



PATRÍCIA DA SILVA NASCIMENTO

**PROPOSTA DE ROTA BIOSSÍNTECA PARA O
POLICETÍDEO FOSDIECINA A**

LAVRAS-MG

2023

PATRÍCIA DA SILVA NASCIMENTO

PROPOSTA DE ROTA BIOSSÍNTETICA PARA O POLICETÍDEO FOSDIECINA A

Monografia apresentada à
Universidade Federal de
Lavras, como parte das
exigências do Curso de
Química, para a obtenção do
título de Licenciado.

Prof. Dr. Sérgio Scherrer Thomasi

Orientador

LAVRAS-MG

2023

PATRÍCIA DA SILVA NASCIMENTO

PROPOSTA DE ROTA BISSÍNTEÉTICA PARA O POLICETÍDEO FOSDIECINA A

**PROPOSAL FOR A BIOSYNTHETIC ROUTE FOR THE POLYKETIDE
PHOSDIECIN A**

Monografia apresentada à
Universidade Federal de
Lavras, como parte das
exigências do Curso de
Química, para a obtenção do
título de Licenciado.

Aprovado em: 06 de março de 2023.

Dr. Bárbara Sayuri Bellele

Dr. Luciana de Matos Alves Pinto

Dr. Luciana Lopes Silva Pereira

Dr. Sérgio Scherrer Thomasi

Prof. Dr. Sérgio Scherrer Thomasi

Orientador

LAVRAS-MG

2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre me dar forças para persistir e alcançar minhas vitórias. Aos meus pais e meu irmão, que sempre me apoiaram e estiveram presentes mesmo à distância. À minha madrinha Luzia e seu esposo pelo apoio de sempre. À amigos especiais de vida e aos que conheci em Lavras, Taynara, Kailani, Talita, Rian, Laíssa, Andrei, Pâmela, Luisa, Júlia e Marcos! À Marcilene e Adriano por me tratarem como filha desde minha chegada em Lavras e em especial a seu filho Adriano Vinícius por todas as horas de estudo, companheirismo e apoio de sempre. Ao meu professor e orientador Sérgio Thomasi, profissional que tanto admiro, muito obrigada pela paciência, atenção e aprendizados ao longo de toda minha trajetória acadêmica! E por fim, agradeço à Universidade Federal de Lavras e Departamento de Química.

RESUMO

Policetídeos são uma classe de produtos naturais complexos produzidos por diversos tipos de organismos e agrupados de acordo com sua origem biossintética. Eles são biologicamente produzidos a partir de acetilCoA como precursor, na presença de uma enzima chamada policetídeo sintase (PKS). Do ponto de vista farmacológico, policetídeos são uma importante fonte terapêutica, uma vez que eles têm sido utilizados como agentes antiparasitários, antibióticos, imunossuppressores, agentes citotóxicos e redutores de colesterol. Em 2016, um representante dessa classe foi isolado e identificado a partir do cultivo de uma bactéria de origem marinha, isolado na praia de São Sebastião, São Paulo. Essa substância foi nomeada de Fosdiecina A. Em 2019, uma rota de síntese com 13 etapas foi desenvolvida para a Fosdiecina A na Universidade do Texas. Entretanto, é difícil prever corretamente qual seria a forma mais lucrativa e econômica de se obter essa substância de acordo com a rota de síntese apresentada. Frente a isso, o objetivo do presente trabalho foi fazer uma proposta de retrobiogênese da Fosdiecina A, discutindo detalhadamente qual seria o mecanismo de formação dessa substância pela bactéria. Espera-se com esse trabalho, elucidar o mecanismo de formação da substância entendendo quais são os materiais de partida utilizados na biossíntese do composto, caso a obtenção por vias bioquímicas seja mais vantajosa do que a síntese.

Palavras-chaves: Fosdiecina A, Policetídeos, *Streptomyces*, Antitumoral, biossíntese

ABSTRACT

Polyketides are a class of complex natural products produced by several types of organisms and grouped according to their biosynthetic origin. They are biologically produced from acetylCoA as a precursor, in the presence of an enzyme called polyketide synthetase (PKSs). From a pharmacological point of view, polyketides are an important therapeutic source, since they have been used as antiparasitic agents, antibiotics, immunosuppressants, cytotoxic agents and cholesterol reducers. In 2016, a representative of this class was isolated and identified from the cultivation of a bacterium of marine origin, isolated on the beach of São Sebastião, São Paulo. This substance was named Phosdiecin A. In 2019, a 13-step synthesis route was developed for Phosdiecin A at the University of Texas. However, it is difficult to predict correctly which would be the most profitable and economical way to obtain this substance according to the synthesis route presented. In view of this, the objective of the present work was to make a proposal for the retrobiosynthesis of Phosdiecin A, discussing in detail what would be the mechanism of formation of this substance by the bacteria. It is hoped that this work will elucidate the mechanism of formation of the substance, understanding what are the starting materials used in the biosynthesis of the compound, if obtaining it through biochemical routes is more advantageous than synthesis.

Keywords: Phosdiecin A, Polyketides, *Streptomyces*, Antitumor, biosynthesis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Biossíntese genérica de policetídeos pela via do acetato.	10
Figura 2 – Policetídeos com amplas atividades farmacológicas.	12
Figura 3 – Estrutura cristalina da PP2A.	13
Figura 4– Policetídeos com atividades antitumorais pela inibição da enzima PP2A.	16
Figura 5 – Esquema geral de formação do ácido isobutírico.	17
Figura 6– Mecanismo de reação entre o aminoácido valina e a coenzima PLP.	18
Figura 7 – Descarboxilação e conversão da imina 1 em imina 2.	18
Figura 8 – Interversão da imina 2 em imina 3.	19
Figura 9– Hidrólise da imina 3 para formar o aldeído isobutírico e o fosfato de piridoxamina (PLA).	19
Figura 10 – Mecanismo de oxidação do aldeído isobutírico à ácido isobutírico.	20
Figura 11– Transferência de dois grupos fosfatos a partir de ATP para o ácido isobutírico.	20
Figura 12– Mecanismo de reação entre a coenzima A (CoA) e a forma fosfatada do ácido isobutírico.	21
Figura 13– Representação simplificada da “porção” coenzima A em biomoléculas.	21
Figura 14– Reação entre a isopropilcoenzima A e acetilcoenzima A para produzir o 1º intermediário da biossíntese.	22
Figura 15– Mecanismo da condensação de Claisen que ocorre entre uma unidade de acetilCoa e a isopropilcoenzima A para produzir o 1º intermediário.	22
Figura 16– Redução com a participação de NADH e eliminação da hidroxila de álcool para formar o 2º intermediário.	23
Figura 17– Mecanismo de conversão do 1º intermediário no 2º intermediário com a participação de NADH.	23
Figura 18– Redução da ligação dupla C=C com a participação de dinucleótido de flavina e adenina (FADH2) para converter o 2º intermediário no 3º intermediário.	24
Figura 19– Redução da dupla C=C com a participação de FADH2 para converter o 2º intermediário no 3º intermediário.	25
Figura 20– Propostas de reações que levariam ao 5º intermediário na biossíntese.	25
Figura 21– Série de reações que convertem o 5º intermediário no 8º intermediário na proposta de biossíntese da fosdiecina.	26
Figura 22– Transferência de grupamento metil por SAM para dar origem ao 9º intermediário.	27
Figura 23– Série de reações que converteriam o 9º intermediário no 12º intermediário na proposta de biossíntese da fosdiecina.	28
Figura 24 – Série de reações que converteriam o 12º intermediário no 17º intermediário na proposta de biossíntese da fosdiecina.	29
Figura 25– Proposta de série de reações que converteriam o 17º intermediário na FOSDIECINA.	30
Figura 26 – Estrutura geral das penicilinas	31

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REFERENCIAL TEÓRICO	9
2.1 Policetídeos e a via do acetato	9
2.2 Produção de policetídeos em seres vivos e suas funções	10
2.3 Policetídeos produzidos por bactérias do gênero <i>Streptomyces</i>	13
2.4 Isolamento e síntese do policetídeo Fosdiecina A	15
2.5 Partes essenciais para ação citotóxica de policetídeos advindos de estreptomicetos	16
3. DISCUSSÃO	17
3.1 Proposta de rota biossintética para o policetídeo Fosdiecina A.....	17
4. CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	32

1. INTRODUÇÃO

A síntese orgânica é uma ferramenta que permite a construção de moléculas orgânicas das mais simples às mais complexas, partindo de precursores mais simples. É uma área essencial em diversos âmbitos da sociedade, dentre eles o farmacêutico. Antes de se produzir um fármaco em larga escala, inicialmente são feitas sínteses em nível laboratorial para descobrir características estruturais que elevem efeitos medicinais ou diminuam indesejáveis efeitos colaterais de um novo fármaco ou até mesmo para exercer aprimoramento em um já existente (SOLOMONS, 2012a).

Policetídeos é uma classe muito importante de produtos naturais com grande potencial farmacêutico. São complexos metabólitos secundários biossintetizados por fungos, bactérias, plantas, insetos, esponjas, algas e outros seres, tendo funções de defesa contra patógenos, interações simbióticas, resposta à exposição de luz UV, pigmentação, dentre outras. Sua biossíntese se dá pela via do acetato, através de sucessivas condensações de Claisen entre unidades de acetilcoenzima A. É também por essa via que são formados ácidos graxos, poliacetilenos, prostaglandinas, compostos aromáticos, dentre outros.

As atividades farmacológicas desses compostos são vastas, vão desde ação antifúngica, antibiótica, redutora de colesterol, anti-parasitária, imunossupressora, antitumoral e outras. Bactérias do gênero *Streptomyces* produzem metabólitos com grande potencial antitumoral, os compostos possuem alta capacidade de inibição da enzima serina/treonina proteína fosfatase 2A (PP2A), responsável por funções biológicas essenciais, como divisão celular.

Alguns dos policetídeos com ação citotóxica produzidos por esses actinomicetos são Fostriecina, Sultriecina, Citostatina, Fosfolina, Leustroducsina, Foslactomicinas e mais recentemente descoberto em 2014, a Fosdiecina A. Essa última foi sintetizada pela primeira vez em 2019 na Universidade do Texas com uma rota sintética contendo 13 etapas, contudo cabe analisar a viabilidade econômica de sua síntese, seja em rendimento, tempo de produção, geração de resíduos e outros fatores cabíveis.

Diante disso, o objetivo dessa monografia é fazer uma proposta de retrobiogênese da Fosdiecina A, discutindo de forma detalhada cada etapa de seu mecanismo de formação pela bactéria *Streptomyces cebimarensis* SS99BA-2. A partir disso, pretende-se compreender quais

os materiais de partida empregados em sua biossíntese para ser capaz de obtê-la por vias bioquímicas, ou seja, pelo cultivo da bactéria, caso seja mais vantajoso do que sintetizá-la.

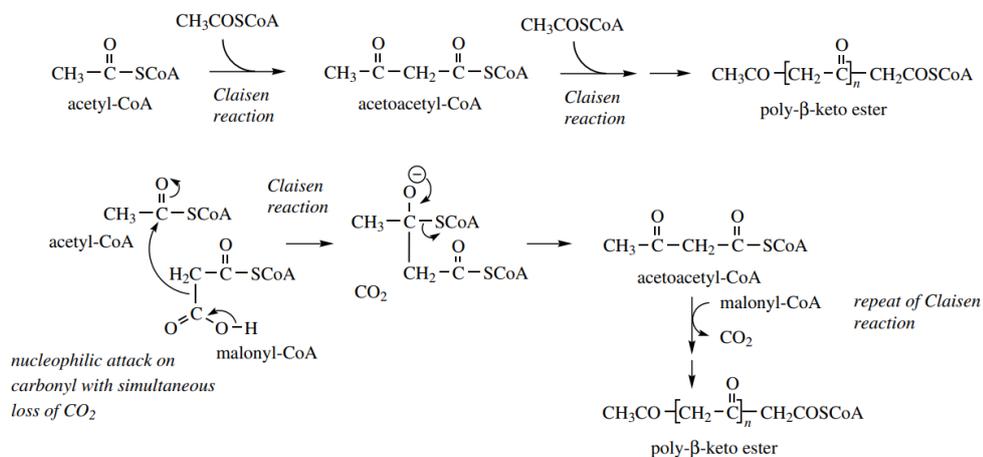
2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Policetídeos e a via do acetato

Policetídeos são metabólitos secundários complexos naturais biossintetizados por bactérias, fungos, esponjas, insetos e outros seres vivos a partir da via do acetato, onde por meio de enzimas policetídeo sintases (PKS) ocorrem condensações sucessivas de unidades de acetilcoenzima A, aumentando gradativamente a cadeia cetônica, advinda de derivados de cadeias poli- β -ceto (DEWICK, 2002). Também gerados pela via do acetato encontramos ácidos graxos, poliacetilenos, antibióticos macrólidos, prostaglandinas, antraquinonas, tetraciclinas e diversos compostos aromáticos. Na Figura 1 é possível ver a biossíntese genérica de policetídeos pela via do acetato.

Poderia ser pensada a formação da cadeia poli- β -ceto como uma série de reações de Claisen, em que o reverso seria um conjunto de oxidação- β presentes na metabolização de ácidos graxos. Dessa forma, para os policetídeos, uma molécula de acetil-CoA se acoplaria a uma outra por condensação de Claisen gerando uma acetoacetil-CoA, em que o processo se repetiria até a formação de um éster poli- β -ceto. Contudo, ao estudar as enzimas presentes na biossíntese de ácidos graxos notou-se não ser uma abordagem tão correta. Sendo assim, atualmente sabe-se que a biossíntese de ácidos graxos inicia com uma carboxilação de acetil-CoA a malonil-CoA e nessa reação estão envolvidos ATP, CO₂ na forma de bicarbonato e a coenzima biotina para o transporte de CO₂. Essa conversão torna o carbono conectado aos α -hidrogênios um nucleófilo melhor na condensação de Claisen, isso devido ao aumento de sua acidez. Seguidamente, não se percebe formação de derivados de ácido malônico nem ocorre incorporação de bicarbonato. A carboxilação promovida pelo carbono α do malonil-CoA na carbonila da molécula de acetil-CoA ao longo da condensação de Claisen favorece então a saída do grupo carboxila do malonil-CoA na forma de CO₂, formando então o acetoacetil-CoA. Por fim a repetição de condensações de Claisen fornece distintos poli- β -ceto ésteres (DEWICK, 2002).

Figura 1– Biossíntese genérica de policetídeos pela via do acetato.



Fonte: (DEWICK, 2002).

A via do acetato até então é igual para aromáticos e ácidos graxos e outros que a seguem, contudo para os primeiros a via segue até chegar nos processos de montagem completa e ciclização de cadeia, já para os segundos, antes de acoplar o próximo malonato ocorre redução dos grupos carbonila.

A formação de ácidos graxos comuns se dá sempre em número par de cabonos, isso ocorre porque durante a condensação de Claisen os carbonos fornecidos pelo acetato ficam fixados na cabeça da cadeia, demonstrado pela extremidade metil, já o malonato é responsável por fornecer os carbonos de extensão de cadeia e nunca pelo grupo inicial. Sendo assim, o acetato fornece dois carbonos para formação inicial do ácido graxo e cada malonato sempre fornece dois carbonos para a cadeia. Os ácidos graxos mais abundantes são de 16 e 18 carbonos, contudo ácidos graxos naturais podem chegar a 30 ou mais átomos de carbono. No entanto, também existem alguns ácidos graxos com número ímpar de carbonos, isso pode se dar pela ocorrência de incorporação de unidade inicial distinta ao acetato, como a propionil-coA, ou por perda de carbono de um ácido de cadeia com número par de carbonos (DEWICK, 2002).

2.2 Produção de policetídeos em seres vivos e suas funções

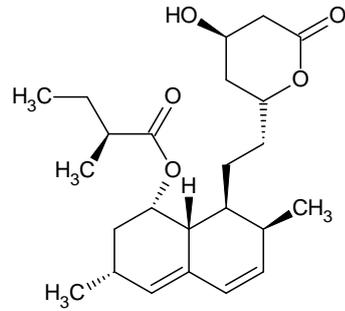
Nas plantas a produção de policetídeos, os flavonóides, está relacionados a muitos fatores como resposta à exposição de luz UV, pigmentação de flores, defesa contra patógenos e interações simbióticas planta-patógeno (SCHRODER et al., 1998; WINKEL-SHIRLEY, 2002).

Em seres marinhos, algas unicelulares dinoflagelados, macro-algas, esponjas e moluscos, a produção de policetídeos tende a ser na forma de compostos tóxicos a serem utilizados como mecanismos de defesa contra predadores, como é o caso das brevetoxinas produzidas pelo dinoflagelado *Gymnodinium breve*. Já em um estudo bioquímico no ouriço-do-mar feito por Salaque et al. (SALAUQUE et al., 1967) percebeu-se o uso de moléculas de ácido acético na biossíntese do policetídeo equinocromo A, um pigmento presente em células pigmentares embrionárias. Apesar de não se compreender totalmente a função dessas células que ficam embutidas no epitélio larval, com base na ação fotoativa já observada nos policetídeos há hipóteses e observações de mudanças na forma da célula de pigmento e deslocamento do grânulo de pigmento dentro dos pseudópodes do ouriço do mar *Centrostephanus longispinus* (WEBER E DAMBACH, 1974; GRAS E WEBER, 1977; WEBER E GRAS, 1980). Essas observações também foram vistas em fotorreceptores dérmicos, melanóforos, de anfíbios e peixes (WISE, 1969; SCHLIWA E BEREITER-HAHN, 1973).

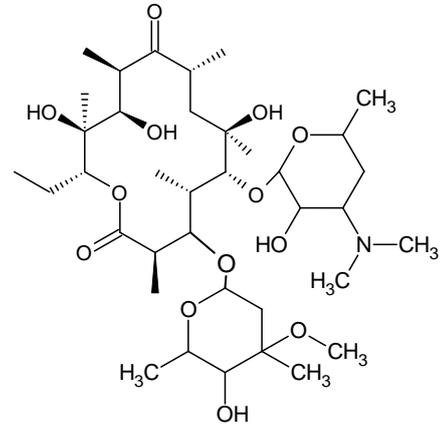
Apesar de se conhecerem muitos policetídeos advindos de fungos e bactérias, pouco se sabe do real potencial biossintético desses compostos. Muitos deles são produzidos como sinal químico, seja para defesa de habitat ou associação interespecíes. Sobre a última já é fato a diversidade de compostos gerados dessa interação e reforçando isso, Schroeckh et al. em seu trabalho monitorou o comportamento do fungo *Aspergillus nidulans* e a bactéria *S. hygroscopicus* em um mesmo habitat e descobriram de forma inédita uma resposta metabólica específica, produziram novos metabólitos, advindos de sua interação direta, o que não foi observado quando estavam em habitats distintos (SCHROECKH, 2009). Anteriormente, Siemieniewicz e Schrempf (SIEMIENIEWICZ E SCHREMPF, 2007), ao observarem a bactéria *Streptomyces olivaceoviridis* junto ao fungo *Aspergillus proliferans* notaram que redes de hifas da bactéria se estendiam numerosamente devido às hifas do fungo.

Esses compostos possuem atividades farmacológicas amplas, podendo apresentar ação como antifúngicos, antibióticos, antitumorais, imunossupressores, agentes redutores de colesterol, dentre outros. A lovastatina atua reduzindo níveis de colesterol, eritromicina como antibiótico, avermectina como anti-parasitário, anfotericina como antifúngico, doxorubicina e salinomicina como antineoplásicos (GOKHALE, 2007; DEWICK, 2002; PAULO, 2019). Os compostos citados podem ser vistos na Figura 2.

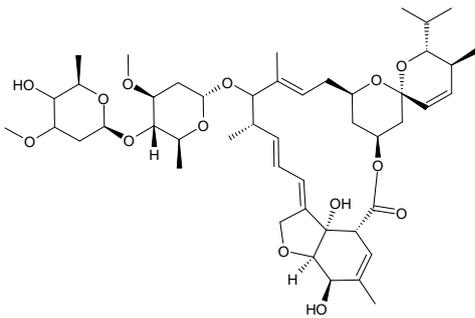
Figura 2 – Policetídeos com amplas atividades farmacológicas.



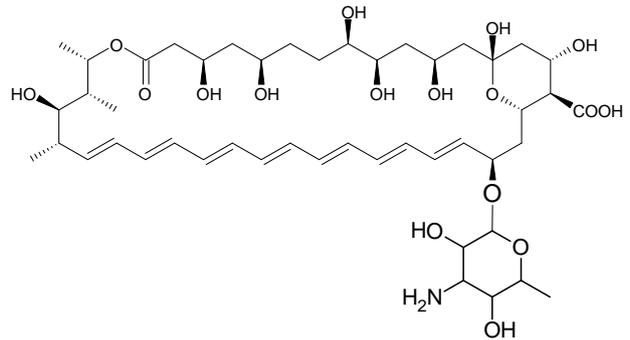
1. Lovastatina



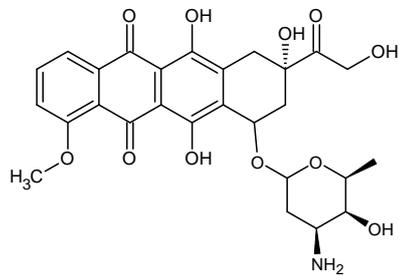
2. Eritromicina



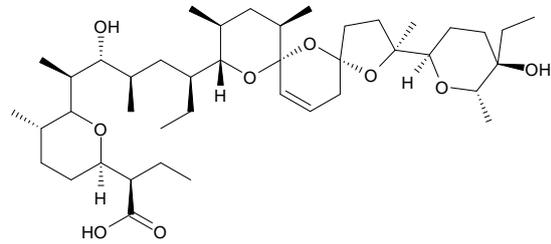
4. Avermectina



3. Anfotericina



5. Doxorubicina



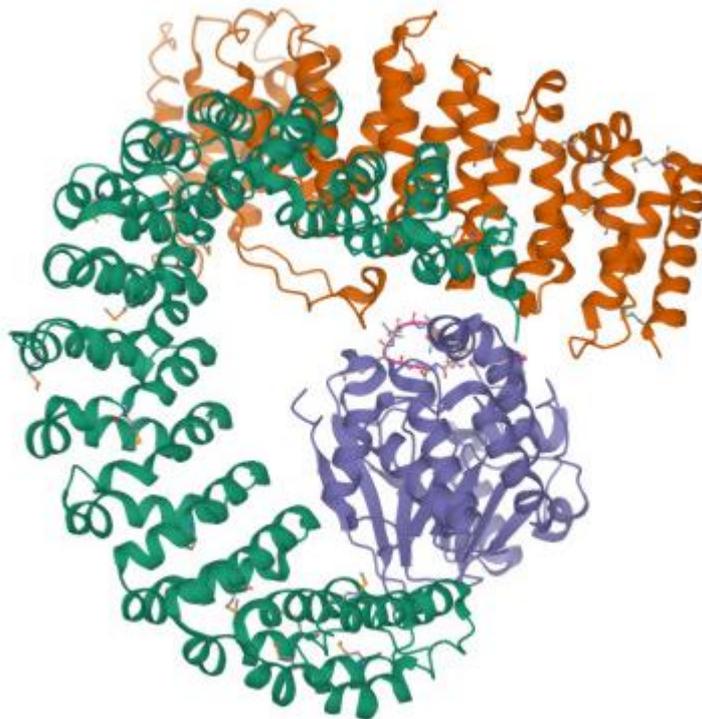
6. Salinomicina

Fonte: Do Autor (2023).

2.3 Policetídeos produzidos por bactérias do gênero *Streptomyces*

Em 1983, foi isolado o primeiro metabólito da classe de substâncias biossintetizadas por estreptomicetos, a Fostriecina (7). Foi isolada a partir de uma cultura de *Streptomyces pulveraceus subsp. fostreus ATCC 31906*. Assim como os outros metabólitos biossintetizados por estreptomicetos, a Fostriecina promove inibição da enzima serina/treonina proteína fosfatase 2A (EC 3.1.3.16), enzima responsável por atividades biológicas essenciais, como divisão celular. Sendo assim, essa ação inibitória a torna um agente antitumoral. Esse composto apresentou atividade citotóxica contra vários tipos de cânceres, como câncer de ovário, de mama, leucemia (TUNAC, 1983; TROST, 2016). Na Figura 3 é possível ver a enzima serina/treonina proteína fosfatase 2A (PP2A).

Figura 3 – Estrutura cristalina da PP2A.



Fonte: RCSB PDB Protein Data Bank (2012).

Seguidamente em 1992, foi isolada a molécula Sultriecina (**8**), ela é a única dentre sua classe que possui um grupo funcional sulfato ao invés de um fosfato, além disso há em sua estrutura um trieno conjugado e uma δ -lactona α, β insaturada. Foi isolada a partir de uma cultura de *Streptomyces roseiscleroticus* L827-2 (ATCC 53903). Sua atividade antitumoral também advém da inibição da enzima serina/treonina proteína fosfatase 2A (PP2A). Em testes *in vitro* a molécula apresentou atividade antifúngica e *in vivo* atividade antitumoral potente contra L1210 leucemias, B16 melanoma e P388. (OHKUMA, 1992; TROST, 2016).

A molécula Citostatina (**9**) foi isolada a partir de uma cultura de bactérias *Streptomyces* sp. MJ654-NF4 no ano de 1994. Essa importante molécula se mostrou eficaz contra muitas linhagens de células cancerígenas, tendo atividade citotóxica em concentrações submicromolares, e em testes com camundongos foi capaz de induzir a apoptose celular e de inibir metástase de células de melanoma B16-BL6 (SALIT, 2008).

As Foslactomicinas (**10**) também chamadas Fosfazomicinas ou Fosfolinas, advindas de policetídeos são antibióticos antifúngicos produzidos por diversos *Streptomyces* spp. (*S. pulveraceus*, *S. hygroscopicus*, *Streptomyces* sp. HK803, *S. nigrescens*, dentre outros). Além de antifúngica, também apresentaram atividades biológica, citotóxicas, indução de fatores estimuladores de colônias no estroma da medula óssea das células. A inibição de tumor metástase recentemente se mostrou consequente dessa atuação das foslactomicinas (FOTSO, 2013).

Alguns anos depois, ainda durante pesquisas com indutores de fatores estimuladores de colônias, foram identificados três compostos ativos a partir de culturas de *Streptomyces platenses* SANK 600191, sendo denominados Leustroductinas (LCNs) A, B e C (**11**) Posteriormente foi sintetizado um análogo através de saponificação denominado Leustroductina H, que demonstrou atividade trombopoietica. As Leustroductinas se mostraram congêneres de Foslactomicinas através de estudos de determinação estrutural e por tamanha semelhança estrutural, assim como as Foslactomicinas, as Leustroductinas também demonstraram atividade indutora de fatores estimuladores de colônias. Agentes indutores de CSFs são substâncias que têm sido importantes para pacientes com leucopenia advinda de radioterapia, câncer-quimioterapia e transplante de medula óssea, pois auxiliam na recuperação de leucócitos do sangue periférico (KOHAMA, 1993; DRUAIS, 2010).

De estrutura muito semelhante às Foslactomicinas e Leustroductinas, foi isolada de uma cultura de *Streptomyces hygroscopicus*, a Fosfolina (**12**), um antibiótico antitumoral que

apresentou grande atividade contra células de leucemia murina P388, também leucemia murina L1210 e EL-4 (THOMASI, 2016, p. 157).

2.4 Isolamento e síntese do policetídeo Fosdiecina A

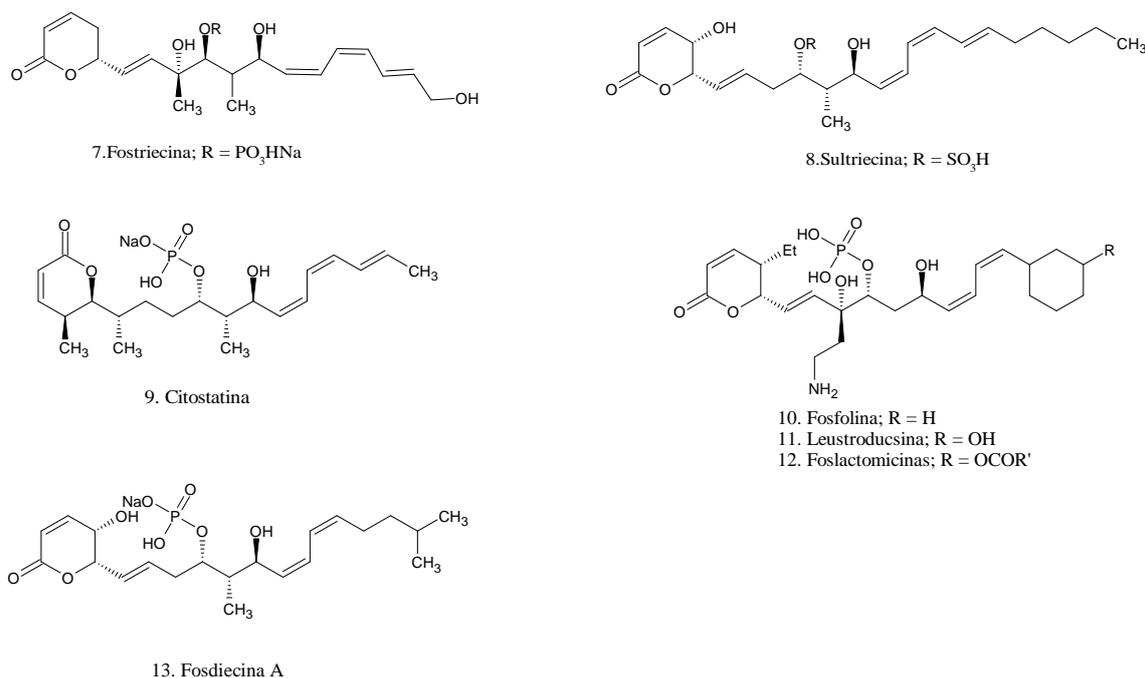
Em 2014, dois novos policetídeos nomeados Fosdiecina A (**13**) e Fosdiecina B (**14**) pertencentes à família da Fostriecina foram descobertos por Thomasi (2014), onde o primeiro se mostrou promissor em testes de atividade citotóxica. Foram isolados a partir de uma cultura de *Streptomyces cebimarensis* SS99BA-2 encontrada em São Sebastião, litoral norte do estado de São Paulo, em sedimentos marinhos recolhidos em 12 e 15m de profundidade. As duas estruturas só se diferem devido à insaturação na posição α - β insaturada da lactona de seis membros da Fosdiecina A, a presença dessa insaturação na lactona é um dos fatores estruturais que colaboram para a atividade citotóxica da molécula, o que não é visto na Fosdiecina B.

A primeira síntese da Fosdiecina A foi feita em 2019 por Della-Felice et al. (2019), na Universidade do Texas, em Austin nos Estados Unidos. Sua síntese foi a de menor número de etapas dentre a família da Fostriecina, totalizando 13 etapas até chegar na molécula descoberta por Thomasi (2014). Das mais de 30 sínteses totais e formais relatadas de membros da mesma família, elas chegaram a ter de 19 a 34 etapas para se obter o composto de interesse.

O método usado pelos autores se baseia no acoplamento redutor de carbonila mediado por álcool assimétrico, sendo também um modelo viável para a síntese de outros membros da família da Fostriecina, bem como auxílio no estudo da estrutura/atividade de análogos sintéticos (DELLA-FELICE et al., 2019).

Na Figura 4 é possível ver a molécula recentemente encontrada, Fosdiecina A e as outras pertencentes à sua família.

Figura 4– Policetídeos com atividades antitumorais pela inibição da enzima PP2A.



Fonte: Do Autor (2023).

2.5 Partes essenciais para ação citotóxica de policetídeos advindos de estreptomicetos

Segundo Burke et al. (2010), algumas partes são de essencial presença nas moléculas da classe de policetídeos para apresentar ação citotóxica, sendo elas, a lactona eletrofílica α - β insaturada, cauda hidrofóbica Z,Z,E-trieno e monoéster de fosfato. Esse último promove uma inibição seletiva da enzima serina/treonina proteína fosfatase 2A (PP2A). No caso da Sultriecina que não possui um monoéster de fosfato, mas um de sulfato, foi visto nos estudos feitos pelos autores que apesar da ação antitumoral potente *in vivo*, a molécula não possui seletividade na inibição proteína fosfatase 2A (PP2A) como nas outras moléculas de sua classe. Com isso constatou-se que o sulfato é um substituto pobre para o fosfato na coordenação bimetálica com a enzima. Em uma série de substituições de partes da molécula Fostriecina foi possível averiguar a importância das partes essenciais citadas anteriormente. A remoção da cauda Z,Z,E-trieno ocasionou a perda de atividade em 200 vezes e a inserção de PMB éter em seu lugar resultou em perda de atividade em 100 vezes. A retirada da lactona eletrofílica α - β insaturada causa perda de atividade em 12 vezes, já a retirada do monoéster fosfato resulta em perda acima de 250 vezes em atividade. Ao comparar um análogo contendo a lactona eletrofílica α - β insaturada sem a cauda cauda Z,Z,E-trieno com um segundo sem a lactona mas contendo a cauda perceberam que o segundo análogo era 15 vezes mais potente que o primeiro,

enfatizando a importância fundamental da cauda Z,Z,E-trieno na seletividade para PP2A e ação citotóxica.

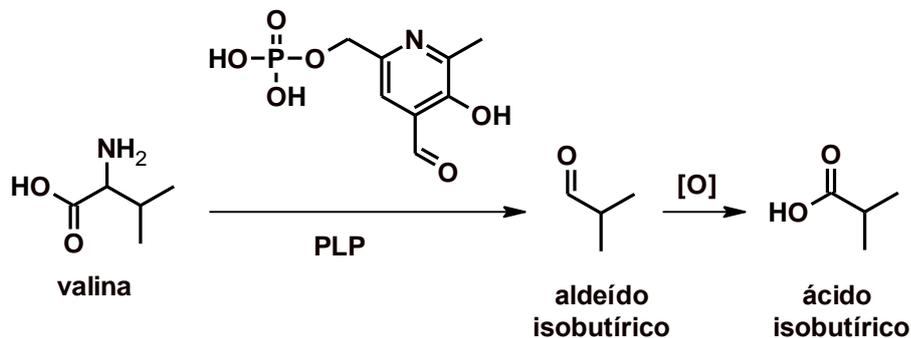
3. DISCUSSÃO

3.1 Proposta de rota biossintética para o policetídeo Fosdiecina A

É de se supor que a cadeia carbônica hidrofóbica ao final da estrutura da fosdiecina, contendo um grupo isopropil, seja formada a partir do aminoácido valina. A cadeia carbônica de policetídeos é construída a partir de várias reações de condensação de Claisen entre unidades de acetilcoenzima A (DEWICK, 2002), entretanto para essa molécula em específico isso não explicaria como aparece um grupamento isopropil ao final da cadeia. Assim, propõe-se que na biossíntese dessa substância, a primeira condensação de Claisen ocorra entre uma unidade de acetilcoenzima A e uma unidade de isopropilcoenzima A.

Na natureza, derivados da acetilcoenzima A são formados a partir de aminoácidos (MELCHIOR, 2013). Dessa forma, espera-se que nesse caso deva ocorrer o mesmo processo. Em primeiro momento, a valina precisa passar por uma reação de transaminação com a participação da coenzima fosfato de piridoxal (PLP). Essa reação produz, em um primeiro momento, o aldeído isobutírico, que deverá sofrer oxidação espontânea à ácido isobutírico, de acordo com a Figura 5. O ácido isobutírico é o material de partida para a isopropilcoenzima A.

Figura 5 – Esquema geral de formação do ácido isobutírico.

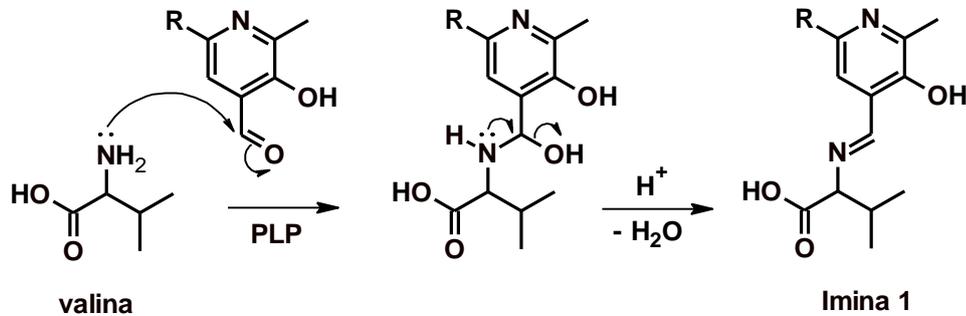


Fonte: Do Autor (2023).

Nessa reação, um átomo de carbono do aminoácido valina é perdido na forma de gás carbônico. Isso é possível de se entender com mais detalhes quando se analisa o provável mecanismo dessa reação. O grupo amina da valina deverá reagir com o grupamento aldeído da

coenzima PLP para dar origem à um intermediário que vamos chamar de Imina 1, devido à formação da função imina entre o aminoácido e a PLP, conforme pode ser visto na Figura 6.

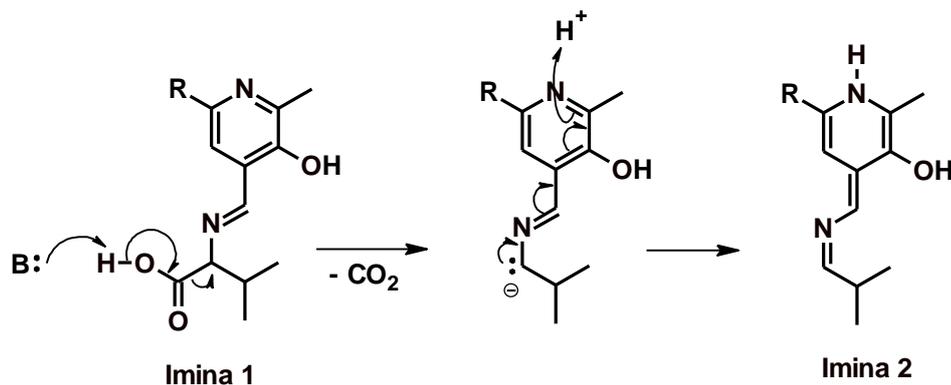
Figura 6– Mecanismo de reação entre o aminoácido valina e a coenzima PLP.



Fonte: Do Autor (2023).

Se o intermediário imina 1 sofrer hidrólise, volta-se a formar a valina e a coenzima PLP na sua forma de aldeído. Entretanto, enquanto o aminoácido valina não se descarboxila com facilidade, o mesmo não é válido para a imina 1. Isso acontece porque ao se descarboxilar, com o auxílio de uma base de Lewis qualquer, o par de elétrons da ligação carbono-carbono rompida, pode se estabilizar por ressonância em um longo sistema conjugado. E ainda, essa estrutura pode se transformar em uma espécie neutra ao capturar um hidrogênio do meio, formando um outro intermediário que iremos nomear de imina 2, de acordo com o esquema apresentado na figura 7.

Figura 7 – Descarboxilação e conversão da imina 1 em imina 2.

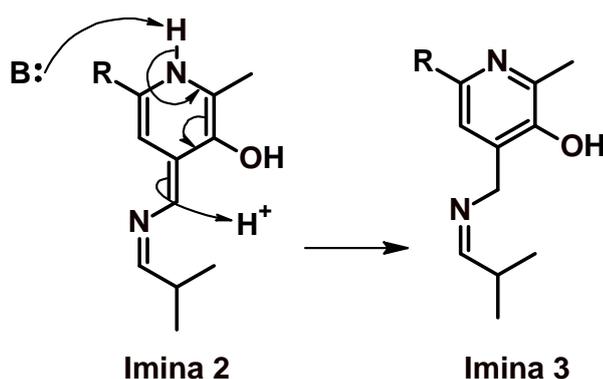


Fonte: Do Autor (2023).

Por se tratar de um sistema conjugado, dificilmente a imina 2 sofre hidrólise. Entretanto, uma base de Lewis qualquer pode catalisar a rearomatização do sistema nitrogenado heterocíclico da

PLP. Quando isso acontece, forma-se uma imina não conjugada, que sofre hidrólise de maneira muito mais fácil e rápida. Esse intermediário será identificado como imina 3 e seu mecanismo de formação pode ser visto na Figura 8.

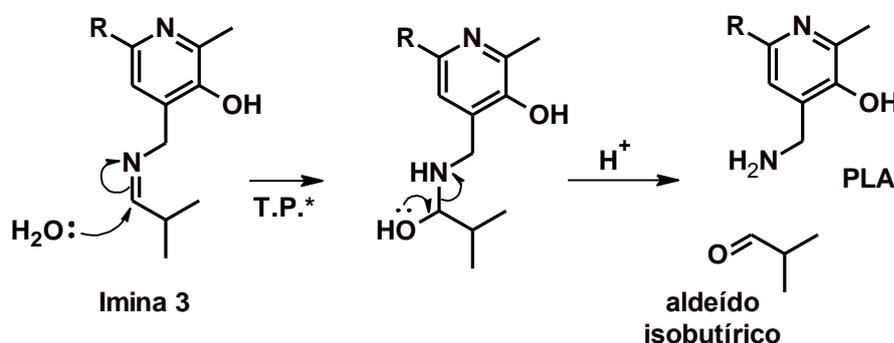
Figura 8 – Interversão da imina 2 em imina 3.



Fonte: Do Autor (2023).

A imina 3 pode, facilmente, sofrer hidrólise para formar o aldeído isobutírico e a fosfato de piridoxamina (PLA). Uma molécula de água ataca o carbono eletrofílico do grupamento imina para formar o intermediário aminoálcool. Esse intermediário rapidamente pode capturar um átomo de hidrogênio pelo átomo de nitrogênio levando à uma clivagem da ligação nitrogênio-carbono para formar os dois produtos, de acordo com o esquema de reação que pode ser visto na Figura 9.

Figura 9– Hidrólise da imina 3 para formar o aldeído isobutírico e o fosfato de piridoxamina (PLA).

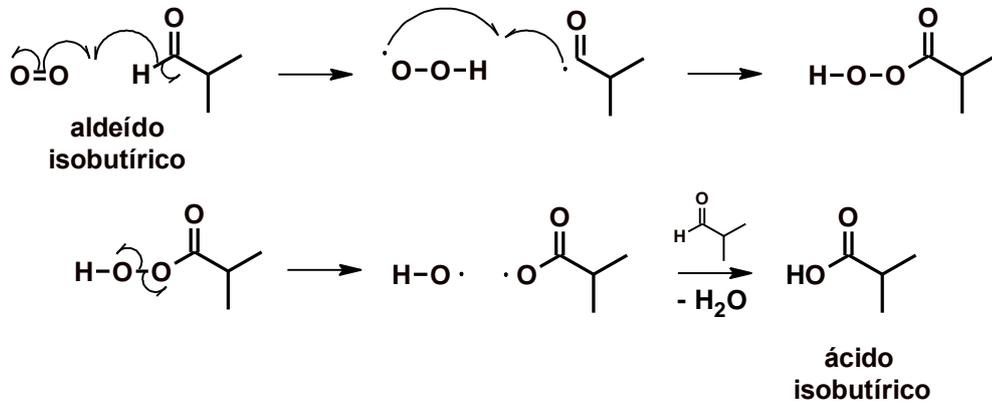


Fonte: Do Autor (2023).

A oxidação do aldeído isobutírico à ácido isobutírico deve envolver um mecanismo clássico de reação radicalar envolvendo oxigênio molecular (O_2), passando por um peróxido intermediário. O mecanismo dessa reação já é bem conhecido e descrito na literatura

(SOLOMONS, 2012a). Dessa forma, propõe-se que o aldeído isobutírico seja oxidado à ácido isobutírico de acordo com o mecanismo apresentado na Figura 10.

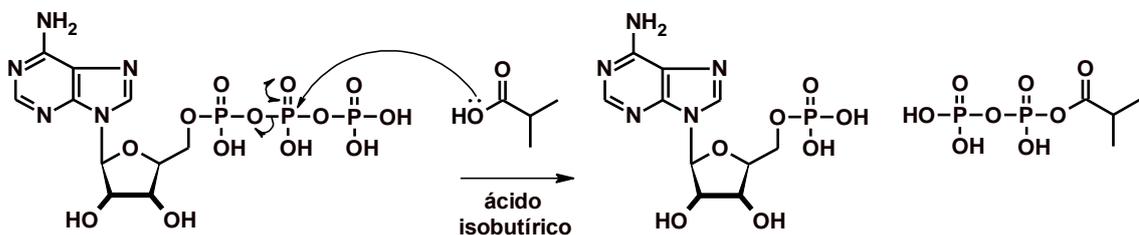
Figura 10 – Mecanismo de oxidação do aldeído isobutírico à ácido isobutírico.



Fonte: Do Autor (2023).

Para formar uma unidade de isopropilcoenzima A, o ácido isobutírico precisa reagir com a coenzima A (CoA), por uma substituição acílica. Entretanto, essa reação não pode acontecer por simples contato entre esses dois compostos pois o grupamento $-\text{OH}$ não é um bom grupo abandonador. Dessa forma, essa reação precisa ser mediada por adenosina trifosfato (ATP). Assim como ocorre na formação da ligação peptídica (NELSON, 2014), a formação de um tioéster envolve o gasto de ATP. Isso porque o ATP, transfere dois grupamentos fosfato para o ácido carboxílico, fazendo do oxigênio um bom grupo abandonador e pronto para reações de substituição acílica, conforme pode ser visto na Figura 11.

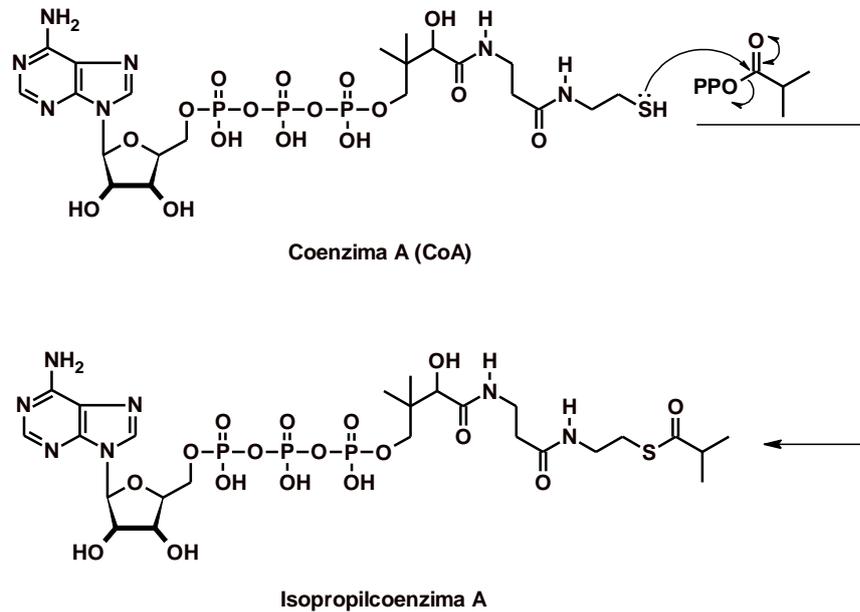
Figura 11– Transferência de dois grupos fosfatos a partir de ATP para o ácido isobutírico.



Fonte: Do Autor (2023).

Uma vez que o oxigênio sp^3 do ácido carboxílico agora se converteu em um bom grupo abandonador, esse intermediário pode se acoplar com a coenzima A (CoA) por uma substituição nucleofílica acílica para formar o tioéster isopropilcoenzima A, necessário para o início da formação da cadeia carbônica da fosdiecina. Esse mecanismo de reação pode ser visto na Figura 12.

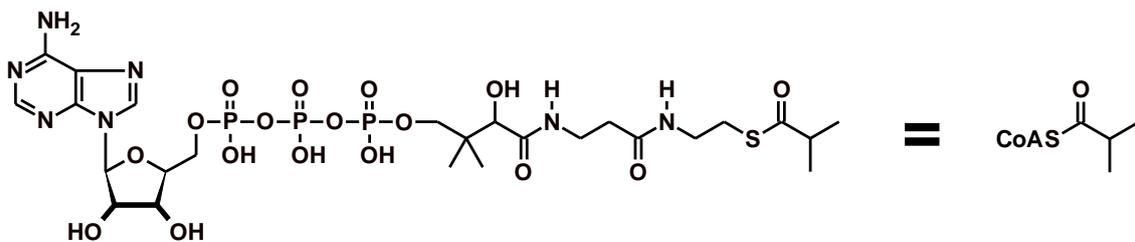
Figura 12– Mecanismo de reação entre a coenzima A (CoA) e a forma fosfatada do ácido isobutírico.



Fonte: Do Autor (2023).

Uma vez que a estrutura da coenzima A é extensa e ela aparecerá em vários momentos a partir deste ponto, essa nomenclatura (CoA) será utilizada nas estruturas toda vez que uma porção dessas estiver presente, de acordo com o esquema apresentado na Figura 13.

Figura 13– Representação simplificada da “porção” coenzima A em biomoléculas.

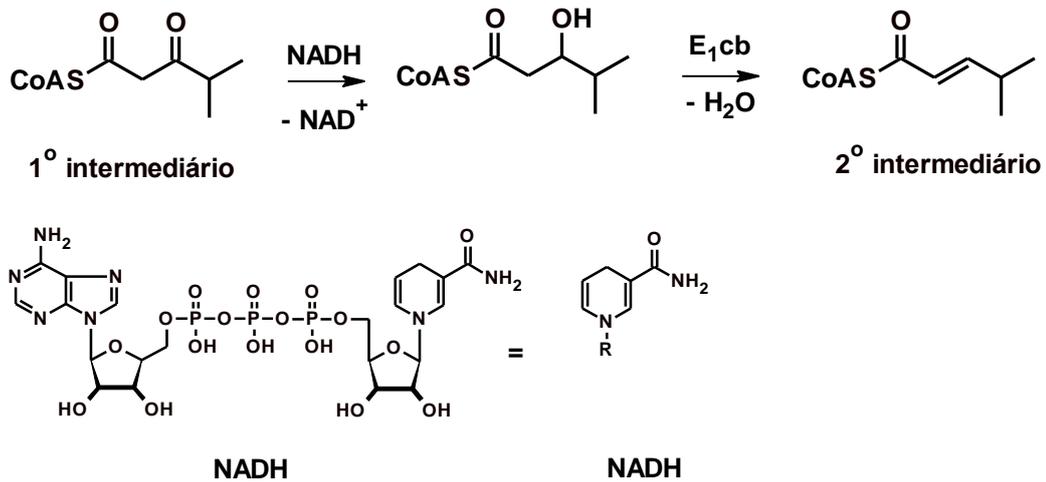


Fonte: Do Autor (2023).

Uma vez formado o precursor inicial da fosdiecina, a isopropilcoenzima A, este deverá reagir com uma unidade de acetilcoenzima A (AcetilCoA) para dar origem ao primeiro intermediário da biossíntese, de acordo com o esquema de reação apresentado na Figura 14.

sofrer uma redução, com a participação de dinucleótido de nicotinamida e adenina na sua forma reduzida (NADH), seguida de uma eliminação do tipo E₁cb, conforme pode ser visto no esquema apresentado na Figura 16.

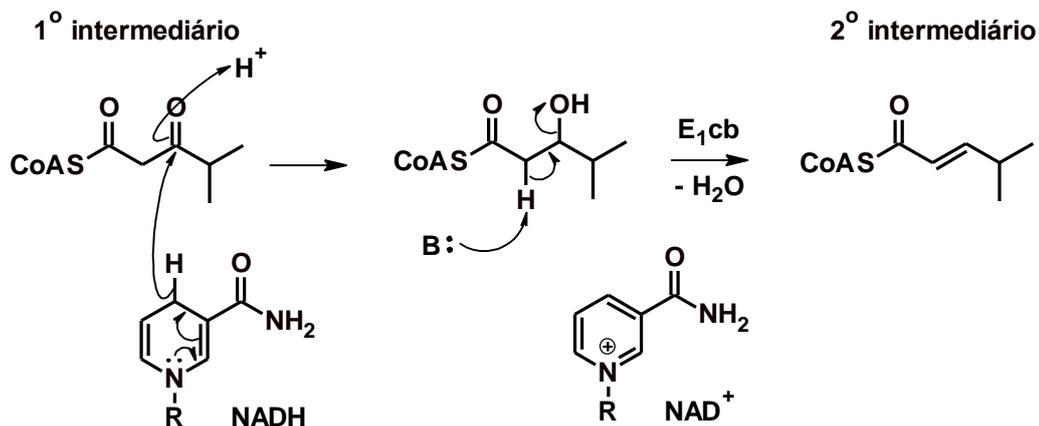
Figura 16– Redução com a participação de NADH e eliminação da hidroxila de álcool para formar o 2º intermediário.



Fonte: Do Autor (2023).

Essa reação de redução ocorre quando o dinucleótido de nicotinamida e adenina na sua forma reduzida (NADH) transfere seu íon hidreto para o carbono carbonílico de cetona no 1º intermediário. A ligação dupla C=O se rompe. O oxigênio acomoda o par de elétrons da ligação rompida e imediatamente captura um próton do meio para forma um álcool secundário. Ao formar esse álcool, ele é equivalente a um aldol, que se desidrata muito facilmente para dar origem à uma carbonila alfa, beta-insaturada presente no 2º intermediário. Esse mecanismo detalhado pode ser visualizado na Figura 17.

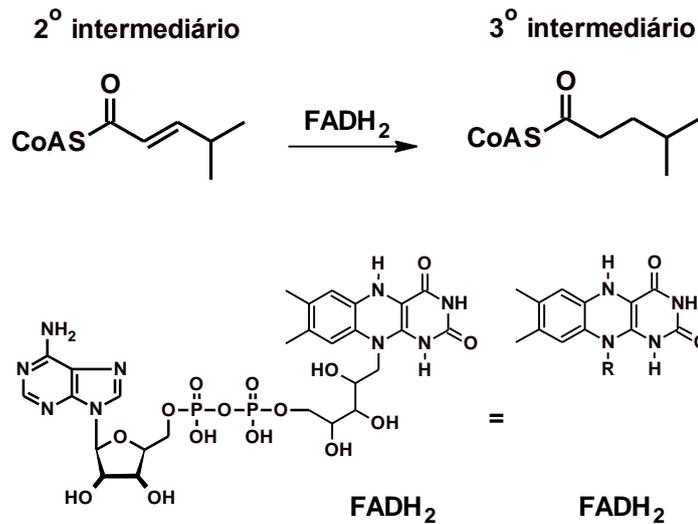
Figura 17– Mecanismo de conversão do 1º intermediário no 2º intermediário com a participação de NADH.



Fonte: Do Autor (2023).

Como não existe uma ligação dupla C=C nesta posição na estrutura da fosdiecina, isso sugere que ela já sofreu uma redução neste momento. Essa reação deverá ser feita com a participação de dinucleótido de flavina e adenina (FADH₂) em sua forma reduzida. Essa proposta está esquematizada na Figura 18.

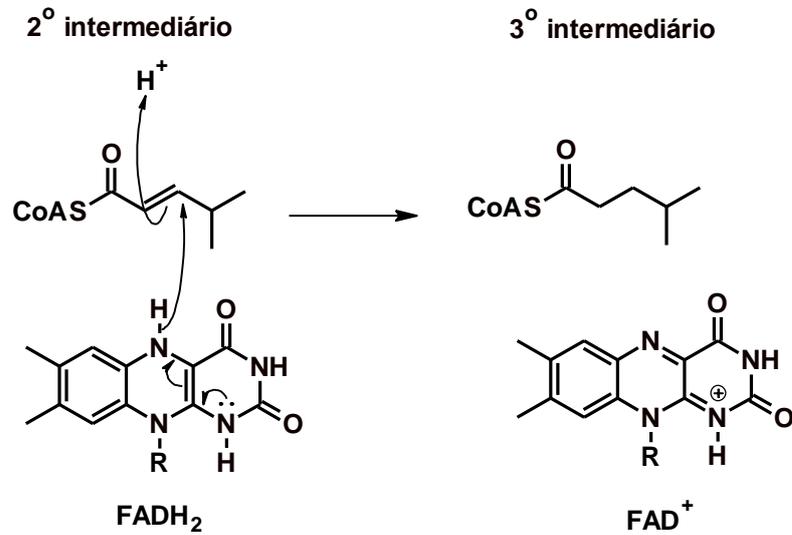
Figura 18– Redução da ligação dupla C=C com a participação de dinucleótido de flavina e adenina (FADH₂) para converter o 2º intermediário no 3º intermediário.



Fonte: Do Autor (2023).

Nessa reação, o FADH₂ atua de maneira muito semelhante ao NADH, transferindo um hidreto para o carbono beta do sistema carbonílico alfa,beta-insaturado. A transferência de hidreto deve ocorrer nessa posição, uma vez que ao se romper a ligação dupla carbono – carbono, o par de elétrons dessa ligação pode se estabilizar por ressonância antes de capturar um próton do meio. Simultaneamente, o dinucleótido de flavina e adenina (FADH₂) em sua forma reduzida se converte na sua forma oxidada (FAD⁺). Essa proposta de mecanismo está detalhada na Figura 19.

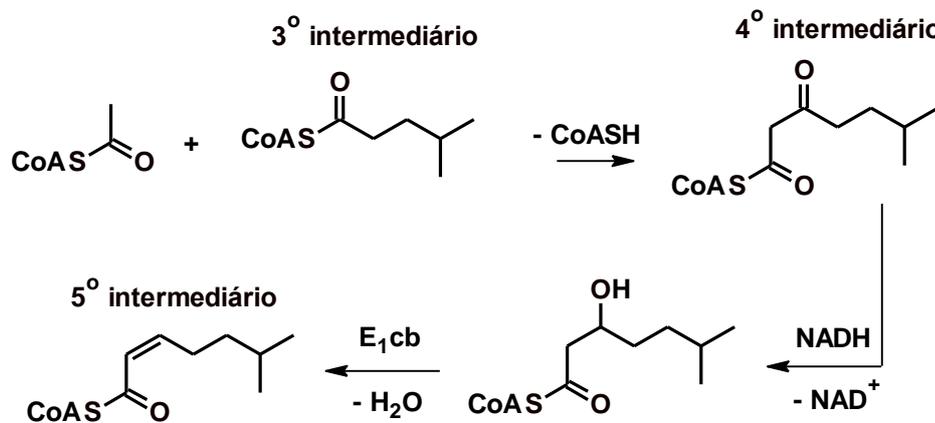
Figura 19– Redução da dupla C=C com a participação de FADH₂ para converter o 2° intermediário no 3° intermediário.



Fonte: Do Autor (2023).

Após essa etapa de redução da ligação dupla C=C que forma o 3° intermediário, a cadeia carbônica deve continuar crescendo por mais uma condensação de Claisen com outra unidade de AcetilCoA para dar origem ao 4° intermediário. Novamente, a carbonila de cetona do 4° intermediário sofre redução com a participação de NADH, seguida de uma eliminação E1cb que produz o 5° intermediário que possui uma ligação dupla C=C com estereoquímica Z. Uma vez que essa dupla está presente na estrutura final, nenhuma reação adicional de redução ocorre neste momento, de acordo com a proposta apresentada na Figura 20.

Figura 20– Propostas de reações que levariam ao 5° intermediário na biossíntese.

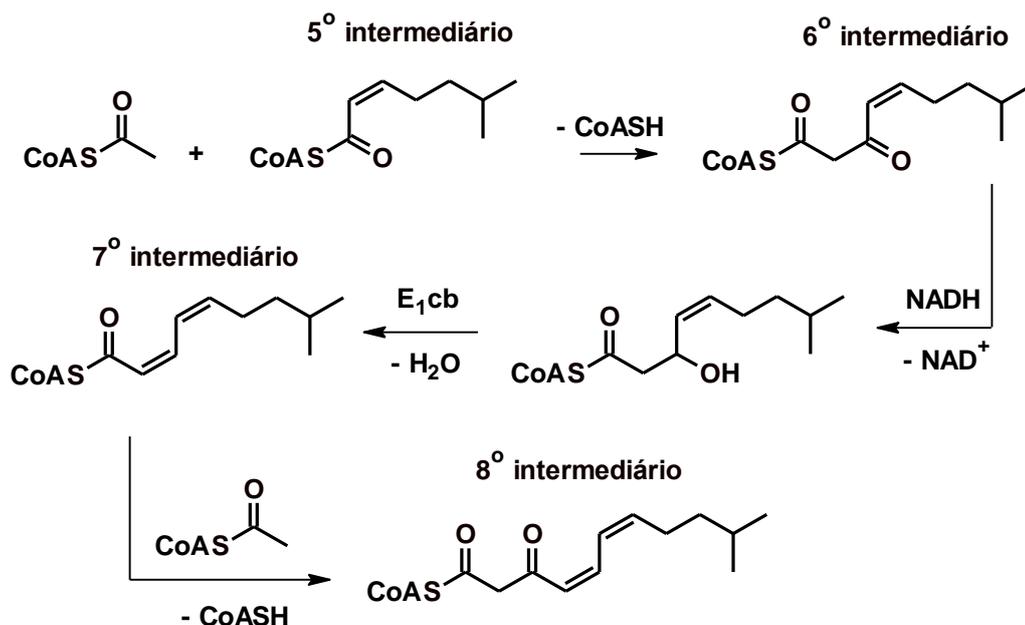


Fonte: Do Autor (2023).

A partir deste ponto, a cadeia carbônica continuaria crescendo seguindo exatamente essas mesmas etapas de reações. O 5° intermediário reage novamente com AcetilCoA, seguindo

de redução e eliminação para formar a segunda dupla C=C com orientação também Z, dando origem ao 7º intermediário. Por sua vez, o 7º intermediário sofre nova condensação de Claisen com AcetilCoA para produzir o 8º intermediário. Toda essa série de reações está apresentada na Figura 21.

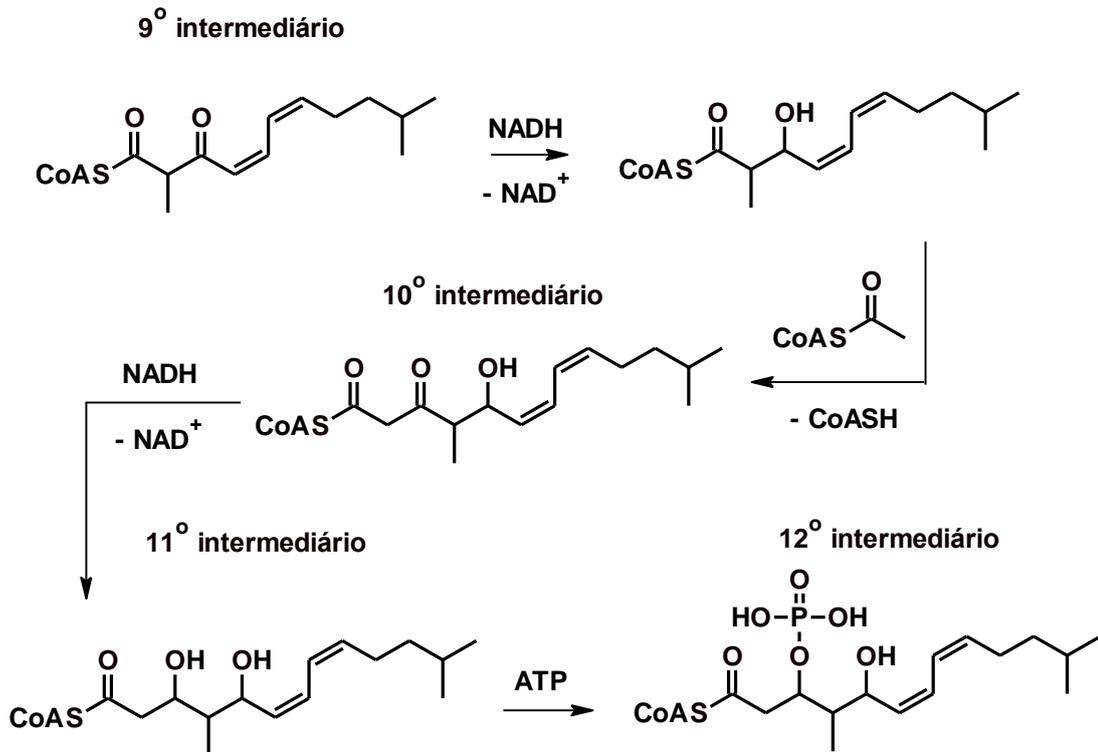
Figura 21– Série de reações que convertem o 5º intermediário no 8º intermediário na proposta de biossíntese da fosdiecina.



Fonte: Do Autor (2023).

Na parte central da cadeia carbônica da fosdiecina, vemos um grupamento metil. Esse grupamento metil deve ser inserido neste momento, após a formação do 8º intermediário. Essas reações mediadas por S-adenosilmetionina (SAM), um cofator enzimático envolvido na transferência de grupos metil. A reação ocorre via SN2: uma base de Lewis remove facilmente um próton do 8º intermediário, devido à relativa alta acidez dos hidrogênios entre as duas carbonilas, e em seguida, esse ânion promove um ataque nucleofílico no grupo -CH₃ do SAM, conforme pode ser visto na Figura 22.

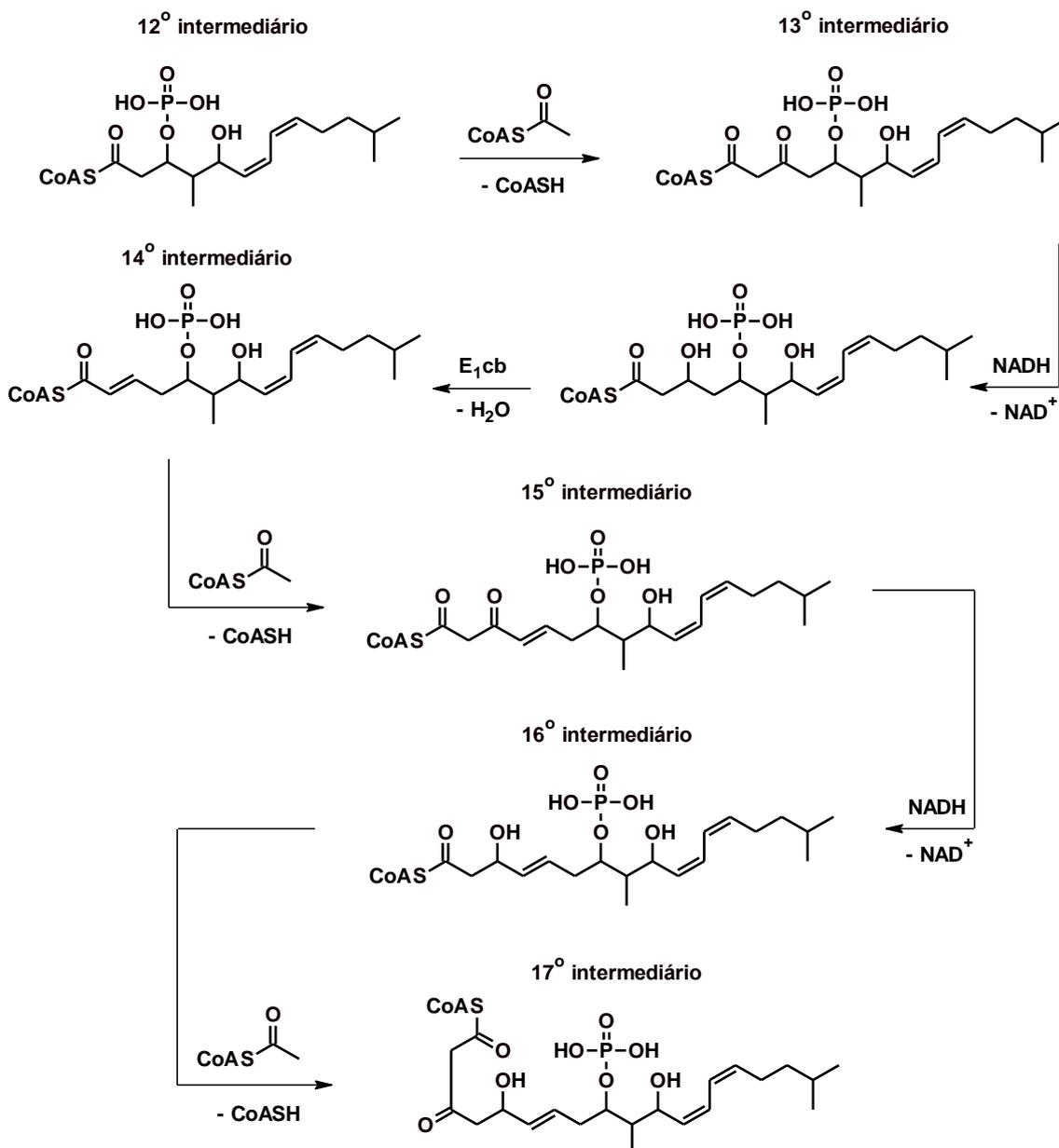
Figura 23– Série de reações que converteriam o 9º intermediário no 12º intermediário na proposta de biossíntese da fosdiecina.



Fonte: Do Autor (2023).

Em seguida, a cadeia carbônica do 12º intermediário deverá continuar crescendo por outra condensação de Claisen com mais uma unidade de acetilCoA, que originará o 13º intermediário, que, por sua vez, irá sofrer redução e eliminação para formar o 14º intermediário que, agora, forma uma dupla C=C com configuração *E*. Uma nova condensação de Claisen com acetilCoa forma o 15º intermediário seguida de redução para originar o álcool secundário visto no 16º intermediário. Essa hidroxila de álcool não sofre desidratação e será necessária para uma etapa posterior. Por fim, outra condensação de Claisen com acetilCoA formará o 17º intermediário. Todas essas propostas de reações que ocorreriam na biossíntese da fosdiecina, podem ser visualizadas na Figura 24.

Figura 24 – Série de reações que converteriam o 12º intermediário no 17º intermediário na proposta de biossíntese da fosdiecina.

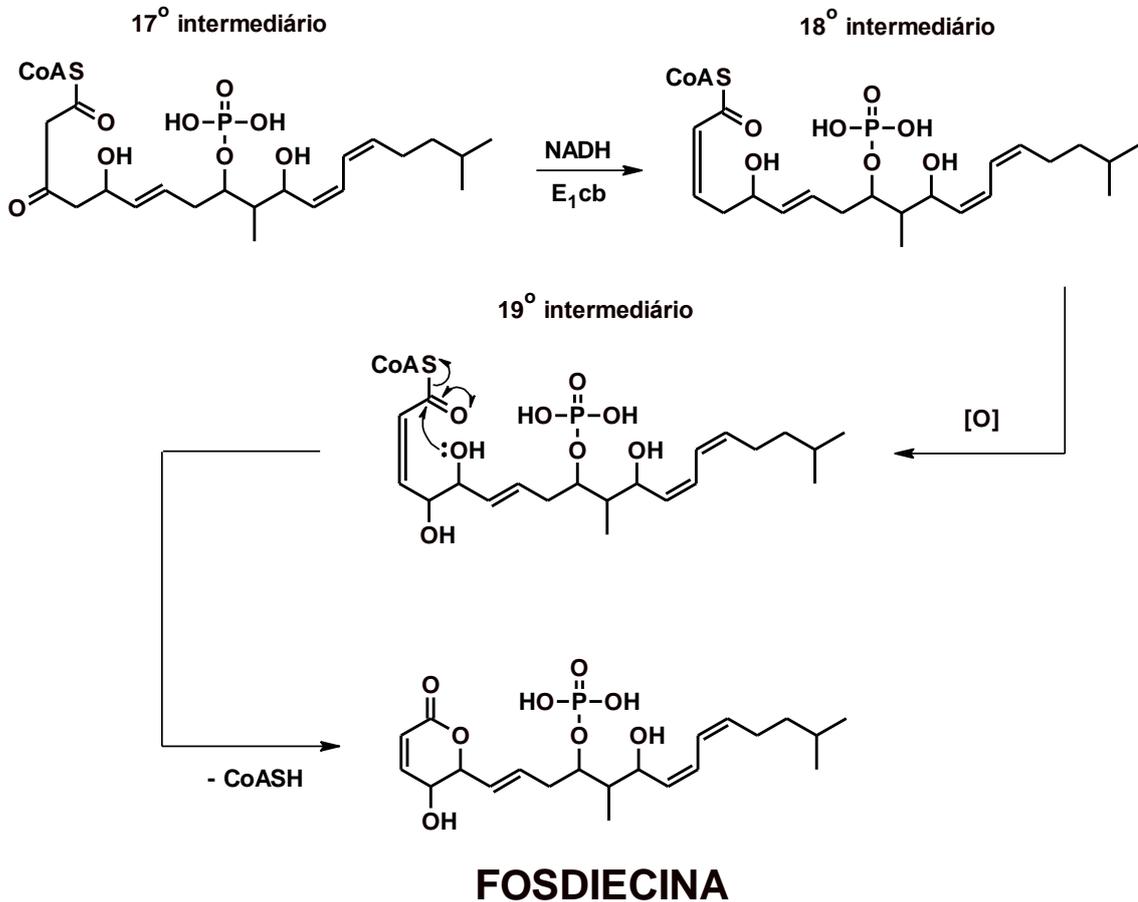


Fonte: Do Autor (2023).

A mesma reação de redução seguida de desidratação E1cb, converte o 17º intermediário no 18º intermediário, formando uma nova ligação dupla C=C com configuração Z. Em seguida, uma oxidação (com a participação de O₂ molecular) deve ocorrer no carbono saturado sp³ vizinho à nova dupla C=C Z que acaba de ser formada. Esse processo deve ser especialmente favorável pois esta é uma posição suscetível à formação de radicais uma vez que eles podem ser estabilizados por ressonância. Na etapa final, uma dessas hidroxilas promove um ataque nucleofílico na carbonila do tioéster presente na estrutura, promovendo uma substituição

nucleofílica acíclica, liberando a coenzima A e produzindo simultaneamente a fosdiecina. Essa parte final da proposta de biossíntese pode ser vista na Figura 25.

Figura 25– Proposta de série de reações que converteriam o 17º intermediário na FOSDIECINA.

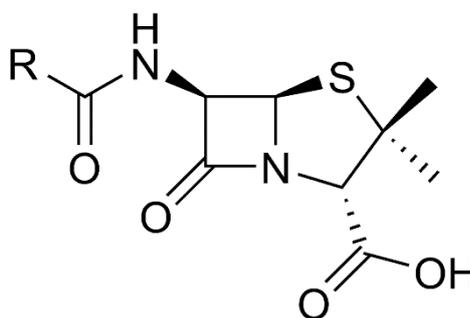


Fonte: Do Autor (2023).

Diante da retrobiogênese apresentada, em que é necessário a passagem por 19 intermediários antes de chegar ao produto final, a Fosdiecina A, e também pela análise de sua síntese obtida na Universidade do Texas em 13 etapas, fica claro alguns aspectos como grandes intervalos de temperatura, variando de -78°C a 50°C , o que pode ocasionar altos custos energéticos, há também o aspecto de rendimento, em que chega a 99% em algumas etapas e em outras chega a 27%, por fim, a alta demanda de tempo até chegar no composto final. Dessa forma, a retrobiossíntese sugere possíveis precursores que podem ser fornecidos à um cultivo da cultura de bactéria *Streptomyces cebimarensis* SS99BA-2 caso seja mais viável que sintetizá-la.

Buscando respaldar essa opção biossintética de gerar a Fosdiecina A vale ressaltar algumas moléculas clássicas, as penicilinas, que apesar de a muito tempo descobertas ainda são produzidas pelo cultivo da cultura de fungos do gênero *Penicillium* que as produzem (CALIXTO E CAVALHEIRO, 2012). Sua síntese é extremamente dificultada pelo anel β -Lactâmico, tornando o meio biossintético mais viável até nos dias atuais. Na Figura 26 encontra-se uma estrutura geral das penicilinas.

Figura 26 – Estrutura geral das penicilinas



Fonte: Do autor (2023).

4. CONCLUSÃO

Desse modo, através do trabalho em questão fica evidente a importância dos policetídeos produzidos pelas bactérias do gênero *Streptomyces*, principalmente por suas multiplicidades de usos como fármacos.

A Fosdiecina A assim como outras moléculas de sua classe apresenta potencial antitumoral, ela possui todas as partes estruturais que tiveram comprovação de presença necessária para atividade citotóxica. Ainda se faz necessário muito aprofundamento sobre sua ação biológica *in vivo* para vir a ser usada como fármaco. Contudo sua síntese já corrobora muito para estudos de sua atividade e caso se mostre inviável e a molécula venha a ser de fato um fármaco antitumoral é possível aperfeiçoar sua produção através do cultivo da bactéria, uma vez que a retrobiossíntese sugere possíveis precursores que podem ser fornecidos à um cultivo da cultura de bactéria *Streptomyces cebimarensis SS99BA-2* dentro das condições necessárias para obtenção desse policetídeo de maneira economicamente mais viável.

Por fim, este trabalho abre margens futuras para comprovação da veracidade dos materiais de partida usados pela bactéria na biossíntese da Fosdiecina A, que pode ser feita utilizando reagentes marcados com hidrogênio deutério (^2H) ou oxigênio 17 (^{17}O), por exemplo, e que

quando submetidos à Ressonância Magnética Nuclear (RMN) emitem um sinal mais intenso em relação aos outros picos, o que provaria o uso dos materiais de partida pela bactéria se os átomos marcados estivessem presentes na molécula final.

REFERÊNCIAS

BURKE, Christopher P. *et al.* Total Synthesis and Evaluation of Phostriecin and Key Structural Analogues. **The Journal of Organic Chemistry**, 75 (22), 7505-7513, 2010.

CALIXTO, C. M. F. E CAVALHEIRO, E. T. G. Penicilina: efeito do acaso e momento histórico no desenvolvimento científico. **Química Nova na Escola**, 34 (3), 118-123, 2012.

DELLA-FELICE, Franco *et al.* Total Synthesis and Structural Validation of Phosdiecin A via Asymmetric Alcohol-Mediated Carbonyl Reductive Coupling. **Journal of the American Chemical Society**, 141, 13778–13782, 2019.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products. **John Wiley & Sons**, Ltd, 2 ed., 2002.

DRUAIS, Valérie *et al.* A convergent approach toward phoslactomycins and leustroducsins. **Tetrahedron**. Volume 66, Issue 33, 6358-6375, 2010, ISSN 0040-4020.

FOTSO, S. *et al.* Phoslactomycins from *Streptomyces* sp. MLA1839 and Their Biological Activities. **Journal of Natural Products**, 76 (8), 1509-1513, 2013.

GOKHALE, R. S., SANKARANARAYANAN, R., & MOHANTY, D. Versatility of polyketide synthases in generating metabolic diversity. **Current Opinion in Structural Biology**, 17(6), 736–743, 2007.

GRAS, H. E WEBER, W. Light-induced alterations in cell shape and pigment displacement in chromatophores of the sea urchin *Centrostephanus longispinus*. **Cell. Tiss. Res.** 182, 165-176, 1977.

KOHAMA, T. *et al.* "Novel microbial metabolites of the phoslactomycins family induce production of colony stimulating factors by bone marrow stromal cells. II. Isolation, physico-chemical properties and structure determination". **The Journal of Antibiotics**, 46 (10), 1512, 1993.

LIU, XUE-JIAO *et al.* Identification of the Post-Polyketide Synthase Modification Enzymes for Fostriecin Biosynthesis in *Streptomyces pulveraceus*. **Journal of Natural Products**, 76 (4), 524-529, 2013.

MELCHIOR, R. SEMINÁRIO PARA DISCIPLINA BIOQUÍMICA DO TECIDO ANIMAL, 2013, Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul, RS: Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

NELSON, DAVID L. Princípios de bioquímica de Lehninger [recurso eletrônico] / David L. Nelson, Michael M. Cox ; [tradução: Ana Beatriz Gorini da Veiga ... et al.] ; revisão técnica: Carlos Termignoni ... [et al.]. – 6. ed. – Dados eletrônicos. – Porto Alegre : Artmed, 2014.

OHKUMA, Hiroaki *et al.* Sultricin, a New Antifungal and Antitumor Antibiotic from *Streptomyces Roseiscleroticus*. Production, Isolation, Structure and Biological Activity. **The Journal of Antibiotics**, 1992, 45 (8), 1239–1249.

PAULO, Bruno S. *et al.* Avanços recentes em biossíntese combinatória de policetídeos: perspectivas e desafios. **Quim. Nova**, Vol. 42, No. 1, 71-83, 2019.

RCSB PDB PROTEIN DATA BANK. **Crystal structure of Protein Phosphatase 2A (PP2A) holoenzyme with the catalytic subunit carboxyl terminus truncated**. [2012]. Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/2NYL>. Acesso em: 09 mar. 2023.

SALIT, Anne-Frédérique *et al.* Synthetic studies toward cytostatin, a natural product inhibitor of protein phosphatase 2A. **Tetrahedron**, Vol. 60, Issue 8, 6684-6697, 2008.

SCHLIWA, M. AND BEREITER-HAHN, J. Pigment movements in fish melanophores: morphological and physiological studies. III. The effects of colchicine and vinblastine. **Z. Zellforsch.** 147, 127-148, 1973.

SCHRODER, Joachim, *et al.* Plant polyketide synthases: a chalcone synthase-type enzyme which performs a condensation reaction with methylmalonyl-CoA in the biosynthesis of C-methylated chalcones. **Biochemistry** 37, 8417-8425. Service, M. and Wardlaw, A. C. (1984). Echinochrome-A as a bactericidal substance in the coelomic fluid of *Echinus esculentus* (L.). **Comp. Biochem. Physiol.** 79B, 161-165, 1998.

SCHROECKH, V.; SCHERLACH, K., *et al.* Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. volume 106, issue 34, 2009.

SIEMIENIEWICZ KW, SCHREMPF H. Concerted responses between the chitinbinding protein secreting *Streptomyces olivaceoviridis* and *Aspergillus proliferans*. **Microbiology**. 153, 593–600, 2007.

SOLOMONS, T. W. GRAHAM, 1934- Química orgânica, volume 1/ T. W. GRAHAM SOLOMONS, CRAIG B. FRYHLE; tradução e revisão técnica Júlio Carlos Afonso (*et al.*), - Rio de Janeiro: LTC, p. 463, 2012a.

SOLOMONS, T. W. GRAHAM, 1934- Química orgânica, volume 2/ T. W. GRAHAM SOLOMONS, CRAIG B. FRYHLE; tradução e revisão técnica Júlio Carlos Afonso [et al.]. - Rio de Janeiro: LTC, p. 281-283, 2012b.

THOMASI, Sérgio Scherrer. **Aplicação de LC-SPE/NMR na caracterização de substâncias isoladas de cultivos da bactéria marinha *Streptomyces cebimarensis* SS99BA-2**. 2014. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

THOMASI Sérgio Scherrer *et al.* Identification of Two New Phosphorylated Polyketides from a Brazilian *Streptomyces* sp. Through the Use of LC-SPE/NMR. **Helv. Chim. Acta**, 99, 281 – 285, 2016.

TROST, B. M.; KNOPF, J. D.; BRINDLE, C. S., Synthetic Strategies Employed for the Construction of Fostriecin and Related Natural Products. **Chem. Rev.**, 116, 15035-15088, 2016.

TUNAC, J. B.; GRAHAM, B. D.; DOBSON, W. E. Novel Antitumor Agents CI-920, PD 113,270 and PD 113,271. I. Taxonomy, Fermentation and Biological Properties. **The Journal of Antibiotics**, 36 (12), 1595–1600, 1983.

WEBER, W. AND DAMBACH, M. Light-sensitivity of isolated pigment cells of the sea urchin *Centrostephanus longispinus*. **Cell Tiss. Res.** 148, 437- 440, 1974.

WEBER, W. AND GRAS, H. Ultrastructural observations on changes in cell shape in chromatophores of the sea urchin *Centrostephanus longispinus*. **Cell Tiss. Res.** 206, 21-33, 1980.

WINKEL-SHIRLEY, B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. **Curr. Opin. Plant Biol.** 5, 218-223, 2002.

WISE, Gary E. Ultrastructure of amphibian melanophores after light-dark adaptation and hormonal treatment. **J. Ultrastruct. Res.** 27, 472-485, 1969.