Quitina e Quitosano: Substratos para Síntese Química de Peptidoglicano

Fausto Queda*
Sérgio R. Filipe
Maria Manuel Marques

Chitin and Chitosan: Reliable Sources for Peptidoglycan Chemical Synthesis. *Peptidoglycan (PGN) is a major component of bacteria cell walls. The composition of PGN, or enzymes involved in its synthesis, is often linked with the development of bacterial infections. The limited access to pure, chemically defined, amounts of specific PGN fragments hampers the research of processes where PGN has an important role. This work aimed to develop straightforward and sustainable synthetic routes to access PGN fragments that could be valuable for biological studies. Two approaches were developed that rely on the use of chitin or chitosan as starting materials. The first approach involved an acetolysis reaction of chitin to give a peracetylated disaccharide in a gram scale which, through protecting group orthogonal synthesis, gave an advanced PGN intermediate in five synthetic steps. This molecule possesses all the functional groups in the correct positions as the PGN fragments, considered a high-value synthetic intermediate. The second approach used chitosan as the starting material in a chemoenzymatic synthesis. It was possible to modify a high molecular weight chitosan polymer to produce a PGN surrogate through an orthogonal protecting group strategy. Using commercially available PGN hydrolases, we were able to hydrolyze this surrogate and identify the oligosaccharides that are present in the surrogate PGN sugar backbone.*

O peptidoglicano (PGN) é um constituinte importante da parede celular bacteriana que está relacionado, diretamente ou através das enzimas que o sintetizam, com a progressão de diferentes infeções bacterianas e com diferentes mecanismos de resistência a antibióticos. O acesso limitado a fragmentos de PGN de estrutura quimicamente definida e com elevado grau de pureza têm interferido com a investigação do papel crucial que o PGN exerce em diferentes processos biológicos. Numa primeira abordagem, por meio de uma reação de acetólise da quitina, foi possível obter o dissacárido peracetilado correspondente, que através de uma estratégia ortogonal de grupos protetores originou um intermediário avançado em apenas cinco passos de síntese. Esta molécula apresenta todos os grupos funcionais, com um posicionamento correto, tal como os fragmentos de PGN, e consequentemente, sendo um intermediário de alto valor sintético. Numa segunda estratégia, foi utilizado quitosano como material de partida numa síntese quimioenzimática. Através de uma estratégia ortogonal com diferentes grupos protetores foi possível modificar um polímero de alto peso molecular num mimético da componente de hidrato de carbono do PGN. Após hidrólise com enzimas que reconhecem e degradam o PGN, foi possível identificar vários oligossacáridos que constituem o PGN.

O peptidoglicano (PGN) é o maior constituinte da parece celular bacteriana. É composto por uma repetição do dissacárido constituído por *N*-acetilglucosamina (NAG) β-(1,4) ácido *N*-acetilmurâmico (NAM) (Figura 1). Nas unidades NAM é frequentemente encontrado um pentapéptido, que diretamente ou através de outras pontes de aminoácidos, é responsável pela interligação das cadeias de PGN e pela construção de uma rede glicopeptídica tridimensional que confere à bactéria uma elevada resistência a diferentes condições encontradas no seu meio circundante.

Alterações no processo de síntese e/ou da composição do PGN estão por vezes associadas com a capacidade de certas estirpes bacterianas em expressar uma maior resistência ou tolerância a diferentes antibióticos ou bem como com o sucesso destes microrganismos em tolerar ou alterar interações bactéria/hospedeiro.

A determinação do papel do PGN no estudo das

interações bactérias/hospedeiro tem sido limitada pela falta de fragmentos de PGN puros com uma composição e tamanho bem definidos [1]. Para contornar estes problemas, diferentes grupos têm desenvolvido ao longo dos anos estratégias complexas para a síntese destes fragmentos, que partem de monossacáridos de glucosamina seletivamente modificados (Figura 2) [2].

A síntese de oligossacáridos contendo a unidade NAG, bem como de dissacáridos NAG-NAM, é uma tarefa desafiante devido às limitações associadas à enantiosseletividade da reação de glicosilação em unidades NAG, causadas: i) pela presença de uma ligação glicosídica β-(1,4), que requer uma sequência sintética *multi-step* para alcançar as regio- e estereosseletividades aquando

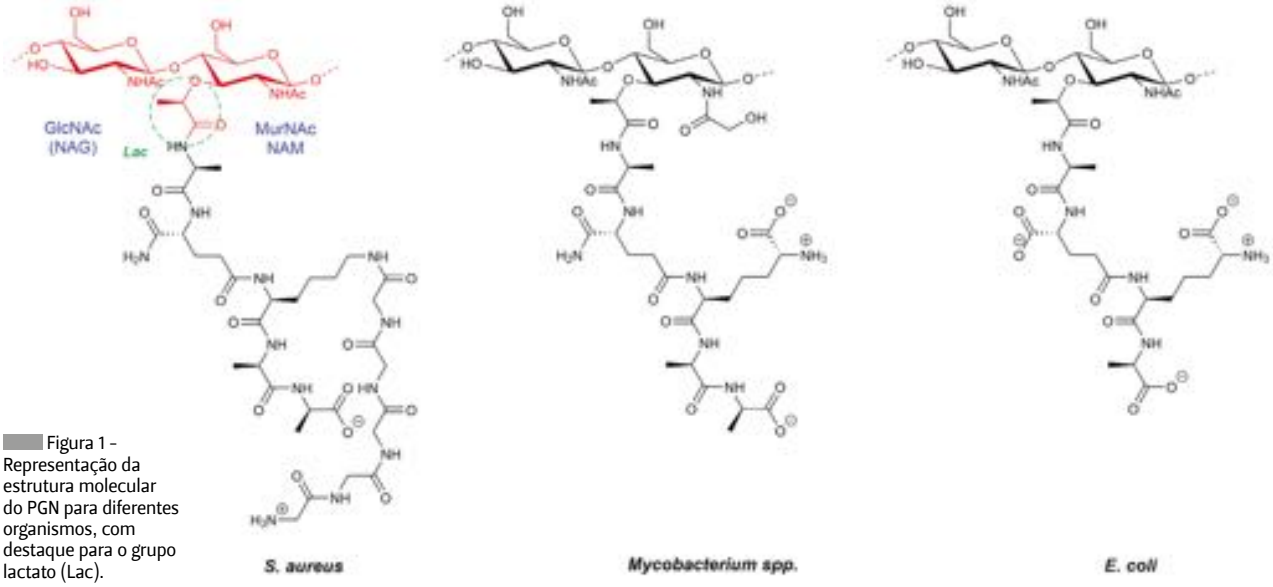


Figura 1 - Representação da estrutura molecular do PGN para diferentes organismos, com destaque para o grupo lactato (Lac).

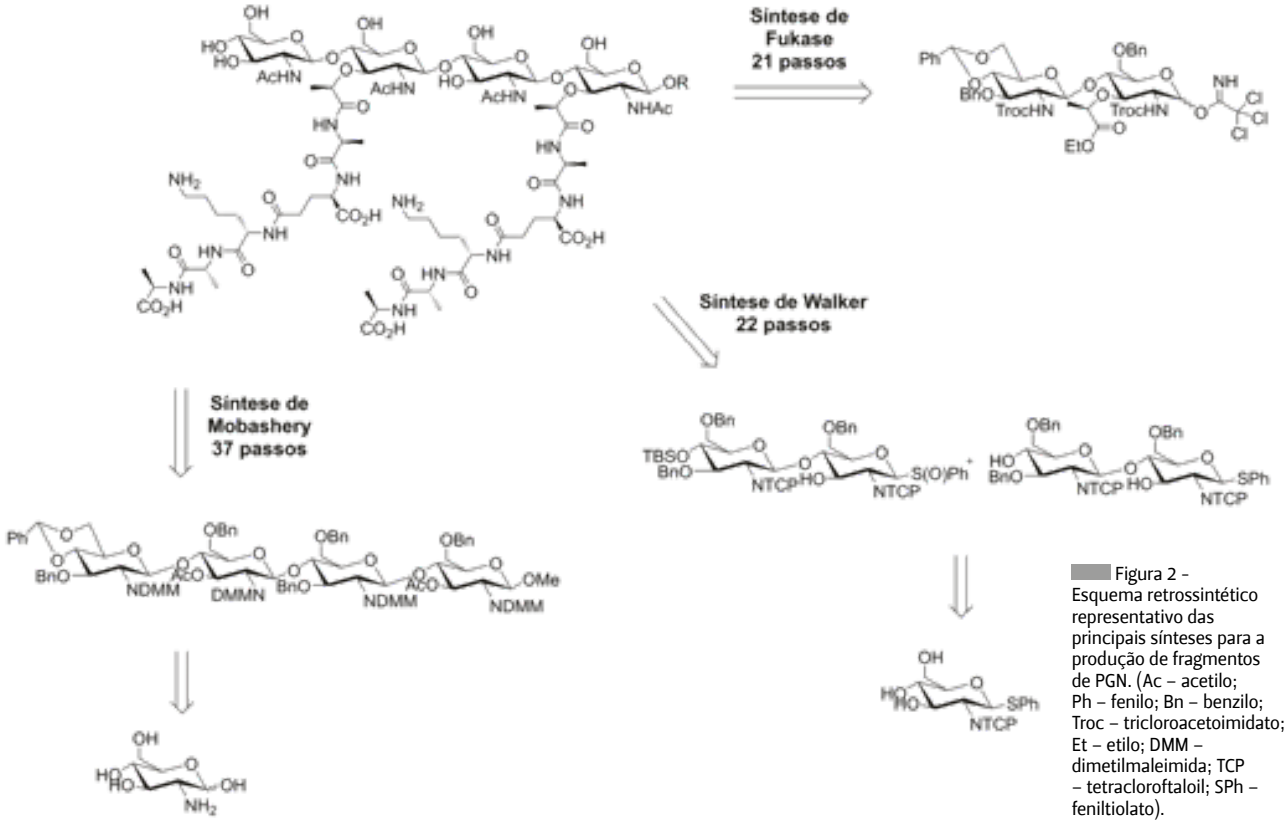


Figura 2 - Esquema retrossintético representativo das principais sínteses para a produção de fragmentos de PGN. (Ac – acetilo; Ph – fenilo; Bn – benzilo; Troc – tricloroacetoimidato; Et – etilo; DMM – dimetilmaleimida; TCP – tetracloroftaloil; SPh – feniltiolato).

do estabelecimento destas ligações glicosídicas, que são cruciais para a atividade biológica; ii) pelo uso de doadores de 2-acetamido-2-desoxiglicosilo que levam à formação de um intermediário com uma elevada estabilidade, a 1,2-*O*,*N*-oxazolidina, do que resulta que quando estas moléculas são usadas como aceitadores se comportem como nucleófilos fracos (Figura 3) [3].

Os químicos orgânicos, inspirados pela Natureza, têm desenvolvido estratégias para sintetizar fragmentos de PGN semelhantes aos que são usados pelas bactérias na síntese de PGN. A similaridade entre a síntese orgânica e a síntese por bactérias pode ser realçada em alguns passos-chave: 1) é necessária uma ativação anomérica para que mais tarde possam ser realizadas reações de glicosilação; 2) é essencial uma alquilação da posição *O*-3 em unidades NAG para que seja instalada a unidade peptídica e que transforma as unidades NAG em unidades NAM; 3) é importante o acoplamento de aminoácidos que serão depois usados na ligação de diferentes cadeias de glicanos.

Este trabalho teve por base uma estratégia inovadora para a síntese de fragmentos de PGN. Para ultrapassar um dos maiores problemas, o estabelecimento da ligação glicosídica β-(1,4), utilizou-se como material de partida os biopolímeros de quitina e de quitosano, dado que já contêm a ligação glicosídica β-(1,4) na sua estrutura. Para tal, duas vias sintéticas distintas foram pensadas, ambas partindo de biomassa contendo os biopolímeros quitina e quitosano (Figura 4).

Os resultados preliminares foram focados na modificação seletiva de quitobiose (um dissacárido constituído por duas unidades de glucosamina β-(1,4)) ou de derivados de glucosamina, através de oxidação seletiva ou substituição do grupo *N*-acetilo por outros grupos protetores. A seleção dos novos grupos protetores foi feita considerando que seriam capazes de facilitar a síntese das unidades NAG-NAM. Tendo em conta os resultados obtidos, foram

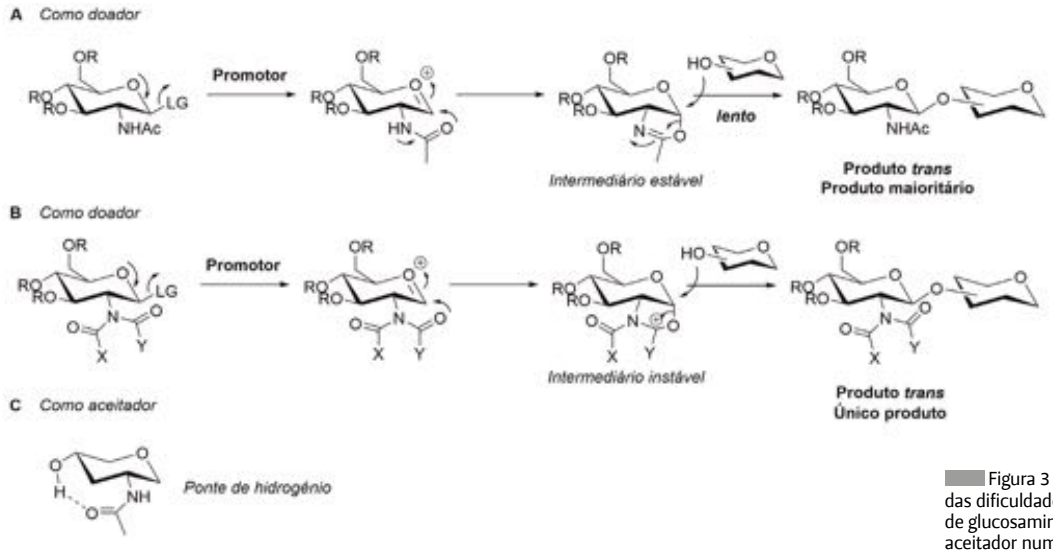
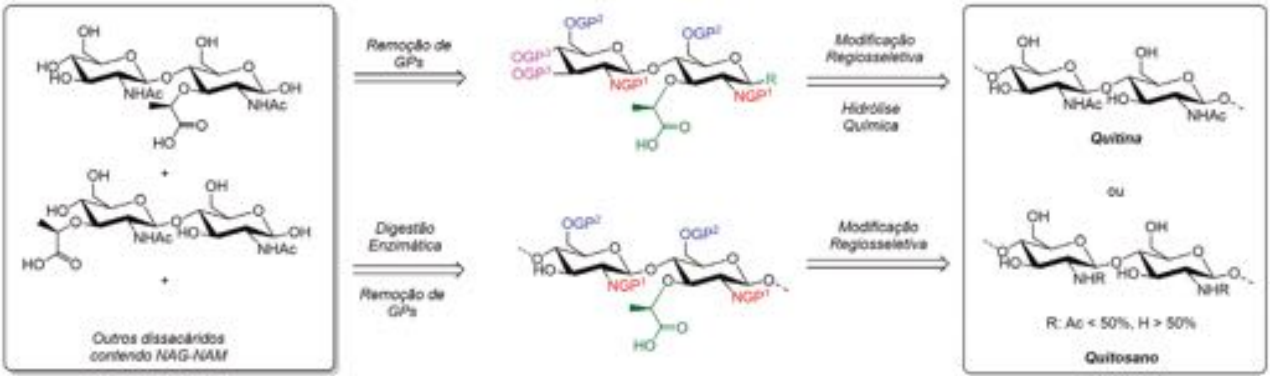


Figura 3 - Esquema representativo das dificuldades de utilização da unidade de glucosamina tanto como doador como aceitador numa reação de glicosilação.

Figura 4 - Esquema da estratégia pensada inicialmente para a síntese de fragmentos de PGN a partir dos biopolímeros quitina e quitosano. GPs: grupos protetores.



desenhadas duas estratégias sintéticas levando à preparação de um dissacárido, um intermediário avançado, contendo a unidade NAG-NAM, e também a obtenção de oligossacáridos que contêm a unidade NAG-NAM.

A primeira abordagem envolveu o uso de quitobiose peracetilada como material de partida, que foi obtida numa escala multi-grama através da acetólise da quitina. Várias experiências foram realizadas para proteger os diversos grupos funcionais presentes (Figura 5). Um precursor da unidade NAG-NAM foi sintetizado em seis passos. Este precursor é essencial para que a cadeia de hidrato de carbono possa ser alongada, criando assim oligossacáridos de maior peso molecular. A transacetilação da quitobiose, que permitiu a obtenção do derivado *N*-trifluoroacetilo (NTFA), revelou ser crucial, bem como com a combinação de diferentes grupos protetores nos diferentes grupos hidroxilo, permitindo uma inserção regiosseletiva da unidade Lac em apenas uma das posições *O*-3. A proteção regiosseletiva das posições *O*-3 e *O*-4 do resíduo terminal revelou-se um desafio, porém ultrapassado com o uso do grupo *O*-protetor butano-2,3-diona. Este protocolo que foi desenvolvido tira partido do facto da ligação glicosídica β-(1,4) estar presente no material de partida, o que elimina uma das grandes dificuldades das sínteses tradicionais de fragmentos de PGN. Mais ainda, este protocolo permite uma síntese rápida, em apenas seis passos, usando um material de partida que pode ser facilmente isolado em vários gramas [4].

O quitosano foi também investigado como um molde confiável para uma abordagem quimioenzimática para obtenção de oligossacáridos contendo a unidade NAG-NAM (Figura 6), uma vez que na sua composição existem grupos funcionais com diferentes reatividades e, como tal, podem ser aplicadas diferentes estratégias sintéticas [5].

Os miméticos da parede celular bacteriana foram obtidos a partir do quitosano, numa abordagem *top-down* (de cima para baixo) usando, para isso, uma estratégia quimioenzimática. Assim, o quitosano foi quimicamente modificado através da proteção no átomo de nitrogénio com o grupo ftaloílo e uma proteção das posições *O*-6 recorrendo a uma pinça molecular, que foi introduzida através da esterificação de duas posições *O*-6 em unidades alternadas de glucosamina, levando à criação de diferentes acessibilidades às posições *O*-3. Dois ácidos dicarboxílicos foram utilizados para esta abordagem, com diferentes comprimentos de cadeia e flexibilidade para a produção de oligossacáridos contendo a unidade NAG-NAM. Em oito passos sintéticos foi possível obter um polímero modificado contendo todos os grupos funcionais encontrados no PGN natural. A conversão das unidades NAG, inicialmente presentes no quitosano, em unidades NAM foi avaliada recorrendo à hidrólise química do polímero, com HCl 3 M, e subsequente análise por cromatografia de troca aniónica. A análise do rácio NAM:NAG permitiu verificar que uma das amostras produzidas continha um rácio semelhante (NAM:NAG 1,2:1) ao presente na amostra natural de PGN de *S. aureus*.

A intercalação alternada das unidades NAG-NAM foi avaliada recorrendo a hidrólise enzimática. Desta forma, recorreu-se a enzimas hidrolíticas capazes de reconhecer e digerir PGN, a lisozima e a mutanolisina. Assumiu-se que só seriam hidrolisadas amostras cujo conteúdo NAG-NAM fosse alternado o suficiente para ser reconhecido pela enzima. O resultado da hidrólise enzimática foi avaliado por HPLC e LC-MS. Após esta análise foi possível concluir que 33% do polímero modificado havia sido digerido por estas enzimas, tendo sido identificados, como produtos maioritários, o dissacárido NAG-NAM, bem como o trissacárido NAG-NAG-NAM. Ao mesmo tempo, o polímero modificado mostrou ser capaz de co-precipitar com proteínas PGRPs (do inglês *Peptidoglycan Recognition Proteins*), que são capazes de reconhecer peptidoglicano [6].

Os compostos produzidos são biologicamente rele-

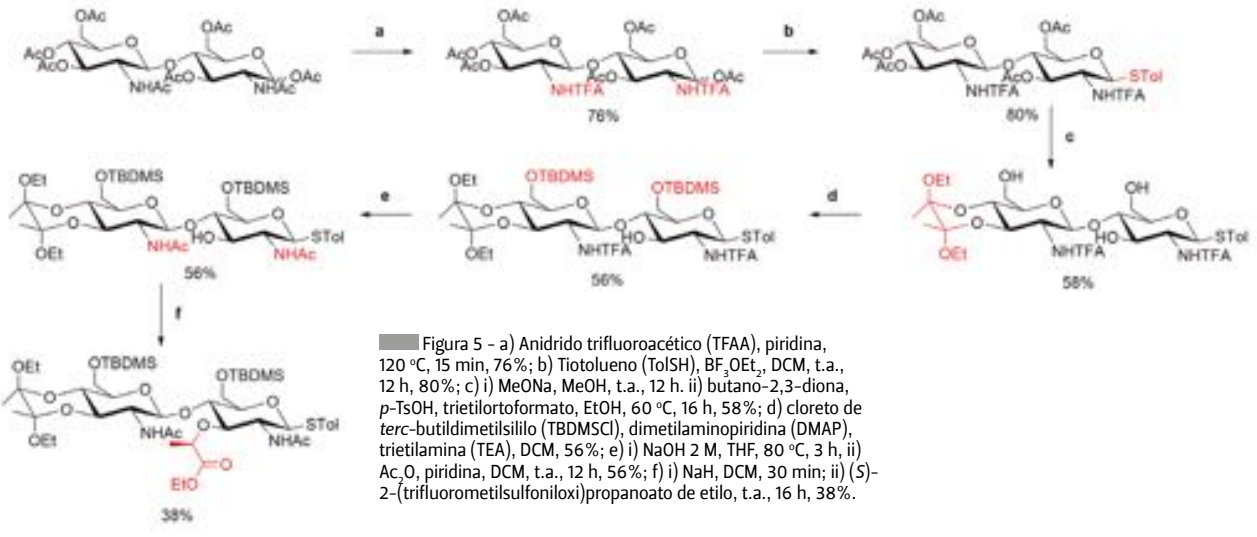


Figura 5 - a) Anidrido trifluoroacético (TFAA), piridina, 120 °C, 15 min, 76%; b) Tiotolueno (TolSH), BF_3OEt_2, DCM, t.a., 12 h, 80%; c) i) MeONa, MeOH, t.a., 12 h. ii) butano-2,3-diona, *p*-TsOH, trietilortoformato, EtOH, 60 °C, 16 h, 58%; d) cloreto de *terc*-butildimetilsililo (TBDMSCl), dimetilaminopiridina (DMAP), trietilamina (TEA), DCM, 56%; e) i) NaOH 2 M, THF, 80 °C, 3 h, ii) Ac_2O, piridina, DCM, t.a., 12 h, 56%; f) i) NaH, DCM, 30 min; ii) (*S*)-2-(trifluorometilsulfoniloxi)propanoato de etilo, t.a., 16 h, 38%.

vantes e poderão permitir novos estudos no campo da glicobiologia. Todo o trabalho desenvolvido, representado na Figura 7, os compostos preparados, os precursores alcançados bem como a metodologia de caracterização abre o acesso a estruturas complexas e possibilita novos estudos de reconhecimento molecular que norteiam as interações chave entre bactéria/hospedeiro e que são cruciais para o entendimento das infeções bacterianas.

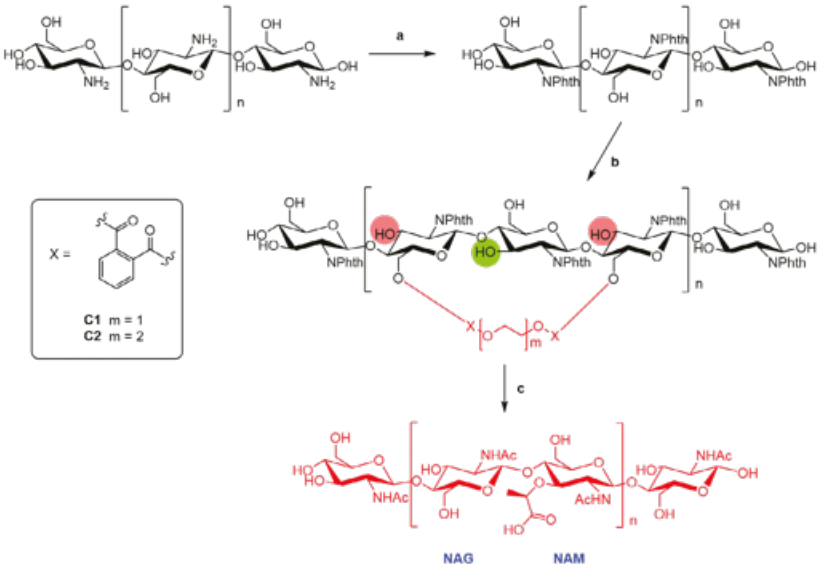


Figura 6 - Esquema resumo da estratégia de modificação regiosseletiva do quitosano para obtenção de miméticos do PGN. a) Anidrido ftálico, dimetilformamida (DMF) 5% H_2O, 120 °C, 16 h; b) C1 (m = 1) ou C2 (m = 2), carbonildiimidazole (CDI), DMF, t.a. 24 h; c) i) TBDMSCl, imidazole, DMF, N_2, t.a., 72 h; ii) (*S*)-2-CPA, NaH, DMF, t.a., 48 h; iii) NH_2NH_2, H_2O, refluxo, 24 h; iv) Ac_2O, piridina, t.a., 16 h; v) fluoreto de tetrabutilamónio (TBAF), piridina, t.a., 16 h.

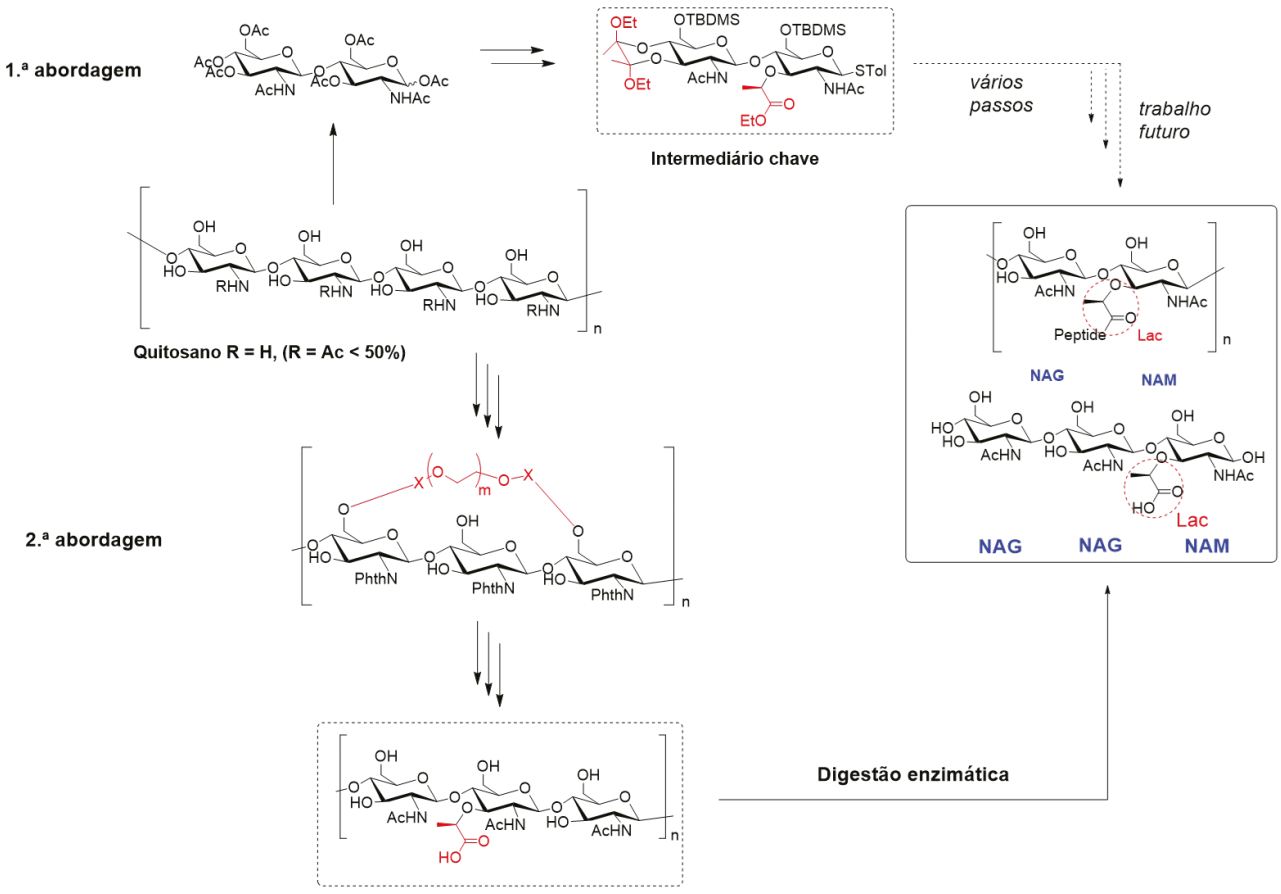


Figura 7 - Esquema resumo das estratégias sintéticas seguidas ao longo do trabalho.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelas operações LISBOA-05-3559-FSE-000007 e CENTRO--04-3559-FSE-000094, cofinanciado pelos programas Lisboa 2020, Centro 2020, Portugal 2020, União Europeia, através do Fundo Social Europeu, bem como pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) e Agência Nacional de Inovação (ANI).

Referências

[1] S. R. Filipe, A.Tomasz, P. Ligoxygakis, *EMBO Reports* **2005**, *6*, 327-333. DOI: 10.1038/sj.embor.7400371.

[2] a) F. Queda, G. Covas, S. R. Filipe, M. M. B. Marques, *Pharmaceuticals (Basel)* **2020**, *13*, 392. DOI: 10.3390/ph13110392. b) S. Inamura, K. Fukase, S. Kusumoto, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7613-7616. DOI: 10.1016/s0040-4039(01)01619-7. c) Y. Zhang, E. J. Fechter, T. S. A. Wang, D. Barrett, S. Walker, D. E. Kahne, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3080-3081. DOI: 10.1021/ja069060g. d) S. O. Meroueh, K. Z. Bencze, D. Hesek, M. Lee, J. F. Fisher, T. L. Stemmler, S. Mobashery, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 4404-4409. DOI: 10.1073/pnas.0510182103.

[3] R. Enugala, L. C. R. Carvalho, M. J. D. Pires, M. M. B. Marques, *Chem. Asian J.* **2012**, *7*, 2482-2501. DOI: 10.1002/asia.201200338.

[4] L. C. R. Carvalho, F. Queda, C. V. Almeida, S. R. Filipe, M. M. B. Marques, *Asian J. Org. Chem.* **2018**, *7*, 2544-2551. DOI: 10.1002/ajoc.201800592.

[5] L. C. R. Carvalho, F. Queda, C. V. A. Santos, M. M. B. Marques, *Chem. Asian J.* **2016,** *11*, 3468-3481. DOI: 10.1002/asia.201601041.

[6] F. Queda, G. Covas, T. Silva, C. A. Santos, M. R. Bronze, F. J. Canada, M. C. Corvo, S. R. Filipe, M. M. B. Marques, *Carbohydr. Polym.* **2019**, *224*, 115133. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.115133.

>

***Fausto Queda**

CoLab AlmaScience.

Fausto Queda é Investigador Sénior no *CoLab AlmaScience* no campo da química/bioquímica. Em 2012 obteve o grau de Licenciado em Bioquímica pela Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. Em 2015 obteve o grau de Mestre em Química Bioorgânica pela mesma instituição. Em 2019 concluiu o doutoramento em Química Sustentável, cuja tese teve como título "Quitina e quitosano: substratos para síntese química de peptidoglicano". A sua tese de doutoramento foi distinguida como "A melhor tese de doutoramento em química orgânica – 2022" pela Sociedade Portuguesa da Química. Depois do seu doutoramento foi investigador na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, onde trabalhou com o Prof. Carlos Afonso em novos métodos para dissolução de biopolímeros e sua utilização em reações sob condições de fluxo. Os seus interesses de investigação estão sempre na interface entre a química sustentável, a química orgânica e a química dos materiais.

fausto.queda@almascience.pt

ORCID.org/0000-0002-6276-8504

>

Maria Manuel Marques

NOVA School of Science and Technology.

Maria Manuel Marques é professora auxiliar com agregação no Departamento de Química da *NOVA School of Science and Technology* tendo obtido o grau de Doutor em química orgânica, em 2001, na Universidade Nova de Lisboa. Em 2001 iniciou o seu pós-doutoramento no grupo do Prof. Johan Mulzer no *Institute of Organic Chemistry* na Universidade de Viena. Em 2003, regressou à Faculdade de Ciências e Tecnologia como investigadora do REQUIMTE. No período 2004-2018 foi professora auxiliar convidada do departamento de química (FCT-NOVA) e esteve envolvida com o ensino de química orgânica em diferentes ciclos de estudos. Em 2016 obteve a Agregação em Química. Desde 2018 que é professora auxiliar no Departamento de Química. Maria Manuel Marques orientou diversos estudantes de mestrado e doutoramento, bem como investigadores de pós-doutoramento. Os seus interesses de investigação estão focados no desenvolvimento de novas vias sintéticas e sustentáveis envolvendo reações catalisadas por metais, em particular para a síntese de compostos heterocíclicos bioativos, e desenvolvimento de novas estratégias sintéticas para preparação de glicopéptidos para o entendimento de sistemas biológicos.

msbm@fct.unl.pt

ORCID.org/0000-0002-6712-752X

>

Sérgio R. Filipe

NOVA School of Science and Technology.

Sérgio Raposo Filipe é professor auxiliar no Departamento de Ciências da Vida da *NOVA School of Science and Technology* desde 2015. Em 2001, obteve o grau de doutor em Biologia pelo Instituto de Tecnologia Química e Biológica da Universidade Nova de Lisboa, sob orientação do Prof. Alexander Tomasz e da Prof.ª Hermínia de Lencastre, tendo nesse ano iniciado o seu pós-doutoramento no grupo do Prof. David Sherratt no Departamento de Bioquímica da Universidade de Oxford. Em 2004, regressou ao Instituto de Tecnologia Química e Biológica, como *Group Leader* no Laboratório Associado de Oeiras, onde se manteve até 2015. Nesse ano, passou a integrar a unidade de investigação UCIBIO e o Departamento de Ciências da Vida da *NOVA School of Science and Technology* onde é responsável pelas unidades curriculares de biologia molecular, e outras com ela relacionadas, em diferentes ciclos de estudos. A sua investigação tem-se centrado no estudo dos mecanismos usados pelos organismos bacterianos para a síntese da sua parede celular e nas estratégias usadas por estes microrganismos para a prevenção do reconhecimento da sua parede por recetores de um sistema imunitário.

sfilipe@fct.unl.pt

ORCID.org/0000-0002-4485-832X