



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

**Síntese e avaliação da atividade biológica de adutos  
de Morita-Baylis-Hillman e hexahidrocromenonas  
frente a cepa de CV026.**

**Saulo Marques da Cunha**

Tese de Doutorado

**Orientador:** Prof. Dr. Angelo Henrique de Lira Machado

Brasília, DF

2024

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

## **Síntese e avaliação da atividade biológica de adutos de Morita-Baylis-Hillman e hexahidrocromenonas frente a cepa de CV026**

**Saulo Marques da Cunha**

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade de Brasília – UnB, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Química.

**Orientador:** Prof. Dr. Angelo Henrique de Lira Machado

**Área de concentração:** Química Orgânica

Brasília, DF  
Fevereiro de 2024

“Carry on my wayward son,  
There'll be peace when you are done  
Lay your weary head to rest  
Don't you cry no more”

**Kerry Livgren – Carry on Wayward Son**

Dedico esse trabalho aos meus pais José Salustino e Maria Sidrônia por todo o suporte e amor empreendidos na criação dos seus filhos. E dedico esse trabalho em memória do anjinho Gustavo Marques da Cunha Marcovich.



## **Agradecimentos**

A Deus que norteia meus caminhos principalmente nos momentos mais obscuros.

Aos meus pais, José Salutino e Maria Sidrônia, pelo incentivo, força, apoio, confiança que depositaram em mim e por tanto carinho e dedicação empregados na minha criação. A minha irmã Milena pelo companheirismo, apoio e torcida. E ao meu sobrinho Benjamin por trazer mais alegria à minha vida. A minha namorada, Daniela, pelo carinho, paciência e cumplicidade para passar por tantos momentos tortuosos.

Ao professor Dr. Angelo Henrique de Lira Machado por ter me aceitado como aluno, por ter acreditado no meu potencial e por não ter desistido de mim mesmo quando eu já havia desistido de continuar na pós-graduação. Sou grato por sua paciência e dedicação nesses mais de 10 anos de parceria. Levarei sua amizade e ensinamentos por toda a vida.

Aos demais professores do LITMO Dra. Maria Lucília dos Santos, Dra. Maria Márcia Murta, Dr. Guilherme Dotto Brand e Dr. Rafael Oliveira Rocha pelos ensinamentos, conselhos e momentos de descontração que tornaram essa jornada mais amena.

Aos colegas de pós-graduação: Terezinha, Diana, José, Charley, Leandro, Paulo, Luiz, João Bueno, Samuel, Adolfo, Robson, Vinicius, Jorge, Hélio, Francisco, Guilherme, Angélica, Kadu, João, Saulo e aos demais colegas de laboratório pelo companheirismo, conselhos e conversas na hora do café. Um agradecimento especial aos meus amigos Felipe e à Thaissa que suportaram muitas reclamações e desabafos nos últimos anos, mas sempre conseguiram tornar o ambiente mais agradável. E ao Luan que além do companheirismo auxiliou na obtenção de vários espectros na etapa final deste trabalho.

Aos amigos João Victor e Thiago que sempre me incentivaram a dar continuidade ao projeto e que sempre estiveram presentes nessa etapa da minha vida.

A Fernanda, a amiga mais improvável de todas. Que insistiu no meu retorno ao laboratório, me ensinou a fazer os ensaios computacionais e biológicos. Foi psicóloga e incentivadora em vários momentos e que sem o esforço e dedicação eu não teria conseguido alcançar os pré-requisitos necessários para finalizar essa etapa da minha vida. No final das contas, você estava certa. Eu fui mais uma pessoa para entrar no seu artigo. Sou muito grato pela nossa amizade, Fáhvéhro.

Ao IFB que concedeu o afastamento para finalização desse trabalho. Aos meus colegas de trabalho dos *campi* Samambaia e Brasília que auxiliaram e incentivaram a conclusão dessa

empreitada, em especial, ao Davi, que forneceu suporte necessário para que esse afastamento ocorresse.

Ao professor Dr. Alex Leite Pereira da FCE por ter gentilmente cedido tempo, espaço e recursos para a realização dos ensaios biológicos.

Aos professores Dr. Alberto de Andrade Reis Mota, Dr. Thiago Viana de Freitas, Dr. Luiz Antônio Soares Romeiro, Dra. Maria Márcia Murta e Dr. Carlos Kleber Zago de Andrade por aceitarem participar da Banca Examinadora.

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

A UnB e ao Instituto de Química.

A CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

## Resumo

A busca por novas moléculas com atividade antibiótica é de fundamental importância dado o surgimento de novas cepas multirresistentes. Entretanto, novas estratégias, que envolvem a redução da patogenicidade numa infecção bacteriana vem se mostrando como ferramentas poderosas no tratamento de pessoas afligidas por tais enfermidades. *Quorum sensing* (QS) é um mecanismo de densidade populacional que regula, dentre outros fatores, a expressão de genes de virulência em bactérias. Tal estratégia, permite que a bactéria se comporte como um organismo multicelular e só expresse os fatores de virulência, quando a população alcance determinado limiar, facilitando o ataque ao sistema imunológico do hospedeiro. O QS é baseado na produção de sinais químicos, denominados autoindutores. Em bactérias Gram-negativas, os autoindutores responsáveis pela verificação da densidade populacional são as *N*-acilhomoserinalactonas. Uma cepa sensor bastante utilizada em ensaios de QS é a *Chromobacterium subtsugae* CV026 ATCC 31532 que é deletada para dois genes: 1 – o gene *cviI*, responsável pela síntese do autoindutor; e 2 – o gene *vioS*, repressor do sistema CviI/R. Essa cepa sensor, na presença de autoindutor fornecido por uma fonte externa, forma um pigmento roxo, conhecido como violaceína, sendo indicador da ocorrência do mecanismo de QS. Dessa forma, a busca de compostos que sejam capazes de reduzir a produção de violaceína, representa o primeiro passo na busca de moléculas que promovam a interferência no processo de patogenicidade bacteriano, sem comprometer o crescimento da cepa e diminuindo as chances de mutação para tipos mais resistentes. Diferentes classes de compostos são capazes de interferir no QS de CV026. Neste trabalho, foram avaliados diferentes subacervos de adutos de Morita-Baylis-Hillman (AMBH) e sua capacidade em interferir na biossíntese da violaceína. A escolha desses compostos é baseada em semelhanças estruturais com a do autoindutor *N*-acilhomoserina lactona cognato. Foi observada a inibição acima de 80% na concentração de 1,25 mM para um dos candidatos avaliados. A indução de violaceína também pôde ser verificada na ausência do autoindutor cognato em um dos ensaios. Além disso, verificou-se a importância da hidroxila dos AMBH para o efeito inibitório. Os dados de ancoragem molecular, competição, atividade quitinolítica e RT-qPCR, sugerem que a interferência ocorre em nível transcricional. O trabalho também aborda a síntese de uma classe de compostos que foram previamente avaliados quanto à sua capacidade inibitória de QS em CV026, as hidrocromenonas. A tentativa de promover a separação dos isômeros (*R,S*) de uma hidrocromenona conduziu a formação do núcleo hidrocromenimina e foi sugerida uma possível explicação conformacional baseada em seus espectros e estudos computacionais. Diferentes e inéditos análogos dessas cromeniminas, foram obtidos empregando hidrazinas e hidroxilaminas.

**Palavras-chave:** *quorum sensing*, CV026, AMBH, hexahidrocromenonas, hexahidrocromeniminas.

## Abstract

The search for new molecules with antibiotic activity is of fundamental importance given the emergence of new multidrug-resistant strains. However, new strategies involving the reduction of pathogenicity in bacterial infections have proven to be powerful tools in treating individuals afflicted with such diseases. *Quorum sensing* (QS) is a population density mechanism that regulates, among other factors, the expression of virulence genes in bacteria. This strategy allows the bacterium to behave as a multicellular organism and only express virulence factors when the population reaches a certain threshold, facilitating the attack on the host's immune system. QS is based on the production of chemical signals, called autoinducers. In Gram-negative bacteria, the autoinducers responsible for population density verification are *N*-acyl homoserine lactones. A widely used sensor strain in QS assays is *Chromobacterium subtsugae* CV026 ATCC 31532, which is deleted for two genes: 1 - the *cviI* gene, responsible for autoinducer synthesis; and 2 - the *vioS* gene, a repressor of the CviI/R system. This sensor strain, in the presence of autoinducer supplied by an external source, forms a purple pigment known as violacein, indicating the occurrence of the QS mechanism. Thus, the search for compounds capable of reducing violacein production represents the first step in the search for molecules that promote interference in the bacterial pathogenicity process without compromising strain growth and reducing the chances of mutation to more resistant types. Different classes of compounds are capable of interfering with CV026 QS. In this work, different subsets of Morita-Baylis-Hillman adducts (MBHA) and their ability to interfere with violacein biosynthesis were evaluated. The choice of these compounds is based on structural similarities to the cognate *N*-acyl homoserine lactone autoinducer. Inhibition above 80% was observed at a concentration of 1.25 mM for one of the candidates evaluated. Violacein induction could also be observed in the absence of the cognate autoinducer in one of the assays. Furthermore, the importance of AMBH hydroxyl for the inhibitory effect was verified. Molecular docking, competition, chitinolytic activity, and RT-qPCR data suggest that interference occurs at the transcriptional level. The work also addresses the synthesis of a class of compounds that were previously evaluated for their QS inhibitory capacity in CV026, hydrochromenones. The attempt to separate the (*R,S*) isomers of a hydrochromenone led to the formation of the hydrochromenimine core, and a possible conformational explanation based on its spectra and computational studies was suggested. Different and unprecedented analogs of these chromenimines were obtained using hydrazines and hydroxylamines.

**Keywords:** *quorum sensing*, CV026, MBHA, hexahydrochromenones, hexahydrochromenimines.

## Sumário

Lista de Abreviaturas e Acrônimos .....	xi
Lista de Aminoácidos .....	xiii
<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1 <i>Quorum Sensing</i> .....	1
1.2 <i>Chromobacterium spp.</i> .....	5
1.3 Reação de Morita-Baylis-Hillman .....	8
1.4 Mecanismo da reação de MBH .....	11
1.5 Aplicações Biológicas .....	16
1.6 Cromenonas .....	23
1.7 Aplicações Biológicas das Cromenonas.....	25
1.8 Cromenonas como inibidoras de <i>Quorum Sensing</i> em <i>Chromobacterium</i> .....	28
<b>2. Objetivos</b> .....	34
2.1 Objetivos Gerais .....	34
2.2 Objetivos Específicos .....	34
<b>3. Resultados e Discussão</b> 34	
3.1 Adutos de Morita-Baylis-Hillman .....	35
3.1.1 AMBH como inibidores de <i>quorum sensing</i> .....	35
3.1.2 Inibição da Biossíntese de Violaceína .....	40
3.1.3 Ancoragem Molecular dos AMBH .....	56
3.1.4 Teste de Competição .....	92
3.1.5 Atividade Quitinolítica .....	93
3.1.6 RT-qPCR .....	95
3.2 Hexahidrocromenonas .....	96
3.2.1 Lactonas vinílogas análogas a 5-oxo .....	96
3.2.2 Estudo Metodológico para otimização para a formação do produto de monoalquilação da reação de adição de Michael .....	110
3.2.3 Síntese e separação dos enantiômeros de 6-oxo .....	117
3.2.4 Estudo Metodológico para formação das iminas diastereoisoméricas da 6-oxo ....	121

3.2.5 Proposta de estereoquímica da metila do núcleo cromenimina .....	131
3.2.6 Hidrólise dos diastereoisômeros de 222 .....	135
3.2.7 Síntese de novos derivados nitrogenados de 6-oxo .....	145
3.2.8 Ancoragem Molecular das hexahidrocromenonas e hexahidrocromeniminas .....	160
<b>4. Conclusões .....</b>	<b>171</b>
<b>5. Perspectivas .....</b>	<b>175</b>
<b>6. Materiais e Métodos .....</b>	<b>176</b>
6.1 Parte Experimental .....	177
<b>7. Bibliografia .....</b>	<b>198</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>207</b>

## Lista de Abreviaturas e Acrônimos

**AHL** – *N*-acilhomoserinalactonas

**AI** – Autoindutores

**AIP** – Peptídeos autoindutores

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

**BHT** – 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol

**CCD** – Cromatografia em camada delgada

**COSY** – Correlation Spectropy

**COX** – Ciclooxigenase

**d** – duplete

**DBD** – DNA Bind Domain

**dd** – duplo duplete

**dddd** – duplo duplo duplo duplete

**ddddd** – duplo duplo duplo duplo duplete

**dddt** – duplo duplo duplo de triplete

**DPD** – 4,5-dihidroxi-2,3-pentanediona

**DPPH** – 2,2-difenil-1-picrilidrazila

**dqd** – duplo quarteto de duplete

**EC<sub>50</sub>** – Concentração molar de um agonista que produz 50% do efeito máximo possível desse agonista

**EI** – Electron ionization

**ESI** – Electrospray ionization

**GC/MS** – Gas chromatography – mass spectrometry

**GRE** – Grupo retirador de elétrons

**HPLC** – High performance liquid chromatography

**HSL** – Homoserina lactona

**HMQC** – Heteronuclear single quantum correlation

**Hz** – hertz

**IC<sub>50</sub>** – Concentração que promove 50% do efeito inibitório máximo

**IQS** – Inibidores de quorum sensing

**J** – Constante de acoplamento

**LBD** – Ligand Bind Domain

**LD<sub>50</sub>** – Concentração que promove 50% do efeito letal máximo

**m/z** – Razão carga-massa

**MAO** – Monoamina oxidase

**MBH** – Morita-Baylis-Hillman

**MIC** – Concentração Inibitória Mínima

**MO** – Micro-ondas

**MS** – Peneira molecular

**ppm** – Partes por milhão

**PQS** – 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona

**q** – quarteto

**qPCR** – reação em cadeia da polimerase quantitativa

**QS** – Quorum Sensing

**quid** – quinteto de dubletos

**RMN de <sup>13</sup>C** – Ressonância magnética nuclear de carbono 13

**RMN de <sup>1</sup>H** – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

**s** – simpleto

**SAR** – Relação estrutura atividade

**t** – tripleto

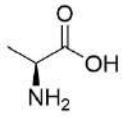
**t.a.** – Temperatura Ambiente

**TMS** – Tetrametilsilano

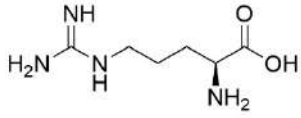
**δ** – Deslocamento químico



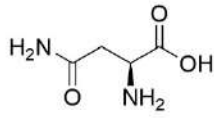
## Lista de Aminoácidos



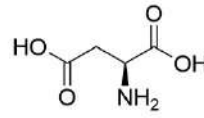
**Alanina**  
(Ala - A)



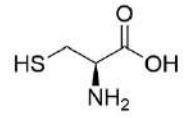
**Arginina**  
(Arg - R)



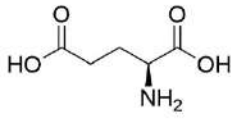
**Asparagina**  
(Asn - N)



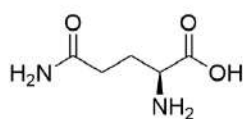
**Ácido Aspártico**  
(Asp - D)



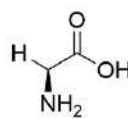
**Cisteína**  
(Cys - C)



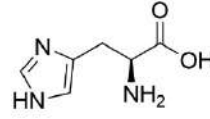
**Ácido Glutâmico**  
(Glu - E)



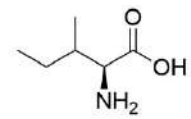
**Glutamina**  
(Gln - Q)



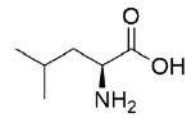
**Glicina**  
(Gly - G)



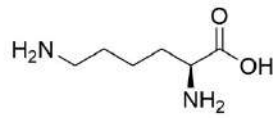
**Histidina**  
(His - H)



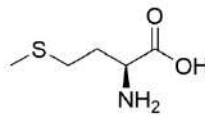
**Isoleucina**  
(Ile - I)



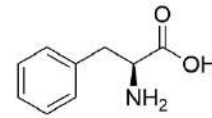
**Leucina**  
(Leu - L)



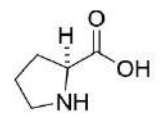
**Lisina**  
(Lys - K)



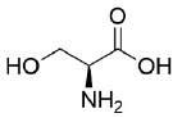
**Metionina**  
(Met - M)



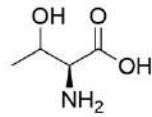
**Fenilalanina**  
(Phe - F)



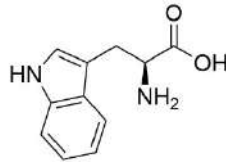
**Prolina**  
(Pro - P)



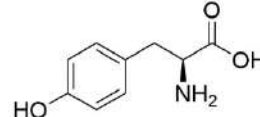
**Serina**  
(Ser - S)



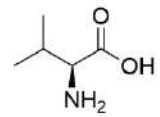
**Treonina**  
(Thr - T)



**Triptofano**  
(Trp - W)



**Tirosina**  
(Tyr - Y)



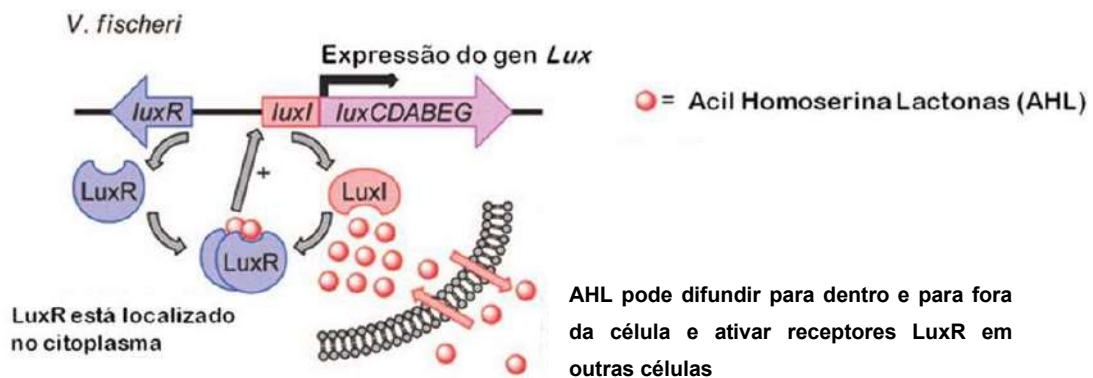
**Valina**  
(Val - V)

# 1. Introdução

## 1.1 Quorum Sensing

*Quorum sensing* (QS) é um sistema de sinalização celular baseado no reconhecimento de sinais químicos genericamente denominados de autoindutores (AI) que é utilizado por microrganismos para coordenar a expressão genética em resposta a mudanças na densidade populacional.<sup>1</sup>

O primeiro sistema de QS descrito foi observado na bactéria bioluminescente *Vibrio fischeri*. Nesta espécie, duas proteínas controlam a expressão do operon *lux* (*luxICDABE*) (Figura 1): LuxI, que é a sintetase de um autoindutor identificado como 3-oxo-C6-HSL; e LuxR, o receptor citoplasmático de 3-oxo-C6-HSL (Figura 2). Durante os processos de sinalização, AI-1 atravessa livremente os envelopes celulares e interage com o ativador transcricional LuxR promovendo, assim, a ativação do operon *lux*.<sup>2</sup>

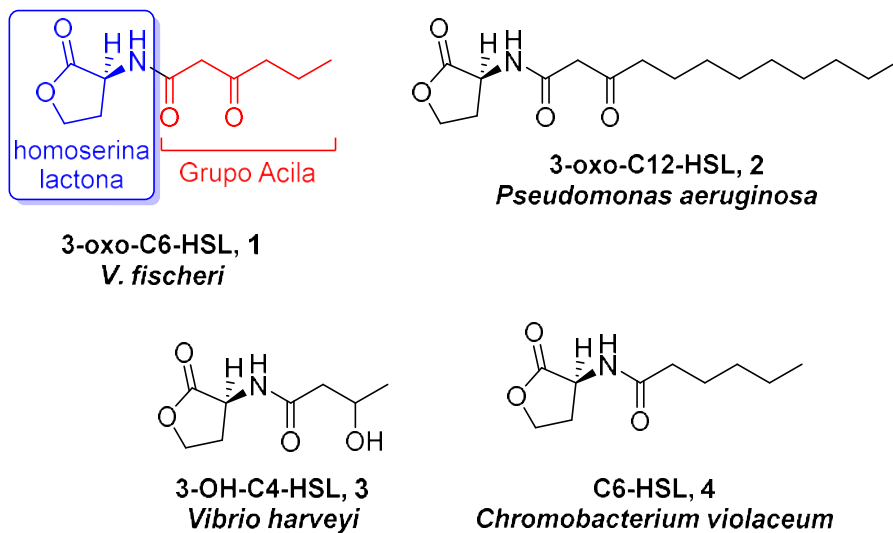


**Figura 1.** Processo de *Quorum Sensing* (QS) na bactéria bioluminescente *V. fischeri*.<sup>§</sup>

O sistema LuxI/R é considerado um paradigma em relação a comunicação em bactérias Gram-negativas. Um grande número de bactérias, que atualmente excede 70 espécies conhecidas de Gram-negativas, possuem sistemas LuxI/R e comunica-se por meio de *N*-acilhomoserinalactonas (AHL).<sup>1,3</sup> Devido à extrema especificidade existente entre proteínas LuxR e seus sinais cognatos, estes sistemas são usados predominantemente para a comunicação intraespecífica. Os estudos deste sistema de QS em diferentes espécies de bactérias têm revelado uma grande variedade estrutural de AHL. Isso porque, apesar das AHL compartilharem a porção homoserina lactona, diferentes isoformas das enzimas LuxI

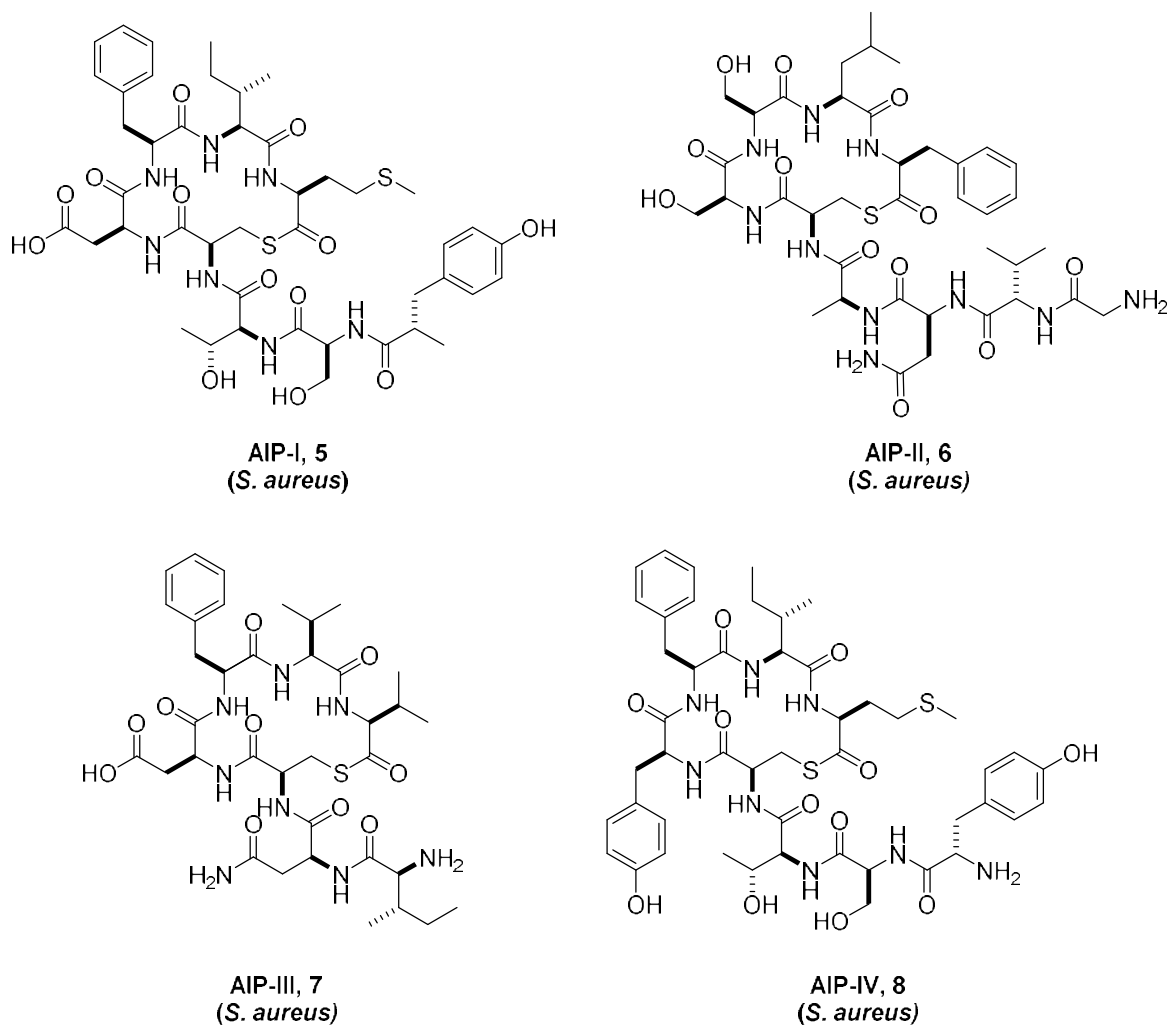
<sup>§</sup> Figura adaptada da referência 4.

incorporam cadeias acila de tamanho e estado de saturação específicos (Figura 2). Esta variação estrutural permite que isoformas da LuxR características de cada espécie bacteriana consigam diferenciar as várias AHL.<sup>4</sup>



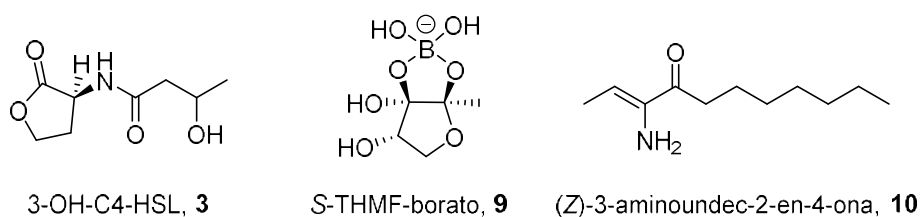
**Figura 2.** *N*-acilhomoserinalactonas (AHL) que atuam com AI's em QS bacteriano.

O segundo sistema de QS predominante é encontrado em bactérias Gram-positivas e utiliza peptídeos cíclicos modificados que variam de 5 a 17 resíduos de aminoácidos como moléculas sinalizadoras.<sup>1,5</sup> Os peptídeos sinais são ativamente secretados pelas células bacterianas e quando atingem concentração limite são percebidos por quinases sensoras que atuam como receptores de superfície. Semelhante ao sistema LuxI/R, circuitos de QS baseados em peptídeos sinais servem à comunicação intraespecífica, e o exemplo máximo dessa especificidade é encontrada em *Staphylococcus aureus*. Baseado na sequência primária de seus peptídeos autoindutores (AIPs), cepas de *S. aureus* são atualmente classificados em 4 subgrupos (Figura 3). Surpreendentemente, além de ativar exclusivamente seu receptor cognato, os AIP inibem por competição todas as outras quinases sensoras apresentadas por outras variedades de *S. aureus*. Assim, em virtude dessa extrema especificidade e diante da coinfeção com duas diferentes cepas *S. aureus*, a competição intraespecífica selecionará o subgrupo que primeiro estabelecer seu circuito de QS.<sup>2</sup> Esta inibição intraespecífica do QS foi comprovada em experimentos de desafio com modelos animais, nos quais camundongos foram protegidos da infecção por *S. aureus* pelo uso de AIPs não-cognatos secretado por outro subgrupo *S. aureus*.<sup>6,7</sup>



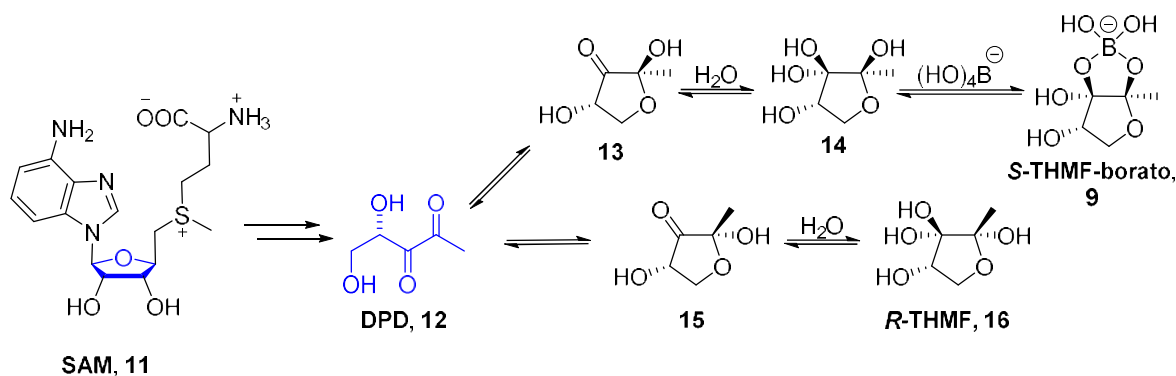
**Figura 3.** Peptídeos autoindutores (AIP's) cíclicos que atuam no QS de *S. aureus*.

Uma terceira classe conhecida de circuito de QS é um híbrido entre os dois sistemas classicamente preconizados para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Neste sistema a sinalização mediada por AHL, característica de Gram-negativas, é percebida por quinases sensoras associadas à membrana que são predominantes em bactérias Gram-positivas. Sistemas híbridos de QS foram inicialmente identificados na espécie bioluminescente *Vibrio harveyi* que utiliza três sinais químicos diferentes em seus processos de comunicação: HAI-1 (3-hidroxi-C4-HSL) **3**; AI-2, um furanosil borato diester (*S*-THMF-borato) **9**; e um terceiro sinal secretado por *V. harveyi* denominado CAI-1 ((*Z*)-3-aminoundec-2-en-4-ona) **10** (Figura 4).<sup>8</sup>



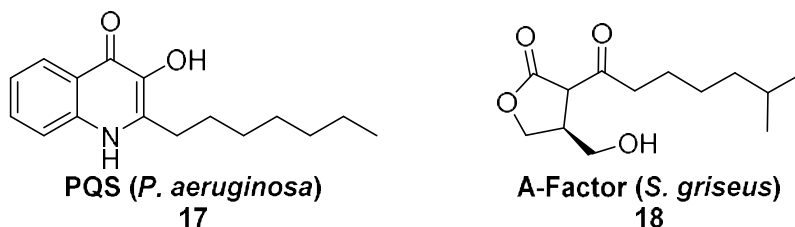
**Figura 4.** Autoindutores empregados pela *V. harveyi*.

A síntese de *S*-THMF-borato **9** envolve o consumo de SAM **11** que leva à formação da 4,5-dihidroxi-2,3-pentanediona (DPD) **12**, molécula cerne para a síntese de grande parte dos AI-2's conhecidos atualmente. Em *V. harveyi*, DPD espontaneamente cicliza para formar o anel furano (**13**), sofre hidratação e a adição de um íon borato para dar origem a *S*-THMF-borato (**9**).<sup>9</sup>



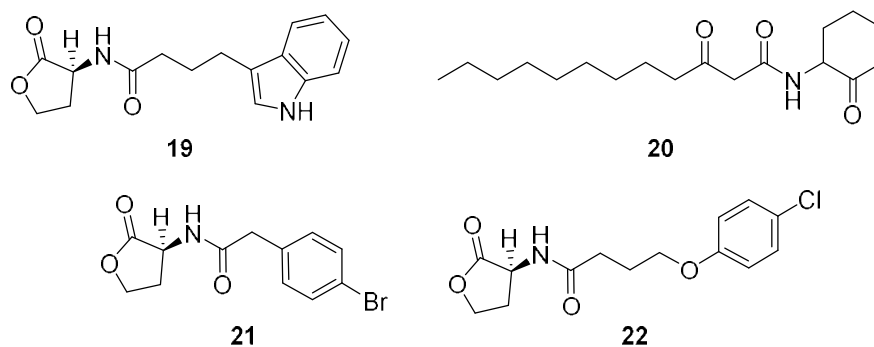
**Esquema 1.** Biossíntese do *S*-THMF-borato e *R*-THMF, AI's no QS híbrido de *V. harveyi*.

Outras classes de substâncias que atuam como AI's característicos em algumas espécies de bactérias são as quinolonas **17** e as  $\gamma$ -butirolactonas **18** (Figura 5). A bactéria *P. aeruginosa* lança mão da 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS) **17** como um ponto de regulação na comunicação entre os seus dois sistemas de QS: Las e Rhl.<sup>10</sup> A 2-6-metil-1-oxoheptil-3*R*-hidróximetilbutirolactona **18** produzida pela bactéria *Streptomyces griseus* atua como autoindutor no seu QS controlando a diferenciação morfológica e a produção de metabólitos secundários.<sup>11</sup>



**Figura 5.** 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS) e A-Factor, AI's característicos dos sistemas QS de *P. aeruginosa* e *S. griseus*, respectivamente.

A crescente prevalência de cepas bacterianas resistente aos antibióticos, bem como a emergência de cepas multirresistentes, pressionam para a descoberta de novas alternativas terapêuticas visando o controle de infecções por microrganismos. Diversos patógenos humanos de relevante importância médica utilizam-se de QS para regular a expressão de fatores de virulência. Esta estratégia aumenta as chances de sobrevivência da colônia uma vez que a expressão de fatores de virulência é realizada apenas quando a população bacteriana alcança elevado contingente facilitando assim a subjugação do sistema imune. Desta forma, impedir a expressão de fatores de virulência pode ser uma alternativa que oferece a oportunidade de inibir a patogênese microbiana sem impor imediata pressão seletiva ao agente etiológico. Este conceito representa um novo paradigma na prevenção e tratamento das doenças infecciosas,<sup>12</sup> pois sua terapêutica – conhecida por agentes antivirulência, usa fármacos baseados em moléculas sinais que têm por objetivo atenuar a patogenicidade ao invés do crescimento microbiano.<sup>13</sup> Assim uma variedade de análogos a autoindutores, sintéticos e naturais, tem sido sondada levando à descoberta de alguns inibidores de *quorum sensing* (IQS) (Figura 6).<sup>14-16</sup>



**Figura 6:** Estrutura química de alguns inibidores do QS sintéticos que mimetizam AI's naturais.<sup>14-16</sup>

## 1.2 *Chromobacterium* spp.

*Chromobacterium violaceum* é uma espécie de bactéria Gram-negativa bastante empregada em estudos envolvendo IQS devido à sua capacidade em sintetizar o pigmento violaceína, um metabólito secundário cuja síntese é regulada por *quorum sensing*.<sup>17</sup> A coloração promovida pelo pigmento é utilizada como descritor da ocorrência de QS, possibilitando assim, avaliar se uma molécula é capaz ou não de modular este sistema de QS. Uma das cepas de *Chromobacterium* mais utilizadas é a CV026, uma mutante da cepa ATCC 31532, que é deletada para dois importantes genes relacionados ao seu QS; o gene *cviI*, responsável pela produção do autoindutor **C6-HSL** e o gene *vioS*, responsável por reprimir o sistema CviI/R. A

ausência da proteína responsável pela síntese do autoindutor cognato torna necessária a adição de **C6-HSL** de uma fonte externa para a produção de violaceína. O acréscimo de um provável inibidor ao meio teste, pode reduzir a produção de violaceína, tornando possível avaliar se houve interferência no *quorum sensing* nesta cepa. Recentemente, Soby e Harrison, avaliaram a necessidade de reclassificar a cepa ATCC 31532, e sua mutante CV026, em *Chromobacterium subtsugae*. Os autores avaliaram tanto as características fenotípicas quanto genotípicas, além da produção de HCN, para afirmar que a classificação dessas cepas como *C. violaceum* foi feita erroneamente.<sup>18</sup>

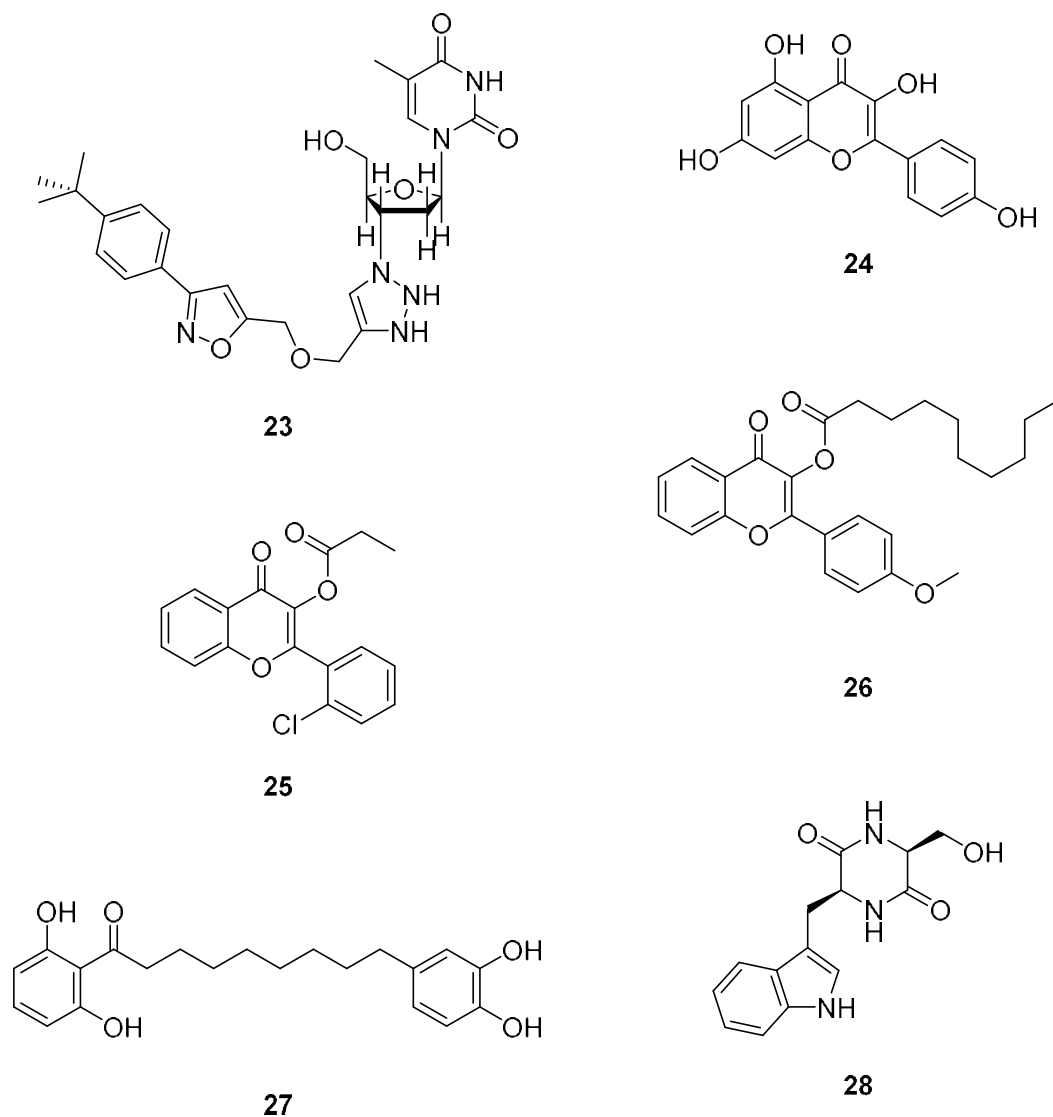
Williams e colaboradores avaliaram uma série de AHL cujo comprimento das cadeias acila era a característica que determinava o perfil agonista ou antagonista dessas moléculas no QS de CV026.<sup>19</sup> Cadeias menores, com quatro ou seis carbonos foram capazes de induzir a produção de violaceína, enquanto cadeias variando de dez a quatorze carbonos apresentaram efeito inibitório. Curiosamente, a cadeia intermediária C8 apresentou efeito ambíguo, promovendo uma leve indução quando o autoindutor cognato não estava presente e inibindo fracamente quando havia uma pequena concentração de **C6-HSL**.

Bassler e colaboradores realizaram a síntese e avaliação de substâncias capazes de antagonizar o *quorum sensing* ao se ligar à proteína CviR de *C. subtsugae*.<sup>20</sup> Dentre as estruturas testadas, **22** foi capaz de inibir a produção de violaceína na menor concentração,  $IC_{50} = 295$  nM (Figura 6). A eficácia de **22** também foi testada *in vivo*, utilizando *C. elegans* como modelo de infecção. Esses nematódeos possuem tempo médio de vida de 15 dias quando crescem na presença de uma cepa de *E. coli* não patogênica, e dois dias quando crescem na presença de *C. subtsugae*. A adição de **22** ao meio aumentou o tempo de meia vida de *C. elegans* para sete dias, evidenciando como essa molécula pode interromper a patogenicidade mediada pelo QS de *C. subtsugae*.

Em um estudo visando a síntese de derivados 1,2,3-triazóis 1,4 dissubstituídos, Lin e colaboradores empregaram a química *click* auxiliada por radiação de ultrassom para desenvolver uma série de compostos e testá-los frente à cepa CV026 e sua capacidade de inibir a produção de violaceína (Figura 7).<sup>21</sup> Dentre os compostos testados, **23** foi o que apresentou o menor valor de  $IC_{50}$ ,  $42,8 \pm 4,5$   $\mu$ M. Segundo os autores o efeito antagonista pode ser devido à interação com um ou mais resíduos aromáticos de resíduos de aminoácidos presentes na proteína do tipo LuxR.

Flavonoides também foram avaliados quanto a sua capacidade de inibir a violaceína em CV026. Ilk e colaboradores testaram a liberação do kaempferol (**24**) em nanopartículas de quitosana em diferentes tempos de armazenamento (Figura 7).<sup>22</sup> Segundo os autores, o

kaempferol quando utilizado puro, perdeu sua capacidade inibitória de QS imediatamente após a síntese, entretanto, a nanopartícula de quitosana/kaempferol recém-sintetizada foi capaz de inibir em 76% a produção de violaceína. Além disso, após 30 dias, a nanopartícula ainda era capaz de inibir a produção de violaceína em 34%, o que poderia indicar que tal formulação poderia ser utilizada como IQS de longa duração.



**Figura 7:** Estruturas químicas que possuem atividade inibitória de produção de violaceína em CV026.

Outro estudo envolvendo o potencial dos flavonoides como IQS foi desenvolvido por Fallarero e Manner que avaliaram 3040 compostos derivados de produtos naturais,<sup>23</sup> dos quais dois flavonoides, **25** e **26** (Figura 7), mostraram-se promissores frente à mutante CV026 e à cepa selvagem ATCC31532. Encorajados pelo resultado, os pesquisadores estenderam o escopo do trabalho a outras espécies de bactérias Gram-negativas e avaliaram o impacto desses



compostos na inibição de outras características controladas por *quorum sensing* em cepas de *P. aeruginosa* e *E. coli*. Foi reportada uma redução entre 11 – 51% da biomassa de biofilme formada frente às cepas analisadas. Segundos os autores, as moléculas **25** e **26** poderiam ser empregadas como compostos adjuvantes em antibioticoterapias no intuito de aumentar a suscetibilidade dos biofilmes aos agentes bactericidas.

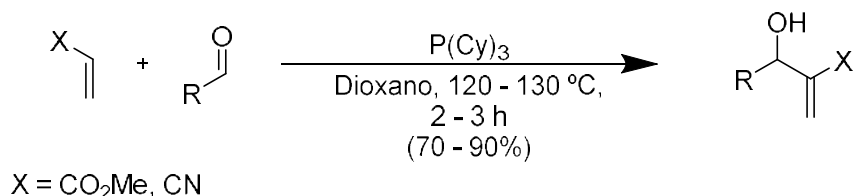
Em outra avaliação com CV026 antes da utilização de outras cepas Gram-negativas, Chan e colaboradores verificaram que a utilização de 3 mg/mL do composto **27** (Figura 7) era capaz de reduzir drasticamente a produção de violaceína.<sup>24</sup> O resultado promissor fez com que os pesquisadores transpusessem os ensaios para a cepa *P. aeruginosa* PAO1, dos quais conseguiram inibir a produção de piocianina e reduzir o biofilme em 69,4%, sem comprometer a viabilidade bacteriana. Segundo os autores, o composto **27** é capaz de interagir com ambos os sistemas, *las* e *rhl* da PAO1. Estudos adicionais estão sendo realizados para comprovar que essa interação ocorre apenas nos homólogos LuxR e não nos LuxI.

Zhu e colaboradores conseguiram, a partir da alga marinha *Rheinheimera aquimaris* QSI02, isolar o dicetopiperazina **28** e avaliar sua atividade IQS (Figura 7).<sup>25</sup> Os autores verificaram que na concentração de 0,2 mg/mL o composto **28** era capaz de inibir a produção de violaceína em 67% quando comparada ao controle com DMSO. Estudos de *docking molecular* mostram que essa dicetopiperazina interage com a CviR com uma energia menor que a apresentada pelo autoindutor cognato, além de preservar importantes ligações de hidrogênio. O composto **28** também foi avaliado frente à cepa PAO1 de *P. aeruginosa* com relação à sua produção de piocianina, atividade de elastase e inibição da formação de biofilme. Em todos ensaios avaliados a inibição dos fenótipos foi bastante próxima ao do controle, azitromicina, com exceção da inibição de biofilme, em que o composto **28** foi melhor sucedido.

### 1.3 Reação de Morita-Baylis-Hillman

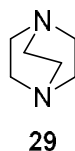
A reação de Morita-Baylis-Hillman (MBH) pode ser definida como o produto de adição entre um alceno ou alcino ativado para adições nucleofílicas e um composto carbonílico catalisada por uma base de Lewis macia, resultando na formação de uma ligação  $\sigma$  C-C e no surgimento de um novo centro estereogênico.<sup>26</sup> Esses adutos polifuncionalizados podem ser empregados como intermediários na obtenção de moléculas mais complexas como compostos biologicamente ativos e na síntese de produtos naturais.<sup>27,28</sup>

O primeiro exemplo desse tipo de reação foi reportado por Morita e colaboradores,<sup>29</sup> em 1968, no qual 12 compostos foram obtidos quando acrilato de metila ou acrilonitrila e diferentes aldeídos foram colocados na presença de triciclohexilfosfina como catalisador (Esquema 2).



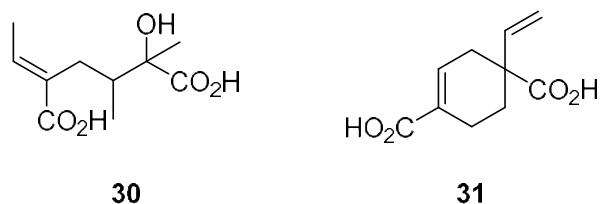
**Esquema 2:** Condições experimentais relatadas por Morita e colaboradores.

Alguns anos depois, em 1972, Baylis e Hillman depositaram uma patente com uma reação bastante similar à que foi reportada por Morita, dessa vez aumentando o escopo de alcenos ativados e utilizando aminas cíclicas terciárias como catalisadores; com destaque especial para o 1,4-diazobicyclo[2.2.2]octano, o DABCO **29**.<sup>30</sup> A substituição da fosfina terciária por uma amina possibilitou melhora no rendimento, tendo em vista que intermediários fosfônio podem isomerizar para ílidio de fósforo e promover a formação de alcenos por meio da reação de Wittig.<sup>26</sup>



**Figura 8:** Estrutura do 1,4-diazobicyclo[2.2.2]octano, o DABCO

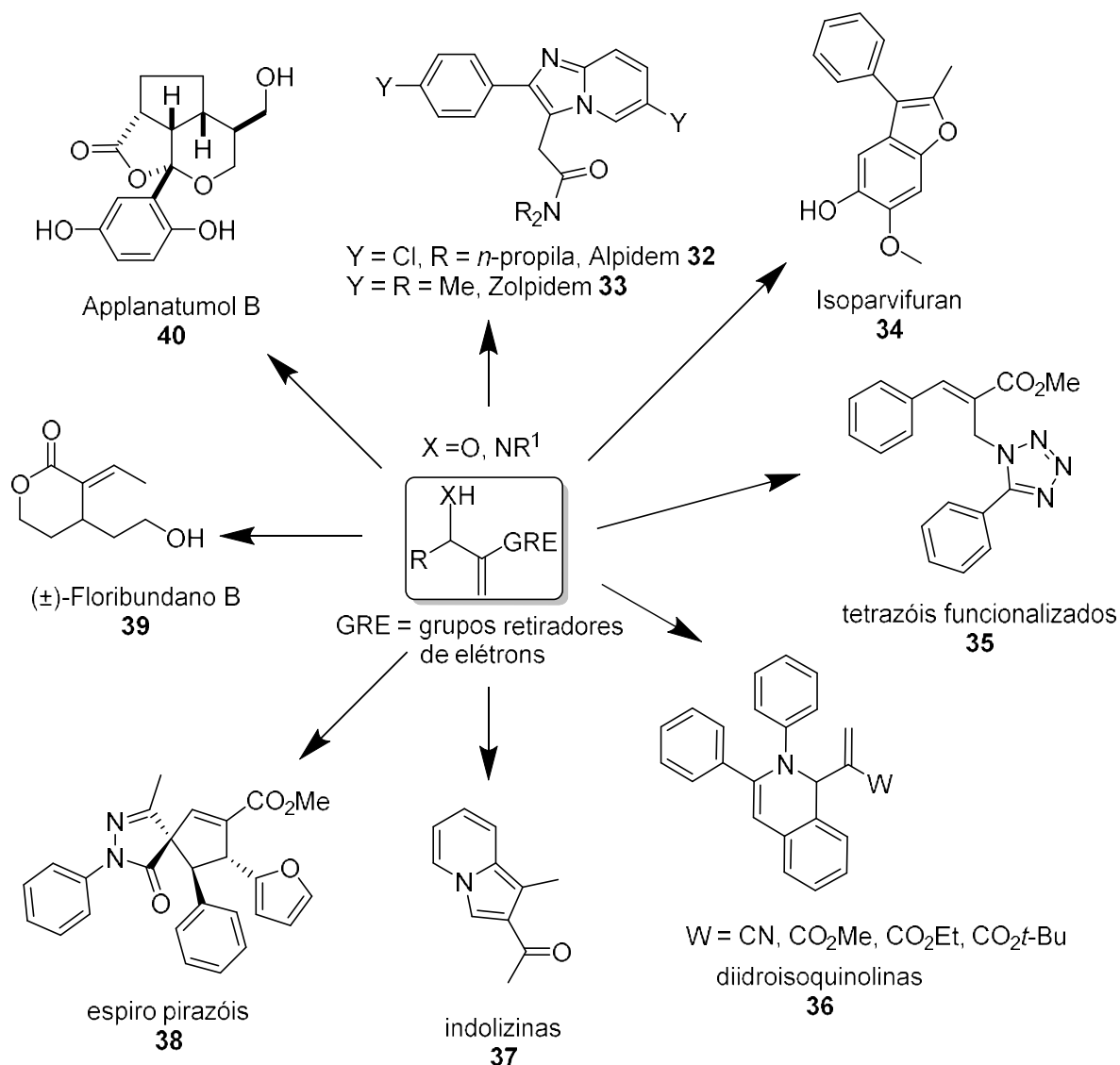
Apesar do grande potencial desta reação em síntese orgânica, como a formação de uma ligação C – C na posição  $\alpha$  de um alceno ativado, pouca importância foi dada à reação de MBH até o início dos anos 1980 quando ela foi empregada na síntese dos ácidos integerrinécico **30** e micanécico **31**, por Drewes e Emslie em 1982, e Hoffman e Rabe em 1983, respectivamente.<sup>31,32</sup> Nos anos seguintes, houve um considerável aumento da utilização desta reação, até que em 1988 surgiu o primeiro artigo de revisão no qual se cunha o nome reação de Baylis-Hillman, no qual futuramente foi acrescido do nome de Morita.<sup>33</sup>



**Figura 9:** Estruturas dos ácidos integerrinécico **30** e micanécico **31**.

A possibilidade de obtenção de uma nova ligação de carbono com a formação de compostos quimio-, regio- e estereosseletivamente que podem ser utilizados para a formação de estruturas mais complexas, sendo originados de materiais de partida simples chamou a atenção de pesquisadores no mundo todo.<sup>34-38</sup> Somadas a essas vantagens estão a possibilidade de trabalhar em grande escala, a economia de átomos, o fato de poder ocorrer em condições de trabalho brandas e, normalmente, não fazer a uso de metais.<sup>26</sup>

A principal desvantagem associada à essa metodologia refere-se ao tempo reacional que pode variar de minutos a semanas, a depender da estrutura do acceptor de Michael e do composto carbonilado.<sup>34-39</sup> Ainda assim, os adutos de Morita-Baylis- Hillman (AMBH) se mostram como uma ferramenta versátil na síntese orgânica uma vez que originam uma molécula com três diferentes grupos funcionais próximos que podem ser utilizados em transformações futuras. Além disso, a possibilidade de variar seus 3 componentes, alceno ou alcino ativado, eletrófilo e catalisador permitem que sejam alcançadas variadas classes de compostos funcionalizados. A Figura 9 contém algumas estruturas que foram obtidas por meio da reação de Morita-Baylis-Hillman como os fármacos Alpidem **32**,<sup>40</sup> Zolpidem **33** e Isopravifuran **34**,<sup>41</sup> compostos heterocíclicos como tetrazóis funcionalizados **35**,<sup>42</sup> diidroisoquinolinas **36**,<sup>43</sup> indolizinas **37**,<sup>44</sup> espiro pirazóis **38**,<sup>45</sup> além da síntese de compostos naturais como o (±)-Floribundano B **39**<sup>46</sup> e o Applanatumol B **40**.<sup>47</sup>



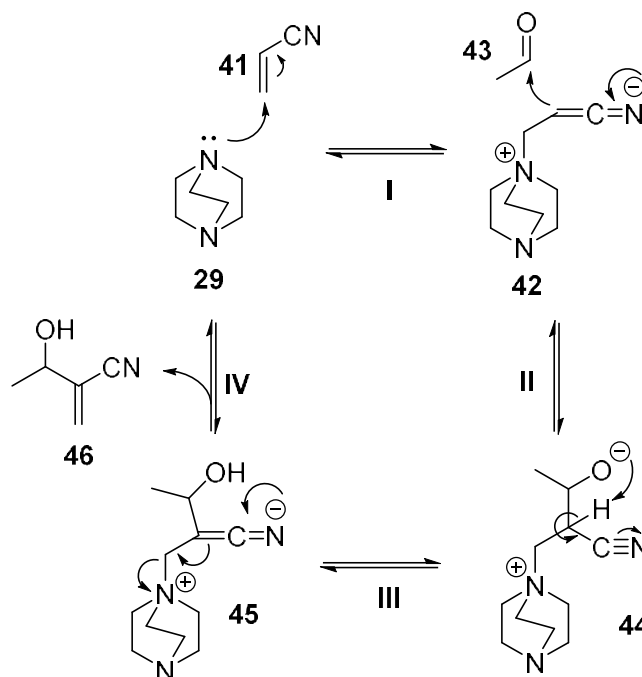
**Figura 9:** Estruturas obtidas empregando a reação de Morita-Baylis-Hillman.

#### 1.4 Mecanismo da reação de MBH

Um campo de estudo dentro das reações de Morita-Baylis-Hillman bastante pesquisado é seu mecanismo. A compreensão de como ocorre precisamente o mecanismo é bastante almejada, principalmente para aqueles que buscam a indução assimétrica, na qual a busca por catalisadores quirais mais eficientes é sempre visada.

A primeira proposta mecanística para reações de MBH foi apresentada por Hoffman e Rabe,<sup>32</sup> em 1983, quando apresentaram a síntese do ácido micanécico **30**. Essa proposta foi melhor desenvolvida por Isaacs e Hill que utilizaram estudos cinéticos para demonstrar que essa reação seria de primeira ordem com relação aos três componentes avaliados: acetaldeído **41**, acrilonitrila **43** e DABCO **29**.<sup>48</sup> A primeira etapa desse mecanismo, **I**, é a adição nucleofílica

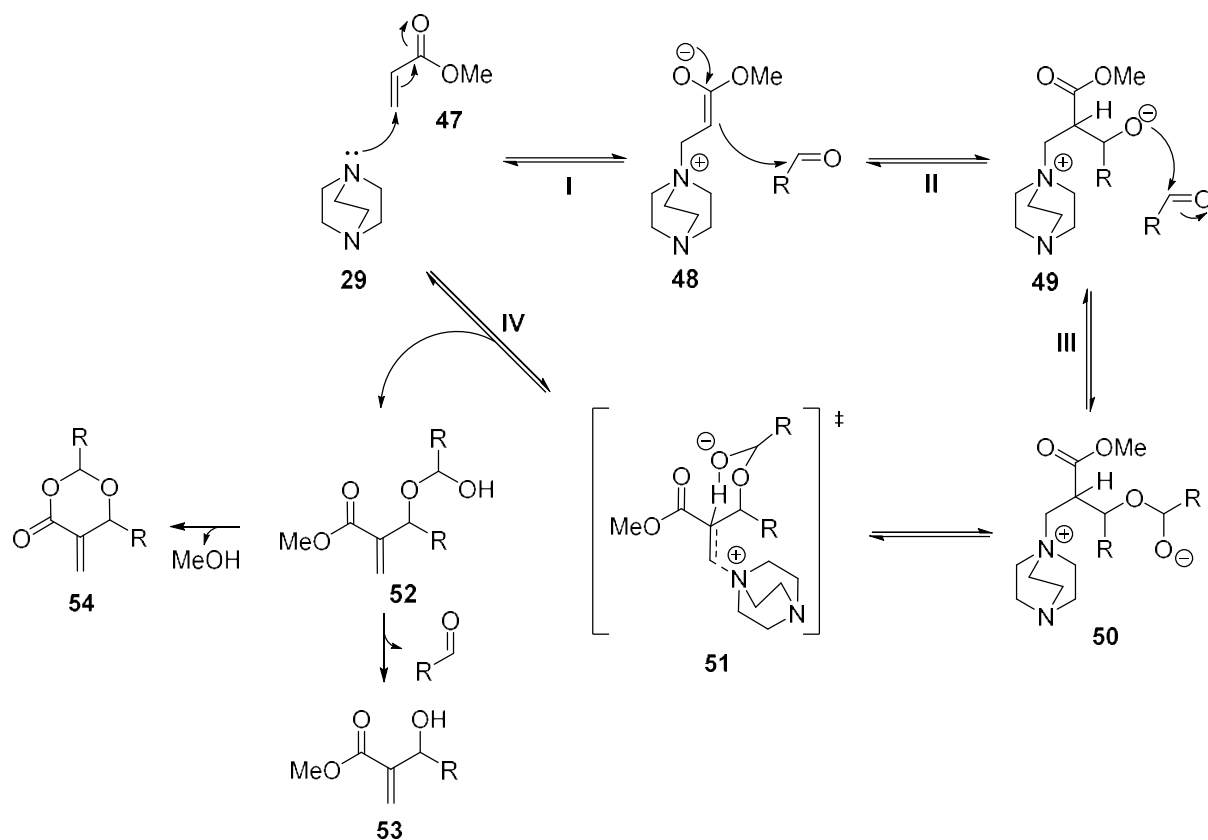
conjugada da amina terciária, nesse caso, o DABCO, ao alceno ativado, acrilonitrila **41**, levando à formação do intermediário zwitteriônico **42**. Em **II**, ocorre a formação da espécie **44** por meio da adição aldólica de **42** ao acetaldeído **43**, etapa lenta segundo os autores. A espécie **45** seria formada após uma transferência interna de prótons sofrida por **44**, etapa rápida, **III**. Por fim, etapa **IV**, a regeneração do catalisador conduz à formação do AMBH **46**, como mostra o Esquema 3.



**Esquema 3:** Mecanismo da reação de MBH proposto por Isaacs e Hill.

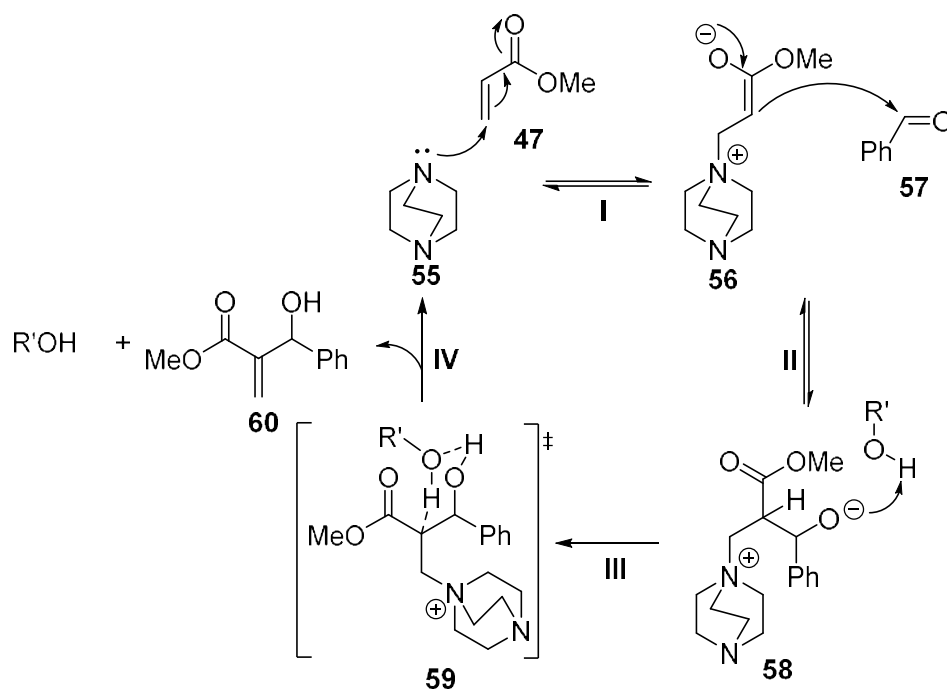
McQuade e colaboradores reavaliaram o mecanismo das reações de MBH empregando estudos cinéticos em diferentes solventes apróticos, em que foi possível estabelecer uma relação de segunda ordem em relação ao aldeído e de primeira ordem com relação ao alceno ativado e ao catalisador (Esquema 4).<sup>49</sup> Nessa proposta as primeiras duas etapas, adição nucleofílica conjugada e adição aldólica, etapas **I** e **II** respectivamente, ocorrem exatamente como o proposto por Isaacs e Hill. A diferença está na presença de uma segunda molécula de aldeído que sofre o ataque nucleofílico da espécie **49**, levando à formação do hemiacetal **50**, etapa **III**. Este, por sua vez, pode adotar um estado de transição de seis membros, mais estável que o sistema de quatro membros proposto por Isaacs e Hill, e remover o hidrogênio de posição  $\alpha$  do acrilato, sendo essa, a etapa lenta da reação. A eliminação da amina terciária, etapa **IV**, conduz a regeneração do catalisador e a formação do composto **52**, que após a eliminação de uma molécula de aldeído leva ao AMBH **53**. Para a elaboração deste mecanismo, os autores consideraram além dos estudos cinéticos dos isótopos, evidências experimentais da formação

de subprodutos dioxanona, **54**, que surgiriam pela transesterificação dos intermediários **50** ou **52**.



**Esquema 4:** Proposta mecanística da reação de MBH de McQuade e colaboradores.

O mecanismo das reações de MBH envolvendo solventes próticos foi abordado por Aggarwal e colaboradores.<sup>50</sup> Nessa proposta, que também fez uso de ferramentas cinéticas, os autores abordaram que, na presença de um doador de prótons, o mecanismo ocorre de maneira concertada, com a fonte de prótons participando de um estado de transição de 6 membros (Esquema 5). Assim como na proposta de McQuade e colaboradores, as etapas **I** e **II** ocorrem por meio da adição nucleofílica da amina terciária ao alceno ativado, seguida da adição aldólica ao aldeído. A etapa **III**, etapa lenta da reação, consiste na participação do intermediário zwitteriônico **58** e de uma fonte doadora de prótons, que tanto pode ser o solvente, quanto a subunidade hidroxílica presente no próprio AMBH. Essas duas espécies interagem de forma que ocorra a desprotonação na posição  $\alpha$  do intermediário **59** concomitantemente à abstração do próton da fonte hidroxílica; este último funcionando como um transportador de prótons. A eliminação da amina terciária, etapa **IV**, conduz à formação do aduto **60** e reestabelece o doador de prótons.

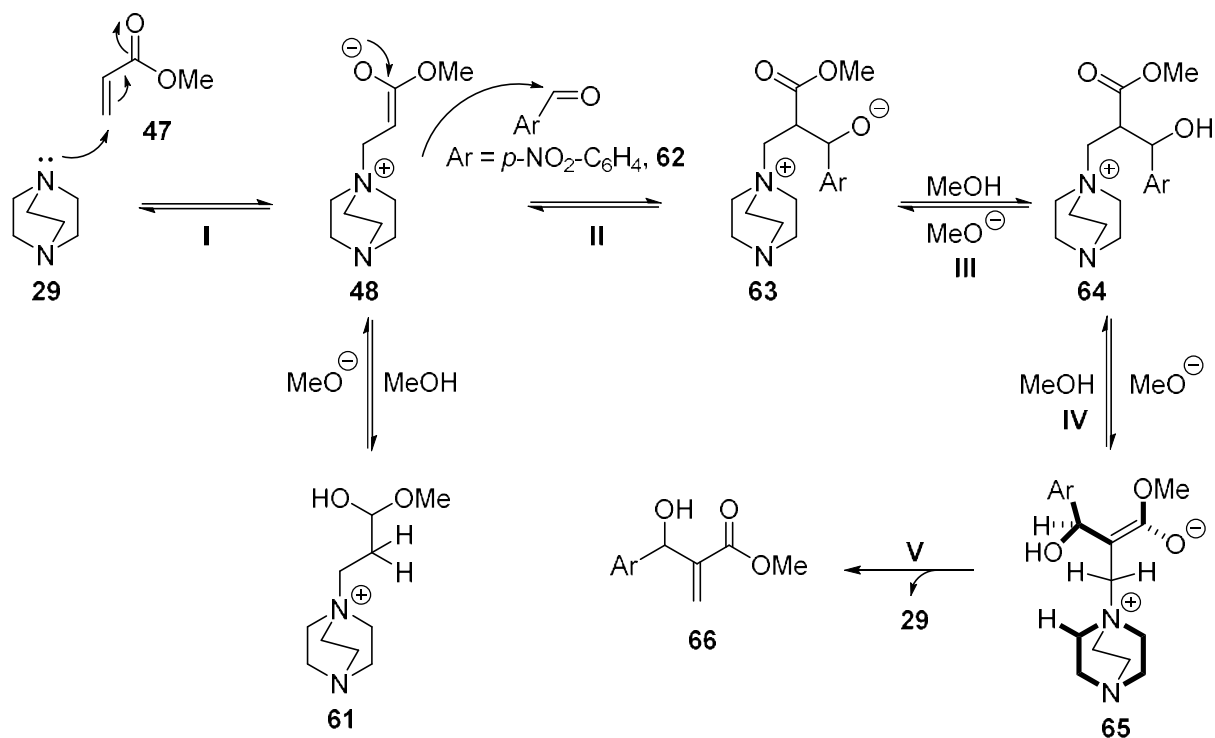


**Esquema 5:** Proposta mecanística de Aggarwal e colaboradores.

Em um estudo posterior, Aggarwal e colaboradores<sup>51</sup> utilizaram ferramentas computacionais para reafirmar a sua proposta mecanística, na qual todas as espécies envolvidas: aldeído, alceno ativado, álcool e amina são todos de primeira ordem. Esse mesmo trabalho também confirma a proposta de McQuade, que envolve um segundo equivalente de aldeído quando a reação de MBH ocorre em solventes apróticos. Os autores também abordam que após a reação avançar em cerca de 20% com relação à formação do produto, a autocatálise, ou seja, a porção hidroxílica do AMBH funcionando como doador de prótons no mecanismo concertado de seis membros, torna-se bastante evidente, mesmo quando a reação ocorre em condições apróticas.

Essa abordagem envolvendo o transporte de prótons, defendida por Aggarwal e colaboradores, foi posteriormente refutada por Plata e Singleton que realizaram um estudo de caso envolvendo acrilato de metila **47** e *p*-nitrobenzaldeído **62** na presença de metanol como reação modelo de MBH, utilizando tanto dados experimentais, quanto estudos teóricos.<sup>52</sup> Através de medidas cinéticas e termodinâmicas, observação e obtenção dos intermediários reacionais, incorporação isotópica do solvente e efeitos isotópicos cinéticos, os autores propuseram um novo mecanismo e um perfil completo de energia livre reacional, considerando todos os intermediários e estados de transição. Assim como reportado para as propostas mecanísticas anteriores, as etapas **I** e **II** seriam respectivamente, a adição nucleofílica da amina terciária ao carbono  $\beta$  do alceno ativado e a adição do tipo aldol ao aldeído, neste caso, o *p*-

nitrobenzaldeído, originando a molécula **63**. Ressalta-se aqui que o intermediário zwitteriônico **48** pode ser protonado por metanol e formar a espécie **61** de forma reversível. A etapa **III** consiste na protonação do alcóxido **63**, também promovida por metanol, levando à formação da espécie **64** por meio de um mecanismo ácido-base. A desprotonação de **64** na posição  $\alpha$ , conduz ao surgimento de **65**, que após a eliminação do catalisador forma o AMBH **66** (Esquema 6). Segundo os autores, essa sequência de protonação do alcóxido **63**, seguida de desprotonação da espécie **64** promovida pelo metanol na forma de um simples sequência ácido-base retrata de forma mais fidedigna o mecanismo, com base nos estudos de energia livre, como ocorre a reação de MBH para esse caso, em face ao mecanismo com um estado de transição concertado de seis membros proposto por Aggarwal.



**Esquema 6:** Proposta mecanística de Plata e Singleton.

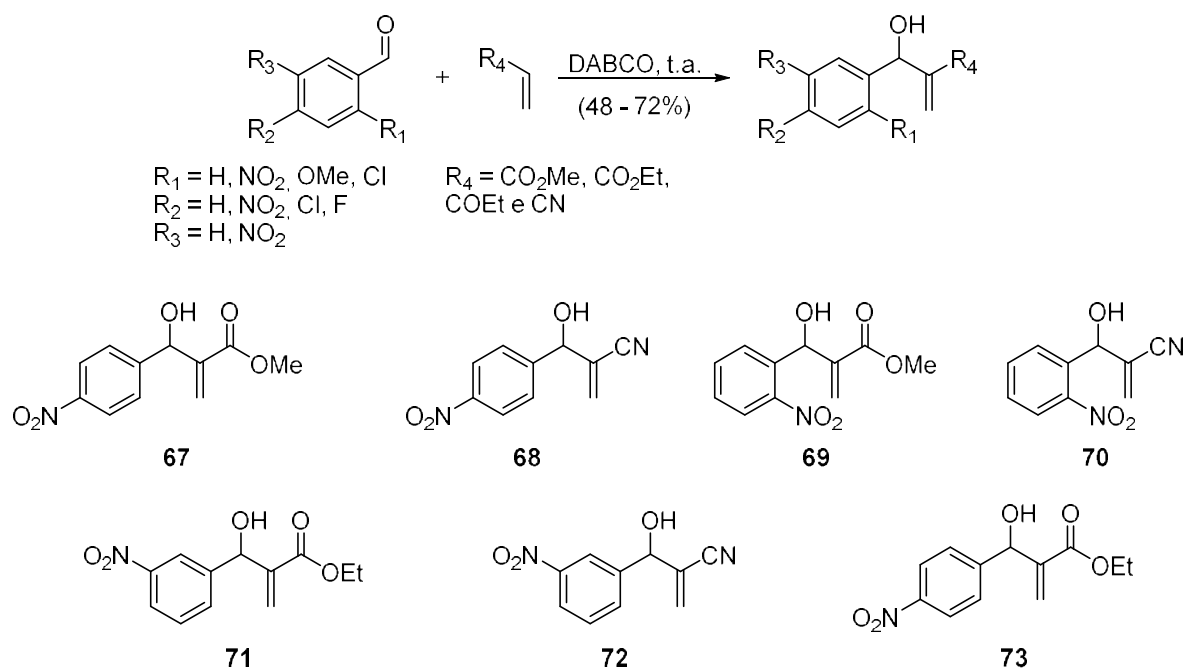
Mesmo considerando o grande avanço nas últimas décadas, ainda não existe um mecanismo definitivo que descreva as reações de Morita-Baylis-Hillman, e sua busca continua a ser almejada por vários grupos de pesquisa. Ainda assim, cabe destacar o grande avanço que essas contribuições fizeram tanto no campo teórico quanto experimental, possibilitando melhor controle dos fatores que influenciam essa reação e expandindo assim, a sua aplicabilidade.



## 1.5 Aplicações Biológicas

Dadas as características da reação de MBH, sua aplicação se tornou bastante difundida e seus adutos se tornaram bastante explorados como intermediários reacionais e etapas chaves de síntese, várias dessas, com potencial biológico. Os próprios AMBH's e suas variações com diferentes alcenos e eletrófilos vêm sendo avaliados na busca por novos compostos ativos e prováveis fármacos, e sua busca se tornou o foco de vários grupos de pesquisa.<sup>38</sup>

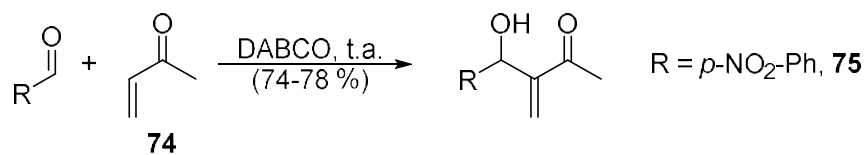
Singhi e Bhat avaliaram a capacidade antimicrobiana de 20 AMBH's obtidos diretamente da adição de diferentes benzaldeídos e derivados vinílicos sob a catálise de DABCO (Esquema 7).<sup>53</sup> Dentre todos os compostos testados, aqueles derivados de benzaldeído 2, 3 e 4-NO<sub>2</sub> substituídos, **67** – **72** foram os que apresentaram os melhores resultados frente às cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium diphtheriae* com valores de MIC variando de 14-18 µg·mL<sup>-1</sup>, além disso, **72** e **73** apresentaram também boa atividade antifúngica frente à *Candida albicans*, MIC 10-11 µg·mL<sup>-1</sup>.



**Esquema 7:** Estrutura dos AMBH's testados por Singhi e Bhat.

A capacidade bactericida de adutos obtidos diretamente da adição de diferentes aldeídos e metil-vinil-cetona **74** foi alvo de estudo de Ullah e colaboradores (Esquema 8).<sup>54</sup> Os AMBH's gerados foram testados frente às cepas das bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* e Gram-positiva *S. aureus*. O melhor resultado foi obtido para o

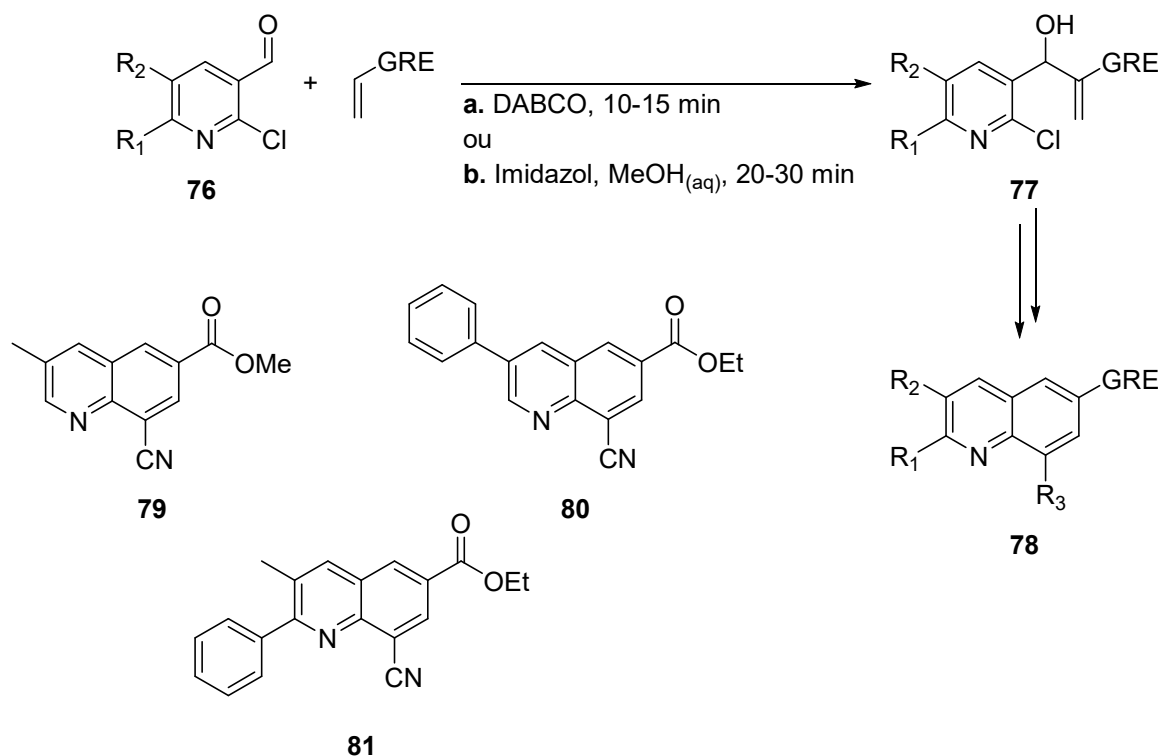
composto **75** que apresentou capacidade inibitória duas vezes maior que o fármaco de referência utilizada no estudo, doxiciclina.



$\text{R} = \text{H, Ph, } p\text{-Me-Ph,}$   
 $p\text{-NO}_2\text{-Ph, } p\text{-OMe-Ph}$

**Esquema 8:** AMBH's sintetizados por Ullah e colaboradores com atividade bactericida.

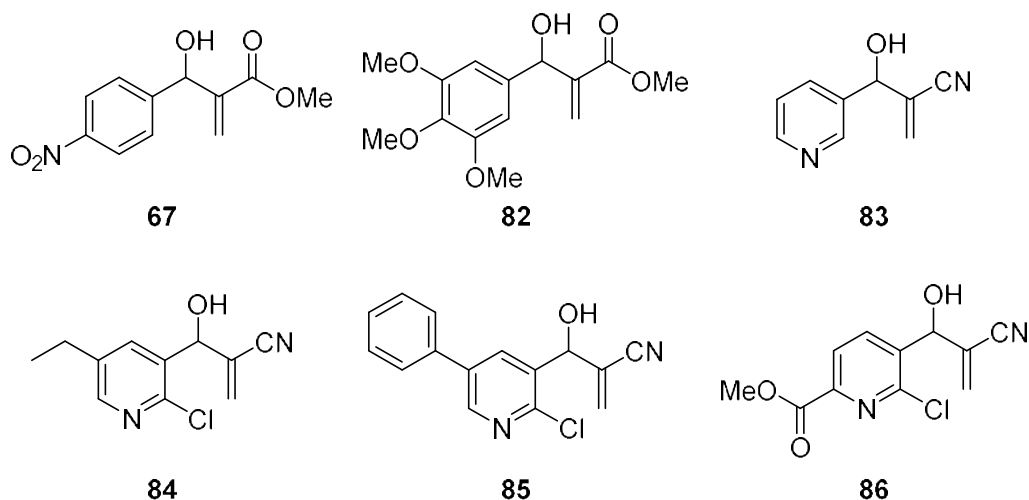
AMBH's também foram empregados na síntese de quinolinas e tiveram seu potencial antibacteriano avaliado por Rao e colaboradores (Esquema 9).<sup>55</sup> Os diferentes compostos foram obtidos empregando-se 2-cloro-3-piridinilaldeídos, **76**, com diferentes alcenos ativados, originando os AMBH's **77**. O prosseguimento com a rota sintética levou à formação das quinolinas **78**. Os 15 compostos obtidos foram testados frente às cepas bacterianas Gram-positivas *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus* e *S. aureus* e Gram-negativas *P.aeruginosa*, *Klebsiella aerogenes* e *C. violaceum*, empregando penicilina e estreptomicina como drogas padrão. Os compostos **79** – **81**, apresentando o grupo ciano na posição C-8, se mostraram bastante promissores tanto nas cepas Gram-positivas, quanto nas Gram-negativas, com valores de MIC variando de 6,25 – 12,5 µg/mL. O composto **80** se mostrou particularmente efetivo contra *C. violaceum*, com valor de inibição correspondendo à metade do observado para a penicilina. Esses compostos também foram avaliados quanto a sua capacidade antifúngica frente a cepas de *Aspergillus niger*, *Chrysosporium tropicum* e *Rhizopus oryzae* apresentando atividade modesta com valores de zona de inibição de 9 – 11 mm na concentração de 100 µg/mL.



**Esquema 9:** Quinolinas sintetizadas por Rao e colaboradores com atividade antibacteriana.

A atividade antimalárica de AMBH's também foi investigada por Bhat e colaboradores em estudo anterior,<sup>56</sup> no qual dos 16 compostos testados, três apresentaram acentuada inibição do crescimento parasitário total *in vitro* do protozoário *Plasmodium falciparum*; **67**, **82** e **83** (Figura 10). Esse resultado foi expandido para pesquisa *in vivo*, nos quais os compostos foram administrados em ratos infectados com *Plasmodium berghei* e constatando-se que **67** e **83** foram os melhores candidatos com uma dosagem de 80 mg/kg.

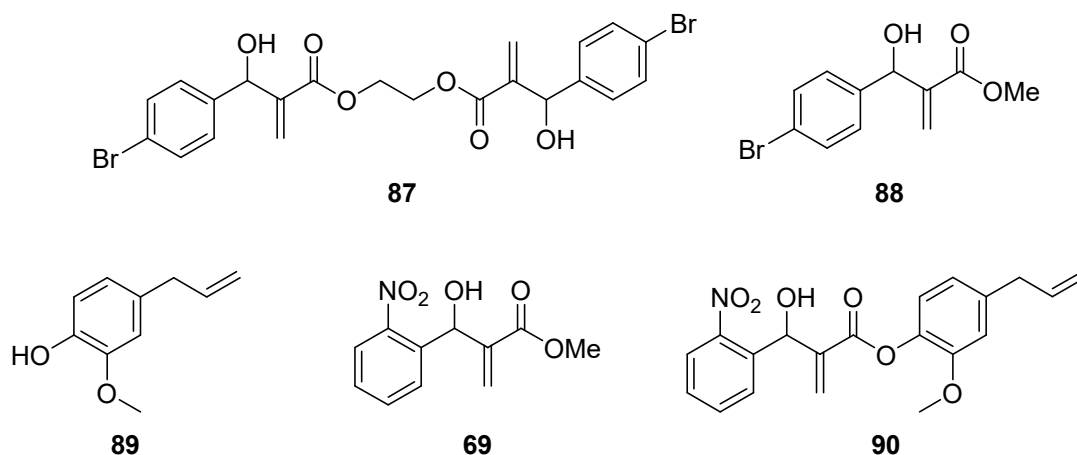
Rao e colaboradores também avaliaram a atividade antimalárica de AMBH's derivados de 2-cloronicotinaldeídos.<sup>57</sup> Todos os seis compostos testados apresentaram atividade antimalárica, *in vitro*, frente ao *Plasmodium falciparum* tanto na cepa resistente, quanto na cepa sensível à cloroquina. Os compostos **84-86** foram os que apresentaram os melhores resultados em ambas as cepas, sendo **85** o composto que apresentou os menores valores de inibição para a cepa resistente. Os autores apontam que a presença do grupo ciano, bem como a presença do grupo fenila na posição 5 do anel piridínico, aumentam o caráter antimalárico dos AMBH's.



**Figura 10:** AMBH's com atividade antimalárica.

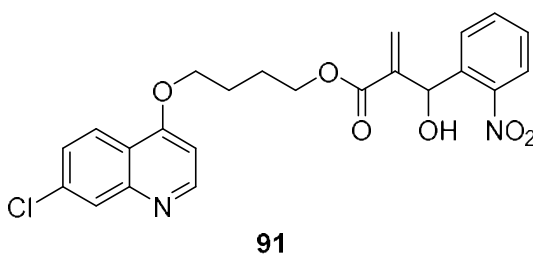
O potencial leishmanicida dos AMBH's foi abordado por Vasconcellos e colaboradores em uma série de compostos homodiméricos obtidos de diacrilatos frente à *Leishmania donovani* (Figura 11).<sup>58</sup> Dentre as moléculas testadas, **87** foi a que apresentou os melhores resultados, sendo cerca de 400 vezes mais potente que seu monômero **88** e 1,24 vezes mais potente que o composto de referência de segunda linha para o tratamento de leishmaniose, a anfotericina B. Além disso, o composto **87** não apresentou toxicidade contra glóbulos vermelhos, o que contribui para que se torne um candidato viável à fármaco.

Vasconcellos e seu grupo de pesquisa também empregaram a reação de MBH na obtenção de adutos derivados de óleos essenciais, como o eugenol **89**, para a obtenção de estruturas que tivessem ação leishmanicida contra *Leishmania amazonensis*, a maior causadora do tipo tegumentar da doença no Brasil (Figura 11).<sup>59</sup> Nesse trabalho, os pesquisadores consideraram o conhecimento prévio das atividades leishmanicidas do eugenol **89** e do AMBH **69** para desenvolver uma molécula híbrida, aprimorando a atividade inibitória contra os promastigotos de *L. amazonensis*. O híbrido **90** apresentou capacidade inibitória superior a de seus predecessores **69** e **89**, entretanto, quando comparado frente à anfotericina B, se mostrou cerca de 9 vezes menos efetivo. Ainda assim, devido a sua baixa toxicidade contra glóbulos vermelhos, o híbrido **90** se mostra interessante para estudos futuros.



**Figura 11:** Compostos Leishmanicidas estudados por Vasconcellos e colaboradores.

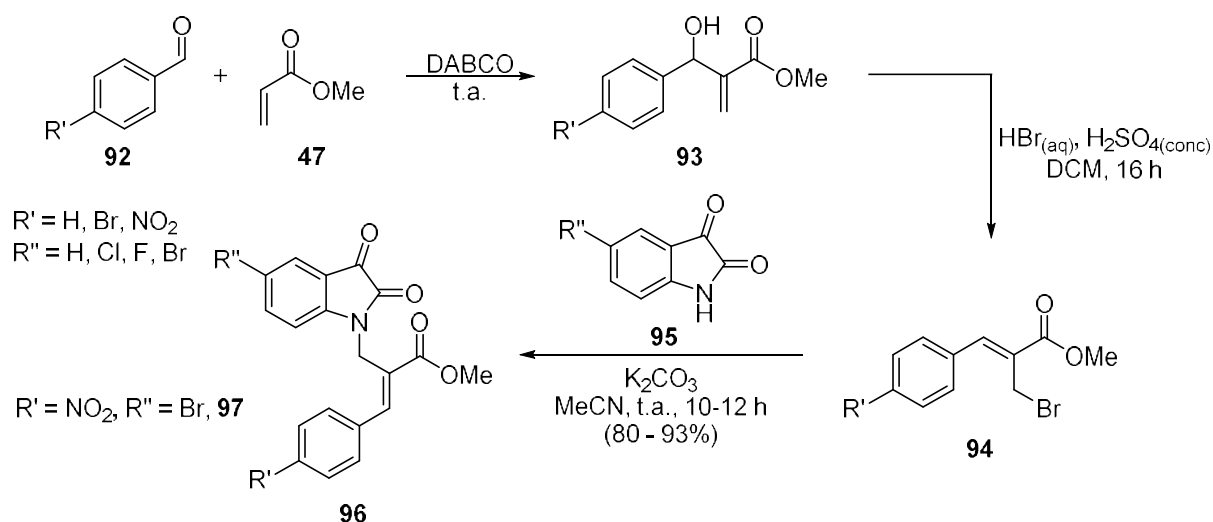
Lima-Júnior e colaboradores avaliaram o potencial anticâncer de AMBH's hibridizados com 7-cloroquinolinas contra linhagens de câncer de mama, colorretal, pulmonar e leucemia promielocítica.<sup>60</sup> Dentre os compostos testados *in vitro*, **91** foi o que apresentou os melhores resultados frente às linhagens celulares estudadas, além disso foi o que apresentou a menor citotoxicidade contra as células humanas saudáveis, sendo cerca de 3 vezes mais seletivo que o fármaco quimioterápica de referência, doxorubicina, no ensaio contra a linhagem de câncer de mama (Figura 12).



**Figura 12:** Estrutura do AMBH anticâncer sintetizado por Lima-Júnior e seu grupo de pesquisa.

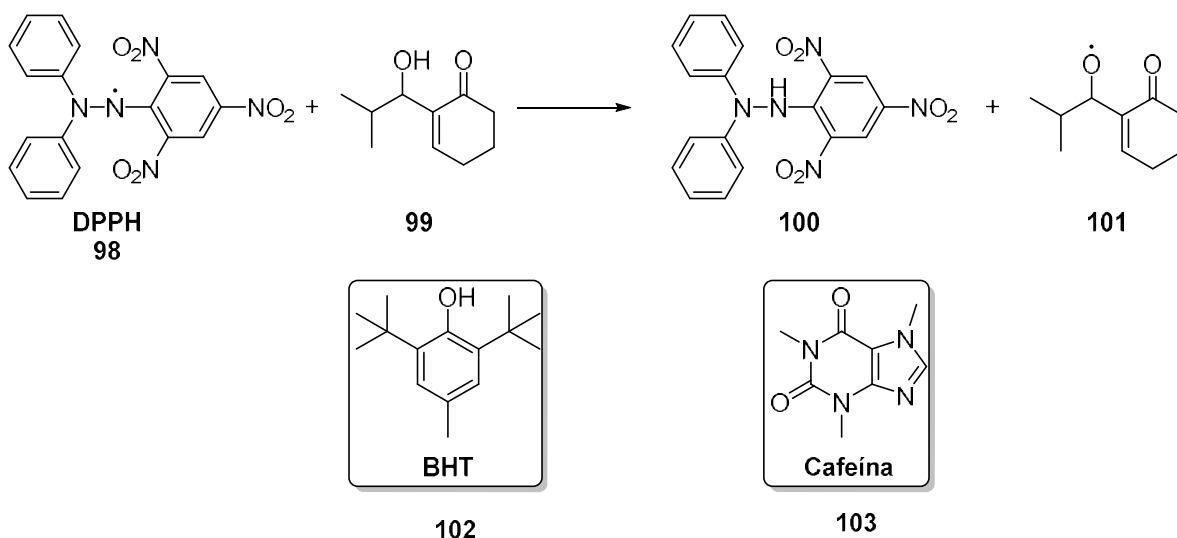
Rao e colaboradores sintetizaram uma série de híbridos entre AMBH's e isatinas em quatro etapas reacionais e testaram sua capacidade contra linhagens de câncer de cólon e linfoma humanos.<sup>61</sup> A primeira etapa reacional consistiu na formação do AMBH **93** através da adição entre diferentes aldeídos **92** e o acrilato de metila **47** na presença de DABCO (Esquema 10). Em seguida, foi realizada a reação de bromação de aduto **93**, levando à formação de **94**, que após a reação com diferentes isatinas **95** formaram os híbridos **96**. Dos doze híbridos sintetizados, o composto **97** foi o que apresentou o melhor resultado de citotoxicidade específica para as linhagens de câncer analisadas. Além disso, os compostos sintetizados foram avaliados frente à cepa *Mycobacterium tuberculosis* e o composto **97** apresentou MIC = 1,56 µg·mL<sup>-1</sup>,

valor menor que o das dos fármacos utilizados para o tratamento de tuberculose Etambutol (7,64  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e Pirazinamida (50,77  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).



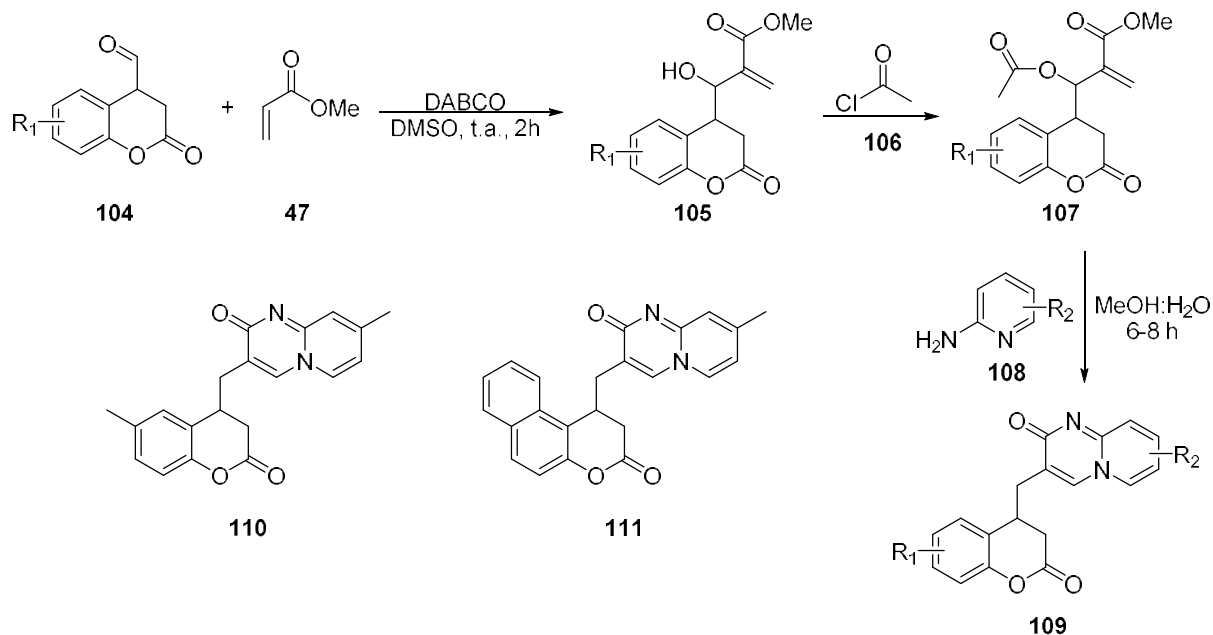
**Esquema 10:** Rota sintética desenvolvida por Rao e colaboradores na obtenção dos híbridos de AMBH e isatinas.

O potencial antioxidante dos AMBH's e seus derivados, foi explorado por Elleuch e colaboradores.<sup>62</sup> Nesse estudo, foram utilizados os álcoois obtidos diretamente da reação de MBH, seus acetatos, fosfonatos e hidrazona fosfonatos que foram colocados na presença de 2,2-difenil-1-picrazilhidrazila (DPPH) **98**, fonte de radicais livres, para a determinação da atividade antioxidante. Dos 36 compostos avaliados, o álcool **99** foi que apresentou o resultado mais promissor com valor de  $\text{IC}_{50} = 2,38 \pm 0,8 \mu\text{M}$ , concentração para a neutralização de 50% dos radicais de DPPH **98**, resultado superior aos apresentados pelos padrões empregados no estudo, BHT **102** e cafeína **103** ( $4,535 \pm 0,04$  e  $4,725 \pm 0,035 \mu\text{M}$ ). Segundo os autores, a reação entre o DPPH e o álcool **99** ocorreu conforme descrito no esquema 11. A importância da hidroxila para a atividade antioxidante pode ser observada quando se compara o álcool com seu equivalente acetilado, cujo valor de neutralização não pôde ser determinado. Além disso, o potencial demonstrado por **99** quando comparado ao BHT **102**, utilizado como conservante industrial, o torna um promissor candidato para o uso como antioxidante em diversos setores como alimentício, cosmético e farmacêutico.



**Esquema 11:** Reação entre o DPPH e o AMBH **99**.

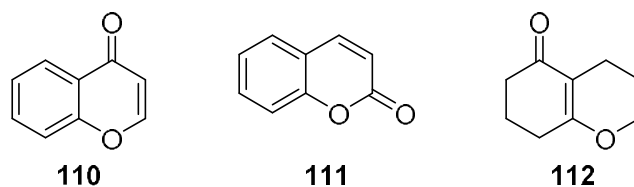
Shastri e colaboradores utilizaram AMBH's como intermediários na obtenção de híbridos de cumarina e piridopirimidinonas e avaliaram sua atividade anti-inflamatória (Esquema 12).<sup>63</sup> Os adutos **105** foram obtidos por meio da condensação do acrilato de metila **47** com diferentes 4-formilcumarinas **104**. Os AMBH's formados **105** foram convertidos em seus acetatos **107** por meio da reação com cloreto de acetila **106** que, em seguida, foram submetidos à ciclocondensação com 2-aminopiridinas **108** para a formação dos híbridos de cumarina e piridopirimidinonas **109**. Os compostos formados foram testados frente às metaloproteínases de matriz, enzimas que digerem proteínas de matriz extracelular envolvidas em processos de inflamação,<sup>64</sup> MMP-2 e MMP-9, e dentre essas, **110** (MMP-2 = 89% e MMP-9 = 88%) e **111** (MMP-2 = 90% e MMP-9 = 88%) apresentaram valores de capacidade anti-inflamatória mais próximos que o do fármaco de referência, a tetraciclina (95 e 90% para MMP-2 e MMP-9, respectivamente). Segundo os autores, a metila presente na porção piridopirimidinonas, constante em **110** e **111**, aumenta a capacidade inibitória, principalmente frente à MMP-9, e são estruturas promissoras na busca por novos anti-inflamatórios.



**Esquema 12:** Híbridos de hidrocumarina e piridopirimidinonas sintetizados por Shastri e colaboradores.

## 1.6 Cromenonas

Cromenonas são compostos que contém um anel aromático fundido a um anel pirona em sua estrutura, e possuem entre seus principais representantes a cromona **110** e a cumarina **111**, ambos ocorrendo naturalmente em metabólitos secundários extraídos de plantas.<sup>65</sup> Também são consideradas cromenonas estruturas mais simples que não apresentam aromaticidade como a hidrocromenona **112**, normalmente encontrada na literatura científica como intermediários de síntese (Figura 13).



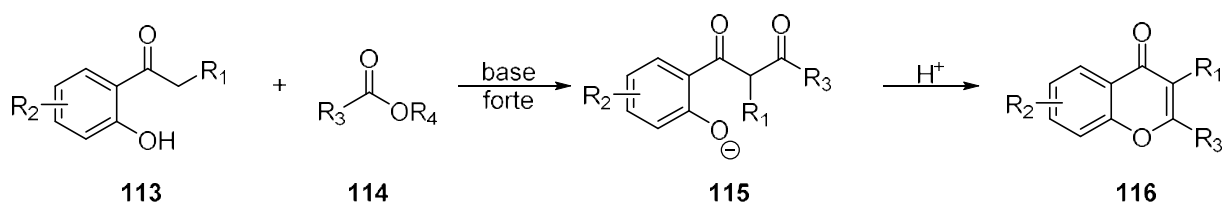
**Figura 13:** Estruturas da cromona **110**, da cumarina **111** e hidrocromenona **112**.

Por serem estruturas frequentemente encontradas em produtos naturais, como flavonoides, e por apresentarem diversas propriedades farmacológicas empregadas pela medicina popular, as cromenonas, em especial, as cromonas e cumarinas, se tornaram estruturas



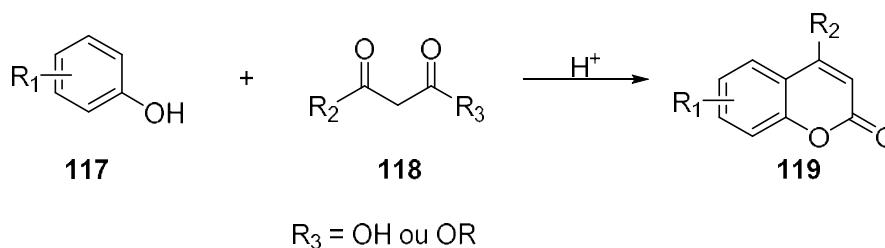
bastante pesquisadas pela química medicinal, sendo comum encontrá-las em sínteses e em estudos de modificação estrutural.

Diferentes metodologias podem ser encontradas na literatura para a síntese de cromenonas,<sup>66,67</sup> dentre essas, alguns procedimentos podem ser considerados clássicos por serem mais constantemente aplicados. É o caso da condensação de Claisen utilizada na formação de cromonas (Esquema 13).<sup>68</sup> Nessa metodologia, uma *orto*-hidroxiarilcetona **113**, na presença de uma base forte, reage com o éster **114**, formando o intermediário 1,2-dioxofenóxi **115**. O tratamento deste em meio ácido, conduz à ciclização e formação da cromona **116**.



**Esquema 13:** Formação de cromonas por meio da condensação de Claisen.

De forma semelhante, a condensação de Pechmann, pode ser considerada como a mais importante metodologia para a síntese de cumarinas.<sup>69</sup> Essa reação ocorre por meio da adição do fenol **117** ao composto 1,3-dicarbonílico **118**, em meio ácido, conduzindo à formação da cumarina **119**.

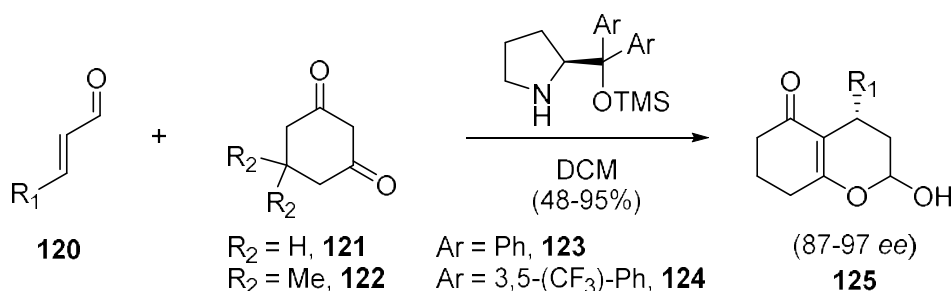


**Esquema 14:** Formação de cumarinas por meio da condensação de Pechmann.

Com relação às hidrocromenonas, não existe uma rota tradicional para a obtenção de seu núcleo, tendo em vista que a posição da carbonila, do éter e da ligação dupla podem se dispor de diferentes maneiras. Dessa forma, diferentes metodologias são aplicadas na obtenção de diferentes hidrocromenonas. No que tange a síntese das hidrocromen-5-onas e hidrocromen-4-onas observa-se a utilização de compostos 1,3 dicarbonílicos, tanto em condições ácidas, quanto em condições básicas, para a obtenção do núcleo cromenona

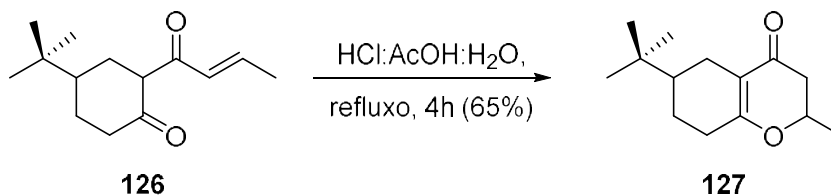
Rueping e colaboradores utilizaram diversos aldeídos  $\alpha,\beta$ -insaturados **120** na presença de di-hidro-resorcinol **121** ou dimedona **122**, catalisada por diarilprolinol-éter, para obter

diferentes hidrocromen-5-onas **125** com bons resultados e de forma enantioselectiva (Esquema 15).<sup>70</sup>



**Esquema 15:** Hidrocromen-5-onas sintetizadas por Rueping e colaboradores.

Gelin e Dolmazon realizaram a síntese do núcleo hidrocromen-4-ona enquanto estudavam a formação de diferentes derivados de 1-oxa-decalonas (Esquema 16).<sup>71</sup> O composto **126** foi colocado sob refluxo, em condição ácida, numa mistura 1:1:1 de HCl concentrado:AcOH:H<sub>2</sub>O, originando a cromenona **127** com bom rendimento.



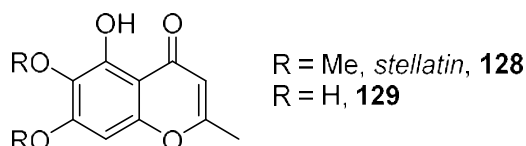
**Esquema 16:** Hidrocromen-4-ona sintetizada por Gelin e Dolmazon.

Diferentemente de cromonas e cumarinas, a literatura com relação às hidrocromenonas e suas variações é escassa, possivelmente, em virtude da facilidade com a qual esses núcleos possam sofrer aromatização. E dada a importância das cromenonas, do ponto de vista biológico, o estudo de seus derivados mais simples se faz necessário, ampliando-se a compreensão sobre essa privilegiada classe de compostos.

### 1.7 Aplicações Biológicas das Cromenonas

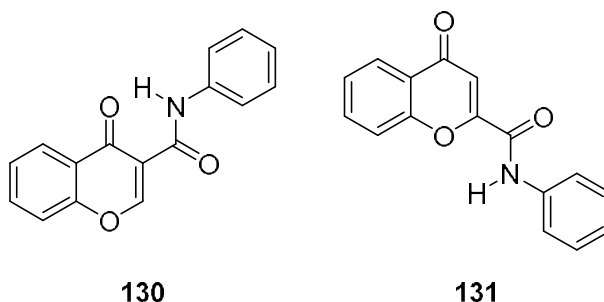
Jachak e colaboradores isolaram e modificaram a estrutura da cromenona *stellatin* **128**, uma conhecida inibidora da ciclooxigenase (COX), responsável por processos inflamatórios, a partir da planta *Dysophylla stellata*s e avaliaram a capacidade inibitória desses compostos frente à COX-1 e COX-2.<sup>72</sup> Dentre as estruturas avaliadas, sete apresentaram maior atividade inibitória frente à COX-2 que a *stellatin*; além disso, os autores concluíram por meio de avaliação da relação estrutura-atividade (*SAR*) que a ligação dupla entre C2 – C3, a carbonila

em C4 e a hidroxila em C5 eram fundamentais para a atividade inibitória (Figura 14). O composto **129** apresentou grande capacidade inibitória comparável ao do fármaco anti-inflamatória não esteroidal (AINE) indometacina, outrossim também foi capaz de exibir uma considerável capacidade antioxidativa, o que o torna um potencial candidato à fármaco anti-inflamatório.



**Figura 14:** Estruturas dos compostos anti-inflamatórios **128** e **129**.

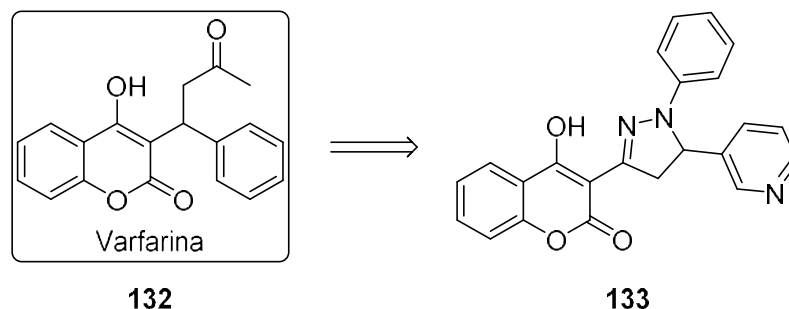
Parkinson e Alzheimer são doenças neurodegenerativas que causam diminuição da qualidade de vida dos pacientes. Inibidores de monoamina oxidase (MAO), enzima envolvida na degradação de aminas, vêm se tornando uma alternativa para o desenvolvimento de fármacos contra esse tipo de doença. Nesse contexto, Borges e colaboradores estudaram a utilização de cromonas 2 e 3-substituídas com carboxamidas, respectivamente **130** e **131**, como inibidores da MAO - tipos A e B (Figura 15).<sup>73,74</sup> A avaliação biológica evidenciou que as cromonas 2-substituídas eram inativas, enquanto as 3-substituídas eram potentes inibidores. O emprego de ferramentas experimentais em conjunto com computacionais demonstrou que a posição do substituinte no anel benzopirano era crucial para a ligação de hidrogênio intramolecular entre a cromona e o próton amídico, pois aumentava a estabilização dos ligantes com um alto nível de co-planaridade. Somado a isso, verificou-se nos ensaios biológicos a especificidade dessas moléculas como inibidoras da MAO-B com valores de IC<sub>50</sub> na faixa micromolar.



**Figura 15:** Estruturas dos inibidores da MAO-B **130** e **131**.

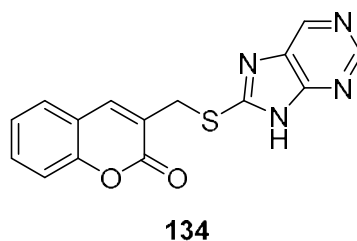
Abdelhafez e colaboradores avaliaram a capacidade anticoagulante de diferentes 4-hidroxicumarinas-3-substituídas, análogos da varfarina **132**, em ensaios *in vitro* e *in vivo* (Figura 16).<sup>75</sup> Apesar de todos os candidatos apresentarem baixa atividade anticoagulante quando comparados à varfarina, 5,2 - 19,4%, nos testes *in vitro*; o mesmo não aconteceu para

os testes *in vivo*, nos quais se verificou a potência dos derivados 3-pirazolil-4-hidroxicumarínicos, apresentando tempos de coagulação equiparáveis ao de **132**. O melhor resultado foi o demonstrado pelo composto **133**, que além de apresentar maior tempo de coagulação que o da varfarina, se mostrou menos letal com valor de LD<sub>50</sub> mais de duas vezes superior.



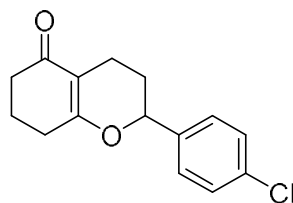
**Figura 16:** Estruturas das 4-hidroxicumarinas com capacidade anticoagulante.

Neyts e colaboradores sintetizaram e avaliaram uma série de compostos heterobíclicos conjugados frente ao vírus da hepatite C (Figura 17).<sup>76</sup> Dentre os compostos avaliados, percebeu-se que os melhores efeitos inibitórios eram dos derivados cumarínicos, destaque especial é dado à estrutura **134**, que demonstrou potente atividade contra o vírus da hepatite C, EC<sub>50</sub> = 2 μM, além de apresentar baixa toxicidade às células hospedeiras, colocando essa molécula em destaque para avaliações futuras.



**Figura 17:** Estrutura da cumarina-purina **134** com atividade anti-hepatite C.

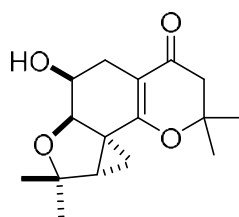
Zav'yalov e colaboradores exploraram a capacidade fungicida e antimicrobiana de uma série de composto 1,3-dicarboxilados (Figura 18).<sup>77</sup> A hidrocromen-5-ona halogenada **135** apresentou acentuada atividade contra a *M. tuberculosis*, além disso, demonstrou efeito fungicida contra diversas cepas.



135

**Figura 18:** Estrutura da hidrocromen-5-ona **135**.

Che e colaboradores estudaram tetraidrocromenonas obtidas do fungo endófito *Pestalotiopsis fici*.<sup>78</sup> As diferentes espécies de fungos do gênero *Pestalotiopsis* têm se mostrado uma valiosa fonte de compostos bioativos, em especial, metabólitos secundários.<sup>79</sup> Os autores realizaram a extração e caracterização de cinco diferentes hidrocromenonas e avaliaram a capacidade inibitória desses compostos contra HIV-1. Dentre os compostos analisados, a molécula **136**, a qual denominaram pestaloficiol A, foi capaz de promover a inibição da replicação do HIV-1 em concentrações micromolares, além de apresentar toxicidade moderada (Figura 19).



pestaloficiol A

136

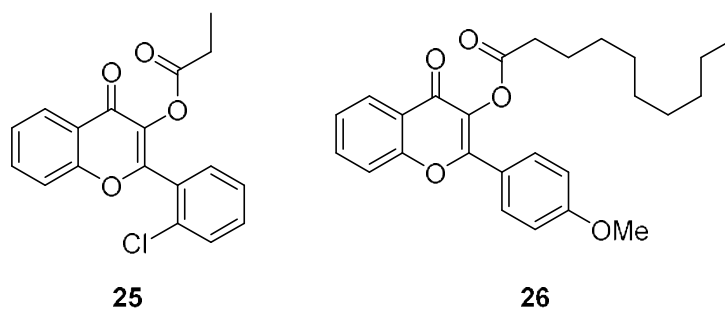
**Figura 19:** Estrutura do composto anti-HIV-1, **136**.

### 1.8 Cromenonas como inibidoras de *Quorum Sensing* em *Chromobacterium*

A capacidade de inibição do *QS*, focando na atividade anti-biofilme, é vista como uma alternativa para o crescente aumento de cepas multirresistentes aos antibióticos, tendo em vista que não exerce pressão sobre o crescimento bacteriano. Dessa forma, ensaios iniciais empregando *C. violaceum* e *C. subtsugae* são amplamente difundidos por conta da capacidade de metabolizar o pigmento violaceína, facilitando o acompanhamento do teste de inibição por meio da produção desse composto. Além disso, apesar de raro, *C. violaceum* também pode causar infecções em humanos, levando a casos graves de sepse e morte.<sup>80</sup> Por tais motivos, se faz necessária a avaliação de moléculas que sejam capazes de inibir cepas de *Chromobacterium*

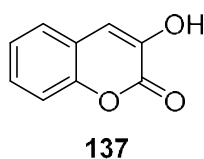
*spp.* Nessa perspectiva, cromenonas se mostram promissoras, tendo em vista que esses metabólitos secundários apresentam diversas propriedades biológicas.

Em um estudo avaliando diferentes compostos naturais, Fallarero e Manner encontraram duas cromonas, flavonas **25** e **26** (Figura 20), capazes de inibir a produção de violaceína acima de 91%, tanto na cepa selvagem (ATCC 31532) quanto na cepa mutante (CV026) da *C. subtsugae* na concentração de 400  $\mu\text{M}$ .<sup>23</sup> O resultado animador levou os autores a reavaliar os compostos, dessa vez na concentração de 40  $\mu\text{M}$ , e apesar de exibirem inibição dependente da concentração, foram obtidos excelentes valores, 90 e 83%, para **25** e **26**, respectivamente. Os autores apontam que os ésteres ligados em C-3 de ambas cromonas podem interagir no sítio específico de *CviR* como as cadeias acila das acilhomosserrinalactonas, promovendo competição na formação do complexo ligante, resultando na inibição da produção de violaceína.



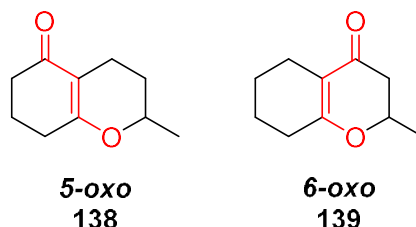
**Figura 20:** Estrutura das cromonas **25** e **26** com atividade inibitória contra *C. subtsugae*.

Arena e colaboradores avaliaram como os padrões de substituição em diferentes cumarinas afetavam a capacidade frente às cepas de *C. violaceum* e *C. subtsugae*.<sup>81</sup> Em uma primeira abordagem qualitativa, os autores comprovaram haver a necessidade da insaturação entre os carbonos C3 – C4 para inibição na cepa mutante *C. subtsugae* CV026, baseada na ausência de inibição de violaceína apresentada pela diidrocumarina. Uma segunda abordagem, dessa vez empregando a cepa *C. violaceum* (ATCC 2472), e quantificando a produção de violaceína, demonstrou que as hidroxycumarinas substituídas nas posições 3 e 7, acentuavam o caráter inibitório, enquanto a substituição na posição 4 reduzia a inibição. Dentre os compostos testados, destaca-se a cumarina **137**, apresentando valor de  $\text{EC}_{50} = 4,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , sem comprometer o crescimento bacteriano (Figura 21).



**Figura 21:** Estrutura da cumarina **137** com atividade contra *Chromobacterium spp.*

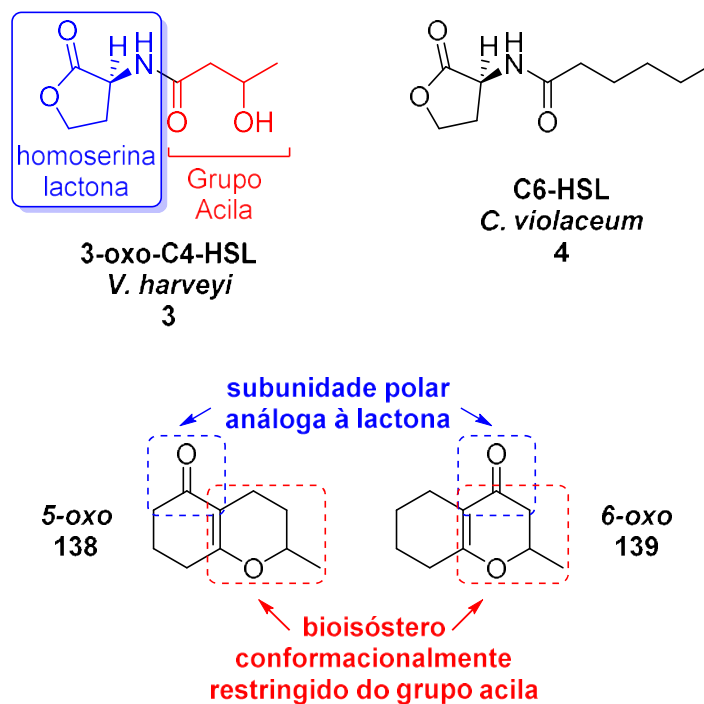
Estudos preliminares realizados por nosso laboratório em colaboração com o grupo de pesquisas do Prof. Alex Pereira Leite (FCE-UnB) demonstraram que lactonas vinílogas sintéticas, hidrocromenonas não naturais, as quais foram denominadas 5-oxo **138** e 6-oxo **139**, são novos antagonistas de QS em bactérias Gram-negativas (Figura 22).



**Figura 22.** Estruturas das lactonas vinílogas 5-oxo e 6-oxo.

Testada frente a uma cepa repórter de *V. harveyi*, uma mistura racêmica (*R,S*)-6-oxo na concentração de 752  $\mu\text{M}$  inibiu a expressão de bioluminescência em 89%.<sup>82,83</sup> A inibição de QS foi também verificada em *C. violaceum* que expressa o pigmento violaceína sob controle de QS. A lactona (*R,S*)-6-oxo em concentração de 752  $\mu\text{M}$  reduziu a síntese de violaceína em 67% sem comprometer o crescimento bacteriano.

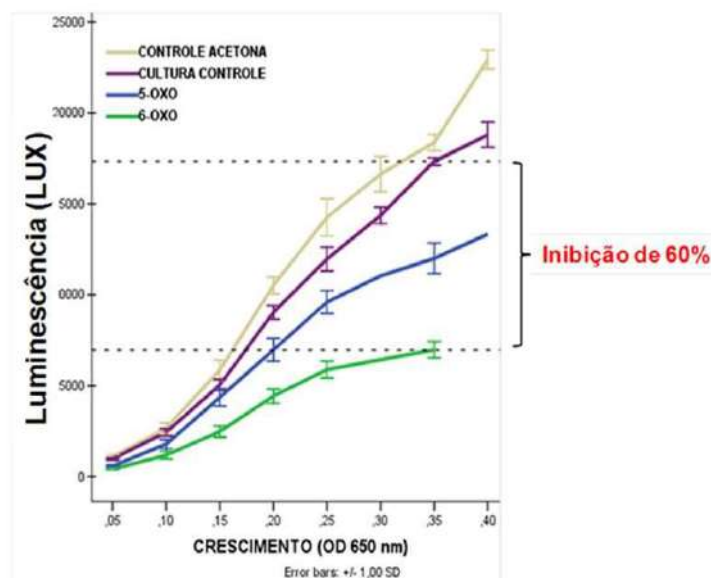
A comparação da estrutura química das hidrocromenonas 5-oxo **138** e 6-oxo **139** com a dos autoindutores naturais de *V. harveyi* (3-OH-C6-HSL) **1** e *C. violaceum* (C6-HSL) **4** nos permite identificar similaridades estruturais potencialmente responsáveis pelas respostas observadas nos ensaios por nós realizados (Figura 23). O grupo carbonila das lactonas vinílogas mimetiza as interações que o éster desses AI's apresentam com seus receptores. Somado a isso, o anel que compreende o oxigênio do enoléter em 5-oxo e 6-oxo, além de mimetizar o grupo acila das AHL, garante restrição conformacional a esta parte da molécula.



**Figura 23:** Similaridades estruturais presentes entre os AI's da *V. harveyi* e *C. violaceum* e as lactonas vinílogas 5-oxo e 6-oxo.

A influência do posicionamento do grupo carbonila para a atividade antagonista de QS das lactonas 5-oxo e 6-oxo foi constatada em ensaios de cinética de expressão da bioluminescência em *V. harveyi* (Gráfico 1). O posicionamento diferenciado destas carbonilas responde por uma diferença de inibição de até 100% quando os resultados das lactonas 6-oxo e 5-oxo são comparados, 60 % contra 30 %, respectivamente.





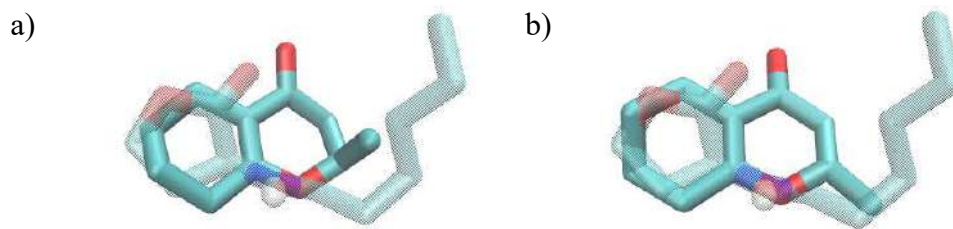
**Gráfico 1.** Cinética de expressão de bioluminescência em *V. harveyi* BB886 na presença das lactonas 5-oxo e 6-oxo em 752 µmol/L.<sup>§</sup>

Esses dados apontam para a necessidade de se avaliar a presença e o posicionamento dos grupos funcionais de 5-oxo e 6-oxo. Diferenças estruturais, como as observadas entre essas moléculas, podem acarretar não só na maior afinidade por um ou outro sistema de QS como também maior inibição deste. Esta estratégia possibilitaria a descoberta de compostos mais eficientes e com atividade específica que poderiam servir de princípio ativo para novos fármacos bloqueadores da virulência microbiana.

Em estudos posteriores do nosso grupo de pesquisa, Favero avaliou a capacidade inibitória da produção do pigmento violaceína pela cromenona **139** frente à cepa repórter *C. subtsugae* CV026.<sup>84</sup> Foi observada inibição de 65% na produção do pigmento na concentração de 625 µM; vale ressaltar que essa inibição não ocorre de forma definitiva, sendo possível revertê-la, como foi demonstrado pela autora por meio do teste de competição pelo sítio de ligação.

Visando maior compreensão acerca da interação desse composto com o sítio de ligação receptor, foi realizado a ancoragem molecular de ambos os enantiômeros de **139** com CviR, proteína responsável por receber o autoindutor e promover a mudança conformacional desencadeando a transição gênica que resulta na síntese de violaceína. Verificou-se que ambos os enantiômeros de **139** se posicionavam no sítio receptor de forma semelhante e se dispuseram de forma análoga ao AI cognado de CV026, a AHL **C6-HSL**, com as carbonilas localizadas na região em que se encontra a carboxila da lactona (Figura 24).

<sup>§</sup> Silva, F. Dado não publicado.



**Figura 24:** Sobreposição dentro do sítio ativo do autoindutor **C6-HSL** com: a) **(R)-139** e b) **(S)-139**.<sup>84</sup>

Estudos de síntese de moléculas capazes de mimetizar as AHL e modular o *quorum sensing* são de extrema importância, pois além de expandir a biblioteca de compostos existentes com tal funcionalidade, tais estudos geram informações a respeito de interações específicas nos sítios ligantes, interações competitivas e não competitivas de possíveis antagonistas, além de servirem de base para elucidação mecanística de processos de QS mais complexos.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivos Gerais

Esta tese de doutorado teve como objetivo geral a síntese e avaliação de diferentes adutos de Morita-Baylis-Hillman e hexahidrocromenonas quanto a sua capacidade de modular a biossíntese de violaceína na cepa CV026 de *Chromobacterium subtsugae*, um conhecido fenótipo do QS desta cepa bacteriana, bem como a avaliação do mecanismo de modulação das substâncias que apresentaram a maior capacidade de promover a modulação observada.

### 2.2 Objetivos Específicos

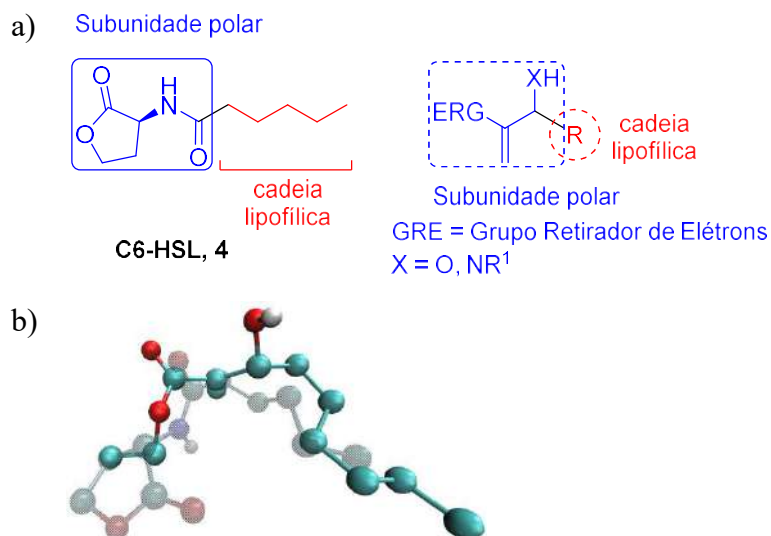
- Sintetizar adutos de MBH e hexahidrocromenonas, e caracterizá-los espectroscopicamente.
- Avaliar a capacidade que essas moléculas têm de modular a biossíntese de violaceína na cepa CV026 de *Chromobacterium subtsugae*, conhecido fenótipo desta cepa bacteriana.
- Definir grupos farmacofóricos importantes para a modulação observada.
- Realizar ensaios de ancoragem molecular para verificar a possível interação entre as moléculas avaliadas e o ativador transcricional do QS de CV026, CviR.
- Avaliar por ensaios de competição com o autoindutor cognato do QS de CV026, modulação da atividade quinolítica da CV026 e experimentos de RT-qPCR se o mecanismo de modulação observado ocorre em nível transcricional pela interação das moléculas moduladora com a CviR, o ativador transcricional do QS de CV026.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Adutos de Morita-Baylis-Hillman

##### 3.1.1 AMBH como inibidores de *quorum sensing*

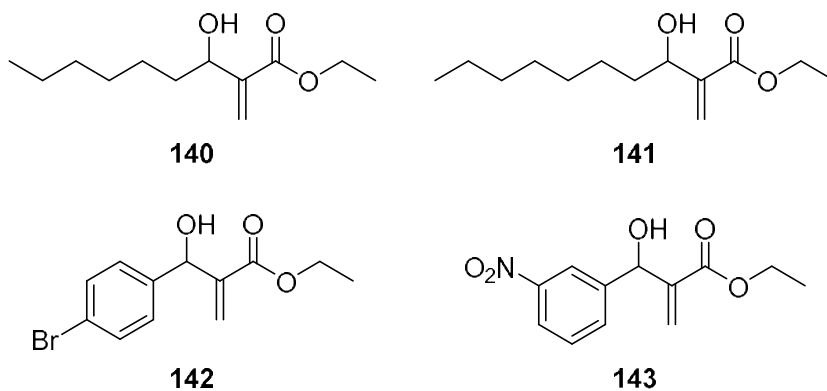
A utilização dos AMBH's como inibidores de *quorum sensing* tem, como ponto de partida, características estruturais compartilhadas entre esses e as acilhomoserinalactonas (Figura 25a). Em ambas as estruturas podem-se perceber duas frações distintas, uma porção polar e uma cadeia lipofílica. A subunidade polar presente nos AMBH's compreende: um grupo retirador de elétrons (GRE) remanescente de um aceptor de Michael e um grupo doador de ligação de hidrogênio na forma de uma hidroxila ou derivados de amina. Esses grupos podem mimetizar a carbonila da lactona e o nitrogênio amídico constantes na porção polar das AHL. Além disso, o vinilideno presente nos AMBH's pode garantir restrição conformacional de forma análoga àquela imposta pela amida planar dos AI's. De forma similar, a cadeia lipofílica presente nas AHL também pode ser comparada à cadeia dos derivados carbonilados empregados na reação de MBH. A figura 25b contém a sobreposição da **C6-HSL** com o AMBH (**R**)-140, na qual é possível verificar semelhanças no posicionamento das cadeias lipofílicas e, parcialmente, das porções polares de ambas as moléculas. A possibilidade de se preparar AMBH a partir de diferentes aldeídos permite o acesso, em uma única etapa reacional, a diferentes moléculas com similaridade estrutural com as AHL, possibilitando a rápida construção de acervo molecular com possível atividade moduladora de *QS* bacteriano.



**Figura 25 - a)** Comparação estrutural entre a AHL **C6-HSL** e a estrutura geral dos AMBH's. **b)** Sobreposição da estrutura da **C6-HSL** ( estrutura sombreada) com a estrutura do AMBH (**R**)-**140** (estrutura sólida).

Ao longo da última década, nosso grupo de pesquisa tem trabalhado com o uso de AMBH como intermediários reacionais,<sup>46,85-89</sup> isso nos permitiu o acesso a algumas das moléculas que serão avaliadas quanto a sua possível atividade modulatória no QS de CV026, um dos objetivos desta tese.

Para iniciar o estudo, foi escolhido o subacervo de AMBH provenientes do acrilato de etila e aldeídos contendo grupos alifáticos e aromáticos. Dentre esses AMBH havia adutos preparados com aldeídos de cadeia longa, como o *n*-heptanal (**140**) e o *n*-octanal (**141**), cujas cadeias são muito similares em tamanho quando comparadas à cadeia lipofílica de **C6-HSL** (Figura 26). Além desses, esse subacervo também dispunha dos adutos **142** e **143**, provenientes, respectivamente, do 4-bromo-benzaldeído e 3-nitro-benzaldeído.<sup>86</sup>

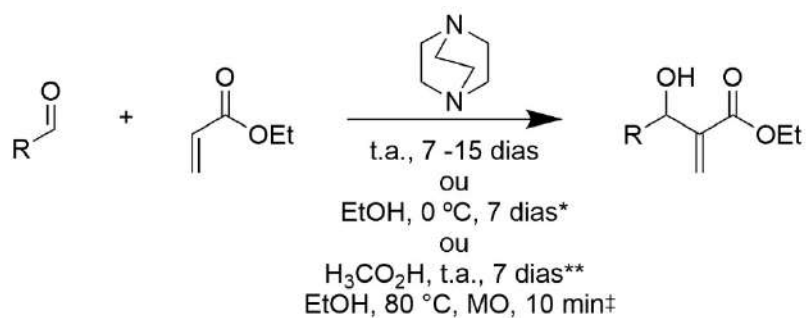




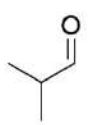
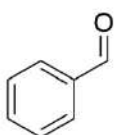
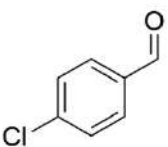
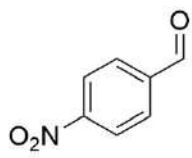
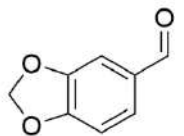
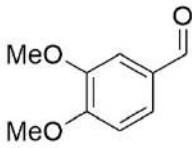
**Figura 26.** Estruturas dos AMBH disponíveis no subacervo de acrilato de etila.

Para que este subacervo tivesse variações estruturais que permitissem avaliar o impacto da cadeia procedente do aldeído na modulação do QS de CV026, foram preparados mais oito AMBH's, **144 – 151**. A síntese desses compostos foi realizada segundo procedimentos descritos na literatura,<sup>39,90,91</sup> utilizando DABCO como amina terciária, e obtendo-se rendimentos que variaram de 53 – 98% (Tabela 1). Como o objetivo do trabalho era avaliar essa classe de compostos frente ao QS de CV026, não foi realizado nenhuma tentativa de otimização dos rendimentos obtidos.

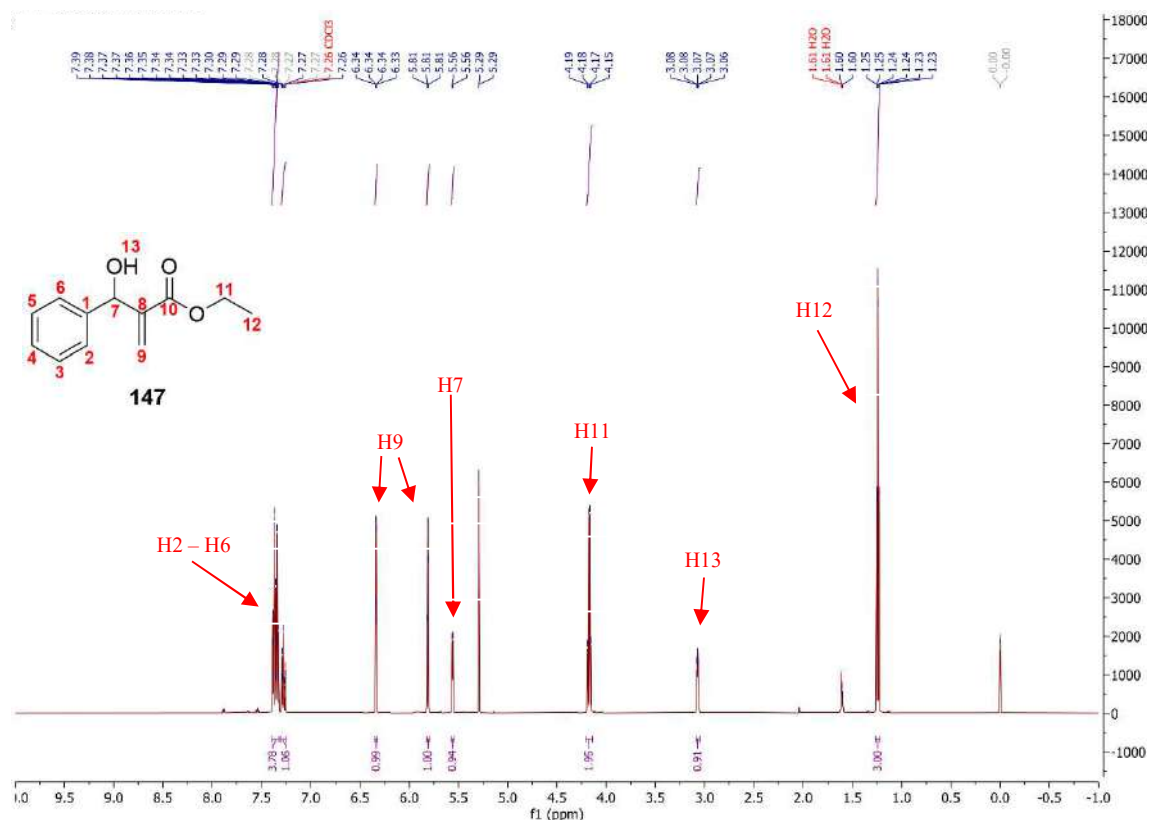
As estruturas dos AMBH's sintetizados são consideravelmente semelhantes, diferindo apenas nas cadeias lipofílicas provenientes dos diferentes aldeídos, como pode ser observado nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  presentes nos anexos **E1.1 – E8.3**. Portanto, será abordada a análise da molécula **147** como espectro modelo.

**Tabela 1.** Adutos de Mora-Baylis-Hillman derivados de acrilato de etila sintetizados neste trabalho.



Entrada	Aldeído	AMBH	Rendimento (%)
1		144	98
2		145	90
3		146	91
4*		147	62
5*		148	87
6‡		149	69
7**		150	82
8**		151	53

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **147** (Figura 27) contém sinais de ressonância com deslocamentos característicos que permitem confirmar a formação do AMBH. Os dois multipletos compreendidos entre 7,39 – 7,32 e 7,30 – 7,25 ppm com integração para 4 e 1 hidrogênios, respectivamente, são referentes aos hidrogênios aromáticos provenientes do benzaldeído. Os sinais referentes aos hidrogênios vinílicos foram observados como simpletos em 6,34 e 5,81 ppm. O duplete em 5,56 ppm ( $J = 5,3$  Hz), integrando para um hidrogênio, refere-se ao próton na posição carbinólica 7. Este é o sinal mais característico da formação do AMBH. Em 4,17 ppm, observa-se um quarteto ( $J = 7,1$  Hz), integrando para dois hidrogênios, atribuídos aos prótons do metileno da etila. Outro duplete, encontrado em 3,07 ppm ( $J = 5,3$  Hz; 1H) refere-se ao próton hidroxílico H13. Por fim, o triploto ( $J = 7,1$  Hz) referente à metila H12, pode ser observado em 1,24 ppm.

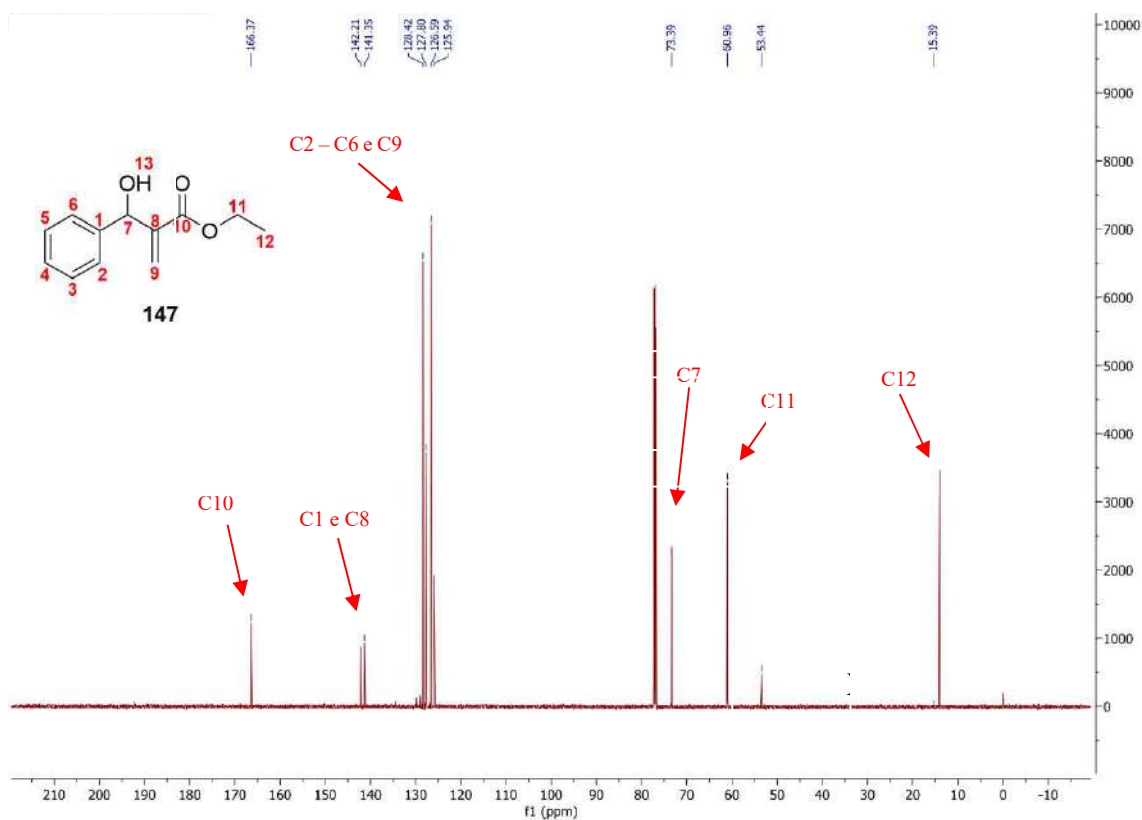


**Figura 27.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C, 600 MHz) do AMBH **147**.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 28) acusou 10 sinais diagnósticos para a molécula **147**. Em 166,4 ppm observa-se o carbono proveniente da carboxila C10. Em 142,2 e 141,4 ppm observam-se 2 sinais referentes aos carbonos  $\text{sp}^2$  que não se encontram ligados a nenhum átomo de hidrogênio, C1 e C8, respectivamente. Na região compreendida entre 128,4 – 125,9 ppm encontram-se os carbonos aromáticos C2 – C6, além do carbono vinílico C9. Em 73,4 pode ser



observado o carbono carbinólico C7, e em 61 ppm, o C11 do metileno da etila. Por fim, em 15,4 ppm encontra-se a metila proveniente da cadeia etila.



**Figura 28.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C, 600 MHz) do AMBH 147.

### 3.1.2 Inibição da Biossíntese de Violaceína

Com o subacervo de adutos derivados do acrilato de etila em mãos, a etapa seguinte consistiu na avaliação da capacidade inibitória do QS da cepa CV026, por meio da interferência na biossíntese do pigmento violaceína. Essa mutante de *Chromobacterium spp.* não produz o seu AI cognato **C6-HSL** e, para se observar fenótipos do seu QS, é necessário adicioná-lo ao ensaio. Isso permite que o impacto das moléculas que serão testadas seja avaliado separadamente para a interferência no crescimento bacteriano e para a modulação da síntese de violaceína, fenótipo de QS de CV026 que é avaliado.

Baseado nisso, Favero<sup>84</sup> desenvolveu um ensaio que é realizado simultaneamente em duas condições distintas. Na condição denominada Branco, avalia-se se as moléculas de interesse são capazes de interferir no crescimento bacteriano por meio da comparação entre uma cultura contendo os AMBH's e outra cultura na qual esses compostos estão ausentes. Caso a diferença estatística entre essas duas culturas seja  $p \leq 0,05$ , em intervalo de confiança de 95%,

conclui-se que houve interferência no crescimento bacteriano e que esse valor de concentração do AMBH não pode ser utilizado para a avaliação da interferência no QS desta bactéria.

Na outra condição, chamada de Teste, a quantidade de violaceína produzida num meio de cultura contendo uma quantidade fixa de **C6-HSL**, o agonista, é comparada com a quantidade de violaceína produzida em um meio de cultura contendo, além da mesma quantidade fixa de **C6-HSL**, diferentes concentrações dos AMBH's que estão sendo testados.

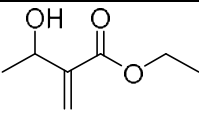
Tanto nos ensaios Branco quanto nos ensaios Teste, os meios de cultura são analisados por meio da leitura da densidade ótica (OD) com um espectrofotômetro (630 nm) do tipo leitor de Elisa. A porcentagem da inibição de violaceína foi obtida pela seguinte equação:

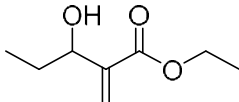
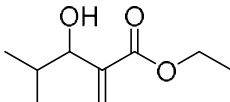
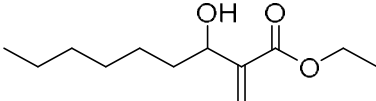
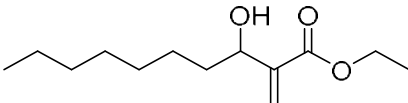
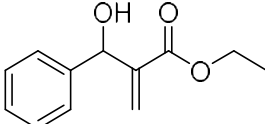
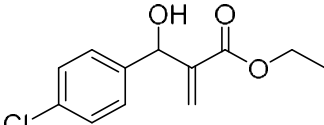
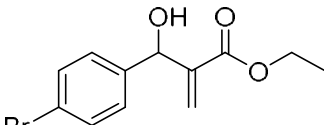
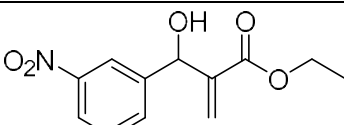
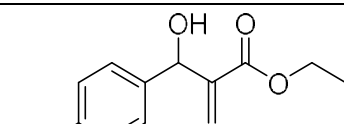
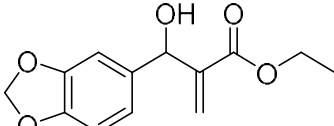
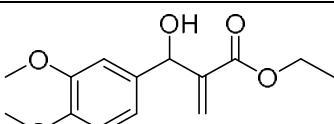
$$\%(inibição) = \frac{(\mu OD_{teste_{solvente}} - \mu OD_{teste_{AMBH}})}{\mu OD_{teste_{solvente}}} \times 100\%$$

Os AMBH's foram avaliados quanto à sua capacidade inibitória da produção de violaceína nas concentrações de 1,25 mM, 625  $\mu$ M, 312  $\mu$ M e 156  $\mu$ M. Apesar de alguns compostos apresentarem inibição relevante em concentrações intermediárias, para fins de comparação, serão considerados apenas os resultados referentes a 1,25 mM (Tabela 2). Os resultados nas outras concentrações estão nos anexos desta tese.

De uma forma geral, os AMBH's provenientes de aldeídos aromáticos são mais eficientes na inibição da síntese de violaceína no ensaio com CV026 do que os AMBH's preparados com aldeídos alifáticos. Analisando isoladamente os AMBH's de alifáticos, observa-se a redução do efeito inibitório com o aumento do tamanho da cadeia alquílica, como pode ser observado quando se comparam os compostos **144**, **145**, **146** e **141** (Tabela 2, entradas 1, 2, 3 e 5). O AMBH **140** parece ser exceção a esta tendência e isso pode ser atribuído ao fato de que, dentre os derivados alifáticos, ele é o que mais se assemelha, considerando-se o tamanho da cadeia lipofílica, ao autoindutor cognato **C6-HSL** da cepa CV026. Esse fator pode ser o responsável pela diferença de inibição observada entre **140** e **141** (Tabela 2, entradas 4 e 5), que diferem em apenas um metileno na cadeia lipofílica.

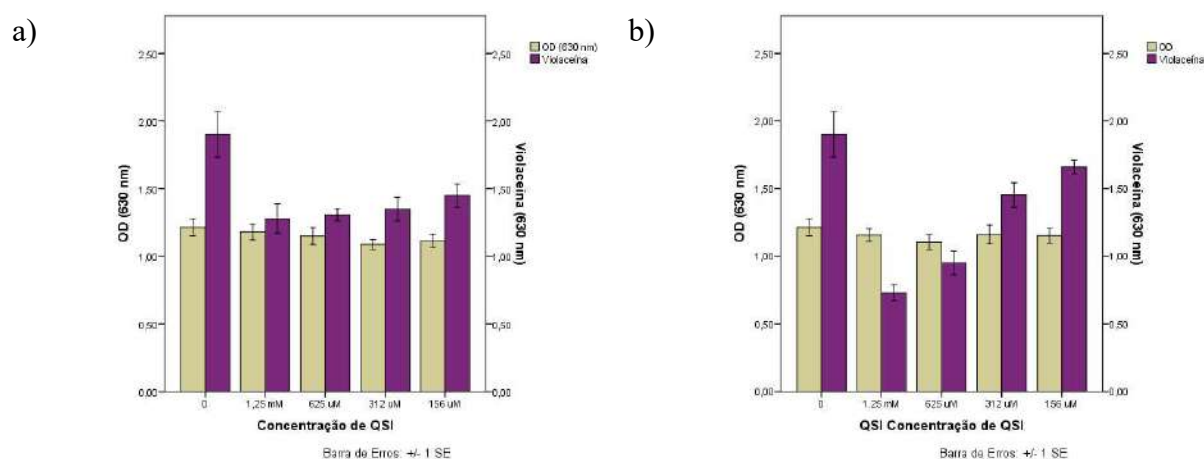
**Tabela 2.** Dados de inibição de violaceína do subacervo de acrilato de etila à 1,25 mM.

Entrada	Molécula	Inibição em (%) 1,25 mM	
1		<b>144</b>	30

2		<b>145</b>	24
3		<b>146</b>	26
4		<b>140</b>	35
5		<b>141</b>	17
6		<b>147</b>	49
7		<b>148</b>	33
8		<b>142</b>	62
9		<b>143</b>	42
10		<b>73</b>	40
11		<b>149</b>	36
12		<b>150</b>	40

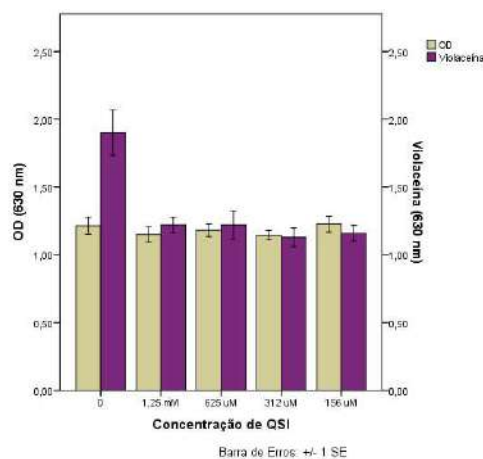
O aduto **147** (Tabela 2, entrada 6), proveniente do benzaldeído, apresentou inibição de 49%, resultado superior a todos os observados para os derivados alquílicos. A capacidade

moduladora da síntese de violaceína em CV026 também foi avaliada em AMBH's com grupo arila contendo substituintes. A natureza do halogeneto ligado à posição 4 da arila é importante para a atividade biológica em estudo. O AMBH que contém cloro **148** apresentou a menor inibição dentre os adutos aromáticos (33%) e, em contrapartida, o aduto com bromo **142** apresentou o melhor resultado de inibição (62%) neste subacervo (Tabela 2, entradas 7 e 8, respectivamente). Para além do valor absoluto de inibição na concentração de 1,25 mM, foi observado que, apesar da baixa inibição apresentada por **148**, percebe-se que seu efeito continua constante mesmo em concentrações menores (Figura 29a). O mesmo não ocorre com **142**, para o qual é possível notar uma relação direta da inibição com a concentração do aduto, de uma maneira dose-resposta mais sensível à concentração (Figura 29b).



**Figura 29.** Gráfico de inibição da biossíntese de violaceína por **148** (a) e **142** (b).

A presença do grupo nitro, tanto na posição 3 quanto na posição 4, da arila resultou em uma discreta diminuição do efeito inibitório, independentemente da posição em que se encontra o grupo nitro (Tabela 2, entradas 9 e 10). De forma similar, a incorporação de grupos doadores de densidade eletrônica, como 3,4-metilenodioxi e 3,4-dimetóxi (Tabela 2, entradas 11 e 12), também ocasionou em redução da atividade inibitória observada. Dessa forma, não foi evidenciada nenhuma relação entre a natureza eletrônica do grupo arila dos AMBH's aromáticos e a sua atividade inibitória. Assim, como reportado para a molécula **148**, o composto **149** também apresentou perfil constante no que diz respeito às inibições em diferentes concentrações (Figura 30). Ambas as estruturas apresentaram valores de inibição máximo bastante próximos e podem ser candidatos a modificações que conduzam ao incremento do perfil inibitório em concentrações mais baixas.

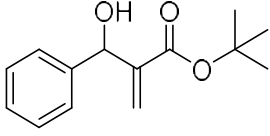
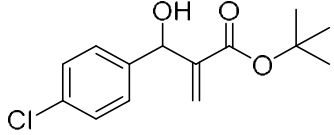
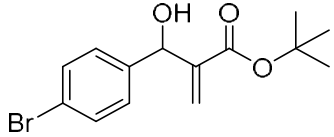
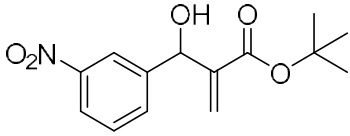
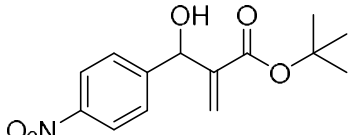
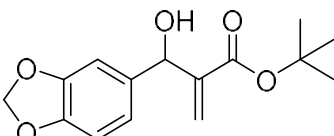
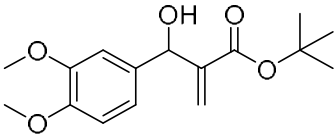


**Figura 30.** Gráfico de inibição da biossíntese de violaceína para o composto **149**.

Impulsionados pelo resultado de inibição apresentado pelos compostos derivados do acrilato de etila, partiu-se para a ampliação do escopo de adutos de MBH por meio da variação da porção polar da estrutura. A substituição do grupo etoxila ligado à carboxila, por *tert*-butoxila, conduz ao aumento de volume e não se sabe o impacto que essa alteração provocaria na modulação de QS de CV026. Além disso, na avaliação dos derivados de acrilato de etila, verificou-se que as substâncias derivadas de aldeídos aromáticos apresentaram melhores resultados de inibição da biossíntese de violaceína do que aquelas provenientes de aldeídos alquílicos. Baseado nessas duas afirmações, foram testados AMBH's oriundos do acrilato de *tert*-butila e diferentes aldeídos aromáticos que estavam presentes na nossa biblioteca de compostos (Tabela 3).<sup>88</sup>

Comparando-se com os compostos derivados do acrilato de etila, o subacerto do acrilato de *tert*-butila apresentou menor capacidade inibitória da biossíntese de violaceína em CV026. Com exceção do composto proveniente do 4-Cl-benzaldeído, **152** (Tabela 3, entrada 2), que apresentou inibição de 37%, comparável ao seu análogo etoxilado **148**, com 33% (Tabela 2, entrada 7). Esse aduto e o composto derivado do benzaldeído **151** (Tabela 3, entrada 1) apresentaram as maiores capacidades inibitórias para este subacervo, com valores aproximados de 40%. A presença do grupo *tert*-butila, mais volumoso que seu equivalente etila, na estrutura dos adutos promove a diminuição da capacidade inibitória, independentemente da natureza eletrônica dos substituintes ligados ao anel benzênico.

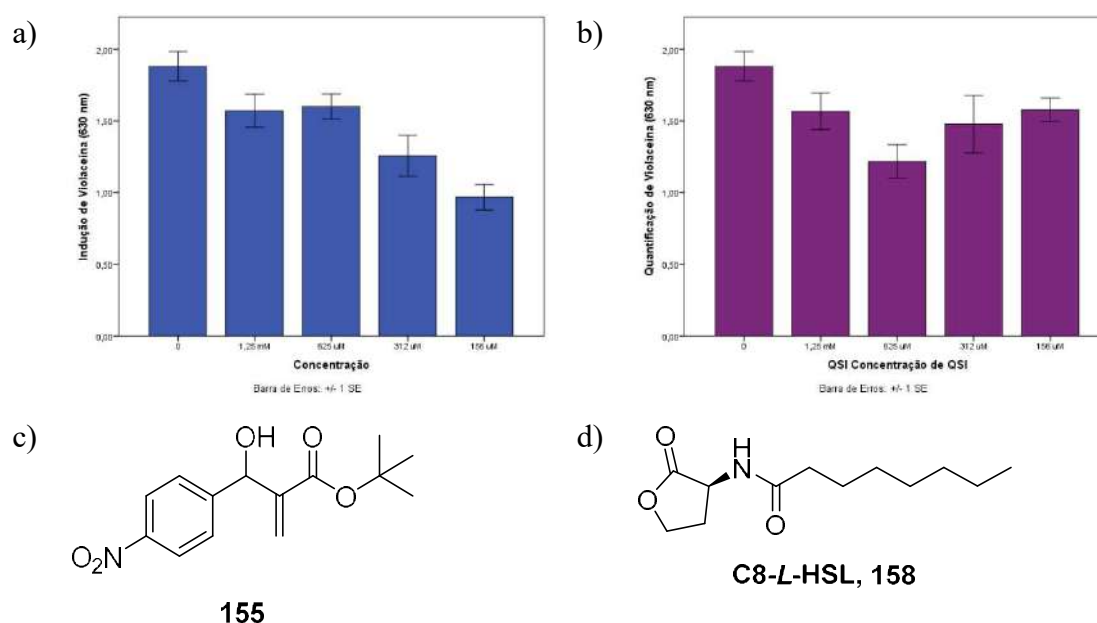
**Tabela 3.** Dados de inibição do subacervo do acrilato de *tert*-butila a 1,25 mM.

Entrada	Molécula	Inibição em (%) 1,25 mM
1		40
2		37
3		25
4		15
5		16*
6		25
7		14

\*Molécula induziu a produção de violaceína no teste de controle.

Ainda considerando o subacervo dos AMBH's de *tert*-butila, um resultado particularmente interessante foi observado no ensaio Branco com o aduto **155**. Ele promoveu a indução da síntese de violaceína na ausência do autoindutor cognato **C6-HSL**. Foi observada a formação de violaceína acima de 80% nas concentrações de 1,25 mM e 625  $\mu$ M para o ensaio com esse aduto (Figura 31a), considerando-se 100% de indução o resultado obtido com a adição do AI cognato de CV026, **C6-HSL**, ao meio de cultura, na ausência de qualquer tipo de inibidor. Na condição de Teste, quando o meio de cultura contém uma quantidade fixa do autoindutor cognato e variou-se a concentração de **155**, foi observado um perfil dose-resposta em formato de "V", com efeito máximo de inibição na concentração de 625  $\mu$ M (Figura 31b). Ou seja, **155**

é capaz de induzir a produção de violaceína na ausência do autoindutor cognato (ensaio Branco), e inibir quando **C6-HSL** está presente (ensaio Teste). Evento similar foi reportado por Hughson e colaboradores para a octonoil-*L*-homoserina lactona, C8-HSL, **158** (Figura 31d), enquanto avaliava como diferentes ligantes naturais e sintéticos interferiam no sistema de QS da *C. subtsugae* ATCC31532.<sup>92</sup> Os autores sugeriram a ocorrência de uma interação colaborativa, do tipo agonista, entre C8-HSL e o ativador transcricional CviR na ausência do autoindutor cognato C6-HSL, conduzindo à expressão do *vioABCDE* e ao aumento de produção de violaceína. Em contraste, quando **C6-HSL** e **158** estão presentes no meio, ocorre a competição para interagir com CviR, ocasionando a inibição da produção de violaceína controlada por QS. Admitindo **155** como um modulador da biossíntese de violaceína por direcionamento de CviR, a inibição constatada na condição de teste com 625  $\mu$ M deste aduto pode ser interpretada de forma análoga. O aduto **155** e o autoindutor cognato C6-HSL competem pela ligação ao CviR em CV026, suprimindo a expressão do *vioABCDE* com diminuição da produção de violaceína. Em contrapartida, com maior concentração de **155** (1,25 mM) na condição de teste, esse aduto pode se ligar adequadamente ao CviR, ativando a expressão do *vioABCDE* e acarretando o aumento observado na produção de violaceína.

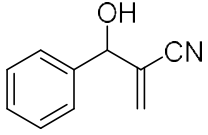
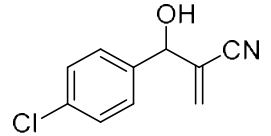
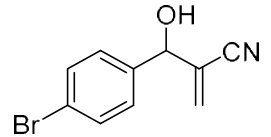
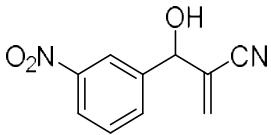
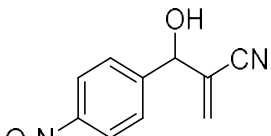
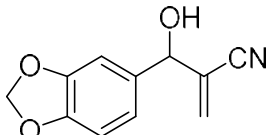
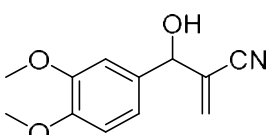


**Figura 31** – **a)** Indução da violaceína promovida por diferentes concentrações do aduto **155** no ensaio Branco (o valor de “zero” é referente ao resultado do ensaio que contém apenas o autoindutor C6-HSL no meio de cultura de CV026, experimento controle do ensaio Teste, e expressa a máxima indução deste AI cognato na condição de ensaio); **b)** Ensaio teste com o aduto **155** para avaliar a sua capacidade de inibição da síntese de violaceína na presença do

autoindutor cognato **C6-HSL**; **c)** estrutura do **AMBH 155**; **d)** estrutura da *n*-octanoil-*L*-homoserina lactona, **158**.

De posse dos dados provenientes do efeito causado pela substituição da etila por *terc*-butila no grupo éster, se fez necessário avaliar também o comportamento inibitório de moléculas que possuíssem menor volume na porção polar dos adutos. Dessa forma, avaliando o acervo de compostos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa, optou-se por utilizar as estruturas referentes ao subacervo oriundo da reação de MBH com acrilonitrila (Tabela 4).<sup>89</sup>

**Tabela 4.** Dados de inibição do sub acervo da acrilonitrila a 1,25 mM.

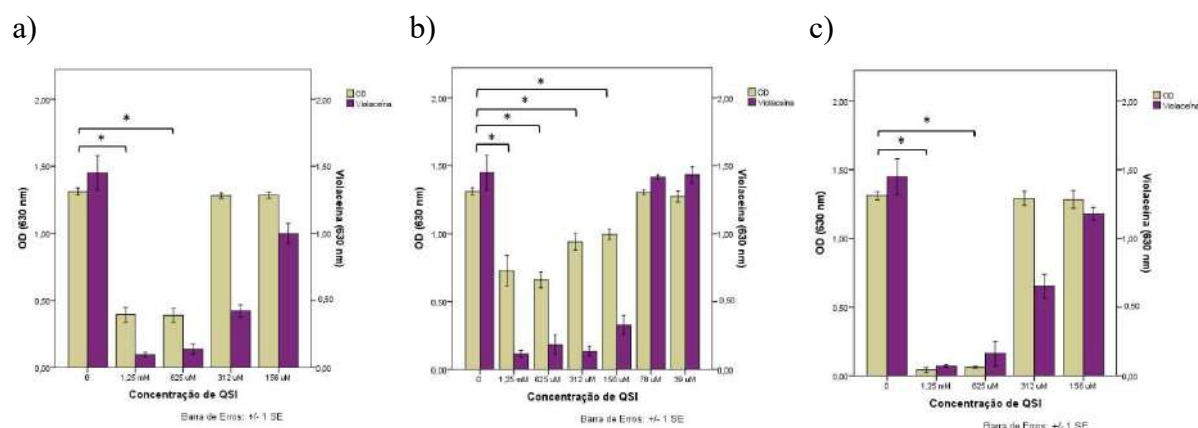
Entrada	Molécula		Inibição em (%) 1,25 mM
1		<b>159</b>	73
2		<b>160</b>	93*
3		<b>161</b>	92*
4		<b>72</b>	74
5		<b>68</b>	95*
6		<b>162</b>	37
7		<b>163</b>	67

\*Morte celular.



Os compostos derivados da acrilonitrila proporcionaram maior atividade que seus análogos ésteres, apresentando valores de inibição em torno de 70%, independentemente da natureza eletrônica dos substituintes ligado ao anel aromático, como pode ser observado para os compostos **159**, **72** e **163** (Tabela 4, entradas 1, 4 e 7). A exceção é o aduto **162** (Tabela 4, entrada 6), derivado do piperonal, que exibiu atividade inibitória bastante similar à apresentada por seu análogo éster etílico (Tabela 2, entrada 11). Além disso, outro comportamento demonstrado pelos compostos desse acervo foi a constatação de que três adutos se mostraram inibidores do crescimento bacteriano na concentração de 1,25 mM (**160**, **161** e **68**), todos apresentando grupos retiradores de elétrons ligados ao anel benzênico.

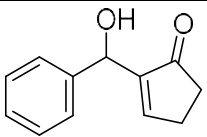
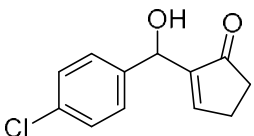
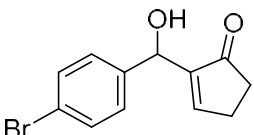
Apesar do caráter bactericida demonstrado por esses compostos, também foi possível verificar sua capacidade inibitória em concentrações mais baixas. O composto **160** (Tabela 4, entrada 2), derivado do 4-clorobenzaldeído, promoveu a morte celular nas concentrações de 1,25 mM e 625 µM (Figura 32a). Nas demais diluições, não foi observado o efeito bactericida e o aduto **160** foi capaz de promover a inibição da síntese de violaceína em 71% na concentração de 312 µM. A substituição do cloro por bromo resultou num incremento ainda maior no efeito bactericida, como pode ser observado no composto **161** (Tabela 4, entrada 3), no qual foi constatada morte celular nas quatro concentrações avaliadas: 1,25 mM, 625 µM, 312 µM e 156 µM; fazendo-se necessárias outras duas diluições, 78 µM e 39 µM (Figura 32b). Conforme pode ser notado no gráfico de inibição para o composto **161**, apesar da morte celular não ser mais evidenciada nas concentrações inferiores, não foi observado o efeito inibitório sobre a síntese de violaceína. O composto **68**, que tem um forte grupo retirador de elétrons na posição 4 da arila (Tabela 4, entrada 5), promoveu acentuado efeito sobre a morte celular nas concentrações de 1,25 mM e 625 µM (Figura 32c). Nas demais diluições não se verificou prejuízo no crescimento celular, sendo observada inibição da síntese de violaceína de 55% na concentração de 312 µM.

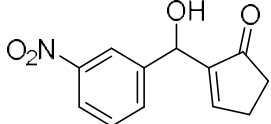
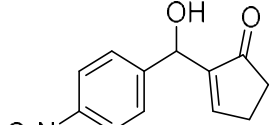
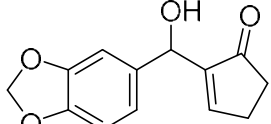
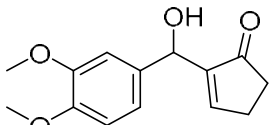
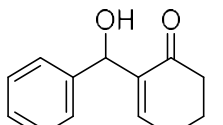
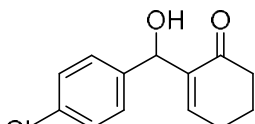
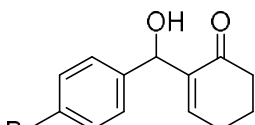
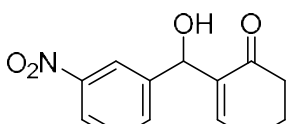
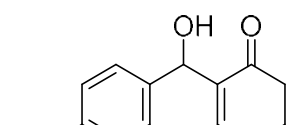
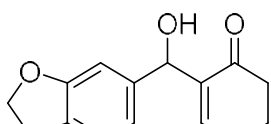


**Figura 32 – a)** Gráfico de inibição da biossíntese de violaceína para o composto **160**; **b)** Gráfico de inibição da biossíntese de violaceína para o composto **161**; **c)** Gráfico de inibição da biossíntese de violaceína para o composto **68**.

Seguindo-se a avaliação das relações entre a estrutura química dos adutos e a atividade moduladora da síntese de violaceína em CV026, ainda não havia em nossos subacervos AMBH's com as porções polares conformacionalmente rígidas, de forma semelhante às acil-homosserina lactonas. Portanto, foi utilizado um novo subacervo compreendendo enonas cíclicas de cinco e seis membros, de forma a se estimar o impacto na inibição da síntese de violaceína causado por essa rigidez estrutural, bem como a influência da incorporação de mais um átomo de carbono no ciclo introduzido.<sup>87</sup> Os resultados obtidos para inibição à 1,25 mM das enonas cíclicas avaliadas estão agrupados na tabela 5.

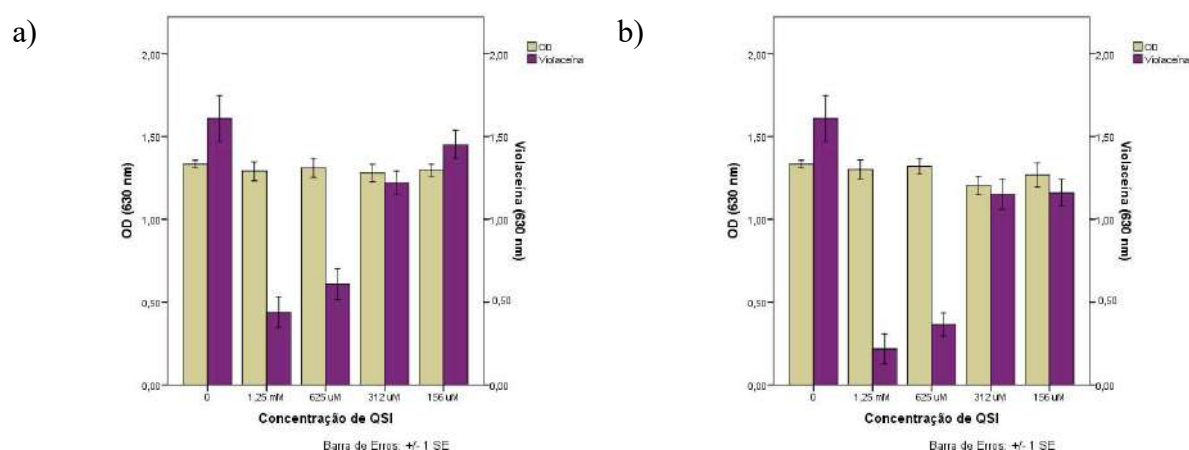
**Tabela 5.** Dados de inibição do subacervo de enonas cíclicas a 1,25 mM.

Entrada	Molécula	Inibição em (%) 1,25 mM
1		<b>164</b> 59
2		<b>165</b> 73
3		<b>166</b> 86

4		<b>167</b>	79
5		<b>168</b>	31
6		<b>169</b>	69
7		<b>170</b>	24
8		<b>171</b>	62
9		<b>172</b>	15
10		<b>173</b>	30
11		<b>174</b>	50
12		<b>175</b>	59
13		<b>176</b>	68

Verificando os dados da tabela 5, percebe-se que houve grande variação entre os valores obtidos para inibição da síntese de violaceína, entre 15 – 86%. Também foi possível observar uma tendência de inibição mais acentuada para as ciclopentenonas; sendo o derivado 4-NO<sub>2</sub> a

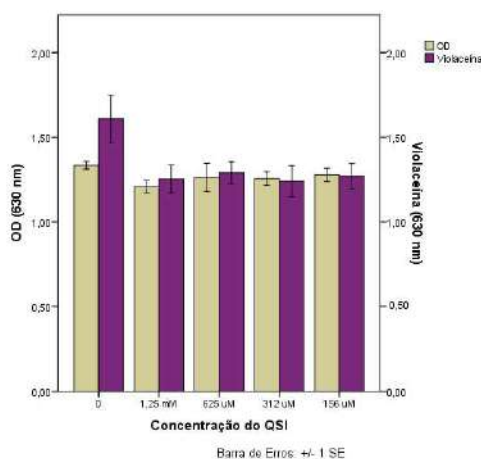
única exceção, apresentando quase o dobro de atividade inibitória para a ciclohexexona **175**, 59% (Tabela 5, entrada 12), frente à ciclopentenona **168**, 31% (Tabela 5, entrada 6). Dos sete compostos derivados da ciclopentenona, cinco apresentaram valores de atividade inibitória superior a  $60 \pm 1\%$ . De forma similar aos casos anteriores, não se percebeu nenhuma correlação entre a inibição de violaceína e a natureza eletrônica do substituinte do grupo arila no subacervo avaliado. A não substituição na porção aromática coloca ambos os derivados em condição bastante similar no que diz respeito à inibição, compostos **164** e **171** (Tabela 5, entradas 1 e 8). Com relação aos grupos substituintes na arila, a introdução do cloro e bromo na posição 4 resultou no aumento do valor da inibição para os derivados contendo enonas cíclicas de 5 membros, compostos **165** e **166** (Tabela C, entradas 2 e 3). Ambos os adutos apresentaram inibições acima de 62% nas concentrações à 625  $\mu\text{M}$ , com **166** se mostrando como o candidato mais potente neste estudo, apresentando inibições de 86% e 77% a 1,25 mM e 625  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Figura 33). Entretanto, o efeito contrário foi percebido para as estruturas contendo a subunidade ciclohexenona, resultando em acentuada diminuição da atividade inibitória (Tabela 5, entradas 9 e 10).



**Figura 33 – a)** Gráfico de inibição da biossíntese de violaceína para o composto **165**; **b)** Gráfico de inibição da biossíntese de violaceína para o composto **166**.

Com relação ao grupo  $\text{NO}_2$ , sua presença na posição 3 resultou no aumento da inibição para o derivado ciclopentenona **167**, e numa discreta redução para o derivado ciclohexenona **174** (Tabela 5, entradas 4 e 11). A introdução do derivado 3,4-metilenodioxo provocou um pequeno incremento na capacidade inibitória de ambas enonas cíclicas, compostos **169** e **176** (Tabela 5, entradas 6 e 13) quando comparadas aos respectivos análogos não substituídos **164** e **171** (Tabela 5, entradas 1 e 8). Resultado oposto foi observado para o aduto derivado da reação de MBH entre a ciclopentenona e o 3,4-dimetóxi-benzaldeído **170** (Tabela 5, entrada 7), para o

qual se percebe uma acentuada diminuição da atividade inibitória quando comparado ao seu análogo não substituído **164** (Tabela 5, entrada 1). Apesar da baixa atividade apresentada por **170**, sua capacidade inibitória se manteve constante, mesmo nas menores concentrações avaliadas (Figura 34).



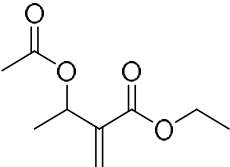
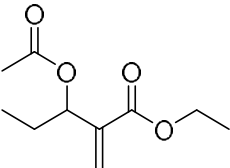
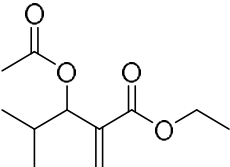
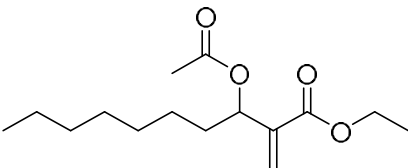
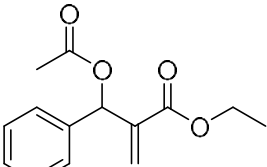
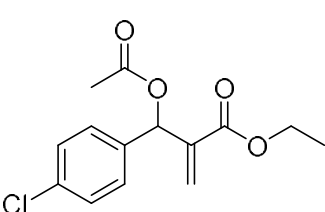
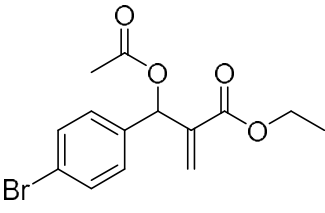
**Figura 34.** Gráfico de inibição da biossíntese de violaceína para o composto **170**.

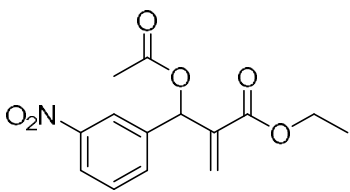
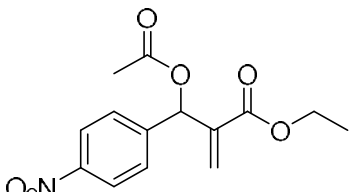
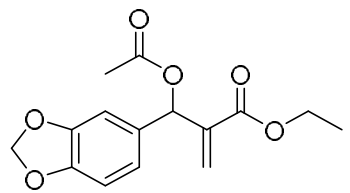
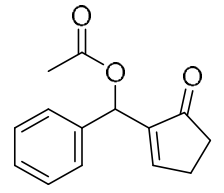
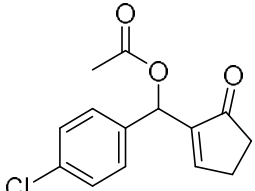
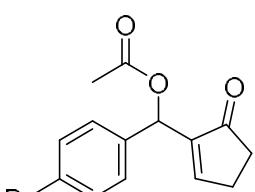
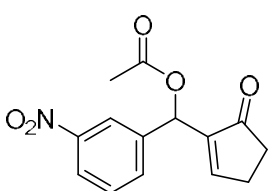
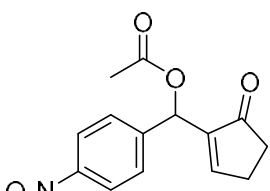
Comparando os dados apresentados na tabela 5 com os presentes nas tabelas 2 e 3, nota-se que a restrição conformacional introduzida pelas enonas cíclicas aumenta a capacidade inibitória, quando comparada àquela apresentada pelos grupos ésteres, mais flexíveis. Quando as enonas cíclicas são comparadas à série das nitrilas, percebe-se um incremento na atividade inibitória com relação ao derivado não substituído em favor das nitrilas (Tabela 4, entrada 1 e Tabela 5, entradas 1 e 8). A diminuição da atividade é mais acentuada no caso do derivado do 3,4-dimetóxi-benzaldeído, na qual a inibição para a nitrila é aproximadamente 3 vezes maior que a apresentada pela ciclopentenona (Tabela 4, entrada 7 e Tabela 5, entrada 7). Efeito oposto é observado para os derivados 3,4-metilenodioxo, em que a capacidade inibitória das enonas cíclicas é praticamente o dobro da exibida pela nitrila.

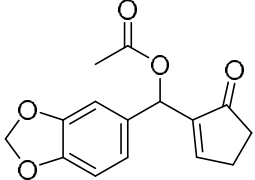
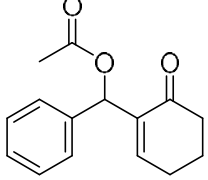
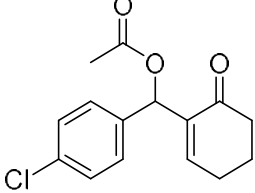
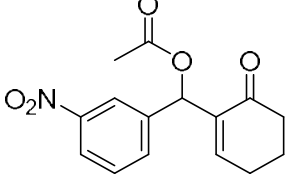
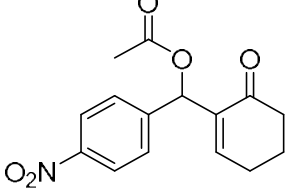
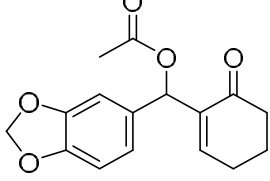
A porção polar das AMBH's compreende, além do grupo retirador de elétrons, uma hidroxila ou derivado de amina e nos restava avaliar como esse grupo, doador e acceptor de ligação de hidrogênio, influencia na atividade inibitória da síntese da violaceína observada nos adutos testados. Para isso, foram empregados dois subacervos moleculares, nos quais a porção hidroxílica fora acetilada, convertendo essa parte da molécula em um grupo unicamente acceptor de ligação de hidrogênio. A escolha desses dois subacervos recaiu no fato das enonas cíclicas apresentarem os melhores resultados de inibição dentre todos os compostos avaliados e os derivados de acrilato de etila proporcionarem o maior número de substâncias testadas na primeira etapa deste trabalho, além de exibirem resultados intermediários na série dos

compostos acrílicos.<sup>87</sup> Os dados obtidos para o ensaio de inibição desses dois sub acervos estão agrupados na tabela 6.

**Tabela 6.** Dados de inibição/indução dos AMBH's acetilados à 1,25 mM.

Entrada	Molécula	Inibição em (%) 1,25 mM	
1		177	0
2		178	1*
3		179	2*
4		180	1*
5		181	2
6		182	10*
7		183	2*

8		<b>184</b>	2*
9		<b>185</b>	0
10		<b>186</b>	0
11		<b>187</b>	3*
12		<b>188</b>	18
13		<b>189</b>	23
14		<b>190</b>	5
15		<b>191</b>	3*

16		<b>192</b>	8
17		<b>193</b>	11
18		<b>194</b>	2*
19		<b>195</b>	3
20		<b>196</b>	7
21		<b>197</b>	3

---

\*Indução de violaceína

A principal informação extraída da tabela 6 trata-se da importância da hidroxila na porção polar da estrutura para o efeito inibitório. A acetilação desse fragmento nas estruturas resultou em acentuada diminuição da inibição da biossíntese da violaceína quando comparada aos seus análogos não acetilados. Cabe ressaltar que, apesar da redução da atividade inibitória da síntese de violaceína, nenhum dos compostos avaliados apresentou diminuição do crescimento bacteriano. Essa diminuição de atividade inibitória da síntese de violaceína é mais proeminente no subacervo dos derivados acrílicos, nos quais alguns compostos apresentaram até mesmo o efeito oposto, com indução da síntese de violaceína, como no caso do composto



**182** (Tabela 6, entrada 6). Os valores de indução exibidos na tabela 6 foram bastante sutis, sendo perceptíveis apenas após a análise dos dados obtidos pelo leitor de Elisa. Diferente do que ocorreu com o aduto **155**, nenhum efeito de indução do fenótipo foi perceptível na condição do experimento Branco.

No geral, houve bastante proximidade entre os valores reportados para ambas as enonas cíclicas, exceto para os derivados halogenados de ciclopentenona, que apresentaram os melhores resultados de inibição dentre os adutos acetilados, 18% e 23 % (Tabela 6, entradas 12 e 13). Assim como para o caso dos AMHB's não acetilados, o AMBH acetilado que apresentou o melhor resultado geral nesse subacervo foi a estrutura proveniente do 4-bromobenzaldeído, indicando que apesar dessa modificação estrutural na hidroxila, parte da atividade inibitória da molécula se conserva por meio das interações remanescentes nessa estrutura.

De forma geral, as enonas cíclicas apresentaram os melhores efeitos inibitórios, seguidos dos derivados de acrilonitrila, acrilatos de etila, *terc*-butila e AMBH's acetilados. A restrição conformacional presente nas enonas cíclicas, especialmente para os derivados ciclopentenona, que possuem tamanho equivalente à porção lactona do autoindutor cognato, parece favorecer o caráter inibitório. Apesar de apresentar morte celular em 3 derivados aromáticos, fica evidente a predominância dos AMBH's provenientes da acrilonitrila em detrimento aos seus análogos ésteres. Estes, por sua vez, demonstram que a atividade inibitória é mais favorável para os derivados etílicos que seus equivalentes *terc*-butílicos. Pode-se propor, portanto, que a atividade inibitória para a série acrílica teria relação com o tamanho do grupo alquila do éster, de forma que o aumento do volume da molécula parece dificultar sua interação dentro do sítio receptor, possivelmente restringindo sua movimentação em virtude de algum fator estéreo. Por fim, AMBH's acetilados apresentaram acentuada redução de sua atividade inibitória quando comparada aos seus análogos hidroxilados, indicando que o grupo doador de ligação de hidrogênio parece desempenhar uma considerável contribuição farmacofórica.

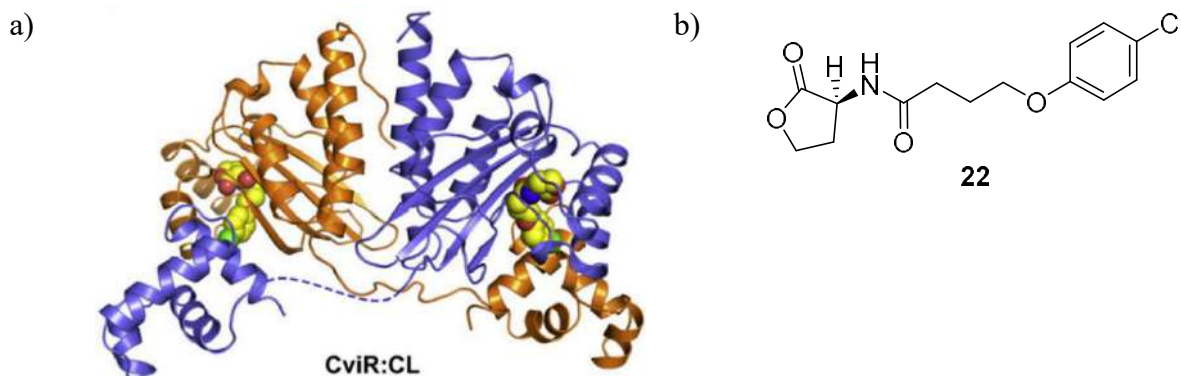
### **3.1.3 Ancoragem Molecular dos AMBH**

A atividade dos AMBH's frente ao QS de CV026 fez surgir um novo questionamento; qual mecanismo de inibição da biossíntese de violaceína está envolvido para esse conjunto de moléculas? Isso porque esta inibição pode acontecer pela interferência no mecanismo de QS responsável por regular a expressão do operon *vioABCDE* ou pela inibição direta de uma das enzimas *VioABCDE* que convertem triptofano em violaceína. Uma das ferramentas empregadas

na tentativa de se elucidar essa pergunta foi a utilização de ancoragem molecular (do inglês, *molecular docking*).

A ancoragem molecular é uma ferramenta computacional bastante utilizada em química medicinal, pela qual é possível estudar como um ligante se coordena com uma macromolécula, permitindo, também, estudar as interações do tipo não-covalentes que ocorrem entre o ligante e o sítio receptor. O experimento de ancoragem molecular tem como resultado duas importantes informações: (1) a predição da pose (posição, orientação e conformação) do ligante no receptor e (2) a função de *score* que classifica a afinidade de ligação relativa a cada pose.<sup>93</sup> Para o caso específico do QS de CV026, a proposição trata-se de como os AMBH's poderiam interagir com a proteína CviR resultando na diminuição de quantidade de violaceína sintetizada, pois ao obstruir a interação entre o autoindutor e o ativador transcricional CviR, a transcrição do operon *vioABCDE* é drasticamente atenuada, resultando no prejuízo da expressão dos genes responsáveis pelo fenótipo.

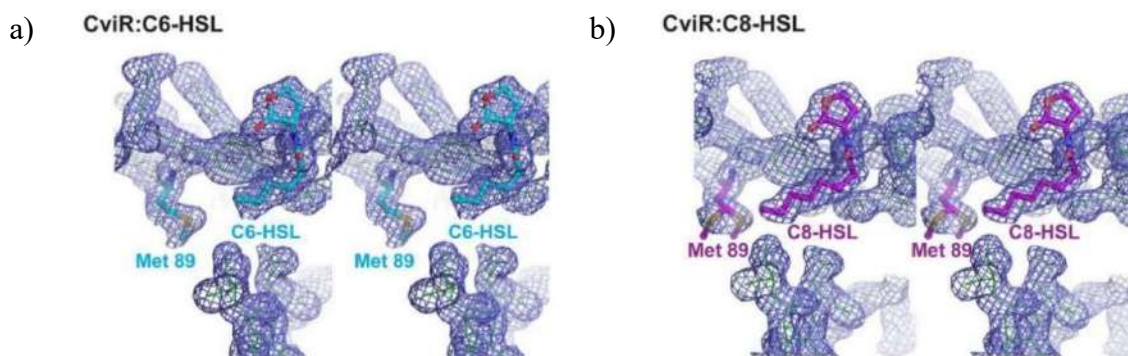
A estrutura do complexo entre a CviR e o inibidor CL, **22** foi resolvida por cristalografia de difração de raio-x por Hughson e colaboradores e encontra-se disponível no *Protein Data Bank* sob o código 3QP5 (Figura 35a).<sup>92</sup> Os autores determinaram a estrutura de CviR como um homodímero, cujos monômeros são constituídos de dois diferentes domínios: o LBD (sigla do inglês para *ligand bind domain*), domínio responsável pela interação com o autoindutor, e o DBD (sigla em inglês para *DNA bind domain*), domínio responsável pela interação com o DNA. Esses domínios se arranjam de forma cruzada, nos quais o DBD de um monômero está localizado abaixo do LBD do outro monômero (Figura 35a). Quando **22**, um potente antagonista do QS de *C. subtsugae* interage com o LBD de CviR, ocorre uma mudança conformacional nessa proteína, resultando na não interação do DBD com o DNA o que, conseqüentemente, prejudica a transcrição do operon *vioABCDE*.

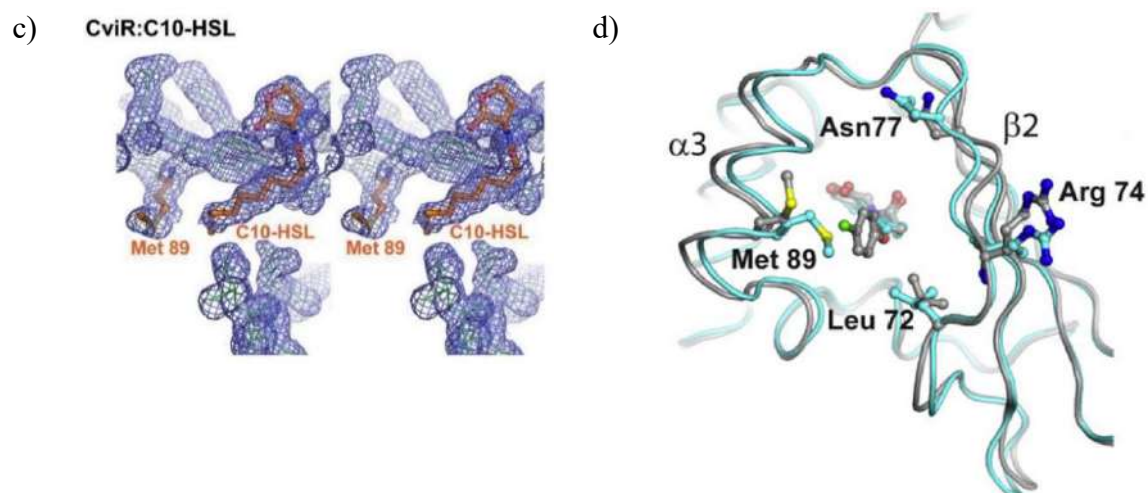


**Figura 35 – a)** Estrutura do complexo CviR:CL resolvida por difração de raio X (PDB: 3QP5). Em laranja e azul encontram-se os monômeros em sua forma cruzada. O composto **22** está

presente em amarelo dentro do LBD; **b)** O composto CL, **22**, é o mais potente antagonista de *C. subtsugae* existente até o momento.<sup>92</sup>

Hughson também forneceu evidências de que a mudança conformacional na CviR que ocasiona a não interação do DBD com o DNA conduzindo à inibição do QS em CV026 é promovida pela interação da cadeia acila de AHL com a cadeia lateral do resíduo de aminoácido Met89. Através de um estudo envolvendo o autoindutor de CviR, **C6-HSL**, e análogos com tamanhos maiores de cadeia acila, foi possível observar o impacto da mudança de posicionamento da cadeia lateral desse resíduo de aminoácido na conformação da proteína. Quando C6-HSL, AHL com cadeia acila curta, está complexada à CviR, o posicionamento do resíduo Met89 permite a interação do DBD com o DNA (Figura 36a). Na substituição do autoindutor por um análogo de cadeia maior, C8-HSL, ocorre uma sutil mudança na conformação de Met89, com a cadeia lateral deste resíduo de aminoácido ocupando duas conformações diferentes, sendo uma delas idêntica à observada para C6-HSL (Figura 36b). O aumento da cadeia acila da AHL, no caso de C10-HSL, promove uma mudança na conformação da cadeia lateral de Met89, similar à apresentada pela outra conformação de C8-HSL, que conduz à não interação do DBD com o DNA (Figura 35c). Quando se compara o inibidor CL, **22**, com o autoindutor C6-HSL, observa-se uma grande mudança conformacional na disposição da cadeia lateral de Met 89, demonstrando a disposição desse resíduo de aminoácido nas condições agonistas e antagonistas de CviR (Figura 36d).



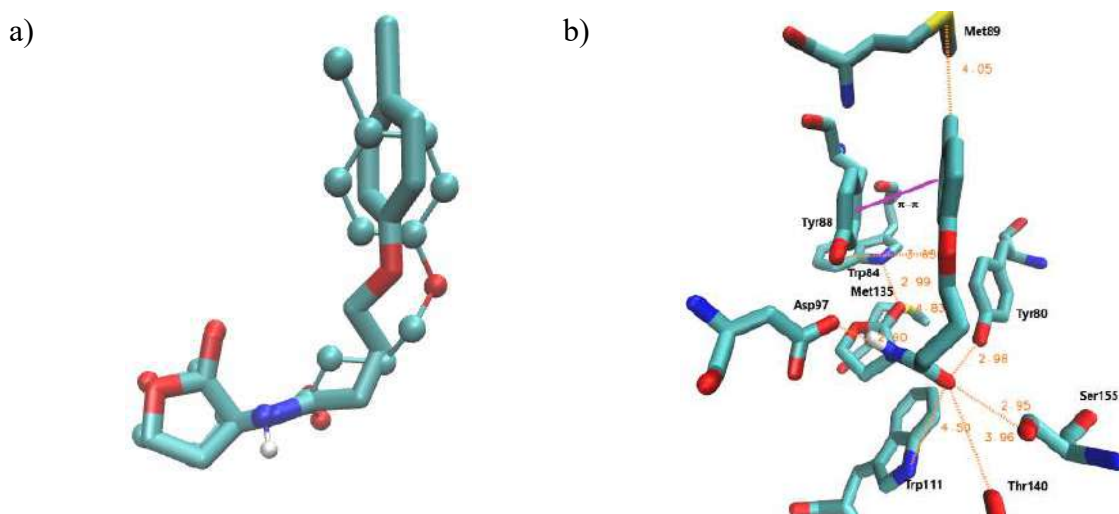


**Figura 36** – a) Interação entre o LBD e C6-HSL, estrutura em azul; b) interação entre o LBD e C8-HSL, estrutura em roxo; c) interação entre o LBD e a C10-HSL; d) comparação entre C6-HSL, em ciano, e CL, em cinza, e seu efeito sobre a conformação do resíduo de aminoácido Met89.<sup>92</sup>

Para os ensaios de ancoragem molecular, foi utilizado o programa AutoDock Vina, devido a sua rapidez e acurácia na capacidade de predição da conformação do ligante no sítio receptor, além de ser de fácil utilização e tratar-se de um *software* de fonte aberta.<sup>94,95</sup> As estruturas dos AMBH's, do **C6-HSL** e do ligante **CL (22)** foram geradas através do programa Avogadro (Versão 1.2.0), no qual também foram otimizadas através da aplicação do UFF (sigla em inglês para *Universal Force Field*).

Um estudo inicial de re-ancoramento molecular do composto **22** foi realizado como forma de validar os parâmetros computacionais que foram utilizados no AutoDock Vina. Nesta rotina computacional, as estruturas químicas obtidas como resultados do re-ancoramento do complexo CviR:**22** foram comparadas com a obtida por cristalografia por difração de Raio-x (PDB: 3QP5) (Figura 37a). Foram observadas interações hidrofílicas com os resíduos de aminoácidos Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97, Trp111, Met135, Thr140 e Ser155. Cabe destacar também a interação do cloro terminal com a Met89 e a interação hidrofóbica do tipo  $\pi$ - $\pi$  entre a porção aromática de **22** e o fenol de Tyr88 (Figura 37b). A sobreposição das estruturas evidencia uma grande similaridade conformacional no estudo de re-ancoramento molecular e os dados obtidos por cristalografia. A subunidade lactona, bem como a amida, apresentaram acentuada sobreposição na comparação entre os resultados da re-ancoragem e os dados cristalográficos. A cadeia alquílica espaçadora presente entre a amida e a arila fornece alguma liberdade conformacional a essa parte da estrutura, conduzindo a uma mudança de conformação

nessa parte da molécula e na disposição da arila. Ainda assim, existe elevada proximidade entre o oxigênio ligado à arila de ambas as estruturas. A discordância mais notável, ainda que discreta, foi o posicionamento da arila, que ainda assim, aponta na direção do resíduo de aminoácido Met89. Tendo em vista que o experimento de ancoragem molecular se propõe a simular as interações polares não covalentes entre ligante e receptor, o ensaio de re-ancoragem foi considerado exitoso em prever as conformações no sítio receptor, validando os parâmetros computacionais empregados.



**Figura 37** – a) Sobreposição da conformação adotada por **22** no experimento de difração de raios-X (estrutura tubular) e ensaio de re-ancoramento (modelo bola-bastão);<sup>84</sup> b) interações presentes no complexo CviR:**22**.

Como forma de avaliar se os AMBH's apresentavam sua atividade modulatória em função da sua interação com o sítio específico ou devido a alosterismo, interação com outra parte da macromolécula que não seja o sítio específico, foi empregado no experimento de ancoragem molecular um tamanho de caixa que acomodou a proteína CviR em todo seu volume (experimento de ancoragem às cegas). Para analisar que interações hidrofílicas e hidrofóbicas entre CviR e o ligante estudado eram relevantes, foram consideradas aquelas com distâncias de até 5 Å. Além disso, como os compostos utilizados para o ensaio de inibição estavam presentes em sua forma racêmica, foram calculados complexos da CviR com ambos os isômeros *R* e *S* separadamente nos ensaios de ancoragem, sendo demonstrada também a média energética isomérica para cada molécula (Tabela 7). Desta forma, pôde-se verificar que todos os compostos avaliados apresentaram suas poses de menor energia no LBD da CviR, não sendo

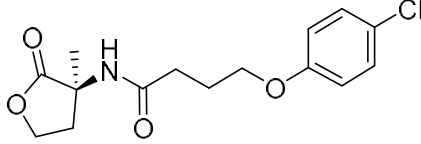
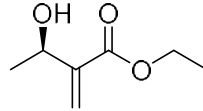
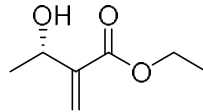
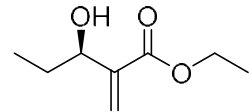
evidenciado nenhum efeito alostérico, o que reforça a ideia de que os AMBH's interferem no QS de CV026 através da interação com a proteína CviR.

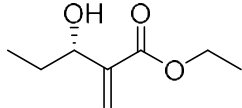
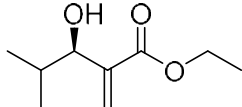
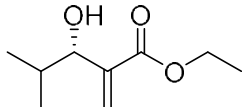
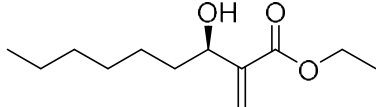
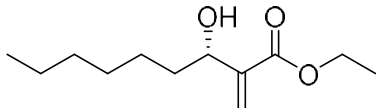
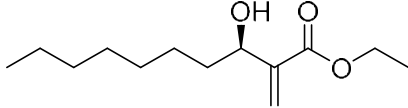
Apesar de o complexo CviR:**22** do arquivo PDB ser um homodímero, ele não é simétrico e apresenta diferenças morfológicas no LDB de cada unidade de CviR. Isso levou à observação de resultados de ancoragem molecular que ora colocam o ligante em uma unidade de CviR e ora na outra. Para uma comparação apropriada (Tabela 7), as informações de ancoragem molecular de cada aduto se referem à pose de menor energia desse aduto no LBD que, no experimento de *redocking*, rendeu o complexo CviR:**22** de menor energia. Este procedimento foi adotado mesmo que essa pose não fosse referente à de menor energia de afinidade para a molécula testada.

A semelhança estrutural entre as AHL e os adutos de MBH testados nos permitiu sugerir que os grupos carbonilados dos adutos mimetizam a lactona da homoserina, posicionando o substituinte do carbono alílico dos adutos na região que acomoda a cadeia do grupo acila das AHL. Com isso, cadeias mais longas e mais volumosas seriam capazes de modificar o posicionamento da Met89 e impedir que a CviR de CV026 adote a conformação que, ao se ligar ao DNA, promova a transcrição dos genes relacionados ao seu QS.

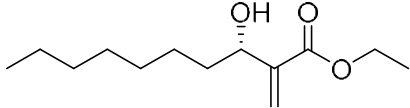
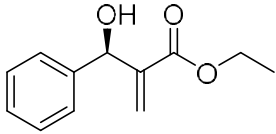
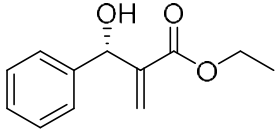
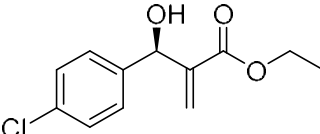
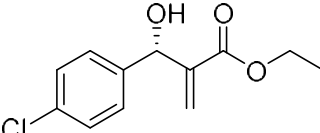
Verificou-se que, de forma análoga ao evidenciado para o composto **22**, os compostos, em sua maioria, são capazes de interagir com os resíduos de aminoácido Tyr80, Tyr88, Asp97 e Ser155 em maior grau, mas não necessariamente se arranjam de forma a direcionar o grupo substituinte dos adutos em direção ao local em que está a cadeia alifática dos AHL. Também foram observadas, em menor grau, interações com Trp84, Met89, Trp111, Met135, Thr140 e Met253. Com relação às interações hidrofóbicas, alguns compostos apresentaram interação com o resíduo de aminoácido Trp111 ou com a porção aromática de Tyr88, como demonstrado por **22**.

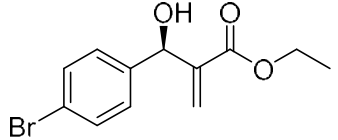
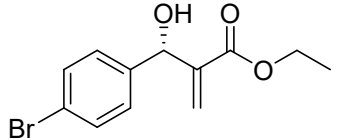
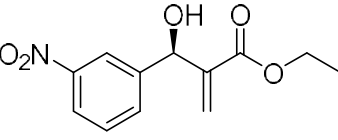
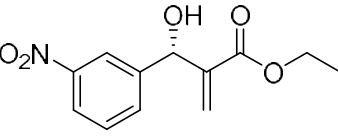
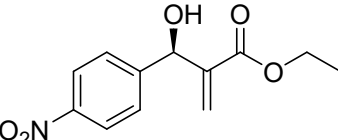
**Tabela 7.** Valores de inibição (%) , afinidade de ligação do ancoramento molecular e LogP para o composto **22** e para os AMBH e seus acetatos.

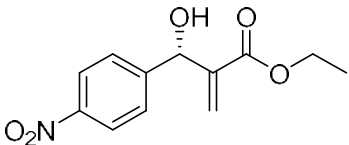
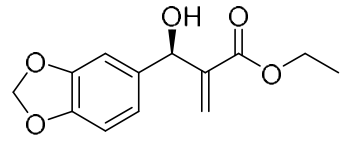
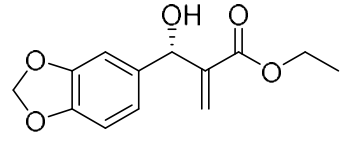
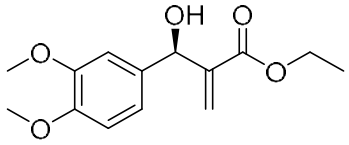
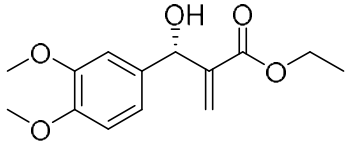
Molécula	Inibição (%) em 1,25 mM	Afinidade da ligação (kcal/mol)	Afinidade Média de ligação média R/S (kcal/mol)	LogP	Interações Hidrofílicas	Interações Hidrofóbicas
 <p><b>22</b></p>	95*	-8,5	-	1,474	Tyr80, Trp84, Tyr88, Met89, Asp97, Trp111, Met135, Thr140, Ser155	Tyr88
 <p><b>(R)-144</b></p>	30	-5,15	-5,20	0,8	Tyr80, Asp97, Ile99, Trp111, Ser155	
 <p><b>(S)-144</b></p>		-5,25			Tyr80, Asp97, Ile99, Trp111	
 <p><b>(R)-145</b></p>	24	-5,55	-5,53	1,323	Tyr80, Tyr88, Asp97, Ser155	

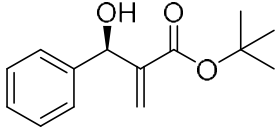
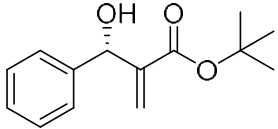
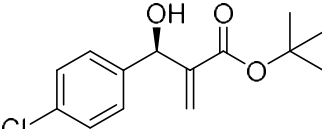
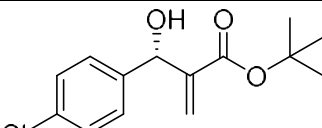
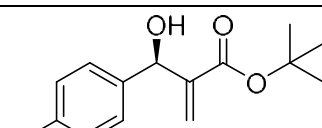
 <b>(S)-145</b>		-5,50			Tyr80, Tyr88, Asp97, Ile99, Trp111, Thr140, Ser155	
 <b>(R)-146</b>	26	-5,80	-5,78	1,688	Tyr80, Asp97, Trp111, Thr140, Ser155	
 <b>(S)-146</b>		-5,75			Tyr80, Tyr88, Asp97, Trp111, Thr140, Ser155	
 <b>(R)-140</b>	35	-6,30	-6,30	3,101	Leu57, Tyr80, Asp97, Trp111, Thr140, Ser155	
 <b>(S)-140</b>		-6,30			Tyr80, Tyr88, Asp97, Leu100, Trp111, Thr140, Ser155	
 <b>(R)-141</b>	17	-6,30	-6,28	3,546	Tyr88, Asp97, Leu100	

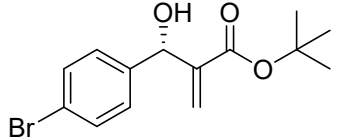
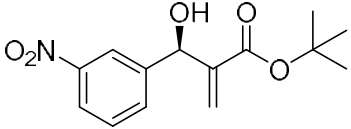
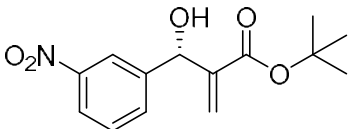
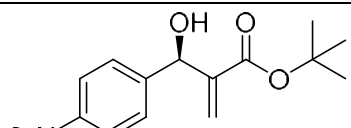
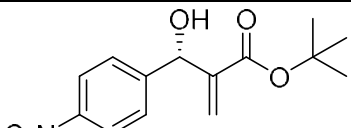


 <b>(S)-141</b>		-6,25			Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97	
 <b>(R)-147</b>	49	-7,5	-7,48	2,168	Tyr80, Tyr88, Asp97, Trp111, Thr140, Ser155	Trp111
 <b>(S)-147</b>		-7,45			Tyr80, Asp97, Trp111, Thr140, Ser155	Trp111
 <b>(R)-148</b>	33	-7,40	-7,43	2,772	Tyr80, Tyr88, Asp97, Trp111, Thr140, Ser155	Tyr88
 <b>(S)-148</b>		-7,45			Tyr80, Tyr88, Asp97, Trp111, Met135, Thr140, Ser155	

 <b>(R)-142</b>	62	-7,40	-7,28	2,937	Tyr80, Tyr88, Asp97, Trp111, Thr140, Ser155	Tyr88
 <b>(S)-142</b>		-7,15			Tyr80, Asp97, Trp111, Thr140, Ser155	
 <b>(R)-143</b>	42	-7,60	-7,53	2,108	Tyr80, Tyr88, Asp97, Trp111, Thr140, Ser155	Tyr88
 <b>(S)-143</b>		-7,45			Tyr80, Tyr88, Met89, Asp97, Ser155, Met253	Tyr88
 <b>(R)-73</b>	40	-7,45	-7,50	2,108	Tyr80, Leu85, Tyr88, Met89, Asp97, Ser155	Tyr88

 <p><b>(S)-73</b></p>		-7,55			Tyr80, Leu85, Tyr88, Met89, Asp97, Ser155	Tyr88
 <p><b>(R)-149</b></p>	36	-7,50	-7,45	1,791	Tyr80, Tyr88, Asp97, Leu100, Trp111, Thr140, Ser155	Tyr88
 <p><b>(S)-149</b></p>		-7,40			Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97, Trp111, Thr140, Ser155	Tyr88
 <p><b>(R)-150</b></p>	40	-7,15	-7,15	1,863	Tyr80, Leu85, Tyr88, Asp97, Trp111, Ser155	Tyr88
 <p><b>(S)-150</b></p>		-7,15			Leu57, Tyr80, Tyr88, Asp97, Ser155	Tyr88

 <b>(R)-151</b>	40	-8,00	-8,00	2,865	Tyr80, Tyr88, Asp97, Trp111, Thr140, Ser155	Trp111
 <b>(S)-151</b>		-8,00			Tyr80, Tyr88, Trp111, Thr140, Ser155	Trp111
 <b>(R)-152</b>	37	-7,70	-7,80	3,469	Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97, Met135, Ser155	Trp111
 <b>(S)-152</b>		-7,90			Tyr80, Trp84, Tyr88, Trp111, Met135, Thr140, Ser155	Trp111
 <b>(R)-153</b>	25	-7,80	-7,60	3,634	Tyr80, Tyr88, Asp97, Ser155	Tyr88

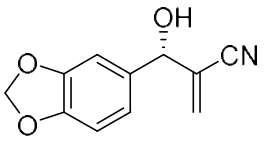
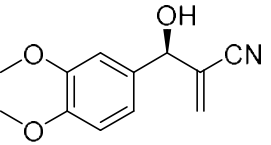
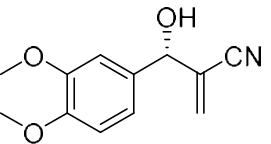
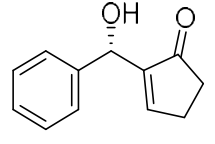
 <p><b>(S)-153</b></p>		-7,40			Tyr80, Asp97, Thr140, Ser155	
 <p><b>(R)-154</b></p>	15	-7,50	-7,55	2,805	Tyr80, Tyr88, Asp97, Trp111, Met135, Thr140, Ser155	Trp111
 <p><b>(S)-154</b></p>		-7,59			Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97	
 <p><b>(R)-155</b></p>	16**	-7,50	-7,50	2,805	Tyr80, Trp84, Asp97, Met135, Ser155	
 <p><b>(S)-155</b></p>		-7,50			Tyr80, Leu85, Trp111, Thr140, Ser155	

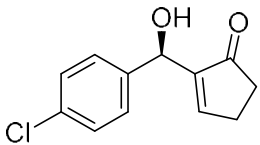
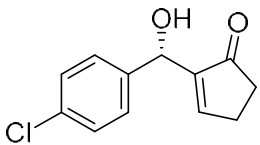
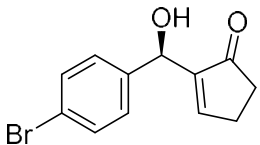
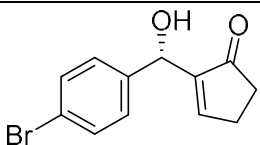
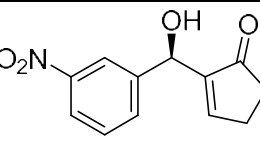
<p><b>(R)-156</b></p>	25	-8,20	-7,90	2,488	Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97, Trp111, Thr140, Ser155	
<p><b>(S)-156</b></p>		-7,60			Tyr80, Asp97, Trp111, Thr140, Ser155	
<p><b>(R)-157</b></p>	14	-6,80	-7,00	2,55	Tyr80, Tyr88, Asp97, Thr140, Ser155	
<p><b>(S)-157</b></p>		-7,20			Tyr80, Tyr88, Asp97, Trp111, Ser155	
<p><b>(R)-159</b></p>	73	-7,40	-7,35	1,657	Leu57, Tyr80, Asp97, Thr140, Ser155	Trp111

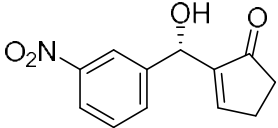
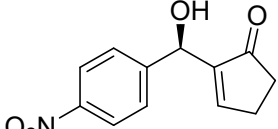
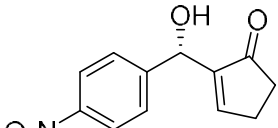
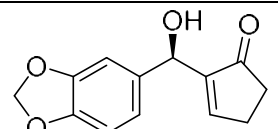
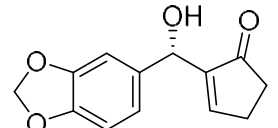
<p><b>(S)-159</b></p>		-7,30			Tyr80, Tyr88, Asp97, Trp111, Thr140, Ser155	Trp111
<p><b>(R)-160</b></p>	93 <sup>‡</sup>	-7,10	-7,10	2,261	Tyr80, Tyr88, Asp97, Trp111, Met135, Thr140, Ser155	Trp111
<p><b>(S)-160</b></p>		-7,10			Tyr80, Tyr88, Asp97, Trp111, Met135, Thr140, Ser155	Trp111
<p><b>(R)-161</b></p>	92 <sup>‡</sup>	-6,90	-6,85	2,425	Tyr80, Tyr88, Asp97, Trp111, Ser155	Tyr88
<p><b>(S)-161</b></p>		-6,80			Tyr80, Tyr88, Asp97, Met135	

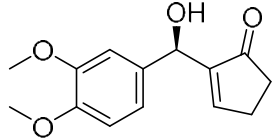
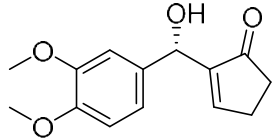
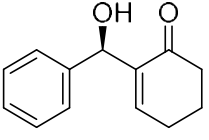
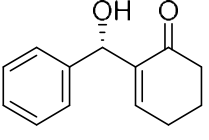
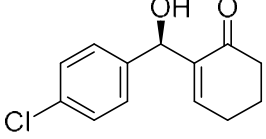
<p><b>(R)-72</b></p>	74	-6,90	-6,90	1,597	Tyr80, Tyr88, Asp97, Trp111, Ser155	Tyr88
<p><b>(S)-72</b></p>		-6,90			Tyr80, Tyr88, Asp97, Met89, Ser155, Met253	Tyr88
<p><b>(R)-68</b></p>	95 <sup>‡</sup>	-7,00	-6,95	1,597	Tyr80, Trp84, Asp97, Met135, Ser155	
<p><b>(S)-68</b></p>		-6,90			Tyr80, Leu85, Tyr88, Met89, Asp97, Trp111, Ser155	Tyr88
<p><b>(R)-162</b></p>	37	-6,90	-6,95	1,28	Tyr80, Tyr88, Asp97, Trp111, Ser155	Tyr88

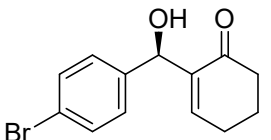
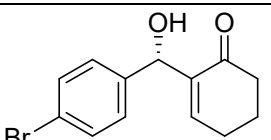
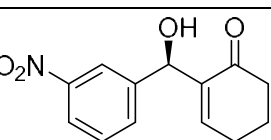
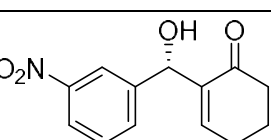


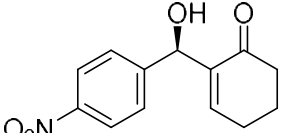
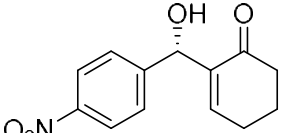
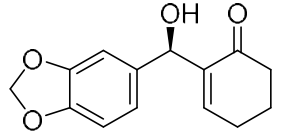
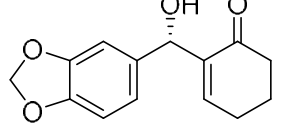
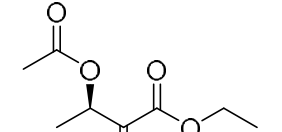
 <b>(S)-162</b>		-7,00			Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97, Trp111	
 <b>(R)-163</b>	67	-6,80	-6,80	1,341	Tyr80, Tyr88, Asp97, Trp111, Ser155	Tyr88
 <b>(S)-163</b>		-6,80			Tyr80, Tyr88, Asp97, Trp111, Thr140, Ser155	Tyr88
 <b>(R)-164</b>	59	-8,30	-7,90	1,94	Tyr80, Trp111, Thr140, Ser155	Trp111
 <b>(S)-164</b>		-7,50			Leu57, Tyr80, Asp97, Trp111, Thr140, Ser 155	Trp111

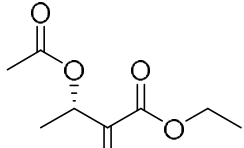
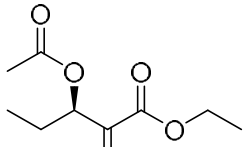
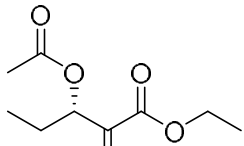
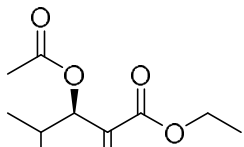
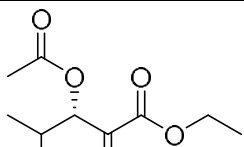
 <b>(R)-165</b>	73	-7,70	-7,50	2,545	Tyr80, Trp84, Trp111, Met135, Thr140, Ser155	Trp111
 <b>(S)-165</b>		-7,30			Tyr80, Tyr88, Asp97, Leu100, Trp111, Met135, Ser155	Trp111
 <b>(R)-166</b>	86	-7,30	-7,30	2,709	Tyr80, Tyr88, Asp97, Met135, Ser155	
 <b>(S)-166</b>		-7,30			Tyr80, Tyr88, Asp97, Trp111	
 <b>(R)-167</b>	79	-7,50	-7,50	1,88	Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97, Trp111, Met135, Thr140, Ser155	Tyr88

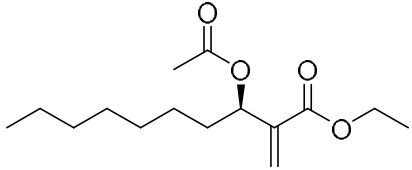
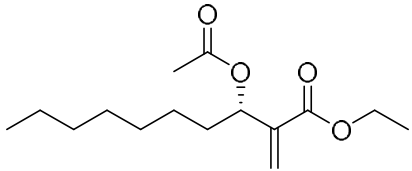
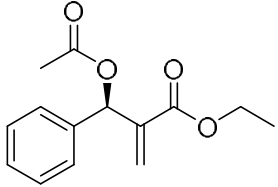
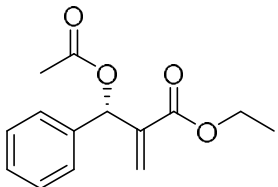
 <b>(S)-167</b>		-7,50			Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97, Met135	
 <b>(R)-168</b>	31	-7,40	-7,45	1,88	Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97, Trp111, Met135, Ser155	
 <b>(S)-168</b>		-7,50			Tyr80, Tyr88, Asp97, Trp111, Met135	
 <b>(R)-169</b>	69	-8,10	-7,90	1,564	Tyr80, Trp84, Asp97, Trp111, Met135, Thr140, Ser155	Trp111
 <b>(S)-169</b>		-7,70			Tyr80, Trp84, Asp97, Ile99, Leu100, Trp111, Met135, Ser155	

 <p><b>(R)-170</b></p>	24	-6,90	-6,90	1,625	Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97, Trp111, Met135, Thr140, Ser155	Tyr88
 <p><b>(S)-170</b></p>		-6,90			Tyr80, Tyr88, Asp97, Trp111, Ser155	Tyr88
 <p><b>(R)-171</b></p>	62	-8,50	-8,20	2,385	Tyr80, Trp111, Thr140, Ser155	Trp111
 <p><b>(S)-171</b></p>		-7,90			Leu57, Tyr80, Asp97, Trp111, Thr140, Ser155	Trp111
 <p><b>(R)-172</b></p>	15	-7,90	-8,10	2,989	Tyr80, Trp84, Trp111, Met135, Thr140, Ser155	Trp111

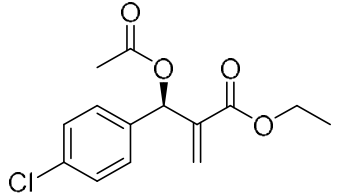
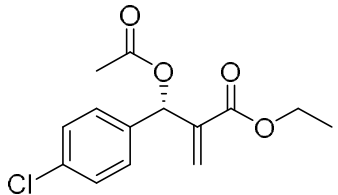
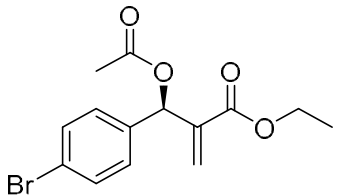
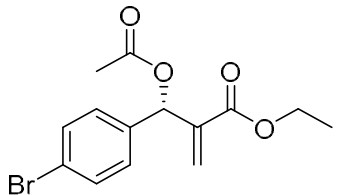
 <b>(S)-172</b>		-8,30			Tyr80, Asp97, Trp111, Thr140, Ser155	Tyr88
 <b>(R)-173</b>	30	-7,80	-7,75	3,154	Tyr80, Tyr88, Asp97, Trp111, Thr140, Ser155	Tyr88
 <b>(S)-173</b>		-7,70			Tyr80, Leu85, Met89, Asp97, Le100, Ser155	Tyr88
 <b>(R)-174</b>	50	-7,70	-7,95	2,325	Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97, Trp111, Met135, Thr140, Ser155	Tyr88
 <b>(S)-174</b>		-8,20			Tyr80, Asp97, Trp111, Ser155	Tyr88

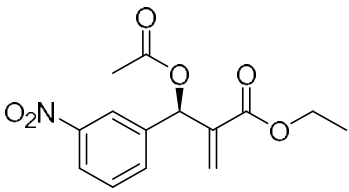
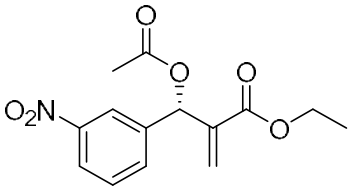
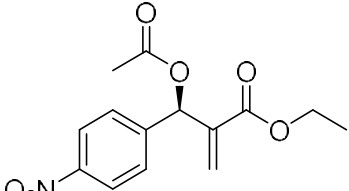
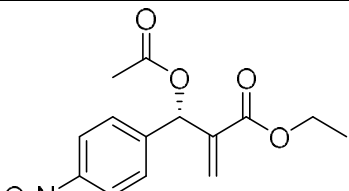
 <p><b>(R)-175</b></p>	59	-7,80	-7,80	2,325	Tyr80, Asp97, Trp111, Ser155	Tyr88
 <p><b>(S)-175</b></p>		-7,80			Tyr80, Trp84, Asp97, Trp111, Met135	
 <p><b>(R)-176</b></p>	68	-7,90	-8,00	2,008	Tyr80, Tyr88, Asp97, Trp111, Thr140, Ser155	Tyr88
 <p><b>(S)-176</b></p>		-8,10			Tyr80, Tyr88, Asp97, Met135, Ser155	
 <p><b>(R)-177</b></p>	0	-5,60	-5,65	1,241	Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97, Met135, Ser155	

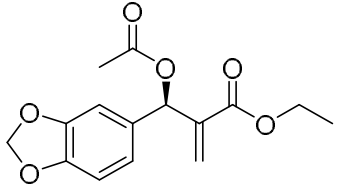
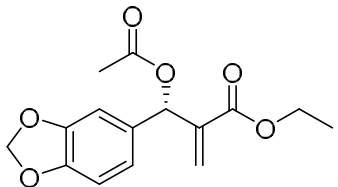
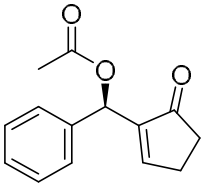
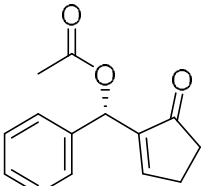
 <p><b>(S)-177</b></p>		-5,70			Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97, Ser155	
 <p><b>(R)-178</b></p>	1**	-5,40	-5,55	1,764	Tyr80, Tyr88, Asp97, Ser155	
 <p><b>(S)-178</b></p>		-5,70			Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97	
 <p><b>(R)-179</b></p>	2**	-5,80	-5,75	2,129	Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97	
 <p><b>(S)-179</b></p>		-5,70			Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97	

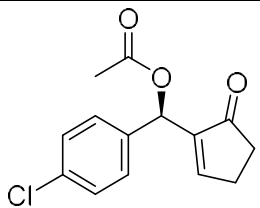
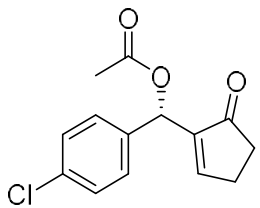
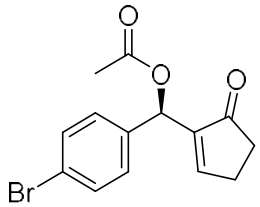
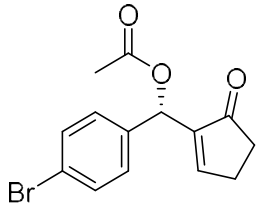
 <p><b>(R)-180</b></p>	1**	-6,10	-6,15	3,987	Tyr80, Tyr88, Asp97, Thr140, Ser155
 <p><b>(S)-180</b></p>		-6,20			Tyr80, Trp84, Ser155
 <p><b>(R)-181</b></p>	2	-6,40	-6,40	2,609	Met89, Met253
 <p><b>(S)-181</b></p>		-6,40			Met89, Val250, Met253

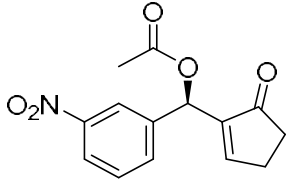
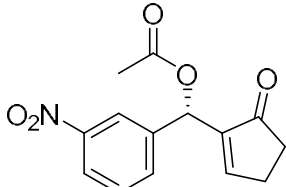
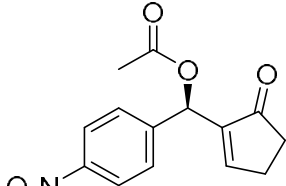
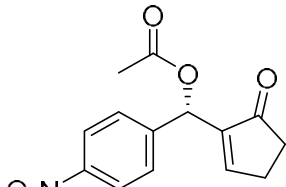


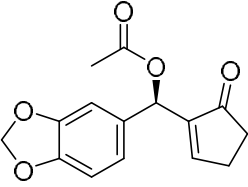
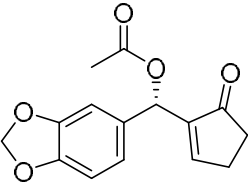
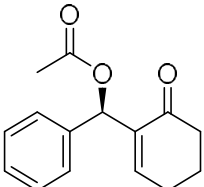
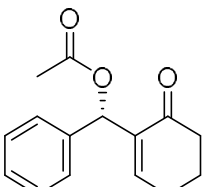
 <p><b>(R)-182</b></p>	10**	-6,60	-6,60	3,213	Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97	
 <p><b>(S)-182</b></p>		-6,60			Leu85, Met89, Val250, Met253	Tyr88
 <p><b>(R)-183</b></p>	2**	-6,80	-6,75	3,378	Tyr80, Tyr88, Asp97, Ser155	Tyr88
 <p><b>(S)-183</b></p>		-6,70			Tyr80, Met89, Val250, Met253	Tyr88

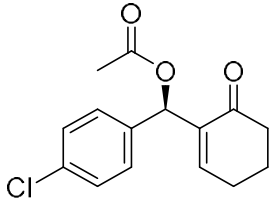
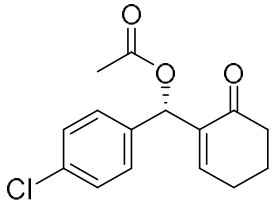
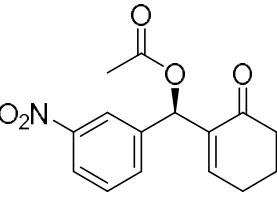
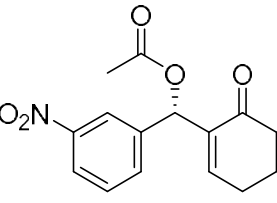
 <p><b>(R)-184</b></p>	2**	-6,70	-6,70	2,549	Tyr80, Leu85, Tyr88, Met89, Ser155	
 <p><b>(S)-184</b></p>		-6,70			Tyr80, Tyr88, Asp97, Ser155, Met253	
 <p><b>(R)-185</b></p>	0	-7,00	-7,00	2,549	Tyr80, Met89, Ser155, Met253	
 <p><b>(S)-185</b></p>		-7,00			Tyr80, Tyr88, Met89, Asp97, Val250, Met253	Tyr88

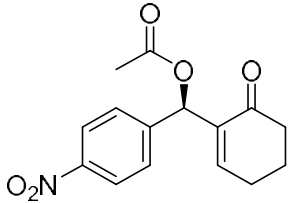
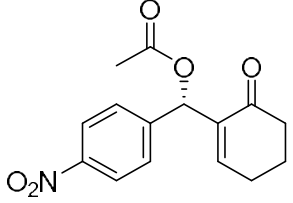
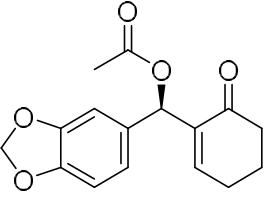
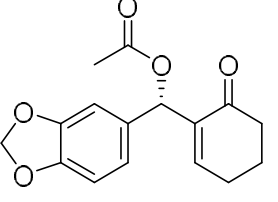
 <p><b>(R)-186</b></p>	0	-7,10	-6,95	2,232	Tyr80, Tyr88, Asp97, Ser155	
 <p><b>(S)-186</b></p>		-6,80			Tyr80, Tyr88, Asp97, Ser155	
 <p><b>(R)-187</b></p>	3**	-7,10	-7,15	2,382	Tyr80, Trp84, Asp97, Ser155	Tyr88
 <p><b>(S)-187</b></p>		-7,20			Tyr88, Met89, Met253	Tyr88

 <b>(R)-188</b>	18	-7,50	-7,45	2,986	Tyr80, Tyr88, Asp97, Ser155, Met253	
 <b>(S)-188</b>		-7,40			Tyr80, Asp97, Trp111, Ser155	Tyr88
 <b>(R)-189</b>	23	-7,50	-7,55	3,15	Tyr80, Asp97, Ser155, Met253	
 <b>(S)-189</b>		-7,60			Tyr80, Trp84, Ty88, Asp97, Met135, Ser155	Tyr88

 <b>(R)-190</b>	5	-7,40	-7,40	2,322	Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97	
 <b>(S)-190</b>		-7,40			Tyr80, Tyr88, Asp97, Trp111, Ser155	Tyr88
 <b>(R)-191</b>	3**	-7,60	-7,60	2,322	Tyr80, Tyr88, Asp97, Ser155, Met253	
 <b>(S)-191</b>		-7,60			Tyr80, Trp84, Tyr88, Met89, Asp97, Met135, Ser155	Tyr88

 <p><b>(R)-192</b></p>	8	-7,90	-7,65	2,005	Tyr80, Tyr88, Asp97, Ser155, Met253	
 <p><b>(S)-192</b></p>		-7,40			Tyr88, Met89, Asp97, Val250, Met253	
 <p><b>(R)-193</b></p>	11	-7,60	-7,50	2,826	Tyr80, Tyr88, Asp97, Ser155	Trp111
 <p><b>(S)-193</b></p>		-7,40			Gln70, Leu72, Ala94, Gln95	

 <b>(R)-194</b>	2**	-7,40	-7,50	3,43	Tyr80, Ser155, Met253
 <b>(S)-194</b>		-7,60			-
 <b>(R)-195</b>	3	-7,00	-7,40	2,766	Tyr88, Met89, Met253
 <b>(S)-195</b>		-7,80			Tyr80, Leu85, Tyr88, Asp97, Ser155

 <b>(R)-196</b>	7	-7,60	-7,60	2,766	Tyr80, Ser155, Met253
 <b>(S)-196</b>		-7,60			Tyr80, Tyr88, Met89, Ala94, Ser155, Met253
 <b>(R)-197</b>	3	-7,60	-7,30	2,449	Tyr80, Tyr88, Asp97, Ser155, Val250, Met253
 <b>(S)-197</b>		-7,00			Asn92

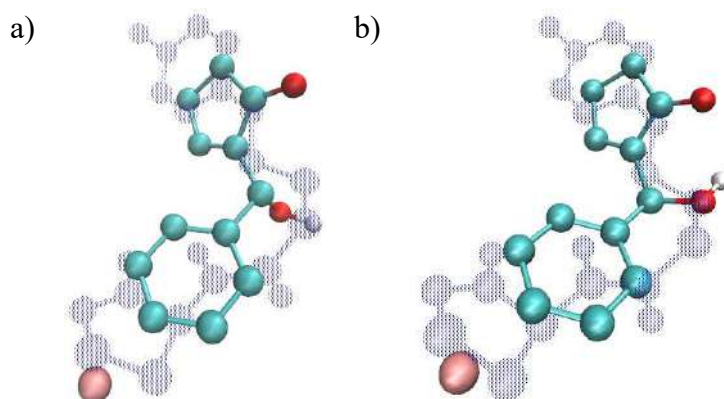
\* Concentração de 32  $\mu$ M.

\*\* Indução de violaceína.



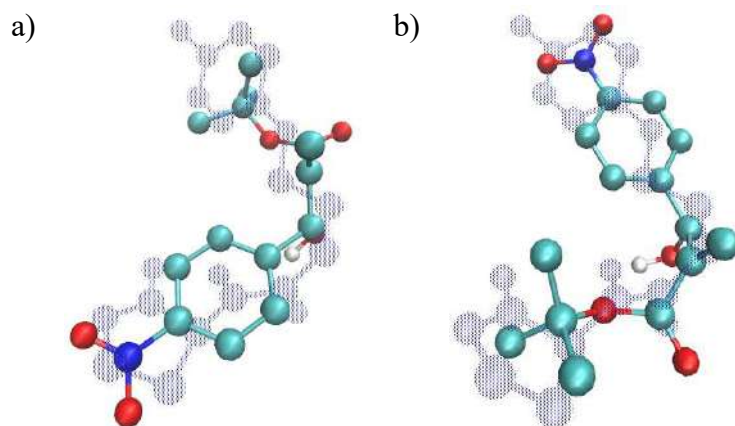
‡ Morte celular.

Dentre todas as moléculas analisadas, **166** foi a que apresentou o melhor resultado de inibição, além disso, tanto o isômero *R* quanto o isômero *S* adotaram conformações bastante parecidas quando ligadas ao LBD. Os dois isômeros dispuseram suas porções aromáticas onde, no complexo CviR:**22**, reside o nitrogênio amídico do ligante. Já a parte ciclopentenona se arranhou, em ambos os casos, onde a fração aromática de **22** se posiciona. Cabe ressaltar que, diferentemente do que se havia pensado, foi a porção polar que se acomodou sobre a região na qual se encontra a cadeia lipofílica dos AHL (Figura 38).



**Figura 38 - a)** Sobreposição de (*R*)-**166** (sólido) e **22** (sombreado); **b)** sobreposição de (*S*)-**166** (sólido) e **22** (sombreado).

A molécula **155** foi a única, dentre todas testadas, que promoveu a indução de violaceína sem a necessidade da presença do autoindutor cognato no experimento. Apesar das diferentes poses adotadas pelos isômeros de **155** no LBD, ambos apresentaram energias de afinidade idênticas (-7,50 kcal/mol), diferindo apenas nas interações hidrofílicas com os resíduos de aminoácidos (Figura 39). O isômero *R* posicionou sua parte aromática sobre a região correspondente ao nitrogênio amídico em **22**, de forma que o grupo nitro se posicionasse onde reside a porção lactona de **22**. O volumoso grupo *tert*-butila se acomodou na região correspondente ao grupo 4-clorofenila do controle positivo de inibição, em direção à Met89. No isômero *S*, houve a inversão do posicionamento observado em *R*, com o grupo *tert*-butila do aduto ocupando a região originalmente ocupada pela lactona de **22** e o grupo nitro acomodando-se onde haveria o grupo 4-clorofenila. Em ambos os isômeros, a hidroxila do aduto se dispôs de forma bastante similar, interagindo com os mesmos resíduos de aminoácidos, Tyr80 e Ser155.



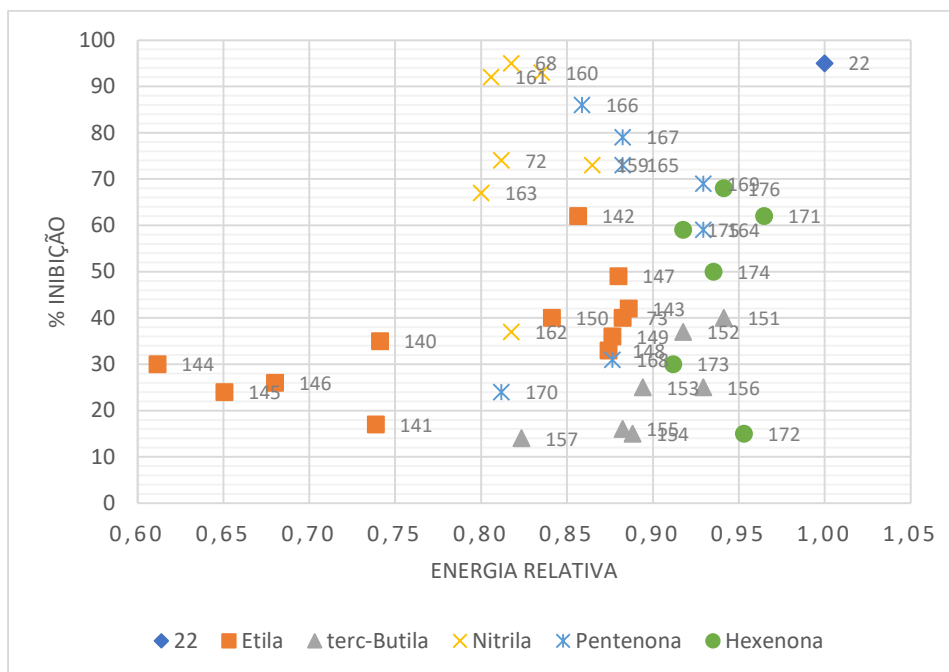
**Figura 39 - a)** Sobreposição de (*R*)-155 (sólido) e 22 (sombreado); **b)** sobreposição de (*S*)-155 (sólido) e 22 (sombreado).

Os dados da Tabela 7 foram utilizados na obtenção de dois 2 gráficos distintos, na busca por tendências que pudessem elucidar as relações entre as estruturas químicas e as diferentes atividades inibitórias nos acervos de adutos avaliados (Figura 40). Aquele apresentado na Figura 40a contém a Inibição % (em 1,25 mM) *versus* a Energia Relativa (kcal/mol) dos complexos CviR:**Aduto** normalizadas com relação à energia do complexo CviR:**22**. A figura 40b contém a Inibição % (em 1,25 mM) *versus* o LogP de cada composto testado. Os gráficos não contêm os dados relativos aos acetatos dos adutos, uma vez que a desativação do grupo doador de ligação de hidrogênio resultou na inativação dos adutos.

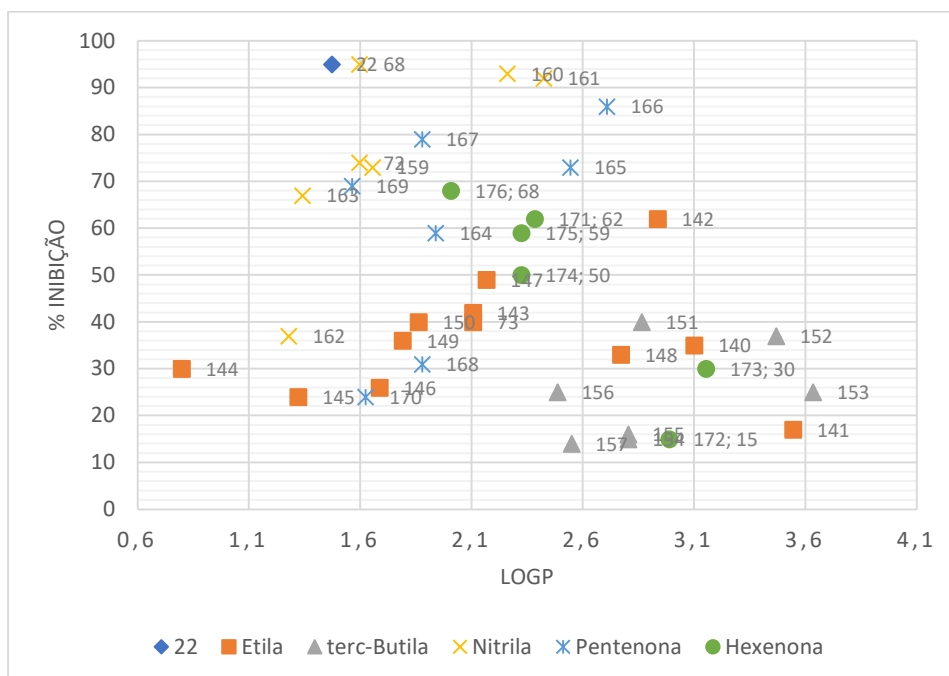
Como reportado anteriormente, os ensaios de inibição dos AMBH apresentaram a seguinte ordem decrescente de reatividade: enonas cíclicas, com os derivados da ciclopentenona apresentando melhores resultados que os da ciclohexenona; acrilonitrila; acrilato de etila e acrilato de *terc*-butila. Excluindo-se desta análise, os resultados apresentados por **68**, **160** e **161**, cujo efeito inibitório foi acompanhado de morte celular, dentre os demais adutos, o melhor resultado foi obtido para o composto **166**, aduto derivado da ciclopentenona e 4-bromobenzaldeído (86% de inibição em 1,25 mM). Entretanto, essa molécula apresenta energia relativa intermediária quando comparada aos demais compostos avaliados. De forma similar, a análise de moléculas que se dispõem mais à direita no gráfico, e de energia relativa mais próxima àquela apresentada pelo inibidor **22**, percebem-se compostos como o aduto **172**, cuja atividade inibitória está entre as mais baixas obtidas. O que se infere desse agrupamento de dados é que a energia relativa obtida pela normalização da afinidade do composto pelo sítio de ligação não corresponde a um bom descritor para a elucidação da atividade inibitória obtida experimentalmente, não sendo possível fazer considerações sobre os compostos dentre um

mesmo subacervo ou comparação entre os subacervos avaliados. Esta observação sugere que experimentos mais acurados de modelagem dos complexos CviR:Aduto precisam ser realizados na tentativa de se observar uma correlação entre Inibição % dos **Adutos** e Energia relativa dos complexos CviR:**Aduto**.

a)



b)



**Figura 40 – a)** Gráfico da porcentagem de inibição pela energia relativa (%) para a molécula **22** e os sub-acervos de adutos oriundos de acrilato de etila, acrilato de *terc*-butila, acrilonitrila e enonas cíclicas (legenda no gráfico); **b)** Gráfico da porcentagem de inibição pelo LogP para

a molécula **22** e os subacervos de adutos oriundos de acrilato de etila, acrilato de *terc*-butila, acrilonitrila e enonas cíclicas (legenda no gráfico).

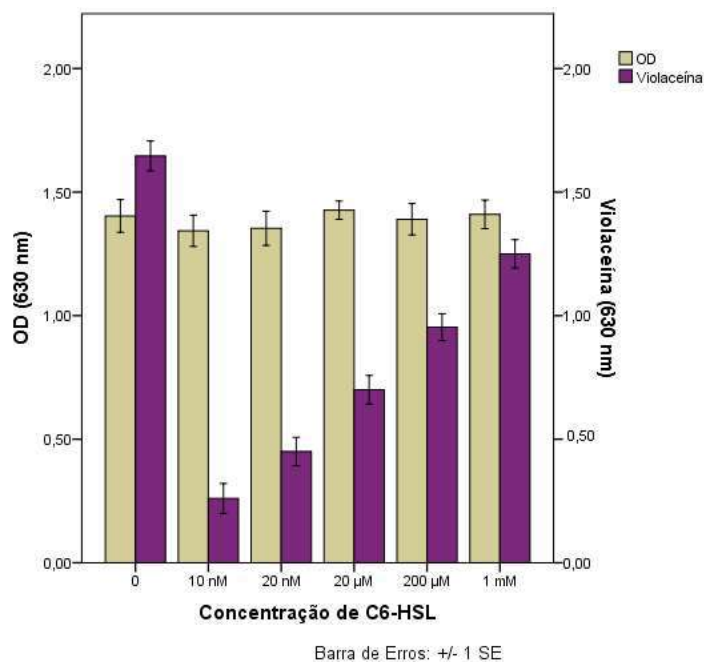
De forma similar, foi realizado o agrupamento dos valores obtidos para a inibição percentual dos adutos em função do seu LogP (Figura 40b). Este é um parâmetro rotineiramente empregado como uma medida da lipofilicidade de um composto bioativo e é associado à sua capacidade de permeação de barreiras celulares.<sup>96</sup> Apesar dos valores calculados para o LogP serem todos obtidos entre 0,8 – 3,6, infelizmente, não foi possível fazer qualquer correlação entre a inibição e a lipoficidade dos AMBH, indicando que assim como a energia relativa, esse também não é o descritor mais adequado para a elucidação da atividade inibitória.

### 3.1.4 Teste de Competição

De posse dos dados de inibição e dos resultados de ancoragem molecular dos AMBH's para CV026, restava identificar por qual mecanismo tal fenômeno ocorria. Existiam duas hipóteses: (1) a interrupção do QS promovida pela competição do sítio de ligação de CviR, ocasionando a repressão do *vioABCDE*, condição que fora reforçada pelos ensaios de ancoragem molecular; ou (2) a inibição da biossíntese da violaceína interferindo diretamente em alguma das enzimas provenientes do *vioABCDE*.

Para a verificação da hipótese da competição pelo sítio de ligação de CviR de CV026 foi realizado um experimento empregando o composto **166**, aduto que apresentou o melhor resultado no teste de inibição (86% em 1,25 mM) e o autoindutor **C6-HSL**. O procedimento ocorre de forma análoga à que foi utilizada para determinação de inibição de violaceína, com a diferença de que a concentração do aduto **166** foi mantida fixa, em 1,25 mM, enquanto diferentes concentrações do autoindutor **C6-HSL** (entre 10 nM – 1 mM) foram acrescentadas ao meio (Figura 41).

O aumento da quantidade de **C6-HSL** no meio provocou a atenuação do efeito inibitório causado por **166**, de tal forma, que o autoindutor foi bem-sucedido em reestabelecer a produção de violaceína em concentrações próximas à desse AMBH. Tal resultado indicou que o composto **166** compete com **C6-HSL** para se ligar ao sítio de CviR, sugerindo que, pela similaridade estrutural e pelos resultados de ancoragem molecular, os AMBH's inibem a biossíntese da violaceína por meio da interferência QS de CV026. Além disso, a ligação dos adutos com o sítio de ligação não ocorre de forma definitiva, indicando que o mecanismo de QS pode ser retomado dependendo da quantidade de autoindutor presente no meio.



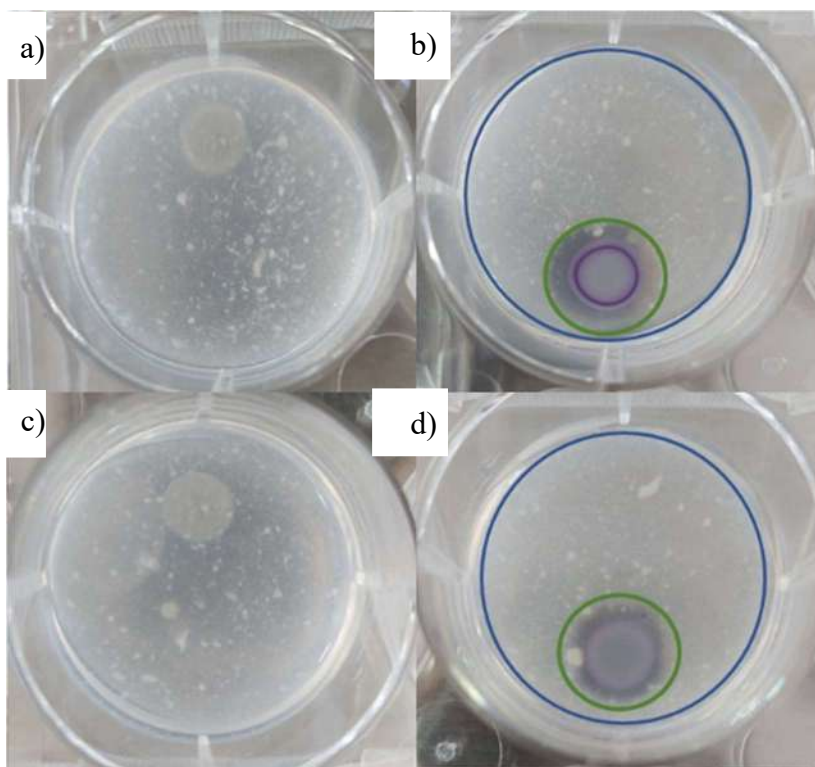
**Figura 41.** Teste de competição entre o composto **166** e o autoindutor **C6-HSL**.

### 3.1.5 Atividade Quitinolítica

Além da biossíntese de violaceína, um número considerável de fenótipos é controlado por QS em *Chromobacterium* spp., dentre eles, a capacidade de hidrolisar quitina.<sup>97</sup> Como os resultados obtidos nos ensaios de ancoragem molecular e competição indicam que os AMBH interferem na ação transcricional de CviR e na expressão de diferentes genes controlados por QS, foi realizado um novo experimento, dessa vez abordando a atividade quitinolítica de CV026, para endossar os resultados anteriores.

O ensaio de inibição do consumo de quitina foi realizado utilizando uma adaptação da metodologia desenvolvida por Chernin e colaboradores.<sup>97</sup> O ensaio Branco foi realizado na ausência de C6-HSL e está apresentado na Figura 42a, na qual não se observou o halo de atividade quitinolítica e nem a formação do pigmento violeta. O ensaio Teste (Figura 42b) foi realizado com a adição do autoindutor **C6-HSL** ao inóculo bacteriano. Nele pode-se observar um resultado tipicamente positivo de ativação simultânea desses fenótipos, obtido pela ação do autoindutor. O inibidor **22** foi utilizado como controle positivo de inibição e o resultado de seu ensaio na presença do autoindutor **C6-HSL** pode ser observado na Figura 42c, no qual não há coloração violeta (síntese de violaceína) nem observação do halo relativo ao consumo de quitina, semelhante ao observado no ensaio Branco. O aduto **166**, aquele que apresentou o melhor resultado no teste de inibição da síntese de violaceína, foi avaliado em um ensaio com

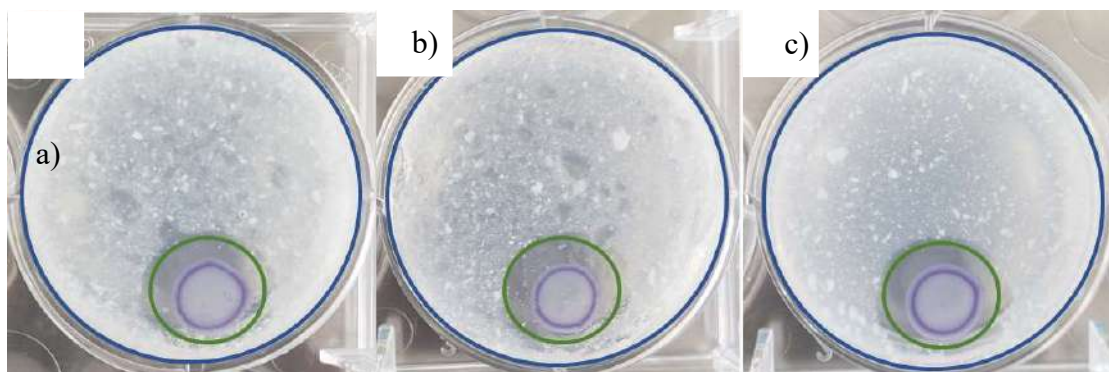
a presença do autoindutor **C6-HSL** (Figura 42d), no qual foi observada a diminuição da produção de violaceína, pela diminuição da intensidade da coloração roxa, e a diminuição do halo de consumo de quitina. Trata-se de um resultado discreto, quando comparado ao observado para a ação do inibidor **22**, contudo, confirma que o aduto **166** inibe ambos fenótipos em CV026, o que está em linha com um mecanismo de modulação desses fenótipos em nível transcricional, atuando competitivamente na CviR de CV026.



**Figura 42.** Avaliação da atividade modulatória do aduto **166** frente a atividade quitinolítica e biossíntese de violaceína de CV026: **a)** Ensaio Branco = CV026 na ausência do autoindutor; **b)** Ensaio Teste = CV026 na presença do autoindutor; **c)** Controle positivo de inibição = CV026 na presença do autoindutor e do controle positivo de inibição **22**; **d)** Ensaio de avaliação da atividade inibitória do aduto **166** = CV026 na presença do autoindutor e do aduto **166**;

O aduto que apresentou indução da síntese de violaceína, **155**, também foi avaliado por meio desses ensaios (Figura 43). No entanto foram realizados dois testes, um na ausência e outro na presença do autoindutor. No ensaio com ausência de C6-HSL se observou a síntese de violaceína e o consumo de quitina de forma similar ao observado para o controle positivo (Figura 43b), ação esperada para um indutor de fenótipos do QS de CV026. No entanto, na presença do autoindutor **C6-HSL** não se observou a diminuição na produção de violaceína e

nem na atividade quitinolítica (Figura 43c), possivelmente em virtude da pequena capacidade modulatória da mistura **155** + **C6-HSL** na expressão do *vioABCDE* promovida por CviR. Tal fato encontra-se alinhado ao que foi discutido com base nos resultados relativos ao experimento relacionado à Figura 31, e com o que foi reportado por Hughson e colaboradores quando havia a mistura C6-HSL e C8-HSL.<sup>92</sup>



**Figura 43** – Avaliação da atividade modulatória do aduto **155** frente a atividade quitinolítica e biossíntese de violaceína de CV026: **a)** Ensaio Teste = CV026 na presença do autoindutor; **b)** Ensaio com a ação isolada do aduto **155** como ativador da atividade quitinolítica e biossíntese de violaceína de CV026; **c)** ensaio contendo o aduto **155** e o autoindutor C6-HSL.

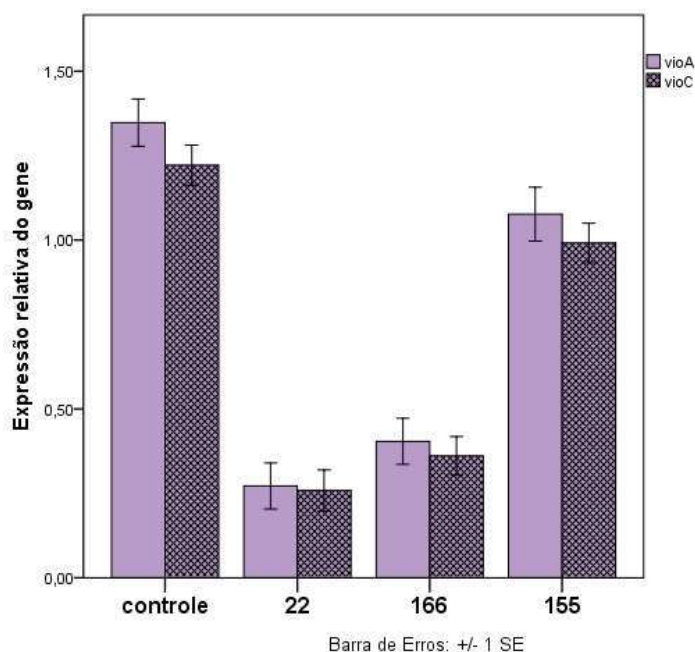
### 3.1.6 RT-qPCR

Os ensaios realizados até o momento direcionam para uma interferência em nível transcricional do QS em CV026. Em outras palavras, os AMBH devem conduzir CviR a uma mudança conformacional, tornando-a parcialmente incapaz de interagir com o DNA para ativar a transcrição gênica, salvo pela molécula **155**, que foi capaz de promover a indução. Para confirmar que de fato há a modulação na transcrição do operon *vioABCDE*, foi realizado o ensaio de RT-qPCR na presença dos compostos **166** e **155**, responsáveis, respectivamente, pelo melhor resultado de inibição e indução, sondando-se os *loci* *vioA* e *vioC* (Figura 44).

Uma vez mais, o composto **22** foi utilizado como controle positivo de inibição do QS de CV026, o qual apresentou redução de 80% e 78% para a transcrição de *vioA* e *vioC*, respectivamente. A molécula **166** apresentou efeito inibitório similar na transcrição do *vioABCDE*, com inibição de 70% e 71% para a transcrição *vioA* e *vioC*, respectivamente. Por fim, endossando o efeito indutivo observado, o composto **155** exibiu transcrição do *vioABCDE* análoga àquela apresentada pela ação do autoindutor **C6-HSL**, promovendo a transcrição de *vioA* em 80% e de *vioC* em 75%. Esses resultados nos permitiram concluir que esses AMBH



agem como moduladores de fenótipos controlados por QS em CV026 em nível transcricional por um mecanismo de competição com o autoindutor no fator de transcrição CviR.



**Figura 44.** Gráfico das transcrições relativas dos genes *vioA* e *vioC* sem QSI e nas presenças das moléculas **22** (30  $\mu$ M), **166** e **155** (1,25 mM).

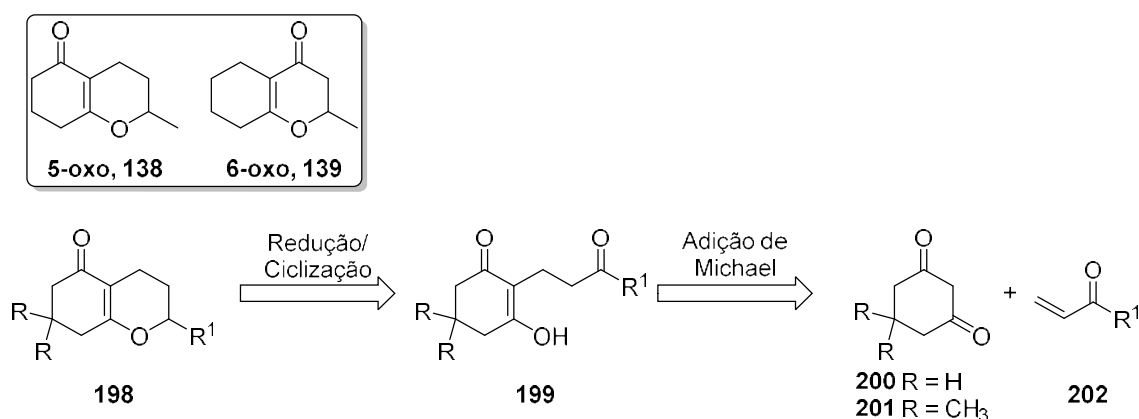
## 3.2 Hexahidrocromenonas

### 3.2.1 Lactonas vinílogas análogas a 5-oxo

Como citado previamente, a hexahidrocromenona 6-oxo (**139**) foi relatada por nosso grupo de pesquisas como um novo inibidor da expressão de fenótipos do QS em *V. harveyi*. e em *C. subtsugae* CV026.<sup>83,84</sup> Em ambos os casos, 6-oxo atua competindo com autoindutores do tipo AHL (QS do tipo 1). A lactona viníloga isomérica 5-oxo (**138**) também inibe o fenótipo do QS em *V. harveyi* pela competição com AHL, sugerindo que esta substância também teria a capacidade de modular a expressão de fenótipos do QS em *C. subtsugae* CV026,<sup>83</sup> o que motivou os trabalhos que estão relatados nesta seção.

Outra motivação para o estudo de hexahidrocromenonas e substâncias análogas como moduladores da expressão de fenótipos do QS em *C. subtsugae* CV026 é a flexibilidade sintética da rota de síntese utilizada para a preparação de 5-oxo.<sup>98</sup> Ela está baseada em uma sequência com três reações (Esquema 17): adição de Michael entre uma  $\beta$ -dicetona e uma enona, seguida da redução quimiosseletiva da cetona não conjugada, que rende um álcool que

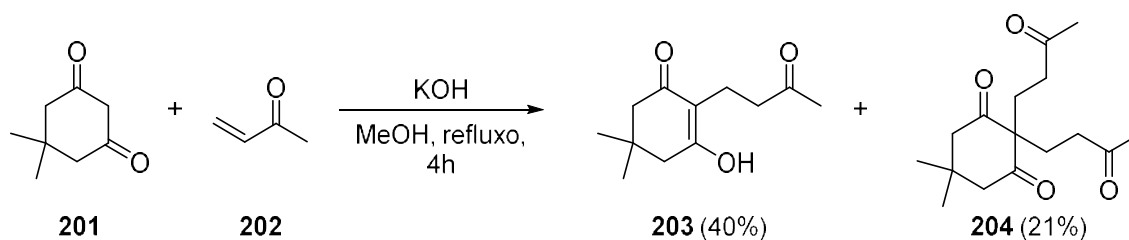
prontamente participa de uma reação de ciclização, quando colocado em meio ácido. A utilização de diferentes  $\beta$ -dicetonas e aceptores de Michael tem o potencial de fornecer diferentes análogos da 5-oxo por meio da variação dos substituintes ligados ao centro quiral (Esquema 17). Esta abordagem é desejável neste tipo de trabalho, pois possibilita a obtenção de um acervo de compostos estruturalmente diversificados capaz de permitir um maior conhecimento das relações entre as características estruturais dos análogos de 5-oxo e sua ação no sistema QS bacteriano a ser estudado, o que nos permitiria a otimização do efeito inibidor desejado.



**Esquema 17.** Análise retrossintética das moléculas análogas à lactona viníloga 5-oxo.<sup>98</sup>

A 5,5-dimetilcicloexano-1,3-diona **201**, comumente denominada como dimedona, foi inicialmente utilizada como  $\beta$ -dicetona em todas as reações teste realizadas nesta tese, no lugar da cicloexano-1,3-diona **200**, pois apresentava-se em maior quantidade em nosso laboratório. Além dessa razão, a preparação de análogos da 5-oxo com a dimedona permite verificar a influência das duas metilas ligadas ao carbono quaternário presentes no carbono  $\beta$ -carbonílico na inibição da expressão de fenótipos do QS de CV026.

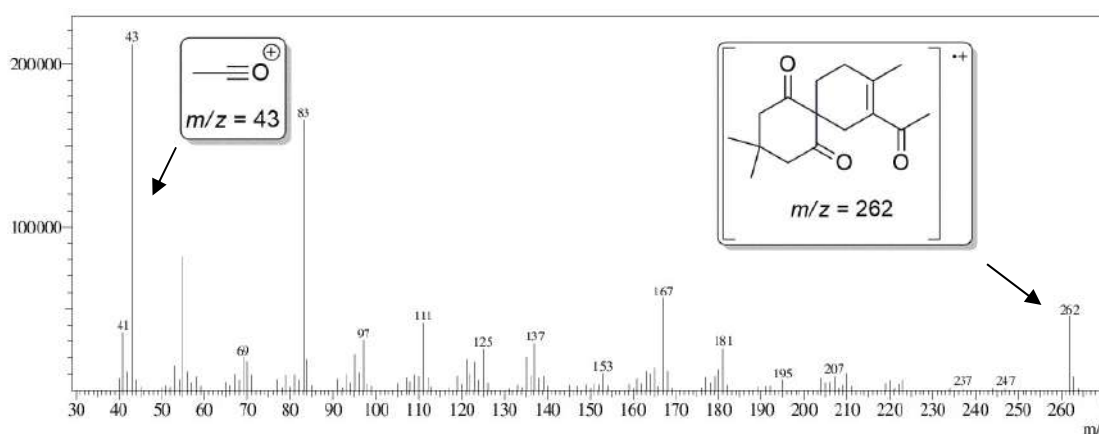
Tendo o trabalho de Mahajan e Silva como base,<sup>98</sup> a primeira etapa reacional foi a formação da ligação C—C por meio da adição 1,4 de Michael, realizada entre a dimedona **201** e a metil vinil cetona **202** na presença de hidróxido de potássio (KOH) sob refluxo de metanol. Como resultado, foram obtidas, após otimização, as moléculas **203** e **204**, sendo que o produto monoalquilado **203** foi obtido com rendimento de 40% (Esquema 18).



**Esquema 18.** Esquema de adição 1,4 entre a dimedona **201** e a metil vinil cetona **201**.

Diversas tentativas foram realizadas com o intuito de diminuir a proporção do produto de dialquilação nessa reação. Em todos os ensaios, além da formação dos produtos **203** e **204**, não foi observada a conversão total da dimedona **201**. Também foi observado que o aumento de tempo reacional ou aumento de temperatura (acima de 65 °C) acarretava no aumento do produto de dialquilação **204**. Essas observações sugerem que, nesta condição de reação, ambas as reações de alquilação (formação de **203** e formação de **204**) têm velocidades muito próximas, o que dificulta a exclusiva obtenção de **203**.

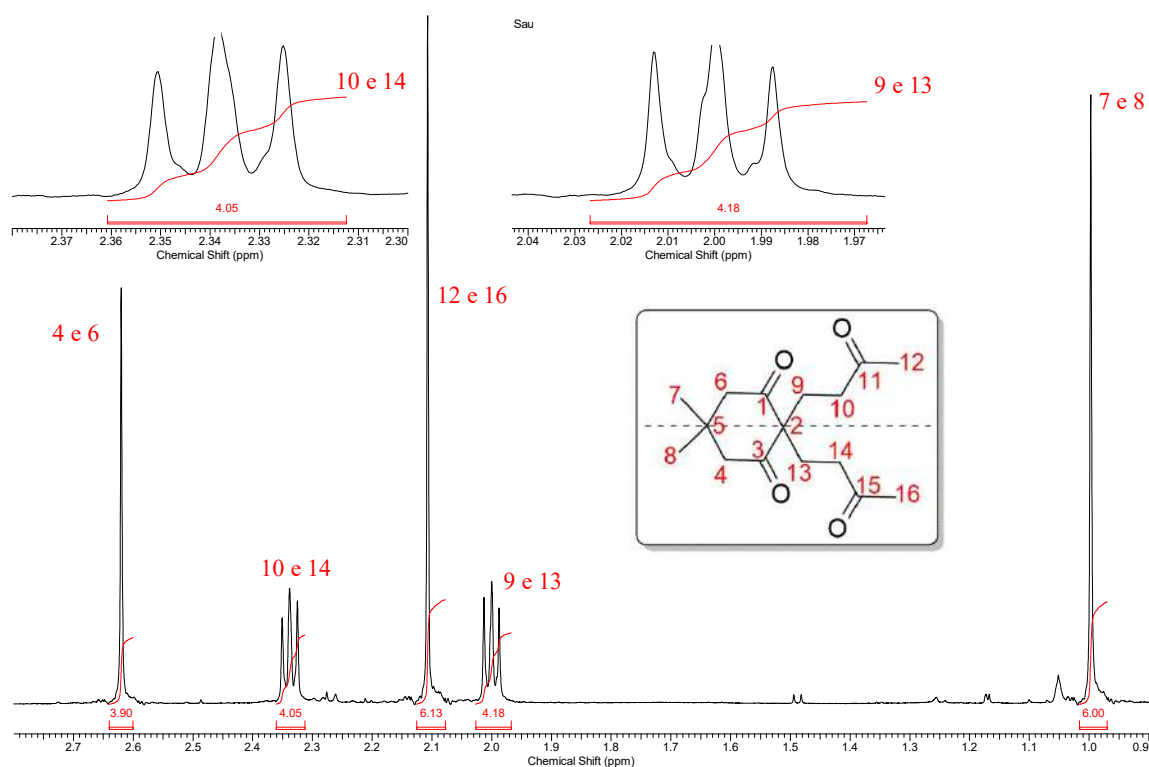
As moléculas **203** e **204** foram caracterizadas por espectrometria de massas e RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e HMQC (esta última apenas para **204**). O espectro de massas da molécula **204** apresentou o pico base com  $m/z$  43 (100,0 %), referente à formação do íon acílio; o íon molecular teórico (280, referente à  $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_4$ ) não foi detectado, possivelmente em virtude da elevada energia de ionização empregada na técnica de impacto por elétrons. Entretanto, foi possível detectar o íon com razão  $m/z$  262 (21,3 %) referente à eliminação de água ( $M - 18$ ), possivelmente, indicando a formação de um produto de anelação de condensação aldólica da molécula **204** (Figura 45).



**Figura 45.** Espectro de Massa por IE da molécula **204**.

Em virtude da simetria presente na estrutura da molécula **204**, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  apresenta apenas cinco sinais (Figura 46). O primeiro sinal observado (H4 e H6) em 2,62

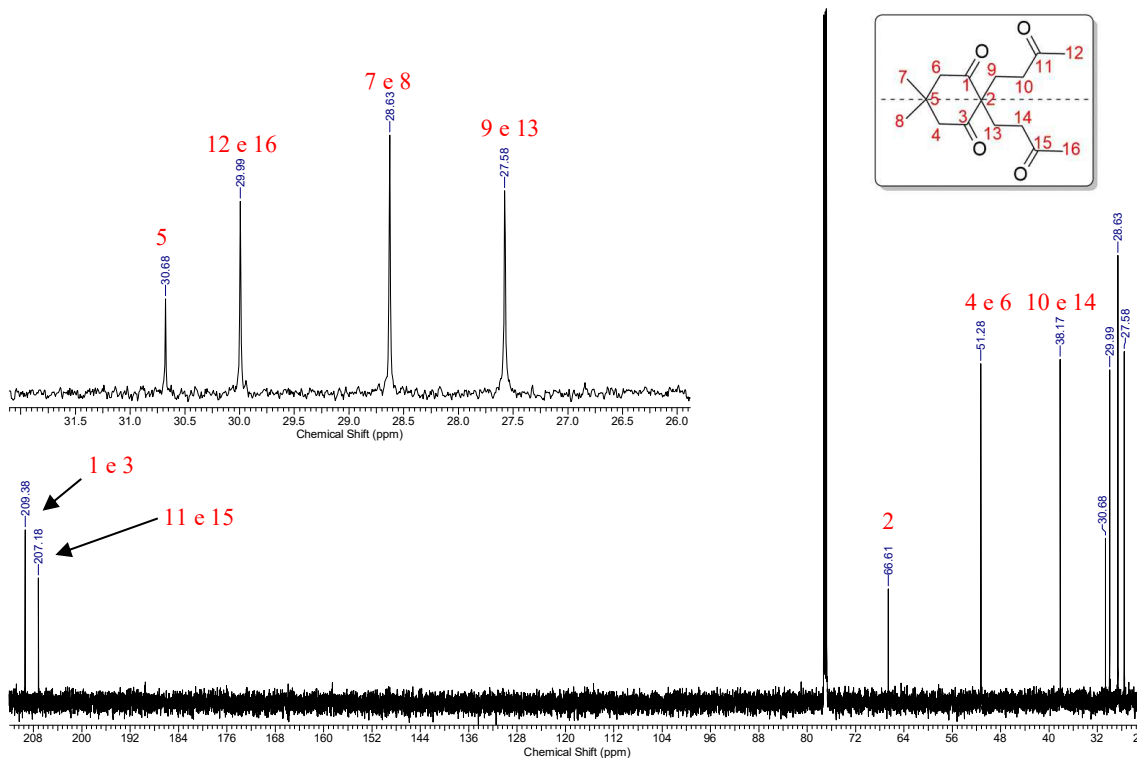
ppm, apresentando-se como um simpleto com quatro hidrogênios de integração, atribuído aos dois metilenos  $\alpha$ -carbonílicos oriundos da dimedona. O segundo sinal (H10 e H14) observado apresenta-se como um multipeto entre 2,36 – 2,31 ppm, com quatro hidrogênios de integração, atribuído aos dois metilenos  $\alpha$ -carbonílicos oriundos da metil vinil cetona. O terceiro sinal (H12 e H16), com seis hidrogênios de integração, é um simpleto em 2,11 ppm atribuído às duas metilas  $\alpha$  carbonílicas oriundas da metil vinil cetona. O quarto sinal (H9 e H13) apresenta-se de forma análoga ao segundo sinal (H10 e H14), um multipeto entre 2,03 – 1,97 ppm com quatro hidrogênios de integração, atribuído aos hidrogênios dos dois metilenos  $\beta$ -carbonílicos. O quinto e último sinal (H7 e H8) apresenta-se como um simpleto em 1,00 ppm, integrando para seis hidrogênios, atribuído às duas metilas da dimedona.



**Figura 46.** Ampliação do RMN de  $^1\text{H}$  da molécula **204**.

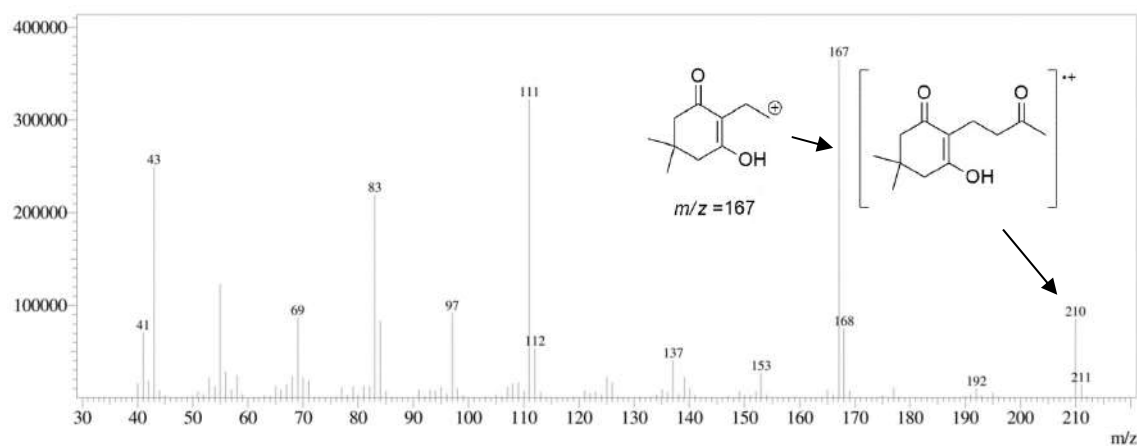
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  evidenciou nove sinais para a molécula **204** (Figura 47). A atribuição dos sinais de  $^{13}\text{C}$  foi realizada em conjunto com os dados obtidos por HMQC. Os dois primeiros sinais (C1 e C3) e (C11 e C15) referem-se às carbonilas provenientes da dimedona e da metil vinil cetona, respectivamente em 209,4 e 207,2 ppm. O terceiro sinal (C2) em 66,6 ppm refere-se ao carbono quaternário ao qual se ligam as duas carbonilas provenientes da dimedona. Os sinais em 51,3 e 38,2 ppm são referentes aos carbonos metilênicos (C4 e C6) e (C10 e C14), respectivamente. O sinal em 30,7 ppm refere-se ao carbono quaternário (C5)  $\beta$ -

carbonílico proveniente da dimedona, no qual estão ligadas as metilas. Os sinais em 30,0 e 28,6 ppm são referentes às metilas (C12 e C16) e (C7 e C8), respectivamente; e o sinal em 27,6 foi atribuído aos carbonos (C9 e C13)  $\beta$ -carbonílicos provenientes da metil vinil cetona.



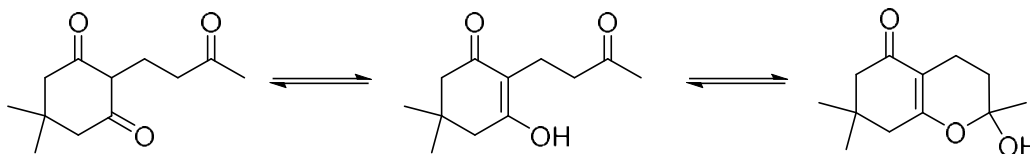
**Figura 47.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da molécula **204**.

O espectro de massa da molécula **203** apresentou o pico base, com  $m/z$  167 (100 %), formado a partir da perda de um radical acila, e o íon molecular, com  $m/z$  210 (23,9 %) (Figura 48). A massa exata do aduto  $[\text{M}+1]^+$  foi confirmada por meio de EMAR com variação de 2,0 ppm entre a massa teórica,  $(\text{M} + 1)$  211,1329 u.m.a., e a massa obtida  $(\text{M} + 1)$  211,1333 u.m.a..



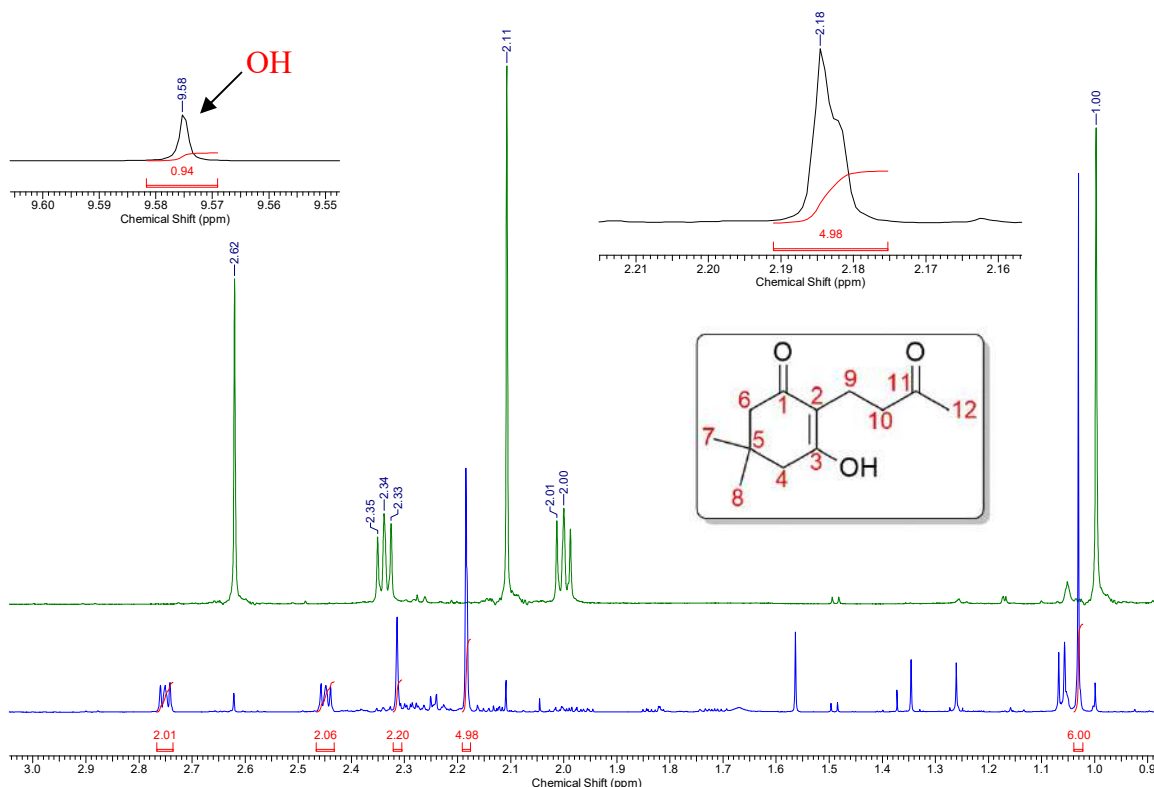
**Figura 48.** Espectro de Massa por IE de **203**.

Diferentemente de **204**, o composto **203** está presente no meio reacional em mais de uma forma devido ao tautomerismo apresentado pela parte  $\beta$ -dicetônica da estrutura. Dessa forma, três possíveis estruturas podem ser observadas espectroscopicamente: a forma 1,3-dicarbonílica, a forma enólica e a forma hemicetal; esta, referente à adição nucleofílica da hidroxila da forma enólica à cetona proveniente da metil vinil cetona (Figura 49).



**Esquema 19.** Estruturas em equilíbrio da molécula **203**: 1,3-dicarbonílica, enólica e hemicetal.

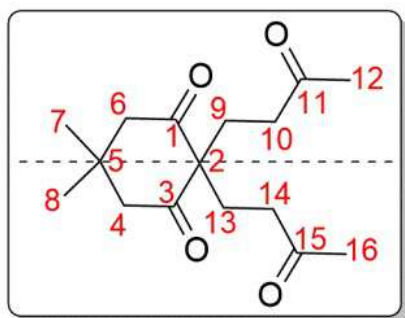
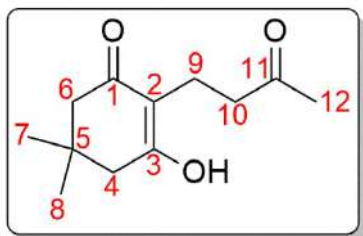
Em virtude da possibilidade da molécula se apresentar em mais de uma forma tautomérica, os dados espectroscópicos obtidos nem sempre são facilmente interpretados. Entretanto, com o auxílio dos dados espectrais do produto de dialquilação **204**, algumas considerações podem ser feitas nos espectros de ressonância da substância **203**, tendo em vista que os deslocamentos químicos referentes à forma 1,3-dicarbonílica do produto monoalquilado seriam semelhantes aos apresentados pela estrutura simétrica do produto dialquilado. A sobreposição dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dessas duas substâncias permitiu observar alguns sinais referentes à estrutura 1,3-dicarbonílica no produto de monoalquilação como os simples em 2,11 e 1,00 ppm atribuídos, respectivamente, às metilas provenientes da dimedona e metil vinil cetona; e o simpleto em 2,62 ppm que foi atribuído aos metilenos  $\alpha$ -carbonílicos provenientes da dimedona (Figura 50). A observação do simpleto em 9,58 ppm integrando para um hidrogênio, referente à hidroxila da forma enólica, é uma evidência da formação do produto **203**.



**Figura 50.** Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **203** em azul com sobreposição do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **204** em verde.

A presença da ligação dupla entre os carbonos C2 e C3, e consequente quebra de simetria em relação à estrutura 1,3-dicarbonílica, pode ser percebida por toda a molécula, por meio de variações nos valores dos deslocamentos químicos. A Tabela 8 permite comparar os valores dos deslocamentos químicos, multiplicidade e número de hidrogênios observados para as moléculas **203** e **204**. Foi possível perceber a diferenciação dos hidrogênios H4 e H6 em **203**, em comparação com a estrutura 1,3-dicarbonílica de **204**, sendo que H6 variou cerca de 0,3 ppm para campo mais alto, e H4 variou cerca de 0,45 ppm, também para campo mais alto, e sobrepondo-se aos hidrogênios H12 pertencentes à metila  $\alpha$ -carbonílica proveniente da metil vinil cetona (Figura 50). Os hidrogênios metilênicos H9 e H10 foram deslocados para campo mais baixo, 2,47 – 2,43 ppm e 2,77 - 2,74 ppm respectivamente. Isso provavelmente se deve ao fato do carbono C2, de hibridização  $sp^2$ , da forma enólica, dispor a ligação C2–C9 no mesmo plano das ligações C1–C2 e C2–C3, o que acarretaria um maior alinhamento da cadeia derivada da metil vinil cetona com o cone de desblindagem proveniente do efeito de anisotropia diamagnética do sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado, comparado com aquele apresentado pelo sistema 1,3-dicarbonílico.

**Tabela 8.** Deslocamentos químicos, multiplicidade e nº de hidrogênios das moléculas **203** e **204**.



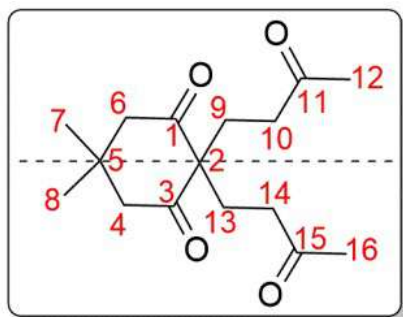
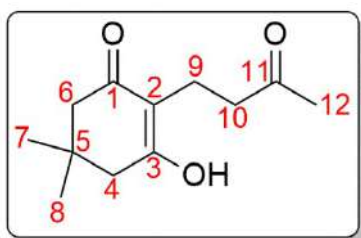
	<b>203</b>	<b>204</b>
<b>Posição</b>	<b>δ (ppm), nº de H, m</b>	<b>δ (ppm), nº de H, m</b>
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	2,18 (5H, s)	2,62 (4H, s)
5	-	-
6	2,32 (2H, s)	2,62 (4H, s)
7	1,03 (s, 6H)	1,00 (6H, s)
8	1,03 (s, 6H)	1,00 (6H, s)
9	2,47 – 2,43 (2H, m)	2,04 – 1,96 (4H, m)
10	2,77 – 2,74 (2H, m)	2,38 - 2,30 (4H, m)
11	-	-
12	2,18 (5H, s)	2,11 (6H, s)
<b>OH</b>	9,58 (1H, s)	
13		2,04 – 1,96 (4H, m)
14		2,38 - 2,30 (4H, m)
15		-
16		2,11 (6H, s)

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da molécula **203**, bem como o espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , apresentam sinais dos três possíveis tautômeros do composto monoalquilado. Dessa forma, procedendo-se como no caso anterior, comparando-se os sinais referentes à estrutura dialquilada com aqueles apresentados pela forma 1,3-dicarbonílica - como forma de facilitar a interpretação do espectro, e considerando os sinais mais pronunciados como sendo os referentes à forma majoritária, nesse caso, a enólica, os dados obtidos para a substância **203** foram agrupados e comparados com os de **204** na Tabela 9. Podem ser notadas variações no



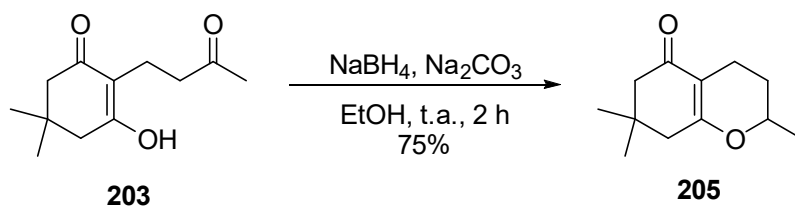
deslocamento químico de alguns carbonos em virtude da presença do sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado em comparação com a estrutura 1,3-dicarbonílica. Dentre essas mudanças está a variação em mais de 7 ppm para campo mais alto do carbono C11, referente à carbonila proveniente da metil vinil cetona, provavelmente, também influenciada pelo campo de desblindagem proveniente da anisotropia diamagnética do sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado. Uma outra possível explicação para esse fenômeno seria a doação de densidade eletrônica pelo orbital  $\pi$  da ligação dupla C2=C3 existente na forma enólica, para o orbital antiligante da carbonila C11, desblindando essa carbonila em comparação com sua estrutura 1,3-dicarbonilada.

**Tabela 9.** Deslocamentos químicos relativos ao  $^{13}\text{C}$  das substâncias **203** e **204**.



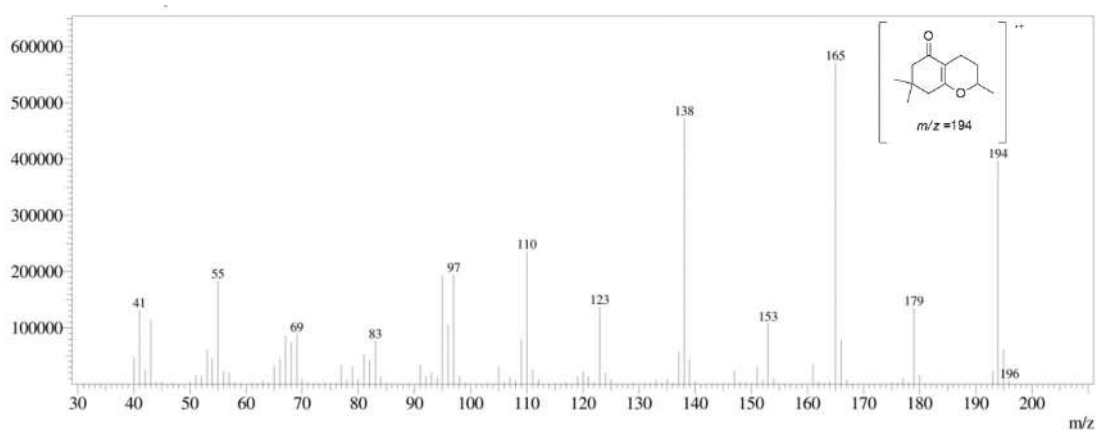
Posição	203	204
	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
1	198,4	209,4
2	113,5	66,6
3	171,6	209,4
4	42,8	51,3
5	31,4	30,7
6	50,5	51,3
7	28,3	28,6
8	28,3	28,6
9	15,1	27,6
10	43,6	38,2
11	214,7	207,2
12	29,6	30,0
13	-	27,6
14		38,2
15		207,2
16		30,0

De posse da molécula **203** deu-se prosseguimento à sequência reacional para a formação da lactona vinílica análoga 5-oxo. Seguindo-se o procedimento de Mahajan e Silva,<sup>98</sup> o produto de monoalquilação foi reduzido empregando-se  $\text{NaBH}_4$  na presença de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  em etanol à temperatura ambiente por duas horas, formando a lactona vinílica **205** com 75 % de rendimento (Esquema 20).



**Esquema 20.** Formação da lactona viníloga **205**.<sup>98</sup>

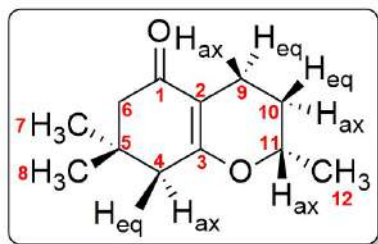
A molécula **205** foi caracterizada pelas técnicas de espectrometria de massas e RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e técnicas bidimensionais (COSY e HMQC). O espectro de massa da molécula **205** apresentou como pico base em  $m/z$  165 (100 %) e o íon molecular em  $m/z$  194 (70 %) (Figura 51). A massa exata do aduto  $[\text{M}+1]^+$  foi confirmada por meio de EMAR com variação de 1,0 ppm entre a massa teórica,  $(\text{M} + 1)$  195,1385 u.m.a., e a massa obtida,  $(\text{M} + 1)$  195,1383 u.m.a..



**Figura 51.** Espectro de Massa por IE de **205**.

Os dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e COSY da substância **205** foram agrupados na Tabela 10. O surgimento do duplo quarteto de dupletos em 4,07 ppm no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e o sinal em 73,9 ppm no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , posição 11, é uma forte evidência da formação do tetrahidropirano da estrutura da lactona viníloga **205**.<sup>99</sup>

**Tabela 10.** Dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e COSY de **205**.



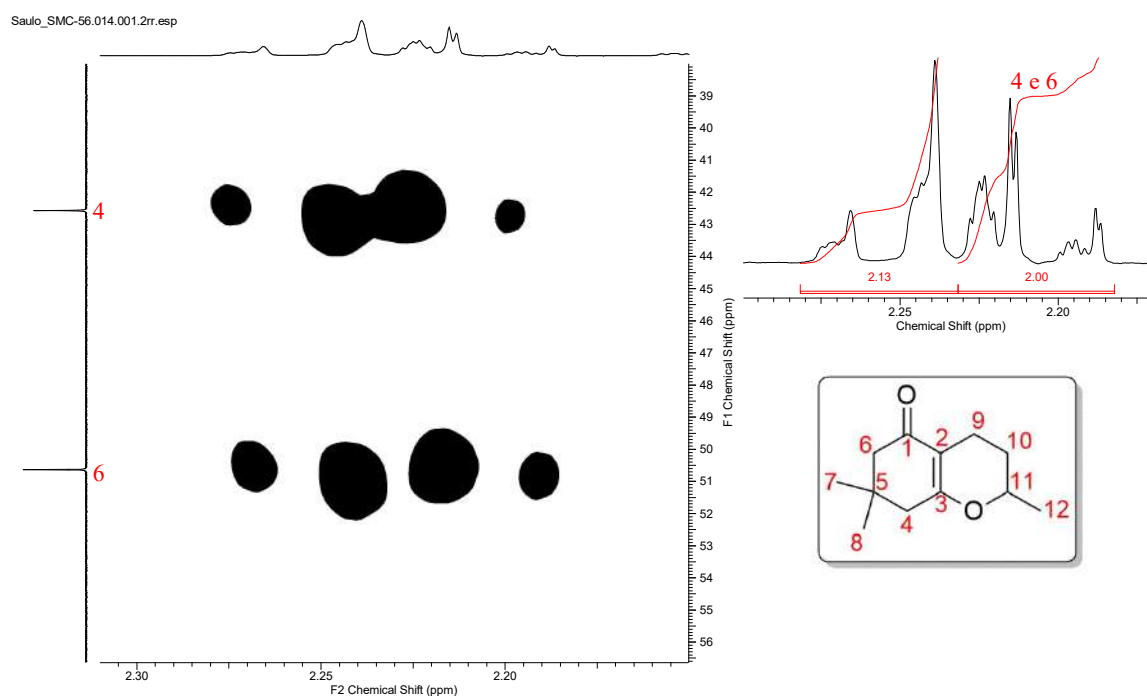
Posição	$^1\text{H}$ / $\delta$ ppm, (multiplicidade, integração)	$^{13}\text{C}$ $\delta$ ppm	COSY
1	-	198,0	-
2	-	109,8	-
3	-	169,7	-
4	2,28 – 2,23 (m, 2H) e 2,23 -2,18 (m, 2H)	42,6	
5	-	32,0	-
6	2,28 – 2,23 (m, 2H) e 2,23 -2,18 (m, 2H)	50,6	
7	1,07 (s, 3H)	29,1	
8	1,04 (s, 3H)	27,7	
9	2,40 ( $\text{H}_{\text{eq}}$ , dddt, $J=16,6$ Hz; 5,2 Hz; 3,5 Hz; 1,6 Hz, 1H) e 2,13 ( $\text{H}_{\text{ax}}$ , ddddd, $J=16,9$ Hz; 10,4 Hz; 6,2 Hz; 2,6 Hz; 1,5 Hz, 1H)	17,4	H9, H10
10	1,93 ( $\text{H}_{\text{eq}}$ , dddd, $J=13,9$ Hz; 6,1 Hz; 3,3 Hz; 2,4 Hz, 1H) e 1,51 ( $\text{H}_{\text{ax}}$ , dddd, $J=13,8$ Hz; 10,7 Hz; 9,8 Hz; 5,7 Hz, 1H)	28,4	H9, H10 e H11
11	4,08 ( $\text{H}_{\text{ax}}$ , dqd, $J=9,7$ Hz; 6,4 Hz; 2,6 Hz, 1H)	73,8	H10 e H12
12	1,34 (d, $J=6,6$ Hz, 3H)	20,7	H11

Pela análise do espectro de COSY, pode-se concluir que o hidrogênio H11 está acoplado ao duplete em 1,34 ppm, referente aos hidrogênios metílicos H12, ao duplo duplo duplo duplete em 1,93 ppm e ao duplo duplo duplo duplete em 1,51 ppm, referentes aos hidrogênios H10. Os valores das constantes de acoplamento  $J=9,7$  Hz e  $J=2,6$  Hz, indicam, respectivamente, o acoplamento vicinal di-axial e axial-equatorial entre H11 e H10, sugerindo que o sinal referente a 1,93 ppm pode ser atribuído ao hidrogênio na posição pseudo-equatorial e o sinal em 1,51 ppm se refere ao hidrogênio pseudo-axial. Procedendo da mesma forma, a análise do espectro de COSY indica que os hidrogênios em H10 estão acoplados entre si, com o hidrogênio de H11

e com o duplo duplo duplo de triplete em 2,40 ppm e com o duplo duplo duplo duplo duplo duplo em 2,13 ppm, referentes aos hidrogênios H9. Partindo-se do hidrogênio pseudo-equatorial H10, pode-se observar que o valor da constante de acoplamento  $J = 6,1$  Hz e  $J = 3,3$  Hz, indicam, respectivamente, o acoplamento vicinal equatorial-axial e di-equatorial entre H10 e H9, dessa forma, pode-se inferir que os sinais em 2,40 ppm e em 2,13 ppm, referem-se aos hidrogênios pseudo-equatorial e pseudo-axial, respectivamente.

Apesar de não ser aparente no espectro de COSY, a análise do espectro de  $^1\text{H}$  indicou a existência do acoplamento bisalílico entre o hidrogênio pseudo-equatorial H9 e os hidrogênios metilênicos H4 por meio da constante de acoplamento  $J = 1,6$  Hz.

Os multipletos localizados entre 2,28 – 2,23 ppm e 2,23 – 2,18 ppm, foram atribuídos aos metilenos nas posições 4 e 6. A análise do espectro de HMQC indica que ambos os hidrogênios dos dois metilênicos têm ressonância em regiões muito próximas, de forma que não foi possível atribuir com certeza a qual multipletos se refere cada posição (Figura 52).



**Figura 52.** Ampliação do espectro de RMN de HMQC e  $^1\text{H}$  de **205**.

É possível verificar pelos dados de RMN que as duas metilas provenientes da dimedona foram detectadas em ambientes químicos diferentes, separadas 0,03 ppm no RMN de  $^1\text{H}$  e 1,7 ppm no RMN de  $^{13}\text{C}$ . Possivelmente, a metila na posição pseudo-equatorial sofre leve influência do cone de desblindagem proveniente do efeito de anisotropia diamagnética

proveniente do sistema  $\alpha$ - $\beta$ -insaturado, ocasionando uma ligeira desblindagem dessa metila em comparação com a que está localizada na posição pseudo-axial.

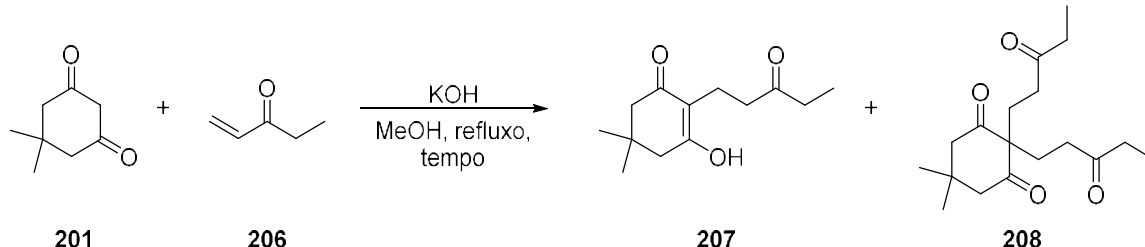
Tendo sido comprovada a formação da lactona viníloga **205**, partiu-se em busca da ampliação da biblioteca de compostos que poderiam ser alcançados por meio dessa síntese. A escolha imediata foi permanecer com a dimedona como  $\beta$ -dicetona e empregar a etil vinil cetona como composto  $\alpha,\beta$ -insaturado. Fazendo uso da mesma metodologia utilizada na formação dos compostos **203** e **204**,<sup>98</sup> também se verificou a formação majoritária do composto dialquilado **208**. Entretanto, houve uma redução acentuada no rendimento para a formação do produto monoalquilado **207**, apenas 12% de rendimento.

Como os rendimentos foram bastante modestos para ambas as reações de adição 1,4 testadas neste trabalho, foram realizados alguns testes empregando dimedona e etil vinil cetona para verificar se a variação de algumas condições reacionais, em especial, o tempo de adição do composto  $\alpha,\beta$ -insaturado, poderia resultar no aumento do rendimento para a formação do produto **207**. Os resultados obtidos foram agrupados na Tabela 11.

Em todos os experimentos não houve consumo completo da  $\beta$ -dicetona ácida e verificou-se a presença do produto da reação de dialquilação **208**, que não foi quantificado. Houve a formação do composto monoalquilado **207** em todos os ensaios, no entanto, não foi obtido rendimento superior a 28%.

Pode-se verificar, por meio desses ensaios, a influência do tempo de adição do composto  $\alpha,\beta$ -insaturado na formação do produto de monoalquilação desejado (experimentos 1 - 5). Houve aumento gradual da formação do produto **207** até um tempo de adição de 80 minutos (experimentos 1-4). Tempos maiores de adição da etil vinil cetona ocasionaram redução do rendimento do produto de monoalquilação (experimento 5), mesmo quando tempos menores de refluxo foram empregados (experimento 6).

**Tabela 11.** Condições experimentais testadas para a adição 1,4 entre a dimedona **201** e etil vinil cetona **206**.



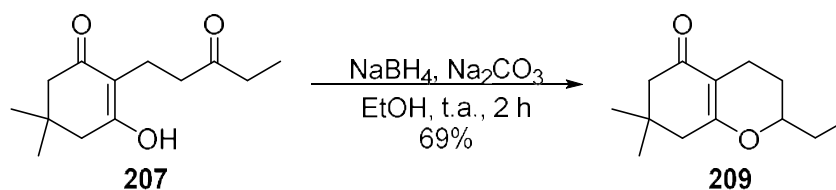
CC(=O)C=C + C1CC(=O)C(C)(C)CC1=O >> [KOH, MeOH, reflux, tempo] CC(=O)CC1C=C(O)C(C)(C)CC1=O + CC(=O)CC1C(C)C(CC(=O)CC)C(C)(C)CC1=O

Experimento	Tempo de adição da etil vinil cetona	Tempo de refluxo	Eq de KOH	207
1	8 min	4 h	0,22	12%
2	30 min	4 h	0,22	17%
3	60 min	4 h	0,22	25%
4	80 min	4 h	0,22	28%
5	100 min	4 h	0,22	25%
6	180 min	1 h	0,22	11%
7	80 min	1 h	0,22	20%
8	80 min	2 h	0,22	22%
9	80 min	4 h	0,44	26%

O tempo ao qual o meio reacional é submetido ao refluxo também influenciou no aumento do rendimento do produto monoalquilado (experimentos 7 e 8), entretanto, como reportado anteriormente, manter o refluxo por mais de 4 horas tende a favorecer a formação do produto de dialquilação **208**. O aumento na quantidade de KOH não conduziu a grandes variações no rendimento obtido (experimento 9); assim, a melhor condição experimental empregando essa metodologia foi a apresentada no ensaio 4.

As moléculas **207** e **208** foram caracterizadas por espectrometria de massa e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . A análise dos dados espectrais desta substância é similar àquela que foi realizada para **203** e **204** e não será comentada.

Com o produto da adição de Michael **207** em mãos, partiu-se para a etapa seguinte da sequência reacional, redução seguida de ciclização. Novamente, seguindo o procedimento de Mahajan e Silva,<sup>98</sup> o produto de monoalquilação entre a dimedona e a etil vinil cetona foi reduzido na presença de  $\text{NaBH}_4$  e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  em etanol à temperatura ambiente por duas horas, formando a lactona vinílica **209** com 69% de rendimento (Esquema 21).



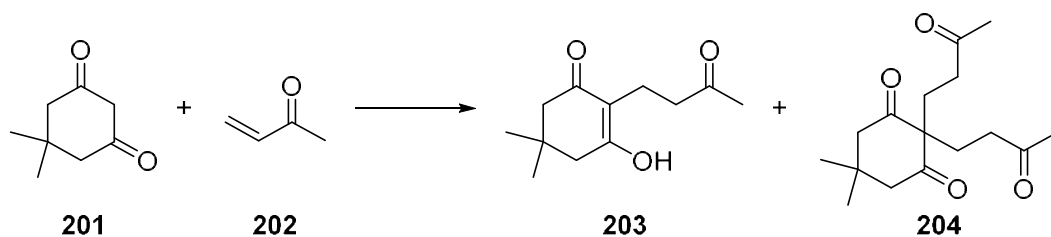
**Esquema 21.** Formação da lactona viníloga **209**.

A molécula **209** foi caracterizada por espectrometria de massa e RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e técnicas bidimensionais (COSY e HMQC). A análise dos dados espectrais desta substância também é similar à que foi realizada para a substância **205** e não será comentada.

### 3.2.2 Estudo Metodológico para otimização da formação do produto de monoalquilação da reação de adição de Michael

Apesar de a rota sintética escolhida ter sido capaz de gerar as lactonas vinílogas **205** e **209**, ficou evidente que a etapa de adição de Michael representou um ponto a ser aperfeiçoado, tendo em vista que foram obtidos apenas 40 e 28% de rendimento para as substâncias **203** e **207**, respectivamente. Dessa forma, partiu-se em busca de metodologias descritas na literatura que pudessem ser aplicadas à síntese proposta, de forma a melhorar o rendimento dessa etapa. Os dados obtidos foram agrupados na Tabela 12.

A primeira metodologia testada (Tabela 12, entrada 1) foi descrita em 1957 por Nazarov e Zav'yalov<sup>100</sup> que, assim como a procedimento de Mahajan e Silva, faziam uso de condições básicas na formação do produto de adição 1,4. À primeira vista, os resultados não se mostraram animadores, tendo em vista que o rendimento obtido para o produto de monoalquilação **203** foi ligeiramente superior aos apresentados pela metodologia anterior (44% vs. 40%). Entretanto, quando se comparam as duas metodologias, pela primeira vez, o produto de dialquilação **204** não foi obtido em grande proporção, com apenas 6% de rendimento, somado a isso, houve uma redução considerável do tempo reacional de 4 horas para 30 minutos com a formação de quantidades praticamente equivalentes do produto desejado **203**.

**Tabela 12.** Condições testadas na formação do produto de monoalquilação **203**.

Entrad a	Catalisador	Tempo (h)	Solvente	Temperatura (°C)	203 (%)	204 (%)
1	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (20 mol%)	0,5	MeOH:H <sub>2</sub> O	80 - 85	44	6
2	ZrCl <sub>4</sub> (2 mol%)	0,25	-	t.a.	-	-
3	ZrCl <sub>4</sub> (10 mol%)	8	-	t.a.	-	-
4	ZrCl <sub>4</sub> (10 mol%)	8	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	t.a.	-	-
5	Al <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	0,67	-	t.a.	5	41
6	Al <sub>2</sub> O <sub>4</sub> *	0,67	-	t.a.	7	4
7	Calixareno <b>214</b> (1,5 mol%)	4	MeOH	refluxo	-	-
8	Calixareno <b>214</b> (5 mol%)	16 + 8	MeCN	t.a. + refluxo	-	-

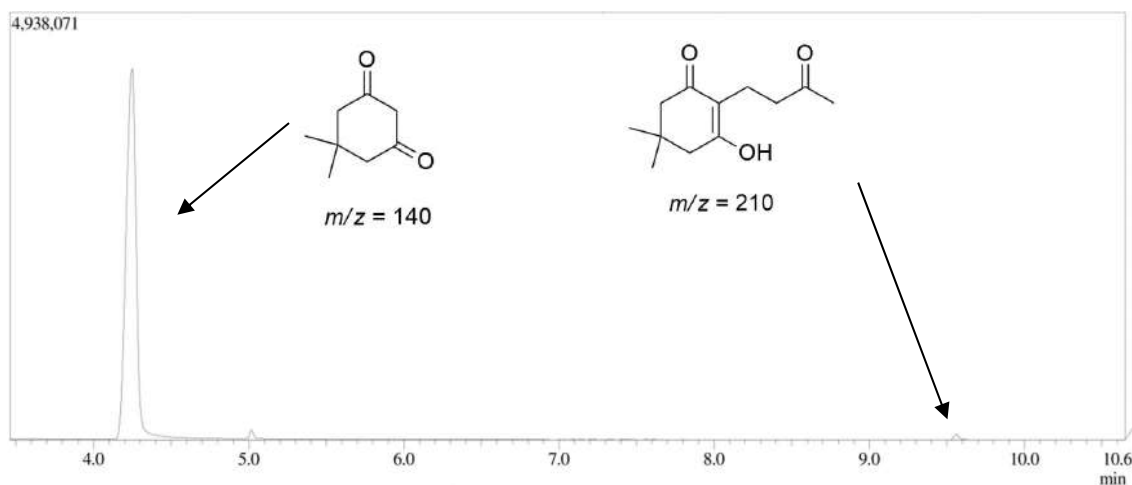
\*Foi empregado o dobro de dimedona neste ensaio.

Essa metodologia se apresentava mais adequada que aquela sob a qual o projeto havia sido iniciado, entretanto, acreditava-se que os rendimentos ainda poderiam ser melhorados. Como nos dois casos anteriores, a formação das ligações C—C foi promovida por catálise básica, e os rendimentos obtidos variaram por volta de 40%, optou-se por realizar uma busca na literatura por metodologias nas quais a reação de Michael, envolvendo β-dicetonas, ocorresse em condições ácidas, como forma de confrontar quais seriam as melhores alternativas para a transformação pretendida.

Os primeiros testes realizados empregando-se catálise ácida para formação do aduto **203** tiveram por base o trabalho de Reddy e colaboradores,<sup>101</sup> no qual quantidades catalíticas de tetracloreto de zircônio (ZrCl<sub>4</sub>) foram utilizadas à temperatura ambiente e sem adição de solventes. O uso de dimedona em vez de diidrorresorcinol, sob as mesmas condições empregadas pelos autores não conduziu à formação do produto desejado **203** (Tabela 12, entrada 2). Por esse motivo, resolveu-se realizar um segundo experimento, no qual foram empregados 10 mol% de catalisador, e o acompanhamento da reação foi realizado por cromatografia em camada delgada ao longo de 8 horas (com a amostragem ocorrendo em



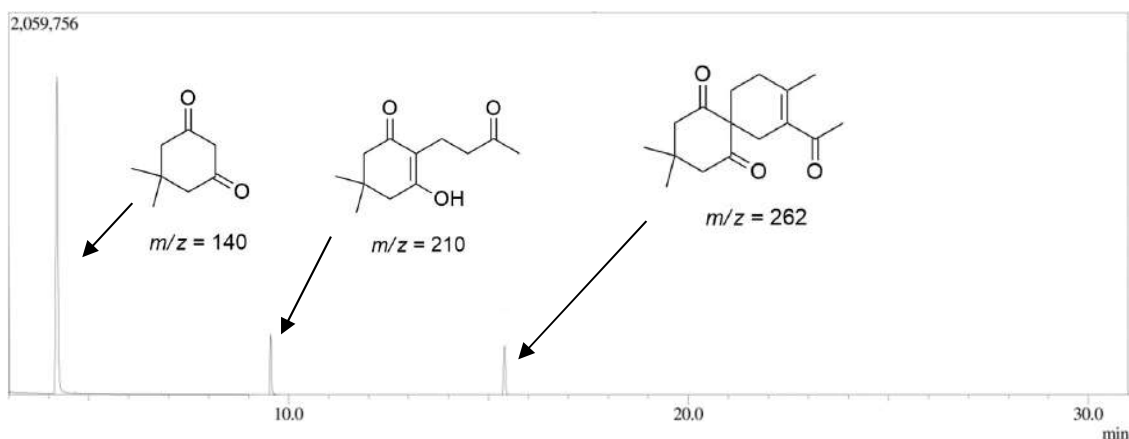
intervalos de 15 minutos na primeira hora, seguidos de intervalos de 1 hora a cada hora seguinte). Após esse tempo, a reação foi finalizada e tratada conforme o procedimento dos autores, entretanto, houve apenas a recuperação da dimedona (Tabela 12, entrada 3). Considerando que havia a possibilidade de a reação não prosseguir em virtude de um processo ineficaz de mistura dos reagentes por conta da ausência de solvente, foi realizado um terceiro experimento, similar ao segundo, na presença de diclorometano, no entanto, assim como nos ensaios anteriores, apenas a  $\beta$ -dicetona foi recuperada (Tabela 12, entrada 4). Amostras dos brutos reacionais foram analisadas por GC/MS e revelaram que o produto de monoalquilação entre a dimedona e metil vinil cetona, **203**, estava sendo formado, mas numa proporção mínima (Figura 53). Foram detectados três sinais cromatográficos, com tempos de retenção em 4,25, 5,02 e 9,53 minutos. O pico observado em 4,25 min apresentou íon molecular com em  $m/z$  140, condizente com a dimedona. O pico observado em 9,53 min apresentou íon molecular em  $m/z$  210, condizente com composto **203**, mas em baixíssimo percentual de área, apenas 0,72%. O pico observado em 5,02 min apresentou íon com  $m/z = 140$ , mas sua estrutura não foi atribuída a nenhuma substância relacionada à reação.



**Figura 53.** Traço cromatográfico do bruto reacional da reação entre a dimedona e a metil vinil cetona na presença de  $ZrCl_4$ .

Em vista do resultado desfavorável empregando  $ZrCl_4$ , optou-se por não se investir maior esforço nessa metodologia. Em seu lugar, foi testada uma metodologia apresentada por Bardón e colaboradores,<sup>102</sup> na qual a  $\beta$ -dicetona era suportada em alumina neutra, seguida da adição da enona para formação do aduto de Michael. O primeiro experimento seguiu a mesma metodologia descrita pelos autores, entretanto, após o tratamento adequado, o material monoalquilado **203** foi obtido em singelos 5% de rendimento. Em contrapartida, o produto de dialquilação **204** foi obtido com 41% de rendimento (Tabela 12, entrada 5). Um segundo

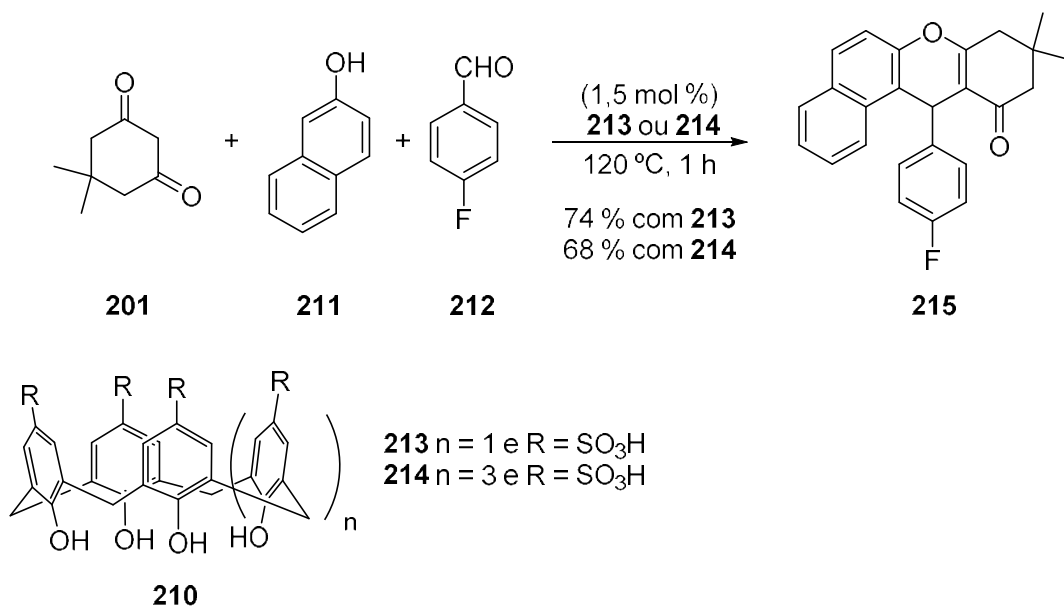
experimento foi realizado, dessa vez, utilizando o dobro de equivalentes de dimedona (Tabela 12, entrada 6). O rendimento para o produto desejado **203** permaneceu basicamente o mesmo do ensaio anterior (7 % vs. 5 %). Entretanto, houve uma redução acentuada da quantidade de produto dialquilado (8% vs. 41%). A análise do bruto reacional de GC/MS do segundo ensaio evidenciou uma baixa proporção dos produtos **203** (9,72% em 9,55 min), e **204** (10,56% em 15,40 min,  $m/z$  262 referente ao M - 18), frente à dimedona, indicando possivelmente que a alumina empregada foi insuficiente para suportar o excesso de  $\beta$ -dicetona utilizado (Figura 54).



**Figura 54.** Cromatograma do bruto reacional da reação entre a dimedona e a metil vinil cetona suportadas em  $\text{Al}_2\text{O}_3$ .

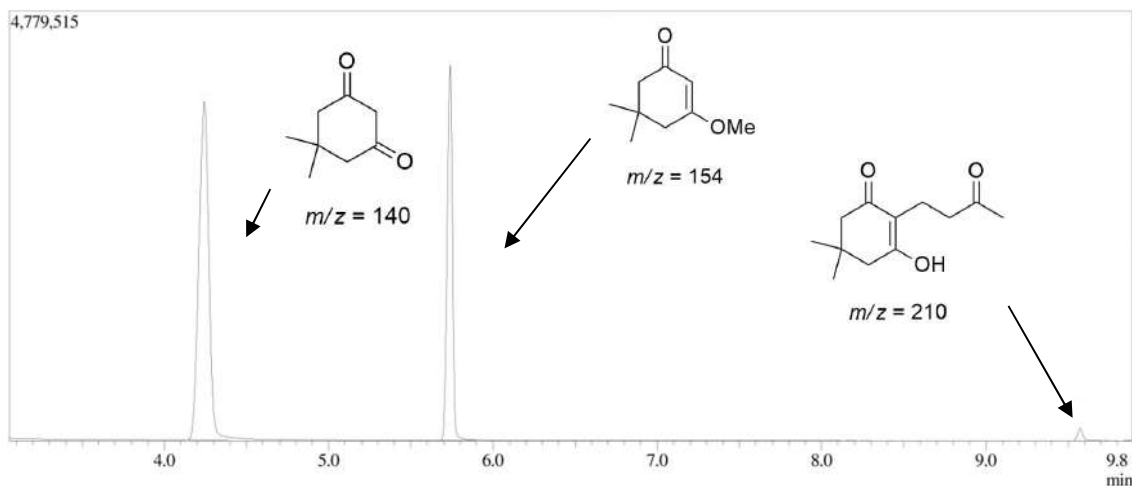
Uma terceira metodologia envolvendo a reação de adição de Michael sob condição ácida foi testada, entretanto, diferentemente das duas tentativas anteriores, nas quais foram empregados ácidos de Lewis, foi utilizado um ácido de Brønsted, o calixareno **210**.

Calixarenos são compostos macrocíclicos provenientes da condensação entre o formaldeído e fenóis substituídos na posição *para*.<sup>103</sup> O nome calixareno deve-se ao seu formato semelhante à um cálice e a incorporação de anéis aromáticos nessa estrutura.<sup>104</sup> Tais compostos chegaram ao nosso laboratório, cedidos pelo Prof. Dr. Ângelo de Fátima, do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, cujo trabalho emprega calixarenos derivados do ácido *para*-toluenossulfônico, compostos **213** e **214**, em quantidades catalíticas na obtenção de xantenonas **215** por meio de reações multicomponentes (Esquema 22).<sup>105</sup>



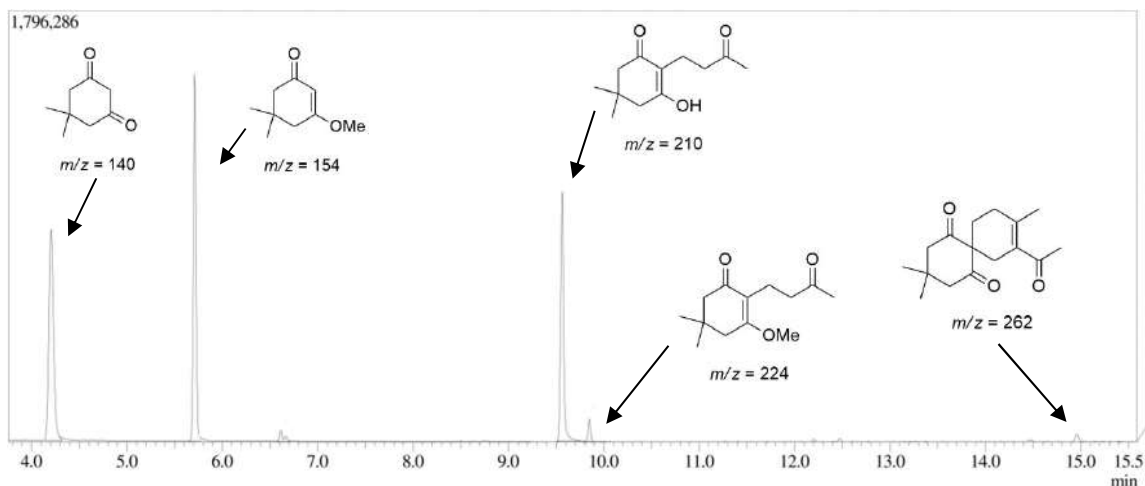
**Esquema 22.** Reação de formação do composto **215** catalisada pelos calixarenos **213** e **214**.

Cerca de 220 mg dos compostos **213** e **214** foram disponibilizados para o nosso laboratório. Arbitrariamente, escolheu-se o calixareno **214** ( $n = 3$  e  $R = \text{SO}_3\text{H}$ ) nos testes realizados. Diferentemente do procedimento de Fátima e colaboradores,<sup>105</sup> os experimentos foram realizados na presença de solvente, tendo em vista que a ausência do mesmo poderia acarretar uma mistura ineficiente dos reagentes. Dessa forma, no primeiro ensaio, metanol foi utilizado como solvente na presença de 1,5 mol% de **214** (Tabela 12, entrada 7). A reação permaneceu em temperatura de refluxo por 4 horas, sendo monitorada a cada 30 minutos por CCD. Como o produto de monoalquilação não foi detectado, o bruto reacional foi enviado para análise por GC/MS (Figura 55). Além do pico indicativo da dimedona em 4,24 min e  $m/z$  140 (62,44% em proporção), podem-se perceber outros dois sinais: um em 9,57 min e  $m/z$  210 (1,17% em proporção) atribuído ao produto de monoalquilação **203** desejado e um em 5,71 min e  $m/z$  154 (36,39% em proporção) referente à metoxilação da dimedona.



**Figura 55.** Cromatograma do bruto reacional da reação entre a dimedona e a metil vinil cetona com 1,5 mol% de **214** em metanol.

Devido à elevada proporção do produto de metoxilação da dimedona (36,39%), imaginou-se que estaria ocorrendo o ataque nucleofílico do oxigênio do metanol a uma das carbonilas da dimedona e que a formação desse aduto estaria comprometendo a formação do produto da reação de adição de Michael desejada. Como forma de contornar essa situação, foi realizado um segundo experimento no qual a acetonitrila foi utilizada como solvente e a quantidade do calixareno **214** foi aumentada para 5 mol% (Tabela 12, entrada 8). A reação também permaneceu à temperatura ambiente por 16 horas, seguidas de mais 8 horas de refluxo. A formação do produto de monoalquilação **203** foi confirmada por análise em CCD e o bruto reacional foi analisado por GC/MS (Figura 56). Percebe-se um aumento considerável do pico em 9,55 min, atribuído ao produto monoalquilado (26,72% em proporção), comparado ao ensaio anterior. Entretanto percebeu-se que o sinal do produto de metoxilação da dimedona se apresentou praticamente na mesma proporção, quando comparado ao primeiro ensaio (33,50% de proporção). Outros quatro picos foram evidenciados nesse cromatograma: o pico em 14,96 min com  $m/z$  262 (0,89% em proporção) referente ao produto de anelação da condensação aldólica da forma dialquilada; o pico em 9,85 min com  $m/z$  224 (1,84% em proporção), referente à forma metoxilada do produto **203**; e os picos em 6,62 min com  $m/z$  168 (0,90% em proporção) e em 6,67 min com  $m/z$  180 (0,40% em proporção) cujas estruturas não foram definidas.



**Figura 56.** Traço cromatográfico do bruto reacional da reação entre a dimedona e a metil vinil cetona catalisada com 5 mol% de **214** em acetonitrila.

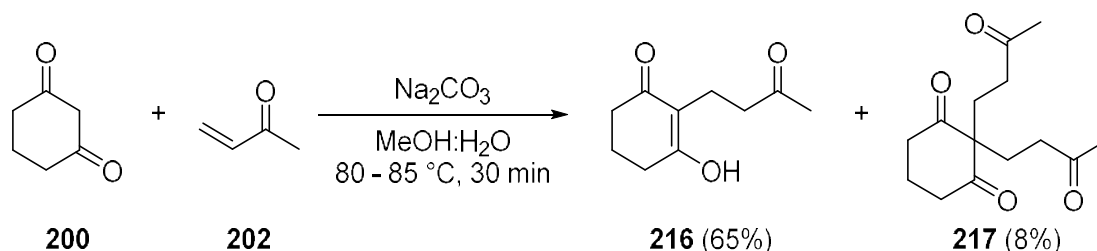
Tendo em vista que a proporção do produto de metoxilação da dimedona em ambos os ensaios foi praticamente a mesma, possivelmente, o metanol empregado como solvente não seria o responsável pelas reações de adição à carbonila que estão ocorrendo. Uma provável hipótese, é que exista uma quantidade considerável de metanol residual presente na amostra do catalisador utilizado, tendo em vista que no processo utilizado para a obtenção do calixareno é realizada a recristalização nesse solvente.<sup>105</sup>

Em nenhum dos dois ensaios foi possível separar por cromatografia em coluna de gel de sílica os produtos identificados nas análises de GC/MS, o que torna essa metodologia inviável para a obtenção do produto de monoalquilação.

Dentre todas as metodologias avaliadas, a que apresentou os melhores resultados foi a que emprega  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Esta, apesar de resultar em rendimentos do produto de monoalquilação semelhantes à metodologia utilizada por Mahajan, acarretava em menor formação do produto dialquilado. Em virtude da ligeira vantagem dessa metodologia comparada à anterior, a reação foi novamente realizada, dessa vez, utilizando-se etil vinil cetona como composto  $\alpha,\beta$ -insaturado. O produto de monoalquilação **207** e o produto de dialquilação **208** foram obtidos com 51% e 4% de rendimento, respectivamente, demonstrando que essa metodologia se mostrava mais adequada do que a primeira, tendo em vista que os rendimentos obtidos para os produtos de monoalquilação, tanto com a metil vinil cetona quanto com a etil vinil cetona, apresentavam resultados mais próximos entre si e mais elevados quando comparados às demais metodologias testadas.

Tendo demonstrado bons resultados com a dimedona, essa metodologia também foi empregada utilizando-se diidrorresorcinol **200** como  $\beta$ -dicetona ácida e metil vinil cetona **202**

como composto  $\alpha,\beta$ -insaturado. Os compostos **216** monoalquilado e **217** dialquilado foram obtidos com 65% e 8% de rendimento, respectivamente.



**Esquema 23.** Formação dos produtos de monoalquilação **216** e dialquilação **217** provenientes do diidrorresorcinol **200** e a metil vinil cetona **202**.

As substâncias **216** e **217** foram caracterizadas por espectrometria de massa e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . A análise dos dados espectrais dessas substâncias é similar à que foi realizada para **203** e **204**, exceto pela ausência das metilas  $\beta$ -carbonílicas existentes apenas na dimedona, e por essa razão não será comentada.

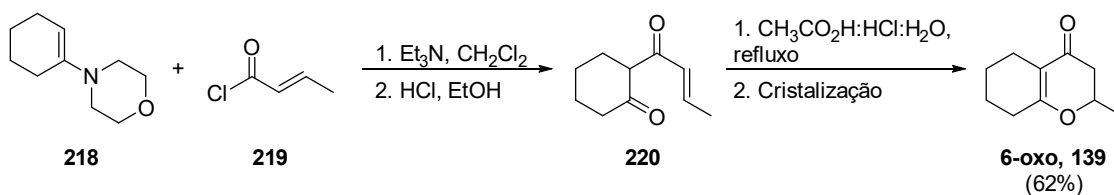
De posse do produto de adição de Michael **216**, realizou-se a redução seguida de ciclização por meio da mesma abordagem empregada para as moléculas **205** e **209**,<sup>98</sup> originando a lactona vinílica 5-oxo **138** com 66% de rendimento.

A molécula **138** foi caracterizada por espectrometria de massa e RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e técnicas bidimensionais (COSY e HMQC). A análise dos dados espectrais dessas substâncias é similar à que foi realizada para **205** e **209**, exceto pela ausência das metilas  $\beta$ -carbonílicas existentes apenas na dimedona, e não será comentada.

### 3.2.3 Síntese e separação dos enantiômeros de 6-oxo

A avaliação de 6-oxo frente à cepa *C. subtsugae* CV026 já foi reportada pelo nosso grupo de pesquisa, contudo, para uma amostra racêmica. Para melhor compreender a influência da estereoquímica na inibição observada naquele ensaio, se faz necessária a obtenção de amostras enantiomericamente enriquecidas de ambos enantiômeros da 6-oxo.

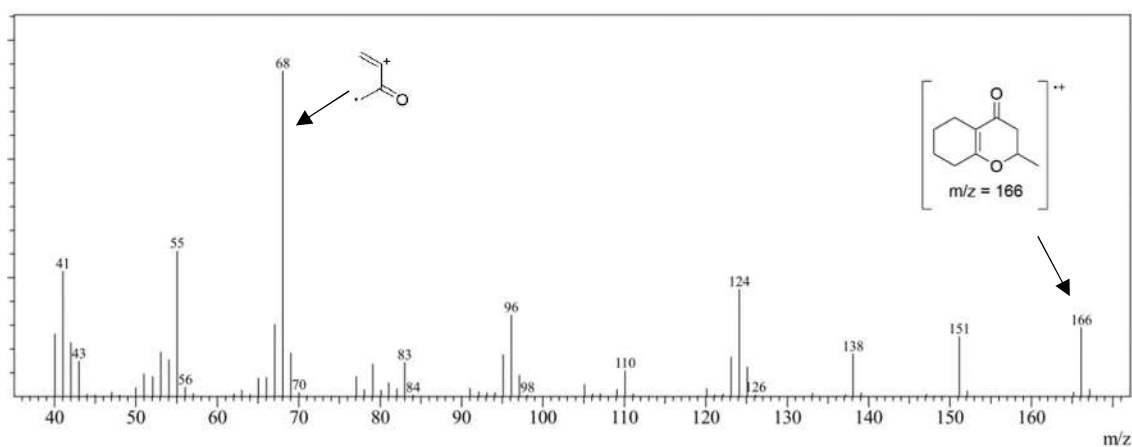
Com esse objetivo, foi realizada a síntese racêmica de 6-oxo com base no procedimento otimizado por Cavalcante, no nosso grupo de pesquisas (Esquema 24).<sup>82</sup>



**Esquema 24.** Rota sintética para a obtenção da lactona viníloga 6-oxo, **139**.

A primeira etapa do processo de síntese da 6-oxo (**139**) consistiu na acilação do 1-morfolinociclohexeno **218** com cloreto de crotonoíla **219**, originando o intermediário (**220**), obtido como um óleo viscoso de coloração amarelada após evaporação dos voláteis, que foi solubilizado, sem etapas adicionais de purificação, em uma solução de ácido acético, ácido clorídrico e água (1 mL de cada por grama de óleo) e colocado em condição de refluxo. O material resultante foi submetido a cristalização e recristalização em hexano, resultando na formação de **139** na forma de agulhas brancas finas com 62% de rendimento.

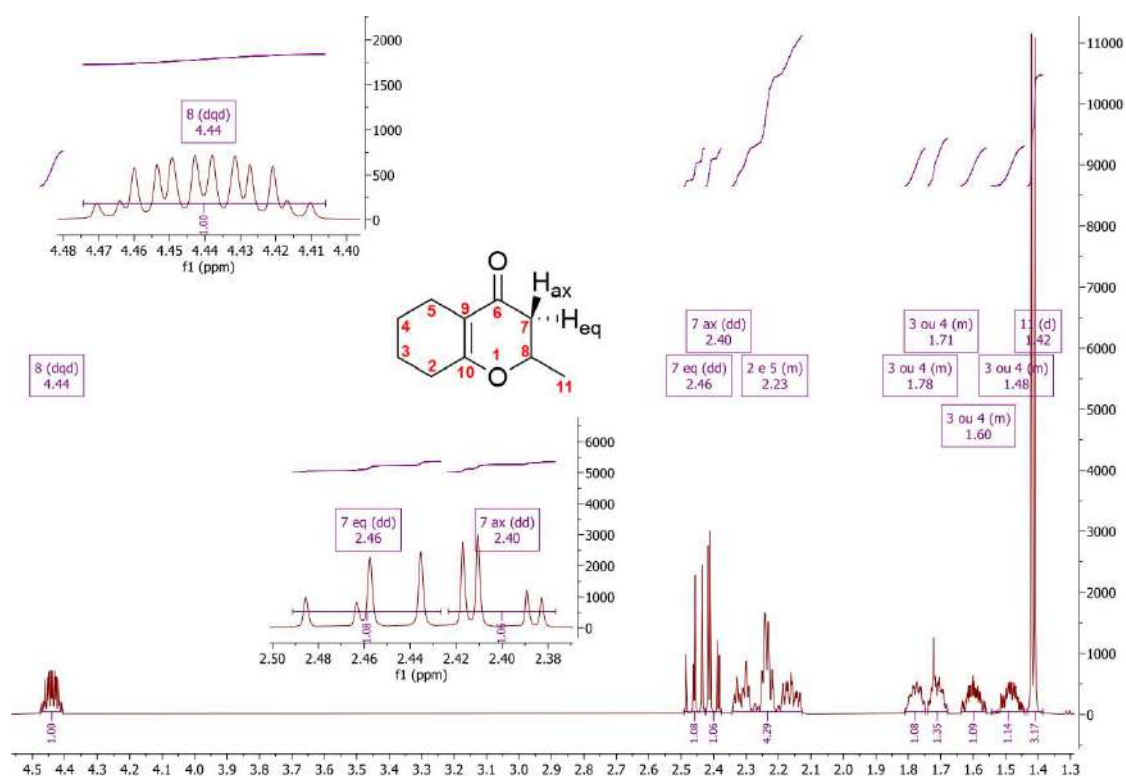
A lactona viníloga **139** foi caracterizada pelas técnicas de espectrometria de massas e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . O espectro de massa da molécula **139** apresentou pico base com  $m/z$  68 e o íon molecular com  $m/z$  166 (28,88 % intensidade relativa) (Figura 57).



**Figura 57.** Espectro de Massa por IE do composto **139**.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da molécula **139** apresentou 9 sinais de ressonância (Figura 58).<sup>82</sup> O primeiro, e possivelmente, o sinal mais característico para a formação da 6-oxo, é um duplo quarteto de dupletos em 4,44 ppm, que foi atribuído ao H8. A análise das constantes de acoplamento desse evidencia o acoplamento com o hidrogênio pseudo-axial H7,  $J = 12,7$  Hz, e os hidrogênios da metila H11,  $J = 6,4$  Hz, e o hidrogênio pseudo-equatorial H7,  $J = 3,9$  Hz. Também foram observados dois duplo dupletos, em 2,46 e 2,40 ppm, que foram atribuídos aos hidrogênios pseudo-equatorial e pseudo-axial na posição 7, respectivamente.

Além do acoplamento com o hidrogênio H8, esses hidrogênios apresentam acoplamento geminal,  $J = 16,8$  ppm. Um multiplete integrando para 4 hidrogênios na região entre 2,34 – 2,13 ppm, foi atribuído aos dois grupos metilênicos H2 e H5 ligados diretamente à ligação dupla do anel dihidropiranona. Em seguida, quatro multipletos, cada um integrando para 1 hidrogênio (1,81 – 1,75 ppm; 1,74 – 1,68 ppm; 1,64 – 1,56 ppm e 1,54 – 1,44 ppm), foram atribuídos aos hidrogênios H3 e H4. Por fim, o duplete bastante acentuado em 1,42 ppm referente ao grupo metila H11, acopla com o hidrogênio vicinal H8 com uma constante de acoplamento  $J = 6,3$  Hz.

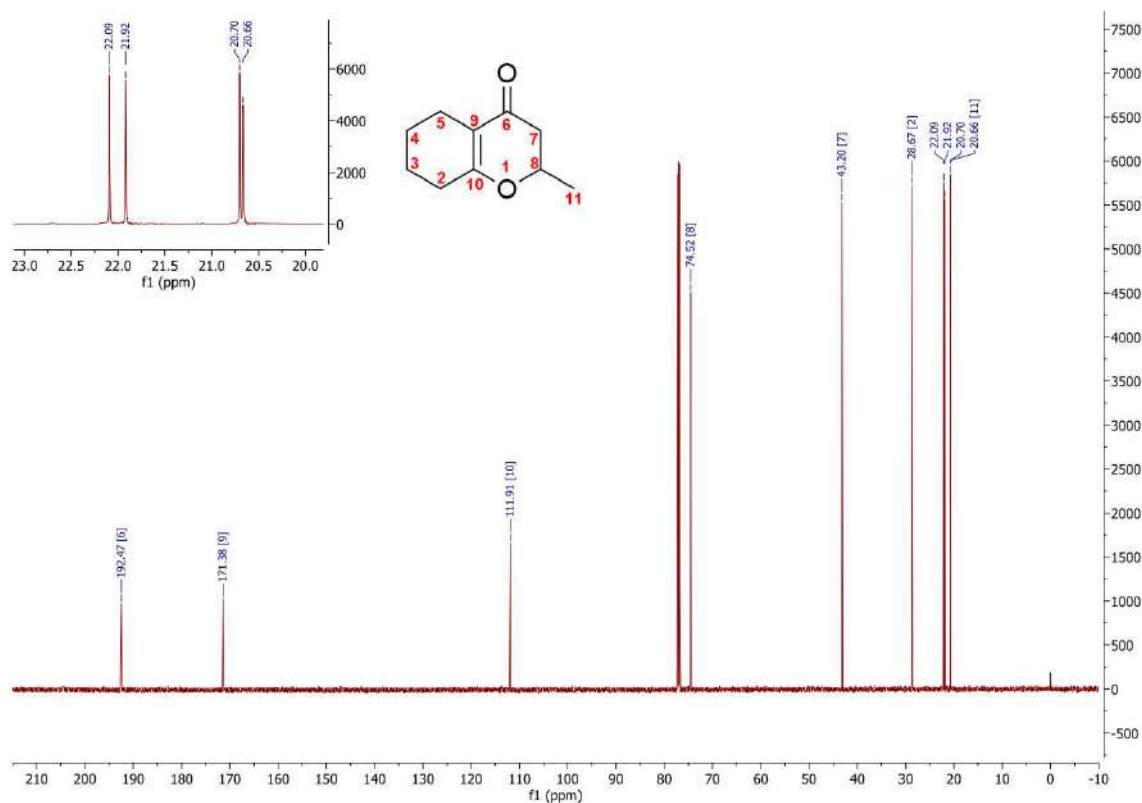


**Figura 58.** Espectro de RMN –  $^1\text{H}$  do composto **139**.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da molécula **139** evidenciou todos os 10 carbonos esperados na estrutura (Figura 59). O sinal mais desblindado observado foi atribuído à carbonila, carbono C6, em 192,5 ppm. Em seguida, em 171,4 ppm encontra-se o carbono insaturado  $\beta$ -carbonílico C10, que é duplamente desblindado pela proximidade com o átomo de oxigênio do anel dihidropiranona e pelo efeito de anisotropia magnética da ligação  $\text{C}=\text{C}$ . O próximo sinal, em 111,9 ppm, é referente ao outro carbono da ligação  $\text{C}=\text{C}$   $\alpha$ -carbonílico C9. Em 74,5 ppm encontra-se o metino quiral C8, vizinho ao átomo de oxigênio. O sinal em 43,2 ppm é referente ao metileno  $\alpha$ -carbonílico C7. A atribuição dos demais carbonos de **139** não pôde ser constatada ao certo e se fez necessária a utilização da predição gerada pelo *software* MestReNova, versão



14.1.1-24571, na qual foi possível inferir que o sinal com deslocamento em 28,7 ppm refere-se ao carbono C2. Além disso, a consulta ao trabalho de Cavalcante, permitiu a atribuição do sinal mais à direita em 20,7 ppm como sendo pertencente à metila C11.<sup>82</sup> Tal atribuição foi obtida por meio do experimento de DEPT. Entretanto, devido à proximidade entre os sinais, não foi possível atribuir com exatidão a quais metilenos pertenciam os deslocamentos em 22,1; 22,0 e 20,7 ppm.



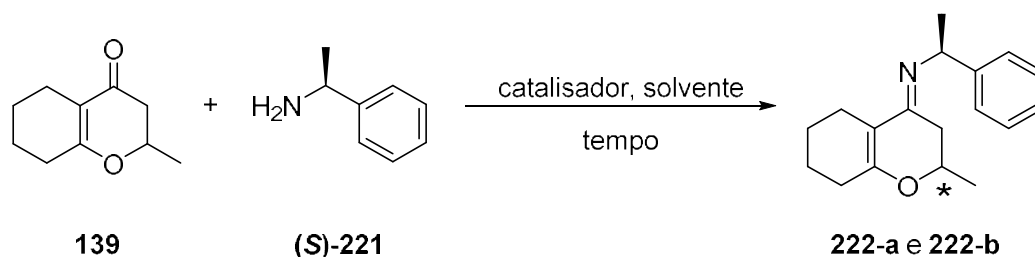
**Figura 59.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **139**.

De posse da 6-oxo, **139**, a etapa seguinte consistiu na obtenção de seus enantiômeros *R* e *S*, de forma a averiguar a importância da estereoquímica na inibição da biossíntese de violaceína frente à cepa *C. subtsugae* CV026. A estratégia utilizada para tal, consistiu na formação de diastereoisômeros separáveis, por meio da reação entre a 6-oxo e um auxiliar quiral, seguida da remoção do mesmo, e obtenção dos enantiômeros em sua forma enriquecida. O auxiliar quiral empregado foi a (*S*)-(-)-1-fenilamina **221**, e foi gentilmente cedida pelo Professor Dr Brenno Amaro da Silveira Neto.

### 3.2.4 Estudo Metodológico para formação das iminas diastereoisoméricas da 6-oxo

Com a 6-oxo e o auxiliar quiral em mãos, a etapa seguinte consistiu na busca de uma metodologia que fosse capaz de gerar os diastereoisômeros em quantidade suficiente para que fosse possível realizar a separação. No entanto, a pesquisa por uma metodologia que fosse adequada à 6-oxo se mostrou consideravelmente desafiadora, tendo em vista que a maior parte dos procedimentos descritos na literatura partem de ciclohexanonas ou de flavonoides, e estes, apesar de serem cromenonas, assim como a 6-oxo, que é uma hexahidrocromenona, aparentemente não reagem sob condições análogas. As condições testadas na formação dos diastereoisômeros pela condensação de **139** e **221** foram agrupados na Tabela 13.

**Tabela 13.** Condições experimentais avaliadas na obtenção dos diastereoisômeros **222-a** e **222-b**.



Entrada	Catalisador	Solvente	Temperatura	Tempo (h)	222-a (%)	222-b (%)
1	AcOH	MeOH	Refluxo	24	-	-
2	AcOH, MS 3Å	MeOH	Refluxo	24	-	-
3	PTSA, MS 3Å	Tolueno	Refluxo	24	3	3
4	PTSA, MS 3Å	Tolueno	Refluxo	48	4	3
5	PTSA, MS 3Å	Tolueno	Refluxo	72	5	4
6	PTSA, MS 3Å	Tolueno	Refluxo	96	6	4
7	PTSA, MS 3Å, Dean-	Tolueno	Refluxo	24	Traços	

	Stark					
	Adaptado					
8	TFA, MS 3Å	Tolueno	Refluxo	24	5	4
9	TFA, MS 3Å	Tolueno	Refluxo	120	8	5
10	TFA, MS 3Å, Dean- Stark	Tolueno	Refluxo	48	-	-
	Pequeno					
11	TFA, Dean- Stark Grande	Tolueno	Refluxo	48	10	9
12	TiCl <sub>4</sub> , Et <sub>3</sub> N	Tolueno	0 °C → t.a.	24	-	-
13	TiCl <sub>4</sub> , Et <sub>3</sub> N	Tolueno	0 °C → t.a.	48	-	-
14	TFA, MO, Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Tolueno	120 °C	1,5	6	5
15	TFA, MO	Tolueno	150 °C	1	12	12
16	PTSA, MO	Tolueno	150 °C	0,5	16	14
17	PTSA, MO	Tolueno	150 °C	1	27	26
18	PTSA, MO	Tolueno	150 °C	1,25	23	22
19	PTSA, MO	Tolueno	150 °C	1,5	24	22
20	PTSA, MO	Tolueno	150 °C	2	22	22
21	PTSA, MO	Tolueno	150 °C	2,5	24	22

Os rendimentos apresentados foram obtidos por meio do isolamento em coluna cromatográfica.

A primeira metodologia testada empregava quantidades catalíticas de ácido acético em metanol e já havia sido empregada em nosso laboratório para a formação de tosilhidrazonas da 6-oxo.<sup>106</sup> No entanto, as iminas diastereoisoméricas não foram obtidas, mesmo quando peneira molecular 3 Å foi adicionada ao meio reacional (Tabela 13, entradas 1 e 2).

Na busca de alternativas para a formação das iminas **222 a** e **b**, encontrou-se o trabalho de Pfau, no qual 2-metilciclohexanonas racêmicas eram convertidas em iminas quirais na presença de **221** sob catálise de ácido *p*-toluenossulfônico (PTSA) em tolueno.<sup>107</sup> O procedimento de Pfau foi adaptado, adicionando-se MS 3 Å ao meio reacional e foi possível obter os compostos **222-a** e **222-b** com baixo rendimento, 3,0 e 2,8 %, respectivamente (Tabela

13, entrada 3). A busca por melhoria dos rendimentos das iminas **222 a** e **b** por meio dessa metodologia resultou em incrementos bastante sutis, mesmo quando os tempos reacionais foram estendidos para 4 dias (Tabela 13, entradas 3 - 6). Como a formação da imina ocorre necessariamente pela saída de água do meio reacional, foi levantada a hipótese que a peneira molecular poderia não ser o suficiente para conduzir a reação na direção dos produtos desejados. Uma alternativa para contornar esse possível percalço, era a utilização de um sistema como Dean-Stark. Entretanto, tais sistemas costumam demandar quantidades maiores de reagentes e visando a utilização de pequenas quantidades nessa etapa teste de condensação, optou-se por utilizar um aparato como o montado por Stoltz e colaboradores, no qual é possível emular um Dean-Stark para sistemas com menores quantidades de reagentes. (Figura 60).<sup>108</sup>



**Figura 60.** Aparato similar ao montado por Stoltz e colaboradores para a formação das iminas **222 a** e **b**.

Nessa montagem, empregou-se um funil de adição de líquidos, ao qual foi colocado um algodão embebido no solvente utilizado na reação, e acima dele, uma pequena camada de peneira molecular, também embebida em solvente. Acima do funil de adição foi acoplado um condensador e o aparato foi acoplado ao balão no qual foi realizada a reação. Apesar da elaborada montagem do aparato, apenas traços das iminas desejadas foram obtidas por meio dessa metodologia (Tabela 13, entrada 7).

Como a metodologia envolvendo PTSA apresentou rendimentos muito abaixo do esperado, foi realizada uma nova busca na literatura por procedimentos que conduzissem à formação das iminas **222 a e b** com melhores rendimentos. Stavber e colaboradores, realizaram a condensação entre tetralona, uma ciclohexanona, e aminas na presença de ácido trifluoroacético, TFA, em ciclohexano.<sup>109</sup> Esta metodologia, foi adaptada para ser realizada em tolueno e na presença de peneira molecular 3 Å, de forma análoga à reação empregando PTSA. Apesar de apresentar singelos 9,3% de rendimento de ambos os isômeros, a reação catalisada por TFA apresentou rendimento equiparável àquela realizada na presença de PTSA, com a vantagem de ser realizada em tempo consideravelmente menor (Tabela 13, entradas 8). Infelizmente, o aumento do tempo reacional para 120 horas acarretou apenas num pequeno aumento no rendimento dos diastereoisômeros obtidos (Tabela 13, entrada 9).

Como o resultado apresentado pelo TFA foi ligeiramente superior ao apresentado pelo PTSA, houve a tentativa de realizar a reação em escala maior, possibilitando a utilização de um aparato de Dean-Stark como forma de verificar a influência da escala empregada na reação na formação das iminas de interesse. Em uma primeira tentativa, não foram obtidos os produtos de interesse, no entanto, quantidades próximas a 20% de ambos os diastereoisômeros foram alcançados quando um incremento ainda maior de escala foi aplicado (Tabela 13, entradas 10 e 11). Com essa metodologia, foi a primeira vez que o rendimento de um dos diastereoisômeros ultrapassou os 10%.

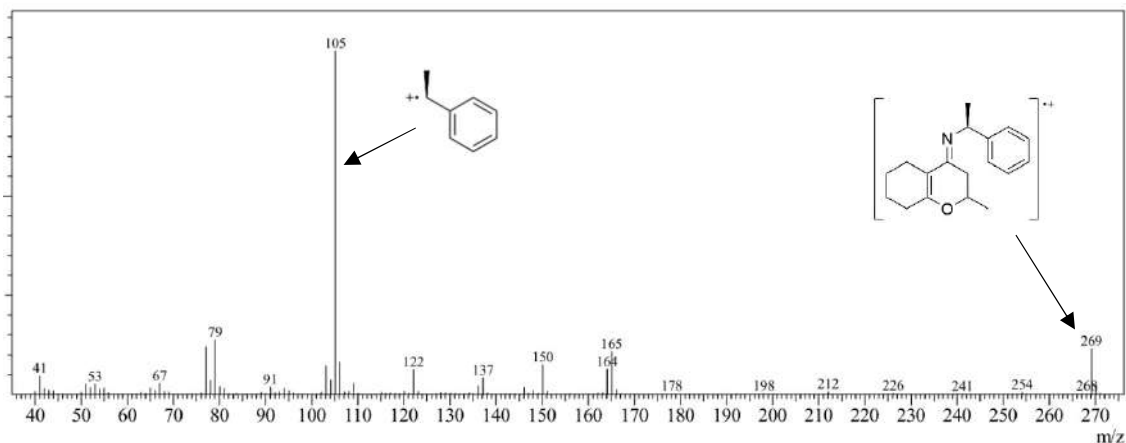
Com valores de rendimentos ainda bastante aquém do desejado, prosseguiu-se na busca por uma alternativa de síntese das iminas **222 a e b**. O procedimento empregado foi similar ao utilizado por Wu e colaboradores para realizar a resolução enantiomérica da ( $\pm$ )-pinocembrina, uma flavona possuindo um centro quiral em C2, com a utilização de tolueno no lugar de benzeno.<sup>110</sup> Foram realizadas duas tentativas dessa abordagem, empregando tempos reacionais de 24 e 48 horas, no entanto, em ambos os casos, nenhum sinal da formação das iminas de interesse foi detectado (Tabela 13, entradas 12 e 13).

Apesar do esforço empregado na busca de uma metodologia que promovesse a formação dos diastereoisômeros de interesse, o melhor resultado obtido promovia apenas 19,1% de rendimento reacional, considerando ambos os isômeros, e deveria ser realizado em Dean-Stark, que exigia que a reação ocorresse em quantidades maiores. Também se verificou que o aumento do tempo reacional ocasionava apenas singelos incrementos no rendimento. O que havia sido pouco explorado até o momento, era o aquecimento da reação. Como alternativa e na busca por temperaturas que excedessem a do refluxo do solvente recorreu-se, então, para o aquecimento promovido por irradiação de micro-ondas.

Optou-se por iniciar os experimentos em micro-ondas utilizando TFA como catalisador, tendo em vista, que os melhores rendimentos, até o momento, haviam sido alcançados com esse ácido. Ao meio reacional também foi adicionado sulfato de sódio, como forma de reter a água gerada no processo, a temperatura foi ajustada para 120 °C e foram realizados 3 ciclos de 30 minutos, no qual o acompanhamento da reação era realizado por CCD (Tabela 13, entrada 14). Apesar do baixo rendimento obtido por essa metodologia, 6,4 e 4,5%, as iminas **222 a** e **b** foram formadas em apenas 90 minutos, indicando a vantagem do aquecimento por irradiação de micro-ondas sobre o aquecimento convencional. Uma nova tentativa, dessa vez, a 150 °C e sem a adição de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi realizada em 2 ciclos de 30 minutos, fornecendo as iminas com 11,8 e 11,6% de rendimento, melhor resultado obtido até então (Tabela 13, entrada 15).

Tendo sido exitosa a iniciativa de promover a reação de formação das iminas diastereoisoméricas por meio do aquecimento irradiado por micro-ondas, optou-se por tentar novamente a reação catalisada por PTSA, tendo em vista que as reações utilizando TFA ainda apontavam presença de 6-oxo quando as CCD's eram realizadas. Para esses ensaios estabeleceu-se a temperatura de 150 °C e foram realizados pequenos incrementos no tempo reacional, que variou de 30 a 150 minutos (Tabela 13, entradas 16 - 21). Percebe-se uma melhora nos rendimentos quando PTSA foi utilizado. Com apenas 30 minutos de reação, o rendimento das iminas aproximou-se de 30%. O incremento no tempo reacional para 1 hora, praticamente dobrou o rendimento dos diastereoisômeros, totalizando 27,2 e 26,4%, melhor resultado obtido (Tabela 13, entrada 17). Apesar de se mostrar um rendimento aparentemente modesto, 53,6% no somatório dos dois diastereoisômeros, tal valor está em concordância com o obtido por Wu e colaboradores, que alcançaram 55%.<sup>110</sup> Os demais incrementos até o máximo de 150 minutos resultaram em menores rendimentos de **222 a** e **b**, entretanto, considerando ambos os diastereoisômeros, sempre foram obtidos valores acima de 40%.

As iminas **222 a** e **b** foram caracterizadas por espectrometria de massas e RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. O espectro de massas das iminas apresentou como pico base com *m/z* 105 e o íon molecular com *m/z* 269 (12,35 e 12,26%, para **222-a** e **222-b**, respectivamente) (Figura 61). A massa exata da imina **222-a** e **b** foi confirmada por meio de EMAR com variação de 1,9 ppm, massa teórica (M + 1) 270,1858 u.m.a., massa obtida (M + 1) 270,1853 u.m.a., para a imina **222-a**, e massa exata para **222-b**, massas teórica e obtida (M + 1) 270,1858 u.m.a..



**Figura 61.** Espectro de massa por EI da imina **222-a**.

Os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  das iminas **222 a e b** e da 6-oxo foram agrupados na Tabela 14. A observação dos multipletos entre 7,40 – 7,27 ppm, ausentes na 6-oxo, bem como o quarteto na região próxima a 5,2 ppm são referentes aos hidrogênios aromáticos e ao metino advindos da (*S*)-(-)-1-fenetilamina. A substituição do oxigênio por nitrogênio, na formação das iminas, pode ser observada por meio do aumento de blindagem dos carbonos da ligação dupla  $\text{C} = \text{C}$ , principalmente no carbono  $\beta$  C10, que foi deslocado aproximadamente 15 ppm para campo alto. Efeito similar pode ser observado no carbono quiral C8, que se encontram cerca de 20 ppm mais blindados que aquele presente na estrutura da 6-oxo. O aumento da blindagem também é percebido no espectro de  $^1\text{H}$ , no qual o dupletos de quartetos de dupletos (dqd) em 4,44 ppm, é substituído por um quinteto de dubletos (quid) na região próxima a 3,50 ppm. Na região que se estende de 2,72 – 1,51 ppm encontram-se os sinais advindos dos hidrogênios metilênicos da 6-oxo, que variaram de forma sutil quando convertidos nas iminas **222 a e b**, com exceção de H7 que apresentaram mais desblindados em cerca de 0,25 ppm. Também se encontra nessa região, o sinal referente à metila proveniente da amina, que se mostra como um duplete na região próxima a 1,62 ppm, mas que está sobreposto com os sinais de H3 e H4. Possivelmente a mudança mais considerável da formação da imina em relação à 6-oxo seja referente ao deslocamento da metila ligada no carbono quiral. Em um dos isômeros, houve uma sutil mudança de 0,18 ppm para um campo alto, duplete em 1,24 ppm. Enquanto, para o outro isômero, o sinal atribuído aos mesmos hidrogênios, um duplete em 0,62 ppm, foi deslocado 0,80 ppm para campo alto. Comparando-se os sinais atribuídos aos hidrogênios da metila de ambos os isômeros, há uma diferença de 0,62 ppm entre um diastereoisômeros e outro.

A Figura 62 contém a sobreposição dos 3 espectros de  $^1\text{H}$  na janela espectral entre 4,54 ppm e 0,34 ppm, na qual é possível perceber o deslocamento do hidrogênio metínico H8 para

uma região mais blindada e a variação presente nas metilas dos núcleos cromenimina em cada diastereoisômero

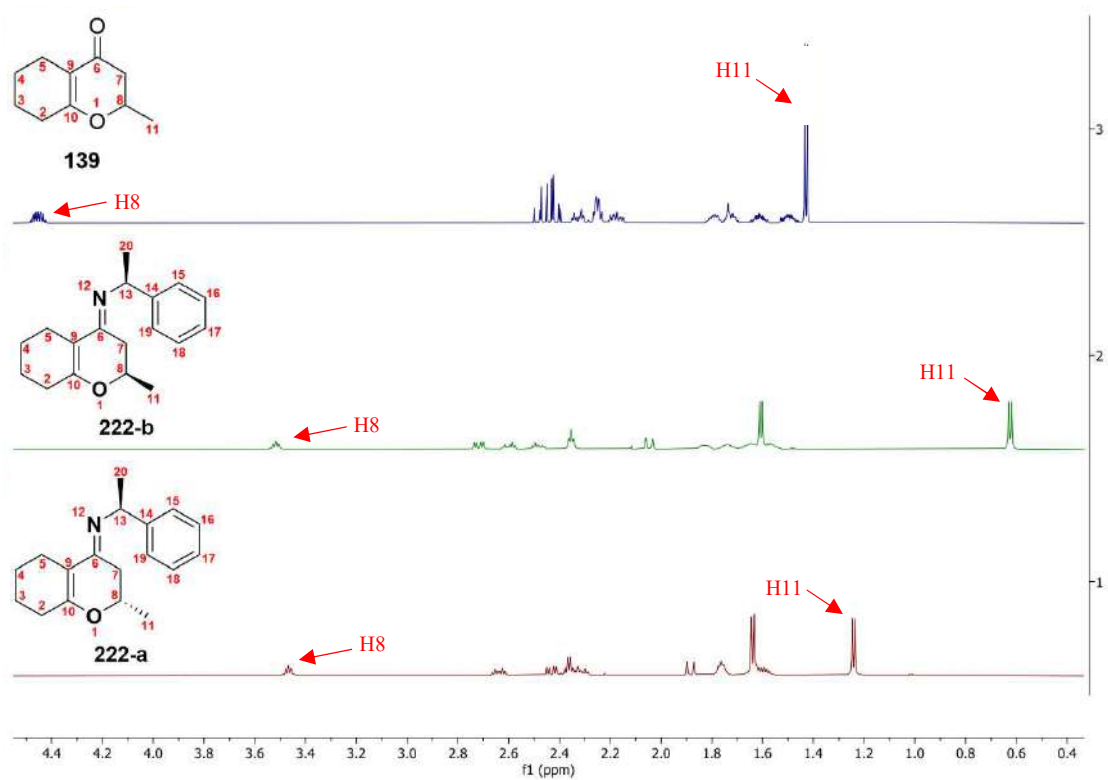
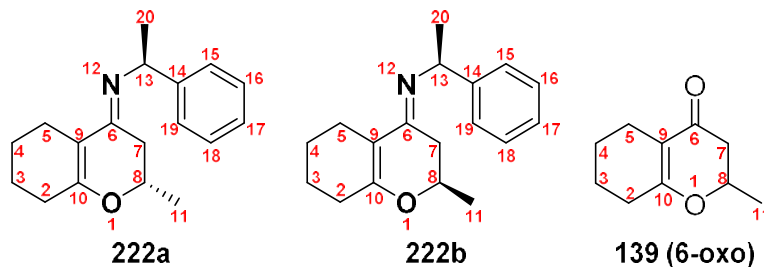


Figura 62. Sobreposição dos espectros das iminas **222 a e b** e da cromenona **139**.



**Tabela 14.** Dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  das iminas **222 a e b** e da molécula **139**.



Posição	$^1\text{H}$ / $\delta$ ppm, (multiplicidade, integração)			$^{13}\text{C}$ $\delta$ ppm		
	222a	222b	139	222a	222b	139
1	-	-	-	-	-	-
2	2,47 – 2,28 (m, 4H), 1,88 (dd, $J = 16,4, 1,6$ Hz, 1H)	2,72 (dd, $J = 16,1, 6,2$ Hz, 1H), 2,63 – 2,56 (m, 1H), 2,52 – 2,44 (m, 1H), 2,35 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H), 2,05 (dd, $J = 16,1, 1,7$ Hz, 1H)	2,34 – 2,13 (m, 4H)	28,0	28,4	28,7
3	1,81 – 1,71 (m, 2H), 1,71 – 1,55 (m, 5H),	1,87 – 1,79 (m, 1H), 1,78 – 1,69 (m, 1H), 1,69 – 1,51 (m, 5H)	1,81 – 1,75 (m, 1H), 1,74 – 1,68 (m, 1H), 1,64 – 1,56 (m, 1H), 1,54 – 1,44 (m, 1H)	23,1; 22,3 e 21,9	23,1; 22,2 e 22,0	22,1; 22,0 e 20,7
4	1,81 – 1,71 (m, 2H), 1,71 – 1,55 (m, 5H),	1,87 – 1,79 (m, 1H), 1,78 – 1,69 (m, 1H), 1,69 – 1,51 (m, 5H)	1,81 – 1,75 (m, 1H), 1,74 – 1,68 (m, 1H), 1,64 – 1,56 (m, 1H), 1,54 – 1,44 (m, 1H)	23,1; 22,3 e 21,9	23,1; 22,2 e 22,0	22,1; 22,0 e 20,7

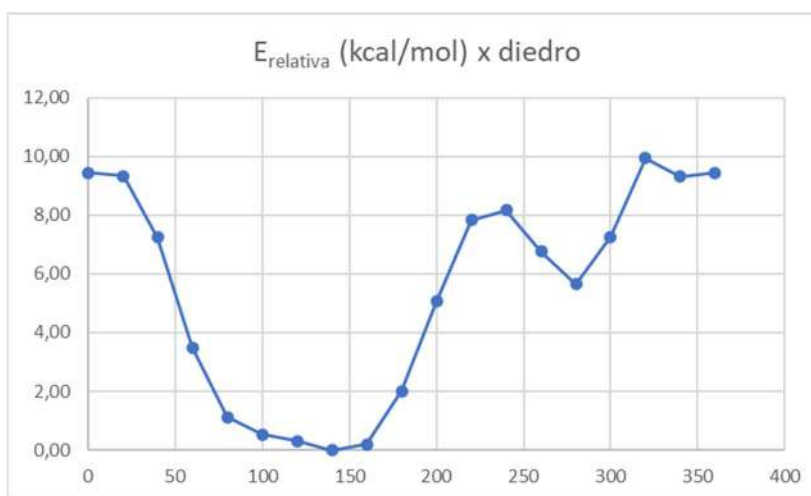
5	2,47 – 2,28 (m, 4H), 1,88 (dd, $J = 16,4, 1,6$ Hz, 1H)	2,72 (dd, $J = 16,1, 6,2$ Hz, 1H), 2,63 – 2,56 (m, 1H), 2,52 – 2,44 (m, 1H), 2,35 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H), 2,05 (dd, $J = 16,1, 1,7$ Hz, 1H)	2,34 – 2,13 (m, 4H)	23,1; 22,3 e 21,9	23,1; 22,2 e 22,0	22,1; 22,0 e 20,7
6				189,6	190,1	192,5
7	2,68 – 2,59 (m, 1H), 2,47 – 2,28 (m, 4H)	2,72 (dd, $J = 16,1, 6,2$ Hz, 1H), 2,63 – 2,56 (m, 1H), 2,52 – 2,44 (m, 1H), 2,35 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H)	2,46 (dd, $J = 16,8, 13,3$ Hz, 1H), 2,40 (dd, $J =$ 16,7, 3,9 Hz, 1H)	41,4	42,2	43,2
8	3,47 (quid, $J = 6,6, 1,6$ Hz, 1H)	3,52 (quid, $J = 6,5, 1,7$ Hz, 1H)	4,44 (dq, $J = 12,7,$ 6,4, 3,9 Hz, 1H)	54,3	54,6	74,5
9				106,1	107,3	111,9
10				156,7	155,7	171,4
11	1,24 (d, $J = 6,7$ Hz, 3H),	0,62 (d, $J = 6,7$ Hz, 3H),	1,42 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H),	17,3	16,3	20,7
12						
13	5,15 (q, $J = 7,0$ Hz, 1H)	5,19 (q, $J = 6,9$ Hz, 1H)		47,6	46,8	
14				142,2	139,0	
15	7,39 – 7,27 (m, 5H)	7,40 – 7,36 (m, 4H), 7,34 – 7,30 (m, 1H)		126,5	128,2	
16	7,39 – 7,27 (m, 5H)	7,40 – 7,36 (m, 4H), 7,34 – 7,30 (m, 1H)		128,7	128,4	
17	7,39 – 7,27 (m, 5H)	7,40 – 7,36 (m, 4H), 7,34 – 7,30 (m, 1H)		127,6	127,9	
18	7,39 – 7,27 (m, 5H)	7,40 – 7,36 (m, 4H), 7,34 – 7,30 (m, 1H)		128,7	128,4	

19	7,39 – 7,27 (m, 5H)	7,40 – 7,36 (m, 4H), 7,34 – 7,30 (m, 1H)		126,5	128,2	
20	1,71 – 1,55 (m, 5H),	1,69 – 1,51 (m, 5H),		17,7	18,1	

### 3.2.5 Proposta de estereoquímica da metila do núcleo cromenimina

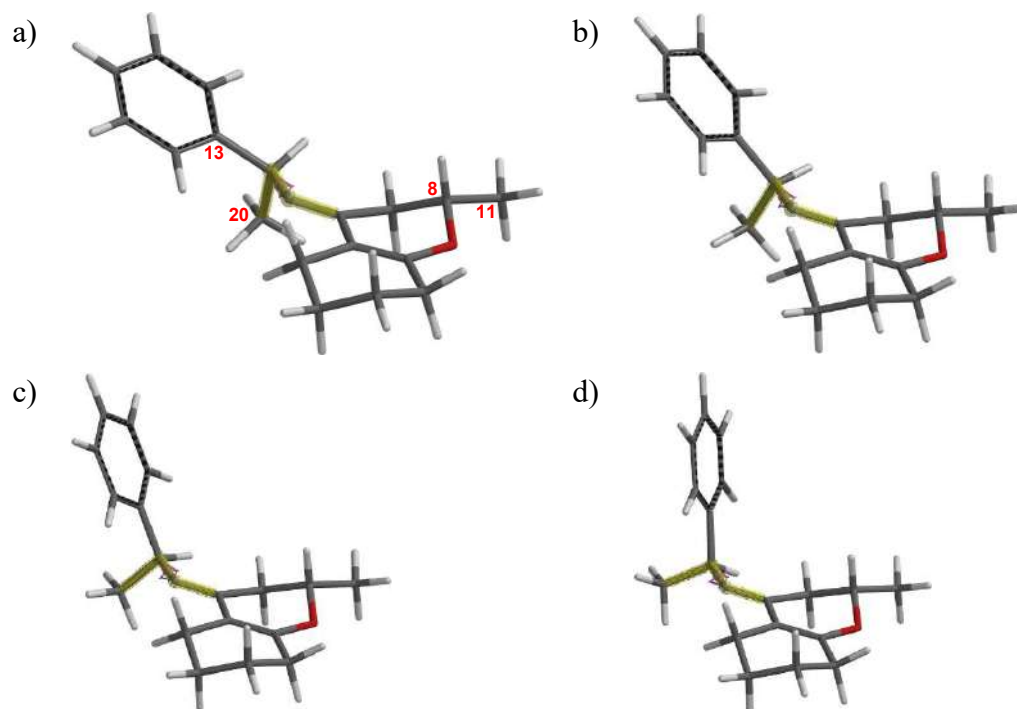
Essa diferença entre os deslocamentos químicos dos sinais de ressonância atribuídos aos hidrogênios da metila da 6-oxo e aos das metilas dos diastereoisômeros **222a** e **222b** parece ter sua origem na presença do grupo arila do auxiliar quiral. Assumindo-se a hipótese de que o grupo arila pode se posicionar de forma que a metila das iminas esteja sobre uma das faces do grupo arila, isso causaria a blindagem desses núcleos, e faria com que os hidrogênios da metila das aminas fossem mais blindados do que os hidrogênios da metila da 6-oxo. Além disso, como as metilas das iminas tem orientações espaciais diferentes, o isômero **222b** poderia ter sua metila posicionada mais próxima do cone de proteção do grupo arila e isso permitiria atribuir a estereoquímica absoluta do carbono quiral C8, já que a estereoquímica absoluta do auxiliar quiral é conhecida.

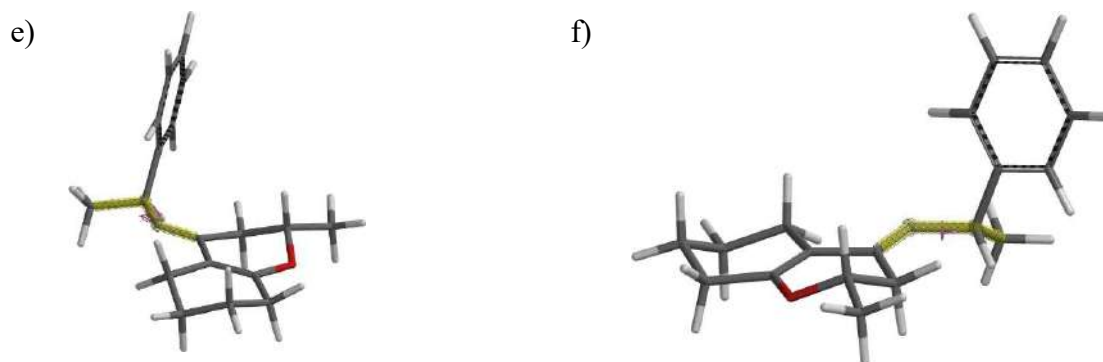
Na busca da elucidação dessa estereoquímica absoluta para os isômeros **a** e **b** da imina **222**, recorreu-se à química computacional. Foi realizado um experimento de busca conformacional no *software* Spartan 14 versão 1.1.4, empregando-se o método Hartree Fock utilizando o conjunto de funções de base 6-31G\*. O experimento consistiu na otimização das estruturas químicas obtidas pela rotação em torno da ligação N12-C13. Para isso, foi realizado um primeiro experimento de minimização de energia e baseado na estrutura obtida foi estabelecido o diedro C6=N12-C13-C20(Ph), que foi mantido fixo em cada um dos 18 passos de otimização, e que diferiram entre si pelo incremento sucessivo de 20° no ângulo diedro, até que se completasse 360°. A energia de cada estrutura otimizada foi expressa como energia relativa (kcal/mol) à menor energia observada, e sua variação em função do ângulo do diedro pode ser observada no gráfico da Figura 63.



**Figura 63.** Gráfico da Energia relativa X ângulo do diedro da imina **222a**.

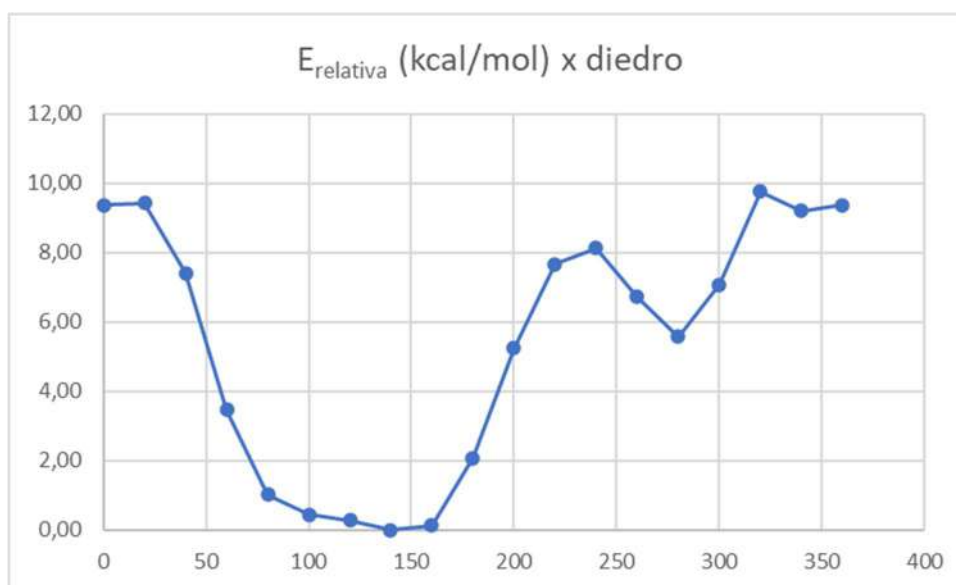
A análise da Figura 63 permite observar a presença de 2 mínimos de energia, um na região que tem o ângulo diedro C6=N12-C13-C20(Ph) entre 80° – 160° e outro em 280°, com diferença de energia de 5,64 kcal/mol entre ambos. Pode-se inferir, baseado nessa diferença de energia, que as estruturas com maior população seriam aquelas com conformação que apresentam esse ângulo do diedro entre 80° – 160°. A Figura 64 contém a conformação adotada para os ângulos de 80°, 100°, 120°, 140° e 160°. É possível verificar, a cada incremento, o alinhamento gradual da ligação C13-C20(Ph), proveniente da (*S*)-(-)-1-fenetilamina, com a ligação C8 – H8, oriunda do anel piranona, disposta na posição pseudo-axial. O mínimo de energia é alcançado quando a conformação dispõe essas ligações de forma praticamente paralelas, ângulo de diedro C6=N12-C13-C20(Ph) igual a 140° (Figura 64d e 64f). O paralelismo entre essas ligações que englobam as estruturas compreendidas entre 80° – 160° dispõe o átomo de hidrogênio ligado ao C8, sob influência do efeito de blindagem anisotrópica do grupo fenila. Tal efeito sobre o átomo de hidrogênio é bastante sutil quando se comparam os espectros de RMN de <sup>1</sup>H dos dois isômeros de **222**, com ambos diferindo apenas 0,05 ppm (Tabela 14 e Figura 62).





**Figura 64.** Conformações de **222a** obtidas no experimento de busca conformacional com o ângulo de diedro C6=N12-C13-C20(Ph) (amarelo) mantido fixo em: **a)** 80°; **b)** 100°; **c)** 120°, **d)** 140°, **e)** 160° e **f)** 140° com enfoque no paralelismo entre a ligação C13-C20(Ph) e a ligação C8-H8 orientada na posição pseudo-axial.

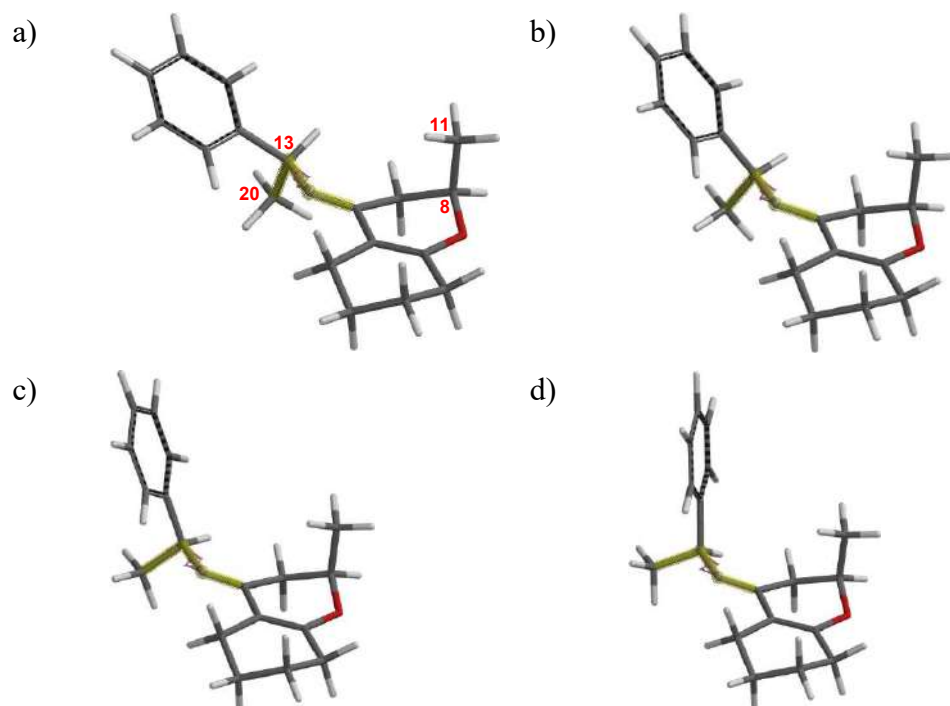
Quando foram analisados os resultados obtidos para o outro isômero de **222**, que coloca o grupo metila na posição pseudo-axial do anel piranimina, percebe-se um gráfico de energia relativa em função do ângulo do diedro bastante similar ao obtido para o primeiro isômero (Figura 65). Assim, como o observado para **222a**, **222b** também apresenta duas regiões com mínimo de energia, uma com os ângulos de diedro variando entre 80° – 160° e a outra em 280°, apresentando diferença de energia relativa entre essas duas regiões de 5,57 kcal/mol.

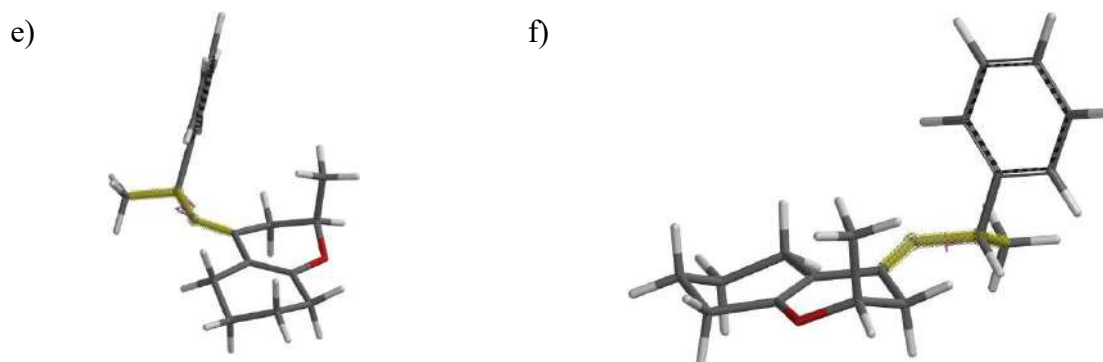


**Figura 65.** Gráfico da Energia relativa X ângulo do diedro da imina **222b**.

De maneira similar ao primeiro isômero analisado, se esperava que a maior densidade populacional de **222b** apresente-se nas conformações que dispõem o ângulo de diedro C6=N12-C13-C20(Ph) entre 80° – 160° (Figura 65). Aqui, também observa-se o alinhamento gradual da

ligação C13 – C20(Ph), proveniente da (*S*)-(-)-1-fenetilamina, com a ligação C8 – C11(Me) disposta na posição pseudo-axial, até se alcançar o mínimo de energia, quando a conformação dispõe essas ligações de forma praticamente paralelas, ângulo do diedro C6=N12-C13-C20(Ph) igual a 140° (Figura 66 - d e f). No entanto, dessa vez, a metila C11 ocupa a posição pseudo axial, maior e mais volumosa que o átomo de hidrogênio, fazendo com que a blindagem decorrente do efeito de anisotropia magnética do grupo fenila se apresentasse mais perceptível para esse. Quando se observam os deslocamentos químicos do sinal atribuído às metilas C11 de **222a** e **222b** no RMN de  $^1\text{H}$ , é possível perceber uma diferença de 0,62 ppm entre esses isômeros, 1,24 ppm para o isômero com a metila na posição pseudo equatorial, e 0,62 ppm para o isômero com a metila na posição pseudo axial (Tabela 14 e Figura 62). Diferença superior à de 0,05 ppm experimentada pelo átomo de hidrogênio na posição 8. Tal discrepância sobre o efeito de blindagem experimentado por essas metilas pode ser atribuída à disposição das mesmas nos dois diferentes diastereoisômeros. Desta forma, baseados nos experimentos de busca conformacional teórica e espectroscopia de RMN, foi possível propor a configuração (*8S*, *13S*) para a molécula **222a**, e a configuração (*8R*, *13S*) para a imina **222b**.



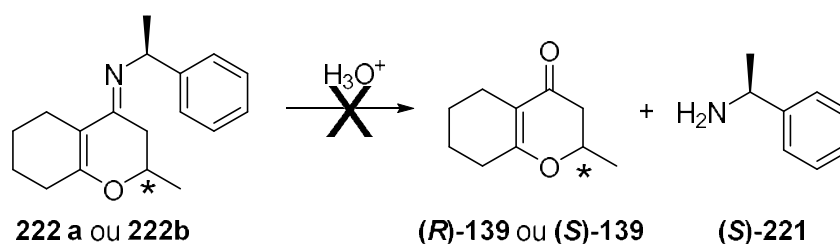


**Figura 66.** Conformações de **222b** obtidas no experimento de busca conformacional com o ângulo de diedro C6=N12-C13-C20(Ph) (amarelo) mantido fixo em : **a)** 80°; **b)** 100°; **c)** 120°, **d)** 140°, **e)** 160° e **f)** 140° com enfoque no paralelismo entre a ligação C13-C20(Ph) e a ligação C8-H8 orientada na posição pseudo-axial.

### 3.2.6 Hidrólise dos diastereoisômeros de 222

De posse dos diastereoisômeros **222a** e **222b** e tendo-se atribuído suas configurações como (*S,S*) e (*R,S*), respectivamente, restava realizar a hidrólise de ambos, para a obtenção dos isômeros *S* e *R* da 6-oxo. De forma similar à formação dos diastereoisômeros, a hidrólise para a lactona viniloga se mostrou ainda mais desafiadora, e, apesar do esforço despendido, em nenhuma das tentativas foi possível isolá-la. Aparentemente, o núcleo cromeimina formado nas iminas **222 a** e **b** se mostrava mais estável que as cromenonas análogas (*R*)-6-oxo e (*S*)-6-oxo, como aquelas descritas por Wu na resolução da ( $\pm$ )-pinocembrina (Tabela 15).

**Tabela 15.** Condições testadas para hidrólise dos diastereoisômeros **222 a** e **b**.

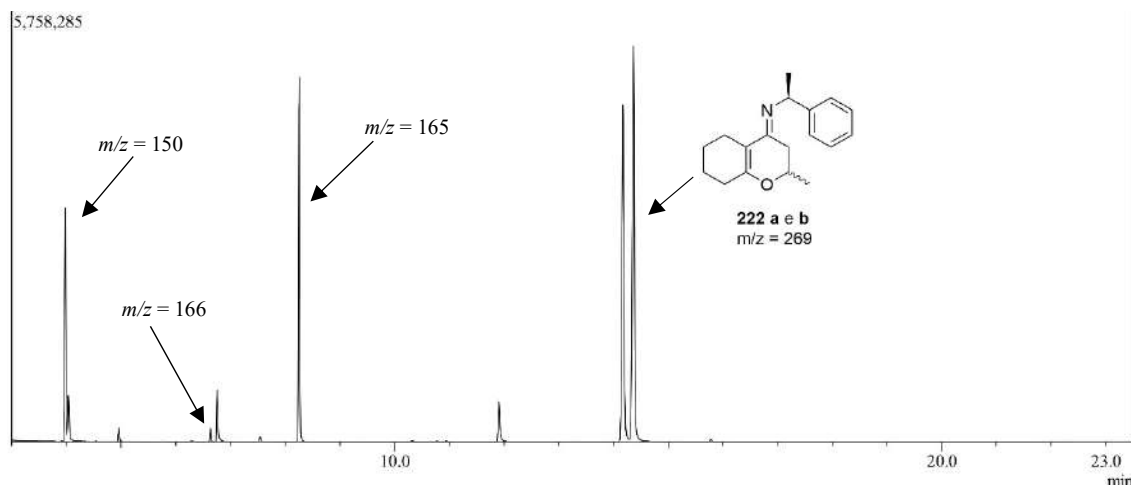


Entrada	Catalisador	Solvente	Temperatura	Tempo	139 ( <i>R</i> ) ou ( <i>S</i> ) (%)
1	HCl 1 mol/L	AcOEt:EtOH	Refluxo	1,5 h	-
2	HCl 10%	AcOEt:EtOH	Refluxo	2 h	-
3	HCl 10%	AcOEt:EtOH	Refluxo	16 h	-
4	HCl 10%	AcOEt:EtOH	T.A.	24 h	-
5	HCl 10%	AcOEt:EtOH	T.A.	72 h	-



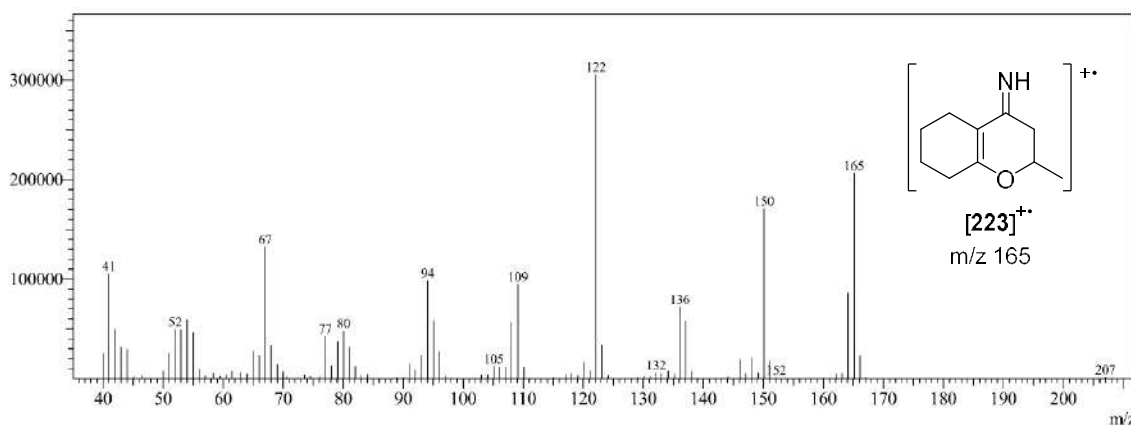
6	HCl 10%	AcOEt:EtOH	T.A.	96 h	-
7	HCl 1 mol/L	EtOH	Refluxo	1,5 h	-
8	HCl 10%	EtOH	Refluxo	2,5 h	-
9	HCl 10%	EtOH	Refluxo	24 h	-
10	SiO <sub>2</sub> , US	H <sub>2</sub> O	T.A.	1 h	-
12	SiO <sub>2</sub> , US	<i>i</i> -PrOH:H <sub>2</sub> O	T.A.	4 h	-
12	SiO <sub>2</sub>	<i>i</i> -PrOH:H <sub>2</sub> O	refluxo	24 h	-
13	SiO <sub>2</sub>	<i>i</i> -PrOH:H <sub>2</sub> O	refluxo	72 h	-
14	SiO <sub>2</sub> , MO	<i>i</i> -PrOH:H <sub>2</sub> O	80 °C	10 min	-
15	SiO <sub>2</sub> , MO	H <sub>2</sub> O	90 °C	15 min	-
16	SiO <sub>2</sub> , MO	H <sub>2</sub> O	100 °C	2 h	-
17	HCl 37%	MeCN	T.A.	5 min	-
18	HCl 37%	MeCN	Refluxo	24 h	-

A análise por CCD durante o acompanhamento reacional não evidenciou a formação dos produtos de hidrólise desejados. De forma geral, os dados de GC/MS para os brutos reacionais apresentavam o material de partida e alguns possíveis produtos de degradação. O traço cromatográfico apresentado na Figura 67 foi obtido da reação de hidrólise dos diastereoisômeros **222a** e **222b**, utilizando HCl 10% e solução AcOEt:EtOH como solvente sob refluxo de 16 horas (Tabela 15, entrada 3). Foram observados 10 sinais ao todo, sendo 4 deles bastante intensos. O primeiro sinal foi observado no tempo de retenção 4 min e com  $m/z$  150, o segundo foi observado no tempo de retenção 8,3 min e razão  $m/z$  165, e dois sinais foram observados nos tempos de retenção 14,2 e 14,4 min com razão  $m/z$  269, foram atribuídos aos diastereoisômeros **222a** e **222b**. Dentre os picos menos intensos, um em 6,6 min, apresenta razão  $m/z$  166. Este valor coincide com a massa apresentada por 6-oxo, e apresenta padrão de fragmentação idêntico ao da Figura 57, tais indícios são indicativos que a metodologia gera o produto desejado, mas em proporção muito baixa.



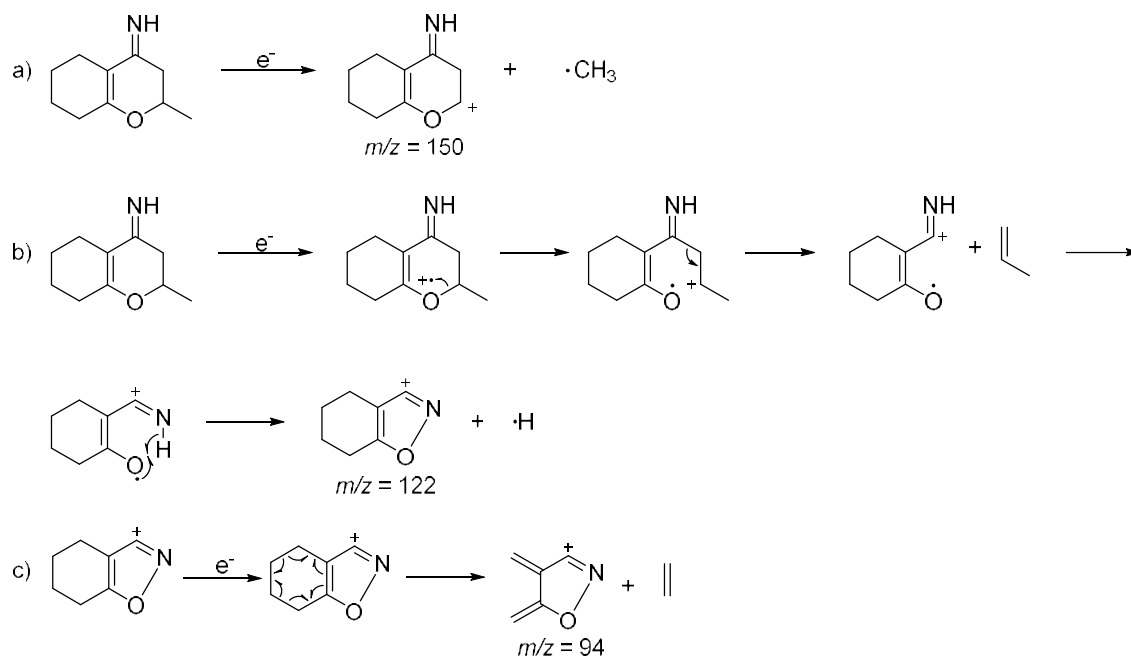
**Figura 67.** Cromatograma do bruto reacional da hidrólise dos diastereoisômeros **222 a e b**.

Apesar da reação de hidrólise não conduzir à formação de quantidades consideráveis de **139**, o sinal cromatográfico com tempo de retenção 8,3 minutos estava sendo obtido em grande proporção. Ele apresentou o íon  $m/z$  165 e os fragmentos do espectro de massa dessa estrutura eram bastante similares àqueles evidenciados na Figura 57, diferindo apenas em 1 ou 2 unidades (Figura 68). Tal característica nos levou a considerar que o íon com  $m/z$  165 se tratava da cromenimina **223**, como sendo a responsável pelo pico em 8,3 minutos e razão  $m/z = 165$ .



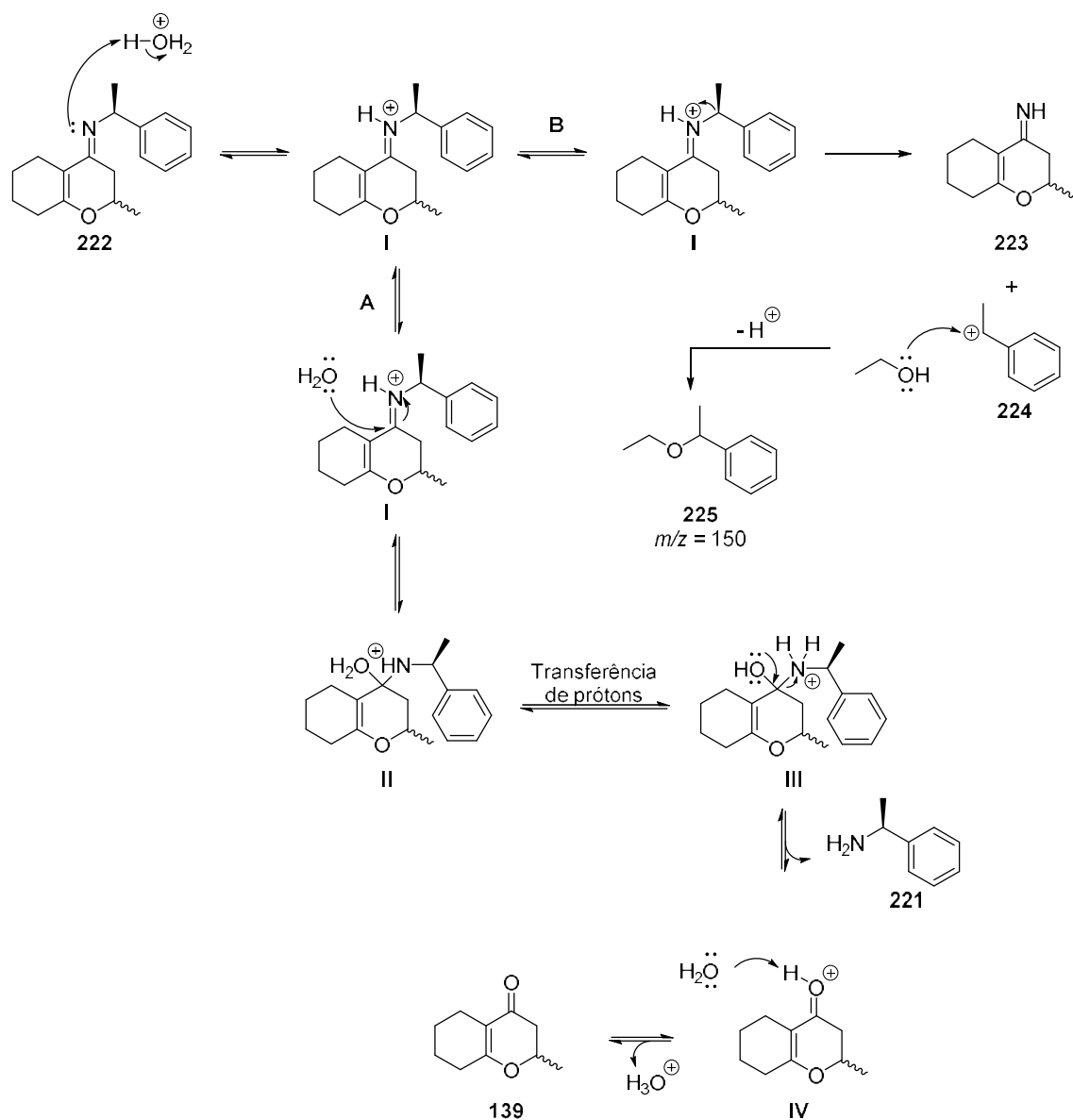
**Figura 68.** Espectro de massas por impacto de elétrons do composto com razão  $m/z = 165$ .

Considerando que a estrutura referente à **223**, seja de fato, a cromenimina proposta, a primeira fragmentação ocorre devido à perda do grupo metila radical, originando o pico  $m/z$  150 (Esquema 24, letra a). O íon do pico base  $m/z = 122$  é formado após a eliminação de propeno, seguida da formação do cátion isoxazóila e perda de hidrogênio radical (Esquema 25, letra b). Esse mesmo imínio cíclico pode sofrer fragmentação do tipo retro Diels-Alder e formar o íon molecular  $m/z = 94$  (Esquema 25, letra c).



**Esquema 25.** Propostas de mecanismo de fragmentação de **223**.

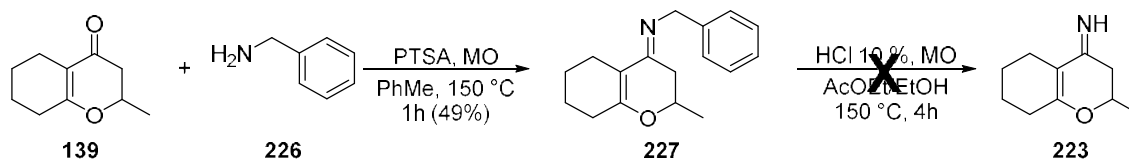
Uma provável explicação da formação do composto **223** pode ser fornecida com base no mecanismo de formação desse composto e **139** (Esquema 26). O primeiro passo é a protonação da imina **222**, levando à formação do intermediário imínio **I**. Nesse ponto, o mecanismo pode seguir por dois caminhos distintos. Seguindo o caminho A, o intermediário imínio **I**, bastante eletrofílico, sofre ataque nucleofílico da água, formando o intermediário hemiaminal **II**. Este, por sua vez, realiza a transferência de prótons, **III**, e os pares de elétrons não ligantes do átomo de oxigênio formam a ligação C = O, eliminando a molécula **221** no processo, e originando o íon oxocarbênio **IV**. A última etapa consiste na remoção do próton do íon oxocarbênio **IV** levando à formação da 6-oxo, **139**. Seguindo o caminho B, o intermediário **I** pode sofrer a quebra heterolítica da ligação  $\sigma$  N – C, originando o composto **223** e o cátion benzílico secundário **224**. A formação desse, pode ser evidenciada na análise por GC/MS pela presença do pico em 4,0 min e  $m/z$  150 (figura 66), atribuído à formação do 1-etóxiethylbenzeno, **225**.



**Esquema 26.** Mecanismo de formaço dos compostos **139** e **223**.

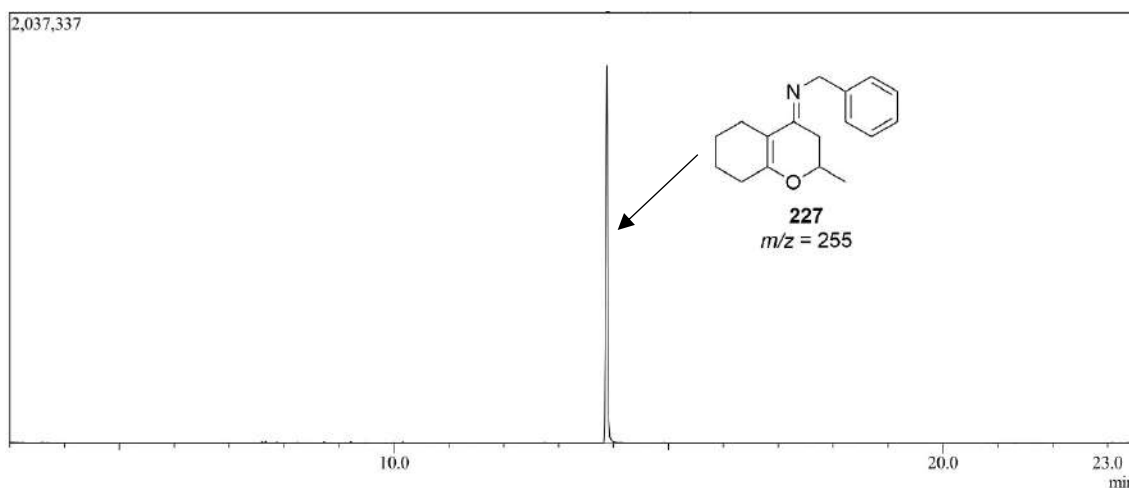
Tendo em vista que a proporço de **223** formada é bastante superior à quantidade de **139**, bem como a identificaço do subproduto **225**, pode-se inferir que a reaço ocorra majoritariamente pelo caminho **B**, através da quebra heterolítica e formaço do cátion benzílico secundário. A formaço deste carbocátion em detrimento à adiço da água ao eletrófilo imínio pode ser justificada em função da estabilidade promovida pelas estruturas de ressonância do primeiro.

Como forma de verificar a estabilidade do cátion benzílico secundário, foi realizada a síntese do composto **227**, cromenimina derivada da 6-oxo com a benzilamina **226**, baseada na metodologia estipulada para a síntese de **222**, submetendo-se, em seguida, a molécula à condiço de hidrólise (Esquema 27).



**Esquema 27.** Sequência reacional de formação da imina **227**, seguida da tentativa de hidrólise.

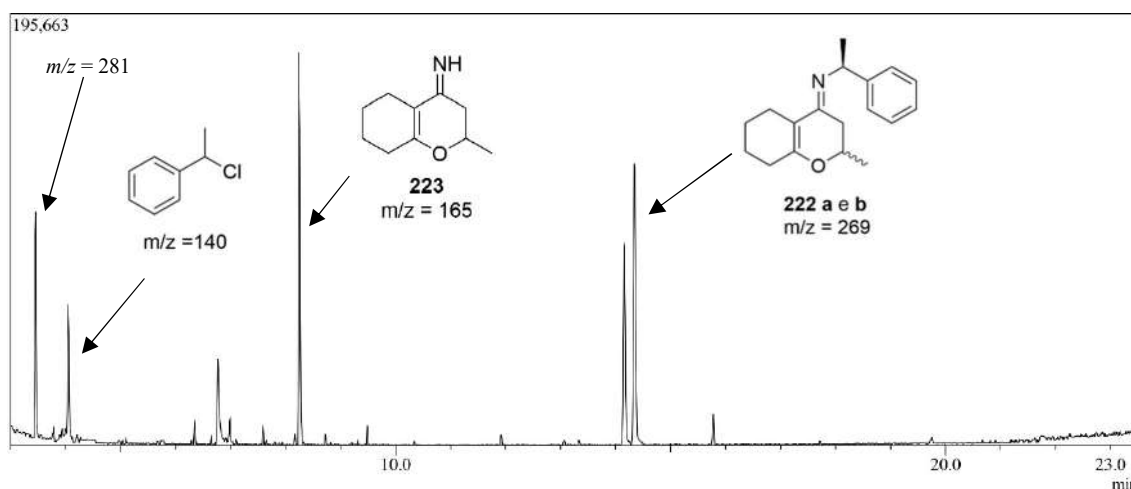
O cromatograma do bruto reacional pode ser observado na Figura 69. Apesar de serem percebidos alguns sinais entre 7,9 e 9,9 min, o sinal com maior área foi observado em 13,9 min e  $m/z = 255$ , referente à imina **227**. O sinal em 8,3 min, referente à formação da cromenimina **223** foi detectado nesta análise como apenas 0,09% de área total. A formação deste, a partir de **227**, também ocorre através da quebra heterolítica da ligação  $\sigma$  N – C, no entanto, gera um cátion benzílico primário, menos estável que o cátion secundário obtido quando **222** é submetida à condição de hidrólise. Tal fato pode ser um dos fatores que explica a baixa conversão de cromenimina **223** a partir de **227**. Destaca-se também a ausência do sinal em 6,3 min, referente à formação de 6-oxo. Era esperada maior formação deste, uma vez que a estabilidade do carbocátion benzílico havia diminuído. Tal fato indica, possivelmente, que a barreira energética necessária para a adição nucleofílica de água ao imínio seja muito grande por meio desta metodologia.



**Figura 69.** Cromatograma do bruto reacional da reação de hidrólise da imina **226**.

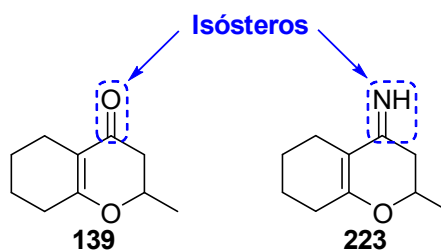
Condições mais drásticas de hidrólise de **222**, empregando HCl 37% também foram avaliadas. Esperava-se que, ainda após a formação de **223** fosse possível convertê-la em 6-oxo. Mesmo sob condições de refluxo por 24 horas (Tabela 15, entrada 18), não foram observadas quantidades relevantes de 6-oxo enquanto a proporção de **223** era cada vez mais presente (Figura 70). A formação do carbocátion benzílico pode ser observada por meio do aparecimento

do sinal em 4,1 min, com razão  $m/z$  140, relativo à formação do 1-cloroetilbenzeno. O sinal em 3,5 minutos, com razão  $m/z$  281 não teve sua estrutura definida.



**Figura 70.** Cromatograma do bruto de hidrólise da molécula **222** sob refluxo de HCl 37% por 24 horas.

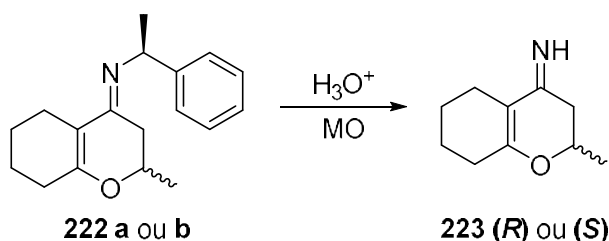
Apesar do insucesso na obtenção dos isômeros (*R*)-**139** e (*S*)-**139**, a reação de hidrólise foi capaz de fornecer o composto inédito **223**. Espera-se que a substituição do átomo de oxigênio da carbonila pelo N – H da imina, possa acarretar em mudanças na inibição da biossíntese da violaceína, uma vez que tal mudança pode provocar alterações consideráveis no  $pK_a$ , além de adicionar um novo doador de ligação de hidrogênio na estrutura (Figura 71). Este bioisômero da 6-oxo, por sua vez, pode ser obtido nas suas duas formas enantioméricas enriquecidas e além de ajudar a compreender o efeito da estereoquímica com relação à inibição do QS em CV026, quando os testes forem realizados.



**Figura 71.** Relação de bioisosterismo presente nas moléculas **139** e **223**.

O primeiro passo em busca de amostras enriquecidas nos enantiômeros de **223** foi otimizar a reação de formação desse composto. Para isso, se recorreu ao aquecimento sob irradiação de micro-ondas como alternativa para os longos tempos reacionais, utilizando como referência a reação de hidrólise de **222** que gerou a maior proporção de **223** (Tabela 15, entrada 3). Os dados obtidos agrupados na Tabela 16.

**Tabela 16.** Condições experimentais testadas na otimização da obtenção de **223**.



Entrada	Catalisador	Solvente	Temperatura	Tempo	223 (%)
1	HCl 10%	AcOEt:EtOH	80 °C	20 min	14%
2	HCl 10%	AcOEt:EtOH	100 °C	1 h	45%
3	HCl 10%	AcOEt:EtOH	100 °C	2 h	80%
4	HCl 10%	AcOEt:EtOH	150 °C	1,25 h	81%
5	HCl 10 %	AcOEt:EtOH	150 °C	2	68%

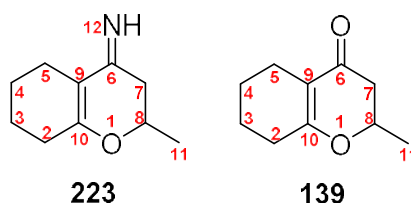
Os experimentos em micro-ondas são adaptações do procedimento de Wu e colaboradores na resolução do alcaloide ( $\pm$ )-pinocembrina,<sup>110</sup> na qual a hidrólise da fenetilamina **221** era realizada numa solução AcOEt:EtOH na presença de HCl. A utilização do MO na temperatura de 80 °C resultou no baixo rendimento obtido de **223** (Tabela 16, entrada 1). O aumento da temperatura para 100 °C, juntamente com o aumento do tempo reacional resultou em aumentos expressivos na quantidade de cromenimina isolada (Tabela 16, entradas 2 e 3). Um novo incremento na temperatura, dessa vez para 150 °C, resultou em quantidades análogas de **223** isolada, com redução de 45 minutos no tempo reacional (Tabela 16, entrada 4). Maiores incrementos no tempo, mantendo a temperatura em 150 °C, resultaram no aumento da quantidade de subprodutos e, conseqüentemente, redução na quantidade de **223** obtida (Tabela 16, entrada 5).

De posse da melhor condição experimental para a formação de **223** (Tabela 16, entrada 4), restava a obtenção desses enantiômeros a partir dos diastereoisômeros (*S,S*)-**222** e (*R,S*)-**222**. As cromeniminas (*R*)-**223** e (*S*)-**223** foram caracterizadas por espectrometria de massa e RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$ . A massa molecular da imina (*R*)-**223** foi confirmada por meio de EMAR com variação de 1,8 ppm, massa teórica ( $M + 1$ ) 166,1232 u.m.a., massa obtida ( $M + 1$ ) 166,1229 u.m.a., a massa da imina (*S*)-**223** apresentou variação de 1,2 ppm, massa obtida ( $M + 1$ ) 166,1230 u.m.a..

Os dados de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  das moléculas **223** e **139** foram agrupados na tabela 17. De forma geral, os deslocamentos químicos são bastante similares nas duas moléculas. Assim como no caso das iminas **222**, a substituição do átomo de oxigênio pelo nitrogênio na molécula

**223** provoca o aumento da blindagem dos carbonos na ligação dupla C=C em aproximadamente 8 ppm quando comparado a **139**. Tal efeito é ainda mais pronunciado no carbono quiral C8 que é deslocado cerca de 26 ppm para uma região mais blindada. Isto também pode ser observado no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , no qual houve aumento da blindagem em cerca de 0,7 ppm e convertendo o duplete de quarteto de dupletos de **139** em um multipletto na molécula **223**. Os sinais referentes aos hidrogênios na posição 7 de **139** também foram impactados com o aumento de blindagem provocado pela formação da imina e foram deslocados para a mesma região dos hidrogênios nas posições 2 e 5, resultando na formação de um multipletto na região de 2,37 – 2,13. Os átomos nas posições 3 e 4, pouco foram afetados, possivelmente, em decorrência da distância da ligação C=N, apresentando deslocamentos químicos bastante similares nas duas moléculas. Por fim, a metila na posição 11 também é submetida à influência da imina, apresentando um sutil aumento na blindagem, se mostrando como um duplete em 1,28 ppm. Infelizmente, o hidrogênio ligado ao nitrogênio não pôde ser detectado neste experimento, uma vez que o mesmo foi adquirido em metanol deuterado.

**Tabela 17.** Dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 22 °C) das substâncias **223** e **139**.

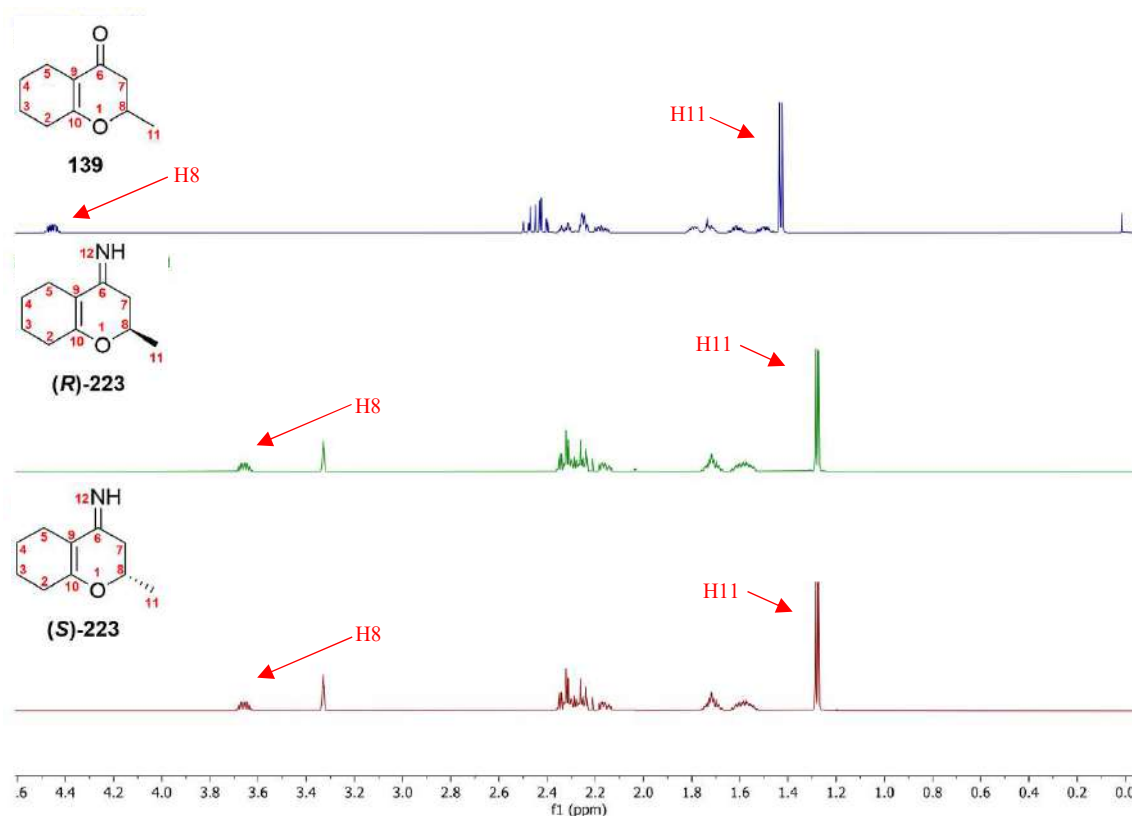


Posição	$^1\text{H}$ $\delta$ (multiplicidade, integração)		$^{13}\text{C}$ $\delta$	
	<b>223</b>	<b>139</b>	<b>223</b>	<b>139</b>
1	-	-	-	-
2	2,37 – 2,13 (m, 6H)	2,34 – 2,13 (m, 4H)	28,2	28,7
3	1,76 – 1,67 (m, 2H) e 1,64 – 1,52 (m, 2H)	1,81 – 1,75 (m, 1H), 1,74 – 1,68 (m, 1H), 1,64 – 1,56 (m, 1H), 1,54 – 1,44 (m, 1H)	22,3; 21,7 e 20,7	22,1; 22,0 e 20,7
4	1,76 – 1,67 (m, 2H) e 1,64 – 1,52 (m, 2H)	1,81 – 1,75 (m, 1H), 1,74 – 1,68 (m, 1H), 1,64 – 1,56 (m, 1H), 1,54 – 1,44 (m, 1H)	22,3; 21,7 e 20,7	22,1; 22,0 e 20,7



5	2,37 – 2,13 (m, 6H)	2,34 – 2,13 (m, 4H)	22,3; 21,7 e 20,7	22,1; 22,0 e 20,7
6			192,2	192,5
7	2,37 – 2,13 (m, 6H)	2,46 (dd, J = 16,8, 13,3 Hz, 1H), 2,40 (dd, J = 16,7, 3,9 Hz, 1H)	42,8	43,2
8	3,70 – 3,62 (m, 1H)	4,44 (dq, J = 12,7, 6,4, 3,9 Hz, 1H)	48,0	74,5
9			103,7	111,9
10			163,5	171,4
11	1,28 (d, J = 6,3 Hz, 3H),	1,42 (d, J = 6,3 Hz, 3H),	18,3	20,7
12	Não observável em CD <sub>3</sub> OD			

A Figura 72 contém a ampliação dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H na janela espectral entre 4,6 e -0,5 ppm, evidenciando a igualdade esperada para os isômeros (*R*) e (*S*) de **223** e a similaridade com **139**. Como reportado previamente, não foi possível evidenciar o sinal referente ao hidrogênio da ligação N – H, uma vez que ele é trocado com o deutério de CD<sub>3</sub>OD. Apesar da possibilidade de observação deste sinal, tentativas de realizar o espectro em CDCl<sub>3</sub> resultavam na formação de produtos de degradação que se sobrepunham aos sinais de **223**.

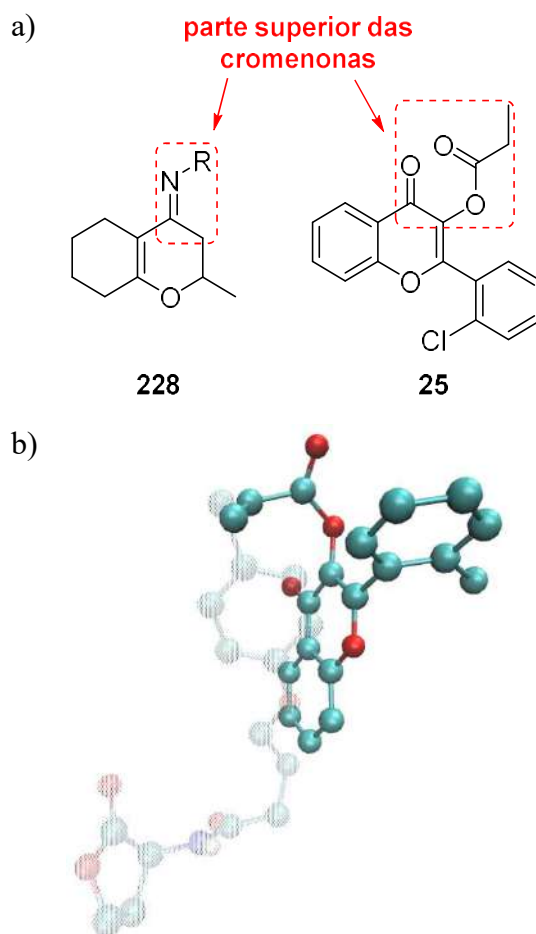


**Figura 72.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $22\text{ }^\circ\text{C}$ ) das substâncias (*S*)-223, (*R*)-223 e 139.

### 3.2.7 Síntese de novos derivados nitrogenados de 6-oxo

Como reportado anteriormente, lactonas vinílogas como a 6-oxo mimetizam interações importantes das *N*-acil homoserina lactonas, o que pode ser afirmado dada sua capacidade de inibição da biossíntese de violaceína no sistema de QS de CV026.<sup>84</sup> Dessa forma, espera-se que seu bioisômero **223**, também seja capaz de interferir no sistema de QS de *Chromobacterium*. A substituição do átomo de oxigênio da carbonila por um átomo de nitrogênio, além de poder promover mudanças na acidez do composto, também insere um ponto de ancoragem de substituintes, permitindo a incorporação de novos fragmentos nessa porção da molécula.

De fato, a presença de substituintes na região próxima à carbonila das cromenonas exerce um efeito positivo na interferência de diferentes sistemas de QS, como foi relatado por Fallarero,<sup>23</sup> ao mostrar que a cromenona **25** inibe a síntese de violaceína em *Chromobacterium*. (Figura 73a).

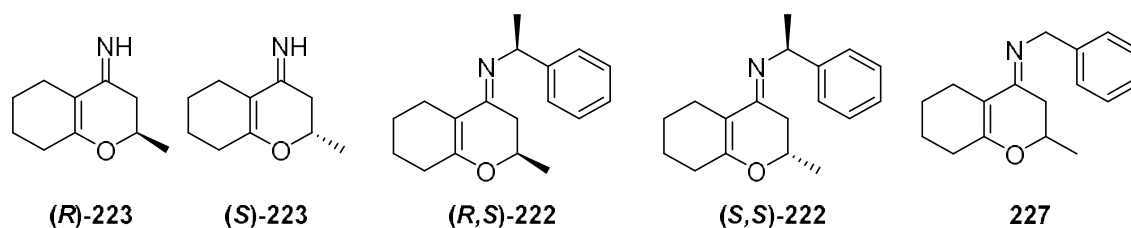


**Figura 73 - a)** Comparação das partes superiores das moléculas **228** e **25**; **b)** sobreposição de **25** com a estrutura do inibidor **22** no sítio de interação CviR de CV026.

Para avaliar como **25** se posiciona no LBD da CviR de CV026, foi realizado um experimento de ancoragem molecular (figura 73b). Apesar da substituição das estruturas **228** e **25** não serem exatamente na mesma posição, ambas se desenvolvem no mesmo sentido, posição próxima à carbonila das cromenonas (Figura 73a). O efeito desse substituinte, em especial da disposição da carbonila e do grupo substituinte  $\alpha$ -carbonílico de **25** pode ser observado no experimento de ancoragem molecular, no qual se observa o posicionamento desta parte da molécula na mesma direção do cloreto do grupo arila do inibidor sintético **22** (Figura 73b). Tal interação na direção do resíduo de aminoácido Met89, como proposto por Bassler e colaboradores<sup>92</sup> é a responsável por promover o forte efeito inibitório de **22**. Dessa forma, pode-se supor que a incorporação de diferentes grupos substituintes na porção superior das cromenonas possa torná-las melhores inibidoras ao dispor tal substituintes em direção à Met89.

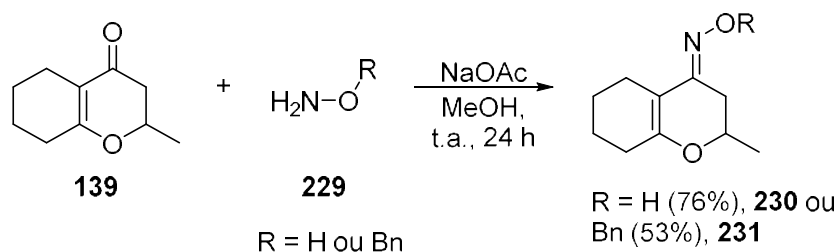
Portanto, buscando aumentar o acervo molecular de compostos potencialmente inibidores do QS de CV026, foi conduzido o estudo da síntese de novos derivados baseados em iminas de 6-oxo.

Durante os ensaios em busca da separação da 6-oxo, três derivados nitrogenados foram sintetizados: os isômeros (*R*) e (*S*)-**223**, os diastereoisômeros (*R,S*) e (*S,S*)-**222** e **227** (Figura 74). Pensando em aumentar a variabilidade de compostos imínicos formados, foram empregados derivados de aminas primárias, como hidroxilaminas e hidrazinas na obtenção de suas respectivas oximas e hidrazonas.



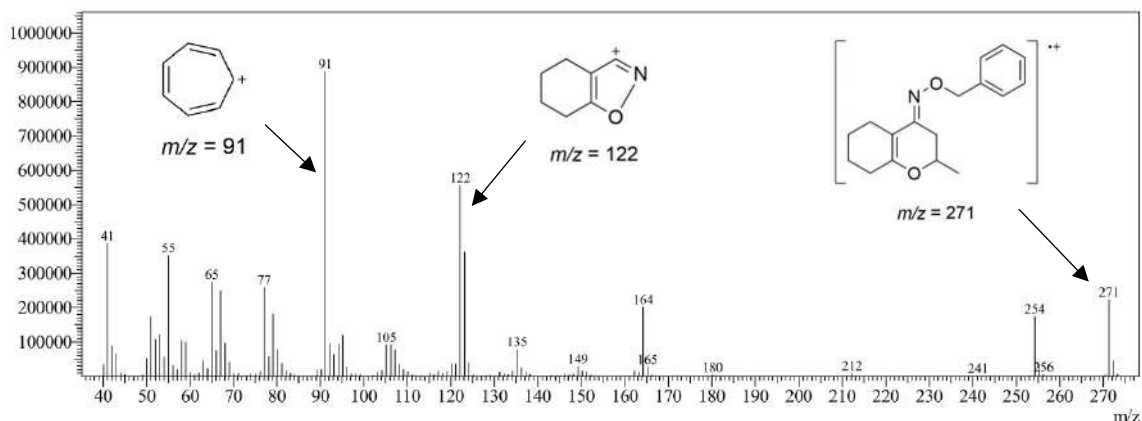
**Figura 74.** Derivados imídicos sintetizados nas etapas anteriores.

A formação das oximas teve por base o trabalho de Heathcock e Hinman,<sup>111</sup> no qual a formação da ligação dupla C=N entre 6-oxo e hidroxilamina **229** foi alcançada na presença de acetato de sódio (NaOAc) em metanol à temperatura ambiente. As oximas **230** e **231** foram obtidas com 76 e 53% de rendimento, respectivamente (Esquema 28).



**Esquema 28.** Formação das oximas **229** e **230** a partir de suas respectivas hidroxilaminas.

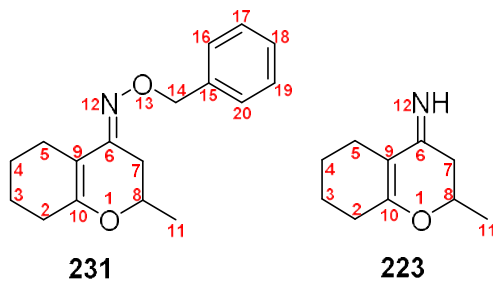
As moléculas **230** e **231** foram caracterizadas por espectrometria de massas e RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C. O espectro de massa da molécula **231** apresentou o pico base com *m/z* 91, referente à formação do íon tropílio, proveniente do fragmento benzílico; e íon molecular *m/z* 271 (25,1 %) (Figura 75). Além desses, o íon *m/z* 122 foi observado com bastante abundância, possivelmente o cátion isoxazoíla, como observado anteriormente para a fragmentação do composto **223** (Esquema 24). A massa exata da oxima **231** foi confirmada por EMAR com variação de 1,1 ppm, massa teórica (M + 1) 272,1645 u.m.a., massa obtida (M + 1) 272,1648.



**Figura 75.** Espectro de impacto por elétrons do composto **231**.

Os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  das moléculas **231** e **223** foram agrupados na Tabela 18. O aparecimento dos multipletos entre 7,42 – 7,35 ppm e 7,34 – 7,30 ppm, bem como o sinal entre 5,15 – 5,08 ppm, ausentes no composto **223**, são referentes aos hidrogênios aromáticos e ao grupo metileno provenientes da *O*-benzil-hidroxilamina. Os efeitos da formação da oxima nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  podem ser verificados em alguns segmentos em ambos os espectros. Os sinais referentes às ligações  $\text{C}=\text{N}$  da imina e  $\text{C}=\text{C}$  do carbono  $\beta$ , 157,6 e 152,2 ppm, não puderam ser distinguidos no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **231**, diferentemente do observado em **223**, no qual tais sinais mostram-se afastados cerca de 30 ppm. Em 4,04 ppm é possível observar o duplete de quarteto de dupletos ( $J = 12,6; 6,3$  e  $3,2$  Hz), integrando para 1 hidrogênio, referente ao próton na posição 8. Tal multiplicidade também está presente na 6-oxo; além disso, o deslocamento químico é encontrado numa posição intermediária entre a 6-oxo (4,44 ppm) e a imina **223** (3,70 – 3,62 ppm). A presença do átomo de oxigênio ligado ao nitrogênio na oxima também pode ser verificada no espectro de  $^{13}\text{C}$  na posição 8, na qual houve o deslocamento em mais de 27 ppm para uma região mais desblindada, quando comparada a **223**. O duplete de dupletos em 3,13 ppm e o multiplete entre 2,38 – 2,32 ppm são alusivos aos hidrogênios diastereotópicos na posição 7, tal diferença de mais de 0,8 ppm pode ser atribuída ao alinhamento de um dos hidrogênios a um dos pares de elétrons não ligantes do oxigênio da oxima. O efeito também é pronunciado no  $^{13}\text{C}$ , no qual existe um aumento de mais de 12 ppm quando comparado ao mesmo sinal em **223**. Os demais sinais de **231** apresentam pouca variação quando comparados com a imina **223**.

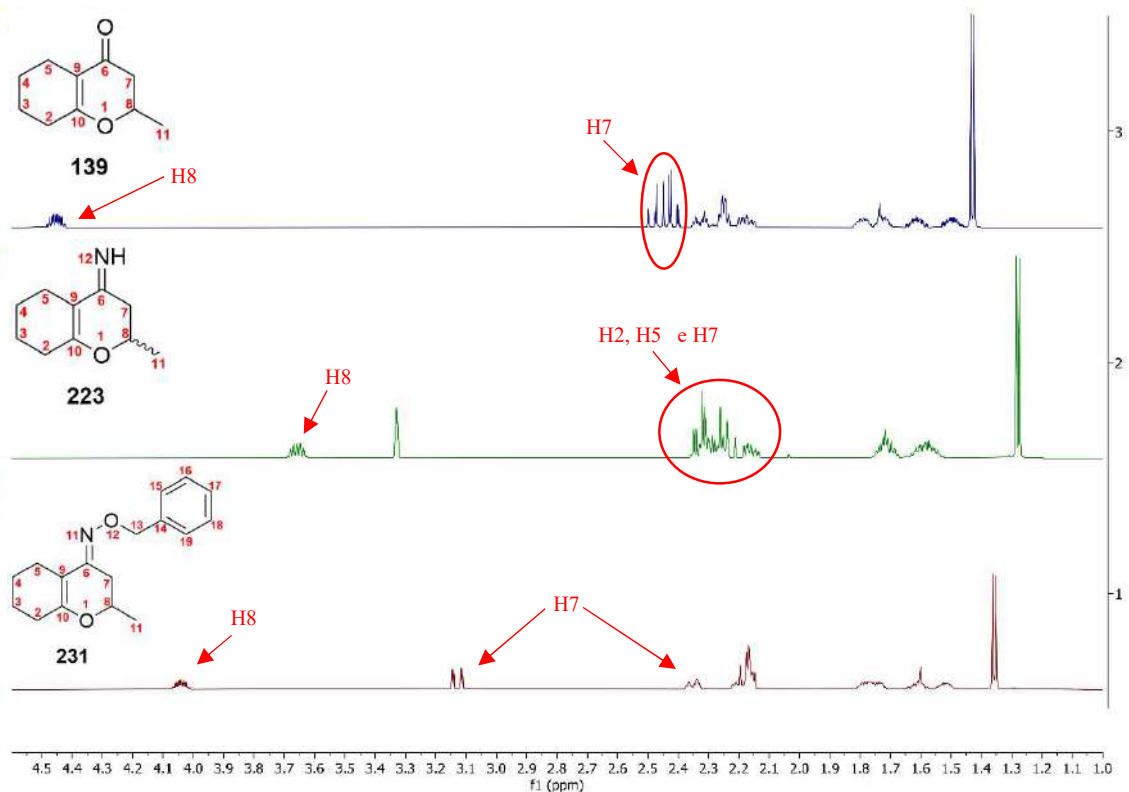
**Tabela 18.** Dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  das substâncias **231** e **223**.



Posição	$^1\text{H}$ / ppm, (multiplicidade, integração)		$^{13}\text{C}$ / ppm	
	231	223	231	223
1	-	-	-	-
2	2,23 – 2,13 (m, 4H)	2,37 – 2,13 (m, 6H)	28,3	28,2
3	1,82 – 1,71 (m, 2H); 1,65 – 1,57 (m, 1H) e 1,56 – 1,48 (m, 1H)	1,76 – 1,67 (m, 2H) e 1,64 – 1,52 (m, 2H)	22,4; 22,2 e 22,1	22,3; 21,7 e 20,7
4	1,82 – 1,71 (m, 2H); 1,65 – 1,57 (m, 1H) e 1,56 – 1,48 (m, 1H)	1,76 – 1,67 (m, 2H) e 1,64 – 1,52 (m, 2H)	22,4; 22,2 e 22,1	22,3; 21,7 e 20,7
5	2,23 – 2,13 (m, 4H)	2,37 – 2,13 (m, 6H)	22,4; 22,2 e 22,1	22,3; 21,7 e 20,7
6			157,6 e 152,2	192,2
7	3,13 (dd, J = 17,0, e 3,3 Hz, 1H), 2,38 – 2,32 (m, 1H)	2,37 – 2,13 (m, 6H)	30,4	42,8
8	4,04 (dq, J = 12,6; 6,3 e 3,2 Hz, 1H)	3,70 – 3,62 (m, 1H)	75,8	48,0
9			105,5	103,7
10			157,6 e 152,2	163,5
11	1,36 (d, J = 6,3 Hz, 3H).	1,28 (d, J = 6,3 Hz, 3H)	20,9	18,3

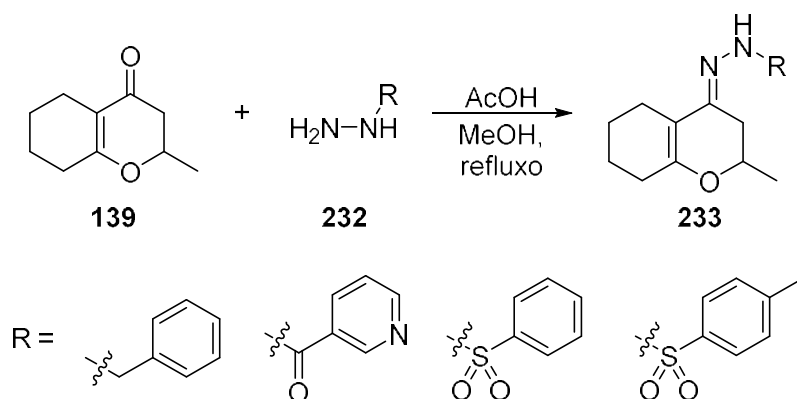
12		Não observável em CD <sub>3</sub> OD		
13	5,15 – 5,08 (m, 2H)		71,3	
14			138,2	
15	7,42 – 7,35 (m, 4H)		128,3 e 128,2	
16	7,42 – 7,35 (m, 4H)		128,3 e 128,2	
17	7,34 – 7,30 (m, 1H)		127,7	
18	7,42 – 7,35 (m, 4H)		128,3 e 128,2	
19	7,42 – 7,35 (m, 4H)		128,3 e 128,2	

A Figura 76 contém a ampliação na janela espectral compreendida entre 4,6 ppm e 1,0 ppm para as moléculas **139**, **223** e **231**. É possível observar o efeito da presença do átomo de oxigênio ligado à imina da oxima quando se comparam com os espectros da lactona viníloga **139** e com a imina **223**. O hidrogênio ligado a C8 é observado como um duplete de quarteto de dupletos em 4,04 ppm; dispendo-se de forma intermediária ao deslocamento entre a lactona viníloga e a imina. Possivelmente, o oxigênio da oxima fornece mais densidade eletrônica à molécula, de forma que seu deslocamento químico se aproxime do valor do deslocamento químico da 6-oxo, além de apresentar igual multiplicidade. Tal efeito também é observado na posição 7,  $\alpha$ -oxima, na qual os hidrogênios se mostram quimicamente distintos como um duplete de dupletos em 3,13 ppm e como um multiplete na região entre 2,38 – 2,32 ppm. Duplete de dupletos também são observados para os hidrogênios diastereotópicos na posição 7 da 6-oxo. A diferença é que na oxima existe uma maior desblindagem sobre um desses átomos de hidrogênio, afastando-o cerca de 0,8 ppm de seu homólogo geminal. Esses mesmos hidrogênios, juntamente com aqueles nas oposições 2 e 5, são observados como um multiplete na molécula **223**.



**Figura 76.** Espectros de hidrogênio das substâncias **231**, **223** e **139**.

A formação dos análogos hidrazona tiveram como base a metodologia já empregada em nosso laboratório, desenvolvida por Mahajan e Resck,<sup>106</sup> para a formação de tosilhidrazonas de lactonas vinílogas sob catálise ácida em refluxo de metanol (Esquema 29).



**Esquema 29.** Esquema geral de formação das hidrazonas a partir de suas respectivas hidrazinas (**232**) e 6-oxo (**139**).

Foram empregadas nesta etapa de estudo as seguintes substâncias comercialmente disponíveis baseadas em hidrazinas: benzilhidrazina, nicotinoil hidrazida, benzenossulfonil



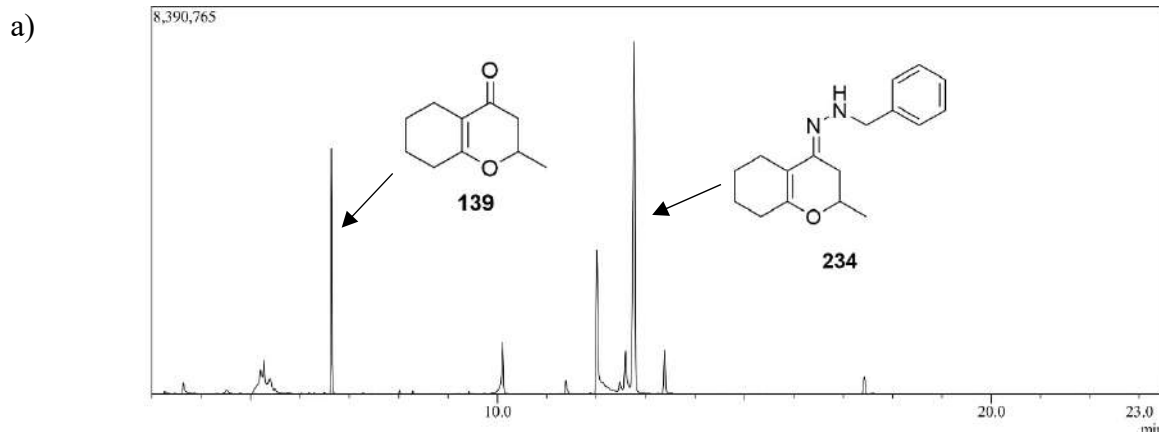
hidrazida e *p*-toluenossulfonilhidrazida. A Tabela 19, reúne o tempo reacional e o rendimento obtido para cada hidrazona.

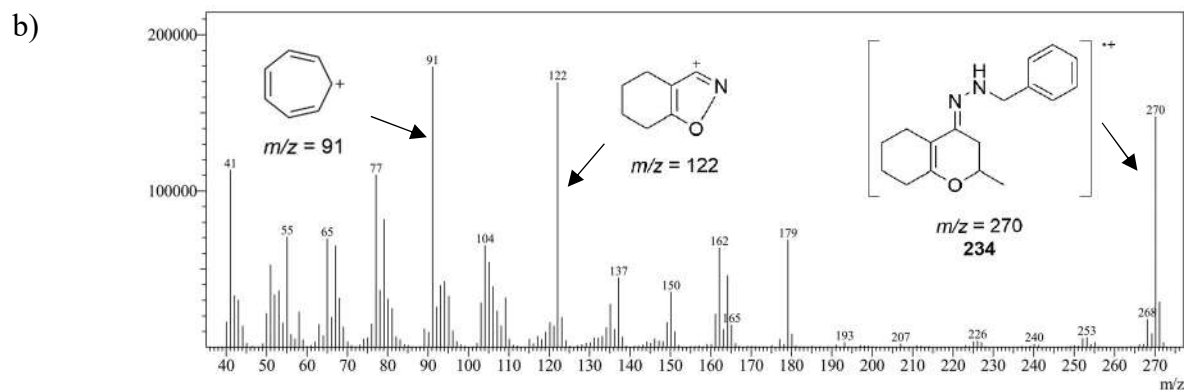
**Tabela 19.** Tempo reacional e rendimento das hidrazonas **234** a **237**.

Hidrazina	Molécula	Tempo reacional	Rendimento
benzilhidrazina	<b>234</b>	6h	-
nicotinoil hidrazida	<b>235</b>	120 h	23%
benzenossulfonil hidrazida	<b>236</b>	2h	49%
<i>p</i> -toluenossulfonilhidrazida	<b>237</b>	2h	40%

Como pode ser observado, os rendimentos variaram de baixos a moderado. Entretanto, como o objetivo era a formação das moléculas para verificação da capacidade inibidora da produção da biossíntese da violaceína, não houve a preocupação em buscar a otimização do rendimento dessas metodologias.

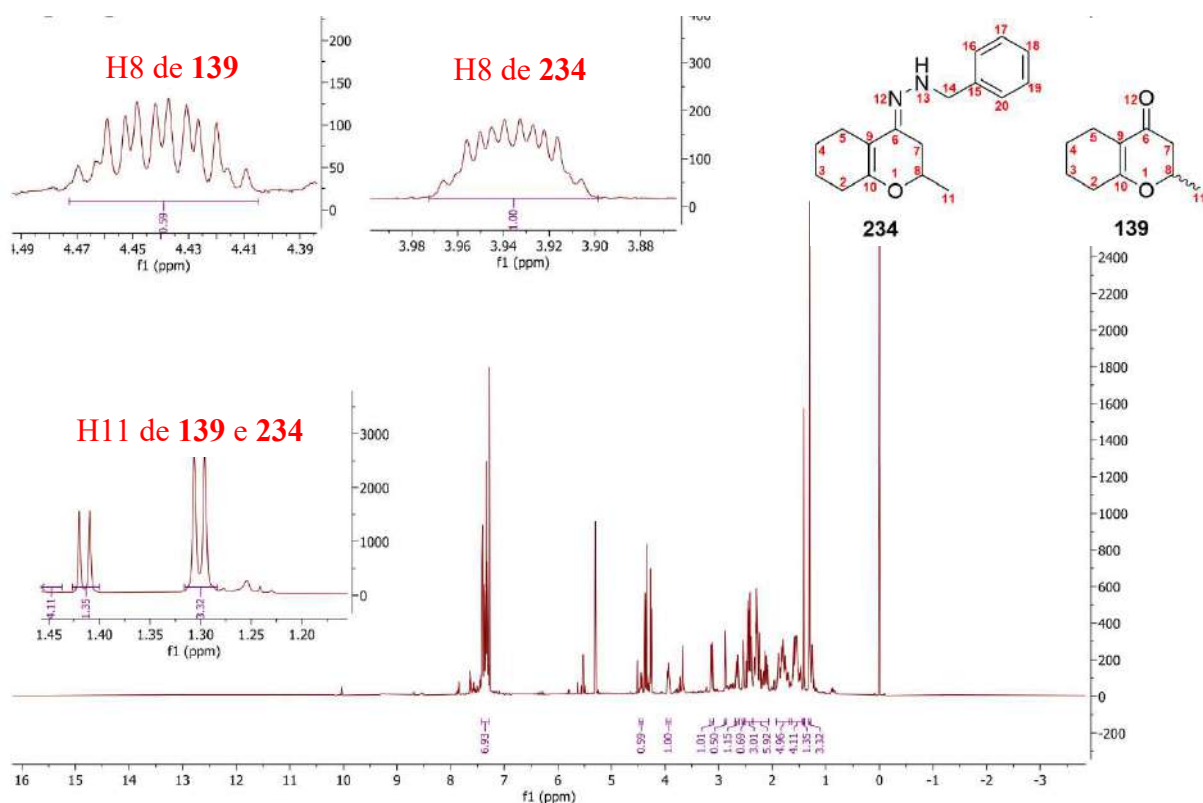
As substâncias **234** a **237** foram caracterizadas por espectrometria de massas e RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  (no caso de **234**, apenas o bruto reacional foi analisado). A formação da hidrazona **234** pôde ser confirmada por meio da análise dos dados de GC/MS. O cromatograma do bruto reacional mostra um sinal intenso em 12,8 min com  $m/z = 270$ , além de 6-oxo em 6,6 min e vários produtos de reações paralelas (Figura 77a). O espectro de massas referente a esse sinal mostra o íon molecular com  $m/z$  270, e pico base com  $m/z$  91, que foi atribuído à formação do cátion tropílio (Figura 77b). Assim como para outros derivados nitrogenados de 6-oxo, também foi possível a visualização do cátion isoxazoíla com razão  $m/z$  122. Além desses, também foram detectados os cátions fenila ( $m/z$  77) e o  $(M - 91)^+$  com  $m/z$  179, atribuído à quebra da ligação  $\sigma$  N – C seguido de perda do fragmento benzílico da hidrazona. A massa exata do íon molecular da hidrazona **234** foi confirmada por EMAR com variação de 0,4 ppm, massa teórica  $(M + 1)$  271,1810 u.m.a. e massa obtida  $(M + 1)$  271,1811 u.m.a..





**Figura 77 – a)** Cromatograma do bruto reacional da substância **234**; **b)** espectro de impacto por elétrons de **234**.

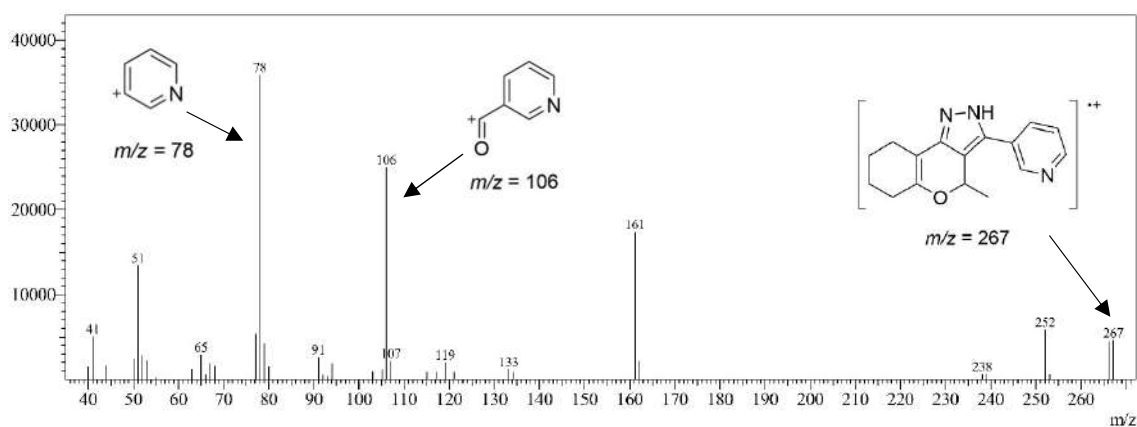
Apesar do resultado positivo indicado pelos dados de GC/MS, todas as tentativas de purificação por cromatografia em coluna do composto **234** resultaram em degradação. Através do acompanhamento por CCD, foi perceptível a deterioração dos materiais que se apresentavam como manchas arrastadas a cada nova verificação, impossibilitando a obtenção dos espectros de ressonância do composto **234** isolado. Na análise do bruto reacional de formação desta hidrazona foi possível apontar alguns dos sinais característicos das iminas derivadas da 6-oxo (Figura 78).



**Figura 78.** Espectro do bruto reacional da reação de formação do composto **234**.

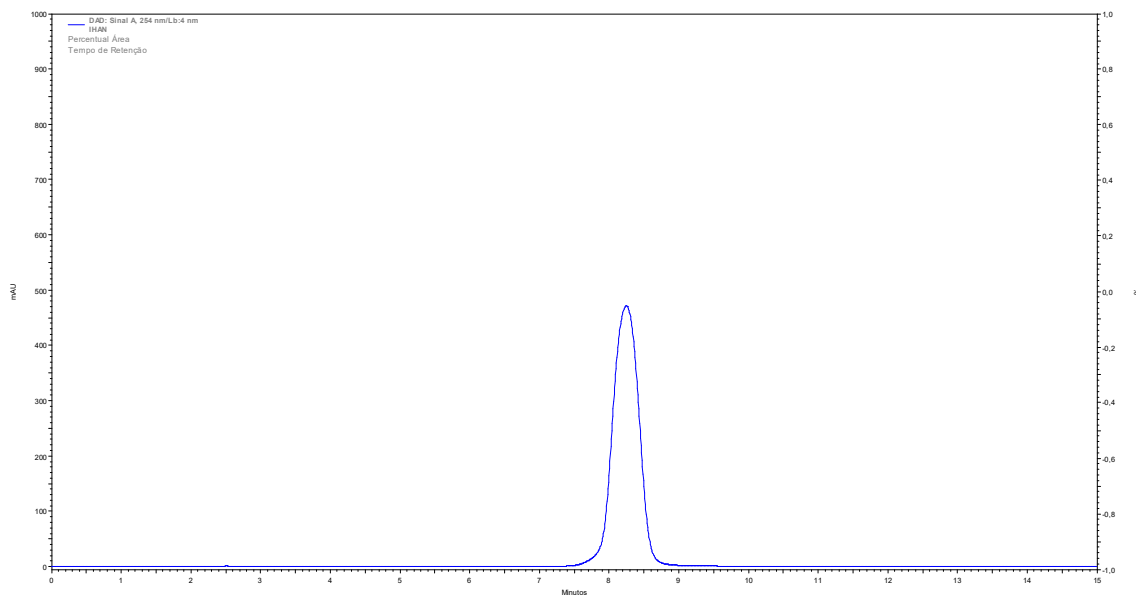
O duplete de quarteto de dupletos, em 3,94 ppm, se refere ao hidrogênio quiral na posição 8, bastante similar ao observado para o composto análogo **231**. Outro sinal bastante evidente é o duplete em 1,30 ppm referente à metila na posição 11. Os sinais equivalentes na molécula **139** também podem ser observados no espectro, em 4,44 ppm para o hidrogênio na posição 8, e em 1,41 ppm para a metila na posição 11. Com exceção dos picos referentes à porção aromática, proveniente da benzilhidrazina, os demais sinais encontram-se sobrepostos, tendo em vista que os deslocamentos são bastante próximos em ambas as moléculas.

A análise por GC/MS da substância **235**, hidrazona proveniente da hidrazida nicotínica, apresentou no espectro de massas o pico base  $m/z$  78, relativo à fragmentação da porção piridina da molécula (Figura 79). Não foi possível visualizar o íon molecular teórico (em  $m/z$  285, correspondendo a  $[C_{16}H_{19}N_3O_2]^{++}$ ), possivelmente devido à elevada energia de ionização da técnica de impacto por elétrons. Em seu lugar, foi detectado o íon com razão  $m/z$  267 (12,8 %) atribuído ao íon molecular após perda de água  $[M - 18]^+$ . Além desses, também está presente o fragmento com razão  $m/z$  106, referente à saída da porção nicotínica da estrutura. A massa exata do íon molecular protonado da hidrazona **235** foi confirmada por EMAR com variação de 0,7 ppm, massa teórica  $(M + 1)$  286,1556 u.m.a. e massa obtida  $(M + 1)$  286,1554 u.m.a..



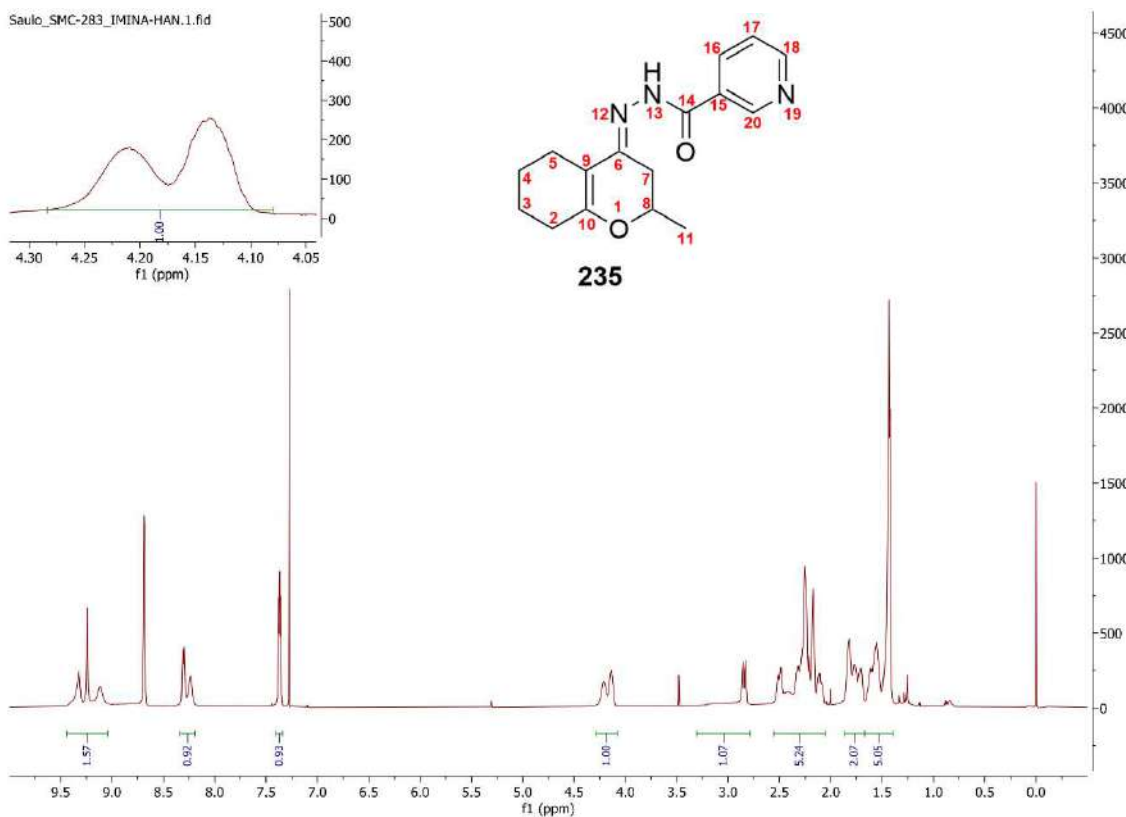
**Figura 79.** Espectro de massa de impacto por elétrons da hidrazona **235**.

A substância **235** foi obtida como um pó branco cristalino, e sua pureza foi confirmada por HPLC-UV (Figura 80). Um único sinal em 8,27 min foi detectado no comprimento de onda de 254 nm.



**Figura 80.** Cromatograma da hidrazona **235** obtido em HPLC-UV.

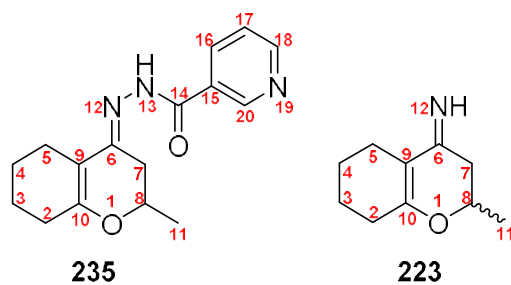
Apesar da aparente pureza de **235** seus espectros de ressonância não foram de fácil compreensão (Figura 81), com vários sinais se sobrepondo e não sendo possível observar a multiplicidade característica desses análogos da 6-oxo.



**Figura 81.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da hidrazona **235**.

Os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  das moléculas **235** e **223** foram agrupados na tabela 20. Os sinais compreendidos entre 9,44 ppm a 7,37 ppm foram atribuídos à incorporação do fragmento nicotínico. O multipletto em 9,44 ppm – 9,04 ppm, integrando para 2 hidrogênios, se refere aos prótons do nitrogênio da hidrazona e, possivelmente, daquele localizado na posição 20. Este próton experimenta maior efeito de desblindagem devido sua disposição  $\alpha$  – nitrogênio e  $\beta$  – carbonílica. O dupletto de dupletos em 8,69 ppm ( $J = 4,9$  e  $1,8$  Hz) foi atribuído ao próton  $\alpha$  – nitrogênio na posição 18 que se acopla aos hidrogênios H17 e H16. O multipletto encontrado na região entre 8,34 ppm – 8,19 ppm é alusivo ao próton  $\beta$ -carbonílico H16. Por fim, o dupletto de dupletos em 7,37 ppm ( $J = 8,0$  e  $4,9$  Hz) corresponde ao hidrogênio H17. Com relação ao espectro de  $^{13}\text{C}$  da molécula **235**, observa-se a duplicação de diversos sinais. A atribuição dos picos referentes à carbonila do grupo acila da hidrazona, C14, e ao carbono  $\beta$  do sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado do anel cromenimina, C10, não foram diferenciados no espectro de  $^{13}\text{C}$ , surgindo em 167,8 ppm e 160,1 ppm. Os picos referentes ao carbono imínico C6 foram atribuídos como sendo aqueles em 151,6 ppm e 151,5 ppm. O sinal referente ao hidrogênio na posição 8, assim como o observado para o composto **231**, foi observado como um multipletto entre 4,28 ppm – 4,08 ppm, um aumento da desblindagem de aproximadamente 0,4 ppm quando comparado à imina **223**. Este aumento da desblindagem é ainda mais pronunciado no espectro de  $^{13}\text{C}$ , resultando numa diferença de cerca de 23 ppm entre as duas moléculas. Os hidrogênios diastereotópicos da posição 7 podem ser observados nos multipletos entre 3,30 ppm – 2,79 ppm e 2,55 ppm – 2,05 ppm. Este último compreende também os hidrogênios H2 e H5. De forma análoga ao observado para a oxima **231**, o carbono na posição 7 experimenta um efeito no aumento da blindagem de 11 ppm. Os demais sinais apresentam deslocamentos químicos semelhantes em **223** e **235**, no entanto em **235** existe a sobreposição da metila H11 com os hidrogênios metilênicos H3 e H4.

**Tabela 20.** Dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  das substâncias **235** e **223**.

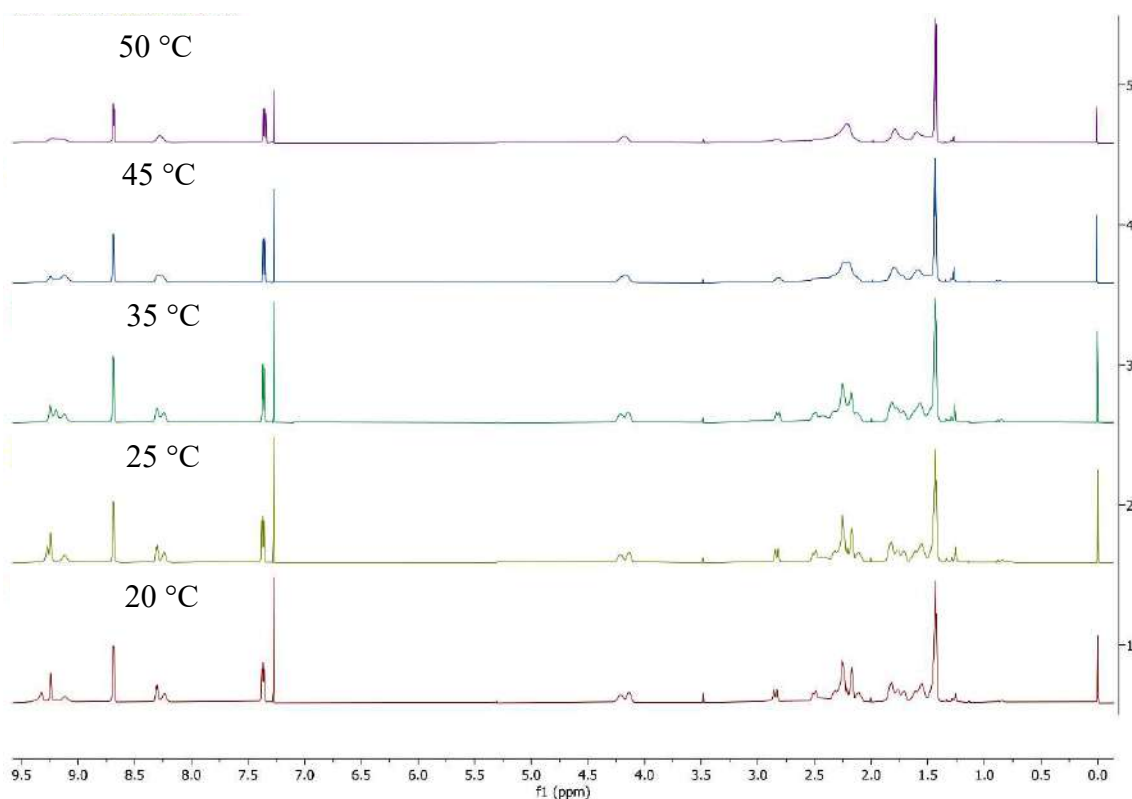


Posição	$^1\text{H}$ / ppm, (multiplicidade, integração)		$^{13}\text{C}$ (ppm)	
	235	223	235	223
1	-	-	-	-
2	2,55 – 2,05 (m, 5H)	2,37 – 2,13 (m, 6H)	30,6	28,2
3	1,87 – 1,67 (m, 2H) e 1,67 – 1,39 (m, 5H)	1,76 – 1,67 (m, 2H) e 1,64 – 1,52 (m, 2H)	22,3; 22,2; 22,0 e 21,9	22,3; 21,7 e 20,7
4	1,87 – 1,67 (m, 2H) e 1,67 – 1,39 (m, 5H)	1,76 – 1,67 (m, 2H) e 1,64 – 1,52 (m, 2H)	22,3; 22,2; 22,0 e 21,9	22,3; 21,7 e 20,7
5	2,55 – 2,05 (m, 5H)	2,37 – 2,13 (m, 6H)	28,7 e 28,3	22,3; 21,7 e 20,7
6	-	-	151,6 e 151,5	192,2
7	3,30 – 2,79 (m, 1H) e 2,55 – 2,05 (m, 5H)	2,37 – 2,13 (m, 6H)	31,8	42,8
8	4,28 – 4,08 (m, 1H)	3,70 – 3,62 (m, 1H)	71,7 e 71,1	48,0
9	-	-	107,6	103,7
10	-	-	167,8 e 160,1	163,5
11	1,67 – 1,39 (m, 5H)	1,28 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H),	20,9 e 20,7	18,3
12	-	Não observável em $\text{CD}_3\text{OD}$	-	-
13	9,44 – 9,04 (m, 2H)	-	-	-

14	-	-	167,8 e 160,1	-
15	-	-	129,3	-
16	8,34 – 8,19 (m, 1H)	-	138,0 e 135,5	-
17	7,37 (dd, $J = 8,0, 4,9$ Hz, 1H)	-	123,4 e 122,6	-
18	8,69 (dd, $J = 4,9, 1,8$ Hz, 1H)	-	148,1 e 147,7	-
19		-		-
20	9,44 – 9,04 (m, 2H)	-	148,1 e 147,7	-

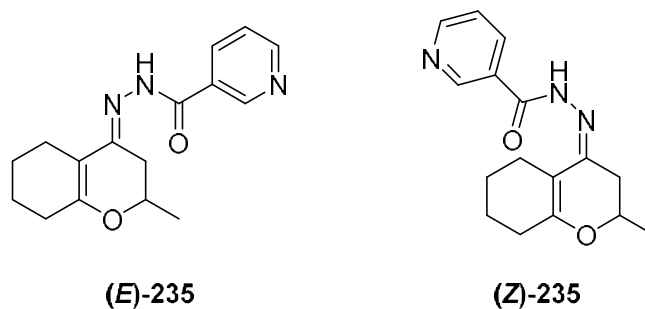
A falta de resolução e as sobreposições observadas no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  bem como a duplicidade de sinais em  $^{13}\text{C}$  do composto **235** são indicativos da existência de rotâmeros. A introdução da porção amida, presente na hidrazina nicotínica, é a provável causadora do efeito, tendo em vista que rotâmeros podem surgir em decorrência da elevada barreira rotacional em torno da ligação C(O)-N.<sup>112</sup> Tal efeito pode ser observado não apenas na porção nicotínica da estrutura, mas também no núcleo cromenimina, no qual é possível notar a duplicidade dos sinais referentes às posições 3, 4, 5, 8 e 11 no espectro de  $^{13}\text{C}$ . Como a pureza de **235** havia sido confirmada por HPLC-UV (Figura 79), descartando-se a presença de impurezas que pudessem ocasionar na detecção de sinais não pertencentes à amostra, realizou-se o experimento de RMN de  $^1\text{H}$  com aumento de temperatura, de forma que a velocidade de interconversão entre os isômeros conformacionais aumentasse e fosse possível observar os sinais com melhor definição (Figura 82). É possível observar a melhora na definição dos sinais em função do aumento de temperatura. O multipletto referente ao hidrogênio fenílico *orto* à carbonila na posição 16 pode ser observado em 50 °C como um simpleto. Melhora considerável na resolução também pode ser observada em 7,36 ppm referente ao próton na posição H17, no qual o dupletto de dupletto a 20 °C, foi observado como um dupletto de dupletto de dupletos ( $J = 8,0; 4,9$  e  $1,0$  Hz) a 50 °C. Sinais diagnósticos da presença da ligação imídica também apresentaram melhorias na definição a 50 °C, como pode ser observado pelo surgimento dos simpletos em 4,16 e 2,84, referentes aos hidrogênios nas posições 8 e 7, vistos como multipletos

em temperaturas mais baixas, entretanto, não foi possível observar a multiplicidade característica, geralmente, presente no hidrogênio quiral.



**Figura 82.** Experimento de RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) com aumento de temperatura para a substância **235**.

Considerando que os experimentos com aumento de temperatura evidenciaram melhora discreta na resolução dos sinais da molécula **235**, existe a possibilidade que essa sobreposição de sinais seja decorrente de isomeria *E/Z* presente na hidrazona, que ora dispõe a porção aromática para fora dos anéis da cromenimina, ora sobre a porção cíclica, considerando o plano da página. Tal efeito de isomeria *E/Z* em hidrazonas e suas implicações nos espectros de RMN podem ser encontradas na literatura.<sup>113-116</sup>



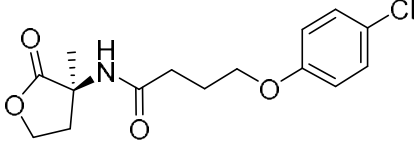
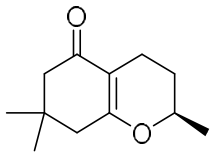
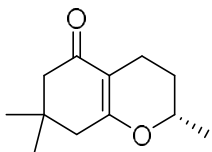
**Figura 83.** Isomerismo *E/Z* presente em **235**.

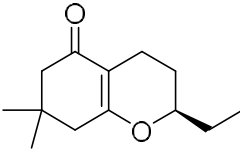
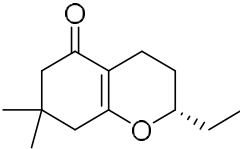
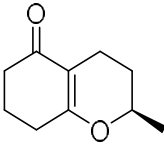
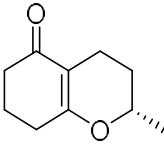
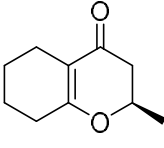


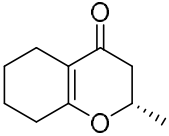
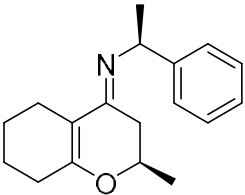
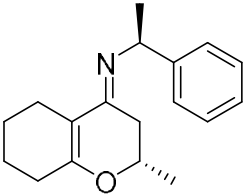
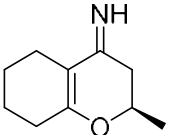
### 3.2.8 Ancoragem Molecular das hexahidrocromenonas e hexahidrocromeniminas

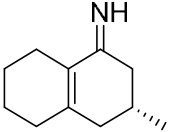
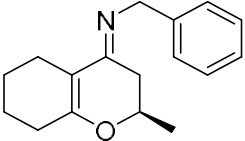
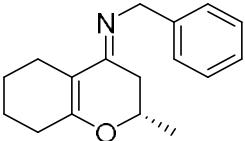
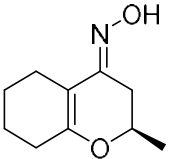
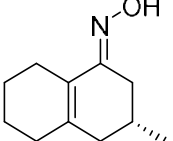
Assim como o realizado para os AMBH's, foi avaliada a capacidade de interação das cromenonas e dos análogos sintetizados neste trabalho, com a proteína CviR, por meio de experimentos de ancoragem molecular. O tamanho de caixa empregado nesses ensaios comportava todo o volume da proteína, como forma de se verificar se as posições encontradas eram referentes às interações com o sítio específico ou efeito de alosterismo. A ancoragem foi realizada às cegas e foram consideradas interações com até 5Å de distância. De forma equivalente ao que foi realizado com as AMBH's, foram considerados ambos enantiômeros de cada composto e suas energias são apresentadas como a média dos isômeros *R* e *S*. Os resultados obtidos foram agrupados na Tabela 21.

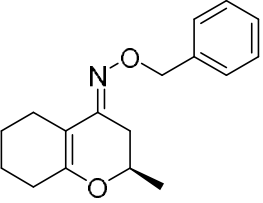
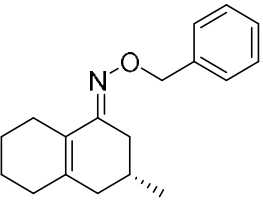
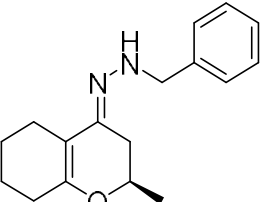
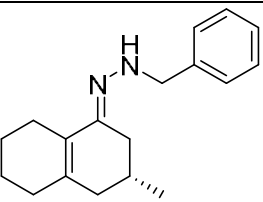
**Tabela 21.** Resultados de ancoramento molecular e LogP para o inibidor **22**, cromenonas e análogos.

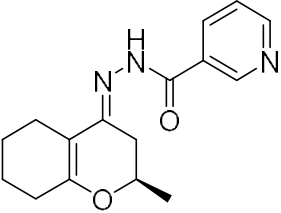
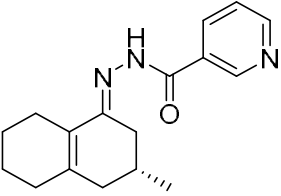
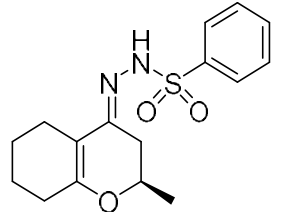
Molécula	Afinidade da ligação (kcal/mol)	Afinidade Média de ligação média R/S (kcal/mol)	LogP	Interações Hidrofílicas	Interações Hidrofóbicas
 <p><b>22</b></p>	-8,5	-	1,474	Tyr80, Trp84, Tyr88, Met89, Asp97, Trp111, Met135, Thr140, Ser155	Tyr88
 <p><b>(R)-205</b></p>	-7,40	-7,30	2,142	Tyr80, Tyr88, Asp97 e Trp111	
 <p><b>(S)-205</b></p>	-7,20			Tyr80, Tyr88, Asp97 e Trp111	

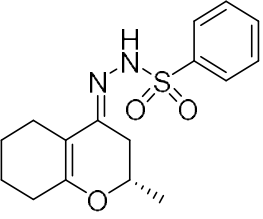
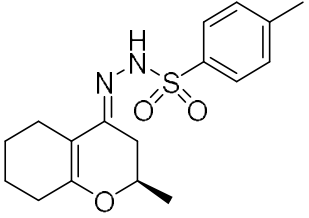
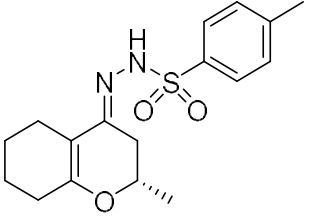
 <p><b>(R)-209</b></p>	-7,10	-7,05	2,665	Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97 e Leu100
 <p><b>(S)-209</b></p>	-7,00			Tyr80, Tyr88 e Asp97
 <p><b>(R)-138</b></p>	-7,10	-6,9	1,555	Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97 e Ser155
 <p><b>(S)-138</b></p>	-6,70			Tyr80, Tyr88, Asp97, Trp111 e Ser155
 <p><b>(R)-139</b></p>	-7,70	-7,25	1,711	Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97, Trp111 e Ser155

 <p><b>(S)-139</b></p>	-6,80			Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97 e Trp111	
 <p><b>(R,S)-222</b></p>	-9,30	-8,95	4,089	Tyr88	Tyr88
 <p><b>(S,S)-222</b></p>	-8,60			Tyr88	Tyr88
 <p><b>(R)-223</b></p>	-6,90	-6,65	1,724	Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97, Trp111, Thr140 e Ser155	

 <b>(S)-223</b>	-6,40			Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97, Trp111 e Ser155	
 <b>(R)-227</b>	-9,00	-8,55	3,672	Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97, Trp111 e Ser155	Tyr88
 <b>(S)-227</b>	-8,10			Tyr88, Met89 e Asp97	
 <b>(R)-230</b>	-6,70	-6,55	1,721	Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97, Trp111 e Ser155	
 <b>(S)-230</b>	-6,40			Tyr80, Tyr88, Asp97, Ile99, Trp111, Thr140 e Ser155	

 <p><b>(R)-231</b></p>	-8,30	-8,05	3,823	Tyr80, Trp84, Tyr88 e Asp97	Trp111
 <p><b>(S)-231</b></p>	-7,80			Tyr80, Tyr88 e Asp97	
 <p><b>(R)-234</b></p>	-7,60	-7,75	3,375	Tyr88 e Met253	Tyr88
 <p><b>(S)-234</b></p>	-7,90			Tyr88 e Ala94	Tyr88

 <p><b>(R)-235</b></p>	-7,50	-7,50	1,779	Ile69, Leu72, Gln70, Tyr88 e Ala94	
 <p><b>(S)-235</b></p>	-7,50			Met253	
 <p><b>(R)-236</b></p>	-9,80	-8,6	2,744	Tyr80, Tyr88, Asp97 e Ser155	Trp111

 <p><b>(S)-236</b></p>	-7,40			Tyr88, Asn92 e Val250	
 <p><b>(R)-237</b></p>	-8,60	-8,40	3,257	Tyr80, Trp84, Tyr88, Asp97 e Ser155	
 <p><b>(S)-237</b></p>	-8,20			Leu85, Tyr88, Met89 e Asn92	Tyr88

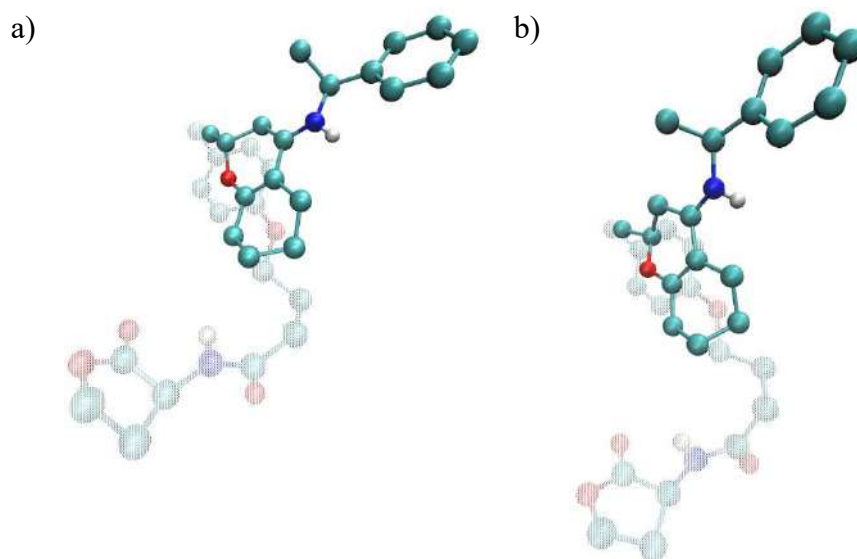


De forma análoga ao que foi realizado para os AMBH's, também foram analisadas as interações com o LBD referentes ao monômero de menor energia do complexo CviR:**22**; tendo em vista que a interação com a primeira molécula do inibidor desencadeia uma mudança conformacional ao longo de toda a proteína. Mesmo tal análise não resultando, na maioria dos casos, na menor energia de interação encontrada nos ensaios de ancoragem molecular, em todos os experimentos, não foi observado efeito alostérico, com todos os compostos sendo encontrados dentro do LBD, como segunda menor energia.

Como reportado anteriormente, esperava-se que a introdução de novos grupos na ligação C=O das cromenonas promovesse maior interação com o resíduo de aminoácido Met89, responsável por promover a mudança conformacional de CviR, desativando o domínio de ligação com o DNA, e desencadeando a inibição da biossíntese de violaceína. O que pôde ser verificado é que mesmo não sendo observadas interações diretas com o resíduo de Met89, todas as iminas mais volumosas conseguem dispor parte de suas estruturas em direção a este resíduo. O mesmo não pode ser constatado para as moléculas menores, como as cromenonas, a imina **223** e a oxima **230**, nas quais existe uma tendência a mimetizar as interações da porção lactona e acila do inibidor **22**. De forma geral, observam-se mais interações com os resíduos de aminoácidos Tyr80, Tyr88 e Asp 97, em maior grau, e com os resíduos Trp84, Trp111 e Ser155, em menor proporção. Todos esses apresentam interações com o inibidor **22**.

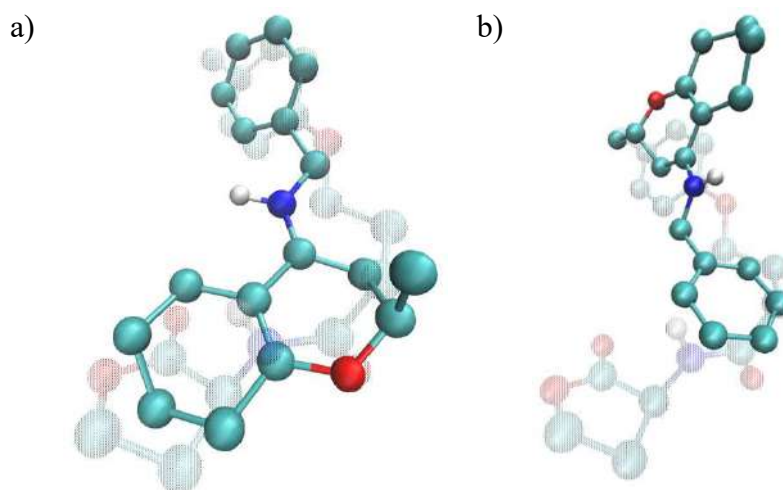
Dentre os compostos avaliados, três apresentaram energias de afinidades menores que a do inibidor sintético **22**. São eles: o composto **222**, proveniente da condensação da 6-oxo e (S)-(-)-1-fenetilamina; o composto **227**, condensação da 6-oxo e benzilamina; e o composto **236**, condensação da 6-oxo e benzenossulfonil hidrazida.

O composto **222** foi o que apresentou a menor energia dentre todos os compostos avaliados neste trabalho, -8,95 kcal/mol. Apesar dos dois diastereoisômeros terem sido obtidos de forma enriquecida e, individualmente, ambos apresentarem energia de afinidade inferior ao inibidor sintético **22**, 8,50 kcal/mol, optou-se por apresentá-los como a média dos isômeros (R,S) e (S,S), como foi realizado anteriormente para os AMBH's. Conforme apresentado na Figura 84, ambos os diastereoisômeros se dispõem de forma bastante similar, com o anel cromenimina sobre a região correspondente ao anel aromático de **22** e o restante da molécula de **222** está disposta em uma região não ocupada pelo inibidor. Além disso, nas duas estruturas, a metila do núcleo cromenimina está disposta em direção ao resíduo de aminoácido Met89. Destaca-se também que em ambos os diastereoisômeros foram percebidas interações hidrofílicas e hidrofóbicas apenas com o resíduo de Tyr88, indicando que outros efeitos podem estar envolvidos na estabilização do composto – sítio ligante além das interações avaliadas.



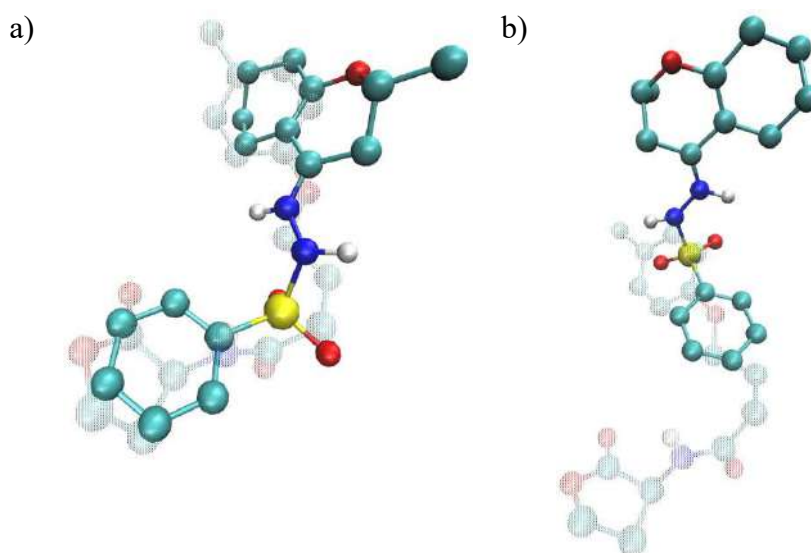
**Figura 84 – a)** Sobreposição de *(R,S)*-222 e 22; **b)** sobreposição de *(S,S)*-222 e 22.

O composto **227** apresentou energia de afinidade ligeiramente inferior à de **22**, -8,55 kcal/mol. Apesar de diferir do composto **222** apenas em uma metila, tanto o isômero *R* quanto o *S* de **227** se dispuseram de formas completamente diferentes (Figura 85). O isômero *R* dispôs o núcleo cromenimina onde se encontram as porções lactona e acila do inibidor, com o átomo de oxigênio adotando conformação similar à da carbonila amídica. Já o fragmento benzílico de **227** é observado em uma posição bastante similar do grupo aromático de **22**. O isômero *S* encontra-se invertido 180° em relação ao isômero *R*. O fragmento cromenimina está disposto parcialmente sobre a porção aromática de **22**, com sua metila direcionada para o resíduo Met89, assim como o cloreto do inibidor. A porção benzílica dispõe o nitrogênio em posição similar à observada para o oxigênio aromático de **22**. O anel benzênico de *(S)*-**227** está disposto sobre a cadeia espaçadora compreendida entre a carbonila amídica e o oxigênio aromático do inibidor.



**Figura 85– a)** Sobreposição de *(R)*-227 e 22; **b)** sobreposição de *(S)*-227 e 22.

O composto que apresentou a segunda menor energia de afinidade, -8,60 kcal/mol, é o produto de condensação entre a 6-oxo e a benzenossulfonil hidrazida, **236**. Seus isômeros, dispostos de maneiras diferentes, apresentaram diferença de energia de mais de 2,0 kcal/mol, em favor do isômero *R* (Figura 86). Este, dispõe parte do núcleo cromenimina sobre a mesma localidade na qual se encontra a porção aromática de **22**. Os nitrogênios da hidrazona e o grupo sulfonil estão arranjados de forma similar ao átomo de oxigênio ligado à porção aromática e a carbonila amídica do inibidor, respectivamente. O fragmento aromático de (*R*)-**236** encontra-se na mesma região ocupada pela porção lactona de **22**. O isômero *S* dispõe parte do sulfonilhidrazona na mesma região na qual se encontra o anel aromático de **22**. A porção aromática de (*S*)-**236** pode ser observada em posição análoga ao átomo de oxigênio ligado ao anel benzênico do inibidor. O núcleo cromenimina encontra-se projetado para longe da localização na qual se observa **22**, tal fato deve contribuir para a diferença de energia entre ambos os isômeros.



**Figura 86** – a) Sobreposição de (*R*)-**236** e **22**; b) sobreposição de (*S*)-**236** e **22**.

A utilização de ancoragem molecular às cegas pode não ser a ferramenta computacional mais adequada para se explicar a possível atividade inibitória dos compostos sintetizados. Mas serve como um provável indicativo de que essas moléculas interagem com o sítio receptor ligante de CviR e podem auxiliar na explicação dos dados de inibição obtidos.

Ensaio biológico sobre a capacidade modulatória das cromeniminas sintetizadas neste trabalho serão conduzidos em breve.

#### 4. Conclusões

O objetivo geral deste trabalho foi a síntese e avaliação da capacidade inibitória da produção de biossíntese de violaceína em CV026 por AMBH's e hexahidrocromenonas. Inicialmente, foi realizada a síntese de oito adutos de MBH derivados do acrilato de etila, para se verificar a sua capacidade de modular a biossíntese da violaceína, um reconhecido fenótipo do QS em CV026. Os ensaios de inibição indicaram que os adutos provenientes de aldeídos aromáticos eram mais eficientes que os preparados a partir de aldeídos alifáticos, independentemente da natureza eletrônica dos substituintes do grupo arila.

Tendo sido observado o efeito do tamanho de cadeia no subacervo de adutos provenientes do acrilato de etila, foi avaliado o impacto do aumento do volume do grupo alquila da porção polar na modulação da biossíntese da violaceína em CV026, ao se empregar o subacervo derivado do acrilato de *tert*-butila. Neste, foi constatada a redução na capacidade inibitória de produção de violaceína, quando comparada ao subacervo do acrilato de etila. Adicionalmente, foi observado um interessante resultado apresentado pela molécula **155**, derivada do *p*-NO<sub>2</sub>-benzaldeído, que foi capaz de induzir a produção de violaceína acima de 80% nas concentrações de 1,25 mM e 625 µM na ausência do autoindutor cognato **C6-HSL**. Na presença do autoindutor, **155** apresentou comportamento contrário, inibindo a produção de violaceína e apresentando um perfil dose-resposta em formato de “V”, com máximo de inibição na concentração de 625 µM.

A incorporação de um grupo menos volumoso na porção éster, verificada pela utilização do subacervo da acrilonitrila, resultou em aumento da capacidade inibitória da produção da violaceína, apresentando valores próximos a 70% a 1,25 mM com exceção da molécula **162**, cuja inibição foi de 37% nessa mesma concentração. Três compostos desse subacervo se mostraram bactericidas, **160**, **161** e **68**, e exceto pela molécula **161**, os demais apresentaram atividade inibitórias do QS em CV026 em concentrações menores, como 312 µM e 156 µM.

O emprego de adutos contendo a porção polar conformacionalmente rígida, como aquelas apresentadas pelas AHL, foi examinado através do subacervo das ciclopentenonas e ciclohexanonas. Foi observada inibição mais acentuada para os derivados da ciclopentenona, entre os quais cinco moléculas apresentaram atividade superior a  $60 \pm 1\%$ , com **166** se mostrando o AMBH com a maior capacidade inibitória, 86% e 77% a 1,25 mM e 625 µM, respectivamente. Dessa forma, pôde-se observar que a restrição conformacional das enonas cíclicas, em especial a ciclopentenona, promove o aumento da capacidade inibitória quando comparada aos grupos ésteres, mais flexíveis. No entanto, quando as moléculas derivadas da

ciclopentenona são comparadas com suas respectivas análogas da série da acrilonitrila o efeito de restrição conformacional não é tão evidente.

A utilização dos subacervos acetilados dos derivados de acrilato de etila e enonas cíclicas demonstrou a importância da hidroxila como grupo farmacofórico para a atividade inibitória dos AMBH's, nos quais se verificou queda acentuada de inibição. O impacto foi mais proeminente no subacervo dos derivados acrílicos, sendo observado, em alguns casos, a indução de violaceína.

Os ensaios de ancoragem molecular não nos permitiram apontar ação alostérica das moléculas testadas, o que dá suporte à hipótese de que os AMBH's interferiram no QS de CV026 através da interação com a proteína CviR. Ambos os enantiômeros da molécula **166**, a que apresentou o melhor resultado nos ensaios de inibição de violaceína, se dispuseram de forma bastante similar no domínio de ligação do autoindutor da CviR, acomodando a porção ciclopentanona na mesma região na qual residem a cadeia lipofílica e o grupo arila de **22**. Os experimentos de ancoragem dos enantiômeros do composto **155**, aduto em cujo ensaio se observou a indução da síntese de violaceína na ausência do autoindutor cognato, apresentaram esses ligantes no LBD da CviR, mas com poses com disposição contrárias. Tentativas de racionalizar a inibição apresentada pelos AMBH's com base na energia relativa de afinidade obtida por ancoragem molecular ou no LogP calculado para as substâncias testadas se mostraram infrutíferas.

Como forma de entender o mecanismo de modulação da biossíntese de violaceína em CV026 observado para os AMBH's, foram realizados ensaios adicionais. O primeiro destes foi o teste de competição pelo sítio de interação. Nesse experimento a concentração da molécula **166** foi mantida constante enquanto a concentração do autoindutor cognato (**4**) foi gradualmente aumentada. Foi constatada a diminuição do efeito inibitório provocado por **166** com a produção de violaceína sendo restabelecida quando a concentração do autoindutor se encontrava próxima à do AMBH, indicando que havia competição pelo sítio de CviR. Este resultado sugeriu que a modulação observada ocorre em nível transcricional.

Outro ensaio realizado como forma de verificar o mecanismo de modulação observado foi o ensaio do consumo de quitina, outro fenótipo controlado por QS em CV026. A molécula **166** foi capaz de inibir ambos os fenótipos, produção de violaceína e consumo de quitina, sugerindo que o mecanismo de inibição ocorre em nível transcricional. O AMBH **155**, que induziu a produção de violaceína, foi capaz de induzir a produção de violaceína juntamente com o consumo de quitina na ausência do autoindutor cognato. Sua baixa capacidade inibitória não pôde ser observada no ensaio contendo **155** + C6-HSL.

Por fim, para se verificar se as moléculas **155** e **166** modulavam o QS por meio da interferência da transcrição do operon *vioABCDE*, foi realizado o ensaio de RT-qPCR. A molécula **166** foi capaz de inibir a transcrição de *vioA* e *vioC* em torno de 70%, enquanto que **155** foi capaz de promover a transcrição desses genes acima de 75%, indicando que tais modulações de fato ocorrem em nível transcricional através de um mecanismo de competição com o autoindutor no fator de transcrição CviR.

A síntese das hexahidrocromenonas foi iniciada pelos análogos da 5-oxo. A primeira etapa da formação dessas moléculas consistiu na formação da ligação C–C por meio da adição de Michael entre uma  $\beta$ -dicetona e a metil ou etil vinil cetona em condições básicas. A reação apresentou a formação paralela do subproduto de dialquilação em proporção elevada, fazendo-se necessária a investigação de metodologias que conduzissem à minimização deste, em detrimento ao produto de monoalquilação desejado. Foram investigadas tanto condições ácidas, quanto básicas nesse estudo metodológico, no qual se verificou que a utilização de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em uma solução de MeOH:H<sub>2</sub>O apresentou rendimentos moderados de formação do produto monoalquilado e baixa formação do subproduto dialquilado. A formação da 5-oxo e seus análogos foi alcançada após a redução quimiosseletiva da cetona não conjugada dos respectivos produtos de monoalquilação.

Para a averiguação do efeito da estereoquímica sobre o efeito inibitório da 6-oxo sobre o QS de CV026, se fazia necessária a separação dos isômeros em amostras enantiomericamente enriquecidas de cada um deles. Para isso, recorreu-se à formação das iminas diastereoisoméricas da 6-oxo com o auxiliar quiral (*S*)-(-)-fenetilamina. Tal etapa se mostrou particularmente desafiadora, uma vez que os diastereoisômeros foram obtidos em rendimentos baixos. Resultados equiparáveis aos da literatura só foram alcançados após o desenvolvimento de uma metodologia empregando aquecimento por micro-ondas e PTSA como catalisador. Diferenças espectrométricas existentes entre ambos os diastereoisômeros, juntamente com o auxílio da química computacional, nos conduziram a propor a configuração (*8S*, *13S*) para a molécula **222a**, e a configuração (*8R*, *13S*) para a imina **222b**.

A hidrólise dos diastereoisômeros **222 a** e **b** e consequente obtenção dos isômeros (*R,S*) da 6-oxo se mostraram ainda mais difícil que a etapa anterior, não sendo alcançados em proporções relevantes em nenhuma das condições avaliadas. A análise espectrométrica dos produtos obtidos após as reações de hidrólise nos levou a considerar a formação da cromenimina **223**, 6-oxo contendo um NH na posição referente ao átomo de oxigênio da carbonila. A sua formação em detrimento à 6-oxo pode ser explicada pela quebra heterolítica da ligação  $\sigma$  N – C<sub>benzilico</sub>, conduzindo à formação do cátion benzílico secundário. A importância

da estabilidade deste cátion foi verificada pela síntese do cromenimina **227**, derivada da benzilamina e 6-oxo, para a qual a condição de hidrólise não foi capaz de conduzir à formação de **223** e surgimento do cátion benzílico em proporções consideráveis. Ainda que os enantiômeros da 6-oxo não tenham sido obtidos, foi possível alcançar as formas enantioméricas de seu bioisômero **223**.

A substituição do átomo de oxigênio por um átomo de nitrogênio, nos levou a buscar novos derivados nitrogenados de 6-oxo que expandissem o acervo de compostos derivados dessa molécula e que pudessem interagir com o QS de CV026. Para tal foram realizadas reações com hidroxilaminas e hidrazinas que conduziram à formação de oximas e hidrazonas, respectivamente. Todos os compostos puderam ser purificados, com exceção da molécula **234** que degradou ao ter contato com a sílica durante a purificação. A avaliação dos compostos sintetizados por ancoragem molecular não apontou nenhuma interação alostérica, já que os resultados obtidos sempre apresentaram as estruturas avaliadas no LDB da CviR. Além disso, três moléculas (**222**, **227** e **236**) apresentaram energia de afinidade com CviR menores que obtida para o inibidor sintético **22**, e todas direcionaram parte de suas estruturas em direção ao resíduo de aminoácido Met89.

## 5. Perspectivas

Em virtude dos objetivos almejados neste trabalho, a principal perspectiva é a avaliação das hexahidrocromenonas sintetizadas frente ao QS de CV026. Tendo em vista que a 6-oxo consegue inibir esse sistema de QS, espera-se que a 5-oxo e seus análogos também sejam capazes de modular esse mesmo sistema, considerando que a diferença entre essas cromenonas reside no posicionamento no qual a carbonila se encontra. Além disso, as cromeniminas geradas também são substâncias com grande potencial de modulação do QS em CV026. A incorporação do átomo de nitrogênio resulta em alterações no  $pK_a$  da molécula e incorpora um novo sítio doador de ligação hidrogênio, tal fato pode alterar tanto a dinâmica de travessia da membrana plasmática, quanto a sua capacidade de interação com CviR.

Outro ponto que merece atenção é a síntese de uma segunda geração de AMBH's capazes de modular o QS em CV026 em concentrações mais baixas. Apesar dos resultados favoráveis obtidos neste trabalho, se reconhece que as concentrações obtidas nos ensaios de inibição estão muito aquém daquelas demonstradas por várias outras moléculas presentes na literatura.

Por fim, o emprego de uma outra ferramenta computacional que seja capaz de fornecer mais informações a respeito das moléculas avaliadas, considerando as prováveis mudanças conformacionais e eletrônicas tanto do composto estudado quanto da proteína do complexo, pode auxiliar no planejamento racional de novos moduladores do QS em CV026.



## 6. Materiais e Métodos

Os aldeídos alifáticos, propanalaldeído e isobutiralaldeído, e as enonas, metil vinil cetona e etil vinil cetona, foram previamente purificados por destilação. Os solventes, obtidos a partir de fontes comerciais, foram tratados antes de serem utilizados de acordo com a literatura.<sup>117</sup> O diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) e a trietilamina ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) foram ambos tratados utilizando hidreto de cálcio e destilados antes de serem utilizados. O metanol ( $\text{MeOH}$ ) foi previamente agitado com iodo e magnésio metálico, refluxado, destilado e armazenado em peneira molecular 3 Å. O tolueno ( $\text{PhMe}$ ) foi refluxado em sódio metálico, destilado e também foi armazenado em peneira molecular.

As análises de cromatografia em camada delgada foram realizadas utilizando cromatoplacas 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 10% 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 estão descritas nos procedimentos experimentais.

Os experimentos de ressonância magnética nuclear foram realizados nos seguintes aparelhos: Varian Mercury Plus (300 MHz para  $^1\text{H}$  e 75 MHz para  $^{13}\text{C}$ ) 7,04 T e Bruker Ascend (600 MHz para  $^1\text{H}$  150 e MHz para  $^{13}\text{C}$ ) 14,1 T. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm). As constantes de acoplamento estão expressas em Hertz (Hz). As amostras analisadas foram dissolvidas em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) ou metanol deuterado ( $\text{MeOD}$ ). Para os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foi utilizado como referência interna o tetrametilsilano TMS (0,0 ppm), para os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , o clorofórmio deuterado (77,00 ppm) ou o metanol deuterado (49,15 ppm). Os espectros foram processados nos programas ACD Labs 12.01 e MestReNova 14.1.1-24571.

Os experimentos de massa IE foram obtidos em aparelho de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC/MS), utilizando cromatógrafo Shimadzu 7890 A, com coluna capilar 5%-fenil-95%-metilsiloxano (HP5, 30 mm x 0,32 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ) e hélio como gás carreador (1,0  $\mu\text{m}/\text{min}$ ). A temperatura do forno foi programada de 100 a 200 °C, a uma taxa de aquecimento de 3 °C/min ou de 100 a 250 °C, a uma taxa de aquecimento de 5 °C/min. Um miligrama de amostra foi dissolvido em 1,5 mL de acetonitrila, diclorometano ou metanol

e 1,0  $\mu\text{L}$  da solução foi injetada no modo com divisão de fluxo (1:50). Os dados foram analisados usando o software GCMSsolution.

Os espectros de massa de alta resolução foram adquiridos em um Triplo ToF 5600 Sciex, por análise de injeção em fluxo utilizando um cromatógrafo Eksigent UltraLC 100 Sciex ajustado para uma velocidade de fluxo de 0,3 mL/min. Uma fonte DuoSpray Ion Source (ESI) foi utilizada e os espectros de MS foram adquiridos no modo positivo, empregando calibração externa, na escala de 100 – 1000 Da. Os parâmetros de aquisição foram: TEM 450, GS1 45, CUR 25, GS2 50, ISVF 5500 e DP 80. Os dados foram analisados usando o software v2.1 PeakView ou MestReNova 14.1.1-24571.

Os espectros de infravermelho foram obtidos no espectrofotômetro Varian FT 640-IR por refletância total atenuada (ATR) e utilizando  $\text{cm}^{-1}$  como unidade de frequência. O programa Essential FTIR foi utilizado na obtenção dos gráficos.

Os testes de modulação do QS em CV026 foram realizados na Faculdade de Ceilândia (FCE-UnB) no laboratório do Prof. Dr. Alex Leite Pereira. Todos os recipientes e solventes utilizados nos testes biológicos foram autoclavados a 121 °C por vinte minutos, seguindo o padrão de autoclavagem do laboratório.

A cepa CV026 foi doada pela Prof Dr<sup>a</sup> Lídia Maria Pepe de Moraes do Instituto de Biologia-IB-UnB. Ela é um dublo mutante da *Chromobacterium subtsugae* ATCC34532 na qual os genes da proteína responsável por sintetizar o autoindutor cognato, C6-HSL, *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.

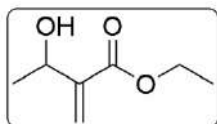
## 6.1 Parte Experimental

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

Em um balão de fundo redondo de 50 mL, equipado com barra de agitação magnética, foram adicionados 22,4 mmol de aldeído, 34 mmol de acrilato de etila (1,5 eq) e 3,2 mmol de 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (0,14 eq). O sistema foi colocado sob agitação durante 7 a 15 dias à temperatura ambiente. Ao final deste período, o excesso de acrilato de etila foi removido em evaporador rotatório e o material resultante foi solubilizado em 30 mL de éter etílico e lavado com solução de ácido clorídrico 10% (2 x 10 mL), água destilada (2 x 15 mL) e salmoura (1 x 15 mL). A fase orgânica foi seca em sulfato de sódio e concentrada em evaporador rotatório.

Quando necessária, a purificação do material foi realizada em coluna cromatográfica em sílica-gel com solução eluente de 10% acetato de etila/90% hexano (v/v). Para o derivado do acetaldeído foram empregados 250 mL de aldeído.

#### Etil 3-hidróxi-2-metilenobutanoato 144



**Caraterísticas:** óleo viscoso incolor

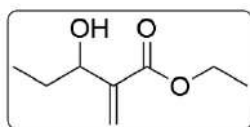
**Rendimento:** 98%

**RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 6,21 (s, 1H); 5,81 (t, 1H); 5,84 – 5,80 (m, 1H); 4,62 (q, *J* = 6,4 Hz, 1H); 4,24 (q, *J* = 7,1Hz, 2H); 1,38 (d, *J* = 6,5 Hz, 3H); 1,32 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz).

**RMN <sup>13</sup>C (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 166,7; 143,7; 123,9; 67,1; 60,8; 22,0; 14,1.

**EIMS (m/z (%)):** 144 [M<sup>+</sup>], 129 ([M-CH<sub>3</sub>)<sup>+</sup>], 43 (100).

#### Etil 3-hidróxi-2-metilenopentanoato 145



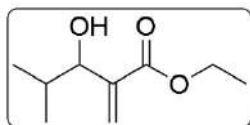
**Caraterísticas:** óleo viscoso incolor

**Rendimento:** 90%

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 6,24 (d, *J* = 1,0 Hz, 1H); 5,78 (t, *J* = 1,0 Hz, 1H); 4,33 (dd, *J* = 6,5; 6,2 Hz, 1H); 4,24 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H); 3,20 – 2,70 (m, 1H); 1,77 – 1,60 (m, 2H); 1,32 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H); 0,95 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 161,8; 137,5; 120,0; 68,2; 56,0, 24,2; 9,3; 5,2.

#### Etil 3-hidróxi-4-metil-2-metilenopentanoato 146



**Características:** óleo viscoso incolor

**Rendimento:** 91%

**RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 6,25 (d, *J* = 1,3 Hz, 1H); 5,74 (m, 1H); 4,23 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H); 4,08 (dd, *J* = 7,0; 1,0 Hz, 1H); 1,94 (hept, *J* = 6,8 Hz, 1H) 1,32 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H); 0,96 (d, *J* = 6,7 Hz, 3H); 0,88 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 166,7; 141,5; 125,7; 77,8; 60,7; 32,7; 19,5; 17,6; 14,1.

**EIMS (m/z (%)):** 173(M<sup>+</sup>), 83(100).

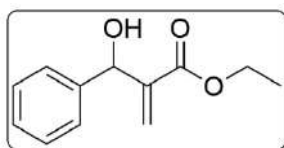
### Síntese dos adutos aromáticos de Morita-Baylis-Hillman

Em um frasco selado do tipo Schlenk foram adicionados 2,7 mmol do aldeído aromático, 27 mmol do acrilato de etila (10,0 eq), 2,5 mmol de DABCO (1,0 eq) e 2 mL de etanol. O sistema foi fechado e colocado no congelador por 2 dias, no caso do p-clorobenzaldeído, e 7 dias para o benzaldeído. Posteriormente, o excesso de acrilato de etila foi removido em evaporador rotatório e o material resultante foi purificado em coluna cromatográfica de sílica-gel com solução eluente de 20% acetato de etila/80% hexano (v/v).

Para a formação do AMBH **149**, proveniente do 4-nitrobenzaldeído, foi empregado aquecimento por micro-ondas. Em frasco específico, equipado com barra de agitação magnética, foram adicionados 3,3 mmol de 4-nitrobenzaldeído, 4,9 mmol de acrilato de etila (1,5 eq) e 0,45 mmol de DABCO (0,14 eq). O frasco foi selado e submetido à temperatura de 80 °C por 30 minutos. O excesso de acrilato de etila foi removido em evaporador rotatório e o material resultante foi purificado em coluna cromatográfica de sílica-gel com solução eluente de 20% acetato de etila/80% hexano (v/v).

Em um balão de 10 mL, equipado com barra de agitação magnética, foram adicionados 3,4 mmol de piperonal ou 3,4-dimetóxi benzaldeído, 6,8 mmol de acrilato de etila (2,0 eq), 3,4 mmol de DABCO (1,0 eq) e 3,4 mmol de ácido acético (1,0 eq). O sistema foi fechado com tampa de teflon e a mistura reacional permaneceu sob agitação por 7 dias. Passado este período, o material foi evaporado e purificado em coluna cromatográfica de sílica-gel com solução eluente de 20% acetato de etila/80% hexano (v/v).

#### Etil 2-(hidróxi(fenil)metil)acrilato **147**



**Características:** óleo viscoso incolor

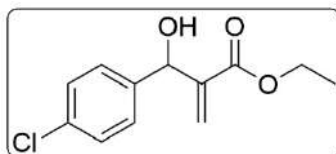
**Rendimento:** 62%

**RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 7,39 – 7,25 (m, 5H); 6,33 (s, 1H); 5,81 (s, 1H); 5,56 (d, *J* = 5,3 Hz, 1H); 4,17 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H); 3,08 (d, *J* = 5,3 Hz, 1H); 1,24 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 166,4; 142,2; 141,4; 128,4; 127,8; 126,6; 125,9; 73,4; 61,0; 14,0.

**EIMS (m/z (%)):** 206(M<sup>+</sup>), 105(100).

### Etil 2-((4-clorofenil)(hidróxi)metil)acrilato 148



**Características:** óleo viscoso incolor

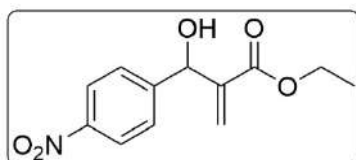
**Rendimento:** 87%

**RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 7,31 (s, 4H); 6,30 (t, *J* = 1,0 Hz, 1H); 5,80 (t, *J* = 1,0 Hz, 1H); 5,51 (d, *J* = 6,1 Hz, 1H); 4,17 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H); 3,15 (s, 1H); 1,25 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 166,2; 141,9; 13,9; 133,6; 128,6; 128,0; 126,1; 72,8; 61,1; 14,1.

**EIMS (m/z (%)):** 240(M<sup>+</sup>), 139(100).

### Etil 2-(hidróxi(4-nitrofenil)metil)acrilato 149



**Características:** óleo viscoso amarelado

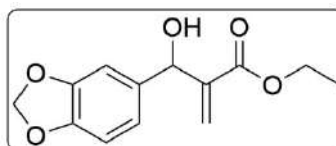
**Rendimento:** 69%.

**RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8,23 – 8,18 (m, 2H); 7,60 – 7,54 (m, 2H); 6,40 (s, 1H); 5,85 (s, 1H); 5,63 (d, *J* = 6,2 Hz, 1 H) 4,22 (q, *J* = 7,2 Hz, 2H); 3,39 (d, *J* = 6,2 Hz, 1H); 1,22 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 166,0; 148,7; 147,5; 141,2; 127,3; 127,0; 123,6; 72,8; 61,3; 14,0.

**EIMS (m/z (%)):** 250(M<sup>+</sup>), 150(100).

### Etil 2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il(hidróxi)metil)acrilato 150



**Características:** óleo viscoso incolor

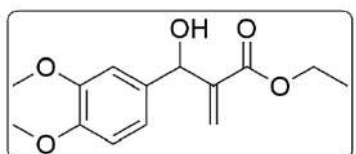
**Rendimento:** 82%.

**RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 6,85 – 6,70 (m, 2H); 6,32 (s, 1H); 5,94 (s, 2H); 5,83 (s, 1H); 5,48 (s, 1H); 4,22 – 4,14 (m, 2H); 2,97 (s, 1H); 1,26 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 166,3; 147,8; 147,2; 142,2; 135,4; 125,6; 120,2; 108,1; 107,2; 101,1; 73,1; 61,0; 14,1.

**EIMS (m/z (%)):** 250(M<sup>+</sup>), 149(100).

### Etil 2-((3,4-dimetóxi)fenil)(hidróxi)metil)acrilato 151



**Características:** óleo viscoso incolor

**Rendimento:** 53%

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 6,93 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H); 6,89 (ddd, *J* = 8,3, 2,0, 0,6 Hz, 1H); 6,83 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H); 6,32 (s, 1H); 5,81 (s, 1H); 5,52 (s, 1H); 4,18 (qd, *J* = 7,2, 1,7 Hz, 2H); 3,87 (s, 3H); 3,87 (s, 3H) 3,11 (s, 1H), 1,25 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 166,5; 149,0; 148,6; 142,3; 134,0; 125,6; 119,0; 110,9; 109,8; 73,0; 61,0; 55,9; 55,8; 14,1.

**EIMS (m/z (%)):** 266(M<sup>+</sup>), 165(100).

### **Formação dos adutos de Michael da 5-oxo e análogos**

#### **Metodologia 1 (KOH em metanol)**

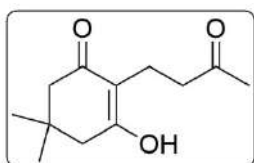
Em um balão de fundo redondo de 10 mL equipado com barra de agitação magnética, foram adicionados 350,0 mg de dimedona (2,5 mmol) e 30,0 mg de KOH (0,5 mmol) em 1 mL de metanol. Em seguida, com o auxílio de uma bomba de seringa, foi adicionada por 80 min, uma solução de 3,25 mmol do composto α,β-insaturado em 2 mL de metanol à primeira solução. Feito isso, o balão foi equipado com condensador e foi aquecido até a temperatura de refluxo, permanecendo assim por 4 horas. Passado esse tempo, o metanol foi evaporado e o resíduo formado foi solubilizado em 5 mL de acetato de etila. Essa mistura foi extraída com NaHCO<sub>3</sub> (3 x 2 mL) e solução de salmoura (1 x 2 mL). As fases aquosas foram reunidas e a solução resultante foi acidificada com HCl comercial e, em seguida, foi exaustivamente extraída com acetato de etila (10 mL por vez). As fases orgânicas foram reunidas, secas com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e os voláteis foram removidos em evaporador rotatório. O material resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel com solução eluente de 50% acetato de etila/50% hexano (v/v).

#### **Metodologia 2 (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em metanol/água)**

Em um balão de fundo redondo de 15 mL equipado com barra de agitação magnética, foram adicionados 5,3 mmol da β-dicetona ácida (2,5 mmol) e 50,0 mg de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,5 mmol) em 2 mL de água destilada. Em seguida, foi adicionada gota a gota, uma solução de 4,6 mmol do composto α,β-insaturado em 2 mL de metanol à primeira solução. Feito isso, o balão foi equipado com condensador e transferido para um banho de óleo pré-aquecido entre 80 – 85 °C, onde permaneceu por 30 minutos. A solução foi resfriada, ainda sob agitação, até a temperatura ambiente e, em seguida, foram adicionados 2 mL de solução saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Após 10 minutos, foram adicionados 2 mL de acetato de etila à mistura reacional e prosseguiu-se com a agitação por mais 5 minutos. A fase aquosa foi reservada e a fase orgânica foi exaustivamente

extraída com solução saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2 mL por vez). Em seguida, as fases aquosas foram reunidas, acidificadas com HCl 10% e extraídas exaustivamente com acetato de etila (5 mL por vez). As fases orgânicas foram reunidas, secas com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e os voláteis foram removidos em evaporador rotatório. O material resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel com solução eluente de 50% acetato de etila/50% hexano (v/v).

### 3-hidróxi-5,5-dimetil-2-(3-oxobutil)ciclohex-2-em-1-ona 203



**Características:** óleo viscoso castanho claro

**Rendimento:** 44%

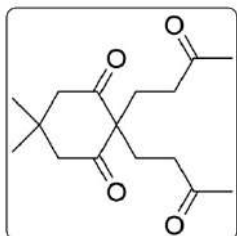
**$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  9,54 (s, 1H); 2,72 – 2,69 (m, 2H); 2,42 – 2,39 (m, 2H); 2,27 (s, 2H); 2,14 (s + s, 5H); 0,99 (s, 6H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  215,3; 198,5; 170,2; 113,5; 50,5; 43,5; 42,8; 31,4; 29,6; 28,3; 15,1.

**EIMS (m/z (%)):** 210( $\text{M}^+$ ), 167(100).

**EMAR (ESI-TOF) m/z:** calculado para  $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{O}_3 = 211,1334$ ;  $[\text{M} + \text{H}]$  encontrado = 211,1333.

### 5,5-dimetil-2,2-bis(3-oxobutil)ciclohexano-1,3-diona 204



**Características:** sólido cristalino

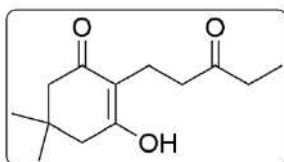
**Rendimento:** 20%

**$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  2,62 (s, 4H); 2,36 – 2,30 (m, 4H); 2,11 (s, 6H); 2,02 – 1,97 (m, 4H); 1,00 (s, 6H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  209,4; 207,2; 67,2; 49,3; 41,0; 30,7; 30,0; 28,6; 27,6.

**EIMS (m/z (%)):** 262( $\text{M}^+ - 18$ ), 43(100).

### 3-hidróxi-5,5-dimetil-2-(3-oxopentil)ciclohex-2-en-1-ona 207



**Características:** óleo viscoso castanho claro

**Rendimento:** 28%

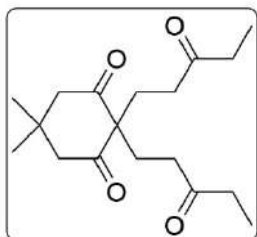
**$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  9,69 (s, 1H); 2,74 – 2,71 (m, 2H); 2,48 – 2,43 (m, 4H); 2,33 – 2,31 (m, 2H); 2,18 (s, 2H); 1,08 – 1,05 (m, 4H); 1,03 (s, 6H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  217,5; 198,4; 171,6; 112,2; 49,7; 42,8; 42,1; 35,7; 31,4; 28,3; 15,0; 7,8.

**EIMS (m/z (%)):** 224( $\text{M}^+$ ), 167(100).

**EMAR (ESI-TOF) m/z:** calculado para  $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{O}_3 = 225,1491$ ;  $[\text{M} + \text{H}]$  encontrado = 225,1486.

### 5,5-dimetil-2,2-bis(3-oxopentil)ciclohexano-1,3-diona 208



**Características:** sólido cristalino

**Rendimento:** 20%

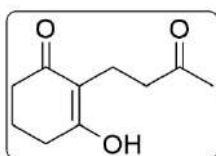
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 2,62 (s, 4H); 2,42 – 2,27 (m, 8H); 2,05 – 1,97 (m, 4H); 1,08 – 0,96 (m, 12H).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 210,0; 209,4; 61,6; 53,7; 37,6; 36,0; 31,0;

28,6; 27,6; 7,8.

**EIMS (m/z (%)):** 290(M<sup>+</sup> - 18), 57(100).

### 3-hidróxi-2-(3-oxobutil)ciclohex-2-en-1-ona 216



**Características:** óleo viscoso amarelado

**Rendimento:** 65%

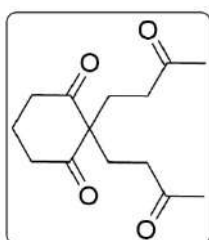
**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 9,69 (s, 1H); 2,79 – 2,75 (m, 2H); 2,65 – 2,52 (m, 1H); 2,44 (q, J = 6,2, 5,4 Hz, 3H); 2,40 – 2,34 (m, 2H); 2,33 – 2,28 (m, 2H); 2,19 (s, 2H); 2,15 (s, 1H); 2,03 – 1,94 (m, 2H); 1,90 (qui, J = 6,5 Hz, 2H); 1,75 – 1,65 (m, 1H); 1,56 (s, 1H).

**RMN <sup>13</sup>C (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 214,8; 209,0; 200,6; 198,9; 198,2; 176,4; 173,5; 169,0; 155,8; 133,1; 114,7; 111,0; 98,2; 44,9; 43,7 41,2; 36,6; 33,5; 32,9; 32,6; 31,7; 31,3; 29,9; 29,6; 29,1; 28,8; 27,8; 27,5; 24,2; 21,2; 21,1; 20,9; 20,4; 19,9; 15,4; 15,1.

**EIMS (m/z (%)):** 182(M<sup>+</sup>), 139(100).

**EMAR (ESI-TOF) m/z:** calculado para C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>O<sub>3</sub> = 183,1021; [M + H] encontrado = 183,1011.

### 2,2-bis(3-oxobutil)ciclohexano-1,3-diona 217



**Características:** sólido branco

**Rendimento:** 8%

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 2,67 – 2,59 (m, 4H); 2,33 – 2,25 (m, 4H); 2,06 (s, 6H); 2,01 – 1,92 (m, 6H).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 209,8; 207,5; 67,0; 38,3; 38,2; 30,0; 27,7;

17,1.

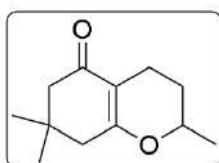
**EIMS (m/z (%)):** 234(M<sup>+</sup> - 18), 43(100).



### Síntese das lactonas vinílogas análogas à 5-oxo

Em um balão de fundo redondo de 10 mL, equipado com barra de agitação magnética, 1,0 mmol do produto monoalquilado da adição de Michael e 106,0 mg de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,0 mmol) foram solubilizados em 3 mL de etanol 95%. Em seguida, foram acrescentados 30,0 mg de NaBH<sub>4</sub> (0,8 mmol) à mistura reacional, que permaneceu em agitação à temperatura ambiente por 2 horas. Após esse período, a reação foi acidificada pela adição de solução de HCl 10% e foi agitada novamente por mais 10 minutos. Feito isso, a mistura reacional foi extraída com acetato de etila (2 x 5 mL). As fases orgânicas foram reunidas e extraídas com NaHCO<sub>3</sub> (2 x 3 mL) e salmoura (1 x 3 mL), seguida da secagem com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e os voláteis foram removidos em evaporador rotatório. Nos casos em que foi necessário, a purificação do material foi realizada por coluna cromatográfica de sílica-gel com solução eluente de 30% acetato de etila/70% hexano (v/v).

#### 2,7,7-trimetil-2,3,4,6,7,8-hexahidro-5H-cromen-5-ona 205



**Característica:** óleo incolor

**Rendimento:** 75%

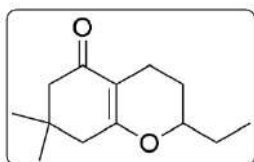
**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 4,08 (dq, *J* = 9,7, 6,4, 2,6 Hz, 1H); 2,40 (dddt, *J* = 16,6; 5,2; 3,5; 1,6 Hz, 1H); 2,28 – 2,23 (m, 2H); 2,23 – 2,18 (m, 2H); 2,1, (dddd, *J* = 16,9; 10,4; 6,2; 2,6; 1,5 Hz 1H); 1,93 (dddd, *J* = 13,9; 6,1; 3,3; 2,4 Hz, 1H); 1,51 (dddd, *J* = 13,8; 10,7; 9,8; 5,7 Hz, 1H); 1,34 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H); 1,07 (s, 3H); 1,04 (s, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 198,8; 169,7; 109,8; 71,0; 51,0; 44,2; 32,0; 29,7; 28,4; 27,7; 20,1; 17,4.

**EIMS (m/z (%)):** 194(M<sup>+</sup>), 165(100).

**EMAR (ESI-TOF) m/z:** calculado para C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>O<sub>2</sub> = 195,1385; [M + H] encontrado = 195,1383.

#### 2-etil-7,7-dimetil-2,3,4,6,7,8-hexahidro-5H-cromen-5-ona 209



**Características:** óleo incolor

**Rendimento:** 69%

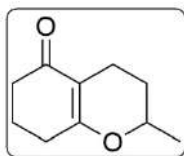
**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 3,85 (dddd, *J* = 9,7; 7,1; 5,7; 2,4 Hz, 1H); 2,43 – 2,37 (m, 1H); 2,29 – 2,18 (m, 4H); 2,15 – 2,07 (m, 1H); 1,93 (dddd, *J* = 13,7; 6,0; 3,3; 2,4 Hz, 1H); 1,71 (dt, *J* = 13,9; 7,3 Hz, 1H); 1,65 – 1,56 (m, 1H); 1,51 (dddd, *J* = 13,7; 10,7; 9,8; 5,6 Hz, 1H); 1,07 (s, 3H); 1,04 (s, 3H); 1,00 (t, *J* = 7,5 Hz, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 198,0; 169,8; 110,0; 78,9; 51,5; 42,5; 32,0; 29,6; 27,7; 26,1; 17,4; 8,9.

**EIMS (m/z (%)):** 208(M<sup>+</sup>), 97(100).

**EMAR (ESI-TOF) m/z:** calculado para C<sub>13</sub>H<sub>21</sub>O<sub>2</sub> = 209,1542; [M + H] encontrado = 209,1533.

### 2-metil-2,3,4,6,7,8-hexahidro-5H-cromen-5-ona 138



**Caraterísticas:** óleo viscoso

**Rendimento:** 66%

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 4,03 (ddd, *J* = 9,9; 6,3; 2,5 Hz, 1H); 2,37 – 2,27 (m, 5H); 2,12 – 2,05 (m, 1H); 1,95 – 1,85 (m, 3H); 1,48 (dddd, *J* = 13,8; 10,9; 9,9; 5,5 Hz, 1H); 1,30 (d, *J* = 6,3 Hz, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 198,4; 171,5; 111,2; 73,8; 36,7; 28,8; 28,4; 20,9; 20,7; 17,7.

**EIMS (m/z (%)):** 166(M<sup>+</sup>), 137(100).

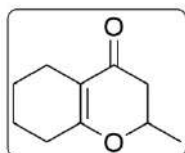
**EMAR (ESI-TOF) m/z:** calculado para C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>O<sub>2</sub> = 167,1062; [M + H] encontrado = 167,1066.

### Síntese da 6-oxo (139)

Em um balão de fundo redondo de 3 bocas (volume nominal de 500 mL), equipado com barra de agitação magnética, foram adicionados 114 mmol de morfolinociclohexeno e 120 mL de diclorometano seco. Em seguida, foram acoplados ao balão um funil para adição de líquidos contendo solução de 134 mmol de cloreto de crotonoíla em 100 mL de DCM, um tubo de cloreto de cálcio e o sistema foi purgado com argônio com o auxílio de um borbulhador. Imediatamente, sob agitação, foram adicionados 158 mmol de trietilamina (1,4 eq) e o sistema foi resfriado abaixo de 0 °C, permanecendo nesta condição por 30 minutos. Passado este período, iniciou-se a dosagem da solução de cloreto de crotonoíla à mistura reacional por 80 minutos. Ao final da adição, um condensador foi acoplado ao balão e a temperatura foi ajustada para 40 °C, permanecendo sob condição de refluxo por 36 horas. Após este período, uma solução de 120 mL de HCl 10% e 60 mL de etanol 95% foram adicionados ao meio reacional, a temperatura foi ajustada e o sistema permaneceu sob refluxo por mais 10 horas. Finalizando-se esta etapa, as fases aquosa e orgânica foram separadas. A fase aquosa foi extraída com DCM (3 x 80 mL) e as porções orgânicas foram reunidas. Estas foram lavadas com água destilada (3 x 200 mL), solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (1 x 120 mL), salmoura (1 x 120 mL), secas com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrada em evaporador rotatório. O óleo castanho resultante foi adicionado a um balão de 250 mL, equipada com barra de agitação magnética, e foi solubilizado numa solução de AcOH (99,85%)/HCl (37%)/H<sub>2</sub>O (1:1:1 de cada componente para cada 1 g de óleo). A mistura reacional foi aquecida a, aproximadamente, 80 °C por 4 horas. Passado este tempo, o material foi resfriado à temperatura ambiente e foram adicionados 80 mL de água destilada ao

meio reacional, promovendo a separação de fases. A fase aquosa foi extraída com DCM (3 x 80 mL) e as fases orgânicas foram reunidas. Estas foram lavadas com água destilada (3 x 80 mL), NaHCO<sub>3</sub> (1 x 120 mL), salmoura (1 x 120 mL), secas em Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrada em evaporador rotatório originando um óleo marrom bastante viscoso. Este material foi dissolvido a quente em 80 mL de uma solução 5% acetato de etila:95% hexano (v/v), na presença de carvão ativado, permanecendo nessa condição por 6 horas. Em seguida, o material resultante foi filtrado a vácuo em celite e o líquido resultante foi concentrado em evaporador rotatório originando um líquido castanho claro que se solidificou ao ser armazenado na geladeira. Este material foi solubilizado em 100 mL de hexano quente e resfriado à temperatura ambiente. Posteriormente, foi colocado na geladeira por 4 horas, seguidas de outras 4 horas no congelador. Passado este período, verificou-se a presença de um sistema bifásico consistindo de um líquido amarelado e um óleo castanho bastante viscoso. O líquido amarelado foi concentrado em evaporador rotatório, originando um óleo amarelado que só solidificava após o resfriamento na geladeira. Este material foi novamente solubilizado em hexano a quente e o ciclo foi repetido mais duas vezes, até o aparecimento de 11,75 g de um sólido na forma de agulhas brancas (62%).

### 2-metil-2,3,5,6,7,8-hexahidro-4H-cromen-4-ona 139



**Características:** agulhas brancas

**Rendimento:** 62%

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 4,44 (dq, *J* = 12,7; 6,4; 3,9 Hz, 1H); 2,46 (dd, *J* = 16,8; 13,3 Hz, 1H); 2,40 (dd, *J* = 16,8; 3,9 Hz, 1H), 2,34 – 2,13 (m, 4H), 1,81 – 1,75 (m, 1H); 1,74 – 1,68 (m, 1H), 1,64 – 1,56 (m, 1H), 1,54 – 1,44 (m, 1H), 1,42 (d, *J* = 6,3 Hz, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 192,5; 171,4; 111,9; 74,5; 43,2; 28,7; 22,1; 21,9; 20,7; 20,6.

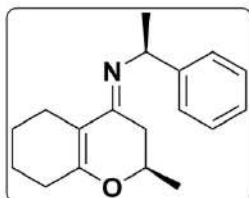
**EIMS (m/z (%)):** 166(M<sup>+</sup>), 68(100).

### Formação das iminas *R,S* e *S,S* 222 e 227

Em um frasco próprio para aquecimento por micro-ondas, equipado com barra de agitação magnética, foram adicionados: 3,0 mmol de 6-oxo, 3,0 mmol de (*S*)-(-)-1-fenetilamina, 0,3 mmol de ácido *p*-toluenossulfônico e 3 mL de tolueno seco. O sistema foi fechado e aquecido a 150 °C por 1 hora. Ao final do processo, o material foi transferido para um balão de volume adequado e concentrado em evaporador rotatório, originando um óleo castanho escuro.

Este foi purificado em coluna cromatográfica de sílica-gel com solução eluente 50% acetato: 50% hexano (v/v).

**(R)-2-metil-N-((S)-1-fenil)-2,3,5,6,7,8-hexahidro-4H-cromen-4-imina (R,S)-222**



**Caraterísticas:** óleo castanho

**Rendimento:** 26,4%

**IV (ATR)  $\text{cm}^{-1}$ :** 1619,1544, 1452, 1195, 1167, 701.

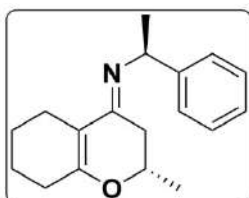
**$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  7,43 – 7,35 (m, 4H), 7,34 – 7,30 (m, 1H), 5,19 (q,  $J = 6,9$  Hz, 1H), 3,52 (quid,  $J = 6,5, 1,7$  Hz, 1H), 2,72 (dd,  $J = 16,1, 6,2$  Hz, 1H), 2,60 (dt,  $J = 17,0, 6,3$  Hz, 1H), 2,48 (dt,  $J = 16,9, 6,6$  Hz, 1H), 2,35 (t,  $J = 6,4$  Hz, 2H), 2,05 (dd,  $J = 16,1, 1,7$  Hz, 1H), 1,87 – 1,79 (m, 1H), 1,78 – 1,69 (m, 1H), 1,69 – 1,51 (m, 5H), 0,62 (d,  $J = 6,7$  Hz, 3H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  190,1; 155,7; 140,1; 128,4; 128,2; 127,9; 107,3; 54,6; 46,8; 42,2; 28,4; 23,1; 22,2, 22,0; 18,1; 16,3.

**EIMS ( $m/z$  (%)):** 269( $\text{M}^+$ ), 105(100).

**EMAR (ESI-TOF)  $m/z$ :** calculado para  $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{NO} = 270,1858$ ;  $[\text{M} + \text{H}]$  encontrado = 270,1857.

**(S)-2-metil-N-((S)-1-fenil)-2,3,5,6,7,8-hexahidro-4H-cromen-4-imina (S,S)-222**



**Características:** óleo castanho

**Rendimento:** 27,2%

**IV (ATR)  $\text{cm}^{-1}$ :** 1611, 1539, 1448, 1200, 1167.

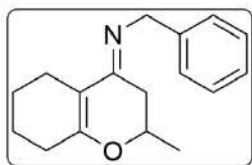
**$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  7,39 – 7,27 (m, 5H), 5,15 (q,  $J = 7,0$  Hz, 1H), 3,47 (quid,  $J = 6,6, 1,6$  Hz, 1H), 2,64 (dt,  $J = 17,0, 6,4$  Hz, 1H), 2,47 – 2,28 (m, 4H), 1,88 (dd,  $J = 16,4, 1,6$  Hz, 1H), 1,81 – 1,71 (m, 2H), 1,71 – 1,55 (m, 5H), 1,24 (d,  $J = 6,7$  Hz, 3H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  189,6; 156,7; 142,2; 128,7; 127,6; 126,5; 106,1; 54,3; 47,6; 41,4; 28,0; 23,1; 22,3; 21,9; 17,7; 17,3.

**EIMS ( $m/z$  (%)):** 269( $\text{M}^+$ ), 105(100).

**EMAR (ESI-TOF)  $m/z$ :** calculado para  $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{NO} = 270,1858$ ;  $[\text{M} + \text{H}]$  encontrado = 270,1854.

### ***N*-benzil-2-metil-2,3,5,6,7,8-hexahidro-4*H*-cromen-4-imina 227**



**Características:** óleo castanho

**Rendimento:** 49%

**IV (ATR)  $\text{cm}^{-1}$ :** 1546, 1167.

**$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  7,39 – 7,36 (m, 2H); 7,32 – 7,28 (m, 1H); 7,26 – 7,23 (m, 2H); 4,79 (d,  $J = 16,7$  Hz, 1H); 4,14 (d,  $J = 16,8$  Hz, 1H); 3,56 (quid,  $J = 6,7, 3,2$  Hz, 1H); 2,82 (dd,  $J = 16,2, 6,7$  Hz, 1H); 2,49 – 2,43 (m, 1H); 2,33 – 2,29 (m, 2H); 2,27 – 2,20 (m, 2H); 1,78 – 1,66 (m, 2H); 1,58 – 1,50 (m, 1H); 1,48 – 1,40 (m, 1H); 1,21 (d,  $J = 6,7$  Hz, 3H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  189,5; 157,5; 138,2; 129,0; 127,5; 126,1; 105,8; 53,3; 51,3; 42,0; 27,9; 22,6; 22,0; 21,9; 15,1.

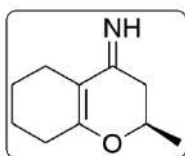
**EIMS ( $m/z$  (%)):** 255( $\text{M}^+$ ), 91(100).

**EMAR (ESI-TOF)  $m/z$ :** calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{NO} = 256,1701$ ;  $[\text{M} + \text{H}]$  encontrado = 256,1701.

### **Formação das iminas *R* e *S* 223**

Em um frasco próprio para aquecimento por micro-ondas, equipado com barra de agitação magnética, foram adicionados 0,4 mmol da imina **222**, 0,6 mmol de HCl 10% e 1 mL de uma solução de acetato de etila/etanol (5:2). O sistema foi fechado e aquecido a 150 °C por 1,25 horas. Ao final do processo, a mistura reacional foi diluída em 4,5 mL de acetato de etila e lavado com água destilada (3 x 3 mL). As fases orgânicas foram reunidas, secas em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentradas em evaporador rotatório. O material resultante foi purificado por coluna cromatográfica em sílica-gel com solução eluente 90% acetato de etila:10% hexano (v/v).

### **(*R*)-2-metil-2,3,5,6,7,8-hexahidro-4*H*-cromen-4-imina (*R*)-223**



**Características:** óleo incolor

**Rendimento:** 78%

**IV (ATR)  $\text{cm}^{-1}$ :** 3276, 1611, 1561, 1531, 1161.

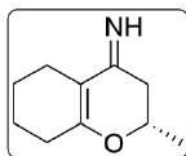
**$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, MeOD):**  $\delta$  3,70 – 3,62 (m, 1H); 2,37 – 2,13 (m, 6H); 1,76 – 1,67 (m, 2H); 1,64 – 1,52 (m, 2H); 1,28 (d,  $J = 6,4$  Hz, 3H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (151 MHz, MeOD):**  $\delta$  192,2; 163,5; 103,7; 48,0; 42,8; 28,2; 22,3; 21,7; 20,7; 18,7.

**EIMS ( $m/z$  (%)):** 165( $\text{M}^+$ ), 122(100).

**EMAR (ESI-TOF)  $m/z$ :** calculado para  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{NO} = 166,1232$ ;  $[\text{M} + \text{H}]$  encontrado = 166,1229.

### (S)-2-metil-2,3,5,6,7,8-hexahidro-4H-cromen-4-imina (S)-223



**Características:** óleo incolor

**Rendimento:** 81%

**IV (ATR)  $\text{cm}^{-1}$ :** 3271, 1610, 1560, 1529, 1160.

**$^1\text{H NMR}$  (600 MHz, MeOD):**  $\delta$  3,70 – 3,62 (m, 1H); 2,37 – 2,13 (m, 6H); 1,77 – 1,67 (m, 2H); 1,64 – 1,52 (m, 2H); 1,28 (d,  $J = 6,5, 3\text{H}$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (151 MHz, MeOD):**  $\delta$  192,2; 163,5; 103,7, 48,0; 42,8; 28,2; 22,3; 21,7; 20,7; 18,7.

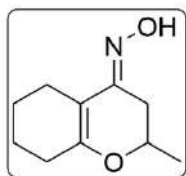
**EIMS (m/z (%)):** 165( $\text{M}^+$ ), 122(100).

**EMAR (ESI-TOF) m/z:** calculado para  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{NO} = 166,1232$ ;  $[\text{M} + \text{H}]$  encontrado = 166,1230.

### Formação das oximas 230 e 231

Em um balão de 10 mL, equipado com barra de agitação magnética, foram adicionados 0,42 mmol de 6-oxo, 1,26 mmol da hidroxilamina e 2,5 mL de MeOH. A mistura foi colocada sob agitação à temperatura ambiente e, por fim, adicionou-se 1,27 mmol de acetato de sódio ao meio reacional. A reação permaneceu por agitação por 24 horas. Passado este período, foram adicionados 5 mL de solução tampão fosfato pH 7,0, permanecendo sob agitação por mais 30 minutos. Em seguida, o material foi concentrado em evaporador rotatório para a remoção do metanol e foi ressuscitado com DCM, promovendo a separação de fases. A fase aquosa foi extraída com DCM (2 x 3 mL) e as fases orgânicas foram reunidas. Estas foram lavadas com salmoura (1x 3 mL), secas em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentradas em evaporador rotatório. A oxima **231** foi purificada por coluna cromatográfica em sílica-gel com solução eluente 3% acetato de etila:97%hexano (v/v).

### 2-metil-2,3,5,6,7,8-hexahidro-4H-cromen-4-ona oxima 230



**Características:** sólido branco

**Rendimento:** 76%

**IV (ATR)  $\text{cm}^{-1}$ :** 1639, 1142, 941, 855.

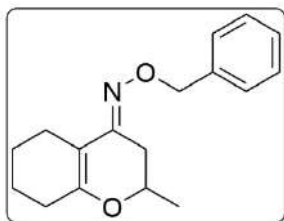
**$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  9,18 (s, 1H); 4,05 (dq,  $J = 12,6; 6,3; 3,2$  Hz, 1H); 3,14 (dd,  $J = 16,9; 3,2$  Hz, 1H); 2,32 – 2,25 (m, 1H); 2,21 – 2,10 (m, 4H); 1,80 – 1,70 (m, 2H); 1,61 – 1,45 (m, 2H); 1,37 (d,  $J = 6,3$  Hz, 3H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  158,1; 152,5; 108,9; 71,4; 29,6; 28,2; 22,3; 22,1; 22,0; 20,8.

**EIMS (m/z (%)):** 181( $\text{M}^+$ ), 122(100).

**EMAR (ESI-TOF)  $m/z$ :** calculado para  $C_{10}H_{16}NO_2 = 182,1181$ ;  $[M + H]$  encontrado = 182,1176.

### 2-metil-2,3,5,6,7,8-hexahidro-4H-cromen-4-ona *O*-benzil oxima **231**



**Características:** óleo viscoso incolor

**Rendimento:** 53%

**IV (ATR)  $cm^{-1}$ :** 1638, 1016, 698.

**$^1H$  NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  7,42 – 7,35 (m, 4H); 7,34 – 7,30 (m, 1H); 5,15 – 5,08 (m, 2H); 4,04 (dq,  $J = 12,6; 6,3; 3,2$  Hz, 1H); 3,13 (dd,  $J = 17,0; 3,3$  Hz, 1H); 2,38 – 2,32 (m, 1H); 2,23 – 2,13 (m, 4H); 1,82 – 1,71 (m, 2H); 1,65 – 1,57 (m, 1H); 1,56 – 1,48 (m, 1H); 1,36 (d,  $J = 6,3$  Hz, 3H).

**RMN  $^{13}C$  (151 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  157,6; 152,2; 138,2; 128,3; 128,2; 127,7; 105,1; 75,8; 71,3; 30,4; 28,3; 22,4; 22,2; 21,1; 20,9.

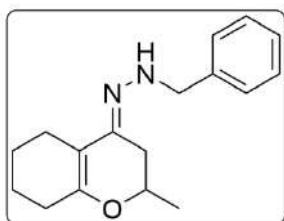
**EIMS ( $m/z$  (%)):** 271( $M^+$ ), 91(100).

**EMAR (ESI-TOF)  $m/z$ :** calculado para  $C_{17}H_{22}NO_2 = 272,1651$ ;  $[M + H]$  encontrado = 272,1650.

### Formação das hidrazonas

Em um balão de 25 mL, equipado com barra de agitação magnética, foram adicionados 5 mmol de 6-oxo, 5,5 mmol de hidrazina e 5 mL de MeOH. O sistema foi colocado sob agitação e, em seguida, foram adicionadas 5 gotas de AcOH ao meio reacional, e o mesmo foi posto em condição de refluxo por 2 a 120 horas, a depender da hidrazina empregada. Passado este período, o material resultante foi concentrado em evaporador rotatório. As hidrazonas **236** e **237** foram recristalizadas em metanol obtendo-se sólidos brancos ao final. A purificação da hidrazona nicotínica **235** foi realizada por coluna cromatográfica em sílica-gel com solução eluente de 95% de acetato de etila:5% hexano (v/v).

### 1-benzil-2-(2-metil-2,3,5,6,7,8-hexahidro-4H-cromen-4-ilideno)hidrazina **234**



**Características:** óleo castanho obtido junto com 6-oxo (**139**)

**Rendimento:** não estipulado

**IV (ATR)  $cm^{-1}$ :** 3425, 1604, 1455, 752, 700.

**$^1H$  NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  7,43 – 7,28 (m, 7H); **139** 4,44 (dq,  $J = 12,8; 6,3; 3,9$  Hz, 1H); 4,38 – 4,30 (m, 1H); 4,26 (d,  $J = 12,6$  Hz, 1H); 3,94 (ddd,  $J = 13,9; 6,5; 3,5$  Hz, 1H); 3,79 – 3,64 (m, 1H); 3,12 (dd,  $J = 17,8; 3,4$  Hz, 1H);

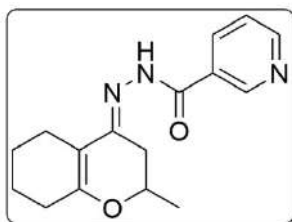
2,88 (d,  $J = 6,2$  Hz, 1H), 2,66 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 2,54 (t,  $J = 6,3$  Hz, 1H); **139 e 234** 2,50 – 2,36 (m, 3H); **139 e 234** 2,36 – 2,20 (m, 4H); **139 e 234** 2,20 – 2,06 (m, 2H); **139 e 234** 1,92 – 1,67 (m, 5H); **139 e 234** 1,65 – 1,45 (m, 4H); **139** 1,41 (d,  $J = 6,3$  Hz, 1H); 1,30 (d,  $J = 6,3$  Hz, 3H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  **139** 192,3; **139** 171,1; **234** 169,4; 130,7; **234** 130,1; **234** 129,2; **234** 128,6; **234** 128,2; 128,1; **139** 111,9; **234** 103,9; **139** 74,5; **234** 72,8; 65,2; 55,4; **234** 53,4; **234** 52,1; **139** 43,1; **234** 34,0; 31,6; **234** 29,8; **139** 28,6; **234** 23,5; **234** 22,4; **139** 22,0; **139** 21,9; **234** 21,8; **234** 21,5; **234** 21,3; **234** 21,1; **234** 21,0; **139** 20,7; **139** 20,6; **234** 19,8; **234** 19,4.

**EIMS ( $m/z$  (%)):** 270( $\text{M}^+$ ), 91(100).

**EMAR (ESI-TOF)  $m/z$ :** calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O} = 271,1810$ ;  $[\text{M} + \text{H}]$  encontrado = 281,1811.

#### ***N'*-(2-metil-2,3,5,6,7,8-hexahidro-4*H*-cromen-4-ilideno)nicotino hidrazida 235**



**Característica:** cristais brancos

**Rendimento:** 22,8%

**IV (ATR)  $\text{cm}^{-1}$ :** 1648, 1619, 1538, 1142.

**$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C):**  $\delta$  9,44 – 9,04 (m, 2H); 8,69 (dd,  $J = 4,9, 1,8$  Hz, 1H); 8,34 – 8,19 (m, 1H); 7,37 (dd,  $J = 8,0, 4,8$  Hz, 1H); 4,28 – 4,08 (m, 1H); 3,30 – 2,79 (m, 1H); 2,55 – 2,05 (m, 5H); 1,79 (d,  $J = 37,0$  Hz, 2H); 1,67 – 1,39 (m, 5H).

**$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 50 °C):**  $\delta$  9,20 (d,  $J = 51,2$  Hz, 2H); 8,69 (dd,  $J = 4,8, 1,7$  Hz, 1H); 8,29 (s, 1H); 7,36 (ddd,  $J = 7,9, 4,8, 0,9$  Hz, 1H); 4,19 (s, 1H); 2,84 (s, 1H); 2,27 (d,  $J = 52,4$  Hz, 5H); 1,93 – 1,37 (m, 7H).

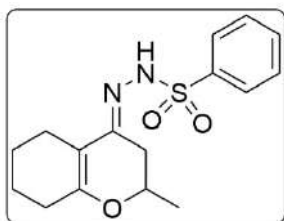
**RMN  $^{13}\text{C}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  167,7; 160,1; 151,6; 151,5; 147,6; 138,0; 135,4; 107,6; 71,1; 31,7; 30,6; 28,7; 28,3; 22,3; 22,2; 21,9; 20,9; 20,7.

**EIMS ( $m/z$  (%)):** 267( $\text{M}^+ - 18$ ), 78(100).

**EMAR (ESI-TOF)  $m/z$ :** calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2 = 286,1556$ ;  $[\text{M} + \text{H}]$  encontrado = 286,1554.



***N'*-(2-metil-2,3,5,6,7,8-hexahidro-4*H*-cromen-4-ilideno)benzenossulfono hidrazida 236**



**Características:** sólido branco

**Rendimento:** 49,2%

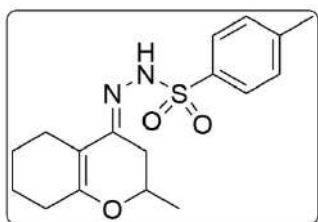
**IV (ATR)  $\text{cm}^{-1}$ :** 1332, 1167, 725, 687.

**$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  7,98 (dd,  $J = 8,3; 1,3$  Hz, 2H); 7,62 – 7,57 (m, 1H); 7,52 (t,  $J = 7,8$  Hz, 2H); 7,15 (s, 1H); 4,04 (dq,  $J = 12,5; 6,2; 3,2$  Hz, 1H); 2,67 (dd,  $J = 16,2; 3,3$  Hz, 1H); 2,35 – 2,28 (m, 1H); 2,14 – 2,09 (m, 2H); 2,07 – 1,98 (m, 2H); 1,71 (ddt,  $J = 23,1; 12,2; 5,9$  Hz, 2H); 1,55 – 1,40 (m, 2H); 1,33 (d,  $J = 6,3$  Hz, 3H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  160,2; 153,4; 138,2; 133,0; 128,7; 128,2; 107,3; 71,1; 31,1; 28,2; 22,2; 22,1; 21,9; 20,7.

**EMAR (ESI-TOF)  $m/z$ :** calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3\text{S} = 321,1273$ ;  $[\text{M} + \text{H}]$  encontrado = 321,1275.

**4-metil-*N'*-(2-metil-2,3,5,6,7,8-hexahidro-4*H*-cromen-4-ilideno)benzenossulfono hidrazida 237**



**Características:** sólido branco

**Rendimento:** 39,8%

**IV (ATR)  $\text{cm}^{-1}$ :** 1638, 1328, 1160, 677.

**$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  7,86 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H); 7,31 (d,  $J = 8,0$  Hz, 2H); 7,12 (s, 1H); 4,03 (dq,  $J = 12,6; 6,3; 3,2$  Hz, 1H); 2,66 (dd,  $J = 16,3; 3,3$  Hz, 1H); 2,43 (s, 3H); 2,32 (dt,  $J = 16,3; 4,3$  Hz, 1H); 2,14 – 2,09 (m, 2H); 2,07 – 1,99 (m, 2H); 1,77 – 1,66 (m, 2H); 1,55 – 1,40 (m, 2H); 1,55 – 1,40 (m, 2H); 1,33 (d,  $J = 6,3$  Hz, 3H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  160,0; 153,1; 143,9; 135,2; 129,3; 128,2; 107,3; 71,1; 31,1; 28,2; 22,2; 22,1; 22,0; 21,6; 20,7.

**EMAR (ESI-TOF)  $m/z$ :** calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_3\text{S} = 335,1429$ ;  $[\text{M} + \text{H}]$  encontrado = 335,1434.

**Procedimento Empregado Para Teste Biológico.**

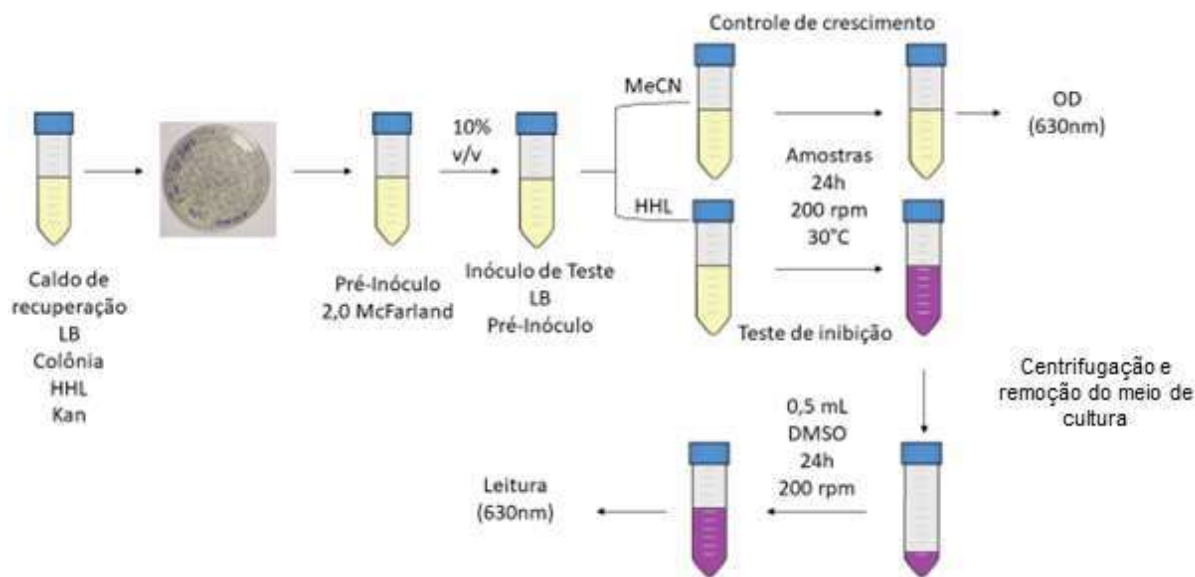
**Cepa de *Chromobacterium subtsugae* e condições de cultivo**

A cepa 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 em ágar LB (48 horas à 28°C) foram utilizadas para 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 5 µM. Uma alíquota de 1,00 mL dessa cultura foi transferida para um tubo cônico tipo falcon (volume de 15 ml) e suplementada com 25 µL das moléculas testadas em uma solução de acetonitrila 25%, em diferentes concentrações finais (1,25 mM, 625 µM, 312 µM e 156 µM). Os ensaios foram mantidos sob agitação de 200 rpm a 28 °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 28 °C em espectrofotômetro de placa (Biotek - ELx808™). Para determinação de produção de violaceína, o experimento “teste” foi submetido a centrifugação de 400 rpm por 10 min. Em seguida, o meio de cultura foi retirado, permanecendo apenas o pellet bacteriano. 0,5 mL de DMSO foi utilizado para extrair a violaceína, ficando sob agitação de 200 rpm a 28 °C por 24 horas. A absorbância (630nm) produzida pelo extrato de DMSO foi utilizado para estimar a produção de violaceína (Figura 87). Experimento realizado em triplicata.



**Figura 87.** Experimento de quantificação de violaceína.<sup>84</sup>

### Ensaio de competição

O ensaio de competição foi feito de forma similar ao de quantificação de violaceína, contudo, neste teste a concentração do composto inibidor **166** foi mantida em 1,25 mM enquanto a concentração do autoindutor **4** foi variada de 10 nM até 1 mM. Experimento realizado em triplicata.

### Ensaio de consumo de quitina

A preparação da suspensão coloidal de quitina foi realizada segundo o procedimento descrito por Rodriguez-Kabana e colaboradores.<sup>118</sup> Em um béquer de 250 mL, equipado com barra de agitação magnética, foram adicionados 4,0 g de quitina comercial e 36 mL de HCl (37%). Essa mistura foi colocada sob agitação por 2 horas. Após este período, o conteúdo do béquer foi transferido para um erlenmeyer de 2 litros e foi adicionada água destilada até se atingir o volume final de 1 L. A mistura permaneceu em repouso por 8 horas, permitindo que a quitina se depositasse no fundo do erlenmeyer. O líquido sobrenadante foi gentilmente removido, de forma que o material depositado no fundo do recipiente fosse minimamente perturbado; e o material foi novamente ressuspensionado em água. Esse processo foi repetido mais 10 vezes, até que a suspensão de quitina atingisse pH 6,0. Ao final do processo, a suspensão coloidal foi filtrada e armazenada na geladeira. O teste de averiguação de consumo de quitina foi feito de acordo com a metodologia de Chernin e colaboradores com poucas modificações.<sup>97</sup> As colônias isoladas de CV026 foram usadas para fazer uma suspensão bacteriana ajustada em

nível 2 da escala de 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 o autoindutor cognato **4**. 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 bactéria suplementada com **4** (controle positivo); em outro poço a suspensão, o **4** e a molécula avaliada (**155** ou **166**); e em um terceiro poço apenas a suspensão bacteriana (controle negativo). A placa foi incubada em estufa a 28°C por 72 h 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/μL. 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 μL) foi composta da seguinte forma: 10 μl de GoTaq® qPCR Master Mix, 2,5 μl de primers direto e reverso (150 nM), 0,4 μl de GoScript™ RT Mix para 1-Step RT-qPCR e 4 μl 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  $\Delta\Delta C_t$ . Dois loci em *vioABCDE* (*vioA* e *vioC*) foram avaliados para determinar a expressão relativa do transcrito *vioABCDE*. O gene de referência *16S* foi usado como controle interno para normalização dos dados. Esses experimentos foram conduzidos independentemente 3 vezes. Primers para *vioA*, *vioC* e *16S* (Tabela 22) foram projetados usando a ferramenta baseada na web Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).

**Tabela 22.** Sequência dos primers utilizados na RT-PCR.

<b>Primer</b>	<b>Sequence</b>
<i>vioA-F</i>	ATCCGGAAATCCAGAGCTTC
<i>vioA-R</i>	ACTTGTCGCCCTTGAAGTAG
<i>vioC-F</i>	GCCTTTTTTCGACCGTTACTTC
<i>vioC-R</i>	CTATGCATGTAGCGGGTGTA
<i>16S-F</i>	GAGCTAGAGTGCGTCAGAGG
<i>16S-R</i>	GTGAACGGATACACCTCGCT

### **Procedimento Empregado Para Ancoragem Molecular.**

AutoDock Vina 1.1.2 e VMD 1.9.3 (*Visual Molecular Dynamics*) foram os programas utilizados para realizar os ensaios de ancoragem molecular e visualização dos resultados, respectivamente. Os ligantes foram desenhados com o auxílio do programa Avogadro (Versão 1.2.0), no qual também foram otimizadas através da aplicação do UFF (sigla em inglês para *Universal Force Field*). A estrutura da proteína CviR foi obtida no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB), sob o código de identificação 3QP5. Este arquivo trata-se da estrutura cristalográfica de raio-X de CviR de *C.subtsugae* ATCC 31532/CV026 complexada ao inibidor sintético **22**. Os experimentos de ancoragem molecular foram realizados empregando-se a forma dimérica da estrutura de CviR e seu centro foi definido como o centro do grid utilizado ( $x = 39$ ,  $y = -0,15$ ,  $z = 15,71$ ) com dimensões de 60 Å x 90 Å x 100 Å. Os resultados dos experimentos de ancoragem aparecem como uma lista da energia livre ( $\Delta G$ ) referente à interação da proteína com as diferentes conformações adotadas pelas moléculas. Após o resultado da ancoragem, as estruturas complexadas foram avaliadas manualmente dentro do sítio ligante, avaliando-se as distâncias com os resíduos de aminoácido e a disposição da molécula em relação ao inibidor **22**.

### **Experimento de Busca Conformacional dos Diastereoisômeros da Molécula 222**

O experimento de busca conformacional foi realizado no software Spartan 14 versão 1.1.4, empregando-se a rotina “Energy Profile” no estado fundamental. Cada conformero foi otimizado no método Hartree Fock utilizando-se o conjunto de funções de base 6-31G\*. O experimento consistiu na otimização das estruturas químicas obtidas pela rotação em torno da ligação N12-C13. Para isso, foi estabelecido o diedro C6=N12-C13-C20(Ph), que foi mantido

fixo em cada um dos 18 passos de otimização, e que diferiram entre si pelo incremento sucessivo de  $20^\circ$  no ângulo diedro, até que se completasse  $360^\circ$ .

## 7. Bibliografia

1. Camilli, A.; Bassler, B. L.; *Source: Science, New Series* **2006**, *311*, 1113. <https://doi.org/10.1126/science.1121357>.
2. Waters, C. M.; Bassler, B. L.; *Annu Rev Cell Dev Biol* **2005**, *21*, 319. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001>.
3. Henke, J. M.; Bassler, B. L.; *Trends Cell Biol* **2004**, *14*, 648. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.09.012>.
4. Galloway, W. R. J. D.; Hodgkinson, J. T.; Bowden, S. D.; Welch, M.; Spring, D. R.; *Chem Rev* **2011**, *111*, 28. <https://doi.org/10.1021/cr100109t>.
5. Visick, K. L.; Fuqua, C.; *J. Bacteriol.* *187*, 5507. <https://doi.org/10.1128/JB.187.16.5507-5519.2005>.
6. Wright III, J. S.; Jin, R.; Novick, R. P.; *PNAS* **2005**, *102* (5). <https://doi.org/10.1073/pnas.0407661102>.
7. Zhang, L. H.; Dong, Y. H.; *Mol Microbiol* **2004**, *53*, 1563. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04234.x>.
8. Ng, W. L.; Perez, L. J.; Wei, Y.; Kraml, C.; Semmelhack, M. F.; Bassler, B. L.; *Mol Microbiol* **2011**, *79*, 1407. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07548.x>.
9. Schauder, S.; Shokat, K.; Surette, M. G.; Bassler, B. L.; *Mol Microbiol* **2001**, *41* (2), 463. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02532.x>.
10. Pesci, E. C.; Milbank, J. B. J.; Pearson, J. P.; Mcknight, S.; Kende, A. S.; Greenberg, E. P.; Iglewski, B. H.; *Biochemistry* **1999**, *38*, 11229. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11229>.
11. Chater, K. F.; Horinouchi, S.; *Mol Microbiol* **2003**, *48*, 9. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03476.x>.
12. Cegelski, L.; Marshall, G. R.; Eldridge, G. R.; Hultgren, S. J.; *Nat Rev Microbiol* **2008**, *6*, 17. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1818>.
13. Rasmussen, T. B.; Givskov, M.; *IJMM* **2006**, *296*, 149. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.02.005>.
14. Geske, G. D.; Wezeman, R. J.; Siegel, A. P.; Blackwell, H. E.; *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12762. <https://doi.org/10.1021/ja0530321>.
15. Smith, K. M.; Bu, Y.; Suga, H.; *Chem Biol* **2003**, *10*, 81. [https://doi.org/10.1016/s1074-5521\(03\)00002-4](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(03)00002-4).

16. Smith, K. M.; Bu, Y.; Suga, H.; *Chem Biol* **2003**, *10*, 563. [https://doi.org/10.1016/s1074-5521\(03\)00107-8](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(03)00107-8).
17. Batista, J. H.; Neto, J. F. da S.; *Front Microbiol* **2017**, *8*, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02213>.
18. Harrison, A. M.; Soby, S. D.; *AMB Expr* **2020**, *10*, 202. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01140-1>.
19. 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.; *Microbiology (NY)* **1997**, *143*, 3703. [<https://doi.org/10.1099/00221287-143-12-3703>].
20. Swem, L. R.; Swem, D. L.; O'Loughlin, C. T.; Gatmaitan, R.; Zhao, B.; Ulrich, S. M.; Bassler, B. L.; *Mol Cell* **2009**, *35*, 143. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2009.05.029>.
21. Zhang, D. wei; Zhang, Y. min; Li, J.; Zhao, T. qi; Gu, Q.; Lin, F.; *Ultrason Sonochem* **2017**, *36*, 343. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2016.12.011>.
22. Ilk, S.; Sağlam, N.; Özgen, M.; Korkusuz, F.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *94*, 653. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2016.10.068>.
23. Manner, S.; Fallarero, A.; *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (5), 1346. <https://doi.org/10.3390/IJMS19051346>.
24. Chong, Y. M.; Yin, W. F.; Ho, C. Y.; Mustafa, M. R.; Hadi, A. H. A.; Awang, K.; Narrima, P.; Koh, C. L.; Appleton, D. R.; Chan, K. G.; *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 2261. <https://doi.org/10.1021/NP100872K>.
25. Sun, S.; Dai, X.; Sun, J.; Bu, X.; Weng, C.; Li, H.; Zhu, H.; *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 39637. <https://doi.org/10.1038/srep39637>.
26. Zhao, M.-X.; Wang, F. J.; Wei, Y.; Shi, M.; *The Chemistry of Morita–Baylis–Hillman Reaction*; RSC: Cambridge, UK, 2011.
27. He, Y. L.; Zhong, M.; Song, Z. L.; Shen, Y. K.; Zhao, L.; Fang, J.; *Bioorg Med Chem* **2023**, *79*, 117169. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2023.117169>.
28. Sridhar, C.; Vijaykumar, B. V.D.; Radhika, L.; Shin, D. S.; Chandrasekhar, S.; *Eur J. Org. Chem.* **2014**, 6707. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201402700>.
29. Morita, K.; Suzuki, Z.; Hirose, H.; *Bull Chem Soc Jpn* **1968**, *41*, 2815. <https://doi.org/10.1246/BCSJ.41.2815>.
30. Baylis, A. B.; Hillman, M. E. D. *German Patent 2155113*, **1972**. (CA 1972, 77, 4174q).
31. Drewes, S. E.; Emslie, N. D.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* **1982**, 2079. <https://doi.org/10.1039/P19820002079>.



32. Hofmann, H. M. R.; Rabe, J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1983**, *22* (10), 795. <https://doi.org/10.1002/anie.198307951>.
33. Drewes, S. E.; Roos, G. H. P.; *Tetrahedron* **1988**, *44*, 4653. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)86168-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)86168-8).
34. Basavaiah, D.; Rao, A. J.; Satyanarayana, T.; *Chem Rev* **2003**, *103*, 811. <https://doi.org/10.1021/CR010043D>.
35. Wei, Y.; Shi, M.; *Chem Rev* **2013**, *113*, 6659. <https://doi.org/10.1021/CR300192H>.
36. Singh, V.; Batra, S.; *Tetrahedron* **2008**, *64*, 4511. <https://doi.org/10.1016/J.TET.2008.02.087>
37. Santos, L. S.; Pavam, C. H.; Almeida, W. P.; Coelho, F.; Eberlin, M. N.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4330. <https://doi.org/10.1002/ANIE.200460059>.
38. Lima-Junior, C. G.; Vasconcellos, M. L. A. A.; *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 3954. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2012.04.061>.
39. Junior, C. G. L.; Silva, F. P. L.; De Oliveira, R. G.; Subrinho, F. L.; De Andrade, N. G.; Vasconcellos, M. L. A. A.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, *22*, (11), 2220. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2012.04.061>.
40. Nair, D. K.; Mobin, S. M.; Namboothiri, I. N. N.; *Org. Lett.* **2012**, *14*, 4580. <https://doi.org/10.1021/OL3020418>.
41. Kumar, T.; Mobin, S. M.; Namboothiri, I. N. N.; *Tetrahedron* **2013**, *69*, 4964. <https://doi.org/10.1016/J.TET.2013.04.023>.
42. Srihari, P.; Dutta, P.; Rao, R. S.; Yadav, J. S.; Chandrasekhar, S.; Thombare, P.; Mohapatra, J.; Chatterjee, A.; Jain, M. R.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5569. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.08.047>.
43. Basavaiah, D.; Thamizharasi, P.; *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, 5135. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201700743>.
44. Basavaiah, D.; Veeraraghavaiah, G.; Badsara, S. S.; *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 1551. <https://doi.org/10.1039/c3ob42064g>.
45. Zheng, W.; Li, Y.; Zhang, J.; Du, S.; Miao, Z.; *Synthesis (Germany)* **2017**, *49*, 3676. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1589030>.
46. Souza, D. M.; Machado, L. L.; Machado, A. H. L.; *Tetrahedron Lett.* **2019**, *60*, 1811. <https://doi.org/10.1016/J.TETLET.2019.05.067>.
47. Uchida, K.; Kawamoto, Y.; Kobayashi, T.; Ito, H.; *Org. Lett.* **2019**, *21*, 6199. <https://doi.org/10.1021/ACS.ORGLT.9B01901>.

48. Hill, J. S.; Isaacs, N. S.; *J. Phys. Org. Chem.* **1990**, *3*, 285. <https://doi.org/10.1002/poc.610030503>.
49. Price, K. E.; Broadwater, S. J.; Jung, H. M.; McQuade, D. T.; *Org. Lett.* **2005**, *7*, 147. <https://doi.org/10.1021/OL047739O>.
50. Aggarwal, V. K.; Fulford, S. Y.; Lloyd-Jones, G. C.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1706. <https://doi.org/10.1002/anie.200462462>.
51. Robiette, R.; Aggarwal, V. K.; Harvey, J. N.; *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15513. <https://doi.org/10.1021/JA0717865>.
52. Plata, R. E.; Singleton, D. A.; *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3811. <https://doi.org/10.1021/JA5111392>.
53. Singh, S. A.; Bhat, S. V.; *Acta Pharm.* **2011**, *61*, 447. <https://doi.org/10.2478/v10007-011-0034-2>.
54. Haleem, A.; Ullah, H.; Samiullah; Akbar, A.; Ahmad, N.; Ellahi, M.; Nawaz, M.; *Pharm. Chem. J.* **2022**, *56*, 185. <https://doi.org/10.1007/s11094-022-02617-y>
55. Narender, P.; Srinivas, U.; Ravinder, M.; Rao, B. A.; Ramesh, Ch.; Harakishore, K.; Gangadasu, B.; Murthy, U. S. N.; *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 4600. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.02.020>.
56. Kundu, M. K.; Sundar, N.; Kumar, S. K.; Bhat, S. V.; Biswas, S.; Valecha, N.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 731. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(99\)00057-8](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(99)00057-8).
57. Narender, P.; Srinivas, U.; Gangadasu, B.; Biswas, S.; Rao, V. J.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 5378. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2005.09.008>.
58. da Silva, W. A. V.; Rodrigues, D. C.; de Oliveira, R. G.; Mendes, R. K. S.; Olegário, T. R.; Rocha, J. C.; Keesen, T. S. L.; Lima-Júnior, C. G.; Vasconcellos, M. L. A. A.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 4523. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.07.022>.
59. Xavier, F. J. S.; Rodrigues, K. A. da F.; de Oliveira, R. G.; Lima Junior, C. G.; Rocha, J. da C.; Keesen, T. S. L.; de Oliveira, M. R.; Silva, F. P. L.; Vasconcellos, M. L. A. de A.; *Molecules* **2016**, *21* (11), 1483. <https://doi.org/10.3390/molecules21111483>.
60. Oliveira, J. P. G.; Caleffi, G. S.; Silva, E. P.; Coelho, M. C.; Castro, A. C.; Mendes, R. K. S.; Olegário, T. R.; Lima-Junior, C. G.; Vasconcellos, M. L. A. A.; Souza, J. L. C.; Souza, S. M.; Militão, G. C. G.; Vaz, B. G.; Ramalho, R. R. F.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2021**, *32*, 347. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20200185>.
61. Kumar, S. B.; Ravinder, M.; Kishore, G.; Jayathirtha Rao, V.; Yogeeswari, P.; Sriram, D.; *Med. Chem. Res.* **2014**, *23*, 1934. <https://doi.org/10.1007/s00044-013-0787-x>.

62. Elleuch, H.; Mihoubi, W.; Mihoubi, M.; Ketata, E.; Gargouri, A.; Rezgui, F.; *Bioorg. Chem.* **2018**, *78*, 24. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.03.004>.
63. Madar, J. M.; Shastri, L. A.; Shastri, S. L.; Holiyachi, M.; Naik, N.; Kulkarni, R.; Shaikh, F.; Sungar, V.; *Synth. Commun.* **2018**, *48*, 375. <https://doi.org/10.1080/00397911.2017.1397698>.
64. Araújo, R. V. S.; Silva, F. O.; Melo-Júnior, M. R.; Porto, A. L. F.; Vidal de Souza, R. *Rev. Ciên. Méd. Biol.* **2011**, *10*, 82. <https://doi.org/10.9771/cmbio.v10i1.5470>.
65. Wen, H.; Xue, N.; Wu, F.; He, Y.; Zhang, G.; Hu, Z.; Cui, H.; *Molecules* **2018**, *23*, [https://doi.org/10.3390/molecules23051063] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29724067>
66. Stefanachi, A.; Leonetti, F.; Pisani, L.; Catto, M.; Carotti, A.; *Molecules* **2018**, *23* (2), 250 <https://doi.org/10.3390/molecules23020250>.
67. Gaspar, A.; Matos, M. J.; Garrido, J.; Uriarte, E.; Borges, F.; *Chem. Ver.* **2014**, *114*, 4960. <https://doi.org/10.1021/cr400265z>.
68. Ellis, G. P.; *Chemistry of Heterocycles Compounds*, Willey: New York, 1977.
69. Heravi, M. M.; Khaghaninejad, S.; Mostofi, M.; *Pechmann reaction in the synthesis of coumarin derivatives*; Academic; Press Inc, 2014.
70. Rueping, M.; Sugiono, E.; Merino, E.; *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 6329. <https://doi.org/10.1002/chem.200800836>.
71. Dolmazon, R.; Gelin, S.; *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 4003. <https://doi.org/10.1021/jo00195a024>.
72. Gautam, R.; Jachak, S. M.; Kumar, V.; Mohan, C. G.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 1612. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.01.116>.
73. Gaspar, A.; Reis, J.; Fonseca, A.; Milhazes, N.; Viña, D.; Uriarte, E.; Borges, F.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 707. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.11.128>.
74. Gaspar, A.; Teixeira, F.; Uriarte, E.; Milhazes, N.; Melo, A.; Cordeiro, M. N. D. S.; Ortuso, F.; Alcaro, S.; Borges, F.; *Chem. Med. Chem.* **2011**, *6*, 628. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201000452>.
75. Abdelhafaz, O. M.; Amin, K. M.; Batran, R. Z.; Maher, T. J.; Nada, S. A.; Sethumadhavan, S.; *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 3371. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.04.009>.
76. Neyts, J.; De Clercq, E.; Singha, R.; Chang, Y. H.; Das, A. R.; Chakraborty, S. K.; Hong, S. C.; Tsay, S. C.; Hsu, M. H.; Hwu, J. R.; *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1486. <https://doi.org/10.1021/jm801240d>.

77. Gunar, V. I.; Ovechkina, L. F.; Zav'yalov, S. I.; Pershin, G. N.; Milovanova, S. N.; *Russ. Chem. Bull.* **1966**, *15*, 2097. <https://doi.org/10.1007/BF00867707>.
78. Liu, L.; Tian, R.; Liu, S.; Chen, X.; Guo, L.; Che, Y.; *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 6021. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.04.052>.
79. Harper, J. K.; Arif, A. M.; Ford, E. J.; Strobel, G. A.; Porco Jr., J. A.; Tomer, D. P.; O'Neill, K. L.; Heider, E. M.; Grant, D. M.; *Tetrahedron* **2003**, *59*, 2471. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(03\)00255-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(03)00255-2).
80. Mohammed, S.; Khalifa, A.; Al Khaldi, T.; Alqahtani, M. M.; Al Ansari, A. M.; Alkhalifa, S.; Khaldi, A.; Mm, A.; *BMJ Case Rep.* **2015**. <https://doi.org/10.1136/bcr-2015-210987>.
81. D'Almeida, R. E.; Molina, R. R. D. I.; Viola, C. M.; Luciardi, M. C.; Nieto Peñalver, C.; Bardón, A.; Arena, M. E.; *Bioorg. Chem.* **2017**, *73*, 37. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.05.011>.
82. 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, Brasil, 2019.
83. Cavalcante, R. A. F.; Silva, F. L.; Favero, F.; Resck, I. S.; Pereira, A. L.; Machado, A. H. L.; *Magn. Reson. Chem.* **2020**, *58*, 31. <https://doi.org/10.1002/mrc.4906>.
84. Favero, F.; *Avaliação da atividade modulatória de diferentes classes químicas frente a expressão de fenótipos de Quorum Sensing de uma cepa de Chromobacterium*, Universidade de Brasília, Brasil, 2023.
85. 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.; *Beilstein J. Org. Chem.* **2019**, *15*, 2544. <https://doi.org/10.3762/bjoc.15.247>.
86. 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, Brasil, 2019.
87. Souza, D. de M.; *Síntese e resolução cinética de Adutos de Morita-Baylis-Hillman e primeira síntese total do (+) Floribundano B*, Universidade de Brasília, Brasil, 2019.
88. Silva, V. S.; *Avaliação do efeito estéreo no rearranjo de Hurd-Claisen em adutos de Morita-Baylis-Hillman*, Universidade de Brasília, Brasil, 2017.

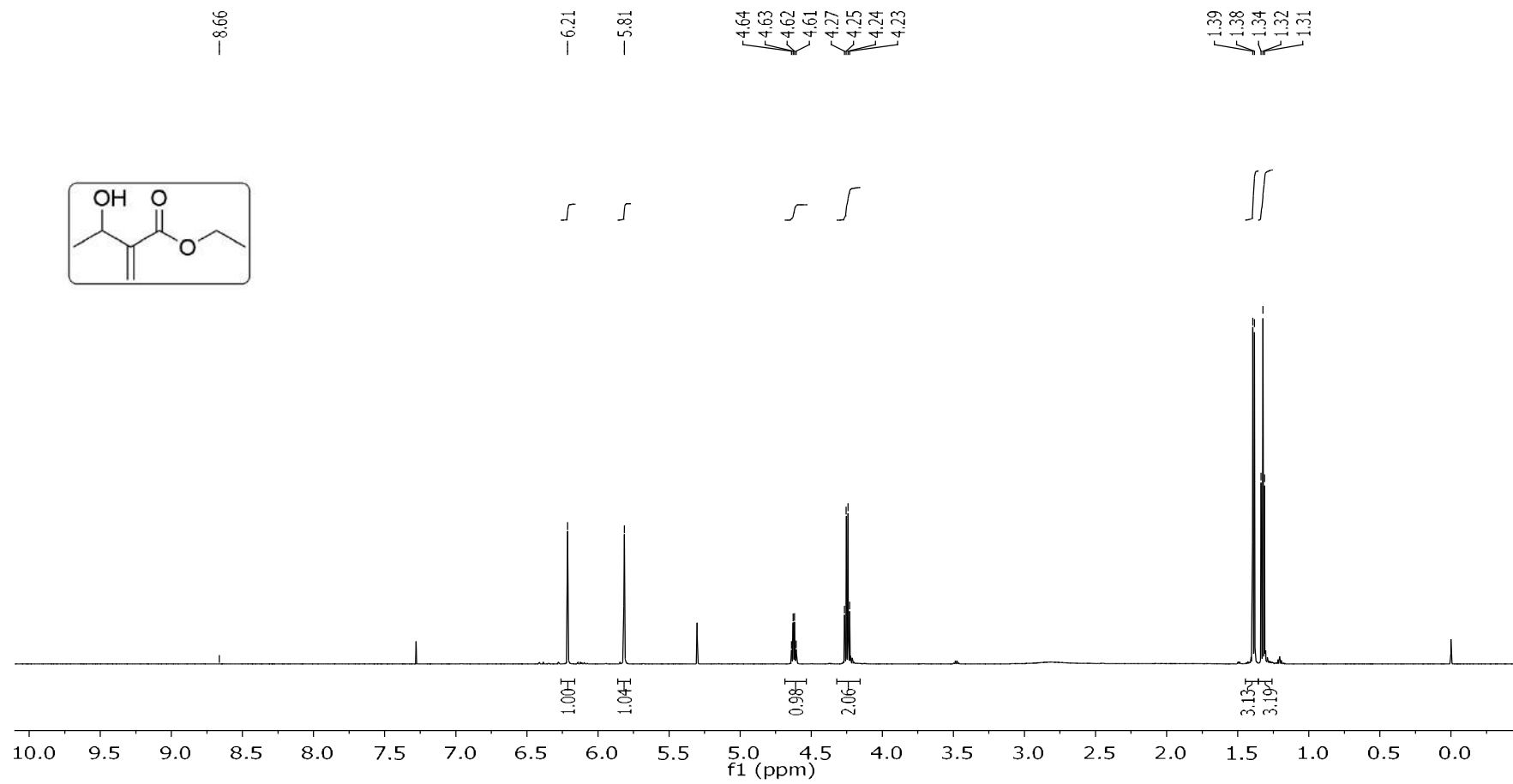
89. Silva, C. A. L.; *Desafios da otimização do rearranjo de Hurd-Claisen em nitrilas de Morita-Baylis-Hillman sob aquecimento convencional*, Universidade de Brasília, Brasil, 2018.
90. Coelho, F.; Almeida, W. P.; Veronese, D.; Mateus, C. R.; Lopes, E. C. S.; Rossi, R. C.; Silveira, G. P. C.; Pavam, C. H. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 7437. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(02\)00822-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(02)00822-0).
91. Camilo, N. S.; Santos, H.; Zeoly, L. A.; Fernandes, F. S.; Rodrigues, M. T.; Silva, T. S.; Lima, S. R.; Serafim, J. C.; de Oliveira, A. S. B.; Carpanez, A. G.; Amarante, G. W.; Coelho, F.; *Eur. J. Org. Chem.* **2022**. <https://doi.org/10.1002/ejoc.202101448>.
92. Chen, G.; Swem, L. R.; Swem, D. L.; Stauff, D. L.; O'Loughlin, C. T.; Jeffrey, P. D.; Bassler, B. L.; Hughson, F. M.; *Mol. Cell.* **2011**, *42*, 199. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.04.003>. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21504831>
93. Meng, X.-Y.; Zhang, H.-X.; Mezei, M.; Cui, M. *Curr. Comput. Aided Drug Des.* **2011**, *7* (2), 146. <https://doi.org/10.2174%2F157340911795677602>.
94. Trott, O.; Olson, A. J.; *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
95. Eberhardt, J.; Santos-Martins, D.; Tillack, A. F.; Forli, S.; *J. Chem. Inf. Model* **2021**, *61*, 3891. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203>.
96. Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M.; *Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos*; 2a. ed.; Artmed: Porto Alegre, 2008.
97. Chernin, L. S.; Winson, M. K.; Thompson, J. M.; Haran, S.; Bycroft, B. W.; Chet, I.; Williams, P.; Stewart, G. S. A. B.; *J. Bacteriol.* **1998**, *180* (17), 4435. <https://doi.org/10.1128/jb.180.17.4435-4441.1998>.
98. Mahajan, J. R.; da Silva, C. R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1990**, *1*, 87. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.19900019>.
99. Crews, P.; Rodríguez, J.; Jaspars, M.; *Organic structure analysis*; Oxford University Press: New York, 1998.
100. I N Nazarov, R. B.; Zavyalov, S. I.; *Bull. Acad. Sci USSR, Div Chem Sci.* **1957**, *6*, 219.
101. Smitha, G.; Patnaik, S.; Reddy, C. S.; *Synthesis (Stuttg)* **2005**, 711. <https://doi.org/10.1055/s-2005-861837>.
102. Vera, N.; Popich, S.; Luna, L.; Cravero, R.; González Sierra, M.; Bardo, A.; *Chem Biodivers* **2006**, *3*, 21. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200690002>.

103. McNaught, A. D.; Wilkinson, A.; *The IUPAC Compendium of Chemical Terminology*, 2a. ed.; International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC): Research Triangle Park, NC, 2019.
104. David Gutsche, C.; Dhawan, B.; Hyun No, K.; Muthukrishnan, R.; *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 3782. <https://doi.org/10.1021/ja00403a028>.
105. Da Silva, D. L.; Terra, B. S.; Lage, M. R.; Ruiz, A. L. T. G.; Da Silva, C. C.; De Carvalho, J. E.; Carneiro, J. W. M.; Martins, F. T.; Fernandes, S. A.; De Fátima, Â.; *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 3280. <https://doi.org/10.1039/c4ob02611j>
106. Mahajan, J. R.; Resck, I. S.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1997**, *8*, 603. <https://dx.doi.org/10.1590/S0103-50531997000600007>.
107. Pfau, M.; Revial, G.; Guingant, A.; d'Angelo, J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 273. <https://doi.org/10.1021/ja00287a061>.
108. Wright, A. C.; Du, Y. E.; Stoltz, B. M.; *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 11258. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b01541>.
109. Pravst, I.; Zupan, M.; Stavber, S.; *Synthesis (Stuttg)* **2005**, *18*, 3140. <https://doi.org/10.1055/s-2005-918424>.
110. Yuan, Y.; Yang, Q. Y.; Tong, Y. F.; Chen, F.; Qi, Y.; Duan, Y. B.; Wu, S.; *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2008**, *10*, 999. <https://doi.org/10.1080/10286020802240418>.
111. Hinman, M. M.; Heathcock, C. H.; *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7751. <https://doi.org/10.1021/jo0106391>.
112. Liebman, J. F.; Greenberg, A.; *Biophys. Chem.* **1974**, *1* (3), 222. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(74\)80008-6](https://doi.org/10.1016/0301-4622(74)80008-6).
113. Romero, E. L.; D'Vries, R. F.; Zuluaga, F.; Chaur, M. N.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2015**, *26*, 1265. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150092>.
114. Tisovský, P.; Csicsai, K.; Donovalová, J.; Šandrik, R.; Sokolík, R.; Gáplovský, A.; *Molecules* **2020**, *25*, 2082. <https://doi.org/10.3390/molecules25133082>.
115. Lu, C.; Htan, B.; Fu, S.; Ma, C.; Gan, Q.; *Tetrahedron* **2019**, *75*, 4010. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2019.06.022>.
116. Fernández-Palacios, S.; Matamoros, E.; Morato Rojas, I.; López Navarrete, J. T.; Ruiz Delgado, M. C.; Vida, Y.; Perez-Inestrosa, E.; *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 14739. <https://doi.org/10.3390/ijms241914739>.
117. Armarego, W. L. F.; Chai, C. L. L.; *Purification of Laboratory Chemicals*; 5a. ed.; Butterworth Heinemann: Cornwall, 2003.

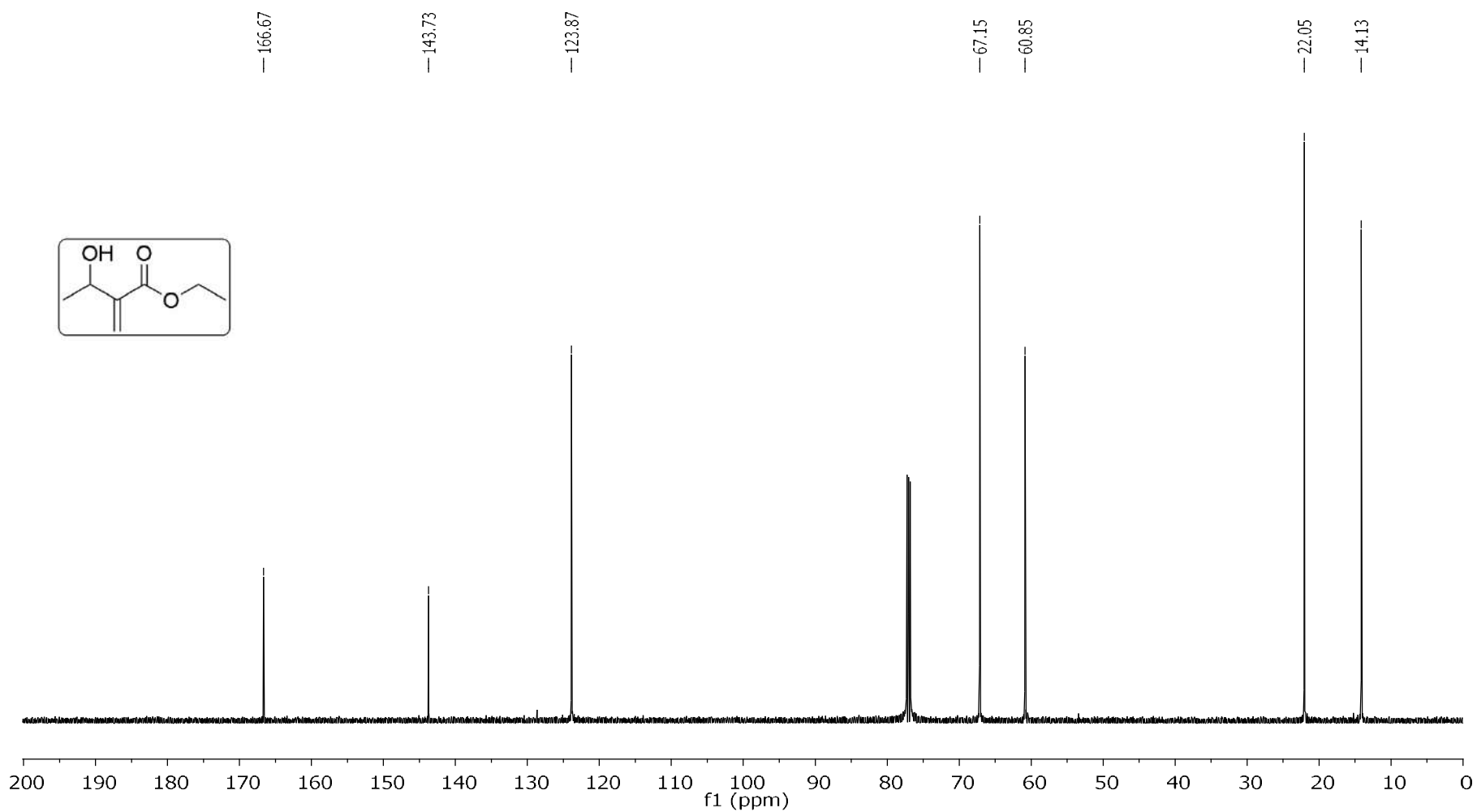
118. Rodriguez-kabana, R.; Godoy, G.; Morgan-jones, G.; Shelby, R. A.; *Plant. Soil.* **1983**, *75*, 95. <https://doi.org/10.1007/BF02178617>.

## **Anexos**

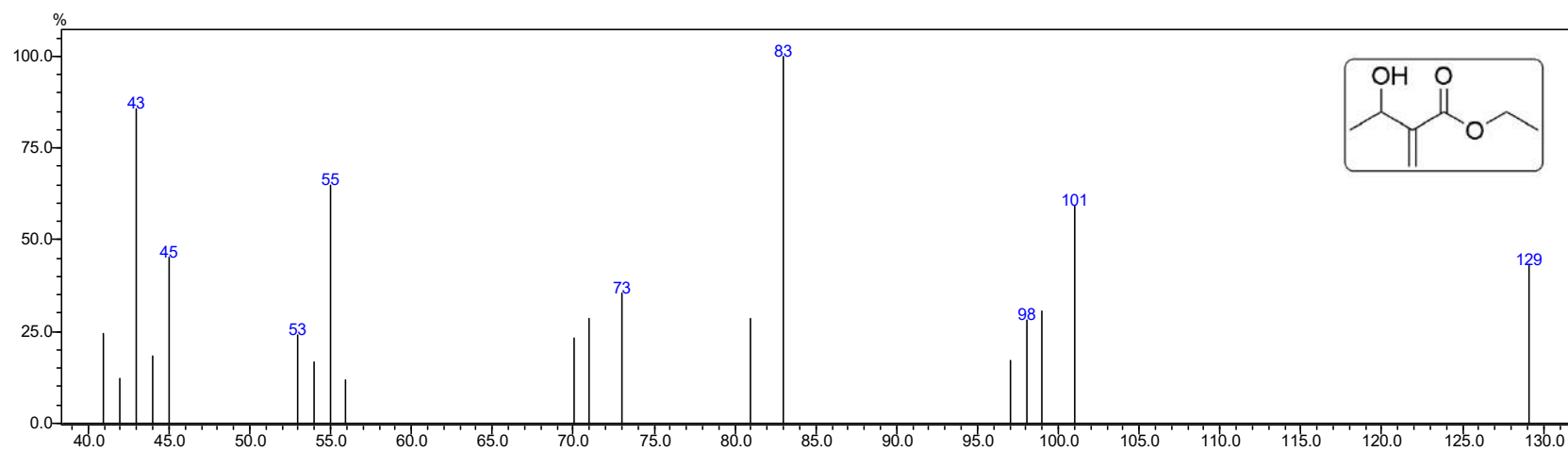




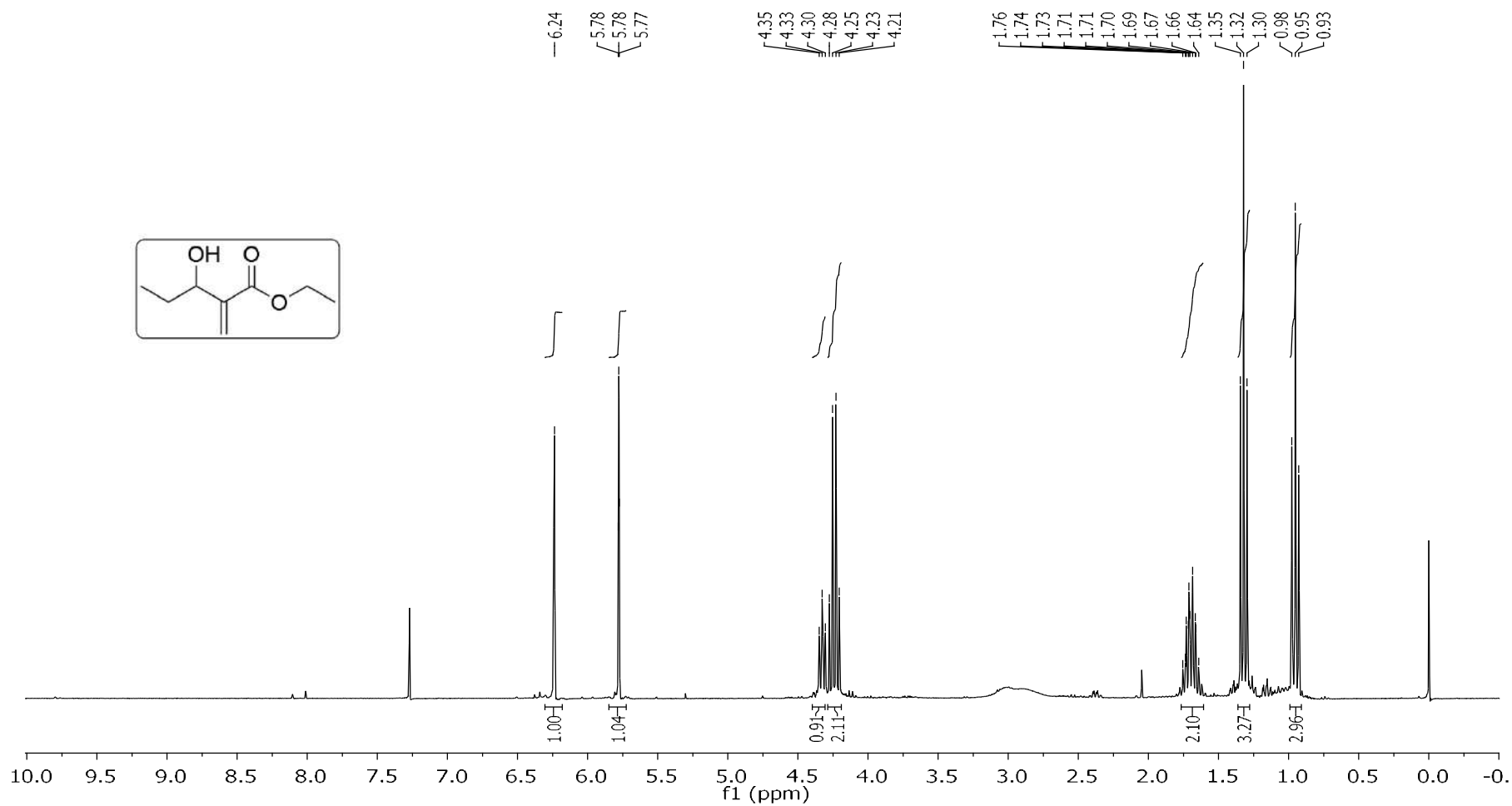
**Espectro E – 1.1 – (RMN de  $^1\text{H}$ , 600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – 144**



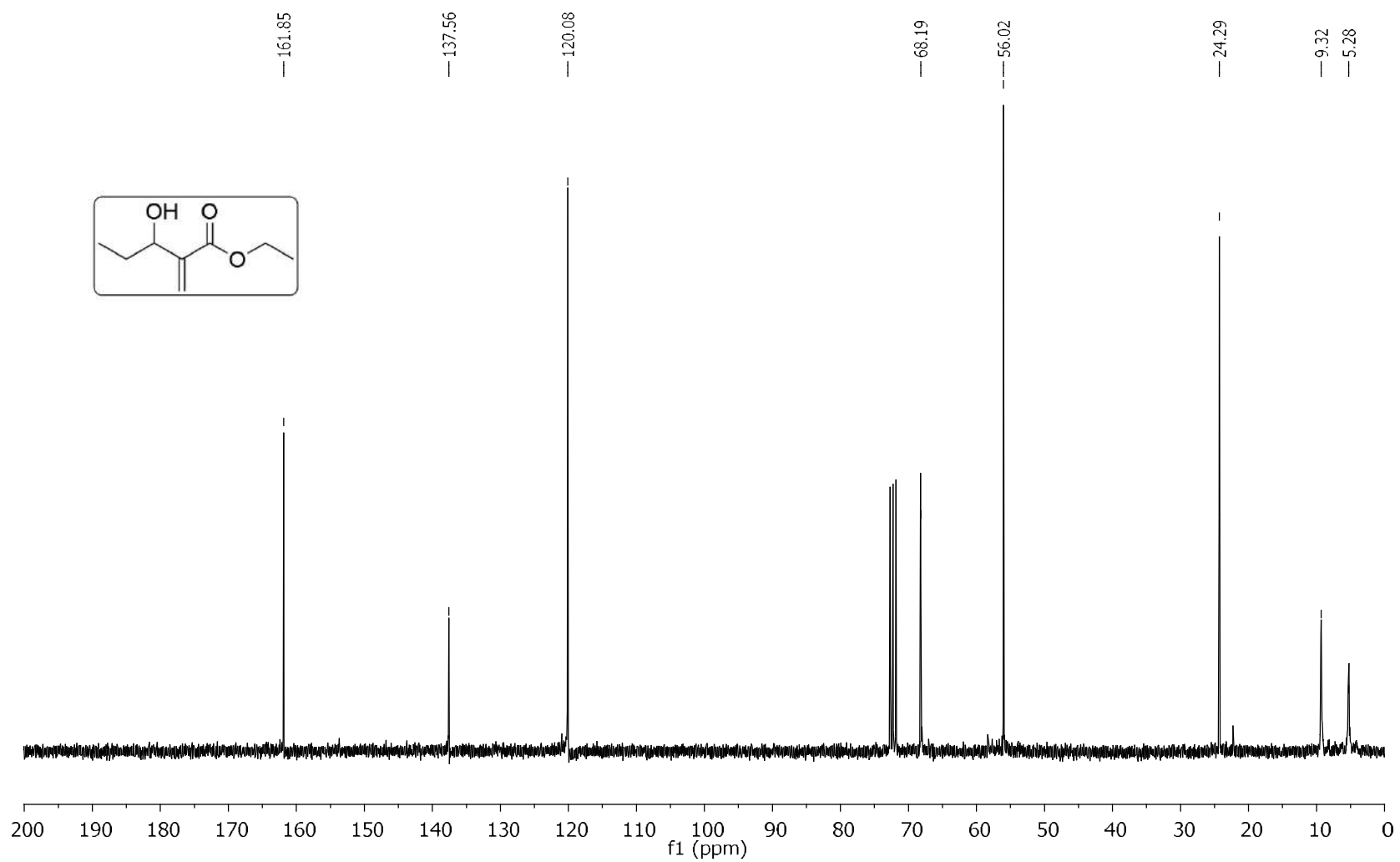
**Espectro E – 1.2 – (RMN de <sup>13</sup>C, 150,91 MHz, CDCl<sub>3</sub>) – 144**



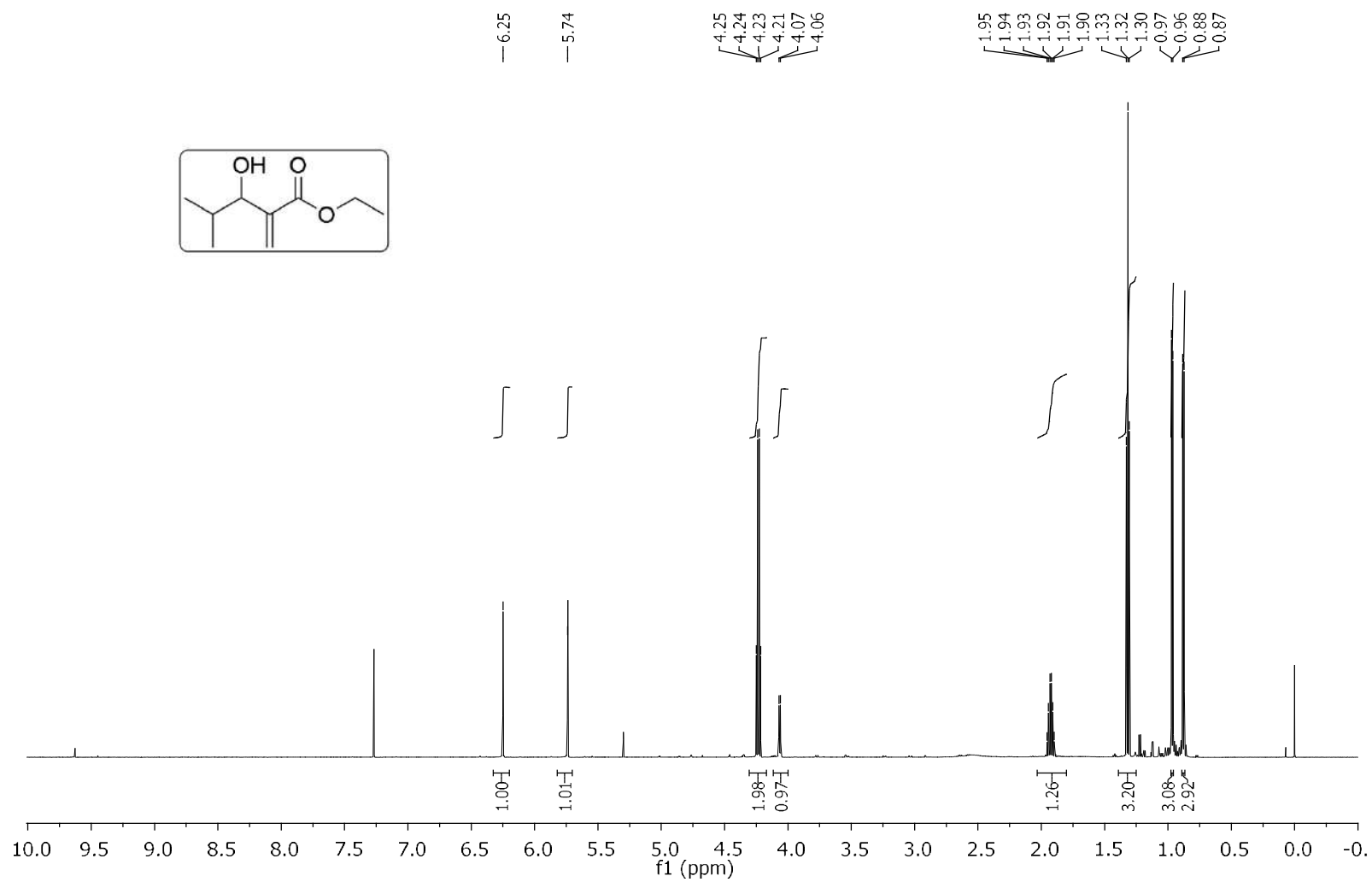
**Espectro E – 1.3 – [EM (70 eV)  $m/z$ ] – 144**



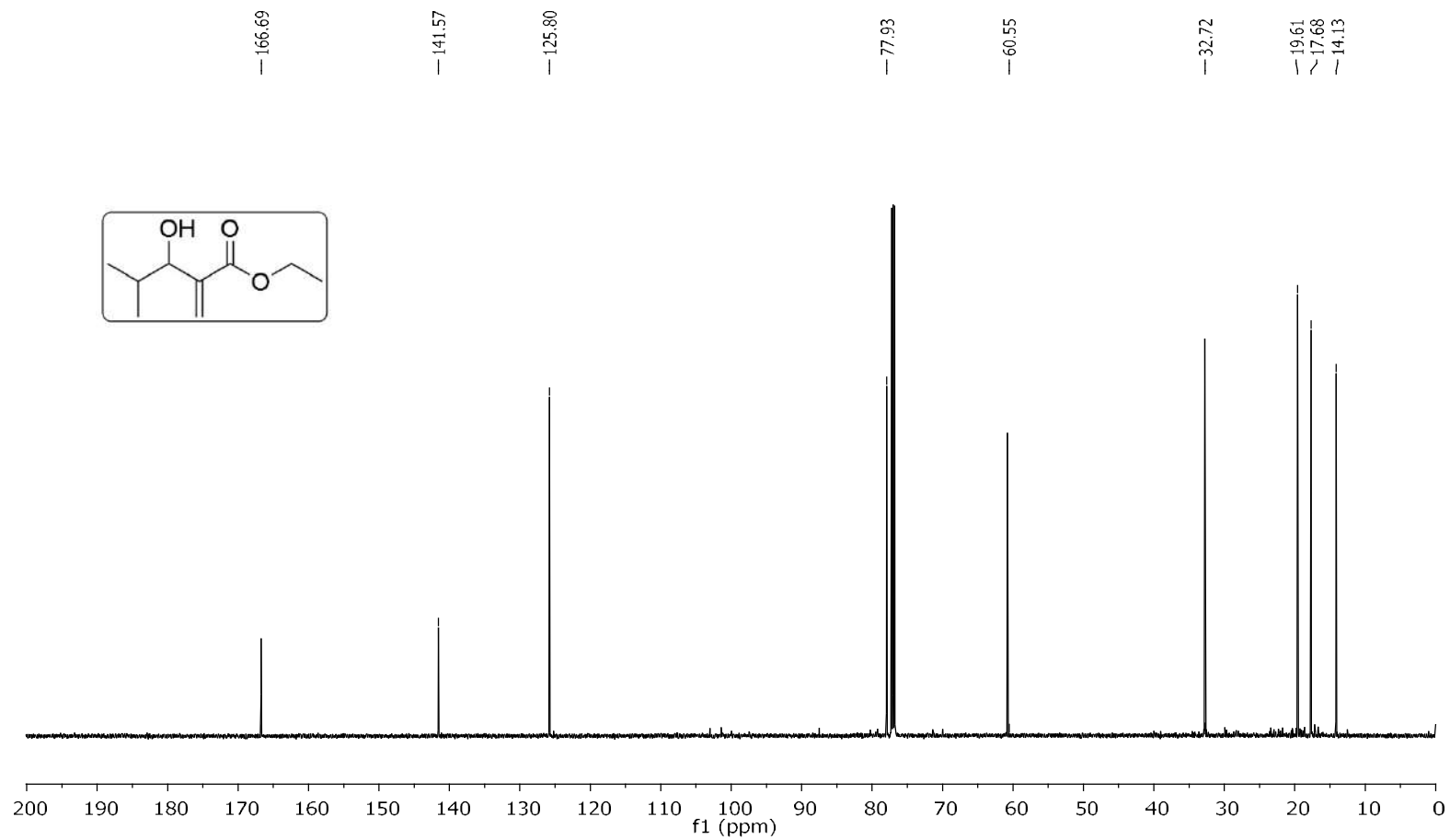
**Espectro E – 2.1 – (RMN de <sup>1</sup>H, 600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) – 145**



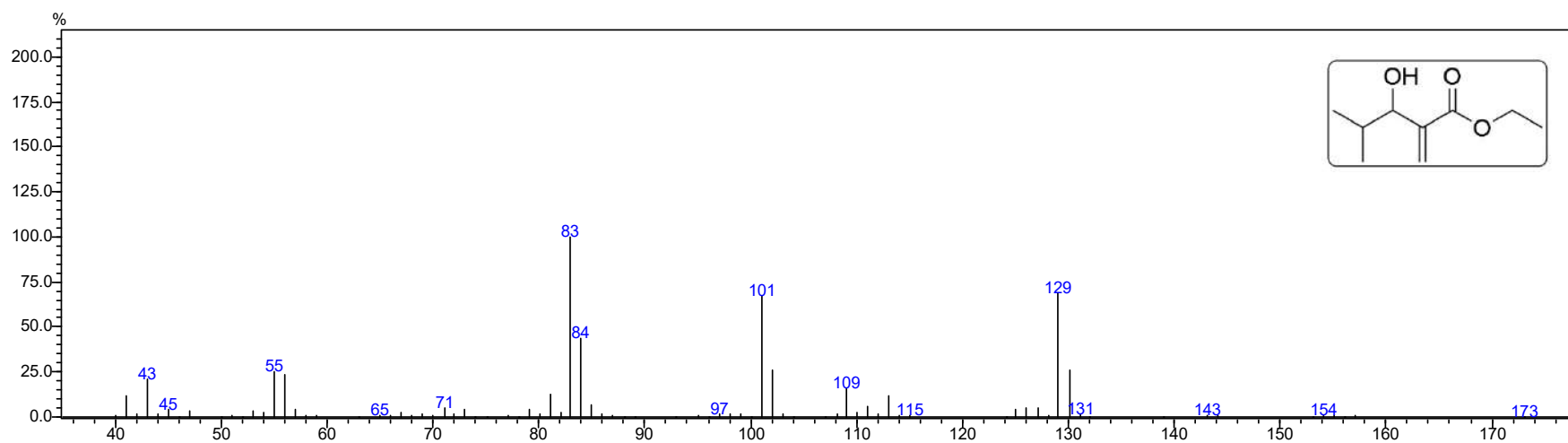
Espectro E - 2.2 - (RMN de  $^{13}\text{C}$ , 150,91 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) - 145



**Espectro E – 3.1 – (RMN de  $^1\text{H}$ , 600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – 146**

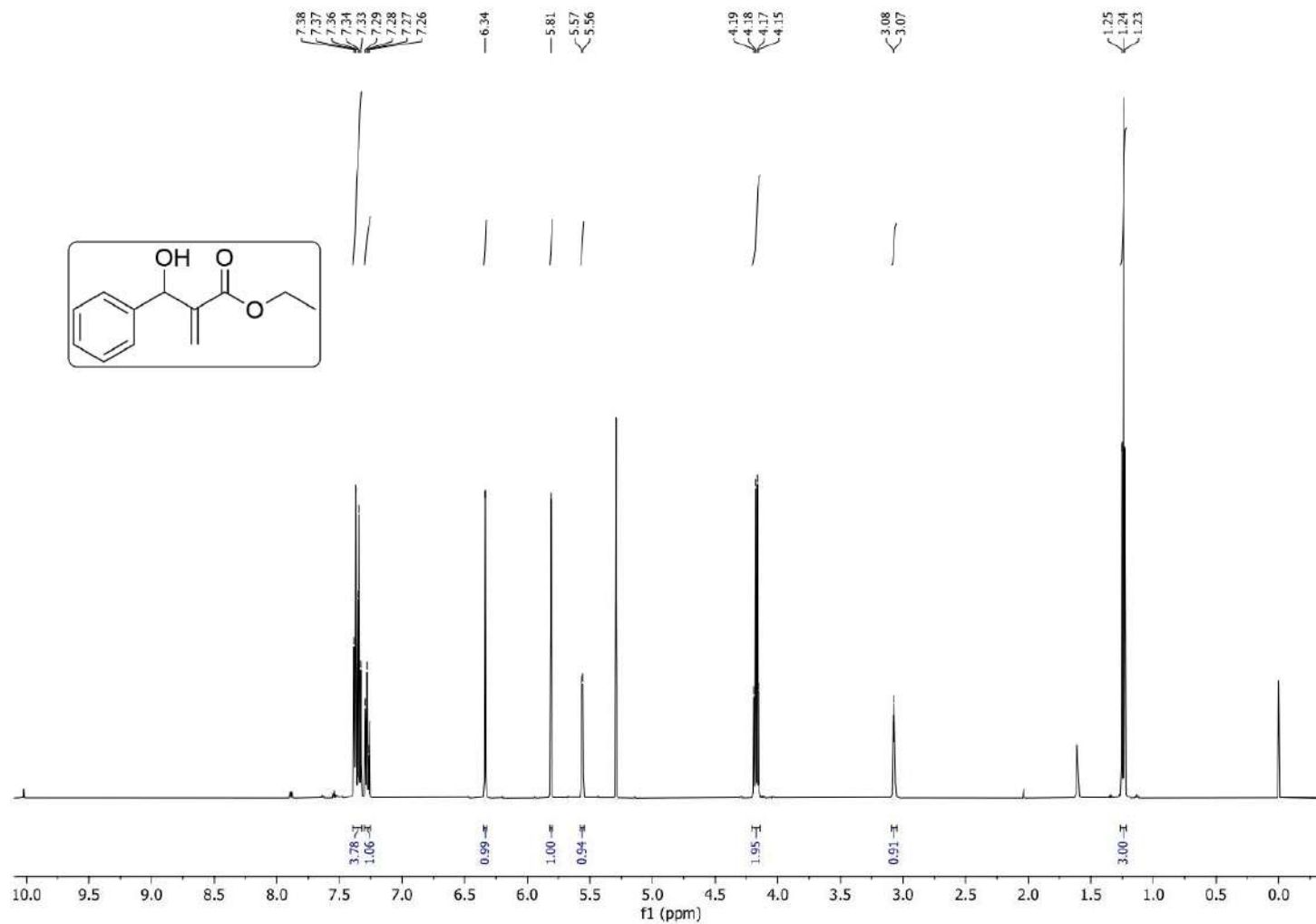


**Espectro E – 3.2 – (RMN de  $^{13}\text{C}$ , 150,91 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – 146**

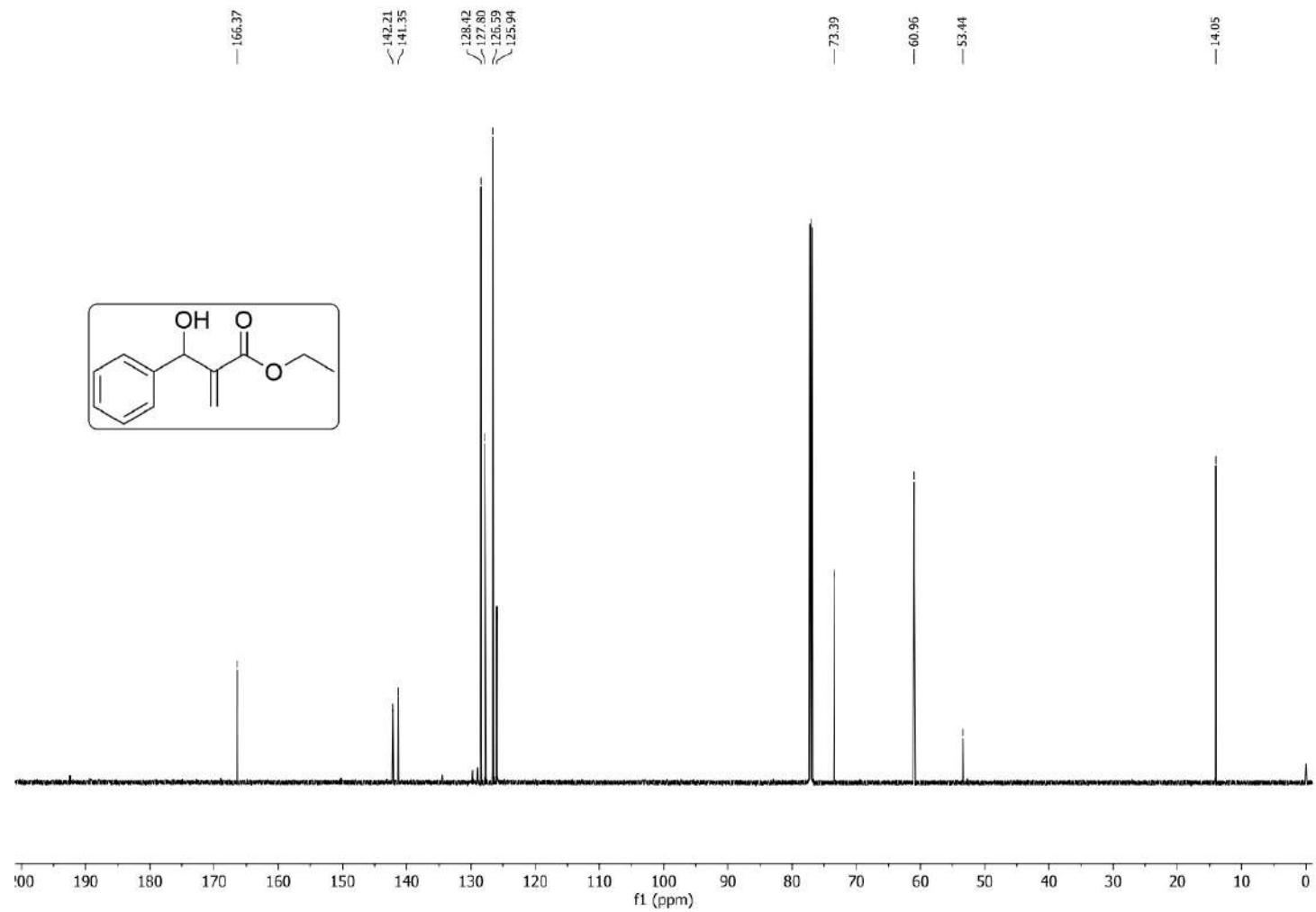


Espectro E – 3.3 – [EM (70 eV) *m/z*] – 146

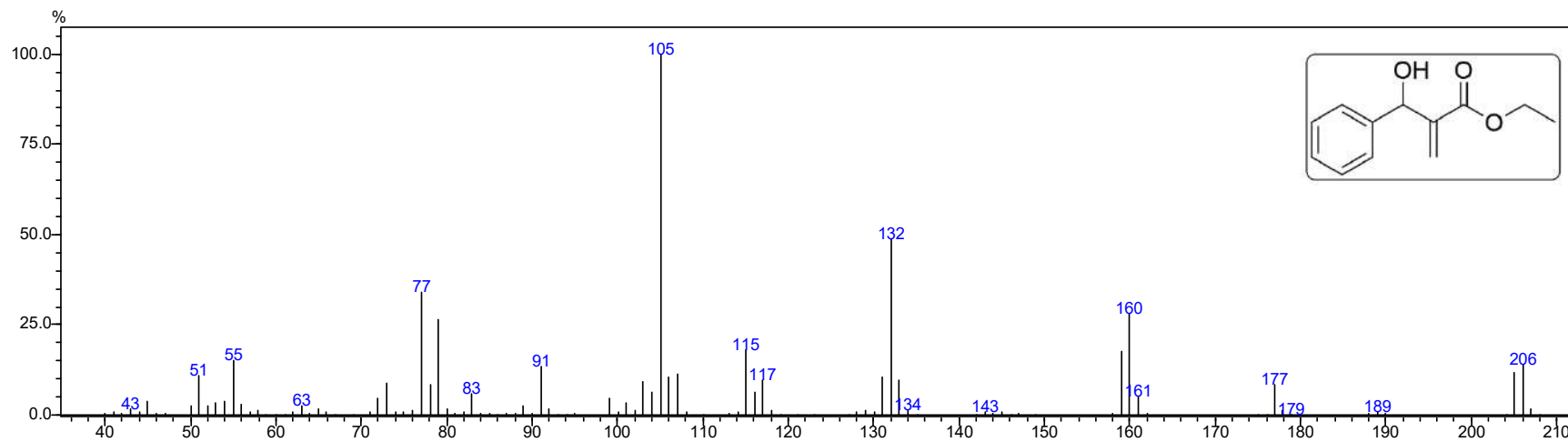




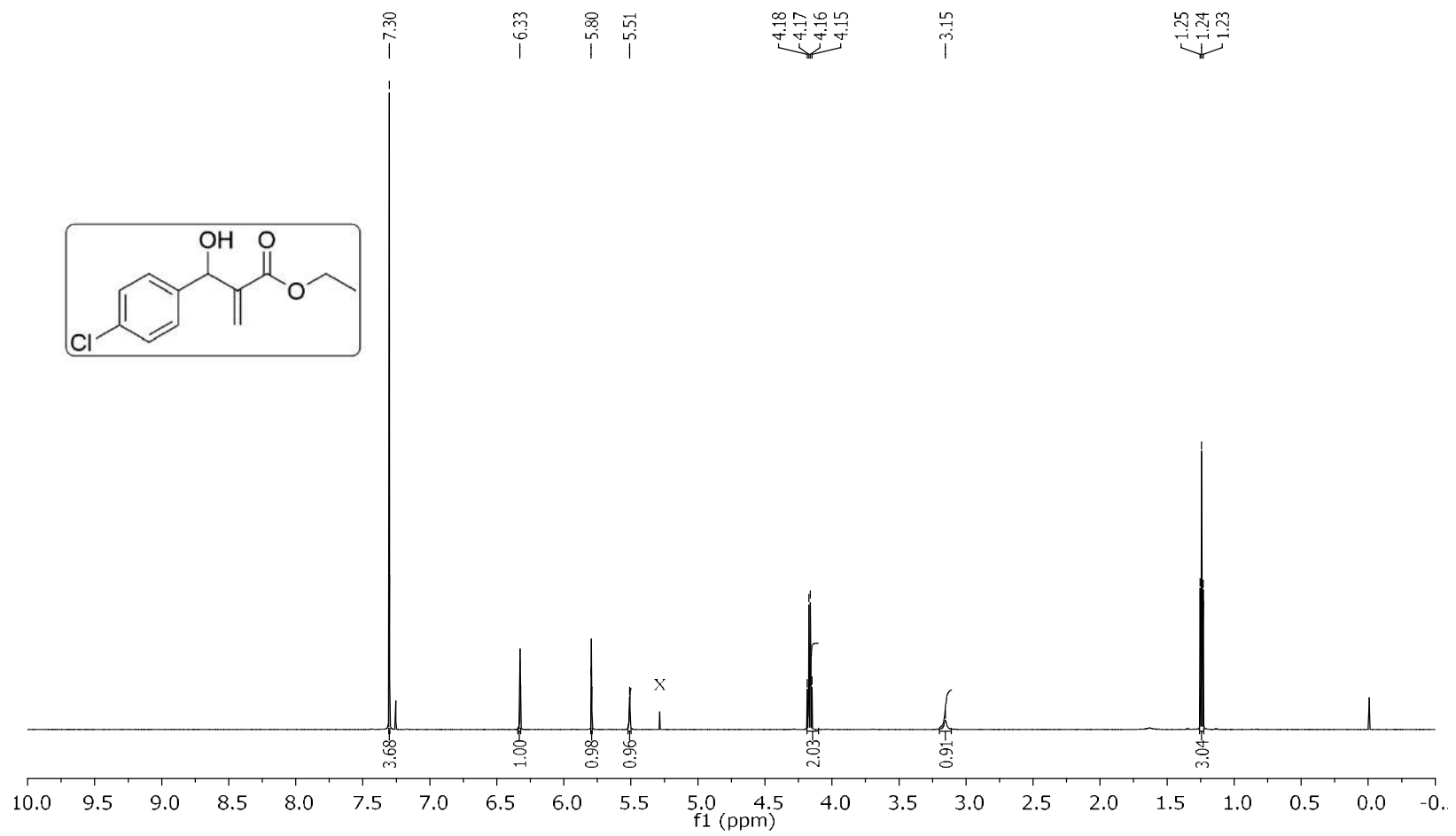
**Espectro E – 4.1 – (RMN de  $^1\text{H}$ , 600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – 147**



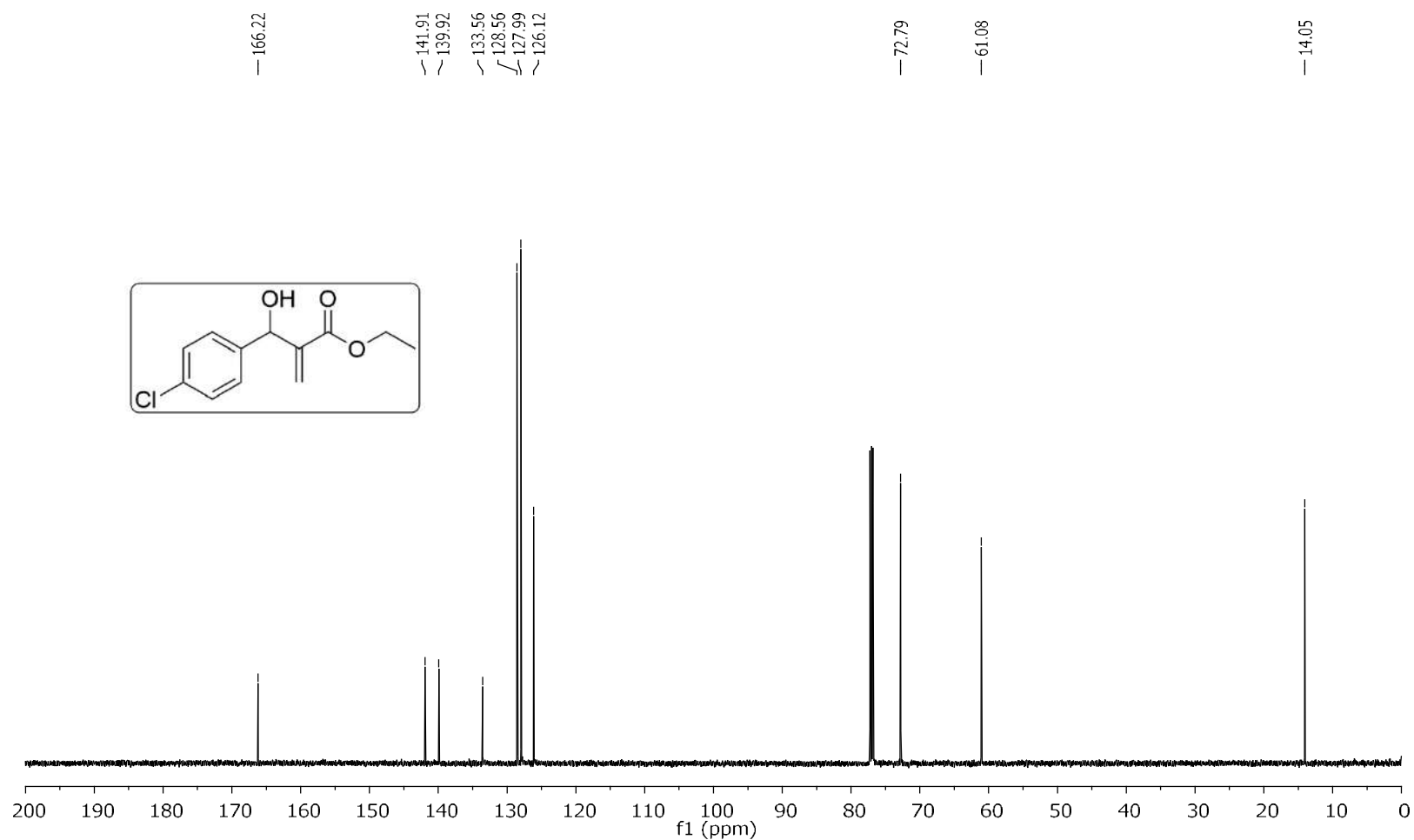
**Espectro E - 4.2 - (RMN de <sup>13</sup>C, 150,91 MHz, CDCl<sub>3</sub>) - 147**



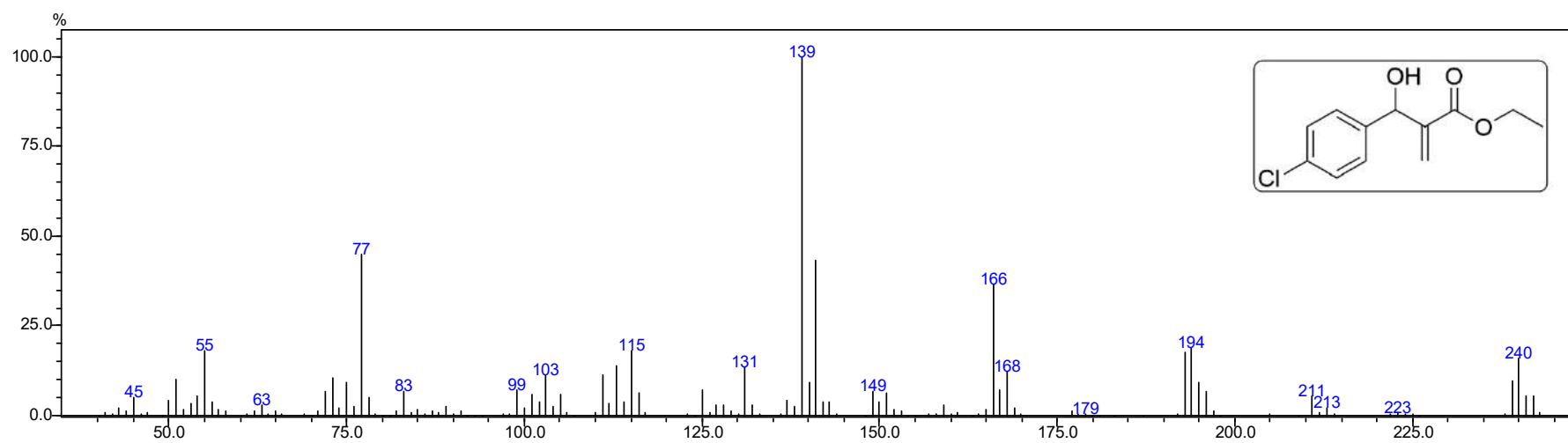
**Espectro E – 4.3 – [EM (70 eV)  $m/z$ ] – 147**



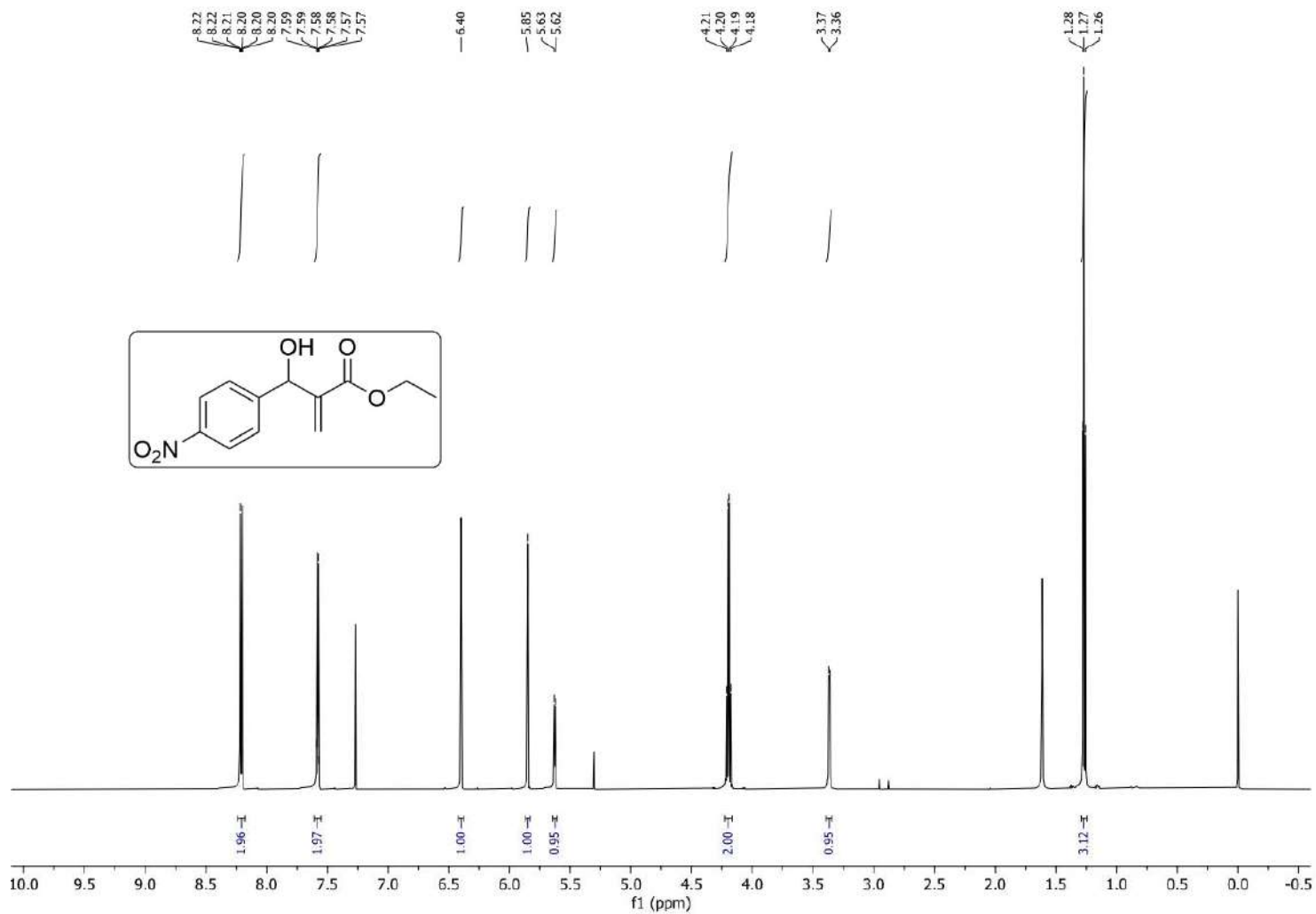
**Espectro E – 5.1 – (RMN de <sup>1</sup>H, 600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) – 148**



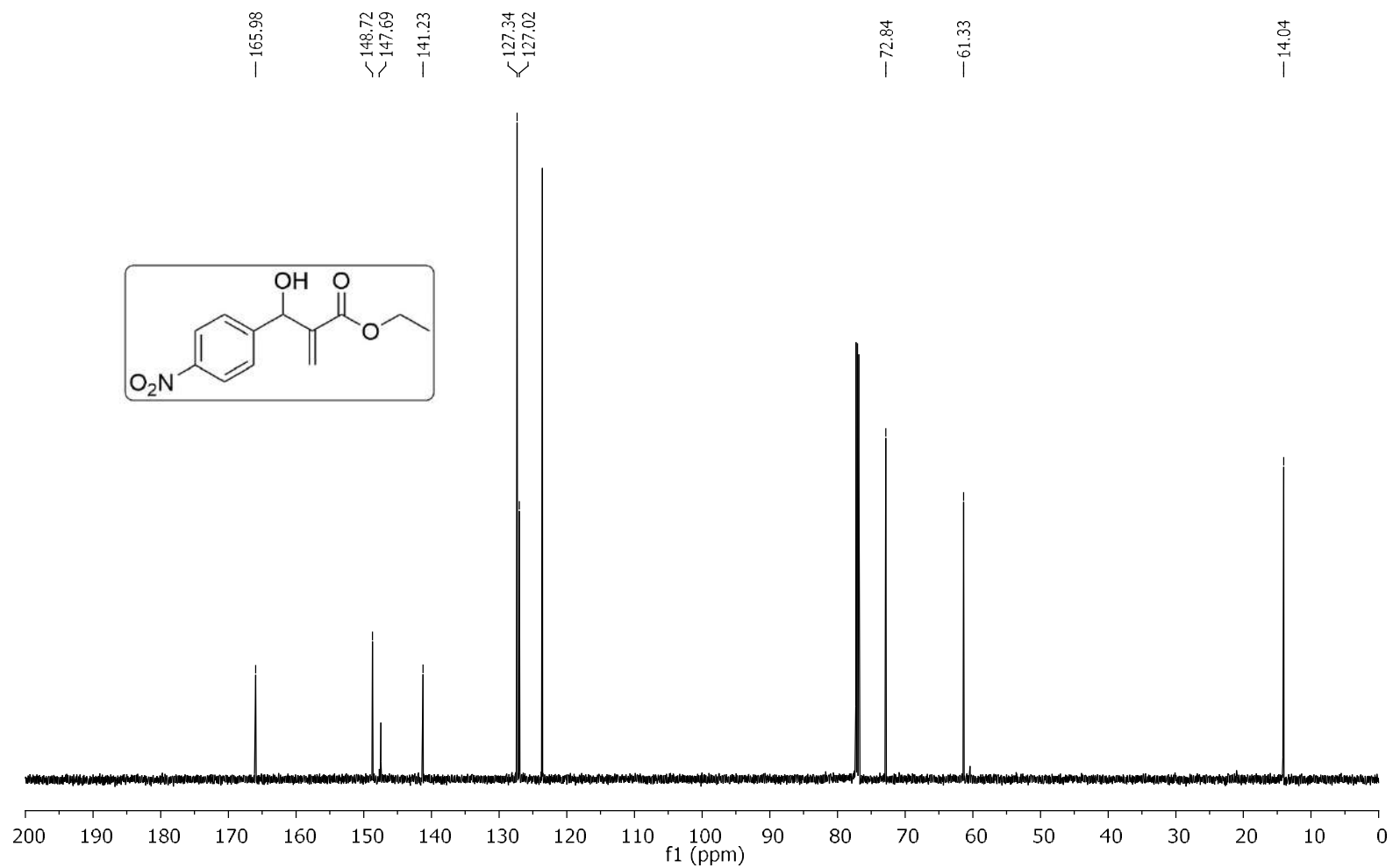
**Espectro E – 5.2 – (RMN de  $^{13}\text{C}$ , 150,91 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – 148**



**Espectro E – 5.3 – [EM (70 eV)  $m/z$ ] – 148**

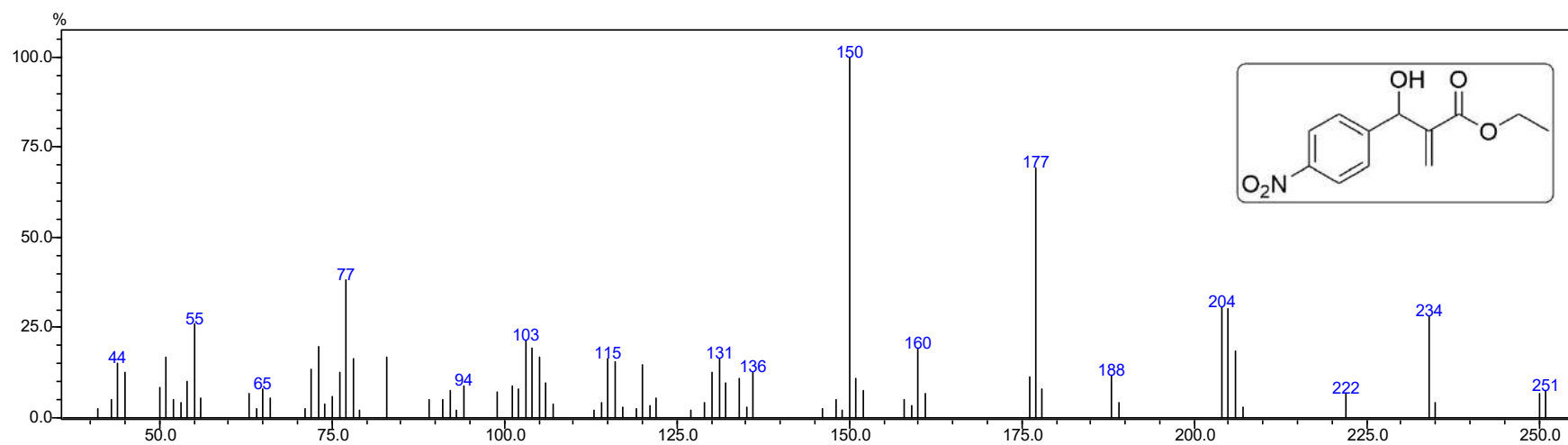


**Espectro E – 6.1 – (RMN de  $^1\text{H}$ , 600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – 149**

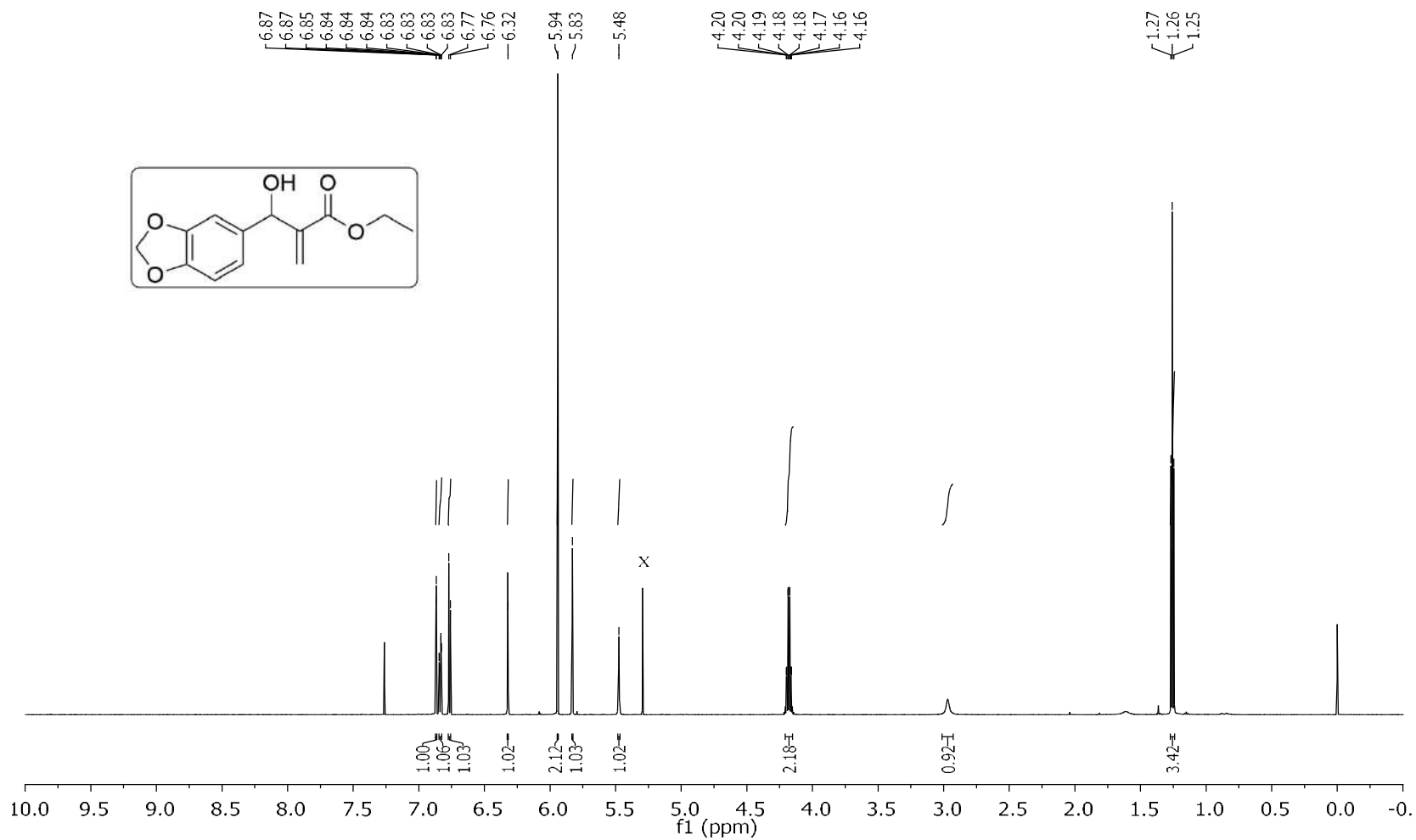


**Espectro E – 6.2 – (RMN de <sup>13</sup>C, 150,91 MHz, CDCl<sub>3</sub>) – 149**

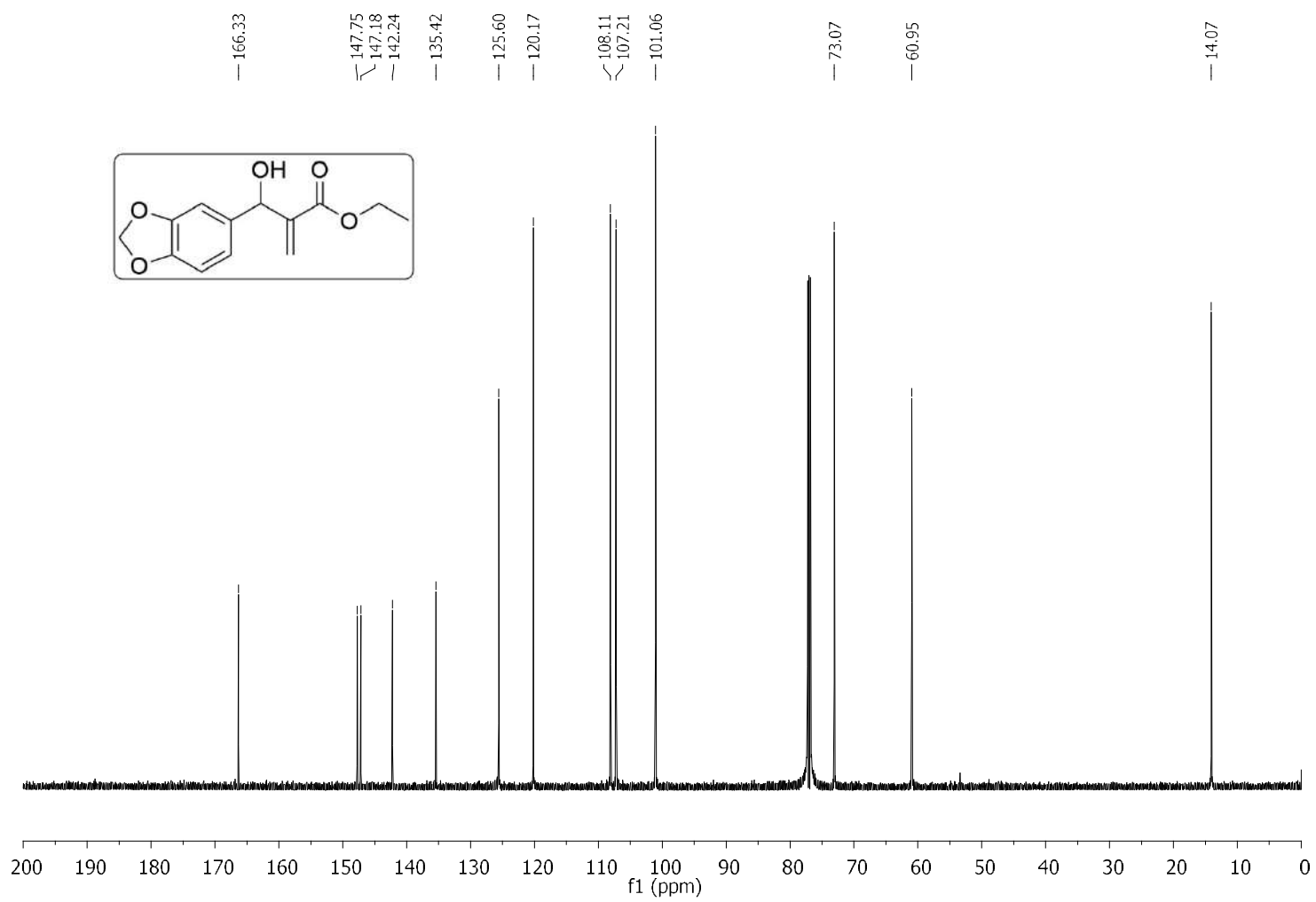




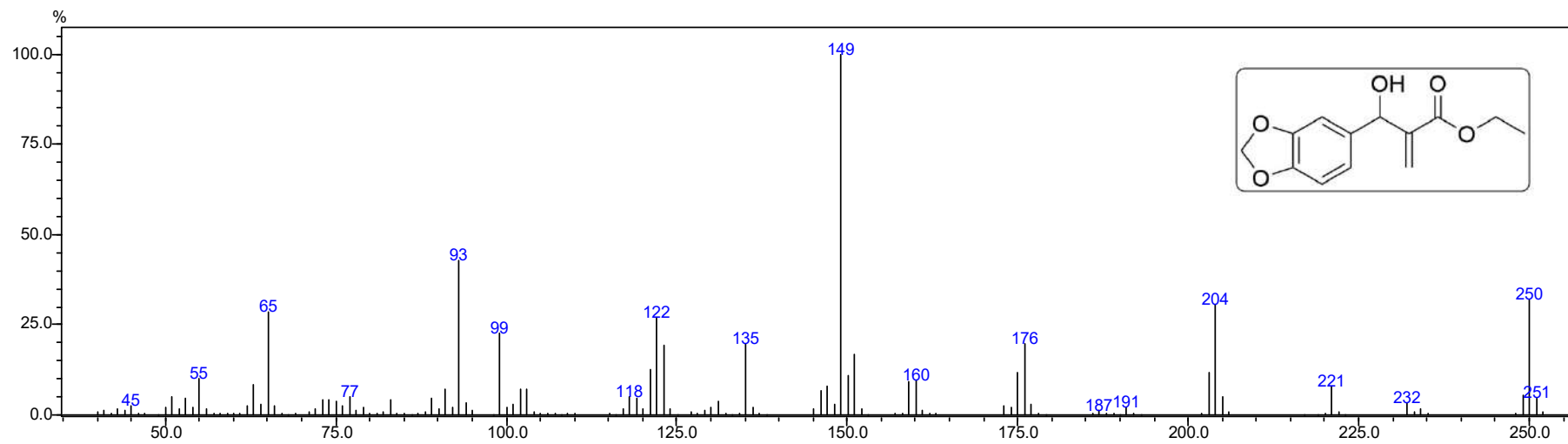
**Espectro E – 6.3 – [EM (70 eV) *m/z*] – 149**



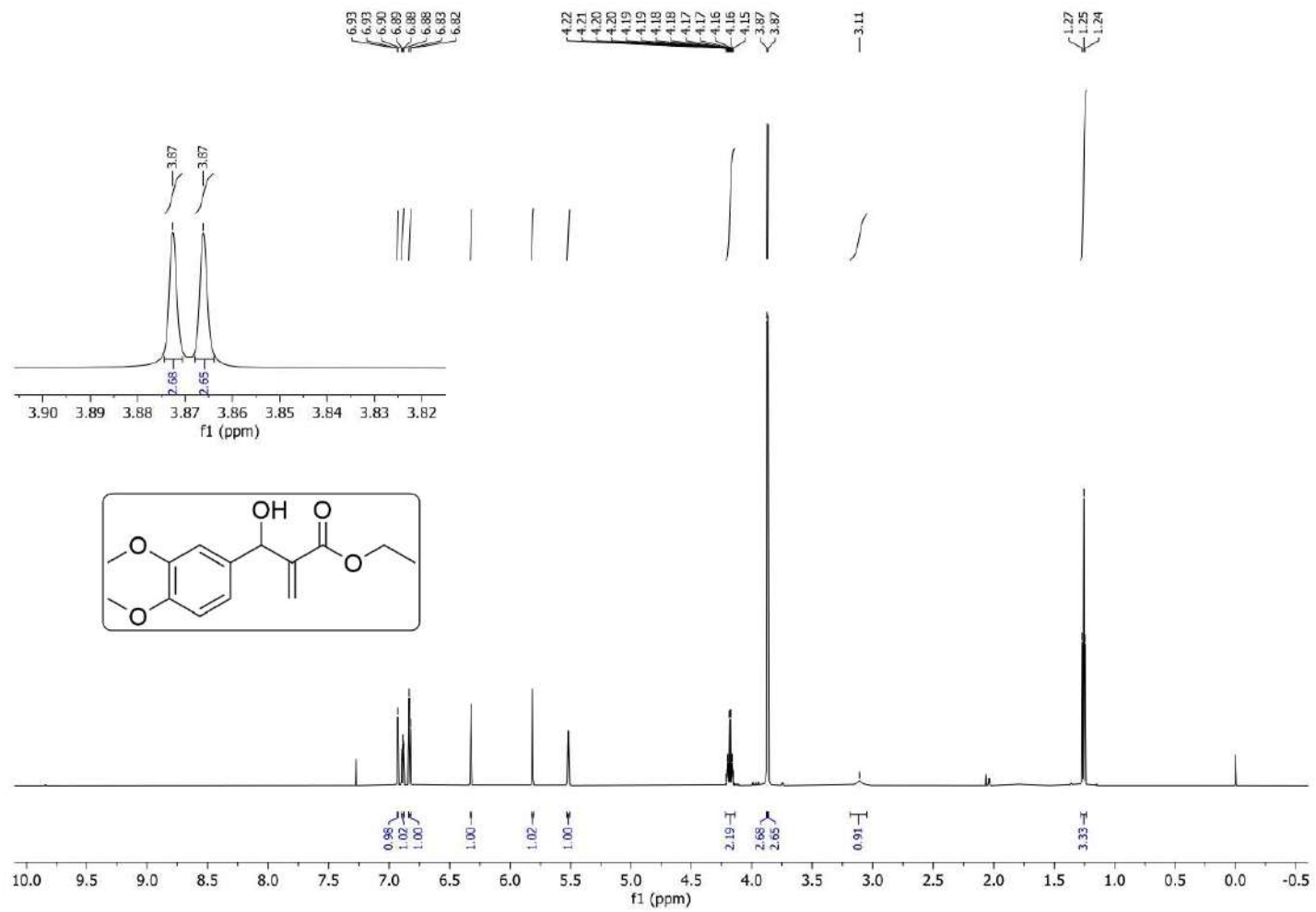
**Espectro E – 7.1 – (RMN de  $^1\text{H}$ , 600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – 150**



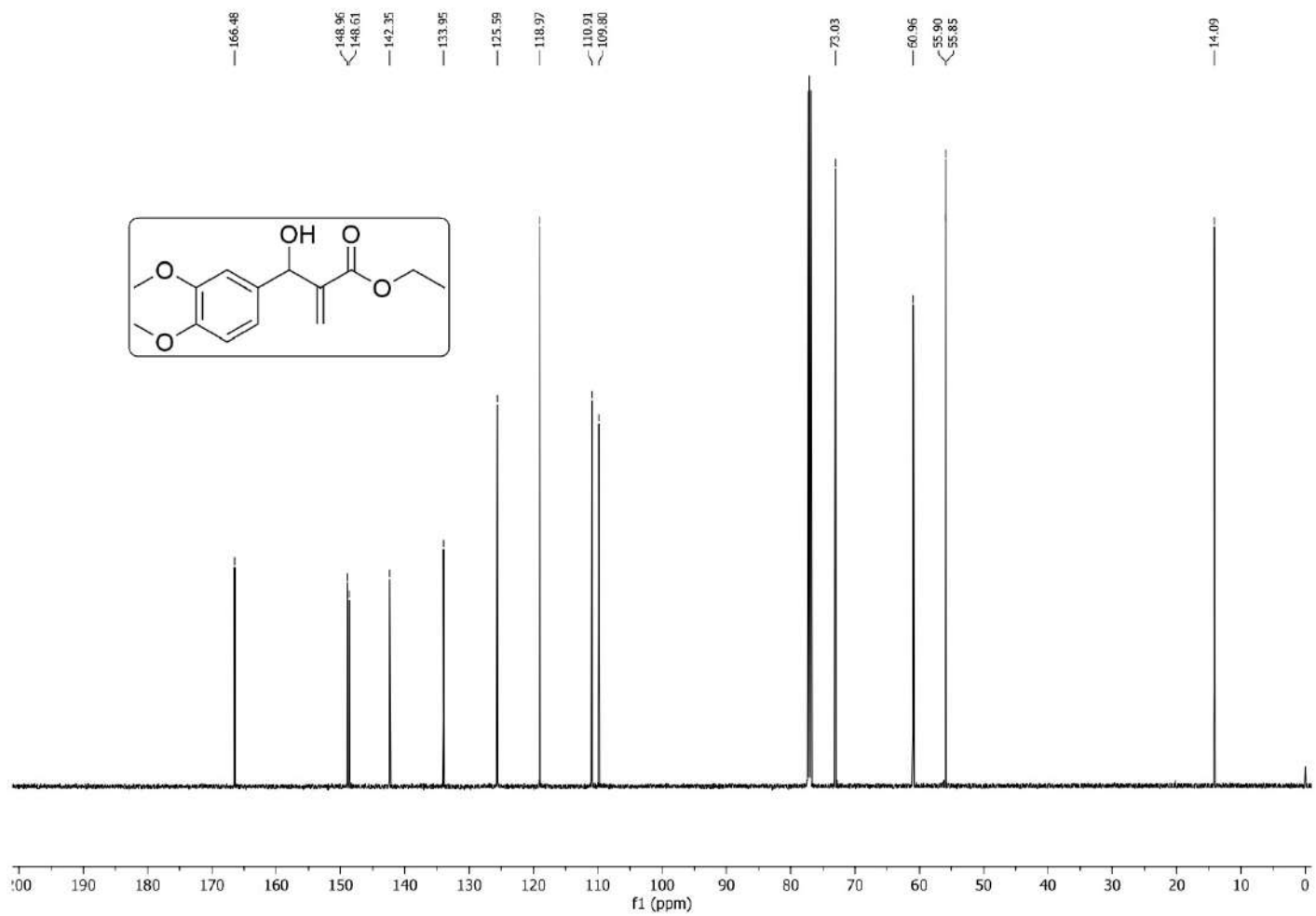
**Espectro E – 7.2 – (RMN de <sup>13</sup>C, 150,91 MHz, CDCl<sub>3</sub>) – 150**



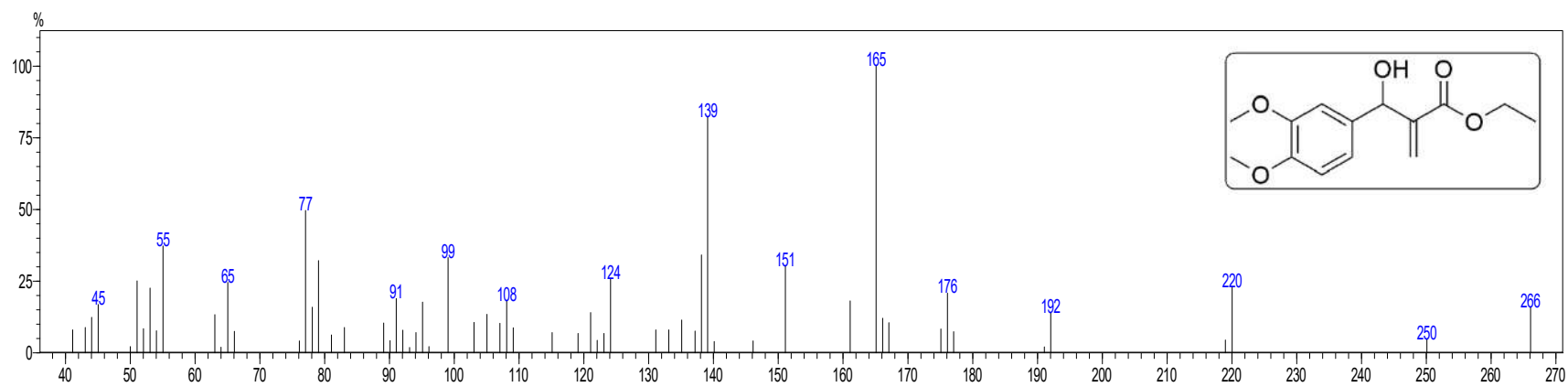
**Espectro E – 7.3 – [EM (70 eV)  $m/z$ ] – 150**



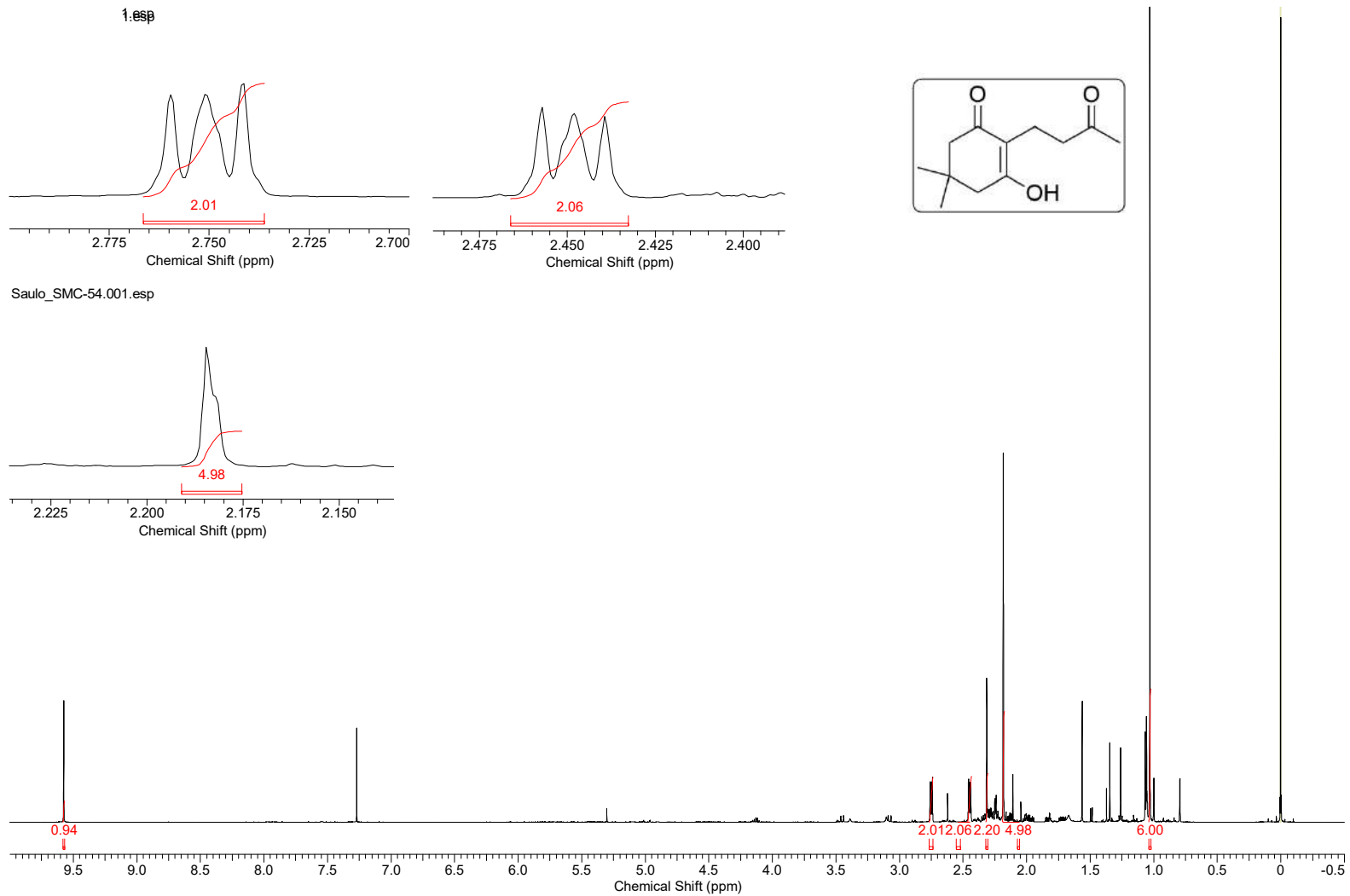
**Espectro E – 8.1 – (RMN de <sup>1</sup>H, 600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) – 151**



Espectro E – 8.2 – (RMN de  $^{13}\text{C}$ , 150,91 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – 151

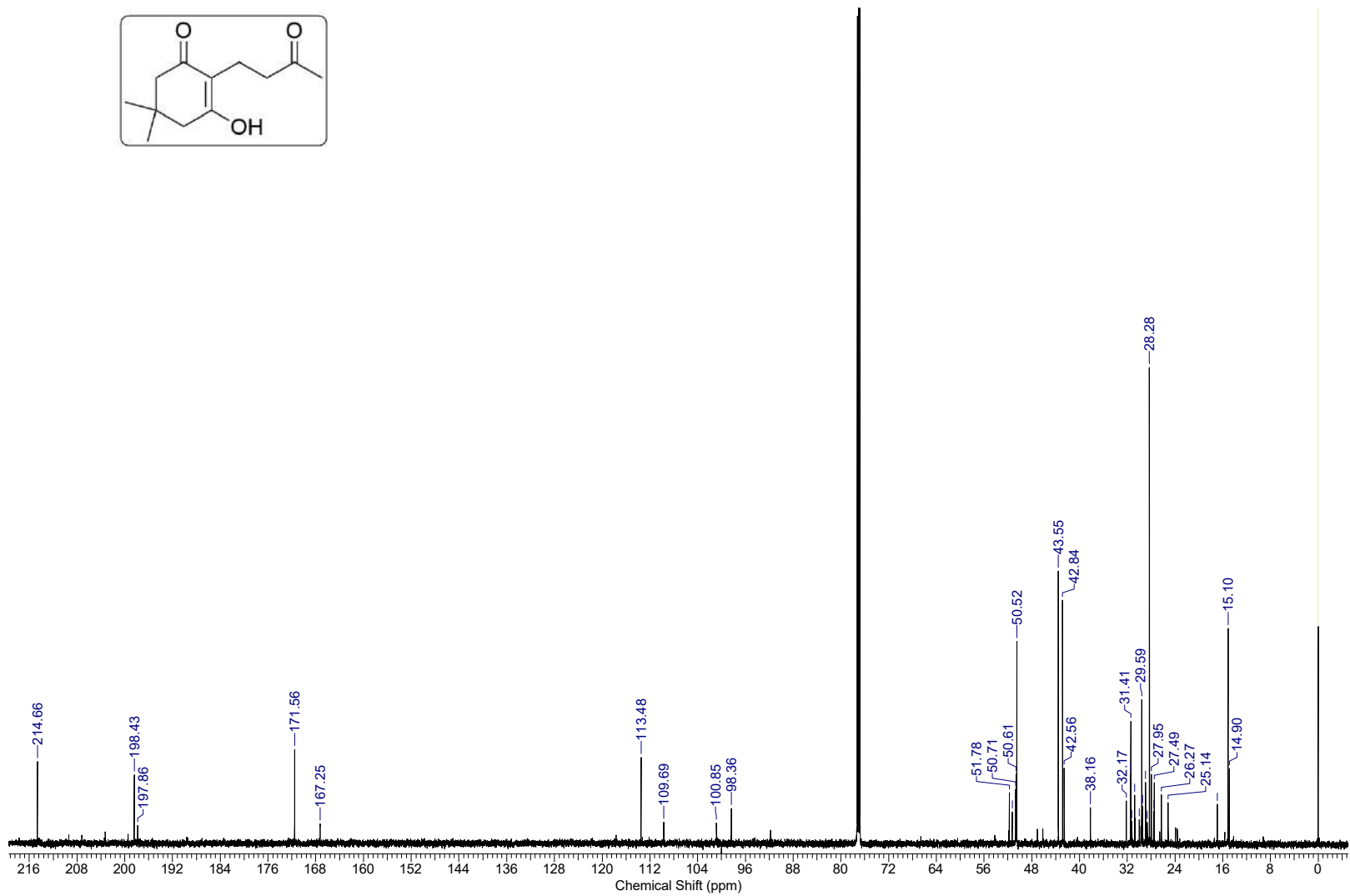
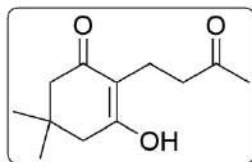


**Espectro E – 8.3 – [EM (70 eV)  $m/z$ ] – 151**

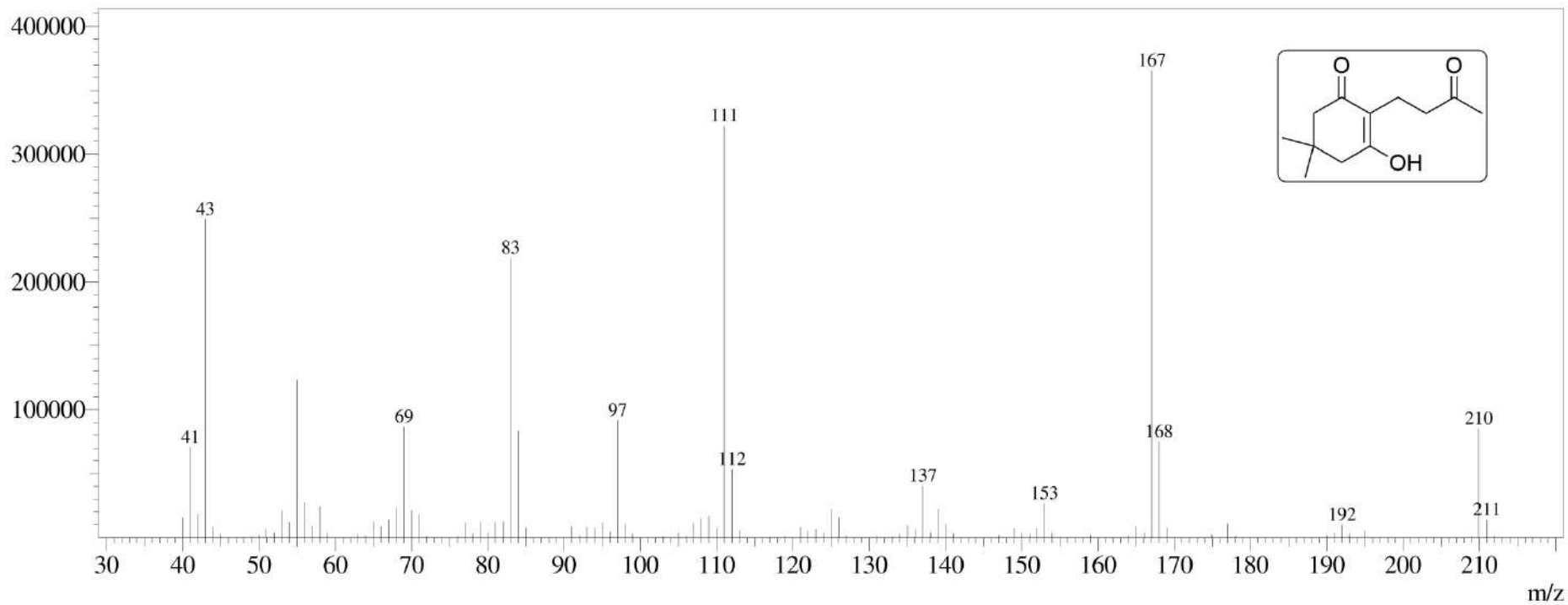


**Espectro E – 9.1 – (RMN de <sup>1</sup>H, 600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) – Molécula 203**

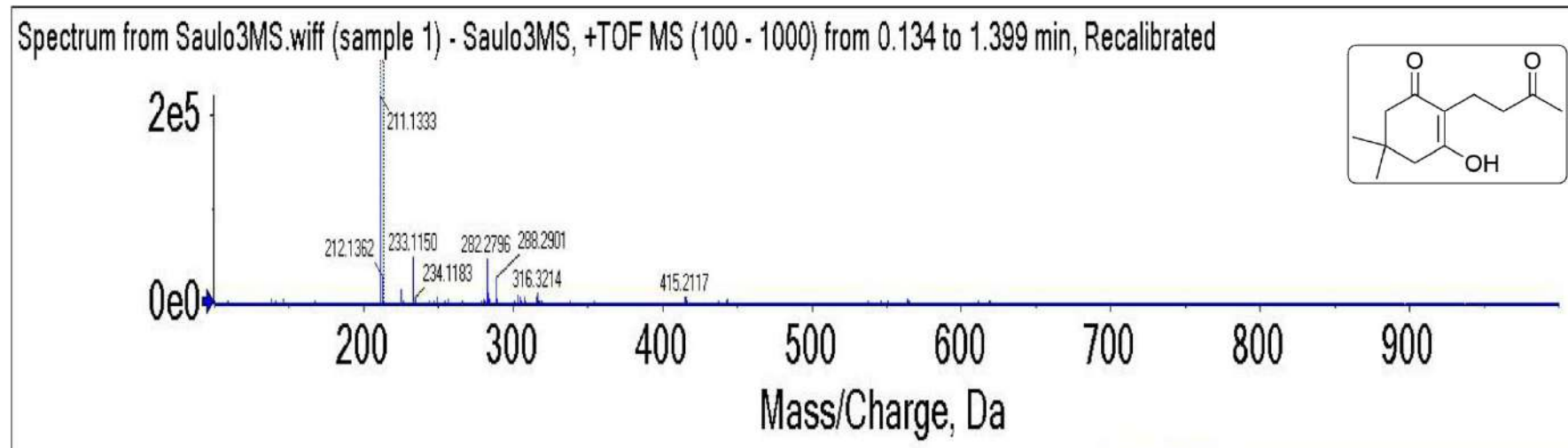




Espectro E – 9.2 – (RMN de  $^{13}\text{C}$ , 150,91 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Molécula 203

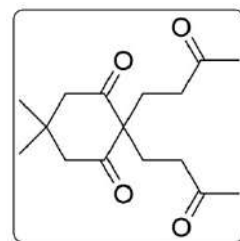
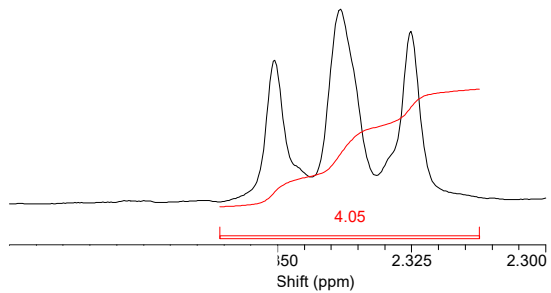


**Espectro E – 9.3 – [EM (70 eV)  $m/z$ ] – Molécula 203**

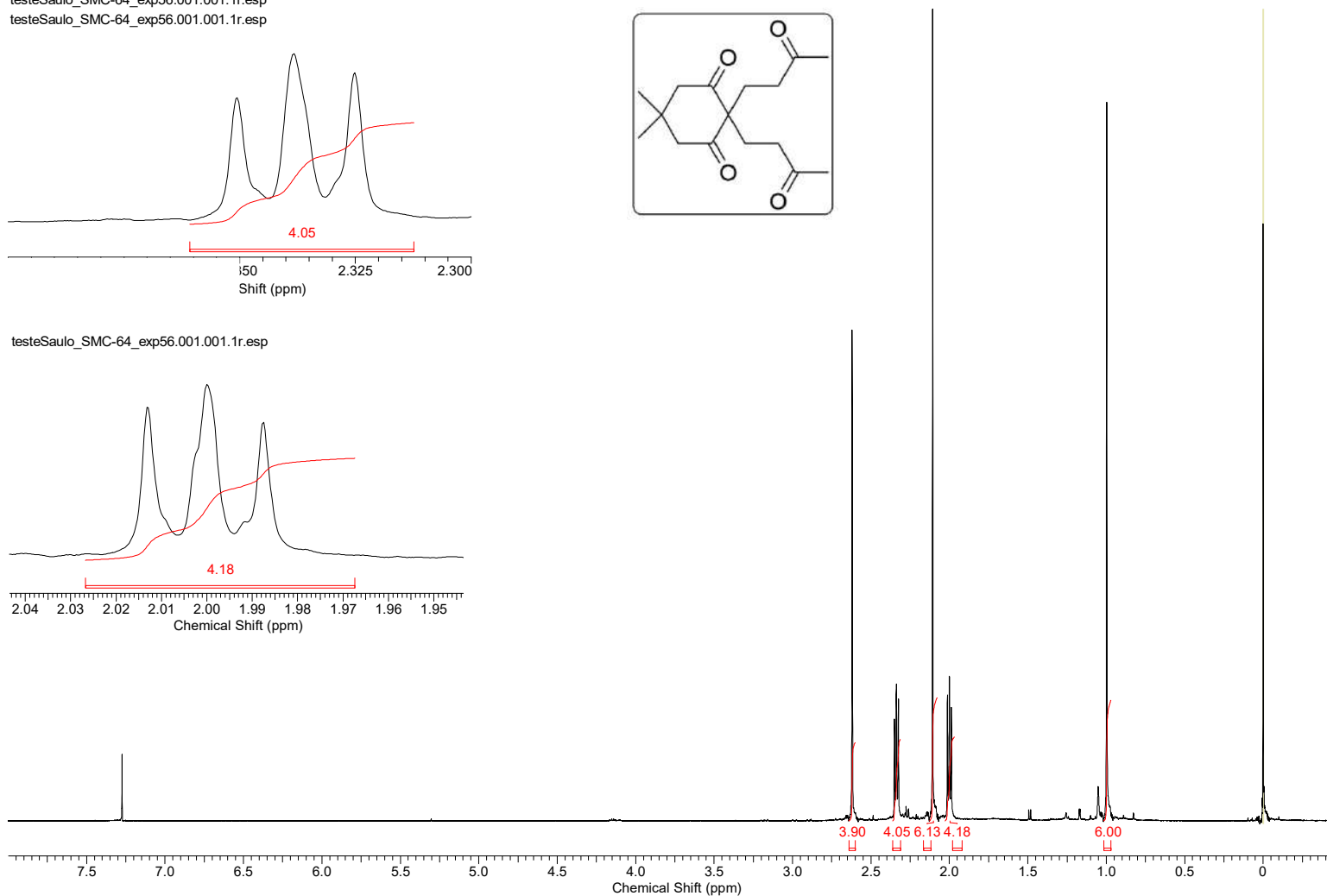
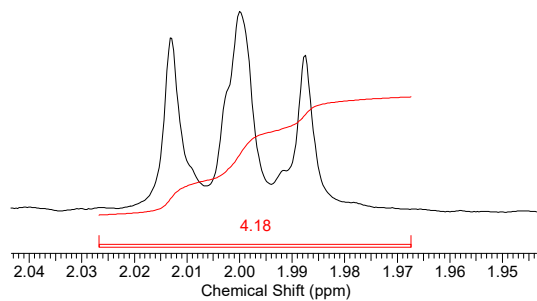


**Espectro E – 9.4 – EMAR (ESI-TOF)  $m/z$  calculado para  $C_{12}H_{19}O_3 = 211,1334$ ;  $[M + H]$  encontrado = 211,1333 – Molécula 203**

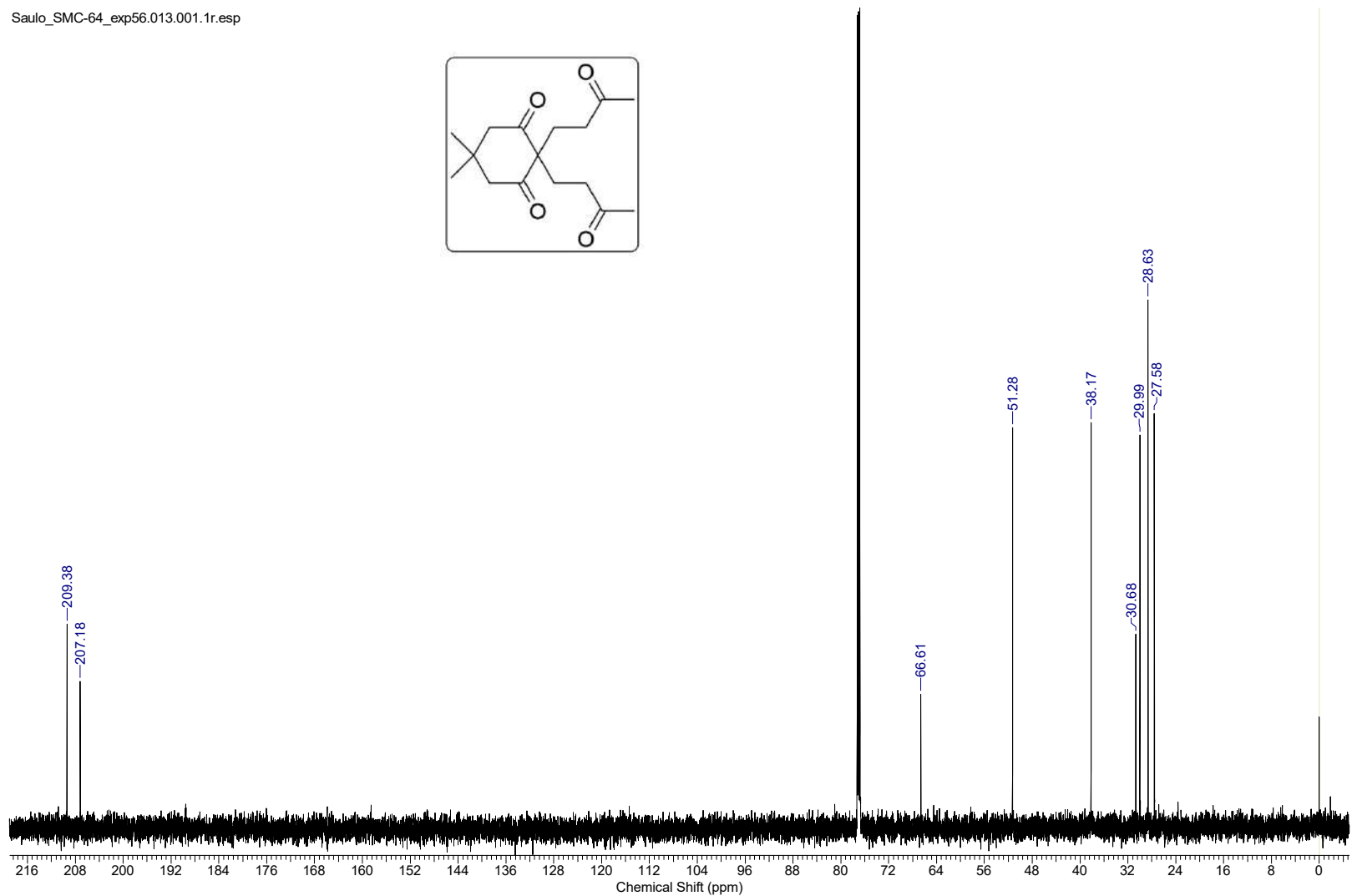
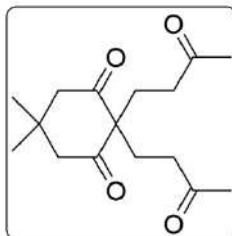
testeSaulo\_SMC-64\_exp56.001.001.1r.esp  
testeSaulo\_SMC-64\_exp56.001.001.1r.esp



testeSaulo\_SMC-64\_exp56.001.001.1r.esp

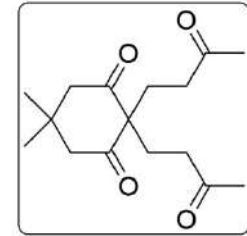
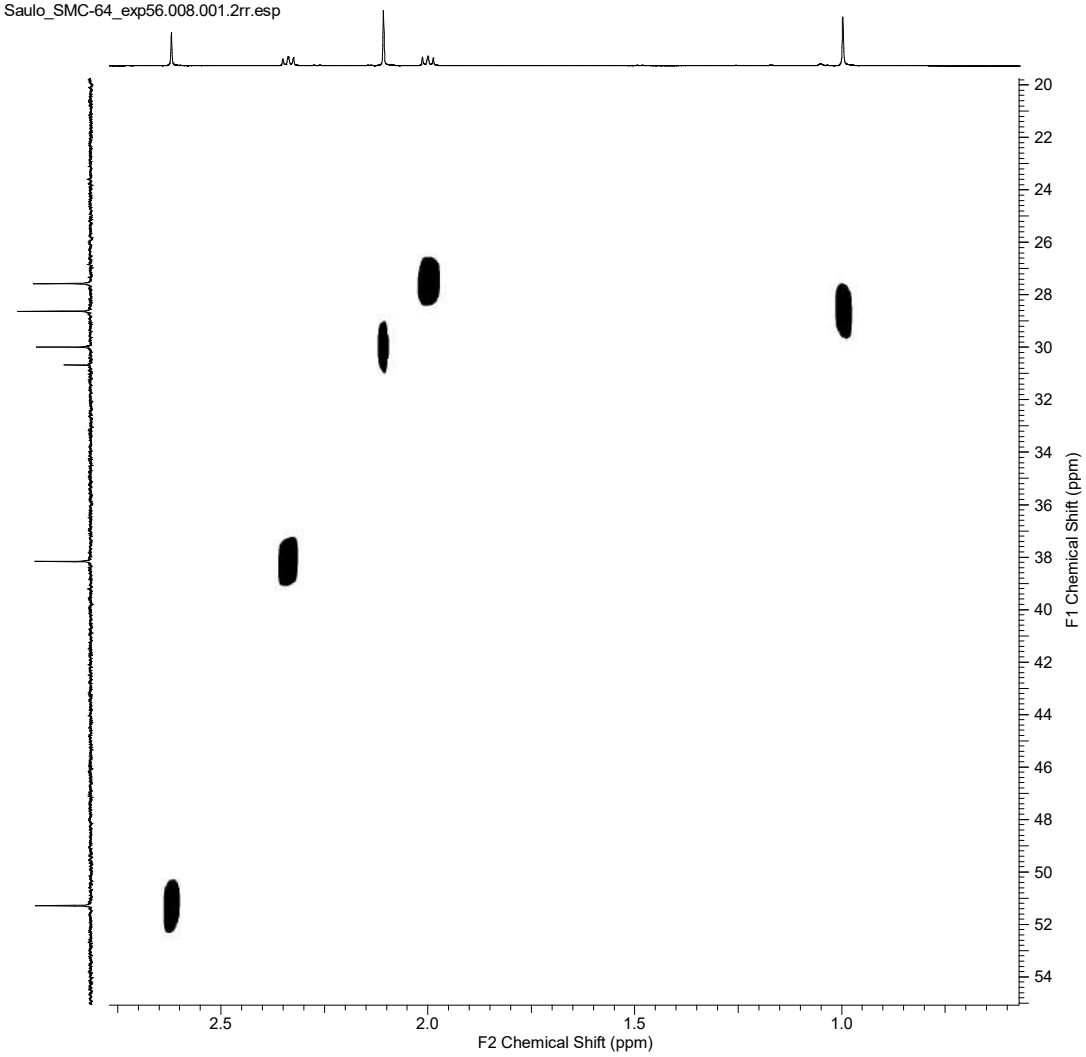


**Espectro E – 10.1 – (RMN de  $^1\text{H}$ , 600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Molécula 204**

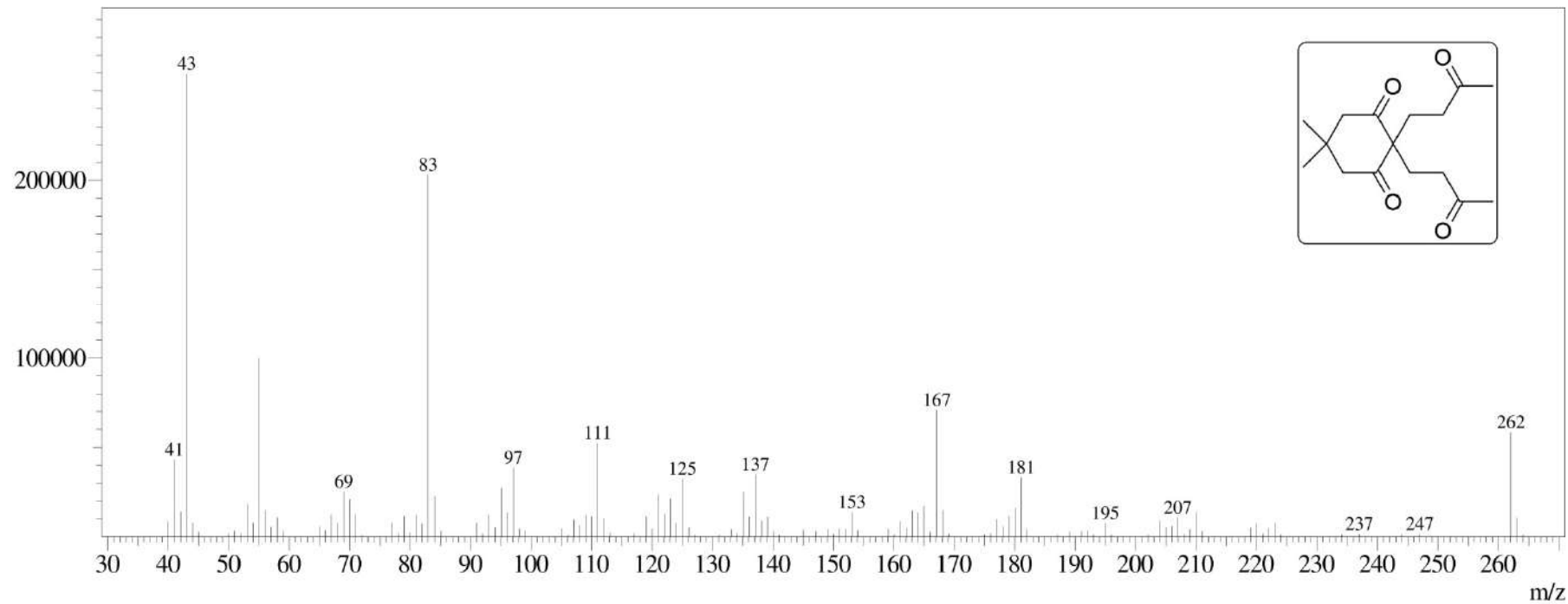


**Espectro E – 10.2 – (RMN de <sup>13</sup>C, 150,91 MHz, CDCl<sub>3</sub>) – Molécula 204**

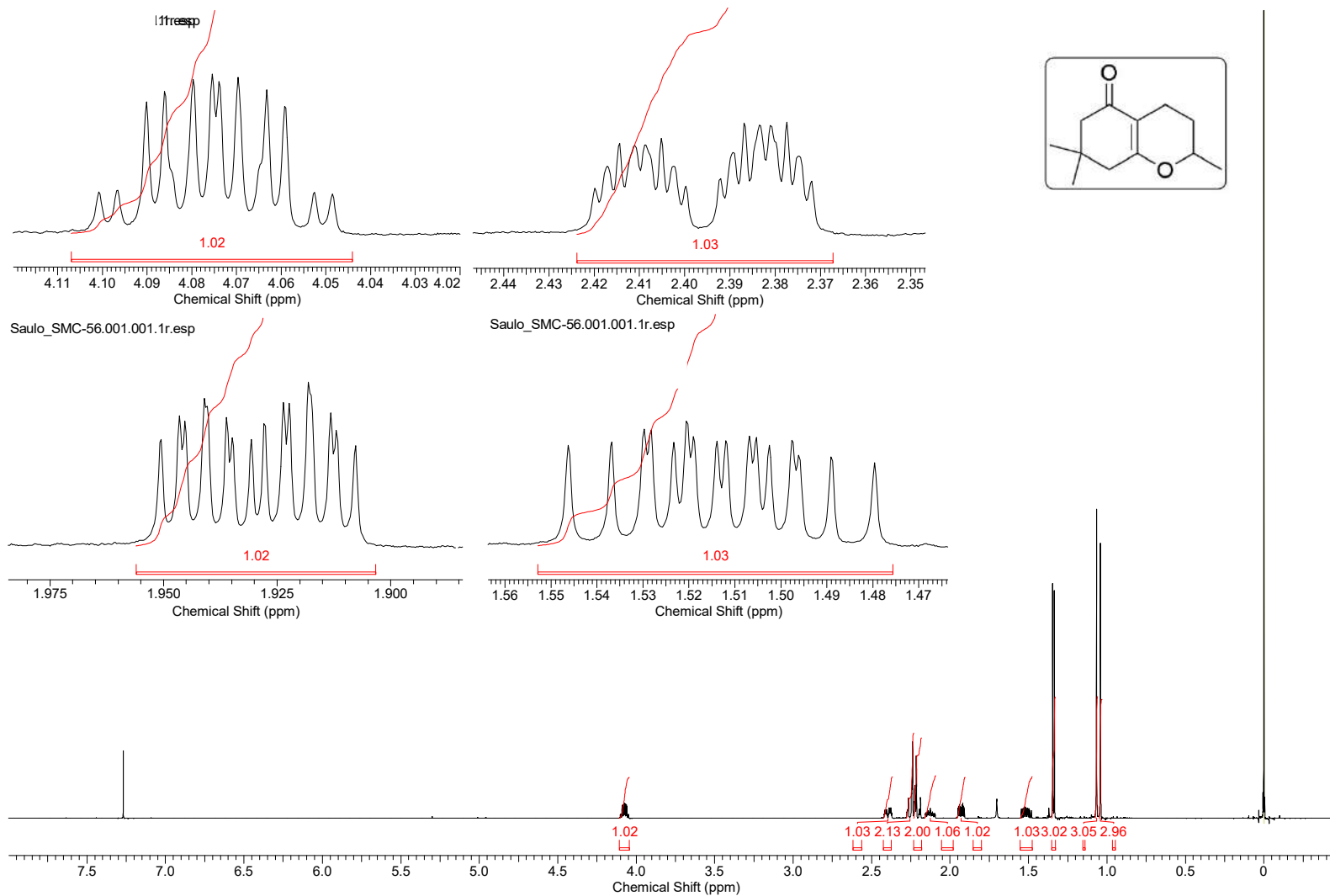
Saulo\_SMC-64\_exp56.008.001.2rr.esp



Espectro E – 10.3 – HMQC (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) – Molécula 204

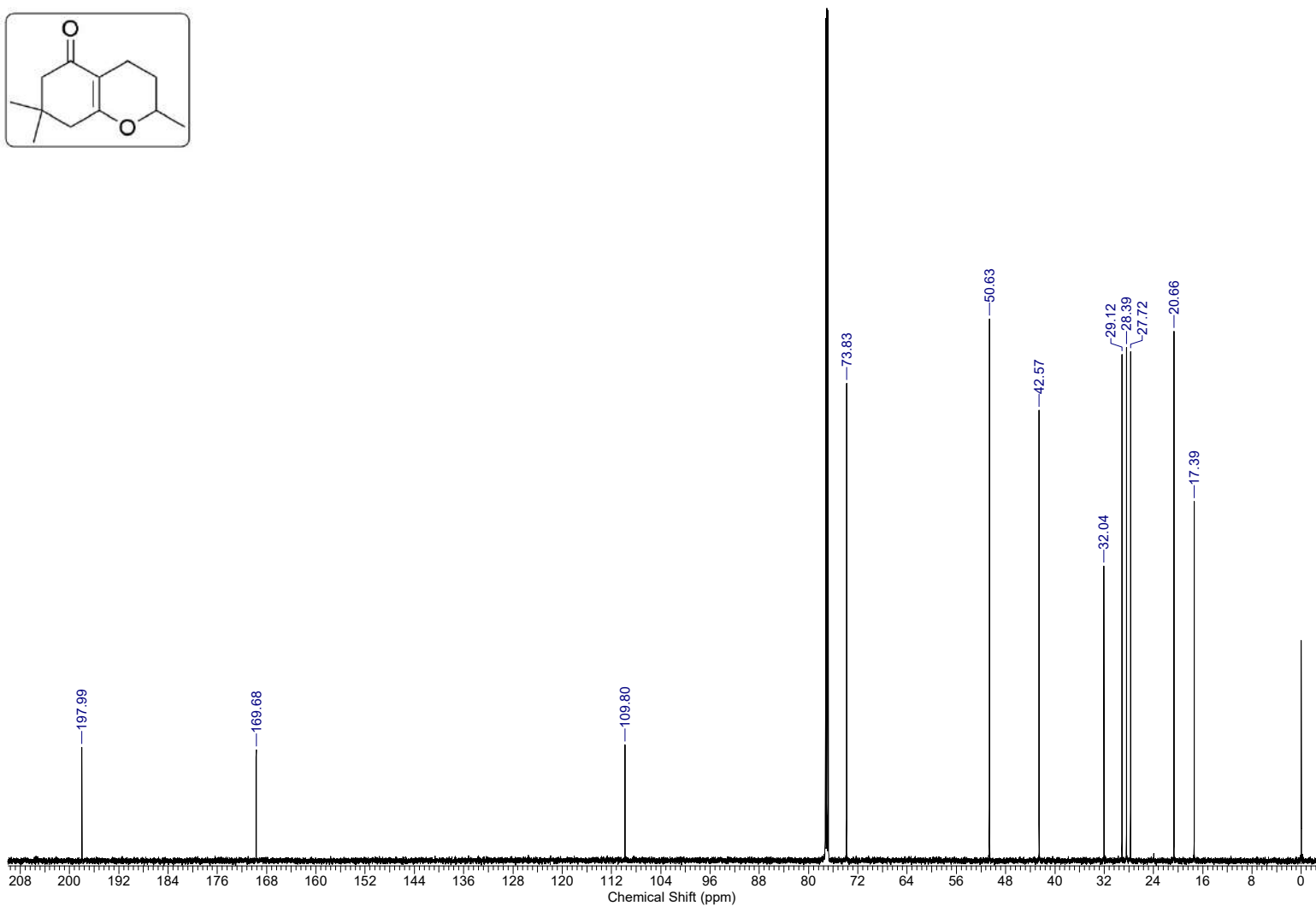
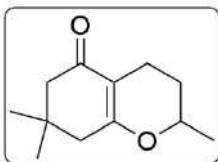


**Espectro E – 10.4 – [EM (70 eV)  $m/z$ ] – Molécula 204**



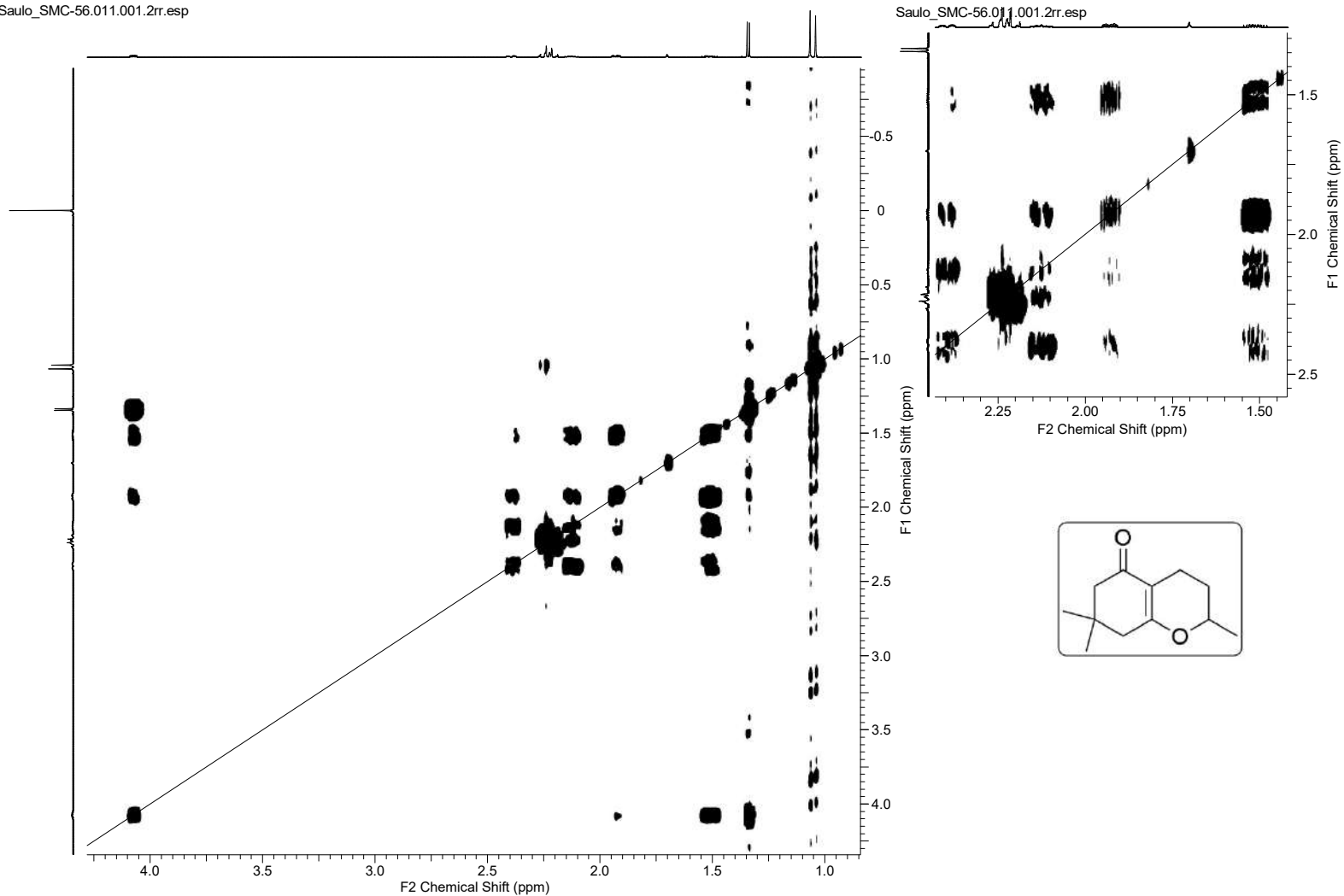
**Espectro E – 11.1 – ((RMN de <sup>1</sup>H, 600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) – Molécula 205**



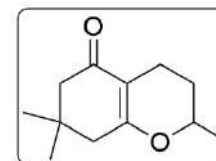
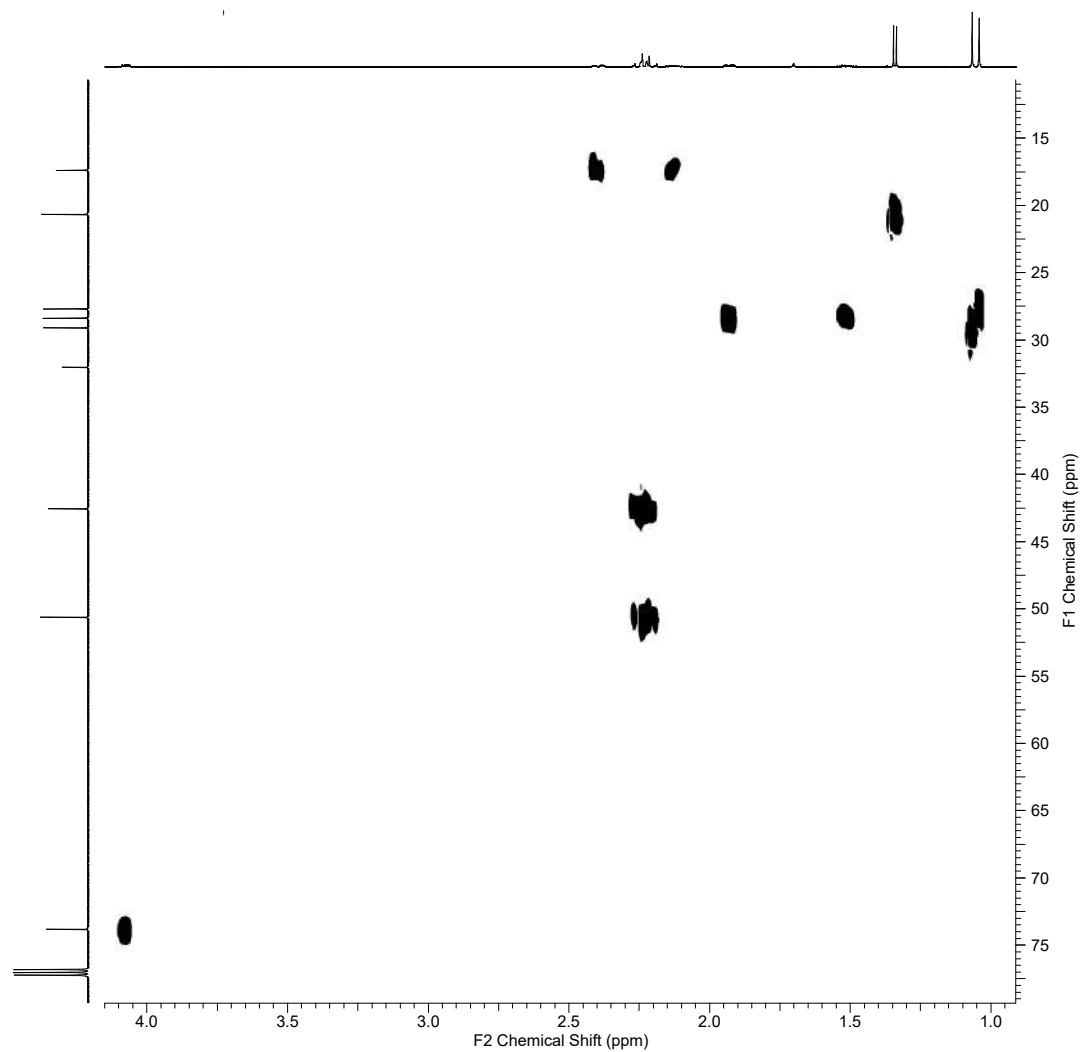


**Espectro E – 11.2 – (RMN de <sup>13</sup>C, 150,91 MHz, CDCl<sub>3</sub>) – Molécula 205**

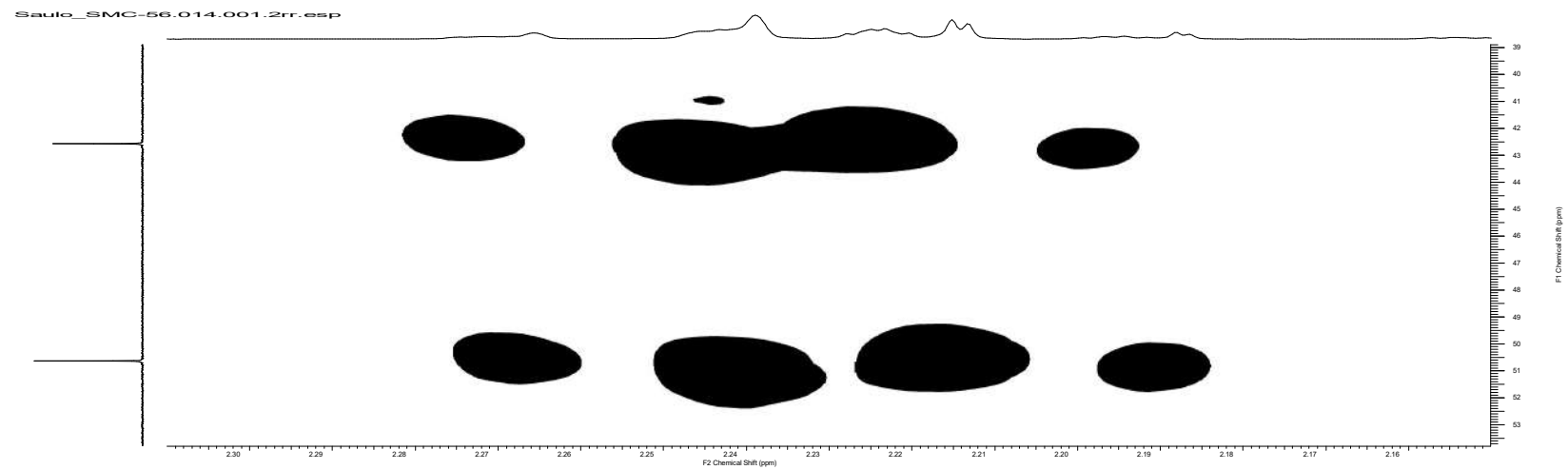
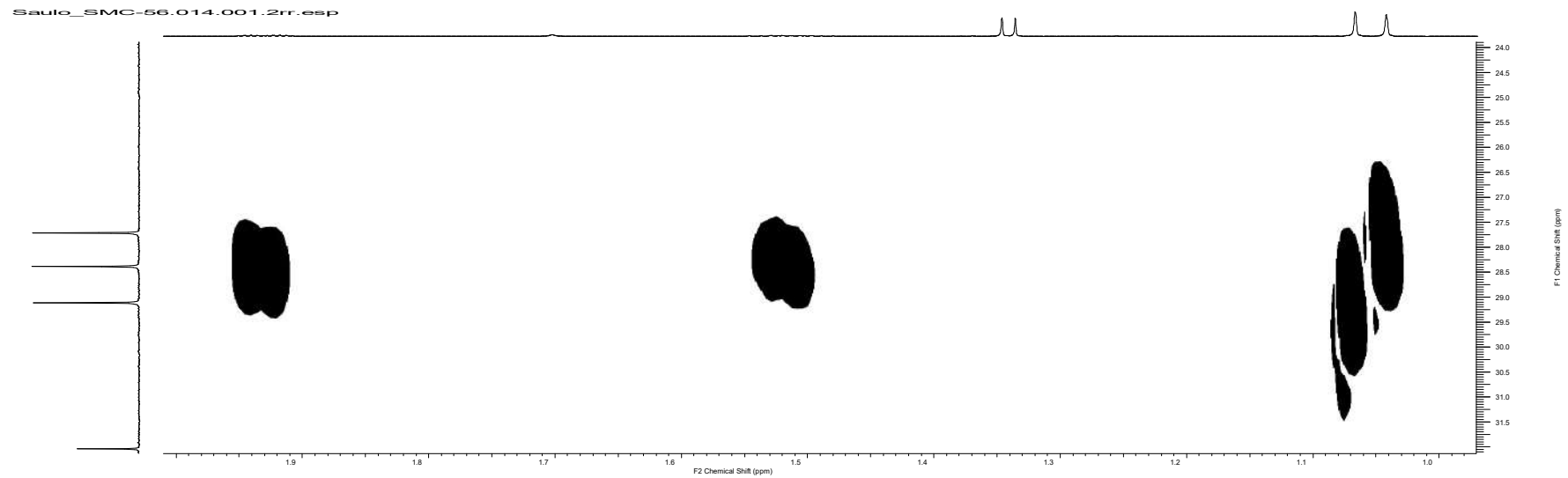
Saulo\_SMC-56.011.001.2rr.esp



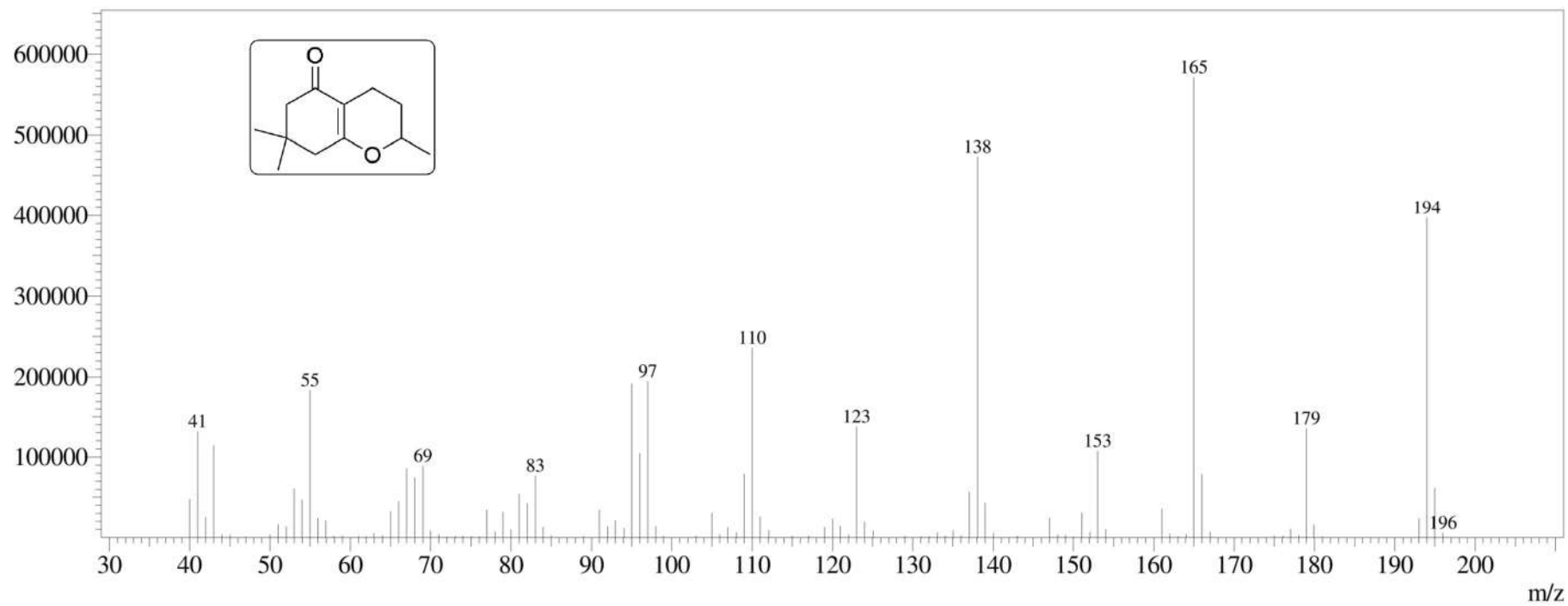
**Espectro E – 11.3 – COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Molécula 205**



**Espectro E – 11.4 – HMQC (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) – Molécula 205**

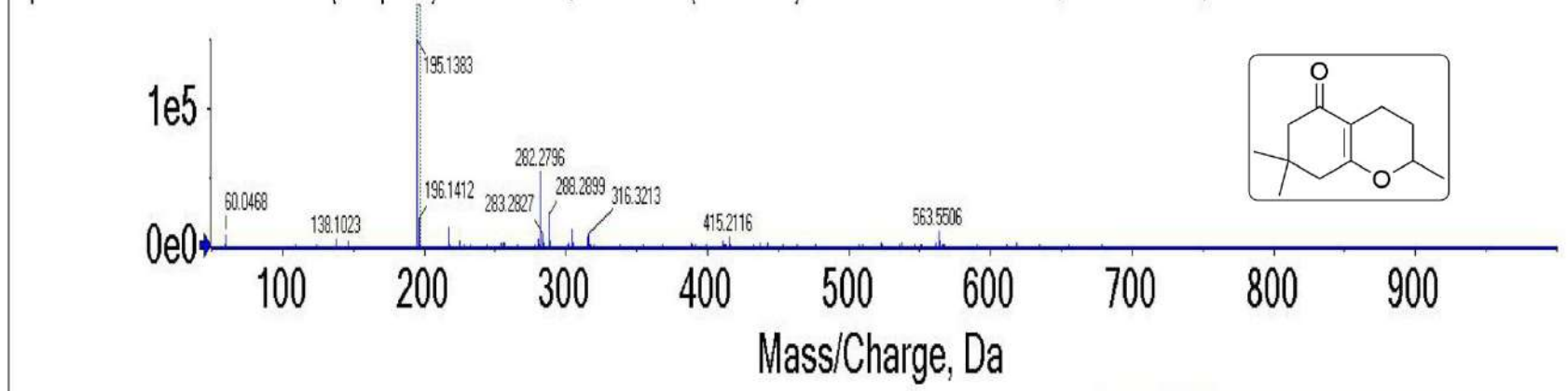


**Espectro E – 11.4 – HMQC (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) – Molécula 205 (Ampliação)**



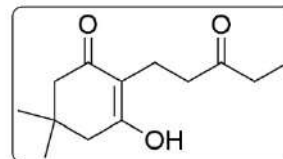
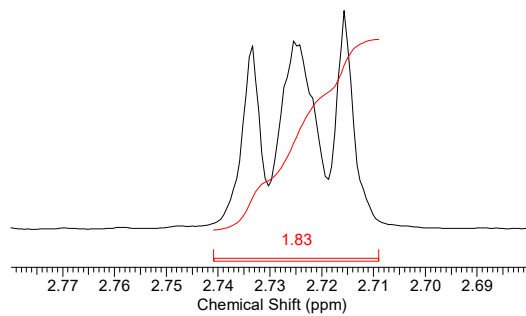
**Espectro E – 11.5 – [EM (70 eV)  $m/z$ ] – Molécula 205**

Spectrum from Saulo2MS.wiff (sample 1) - Saulo2MS, +TOF MS (50 - 1000) from 0.125 to 0.714 min, Recalibrated, Recalibrated

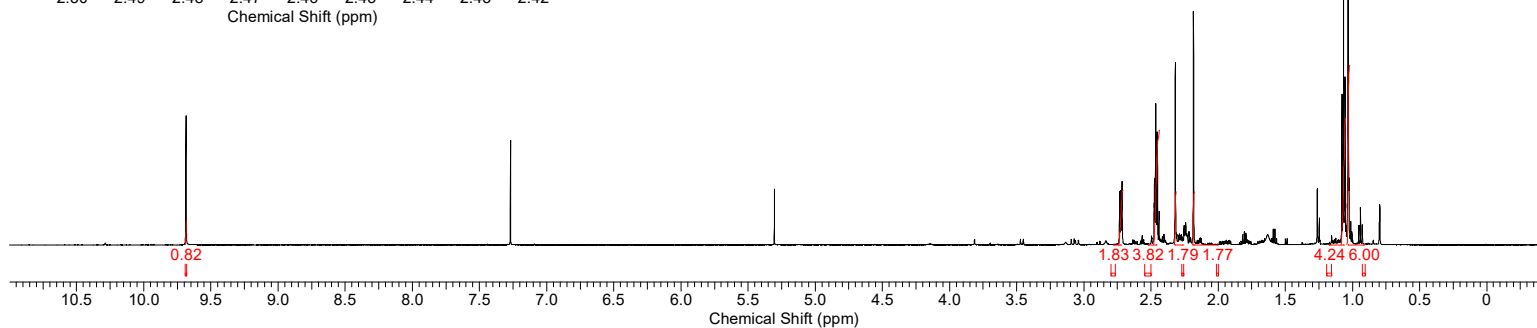
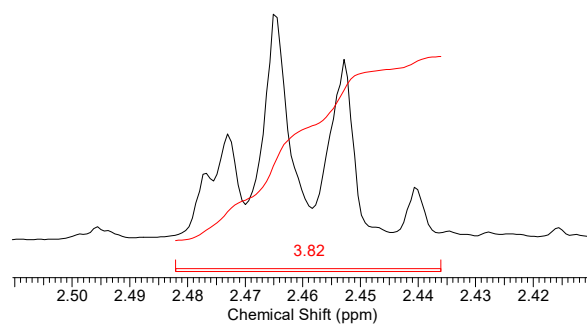


Espectro E – 11.6 – EMAR (ESI-TOF)  $m/z$  calculado para  $C_{12}H_{19}O_2 = 195,1385$ ;  $[M + H]$  encontrado = 195,1383 – Molécula 205

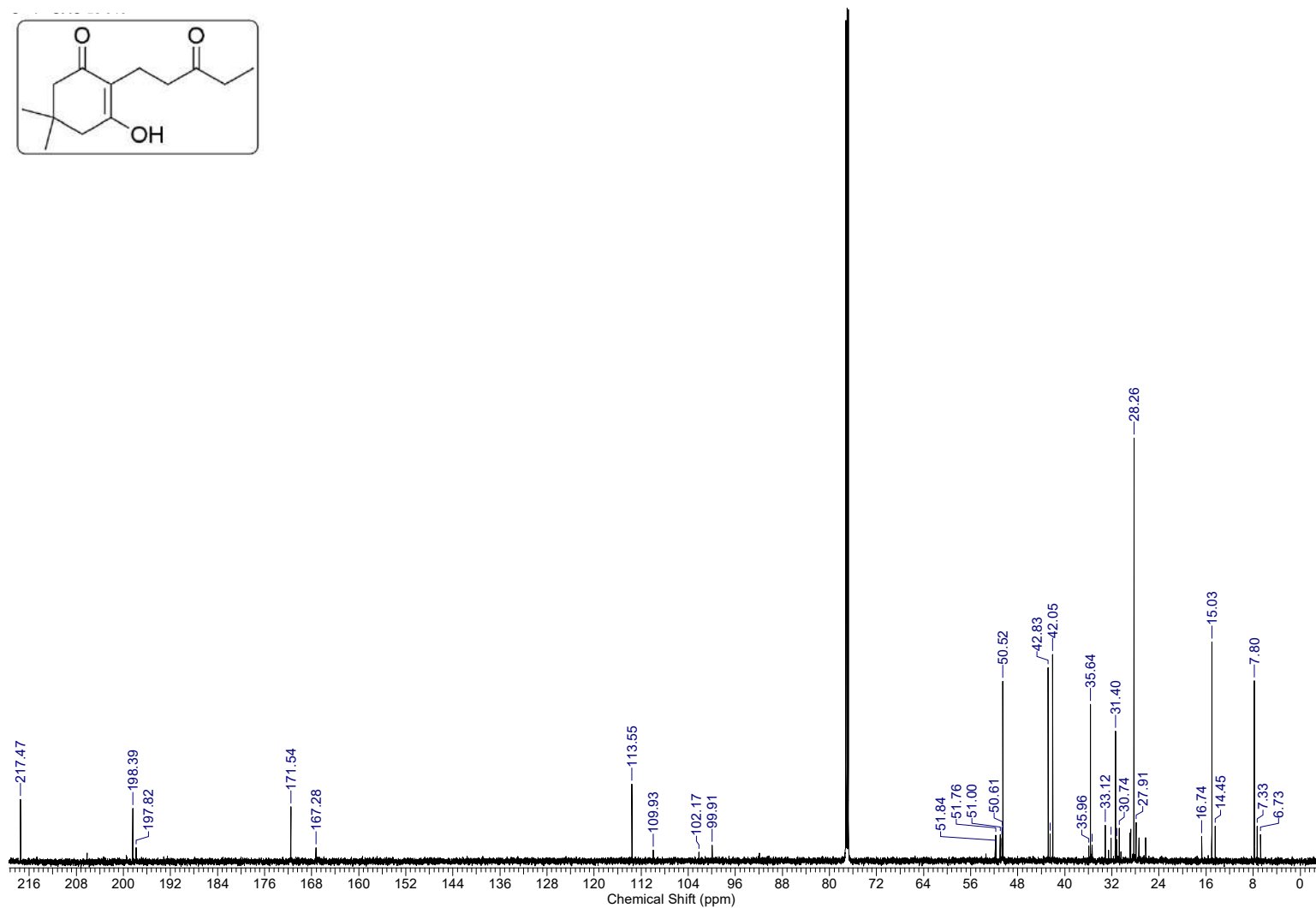
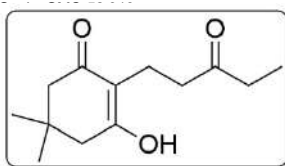
Saulo\_SMC-52.001.esp



Saulo\_SMC-52.001.esp

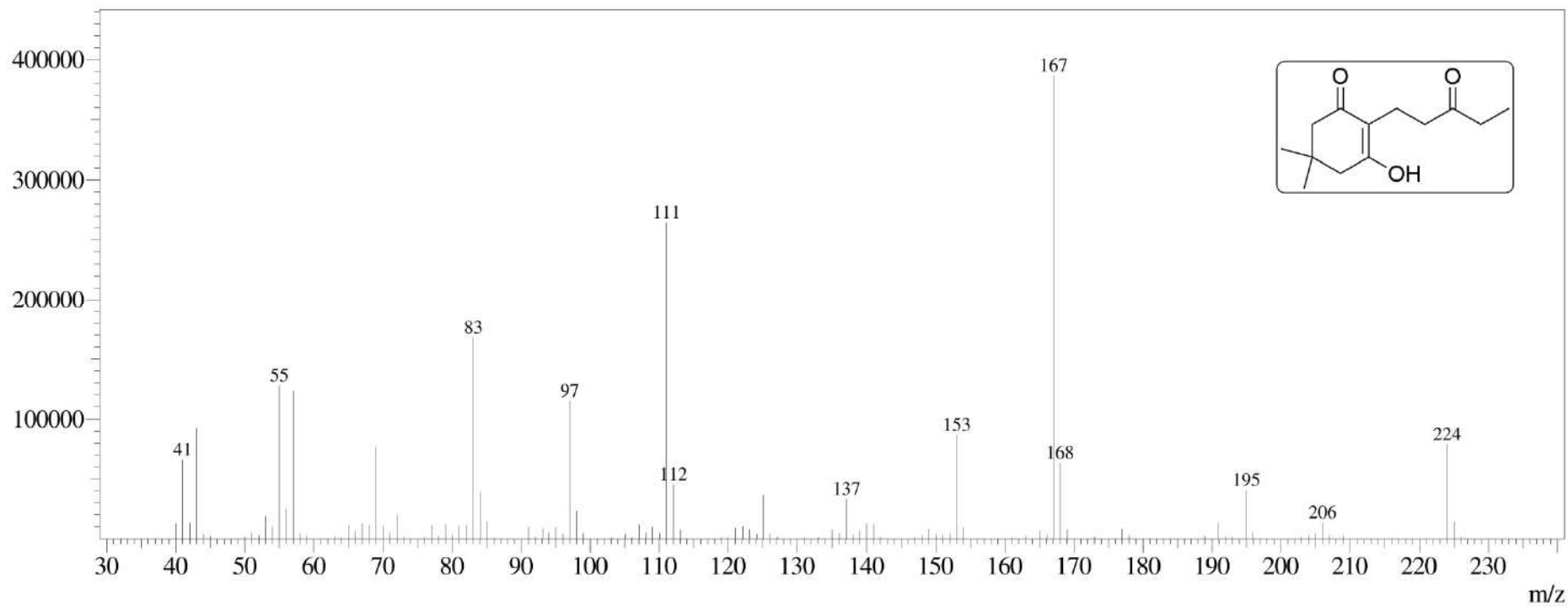


**Espectro E – 12.1 – (RMN de  $^1\text{H}$ , 600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Molécula 207**

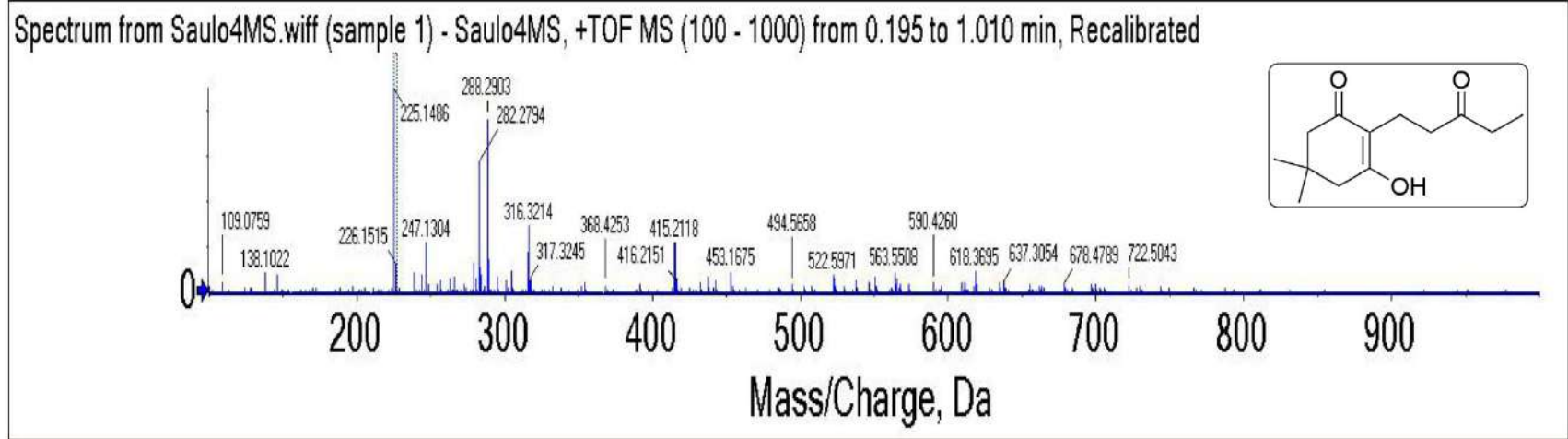


**Espectro E – 12.2 – (RMN de  $^{13}\text{C}$ , 150,91 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Molécula 207**

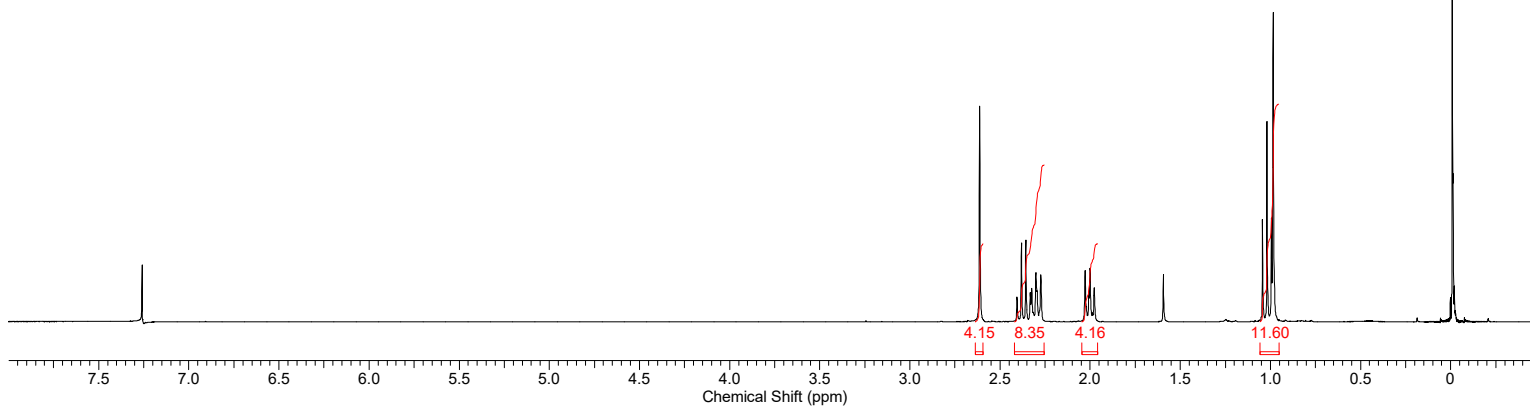
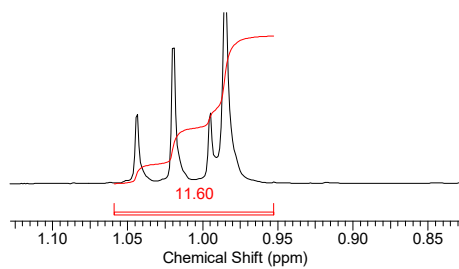
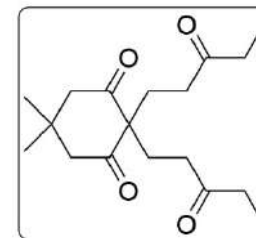
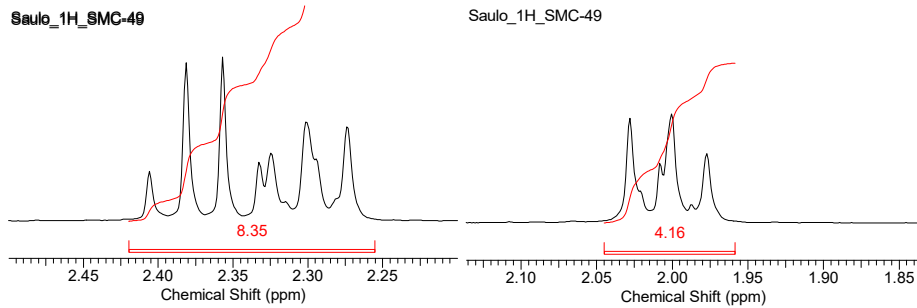




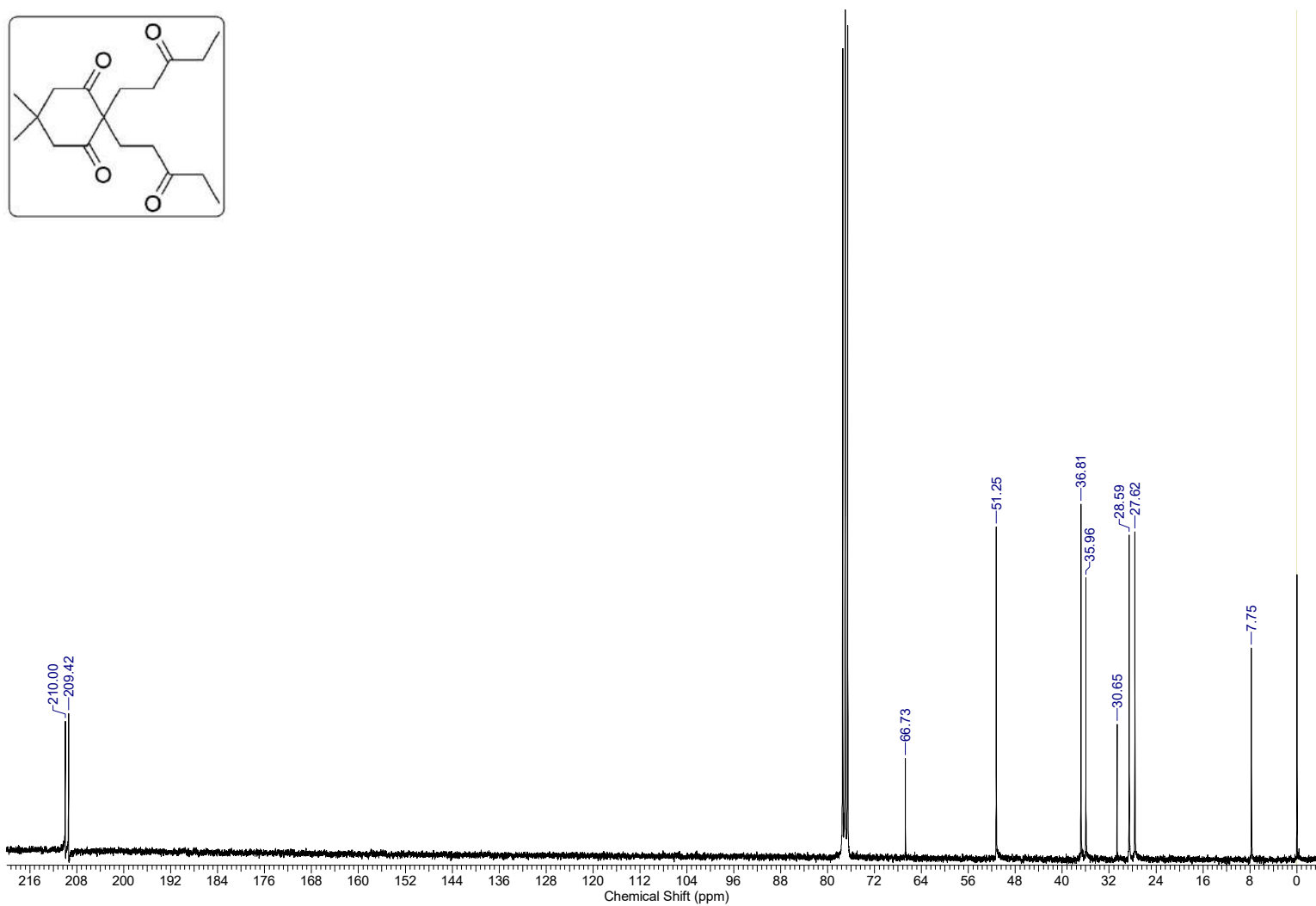
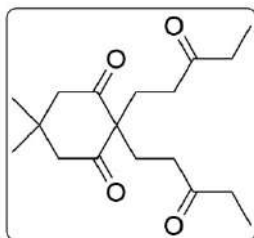
**Espectro E – 12.3 – [EM (70 eV)  $m/z$ ] – Molécula 207**



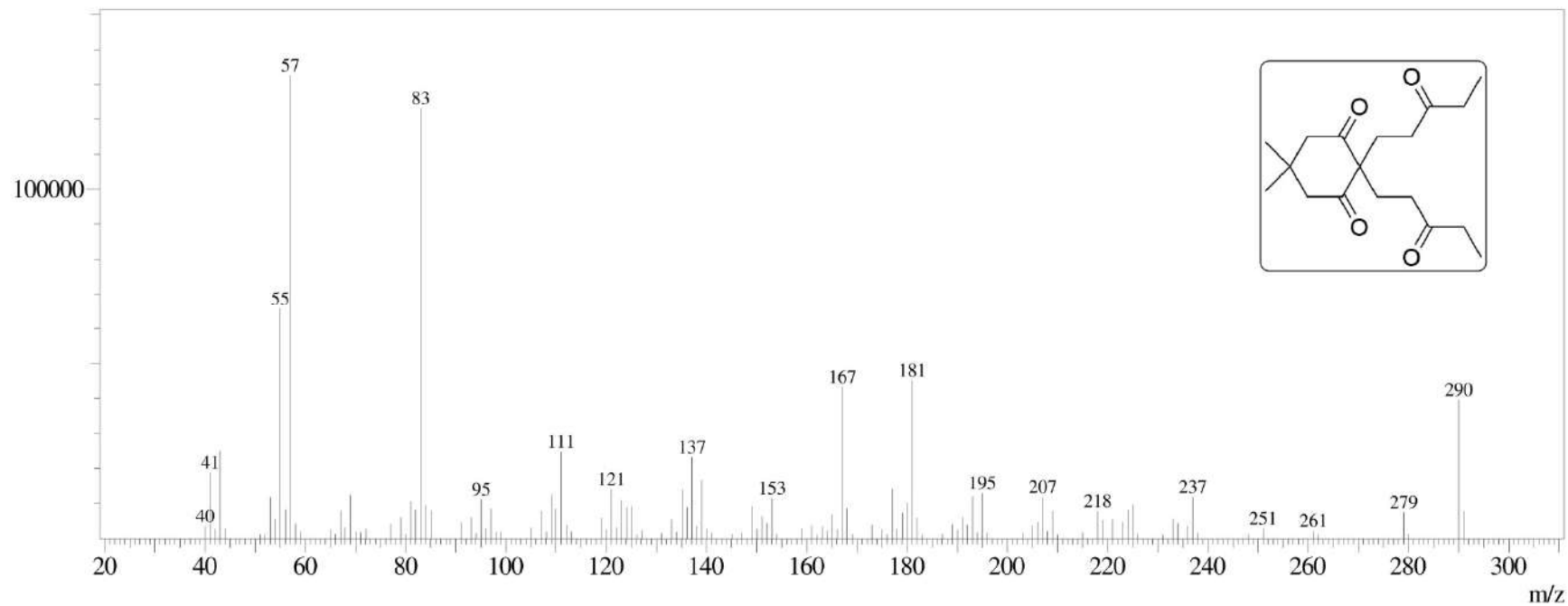
**Espectro E – 12.4 – EMAR (ESI-TOF)  $m/z$  calculado para  $C_{13}H_{21}O_3 = 225,1491$ ;  $[M + H]$  encontrado = 225,1486 – Molécula 207**



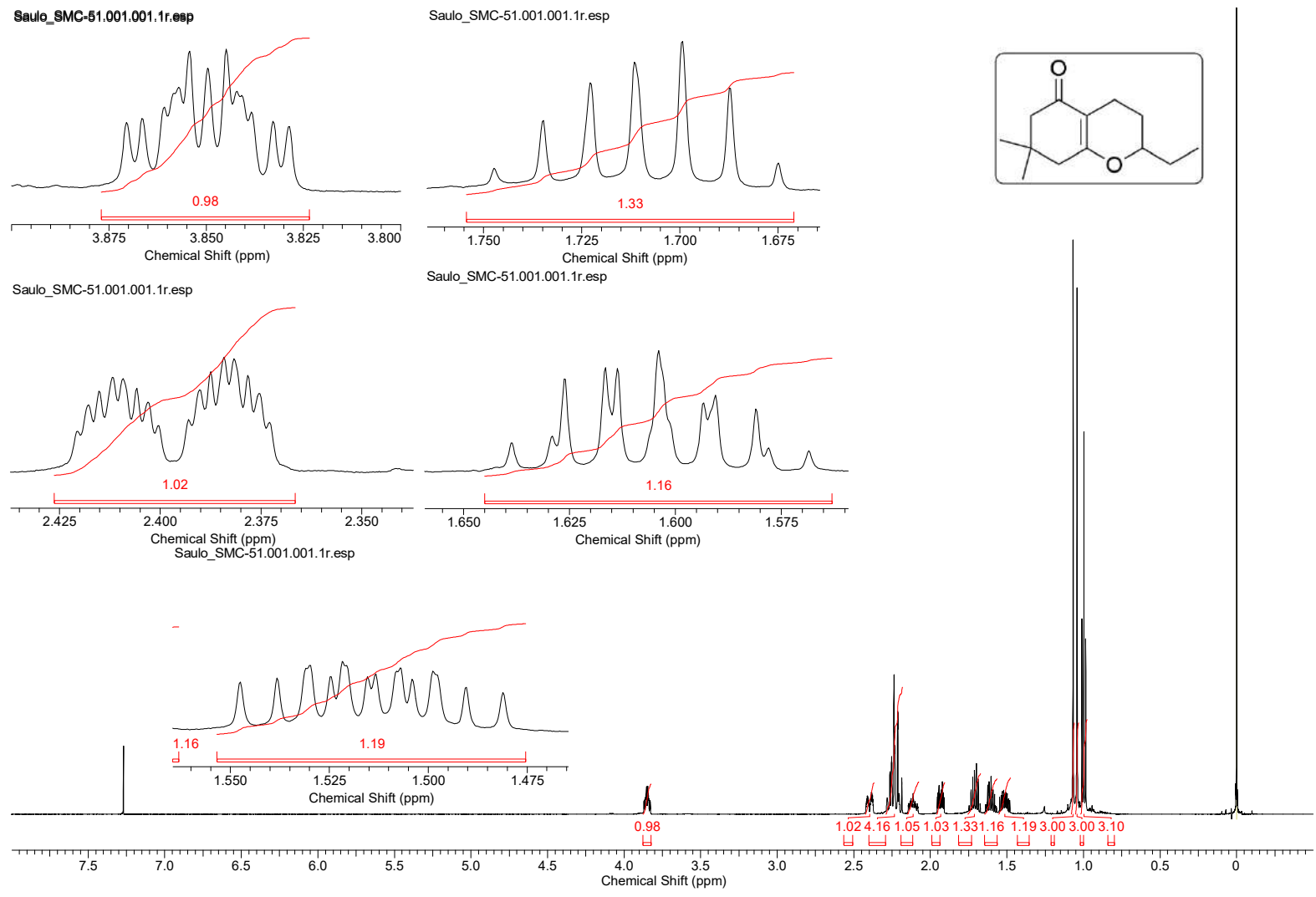
**Espectro E – 13.1 – (RMN de  $^1\text{H}$ , 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Molécula 208**



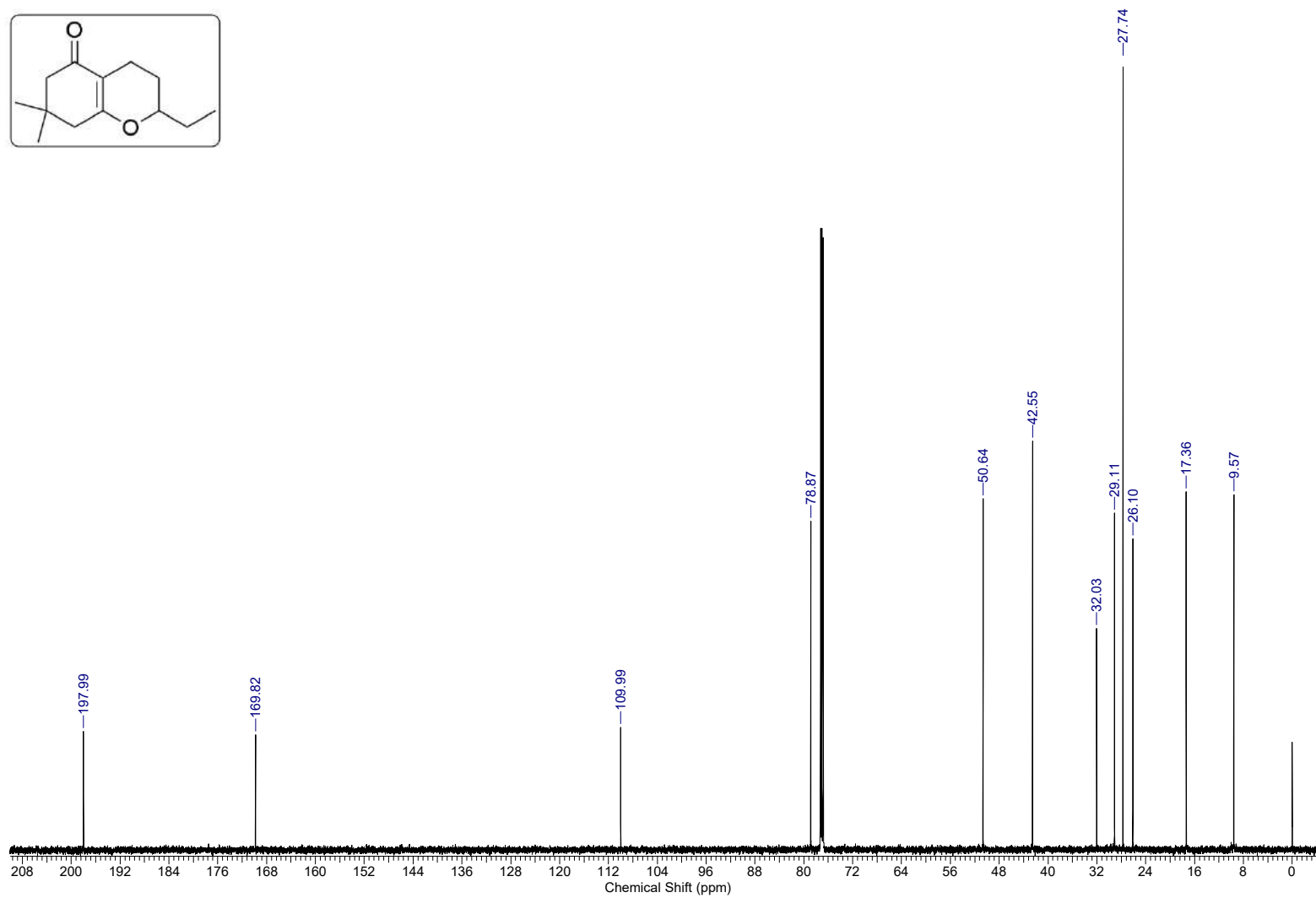
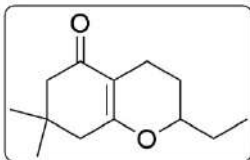
Espectro E – 13.2 – (RMN de  $^{13}\text{C}$ , 75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Molécula 208



**Espectro E – 13.3 – [EM (70 eV)  $m/z$ ] – Molécula 208**

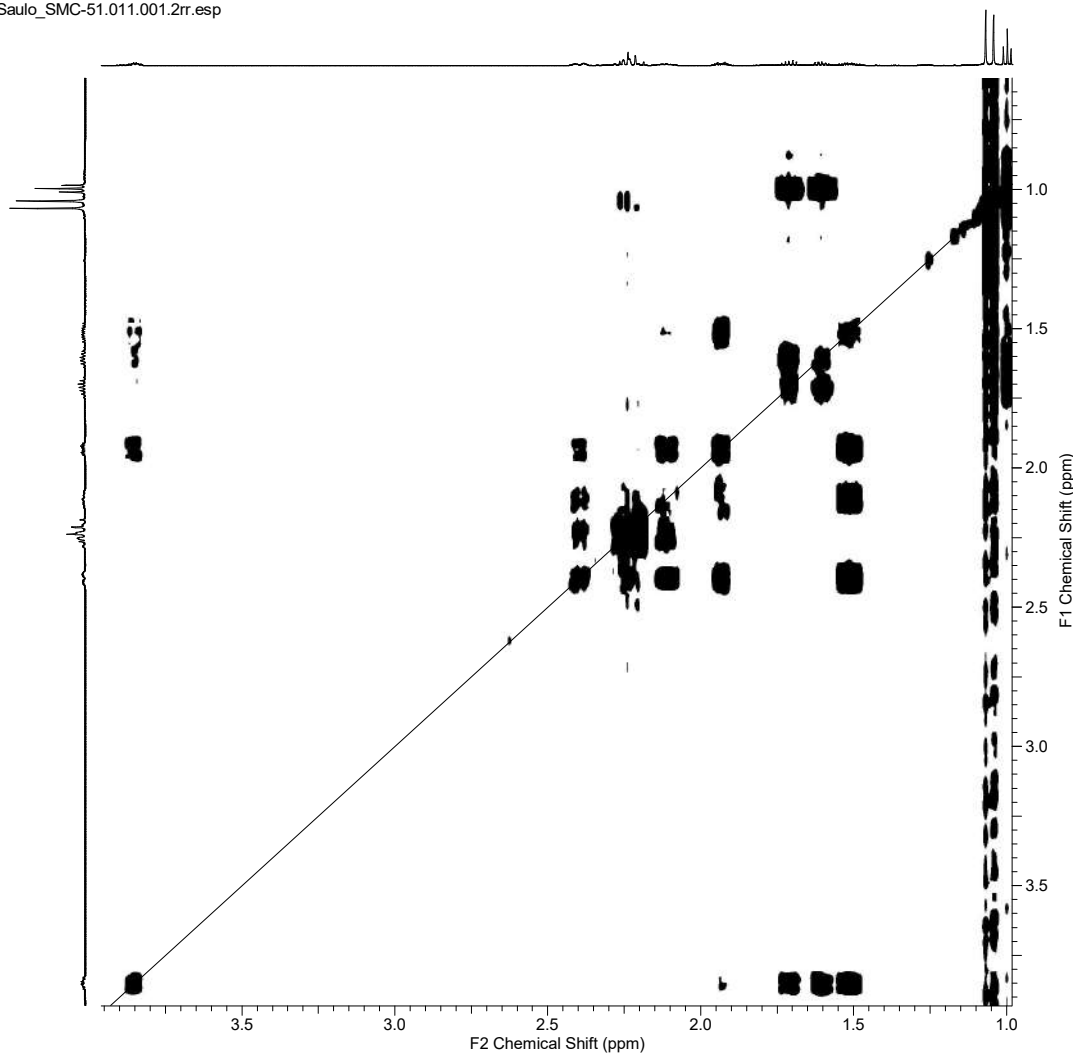


**Espectro E – 14.1 – ((RMN de <sup>1</sup>H, 600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) – Molécula 209**

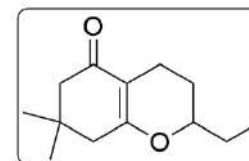
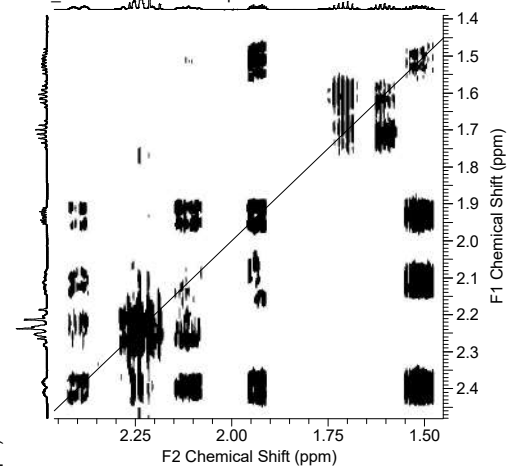


**Espectro E – 14.2 – (RMN de <sup>13</sup>C, 150,91 MHz, CDCl<sub>3</sub>) – Molécula 209**

Saulo\_SMC-51.011.001.2rr.esp



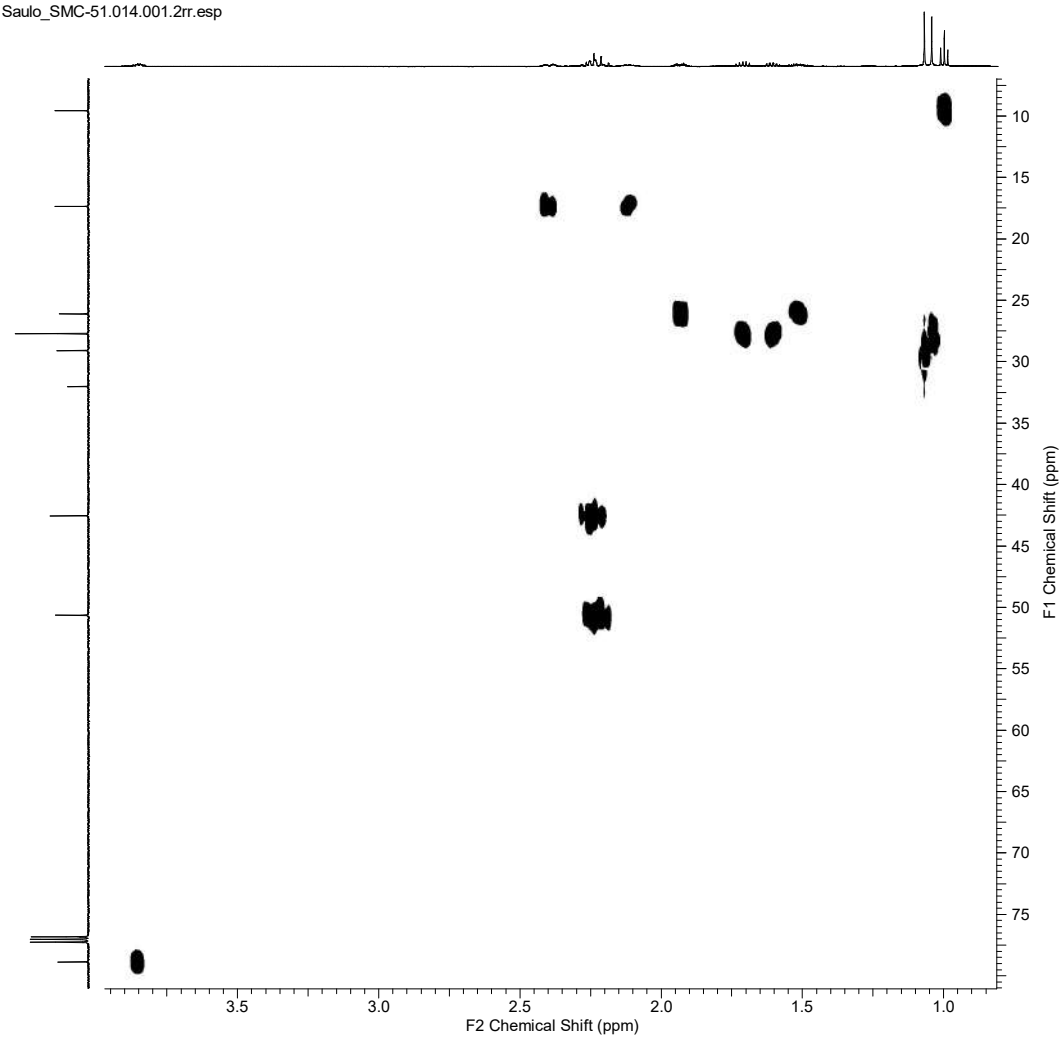
Saulo\_SMC-51.011.001.2rr.esp



**Espectro E – 14.3 – COSY  $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Molécula 209**

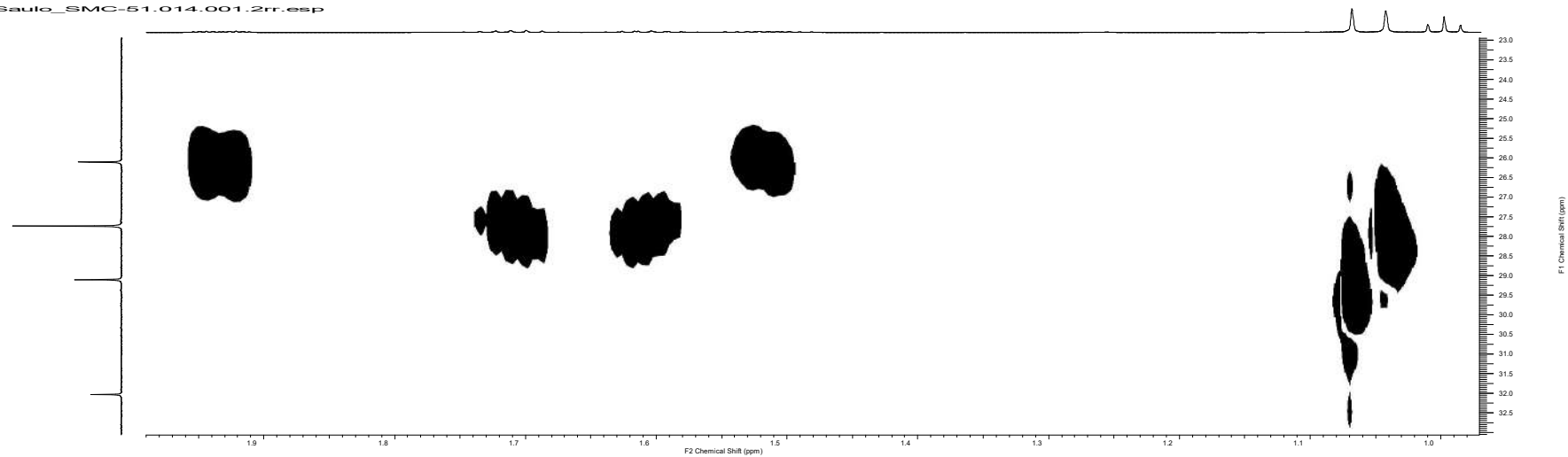


Saulo\_SMC-51.014.001.2rr.esp

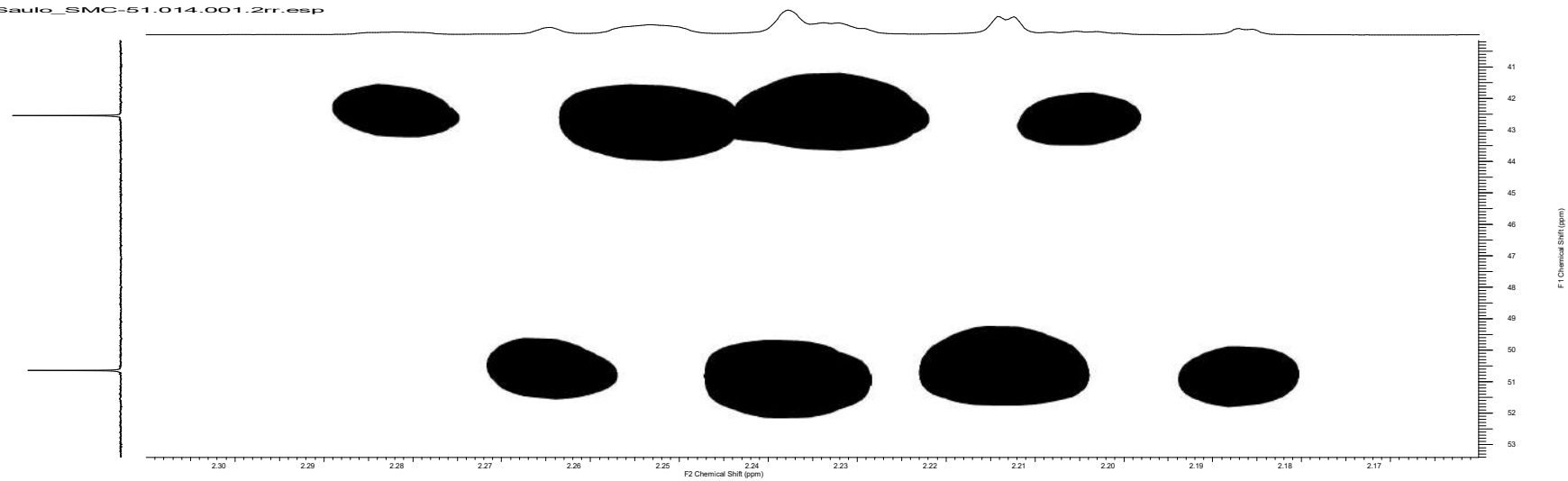


**Espectro E – 14.4 – HMQC (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) – Molécula 209**

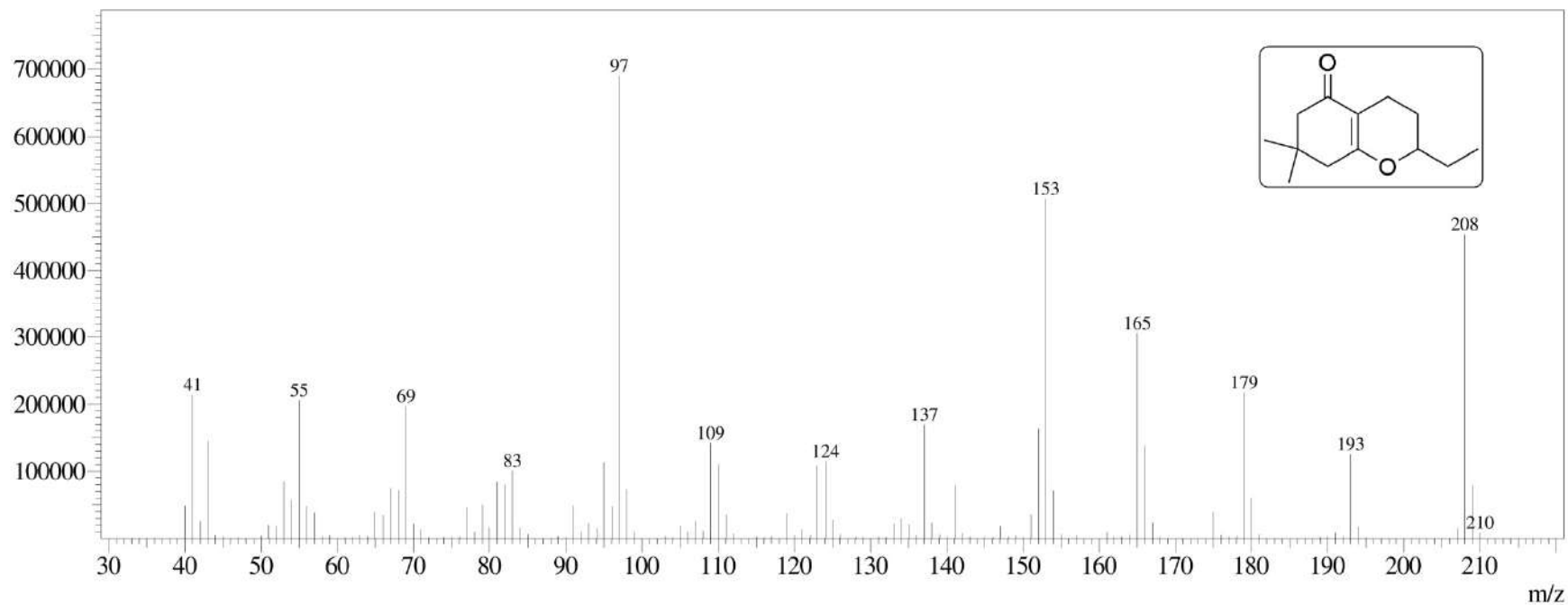
Saulo\_SMC-51.014.001.2rr.esp



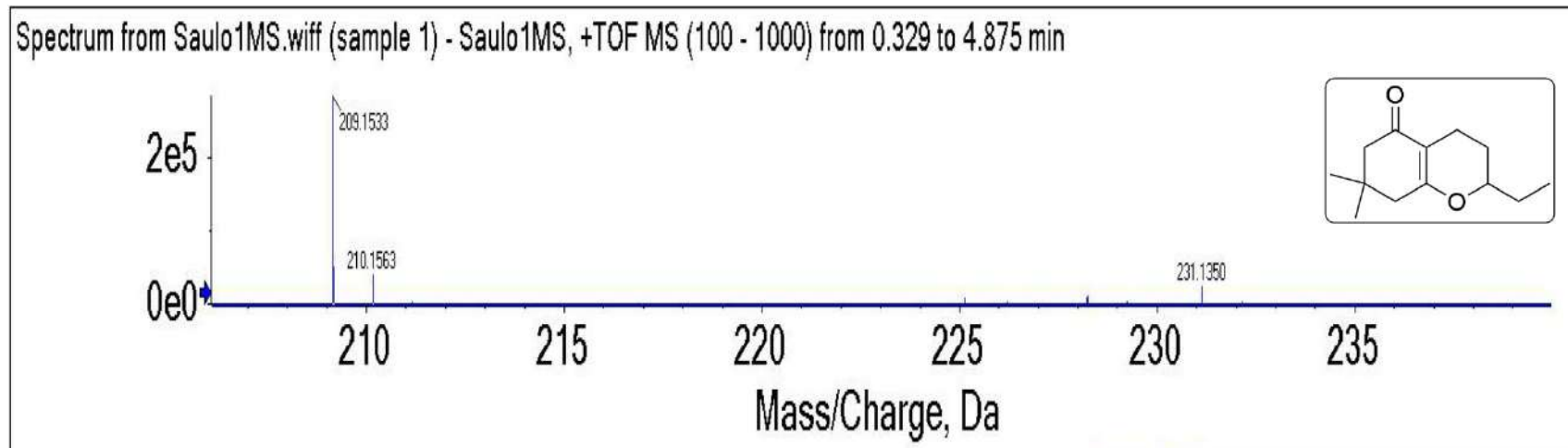
Saulo\_SMC-51.014.001.2rr.esp



**Espectro E – 14.4 – HMQC (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) – Molécula 209 (Ampliação)**

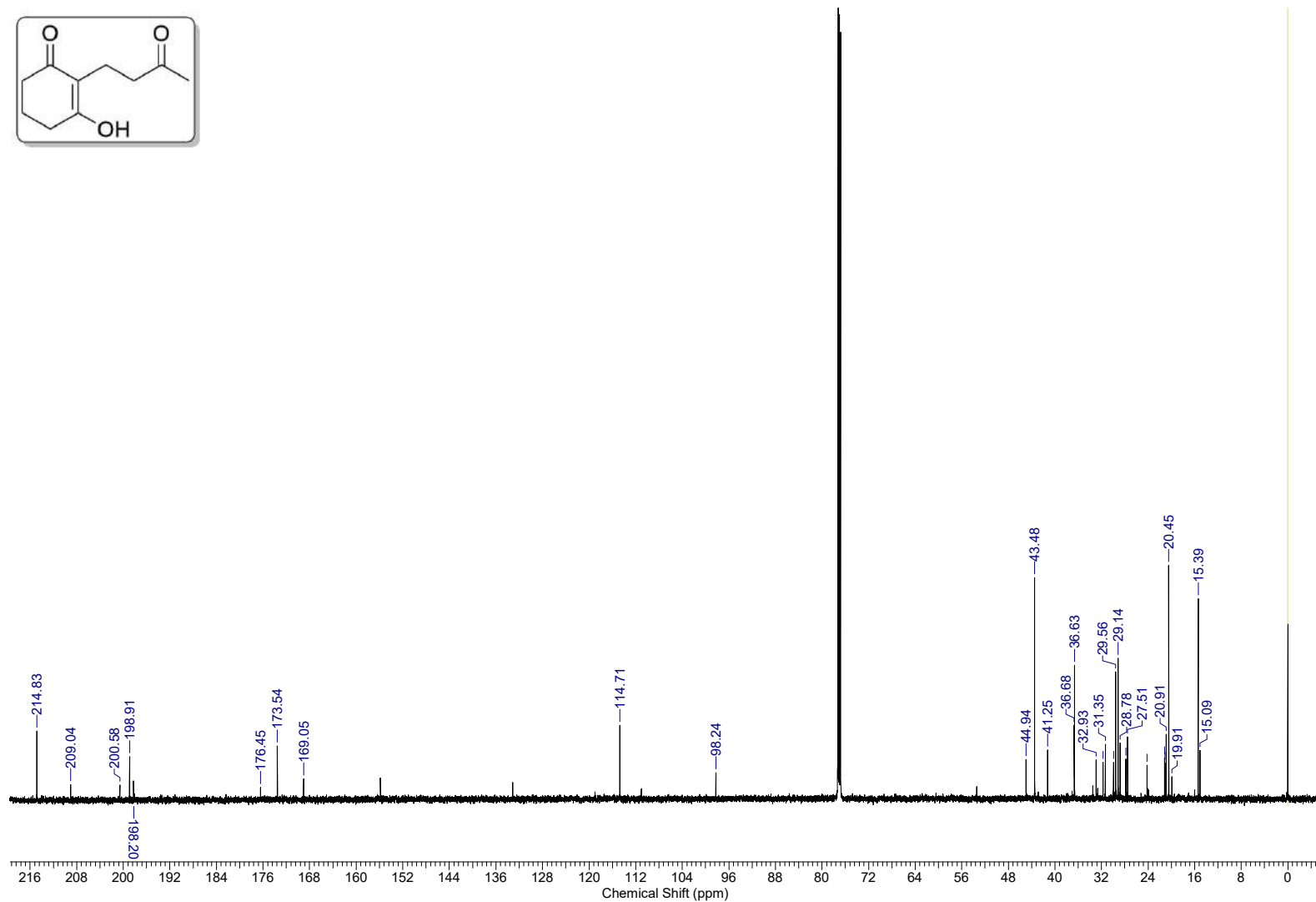
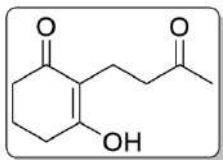


**Espectro E – 14.5 – [EM (70 eV)  $m/z$ ] – Molécula 209**

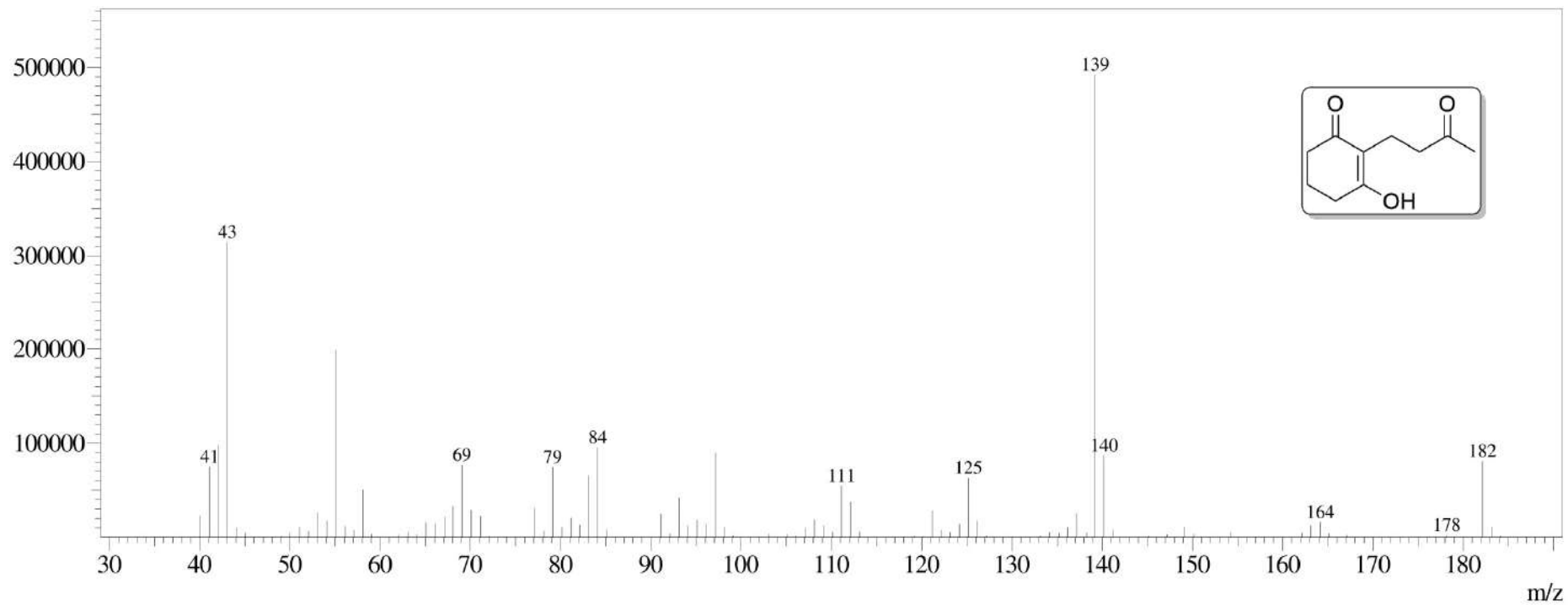


**Espectro E – 14.6 – EMAR (ESI-TOF)  $m/z$  calculado para  $C_{13}H_{21}O_2 = 209,1542$ ;  $[M + H]$  encontrado = 209,1533 – Molécula 209**

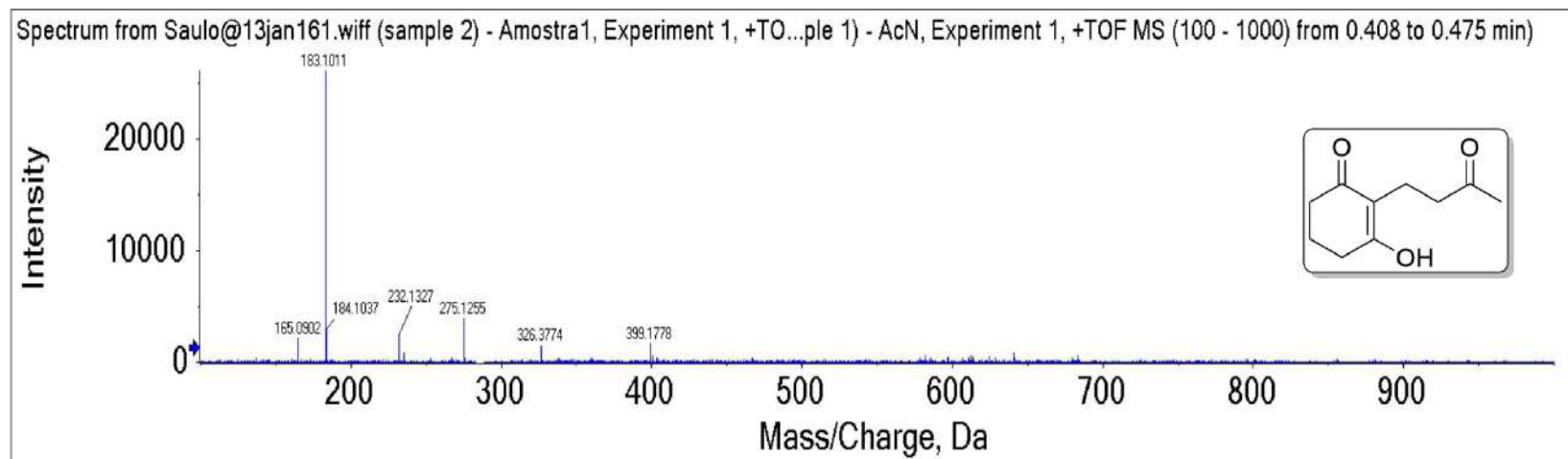




Espectro E – 15.2 – (RMN de  $^{13}\text{C}$ , 150,91 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Molécula 216

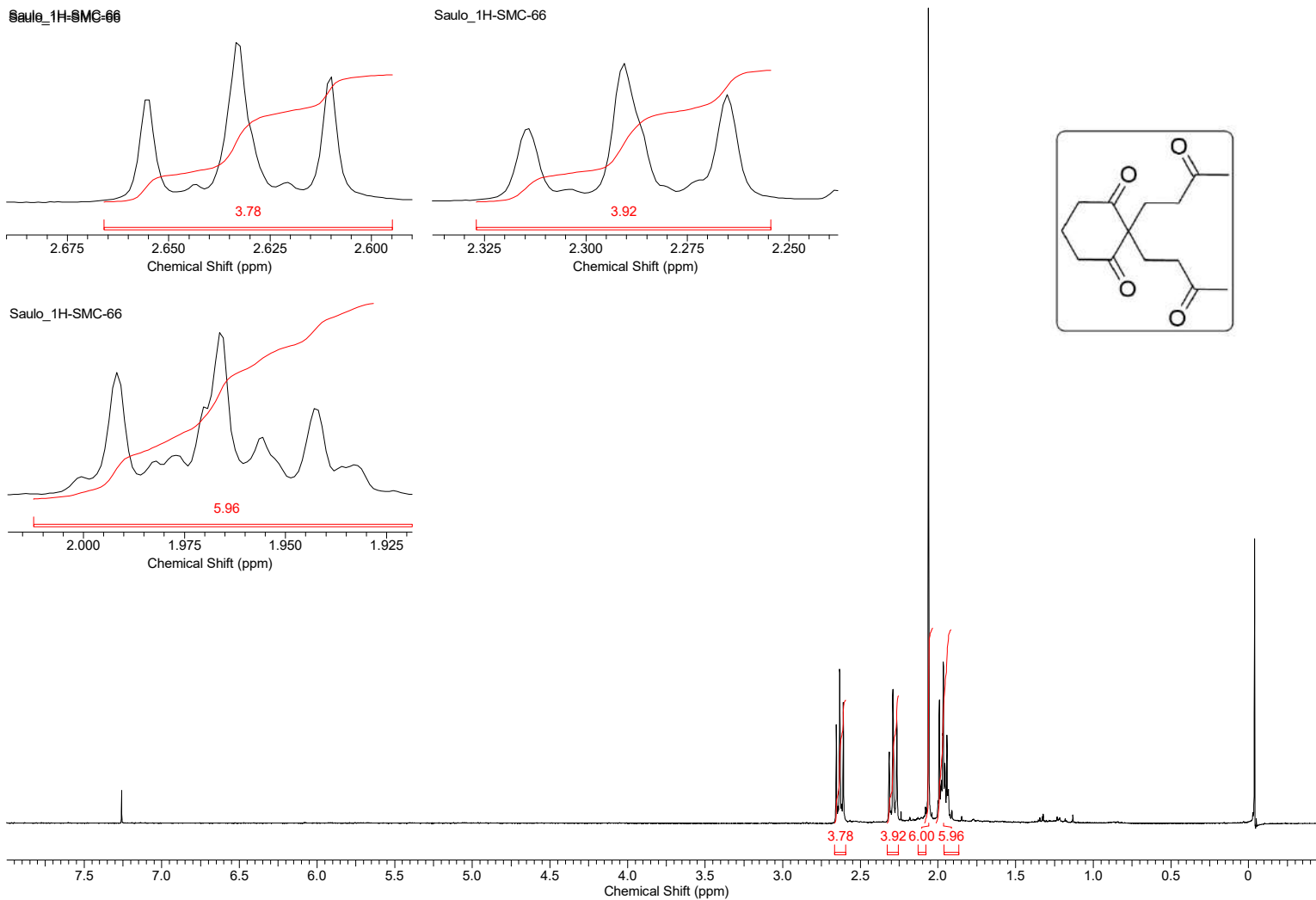


**Espectro E – 15.3 – [EM (70 eV)  $m/z$ ] – Molécula 216**

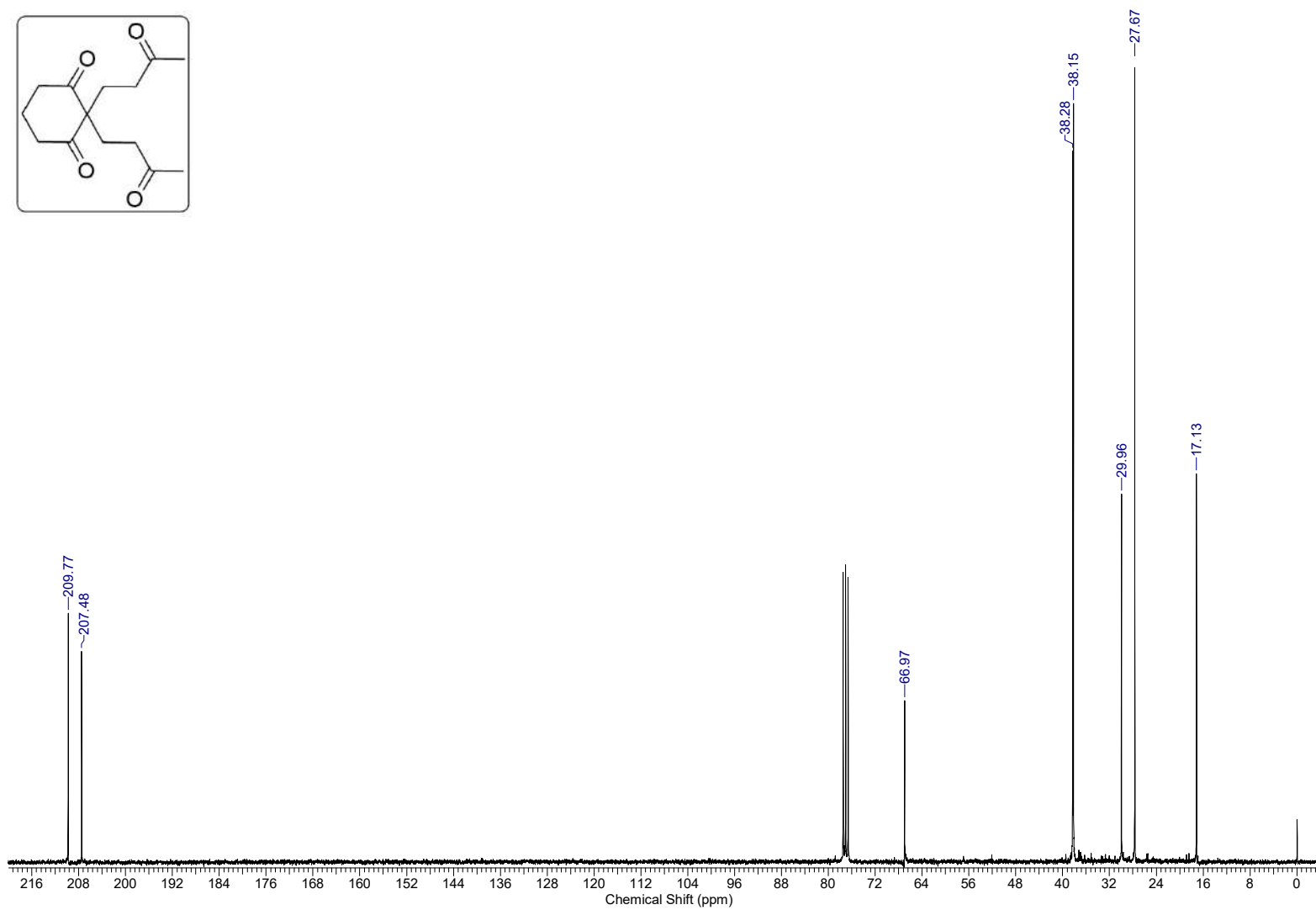
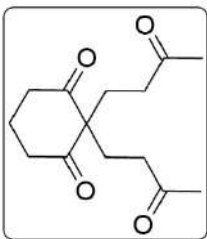


**Espectro E – 15.4 – EMAR (ESI-TOF)  $m/z$  calculado para  $C_{10}H_{15}O_3 = 183,1021$ ;  $[M + H]$  encontrado = 183,1011 – Molécula 216**

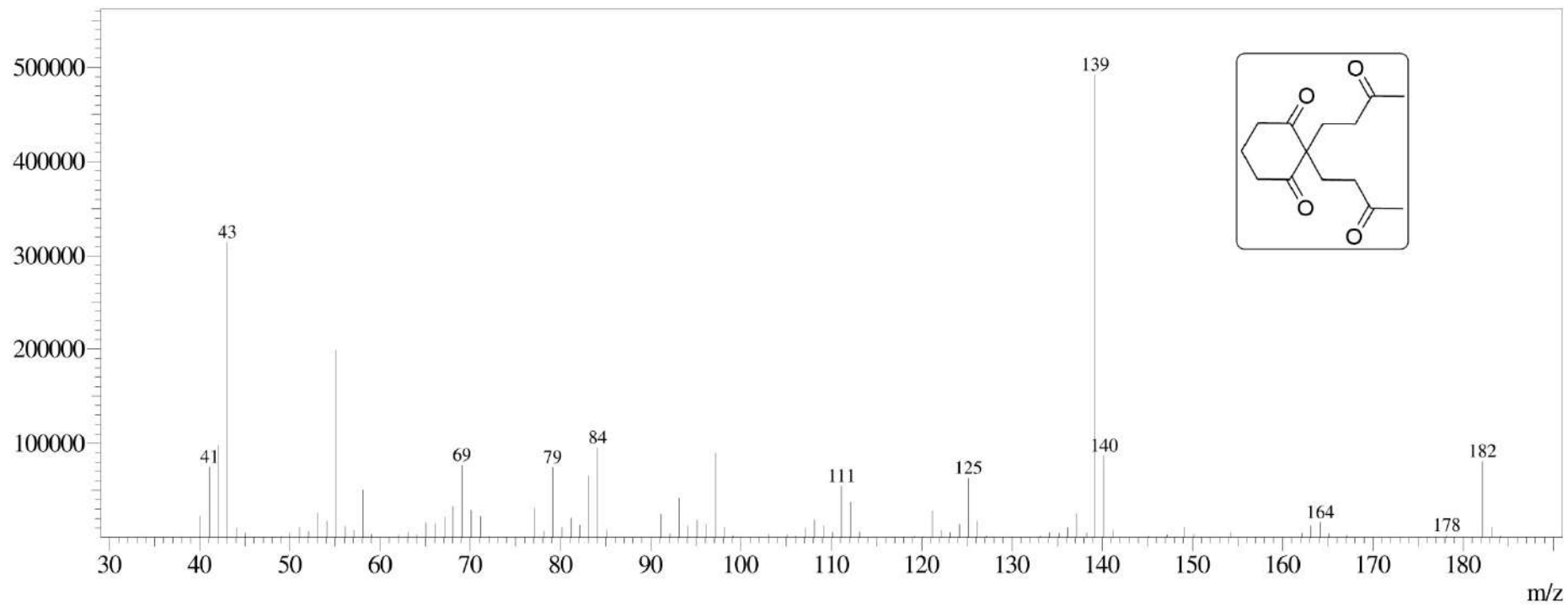




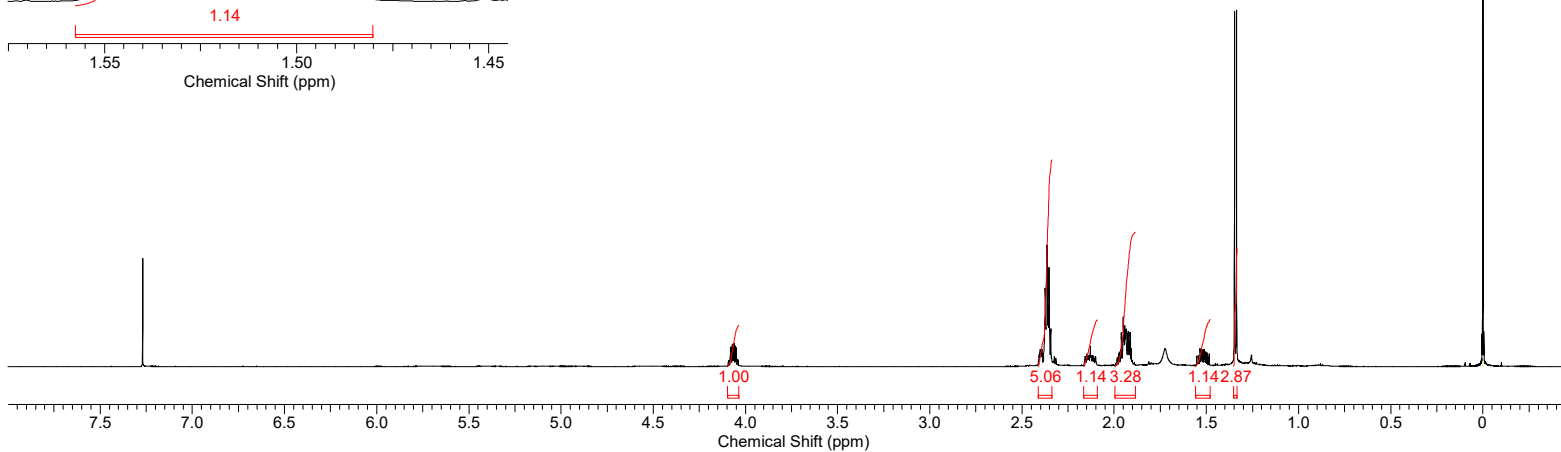
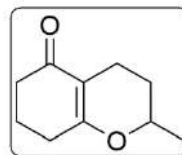
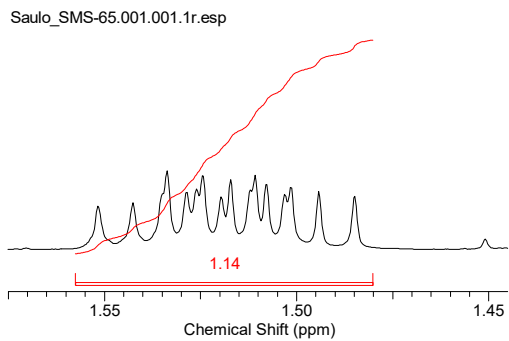
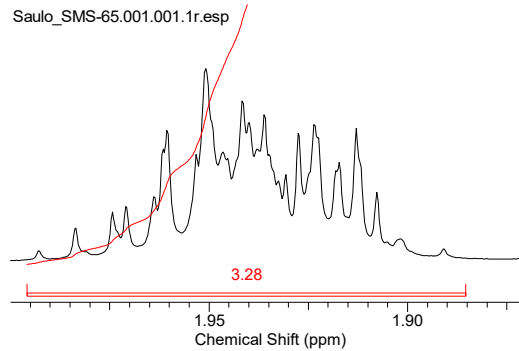
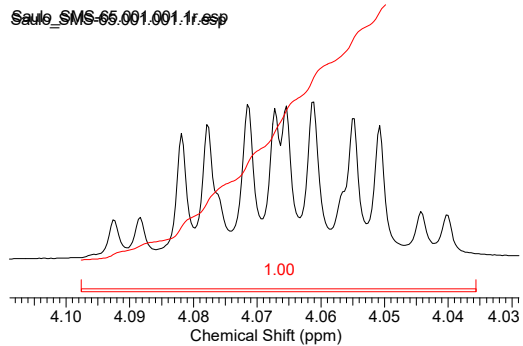
**Espectro E – 16.1 – (RMN de  $^1\text{H}$ , 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Molécula 217**



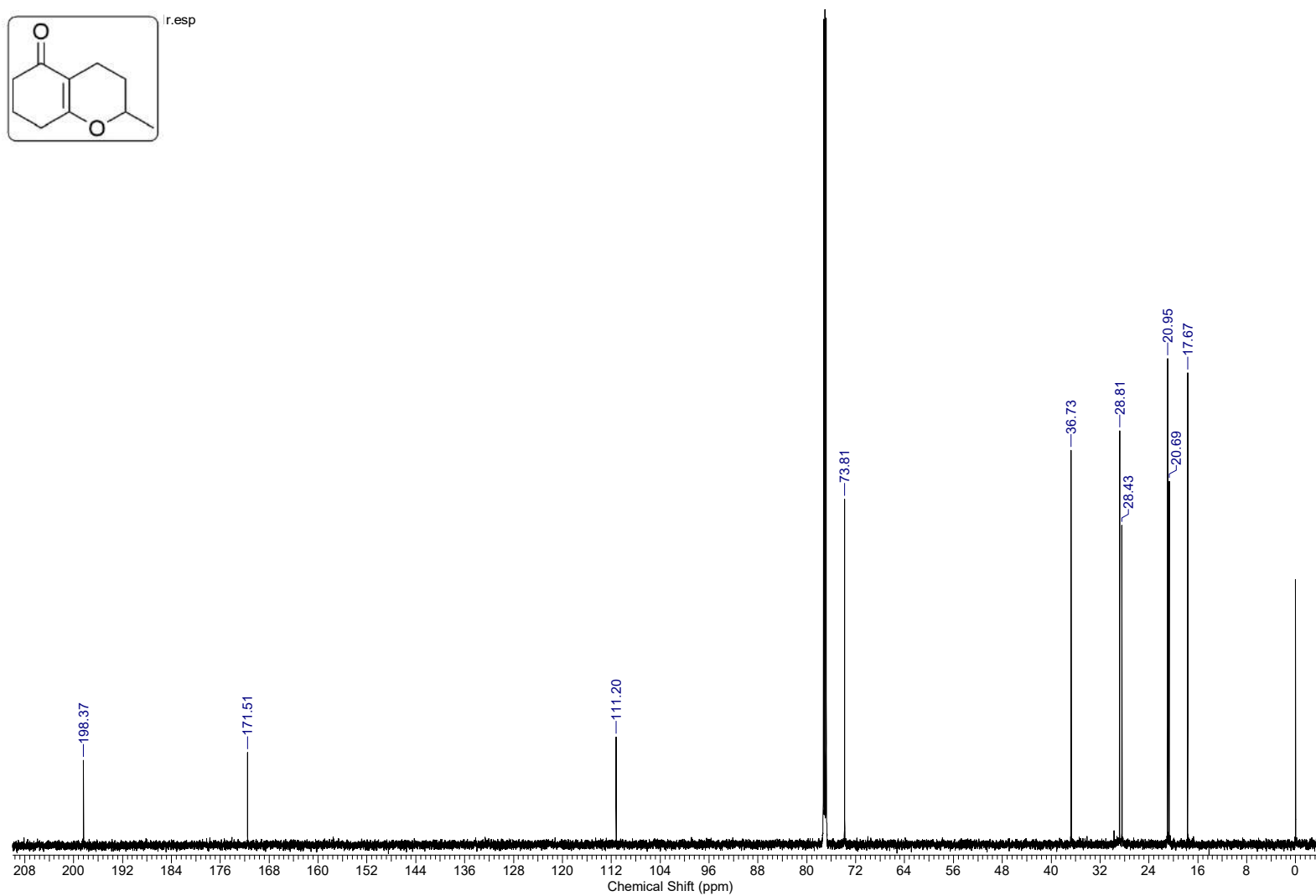
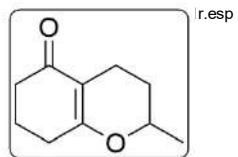
Espectro E – 16.2 – (RMN de  $^{13}\text{C}$ , 150,91 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Molécula 217



**Espectro E – 16.3 – [EM (70 eV)  $m/z$ ] – Molécula 217**

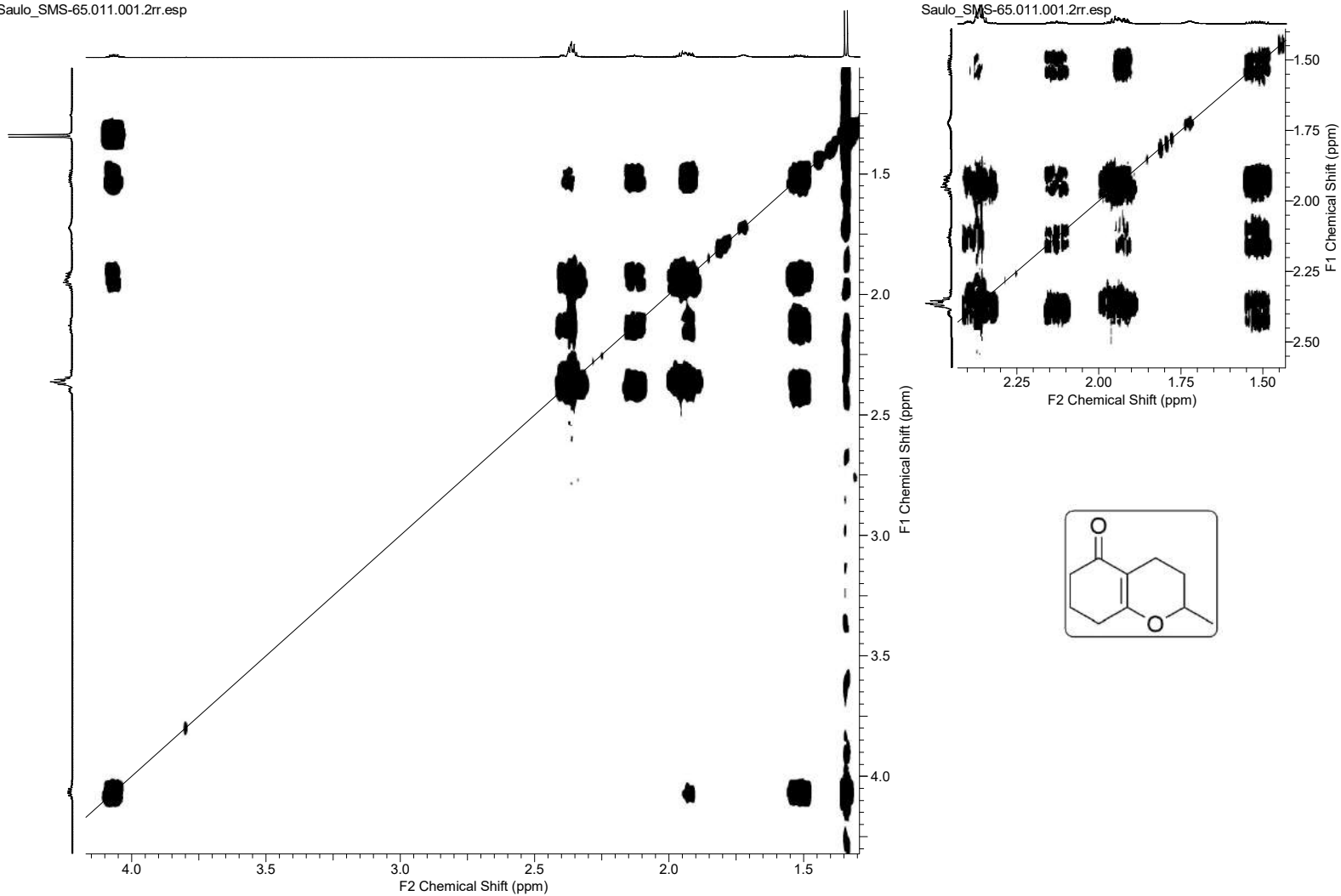


**Espectro E – 17.1 – ((RMN de  $^1\text{H}$ , 600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Molécula 138**



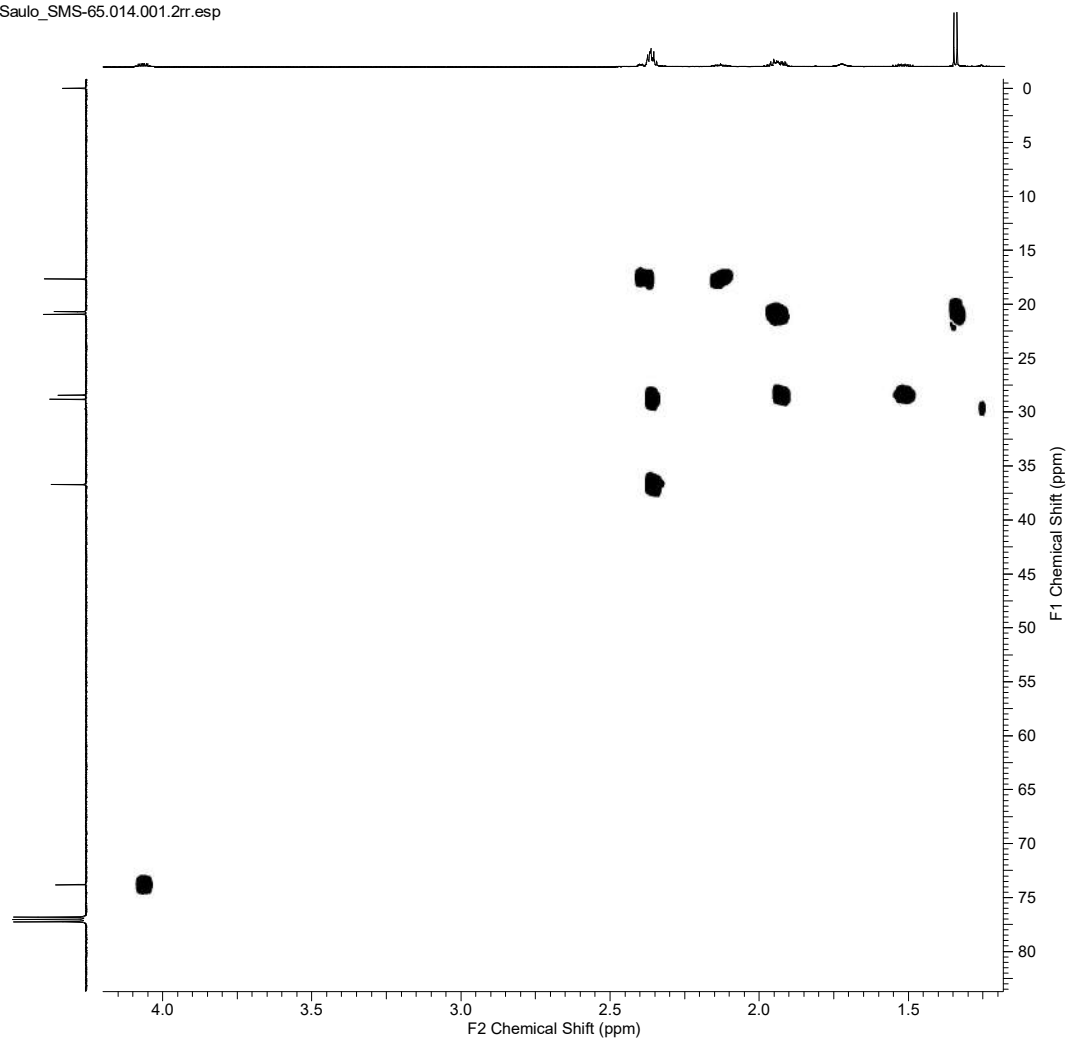
Espectro E – 17.2 – (RMN de  $^{13}\text{C}$ , 150,91 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Molécula 138

Saulo\_SMS-65.011.001.2rr.esp

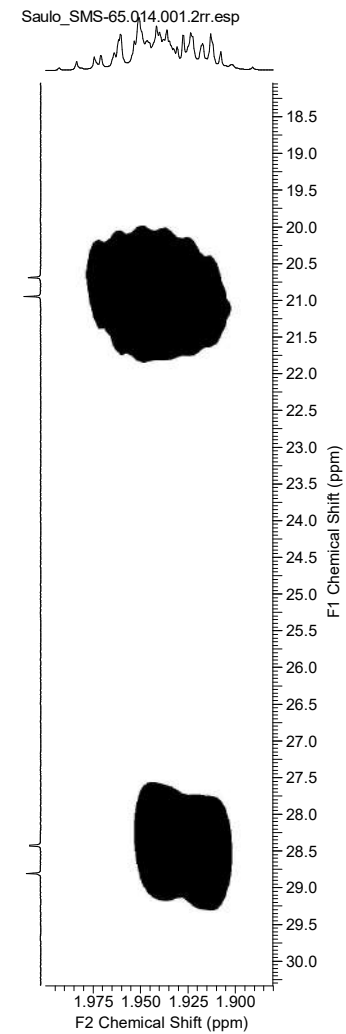
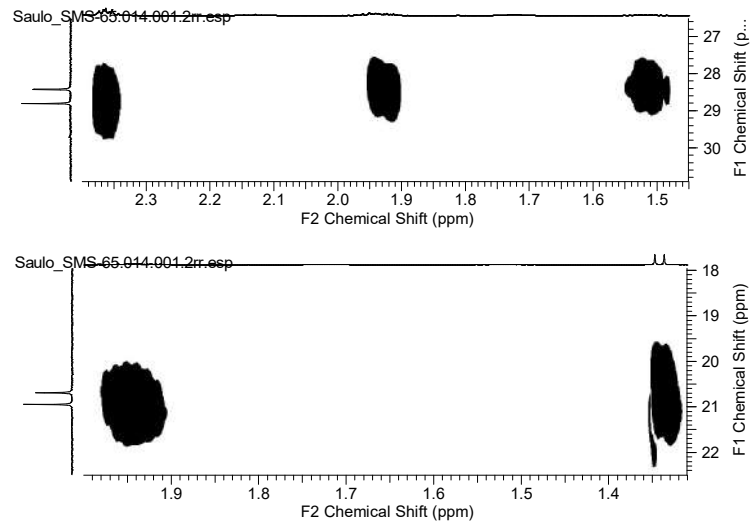
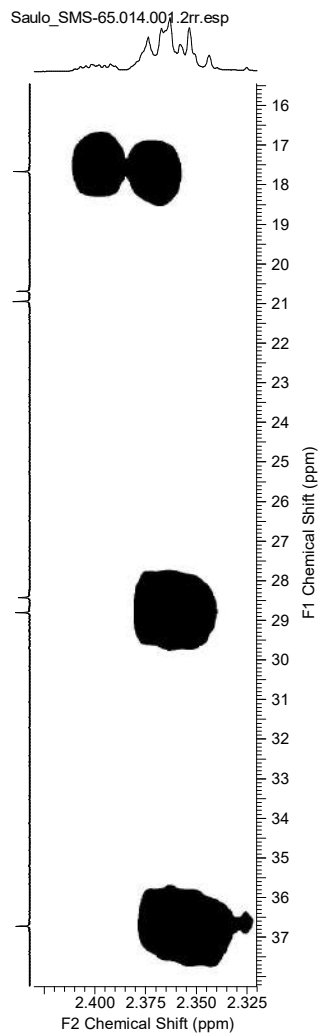


**Espectro E – 17.3 – COSY  $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Molécula 138**

Saulo\_SMS-65.014.001.2rr.esp

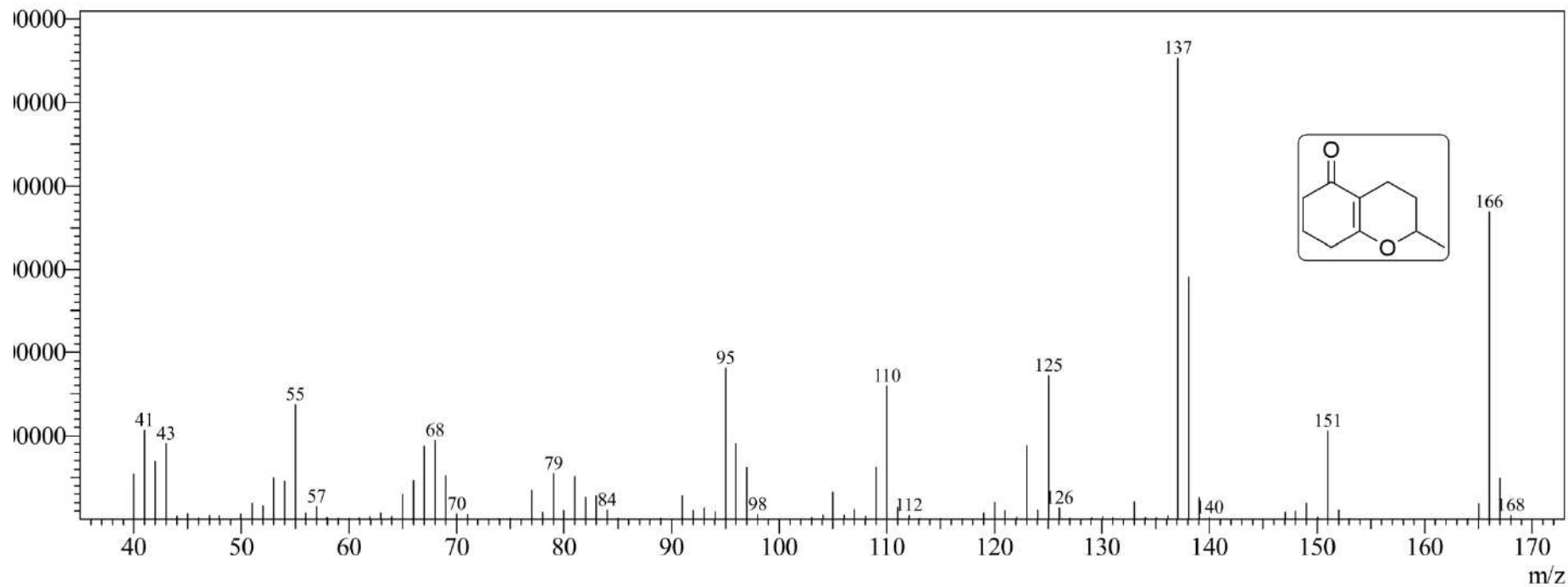


**Espectro E – 17.4 – HMQC (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) – Molécula 138**

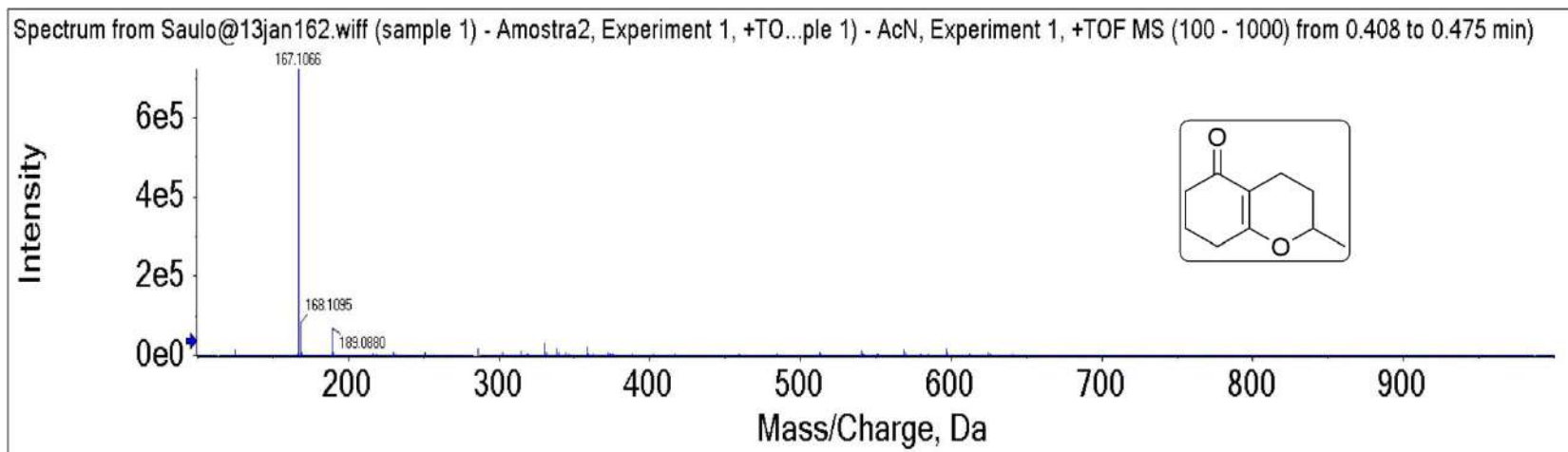


**Espectro E – 17.4 – HMQC (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Molécula 138 (Ampliação)**

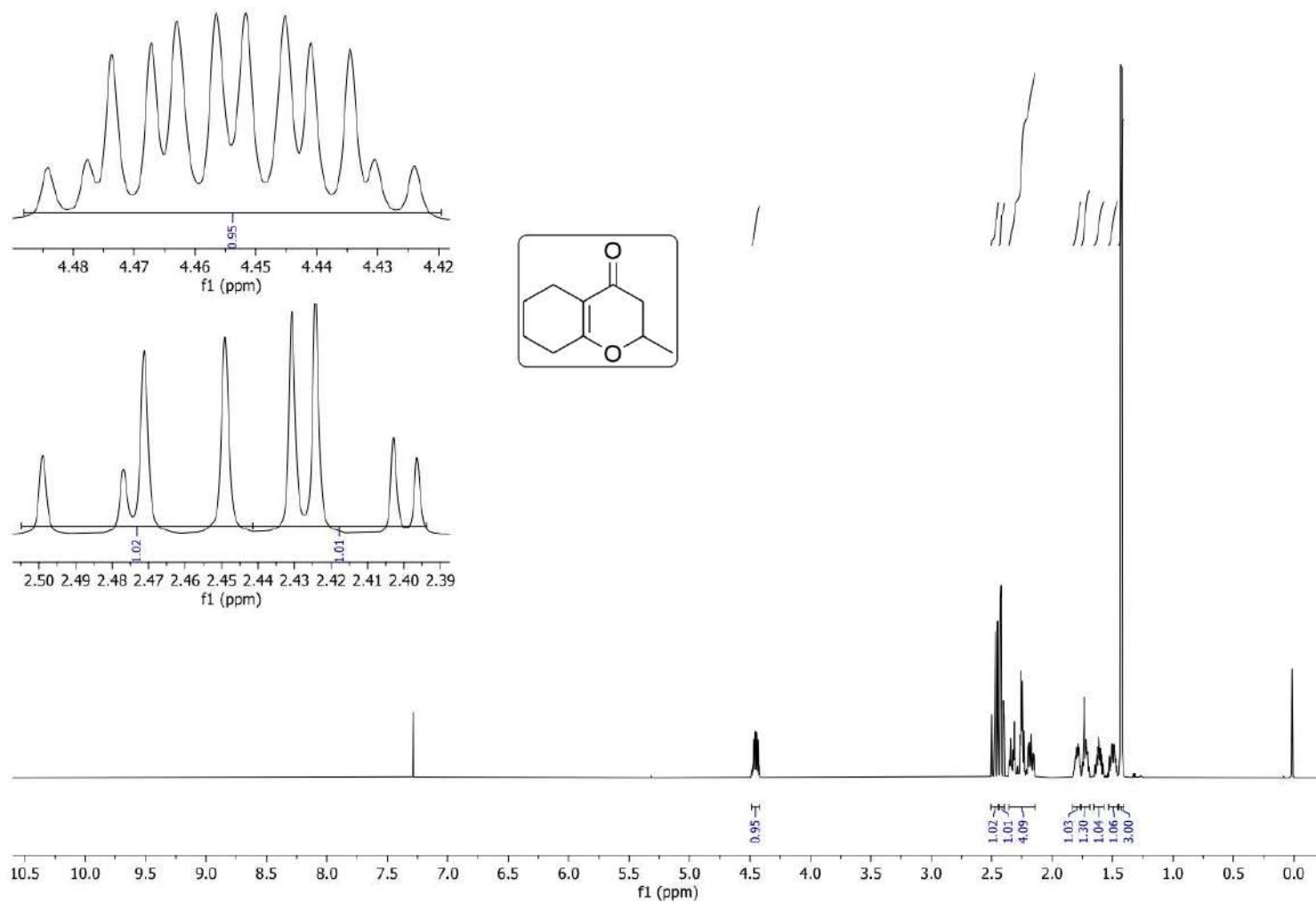




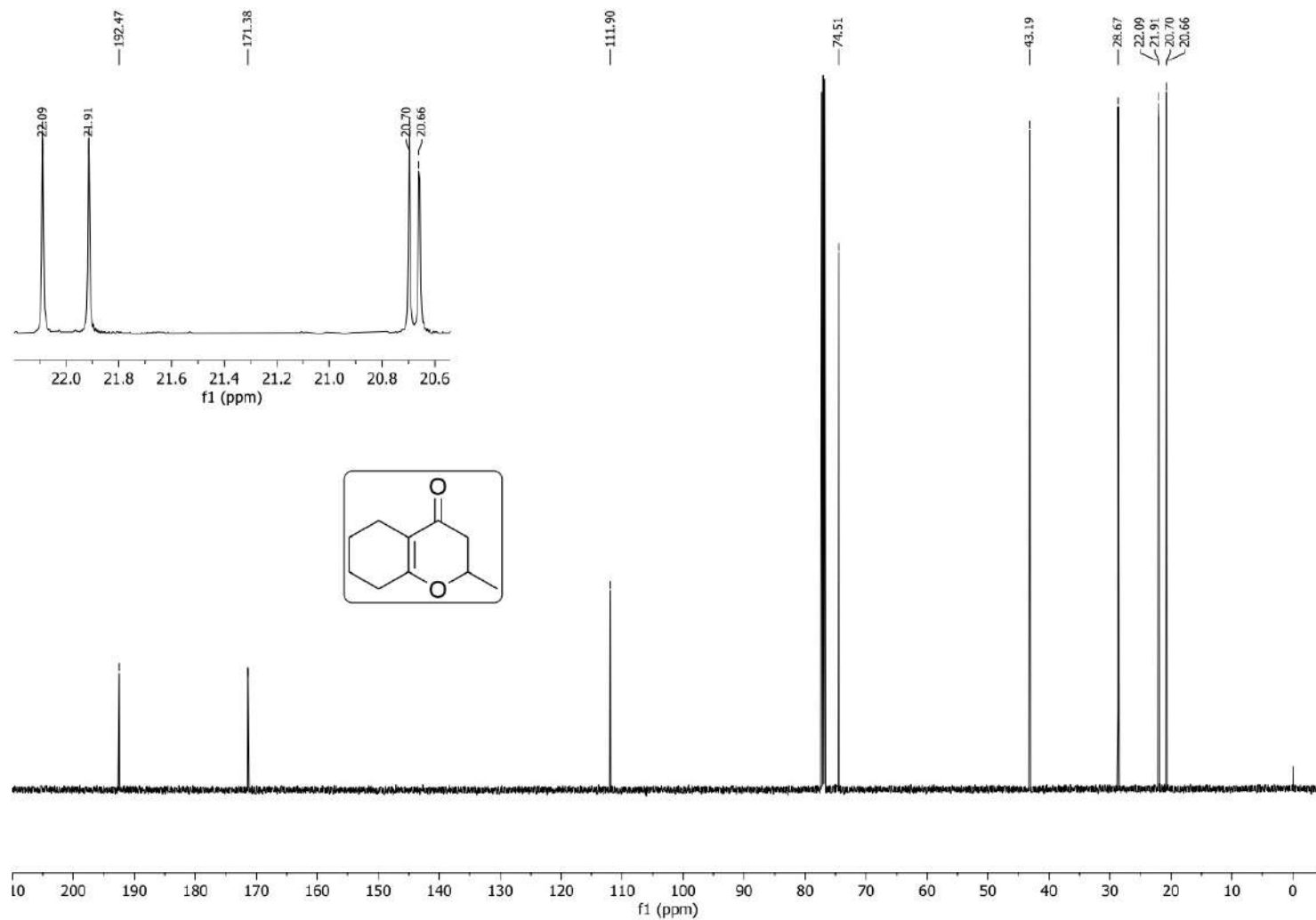
**Espectro E – 17.5 – [EM (70 eV)  $m/z$ ] – Molécula 138**



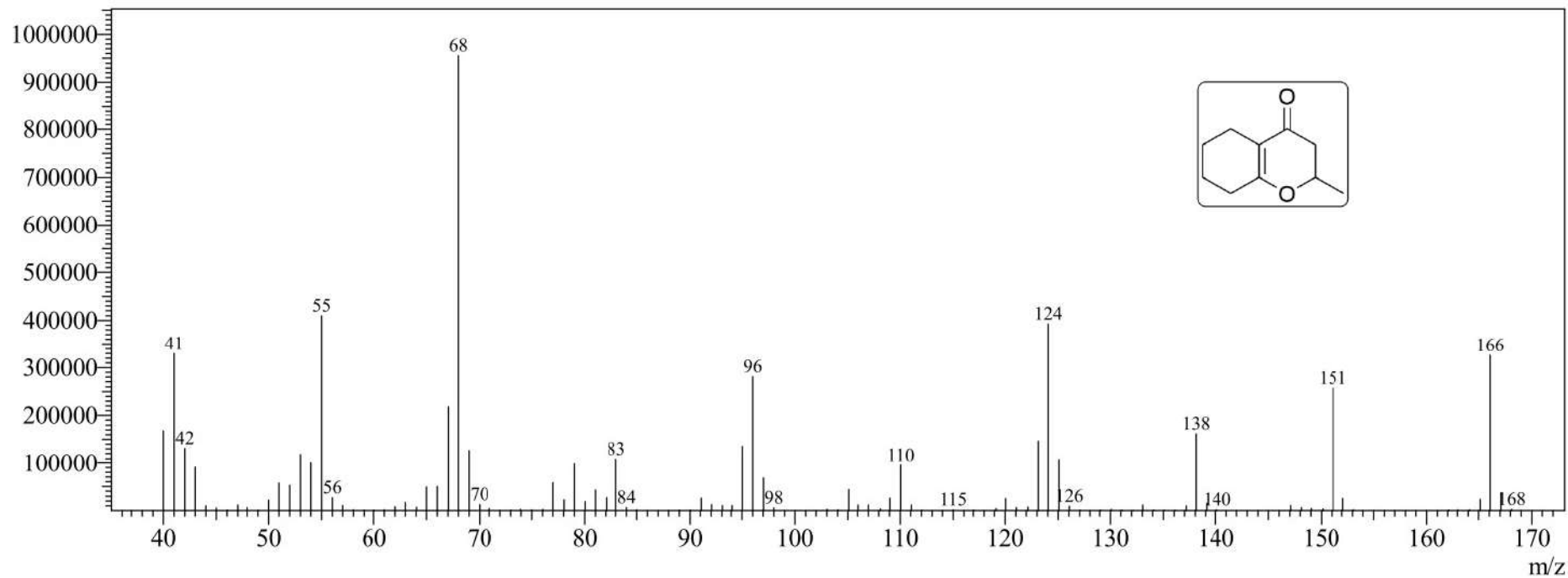
**Espectro E – 17.6 – EMAR (ESI-TOF)  $m/z$  calculado para  $C_{10}H_{15}O_2 = 167,1062$ ;  $[M + H]$  encontrado = 167,1066 – Molécula 138**



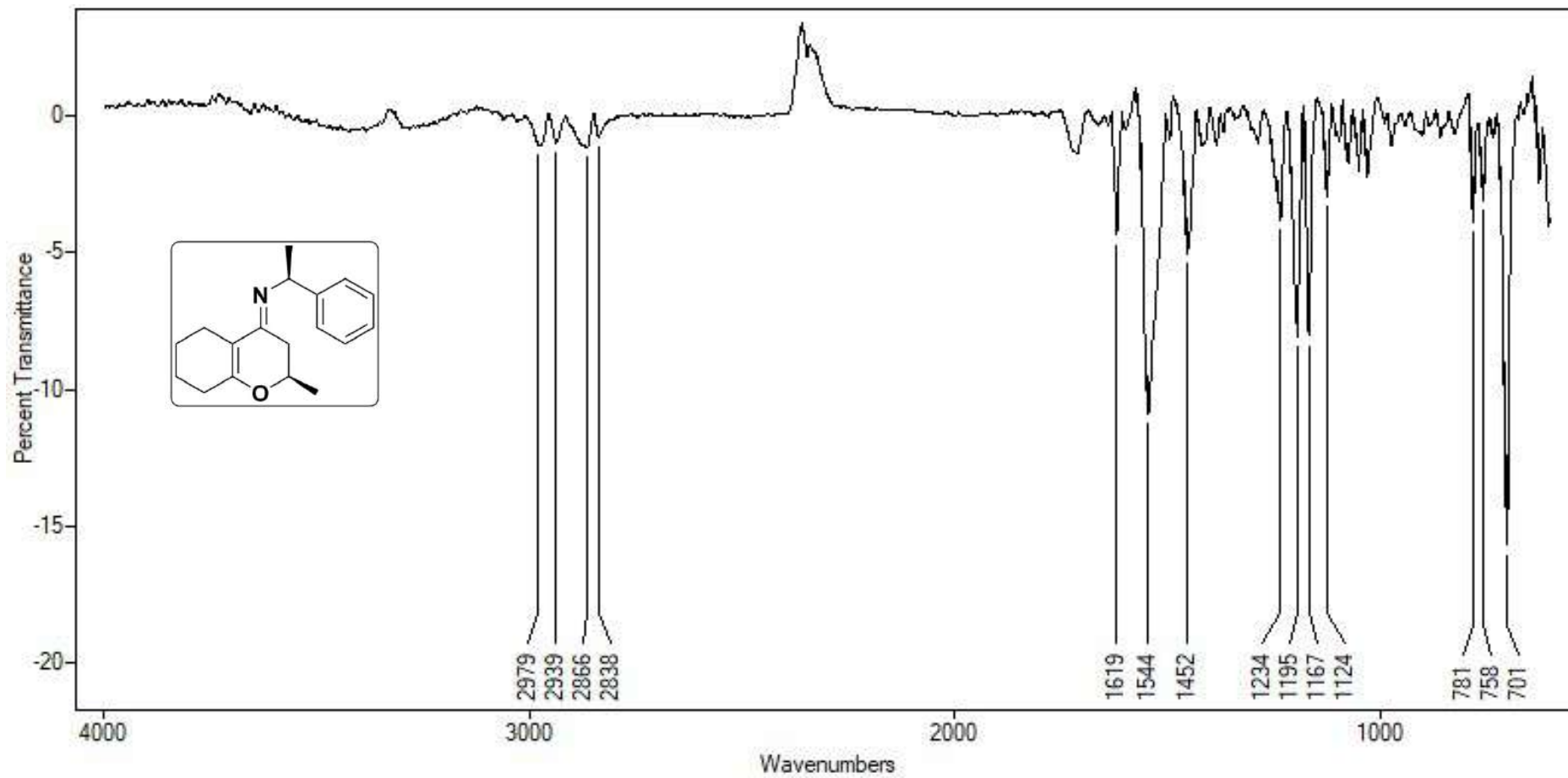
**Espectro E – 18.1 – ((RMN de <sup>1</sup>H, 600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) – Molécula 139**



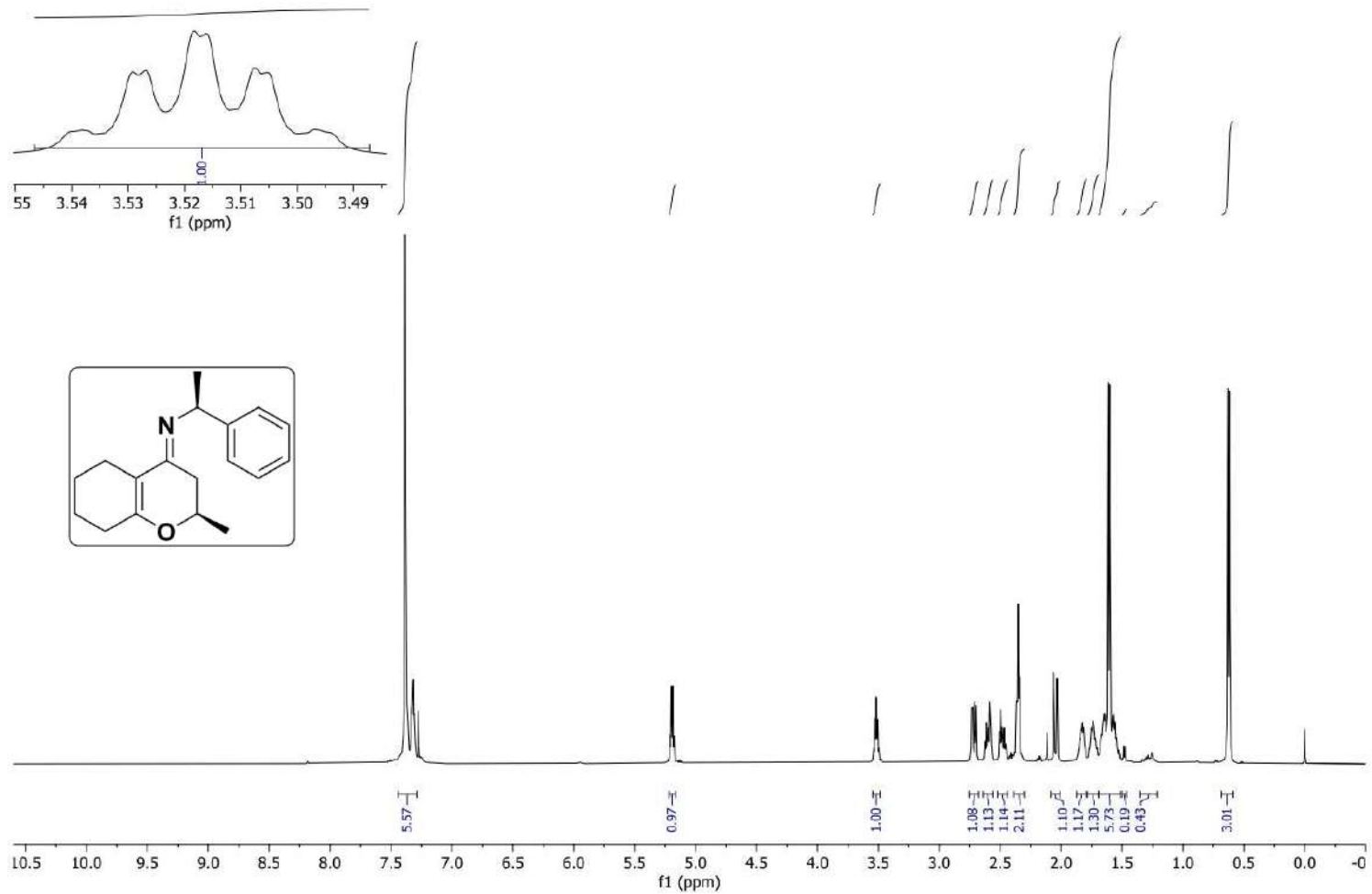
**Espectro E – 18.2 – (RMN de  $^{13}\text{C}$ , 150,91 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Molécula 139**



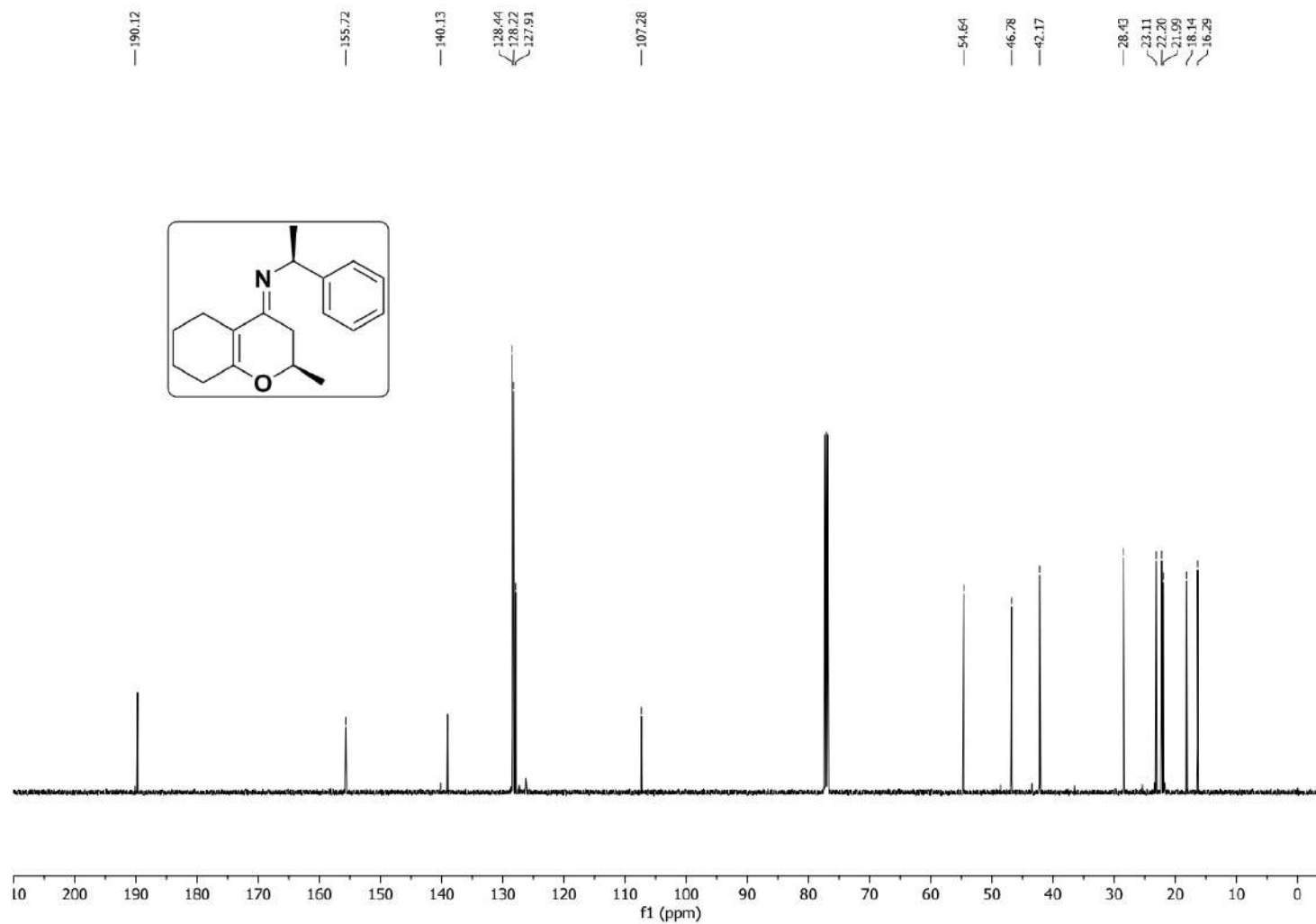
**Espectro E – 18.3 – [EM (70 eV)  $m/z$ ] – Molécula 139**



Espectro E – 19.1 – [IV (ATR) cm<sup>-1</sup>] – Molécula (R,S)-222

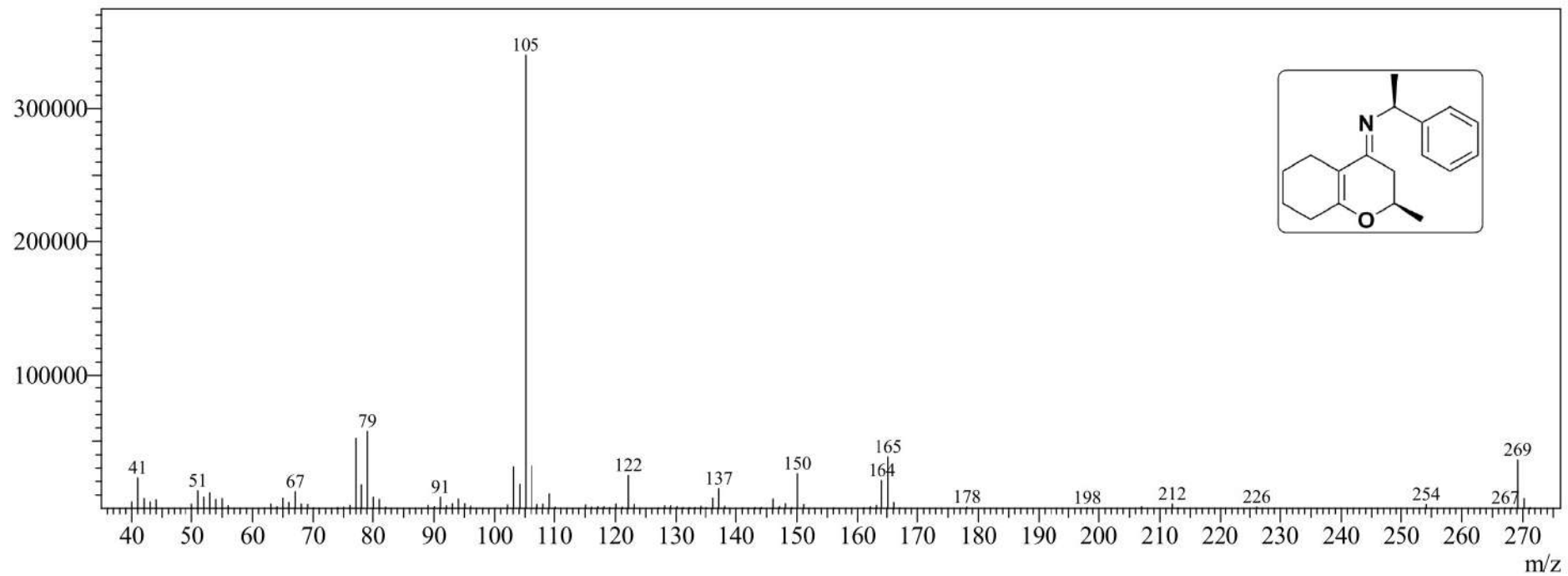


**Espectro E – 19.2 – ((RMN de  $^1\text{H}$ , 600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Molécula (R,S)-222**

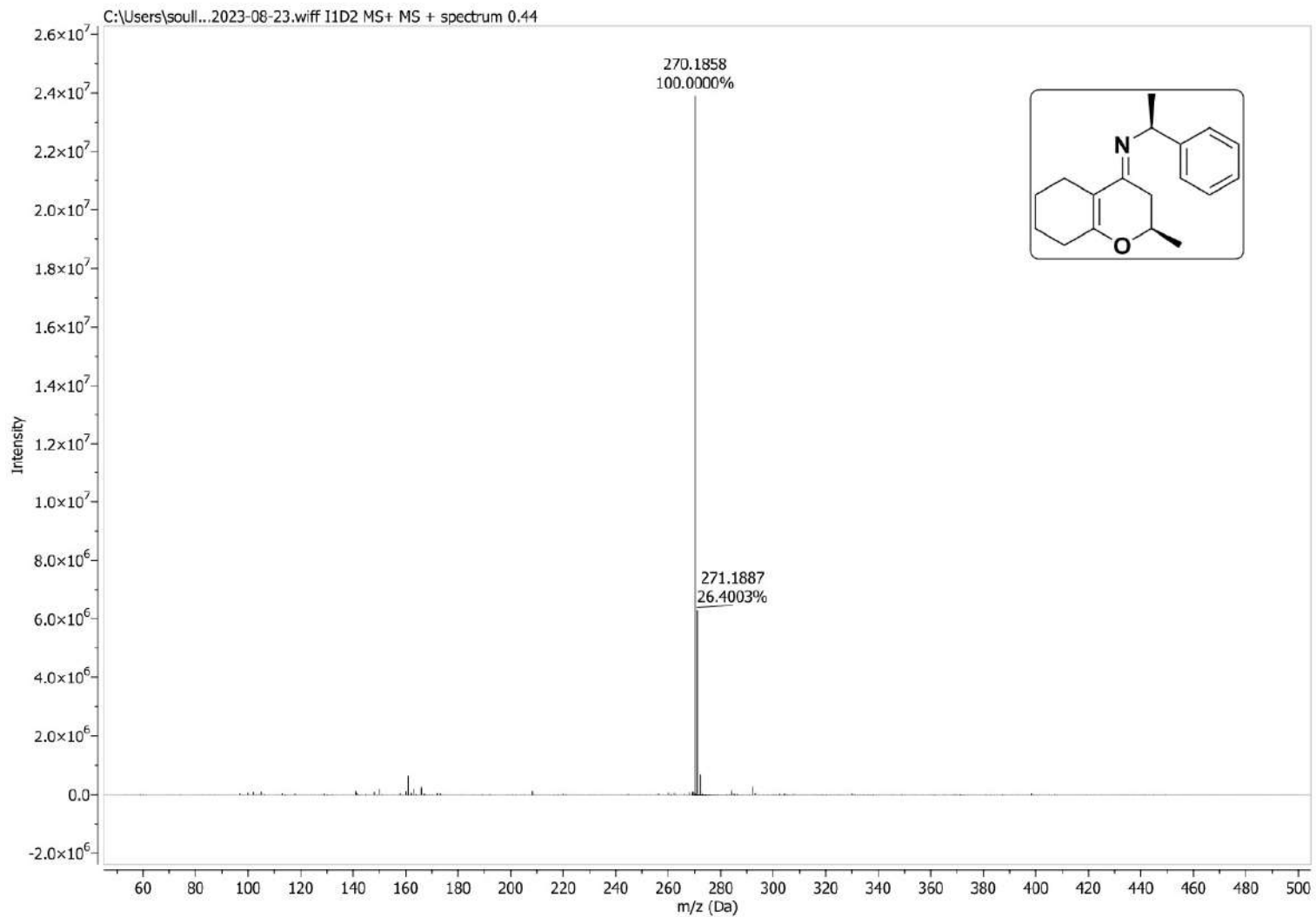


Espectro E – 19.3 – (RMN de  $^{13}\text{C}$ , 150,91 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Molécula (R,S)-222

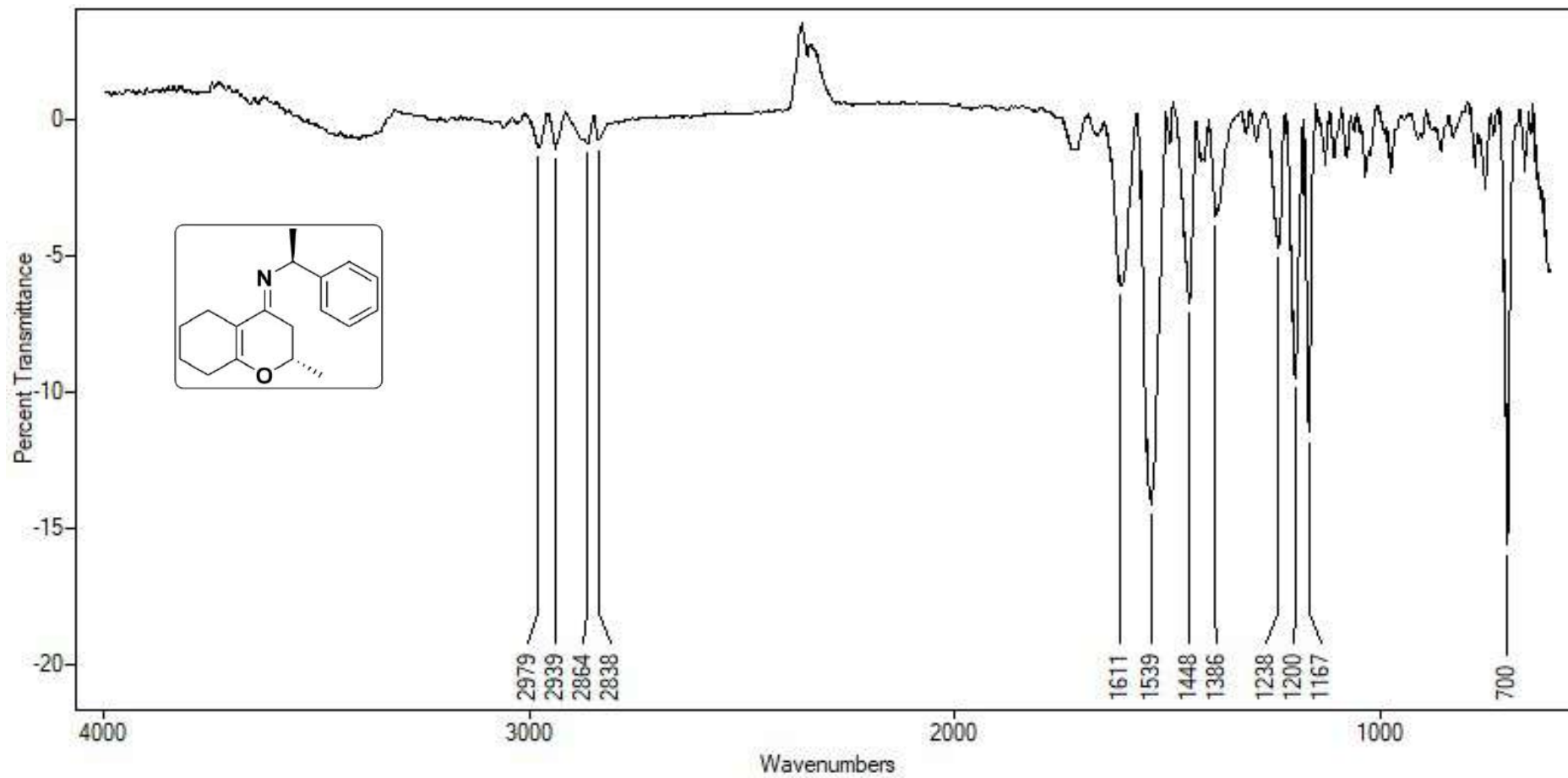




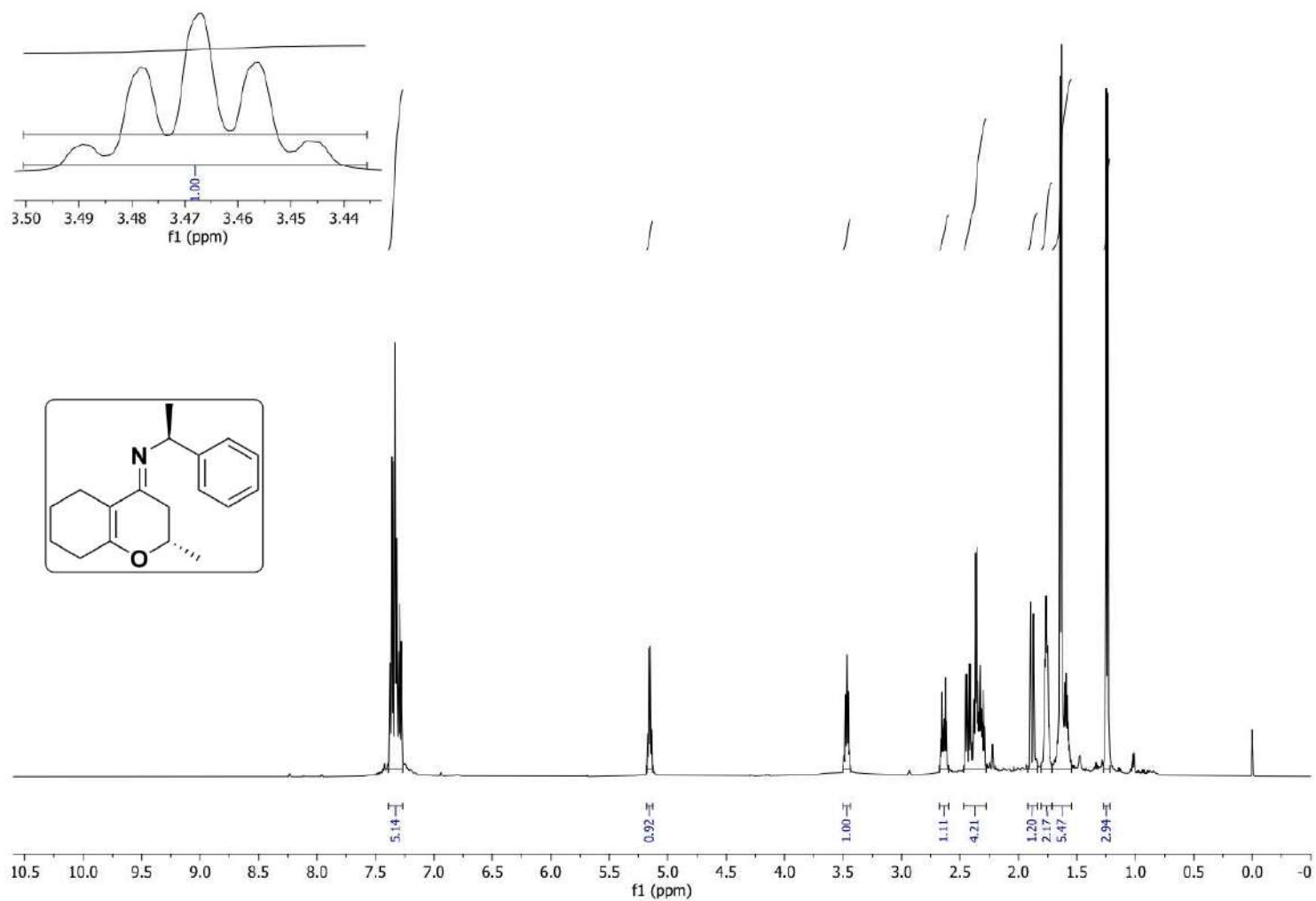
**Espectro E – 19.4 – [EM (70 eV)  $m/z$ ] – Molécula (R,S)-222**



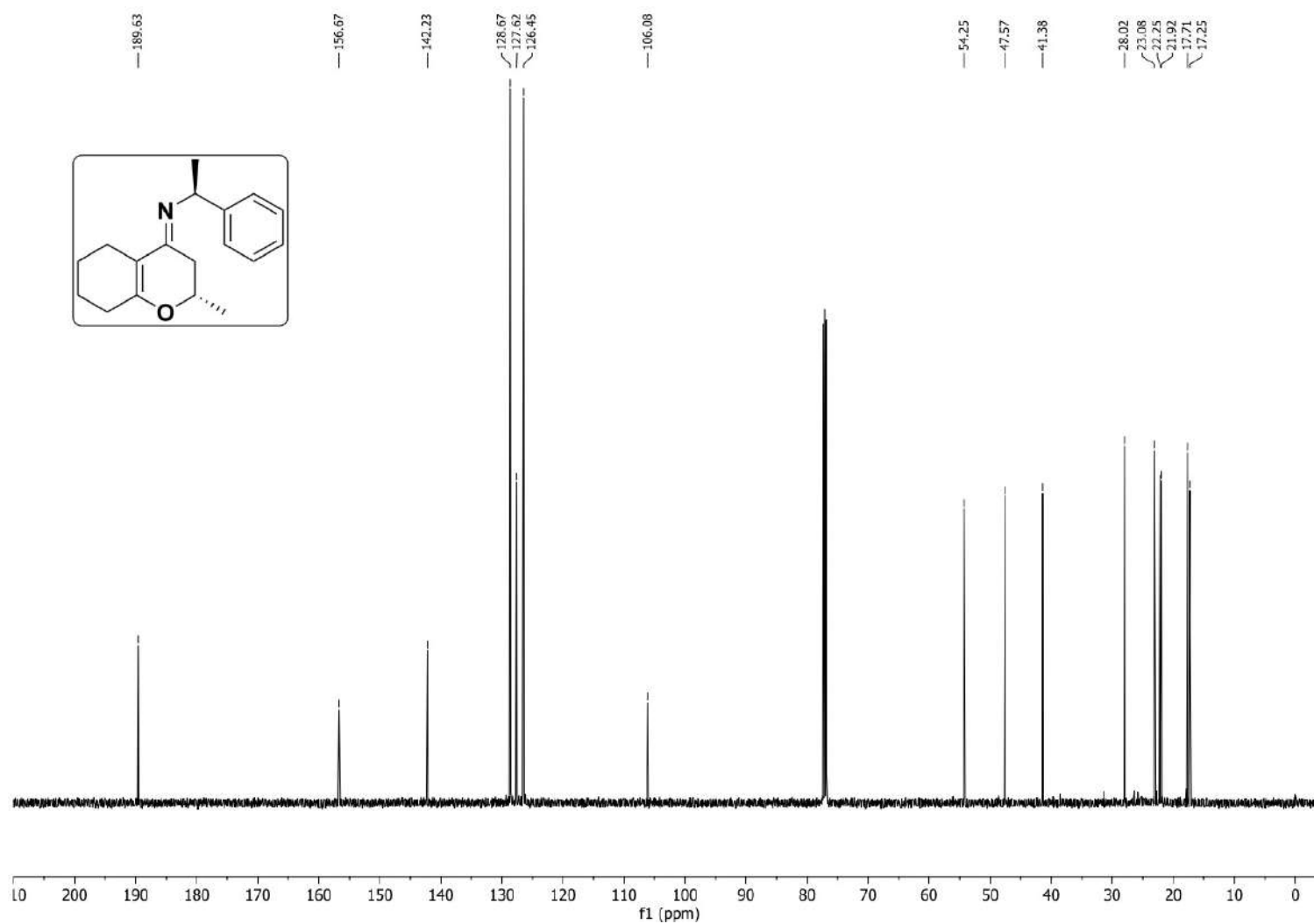
**Espectro E – 19.5 – EMAR (ESI-TOF)  $m/z$  calculado para  $C_{18}H_{24}NO = 270,1858$ ;  $[M + H]$  encontrado = 270,1858 – Molécula (*R,S*)-222**



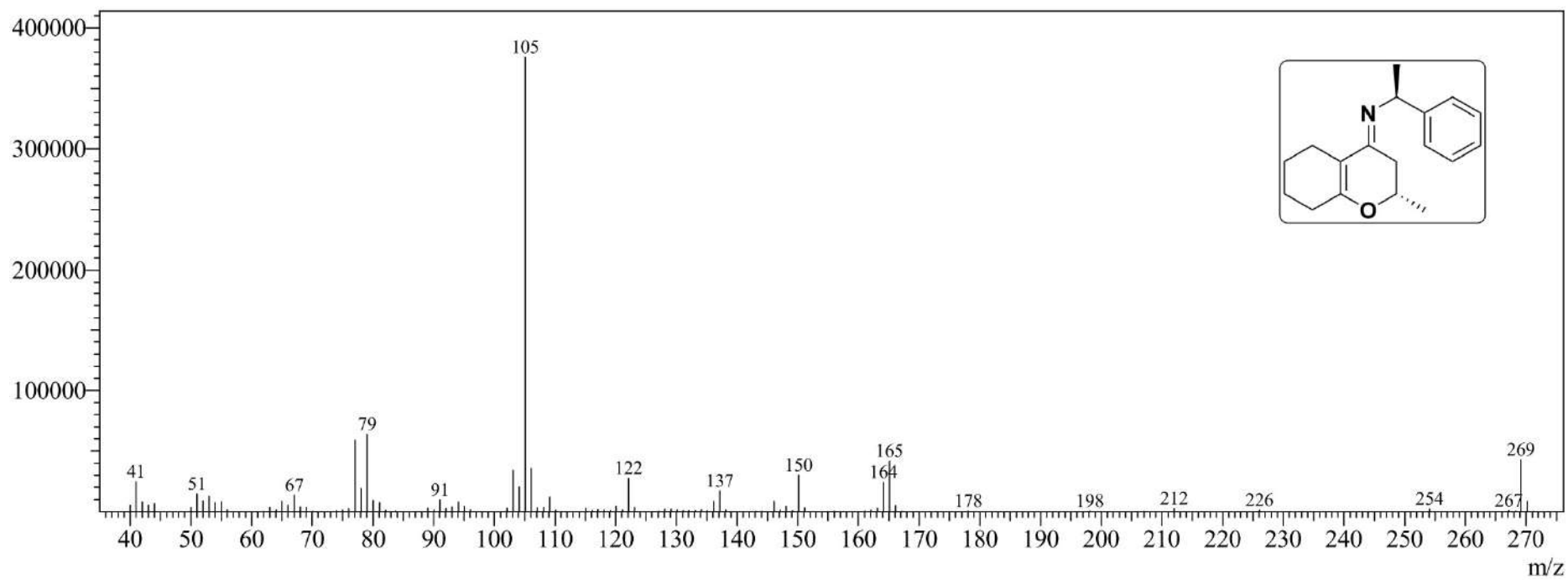
Espectro E – 20.1 – [IV (ATR) cm<sup>-1</sup>] – Molécula (S,S)-222



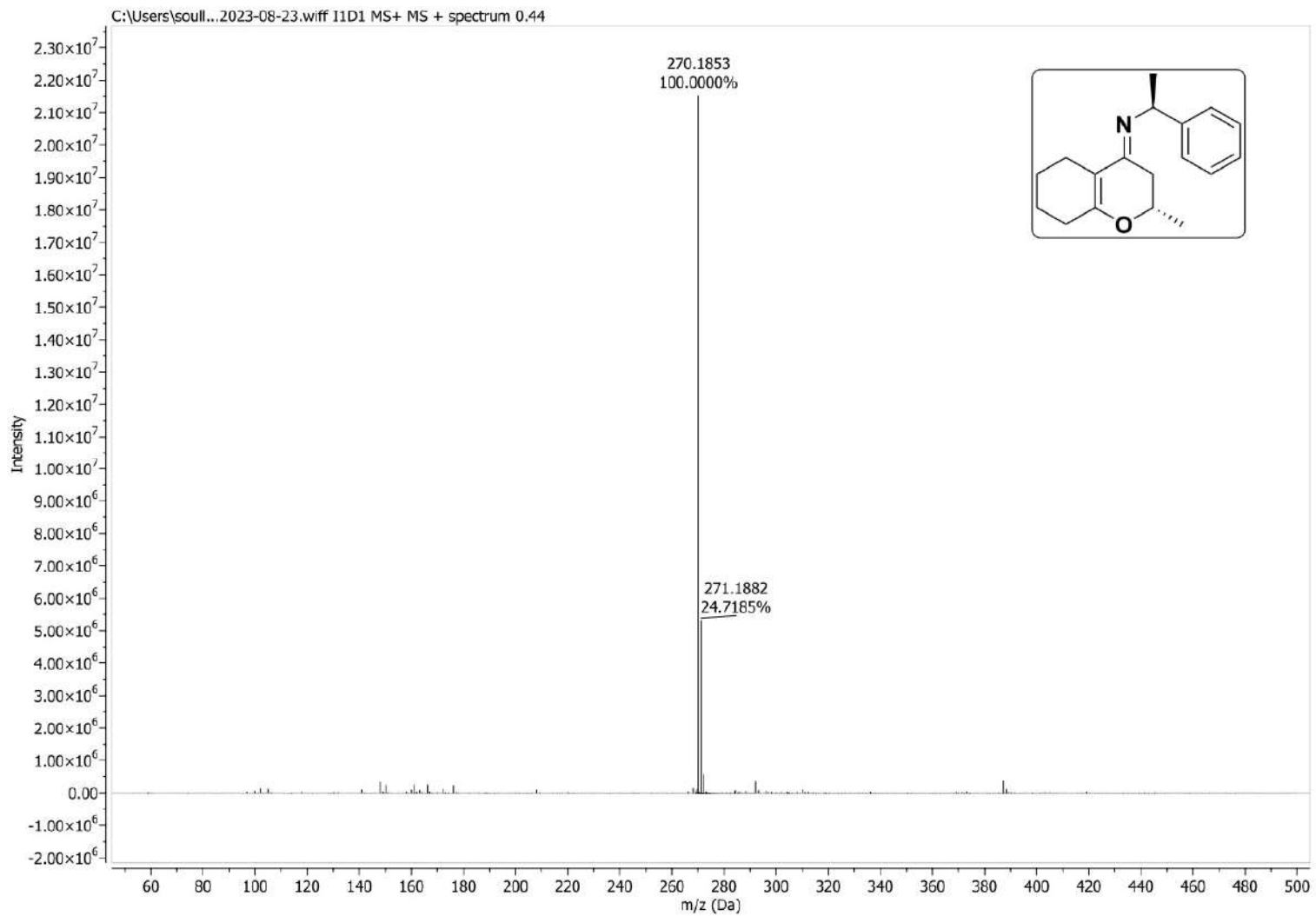
**Espectro E – 20.2 – ((RMN de <sup>1</sup>H, 600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) – Molécula (S,S)-222**



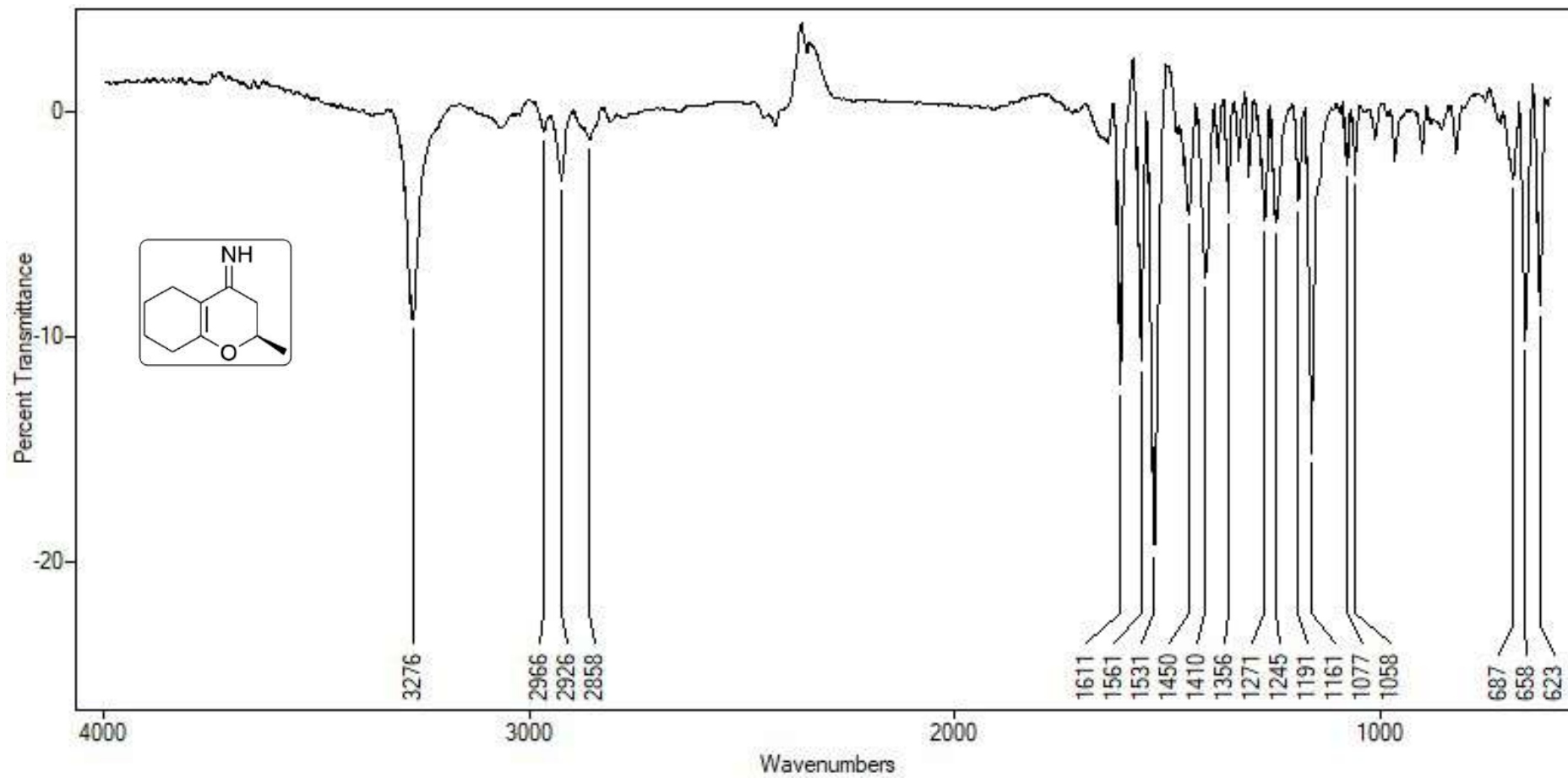
Espectro E – 20.3 – (RMN de  $^{13}\text{C}$ , 150,91 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Molécula (S,S)-222



**Espectro E – 20.4 – [EM (70 eV)  $m/z$ ] – Molécula (S,S)-222**

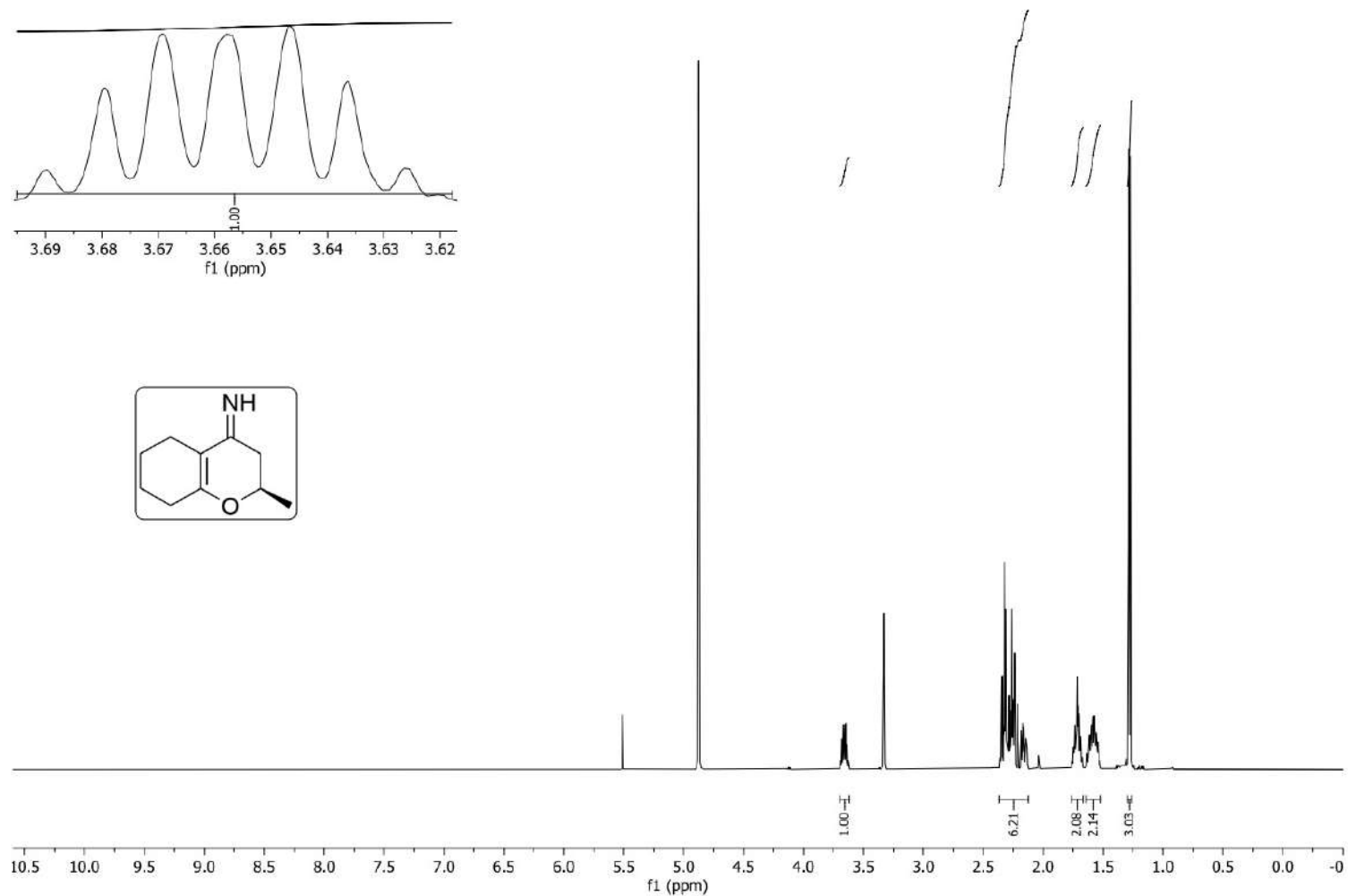


**Espectro E – 20.5 – EMAR (ESI-TOF)  $m/z$  calculado para  $C_{18}H_{24}NO = 270,1858$ ;  $[M + H]$  encontrado = 270,1853 – Molécula (*S,S*)-222**

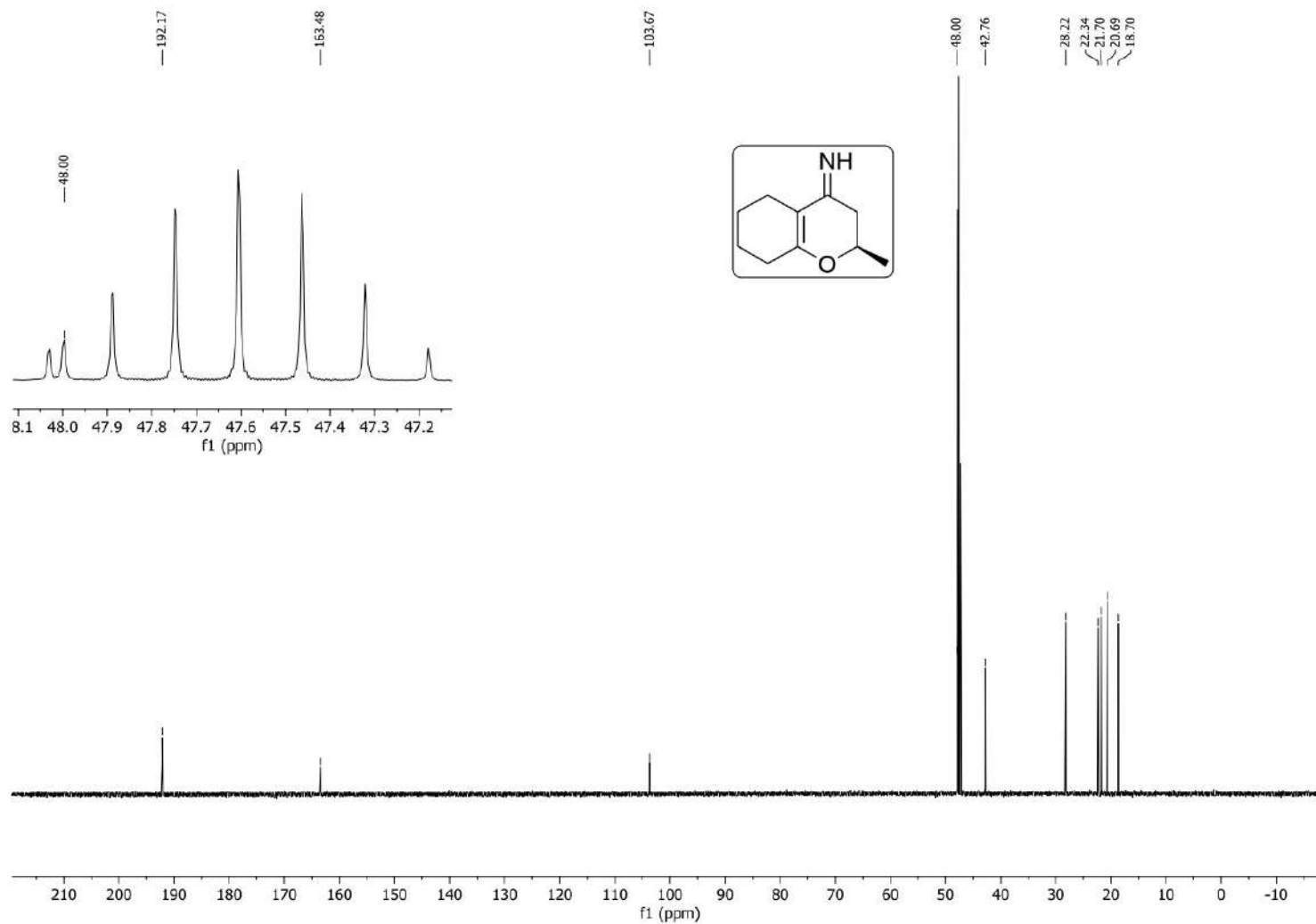


Espectro E – 21.1 – [IV (ATR) cm<sup>-1</sup>] – Molécula (R)-223

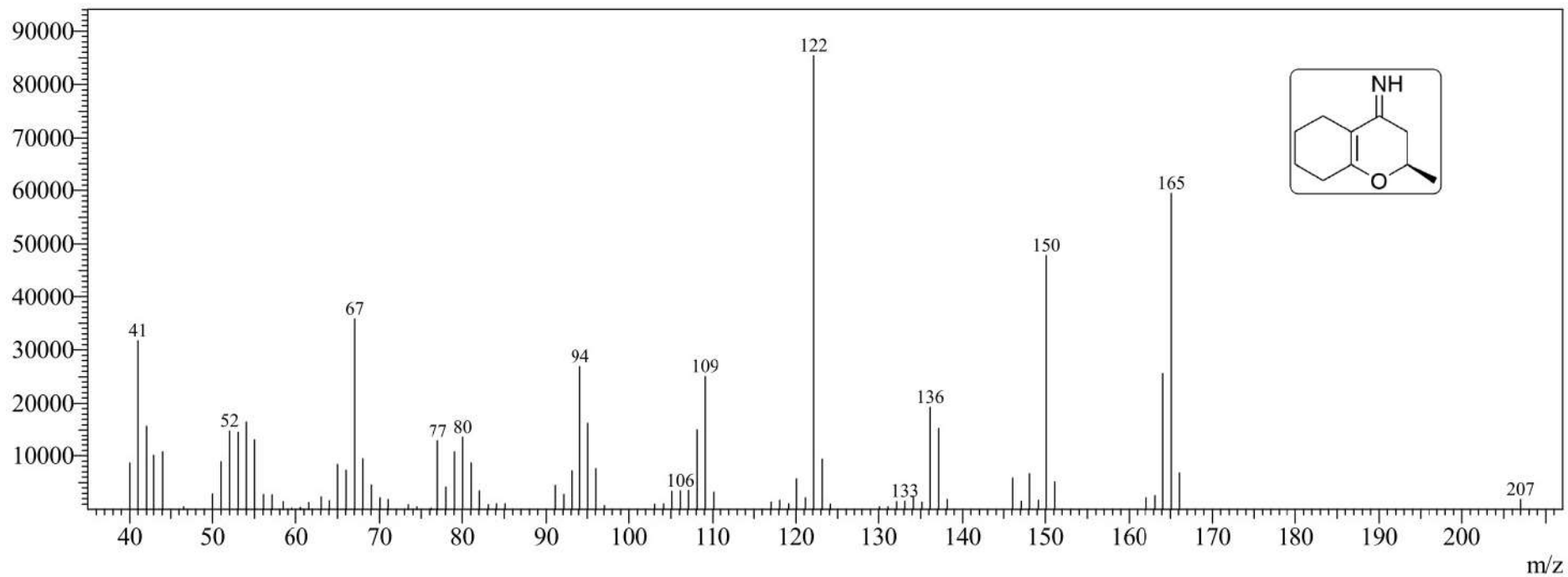




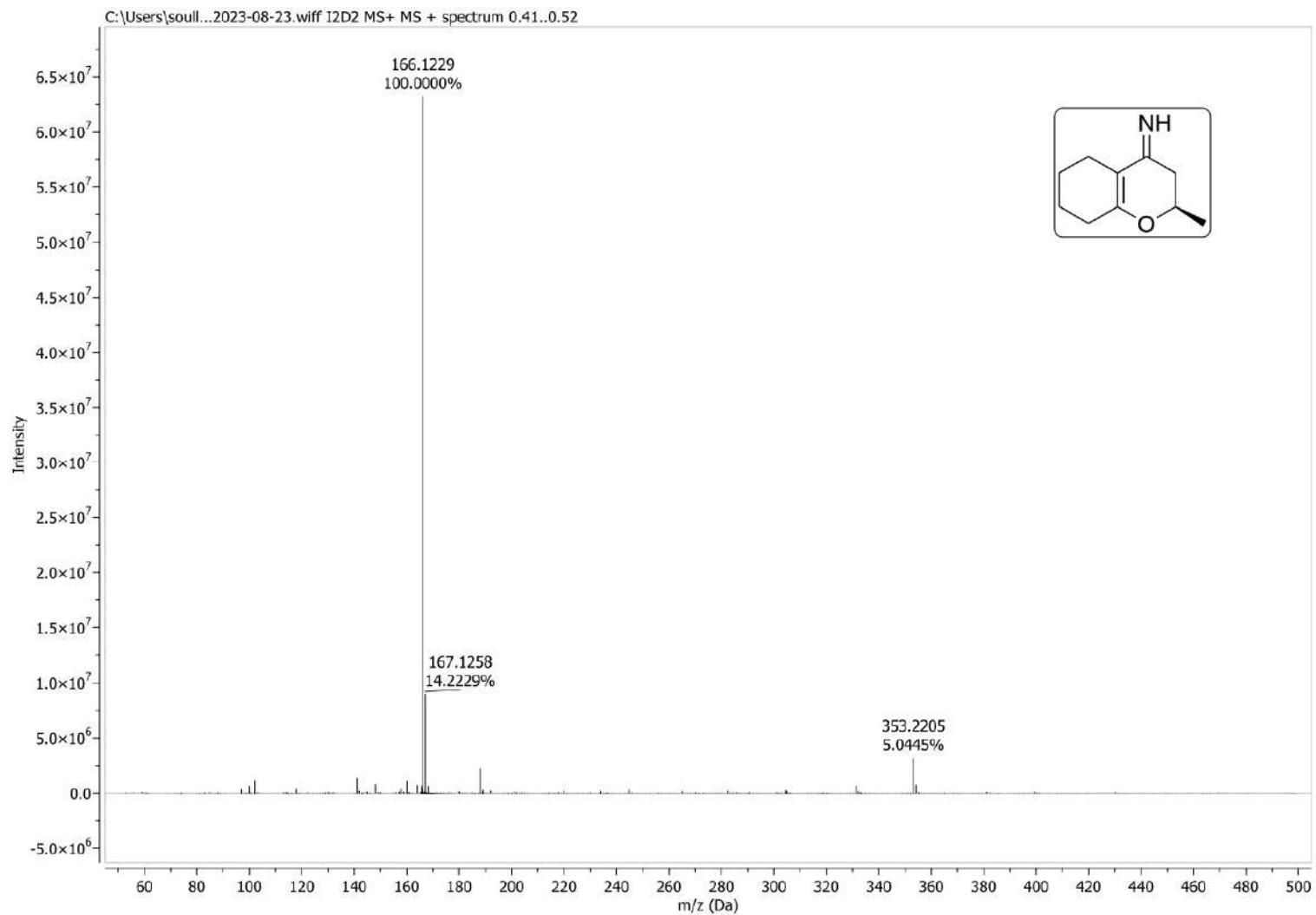
**Espectro E – 21.2 – ((RMN de  $^1\text{H}$ , 600 MHz, MeOD) – Molécula (R)-223**



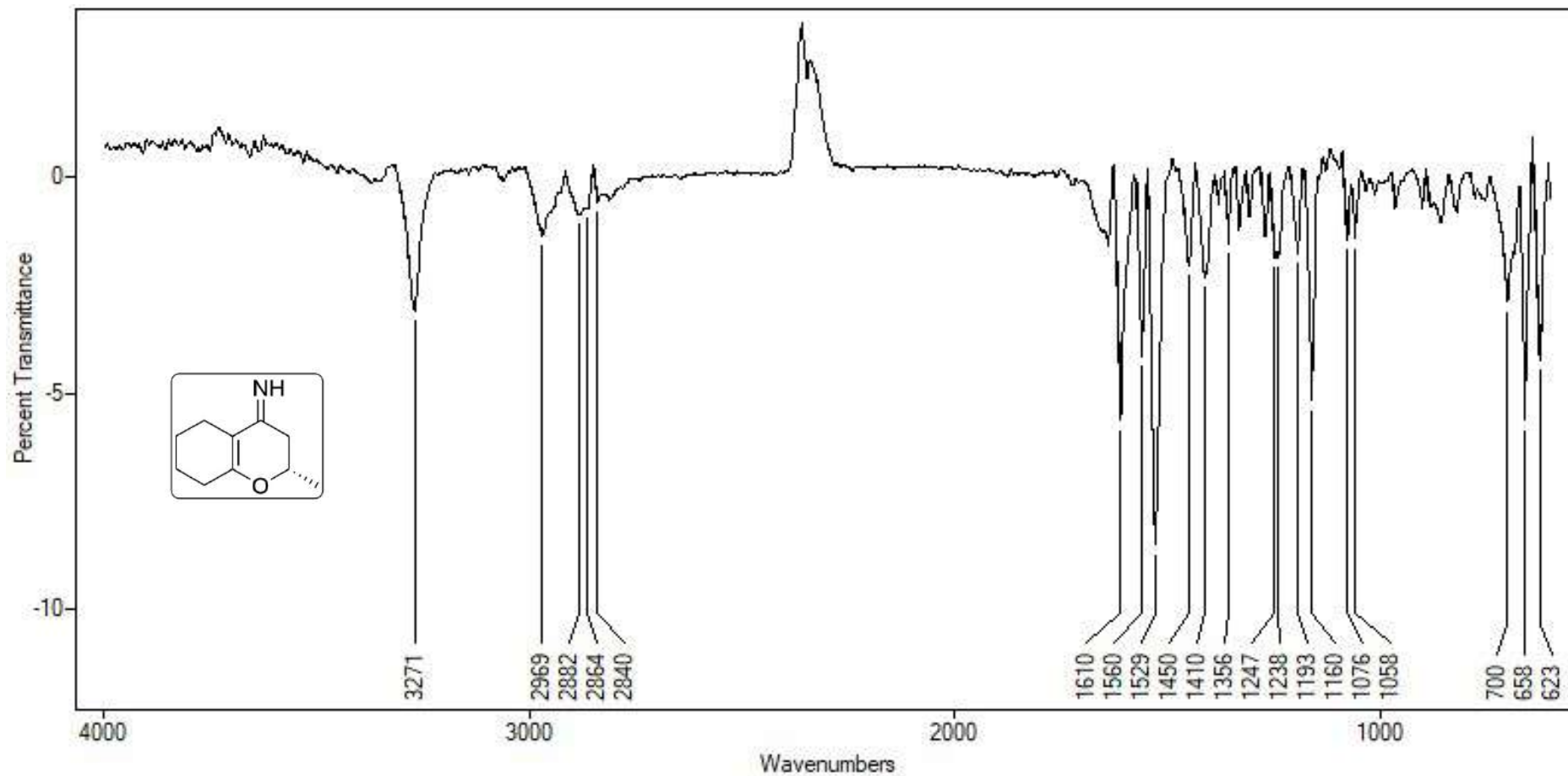
Espectro E – 21.3 – (RMN de  $^{13}\text{C}$ , 150,91 MHz, MeOD) – Molécula (R)-223



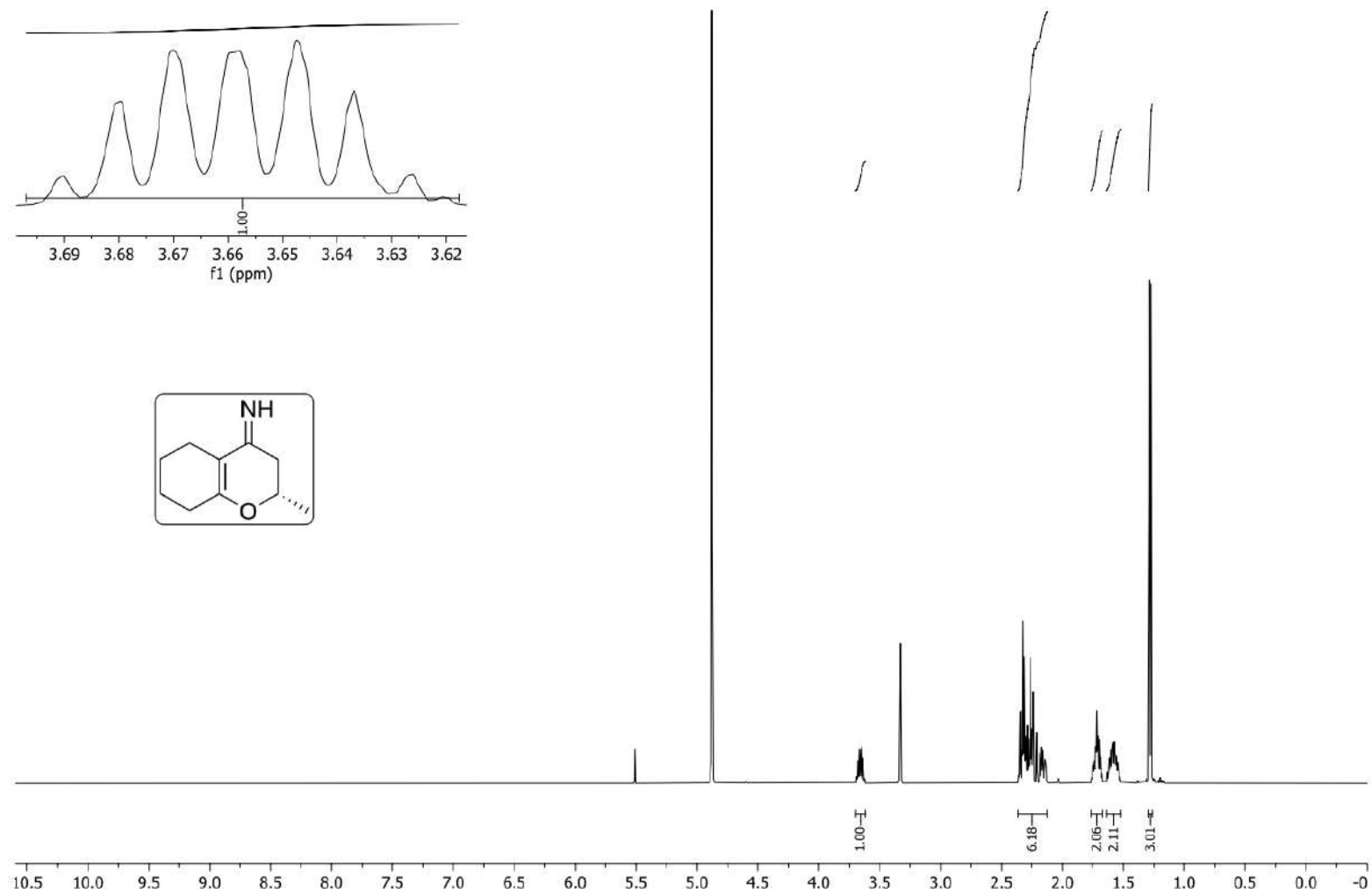
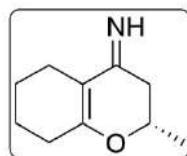
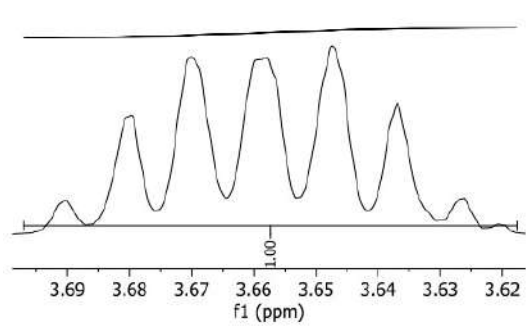
**Espectro E – 21.4 – [EM (70 eV)  $m/z$ ] – Molécula (R)-223**



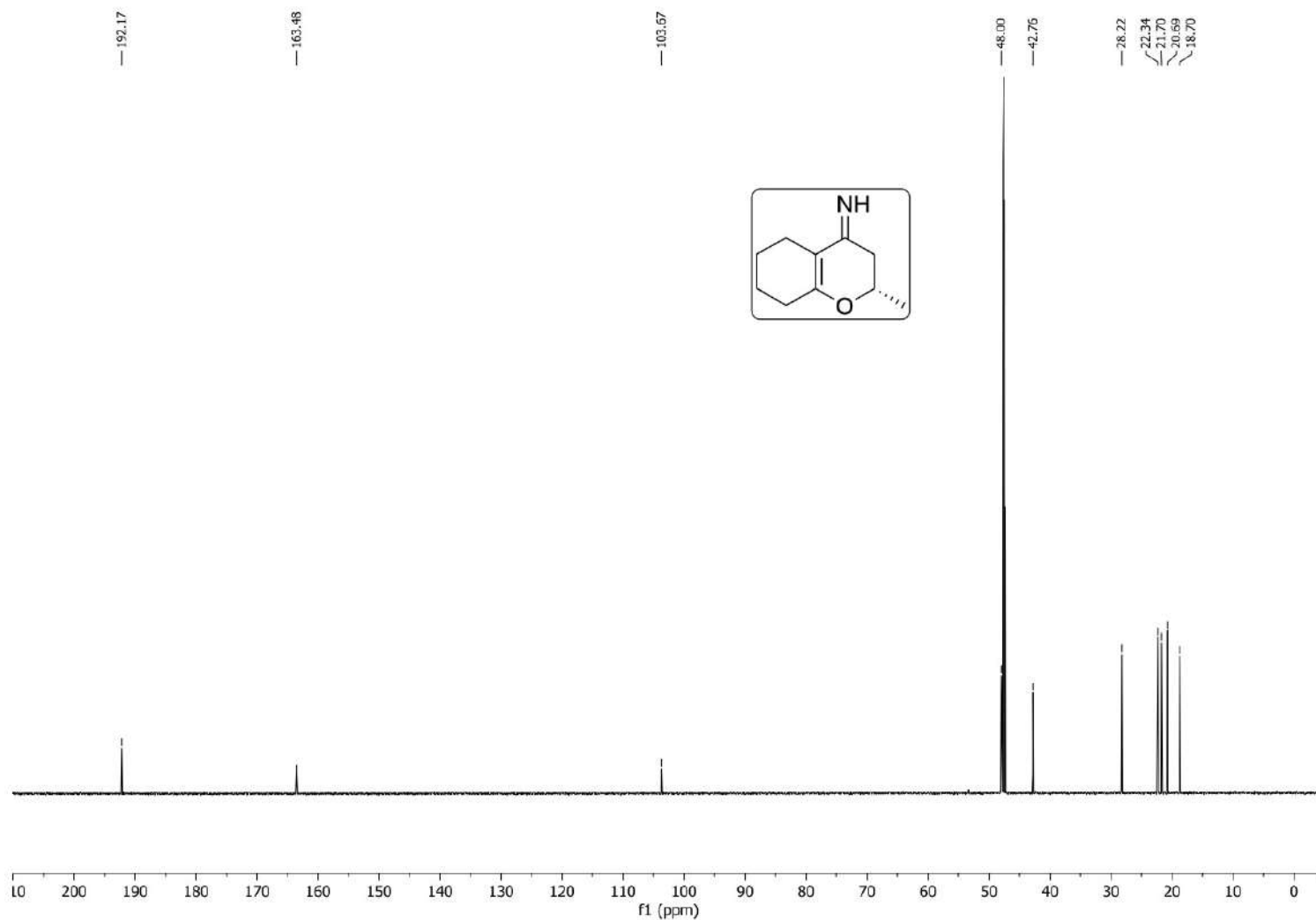
**Espectro E – 21.5 – EMAR (ESI-TOF)  $m/z$  calculado para  $C_{10}H_{16}NO = 166,1232$ ;  $[M + H]$  encontrado = 166,1229 – Molécula (R)-223**



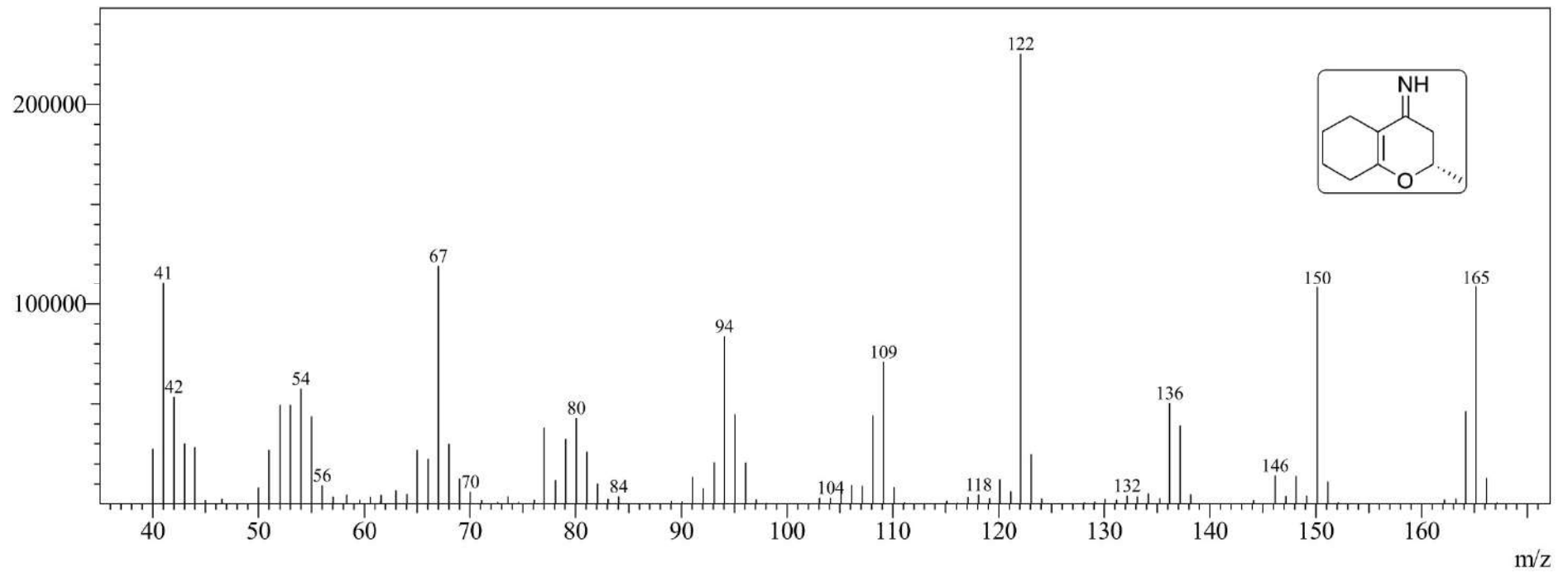
Espectro E – 22.1 – [IV (ATR)  $\text{cm}^{-1}$ ] – Molécula (S)-223



**Espectro E – 22.2 – ((RMN de  $^1\text{H}$ , 600 MHz, MeOD) – Molécula (S)-223**

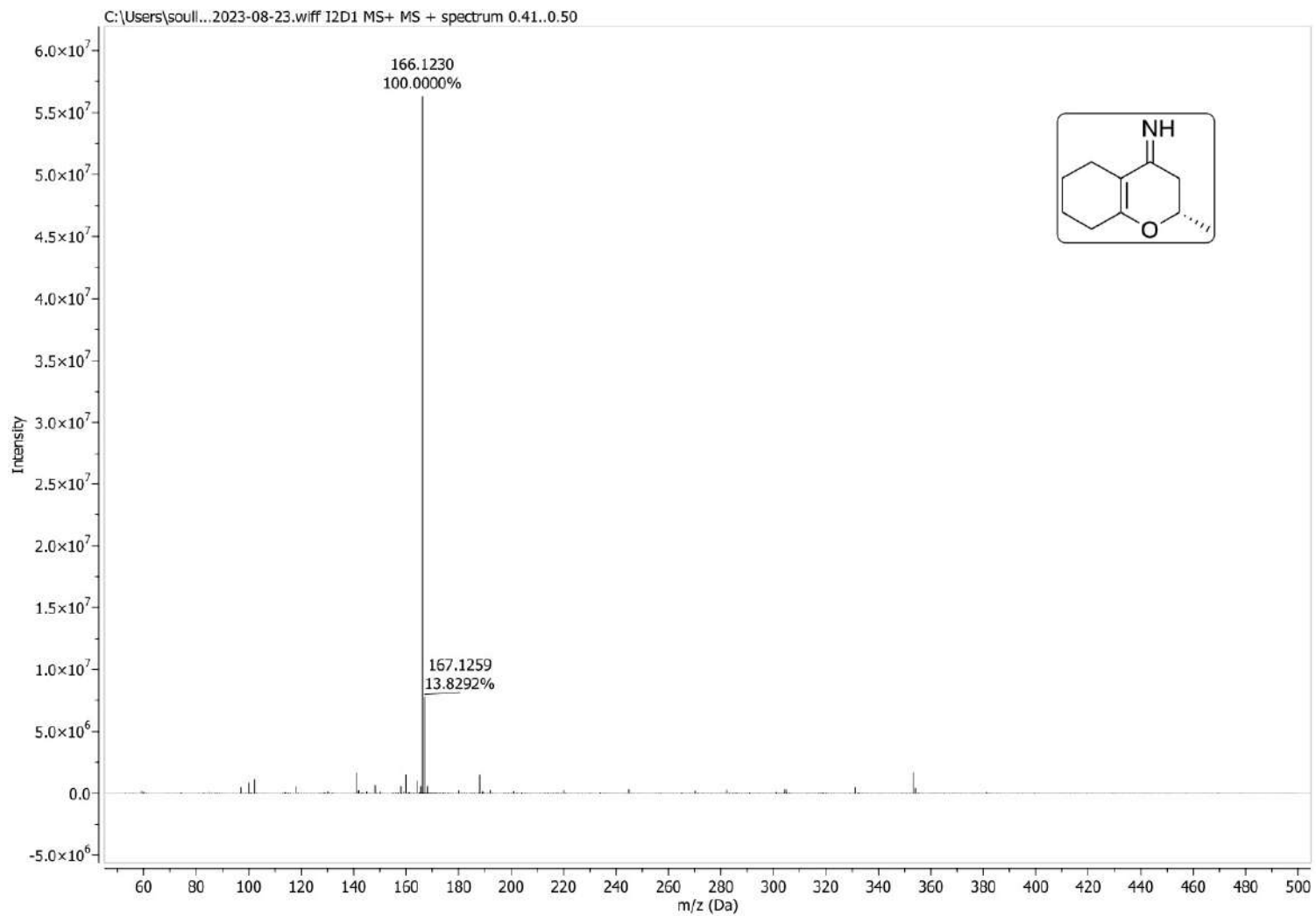


Espectro E – 22.3 – (RMN de  $^{13}\text{C}$ , 150,91 MHz, MeOD) – Molécula (S)-223

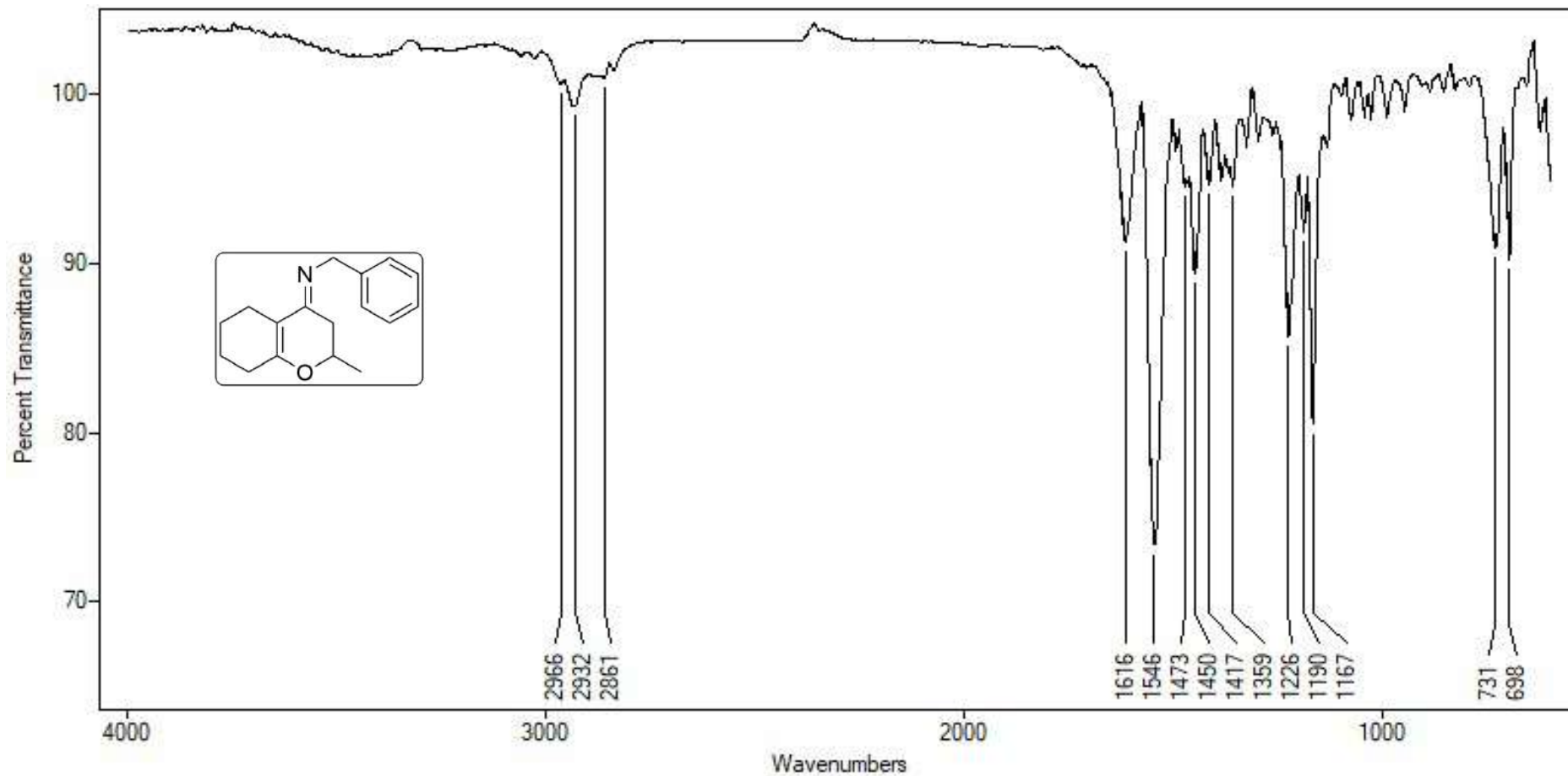


**Espectro E – 22.4 – [EM (70 eV)  $m/z$ ] – Molécula (S)-223**

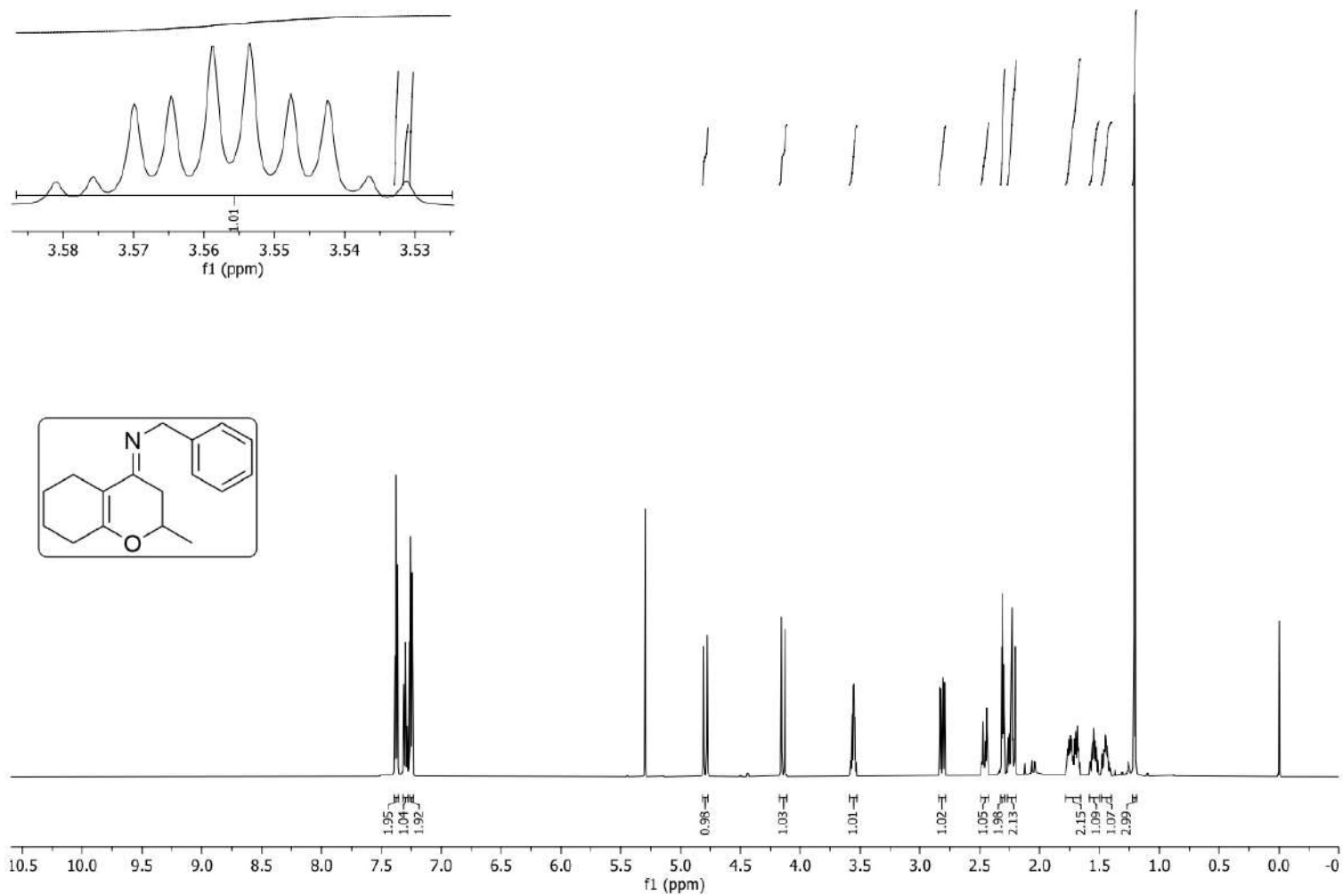




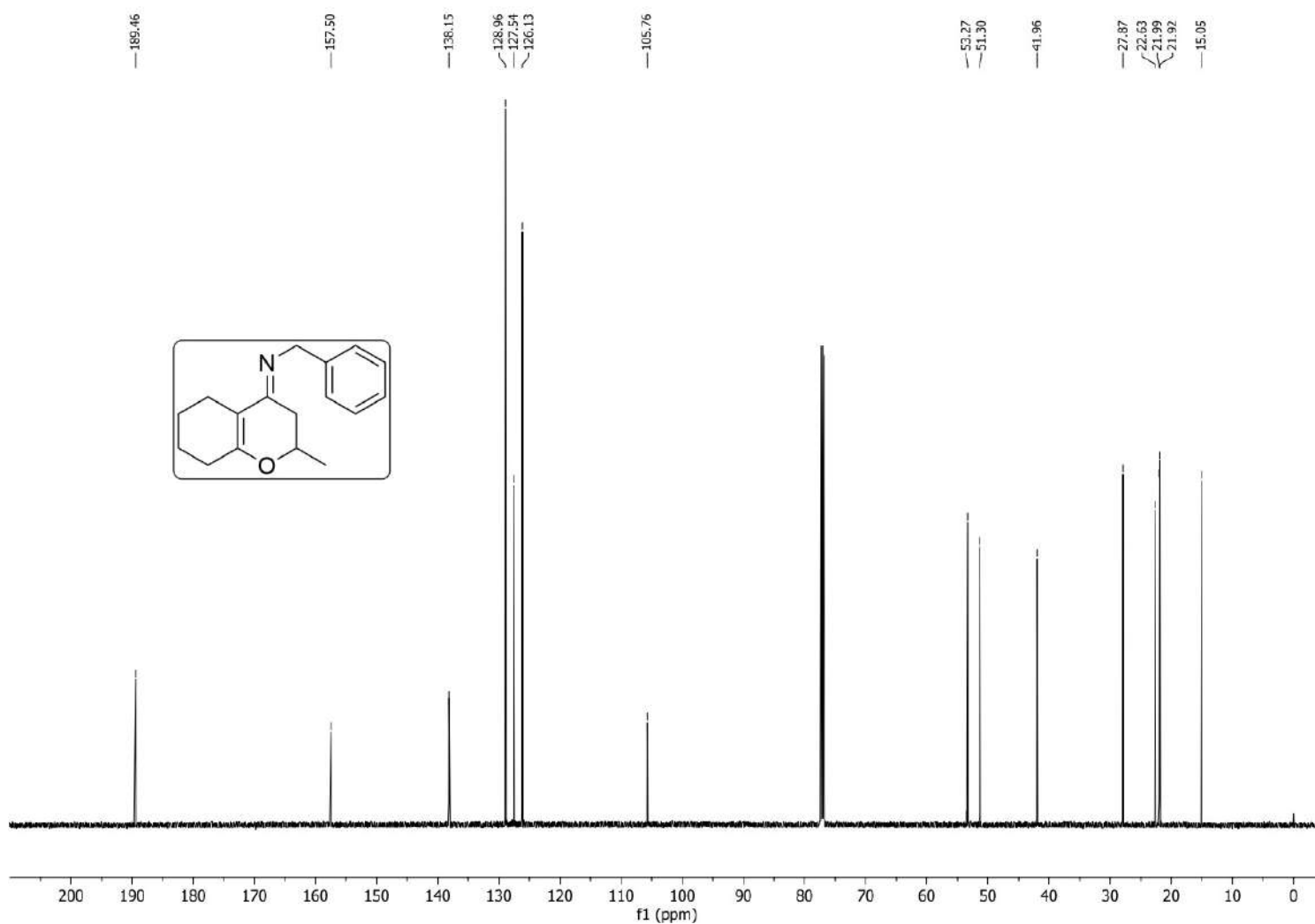
**Espectro E – 22.5 – EMAR (ESI-TOF)  $m/z$  calculado para  $C_{10}H_{16}NO = 166,1232$ ;  $[M + H]$  encontrado = 166,1230 – Molécula (S)-223**



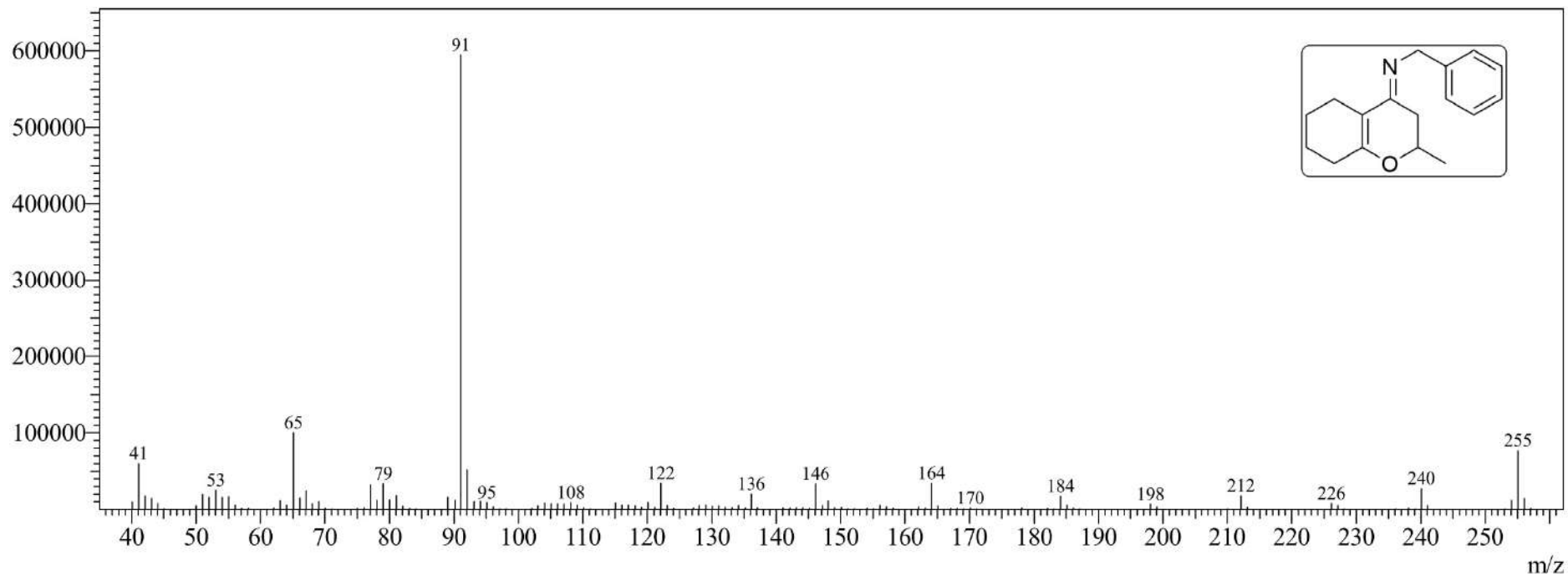
Espectro E – 23.1 – [IV (ATR) cm<sup>-1</sup>] – Molécula 227



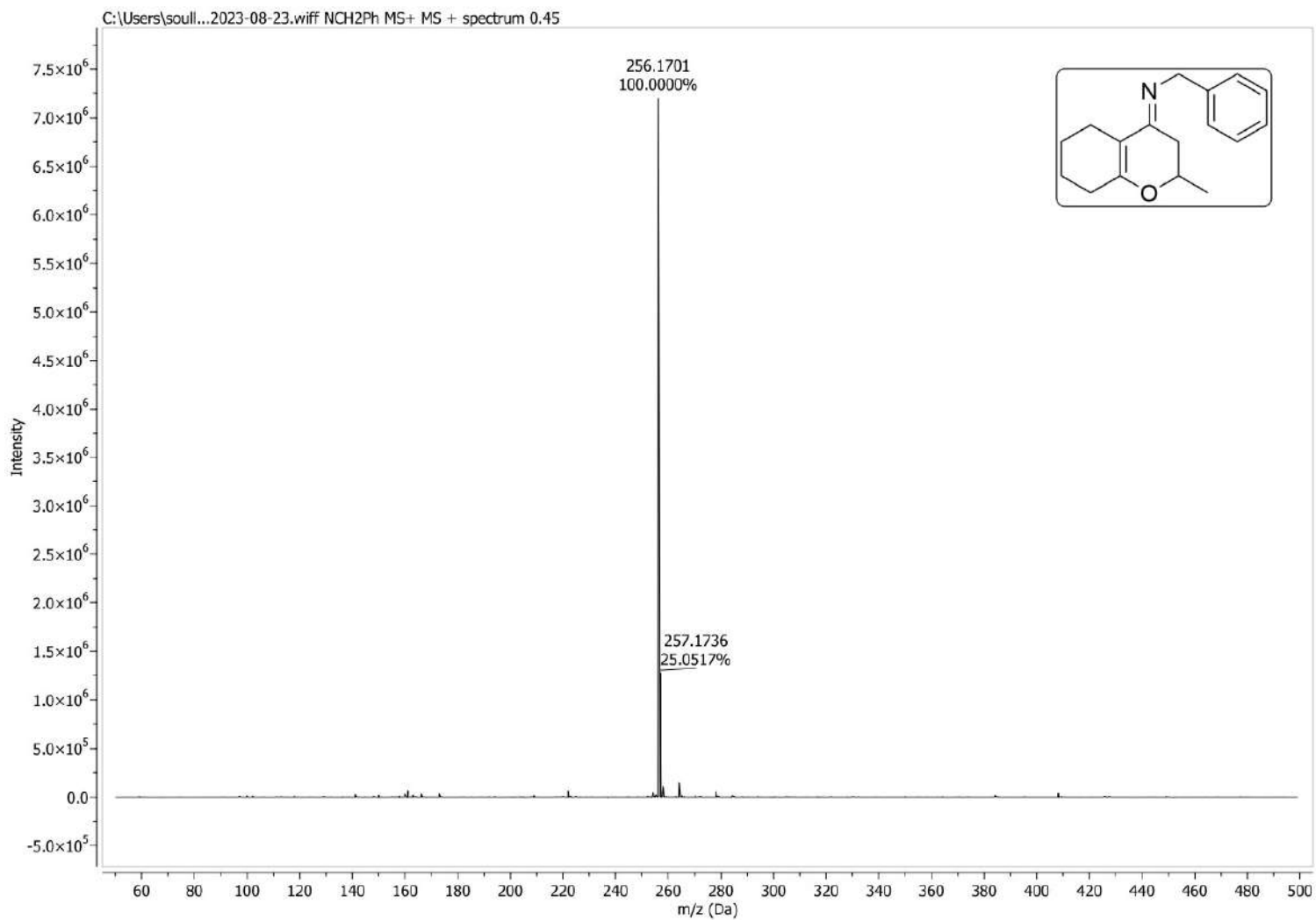
**Espectro E – 23.2 – ((RMN de  $^1\text{H}$ , 600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Molécula 227**



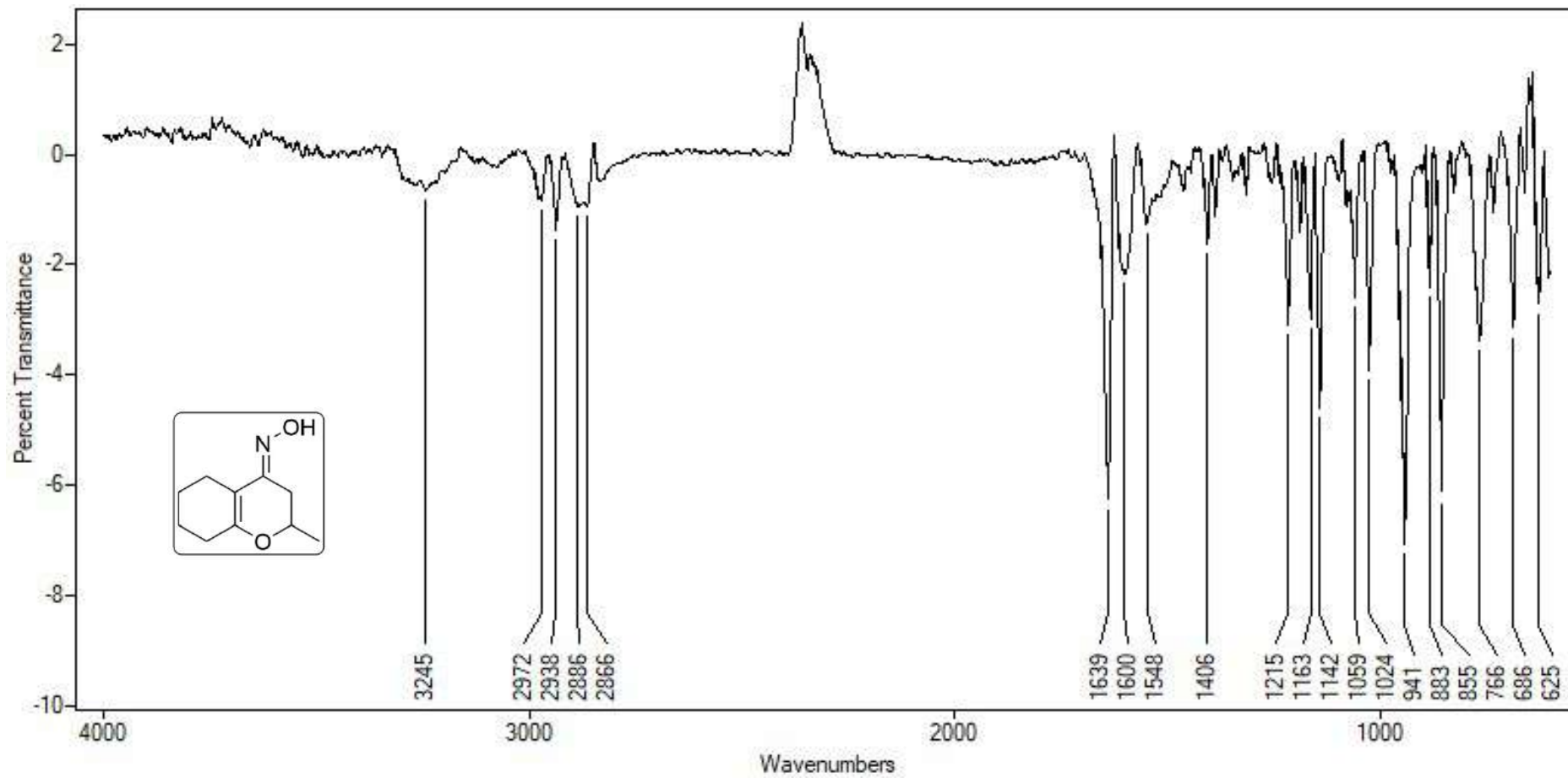
**Espectro E – 23.3 – (RMN de  $^{13}\text{C}$ , 150,91 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Molécula 227**



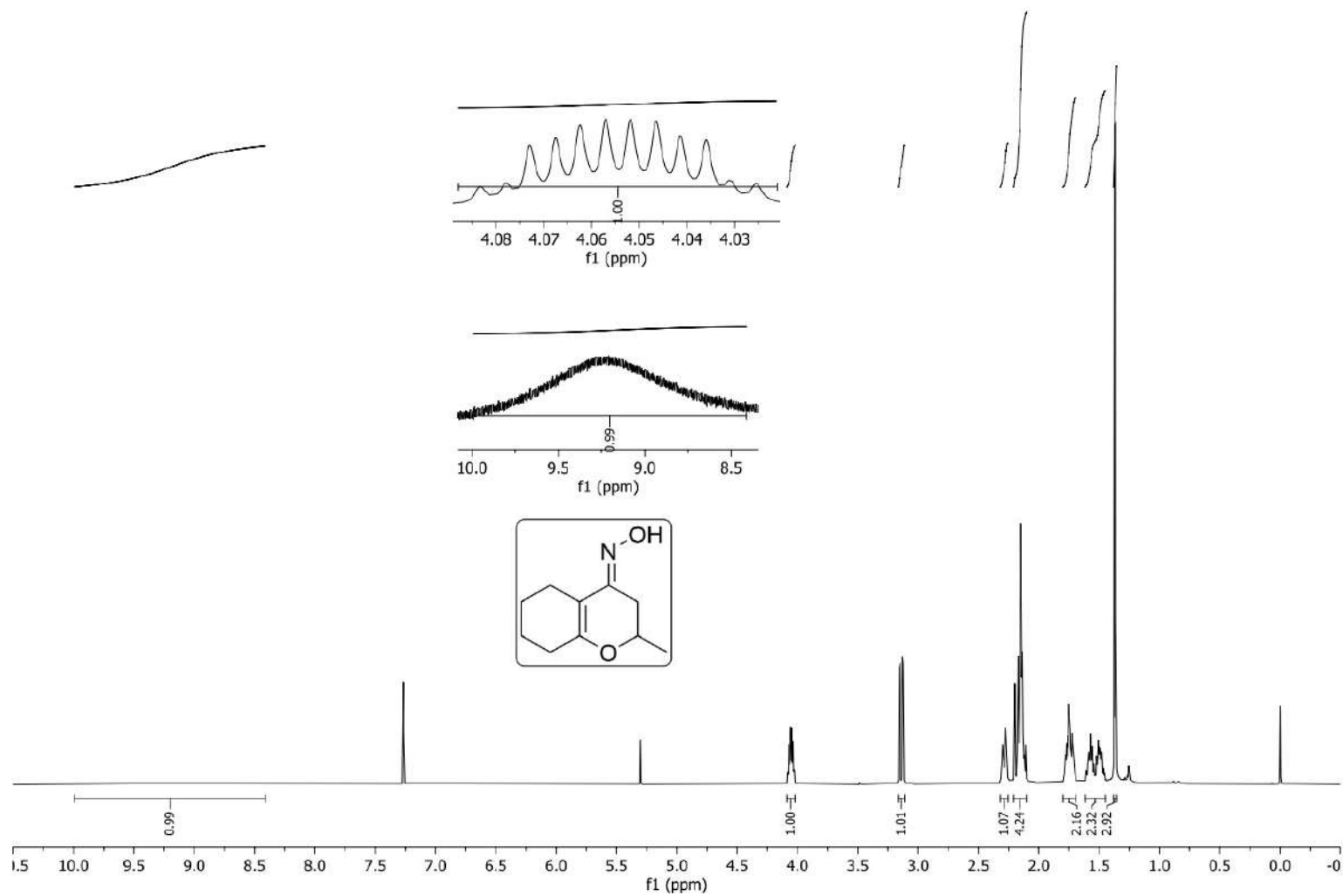
**Espectro E – 23.4 – [EM (70 eV)  $m/z$ ] – Molécula 227**



**Espectro E – 23.5 – EMAR (ESI-TOF)  $m/z$  calculado para  $C_{17}H_{27}NO = 256,1701$ ;  $[M + H]$  encontrado =  $256,1701$  – Molécula 227**

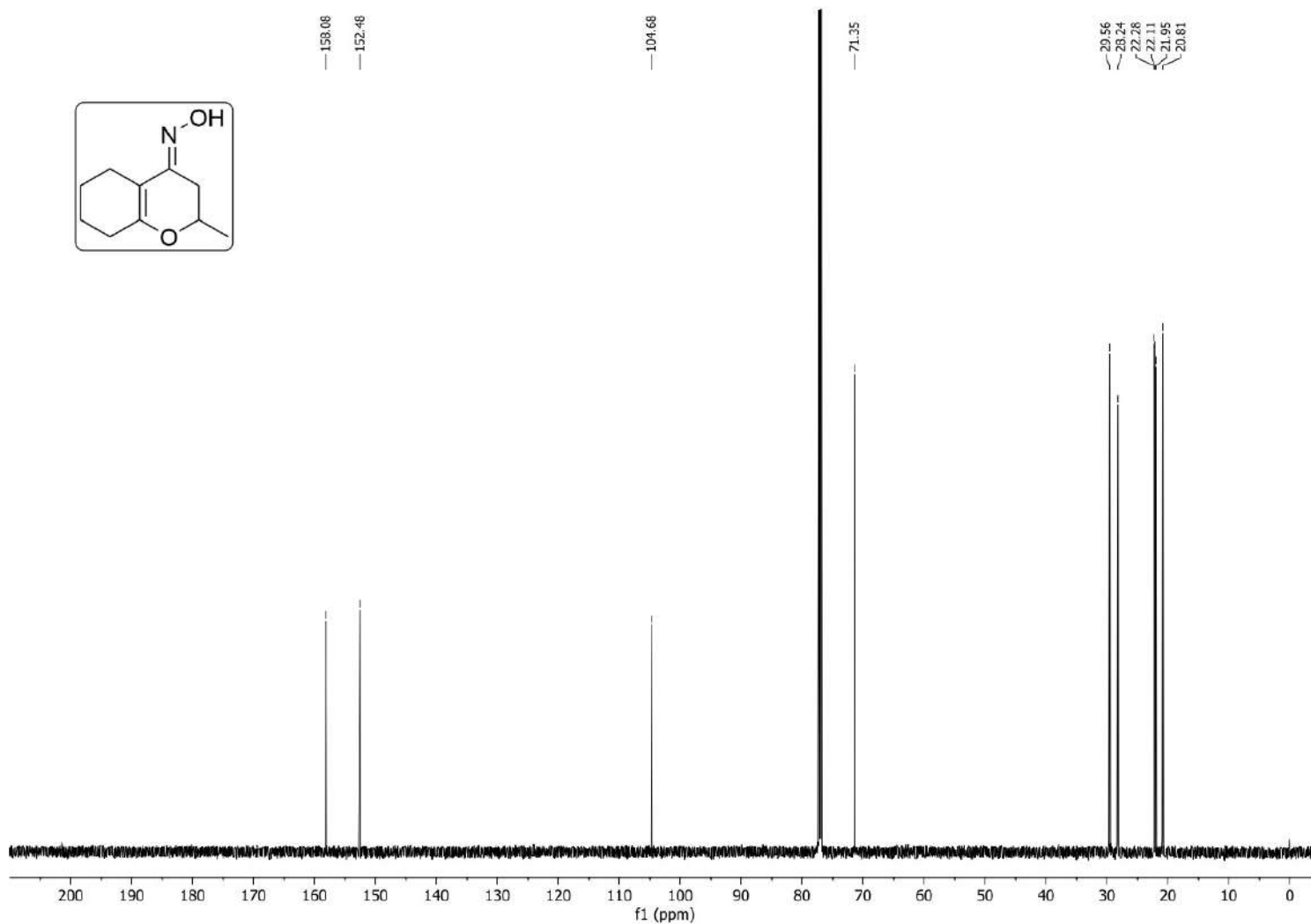


Espectro E – 24.1 – [IV (ATR) cm<sup>-1</sup>] – Molécula 230

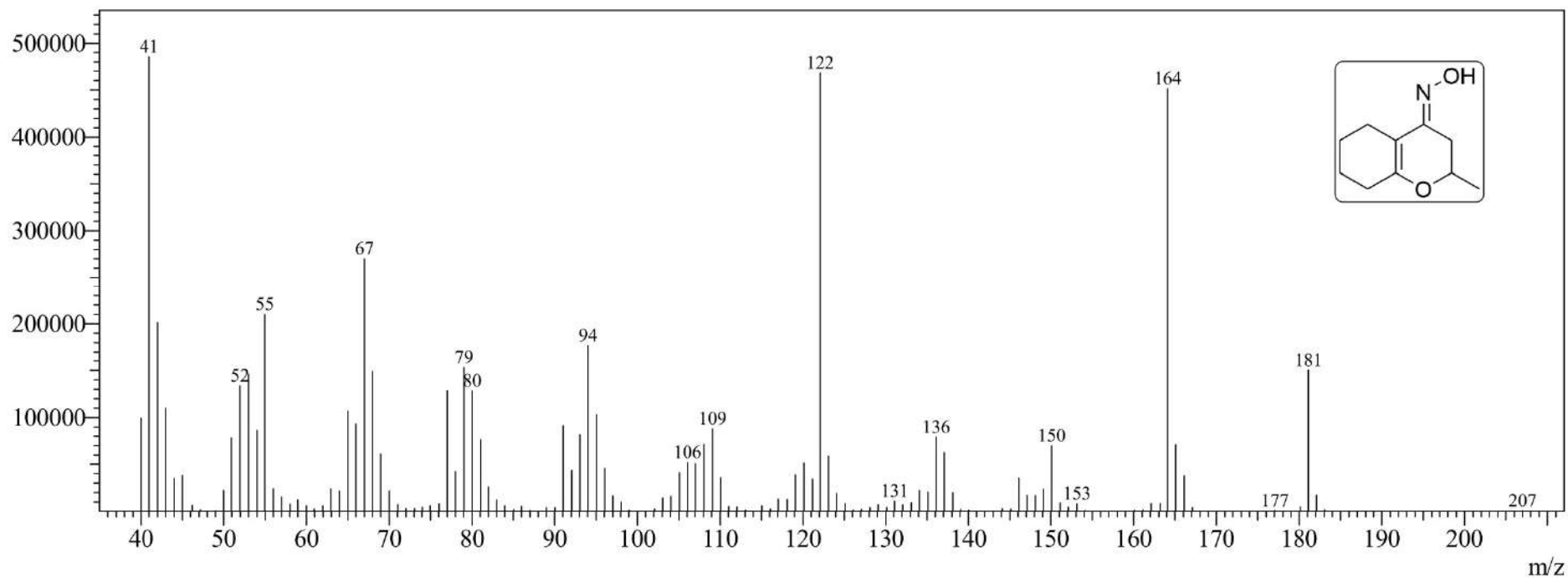


**Espectro E – 24.2 – ((RMN de  $^1\text{H}$ , 600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Molécula 230**

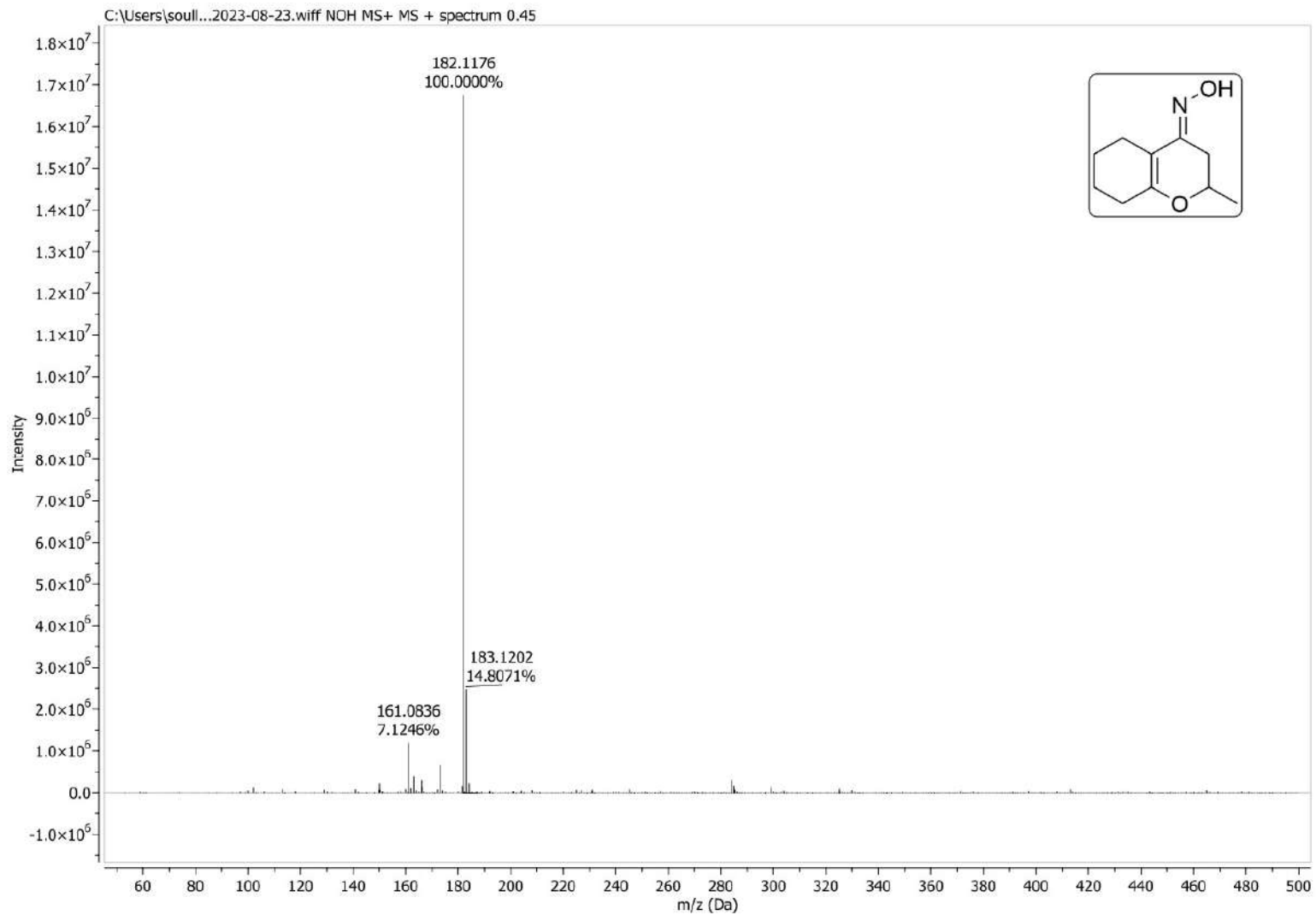




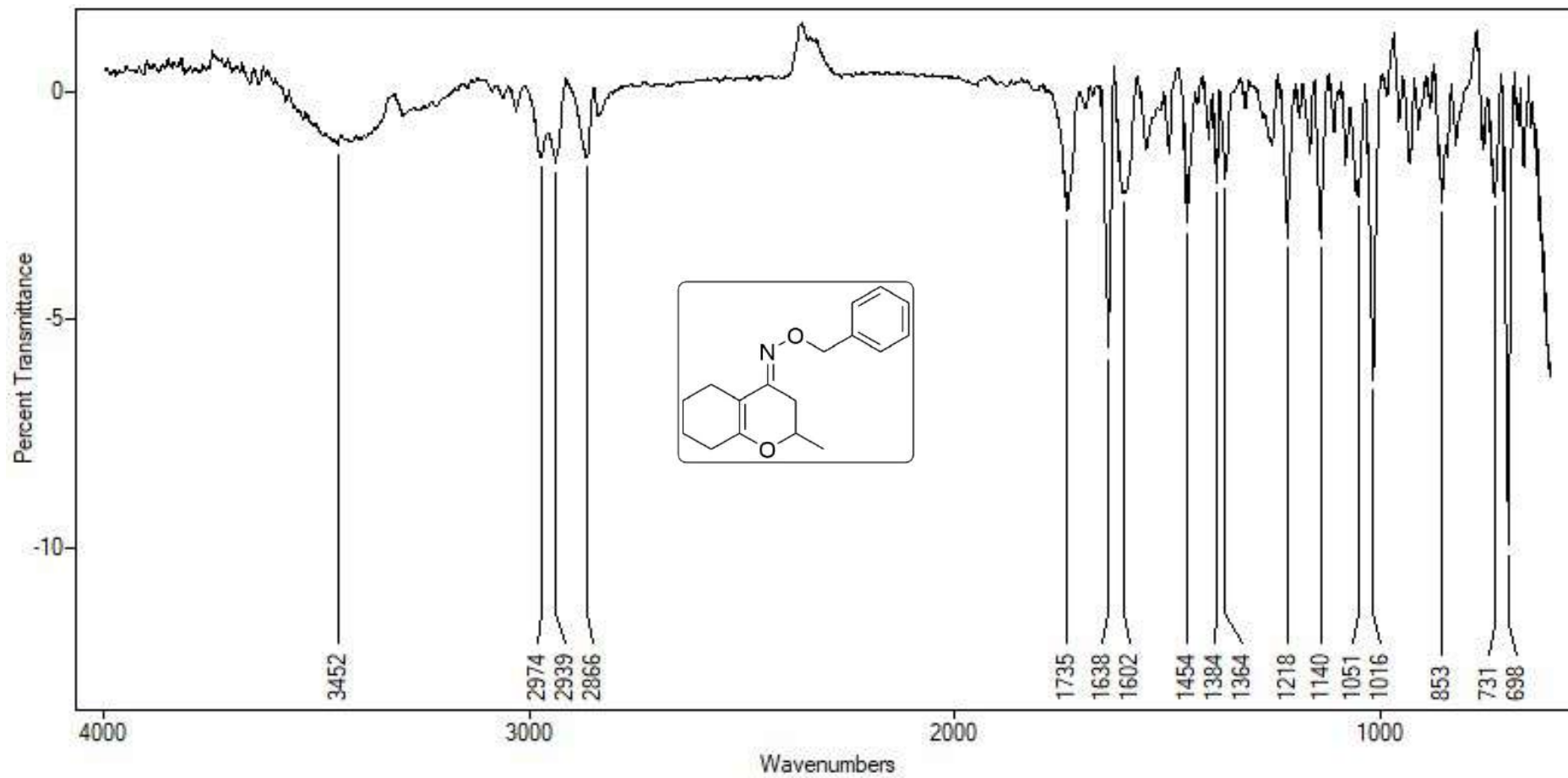
**Espectro E – 24.3 – (RMN de  $^{13}\text{C}$ , 150,91 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Molécula 230**



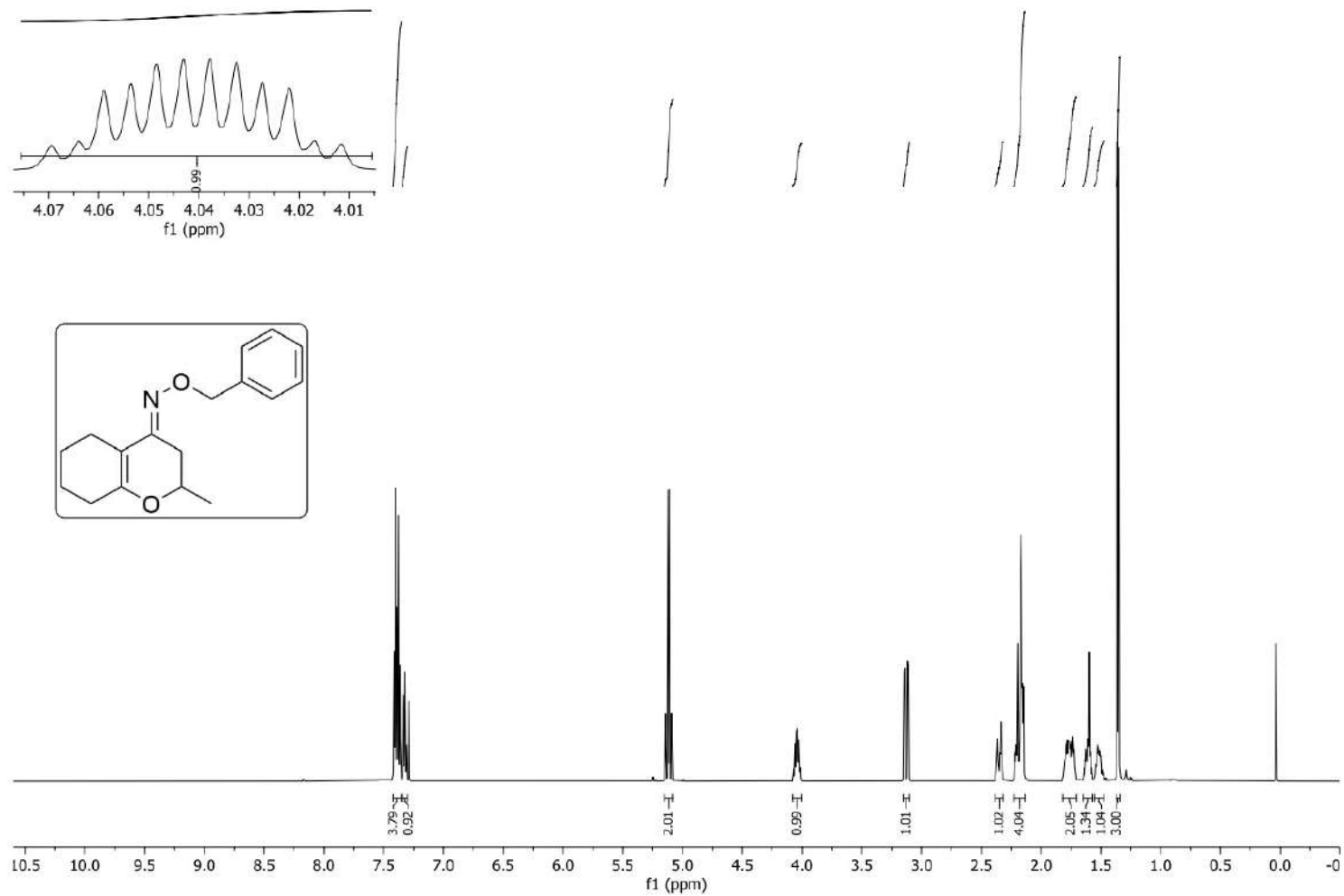
**Espectro E – 24.4 – [EM (70 eV)  $m/z$ ] – Molécula 230**



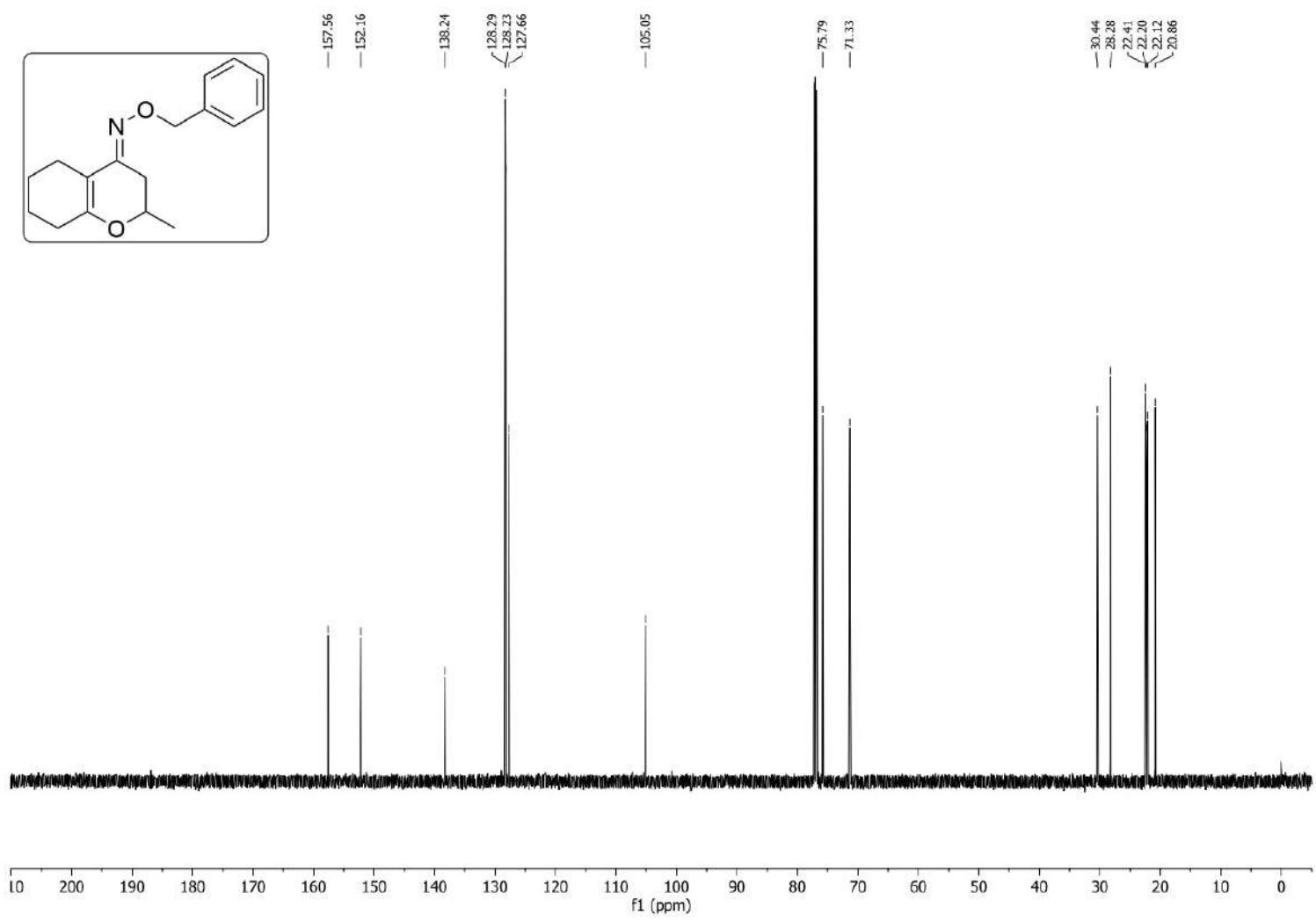
**Espectro E – 24.5 – EMAR (ESI-TOF)  $m/z$  calculado para  $C_{10}H_{16}NO_2 = 182,1181$ ;  $[M + H]$  encontrado = 182,1176 – Molécula 230**



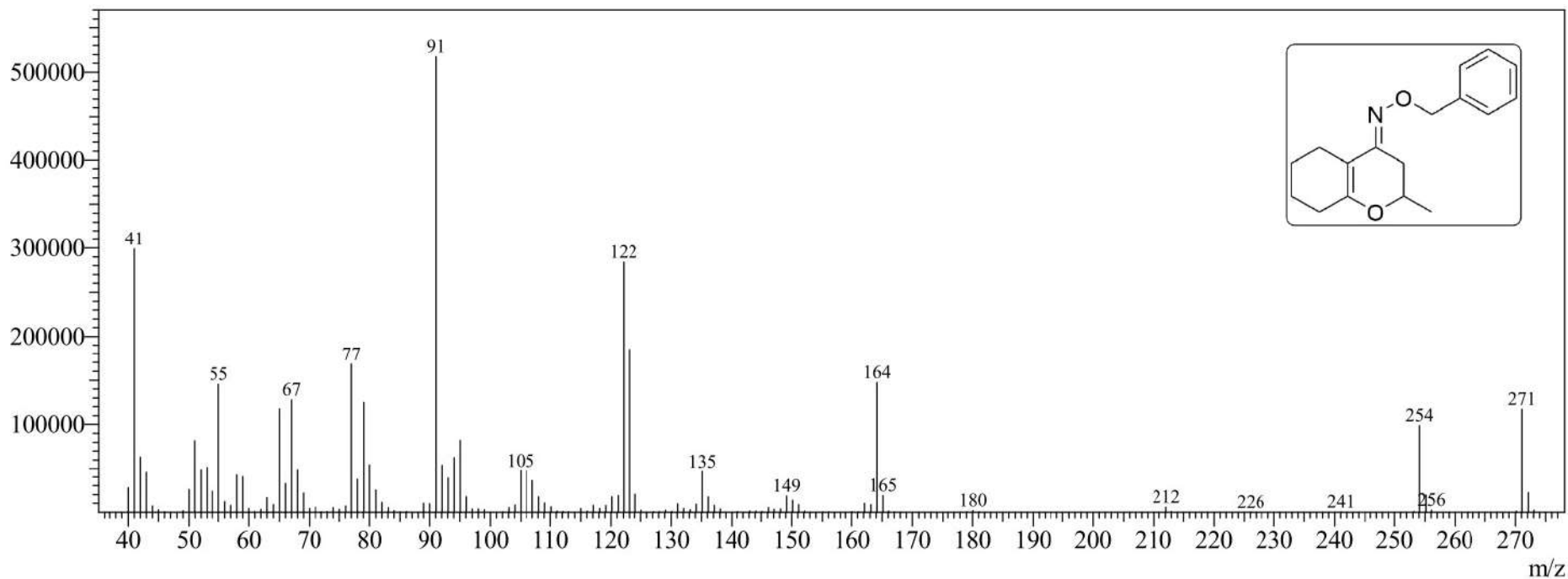
Espectro E – 25.1 – [IV (ATR) cm<sup>-1</sup>] – Molécula 231



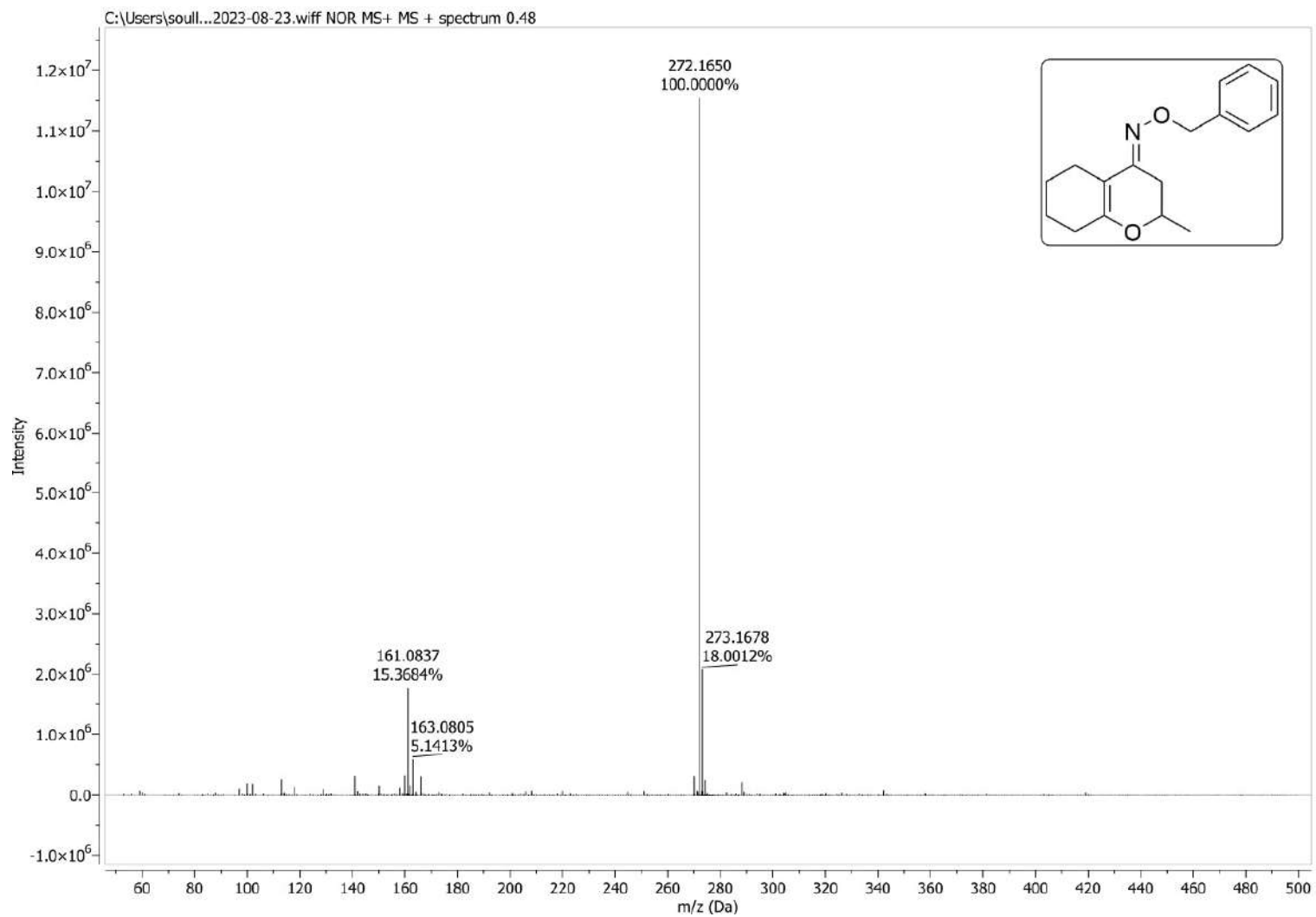
**Espectro E – 25.2 – ((RMN de  $^1\text{H}$ , 600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Molécula 231**



Espectro E – 25.3 – (RMN de  $^{13}\text{C}$ , 150,91 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Molécula 231

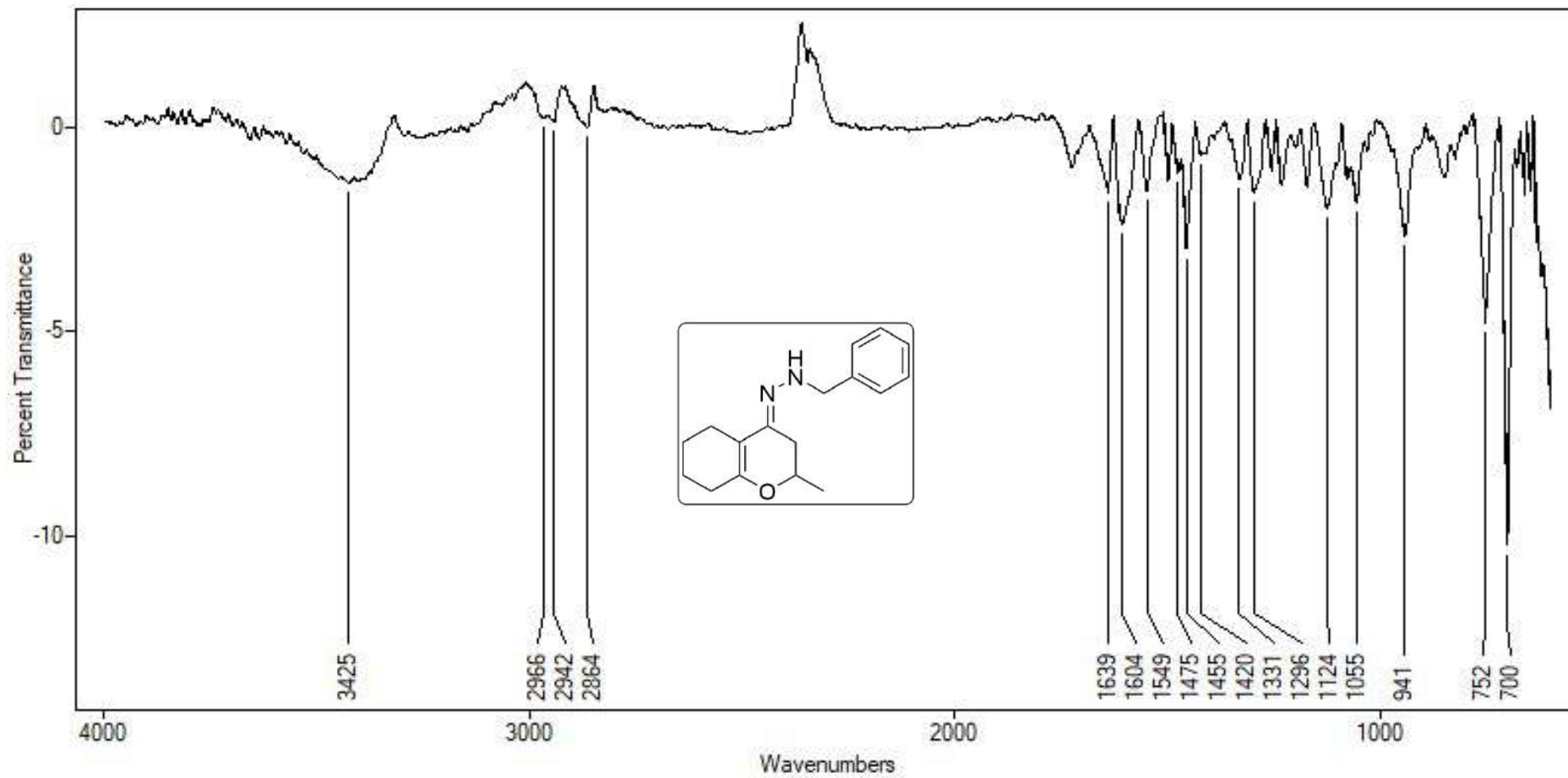


**Espectro E – 25.4 – [EM (70 eV)  $m/z$ ] – Molécula 231**

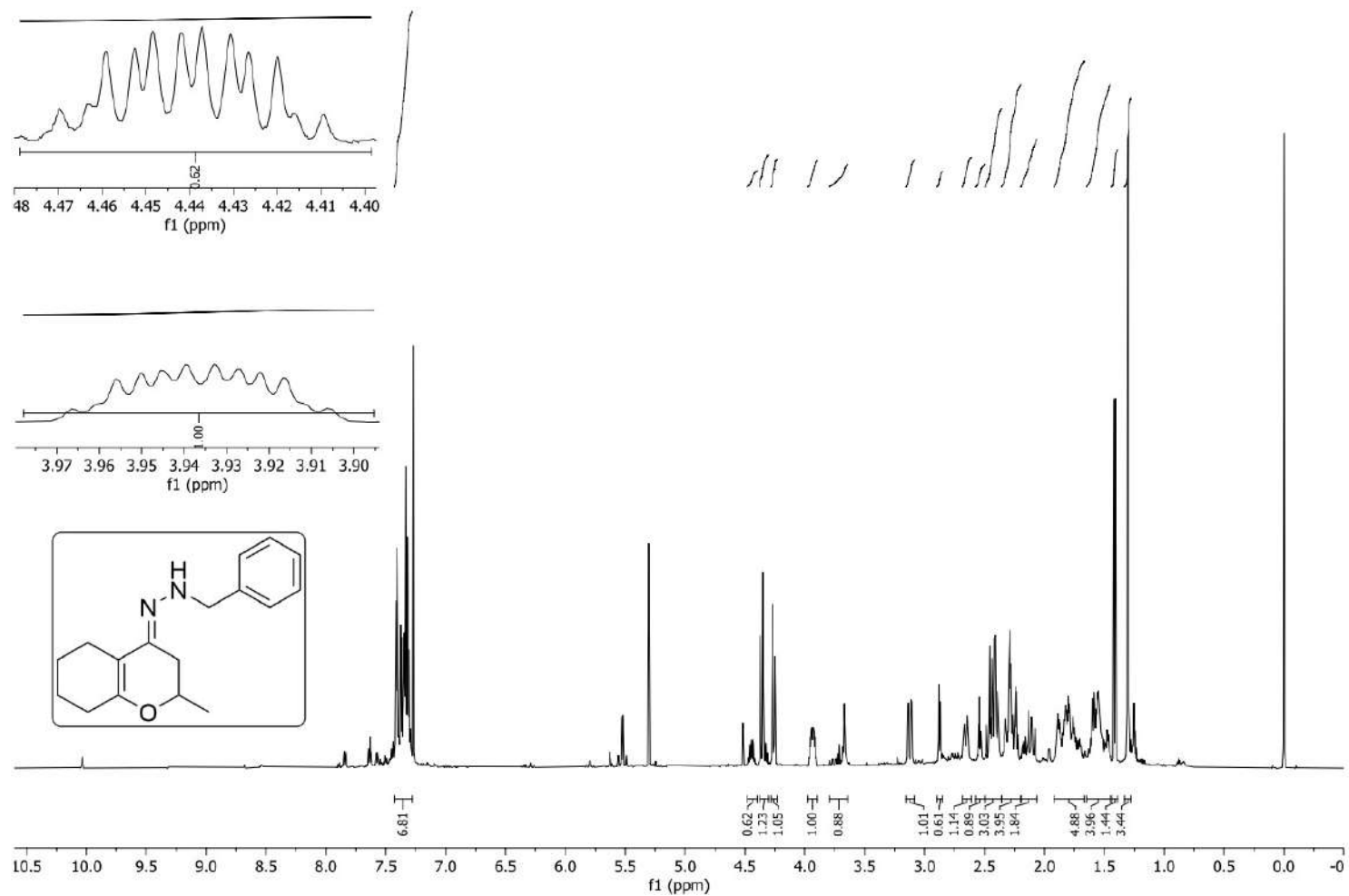


**Espectro E – 25.5 – EMAR (ESI-TOF)  $m/z$  calculado para  $C_{17}H_{22}NO_2 = 272,1651$ ;  $[M + H]$  encontrado = 272,1650 – Molécula 231**

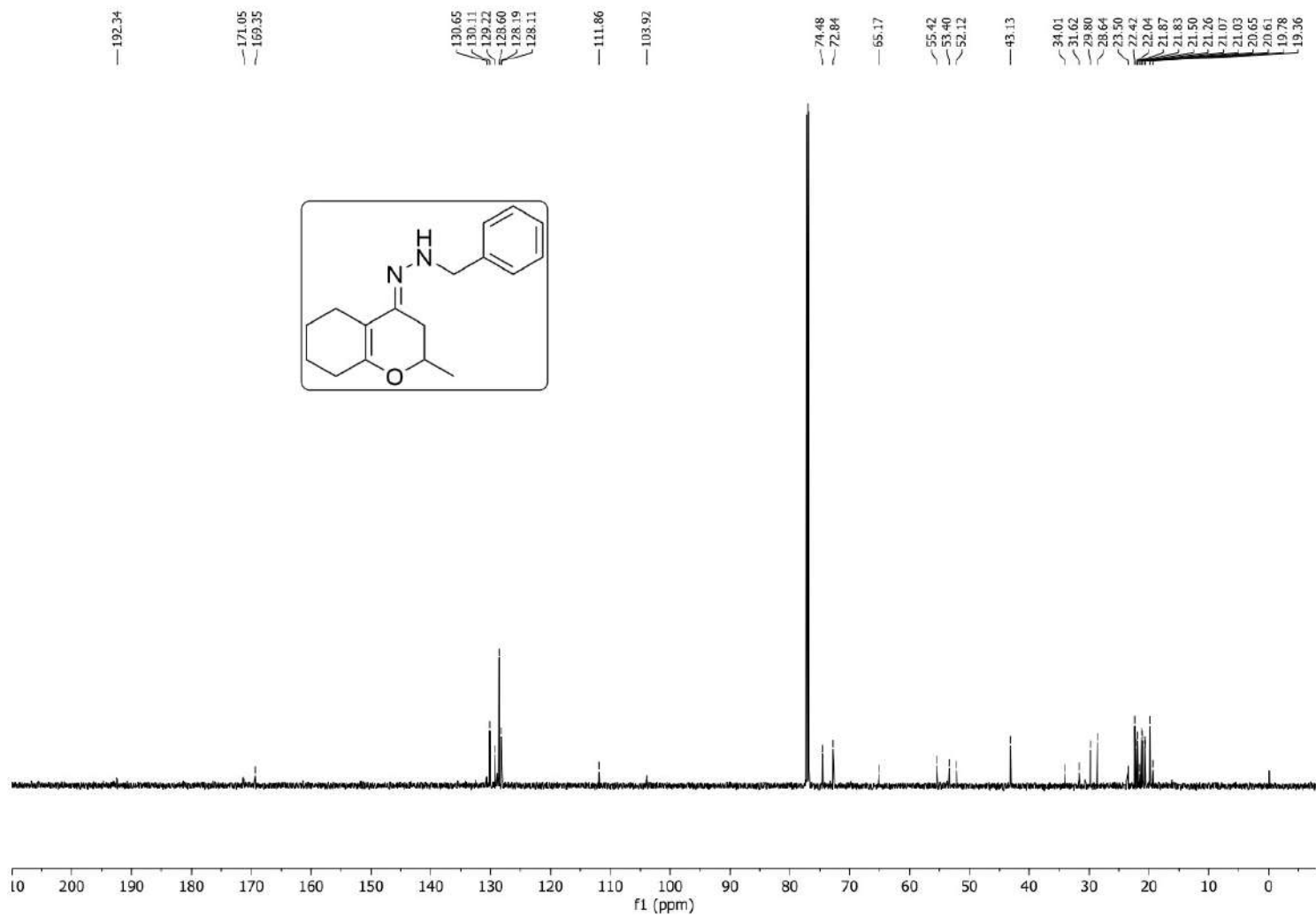




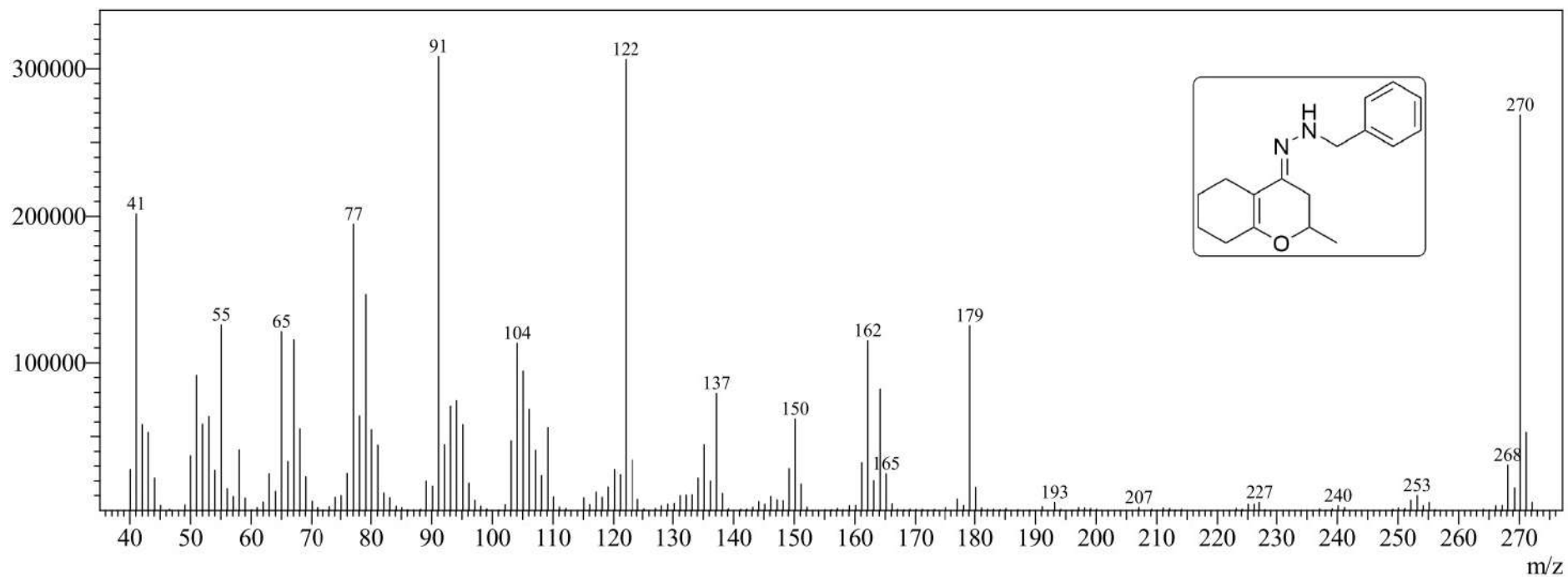
Espectro E – 26.1 – [IV (ATR) cm<sup>-1</sup>] – Molécula 234



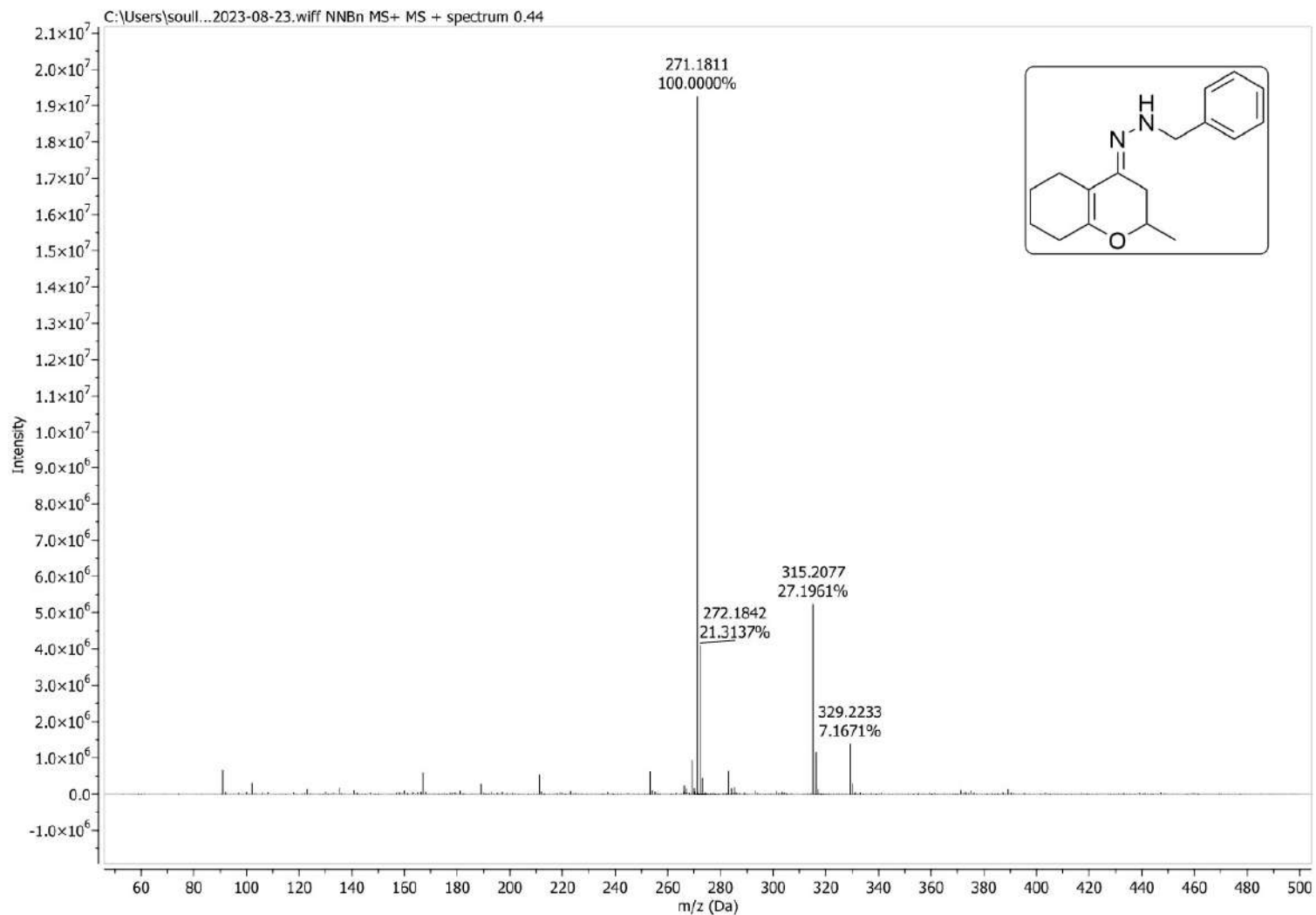
**Espectro E – 26.2 – ((RMN de  $^1\text{H}$ , 600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Molécula 234**



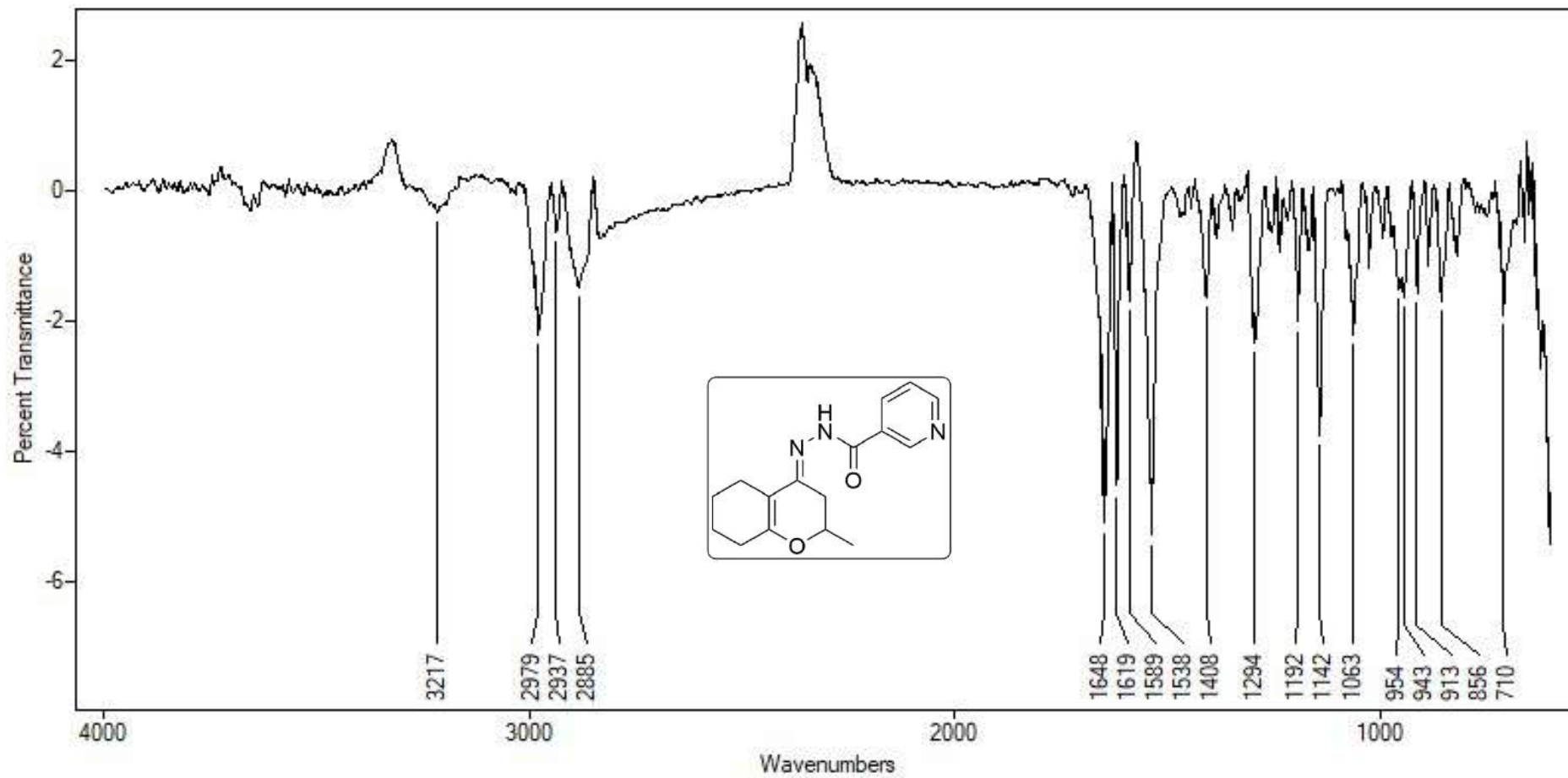
**Espectro E – 26.3 – (RMN de <sup>13</sup>C, 150,91 MHz, CDCl<sub>3</sub>) – Molécula 234**



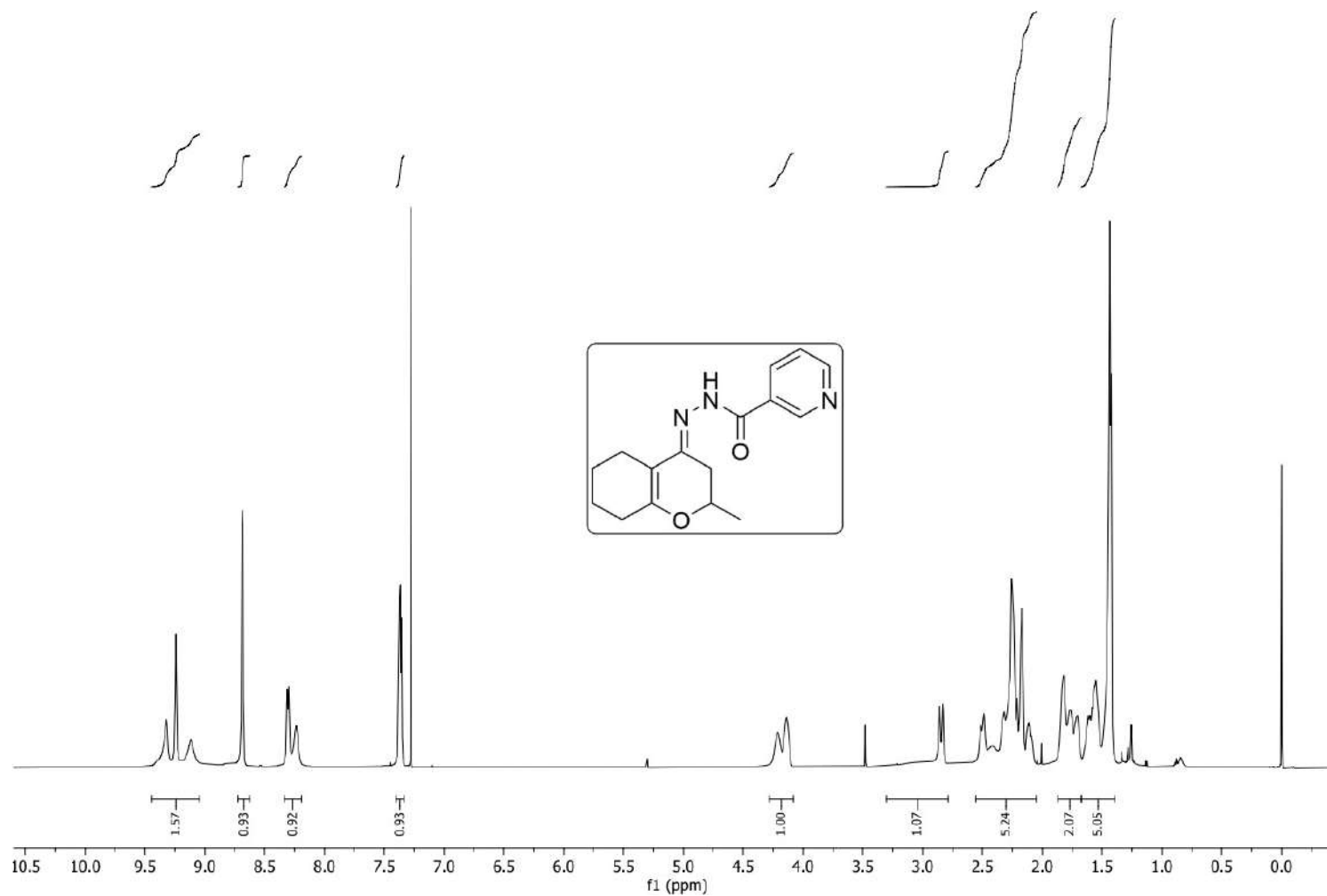
**Espectro E – 26.4 – [EM (70 eV)  $m/z$ ] – Molécula 234**



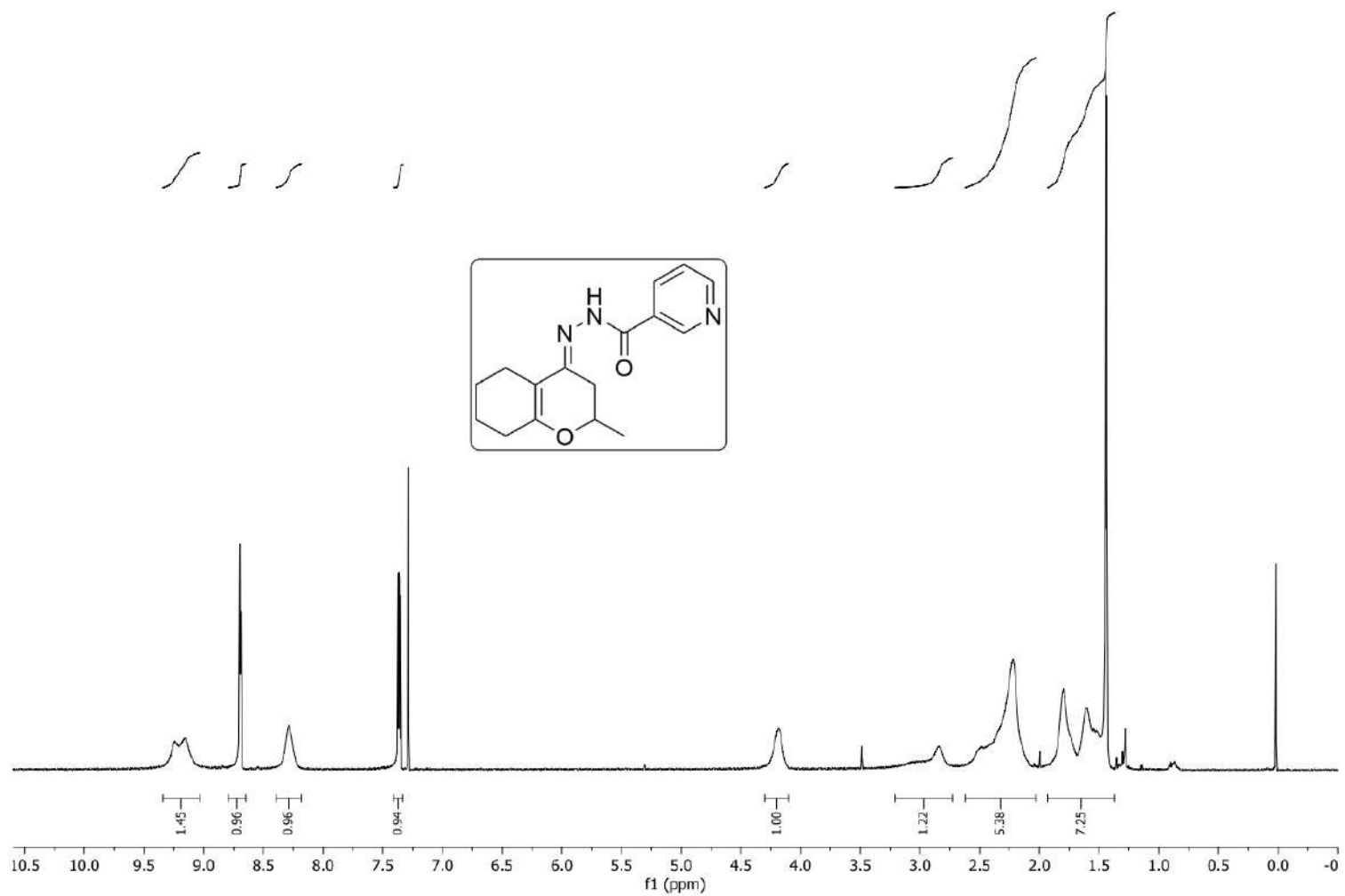
**Espectro E – 26.5 – EMAR (ESI-TOF)  $m/z$  calculado para  $C_{17}H_{23}N_2O = 271,1810$ ;  $[M + H]$  encontrado = 281,1811– Molécula 234**



Espectro E – 27.1 – [IV (ATR) cm<sup>-1</sup>] – Molécula 235

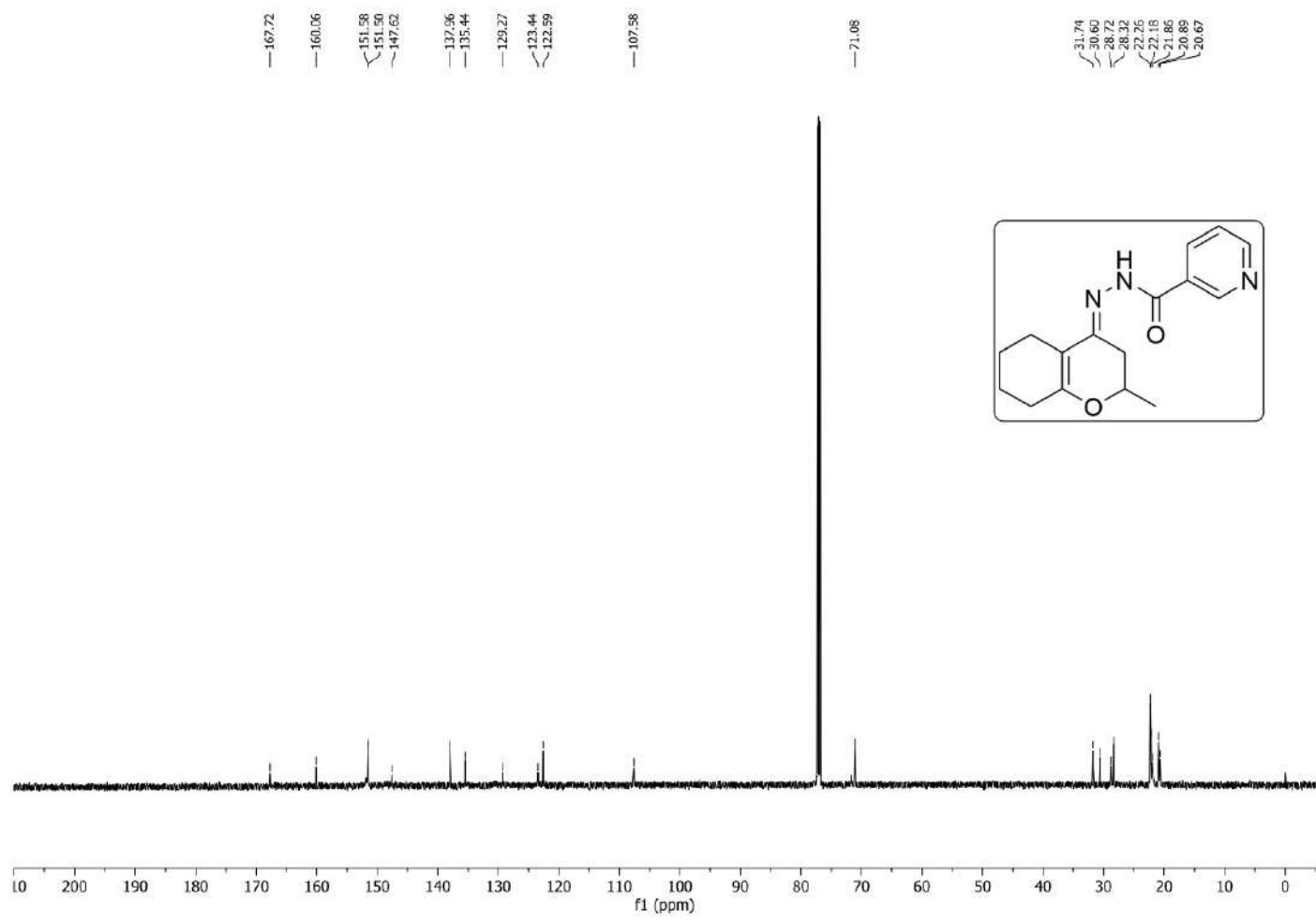


**Espectro E – 27.2 – ((RMN de <sup>1</sup>H, 600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C) – Molécula 235**

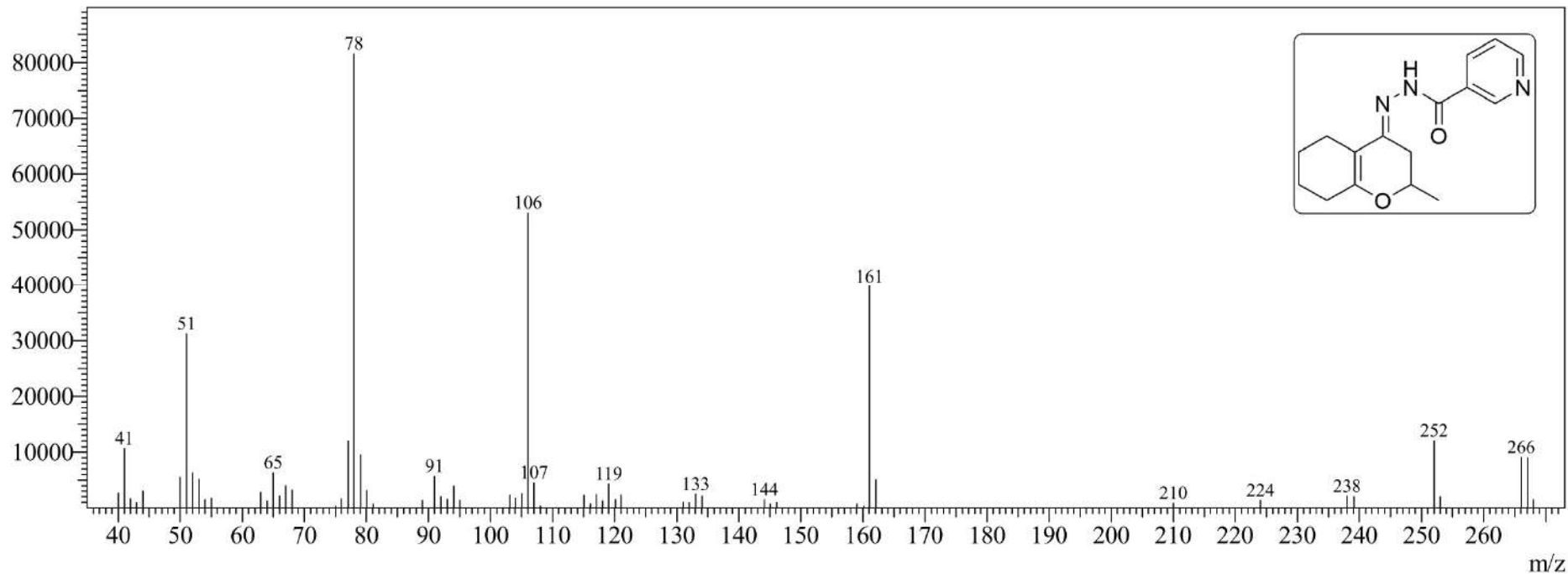


Espectro E – 27.3 – ((RMN de <sup>1</sup>H, 600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 50 °C) – Molécula 235

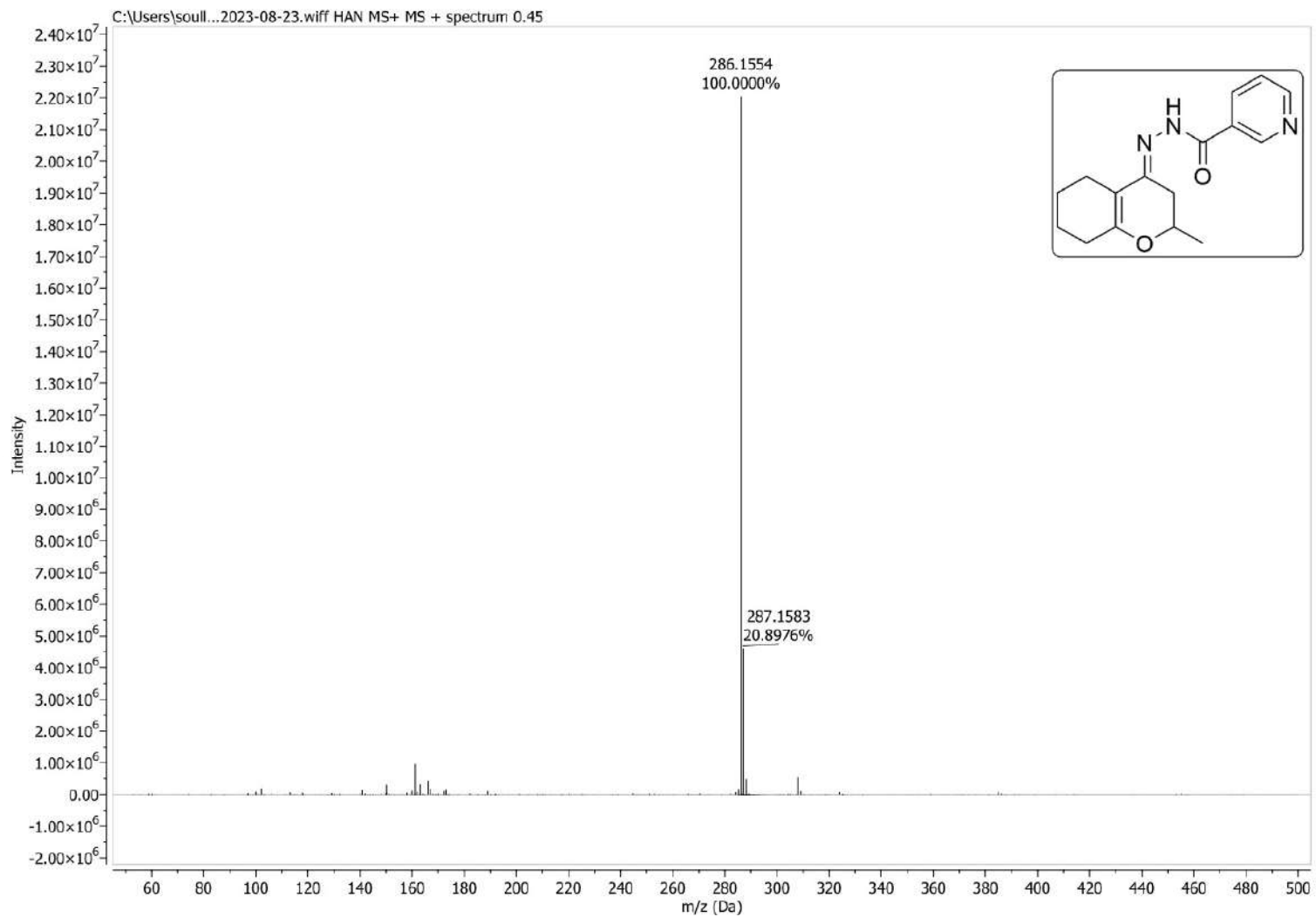




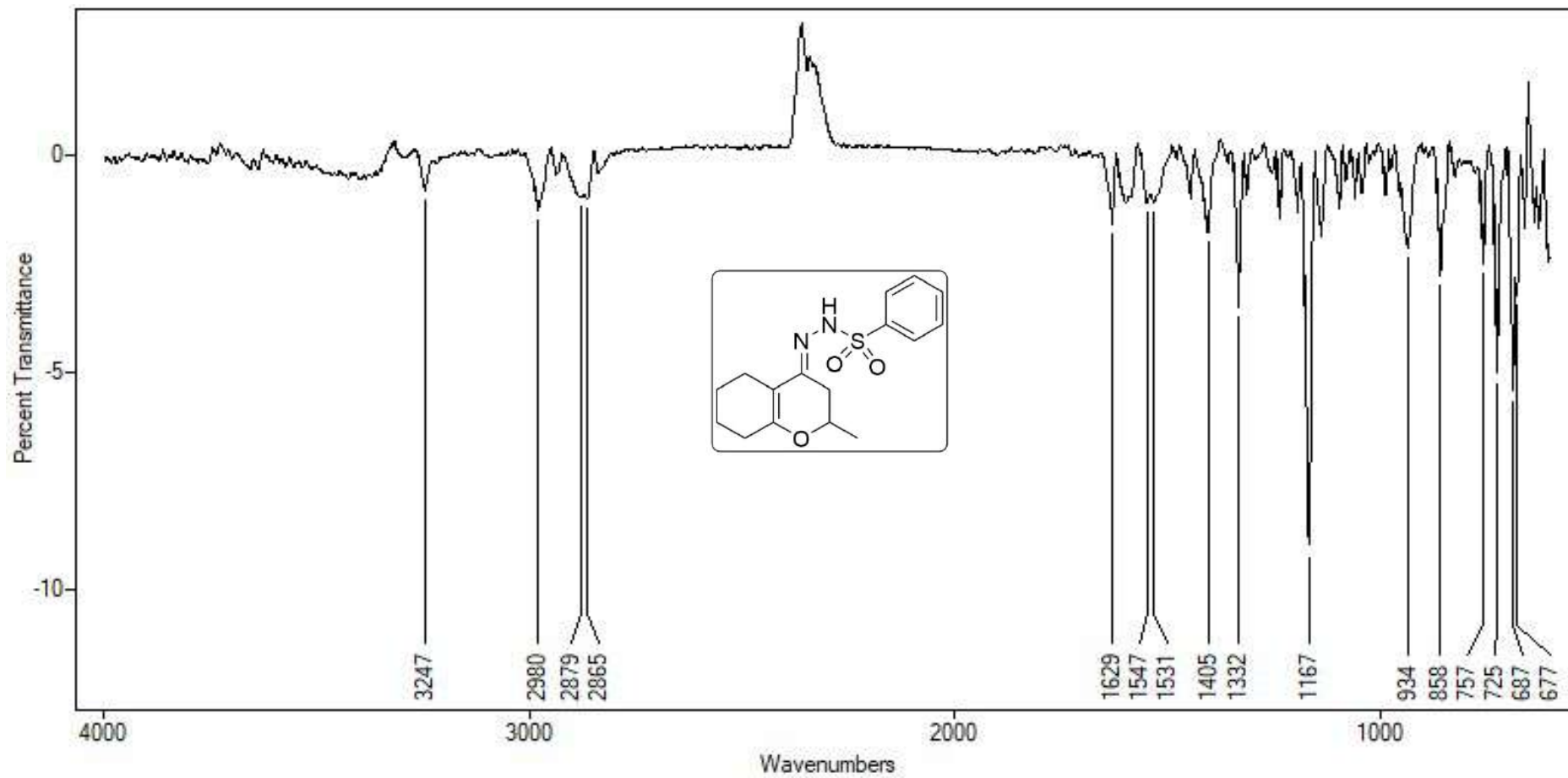
**Espectro E – 27.4 – (RMN de  $^{13}\text{C}$ , 150,91 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C) – Molécula 235**



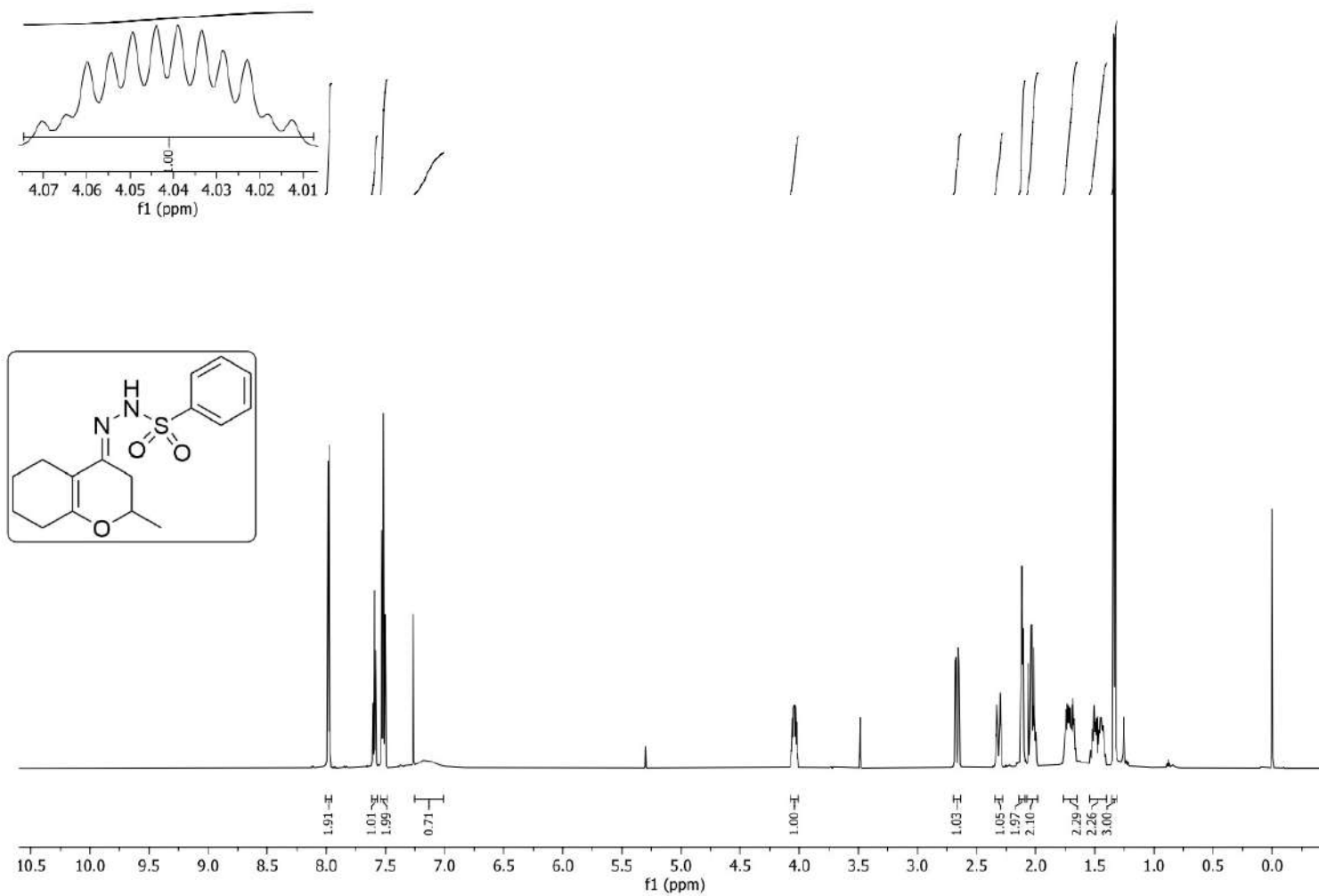
**Espectro E – 27.5 – [EM (70 eV)  $m/z$ ] – Molécula 235**



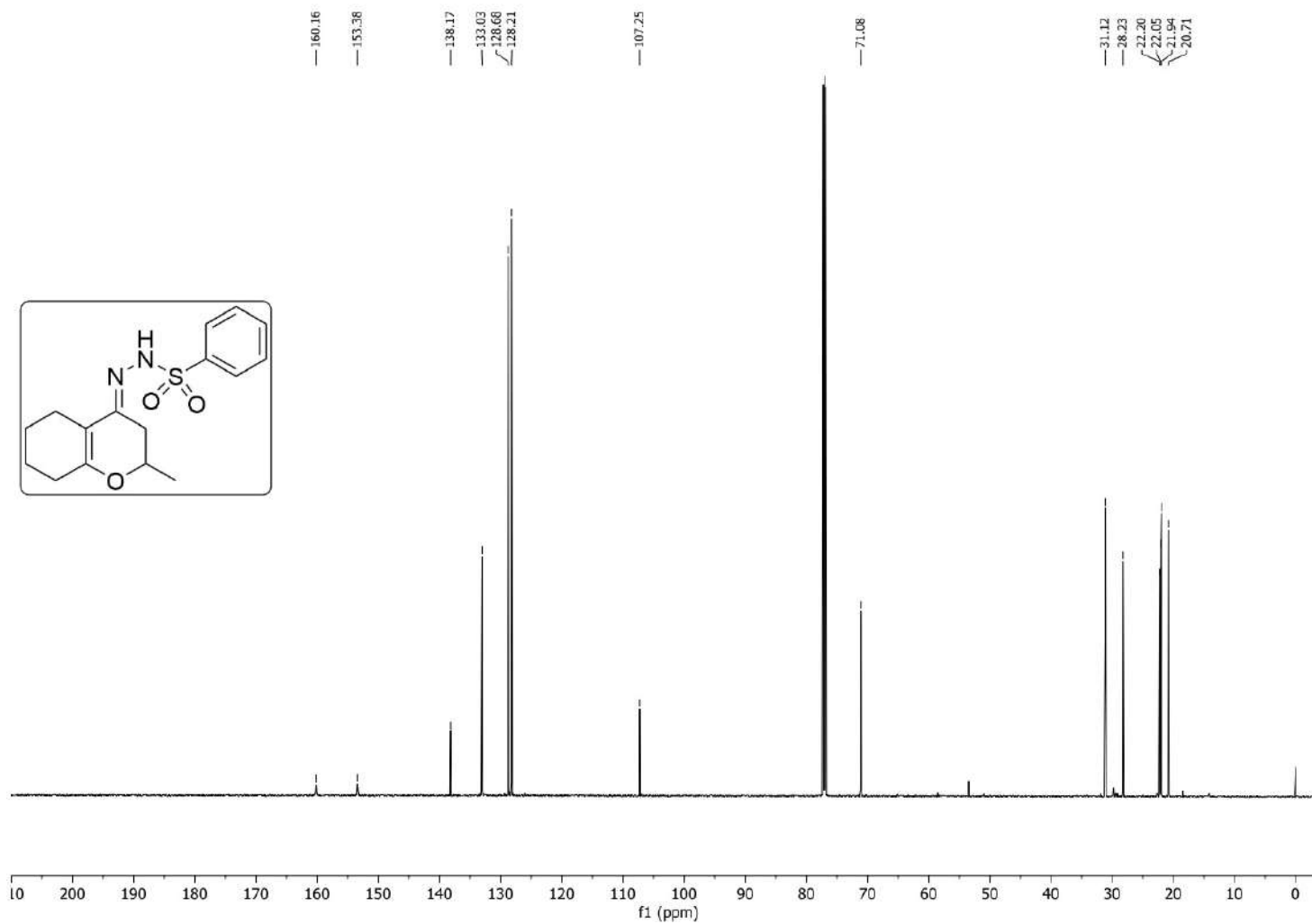
**Espectro E – 27.6 – EMAR (ESI-TOF)  $m/z$  calculado para  $C_{16}H_{19}N_3O_2 = 286,1556$ ;  $[M + H]$  encontrado = 286,1554– Molécula 235**



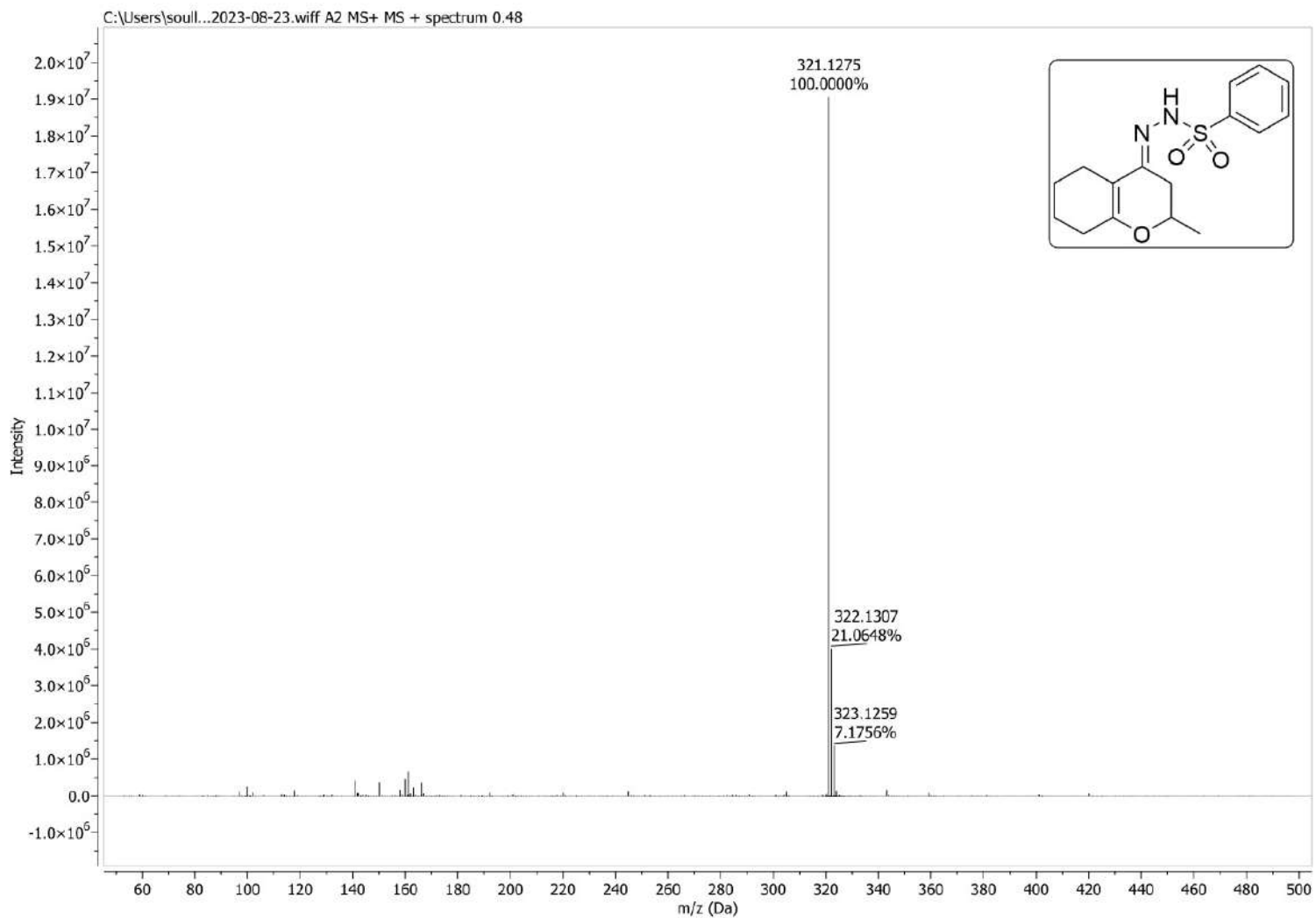
Espectro E – 28.1 – [IV (ATR) cm<sup>-1</sup>] – Molécula 236



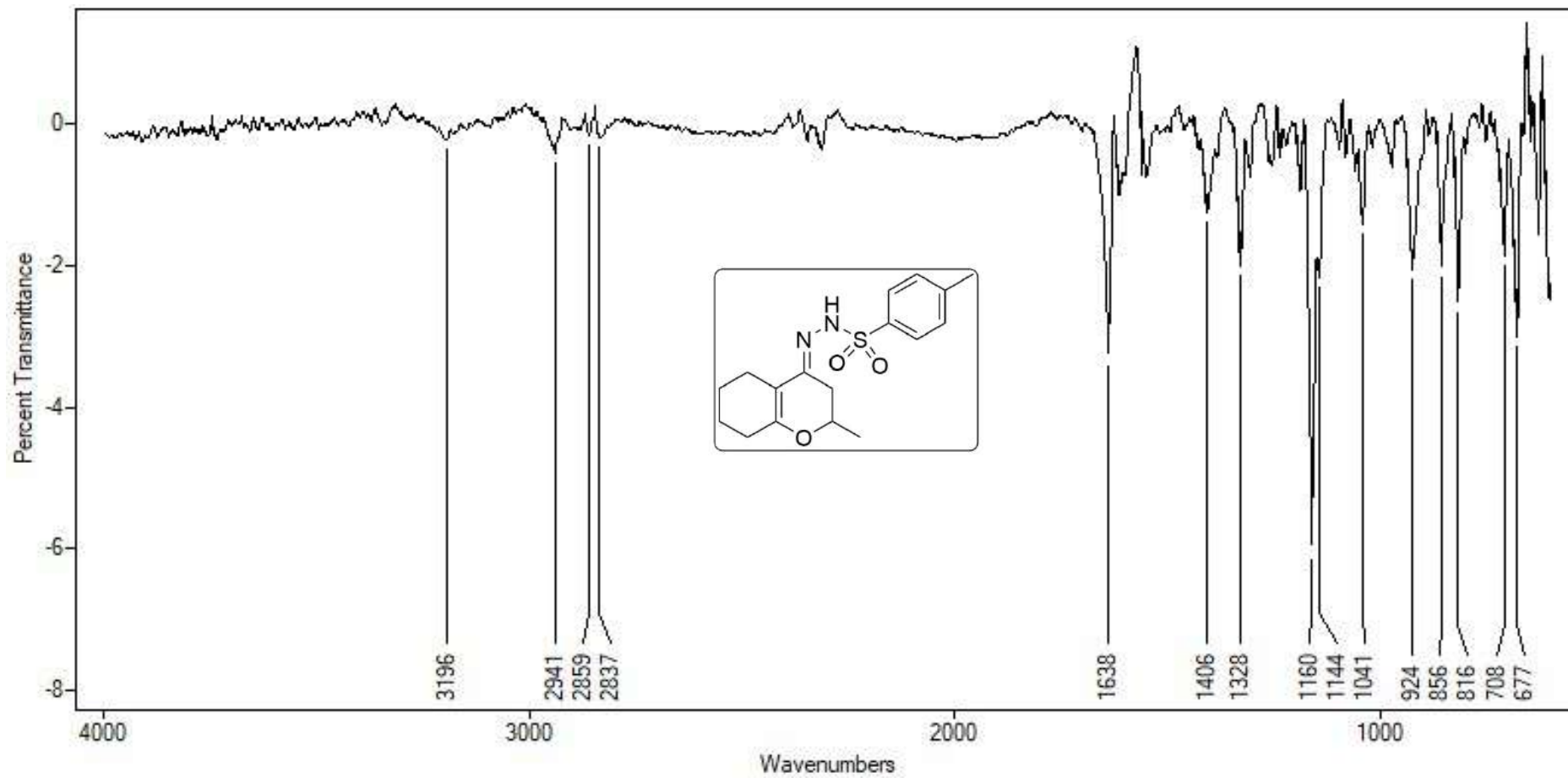
**Espectro E – 28.2 – ((RMN de  $^1\text{H}$ , 600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Molécula 236**



**Espectro E – 28.3 – (RMN de  $^{13}\text{C}$ , 150,91 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C) – Molécula 236**

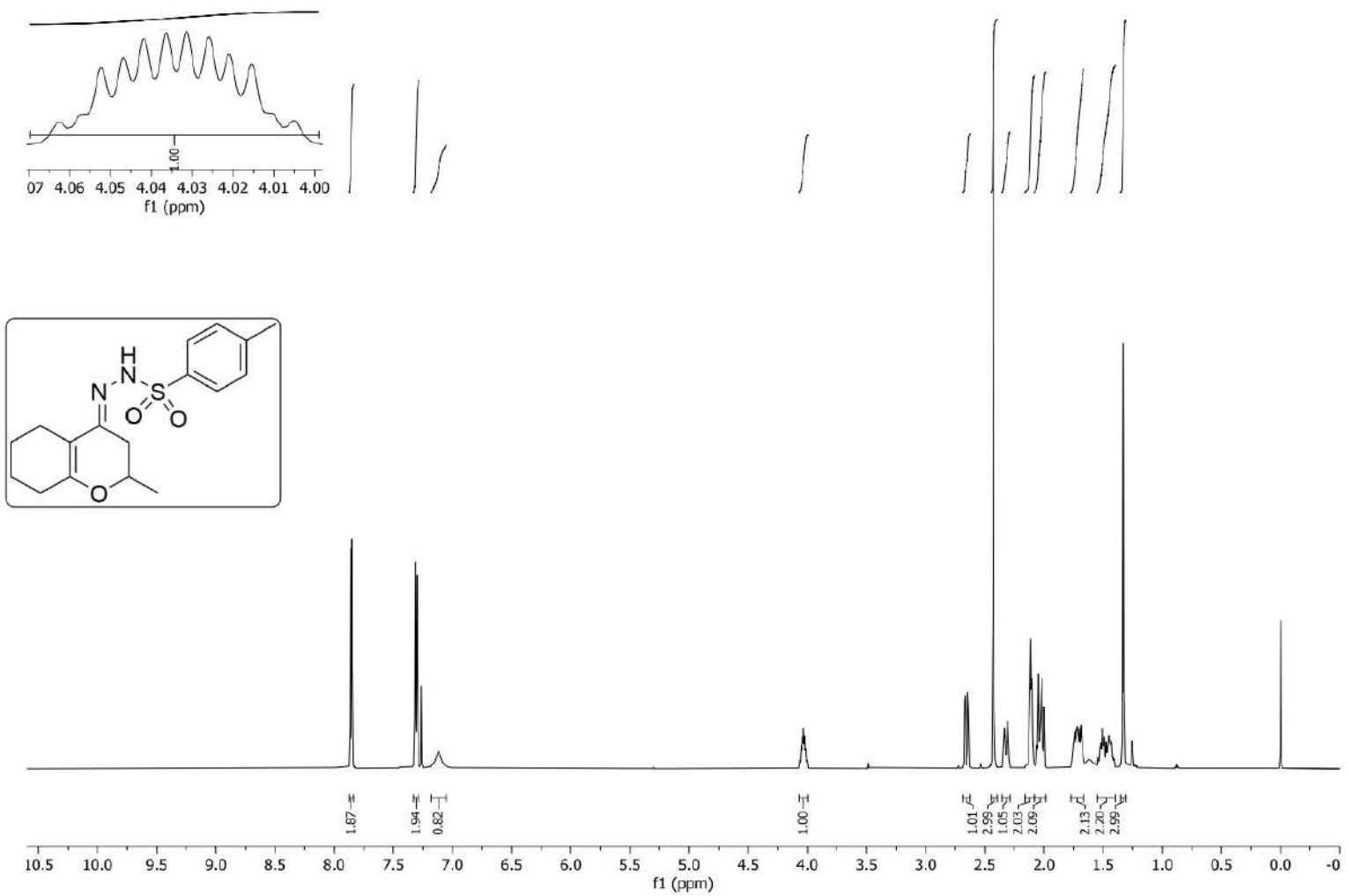


**Espectro E – 28.4 – EMAR (ESI-TOF)  $m/z$  calculado para  $C_{16}H_{21}N_2O_3S = 321,1273$ ;  $[M + H]$  encontrado = 321,1275 – Molécula 236**

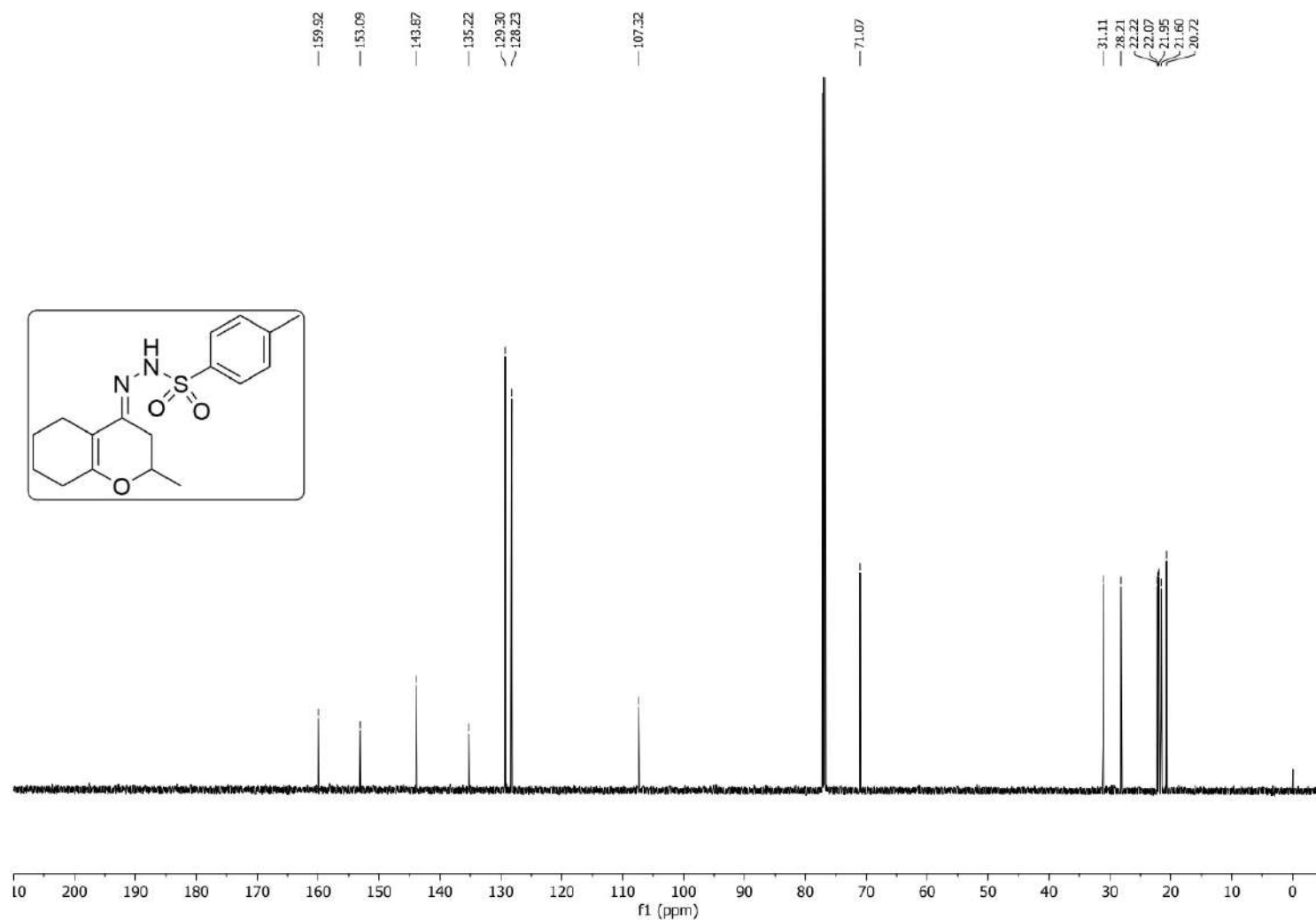


Espectro E – 29.1 – [IV (ATR) cm<sup>-1</sup>] – Molécula 237

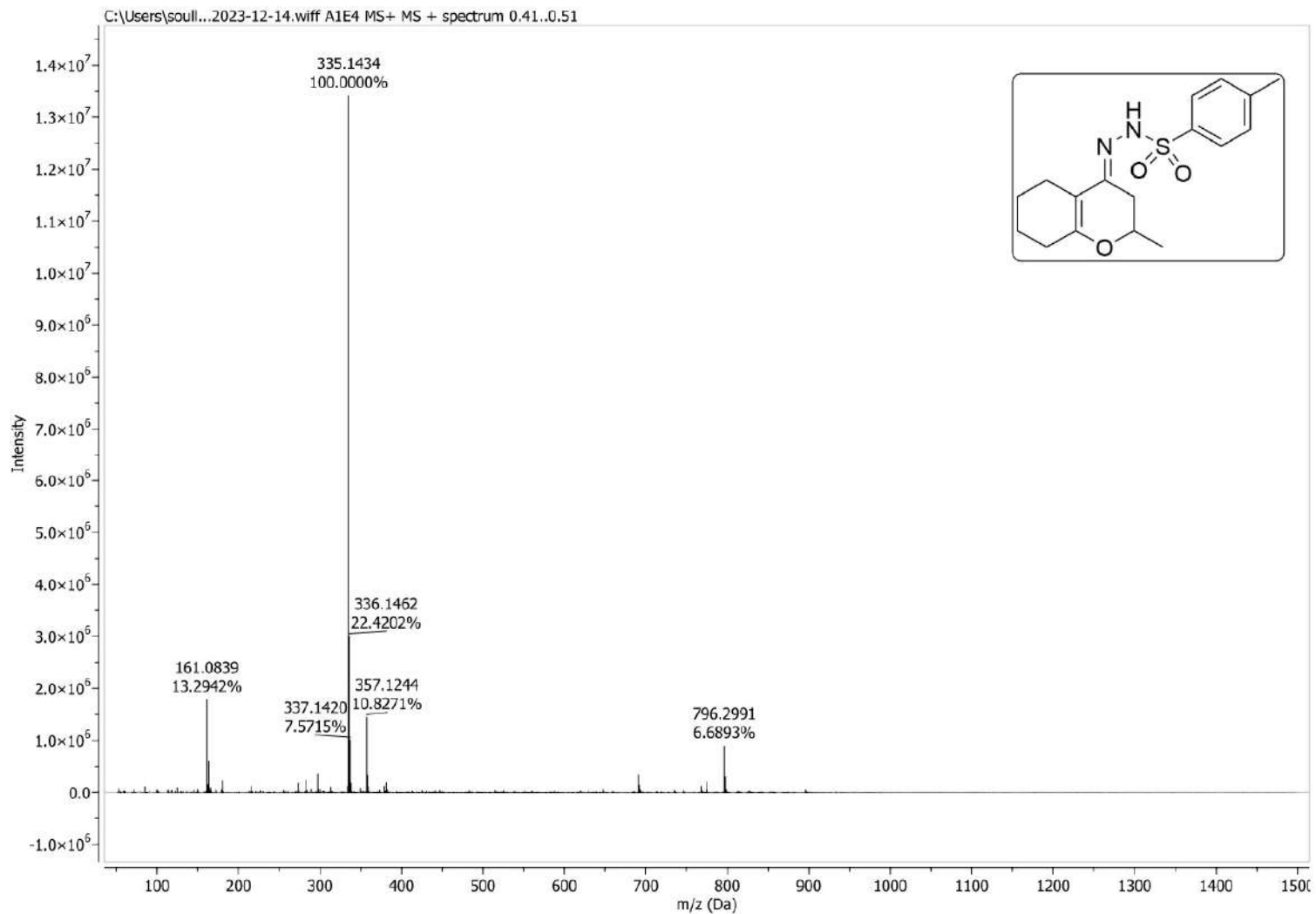




**Espectro E – 29.2 – ((RMN de <sup>1</sup>H, 600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) – Molécula 237**



**Espectro E – 29.3 – (RMN de  $^{13}\text{C}$ , 150,91 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C) – Molécula 237**



**Espectro E – 29.4 – calculado para  $C_{17}H_{23}N_2O_3S = 335,1429$ ;  $[M + H]$  encontrado = 335,1434 – Molécula 237**

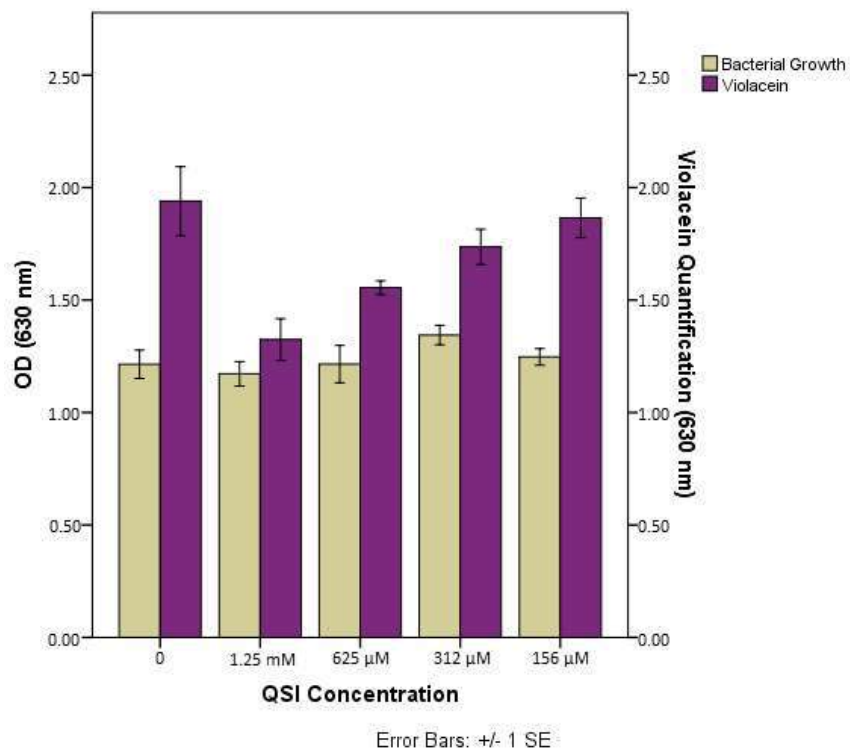


Figura F1 – Ensaio de quantificação de violaceína com 144

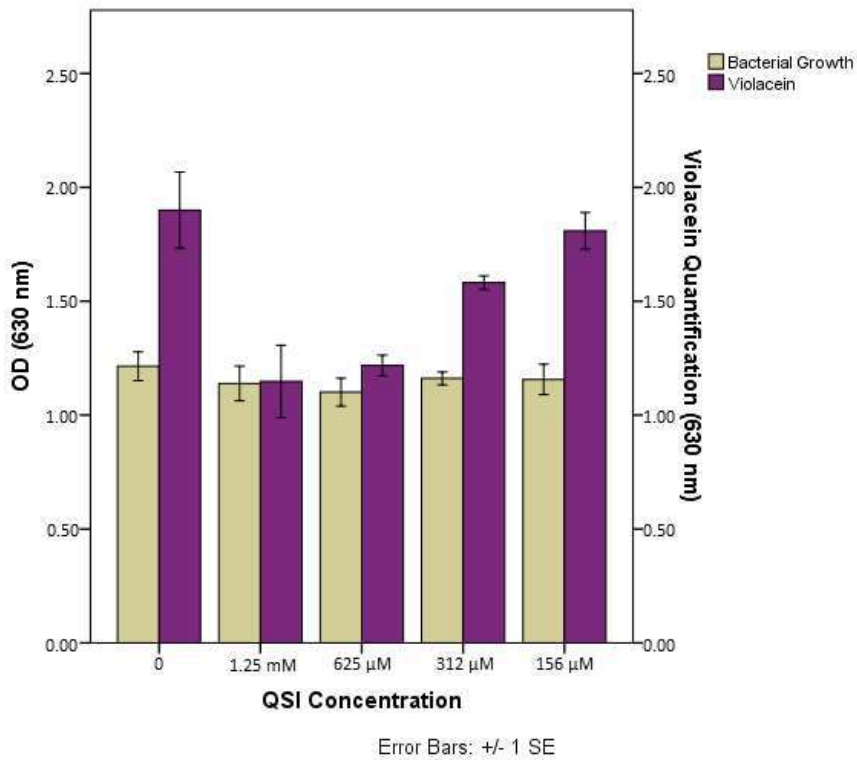


Figura F2 – Ensaio de quantificação de violaceína com 145

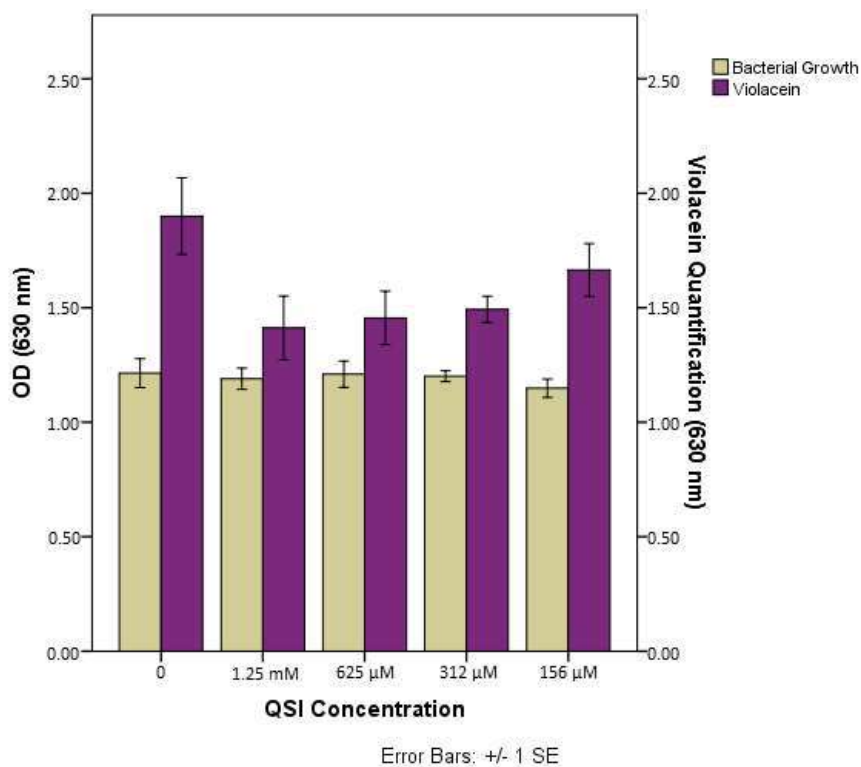


Figura F3 – Ensaio de quantificação de violaceína com 146

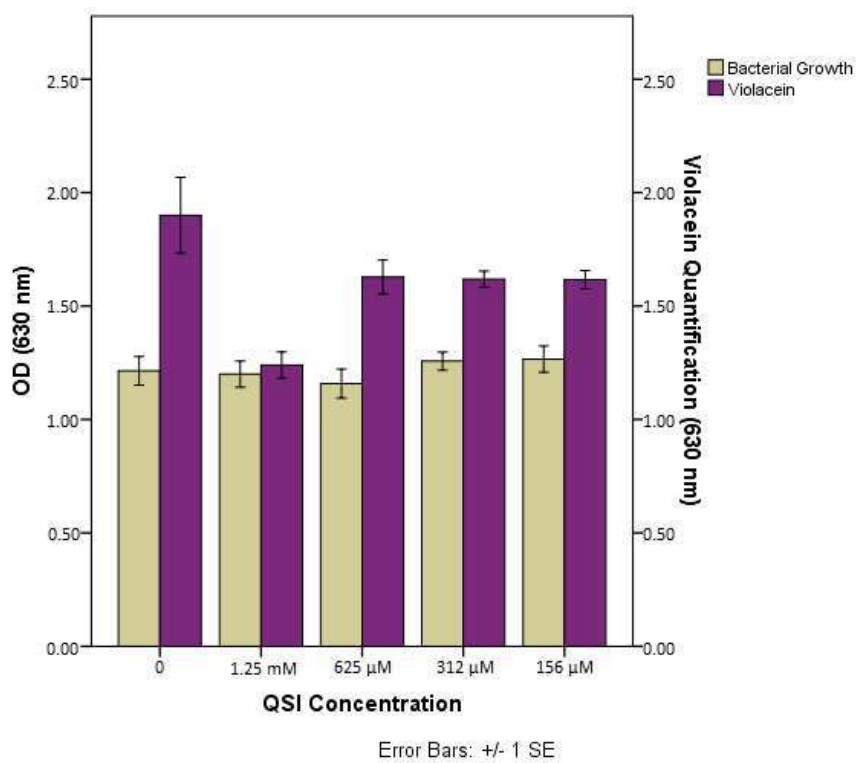


Figura F4 – Ensaio de quantificação de violaceína com 140

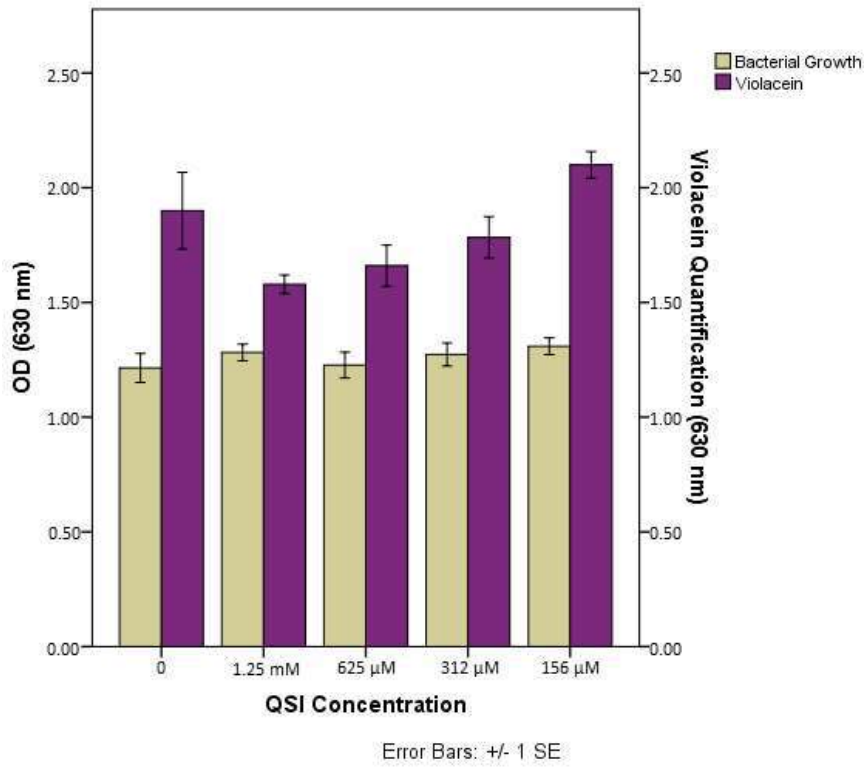


Figura F5 – Ensaio de quantificação de violaceína com 141

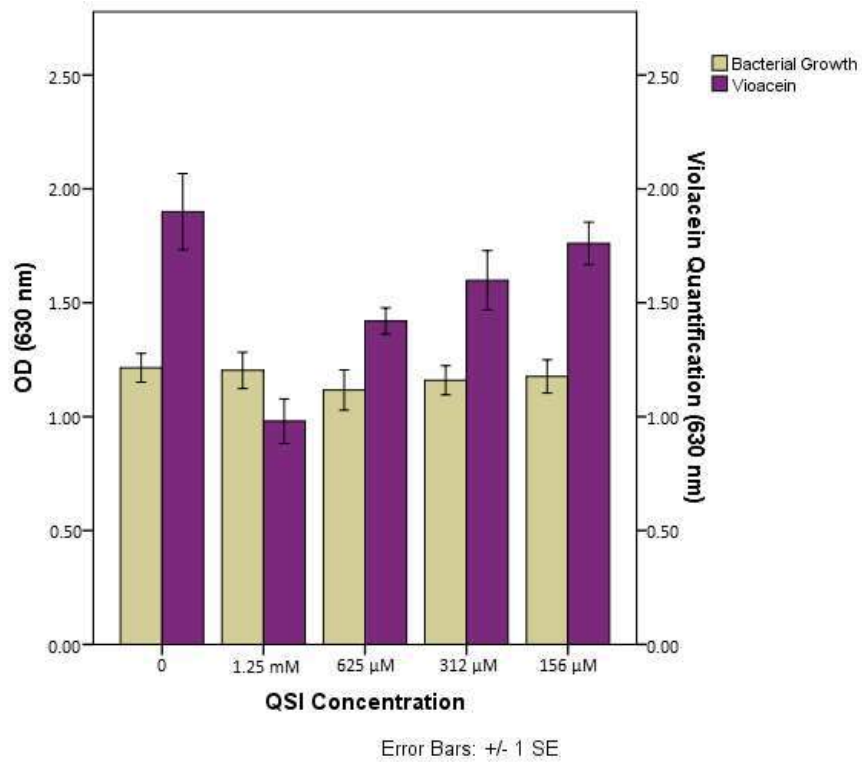


Figura F6 – Ensaio de quantificação de violaceína com 147

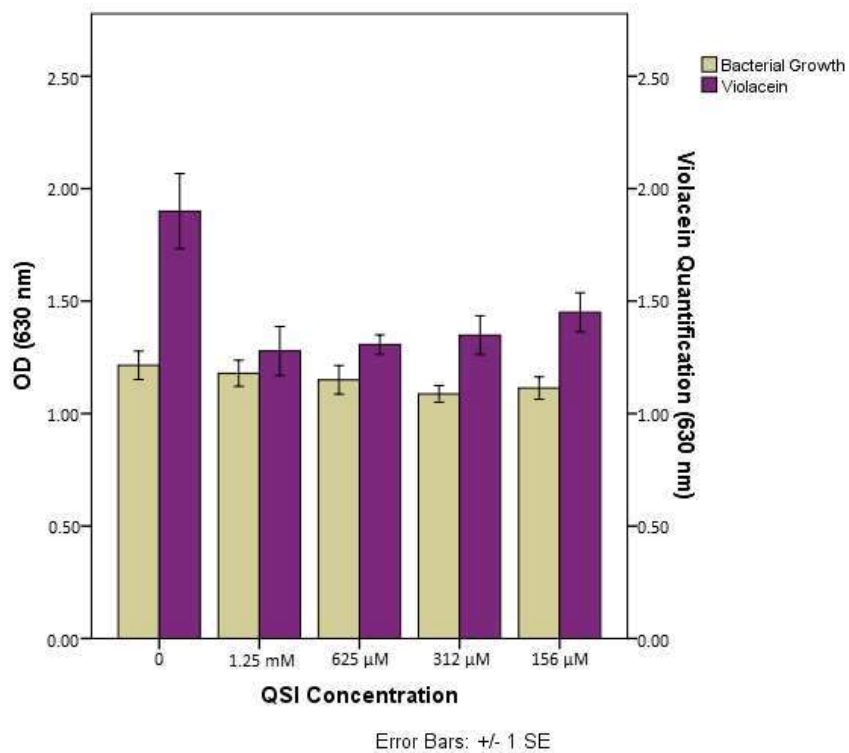


Figura F7 – Ensaio de quantificação de violaceína com 148

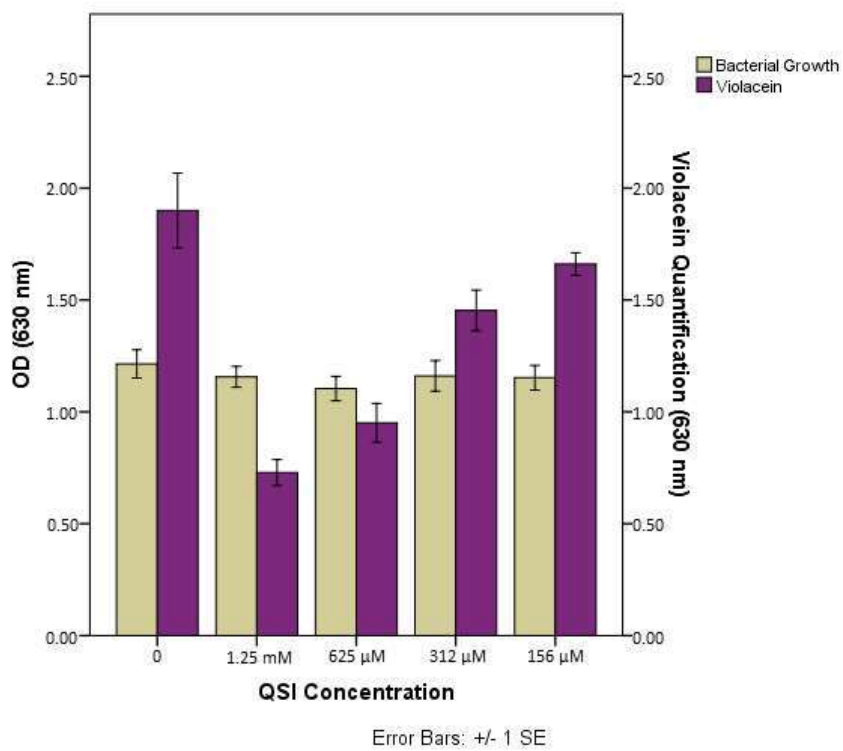
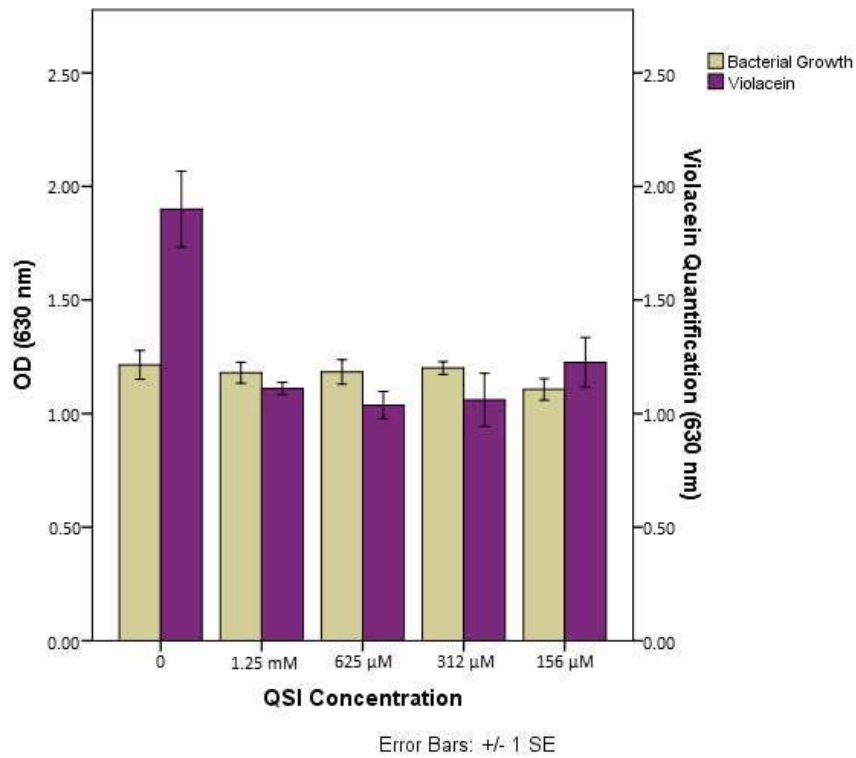
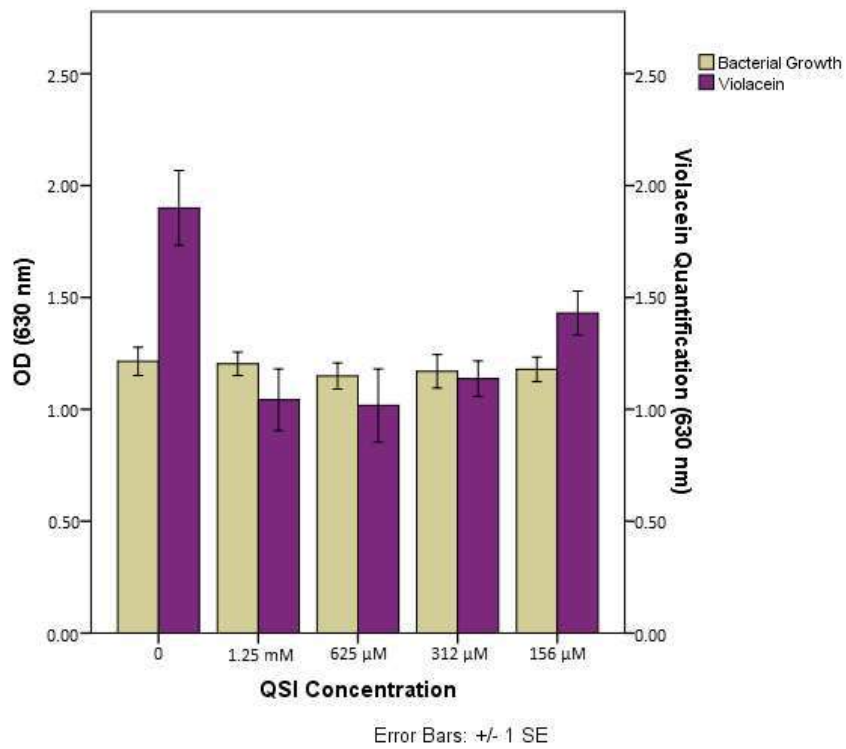


Figura F8 – Ensaio de quantificação de violaceína com 142



**Figura F9 – Ensaio de quantificação de violaceína com 143**



**Figura F10 – Ensaio de quantificação de violaceína com 73**



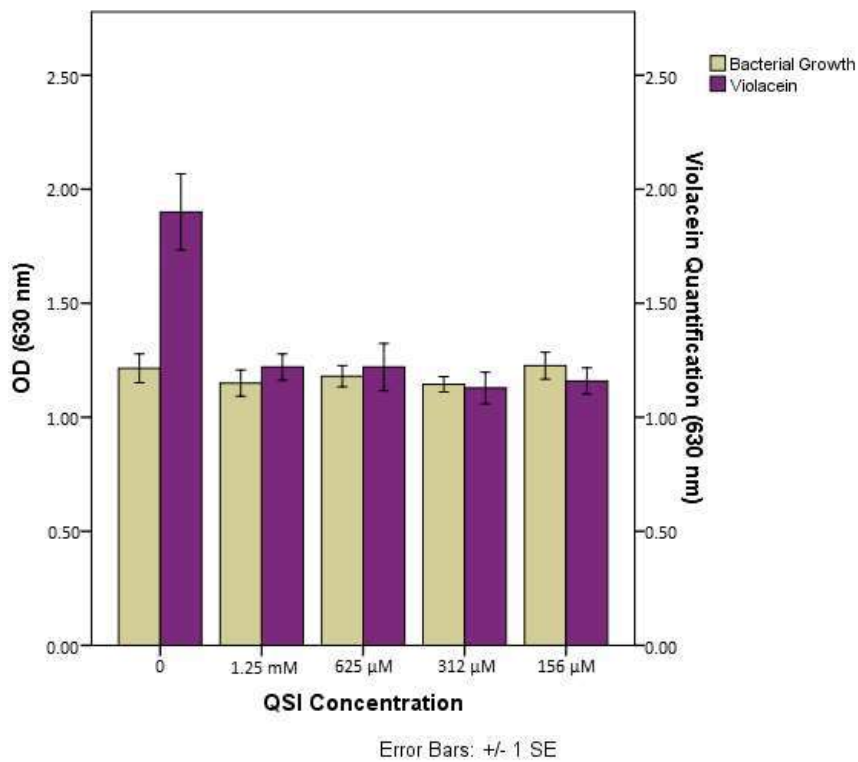


Figura F11 – Ensaio de quantificação de violaceína com 149

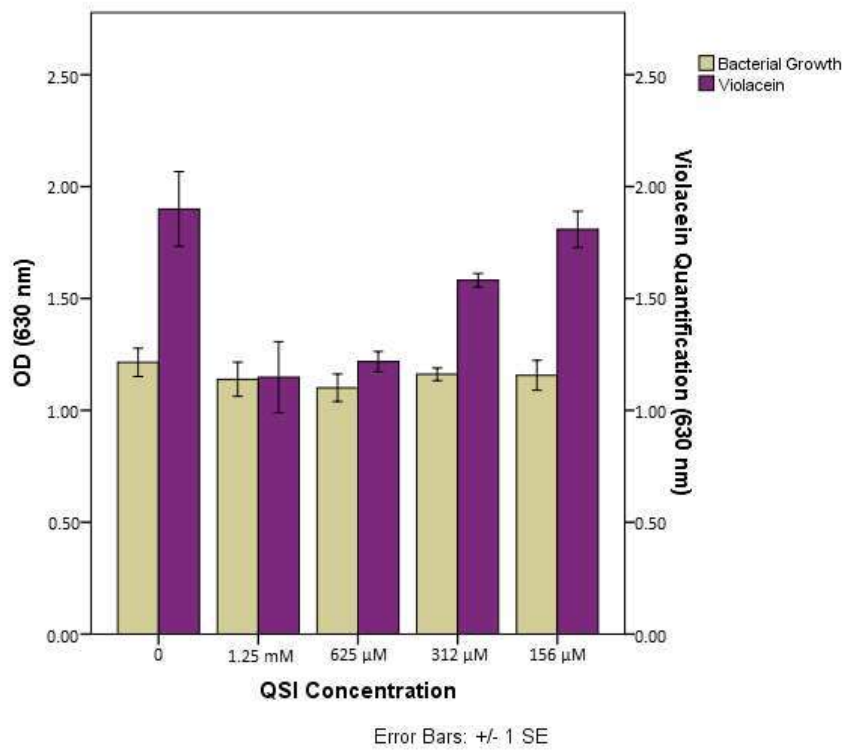
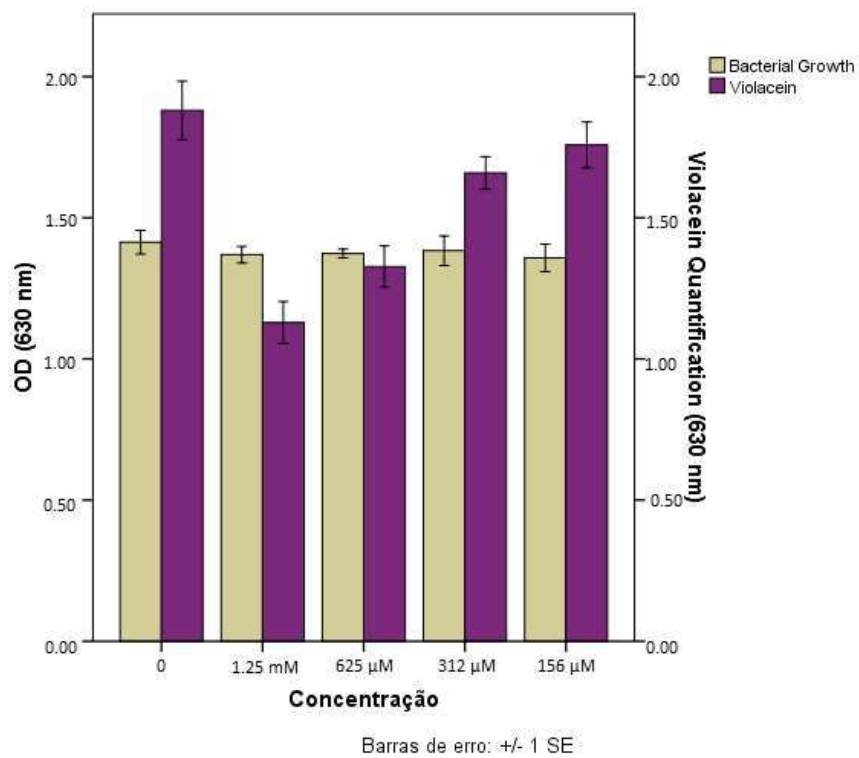
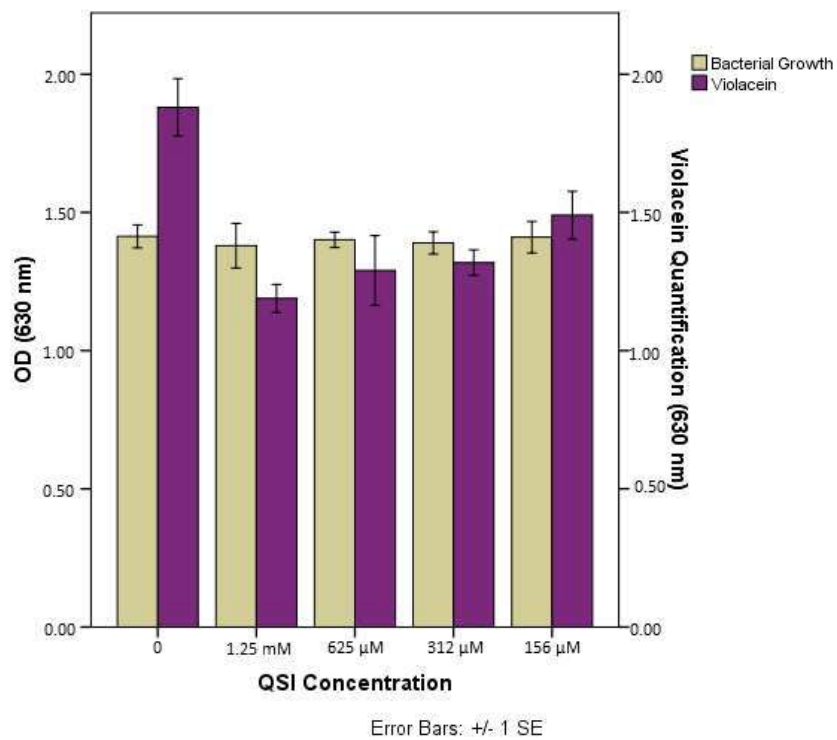


Figura F12 – Ensaio de quantificação de violaceína com 150



**Figura F13 – Ensaio de quantificação de violaceína com 151**



**Figura F14 – Ensaio de quantificação de violaceína com 152**

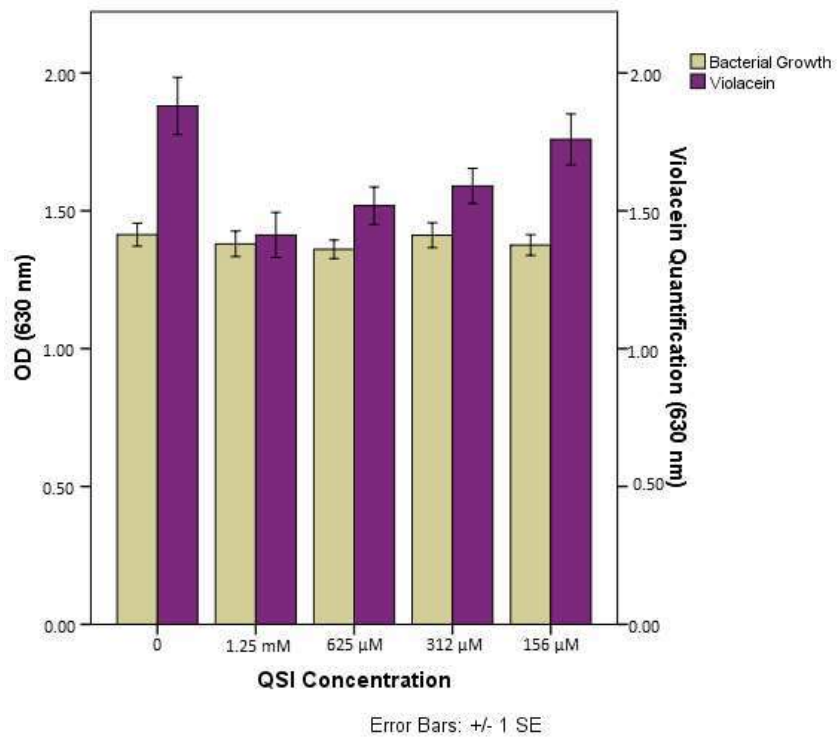


Figura F15 – Ensaio de quantificação de violaceína com 153

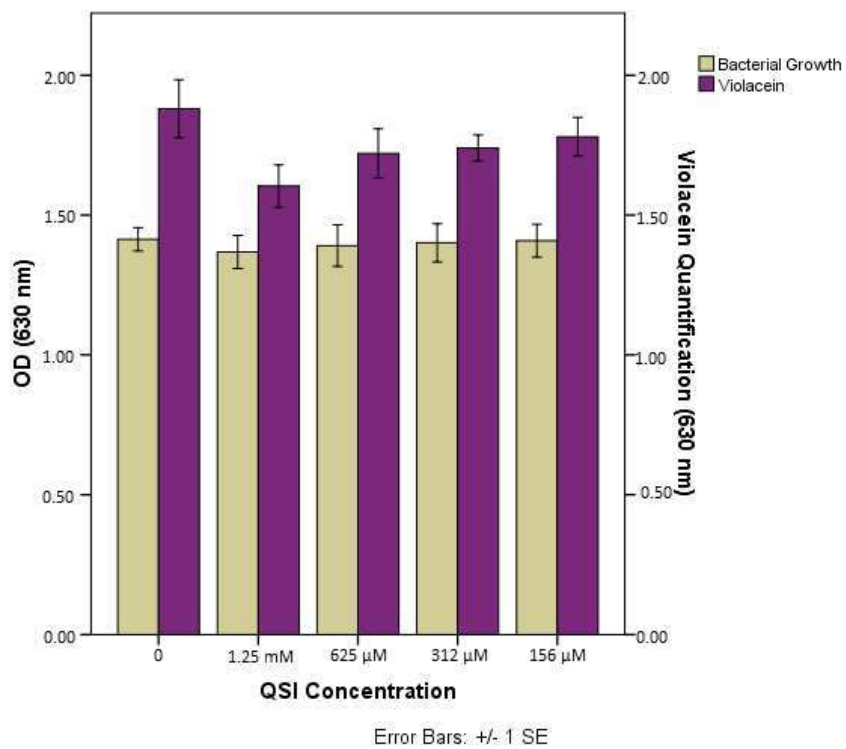
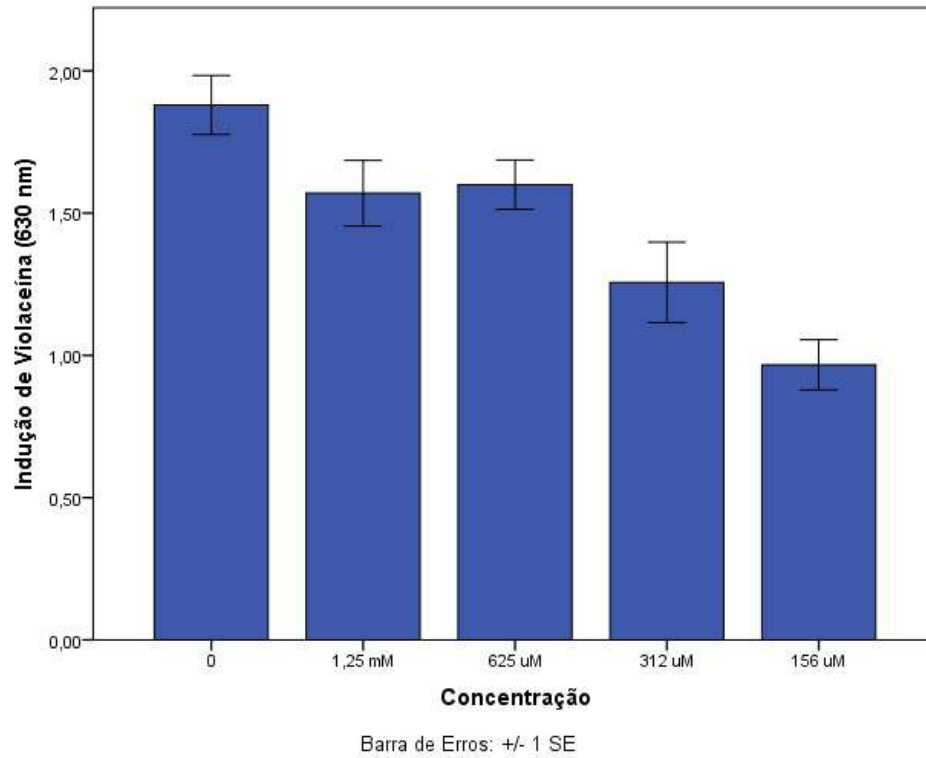
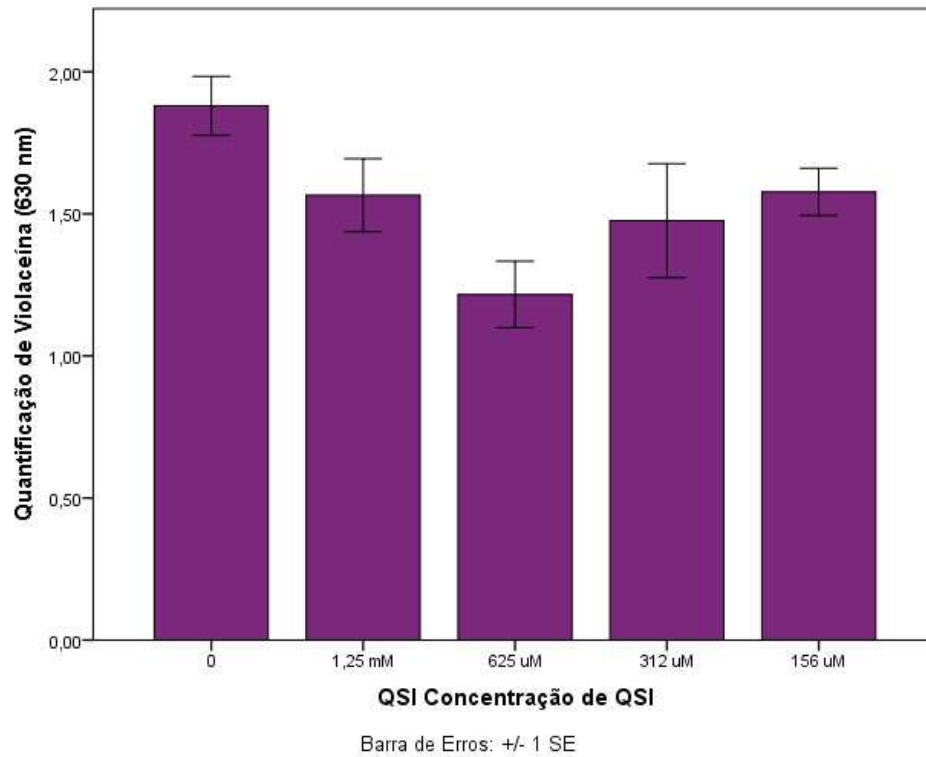


Figura F16 – Ensaio de quantificação de violaceína com 154



**Figura F17.1 – Ensaio de indução de violaceína com 155 no ensaio Branco**



**Figura F17.2 – Ensaio de inibição de violaceína com 155**

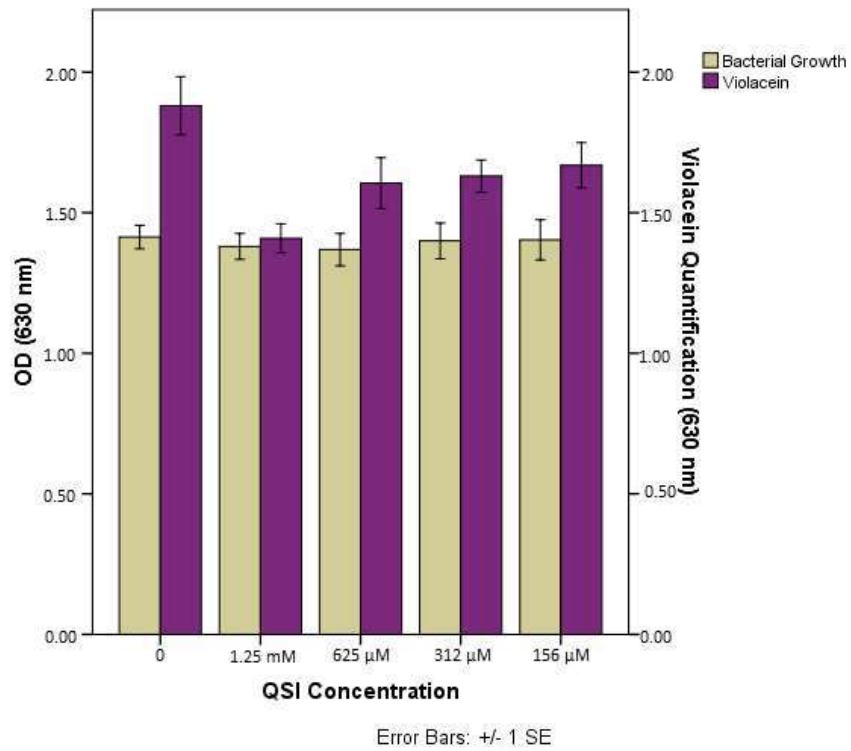


Figura F18 – Ensaio de quantificação de violaceína com 156

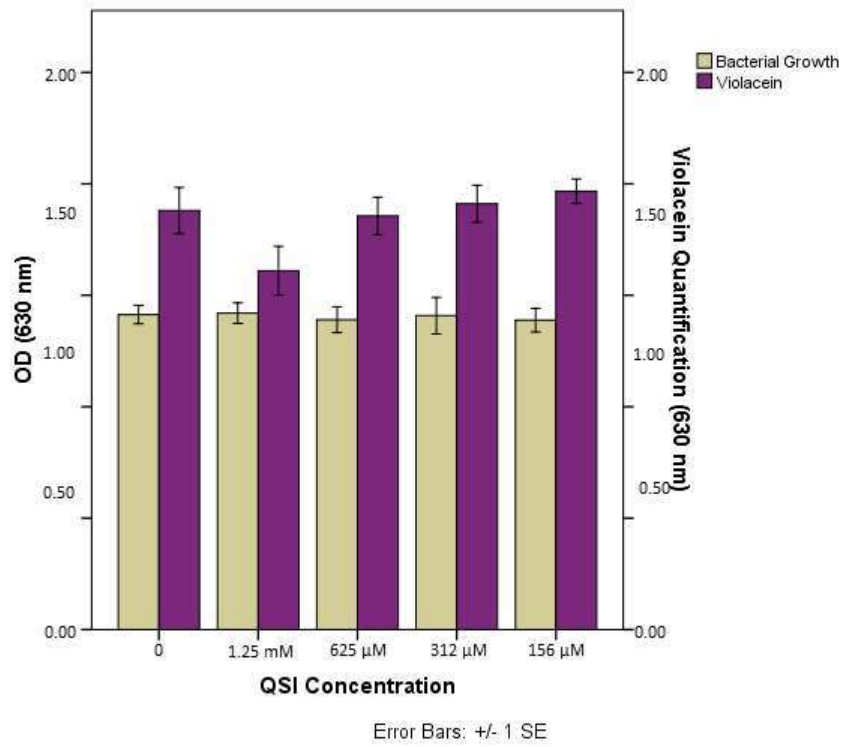


Figura F19 – Ensaio de quantificação de violaceína com 157

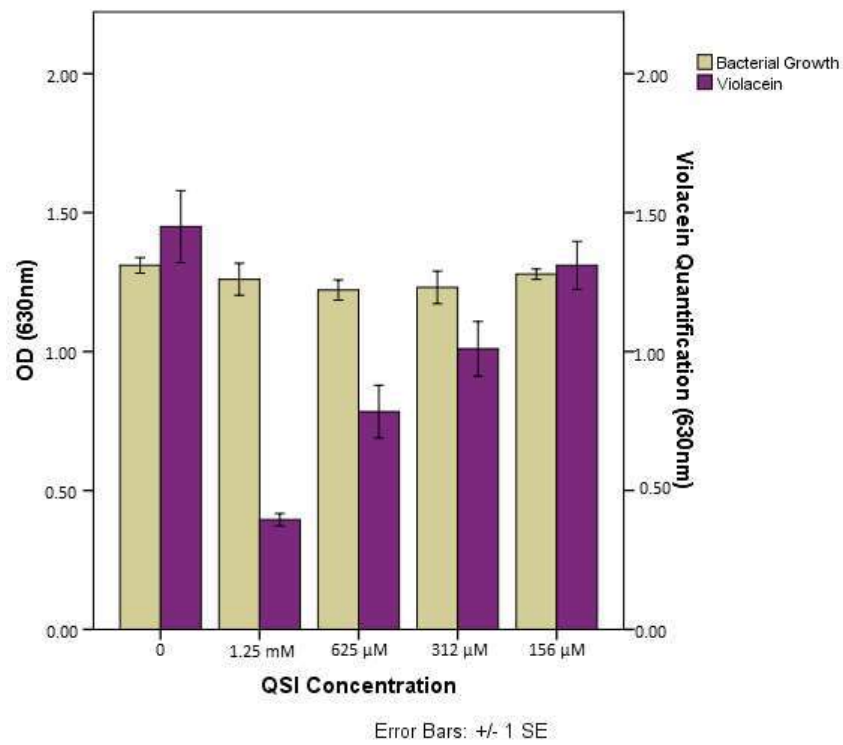


Figura F20 – Ensaio de quantificação de violaceína com 159

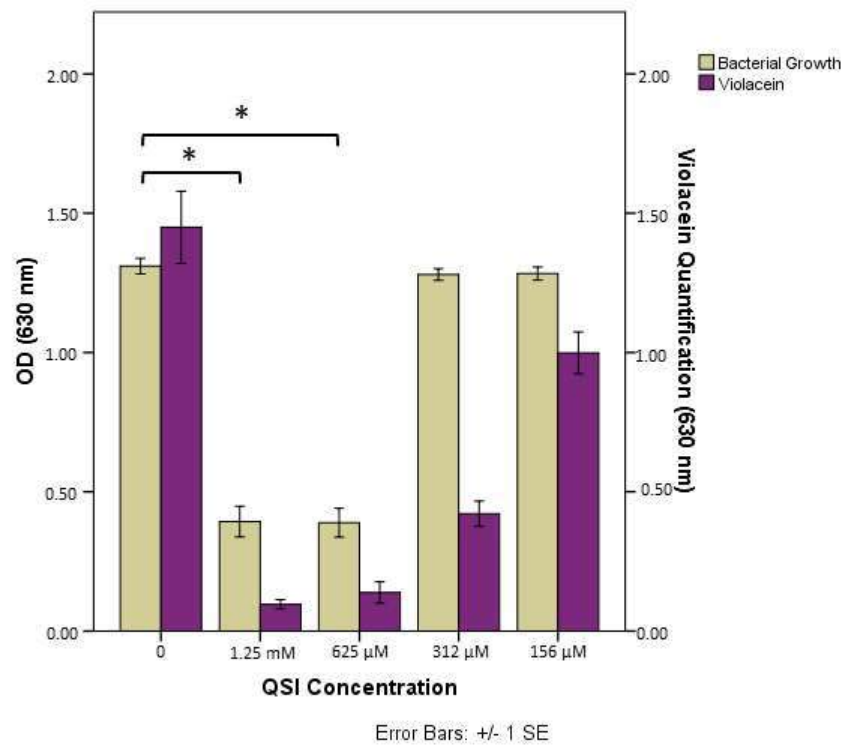


Figura F21 – Ensaio de quantificação de violaceína com 160. \*Morte celular

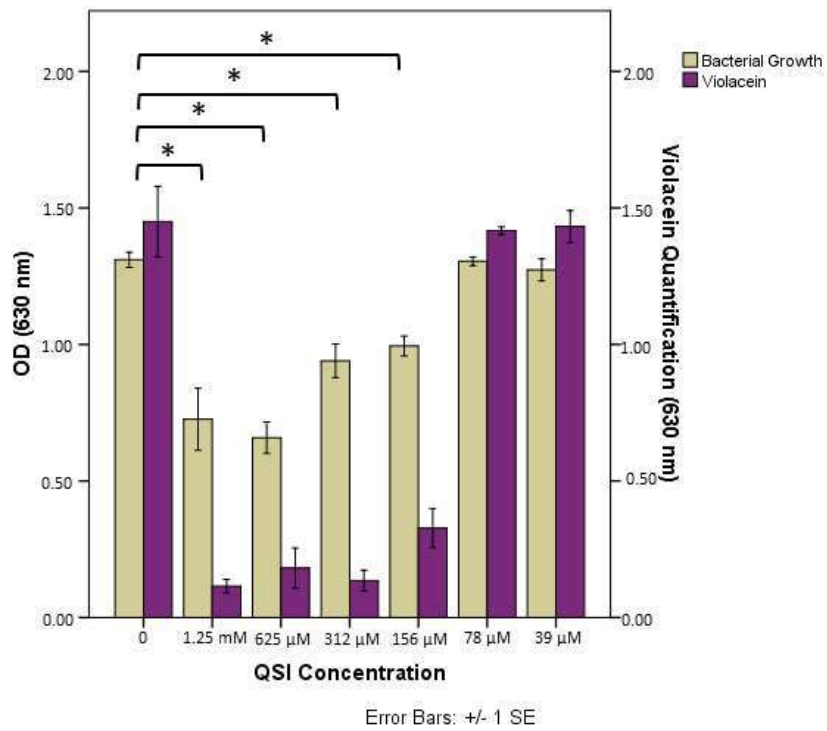


Figura F22 – Ensaio de quantificação de violaceína com 161. \*Morte celular

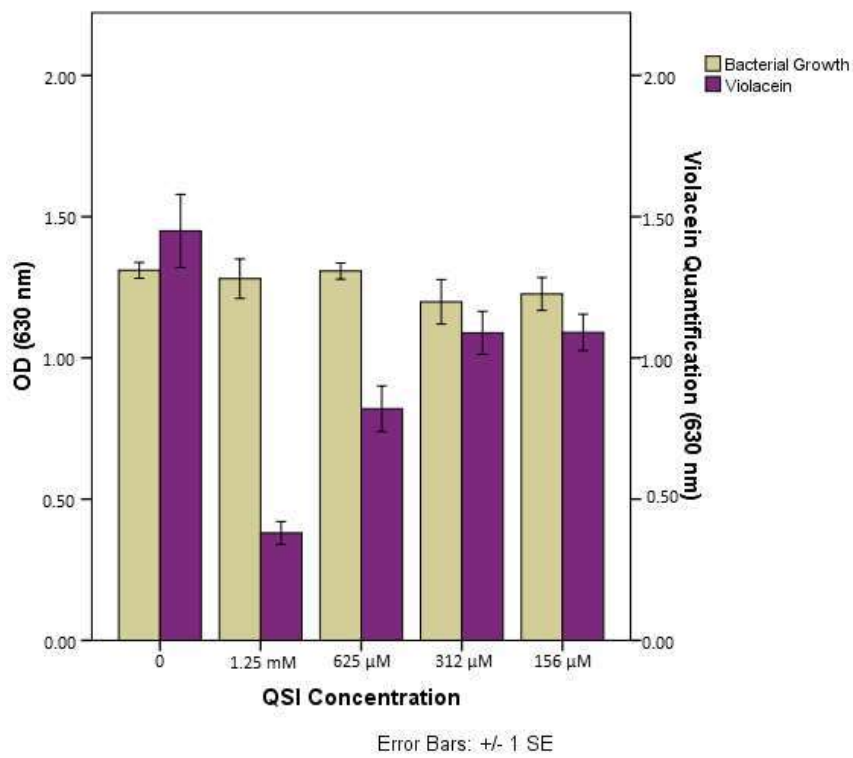


Figura F23 – Ensaio de quantificação de violaceína com 72

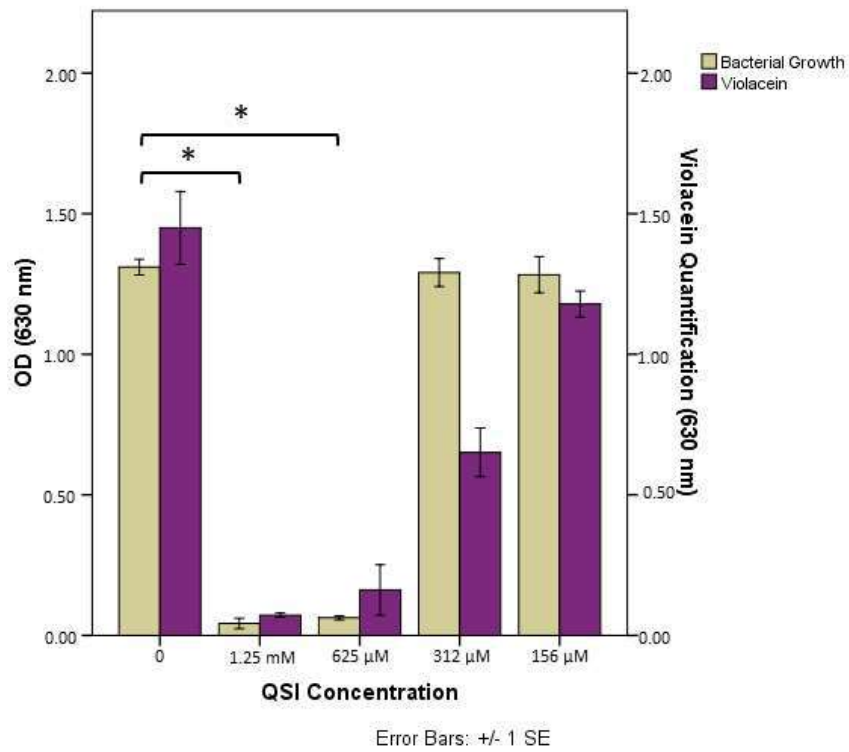


Figura F24 – Ensaio de quantificação de violaceína com 68. \*Morte celular

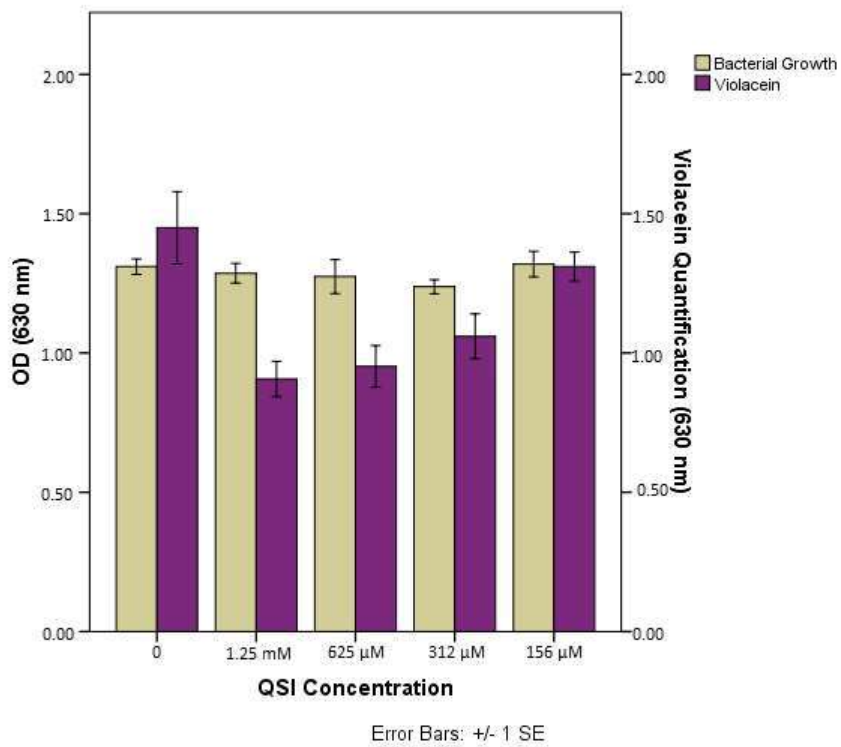


Figura F25 – Ensaio de quantificação de violaceína com 162



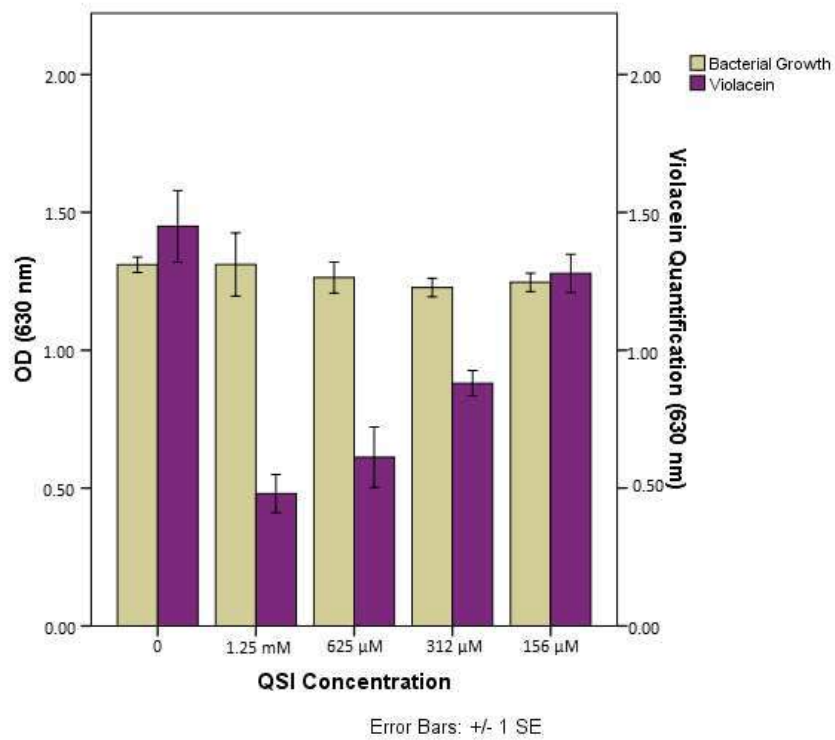


Figura F26 – Ensaio de quantificação de violaceína com 163

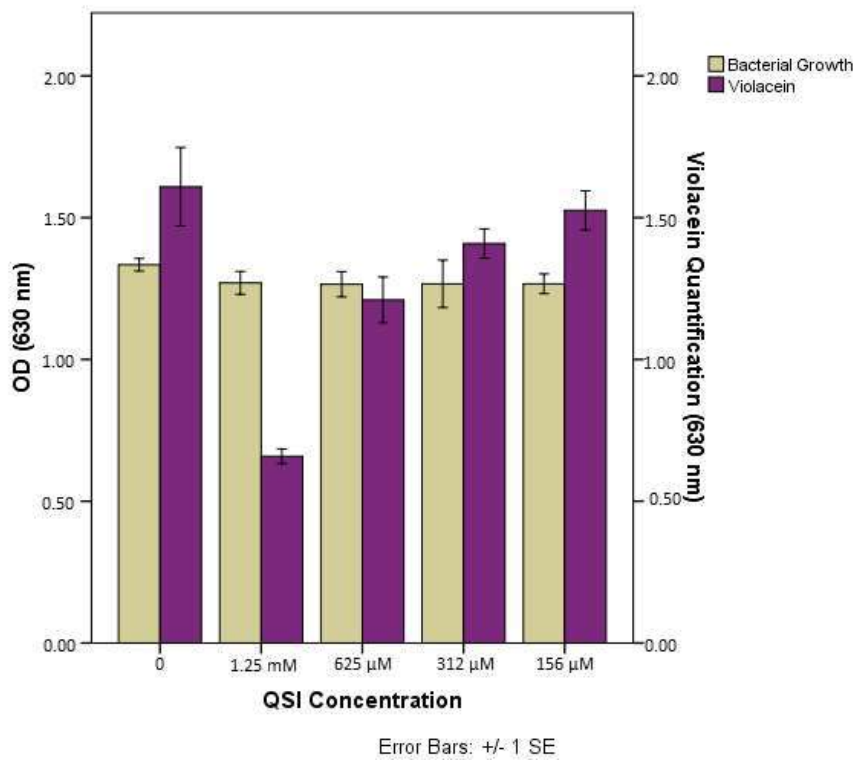


Figura F27 – Ensaio de quantificação de violaceína com 164

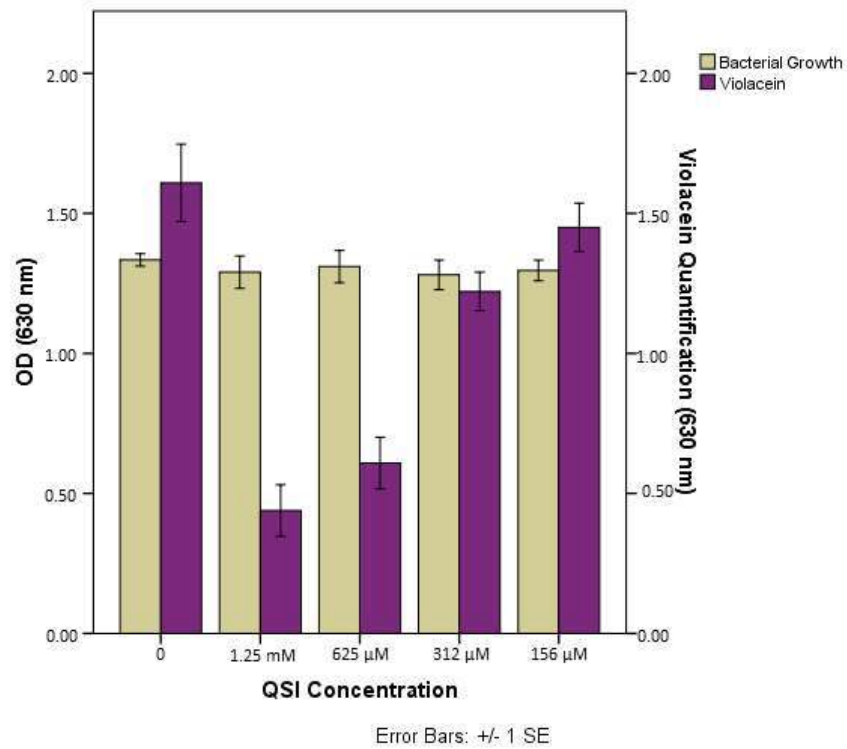


Figura F28 – Ensaio de quantificação de violaceína com 165

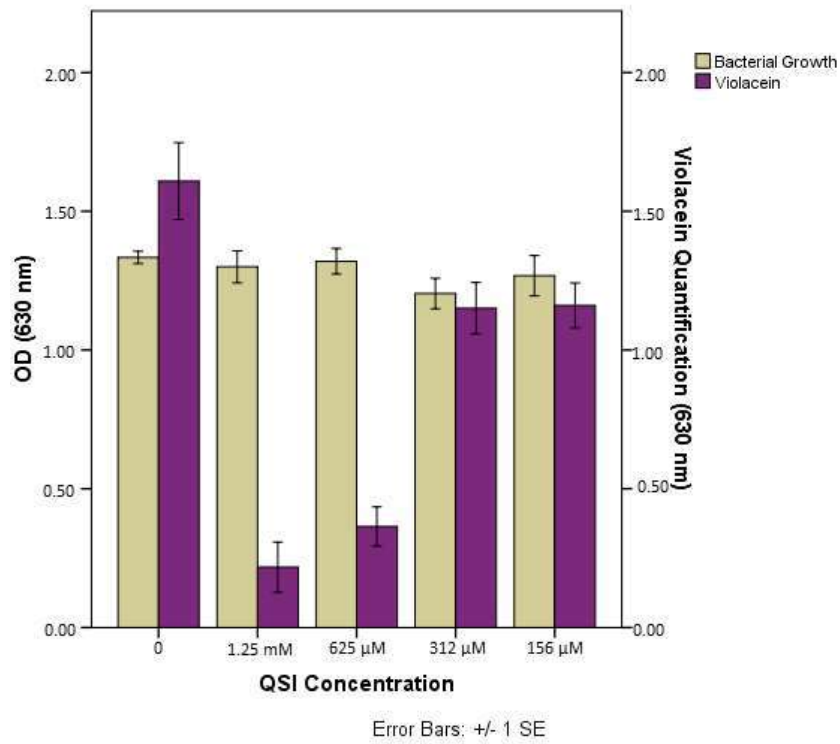
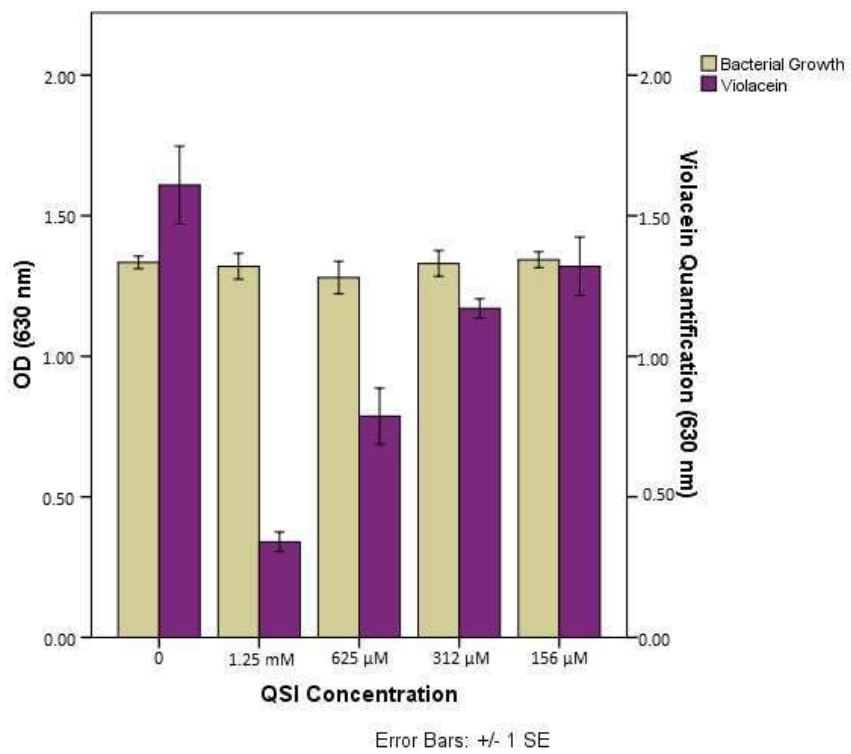
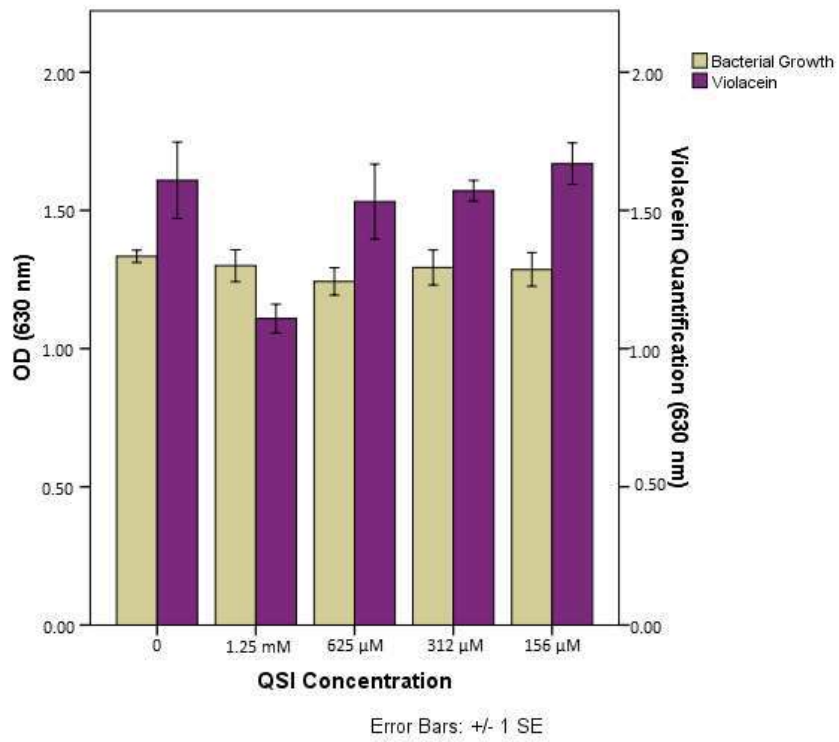


Figura F29 – Ensaio de quantificação de violaceína com 166



**Figura F30 – Ensaio de quantificação de violaceína com 167**



**Figura F31 – 60 – Ensaio de quantificação de violaceína com 168**

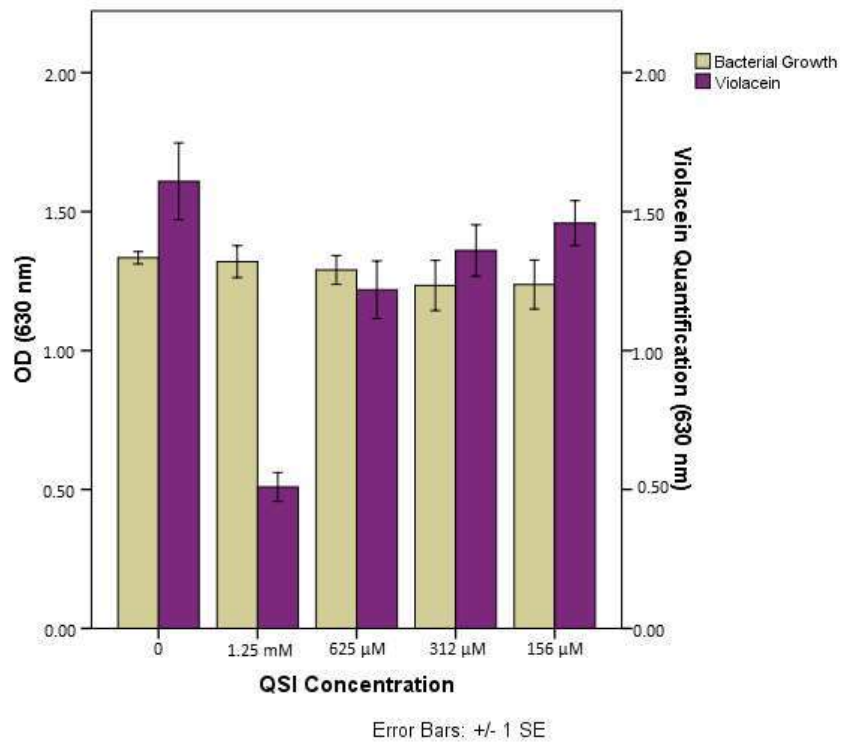


Figura F32 – Ensaio de quantificação de violaceína com 169

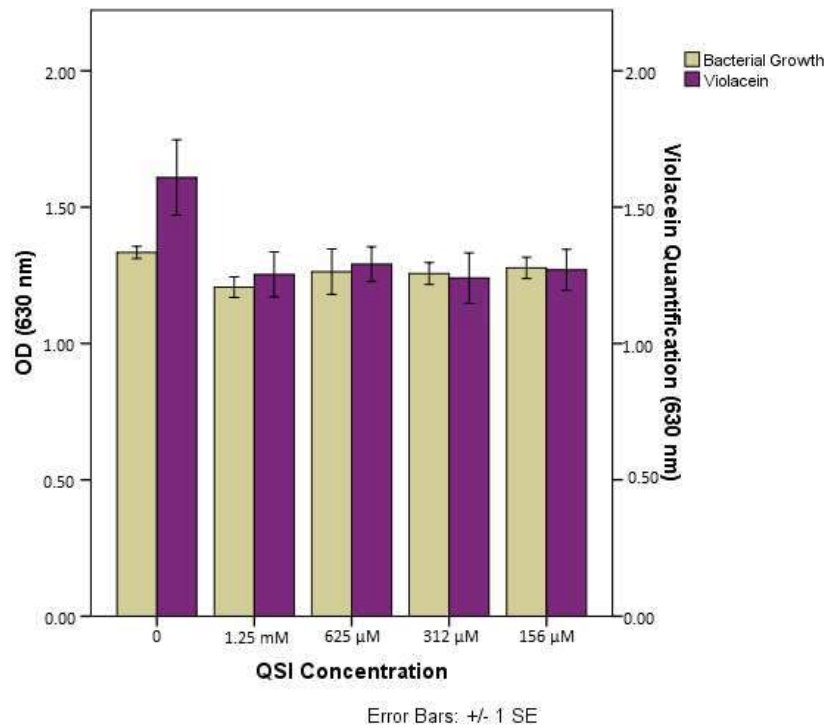


Figura F33 – Ensaio de quantificação de violaceína com 170

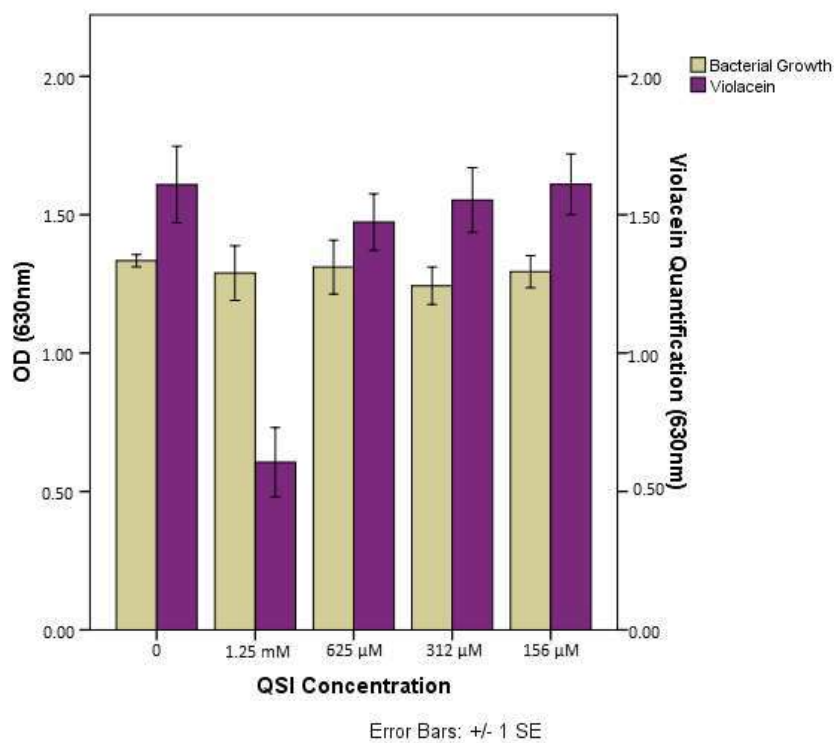


Figura F34 – Ensaio de quantificação de violaceína com 171

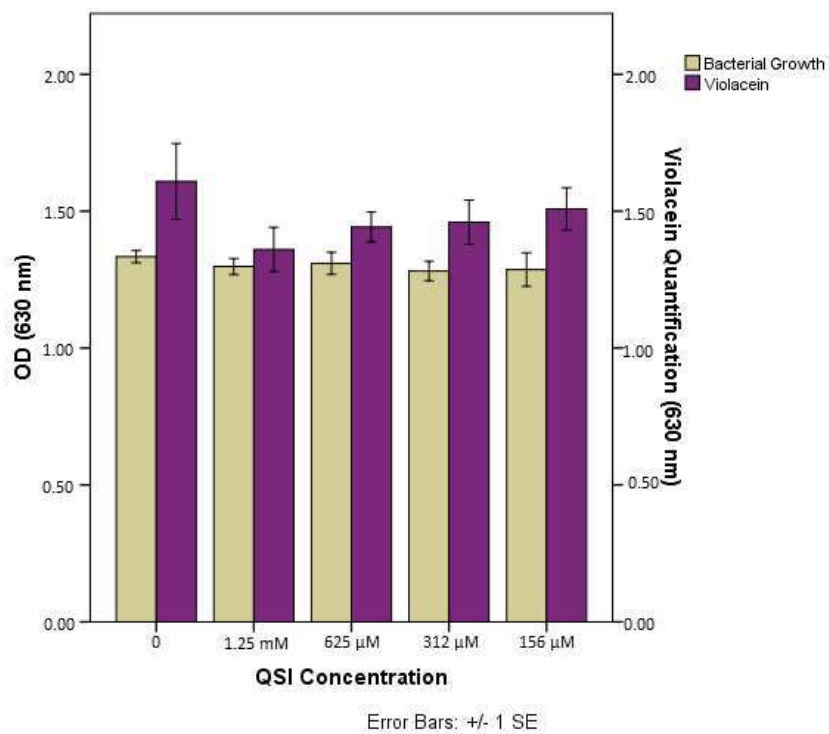


Figura F35 – Ensaio de quantificação de violaceína com 172

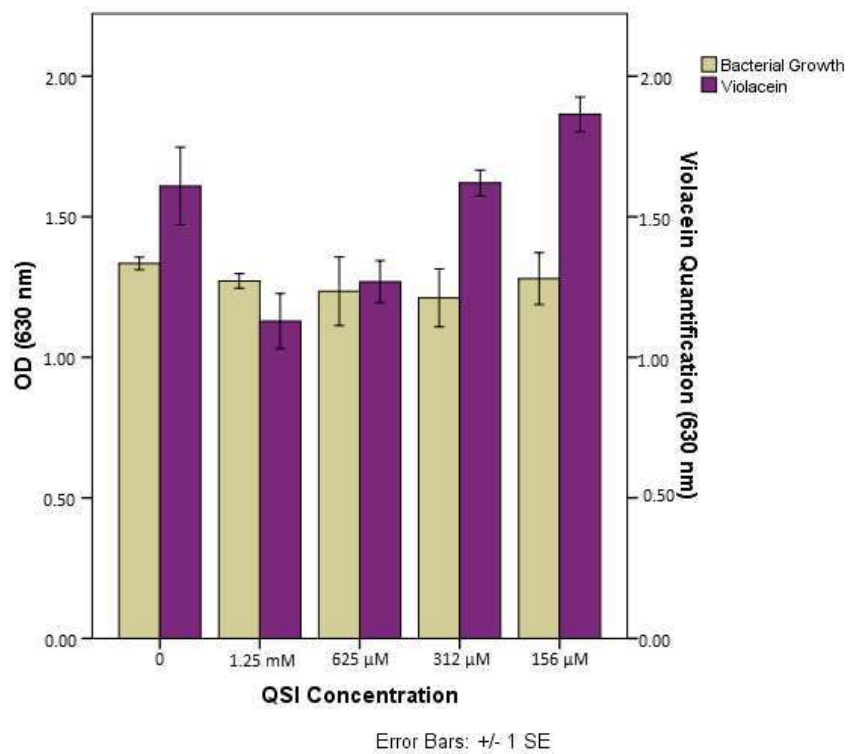


Figura F36 – Ensaio de quantificação de violaceína com 173

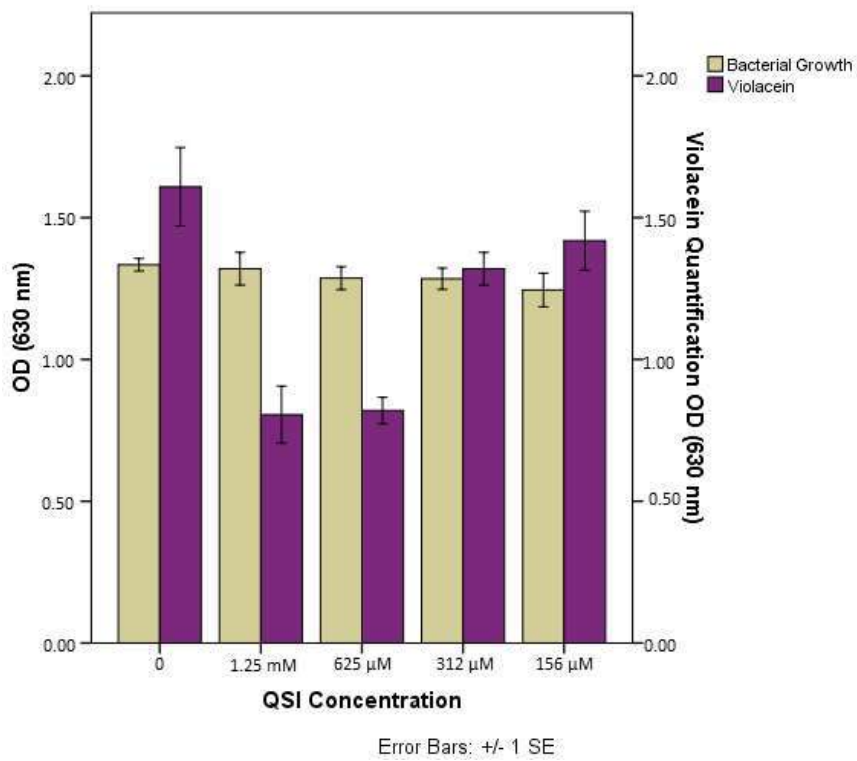
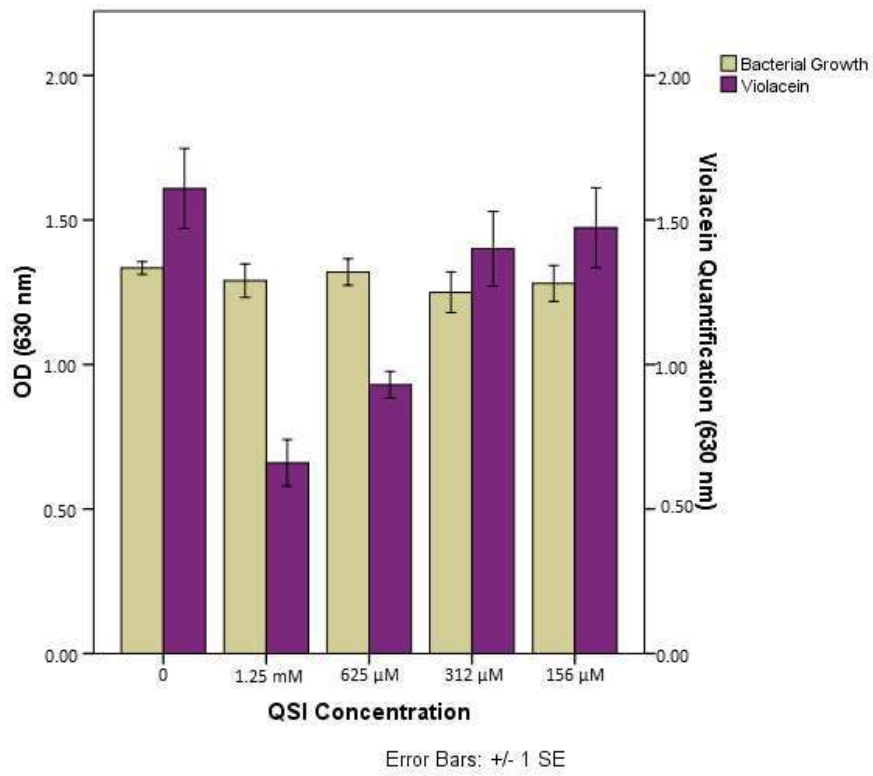
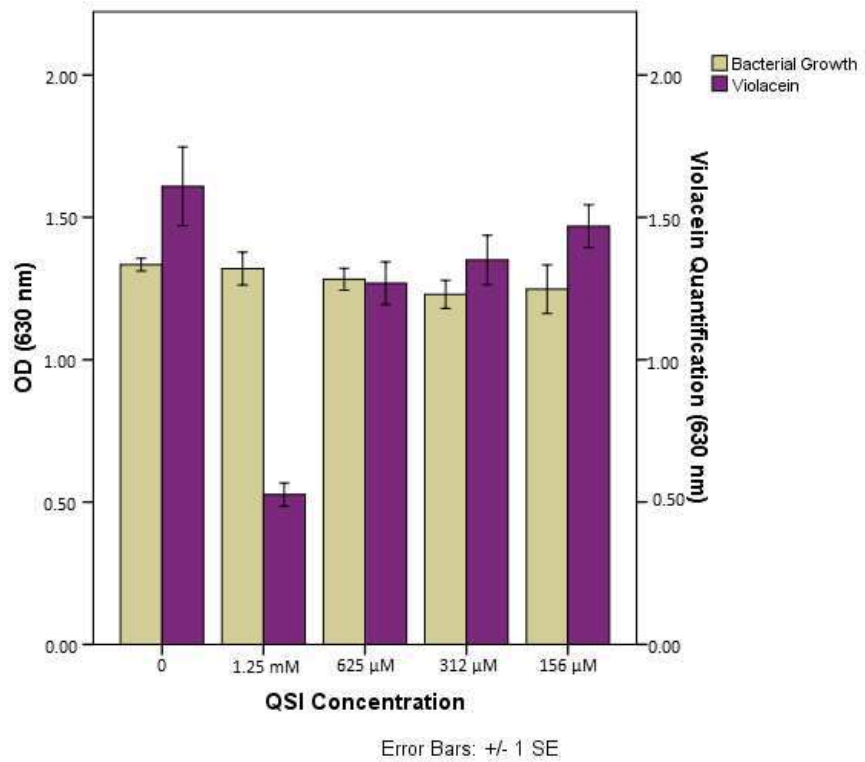


Figura F37 – Ensaio de quantificação de violaceína com 174



**Figura F38 – Ensaio de quantificação de violaceína com 175**



**Figura F39 – Ensaio de quantificação de violaceína com 176**

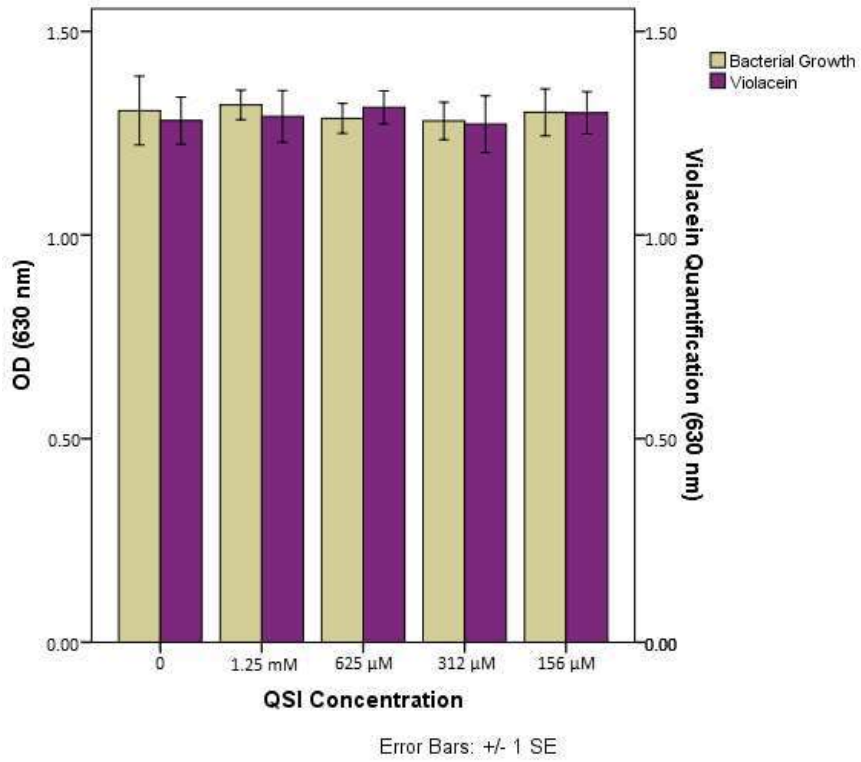


Figura F40 – Ensaio de quantificação de violaceína com 177

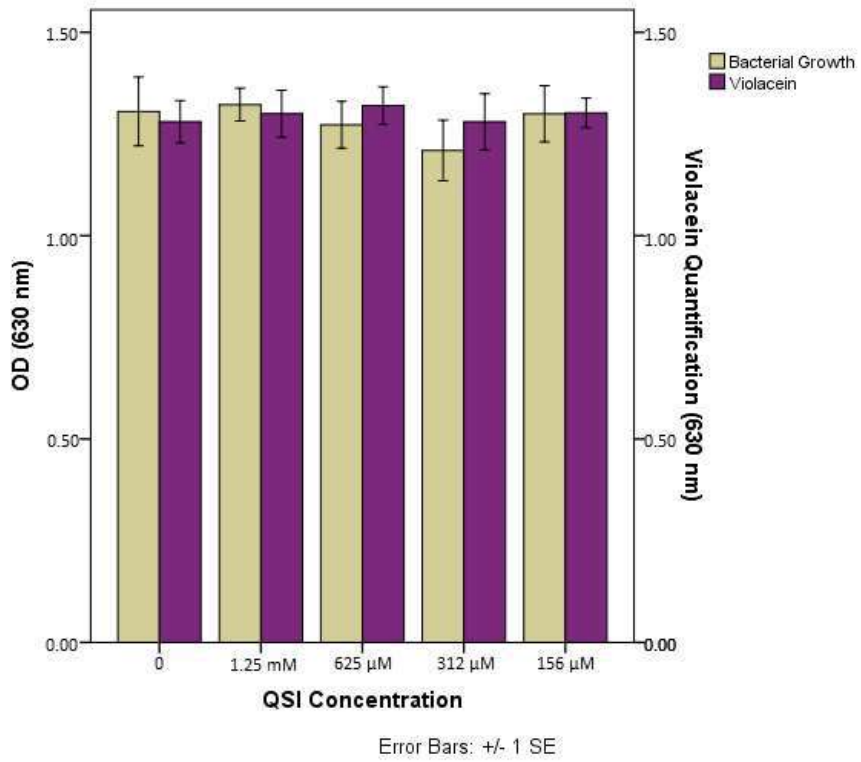


Figura F41 – Ensaio de quantificação de violaceína com 178



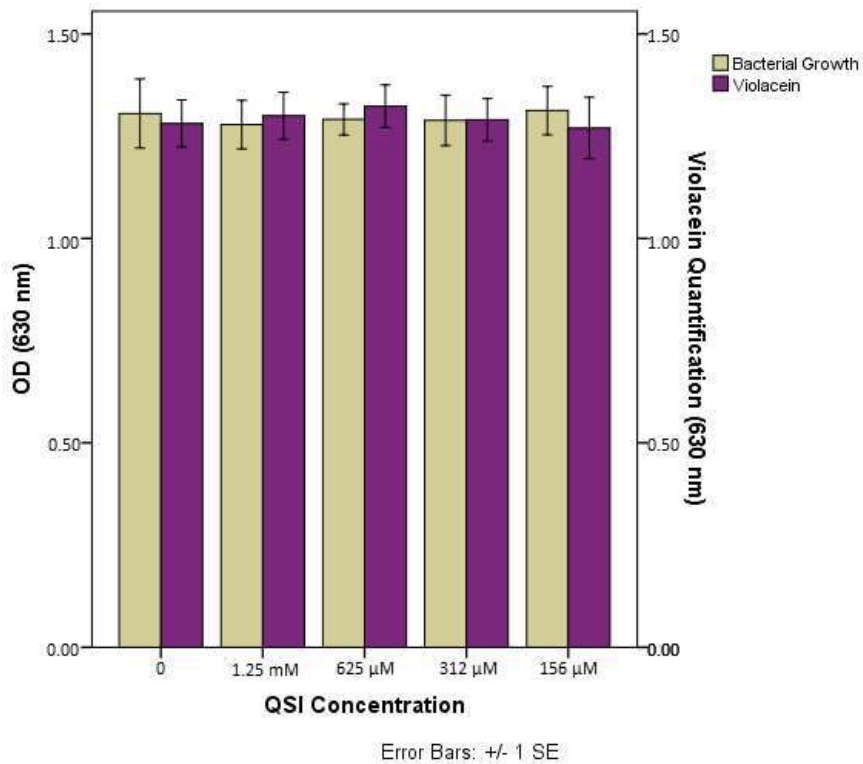


Figura F42 – Ensaio de quantificação de violaceína com 179

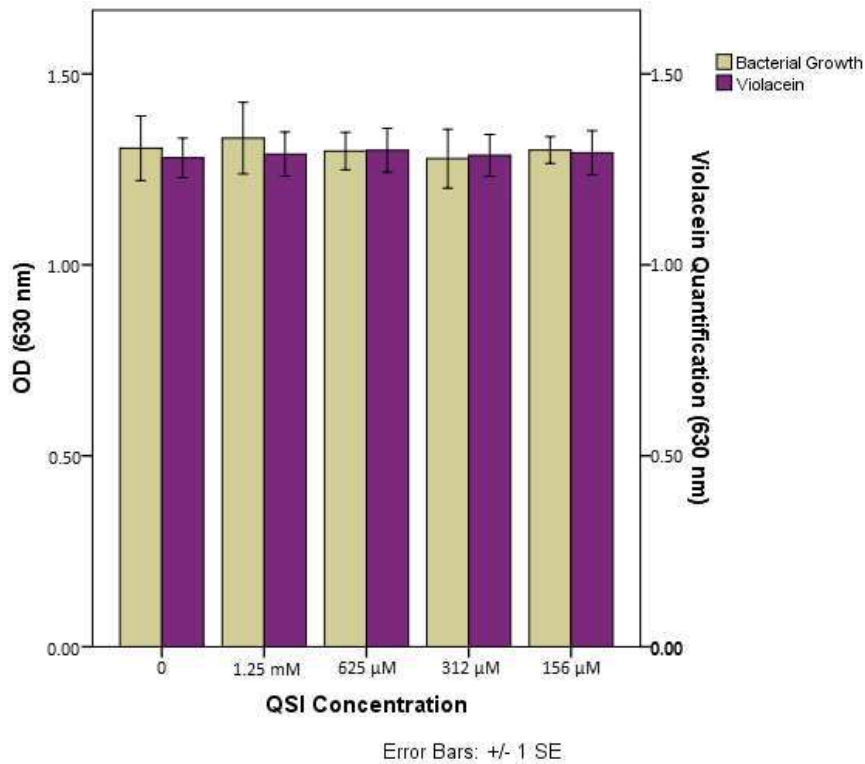
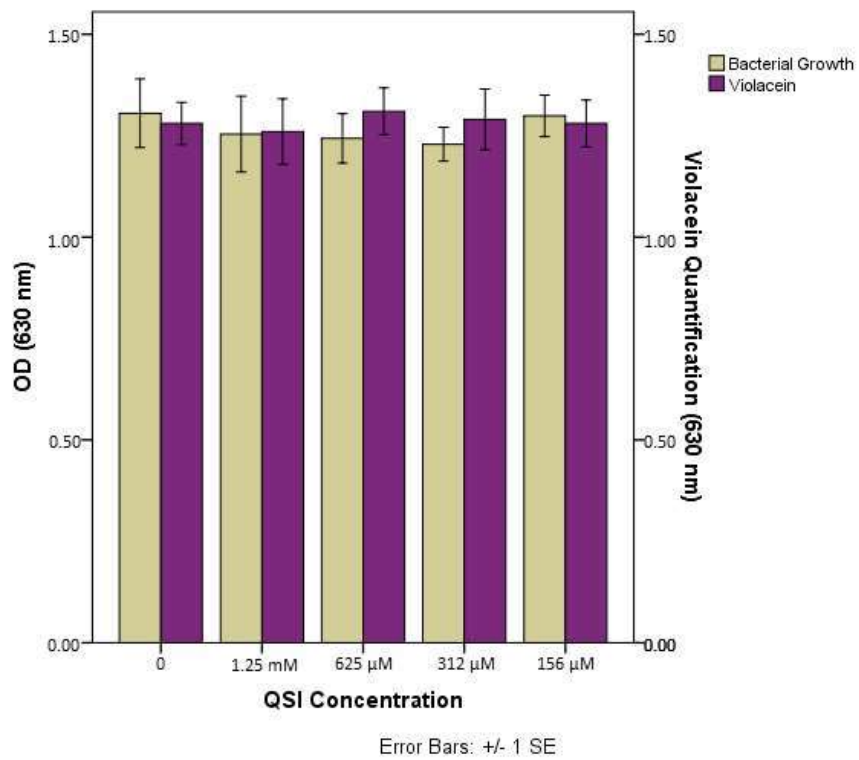
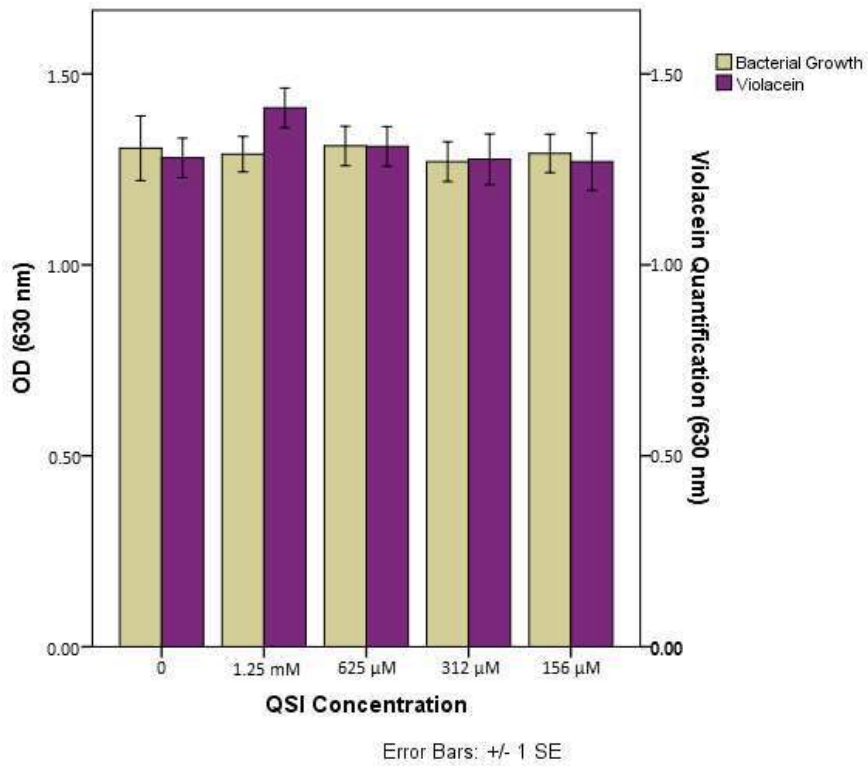


Figura F43 – Ensaio de quantificação de violaceína com 180



**Figura F44 – Ensaio de quantificação de violaceína com 181**



**Figura F45 – Ensaio de quantificação de violaceína com 182**

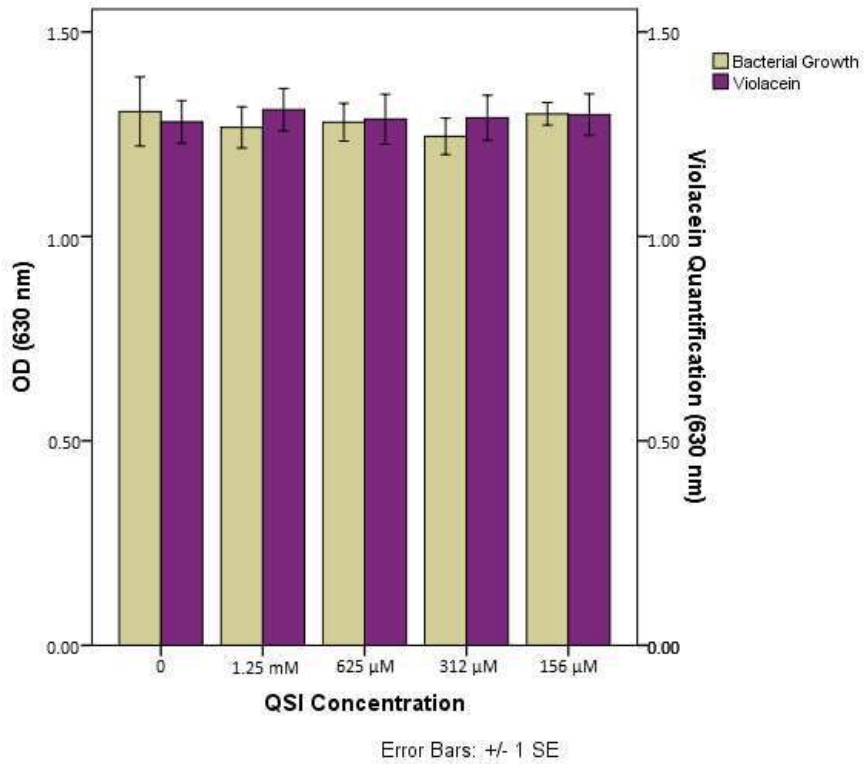


Figura F46 – Ensaio de quantificação de violaceína com 183

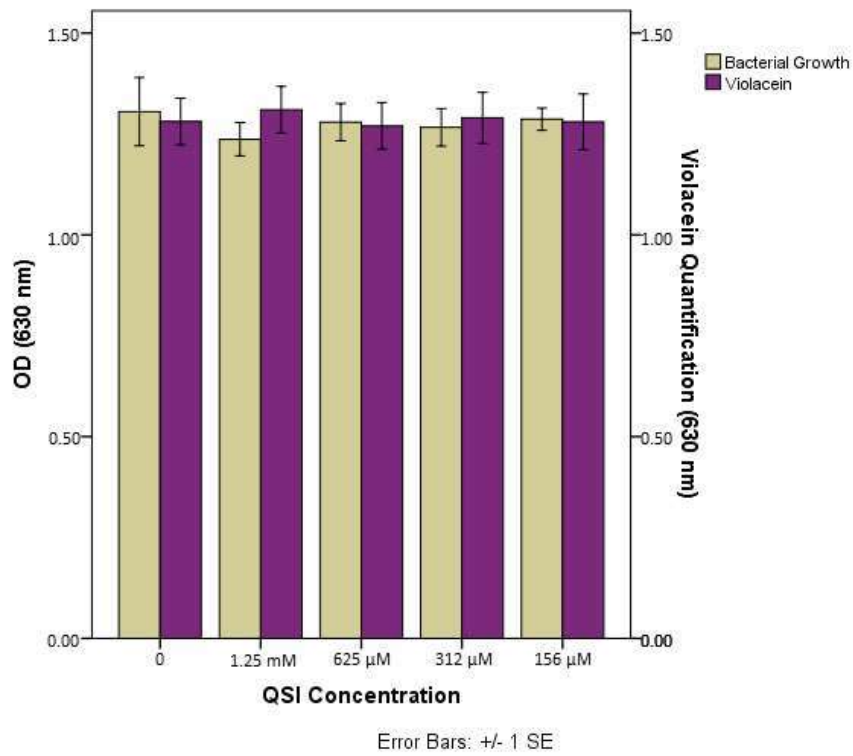


Figura F47 – Ensaio de quantificação de violaceína com 184

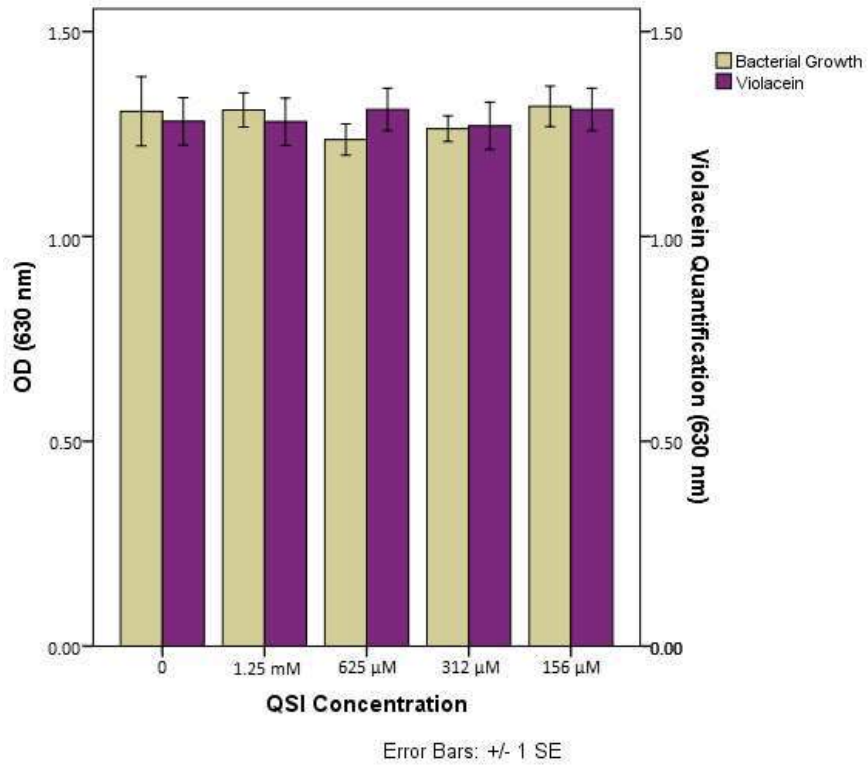


Figura F48 – Ensaio de quantificação de violaceína com 185

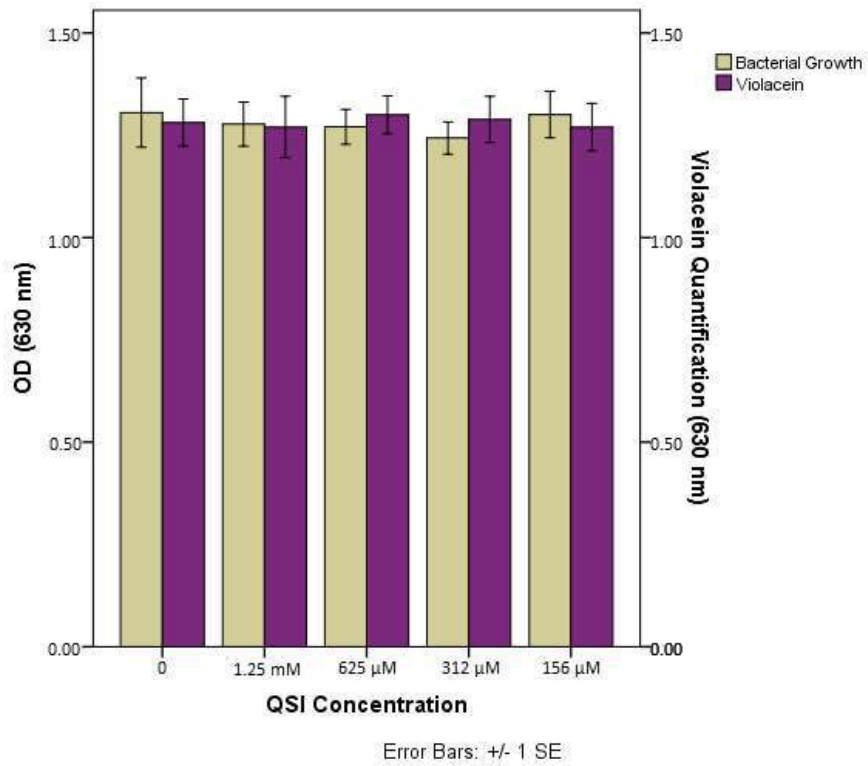


Figura F49 – Ensaio de quantificação de violaceína com 186

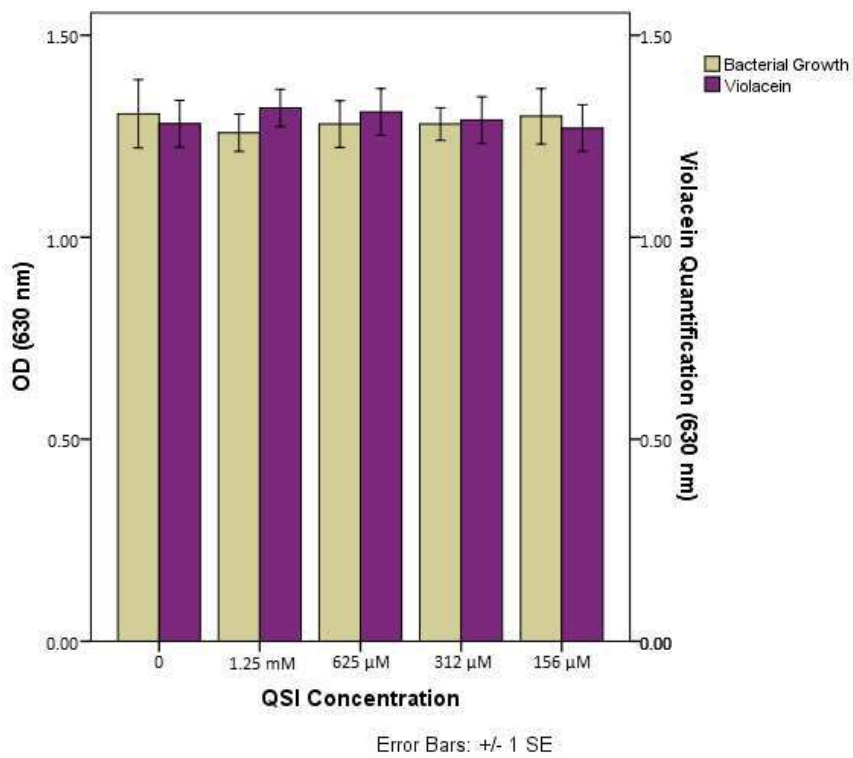


Figura F50 – Ensaio de quantificação de violaceína com 187

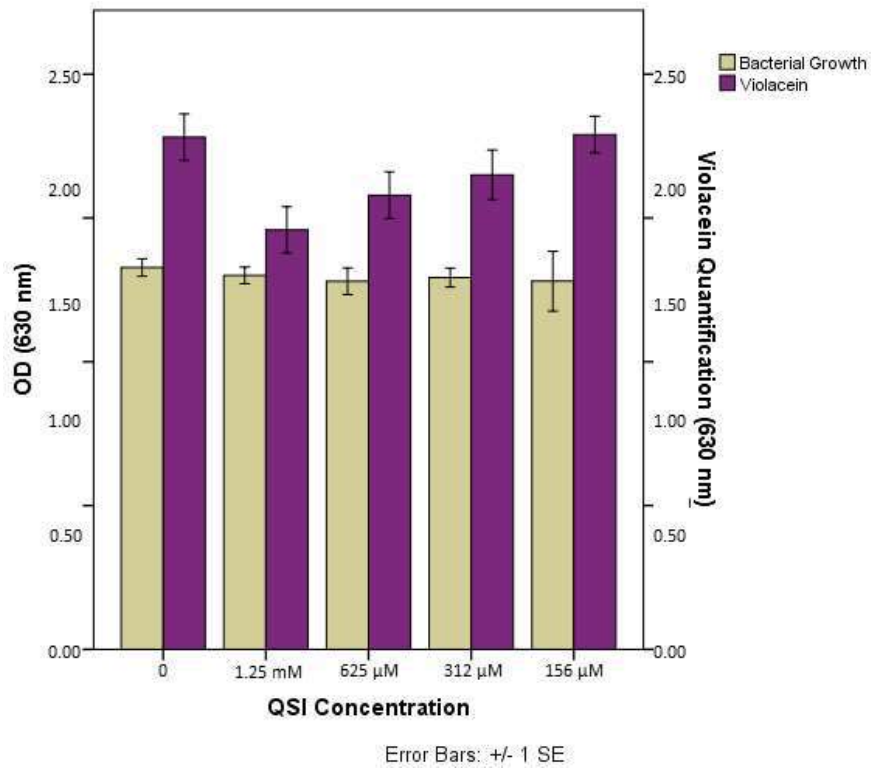
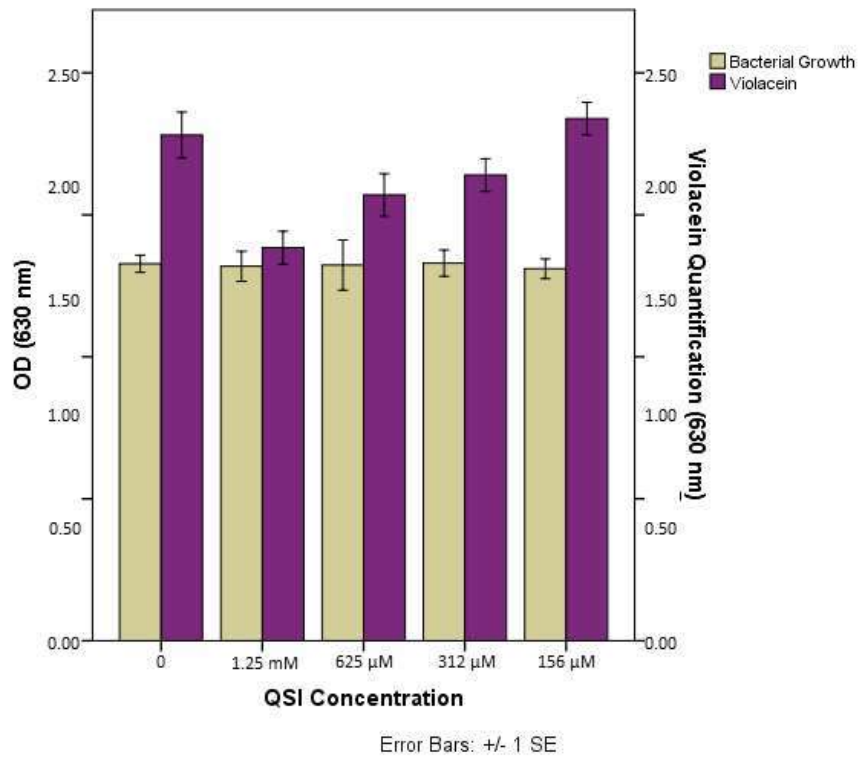
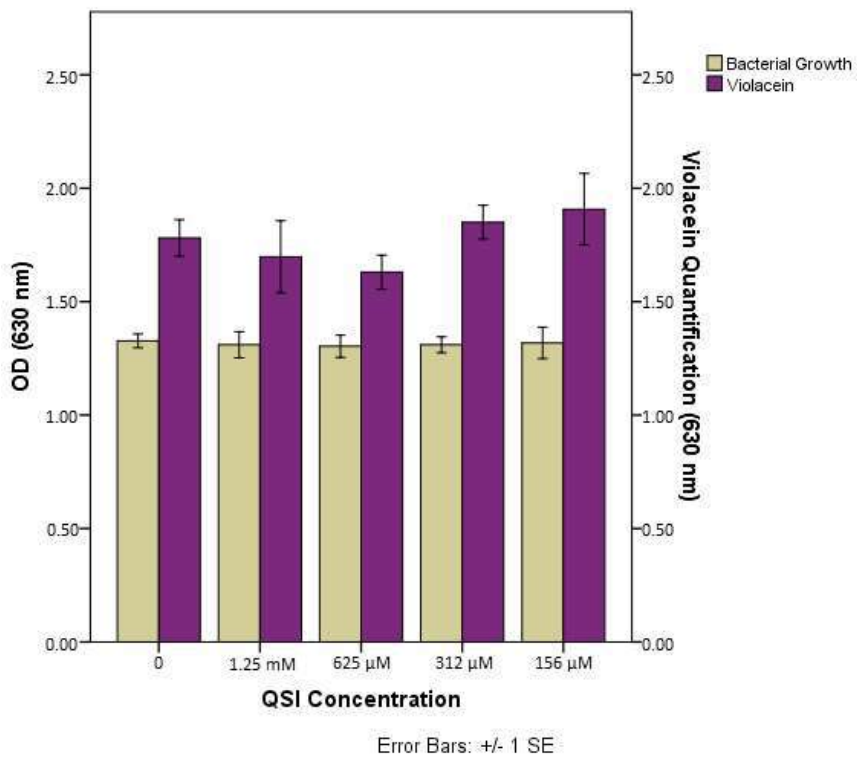


Figura F51 – Ensaio de quantificação de violaceína com 188



**Figura F52 – Ensaio de quantificação de violaceína com 189**



**Figura F53 – Ensaio de quantificação de violaceína com 190**

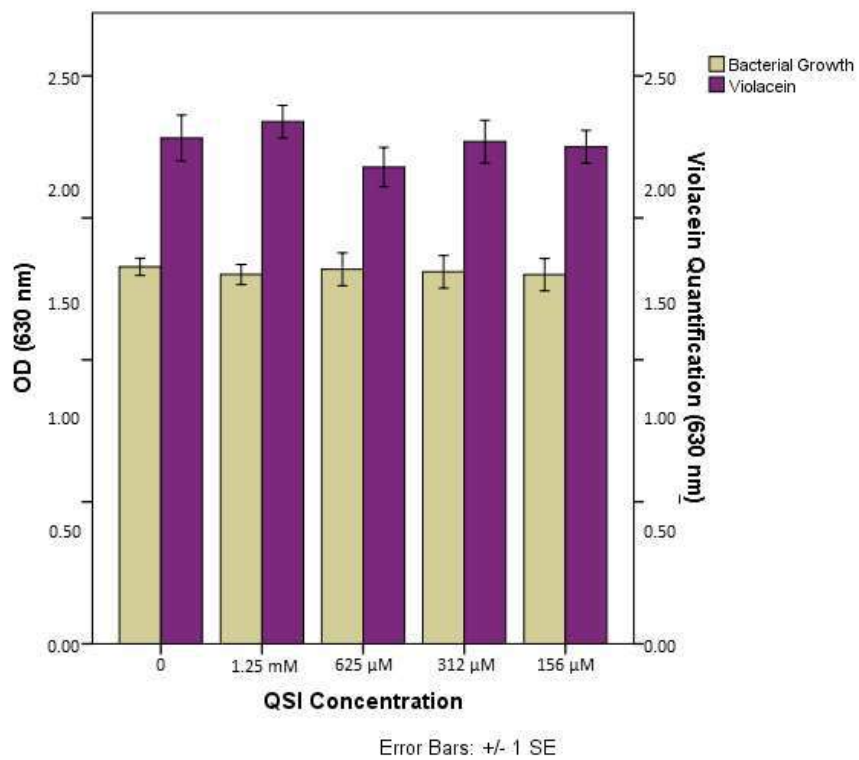


Figura F54 – Ensaio de quantificação de violaceína com 191

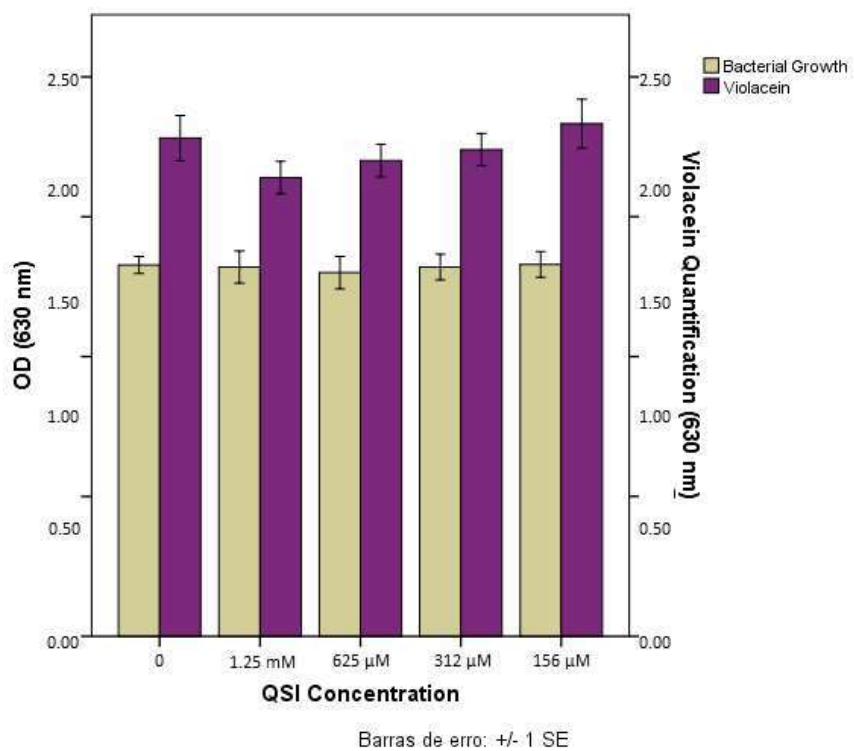


Figura F55 – Ensaio de quantificação de violaceína com 192

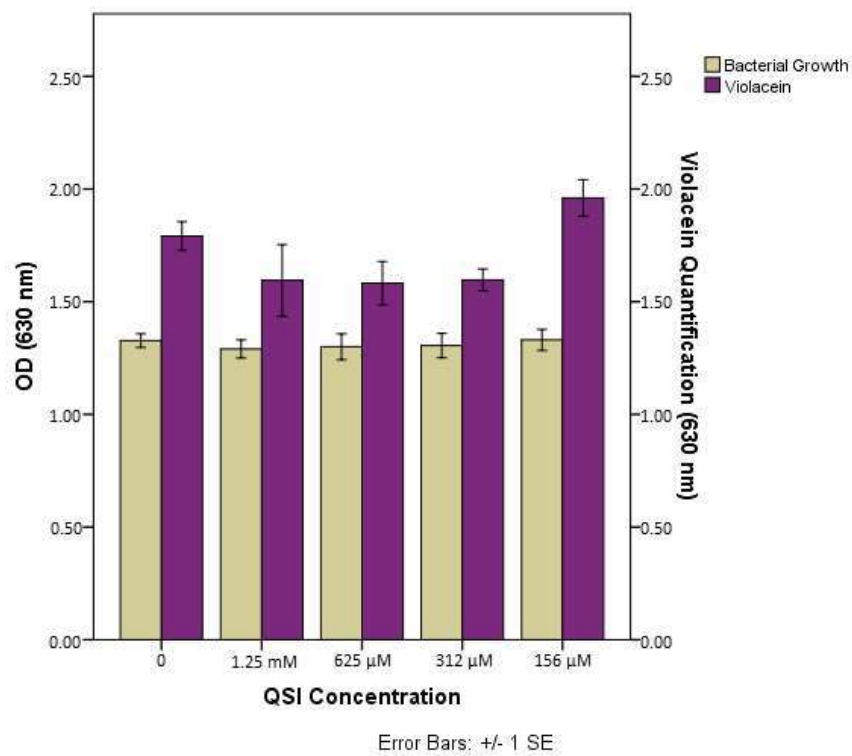


Figura F56 – Ensaio de quantificação de violaceína com 193

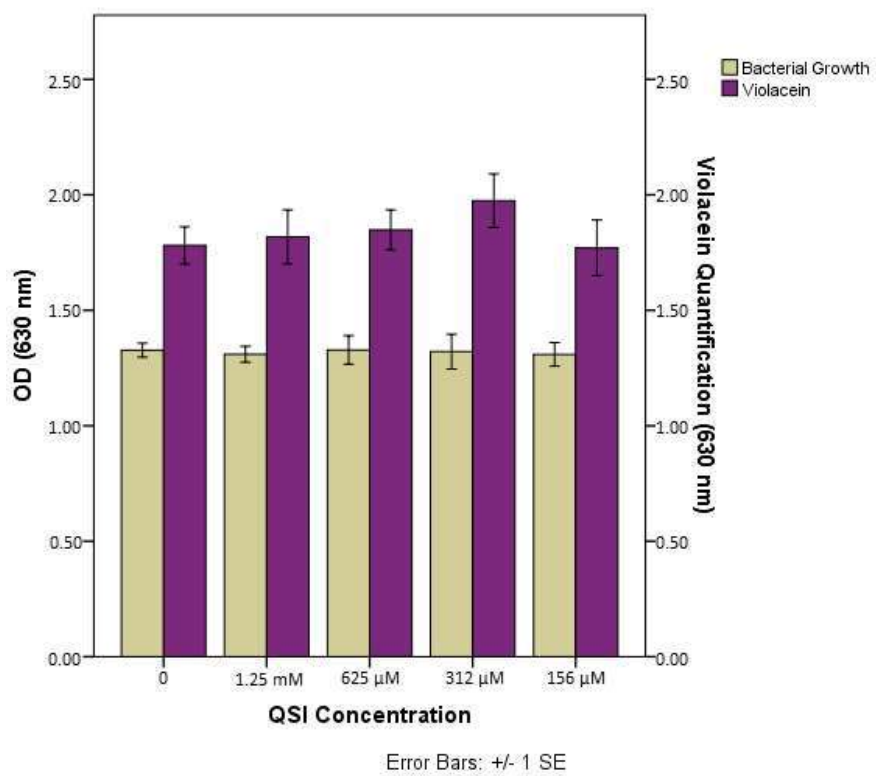


Figura F57 – Ensaio de quantificação de violaceína com 194



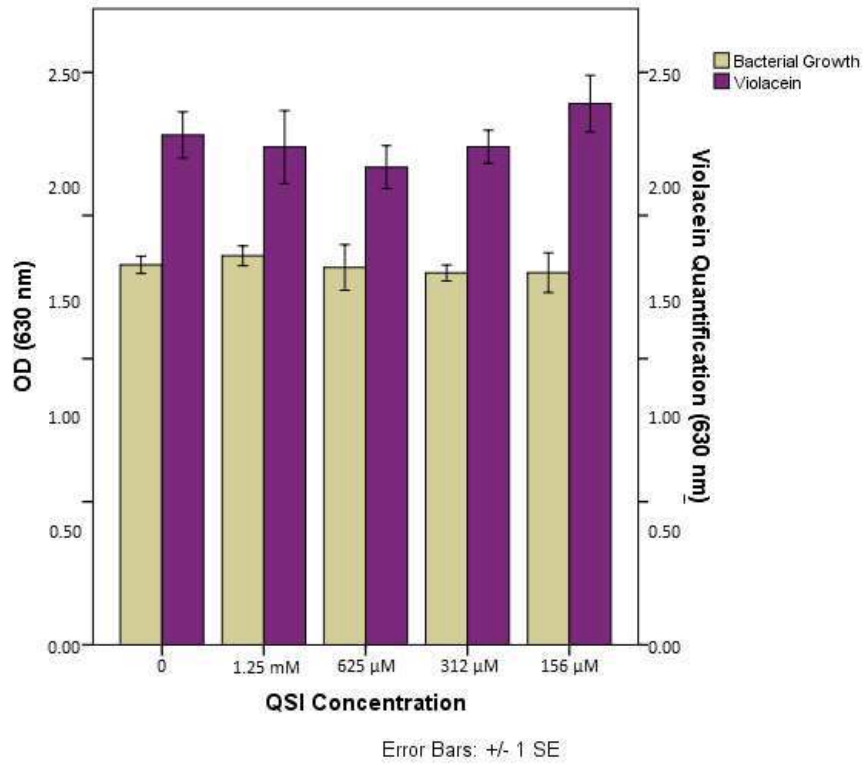


Figura F58 – Ensaio de quantificação de violaceína com 195

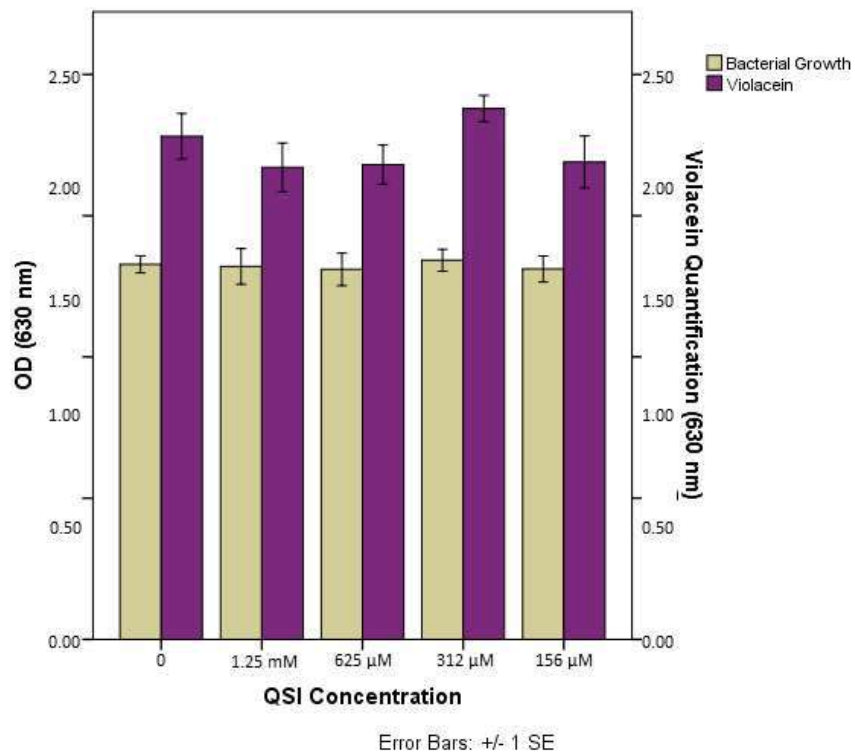


Figura F59 – Ensaio de quantificação de violaceína com 196

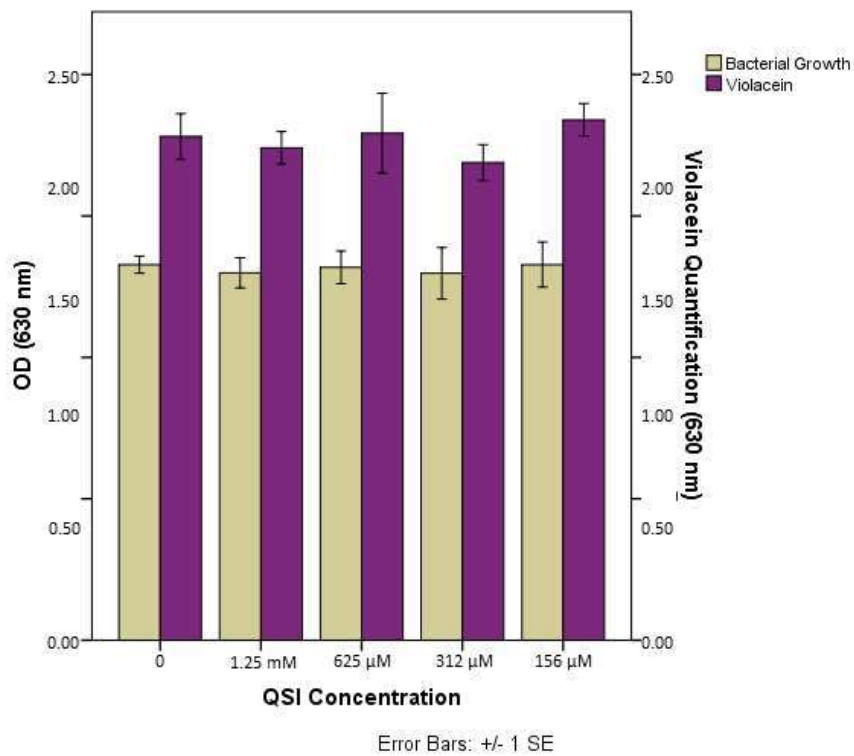


Figura F60 – Ensaio de quantificação de violaceína com 197

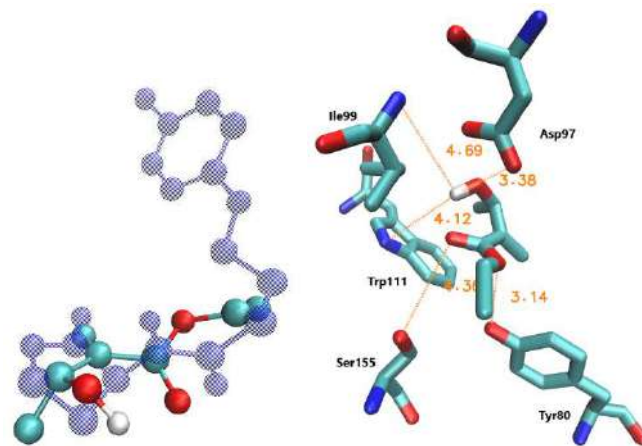


Figura F61 – (A) Sobreposição entre 22 e (R)-144. (B) Interações entre (R)-144 e os resíduos de aminoácido em CviR.

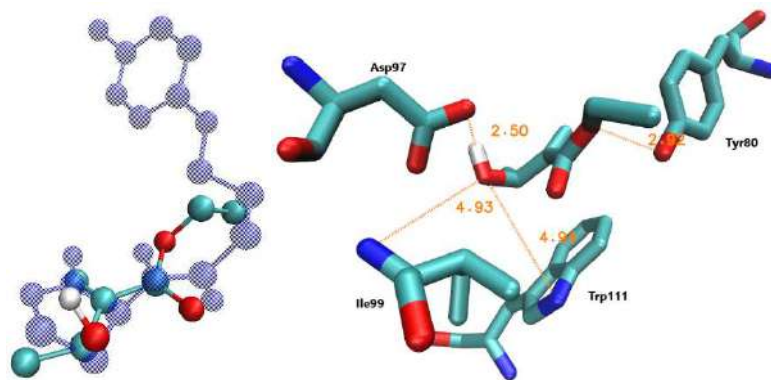


Figura F62 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-144. (B) Interações entre (*S*)-144 e os resíduos de aminoácido em CviR.

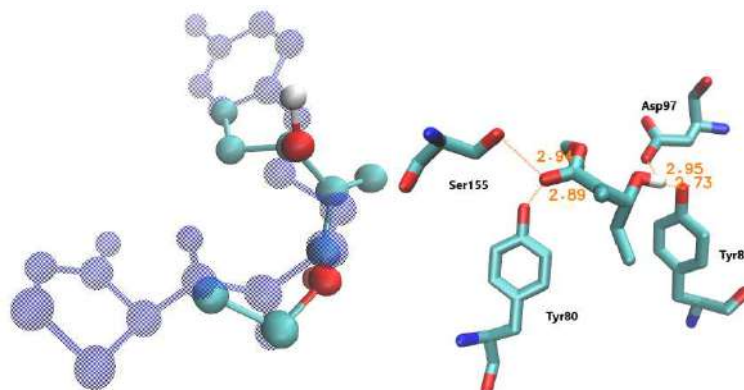


Figura F63 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-145. (B) Interações entre (*R*)-145 e os resíduos de aminoácido em CviR.

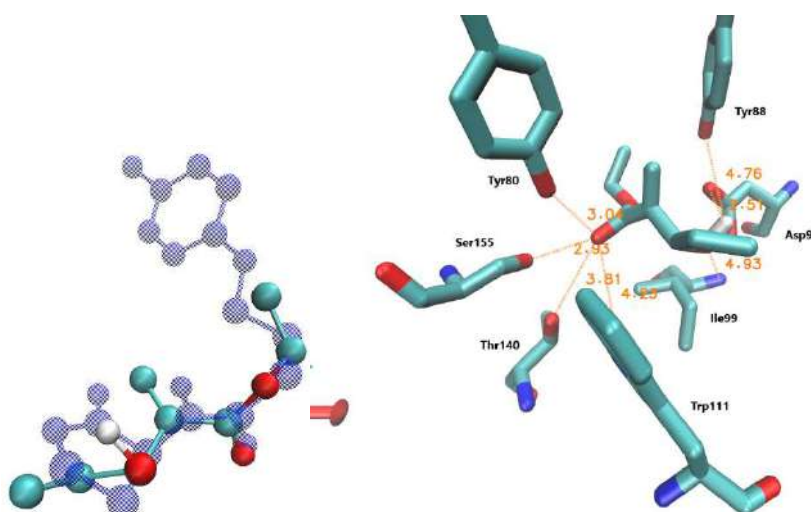


Figura F64 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-145. (B) Interações entre (*S*)-145 e os resíduos de aminoácido em CviR.

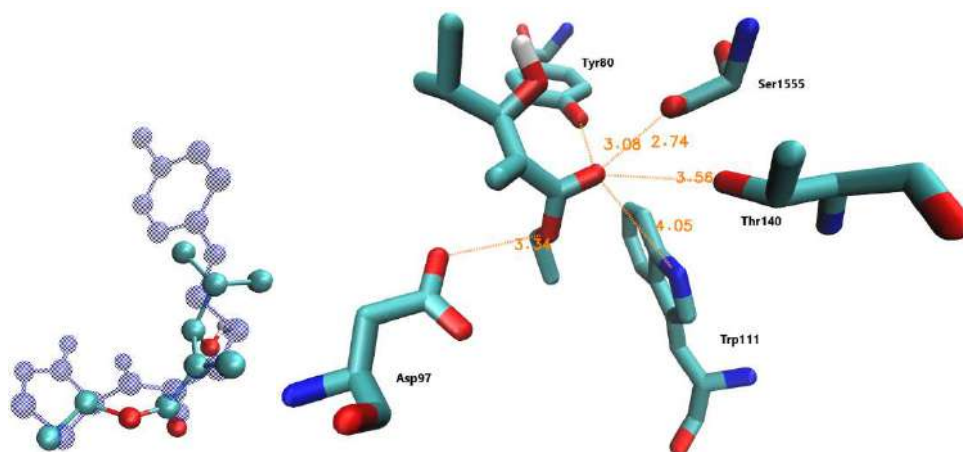


Figura F65 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-146. (B) Interações entre (*R*)-146 e os resíduos de aminoácido em CviR.

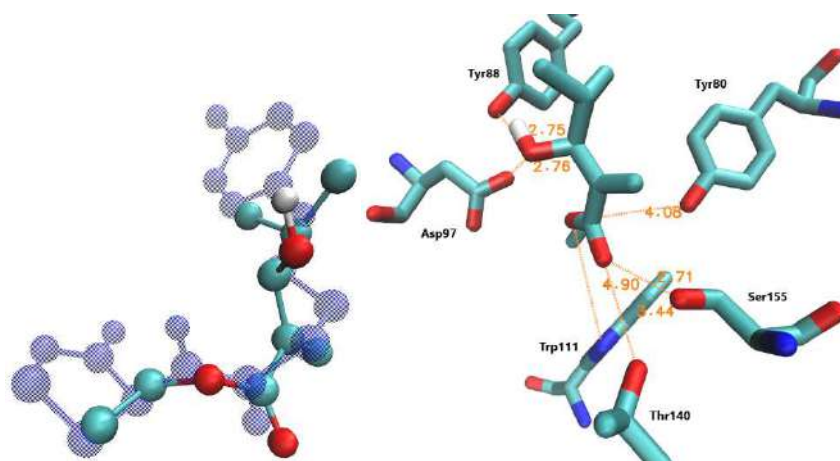


Figura F66 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-146. (B) Interações entre (*S*)-146 e os resíduos de aminoácido em CviR.

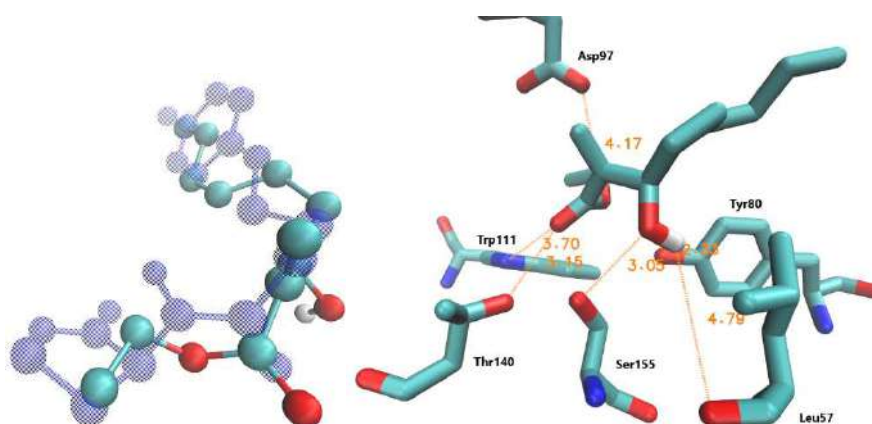


Figura F67 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-140. (B) Interações entre (*R*)-140 e os resíduos de aminoácido em CviR.

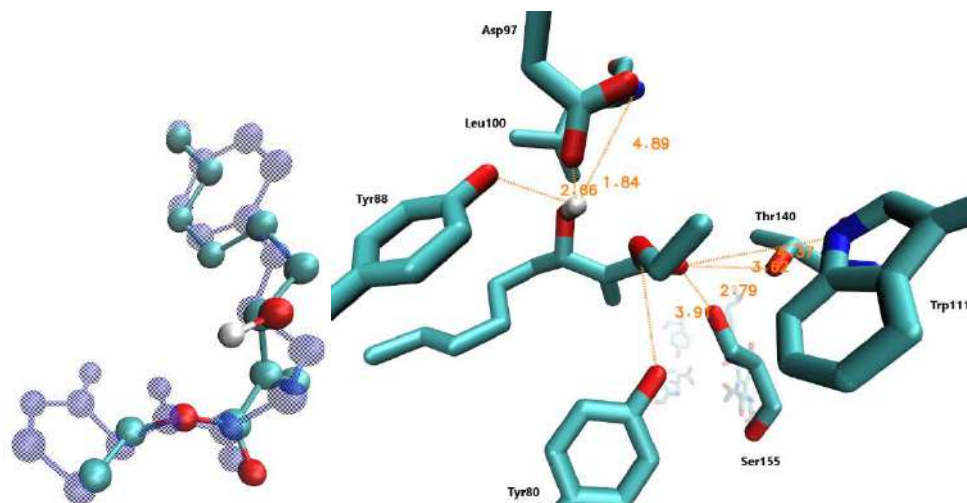


Figura F68 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-140. (B) Interações entre (*S*)-140 e os resíduos de aminoácido em CviR.

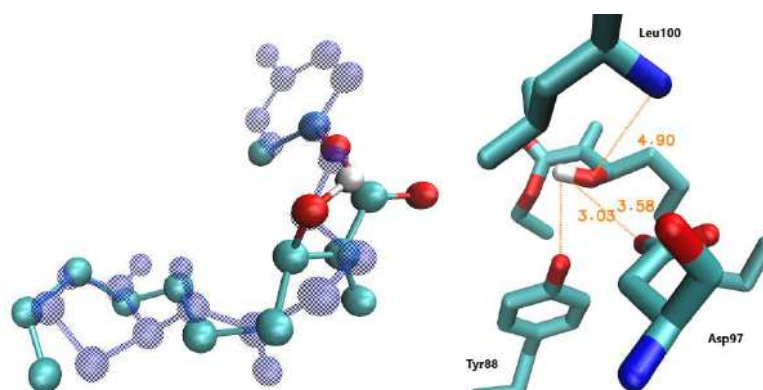


Figura F69 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-141. (B) Interações entre (*R*)-141 e os resíduos de aminoácido em CviR.

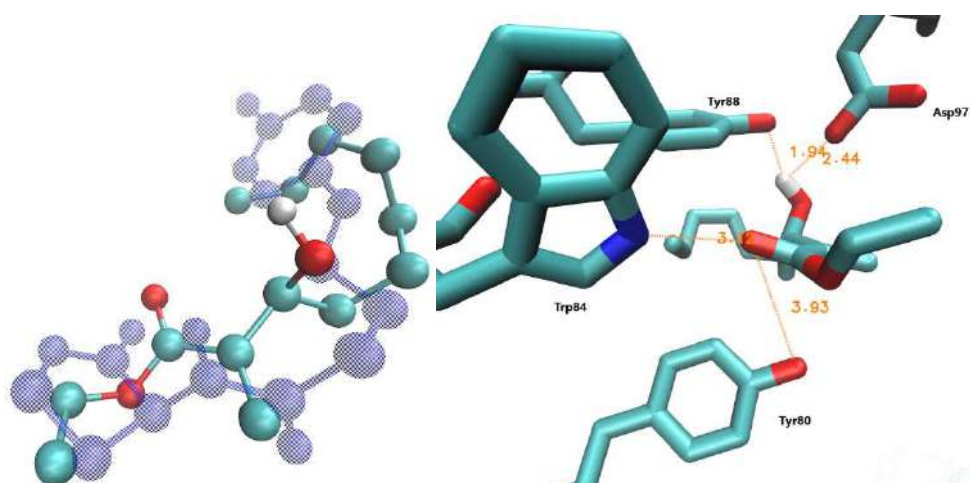


Figura F70 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-141. (B) Interações entre (*S*)-141 e os resíduos de aminoácido em CviR.



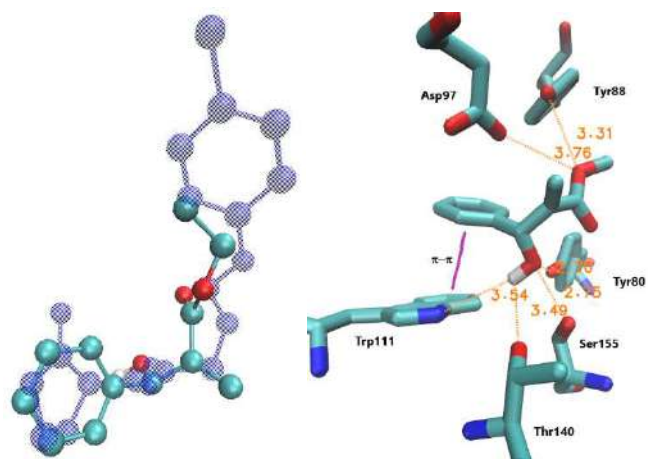


Figura F71 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-147. (B) Interações entre (*R*)-147 e os resíduos de aminoácido em CviR.

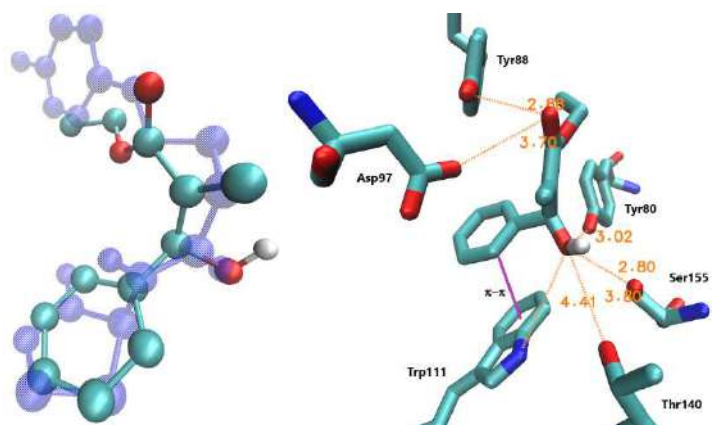


Figura F72 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-147. (B) Interações entre (*S*)-147 e os resíduos de aminoácido em CviR.

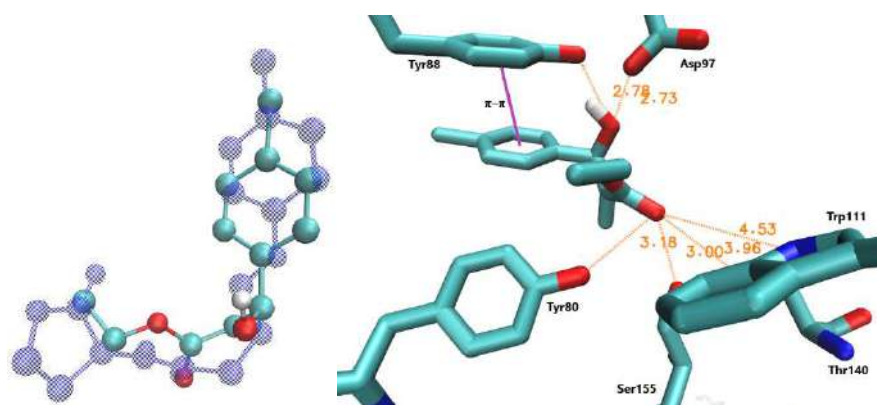


Figura F73 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-148. (B) Interações entre (*R*)-148 e os resíduos de aminoácido em CviR.

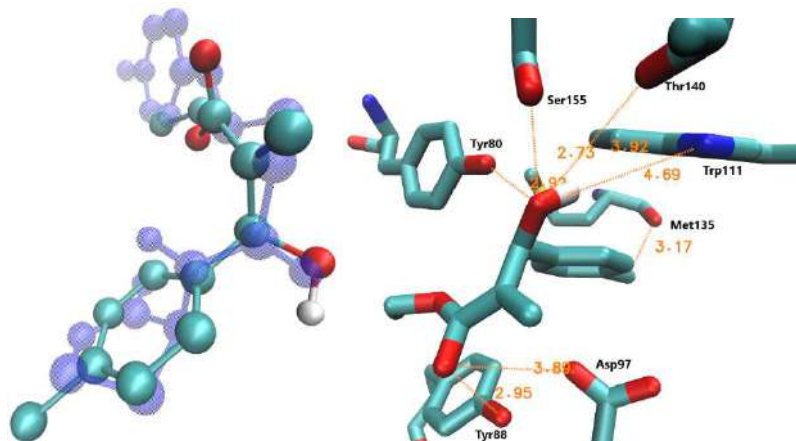


Figura F74 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-148. (B) Interações entre (*S*)-148 e os resíduos de aminoácido em CviR.

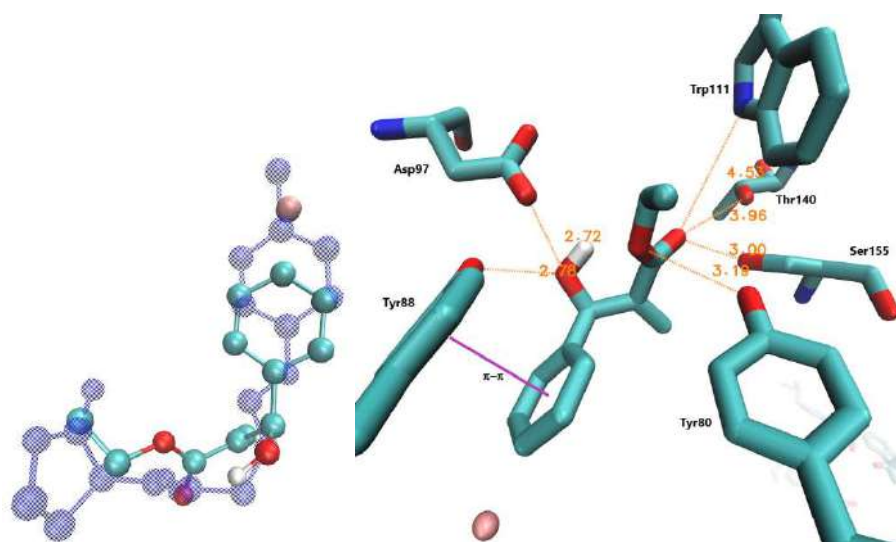


Figura F75 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-142. (B) Interações entre (*R*)-142 e os resíduos de aminoácido em CviR.

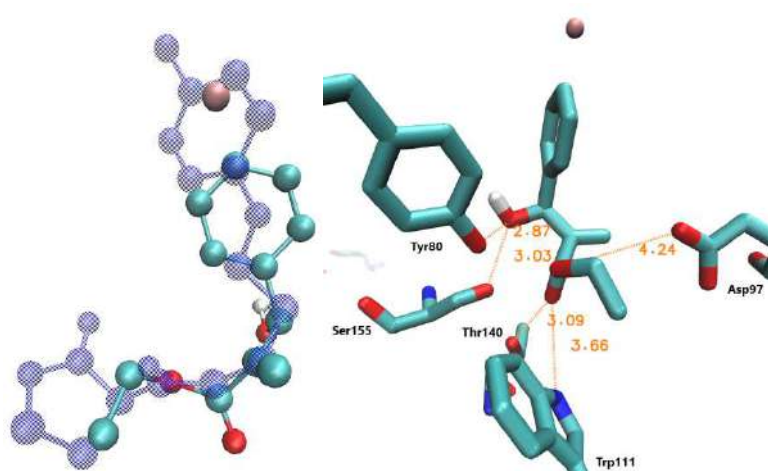


Figura F76 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-142. (B) Interações entre (*S*)-142 e os resíduos de aminoácido em CviR.

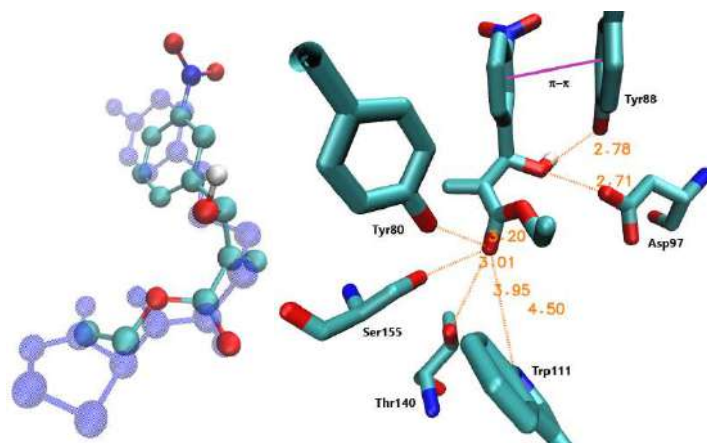


Figura F77 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-143. (B) Interações entre (*R*)-143 e os resíduos de aminoácido em CviR.

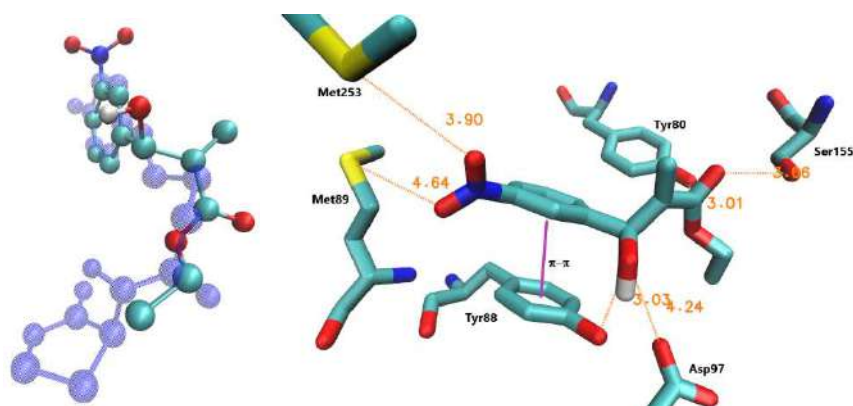


Figura F78 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-143. (B) Interações entre (*S*)-143 e os resíduos de aminoácido em CviR.

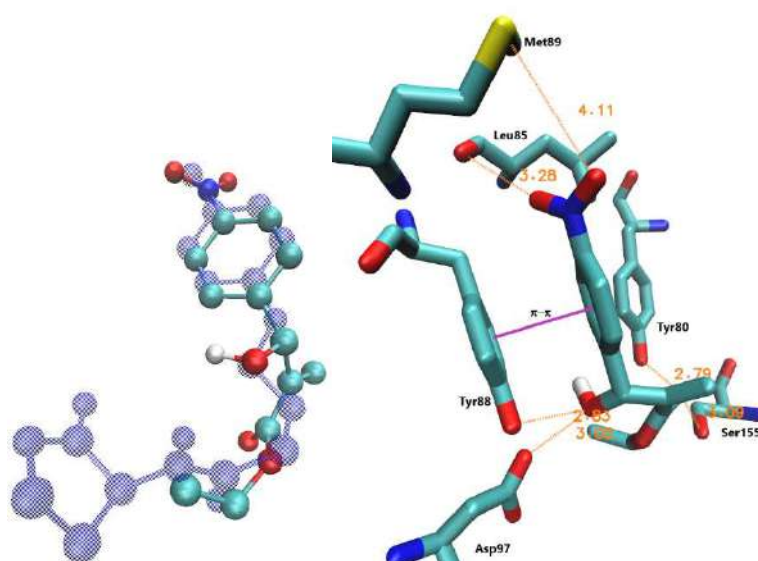


Figura F79 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-73. (B) Interações entre (*R*)-73 e os resíduos de aminoácido em CviR.



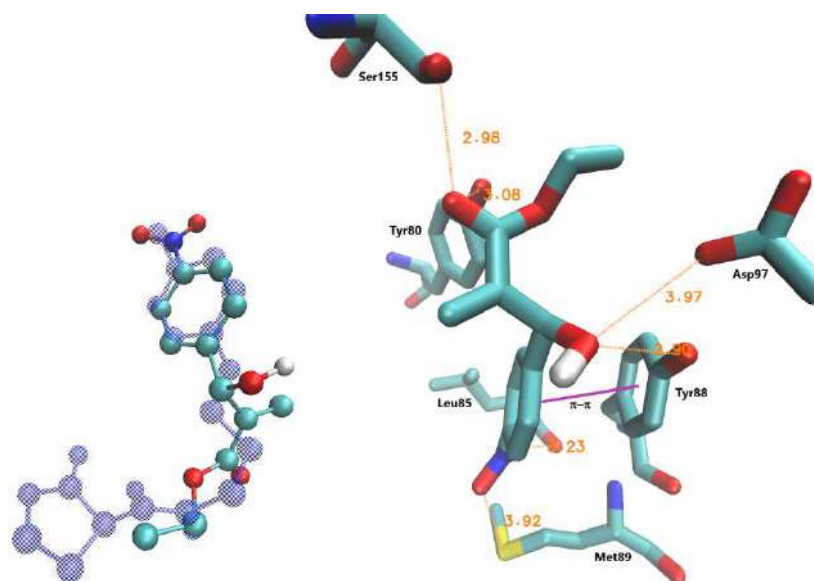


Figura F80 – (A) Sobreposição entre 22 e (S)-73. (B) Interações entre (S)-73 e os resíduos de aminoácido em CviR.

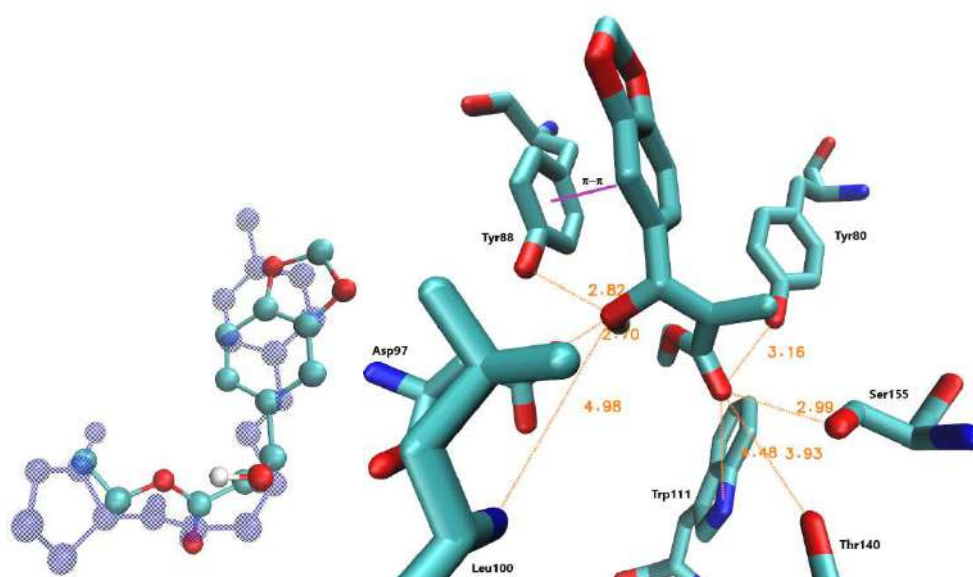


Figura F81 – (A) Sobreposição entre 22 e (R)-149. (B) Interações entre (R)-149 e os resíduos de aminoácido em CviR.

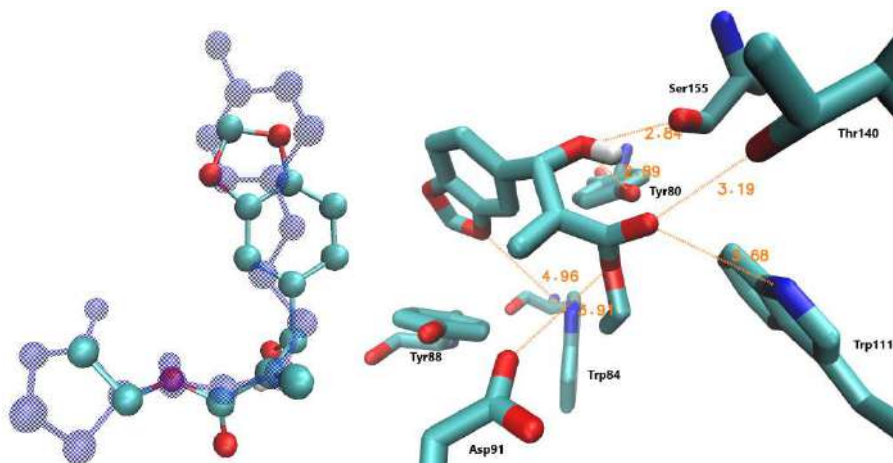


Figura F82 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-149. (B) Interações entre (*S*)-149 e os resíduos de aminoácido em CviR.

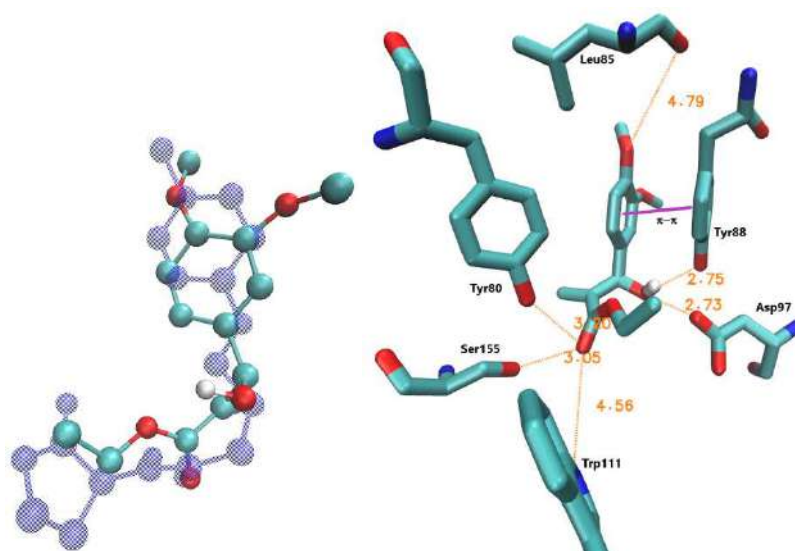


Figura F83 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-150. (B) Interações entre (*R*)-150 e os resíduos de aminoácido em CviR.

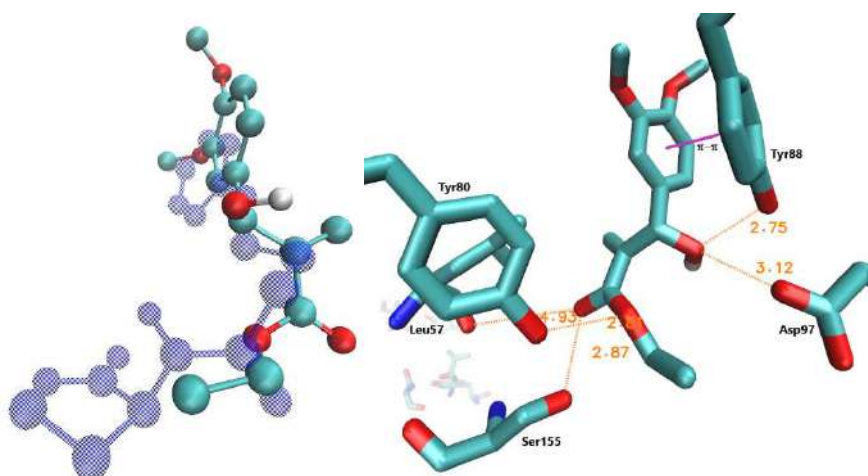


Figura F84 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-150. (B) Interações entre (*S*)-150 e os resíduos de aminoácido em CviR.

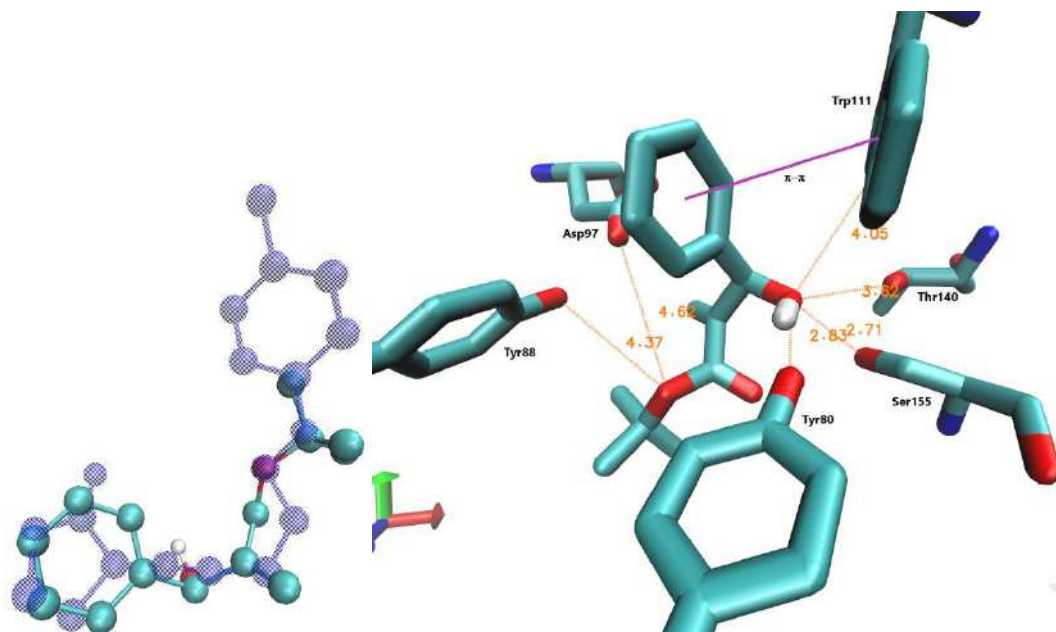


Figura F85 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-151. (B) Interações entre (*R*)-151 e os resíduos de aminoácido em CviR.

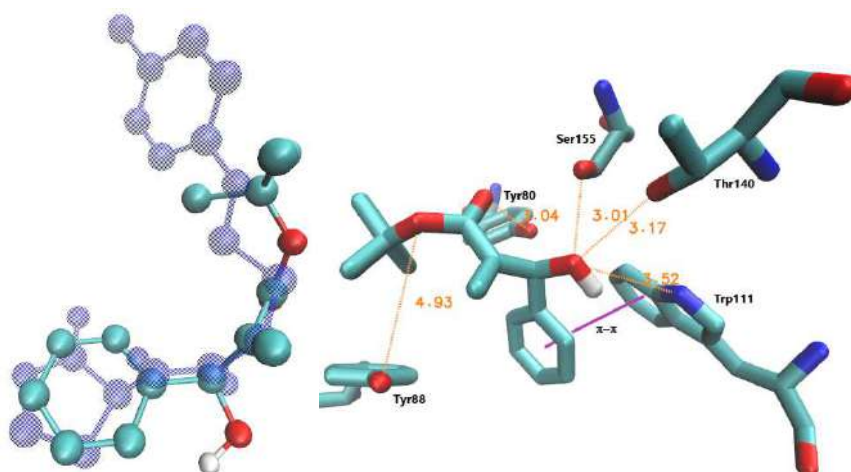


Figura F86 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-151. (B) Interações entre (*S*)-151 e os resíduos de aminoácido em CviR.

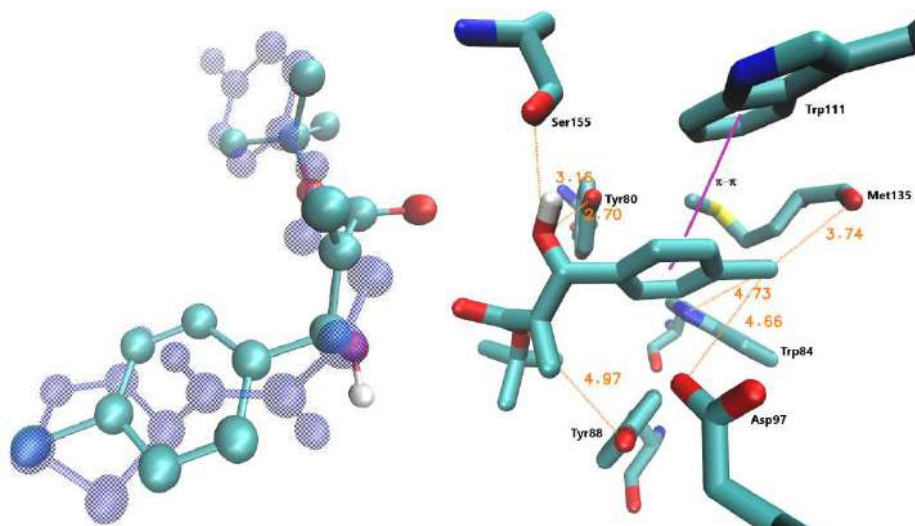


Figura F87 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-152. (B) Interações entre (*R*)-152 e os resíduos de aminoácido em CviR.

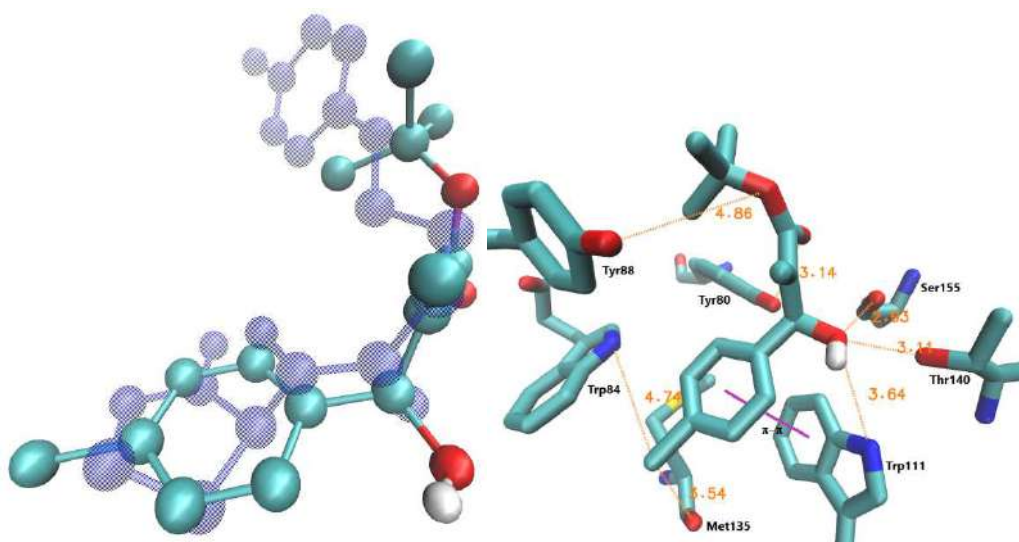


Figura F88 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-152. (B) Interações entre (*S*)-152 e os resíduos de aminoácido em CviR.



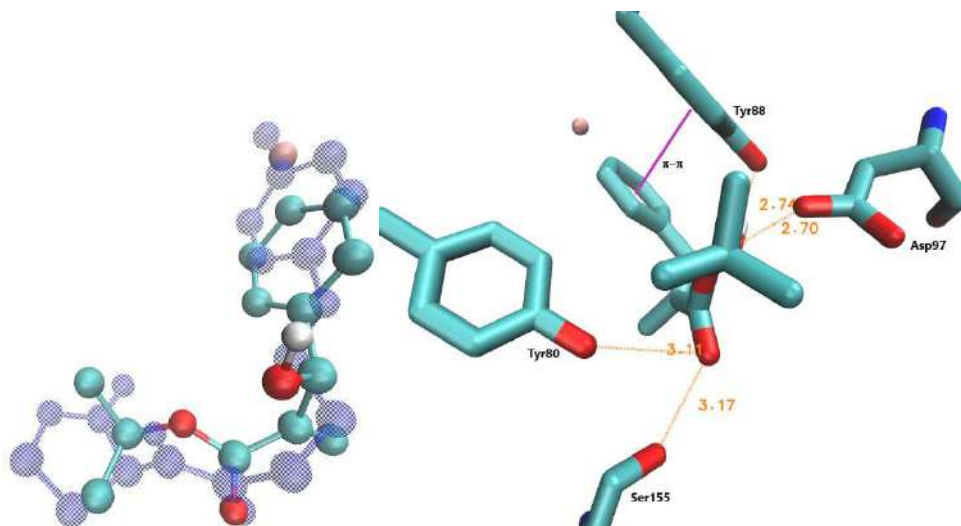


Figura F89 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-153. (B) Interações entre (*R*)-153 e os resíduos de aminoácido em CviR.

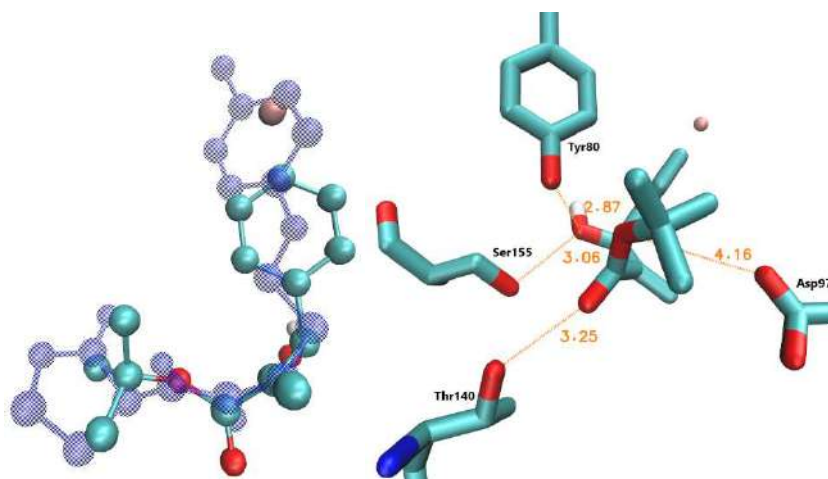


Figura F90 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-153. (B) Interações entre (*S*)-153 e os resíduos de aminoácido em CviR.

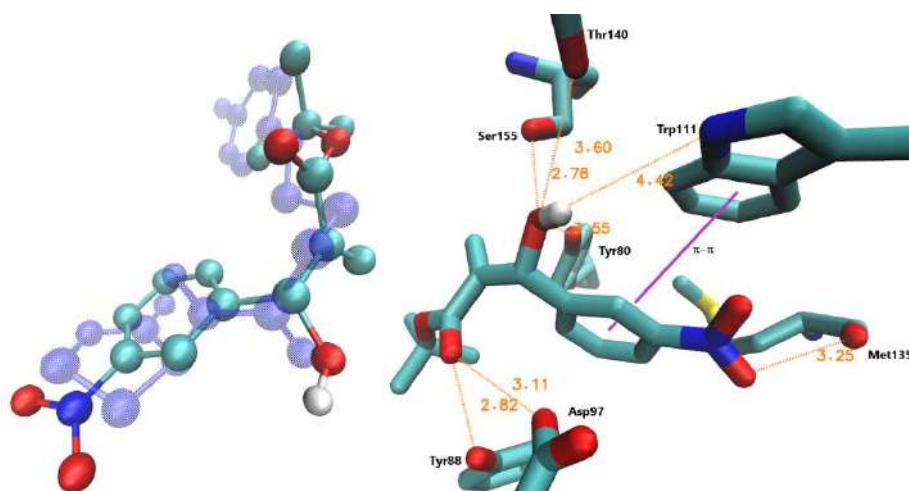


Figura F91 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-154. (B) Interações entre (*R*)-154 e os resíduos de aminoácido em CviR.

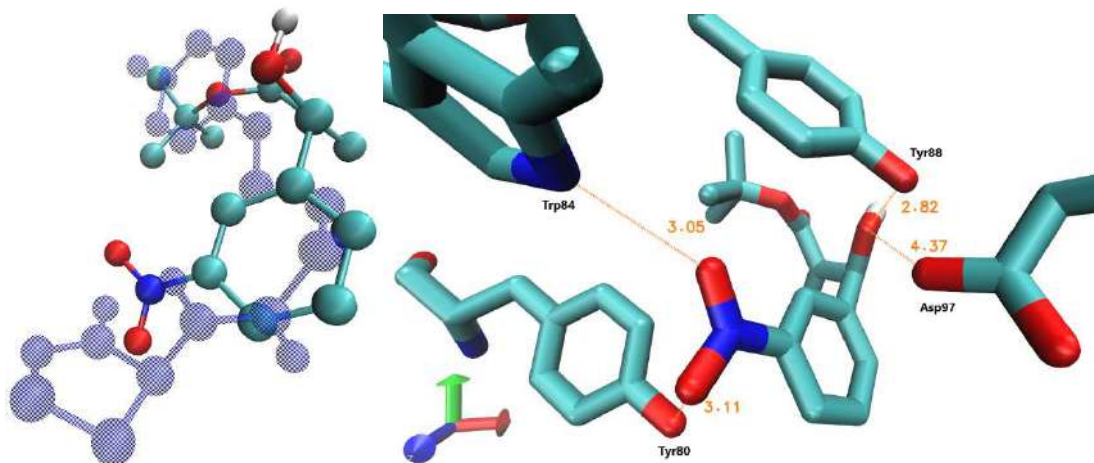


Figura F92 – (A) Sobreposição entre 22 e (S)-154. (B) Interações entre (S)-154 e os resíduos de aminoácido em CviR.

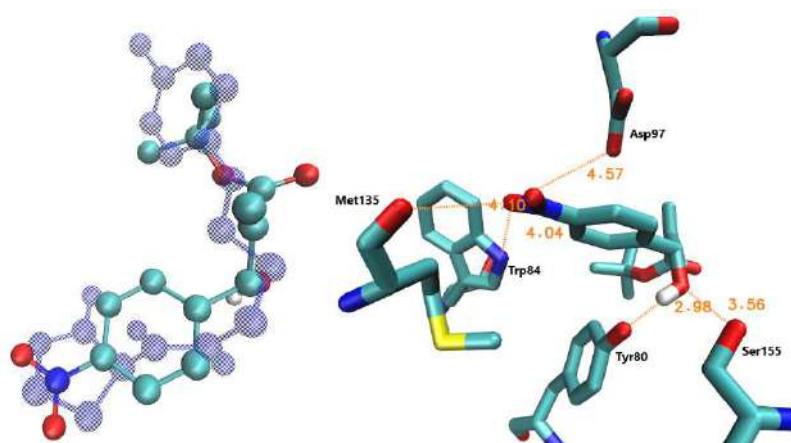


Figura F93 – (A) Sobreposição entre 22 e (R)-155. (B) Interações entre (R)-155 e os resíduos de aminoácido em CviR.

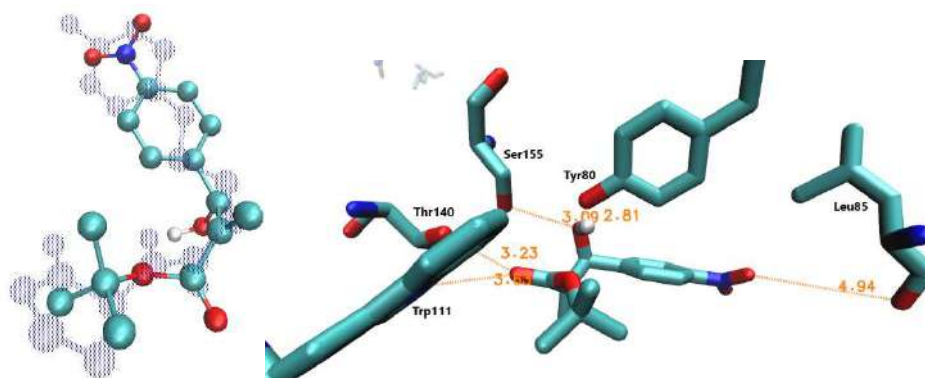


Figura F94 – XX – (A) Sobreposição entre 22 e (S)-155. (B) Interações entre (S)-155 e os resíduos de aminoácido em CviR.

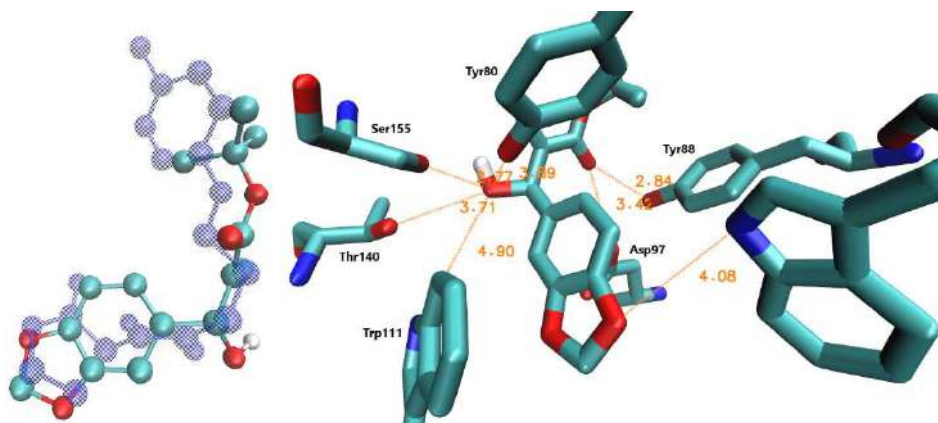


Figura F95 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-156. (B) Interações entre (*R*)-156 e os resíduos de aminoácido em CviR.

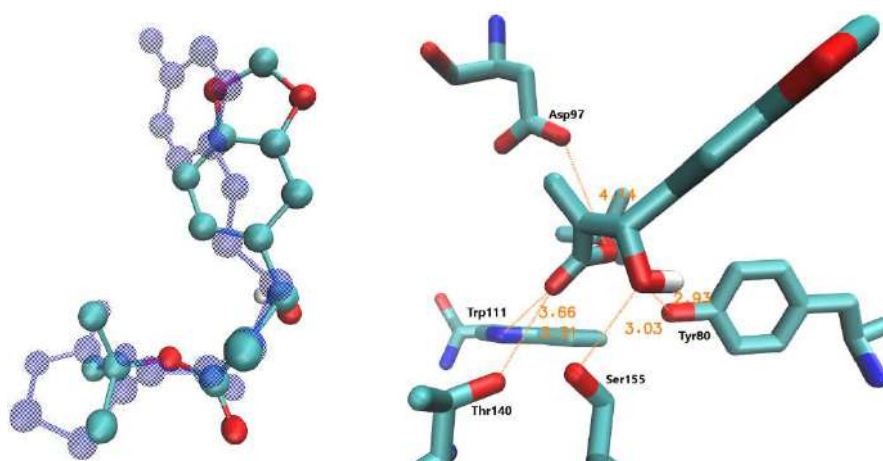


Figura F96 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-156. (B) Interações entre (*S*)-156 e os resíduos de aminoácido em CviR.

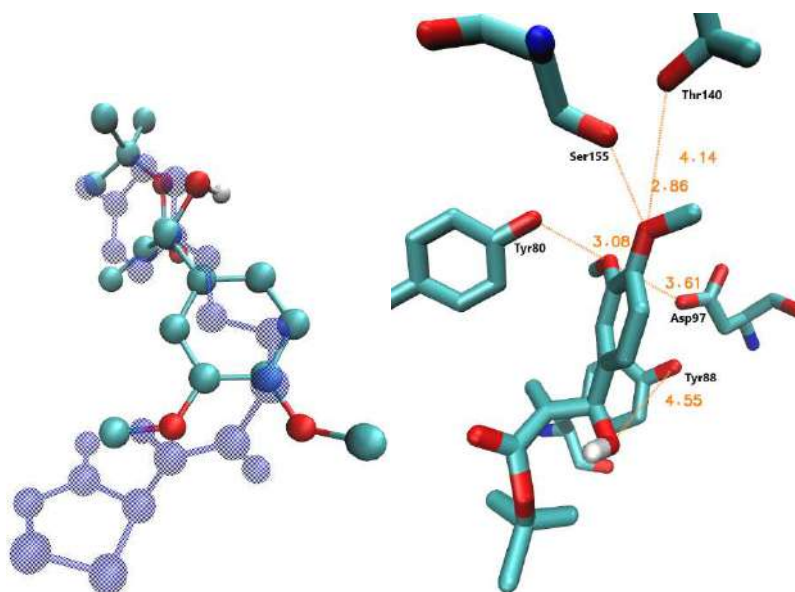


Figura F97 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-157. (B) Interações entre (*R*)-157 e os resíduos de aminoácido em CviR.

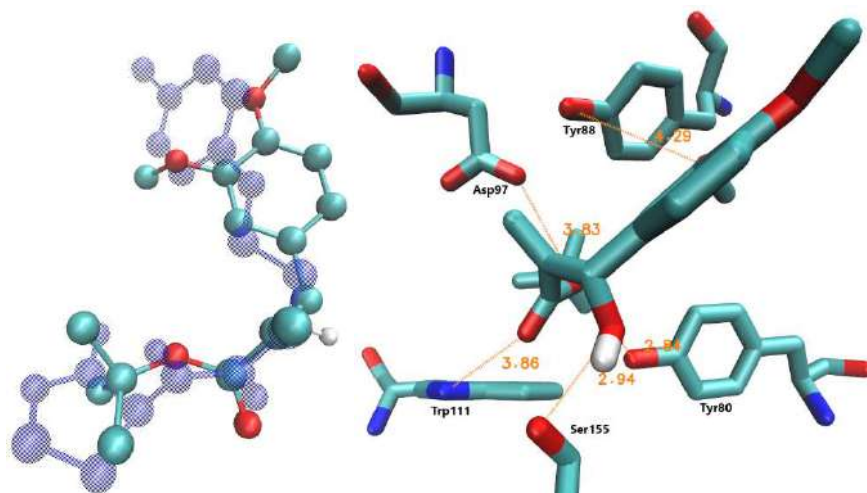


Figura F98 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-157. (B) Interações entre (*S*)-157 e os resíduos de aminoácido em CviR.

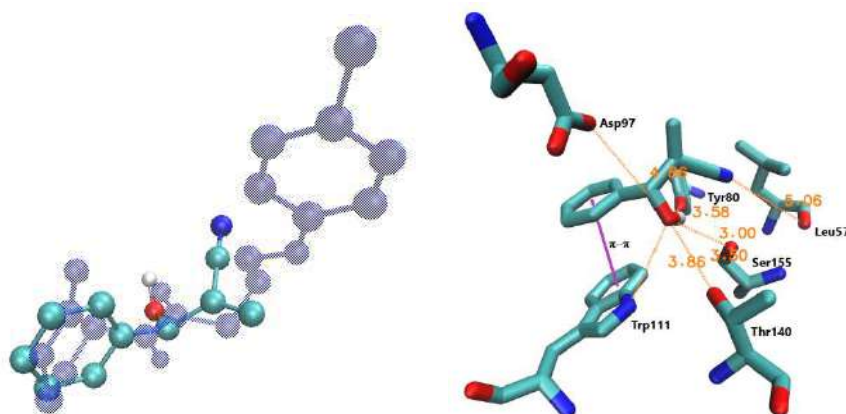


Figura F99 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-159. (B) Interações entre (*R*)-159 e os resíduos de aminoácido em CviR.

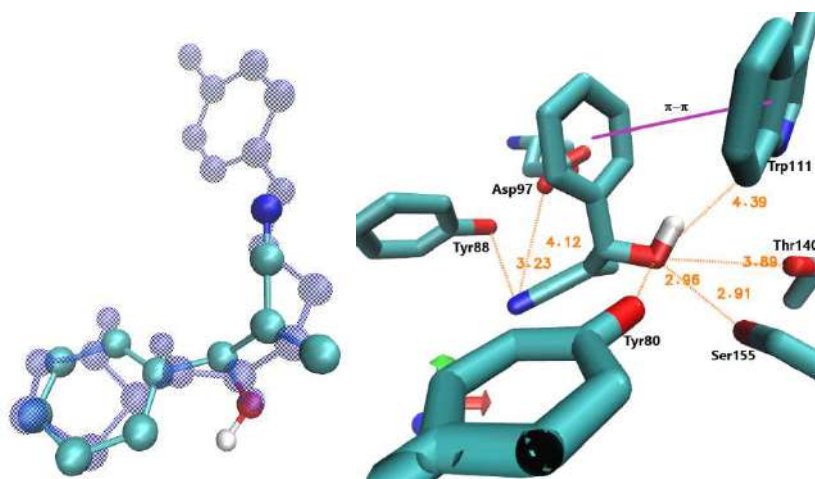


Figura F100 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-159. (B) Interações entre (*S*)-159 e os resíduos de aminoácido em CviR.



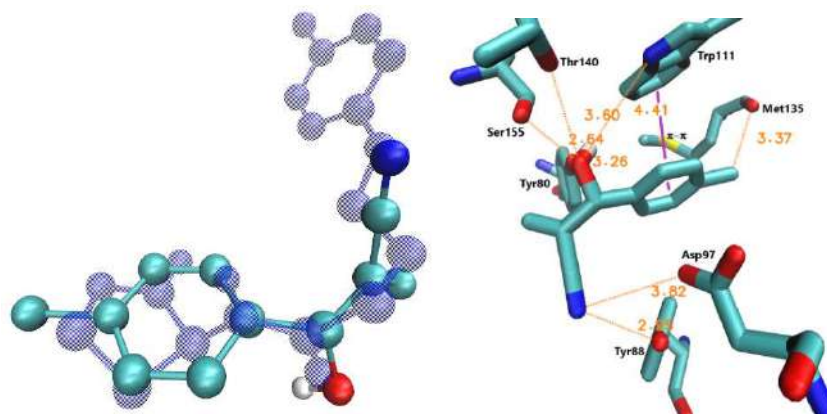


Figura F101 – (A) Sobreposição entre 22 e (R)-160. (B) Interações entre (R)-160 e os resíduos de aminoácido em CviR.

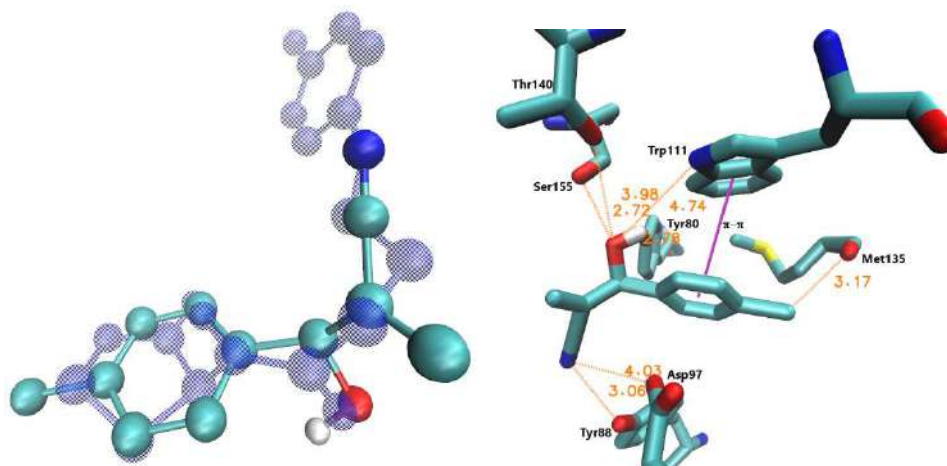


Figura F102 – (A) Sobreposição entre 22 e (S)-160. (B) Interações entre (S)-160 e os resíduos de aminoácido em CviR.

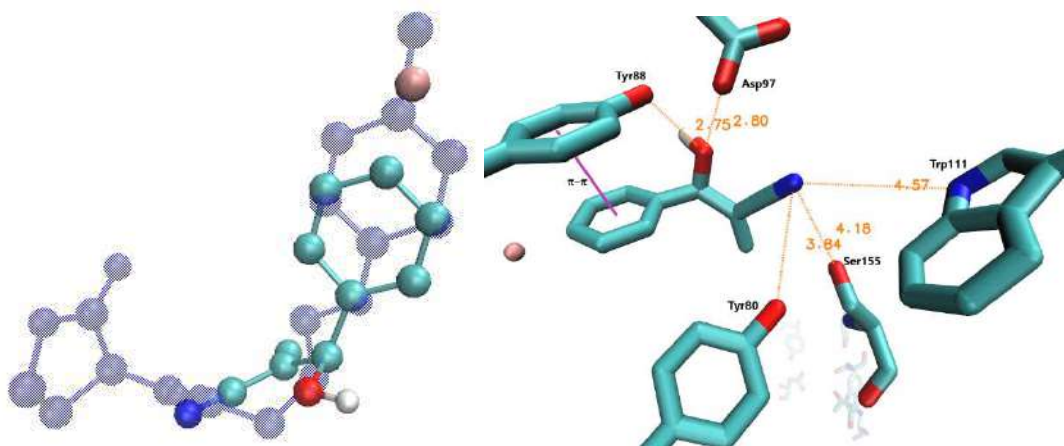


Figura F103 – (A) Sobreposição entre 22 e (R)-161. (B) Interações entre (R)-161 e os resíduos de aminoácido em CviR.

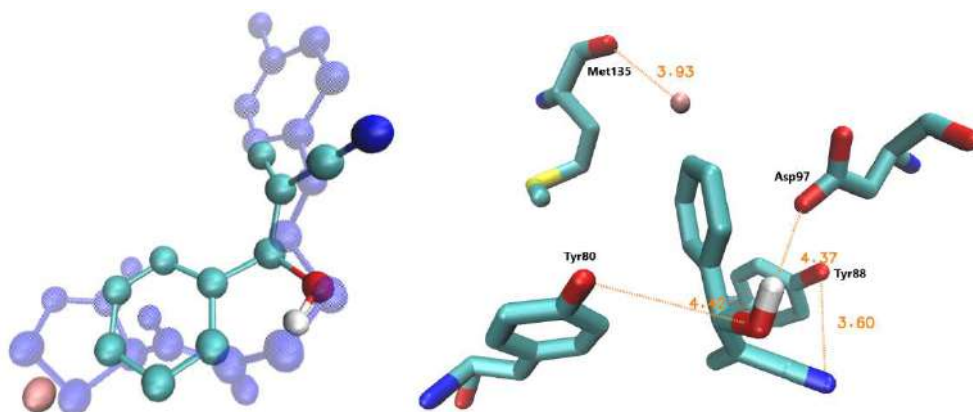


Figura F104 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-161. (B) Interações entre (*S*)-161 e os resíduos de aminoácido em CviR.

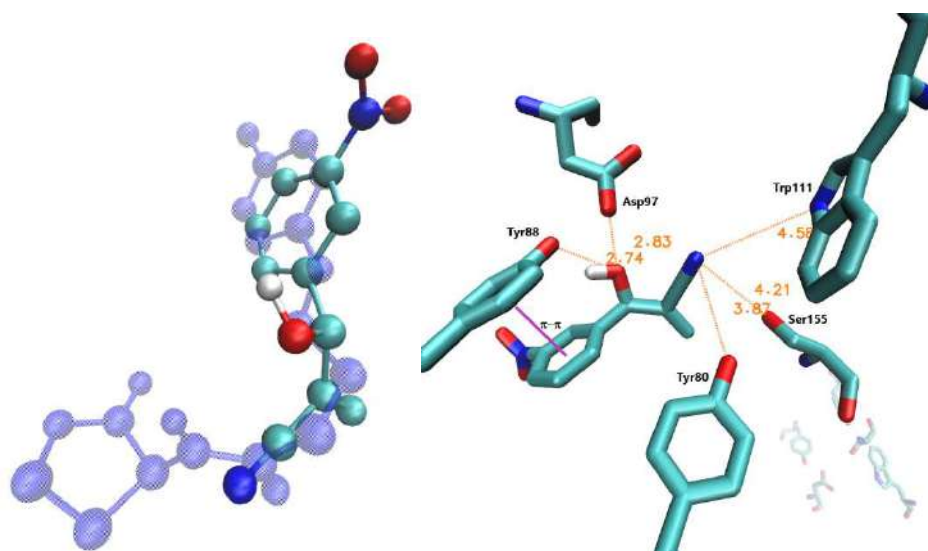


Figura F105 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-72. (B) Interações entre (*R*)-72 e os resíduos de aminoácido em CviR.

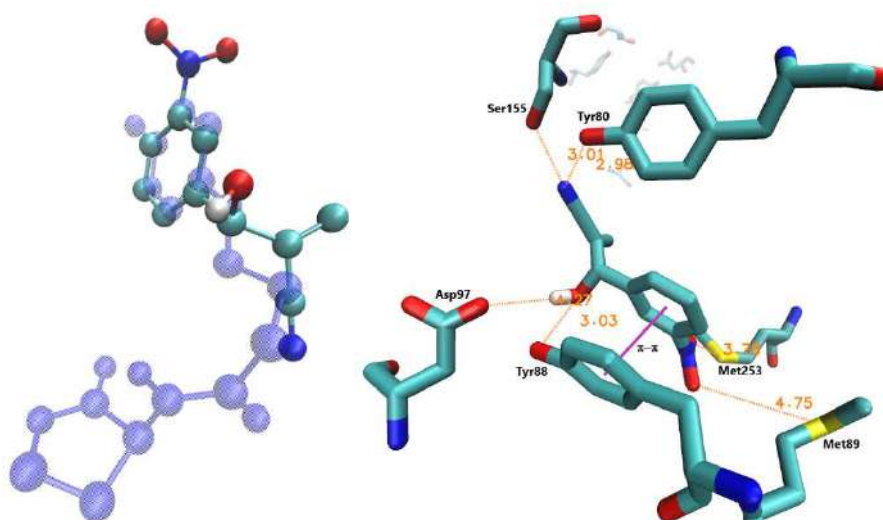


Figura F106 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-72. (B) Interações entre (*S*)-72 e os resíduos de aminoácido em CviR.

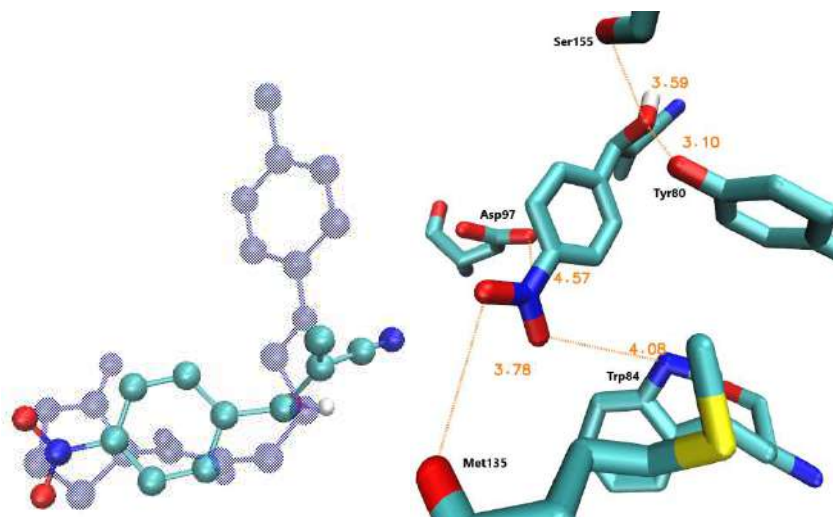


Figura F107 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-68. (B) Interações entre (*R*)-68 e os resíduos de aminoácido em CviR.

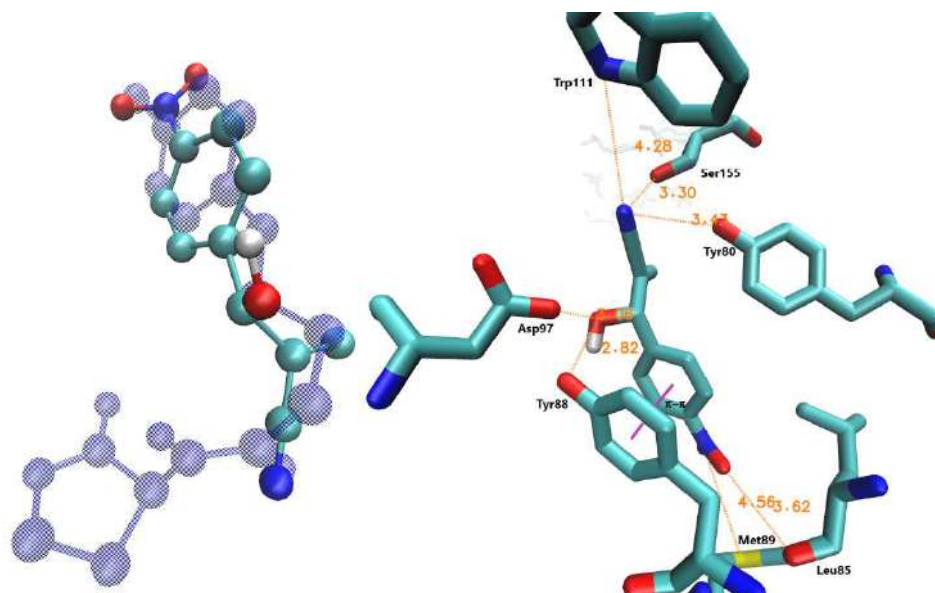


Figura F108 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-68. (B) Interações entre (*S*)-68 e os resíduos de aminoácido em CviR.

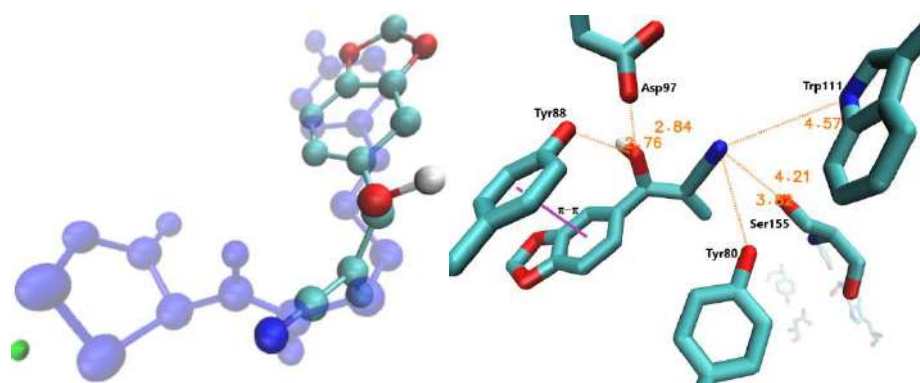


Figura F109 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-162. (B) Interações entre (*R*)-162 e os resíduos de aminoácido em CviR.

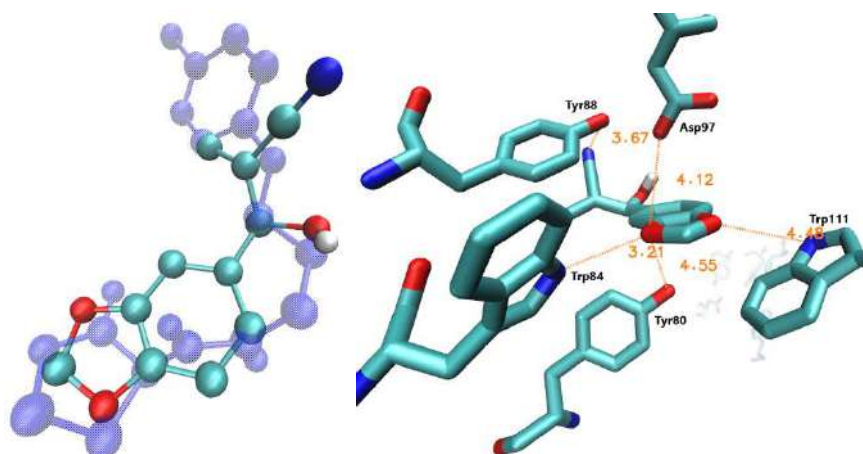


Figura F110 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-162. (B) Interações entre (*S*)-162 e os resíduos de aminoácido em CviR.

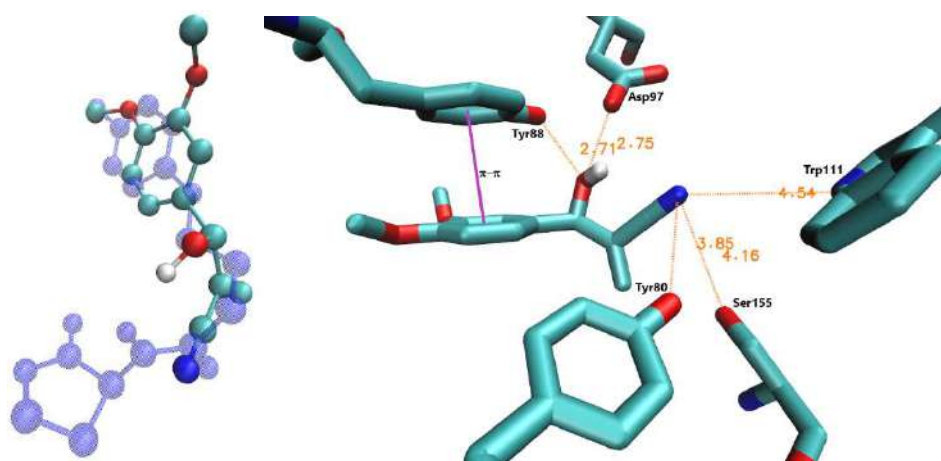


Figura F111 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-163. (B) Interações entre (*R*)-163 e os resíduos de aminoácido em CviR.

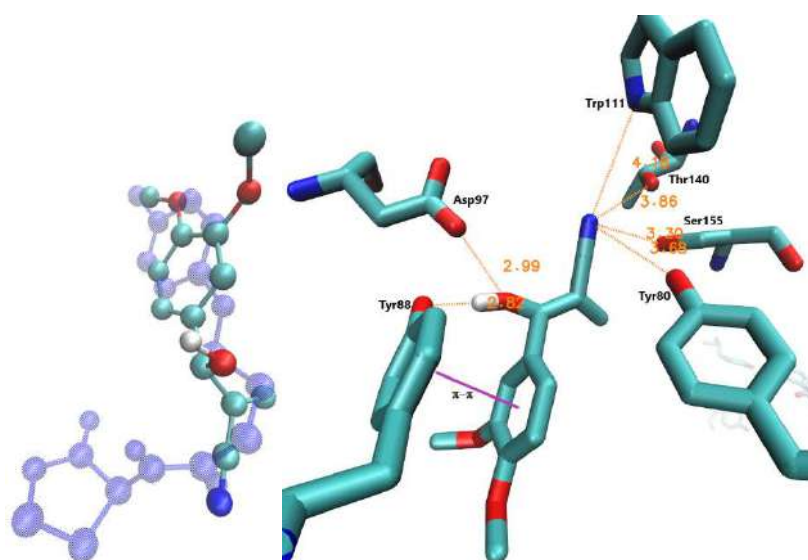


Figura F112 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-163. (B) Interações entre (*S*)-163 e os resíduos de aminoácido em CviR.



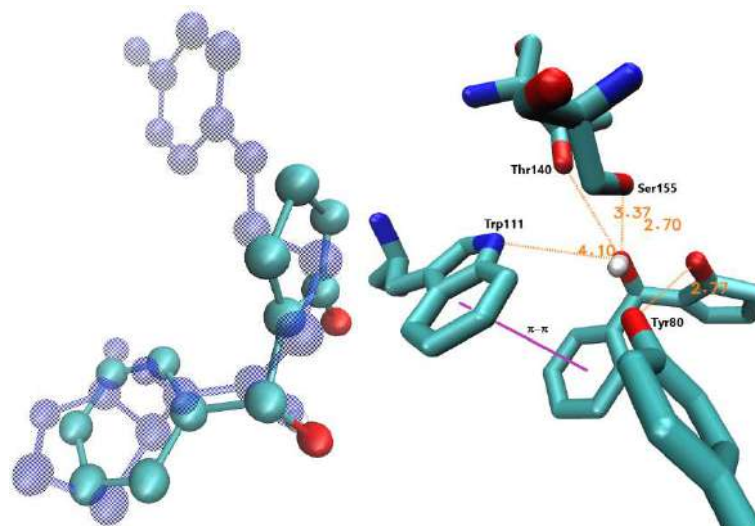


Figura F113 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-164. (B) Interações entre (*R*)-164 e os resíduos de aminoácido em CviR.

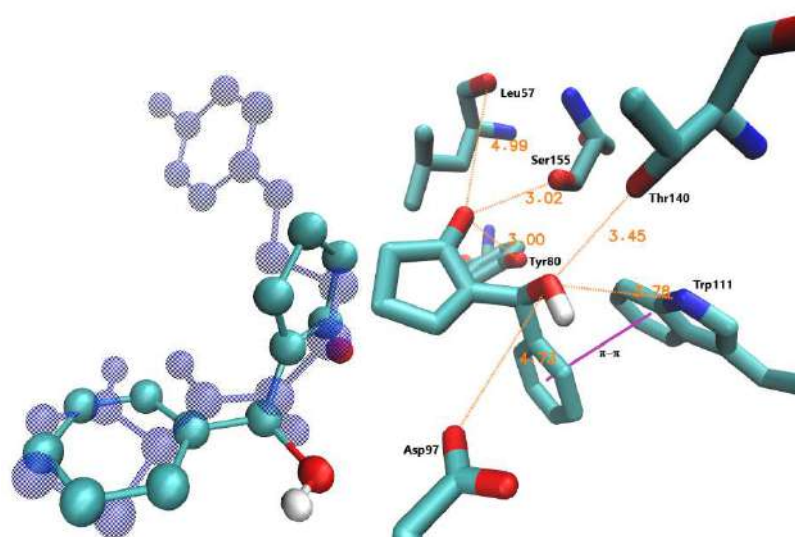


Figura F114 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-164. (B) Interações entre (*S*)-164 e os resíduos de aminoácido em CviR.

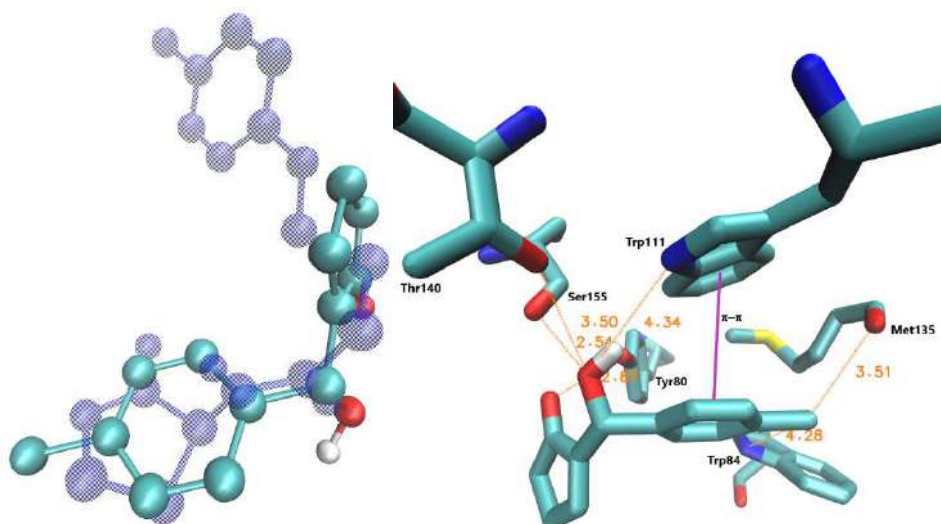


Figura F115 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-165. (B) Interações entre (*R*)-165 e os resíduos de aminoácido em CviR.

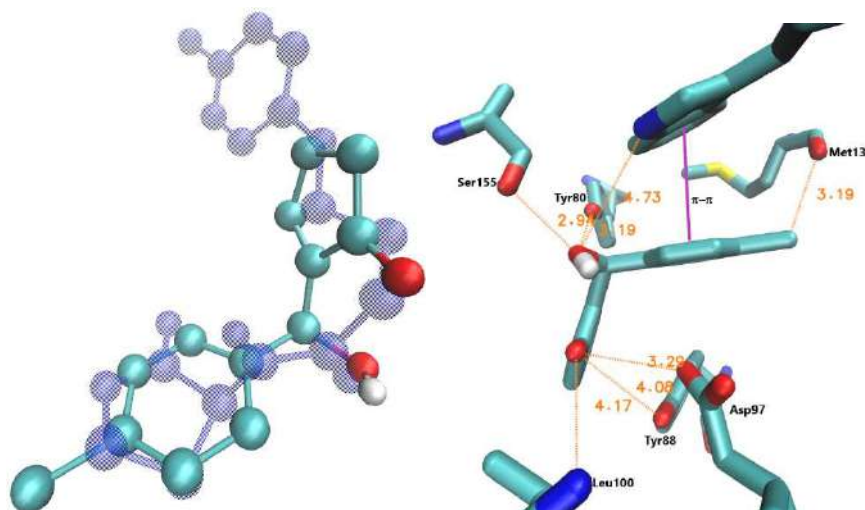


Figura F116 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-165. (B) Interações entre (*S*)-165 e os resíduos de aminoácido em CviR.

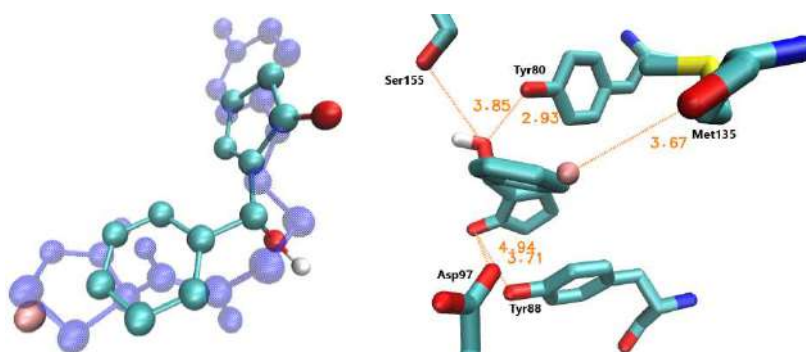


Figura F117 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-166. (B) Interações entre (*R*)-166 e os resíduos de aminoácido em CviR.

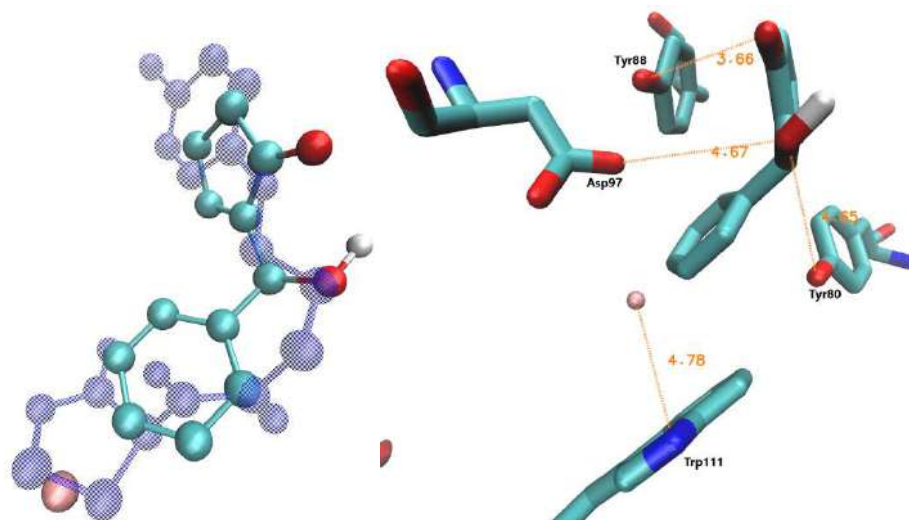


Figura F118 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-166. (B) Interações entre (*S*)-166 e os resíduos de aminoácido em CviR.

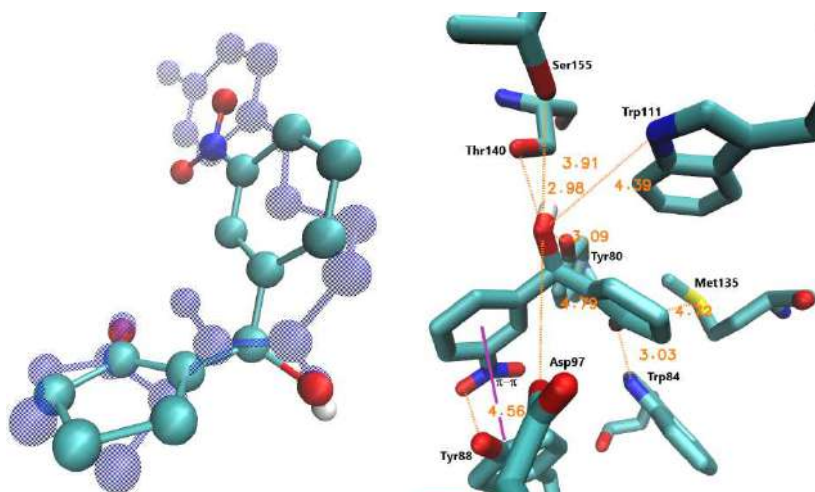


Figura F119 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-167. (B) Interações entre (*R*)-167 e os resíduos de aminoácido em CviR.

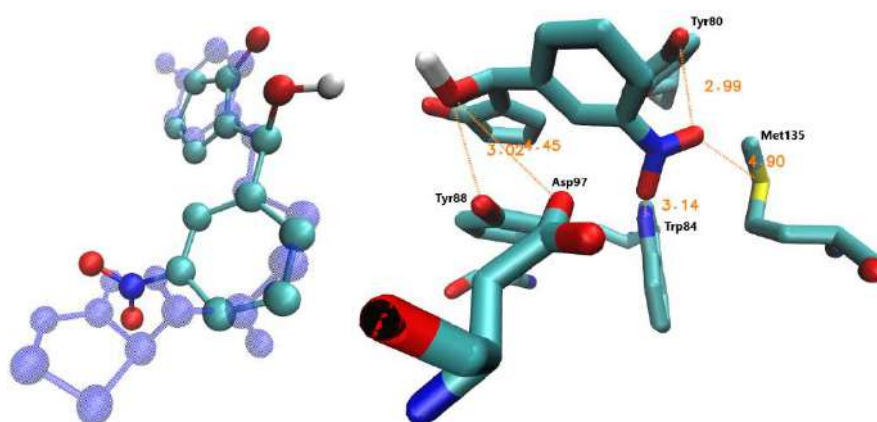


Figura F120 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-167. (B) Interações entre (*S*)-167 e os resíduos de aminoácido em CviR.

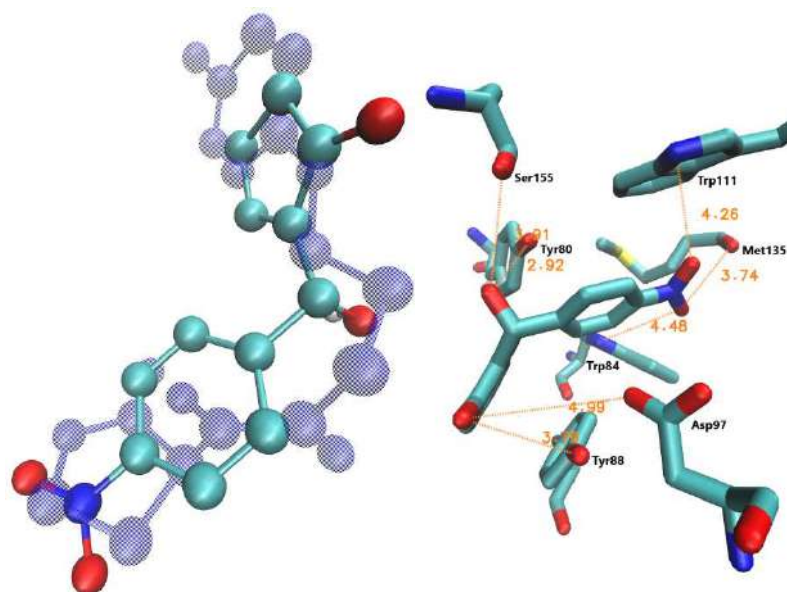


Figura F121 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-168. (B) Interações entre (*R*)-168 e os resíduos de aminoácido em CviR.

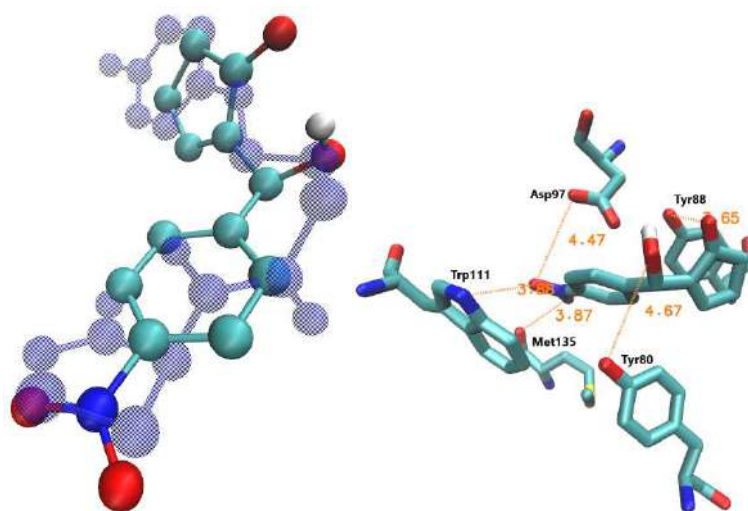


Figura F122 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-168. (B) Interações entre (*S*)-168 e os resíduos de aminoácido em CviR.



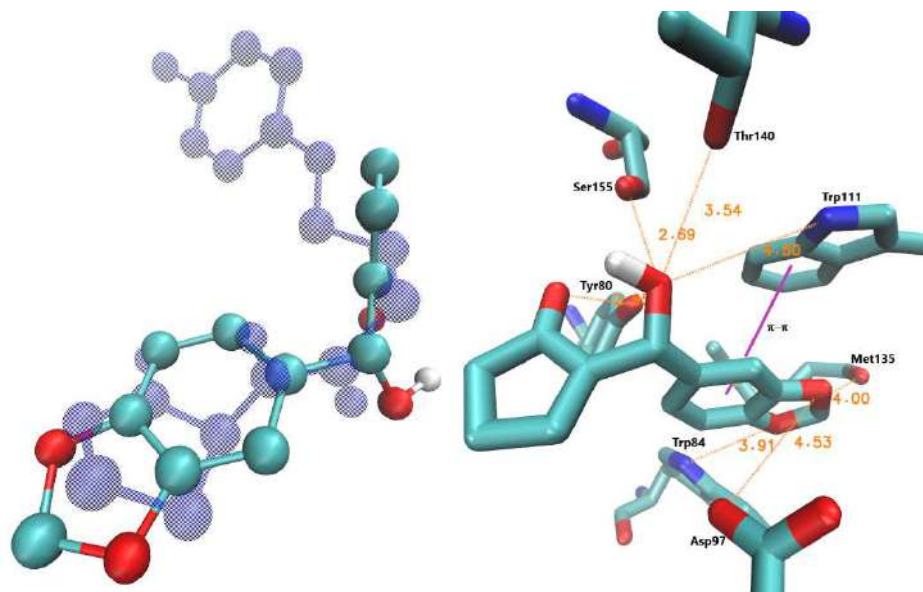


Figura F123 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-169. (B) Interações entre (*R*)-169 e os resíduos de aminoácido em CviR.

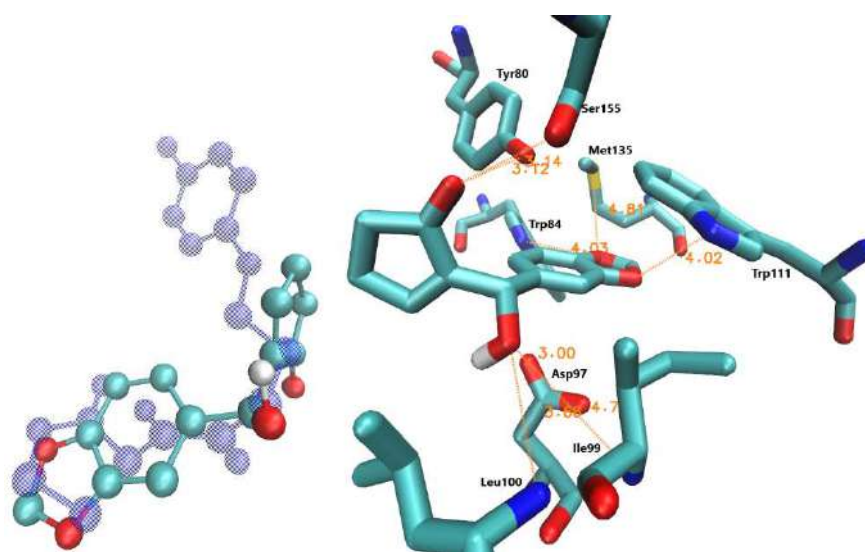


Figura F124 – XX – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-169. (B) Interações entre (*S*)-169 e os resíduos de aminoácido em CviR.

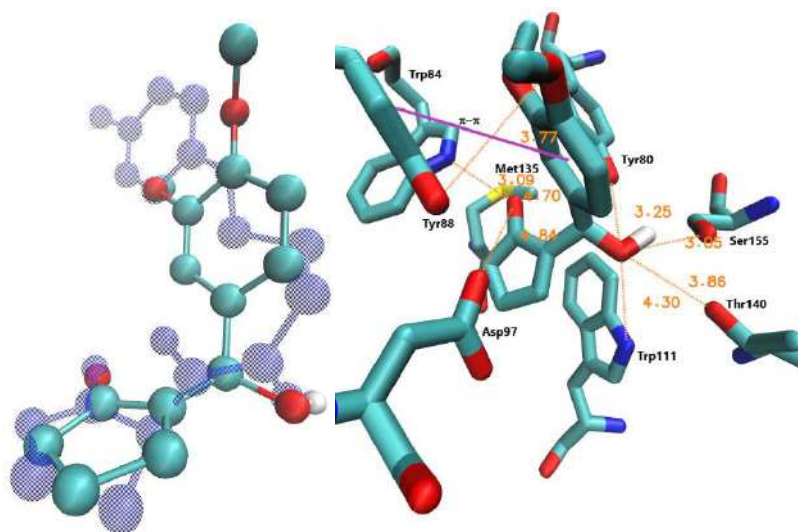


Figura F125 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-170. (B) Interações entre (*R*)-170 e os resíduos de aminoácido em CviR.

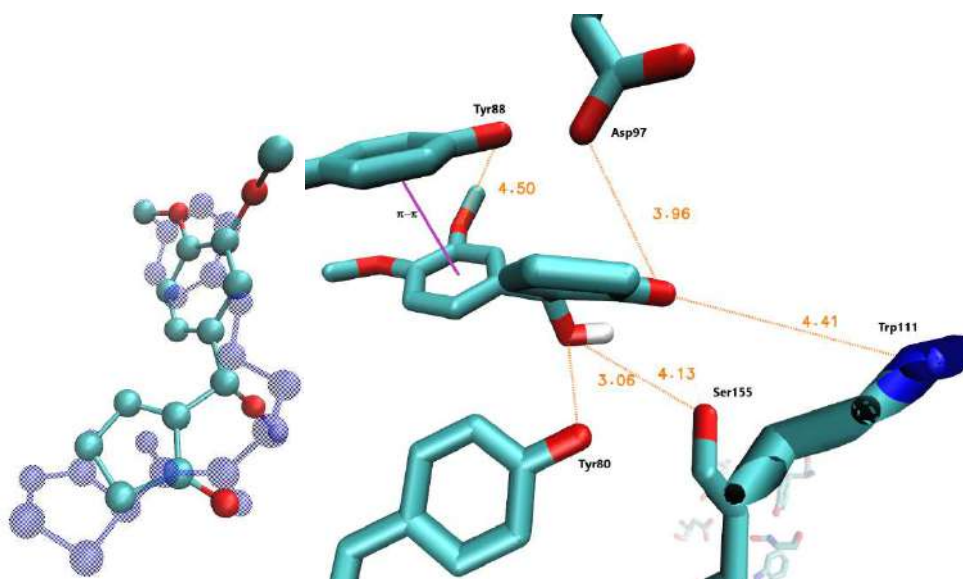


Figura F126 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-170. (B) Interações entre (*S*)-170 e os resíduos de aminoácido em CviR.

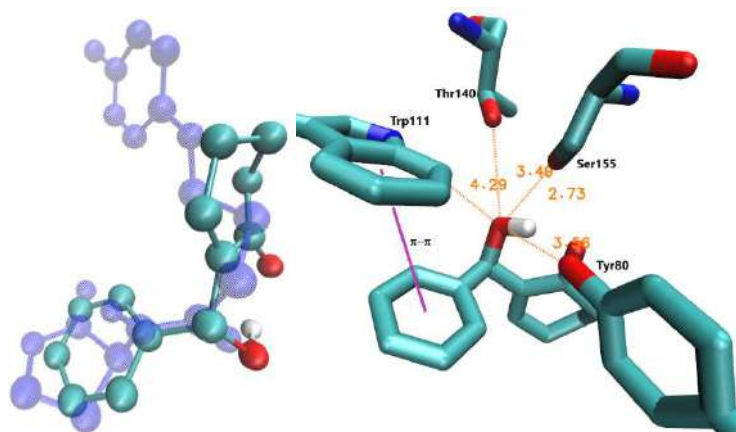


Figura F127 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-171. (B) Interações entre (*R*)-171 e os resíduos de aminoácido em CviR.

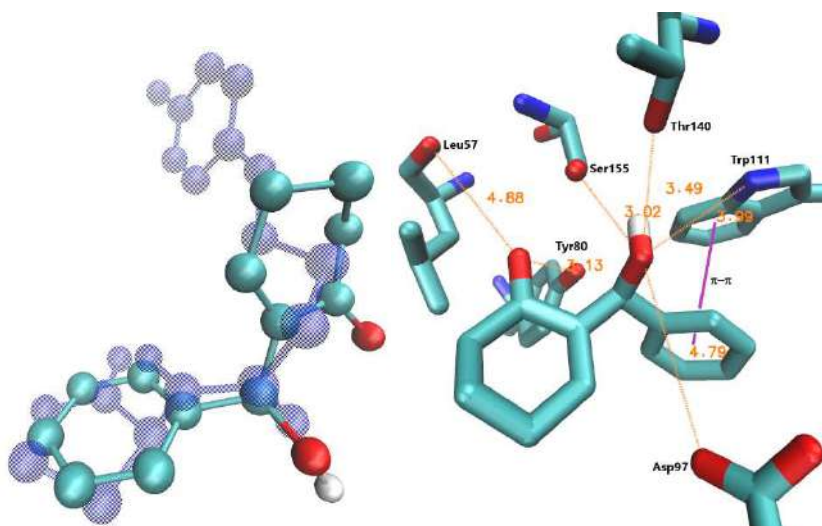


Figura F128 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-171. (B) Interações entre (*S*)-171 e os resíduos de aminoácido em CviR.

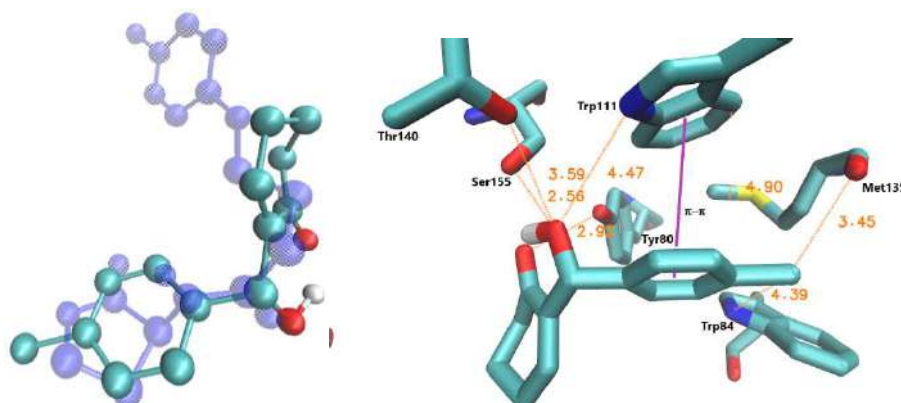


Figura F129 – XX – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-172. (B) Interações entre (*R*)-172 e os resíduos de aminoácido em CviR.

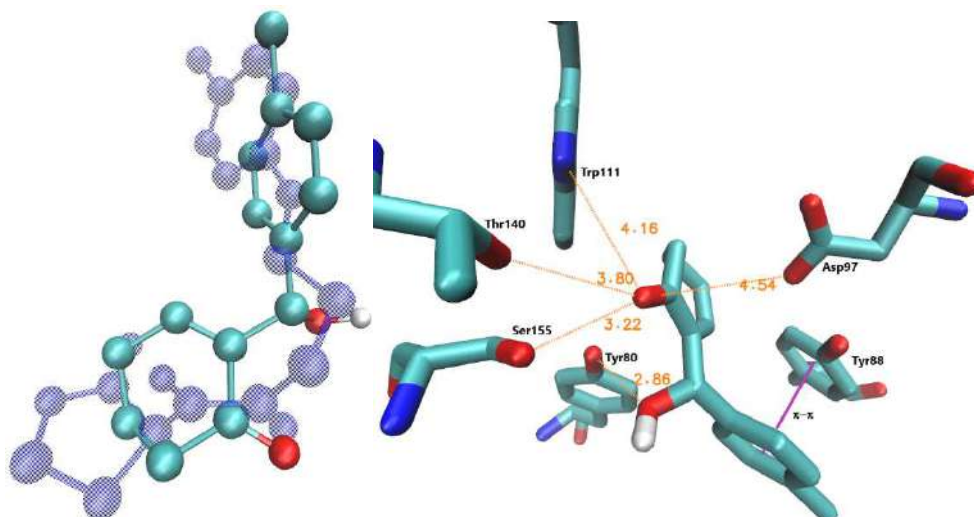


Figura F130 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-172. (B) Interações entre (*S*)-172 e os resíduos de aminoácido em CviR.

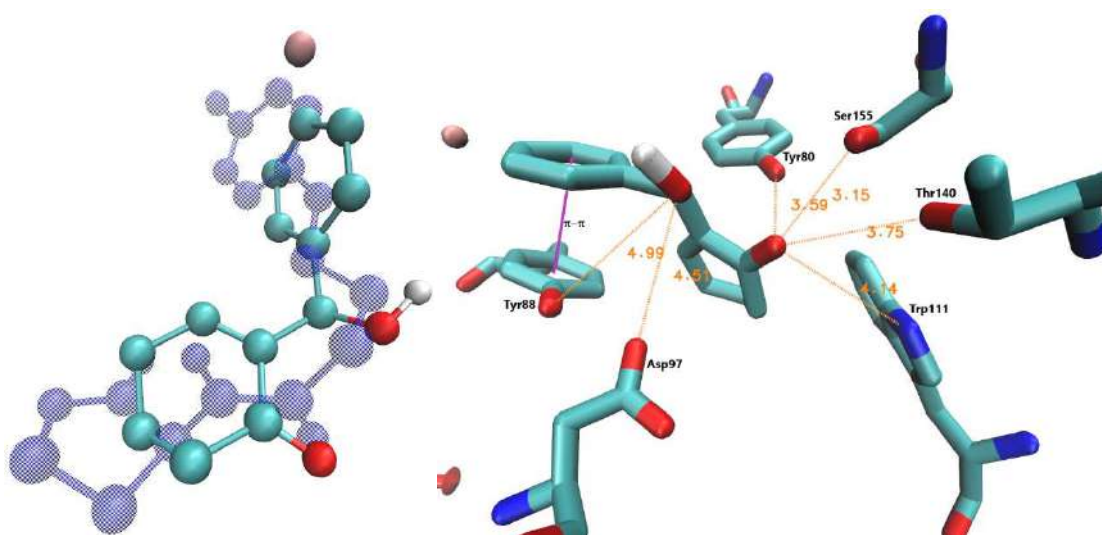


Figura F131 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-173. (B) Interações entre (*R*)-173 e os resíduos de aminoácido em CviR.



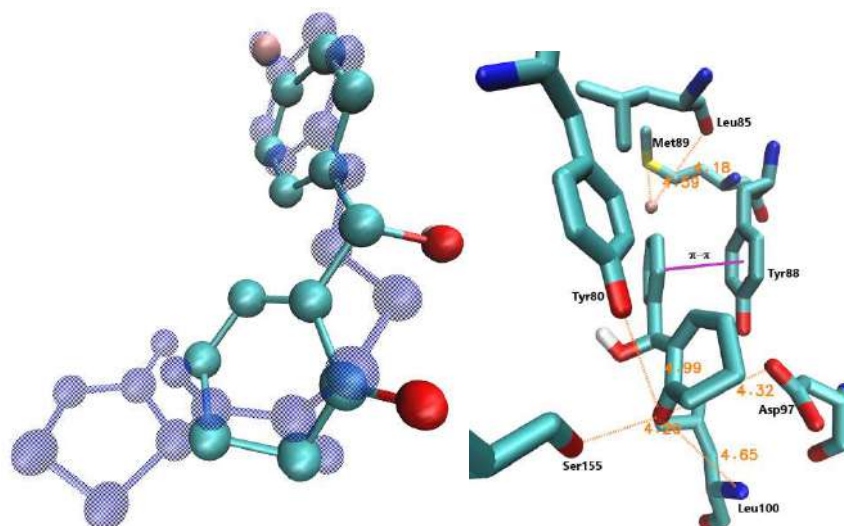


Figura F132 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-173. (B) Interações entre (*S*)-173 e os resíduos de aminoácido em CviR.

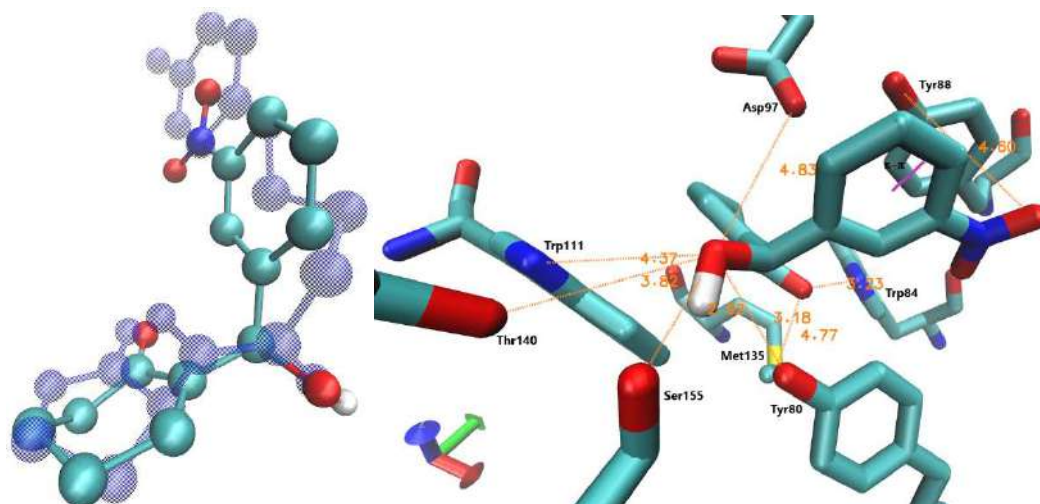


Figura F133 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-174. (B) Interações entre (*R*)-174 e os resíduos de aminoácido em CviR.

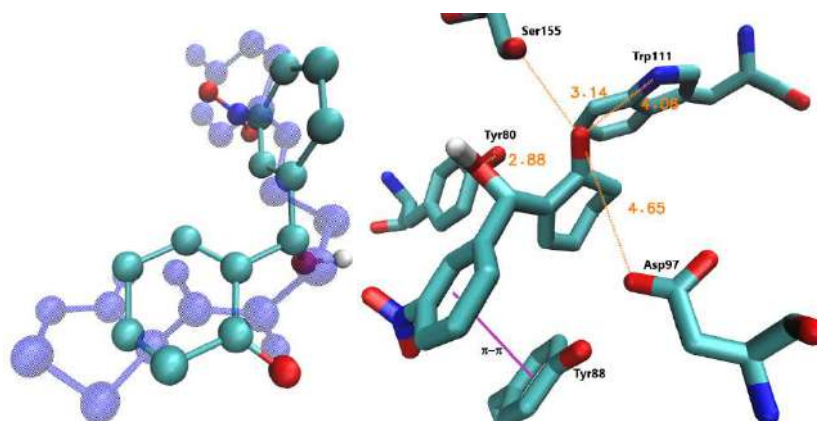


Figura F134 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-174. (B) Interações entre (*S*)-174 e os resíduos de aminoácido em CviR.

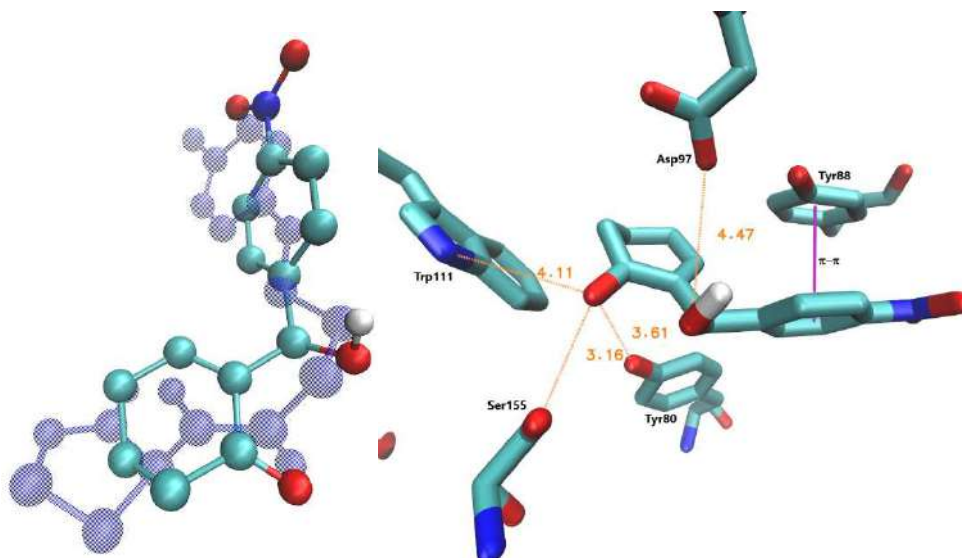


Figura F135 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-175. (B) Interações entre (*R*)-175 e os resíduos de aminoácido em CviR.

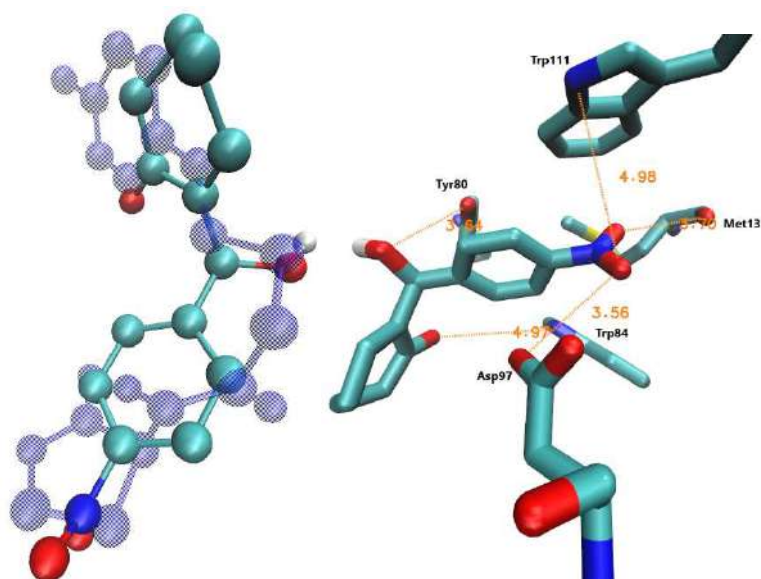


Figura F136 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-175. (B) Interações entre (*S*)-175 e os resíduos de aminoácido em CviR.

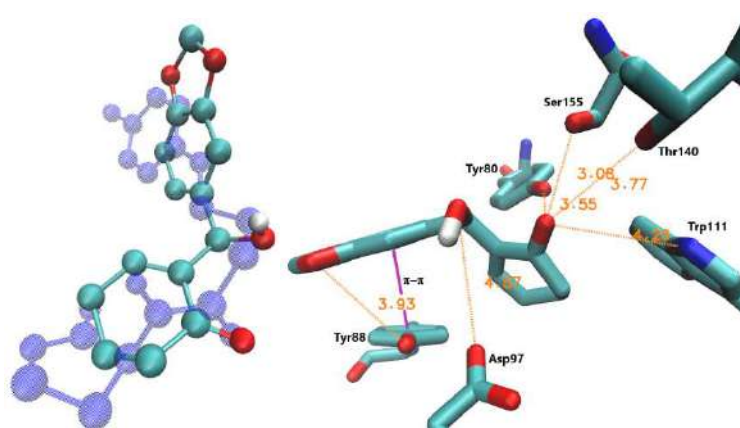


Figura F137 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-176. (B) Interações entre (*R*)-176 e os resíduos de aminoácido em CviR.

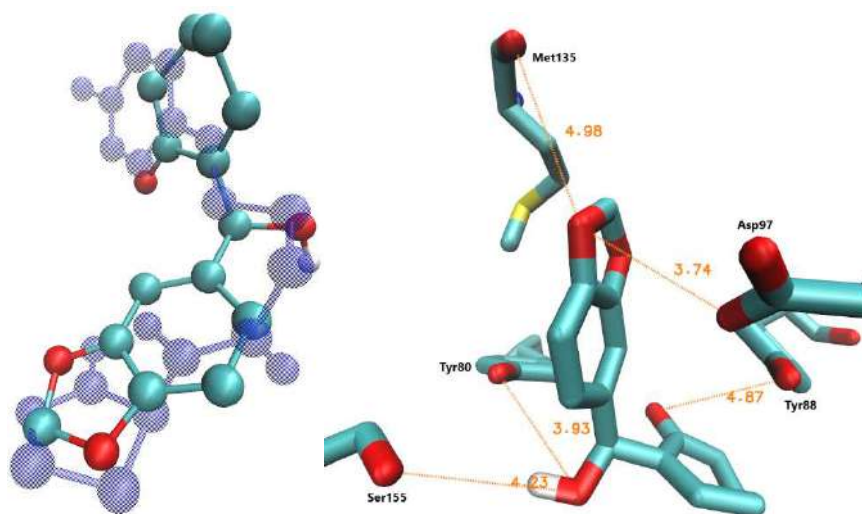


Figura F138 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-176. (B) Interações entre (*S*)-176 e os resíduos de aminoácido em CviR.

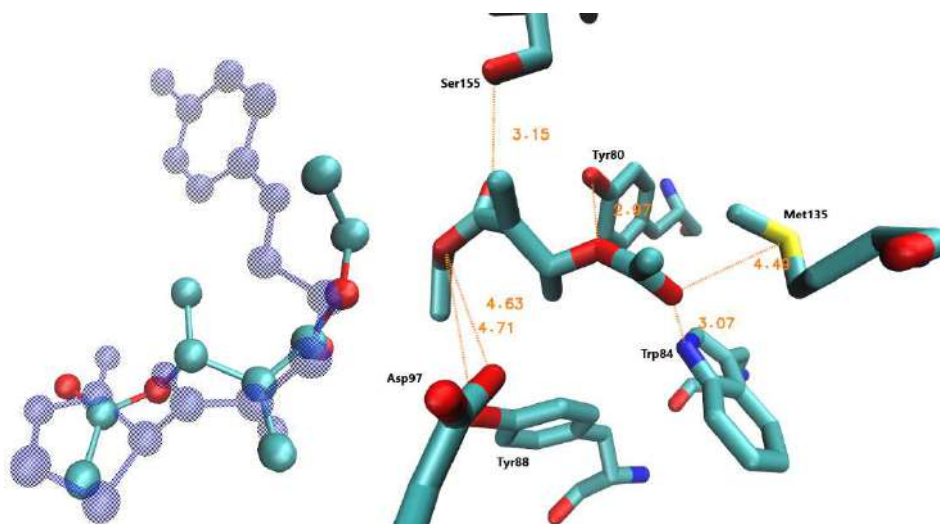


Figura F139 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-177. (B) Interações entre (*R*)-177 e os resíduos de aminoácido em CviR.

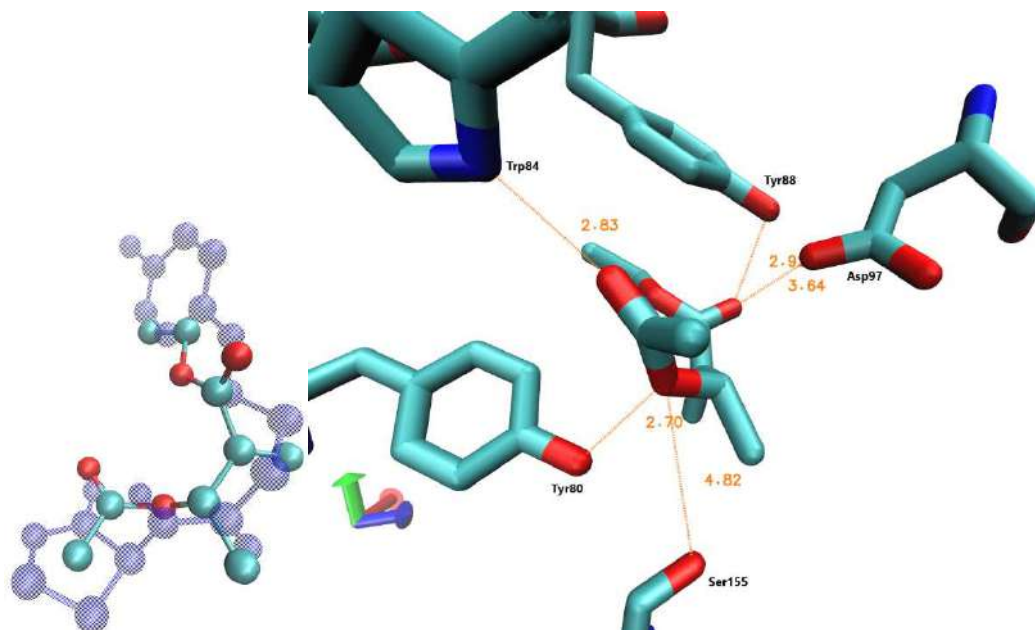


Figura F140 – (A) Sobreposição entre 22 e (S)-177. (B) Interações entre (S)-177 e os resíduos de aminoácido em CviR.

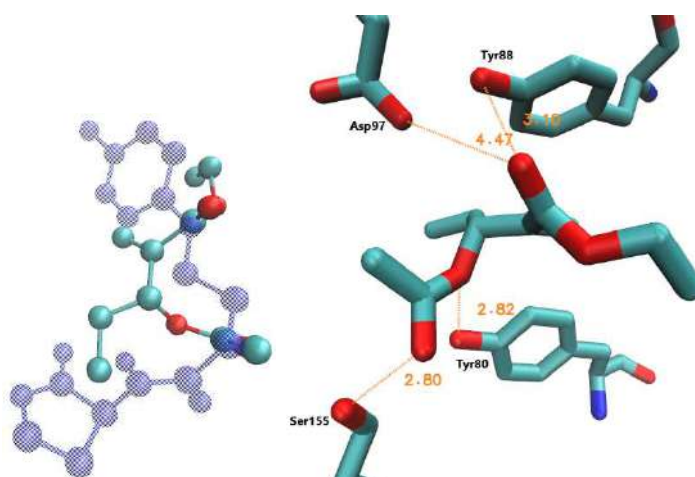


Figura F141 – (A) Sobreposição entre 22 e (R)-178. (B) Interações entre (R)-178 e os resíduos de aminoácido em CviR.

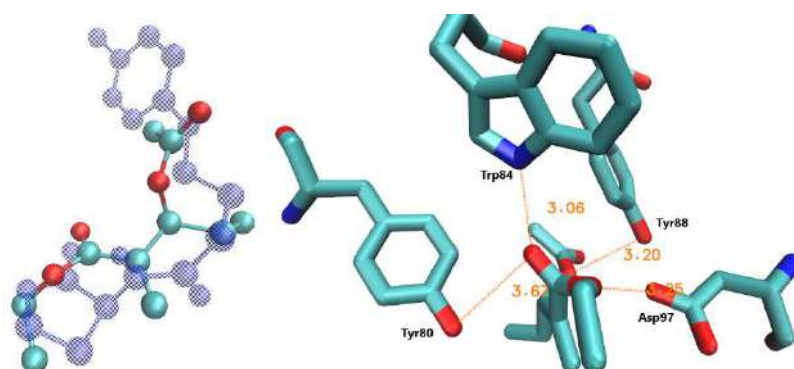


Figura F142 – (A) Sobreposição entre 22 e (S)-178. (B) Interações entre (S)-178 e os resíduos de aminoácido em CviR.



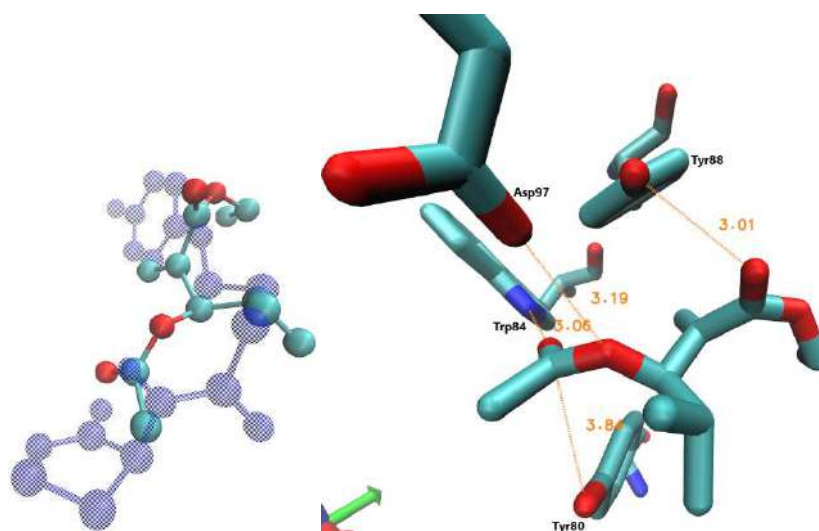


Figura F143 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-179. (B) Interações entre (*R*)-179 e os resíduos de aminoácido em CviR.

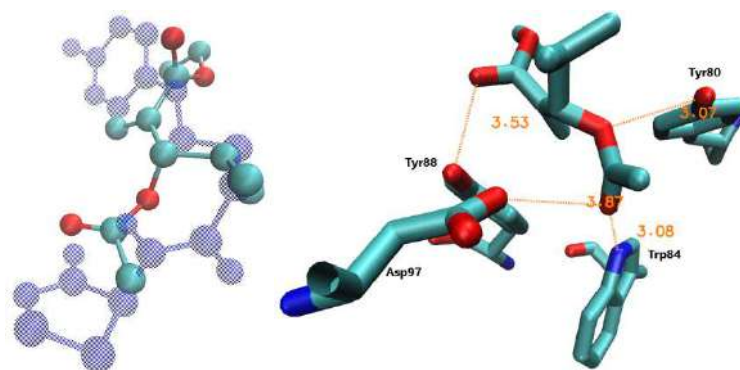


Figura F144 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-179. (B) Interações entre (*S*)-179 e os resíduos de aminoácido em CviR.

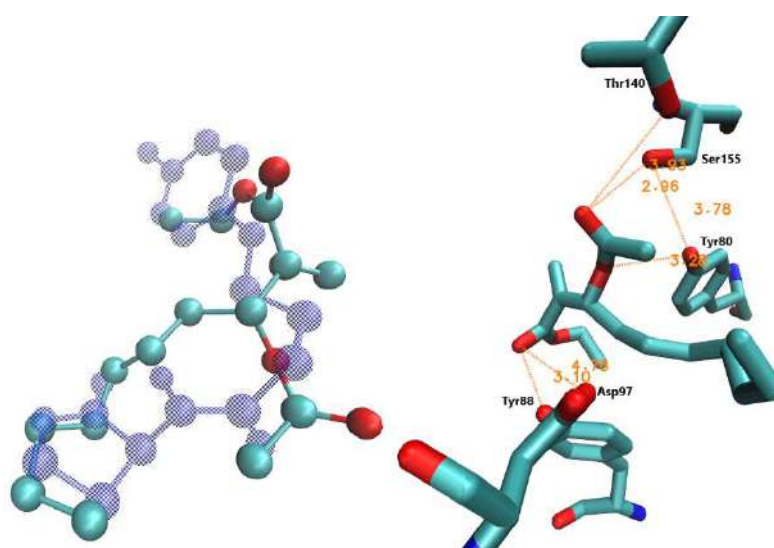


Figura F145 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-180. (B) Interações entre (*R*)-180 e os resíduos de aminoácido em CviR.

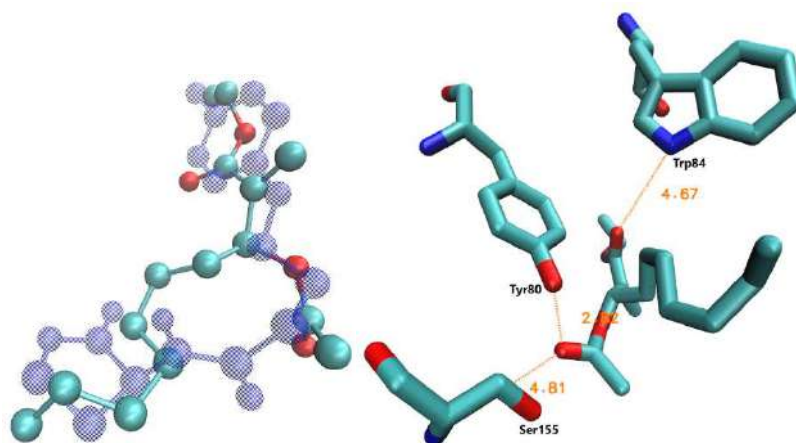


Figura F146 – (A) Sobreposição entre 22 e (S)-180. (B) Interações entre (S)-180 e os resíduos de aminoácido em CviR.

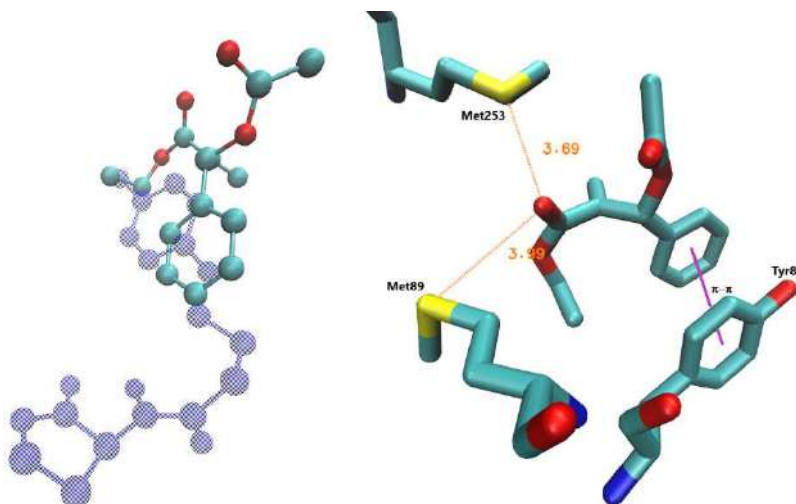


Figura F147 – (A) Sobreposição entre 22 e (R)-181. (B) Interações entre (R)-181 e os resíduos de aminoácido em CviR.

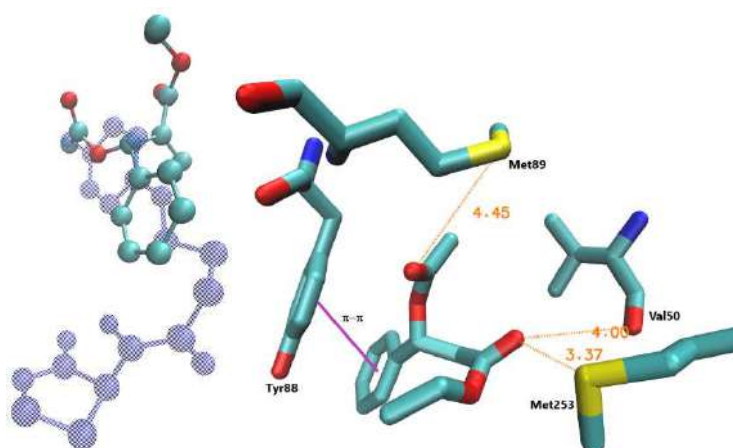


Figura F148 – (A) Sobreposição entre 22 e (S)-181. (B) Interações entre (S)-181 e os resíduos de aminoácido em CviR.

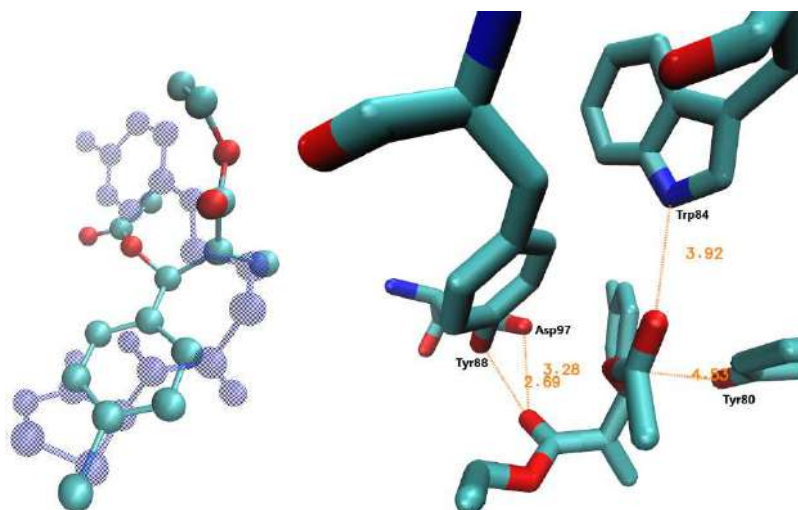


Figura F149 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-182. (B) Interações entre (*R*)-182 e os resíduos de aminoácido em CviR.

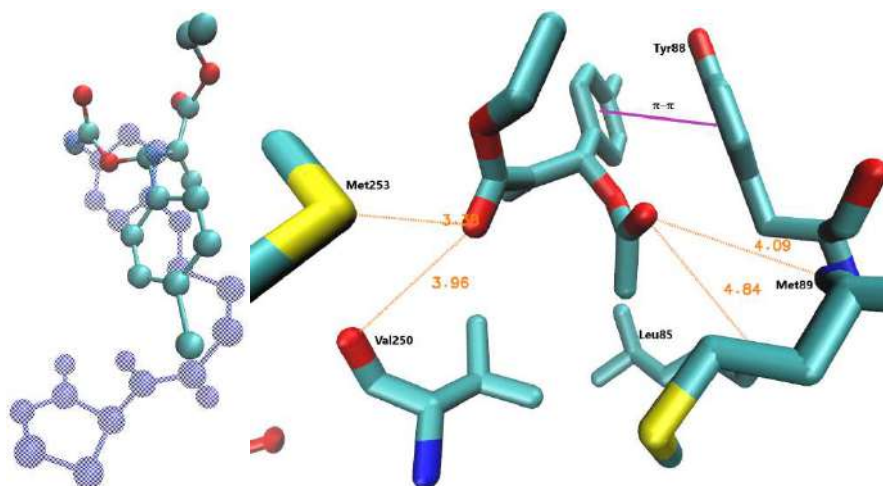


Figura F150 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-182. (B) Interações entre (*S*)-182 e os resíduos de aminoácido em CviR.

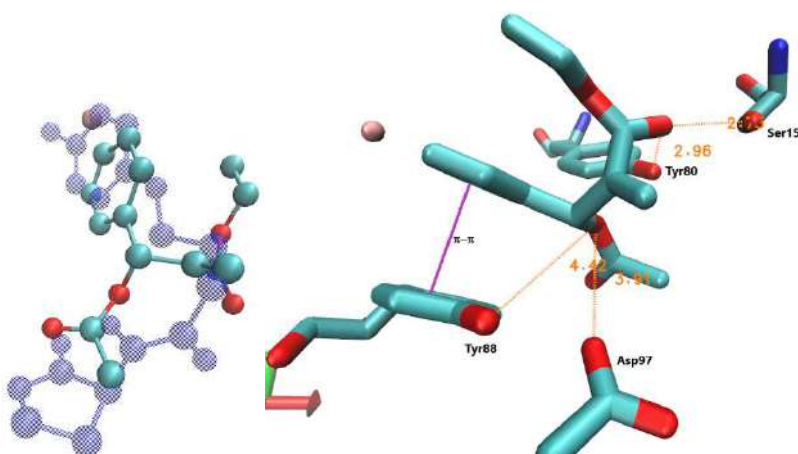


Figura F151 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-183. (B) Interações entre (*R*)-183 e os resíduos de aminoácido em CviR.

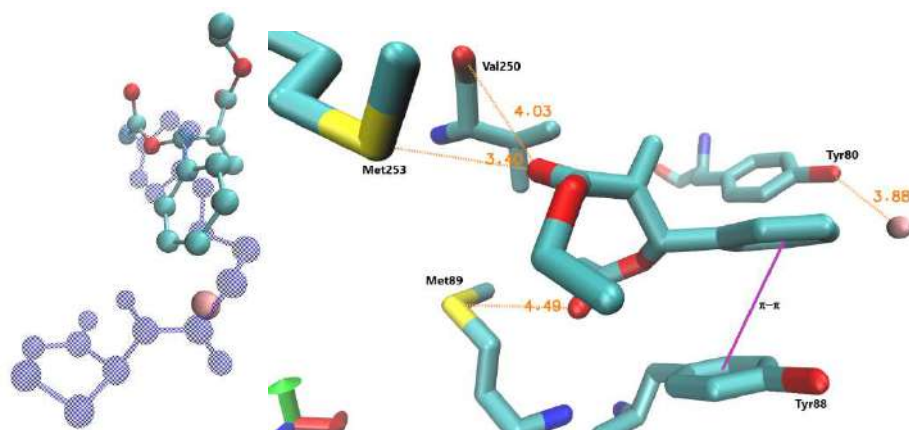


Figura F152 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-183. (B) Interações entre (*S*)-183 e os resíduos de aminoácido em CviR.

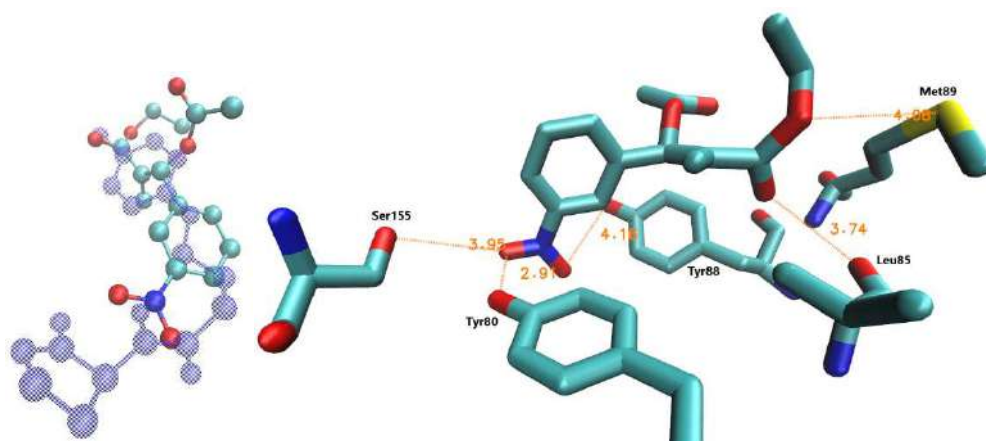


Figura F153 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-184. (B) Interações entre (*R*)-184 e os resíduos de aminoácido em CviR.

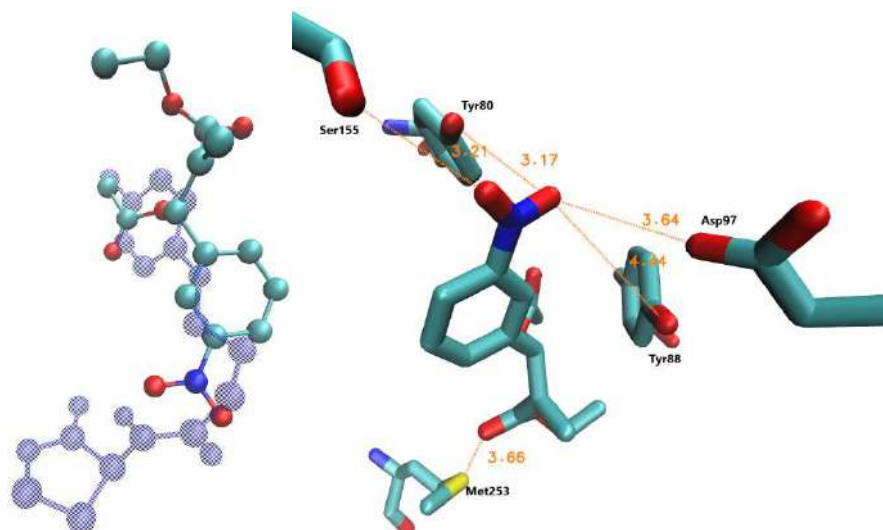


Figura F154 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-184. (B) Interações entre (*S*)-184 e os resíduos de aminoácido em CviR.



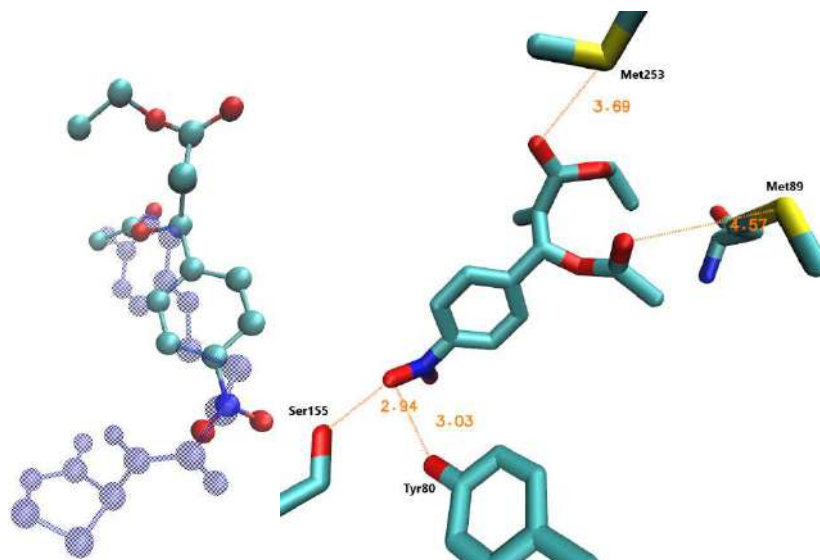


Figura F155 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-185. (B) Interações entre (*R*)-185 e os resíduos de aminoácido em CviR.

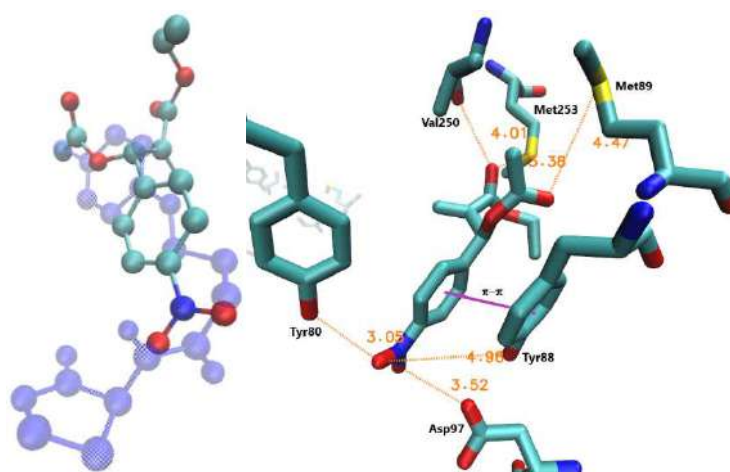


Figura F156 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-185. (B) Interações entre (*S*)-185 e os resíduos de aminoácido em CviR.

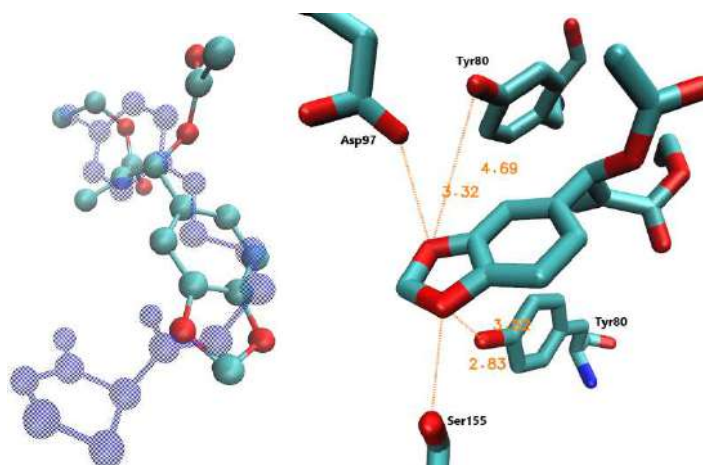


Figura F157 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-186. (B) Interações entre (*R*)-186 e os resíduos de aminoácido em CviR.

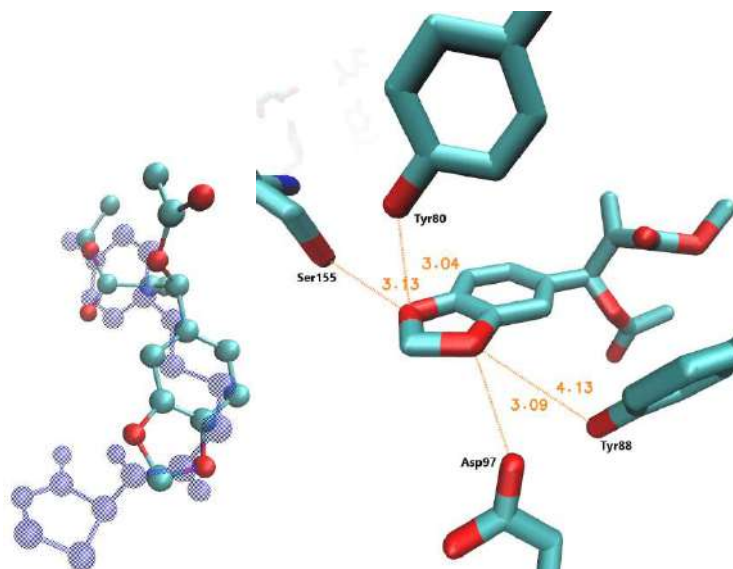


Figura F158 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-186. (B) Interações entre (*S*)-186 e os resíduos de aminoácido em CviR.

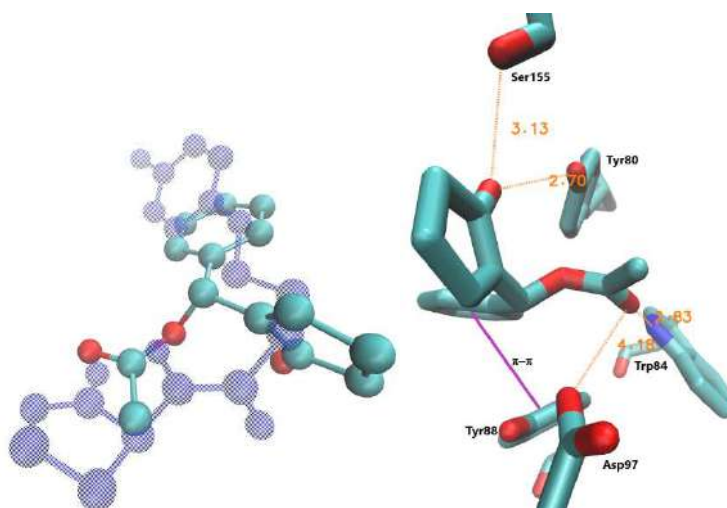


Figura F159 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-187. (B) Interações entre (*R*)-187 e os resíduos de aminoácido em CviR.

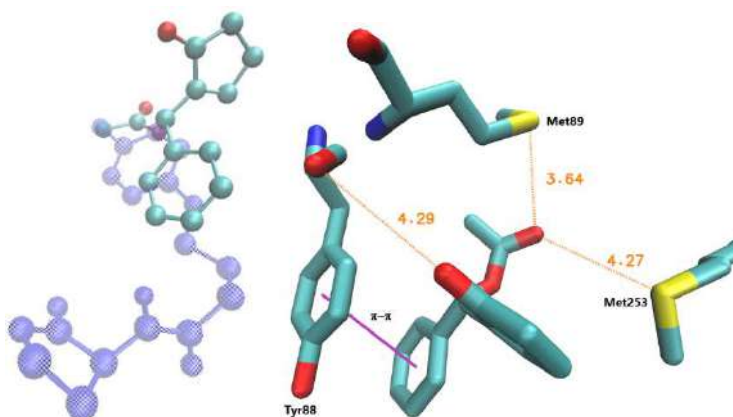


Figura F160 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-187. (B) Interações entre (*S*)-187 e os resíduos de aminoácido em CviR.

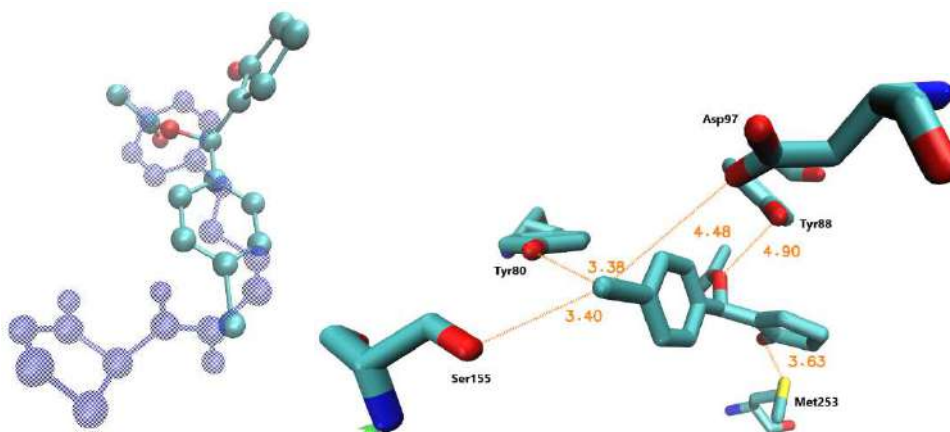


Figura F161 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-188. (B) Interações entre (*R*)-188 e os resíduos de aminoácido em CviR.

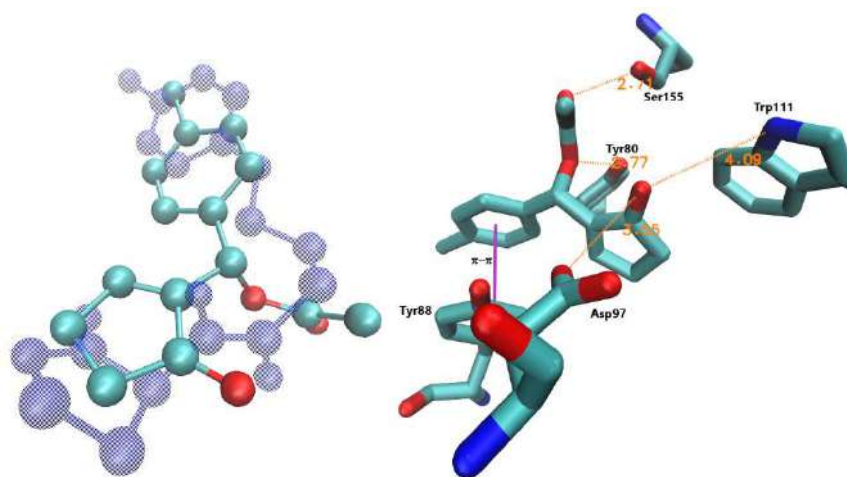


Figura F162 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-188. (B) Interações entre (*S*)-188 e os resíduos de aminoácido em CviR.

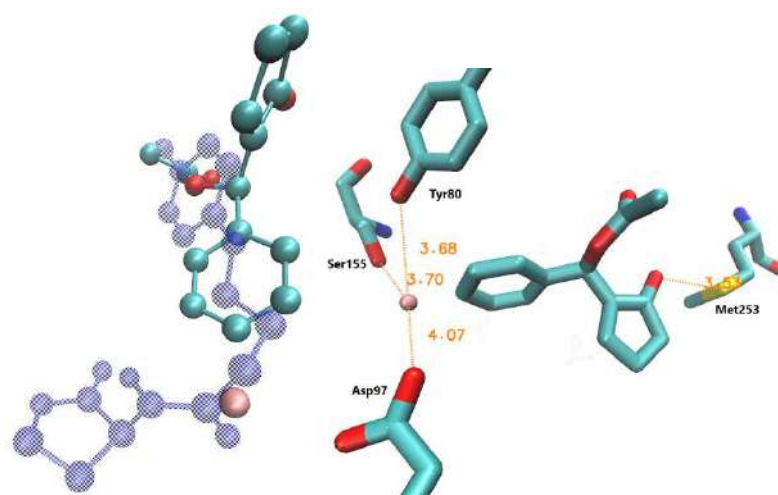


Figura F163 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-189. (B) Interações entre (*R*)-189 e os resíduos de aminoácido em CviR.

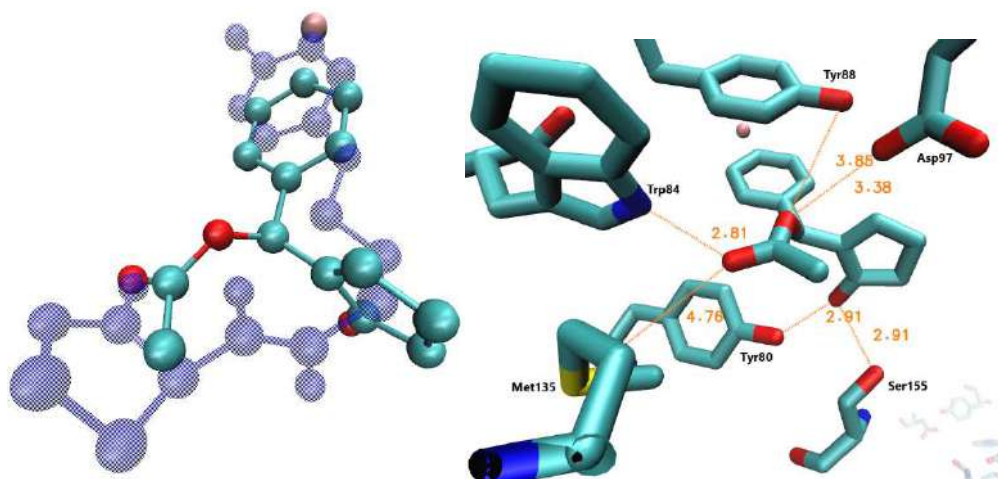


Figura F164 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-189. (B) Interações entre (*S*)-189 e os resíduos de aminoácido em CviR.

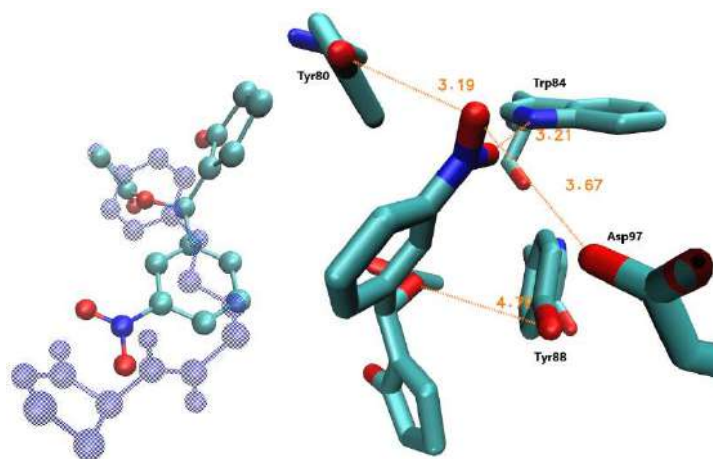


Figura F165 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-190. (B) Interações entre (*R*)-190 e os resíduos de aminoácido em CviR.

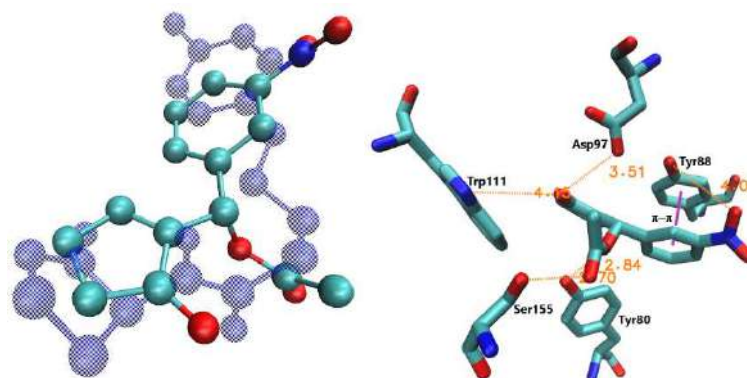


Figura F166 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-190. (B) Interações entre (*S*)-190 e os resíduos de aminoácido em CviR.



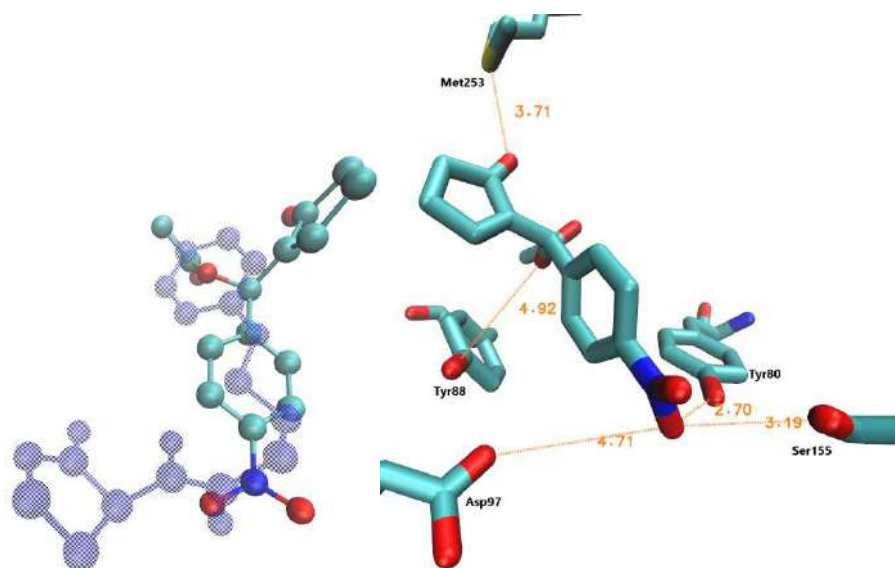


Figura F167 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-191. (B) Interações entre (*R*)-191 e os resíduos de aminoácido em CviR.

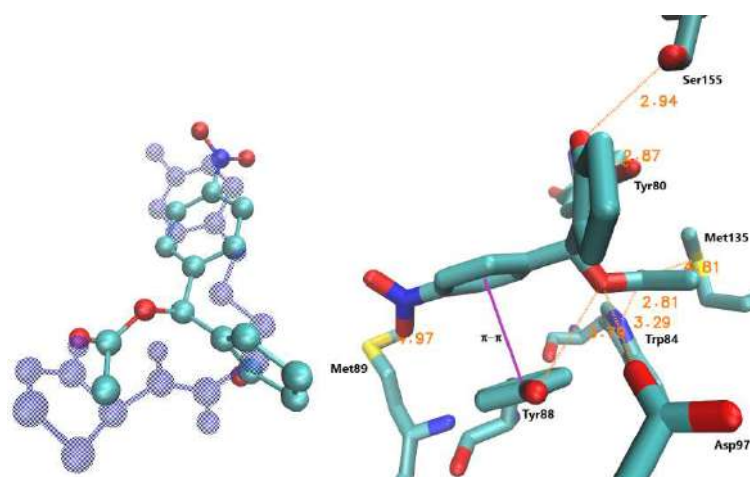


Figura F168 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-191. (B) Interações entre (*S*)-191 e os resíduos de aminoácido em CviR.

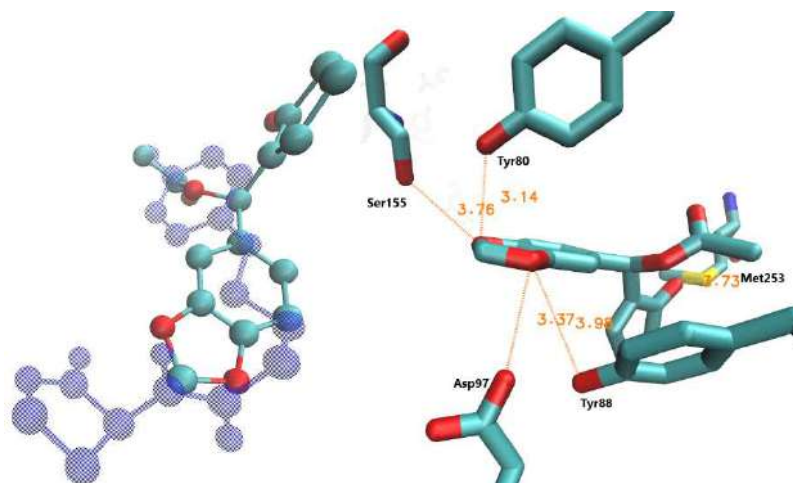


Figura F169 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-192. (B) Interações entre (*R*)-192 e os resíduos de aminoácido em CviR.

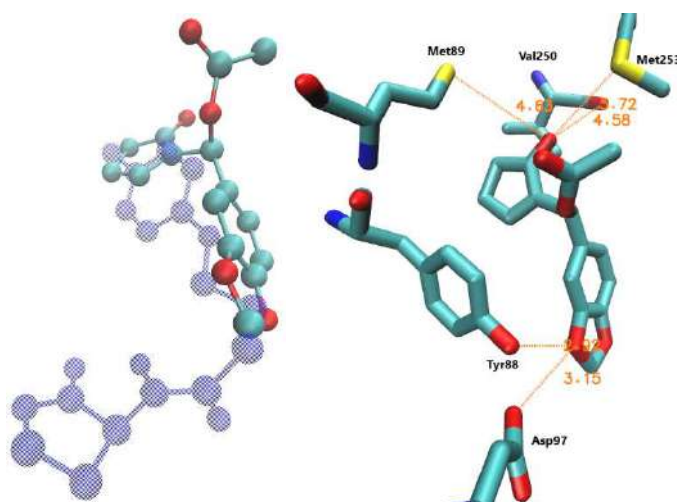


Figura F170 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-192. (B) Interações entre (*S*)-192 e os resíduos de aminoácido em CviR.

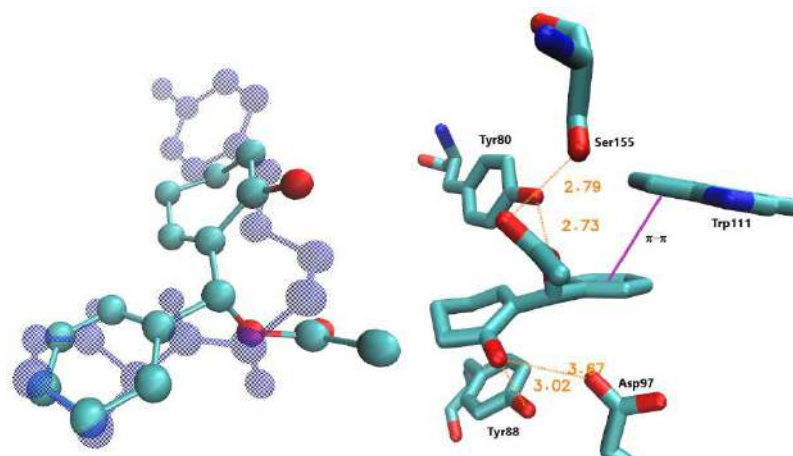


Figura F171 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-193. (B) Interações entre (*R*)-193 e os resíduos de aminoácido em CviR.

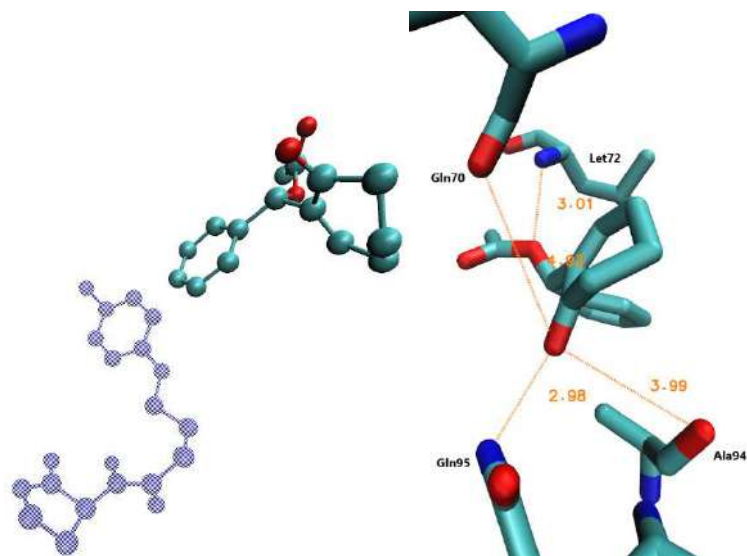


Figura F172 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-193. (B) Interações entre (*S*)-193 e os resíduos de aminoácido em CviR.

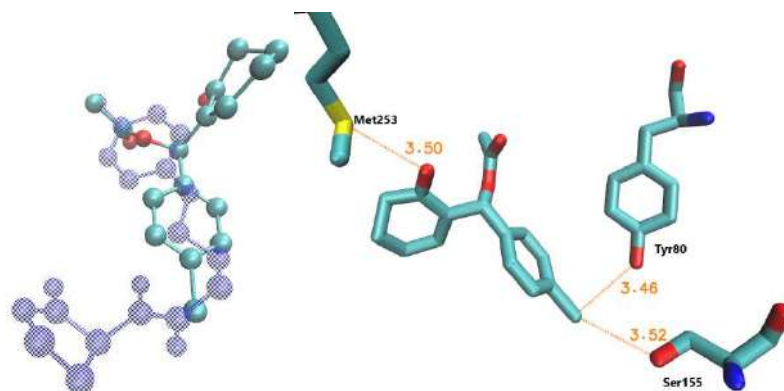


Figura F173 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-194. (B) Interações entre (*R*)-194 e os resíduos de aminoácido em CviR.

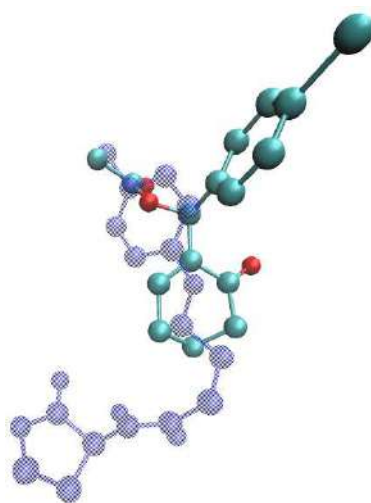


Figura F174 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-194.

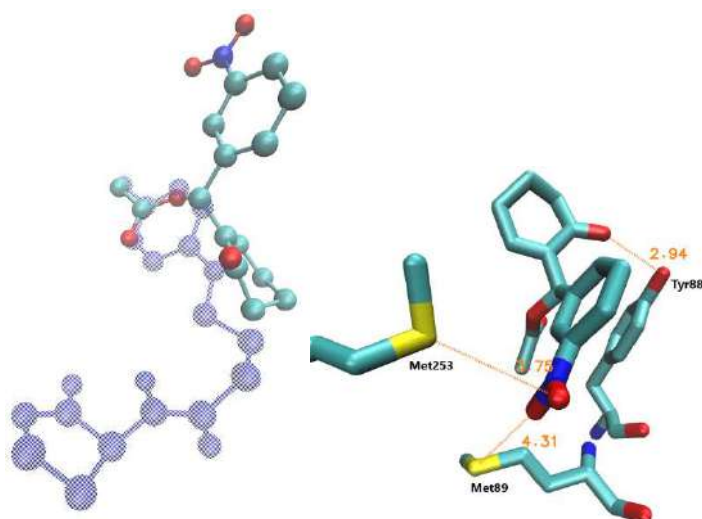


Figura F175 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-195. (B) Interações entre (*R*)-195 e os resíduos de aminoácido em CviR.

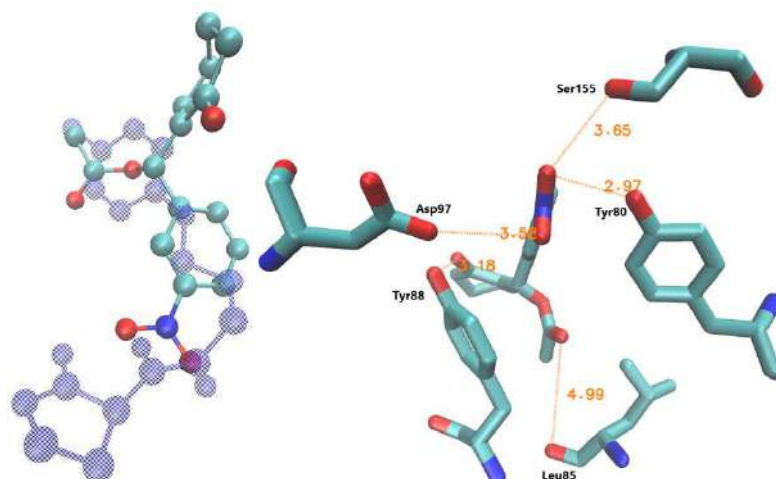


Figura F176 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-195. (B) Interações entre (*S*)-195 e os resíduos de aminoácido em CviR.

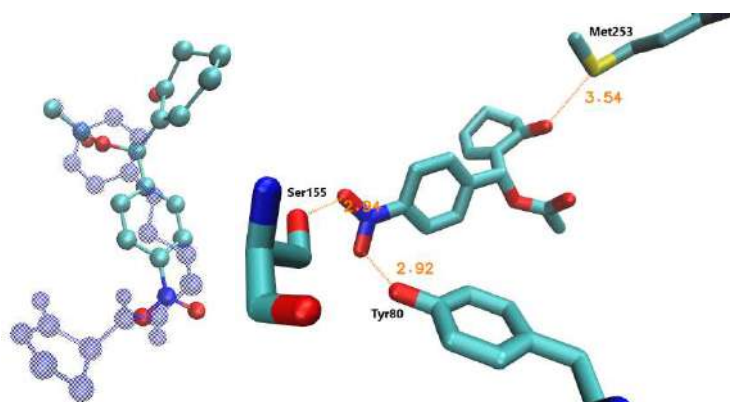


Figura F177 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-196. (B) Interações entre (*R*)-196 e os resíduos de aminoácido em CviR.

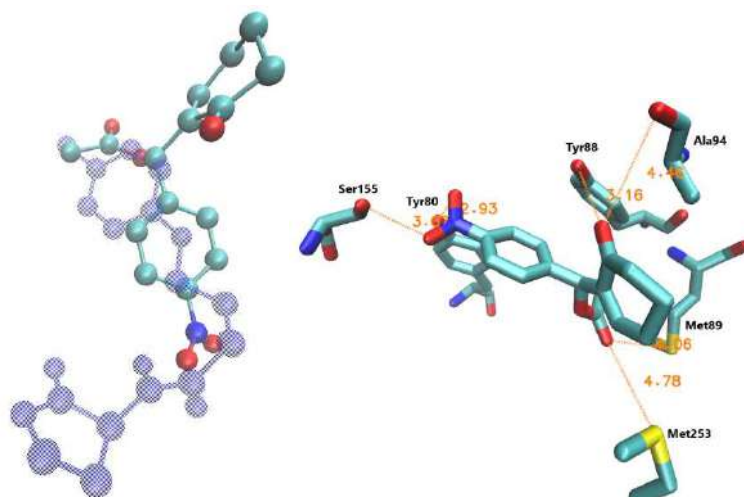


Figura F178 – (A) Sobreposição entre 22 e (S)-196. (B) Interações entre (S)-196 e os resíduos de aminoácido em CviR.

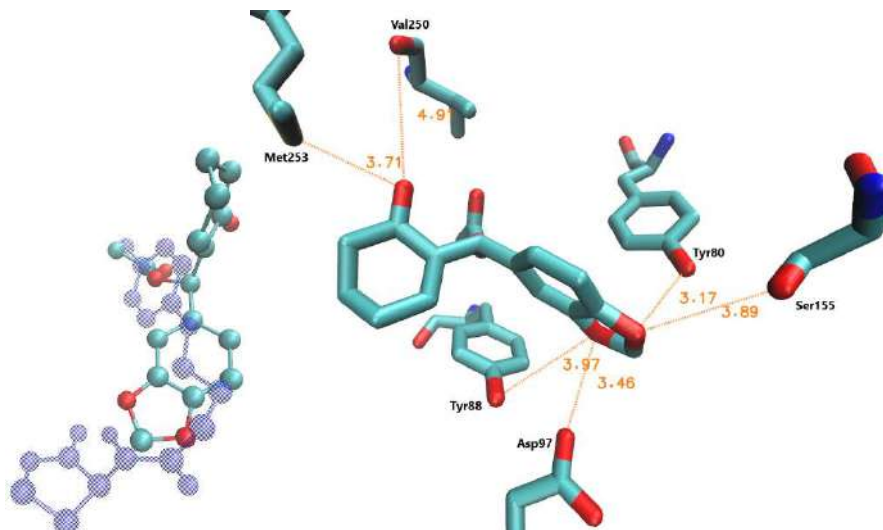


Figura F179 – (A) Sobreposição entre 22 e (R)-197. (B) Interações entre (R)-197 e os resíduos de aminoácido em CviR.

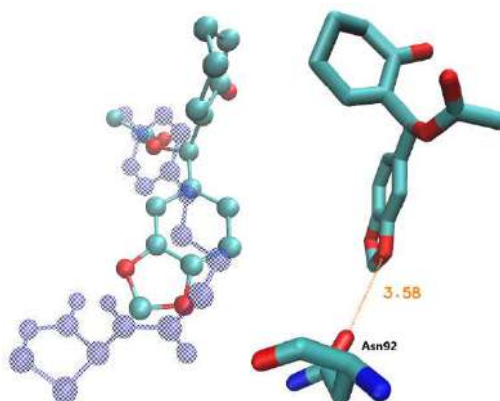


Figura F180 – (A) Sobreposição entre 22 e (S)-197. (B) Interações entre (S)-197 e os resíduos de aminoácido em CviR.



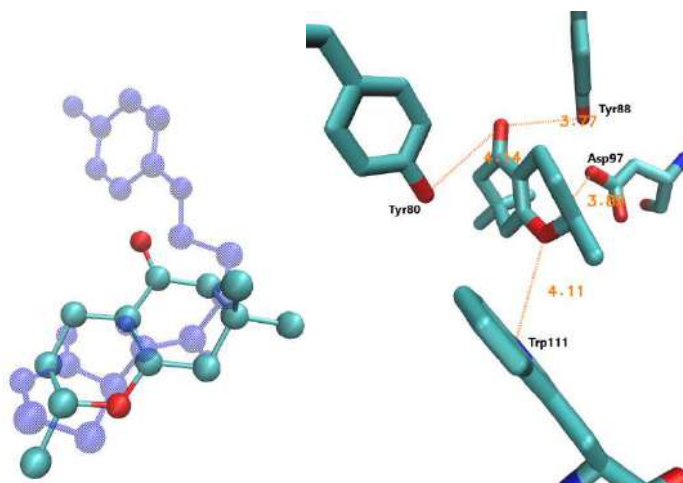


Figura F181 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-205. (B) Interações entre (*R*)-205 e os resíduos de aminoácido em CviR.

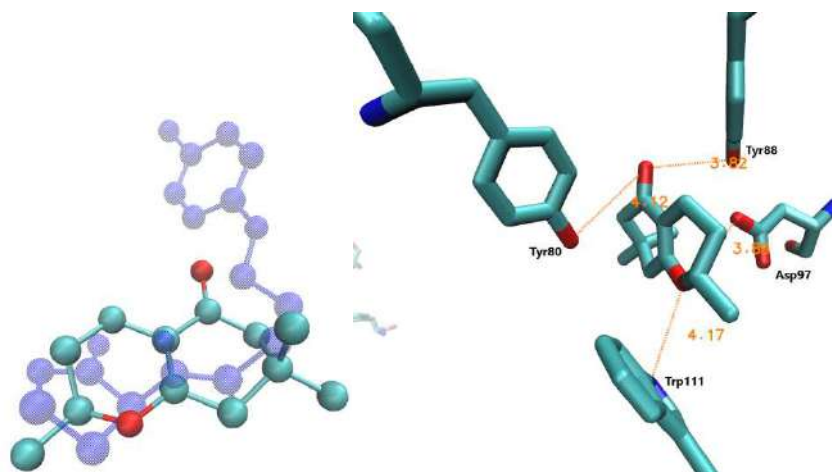


Figura F182 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-205. (B) Interações entre (*S*)-205 e os resíduos de aminoácido em CviR.

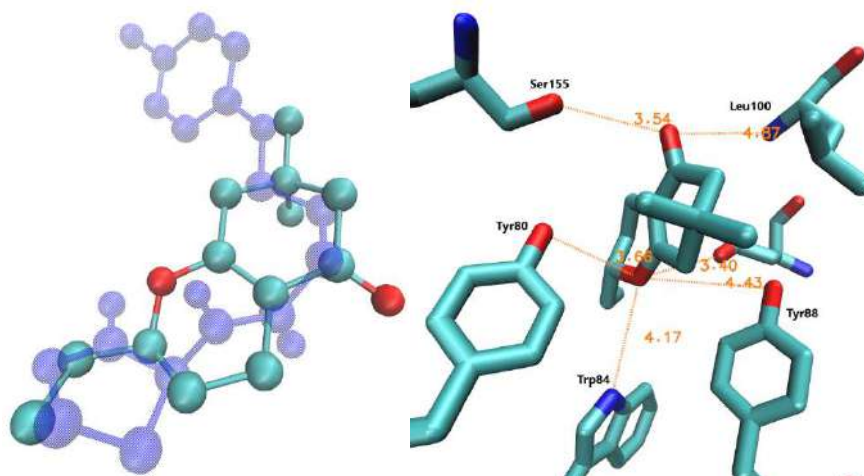


Figura F183 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-209. (B) Interações entre (*R*)-209 e os resíduos de aminoácido em CviR.

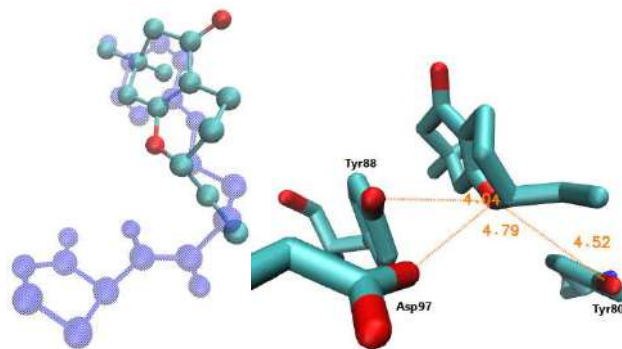


Figura F184 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-209. (B) Interações entre (*S*)-209 e os resíduos de aminoácido em CviR.

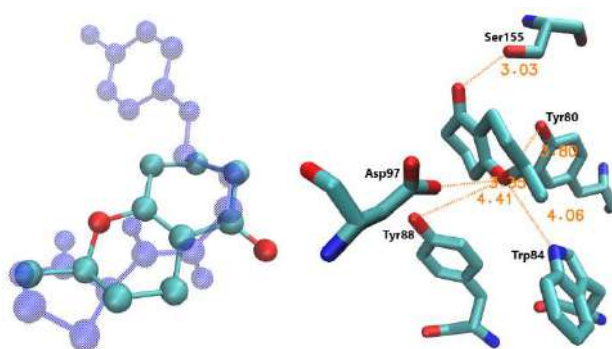


Figura F185 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-138. (B) Interações entre (*R*)-138 e os resíduos de aminoácido em CviR.

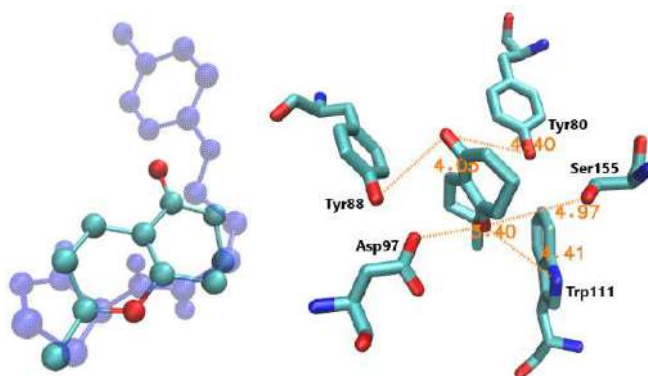


Figura F186 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-138. (B) Interações entre (*S*)-138 e os resíduos de aminoácido em CviR.

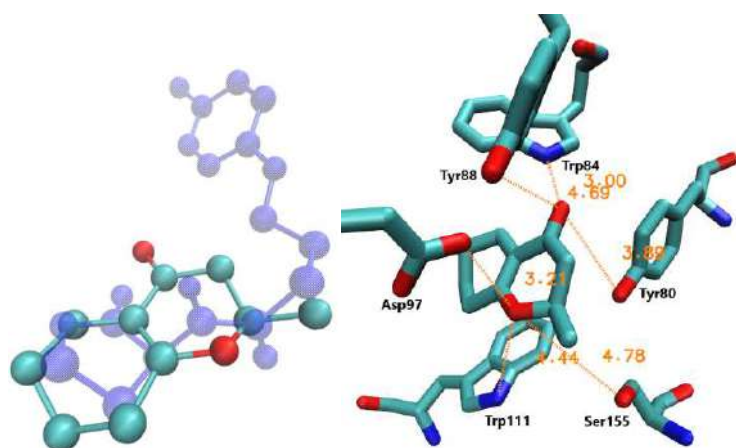


Figura F187 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-139. (B) Interações entre (*R*)-139 e os resíduos de aminoácido em CviR.

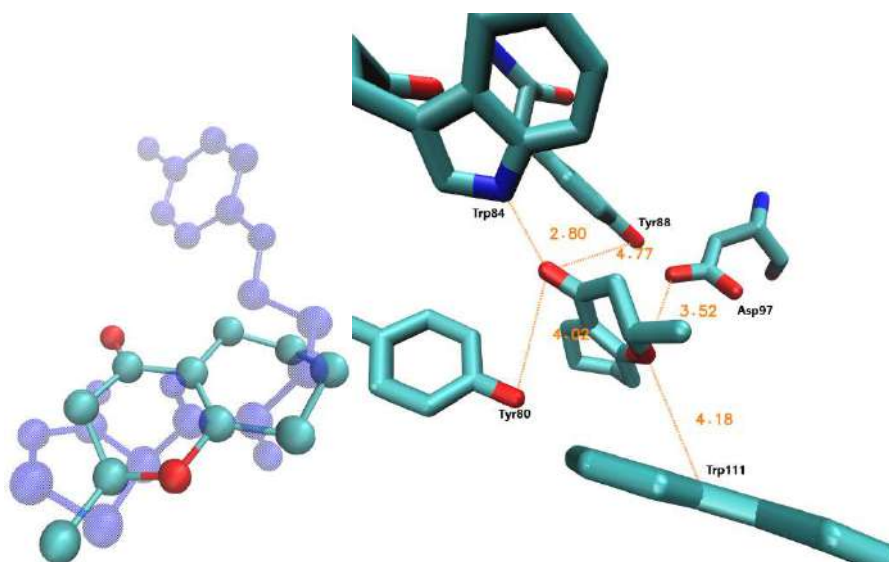


Figura F188 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-139. (B) Interações entre (*S*)-139 e os resíduos de aminoácido em CviR.

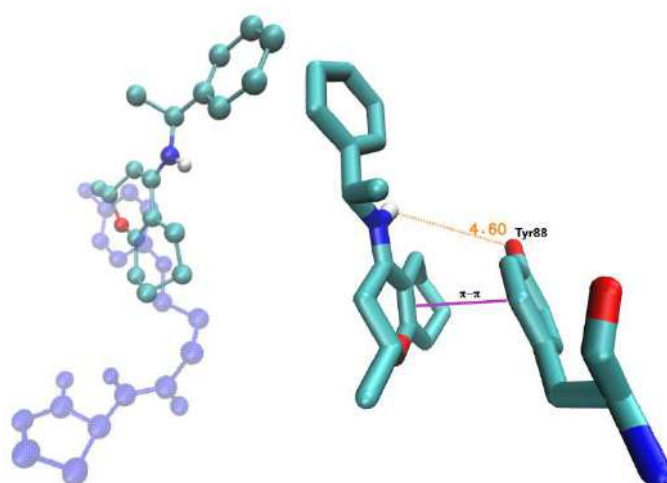


Figura F189 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R,S*)-222. (B) Interações entre (*R,S*)-222 e os resíduos de aminoácido em CviR.



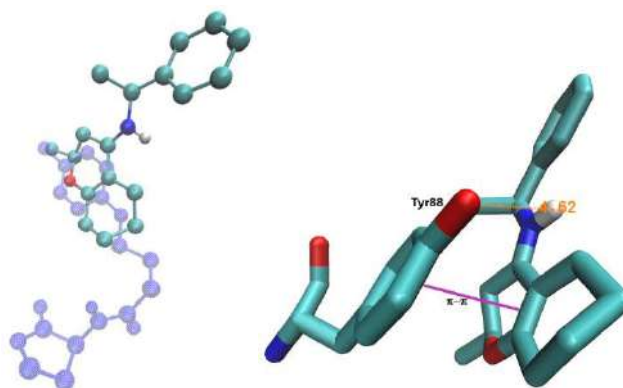


Figura F190 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S,S*)-222. (B) Interações entre (*S,S*)-222 e os resíduos de aminoácido em CviR.

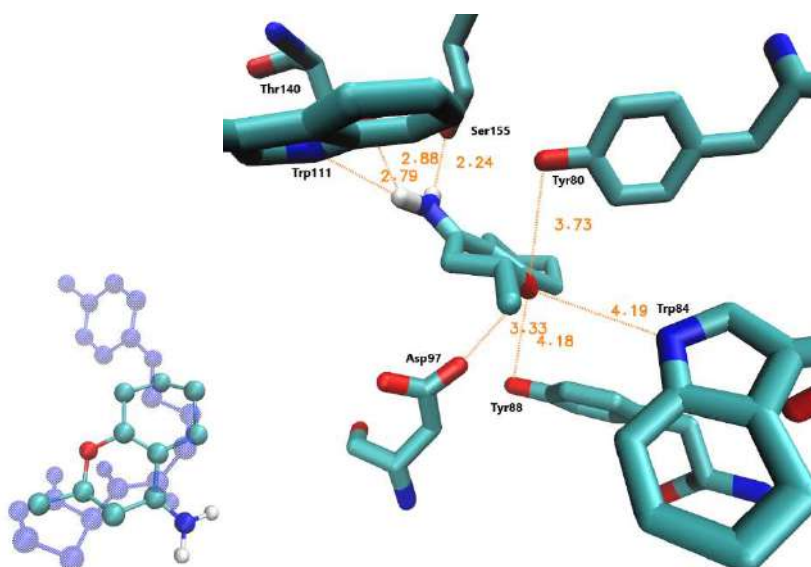


Figura F191 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-223. (B) Interações entre (*R*)-223 e os resíduos de aminoácido em CviR.

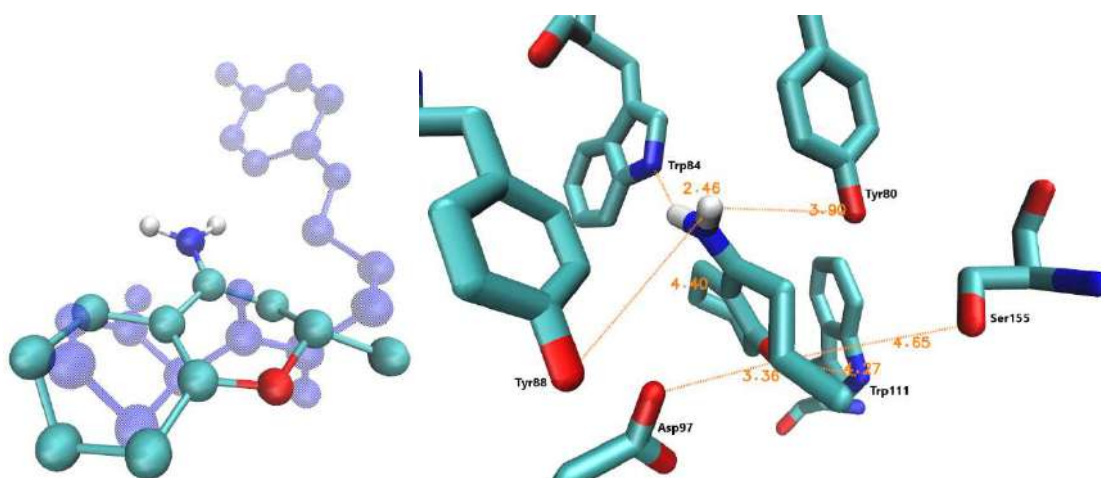


Figura F192 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-223. (B) Interações entre (*S*)-223 e os resíduos de aminoácido em CviR.

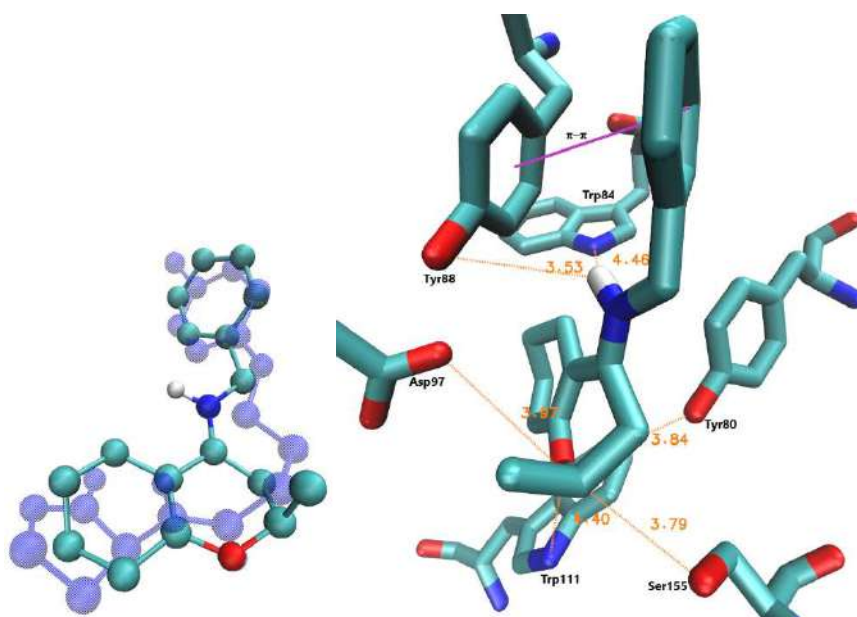


Figura F193 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-227. (B) Interações entre (*R*)-227 e os resíduos de aminoácido em CviR.

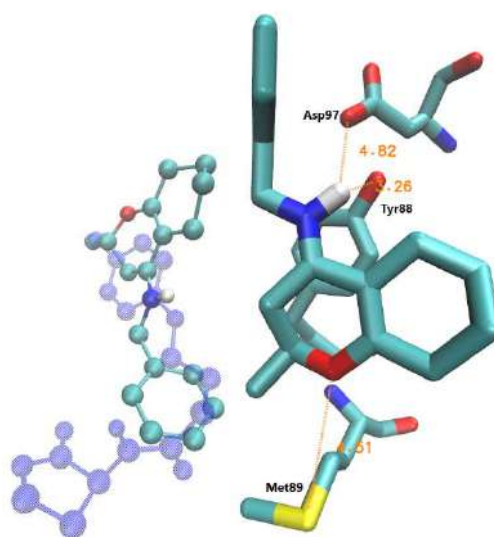


Figura F194 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-227. (B) Interações entre (*S*)-227 e os resíduos de aminoácido em CviR.

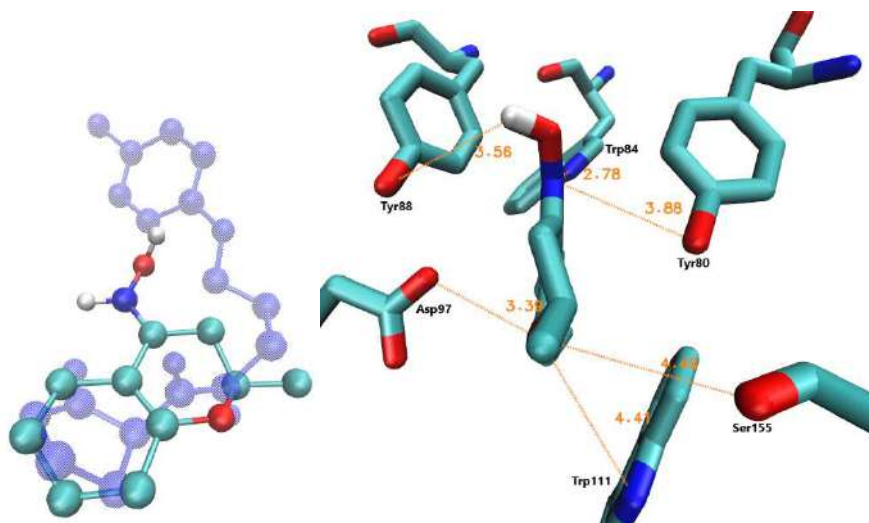


Figura F195 – (A) Sobreposição entre 22 e (R)-230. (B) Interações entre (R)-230 e os resíduos de aminoácido em CviR.

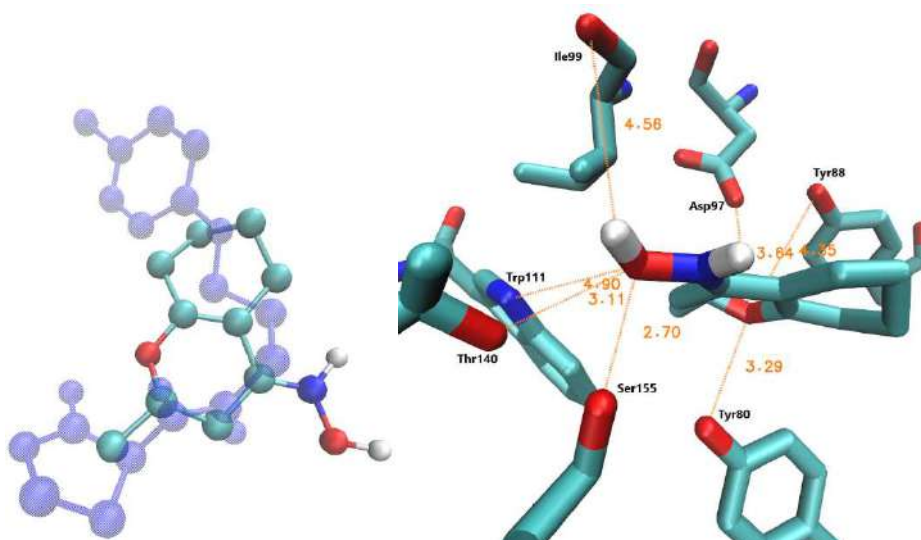


Figura F196 – (A) Sobreposição entre 22 e (S)-230. (B) Interações entre (S)-230 e os resíduos de aminoácido em CviR.

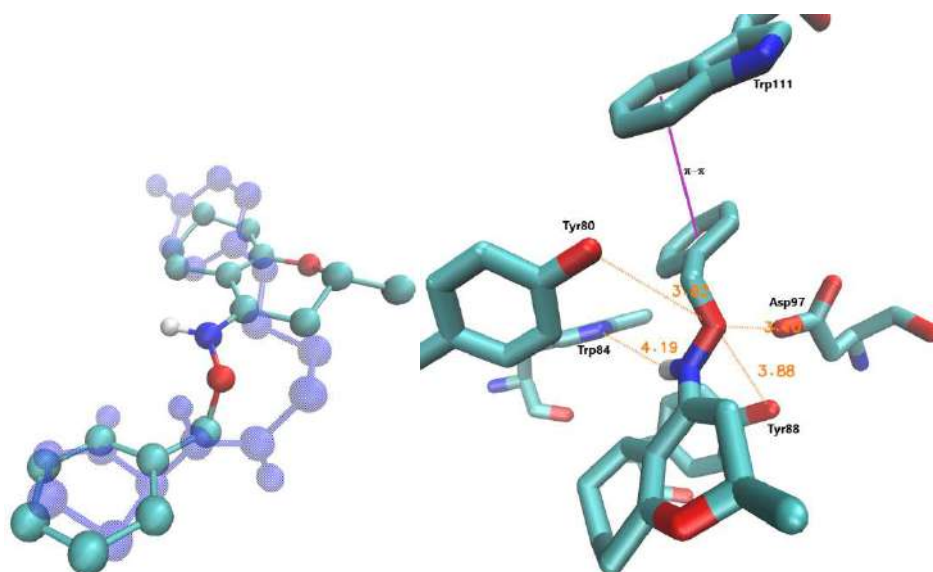


Figura F197 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-231. (B) Interações entre (*R*)-231 e os resíduos de aminoácido em CviR.

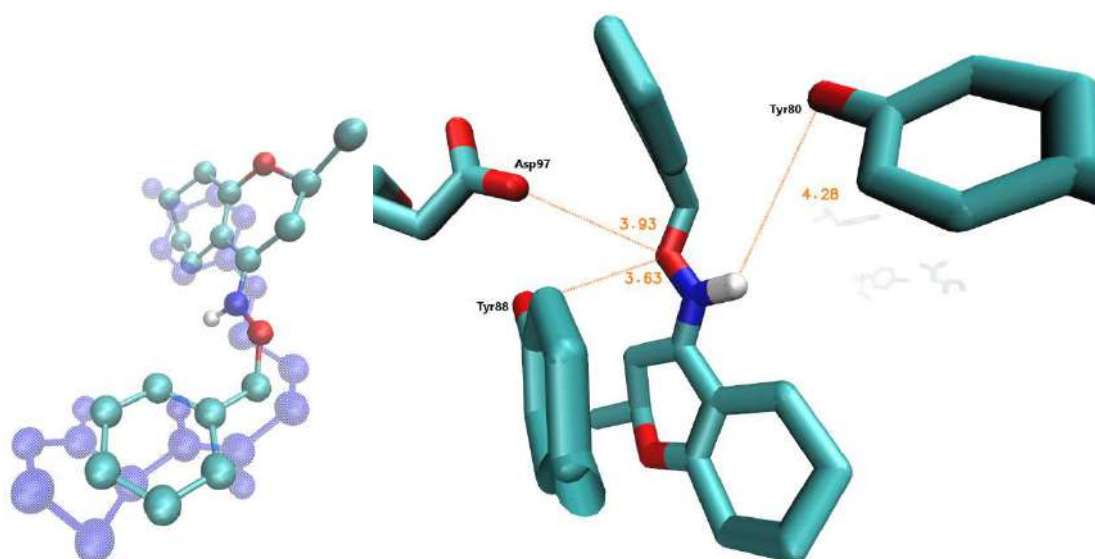


Figura F198 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-231. (B) Interações entre (*S*)-231 e os resíduos de aminoácido em CviR.

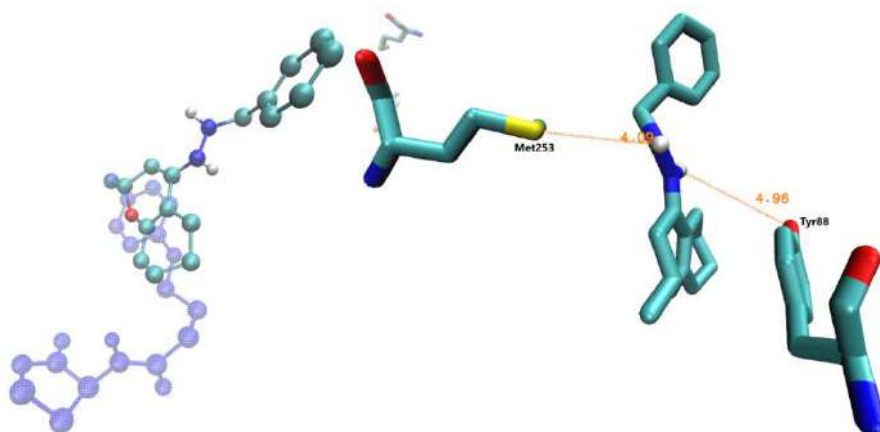


Figura F199 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-234. (B) Interações entre (*R*)-234 e os resíduos de aminoácido em CviR.

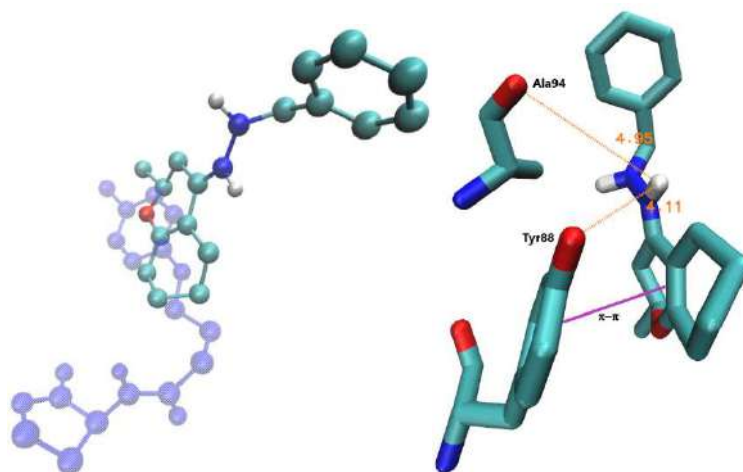


Figura F200 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-234. (B) Interações entre (*S*)-234 e os resíduos de aminoácido em CviR.

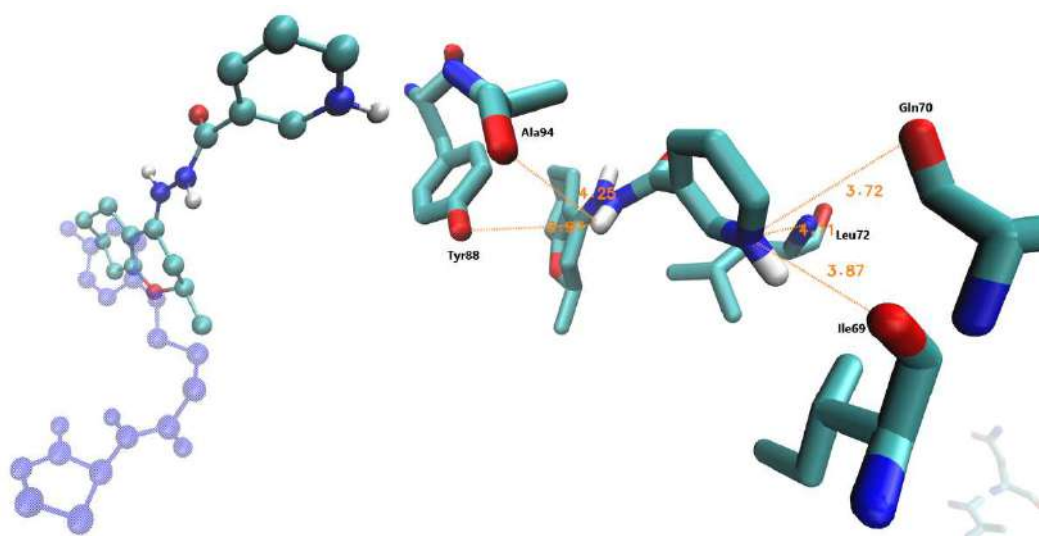


Figura F201 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-235. (B) Interações entre (*R*)-235 e os resíduos de aminoácido em CviR.



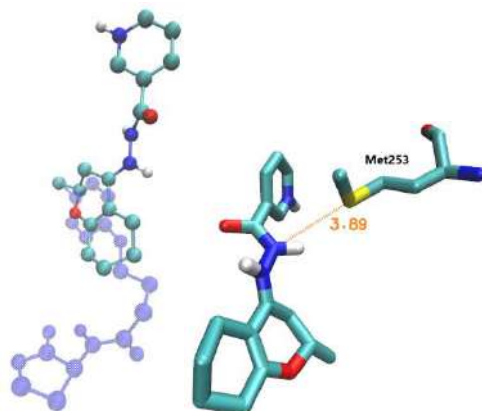


Figura F202 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-235. (B) Interações entre (*S*)-235 e os resíduos de aminoácido em CviR.

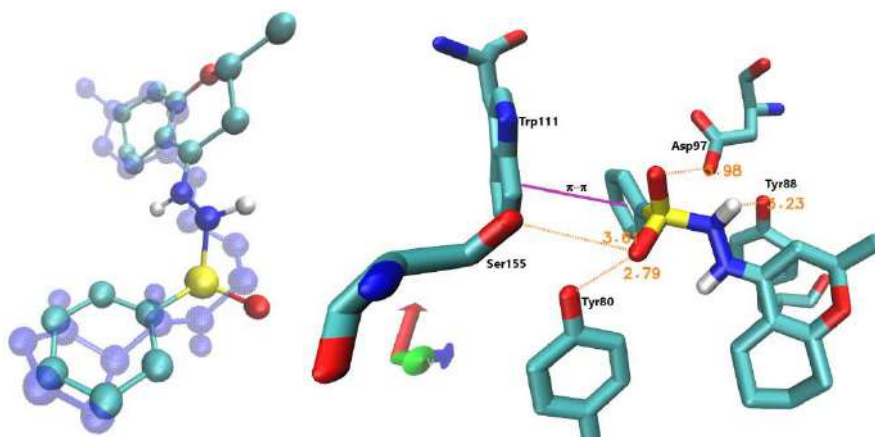


Figura F203 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-236. (B) Interações entre (*R*)-236 e os resíduos de aminoácido em CviR.

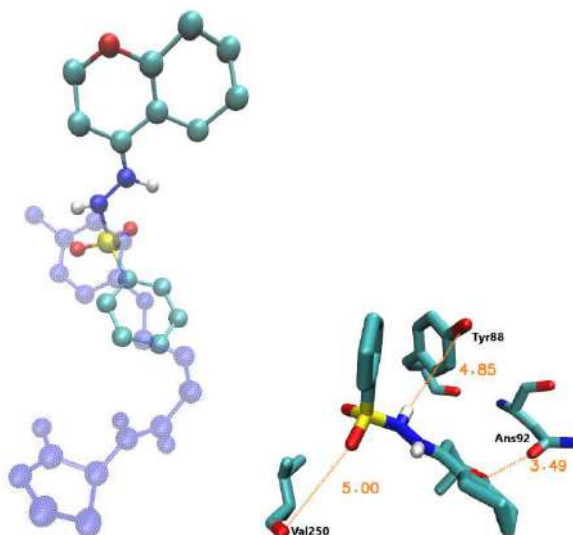


Figura F204 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-236. (B) Interações entre (*S*)-236 e os resíduos de aminoácido em CviR.

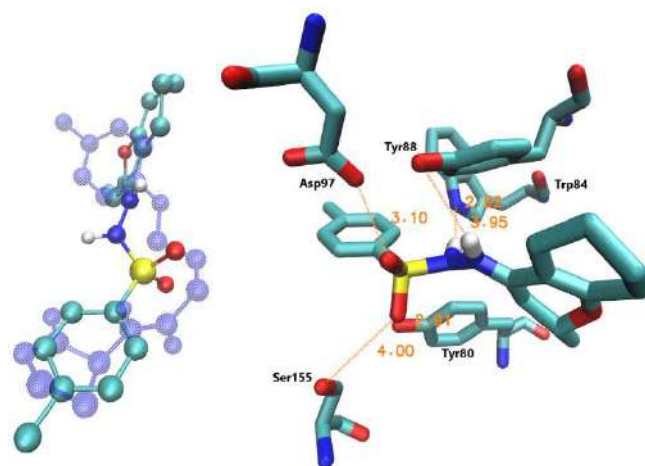


Figura F205 – (A) Sobreposição entre 22 e (*R*)-237. (B) Interações entre (*R*)-237 e os resíduos de aminoácido em CviR.

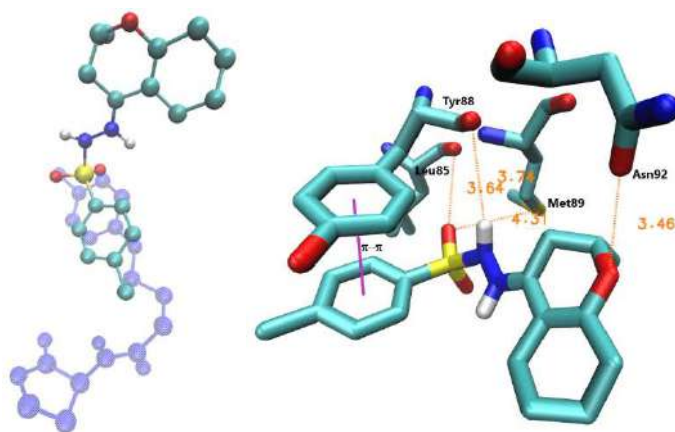

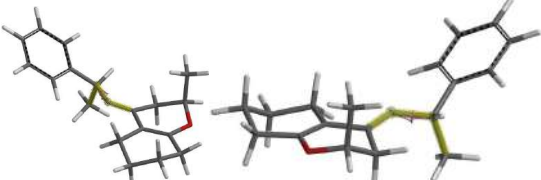
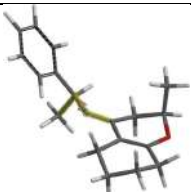

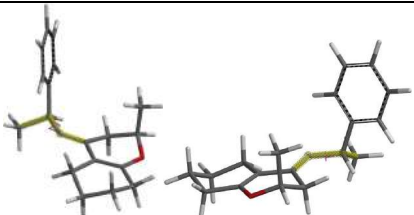











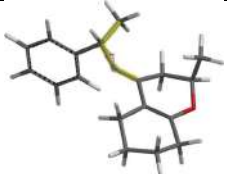
Figura F206 – (A) Sobreposição entre 22 e (*S*)-237. (B) Interações entre (*S*)-237 e os resíduos de aminoácido em CviR.

Tabela T1 – Conformações encontradas variando-se o ângulo de diedro de (*R,S*)-222

Ângulo diedro	Conformação*	E <sub>relativa</sub> (kcal/mol)
0		9,37
20		9,41
40		7,41

60		3,46
80		1,02
100		0,46
120		0,29
140		0,00
160		0,13
180		2,09
200		5,24



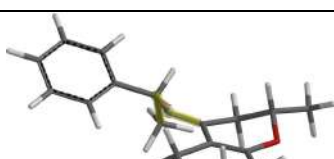
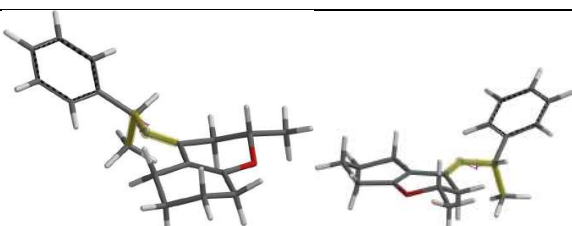
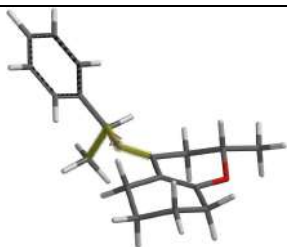
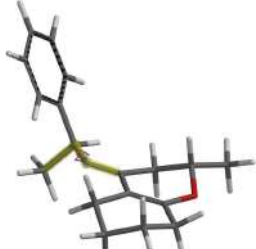
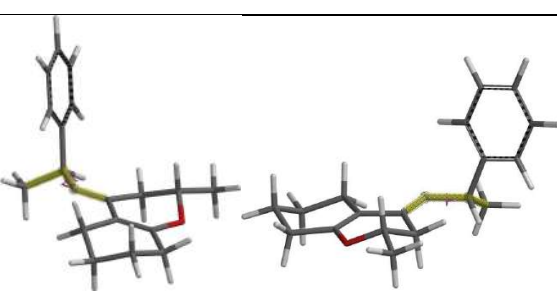




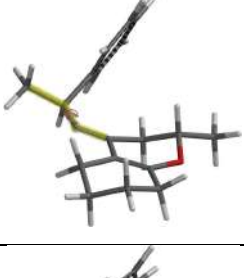
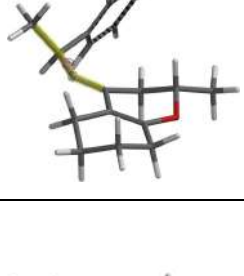
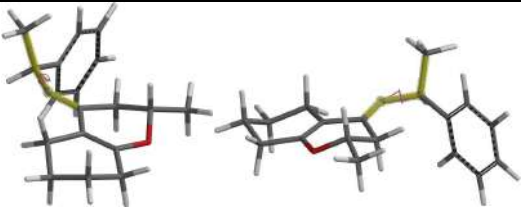
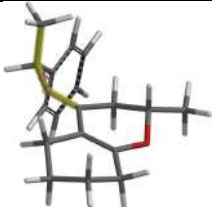
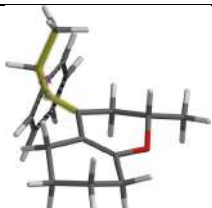
220		7,67
240		8,12
260		6,73
280		5,57
300		7,08
320		9,75
340		9,21

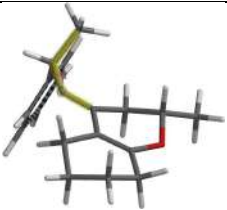
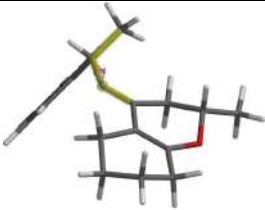
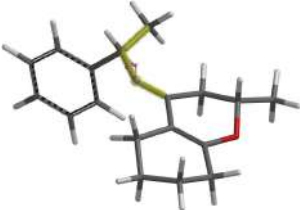
\*ligações em amarelo correspondem ao diedro

**Tabela T1 – Conformações encontradas variando-se o ângulo de diedro de (S,S)-222**

Ângulo diedro	Conformação*	E <sub>relativa</sub> (kcal/mol)
0		9,44

20		9,34
40		7,25
60		3,49
80		1,13
100		0,53
120		0,31
140		0,00

160		0,19
180		2,00
200		5,06
220		7,84
240		8,17
260		6,75
280		5,64

300		7,26
320		9,95
340		9,31

\*ligações em amarelo correspondem ao diedro

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, (dia) de (mês) de (ano).

Assinatura do/a discente: Paulo Marques da Cunha

Programa: Programa de Pós-Graduação em Química

Nome completo: Paulo Marques da Cunha

Título do Trabalho: Síntese e avaliação da atividade biológica de adutos de Morita-Baylis-Hillman e hexahidroacromenonas frente a cepa de CV

Nível: ( ) Mestrado (X) Doutorado

Orientador/a: Angelo Henrique de Lira Machado