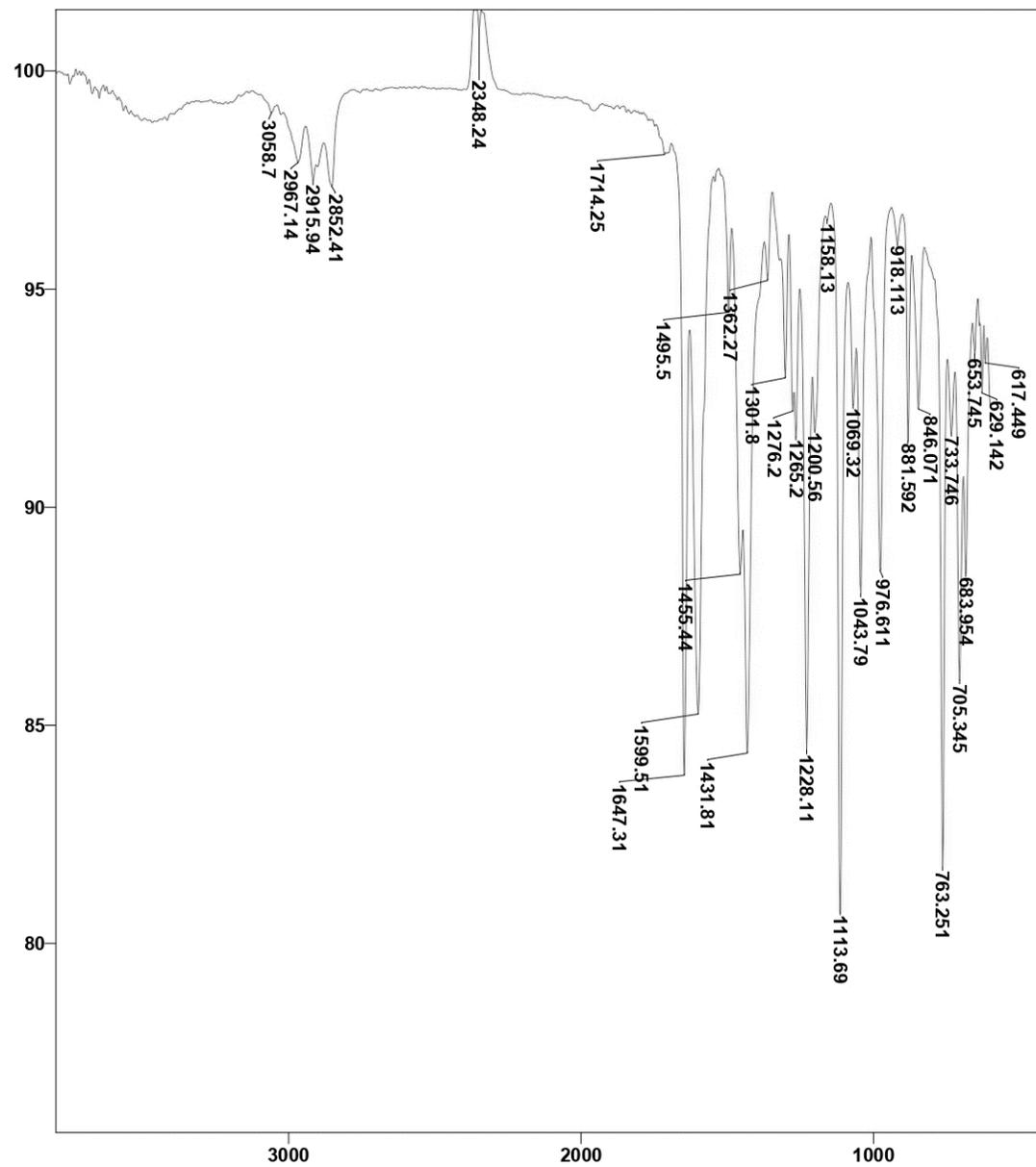


Figura S76 - Espectro de Infravermelho (ATR) – (*E*)-1-morfolina-3-fenilprop-2-en-1-ona **132**.

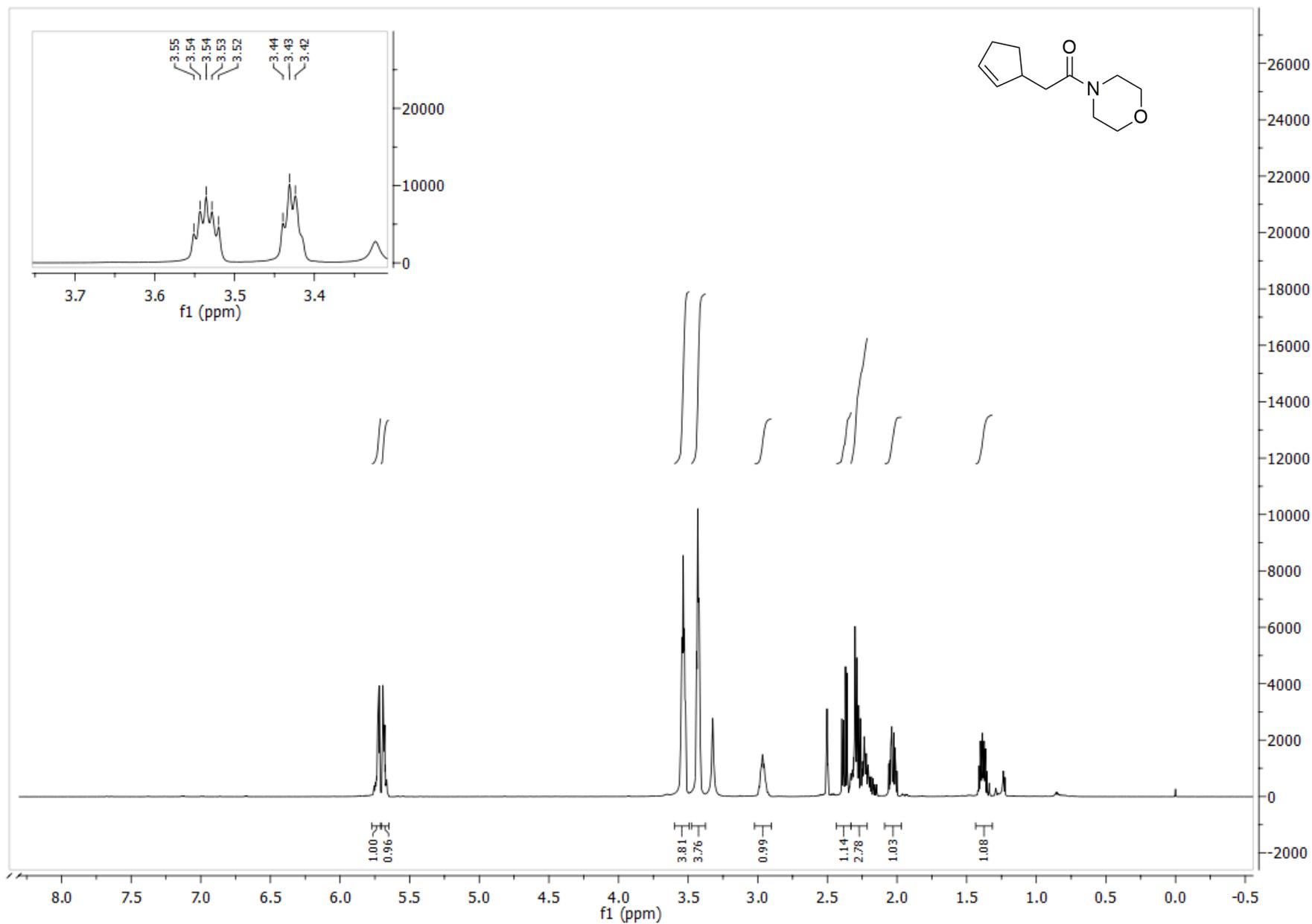


Figura S77- Espectro (RMN de ^1H 600 MHz, DMSO, 25°C) –2-(ciclopent-2-en-1-il)-1-morfolinaetanaona **133**.

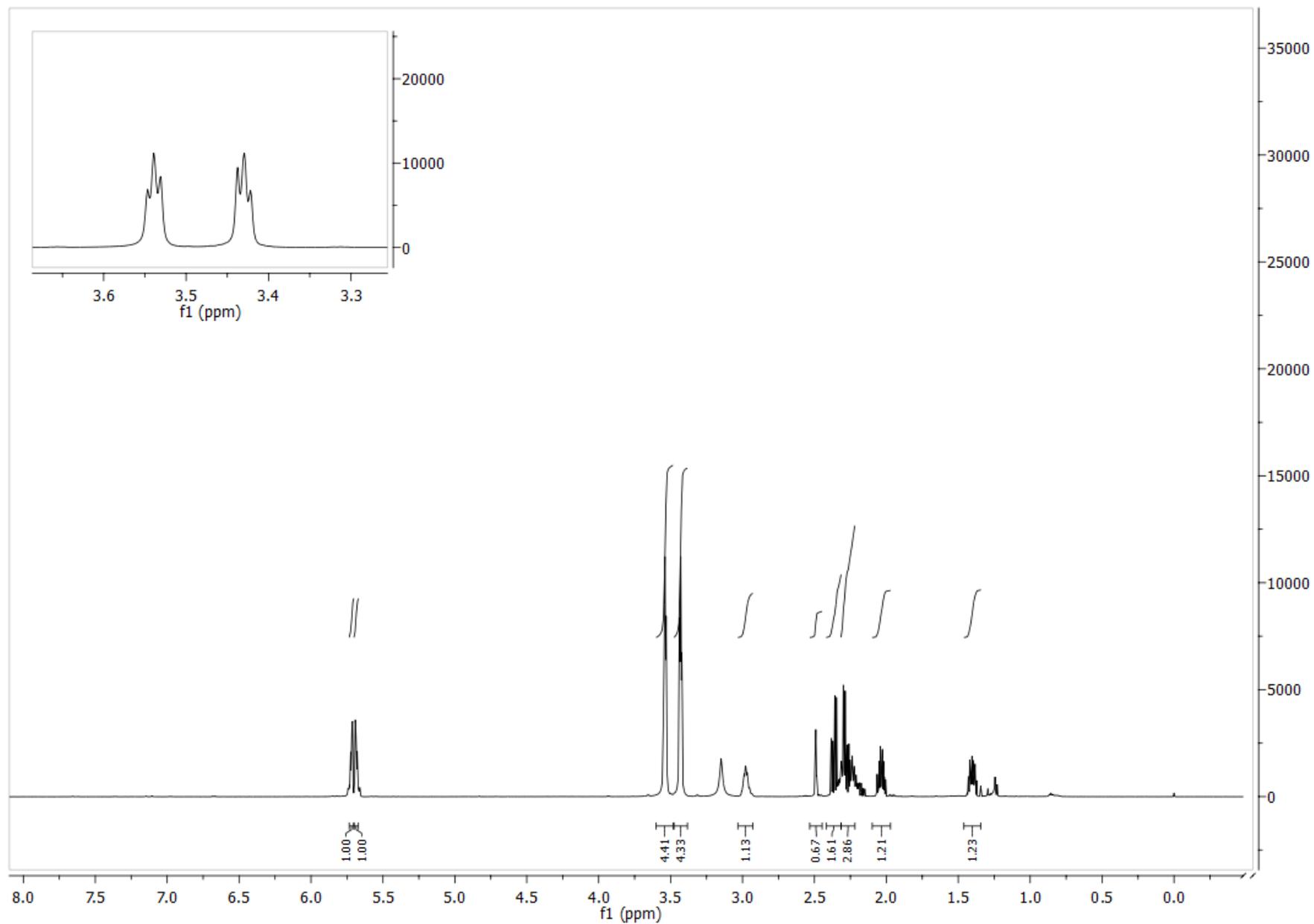


Figura S78 - Espectro (RMN de ^1H 600 MHz, DMSO, 60°C) -2-(ciclopent-2-en-1-il)-1-morfolinaetanona **133**.

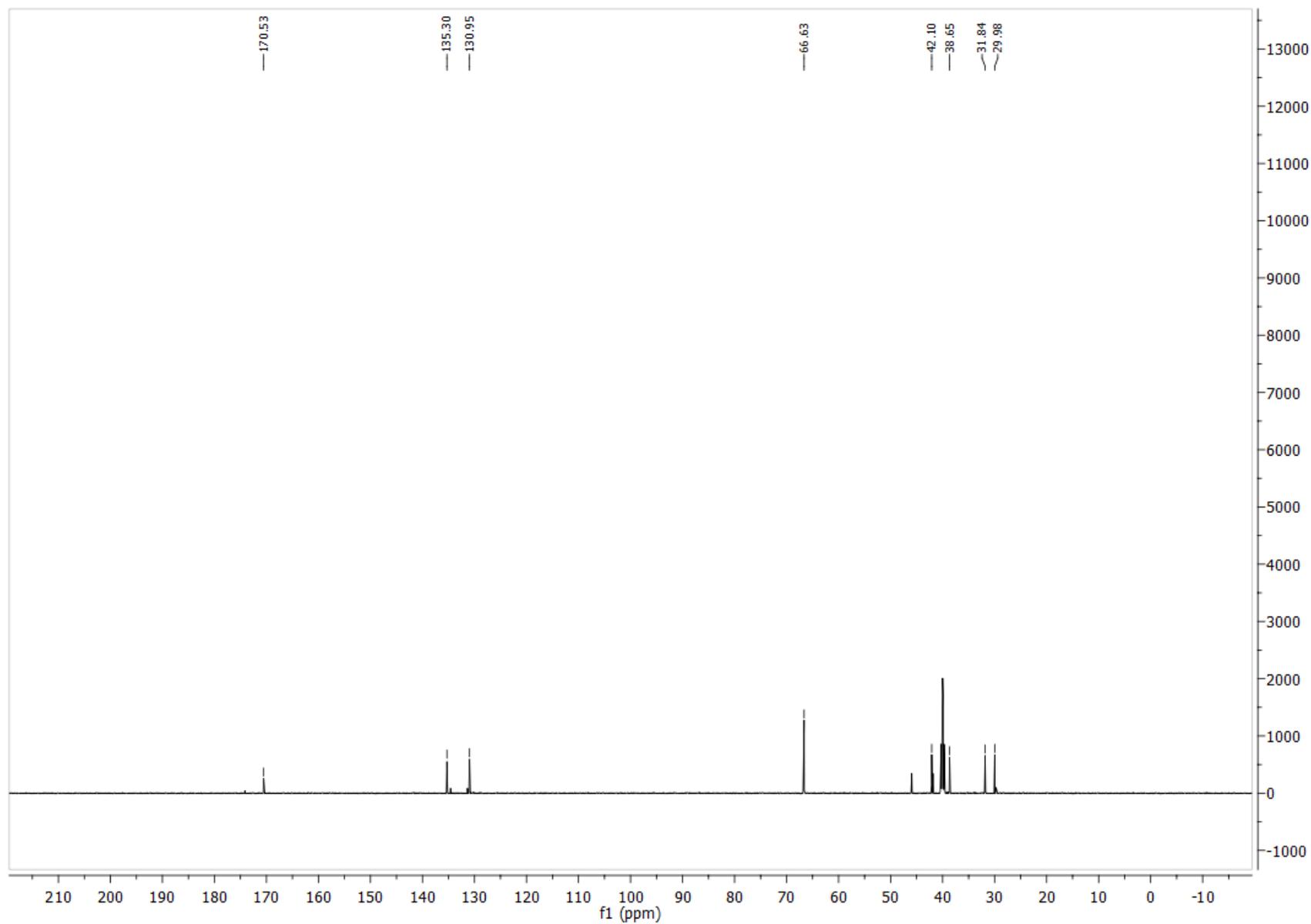


Figura S79 - Espectro (RMN de ^{13}C 151 MHz, DMSO, 25°C) –2-(ciclopent-2-en-1-il)-1-morfolinaetanona **133**.

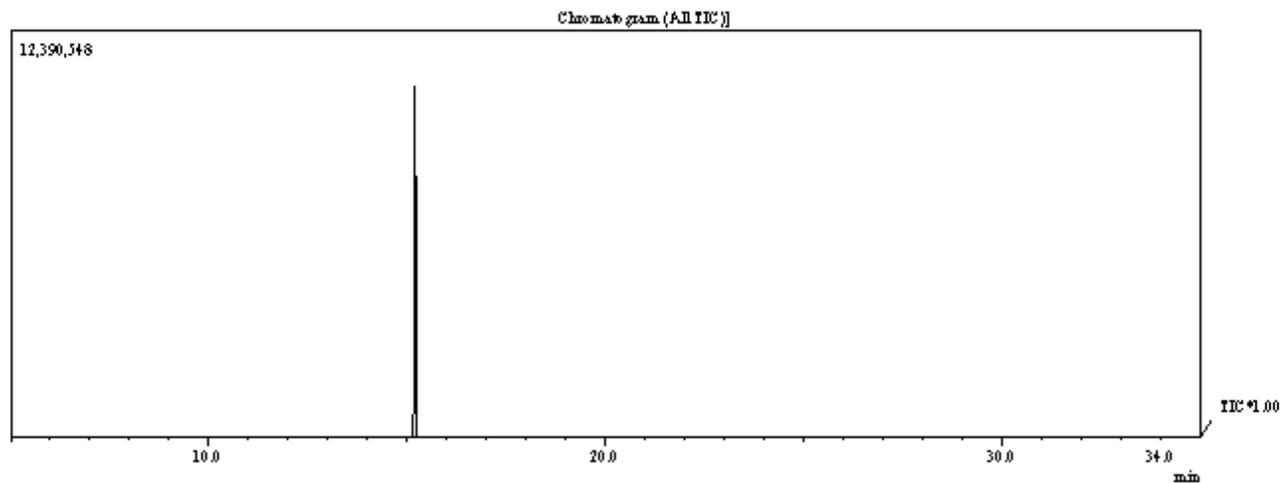


Figura S80 - Cromatograma da 2-(ciclopent-2-en-1-il)-1-morfolinaetanona **133**.

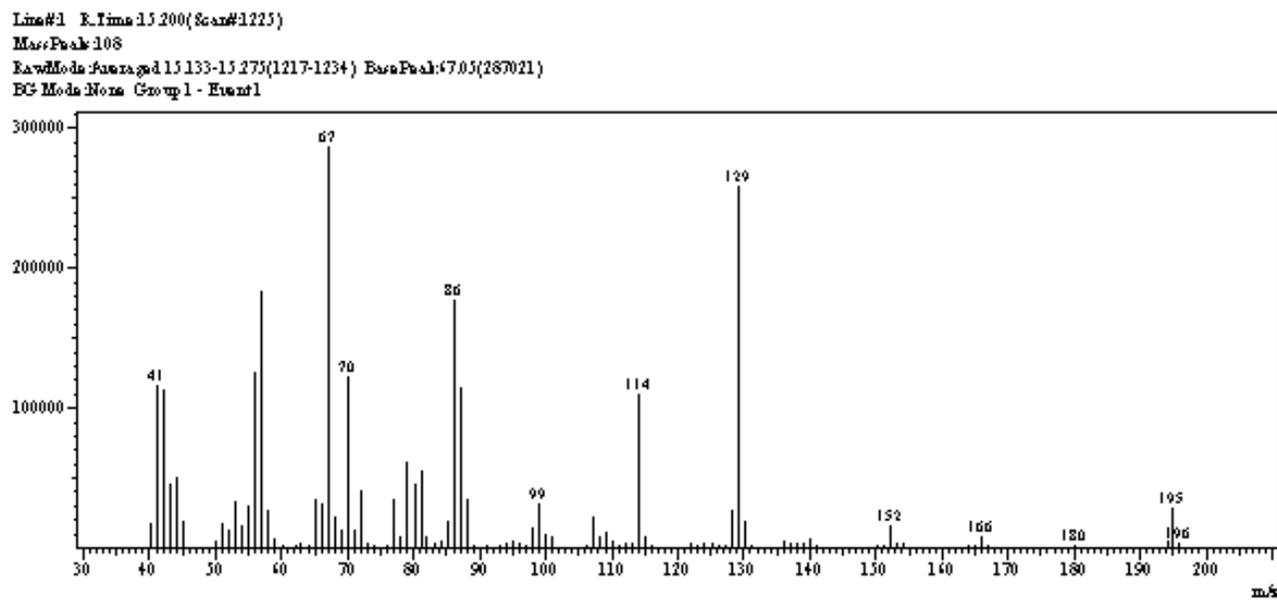


Figura S81 - Espectro (EM 70 eV m/z) – 2-(ciclopent-2-en-1-il)-1-morfolinaetanona **133**.

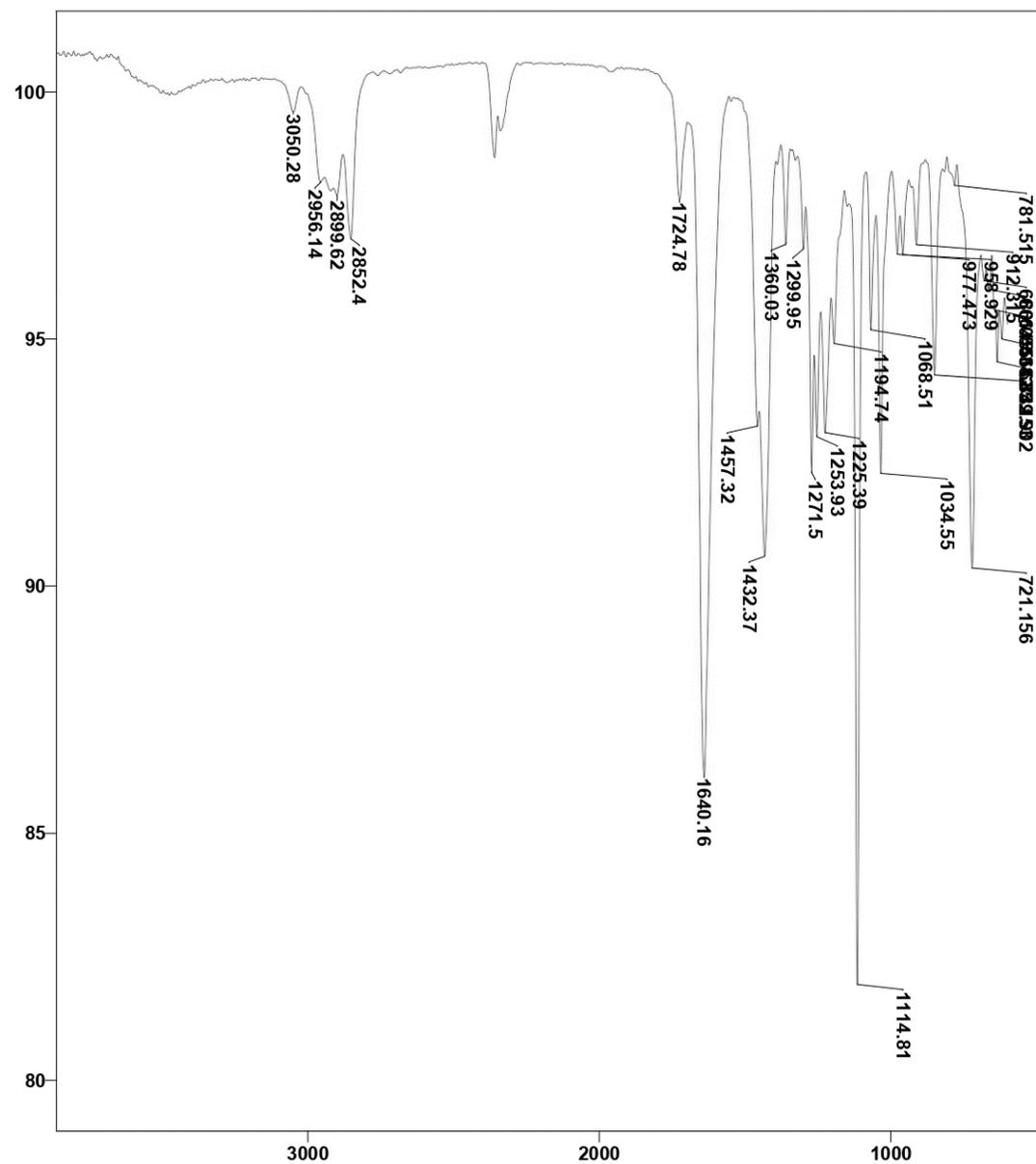


Figura S82 - Espectro de Infravermelho (ATR) – 2-(ciclopent-2-en-1-il)-1-morfolinaetanova **133**.

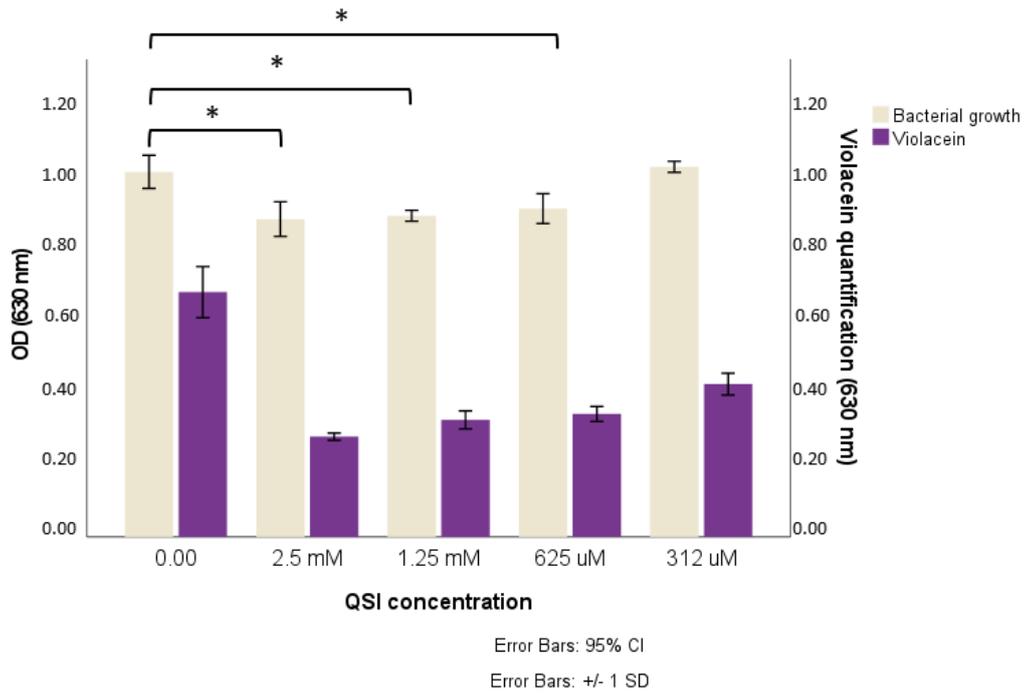


Figura S83 - Ensaio de quantificação de violaceína com **115**.

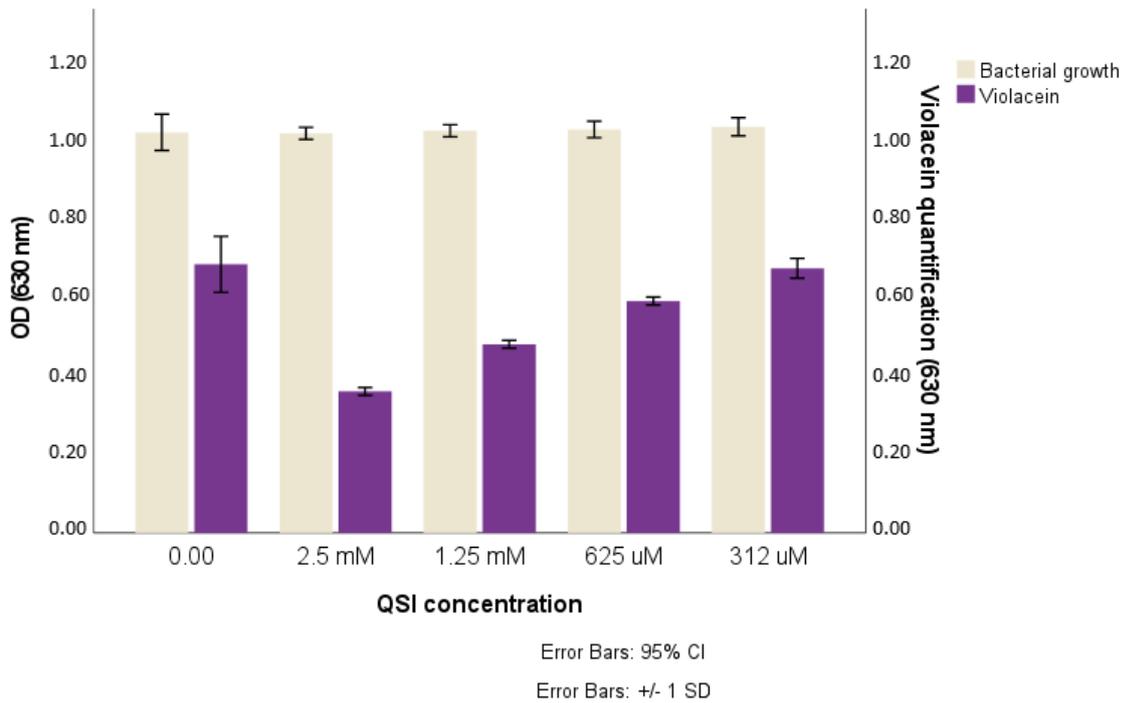


Figura S84 - Ensaio de quantificação de violaceína com **95**.

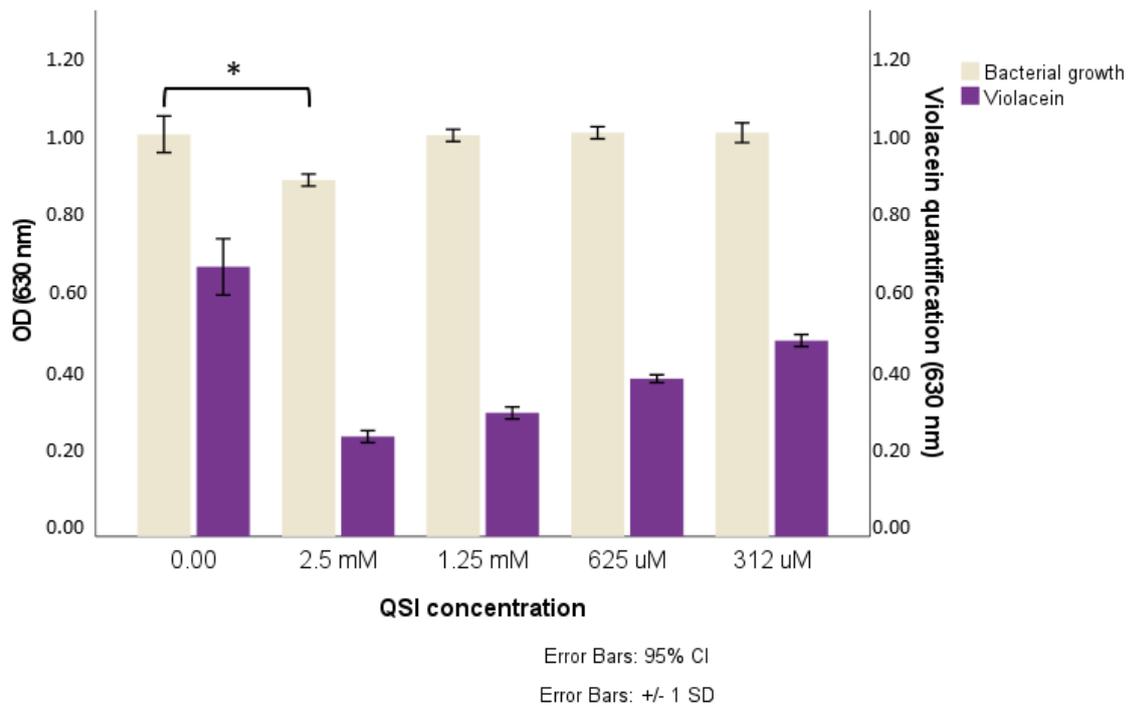


Figura S85 -. Ensaio de quantificação de violaceína com **96**.

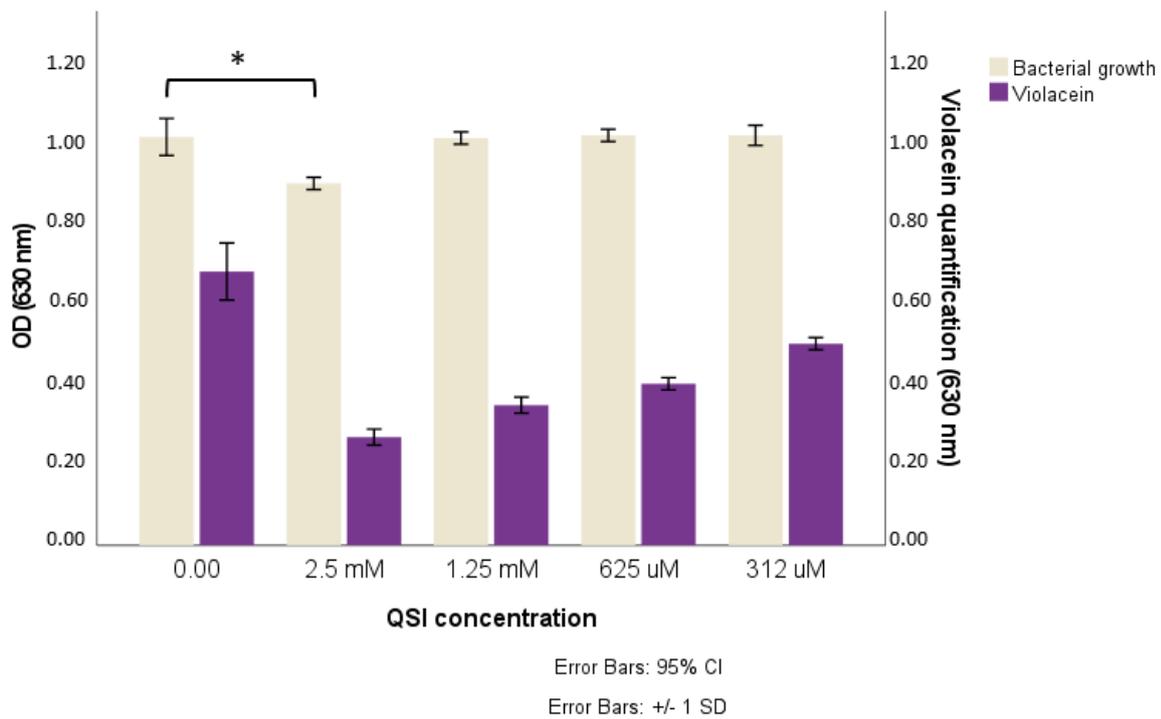


Figura S86 -. Ensaio de quantificação de violaceína com **120**.

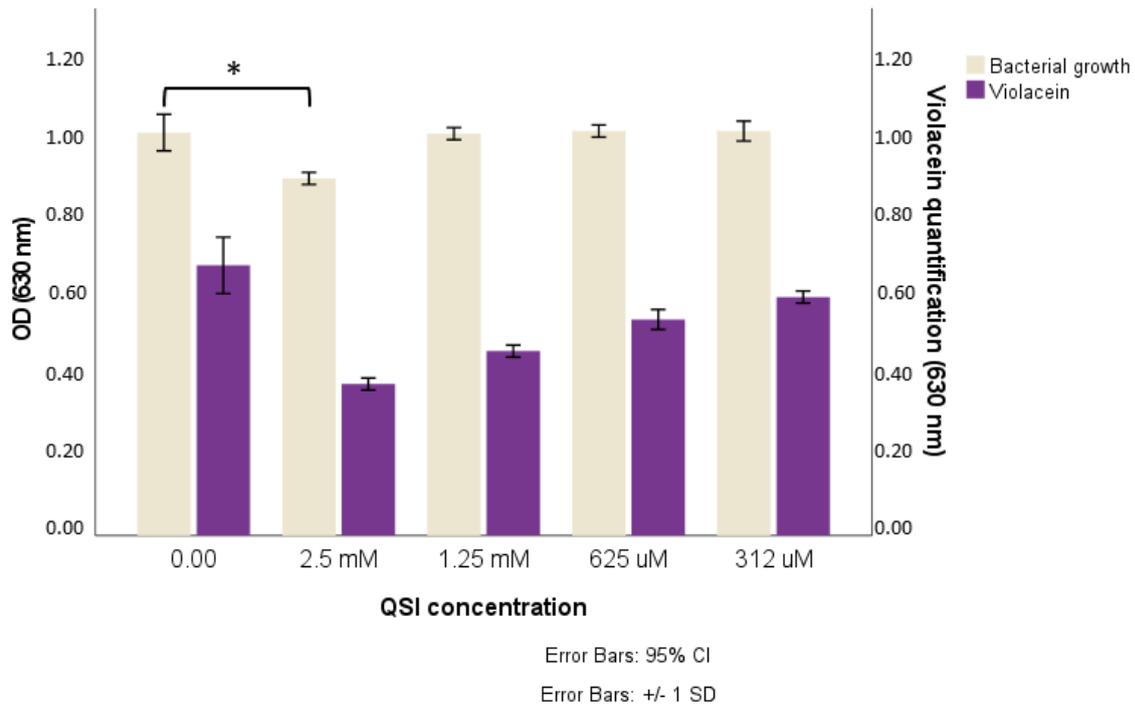


Figura S87 -. Ensaio de quantificação de violaceína com **121**.

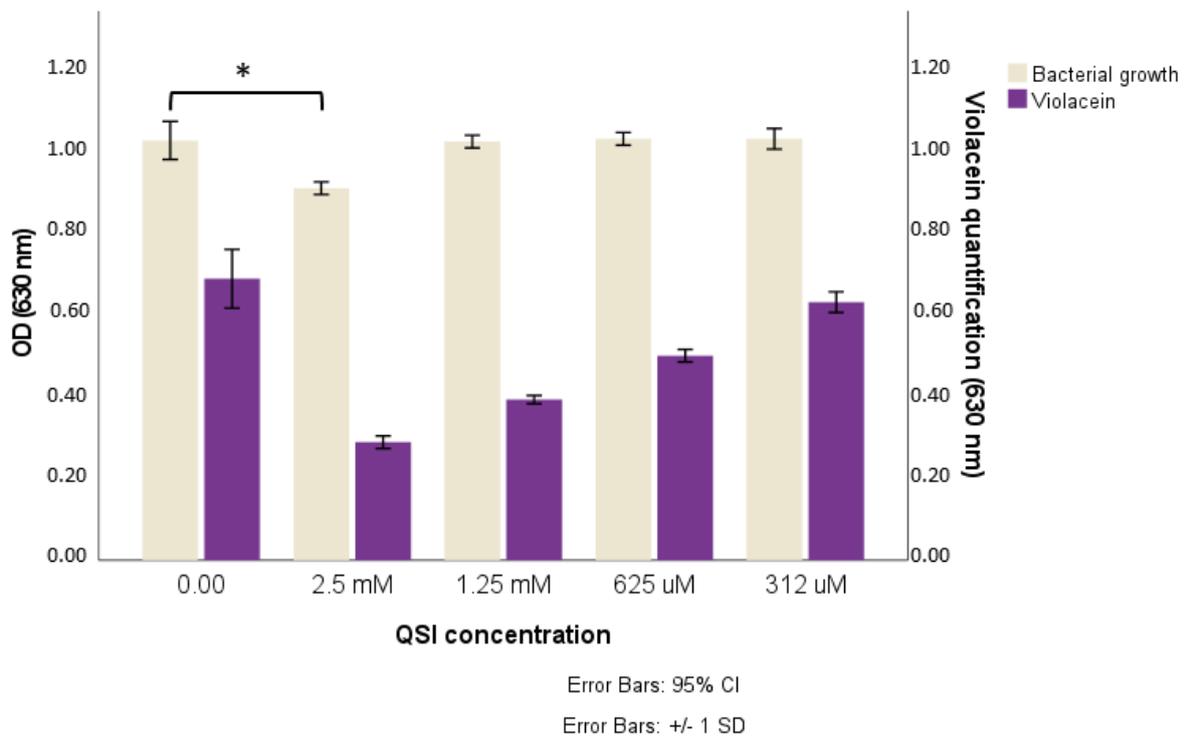


Figura S88 -. Ensaio de quantificação de violaceína com **122**.

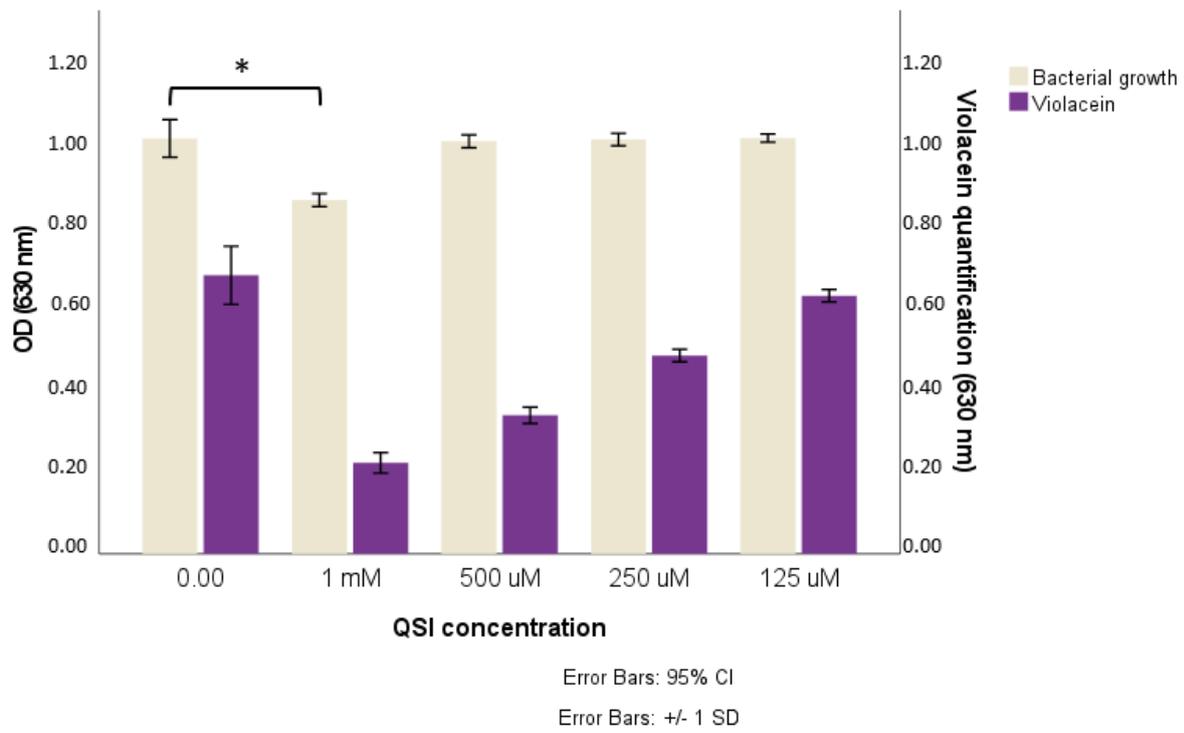


Figura S89 -. Ensaio de quantificação de violaceína com **123**.

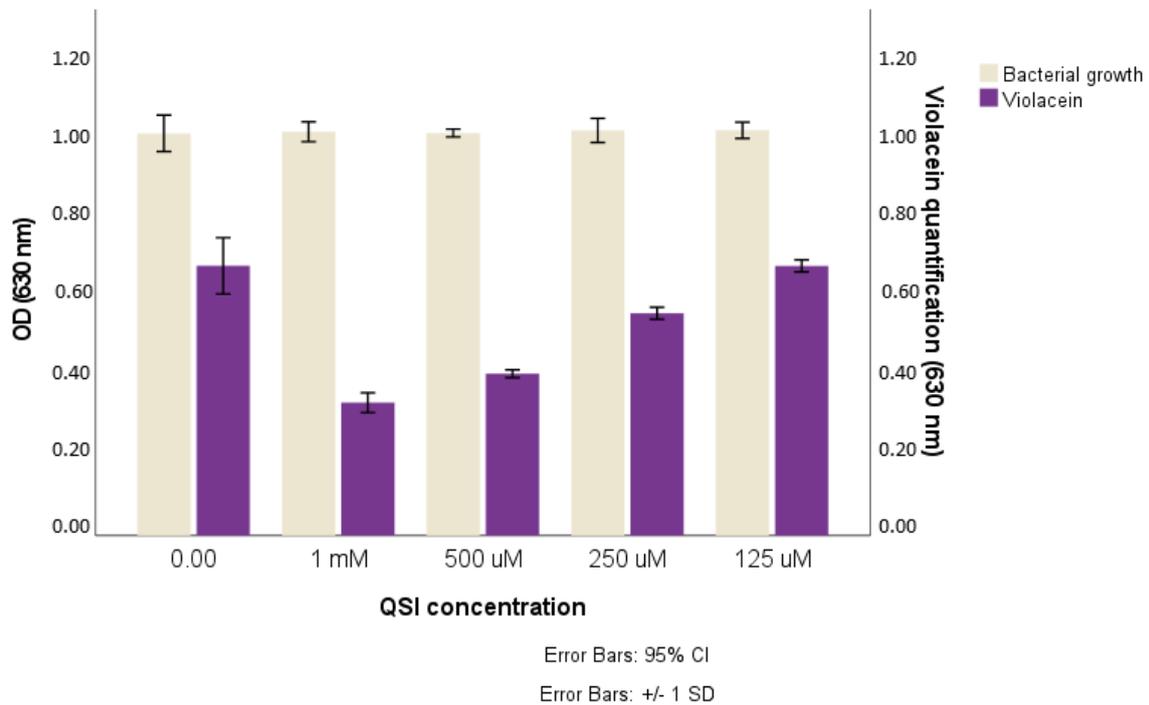


Figura S90 -. Ensaio de quantificação de violaceína com **124**.

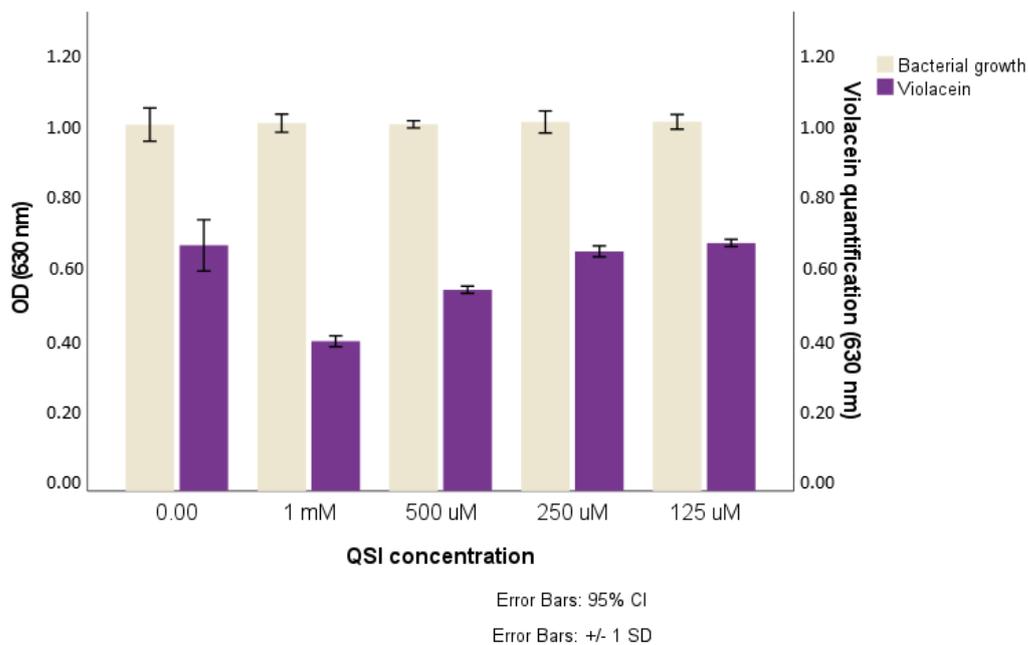


Figura S91 - Ensaio de quantificação de violaceína com **98**.

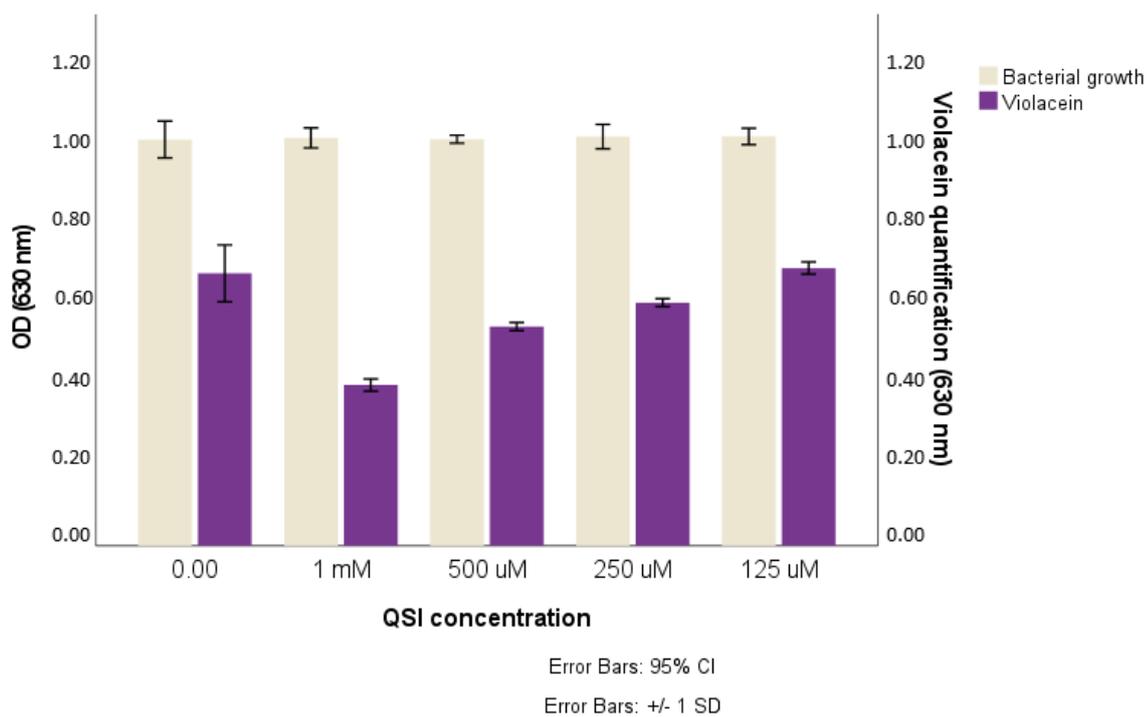


Figura S92 - Ensaio de quantificação de violaceína com **125**.

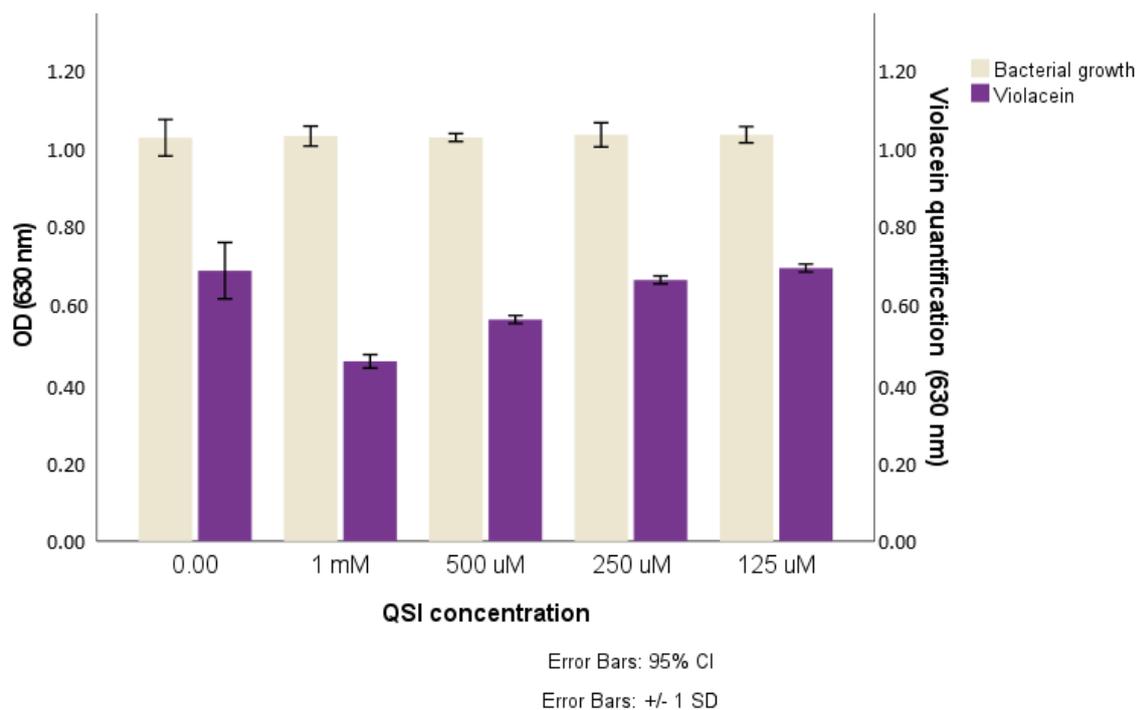


Figura S93 -. Ensaio de quantificação de violaceína com **97**.

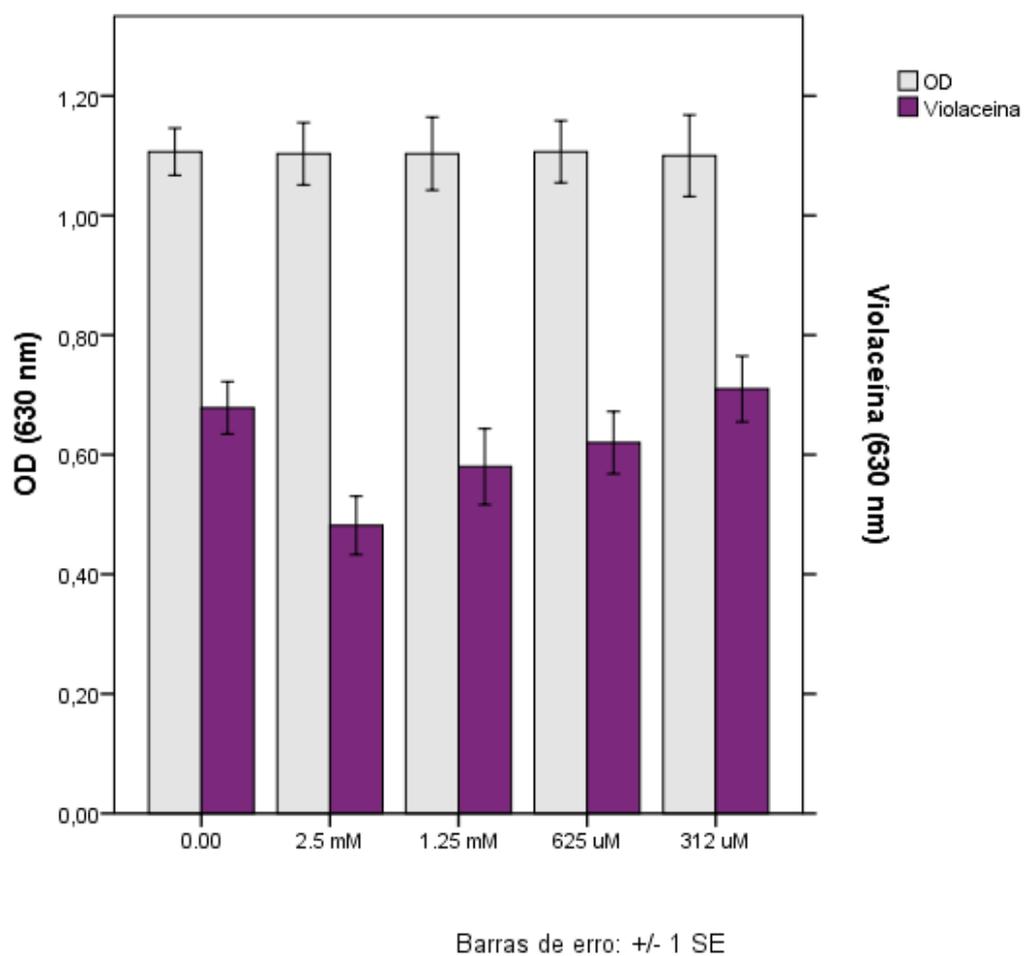


Figura S94 -. Ensaio de quantificação de violaceína com **116**.

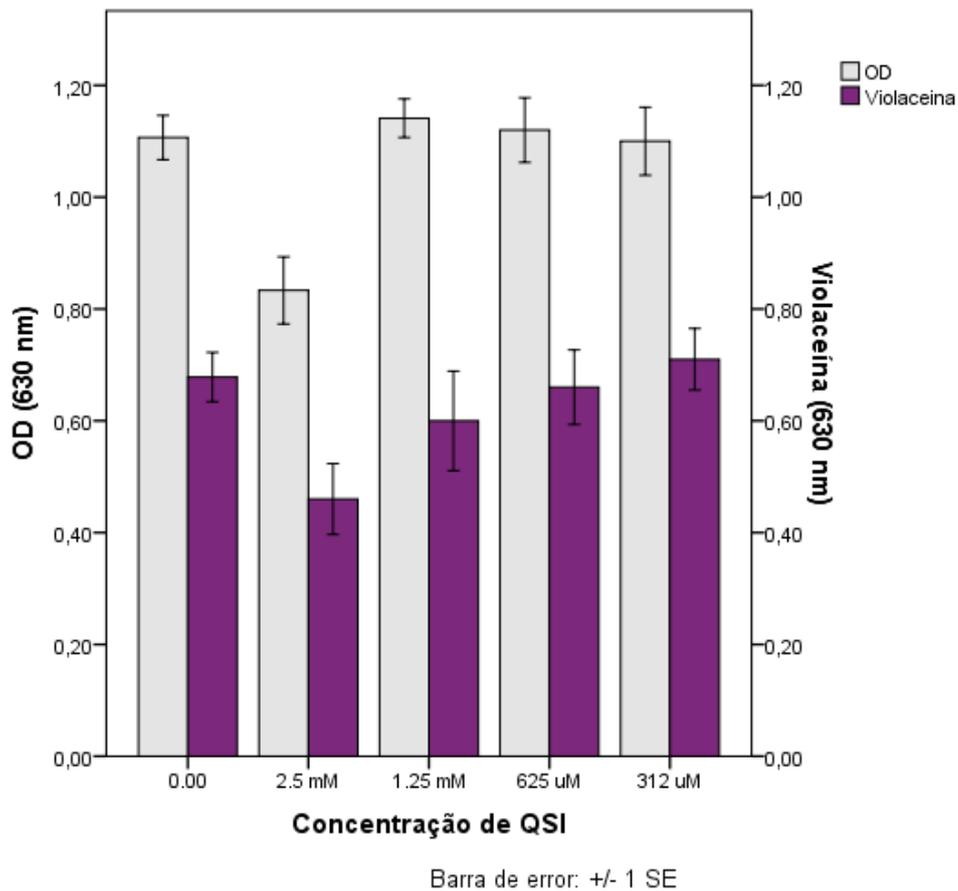


Figura S95 - Ensaio de quantificação de violaceína com **126**.

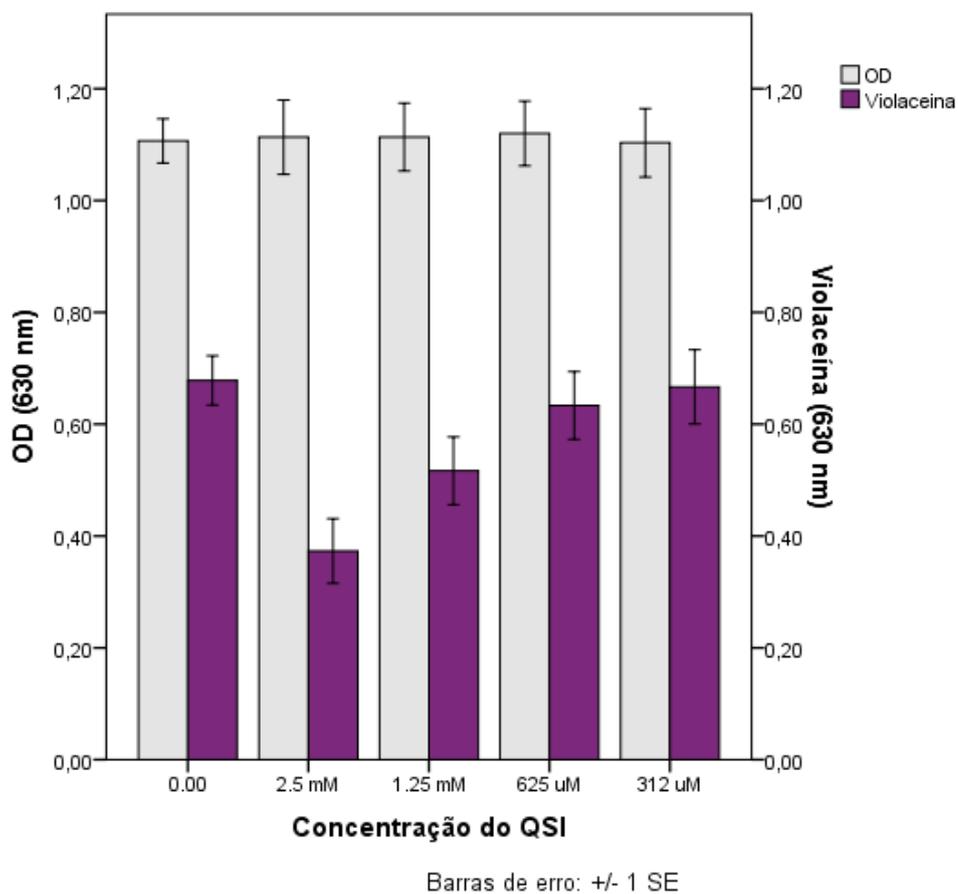


Figura S96 - Ensaio de quantificação de violaceína com **119**.

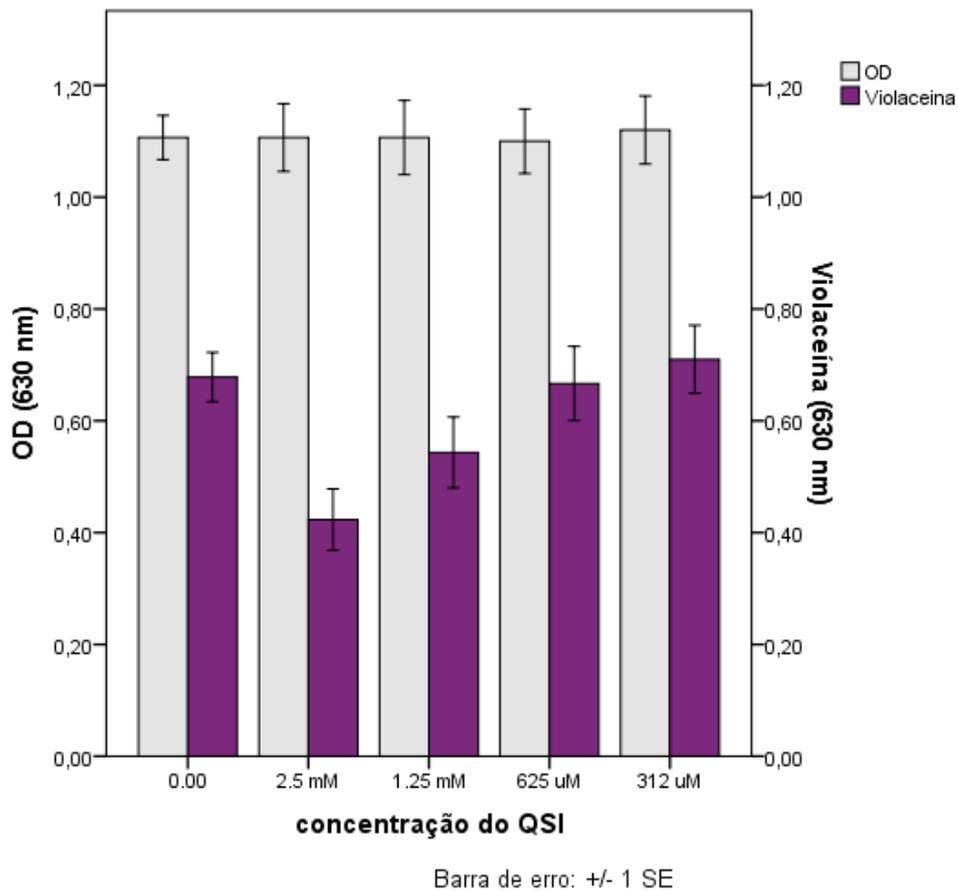


Figura S97 -. Ensaio de quantificação de violaceína com **127**.

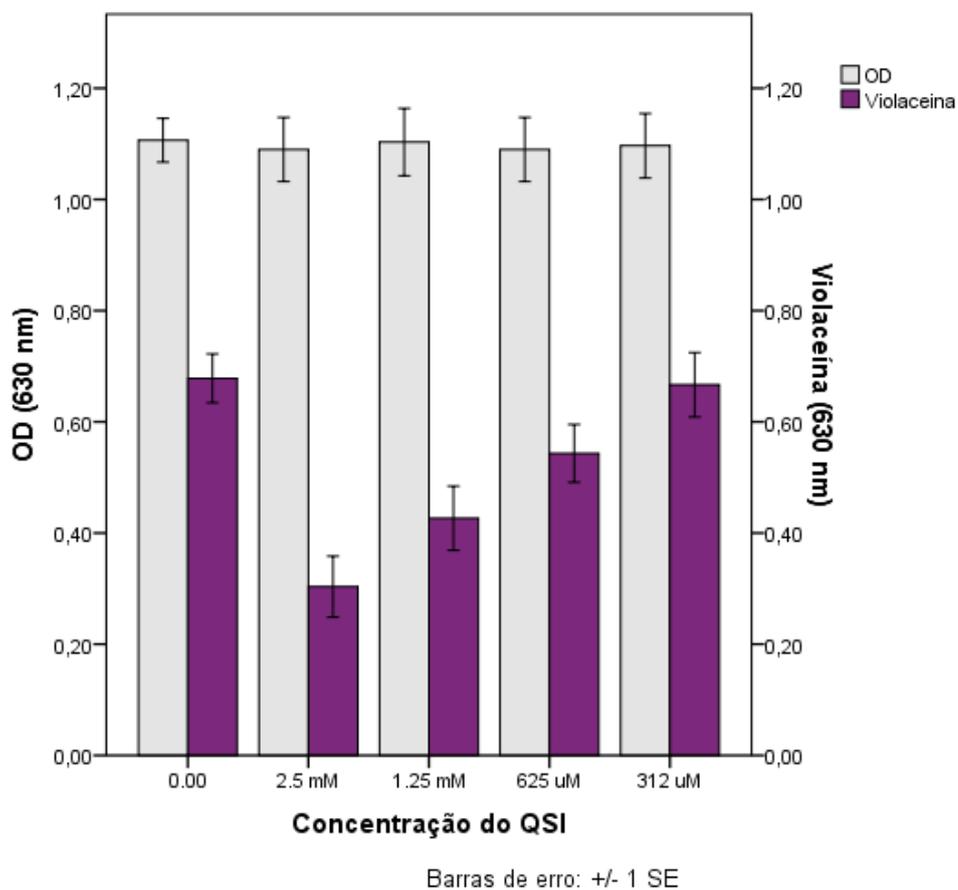


Figura S98 -. Ensaio de quantificação de violaceína com **128**.

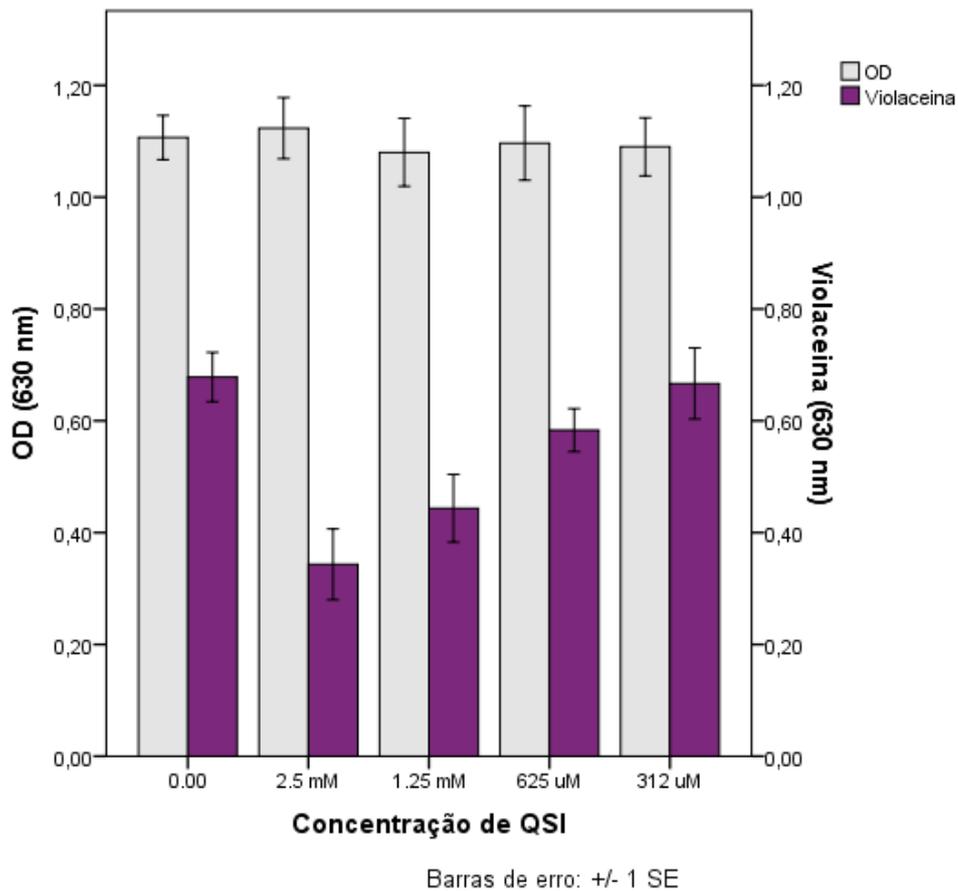


Figura S99 -. Ensaio de quantificação de violaceína com **129**.

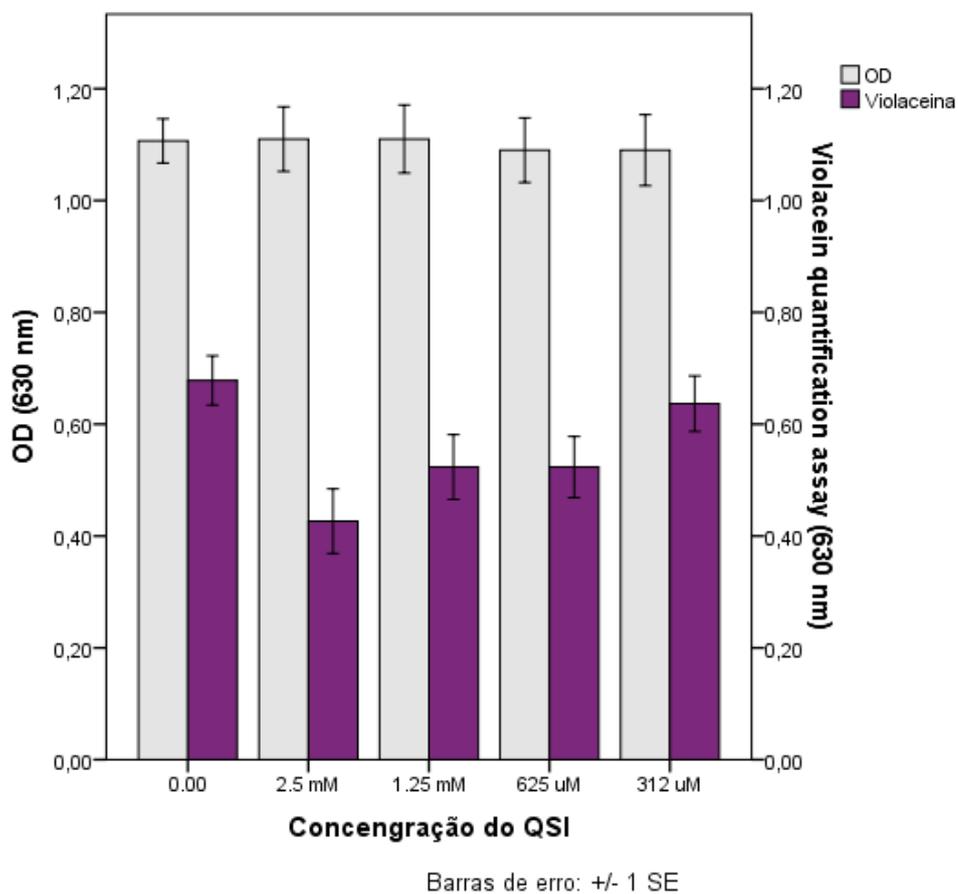


Figura S100 -. Ensaio de quantificação de violaceína com **130**.

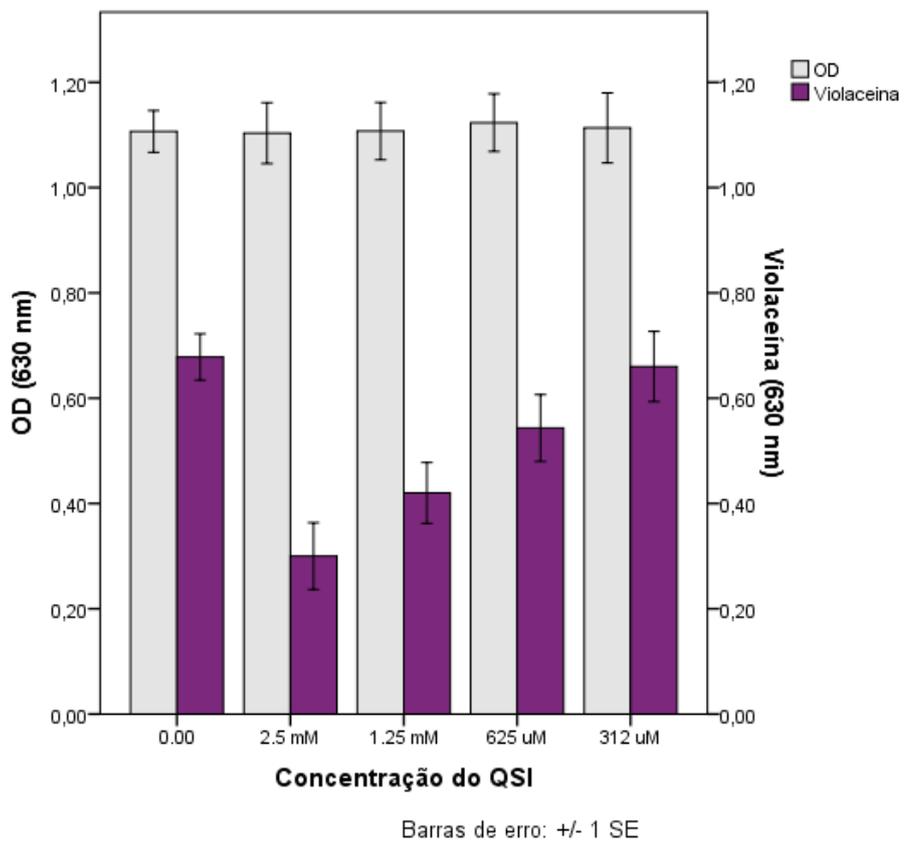


Figura S101 -. Ensaio de quantificação de violaceína com **131**.

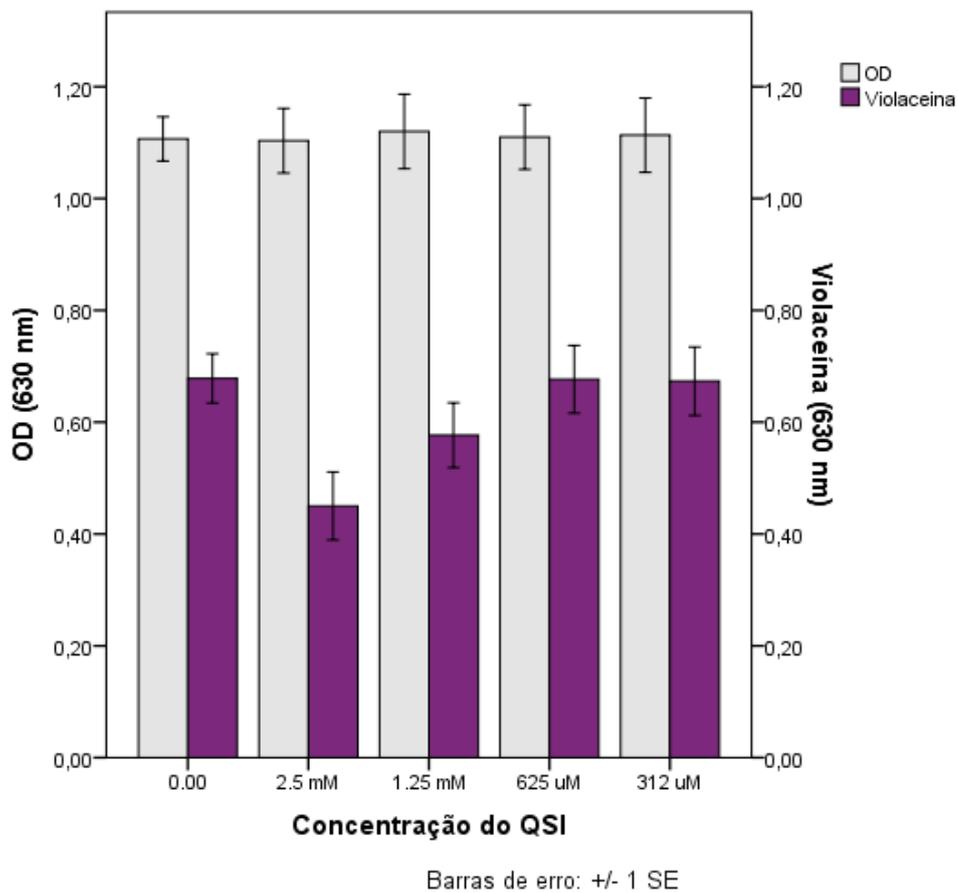


Figura S102-. Ensaio de quantificação de violaceína com **132**.

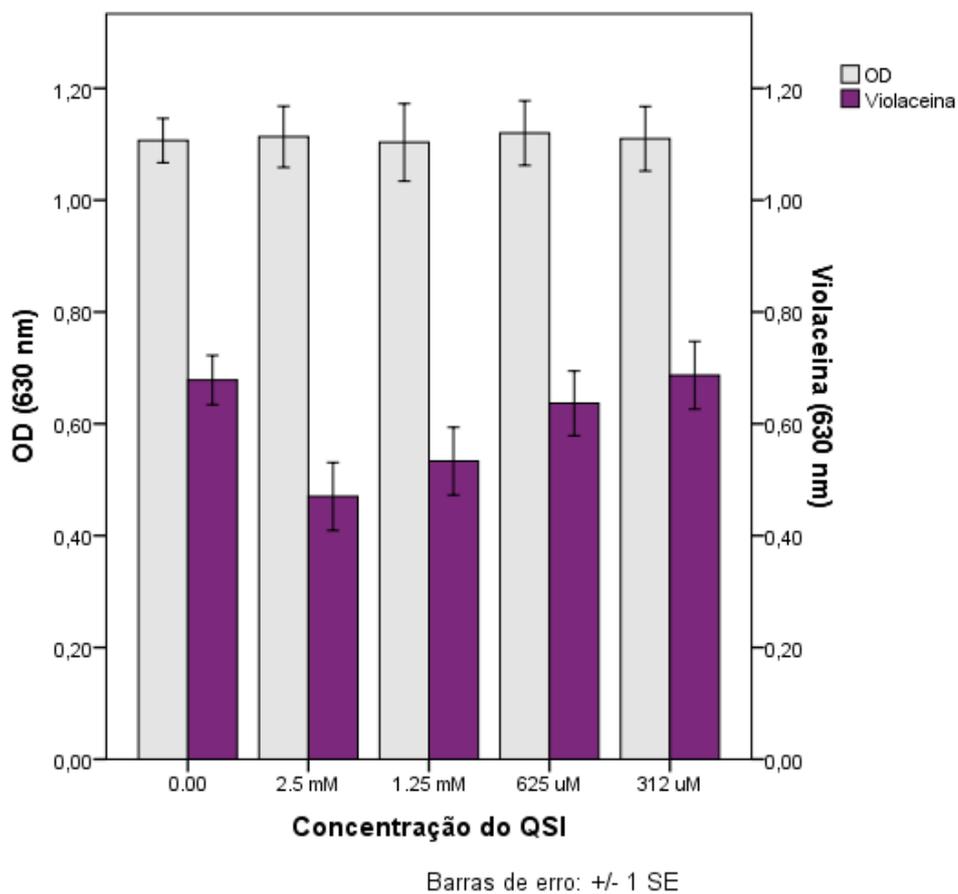


Figura S103 -. Ensaio de quantificação de violaceína com **133**.

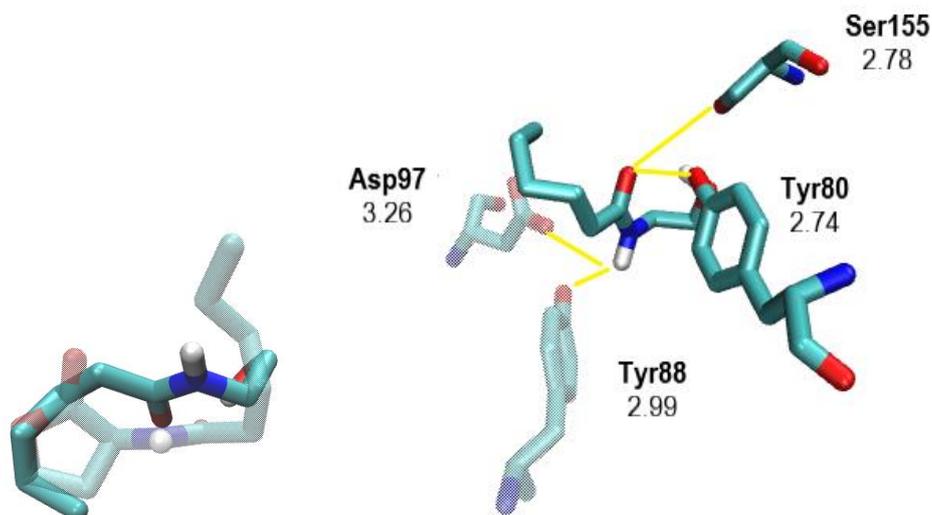


Figura S104 – (A) Sobreposição entre **51** e **115**. (B) Interações entre **115** e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

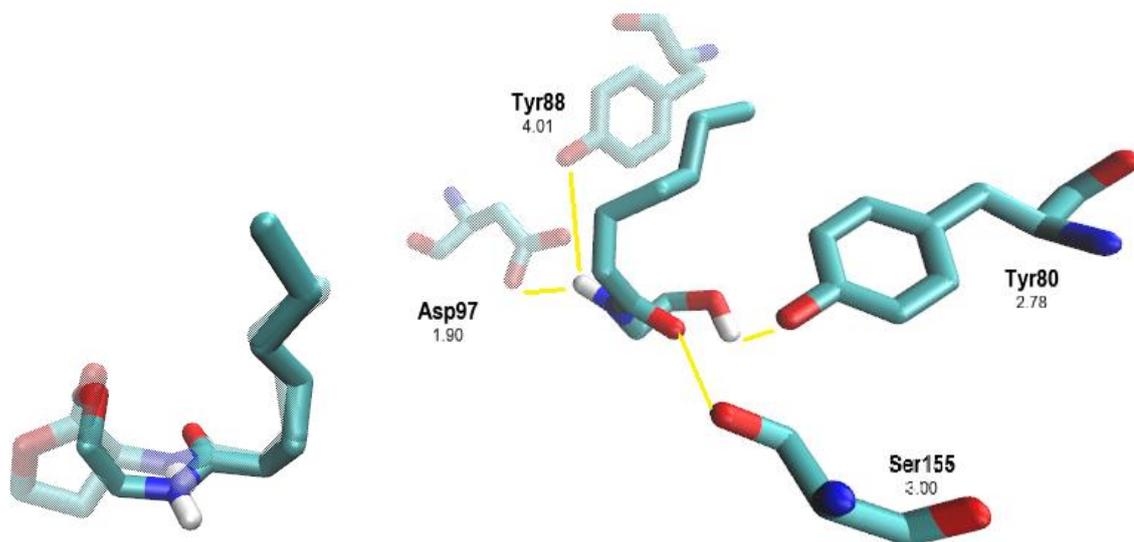


Figura S105 – (A) Sobreposição entre 51 e 95. (B) Interações entre 95 e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

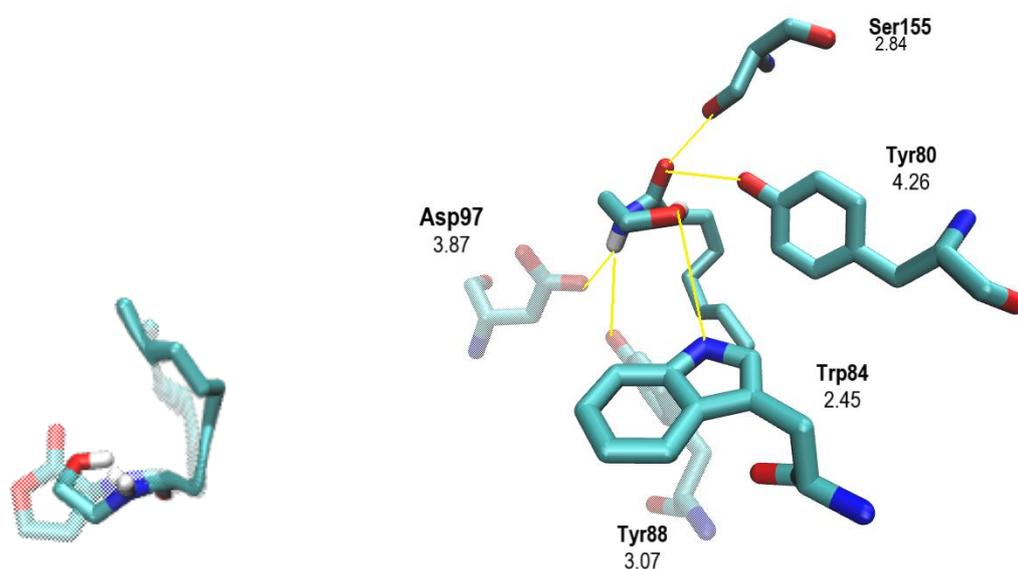


Figura S106 – (A) Sobreposição entre 51 e 96. (B) Interações entre 96 e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

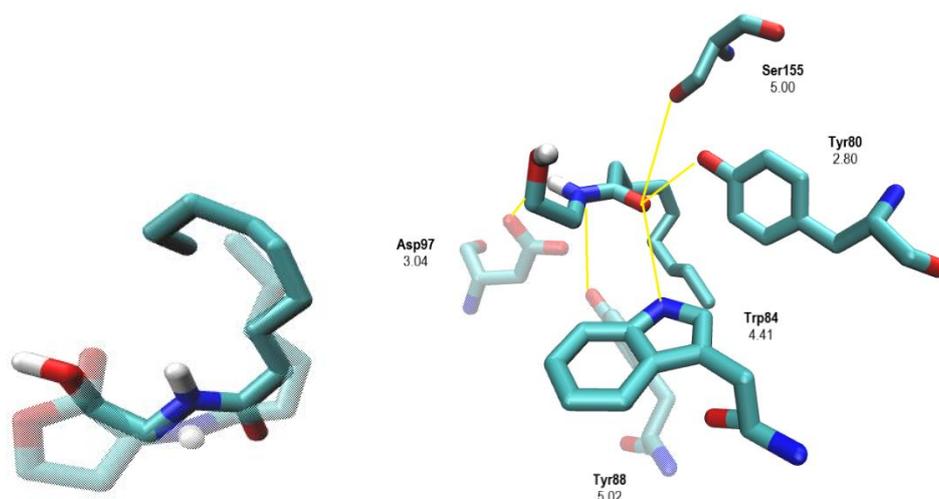


Figura S107 – (A) Sobreposição entre 51 e 120. (B) Interações entre 120 e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

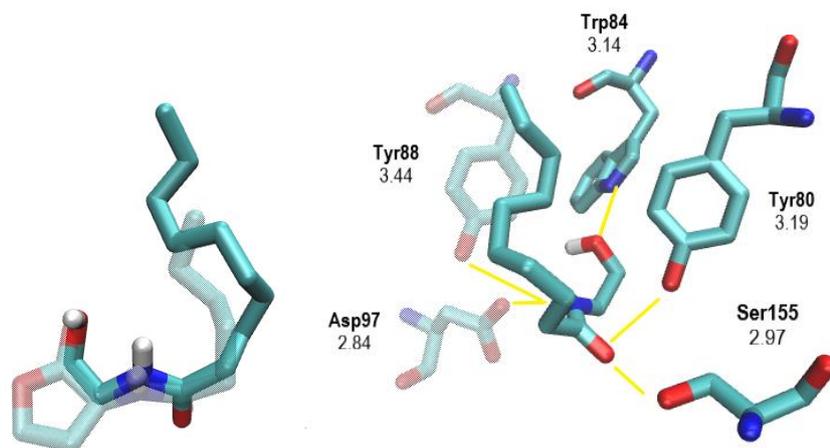


Figura S108 – (A) Sobreposição entre 51 e 121. (B) Interações entre 121 e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

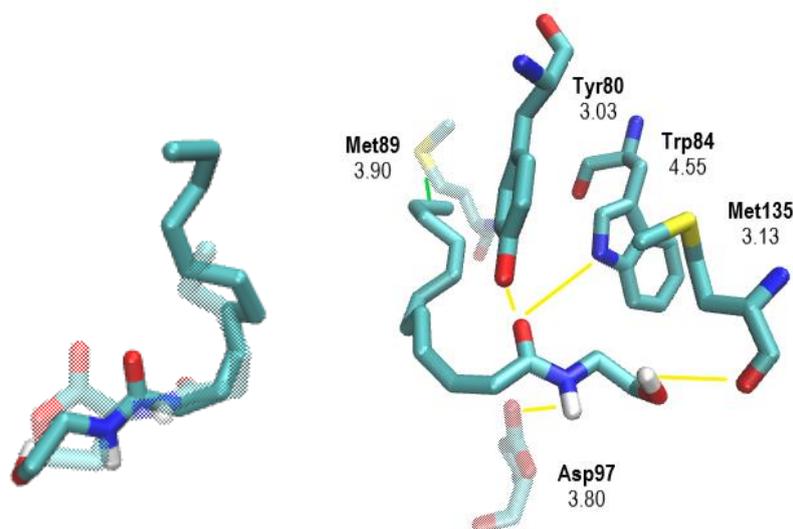


Figura S96 – (A) Sobreposição entre 51 e 122. (B) Interações entre 122 e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

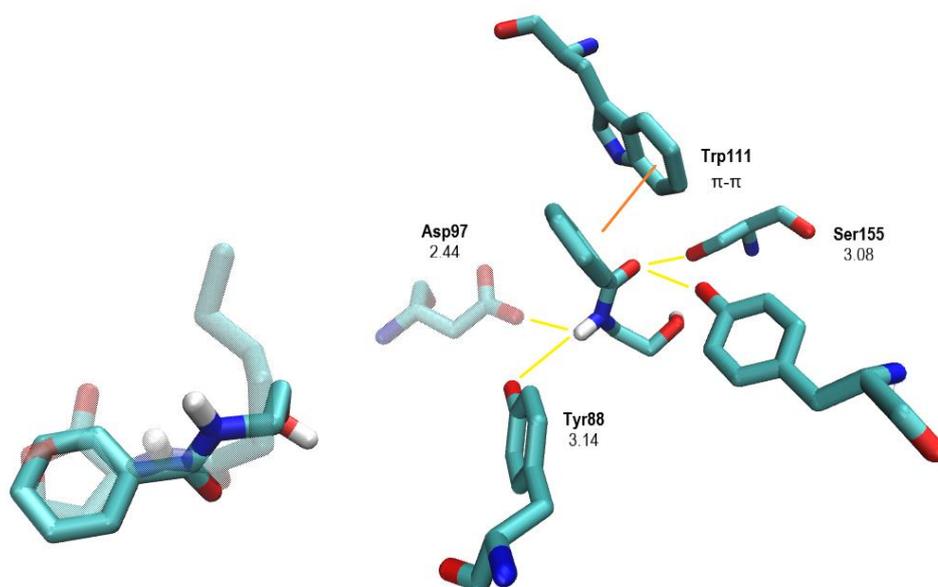


Figura S110 – (A) Sobreposição entre 51 e 123. (B) Interações entre 123 e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

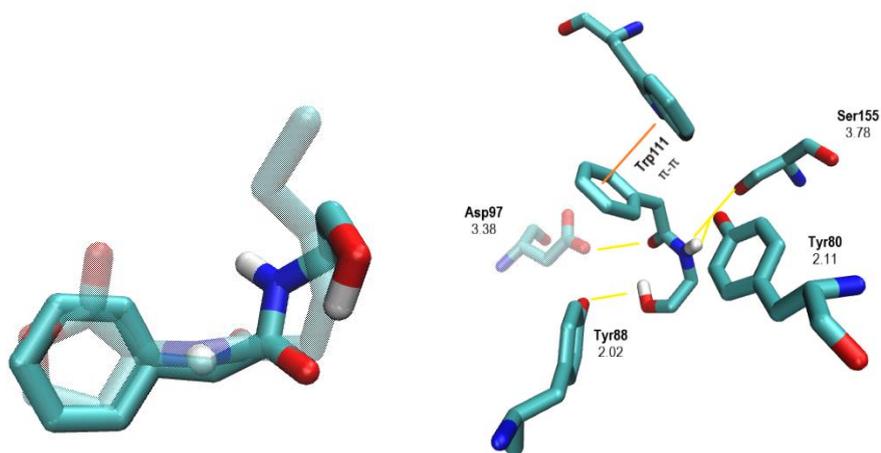


Figura S111 – (A) Sobreposição entre 51 e 124. (B) Interações entre 124 e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

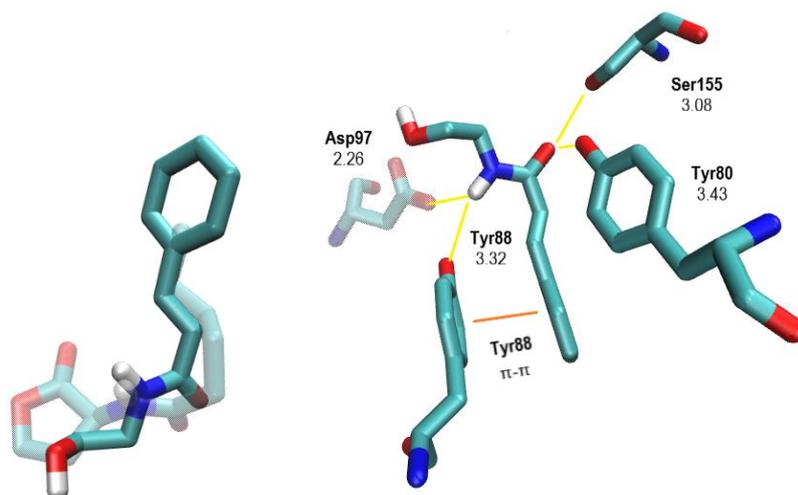


Figura S112 – (A) Sobreposição entre 51 e 98. (B) Interações entre 98 e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

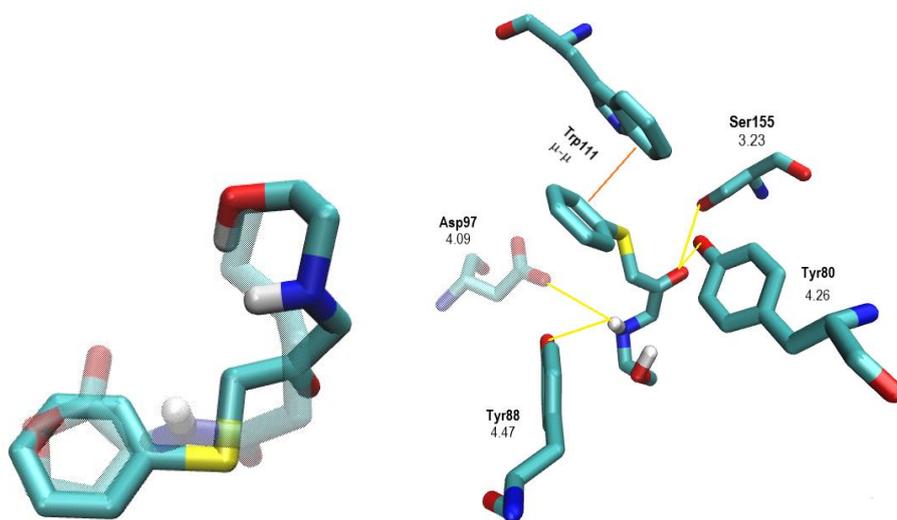


Figura S113 – (A) Sobreposição entre 51 e 125. (B) Interações entre 125 e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

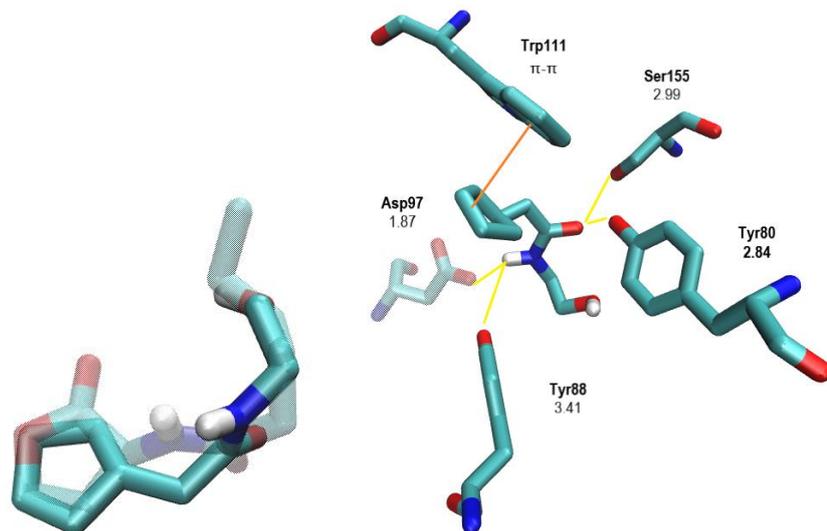


Figura S114 – (A) Sobreposição entre 51 e 97. (B) Interações entre 97 e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

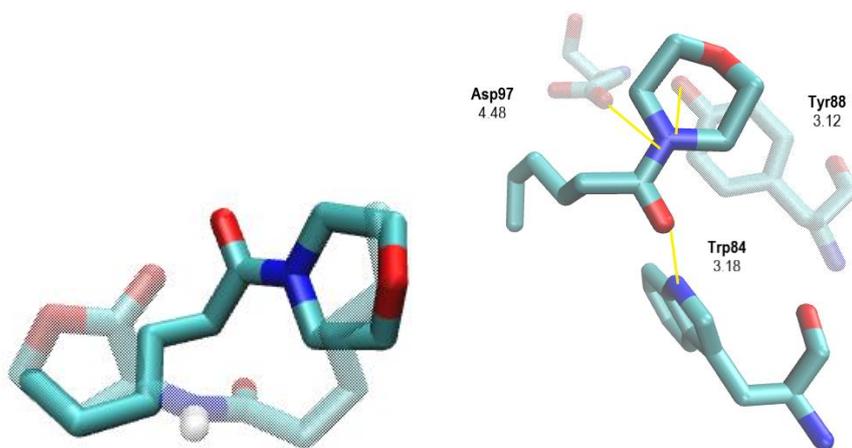


Figura S115– (A) Sobreposição entre 51 e 116. (B) Interações entre 116 e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

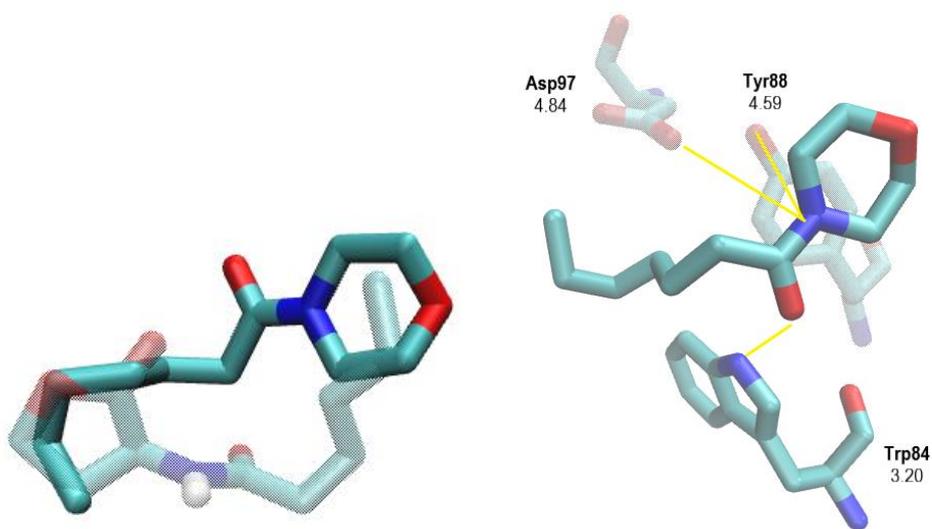


Figura S116 – (A) Sobreposição entre 51 e 126. (B) Interações entre 126 e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

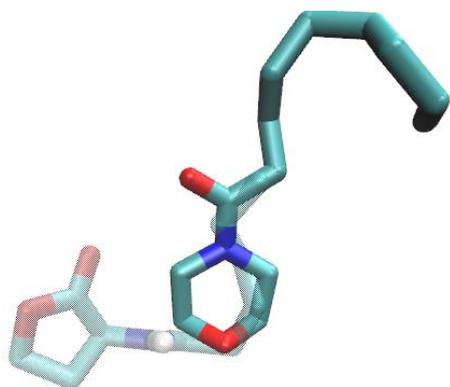


Figura S117 – (A) Sobreposição entre **51** e **119**. (B) Interações entre **119** e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

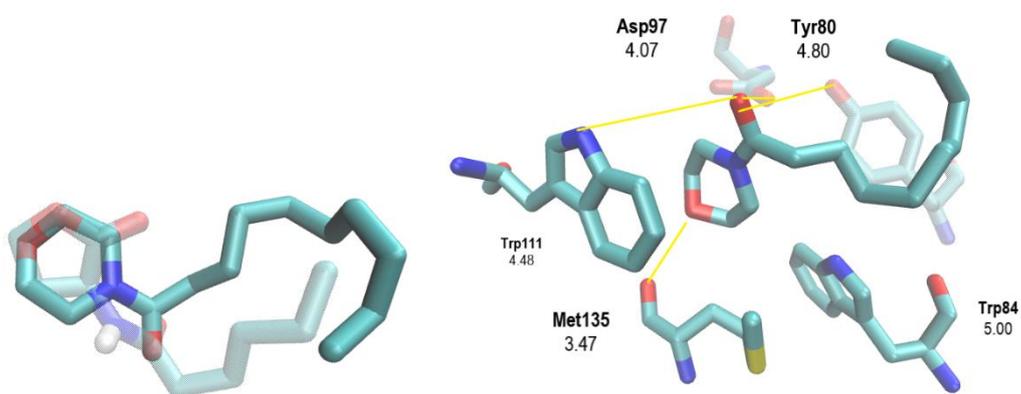


Figura S118 – (A) Sobreposição entre **51** e **127**. (B) Interações entre **127** e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

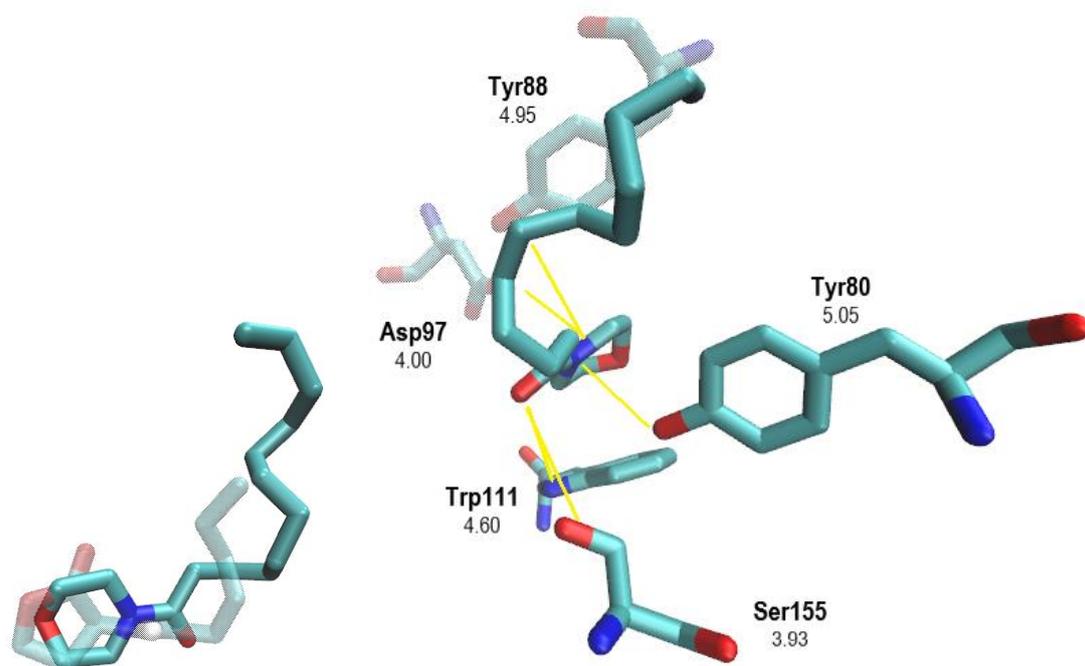


Figura S118 – (A) Sobreposição entre **51** e **128**. (B) Interações entre **128** e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

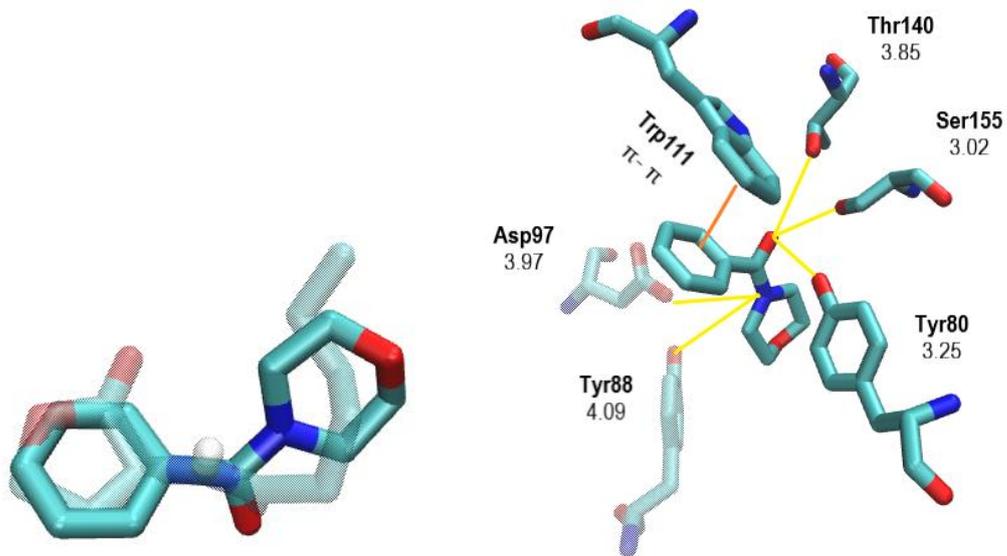


Figura S120 – (A) Sobreposição entre 51 e 129 (B) Interações entre 129 e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

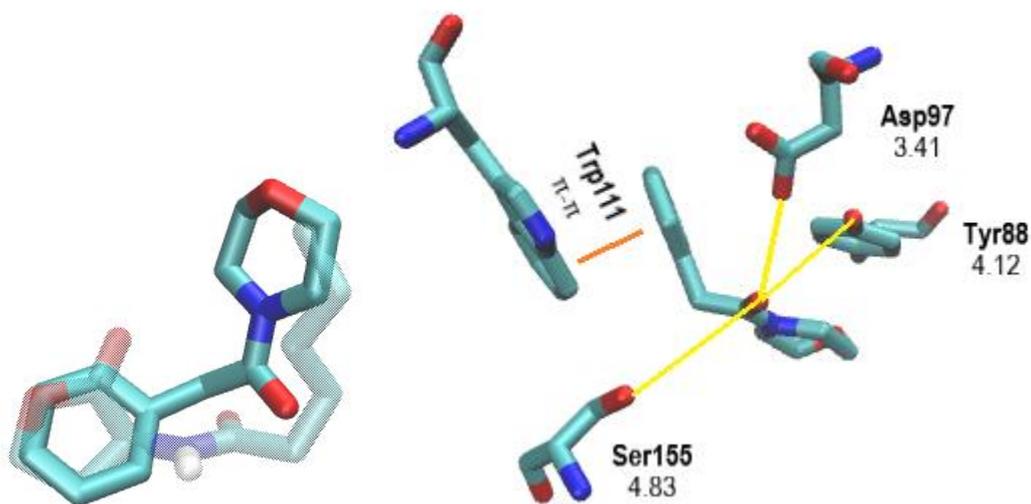


Figura S121 – (A) Sobreposição entre 51 e 130. (B) Interações entre 130 e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

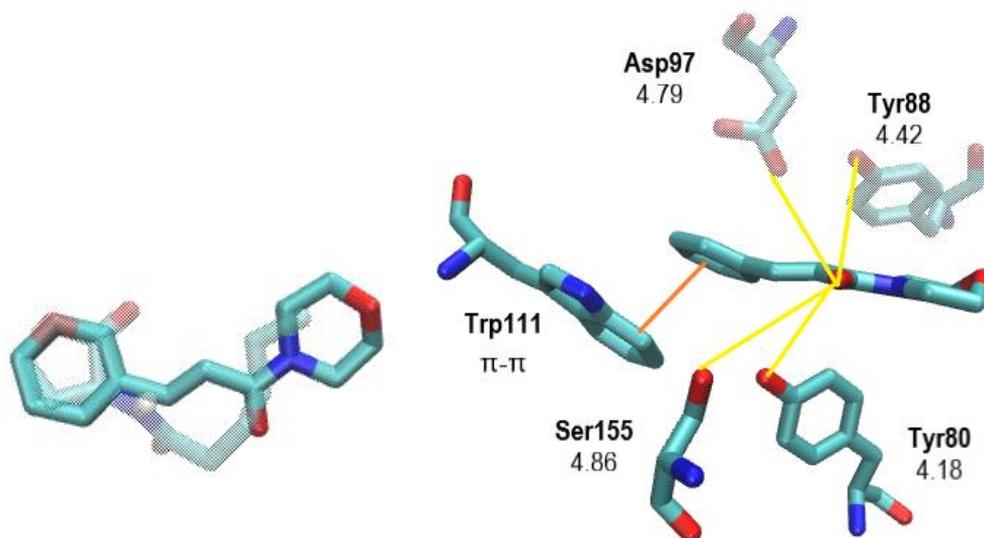


Figura S122 – (A) Sobreposição entre 51 e 131. (B) Interações entre 131 e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

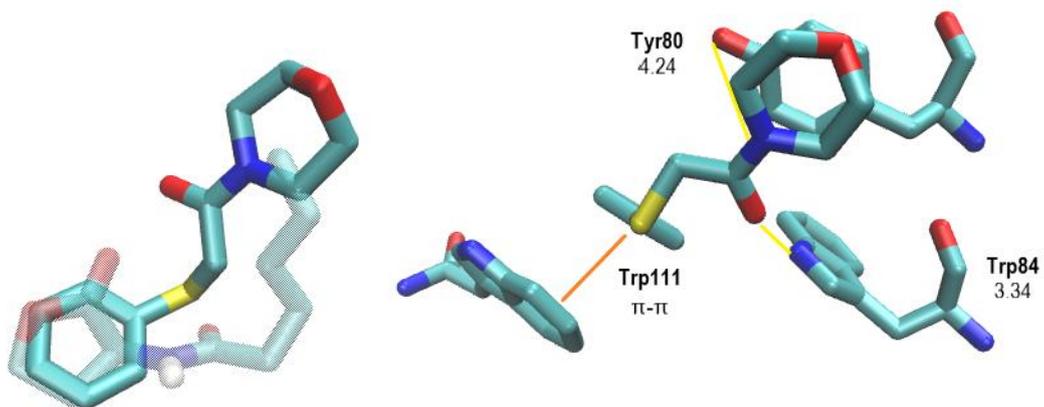


Figura S123 – (A) Sobreposição entre 51 e 132. (B) Interações entre 132 e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

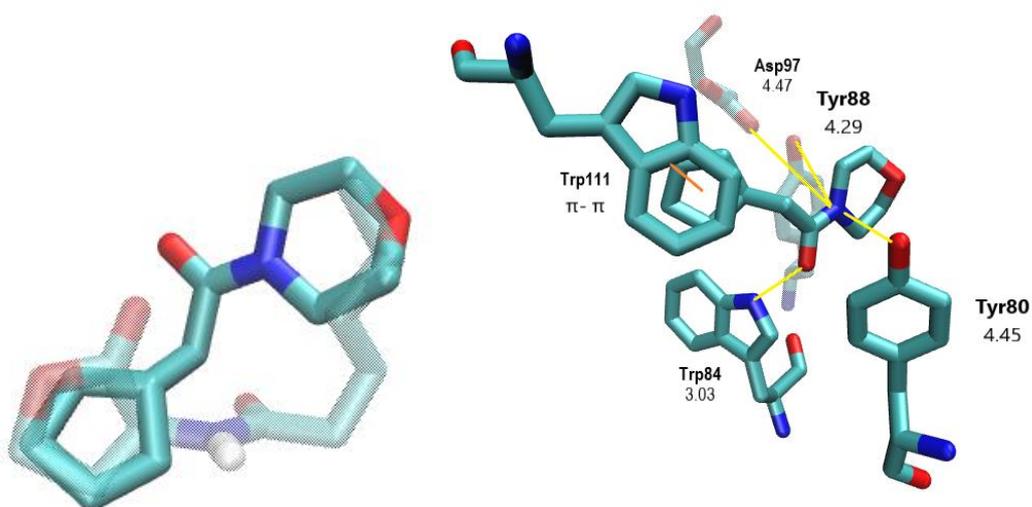


Figura S124 – (A) Sobreposição entre 51 e 133. (B) Interações entre 133 e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

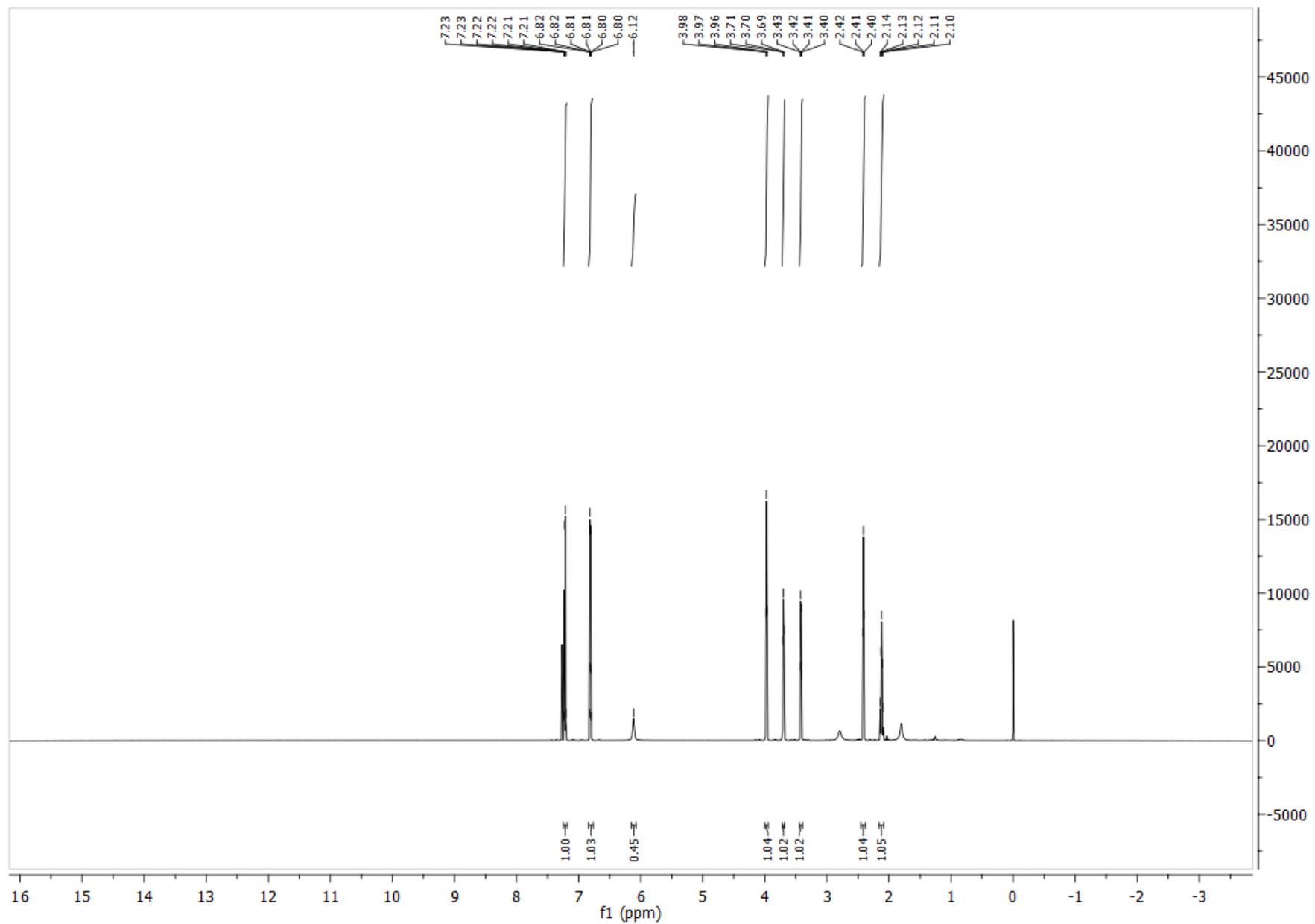


Figura S125 - Espectro (RMN de ¹H 600 MHz, CDCl₃, 25°C) – 4-(4-clorofenoxi)-*N*-(2-hidroxietyl)butanamida **134**.

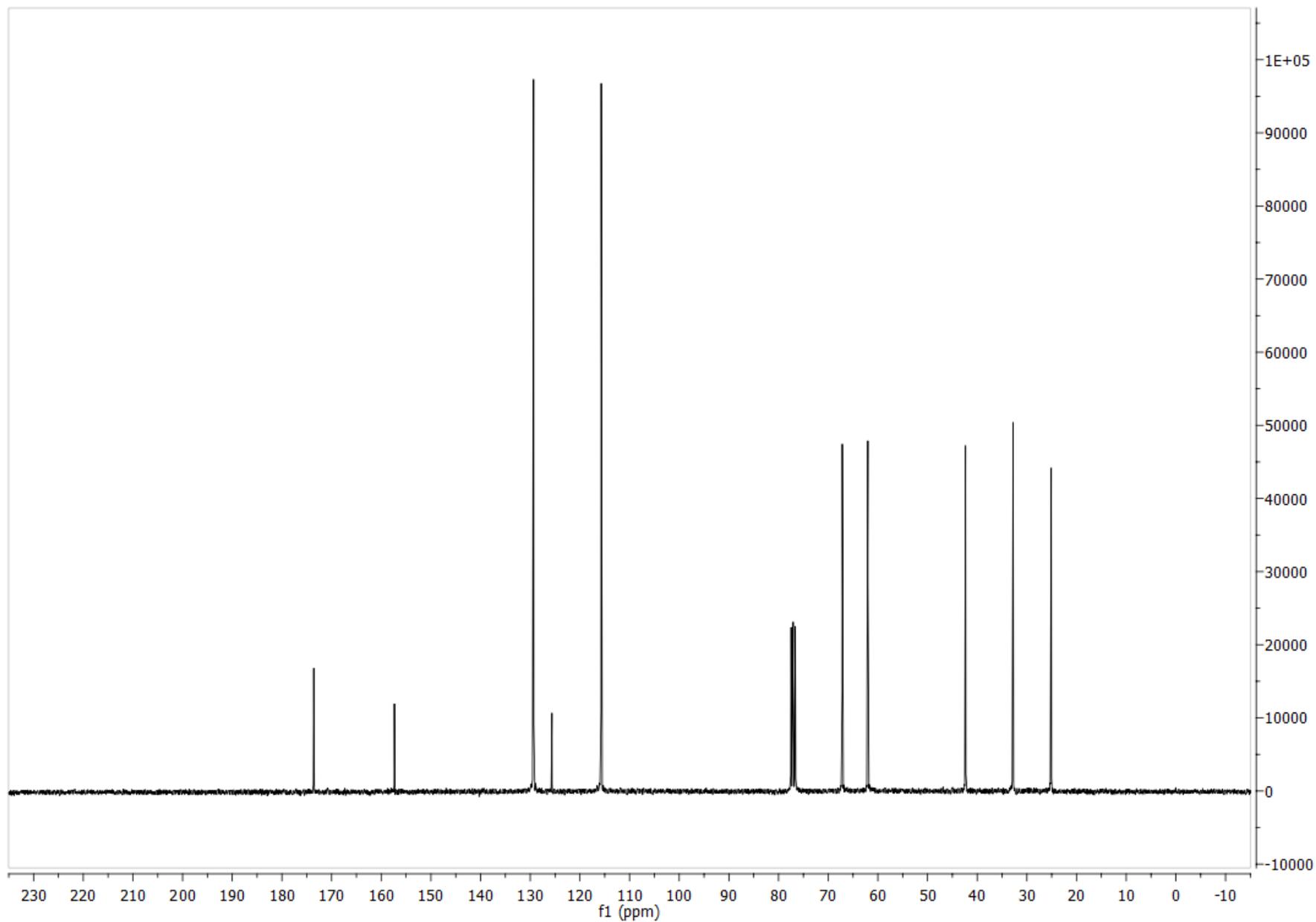


Figura S126 - Espectro (RMN de ^{13}C 75 MHz, CDCl_3 , 25°C) – 4-(4-clorofenoxi)-*N*-(2-hidroxietil)butanamida **134**.

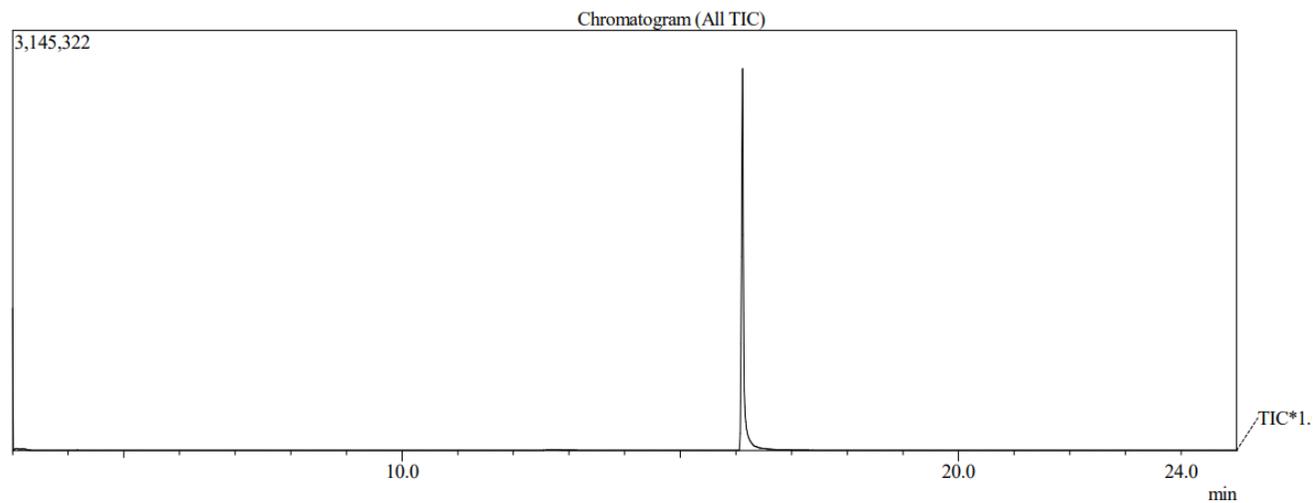


Figura S127 - Cromatograma da 4-(4-clorofenoxi)-*N*-(2-hidroxi)etil)butanamida **134**.

Line#:1 R.Time:16.117(Scan#:1575)
 MassPeaks:92
 RawMode:Averaged 15.992-16.267(1560-1593) BasePeak:85.05(78194)
 BG Mode:None Group 1 - Event 1 Scan

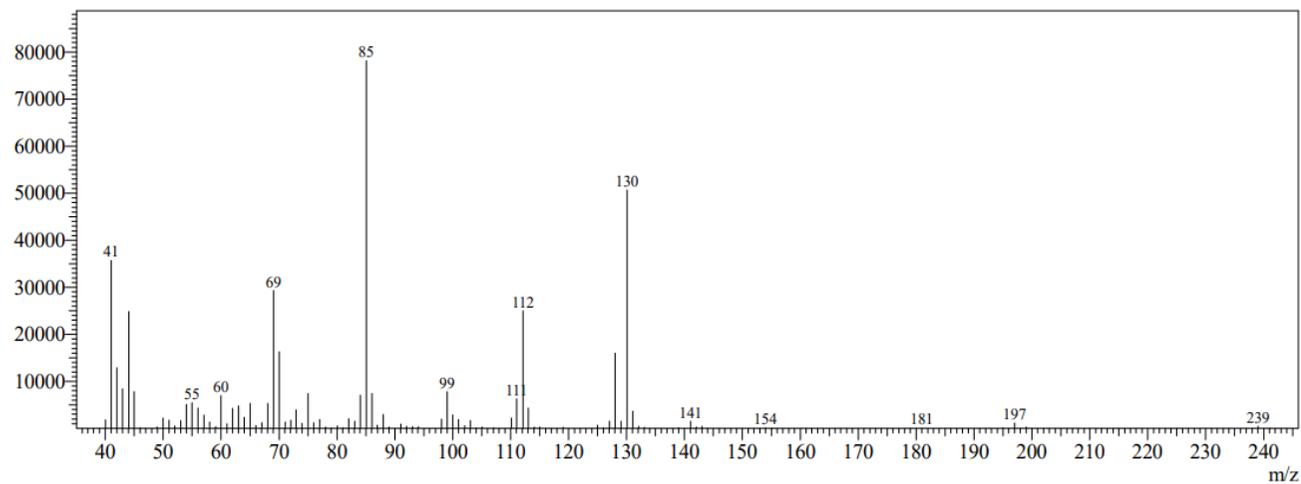


Figura S128- Espectro (EM 70 eV m/z) – 4-(4-clorofenoxi)-*N*-(2-hidroxi)etil)butanamida **134**.

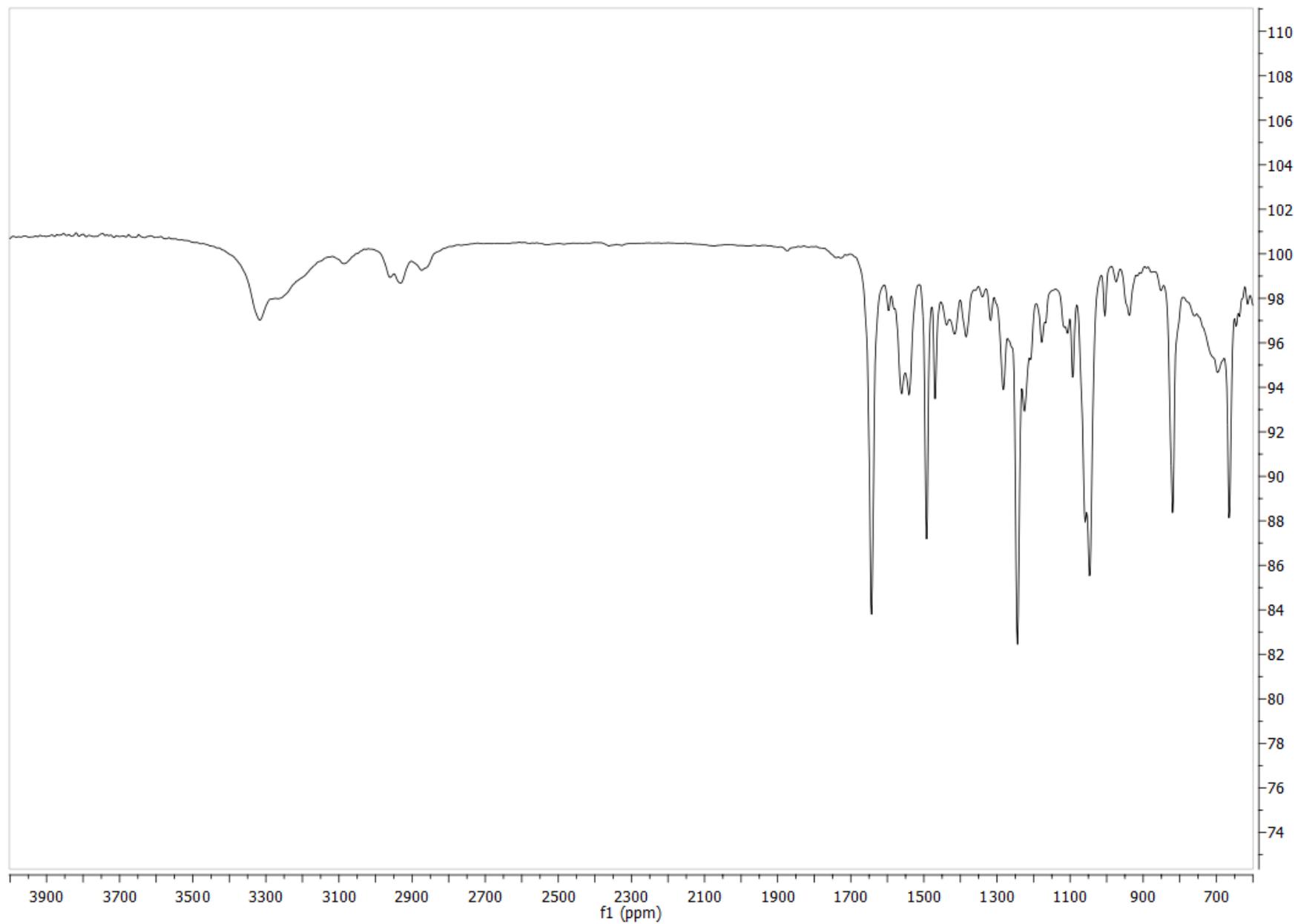


Figura S129 - Espectro de Infravermelho (ATR) – 4-(4-clorofenoxi)-*N*-(2-hidroxietyl)butanamida **134**.

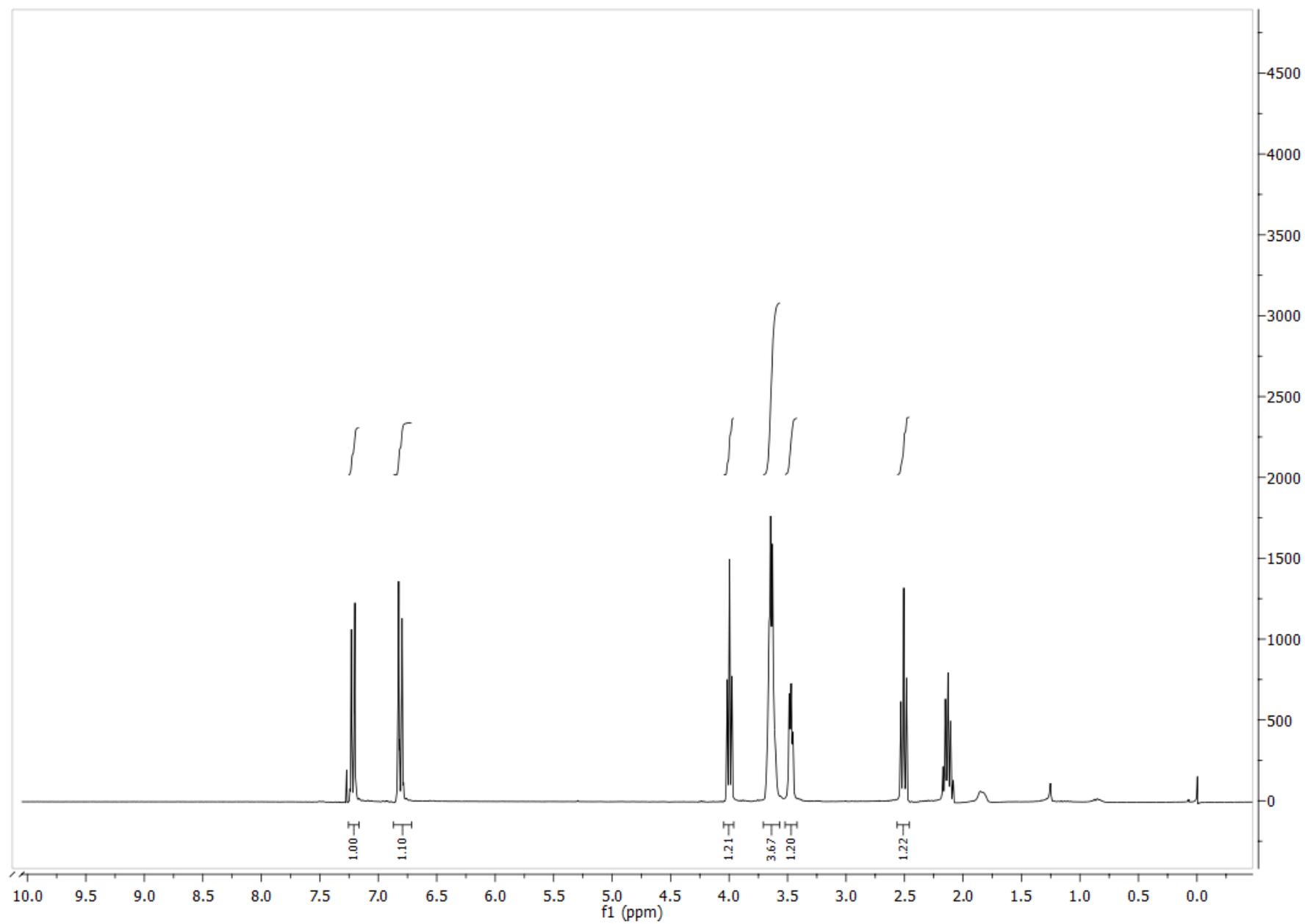


Figura S130 - Espectro (RMN de ^1H 600 MHz, CDCl_3 , 25°C) – 4-(4-clorofenoxi)-1-morfolinobutan-1-ona **135**.

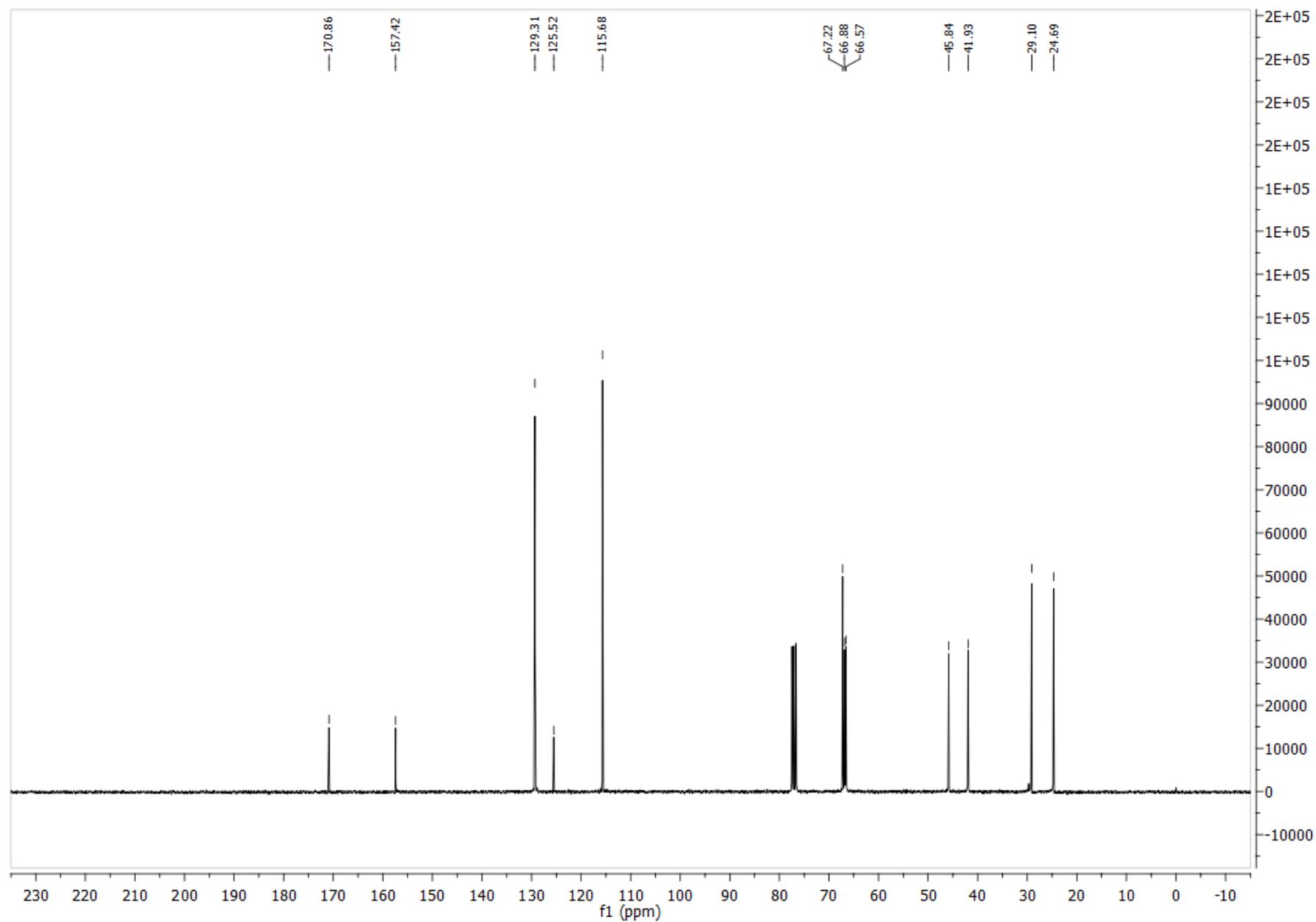


Figura S131 - Espectro (RMN de ^{13}C 75 MHz, CDCl_3 , 25°C) – 4-(4-clorofenoxi)-1-morfolinobutan-1-ona **135**.

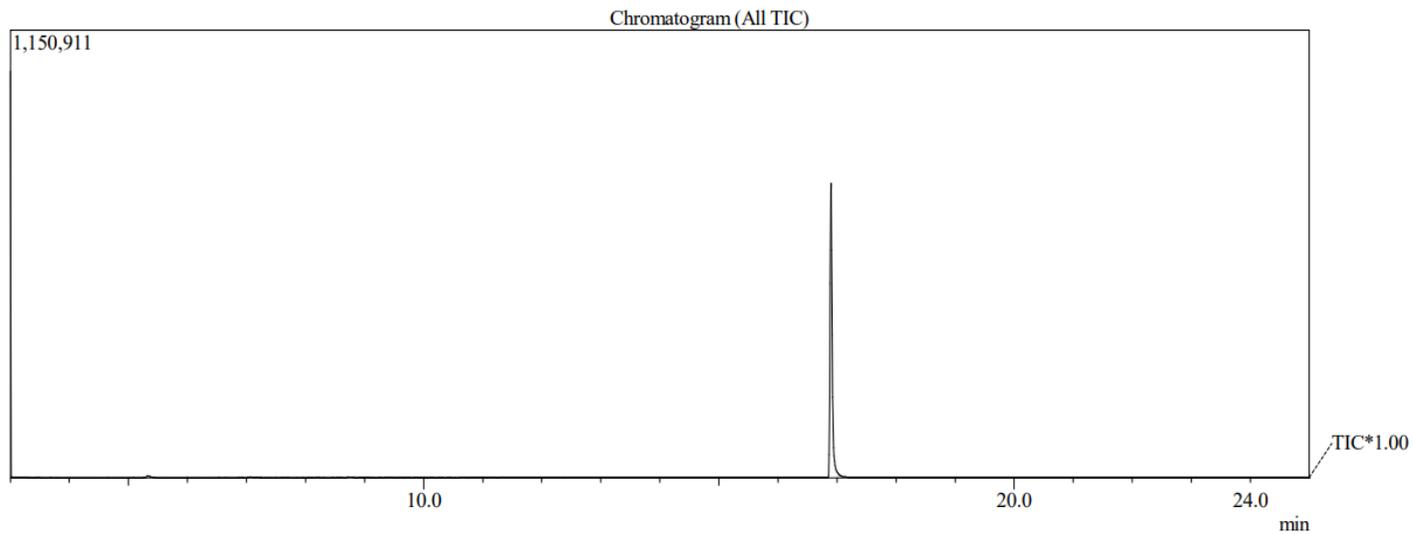


Figura S132 - Cromatograma da – 4-(4-clorofenoxi)-1-morfolinobutan-1-ona **135**.

Line#:1 R.Time:16.900(Scan#:1669)
MassPeaks:58
RawMode:Averaged 16.858-16.933(1664-1673) BasePeak:156.15(97800)
BG Mode:None Group 1 - Event 1 Scan

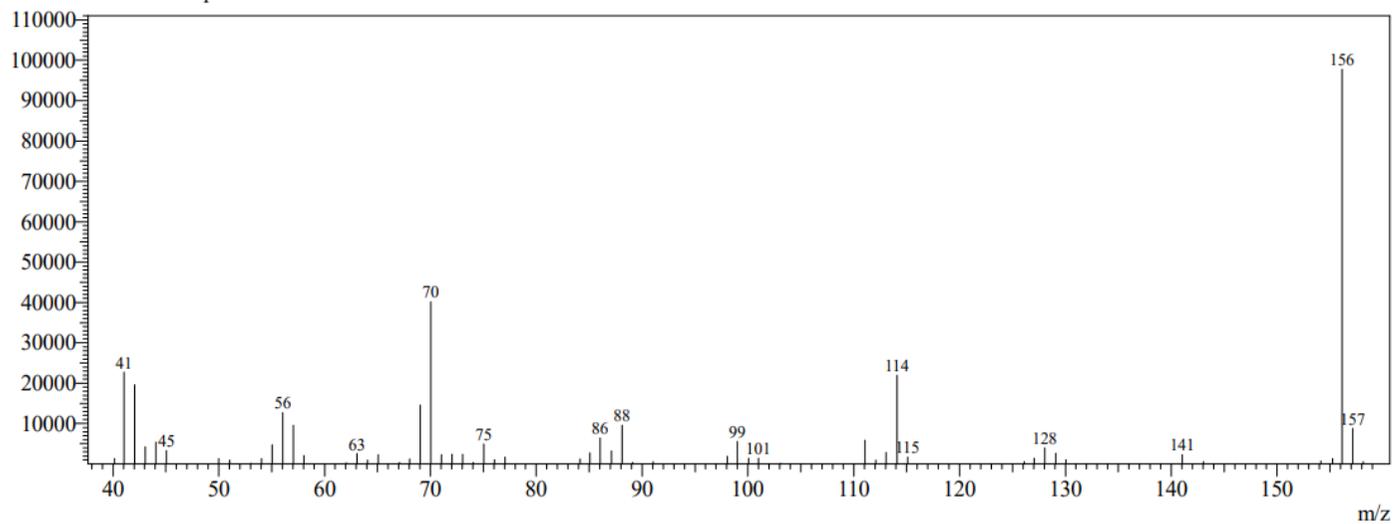


Figura S133 - Espectro (EM 70 eV m/z) – 4-(4-clorofenoxi)-1-morfolinobutan-1-ona **135**.

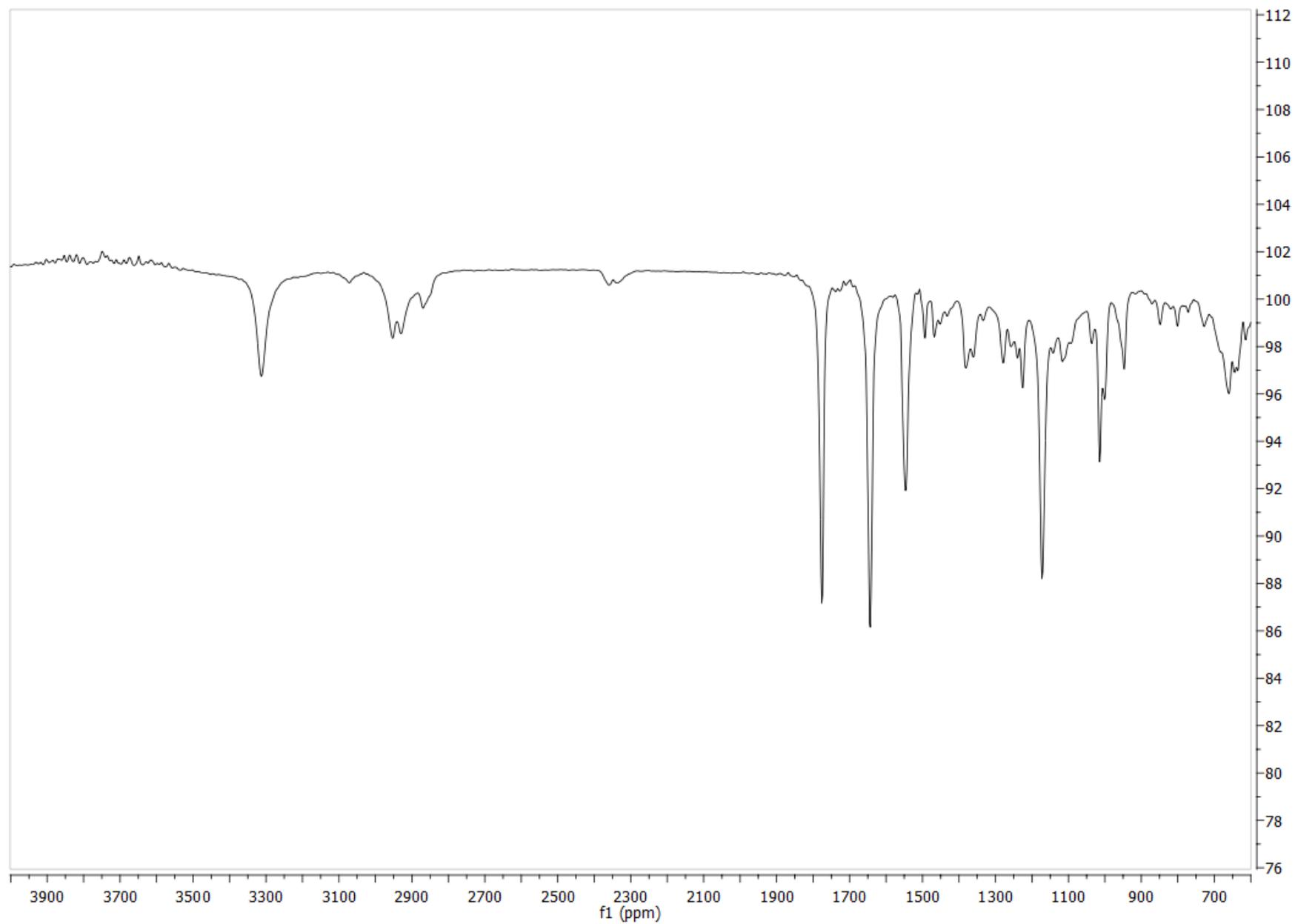


Figura S134 - Espectro de Infravermelho (ATR) – 4-(4-clorofenoxi)-1-morfolinobutan-1-ona **135**.

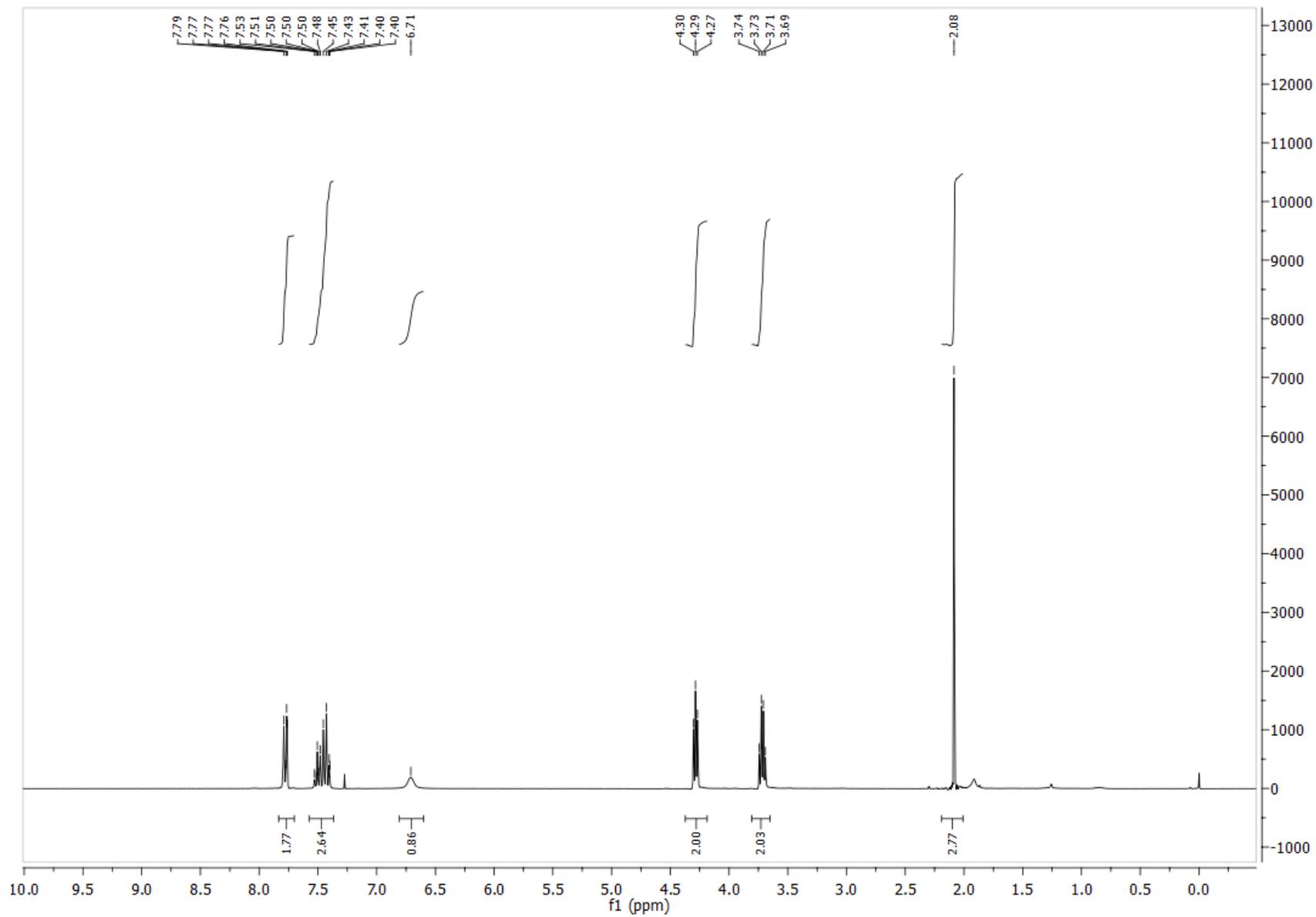


Figura S135 – Espectro (RMN de ^1H 600 MHz, CDCl_3 , 25°C) – Acetato de 2-benzamidoetil **136**.

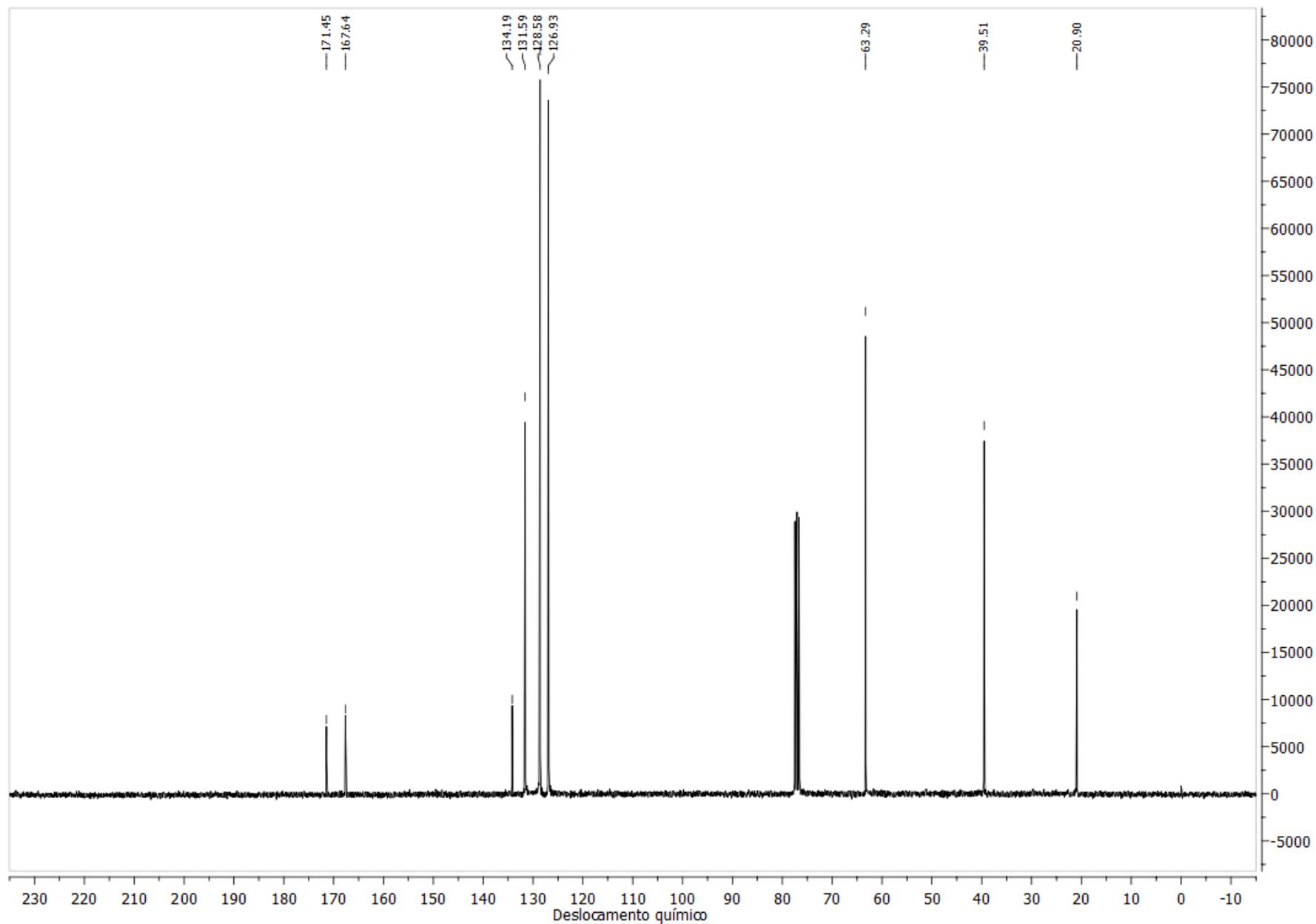


Figura S136 - Espectro (RMN de ^{13}C 75 MHz, CDCl_3 , 25°C) – Acetato de 2-benzamidoetil **136**.

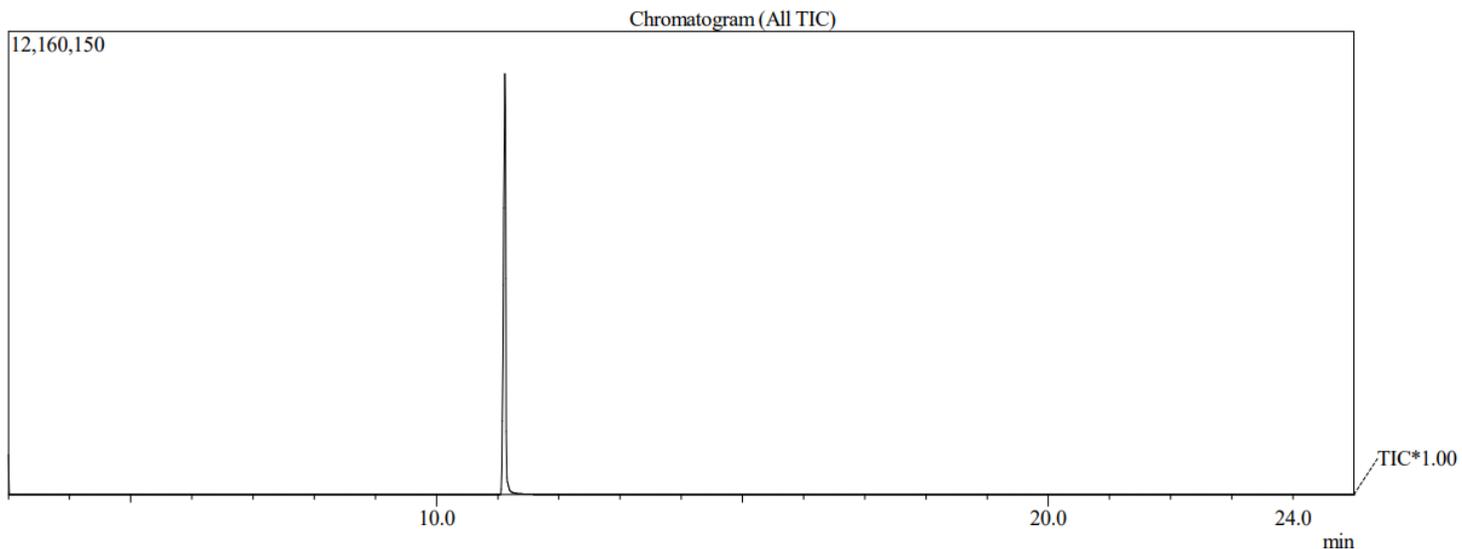


Figura S137 - Cromatograma da – Acetato de 2-benzamidoetil **136**.

Line#:1 R.Time:11.117(Scan#:975)
 MassPeaks:75
 RawMode:Averaged 11.067-11.142(969-978) BasePeak:105.10(2079323)
 BG Mode:None Group 1 - Event 1 Scan

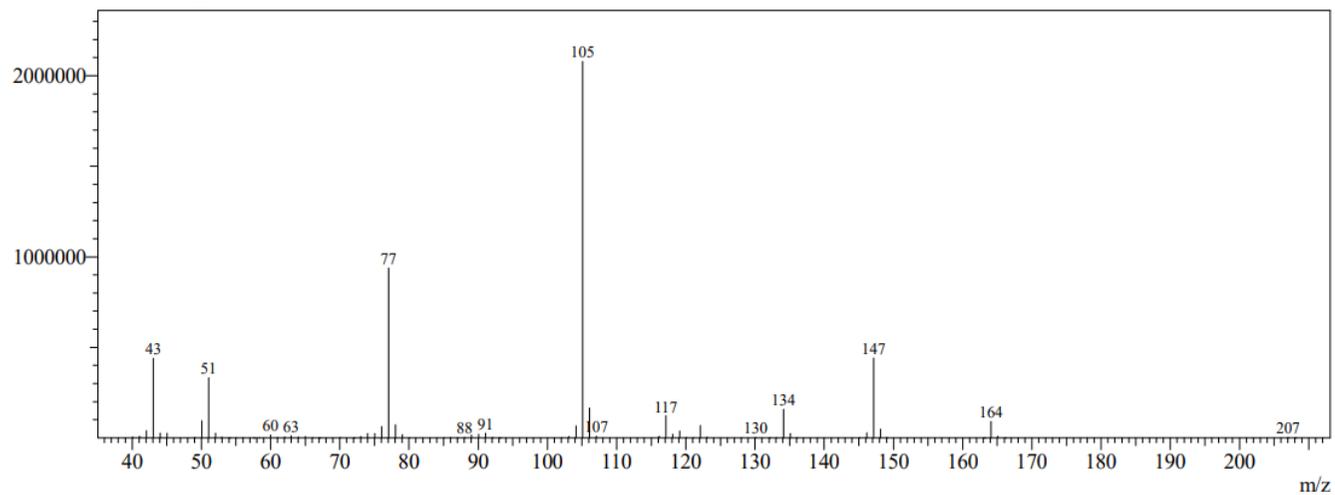


Figura S138 - Espectro (EM 70 eV m/z) – Acetato de 2-benzamidoetil **136**.

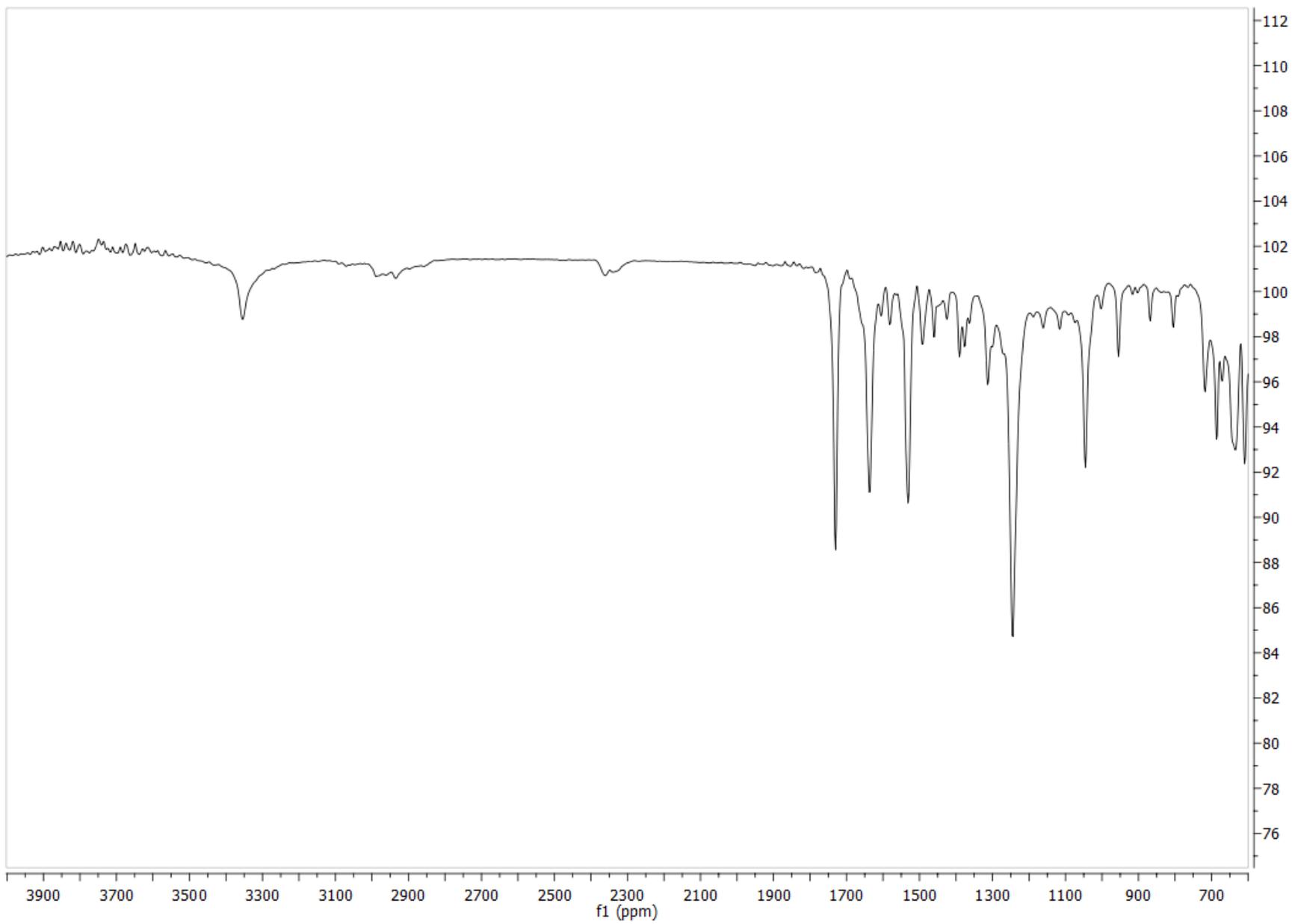


Figura S139 - Espectro de Infravermelho (ATR) – Acetato de 2-benzamidoetil **136**.

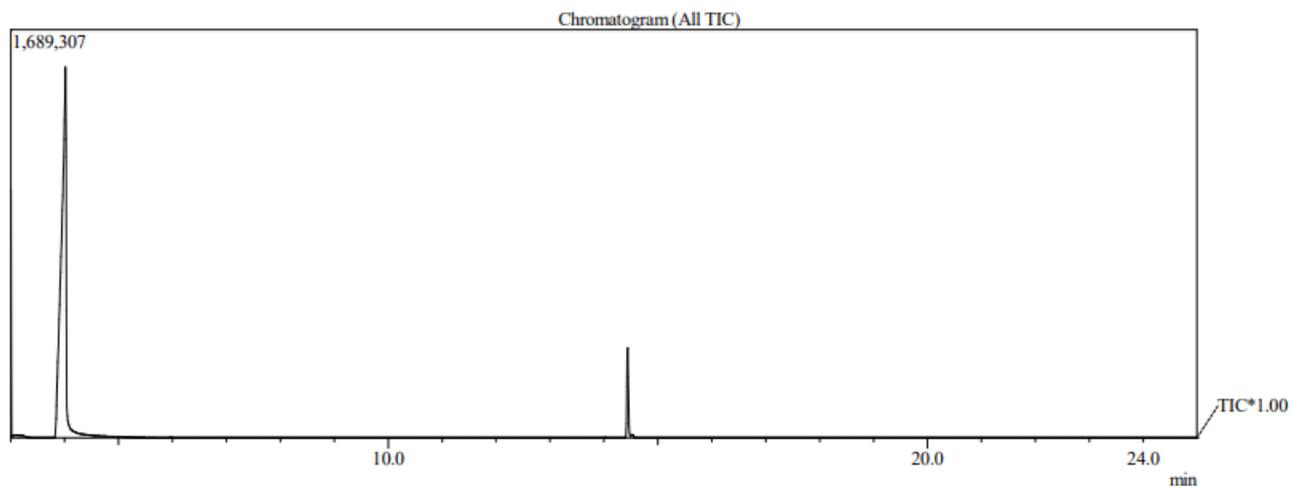


Figura S140 - Cromatograma da reação de bromação do composto **123**.

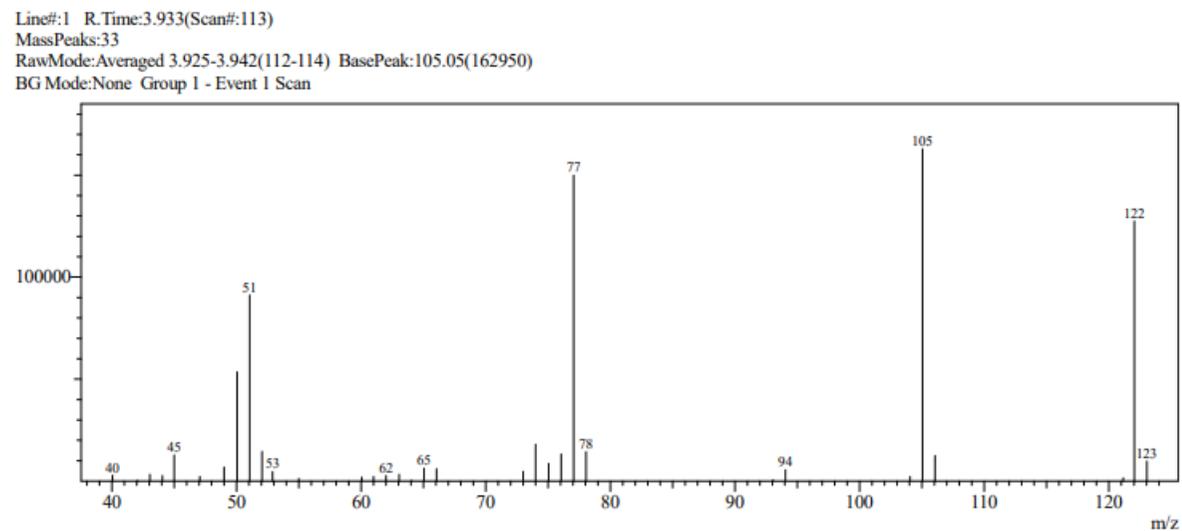


Figura S141 - Espectro (EM 70 eV m/z) – Para o primeiro pico do cromatograma acima.

Line#:1 R.Time:14.442(Scan#:1374)
MassPeaks:77
RawMode:Averaged 14.417-14.450(1371-1375) BasePeak:221.00(17543)
BG Mode:None Group 1 - Event 1 Scan

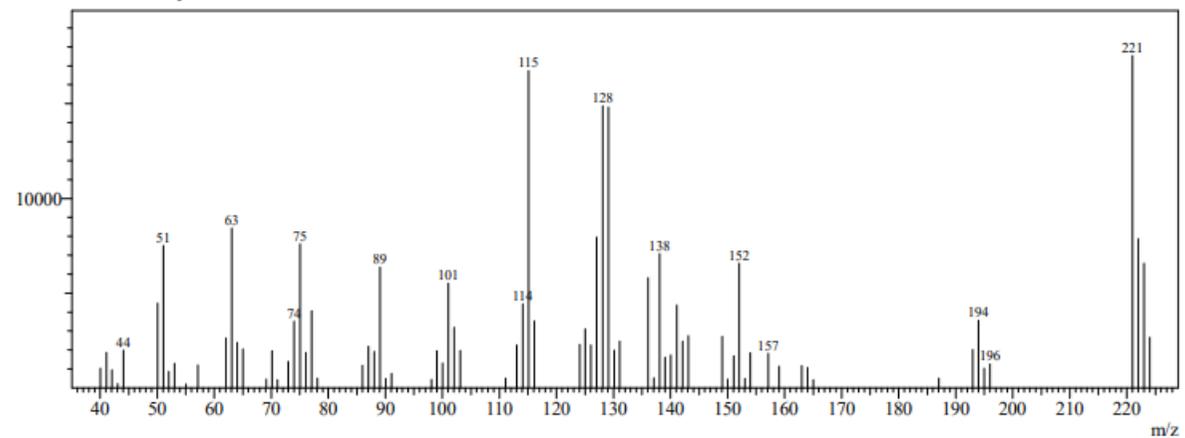


Figura S142 - Espectro (EM 70 eV m/z) – Para o segundo pico do cromatograma acima.

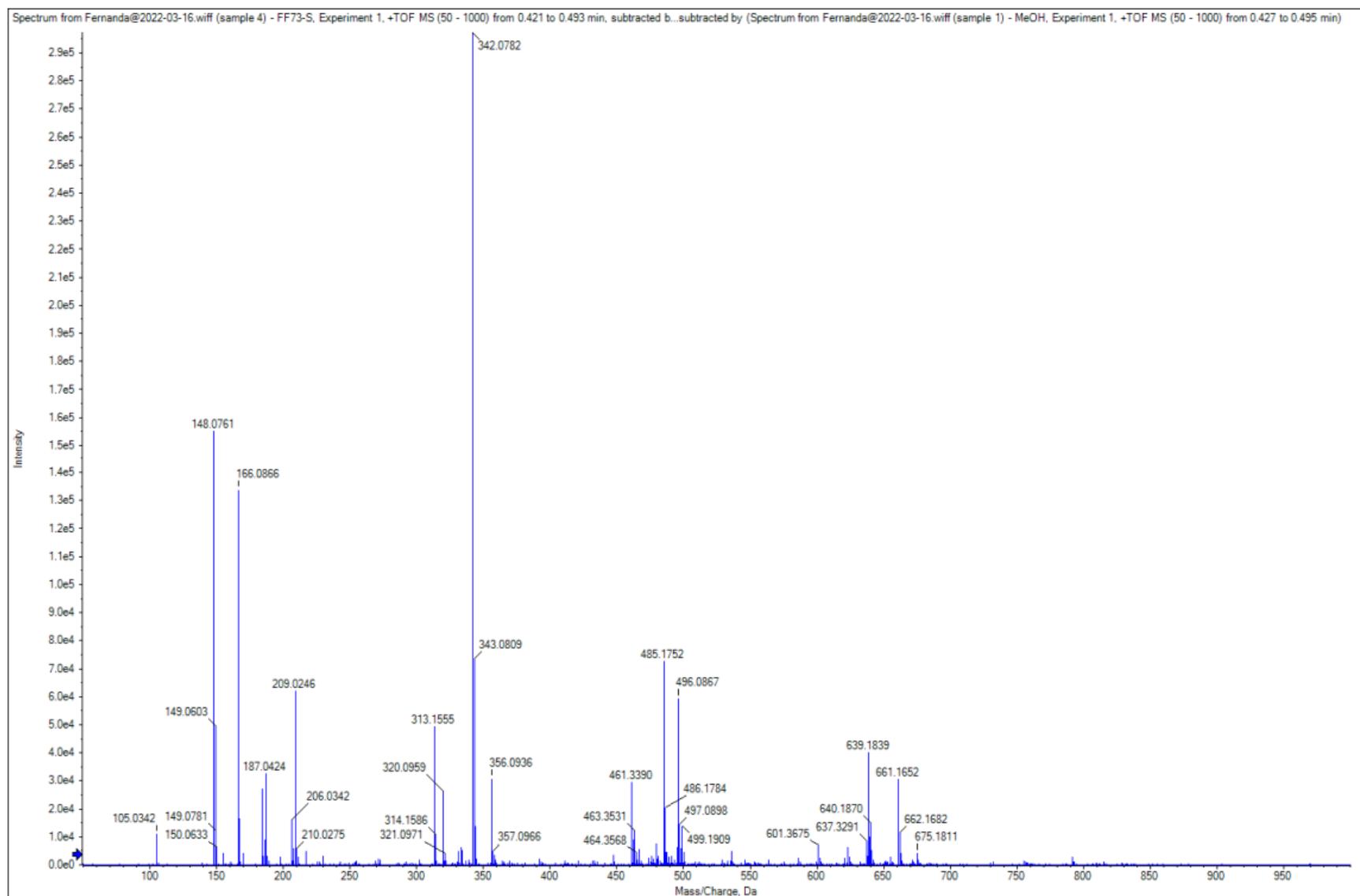


Figura S143 – EMAR do bruto da reação de tosilção da molécula **123**. Produto formado, **139**, m/z $[M+Na] = 342,0782$.

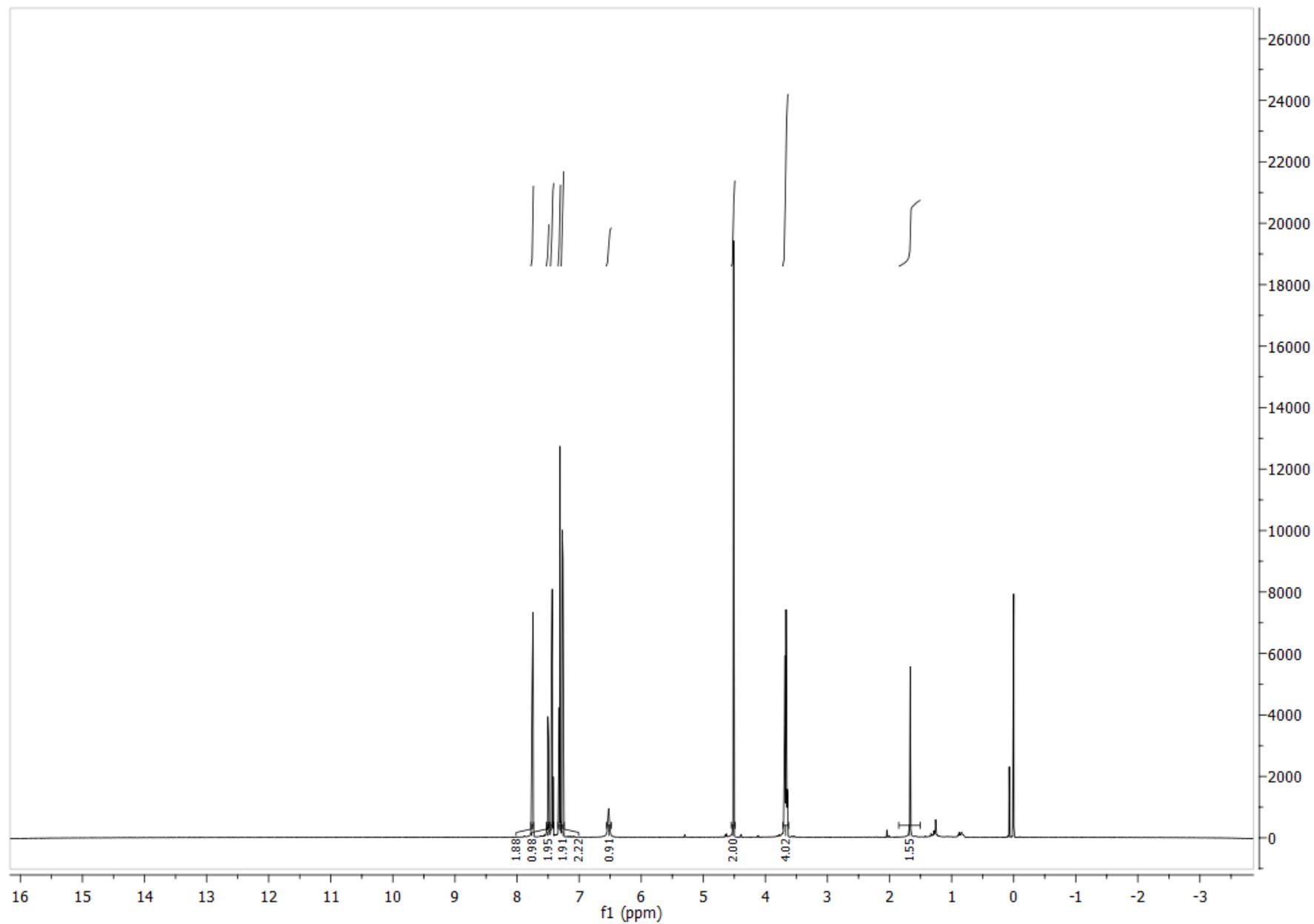


Figura S144 – Espectro (RMN de ¹H 600 MHz, CDCl₃, 25°C) – *N*-(2-((4-clorobenzil)oxi)etil)benzamida **138**.

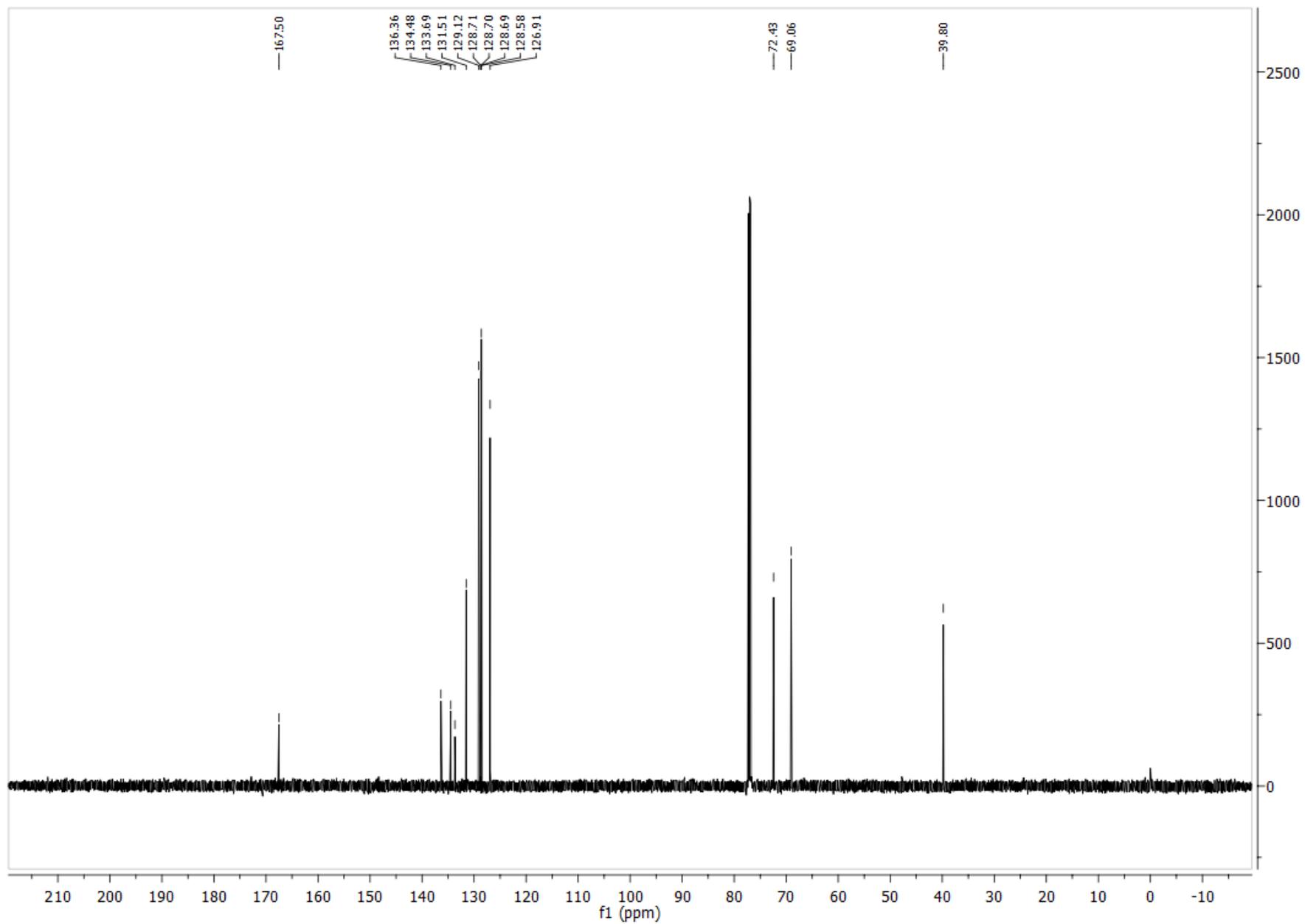


Figura S145 - Espectro (RMN de ¹³C 75 MHz, CDCl₃, 25°C) – *N*-(2-((4-clorobenzil)oxi)etil)benzamida **138**.

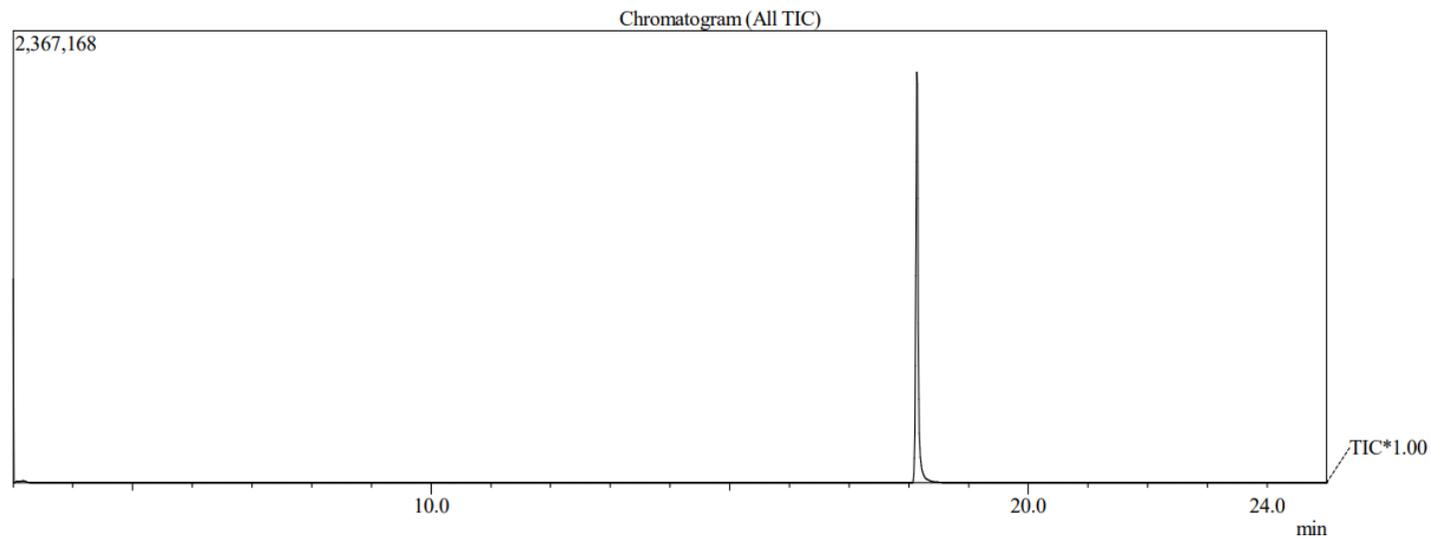


Figura S146 - Cromatograma da *N*-(2-((4-clorobenzil)oxi)etil)benzamida **138**.

Line#:1 R.Time:18.133(Scan#:1817)
 MassPeaks:70
 RawMode:Averaged 18.100-18.167(1813-1821) BasePeak:105.05(364759)
 BG Mode:None Group 1 - Event 1 Scan

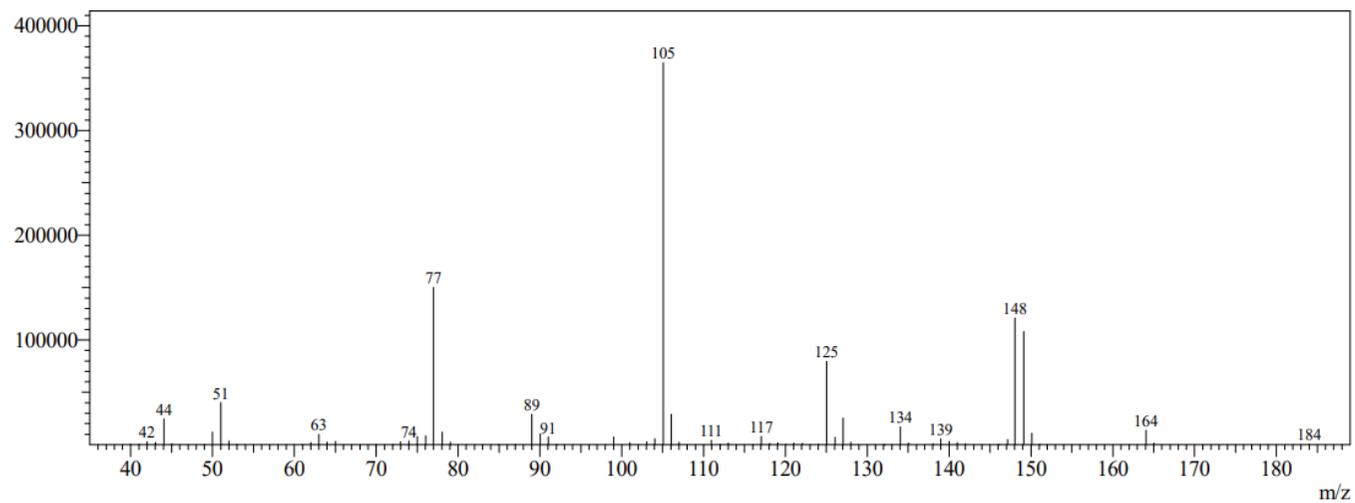


Figura S147 - Espectro (EM 70 eV m/z) – *N*-(2-((4-clorobenzil)oxi)etil)benzamida **138**.

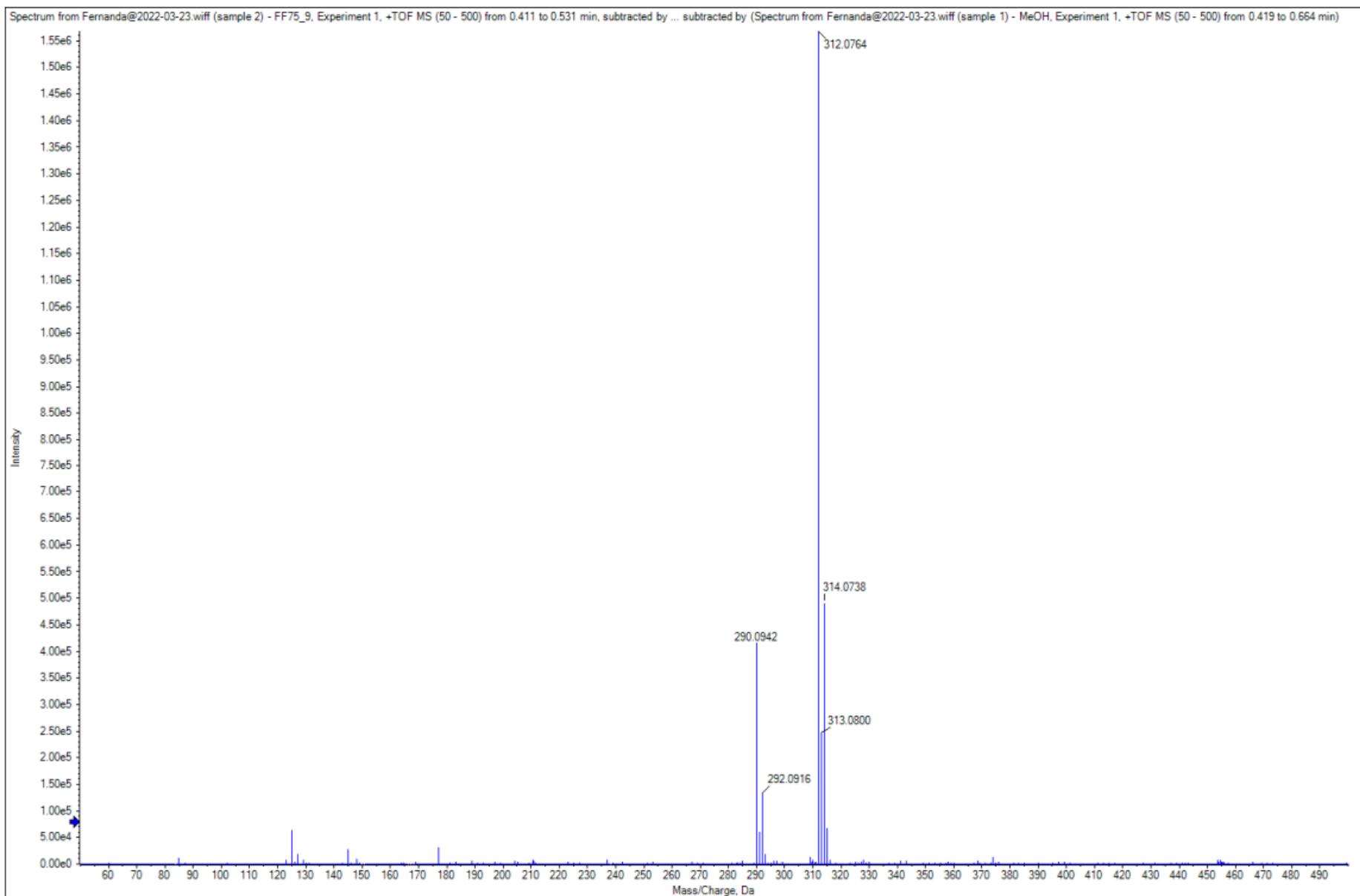


Figura S148- EMAR do produto formado, **138**, m/z $[M+Na] = 312,0764$.

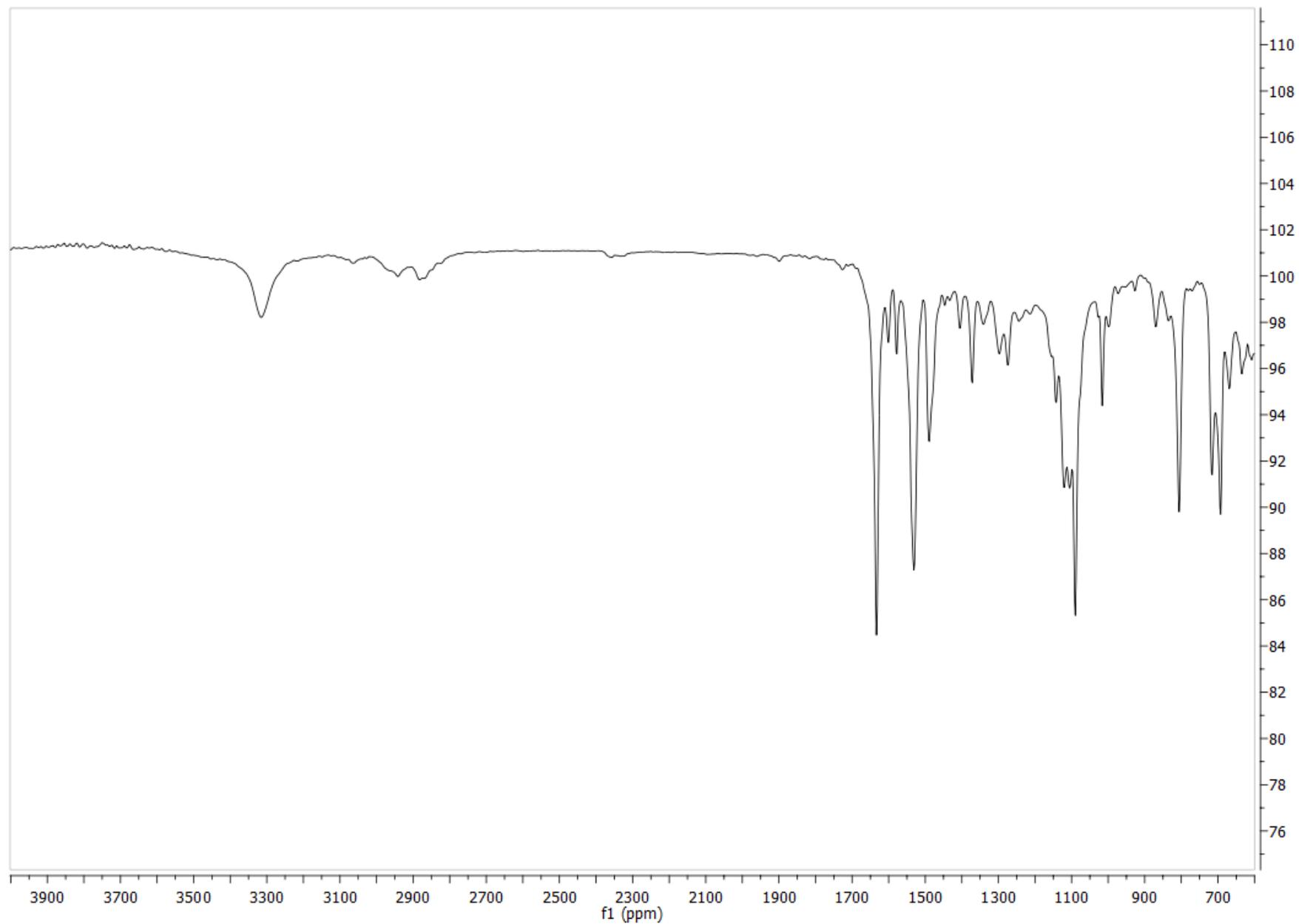


Figura S149- Espectro de Infravermelho (ATR) – *N*-(2-((4-clorobenzil)oxi)etil)benzamida **138**.

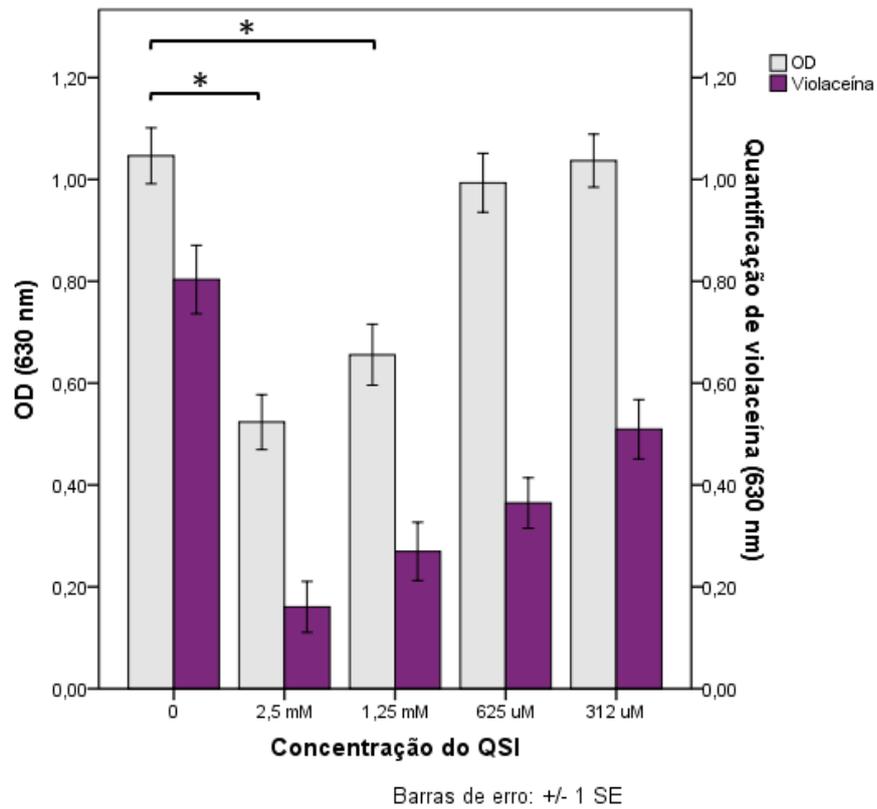


Figura S150 - Ensaio de quantificação de violaceína com 154.

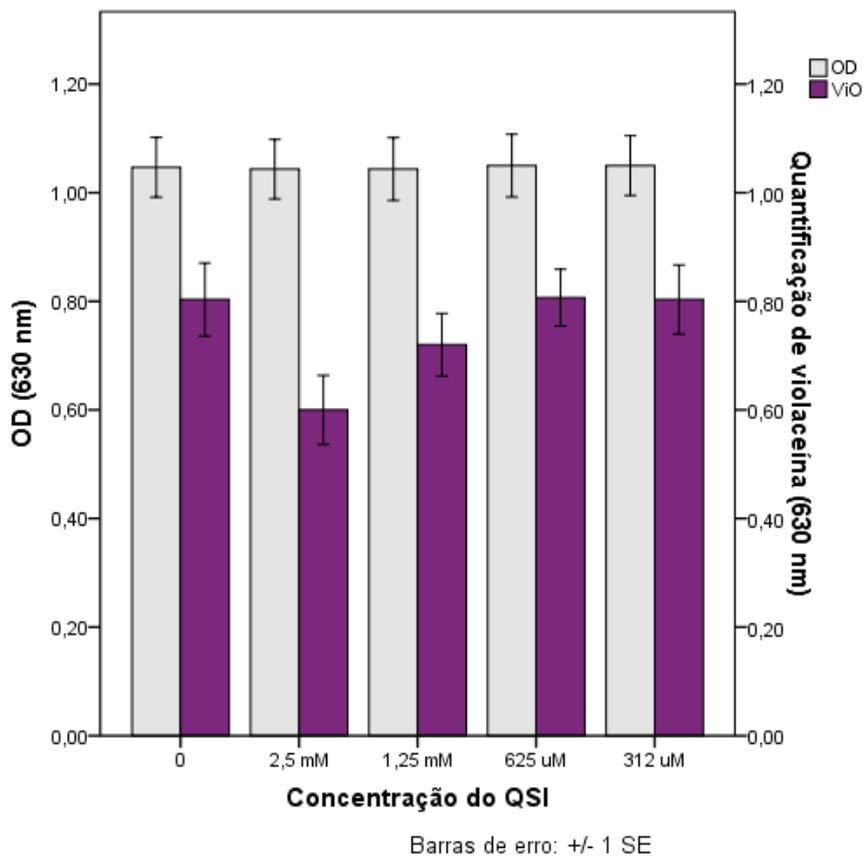


Figura S151 - Ensaio de quantificação de violaceína com 155.

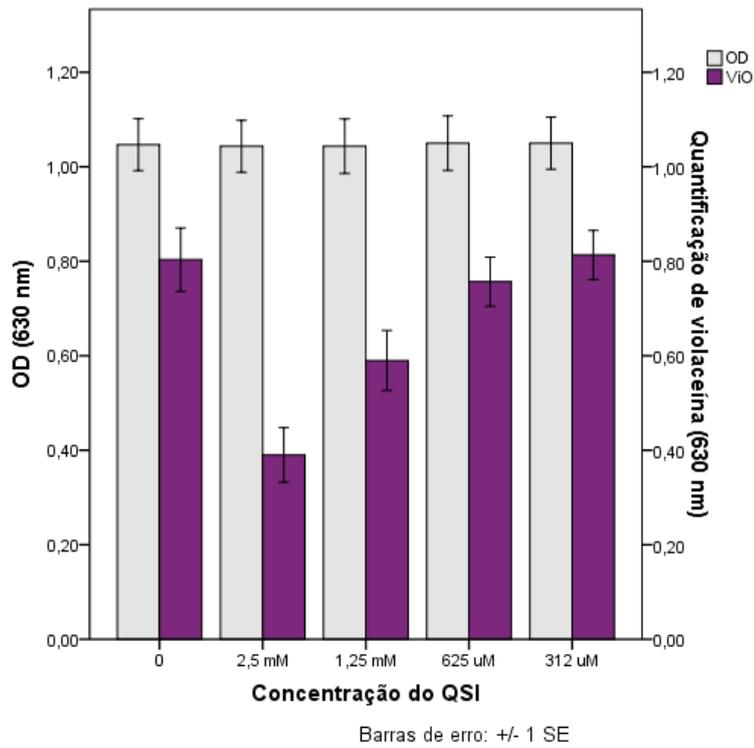


Figura S152 - Ensaio de quantificação de violaceína com 156.

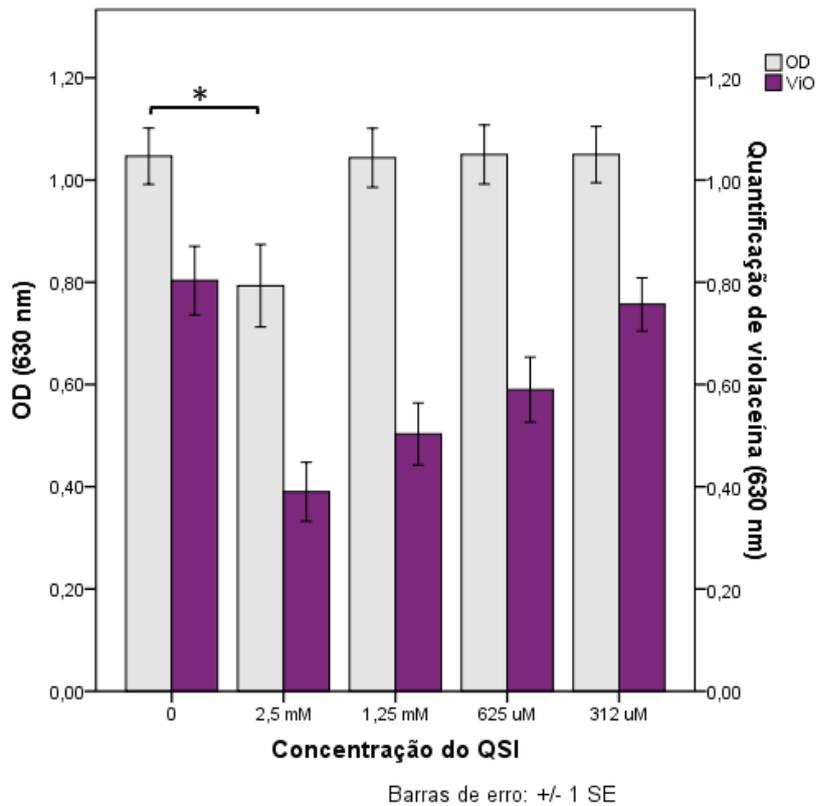


Figura S153 - Ensaio de quantificação de violaceína com 157

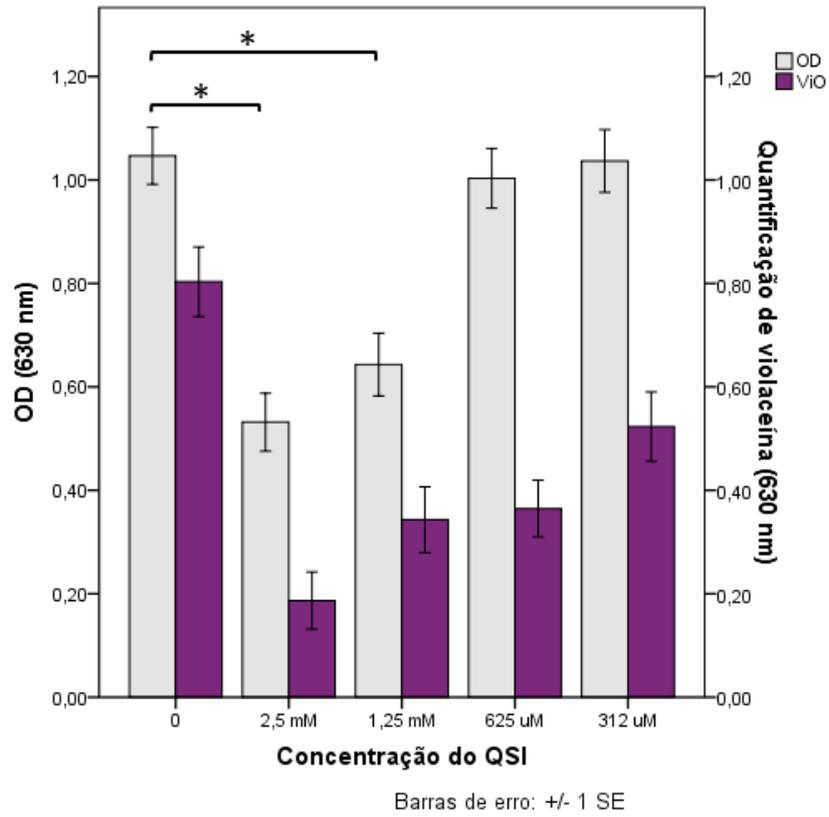


Figura S154 - Ensaio de quantificação de violaceína com 158.

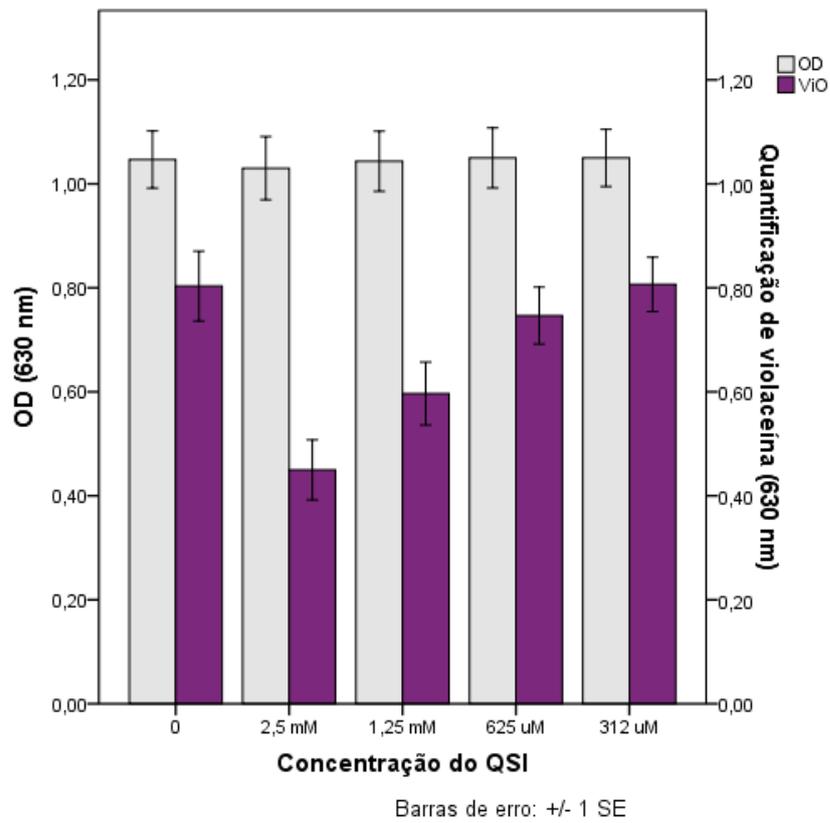


Figura S155 - Ensaio de quantificação de violaceína com 159.

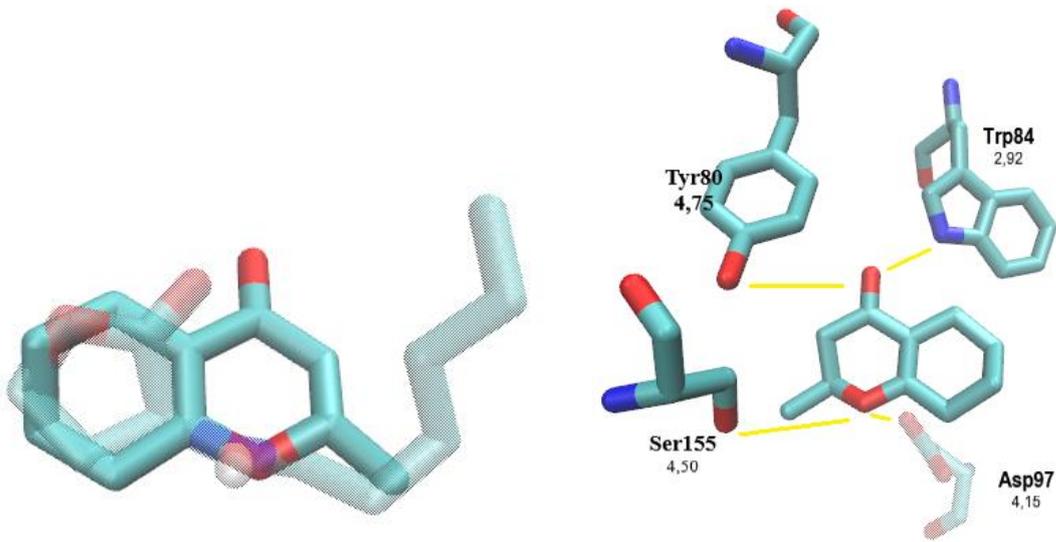


Figura S156 – (A) Sobreposição entre **51** e (*S*)-**154**. (B) Interações entre (*S*)-**154** e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

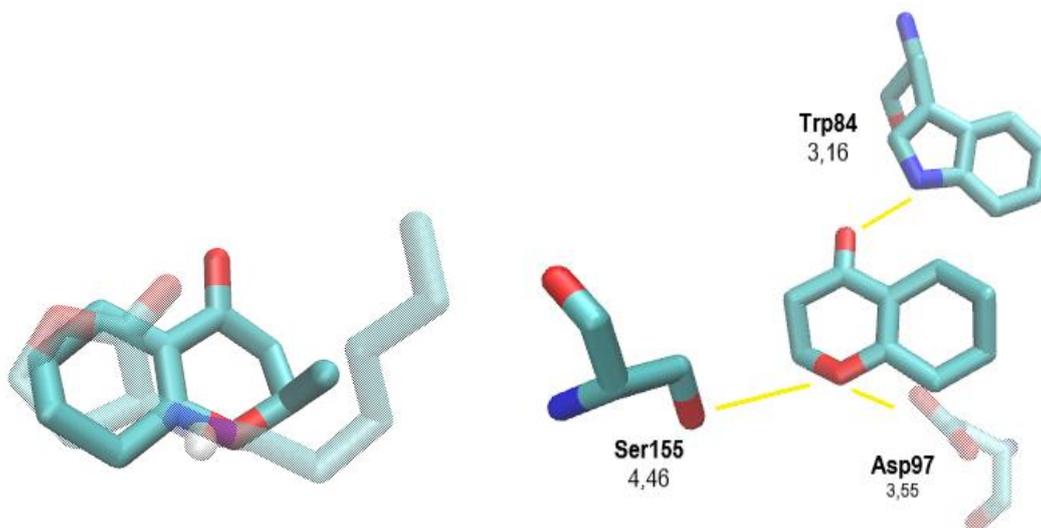


Figura S157 – (A) Sobreposição entre **51** e (*R*)-**154**. (B) Interações entre (*R*)-**154** e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

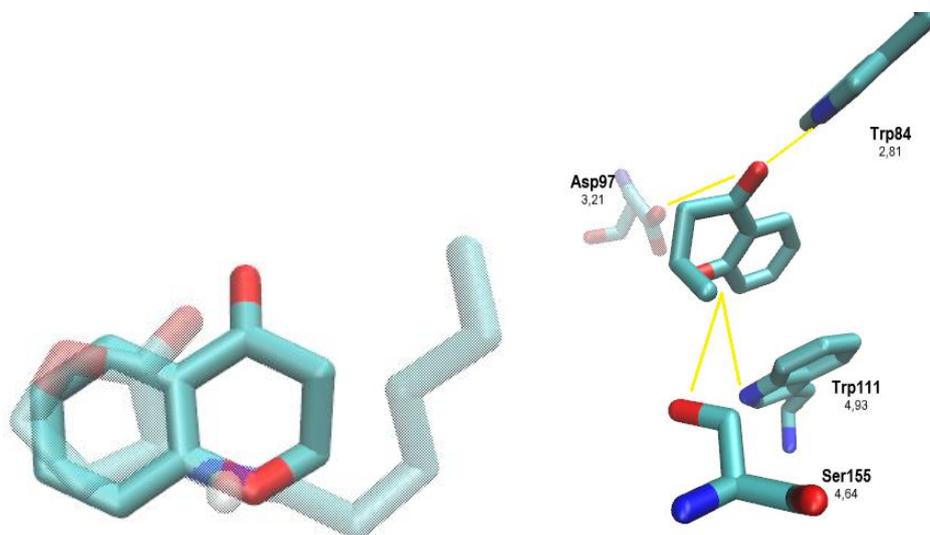


Figura S158 – (A) Sobreposição entre **51** e (*S*)-**155**. (B) Interações entre (*S*)-**155** e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

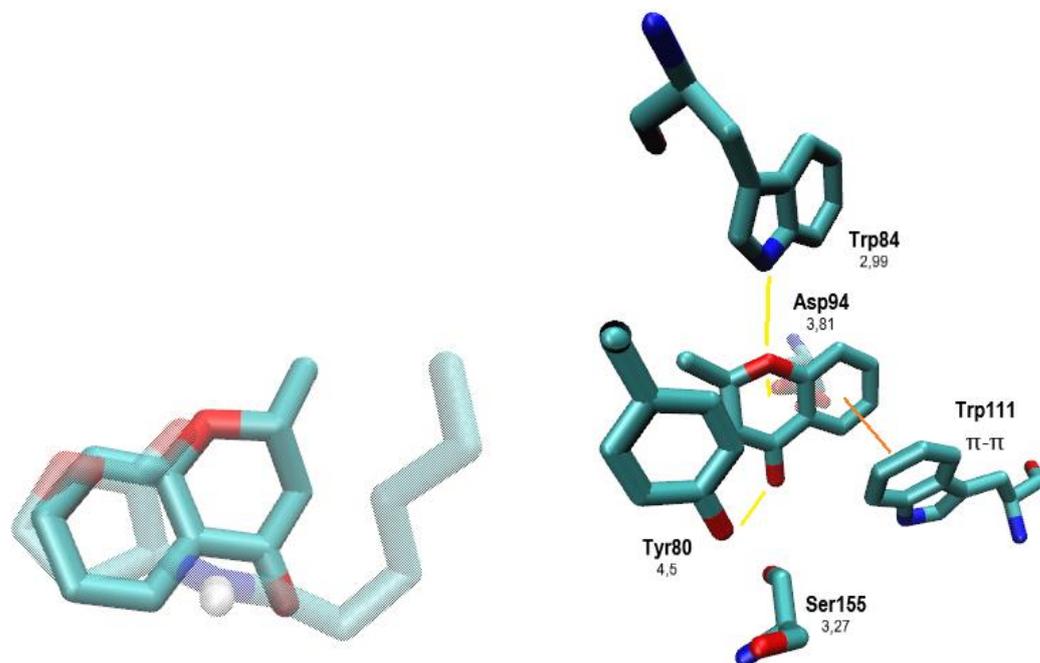


Figura S159 – (A) Sobreposição entre **51** e (*R*)-**155**. (B) Interações entre (*R*)-**155** e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

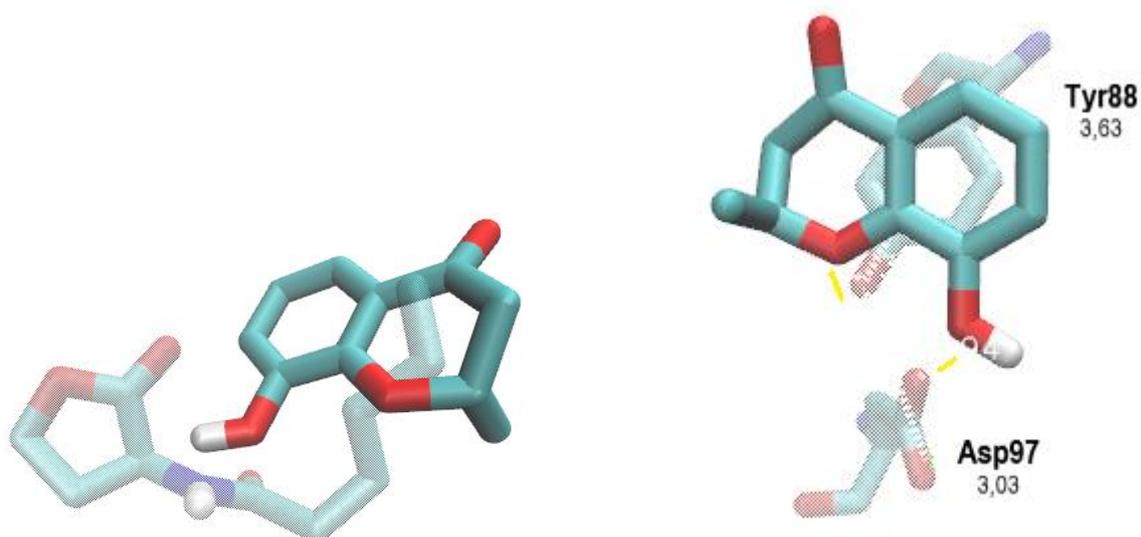


Figura S160 – (A) Sobreposição entre **51** e (*S*)-**156**. (B) Interações entre (*S*)-**156** e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

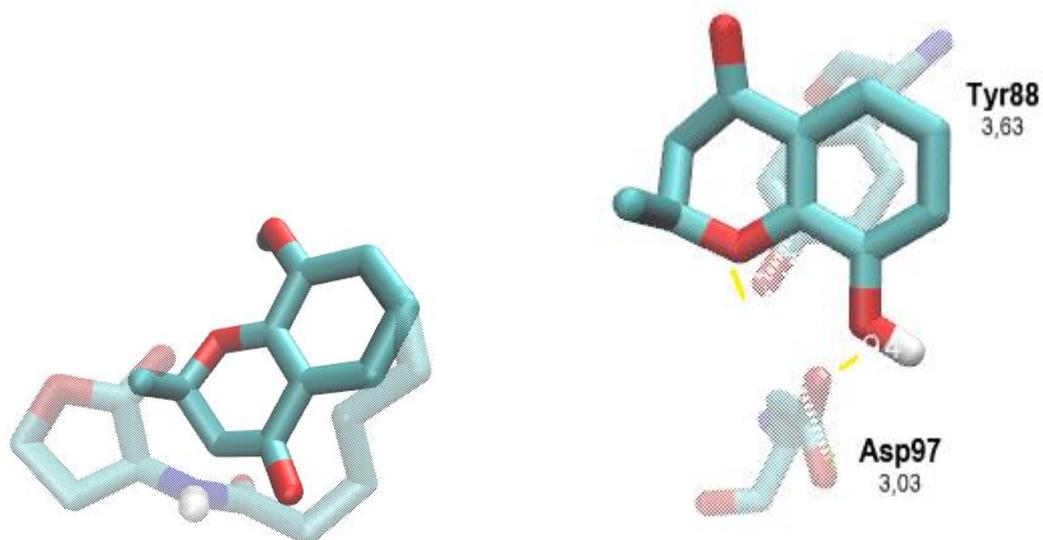


Figura S161 – (A) Sobreposição entre **51** e (*R*)-**156**. (B) Interações entre (*R*)-**156** e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

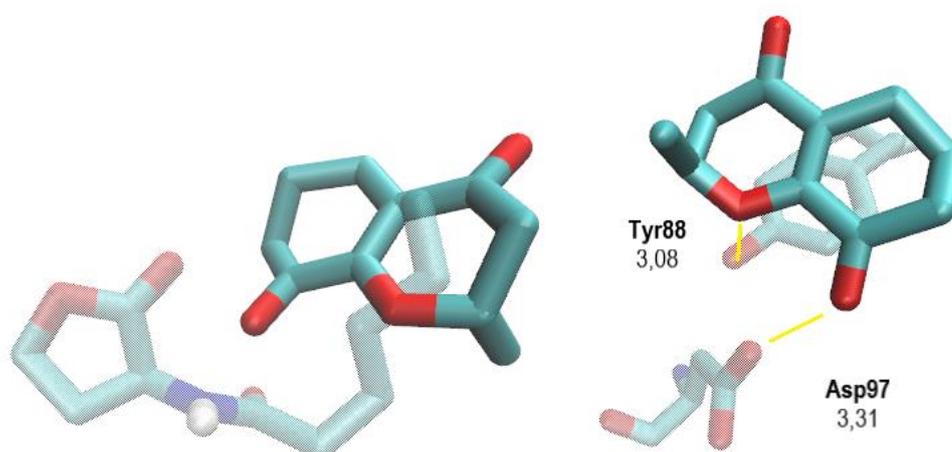


Figura S162 – (A) Sobreposição entre **51** e (*S*)-**157**. (B) Interações entre (*S*)-**157** e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

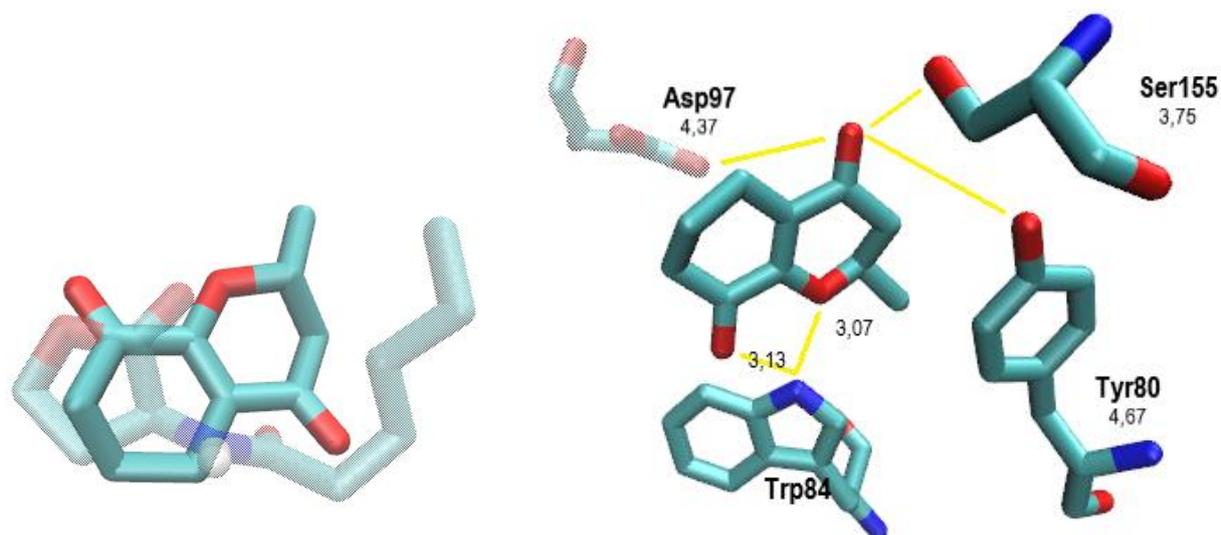


Figura S163 – (A) Sobreposição entre **51** e (*R*)-**157**. (B) Interações entre (*R*)-**157** e os aminoácidos no sítio de ligação do

HHL.

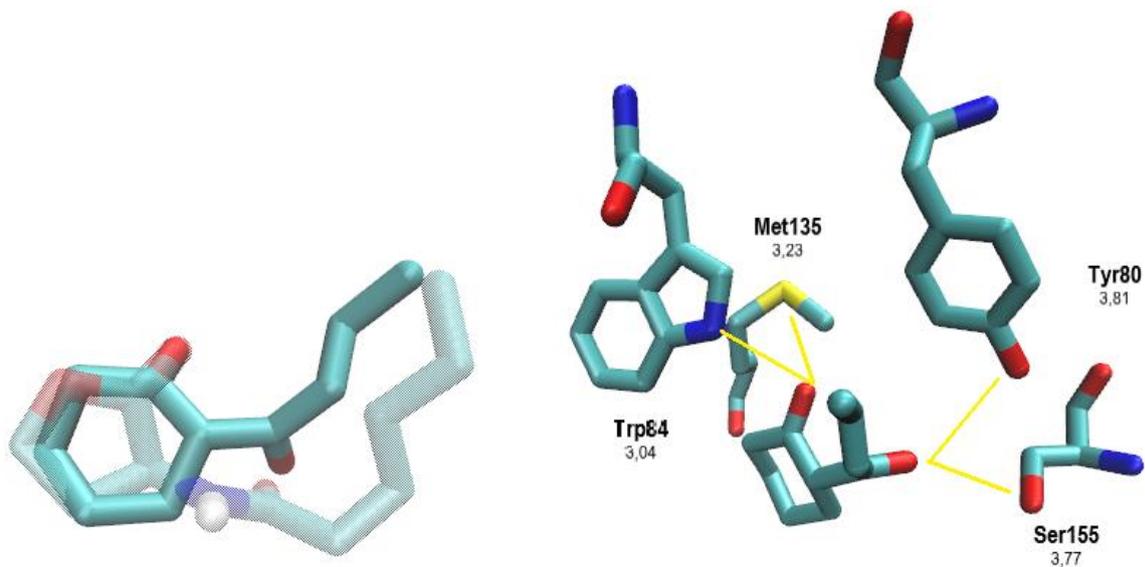


Figura S164 – (A) Sobreposição entre 51 e 158. (B) Interações entre 158 e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

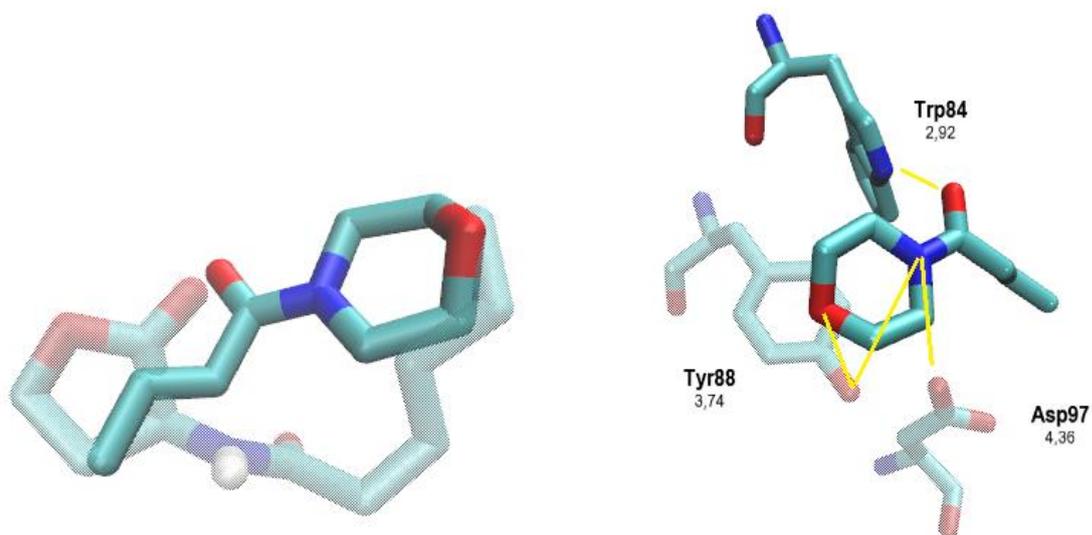
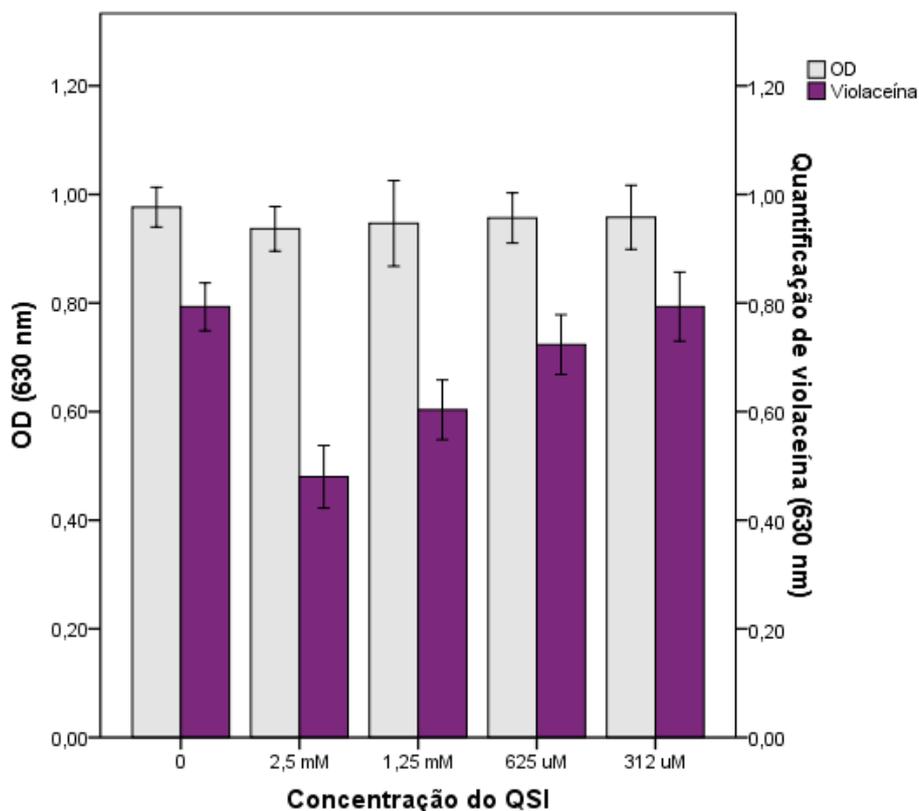


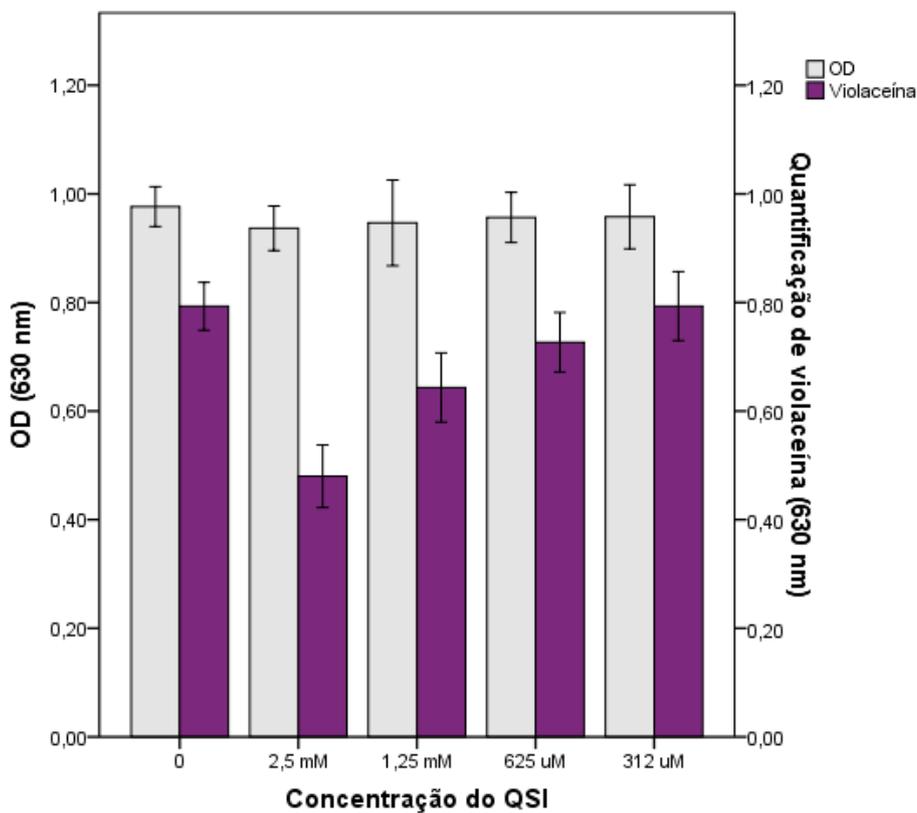
Figura S165 – (A) Sobreposição entre 51 e 159. (B) Interações entre 159 e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.



Barras de erro: +/- 1 SE

5

Figura S166 - Ensaio de quantificação de violaceína da estrutura **174E**.



Barras de erro: +/- 1 SE

Figura S167 - Ensaio de quantificação de violaceína da estrutura **174Z**.

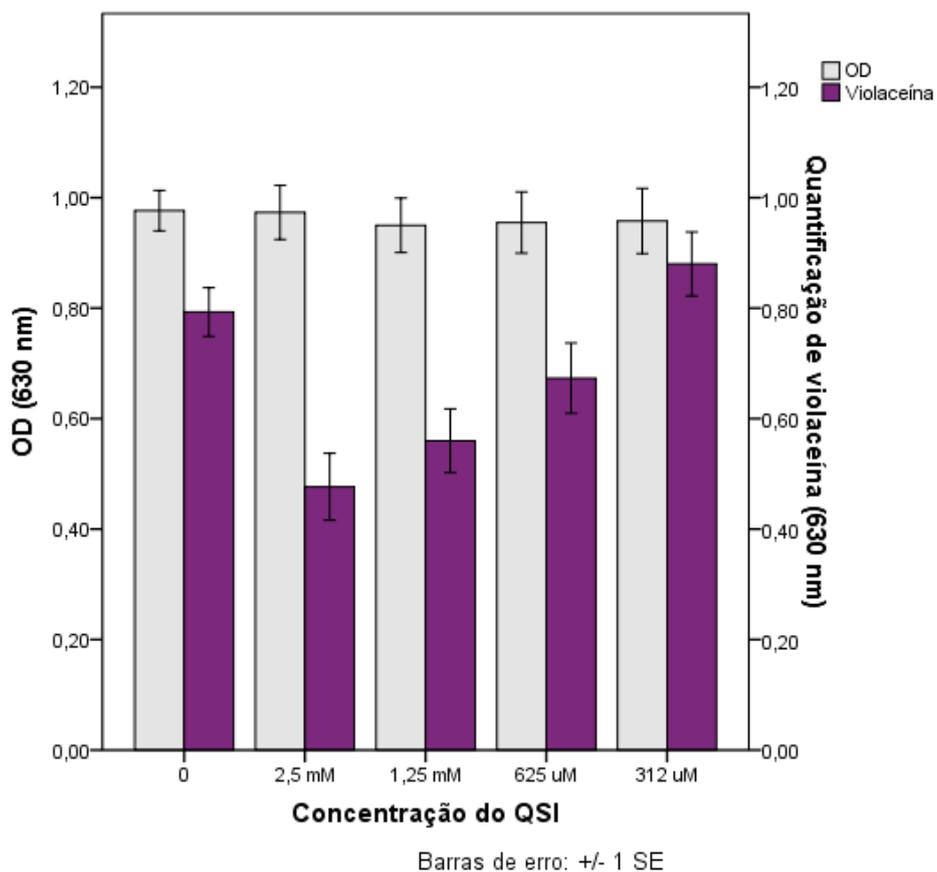


Figura S168 - Ensaio de quantificação de violaceína da estrutura **175E**.

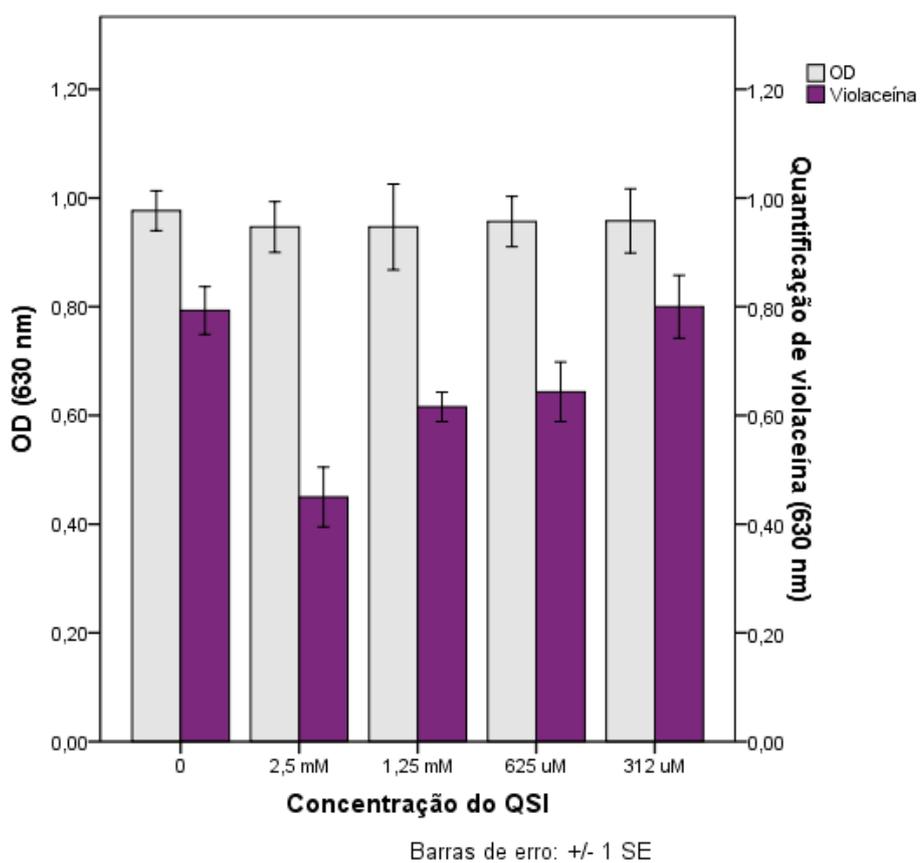


Figura S169 - Ensaio de quantificação de violaceína da estrutura **175Z**.

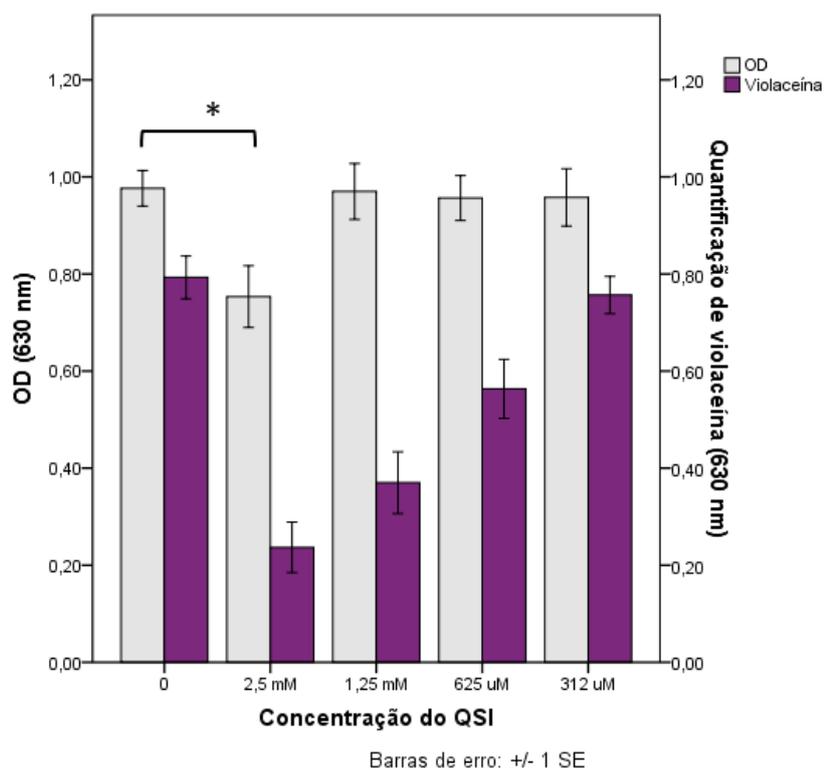


Figura S170 - Ensaio de quantificação de violaceína da estrutura 176E.

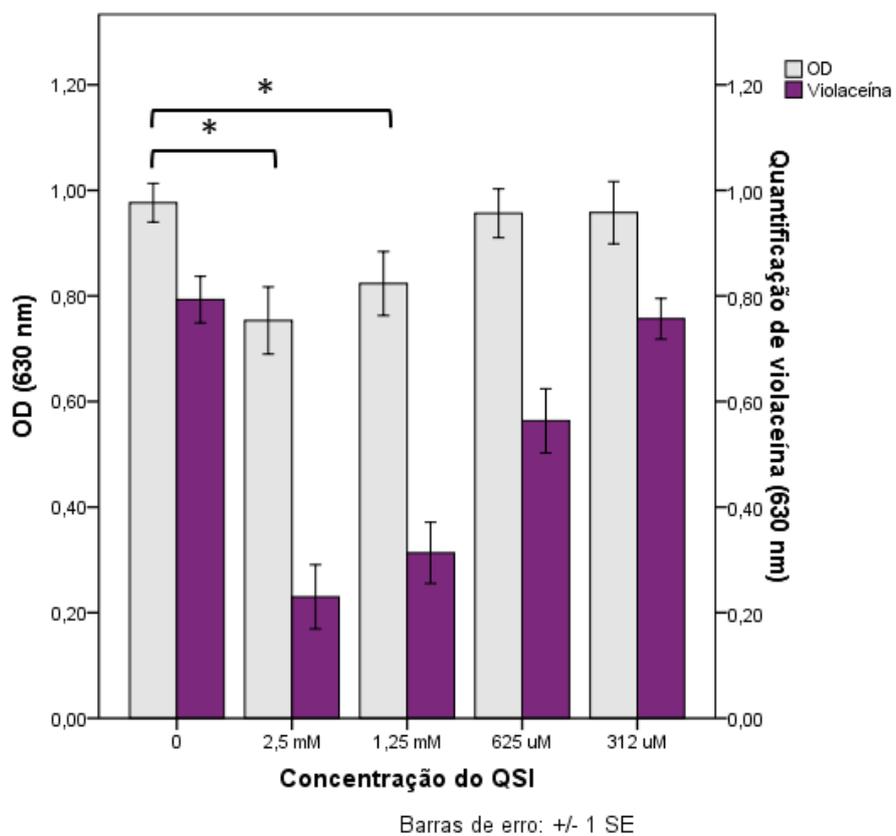


Figura S171 - Ensaio de quantificação de violaceína da estrutura 176Z.

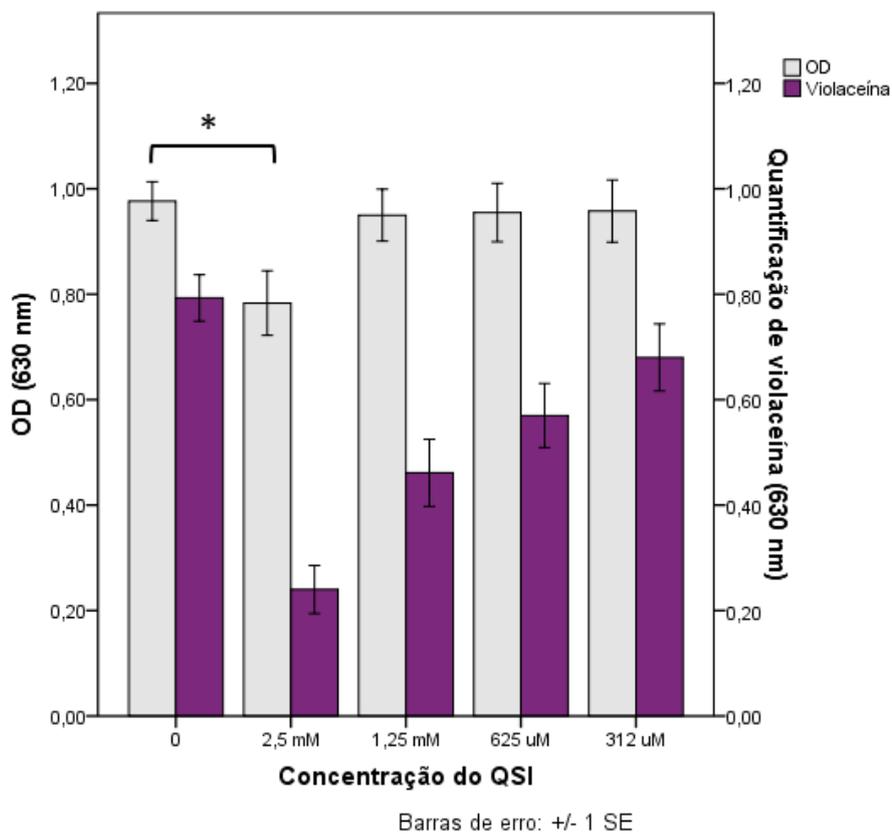


Figura S172 - Ensaio de quantificação de violaceína da estrutura 177E.

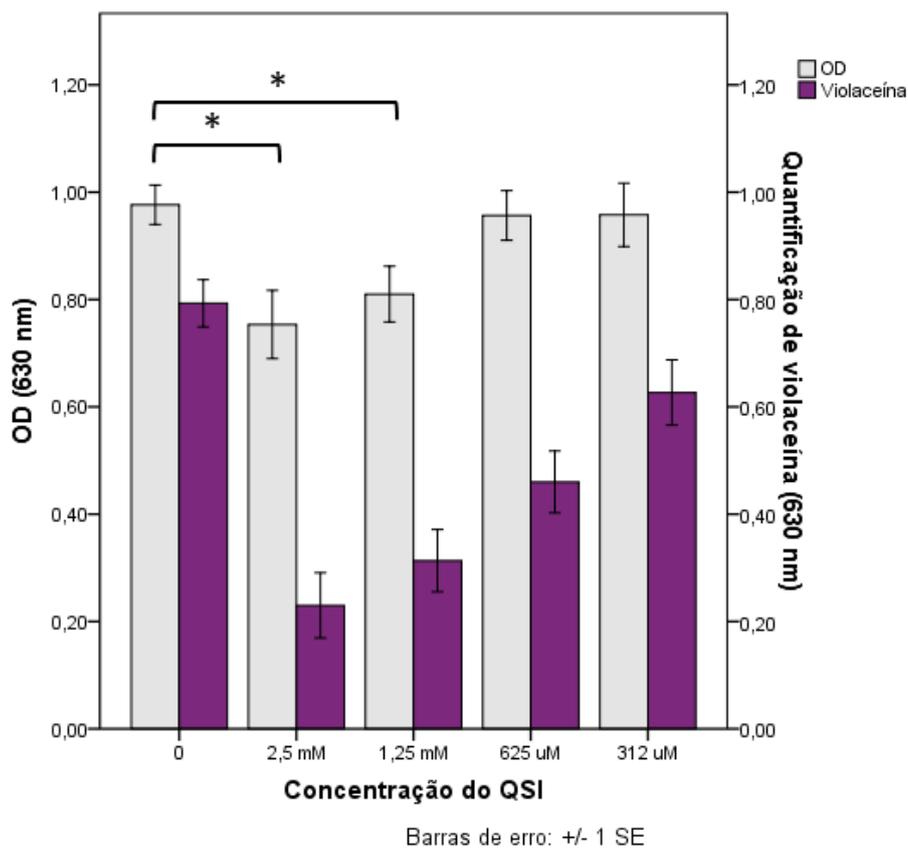


Figura S173 - Ensaio de quantificação de violaceína da estrutura 177Z.

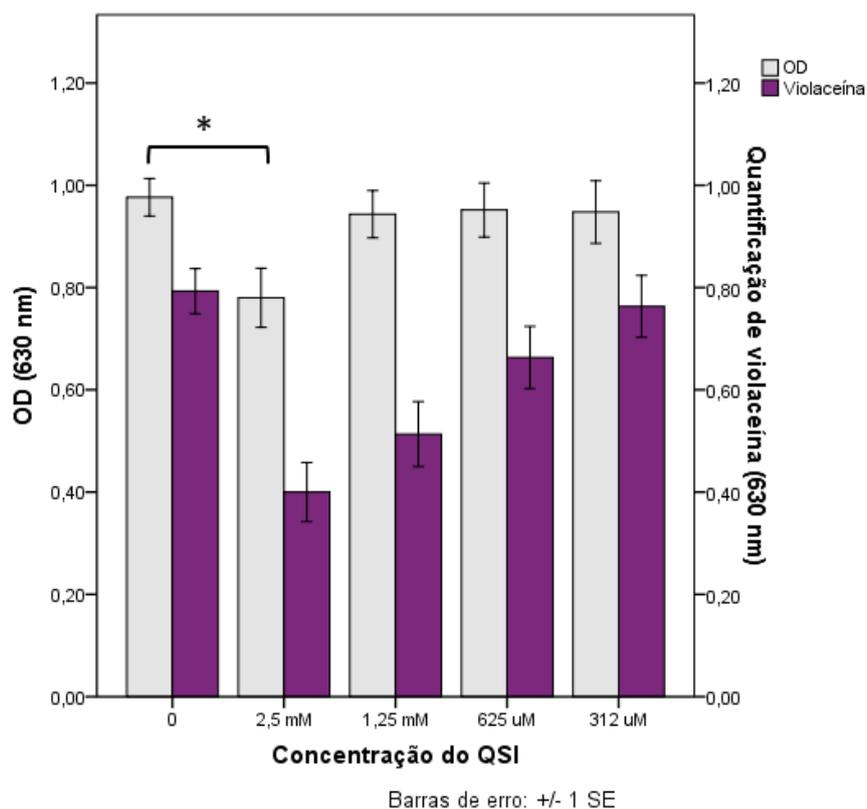


Figura S174 - Ensaio de quantificação de violaceína da estrutura 178E.

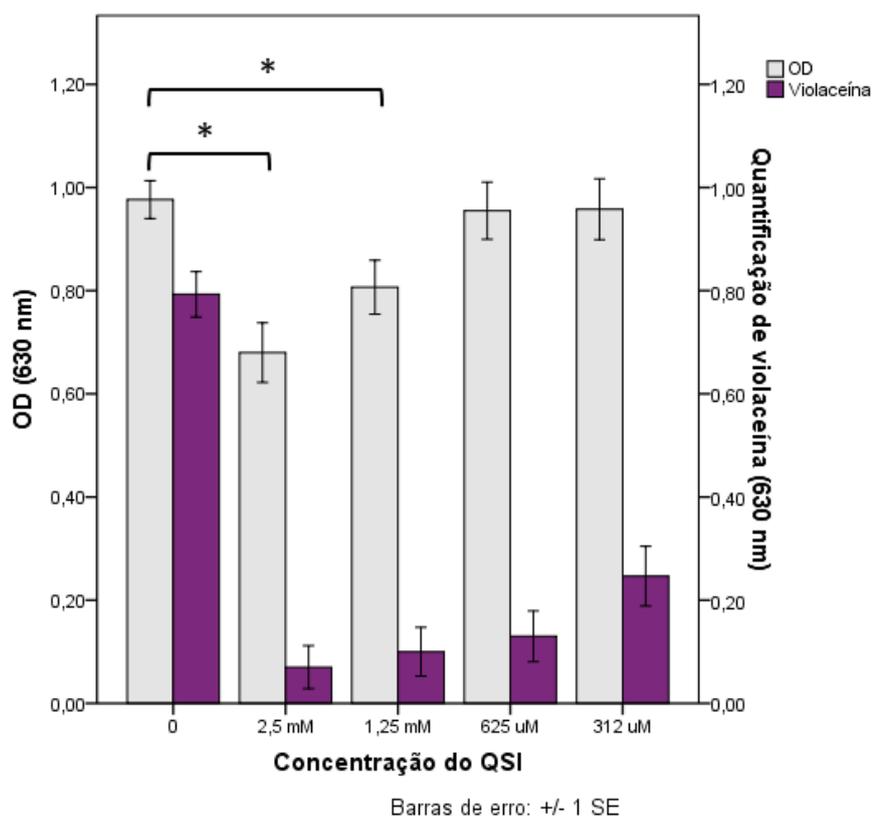


Figura S175 - Ensaio de quantificação de violaceína da estrutura 179E.

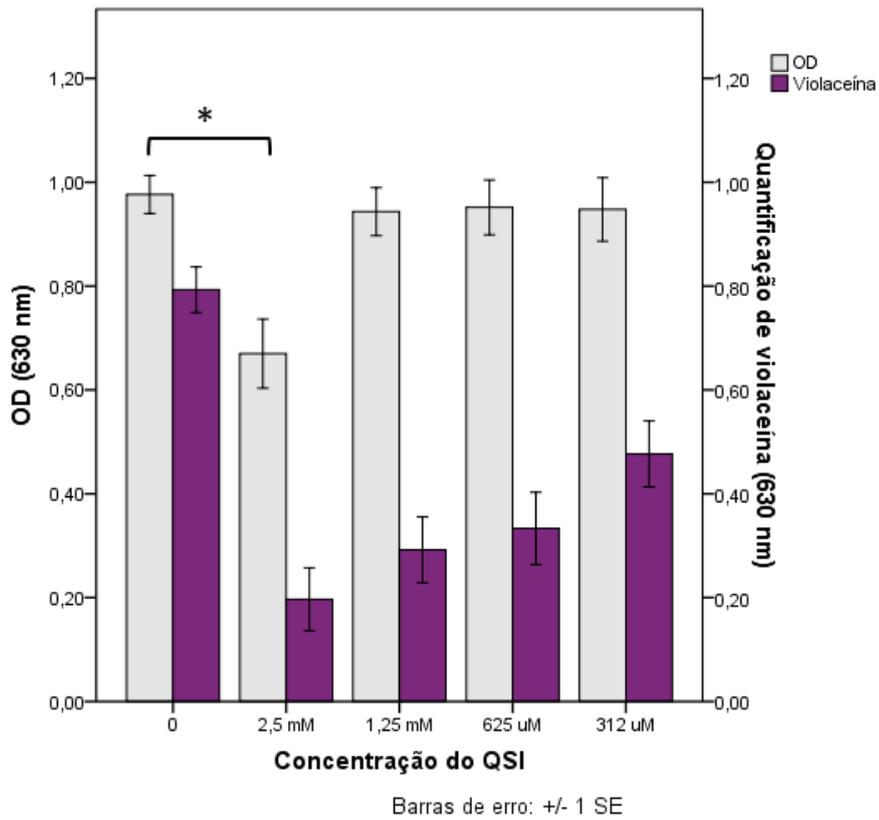


Figura S176 - Ensaio de quantificação de violaceína da estrutura 180E.

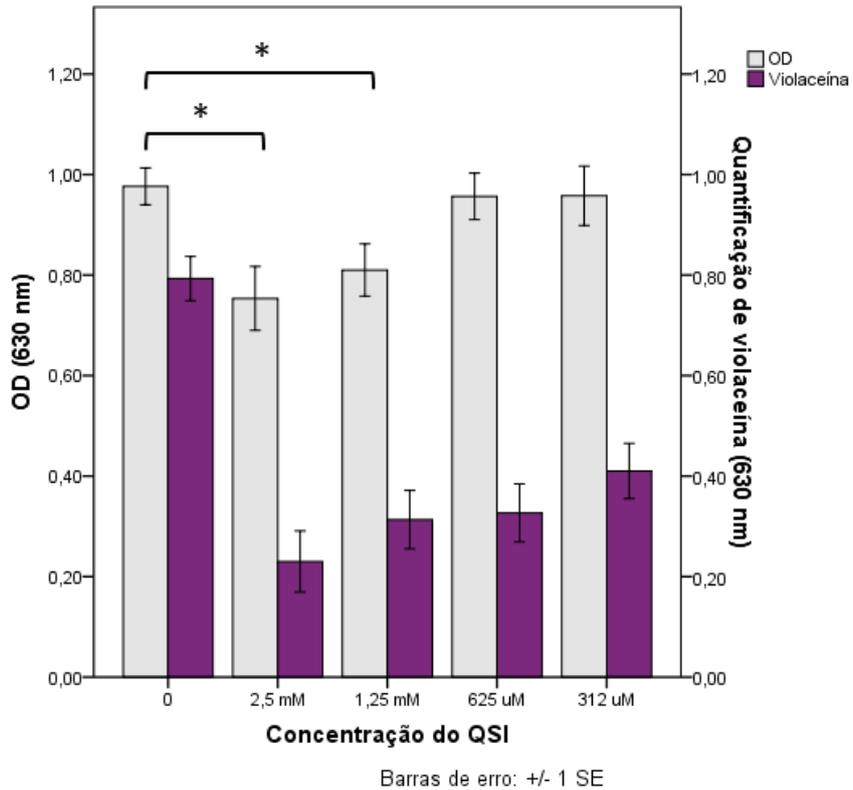


Figura S177 - Ensaio de quantificação de violaceína da estrutura 181E.

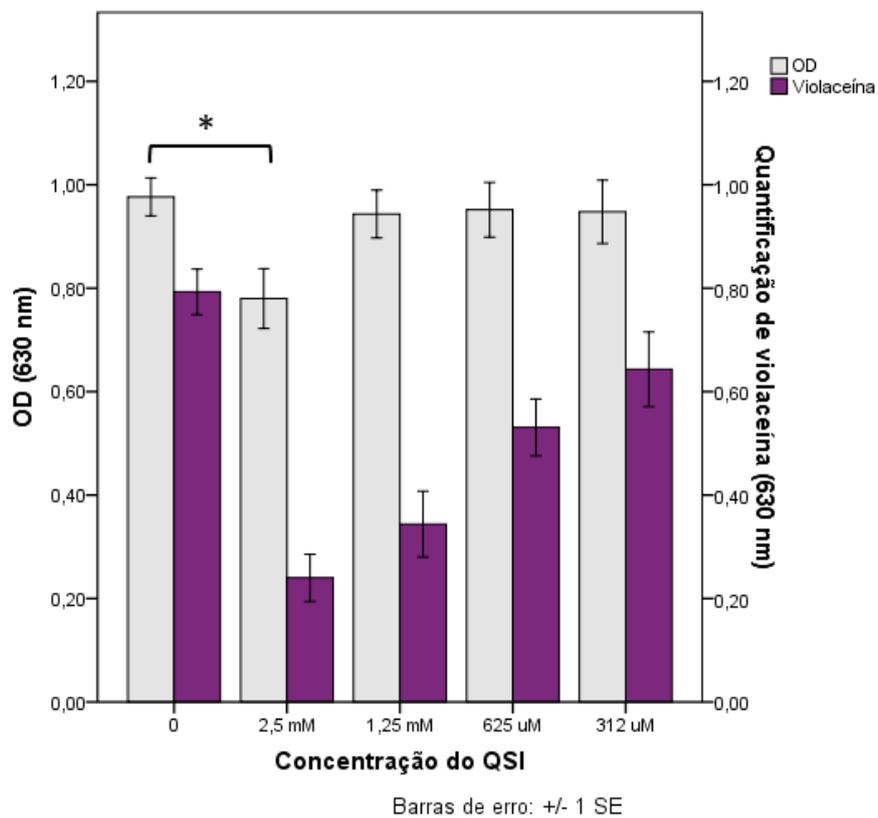


Figura S178 - Ensaio de quantificação de violaceína da estrutura 182E.

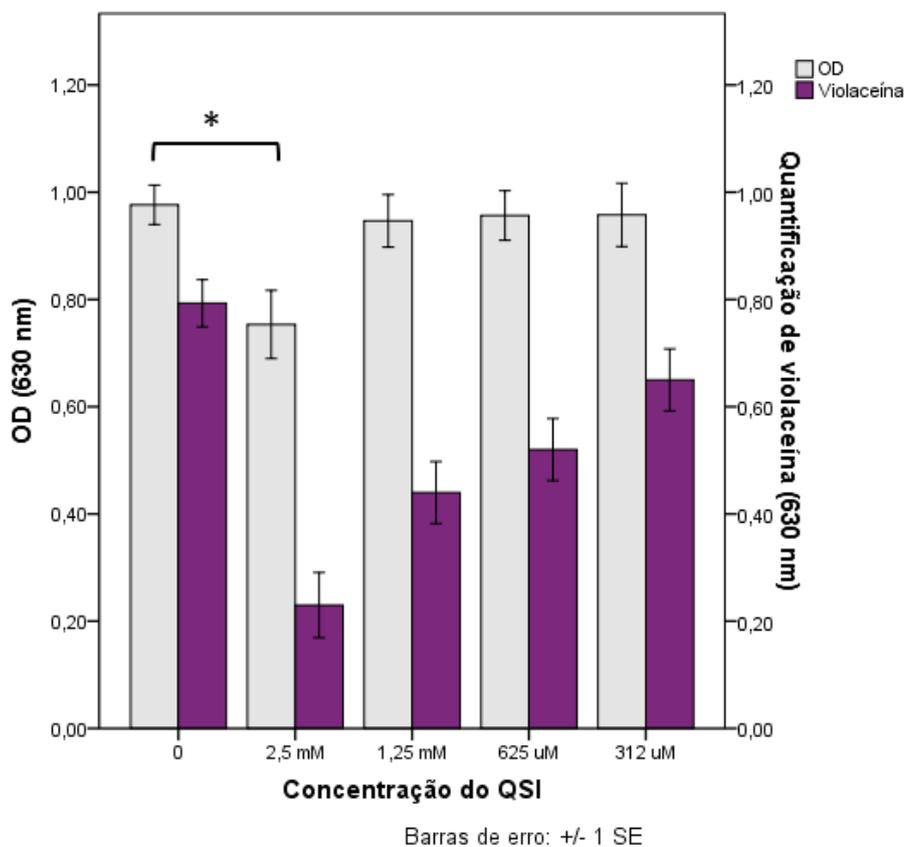


Figura S179 - Ensaio de quantificação de violaceína da estrutura 183E.

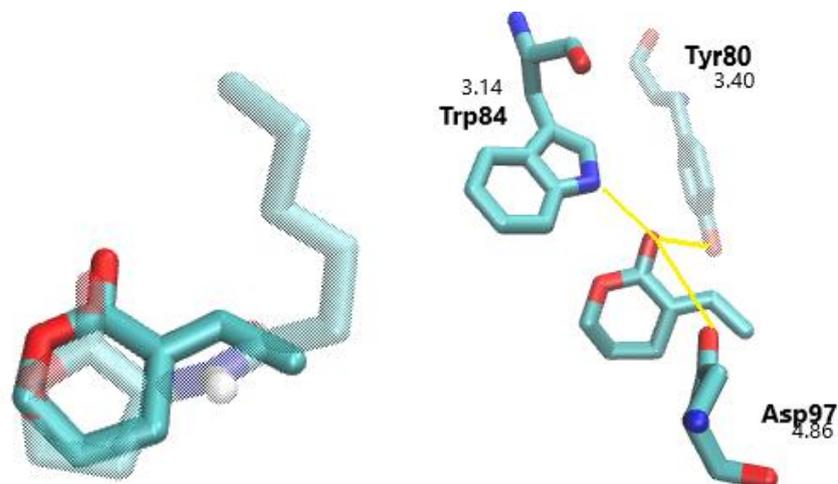


Figura S180 - (A) Sobreposição entre **51** e **174E**. (B) Interações entre **174E** e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

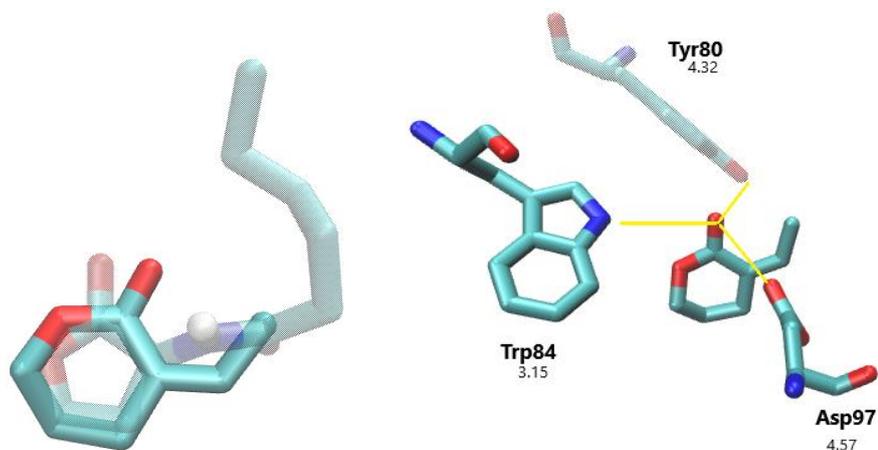


Figura S181 - (A) Sobreposição entre **51** e **174Z**. (B) Interações entre **174Z** e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

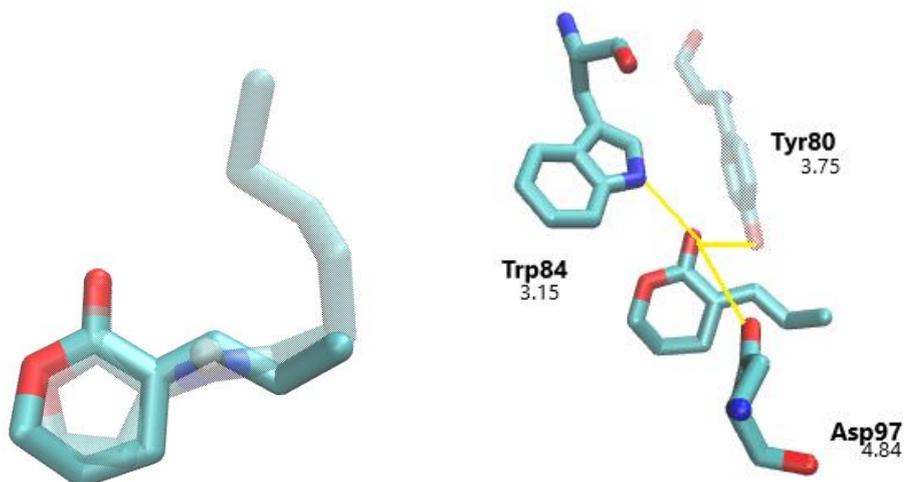


Figura S182 - (A) Sobreposição entre **51** e **175E**. (B) Interações entre **175E** e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

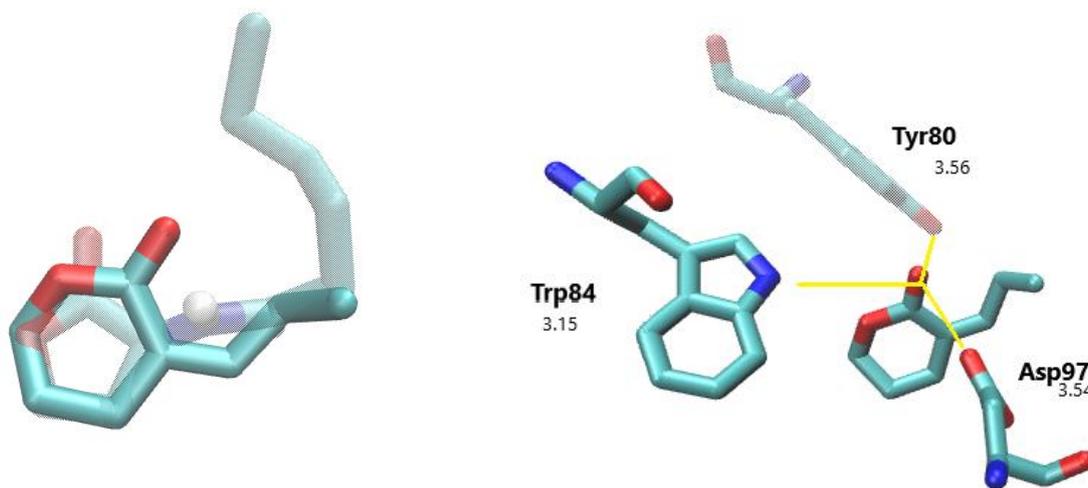


Figura S183 - (A) Sobreposição entre **51** e **175Z**. (B) Interações entre **176Z** e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

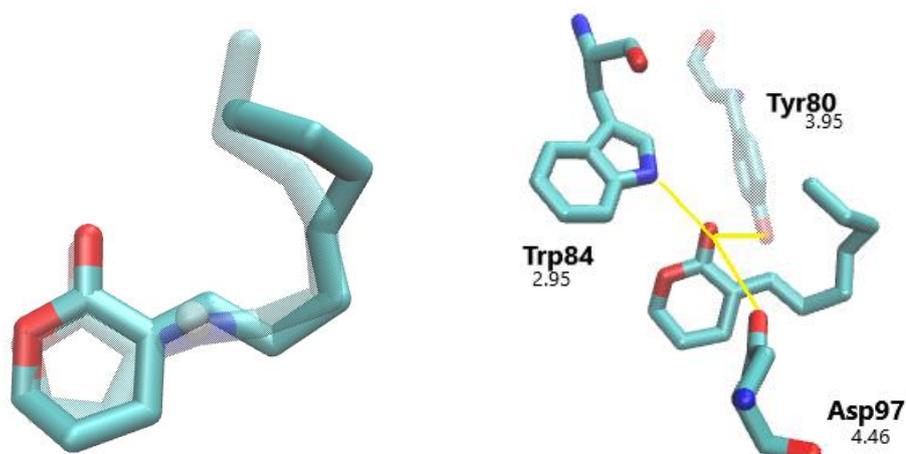


Figura S184 - (A) Sobreposição entre **51** e **176E**. (B) Interações entre **176E** e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

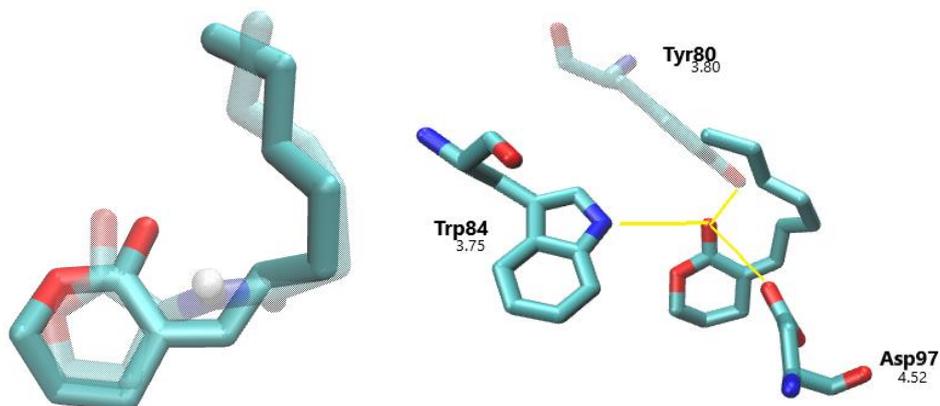


Figura S185 - (A) Sobreposição entre **51** e **176Z**. (B) Interações entre **176Z** e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

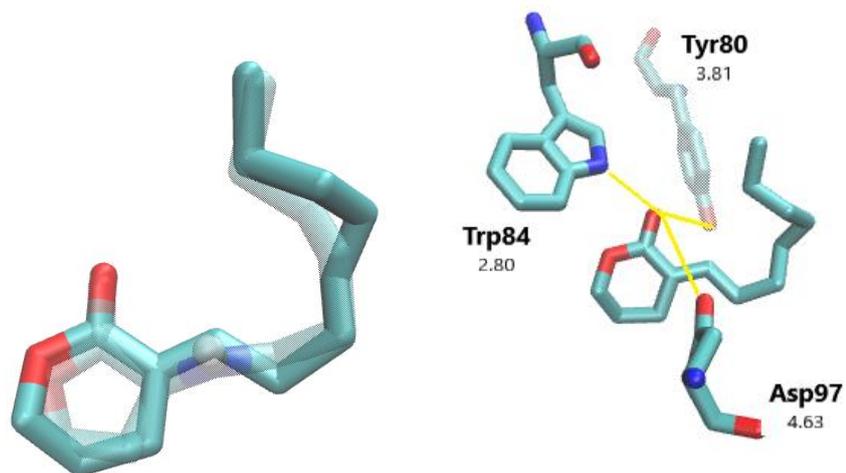


Figura S186 - (A) Sobreposição entre **51** e **177E**. (B) Interações entre **177E** e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

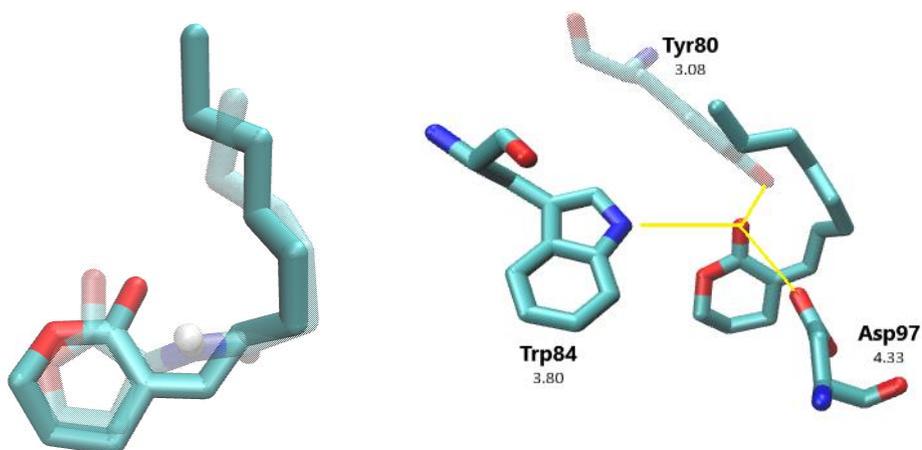


Figura S187 - (A) Sobreposição entre **51** e **177Z**. (B) Interações entre **177Z** e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

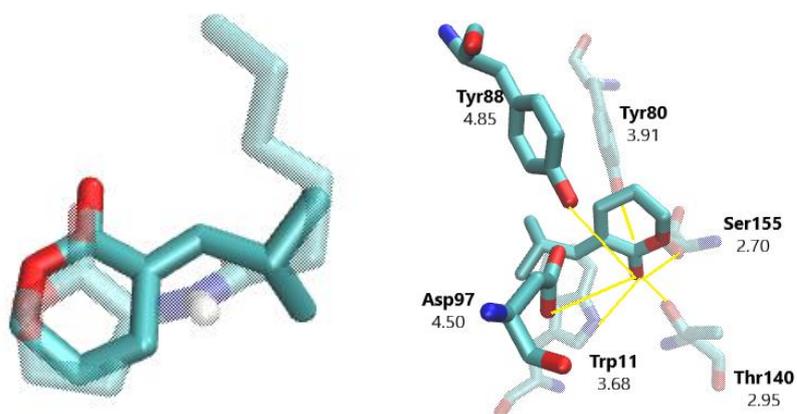


Figura S188 - (A) Sobreposição entre **51** e **178E**. (B) Interações entre **178E** e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

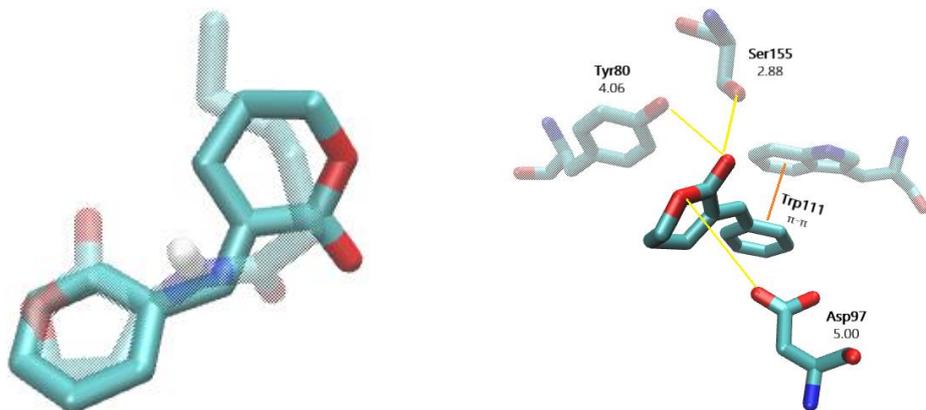


Figura S189 - (A) Sobreposição entre **51** e **179E**. (B) Interações entre **179E** e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

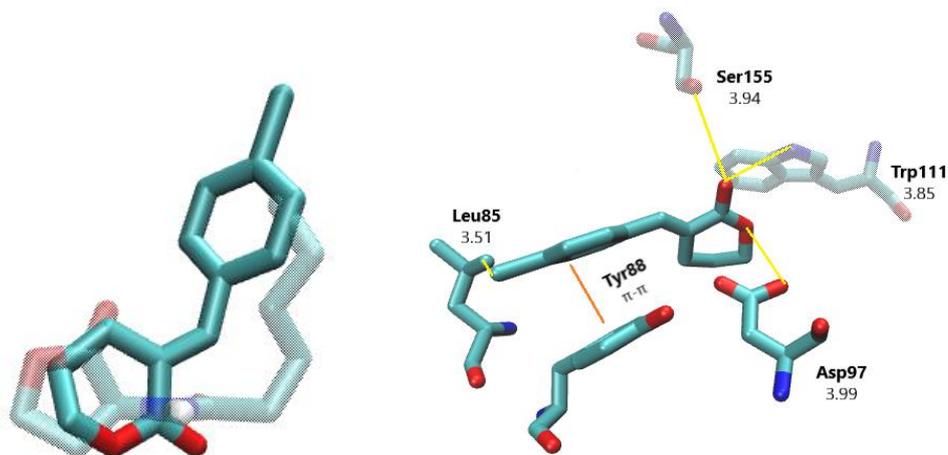


Figura S190 - (A) Sobreposição entre **51** e **180E**. (B) Interações entre **180E** e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

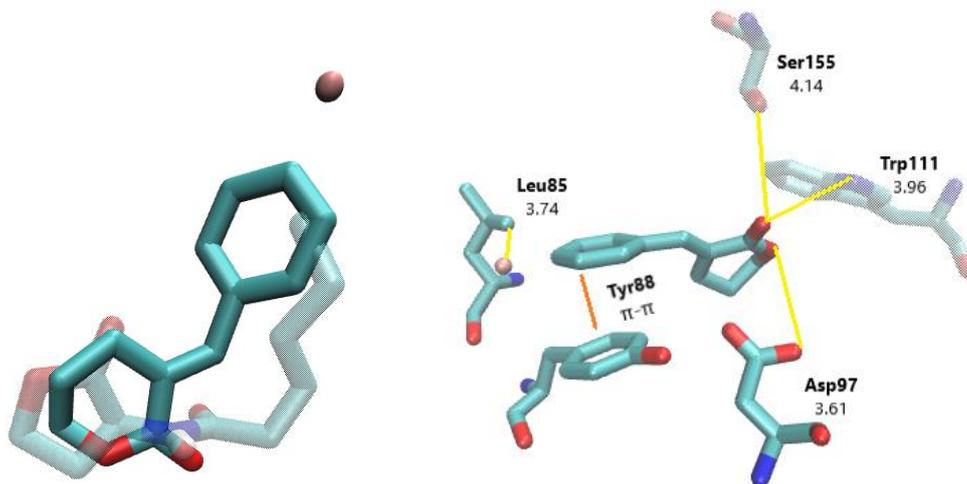


Figura S191 - (A) Sobreposição entre **51** e **181E**. (B) Interações entre **181E** e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

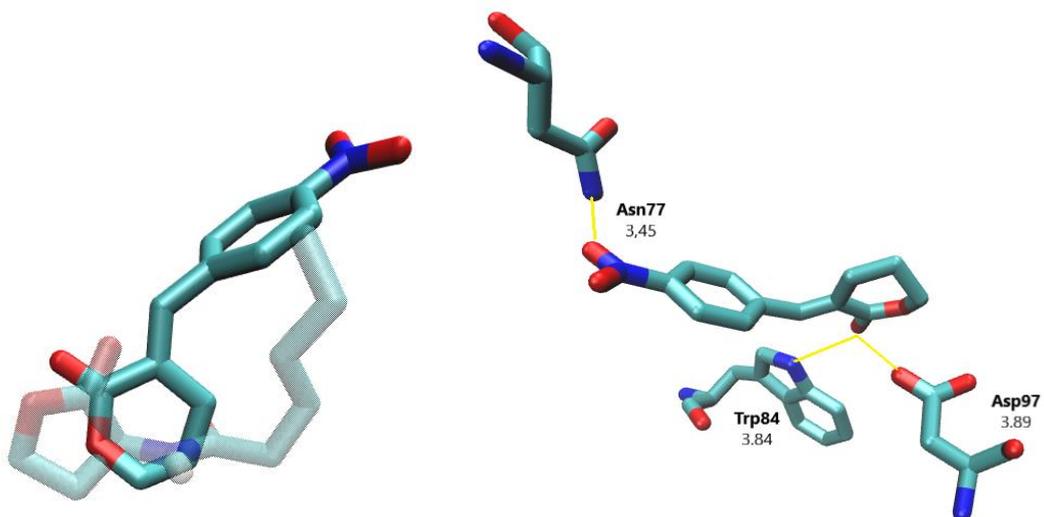


Figura S192 - (A) Sobreposição entre 51 e 182E. (B) Interações entre 182E e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

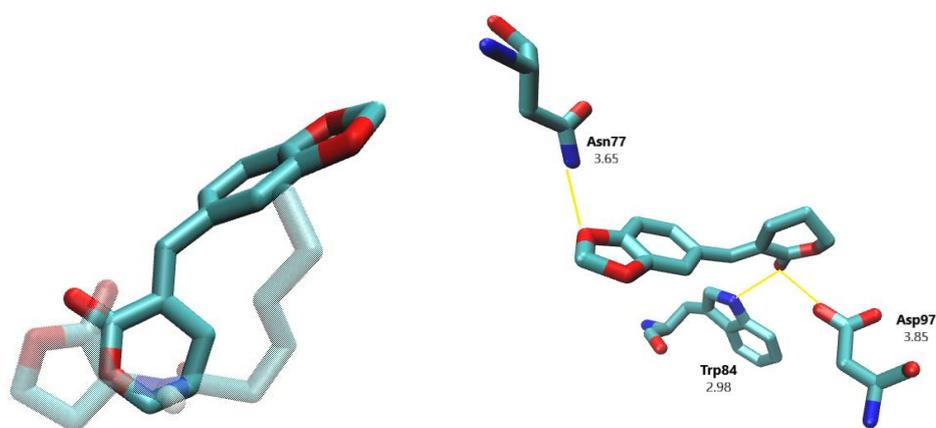


Figura S193- (A) Sobreposição entre 51 e 183E. (B) Interações entre 183E e os aminoácidos no sítio de ligação do HHL.

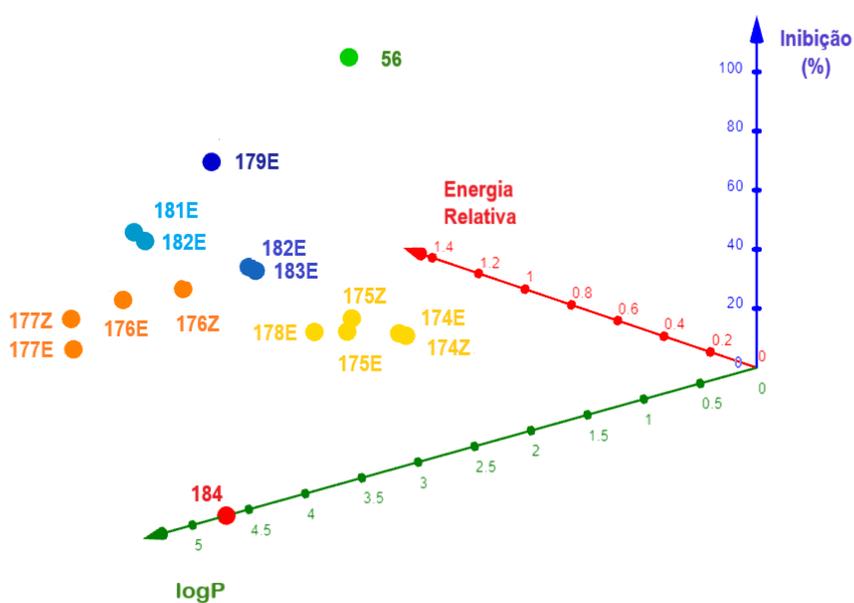


Figura S194- Análise 3D dos parâmetros inibição, energia relativa e logP para as das 2-alquenil- δ -

valerolactonas.

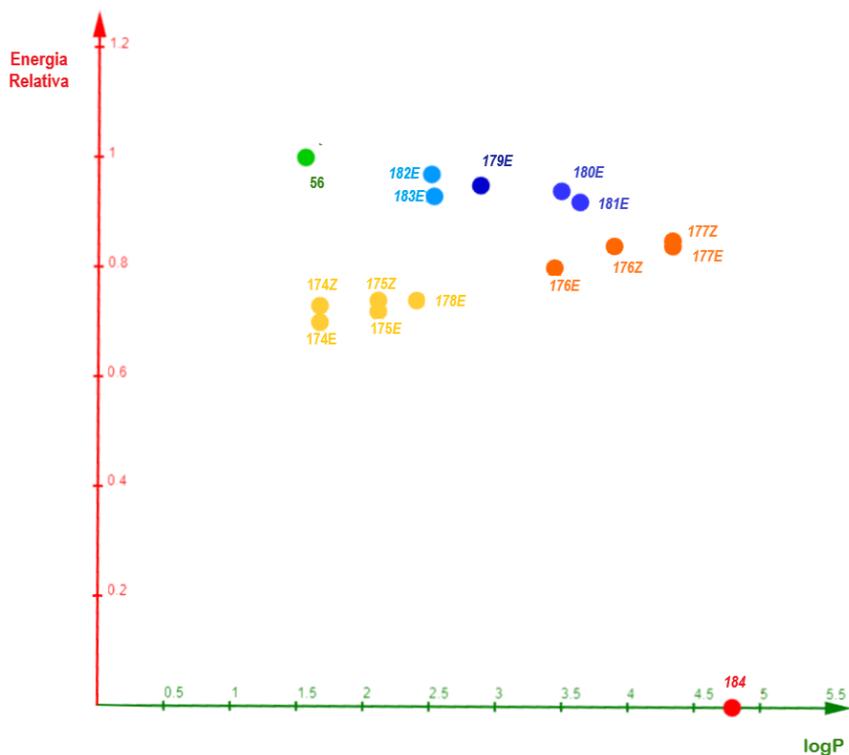


Figura S195- Gráfico Energia relativa contra logP para as das 2-alquenil-δ-valerolactonas.

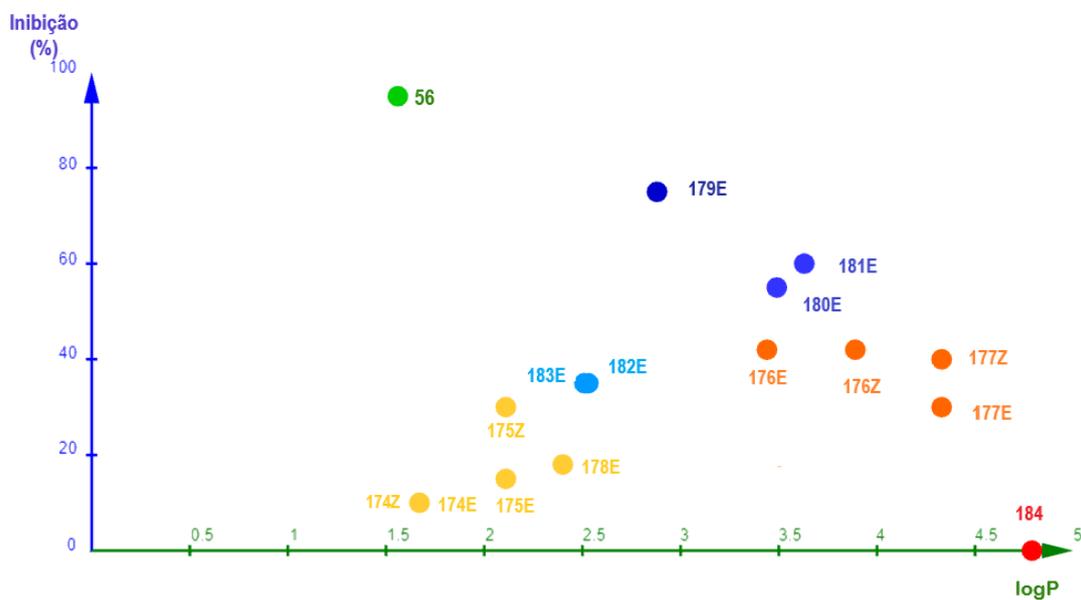


Figura S196- Gráfico Inibição contra logP para as das 2-alquenil-δ-valerolactonas.

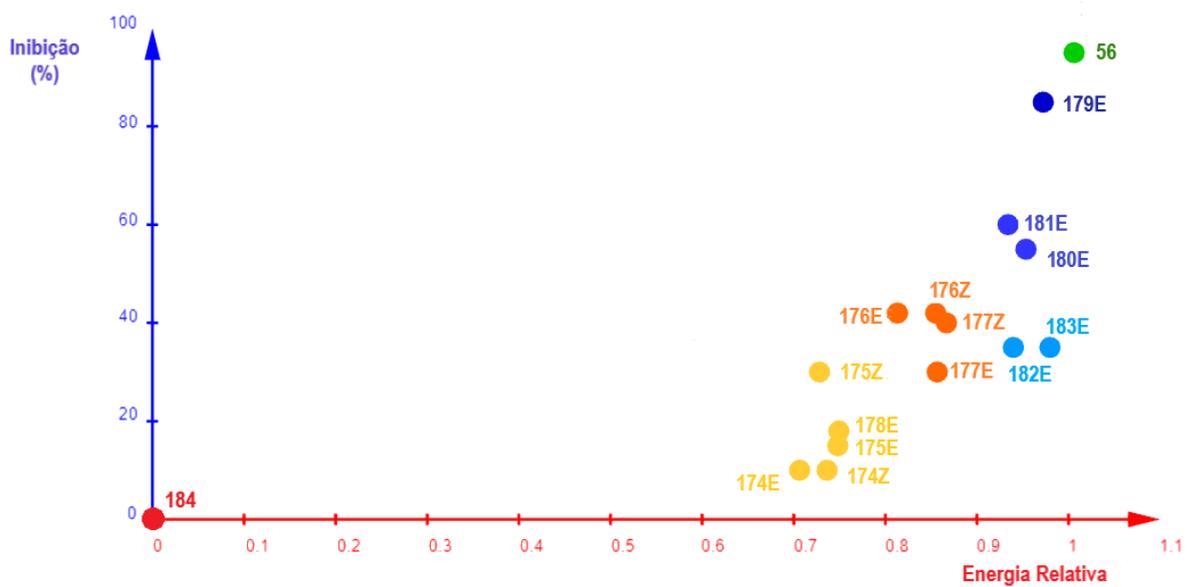


Figura S197- Gráfico Energia relativa contra Inibição para as das 2-alkenil- δ -valerolactonas.

**DECLARAÇÃO DE ORIGINALIDADE DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO OU TESE DE
DOUTORADO**

Declaro que a presente dissertação/tese é original, elaborada especialmente para este fim, não tendo sido apresentada para obtenção de qualquer título e que identifico e cito devidamente todas as autoras e todos os autores que contribuíram para o trabalho, bem como as contribuições oriundas de outras publicações de minha autoria.

Declaro estar ciente de que a cópia ou o plágio podem gerar responsabilidade civil, criminal e disciplinar, consistindo em grave violação à ética acadêmica.

Brasília, 7 de julho de 2023.

Assinatura da discente: Fernanda Favero

Programa: Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ)

Nome completo: Fernanda Favero

Título do Trabalho: Avaliação da atividade modulatória de diferentes classes químicas frente a expressão de fenótipos de *Quorum Sensing* de uma cepa de *Chromobacterium*.

Nível: () Mestrado (X) Doutorado

Orientador: Angelo Henrique de Lira Machado