

I



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

**Acil-Homosserina Lactonas Produzidas pelas Bactérias
Fitopatogênicas *Pantoea ananatis* e *Methylobacterium
mesophilicum* e Defesa Química no Opilião *Hoplobunus
mexicanus***

ARMANDO MATEUS POMINI

TESE DE DOUTORADO

ORIENTADORA

PROFA. DRA. ANITA JOCELYNE MARSAIOLI

CAMPINAS – SÃO PAULO

ABRIL/2009

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

P771a Pomini, Armando Mateus.
Acil-homosserina lactonas produzidas pelas bactérias fitopatogênicas *Pantoea ananatis* e *Methylobacterium mesophilicum* e defesa química no opilião *Hoplobunus Mexicanus* / Armando Mateus Pomini. -- Campinas, SP: [s.n], 2009.

Orientadora: Anita Jocelyne Marsaioli.

Tese - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. Acil-homosserina lactona. 2. *Methylobacterium mesophilicum*. 3. Configuração absoluta. 4. Opiliões.
I. Marsaioli, Anita Jocelyne. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Acyl-homoserine lactones from the phytopathogenic bacteria *Pantoea ananatis* and *Methylobacterium mesophilicum* and chemical defense in the harvestman *Hoplobunus mexicanus*

Palavras-chaves em inglês: Acyl-homoserine lactone, *Methylobacterium mesophilicum*, Absolute configuration, Harvestman

Área de concentração: Química orgânica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Anita Jocelyne Marsaioli (IQ-UNICAMP), Edson Rodrigues Filho (DQ/UFSCAR), Denis Pires de Lima (DQ/UFMS), Antônio Cláudio Herrera Braga (IQ/UNICAMP), Ljubica Tasic (IQ/UNICAMP)

Data de defesa: 28/04/2009

DEDICATÓRIA

*DEDICO ESTE TRABALHO À
ADRIANA, AOS MEUS PAIS
ARMANDO E SHIRLEY, E À MINHA
IRMÃ JULIANA.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço humildemente a Deus pela saúde, paz e tranquilidade que proporcionou a mim e meus entes amados durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais Shirley e Armando Pomini e minha irmã Juliana por todo carinho e compreensão ao longo dos anos, separados pela distância, mas unidos pelo amor.

À minha namorada Adriana pelo imenso amor compartilhado, apoio e incentivo. Os vários anos trabalhando ao lado do ser amado jamais serão esquecidos. Sua ternura, amor e seu companheirismo tornam cada minuto de minha vida muito especial!

À Profa. Anita Marsaioli, esta cientista inigualável, pela orientação e amizade ao longo da pós-graduação.

Aos meus familiares especialmente José Soeiro, Tata, Luana, aos meus avós José (*in memoriam*) e Hilda, ao meu amigo Milton, muito obrigado!

Aos colegas de laboratório Cabeça, Lucas, Marcela, Simone, Georgiana, Carlinha, Diana, Célio. Muito obrigado pela amizade e auxílio. Ao meu aluno Pedro agradeço pelo auxílio no laboratório, pela amizade e agradável convívio.

Agradeço também aos colaboradores Dr. Welington Araújo (Esalq), Dr. Glauco Machado (USP) e ao doutorando Luíz F. Cabeça (Unicamp), imprescindíveis para a realização desta obra.

Nunca esquecerei minha passagem pelo “todo poderoso” Instituto de Química, ao qual agradeço na figura de seus funcionários e professores. Agradeço especialmente à Sônia, Soninha, Tiago, Cláudia e Daniel pela aquisição de diferentes espectros; à Dona Maria e Karina, pelo auxílio no laboratório. Expresso minha gratidão aos professores Dr. Antônio Herrera

VIII

Braga, Dr. José Augusto R. Rodrigues e Dr. Carlos Roque D. Correia pelas agradáveis discussões durante o Exame Geral e ao Dr. Paulo Imamura, Dr. Sebastião Fonseca, Dra. Eva Magalhães e Dr. Aderbal Magalhães, pelo conhecimento transmitido e agradável convivência. Agradeço muito à Dra. Carol Collins pelas revisões dos artigos.

Sou grato à **Fapesp** (processo 05/02934-4) pelo auxílio financeiro ao projeto e pela bolsa de estudos concedida. Congratulo a Instituição na figura de seus Diretores e Acessores pela extrema profissionalidade e compromisso com a ciência.

“Se desejas o bem em minha vida, que Deus lhe retribua em dobro.”

Armando Mateus Pomini

28-04-2009

Curriculum Vitae Resumido

1. Dados pessoais

Nome: Armando Mateus Pomini; Data de Nascimento: 19/06/1982; Nacionalidade: Brasileira; Cidade: Cambé – Estado do Paraná; Filiação: Pai: Armando Pomini; Mãe: Shirley Clélia da Conceição Bailoni Pomini; Estado Civil: Solteiro; RG: 8257223-6 – SESP – PR. Endereço: Rua Planalto, 120. CEP 86191-240, Cambé, Paraná. armandopomini@gmail.com; Fone (43) 32544651.

2. Formação Acadêmica

Graduação em Química, Bacharelado e Tecnológica. Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, Paraná (2000-2004). Título da monografia: “Síntese e teste antimicrobiano de asperfenamato, metabólito isolado de *Zeyhera digitalis* (Bignoniaceae)”. Orientador: Dr. Milton Faccione. Bolsista da Coordenadoria de Pesquisa e Pós Graduação da UEL, CPG/UEL.

Mestrado em Química Orgânica. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, São Paulo (2004-2006). Título da dissertação: “Semioquímicos produzidos por bactérias fitopatogênicas e opiliões brasileiros”. Orientadora: Dra. Anita Jocelyne Marsaioli. Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 03/09357-7).

Doutorado em Química Orgânica. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, São Paulo (2006-2009). Título da tese: “Acil-Homosserina Lactonas Produzidas pelas Bactérias Fitopatogênicas *Pantoea ananatis* e *Methylobacterium mesophilicum* e Defesa Química no Opilião *Hoplobunus mexicanus*”. Orientadora: Dra. Anita Jocelyne Marsaioli. Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 05/02934-4).

3. Prêmios e distinções

Láurea Acadêmica, Universidade Estadual de Londrina (2004).

Primeiro colocado, exame de admissão ao mestrado, Universidade Estadual de Campinas (2003).

Primeiro colocado no Estado do Paraná, Exame Nacional de Cursos (Química), MEC (2003).

4. Orientações e co-orientações

Programa Ciências e Artes nas Férias. Orientação de 2 alunos do ensino médio em laboratório durante 1 mês.

Supervisão: Iniciação científica, Pedro L. R. Cruz. Duração: 1 ano e 3 meses.

5. Artigos publicados em periódicos internacionais

MACHADO, G ; POMINI, A. M. Chemical and behavioral defenses of the neotropical harvestman *Camarana flavipalpi* (Arachnida: Opiliones). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 369-376, 2008.

POMINI, A. M. ; MARSAIOLI, A. J. Absolute Configuration and Antimicrobial Activity of Acylhomoserine Lactones. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1032-1036, 2008.

POMINI, A. M. ; GAI, C. ; CRUZ, P. R. ; ARAUJO, W. L. ; MARSAIOLI, A. J. . Long chain acyl-homoserine lactones from *Methylobacterium mesophilicum*: synthesis and absolute configuration. **Journal of Natural Products**, v. -, p. ---, 2009, submetido.

POMINI, A. M. ; MACHADO, G. ; PINTO-DA-ROCHA, RICARDO ; MARSAIOLI, A. J. . Lines of defense in the harvestman *Hoplobunus mexicanus* (Arachnida: Opiliones): aposematism, stridulation, thanatosis and irritant chemicals. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. -, p. ---, 2009, submetido.

POMINI, A. M. ; CABEÇA, L. F. ; CRUZ, P. R. ; MARSAIOLI, A. J. Interactions of (S)-N-(3-oxo-octanoyl)-homoserine lactone with *Agrobacterium tumefaciens* Cells and Liposomes Studied by Saturation Transfer Difference NMR. **Journal of Biomolecular NMR**, v. -, p. ---, 2009, em preparação.

POMINI, A. M. ; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. ; MARSAIOLI, A. J. Acyl-Homoserine Lactones Produced by *Pantoea sp.* Isolated from the Maize White Spot Foliar Disease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 1200-1204, 2007.

POMINI, A. M. ; TREVISAN FERREIRA, D. ; BRAZ-FILHO, R. ; SARIDAKIS, H. O. ; SCHMITZ, W.; ISHIKAWA, N. I. ; FACCIONE, M.. A new method for asperphenamate synthesis and its antimicrobial activity evaluation. **Natural Product Research**, v. 20, n. 6, p. 537-541, 2006.

POMINI, A. M. ; ARAÚJO, W. L. ; MARSAIOLI, A. J. Structural Elucidation and Biological Activity of Acyl-homoserine Lactones from the Phytopathogen *Pantoea ananatis* Serrano 1928. **Journal of Chemical Ecology**, v. 32, p. 1769-1778, 2006.

POMINI, A. M. ; MANFIO, G. P. ; ARAÚJO, W. L. ; MARSAIOLI, A. J. Acyl-homoserine Lactones from *Erwinia psidii* R. IBSBF 435 , a Guava Phytopathogen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Estados Unidos, v. 53, p. 6262-6265, 2005.

MACHADO, G. ; CARRERA, P. C. ; POMINI, A. M. ; MARSAIOLI, A. J. Chemical Defense in Harvestmen (Arachnida, Opiliones): Do Benzoquinone Secretions Deter Invertebrate and Vertebrate Predators? **Journal of Chemical Ecology**, USA, v. 31, n. 11, p. 2519-2539, 2005.

POMINI, A. M. ; FACCIONE, M. ; FERREIRA, D. T. ; BRAZ FILHO, R. . Synthesis of asperphenamate and aurantiamide benzoate for structural revision. **Revista Latinoamericana de Química**, México, v. 32, n. 1, p. 49-56, 2004.

POMINI, A. M. ; FACCIONE, M. ; FERREIRA, D. T. ; BRAZ FILHO, R. ; SOEIRA, L. S. ; ZANOLLI FILHO, L. A. . Synthesis and cytotoxicity of N-Benzoyl-S-phenylalaninol against *Artemia salina* and eight human tumor cell lines. **Revista Latinoamericana de Química**, México, v. 32, n. 3, p. 87-92, 2004.

6. Produto tecnológico com registro

Produção do híbrido entre as orquídeas *Miltonia regnellii* x *Oncidium crispum*. Registro na “Royal Horticultural Society”, Inglaterra, maio 2005.

7. Participações em congressos

Até 22/02/2009, contabilizou-se 3 participações em congressos internacionais e 18 em congressos nacionais, incluindo pôsteres e apresentações orais.

RESUMO

Tese de Doutorado

Autor: Armando Mateus Pomini

Orientadora: Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli

As bactérias Gram-positivas e Gram-negativas possuem um mecanismo de comunicação química intra-específico conhecido como “quorum-sensing”, regulando a expressão de uma vasta gama de atividades biológicas. As bactérias Gram-negativas utilizam acil-homoserina lactonas (acil-HSLs) como principais substâncias sinalizadoras. Na presente tese, relatamos a determinação da configuração absoluta do raro metabólito (S)-(-)-*N*-heptanoil-HSL produzida pela bactéria fitopatogênica *Pantoea ananatis*. A configuração absoluta desta substância foi determinada através da técnica de cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama com coluna quirál, através de comparações de tempo de retenção e co-injeção com padrões sintetizados. Avaliou-se também a importância da configuração absoluta para a atividade antimicrobiana de acil-HSLs contra bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*). Curiosamente, o enantiômero não natural (*R*)-*N*-3-oxo-octanoil-HSL foi tão ativo quanto o produto natural (*S*). Estudou-se também as interações da (*S*)-*N*-3-oxo-octanoil-HSL com células de *Agrobacterium tumefaciens* NTL4(pZLR4) através da técnica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio por diferença de transferência de saturação (STD-RMN), revelando que o primeiro evento de interação da substância com a célula ocorre com a região lipídica da membrana celular externa. Finalmente, realizou-se o estudo químico das substâncias sinalizadoras produzidas pela bactéria *Methylobacterium mesophilicum*, que ocorre simbioticamente com a bactéria *Xylella fastidiosa* nos vasos condutores de laranjeiras atacadas pela clorose variegada dos citros. Entre os vários resultados inéditos, reportamos a caracterização e síntese do produto natural inédito (*S*)-*N*-(2*E*)-dodecenoil-HSL e a primeira síntese do metabólito (*S*)-*N*-(2*E*, 7*Z*)-tetradecadienil-HSL. Outrossim, reportamos a primeira caracterização da configuração absoluta de cinco acil-HSLs naturais

de cadeia longa. Realizou-se também estudos relacionados aos efeitos das acil-HSLs sintéticas contra bactérias Gram-positivas endofíticas da laranjeira. Adicionalmente, caracterizou-se a secreção de defesa do opilião *Hoplobunus mexicanus*. O repertório de defesa deste animal é composto por dois componentes voláteis de alta irritabilidade (2,5-dimetil-fenol e 2-metil-5-etil-fenol), além da tanatose e emissão de sons, uma característica inédita em opiliões.

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

Author: Armando Mateus Pomini

Advisor: Prof. Dr. Anita Jocelyne Marsaioli

Gram-positive and Gram-negative bacteria use quorum sensing communication circuits to regulate a diverse array of physiological activities. In general, Gram-negative bacteria use acylated homoserine lactones (acyl-HSLs) as autoinducers, and Gram-positive bacteria use processed oligo-peptides. In the present work, we relate the absolute configuration determination of the rare metabolite (*S*)-(-)-*N*-heptanoyl-HSL produced by the phytopathogen *Pantoea ananatis*. The absolute configuration was determined by gas chromatography coupled to flame ionization detection with chiral column, through retention time comparison and co-injections with synthetic products. The importance of the absolute configuration for the antimicrobial activity of acyl-HSL against Gram-positive bacteria (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*) was assessed. Curiously, non-natural (*R*)-*N*-3-oxo-octanoyl-HSL was as active as the natural product with (*S*) absolute configuration. The interaction of (*S*)-*N*-3-oxo-octanoyl-HSL with *Agrobacterium tumefaciens* NTL4(pZLR4) cells was further studied using hydrogen nuclear magnetic resonance experiments with saturation transfer difference (STD-NMR) revealing that the first binding event is the diffusion through the lipidic part of the outer membrane. Finally, we have investigated the chemical study of the signaling substances produced by *Methylobacterium mesophilicum*, which co-occurs with *Xylella fastidiosa* in orange trees affected by the citrus variegated chlorosis disease. Among several results, we report herein the characterization and synthesis of a new natural product [(*S*)-*N*-(2*E*)-dodecenoyl-HSL], the first synthetic procedure for the rare (*S*)-*N*-(2*E*,7*Z*)-tetradecadienyl-HSL and the occurrence of a rare long, odd chain representative (*N*-tridecanoyl-HSL) in trace amounts. We report the first absolute configuration determination for five natural

acyl-HSLs. We have also studied the effects of synthetic acyl-HSLs on Gram positive bacteria isolated from orange tissues. Additionally, the defensive secretion produced by the harvestman *Hoplobunus mexicanus* was characterized. The defensive repertory of this arachnid includes two irritating and volatile components (2,5-dimethyl-phenol and 2-methyl-5-ethyl-phenol), besides thanatosis and sound emission, a new behavioral artifice in opilionids.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

β -CD	Beta-ciclodextrina
δ	Deslocamento químico (em partes por milhão, ppm)
A	Absorvância
Acil-HSL	Acil-homosserina lactona
ACP	<i>Acyl carrier protein</i> (Proteína carreadora de acila)
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CG(quiral)-FID	Cromatografia gasosa acoplada a detecção por ionização em chama e coluna com fase estacionária quiral
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CoA	Co-enzima A
CHOI3	Meio de cultivo CHOI3
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i> (¹ H, ¹ H ³ J)
D.O.	Densidade ótica
eV	Elétron-volt
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i> (correlação heteronuclear de ¹ H, ¹³ C a múltiplas ligações)
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum coherence</i> (correlação heteronuclear de ¹ H, ¹³ C a uma ligação)
Hz	Hertz
LB	Meio de cultivo Luria Bertani
<i>m/z</i>	Relação massa por carga

NB	Meio de cultivo caldo nutriente
NOE	Efeito <i>Overhauser</i> nuclear
OD	<i>Optical density</i>
Ppm	Parte por milhão
R _f	Fator de retenção
RMN	Ressonância magnética nuclear
ROE	<i>Rotating-frame Overhauser Enhancement</i>
RLU	<i>Relative light units</i>
STD	<i>Saturation transfer difference</i> (diferença de transferência de saturação)
SAM	S-adenosilmetionina
TMS	Tetrametilsilano
Tr	Tempo de retenção
TSB	Meio de cultivo – tripticase soy broth
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

ÍNDICE GERAL

1. Introdução	01
1. Introdução – Ecologia Química	03
1.1. Química da comunicação bacteriana	03
1.2. Acil-homosserina lactonas produzidas por <i>Pantoea ananatis</i>	08
1.3. Atividade antimicrobiana das acil-HSLs	12
1.4. Interações bacterianas e a clorose variegada dos citros	15
2. Objetivos	23
3. Resultados e discussão	27
3.1. Determinação da configuração absoluta da (<i>S</i>)- <i>N</i> -heptanoil-HSL produzida por <i>Pantoea ananatis</i> .	29
3.2. A importância da configuração absoluta para a atividade antimicrobiana das acil-HSLs.	38
3.2.1. Estudo da interação da (<i>S</i>)- <i>N</i> -3-oxo-octanoil-HSL com células íntegras de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL4(pZLR4)	44
3.3. Estudo químico das acil-homosserina lactonas produzidas por <i>Methylobacterium mesophilicum</i> SR 1.6/6	55
3.3.1. Estudos preliminares – extrato semi-purificado	55
3.3.1.1. Principais técnicas utilizadas nas caracterizações estruturais	61
3.3.2. Derivatização das acil-homosserina lactonas com dimetil-dissulfeto	62
3.3.3. Estudos avançados – obtenção de fração mais pura	69
3.3.3.1. Avaliação da produção de acil-homosserina lactonas por <i>M. mesophilicum</i> em condições não metanotróficas de crescimento	76
3.3.4. Síntese das acil-homosserina lactonas	81
3.3.4.1. Síntese das acil-HSLs saturadas	81

3.3.4.2. Síntese da (<i>S</i>)- <i>N</i> -(<i>2E</i>)-dodecenoil-homosserina lactona	82
3.3.4.3. Síntese da (<i>S</i>)- <i>N</i> -(<i>2E,7Z</i>)-tetradecadienil-homosserina lactona	86
3.3.5. Identificação estrutural dos produtos naturais por co-injeção e comparação de espectros de massas com produtos sintéticos (CG-EM)	90
3.3.6. Determinação da configuração absoluta dos produtos naturais	96
3.3.7. Outras ocorrências dos metabólitos detectados em <i>M. mesophilicum</i>	101
3.3.8. Avaliação da atividade biológica de produtos sintéticos e fração natural das acil-HSLs produzidas por <i>Methylobacterium mesophilicum</i>	103
3.3.8.1. Avaliação da atividade antimicrobiana das acil-homosserina lactonas contra bactérias Gram-positivas endofíticas da laranja	104
3.4. Estratégias de defesa do opilião <i>Hoplobunus mexicanus</i>	109
3.4.1. Caracterização da secreção produzida por <i>H. mexicanus</i>	109
4. Conclusões	121
5. Parte experimental	127
5.1. Materiais e Equipamentos	129
5.1.1. Equipamentos	129
5.1.2. Meios de cultivo para microrganismos	132
5.1.3. Reagentes e solventes	133
5.1.4. Cepas bacterianas	134
5.2. Determinação da configuração absoluta de (<i>S</i>)- <i>N</i> -heptanoil-HSL produzida por <i>Pantoea ananatis</i> CCT 6481.	134
5.2.1. Cultivo de <i>P. ananatis</i> e purificação da (<i>S</i>)- <i>N</i> -heptanoil-HSL	134
5.2.2. Síntese da <i>N</i> -heptanoil-HSL (racemato e enantiômeros)	136
5.2.3. Avaliação da atividade biológica da <i>N</i> -heptanoil-HSL sintética (racemato e enantiômeros) e produto natural com o biorepórter <i>A. tumefaciens</i> NTL4(pZLR4).	138
5.2.4. Determinação da configuração absoluta da (<i>S</i>)- <i>N</i> -heptanoil-HSL produzida por <i>P. ananatis</i>	139

5.3. Avaliação da importância da configuração absoluta para atividade antimicrobiana de acil-HSLs.	140
5.3.1. Síntese dos compostos a serem avaliados biologicamente.	140
5.3.2. Bioensaios de atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas.	146
5.3.2.1. Ensaio semi-quantitativo preliminar – análise visual	146
5.3.2.2. Ensaio quantitativo – análise absorciométrica	147
5.3.3. Experimentos de diferença de transferência de saturação (STD-RMN) com células íntegras de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL4(pZLR4)	148
5.4. Estudo químico das acil-HSLs produzidas por <i>Methylobacterium mesophilicum</i> em meio CHOI3, TSB e CHOI3/glucose	149
5.4.1. Procedimento geral de cultivo e preparação de extratos	149
5.4.2. Preparação de frações para ensaios biológicos e análises preliminares	150
5.4.3. Avaliação da atividade biológica fração acetato de etila dos extratos de <i>M. mesophilicum</i> com o biorepórter <i>A. tumefaciens</i> NTL4(pZLR4).	152
5.4.4. Reação de derivatização com dimetildissulfeto e iodo	152
5.4.5. Purificação das acil-HSLs naturais – procedimento geral	153
5.4.6. Determinação dos índices de retenção das acil-HSLs	154
5.4.7. Síntese das acil-HSLs de cadeia linear saturada	155
5.4.8. Síntese da (S)-(2E)-dodecenoil-HSL	160
5.4.8.1. Obtenção do ácido 2-bromo-dodecanóico	160
5.4.8.2. Obtenção do ácido 2-iodo-dodecanóico	161
5.4.8.3. Obtenção do ácido (2E)-dodecenóico	163
5.4.8.4. Obtenção da (±) e (S)-(2E)-dodecenoil-HSL	164
5.4.9. Síntese da (S)-(2E,7Z)-tetradecadienil-HSL	166
5.4.9.1. Obtenção da (S)-N-3-oxo-(7Z)-tetradecenoil-HSL	166
5.4.9.2. Obtenção da (S)-N-3-hidroxi-(7Z)-tetradecenoil-HSL	168
5.4.9.3. Obtenção da (S)-N-3-metil-(7Z)-tetradecenoil-HSL	170
5.4.9.4. Obtenção da (S)-N-(2E, 7Z)-tetradecadienil-HSL	171

5.4.10. Co-injeções das acil-HSLs sintéticas com os produtos naturais	172
5.4.11. Determinação da configuração absoluta das acil-HSLs naturais produzidas por <i>M. mesophilicum</i>	173
5.4.11.1. Reação de hidrogenação catalítica	173
5.4.11.2. Análises por cromatografia gasosa acoplada a detecção por ionização em chama com coluna quirál	173
5.4.12. Avaliação da atividade biológica dos produtos sintéticos e fração F22 de <i>M. mesophilicum</i> com o bioreporter <i>A. tumefaciens</i> NTL4(pZLR4).	175
5.4.13. Avaliação da atividade antimicrobiana das acil-HSLs sintéticas contra bactérias Gram-positivas endofíticas da laranja	175
5.5. Estudo da secreção produzida pelo opilião <i>Hoplobunus mexicanus</i>	177
6. Referências Bibliográficas	179
7. Anexos	193

1. INTRODUÇÃO

1.. Introdução – Ecologia Química

Ao longo de milhares de anos, os organismos vivos desenvolveram mecanismos de comunicação utilizando sinais sonoros, visuais e químicos. A Ecologia Química é a área da ciência que se ocupa com o estudo do uso de substâncias químicas como carreadoras de informações entre os diferentes organismos. Esta área da ciência teve um grande avanço a partir da metade do século XX, com a primeira caracterização química do feromônio utilizado por mariposas do bicho da seda (*Bombyx mori*) (Millar e Haynes, 1998). O avanço foi intensificado com o desenvolvimento de metodologias analíticas e instrumentais cada vez mais sensíveis e confiáveis.

Os processos de comunicação mediados por sinalizadores químicos se dividem em duas grandes classes, sendo aqueles empregados entre indivíduos de uma mesma espécie (feromônios) e os empregados entre indivíduos de espécies distintas (aleloquímicos). O estudo destas substâncias permite revelar ou aprofundar o conhecimento disponível sobre diversas interações ecológicas, muitas vezes essenciais para a sobrevivência das espécies no nicho ecológico (Nordlund e Lewis, 1976).

1.1. Química da comunicação bacteriana

Não apenas os organismos macroscópicos como insetos e mamíferos utilizam substâncias químicas na sua comunicação, mas também os microorganismos dependem da comunicação química para sobreviver. Assim, a literatura mostra diversos exemplos de bactérias que não existem como células independentes, mas como microorganismos coloniais que exploram

sistemas elaborados de comunicação intercelular para facilitar sua adaptação às mudanças das condições ambientais (Whitehead *et al.*, 2001).

Os microrganismos são constantemente sujeitos a diversos estímulos ambientais, como alterações de temperatura, osmolaridade, pH, disponibilidade de nutrientes, presença de substâncias químicas que interferem em seu desenvolvimento e até mesmo a presença de outros organismos. Desta forma, as bactérias desenvolveram ao longo de milhares de anos de evolução mecanismos adaptativos em resposta à estas flutuações do ambiente, bem como nas interações ecológicas com outras espécies, seja de modo simbiótico ou até mesmo patogênico (Whitehead *et al.*, 2001).

Há aproximadamente 30 anos a ciência reconheceu os primeiros indícios relacionados aos mecanismos de percepção e resposta empregados pelas bactérias. Esta linguagem apresenta a forma de sinais químicos secretados a partir das células e que podem induzir diversas alterações na fisiologia bacteriana. Ao contrário do que se imaginava, não se trata de um fenômeno raro: a percepção do quorum (“*quorum sensing*”) é um processo altamente difundido entre os mais diversos gêneros de bactérias, mostrando sua habilidade em perceber e responder à presença de populações microbianas vizinhas (Whitehead *et al.*, 2001; Eberhard *et al.*, 1981).

O processo *quorum-sensing* se baseia na produção de uma substância sinalizadora de baixa massa molecular, cuja concentração extracelular está relacionada à densidade populacional do microrganismo produtor. A substância sinalizadora pode ser detectada pelas células e isto permite a população como um todo iniciar uma ação coordenada, uma vez atingida uma densidade populacional crítica. Isto pode ser de vital importância, por exemplo, em infestações patogênicas, onde a produção de fatores de virulência prematuramente (em baixas densidades celulares) pode alertar os sistemas de

defesa do hospedeiro minimizando as chances de colonização bem sucedida (Fast, 2003).

Dentre as bactérias Gram-negativas, as substâncias sinalizadoras melhor caracterizadas são as acil-homoserina lactonas (acil-HSLs). A estrutura genérica destes metabólitos é uma lactona (porção homoserina) ligada à uma cadeia acila saturada ou insaturada, que pode conter substituintes carbonila ou hidroxila (Figura 1).

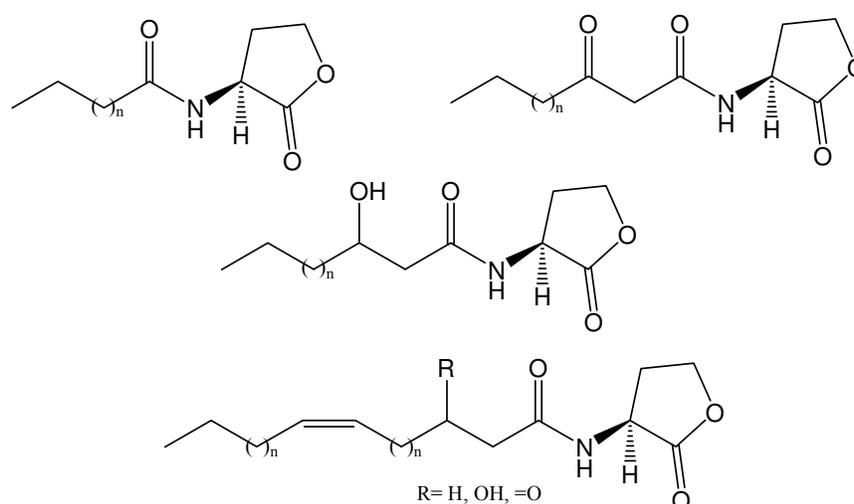


Figura 1. Acil-homoserina lactonas, as principais substâncias sinalizadoras em bactérias Gram-negativas.

Ao nível molecular, a atuação das acil-HSLs pode ser explicada da seguinte maneira: inicialmente, um gene homólogo de *luxI* codifica uma enzima LuxI responsável pela síntese de acil-HSLs. Desta forma, os novos indivíduos de uma população bacteriana crescente também produzirão acil-HSLs, até que uma concentração crítica é atingida e os metabólitos sinalizadores passam a interagir com proteínas receptoras homólogas de LuxR (codificado inicialmente por um gene *luxR*). O complexo (acil-HSL)-LuxR

passa a controlar a transcrição genes que levam à expressão de diferentes fatores fenotípicos (Whitehead *et al.*, 2001).

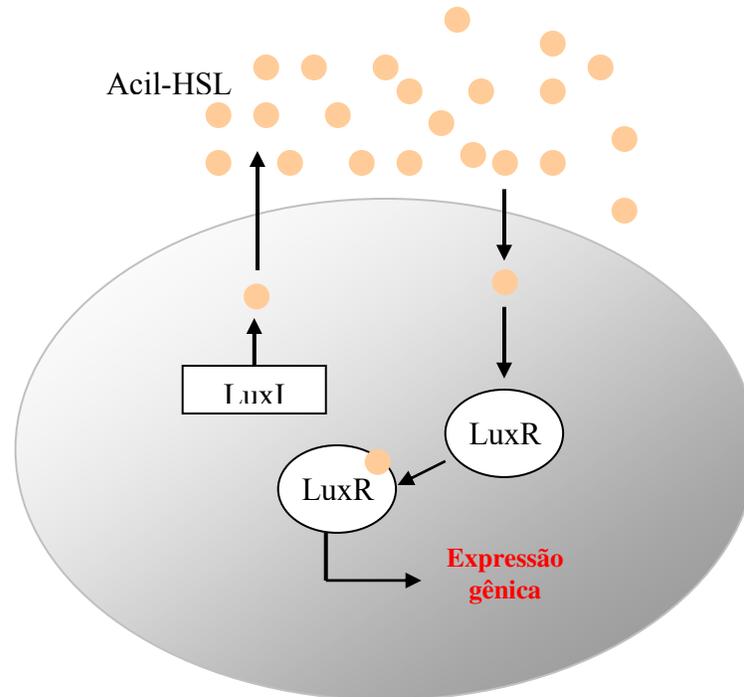


Figura 2. Diagrama mostrando o princípio básico do fenômeno *quorum-sensing*, baseado na síntese e percepção de substâncias sinalizadoras produzidas pelos indivíduos numa população (acil-HSLs).

O marco inicial dos estudos em *quorum-sensing* foi o trabalho de identificação das acil-HSLs produzidas pela bactéria marinha bioluminescente *Vibrio fischeri* (Eberhard *et al.*, 1981). Quando esta bactéria se desenvolve livremente na água do mar, não se observa a formação de luz. No entanto, quando cresce até altas concentrações celulares, *V. fischeri* produz bioluminescência com luz azul-esverdeada. Normalmente, este microrganismo é encontrado em interações simbióticas com peixes e moluscos, especialmente com a espécie *Euprymna scolopes* (Figura 3). Este pequeno molusco que habita as águas rasas dos recifes de corais no arquipélago havaiano é um

predador de hábitos noturnos, que se beneficia do fenômeno de bioluminescência gerada pela bactéria *V. fischeri* para confundir suas presas. O animal possui um órgão específico onde a bactéria se desenvolve até altas concentrações celulares, o que leva à formação de luz através da enzima luciferase. A bactéria se beneficia na relação simbiote, uma vez que recebe do molusco nutrientes que propiciam o seu desenvolvimento (Graft e Ruby, 1998). A síntese e atividade da luciferase são reguladas pela bactéria através da secreção da (S)-N-(3-oxo-hexanoil)-HSL, através do fenômeno *quorum-sensing* (Eberhard *et al.*, 1981). Isto é compreensível, pois a expressão de luz só é significativa quando produzida por uma alta densidade bacteriana. Desta forma, os mecanismos de comunicação impedem o gasto energético relacionado à emissão de luz num momento impróprio.

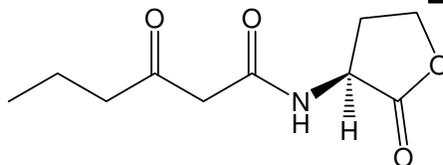
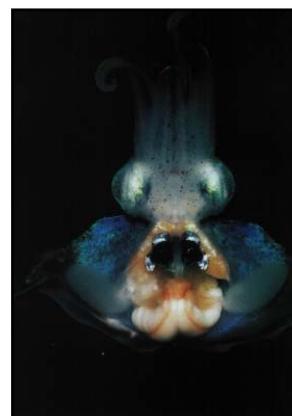


Figura 3. Espécie hawaiana de molusco (*Euprymna scolopes*) com a qual a bactéria *V. fischeri* interage simbioticamente. À direita observa-se na penumbra uma bioluminescência azulada no animal. O principal metabólito sinalizador em *V. fischeri* é a (S)-N-(3-oxo-hexanoil)-HSL.

1.2. Acil-homosserina lactonas produzidas por *Pantoea ananatis*

Num trabalho anterior, nosso grupo de pesquisas estudou a produção de acil-homosserina lactonas pela espécie *Pantoea ananatis* CCT 6481 (Pomini *et al.*, 2006). Esta espécie foi inicialmente descrita como um fitopatógeno do abacaxi (Serrano, 1928). Atualmente, um dos principais focos de ocorrência da espécie são as plantações de cebola nos Estados Unidos, no estado da Geórgia, onde tem efeito devastador (Walcott *et al.*, 2002). A espécie também é fitopatogênica ao arroz na Austrália, ao eucalipto na África do Sul (Figura 4) e à forrageira *Sorghum sudanense* no estado da Califórnia, Estados Unidos (Cothier *et al.*, 2004; Coutinho *et al.*, 2002; Azad *et al.*, 2000).

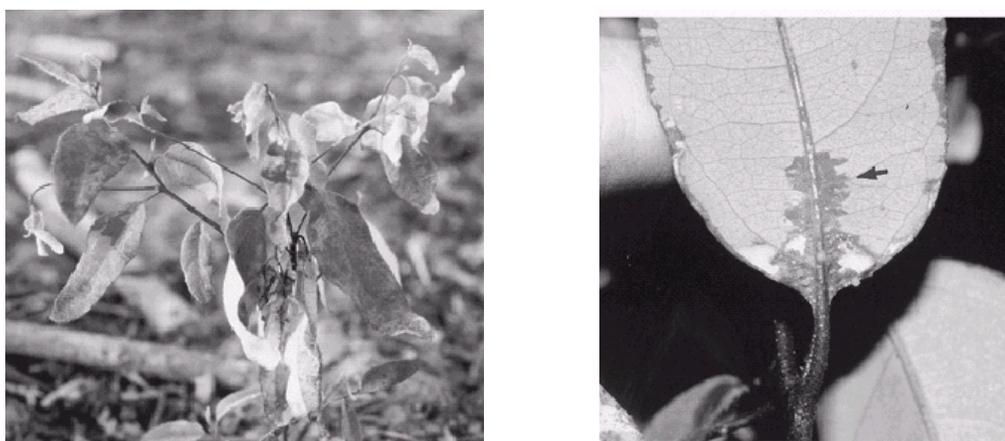


Figura 4. *Pantoea ananatis* atacando mudas jovens de eucalipto na África do Sul (Coutinho *et al.*, 2002).

O estudo químico dos extratos do meio de cultivo de *P. ananatis* permitiu detectar três acil-homosserina lactonas: (*S*)-*N*-hexanoil-HSL, *N*-hetpanoil-HSL e traços de *N*-octanoil-HSL. A configuração absoluta da (*S*)-*N*-hexanoil-HSL foi determinada por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama e com coluna cromatográfica de fase estacionária quiral

(Pomini *et al.*, 2006). Com base neste trabalho, Morohoshi e colaboradores (2007) realizaram o estudo bioquímico da cepa *P. ananatis* SK-1, e reportaram a ocorrência de *N*-hexanoil- e *N*-3-oxo-hexanoil-HSL como substâncias sinalizadoras (através de técnicas de biorevelação), citando os resultados obtidos em nosso grupo de pesquisas. Além disso, o trabalho relatou a identificação das proteínas EanI e EanR, responsáveis pela síntese e detecção das substâncias sinalizadoras, e demonstrou que estas substâncias são responsáveis pela síntese de exopolissacarídeos e expressão de biofilmes, essenciais para a colonização dos tecidos da cebola (Figura 5).

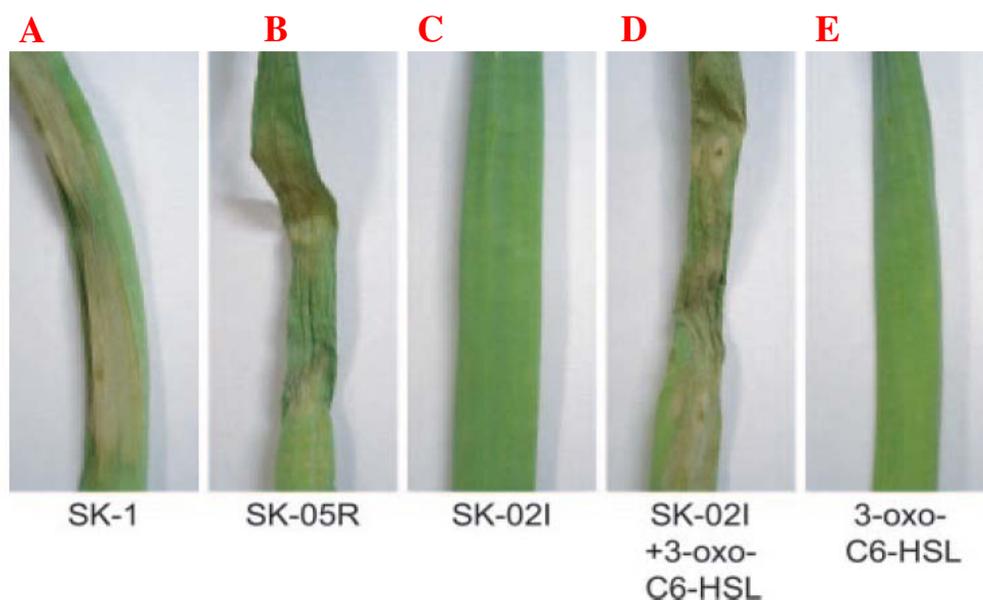
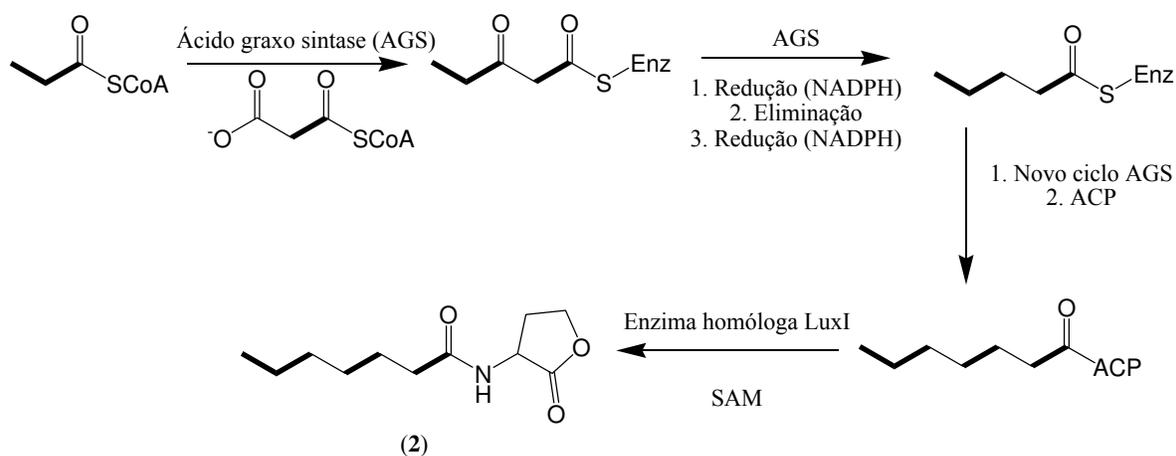


Figura 5. Bioensaios de inoculação em folhas de cebola com diferentes cepas de P. ananatis. A. cepa SK1 selvagem e patogênica; B. cepa SK-05R mutante patogênica, super-expressor da proteína EanR; C. SK-021, mutante incapaz de produzir acil-HSLs e não patogênica; D. co-inoculação da cepa SK-021 com N-3-oxo-hexanoil-HSL sintética, restaurando a patogenicidade; E. branco realizado com a N-3-oxo-hexanoil-HSL sintética (Morohoshi et al., 2007).

Desta forma, o mutante SK-021, incapaz de produzir acil-HSLs, mostrou-se não patogênico em ensaios de inoculação em folhas de cebola, sendo a patogenicidade restaurada pela adição de *N*-3-oxo-hexanoil-HSL sintética (Figura 5). Este estudo é semelhante a outros realizados na área de bactérias fitopatogênicas e demonstra claramente a importância dos mecanismos de comunicação intercelular para a expressão de fatores de virulência nestas bactérias (Morohoshi *et al.*, 2007).

Um fato interessante observado em nosso trabalho anterior foi a ocorrência do metabólito *N*-heptanoil-HSL na espécie *P. ananatis* (Pomini *et al.*, 2006). Trata-se do primeiro relato desta substância no gênero *Pantoea*. Nosso grupo também reportou a ocorrência desta substância na espécie *Erwinia psidii* (Pomini *et al.*, 2005). Esta substância já havia sido reportada na espécie *Sinorhizobium leguminosarum*, onde participa do controle da expressão de genes envolvidos nos fenômenos de formação de nódulos em leguminosas simbiotes e na espécie *Serratia marcescens*, controlando a expressão de um antibiótico que confere coloração vermelha às colônias desta bactéria (Horng *et al.*, 2002; Lithgow *et al.*, 2000). Nestas espécies bacterianas, esta substância foi identificada por técnicas espectroscópicas como CG-EM e CLAE-EM-EM, por comparação do padrão de fragmentação e co-injeção com produtos sintéticos. Em adição, indícios da ocorrência deste metabólito também foram detectados nos caldos de cultivo da bactéria *Edwardsiella tarda*, onde participaria do controle da expressão de genes que levam à fatores de patogenicidade contra algumas espécies de peixes. No entanto, em *E. tarda* a *N*-heptanoil-HSL foi identificada apenas por cromatografia em camada delgada, por biorevelação com a cepa biossensora *Chromobacterium violaceum* CV026, e os próprios autores relatam a incerteza a respeito da identidade da molécula (Morohoshi *et al.*, 2004).

O que chama a atenção ao metabólito é a presença do grupo heptanoíla, um derivado de ácido graxo com número ímpar de carbonos. As formas mais comuns de ocorrência de ácidos graxos são aqueles formados por números pares de carbonos, o que está relacionado com a sua origem biossintética. Dentre os microrganismos procariontes, a biossíntese dos ácidos graxos é melhor compreendida em *Escherichia coli*, no complexo ácido graxo sintase (Lehninger *et al.*, 1995). O iniciador da cadeia acila é normalmente grupo acetato (unidade C₂), ao qual são inseridos novas unidades acetato através do ataque nucleofílico de malonato, ativado por descarboxilação. Assim são gerados os ácidos graxos com número par de carbonos na cadeia acila. No caso de ácidos graxos com número ímpar de carbonos, o iniciador das diversas etapas biossintéticas é o propionato (unidade C₃), ao qual são inseridas as demais unidades de acetato. A literatura aponta esta via metabólica como a provável origem da porção acila da *N*-heptanoil-HSL (Esquema 1) (Whithers *et al.*, 2001).



Esquema 1. Provável origem biossintética da substância (2) a partir do propionil-ACP.

Além da *N*-heptanoil-HSL, outras substâncias sinalizadoras com cadeia acila lateral com número ímpar de átomos de carbono foram descritas recentemente na literatura. Foram detectadas a *N*-tridecanoil-HSL, *N*-pentadecanoil-HSL, *N*-pentadecenoil-HSL e *N*-pentadecadienil-HSL em bactérias Gram-negativas de origem marinha (Alphaproteobacteria). Além disso, a espécie *Yersinia pseudotuberculosis* produz traços de *N*-tridecanoil-HSL (Ortori *et al.*, 2007). Assim, estes metabólitos com cadeias acila laterais ímpares possuem cada dia maior importância e ocorrência mais ampla (Wagner-Döbler *et al.*, 2005). Apesar desta importância, não há relatos na literatura da caracterização da configuração absoluta de nenhum dos metabólitos desta classe.

1.3. Atividade antimicrobiana das acil-HSLs

Recentemente, descobriu-se uma nova atividade biológica para as acil-homosserina lactonas. Kaufmann e colaboradores (2005) reportaram que a (*S*)-*N*-(3-oxododecanoil)-HSL, uma molécula sinalizadora produzida por *Pseudomonas aeruginosa* (Pearson *et al.*, 1994), era capaz de inibir o crescimento de diversas bactérias Gram-positivas, sendo inócuas, porém sobre bactérias Gram-negativas (Figura 6). Cepas de *Bacillus cereus* (bactéria Gram positiva) que produzem lactonases (exemplo *B. cereus* ATCC 14579) são resistentes à (*S*)-*N*-(3-oxododecanoil)-HSL. Estas enzimas tem sido empregadas em processos de bloqueio de comunicação intercelular, mediante degradação das substâncias sinalizadoras (Dong *et al.*, 2002).

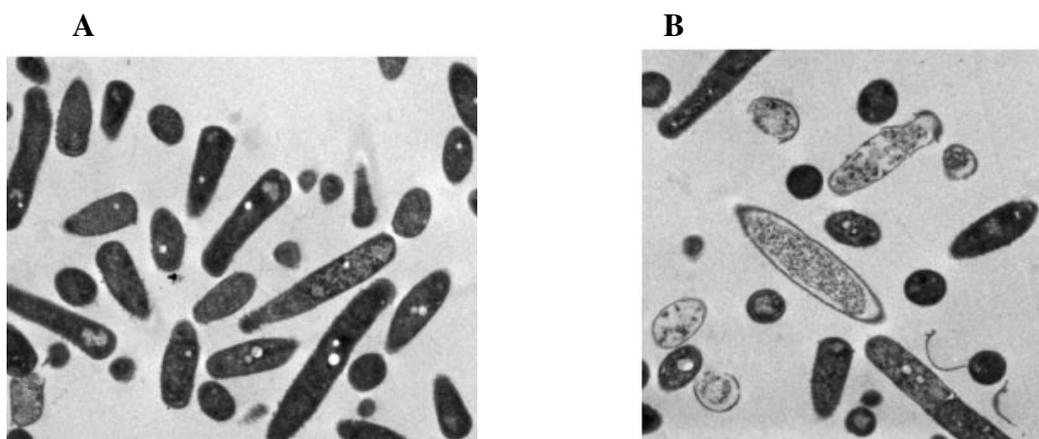


Figura 6. Micrografias eletrônicas de B. cereus ATCC 11778 cultivado na presença de DMSO (A) e (S)-N-(3-oxododecanoil)-HSL (B). Observa-se na Figura B uma alteração morfológica evidente, como a translucidez da membrana e parede celulares. A cepa ATCC 11778 é suscetível à ação antibacteriana de (S)-N-(3-oxododecanoil)-HSL (Kaufmann et al., 2005).

A ação antimicrobiana de diversas acil-HSLs sobre *Staphylococcus aureus* foi extensivamente estudada por Qazi e colaboradores (2006), utilizando-se uma cepa mutante que expressa bioluminescência proporcional ao número de indivíduos da população. De forma geral, *N*-acil-HSLs sem substituintes oxo na posição 3 da cadeia lateral não mostraram qualquer tipo de inibição de crescimento do microrganismo. Entretanto, 3-oxo-acil-HSLs com cadeias laterais contendo 8, 10, 12 e 14 átomos de carbono foram eficientes nesta inibição (Figura 7) (Qazi et al., 2006). A *N*-(3-oxododecanoil)-HSL foi uma das substâncias mais ativas (Figura 6B).

Bioensaios hemolíticos com eritrócitos de coelhos demonstraram ainda que a *N*-(3-oxododecanoil)-HSL é capaz de inibir a produção de exotoxinas do tipo hemolisina por *S. aureus*, demonstrando, portanto a interferência desta

substância também na produção de fatores de virulência da bactéria (Qazi *et al.*, 2006).

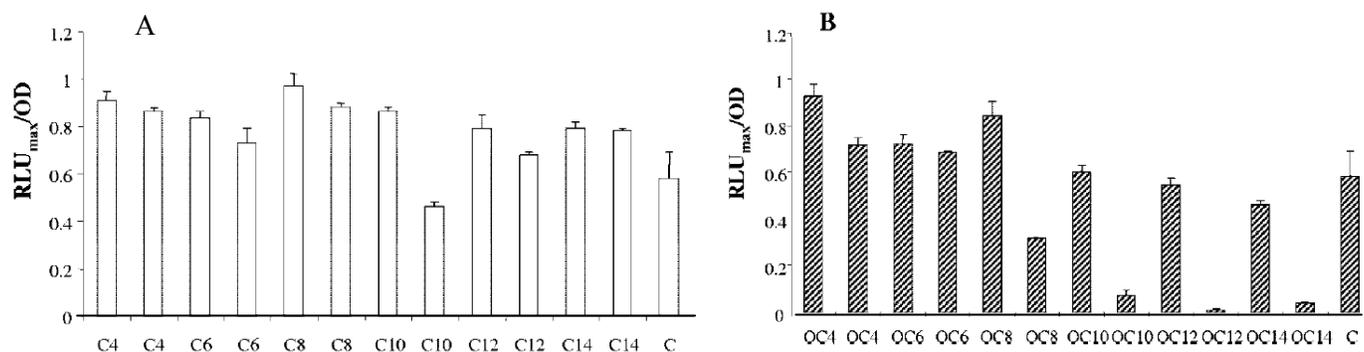


Figura 7. Avaliação da atividade antimicrobiana de diversas acil-HSLs sobre *S. aureus* RN6390(pSB2030), medida através da intensidade de bioluminescência. A. série de N-acil-HSLs. B. série de N-3-oxo-acil-HSLs. A barra C indica a atividade do controle (apenas diluente); Para cada acil-HSL a primeira barra representa a concentração de 5 μM e a segunda barra, 50 μM.

A atividade bactericida (ou bacteriostática) de *N*-(3-oxo-dodecanoil)-HSL sobre *S. aureus* foi atribuída à sua interferência nos mecanismos de sinalização intercelular, influenciando na regulação da expressão de fatores de virulência e profundas alterações na membrana celular (Qazi *et al.*, 2006).

A *N*-(3-oxo-dodecanoil)-HSL é uma molécula sinalizadora produzida por *Pseudomonas aeruginosa* que inibe o crescimento e a produção de fatores de virulência de *S. aureus*, conferindo à *P. aeruginosa* uma vantagem competitiva importante na colonização de pulmões e outros tecidos do hospedeiro, principalmente de pacientes afetados pela fibrose cística. De forma geral, a literatura clínica aponta uma substituição gradativa de *S. aureus* por *P. aeruginosa* nos tecidos do hospedeiro conforme as doenças pulmonares

avançam. Provavelmente, a atividade biológica de *N*-(3-oxododecanoil)-HSL sobre *S. aureus* deve contribuir para este processo, uma vez que a concentração deste metabólito no biofilme do muco pulmonar (aprox. 600 μ M) é consideravelmente maior que aquela produzida por populações planctônicas de *P. aeruginosa* (5 μ M) (Charlton *et al.*, 2000; Qazi *et al.*, 2006).

1.4. Interações bacterianas e a clorose variegada dos citros

O Brasil é o maior produtor mundial de laranjas e controla grande parte do mercado internacional do suco concentrado desta fruta. Neste contexto, os pomares paulistas representam mais de 80% da produção nacional, que gera divisas da ordem de 1,5 bilhão de dólares ao ano e emprega mais de 3,4 milhões de pessoas em sua cadeia produtiva (Araújo *et al.*, 2002). Porém, o cultivo da laranjeira é dificultado pela ocorrência de diversas pragas e doenças. A clorose variegada dos citros (CVC) (também conhecida como *amarelinho*) é uma doença da laranja (*Citrus sinensis*) e outros citros comerciais causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, que normalmente se limita ao xilema desta planta. Trata-se da principal doença da citricultura paulista, e estima-se que as perdas provocadas por esta doença são da ordem de centenas de milhões de reais ao ano (Lacava *et al.*, 2004; Laranjeira *et al.*, 2003). Os pomares das regiões norte e noroeste do estado de São Paulo são os mais atingidos pela doença, que em determinadas localidades ataca até 70% dos pomares (Figura 8).

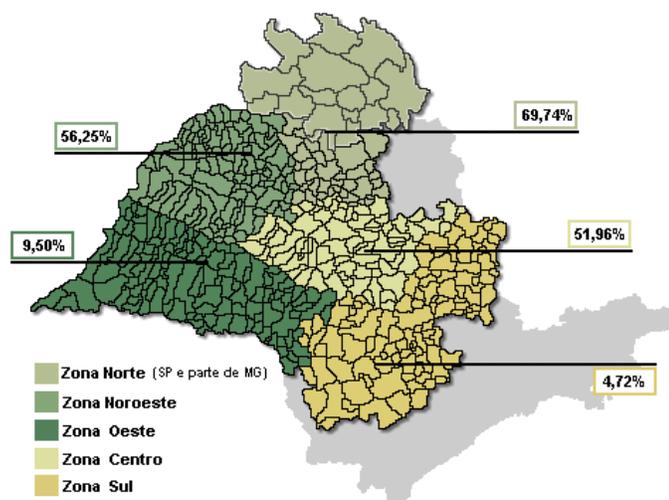


Figura 8. Zoneamento agrícola de incidência da clorose variegada dos citros no estado de São Paulo e sul de Minas Gerais em 2005. Fonte: Fundecitrus (<http://www.fundecitrus.com.br>)

As plantas afetadas pela CVC apresentam clorose foliar semelhante à deficiência de zinco, que se inicia na parte superior da copa. Na face inferior das folhas desenvolvem-se pontuações pequenas, de cor marrom claro, que podem se tornar marrom escuro ou mesmo necróticas (Lee *et al.*, 1991; Rossetti, 1993) (Figuras 9, 10). A doença causa redução do tamanho dos frutos, endurecimento da casca, maturação precoce e menor resistência ao sol não podendo ser utilizados pela indústria de sucos (Site Fundecitrus). O crescimento da planta é mais lento, ocasionando morte dos ponteiros e queda das folhas (Lee *et al.*, 1991). A bactéria, além de ser carregada através de material vegetal infectado, é transmitida de planta a planta por meio de insetos vetores que se alimentam de seiva do xilema, conhecidos como cigarrinhas, pertencentes às famílias Cercopidae e Cicadellidae (Lopes, 1999).



Folhas com sintomas de CVC
(pequenas manchas amareladas)



Estágio mais avançado
lesões de cor palha



Desfolha dos ramos
mais altos da planta



Frutos saudios ao lado de frutos de
tamanho reduzido devido à doença



Sintomas de murcha em folhas e
queimadura do sol em frutos



Detalhe de murcha em folhas e
queimadura do sol em frutos

Figura 9. Efeitos da clorose variegada dos citros nas folhas e frutos de laranjeira. A doença aumenta a suscetibilidade dos frutos aos raios solares.

Fonte: site Fundecitrus (www.fundecitrus.com.br).

A laranjeira não é a única espécie vegetal prejudicada por doenças causadas por *X. fastidiosa*. Já foram reportados ataques sobre videiras, alface, pessegueiros, vinca, amêndoas, pecan, café entre outros (Purcell e Hopkins, 1996). Isto demonstra claramente a importância desta bactéria no meio rural e a necessidade urgente de novos estudos visando uma melhor compreensão das doenças a ela relacionadas.

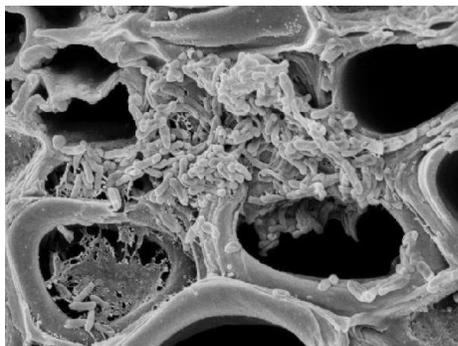


Figura 10. Micrografia de eletrônica varredura mostrando a bactéria X. fastidiosa colonizando o interior do xilema da laranjeira. Fonte: E. W. Kitajima (Esalq).

Apesar da *Xylella fastidiosa* ter sido o primeiro fitopatógeno a ter sua sequência genética decifrada, ainda não surgiram metodologias de controle da doença da clorose variegada (Simpson *et al.*, 2000). Entretanto, em alguns pomares infectados é possível encontrar alguns poucos exemplares saudáveis e resistentes à doença. Estas plantas assintomáticas podem ser encontradas nas mesmas áreas de cultivo e são genotipicamente idênticas às plantas doentes, indicando que algum outro fator confere a estas plantas resistência a doença. Um destes fatores pode ser a natureza da comunidade endofítica microbiana que coloniza cada planta individual de laranjeira (Araújo *et al.*, 2002).

Os microrganismos endofíticos são aqueles que não causam prejuízos visuais às plantas, mas que podem ser isolados a partir de tecidos ou partes internas do vegetal, esterelizados superficialmente. Além disso, os endofíticos normalmente colonizam um nicho similar ao dos microrganismos fitopatogênicos, e muitas vezes podem interagir entre si, sendo empregados em mecanismos de controle biológico (Araújo *et al.*, 2002).

Um estudo recente mostrou quais são os principais microrganismos endofíticos presentes em laranjeiras do interior de São Paulo e sul de Minas Gerais. Foram detectadas bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Nocardia*, *Pantoea*, *Streptomyces*, *Xanthomonas* e várias espécies do gênero *Methylobacterium* (*M. extorquens*, *M. mesophilicum*, *M. fujisawaense*, *M. radiotolerans* e *M. zatmanii*), entre outros. O estudo da variação sazonal desta colonização endofítica mostrou a presença expressiva de espécies do gênero *Methylobacterium* em plantas sintomáticas infectadas por *Xylella fastidiosa* principalmente no outono, com decréscimo na primavera (Araújo *et al.*, 2002). Porém, de uma forma geral, as espécies do gênero *Methylobacterium* apresentaram a maior frequência de isolamento (Figura 11).

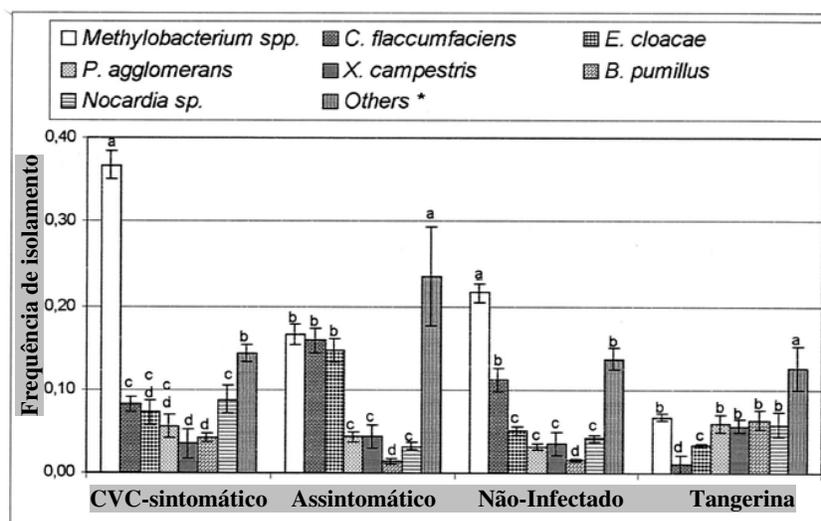


Figura 11. Frequência de isolamento de microrganismos endofíticos de diferentes indivíduos de *Citrus sinensis* (laranjeiras) no período março-abril de 1997. Note a grande proporção de *Methylobacterium* spp. em laranjeiras com sintomas da clorose variegada dos citros (CVC-sintomático). Referência: Araújo *et al.*, 2002.

As bactérias do gênero *Methylobacterium* são capazes de fixar nitrogênio atmosférico e podem sobreviver utilizando metanol como única fonte de carbono. Elas são encontradas nos mais diversos ambientes como solo, rizosfera e água; porém, são frequentemente encontradas associadas a plantas em relações simbióticas, onde contribuem produzindo diversos fitormônios como ácido indolacético, citocinas e vitamina B12 e em contrapartida recebem o metanol produzido pelas plantas como fonte de carbono (Penalver *et al.*, 2006).

Verificou-se que a ocorrência de espécies do gênero *Methylobacterium* em citros têm uma correlação estreita com a ocorrência e severidade dos sintomas da doença da clorose variegada causada por *Xylella fastidiosa*; ou seja, altas densidades populacionais de *Methylobacterium* foram encontradas em exemplares severamente atacados pela clorose variegada dos citros, prevalecendo sobre outras bactérias, principalmente as Gram-positivas (Araújo *et al.*, 2002).

Num trabalho recente, Poonguzhali e colaboradores (2007) realizaram ensaios com biorepórteres visando encontrar evidências da produção de acil-homosserina lactonas por diversas espécies do gênero *Methylobacterium* provenientes de diferentes fontes, como água potável, solo, como endofíticos do arroz ou da rizosfera. Das 18 cepas estudadas, 12 induziram a síntese de β -galactosidase na cepa mutante *Agrobacterium tumefaciens* (traR, tra::lacZ749). Entretanto, nenhuma cepa estimulou a síntese do antibiótico violaceína com o biossensor *Chromobacterium violaceum* CV026. Trata-se de um resultado interessante, uma vez que a cepa CV026 é capaz de detectar apenas acil-homosserina lactonas de cadeia acila curtas (butanoil e hexanoil), sugerindo que as espécies do gênero *Methylobacterium* devam produzir substâncias sinalizadoras de cadeia longa.

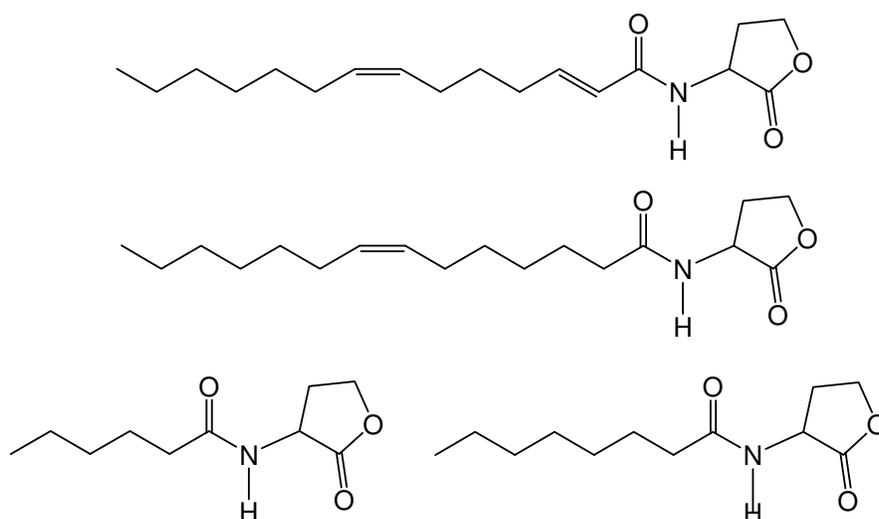


Figura 12. Acil-homosserina lactonas produzidas por Methylobacterium extorquens AM1 (Penalver et al., 2006).

Atualmente, *M. extorquens* AM1 é a única espécie do gênero estudada detalhadamente quanto à produção de acil-homosserina lactonas (Penalver *et al.*, 2006). Interessantemente, esta cepa produz acil-HSLs de cadeia longa (tetradecanoil) em condições metanotróficas de crescimento, com um padrão de insaturações inédito na literatura, a *N*-(2*E*, 7*Z*)-tetradecadienil-HSL (Figura 12), entre outras. Por outro lado, quando o metanol é substituído por succinato como fonte de carbono, acil-HSLs de cadeia curta (*N*-hexanoil e *N*-octanoil-HSL) são produzidas. A mistura de ambas fontes de carbono leva à produção de acil-HSLs de cadeias curtas e longas, mostrando claramente uma mudança no padrão de expressão destes metabólitos dependendo da fonte de carbono disponível. Posteriormente, descobriu-se que estas substâncias são responsáveis pela regulação da síntese de exopolissacarídeos, fatores

importantes na constituição de biofilmes pelas bactérias (Penalver *et al.*, 2006).

Em conjunto, todos estes dados nos fizeram levantar a hipótese que *M. mesophilicum* isolada da laranjeira produza acil-homosserina lactonas. Dados os estudos recentes mostrando a importância destes metabólitos como agentes antimicrobianos contra bactérias Gram-positivas (além de substâncias sinalizadoras), isto estimulou nosso grupo de pesquisas a consolidar uma já produtiva parceria com o Prof. Dr. Welington Luíz de Araújo da ESALQ (Piracicaba, São Paulo) para estudar a produção de acil-homosserina lactonas por *M. mesophilicum* e os possíveis efeitos destas substâncias sinalizadoras contra algumas bactérias endofíticas Gram-positivas da laranja.

2. OBJETIVOS

2. Objetivos

Os principais objetivos deste trabalho são:

- 1) Determinar a configuração absoluta da (*S*)-*N*-heptanoil-homosserina lactona produzida por *Pantoea ananatis*.
- 2) Avaliar a importância da configuração absoluta para atividade antimicrobiana de acil-homosserina lactonas contra bactérias Gram-positivas.
- 3) Estudar a interação da (*S*)-*N*-3-oxo-octanoil-HSL com lipossomas e células íntegras de *Agrobacterium tumefaciens* NTL4(pZLR4).
- 3) Realizar estudo químico das substâncias sinalizadoras produzidas pela bactéria *Methylobacterium mesophilicum* incluindo variações em meios de cultura, sínteses, determinações de configuração absoluta e ensaios com cepa biosensora. Avaliar as atividades antimicrobianas das substâncias sintetizadas contra bactérias Gram-positivas endofíticas da laranja.
- 5) Caracterizar quimicamente a secreção de defesa do opilião *Hoplobunus mexicanus* (Arachnida: Opiliones), contribuindo para elucidar seu repertório de defesa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. Resultados e discussão

3.1. Determinação da configuração absoluta da (*S*)-*N*-heptanoil-HSL produzida por *Pantoea ananatis*.

Num trabalho anterior (Pomini *et al.*, 2006), nosso grupo de pesquisas relatou a ocorrência de três acil-HSLs nos caldos de cultivo da bactéria *Pantoea ananatis* CCT 6481. Os metabólitos identificados possuíam cadeias acila lateral com 6, 7 e 8 átomos de carbono, sendo que a (*S*)-*N*-hexanoil-HSL teve sua configuração absoluta estabelecida. As pequenas quantidades de *N*-heptanoil e *N*-octanoil-HSL produzidas impossibilitaram a determinação de suas configurações absolutas naquela época (Figura 13).

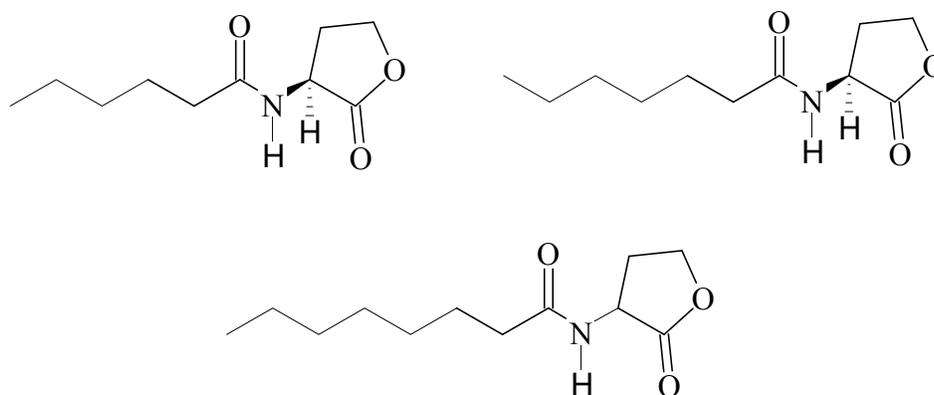


Figura 13. Acil-homoserina lactonas produzidas por *Pantoea ananatis* CCT 6481 (Pomini *et al.*, 2006).

A *N*-heptanoil-HSL é um produto natural de ocorrência restrita, e uma das poucas substâncias sinalizadoras que possuem uma cadeia acila lateral com número ímpar de átomos de carbono. O aumento no número de

microrganismos que produzem esta substância e o relato de outras substâncias sinalizadoras desta classe com característica similar nos estimularam a determinar a configuração absoluta deste metabólito.

Inicialmente, a bactéria *Pantoea ananatis* CCT 6481 foi cultivada em meio de cultivo caldo nutriente (6 litros). Após o crescimento bacteriano, as células foram removidas por centrifugação e o sobrenadante extraído com acetato de etila. O extrato obtido foi purificado por cromatografia em coluna e as frações reunidas por semelhança em cromatografia de camada delgada. A análise das frações reunidas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas permitiu identificar um sinal com padrão de fragmentação característico da *N*-heptanoil-HSL em frações que eluíram na polaridade diclorometano/acetato de etila 25% (Figura 14). A substância foi identificada por co-injeção e comparação do padrão de fragmentação por impacto eletrônico com o produto sintético (CG-EM) e também com o produto natural obtido do mesmo microrganismo num trabalho anterior (Pomini *et al.*, 2006).

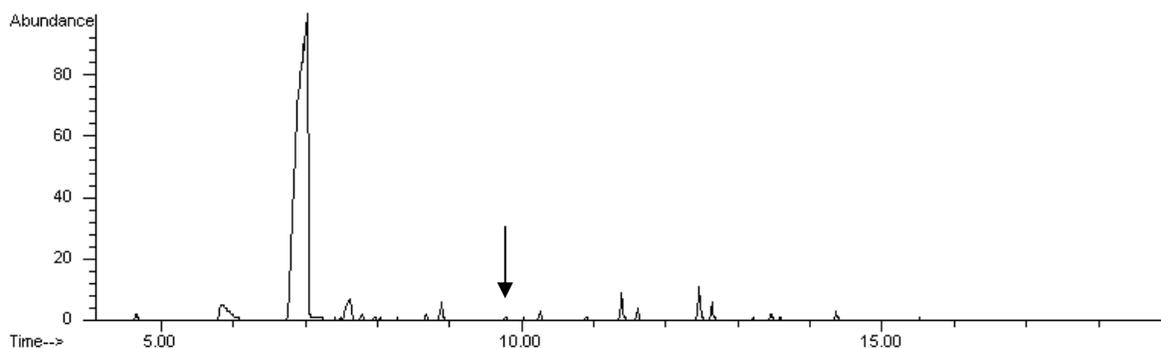


Figura 14. Cromatograma de íons totais da Fração M (4,8 mg) obtida do cultivo de *P. ananatis*. O pico cromatográfico correspondente à *N*-heptanoil-HSL está indicado.

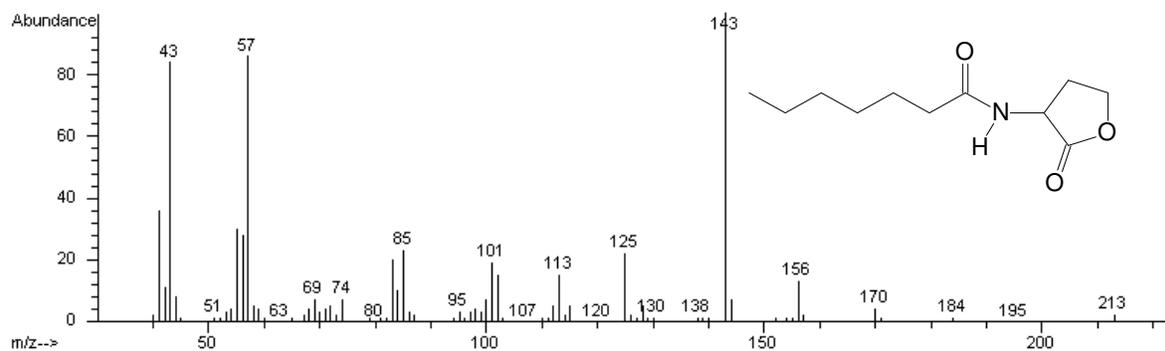
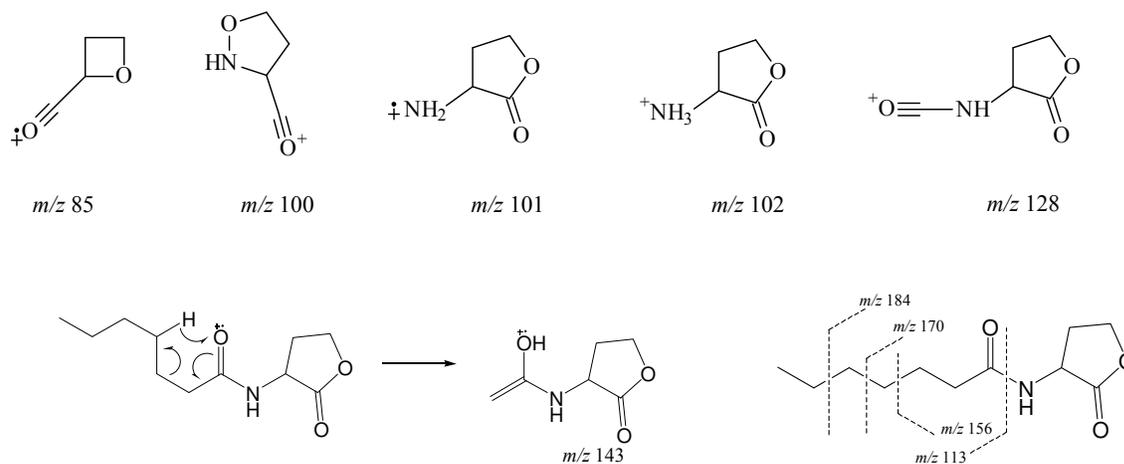


Figura 15. Espectro de massas da (S)-N-heptanoil-HSL produzida por *P. ananatis*.

O espectro de massas da N-heptanoil-HSL apresenta como pico base o íon de m/z 143, obtido pelo rearranjo de McLafferty envolvendo a carbonila da cadeia acila. O íon molecular aparece com pequena abundância em m/z 213. Outros fragmentos importantes são m/z 100, 101, 102 e 128 (Figura 15; Esquema 2).



Esquema 2. Proposta estrutural para alguns fragmentos característicos da N-heptanoil-HSL observados por CG-EM (IE, 70 eV).

A fração em que foi identificada a *N*-heptanoil-HSL foi submetida a um bioensaio com o repórter *Agrobacterium tumefaciens* NTL4(pZLR4). Entre diversos biossensores construídos para detectar acil-HSLs, o mutante *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) é um dos que possuem maior sensibilidade para acil-HSLs com diferentes comprimentos de cadeia acila e substituintes do tipo oxo e hidroxil (Cha *et al.*, 1998). Este bioensaio é interessante uma vez que ele se utiliza de um mecanismo biológico muito próximo ao naturalmente observado nos fenômenos de *quorum-sensing*.

A espécie *A. tumefaciens* selvagem produz a *N*-(3-oxo-octanoil)-HSL, que coordena a expressão de fatores de virulência deste fitopatógeno (Zhang *et al.*, 1993; Pierson III *et al.*, 1998). O mutante NTL4(pZLR4) é incapaz de produzir a substância sinalizadora pela supressão do gene que codifica a enzima TraI. Além disso, esta cepa recebeu um plasmídeo pTiC58 que contém uma fusão *traG::lacZ* e o gene *traR*. Assim, o gene *traR* codifica a síntese da proteína receptora TraR, que é capaz de se complexar à acil-HSLs exógenas. O complexo assim formado [TraR-(acil-HSL)] regula positivamente a expressão do gene *lacZ*, responsável pela síntese de uma enzima β -galactosidase capaz de degradar o reagente 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo adicionado ao meio (X-Gal). Assim, observa-se uma coloração azul no meio caso exista alguma acil-HSL em concentração suficiente para ativar o biossensor (Figura 16 e Esquema 3) (Ravn *et al.*, 2001; Cha *et al.*, 1998).

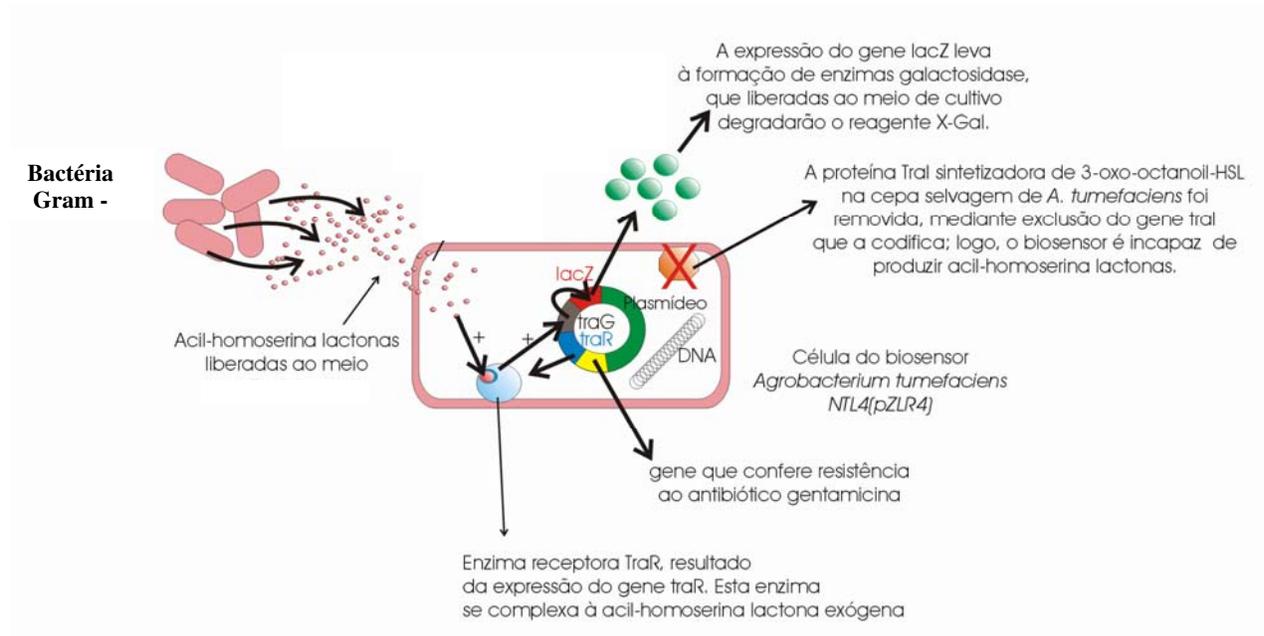
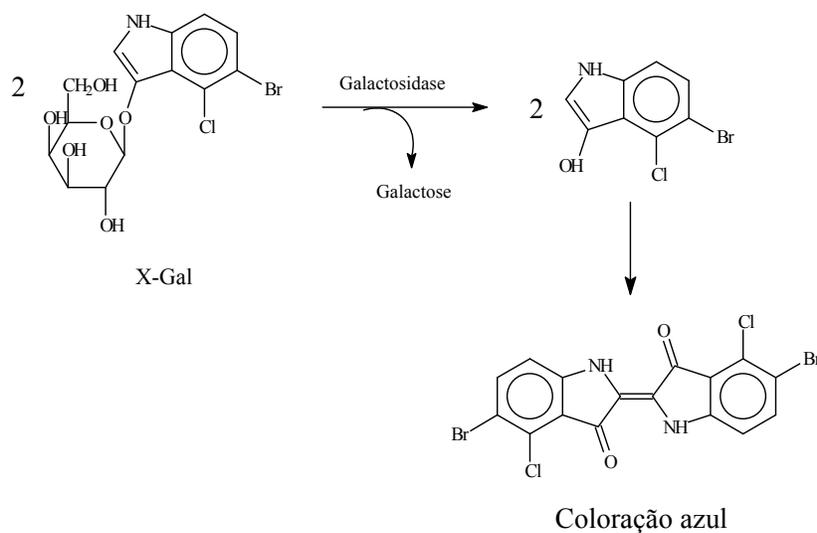


Figura 16. Mecanismo de atuação do biossensor *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4).



Esquema 3. Reação de degradação do reagente X-Gal e formação do derivado de índigo de coloração azul por ação da enzima β -galactosidase (Berg et al., 2002).

A fração M (4,8 mg) obtida do cultivo de 6 litros de *P. ananatis* contendo a *N*-heptanoil-HSL foi avaliada com este biosensor e mostrou atividade biológica positiva, conforme mostrado na Figura 17. Os produtos sintéticos (racemato e enantiômeros) também mostraram atividade biológica positiva. Estes produtos sintéticos foram obtidos pela reação entre ácido heptanóico e cloridrato ou bromidrato de (\pm) , (*R*) ou (*S*)- α -amino- γ -butirolactona em meio aquoso, mediada por cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida, mostrada no Esquema 4 (Pomini *et al.*, 2006).

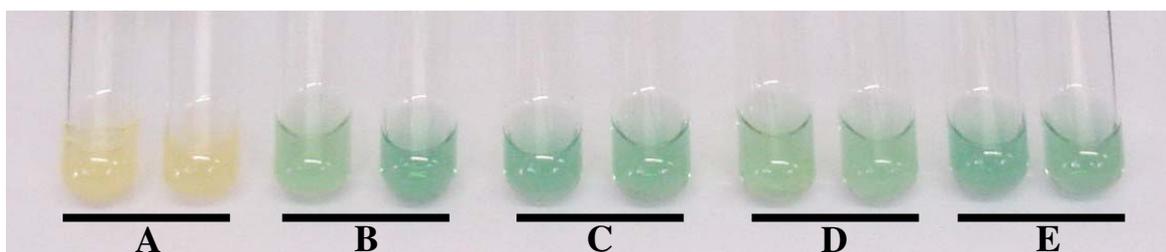
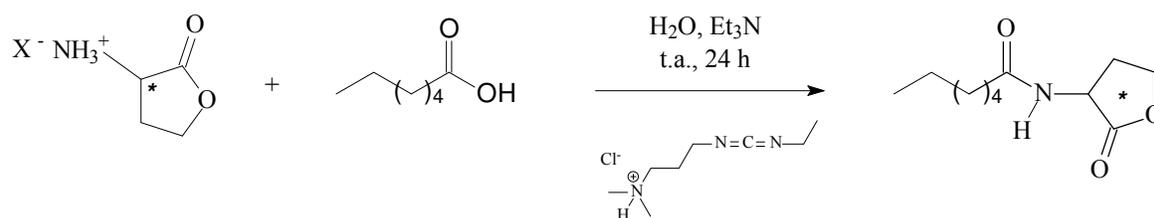


Figura 17. Avaliação da atividade biológica de produtos sintéticos e natural com o biossensor *Agrobacterium tumefaciens* NTL4(pZLR4). A. Etanol (branco); B. (*R*)-*N*-heptanoil-HSL sintético; C. (*S*)-*N*-heptanoil-HSL sintético; D. (\pm) -*N*-heptanoil-HSL sintético; E. Fração M do cultivo de *P. ananatis* CCT 6481.



Esquema 4. Esquema de síntese da *N*-heptanoil-HSL. $X = Br^-$ ou Cl^- ; * = racemato, *R* ou *S*. Rendimento: 64 %.

Como reportado na literatura, a configuração absoluta é de extrema importância para a atividade biológica das substâncias sinalizadoras. No primeiro trabalho químico reportando o isolamento de uma substância desta classe, demonstrou-se que a mistura racêmica (sintética) (\pm)-*N*-(3-oxo-hexanoil)-HSL era menos eficiente na ativação da bioluminescência na bactéria *Vibrio fischeri* que o produto natural, o que foi atribuído a uma possível atividade reduzida de um dos enantiômeros na mistura racêmica (Eberhard *et al.*, 1981). No estudo realizado com o fitopatógeno *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (ex *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*), demonstrou-se que a forma natural (*S*)-(-)-*N*-(3-oxo-hexanoil)-HSL é 90 % mais ativa na regulação da biossíntese do antibiótico carbapenem que o enantiômero (*R*)-(+) (Chhabra *et al.*, 1993). Desta forma, compreendemos a necessidade de determinar a configuração absoluta da *N*-heptanoil-HSL produzida por *P. ananatis*.

A pequena quantidade de *N*-heptanoil-HSL obtida dos cultivos de *P. ananatis* e sua presença em frações complexas não permitiu seu isolamento. Este metabólito foi encontrado com abundância relativa (CG-EM) de 1,4 % na fração FRAM (massa total de 4,8 mg), a mais pura obtida. Esta quantidade extremamente pequena de material requeria uma metodologia sensível o suficiente para determinar a configuração absoluta da substância. A metodologia escolhida foi a cromatografia em fase gasosa com detecção por ionização em chama e coluna com fase estacionária quiral da Chrompack (chirasil ciclodextrina CB). As condições analíticas foram otimizadas utilizando a mistura racêmica sintética [tempos de eluição de 60,87 min. e 61,05 min. para os enantiômeros (*R*) e (*S*) respectivamente]. A eluição do estereoisômero sintético (*S*)-(-)-*N*-heptanoil-HSL nas mesmas condições, forneceu o tempo de retenção de 61,06 min e o enantiômero (*R*) sintético eluiu

após 60,88 min. A análise da fração FRA M obtida do cultivo de *P. ananatis* mostrou um sinal com tempo de retenção (61,03 min) muito próximo do observado para o enantiômero (*S*) sintético. A co-injeção do produto natural FRAM com o produto racêmico sintético resultou numa perfeita sobreposição de sinais, com um incremento na abundância relativa do enantiômero (*S*) (61,03 min) em comparação com a do (*R*) (60,85 min). Desta forma, o produto natural foi identificado como a (*S*)-(-)-*N*-heptanoil-HSL com um excesso enantiomérico de 90 % (Figura 18).

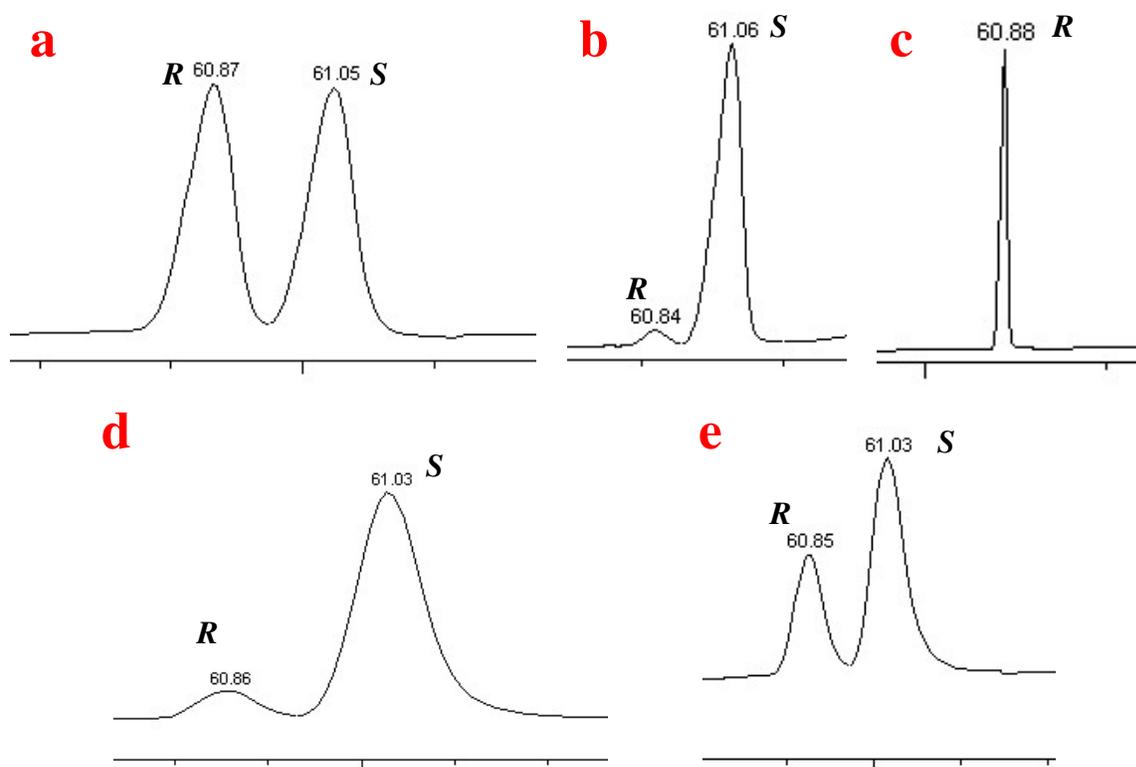


Figura 18. Cromatogramas obtidos por CG-FID e coluna com fase estacionária quiral Chrompack Chirasil. a. (\pm)-*N*-heptanoil-HSL sintética; b. (*S*)-*N*-heptanoil-HSL sintética; c. (*R*)-*N*-heptanoil-HSL sintética; d. Produto natural Fração M cultivo *P. ananatis*; e. Co-injeção Fração M e (\pm)-*N*-heptanoil-HSL sintética.

A utilização da metodologia CG-FID com fase estacionária quiral provou ser conveniente para a determinação da configuração absoluta da *N*-heptanoil-HSL, principalmente devido à pequena quantidade deste metabólito produzida pela bactéria.

Em todos os casos descritos na literatura, as acil-HSLs apresentaram centro estereogênico na porção lactônica com configuração absoluta (*S*). A bactéria *P. carotovorum* produz a (*S*)-(-)-*N*-(3-oxo-hexanoil)-HSL (Bainton *et al.*, 1992), a espécie *Sinorhizobium leguminosarum* sintetiza a *N*-[(3*R*)-hidroxi-(7*Z*)-tetradecenoil]-(*S*)-HSL (Schripsema *et al.*, 1996) e as bactérias *Erwinia psidii*, *Pantoea agglomerans* e *Pantoea ananatis* produzem respectivamente a (*S*)-*N*-hexanoil-HSL, a (*S*)-*N*-butanoil-HSL e a (*S*)-*N*-hexanoil-HSL como metabólitos sinalizadores majoritários (Pomini *et al.*, 2005; Pomini *et al.*, 2006; Pomini *et al.*, 2006).

A configuração absoluta (*S*) pode ser explicada analisando-se a provável origem biossintética destes metabólitos. Estudos realizados com a bactéria *Vibrio fischeri* possibilitaram a purificação da enzima *LuxI* responsável pela síntese de acil-HSLs nesta bactéria. Os substratos para a síntese de *N*-hexanoil-HSL são o hexanoil-ACP (*acyl carrier protein*, proteína carreadora de acila), que fornece a porção acila da molécula, e a *S*-adenosil metionina (SAM), cuja porção aminoácido é o bloco construtor da porção homosserina lactona no produto final (Schaefer *et al.*, 1996). Portanto, a origem da estereoquímica (*S*) no produto (*S*)-(-)-*N*-heptanoil-HSL poderia ser derivada da estereoquímica (*S*) da posição α -aminoácido na SAM.

Em vários casos reportados na literatura, a *N*-heptanoil-HSL ocorre em pequenas quantidades em microrganismos que produzem quantidades comparativamente grandes de *N*-hexanoil-HSL (Pomini *et al.*, 2005 e 2006; Lithgow *et al.*, 2000). O fato da (*S*)-*N*-heptanoil-HSL produzida por *P.*

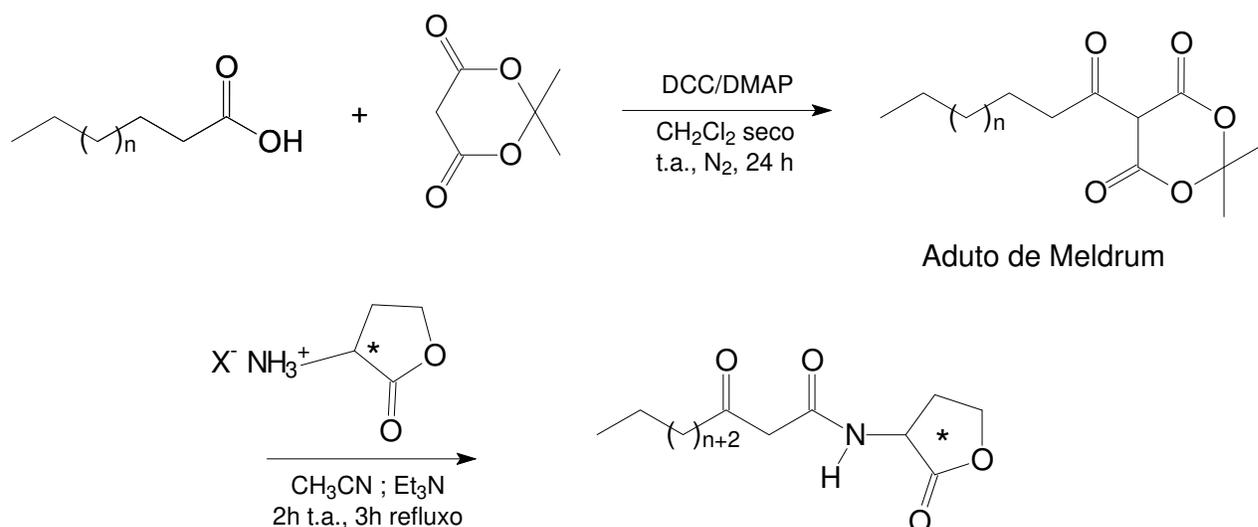
ananatis também possuir configuração absoluta (*S*) indica que ela provavelmente deve compartilhar do mesmo mecanismo de biossíntese das demais acil-HSLs, reforçando a idéia de que a sua produção ocorre devido à grande semelhança estrutural entre o heptanoil-ACP e o hexanoil-ACP, que são recebidos pelo sítio ativo da enzima homóloga de LuxI, sintetizadora das substâncias sinalizadoras em bactérias Gram-negativas. Esta hipótese já havia sido comentada por Ortori e colaboradores (2007). Um trabalho publicado por Horng e colaboradores (2002) relatou que o silenciamento do gene *cinI* leva à não produção de *N*-hexanoil, *N*-heptanoil e *N*-octanoil-HSL na espécie *Rhizobium leguminosarum*, sendo uma evidência importante de que estas substâncias são produzidas pela mesma proteína sintetizadora CinI. Desta forma, os resultados mostrados no presente trabalho corroboram sob o ponto de vista químico com outros dados e hipóteses publicadas na literatura.

3.2. A importância da configuração absoluta para a atividade antimicrobiana das acil-HSLs.

Apesar dos estudos realizados e da importância da atividade antimicrobiana de algumas acil-HSLs, não foi reportado na literatura nenhum ensaio comparativo das atividades biológicas dos enantiômeros e racematos destas substâncias.

Inicialmente, realizou-se a síntese de diferentes *N*-(3-oxo-acil)-HSLs, que reconhecidamente possuem maior atividade biológica em comparação com as substâncias sinalizadoras que não possuem carbonila na posição 3 da cadeia acila (Qazi et al., 2006). Sintetizou-se os enantiômeros *R*, *S* e o racemato de *N*-(3-oxo-octanoil), *N*-(3-oxo-dodecanoil) e *N*-(3-oxo-tetradecanoil)-HSL. A primeira reação da rota sintética consistiu na formação

de ligação carbono-carbono entre o reagente de Meldrum e o anidrido do ácido carboxílico, obtido *in situ* na presença de dicitlohexilcarbodiimida e do ácido carboxílico correspondente. A reação foi feita com diclorometano seco e sob atmosfera de nitrogênio. Em seguida, o aduto de Meldrum foi refluxado com o bromidrato ou cloridrato de (*S*), (*R*) ou (\pm)- α -amino- γ -butirolactona em acetonitrila, gerando uma 3-oxo-amida mediante ataque nucleofílico e descarboxilação do aduto de Meldrum (Chhabra *et al.*, 2003). A rota sintética é mostrada no esquema abaixo:



Esquema 5. Rota sintética para diversas *N*-(3-oxo-acil)-HSLs; $n = 1, 5$ ou 7 ;

$X = Br^-$ ou Cl^- ; * = racêmico, *R* ou *S*. Rendimentos globais, vide

Experimental.

Além das *N*-(3-oxoacil)-HSLs, a *N*-heptanoil-HSL também foi empregada nos bioensaios antimicrobianos. Os microrganismos *Bacillus subtilis* CCT 0089, *Bacillus cereus* CCT 4060 e *Staphylococcus aureus* CCT 1295 foram escolhidos para realizar os bioensaios preliminares para escolha

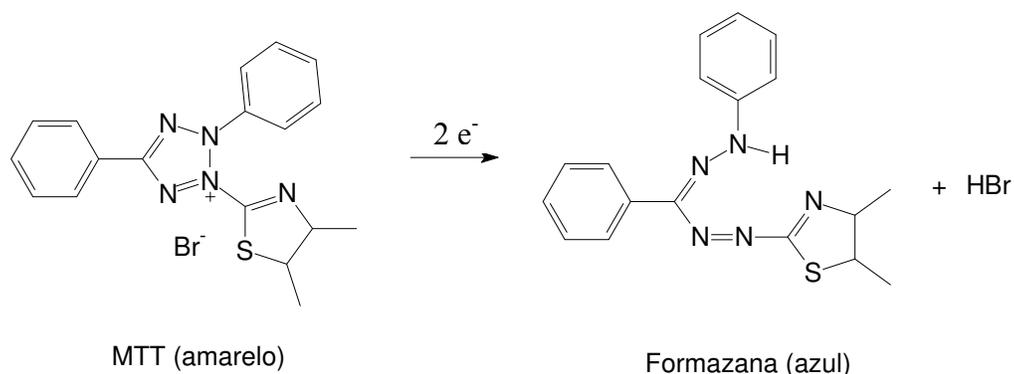
da substância mais ativa. Estas bactérias foram escolhidas por pertencerem ao grupo das Gram-positivas, que reconhecidamente são mais suscetíveis à ação antibacteriana das acil-HSLs (Kaufmann *et al.*, 2005).

O bioensaio preliminar consiste em submeter os microrganismos a diferentes concentrações da substância de interesse, através de diluições sucessivas em microplacas de 96 poços. O teste biológico é feito com a adição das substâncias ao meio de cultivo inoculado pelo microrganismo, seguido de incubação em BOD sob temperatura controlada. Após a incubação, a placa é “revelada” pela adição de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT). No caso de crescimento microbiano e na presença de processos respiratórios, o MTT sofre uma reação de redução levando a um produto com coloração roxa (Bicalho *et al.*, 2003). Ao contrário, quando o crescimento microbiano é inibido o reagente mantém sua coloração amarelada (Figura 19 e Esquema 6). Os testes são acompanhados pela realização de um branco com solvente e de um controle positivo com um antibiótico reconhecidamente ativo sobre os microrganismos em teste. Neste caso, o controle positivo foi feito com cloranfenicol.

Os resultados obtidos com os diferentes microrganismos e produtos sintéticos são esquematizados na Tabela 1.

De forma geral, o único microrganismo suscetível à *N*-heptanoil-HSL foi o *B. subtilis* em altas concentrações. As *N*-(3-oxo-acil)-HSLs apresentaram uma atividade biológica comparativamente maior do que no caso da *N*-heptanoil-HSL, o que concorda com a literatura onde cadeias acila laterais não oxigenadas conferem atividade antimicrobiana reduzida ou até mesmo não são ativos (Qazi *et al.*, 2005). A *N*-(3-oxo-octanoil)-HSL apresentou-se neste bioensaio como a substância com maior atividade antibacteriana. A atividade biológica observada para os produtos sintéticos é

consideravelmente menor do que aquela obtida com o antibiótico comercial (cloranfenicol).



Esquema 6. Reação de conversão do MTT amarelo (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) em produto de coloração roxo-azulado, na presença de microrganismos vivos (processos respiratórios).

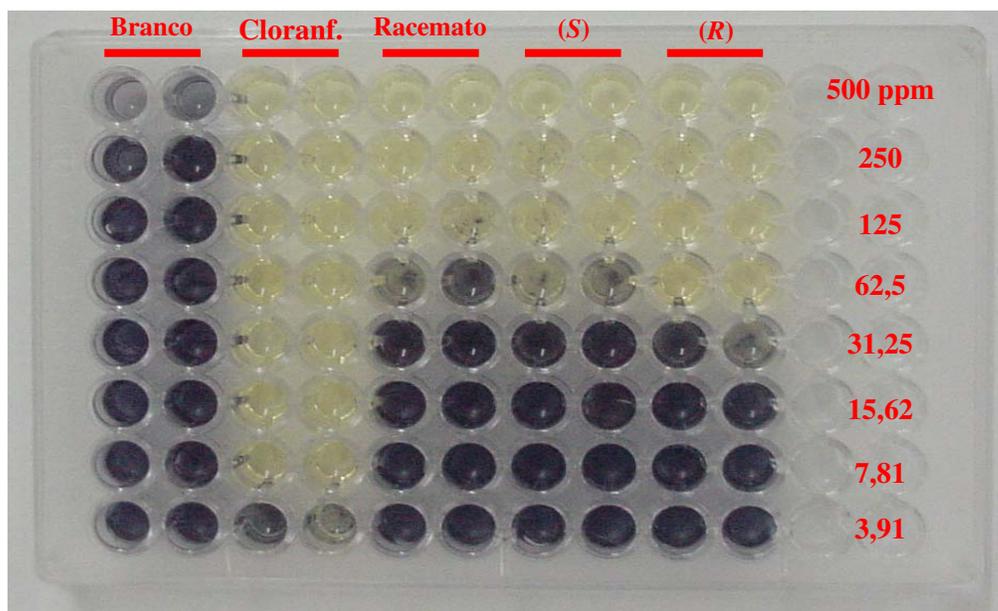


Figura 19. Exemplo de bioensaio preliminar com o microrganismo *Bacillus cereus* CCT 4060, utilizando racemato e enantiômeros puros de *N*-(3-oxo-octanoil)-HSL. As zonas de inibição do crescimento microbiano são visualizadas em amarelo. Branco água/DMSO 20% e controle positivo cloranfenicol.

Tabela 1. Resultados dos ensaios antimicrobianos preliminares sobre bactérias Gram-positivas.

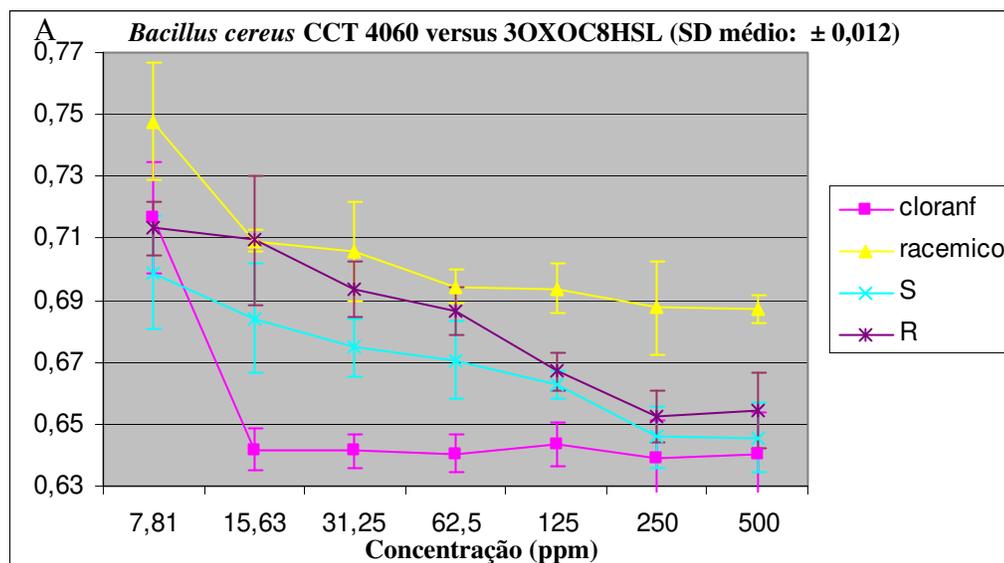
Soluções	Faixa de concentrações para inibição (ppm)		
	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
Água/DMSO 20 %	-	-	-
Cloranfenicol	15,62-3,91	3,91	31,25-7,81
<i>N</i> -heptanoil-HSL	-	500	-
<i>N</i> -(3-oxo-octanoil)-HSL	125-62,5	125-62,5	500
<i>N</i> -(3-oxo-dodecanoil)-HSL	500-125	250-125	500
<i>N</i> -(3-oxo-tetradecanoil)-HSL	500	500-250	500

(-) Inativo até a máxima concentração testada (500 ppm).

Os bioensaios preliminares foram importantes para averiguar a suscetibilidade de cada microrganismo e o potencial antimicrobiano de cada substância, antes de um estudo mais refinado. Desta forma, a *N*-(3-oxo-octanoil)-HSL e o microrganismo *B. cereus* foram escolhidos para realização de um ensaio quantitativo através da leitura da densidade ótica (DO a 650 nm) após incubação com os produtos sintéticos, permitindo assim uma visão mais apurada da importância da configuração absoluta para atividade antimicrobiana. Os resultados são mostrados na Figura 20.

Neste bioensaio, uma maior concentração de células é indicada por uma maior turbidez e maiores níveis de absorvância. A atividade antimicrobiana dos enantiômeros a 250 ppm foi comparável à do cloranfenicol a 15,63 ppm, mostrando mais uma vez que as acil-HSLs são consideravelmente menos ativas que o antibiótico comercial. Não foram observadas diferenças significativas entre as atividades dos enantiômeros (*R*) e (*S*), indicada pela sobreposição da faixa de desvio padrão dos valores de absorvância. Trata-se

de um resultado extremamente interessante, uma vez que até o momento não foram reportados na literatura microrganismos capazes de produzir o enantiômero (*R*) majoritariamente. O fato do enantiômero (*R*) ser tão ativo quanto o (*S*) pode indicar a presença de receptores específicos para este enantiômero. Outro dado importante averiguado é a menor atividade antimicrobiana do produto sintético racêmico comparada à dos enantiômeros (*R*) e (*S*).



A

Figura 20. Avaliação absorciométrica (650 nm) da atividade antimicrobiana de *N*-3-oxo-octanoil-HSL (racemato e enantiômeros) versus *B. cereus* CCT 4060. O branco foi feito com DMSO/H₂O ¼ com $A = 0,72 \pm 0,01$. Cada concentração foi avaliada em quadruplicata e o ensaio completo foi realizado em duplicata.

A explicação para estas observações ao nível molecular não é trivial, e depende de estudos complexos de bioquímica, com a perfeita caracterização dos possíveis receptores, genes e fatores fenotípicos influenciados pelas acil-HSLs. No entanto, acreditamos que estes resultados possam se encaixar num

modelo onde receptores distintos teriam afinidades seletivas para cada dos enantiômeros. Desta forma, a mistura racêmica seria a menos ativa pois um isômero seria diluído em 50 % pelo outro durante sua interação com o receptor. Isto explicaria o fato dos enantiômeros distintos apresentarem níveis superiores de atividade.

Nesta seção os estudos foram centrados em atividades antimicrobianas sobre bactérias que não produzem acil-HSLs, sendo que neste enfoque as acil-HSLs podem ser consideradas alomônios. Entretanto, existem estudos mostrando que o enantiômero (*R*) é muito menos ativo que o enantiômeros (*S*) quando estas moléculas atuam como feromônios. Um exemplo claro é a (*S*)-*N*-3-oxo-hexanoil-HSL produzida por *Pectobacterium carotovorum*, que é 90 % mais ativa que o enantiômero (*R*) no controle da expressão do antibiótico carbapenem por esta bactéria. Assim, observam-se grandes distinções na importância da configuração absoluta destas substâncias quando elas estão atuando como feromônios ou como alomônios (Chhabra *et al.*, 1993; Pomini *et al.*, 2008).

3.2.1. Estudo da interação da (*S*)-*N*-3-oxo-octanoil-HSL com células íntegras de *Agrobacterium tumefaciens* NTL4(pZLR4)

Atualmente, diversos estudos indicam que as acil-HSLs mantêm importantes relações com as membranas celulares das bactérias. Além de atravessarem as membranas por difusão para atingir o ambiente, os metabólitos sinalizadores também interagem com receptores presentes na membrana celular.

As interações com receptores de membrana são importantes no caso da atividade antimicrobiana das 3-oxo-acil-HSLs sobre bactérias Gram-positivas

(Kaufman *et al.*, 2005; Qazi *et al.*, 2006; Redfield *et al.*, 2001). A atividade antimicrobiana foi extensivamente estudada na bactéria *Staphylococcus aureus*, que não produz acil-HSLs. Estes estudos revelaram que importantes interferências no mecanismo de sinalização intercelular e expressão de fatores fenotípicos de *S. aureus* são observados na presença de 3-oxo-acil-HSLs. O mecanismo de quorum-sensing em *S. aureus* depende das atividades de proteínas associadas a membranas, e estudos indicam a presença de receptores específicos localizados na membrana celular capazes de detectar as 3-oxo-acil-HSLs (Qazi *et al.*, 2006).

Outro caso interessante é o da bactéria *Agrobacterium tumefaciens*, um fitopatógeno importante que induz o crescimento de tumores em plantas mediante transferência de DNA oncogênico de um plasmídeo para o núcleo do hospedeiro. Esta espécie emprega uma estratégia complexa para controlar o fenômeno de transferência conjugal do plasmídeo *Ti* entre os indivíduos, usando a (*S*)-*N*-(3-oxo-octanoil)-HSL como a principal substância sinalizadora (Zhang *et al.*, 1993). Num modelo proposto anteriormente na literatura, as unidades monoméricas da proteína receptora TraR se encontram na membrana celular interna e possuem a parte *N*-terminal protegida. Ao interagir com a substância sinalizadora a proteína receptora sofre dimerização e desprende-se desta membrana levando a acil-HSL na região hidrofóbica do dímero. Isto permite ao complexo TraR-(acil-HSL) viajar pelo citoplasma e encontrar as regiões específicas de interação com promotores no DNA, controlando a expressão gênica (Qin *et al.*, 2000).

Desta forma, fica claro que as interações de acil-HSLs com as membranas celulares são cruciais para suas atividades biológicas. Portanto, decidiu-se estudar a interação da (*S*)-*N*-(3-oxo-octanoil)-HSL com células íntegras de *Agrobacterium tumefaciens* NTL4(pZLR4) através de

experimentos de ressonância magnética nuclear via diferença de transferência de saturação (STD-NMR), mapeando os principais pontos de interações da substância com as células (Klein *et al.*, 1999; Mayer *et al.*, 1999; Carlomagno *et al.*, 2005). Esta cepa apresenta a vantagem de não produzir acil-HSLs, permitindo um melhor controle das condições experimentais. Este trabalho foi conduzido em colaboração com o doutorando Luíz Fernando Cabeça (IQ, Unicamp).

Os experimentos em RMN foram iniciados com a aquisição de um espectro de hidrogênio simples para a (*S*)-*N*-(3-oxo-octanoil)-HSL no sistema de solventes D₂O e DMSO-d₆ (20%, 600 μL), visando determinar os deslocamentos químicos para a substância neste sistema de solventes. O espectro é mostrado na Figura 21.

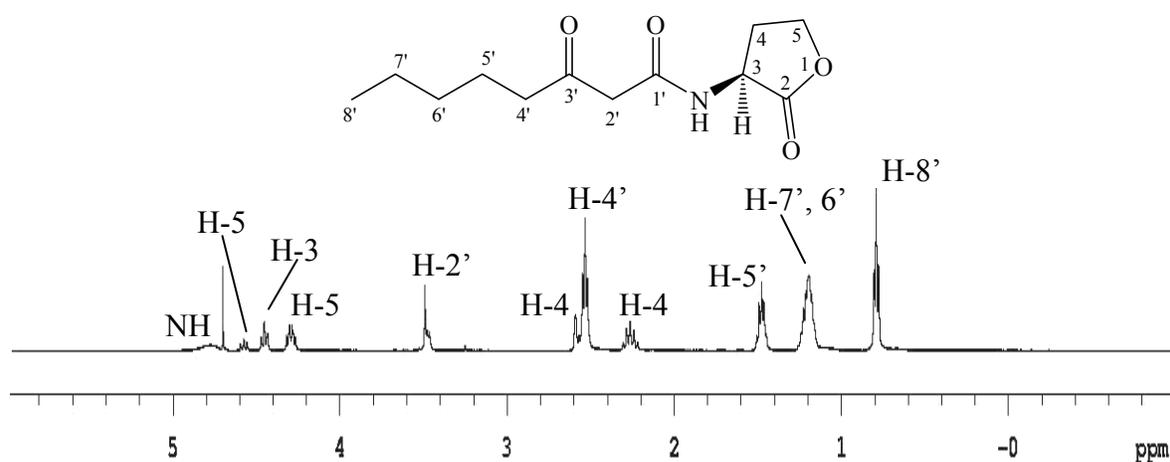


Figura 21. Atribuição dos deslocamentos químicos em RMN de ¹H para a (*S*)-*N*-3-oxo-octanoil-HSL(499.89 MHz, D₂O/DMSO-d₆ 20%/ref H₂O residual 4.70 ppm, 25°C e pH=7).

Uma vez determinados os deslocamentos químicos para esta molécula, realizou-se a análise de STD com a (*S*)-*N*-(3-oxo-octanoil)-HSL na presença de β -CD e células íntegras de *Agrobacterium tumefaciens* NTL4(pZLR4). Vale ressaltar que a (*S*)-*N*-(3-oxo-octanoil)-HSL é produzida por células selvagens de *A. tumefaciens*, como descrito acima, constituindo-se portando um estudo de caso.

A técnica de STD consiste no estudo da interação de uma macromolécula ou até mesmo uma célula com uma substância de baixa massa molecular baseando-se no equilíbrio estabelecido entre estas moléculas. Ao irradiar a macromolécula com um pulso de radiofrequência, a energia difunde-se através dos átomos de hidrogênio desta por efeito NOE (difusão de spin), até atingir a região de interação com a molécula de baixa massa molecular, ocorrendo a transferência de magnetização intermolecular através de um processo conhecido como relaxação cruzada (Figura 22). A transferência de magnetização é proporcional ao grau de interação de cada região do metabólito secundário com a macromolécula, permitindo portanto estabelecer o mapa de epitopo de interações (Mayer *et al.*, 1999).

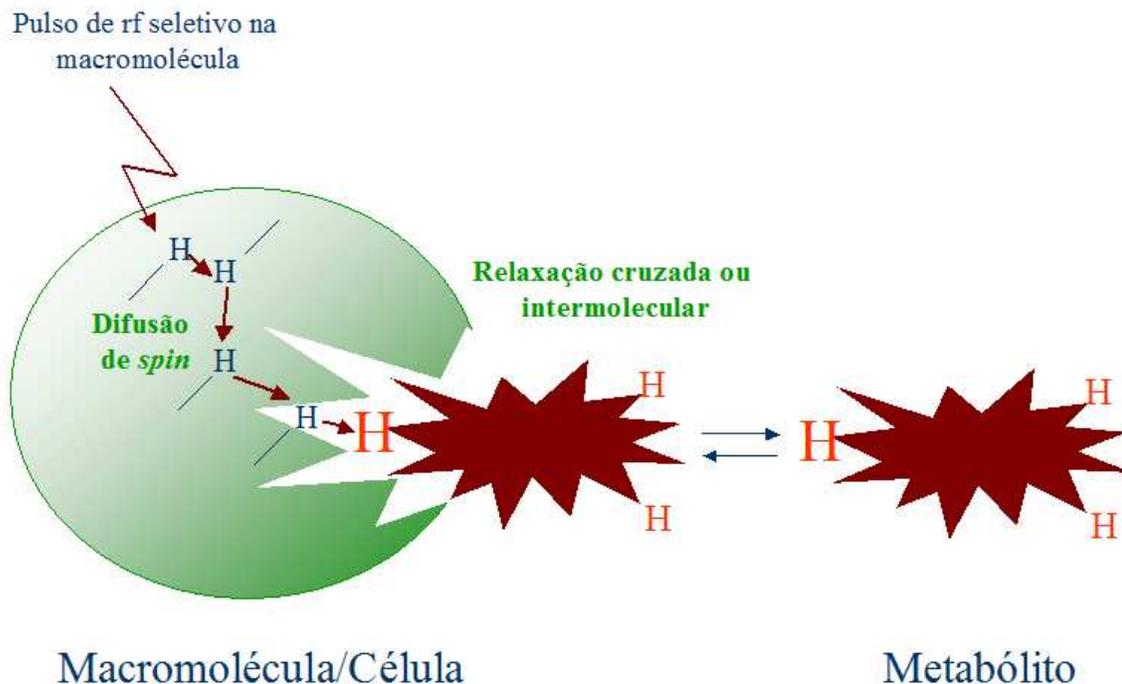


Figura 22. Princípio da técnica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio com diferença de transferência de saturação.

A Figura 23 mostra o grau de interação de cada região da molécula de (*S*)-*N*-(3-oxo-octanoil)-HSL com as células íntegras da bactéria. Através do mapa de epitopo verifica-se que a cadeia acila hidrofóbica é extremamente importante para esta interação. Portanto, a grande afinidade das células pelas porções hidrofóbicas da molécula corrobora com a literatura onde está reportado que acil-HSLs de cadeia curta penetram nas células de bactérias Gram-negativas através de difusão pela membrana celular (Pearson *et al.*, 1999).

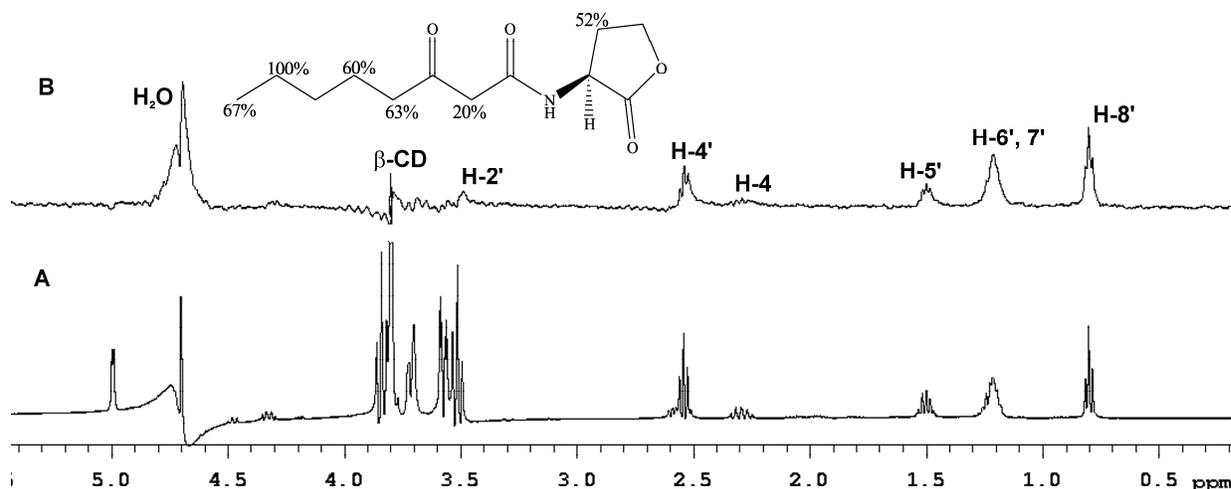


Figura 23. A. Espectro de RMN de ^1H (499,886 MHz, D_2O /ref. residual H_2O 4,70 ppm, 600 μL total) da mistura de (*S*)-*N*-(3-oxo-octanoil)-HSL (10 mM), β -CD (10 mM) e células de *Agrobacterium tumefaciens* NTL4(pZLR4) (15 mg/mL). A) Espectro de STD off-resonance (pulso rf em 30 ppm). B) Espectro de STD on-resonance (pulso rf em -0,5 ppm). Acima: Estrutura da (*S*)-*N*-(3-oxo-octanoil)-HSL e o grau relativo de transferência de saturação dos prótons individuais, normalizados em relação a $\text{H-7}'$.

Com o intuito de melhor compreender estas interações, decidiu-se aprofundar o estudo utilizando lipossomas como modelos de membranas celulares. Assim como as membranas celulares, os lipossomas são estruturas lipídicas organizadas em bi-camadas. Neste caso, os lipossomas foram obtidos a partir da fosfatidil-colina de ovo disponível comercialmente, e as bicamadas foram geradas através de um procedimento de suspensão em solvente e extrusão (Cereda *et al.*, 2004).

Desta forma, obteve-se o espectro de RMN de ^1H da (*S*)-*N*-3-oxo-octanoil-HSL após adição dos lipossomas (Figura 24). Observou-se neste caso uma tendência dos sinais do metabólito secundário perderem suas

multiplicidades (tripletos, multipletos) se transformando em singletos largos. Este fenômeno já é um indicativo de interação do metabólito com o lipossoma.

Finalmente, o espectro de STD foi obtido mediante pulsos de radiofrequência sobre o lipossoma, com transferência de magnetização para a acil-HSLs mediante efeito NOE (Figura 24). O espectro STD indicou que a transferência de saturação ocorreu apenas à moléculas de (*S*)-*N*-(3-oxo-octanoil)-HSL ligadas ao lipossoma com uma velocidade que depende da mobilidade do lipossoma, do tempo de meia vida e da geometria do complexo (*S*)-*N*-(3-oxo-octanoil)-HSL-lipossoma. Os valores de saturação de cada hidrogênio foram calculados através da determinação das intensidades individuais no espectro de STD (I_{STD}) e no espectro de referência (I_0) (Meyer *et al.*, 2003).

O mapa de epitopo revelou que a cauda hidrofóbica entre H-4' e H-8' da (*S*)-*N*-3-oxo-octanoil-HSL é o ponto mais importante de ancoramento da substância aos lipossomas. Por outro lado, os hidrogênios pertencentes à porção lactona da molécula interagiram fracamente, reforçando a importância da cauda hidrofóbica na interação (Figura 24). Estes resultados são muito semelhantes aos obtidos com células íntegras de *A. tumefaciens* mutante, confirmando portanto as suspeitas de interação do metabólito com a membrana celular externa da bactéria.

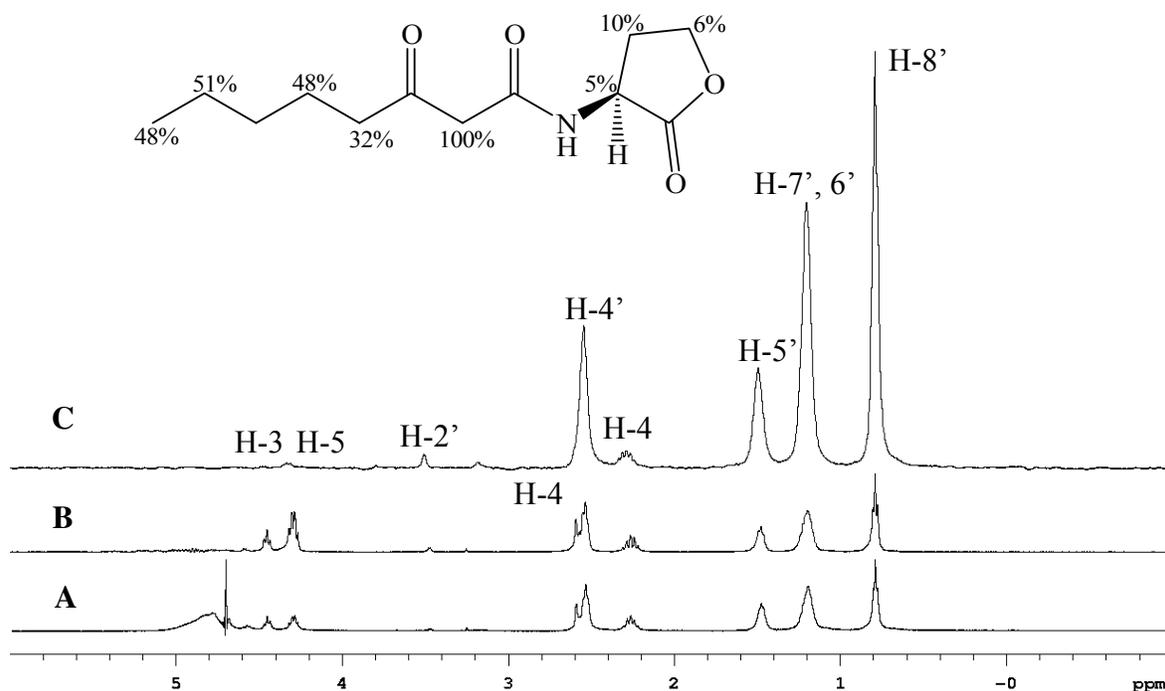


Figura 24. A) Espectro de RMN de ^1H de uma suspensão de lipossomas (5 mmol L^{-1} ; EPC 400 nm) (499.89 MHz , $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO}_d_6$ 20% /ref residual H_2O 4.70 ppm) na presença de (*S*)-*N*-(3-oxo-octanoil)-HSL (10 mmol L^{-1}). B) Espectro de STD off-resonance (pulso rf em 30 ppm). C) Espectro de STD on-resonance, 298 K, pH=7 (pulso rf em $-0,5 \text{ ppm}$). Acima: estrutura da (*S*)-*N*-(3-oxo-octanoil)-HSL; o grau relativo de interação dos hidrogênios individuais foi normalizado em relação ao H-2'.

Durante os experimentos com as células íntegras de *A. tumefaciens* mutante ou ainda com os lipossomas a solubilização da (*S*)-*N*-(3-oxo-octanoil)-HSL em D_2O era difícil nas concentrações utilizadas, mesmo na presença de $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, requerendo muitas vezes o uso de ultrassom e longos tempos de agitação. Desta forma, realizou-se a adição de β -cyclodextrina (β -CD) nestes sistemas, uma vez que esta substância é muito utilizada em preparações farmacêuticas visando melhorar a solubilidade de substâncias

apolares em meio aquoso. Afortunadamente, a substância se dissolveu muito bem no sistema de solvents quando a β -CD foi adicionada. Um espectro de RMN de ^1H simples foi obtido após adição do açúcar ao meio (Figura 25). A β -ciclodextrina apresentou sinais na faixa entre 3,4 e 3,9 ppm, sobrepondo-se com o sinal do H-2' da (*S*)-*N*-3-oxo-octanoil-HSL.

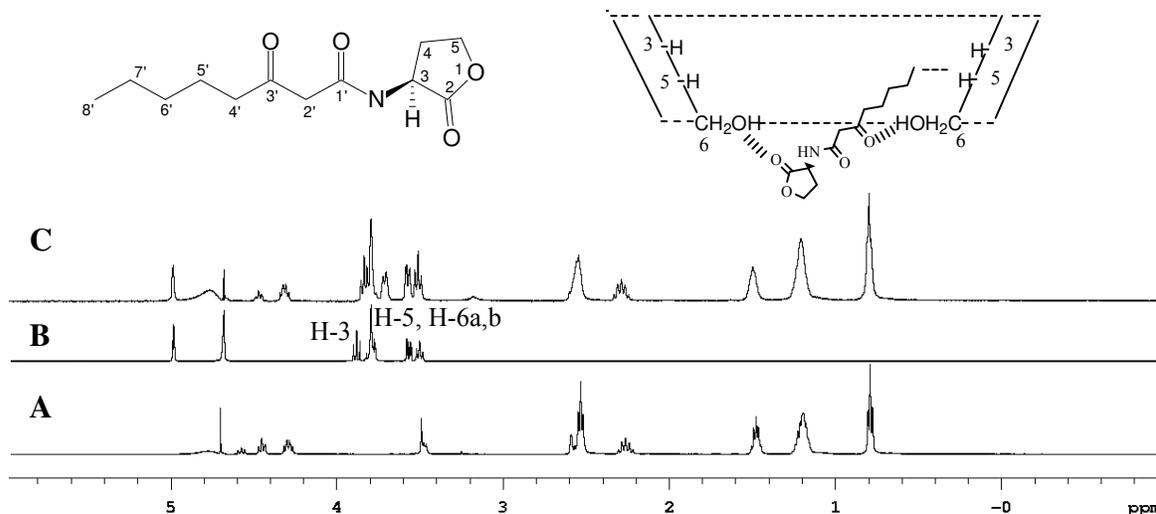


Figura 25. A) Espectro de RMN de ^1H (499,89 MHz, D_2O /ref. residual H_2O 4.70 ppm) da (*S*)-*N*-(3-oxo-octanoil)-HSL (10 mmol L^{-1}); B) β -CD (10 mmol L^{-1}) e C) mistura de (*S*)-*N*-(3-oxo-octanoil)-HSL e β -CD a 298 K and pH=7. Acima: sugestão para o complexo entre (*S*)-*N*-(3-oxo-octanoil)-HSL/ β -CD.

O espectro de RMN de ^1H ROE não revelou nenhuma interação entre os hidrogênios da acil-HSL e a β -CD quando o sinal dos hidrogênios H-3' da β -CD foram irradiados seletivamente em 3,84 ppm. Entretanto, um pequeno incremento Overhauser foi observada para a metila terminal da acil-HSL quando o os hidrogênios H-5' da β -CD foram irradiados em 3,71 ppm. Desta forma, levantou-se a hipótese de que ligações de hidrogênio entre as

carbonilas da acil-HSL e os grupos hidroxila da borda da β -CD sejam as principais forças de interação intermoleculares, enquanto que a cadeia acila lateral da acil-HSL entra no anel ciclodextrina e interage com os hidrogênios H-5', de acordo com o modelo proposto na Figura 25. Este modelo é corroborado pela alteração do deslocamento químico do H-5' da β -CD na presença da acil-HSL, passando de 3,81 para 3,71 ppm, um indicativo de interação das moléculas em solução (Figura 25).

Após a adição de lipossomas, obteve-se uma solução ternária entre acil-HSL, lipossomas e β -ciclodextrina que foi submetida à análises por STD. Interessantemente, observou-se um aumento expressivo na taxa de interação entre a acil-HSL e os lipossomas, como pode ser visto pelo incremento geral de porcentagens de interação no espectro de STD (Figura 26). Assim, demonstrou-se que as moléculas de β -ciclodextrina podem ser eficientes carreadoras para acil-HSLs, uma vez que ela é capaz de aumentar sua solubilidade em meio aquoso e entregar as moléculas ao lipossoma com grande eficiência.

Em conclusão, observou-se importantes interações entre a acil-HSL e as células, principalmente na porção hidrofóbica da molécula. Desta forma, é compreensível porquê a natureza escolheu estas moléculas lipofílicas como sinalizadores, uma vez que elas atuam principalmente em receptores localizados na membrana celular. Os lipossomas foram um modelo extremamente importante para demonstrar as interações destas substâncias ao nível de membrana. Também é interessante notar que a β -CD pode constituir um importante carreador de 3-oxo-acil-HSLs para lipossomas, uma vez que sua capacidade de entrega foi claramente demonstrada nos espectros de RMN em concentrações equimolares. Isto abre uma importante porta, uma vez que o

sistema lipossomas/ β -CD poderia ser utilizado como carreador de acil-HSLs em aplicações médicas e biotecnológicas. Além disso, trata-se do primeiro estudo de STD para um sistema célula/acil-HSL, contribuindo com os mapas de epitopo mostrando interações relevantes, que poderão ser extremamente úteis no futuro em estudos de projeto e síntese de antagonistas dos mecanismos de sinalização intercelular.

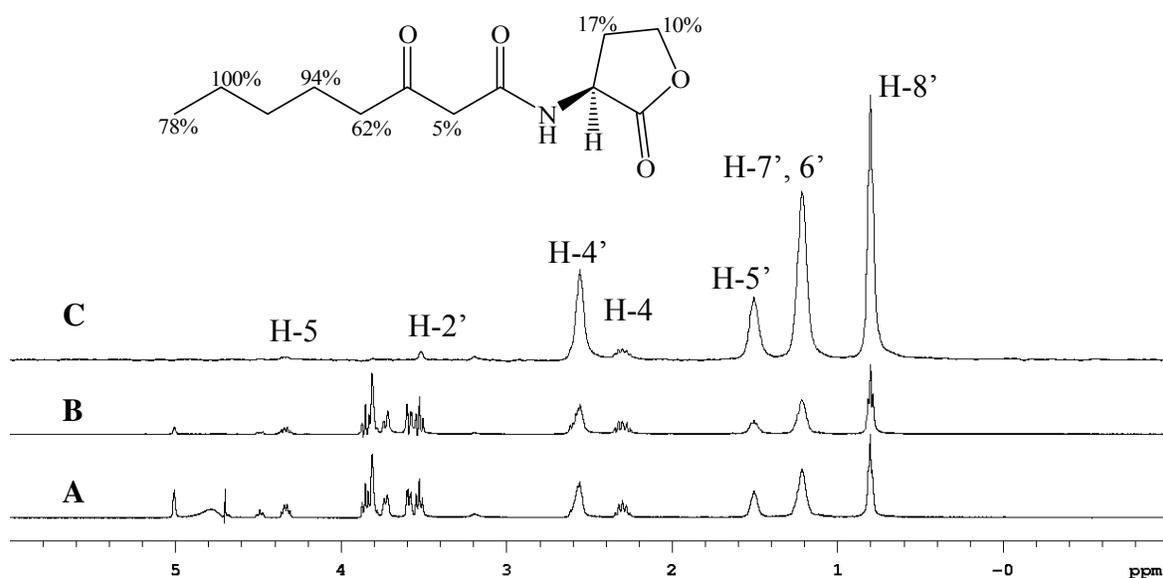


Figura 26. A) Espectro de RMN de ^1H da mistura de (S)-N-(3-oxo-octanoil)-HSL, β -CD e lipossomas (EPC, 400 nm) (499.886 MHz, D_2O /ref. residual H_2O 4.70 ppm). B) Espectro de STD off-resonance (pulso rf em 30 ppm). C) Espectro STD on-resonance (pulso rf em -0,5 ppm). Acima: grau de interação de cada hidrogênio da (S)-N-(3-oxo-octanoil)-HSL com lipossomas normalizados em relação a H-7'.

3.3. Estudo químico das acil-homosserina lactonas produzidas por *Methylobacterium mesophilicum* SR 1.6/6

A alta prevalência de bactérias do gênero *Methylobacterium* sobre outras bactérias Gram-positivas endofíticas em laranjeiras atacadas pela doença da clorose variegada dos citros levou nosso grupo de pesquisas a supor que a bactéria *M. mesophilicum* SSR 1.6/6 produza acil-HSLs. Isto, aliado aos relatos de atividades antimicrobianas dessas substâncias, estimulou-nos a caracterizar as acil-HSLs produzidas por esta cepa e avaliá-las sobre bactérias endofíticas Gram-positivas da laranjeira.

3.3.1. Estudos preliminares – extrato semi-purificado

A bactéria *M. mesophilicum* é capaz de crescer em meios de cultura simples, contendo sais minerais e metanol como única fonte de carbono (meio CHOI3). Os meios de constituição química definida apresentam como principal vantagem a ausência de interferentes químicos que poderiam dificultar a caracterização dos metabólitos sinalizadores produzidos pela bactéria.

Inicialmente realizou-se um estudo preliminar dos extratos de *M. mesophilicum* obtidos a partir de 5 litros do meio de cultivo da bactéria. Os inóculos da bactéria *M. mesophilicum* foram preparados em tubos de ensaio contendo meio CHOI3, incubados durante 4 dias. Os inóculos foram adicionados a erlenmeyers contendo 1 L de meio CHOI3, que foram incubados durante cinco dias sob agitação. O crescimento da bactéria na forma de grumos pegajosos facilitou o processo de remoção das células do meio de cultura, que pode ser feito por filtração à pressão atmosférica com papel de

filtro comum. Os metabólitos de interesse foram extraídos do meio de cultura com acetato de etila previamente destilado. Obteve-se uma quantidade pequena de extrato (16,6 mg).

A purificação rápida do extrato acetato de etila em coluna de sílica gel, forneceu uma fração de 8,0 mg com resposta positiva no teste com o biossensor *Agrobacterium tumefaciens* NTL4(pZLR4) (descrito anteriormente) o qual é sensível à presença de substâncias com atividade sinalizadora em bactérias (Figura 27), estimulando assim um estudo químico mais aprofundado.

A fração acetato de etila do cultivo de *M. mesophilicum* foi analisada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. A análise dos espectros de massas conduziu à identificação prévia de diversas acil-HSLs, sendo cinco em quantidades traços e três majoritárias.

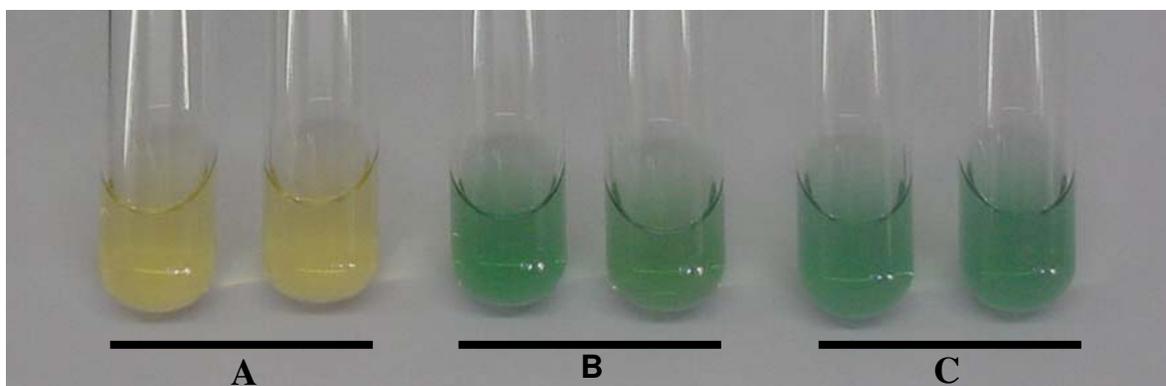


Figura 27. Avaliação da atividade biológica de comunicação bacteriana com o biossensor *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4). A. Etanol (branco); B. (S)-N-3-(*oxo-octanoil*)-HSL sintética (controle positivo); C. Fração acetato de etila cultivo *M. mesophilicum*.

O espectro de massas da (S)-N-dodecanoil-HSL (Figura 28, pico 1) apresentou o pico do íon molecular em m/z 283 e um padrão de fragmentação

característico de acil-HSLs com cadeias laterais não substituídas, com o pico base em m/z 143 resultante do rearranjo de McLafferty da carbonila da cadeia acila (Pomini *et al.*, 2006; Chhabra *et al.*, 1993). Identificou-se ainda um pico (Figura 28, pico 2) com íon molecular em m/z 281 e padrão de fragmentação distinto à da *N*-dodecanoil-HSL. A diferença de duas unidades de massa atômica levou-nos à assinalar esta substância como sendo a (*S*)-*N*-(2*E*)-dodecenoil-HSL. A pequena abundância relativa do íon m/z 143 (25%) se comparado aos homólogos saturados é um indicativo de que a insaturação está conjugada à carbonila, estabilizando-a energeticamente e tornando o rearranjo de McLafferty menos favorável (Figura 29 A).

O pico 3 também apresentou um padrão de fragmentação característico de acil-HSLs não substituídas, com íon molecular em m/z 297, sendo assinalado tentativamente como a *N*-tridecanoil-HSL, portanto com uma cadeia acila lateral com número ímpar de átomos de carbono. Existem apenas dois relatos na literatura reportando a ocorrência da *N*-tridecanoil-HSL nos caldos de cultivo de uma bactéria marinha e a partir do extrato da bactéria *Yersinia pseudotuberculosis*, sempre em quantidades traço (Ortori *et al.*, 2007; Wagner-Döbler *et al.*, 2005).

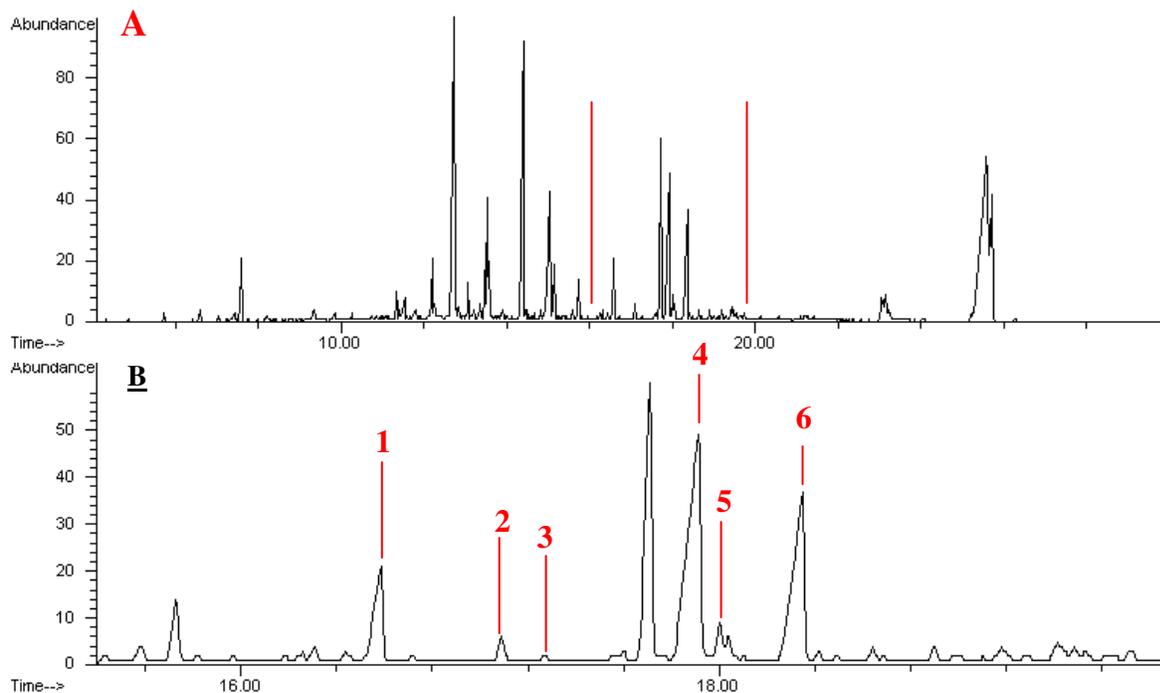


Figura 28. A. Cromatograma de íons totais (CG-EM) da fração acetato de etila do cultivo de *M. mesophilicum*. B. região entre 15,5-19,3 min, onde apareceram as acil-HSLs. Identificação: 1. (S)-N-dodecanoil-HSL; 2. (S)-N-(2E)-dodecenoil-HSL; 3. N-tridecanoil-HSL; 4. (S)-N-(7Z)-tetradecenoil-HSL; 5. (S)-N-tetradecanoil-HSL; 6. (S)-N-(2E, 7Z)-tetradecadienil-HSL.

A acil-HSL majoritária (Figura 28, pico 4) apresentou o íon molecular m/z 309 e foi sucedida por um pico de pequena abundância relativa (Figura 28, pico 5), com o espectro de massas apresentando o íon molecular em m/z 311. Estas substâncias foram assinaladas como sendo a (S)-N-(7Z)-tetradecenoil e (S)-N-tetradecanoil-HSL, respectivamente. O pico 6, umas das acil-HSLs majoritárias, trata-se da (S)-N-(2E,7Z)-tetradecadienil-HSL, com íon molecular em m/z 307. Esta substância também apresentou o fragmento m/z 143 menos abundante que os homólogos saturados por possuir uma carbonila conjugada (Figura 30 C).

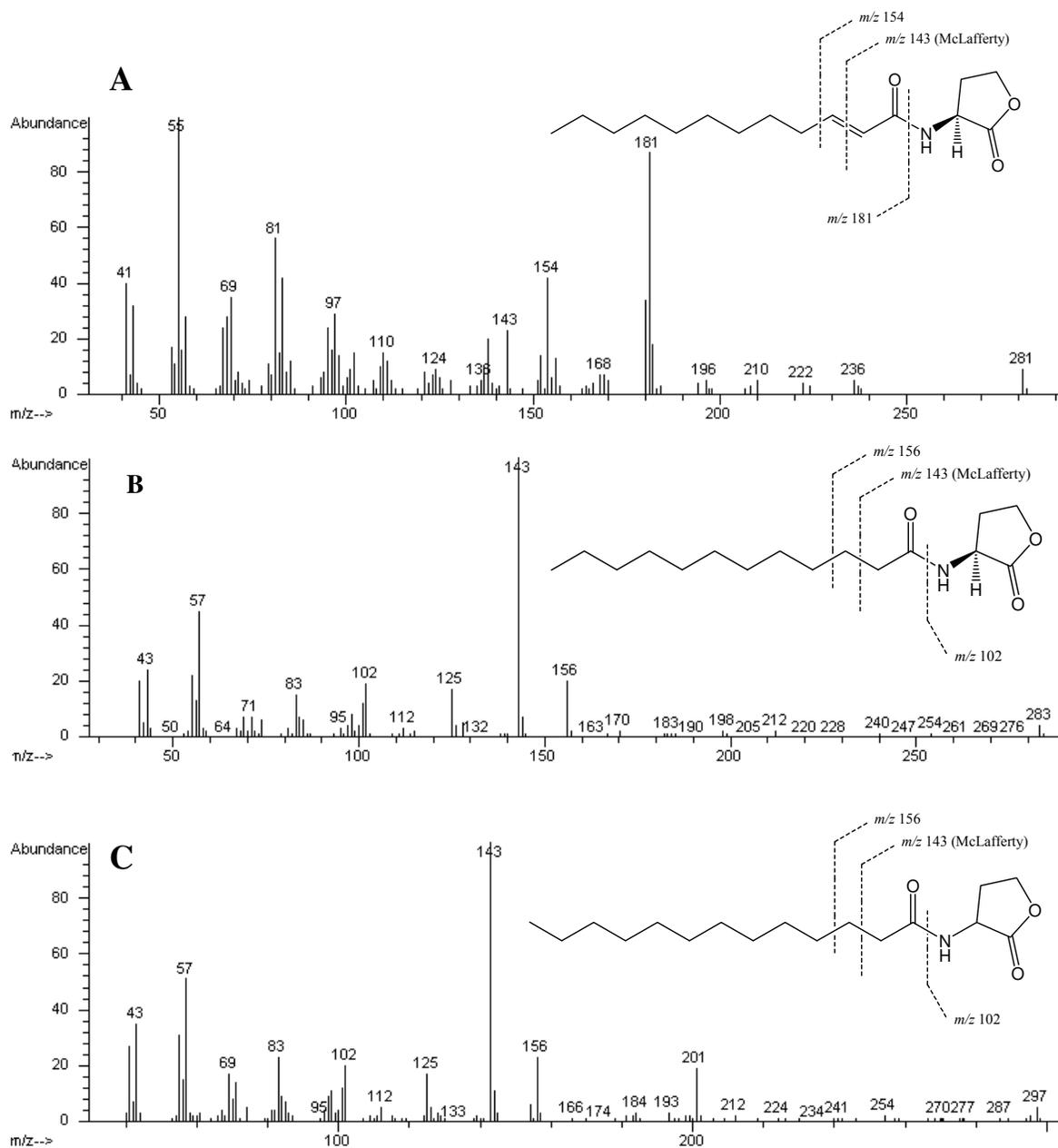


Figura 29. Espectros de massas da A. (S)-N-(2E)-dodecenoil-HSL, B. (S)-N-dodecanoil-HSL e C. N-tridecanoil-HSL.

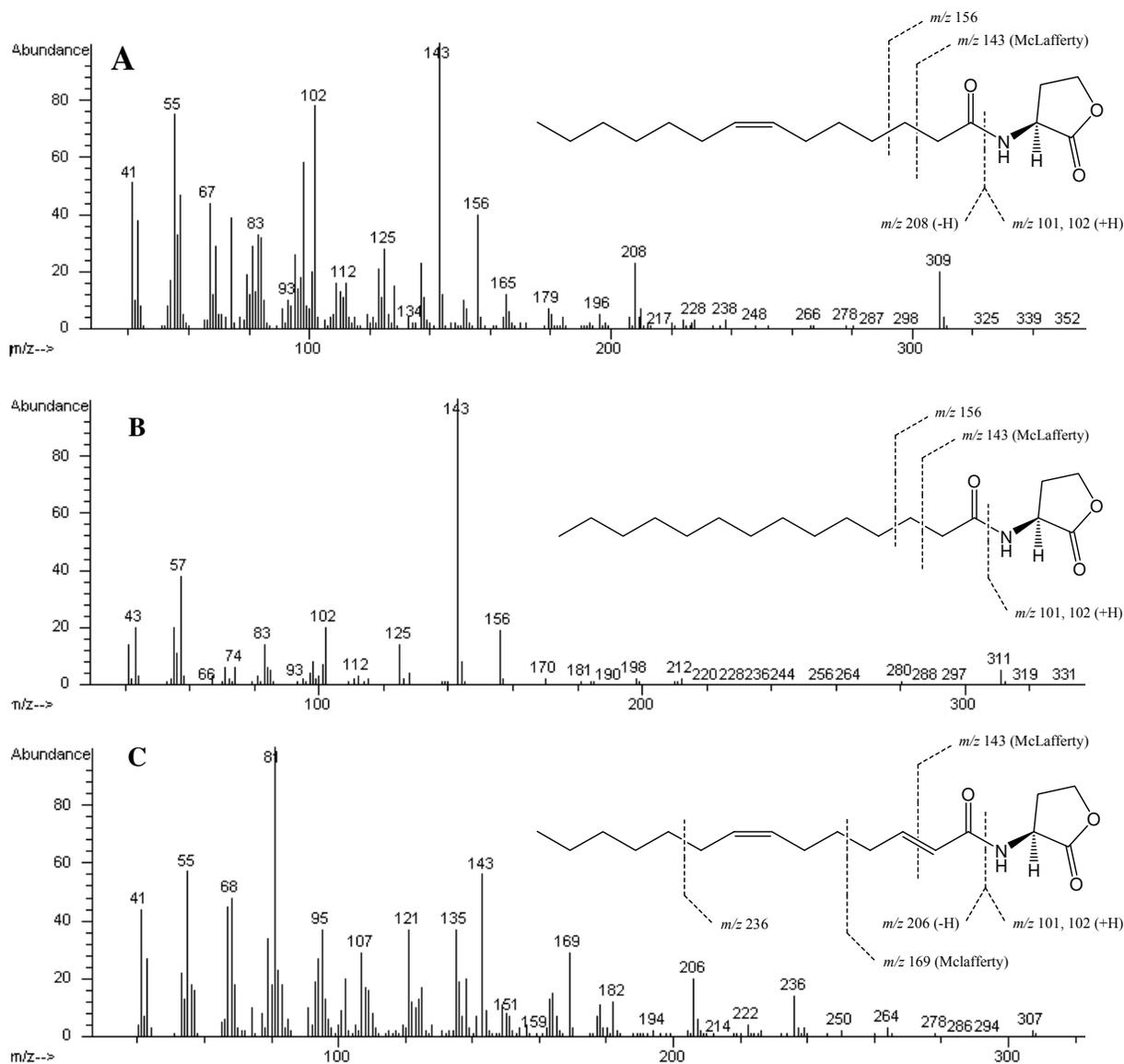


Figura 30. Espectros de massas da A. (S)-N-(7Z)-tetradecenoil-HSL; B. (S)-N-tetradecanoil-HSL; C. (S)-N-(2E,7Z)-tetradecadienil-HSL.

Como mostrado acima, as acil-HSLs estavam presentes em uma fração complexa e de massa reduzida (8,0 mg) dificultando o isolamento e a caracterização estrutural de todas estas substâncias por ressonância magnética nuclear e espectroscopia no infravermelho. Decidiu-se, portanto, realizar a caracterização destes metabólitos por CG-EM, utilizando derivados obtidos

por reações em micro-escala e comparação do comportamento cromatográfico e de fragmentação com padrões sintéticos.

3.3.1.1. Principais técnicas utilizadas nas caracterizações estruturais

Basicamente, foram identificadas seis acil-HSLs nos caldos de cultivo de *M. mesophilicum* (Figura 31).

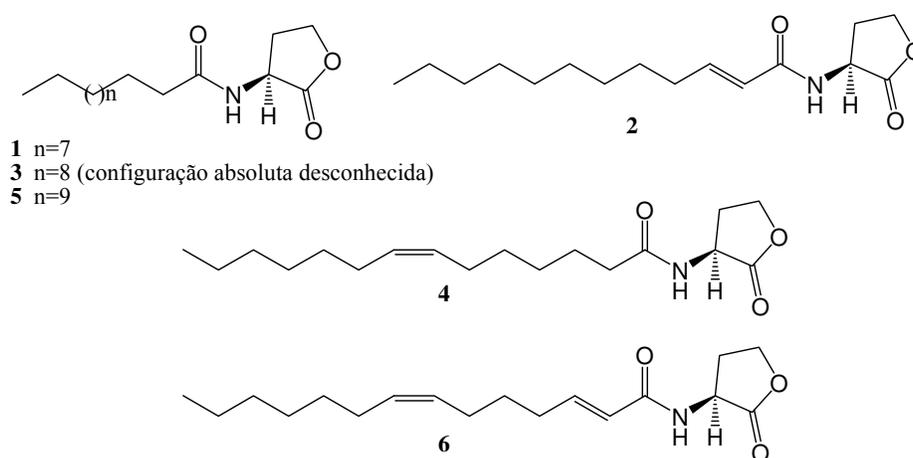


Figura 31. Acil-HSLs identificadas nos caldos de cultivo da bactéria *M. mesophilicum*.

Nos próximos tópicos serão discutidos em detalhes os meandros que levaram à caracterização estrutural dos metabólitos secundários identificados. A seguir, listamos os principais procedimentos empregados:

- Posições de insaturações: derivatização das acil-HSLs naturais com dimetil-dissulfeto e iodo e análise dos derivados por espectrometria de massas (impacto eletrônico).

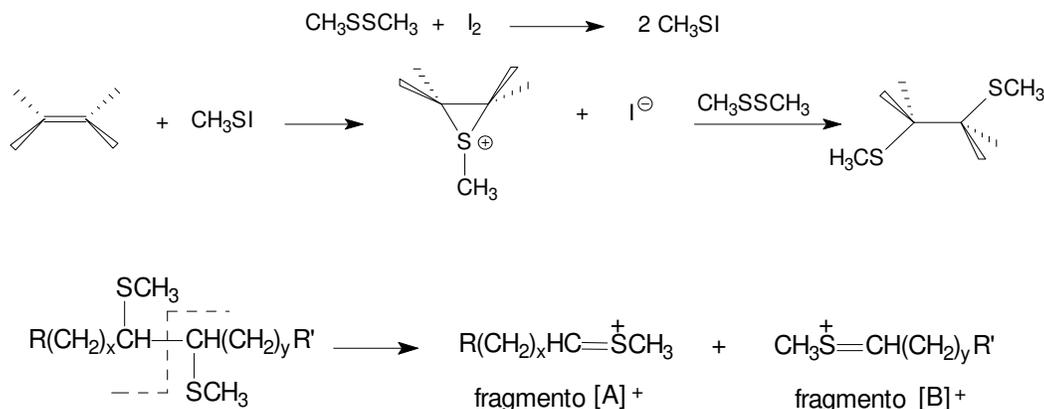
- Configurações geométricas (*Z* ou *E*) das insaturações: análises por RMN de ^1H e ^{13}C de frações semi-purificadas contendo os produtos naturais, caracterizando a posição geométrica de acordo com constantes de acoplamento ou ainda exploração do efeito γ .
- Configuração absoluta de C-3 nas diversas acil-HSLs: análises por cromatografia gasosa acoplada a detecção por ionização em chama, e coluna cromatográfica com fase estacionária quiral. Uso de um procedimento de hidrogenação catalítica para reduzir a complexidade da amostra.
- Caracterização final de todos os metabólitos: realizações de sínteses, co-injeções e comparações de espectros de massas dos padrões sintéticos com os produtos naturais.

3.3.2. Derivatização das acil-homoserina lactonas com dimetil-dissulfeto

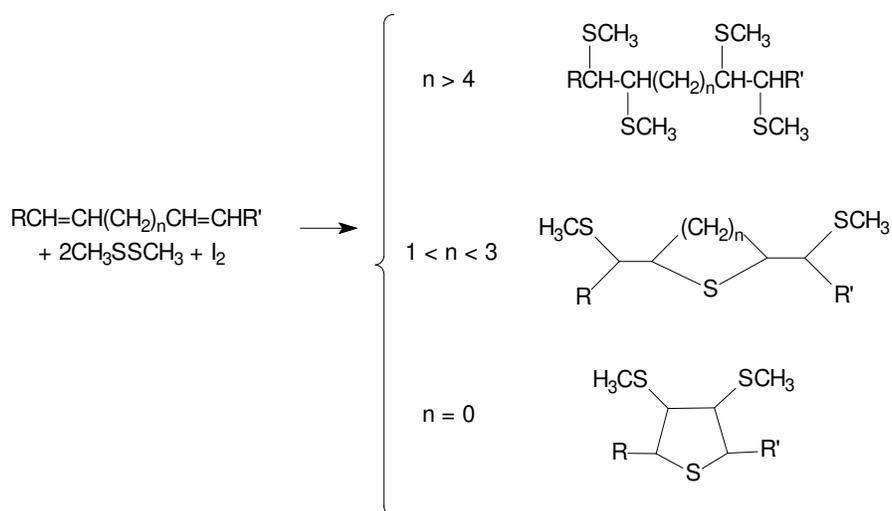
A primeira questão estrutural abordada foi a posição das duplas ligações pois, aparentemente, diversas acil-HSLs identificadas possuíam insaturações em suas porções ácido graxo. Através da pesquisa na literatura, foi possível verificar que a reação de compostos insaturados com dissulfeto de dimetila (DMDS) e iodo é o método mais eficiente e recomendado para a localização das duplas ligações em cadeias carbônicas (Millar e Haynes, 1998). O iodo age como um catalisador na adição do DMDS na ligação dupla para formar derivados lineares ou cíclicos. Vincenti e colaboradores sugeriram um mecanismo para este tipo de reação (Vicenti *et al.*, 1987), mostrado no Esquema 7. Em compostos lineares contendo insaturações, a dupla ligação pode ser localizada uma vez que a clivagem da ligação carbono-carbono entre os carbonos adjacentes contendo o substituinte sulfeto de metila (CH_3S)

forneem os íons fragmentos majoritários $[A]^+$ e $[B]^+$ (Esquema 7). Os fragmentos majoritários podem ser facilmente identificados porque a soma de seus valores de m/z é igual ao valor de m/z do íon molecular (Buser *et al.*, 1983).

As estruturas dos derivados DMDS de moléculas contendo um sistema dieno dependem do número de grupos metilenos entre as duas duplas ligações (Esquema 8). Pode ocorrer a formação de derivados cíclicos, originados da adição de duas moléculas de DMDS em um dieno, contendo duas cadeias alquil lineares com um grupo metiltio na posição α ao anel. Estes são formados somente quando existir pelo menos três grupos metilenos separando as duas duplas ligações. Quando existir mais de quatro grupos metilenos entre as duas duplas ligações ocorrerá a formação de adutos lineares contendo quatro grupos metiltio (Vicenti *et al.*, 1987; Buser *et al.*, 1983).



Esquema 7. Mecanismo geral da reação do DMDS/I₂ com uma dupla ligação e representação da clivagem da ligação carbono-carbono entre os CH₃S do derivado DMDS fornecendo fragmentos normalmente de grande intensidade por impacto eletrônico.

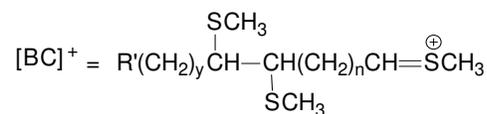
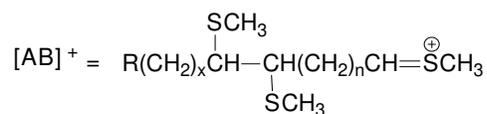
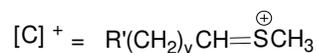
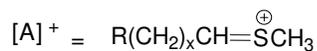
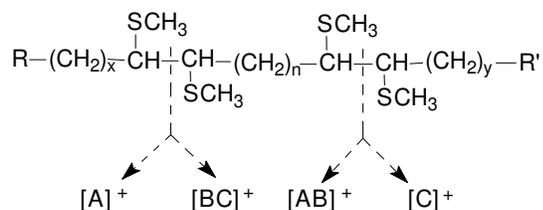


Esquema 8. Diferentes adutos formados na reação de derivatização, de acordo com o tipo de composto insaturado.

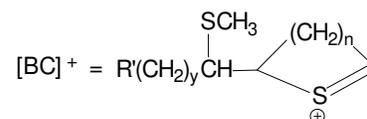
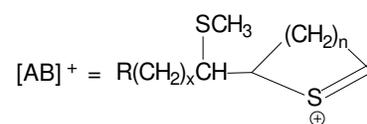
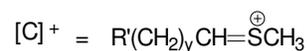
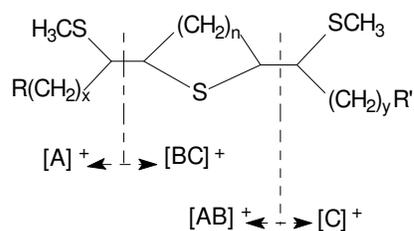
A principal informação obtida a partir do espectro de massas dos adutos de DMDS de alcenos refere-se à clivagem da ligação carbono-carbono entre os dois grupos tiometil (Esquema 7). Cada um dos fragmentos chave pode perder moléculas neutras fornecendo fragmentos secundários que confirmam a localização original das duas duplas ligações. Uma fragmentação similar e significativa é observada para tioéteres cíclicos de quatro, cinco e seis membros produzidos pela reação de DMDS e iodo com compostos dienos, nos quais as duplas ligações são separadas por um, dois ou três grupos $-\text{CH}_2-$ (Esquema 10). A estrutura do íon cíclico é estável e o número de íons originados a partir dele é reduzido (Esquema 10). Os fragmentos chaves no espectro de massas são normalmente intensos.

Dado o grande número de informações disponíveis e a interpretação relativamente fácil dos espectros de massas de derivados de DMDS, decidiu-

se aplicar esta técnica ao problema da determinação das duplas ligações de diversas acil-HSLs produzidas por *M. mesophilicum*. A reação de derivatização foi feita em micro escala, utilizando-se apenas 0,3 mg da fração acetato de etila. O cromatograma de íons totais da fração derivatizada é mostrado na Figura 32.



Esquema 9. Fragmentação básica de um derivado DMDS linear originado da derivatização de um sistema dieno isolado.



Esquema 10. Mecanismo básico de fragmentação de um derivado DMDS cíclico.

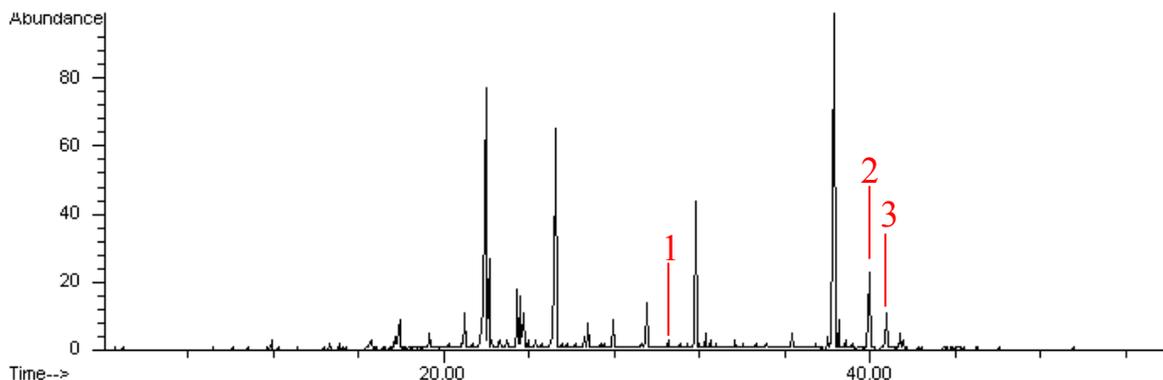


Figura 32. Cromatograma de íons totais (CG-EM, IE) do derivado DMDS da fração acetato de etila do cultivo de *M. mesophilicum*. 1. (S)-N-(2E)-dodecenoil-HSL que não reagiu; 2. derivado de (S)-N-(7Z)-tetradecenoil-HSL; 3. derivado de (S)-N-(2E,7Z)-tetradecadienil-HSL.

A análise do espectro de massas do pico em 39,95 min permitiu caracterizá-lo facilmente como sendo o derivado de DMDS da (*S*)-*N*-(7*Z*)-tetradecenoil-HSL, uma vez que este derivado já havia sido reportado na literatura (Wagner-Döbler *et al.*, 2005). A presença dos fragmentos *m/z* 258, 157 e 145 permitiu identificar a posição da insaturação no átomo de carbono C7' da cadeia lateral, conforme o mecanismo de fragmentação abaixo (Figura 33).

O segundo composto insaturado de interesse presente em maior proporção era a (*S*)-*N*-(2*E*, 7*Z*)-tetradecadienil-HSL. Identificou-se um sinal em 40,75 min com um espectro de massas muito similar ao derivado DMDS da (*S*)-*N*-(7*Z*)-tetradecenoil-HSL, porém com um íon molecular 2 unidades de massa atômica menor (*m/z* 401). Os fragmentos principais *m/z* 155 e 256 eram 2 unidades de massa atômica menores, enquanto que o fragmento *m/z* 145 se manteve. Desta forma, inferiu-se que uma das insaturações também estava localizada na posição 7, enquanto a segunda insaturação estaria presente entre a posição 7 e a carbonila da cadeia lateral (Figura 34). Conforme mostrado anteriormente, duplas ligações separadas entre si por 0, 1, 2 ou 3 metilenos podem gerar derivados de DMDS cíclicos. Porém, a formação destes produtos cíclicos não observada. Isto poderia ser atribuído ao fato da segunda insaturação estar conjugada à carbonila e ser pobre em elétrons, dificultando sua derivatização por DMDS (Attygalle *et al.*, 1993). Um substância com estas características é a *N*-(2*E*, 7*Z*)-tetradecadienil-HSL produzida por outra bactéria do mesmo gênero, a *M. extorquens* (Penalver *et al.*, 2006). A comprovação da identidade das substâncias produzidas por *M. mesophilicum* foi feita posteriormente através da obtenção de um padrão sintético (Tópico 3.3.4). Vale ressaltar que não existem na literatura relatos de síntese da (*S*)-*N*-(2*E*, 7*Z*)-tetradecadienil-HSL.

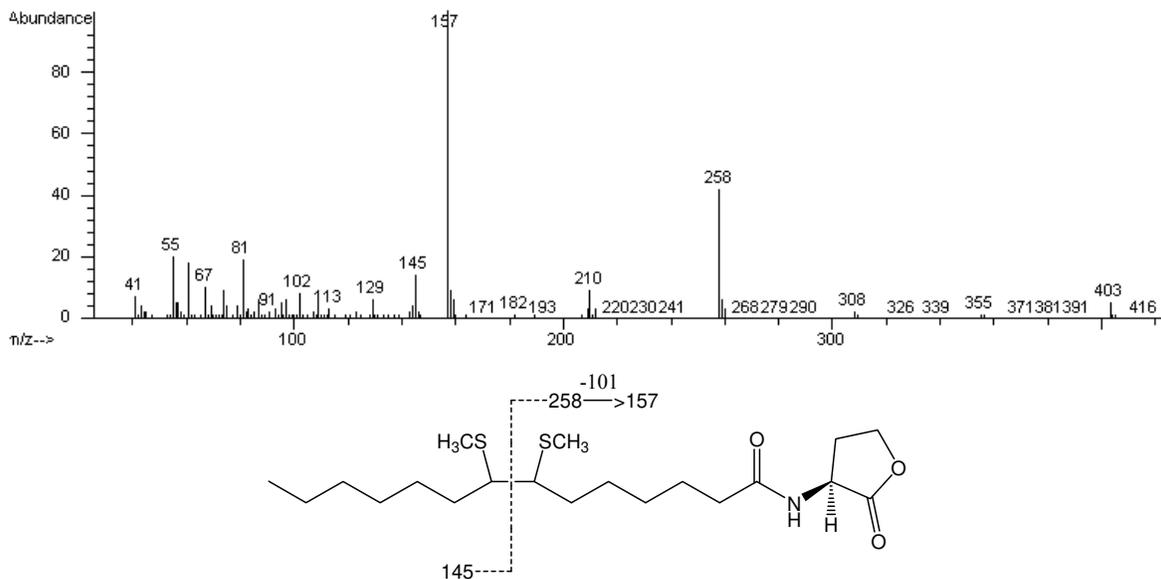


Figura 33. Espectro de massas (IE, 70 eV) do derivado de DMDS da (S)-N-(7Z)-tetradecenoil-HSL.

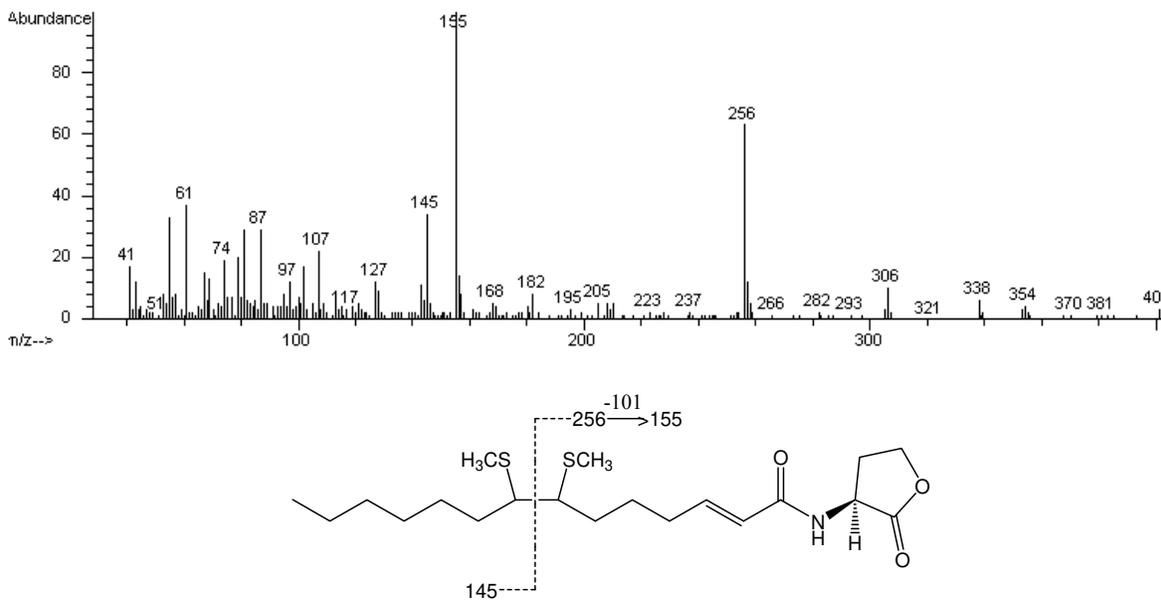


Figura 34. Espectro de massas (IE, 70 eV) do derivado de DMDS da (S)-N-(2E, 7Z)-tetradecadienil-HSL.

A única acil-HSL contendo uma insaturação cujo espectro de massas do derivado de DMDS não foi encontrado foi a (S)-N-(2E)-dodecenoil-HSL. Porém, identificou-se um sinal muito pequeno no cromatograma obtido pela análise da derivatização (Figura 32) que correspondente à (S)-N-(2E)-dodecenoil-HSL que não reagiu (30,52 min). Como visto no exemplo anterior, a reação de DMDS não ocorre com ligações duplas conjugadas à carbonila (Attygalle *et al.*, 1993). Isto, aliado ao fato da substância (S)-N-(7Z)-tetradecenoil-HSL ter sido completamente consumida na reação, nos leva a crer que o composto possui sua única insaturação conjugada à carbonila. Esta hipótese também foi comprovada mediante obtenção de padrão sintético.

3.3.3. Estudos avançados – obtenção de fração mais pura contendo acil-HSLs

O estudo realizado com o extrato semi-purificado demonstrou que seria promissor o estudo completo das acil-HSLs produzidas por *M. mesophilicum*, inclusive com a caracterização de uma substância sinalizadora inédita na natureza ((S)-N-(2E)-dodecenoil-HSL), além de uma representante rara com cadeia acila com número ímpar de átomos de carbono, a N-tridecanoil-HSL. Desta forma, considerou-se apropriado obter uma fração com a maior pureza possível destas substâncias para facilitar estudos posteriores de co-injeção com produtos sintéticos e determinações de configurações absolutas.

Assim, procedeu-se à preparação do extrato do cultivo de *M. mesophilicum* a partir de 8 litros de meio, num procedimento similar ao descrito anteriormente (Tópico 3.3.1). Obteve-se 17,1 mg de um extrato bruto, que foi posteriormente purificado por cromatografia em coluna de sílica gel com solventes e misturas de solventes de polaridades crescentes (hexano,

diclorometano e acetato de etila). As análises das frações por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas permitiu identificar uma fração (F22) de massa extremamente pequena (1,0 mg) que continha as acil-homossarina lactonas em estudo (Figura 35). Neste momento, o maior desafio do presente projeto de doutorado descortinou-se, consistindo em caracterizar as seis substâncias de interesse presentes numa fração de massa total 1,1 mg.

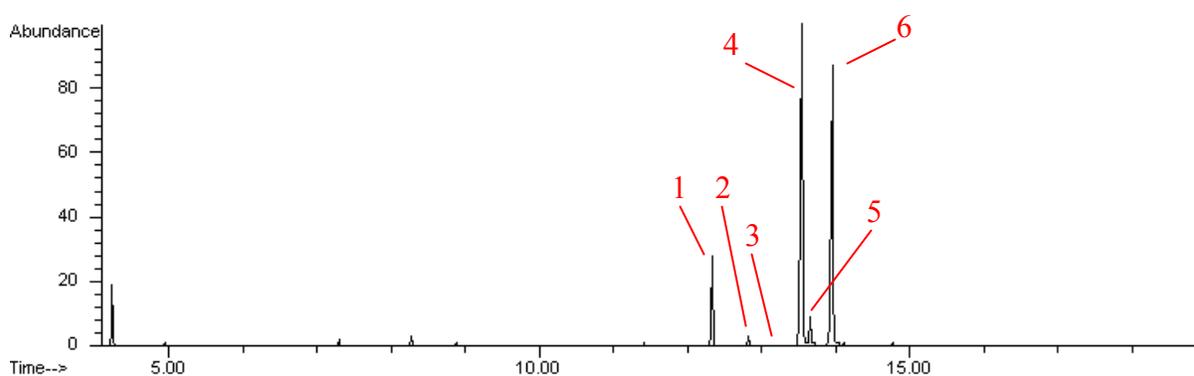


Figura 35. Cromatograma de íons totais (CG-EM, 70 eV) da Fração F22 (1,1 mg total) obtida da purificação do extrato de 8 L do cultivo de *M. mesophilicum*. 1. (S)-N-dodecanoil-HSL; 2. (S)-N-(2E)-dodecenoil-HSL; 3. N-tridecanoil-HSL; 4. (S)-N-(7Z)-tetradecenoil-HSL; 5. (S)-N-tetradecanoil-HSL; 6. (S)-N-(2E,7Z)-tetradecadienil-HSL.

Como pode ser observado na Figura 35, a fração F22 possuía as acil-HSLs em alta pureza. Isto permitiu a obtenção de um espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) da mistura, que foi extremamente importante pois forneceu pistas sobre as possíveis geometrias das insaturações presentes (Figura 36).

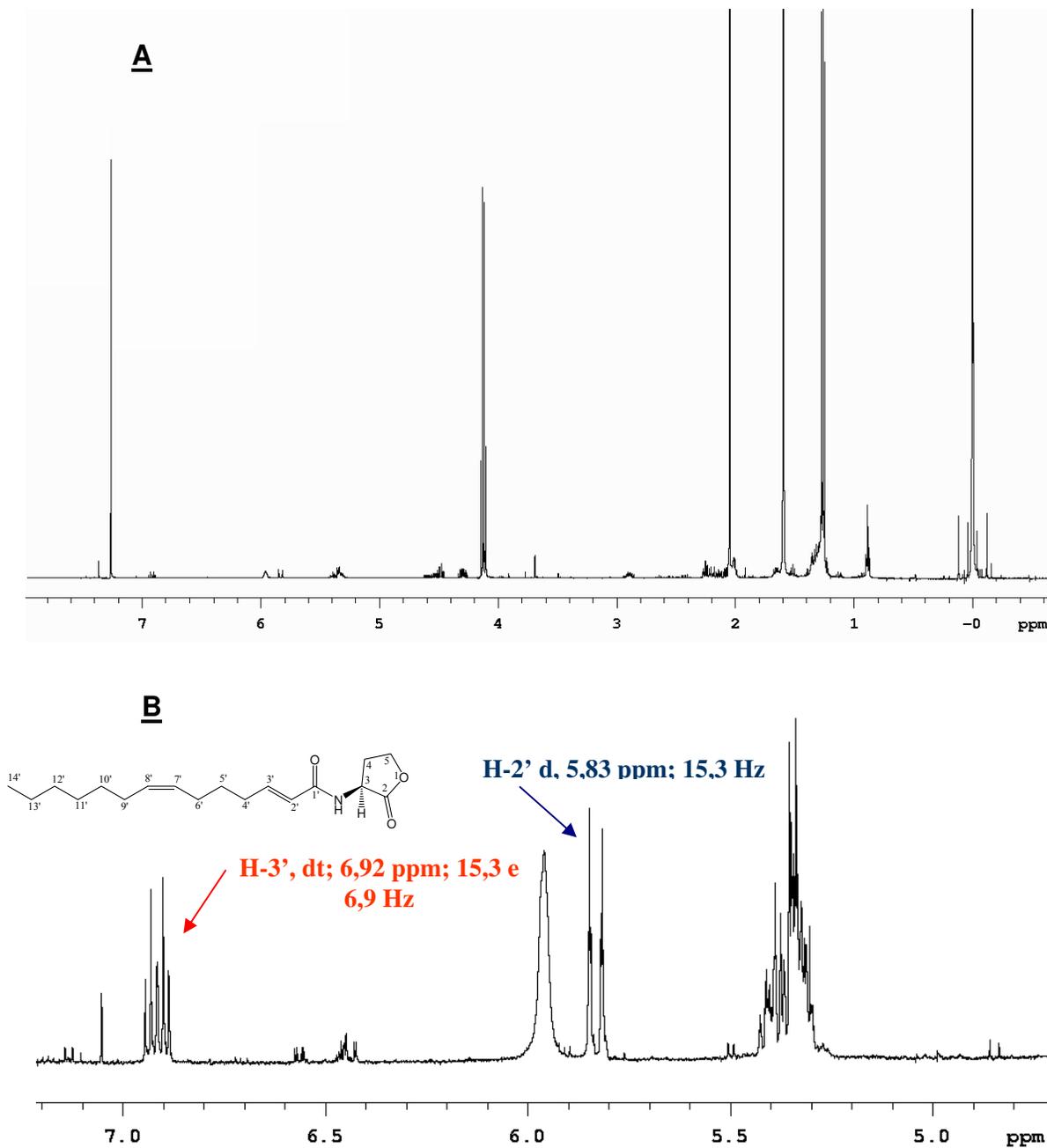


Figura 36. A. Espectro de RMN de ^1H (499,88 MHz, CDCl_3 , TMS) da fração F22 proveniente do cultivo de *M. mesophilicum*. B. Ampliação da região entre 5,0-7,0 ppm.

Em aproximadamente 6,92 ppm, pode-se observar os sinais relativos ao hidrogênio H-3' da porção da (*S*)-*N*-(2*E*,7*Z*)-tetradecadienil-HSL, que é a acil-HSL mais abundante da amostra (Figura 32B). A constante de acoplamento de $J=15,3$ Hz também foi observada no sinal do hidrogênio H-2' (5,83 ppm) denotando claramente a geometria *trans* para a insaturação presente na posição 2 da cadeia acila lateral.

Tanto a (*S*)-*N*-(2*E*,7*Z*)-tetradecadienil-HSL quanto a (*S*)-*N*-(7*Z*)-tetradecenoil-HSL possuíam uma insaturação na posição 7 da cadeia acila lateral. Como pode ser observado na Figura 35, ambas substâncias estão presentes em proporções semelhantes na amostra, e os sinais dos hidrogênios H-7' e H-8' se sobrepuseram no espectro de RMN de ^1H (Figura 36A). Entretanto, recentemente Penalver e colaboradores (2006) reportaram o isolamento destes metabólitos produzidos por *Methylobacterium extorquens*, uma espécie extremamente próxima de *M. mesophilicum*, objeto do presente estudo. Em seu artigo, Penalver reportou os espectros de RMN de ^1H destes metabólitos, e a comparação com os dados espectrais mostrou que ambas moléculas no presente estudo possuem a insaturação na posição 7 com geometria *cis* com (Figura 37). Outras comparações espectrais foram possíveis após o isolamento da (*S*)-(7*Z*)-tetradecenoil-HSL dos caldos de cultivo de *M. mesophilicum*, detalhado no tópico 3.3.3.1, em meio TSB.

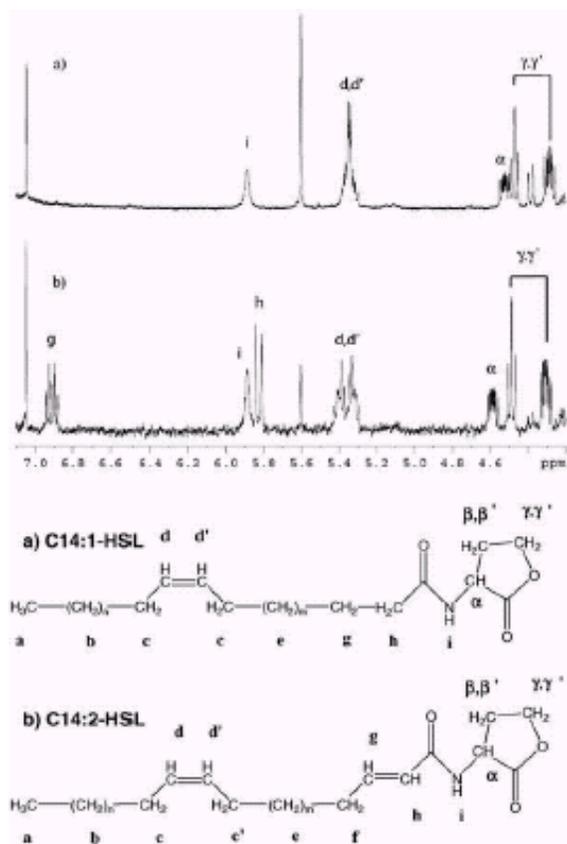


Figura 37. Espectros de RMN de ¹H da (*S*)-*N*-(7*Z*)-tetradecenoil-HSL (a) e (*S*)-*N*-(2*E*,7*Z*)-tetradecadienil-HSL (b) produzidas por *M. extorquens*, reportados por Penalver e colaboradores (2006).

As frações reunidas F29-38 provenientes do cultivo de *M. mesophilicum* em meio TSB apresentaram a substância (*S*)-(*7Z*)-*N*-tetradecenoil-HSL em grande proporção na amostra (aprox. 70%), o que permitiu a obtenção de espectros de ressonância magnética nuclear e conseqüentemente uma melhor caracterização do metabólito (Tabela 2).

O espectro de RMN de ¹H da (*S*)-*N*-(*7Z*)-tetradecenoil-HSL natural era idêntico ao reportado para o mesmo metabólito isolado a partir de *M. extorquens* e *Rhodobacter sphaeroides* (Penalver *et al.*, 2006; Puskas *et al.*, 1997). O espectro de RMN de ¹³C mostrou a presença de dois sinais em 129,4

e 130,2 ppm, correspondentes aos carbonos sp^2 C-7' e C-8', além dos sinais dos carbonos carbonílicos em 173,8 e 175,6 ppm. A diferenciação dos sinais de ^{13}C foram feitas utilizando a técnica DEPT 135 e 90° (Tabela 2).

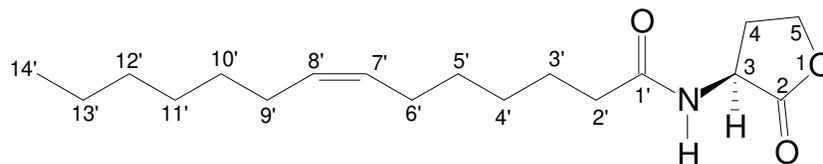


Tabela 2. Atribuição de sinais de RMN de 1H e ^{13}C para a (S)-N-(7Z)-tetradecenoil-HSL natural produzida por *M. mesophilicum*.

C	1H	^{13}C	DEPT
2	-	175,6	C
3	4,54 (ddd, 1H, <i>J</i> 5,8; 11,9; 8,5)	49,2	CH
4	2,84 (m, 1H) e 2,13 (m, 1H)	30,5	CH ₂
5	4,29 (ddd, 1H, <i>J</i> 5,8; 11,2; 9,5) e 4,47 (t, 1H, <i>J</i> 8,9)	66,1	CH ₂
1'	-	173,8	C
2'	2,25 (t, 2H, <i>J</i> 8,0)	36,1	CH ₂
3'	1,66 (m, 2H)	31,7	CH ₂
6', 9'	2,01 (m, 2H)	26,9 e 27,2	CH ₂
4', 5', 10', 11', 12', 13'	1,59 (m) e 1,27 (m)	22,6; 25,3; 28,8; 28,9; 29,4; 29,6	CH ₂
7', 8'	5,34 ppm (m, 2H)	129,4 (8')	CH
		130,2 (7')	CH
14'	0,88 (t, 3H, <i>J</i> 7,0)	14,1	CH ₃
NH	5,95 (largo, 1H)	-	-

Para os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C de (*S*)-*N*-(7*Z*)-tetradecenoil-HSL, produzido em pequena quantidade por *M. mesophilicum*, foi necessário utilizar uma sonda para amostras de 40 μL (nanosonda do fabricante Varian) ainda assim com longos tempos de aquisição (Anexos 130, 131 e 132). A configuração geométrica da insaturação presente na posição C7' da cadeia acila foi determinada por comparações com dados da literatura.

Subchev e colaboradores (1998) sintetizaram os isômeros ácidos (7*Z*) e (7*E*)-tetradecenóico e reportaram os deslocamentos químicos em RMN de ^{13}C . No caso do isômero (*Z*) foi constatada a presença de dois sinais em 26,99 e 27,27 ppm, enquanto o isômero (*E*) apresentou sinais mais desblindados em 32,33 e 32,59 ppm para os carbonos C6' e C9'. Este fenômeno é reportado como “efeito γ ” (Kleinpeter e Seidl, 2005). Neste caso, observou-se para a (*S*)-*N*-(7*Z*)-tetradecenoil-HSL natural produzida por *M. mesophilicum* sinais no espectro de RMN ^{13}C em 26,9 e 27,2 ppm para os carbonos C-6' e C-9', indicando portanto que se trata de um produto com uma insaturação de configuração geométrica *Z* (Figura 38, Tabela 2). Outras comparações foram feitas com determinações de configurações geométricas de acil-HSLs relatadas na literatura (Figura 38; Schripsema *et al.*, 1996 ; Krick *et al.*, 2007).

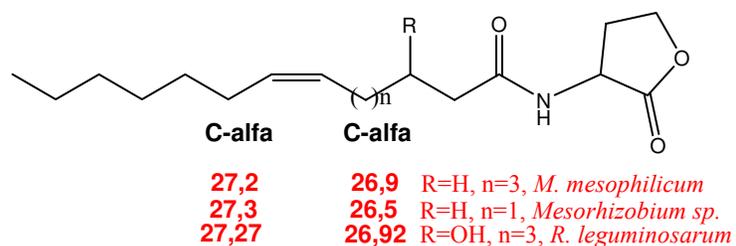


Figura 38. Comparações de deslocamentos químicos (em ppm) de carbonos metilênicos vicinais a insaturações nos metabólitos produzidos por *M. mesophilicum*, *R. leguminosarum* e *Mesorhizobium sp* (Schripsema *et al.*, 1996 ; Krick *et al.*, 2007).

3.3.3.1. Avaliação da produção de acil-homosserina lactonas por *M. mesophilicum* em condições não metanotróficas de crescimento

Como descrito acima, a bactéria Gram-negativa *M. mesophilicum* produz principalmente acil-homosserina lactonas de cadeia longa quando cultivada em meio contendo metanol como única fonte de carbono. Posteriormente, identificou-se as substâncias produzidas em condições não metanotróficas de crescimento.

Foram realizados estudos com dois meios de cultivo distintos. O primeiro consistia numa modificação do meio CHOI3, contendo glucose como única fonte de carbono em substituição ao metanol. No segundo caso, a bactéria foi cultivada em meio complexo TSB (*tripticase soy broth*).

Inicialmente, preparou-se um extrato de acetato de etila a partir de um litro de cultivo da bactéria em cada meio de cultura (CHOI3/glucose e TSB). Este extrato foi filtrado por cromatografia em coluna de sílica gel, rendendo frações que foram ensaiadas com o biossensor *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) como descrito anteriormente. Este teste visava obter evidências da produção de substâncias de interesse nos novos meios, antes de partir para um estudo químico mais aprofundando. Como resultado, ambos os extratos mostraram atividade biológica positiva (Figura 39). Neste caso, realizou-se também um branco com o extrato do meio de cultivo TSB.

O meio CHOI3 modificado contém glucose como única fonte de carbono. Constatou-se que o extrato proveniente do cultivo de *M. mesophilicum* proporcionou uma atividade biológica positiva com o repórter *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4). O mesmo ensaio foi realizado com extratos provenientes do meio de cultura TSB (*tripticase soy broth*). Neste caso (Figura 40), observou-se uma atividade biológica positiva para o extrato

proveniente do meio de cultura puro (C), porém com intensidade menor do que o ensaio realizado com o extrato do cultivo de *M. mesophilicum* (D). Isto pode ser compreendido uma vez que o meio TSB é fabricado utilizando farelo de soja (*Glycine sp.*), e existem relatos na literatura que diversos vegetais como arroz, tomate, ervilha e inclusive a soja produzem substâncias que podem ativar diversos biossensores utilizados nos estudos de quorum sensing (Teplitiski *et al.*, 2000). Desta forma, o ensaio realizado não inviabiliza os estudos químicos em meio TSB, apenas alertam para a possível presença de contaminantes bioativos não produzidos pelo microrganismo em estudo.

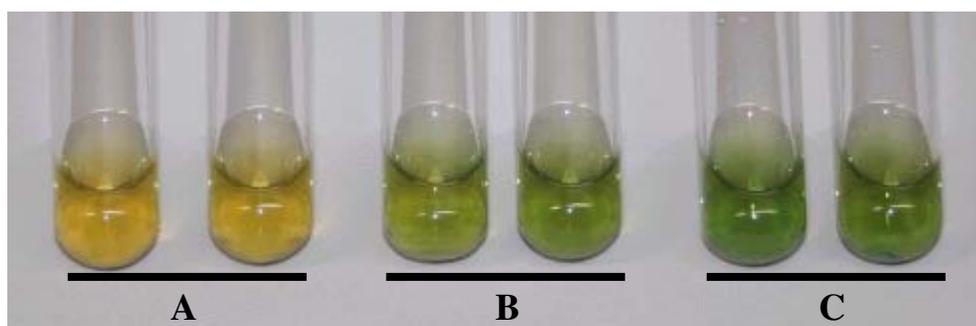


Figura 39. Avaliação da atividade biológica de comunicação bacteriana com o biossensor *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4). A. Etanol (branco); B. (S)-3-(oxo-octanoil)-HSL sintética (controle positivo); C. Fração acetato de etila cultivo *M. mesophilicum* em meio CHO13 modificado contendo glucose.

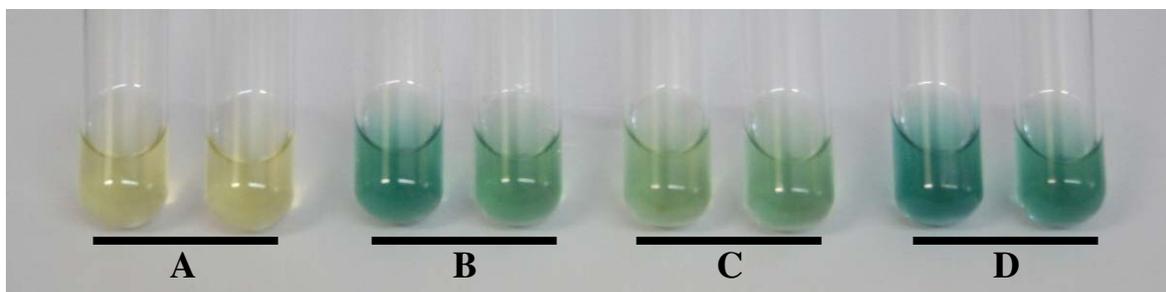


Figura 40. Avaliação da atividade biológica de comunicação bacteriana com o biossensor *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4). A. Etanol (branco); B. (S)-3-(oxo-octanoil)-HSL sintética (controle positivo); C. Fração acetato de etila meio TSB puro; D. Fração acetato de etila cultivo *M. mesophilicum* em meio TSB.

Uma vez constatadas as atividades biológicas positivas, procedeu-se a caracterização estrutural dos metabólitos utilizando-se extratos em acetato de etila obtido a partir de 8 litros de meio de cultivo das bactérias. As condições de preparo dos inóculos, fermentação, preparo do extrato e purificação das substâncias de interesse são semelhantes às descritas no cultivo com metanol como fonte de carbono.

Em todos os casos, as acil-homoserina lactonas foram purificadas por cromatografia em coluna de sílica gel, eluindo na polaridade diclorometano/acetato de etila 7/3. Foram obtidas frações praticamente puras, contendo apenas os compostos de interesse. Isto permitiu a avaliação direta da massa destes metabólitos e uma estimativa de sua produção por litro de cultivo em diferentes meios. No caso do cultivo em meio CHOI3, estima-se uma produção de 137,5 µg/L; CHOI3/glucose, 50 µg/L e no caso do cultivo em meio TSB 287,5 µg/L.

As substâncias foram identificadas pela comparação dos espectros de massas e índices de retenção (Tabela 3). Os Índices de Retenção foram calculados através de uma fórmula levando em consideração os tempos de retenção dos metabólitos de interesse e um padrão de hidrocarbonetos, segundo procedimento consagrado na literatura (vide seção Experimental) (Figura 41).

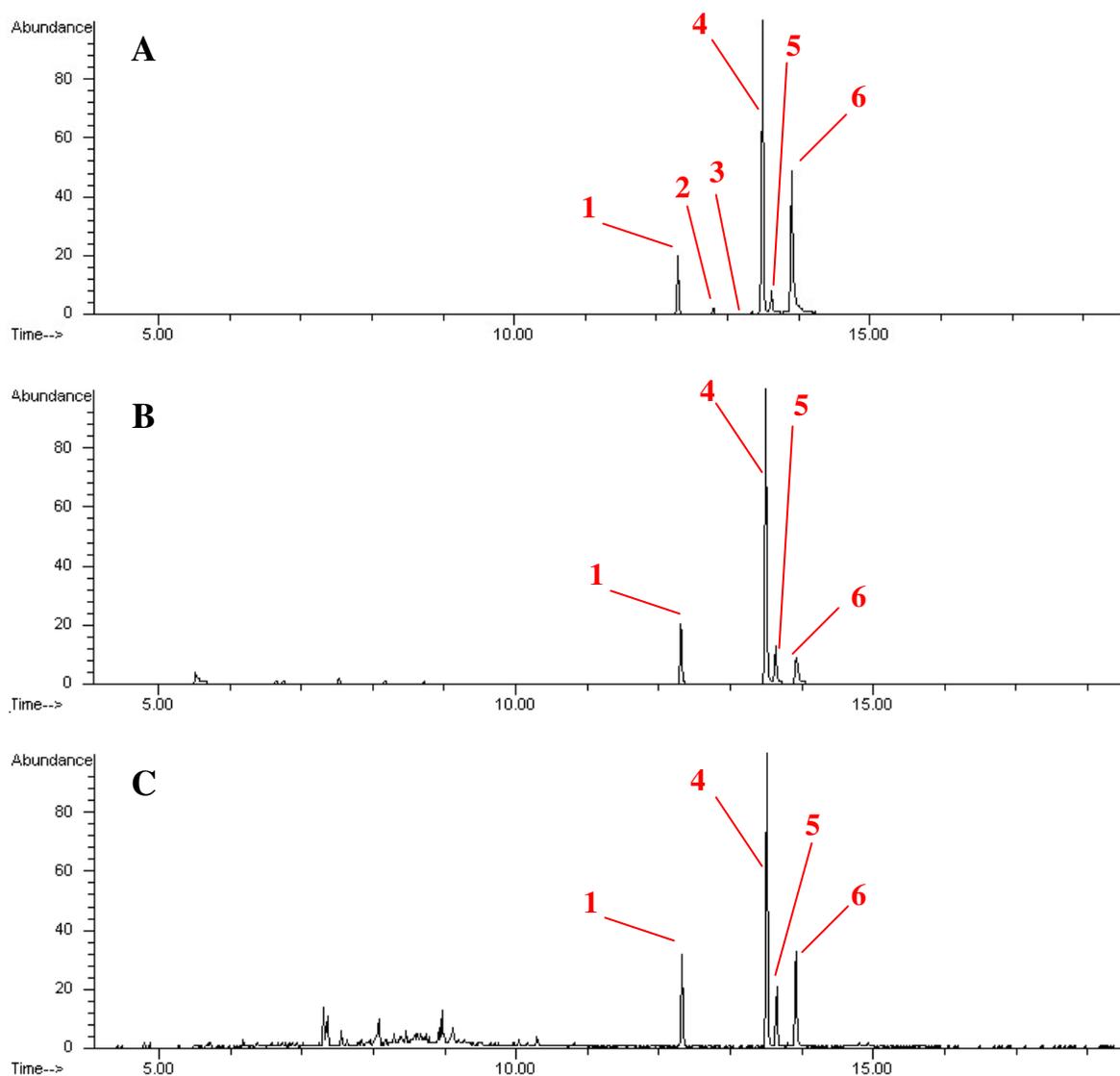


Figura 41. Cromatogramas de íons totais (CG-EM, 70 eV) A. da fração F22 do cultivo de *M. mesophilicum* em metanol; B. fração F29-38 do cultivo em meio TSB; C. fração F23 do cultivo em meio CHOI3 modificado contendo glucose como fonte de carbono. Legenda: (S)-N-dodecanoil-HSL (1), (S)-N-(2E)-dodecanoil-HSL (2), (S)-N-tridecanoil-HSL (3), (S)-N-(7Z)-tetradecanoil-HSL (4), (S)-N-tetradecanoil-HSL (5), (S)-N-(2E,7Z)-tetradecadienil-HSL (6).

Tabela 3. Abundâncias relativas e índices de retenção das acil-HSLs produzidas por *M. mesophilicum* em diferentes meios de cultivo.

Substância	Meio de Cultivo	Ab. Relativa (%)	Índice de Retenção
(S)-N-dodecanoil-HSL	CHOI3	9,7	2348
	TSB	13,3	2347
	CHOI3/glucose	17,8	2350
(S)-N-(2E)-dodecanoil-HSL	CHOI3	1,2	2425
	TSB	Traços	2426
	CHOI3/glucose	Ausente	-
N-tridecanoil-HSL	CHOI3	Traços	2454
	TSB	Ausente	-
	CHOI3/glucose	Ausente	-
(S)-(7Z)-N-tetradecenoil-HSL	CHOI3	47,1	2537
	TSB	69,6	2538
	CHOI3/glucose	52,2	2539
(S)-N-tetradecanoil-HSL	CHOI3	3,7	2559
	TSB	8,9	2559
	CHOI3/glucose	11,5	2558
(S)-(2E,7Z)-N-tetradecadienil-HSL	CHOI3	38,2	2604
	TSB	8,1	2602
	CHOI3/glucose	18,5	2601

Os metabólitos majoritários são os mesmos em todos os cultivos, comprovando de forma irrefutável sua produção pela bactéria *M. mesophilicum*. Pode-se observar algumas variações, como a menor proporção de (S)-N-(2E,7Z)-tetradecadienil-HSL nos cultivos em meio CHOI3/glucose e

TSB se comparado ao cultivo em meio CHOI3 clássico. No caso do cultivo em meio TSB pode-se observar uma quantidade traço de (*S*)-*N*-(2*E*)-dodecenoil-HSL na fração F28. A *N*-tridecanoil-HSL não foi observada nos cultivos em meios não metanotróficos.

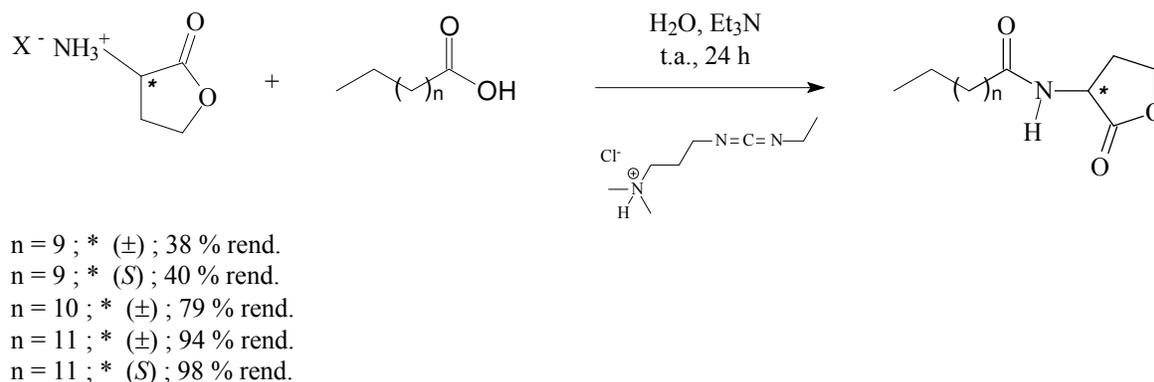
3.3.4. Síntese das acil-homosserina lactonas

Tendo em mãos as informações obtidas por espectrometria de massas, RMN de ^1H e a derivatização com DMDS tornou-se possível sintetizar as substâncias sinalizadoras produzidas por *M. mesophilicum* visando a inequívoca confirmação estrutural por co-injeção e comparação de espectros de massas por CG-EM com os produtos naturais.

3.3.4.1. Síntese das acil-HSLs saturadas

Os estudos sintéticos se iniciaram pela obtenção das acil-homosserina lactonas mais simples que não possuíam insaturações na cadeia acila lateral (*N*-dodecanoil, tridecanoil e tetradecanoil-HSL). As sínteses foram realizadas em meio aquoso, na presença do cloridrato ou bromidrato de (*S*) ou (\pm)- α -amino- γ -butirolactona e o ácido graxo correspondente na presença de cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida como agente condensador (Esquema 11) (Chhabra *et al.*, 1993). Em alguns casos, o procedimento de extração ácido-base adotado ($\text{KHSO}_4/\text{NaHCO}_3$) não foi suficiente para remover o excesso de ácido graxo presente no meio. Este excesso foi removido então pela rápida eluição dos produtos de reação em coluna filtrante contendo sílica-gel impregnada com hidróxido de potássio. Os produtos sintéticos foram caracterizados por CG-EM, RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT

135 e 90 e espectroscopia no infravermelho cujos espectros são mostrados em Anexos. As atribuições espectroscópicas de cada substância sintetizada são mostradas na parte Experimental.

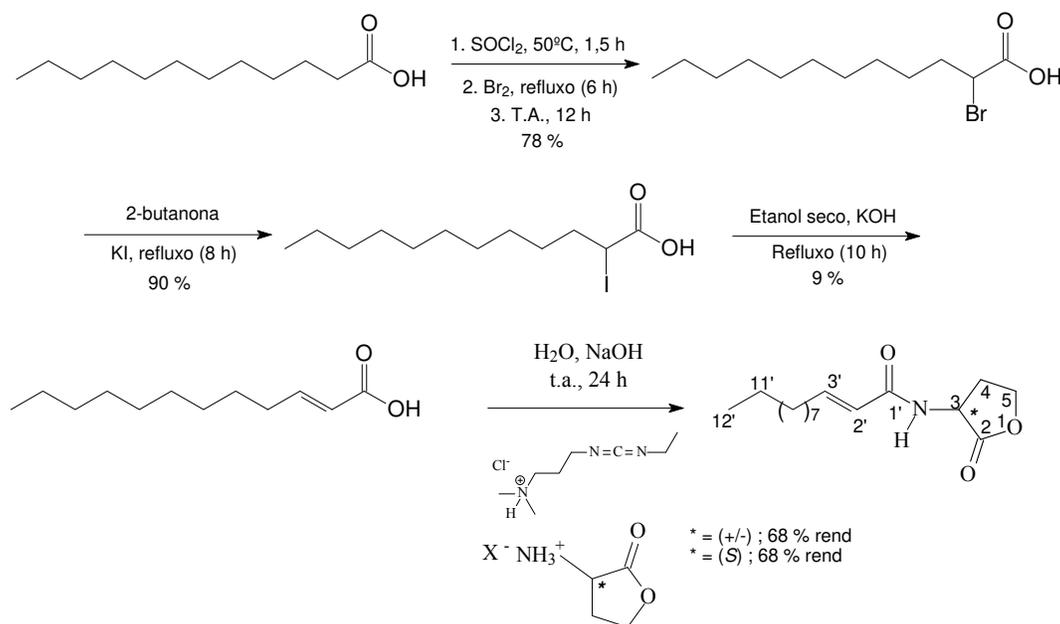


Esquema 11. Esquema de síntese da N-dodecanoil, tridecanoil e tetradecanoil-HSL. (X = Br⁻ ou Cl⁻)

3.3.4.2. Síntese da (S)-N-(2E)-dodecenoil-homosserina lactona

A rota de síntese para a (S)-N-(2E)-dodecenoil-HSL consistiu na obtenção do ácido (2E)-dodecenóico que foi empregado posteriormente na reação de formação de ligação amida com a α -amino- γ -butirolactona também mediada pelo derivado de carbodiimida (Esquema 12). Basicamente, os procedimentos experimentais adotados na síntese do ácido 2-bromo-dodecanóico, 2-iodo-dodecanóico e (2E)-dodecenóico são adaptações das sínteses do ácido (2E)-hexadecenóico relatadas na literatura (Sweet e Estes, 1956; Myers, 1951). Existe um relato na literatura da obtenção direta do ácido (2E)-dodecenóico a partir do ácido 2-bromo-dodecanóico utilizando t-butóxido de potássio como base (Allen e Kalm, 1957). Entretanto, este procedimento apresenta o inconveniente de produzir uma grande quantidade

de ácido (*3E*)-dodecenóico, de difícil remoção e que poderia interferir nas análises posteriores (Allen e Kalm, 1957).



Esquema 12. Síntese da (\pm) e (S)-N-(2E)-dodecenoil-HSL.

A síntese se iniciou pela reação de bromação do ácido láurico, realizada através da obtenção *in situ* do cloreto de ácido correspondente utilizando o cloreto de tionila (reação de Hell-Volhard-Zydelinsky) em condições de refluxo (Sweet e Estes, 1956; Myers, 1951). O produto sintético foi plenamente caracterizado com base em dados espectroscópicos (CG-EM, IV, RMN de ^1H e ^{13}C). O espectro de massas do derivado metil éster apresentou fragmentações características em m/z 213 ($\text{M}^+ - \text{Br}^-$) e sinais duplicados em m/z 152 e 154, resultantes do rearranjo de McLafferty da carbonila do éster (Anexo 85). O espectro de RMN de ^{13}C mostrou a presença de um carbono carbonílico em 175,8 ppm, além do metino ligado a bromo (CH-Br) em 45,4 ppm, que foi confirmado pela análise dos espectros DEPT 90 e 135 (Anexos 87 e 88).

O próximo passo consistiu na reação de substituição nucleofílica do bromo pelo iodeto (Sweet e Estes, 1956; Myers, 1951). A reação foi realizada em condições de refluxo com 2-butanona (previamente destilada sob sulfato de sódio). O espectro de massas apresentou o íon molecular do 2-iodo-dodecanoato de metila em m/z 340 em baixa abundância (1%), sendo o pico base m/z 213 resultante do rearranjo de McLafferty da carbonila do éster (Anexo 90). O produto foi caracterizado com base em dados espectroscópicos.

A etapa de eliminação E2 do ácido iodídrico visando a obtenção do ácido (2*E*)-dodecenóico provou ser a mais trabalhosa desta rota sintética (Sweet e Estes, 1956; Myers, 1951). A reação foi feita utilizando hidróxido de potássio como base, em condições de refluxo. Porém, observou-se uma extensiva formação concomitante de ácido 2-hidroxi-dodecanóico. O produto desejado foi obtido com pequeno rendimento (9 %) após extensivas purificações cromatográficas. O espectro de massas (IE, 70 eV) apresentou um fragmento importante em m/z 181 (25%, $M^+ - OCH_3$). Além disso, o estiramento de C=C pode ser observado no espectro no infravermelho em 1634 cm^{-1} (Anexo 94). O espectro de RMN de ^1H confirmou a posição *E* da insaturação, como era esperado numa reação de eliminação E1 térmica, mostrando sinais em 5,80 ppm (H-2, dubleto, J 15,7 Hz) e 7,08 ppm (H-3, duplo tripleto, J 15,7 e 7,0 Hz) (Anexo 96).

A reação final desta síntese consistiu na formação da ligação amida entre o ácido (2*E*)-dodecenóico e a (\pm) ou (*S*)- α -amino- γ -butirolactona (cloridrato ou bromidrato). Nos procedimentos reacionais normais descritos anteriormente, como por exemplo para a *N*-dodecanoil ou *N*-tetradecanoil-HSL, a trietilamina era uma base eficiente (Chhabra *et al.*, 1993). Porém, neste caso, o uso de trietilamina como base levou a rendimentos muito baixos, quase ao nível de traços de produtos. Desta forma, a reação foi feita através da

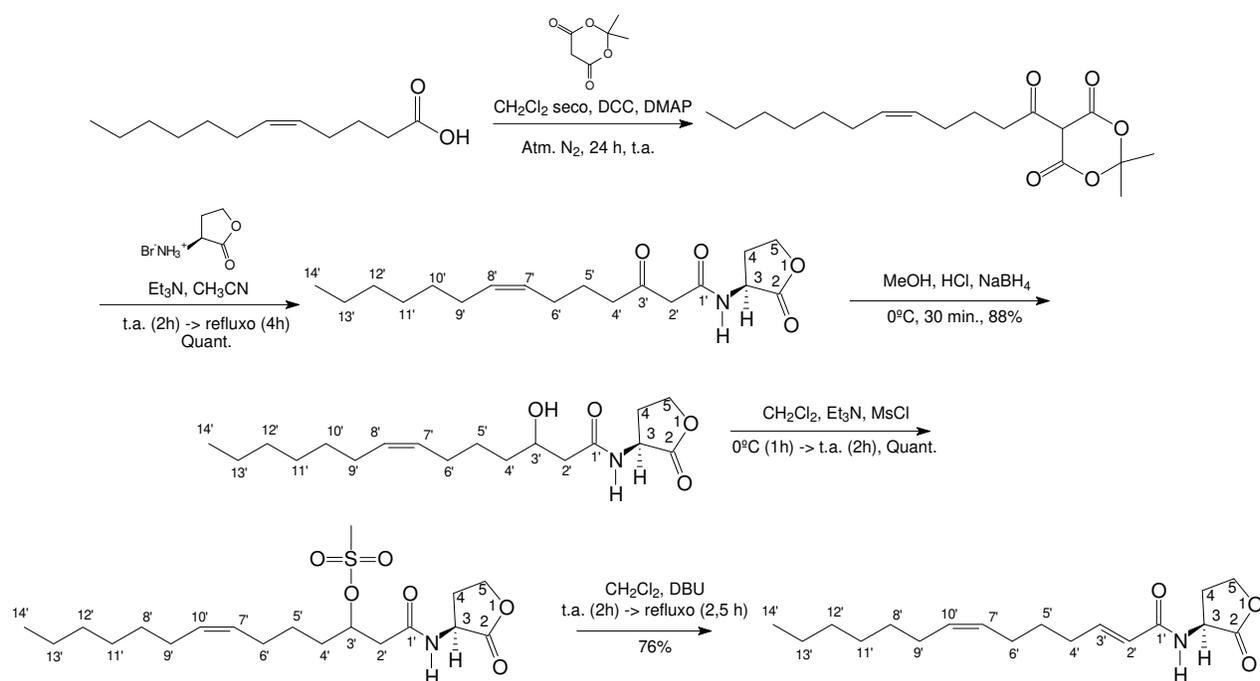
adição de hidróxido de sódio 0,2 M, obtendo-se o produto desejado como um pó amarelo claro em 68% de rendimento. O espectro de massas apresentou o íon m/z 143 (21%) com abundância relativa comparativamente muito menor se comparado ao das acil-HSLs saturadas (Anexo 99), sendo idêntico ao do produto natural (Figura 29 A). O espectro no infravermelho apresentou como sinais mais importantes o estiramento N-H de amida em 3318 cm^{-1} , o estiramento de C-H (sp^2) em 3081 cm^{-1} , a estiramento de carbonila de lactona em 1770 cm^{-1} , o estiramento de C=O de amida em 1634 cm^{-1} e o estiramento C=C em 1533 cm^{-1} (Anexo 100). O espectro de RMN de ^{13}C mostrou como sinais mais importantes o carbono carbonílico da lactona em 175,5 ppm, a carbonila α,β -insaturada da cadeia lateral em 166,3 ppm, o carbono sp^2 C-3' (β carbonílico) em 146,7 ppm e o carbono sp^2 C-2' (α -carbonílico) em 122,2 ppm (Anexo 102). Os sinais mais importantes no espectro de RMN de ^1H foram dos hidrogênios H-3' em 6,86 ppm (duplo triplete, J 15,0 e 7,3 Hz) e dos hidrogênios H-2' em 5,83 ppm (dubleto, J 15,0 Hz) (Anexo 101). Vale ressaltar que os valores das constantes de acoplamento indicam claramente a estereoquímica *trans* para a insaturação.

Desta forma, reportamos a síntese da (*S*)-*N*-(2*E*)-dodecenoil-HSL. Uma revisão bibliográfica mostrou que Zhu e colaboradores (1998) sintetizaram uma série de acil-HSLs α,β -insaturadas, com cadeias acila laterais variando entre 4 e 10 átomos de carbono; estas moléculas apresentaram atividade antagonista sobre o mecanismo de comunicação química em *Agrobacterium tumefaciens* mediado por (*S*)-*N*-3-oxo-octanoil-HSL. Entretanto, vale ressaltar que não há na literatura relatos de detecção ou síntese da (*S*)-*N*-(2*E*)-dodecenoil-HSL, mostrando portanto mais uma característica inédita deste trabalho. Assim como os demais produtos sintéticos, este também foi utilizado

em co-injeções com o produto natural isolado de *M. mesophilicum* (Tópico 3.3.5).

3.3.4.3. Síntese da (S)-N-(2E,7Z)-tetradecadienil-homosserina lactona

A seguinte rota sintética foi aplicada na síntese da acil-HSL acima citada (Esquema 13).



Esquema 13. Rota de síntese da (S)-N-(2E,7Z)-tetradecadienil-homosserina lactona.

A primeira etapa da via sintética mostrada no Esquema 13 consistiu numa reação de formação de ligação carbono-carbono (reação de Meldrum), através do ataque nucleofílico do reagente de Meldrum ao anidrido de ácido gerado *in situ* através do ácido (5Z)-dodecenóico (disponível comercialmente)

e da dicitlohexilcarbodiimida (DCC), em meio básico (Chhabra *et al.*, 2003). O produto de reação é relativamente instável, e foi utilizado na reação seguinte sem prévia purificação. A segunda reação consistiu num ataque nucleofílico da (*S*)- α -amino- γ -butirolactona ao reagente, que ocorre concomitantemente à descarboxilação na temperatura de refluxo da acetonitrila, utilizada como solvente. Assim, obteve-se a (*S*)-*N*-3-oxo-(7*Z*)-tetradecenoil-HSL de forma quantitativa (Chhabra *et al.*, 2003). O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel (eluição em diclorometano/acetato de etila 7/3), apresentando-se como um sólido branco. As acil-homosserina lactonas contendo carbonila ou hidroxila na posição 3 da cadeia acila lateral são instáveis termicamente, sofrendo pirólise nas condições de análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. O espectro no infravermelho da (*S*)-*N*-3-oxo-(7*Z*)-tetradecenoil-HSL apresentou sinais em 3023 cm^{-1} característico de estiramento axial C-H (sp^2), em 1718 cm^{-1} dos estiramentos de carbonila C=O da lactona e em 1792 e 1646 cm^{-1} das carbonilas do sistema 1,3-ceto amida (Anexo 109). O espectro de RMN de ^1H apresentou um singleto em 3,48 ppm correspondente aos hidrogênios metilênicos H-2', altamente desblindados por estarem entre as funções amida e cetona da cadeia lateral. A porção olefina foi identificada no espectro de RMN de ^1H como dois sinais em 5,27 e 5,40 ppm (H-7' e H-8', J 7,1 Hz), com constante de acoplamento coerente ao esperado para uma insaturação com geometria *cis* (Anexo 110). O espectro de RMN de ^{13}C apresentou três sinais de carbonos carbonílicos em 206,3 (C-3'), 174,9 (C-2) e 166,4 (C-1') ppm, correspondentes às carbonilas das porções cetona, lactona e amida respectivamente (Anexo 111). Além disso, verificou-se a presença de dois sinais de metinos (confirmado por DEPT 90 e 135) em 131,4 e 128,1 ppm,

correspondentes aos carbonos C-7' e C-8', respectivamente, da porção olefina da cadeia lateral (Anexo 112).

A reação posterior consistiu na redução da 3-oxo-amida para a 3-hidroxi-amida. Na literatura, foi reportado apenas um procedimento de redução da carbonila da posição 3' em 3-oxo-acil-homosserina lactonas, utilizando cianoborohidreto de sódio como agente redutor (Chhabra *et al.*, 1993). No presente caso utilizou-se borohidreto de sódio, e para evitar a abertura da lactona durante o processo pela basificação do meio, adicionou-se ao ácido clorídrico aquoso (2M) até pH = 3 e a reação foi feita em banho de gelo. Logo após a adição do borohidreto de sódio (2 minutos) o meio foi novamente acidificado com HCl 2M. Com isto, conseguiu-se um rendimento muito bom (88 %) para esta reação, que ocorre de modo praticamente instantâneo. Acreditamos que a redução da cetona tenha ocorrido via hidrogênio radicalar (“nascente”), formado a partir da reação entre o borohidreto de sódio e os prótons presentes no meio (Lee e Choi, 1996). A análise do espectro no infravermelho da (*S*)-*N*-3-hidroxi-(7*Z*)-tetradecenoil-HSL demonstrou o desaparecimento do sinal de estiramento axial de carbonila de cetona do reagente em 1718 cm^{-1} , atestando a redução deste grupo químico do reagente durante a reação (Anexo 114). O sinal do carbono carbonílico C-3' do reagente também não estava mais presente no espectro de RMN de ^{13}C do produto, que por sua vez apresentou diversos sinais duplicados devido à formação de diastereoisômeros durante a reação, como por exemplo os sinais do carbono carbinólico C-3' em 68,6 e 68,5 ppm (Anexo 116). O espectro de RMN de ^1H mostrou claramente a formação do álcool secundário devido a presença de um sinal largo de hidrogênio ligado a oxigênio (OH) em 4,01 ppm (1H, multipeto) (Anexo 115). A formação dos diastereoisômeros também

provocou sensíveis alterações nos sinais do espectro de RMN de ^1H com grande aumento na complexidade dos mesmos.

O próximo passo consistiu na reação de mesilação da função álcool secundário. A reação foi feita com largo excesso de trietilamina, e provou ser altamente eficiente tendo sido observado um rendimento quantitativo. O (S)-*N*-3-mesil-(7Z)-tetradecenoil-HSL mostrou um espectro no infravermelho com sinais proeminentes em 1342 e 1169 cm^{-1} , resultantes estiramentos axiais assimétrico e simétrico do grupo SO_2 (Silverstein, 2000) (Anexo 119). O espectro de RMN de ^{13}C atestou claramente a eficiência da reação de mesilação, uma vez que o carbono carbinólico apresentou-se muito mais desblindado (79,9 ppm) se comparado ao reagente não mesilado (68,5 ppm) (Anexo 121). O espectro de RMN de ^1H também atestou a formação do produto mesilado com destaque para o singlete de CH_3SO_2 - em 3,05 ppm (3H, sinal duplicado pela presença dos diastereoisômeros) (Anexo 120).

O intermediário mesilado foi utilizado para a obtenção do dieno isolado (S)-*N*-(2E,7Z)-tetradecadienil-HSL, na etapa final desta síntese. O produto foi obtido mediante reação de eliminação E2 do mesilato gerando uma amida α,β -insaturada, na presença de DBU como base estericamente impedida e não nucleofílica. Esta reação apresentou o menor rendimento (76%) de todas as etapas mostradas no Esquema 13. O acompanhamento da reação por cromatografia em camada delgada mostrou claramente o final da reação após o refluxo, indicando a formação de um produto ativo sob revelação das cromatoplasas sob luz ultravioleta devido à formação de uma carbonila α,β -insaturada que absorve luz no comprimento de onda utilizado (254 nm). O espectro no IV da (S)-*N*-(2E,7Z)-tetradecadienil-HSL mostrou um sinal intenso de carbonila da lactona em 1780 cm^{-1} . Os estiramentos de $\text{C}=\text{C}$ apareceram como dois sinais intensos em 1552 e 1625 cm^{-1} (Anexo 125). Já o

espectro de RMN de ^{13}C atestou claramente a formação da nova insaturação, com sinais em 122,5 ppm (C-2') e 146,4 ppm (C-3') (Anexo 127). O espectro de RMN de ^1H comprovou a formação de uma insaturação com geometria *trans* através dos sinais em 6,88 ppm (dt, H-3', 1H, J 15,3 e 6,9 Hz) e 5,84 ppm (d, H-2', 1H, J 15,3 Hz), como era esperado de uma reação de eliminação básica assistida por aquecimento, gerando o produto de maior estabilidade termodinâmica (Anexo 126). Os sinais dos hidrogênios H-7' e H-8' apareceram na forma de um multipeto em 5,35 ppm (2H). A geometria (*Z*) para a insaturação em C7' foi confirmada através dos deslocamentos químicos em RMN de ^{13}C de C6' e C9', que foram observados em 26,67 e 27,27 ppm. O espectro de massas do produto sintético era idêntico ao reportado para o produto natural (Anexo 124).

Desta forma, reportamos com sucesso a síntese da (*S*)-*N*-(2*E*,7*Z*)-tetradecadienil-HSL, com rendimento global de 67%. Vale ressaltar que não há na literatura quaisquer relatos de síntese desta substância, o que reforça o ineditismo do presente trabalho.

3.3.5. Identificação estrutural dos produtos naturais por co-injeção e comparação de espectros de massas com produtos sintéticos (CG-EM)

Uma vez obtidos todos os produtos sintéticos de interesse, estes foram utilizados em experimentos de co-injeção com os produtos naturais produzidos por *Methylobacterium mesophilicum* em condições metanotróficas, utilizando a técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (70 eV). Em todos os casos estudados, observou-se a perfeita sobreposição de sinais dos cromatogramas e espectros de massas, confirmando portanto as estruturas propostas. A (*S*)-*N*-(7*Z*)-tetradecenoil-HSL

natural foi identificada posteriormente através de técnicas espectroscópicas e por comparação com dados da literatura.

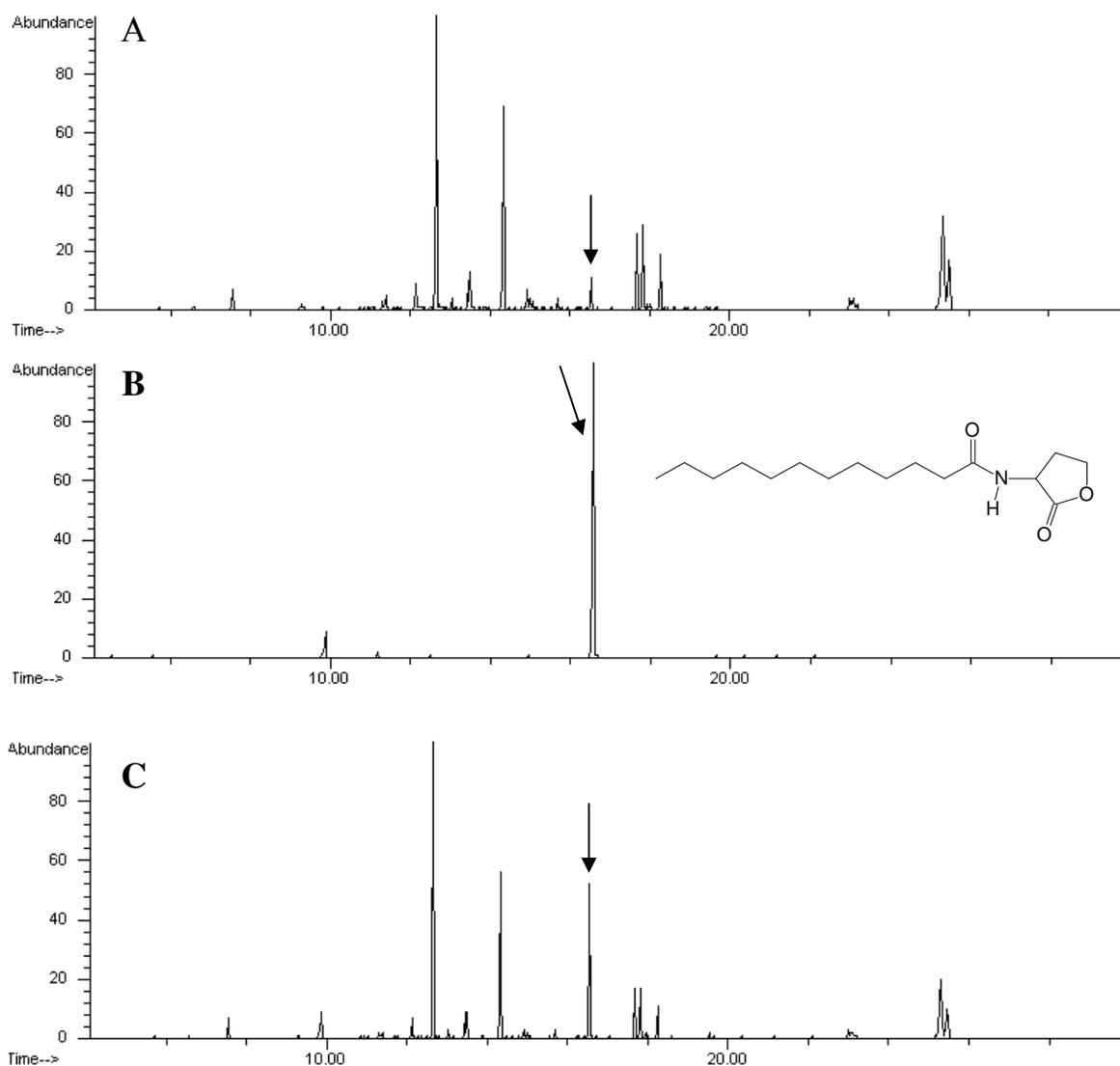


Figura 42. Cromatogramas de íons totais (CG-EM, IE, 70 eV): A. fração acetato de etila do cultivo de *M. mesophilicum*; B. produto sintético (±)-N-dodecanoil-HSL; C. Co-injeção da fração acetato de etila com o produto sintético. Observe o incremento na abundância relativa da N-dodecanoil-HSL natural.

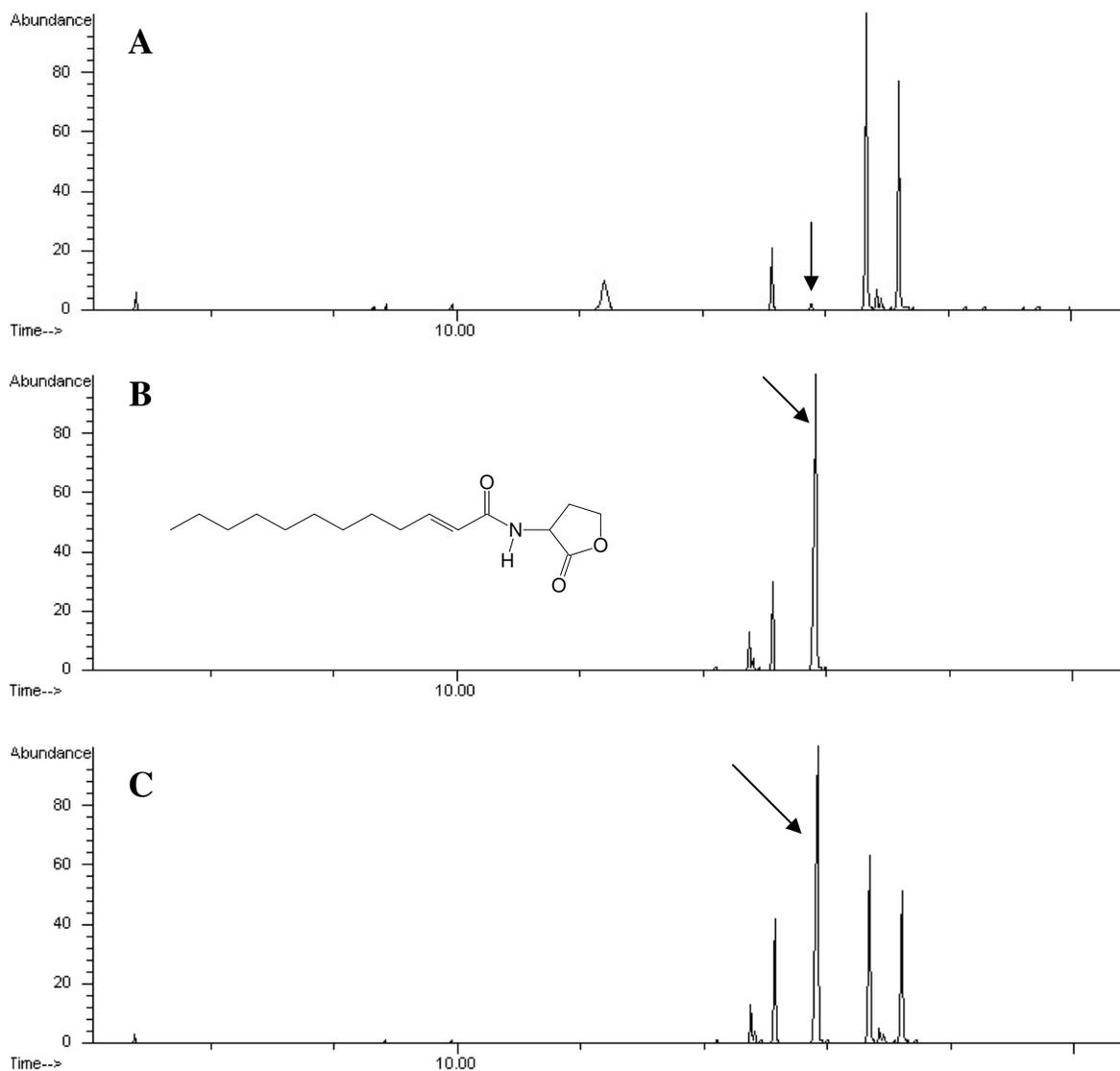


Figura 43. Cromatogramas de íons totais (CG-EM, IE, 70 eV): A. fração F22 semi-purificada do cultivo de *M. mesophilicum*; B. produto sintético (\pm) -(2E)-N-dodecenoil-HSL; C. Co-injeção da fração F22 com o produto sintético.

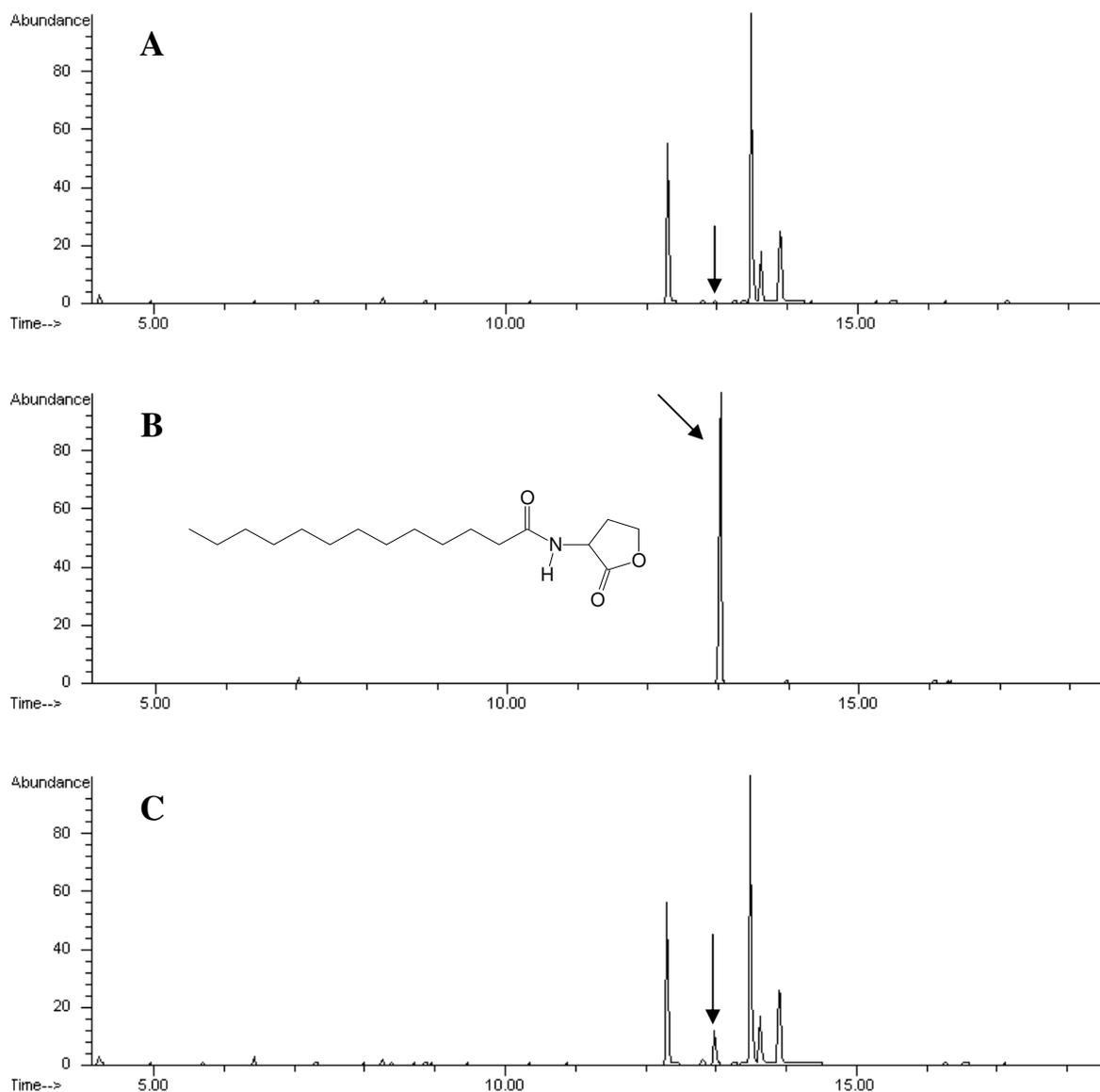


Figura 44. Cromatogramas de íons totais (CG-EM, IE, 70 eV): A. fração F22 semi-purificada do cultivo de *M. mesophilicum*; B. produto sintético (\pm) -N-tridecanoil-HSL; C. Co-injeção da fração F22 com o produto sintético. Todas as análises foram feitas em modo SIM (single ion monitoring) para conferir maior sensibilidade às análises.

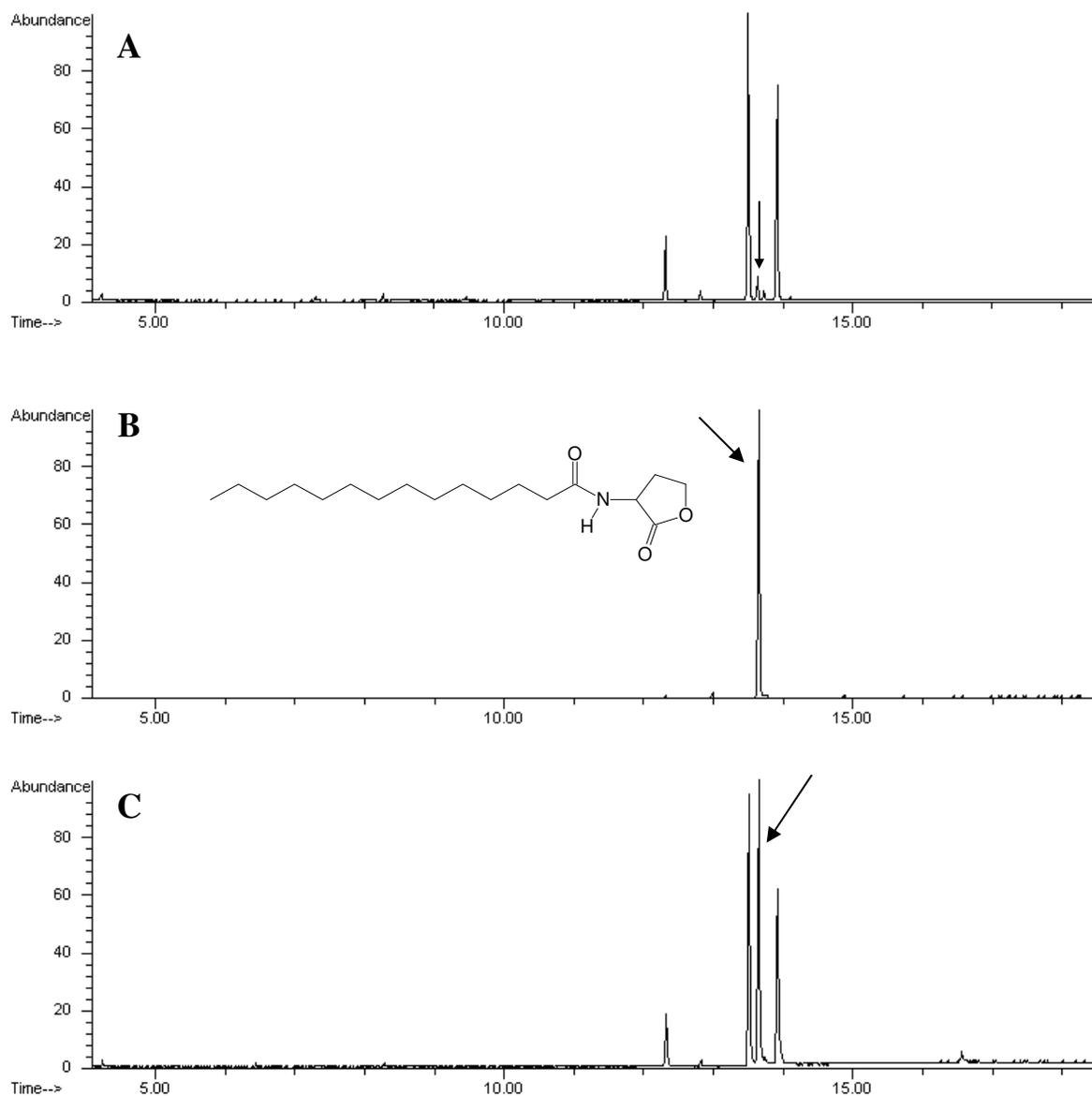


Figura 45. Cromatogramas de íons totais (CG-EM, IE, 70 eV): A. fração F22 semi-purificada do cultivo de *M. mesophilicum*; B. produto sintético (\pm) -N-tetradecanoil-HSL; C. Co-injeção da fração F22 com o produto sintético.

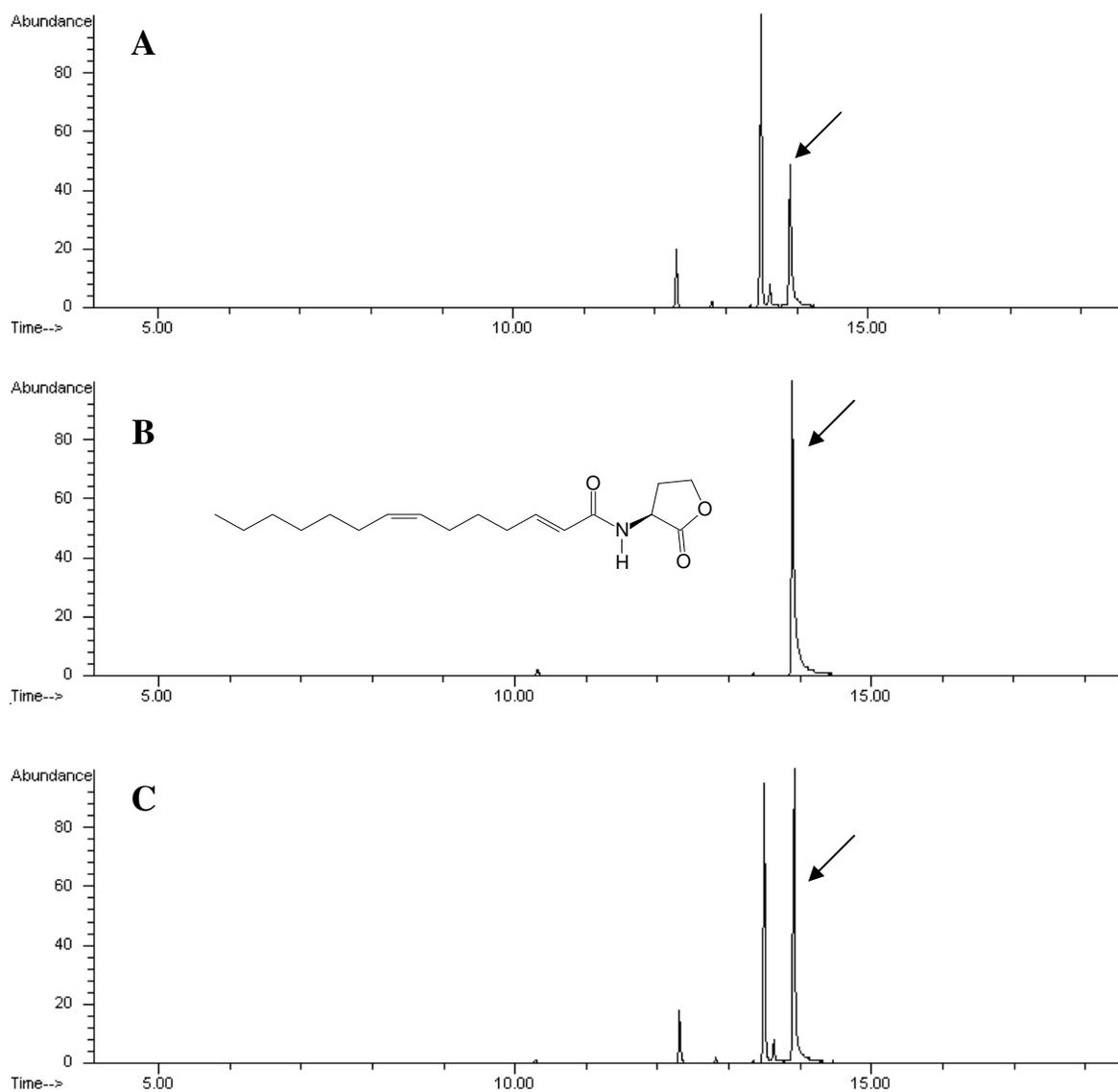


Figura 46. Cromatogramas de íons totais (CG-EM, IE, 70 eV): A. fração F22 semi-purificada do cultivo de *M. mesophilicum*; B. produto sintético (S)-N-(2E,7Z)-tetradecadienil-HSL; C. Co-injeção da fração F22 com o produto sintético.

3.3.6. Determinação da configuração absoluta das acil-HSLs naturais

A última etapa na caracterização estrutural das acil-homosserina lactonas produzidas por *M. mesophilicum* consistiu na determinação da configuração absoluta do centro estereogênico localizado na porção lactona. Dadas as quantidades extremamente pequenas de substâncias disponíveis para análises, foi necessário escolher uma metodologia simples, rápida e principalmente, com alta sensibilidade e capacidade de resolução dos enantiômeros. A técnica escolhida foi a cromatografia gasosa acoplada a detecção por ionização em chama com coluna com fase estacionária quiral Chrompack Chirasil ciclodextrina. Vale ressaltar que nosso grupo de pesquisas foi pioneiro na utilização da técnica de CG-FID com coluna com fase estacionária quiral para determinar a configuração absoluta desta classe de substâncias (Pomini *et al.*, 2005, 2006 e 2007).

A análise inicial da fração F22 bruta proveniente do cultivo de *M. mesophilicum* provou ser impraticável, uma vez que os sinais correspondentes à (*S*)-*N*-tetradecanoil, (*S*)-(7*Z*)-*N*-tetradecenoil e (*S*)-(2*E*,7*Z*)-*N*-tetradecadienil-homosserina lactona eluíram com elevado tempo de retenção, apresentando-se como sinais largos e parcialmente sobrepostos, conforme mostrado na Figura 47. Isto impossibilitava quaisquer estudos de co-injeção com produtos sintéticos enantiomericamente enriquecidos.

Com isto, tornou-se necessário desenvolver um procedimento que possibilitasse a determinação da configuração absoluta destas substâncias em microescala, uma vez que apenas 1,1 mg da mistura de acil-HSLs era disponível, inviabilizando por exemplo estudos extensivos por cromatografia líquida de alta eficiência. A estratégia escolhida consistiu na hidrogenação catalítica de parte da mistura F22, fazendo com que as substâncias contendo

insaturações nas cadeias laterais ((*S*)-(7*Z*)-*N*-tetradecenoil, (*S*)-(2*E*,7*Z*)-*N*-tetradecadienil e (*S*)-(2*E*)-*N*-dodecenoil-HSL) se convertessem nos produtos saturados ((*S*)-*N*-dodecanoil e (*S*)-*N*-tetradecanoil-HSL), sem que houvessem alterações químicas no centro quiral da porção lactônica. Além disso, este procedimento permitiu a determinação da configuração absoluta da (*S*)-(2*E*)-*N*-dodecenoil-HSL com maior precisão, uma vez que este metabólito se apresentava em quantidades extremamente pequenas na amostra.

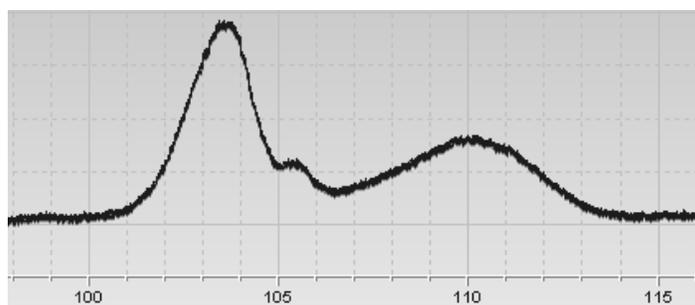
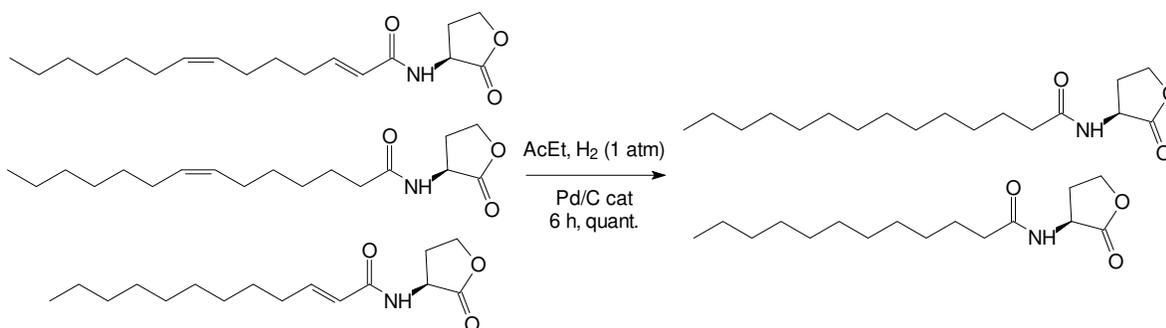


Figura 47. Ampliação do cromatograma (CG-FID f.e. quiral) da fração F22 do cultivo de M. mesophilicum. A coluna não foi capaz de resolver com eficiência a mistura de acil-homosserina lactonas com quatorze átomos de carbono na cadeia lateral.

A derivatização foi realizada utilizando-se uma quantidade extremamente pequena (0,5 mg) da amostra, que foi dissolvida em acetato de etila. A hidrogenação catalítica foi realizada utilizando como catalisador o paládio sobre carbono, em atmosfera de hidrogênio (1 atm). A reação foi extremamente eficiente, convertendo os reagentes em produtos de forma praticamente quantitativa (Esquema 14). A eficiência do procedimento adotado pode ser visualizada nos cromatogramas de íons totais mostrados na Figura 48.



Esquema 14. Reação de hidrogenação catalítica de parte da mistura F22 obtida do cultivo metanotrófico de *M. mesophilicum*.

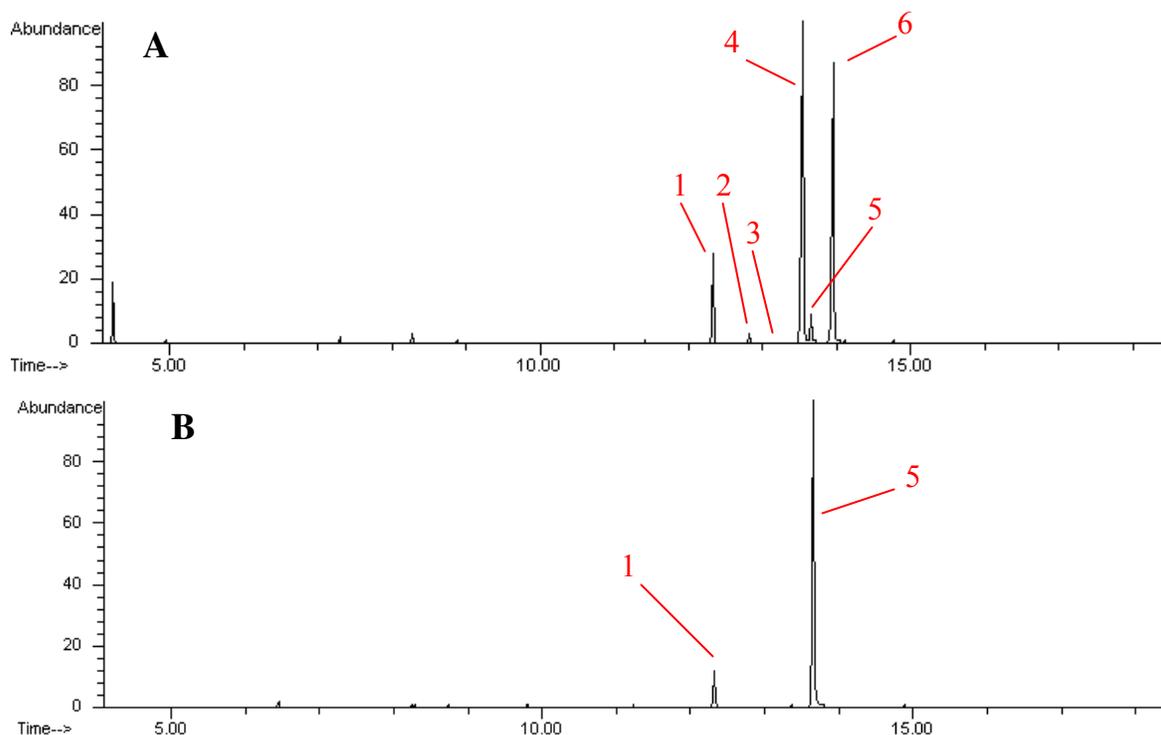


Figura 48. Cromatogramas de íons totais (CG-EM, 70 eV) A. da fração F22 do cultivo de *M. mesophilicum* e B. dos produtos da reação de hidrogenação catalítica. Note a conversão dos reagentes insaturados (S)-N-dodecenoil-HSL (2), (S)-N-(7Z)-tetradecenoil-HSL (4) e (S)-N-(2E,7Z)-tetradecadienil-HSL (6) nos respectivos derivados reduzidos (S)-N-dodecanoil (1) e (S)-N-tetradecanoil-HSL (5).

Este procedimento viabilizou a determinação da configuração absoluta dos diversos metabólitos presentes via CG-FID com fase estacionária quiral, com exceção da *N*-tridecanoil-HSL que estava presente em quantidades extremamente pequenas, indetectáveis nas condições de análise.

A análise do produto sintético (\pm)-*N*-tetradecanoil-HSL na coluna Chrompack chirasil ciclodextrina mostrou a presença de dois sinais resolvidos, em 103,77 e 105,42 min, com abundâncias relativas praticamente idênticas (Figura 49). O produto sintético (*S*)-*N*-tetradecanoil-HSL apresentou tempo de retenção de 105,44 min determinando assim os tempos de retenção de cada enantiômero. A análise da fração F22 natural hidrogenada revelou a presença de um único sinal em 105,40 min, coerente com o observado para o enantiômero (*S*). Finalmente, a co-injeção do produto natural hidrogenado com a mistura racêmica sintética levou a um aumento na abundância relativa do enantiômero (*S*) em 105,31 min se comparado ao sinal do enantiômero (*R*) em 103,56 min. Durante a análise do produto natural hidrogenado, não foi observado qualquer sinal residual para o enantiômero (*R*), indicando que todos os metabólitos, saturados e insaturados contendo quatorze átomos de carbono na cadeia acila lateral possuíam o centro estereogênio na porção lactona com estereoquímica (*S*).

O mesmo procedimento descrito acima foi adotado para a (*S*)-*N*-dodecanoil-HSL natural, que apareceu com um tempo de retenção sensivelmente menor se comparado ao homólogo com quatorze átomos de carbono (Figura 50). Mais uma vez, foi constatado que ambos produtos naturais contendo doze átomos de carbono na cadeia acila lateral possuíam estereoquímica (*S*).

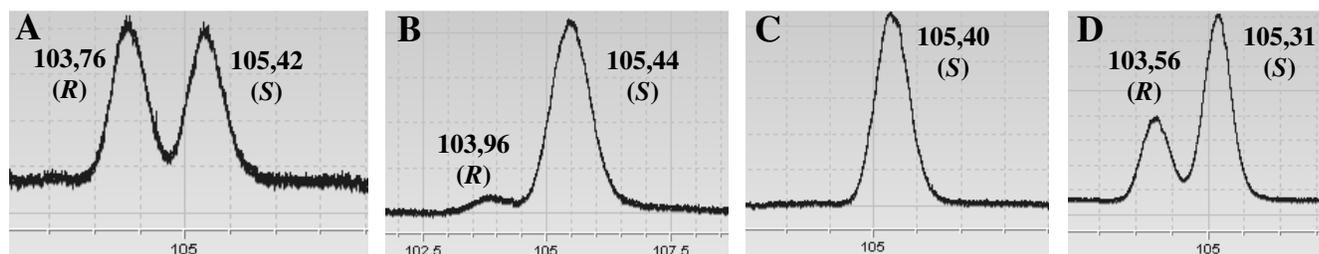


Figura 49. Seções ampliadas de cromatogramas (CG-FID) com fase estacionária quiral Chrompack chirasil ciclodextrina. A. Produto sintético (\pm)-N-tetradecanoil-HSL; B. Produto sintético (S)-N-tetradecanoil-HSL; C. Fração F22 hidrogenada do cultivo de *M. mesophilicum*; D. Co-injeção produto sintético (\pm)-N-tetradecanoil-HSL e fração F22 hidrogenada (1/1, 1 mg/mL cada).

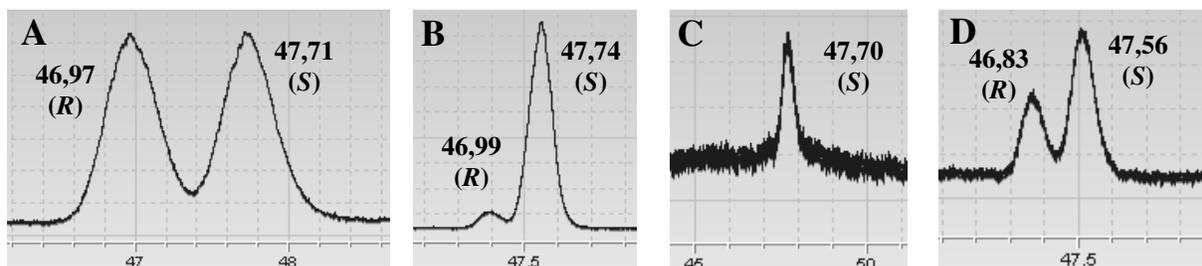


Figura 50. Seções ampliadas de cromatogramas (CG-FID) com fase estacionária quiral Chrompack chirasil ciclodextrina. A. Produto sintético (\pm)-N-dodecanoil-HSL; B. Produto sintético (S)-N-dodecanoil-HSL; C. Fração F22 hidrogenada do cultivo de *M. mesophilicum*; D. Co-injeção (1/1) do produto sintético (\pm)-N-dodecanoil-HSL (0,1 mg/mL) e fração F22 hidrogenada (1 mg/mL).

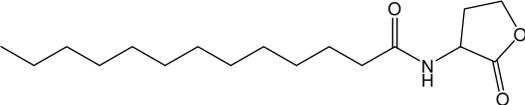
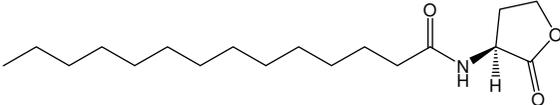
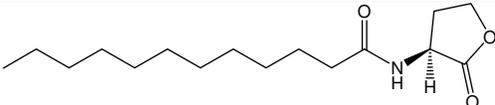
Assim como em todos os outros casos reportados na literatura, o microrganismo *M. mesophilicum* produz acil-homosserina lactonas com configuração absoluta (*S*) no centro estereogênio da porção lactona. Vale ressaltar que nenhuma das substâncias estudadas tinha sua configuração absoluta estabelecida anteriormente na literatura.

3.3.7. Outras ocorrências dos metabólitos detectados em *M. mesophilicum*

Nos últimos anos, foram relatadas algumas ocorrências das acil-HSLs de *M. mesophilicum* reportadas neste trabalho em diferentes gêneros de bactérias Gram-negativas, com exceção da (*S*)-(2*E*)-dodecenoil-HSL que é inédita. A Tabela 4 mostra os relatos encontrados na literatura de isolamento ou detecção dos metabólitos em estudo.

Tabela 4. Ocorrências prévias de algumas das acil-HSLs produzidas por *M. mesophilicum* isolado de laranjeira, incluindo detalhamento sobre técnicas de caracterização estrutural utilizadas e fatores fenotípicos controlados pela acil-HSL.

Espécie	Técnicas utilizadas	Fatores fenotípicos/Refs.
<i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	Bioensaios; CCD/biorevelação; CLAE-ESI-EM-EM; RMN ¹ H e ¹ H- ¹ H COSY	Produção de exopolissacarídeo (Penalver, 2006 a,b)
<i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	CCD/biorevelação; CLAE-ESI-EM-EM; RMN ¹ H e ¹ H- ¹ H COSY	Produção de exopolissacarídeo (Penalver, 2006 a,b)

<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Bioensaios; CCD/biorevelação; CLAE; CG-EM(CI); FAB-HRMS; RMN ¹ H e ¹ H- ¹ H COSY	Produção de exopolissacarídeo, morfologia da colônia (Puskas, 1997)
		
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	LC-QqQLIT	Agregação e motilidade celular (Ortori, 2007)
Diversas bact. marinhas Alphaproteobacteria	Bioensaios; CCD/Biorevelação; CG- EM	- (Döbler, 2005)
		
<i>Aeromonas hydrophyla</i> , <i>Aeromonas salmonicida</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i>	CG-EM	- (Cataldi, 2007)
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	LC-QqQLIT	Agregação e motilidade celular (Ortori, 2007)
<i>Rhizobium etli</i>		Motilidade celular (Rosemeyer, 1998)
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Bioensaios; CCD/Biorevelação; CLAE-ESI-EM-EM	Regulação de interações simbióticas e exopolissacarídeos (Teplitiski, 2003; Marketon, 2002)
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	CLAE-EM	- (Gotschlich, 2001)
		
<i>Aeromonas hydrophyla</i> , <i>A.</i> <i>salmonicida</i> , <i>Yersinia</i> <i>enterocolitica</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> , <i>P. fluoresces</i> , <i>Serratia liquefaciens</i>	CG-EM	- (Cataldi, 2007)
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	LC-QqQLIT	Agregação e motilidade celular (Ortori, 2007)
<i>Rhizobium etli</i>		Motilidade celular (Rosemeyer, 1998)
<i>Halomonas anticariens</i>	Bioensaios; CCD/Biorevelação; CG- EM; CLAE-ESI-EM-EM	- (Llamas, 2005)

<i>Brucella melitensis</i>	Bioensaios; CCD/Biorevelação; FAB-EM; CLAE-ESI- EM	Produção de flagelos (Delrue, 2005; Taminiau, 2002)
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Bioensaios; CCD/Biorevelação; HPLC-ESI-MS-MS	Regulação de interações simbióticas e exopolissacarídeos (Teplitiski, 2003; Marketon, 2002)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Bioensaios; CCD/Biorevelação; CG-EM	Síntese de antibiótico (Park, 2001)
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	CLAE-EM	- (Gotschlich, 2001)

Como pode ser notado acima, diversas bactérias produzem tanto a dodecanoil quanto a tetradecanoil-HSL, o que pode ser explicado pela similaridade estrutural dos respectivos acil-ACPs que são substratos para a síntese destes metabólitos nas proteínas homólogas de LuxI. O uso de um equipamento de alta sensibilidade (cromatógrafo líquido acoplado a um detector híbrido quadrupolo/armadilha de íons linear) permitiu a Ortori e colaboradores (2007) mostrar que a bactéria *Yersinia pseudotuberculosis* pode gerar mais de 24 acil-HSLs com diferentes cadeias acila, porém mostrando maior preferência por alguns acil-ACPs específicos.

3.3.8. Avaliação da atividade biológica de produtos sintéticos e fração natural das acil-HSLs produzidas por *Methylobacterium mesophilicum*

Diversos produtos sintéticos e a fração natural F22 proveniente do cultivo de *M. mesophilicum* em meio CHO13 e que contém as acil-HSLs naturais foram ensaiadas com o biorepórter, com o objetivo de verificar se estas substâncias são as responsáveis pela atividade biológica observada com o extrato acetato de etila bruto (Tópico 3.3.1). Como pode ser observado na Figura 51, todos os produtos sintéticos e natural apresentaram atividade

biológica positiva, corroborando portanto os resultados observados para o extrato bruto e confirmando a origem da atividade biológica observada.

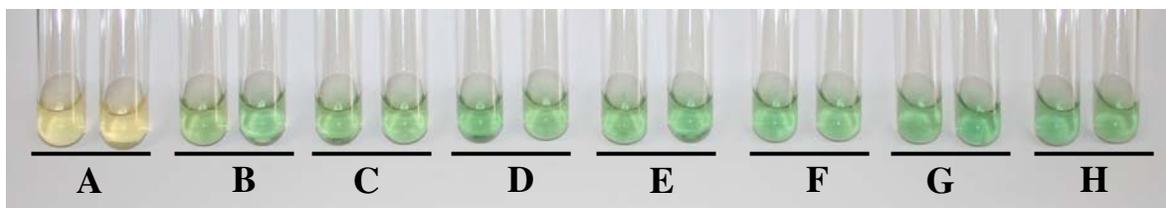


Figura 51. Avaliação da atividade biológica de comunicação bacteriana com o biossensor *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4). A. Etanol (branco); B. (S)-3-(oxooctanoil)-HSL sintética (controle positivo); C. (S)-N-dodecanoil-HSL; D. (±)-N-tridecanoil-HSL; E. (S)-N-tetradecanoil-HSL; F. (S)-N-(2E)-dodecenoil-HSL; G. (S)-N-(2E, 7Z)-tetradecadienil-HSL; H. Fração F22 cultivo *M. mesophilicum*.

3.3.8.1. Avaliação da atividade antimicrobiana das acil-homosserina lactonas sobre bactérias Gram-positivas endofíticas da laranja

O microrganismo *M. mesophilicum* é apenas um dos vários endofíticos que ocorrem no interior da laranja. É notória a grande quantidade de bactérias Gram-positivas que também ocorrem como endofíticos, como espécies dos gêneros *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Nocardia*, *Xanthomonas*, *Nocardiopsis* e *Streptomyces*. Em plantas atacadas pela doença da clorose variegada dos citros causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, entretanto, observa-se um grande aumento na proporção de diversas espécies do gênero *Methylobacterium*, se comparado aos outros microrganismos (vide Introdução). Recentemente, foi demonstrado que a espécie *M. mesophilicum* produz diversas bacteriocinas de

natureza protéica que podem colaborar para o controle das populações de outros microrganismos.

Entretanto, existem relatos na literatura de que diversas acil-homosserina lactonas exercem atividades antimicrobianas sobre bactérias Gram-positivas (Kaufmann *et al.*, 2005; Qazi *et al.*, 2006). A presente tese de doutorado também abordou o assunto em tópicos anteriores. Desta forma, levantou-se a hipótese de que as acil-HSLs produzidas por *M. mesophilicum* poderiam exercer algum tipo de atividade antimicrobiana sobre as diversas bactérias Gram-positivas que co-habitam no interior dos tecidos da laranjeira.

Para testar tal hipótese, os microrganismos *Bacillus sp.* CL15, *Bacillus sp.* CL16, *Curtobacterium flaccumfaciens* ER 1/5 e *Nocardiosis sp.* isolados como endofíticos de laranjeira foram submetidos a ensaios de determinação de concentração inibitória mínima sobre algumas das acil-HSLs sintéticas, idênticas às produzidas por *M. mesophilicum*. Foram ensaiadas a (S)-N-dodecanoil, (S)-N-(2E)-dodecenoil, (S)-N-tetradecanoil e (S)-N-(2E, 7Z)-tetradecadienil-HSL, por serem os produtos sintéticos disponíveis em maiores quantidades.

De uma forma geral, os microrganismos ensaiados apresentam diferentes perfis de crescimento *in vitro*, exigindo portanto uma atenção especial quanto às condições em que cada um foi utilizado no ensaio. As cepas *Bacillus sp.* CL 16 e *Curtobacterium flaccumfaciens* ER 1/5 apresentam crescimento exuberante e rápido, sendo plenamente suficiente um tempo de incubação de 24 h tanto na preparação do inóculo (em tubos inclinados contendo meio sólido) quanto no crescimento durante o ensaio antimicrobiano. Já a cepa *Bacillus sp.* CL15 apresenta um crescimento menos acelerado, tendo sido incubada por 48 h em todos os procedimentos.

Já a espécie *Nocardiosis sp.* apresentou o perfil de crescimento mais distinto de todo o grupo. Esta espécie não gerou uma quantidade adequada de massa celular nos cultivos em *slant*, mesmo durante longos períodos de incubação. Assim, os inóculos foram preparados em erlenmeyers contendo meio líquido, incubados durante três dias em agitador orbital (*shaker*). Além disso, as células cresceram como “pelotas” agrupadas, o que facilitou a remoção e lavagem das mesmas, porém tornou necessário um procedimento de homogeneização do inóculo mais drástico, utilizando um vortexador. Apesar de trabalhoso, o procedimento mostrou-se eficiente. Tais características deixam claro a necessidade de uma cuidadosa avaliação de cada situação antes da execução dos bioensaios.

Como principais resultados, o controle branco feito com água e dimetilsulfóxido não foi capaz de inibir o crescimento de nenhum dos microrganismos em estudo. Já o controle positivo com cloranfenicol foi extremamente eficiente, tendo inibido o crescimento de todos os microrganismos na faixa de concentração de 15,62 a 7,81 ppm. Um perfil típico é mostrado na Figura 52. As demais microplacas são mostradas no Anexo 133.

Já as acil-HSLs sintéticas se mostraram muito pouco ativas sobre todos os microrganismos. No caso das espécies *C. flaccumfaciens*, *Bacillus sp.* CL16 e *Bacillus sp.* CL15, apenas a (S)-N-(2E, 7Z)-tetradecadienil-HSL apresentou atividade biológica, ainda assim em altas concentrações (500 e 1000 ppm). No caso da espécie *Nocardiosis sp.* todas as acil-HSLs apresentaram atividade a 1000 ppm, com exceção da (S)-N-(2E, 7Z)-tetradecadienil-HSL que foi ativa a 500 ppm. Se comparadas ao controle de cloranfenicol, nenhuma das acil-HSLs testadas é potencialmente interessante como antibiótico comercial.

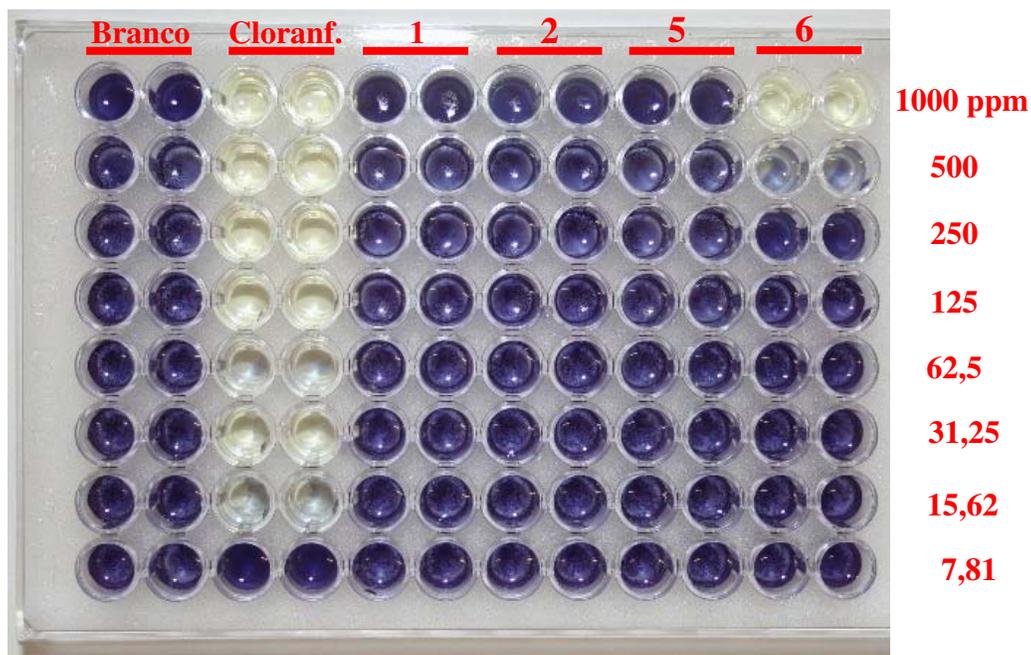


Figura 52. Exemplo de bioensaio CIM com o microrganismo *Bacillus sp.* CL15, endofítico da laranja. As zonas de inibição do crescimento microbiano são visualizadas em amarelo. 1. Branco (água/DMSO 20%); 2. Controle positivo (cloranfenicol); 3. (S)-N-dodecanoil-HSL; 4. (S)-N-(2E)-dodecenoil-HSL; 5. (S)-N-tetradecanoil-HSL. 6. (S)-N-(2E,7Z)-tetradecadienil-HSL.

Outrossim, são mínimas as chances das acil-HSLs produzidas por *M. mesophilicum* exercerem alguma atividade antimicrobiana sobre endofíticos Gram-positivos da laranja. Para fins de balizamento, estimamos que o microrganismo *M. mesophilicum* tenha produzido em torno de 0,1375 ppm de acil-HSLs em meio CHOI3 (1,1 mg para 8 litros), enquanto que a substância mais ativa neste ensaio antimicrobiano apresentou-se viável a longínquos 500 ppm.

É claro que o cultivo em meio líquido pode ser considerado como planctônico, e nestas condições sabe-se que as acil-HSLs atingem concentrações muito menores se comparado aos biofilmes naturais. Por exemplo, estima-se que a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* produza em biofilme uma concentração total de acil-HSLs de 178 ppm, enquanto que em cultivos planctônicos esta concentração está na faixa de 1,48 ppm, ou seja, 120 vezes menor (Charlton *et al.*, 2000). Se o mesmo fator de multiplicação (120 x) for aplicado à quantidade de acil-HSLs produzidas por *M. mesophilicum* em cultivo planctônico, poder-se-ia estimar grosseiramente uma concentração de 16,5 ppm em biofilmes, ainda assim muito longe do valor estimado para o MIC da substância mais ativa (500 ppm).

Outro ponto importante a ser destacado é a visível dependência da estrutura química para atividade antimicrobiana das acil-HSLs. Como descrito anteriormente (Tópico 3.2), 3-oxo-acil-HSLs exibem uma atividade antimicrobiana maior do que os homólogos que não possuem carbonila na posição 3 (Kauffman *et al.*, 2005). Neste caso, todas as acil-HSLs produzidas por *M. mesophilicum* não possuem este maior grau de oxigenação, constituindo também uma possível explicação para a inexistência de uma expressiva atividade antimicrobiana.

RESULTADOS E DISCUSSÃO – SEGUNDA PARTE

DEFESA QUÍMICA EM OPILIÕES

3.4. Estratégias de defesa do opilião *Hoplobunus mexicanus*

Os aracnídeos da ordem Opiliones exibem uma forma compacta devido a larga articulação entre o cefalotórax e o abdômen. Três subordens são tradicionalmente reconhecidas: Cyphophthalmi com aproximadamente 100 espécies espalhadas em torno do mundo; Palpatores com aproximadamente 2500 espécies concentradas na região Holoártica e Laniatores com aprox. 3500 espécies concentradas nas zonas tropicais (Shultz *et al.*, 1998; Hara *et al.*, 2005). Frequentemente a subordem Palpatores é dividida nas subordens Eupnoi e Dyspnoi (Hara *et al.*, 2005). Tratam-se de animais que habitam lugares escuros ou sombreados preferencialmente e que são ativos principalmente à noite. Durante o dia eles normalmente se escondem sob toras e rochas, entre detritos vegetais, na vegetação densa ou ainda em paredes de cavernas. Sua alimentação consiste basicamente de insetos vivos, e ocasionalmente de animais mortos ou líquidos vegetais (Eisner *et al.*, 1978).

Há muito tempo os naturalistas reconhecem que os mecanismos de defesa química são comuns em artrópodes, incluindo os opiliões. Vários destes mecanismos de defesa se baseiam na descarga de substâncias químicas irritantes ou repelentes a partir de sacos integumentais. A partir da década de 1950 a constituição química das secreções de defesa de diversas espécies de opiliões começou a ser estudada. A primeira contribuição nesta área foi

provida por Estable e colaboradores (1955) durante o estudo da secreção de defesa do opilião uruguaio *Acanthopachylus aculeatus*. Este estudo é considerado um marco na história da exocrinologia de artrópodes e levou ao isolamento de três substâncias altamente voláteis e irritantes: 2,3-dimetil-1,4-benzoquinona, 2,5-dimetil-1,4-benzoquinona e 2,3,5-trimetil-1,4-benzoquinona, capazes de repelir aranhas predadoras por exemplo (Eisner *et al.*, 2004).

Apesar do grande número de espécies existentes, poucas secreções de defesa foram estudadas quimicamente. Apenas 37 espécies da subordem Laniatores e 11 espécies da subordem Eupnoi foram estudadas, num universo de quase 6100 espécies no total. A maioria dos Laniatores estudados produzem fenóis e quinonas como secreções de defesa e raramente álcoois e cetonas de cadeia curta (Eisner *et al.*, 1971, 1977; Roach *et al.*, 1980, Estable *et al.*, 1955; Fieser e Ardao, 1956; Acosta *et al.*, 1993; Gnaspini e Cavalheiro, 1998; Machado *et al.*, 2005; Machado *et al.*, 2007). Uma espécie da subfamília Triaenonychidae (Laniatores) produz *N,N*-dimetil-feniletilamina e bornil ésteres (Ekpa *et al.*, 1984). Já os representantes da família Leiobnuninae (subordem Eupnoi) produzem cetonas e alcóois de cadeia curta como secreções de defesa (Blum e Edgar, 1971; Meinwald *et al.*, 1971; Jones *et al.*, 1976, 1977; Ekpa *et al.*, 1985), enquanto um exemplar da família Phalangiinae (subordem Eupnoi) produz naftoquinonas (Wiemer *et al.*, 1978).

As glândulas produtoras de secreções de defesa em opiliões são sacos conectados ao exterior por meio de um canal e uma abertura pequena denominada ozoporo, e se localizam nas margens anteriores do cefalotórax (Figura 53) (Machado *et al.*, 2007). As paredes destes sacos possuem três camadas histológicas básicas: uma membrana basal, uma camada intermediária de epitélio glandular e uma membrana interna de natureza quitinosa, que

protege o interior do animal contra as substâncias potencialmente tóxicas produzidas como secreções de defesa (Holmberg, 1986). As glândulas são esvaziadas por uma pressão indireta de músculos ou órgão adjacentes. Em algumas poucas espécies as secreções são expelidas na forma de um jato forçado contra o organismo agressor. Entretanto, na maior parte dos casos as secreções de defesa são descarregadas na forma de pequenas gotas a partir da abertura da glândula e que escorrem por capilaridade até o opistosoma (lateral inferior do abdômem), e se acumulam nas laterais do próprio corpo do animal. Nos animais da subordem Laniatores, as secreções são normalmente diluídas com fluido entérico que parte da boca do animal. Em algumas espécies das subordens Laniatores e Cyphophthalmi as secreções podem ainda ser transferidas do corpo do opilião para o agressor, sendo que o opilião usa uma das patas como uma espécie de “pincel” para espalhar a substância irritante sobre o agressor (Holmberg, 1986). Por outro lado, existe um relato para a espécie *Rhampsinitus levis* onde não se observa a emissão de um líquido a partir da glândula, mas sim um gás irritante (Juberthie, 1961).

O principal papel das secreções de defesa de opiliões é repelir predadores. Entretanto, existem evidências de repulsão direta de formigas, aranhas e outros opiliões. Em menor grau, sabe-se que alguns animais são capazes de repelir sapos, escorpiões e outros artrópodes (Holmberg, 1986; Machado *et al.*, 2005). Por outro lado, existem evidências de que a secreção de defesa produzida por *Acanthopachylus aculeatus* é ativa sobre várias bactérias e protozoários (Estable *et al.*, 1955). Entretanto, ainda não há estudos mostrando se o opilião usa a secreção de defesa conscientemente como agente antibacteriano ou se trata apenas de um fato incidental (Holmberg, 1986). Existem também evidências de que as secreções de defesa podem ser utilizadas como feromônios de alarme pelos opiliões, como

mostrado anteriormente na espécie *Acutisoma longipes* (Machado *et al.*, 2002).

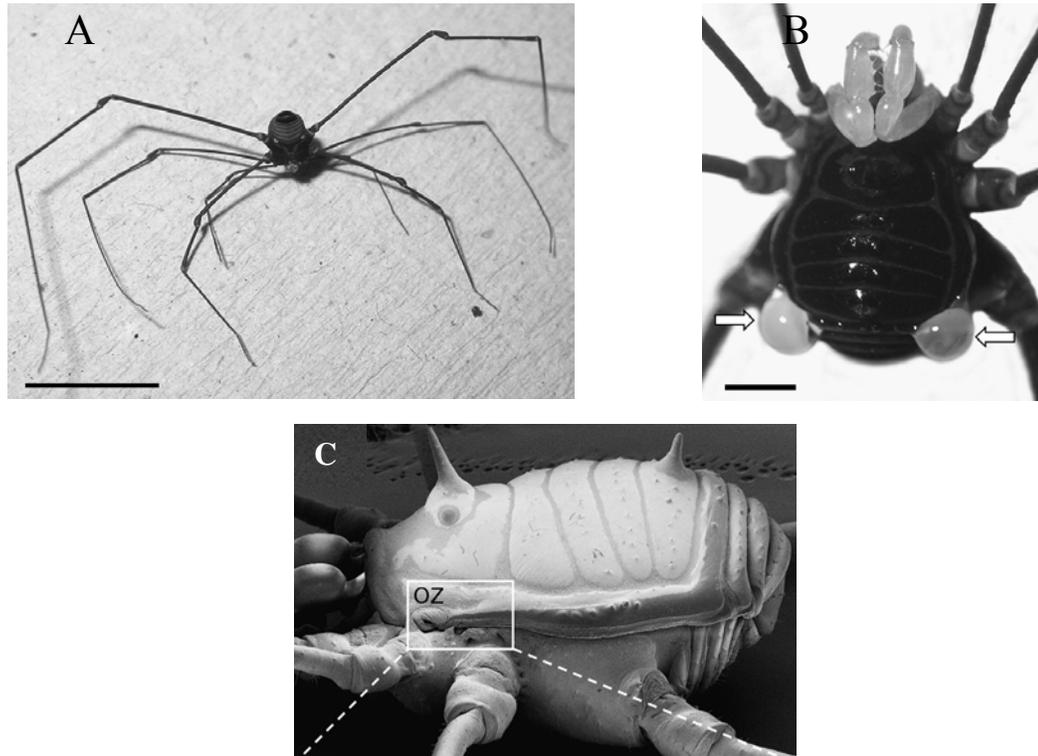


Figura 53. A. Exemplar de *Camarana flavipalpi* (escala: 1 cm); B. detalhe mostrando as gotas contendo a secreção de defesa constituída por fluido entérico e 2-metil-5-etil-fenol (escala: 1 mm). C. Fotomicrografia eletrônica de varredura mostrando o ozoóporo (OZ), saída da glândula exócrina (Machado *et al.*, 2007).

As secreções de defesa não são a única arma utilizada pelos opiliões contra predadores. Outras armas são a tanatose em que o animal se retrai e/ou cessa movimentos, passando a impressão ao predador de que está morto, e a cripse, onde o animal é capaz de sobreviver sem uma das pernas que pode por

ventura estar presa pelo predador. Apesar de todas as espécies de opiliões possuírem as glândulas produtoras de secreção, algumas espécies não utilizam este artifício de defesa. Nas espécies produtoras, normalmente as secreções de defesa são a última arma utilizada contra os predadores, provavelmente devido ao alto custo energético que a biossíntese destas substâncias deve representar aos opiliões (Machado, 2007; Blum, 1971 e 1985). Além disso, algumas espécies são capazes de controlar a quantidade de secreção expelida de acordo com a intensidade do ataque do agressor (Eisner, 1971).

3.4.1. Caracterização da secreção produzida por *Hoplobunus mexicanus*

O opilião *Hoplobunus mexicanus* ROEWER (1915) da superfamília Gonyleptoidea ocorre na região nordeste do México (Figura 54). Assim como várias outras espécies de opiliões, este animal possui artifícios de defesa contra predadores, como por exemplo a tanatose e a defesa química (Figura 55). Entretanto, decidiu-se por estudar este animal dada uma característica única e previamente não observada em aracnídeos desta classe, a emissão de sons e estridulações como estratégia de defesa contra predadores.

Porém, o enfoque deste trabalho está na segunda estratégia de defesa utilizada por este opilião, o uso de secreções químicas. A secreção produzida por *H. mexicanus* é incolor e de cheiro forte, sendo expelida pelas glândulas laterais do cefalotórax em grande quantidade. O objetivo desta seção da presente tese consistiu na caracterização química das secreções de defesa produzidas, em colaboração com o Prof. Dr. Glauco Machado, do Instituto de Biociências da USP.



Figura 54. Visão superior de indivíduos macho (esquerda) e fêmea (direita) de Hoplobunus mexicanus.



Figura 55. Dois indivíduos de H. mexicanus em tanatose. Observe a retração do animal, dando a impressão de estar morto.

O primeiro passo deste trabalho consistiu na caracterização fotomicrográfica da saída da glândula exócrina produtora da secreção de defesa. Os experimentos foram realizados pelo Dr. Glauco Machado,

utilizando a técnica de microscopia eletrônica de varredura (SEM). O resultado é mostrado na Figura 56.

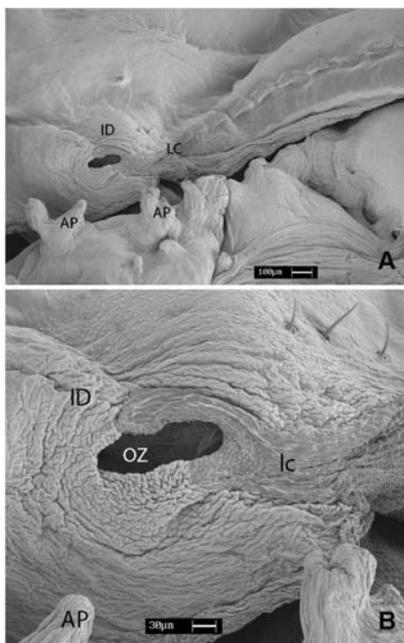


Figura 56. A. Morfologia externa do ozóporo e margem lateral do canal condutor de um indivíduo macho de H. mexicanus. B. Detalhe do ozóporo. Abreviações: AP = apófise; OZ = ozóporo; ID = domo integumentar; LC = canal lateral.

A secreção de defesa de um indivíduo macho adulto de *H. mexicanus* (5 mg) foi coletada com o auxílio de uma pinça e com um chumaço de algodão tratado previamente com solventes, livre de contaminações. O uso de um estereoscópio auxiliou durante a coleta do material, evitando a absorção excessiva de fluido entérico que é emitido antes da secreção de defesa pela glândula exócrina. Imediatamente após a coleta, o material foi suspenso em acetato de etila em um frasco hermético, para evitar a evaporação das substâncias de defesa. A análise da secreção por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas revelou a presença de dois componentes

de voláteis, o 2,5-dimetil-fenol e o 2-metil-5-etil-fenol, com abundâncias relativas de aproximadamente 44 e 56% respectivamente (Figura 57).

O espectro de massas do 2,5-dimetil-fenol apresentou o íon molecular em m/z 122 como pico base do espectro. O segundo pico mais intenso m/z 107 (95 %) correspondia à perda de uma metila pelo íon molecular. Em seguida, os fragmentos mais intensos correspondiam ao íon tropílio (m/z 91, 21%) e íon fenila (m/z 77, 26%), típicos de compostos aromáticos (Figura 57).

O 2-metil-5-etil-fenol apresentou um pico do íon molecular intenso em m/z 136 (44 %). O pico base do espectro correspondeu à fragmentação correspondente à perda de uma metila ($M^+ - CH_3$) em m/z 121. Assim como observado no caso do 2,3-dimetil-fenol, os íons m/z 91 e 77 também estavam presentes com abundância relevante (16 e 14% respectivamente) (Figura 57).

Apesar de constituírem uma ferramenta importante na elucidação estrutural dos metabólitos de interesse, os espectros de massas não forneceram quaisquer informações à respeito do padrão de substituição dos anéis aromáticos. A purificação dos metabólitos seria impraticável dada a alta volatilidade dos mesmos, além da pequena massa disponível para experimentos de purificação. Desta forma, procedeu-se à análise do espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio da mistura. As diferenças de abundância de cada componente foram observadas claramente no espectro de RMN de 1H . A região correspondente aos deslocamentos químicos dos hidrogênios aromáticos deixou claro o padrão de substituição 1,2,5 para o 2-metil-5-etil-fenol, apresentando um singleto em 6,63 ppm, um dubleto com acoplamento *orto* em 7,00 ppm (J 7,62 Hz) e um dubleto com acoplamento *orto* em 6,69 ppm (J 7,62 Hz). Os hidrogênios do metileno ligado ao anel aromático apareceram em 2,56 ppm como um quarteto (J 7,63 Hz) acoplando-se à metila terminal do grupo etila em 1,20 ppm (triplete, J 7,63 Hz). A metila

ligada diretamente ao anel aromático na posição 2 apresentou-se como um singlete em 2,21 ppm (Figura 58, Anexo 134).

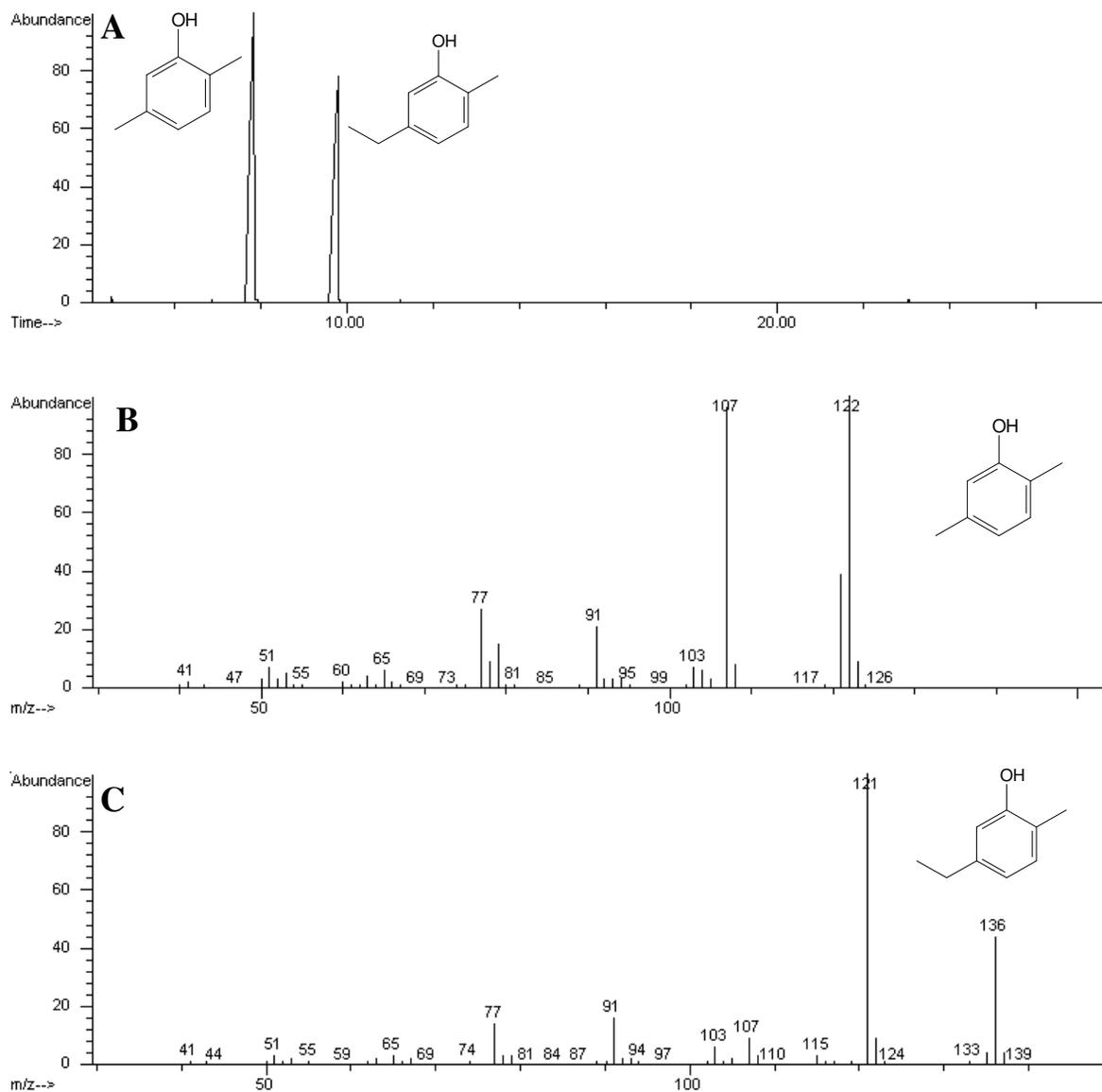


Figura 57. A. Cromatograma de íons totais (CG-EM, 70 eV) da secreção de defesa de *H. mexicanus*; B. Espectro de massas do 2,5-dimetil-fenol; C. Espectro de massas do 2-metil-5-etil-fenol.

Já o 2,5-dimetil-fenol apresentou sinais de maior abundância, com um singlete em 6,60 ppm, um dubleto com acoplamento orto em 7,03 ppm (J 7,63 Hz) e um dubleto com acoplamento orto em 6,66 ppm (J 7,63 Hz). A metila ligada na posição 2 do anel aromático apareceu em 2,20 ppm, enquanto que a metila na posição 5 apresentou-se mais desblindada, em 2,27 ppm (Figura 58, Anexo 134).

A confirmação das posições dos substituintes no anel aromático foi realizada através da análise do espectro de RMN de ^1H NOESY 2D. As principais correlações são mostradas na Figura 54 (Anexo 136). Finalmente, a irradiação dos sinais dos hidrogênios metilênicos em 2,56 ppm do 2-metil-5-etil-fenol no experimento de diferença de NOE resultou em incrementos nos sinais dos hidrogênios em 6,63 (0,1 %), 6,69 (0,12 %) e 1,2 ppm (0,15 %), mostrando definitivamente que o substituinte etila ocupa a posição 5 no anel aromático (Anexo 135).

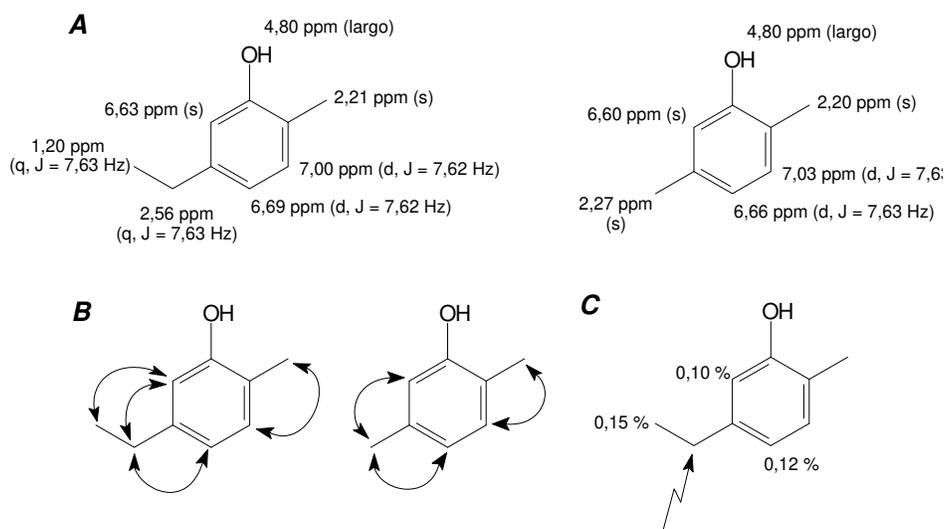


Figura 58. A. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H das substâncias de defesa produzidas por *H. mexicanus*. B. Principais correlações de RMN de ^1H NOESY 2D. C. Incrementos de NOE (RMN de ^1H NOESY 1D) observados no 2-metil-5-etil-fenol após irradiação seletiva do sinal dos hidrogênios metilênicos em 2,56 ppm.

Desta forma, foi possível caracterizar com sucesso os componentes da secreção de defesa produzida por *H. mexicanus*. O 2-metil-5-etil fenol é uma substância de defesa comum, tendo sido identificadas como componente das secreções de defesa de diversos outros opiliões como *Camarana flavipalpi* (Machado *et al.*, 2007), *Pachyloidellus goliath* (Acosta, 1993), *Cynorta astora* (Eisner *et al.*, 1977), *Stygnomma spinifera* (Duffield *et al.*, 1981) e *Eucynortula albipunctata* (Roach *et al.*, 1980). Existe um relato na literatura mostrando que o 2-metil-5-etil-fenol é um composto eficiente na repelência de formigas e lagartos pelo opilião *S. spinifera* (Duffield *et al.*, 1981). Por outro lado, a 2,5-dimetil-fenol é uma substância de defesa relativamente rara, tendo sido descrita em *Daguerreia inermis* e *Progonyleptoidellus striatus* (Hara *et al.*, 2005). Entretanto, vários trabalhos destacam que as estruturas indicadas eram apenas sugestões, podendo ser isômeros com substituintes em outras posições nos anéis aromáticos (por exemplo, Hara *et al.*, 2005). No presente trabalho, entretanto, reportamos de forma inequívoca o padrão de substituição dos compostos identificados na secreção de *H. mexicanus* utilizando técnicas de RMN de ^1H , NOE 1D e NOESY 2D.

A estudo dos mecanismos de defesa destes animais é importante, uma vez que permite uma compreensão mais aprofundada das intrincadas relações ecológicas mantidas por diversos opiliões. Além disso, verificou-se que *H. mexicanus* utiliza uma terceira ferramenta de defesa, a emissão de ruídos e sons para ameaçar o predador. Entretanto, este fenômeno inédito em opiliões requer maiores estudos para uma conclusão definitiva a respeito do arsenal de defesa desta espécie, que está sendo conduzido pelo Prof. Dr. Glauco Machado e equipe.

4. CONCLUSÕES

4. Conclusões

O presente trabalho de doutorado representa a consolidação das pesquisas sobre química da comunicação bacteriana na Unicamp e possivelmente no Brasil, iniciado no mestrado do Sr. Armando M. Pomini. Ao longo do trabalho, reportamos diversos resultados inéditos e inclusive novos protocolos laboratoriais, incluindo:

- 1) Primeiro estudo químico das substâncias sinalizadoras produzidas pelo endófito de laranjeiras *Methylobacterium mesophilicum*; descoberta de uma nova substância a (*S*)-(2*E*)-dodecenoil-HSL nos caldos de cultivo da bactéria, incluindo sua primeira síntese *in vitro*. Reportamos também o segundo relato e primeiro procedimento sintético para a (*S*)-(2*E*, 7*Z*)-tetradecadienil-HSL, além do segundo relato do raro metabólito *N*-tridecanoil-HSL.
- 2) Determinação da configuração absoluta de uma acil-HSL rara produzida por *P. ananatis*, com cadeia acila com número ímpar de átomos de carbono. Tal resultado só foi possível graças ao desenvolvimento do protocolo GC-FID com fase estacionária quiral para acil-HSLs, reportado pioneiramente por nosso grupo de pesquisas. O mesmo protocolo permitiu caracterizar com sucesso a configuração absoluta de cinco acil-HSLs produzidas por *M. mesophilicum*, aplicando previamente o protocolo de minimização da complexidade amostral via derivatização por hidrogenação catalítica.
- 3) Avaliação da importância da configuração absoluta para atividade antimicrobiana de acil-HSLs, mostrando a inesperada atividade para o enantiômero (*R*) não natural. Avaliou-se também a atividade

antimicrobiana das acil-HSLs produzidas por *M. mesophilicum* sobre bactérias endofíticas Gram-positivas, que co-ocorrem com *Xylella fastidiosa* na doença da clorose variegada dos citros, extremamente importante sob o ponto de vista econômico no Brasil.

- 4) Primeiro estudo da interação de uma acil-HSL com células íntegras por ressonância magnética nuclear de diferença de transferência de saturação (STD-RMN), permitindo caracterizar o mapa de epitopo da substância estudada.
- 5) Consolidação do protocolo de “tubos de ensaio” desenvolvido por nosso grupo de pesquisas, que facilita o uso do biorepórter *Agrobacterium tumefaciens* NTL4(pZLR4) na detecção de frações contendo acil-HSLs.
- 6) Contribuímos também para elucidar alguns dos mecanismos de defesa utilizados pelo opilião *H. mexicanus*, com dados adicionais importantes em defesa química além da emissão de som pelo animal como artifício de defesa comportamental.

Desta forma, fica claro que o projeto rendeu ao doutorando um vasto contato com a ciência na interface entre a química de produtos naturais, microbiologia, aracnologia e bioquímica. Como principais perspectivas futuras, acredita-se que os resultados mostrados serão valiosos por exemplo para bioquímicos que estejam interessados na detecção de novos sítios receptores para acil-HSLs dada a descoberta da atividade antibacteriana inédita de um enantiômero (*R*)-acil-HSL. Outrossim, a obtenção das acil-HSLs sintéticas idênticas às produzidas por *M. mesophilicum* abre caminho para uma série de trabalhos, com grande potencial para estudos de controle da clorose variegada dos citros através de interferências nos processos de

comunicação química intercelular, principalmente no que tange a estudos da influência destas substâncias no padrão de expressão gênica de *Xylella fastidiosa*. Este material já se encontra com o grupo de pesquisas do Dr. Welington Araújo (Esalq/USP) e constituirá o tema da Tese de Doutorado de alunos de seu grupo. Assim, temos esperança de que em alguns anos nosso trabalho seja o pilar de diversas descobertas científicas/tecnológicas com impacto direto na economia e na qualidade de vida em nosso país.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5. Parte experimental

5.1. Materiais e Métodos

5.1.1. Equipamentos

- **Ressonância magnética nuclear (RMN)**

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio foram obtidos em equipamento Varian Inova-500, equipamento Bruker Gemini-300, Bruker-250 ou Bruker-300. Utilizou-se CDCl_3 como solvente e tetrametilsilano (TMS) como referência interna (δ 0,0). As análises foram realizadas à temperatura ambiente. Os valores de deslocamentos químicos foram obtidos em ppm e as constantes de acoplamento em Hertz (Hz).

Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono foram obtidos em equipamento Varian Inova, operando a 125,71 MHz, Bruker Gemini operando a 75,45 MHz ou Bruker operando a 62,5 MHz. Utilizou-se CDCl_3 como solvente e tetrametilsilano (TMS) como referência interna (δ 0,0). As análises foram realizadas à temperatura ambiente. Os valores de deslocamentos químicos foram obtidos em ppm.

Para os experimentos de RMN STD utilizou-se D_2O e $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (20%) como mistura solvente e o sinal residual de HDO em 4,7 ppm como referência interna.

- **Espectroscopia no infravermelho (IV)**

As análises de espectroscopia no infravermelho foram feitas em equipamento Bomem Michelson MB, utilizando pastilhas de KBr para suporte das amostras sólidas; amostras oleosas foram analisadas na forma de filmes sobre cristal de NaCl.

- **Rotação ótica específica $[\alpha]_D$ e dicroísmo circular**

As análises polarimétricas foram feitas em equipamento Perkin-Elmer 341 a temperatura ambiente e os resultados foram convertidos para 20°C através de equações indicadas pelo fabricante. Utilizou-se metanol grau HPLC de pureza como solvente nas análises polarimétricas. O espectropolarímetro Jasco J-720 (cela 3 cm³) também foi utilizado em algumas determinações polarimétricas, com resolução de 0,2 nm, velocidade de varredura a 50 nm/min e cela com 0,1 cm de caminho ótico.

- **Cromatografia a gás-espectrometria de massas (CG-EM)**

As análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foram feitas em cromatógrafo a gás marca Agilent modelo 6890, acoplado a um detector seletivo de massas operando por impacto de elétrons a 70 eV marca Hewlett Packard modelo 5973. O cromatógrafo opera com coluna capilar de sílica fundida do tipo HP-5 ou MDN-5S (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Empregou-se hélio de alta pureza como gás de arraste, com fluxo de 1 mL/min. As análises foram realizadas com injetor operando a 250°C e interface a 280°C. Os volumes injetados foram de 1 µL

de solução, sem divisão de fluxo. As rampas de aquecimento variaram de acordo com o experimento realizado.

- **Cromatografia a gás-deteção por ionização em chama (CG-FID)**

As análises de cromatografia gasosa acoplada à deteção por ionização em chama e fase estacionária quiral [CG(quiral)-FID] foram feitas em cromatógrafo a gás marca AGILENT modelo 6890. O cromatógrafo operava com coluna do tipo Chrompack chirasil ciclodextrina CB (25 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Empregou-se hidrogênio de alta pureza como gás de arraste, com fluxo de 1 mL/min.

- **Capelas assépticas de manipulação**

A manipulação e cultivo dos microrganismos utilizou capela de fluxo laminar VECO modelo VLF 509, BOD marca QUIMIS, incubadora Shaker MARCONI modelo MA 420, centrífuga marca HARRIER MSE 18/80 e autoclave marca PHOENIX modelo LV30.

- **Outros equipamentos**

Outros equipamentos: geladeira marca ELECTROLUX, freezer ELECTROLUX, balança analítica SARTORIUS BL1205, estufa de secagem, agitador magnético THERMOLYNE Cimarec 2 e evaporador rotativo marca BÜCHI B-480.

5.1.2. Meios de cultivo para microrganismos

O meio de cultivo Caldo Nutriente (NB) era proveniente da OXOID. O meio NB líquido foi preparado a partir de 20 g de meio NB para 1000 mL de água destilada. O meio sólido NB foi produzido pela adição de 2 % de ágar bacteriológico marca SIGMA. O meio de cultivo Luria-Bertani (LB) possui a seguinte constituição: 1 % peptona (OXOID), 0,5 % NaCl, 0,5 % extrato de levedura (OXOID). Para o meio sólido, adicionou-se 2 % de ágar (SIGMA) (Ravn et al., 2001). O meio CHOI3 tinha a seguinte composição:

Meio CHOI3 (para 1 litro de água destilada):

Reagentes	g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,5
KH ₂ PO ₄	1,305
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	4,02
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,45
Metais Traços	10 ml
Metais Traços (manter no escuro, na geladeira)	
CaCl ₂ H ₂ O	2
FeSO ₄ 7 H ₂ O	2
MnSO ₄ H ₂ O	0,5
ZnSO ₄ H ₂ O	0,26
NaMoO ₄ 2 H ₂ O	0,08
CoCl ₂ 6 H ₂ O	0,08
H ₃ BO ₃	0,06

Após autoclavar adicional 10 ml de metanol por litro. O meio CHOI3 sólido continha 2 % de ágar (OXOID).

O meio CHOI3/glucose modificado continha glucose como única fonte de carbono em substituição ao metanol. A glucose foi autoclavada separadamente à solução de sais para evitar reações indesejadas durante o

processo de esterilização, em tubos contendo 10 g do sacarídeo dissolvidos em 10 mL de água destilada.

Os meios TSB (*tripticase soy broth*) e Müller-Hinton eram provenientes da OXOID. As soluções eram preparadas utilizando 20 g/L do meio comercial em água destilada.

5.1.3. Reagentes e solventes

Todos os solventes utilizados eram da marca SYNTH, grau P.A. de pureza. Estes foram destilados ou bidestilados antes do uso. Os reagentes bromidrato de (\pm)- α -amino- γ -butirolactona, bromidrato de (*S*)-(-)- α -amino- γ -butirolactona, cloridrato de (*R*)-(+)- α -amino- γ -butirolactona, ácido heptanóico, ácido decanóico, ácido dodecanóico e o reagente de Meldrum eram provenientes da ALDRICH. O reagente cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida e o X-GAL eram provenientes da SIGMA. Estes são conservados sob refrigeração (-20°C). A trietilamina era proveniente da MERCK, foi destilada e mantida sob KOH (SYNTH).

A sílica para cromatografia em coluna era proveniente da ACROS, com granulometria 0,035-0,070 mm. As análises em cromatografia em camada delgada foram feitas em placas de sílica suportadas sobre alumínio Sílica gel 60 F₂₅₄ (MERCK). Como reveladores, utilizou-se a técnica física de exposição à luz ultravioleta (254 nm) e revelação química, através da aspensão ou mergulho das placas em solução de p-anisaldeído (5 %), ácido acético glacial (50 mL) e ácido sulfúrico concentrado (1 mL), seguida de aquecimento até aparecimento de manchas coloridas. No caso das acil-HSLs sintéticas, utilizou-se como revelador solução de permanganato de potássio seguido de aquecimento.

5.1.4. Cepas bacterianas

A cepa *Pantoea ananatis* SERRANO CCT 6481^T (= IBSBF 860, NCPPB 1846, ICMP 1850, ATCC 33244), linhagem tipo, foi adquirida da Coleção de Culturas Tropical, da Fundação André Tosello (Campinas, São Paulo). A bactéria foi mantida em meio NB sólido. A bactéria foi isolada no Brasil a partir de uma infecção em abacaxi (*Ananas comosus*) em 1965. A espécie *Methylobacterium mesophilicum* foi isolada como endofítico em laranja atacada pela clorose variegada dos citros, pelo Dr. Wellington Luíz de Araújo (Esalq, USP) e conservada em *slants* contendo meio CHOI3 sólido. O biorepórter *Agrobacterium tumefaciens* NTL4(pZLR4) foi mantido em *slants* contendo meio LB sólido, suplementado com gentamicina (50 µg/mL). As bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* CCT 1295, *Bacillus cereus* CCT 4060, *Bacillus subtilis* CCT 0089, e os endofíticos de laranja *Bacillus sp.* CL15, *Bacillus sp.* CL16, *Nocardiopsis sp.* e *Curtobacterium flaccumfaciens* ER 1/5 foram mantidas em *slants* contendo meio caldo nutriente.

5.2. Determinação da configuração absoluta de (S)-N-heptanoil-HSL produzida por *Pantoea ananatis* CCT 6481.

5.2.1. Cultivo de *P. ananatis* e purificação da (S)-N-heptanoil-HSL

Prepararam-se inóculos do microrganismo *P. ananatis* em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio líquido NB. Os tubos foram mantidos sob incubação a 30°C, sem agitação, em BOD. Após 24 horas, os inóculos foram transferidos a erlenmeyers (2 L) contendo 1 L de meio de cultivo NB líquido

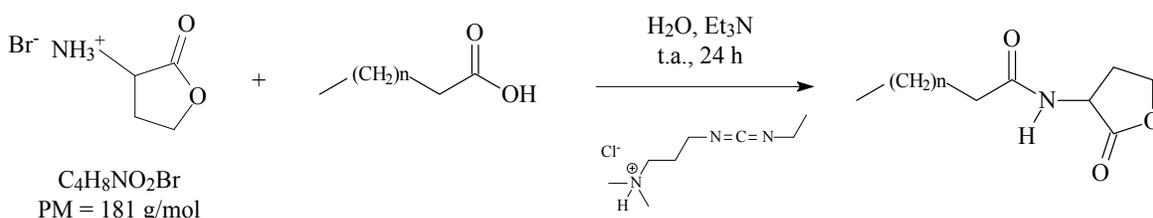
suplementado com solução de propionato (200 μ L de ácido propiônico e 225 mg de NaHCO_3 em 5 mL de água destilada) que foi autoclavada separadamente. Os cultivos foram então incubados a 28°C sob agitação a 110 rpm em aparelho shaker. Após 24 horas, os meios de cultivo foram centrifugados, sob refrigeração (18 °C), à 5000 rpm por 20 minutos. Os sobrenadantes reunidos (1 L) foram extraídos com acetato de etila (previamente destilado), 3 x 500 mL. As fases orgânicas reunidas (1,5 L) foram extraídas com água destilada (1 x 500 mL) e evaporadas sob pressão reduzida a 40-45°C.

O procedimento global descrito acima foi repetido, perfazendo-se 8 litros de cultivo. Obteve-se assim a quantidade total de 0,557 g de extrato. Este extrato fora cromatografado em coluna de sílica (18 g sílica, coluna com 2 cm de diâmetro), com os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, em ordem crescente de polaridade. O acompanhamento da eluição foi realizado via CCD em placas de sílica suportadas sobre alumínio e revelação com anisaldeído sulfúrico, seguida de aquecimento a 120 °C por 2 minutos. As frações foram reunidas por semelhança em CCD.

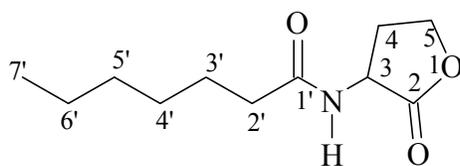
As frações reunidas foram analisadas por CG-EM utilizando-se as seguintes condições: coluna HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), com rampa de temperaturas 100-290(10°C/min) e mantido a 290°C por 1 minuto. O injetor operou em modo splitless a 250°C. O fluxo de gás de arraste foi mantido a 1 mL/min. A identificação da *N*-heptanoil-HSL foi feita com base na análise dos espectros de massas dos diferentes sinais cromatográficos, e posteriormente por co-injeção com produto sintético (tópico 5.2.2).

(*S*)-*N*-heptanoil-homosserina lactona (natural) (CG-EM, IE, 70 eV): m/z 213 (M^+ 1%), 170 (4 %), 156 (14%), 143 (100%), 125 (22%), 113 (14%), 102 (14%), 101 (18%), 85 (22%), 57 (82%), 43 (84%).

5.2.2. Síntese da *N*-heptanoil-HSL (racemato e enantiômeros)



Num balão de ensaio de 5 mL, adicionou-se trietilamina ($1,05 \times 10^{-4}$ mol), bromidrato ou cloridrato de (\pm), (R) ou (S)- α -amino- γ -butirolactona ($1,05 \times 10^{-4}$ mol) e ácido heptanóico ($1,57 \times 10^{-4}$ mol), dissolvidos em 2,5 mL de água ultra pura (Milli-Q). Em seguida, adicionou-se cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida ($1,57 \times 10^{-3}$ mol). A mistura reacional permaneceu sob agitação magnética à temperatura ambiente. Após 24 horas, esta foi extraída com acetato de etila (3 x 10 mL) e a fase orgânica combinada foi extraída com solução de bicarbonato de sódio 5% (2 x 6 mL), bissulfato de sódio 1 M (1 x 6 mL) e solução saturada de cloreto de sódio (1 x 6 mL). O solvente foi evaporado sob pressão reduzida, formando um sólido branco.

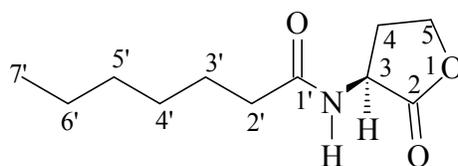


(±)-*N*-heptanoil-homosserina lactona. Rendimento da reação: 64%. R_f 0,6 (CH₂Cl₂/AcEt 1/1). CG-EM (IE, 70 eV) m/z : 213 (M⁺, 2%), 184 (2%), 170 (4%), 156 (15%), 143 (100%), 128 (5%), 125 (20%), 113 (13%), 102 (12%), 101 (16%), 100 (6%), 85 (16%), 83 (13%), 57 (50%), 43 (43%).

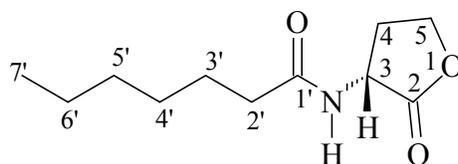
IV (KBr). 3315,8; 2955,4; 2858,8; 1776,7; 1646,4; 1545,7; 1384,2; 1173,6; 1013,6 cm⁻¹.

RMN de ¹H (499,88 MHz, CDCl₃, TMS): δ 0,88 (t, 3H, J 7,3 Hz, H-7'), 1,29 (m, 6H, H-4', H-5', H-6'), 1,64 (quinteto, 2H, J 7,6 Hz, H-3'), 2,14 (m, 1H, H-4), 2,25 (t, 1H, J 8,9 Hz, H-2'), 2,84 (m, 1H, H-4), 4,28 (ddd, 1H, J 11,6; 9,5 e 5,8 Hz, H-5), 4,47 (t, 1H, J 8,9 Hz, H-5), 4,56 (ddd, 1H, J 11,6; 5,8 e 8,6 Hz, H-3), 6,15 (d, NH, J 3,7 Hz).

RMN de ¹³C (125,71 MHz, CDCl₃, TMS): δ 14,0 (C-7'); 22,4 (C-6'); 25,3 (C-3'); 28,8 (C-5'); 30,5 (C-4); 31,4 (C-4'); 36,1 (C-2'); 49,2 (C-3); 66,1 (C-5); 173,7 (C-1'); 175,5 (C-2).



(S)-(-)-*N*-heptanoil-homosserina lactona. Rendimento e dados de CG-EM, RMN de ¹H e ¹³C idênticos aos obtidos para a (±)-*N*-heptanoil-homosserina lactona. $[\alpha]_D^{20}$ -18° (c. 0,42 MeOH).



(*R*)-(+)-*N*-heptanoil-homosserina lactona. Rendimento e dados de CG-EM, RMN de ^1H e ^{13}C similares aos obtidos para a (\pm)-*N*-heptanoil-homosserina lactona. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +17^\circ$ (c. 0,42 MeOH).

5.2.3. Avaliação da atividade biológica da *N*-heptanoil-HSL sintética (racemato e enantiômeros) e produto natural com o biorepórter *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4).

Realizou-se o teste biológico com o biossensor *Agrobacterium tumefaciens* NTL4(pZLR4) com os produtos sintéticos (\pm)-*N*-heptanoil-HSL, (*R*)-*N*-heptanoil-HSL e (*S*)-*N*-heptanoil-HSL, além da Fração M do cultivo de *Pantoea ananatis* contendo a (*S*)-*N*-heptanoil-HSL natural.

O inóculo do microrganismo foi feito em tubo de ensaio contendo 2 mL de meio líquido LB, crescido em BOD a 30°C por 24 h. Em seguida, 20 μL deste inóculo foram adicionados em tubos de ensaio contendo 2 mL de meio líquido LB e 20 μL de solução de X-GAL (solução estoque a 50 mg/mL em DMF, conservada em freezer). Em seguida, os testes foram feitos com 20 μL de soluções dos produtos sintéticos e natural (1 mg/mL em etanol). Os testes foram feitos em duplicata. Utilizou-se etanol (20 μL) como branco. Os tubos foram em seguida incubados em BOD a 30 °C durante 48 horas. Após este período, as soluções foram avaliadas visualmente e fotografadas.

5.2.4. Determinação da configuração absoluta da (S)-*N*-heptanoil-HSL produzida por *P. ananatis*.

Escolheu-se como metodologia de determinação da configuração absoluta da (S)-*N*-heptanoil-HSL natural produzida por *P. ananatis* a técnica de cromatografia gasosa acoplada a detecção por ionização em chama e coluna quiral Chrompack Chirasil ciclodextrina. As análises foram realizadas com injetor operando a 220°C. Os volumes injetados foram de 1 µL com concentração de solutos a 1 mg/mL, com divisão de fluxo de 1/100. O forno foi inicialmente mantido a 50°C, com incremento de temperatura de 2°C/min até 180°C, e 5 min isotermicamente à 180°C. Os resultados são mostrados na tabela abaixo:

Tabela 5. Resultados da determinação da configuração absoluta da (S)-N-heptanoil-HSL produzida por P. ananatis por CG-FID com fase estacionária quiral.

Amostra	T _R enant. (R) (min)	T _R enant. (S) (min)	ee (majoritário)
(±)- <i>N</i> -heptanoil-HSL sint.	60,87	61,05	Picos em 1:1
(S)- <i>N</i> -heptanoil-HSL sint.	60,84	61,06	97 % (S)
(R)- <i>N</i> -heptanoil-HSL sint.	60,88	-	> 99% (R)
(S)- <i>N</i> -heptanoil-HSL nat.	60,86	61,03	90 % (S)
Co-injeção do racemato sintético e prod. natural*	60,85	61,03	22 % (S)

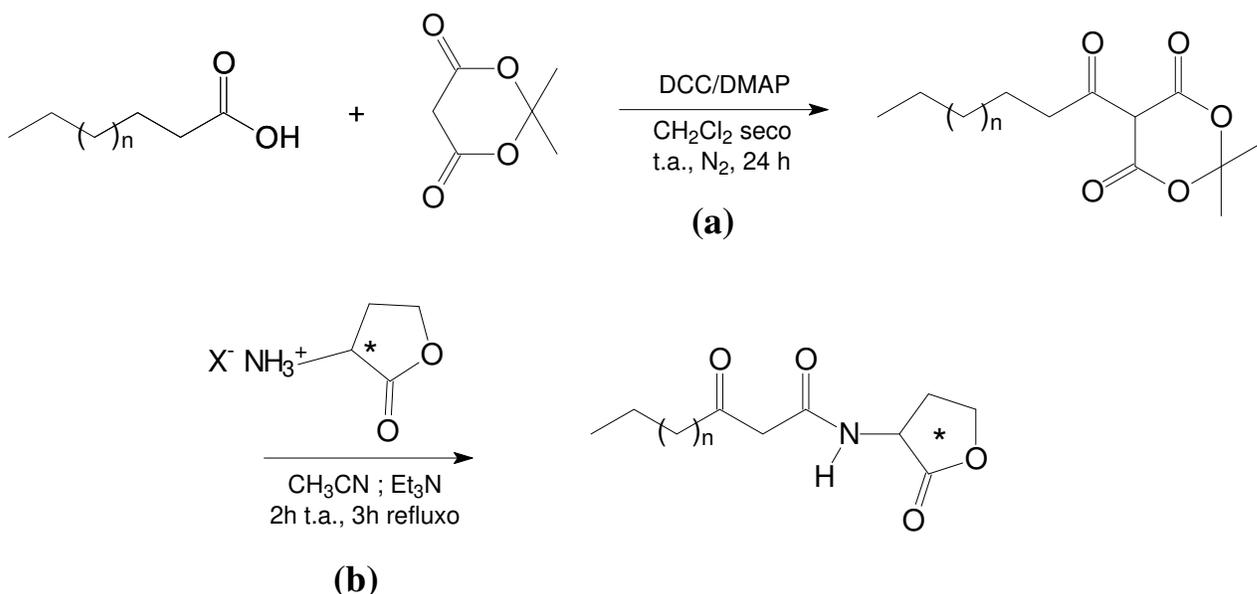
* Co-injeção: mistura 1:1 de (±)-*N*-heptanoil-HSL a 1 mg/mL e Fração M a 0,02 mg/mL. T_R = tempo de retenção.

5.3. Avaliação da importância da configuração absoluta para atividade antimicrobiana de acil-HSLs.

5.3.1. Síntese dos compostos a serem avaliados biologicamente.

A síntese dos produtos (\pm) -*N*-heptanoil-HSL, (*R*)-*N*-heptanoil-HSL e (*S*)-*N*-heptanoil-HSL foi descrita no Tópico 5.2.2.

As acil-HSLs contendo uma carbonila na posição 3 da cadeia acila lateral foram sintetizadas conforme o esquema abaixo:



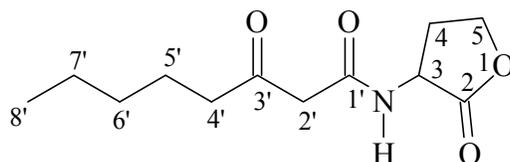
Síntese dos derivados de Meldrum (a). À um balão de 50 ml com duas saídas, acoplou-se uma entrada de nitrogênio seco (agulha e septo) e uma saída levando a um *trap* contendo óleo mineral. Adicionou-se então 20 mL de diclorometano seco, e 2,0 mmol do ácido graxo (hexanóico, decanóico ou dodecanóico). Adicionou-se também 2,1 mmol de DMAP (4-dimetilaminopiridina, 256,2 mg), 2,2 mmol de dicitlohexilcarbodiimida (453,2 mg) e 2,0 mmol de reagente de Meldrum (288,0 mg). A solução

permaneceu sob agitação magnética à temperatura ambiente. O fluxo de nitrogênio foi interrompido 30 minutos após o final da adição dos reagentes. Após 24 horas, havia no meio reacional um precipitado branco, e a solução era amarela. O meio foi filtrado em algodão e a fase orgânica evaporada sob pressão reduzida a 40°C. Em seguida, o óleo amarelo obtido foi dissolvido em 20 mL de acetato de etila e extraído com solução aquosa de HCl 2 M (3 x 10 mL) e água destilada (1 x 10 mL), e seco sob sulfato de magnésio anidro. A fase orgânica foi então filtrada em algodão e evaporada sob pressão reduzida. Os derivados de Meldrum foram conservados em freezer a -20°C, e utilizados para a próxima etapa o mais rapidamente possível. Observou-se rendimentos quantitativos para todos os derivados de Meldrum obtidos.

Síntese das *N*-(3-oxoacil)-HSLs (b). À uma solução do derivado de Meldrum (0,75 mmol de hexanoil-Meldrum, decanoil-Meldrum ou dodecanoil-Meldrum) em 22,5 mL de acetonitrila grau HPLC de pureza adicionou-se 0,75 mmol de bromidrato ou cloridrato de (*R*), (*S*) ou (\pm)- α -amino- γ -butirolactona e 1,2 mmol de trietilamina (126,44 μ L). A mistura permaneceu sob agitação magnética à temperatura ambiente durante 2 horas e depois sob refluxo por 3 horas. Em seguida, a fase orgânica foi evaporada sob pressão reduzida e o sólido branco dissolvido com 20 mL de acetato de etila e 5 mL de metanol. A fase orgânica foi então extraída com soluções aquosas de NaHCO₃ saturada (3 x 10 mL), KHSO₄ 1M (3 x 10 mL) e salmoura (3 x 10 mL). Em seguida, ela foi seca com sulfato de magnésio anidro, filtrada e evaporada, rendendo um sólido amarelado.

Os produtos das reações foram purificados por cromatografia em coluna (12 g de sílica; coluna com 2 cm de diâmetro), com os solventes

hexano, diclorometano e acetato de etila em polaridades crescentes. Os produtos foram recolhidos como sólidos brancos, uniformes, nas frações de polaridade diclorometano/acetato de etila 7/3.

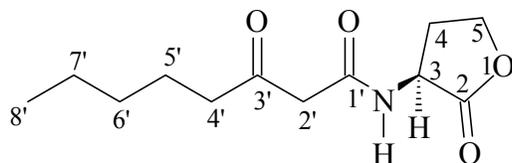


(±)-*N*-(3-oxo-octanoil)-homoserina lactona. Rendimento global: 28 %. R_f 0,421 (AcEt 100%). CG-EM (IE, 70 eV) m/z : 241 (M^+ , 1%), 224 (24%), 185 (7%), 143 (25%), 102 (7 %), 99 (31%), 56 (100%).

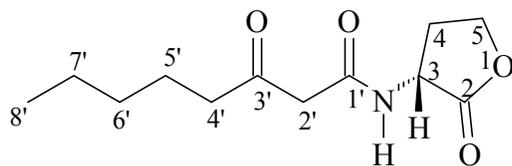
IV (KBr). 3258, 2934, 1777, 1716, 1646, 1546, 1173, 1019, 599 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300,06 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 0,89 (t, 3H, J 7,0 Hz, H-8'); 1,30 (m, 4H, H-6', H-7'); 1,59 (quinteto, 2H, J 7,3 Hz, H-5'); 2,28 (m, 1H, H-4); 2,53 (t, 2H, J 7,3 Hz, H-4'); 2,75 (m, 1H, H-4); 3,47 (s, 2H, H-2'); 4,28 (ddd, 1H, J 11,0; 9,1 e 6,2; Hz, H-5); 4,47 (t, 1H, J 8,2 Hz, H-5); 4,60 (ddd, 1H, J 11,3; 8,8 e 6,2 Hz, H-3); 7,70 (d, NH, J 5,1 Hz).

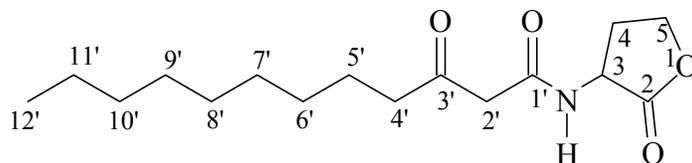
RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 13,8 (C-8'); 22,32 (C-7'); 23,0 (C-6'); 31,1 (C-5'); 29,8 (C-4); 43,8 (C-4'); 48,1 (C-2'); 49,0 (C-3); 65,8 (C-5); 166,4 (C-1'); 174,8 (C-2); 206,5 (C-3').



(S)-*N*-(3-oxo-octanoil)-homoserina lactona. Rendimento global: 38,7 %. Os dados de CG-EM, RMN de ^1H e ^{13}C são idênticos aos obtidos para a (\pm)-*N*-(3-oxo-octanoil)-HSL. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -17^\circ$ (c. 0,53 MeOH).



(R)-*N*-(3-oxo-octanoil)-homoserina lactona. Rendimento global: 67,3 %. Os dados de CG-EM, RMN de ^1H e ^{13}C são idênticos aos obtidos para a (\pm)-*N*-(3-oxo-octanoil)-HSL. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +16^\circ$ (c. 0,51 MeOH).



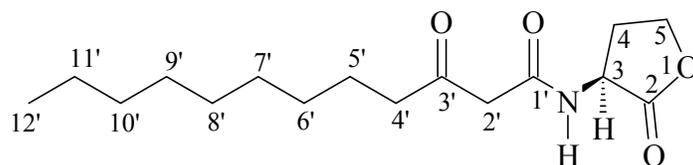
(\pm)-*N*-(3-oxo-dodecanoil)-homoserina lactona. Rendimento global: 39,5 %. R_f 0,473 (AcEt 100%). CG-EM (IE, 70 eV) decomposição.

IV (KBr). 3298, 2925, 2850, 1782, 1721, 1641, 1546, 1382, 1178, 1019, 721 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300,06 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 0,87 (t, 3H, J 6,2 Hz, H-12'); 1,26 (m, 12H, H-11', H-10', H-9', H-8', H-7', H-6'); 1,58 (quinteto, 2H, J 7,0 Hz, H-5'); 2,25 (m, 1H, H-4); 2,53 (t, 2H, J 7,3 Hz, H-4'); 2,75 (m, 1H, H-4); 3,47 (s, 2H, H-2'); 4,28 (ddd, 1H, J 11,4; 9,5 e 6,2 Hz, H-5);

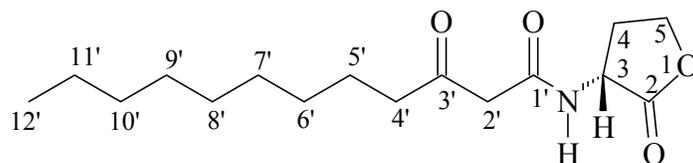
4,47 (t, 1H, J 9,1 Hz, H-5); 4,60 (ddd, 1H, J 11,4; 8,8 e 6,7 Hz, H-3); 7,69 (d, NH, J 6,2 Hz).

RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 14,2 (C-12'); 22,7 (C-11'); 31,87 (C-10'); 29,0 (C-9'); 29,3 (C-8'); 29,38 (C-7'); 29,41 (C-6'); 23,4 (C-5'); 43,9 (C-4'); 48,2 (C-2'); 65,9 (C-5); 29,8 (C-4); 49,1 (C-3); 166,2 (C-1'); 174,6 (C-2); 206,3 (C-3').



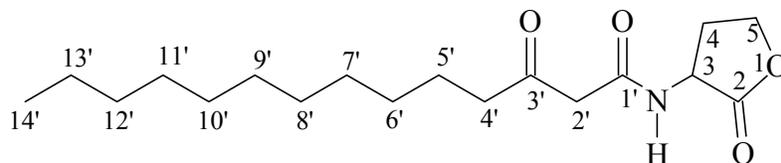
(S)-*N*-(3-oxo-dodecanoil)-homoserina lactona. Rendimento global: 33,8 %.

Os dados de CG-EM, RMN de ^1H e ^{13}C são idênticos aos obtidos para a (\pm)-*N*-(3-oxo-dodecanoil)-HSL. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -19^\circ$ (c. 0,50 MeOH).



(R)-*N*-(3-oxo-dodecanoil)-homoserina lactona. Rendimento global: 45,74 %.

Os dados de CG-EM, RMN de ^1H e ^{13}C são idênticos aos obtidos para a (\pm)-*N*-(3-oxo-dodecanoil)-HSL. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +15^\circ$ (c. 0,50 MeOH).

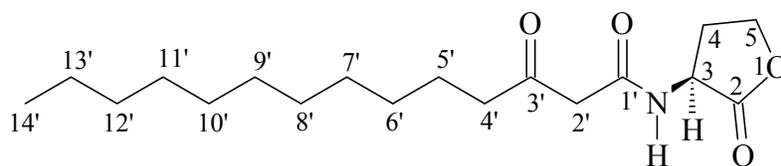


(±)-*N*-(3-oxo-tetradecanoyl)-homoserina lactona. Rendimento global: 46,8 %. R_f 0,526 (AcEt 100%). CG-EM (IE, 70 eV) decomposição.

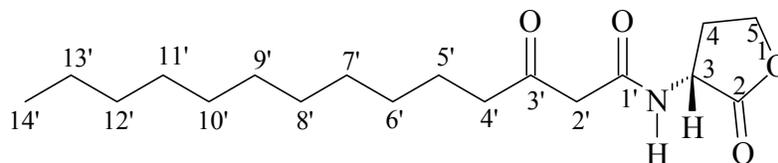
IV (KBr). 3298, 2920, 2850, 1772, 1716, 1641, 1549, 1178, 1015, 721 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300,06 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 0,88 (t, 3H, J 6,7 Hz, H-14'); 1,26 (m, 16H, H-13', H-12', H-11', H-10', H-9', H-8', H-7', H-6'); 1,58 (quinteto, 2H, J 7,0 Hz, H-5'); 2,25 (m, 1H, H-4); 2,53 (t, 2H, J 7,3 Hz, H-4'); 2,74 (m, 1H, H-4); 3,47 (s, 2H, H-2'); 4,27 (ddd, 1H, J 11,0; 9,2 e 6,1 Hz, H-5); 4,48 (t, 1H, J 9,2 Hz, H-5); 4,62 (ddd, 1H, J 11,0; 8,9 e 7,0 Hz, H-3); 7,73 (d, NH, J 6,4 Hz).

RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 14,1 (C-14'); 22,7 (C-13'); 23,4 (C-12'); 29,0 (C-11'); 29,3 (C-9'); 29,4 (C-8'); 29,4 (C-7'); 29,6 (C6', C5'); 29,7 (C-4); 31,87 (C-10'); 43,9 (C-4'); 48,2 (C-2'); 49,0 (C-3); 65,9 (C-5); 166,5 (C-1'); 175,0 (C-2); 206,6 (C-3').



(*S*)-*N*-(3-oxo-tetradecanoyl)-homoserina lactona. Rendimento global: 54,0 %. Os dados de CG-EM, RMN de ^1H e ^{13}C são idênticos aos obtidos para a (±)-*N*-(3-oxo-tetradecanoyl)-HSL. $[\alpha]_D^{20} -14^\circ$ (c. 0,50 MeOH).



(*R*)-*N*-(3-oxo-tetradecanoyl)-homoserina lactona. Rendimento global: 50,7%. Os dados de CG-EM, RMN de ^1H e ^{13}C são idênticos aos obtidos para a (\pm)-*N*-(3-oxo-tetradecanoyl)-HSL. $[\alpha]_D^{20} +11^\circ$ (c. 0,50 MeOH).

5.3.2. Bioensaios de atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas.

5.3.2.1. Ensaio semi-quantitativo preliminar – análise visual

Os ensaios antimicrobianos foram feitos com as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* CCT 1295, *Bacillus cereus* CCT 4060 e *Bacillus subtilis* CCT 0089.

Os inóculos dos microrganismos foram preparados em *slants* contendo meio caldo nutriente sólido (3 tubos cada), crescidos a 30 °C por 24 horas em BOD. Após crescimento, as células foram removidas com alça flambada e suspensas em água destilada estéril (10 mL), até obter uma suspensão com turbidez equivalente a 3×10^8 ufc/mL, de acordo com uma escala de McFarland. No caso dos ensaios preliminares, foram tomados 5 mL desta suspensão e adicionados em 50 mL de meio Miller-Hinton, que foi em seguida pipetado (100 μL) para a microplaca de 96 poços (as placas foram previamente lavadas com água em abundância, secas e esterilizadas por exposição à lâmpada UV durante 1 hora). No topo de cada coluna (em duplicata), foram pipetados 100 μL de cada solução a ser testada (branco,

controle positivo e soluções teste), homogeneizados, e diluídos em série, sendo descartados os 100 µL de solução ao final das diluições. As seguintes soluções foram testadas:

1) Controle negativo (branco): água destilada/dimetilsulfóxido 20 %.

2) Controle positivo: cloranfenicol comercial, estoque a 1 mg/mL.

3) Soluções teste: racemato, enantiômeros R e S dos produtos sintéticos *N*-heptanoil-HSL, *N*-(3-oxo-octanoil)-HSL, *N*-(3-oxo-dodecanoil)-HSL e *N*-(3-oxo-tetradecanoil)-HSL. Soluções estoque a 1 mg/mL em água/dimedilsulfóxido 20 %.

Após as diluições, as placas foram incubadas com tampa em BOD durante 24 horas a 30°C. Após este período, adicionou-se nos poços 100 µL de solução do corante revelador MTT (0,025 % em água destilada). As placas foram avaliadas visualmente e fotografadas 1 hora após a adição do corante. Nos poços em que o desenvolvimento microbiano foi normal, observa-se a formação de coloração roxa; nos poços onde o crescimento foi inibido, observa-se coloração amarelada.

5.3.2.2. Ensaio quantitativo – análise absorciométrica

No caso do ensaio quantitativo, o inóculo foi preparado pela adição de 500 µL da suspensão de *B. cereus* CCT 4060 (3×10^8 ufc/mL) a 50 mL de meio líquido Miller-Hinton.

As microplacas utilizadas neste ensaio eram especiais, esterilizadas de fábrica com raios gama e completamente livres de resíduos de material celular. A cada poço, adicionou-se 100 µL da solução água/dimetilsulfóxido 20%. As soluções a serem testadas (100 µL) foram adicionadas e diluídas por um fator de 50 %. Em seguida, adicionou-se 100 µL do meio Miller-

Hinton contendo o microrganismo. As placas foram incubadas em BOD a 30°C por 24 h e posteriormente analisadas no leitor de microplacas Analytik Jena em modo absorvância (650 nm). Foram tomadas 4 leituras por poço, em 3 pontos diferentes por poço. O teste como um todo foi realizado em quadruplicata.

5.3.3. Experimentos de diferença de transferência de saturação (STD-RMN) células íntegras de *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4)

Estes experimentos foram realizados em colaboração com o doutorando Luis Fernando Cabeça em nosso grupo de pesquisas. Para os experimentos de RMN STD utilizou-se D₂O e (CD₃)₂SO (20%) como mistura solvente e o sinal residual de HDO em 4,7 ppm como referência interna.

Experimentos de STD. Os experimentos de STD foram seletivamente saturados usando trens de pulso Gaussian em -0,5 ppm para os espectros *on-resonance* e em 30 ppm para o espectro de STD controle (*off-resonance*). A subtração dos espectros foi feita após cada varredura por ciclagem de fase. A duração do pulso seletivo era de 50 ms e a espera entre os pulsos foi de 1 ms. A duração da fase de presaturação (2,55 s) foi ajustada usando n=50 ciclos.

Experimentos de ROE (Otting, 1993). Os experimentos de ROESY 1D foram obtidos com pulsos seletivos de 180° e não seletivos de 90°. Um tempo de mistura de 0,5 s foi utilizado durante o *spin-lock*. O pulso seletivo foi gerado por um gerador de ondas, que automaticamente atenuava a forma, potência e duração do pulso para conseguir a seletividade desejada. A subtração das aquisições *on-* e *off-resonance* forneceram os espectros de ROESY 1D.

Preparação dos lipossomas (Cereda 2004). As vesículas de lipossomas foram obtidas através da evaporação de uma solução estoque em clorofórmio de fosfatidilcolina de ovo comercial (EPC) sob fluxo de nitrogênio. As amostras foram mantidas em vácuo por 2 horas para remover o solvente residual. Então, os lipídeos foram suspensos em tampão fosfato/bifosfato 0,4 M pH=7, produzindo vesículas multilamelares de EPC (MLV). As vesículas MLV foram então extrudadas em membranas de policarbonato Nucleopore de 0,4 µm de diâmetro (12 ciclos), para formar uma suspensão de vesículas de lipossomas de 400 nm. A concentração total de lipídeos era de 5 mmol/L.

Preparação das células de *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4). A bactéria foi cultivada como descrito no tópico 5.2.3. Em seguida, as células foram centrifugadas e ressuspensas em tampão fosfato 1 M (pH 7,0) na concentração de 15 mg/mL de células úmidas.

5.4. Estudo químico das acil-HSLs produzidas por *Methylobacterium mesophilicum* em meio CHOI3, TSB e CHOI3/glucose

5.4.1. Procedimento geral de cultivo e preparação de extratos

Prepararam-se inóculos do microrganismo *M. mesophilicum* em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio líquido CHOI3, TSB ou CHOI3/glucose. Os tubos foram mantidos sob incubação a 30°C, sem agitação, em BOD. Após 4 dias, os inóculos foram transferidos a erlenmeyers (2 L) contendo 1 L de meio de cultivo CHOI3. Os cultivos foram então incubados a 29°C sob agitação a 110 rpm em aparelho *shaker*. Após 5 dias, os meios de cultivo foram filtrados sob pressão atmosférica, com papel de filtro convencional,

no caso dos meios CHOI3 e CHOI3/gucose. Os cultivos realizados em meio TSB não foram filtrados. Os sobrenadantes reunidos (1 L) foram extraídos com acetato de etila (previamente destilado), 3 x 500 mL. As fases orgânicas reunidas (1,5 L) foram extraídas com água destilada (1 x 500 mL) e evaporadas sob pressão reduzida a 40-45°C.

Os seguintes extratos foram preparados utilizando a metodologia descrita acima:

Tabela 6. Diferentes extratos produzidos a partir do microrganismo M. mesophilicum.

Extrato	Meio de cultivo	Volume (L)	Massa do extrato (mg)
1	CHOI3	5	16,6
2		8	17,1
3	CHOI3/gucose	1	1,1
4		8	25,6
5	TSB	1	57,3
6		8	386,2

5.4.2. Preparação de frações para ensaios biológicos e análises preliminares

Os extratos obtidos a partir de 1 L de meio TSB e CHOI3/gucose e 5 L de meio CHOI3 (extratos 1, 3 e 5 respectivamente) foram purificados parcialmente por cromatografia em coluna de sílica gel (0,035-0,070 mm, 2-3g, 1,0 cm de diâmetro de coluna) com os solventes hexano (50 mL), acetato

de etila (100-125 mL) e metanol (50 mL). As frações foram evaporadas sob pressão reduzida. Este procedimento visou remover alguns contaminantes, como restos celulares e exopolissacarídeos, e enriquecer a fração acetato de etila em metabólitos secundários. Estas frações foram utilizadas em bioensaios preliminares com o biorepórter *Agrobacterium tumefaciens* NTL4(pZLR4).

No caso dos cultivos em meio CHO13 esta fração também foi utilizada em análises preliminares por CG-EM e na reação de derivatização com DMDS/I₂. A fração acetato de etila foi analisada por CG-EM utilizando-se as seguintes condições: coluna MDN-5S (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), com rampa de temperaturas 60-300(12°C/min) e mantido a 300°C por 10 minutos. O injetor operou em modo splitless a 250°C. O fluxo de gás de arraste (hélio) foi mantido a 1 mL/min. A identificação preliminar das *N*-acil-HSLs foi feita com base na análise dos espectros de massas dos diferentes sinais cromatográficos.

(S)-*N*-dodecanoil-HSL (CG-EM, IE, 70 eV): *m/z* 283 (M⁺, 4%), 170 (2%), 156 (19%), 143 (100%), 125 (17%), 102 (20 %), 83 (15%), 57 (46%), 43 (24 %).

(S)-*N*-(2*E*)-dodecenoil-HSL (CG-EM, IE, 70 eV): *m/z* 281 (M⁺, 11%), 180 (13%), 156 (11%), 143 (25%), 125 (46%), 102 (31%), 101 (30%), 83 (27%), 67 (23 %), 57 (34%), 41 (30%).

N-tridecanoil-HSL (CG-EM, IE, 70 eV): *m/z* 297 (M⁺, 7%), 201 (23%), 156 (20%), 143 (100%), 125 (17%), 102 (21 %), 83 (22%), 57 (54%), 43 (35%).

(S)-*N*-*tetradecanoil*-HSL (CG-EM, IE, 70 eV): *m/z* 311 (M^+ , 5%), 156 (20%), 143 (100%), 125 (14%), 102 (20%), 83 (14%), 57 (38%), 43 (23%).

(S)-*N*-*(7Z)*-*tetradecenoil*-HSL (CG-EM, IE, 70 eV): *m/z* 309 (M^+ , 19%), 228 (12%), 208 (23%), 156 (40%), 143 (100%), 125 (28%), 102 (77%), 55 (76%), 43 (39%), 41 (52%).

(S)-*N*-*(2E,7Z)*-*tetradecadienil*-HSL (CG-EM, IE, 70 eV): *m/z* 307 (M^+ , 2%), 236 (14%), 206 (20%), 169 (30%), 143 (55%), 125 (17%), 121 (38%), 102 (20%), 81 (100%), 68 (48%), 55 (59%), 43 (28%), 41 (45%).

5.4.3. Avaliação da atividade biológica fração acetato de etila dos extratos de *M. mesophilicum* com o biorepórter *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4).

Realizou-se o teste biológico com o biossensor *Agrobacterium tumefaciens* NTL4(pZLR4) com a fração acetato de etila do cultivo de *M. mesophilicum* (extratos 1, 3 e 5) segundo protocolo semelhante ao descrito no Tópico 5.2.3. Utilizou-se etanol como branco e solução de *(S)*-*N*-*(3-oxo-octanoil)*-HSL sintética como controle positivo. As soluções estoque do produto natural e sintético foram feitas em etanol a 1-4 mg/mL. Os resultados foram averiguados 24 horas após a incubação em BOD.

5.4.4. Reação de derivatização com dimetildissulfeto e iodo

À um balão de 25 mL adicionou-se 0,5 mL de diclorometano e 0,5 mg de fração acetato de etila do cultivo de *M. mesophilicum* (extrato 1 semi-

purificado, Tópico 5.4.2). Em seguida, adicionou-se 0,5 mL de DMDS (dimetildissulfeto) e 40 µL de solução de iodo (60 mg/mL em éter etílico). O balão foi fechado com tampa de teflon e vedado com parafilme.

O sistema permaneceu sob aquecimento em banho de óleo e agitação magnética a 40°C durante 22 horas. Após este período, adicionou-se ao meio 3 mL de diclorometano e 3 mL de solução de tiosulfato de sódio 5%. A mistura foi agitada magneticamente com vigor durante 5 minutos. Em seguida, a fase orgânica foi separada e a fase aquosa foi extraída com diclorometano (2 x 1 mL). As fases orgânicas reunidas foram secas sob sulfato de magnésio anidro, filtradas e evaporadas sob fluxo de nitrogênio.

A amostra derivatizada foi analisada por CG-EM nas seguintes condições: coluna MDN-5S (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), com rampa de temperaturas 60-300(6°C/min) e mantido a 300°C por 20 minutos. O injetor operou em modo splitless a 250°C. O fluxo de gás de arraste (hélio) foi mantido a 1 mL/min.

5.4.5. Purificação das acil-HSLs naturais – procedimento geral

Os extratos obtidos a partir de 8 litros de cultivo da bactéria *M. mesophilicum* em meio CHO13, CHO13/glucose e TSB (extratos 2, 4 e 6 respectivamente) foram purificados por cromatografia em coluna de sílica gel (0,035-0,070 mm de diâmetro de partícula) com os solventes hexano, diclorometano e acetato de etila em polaridades crescentes. As condições utilizadas para cada extrato foram:

- 1) Extratos 2 e 4: coluna com 1 cm de diâmetro; 4 g de sílica gel.
- 2) Extrato 6: coluna com 2 cm de diâmetro; 25 g de sílica gel.

As acil-HSLs foram localizadas nas diferentes frações utilizando a técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Em todos os casos, as substâncias de interesse foram observadas em frações que eluíram na polaridade diclorometano/acetato de etila 7/3. Condições gerais de análise: coluna DB-5 ou MDN-5S (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), com rampa de temperaturas 100-290(13°C/min) e mantido a 290°C por 4 minutos. O injetor operou em modo splitless a 250°C. O fluxo de gás de arraste (hélio) foi mantido a 1 mL/min.

5.4.6. Determinação dos índices de retenção das acil-HSLs

Os índices de retenção dos compostos foram obtidos através da comparação dos tempos de retenção das amostras contendo as acil-HSLs naturais com uma mistura de *n*-alcanos padrão (C₁₀ - C₃₇) por CG-EM, sendo calculados com a equação de van den Dool e Kratz. Os índices de retenção dos *n*-alcanos padrão (C₁₀ - C₃₇) foram tidos como números inteiros de 1000 a 3700.

$$IR = 100z + 100 \left[\frac{t_{R(X)} - t_{R(Z)}}{t_{R(Z+1)} - t_{R(Z)}} \right]$$

Onde:

z - número de átomos de carbono do *n*-alcano que elui antes da substância analisada (X);

*t*_{R(X)} - tempo de retenção da substância analisada;

*t*_{R(Z)} - tempo de retenção do *n*-alcano que elui antes da substância analisada;

*t*_{R(Z+1)} - tempo de retenção do *n*-alcano que elui depois da substância analisada.

O padrão de n-alcenos (C10 - C37), utilizado para o cálculo dos índices de retenção, foi obtido por cromatografia em coluna de sílica gel (200 g) de 100 ml de petróleo bruto utilizando hexano bidestilado como eluente. As seis primeiras frações de 50 ml foram analisadas por CCD e CG-EM, sendo as quatro primeiras frações reunidas, formando o padrão de n-alcenos utilizado. Este padrão foi gentilmente cedido pela doutoranda Adriana Pianaro.

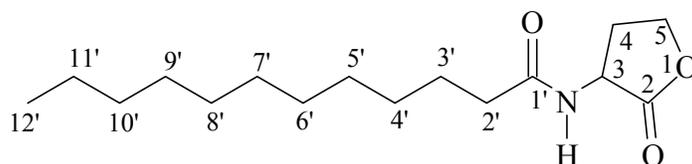
As análises por CG-EM foram feitas nas seguintes condições: coluna MDN-5S (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), com rampa de temperaturas 50-290(3°C/min) e mantido a 290°C por 20 minutos. O injetor operou em modo splitless a 250°C. O fluxo de gás de arraste (hélio) foi mantido a 1 mL/min.

5.4.7. Síntese das acil-HSLs de cadeia linear saturada

A (\pm)-*N*-dodecanoil-HSL, (*S*)-*N*-dodecanoil-HSL, (\pm)-*N*-tridecanoil-HSL e a (*S*)-*N*-tetradecanoil-HSL foram sintetizadas pelo procedimento descrito abaixo:

Num balão de ensaio de 5 mL, adicionou-se ácido dodecanóico, tridecanóico ou tetradecanóico ($1,57 \times 10^{-4}$ mol). Em seguida, adicionou-se uma solução aquosa de NaOH 2M até pH=9. Posteriormente, adicionou-se bromidrato ou cloridrato de (\pm) ou (*S*)- α -amino- γ -butirolactona ($1,05 \times 10^{-4}$ mol) e cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida ($1,57 \times 10^{-4}$ mol). A mistura reacional permaneceu sob agitação magnética à temperatura ambiente. Após 24 horas, esta foi extraída com acetato de etila (3 x 10 mL) e a fase orgânica combinada foi extraída com solução de bicarbonato de sódio

5% (2 x 6 mL), bissulfato de sódio 1 M (1 x 6 mL) e solução saturada de cloreto de sódio (1 x 6 mL). O solvente foi evaporado sob pressão reduzida, formando um sólido amarelado. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel (0,035-0,070 mm, Acros; 3,5 g; coluna com 1 cm de diâmetro) com solventes hexano, diclorometano e acetato de etila em polaridade crescente e frações de 100 ou 200 mL. As substâncias de interesse foram coletadas na polaridade diclorometano/acetato de etila 7/3. Em alguns casos, o excesso de ácido carboxílico foi removido por uma rápida filtração em coluna de sílica gel (2 g) impregnada com solução de KOH em álcoois (3,125 g para 50 mL de isopropanol e 20 mL de etanol), previamente lavada com acetato de etila abundante. Os produtos foram filtrados com 100 mL de acetato de etila.



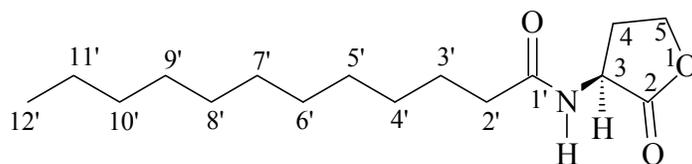
(±)-*N*-dodecanoil-homosserina lactona. Rendimento: 21,2 mg; 71,5 %. R_f 0,625 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 1/1). CG-EM (IE, 70 eV) m/z 283 (M^+ , 3%), 156 (19 %), 143 (100%), 125 (15%), 102 (18%), 83 (12%), 57 (36%), 43 (18%).

IV (KBr): 3318, 2918, 2849, 1777, 1646, 1550, 1279, 1173, 1106 cm^{-1} .

RMN de ^1H (499,88 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 0,88 (t, 3H, J 7,0 Hz, H-12'), 1,26 (m, 16H, H-11' a H-4'), 1,66 (quinteto, 2H, J 7,0 Hz, H-3'), 2,13 (m, 1H, H-4), 2,25 (t, 2H, J 7,4 Hz, H-2'), 2,85 (m, 1H, H-4), 4,29 (ddd, 1H,

J 11,3; 9,1 e 5,8 Hz, H-5), 4,47 (t, 1H, J 8,5 Hz, H-5), 4,56 (ddd, 1H, J 11,3; 8,6 e 5,8 Hz, H-3), 6,07 (d, NH, J 4,9 Hz).

RMN de ^{13}C (125,69 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 14,1 (C-12'); 22,7 (C-11'); 24,2; 25,4; 28,8; 29,2; 31,9; 29,4; 29,4 (C-10' to C-4'); 29,5 (C-3'); 35,3 (C-2'); 66,1 (C-5); 30,7 (C-4); 49,2 (C-3); 173,8 (C-1'); 175,6 (C-2).



(S)-(-)-*N*-dodecanoil-homosserina lactona. Rendimento: 23,5 mg; 79,3%.

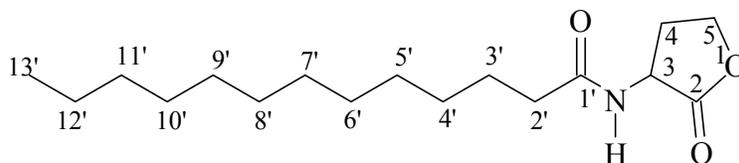
$[\alpha]_{\text{D}}^{20} -7,0^\circ$ (c. 0,16; MeOH).

CG-EM (IE, 70 eV) m/z 283 (M^+ , 4%), 156 (19 %), 143 (100%), 125 (15%), 102 (18%), 83 (12%), 57 (35%), 43 (17%).

IV (KBr): 3326, 2952, 2926, 1776, 1647, 1550, 1172, 1112 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300,06 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 0,88 (t, 3H, J 6,2 Hz, H-12'), 1,26 (m, 16H, H-11' a H-4'), 1,66 (m, 2H, H-3'), 2,13 (m, 1H, H-4), 2,25 (t, 2H, J 7,4 Hz, H-2'), 2,87 (m, 1H, H-4), 4,29 (ddd, 1H, J 11,4; 9,5 e 5,9 Hz, H-5), 4,47 (t, 1H, J 8,4 Hz, H-5), 4,54 (ddd, 1H, J 11,4; 8,4 e 5,5 Hz, H-3), 6,05 (s, NH, largo).

RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 14,1 (C-12'); 22,7 (C-11'); 25,5; 29,3; 29,4; 29,4; 31,9; 29,5; 29,6 (C-10' to C-4'); 29,6 (C-3'); 36,2 (C-2'); 66,1 (C-5); 30,8 (C-4); 49,3 (C-3); 173,7 (C-1'); 175,4 (C-2).

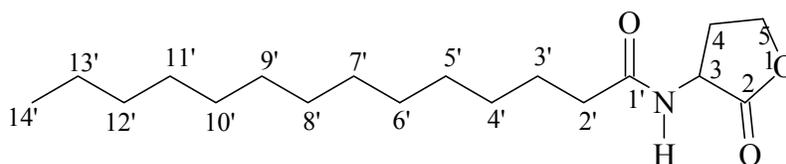


(±)-*N*-tridecanoil-homosserina lactona. Rendimento: 24,6 mg; 78,9 %. R_f 0,625 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcEt}$ 1/1). CG-EM (IE, 70 eV) m/z 297 (M^+ , 3%), 156 (19 %), 143 (100%), 125 (13%), 102 (18%), 83 (12%), 57 (31%), 43 (15%).

IV (KBr): 3320, 2920, 2850, 1776, 1645, 1550, 1168, 1012 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300,06 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 0,88 (t, 3H, J 6,6 Hz, H-12'), 1,26 (m, 18H, H-11' a H-4'), 1,64 (m, 2H, H-3'), 2,14 (m, 1H, H-4), 2,25 (t, 2H, J 7,0 Hz, H-2'), 2,83 (m, 1H, H-4), 4,28 (ddd, 1H, J 11,0; 9,2 e 5,9 Hz, H-5), 4,46 (t, 1H, J 8,8 Hz, H-5), 4,57 (ddd, 1H, J 11,0; 8,8 e 6,2 Hz, H-3), 6,22 (d, NH, J 5,1 Hz).

RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 14,1 (C-13'); 22,7 (C-12'); 24,8; 25,5; 29,2; 29,3; 29,5; 29,6; 30,5 (C-4' a C-11', com sinais sobrepostos); 31,9 (C-3'); 36,2 (C-2'); 66,1 (C-5); 30,5 (C-4); 49,2 (C-3); 173,7 (C-1'); 175,5 (C-2).

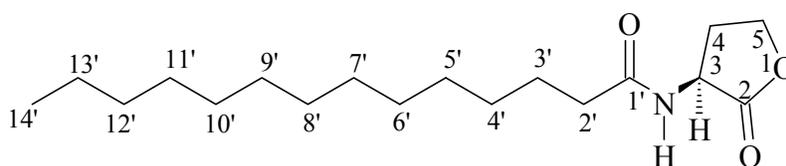


(±)-*N*-tetradecanoil-homosserina lactona. Rendimento: 30,6 mg; 93,7 %. R_f 0,625 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcEt}$ 1/1). CG-EM (IE, 70 eV) m/z 311 (M^+ , 3%), 156 (20 %), 143 (100%), 125 (13%), 102 (19%), 101 (11%), 83 (12%), 57 (32%), 43 (17%).

IV (KBr): 3326, 2917, 2853, 1770, 1634, 1533, 1169, 1006 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300,06 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 0,88 (t, 3H, J 6,6 Hz, H-14'), 1,25 (m, 20H, H-13' a H-4'), 1,64 (m, 2H, H-3'), 2,14 (m, 1H, H-4), 2,25 (t, 2H, J 7,3 Hz, H-2'), 2,83 (m, 1H, H-4), 4,29 (ddd, 1H, J 11,4; 9,5 e 5,9 Hz, H-5), 4,46 (t, 1H, J 8,8 Hz, H-5), 4,57 (ddd, 1H, J 11,4; 8,4 e 6,2 Hz, H-3), 6,22 (d, NH, J 5,1 Hz).

RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 14,1 (C-14'); 22,7 (C-13'); 24,8; 25,5; 29,2; 29,3; 29,5; 29,6; 30,5 (C-4' a C-12', com sinais sobrepostos); 31,9 (C-3'); 36,2 (C-2'); 66,1 (C-5); 30,5 (C-4); 49,2 (C-3); 173,7 (C-1'); 175,5 (C-2).



(S)-*N*-tetradecanoil-homosserina lactona. Rendimento: 32,0 mg; 98,0 %. CG-EM (IE, 70 eV) m/z 311 (M^+ , 3%), 156 (20 %), 143 (100%), 125 (13%), 102 (19%), 101 (10%), 83 (11%), 57 (31%), 43 (17%).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -9,3^\circ$ (c. 0,16; MeOH).

IV (KBr). 3320, 2908, 2843, 1780, 1650, 1552, 1162, 1010 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300,06 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 0,88 (t, 3H, J 6,4 Hz, H-14'), 1,25 (m, 20H, H-13' a H-4'), 1,64 (q, 2H, J 7,3 Hz, H-3'), 2,13 (m, 1H, H-4), 2,24 (t, 2H, J 7,1 Hz, H-2'), 2,83 (m, 1H, H-4), 4,28 (ddd, 1H, J 5,9; 11,2 e 9,3 Hz, H-5), 4,47 (t, 1H, J 8,9 Hz, H-5), 4,58 (ddd, 1H, J 6,1; 11,6; 8,6 Hz, H-3), 6,21 (s, NH, largo).

RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 14,1 (C-14'); 22,6 (C-13'); 29,2; 29,29; 29,31; 29,4; 29,57; 29,60; 29,63; 30,5 (C-4' a C-12', com

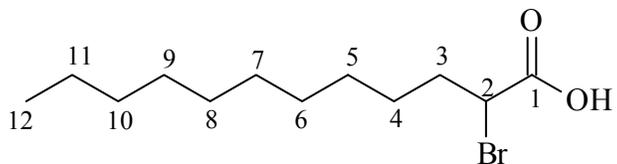
sinais sobrepostos); 31,9 (C-3'); 36,1 (C-2'); 66,1 (C-5); 30,5 (C-4); 49,2 (C-3); 173,8 (C-1'); 176,3 (C-2).

5.4.8. Síntese da (S)-(2E)-dodecenoil-HSL

5.4.8.1. Obtenção do ácido 2-bromo-dodecanóico

À um balão de 3 saídas de fundo redondo de 250 mL munido com uma saída em *trap* com hidróxido de sódio em lentilhas, adicionou-se 13 g de ácido láurico (0,065 mol) e 40 mL de cloreto de tionila (0,336 mol). A reação permaneceu sob agitação a 50°C por 1,5 h em banho de água morna. Em seguida, adicionou-se 5,0 mL de bromo líquido por meio de um funil e refluxou-se por 6 h. Posteriormente, a reação permaneceu sob agitação à temperatura ambiente por toda a noite.

O sistema foi então rearranjado com uma coluna de destilação de bolas, em cuja saída encontrava-se um balão coletor imerso num banho de gelo e ligado a um *trap* contendo hidróxido de sódio em lentilhas. O excesso de cloreto de tionila foi removido por destilação. O resíduo vermelho claro restante no balão de destilação foi gotejado lentamente em um becker contendo 500 mL de água destilada, sob banho de gelo e agitação manual. Em seguida, esta solução foi aquecida, resfriada e colocada em banho de gelo, observando-se a cristalização de um produto sólido amarelo claro. O sólido foi decantado, lavado abundantemente com água destilada e novamente recristalizado mediante aquecimento e resfriamento. Finalmente, o produto sólido puro foi seco ao ar em uma placa de petri tampada com papel alumínio (Sweet, 1956).



Ácido 2-bromo-dodecanóico. Rendimento: 14,08 g; 78 %. CG-EM (IE, 70 eV, derivado metilado via diazometano) m/z 294 (M^+ , 2%), 292 (M^+ , 1%), 265 (5 %), 263 (5%), 223 (18%), 221 (19%), 213 (66%), 154 (97%), 152 (100%), 87 (64%), 55 (35%).

IV (KBr): 2926, 2844, 1716, 1461, 1279, 924 cm^{-1} .

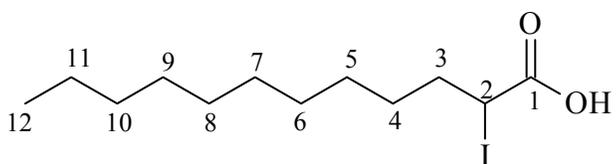
RMN de ^1H (300,06 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 0,88 (t, 3H, J 6,6 Hz, H-12), 1,26 (m, 16H, H-4 a H-11), 2,03 (m, 2H, H-3), 4,23 (t, 1H, J 6,0 Hz, H-2), 9,1 (s, OH, largo).

RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 14,1 (C-12); 22,6 (C-11); 27,2; 28,8; 29,3; 29,45; 29,51; 31,8 (C-4 a C-10); 34,6 (C-3); 45,4 (C-2); 175,8 (C-1).

5.4.8.2. Obtenção do ácido 2-iodo-dodecanóico

A um balão de 250 mL munido com um condensador em banho de água adicionou-se 9,10 g (0,032 mol) de ácido 2-bromo-dodecanóico, 100 mL de 2-butanona (previamente destilada sob sulfato de sódio anidro) e 9,33 g de iodeto de sódio anidro. A reação permaneceu sob refluxo com agitação magnética durante 8 h. Em seguida, o meio foi evaporado sob pressão reduzida. O resíduo marrom foi dissolvido em 500 mL de água destilada e descorado com solução de NaHSO_3 10%, adicionado gota a gota. A solução foi acidificada com H_2SO_4 5%. Formou-se um óleo preto, que foi separado da fase aquosa por decantação. Adicionou-se 200 mL de água destilada ao

óleo e ferveu-se esta suspensão em chapa aquecedora. Durante a fervura, adicionou-se gota a gota uma solução de NaHSO₃ 10% até a completa descoloração do óleo. A fase aquosa foi removida e o óleo amarelo restante foi dissolvido em NaHCO₃ saturado, com formação de espuma. O meio foi acidificado com H₂SO₄ 5% e fervido. O óleo amarelo que precipitou foi coletado com 30 mL de acetato de etila, seco sob sulfato de magnésio anidro, filtrado e evaporado sob pressão reduzida.



Ácido 2-iodo-dodecanóico. Rendimento: 9,52 g; 90 %.

CG-EM (IE, 70 eV, derivado metilado via diazometano) m/z 341 (M^{+} -1, 1%), 213 (100%), 181 (45 %), 163 (64%), 111 (31%), 97 (91%), 83 (66%), 85 (85%), 69 (64%), 55 (93%).

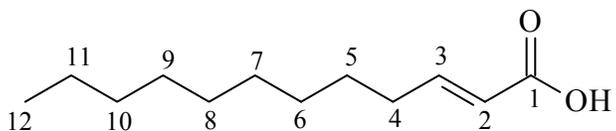
IV (KBr): 2935, 2844, 1706, 1470, 1270, 924 cm^{-1} .

RMN de ¹H (300,06 MHz, CDCl₃, TMS): δ 0,88 (t, 3H, J 6,2 Hz, H-12), 1,26 (m, 16H, H-4 a H-11), 1,98 (m, 2H, H-3), 4,31 (t, 1H, J 7,7 Hz, H-2), 10,37 (s, OH, largo).

RMN de ¹³C (75,45 MHz, CDCl₃, TMS): δ 14,2 (C-12); 20,3 (C-11); 22,7 (C-10); 28,7; 29,3; 29,5; 29,6 (C-4 a C-9, com sinais sobrepostos); 31,9 (C-3); 35,8 (C-2); 177,7 (C-1).

5.4.8.3. Obtenção do ácido (2E)-dodecenóico

A um balão de 250 mL adicionou-se 100 mL de etanol seco, 7 g de ácido 2-iodo-dodecanóico (0,02147 mol) e 4,32 g de hidróxido de potássio (0,07722 mol). A solução permaneceu sob refluxo em banho de água por 10 horas. Em seguida, a reação foi evaporada sob pressão reduzida, dissolvida em 500 mL de água destilada, acidificada com H₂SO₄ 5% e extraída com éter etílico (4 x 150 mL). A fase orgânica foi seca sob sulfato de magnésio anidro, filtrada e evaporada. O produto (óleo amarelo) foi recristalizado duas vezes com hexano quente seguido de evaporação, com a separação de um sólido branco por filtração. O óleo amarelo restante foi exaustivamente purificado por cromatografia em coluna de sílica gel (2 x), com os solventes hexano, diclorometano e acetato de etila em polaridades crescentes.



Ácido (2E)-dodecenóico. Rendimento: 383,3 mg; 9,0 %.

CG-EM (IE, 70 eV, derivado metilado via diazometano) m/z 213 ($M^+ + 1$, 1%), 181 (24%), 138 (24%), 113 (33%), 96 (36%), 87 (100%), 55 (66%), 41 (38%).

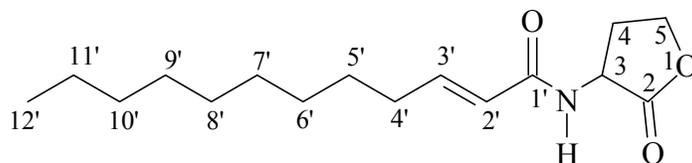
IV (filme sobre NaCl): 2926, 2844, 1688, 1634, 1424, 1279, 934 cm^{-1} .

RMN de ¹H (300,06 MHz, CDCl₃, TMS): δ 0,88 (t, 3H, J 6,2 Hz, H-12), 1,27 (m, 12H, H-6 a H-11), 1,46 (m, 2H, H-5), 2,22 (m, 2H, H-4), 5,81 (d, 1H, J 15,7 Hz, H-2), 7,09 (dt, 1H, J 6,7 e 15,4 Hz), 10,00 (s, OH, largo).

RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 14,2 (C-12); 22,7 (C-11); 27,9; 29,2; 29,3; 29,4; 29,5; 31,9 (C-5 a C-10); 32,4 (C-4); 120,6 (C-2); 152,4 (C-3), 172,2 (C-1).

5.4.8.4. Obtenção da (\pm) e (*S*)-(2*E*)-dodecenoil-HSL

Um balão de 5 mL adicionou-se 1 mL de água destilada e 30,0 mg de ácido (2*E*)-dodecenóico. Aos poucos, adicionou-se gota a gota uma solução de NaOH 0,2 M até que todo ácido fosse convertido no respectivo sal e se atingisse pH=10. Em seguida, adicionou-se 30,0 mg de cloridrato de *N,N*-etil-diaminopropil-carbodiimida ($1,57 \times 10^{-4}$ mol) e 19,11 mg de cloridrato de (\pm)- α -amino- γ -butirolactona (ou bromidrato de (*S*)- α -amino- γ -butirolactona) ($1,05 \times 10^{-4}$ mol), permanecendo sob agitação à temperatura ambiente. Após 24 h, a reação foi extraída com acetato de etila (3 x 10 mL) e as fases orgânicas combinadas foram extraídas com NaHCO_3 5% (3 x 10 mL), KHSO_4 1M (2 x 10 mL) e NaCl saturado (3 x 10 mL), seca sob MgSO_4 anidro, filtrado e evaporado. O excesso de ácido carboxílico foi removido por uma rápida filtração em coluna de sílica gel (2 g) impregnada com solução de KOH em álcoois (3,125 g para 50 mL de isopropanol e 20 mL de etanol), previamente lavada com acetato de etila abundante. Os produtos foram filtrados com 100 mL de acetato de etila. Outras purificações por cromatografia em coluna de sílica gel com os solventes hexano, diclorometano e acetato de etila em polaridades crescentes também foram utilizadas na purificação dos produtos de interesse.

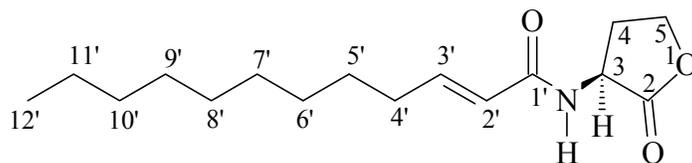


(±)-(2E)-N-dodecenoil-homosserina lactona. Rendimento: 20,0 mg; 68,0 %. R_f 0,658 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcEt}$ 1/1). CG-EM (IE, 70 eV) m/z 281 (M^+ , 6%), 181 (73 %), 154 (36%), 143 (21%), 102 (12%), 97 (30%), 81 (49%), 55 (100%).

IV (KBr): 3326, 2917, 2834, 1770, 1634, 1533, 1161, 1006, 650 cm^{-1} .

RMN de ^1H (499,88 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 0,88 (t, 3H, J 6,6 Hz, H-12'), 1,26 (m, 12H, H-6' a H-11'), 1,44 (m, 2H, H-5'), 2,20 (m, 2H, H-4'), 2,20 (m, 1H, H-4), 2,91 (m, 1H, H-4), 4,31 (ddd, 1H, J 11,4; 9,4 e 5,9 Hz, H-5), 4,49 (t, 1H, J 8,9 Hz, H-5), 4,59 (ddd, 1H, J 11,4; 8,5 e 5,5 Hz, H-3), 5,82 (d, 1H, J 15,3 Hz, H-2'), 5,95 (s, NH, largo), 6,91 (dt, 1H, J 7,0 e 15,3 Hz, H-3').

RMN de ^{13}C (125,69 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 14,1 (C-12'); 22,7 (C-11'); 29,5; 29,4; 29,3; 29,2; 28,1 (C-10' a C-6'), 31,9 (C-5'), 32,1 (C-4'), 30,8 (C-4), 49,4 (C-3), 66,2 (C-5), 122,2 (C-2'), 147,0 (C-3'), 166,4 (C-1'); 175,5 (C-2).



(S)-(2*E*)-*N*-dodecenoil-homosserina lactona. Rendimento: 20,1 mg; 68,3 %. CG-EM (IE, 70 eV) *m/z* 281 (M^+ , 6%), 181 (69 %), 154 (33%), 143 (19%), 102 (13%), 97 (30%), 81 (50%), 55 (100%).

$[\alpha]_D^{20} = -11,5^\circ$ (c. 0,16; MeOH).

IV (KBr): 3320, 3071, 2917, 2829, 1771, 1631, 1533, 1389, 1159 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300,06 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 0,88 (t, 3H, *J* 6,2 Hz, H-12'), 1,26 (m, 12H, H-6' a H-11'), 1,72 (m, 2H, H-5'), 2,17 (m, 2H, H-4'), 2,17 (m, 1H, H-4), 2,86 (m, 1H, H-4), 4,29 (ddd, 1H, *J* 11,0; 9,2 e 5,5 Hz, H-5), 4,48 (t, 1H, *J* 9,2 Hz, H-5), 4,65 (ddd, 1H, *J* 11,0; 8,8 e 6,2 Hz, H-3), 5,83 (d, 1H, *J* 15,4 Hz, H-2'), 6,22 (s, NH, largo), 6,89 (dt, 1H, *J* 7,3 and 15,0 Hz, H-3').

RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 14,2 (C-12'); 22,7 (C-11'); 29,5; 29,4; 29,3; 29,2; 28,2 (C-10' a C-6'), 31,9 (C-5'), 32,2 (C-4'), 30,6 (C-4), 49,3 (C-3), 66,2 (C-5), 122,2 (C-2'), 146,7 (C-3'), 166,3 (C-1'); 175,6 (C-2).

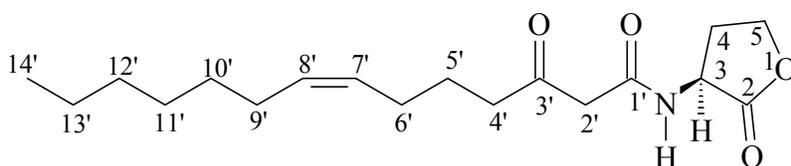
5.4.9. Síntese da *(S)*-(2*E*,7*Z*)-tetradecadienil-HSL

5.4.9.1. Obtenção da *(S)*-(*N*)-3-oxo-(7*Z*)-tetradecenoil-HSL

A um balão de 125 mL com duas saídas sob atmosfera de nitrogênio seco adicionou-se 20 mL de diclorometano seco, ácido de Meldrum (288 mg; 2 mmol), dicitclohexilcarbodiimida (453,2 mg; 2,2 mmol), 4-(dimetilamino)-piridina (256,2 mg; 2,1 mmol) e ácido 5-*cis*-dodecenóico

(358,77 μL ; 2 mmol). O meio reacional foi agitado à temperatura ambiente. Após 24h, a reação foi filtrada e evaporada sob pressão reduzida. O óleo amarelo formado foi dissolvido em 20 mL de acetato de etila, extraído com HCl 2 M (3 x 10 mL), seco sob MgSO_4 anidro, filtrado e evaporado sob fluxo de nitrogênio. Obteve-se 575,1 mg de 5-*cis*-dodecenoil-Meldrum bruto, que foi rapidamente utilizado na próxima etapa reacional.

A um balão de 100 mL em banho de óleo mineral acoplado a um refluxador e aquecimento/agitação magnética, adicionou-se 369,75 mg de 5-*cis*-dodecenoil-Meldrum (1,125 mmol), 189 μL de trietilamina (1,79 mmol), 22,5 mL de acetonitrila grau HPLC de pureza e 204,75 mg de bromidrato de (S)- α -amino- γ -butirolactona (1,125 mmol). A reação permaneceu sob agitação à temperatura ambiente durante 2h e sob refluxo a 110°C por 4h. Em seguida, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O sólido branco formado foi dissolvido em 20 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi extraída com KHSO_4 1M (3 x 10 mL), NaHCO_3 10 % (3 x 10 mL) e NaCl saturado (3 x 10 mL), seco sob MgSO_4 anidro, filtrado e evaporado. O sólido branco formado (454,7 mg) foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel (12 g, coluna com 2 cm de diâmetro) com os solventes hexano, diclorometano e acetato de etila em polaridade crescente. O produto eluiu na polaridade diclorometano/acetato de etila 30%.



(S)-3-oxo-(7Z)-N-tetradecenoil-homosserina lactona. Rendimento: 361,0 mg; 99 %. $[\alpha]_D^{20} = -8,6^\circ$ (c. 0,65, MeOH).

IV (KBr): 3287, 3023, 2917, 2855, 1792, 1718, 1646, 1539, 1172, 1025, 583 cm^{-1} .

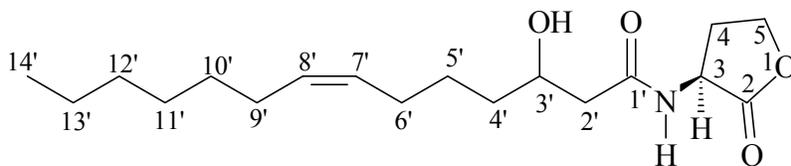
RMN de ^1H (300,0 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 0,88 (t, 3H, J 6,5 Hz, H-14'), 1,25 (m, 8H, H-10' a H-13'), 1,64 (q, 2H, J 7,3 Hz, H-5'), 2,03 (m, 4H, H-6' e H-9'), 2,23 (m, 1H, H-4), 2,53 (t, 2H, J 7,4 Hz, H-4'), 2,73 (m, 1H, H-4), 3,46 (s, 2H, H-2'), 4,28 (ddd, 1H, J 11,4; 9,3 e 6,0 Hz, H-5), 4,46 (t, 1H, J 9,1 Hz, H-5), 4,59 (ddd, 1H, J 11,4; 8,8 e 6,8 Hz, H-3), 5,30 e 5,40 (m, 2H, H-7' e H-8'), 7,69 (s, NH, largo).

RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 14,1 (C-14'); 22,6 (C-13'); 26,2; 28,9; 29,6; 29,7; 27,2 (C-12' a C-9'; C-6'), 23,2 (C-5'), 43,2 (C-4'), 48,3 (C-2'), 31,7 (C-4), 49,0 (C-3), 65,9 (C-5), 206,3 (C-3'), 166,4 (C-1'); 174,9 (C-2), 128,1 (C-8'), 131,4 (C-7').

5.4.9.2. Obtenção da (*S*)-[N-3-hidroxi-(7Z)]-tetradecenoil-HSL

A um balão de 50 mL em banho de gelo e com agitação magnética adicionou-se 150 mg (0,463 mmol) de (*S*)-3-oxo-(7Z)-tetradecenoil-HSL em 5 mL de metanol (grau HPLC de pureza). O meio foi acidificado até pH 3 pela adição de algumas gotas de HCl 2M. Em seguida, adicionou-se aos poucos 24,91 mg (0,659 mmol) de borohidreto de sódio. O meio foi novamente acidificado. Após 30 minutos, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida, rendendo um sólido branco. O produto foi filtrado em coluna de sílica gel (5g; coluna com 5 cm de diâmetro) com 250 mL de

diclorometano/acetato de etila 30%. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida.



(S)-N-[3-hidroxi-(7Z)]-tetradecenoil-homosserina lactona.

Rendimento: 133,1 mg; 88%.

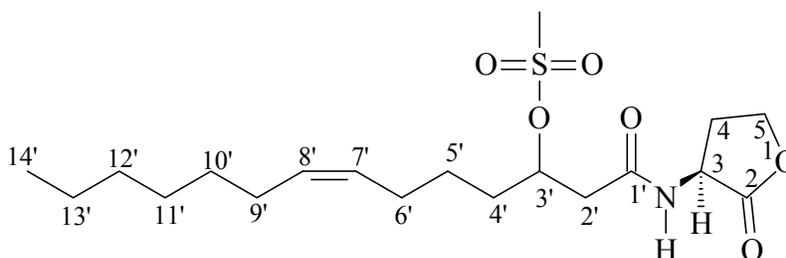
IV (KBr): 3318, 3272, 2917, 2844, 1797, 1642, 1552, 1161, 1015 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300,0 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 0,88 (t, 3H, J 7,1 Hz, H-14'), 1,27 (m, 8H, H-10' a H-13'), 1,50 (m, 4H, H-4' e H-5'), 2,01 (m, 4H, H-6' e H-9'), 2,21 (m, 1H, H-4), 2,41 (m, 2H, H-2'), 2,72 (m, 1H, H-4), 3,44 (m, 1H, H-3'), 4,00 (s, OH, largo), 4,28 (m, 1H, H-5), 4,47 (m, 1H, H-5), 4,58 (m, 1H, H-3), 5,35 (m, 2H, H-7' e H-8'), 6,80 (s, NH, largo).

RMN de ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 14,1 (C-14'); 22,6 (C-13'); 29,0; 29,7; 29,9; 26,9; 27,3 (C-12' a C-9'; C-6'), 25,6 (C-5'), 36,5 (C-4'), 68,5 (C-3'), 42,5 (C-2'), 31,8 (C-4), 49,2 (C-3), 66,1 (C-5), 172,9 (C-1'); 175,6 (C-2), 129,1 (C-8'), 130,6 (C-7').

5.4.9.3. Obtenção da (S)-N-[3-metil-(7Z)]-tetradecenoil-HSL

Num balão de 25 mL em banho de gelo e sob agitação magnética adicionou-se 5 mL de diclorometano e 97 mg (0,3 mmol) de (S)-N-(3-hidroxi-(7Z))-tetradecenoil-HSL. Em seguida, adicionou-se 40 μ L de trietilamina e 30 μ L de cloreto de mesila. Após 1 hora, o banho de gelo foi removido. Após 2 horas, adicionou-se 220 μ L de trietilamina e 100 μ L de cloreto de mesila. O meio foi agitado durante 10 minutos; o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O sólido amarelo formado foi solubilizado em 20 mL de acetato de etila e extraído com KHSO₄ 1M (4 x 10 mL), NaHCO₃ 10 % (3 x 10 mL) e NaCl saturado (2 x 10 mL), seco sob MgSO₄ anidro, filtrado e evaporado.



(S)-N-[3-metil-(7Z)]-N-tetradecenoil-homosserina lactona.

Rendimento 127,9 mg, 99%.

IV (KBr): 3326, 3007, 2926, 2853, 1770, 1642, 1553, 1342, 1169, 897 cm^{-1} .

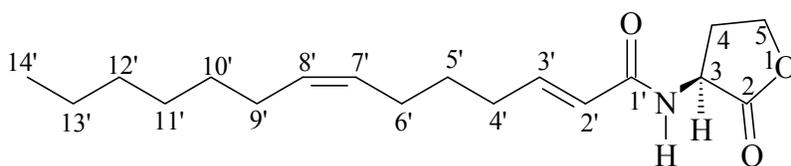
RMN de ¹H (300,0 MHz, CDCl₃, TMS): δ 0,88 (t, 3H, *J* 6,4 Hz, H-14'), 1,28 (m, 8H, H-10' a H-13'), 1,45 (m, 2H, H-5'), 1,82 (m, 2H, H-4'), 2,04 (m, 4H, H-6' e H-9'), 2,26 (m, 1H, H-4), 2,63 (d, 2H, *J* 4,1 Hz, H-2'), 2,72 (m, 1H, H-4), 3,04 e 3,06 (2 s, 3H, SO₂-CH₃), 4,27 (m, 1H, H-5), 4,48

(t, 1H, J 8,9 Hz, H-5), 4,60 (m, 1H, H-3), 5,05 (q, 1H, J 6,3 Hz, H-3'), 5,35 (m, 2H, H-7' e H-8'), 6,65 (t, NH, J 7,9 Hz, largo).

RMN de ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 14,1 (C-14'); 22,6 (C-13'); 26,7; 27,3; 29,6; 29,0 (C-12' a C-9'; C-6', com sinais sobrepostos), 24,9 (C-5'), 34,5 (C-4'), 79,9 (C-3'), 41,0 (C-2'), 31,7 (C-4), 38,1 (SCH₃), 49,1 (C-3), 66,0 (C-5), 169,5 (C-1'); 175,3 (C-2), 128,4 (C-8'), 131,1 (C-7').

5.4.9.4. Obtenção da (S)-N-(2E, 7Z)-tetradecadienil-HSL

A um balão de 25 mL adicionou-se 50 mg (0,124 mmol) de (S)-N-(3-metil-(7Z))-tetradecenoil-HSL em 6 mL de diclorometano. Em seguida, adicionou-se 55,62 μL (0,372 mmol) de DBU. O meio foi agitado a temperatura ambiente por 1 h, quando foi adicionado mais 55,62 μL de DBU. O meio foi refluxado (50°C) durante 2,5 h. Após refluxo, adicionou-se 10 mL de diclorometano e o meio foi extraído com KHSO_4 1M (3 x 10 mL), NaHCO_3 10 % (3 x 10 mL) e NaCl saturado (1 x 10 mL), seco sob MgSO_4 anidro, filtrado e evaporado.



(S)-N-(2E, 7Z)-N-tetradecadienil-homosserina lactona. Rendimento: 29,1 mg; 76%. R_f 0,707 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcEt}$ 1/1). $[\alpha]_D^{20} = -12,0^\circ$ (c. 0,7; MeOH). CG-EM (IE, 70 eV): m/z 307 (M^+ , 1%), 236 (13 %), 206 (18%), 169 (28%), 143 (54%), 102 (20%), 81 (100%), 55 (59%), 46 (100%).

IV (KBr): 3318, 3007, 2935, 1780, 1671, 1625, 1552, 1161, 1015, 650 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300,0 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 0,88 (t, 3H, J 6,2 Hz, H-14'), 1,27 (m, 8H, H-10' a H-13'), 1,52 (q, 2H, J 7,4 Hz, H-5'), 2,03 (m, 4H, H-6' e H-9'), 2,18 (m, 2H, H-4'), 2,18 (m, 1H, H-4), 2,84 (m, 1H, H-4), 4,29 (ddd, 1H, J 12,2; 9,2 e 6,1 Hz, H-5), 4,47 (t, 1H, J 9,2 Hz, H-5), 4,63 (ddd, 1H, J 12,2; 9,2 e 6,1 Hz, H-3), 5,33 (m, 2H, H-7' e H-8'), 5,84 (d, 1H, J 15,3 Hz, H-2'), 6,31 (s, NH, largo), 6,89 (dt, 1H, J 6,9 e 15,3 Hz, H-3').

RMN de ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 14,1 (C-14'); 22,6 (C-13'); 26,67; 27,27 (C-6'; C-9'); 28,19; 28,95; 29,65; 30,48 (C-12' a C-10'; C-5'), 31,7 (C-4'), 146,4 (C-3'), 122,5 (C-2'), 31,7 (C-4), 49,2 (C-3), 66,2 (C-5), 169,4 (C-1'); 175,7 (C-2), 128,7 (C-8'), 130,9 (C-7').

5.4.10. Co-injeções das acil-HSLs sintéticas com os produtos naturais

Os produtos sintéticos foram utilizados para confirmação estrutural das acil-HSLs na fração acetato de etila do cultivo de *M. mesophilicum* (F23, meio CHOI3), através de co-injeção por CG-EM e comparações dos espectros de massas. As análises foram feitas nas seguintes condições: coluna MDN-5S (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), com rampa de temperaturas 60-300(12°C/min) e mantido a 300°C por 10 minutos (para a *N*-dodecanoil-HSL) e 100-290(12°C/min) e mantido a 290°C por 10 minutos para as demais substâncias. O injetor operou em modo splitless a 250°C. O fluxo de gás de arraste (hélio) foi mantido a 1 mL/min.

5.4.11. Determinação da configuração absoluta das acil-HSLs naturais produzidas por *M. mesophilicum*

5.4.11.1. Reação de hidrogenação catalítica

A um balão de 5 mL adicionou-se 0,3 mg da fração F22 do cultivo de *M. mesophilicum* em meio CHO13 (mistura das acil-HSLs) em 400 μ L de acetato de etila. Em seguida, adicionou-se uma quantidade catalítica de Pd/C (10%, Merck). O balão foi fechado com um septo de borracha ao qual foi acoplada uma bexiga contendo hidrogênio gasoso. A reação permaneceu sob atmosfera de hidrogênio (1 atm) e agitação magnética por 6 h. Após este período, o conteúdo reacional foi filtrado em coluna de sílica gel (2 g, 1 cm de diâmetro de coluna) com 150 mL de acetato de etila. Obteve-se 0,0003 g de produto de redução.

5.4.11.2. Análises por cromatografia gasosa acoplada a detecção por ionização em chama com coluna com fase estacionária quiral

A fração F22 hidrogenada e os produtos sintéticos (\pm) e (*S*)-tetradecanoil e dodecanoil-HSL foram analisados utilizando a técnica de cromatografia gasosa acoplada a detecção por ionização em chama e coluna quiral Chrompack Chirasil ciclodextrina. As análises foram realizadas com injetor operando a 220°C (p/ *N*-tetradecanoil-HSL) ou 240°C (p/ *N*-dodecanoil-HSL). Os volumes injetados foram de 1 μ L com concentração de solutos a 1 mg/mL, com divisão de fluxo de 1/100. O forno foi mantido

isotermicamente a 180°C durante 150 minutos. Detector: 240°C (p/ *N*-tetradecanoil-HSL) ou 280°C (p/ *N*-dodecanoil-HSL). Os resultados são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7. Resultados da determinação da configuração absoluta da (*S*)-*N*-dodecanoil, (*S*)-*N*-tetradecanoil,, (*S*)-*N*-(2*E*)-dodecenoil, (*S*)-*N*-(7*Z*)-tetradecenoil e (*S*)-*N*-(2*E*, 7*Z*)-tetradecadienil-HSL produzidas por *M. mesophilicum* por CG-FID com fase estacionária quiral.

Amostra	T _R e % (R) (min)	T _R e % (S) (min)	ee (majoritário)
(S)-N-tetradecanoil-HSL			
(±)- <i>N</i> -tetradecanoil-HSL sint.	103,8 (50%)	105,4 (50%)	Picos em 1:1
(<i>S</i>)- <i>N</i> -tetradecanoil-HSL sint.	-	105,4 (97%)	94 % (<i>S</i>)
F22 Prod. natural	-	105,4 (>99%)	> 99% (<i>S</i>)
Co-injeção (±)- <i>N</i> -tetradecanoil-HSL e prod. natural*	103,6 (29%)	105,3 (71%)	13% (<i>S</i>)
(S)-N-dodecanoil-HSL			
(±)- <i>N</i> -dodecanoil-HSL sint.	46,9 (50%)	47,7 (50%)	Picos em 1:1
(<i>S</i>)- <i>N</i> -dodecanoil-HSL sint.	-	47,7 (97%)	94 % (<i>S</i>)
F22 Prod. natural	-	47,7 (>99%)	> 99% (<i>S</i>)
Co-injeção (±)- <i>N</i> -dodecanoil-HSL e prod. natural [#]	46,8 (32%)	47,5 (68%)	4% (<i>S</i>)

T_R: tempo de retenção

* Co-injeção: mistura 1:1 de (±)-*N*-tetradecanoil-HSL a 1 mg/mL e Fração F22 a 1 mg/mL.

Co-injeção: mistura 1:1 de (±)-*N*-dodecanoil-HSL a 0,1 mg/mL e Fração F22 a 1 mg/mL.

5.4.12. Avaliação da atividade biológica dos produtos sintéticos e fração F22 de *M. mesophilicum* com o bioreporter *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4).

Realizou-se o teste biológico com o biossensor *Agrobacterium tumefaciens* NTL4(pZLR4) com a fração F22 do cultivo de *M. mesophilicum* em meio CHOI3 e os produtos sintéticos (*S*)-*N*-dodecanoil, (\pm)-*N*-tridecanoil, (*S*)-*N*-tetradecanoil, (*S*)-*N*-(2*E*)-dodecenoil e (*S*)-*N*-(2*E*, 7*Z*)-tetradecadienil-HSL segundo protocolo semelhante ao descrito no Tópico 5.2.3. Utilizou-se etanol como branco e solução de (*S*)-*N*-(3-oxo-octanoil)-HSL sintética como controle positivo. As soluções estoque do produto natural e sintético foram feitas em etanol a 2 mg/mL. Os resultados foram averiguados e fotografados 24 horas após a incubação em BOD.

5.4.13. Avaliação da atividade antimicrobiana das acil-HSLs sintéticas contra bactérias Gram-positivas endofíticas da laranja

Os ensaios antimicrobianos das acil-HSLs sintéticas produzidas por *M. mesophilicum* foram feitos com as bactérias Gram-positivas *Curtobacterium flaccumfaciens* ER 1/5, *Bacillus sp.* CL16, *Nocardiosis sp.* e *Bacillus sp.* CL15, isoladas como endofíticas de laranjeira e gentilmente cedidas pelo Dr. Welington Luís Araújo (ESALQ/USP).

Os inóculos dos microrganismos *Curtobacterium flaccumfaciens* ER 1/5 e *Bacillus sp.* CL16 foram preparados em *slants* contendo meio caldo nutriente sólido (3 tubos cada), crescidos a 30 °C por 24 horas em BOD. O inóculo do microrganismo *Bacillus sp.* CL15 foi preparado segundo o mesmo

procedimento, porém com 48 h de incubação. Após crescimento, as células foram removidas com alça flambada e suspensas em água destilada estéril (10 mL), até obter uma suspensão com turbidez equivalente a 3×10^8 células/mL, de acordo com uma escala de McFarland.

No caso da espécie *Nocardiosis sp.* o inóculo foi preparado em erlenmeyer contendo 50 mL de meio Müller-Hinton líquido, incubado em aparelho *shaker* durante 72 h a 30°C e sob agitação (100 rpm). As células (na forma de grumos sólidos) foram decantadas, lavadas com água destilada estéril (2 x), ressuspensas em água destilada (10 mL), vortexadas e diluídas até atingir a concentração desejada.

Os procedimentos relativos à preparação das placas foi o mesmo descrito no Tópico 5.3.2. As seguintes soluções foram testadas:

- 3) Controle negativo (branco): água destilada/dimetilsulfóxido 20 %.
- 4) Controle positivo: cloranfenicol comercial, estoque a 2 mg/mL.
- 5) Soluções teste: (*S*)-*N*-dodecanoil, (*S*)-*N*-(2*E*)-dodecenoil, (*S*)-*N*-tetradecanoil e (*S*)-*N*-(2*E*, 7*Z*)-tetradecadienil-HSL. Soluções estoque a 2 mg/mL em água/dimedilsulfóxido 20 %.

No caso das bactérias *Bacillus sp* CL16 e *Curtobacterium flaccumfaciens* ER 1/5 a adição do agente revelador (Tópico 5.3.2) ocorreu após 24 h de incubação da placa em BOD a 30°C. No caso das cepas *Nocardiosis sp.* e *Bacillus sp.* CL15 as placas foram incubadas por 48 h antes da adição do revelador.

5.5. Estudo da secreção produzida pelo opilião *Hoplobunus mexicanus*

As secreções produzidas por *H. mexicanus* foram coletadas utilizando um chumaço de algodão tratado (previamente limpo com hexano e acetato de etila via refluxo) com o auxílio de pinças e de um estereoscópio. As secreções eram incolores e de odor forte. As análises por CG-EM foram feitas mediante extração do conteúdo absorvido no algodão com acetato de etila, enquanto que as análises por ressonância magnética nuclear foram feitas mediante extração com clorofórmio deuterado.

6. REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

6. Referências Bibliográficas

- ACOSTA, L. E., PORETTI, T. I., MASCARELLI, P. E. The defensive secretions of *Pachyloidellus goliath* (Opiliones, Laniatores, Gonyleptidae). **Bonn. Zool. Beitr.** 44, 19-31, 1993.
- ALLEN, F., KALM, M. J. *Trans*-2-dodecenoic acid. In: Organic Synthesis, 37, 29-31, 1957.
- ARAÚJO, W. L., MARCON, J., MACCHERONI, W., ELSAS, J. D., VUURDE, J. W. L., AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Appl. Environ. Microbiol.**, 68, 4906-4914, 2002.
- ATTYGALLE, A. B., JHAM, G. N., MEINWALD, J. Determination of double-bond position in some unsaturated terpenes and other branched compounds by alkylthiolation. **Anal. Chem.**, 65, 2528-2533, 1993.
- ATTWOOD, M. M., HARDER, W. A rapid and specific enrichment procedure for *Hyphomicrobium spp.* **Anton. Leeuwenh.**, 38, 369-378, 1972.
- AXELROOD, P. E., RELLA, M., SCHROTH, M. N. Role of antibiosis in competition of *Erwinia* strains in potato infection courts. **Appl. Environ. Microbiol.**, 54, 1222-1229, 1988.
- AZAD, H. R., HOLMES, G. J., COOKSEY, D. A. A new leaf blotch disease of sudangrass caused by *Pantoea ananas* and *Pantoea stewartii*. **Plant Dis.**, 84, 973-979, 2000.
- BAINTON, N. J., STEAD, P., CHHABRA, S. R., BYCROFT, B. W., SALMOND, G. P., STEWART, G. S., WILLIAMS, P. N. *N*-(3-oxohexanoyl)-*L*-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora*. **Biochem. J.**, 288, 997-1004, 1992.
- BATCHELOR, J. G., CUSHLEY, R. J., PRESTEGARD, J. H. Carbon-13 Fourier transform nuclear magnetic resonance. VIII. Role of steric and electric field effects in fatty acid spectra. **J. Org. Chem.**, 39, 1968-1705, 1974.
- BECK VON BODMAN, S., FARRAND, S. K. Capsular polysaccharide biosynthesis and pathogenicity in *Erwinia stewartii* require induction by an *N*-acylhomoserine lactone autoinducer. **J. Bacteriol.**, 5000-5008, 1995.
- BERG, J. M., TYMOCKZO, J. L., STRYER, L. **Biochemistry**. Fifth edition. W. H. Freeman and Company: New York, 2002.
- BICALHO, B., GONÇALVES, R. A. C., ZIBORDI, A. P. M., MANFIO, G. P., MARSAIOLI, A. J. Antimicrobial compounds of fungi vectored by

- Clusia* spp. (Clusiaceae) pollinating bees. **Z. Naturforsch.** 58c, 746-751, 2003.
- BLUM, M.S., EDGAR, A.L. 4-Methyl-3-heptanone: identification and role in opilionid exocrine secretions. **Insect Biochem.** 1, 181-188, 1971.
- BLUM, M.S. Exocrine systems. In: Blum, M.S. (Ed.), **Fundamentals of Insect Physiology.** John Wiley & Sons, New York, 535-579, 1985.
- BUSER, H. R., ARN, H., GUERIN, P., RAUSCHER, S. Determination of double bond position in mono-unsaturated acetates by mass spectrometry of dimethyl disulfite adducts. **Anal. Chem.**, 55, 818-822, 1983.
- CARLOMAGNO T. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.** 2005; **34**: 245.
- CATALDI, T. R. I., BIANCO, G., PALAZZO, L., QUARANTA, V. Occurrence of *N*-acyl-L-homoserine lactone in extracts of some Gram-negative bacteria evaluated by gas chromatography mass spectrometry. **Anal. Biochem.**, 361, 226-225, 2007.
- CEREDA, C. M. S., ARAUJO, D. R., BRUNETTO, G. B., DE PAULA, E. **J. Pharm. Pharmaceut. Sci.** 2004; **7**: 235.
- CHA, C., GAO, P., CHEN, Y. C., SHAW, P. D., FARRAND, S. K. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by Gram-negative plant-associated bacteria. **Molec. Plant-Microbe Interact.**, 11, 1119-1129, 1998.
- CHARLTON, T. S., NYS, R. D., NETTING, A., KUMAR, N., HENTZER, M., GIVSKOV, M., KJELLEBERG, S. A novel and sensitive method for the quantification of *N*-3-oxoacyl homoserine lactones using gas chromatography-mass spectrometry: application to a model bacterial biofilm. **Environ. Microbiol.**, 2, 530-541, 2000.
- CHHABRA, S. R., HARTY, C., HOOL, D. S. W., DAYKIN, M., WILLIAMS, P., TELFORD, G., PRITCHARD, D. I., BYCROFT, B. W. Synthetic analogues of the bacterial signal (quorum sensing) molecule *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone as immune modulators. **J. Med. Chem.**, 46, 97-104, 2003.
- CHHABRA, S. R., STEAD, P., BAINTON, N. J., SALMOND, G. P. C., STEWART, G. S. A. B., WILLIAMS, P., BYCROFT, B. Autoregulation of carbapenem biosynthesis in *Erwinia carotovora* by analogues of *N*-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone. **J. Antibiot.**, 46, 441-454, 1993.
- COTHER, E. J., REINKE, R., MCKENZIE, C., LANOISELET, V. M., NOBLE, D. H. An unusual stem necrosis of rice caused by *Pantoea ananas* and the first record of this pathogen on rice in Australia. **Australas. Plant Pathol.**, 33, 495-503, 2004.

- COUTINHO, T. A., PREISIG, O., MERGAERT, J., CNOCKAERT, M. C., RIEDEL, K.-H., SWINGS, J., WINGFIELD, M. J. Bacterial blight and dieback of eucalyptus species, hybrids, and clones in South Africa. **Plant Dis.**, 86, 20-25, 2002.
- DELRUE, R-M., DESCHAMPS, C., LEONARD, S., NIJSKENS, C., DANESE, I., SCHAUS, J-M., BONNOT, S., FERROOZ, J., TIBOR, A., DE BOLLE, X., LETESSON, J-J. A quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of *Brucella melitensis*. **Cel. Microbiol.** 7, 1151-1161, 2005.
- DONG, Y-H., GUSTI, A. R., ZHANG, Q., XU, J-L., ZHANG, L-H. Identification of quorum-quenching *N*-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. **Appl. Envir. Microbiol.**, 68, 1754-1759, 2002.
- DUFFIELD, R. M., OLUBAJO, O., WHEELER, J. W., SHEAR, W. A. Alkylphenols in the defensive secretion of the nearctic opilionid, *Stygnomma spinifera* (Arachnida: opiliones). **J. Chem. Ecol.**, 7, 2, 1981.
- EBERHARD, A., BURLINGAME, A. L., EBERHARD, C., KENYON, G. L., NEALSON, K. H., OPPENHEIMER, N. J. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. **Biochemistry**, 20, 2444-2449, 1981.
- EISNER, T., ALSOP, D., MEINWALD, J. Secretions of opilionids, whip scorpions and pseudoscorpions. In: **Bettini, S. (Ed.), Handbook of Experimental Pharmacology (Arthropod Venoms)**. Springer-Verlag, Berlin, 48, 87-99, 1978.
- EISNER, T., JONES, T. H., HICKS, K., SILDERGLIED, R. E., MEINWALD, J. Quinones and phenols in the defensive secretions of neotropical opilionids. **J. Chem. Ecol.** 3, 321-329, 1977.
- EISNER, T., KLUGE, A. F., CARREL, J. E., MEINWALD, J. Defense of phalangid: liquid repellent administered by leg dabbing. **Science**, 173, 650, 1971.
- EISNER, T., ROSSINI, C., GONZÁLEZ, A., EISNER, M. Chemical defense of an opilionid (*Acanthopachylus aculeatus*). **J. Exp. Biol.**, 207, 1313-1321, 2004.
- EKPA, O., WHEELER, J.W., COKENDOLPHER, J.C., DUFFIELD, R.M. N,N-dimethyl-b-phenylethylamine and bornyl esters from the harvestman *Sclerobunus robustus* (Arachnida: Opiliones). **Tetrahedron Lett.** 25, 1315-1318, 1984.

- ENGBRECHT, J., SILVERMAN, M. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 81, 4154-4158, 1984.
- ESTABLE, C., ARDAO, M. I., BRASIL, N. P., FIESER, L. F. Gonyleptidine. **J. Am. Chem. Soc.**, 77, 4942, 1955.
- FAST, W. Molecular radio jamming: autoinducer analogs. **Chem. Biol.**, 10, 1-3, 2003.
- FIESER, L.F., ARDAO, M.I. Investigation of the chemical nature of Gonyleptidine. **J. Am. Chem. Soc.** 78, 774-781, 1956.
- GNASPINI, P., CAVALHEIRO, A. J. Chemical and behavioral defenses of a neotropical cavernicolous harvestman: *Goniosoma spelaeum* (Opiliones, Laniatores, Gonyleptidae). **J. Arachnol.** 26, 81-90, 1998.
- GOTSCHLICH, A., HUBER, B., GEISENBERGER, O., TOGL, A., STEIDLE, A., RIEDEL, K., HILL, P., TUMMLER, B., VANDAMME, P., MIDDLETON, B., CAMARA, M., WILLIAMS, P., HARDMAN, A., EBERL, L. Synthesis of multiple N-acylhomoserine lactones is wide-spread among the members of the Burkholderia cepacia complex. **System. Appl. Microbiol.**, 24, 1-14, 2001.
- GRAFT, J., RUBY, E. G. Host-derived amino acids support the proliferation of symbiotic bacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 95, 1818-1822, 1998.
- HARA, M. R., CAVALHEIRO, A. J., GNASPINI, P., SANTOS, D. Y. A. C. A comparative analysis of the chemical nature of defensive secretions of Gonyleptidae (Arachnida: Opiliones: Laniatores). **Biochem. System. Ecol.**, 33, 1210-1225, 2005.
- HASTINGS, J. W. Bacterial bioluminescence: an overview. **Methods Enzymol.**, 57, 125-135, 1978.
- HAUBEN, L., MOORE, E. R., VAUTERIN, L., STEENACKERS, M., MERGAERT, J., VERDONCK, L., SWINGS, J. Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. **Syst. Appl. Microbiol.**, 21, 384-397, 1998.
- HOLMBERG, R.G. The scent glands in Opiliones: a review of their function. In: **Proceedings of the Fifth International Arachnological Congress**, 131-133, 1986.
- HORNG, Y. T., DENG, S. C., DAYKIN, M., SOO, P. C., WEI, J. R., LUH, K. T., HO, S. W., SWIFT, S., LAI, H. C., WILLIAMS, P. The LuxR family protein SpnR functions as a negative regulator of N-acylhomoserine lactone-dependent quorum sensing in *Serratia marcescens*. **Mol. Microbiol.**, 45, 1655-1671, 2002.

- JONES, S., YU, B., BAINTON, N. J., BIRDSALL, M., BYCROFT, B. W., CHHABRA, S. R., COX, A. J. R., GOLBY, P., REEVES, P. J., STEPHENS, S., WINSON, M. K., SALMOND, G. P. C., STEWART, G. S. A. B., WILLIAMS, P. The *lux* autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. **EMBO J.**, 12, 2477-2482, 1993.
- JONES, T.H., CONNER, W.E., KLUGE, A.F., EISNER, T., MEINWALD, J. Defensive substances of opilionids. **Experientia** 32, 1234-1235, 1976.
- JONES, T.H., MEINWALD, J., HICKS, K., EISNER, T. Characterization and synthesis of volatile compounds from the defensive secretions of some “daddy longlegs” (Arachnida: Opiliones: *Leiobunum spp.*). **Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.** 74, 419-422, 1977.
- JUBERTHIE, C. Structure et fonction des glandes odorantes chez quelques Opilions (Arachnida). **Verh. Dt. Zool. Ges.** 533-537, 1961.
- KAUFMANN, G. F., SARTORIO, R., LEE, S-H., ROGERS, C. L., MEIJLER, M. M., MOSS, J. A., CLAPHAM, B., BROGAN, A. P., DICKERSON, T. J., JANDA, K. D. Revisiting quorum-sensing: discovery of additional chemical and biological functions for 3-oxo-*N*-acylhomoserine lactones. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 102, 309-314, 2005.
- KITIHARA, Y., KOYAMA, N., MATSUDA, J., AOYAMA, Y., HIRAKATA, Y., KAMIHIRA, S., KOHNO, S., NAKASHIMA, M., SASAKI, H. Antimicrobial activity of saturated fatty acids and fatty amines against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Biol. Pharm. Bull.**, 27, 1321-1326, 2004.
- KLEIN, J., MEINECKE, R., MAYER, M., MEYER, B. **J. Am. Chem. Soc.** 1999; **121**: 5336.
- KLEINPETER, E., SEIDL, P. R. The γ - and the δ -effects in ^{13}C NMR spectroscopy in terms of nuclear chemical shielding (NCS) analysis. **J. Phys. Org. Chem.**, 18, 272, 2005.
- KRICK, A., KEHRAUS, S., EBERL, L., RIEDEL, K., ANKE, H., KAESLER, I., GRAEBER, I., SZEWZYK, U., KÖNIG, G. M. A marine *Mesorhizobium sp.* Produces structurally novel long-chain *N*-acyl-L-homoserine lactones. **Appl. Environ. Microbiol.** 73, 3587-3594, 2007.
- LACAVALA, P. T., ARAÚJO, W. L., MARCON, J., MACCHERONI, W., AZEVEDO, J. L. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. **Lett. Appl. Microbiol.**, 39, 55-59, 2004.

- LAMBAIS, M. R., GOLDMAN, M. H. S., CAMARGO, L. E. A., GOLDMAN, G. H. A genomic approach to the understanding of *Xylella fastidiosa* pathogenicity. **Curr. Op. Microbiol.**, 3, 459-462, 2000.
- LARANJEIRA, F. F., BERGAMIN FILHO, A., AMORIM, L., LOPES, J. R. S. Comportamento sazonal da clorose variegada dos citros em três regiões do estado de São Paulo. **Fitopatol. Bras.**, 28, 633-641, 2003.
- LEE, R. F., BERETTA, M. J. G., HARTUNG, J. H., HOOKER, M. E., DERRICK, K. S. Citrus variegated chlorosis: confirmation of *Xylella fastidiosa* as the causal agent. **Summa Phytopathol.**, 19, 123-125, 1993.
- LEE, D. K., CHOI, B. S. Effect of hydrochloric acid concentrations of the hydride generation efficiencies in ICP-AES. **Bull. Korean Chem. Soc.**, 17, 964-966, 1996.
- LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2ª edição. Sarvier: São Paulo, 1995.
- LITHGOW, J. K., WILKINSON, A., HARDMAN, A., RODELAS, B., WISNIEWSKI-DYÉ, F., WILLIAMS, P., DOWNIE, J. A. The regulatory locus *cinRI* in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing loci. **Mol. Microbiol.**, 37, 81-97, 2000.
- LLAMAS, I., QUESADA, E., MARTINEZ-CANOVAS, M. J., GRONQUIST, M., EBERHARD, A., GONZALEZ, J. E. Quorum sensing in halophilic bacteria: detection of N-acyl-homoserine lactones in the exopolysaccharide-producing species of *Halomonas*. **Extremophiles**, 9, 333-341, 2005.
- LOPES, J. R. S. Estudos com vetores de *Xylella fastidiosa* e implicações no manejo da clorose variegada dos citros. **Laranja**, 20, 329-344, 1999.
- MACHADO, G., BONATO, V., OLIVEIRA, P. S. Alarm communication: a new function for the scent-gland secretion in harvestmen (Arachnida: Opiliones). **Naturwissenschaften**, 89, 357-360, 2002.
- MACHADO, G., CARRERA, PATRICIA C., POMINI, A. M., MARSAIOLI, A. J. Chemical defense in harvestmen (Arachnida: Opiliones): do benzoquinone secretions deter invertebrate and vertebrate predators? **J. Chem. Ecol.**, 31, 2519-253, 2005.
- MACHADO, G., POMINI, A. M. Chemical and behavioral defenses of the neotropical harvestman *Camarana flavipalpi* (Arachnida: Opiliones). **Biochem. System. Ecol.**, no prelo, 2008.
- MANEFIELD, M., WELCH, M., GIVSKOV, M., SALMOND, G. P. C., KJELLEBERG, S. Halogenated furanones from the red alga, *Delisea pulchra*, inhibit carbapenem antibiotic synthesis and exoenzyme

- virulence factor production in the phytopathogen *Erwinia carotovora*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 205, 131-138, 2001.
- MARKETON, M. M., GRONQUIST, M. R., EBERHARD, A., GONZÁLEZ, J. E. Characterization of the *Sinorhizobium meliloti sinR/sinI* locus and the production of novel *N*-acyl homoserine lactones. **J. Bacteriol.**, 184, 5686-5695, 2002.
- MARKETON, M. M., GLENN, S. A., EBERHARD, A., GONZÁLEZ, J. E. Quorum sensing controls exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. **J. Bacteriol.**, 185, 325-331, 2003.
- MEYER, B., PETERS, T. NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. **Angew. Chem. Int. Ed.** 42, 864-890, 2003.
- MAYER, M., MEYER, B. Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy. **Angew. Chem. Int. Ed.** 38, 1784, 1999.
- MEINWALD, J., KLUGE, A.F., CARREL, J.E., EISNER, T. Acyclic ketones in the defensive secretion of a "daddy longlegs" (*Leiobunum vittatum*). **Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.** 68, 1467-1468, 1971.
- MILLAR, K. F., HAYNES, J. G. **Methods in Chemical Ecology**. USA: Chapman & Hall, 1998.
- MOROHOSHI, T., INABA, T., KATO, N., KANAI, K., IKEDA, T. Identification of quorum-sensing signal molecules and the LuxRI homologs in fish pathogen *Edwardsiella tarda*. **J. Biosci. Bioeng.**, 98, 274-281, 2004.
- MOROHOSHI, T., NAKAMURA, Y., YAMAZAKI, G., ISHIDA, A., KATO, N., IKEDA, T. The plant pathogen *Pantoea ananatis* produce *N*-acylhomoserine lactone and cause center rot disease of onion by quorum-sensing. **J. Bacteriol.**, 189, 8333-8338, 2007.
- MYERS, G. S. 2-Octadecenoic acid. I. Preparation and some reactions of the *cis* and *trans* isomers. **J. Am. Chem. Soc.**, 73, 2100-2104, 1951.
- NASSER, W., BOUILLANT, M. L., SALMOND, G., REVERCHON, S. Characterization of the *Erwinia chrysanthemi expI-expR* locus directing the synthesis of two *N*-acyl-homoserine lactone signal molecules. **Mol. Microbiol.**, 29, 1391-1405, 1998.
- NORDLUND, D. A., LEWIS, W. J. Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. **J. Chem. Ecol.**, 2, 2, 211-220, 1976.
- ORTORI, C. A., ATKINSON, S., CHHABRA, S. R., CÁMARA, M., WILLIAMS, P., BARRET, D. A. Comprehensive profiling of *N*-acylhomoserine lactones produced by *Yersinia pseudotuberculosis*

- using liquid chromatography coupled to hybrid quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.**, 387, 497-511, 2007.
- OTTING G. **Curr. Op. Struct. Biol.** 1993; 3: 760.
- PARK, J-H., HWANG, I., KIM, J-W., LEE, S. O., CONWAY, B., GREENBERG, E. P., LEE, K. Characterization of quorum-sensing signaling molecules produced by *Burkholderia cepacia* G4. **J. Microbiol. Biotechnol.** 11, 804-811, 2001.
- PEARSON, J. P., GRAY, K. M., PASSADOR, L., TUCKER, K. D., EBERHARD, A., IGLEWSKI, B. H., GREENBERG, E. P. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 91, 197-201, 1994.
- PEARSON, J. P., VAN DELDEN, C., IGLEWSKI, B. H. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. **J. Bacteriol.**, 181, 1203-1210, 1999.
- PENALVER, C. G. N., MORIN, D., CANTET, F., SAUREL, O., MILON, A., VORHOLT, J. A. *Methylobacterium extorquens* AM1 produces a novel type of acyl-homoserine lactone with a double unsaturated side chain under methylotrophic growth conditions. **FEBS Lett.**, 580, 561-567, 2006.
- PENALVER, C. G. N., CANTET, F., MORIN, D., HARAS, D., VORHOLT, J. A. A plasmide-borne truncated *luxI* homolog controls quorum-sensing systems and extracellular carbohydrate production in *Methylobacterium extorquens* AM1. **J. Bacteriol.**, 188, 7321-7324, 2006.
- PIERSON III, L. S., WOOD, D. W., PIERSON, E. A. Homoserine lactone-mediated gene regulation in plant-associated bacteria. **Annu. Rev. Phytopathol.**, 36, 207-225, 1998.
- PIRHONEN, M., FLEGO, D., HEIKINHEIMO, R., PALVA, E. T. A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. **EMBO J.**, 12, 2467-2476, 1993.
- POMINI, A. M., MANFIO, G. P.M ARAÚJO, W. L., MARSAIOLI, A. J. Acyl-homoserine lactones from *Erwinia psidii* R. IBSBF 435T, a guava phytopathogen (*Psidium guajava* L.). **J. Agric. Food Chem.**, 53, 6262-6265, 2005.
- POMINI, A. M., ARAÚJO, W. L., MARSAIOLI, A. J. Structural elucidation and biological activity of acyl-homoserine lactones from the phytopathogen *Pantoea ananatis* Serrano 1928. **J. Chem. Ecol.**, 32, 1769-1778, 2006.

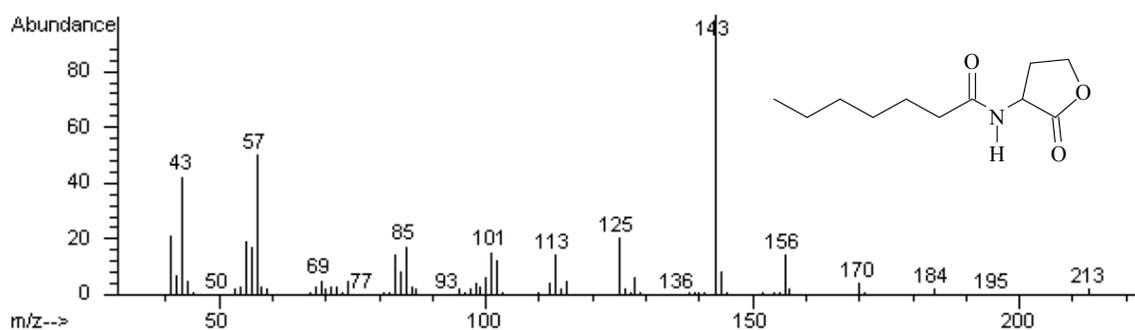
- POMINI, A. M., PACCOLA-MEIRELLES, L. D., MARSAIOLI, A. J. Acyl-homoserine lactones from *Pantoea sp.*, isolated from the maize white spot foliar disease. **J. Agric. Food Chem.**, 55, 1200-1204, 2007.
- POONGUZHALI, SELVARAJ, MUNUSAMY, MADHAIYAN, TONGMIN SA, Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals is wide-spread in Gram-negative *Methylobacterium*. **J. Microbiol. Biotechnol.**, 17, 226-233, 2007.
- PURCELL, A. H., HOPKINS D. L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. **Annu. Rev. Phytopathol.**, 34, 131-151, 1996.
- PUSKAS, A., GREENBERG, E. P., KAPLAN, S., SCHAEFER, A. L. A quorum sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. **J. Bacteriol.**, 179, 7530-7537, 1997.
- QAZI, S., MIDDLETON, B., MUHARRAM, S. H., COCKAYNE, A., HILL, P., O'SHEA, P., CHHABRA, S. R., CÂMARA, M., WILLIAMS, P. N-Achylhomoserine lactones antagonize virulence gene expression and quorum sensing in *Staphylococcus aureus*. **Infect. Immun.**, 74, 910-919, 2006.
- QIN, Y., LUO, Z. Q., SMYTH, A. J., GAO, P., BECK VON BODMAN, S., FARRAND, S. K. Quorum-sensing signal binding results in dimerization of TraR and its release from membranes into the cytoplasm. **EMBO J.** 19, 5212-5221, 2000.
- RAVN, L., CHRISTENSEN, A. B., MOLIN, S., GIVSKOV, M., GRAM, L. Methods for detecting acylated homoserine lactones produced by Gram-negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics. **J. Microbiol. Methods**, 44, 239-251, 2001.
- ROACH, B., EISNER, T., MEINWALD, J. Defensive substance of opilionids. **J. Chem. Ecol.**, 6, 511-516, 1980.
- ROBSON, N. D., COX, A. R. J., MCGOWAN, S. J., BYCROFT, B. W., SALMOND, G. P. C. Bacterial N-acyl-homoserine-lactone-dependent signalling and its potential biotechnological applications. **Trends Biotechnol.**, 15, 458-464, 1997.
- ROSEMEYER, V., MICHIELS, J., VERRETH, C., VANDERLEYDEN, J. **J. Bacteriol.**, 180, 815-821, 1998.
- ROSSETTI, V., GARNIER, M., BOVÉ, J. M., BERETTA, M. J. G., TEIXEIRA, A. R., QUAGGIO, J. A., DeNEGRI, J. D. Présence de bactéries dans le xylème d'orangers atteints de chlorose variégée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. **Comptes Rendus Académie des Sciences de Paris**, 310, 345-349, 1990.
- SCARPARI, L. M., LAMBAIS, M. R., SILVA, D. S., CARRARO, D. M., CARRER, H.. Expression of putative pathogenicity-related genes in

- Xylella fastidiosa* grown at low and high cell density conditions in vitro. **FEMS Microbiol. Lett.**, 22, 83-92, 2003.
- SCHAEFER, A. L., VAL, D. L., HAMZELKA, B. L., CRONAN, J. E., GREENBERG, E. P. Generation of cell-to-cell signals in quorum-sensing: acyl homoserine Lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93, 9505-9509, 1996.
- SCHRIPSEMA, J., RUDDER, K. E. E., VLIET, T. B., LANKHORST, P. P., VROOM, E., KIJNE, J. W., BRUSSEL, A. A. N. Bacteriocin small of *Rhizobium leguminosarum* belongs to the class of N-acyl-L-homoserine lactone molecules, known as autoinducers and as quorum sensing co-transcription factors. **J. Bacteriol.** 178, 366-371, 1996.
- SERRANO, F. B. Bacterial fluitlet brown-rot of pineapple in the Philipines. **Philippine J. Sci.**, 36, 271-305, 1928.
- SHULTZ, J.W. Phylogeny of Opiliones (Arachnida): an assessment of the “Cyphopalpatores” concept. **J. Arachnol.** 26, 257-272, 1998.
- SILVERSTEIN, Livro de espectroscopia, não esquecer de colocar.
- SIMPSON, A. J. G. *et al.* The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, 406, 151159, 2000.
- SMADJA, B., LATOUR, X., FAURE, D., CHEVALIER, S., DESSAUX, Y., ORANGE, N. Involvement of N-acylhomoserine lactones throughout plant infection by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium atrosepticum*). **Molec. Plant-Microbe Interact.**, 17, 1269-1278, 2004.
- SUBCHEV, M., HARIZANOV, A., FRANCKE, W., FRANCKE, S., PLASS, E., RECKZIEGEL, A., SHRÖDER, F., PICKETT, J. A., WADHAMS, L. J., WOODCOCK, C. M. Sex pheromone of female vine moth, *Theresimima ampellophaga* comprises (2S)-butyl (7Z)-tetradecenoate. **J. Chem. Ecol.**, 24, 1141-1151, 1998.
- SWEET, R. S., ESTES, F. L. 2-hexadecenoic acid and related compounds. **J. Org. Chem.**, 21, 1427-1429, 1956.
- TAMINIAU, B., DAYKIN, M., SWIFT, S., BOSCHIROLI, M-L., TIBOR, A., LESTRATE, P., DE BOLLE, X., O'CALLAGHAN, D., WILLIAMS, P., LETESSON, J-J. Identification of a quorum-sensing signal molecule in the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. **Infect. Immun.**, 70, 3004-3011, 2002.
- TEPLITSKI, M., ROBINSON, J. B., BAUER, W. D. Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl-homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, 13, 637-648, 2000.

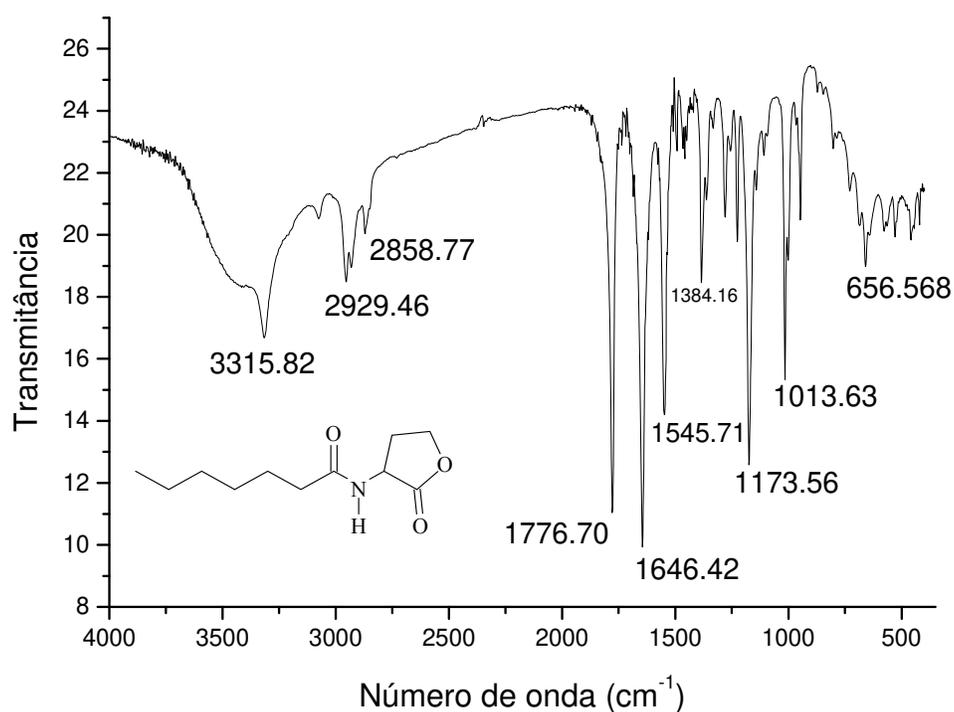
- TEPLITSKI, M., EBERHARD, A., GRONQUIST, M. R., GAO, M., ROBINSON, J. B., BAUER, W. D. Chemical identification of N-acyl homoserine lactone quorum-sensing signals produced by *Sinorhizobium meliloti* strains in defined medium. **Arch. Microbiol.**, 180, 494-497, 2003.
- VENTURI, V., VENUTI, C., DEVESCOVI, G., LUCCHESI, C., FRISCINA, A., DEGRASSI, G., AGUILAR, C., MAZZUCCHI, U. The plant pathogen *Erwinia amylovora* produces acyl-homoserine lactone signal molecules in vitro and in planta. **FEMS Microbiol. Lett.**, 241, 179-183, 2004.
- VINCENTI, M., GUGLIELMETTI, G., CASSANI, G., TONINI, C. Determination of double bond position in diunsaturated compounds by mass spectrometry of dimethyl disulfide derivatives. **Anal. Chem.**, 59, 694-699, 1987.
- WAGNER-DÖBLER, I., THIEL, V., EBERL, L., ALLGAIER, M., BODOR, A., MEYER, S., EBNER, S., HENNIG, A., PUKALL, R., SCHULZ, S. Discovery of complex mixtures of novel long-chain quorum sensing signals in free-living and host-associated marine Alphaproteobacteria. **ChemBioChem**, 6, 2195-2206, 2005.
- WALCOTT, R. R., GITAITIS, R. D., CASTRO, A. C., SANDERS JR. F. H., DIAZ-PEREZ, J. C. Natural infestation of onion seed by *Pantoea ananatis*, causal agent of center root. **Plant Dis.**, 86, 106-111, 2002.
- WHITEHEAD, N. A., BARNARD, A. M. L., SLATER, H., SIMPSON, N. J. L., SALMOND, G. P. C. Quorum sensing in Gram negative bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.**, 25, 365-404, 2001.
- WHITHERS, H., SWIFT, S., WILLIAMS, P. Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-Negative bacteria. **Curr. Op. Microbiol.**, 4, 186-193, 2001.
- WIEMER, D.F., HICKS, K., MEINWALD, J., EISNER, T. Naphtoquinones in defensive secretion of an opilionid. **Experientia** 34, 969-970, 1978.
- ZHANG, L., MURPHY, P. J., KERR, A., TATE, M. E. *Agrobacterium* conjugation by N-acyl-L-homoserine lactones. **Nature**, 362, 446-447, 1993.
- ZHU, J., BEABER, J. W., MORÉ, M. I., FUQUA, C., EBERHARD, A., WINANS, S. C. Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens*. **J. Bacteriol.**, 180, 5398-5405, 1998.

7. ANEXOS

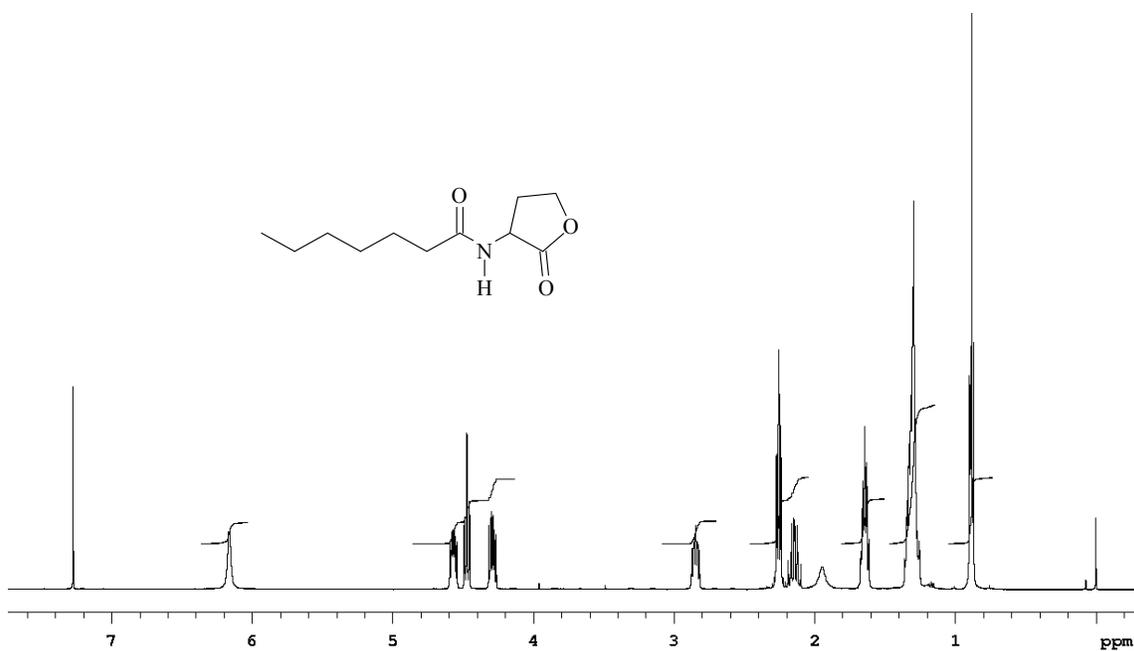
7. Anexos



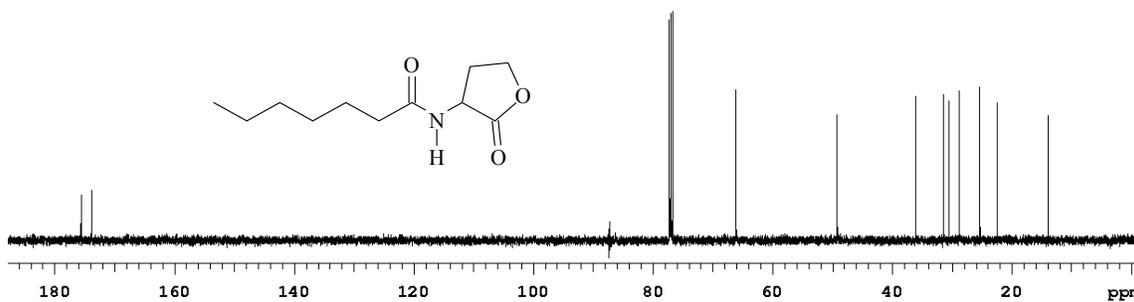
A1. Espectro de massas (IE, 70 eV) da (±)-N-heptanoil-HSL sintética.



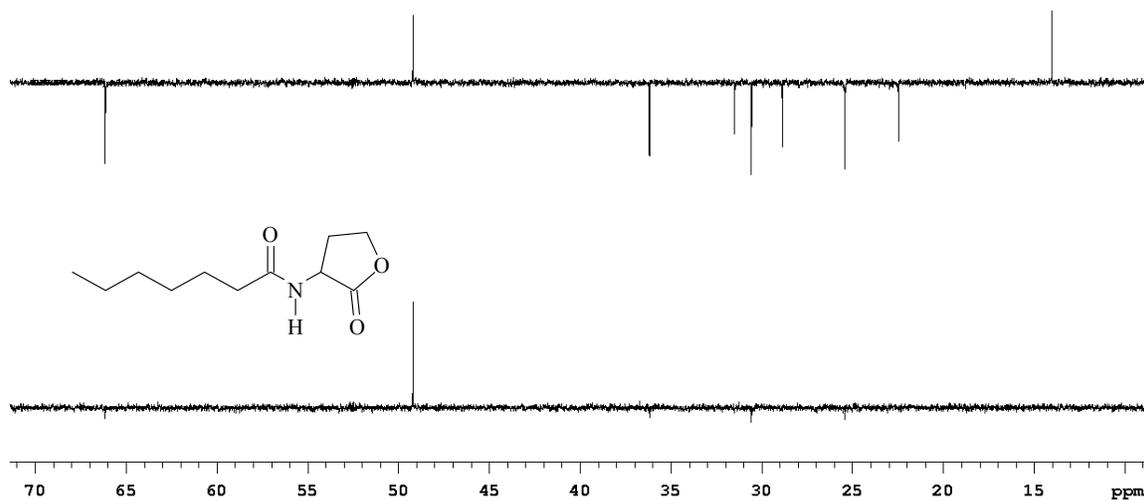
A2. Espectro no infravermelho (KBr) da (±)-N-heptanoil-HSL sintética.



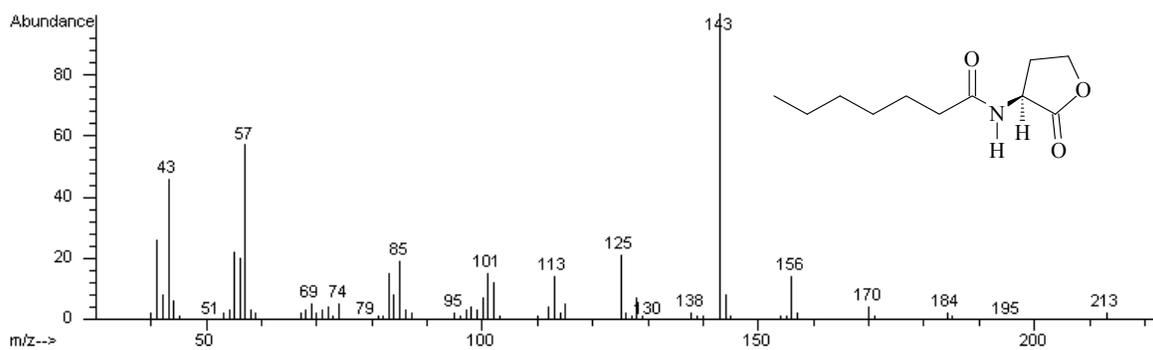
A3. Espectro de RMN de ¹H (499,88 MHz, CDCl₃, TMS) da (±)-*N*-heptanoil-HSL sintética.



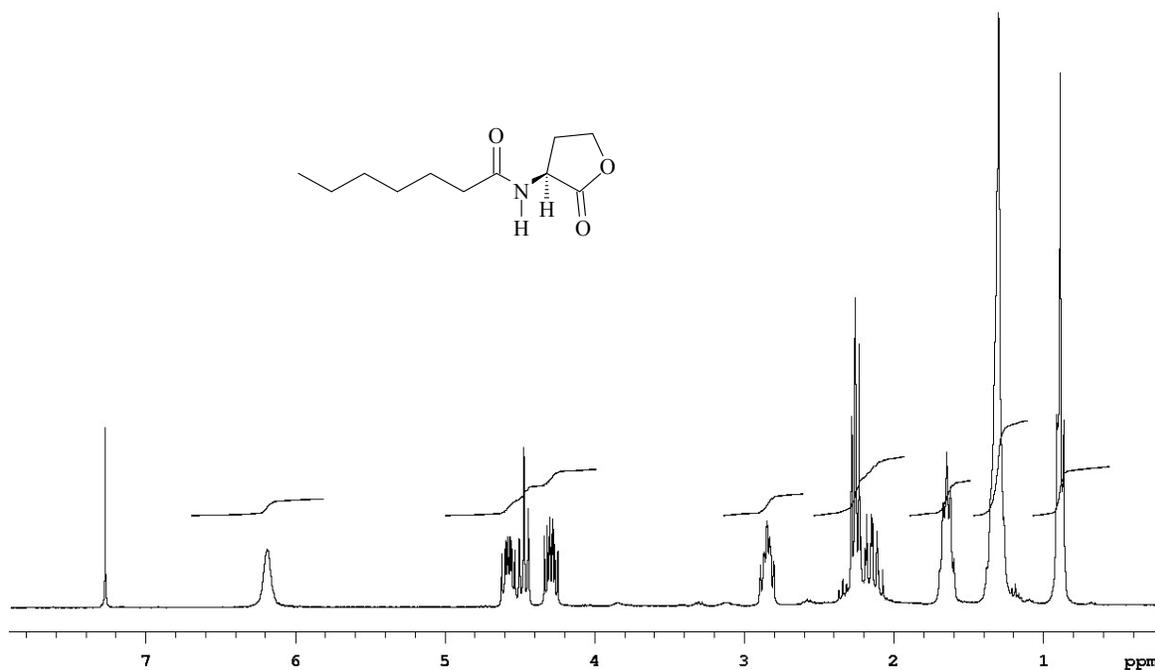
A4. Espectro de RMN de ¹³C (125,69 MHz, CDCl₃, TMS) da (±)-*N*-heptanoil-HSL sintética.



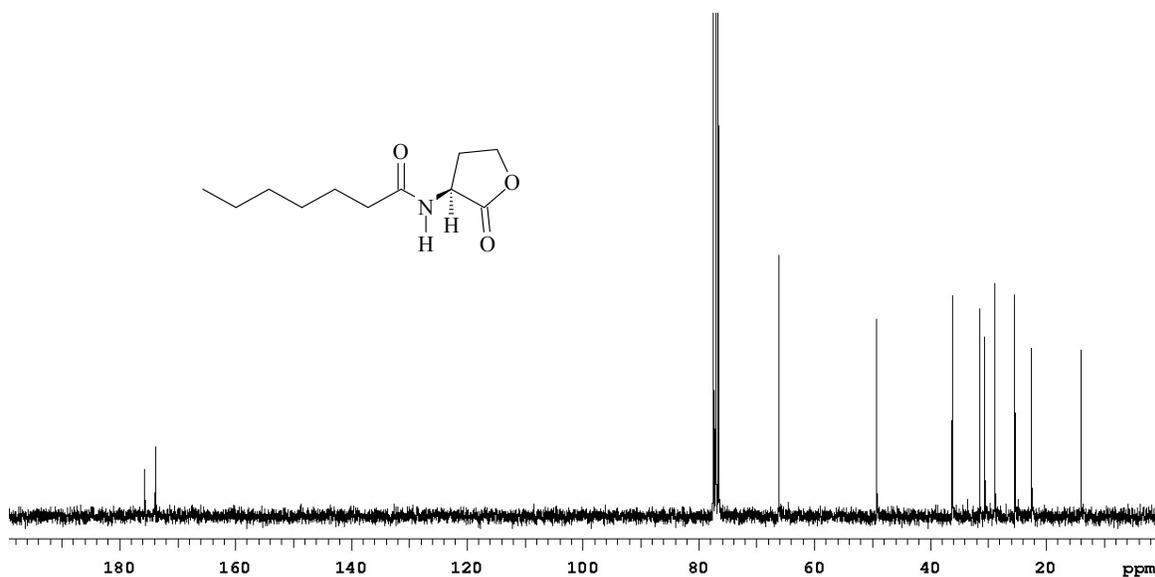
A5. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135° e DEPT 90° (125,69 MHz, CDCl_3 , TMS) da (\pm)-*N*-heptanoil-HSL sintética.



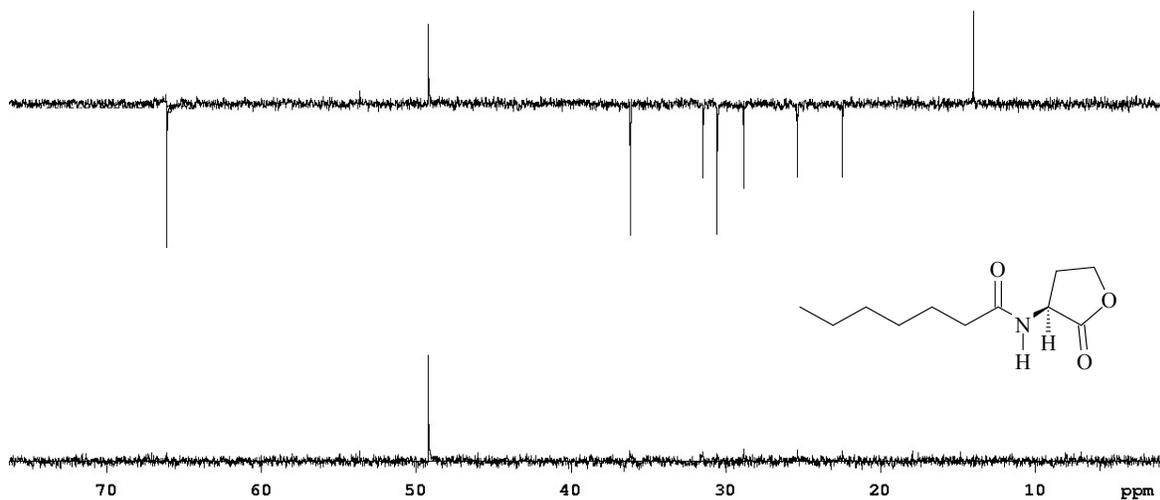
A6. Espectro de massas (IE, 70 eV) da (*S*)-*N*-heptanoil-HSL sintética.



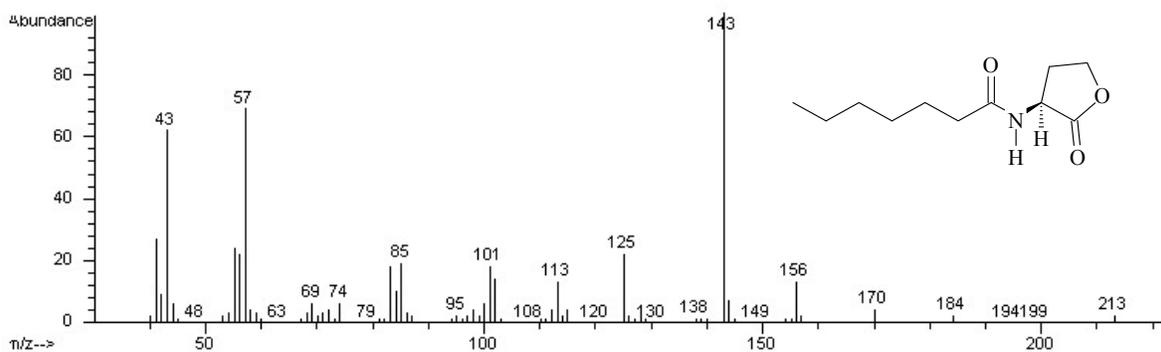
A7. Espectro de RMN de ^1H (300,06 MHz, CDCl_3 , TMS) da *(S)*-*N*-heptanoil-HSL sintética.



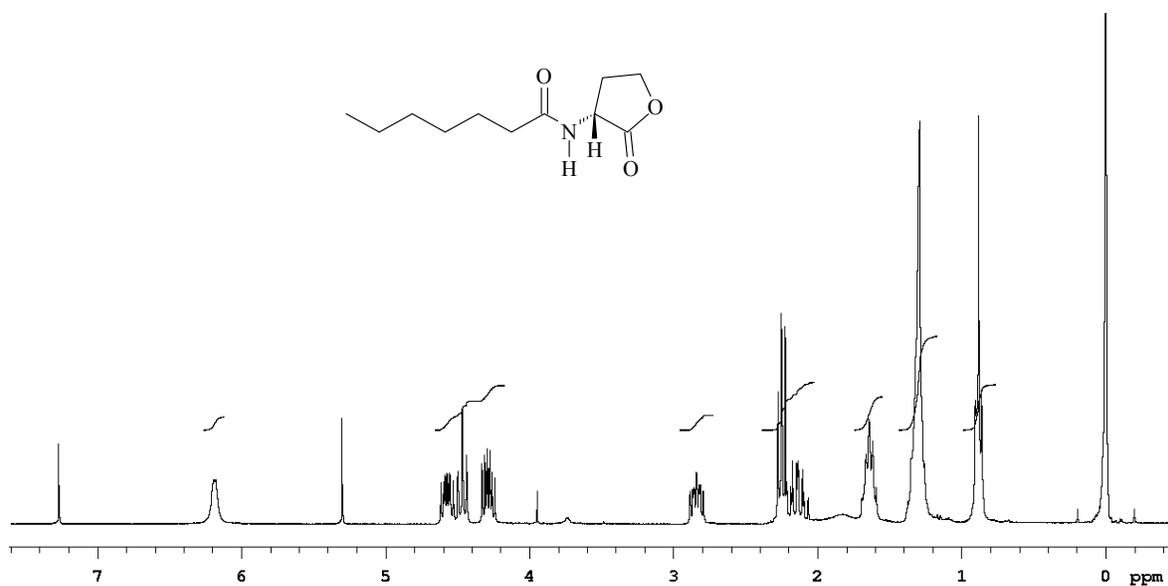
A8. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3 , TMS) da *(S)*-*N*-heptanoil-HSL sintética.



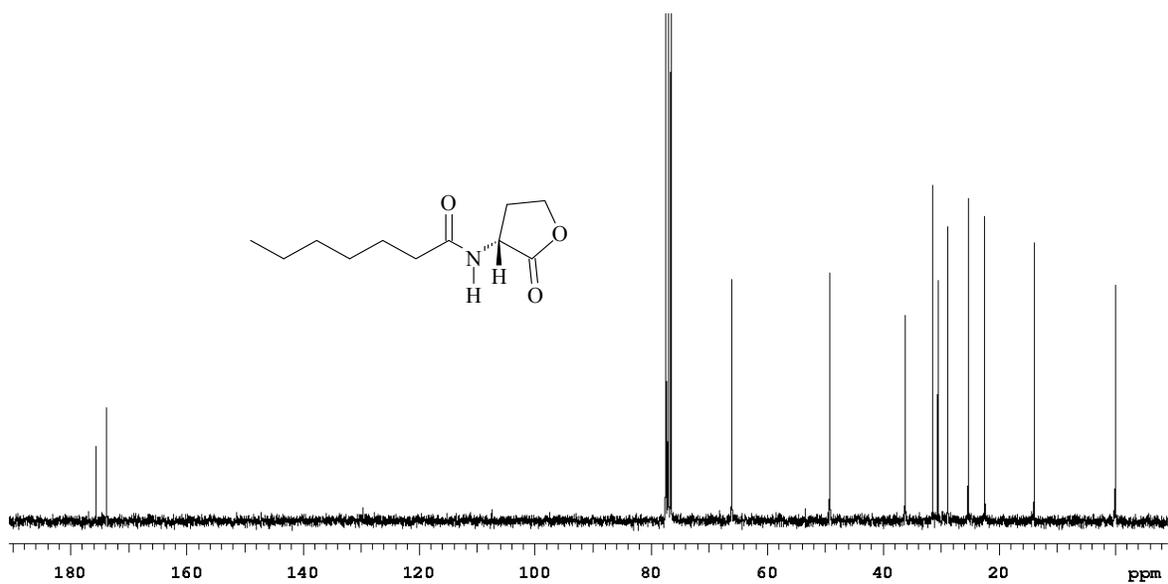
A9. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135° e DEPT 90° (75,45 MHz, CDCl_3 , TMS) da (*S*)-*N*-heptanoil-HSL sintética.



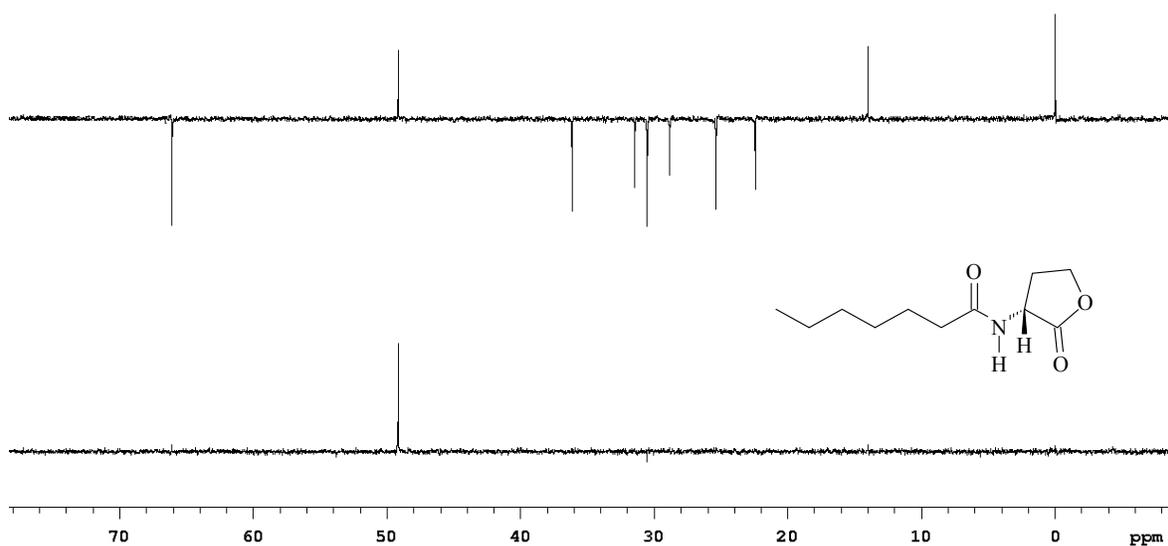
A10. Espectro de massas (IE, 70 eV) da (*R*)-*N*-heptanoil-HSL sintética.



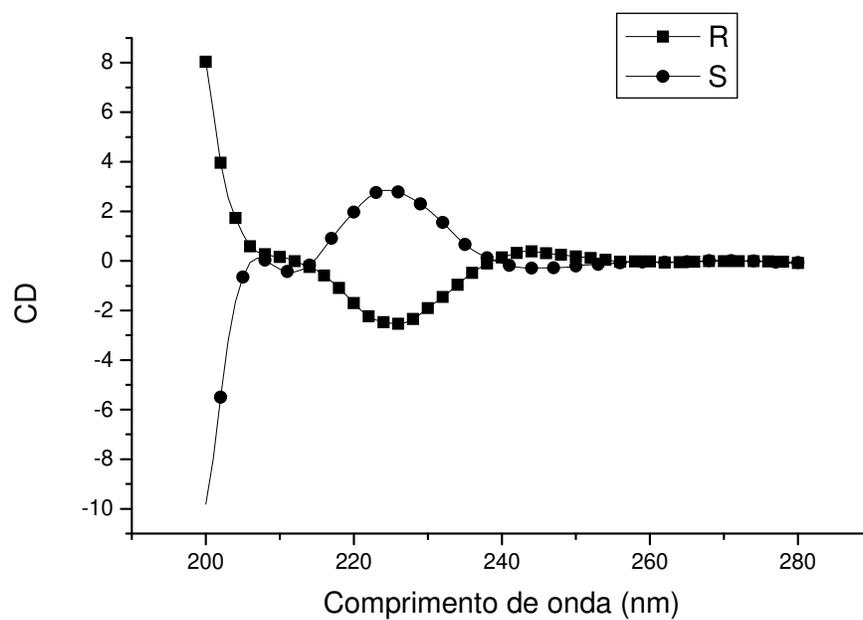
A11. Espectro de RMN de ¹H (300,06 MHz, CDCl₃, TMS) da (*R*)-*N*-heptanoil-HSL sintética.



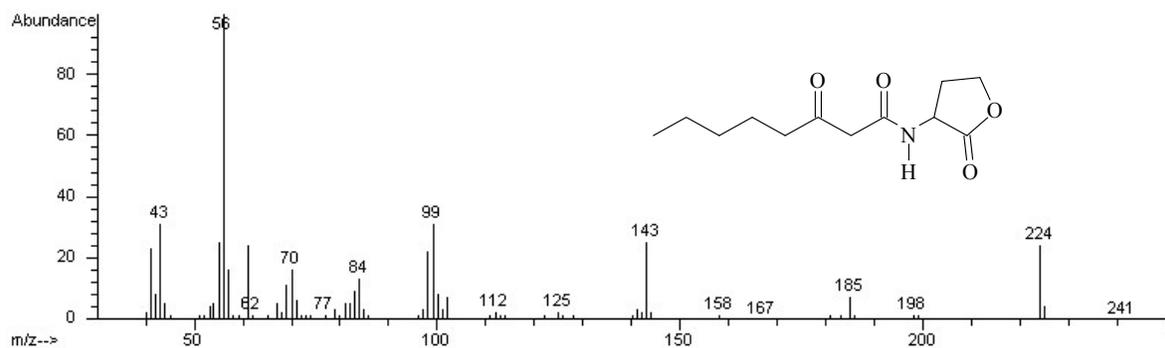
A12. Espectro de RMN de ¹³C (75,45 MHz, CDCl₃, TMS) da (*R*)-*N*-heptanoil-HSL sintética.



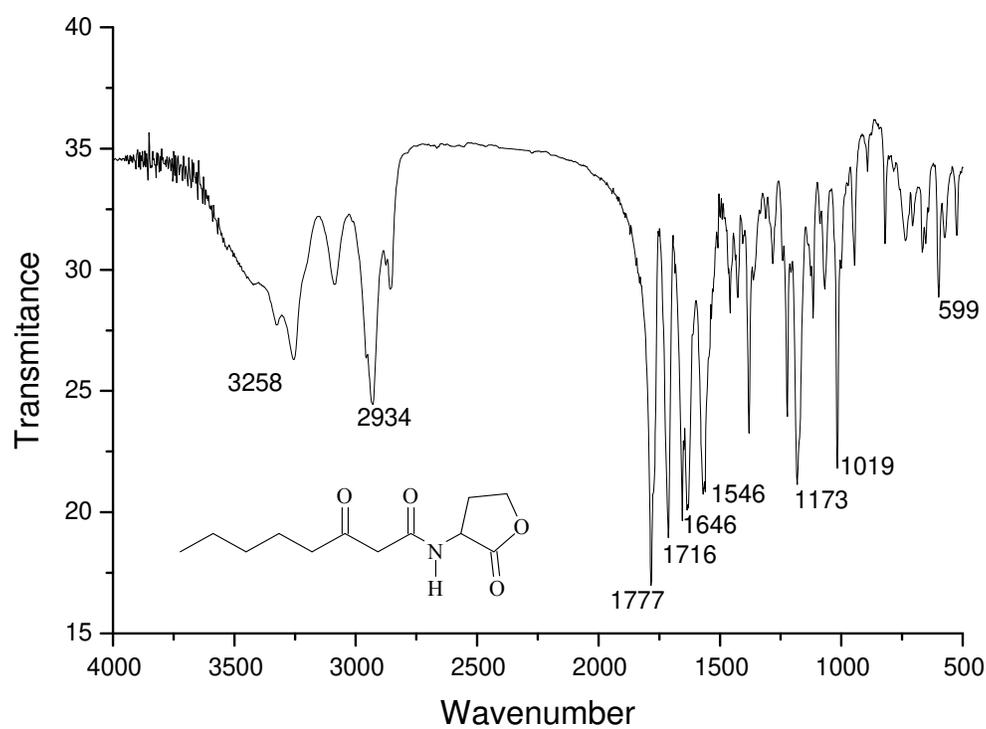
A13. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135° e DEPT 90° (75,45 MHz, CDCl_3 , TMS) da *(R)*-*N*-heptanoil-HSL sintética.



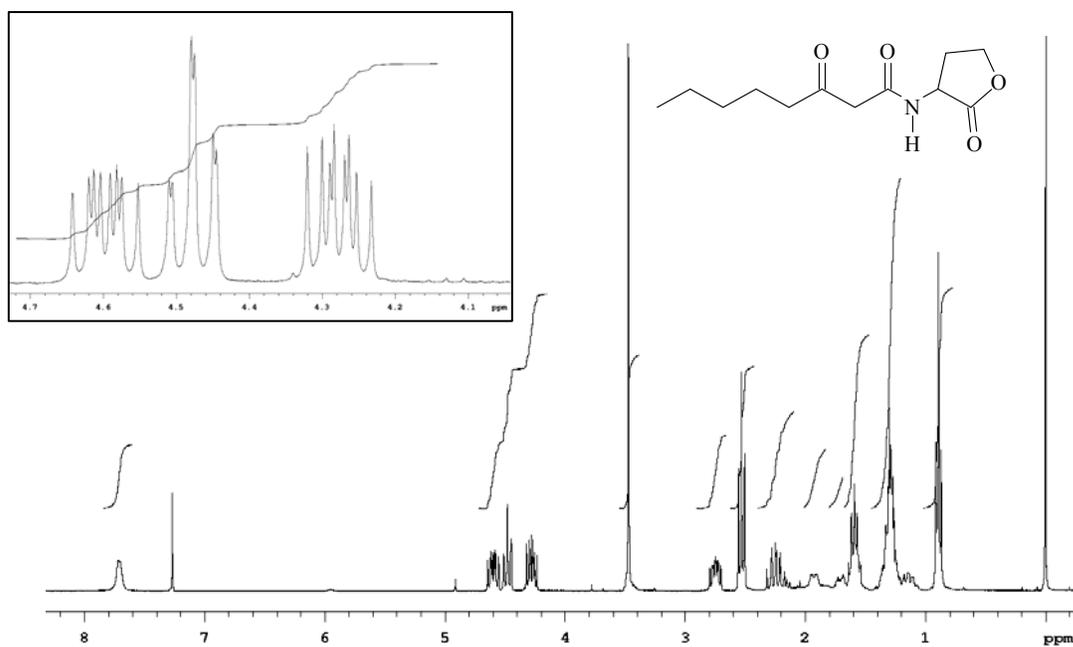
A14. Curvas de dicroísmo circular para a *(R)* e *(S)*-*N*-heptanoil-HSL sintéticas.



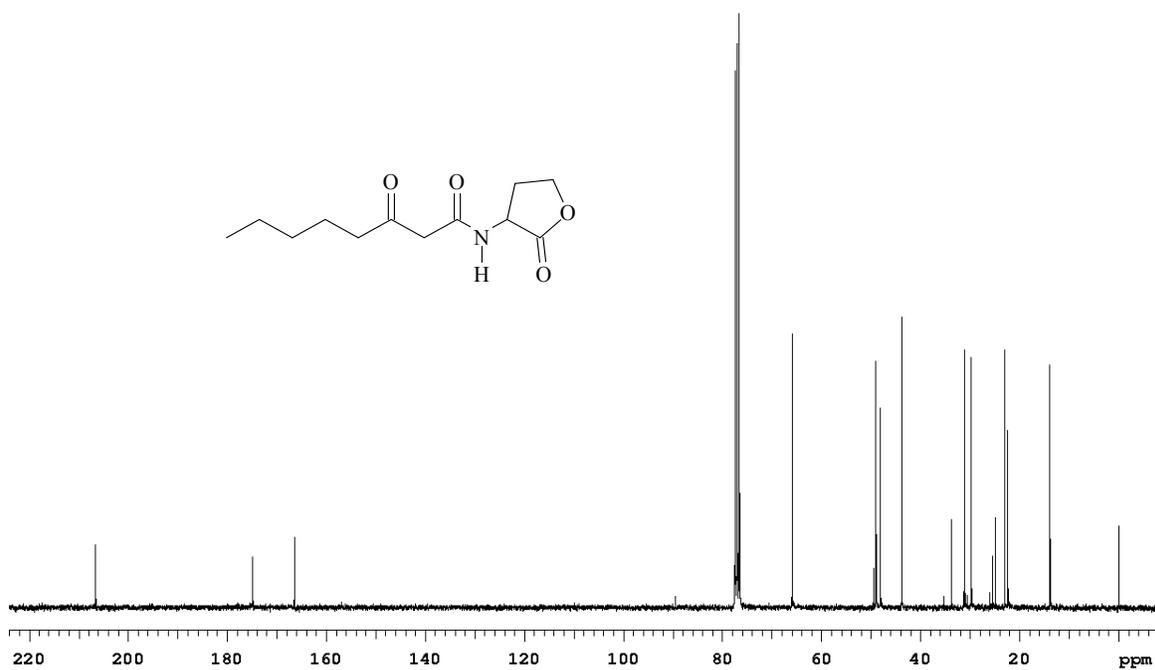
A15. Espectro de massas (IE, 70 eV) da (\pm)-*N*-(3-oxo-octanóil)-HSL sintética.



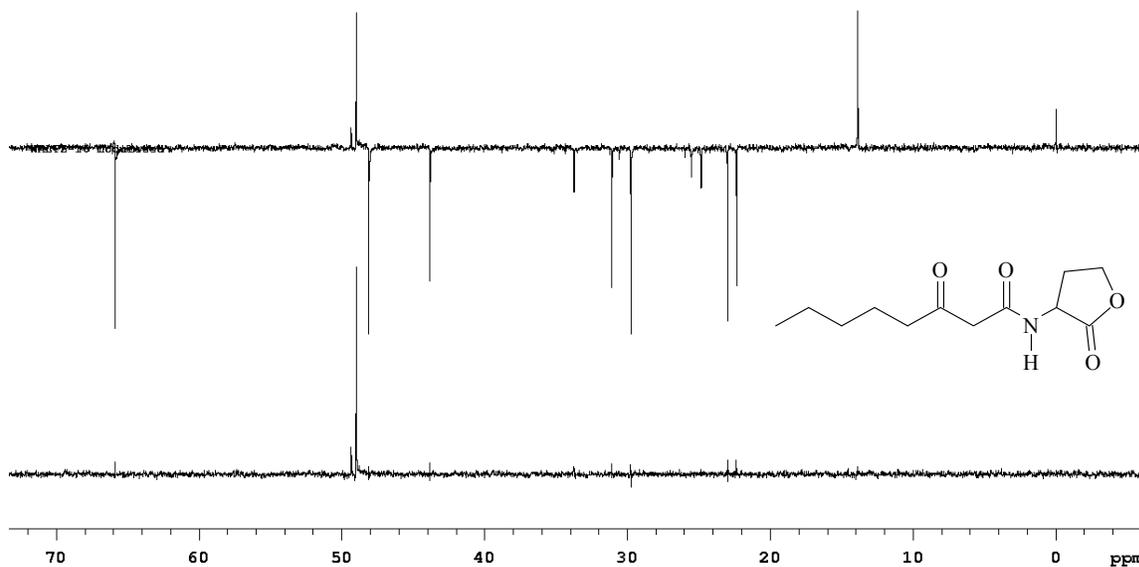
A16. Espectro no infravermelho (KBr) da (\pm)-*N*-(3-oxo-octanóil)-HSL sintética.



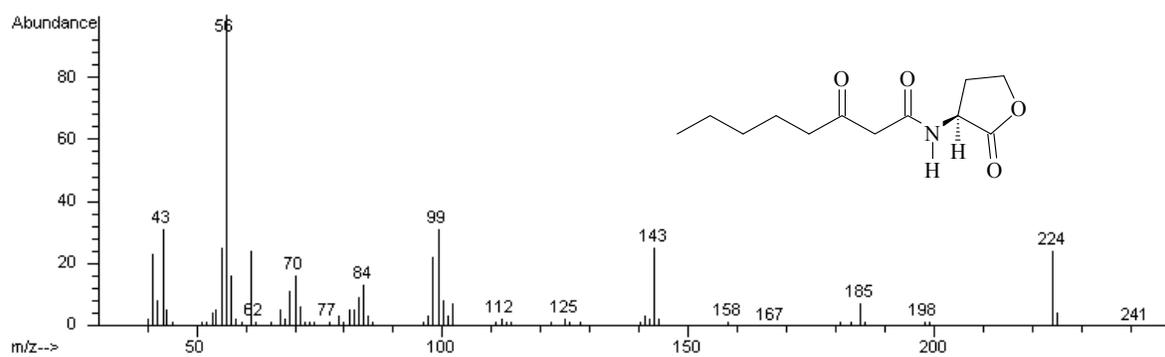
A17. Espectro de RMN de ¹H (300,06 MHz, CDCl₃, TMS) da (±)-N-(3-oxooctanoyl)-HSL sintética.



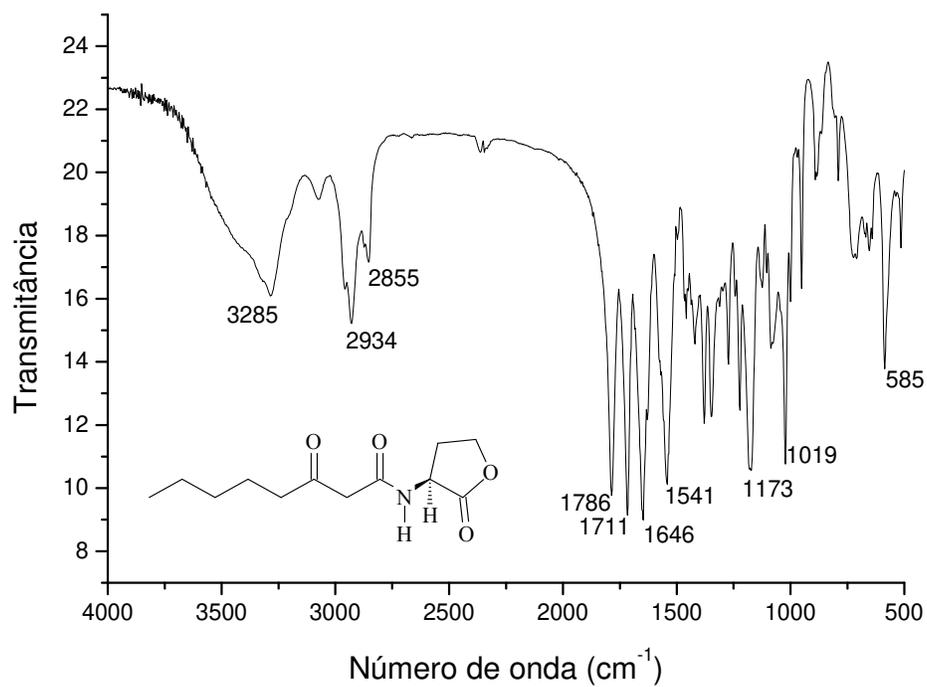
A18. Espectro de RMN de ¹³C (75,45 MHz, CDCl₃, TMS) da (±)-N-(3-oxooctanoyl)-HSL sintética.



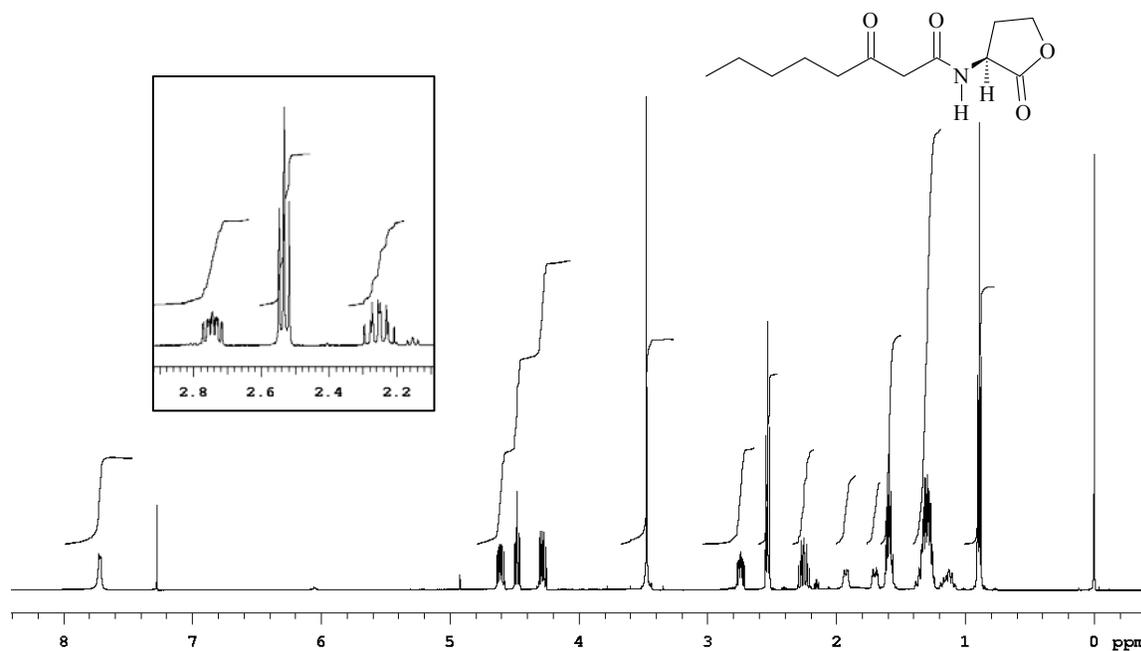
A19. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135° e DEPT 90° (75,45 MHz, CDCl_3 , TMS) da (\pm)-*N*-(3-oxooctanóil)-HSL sintética.



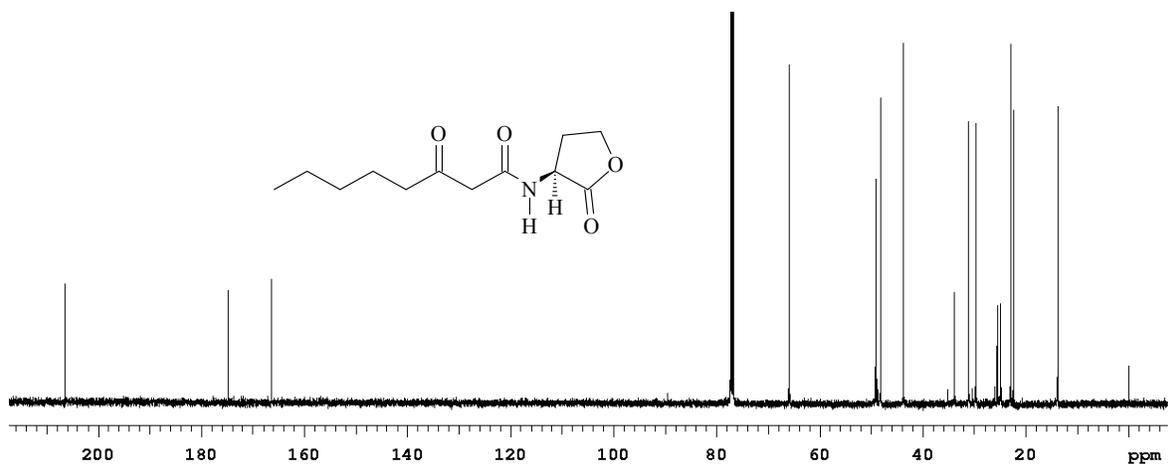
A20. Espectro de massas (IE, 70 eV) da (*S*)-*N*-(3-oxooctanóil)-HSL sintética.



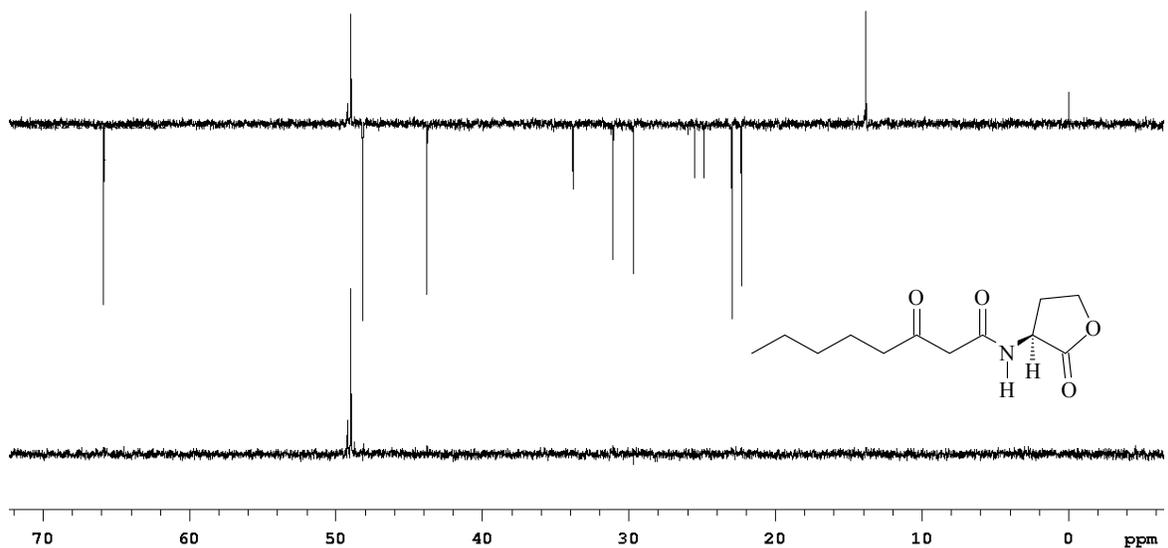
A21. Espectro no infravermelho (KBr) da *(S)*-*N*-(3-oxo-octanoyl)-HSL sintética.



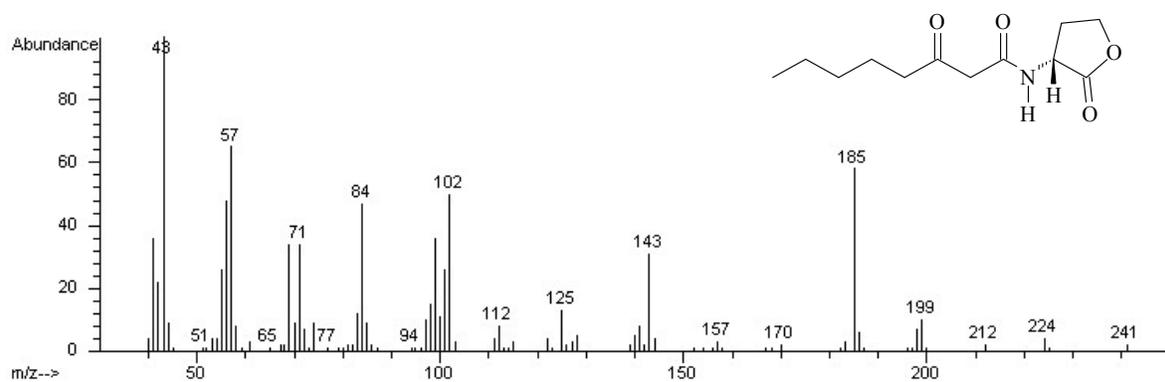
A22. Espectro de RMN de ^1H (499,88 MHz, CDCl_3 , TMS) da *(S)*-*N*-(3-oxo-octanoyl)-HSL sintética.



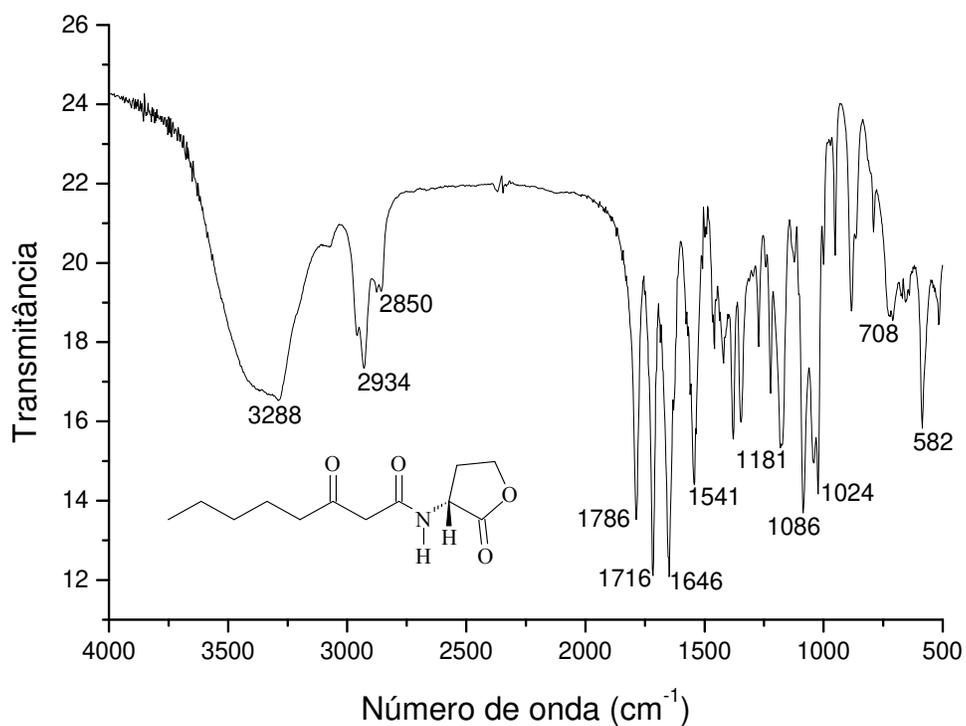
A23. Espectro de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, CDCl_3 , TMS) da (S)-N-(3-oxo-octanoyl)-HSL sintética.



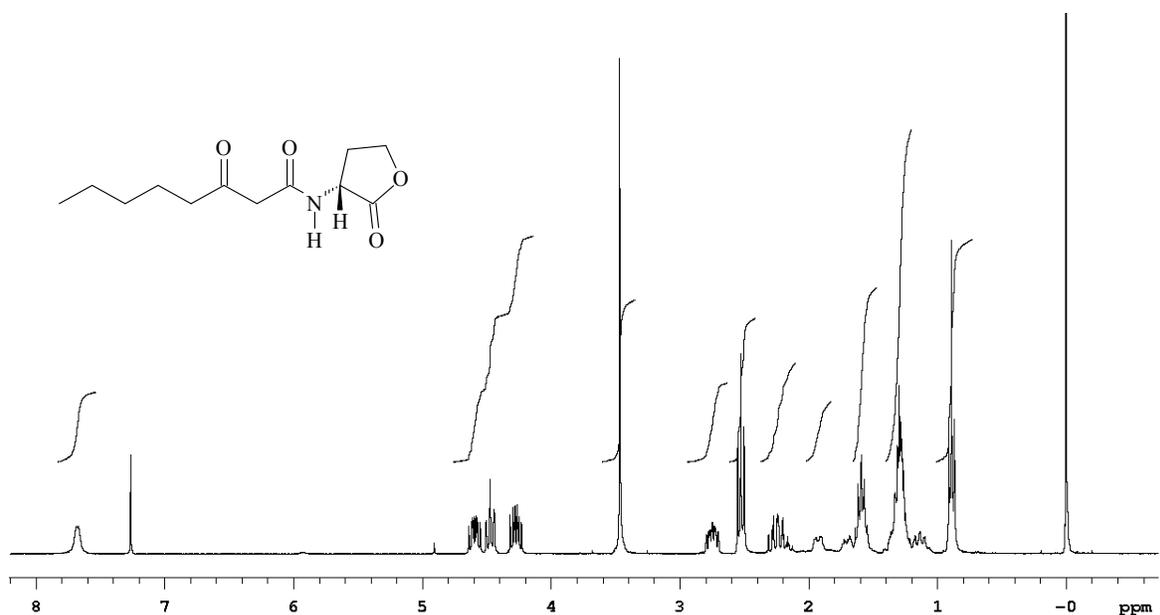
A24. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135° e DEPT 90° (125,69 MHz, CDCl_3 , TMS) da (S)-N-(3-oxo-octanoyl)-HSL sintética.



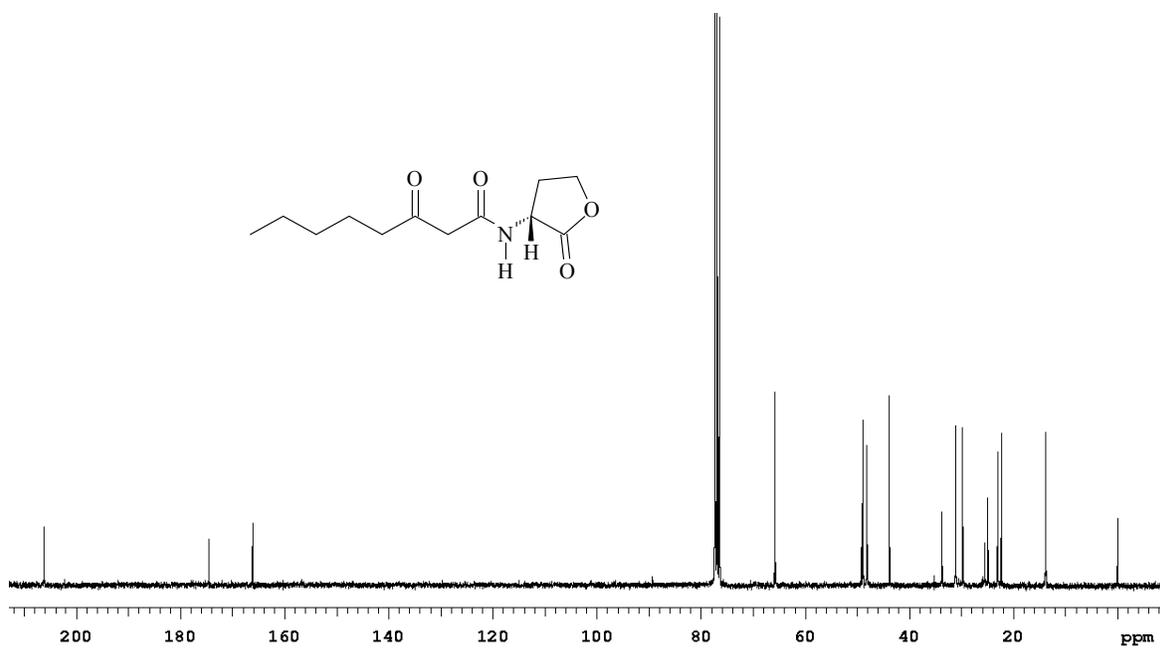
A25. Espectro de massas (IE, 70 eV) da (R)-N-(3-oxo-octanoil)-HSL sintética.



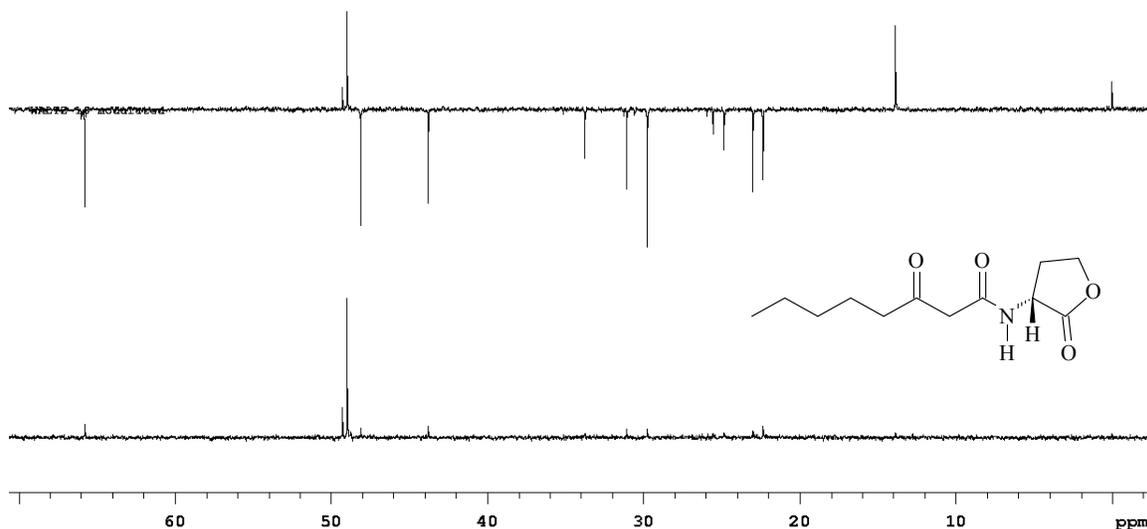
A26. Espectro no infravermelho (KBr) da (R)-N-(3-oxo-octanoil)-HSL sintética.



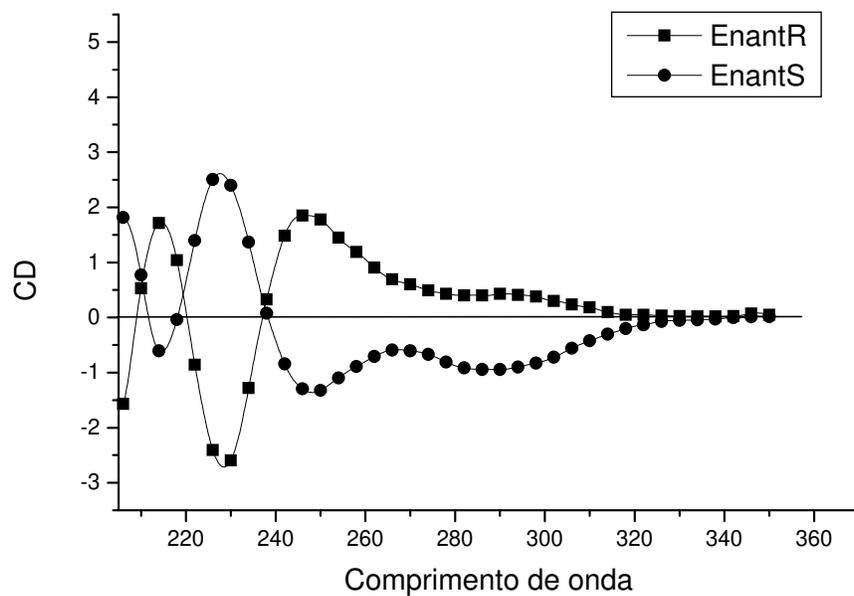
A27. Espectro de RMN de ¹H (300,06 MHz, CDCl₃, TMS) da *(R)*-N-(3-oxo-octanoyl)-HSL sintética.



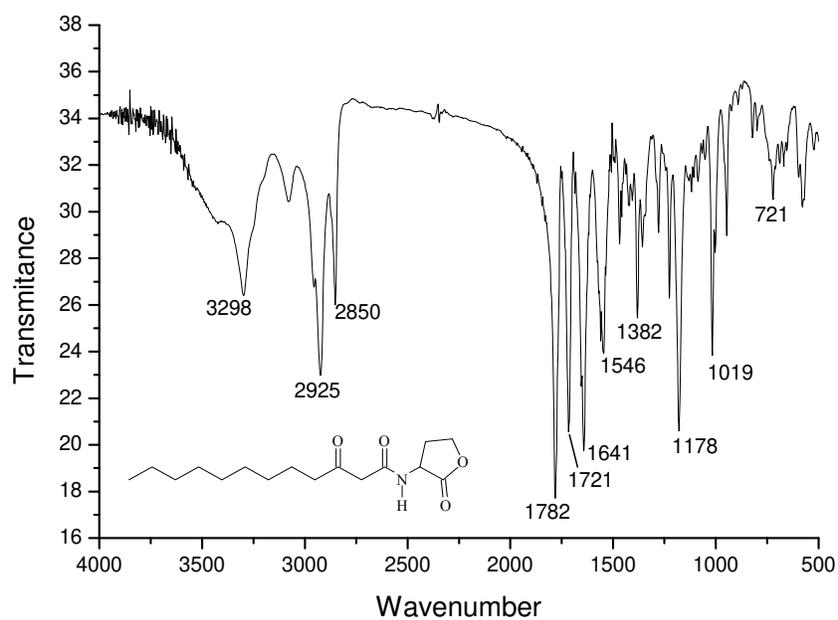
A28. Espectro de RMN de ¹³C (75,45 MHz, CDCl₃, TMS) da *(R)*-N-(3-oxo-octanoyl)-HSL sintética.



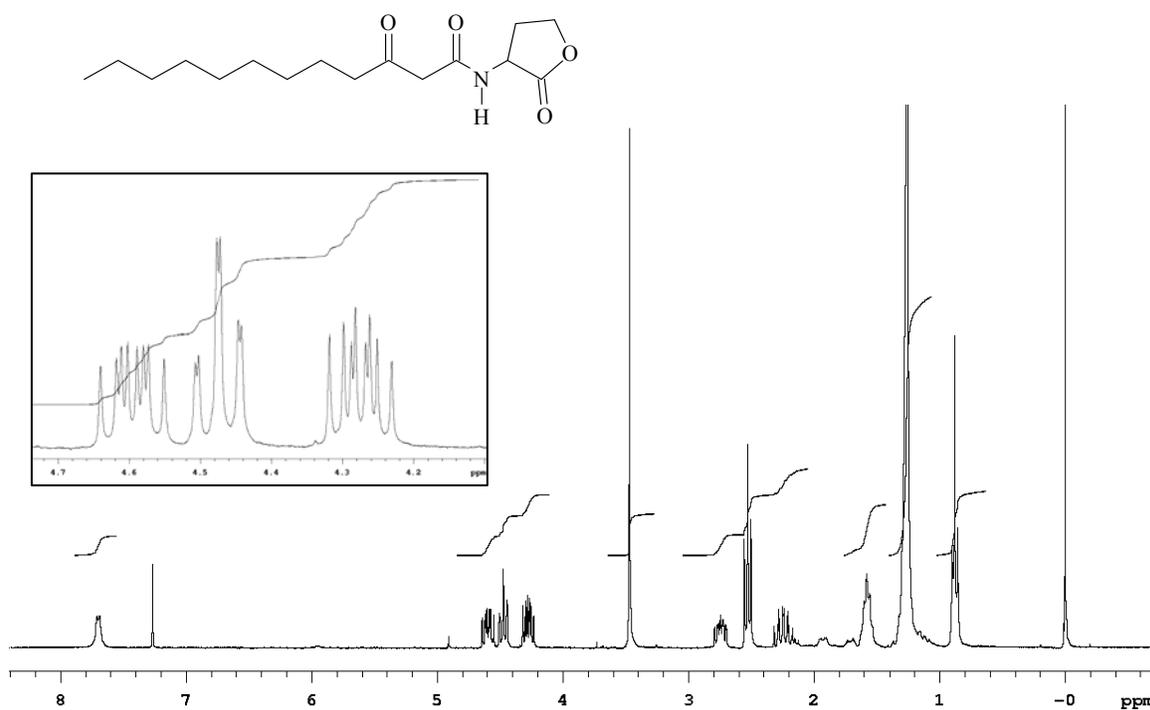
A29. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135° e DEPT 90° (75,45 MHz, CDCl_3 , TMS) da (*R*)-*N*-(3-oxo-octanoyl)-HSL sintética.



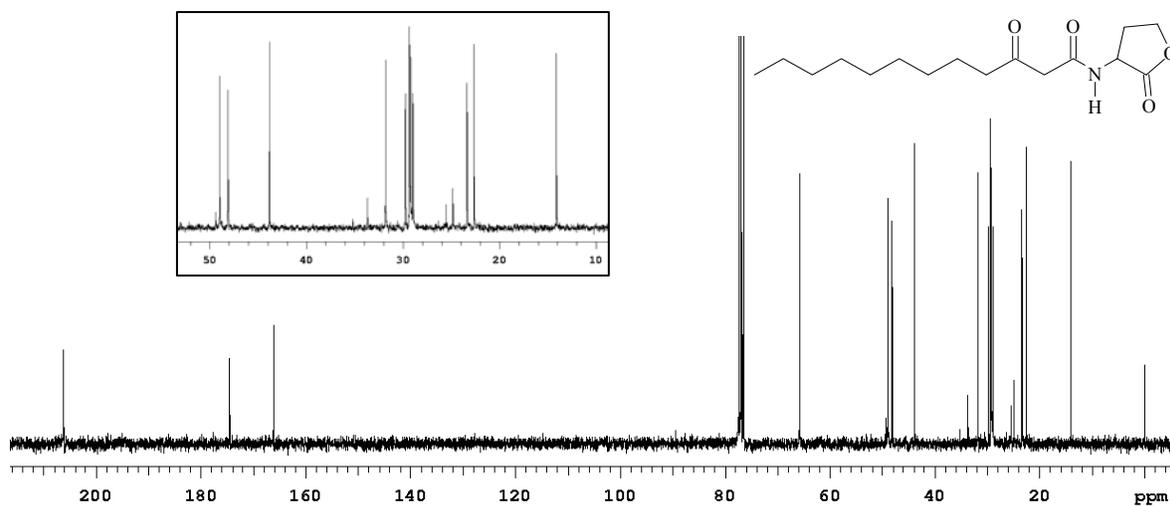
A30. Curvas de dicroísmo circular para a (*R*) e (*S*)-*N*-(3-oxo-octanoyl)-HSL sintéticas.



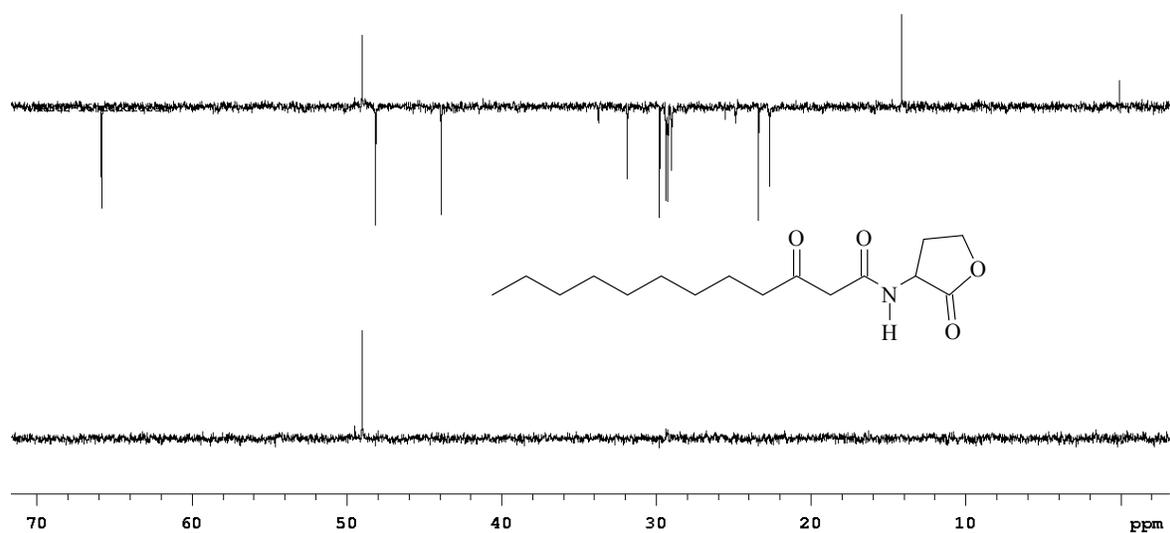
A31. Espectro no infravermelho (KBr) da (\pm) -N-(3-oxo-dodecanoil)-HSL sintética.



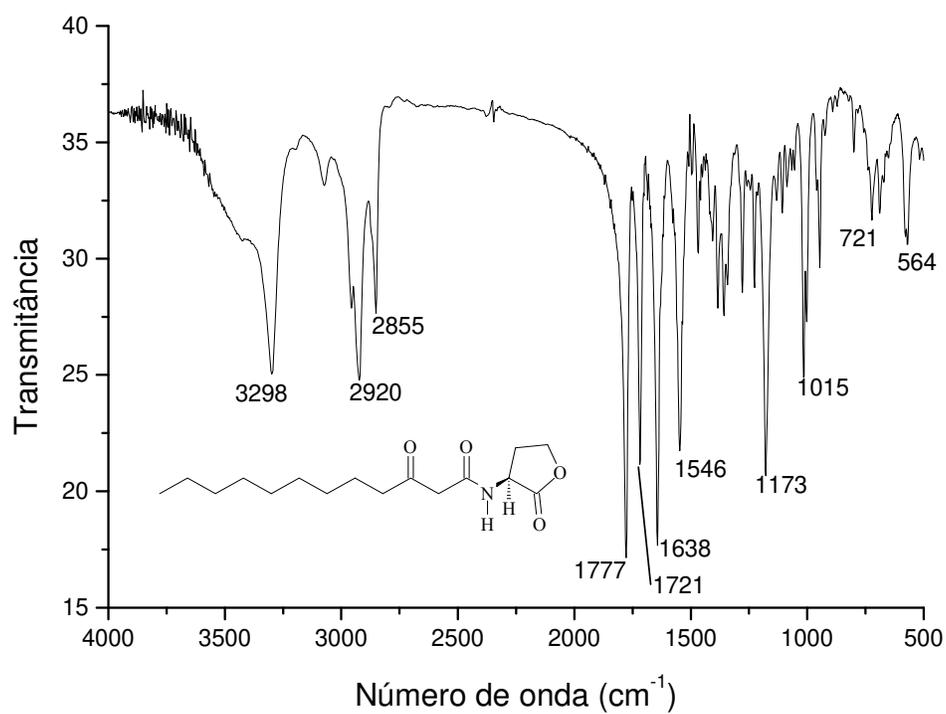
A32. Espectro de RMN de ^1H (300,06 MHz, CDCl_3 , TMS) da (\pm) -N-(3-oxo-dodecanoil)-HSL sintética.



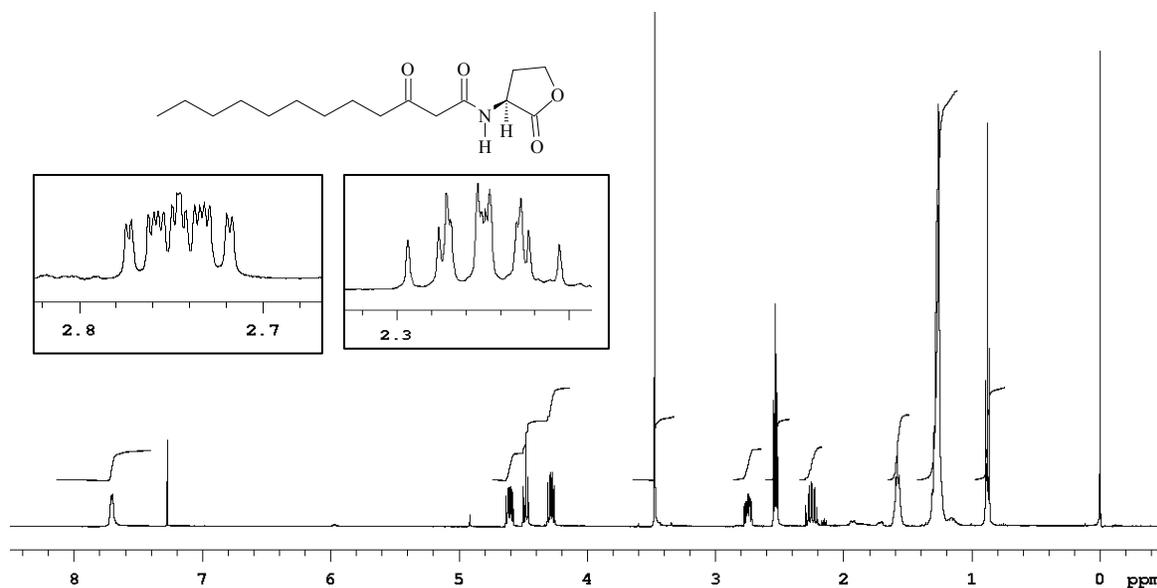
A33. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3 , TMS) da (\pm) -*N*-(3-oxo-dodecanoil)-HSL sintética.



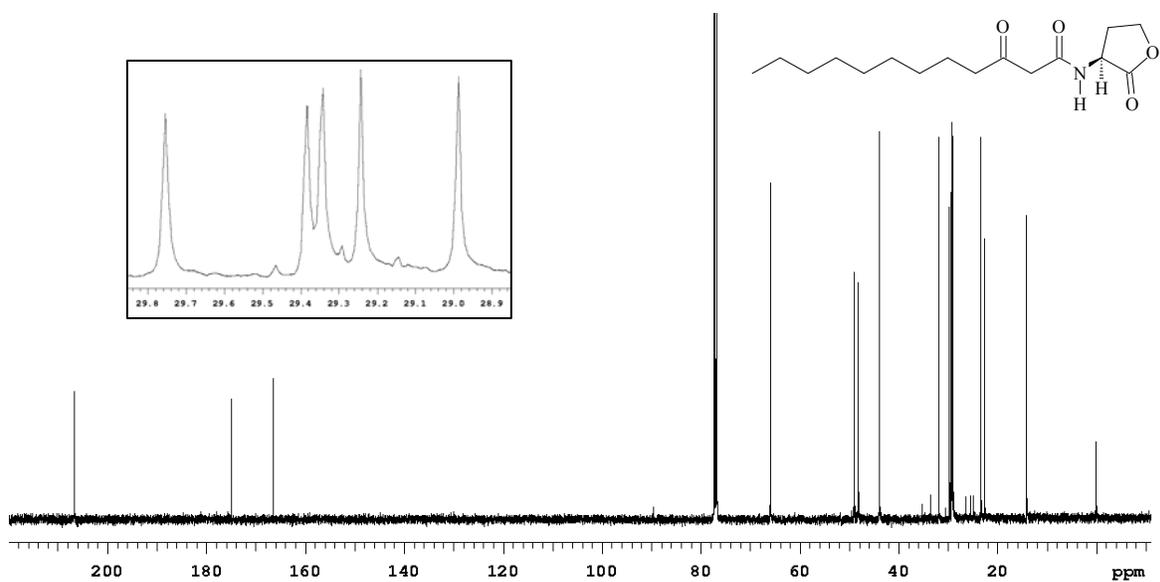
A34. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135° e DEPT 90° (75,45 MHz, CDCl_3 , TMS) da (\pm) -*N*-(3-oxo-dodecanoil)-HSL sintética.



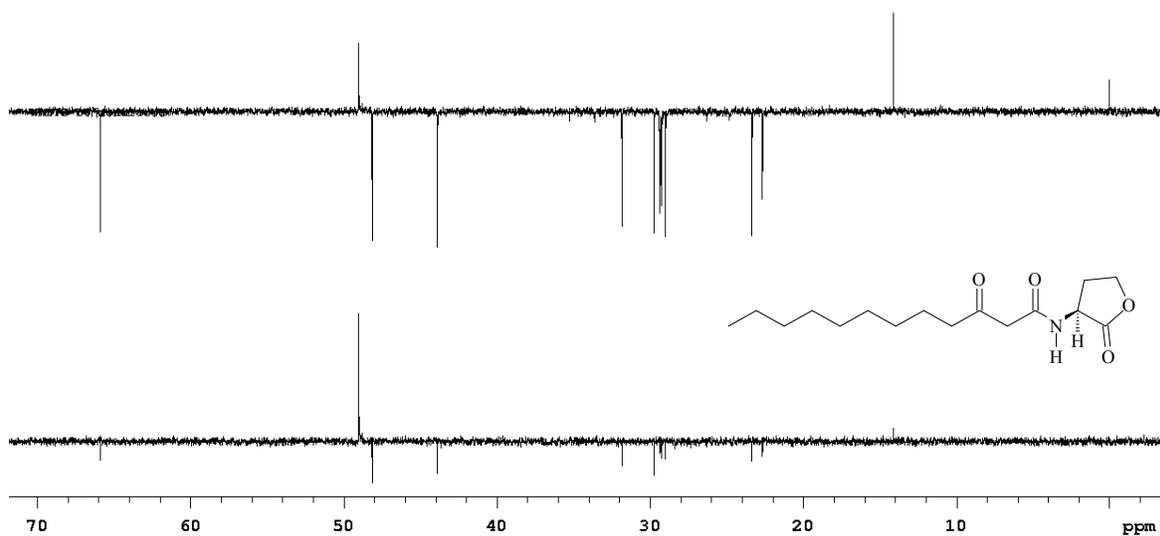
A35. Espectro no infravermelho (KBr) da (*S*)-*N*-(3-oxo-dodecanoil)-HSL sintética.



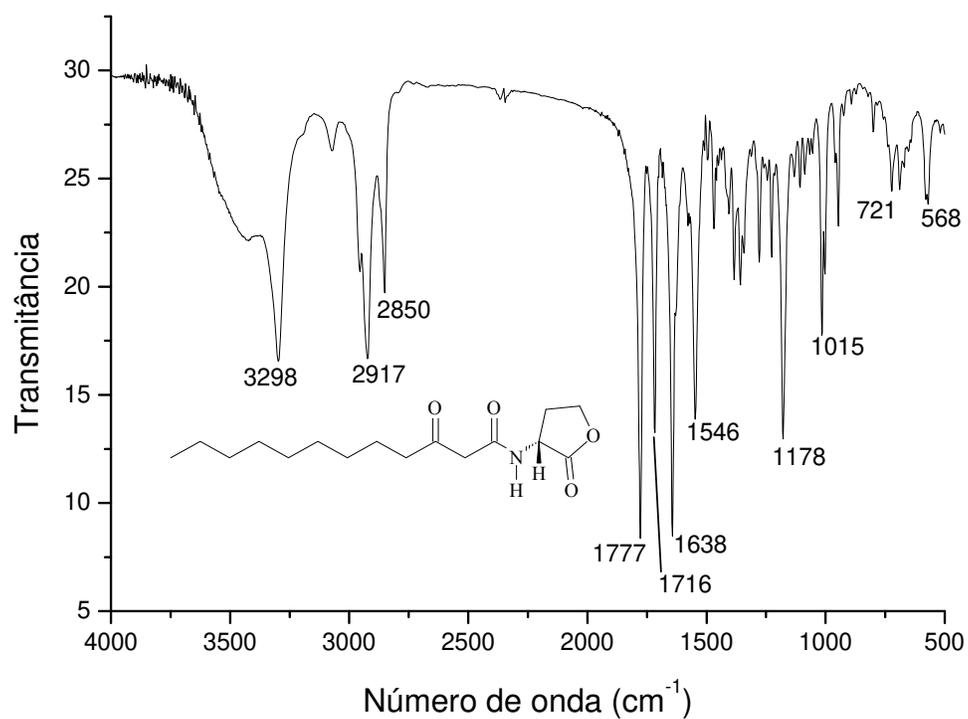
A36. Espectro de RMN de ^1H (499,88 MHz, CDCl_3 , TMS) da (*S*)-*N*-(3-oxo-dodecanoil)-HSL sintética.



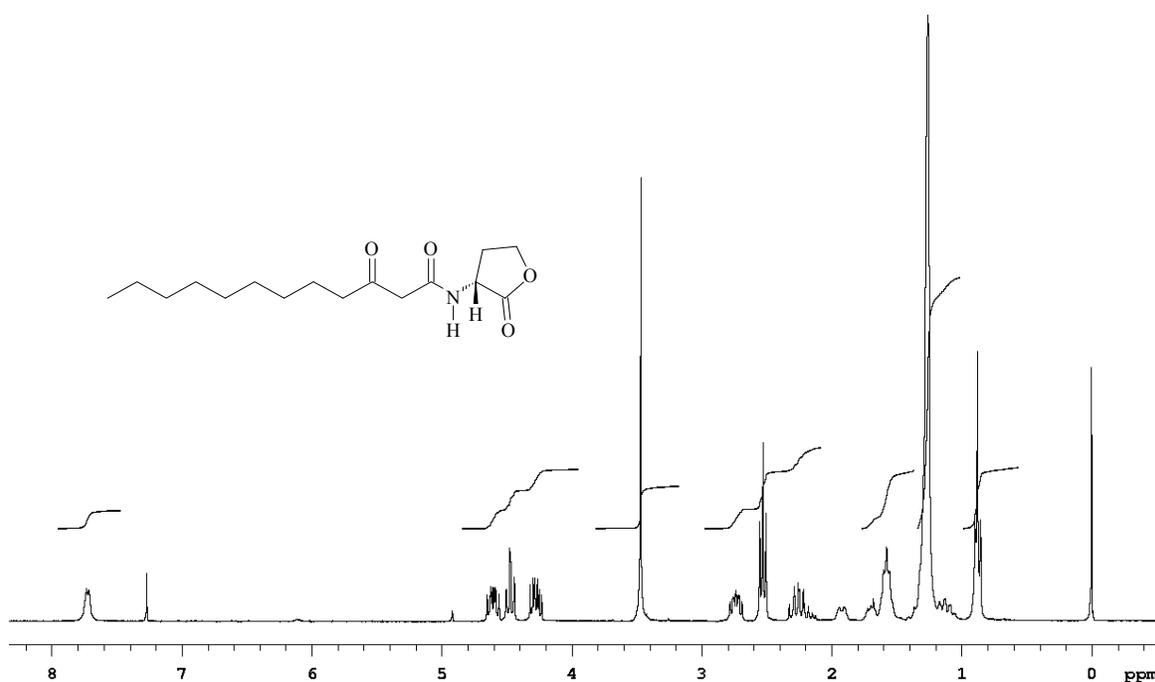
A37. Espectro de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, CDCl_3 , TMS) da *(S)*-*N*-(3-oxo-dodecanoil)-HSL sintética.



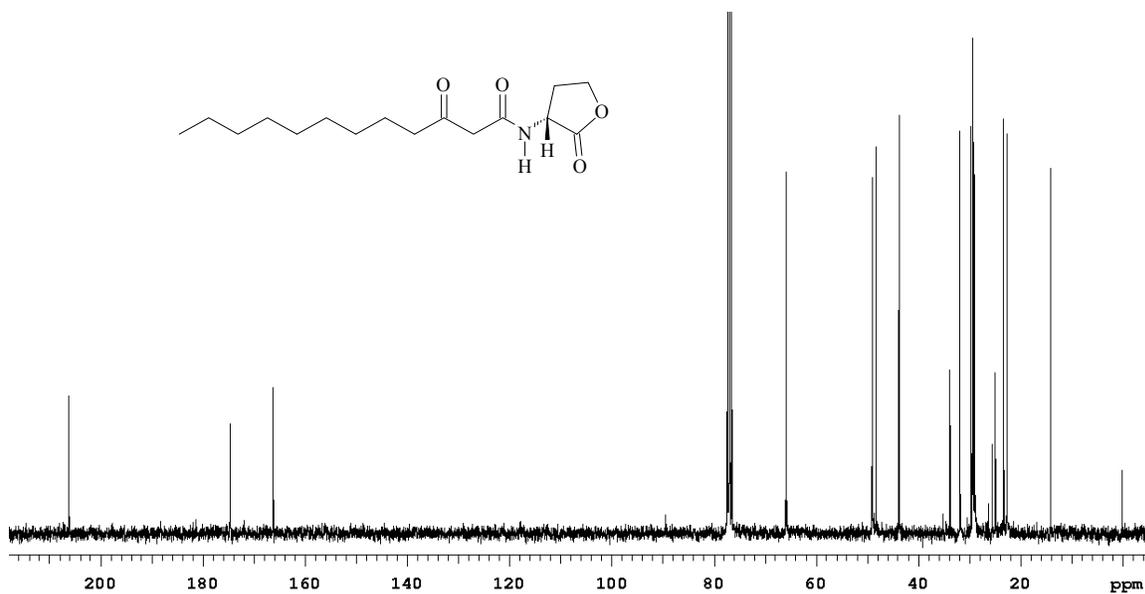
A38. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135° e DEPT 90° (125,69 MHz, CDCl_3 , TMS) da *(S)*-*N*-(3-oxo-dodecanoil)-HSL sintética.



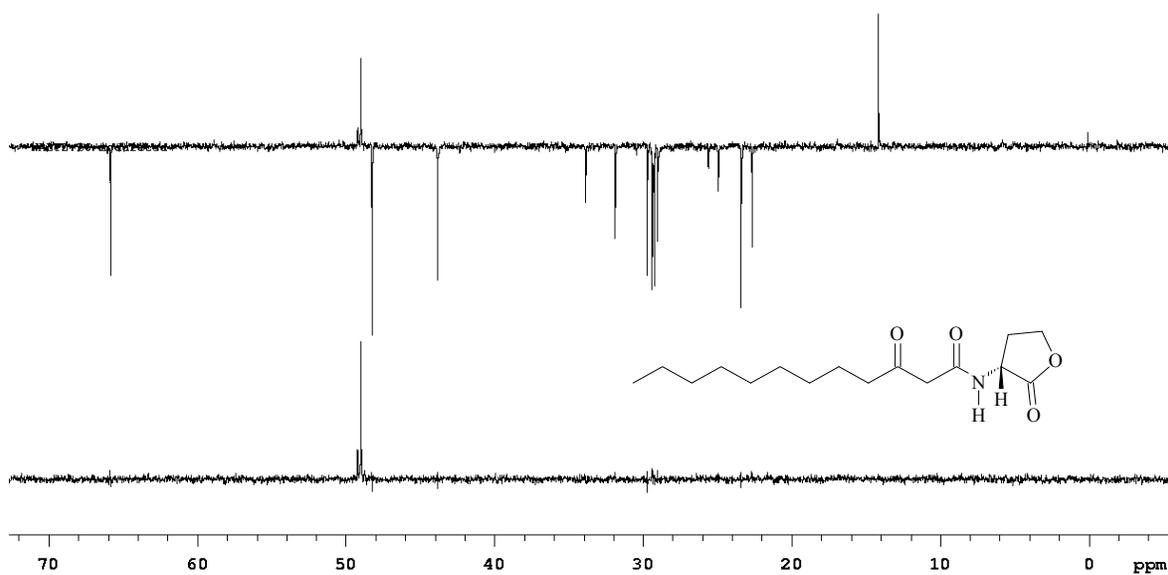
A39. Espectro no infravermelho (KBr) da (*R*)-*N*-(3-oxo-dodecanoil)-HSL sintética.



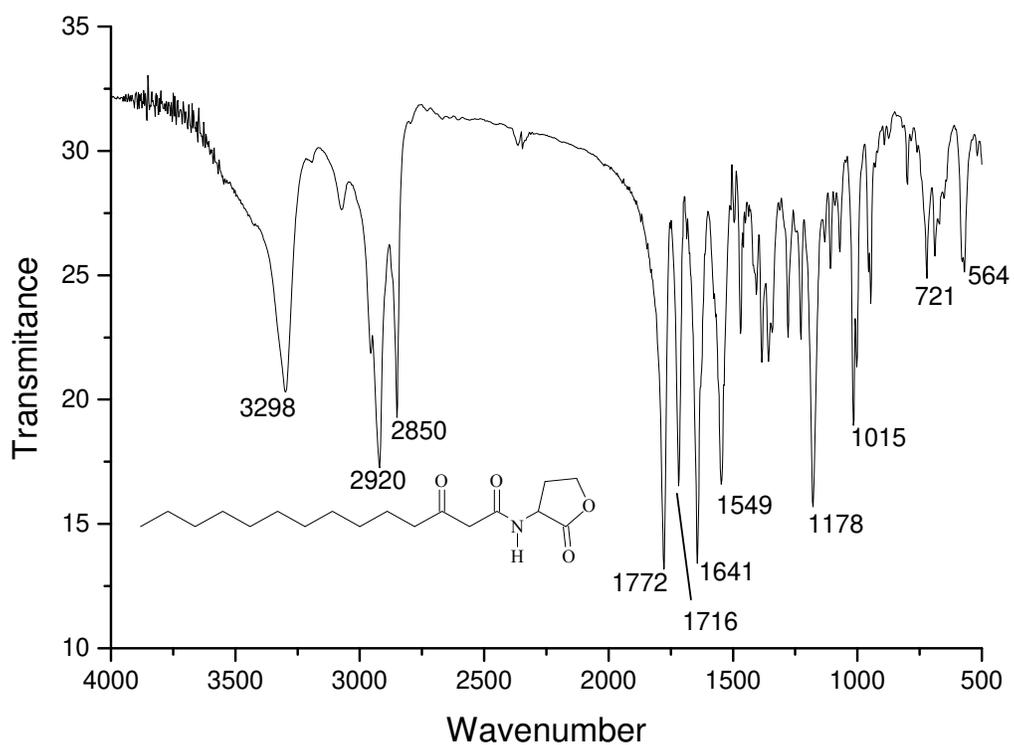
A40. Espectro de RMN de ^1H (499,88 MHz, CDCl_3 , TMS) da (*R*)-*N*-(3-oxo-dodecanoil)-HSL sintética.



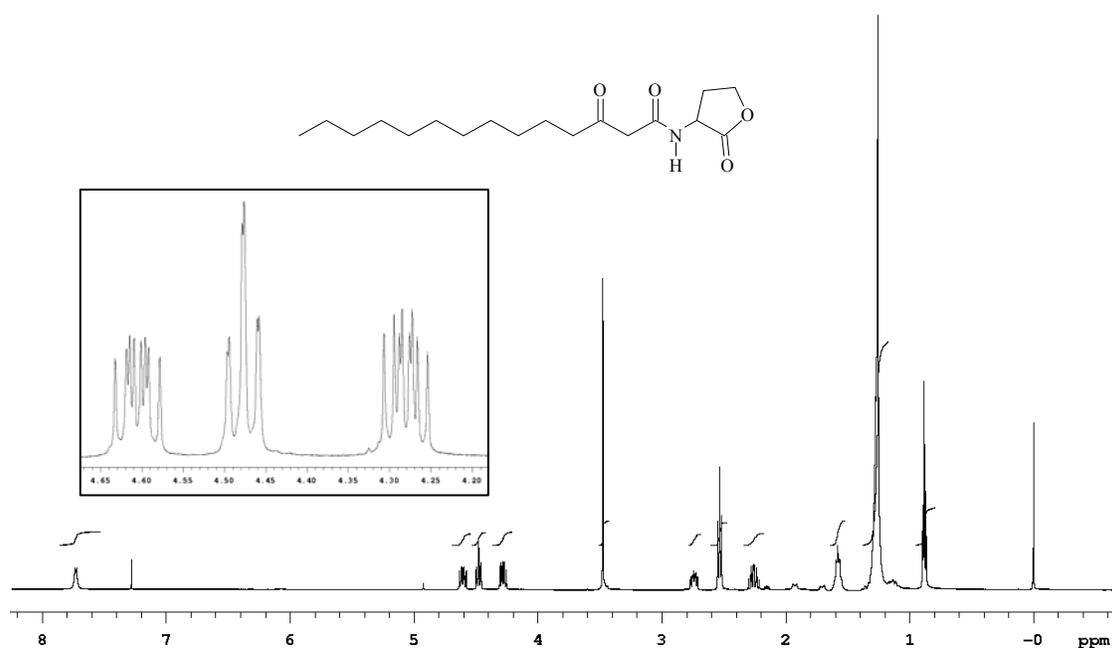
A41. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3 , TMS) da (R) - N -(3-oxo-dodecanoil)-HSL sintética.



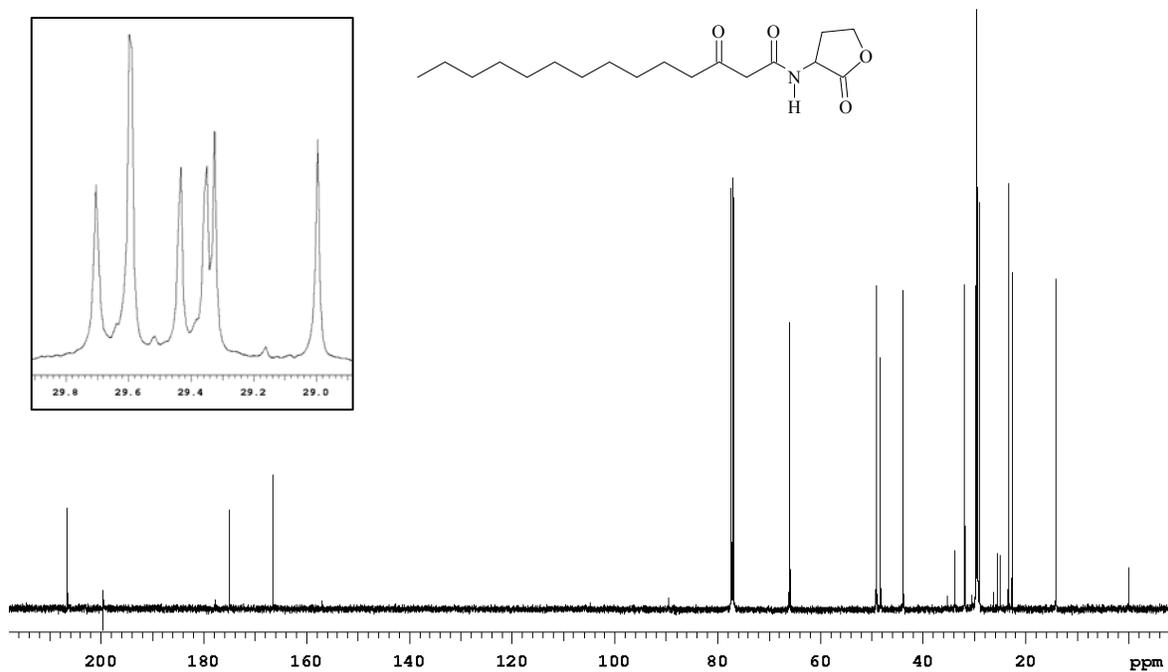
A42. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 e 90° (75,45 MHz, CDCl_3 , TMS) da (R) - N -(3-oxo-dodecanoil)-HSL sintética.



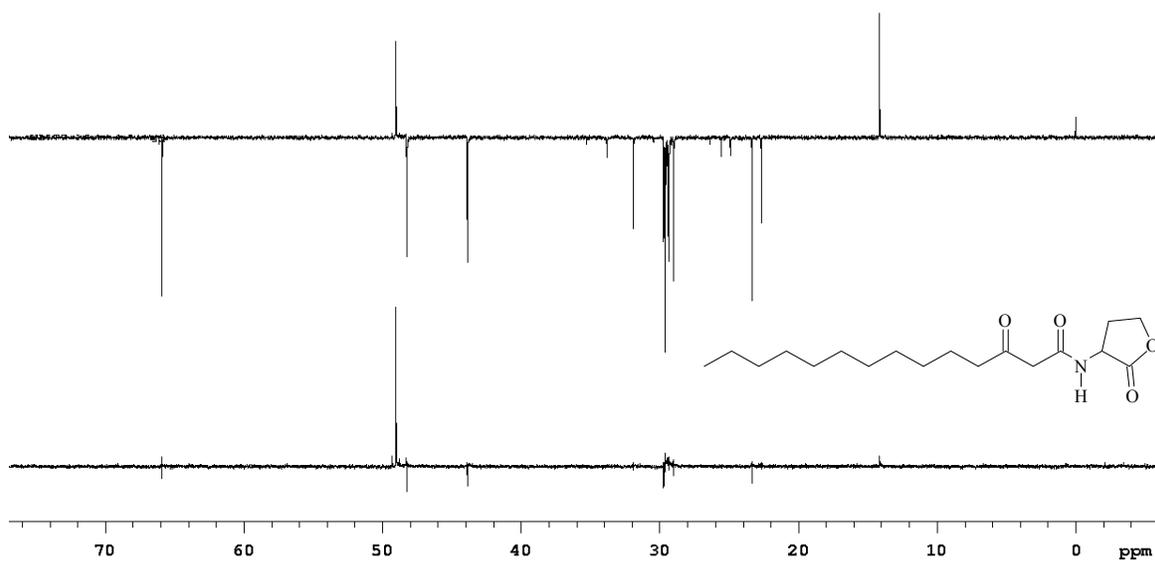
A43. Espectro no infravermelho (KBr) da (\pm)-*N*-(3-oxo-tetradecanoil)-HSL sintética.



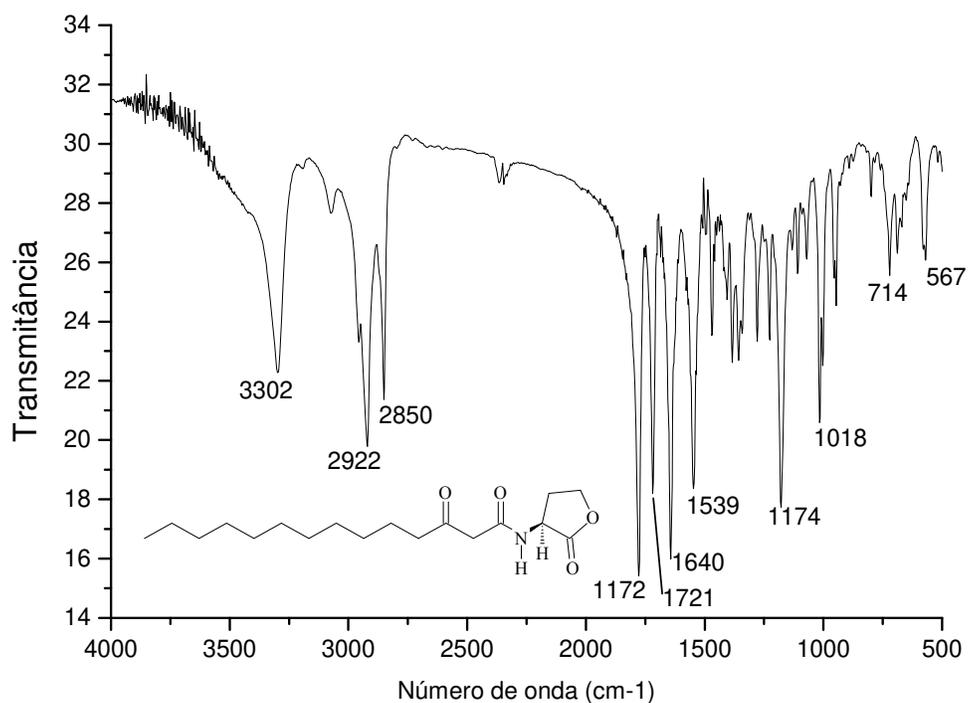
A44. Espectro de RMN de ^1H (499,88 MHz, CDCl_3 , TMS) da (\pm)-*N*-(3-oxo-tetradecanoil)-HSL sintética.



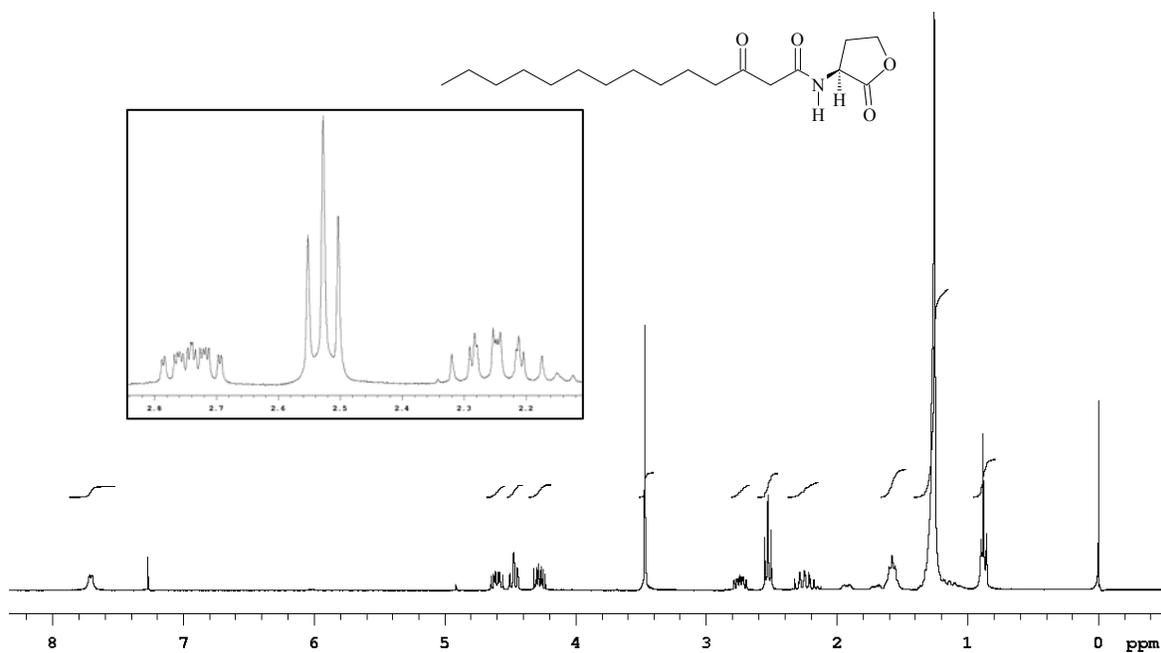
A45. Espectro de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, CDCl₃, TMS) da (\pm) -*N*-(3-oxo-tetradecanoyl)-HSL sintética.



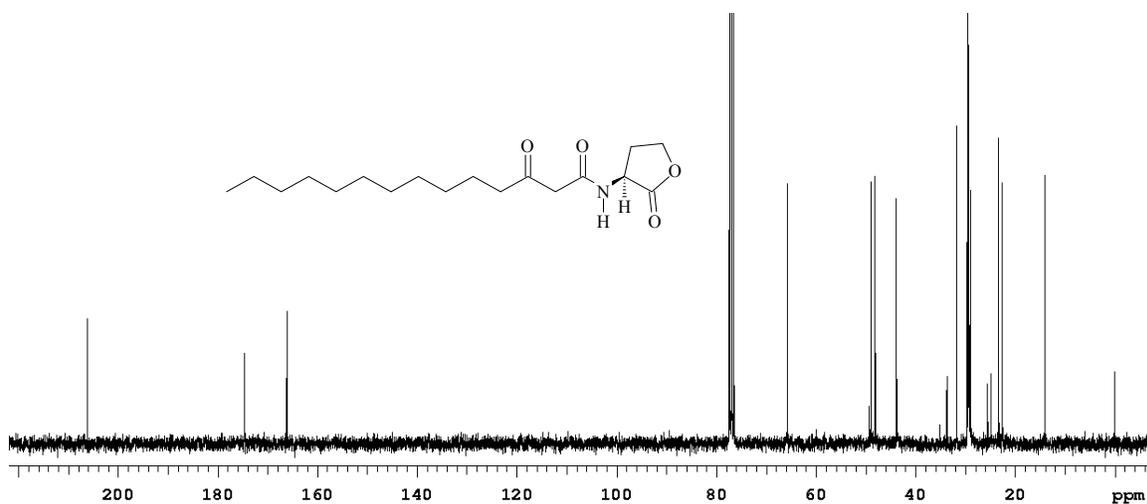
A46. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 e 90° (125,69 MHz, CDCl₃, TMS) da (\pm) -*N*-(3-oxo-tetradecanoyl)-HSL sintética.



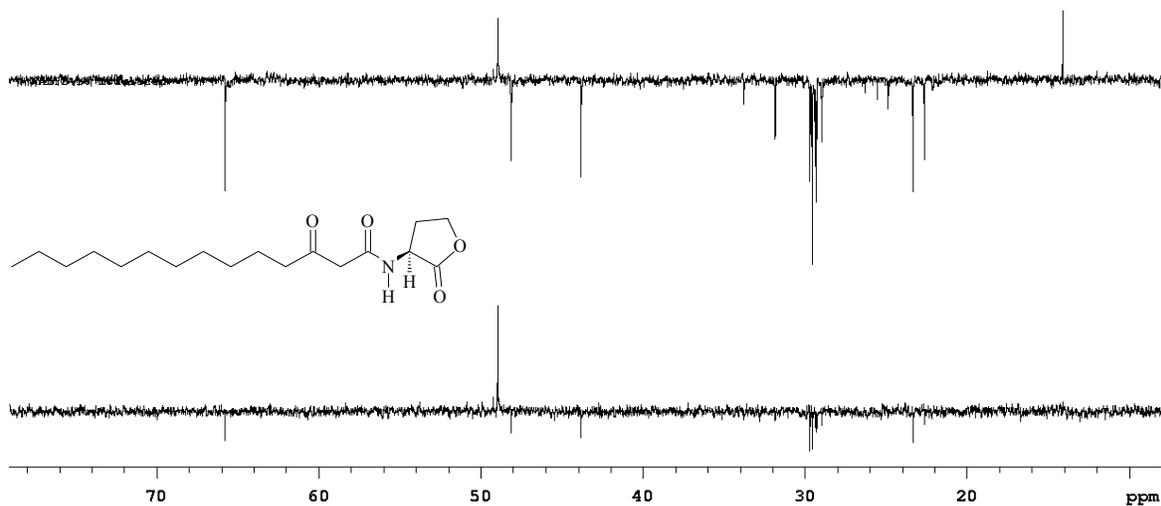
A47. Espectro no infravermelho (KBr) da (*S*)-*N*-(3-oxo-tetradecanoyl)-HSL sintética.



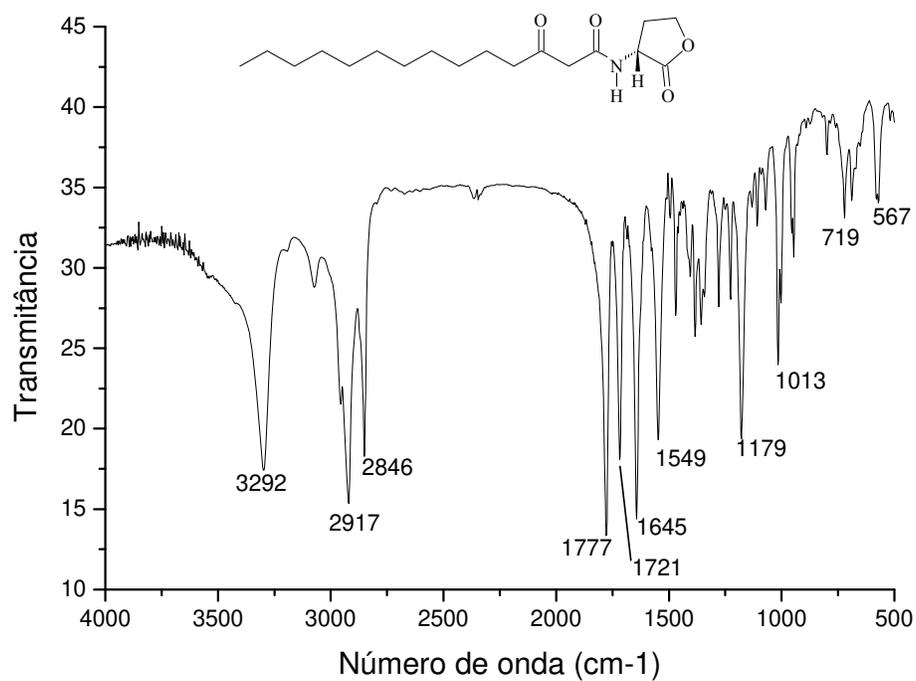
A48. Espectro de RMN de ^1H (300,06 MHz, CDCl_3 , TMS) da (*S*)-*N*-(3-oxo-tetradecanoyl)-HSL sintética.



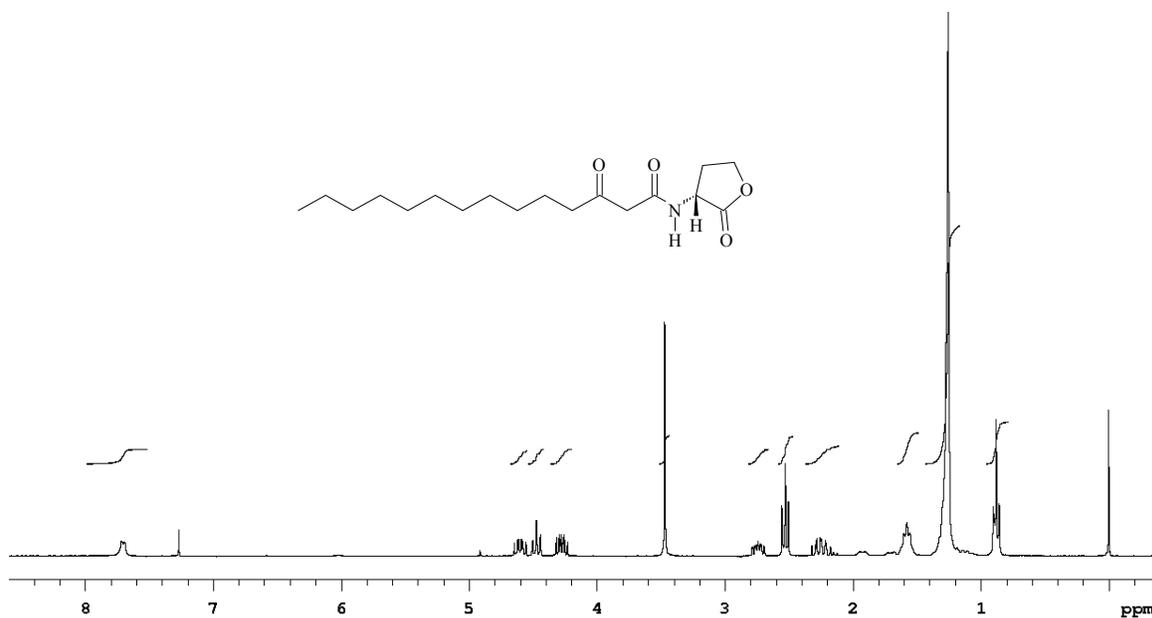
A49. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3 , TMS) da (S) - N -(3-oxo-tetradecanoyl)-HSL sintética.



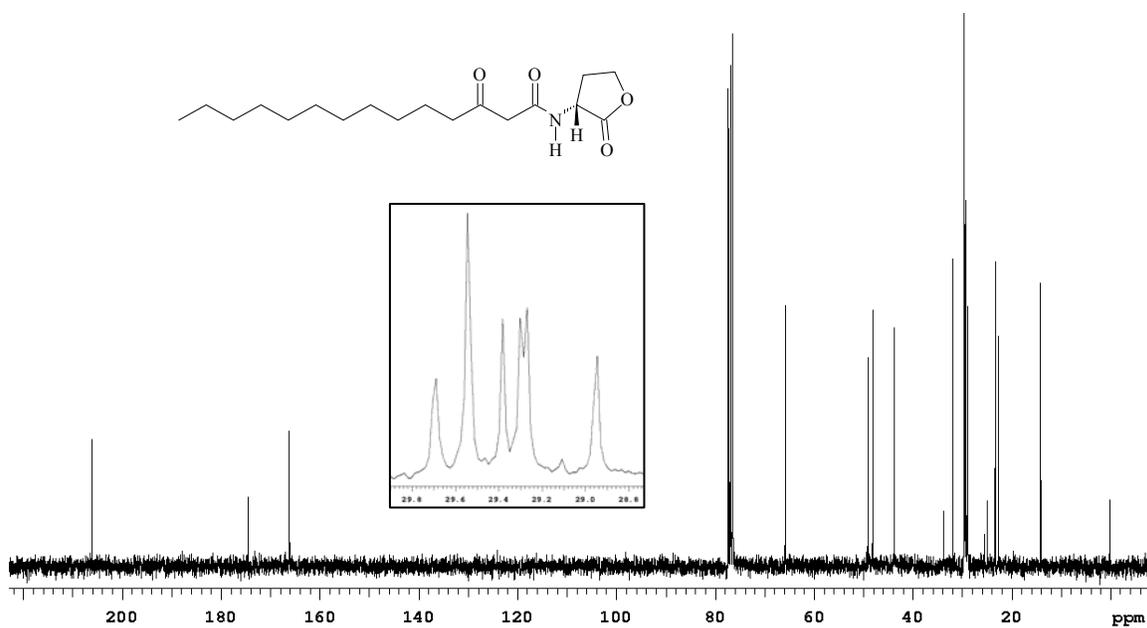
A50. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 e 90° (75,45 MHz, CDCl_3 , TMS) da (S) - N -(3-oxo-tetradecanoyl)-HSL sintética.



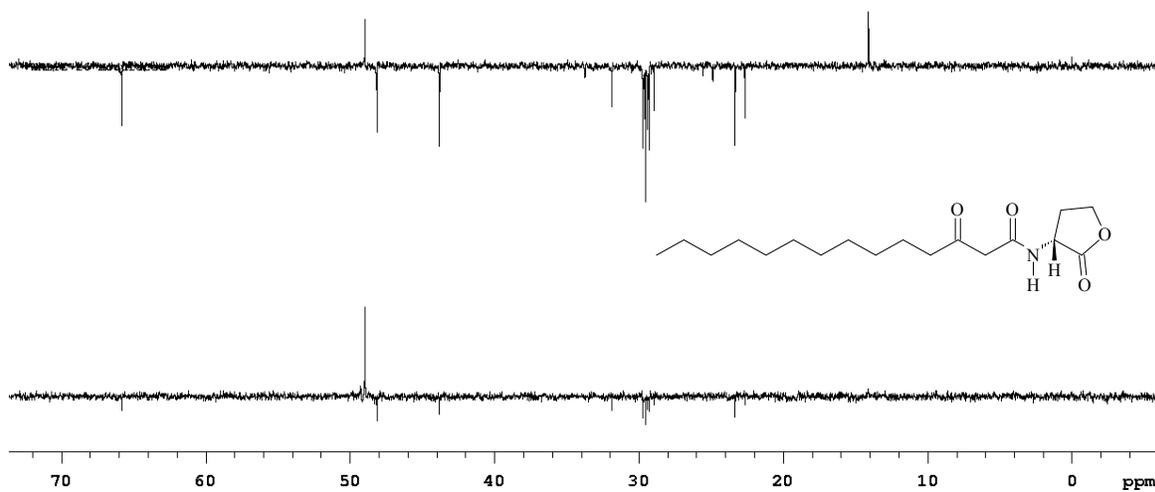
A51. Espectro no infravermelho (KBr) da (*R*)-*N*-(3-oxo-tetradecanoyl)-HSL sintética.



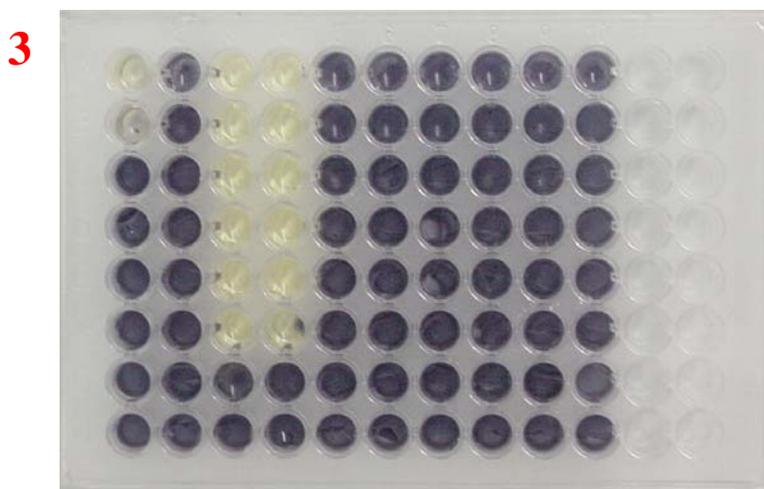
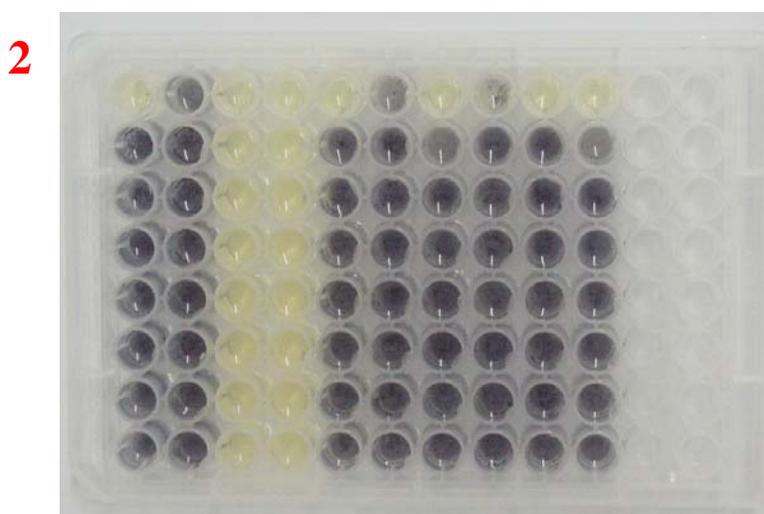
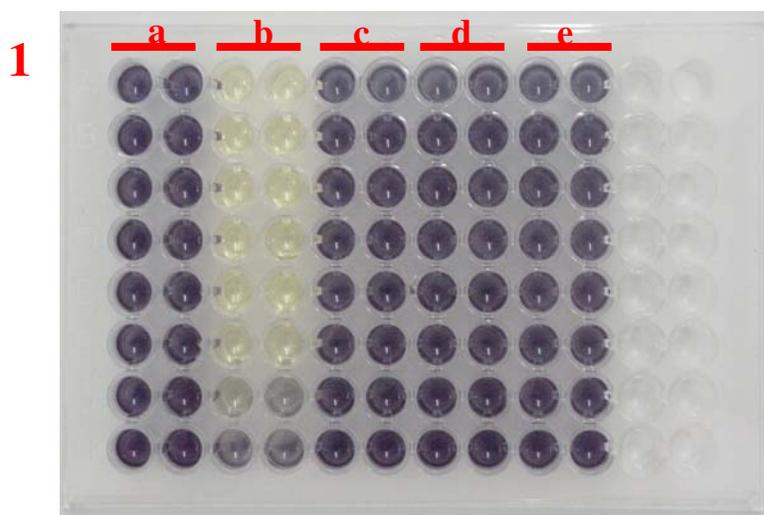
A52. Espectro de RMN de ^1H (300,06 MHz, CDCl_3 , TMS) da (*R*)-*N*-(3-oxo-tetradecanoyl)-HSL sintética.



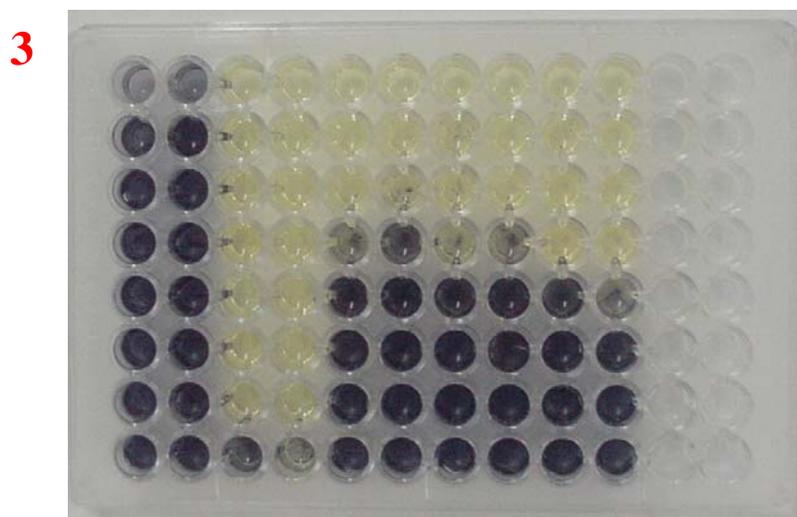
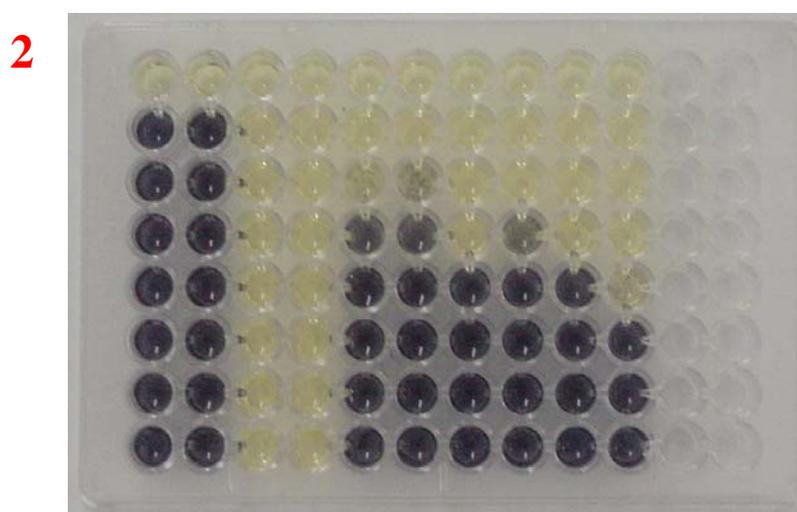
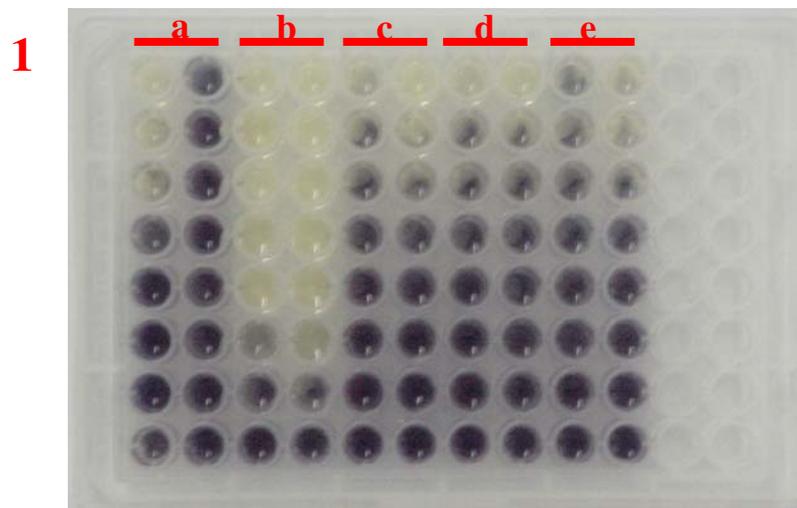
A53. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl₃, TMS) da (R) - N -(3-oxo-tetradecanoyl)-HSL sintética.



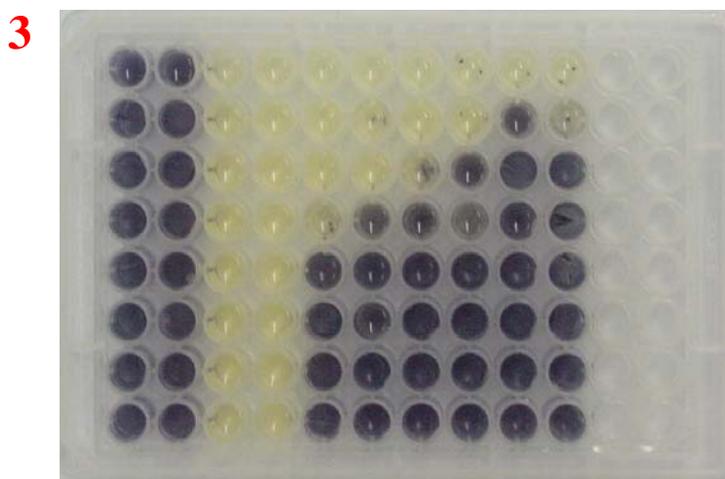
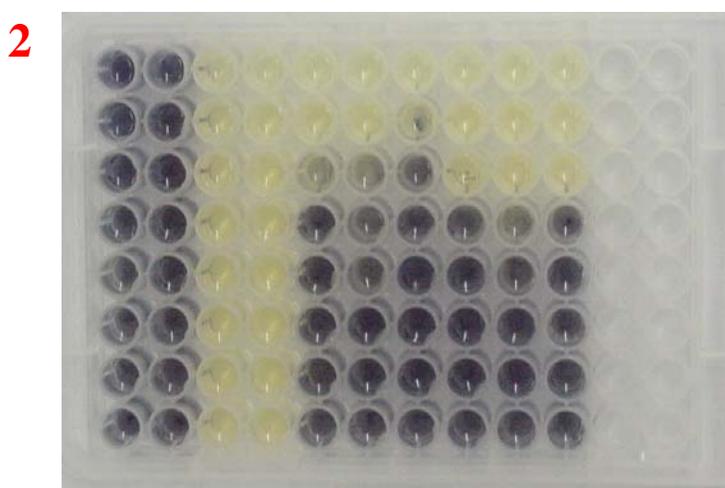
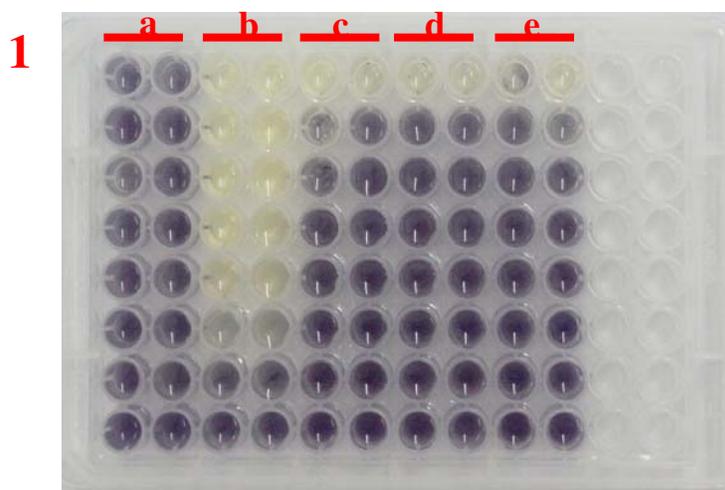
A54. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 e 90° (75,45 MHz, CDCl₃, TMS) da (R) - N -(3-oxo-tetradecanoyl)-HSL sintética.



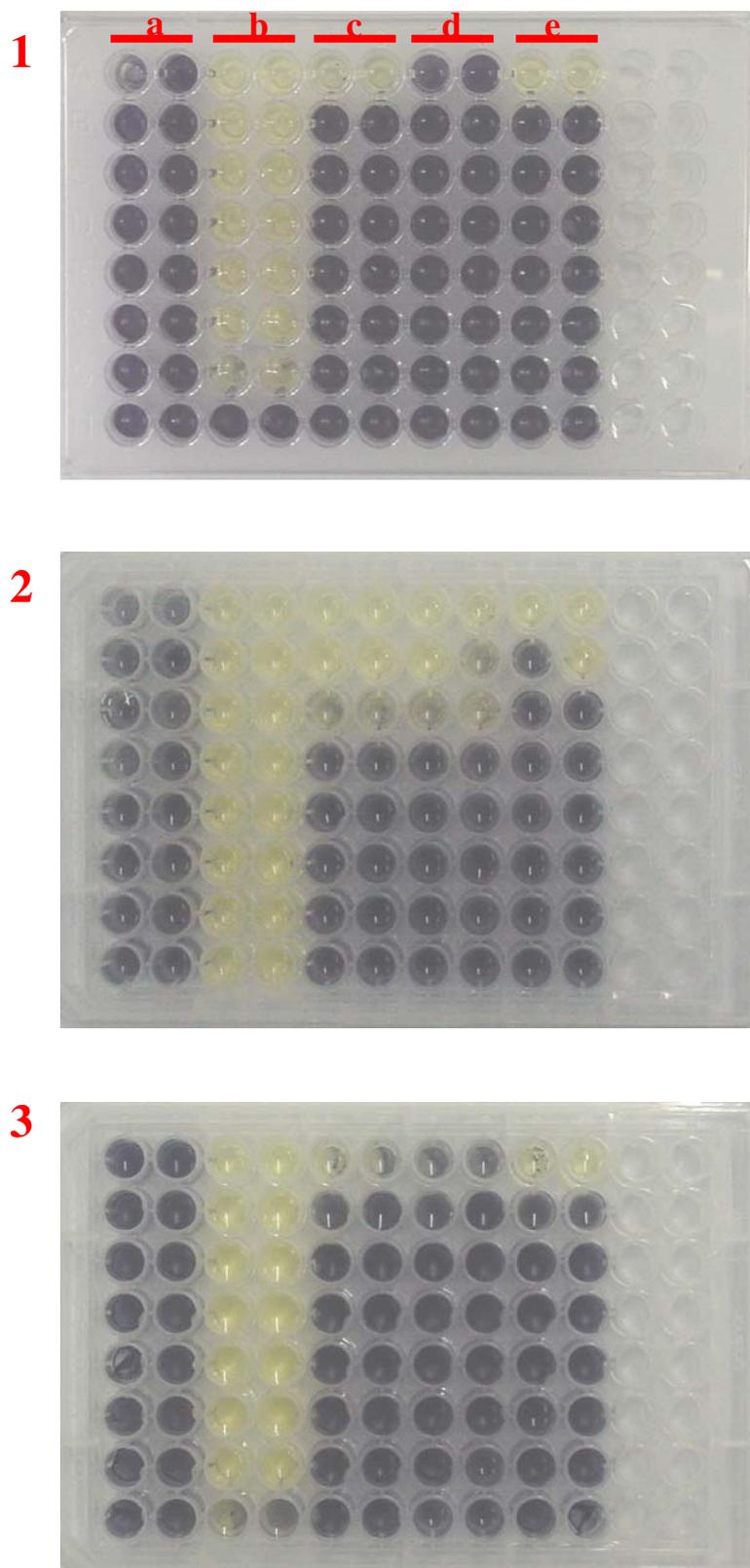
A55. Avaliação semi-quantitativa da atividade antimicrobiana de *N*-heptanoil-HSL contra *S. aureus* (1), *B. subtilis* (2) e *B. cereus* (3). Legenda: a. branco (água/DMSO 20%); b. controle positivo (cloranfenicol); c. racemato; d. enantiômero (*S*); e. enantiômero (*R*).



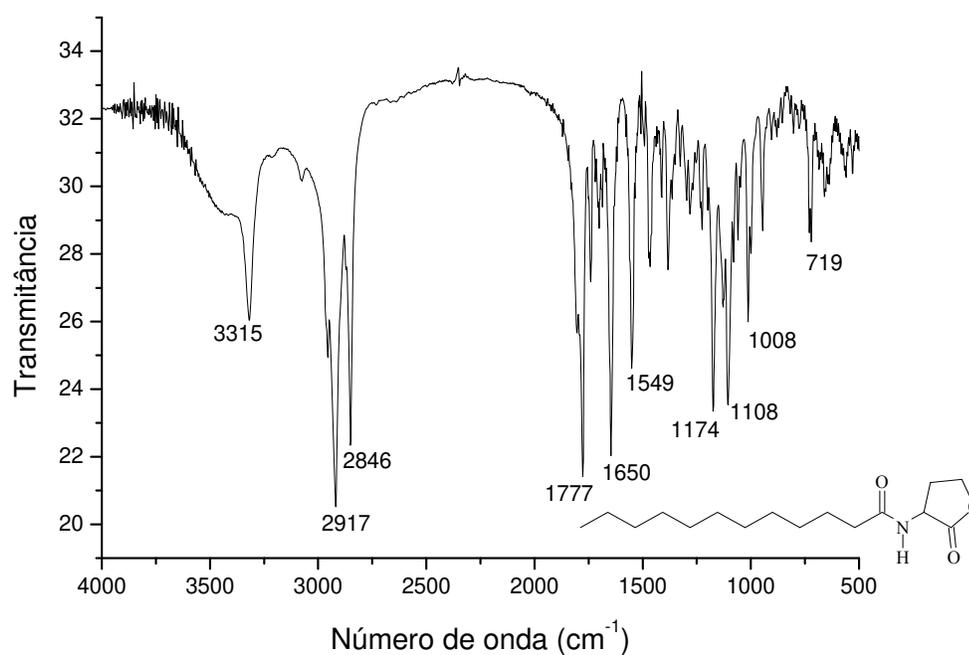
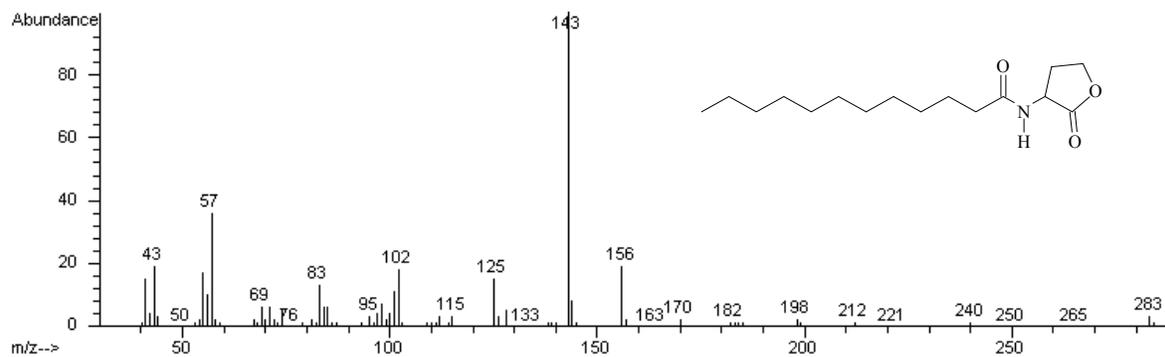
A56. Avaliação semi-quantitativa da atividade antimicrobiana de *N*-(3-oxo-octanoil)-HSL contra *S. aureus* (1), *B. subtilis* (2) e *B. cereus* (3). Legenda: a. branco (água/DMSO 20%); b. controle positivo (cloranfenicol); c. racemato; d. enantiômero (*S*); e. enantiômero (*R*).

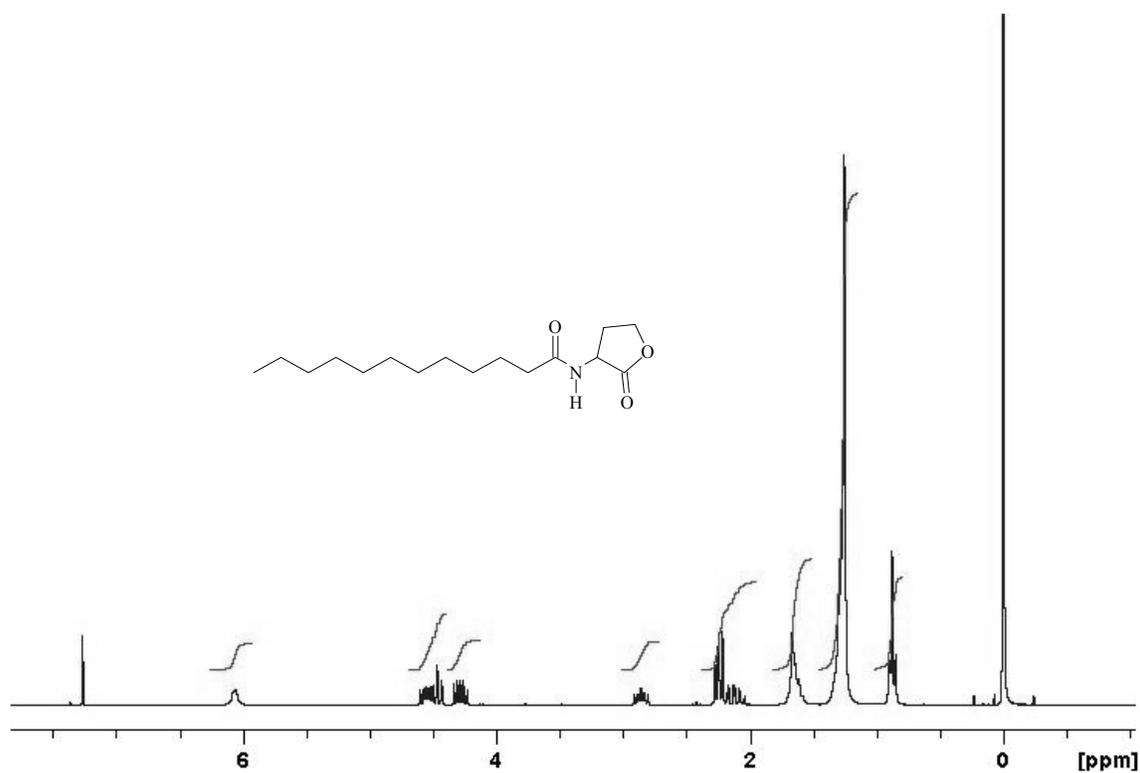


A57. Avaliação semi-quantitativa da atividade antimicrobiana de *N*-(3-oxo-dodecanoil)-HSL contra *S. aureus* (1), *B. subtilis* (2) e *B. cereus* (3). Legenda: a. branco (água/DMSO 20%); b. controle positivo (cloranfenicol); c. racemato; d. enantiômero (*S*); e. enantiômero (*R*).

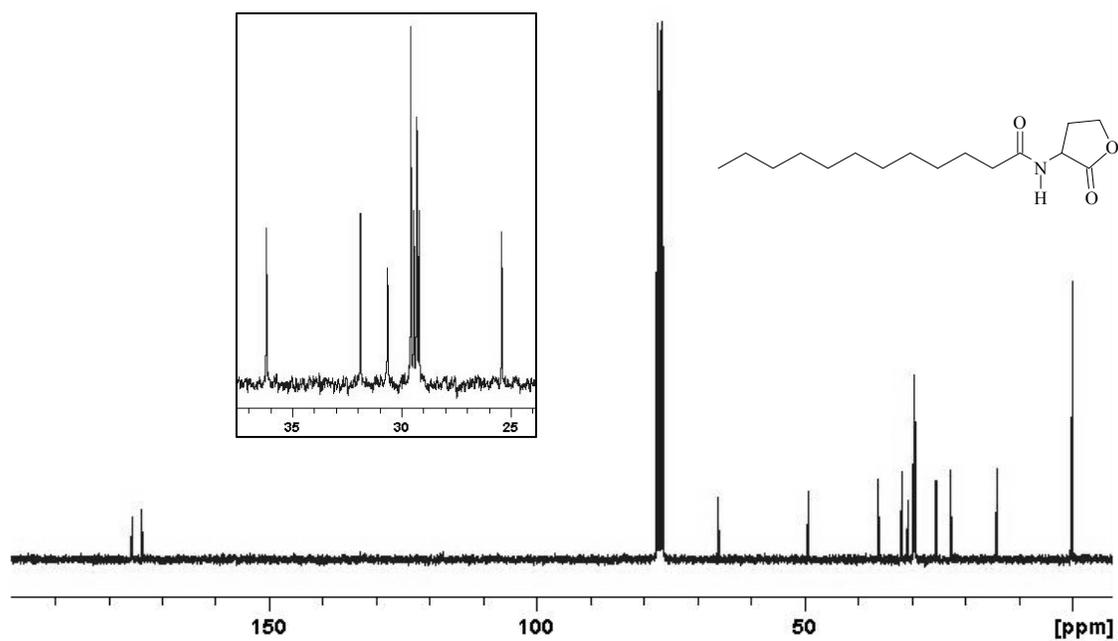


A58. Avaliação semi-quantitativa da atividade antimicrobiana de *N*-(3-oxo-tetradecanoil)-HSL contra *S. aureus* (1), *B. subtilis* (2) e *B. cereus* (3). Legenda: a. branco (água/DMSO 20%); b. controle positivo (cloranfenicol); c. racemato; d. enantiômero (*S*); e. enantiômero (*R*).

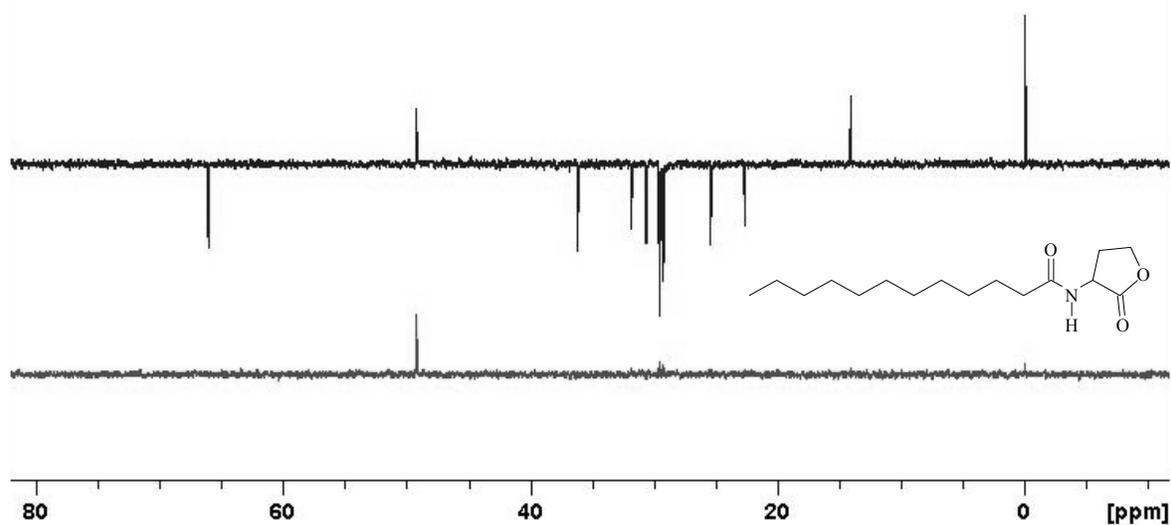
A59. Espectro no infravermelho (KBr) da (\pm)-*N*-dodecanoil-HSL sintética.A60. Espectro de massas (IE, 70 eV) da (\pm)-*N*-dodecanoil-HSL sintética.



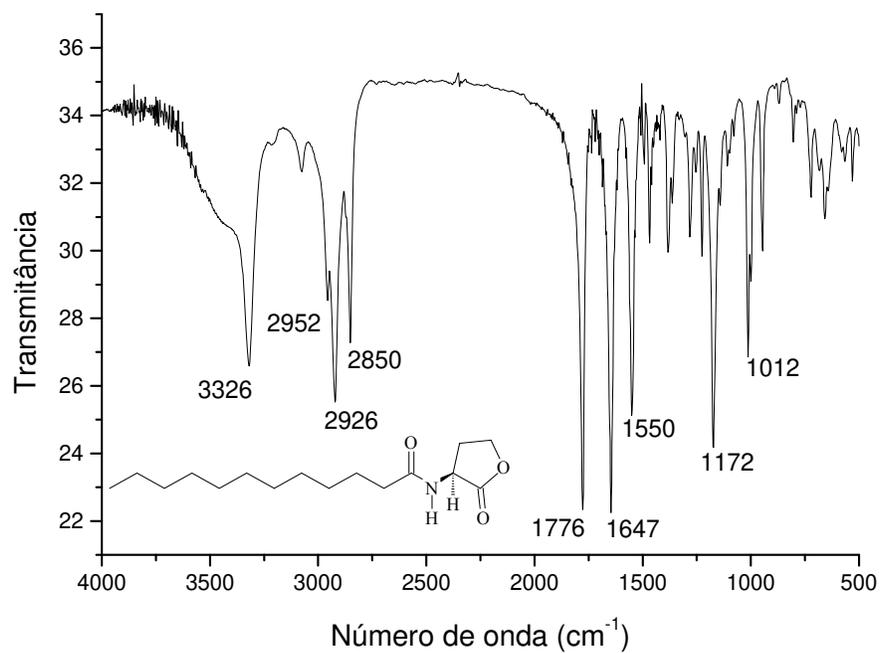
A61. Espectro de RMN de ¹H (250 MHz, CDCl₃, TMS) da (±)-*N*-dodecanoil-HSL sintética.



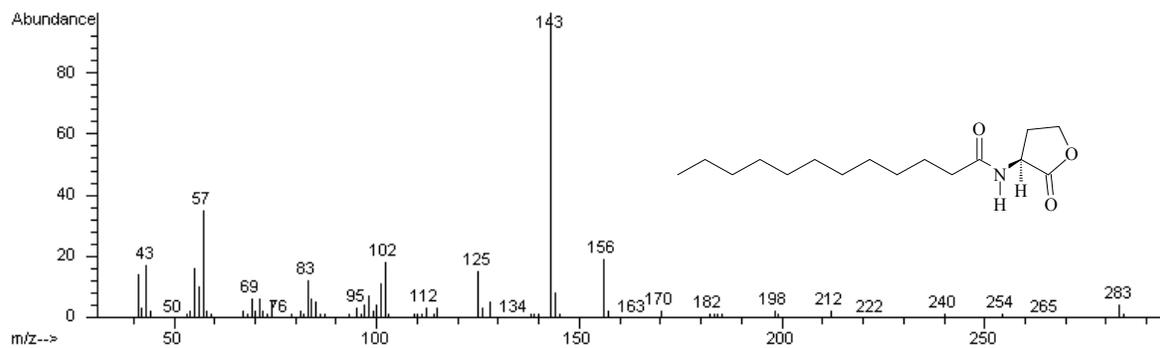
A62. Espectro de RMN de ¹³C (62,50 MHz, CDCl₃, TMS) da (±)-*N*-dodecanoil-HSL sintética.



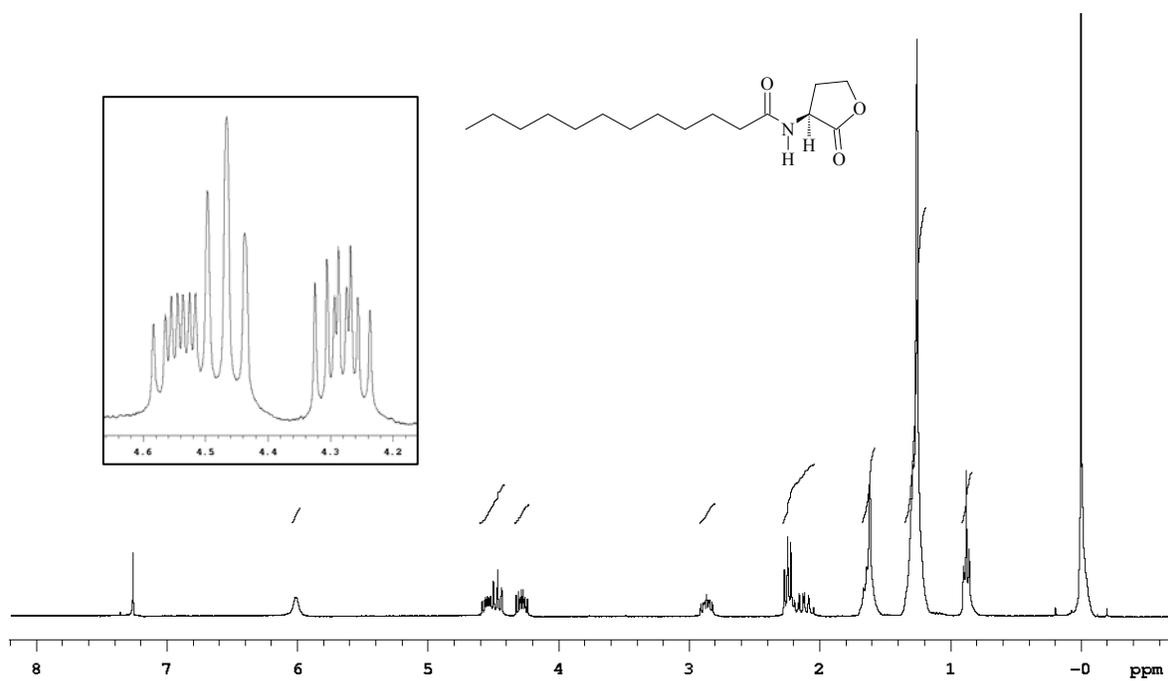
A63. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 e 90° (62,50 MHz, CDCl_3 , TMS) da (\pm)-*N*-dodecanoil-HSL sintética.



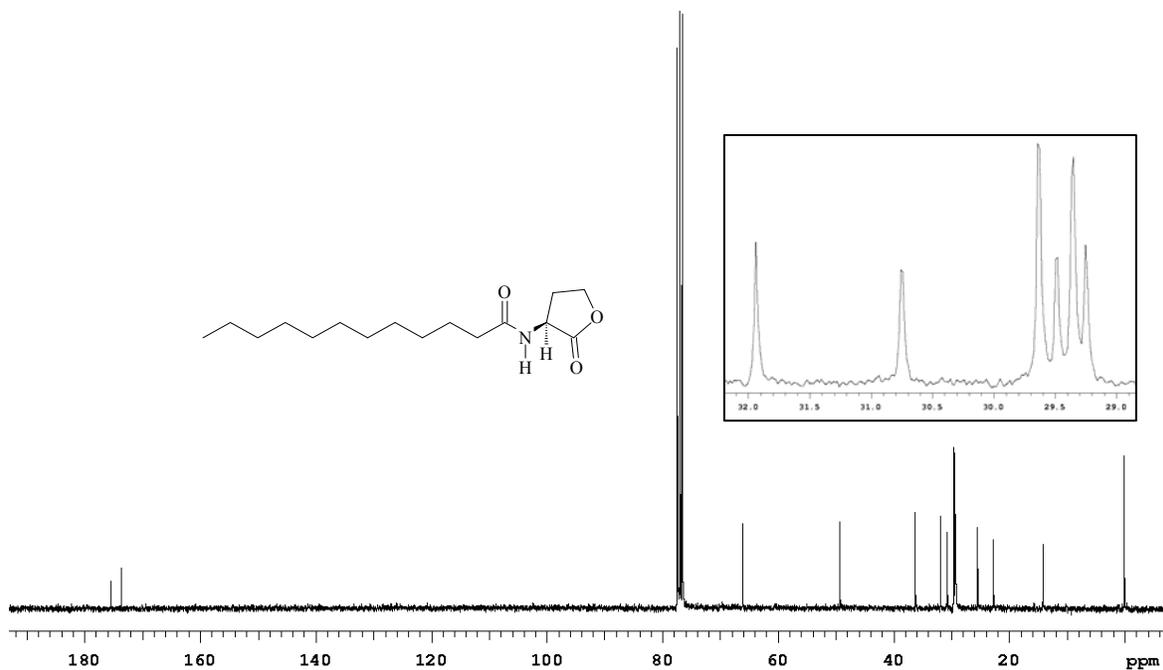
A64. Espectro no infravermelho (KBr) da (*S*)-*N*-dodecanoil-HSL sintética.



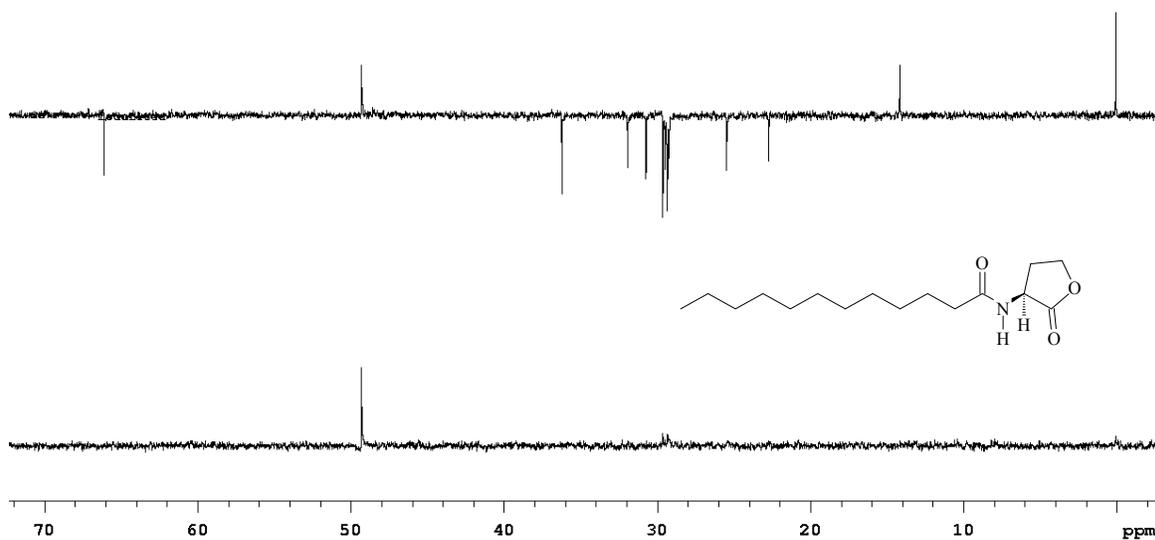
A65. Espectro de massas (IE, 70 eV) da (S)-N-dodecanoil-HSL sintética.



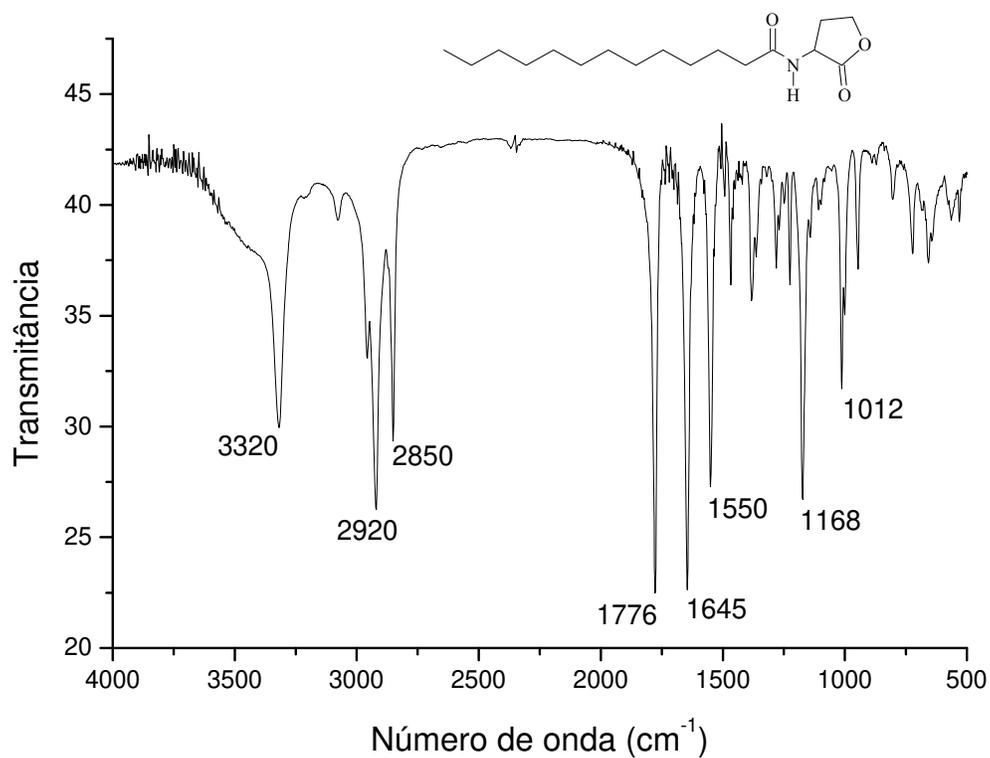
A66. Espectro de RMN de ¹H (300,06 MHz, CDCl₃, TMS) da (S)-N-dodecanoil-HSL sintética.



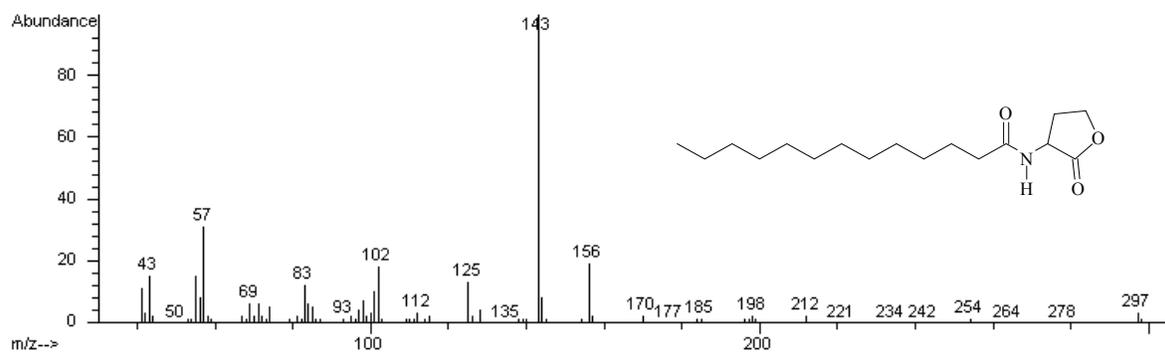
A67. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3 , TMS) da (S)-N-dodecanoil-HSL sintética.



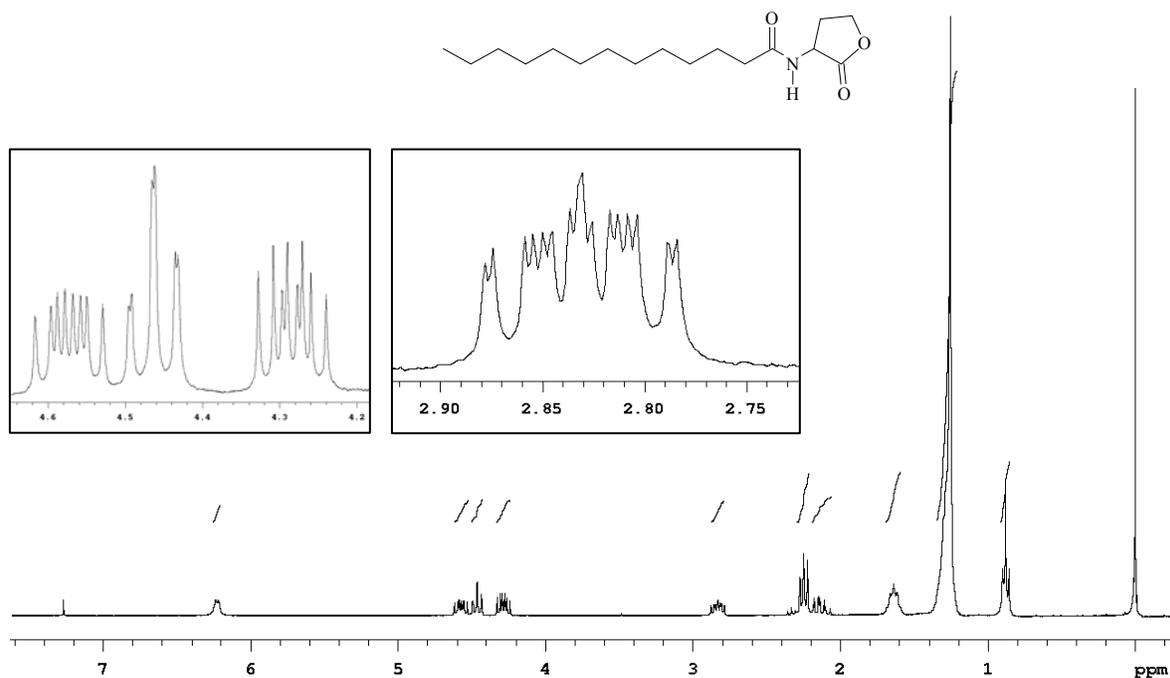
A68. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 e 90° (75,45 MHz, CDCl_3 , TMS) da (S)-N-dodecanoil-HSL sintética.



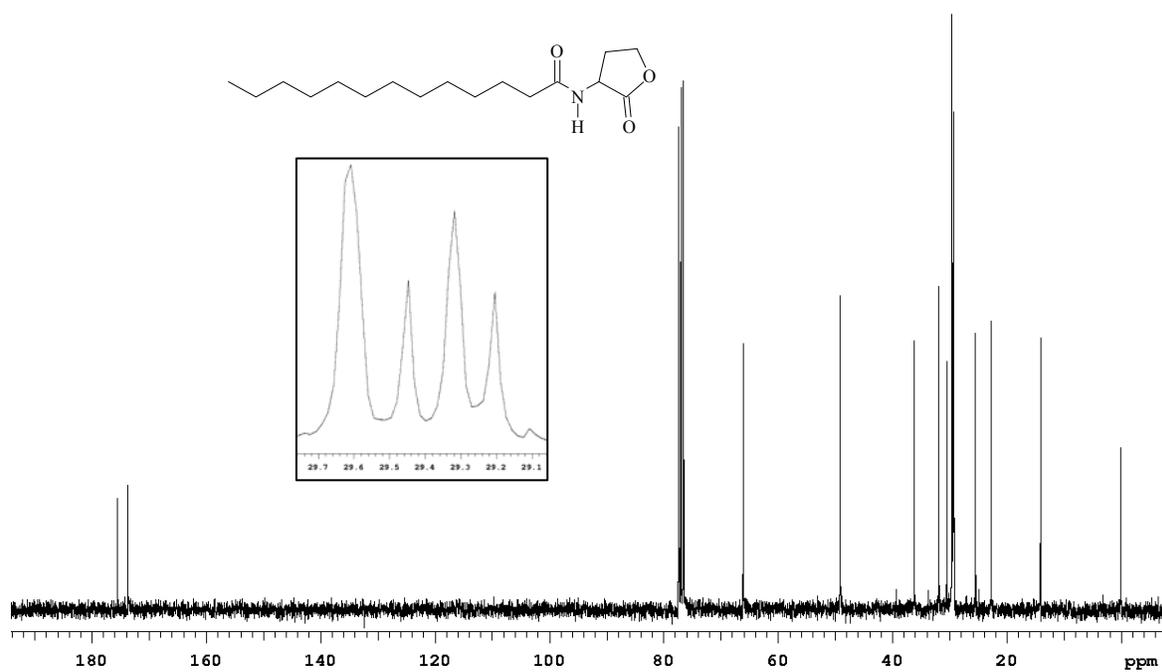
A69. Espectro no infravermelho (KBr) da (±)-*N*-tridecanoil-HSL sintética.



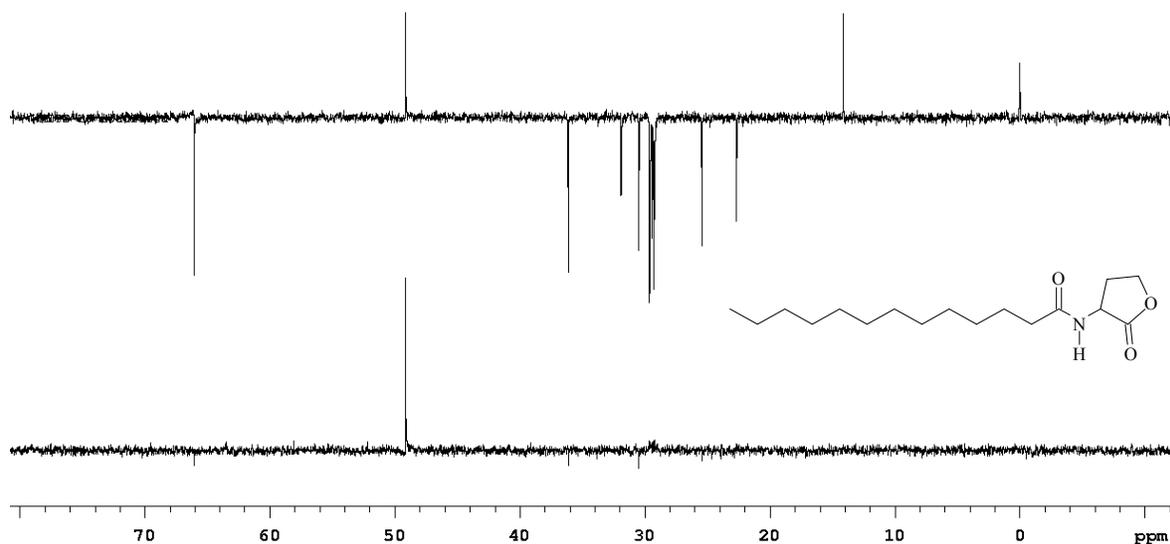
A70. Espectro de massas (IE, 70 eV) da (±)-*N*-tridecanoil-HSL sintética.



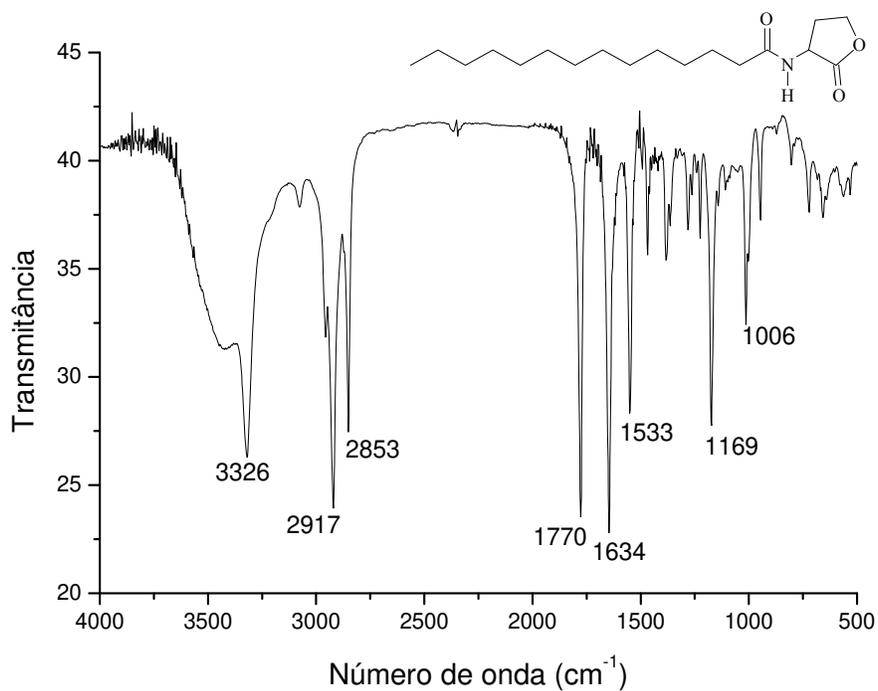
A71. Espectro de RMN de ¹H (300,06 MHz, CDCl₃, TMS) da (±)-*N*-tridecanoil-HSL sintética.



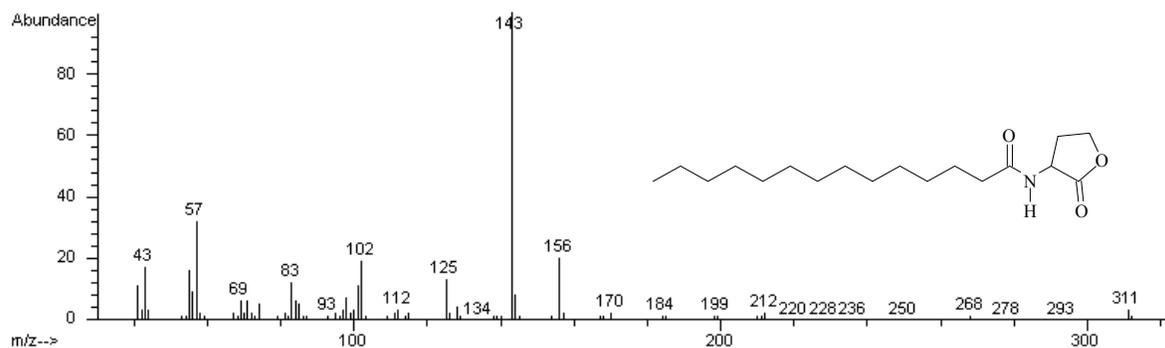
A72. Espectro de RMN de ¹³C (75,45 MHz, CDCl₃, TMS) da (±)-*N*-tridecanoil-HSL sintética.



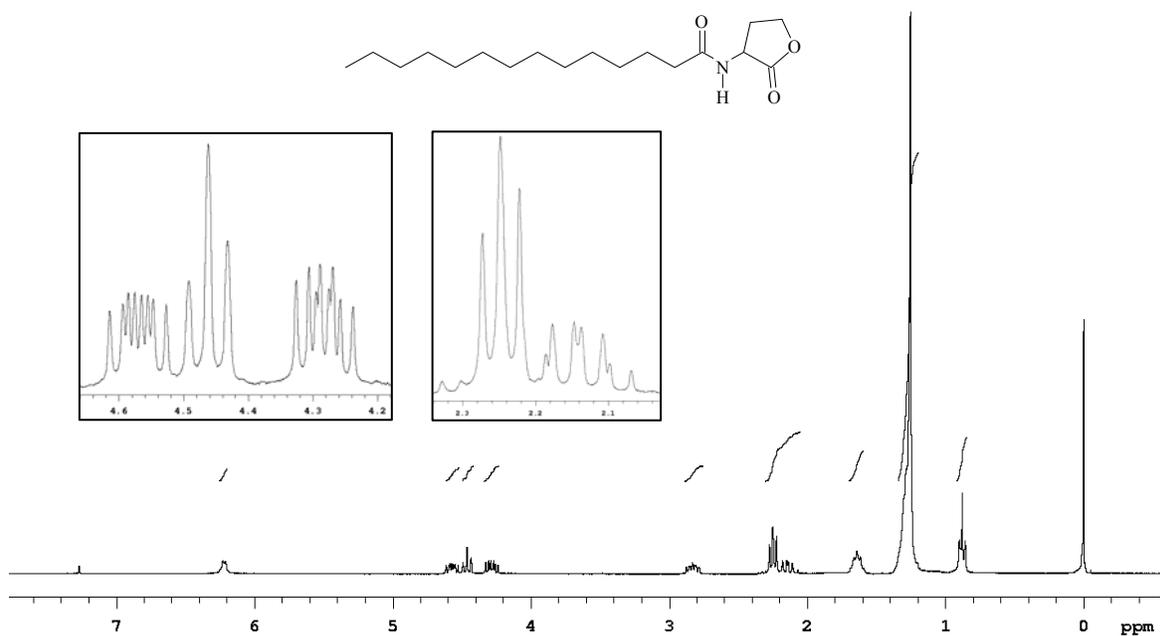
A73. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 e 90° (75,45 MHz, CDCl_3 , TMS) da (\pm)-*N*-tridecanoil-HSL sintética.



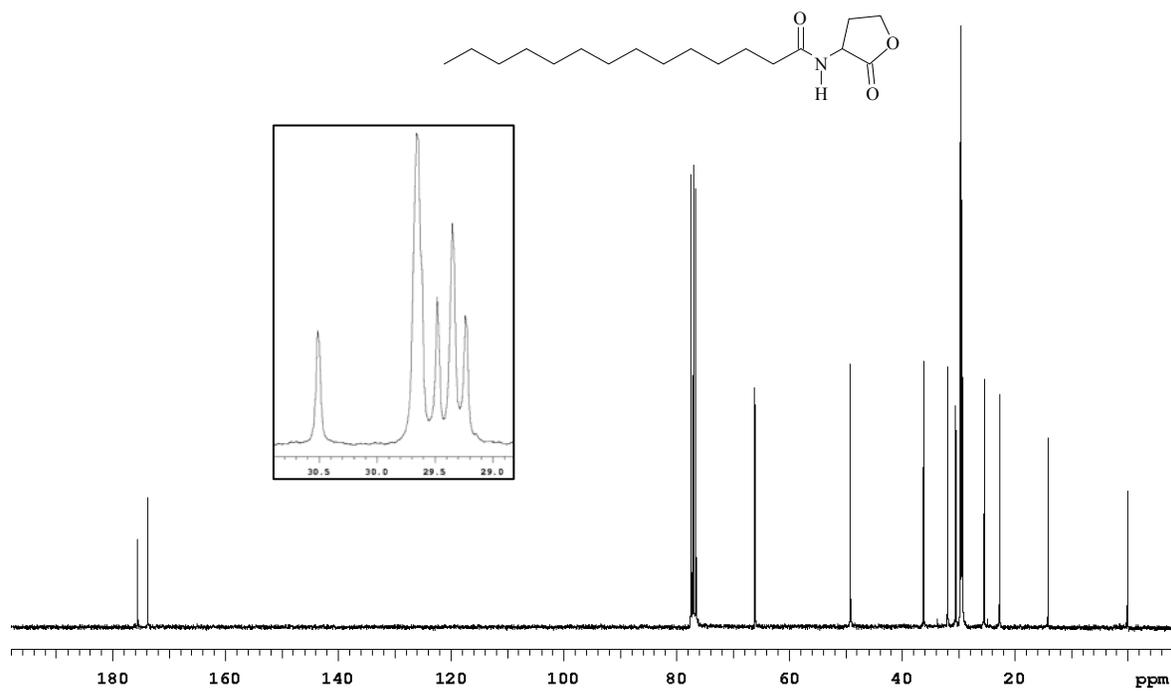
A74. Espectro no infravermelho (KBr) da (\pm)-*N*-tetradecanoil-HSL sintética.



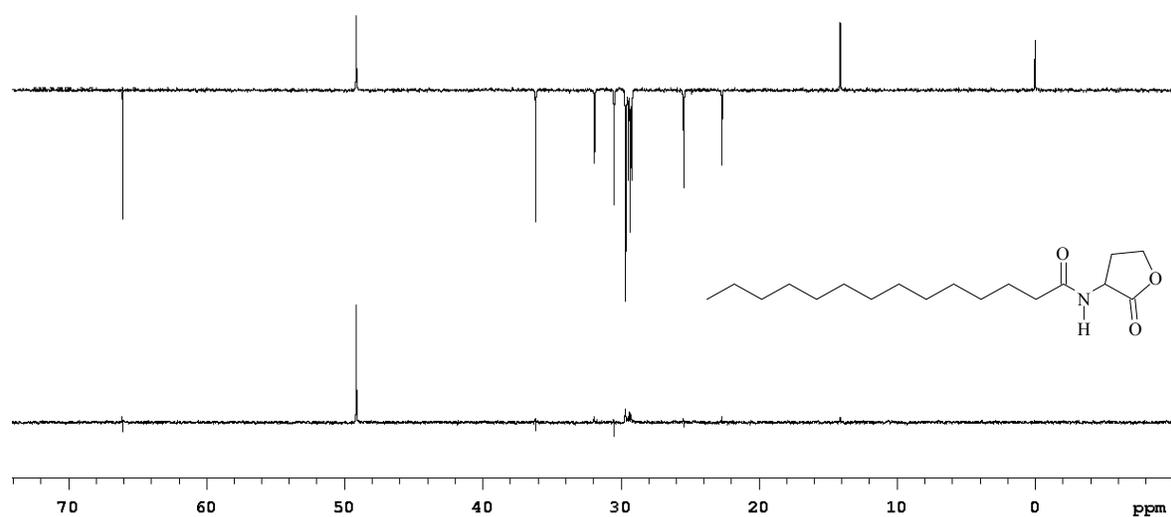
A75. Espectro de massas (IE, 70 eV) da (±)-*N*-tetradecanoil-HSL sintética.



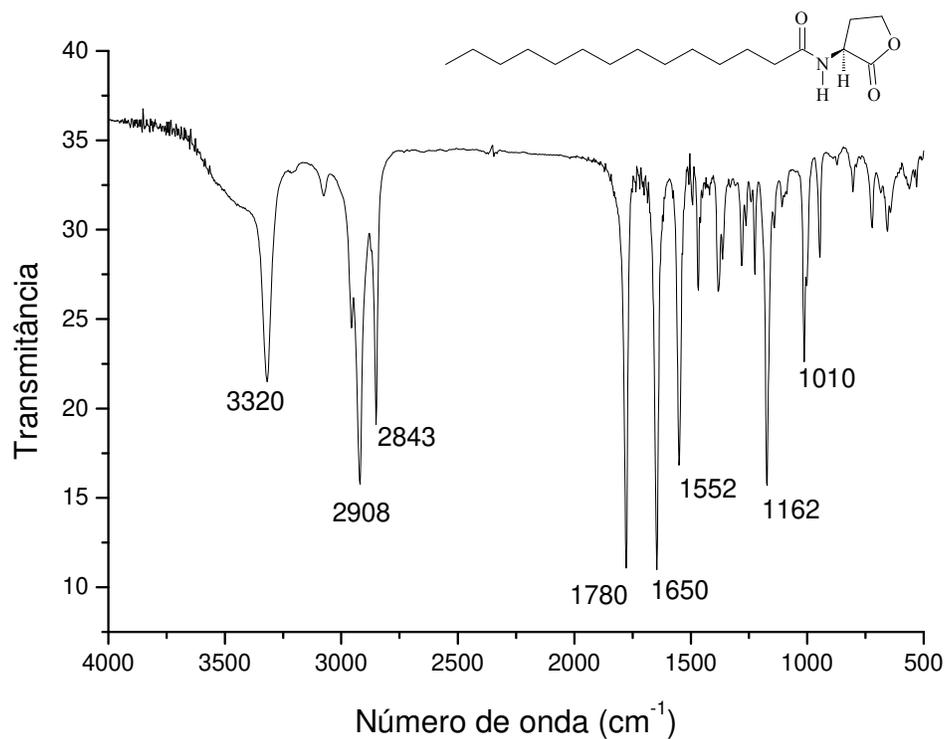
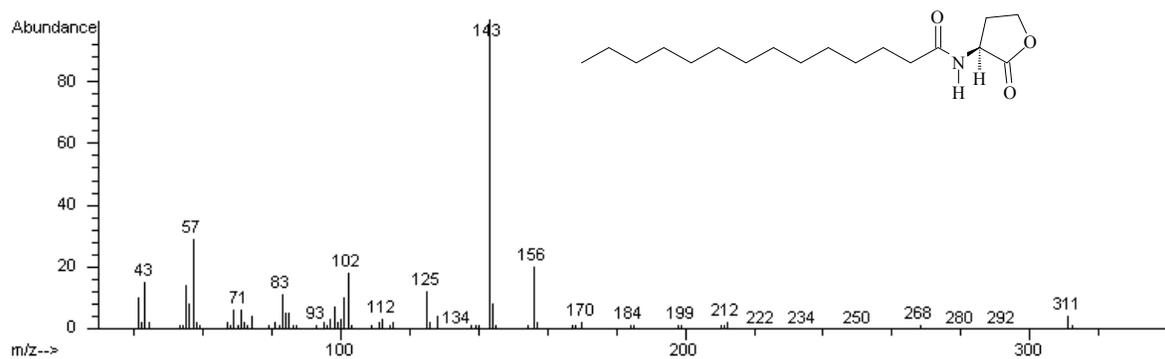
A76. Espectro de RMN de ¹H (300,06 MHz, CDCl₃, TMS) da (±)-*N*-tetradecanoil-HSL sintética.

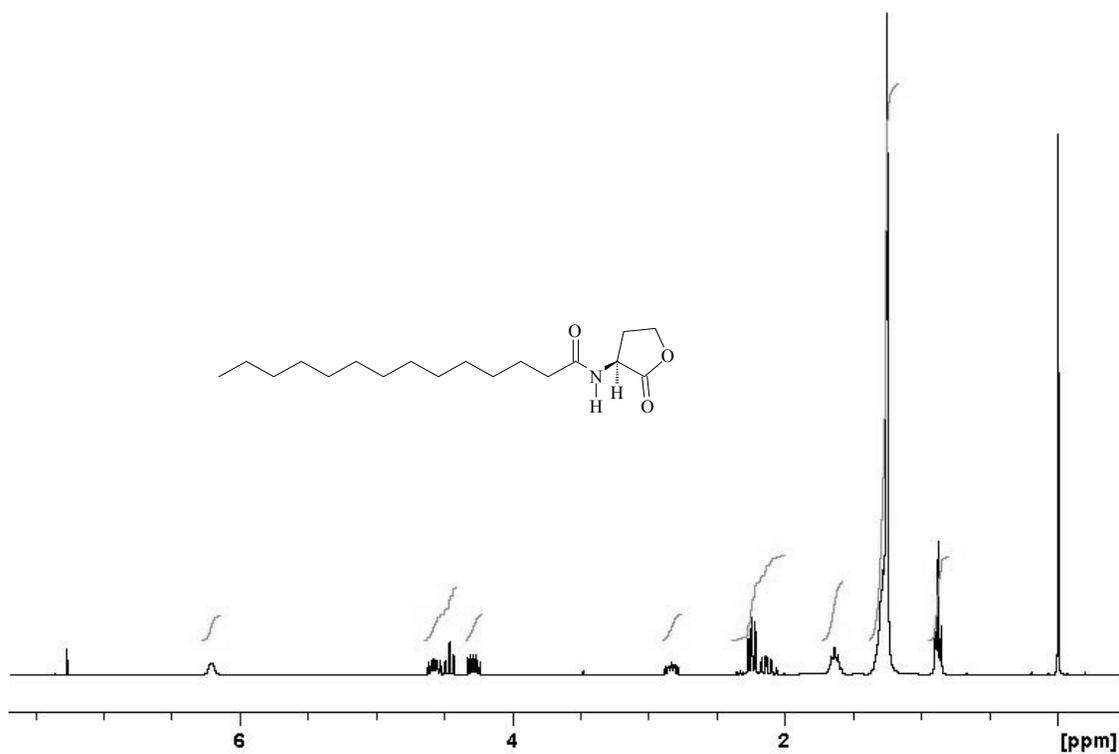


A77. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3 , TMS) da (\pm) -N-tetradecanoil-HSL sintética.

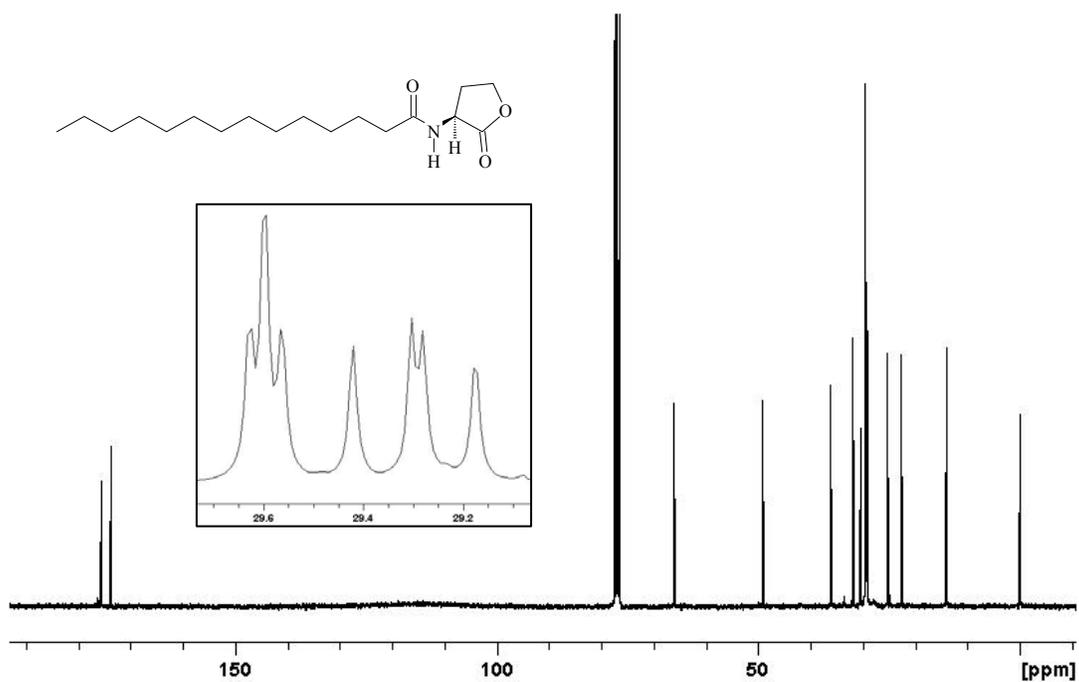


A78. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 e 90° (75,45 MHz, CDCl_3 , TMS) da (\pm) -N-tetradecanoil-HSL sintética.

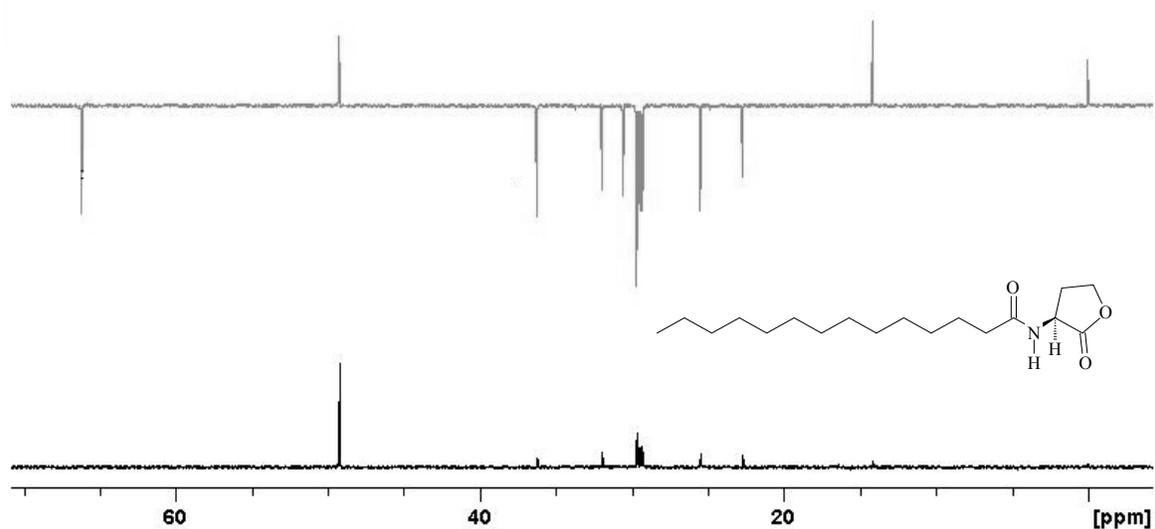
A79. Espectro no infravermelho (KBr) da (*S*)-*N*-tetradecanoil-HSL sintética.A80. Espectro de massas (IE, 70 eV) da (*S*)-*N*-tetradecanoil-HSL sintética.



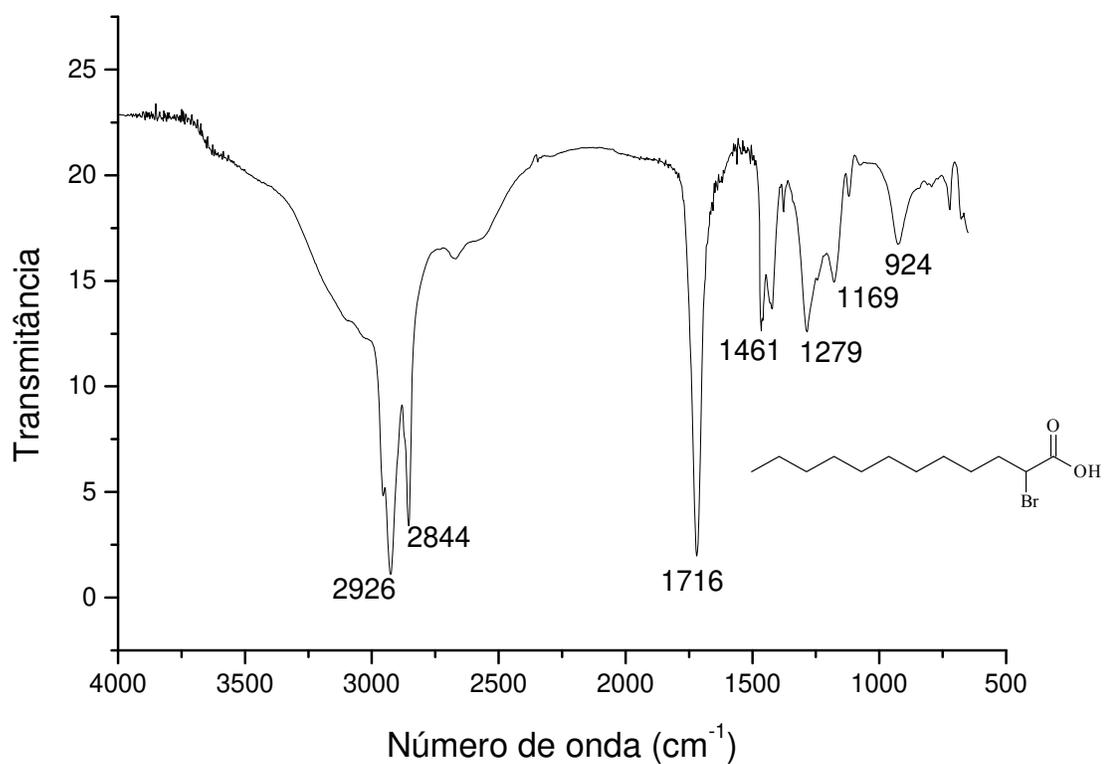
A81. Espectro de RMN de ¹H (300,06 MHz, CDCl₃, TMS) da (*S*)-*N*-tetradecanoil-HSL sintética.



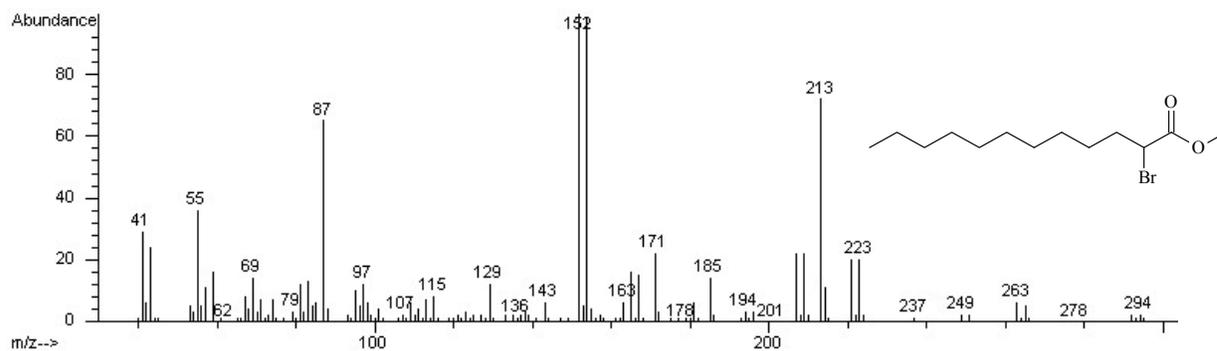
A82. Espectro de RMN de ¹³C (75,45 MHz, CDCl₃, TMS) da (*S*)-*N*-tetradecanoil-HSL sintética.



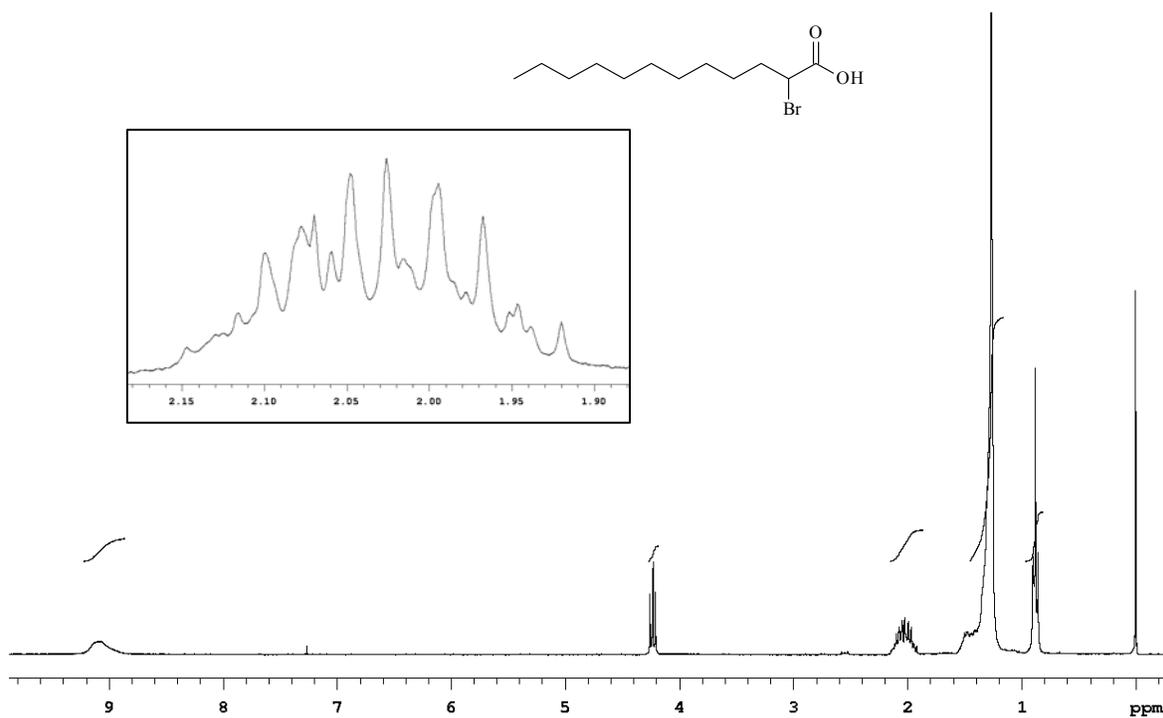
A83. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 e 90° (75,45 MHz, CDCl_3 , TMS) da (S)-N-tetradecanoil-HSL sintética.



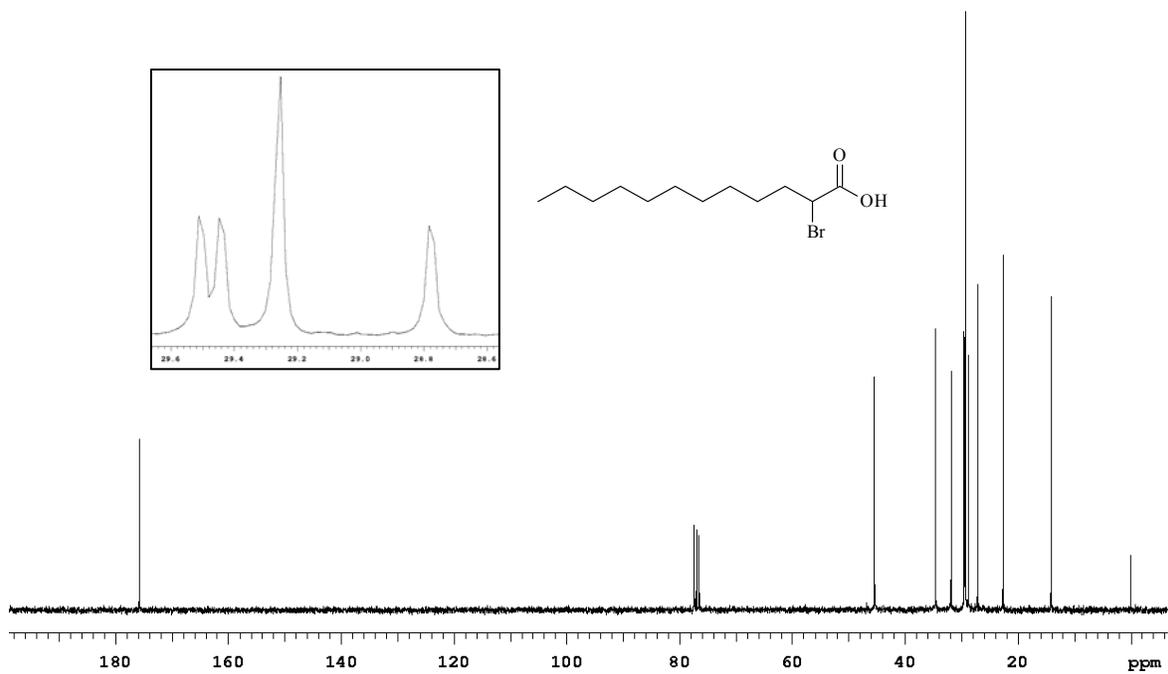
A84. Espectro no infravermelho (KBr) do ácido 2-bromo-dodecanoico.



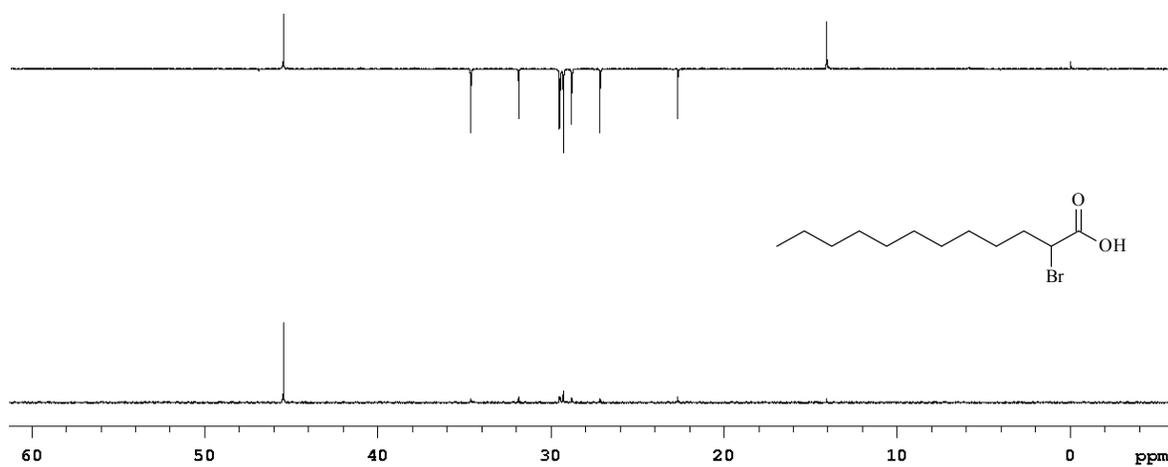
A85. Espectro de massas (IE, 70 eV) do 2-bromo-dodecanoato de metila.



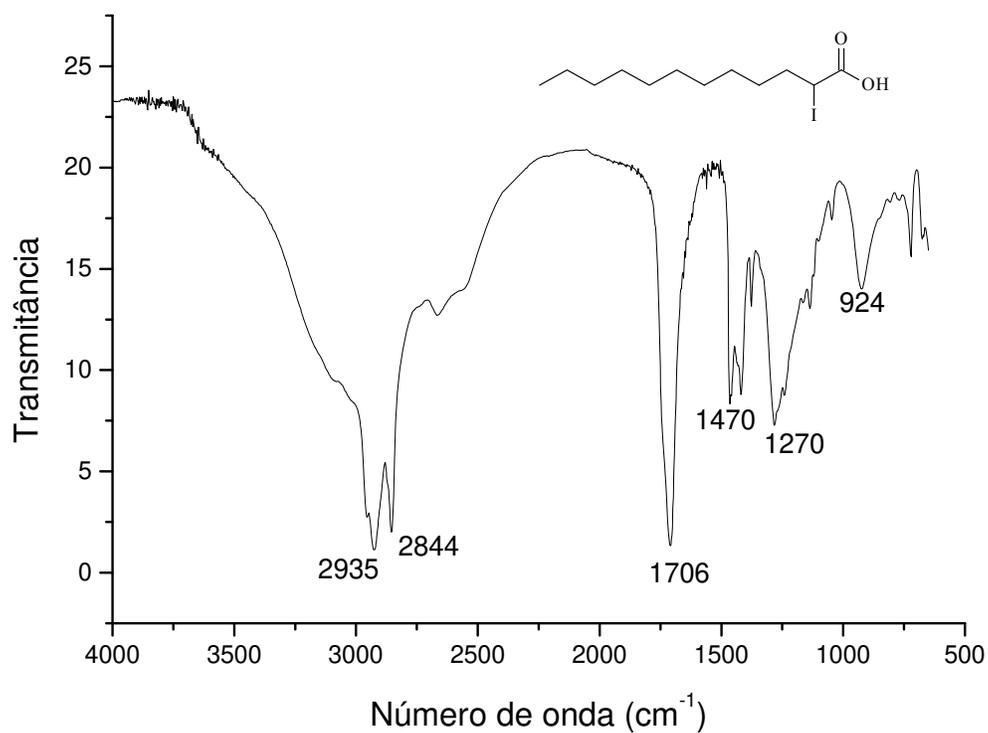
A86. Espectro de RMN de ¹H (300,06 MHz, CDCl₃, TMS) do ácido 2-bromo-dodecanóico.



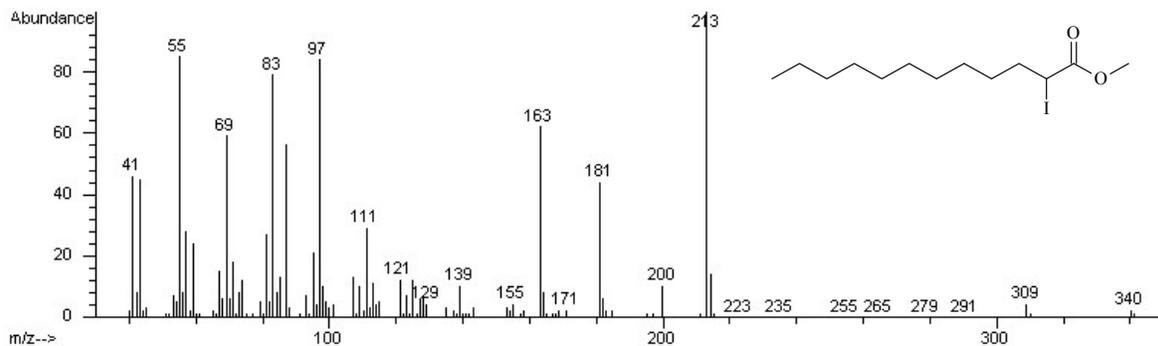
A87. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl₃, TMS) do ácido 2-bromo-dodecanóico.



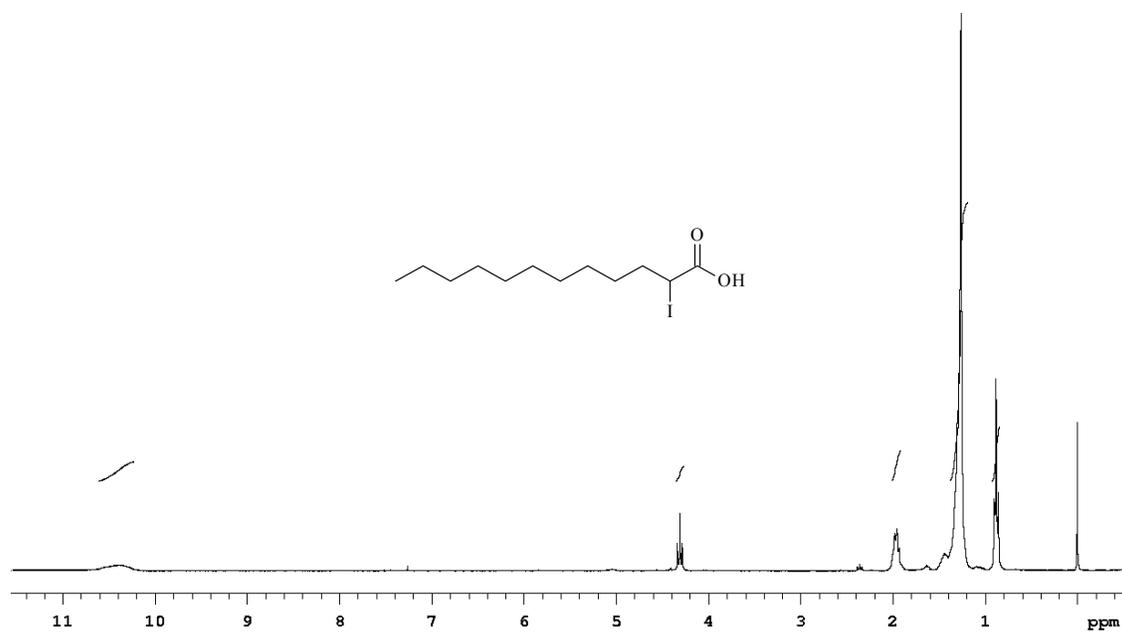
A88. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 e 90° (75,45 MHz, CDCl₃, TMS) do ácido 2-bromo-dodecanóico.



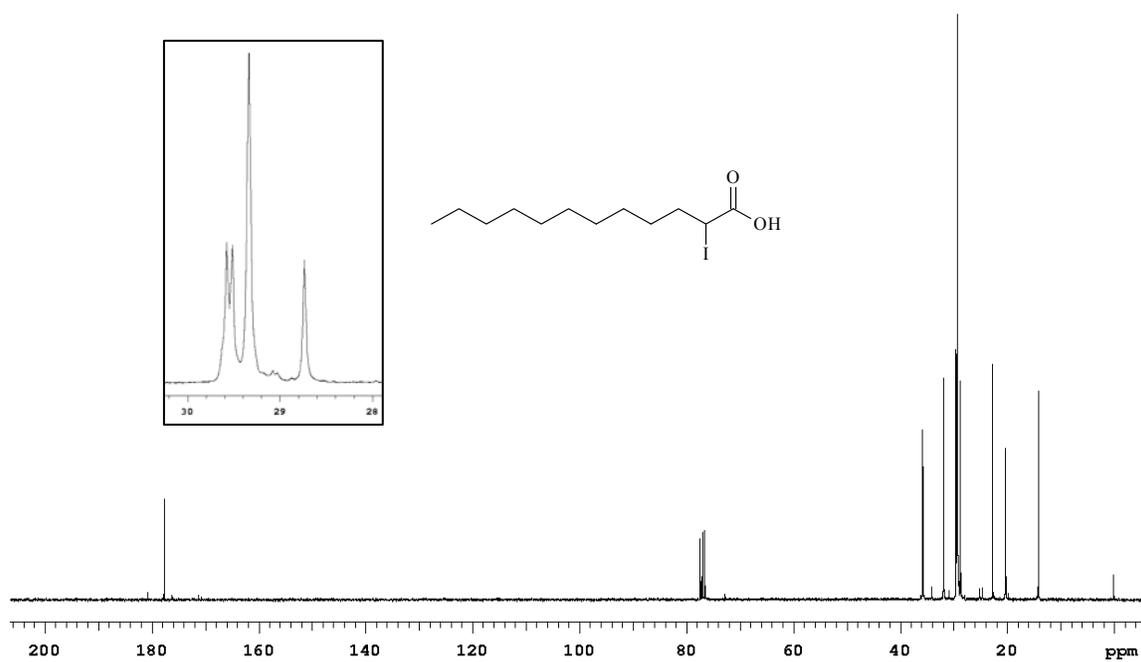
A89. Espectro no infravermelho (KBr) do ácido 2-iodo-dodecanóico.



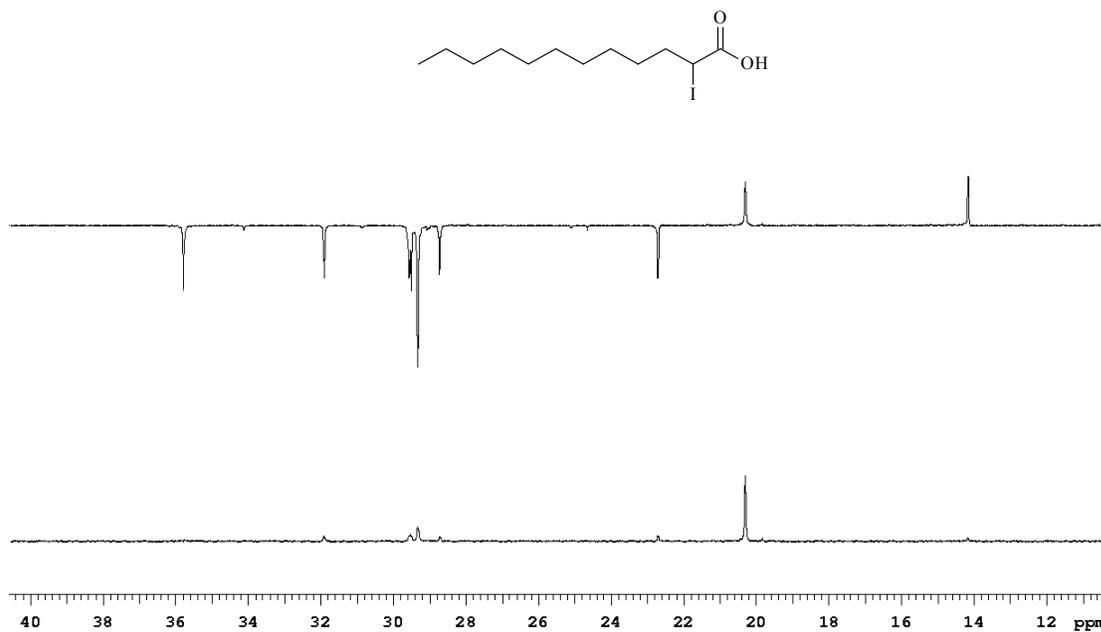
A90. Espectro de massas (IE, 70 eV) do 2-iodo-dodecanoato de metila.



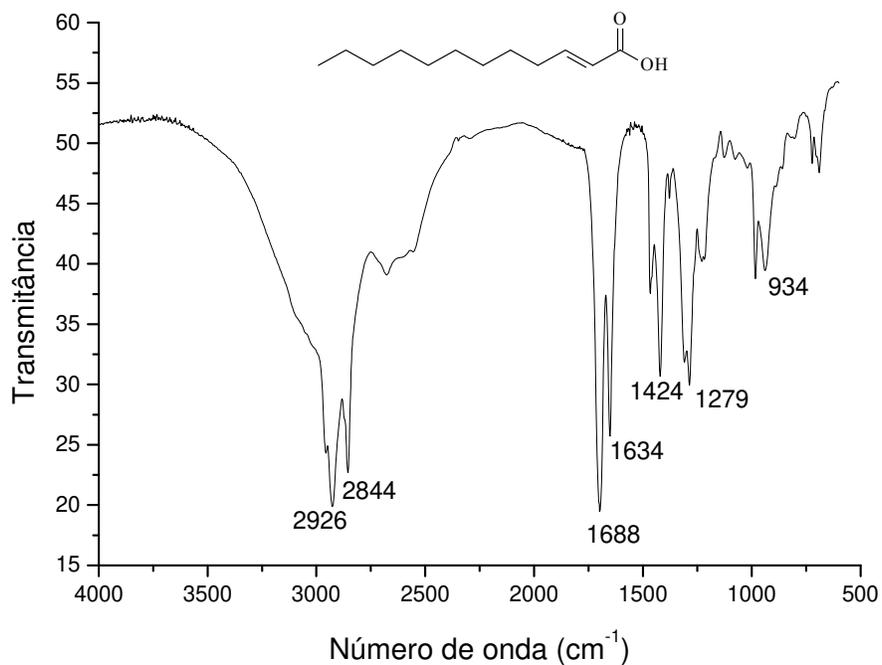
A91. Espectro de RMN de ¹H (300,06 MHz, CDCl₃, TMS) do ácido 2-iodo-dodecanóico.



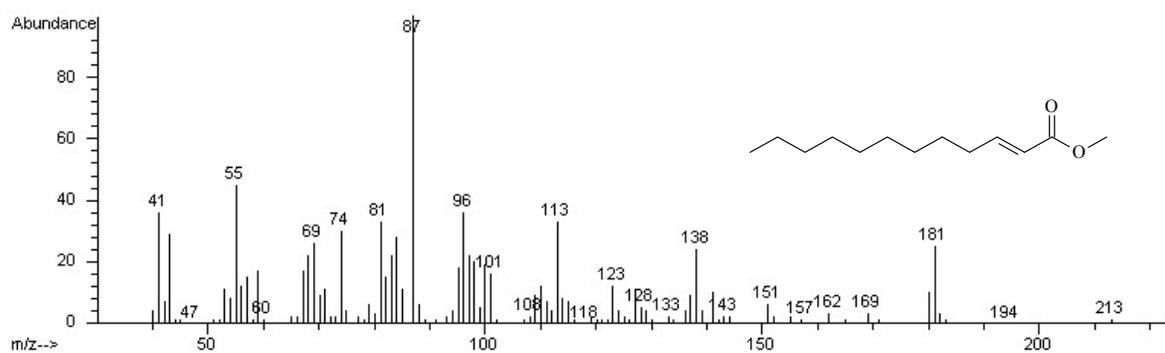
A92. Espectro de RMN de ¹³C (75,45 MHz, CDCl₃, TMS) do ácido 2-iodo-dodecanóico.



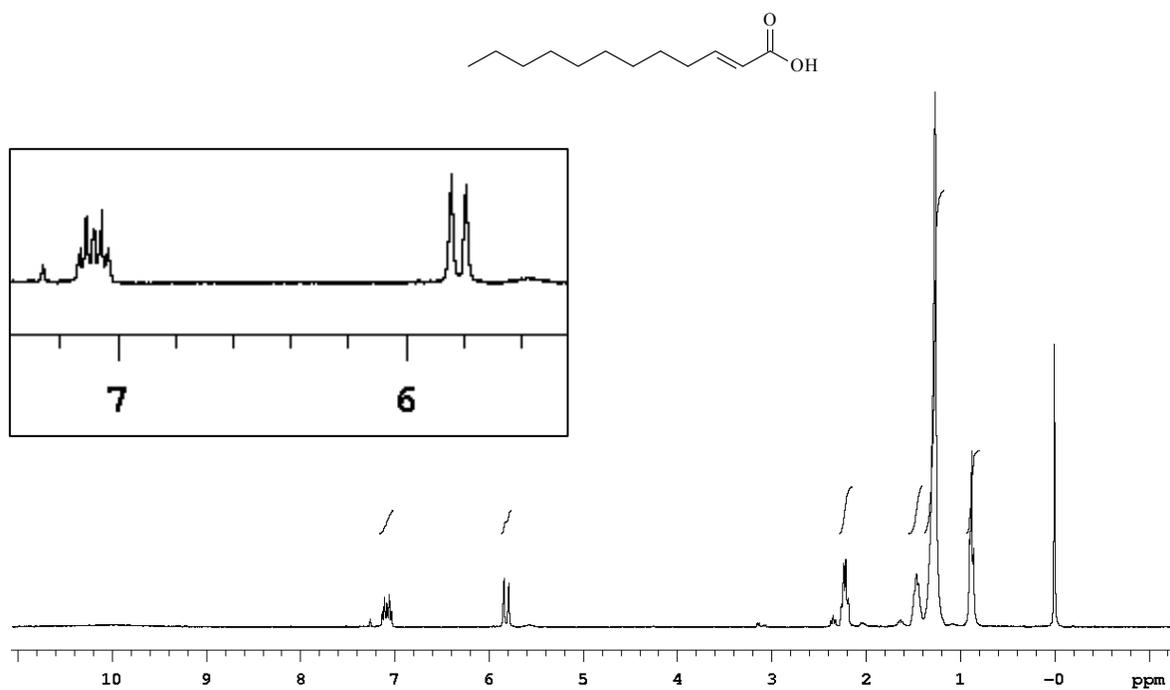
A93. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 e 90° (75,45 MHz, CDCl_3 , TMS) do ácido 2-iodo-dodecanóico.

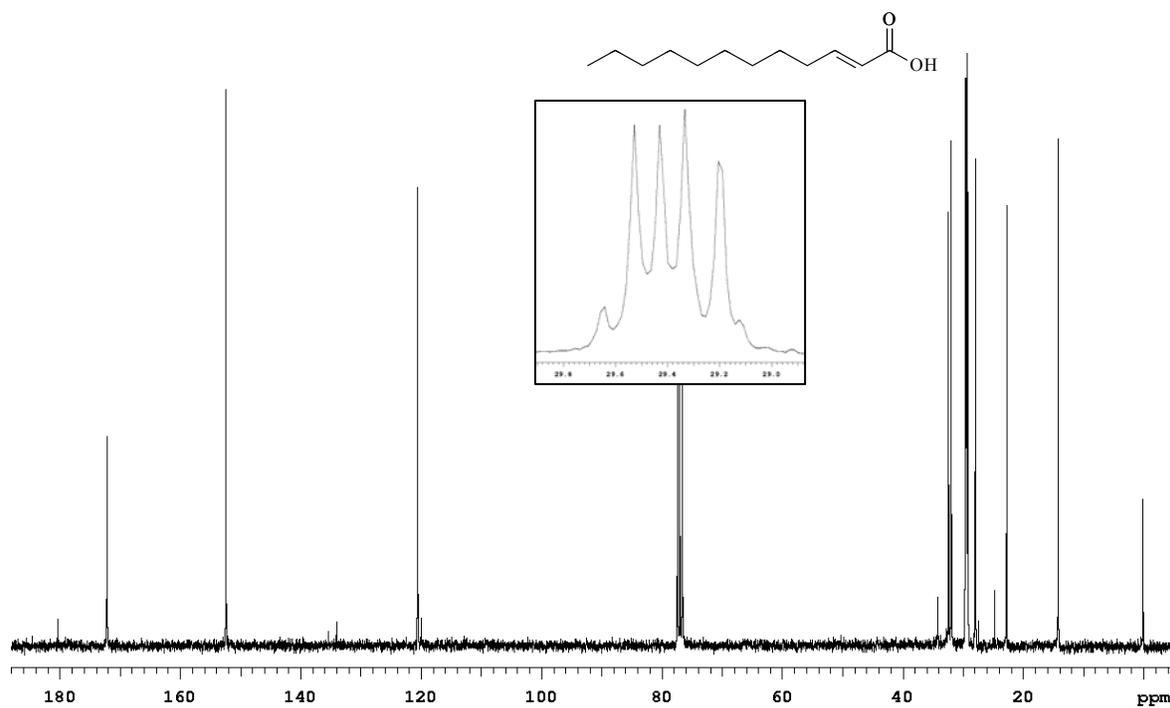


A94. Espectro no infravermelho (filme) do ácido (2E)-dodecenóico.

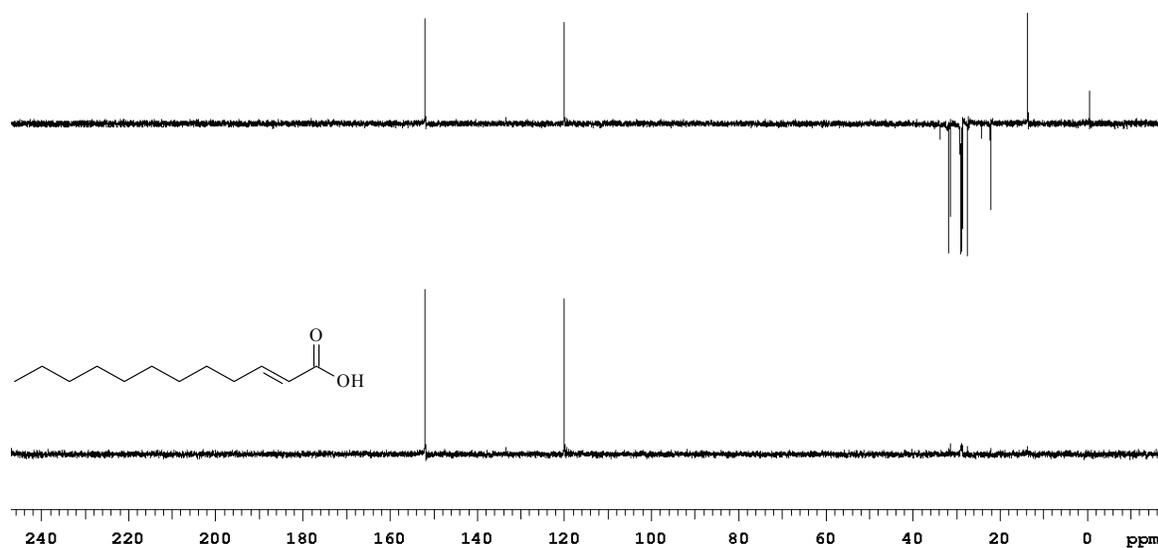


A95. Espectro de massas (IE, 70 eV) do (2E)-dodecenoato de metila.

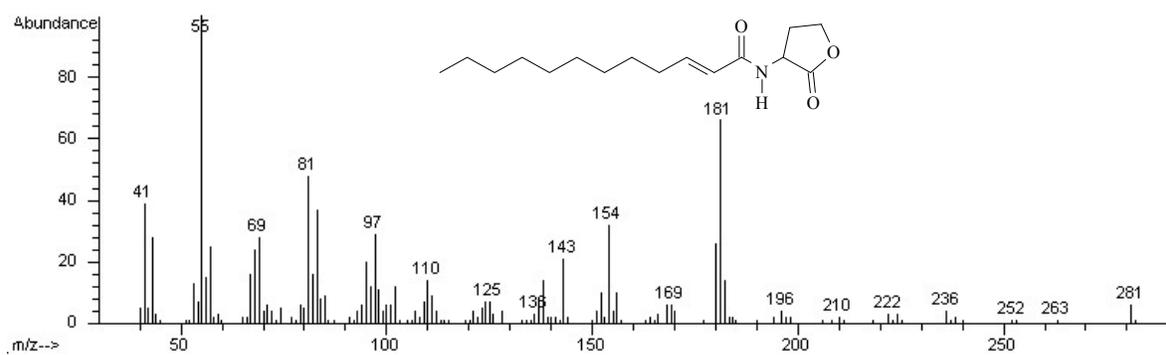
A96. Espectro de RMN de ¹H (300,06 MHz, CDCl₃, TMS) do ácido (2E)-dodecenóico.



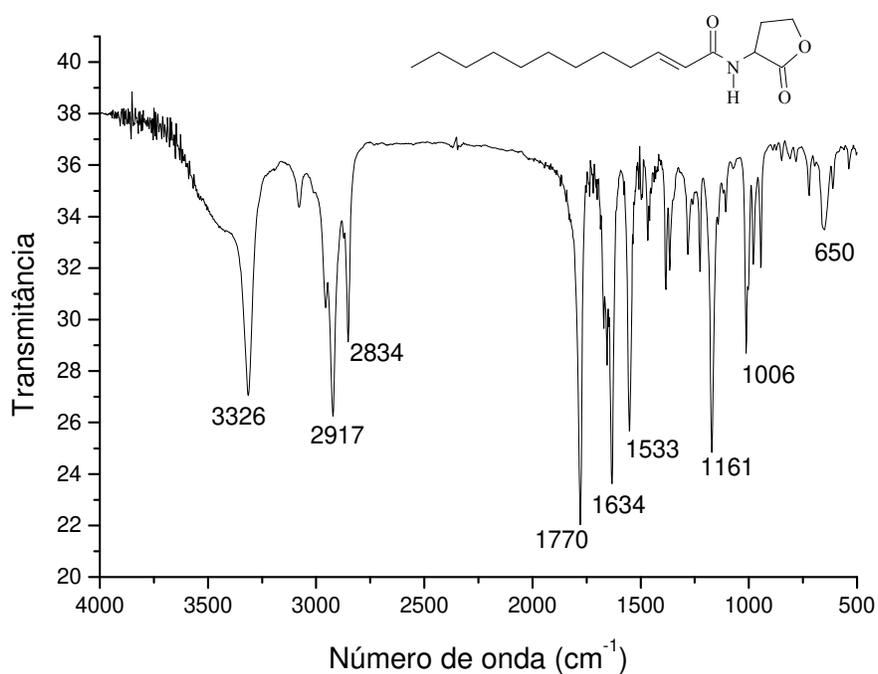
A97. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3 , TMS) do ácido (2E)-dodecenóico.



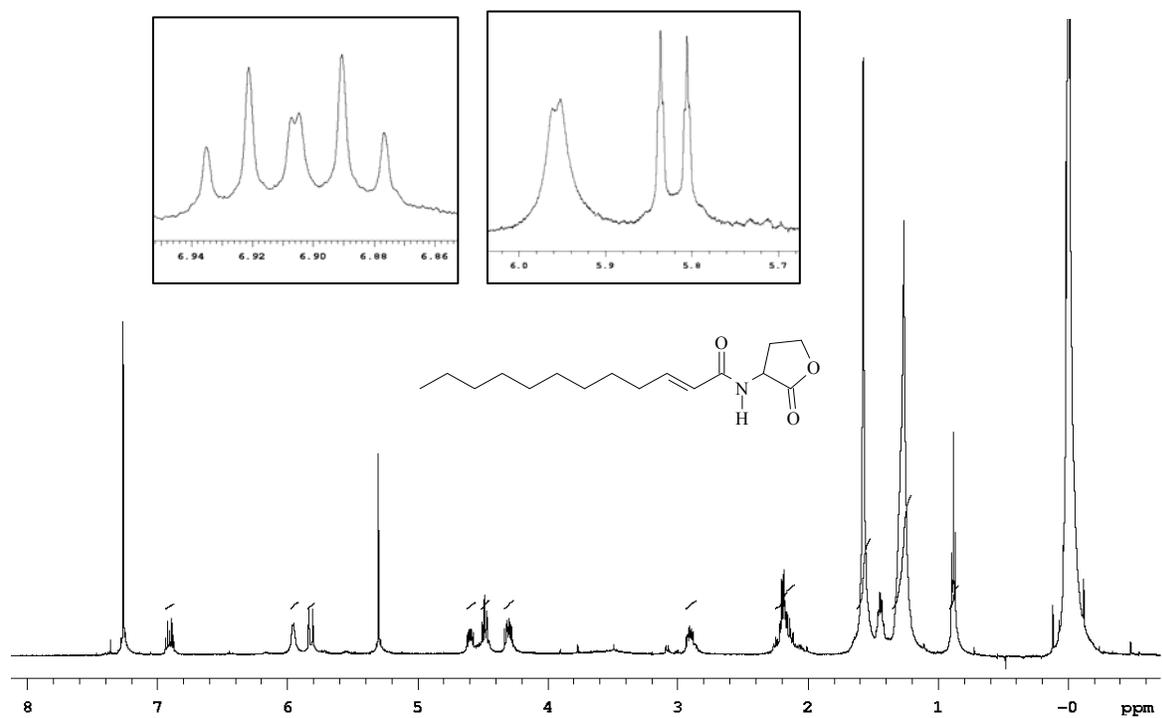
A98. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 e 90° (75,45 MHz, CDCl_3 , TMS) do ácido (2E)-dodecenóico.



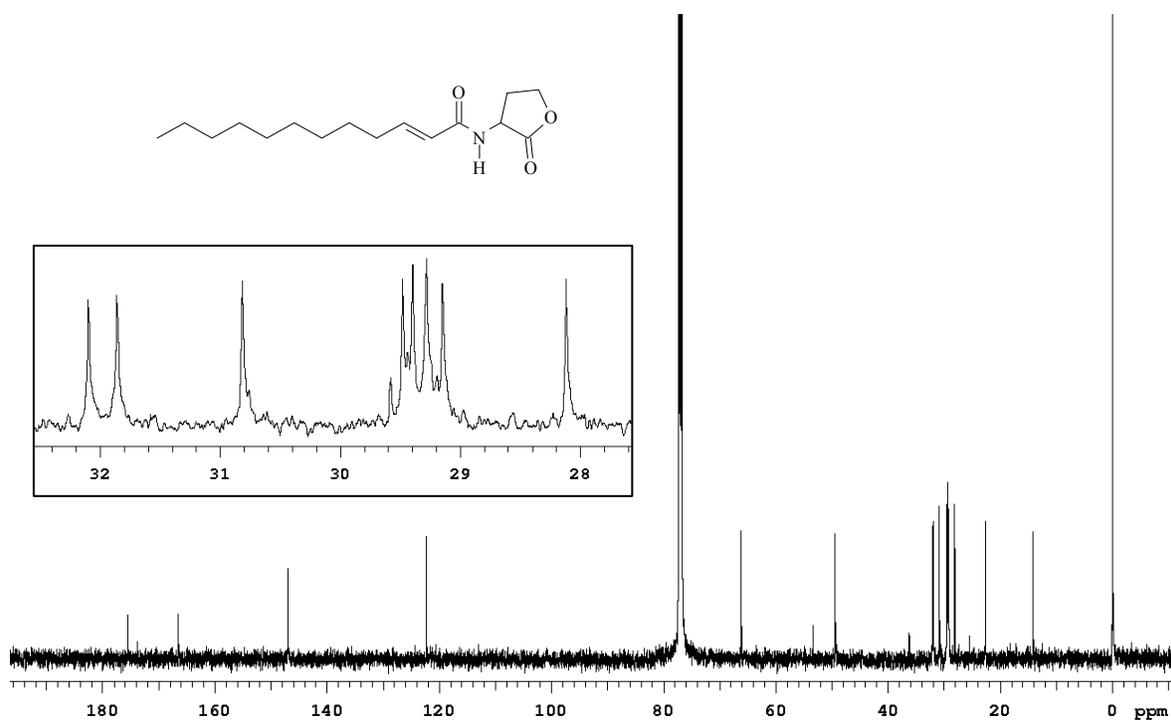
A99. Espectro de massas (IE, 70 eV) da (±)-N-(2E)-dodecenoil-HSL sintética.



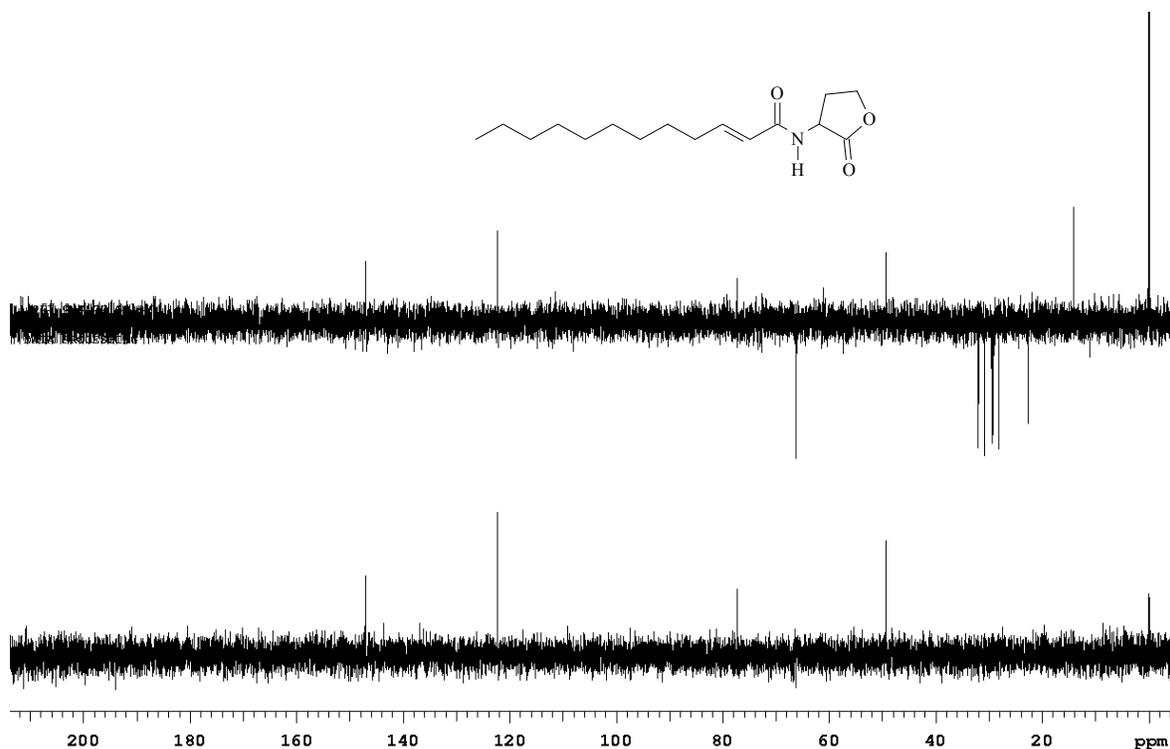
A100. Espectro no infravermelho (KBr) da (±)-N-(2E)-dodecenoil-HSL sintética.



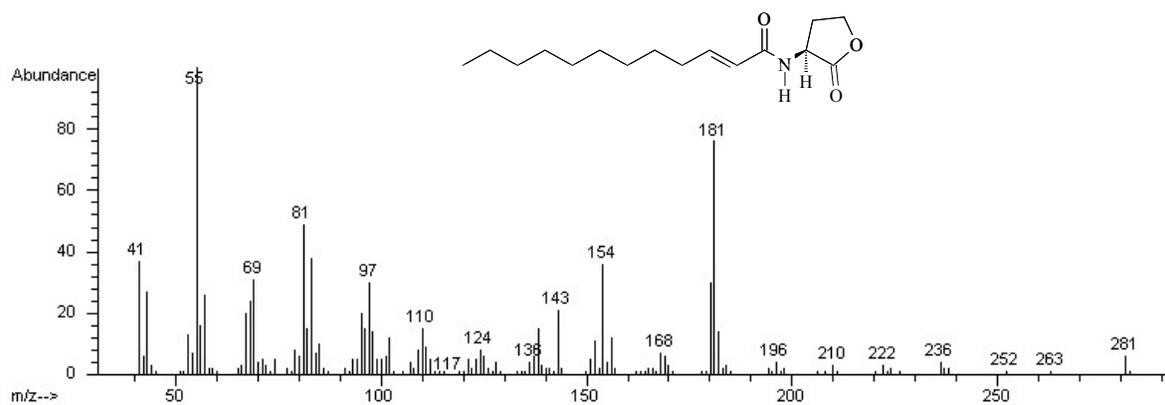
A101. Espectro de RMN de ¹H (499,88 MHz, CDCl₃, TMS) da (±)-*N*-(2*E*)-dodecenoil-HSL sintética.



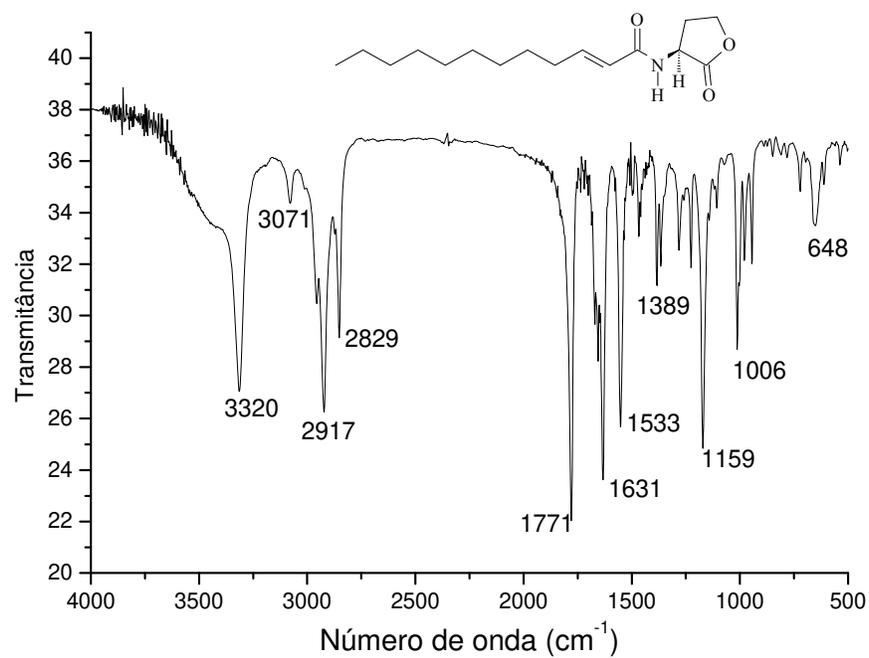
A102. Espectro de RMN de ¹³C (125,69 MHz, CDCl₃, TMS) da (±)-*N*-(2*E*)-dodecenoil-HSL sintética.



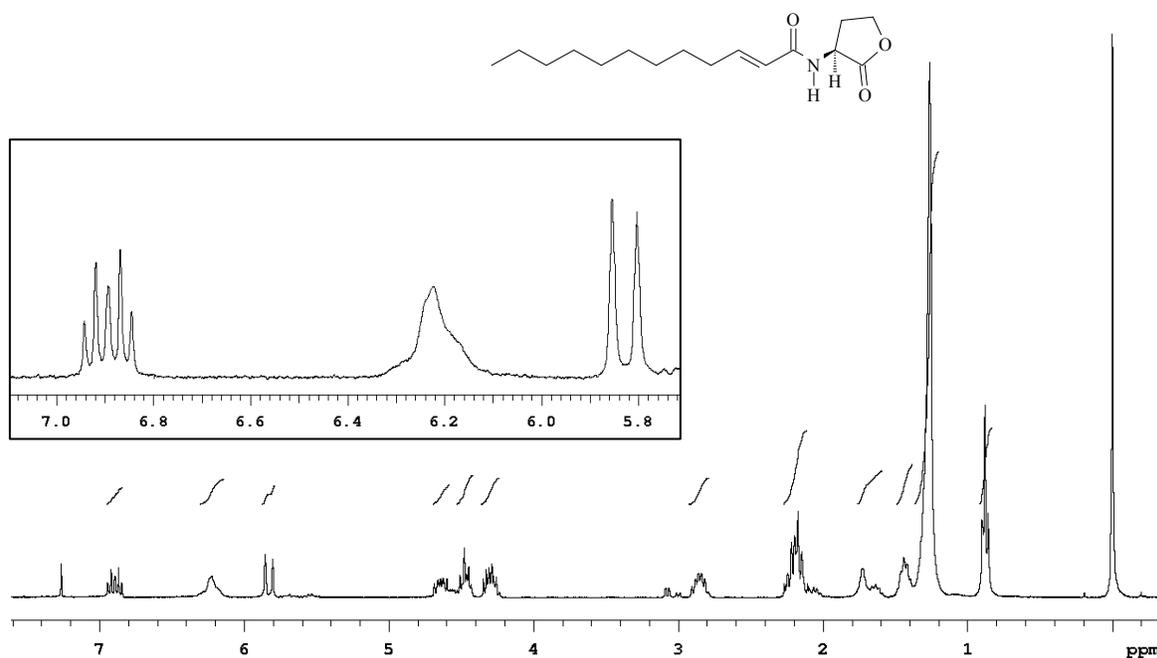
A103. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 e 90° (125,69 MHz, CDCl_3 , TMS) da (\pm) -*N*-(2*E*)-dodecenoil-HSL sintética.



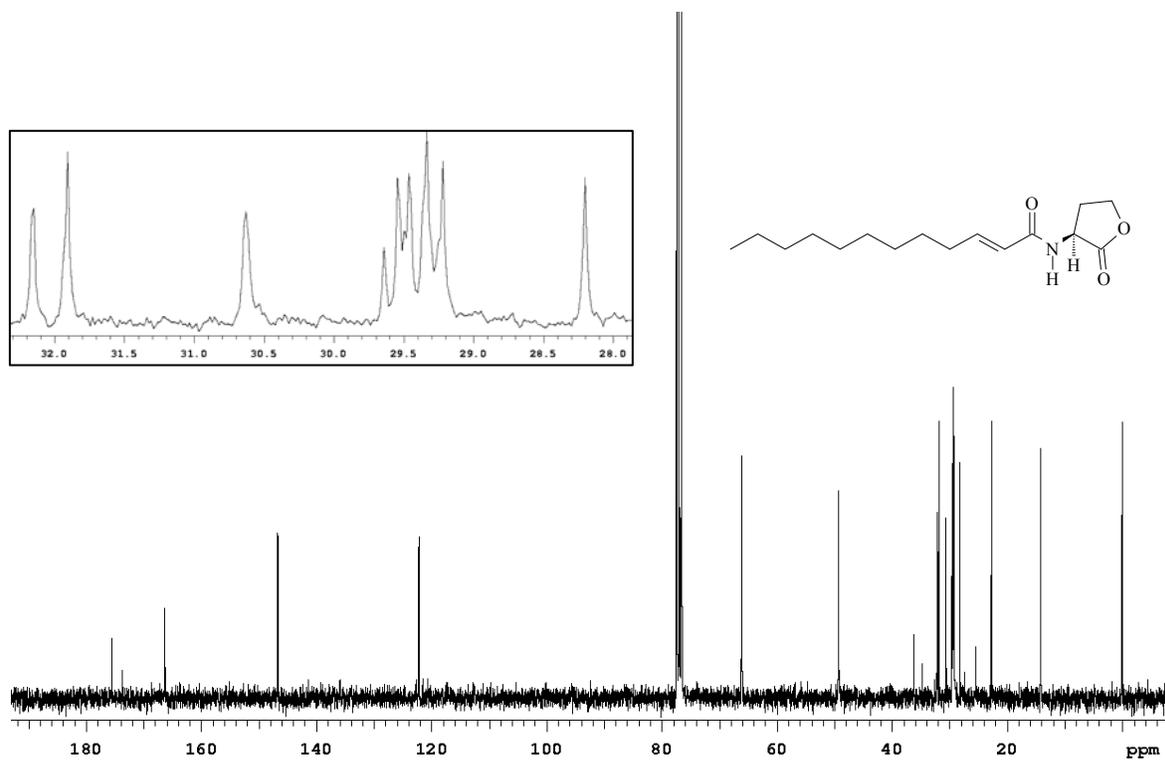
A104. Espectro de massas (IE, 70 eV) da *(S)*-*N*-(2*E*)-dodecenoil-HSL sintética.



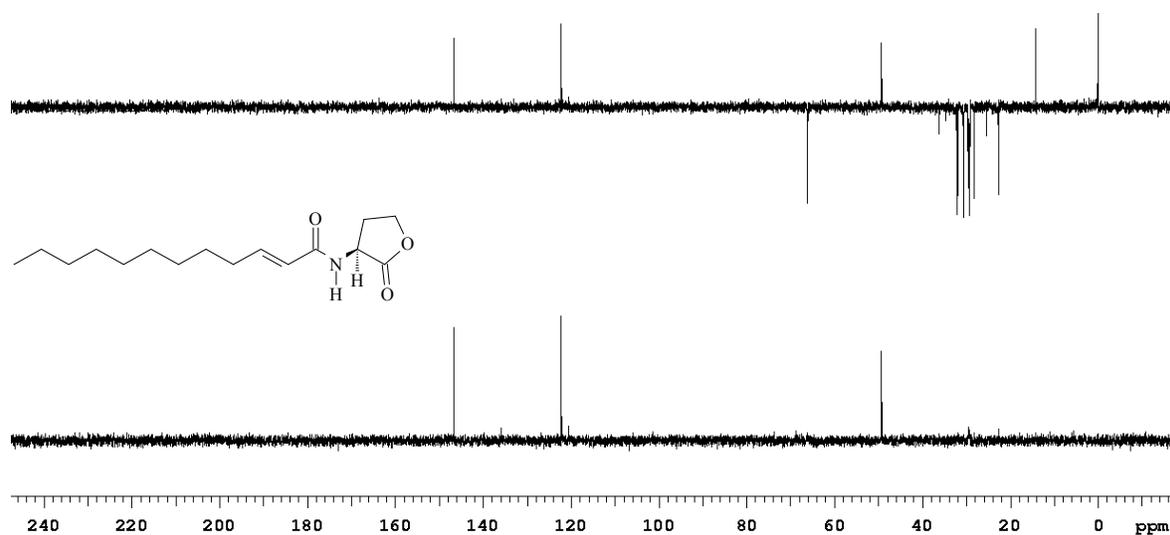
A105. Espectro no infravermelho (KBr) da (*S*)-*N*-(2*E*)-dodecenoil-HSL sintética.



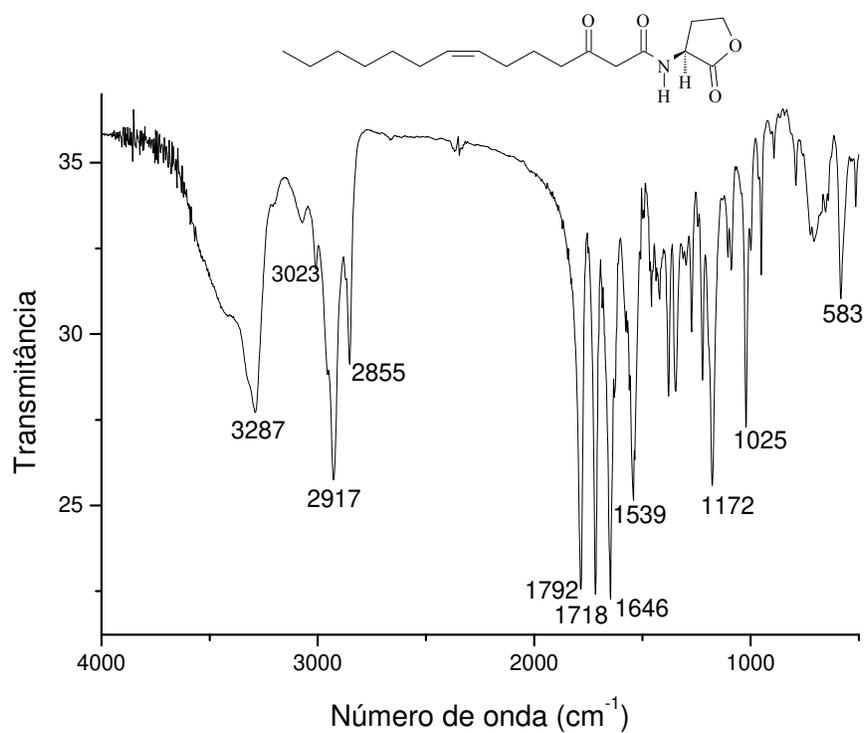
A106. Espectro de RMN de ¹H (300,06 MHz, CDCl₃, TMS) da (*S*)-*N*-(2*E*)-dodecenoil-HSL sintética.



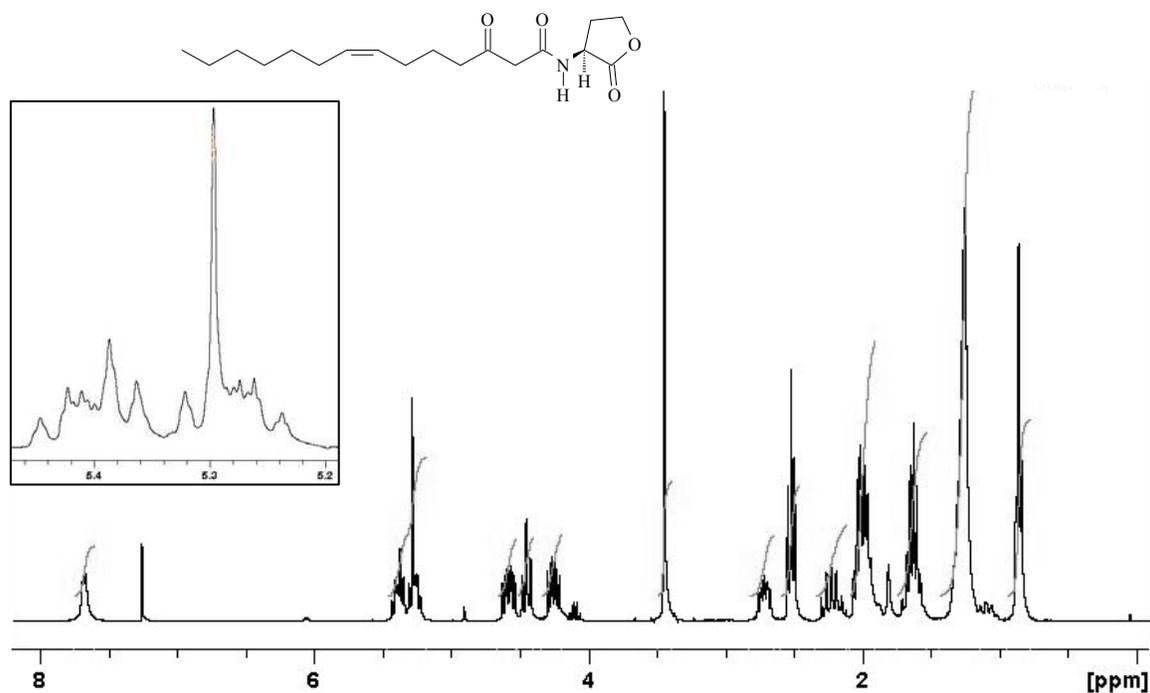
A107. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3 , TMS) da (S) - N -($2E$)-dodecenoil-HSL sintética.



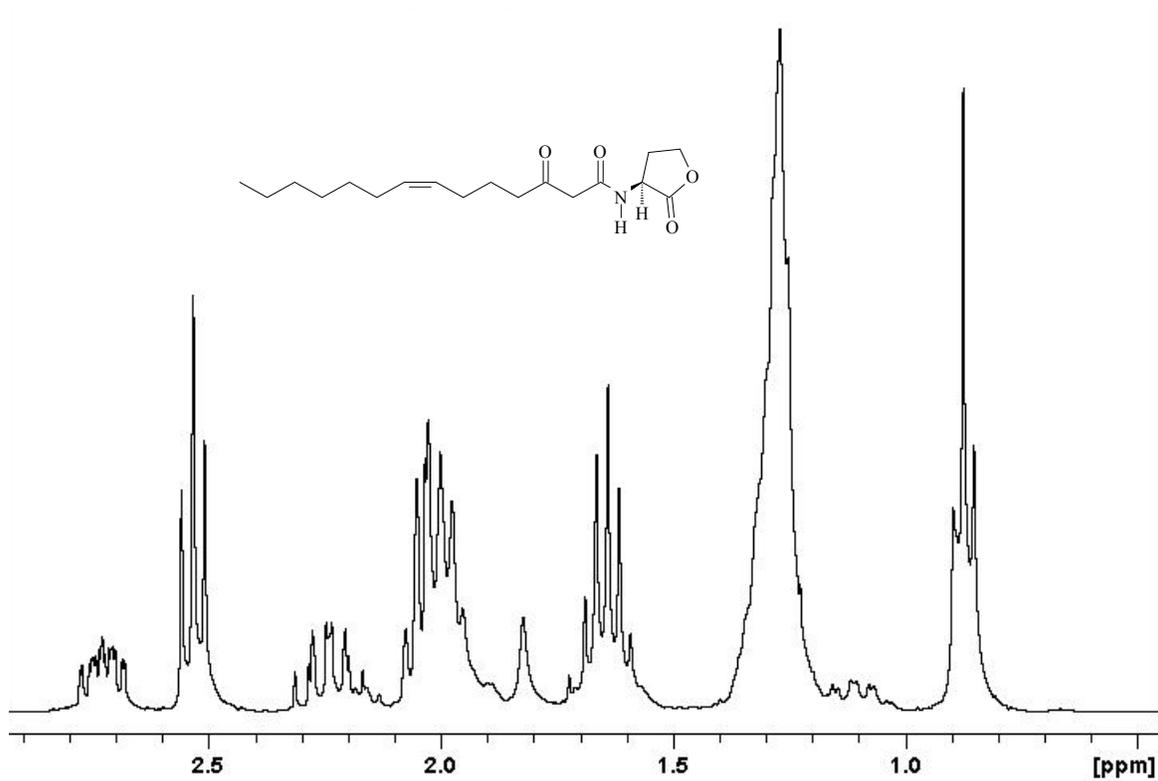
A108. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 e 90° (75,45 MHz, CDCl_3 , TMS) da (S) - N -($2E$)-dodecenoil-HSL sintética.



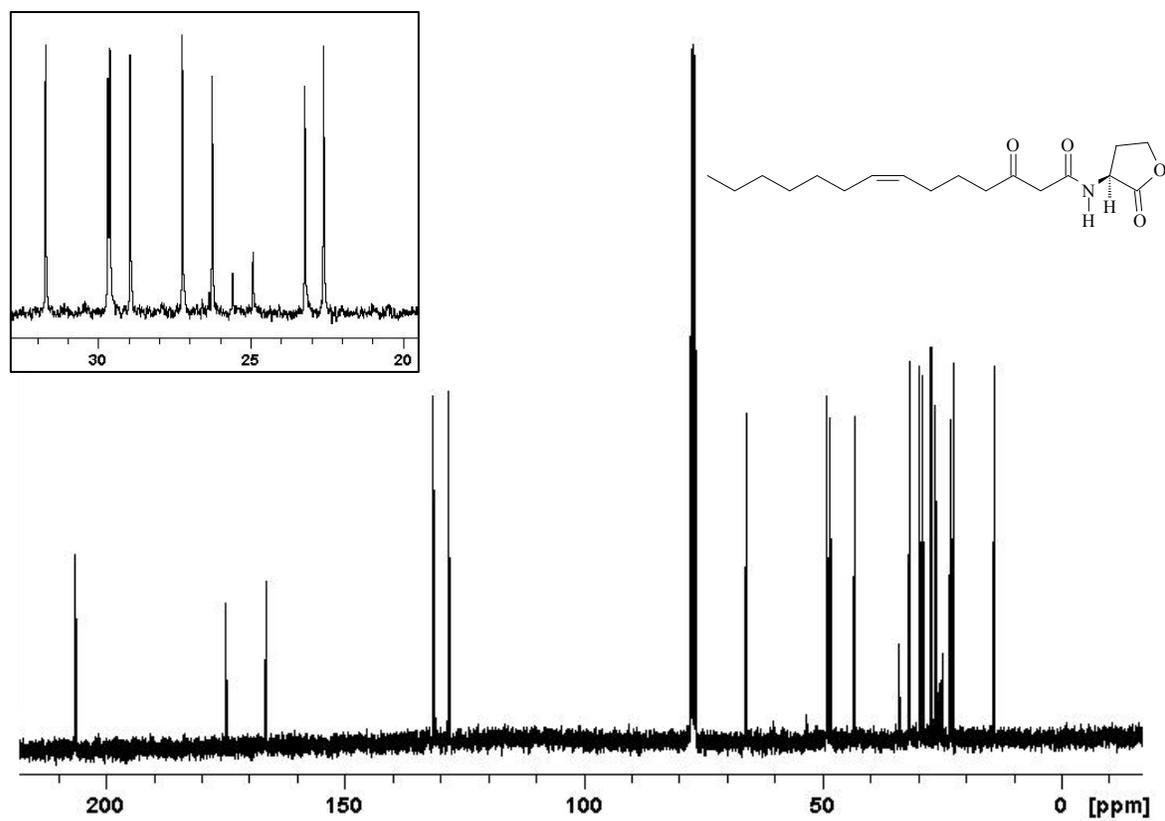
A109. Espectro no infravermelho (KBr) da (*S*)-*N*-(7*Z*)-3-oxo-tetradecenoil-HSL sintética.



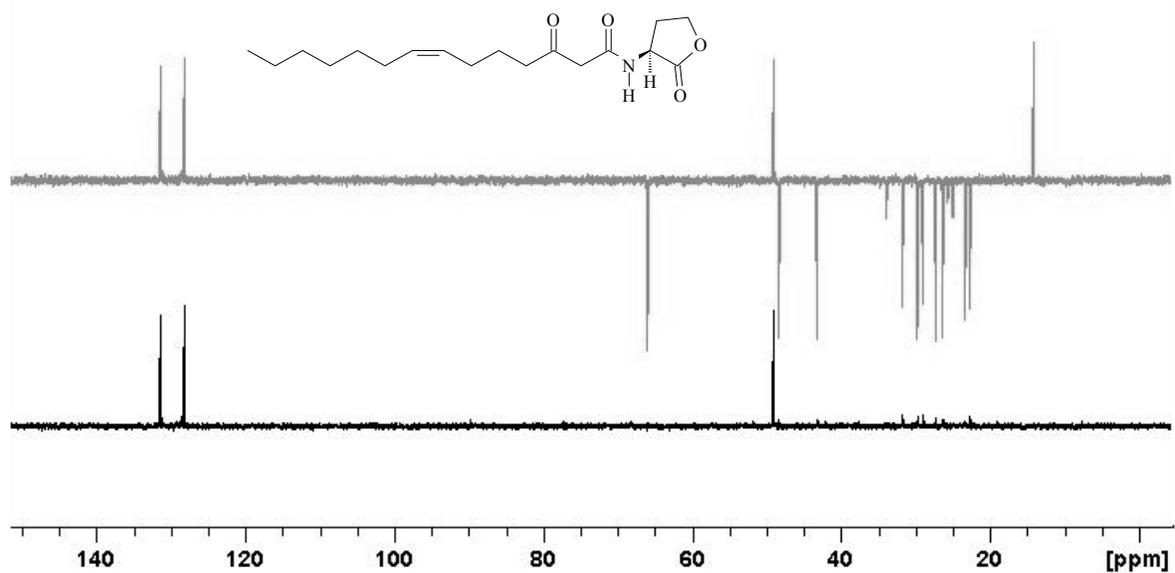
A110. Espectro de RMN de ^1H (300,00 MHz, CDCl_3 , TMS) da (*S*)-*N*-(7*Z*)-3-oxo-tetradecenoil-HSL sintética.



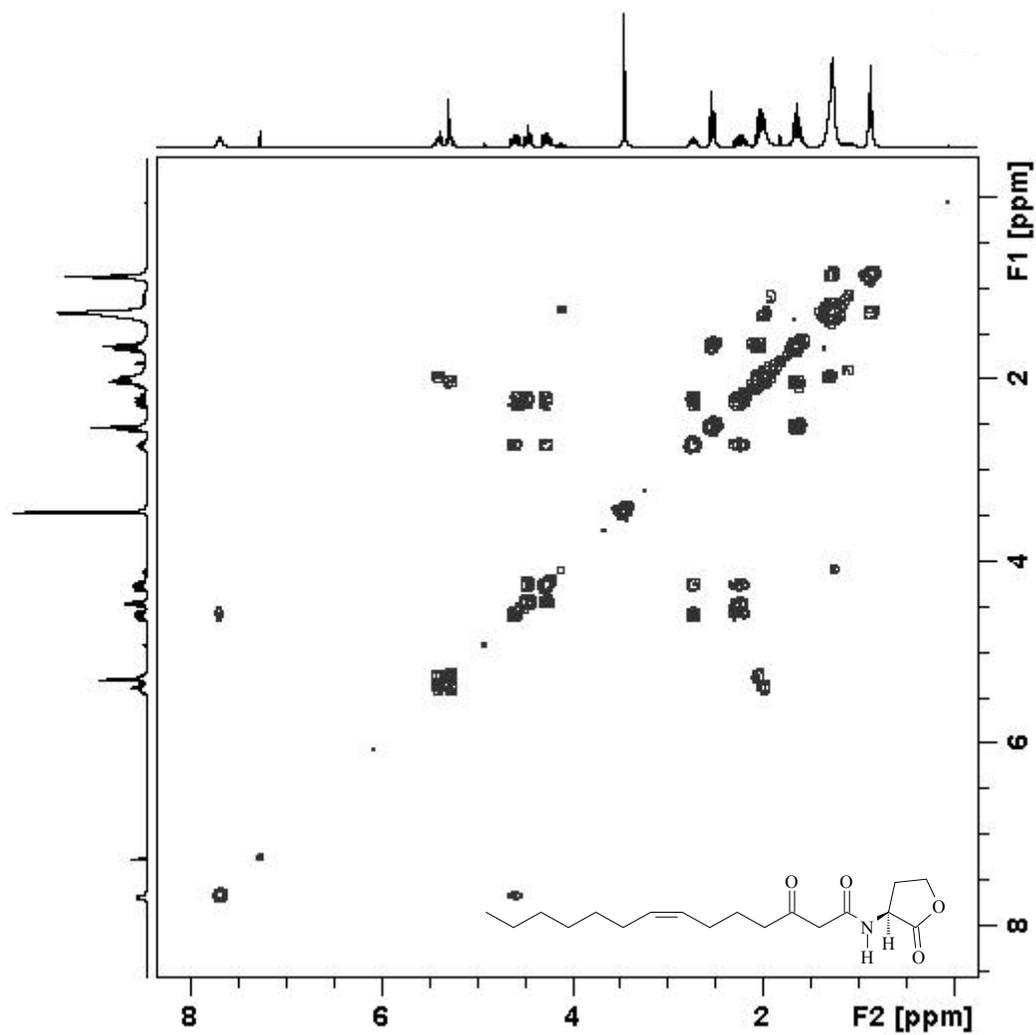
A110A. Espectro de RMN de ^1H (300,00 MHz, CDCl_3 , TMS) da *(S)*-*N*-(7*Z*)-3-oxotetradecenoil-HSL sintética ampliado.



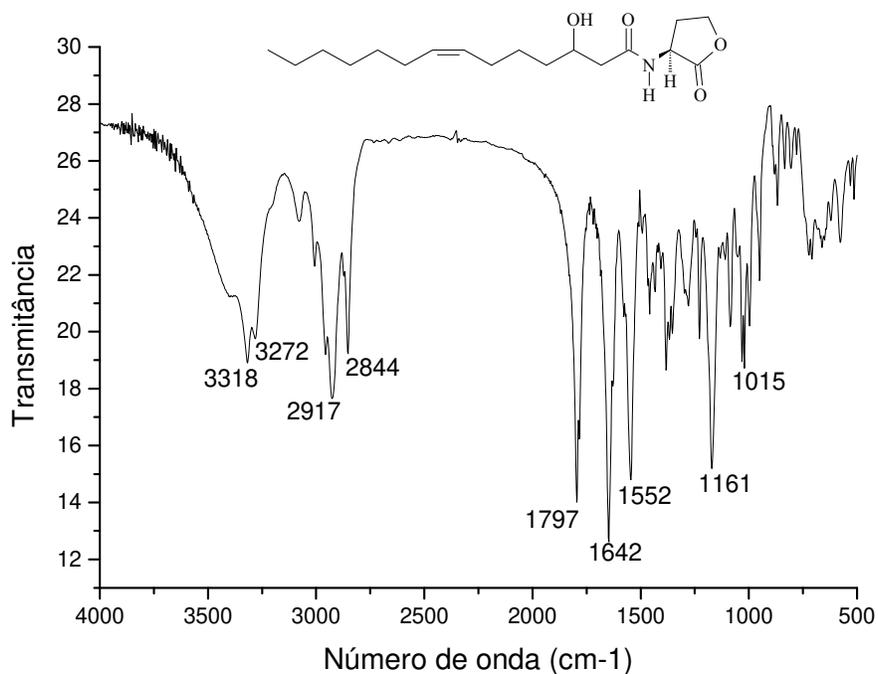
A111. Espectro de RMN de ^{13}C (75,00 MHz, CDCl_3 , TMS) da (S)-N-(7Z)-3-oxo-tetradecenil-HSL sintética.



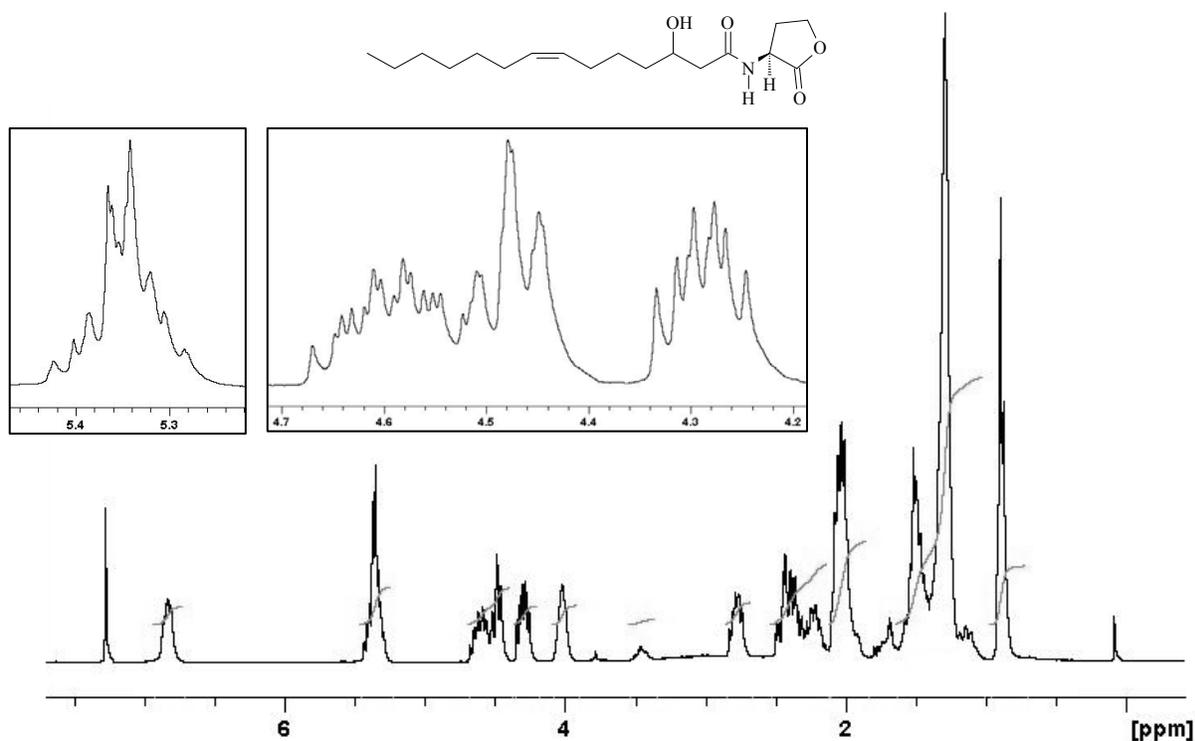
A112. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 e 90° (75,00 MHz, CDCl_3 , TMS) da (S)-N-(7Z)-3-oxo-tetradecenil-HSL sintética.



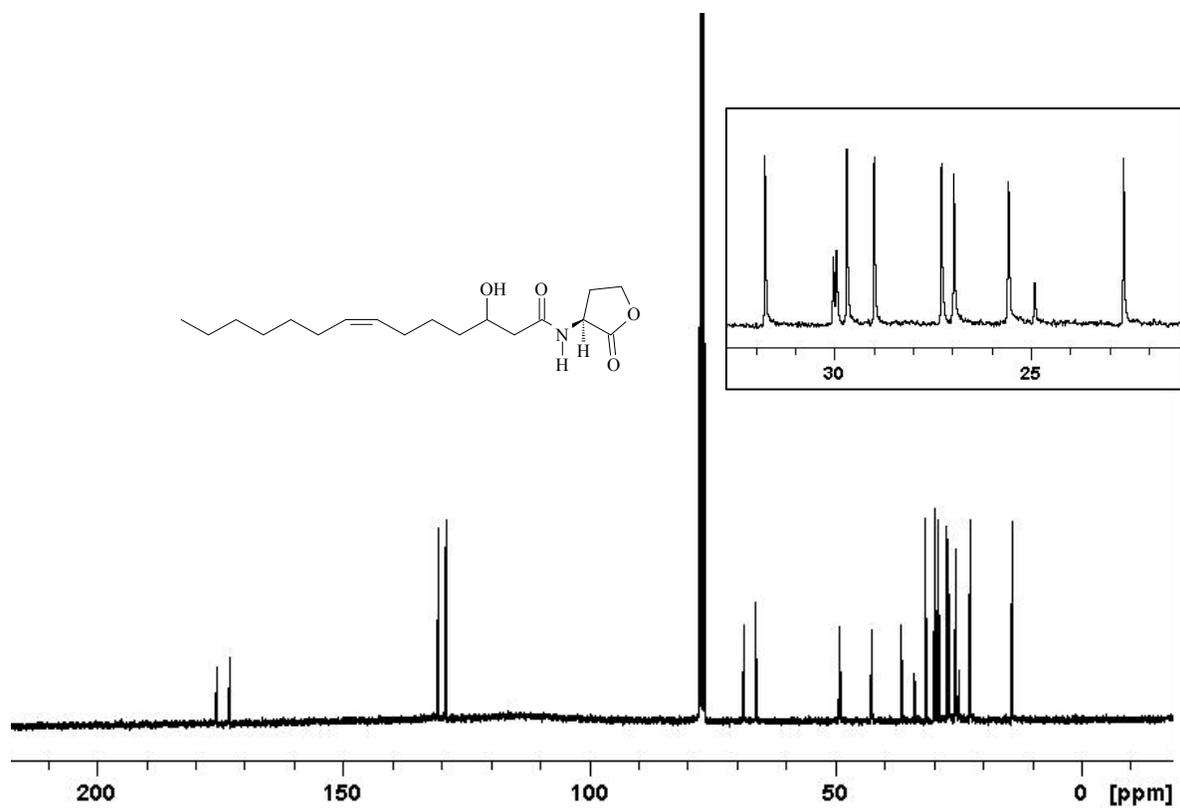
A113. Mapa de contornos de RMN 2D COSY ¹H-¹H (300,00 MHz, CDCl₃, TMS) da (S)-N-(7Z)-3-oxo-tetradecenoil-HSL sintética.



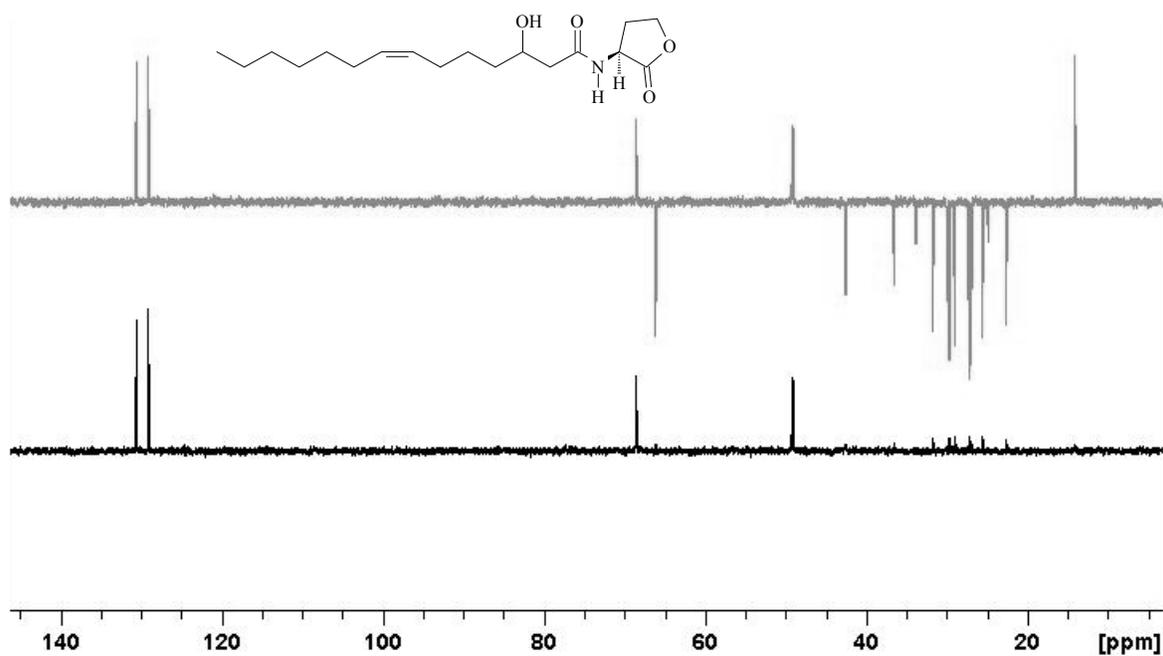
A114. Espectro no infravermelho (KBr) da *(S)*-*N*-(7*Z*)-3-hidroxi-tetradecenoil-HSL sintética.



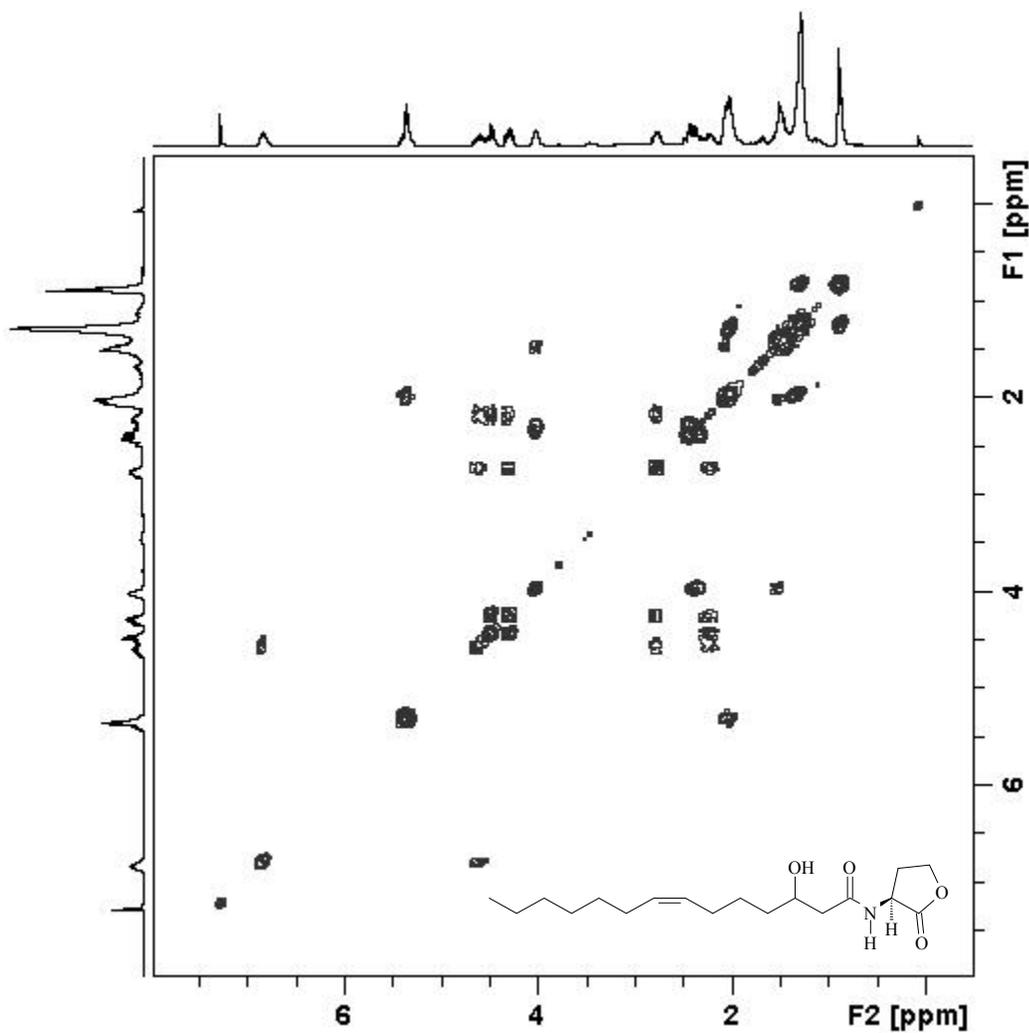
A115. Espectro de RMN de ^1H (300,00 MHz, CDCl_3 , TMS) da *(S)*-*N*-(7*Z*)-3-hidroxi-tetradecenoil-HSL sintética.



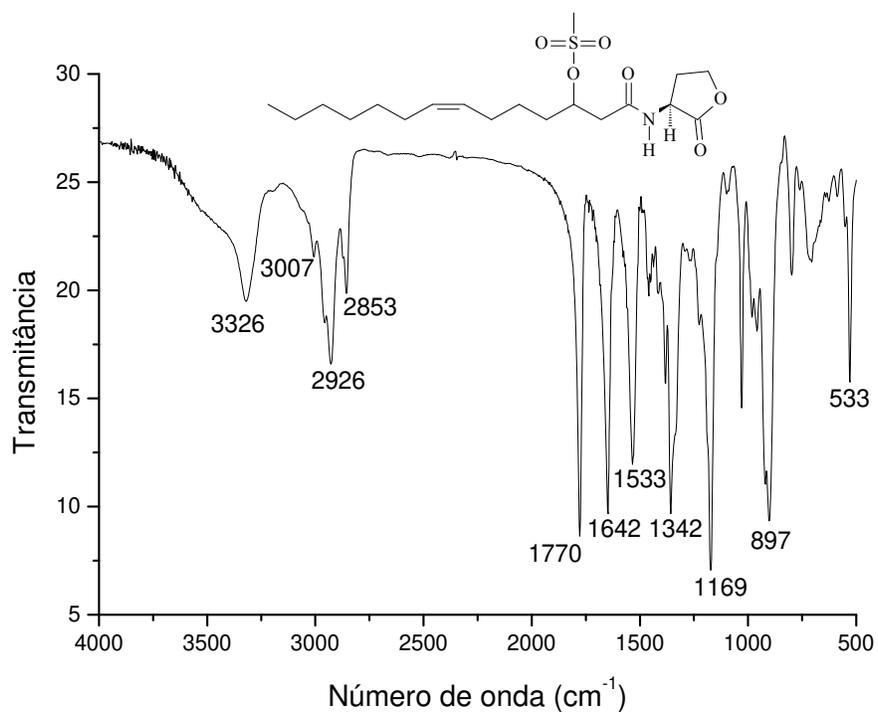
A116. Espectro de RMN de ^{13}C (75,00 MHz, CDCl_3 , TMS) da (*S*)-*N*-(7*Z*)-3-hidroxi-tetradecenil-HSL sintética.



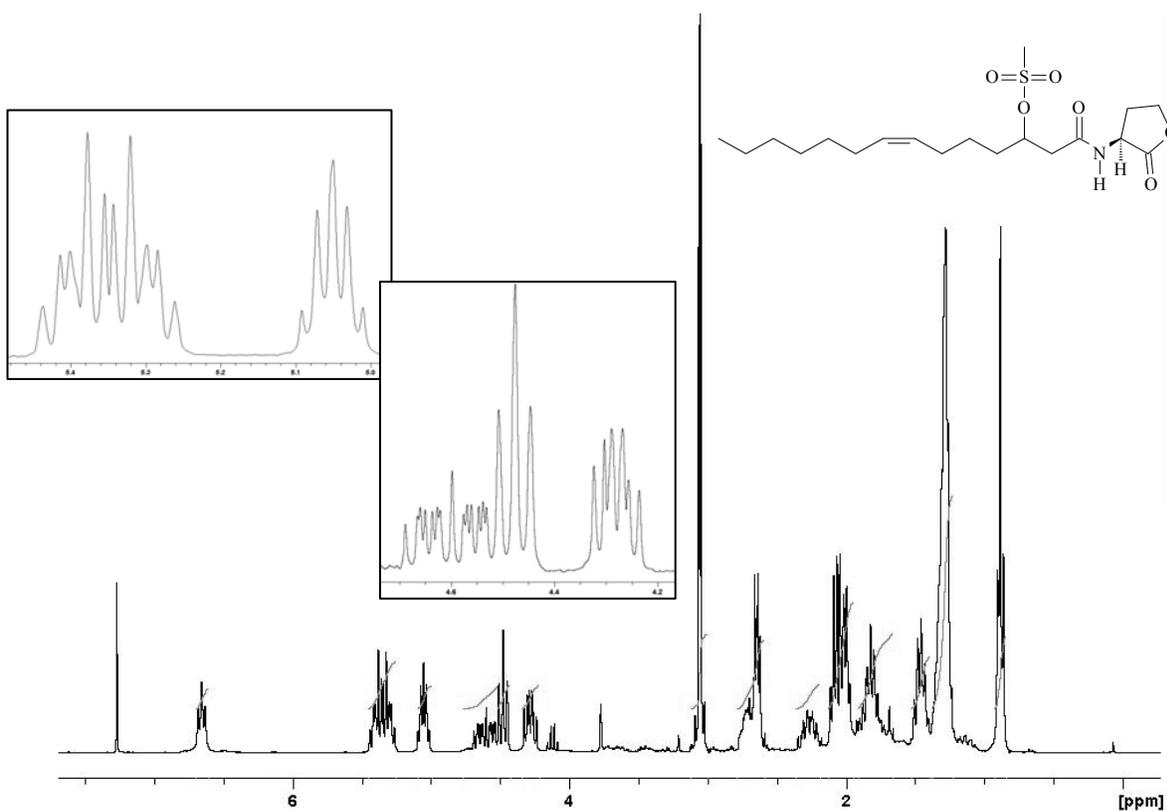
A117. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 e 90° (75,00 MHz, CDCl_3 , TMS) da (*S*)-*N*-(7*Z*)-3-hidroxi-tetradecenil-HSL sintética.



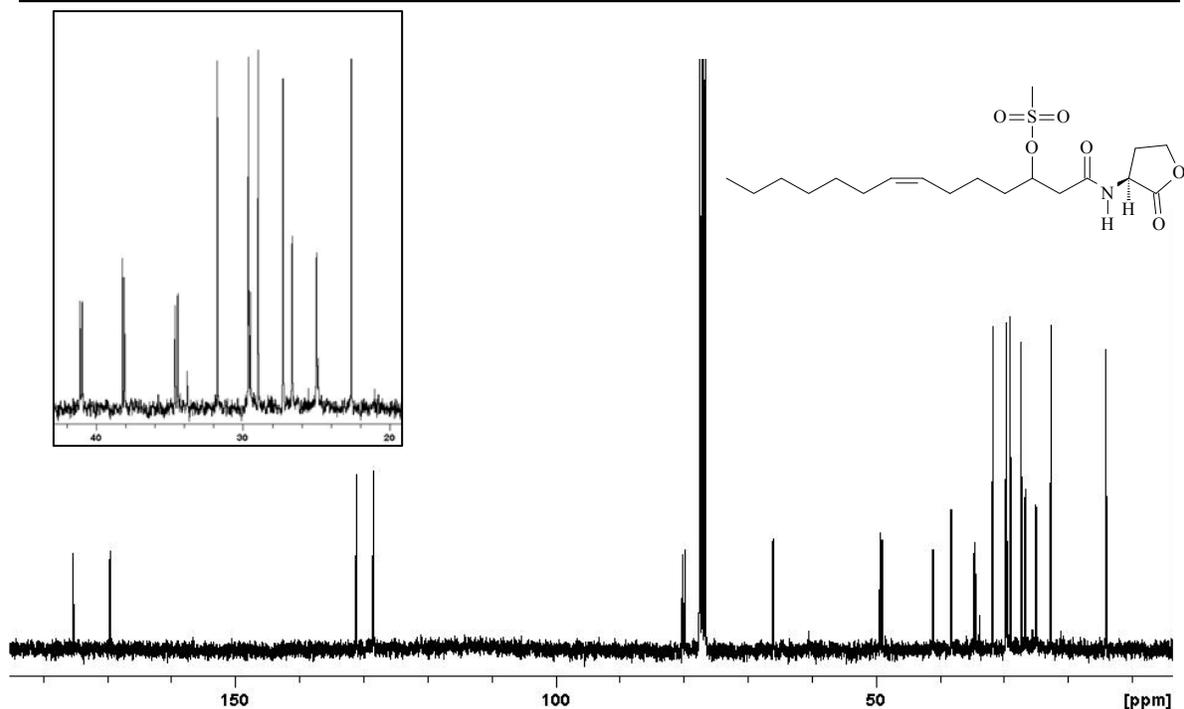
A118. Mapa de contornos de RMN 2D COSY ¹H-¹H (300,00 MHz, CDCl₃, TMS) da (S)-N-(7Z)-3-hidroxi-tetradecenoil-HSL sintética.



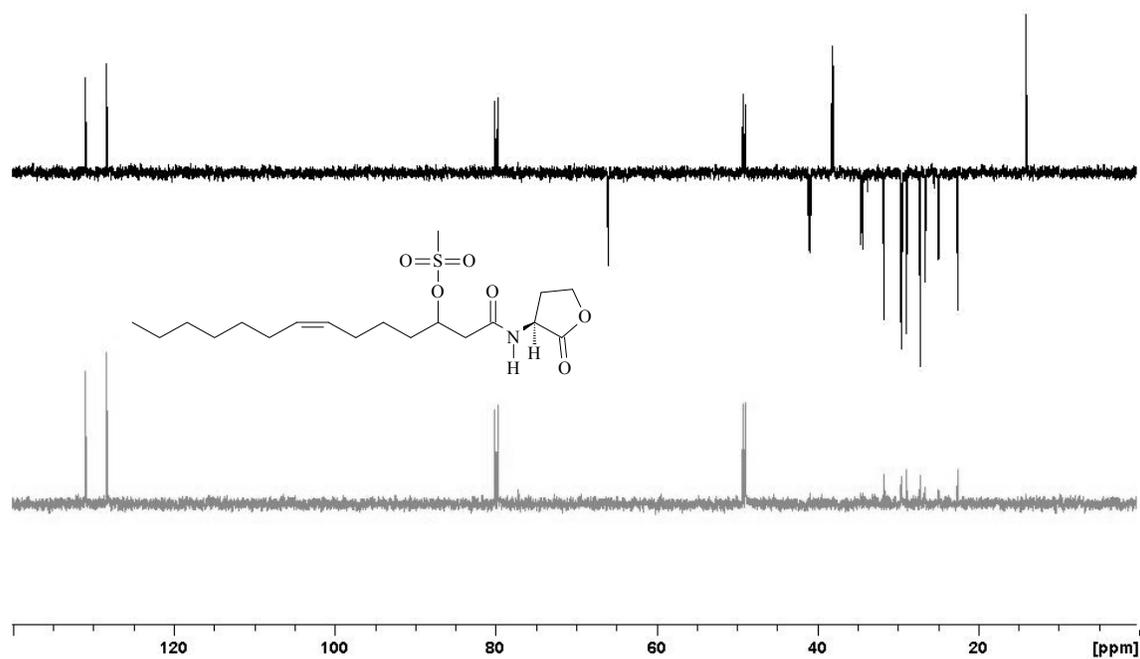
A119. Espectro no infravermelho (KBr) da (*S*)-*N*-(7*Z*)-3-mesil-tetradecenoil-HSL sintética.



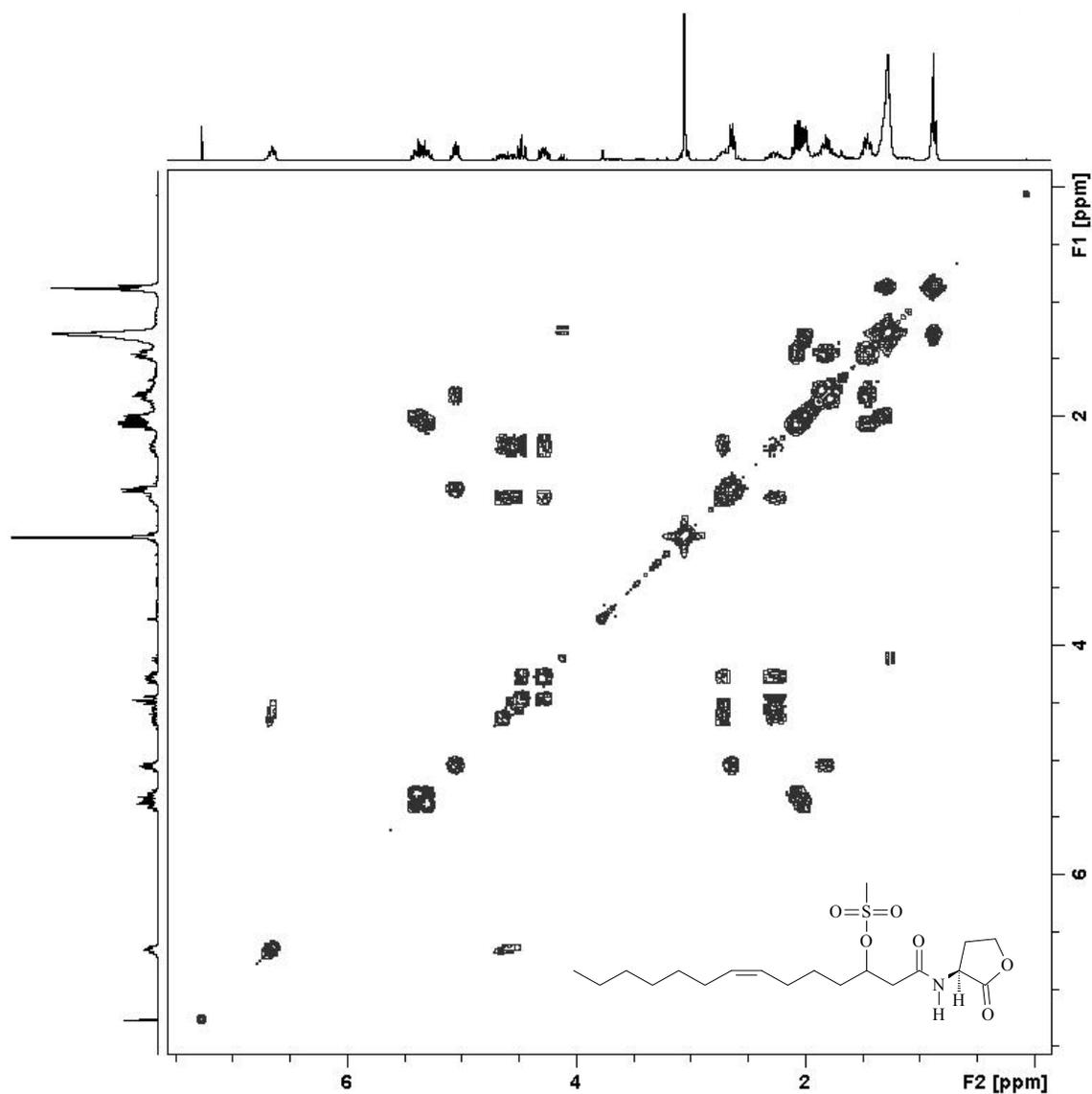
A120. Espectro de RMN de ^1H (300,00 MHz, CDCl_3 , TMS) da (*S*)-*N*-(7*Z*)-3-mesil-tetradecenoil-HSL sintética.



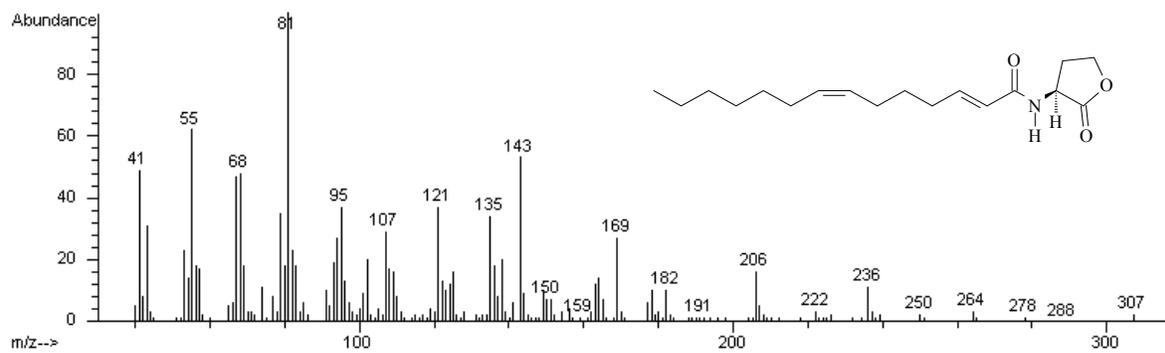
A121. Espectro de RMN de ^{13}C (75,00 MHz, CDCl_3 , TMS) da *(S)*-*N*-(7*Z*)-3-mesil-tetradecenoil-HSL sintética.



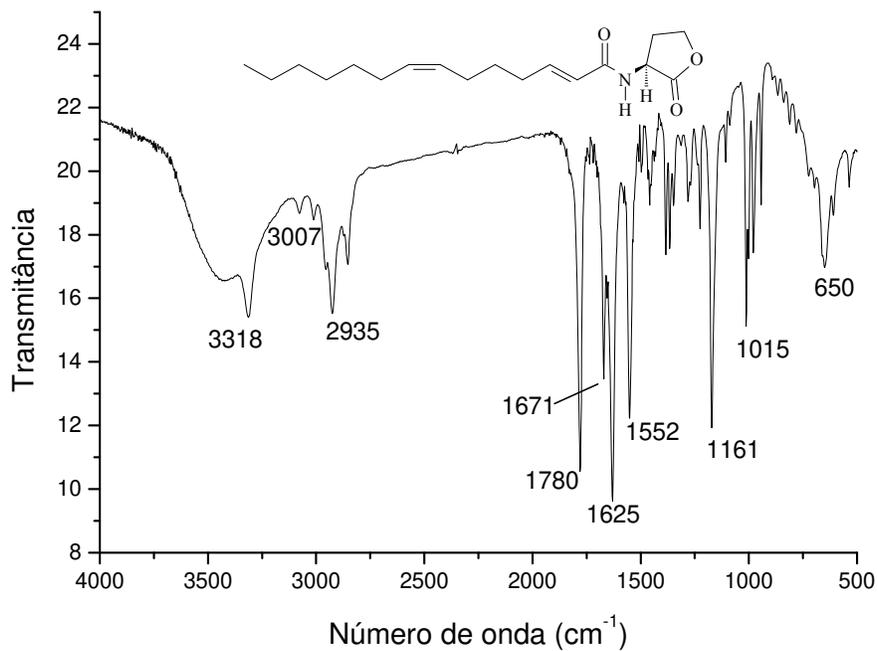
A122. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 e 90° (75,00 MHz, CDCl_3 , TMS) da *(S)*-*N*-(7*Z*)-3-mesil-tetradecenoil-HSL sintética.



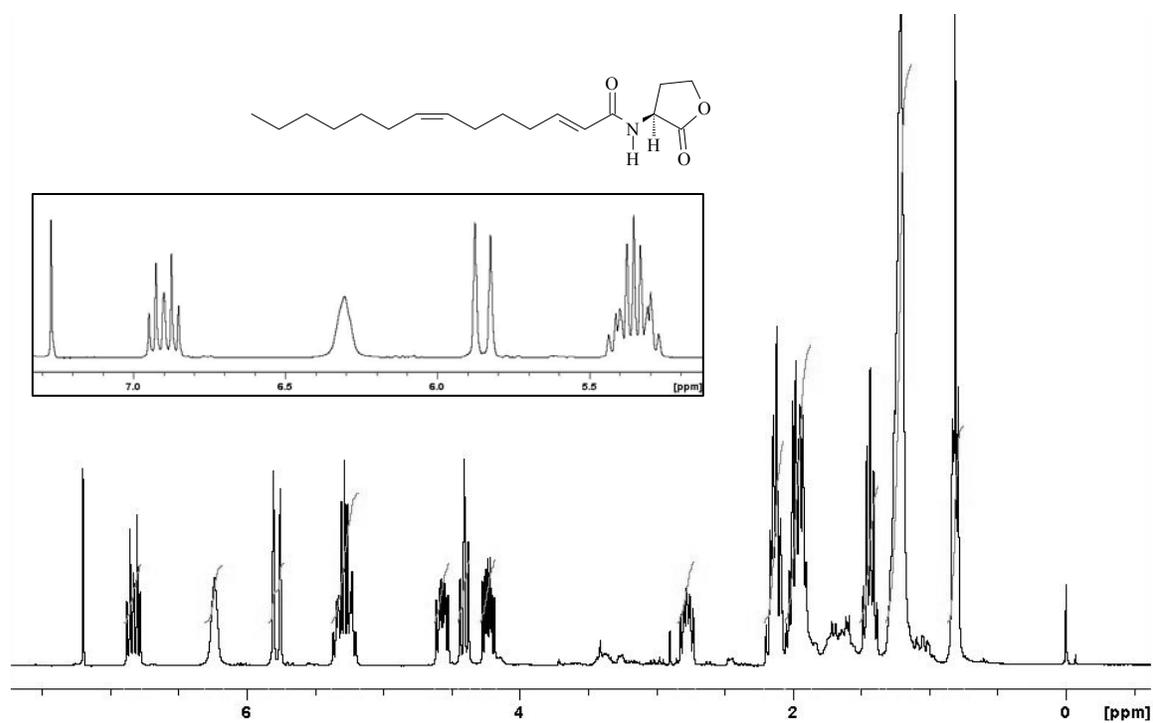
A123. Mapa de contornos de RMN 2D COSY ^1H - ^1H (300,00 MHz, CDCl_3 , TMS) da *(S)*-*N*-(7*Z*)-3-mesil-tetradecenoil-HSL sintética.



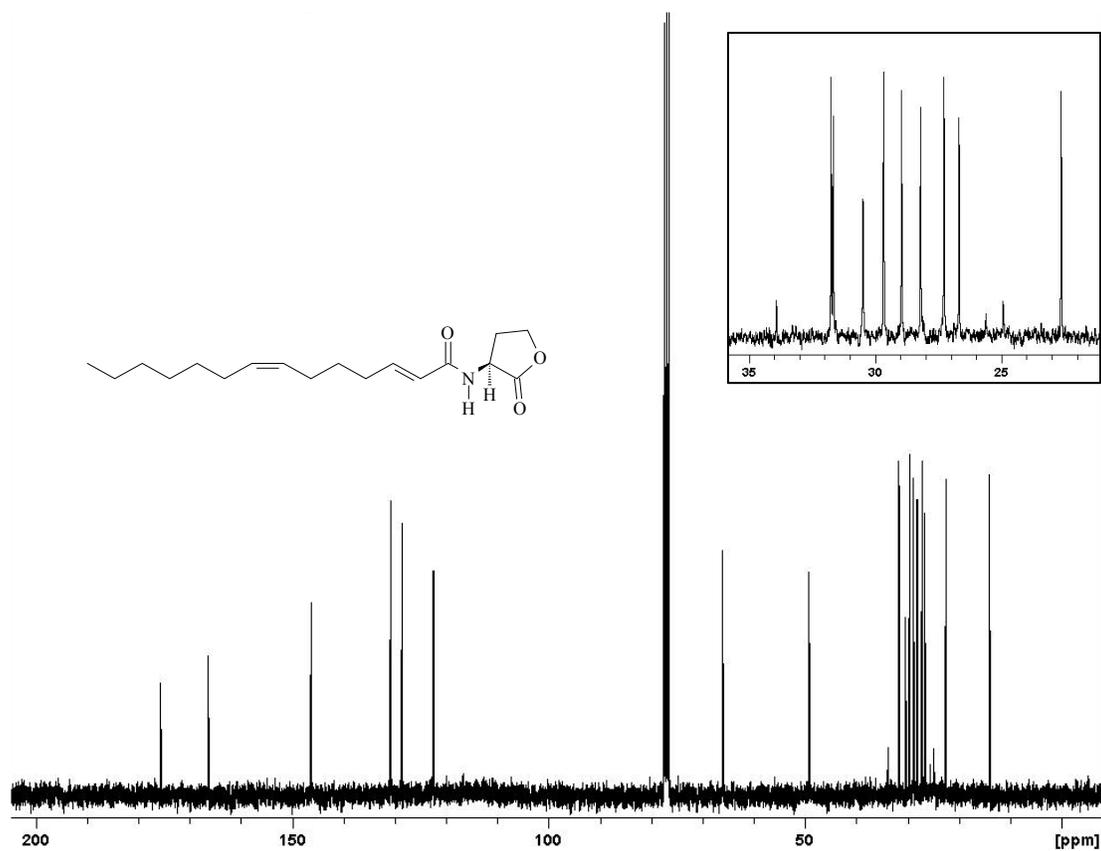
A124. Espectro de massas (IE, 70 eV) da *(S)*-*N*-(2*E*,7*Z*)-tetradecadienil-HSL sintética.



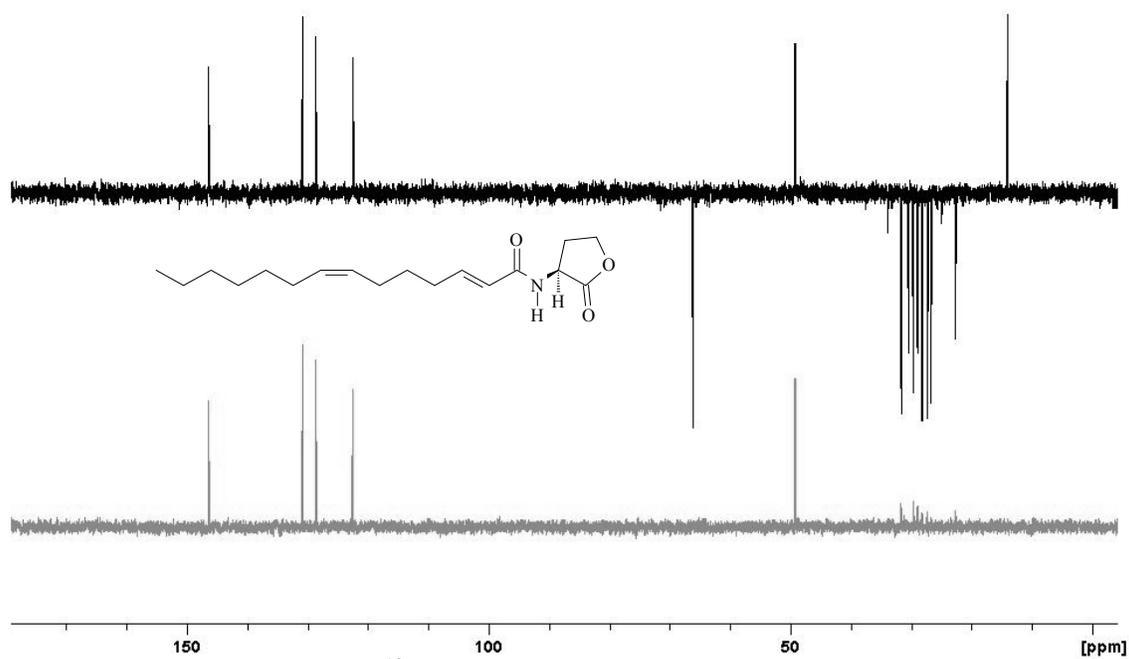
A125. Espectro no infravermelho (KBr) da (*S*)-*N*-(2*E*,7*Z*)-tetradecadienil-HSL sintética.



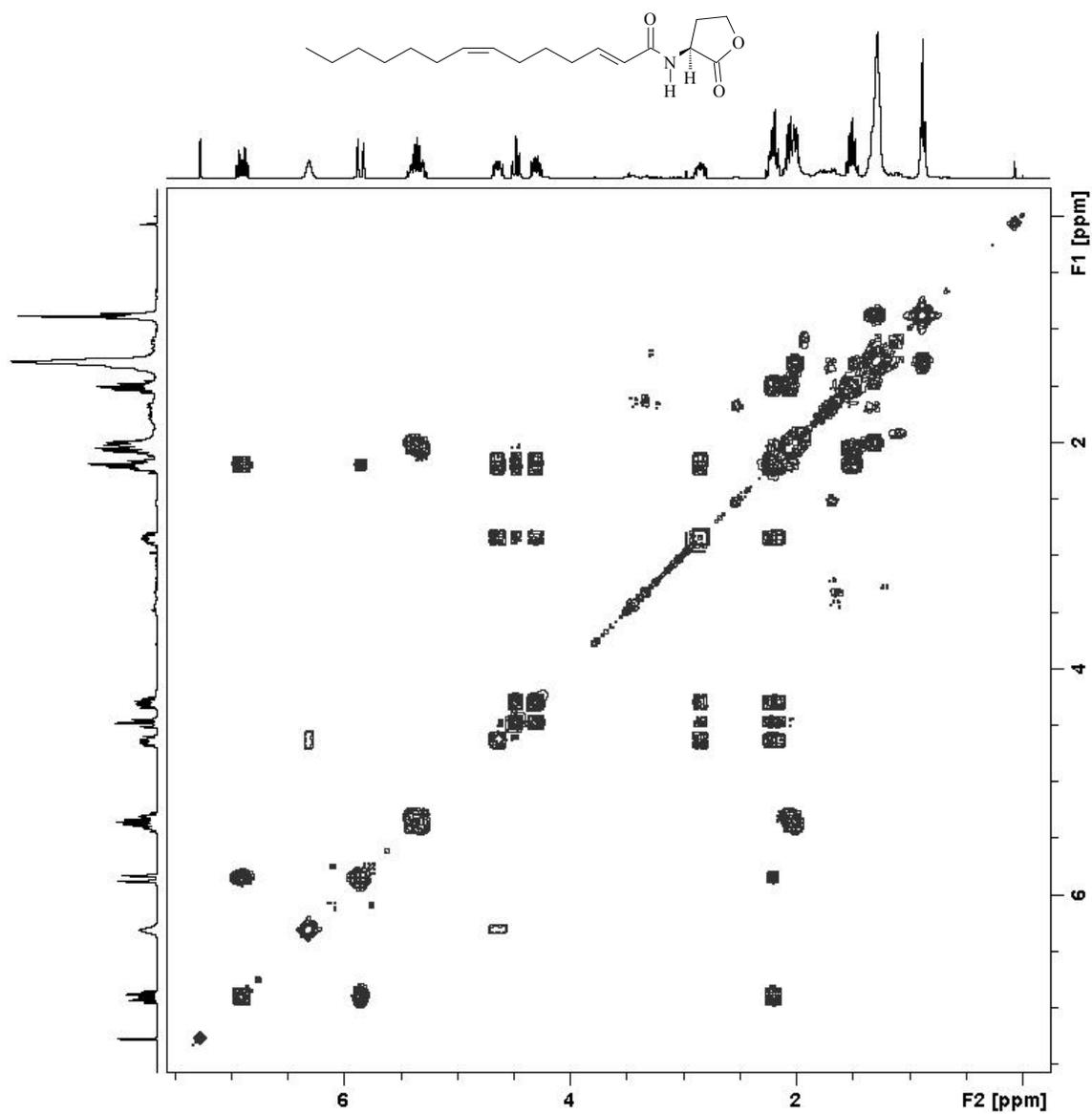
A126. Espectro de RMN de ^1H (300,00 MHz, CDCl_3 , TMS) da (*S*)-*N*-(2*E*,7*Z*)-tetradecadienil-HSL sintética.



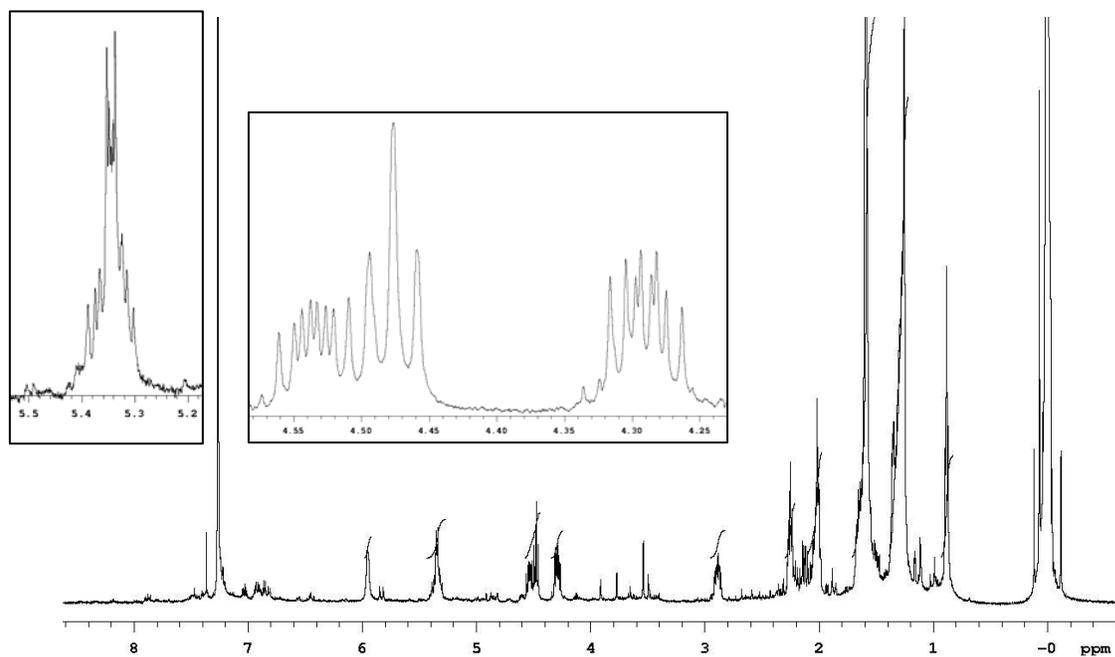
A127. Espectro de RMN de ^{13}C (75,00 MHz, CDCl_3 , TMS) da *(S)*-*N*-(2*E*,7*Z*)-tetradecadienil-HSL sintética.



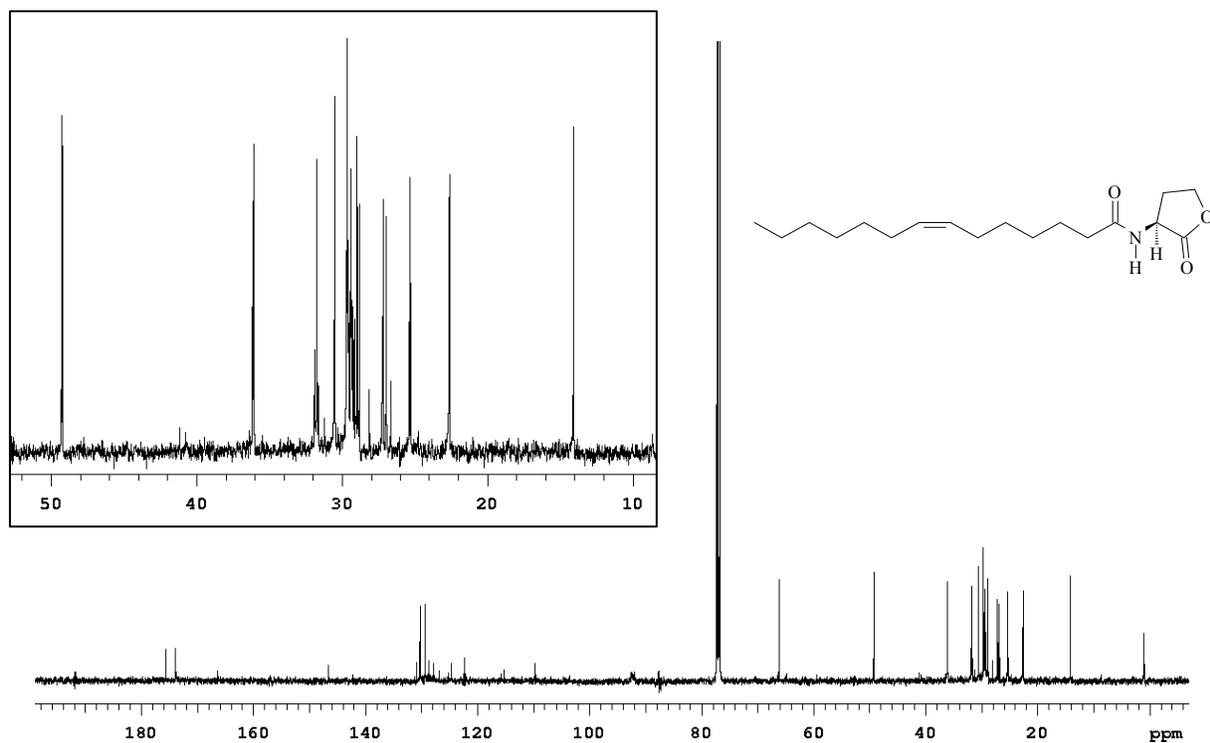
A128. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 e 90° (75,00 MHz, CDCl_3 , TMS) da *(S)*-*N*-(2*E*,7*Z*)-tetradecadienil-HSL sintética.



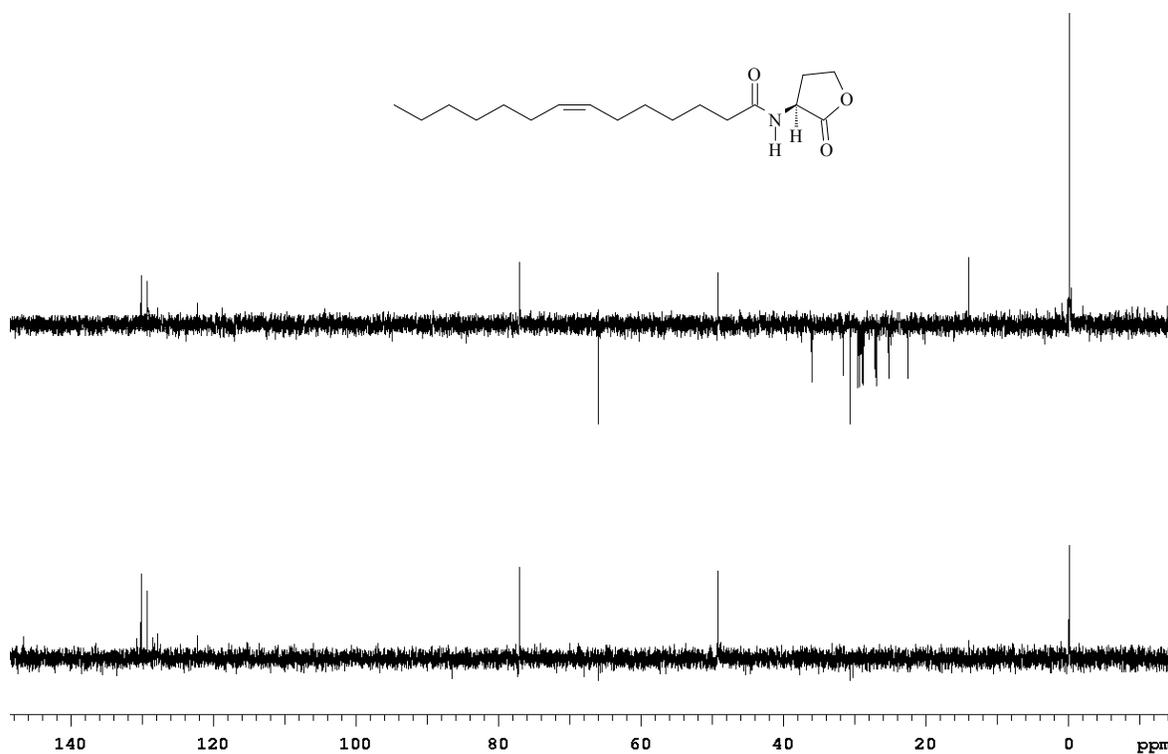
A129. Mapa de contornos de RMN 2D COSY ¹H-¹H (300,00 MHz, CDCl₃, TMS) da (*S*)-*N*-(2*E*,7*Z*)-tetradecadienil-HSL sintética.



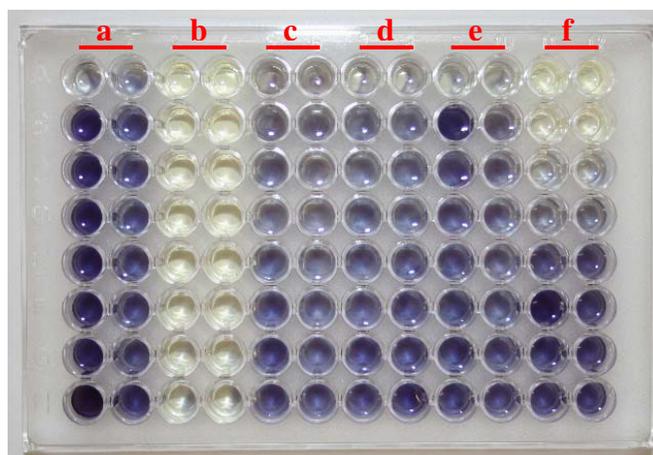
A130. Espectro de RMN de ^1H (499,88 MHz, CDCl_3 , TMS) da (*S*)-*N*-(7*Z*)-tetradecenoyl-HSL natural.



A131. Espectro de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, CDCl_3 , TMS) da (*S*)-*N*-(7*Z*)-tetradecenoyl-HSL natural (em nanosonda).



A132. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 e 90° (125,69 MHz, CDCl_3 , TMS) da *(S)*-*N*-(7*Z*)-tetradecenoil-HSL natural (em nanosonda).



*Curtobacterium
flaccumfaciens*
ER 1/5

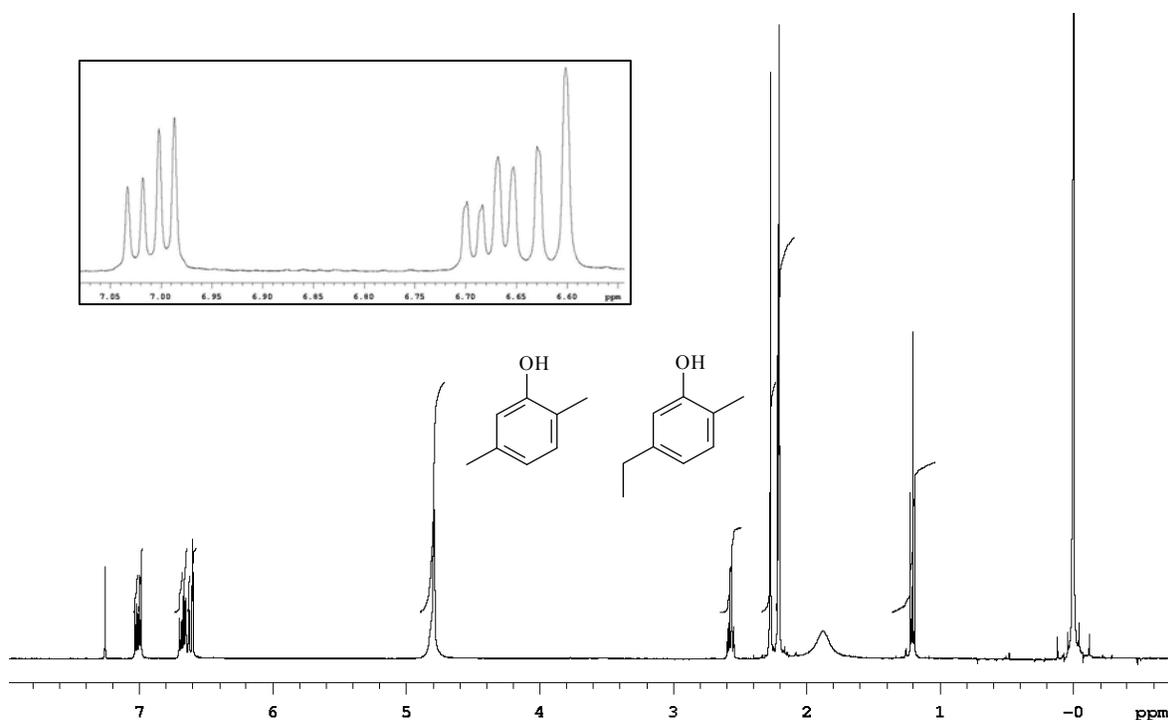


Bacillus sp.
CL 15

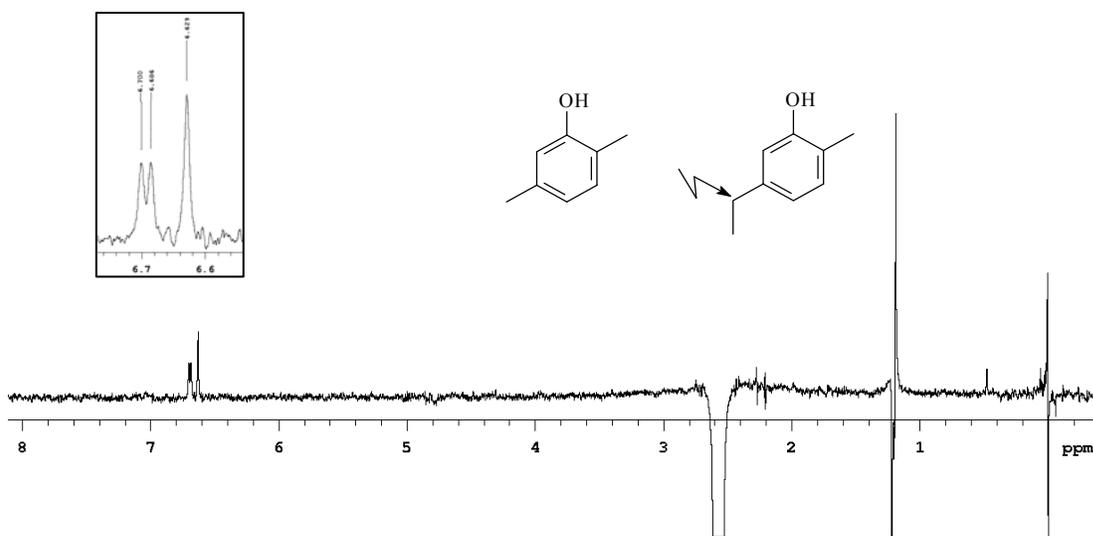


Nocardiosis sp.

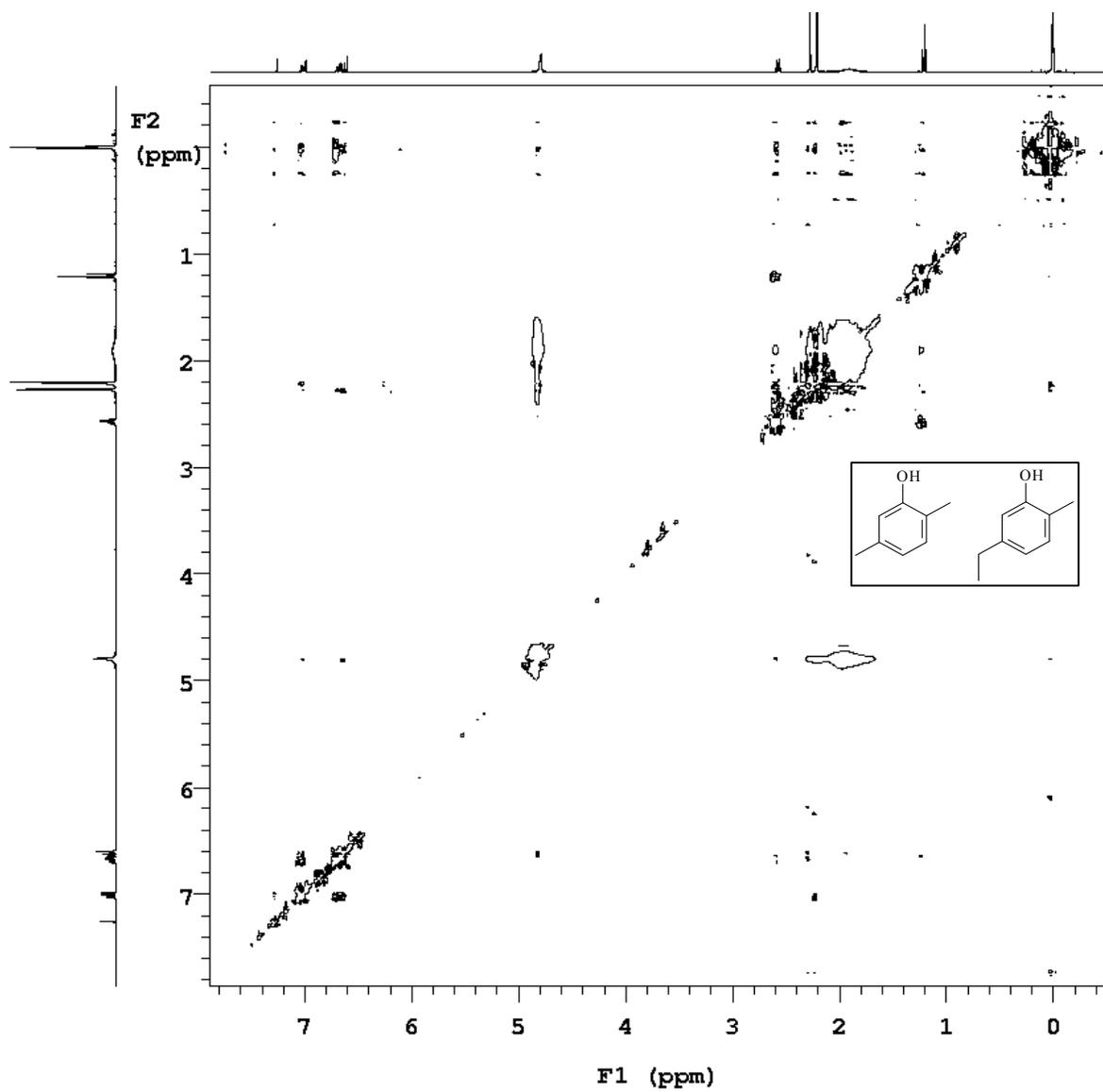
A133. Avaliação semi-quantitativa da atividade antimicrobiana de acil-HSLs sintéticas contra os endofíticos de laranja *C. flaccumfaciens* (1), *Bacillus sp.* (2) e *Nocardiosis sp.* (3). Legenda: a. branco (água/DMSO 20%); b. controle positivo (cloranfenicol); c. (*S*)-*N*-dodecanoil-HSL; d. (*S*)-*N*-(2*E*)-dodecenoil-HSL; e. (*S*)-*N*-tetradecanoil-HSL; f. (*S*)-*N*-(2*E*,7*Z*)-tetradecadienil-HSL.



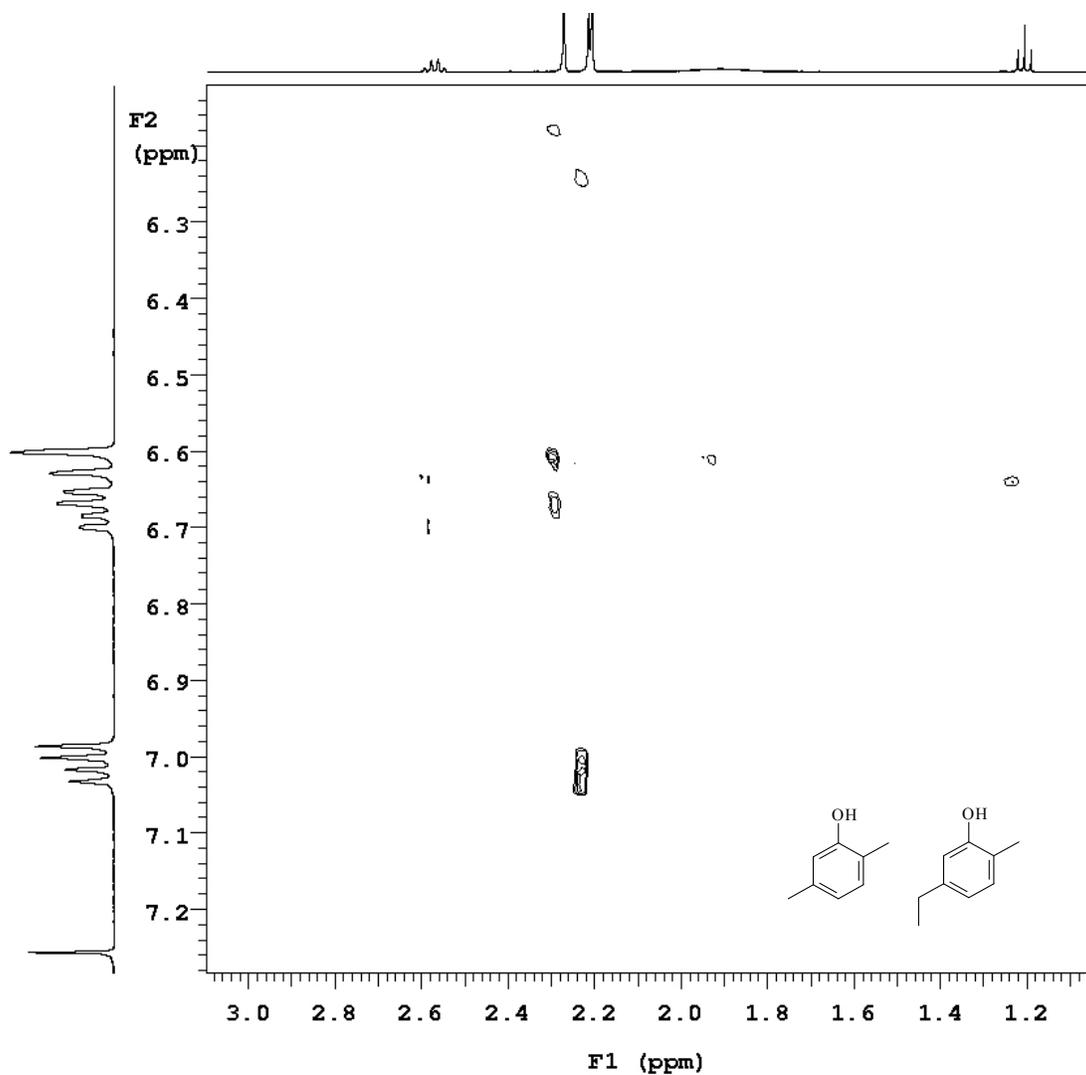
A134. Espectro de RMN de ^1H (499,88 MHz, CDCl_3 , TMS) da secreção produzida por *Hoplobunus mexicanus*, constituída por 2-metil-5-etil-fenol e 2,5-dimetil-fenol.



A135. Espectro de diferença de NOE (499,88 MHz, CDCl_3 , TMS) da secreção produzida por *Hoplobunus mexicanus*, constituída por 2-metil-5-etil-fenol e 2,5-dimetil-fenol, com irradiação seletiva do sinal em 2,56 ppm do 2-metil-5-etil fenol.



A136. Espectro de RMN NOESY 2D (499,88 MHz, CDCl₃, TMS) da secreção produzida por *Hoplobunus mexicanus*, constituída por 2-metil-5-etil-fenol e 2,5-dimetil-fenol.



A137. Espectro de RMN NOESY 2D (499,88 MHz, CDCl_3 , TMS) da secreção produzida por *Hoplobunus mexicanus*, constituída por 2-metil-5-etil-fenol e 2,5-dimetil-fenol. Ampliação mostrando as principais correlações entre os hidrogênios aromáticos e os substituintes alquila.