



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

EMILI BRUNA TOSO BUENO

**PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE
QUINOLONAS E AERUGINALDEÍDO DE
*Pseudomonas aeruginosa***

Londrina
2021

EMILI BRUNA TOSO BUENO

**PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE
QUINOLONAS E AERUGINALDEÍDO DE
*Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr^a. Josiane A. Vignoli
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Rubia Casagrande

Londrina
2021

BUENO, EMILI.

PROCESSO DE PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO CONJUNTA DE 2-HEPTIL-3,4 HIDROXIQUINOLONA (PQS) E 2-(2-HIDROXIFENIL)-THIAZOL-4-CARBALDEÍDO (IQS) / EMILI BUENO. - Londrina, 2022.
56 f.

Orientador: Josiane A. Vignoli Camilios Rúbia Casagrande.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2022.

Inclui bibliografia.

1. A presente invenção trata de um processo de produção, extração e purificação conjunta de 2-heptil-3,4-hidroxiquinolona (PQS) e 2-(2-hidroxifenil)-thiazol-4- carbaldeído (IQS) por cultivos submersos de *Pseudomonas aeruginosa* de forma simultânea, ambos envolvidos na regulação da virulência deste patógeno oportunista. O processo desenvolvido permite a biossíntese e secreção destas moléculas em um tempo de cultivo curto, o que diminui os custos operacionais do processo. Desta forma, o invento permite a obtenção de extratos brutos menos complexos e conseqüentemente com maior pureza dos compostos, o que favorece as técnicas de purificação. Assim o presente processo possibilita a obtenção biotecnológica de PQS e IQS, ambos com alto potencial de aplicação farmacêutica, a partir de métodos simples e de baixo custo. - Tese. I. Rúbia Casagrande, Josiane A. Vignoli Camilios. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Título.

CDU 66

EMILI BRUNA TOSO BUENO

**PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE
QUINOLONAS E AERUGINALDEÍDO DE
*Pseudomonas aeruginosa***

Defesa apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, para exame de qualificação, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Orientadora: Prof. Dra. Josiane A.
Vignoli Camilios
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Daniele Sartori
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Doumit Camilios Neto
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Marcelo Rodrigues de Melo (suplente)
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 09 de dezembro de 2021.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder saúde, força, sabedoria, por ter me abençoando em todos os momentos, sendo o meu guia.

Aos meus pais, Quitéria e Celso e ao meu irmão, Wesley, pelo apoio, incentivo, por acreditarem na minha capacidade e nunca medirem esforços para a concretização dos meus sonhos.

A minha orientadora Profa. Dra. Josiane A. Vignoli pelos ensinamentos, dedicação, disponibilidade e paciência.

Ao Prof. Dr. Doumit Camilos Neto, por todo apoio, dedicação, incentivo e ensinamento.

Ao meu esposo, Marcos, que me incentivou nos momentos difíceis e compreendeu a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho.

A minha amiga de trabalho Wessel, Simões e Ferrari, por todo apoio, dedicação, paciência, contribuição e auxílio.

A Universidade Estadual de Londrina e ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pela elevada qualidade do ensino ofertado.

Aos membros da banca de qualificação e de defesa pela disponibilidade, atenção e ensinamento.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Tereza de Calcutá

BUENO, Emili Bruna Toso. **Produção, extração e purificação de quinolonas do quorum sensing de *Pseudomonas aeruginosa***. 2021. 48 f. Dissertação de Mestrado pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria gram-negativa aeróbica que se utiliza de homoserino lactonas e quinolonas sinalizadoras para realizar um processo de comunicação célula-a-célula, conhecido como *quorum sensing*. Esse mecanismo faz regulação coordenada da expressão de genes dependente da densidade populacional, através da produção, transporte e reconhecimento destas moléculas sinalizadoras. As principais quinolonas sinalizadoras do *quorum sensing* de *P. aeruginosa* são a 4-hidroxi-2-heptil-quinolona (HHQ) e a 2-heptil-3,4-hidroxi-quinolona, também conhecida como PQS. Além dos efeitos na regulação da expressão gênica da bactéria as quinolonas apresentam, também, efeitos na modulação da resposta imune do hospedeiro, sendo possíveis alvos para desenvolvimento de novas drogas anti-inflamatórias. Recentemente, um novo composto [2-(2-hidroxifenil) tiazol-4-carbaldeído] também conhecido como aeruginaldeído, foi identificado como sinalizador de um suposto quarto circuito de comunicação de *P. aeruginosa*. A literatura científica apresenta informações sobre aeruginaldeído que sugerem propriedade antioxidante tendo assim, um potencial para aplicações nas indústrias farmacêutica e cosmética. Neste contexto, esta dissertação teve como objetivo produzir concomitantemente quinolonas do *quorum sensing* de *P. aeruginosa* e aeruginaldeído, por meio de cultivos submersos da cepa PAO1, e ainda buscar metodologias para extração e purificação dessas moléculas produzidas no mesmo meio de cultivo. *P. aeruginosa* foi crescida em meio de sais e glicerol com tempo de cultivo de 3 e 9 dias. Extrações ácido-base sequenciais, seguidas de purificação por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), avaliadas em cada etapa por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foram realizadas para obtenção das moléculas de interesse. Foi obtido uma produção conjunta de aeruginaldeído e quinolona, possibilitando, num tempo de cultivo menor, o que garante menores custos ao processo. A extração ácido-base sequencial permitiu a obtenção das moléculas de interesse a partir do meio de cultivo livre de células. As frações foram obtidas a partir de cultivos de *P. aeruginosa* por três e nove dias. As frações ácidas do terceiro dia continham a molécula de aeruginaldeído onde obteve-se um rendimento de 4,7mg/L; enquanto a fração básica do terceiro e nono dia continham a quinolona. O rendimento de quinolona do nono dia foi igual a 2mg/L. A submissão dessas frações à CCD preparativa permitiu a purificação de ambas as moléculas. O tempo de cultivo de 3 dias permitiu a obtenção de PQS e aeruginaldeído com menor quantidade de metabólitos contaminantes. Consideramos que os métodos de produção, extração e purificação empregados foram adequados para obtenção das moléculas com alto grau de pureza.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*; *Quorum sensing*; PQS; Purificação; Quinolonas; Aeruginaldeído.

BUENO, Emili Bruna Toso. Master's Thesis Project with partial requirement to complete the Master's Degree in the Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, from the State University of Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an aerobic gram-negative bacterium that uses homoserine lactones and signaling quinolones to carry out a process of cell-to-cell communication, known as quorum sensing. This mechanism makes coordinated regulation of gene expression dependent on population density, through the production, transport and recognition of these signaling molecules. The main quinolones that signal the quorum sensing of *P. aeruginosa* are 4-hydroxy-2-heptylquinolone (HHQ) and 2-heptyl-3,4-hydroxy-quinolone, also known as PQS. In addition to the effects on the regulation of the bacterium's gene expression, quinolones also have effects on the modulation of the host's immune response, being possible targets for the development of new anti-inflammatory drugs. Recently, a new compound [2-(2-hydroxyphenyl) thiazol-4-carbaldehyde], also known as aeruginaldehyde, was identified as a signal for a supposed fourth communication circuit of *P. aeruginosa*. The scientific literature presents information on aeruginaldehyde that suggests an antioxidant property, thus having a potential for applications in the pharmaceutical and cosmetic industries. In this context, this dissertation aimed to simultaneously produce quinolones from the quorum sensing of *P. aeruginosa* and aeruginaldehyde, through submerged cultures of the PAO1 strain, and also optimize specific methodologies for extraction and purification of these molecules. *Pseudomonas* was grown in salts and glycerol medium with culture times of 3 and 9 days. Acid-base extractions followed by purification by preparative thin layer chromatography (TLC), evaluated at each step by analytical TLC, were applied to obtain the molecules of interest. The acid-base extraction allowed obtaining the molecules of interest from the cell-free culture medium. The acidic fraction contained the aeruginaldehyde molecule, while the basic fraction contained the quinolone. The submission of these fractions to the preparative thin layer chromatography technique allowed the purification of both molecules. The 3 days of cultivation allowed to obtain PQS and aeruginaldehyde with a lower amount of contaminating metabolites. We believe that the production, extraction and purification methods used were adequate to obtain molecules with a high degree of purity.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; Quorum sensing; PQS; Purification; Quinolones; Aeruginaldehyde.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura das moléculas de acil-homoserinolactonas: (a) N-(3-oxododecanoil)-HSL e (b) N-butilil-HSL. (c) estrutura molecular da quinolona (2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona).....	30
Figura 2 – <i>Quorum sensing</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
Figura 3 – Estrutura do aeruginaldeído [2-(2-hydroxyphenyl) thiazole-4-carbaldehyde]	36
Figura 4 – Cromatografia em Camada Delgada analítica do composto IQS (aeruginaldeído).....	43
Figura 5 – Espectro de massas produzido obtido por ESI-qTOF de 2-(3-hidroxifenil)-1,3-Tiazol-4-carbaldeído	44
Figura 6 – Estrutura proposta para o composto IQS, 2-(3-hidroxifenil)-1,3-Tiazol-4-carbaldeído	45
Figura 7 – Espectro de ressonância magnética nuclear de ¹³ C do 2-(3-hidroxifenil)-1,3-Tiazol-4-carbaldeído em solvente DMSO-d ₆ , a 25 °C	45
Figura 8 – Espectro de ressonância magnética nuclear bidimensional ¹ H- ¹³ HSQC do 2-(3-hidroxifenil)-1,3-Tiazol-4-carbaldeído em solvente DMSO-d ₆ , a 25 °C	46
Figura 9 – Espectro de ressonância magnética nuclear de correlação de hidrogênios -COSY do 2-(3-hidroxifenil)-1,3-Tiazol-4-carbaldeído em solvente DMSO-d ₆ , a 25 °C.....	47
Figura 10 – CCDs analíticas dos extratos brutos de cultivos submersos com 3 e 9 dias, utilizando como fase móvel diclorometano: metanol 5%.....	48
Figura 11 – CCDs analíticas dos extratos brutos de cultivos submersos com 3 e 9 dias, utilizando como fase móvel clorofórmio: metanol 1%.	48
Figura 12 – CCDs analíticas dos extratos de cultivos submersos com 3 e 9 dias, utilizando como fase movel cloroformio: metanol 5%	49
Figura 13 – Estrutura química do PQS	50
Figura 14 – CCDs preparativas dos extratos brutos orgânicos básicos obtidos do terceiro e nono dia de cultivo.	50

Figura 15 – CCDs analíticas das frações purificadas por CCDs preparativas dos extratos básicos.	51
Figura 16 – CCD preparativa da fração ácida obtida do terceiro dia de cultivo.....	52
Figura 17 – CCD analítica da fração ácida obtida da etapa de purificação por CCDs preparativas com os respectivos padrões.	52
Figura 18 – CCD analítica das frações obtidas das etapas de purificação com 3 e 9 dias de cultivo.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Assinalamentos de ^1H e ^{13}C para a molécula IQS (aeruginaldeído) obtidos a partir da análise dos espectros de ressonância magnética nuclear.	46
Tabela 2 – Massas dos extratos brutos em diferentes tempos de cultivo	48
Tabela 3 – Massa da separação dos extratos brutos e purificados das frações básicas com obtenção de PQS	49
Tabela 4 – Obtenção das massas dos extratos purificados em tempos distintos de cultivo	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcilHSLs	4-hidroxi-2-heptil-alquil-quinolonas
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
C4HSL	N-Butirilhomoserinolactona
CCD	Cromatografia em cama delgada
HAQ	4-hidroxi-2-heptil-alquil-quinolonas
HHQ	4-hidroxi-2-heptil-quinolona
HIF	1 α Fator 1 induzível por hipóxia
HOD	Dioxigenase
IL-2	Interleucina 2
IQS	Integrated quorum sensing system
LB	Luria bertani
MSQS	Moléculas sinalizadoras do quorum sensing
NFKB	Fator nuclear kappa B
pH	Potencial hidrogênico
PQS	2-heptil-3,4 hidroxi-quinolona
QS	<i>quorum sensing</i>
RF	Fator de retenção
RMN	Ressonância magnética nuclear
UV	Ultravioleta
ROS	Espécies reativas de oxigênio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	OBJETIVOS	27
2.1	OBJETIVO GERAL	27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	28
3.1	<i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA E PSEUDOMONE QUINOLONE SIGNAL</i>	28
3.2	<i>QUORUM SENSING</i>	30
3.3	AERUGINALDEÍDO	35
3.4	CONTROVÉRSIA DE IQS/ AERUGINALDEÍDO	37
3.5	PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE QUINOLONAS E FENAZINAS	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1	PRODUÇÃO DE QUINOLONAS E AERUGINALDEÍDO	39
4.1.1	Micorganismo	39
4.1.2	Meios De Preservação	39
4.1.3	Preparo Do Pré-Inóculo	39
4.1.4	Preparo Do Inóculo	39
4.1.5	Cultivos Submersos (CSb)	40
4.1.6	Extração Ácido Base	40
4.2	MÉTODOS ANALÍTICOS	40
4.2.1	Cromatografia Líquida em Camada Delgada (CCD) analítica	40
4.2.2	Revelador Vanilina Sulfúrica	41
4.2.3	Revelador Ácido Sulfúrico 10%	41
4.2.4	Aquecimento	41
4.2.5	Análise Gravimétrica	41
4.2.6	Cromatografia Em Camada Delgada (CCD) Preparativa	41
4.2.7	Análise Por Espectrometria de Massas	42
4.2.8	Ressonância Magnética Nuclear	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	43

5.1	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA ANALÍTICA DO COMPOSTO AERUGINALDEÍDO, ISOLADO PRO TRABALHOS PRÉVIOS DE NOSSO GROPO.....	43
5.2	AVALIAÇÃO DO TEMPO DE PRODUÇÃO DE PQS E AERUGINALDEÍDO POR <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> PAO1	43
5.3	ETAPAS DE PURIFICAÇÃO	46
5.4	ENSAIOS PRELIMINARES DE IDENTIFICAÇÃO E CARACTERISTIZAÇÃO ESTRUTURAL DO AERUGINALDEÍDO	49
6	CONCLUSÃO.....	55
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1 INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo aeróbico gram-negativo, encontrado comumente nos solos, pântanos e habitats marinhos costeiros, bem como sobre os tecidos animais e vegetais. Esta bactéria destaca-se por ser um patógeno humano oportunista, atingindo principalmente indivíduos imunocomprometidos ou hospitalizados, sendo uma das causas predominantes de morbidade e mortalidade em pacientes com fibrose cística. O processo de infecção por *P. aeruginosa* ocorre principalmente por meio de dano epitelial, que pode ser gerado por queimaduras e feridas, função mucociliar inadequada, ventilação mecânica (respiradores) e até mesmo por catéteres (STOVER et al., 2000; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; MÉAR et al., 2013; CHO et al., 2013).

P. aeruginosa utiliza uma variedade de fatores de virulência para acometer o hospedeiro e estabelecer a infecção. Utiliza do *quorum sensing* (QS), um mecanismo de comunicação célula a célula, para regular o padrão de comportamento bacteriano, modulando a expressão gênica em fenótipos como o desenvolvimento de biofilme, motilidade e produção de um conjunto de fatores de virulência extracelulares. Estes por sua vez, são capazes de causar dano tecidual extenso, o patógeno penetra na pele ou mucosa atingindo a corrente sanguínea e conseqüente promoção da disseminação sistêmica (KIM et al., 2010; LOU et al., 2017). O sistema QS de *P. aeruginosa* é constituído por moléculas sinalizadoras, N- acetil-homoserinolactonas (acil-HSLs) e as quinolonas (HAQs). As HAQs são compostas pela 4-hidroxi-2-heptil-quinolona (HHQ) e 2- heptil-3,4-hidroxi-quinolona, também conhecida como PQS do inglês "*Pseudomonas* quinolone signal".

Recentemente, um novo composto [2-(2-hidroxifenil) tiazol-4-carbaldeído] também conhecido como aeruginaldeído, foi identificado como sinalizador de um suposto quarto circuito de comunicação de *P. aeruginosa*. Denominado de IQS, do inglês "integrated quorum sensing system", este sistema seria capaz de integrar sinais de estresse ambiental com a rede de detecção densidade populacional (LEE et al., 2013; SUN et al., 2016).

As moléculas sinalizadoras do QS de *P. aeruginosa* desempenham

um papel fundamental na infecção do hospedeiro tanto na regulação da expressão de genes relativos a fatores de virulência, como também modulando a resposta imune no hospedeiro (KIM et al., 2010; LIU; CHAN; CHANG, 2015). Embora a modulação da resposta imune do hospedeiro pelas acil-HSL tem sido intensamente estudada, pouco é conhecido sobre os efeitos das HAQs e do IQS (aeruginaldeído) nos hospedeiros. As quinolonas demonstraram propriedades anti-inflamatória e antioxidante, indicando, portanto, um potencial de aplicações nas indústrias farmacêutica e cosmética (KIM et al., 2010; ABDALLA et al., 2017). Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver um processo de produção conjunta, extração e purificação de quinolonas e aeruginaldeído produzidos por *P. aeruginosa* PAO1.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um processo de produção conjunta, extração e purificação de quinolonas e aeruginaldeído produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Padronizar um processo de produção conjunta de quinolonas e aeruginaldeído por cultivos submersos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1;

Avaliar os tempos de produção dos compostos quinolonas e aeruginaldeído por cultivos submersos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1;

Padronizar as metodologias de extração, purificação e quantificação de quinolonas e aeruginaldeído obtidos dos cultivos submersos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* E *Pseudomone Quinolone Signal*

P. aeruginosa é um patógeno oportunista metabolicamente versátil capaz de sobreviver em uma grande variedade de ambientes. Este bacilo gram-negativo pertence à família Pseudomonadaceae, é aeróbio e mau fermentador de glicose. *P. aeruginosa* apresenta mobilidade por meio de uma flagelação polar e temperatura ótima de crescimento que varia entre 37 °C e 42°C (FERREIRA, 2009).

Em humanos, é a principal causa de infecções de alto risco em pacientes com queimaduras graves, imunocomprometidos, portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica e de fibrose cística. A maior contribuição para a patogenicidade deste microrganismo deve-se a sua habilidade de expressar um arsenal de fatores de virulência (BALASUBRAMANIAN et al., 2013). Dentre os diversos fatores de virulência, destacam-se uma classe de pigmentos redoxativos formados por anéis aromáticos heterocíclicos nitrogenados com derivados carboxi e hidroxil substituídos, coletivamente denominados de fenazinas (MAVRODI et al., 2006; PRICE-WHELAN et al., 2006) e uma mistura de biosurfactantes do tipo ramnolipídico com funções fisiológicas associadas à motilidade bacteriana (do inglês *swarming*), desenvolvimento de biofilme, absorção e biodegradação de compostos com baixa solubilidade (VATSA et al., 2010).

A regulação da expressão dos genes de produção das fenazinas e dos ramnolipídeos, bem como de outros fenótipos de virulência, é realizada por um mecanismo de comunicação entre bactérias, vinculado à densidade populacional. Este sistema de linguagem, conhecido como *quorum sensing* (QS), permite a coordenação do comportamento bacteriano por meio da produção e difusão de pequenas moléculas sinalizadoras difusíveis (MSQS) (SCHAUDER; BASSLER, 2001; ABU et al., 2013). No QS de *P. aeruginosa* existem duas MSQS do tipo acil-homoserinolactonas (acil-HSL): N-(3-oxododecanoil)-HSL e N-butiril-HSL, produzidas pelas enzimas LasI e RhII, respectivamente e MSQS da classe das quinolonas, principalmente a 2-heptil-3-hidroxil-4-quinolona também conhecida como "*Pseudomonas quinolone signal*" (PQS) (DIGGLE et al., 2007).

As MSQS apresentam um papel central durante a infecção regulando tanto a expressão de fatores de virulência da bactéria como modulando a

resposta do sistema imune do hospedeiro (LIU et al., 2015). Uma vez que as MSQS interferem com a sinalização da célula hospedeira e através dessa sinalização modulam a resposta imune, apresentam assim um grande potencial para desenvolvimento de novas drogas imuno-moduladoras, além da possibilidade de gerarem *insights* sobre as vias de sinalização do sistema imune de mamíferos (HOOI et al., 2004, RUMBAUGH et al., 2012; LIU et al., 2015). A quinolona sinalizadora PQS reprime algumas vias da resposta imune de mamíferos que dependem da ativação do fator de transcrição NF-kB. Reprime a ligação de NF-kB e a subsequente expressão dos genes alvos regulados por este regulador transcricional. Além disso, o PQS torna mais lenta a degradação de IκB de monócitos/macrófagos de camundongo e células BAL, o que reduz a velocidade de ativação do NF-kB (KIM et al., 2010a; KIM et al., 2010b). PQS também inibe a produção de IL-2 por células dendríticas derivadas de medula óssea estimuladas por LPS (SKINDERSOE et al., 2009). Adicionalmente, o PQS diminui os níveis da proteína HIF-1α (LEGENDRE et al., 2012). O HIF-1α (fator transcricional induzido por hipóxia) é um fator de transcrição crucial na regulação da defesa e da resposta inflamatória do hospedeiro contra infecções. PQS também reduz o nível intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo um antioxidante que exibe atividade comparável à do ascorbato (Vitamina C), devido seu forte potencial de redução formando um sistema quinóide, e um segundo efeito pró-oxidativo indireto, pelo início de processos mediados por radicais, presumivelmente de uma forma semelhante à vitamina C por radicais mediados por Fe (III) / Fe (II) iniciaram processos oxidativos. (HAÜSSLER; BECKER, 2008).

PQS (2-heptil-3,4-hidroxi-quinolona) foi inicialmente identificado e purificado por Pesci et al. (1999), que realizaram a caracterização inicial do composto. O estudo indicou que a produção deste sinal intercelular ocorria somente na presença da forma ativa da proteína LasR, propondo que o PQS pode atuar como um sinal de conexão adicional dentre os sistemas de QS Las e Rhl (PESCI et al., 1999; DÉZIEL et al., 2004; DIGGLE et al., 2007).

Adicionalmente, LasR é necessário para produção de PQS e RhlR é importante para sua bioatividade. Assim, PQS interliga a hierarquia do QS. A produção de PQS apresenta concentração mais abundante entre 30 e 42 horas de crescimento, diminuindo após 48 horas, desta forma a molécula é produzida mais tarde no ciclo de crescimento do que um sinal de detecção do QS típico (MCKNIGHT, IGLEWSKI E PESCI, 2000).

Relacionado a diminuição de produção após 48 horas de crescimento, sugeriram a presença de um fator capaz de degradar PQS. Atualmente, foi

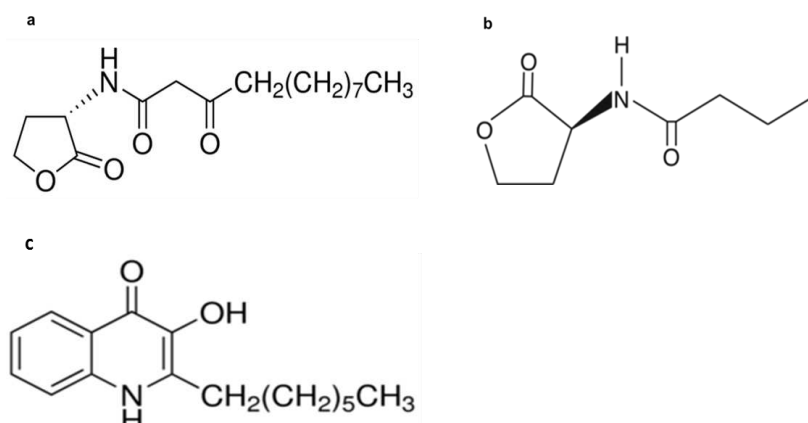
relatado quedioxigenases (Hod) de *P. aeruginosa* são capazes de degradar PQS (PUSTELNY et al. 2009; TETTMANN et al. 2016). PQS também regula sua própria produção controlando a expressão dos seus genes biossintéticos, bem como seu próprio transporte em vesículas de membrana, sendo essas responsáveis também por liberar antimicrobianos e toxinas envolvidas com a sobrevivência depois do desafio com agentes estressantes. (HAÜSSLER; BECKER, 2008).

3.2 QUORUM-SENSING

A adaptação bacteriana a novos ambientes (i.e., capacidade de percepção e reação ao ambiente) é essencial para patogenia. Essa capacidade é afetada por várias condições ambientais, como: osmolaridade, pH, densidade populacional, disponibilidade de nutrientes, defesa contra ação de outros microrganismos e contra exposição a agentes tóxicos (SMITH; IGLEWSKI, 2003; MOREIRA, 2011).

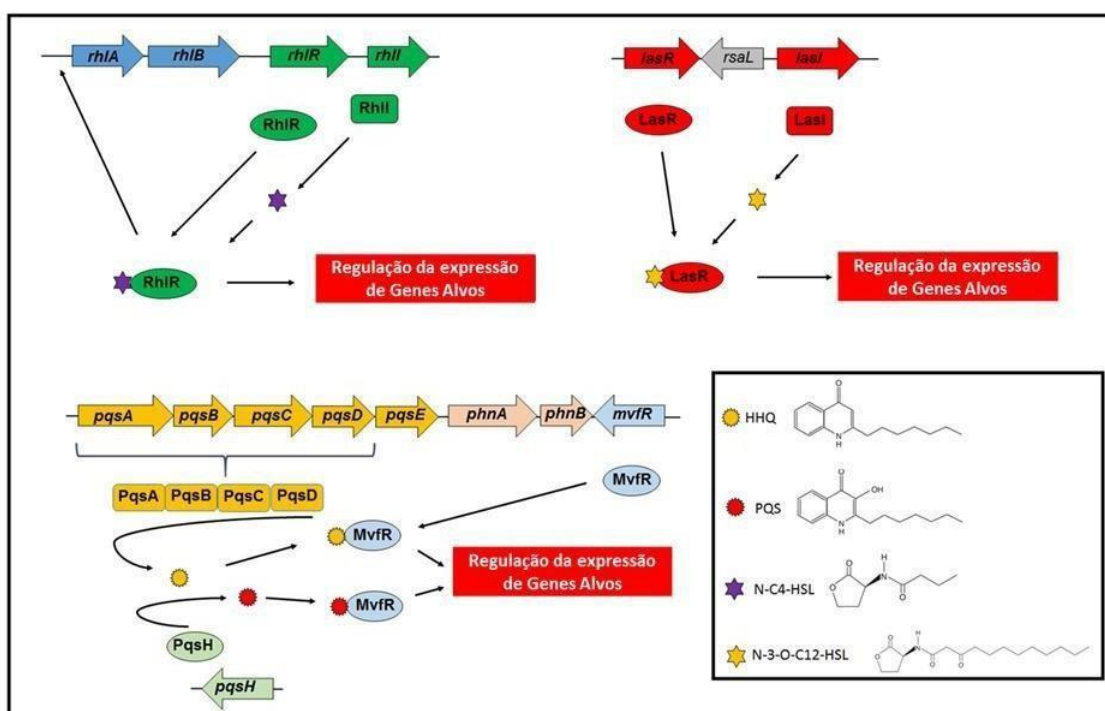
Como mencionado anteriormente, no QS de *Pseudomonas aeruginosa* existem duas moléculas sinalizadoras do tipo acil-homoserinolactonas (acil-HSL): N-(3-oxododecanoil)-HSL (3-oxo-C12-HSL) (Figura 1A) e N-butilil-HSL (C4-HSL) (Figura 1B), produzidas pelas enzimas LasI e RhII, respectivamente, assim como moléculas sinalizadoras do tipo 2-alkil-4-quinolona (AQ). A sinalização AQ utiliza 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS) (Figura 1C) e seu precursor imediato, 2-heptil-4-quinolona (HHQ) (LAMARCHE; DÉZIEL, 2011; O'LOUGHLIN et al., 2013). Estes sinalizadores ligam-se aos relativos fatores de transcrição (LasR, RhIR e MvfR), ativando assim a expressão de genes alvos (Figura 2) (OCHSNER & REISER, 1995; O'LOUGHLIN et al., 2013). Os circuitos que utilizam acil-HSL são comuns em bactérias gram-negativas, porém com moléculas distintas para diferentes bactérias, enquanto o circuito que utiliza as AQ é exclusivo de *P. aeruginosa*. Os circuitos *rhl*, *las* e *pqs* são arranjados hierarquicamente, de modo que exercem influência na regulação de um sobre o outro.

Figura 1 - Estrutura das moléculas de acil-homoserinolactonas: (a) N-(3-oxododecanoil)-HSL e (b) N-butilil-HSL. (c) estrutura molecular da quinolona (2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona).



Fonte: (a) Sigma Aldrich; (b) Cayman Chemical; (c) Sigma Aldrich.

Figura 2 – Quorum-sensing de *Pseudomonas aeruginosa*



Fonte: Almeida (2019).

Análises do transcriptoma de *P. aeruginosa* em resposta ao sistema de *quorum sensing* revelaram que cerca de 6% do genoma deste microrganismo é ativado ou reprimido pelos sistemas *lasIR* ou *rhIIIR* (MEDINA et al., 2003). Estes dois sistemas, que se encontram em regiões cromossômicas distintas (JOY et al., 2017), ativam a transcrição dos genes alvos por meio da ligação a uma região conservada do DNA, denominada “*las box*”, comum a todos genes *quorum-sensing* regulados (MEDINA et al., 2003).

Os complexos RhIR-C4-HSL e LasR-3-oxo-C12-HSL são capazes de controlar os seus próprios circuitos por meio da indução da produção de seus respectivos indutores de ativação (LAMARCHE; DÉZIEL, 2011; MAURA et

al., 2016), mas também ativam e inibem a expressão de outros genes (TORIBIO; ESCALANTE; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2010).

LasR-3-oxo-C12-HSL controla positivamente os sistemas RhlIR e AQ estimulando a expressão de *rhlI* e *rhlR*, e *mvfR*, *pqsH* e *pqsL*, respectivamente (MEDINA et al., 2003; ESCALANTE; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2010; DÉZIEL, 2011; O'LOUGHLIN et al., 2013; LAMARCHE; MAURA et al., 2016; JOY et al., 2017). A regulação da produção de MvfR por este sistema ocorre durante a fase exponencial de crescimento do microrganismo, de modo que nos estágios posteriores a regulação de *mvfR* torna-se independente de LasR (MAURA et al., 2016).

O sistema *las* é ainda capaz de regular o sistema *rhl* em nível pós traducional. A molécula sinalizadora 3-oxo-C12-HSL liga-se a RhlR, dificultando a ligação de C4-HSL a este regulador transcricional, até que C4-HSL e/ou RhlR sejam produzidos em concentração suficiente para superar o efeito de bloqueio (JOY et al., 2016).

A regulação do sistema *las*, por sua vez, é coordenada por um regulador global da expressão de fatores de virulência (Vfr), sintetizado pela expressão do gene *vfr*, o qual ativa a transcrição do gene *lasR* (CRODA-GARCÍA et al., 2011)

O sistema *rhl*, por outro lado, é composto por quatro genes, *rhlA*, *rhlB*, *rhlR* e *rhlI*, sendo os dois primeiros responsáveis pela síntese de enzimas da biossíntese de ramnolipídeos e os dois últimos componentes do circuito de QS. Apesar de serem transcritos na mesma direção (5'-*rhlABRI*- 3'), *rhlA-rhlB*, *rhlR* e *rhlI* apresentam regiões promotoras distintas (JOY et al., 2016).

O sistema *pqs*, por sua vez, compreende quatro unidades de transcrição, sendo o operon *pqsABCDE* e o gene *pqsR* agrupados no mesmo locus, e *pqsH* e *pqsL* localizado a certa distância a jusante do operon *pqsABCDE*-(RAMPIONI et al., 2016).

Os genes estruturais para o PQS são codificados por um operon de cinco genes *pqsABCDE*, sendo os quatro primeiros genes neste locus requeridos para a síntese da molécula HHQ, o qual é oxidado a PQS pela ação da monooxigenase PqsH (GALLAGHER et al., 2002; RAMPIONI et al., 2016). O gene *pqsE*, por sua vez, tem a função putativa de resposta celular a molécula PQS, facilitando a adaptação ambiental de *P. aeruginosa* (RAMPIONI et al., 2010). Uma segunda monooxigenase, PqsL, juntamente com os produtos da expressão de *pqsABCD*, é responsável pela síntese de HQNO, um inibidor de citocromo com importante função em situações de competição ambiental (RAMPIONI et al., 2016).

Há fortes indícios de que IQS (aeruginaldeído) integra sinais de estresse ambientais com a rede de detecção de *quorum sensing*. Os genes supostamente envolvidos na síntese de IQS são um agrupamento de peptídeo sintases não ribossomais *ambBCDE*. A deleção deste operon ocasiona diminuição da produção dos sinais PQS e N-butilil-HSL, bem como dos fatores de virulência piocianina, ramnolipídeos e elastase (LEE e ZHANG, 2015).

O receptor IQS ainda não foi determinado completamente. O indutor 3-oxo-C12-HSL do sistema *rhl* se liga ao LasR ativando *lasI* e diversos genes descendentes. Esse complexo (LasR-autoindutor) também ativa a expressão de genes *rhIR* e *rhII* do sistema *rhl*, assim como *pqsR* e *pqsABCDH* do sistema *pqs* que por sua vez regula *las* e *rhl* por meio da produção de 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona durante crescimento bacteriano livre de estresse. (AZAM; KHAN, 2019).

Além disso, o IQS demonstrou contribuir para a virulência total de *P. aeruginosa* em modelos diferentes de hospedeiros animais, como rato, peixe, dentre outros, destacando a importante contribuição deste novo sistema QS na modulação da patogenia. Vale ressaltar que a produção de IQS é rigorosamente controlada pelo sistema *las* em condições normais de crescimento, e por outro lado são também ativados em condições de depleção de fosfato, um fator de estresse comum durante a infecção bacteriana (LEE et al., 2013).

Em estudo pioneiro sobre IQS, Lee et al., (2013) identificaram que a deleção de *ambB* inibe a ativação independente de LasR, RhIR e PqsR sob condições de limitação de fosfato. Nessas condições de baixo fosfato, o mutante não produz moléculas sinalizadoras suficientes para ativação RhIR e PqsR. Em uma série de experimentos os autores demonstraram que AmbB e três outras proteínas codificadas pelo operon *ambBCDE* seriam responsáveis pela produção de um sinal químico 2-(2-hydroxylphenyl)-thiazole-4-carbaldehyde, então denominado como IQS. A produção do IQS, parece ser regulada, não apenas por LasR, mas também por outra proteína, Phob. Esta última é ativada em condições de baixo fosfato, e pode ativar a produção de IQS na ausência de LasR. A adição de IQS ativa a produção de PQS e N-butilil-HSL em mutantes ($\Delta ambB$) e são capazes de restaurar a produção de fatores extracelulares tóxicos, dentre eles a piocianina.

Consequentemente isso causa implicações importantes para a virulência de *P. aeruginosa*. Em diversos modelos na infecção desta bactéria (i.e., camundongo, zebrafish *Danio rerio*, *Caenorhabditis elegans*) a deleção tanto de *ambB* como de *lasR* promovem atenuação de virulência aumentando a sobrevivência do animal (LEE et al., 2013).

Isso gera uma explicação nova para a ocorrência de mutantes LasR em determinadas infecções humanas persistentes, como as infecções pulmonares de pessoas com fibrose cística, ou seja, a produção ativa desses produtos de virulência dependentes de QS, pode derivar da sinalização IQS. Lee et al., (2013) sugeriram que o sistema IQS pode estar ativo como resultado de regiões locais de limitações de fosfato ou talvez outros estresses ambientais no pulmão com fibrose cística. A limitação de fosfato permitiria a ativação mediada por PhoB da produção de IQS; outra alternativa é que tenham mutações secundárias em *ambB* ou outros genes que liberam o sistema de sinalização alternativo de repressão de fosfato. A adição de sinalização IQS ao circuito QS responde a uma questão e abre caminhos para pesquisas, por exemplo, não sabe a existência de outras condições além da depleção de fosfato sob as quais o IQS pode ser produzido.

É necessário aprender mais sobre o mecanismo, se este controla outros genes além dos citados, pois a identificação deste sinal avigora a ideia da preservação do regulon QS, importante para preservar um *backup* na ativação de RhIR e PqsR que envolve a necessidade de LasR sob determinadas condições ambientais, e gera dúvidas sobre os esforços no desenvolvimento de agentes inibidores de LasR como agentes terapêuticos direcionados a QS (A DANDEKAR; GREENBERG, 2013).

A produção de IQS é ativada por *las* e pelo regulador de resposta de estresse de depleção de fosfato PhoB, este mecanismo de integração permite que o patógeno interligue o QS e sinais de estresse *in vivo* para desencadear a produção de fatores de virulência afim de modular os mecanismos de defesa do hospedeiro. No entanto, a produção de fatores de virulência, aumentada em condições de depleção de fosfato, não apresenta o mesmo efeito na ausência dos genes *amb*. A identificação do sistema IQS, revelou um mecanismo molecular correlacionando a depleção de fosfato, um fator de risco importante, que induz a rápida expressão de fatores de virulência e por consequência causa infecções de alta mortalidade em humanos e animais. Adicionalmente, (LEE et al., 2013) também

sugeriram que IQS pode assumir o papel de *las* na coordenação da fisiologia da comunidade bacteriana através da regulação a jusante de QS e a consequente virulência e manutenção da competição bacteriana nas interações patógeno-hospedeiro. Esta hipótese é apoiada pelo aparecimento de isolados *las* negativos associados positivamente com a progressão de doença e manutenção do fenótipo de virulência dependente de *las*, assim como secreção de protease e produção de ramnolipídeos (LEE et al., 2013).

LEE et al., (2013) sugerem ainda que os genes *ambABCDE* não codificam as enzimas de biossíntese e liberação de AMB [o ácido L-2- amino-4-metoxi-trans-3-butenoico] um aminoácido não proteogénico com função de toxina, inibidor de enzimas dependentes de pirodoxal fosfato (Lee et al., 2010), em vez disso, eles codificam a produção de IQS, que por sua vez, regula a biossíntese de AMB. Os autores mostraram que a produção de AMB foi completamente reprimida pela deleção de qualquer um dos genes *ambB*, o *pqsA* (PQS sintase) ou *rhlI* (C4HSL sintase). Embora a produção de AMB no mutante *ambB*-negativo possa ser restaurada adicionando IQS, PQS ou C4HSL, sua produção em *pqsA*-negativo e *rhlI*-negativo só é restaurada adicionando PQS e C4HSL, respectivamente, mas não acrescentando IQS. Assim, a biossíntese de AMB é regulada pelo IQS pelos sistemas *pqs*, *rhl* semelhantes a outras características de virulência, como a produção de piocianina, por exemplo (LEE et al., 2013). No entanto, mais recentemente, (MURCIA et al., 2015) utilizando métodos *in vitro* de análises de acoplamento enzima-substrato e de intermediários da via metabólica por espectroscopia de massas confirmaram a hipótese prévia, de que o cluster gênico *amb* seria de fato responsável pela síntese de AMB e não pela síntese de IQS como sugerido por Lee et al. (2013).

3.3 AERUGINALDEÍDO

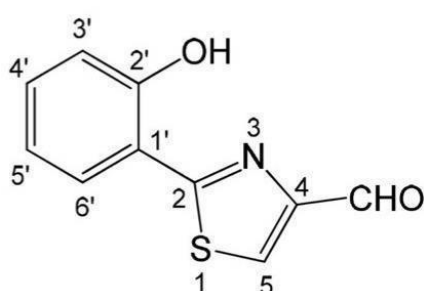
O aeruginaldeído e o aeruginol se originam das enzimas peptídicas sintetases não ribossomais envolvidas nas vias biossintéticas da enantio-pioquelina (ou pioquelina) dos sideróforos (YE et al., 2014).

Este é um produto natural, que foi isolado de *Pseudomonas cepacia* e é formado por metanólise do complexo de zinco da enantio-pioquelina isolada de *P. protegens*. Também chamado de IQS, foi descrito como a quarta molécula do *quorum sensing* em *P. aeruginosa*, além disso foi também obtido em alguns casos, por síntese orgânica direta,

particularmente usando 2-hidroxibenzonitrila como material inicial. Reações com sulfato de hidrogênio geraram 2- hidroxitiobenzamida que subsequentemente foi convertida em 2-(2-hidroxifenil)- tiazol-4-carbaldeído dimetilacetal. Por meio de reações com 3-bromo-1,1-dimetoxi propan-2-ona (3-bromo-1,1-dimethoxypropan-2-one) e o tratamento com ácido finalmente resultou na molécula de aeruginaldeído. Uma outra via inclui como primeira etapa a reação entre 2-hidrobenzonitrila e L-cisteína. O 2-(2-hidroxifenil)-2-tiazolina-4- carboxilato de metil originado pode ser reduzido a 2-(2-hidroxifenil)-4- hidroximetil-2-tiazolina, que depois da oxidação de Swern resulta no aeruginaldeído (YE et al., 2014).

Além de aeruginaldeído possuir atividade antimicrobiana, essa atividade que foi analisada através de um composto análogo de aerugina, ácido di-hidroaruginoico a partir de cultura de de *P. fluorescens* cepa PFM2, que exibiu sua atividade antimicrobiana contra alguns fungos, incluindo *Pythium ultimum*, *Sclerotium rolfsii* [*Corticium rolfsii*], *Colletotrichum gloeosporioides* [*Glomerella cingulata*] e *Rhizoctonia solani* e bactérias fitopatogênicas, como *Bacillus subtilis*, *Erwinia herbícola*, *Staphylococcus albus*, *Pseudomonas fluorescens* (CARMI et al., 1994) e foi demonstrado que a co-ocorrência de aeruginaldeído e aeruginol pode contribuir para redução do estresse oxidativo para cepa produtora visto que, a pioquelina (um provável precursor destas moléculas) é um competente catalisador na remoção de radicais hidroxila. A estrutura do tiazol no aeruginaldeído e aeruginol exclui a barreira configuracional entre a pioquelina e a enantio-pioquelina tornando moléculas de sinalização, genuína para espécies distintas de *Pseudomonas* .Essa sinalização refere-se ao NRPS que regula os sistemas pqs e rhl para determinar a existência de um sistema de sinalização celular, que possibilitaria assumir o papel do sistema *las* na regulação dos sistemas QS em *P. aeruginosa*. (YE et al., 2014).

Figura 3 - Estrutura do aeruginaldeído (2-(2-hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldeído)



Fonte: O autor.

3.4 CONTROVÉRSIA DE IQS/AERUGINALDEÍDO

O primeiro relato ao qual o IQS não poderia ser produto das enzimas codificadas pelo operon *ambABCDE* foi a descoberta que esse tem a mesma estrutura do aeruginaldeído, produzido por *Pseudomonas* distintas, dentre elas *P. protegens* e *Burkholderia thailandensis* que não têm o cluster de genes *amb* (TROTSMANN et al., 2019). O aeruginaldeído foi detectado junto com compostos distintos (ácido aeruginóico, aeruginol, ácido diidroaeruginóico), podendo todos serem produtos da via biossintética do sideróforo pioquelina (YE et al., 2014). Em um estudo recente foi confirmado que este é derivado da pioquelina, desde a incubação do sideróforo a 30°C que resultou no aparecimento de aeruginaldeído (TROTSMANN et al., 2019). Foi sugerido que o mesmo poderia derivar do ácido diidroaeruginóico (Dha) liberado do PchE durante a montagem das enzimas NRPS e o processo biossintético (YE et al., 2014). Porém ainda são publicados artigos, que mencionam sendo o produto da AmbABCD.

3.5 PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE QUINOLONAS E FENAZINAS

Wessel, (2019) desenvolveu um processo de produção, extração e purificação de fenazinas por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. A suplementação do meio de cultivo com caseinato de sódio 1% incrementou a produção de distintas fenazinas, em especial das piorubrininas, o que foi relacionado com maior ativação do sistema de *quorum sensing* da bactéria. Neste trabalho foi verificado que a produção deveria ocorrer por um período de 13 dias. O método preferível de extração consistiu na utilização de clorofórmio na proporção de 1:1 (v/v- clorofórmio: meio de cultivo) por duas vezes consecutivas, para obtenção de um extrato bruto mais concentrado. Ferrari, (2020) produziu quinolonas do *quorum sensing* de *P. aeruginosa* por meio de cultivos submersos da cepa PAO1, avaliando o melhor tempo de cultivo e desenvolvendo metodologias específicas para extração e purificação dessas quinolonas. A *P. aeruginosa* foi crescida em meio de sais e glicerol com tempo de cultivo de 3, 6 e 9 dias. As extrações foram feitas usando acetato de etila acidificado. Também foi utilizado uma sequência de extrações ácido-base. Em ambos os estudos, com diferentes dias de

cultivos, foi possível isolar aeruginaldeído, um composto desconhecido naquele momento, que aparecia durante as extrações, apesar do foco constituir na produção de fenazinas e PQS. Esse estudo foi uma continuidade desses projetos, porém com produção conjunta, e extração e purificação de quinolonas e aeruginaldeído a partir do mesmo meio de cultivo.

Palmer et al., (2011) abordaram algumas técnicas para detectar e quantificar PQS. Primeiramente, foi necessária uma extração de PQS de misturas complexas (por exemplo, culturas de células). A separação de PQS dos extratos ocorreu por cromatografia de camada delgada ao qual foi usada em combinação com a fluorescência natural da molécula para quantificação. Uma segunda técnica de separação para o precursor PQS HHQ foi usando cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Um terceiro método para quantificação de PQS de misturas simples (ensaios enzimáticos) usando fluorescência. Essas técnicas permitem a quantificação e caracterização de PQS de diversos ambientes, um pré-requisito para a compreensão das funções biológicas das moléculas de QS.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PRODUÇÃO DE QUINOLONAS E AERUGINALDEÍDO

4.1.1 Microrganismo

A cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 foi originalmente isolada na Austrália a partir de feridas humanas infectadas (HOLLOWAY, 1955). A PAO1 é a cepa de *P. aeruginosa* mundialmente mais utilizada em estudos laboratoriais, adicionalmente apresenta o genoma sequenciado e publicado (STOVER et al., 2000).

4.1.2 Meios De Preservação

A cepa PAO1 foi mantida em meio líquido Luria Bertani- LB (composição por litro: 10 g triptona, 5 g extrato de levedura e 10 g de NaCl), adicionado de glicerol (20 %, v/v), e estocada a -80 °C. A cepa foi transferida para meios sólidos LA [LB adicionados de 1,5 % (m/v) de ágar], antes de ser utilizada para o preparo do inóculo.

4.1.3 Preparo Do Pré-Inóculo

Os pré-inóculos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL do meio LB, inoculados com 3-5 colônias de PAO1 proveniente de placas de meio LA e incubados por 12-16 h a 37 °C/200rpm.

4.1.4 Preparo Do Inóculo

Os inóculos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL do meio LB, inoculados com o pré-inóculo em uma proporção de 2% (v/v) e incubados, em agitador orbital, a 37 °C por 5-6 h sob agitação de 200 rpm. O crescimento bacteriano durante o preparo do pré-inóculo foi acompanhado pela determinação da absorbância do meio de cultivo a 600 nm ($D.O_{600nm}$), e utilizado como inóculo quando a $D.O_{600nm}$ encontrava-se entre 0,6 e 0,8.

4.1.5 Cultivos Submersos (CSb)

Os ensaios para CSb foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100mL de meio de sais (contendo por litro: 3,0 g KH_2PO_4 ; 7,0 g K_2HPO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) acrescentado de glicerol (3% v/v). Os meios foram inoculados com o pré-inóculo em uma proporção de 2 % v/v e incubados em agitador orbital a 37°C/200rpm. Os cultivos foram interrompidos com 3 e 9 dias.

4.1.6 Extração Ácido-Base

Na extração ácido/base inicialmente o pH do extrato livre de células (sobrenadante) foi ajustado para 11 com NaOH 1,0 mol L^{-1} , sendo esse transferido para funil de separação. Após, adicionou - se acetato de etila num volume correspondente a 1/3 do volume do sobrenadante e este procedimento foi repetido por mais duas vezes. Posteriormente, as fases orgânicas recuperadas foram agrupadas e secas em evaporador rotativo, sendo transferida em seguida para frascos limpos e previamente pesados, para obtenção do rendimento das massas desses extratos. Depois da extração básica, o pH da fração aquosa restante foi alterado para 2 com HCl 1,0 mol L^{-1} e novamente extraído com acetato de etila no volume de 1/3 em relação ao volume do sobrenadante, por três vezes (FERNANDEZ-PIÑAR et al., 2011).

Estas frações também foram agrupadas e secas em evaporador rotativo. Todas as amostras foram armazenadas a - 20° para análises posteriores.

4.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.2.1 Cromatografia Líquida em Camada Delgada (CCD) analítica

As amostras dos extratos orgânicos, bem como provenientes dos processos de purificação foram submetidas à cromatografia em camada delgada (CCD) sobre sílica (DC-Fertigfolien ALUGRAM®Xtra SIL G/UV254, 20x20cm). Esta foi previamente ativada a 100 °C durante 1h. Para separação dos componentes da mistura, foi utilizado fase móvel com clorofórmio/metanol nas frações ácidas e nas frações básicas diclorometano/metanol (95:5), bem como nas duas frações também foi

utilizado clorofórmio/metanol (99:1). As bandas da placa foram visualizadas usando luz UV seguido de foto para registro. Também foi testado revelador vanilina sulfúrica nas placas CCD.

4.2.2 Revelador vanilina sulfúrica

Para preparo 3 g de vanilina foram dissolvidas em 135 mL metanol e 135 mL água destilada, depois adicionado lentamente 30 mL ácido sulfúrico concentrado. Essa solução é borrifada sobre as placas.

4.2.3 Revelador ácido sulfúrico 10%

Constitui na mistura de CH₃OH:H₂SO₄ na proporção de 10%

4.2.4 Aquecimento

CCD analítica é aquecida em uma chapa de aquecimento a uma temperatura de 100°C até serem revelados.

4.2.5 Análise gravimétrica

Realizada através da pesagem das amostras obtidas e acondicionadas em frascos de vidro previamente pesados, para determinar a massa dos compostos purificados.

4.2.6 Cromatografia Em Camada Delgada (CCD) Preparativa

Para separação em CCD preparativa foram empregadas placas de vidro (20x20 cm), recobertas com 1,0 mm de sílica gel, ativada em estufa a 100 °C por duas horas. Como fase móvel, para eluição dos componentes, foi utilizado clorofórmio e metanol (95:5). Depois da corrida cromatográfica, todas regiões nitidamente separadas foram individualmente raspadas—da sílica, após foram transferidas para funil, na sequência extraídas com aproximadamente 15 mL CH₂Cl₂ 50% e 5 mL de metanol. Bandas alaranjadas foram removidas e eluídas com clorofórmio e metanol 95:5 (v/v). Esta continha 2-(hidroxifenil)tiazol-4-carbaldeído que foi submetidas à CCD analítica para avaliar a eficiência da separação. Já para separação da PQS 2-heptil-3,4-hidroxi-quinolona foram empregadas placas de vidro (20 x 20 cm) recobertas com 1,0 mm de sílica gel 60 P/UV254 Macherey-Nagel preparada com solução de 5 % de KH₂PO₄, ativada em estufa a 100 °C por duas horas (DIGGLES et al., 2003). Como fase móvel, para eluição dos componentes, foi utilizado diclorometano/metanol (95:5). As bandas azuis fluorescente com R_f 0,40-0,52 foram removidas e eluídas com diclorometano

e metanol 5% (v/v).

4.2.7 Análise Por Espectrometria de Massas

A análise de MS foi realizada em um espectrômetro de massas de alta resolução Impact II (Bruker Daltonics Corporation, Alemanha) de geometria Q-TOF, equipado com uma fonte de ionização do tipo *electrospray*, operado em modopositivo e negativo com taxa de aquisição de 1 Hz (MS e MS/MS) na faixa de massas de m/z 50 – 600. As análises foram realizadas com voltagem do capilar de 4.0 kV; temperatura da fonte 180°C; e fluxo do gás de dessolvatação 4 L min⁻¹. Os experimentos de MS/MS foram realizados utilizando dissociação induzida por colisão (CID) com uma rampa de energia de colisão na faixa de 15 – 40 eV.

4.2.8 Ressonância Magnética Nuclear

As quinolonas e o aeruginaldeído (IQS) foram submetidos a análise de RMN em estado líquido. Espectros de ¹H e ¹³C foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance III 400 MHz operado à frequência de 400,6 MHz para ¹H, e 100 MHz para ¹³C usando probe direto de 5 mm, BBO, a 25°C. Deslocamentos químicos (δ) para hidrogênio foram expressos em ppm e calibrados de acordo com sinal do TMS, solubilizado em CHCl₃, em 0 ppm. Para carbono foi usado igualmente a escala com unidades em ppm e calibrado com TMS em 0 ppm.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA ANALÍTICA DO COMPOSTO AERUGINALDEÍDO, ISOLADO POR TRABALHOS PRÉVIOS DE NOSSO GRUPO

No presente trabalho optou-se em dar continuidade ao desenvolvimento de um processo de produção de aeruginaldeído, iniciado por Ferrari (2020) utilizando uma composição de meio de cultivo menos complexa e de menor custo e tempos de duração dos cultivos mais curtos. Outra vantagem deste seria a possibilidade de se desenvolver um processo de obtenção conjunta de quinolonas e aeruginaldeído, já que estes compostos são recuperados em extrações subsequentes do mesmo meio de cultivo. Quinolonas e aeruginaldeído saem em frações distintas da extração ácido-base.

Trabalhos prévios de nosso grupo, que objetivaram o desenvolvimento de processos de produção e purificação de fenazinas (WESSEL, 2019) e quinolonas (FERRARI, 2020), isolaram um composto de coloração alaranjada e identidade desconhecida. Alíquotas destes isolados foram avaliadas por CCD analítica (Figura 4) sugerindo que se tratava do mesmo composto.

Figura 4 - Cromatografia em Camada Delgada analítica do composto IQS (aeruginaldeído) isolado por WESSEL E FERRARI



CCD analítica dos extratos purificados com 6 dias de cultivo (1) e 13 dias de cultivo (2), utilizando como fase móvel clorofórmio:metanol 1%. Revelada com metanol: ácido sulfúrico 10%

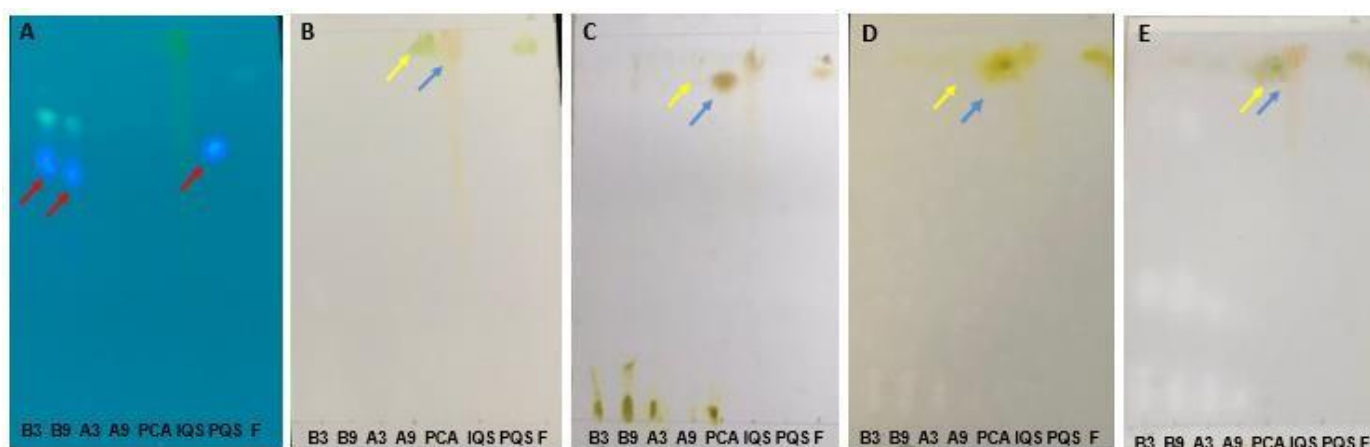
5.2 AVALIAÇÃO DO TEMPO DE PRODUÇÃO DE PQS E AERUGINALDEÍDO POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PAO1

Cultivos com duração de 3 e 9 dias foram submetidos à extração ácido-base.

Estes tempos de cultivo já haviam sido avaliados por Ferrari (2020), no entanto, naquele trabalho o objetivo era a produção e purificação de quinolonas, enquanto neste, o objetivo é a obtenção concomitante de quinolonas e aeruginaldeído. As extrações foram realizadas com acetato de etila nos pHs 11 e 2. Foram obtidos extratos orgânicos em ambos pHs e tempos de cultivo [*i.e.*, pHs 2 e 11 nos dias de cultivo 3 e 9 – resultando, respectivamente, nos extratos brutos orgânicos ácidos (A3) e (A9) e básicos (B3) e (B9)] (Figuras 5 e 6). TROTTMAN et al., (2016) analisaram a produção de PQS e obtiveram uma maior concentração desse composto entre 30 e 42h, demonstrando que a molécula foi produzida mais tarde no ciclo de crescimento. Com isso, foi analisado um dia a mais de produção no nosso cultivo, relacionando os resultados de expressão genica. Pensando no pico de transcrição que está aproximadamente entre 48H, possivelmente o pico de produção desse composto estará à frente disso, então acrescentou-se um dia a mais para produção desse, também foi considerado os testes realizados anteriormente por (FERRARI, 2020), onde analisou o melhor tempo de produção.

Os extratos brutos orgânicos foram avaliados por cromatografia em camada delgada (CCD) analítica para verificar a presença das moléculas de interesse. A Figura 5 apresenta o resultado da CCD analítica utilizando como fase móvel diclorometano: metanol 5%. Já a Figura 6 mostra as mesmas amostras na fase móvel clorofórmio: metanol 1%.

Figura 5 – CCDs analíticas dos extratos brutos de cultivos submersos com 3 e 9 dias, utilizando como fase móvel diclorometano: metanol 5%.

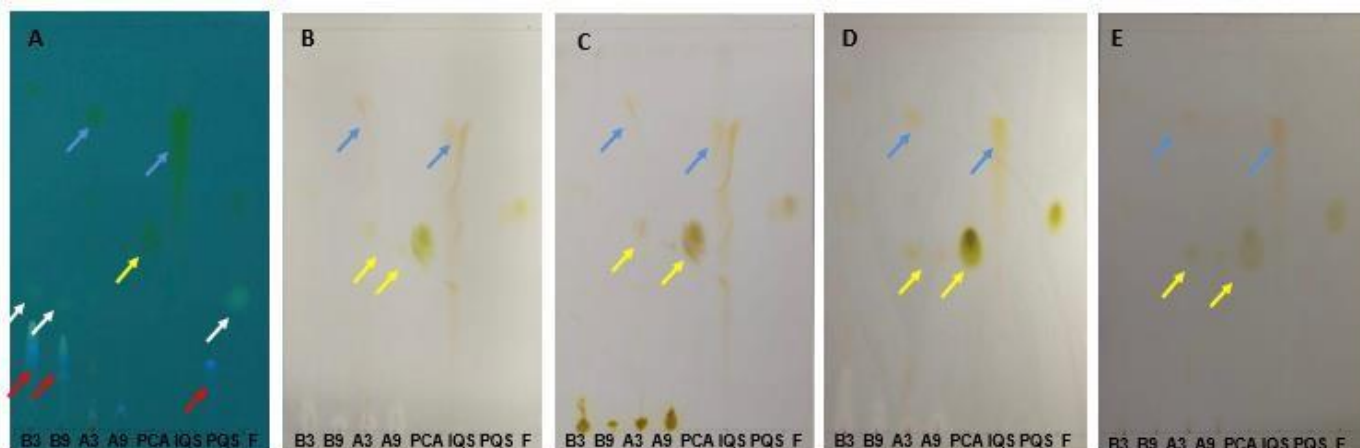


CCDs analíticas dos extratos brutos orgânicos (pHs 2 e 11 com 3 e 9 dias) e os padrões (PCA, IQS, PQS e Fluorescente) reveladas sob luz UV (A), com metanol: ácido sulfúrico 10% (B), após aquecimento (C), com vanilina (D) e após aquecimento (E), em placas ativadas com fosfato monobásico 5% utilizando como fase móvel diclorometano: metanol 5%. Setas vermelhas indicam quilonona sinalizadora (PQS), setas amarelas indicam o composto PCA e setas azuis indicam o composto IQS.

Observa-se na Figura 10 que existe a presença da quinolona sinalizadora

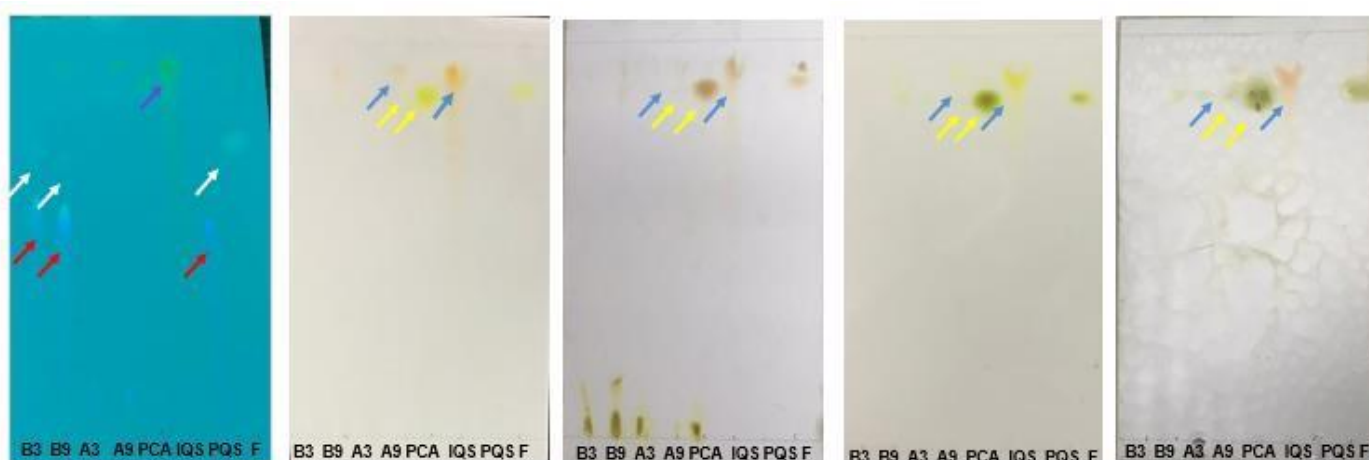
(PQS) nas frações básicas, no terceiro (B3) e nono (B9) dias de cultivos, sendo que essas foram comparadas com o padrão da PQS e visíveis apenas no UV (Figura 10-A). Com isso, pode-se perceber que seria preciso purificar esses extratos brutos para obtenção desta quinolona, e acompanhar o rendimento em tempos distintos de cultivos (Tabela 1).

Figura 6 – CCDs analíticas dos extratos brutos de cultivos submersos com 3 e 9 dias, utilizando como fase móvel clorofórmio: metanol 1%.



CCDs analíticas dos extratos brutos orgânicos (pHs 2 e 11 com 3 e 9 dias) e os padrões (PCA, IQS, PQS e Fluorescente) reveladas sob luz UV (A), com metanol: ácido sulfúrico 10% (B), após aquecimento (C), com vanilina (D) e após aquecimento (E), em placas ativadas com fosfato monobásico 5% utilizando como fase móvel clorofórmio: metanol 1%. Setas vermelhas indicam o composto PQS, setas brancas indicam o composto fluorescente, setas amarelas indicam o composto PCA, setas azuis indicam o composto IQS.

Figura 7 – CCDs analíticas dos extratos de cultivos submersos com 3 e 9 dias, utilizando como fase móvel clorofórmio: metanol 5%.

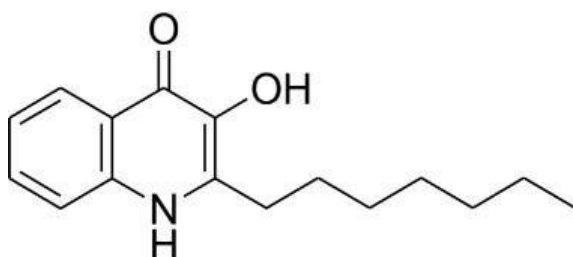


CCDs analíticas dos extratos brutos orgânicos (pHs 2 e 11 com 3 e 9 dias) e os padrões (PCA, IQS, PQS e Fluorescente) reveladas sob luz UV (A), com metanol: ácido sulfúrico 10% (B), após aquecimento (C), com vanilina (D) e após aquecimento (E), utilizando como fase móvel clorofórmio: metanol 5%. Seta na coloração azul (A) está indicando o composto PQS, seta na coloração avermelhada (A) está indicando o composto fluorescente. Setas vermelhas indicam o composto PQS, setas brancas indicam o composto fluorescente, setas amarelas indicam o composto PCA, setas azuis indicam o composto IQS.

Como pode ser observado nas Figuras 6 e 7, há presença da quinolona

senalizadora (PQS) nas fases básicas, como demonstrado anteriormente, com 3 e 9 dias de cultivo. Um motivo concebível da eficácia da extração ácido-base na obtenção de extrato bruto enriquecido deve-se, provavelmente, à impossibilidade de protonação em meio básico do nitrogênio presente no anel heterocíclico da molécula de PQS (Figura 8). Com isso, em meio alcalino PQS se torna menos polar, simplificando a extração do meio aquoso por solventes orgânicos. Enquanto nas fases ácidas pode-se notar a presença do composto aeruginaldeído, sendo mais abundante no tempo de 3 dias.

Figura 8 - Estrutura química do PQS



Fonte: Adaptada de HOI et al., (2014)

Tabela 1 - Massas dos extratos brutos de uma produção conjunta em diferentes tempos de cultivo

Amostra	pH	Tempo de produção	Rendimento
A3	2,0	3 dias	300 mg
B3	11,0	3 dias	229 mg
A9	2,0	9 dias	349 mg
B9	11,0	9 dias	137 mg

Fonte: O próprio autor

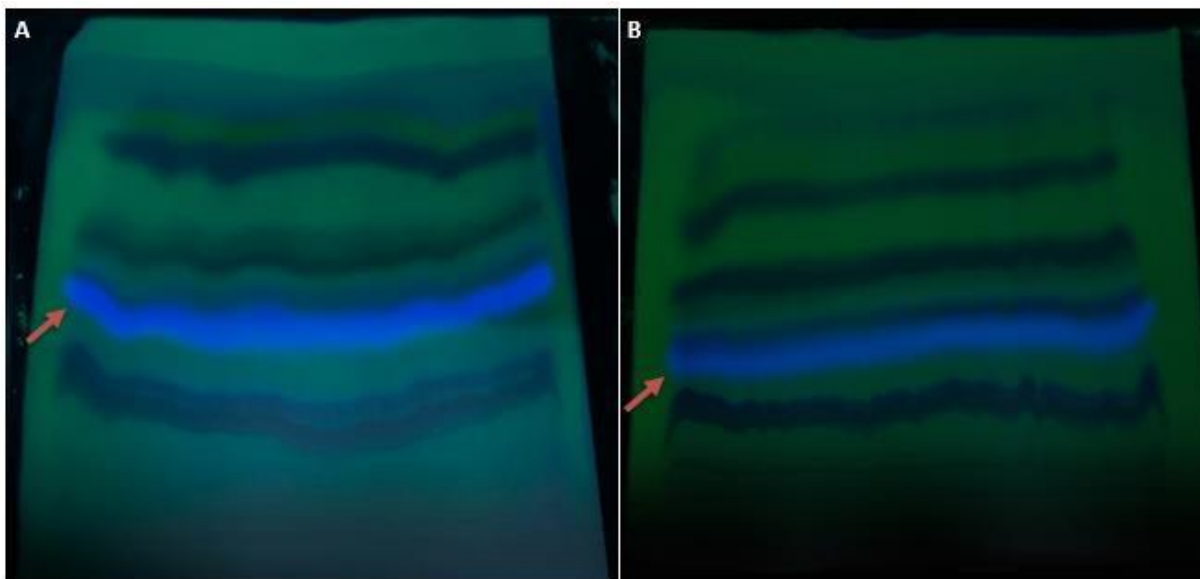
5.3 ETAPAS DE PURIFICAÇÃO

Para purificar o PQS foram realizadas cromatografias em camada delgada preparativa (CCDP) para os extratos básicos (B3 e B9). Posteriormente, foram analisadas por CCDs analíticas e para efeito de comparação foram aplicadas na mesma concentração de 15mg/mL. Essa etapa é fundamental para a remoção de interferentes e o isolamento do analito de interesse.

Por meio da CCDP (Figura 9) foi possível identificar o PQS como a banda cuja coloração é azul fluorescente sob luz UV. Essa banda de interesse (indicada pela seta) foi demarcada, raspada com espátula e extraída, para posterior análise por CCDs analíticas. A amostra básica com 3 dias produziu massa total de PQS de 7 mg, a partir de 1,5 litros de cultivo; enquanto que a básica de 9 dias produziu massa total de 3 mg,

a partir de 1,5 litros de cultivo. Em torno de 100mg por placa foram aplicadas, para aplicação foram dissolvidas em clorofórmio. Calculou-se a massa por gravimetria (Tabela 2).

Figura 9 – CCDs preparativas dos extratos brutos orgânicos básicos obtidos do terceiro e nono dia de cultivo.

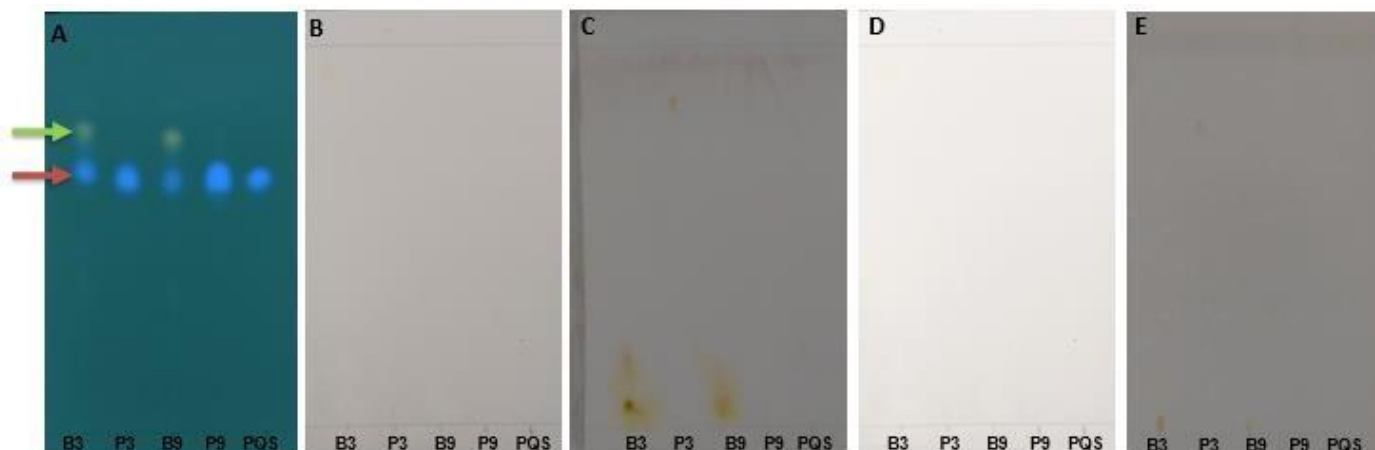


CCDs preparativas dos extratos brutos orgânicos básicos (pH 11) com 3 **(A)** e 9 dias **(B)** reveladas sob luz UV, utilizando como fase móvel diclorometano: metanol 5%.

Através da CCD analítica (Figura 10), percebe-se que o composto PQS tem alto grau de pureza, afinal não há presença de contaminantes nos extratos purificados das amostras.

A partir da CCDP do extrato bruto orgânico ácido de 3 dias (Figura 11) identificamos o aeruginaldeído, composto de coloração alaranjada (indicado pela seta) e representado pelo número 1. Também foi identificado outro composto de coloração avermelhada, representado pelo número 2 e por fim um de coloração amarela [identificada como PCA (ácido fenazina-1-carboxílico) através de comparação de r_f com padrão da fenazina (Figura 12), representado pelo número 3. Esses foram demarcados, raspados e extraídos, para posterior análise por CCD analítica (item 4.3.1). A amostra ácida com 3 dias produziu massa total de 300mg de aeruginaldeído, 7mg do composto de coloração avermelhada e 8mg PCA, a partir de 1,5 litros de cultivo. Calculou-se a massa por gravimetria. (Tabela 03)

Figura 10 – CCDs analíticas das frações purificadas por CCDs preparativas dos extratos básicos.



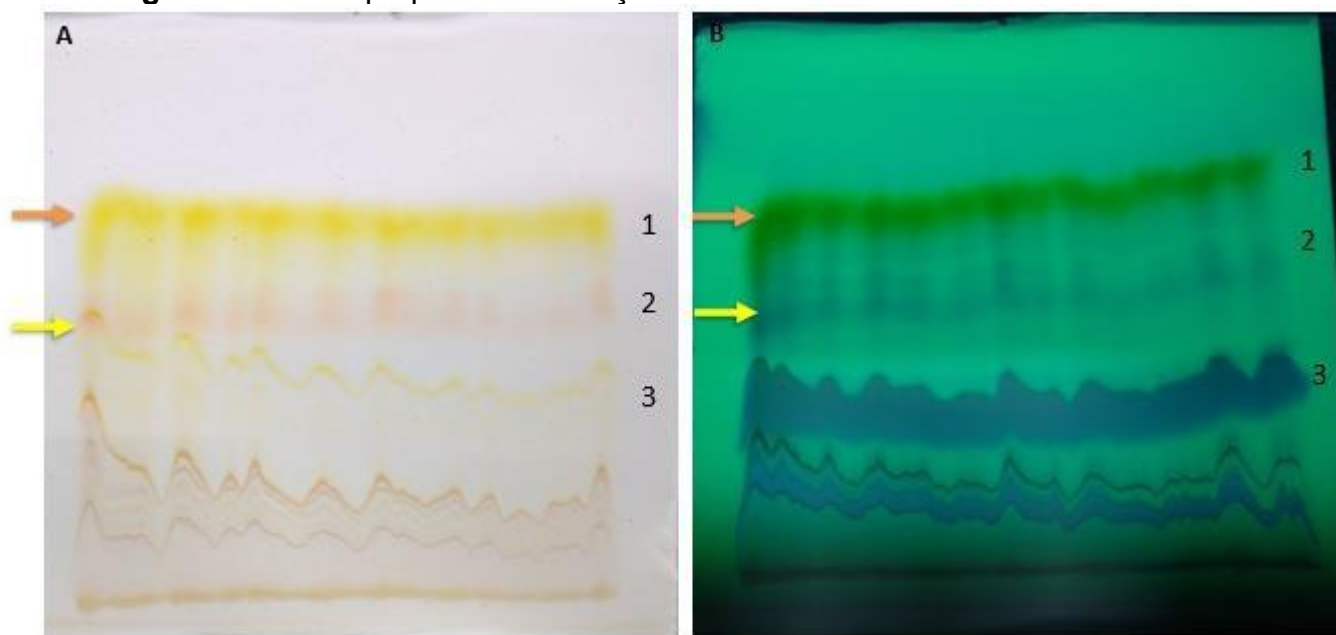
CCDs analíticas das CCDs preparativas dos extratos brutos orgânicos básicos (pH 11) com 3 (**B3**) e 9 dias (**B9**) mostrando a molécula de PQS purificada de ambas as placas (**P3** e **P9**) incluindo ainda o padrão PQS. As placas ativadas com fosfato monobásico 5% utilizando como fase móvel diclorometano: metanol 5% foram reveladas sob luz UV (**A**), com metanol: ácido sulfúrico 10% (**B**), após aquecimento (**C**), com vanilina (**D**) após aquecimento (**E**). Para efeito de comparação foram aplicadas na mesma concentração. Seta vermelha indica PQS, seta verde indica uma molécula contaminante.

Tabela 2 – Massa da separação dos extratos brutos e purificados de uma produção conjunta das frações básicas com obtenção de PQS

Amostra	pH	Tempo de produção	Rendimento
Básica (B3)	11,0	3 dias	10 mg
Purificada (P3)	11,0	3 dias	7 mg
Básica (B9)	11,0	9 dias	137 mg
Purificada (P9)	11,0	9 dias	3 mg

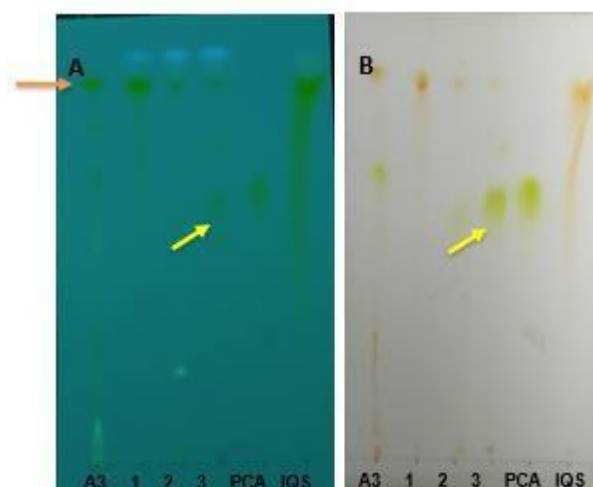
Fonte: O próprio autor

Figura 11 – CCD preparativa da fração ácida obtida do terceiro dia de cultivo.



CCDs preparativas do extrato bruto orgânico ácido com 3 dias (**A3**) após a corrida (**A**) e revelada sob luz UV (**B**), utilizando como fase móvel clorofórmio: metanol 5%. Seta amarela indica o composto PCA, seta laranja indica o composto IQS.

Figura 12 – CCD analítica da fração ácida obtida da etapa de purificação por CCDs preparativas com os respectivos padrões.



CCDs analíticas do extrato bruto orgânico ácido (pH 2) (**A3**), mostrando a molécula do aeruginaldeído purificado (**1**) indicado pela seta, incluindo o padrão (**IQS**), composto identificado pela coloração avermelhada (**2**), composto de coloração amarelada (PCA) (**3**) indicado pela seta, incluindo seu padrão (**PCA**). Utilizando como fase móvel clorofórmio: metanol 1% foram reveladas sob luz UV (**A**), com metanol: ácido sulfúrico 10% (**B**), após aquecimento. Para efeito de comparação foram aplicadas na mesma concentração. Seta laranja indica o composto IQS, seta amarela indica o composto PCA

Tabela 3 – Obtenção das massas dos extratos purificados de uma produção conjunta em tempos distintos de cultivo

Amostra	pH	Tempo de produção	Rendimento
Ácida (A3)	2,0	3 dias	300mg
Vermelho	2,0	3 dias	7mg
PCA	2,0	3 dias	8mg

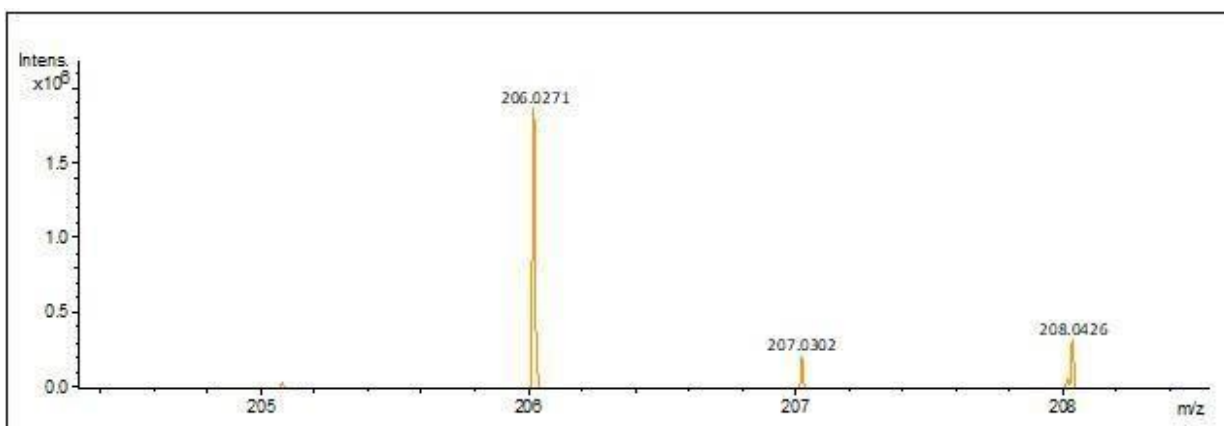
Fonte: O próprio autor

5.4 ENSAIOS PRELIMINARES DE IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO AERUGINALDEÍDO

O composto foi identificado como 2-(3-hidroxifenil)-1,3-Tiazol-4-carbaldeído (Figura 6), de massa exata 205,02 Da, fórmula molecular $C_{10}H_7NO_2S$, pico de massa predominante no espectro de massas no modo positivo aduto de hidrogênio $[M+H]^+$ = 206.0271 m/z (Figura 13).

A análise dos espectros de ressonância magnética nuclear, RMN, de IQS mostra majoritariamente sinais característicos para os diferentes grupos químicos; 2-(3-hidroxifenil)-1,3-Tiazol-4-carbaldeído. Os espectros foram calibrados pelo sinal do carbono da carbonila da acetona adicionada como padrão interno, 10 μ L.

Figura 13 - Espectro de massas produzido obtido por ESI-qTOF de 2-(3-hidroxifenil)-1,3-Tiazol-4-carbaldeído.



No espectro de RMN de ^{13}C é possível atribuir (Figura 7) o sinal em 185,05 ppm ao carbono carbonílico do carbaldeído, confirmado como aldeído por espectro bidimensional ^1H - ^{13}C HSQC, correlacionando o mesmo ao sinal de hidrogênio em 10,00 ppm (Figura 8). O sinal do carbono hidroxilado do anel fenílico, caracterizado pela ausência de hidrogênio associado no HSQC, é observado em 155,17 ppm, assim como 164,08 ppm característico para tiazol substituído em 2. Os sinais de C4, C5, C6 foram assinalados pelo acoplamento dos sinais de ^1H – ^1H COSY de 7,38 ppm tanto com 7,07 e 7,00 ppm (Figura 9). O assinalamento dos sinais de ressonância magnética nuclear estão sumarizados na Tabela 4

Figura 14 - Estrutura proposta para o composto IQS, 2-(3-hidroxifenil)-1,3-Tiazol-4-carbaldeído

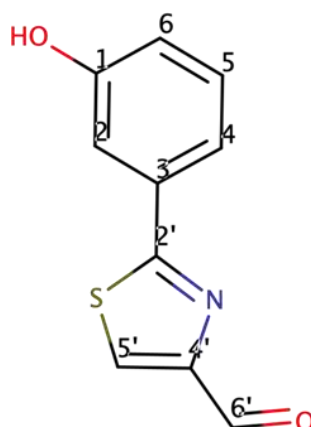


Figura 15 - Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C do 2-(3-hidroxifenil)-1,3-Tiazol-4-carbaldeído em solvente DMSO-d₆, a 25 °C

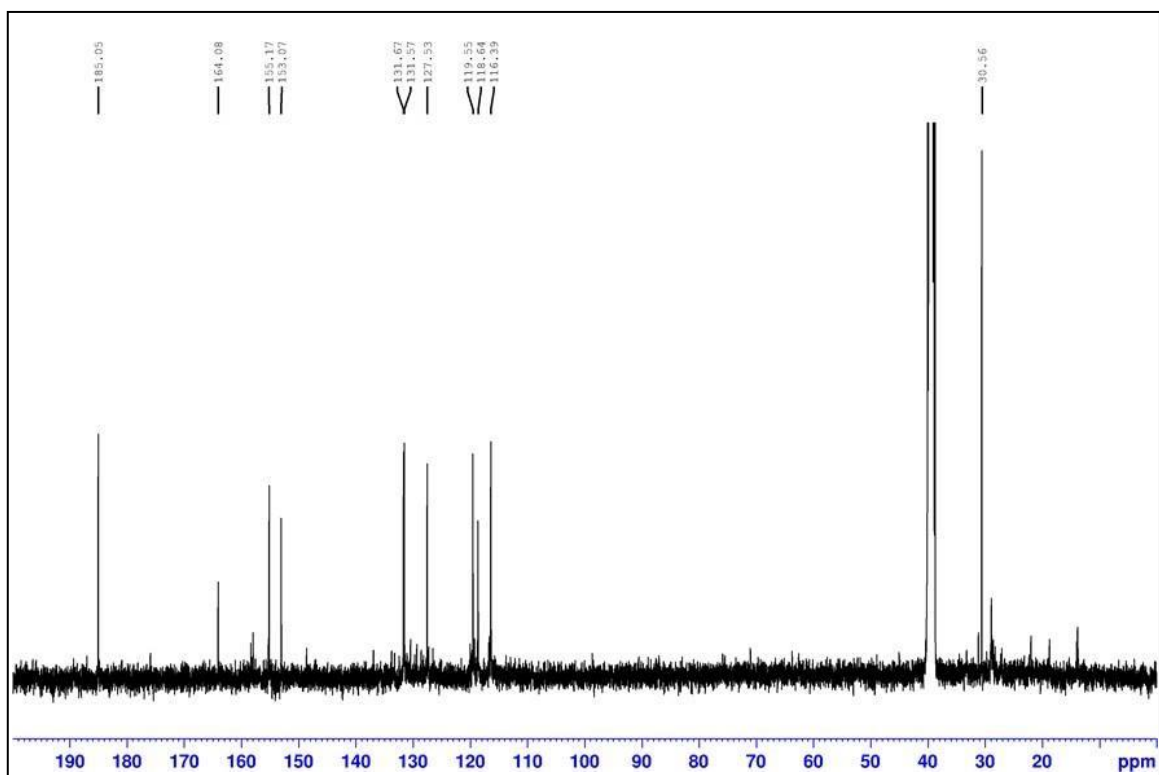


Figura 16 - Espectro de ressonância magnética nuclear bidimensional ^1H - ^{13}C HSQC do 2-(3-hidroxifenil)-1,3-Tiazol-4-carbaldeído em solvente DMSO-d₆, a 25 °C

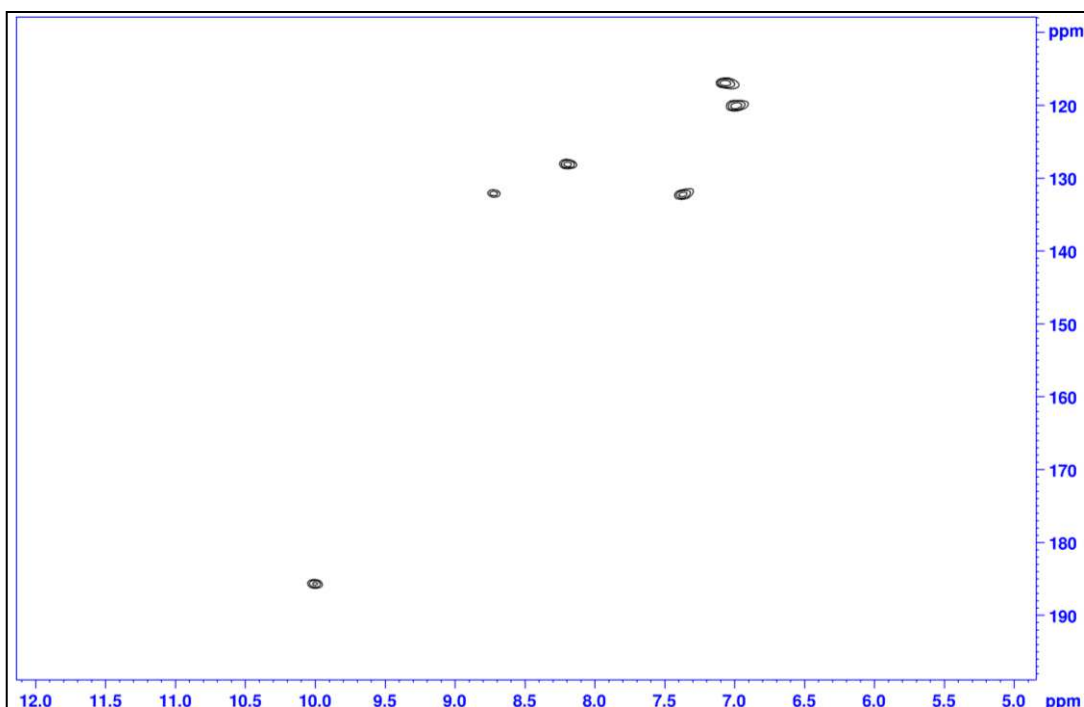


Figura 17- Espectro de ressonância magnética nuclear de correlação de hidrogênios - COSY do 2-(3-hidroxifenil)-1,3-Tiazol-4-carbaldeído em solvente DMSO-d₆, a 25 °C

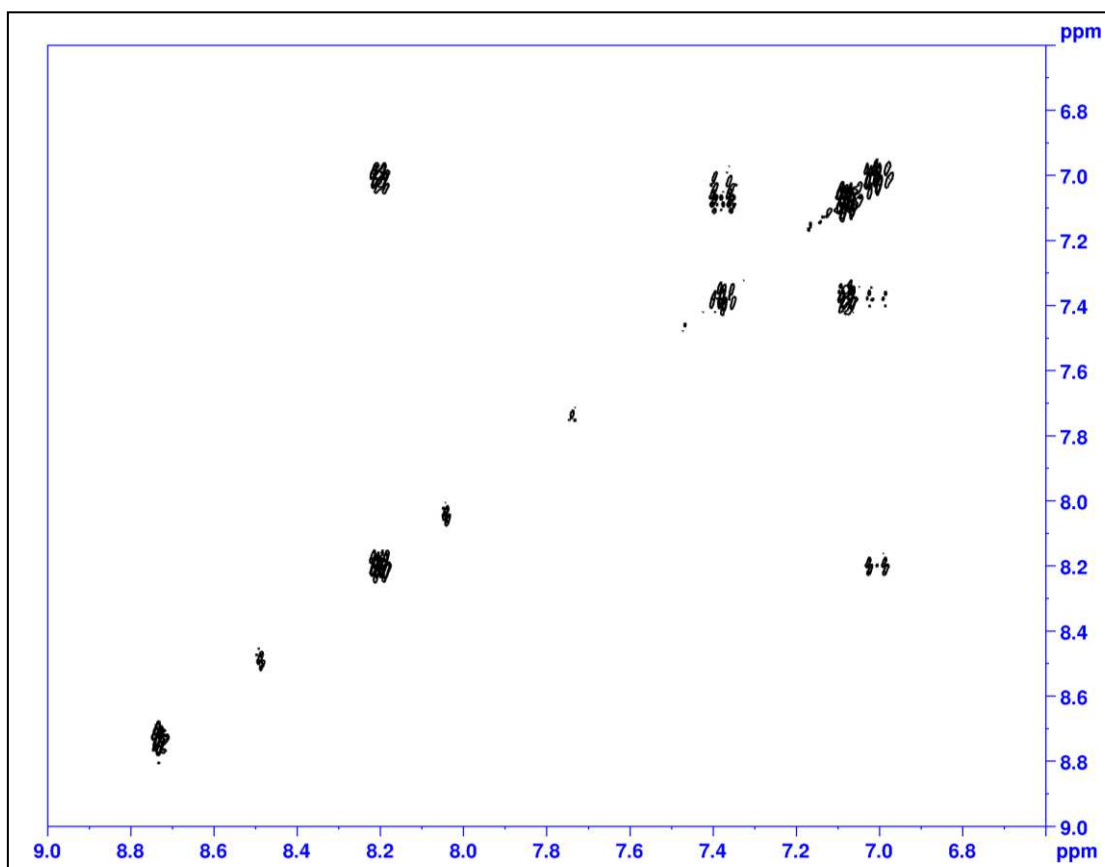


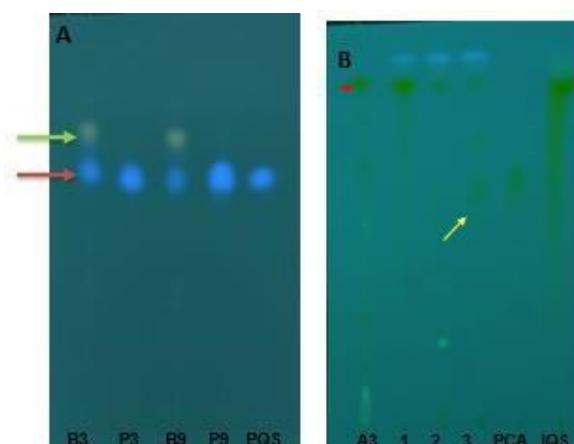
Tabela 4 - Assinalamentos de ^1H e ^{13}C para a molécula IQS (aeruginaldeído) obtidos a partir da análise dos espectros de ressonância magnética nuclear.

Núcleo *	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)
1	-	155,17
2, 5'	8,2	127,6
	8,73	131,55
3, 4'	-	118,6
		153,07
4, 6	7,00	119,5
	7,07	116,4
5	7,38	131,7
2'	-	164,08
6'	10,00	185,05

* Carbonos assinados Figura 5

A presença de aeruginaldeído em ambos os processos de produção sugere que este composto seja bem importante para o metabolismo de *P. aeruginosa*; vale ressaltar que este metabólito foi encontrado em condições distintas, inclusive de tempo de cultivo: i) no processo de produção das fenazinas com 13 dias de cultivo e presença do indutor de *quorum sensing*, caseinato de sódio (WESSEL, 2019) e ii) na ausência de caseinato de sódio e com tempo de cultivo de 6 dias (FERRARI, 2020).

Figura 18 - CCD analítica das frações obtidas da etapa de purificação com 3 e 9 dias de cultivo



CCDs analíticas das CCDs preparativas dos extratos brutos orgânicos básicos (pH 11) com 3 (**B3**) e 9 dias (**B9**) mostrando a molécula de PQS purificada de ambas as placas (**P3** e **P9**) incluindo ainda o padrão PQS. As placas ativadas com fosfato monobásico 5% utilizando como fase móvel diclorometano: metanol 5% foram reveladas sob luz UV (**A**). CCDs analíticas do extrato bruto orgânico ácido (pH 2) (**A3**), mostrando a molécula do aeruginaldeído purificado (**1**) indicado pela seta, incluindo o padrão (**IQS**), composto identificado pela coloração avermelhada (**2**), composto de coloração amarelada (PCA) (**3**) indicado pela seta, incluindo seu padrão (**PCA**). Utilizando como fase móvel clorofórmio: metanol 1% foram reveladas sob luz UV (**B**).

Como demonstrado anteriormente foi obtido uma produção conjunta de aeruginaldeído e quinolona, com poucas etapas, baixo custo, grau de pureza elevado, onde reduziu-se o tempo de produção, tornando esse método mais sustentável e econômico.

6 CONCLUSÃO

- Foi possível adequar um método de produção conjunta de quinolonas e aeruginaldeído,
- Os métodos de extração e purificação desenvolvidos, mostraram-se adequados para obtenção do PQS e também do aeruginaldeído
- Foi obtido uma concentração de quinolonas com maior grau de pureza, onde conseguimos eliminar etapas do processo, afim de torná-lo mais sustentável;
- O tempo de cultivo de 3 dias permitiu a obtenção de PQS e aeruginaldeído com menor quantidade de metabólitos contaminantes;
- Até o momento, não se pode afirmar a quantidade exata produzida da molécula de PQS e aeruginaldeído em cada tempo de cultivo, mesmo com o desenvolvimento de um processo de purificação mais eficaz para quinolonas sinalizadoras.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A DANDEKAR, A.; GREENBERG, E. P. Plan B for quorum sensing. **Nature Chemical Biology**, [S.L.], v. 9, n. 5, p. 292-293, 17 abr. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.1233>.

ABDALLA, M. Y.; HOKE, T.; SERAVALLI, J.; SWITZER, B. L.; BAVITZ, M.; FLIEGE, J. D.; MURPHY, P. J.; BRITIGAN, B. E. *Pseudomonas quinolone signal* induces oxidative Stress and Inhibits Heme Oxygenase-1 Expression in Lung Epithelial Cells. **Infection And Immunity**, [S.L.], v. 85, n. 9, p. 17-176, set. 2017. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.00176-17>.

ABU-TALEB, M. A.; MOHAMED, A. E.; EL-ESLAM, H. N. Application of Pulsed Field Gel Electrophoresis and Ribotyping as Genotypic Methods Versus Phenotypic Methods for Typing of Nosocomial Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Surgical Wards in Suez Canal University Hospital. **Egyptian Journal of Medical Microbiology**, [s.l.], v. 22, n. 2, p.83-100, abr. 2013. Al Manhal FZ, LLC. <http://dx.doi.org/10.12816/0004945>.

AZAM, Mohd W.; KHAN, Asad U. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. **Drug Discovery Today**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 350- 359, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2018.07.003>.

BALASUBRAMANIAN, D.; KUMARI, H.; MATHEE, K. *Pseudomonas aeruginosa* AmpR: an acute-chronic switch regulator. **Pathogens and disease**, [s.l.], p.41-120, ago. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/2049-632x.12208>.

BROQUET, A.; ASEHNOUNE, K. Apoptosis induced by *Pseudomonas aeruginosa*: a lonely killer? **Microbial Biotechnology**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 49- 51, 14 jul. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.12144>.

CARMI, R.; CARMELI, S.; LEVY, E.; GOUGH, F. (+)-(S)-Dihydroaeruginolic Acid, an Inhibitor of Septoria tritici and Other Phytopathogenic Fungi and Bacteria, Produced by *Pseudomonas fluorescens*. **Journal Of Natural Products**, [S.L.], v. 57, n. 9, p. 1200-1205, set. 1994. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/np50111a002>.

CHO, J.; LEE, M.; BAIG, I. A.; HA, N.; KIM, J.; YOON, M. Biochemical characterization and evaluation of potent inhibitors of the *Pseudomonas aeruginosa* PA01 acetohydroxyacid synthase. **Biochimie**, [S.L.], v. 95, n. 7, p. 1411-1421, jul. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2013.03.007>.

CRODA-GARCÍA, G.; GROSSO B.; GONZALEZ-VALDEZ, A.; SERVÍN-GONZÁLEZ, L.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* rhlR: role of the crp orthologue vfr (virulence factor regulator) and quorum-sensing regulators lasr and rhlr. **Microbiology**, [S.L.], v. 157, n. 9, p. 2545-2555, 1 set. 2011. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.050161-0>.

DEZIEL, E.; LEPINE, F.; MILOT, S.; HE J.; MINDRINOS, M.; TOMPKINS, R.; RAHME, L. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S.L.], v. 101, n. 5, p. 1339-1344, 22 jan. 2004. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.030769>.

DIGGLE, S. P.; WINZER, K.; CHHABRA, S. R.; WORRALL, K. E.; CÁMARA, M.;

WILLIAMS, P. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. **Molecular Microbiology**, [S.L.], v. 50, n. 1, p. 29-43, 11 ago. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03672.x>.

DIGGLE, S. P.; MATTHIJS, S.; WRIGHT, V. J.; FLETCHER, M. P.; CHHABRA, S. R.; LAMONT, L.; KONG, X.; HIDER, R. C.; CORNELIS, P.; CÂMARA, M. The *Pseudomonas aeruginosa* 4-Quinolone Signal Molecules HHQ and PQS Play Multifunctional Roles in Quorum Sensing and Iron Entrapment. **Chemistry & Biology**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 87-96, jan. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.11.014>

FERREIRA, B. **Diversidade genética, perfil de resistência aos antimicrobianos e produção de biofilme de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas da água utilizada em unidades de terapia renal substitutiva**. 2009. 63f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - FundaçãoOswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2009.

FERNÁNDEZ-PIÑAR, R.; CÂMARA, M.; DUBERN, J.; RAMOS, J. L.; ESPINOSA-URGEL, M. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone quorum sensing signal alters the multicellular behaviour of *Pseudomonas putida* KT2440. **Research In Microbiology**, [S.L.], v. 162, n. 8, p. 773-781, out. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2011.06.013>.

GALLAGHER, L. A.; MCKNIGHT, S. L.; KUZNETSOVA, M. S.; PESCI, E. C.; MANOIL, C. Functions Required for Extracellular Quinolone Signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, [S.L.], v. 184, n. 23, p. 6472-6480, dez. 2002. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.184.23.6472-6480.2002>.

GALLE, M.; SCHOTTE, P.; HAEGMAN, M.; WULLAERT, A.; YANG, H. J.; JIN, S.; BEYAERT, R. The *Pseudomonas aeruginosa* TypeIII secretion system plays a dual role in the regulation of caspase-1 mediated IL-1 β maturation. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, [S.L.], v. 12, n. 5, p. 1767-1776, set. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00190.x>.

HÄUSSLER, S.; BECKER, T. The *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS) Balances Life and Death in *Pseudomonas aeruginosa* Populations. **Plos Pathogens**, [s.l.], v. 4, n. 9, p.4-1000166, 26 set. 2008. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000166>.

HOOI, D. S. W.; BYCROFT, B. W.; CHHABRA, S. R.; WILLIAMS, P.; PRITCHARD, D. Differential Immune Modulatory Activity of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Signal Molecules. **Infection AndImmunity**, [S.L.], v. 72, n. 11, p. 6463-6470, nov. 2004. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.72.11.6463-6470.2004>.

JOY, S.; BUTALIA, T.; SHARMA, S.; RAHMAN, P. K. S. M. Biosurfactant Producing Bacteria from Hydrocarbon Contaminated Environment. **Biodegradation and Bioconversion of Hydrocarbons**, [S.L.], p. 259-305, 11 nov. 2016. Springer Singapore. http://dx.doi.org/10.1007/978-981-10-0201-4_8.

KIM, K.; KIM, Y. U.; KOH, B. H.; HWANG, S. S.; KIM, S.; LÉPINE, F.; CHO, Y.; LEE. Gap Ryol. HHQ and PQS, two *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecules, down-regulate the innate immune responses through the nuclear factor- κ B pathway. **Immunology**, [S.L.], v. 129, n. 4, p. 578-588, 11 set. 20010a. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03160.x>.

KIM, K.; KIM, S.; LÉPINE, F.; CHO, Y.; LEE, G. R. Global gene expression analysis on the target genes of PQS and HHQ in J774A.1 monocyte/macrophage cells. **Microbial Pathogenesis**, [S.L.], v. 49, n. 4, p. 174-180, out. 2010b. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2010.05.009>.

KIM, K.; KIM, S.; LÉPINE, F.; CHO, Y.; LEE, G. R. Global gene expression analysis on the target genes of PQS and HHQ in J774A.1 monocyte/macrophage cells. **Microbial Pathogenesis**, [S.L.], v. 49, n. 4, p. 174-180, out. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2010.05.009>.

KIM, K.; KIM, Y. U.; KOH, B. H.; HWANG, S. S.; KIM, S.; LÉPINE, F.; CHO, Y.; LEE, Gap Ryol. HHQ and PQS, two *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecules, down-regulate the innate immune responses through the nuclear factor- κ B pathway. **Immunology**, [S.L.], v. 129, n. 4, p. 578-588, 11 set. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03160.x>.

LAMARCHE, M. G.; DÉZIEL, E. MexEF-OprN Efflux Pump Exports the *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS) Precursor HHQ (4-hydroxy-2-heptylquinoline). **Plos One**, [S.L.], v. 6, n. 9, p. 24310-24400, 21 set. 2011. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0024310>.

LEE, J.; WU, J.; DENG, Y.; WANG, J.; WANG, C.; WANG, J.; CHANG, C.; DONG, Y.; WILLIAMS, P.; ZHANG, L. A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. **Nature Chemical Biology**, [S.L.], v. 9, n. 5, p. 339-343, 31 mar. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.1225>.

LEE, J.; ZHANG, L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. **Protein & Cell**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.26-41, 25 set. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>.

LEE, X.; FOX, Á.; SUFRIN, J.; HENRY, H.; MAJCHERCZYK, P.; HAAS, Dieter; REIMMANN, C. Identification of the Biosynthetic Gene Cluster for the *Pseudomonas aeruginosa* Antimetabolite I -2-Amino-4-Methoxy- trans -3-Butenoic Acid. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 192, n. 16, p. 4251-4255, 15 ago. 2010. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.00492-10>.

LEGENDRE, C.; REEN, F. J.; MOOIJ, M. J.; MCGLACKEN, G. P.; ADAMS, C.; O'GARA, F. *Pseudomonas aeruginosa* Alkyl Quinolones Repress Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) Signaling through HIF-1 α Degradation. **Infection And Immunity**, [S.L.], v. 80, n. 11, p. 3985-3992, 4 set. 2012. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.00554-12>.

LIU, Y.; CHAN, K.; CHANG, C. Modulation of Host Biology by *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Signal Molecules: Messengers or Traitors. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 6, p.1-9, 9 nov. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.01226>.

LOU, Z.; WANG, H.; TANG, Y.; CHEN, X. The effect of burdock leaf fraction on adhesion, biofilm formation, quorum sensing and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 122, n. 3, p. 615-624, 18 jan. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.13348>.

LYCZAK, J. B; CANNON, C. L; PIER, G. B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist*address for correspondence. **Microbes And Infection**, [S.L.], v. 2, n. 9, p. 1051-1060, jul. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1286-4579\(00\)01259-4](http://dx.doi.org/10.1016/s1286-4579(00)01259-4).

MAURA, D; HAZAN, R; KITAO, T; BALLOK, A. E.; RAHME, L. G. Evidence for Direct Control of Virulence and Defense Gene Circuits by the *Pseudomonas aeruginosa*

Quorum Sensing Regulator, MvfR. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-14, set. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep34083>.

MAVRODI, D. V; BLANKENFELDT, W; THOMASHOW, L. S. Phenazine Compounds in Fluorescent *Pseudomonas* Spp. Biosynthesis and Regulation. **Annual Review of Phytopathology**, [S.L.], v. 44, n. 1, p. 417-445, set. 2006. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.013106.145710>.

MCKNIGHT, S. L.; IGLEWSKI, B. H.; PESCI, Everett C. *The Pseudomonas* Quinolone Signal Regulates rhl Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, [S.L.], v. 182, n. 10, p. 2702-2708, 15 maio 2000. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.182.10.2702-2708.2000>.

MÉAR, J.-B.; KIPNIS, E.; FAURE, E.; DESSEIN, R.; SCHURTZ, G.; FAURE, K.; GUERY, B. *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* interactions: more than an opportunistic criminal association? **Médecine et Maladies Infectieuses**, [S.L.], v. 43, n. 4, p. 146-151, abr. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2013.02.005>.

MEDINA, G; JUÁREZ, K; VALDERRAMA, B; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhIR transcriptional regulation of the rhlAB Promoter. **Journal of Bacteriology**, [S.L.], v. 185, n. 20, p. 5976-5983, 15 out. 2003. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.185.20.5976-5983.2003>.

MOREIRA, C. A. **Atividade in vitro de agentes antimicrobianos contra biofilmes de *Staphylococcus* spp. de otite canina**. 2011. 103f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) - Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

MURCIA, N. R; LEE, X; WARIDEL, P; MASPOLI, A; IMKER, H. J; CHAI, T; WALSH, C T.; REIMMANN, C. The *Pseudomonas aeruginosa* antimetabolite L -2-amino-4-methoxy-trans-3- butenoic acid (AMB) is made from glutamate and two alanine residues via a thiotemplate-linked tripeptide precursor. **Frontiers in Microbiology**, [S.L.], v. 6, n. 3, p. 6-170, 12 mar. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00170>.

O'LOUGHLIN, C. T.; MILLER, L. C.; SIRYAPORN, A.; DRESCHER, K.; SEMMELHACK, M. F.; BASSLER, B. L.. A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S.L.], v. 110, n. 44, p. 17981-17986, 18 out. 2013. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1316981110>.

OCHSNER, U. A.; REISER, J. Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Proceedings of the National Academy of Sciences, [S.L.], v. 92, n. 14, p. 6424-6428, 3 jul. 1995. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.92.14.6424>.

PALMER, Gregory C.; SCHERTZER, Jeffrey W.; MASHBURN-WARREN, Lauren; WHITELEY, Marvin. Quantifying *Pseudomonas aeruginosa* Quinolones and Examining Their Interactions with Lipids. **Methods In Molecular Biology**, [S.L.], p. 207-217, 8 out. 2010. Humana Press. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60761-971-0_15.

PESCI, E. C.; MILBANK, J. B. J.; PEARSON, J. P.; MCKNIGHT, S.; KENDE, A. S.; GREENBERG, E. P.; IGLEWSKI, B. H.. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences, [S.L.], v. 96, n. 20, p. 11229-11234, 28 set. 1999. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.20.11229>.

PRICE-WHELAN, A.; DIETRICH, L. e P.; NEWMAN, D. K. Rethinking 'secondary' metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. **Nature Chemical Biology**, [S.L.], v. 2, n. 2, p. 71-78, 18 jan. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio764>.

PUSTELNY, C.; ALBERS, A.; BÜLDT-KARENTZOPOULOS, K.; PARCHAT, K.; CHHABRA, S. R.; CÁMARA, M.; WILLIAMS, P.; FETZNER, S. Dioxygenase-Mediated quenching of quinolone-dependent *quorum sensing* in *Pseudomonas aeruginosa*. **Chemistry & Biology**, [S.L.], v. 16, n. 12, p. 1259-1267, dez. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2009.11.013>.

RAMPIONI, G.; FALCONE, M.; HEEB, S.; FRANGIPANI, E.; FLETCHER, M. P.; DUBERN, J. VISCA, P; LEONI, L.; CÁMARA, M.; WILLIAMS, P. Unravelling the Genome-Wide Contributions of Specific 2-Alkyl-4-Quinolones and PqsE to Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **Plos Pathogens**, [S.L.], v. 12, n. 11, p. 1006029- 100645, 16 nov. 2016. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1006029>.

RUMBAUGH, K. P.; KORGAONKAR, A.; TRIVEDI, U.; WHITELEY, M. Community surveillance enhances *Pseudomonas aeruginosa* virulence during polymicrobial infection. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 110, n. 3, p. 1059-1064, 31 dez. 2012. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1214550110>.

SCHAUDER, J. S.; SHOKAT, K.; SURETTE, M. G.; BASSLER, B. L. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. **Molecular Microbiology**, [S.L.], v. 41, n. 2, p. 463-476, 21 dez. 2001. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02532.x>.

SKINDERSOE, M. E.; ZEUTHEN, L. H.; BRIX, S.; FINK, L. N.; LAZENBY, J.; WHITTALL, C.; WILLIAMS, P.; DIGGLE, S. P.; FROEKIAER, H.; COOLEY, M. *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules interfere with dendritic cell-induced T-cell proliferation. **Fems Immunology & Medical Microbiology**, [S.L.], v. 55, n. 3, p. 335-345, abr. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695x.2008.00533.x>.

SMITH, R. *P. aeruginosa quorum sensing* systems and virulence. **Current Opinion in Microbiology**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 56-60, fev. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1369-5274\(03\)00008-0](http://dx.doi.org/10.1016/s1369-5274(03)00008-0).

SONG, D.; MENG, J.; CHENG, J.; FAN, Z.; CHEN, P.; RUAN, H.; TU, Z.; KANG, N.; LI, N.; XU, Y. *Pseudomonasaeruginosa* quorum-sensing metabolite induces host immune cell death through cell surface lipid domain dissolution. **Nature Microbiology**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 97-111, 3 dez. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-018-0290-8>.

STOVER, C. K.; PHAM, X. Q.; ERWIN, A. L.; MIZOGUCHI, S. D.; WARRENER, P.; HICKEY, M. J.; BRINKMAN, F.s. L.; HUFNAGLE, W. O.; KOWALIK, D. J.; LAGROU, M. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, [S.L.], v. 406, n. 6799, p. 959-964, ago. 2000. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/35023079>.

SUN, S.; ZHOU, L.; JIN, K.; JIANG, H.; HE, Y. Quorum sensing systems differentially regulate the production of phenazine-1-carboxylic acid in the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* PA1201. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 30352-30370, 26 jul. 2016. Springer Science and Business Media LLC.

<http://dx.doi.org/10.1038/srep30352>.

TETTMANN, B.; NIEWERTH, C.; KIRSCHHÖFER, F.; NEIDIG, A.; DÖTSCH, A.; BRENNER-WEISS, G.; FETZNER, S.; OVERHAGE, J. Enzyme-Mediated Quenching of the *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS) Promotes Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa* by Increasing Iron Availability. **Frontiers in Microbiology**, [S.L.], v. 7, n. 1978, p. 1-11, 9 dez. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01978>.

THOMPSON, Lyndal s; WEBB, Jeremy s; A RICE, Scott; KJELLEBERG, Staffan. The alternative sigma factor RpoN regulates the quorum sensing gene *hlln* in *Pseudomonas aeruginosa*. **Fems Microbiology Letters**, [S.L.], v. 220, n. 2, p. 187-195, mar. 2003. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1097\(03\)00097-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1097(03)00097-1).

TORIBIO, Jeiry; ESCALANTE, Ana E.; SOBERÓN-CHÁVEZ, Gloria. Rhamnolipids: production in bacteria other than *pseudomonas aeruginosa*. **European Journal of Lipid Science and Technology**, [S.L.], v. 112, n. 10, p. 1082-1087, 20 jul. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.200900256>.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TROTTMANN, F.; FRANKE, J.; ISHIDA, K.; GARCÍA-ALTARES, M.; HERTWECK, C. A Pair of Bacterial Siderophores Releases and Traps an Intercellular Signal Molecule: an unusual case of natural nitroreductase-mediated conjugation. **Angewandte Chemie International Edition**, [S.L.], v. 58, n. 1, p. 200-204, 4 dez. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201811131>.

USHER, L. R.; LAWSON, R. A.; GEARY, I.; TAYLOR, C. J.; BINGLE, C. D.; TAYLOR, G. W.; WHYTE, M. K. B. Induction of Neutrophil Apoptosis by the *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin Pyocyanin: a potential mechanism of persistent infection. **The Journal of Immunology**, [S.L.], v. 168, n. 4, p. 1861-1868, 15 fev. 2002. The American Association of Immunologists. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.168.4.1861>.

VATSA, P.; SANCHEZ, L.; CLEMENT, C.; BAILLIEUL, F.; DOREY, S. Rhamnolipid Biosurfactants as New Players in Animal and Plant Defense against Microbes. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 11, n. 12, p. 5095-5108, 9 dez. 2010. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms11125095>.

WANG, J; WANG, C; YU, H.; AHATOR, S. D.; WU, X.; LV, S.; ZHANG, L. Bacterial quorum-sensing signal IQS induces host cell apoptosis by targeting POT1-p53 signalling pathway. **Cellular Microbiology**, [S.L.], v. 21, n. 10, p. 130761-13088, 14 jul. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/cmi.13076>.

YE, L.; CORNELIS, P.; GUILLEMYN, K.; BALLEET, S.; CHRISTOPHERSEN, C.; HAMMERICH, O. Structure Revision of N- mercapto-4-formylcarbostyryl Produced by *Pseudomonas fluorescens* G308 to 2-(2- Hydroxyphenyl)thiazole-4-carbaldehyde [aeruginaldehyde]. **Natural Product Communications**, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 19345781400900 19345781400906, jun. 2014. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1934578x1400900615>.



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2022 015239 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 78640489000153

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: RODOVIA CELSO GARCIA CD, KM 380 S/N CAMPUS
UNIVERSITARIO

Cidade: Londrina

Estado: PR

CEP: 86055-900

Pafs: Brasil

Telefone: (043) 3371 5812

Fax: (043) 3371 5812

Email: aintecpi@uel.br

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PROCESSO DE PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO CONJUNTA DE 2-HEPTIL-3,4-HIDROXIQUINOLONA (PQS) E 2-(2-HIDROXIFENIL)-THIAZOL-4-CARBALDEÍDO (IQS)

Resumo: A presente invenção trata de um processo de produção, extração e purificação conjunta de 2-heptil-3,4-hidroxiquinolona (PQS) e 2-(2-hidroxifenil)-thiazol-4-carbaldeído (IQS) por cultivos submersos de *Pseudomonas aeruginosa* de forma simultânea, ambos envolvidos na regulação da virulência deste patógeno oportunista. O processo desenvolvido permite a biossíntese e secreção destas moléculas em um tempo de cultivo curto, o que diminui os custos operacionais do processo. Desta forma, o invento permite a obtenção de extratos brutos menos complexos e consequentemente com maior pureza dos compostos, o que favorece as técnicas de purificação. Assim o presente processo possibilita a obtenção biotecnológica de PQS e IQS, ambos com alto potencial de aplicação farmacêutica, a partir de métodos simples e de baixo custo.

Figura a publicar: Fig.1

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 9

Nome: JOSIANE ALESSANDRA VIGNOLI CAMILIOS

CPF: 27845090875

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Al. Pé Vermelho, 180 – apto 2202

Cidade: Londrina

Estado: PR

CEP: 86050-492

País: BRASIL

Telefone: (43) 337 15812

Fax:

Email: aintecsec@uel.br

Inventor 2 de 9

Nome: DOUMIT CAMILIOS NETO

CPF: 00433704977

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Al. Pé Vermelho, 180 – apto 2202

Cidade: Londrina

Estado: PR

CEP: 86050-492

País: BRASIL

Telefone: (43) 337 15812

Fax:

Email: aintecsec@uel.br

Inventor 3 de 9

Nome: KAMILA BYANCA BALDIN WESSEL

CPF: 06700360994

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Delaine Negro, 55, Apto 105

Cidade: Londrina

Estado: PR

CEP: 86050-680

Pafs: BRASIL

Telefone: (43) 337 15812

Fax:

Email: aintecsec@uel.br

Inventor 4 de 9

Nome: EMILI BRUNA TOSO BUENO

CPF: 43123594823

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Graduação

Endereço: Rua Tiradentes, 137 - Centro

Cidade: Estrela do Norte

Estado: SP

CEP: 19230-000

Pafs: BRASIL

Telefone: (43) 337 15812

Fax:

Email: aintecsec@uel.br

Inventor 5 de 9

Nome: RUBIA CASAGRANDE

CPF: 27628686885

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Eurico Hummig, 350

Cidade: Londrina

Estado: PR

CEP: 86050-464

Pafs: BRASIL

Telefone: (43) 337 15812

Fax:

Email: aintecsec@uel.br

Inventor 6 de 9

Nome: WALDICEU APARECIDO VERRI JUNIOR

CPF: 02565289936

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Eurico Hummig, 350

Cidade: Londrina

Estado: PR

CEP: 86050-464

Pafs: BRASIL

Telefone: (43) 337 15812

Fax:

Email: aintecsec@uel.br

Inventor 7 de 9

Nome: CÉSAR AUGUSTO TISCHER

CPF: 94001529904

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: 229 Greenridge ST

Cidade: Ottawa

Estado:

CEP:

País: CANADÁ

Telefone: (43) 337 15812

Fax:

Email: aintecsec@uel.br

Inventor 8 de 9

Nome: MARCELO RODRIGUES DE MELO

CPF: 03680692900

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Luiz Lercó, 355, Apto 903 – BL 2

Cidade: Londrina

Estado: PR

CEP: 86047-610

País: BRASIL

Telefone: (43) 337 15812

Fax:

Email: aintecsec@uel.br

Inventor 9 de 9

Nome: DANIELE SARTORI

CPF: 03114141927

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Benjamin Franklin, nº 300, Apto. 306 BL04

Cidade: Londrina

Estado: PR

CEP: 86063-240

País: BRASIL

Telefone: (43) 337 15812

Fax:

Email: aintecsec@uel.br

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Resumo	Resumo - PQS-IQS_DCN.pdf
Relatório Descritivo	Relatório Descritivo - PQS_IQS_DCN.pdf
Reivindicação	Reivindicações - PQS_IQS_DCN.pdf
Desenho	DESENHO PQS_IQS.pdf
Documento de Cessão	DECLARAÇÃO DE CESSÃO - Josiane_assinado.pdf
Documento de Cessão	DECLARAÇÃO DE CESSÃO - Doumit_assinado.pdf
Documento de Cessão	DECLARACAO DE CESSAO - César Augusto Tischer.pdf
Documento de Cessão	DECLARAÇÃO DE CESSÃO - Daniele Sartori.pdf
Documento de Cessão	DECLARAÇÃO DE CESSÃO - Emili.pdf
Documento de Cessão	DECLARAÇÃO DE CESSÃO - Kamila (1) - assinada.pdf
Documento de Cessão	DECLARAÇÃO DE CESSÃO - Marcelo Rodrigues de Melo.pdf
Documento de Cessão	DECLARAÇÃO DE CESSÃO - Rubia .pdf
Documento de Cessão	DECLARAÇÃO DE CESSÃO - Waldiceu-2.pdf
Portaria	Decreto nº 11.322 - nomeação Marta e Airton.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	Liquidação - PQS e IQS.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

RESUMO**PROCESSO DE PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO CONJUNTA DE 2-HEPTIL-3,4-HIDROXIQUINOLONA (PQS) E 2-(2-HIDROXIFENIL)-THIAZOL-4-CARBALDEÍDO (IQS).**

A presente invenção trata de um processo de produção, extração e purificação conjunta de 2-heptil-3,4-hidroxiquinolona (PQS) e 2-(2-hidroxifenil)-thiazol-4-carbaldeído (IQS) por cultivos submersos de *Pseudomonas aeruginosa* de forma simultânea, ambos envolvidos na regulação da virulência deste patógeno oportunista. O processo desenvolvido permite a biossíntese e secreção destas moléculas em um tempo de cultivo curto, o que diminui os custos operacionais do processo. Desta forma, o invento permite a obtenção de extratos brutos menos complexos e conseqüentemente com maior pureza dos compostos, o que favorece as técnicas de purificação. Assim o presente processo possibilita a obtenção biotecnológica de PQS e IQS, ambos com alto potencial de aplicação farmacêutica, a partir de métodos simples e de baixo custo.

RELATÓRIO DESCRITIVO

PROCESSO DE PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO CONJUNTA DE 2-HEPTIL-3,4-HIDROXIQUINOLONA (PQS) E 2-(2-HIDROXIFENIL)-THIAZOL-4-CARBALDEÍDO (IQS).

Campo da Invenção

- [01] *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria gram-negativa metabolicamente versátil, encontrada nos mais variados ambientes. Sua grande adaptabilidade aos mais diversos ambientes é reflexo de seu extenso genoma, responsável pela expressão de múltiplas proteínas envolvidas no catabolismo, regulação, transporte e virulência (STOVER, C. K. et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, v. 406, n. 6799, p. 959–964, 2000.; LYCZAK, J. B.; CANNON, C. L.; PIER, G. B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: Lessons from a versatile opportunist. *Microbes and Infection*, v. 2, n. 9, p. 1051–1060, 2000).
- [02] Um efeito significativo para a competitividade e virulência deste microrganismo deve-se a sua habilidade de sintetizar numerosos fatores de virulência, incluindo exotoxinas, ramnolipídeos, fenazinas e formação de biofilme (SMITH, R. S.; IGLEWSKI, B. H. *P. aeruginosa quorum-sensing* systems and virulence. *Current Opinion in Microbiology*, v. 6, n. 1, p. 56–60, 2003). A produção destes fatores de virulência é controlada por um mecanismo químico de comunicação bacteriana dependente da densidade celular que coordena a expressão gênica por meio de pequenas moléculas sinalizadoras difusíveis, conhecido como *quorum sensing* (QS) (BALASUBRAMANIAN, D.; SCHNEPER, L.; KUMARI, H.; MATHEE, K. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Nucleic Acids Research*, v. 41, n. 1, p. 1–20, 2013.).
- [03] O QS de *P. aeruginosa* é organizado hierarquicamente, consistindo em quatro mecanismos de sinalização interconectados, chamados Las, Rhl, PQS, e o mais recentemente descoberto sistema de QS nomeado IQS (LEE, J.; ZHANG, L. The hierarchy *quorum sensing* network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein and Cell*, v. 6, n. 1, p. 26–41, 2015.).

- [04] Nos sistemas Las e Rhl, LasI e RhlI sintetizam as moléculas sinalizadoras da classe das acil-homoserinolactonas (HSL) N-(3-oxododecanoil)-HSL (3O-C12-HSL) e N-butilil-HSL (C4-HSL), respectivamente, que por sua vez regulam a expressão de genes-alvo pela ligação a seus respectivos ativadores de transcrição, LasR e RhlR (DIETRICH, L. E. P.; PRICE-WHELAN, A.; PETERSEN, A.; WHITELEY, M.; NEWMAN, D. K. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the *quorum sensing* network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, v. 61, n. 5, p. 1308–1321, 2006).
- [05] *P. aeruginosa* também sintetiza dois sinalizadores da classe das quinolonas, 2-heptil-3-hidroxil-4-quinolona, também chamado *Pseudomonas quinolone signal* (PQS), e seu precursor 2-heptil-4-quinolona (HHQ). Ambos, PQS e HHQ, se ligam ao regulador transcricional PqsR para induzir alguns genes de virulência (BALASUBRAMANIAN, D.; SCHNEPER, L.; KUMARI, H.; MATHEE, K. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Nucleic Acids Research*, v. 41, n. 1, p. 1–20, 2013).
- [06] Mais recentemente, foi reportado um novo sistema de sinalização de QS mediado por 2-(2-hidroxifenil) tiazol-4-carbaldeído também denominado aeruginaldeído ou IQS do inglês “*integrated quorum sensing system*”. O aeruginaldeído é sintetizado a partir de sintetases peptídicas não ribossomais envolvidas na síntese da pioquelinas (uma classe de sideróforos) (YE, L.; CORNELIS, P.; GUILLEMYN, K.; BALLEET, S.; CHRISTOPHERSEN, C.; HAMMERICH, O. Structure revision of N-mercapto-4-formylcarbostyryl produced by *Pseudomonas fluorescens* G308 to 2-(2-hydroxyphenyl)thiazole-4-carbaldehyde [aeruginaldehyde]. *Natural Product Communications*, v. 9, n. 6, p. 789–794, 2014).
- [07] PQS foi purificado e identificado por Pesci e colaboradores (PESCI, E. C.; MILBANK, J. B. J.; PEARSON, J. P.; MCKNIGHT, S.; KENDE, A. S.; GREENBERG, E. P.; IGLEWSKI, B. H. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America, v. 96, n. 20, p. 11229–11234, 1999). Esta quinolona reprime a ligação do fator de transcrição NF- κ B, impedindo sua ativação e conseqüentemente reprimindo a expressão de genes-alvo relacionados às vias da resposta imune em mamíferos (KIM, K.; KIM, Y. U.; KOH, B. H.; HWANG, S. S.; KIM, S. H.; LÉPINE, F.; CHO, Y. H.; LEE, G. R. HHQ and PQS, two *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecules, down-regulate the innate immune responses through the nuclear factor- κ B pathway. Immunology, v. 129, n. 4, p. 578–588, 2010). Além disso, esta molécula também reduz o nível intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROS), exibindo propriedade antioxidante próxima à do ascorbato (Vitamina C) (HÄUSSLER, S.; BECKER, T. The *pseudomonas* quinolone signal (PQS) balances life and death in *Pseudomonas aeruginosa* populations. PLoS Pathogens, v. 4, n. 9, 2008). Já IQS foi purificado e identificado por Lee e colaboradores (LEE, J.; WU, J.; DENG, Y.; WANG, JING; WANG, C.; WANG, JIANHE; CHANG, C.; DONG, Y.; WILLIAMS, P.; ZHANG, L. H. A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. Nature Chemical Biology, v. 9, n. 5, p. 339–343, 2013) e possui provável atividade antifúngica. Aparentemente, a co-ocorrência de IQS e de seu derivado aeruginol pode funcionar como tampão para o microrganismo produtor e assim impedindo o estresse oxidativo (YE, L.; CORNELIS, P.; GUILLEMYN, K.; BALLEET, S.; CHRISTOPHERSEN, C.; HAMMERICH, O. Structure revision of N-mercapto-4-formylcarbostyryl produced by *Pseudomonas fluorescens* G308 to 2-(2-hydroxyphenyl)thiazole-4-carbaldehyde [aeruginaldehyde]. Natural Product Communications, v. 9, n. 6, p. 789–794, 2014).

[08] Como PQS apresenta efeitos na modulação da resposta imune do hospedeiro e propriedades antioxidantes conhecidas, esta quinolona pode apresentar potencial terapêutico, sendo um provável alvo para desenvolvimento de novas drogas anti-inflamatórias e antioxidantes. Já o IQS apresenta possível atividade antifúngica e sua estrutura sugere ainda propriedades antioxidantes. Dada a importância destas

moléculas como possíveis agentes anti-inflamatórios, antimicrobianos e antioxidantes de interesses nas indústrias farmacêutica e cosmética, a busca por métodos de produção, extração e purificação eficientes e de baixo custo torna-se essencial para obtenção destes compostos, a fim de testar suas propriedades.

Antecedentes da Invenção

- [09] A invenção US2004002130A1 refere-se a métodos de detecção de PQS e das células bacterianas que as produzem, bem como métodos de tratamento de infecções bacterianas com compostos como antranilato de metila. A detecção e o tratamento de *Pseudomonas* são particularmente preferidos.
- [010] O processo EP1959990A2 descreve novos adjuvantes e seus usos em composições farmacêuticas, como em vacinas. Em particular, a presente invenção fornece novos compostos úteis como adjuvantes e / ou imunomoduladores para vacinação profilática e / ou terapêutica no tratamento de doenças infecciosas, doenças inflamatórias, doenças autoimunes, tumores, alergias, bem como para o controle da fertilidade em humanos ou populações animais. Os compostos são particularmente úteis não apenas como adjuvantes sistêmicos, mas preferencialmente como adjuvantes mucosais. Além disso, a invenção refere-se à sua utilização como ingredientes ativos em composições farmacêuticas.
- [011] A invenção WO0218342A2 se refere à novas moléculas sinalizadoras bacterianas da classe das quinolonas, mais especificamente, moléculas *Pseudomonas quinolone signal* (PQS), conhecida também como 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona e seus análogos e derivados são também descritos. Esta invenção também descreve composições terapêuticas contendo as moléculas e métodos, como métodos terapêuticos para regular a expressão gênica, para identificar moduladores das moléculas sinalizadoras e para modular a sinalização de detecção de *quorum sensing* em bactérias usando os compostos da invenção.
- [012] A invenção CN110124541A consiste em uma membrana composta modificada pela adição de inibidor de molécula quinolona sinalizadora com atividade contra contaminação biológica, assim como o método de preparação destas. As membranas têm como finalidade o tratamento de água. O método de preparação

compreende as seguintes etapas: 1) submeter um inibidor de quinolona sinalizadora (PQS) antranilato de metila (MA) e um óxido de grafeno de nanomaterial (GO) a uma reação de condensação de hidratação de modo a preparar um material nanocompósito estável GO / MA ; 2) realização do tratamento de mistura e adição do material nanocompósito GO / MA e fluoreto de polivinilideno (PVDF) em um solvente para preparar uma solução de fundição de membrana; e 3) realização de tratamento de conversão de fase para preparar a membrana composta modificada GO / MA-PVDF. Uma série de experiências de otimização provam que o fluxo de água da membrana composta GO / MA-PVDF preparada pela invenção é obviamente melhorado para 150 L / m² h bar. A amplitude de redução de fluxo da membrana composta GO / MA PVDF modificada é reduzida em 27 % em comparação com a de uma membrana PVDF, os conteúdos de proteína do componente biológico da membrana e polissacarídeo na superfície da membrana modificada são reduzidos em 67 % e 39 %, respectivamente, e o número de células é reduzido em 72 %. Os resultados apresentados na invenção comprovam que a membrana composta modificada possui resistência biológica à poluição.

[013] A patente BR112018067655A2 refere-se à modulação da flora de bactérias em um ambiente, inibindo a detecção de *quorum* de uma bactéria específica no ambiente específico por administração de uma quantidade eficaz de uma composição de controle de detecção de *quorum*, que envolve pelo menos um agente de controle de detecção de *quorum*, o qual é um inibidor adsorvente / catalítico para uma molécula de sinal QS, tais como, n-acil homoserina lactonas (AHL), *Pseudomonas quinolone signal* (PQS) e moléculas de detecção de *quorum* autoindutor-1 (AI-1) e autoindutor-2 (AI-2). Os agentes de controle de detecção de *quorum* incluem um material adsorvente, mineral adsorvente ou mineral não poroso tais como, argilas de filossilicato, sílica, calcite, zeólitas, terra de diatomáceas, esmectite, carvão ativado, uma nanopartícula ou uma combinação de qualquer um dos mesmos. Os métodos descritos nesta invenção compreendem a inibição da deterioração dos alimentos e a prevenção de vibriões nos peixes ou crustáceos.

[014] A invenção BR10202001370 refere-se a um processo de produção de PQS, 2-heptil-3,4-hidroxiquinolona, por fermentação submersa utilizando meio de sais e glicerol como fonte de carbono. Através deste processo pode-se ativar os genes do sistema de *quorum sensing* da bactéria, proporcionando uma maior produção de moléculas *quorum sensing*, como as pertencentes à classe de quinolonas. Deste modo, o processo de produção empregado favorece o aumento da concentração de quinolonas secretadas pelo microrganismo. A invenção também provê a extração ácido-base e purificação de PQS produzida por esta tecnologia, sendo possível obter a molécula com elevado grau de pureza, menor custo de processo e ainda considerável redução de resíduos químicos.

[015] As patentes encontradas como anterioridades descrevem: 1) métodos de detecção de PQS e de seus produtores bem como tratamentos para infecções bacterianas; 2) utilização de PQS e seus conjugados como adjuvantes para aplicação terapêutica em composições farmacêuticas; 3) emprego de PQS e seus análogos em composições terapêuticas a fim de modular a detecção de *quorum sensing* em bactérias; 4) desenvolvimento de uma membrana composta modificada pelo uso de inibidor de PQS para realização de tratamento de água; 5) aplicação de materiais porosos para interromper *quorum sensing* bacteriano, a fim de inibir deterioração dos alimentos e prevenir vibriões em peixes ou crustáceos; 6) processo de produção, extração e purificação de PQS.

[016] Já o presente invento, tem o propósito de desenvolver um processo de produção simultânea de PQS e IQS a partir de fermentação submersa de *P. aeruginosa*. E ainda, extrair ambas as moléculas secretadas no meio de cultivo e purificá-las com métodos rápidos, simples e baratos. Desta forma, com este processo biotecnológico é possível obter estas moléculas de forma eficiente e com pureza para avaliar possíveis características e propriedades farmacêuticas.

Sumário da Invenção

[017] A presente invenção trata de um processo de produção, extração e purificação conjunta de 2-heptil-3,4-hidroxiquinolona (PQS) e 2-(2-hidroxifenil)-thiazol-4-

carbaldéido (IQS) por cultivos submersos de *Pseudomonas aeruginosa*, ambos envolvidos na regulação da virulência deste patógeno oportunista. Muito pouco se tem descrito na literatura científica sobre métodos de extração e purificação de PQS e IQS, e não há, até o presente momento, depósito de patente que contemple este tipo de processo. Além de estarem envolvidos na regulação da virulência de *P. aeruginosa*, PQS apresenta grande potencial de aplicação farmacêutica devido às suas potenciais atividades anti-inflamatória e imunossupressoras, enquanto IQS apresenta atividade antifúngica

[018] O objetivo do presente invento é produzir simultaneamente os metabólitos PQS e IQS por cultivos submersos de *Pseudomonas aeruginosa*, e extraí-los e purificá-los. O processo de produção descrito permite a biossíntese e secreção destas moléculas em um tempo de cultivo curto, o que diminui os custos operacionais do processo. Desta forma, este processo de produção permite a obtenção extratos brutos menos complexos e conseqüentemente com maior pureza dos compostos, o que favorece as técnicas de extração e purificação. Adicionalmente, com o presente processo biotecnológico é possível purificar PQS e IQS a partir de métodos simples e de baixo custo.

Descrição Detalhada da Invenção

[019] Foi utilizada a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, isolada na Austrália a partir de feridas humanas infectadas (HOLLOWAY, B. W. Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Gen. Microbiol., 13, 572, 1955). Além de apresentar a sequência completa do seu genoma publicada, esta é a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* mais empregada em estudos científicos (STOVER, C. K. et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature, v. 406, n. 6799, p. 959-964, 2000). Este microrganismo está depositado no banco coleção de culturas americano ATCC (do inglês: *American Type Culture Collection*) sob o número ATCC 15692.

[020] Para o processo de produção das moléculas de interesse foram realizados dois pré-inóculos (para ativação do microrganismo) e um inóculo. Os pré-inóculos foram

realizados em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL do meio Luria-Bertani (composição por litro: 10 g NaCl, 10 g triptona e 5 g extrato de levedura), sendo que o primeiro deles foi inoculado com 3-5 colônias de PAO1, obtidas de cultivo em meio Luria-Bertani adicionado de 1,5 % (m/v) de ágar, e incubado em agitador orbital por 12-20 h em temperaturas de 30 a 37°C e rotação de 150 a 250 rpm. Já o segundo pré-inóculo foi feito com a adição de 2 – 5 % do primeiro pré-inóculo (v/v) e incubado nas mesmas condições.

[021] O inóculo foi realizado em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo volume de 80 - 120 mL de meio de sais (contendo, por litro: 3,0 g KH_2PO_4 ; 7,0 g K_2HPO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) adicionado de glicerol 3 - 6 % (v/v). Os meios foram inoculados com 2 – 4 % do segundo pré-inóculo (v/v) e incubados a 30 - 37°C com rotação de 150 - 250 rpm por 3 e 9 dias.

[022] Nos tempos adequados, os inóculos foram interrompidos por centrifugação a 3.000 - 6.000 g por 10 - 30 minutos, e os sobrenadantes livres de células foram submetidos à extração ácido-base nos pHs 11 e 2, respectivamente, com acetato de etila na proporção de 1:3 (v/v), por três vezes cada. As fases orgânicas de cada pH, recuperadas por meio de funil de separação, foram concentradas em evaporador rotatório e os extratos resultantes foram secados e pesados. Posteriormente, os extratos orgânicos foram submetidos à cromatografia em camada delgada (CCD) analítica (DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV₂₅₄, 20 × 20 cm), utilizando placas com e sem ativação com solução de 5 % de KH_2PO_4 . Foram utilizadas duas fases móveis para eluição dos diferentes compostos produzidos, sendo elas misturas de CH_2Cl_2 : CH_3OH 1 - 5 % e CHCl_3 : CH_3OH 1 - 5 %. Para identificação dos compostos de interesse, as placas foram reveladas sob luz UV, e com o emprego dos reveladores vanilina e CH_3OH : H_2SO_4 10%.

[023] O extrato bruto orgânico ácido (pH 2) de 3 dias foi submetido à cromatografia em camada delgada preparativa, utilizando placa de vidro de 20 x 20 cm revestida com 1,0 mm de sílica gel 60 P/UV254 Macherey-Nagel, ativada em estufa a 100 °C por 1 - 3 horas. Para eluição dos componentes foi CHCl_3 : CH_3OH 1 - 5 % como fase móvel, e as bandas de interesse foram removidas e eluídas com clorofórmio e metanol. Por

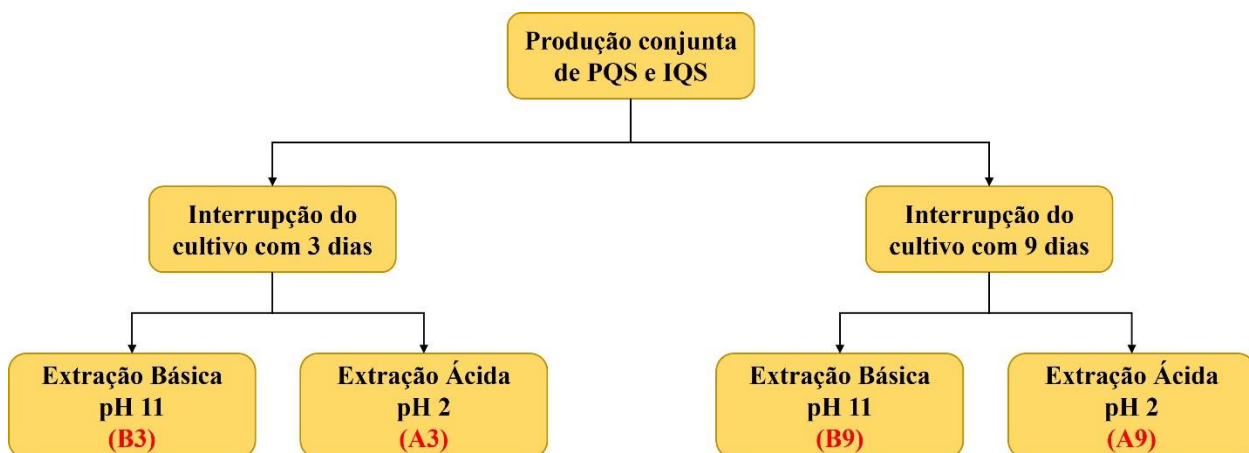
fim, as frações obtidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada analítica.

[024] Os extratos brutos orgânicos básicos (pH 11) também foram submetidos ao processo de purificação por cromatografia em camada delgada preparativa, utilizando placa de vidro de 20 x 20 cm revestida com 1,0 mm de sílica gel 60 P/UV254 Macherey-Nagel preparada com solução de KH_2PO_4 5 %, ativada em estufa a 100 °C por 1 - 3 horas. Para eluição dos componentes foi utilizado $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ 1 - 5 % como fase móvel. As bandas de interesse foram removidas e eluídas com diclorometano e metanol. As frações obtidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada analítica.

[025] A figura 1 apresenta todas as etapas do processo, em que os números indicam os processos e as letras correspondem aos respectivos produtos. A partir do segundo pré-inóculo (A) é feito o inóculo do meio de cultivo (B), como mostra o primeiro processo. O segundo processo é caracterizado pela incubação do produto B em temperatura de 30 °C a 37 °C por 3 e 9 dias, gerando os produtos C ao final do processo. O processo 3 consiste na extração ácido-base (nos pHs 11 e 2, respectivamente) do sobrenadante livre de células de cada produto C com acetato de etila na proporção de 1:3 v/v por três vezes cada, dando origem às fases orgânicas (indicadas pelas setas) apresentadas nos produtos D. Após recuperação em funil de separação, estas fases orgânicas são evaporadas em evaporador rotatório (processo 4) obtendo-se quatro extratos orgânicos, sendo eles básicos (pH 11) e ácidos (pH 2) de cada cultivo (E). Os produtos E básicos e o ácido de 3 dias são submetidos à processo de purificação por cromatografias em camada delgada preparativa (processo 5), como previamente descrito. Para confirmação estrutural, os produtos purificados são analisados por espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear (processo 6).

[026] O fluxograma 1 mostra que esquematiza o processo de extração ácido-base do sobrenadante livre de células dos cultivos (3 e 9 dias) até a obtenção dos quatro extratos orgânicos, sendo eles o extrato básico de 3 dias (B3), extrato ácido de 3 dias (A3), extrato básico de 9 dias (B9) e extrato ácido de 9 dias (A9).

[027] Fluxograma 1: Fluxograma do processo de extração ácido-base do sobrenadante livre de células dos cultivos de 3 e 9 dias com acetato de etila, até obtenção de quatro extratos brutos orgânicos B3, A3, B9 e A9.



[028] A figura 2 apresenta CCDs analíticas de cada extrato bruto, incluindo padrões das moléculas PCA, PQS e IQS para comparação a fim de determinar a presença destes compostos nos extratos obtidos. A fase móvel utilizada foi clorofórmio: metanol 1 – 5 %, e as placas foram reveladas sob luz UV (A), com metanol: ácido sulfúrico 10% (B), com metanol: ácido sulfúrico 10% seguido de aquecimento (C), com vanilina (D) e com vanilina seguida de aquecimento (E). As setas vermelhas indicam a presença de PQS nos extratos básicos enquanto as setas laranja indicam a presença de IQS no extrato ácido de 3 dias. Estes extratos foram submetidos ao processo de purificação.

[029] A Figura 3 exemplifica o processo de purificação por cromatografia em camada delgada preparativa. Primeiramente, as amostras são aplicadas, separadamente, na placa de sílica (A) (fase estacionária), a qual pode ser preparada ou não com solução de KH_2PO_4 5 %, conforme descrito previamente. Após a aplicação da amostra a placa é colocada em cuba contendo a fase móvel específica para ocorrer a eluição (B). Após a eluição, as bandas de interesse são cuidadosamente raspadas (C), a banda que contém PQS só poderá ser visualizada sob luz UV. Por fim, cada banda raspada é extraída com solvente em funil (D) e secada para posteriores análises.

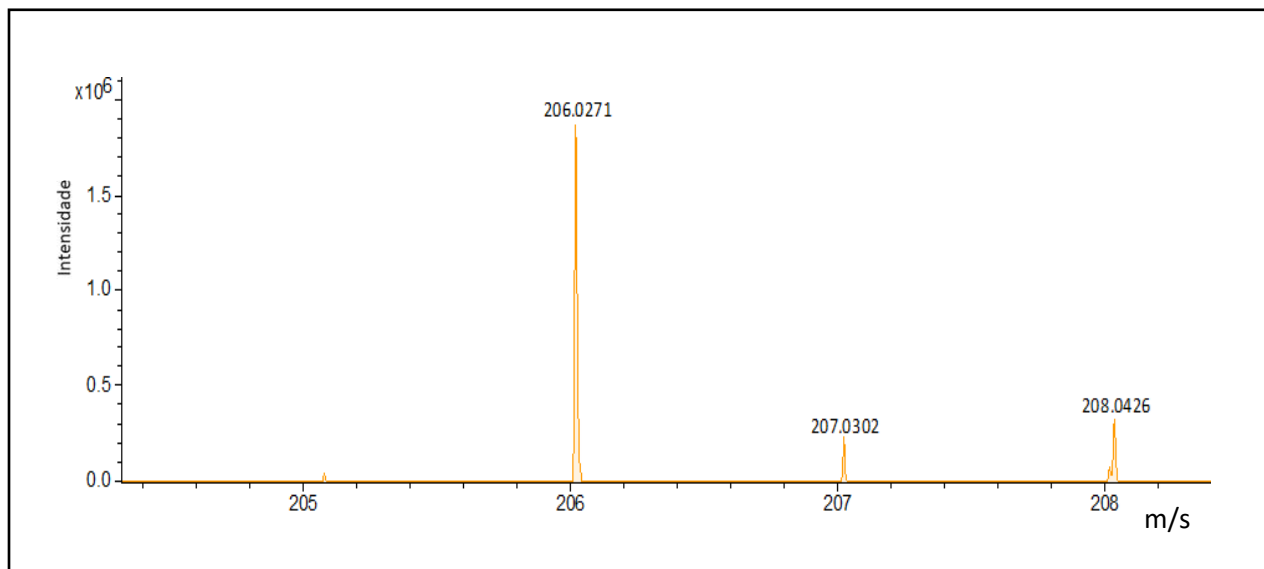
[030] Na Figura 4 está apresentado o processo de purificação do IQS a partir do extrato bruto orgânico ácido com 3 dias (A3) por CCD preparativa, utilizando como fase

móvel clorofórmio: metanol 1 – 5 %. Por se tratar de composto colorido é possível sua visualização logo após a corrida (A) sem necessidade do uso de reveladores. Para avaliar o processo de purificação foram realizadas CCDs analíticas deste processo, mostrando A3, a molécula do IQS purificado (1) indicada também pela seta vermelha, composto avermelhado (2), composto amarelado (3) incluindo os padrões de IQS e de PCA. Como fase móvel foi utilizada a mistura clorofórmio: metanol 1 – 5 %, e as placas foram reveladas sob luz UV (B) e com metanol: ácido sulfúrico 10 % seguido de aquecimento (C). Como pode ser observado, IQS apresentou-se mais concentrado na primeira fração obtida da purificação, comparando com A3 e com outras regiões (2 e 3) que foram purificadas.

[031] A Figura 5 apresenta o processo de purificação de PQS a partir dos extratos brutos orgânicos básicos (pH 11) com 3 (A) e 9 dias (B) por CCDs preparativas. As placas foram preparadas com KH_2PO_4 5 % e a fase móvel utilizada foi diclorometano: metanol 1 – 5 % e elas foram reveladas sob luz UV para visualização da molécula de interesse. O processo de purificação foi acompanhado por CCDs analíticas, que mostraram que a molécula de PQS (indicada pela seta vermelha) foi purificada de ambas as placas (P3 e P9), quando comparadas com o padrão PQS também aplicado. As placas analíticas, também preparadas com KH_2PO_4 5 % utilizando como fase móvel diclorometano: metanol 1 – 5 %, foram reveladas sob luz UV (C), com metanol: ácido sulfúrico 10 % seguido de aquecimento (D) e com vanilina seguido de aquecimento (E).

[032] A identificação e caracterização estrutural do aeruginaldeido foi feita por espectrometria de massas e por espectroscopia de ressonância nuclear magnética. O composto foi identificado como 2-(3-hidroxifenil)-1,3-Tiazol-4-carbaldeído (Figura 6), de massa exata 205,02 Da, fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$, pico de massa predominante no espectro de massas no modo positivo aduto de hidrogênio $[\text{M}+\text{H}^+]$ = 206.0271 m/z (Gráfico 1).

[033] Gráfico 1: Espectro de massas produzido obtido por ESI-qTOF de 2-(3- hidroxifenil)-1,3-Tiazol-4-carbaldeído.



[034] A análise dos espectros de ressonância magnética nuclear, RMN, de IQS mostra majoritariamente sinais característicos para os diferentes grupos químicos; 2-(3-hidroxifenil)-1,3-Tiazol-4-carbaldeído. Os espectros foram calibrados pelo sinal do carbono da carbonila da acetona adicionada como padrão interno. No espectro de RMN de ¹³C é possível atribuir (Figura 7) o sinal em 185,05 ppm ao carbono carbonílico do carbaldeído, confirmado como aldeído por espectro bidimensional ¹H-¹³C HSQC, correlacionando o mesmo ao sinal de hidrogênio em 10,00 ppm (Figura 8). O sinal do carbono hidroxilado do anel fenílico, caracterizado pela ausência de hidrogênio associado no HSQC, é observado em 155,17 ppm, assim como 164,08 ppm característico para tiazol substituído em 2. Os sinais de C₄, C₅, C₆ foram assinalados pelo acoplamento dos sinais de ¹H – ¹H COSY de 7,38 ppm tanto com 7,07 e 7,00 ppm (Figura 9). Os assinalamentos dos sinais de ressonância magnética nuclear estão sumarizados na Tabela 1.

[035] **Tabela 1** - Assinalamentos de ¹H e ¹³C para a molécula IQS (aeruginaldeído) obtidos a partir da análise dos espectros de ressonância magnética nuclear.

Núcleo *	a.	¹H (ppm)	b.	¹³C (ppm)
1		-	c.	155,17
2, 5'	d.	8,2	f.	127,6
	e.	8,73	g.	131,55
3, 4'		-	h.	118,6
			i.	153,07
4, 6	j.	7,00	k.	119,5
	l.	7,07	m.	116,4
5	n.	7,38	o.	131,7
2'		-	p.	164,08
6'	q.	10,00	r.	185,05

*Carbonos assinados Figura 5

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS:

[036] Figura 1: Modelo esquemático do processo de produção conjunta dos compostos PQS e IQS obtidos por fermentação submersa em reatores de 250 mL, e o processo de extração e purificação destas moléculas.

[037] Figura 2: CCDs analíticas dos extratos brutos orgânicos básicos e ácidos com 3 e 9 dias e os padrões PCA, IQS, PQS.

[038] Figura 3: Modelo esquemático do processo de purificação por cromatografia em camada delgada preparativa.

[039] Figura 4: Purificação do IQS a partir do extrato bruto orgânico ácido com 3 dias (A3) por CCD preparativa e análise do resultado desta purificação por CCDs analíticas.

[040] Figura 5: Purificação do PQS a partir dos extratos brutos orgânicos básicos (pH 11) com 3 e 9 dias por CCDs preparativas, e análise do resultado destas purificações por CCDs analíticas.

[041] Figura 6: Estrutura proposta para o composto IQS, 2-(3-hidroxifenil)-1,3-Tiazol-4-carbaldeído.

[042] Figura 7: Espectro de ressonância magnética nuclear de ¹³C do 2-(3-hidroxifenil)-1,3-Tiazol-4-carbaldeído em solvente DMSO-d₆, a 25 °C.

[043] Figura 8: Espectro de ressonância magnética nuclear bidimensional ¹H¹³HSQC do 2-(3-hidroxifenil)-1,3-Tiazol-4-carbaldeído em solvente DMSO-d₆, a 25 °C.

[044] Figura 9: Espectro de ressonância magnética nuclear de correlação de hidrogênios - COSY do 2-(3-hidroxifenil)-1,3-Tiazol-4-carbaldeído em solvente DMSO-d₆, a 25 °C.

[046] **Tabela 1** - Assinalamentos de ^1H e ^{13}C para a molécula IQS (aeruginaldeido) obtidos a partir da análise dos espectros de ressonância magnética nuclear.

Núcleo *	s.	^1H (ppm)	t.	^{13}C (ppm)
1		-	u.	155,17
2, 5'	v.	8,2	x.	127,6
	w.	8,73	y.	131,55
3, 4'		-	z.	118,6
			aa.	153,07
4, 6	bb.	7,00	cc.	119,5
	dd.	7,07	ee.	116,4
5	ff.	7,38	gg.	131,7
2'		-	hh.	164,08
6'	ii.	10,00	jj.	185,05

*Carbonos assinados Figura 5

REIVINDICAÇÕES

- 1. Processo de produção extração e purificação conjunta de 2-heptil-3,4-hidroxiquinolona (PQS) e 2-(2-hidroxifenil)-thiazol-4-carbaldeído (IQS)**, caracterizada pelo processo de fermentação submersa para obtenção de 2-heptil-3,4-hidroxiquinolona (PQS) e 2-(2-hidroxifenil)-thiazol-4-carbaldeído (IQS) produzidos e excretados por *Pseudomonas aeruginosa*; utilizando de glicerol como fonte de carbono e indutor de síntese;
- 2. Processo de produção extração e purificação conjunta de 2-heptil-3,4-hidroxiquinolona (PQS) e 2-(2-hidroxifenil)-thiazol-4-carbaldeído (IQS)**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pela extração ácido-base a partir de sobrenadante livre de células, resultando na obtenção do extrato bruto básico concentrado de 2-heptil-3,4-hidroxiquinolona 2-heptil-3,4-hidroxiquinolona e extrato bruto ácido contendo 2-(2-hidroxifenil)-thiazol-4-carbaldeído;
- 3. Processo de produção extração e purificação conjunta de 2-heptil-3,4-hidroxiquinolona (PQS) e 2-(2-hidroxifenil)-thiazol-4-carbaldeído (IQS)** de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizada pela obtenção de 2-heptil-3,4-hidroxiquinolona (PQS) e de 2-(2-hidroxifenil)-thiazol-4-carbaldeído (IQS) a partir de purificação do extrato orgânico ácido por cromatografia em camada delgada preparativa;

DESENHO

FIG.1

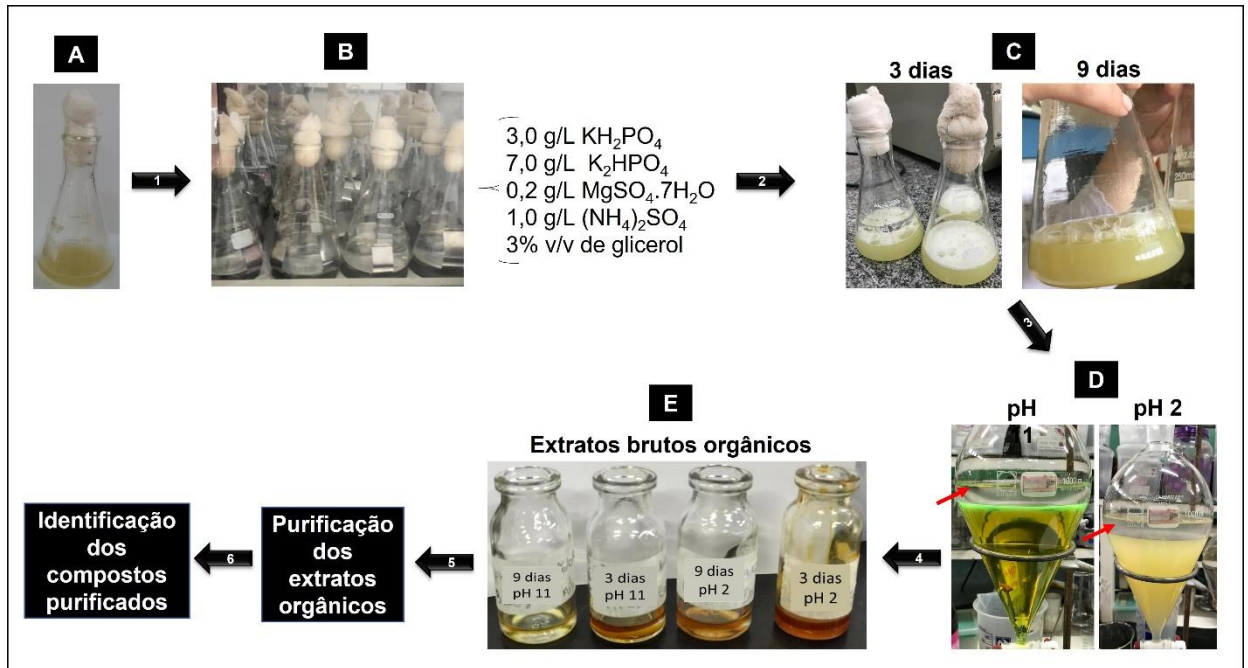


FIG.2

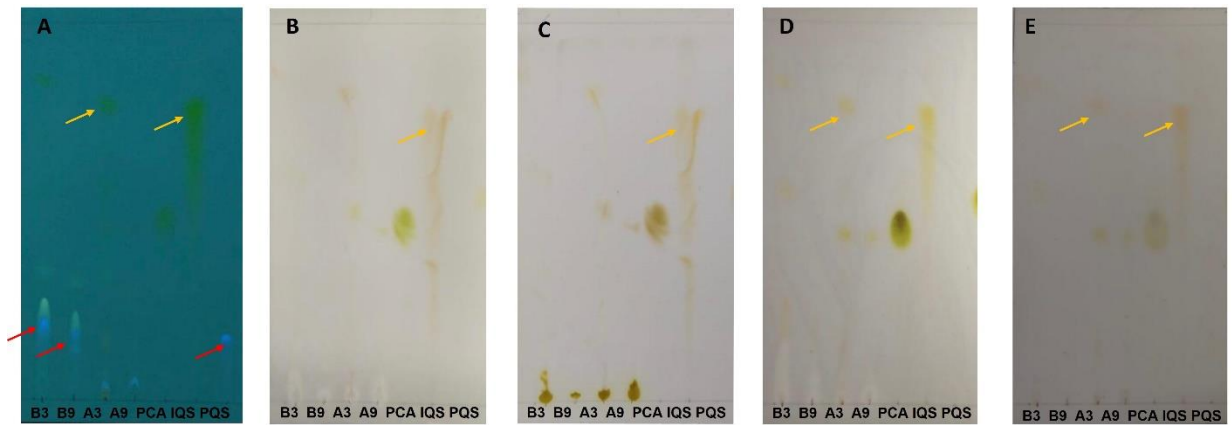


FIG.3

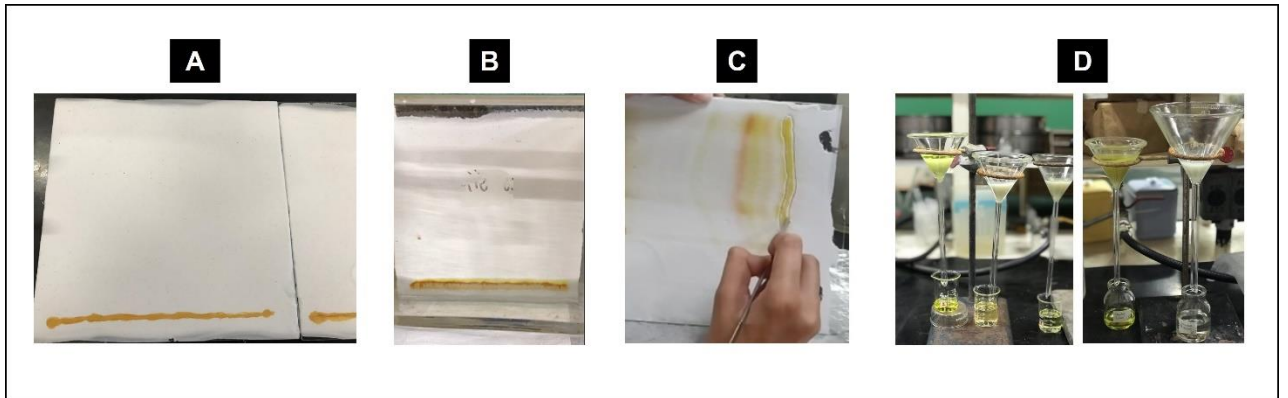


FIG. 4

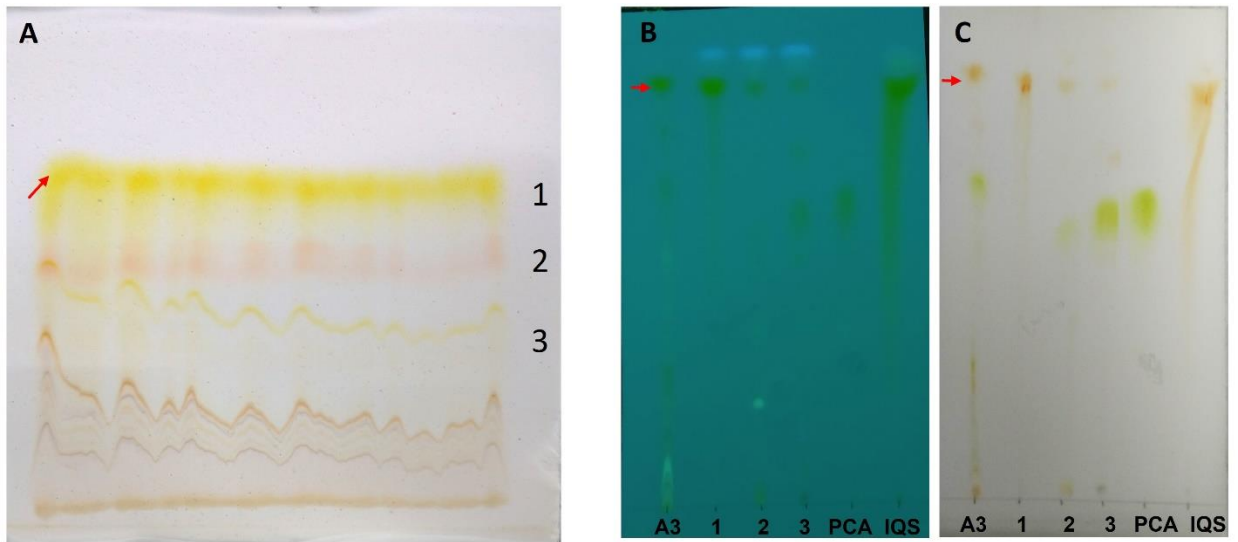


FIG. 5

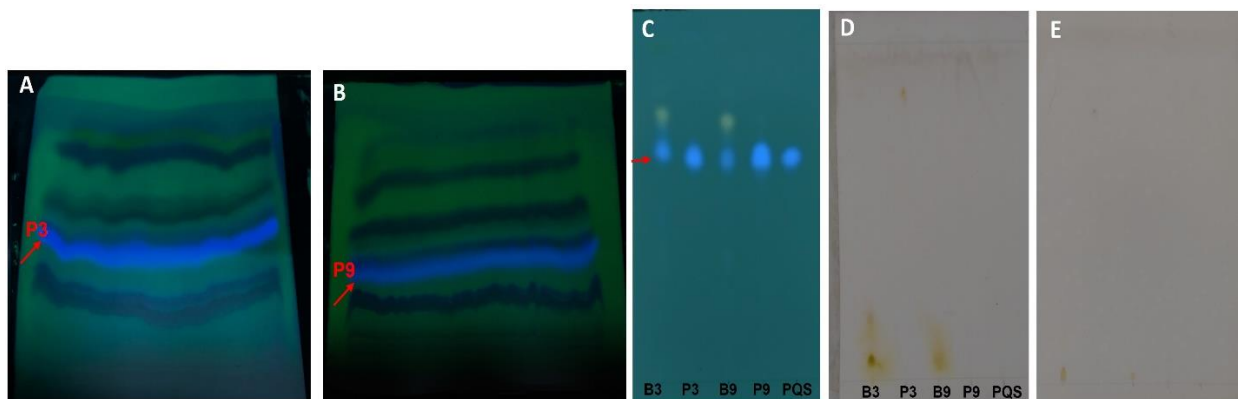


FIG.6

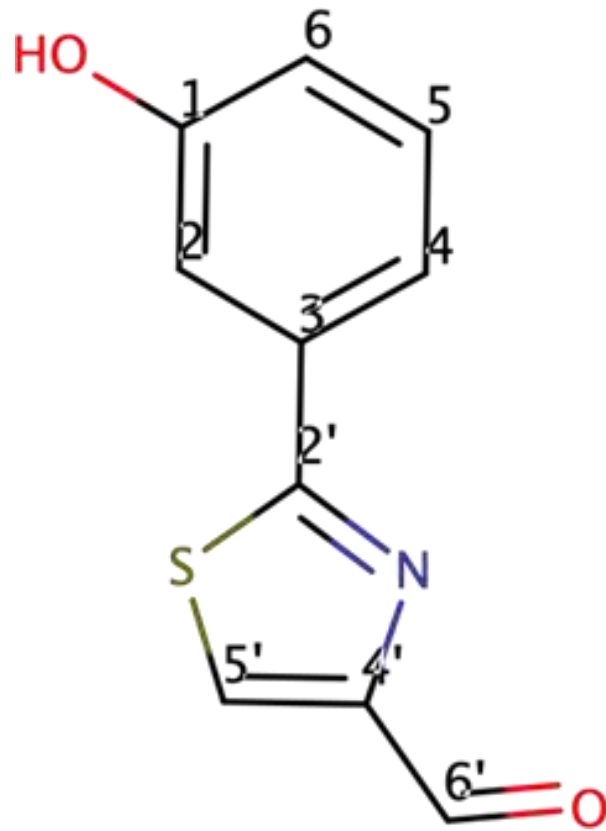


FIG.7

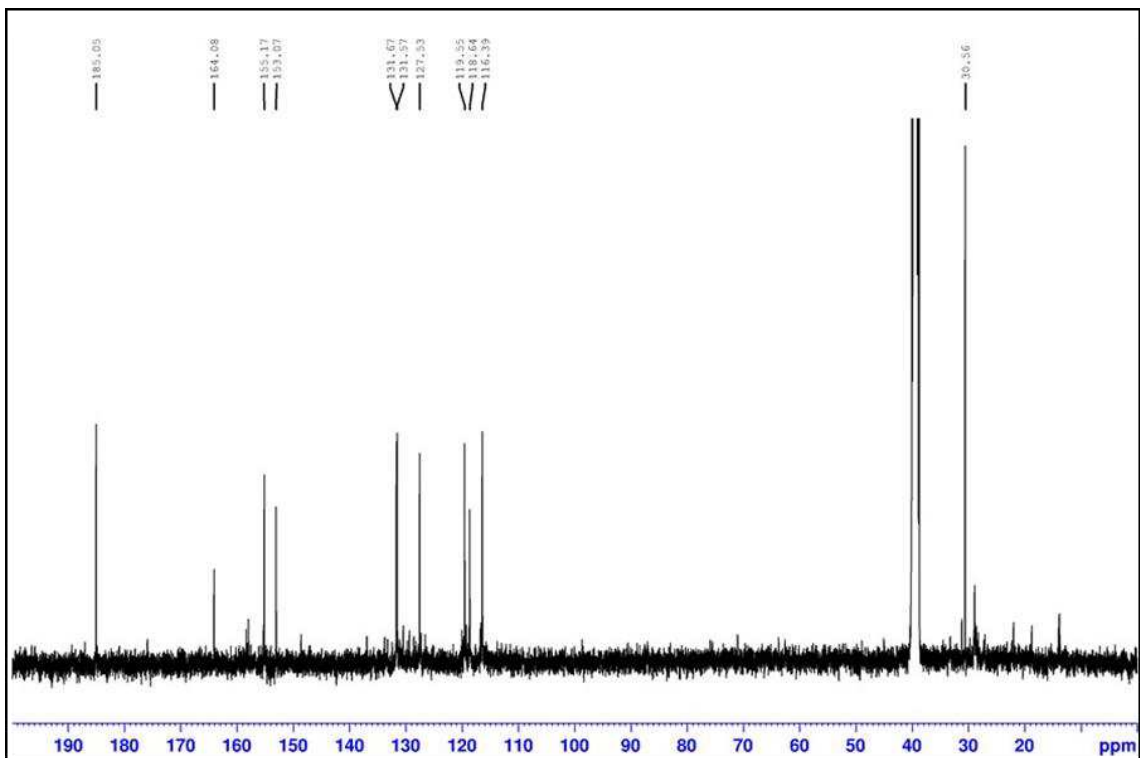


FIG.8

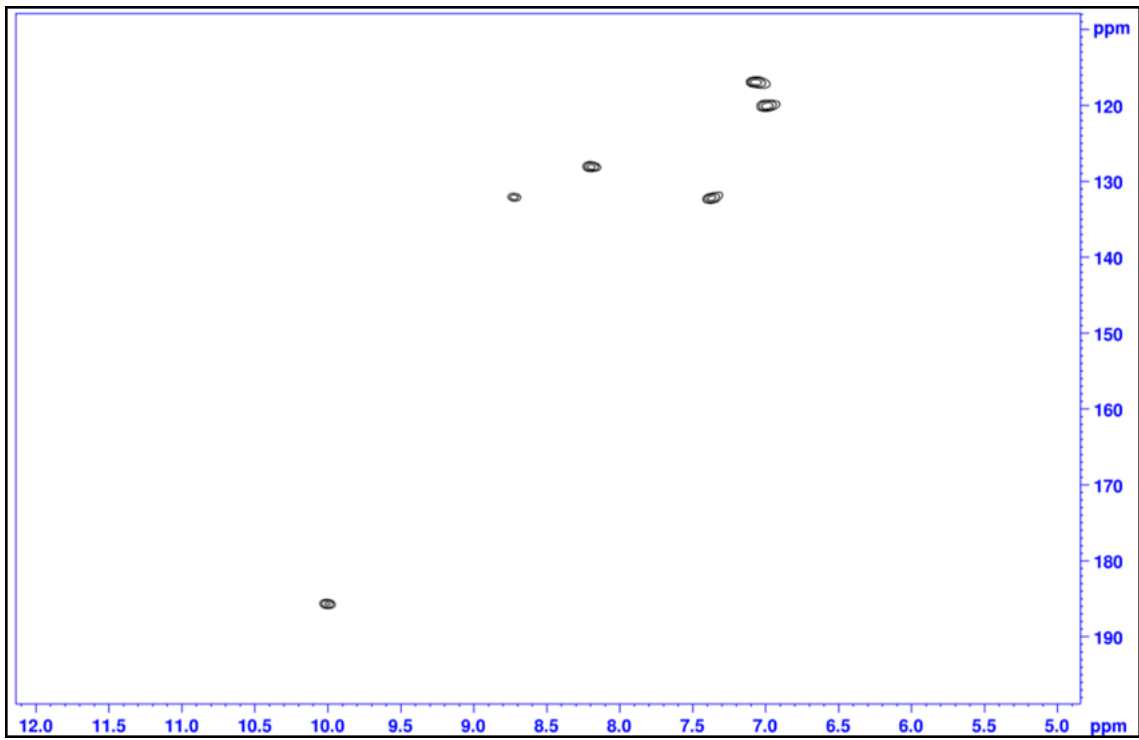
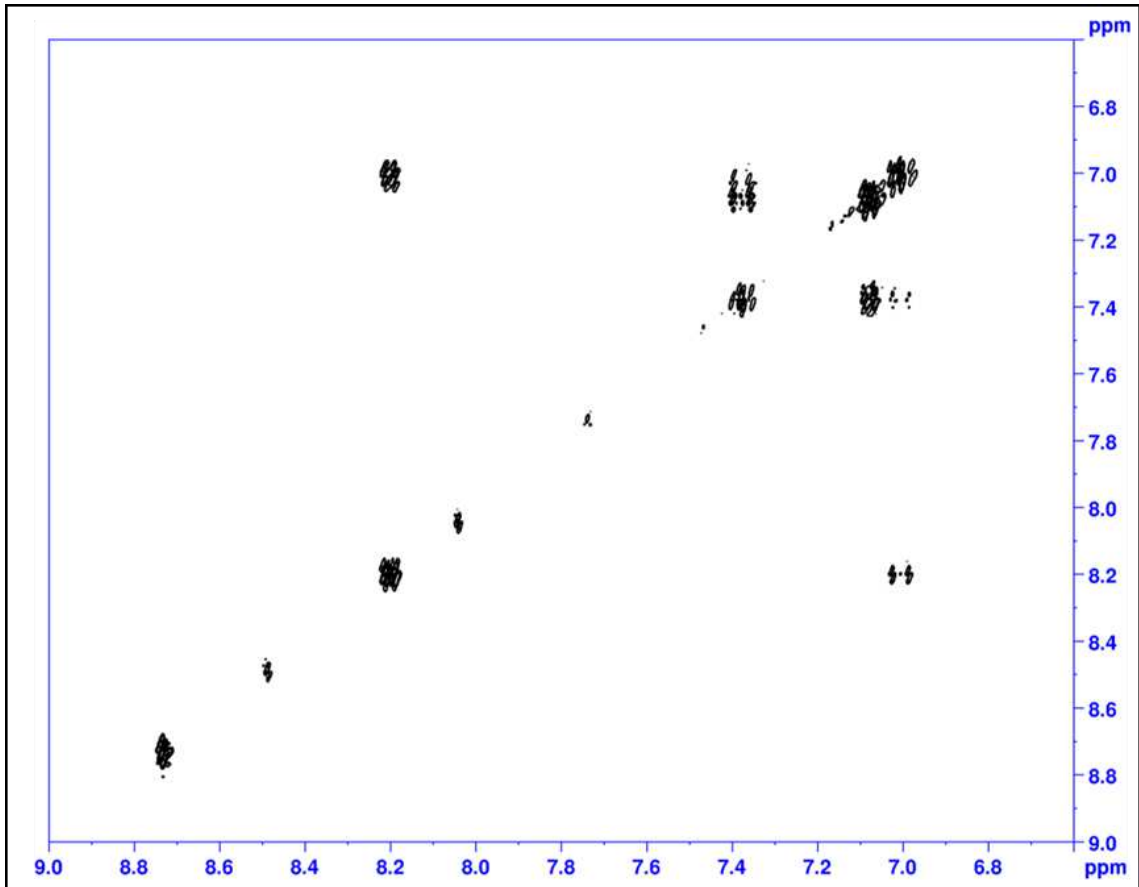


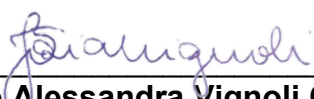
FIG. 9



DECLARAÇÃO DE CESSÃO

EU, Josiane Alessandra Vignoli Camilios, brasileira, docente da Universidade Estadual de Londrina, portadora do CPF nº 278.450.908-75, residente e domiciliada à Al. Pé Vermelho, 180 – apto 2202, Londrina/PR, CEP 86050-492, **DECLARO** para os devidos fins de direito e a quem possa interessar que através desta, e na qualidade professora do ensino superior, cedo a Universidade Estadual de Londrina os direitos inerentes à invenção denominada **“Processo de produção extração e purificação conjunta de 2-heptil-3,4-hidroxiquinolona (PQS) e 2-(2-hidroxifenil)-thiazol-4-carbaldeído (IQS)”**, a fim de que a mesma possa requerer perante o INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial o pedido de patente de invenção, mantendo a declarante na qualidade de “inventora” da referida invenção.

Londrina, 22 de julho de 2022.



Josiane Alessandra Vignoli Camilios
CPF nº 278.450.908-75

DECLARAÇÃO DE CESSÃO

EU, Doumit Camilios Neto, brasileiro, docente da Universidade Estadual de Londrina, portador do CPF nº 004.337.049-77, residente e domiciliado à Al. Pé Vermelho, 180 – apto 2202, Londrina/PR, CEP 86050-492, **DECLARO** para os devidos fins de direito e a quem possa interessar que através desta, e na qualidade professor do ensino superior, cedo a Universidade Estadual de Londrina os direitos inerentes à invenção denominada “**Processo de produção extração e purificação conjunta de 2-heptil-3,4-hidroxiquinolona (PQS) e 2-(2-hidroxifenil)-thiazol-4-carbaldeído (IQS)**”, a fim de que a mesma possa requerer perante o INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial o pedido de patente de invenção, mantendo o declarante na qualidade de “inventor” da referida invenção.

Londrina, 22 de julho de 2022.

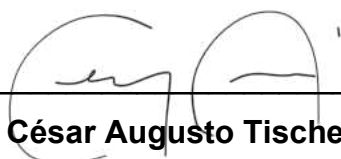
Doumit Camilios Neto

Doumit Camilios Neto
CPF nº 004.337.049-77

DECLARAÇÃO DE CESSÃO

EU, César Augusto Tischer, brasileiro, docente da Universidade Estadual de Londrina, portador do CPF nº 940.015.299-04, residente e domiciliado 229 Greenridge ST Ottawa ON K1C 7R8, Canada, **DECLARO** que, para os devidos fins de direito e a quem possa interessar que através desta, e na qualidade de professor do ensino superior, cedo à Universidade Estadual de Londrina os direitos inerentes à invenção denominada “**Processo de produção extração e purificação conjunta de 2-heptil-3,4-hidroxiquinolona (PQS) e 2-(2-hidroxifenil)-thiazol-4-carbaldeído (IQS)**”, a fim de que a mesma possa requerer perante o INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial o pedido de patente de invenção, mantendo o declarante na qualidade de “inventor” da referida invenção.

Londrina, 22 de julho de 2022.



César Augusto Tischer
CPF nº 940.015.299-04

DECLARAÇÃO DE CESSÃO

EU, Daniele Sartori, brasileira, docente pela Universidade Estadual de Londrina, portadora do CPF nº 031.141.419-27, residente e domiciliada à Rua Benjamin Franklin, nº 300, Apto. 306 BL04, Londrina - PR, CEP: 86.063-240, **DECLARO** para os devidos fins de direito e a quem possa interessar que através desta, e na qualidade de docente do ensino superior, cedo à Universidade Estadual de Londrina os direitos inerentes à invenção denominada “**Processo de produção extração e purificação conjunta de 2-heptil-3,4-hidroxiquinolona (PQS) e 2-(2-hidroxifenil)-thiazol-4-carbaldeído (IQS)**”, a fim de que a mesma possa requerer perante o INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial o pedido de patente de invenção, mantendo a declarante na qualidade de “inventora” da referida invenção.

Londrina, 22 de julho de 2022.



Daniele Sartori

CPF: 031.141.419-27

DECLARAÇÃO DE CESSÃO

EU, Emili Bruna Toso Bueno, brasileira, discente de graduação da Universidade Estadual de Londrina, portadora do CPF nº 431.235.948-23, residente e domiciliada à Rua Tiradentes, 137 - Centro, Estrela do Norte/SP, CEP: 19230-000, **DECLARO** para os devidos fins de direito e a quem possa interessar que através desta, e na qualidade estudante do ensino superior, cedo a Universidade Estadual de Londrina os direitos inerentes à invenção denominada “**Processo de produção extração e purificação conjunta de 2-heptil-3,4-hidroquinolona (PQS) e 2-(2-hidroxifenil)-thiazol-4-carbaldeído (IQS)**”, a fim de que a mesma possa requerer perante o INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial o pedido de patente de invenção, mantendo a declarante na qualidade de “inventora” da referida invenção.

Londrina, 22 de julho de 2022.

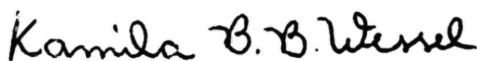
Emili Bruna Toso Bueno.

Emili Bruna Toso Bueno
CPF nº 431.235.948-23

DECLARAÇÃO DE CESSÃO

EU, Kamila Byanca Baldin Wessel, brasileira, discente de pós graduação da Universidade Estadual de Londrina, portadora do CPF nº 067.003.609-94, residente e domiciliada à Rua Delaine Negro, 55, Apto 105, Londrina/PR, CEP 86050-680, **DECLARO** para os devidos fins de direito e a quem possa interessar que através desta, e na qualidade estudante do ensino superior, cedo a Universidade Estadual de Londrina os direitos inerentes à invenção denominada “**Processo de produção extração e purificação conjunta de 2-heptil-3,4-hidroxiquinolona (PQS) e 2-(2-hidroxifenil)-thiazol-4-carbaldeído (IQS)**”, a fim de que a mesma possa requerer perante o INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial o pedido de patente de invenção, mantendo a declarante na qualidade de “inventora” da referida invenção.

Londrina, 22 de julho de 2022.

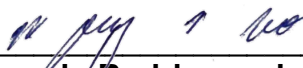


Kamila Byanca Baldin Wessel
CPF nº 067.003.609-94

DECLARAÇÃO DE CESSÃO

EU, Marcelo Rodrigues de Melo, brasileiro, docente da Universidade Estadual de Londrina, portador do CPF nº 036.806.929-00, residente e domiciliado à Rua Luiz Lerco, 355, Apto 903 – BL 2, Londrina/PR, CEP: 86047-610, **DECLARO** para os devidos fins de direito e a quem possa interessar que através desta, e na qualidade professor do ensino superior, cedo a Universidade Estadual de Londrina os direitos inerentes à invenção denominada “**Processo de produção extração e purificação conjunta de 2-heptil-3,4-hidroxiquinolona (PQS) e 2-(2-hidroxifenil)-thiazol-4-carbaldeído (IQS)**”, a fim de que a mesma possa requerer perante o INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial o pedido de patente de invenção, mantendo o declarante na qualidade de “inventor” da referida invenção.

Londrina, 22 de julho de 2022.



Marcelo Rodrigues de Melo
CPF nº 036.806.929-00

DECLARAÇÃO DE CESSÃO

EU, Rubia Casagrande, brasileira, docente da Universidade Estadual de Londrina, portadora do CPF nº 276.286.868-85, residente e domiciliada à Rua Eurico Hummig, 350 - Gleba Fazenda Palhano, Londrina - PR, 86050-464, **DECLARO** para os devidos fins de direito e a quem possa interessar que através desta, e na qualidade de professora do ensino superior, cedo a Universidade Estadual de Londrina os direitos inerentes à invenção denominada “**Processo de produção extração e purificação conjunta de 2-heptil-3,4-hidroxiquinolona (PQS) e 2-(2-hidroxifenil)-thiazol-4-carbaldeído (IQS)**”, a fim de que a mesma possa requerer perante o INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial o pedido de patente de invenção, mantendo a declarante na qualidade de “inventora” da referida invenção.

Londrina, 22 de julho de 2022.



Rubia Casagrande
CPF nº 276.286.868-85

DECLARAÇÃO DE CESSÃO

EU, Waldiceu Aparecido Verri Junior, brasileiro, docente da Universidade Estadual de Londrina, portador do CPF nº 025.652.899-36, residente e domiciliado à Rua Eurico Hummig, 350 - Gleba Fazenda Palhano, Londrina - PR, 86050-464, **DECLARO** para os devidos fins de direito e a quem possa interessar que através desta, e na qualidade de professor do ensino superior, cedo a Universidade Estadual de Londrina os direitos inerentes à invenção denominada “**Processo de produção extração e purificação conjunta de 2-heptil-3,4-hidroxiquinolona (PQS) e 2-(2-hidroxifenil)-thiazol-4-carbaldeído (IQS)**”, a fim de que a mesma possa requerer perante o INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial o pedido de patente de invenção, mantendo o declarante na qualidade de “inventor” da referida invenção.

Londrina, 22 de julho de 2022.

Waldiceu Ap. Verri Junior

Waldiceu Aparecido Verri Junior
CPF nº 025.652.899-36

Poder Executivo

DOCUMENTO CERTIFICADO

CÓDIGO LOCALIZADOR: 37659322

Documento emitido em 09/06/2022 11:23:05.

Diário Oficial Executivo
Nº 11192 | 07/06/2022 | PÁG. 3

Para verificar a autenticidade desta página, basta informar o Código Localizador no site do DIOE.

www.imprensaoficial.pr.gov.br

DECRETO Nº 11.321

Homologa s
nicipio de F
ocorrência d
- Vendaval.

O GOVERNADOR DO ESTADO DO PARANÁ, no uso das atribuições que lhe confere os incisos V e VI do art. 87, da Constituição do Estado do Paraná, tendo em vista o que dispõe o contido no parágrafo único, do Art. 15 do Regulamento do Sistema Estadual de Proteção e Defesa Civil, aprovado pelo Decreto Estadual nº 9.557, de 06 de dezembro de 2013 e, considerando a Portaria do Ministério do Desenvolvimento Regional nº 260, de 02 de fevereiro de 2022 (DOU nº 25 de 04/02/2022), bem como os efeitos adversos que culminaram no desastre ocorrido no município de Reserva do Iguaçu, causando danos e prejuízos, devidamente documentados em formulário de informação de desastres – FIDE, conforme consta no protocolado sob nº 19.056.040-6,

DECRETA:

Art. 1º Fica homologado o Decreto Municipal nº 096, de 31 de maio de 2022, exarado pelo Prefeito de Reserva do Iguaçu, o qual declara Situação de Emergência nas áreas do município em face da ocorrência de Tempestade Local/Convectiva – Vendaval.

Art. 2º Confirma-se, por intermédio deste Decreto de homologação, que os atos oficiais de declaração de situação anormal estão de acordo com os critérios estabelecidos pelo Conselho Nacional de Proteção e Defesa Civil.

Art. 3º Os órgãos do Sistema Estadual de Proteção e Defesa Civil ficam autorizados a prestar o apoio suplementar aos municípios afetados pelo desastre, mediante prévia articulação com a Coordenadoria Estadual de Defesa Civil.

Art. 4º Este Decreto de homologação entrará em vigor na data de sua publicação, retroagindo seus efeitos à data do decreto municipal anteriormente citado, devendo vigorar pelo prazo de 180 (cento e oitenta) dias, a contar da data de ocorrência do evento.

Curitiba, em 07 de junho de 2022, 201º da Independência e 134º da República.

DARCI PIANA
Governador do Estado em exercício

JOÃO CARLOS ORTEGA
Chefe da Casa Civil

FERNANDO RAIMUNDO SCHUNIG
Coordenador Estadual da Defesa Civil

58244/2022

DECRETO Nº 11.321

Nomeações para Reitor e Vice-Reitor da UEPG.

O GOVERNADOR DO ESTADO DO PARANÁ, no uso das atribuições e tendo em vista o disposto na Lei nº 12.127, de 28 de abril de 1998, no Decreto nº 956, de 04 de dezembro de 1991 e o contido no protocolado nº 18.911.925-9,

DECRETA:

Art. 1º Ficam nomeados, de acordo com o inciso III do art. 24, da Lei Estadual nº 6.174, de 16 de novembro de 1970, MIGUEL SANCHES NETO, RG nº 3.641.619-0 e IVO MOTTIN DEMIATE, RG nº 4.316.597-6, para exercerem, em comissão, os cargos de REITOR - Símbolo DAS-1, e VICE-REITOR - Símbolo DAS-3, respectivamente, da Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, com mandato de 04 (quatro) anos, a partir de 1º de setembro de 2022.

Art. 2º Este Decreto entra em vigor na data de sua publicação.

Curitiba, em 07 de junho de 2022, 201º da Independência e 134º da República.

DARCI PIANA
Governador do Estado em exercício

JOÃO CARLOS ORTEGA
Chefe da Casa Civil

ALDO NELSON BONA
Superintendente Geral de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior

58245/2022

DECRETO Nº 11.322

Nomeações de Reitor e Vice-Reitor da UEL.

O GOVERNADOR DO ESTADO DO PARANÁ, no uso das atribuições e tendo em vista o disposto nas Leis nºs 9.663, de 16 de julho de 1991 e 12.127, de 28 de abril de 1998 e o contido no protocolado nº 18.948.224-8,

DECRETA:

Art. 1º Ficam nomeados, de acordo com o inciso III do art. 24, da Lei Estadual nº 6.174, de 16 de novembro de 1970, MARTA REGINA GIMENEZ FAVARO, RG nº 4.043.909-9 e AIRTON JOSÉ PETRIS, RG nº 1.002.654, para exercerem, em comissão, os cargos de REITORA - Símbolo DAS-1, e VICE-

ativamente, da Universidade Estadual de Londrina, a partir de 10 de junho de 2022.

por na data de sua publicação.

, 201º da Independência e 134º da República.

JOÃO CARLOS ORTEGA
Chefe da Casa Civil

JO NELSON BONA
e Ciência, Tecnologia e Ensino Superior

58247/2022

DECRETO Nº 11.323

Exonera SANDRA ALVES RIBEIRO e transfere cargo em comissão da SESA para CASA CIVIL.

O GOVERNADOR DO ESTADO DO PARANÁ, no uso de suas atribuições,

DECRETA:

Art. 1º Fica exonerada, a partir de 03 de março de 2022, SANDRA ALVES RIBEIRO - RG 50199126, do cargo, em comissão, de Chefe de Seção de Regional de Saúde – Símbolo 5-C, da Secretaria de Estado da Saúde.

Art. 2º Fica transferida, até 31 de dezembro de 2022, da estrutura organizacional da Secretaria de Estado da Saúde para a Casa Civil, 1 (um) cargo em comissão, de Chefe de Seção de Regional de Saúde – Símbolo 5-C, alterando a denominação da função para Assistente.

Parágrafo único. Após o prazo estabelecido no caput deste artigo, o cargo retorna automaticamente ao órgão de origem.

Art. 3º Este Decreto entra em vigor na data de sua publicação.

Curitiba, em 07 de junho de 2022, 201º da Independência e 134º da República.

DARCI PIANA
Governador do Estado em exercício

JOÃO CARLOS ORTEGA
Chefe da Casa Civil

CESAR AUGUSTO NEVES LUIZ
Secretário de Estado da Saúde

58249/2022

DECRETO Nº 11.324

Exonera, transfere e nomeia para cargo em comissão da Casa Civil.

O GOVERNADOR DO ESTADO DO PARANÁ, no uso de suas atribuições,

DECRETA:

Art. 1º Fica exonerado ODETINO DE OLIVEIRA CASTRO, RG nº 1.699.241-0, do cargo em comissão, de Assistente – Símbolo 1-C, da Agência de Defesa Agropecuária – ADAPAR.

Art. 2º Fica transferido, até 31 de dezembro de 2022, da estrutura organizacional da Agência de Defesa Agropecuária – ADAPAR para a Casa Civil, 1 (um) cargo em comissão, de Assistente – Símbolo 1-C.

Parágrafo único. Após o prazo estabelecido no caput deste artigo, o cargo retorna automaticamente ao órgão de origem.

Art. 3º Fica nomeado, de acordo com o inciso III do art. 87, da Lei nº 6.174, de 16 de novembro de 1970, ODETINO DE OLIVEIRA CASTRO, RG nº 1.699.241-0, para exercer, em comissão, o cargo de Assistente – Símbolo 1-C, da Casa Civil.

Art. 4º Este Decreto entra em vigor na data de sua publicação.

Curitiba, em 07 de junho de 2022, 201º da Independência e 134º da República.

DARCI PIANA
Governador do Estado em exercício

JOÃO CARLOS ORTEGA
Chefe da Casa Civil

58250/2022

DECRETO Nº 11.325

Nomeação de representantes governamentais e da sociedade civil para a composição do Conselho Estadual de Assistência Social – CEAS-PR.

O GOVERNADOR DO ESTADO DO PARANÁ, no uso de suas atribuições que lhe confere o inciso V, do art. 87, da Constituição Estadual, em consonância com a Lei nº 11.362, de 12 de abril de 1996, e tendo em vista o contido no protocolado nº 18.613.238-6,

DECRETA:

Art. 1º Ficam nomeados para integrar o Conselho Estadual de Assistência Social – CEAS/PR, os representantes Governamentais da Secretaria de Estado da Justiça, Família e Trabalho:

I - RENATA MAREZIUZEK DOS SANTOS, RG nº 7.969.646-3, Suplente, em

NOTA DE LIQUIDAÇÃO

Identificação

N. Documento	22008227	Tipo de Documento	PV	Data de Emissão	20/07/22	Nota Fiscal	665409/0	Data NF	14/07/22	
N. Empenho	22009169	Tipo de Pedido de Origem	OU	N.Linha	1,000					
Proj/Atividade	9013	ENCARGOS ESPECIAIS - UEL								
Unidade Contábil	04530	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA UEL								
Unidade	45307700	AGENCIA DE INOVACAO TECNOLOGICA DA UEL								

Credor

Credor	133576	INPI - INSTITUTO NACIONAL DA P		
Endereço	PRACA MAUA	1121	0	
	CENTRO	- RIO DE JANEIRO	- RJ - BR	
CEP	20081000			
Bco/Ag	001/2234-0			
Conta	333028/1			
CNPJ	42.521.088/0001-37			

Características

Dotação Orçamentária	45307700 9013 28 846 99 33904716 00 0000000250 1	
N. Licitação	Mod. licitação	Isento/Não Aplicável
Valor Liquidado	R\$	70,00 (SETENTA REAIS)
Histórico	PAGAMENTO DE GRU. PE 902514/22.	

Dados do Empenho

Data de Vencimento	20/07/22	Data do Empenho	19/07/22	Prazo de Entrega	19/07/22
Condições de Pagamento	AV				
N. SID					

Liq a pagar ao credor 70,00 1

Controle do Saldo

Valor Total do Empenho	70,00	Saldo a Liquidar Anterior	70,00	Esta Liquidação	70,00
Valor Estornado	,00	Saldo a Liquidar Atual	,00		

ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

Prof Dormit - Pais e IAS

R5843121A 20/07/22 15:05:15 LFANTI

Página

3