
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Planejamento, síntese e avaliação biológica de compostos fenólicos.

DANIELE FERNANDA MARIN

PORTO ALEGRE, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Planejamento, síntese e avaliação biológica de compostos fenólicos.

Dissertação apresentada por
Daniele Fernanda Marin
para a obtenção do GRAU DE MESTRE
em Ciências Farmacêuticas.

Orientador(a): Profa. Dra. Grace Gosmann

Porto Alegre, 2015

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 27 de março de 2015, pela Banca Examinadora constituída por:

Profª Drª Aline Rigon Zimmer
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Profº Dr. Claiton Leoneti Lencina
Universidade Federal de Pelotas.

Profª Drª. Tiana Tasca
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

CIP - Catalogação na Publicação

Marin, Daniele Fernanda
Planejamento, síntese e avaliação biológica de
compostos fenólicos. / Daniele Fernanda Marin. --
2015.
133 f.

Orientadora: Grace Gosmann.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2015.

1. biofilme . 2. infecção. 3. citotoxicidade. 4.
síntese orgânica. I. Gosmann, Grace, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

*Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fitoquímica e Síntese
Orgânica-LAFIS
da Faculdade de Farmácia da UFRGS, na cidade de Porto Alegre.
Agradeço à CAPES, órgão que financiou a bolsa de estudos
para o desenvolvimento deste trabalho,
ao Grupo de Biofilmes e Diversidade Microbiana da UFRGS coordenado pelo
Profº Dr. Alexandre Macedo, em especial à pós-doutoranda Danielle Trentini,
À pós-doutoranda Cristiane Bernardes de Oliveira e à bolsista de iniciação científica
Fernanda Brum pela avaliação citotóxica,
Ao bolsista de iniciação científica Ivan Alejandro por toda ajuda e
disponibilidade,
à Central de RMN/ UFRGS
e à Central de Espectrometria de Massas / UFRGS,
os quais disponibilizaram materiais e metodologias necessárias, para a
realização dos experimentos para a elaboração desta dissertação.
Enfim, agradeço de coração aos meus colegas e professores do LAFIS pela colaboração
e companheirismo.*



Resumo

Infecções causadas por micro-organismos resistentes à antibioticoterapia representam um dos grandes desafios da saúde pública, acarretando em altas taxas de mortalidade, aumento no tempo de internação e gastos do sistema de saúde. Adesão e colonização são pré-requisitos para o estabelecimento de biofilme que resulta em maior resistência bacteriana. Assim a maioria das infecções associadas a biofilmes são de difícil erradicação e tratamento. O desafio é encontrar novos agentes antibacterianos com mecanismos inovadores de ação, incluindo compostos antiaderentes. A delphinidina é um polifenol, pertencente à classe dos taninos condensados (procianidinas) que apresenta importante atividade contra a formação de biofilme bacteriano. Diante deste cenário esta dissertação propôs a obtenção de derivados fenólicos através de síntese orgânica, com o objetivo de avaliar estes compostos frente à formação de biofilme, ao crescimento bacteriano, a erradicação do biofilme já formado e também avaliar a citotoxicidade destes compostos. Os estudos de relação estrutura-atividade com catequinas visando atividade antibiofilme são bem restritos. Tais estudos são essenciais para otimizar as atividades avaliadas. Segundo nossos resultados o composto AP1 foi o que apresentou melhores resultados, na dose de 500 μM , frente à inibição da formação do biofilme e à inibição do crescimento bacteriano apresentando $\text{IC}_{50} > 500 \mu\text{M}$. No ensaio preliminar da avaliação de citotoxicidade, os compostos AP1, AIV1 e AIB1 apresentaram IC_{50} superiores a 500 μM frente a células mononucleares humanas, não apresentando citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas. Os compostos AP1, AIV1 e AC1 apresentaram atividade significativa quando comparada ao controle na inibição da formação do biofilme nas diferentes cepas testadas, no entanto, esses compostos não apresentaram atividade promissora frente à erradicação de um biofilme já estabelecido.

Palavras-Chave: biofilme, epicatequina, citotoxicidade, infecção, síntese.

Design, synthesis and biological evaluation of phenolic compounds

Abstract

Infections caused by microorganisms resistant to antibiotics represent a major public health challenge, resulting in high mortality rates, increased length of stay and costs of the health system. Adhesion and colonization are prerequisites for the establishment of biofilm that results in increased bacterial resistance. So most of the infections associated with biofilms are difficult to eradicate and treatment. The challenge is to find new antibacterial agents with innovative mechanisms of action, including adhesion compounds. The delphinidin is a polyphenol, belonging to the class of tannins (procyanidins), which has activity against important bacterial biofilm formation. In this context, this dissertation proposed obtaining phenol derivatives through organic synthesis, in order to evaluate these compounds against the formation of biofilm, the bacterial growth, eradication of biofilm already formed and assess the cytotoxicity of these compounds. Studies of structure-activity relationship with catechins aiming antibiofilm activity are very few. Such studies are essential to optimize the activities evaluated. According to our results compound AP1 showed the best results at a dose of 500 μ M, compared to inhibition of biofilm formation and bacterial growth inhibition IC_{50} presenting $> 500 \mu$ M. In the preliminary test evaluation of cytotoxicity, AP1, AIV1 and AIB1 compounds showed IC_{50} greater than 500 μ M against human mononuclear cells, showing no cytotoxicity in any of the tested concentrations. AP1, AIV1 and AC1 compounds showed significant activity when compared to the control in the inhibition of biofilm formation in different strains tested, however, these compounds did not show promising activity against the eradication of a biofilm already established.

Keywords: biofilm, epicatechin, cytotoxicity, infection, synthesis.

Lista de Figuras e Esquemas

Figura 1: Estrutura da delfinidina	21
Figura 2: Estrutura da (-)-epicatequina e da (-)-epigallocatequina	21
Figura 3: Passos sequenciais de formação e desenvolvimento de biofilme em uma superfície	26
Figura 4: Principais alvos para combate aos biofilmes microbianos.....	31
Figura 5: Estrutura da (+)-catequina e (-)- epicatequina	34
Figura 6: Proantocianidina 4→8.	35
Figura 7: Compostos fenólicos testados frente ao crescimento de células planctônicas e formação de biofilme de <i>P. aeruginosa</i>	36
Figura 8: Ácido tânico.	37
Figura 9: Estrutura das catequinas avaliadas	39

CAPÍTULO I

Esquema 1: Rota de síntese proposta para obtenção de derivados da delfinidina.	42
Esquema 2: Rota de síntese proposta para obtenção de derivados acilados.	43
Esquema 3: Rota sintética para a formação de proantocianidina oligômeros.	47
Esquema 4: Planejamento da síntese de procianidinas conforme literatura.....	49
Esquema 5: Síntese de derivados acilados da epicatequina.....	65
Esquema 6: Mecanismo de reação de acilação	66
Esquema 7: Acetilação dos grupamentos hidroxila..	87
Esquema 8: Adição de Br ⁻ no C8.....	88
Esquema 9: Mecanismo de substituição eletrofílica de bromo no C8 da epicatequina.	89
Esquema 10: Adição do grupamento de saída	91
Esquema 11: Mecanismo de oxidação do C4 da epicatequina e adição do grupamento de saída.	92

Esquema 12: Reação para formação do dímero	96
Esquema 13: Mecanismo de formação da ligação C4-C8	97
Tabela 1: Tentativas reacionais para promover a ligação 4 → 8.	99
Tabela 2: Derivados sintetizados:	99
Figura 1: Grupos protetores usados na literatura para a (-)-epicatequina.	46
Figura 2: MA01.	51
Figura 3: AP1.....	52
Figura 4: AIV1.....	53
Figura 5: AB1.....	54
Figura 6: AIB1.....	56
Figura 7: AC1.....	57
Figura 8: MABr1.....	59
Figura 9: MABrGS.....	60
Figura 10: Di01.	61
Figura 11: Figura: Espectro de infravermelho do composto MA01.	68
Figura 12: Espectro de RMN de ¹ H do composto MA01	68
Figura 13: Espectro de APT do composto MA01.....	69
Figura 14: Espectro de gHSQC do composto MA01	69
Figura 15: Espectro de infravermelho do composto AP1.....	71
Figura 16: Espectro de RMN de ¹ H do composto AP1	72
Figura 17: Espectro de APT do composto AP1	72
Figura 18: Espectro de gHSQC do composto AP1	73
Figura 19: Espectro de infravermelho do composto AIV1.....	75
Figura 20: Espectro de RMN de ¹ H do composto AIV1	75

Figura 21: Espectro de APT do composto AIV1	76
Figura 22: Espectro de hsqCAD do composto AIV1	76
Figura 23: Espectro de infravermelho do composto AB1.....	78
Figura 24: Espectro de RMN de ¹ H do composto AB1	78
Figura 25: Espectro de APT do composto AB1	79
Figura 26: Espectro de HSQC do composto AB1.....	79
Figura 27: Espectro de infravermelho do composto AIB1.....	81
Figura 28: Espectro de RMN de ¹ H do composto AIB1.....	81
Figura 29: Espectro de APT do composto AIB1	82
Figura 30: Espectro de gHSQC do composto AIB1.....	82
Figura 31: Espectro de infravermelho do composto AC1.....	84
Figura 32: Espectro de RMN de ¹ H do composto AC1.....	85
Figura 33: Espectro de APT do composto AC1	85
Figura 34: Espectro de gHSQC do composto AC1.....	86
Figura 35: Espectro de RMN de ¹ H do composto MABr1	90
Figura 36: Espectro de APT do composto MABr1	90
Figura 37: Espectro de RMN de ¹ H do composto MABrGS.....	94
Figura 38: Espectro de ¹³ C do composto MABrGS.....	95

CAPÍTULO II

Figura 1: Avaliação do percentual de formação do biofilme e do crescimento bacteriano de <i>K. pneumoniae</i>	110
Figura 2: Avaliação do percentual de biofilme remanescente de <i>K. pneumoniae</i> após tratamento com os compostos.....	111
Figura 3: Avaliação do percentual de formação do biofilme e do crescimento bacteriano de <i>P. aeruginosa</i>	112
Figura 4: Avaliação do percentual de biofilme remanescente de <i>P. aeruginosa</i> após tratamento com os compostos.....	112

Figura 5: Avaliação do percentual de formação do biofilme e do crescimento bacteriano de <i>S. aureus</i>	113
Figura 6: Avaliação do percentual de biofilme remanescente de <i>S. aureus</i> após tratamento com os compostos.....	114
Figura 7: Avaliação do percentual de formação do biofilme e do crescimento bacteriano de <i>S. epidermidis</i>	115
Figura 8: Avaliação do percentual de biofilme remanescente de <i>S. epidermidis</i> após tratamento com os compostos.....	116
Figura 9: Avaliação da citotoxicidade em células mononucleares humanas frente aos compostos.	120

Lista de Abreviaturas

BHI- caldo de infusão cérebro coração

CCD- cromatografia em camada delgada

DDQ- 2,3-Dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona

DMAP- 4-*N*, *N'*-dimetilaminopiridina

DMF- dimetilformamida

DMSO- Dimetilsulfóxido

EPS- substâncias poliméricas extracelulares

ECGC- epigallocatequina-3-galato

EGC- epigallocatequina

ECG- epicatequina-3-galato

IC₅₀- Concentração inibitória de 50 %

NBS- N, bromo succinamida

SFB- soro fetal bovino

TMS- Tetrametilsilano

TMSOTf- trimetil trifluorometanosulfonato

TSB- caldo de triptona de soja

UFC- Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVO GERAL:	23
2.1. Objetivos Específicos:.....	23
3. REFERENCIAL TEÓRICO	25
3.1. Biofilme	25
3.1.1. Importância clínica e impacto econômico das infecções associadas a biofilmes.....	26
3.1.2. Bactérias de importância médica formadoras de biofilme	29
3.1.3. Estratégias para abordagem terapêutica:	30
3.2. Polifenóis.....	31
3.2.1. Catequinas.....	33
3.2.2. Atividades biológicas relacionadas:.....	35
4. CAPÍTULO I: PLANEJAMENTO E SÍNTESE DOS DERIVADOS DA EPICATEQUINA	41
4.1. Introdução	41
4.2. Estratégias para o planejamento racional:.....	41
4.3. Revisão da literatura.....	44
4.3.1. Série de derivados acilados:	44
4.3.2. Síntese da série de derivados da delfinidina:	44
4.4. Parte experimental:.....	50
4.4.1. Equipamentos e reagentes:	50
4.4.2. Síntese dos derivados acilados:.....	51
4.4.3. Síntese de derivados da delfinidina.....	59
4.5. Resultados e Discussão	63
4.6. Conclusões.....	101

5. CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS ACILADOS FRENTE AO BIOFILME E TOXICIDADE CELULAR	103
5.1. Introdução	103
5.2. Metodologia.....	104
5.2.1. Avaliação da atividade dos compostos acilados frente ao biofilme, ao crescimento microbiano e a erradicação do biofilme:.....	104
5.2.2. Ensaio de Citotoxicidade:.....	107
5.3. Resultados e Discussões	109
5.4. Conclusão	121
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	122
7. REFERÊNCIAS	124
8. ANEXO:	132
8.1.Parecer do comitê de ética:	132

1. INTRODUÇÃO

Infecções, causadas por agentes etiológicos amplamente resistentes aos antimicrobianos, representam um dos grandes desafios atuais da saúde pública, acarretando em altas taxas de mortalidade, aumento no tempo de internação e gastos do sistema de saúde (NEIDELL, et al., 2012).

De acordo com o órgão norte-americano “National Institutes of Health”, aproximadamente 80% de todas as infecções hospitalares no mundo estão associadas a biofilmes (NIH, 2002), incluindo endocardites, otites, prostatites, periodontites, conjuntivites, vaginites, infecções relacionadas à fibrose cística, especialmente, envolvendo biomateriais tais como cateteres venosos, arteriais e urinários, dispositivos intrauterinos, lentes de contato e próteses (DONLAN & COSTERTON, 2002; HOIBY, 2011; TRENTIN, et al., 2013).

Adesão e colonização são pré-requisitos para o estabelecimento de infecção bacteriana e patogênese. Uma vez que a adesão tenha ocorrido, em dispositivos médicos implantados ou tecido danificado, micro-organismos podem sofrer alterações moleculares específicas para tornarem-se patogênicos e estabelecer biofilmes (COSTERTON, et al., 1999).

É bem conhecido que a formação de biofilme envolve a adesão e acumulação de células microbianas, dentro de uma matriz extracelular (DONLAN & COSTERTON, 2002). O biofilme conseqüentemente resulta em maior resistência bacteriana, o que faz a maioria das infecções associadas aos biofilmes de difícil erradicação e assim contribuem para a cronicidade da doença (DAVIES, 2003; PARSEK, 2003). O desafio e a dificuldade em encontrar novos agentes antibacterianos com mecanismos inovadores de ação, incluindo compostos antiaderentes, conduzem a busca por novos medicamentos.

A capacidade das bactérias em formar biofilmes provoca uma grande dificuldade na terapia antimicrobiana, pois as células bacterianas em biofilmes são extremamente resistentes ao tratamento com antibióticos como também a resposta imunológica do hospedeiro se torna deficiente. Biofilmes de bactérias patogênicas sobre polímeros usados como dispositivos médicos, por exemplo,

cateteres, lentes, próteses, implantes podem causar sérias infecções crônicas hospitalares. Muitas pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de desenvolver dispositivos com superfícies que possuam substâncias que atuem como agentes inibidores da formação de biofilme (PLYUTA, 2013). Neste contexto, os taninos têm atraído atenção devido às suas propriedades biológicas e fisiológicas já relatadas em literatura científica (CHUNG, 2008).

Os taninos são misturas complexas de oligômeros largamente distribuídos nas plantas e que são gerados por polimerização de unidades de flavan-3-ol (taninos condensados) ou por esterificação de vários resíduos de ácido gálico com um núcleo de hidrato de carbono, principalmente, glicose (taninos hidrolisáveis) (SCHOFIELD, 2001; MUELLER-HARVEY, 2001; TRENTIN, 2013). Estes estudos, no entanto, são muitas vezes prejudicados pela dificuldade de isolar os compostos naturais na forma pura, com estrutura definida e em quantidades suficientes para avaliação biológica. A dificuldade na obtenção de amostras puras destes materiais, juntamente com as suas atividades biológicas promissoras, leva ao desafio e entende-se como uma necessidade a síntese orgânica para fornecimento de amostras puras, com estrutura definida e quantidade suficiente para testes biológicos (DENNIS, 2012; OHMORI, et al., 2004; SAITO, 2004).

A delfinidina **(1)** (Figura 1) é um polifenol, pertencente à classe dos taninos condensados (proantocianidinas) que apresentou importante atividade contra a formação de biofilme bacteriano em trabalho do grupo de pesquisa Grupo de Biofilmes e Diversidade Microbiana da UFRGS, coordenado pelo Prof^o Alexandre Macedo (TRENTIN, et al., 2013). Por isso, foi proposta uma rota sintética para se obter amostras de proantocianidinas puras, com quantidade suficiente para avaliação biológica.

Nesta rota de síntese utilizamos a epicatequina **(2)** (Figura 2) como reagente de partida por ter estrutura semelhante ao monômero da delfinidina, a epigalocatequina **(3)** (Figura 2), e ser de mais baixo custo. Como também realizamos outras reações com o mesmo reagente de partida epicatequina, formando derivados acilados, em busca de novos compostos ativos.

Diante deste cenário de novas perspectivas, este projeto propôs a obtenção de derivados fenólicos através de síntese orgânica, com o objetivo de avaliar estes compostos frente à formação e erradicação de biofilmes, o crescimento bacteriano e também avaliar a toxicidade celular destes compostos.

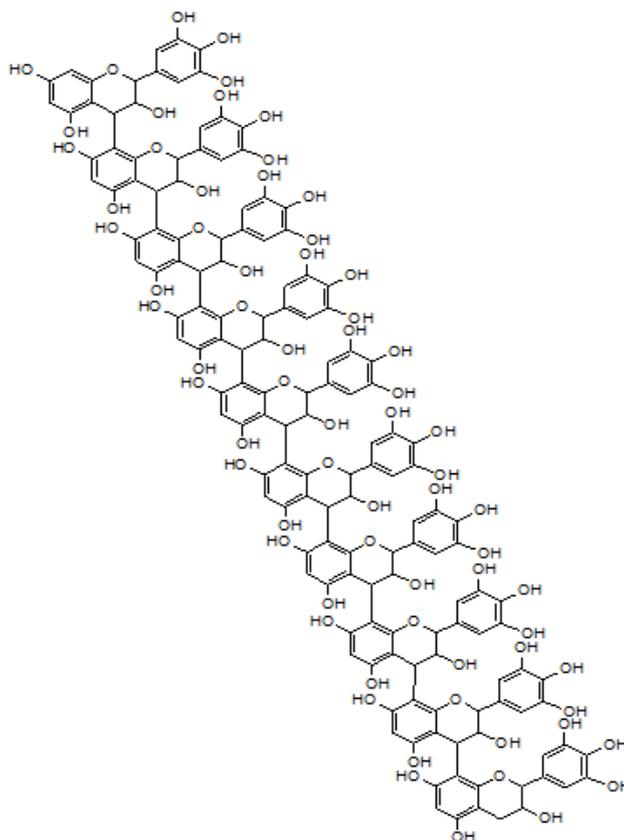


Figura 1: Estrutura da delphinidina (1).

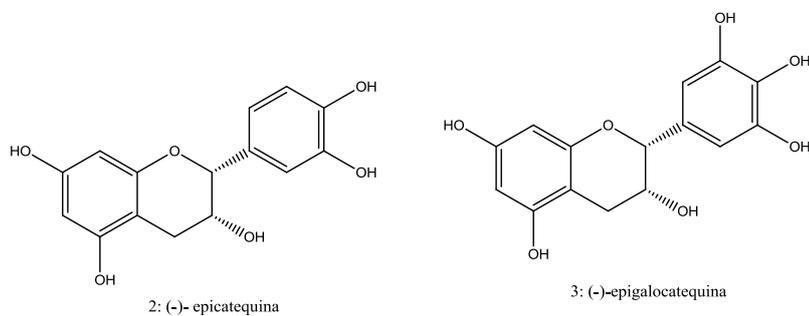


Figura 2: Estrutura da (-)-epicatequina (2) e da (-)-epigallocatequina (3).



2. OBJETIVO GERAL:

O presente trabalho propôs o planejamento e desenvolvimento de uma rota de síntese de compostos fenólicos derivados da delphinidina como também a síntese de outros derivados sintéticos e a avaliação desta série na formação de biofilme em superfícies, no crescimento bacteriano, na erradicação do biofilme previamente formado e na análise citotóxica dos compostos obtidos.

2.1. Objetivos Específicos:

- Desenvolver um protocolo de síntese para derivados de delphinidina, a partir da epicatequina;
- Realizar a síntese de derivados acilados da epicatequina;
- Avaliar a atividade antibacteriana dos derivados obtidos;
- Avaliar os produtos sintetizados frente à formação e erradicação do biofilme;
- Realizar ensaios de citotoxicidade *in vitro*.



3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Biofilme

Os biofilmes microbianos são comunidades de células aderidas de maneira irreversível a uma superfície biótica ou abiótica e entre si e embebidas por uma matriz de substâncias extracelulares poliméricas, produzidas pelos próprios micro-organismos, que funciona como uma barreira a fim de aumentar a sua chance de sobrevivência em um determinado meio, dificultando a penetração de agentes germicidas e antimicrobianos e dificultando o acesso do sistema imune do hospedeiro (COSTERTON, et al., 2002).

As bactérias existem em dois estados de vida básicos: como células planctônicas, também conhecidas como células de vida livre ou como células sésseis, também conhecidas como biofilmes. As células planctônicas são importantes para a rápida proliferação e propagação dos micro-organismos para novos territórios, enquanto que as células sésseis caracterizam a cronicidade (TRENTIN, et al., 2013).

A formação e o desenvolvimento de biofilme envolvem passos sequenciais (Figura 3), primeiramente as bactérias aderem a um substrato (biótico ou abiótico). A ligação pode ser fraca ou reversível, podendo as células bacterianas desligarem-se do substrato (Fig.3A). Entretanto quando ligadas firmemente ao substrato, uma ligação irreversível se forma (Fig.3B), posteriormente as bactérias iniciam uma sinalização celular, denominada *quorum sensing* (Fig. 3C), este sistema controla o crescimento, replicação e secreção de vários fatores de virulência e secreção de polissacarídeos extracelulares, os quais podem levar à formação e ao desenvolvimento de uma matriz do biofilme maduro (Fig.3D). Então células individuais ou fragmentos de biofilme podem se desprender da superfície, podendo assim colonizar e estabelecer um novo biofilme em outra superfície (Fig.3E) (BRYERS, 2008; ZIMMER, 2012).

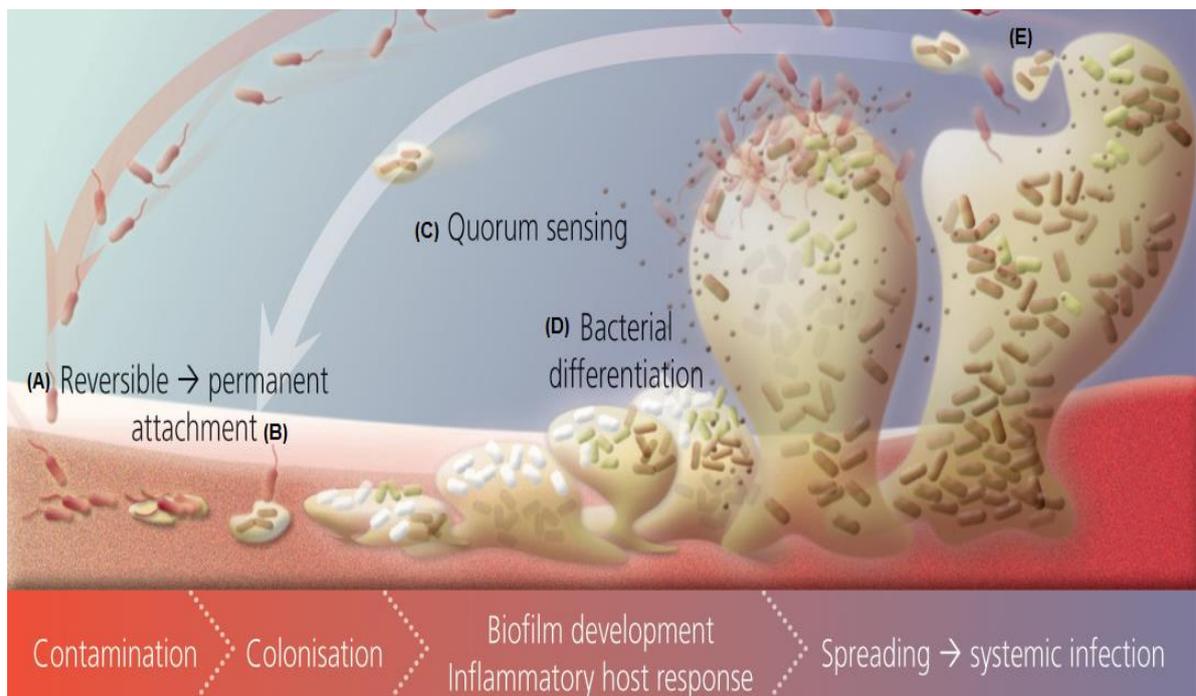


Figura 3: Passos sequenciais de formação e desenvolvimento de biofilme em uma superfície. **(A)** Adesão reversível das células bacterianas a uma superfície. **(B)** Adesão irreversível à superfície. **(C)** Comunicação bacteriana (quorum sensing). **(D)** Desenvolvimento e estruturação do biofilme com produção de componentes da matriz do biofilme. **(E)** Dispersão de células bacterianas individuais ou agregados de células (ZIMMER, 2012). Adaptado de <http://woundsinternational.wordpress.com>.

3.1.1. Importância clínica e impacto econômico das infecções associadas a biofilmes:

Na década de 90, a importância dos biofilmes bacterianos foi destacada por Costerton, Stewart e Greenberg, os quais salientaram que a formação de biofilmes e a sua inerente resistência aos antimicrobianos constituem a causa de muitas infecções crônicas e persistentes (COSTERTON, et al., 2002).

Infecções causadas por biofilmes em dispositivos médicos foram observadas pela primeira vez no início de 1980, quando estudos de microscopia eletrônica revelaram depósito de bactérias sobre a superfície de

dispositivos de longa permanência, como cateteres intravenosos e cardíacos (STONDLEY, 2004).

Determinados tipos de materiais predispõem a adesão dos micro-organismos e conseqüente formação de biofilmes, como certos polímeros. Por outro lado, acredita-se que superfícies impregnadas com antimicrobianos poderiam produzir uma interação desfavorável à deposição celular.

É difícil a erradicação de bactérias em biofilme, pois estas apresentam resistência principalmente devido à penetração insuficiente de antimicrobianos e à dificuldade de reação imunológica do hospedeiro, velocidade de crescimento e alteração do estágio metabólico, o que garante a sobrevivência de tais células em ambientes hostis (ZANIN, 2006)

Vários fatores são sugeridos para explicar a resistência das bactérias do biofilme a antibiótico (DAVIES, 2003; ZIMMER, 2012):

- A matriz EPS (substâncias poliméricas extracelulares) do biofilme reduz a capacidade de penetração de antimicrobianos em todas as áreas do biofilme. Atuando como uma barreira física, reduzindo a difusão de agente antimicrobiano disponível para reagir com as células do biofilme.
- Taxas metabólicas e de crescimento reduzidas, como apresentam as bactérias presentes na parte mais profunda do biofilme, tornando-as menos sensíveis aos antimicrobianos. As bactérias em biofilmes constituem populações heterogêneas com variada taxa de crescimento e variada suscetibilidade aos antimicrobianos (STEWART & FRANKLIN, 2008). A tolerância aos antimicrobianos pode resultar da inibição da morte celular natural em uma população de células bacterianas, conhecidas como células dormentes ou persistentes (“persisters”). Essa população apresenta reduzida taxa metabólica e comumente encontra-se na base da estrutura dos biofilmes, onde há limitada oferta de oxigênio. O baixo metabolismo dessas células persistentes garante a sua resistência ao tratamento com antimicrobianos, visto que os antimicrobianos geralmente agem na fase de crescimento bacteriano, como síntese protéica, síntese de ácidos nucléicos e de parede celular. Dessa forma, o tratamento pode conduzir à erradicação da maior parte da população do biofilme, mas a fração de células persistentes não é atingida e atua, por-

tanto, como um núcleo para reinfecção, após a descontinuação terapêutica (STEWART, 2002; LEWIS, 2012).

- As bactérias do biofilme expressam fatores de proteção específicos, como bombas de efluxo multidrogas.

- O próprio tratamento com antibióticos pode induzir a expressão de fatores de resistência bacterianos. A transferência de genes de resistência é facilitada em biofilmes devido à proximidade das células bacterianas. Dessa forma, a vida em comunidade facilita a transferência horizontal de genes, através de plasmídeos, os quais podem codificar resistência para múltiplos agentes antimicrobianos (MADSEN, 2012);

- Falha no reconhecimento dos biofilmes pela defesa imunológica humana: Devido ao EPS, o sistema imune encontra dificuldade para reconhecer os biofilmes. Dessa forma, as células do interior do biofilme estão protegidas contra a ação de anticorpos, radicais livres e outros compostos reativos produzidos pelos fagócitos que são recrutados para o combate de infecções (BRYERS, 2008; TRENTIN, et al., 2013).

Devido a estes fatores, bactérias que vivem nessas comunidades são frequentemente de 10 a 1000 vezes mais tolerantes aos antimicrobianos do que quando na forma planctônica (DAVIES, 2003), indicando que alguns dos mecanismos envolvidos na resistência dos biofilmes aos antimicrobianos diferem dos mecanismos responsáveis pela resistência de bactérias planctônicas aos mesmos agentes (STEWART, 2002). Dessa maneira, microorganismos que apresentam suscetibilidade a determinados antimicrobianos em testes laboratoriais convencionais são altamente resistentes aos mesmos, quando na forma de biofilmes e, como consequência, doenças envolvendo biofilmes são geralmente crônicas e difíceis de tratar (TRENTIN, et al., 2013).

3.1.2. Bactérias de importância médica formadoras de biofilme:

Os patógenos formadores de biofilme mais comumente encontrados em infecções humanas, relacionadas a dispositivos médicos são: *Staphylococcus* spp. – o principal causador de infecções, associadas a implantes biomédicos (UÇKAY, 2009; ANTUNES, 2011); *Pseudomonas aeruginosa* – micro-organismo formador de biofilme, capaz de causar infecções crônicas progressivas em pacientes com fibrose cística (LYCZAK, et al., 2002; KERR & SNELLING, 2009); e enterobactérias, como *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; *Serratia marcescens* e *Enterobacter cloacae* – as quais demonstram grande potencial de epidemia, devido à alta resistência aos antimicrobianos, incluindo carbapenêmicos (NORDMANN & CORNAGLIA, 2012).

A formação de biofilmes está frequentemente associada às infecções que envolvem o uso de dispositivos biomédicos implantáveis e sabe-se que 60-70% das infecções hospitalares estão associadas ao uso desses dispositivos. As infecções hospitalares são a quarta causa de morte nos Estados Unidos, sendo responsáveis por 2-4 milhões de casos anualmente, elevando em mais de US\$ 5 bilhões o custo médico adicional por ano (WENZEL, 2007). Considerando o Brasil, de acordo com o estudo do programa “SCOPE Surveillance and control of pathogens of epidemiological importance”, a taxa de mortalidade associada às infecções nosocomiais sanguíneas, de 2007 a 2010, atingiu 40% (MARRA, 2011); de maneira semelhante, no Rio Grande do Sul, a taxa de mortalidade associada a infecções em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) foi de 45% em 2003 (LISBOA, 2007; TRENTIN, et al., 2013).

Dentre as infecções causadas pela formação de biofilme há alto índice de endocardites, otites, prostatites, fibrose cística, cáries, infecções em implantes artificiais permanentes ou temporários, infecções decorrentes do uso de lentes de contato (MARRIE, et al., 1982).

Independentemente da sofisticação do implante, todos os dispositivos biomédicos estão suscetíveis ao risco de colonização microbiana e infecção

(TRETER & MACEDO, 2011; BUSSCHER, 2012), devido, principalmente, ao déficit imunológico no local da interface implante-hospedeiro (ROCHFORD, et al., 2012).

A dificuldade de tratamento, devido à resistência bacteriana em infecções associadas a biofilmes, possui consequências diretas (maior tempo de internação, custo de antibioticoterapia e medicamentos complementares, custos com médicos e procedimentos diagnósticos) e indiretas (absenteísmo e desemprego) no desfecho clínico e na qualidade de vida do paciente. Estima-se que o gasto relacionado com o tratamento dessas infecções seja maior do que o gasto envolvido com a retirada ou a troca do dispositivo biomédico e, frequentemente, o principal manejo nas infecções em dispositivos é a sua remoção. No entanto, esse procedimento pode estar associado com o aumento de morbidade e mortalidade, prolongando a hospitalização e elevando os custos para o sistema de saúde (TRENTIN, et al., 2013).

3.1.3. Estratégias para abordagem terapêutica:

Os métodos convencionais de tratamento antimicrobiano não surtem efeito desejável contra as infecções causadas pela formação de biofilme e requerem muitas vezes o uso de doses elevadas, de tratamento prolongado de antibióticos podendo causar resistência aos mesmos, além disso, os microorganismos em biofilmes são mais resistentes ao sistema imune do hospedeiro e aos agentes antimicrobianos (STEWART, 2002). As estratégias para o combate de biofilmes podem ser divididas em duas: a inibição da formação de biofilmes ou tratamento de biofilmes já formados (Figura 4) (TRENTIN, et al., 2013).

Tais características têm desencadeado grande interesse pela síntese de moléculas usadas como estratégia para controlar a formação do biofilme, os agentes de virulência, o crescimento bacteriano, e conseqüentemente a adesão de microrganismos à superfície.

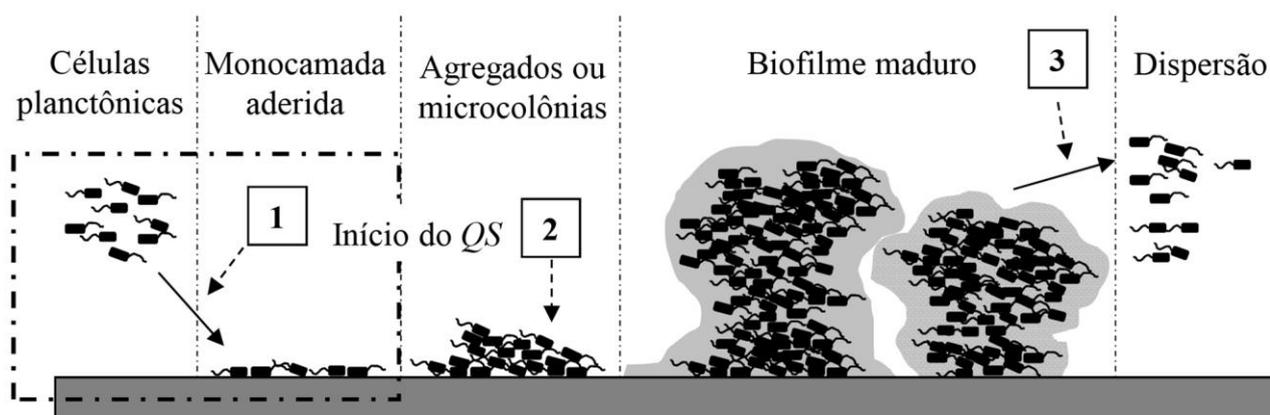


Figura 4: Principais alvos para combate aos biofilmes microbianos: a inibição da formação de biofilmes via bloqueio da adesão bacteriana à superfície (**etapa 1**) ou o rompimento da comunicação celular bacteriana - *Quorum sensing* (**etapa 2**) e erradicação ou tratamento de biofilmes já formados (**etapa 3**). Fonte: Adaptado de Macedo e Abraham (MACEDO & ABRAHAM, 2009; TRENTIN, et al., 2013).

3.2. Polifenóis:

Compostos fenólicos de plantas são conhecidos por apresentar uma atividade antimicrobiana e de proteger as plantas de bactérias fitopatogênicas. Eles são utilizados também como anti-inflamatórios, potentes antioxidantes, colerético e na síntese de fármacos antitumorais (QUIDEAU, 2011; OKAMOTO, 2014; OIZUMI, 2012).

Os compostos fenólicos sabidamente são responsáveis por inibir o crescimento de uma gama de micro-organismos. Estes são os principais compostos responsáveis por interferir no crescimento de micro-organismos estando presentes no chá verde, café, cacau, vinho tinto e nas plantas medicinais. Apesar de numerosas investigações dos seus efeitos, alguns aspectos da influência de compostos fenólicos em micro-organismos são ainda pouco estudados (PLYUTA, 2013).

A capacidade das bactérias para formar biofilmes é considerada como um dos fatores importantes para a patogenicidade das bactérias podendo levar ao desenvolvimento de infecções crônicas bacterianas. Já há estudos que

demonstram que alguns compostos fenólicos exercem um efeito anti-aderência, diminuindo assim a formação de biofilme. Em estudo realizado por Huber, 2003, o ácido tânico, ácido elágico e epigallocatequina galato (EGCG) foram avaliados frente a sua capacidade de interferir no crescimento e formação de biofilme de *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Burkholderia cepacia*. Estes compostos demonstraram ter efeito concentração dependente, pois em concentrações mais elevadas a inibição do crescimento é observada, já em concentrações mais baixas ocorre bloqueio de sinalização bacteriana ou *Quorum sensing* e, portanto, a prevenção da colonização e formação do biofilme em superfícies é evitada. O ácido tânico inibiu o crescimento de *E. coli* em concentrações superiores a 60 µg /ml, enquanto que o crescimento de *B. cepacia* e *P. putida* foi inibido em concentrações acima de 30 µg /ml. Ácido elágico foi capaz de inibir o crescimento destas cepas em concentrações superiores a 40 µg /ml. Em concentrações menores que 40 µg /ml, EGCG não afeta o crescimento das três cepas. Já frente à formação de biofilme a adição de ácido tânico não resultou em significativa redução do biofilme formado pela *B. cepacia*. Em contraste, a formação de biofilmes de *B. cepacia* foi reduzida em 30% pela adição de EGCG e em 50% pela adição de ácido elágico, ambos na concentração de 40 µg /ml (HUBER, 2003). Descobertas realizadas por Jagani e colaboradores (2009) indicam que vários compostos fenólicos naturais mostraram uma redução significativa na formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa*. Apesar disto, poucas investigações sobre o efeito de compostos fenólicos derivados de produtos naturais no biofilme bacteriano foram realizadas (PLYUTA, 2013).

Nas últimas duas décadas há um interesse cada vez maior nestes compostos, principalmente devido aos seus efeitos benéficos à saúde. Entre as classes de polifenóis que têm atraído o interesse recente estão os taninos condensados (proantocianidinas), tais compostos têm sido relatados por apresentarem em ensaios in vitro atividade antioxidante, antitumoral, antiviral, antibacteriana (OHMORI, et al., 2004; DENNIS, 2012).

Estas investigações, no entanto, são muitas vezes dificultadas pela complexidade de isolar os compostos naturais na forma pura, com estrutura

definida e em quantidades suficientes para avaliação biológica. Infelizmente, essas fontes geralmente produzem uma mistura de compostos estreitamente relacionados, que não são facilmente separáveis, mesmo com o auxílio de modernos métodos cromatográficos e analíticos. A dificuldade na obtenção de amostras puras destes materiais, juntamente com as suas atividades biológicas promissoras, leva ao desafio e entende-se como uma necessidade a síntese orgânica para fornecimento de amostras de proantocianidinas puras, com estrutura definida e quantidade suficiente para testes biológicos (DENNIS, 2012; OHMORI, et al., 2004; SAITO, 2004).

3.2.1. Catequinas:

A delphinidina (**1**) (Figura 1) é um polifenol, pertencente à classe dos taninos condensados (proantocianidinas) que apresentou importante atividade contra a formação de biofilme bacteriano em trabalho anterior (TRENTIN, 2013). Como foi referida anteriormente, a síntese de proantocianidinas é desejável devido às promissoras atividades já observadas e de modo a investigar melhor tais propriedades biológicas dessas moléculas.

Proantocianidinas são polifenóis que são comuns em todo o reino vegetal. Eles são um grupo de metabólitos secundários importantes que apresentam várias propriedades biológicas, incluindo as interações de proteínas, quelação de metais e atividade antioxidante, os quais são envolvidos em várias funções de proteção em plantas.

Neste trabalho, usamos a epicatequina para síntese de nossos derivados. A (+)-catequina (**4**) e (-)-epicatequina (**2**) (Figura 5) são os nomes triviais dos flavan-3-óis: (2*R*, 3*S*)-3, 5, 7,3', 4'-pentaidroxiflavanol e (2*R*, 3*R*)-3,5,7,3',4'-pentaidroxiflavanol, respectivamente. Flavanols possuem dois carbonos quirais, ou seja, ocorrem quatro diastereoisômeros para cada uma das moléculas (DENNIS, 2010).

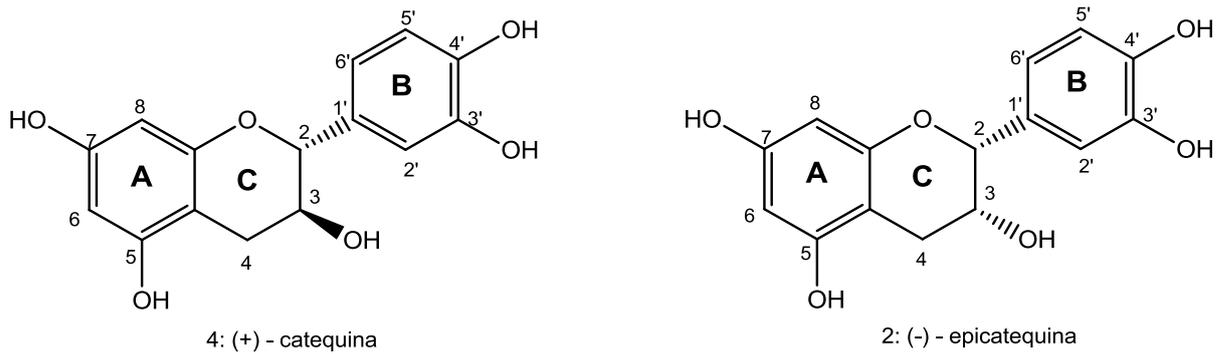
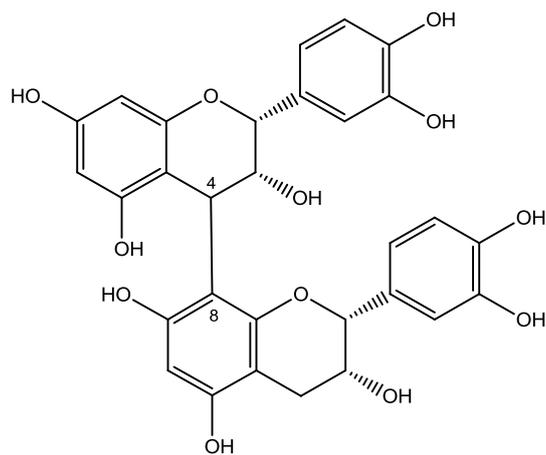


Figura 5: Estrutura da (+)-catequina e (-)- epicatequina (DENNIS, 2010).

Estes flavan-3-óis monoméricos possuem como estrutura básica 2-fenil-3,4-dihidro-2H-cromen-3-ol, pertencem a uma grande família de compostos que ocorrem naturalmente, entre eles, a catequina, epicatequina, epigallocatequina, epicatequina galato, proantocianidinas. Estes possuem a estrutura de anel de 15 carbonos, com o anel C-heterocíclico fundido com o anel aromático do anel A e o anel B aromático ligado ao anel C, através do átomo de carbono C2 (DENNIS, 2010).

Os dímeros proantocianidina são caracterizados por dois monómeros de flavan-3-ol, ligados entre si por uma ligação entre C4 de um monómero com o C8 de outro monómero (Figura 6).

Devido à elevada densidade de elétrons do anel A, as posições C6 e C8 tem comportamento nucleofílico. A posição C4 é propensa à oxidação, podendo formar espécies eletrofílicas em C4. A reação desses eletrófilos C4 com outro monómero de flavanol, ativada pela adição de um ácido de Lewis, fornece a base para a formação do dímero de proantocianidina (DENNIS, 2010).



5:(-)-epicatequina-4-8-(-)-epicatequina

Figura 6: Proantocianidina 4→8.

3.2.2. Atividades biológicas relacionadas:

Um recente estudo demonstrou que uma mistura altamente complexa de proantocianidinas, principalmente composta de profisetinidina e prorobinetinidina e taninos hidrolisáveis, purificados e isolados dos extratos do caule de casca da *Anadenanthera colubrina*, *Commiphora leptophloeos* e *Myracrodruon urundeuva*, tiveram atividade bacteriostática bem como efeitos antiaderentes certificando sua capacidade para controlar o crescimento e evitar formação de biofilme de *P. aeruginosa* (TRENTIN, 2013).

Em trabalho de PLYUTA e colaboradores (2013), foi apresentado o efeito de diferentes compostos fenólicos, vanilina, epicatequina, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido gálico, ácido cinâmico, ácido sinápico, ácido ferúlico, e o ácido clorogênico (Figura 7) sobre o crescimento de células planctônicas e formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*. Neste caso estes compostos exerceram efeito concentração dependente sobre a formação de biofilme. Em concentrações em que ocorre uma pequena diminuição do crescimento bacteriano, todos os compostos fenólicos testados estimularam a *P. aeruginosa* a formação de biofilme. A formação do biofilme de *P. aeruginosa* foi até 2 a 3 vezes maior sob a ação de 4-hidroxibenzóico, ácido gálico, ácido cinâmico nas concentrações de 25-100 µg / mL, ácido sinápico de 200-400

$\mu\text{g/ml}$, ácido ferúlico em $400 \mu\text{g} / \text{ml}$, ácido clorogênico $100\text{-}400 \mu\text{g/mL}$ em comparação com a formação de biofilme na ausência de estes compostos. Os maiores níveis de biofilmes foram observados quando o crescimento bacteriano foi de reduzido de 20-50%. A vanilina nas concentrações de até $750 \mu\text{g/ml}$ estimulou a formação de biofilme de *P. aeruginosa* em até 7 vezes. Já a epicatequina provocou um aumento de até 5 vezes na formação de biofilme de *P. aeruginosa* em concentrações até $750 \mu\text{g} / \text{mL}$. Em concentrações maiores estes compostos fenólicos inibiram a formação de biofilme. Por exemplo, o ácido 4-hidroxibenzóico e ácido gálico em concentrações superiores a $200 \mu\text{g} / \text{mL}$ estes compostos já foram capazes de reduzir a formação de biofilme, já o ácido sinápico, ácido clorogênico e ácido cinâmico acima de $800 \mu\text{g/mL}$ e a vanilina na concentração de $3000 \mu\text{g/mL}$ foi capaz de inibir a formação do biofilme. Ainda nota-se que a inibição de biofilme pelos compostos fenólicos foi na maioria dos casos observados nas concentrações que o mesmo composto suprimiu também o crescimento bacteriano.

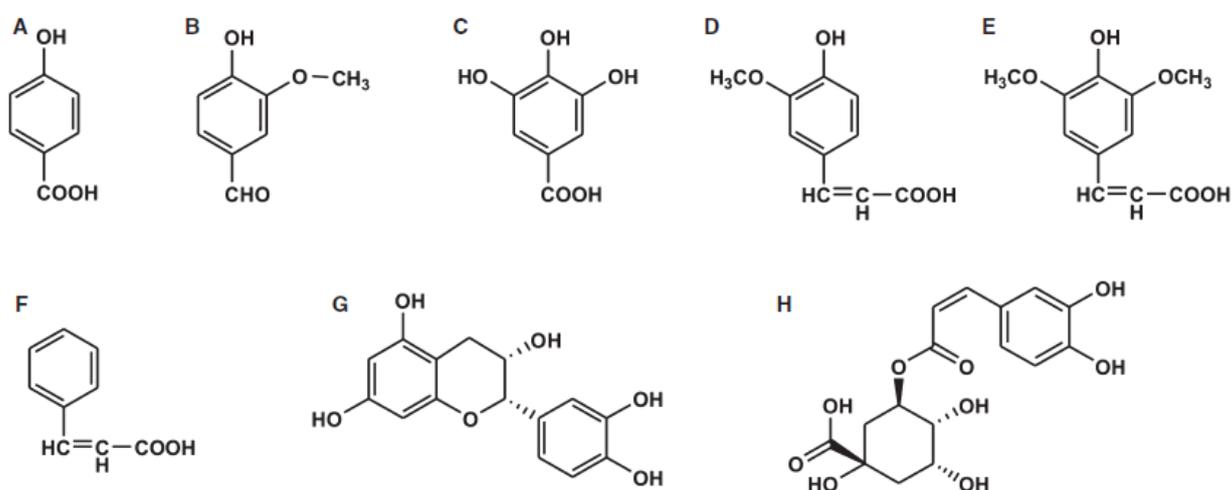


Figura 7: Compostos fenólicos testados frente ao crescimento de células planctônicas e formação de biofilme de *P. aeruginosa*: (A) ácido 4-hidroxibenzóico, (B) vanilina, (C) ácido gálico, (D) ácido ferúlico, (E) ácido sinápico, (F) ácido cinâmico, (G) epicatequina, (H) ácido clorogênico (PLYUTA, 2013).

O ácido tânico (Figura 8) pertence aos taninos hidrolisáveis, é uma molécula polimérica formada pela esterificação do ácido gálico, com a hidroxila de um hidrato de carbono, tal como a glicose. Em 2013, PAYNE e

colaboradores demonstraram que este polifenol é responsável pela inibição da formação de biofilme em *Staphylococcus aureus* sem inibir o crescimento celular bacteriano (PAYNE, 2013).

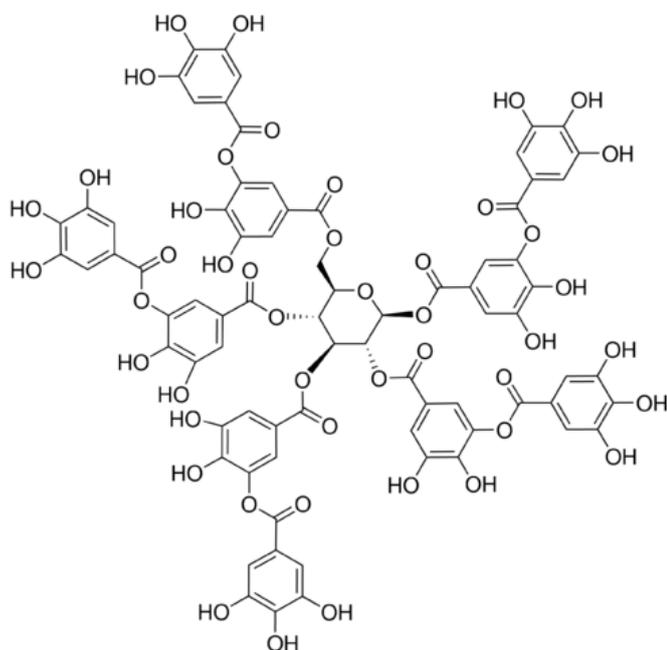


Figura 8: Ácido tânico.

Em recente estudo foram investigados os efeitos de polifenóis como, quercetina, catequina, rutina e gesperetina e ácido tânico na formação do biofilme frente à *Escherichia coli*. Nas concentrações acima de 100 μM de quercetina houve estatisticamente uma diminuição significativa da formação de biofilme. Todos os compostos testados inibiram consideravelmente a expressão do gene de *RpoS*, um dos genes moduladores da expressão da formação de biofilme (SAMOILOVA, 2014).

Outro estudo determinou os efeitos dos principais polifenóis do chá verde, epigalocatequina-3-galato (ECGC) epigalocatequina (EGC) e epicatequina-3-galato (ECG) sobre a capacidade de crescimento da *Candida albicans*, bem como na formação e manutenção de uma comunidade em biofilme. As cepas incubadas com 1,5 ou 2,5 μmol de qualquer um dos polifenóis durante 48 h demonstraram uma redução média de formação de biofilme de 72% quando em comparação com culturas de controle não

tratadas, EGCG se mostrou mais potente do que a EGC ou ECG na concentração de 2,5 $\mu\text{mol/L}$ (EVENSEN & BRAUN, 2009).

A invenção, patenteada em 2013 por MATSUDA, et al., visa proporcionar um dispositivo médico, tal como um stent biliar capaz de inibir continuamente a formação de biofilme. As catequinas avaliadas neste estudo incluem a catequina, epicatequina, epigalocatequina, catequina galato, sendo que a epigalocatequina galato (Figura 9) apresenta as melhores taxas de inibição da formação de biofilme contra *Escherichia coli*. De acordo com esta patente proporciona-se um dispositivo biodegradável de tratamento em que o composto responsável por inibir o biofilme, no caso a epigalocatequina galato, deve ser preferencialmente incorporado num polímero biodegradável, por exemplo, os polímeros hidrófilos facilitando a libertação sustentada de catequinas, é preferível que a libertação sustentada de catequina seja de pelo menos, 0,22 mg/cm^2 por dia. Então conforme este estudo, quando um stent biliar revestido com um complexo epigalocatequina galato-polímero bactérias aderidas à superfície do stent biliar são exterminados, e, assim a formação de biofilme é completamente inibida impedindo assim o desenvolvimento da infecção. Este estudo prova a capacidade, atribuída às catequinas, de inibir ou suprimir o crescimento das bactérias aderidas às superfícies de vários dispositivos médicos (MATSUDA, 2013).

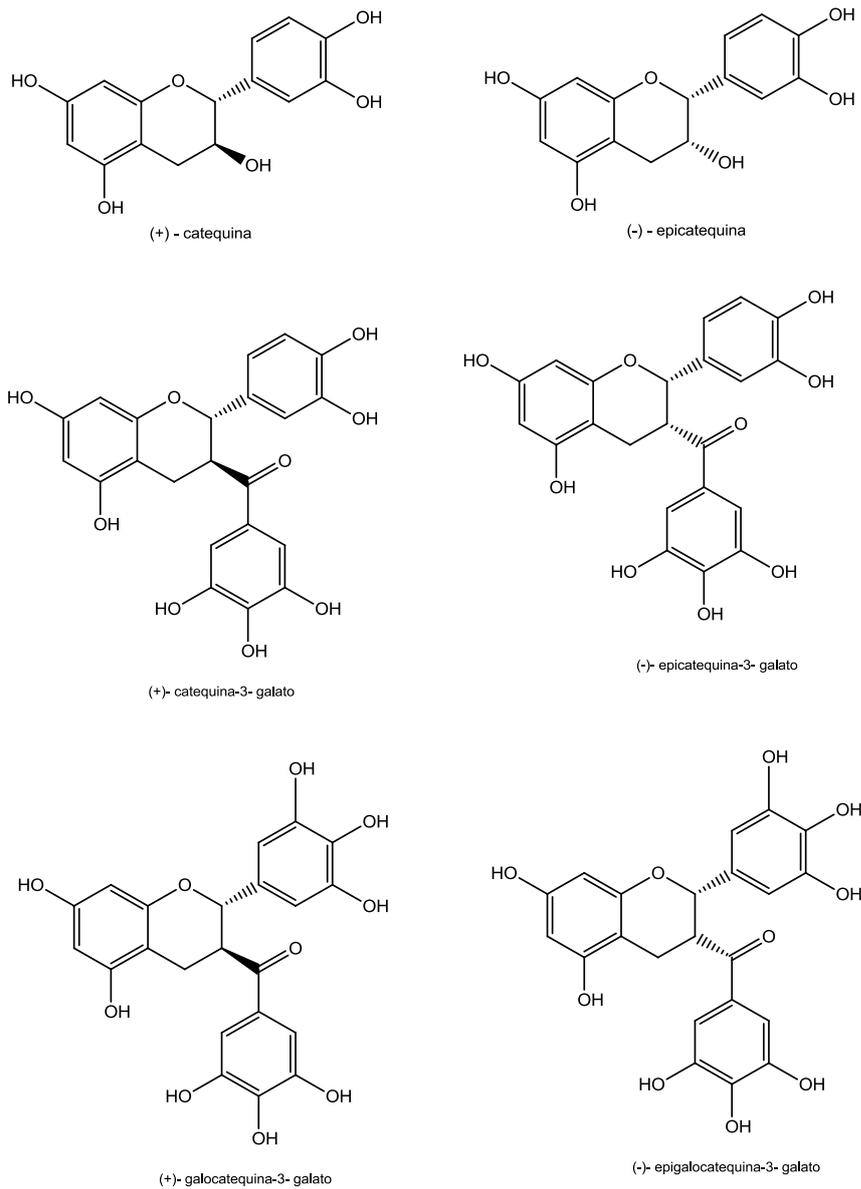


Figura 9: Estrutura das catequinas avaliadas por MATSUDA, 2013.

4. CAPÍTULO I: PLANEJAMENTO E SÍNTESE DOS DERIVADOS DA EPICATEQUINA

4.1. Introdução

Considerando a atividade em potencial da delfinidina contra a formação de biofilme preconizada em ensaios preliminares (TRENTIN, et al., 2013), este composto foi escolhido como protótipo no planejamento da síntese de candidatos ativos.

Também, como discutido anteriormente, a epicatequina devido a suas atividades promissoras, despertou nosso interesse no planejamento para síntese de outros produtos via acilação, buscando novos candidatos ativos que atuem frente à formação de biofilme, ao crescimento bacteriano, a erradicação do biofilme e que sejam seguros para o ser humano.

Neste capítulo apresentamos as estratégias utilizadas para o planejamento dos derivados da epicatequina, seguida de uma breve revisão sobre os métodos disponíveis para a síntese dos derivados propostos. Após, a síntese propriamente dita dos compostos planejados foi discutida.

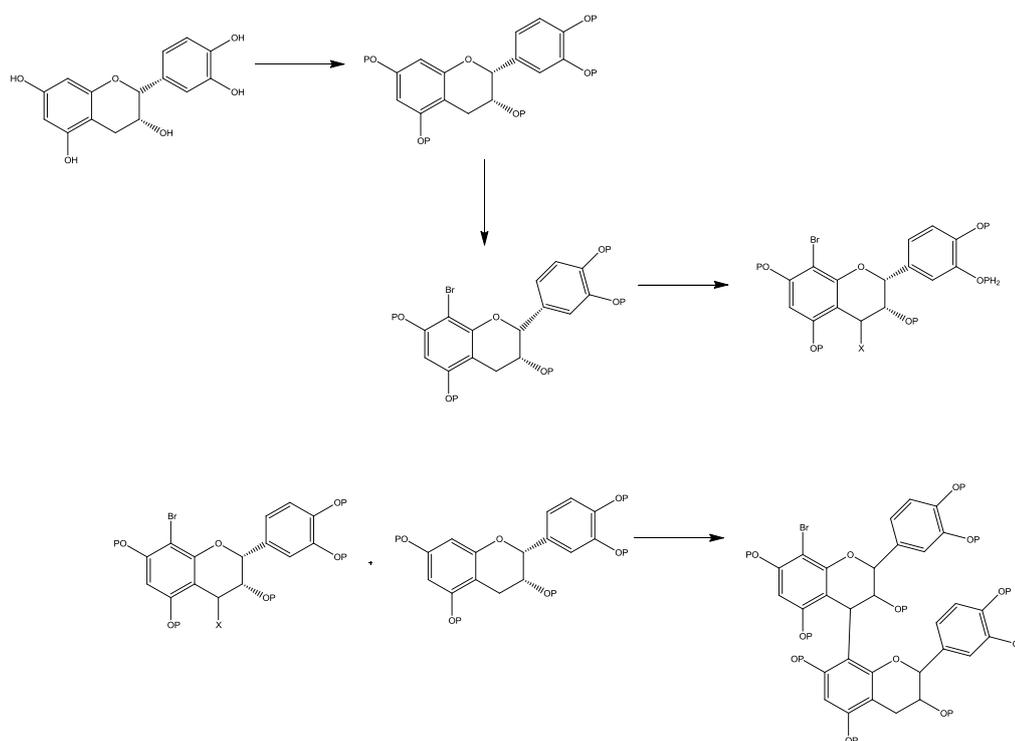
4.2. Estratégias para o planejamento racional:

O composto epicatequina foi escolhido como reagente de partida para o planejamento de candidatos ativos para se obter as duas séries correspondentes: uma rota de síntese para derivados da delfinidina (Esquema 1) e uma série de compostos acilados derivados da epicatequina (Esquema 2).

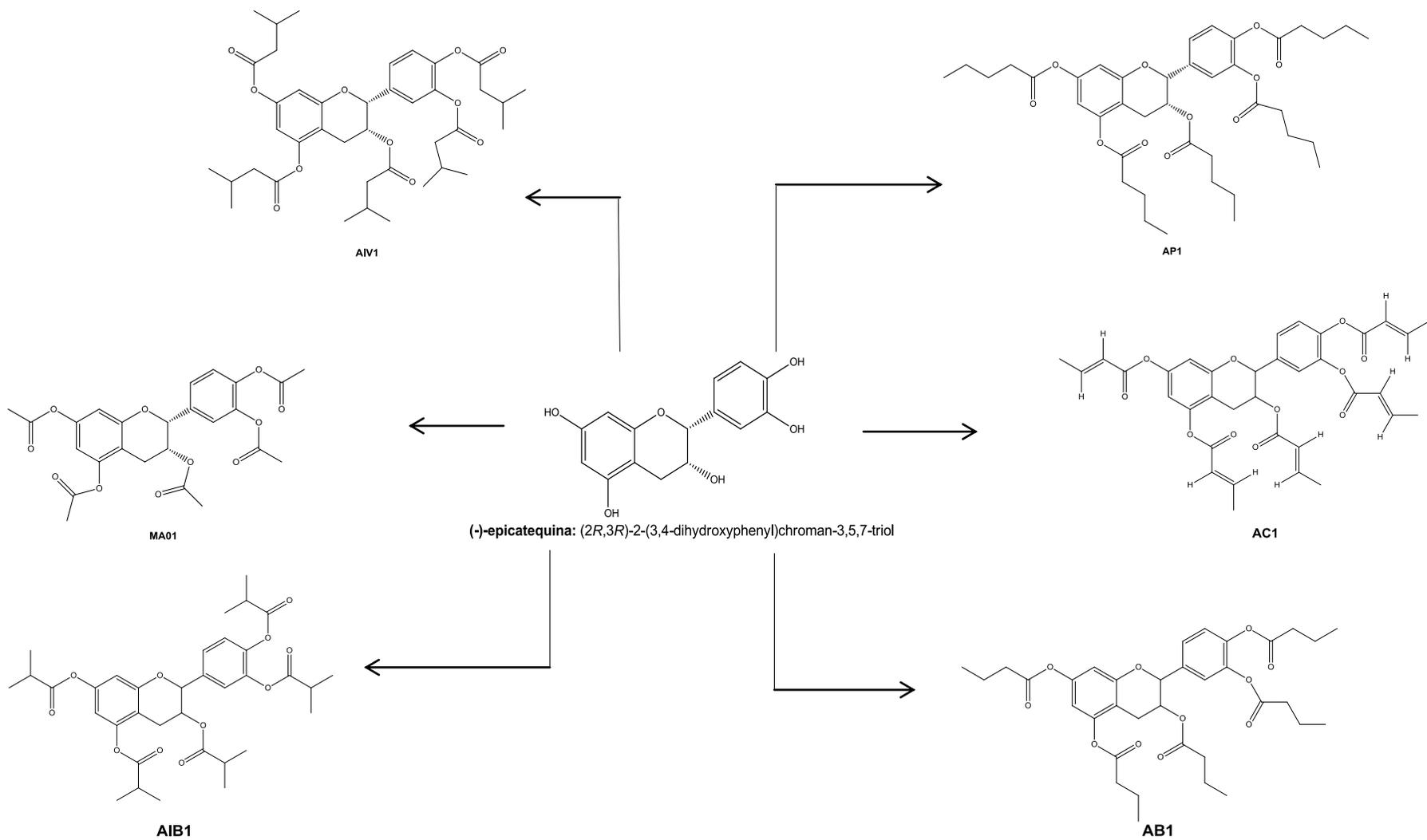
A síntese de derivados da delfinidina a partir da epicatequina foi proposta iniciando com a síntese de dímeros derivados da delfinidina (Esquema 1).

Também, a síntese da série de compostos acilados derivados da epicatequina (Esquema 2) foi proposta, mantendo o mesmo núcleo cromano, porém modificando seus substituintes, a fim de avaliarmos:

- A influência destes ésteres dos derivados acilados frente às atividades avaliadas;
- A importância da insaturação dos substituintes, sendo proposta a síntese de AC1 (Esquema 2);
- A relevância do tamanho da cadeia carbônica dos substituintes, sendo proposta a síntese de AB1, AP1, MA01 (Esquema 2);
- A isomeria entre a cadeia carbônica dos substituintes como relacionado entre AB1x AIB1/ AP1x AIV1 (Esquema 2);
- A influência dos grupamentos hidroxilas livres.



Esquema 1: Rota de síntese proposta para obtenção de derivados da delfinidina. P: grupamento protetor. X: grupamento de saída.



Esquema 2: Rota de síntese proposta para obtenção de derivados acilados.

4.3. Revisão da literatura

4.3.1. Série de derivados acilados:

Esta rota de síntese envolve a reação entre a epicatequina e uma série de anidridos comerciais. Esta é uma estratégia simples, relativamente barata e facilmente reproduzível. O uso destes anidridos já foi alvo de pesquisa para o desenvolvimento de outros derivados visando conferir ou potencializar alguma atividade biológica (SILVA, 2013; YU, 2006).

O carbono do grupo acila (R-COR) é de arranjo plano, de hibridização sp^2 , portanto pode ser atacado com facilidade por um nucleófilo. Basta ter um bom grupo abandonador, para que possa ser substituído pelo nucleófilo (ISENMANN, 2013).

Neste caso ocorre conversão do anidrido nos seus ésteres correspondentes, utilizando um método reacional de acilação que envolve um nucleófilo, neste caso a epicatequina, uma série de anidridos, que diferem entre si quanto à cadeia carbônica e o grau de insaturação, o DMAP usado como catalisador e um solvente apropriado que solubilize o material de partida e não influencie diretamente na reação. A reação se processa rapidamente em condições de temperatura ambiente e leva a excelentes rendimentos, sendo este método de aplicabilidade simples, rápida e de baixo custo, desta forma serve como uma boa alternativa visando à síntese em escala industrial.

4.3.2. Síntese da série de derivados da delfinidina:

A delfinidina é um polifenol, pertencente à classe dos taninos condensados (procianidinas) que apresentou importante atividade contra a formação de biofilme bacteriano em trabalho anteriormente relatado (TRENTIN, et al., 2013). Devido às promissoras atividades já descritas em literatura científica, a síntese de procianidinas é desejável. Para isso foi proposta uma

rota sintética para se obter amostras de procianidinas puras, com quantidade suficiente para avaliação biológica frente a inibição da formação de biofilme, o crescimento bacteriano, a erradicação do biofilme já formado, bem como avaliação de toxicidade celular em linfócitos.

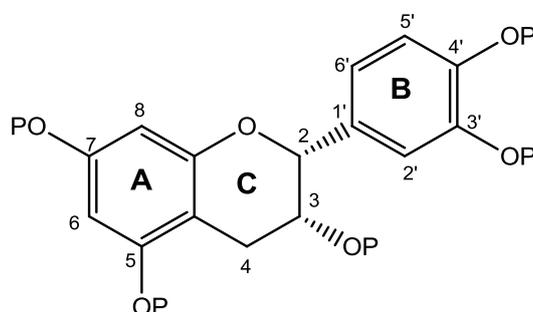
Estes compostos podem ser obtidos a partir do isolamento de produtos naturais ou através de métodos sintéticos. Os métodos sintéticos para a obtenção destes compostos naturais tornaram-se mais prevacentes nos últimos anos (DENNIS, 2012). Os métodos de síntese de procianidinas já estudados serão discutidos ao longo deste capítulo.

A reação de acoplamento de uma molécula ativada, o eletrófilo, com um nucleófilo na presença de um ácido de Lewis, foi descrita pela primeira vez por Kawamoto, et al., em 1990 e resultava em uma mistura de oligômeros dificilmente caracterizada e purificada (TARASCOU, 2006). Desde então, numerosos métodos sintéticos na síntese de oligômeros de catequina tem sido foco de estudos. No entanto, tais esforços têm sido dificultados devido à estabilidade química e a reatividade destes compostos, que tendem a reagir de modo não seletivo para formar misturas oligoméricas polidispersas. Controlar o grau de oligomerização e a formação complexa destes produtos permanece como o grande desafio que precisa ser ultrapassado para a síntese eficiente e bem sucedida de oligômeros de procianidinas. A síntese de dímeros, o mais simples de todos os oligômeros de procianidinas, tem sido alvo primário para planejamento reacional e se baseia em quatro etapas para se obter o dímero desejado (DENNIS, 2012).

O primeiro passo nesta síntese é a proteção dos grupamentos hidroxila. A maioria dos métodos utiliza grupos protetores para reduzir a reatividade das hidroxilas fenólicas e da hidroxila em C3. A proteção destes grupos é realizada para evitar reações colaterais indesejadas durante as próximas reações e deve ser processada de modo que seja estável nas condições reacionais subsequentes, que possa ser removida no final da rota reacional sem degradação da estrutura do anel de catequina, que se obtenha rendimento elevado e seja uma reação fácil de ser realizada e purificada. A utilização de ésteres de benzila ($P = Bn$) (TARASCOU, 2006; DENNIS, 2012; KOZIKOWSKI,

2000); ésteres de metila (P = Me) (KOZIKOWSKI, 2000) ou ésteres de acetila (P = Ac) (ISHIHARA, 2014) como grupos protetores são bem relatados (Figura 1).

De acordo com o método descrito por Dennis, et al., em 2012, à uma solução de catequina em DMF foi adicionada a -78°C NaH seguido imediatamente da adição de cloreto de benzila. Esta reação foi então agitada à temperatura ambiente, nestas condições foi possível obter rendimentos de 90% (DENNIS, 2012). Alguns autores afirmam a necessidade do uso de brometo de benzila para reação de proteção por ser mais reativo que cloreto de benzila (TARASCOU, 2006; KOZIKOWSKI, 2000).



P= Bn, Me, Ac.

Figura 1: Grupos protetores usados na literatura para a (-)-epicatequina.

O grupo benzila é o grupo mais comumente utilizado para proteger as hidroxilas fenólicas na síntese de procianidinas. No entanto, esta síntese é muito limitada por causa da formação de subprodutos (ex: ácido benzoico) durante a proteção das catequinas com o grupo benzila. Outro método de proteção dos grupamentos hidroxila é a acetilação de flavan-3-ol de proantocianidinas, uma reação fácil e que proporciona o derivado acetilado em rendimento quantitativo (ISHIHARA, 2014).

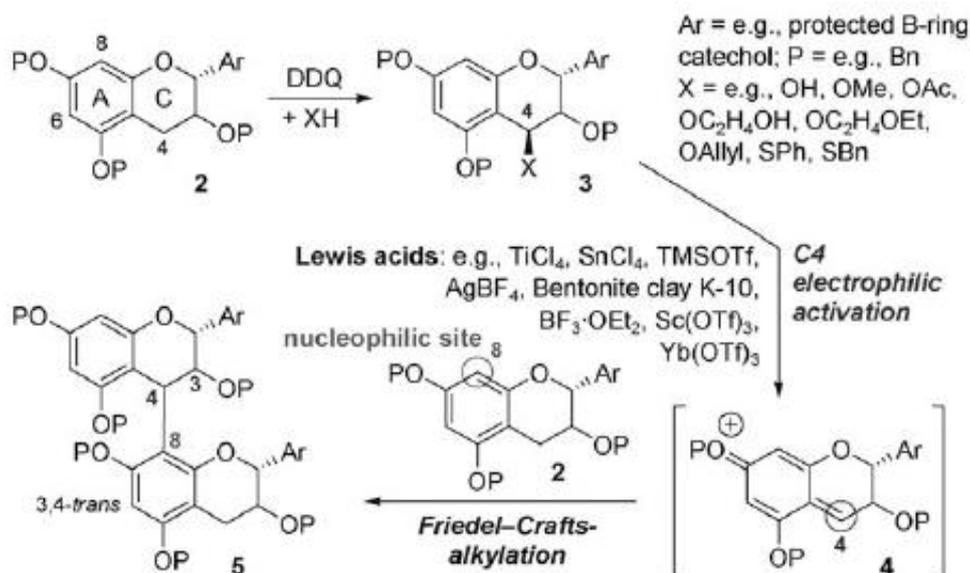
O passo chave nesta metodologia de síntese do dímero é a reação de acoplamento entre um monômero nucleófilo e um eletrófilo utilizando como ativador um ácido de Lewis, tal como TiCl_4 , SnCl_4 ou TMSOTf. Uma das estratégias mais promissora da síntese do dímero pela ligação 4/8 interflavanóis foi a abordagem usando ácido de Lewis como promotor da

condensação entre duas catequinas. Em muitos casos, no entanto as proantocianidinas são obtidas como uma mistura de vários análogos, tornando a purificação de cada composto difícil (ISHIHARA, 2014).

As abordagens discutidas baseiam-se essencialmente no processo de alquilação de Friedel-Crafts para ligar o anel C do eletrófilo ativado na posição C4 com o C8 do anel A do nucleófilo.

Esta abordagem requer em primeiro lugar um derivado protegido que contenha um grupo de saída na posição C4. O C4-éter, segundo descrito por Saito, et al., 2004, o composto é obtido via oxidação de C4 com 2 equivalentes de DDQ na presença de vários nucleófilos (etilenoglicol, 2-etoxietanol, álcool benzílico, álcool isopropílico), proporcionando o C4-éter, com aproximadamente 85% de rendimento bruto (SAITO, 2002; DENNIS, 2010).

O passo seguinte é mediado pelo tratamento desses precursores com um ativador deste acoplamento, para isso é usado o ácido de Lewis tais como TiCl_4 , $\text{BF}_3\text{-OEt}_2$, TMSOTf, AgBF_4 (Esquema 3) (QUIDEAU, 2011; DENNIS, 2012; OHMORI, et al., 2004; TARASCOU, 2006; KATOH, 2012). Porém, este método requer um excesso do nucleofílico para evitar extensa oligomerização e reações de auto-condensação.

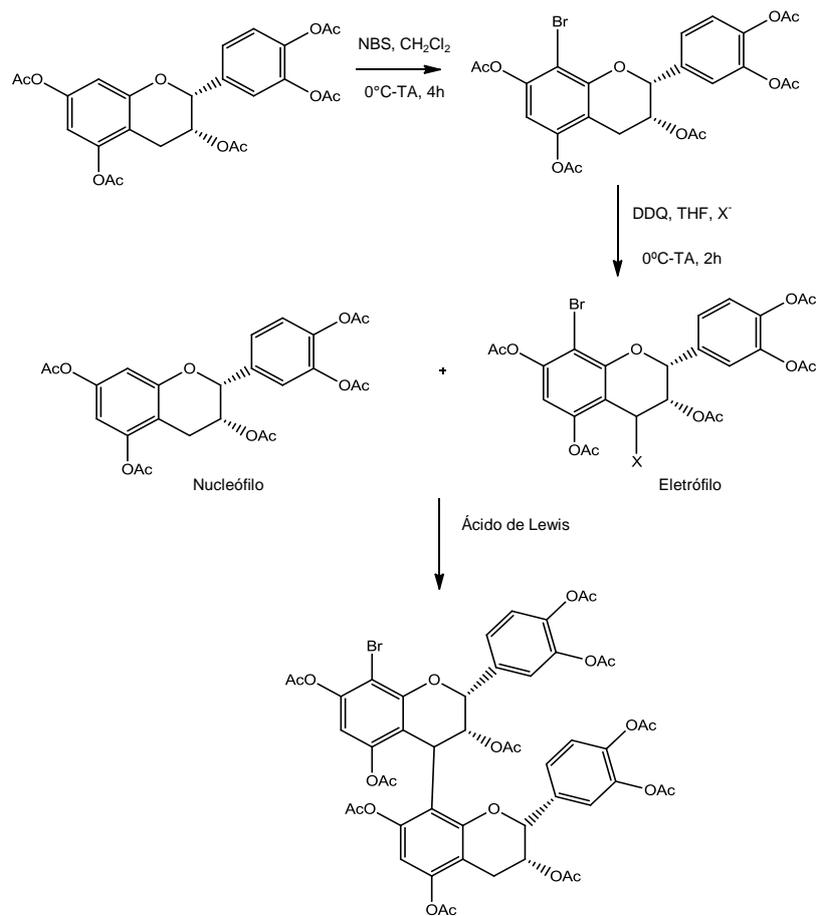


Esquema 3: Rota sintética para a formação de proantocianidina oligômeros. Fonte: (QUIDEAU, 2011).

Ohmori e colaboradores citaram o uso de um átomo de bromo na posição C8 do anel A do composto eletrofílico, o uso de um átomo de halogênio removível diminui o caráter nucleofílico em C8 de um derivado flavanol, de modo a este composto agir principalmente como um eletrófilo. Esta estratégia inspirou outros pesquisadores a estudar a síntese de proantocianidinas de uma maneira controlada (OHMORI, et al., 2004).

Para tornar esta estratégia mais viável surgiram várias metodologias também discutidas por outros autores que empregam a adição de bromo no C8 para evitar a formação desordenada de oligômeros conduzindo à formação seletiva do dímero desejado, sem a necessidade de um grande excesso do nucleófilo. A reação se processa pelo tratamento da catequina previamente protegida com um equivalente de NBS a 0°C-TA por 4h e resulta em rendimentos quantitativos (DENNIS, 2012) (TARASCOU, 2006).

Em resumo, temos como primeira etapa, a síntese dos derivados protegidos, após a ativação da posição C8 pela adição de um átomo de bromo nesta posição, em seguida a oxidação de C4 mediada pelo DDQ para adição de um grupamento de saída e só então a ligação C4→C8 interflavanol, entre eletrófilo e um nucleófilo em quantidades equimolares, para formação do respectivo dímero, reação esta, promovida por um ácido de Lewis apropriado, como demonstrado a seguir (Esquema 4).



Esquema 4: Planejamento da síntese de procianidinas conforme discutido em literatura. Onde X- é um grupo abandonador (etoxietanol, etilenoglicol).

4.4. Parte experimental:

4.4.1. Equipamentos e reagentes:

Para a realização deste trabalho, os produtos químicos e reagentes foram adquiridos da Sigma Aldrich a partir de fornecedores comerciais e utilizados conforme indicação dos fabricante. O coeficiente de partição ($\log P$) foi determinado utilizando o programa de acesso livre na rede mundial: ACD/LogP (www.acdlabs.com/products/phys_chem_lab/logp/) (BENNETT, 2009). Os solventes foram adquiridos de forma anidra ou destilados sob atmosfera de nitrogênio quando necessário. As reações foram monitoradas através de cromatografia de camada delgada (CCD) em folhas de alumínio de sílica gel 60 F254 Merck e visualizadas através de uma lâmpada de luz ultravioleta λ 254 nm e por pulverização com reagente anisaldeído sulfúrico e aquecimento a 100°C. As cromatografias em coluna foram realizadas utilizando gel de sílica 60 (35–70 μm). E as cromatografias em camada delgada preparativa foram realizadas em placas de vidro (20x20 cm) com gel de sílica 60 GF254 merck. A evaporação e concentração dos solventes foram feitas em evaporador rotativo padrão Büchi usando bomba de vácuo. Para realização dos espectros de ressonância magnética nuclear foram utilizados dois equipamentos: RMN de ^1H (500 MHz), RMN de ^{13}C (125 MHz), APT (125 MHz), gHSQC e HSQCAD foram medidos em Equipamento Agilent® 500 MHz, os espectros de RMN de ^1H (400 MHz), RMN de ^{13}C (101 MHz) foram obtidos em um espectrômetro Varian 400MHz. Os deslocamentos químicos são apresentados em δ (ppm). As constantes de acoplamento (J) são dadas em hertz. Os espectros de infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro Perkin-Elmer modelo FT-Spectrum BRXII/Miracle ATR, na faixa de 4000 a 600 cm^{-1} . Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro de alta resolução Q-Tof micro Waters, operando em modo de ionização eletronspray. Todas as reações que exigiam atmosfera inerte foram realizadas em aparato previamente seco e sob atmosfera de nitrogênio.

4.4.2. Síntese dos derivados acilados:

✓ Síntese de **MA01** (2*R*,3*R*)-2-(3,4-diacetoxifenil)cromano-3,5,7-triacetato (Figura 2):

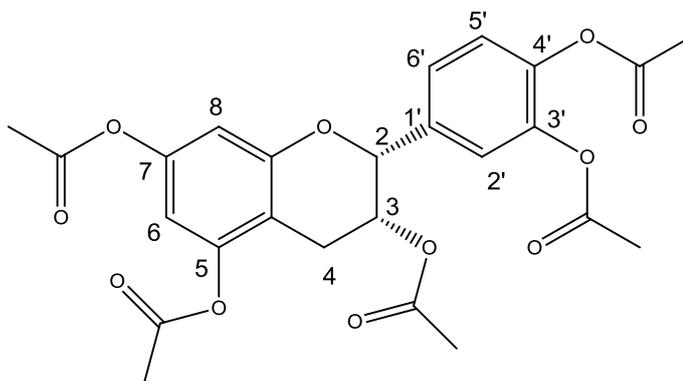


Figura 2: MA01.

Sob (-)-epicatequina (100 mg; 0,3448 mmol) foi adicionada piridina (3 ml) em banho de gelo a 0°C, após adicionou-se anidrido acético (400 µl; 3,448 mmol) gota a gota. Então esta mistura permaneceu agitando à temperatura ambiente por 24h. O produto reacional foi extraído sucessivamente com solução saturada de NaCl (2 x 20 ml) e água (1 x 20 ml) e CH₂Cl₂ (2 x 20 ml). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄, filtrada e após evaporada em evaporador rotatório.

O resíduo bruto foi purificado através de cromatografia em coluna de gel de sílica utilizando ciclohexano - AcOEt (80:20) como fase móvel. Desta maneira o composto **MA01** foi obtido (153 mg), 89% de rendimento, como um sólido bege. Log P: 1.08 ± 0.45; IV: 1767 (C=O de éster), 1202 (CH₃CO) cm⁻¹; *m/z* 523,1417 [M+Na]⁺ consistente com a fórmula molecular C₂₅H₂₄O₁₁Na (Calculado para 523, 1407); RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 1,91-2,29 (s, 15H, 5CH₃), 2,93 (m, 2H, CH₂, H₄), 5,11 (brs, 1H, CH, H₂), 5,39 (brs, 1H, CH-OH, H₃), 6,57(brs, 1H, CH, H₆), 6,67 (brs, 1H, CH, H₈), 7,20 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, CH, H₅), 7,26(d, *J* = 2.6 Hz, 1H, CH, H_{6'}), 7,35 (brs, 1H, CH, H_{2'}); APT (125 MHz, CDCl₃): δ 20,6 (2CH₃), 20,7(2CH₃), 21,2(CH₃), 26,0 (CH₂, C₄), 66,5 (CH, C₃), 76,5 (CH, C₂), 108,0 (CH, C₈), 108,8 (CH, C₆), 109,6 (Cq, C₁₀), 122,1 (CH, C_{2'}),

123,2 (CH, C₅), 124,4 (CH, C₆), 135,8 (Cq, C_{1'}), 141,9 (Cq, C_{3'}), 142,1(Cq, C_{4'}), 149,6 (Cq, C₇), 149,7 (Cq, C₅), 155,0 (Cq, C₉), 167,8 (2Cq, C=O), 168,4 (Cq, C=O), 169 (Cq, C=O), 170,4 (Cq, C=O).

- ✓ Síntese de **AP1** (2*R*, 3*R*)-2-(3,4-bis (pentanoiloxi)fenil) cromano-3, 5, 7-tripentanoato (Figura 3):

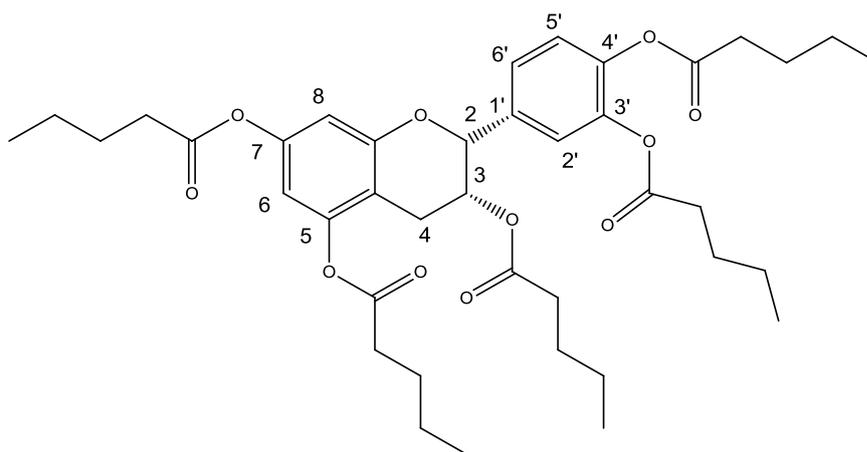


Figura 3: AP1.

Sob (-)-epicatequina (100 mg; 0,3448 mmol) foi adicionado DMF anidro (3 ml), após adicionou-se anidrido pentanóico (683,2 μ l; 3,448 mmol), em seguida DMAP (84,25 mg 0,6896 mmol). Então esta mistura permaneceu agitando à temperatura ambiente por 30 min. O produto reacional foi extraído sucessivamente com solução saturada de NaCl (2 x 20 ml) e água (1 x 20 ml) e CH₂Cl₂ (2 x 20 ml). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄, filtrada e após evaporada em evaporador rotatório.

O resíduo bruto foi purificado através de cromatografia em coluna de gel de sílica utilizando cicloexano - AcOEt (80:20) como fase móvel. Desta maneira o composto oleoso **AP1** foi obtido (205 mg), com 84% de rendimento. Log *P*: 9.29 \pm 0.45; IV: 1709(C=O de éster), 1264 (CH₃CO) cm⁻¹; *m/z* 728, 9089 [M+H₂O]⁺ consistente com a fórmula molecular C₄₀H₅₄O₁₁·H₂O (Calculado para 728, 9055); RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 0,7-1,0(m, 15H, 5CH₃), 1,15- 1,5 (m, 10H, 5CH₂), 1,60-1,80 (m, 10H, 5CH₂), 2,17-2,54(m, 10H, 5CH₂), 2,92 (m,

2H, CH₂, H₄), 5,12 (brs, 1H, CH, H₂), 5,41 (brs, 1H, CH, H₃), 6,54 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H, CH, H₆), 6,67 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H, CH, H₈), 7,19 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, CH, H₅), 7,26(m, 1H, CH, H₆), 7,32 (brs, 1H, CH, H₂); APT (125 MHz, CDCl₃): δ 13,5 (CH₃), 13,6(3CH₃), 13,7 (CH₃), 21,9 (CH₂), 22,1 (CH₂), 22,2(2CH₂), 26,1 (CH₂, C₄), 26,6 (CH₂), 26,7 (3CH₂), 26,9 (CH₂), 33,7 (3CH₂), 33,8 (CH₂), 34,0 (CH₂), 66,5 (CH, C₃), 76,5 (CH, C₂), 107,8 (CH, C₈), 108,7 (CH, C₆), 109,5 (Cq, C₁₀), 121,9 (CH, C₂), 123,2 (CH, C₅), 124,2 (CH, C₆), 135,8 (Cq, C₁), 141,9 (Cq, C₃), 142,1 (Cq, C₄), 149,7 (Cq, C₇), 149,8 (Cq, C₅), 155,0 (Cq, C₉), 170,8 (2Cq, C=O), 171,3 (Cq, C=O), 171,9 (Cq, C=O), 173,3 (Cq, C=O).

- ✓ Síntese de **AIV1** (2*R*,3*R*)-2-(3,4-bis((3-metilbutanoil)oxi)fenil)cromano-3,5,7-trialtris(3-metilbutanoato) (Figura 4):

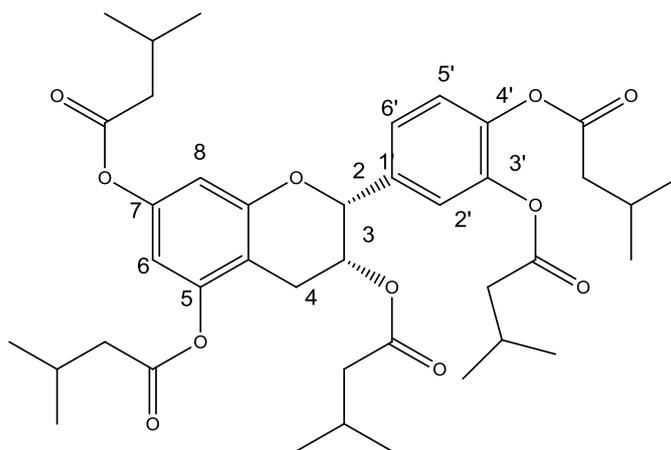


Figura 4: AIV1.

Sob (-)-epicatequina (100 mg; 0,3448 mmol) foi adicionado DMF anidro (3 ml), após adicionou-se anidrido isovalérico (690 µl; 3,448 mmol), em seguida DMAP (84,25 mg 0,6896mmol). Então esta mistura permaneceu agitando à temperatura ambiente por 30 min. O produto reacional foi extraído sucessivamente com solução saturada de NaCl (2 x 20 ml) e água (1 x 20 ml) e CH₂Cl₂ (2 x 20 ml). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄, filtrada e após evaporada em evaporador rotatório.

O resíduo bruto foi purificado através de cromatografia em coluna de gel de sílica utilizando cicloexano - acetato de etila (80:20) como fase móvel. Desta maneira o composto oleoso **AIV1** foi obtido (241 mg), com 98% de rendimento. Log P 8.13 ± 0.47 ; IV: 1760(C=O de éster), 1264 (CH₃CO) cm^{-1} ; m/z 728, 9068 [M+H₂O]⁺ consistente com a fórmula molecular C₄₀H₅₄O₁₁·H₂O (Calculado para 728, 9055) ; RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 0,7-1,1(m, 30H, 10CH₃), 2-2,23 (m, 5H, 5CH), (m, 10H, 5CH₂), 2,24-2,5 (m, 10H, 5CH₂), 2,93 (m, 2H, CH₂, H₄), 5,13 (brs, 1H, CH, H₂), 5,41 (brs, 1H, CH, H₃), 6,53(d, $J = 2,5$ Hz, 1H, CH, H₆), 6,68 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, CH, H₈), 7,17 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, CH, H_{5'}), 7,27(m, 1H, CH, H_{6'}), 7,32 (brs, 1H, CH, H_{2'}); APT (125 MHz, CDCl₃): δ 21,9 (CH₃), 22,1 (CH₃), 22,5-22,3 (8CH₃), 25,4 (CH), 25,5 (CH), 25,6 (CH), 25,7 (CH), 25,8 (CH), 26,2 (CH₂, C₄), 42,9 (2CH₂), 43,0 (CH₂), 43,1 (CH₂), 43,3 (CH₂), 66,5 (CH,C₃), 76,6 (CH, C₂), 108,0 (CH, C₈), 108,8 (CH, C₆), 109,5 (Cq, C₁₀), 121,9 (CH, C_{2'}), 123,3 (CH, C_{5'}), 124,0 (CH, C_{6'}), 135,8 (Cq, C_{1'}), 142,0 (Cq, C_{3'}), 142,2 (Cq, C_{4'}), 149,7 (Cq, C₇), 149,8 (Cq, C₅), 155,0 (Cq, C₉), 170,1(2Cq, C=O), 170,6 (Cq, C=O), 171,3 (Cq, C=O), 172,6 (Cq, C=O).

- ✓ Síntese de **AB1** (2-(3,4-bis (butiriloxi)fenil)cromano-3,5,7-tributirato (Figura 5):

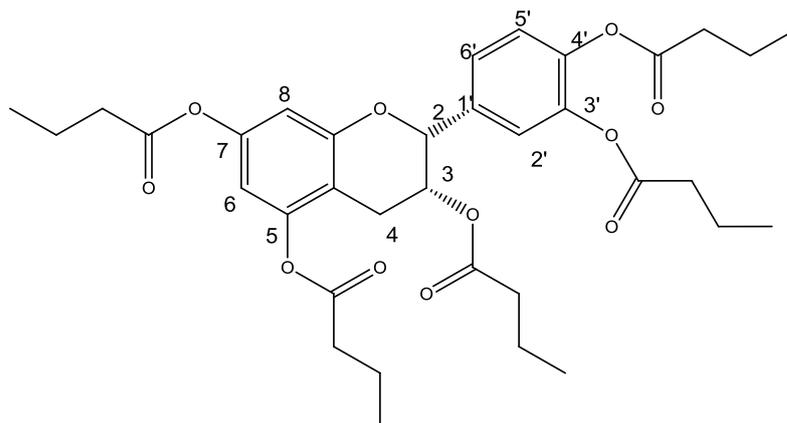


Figura 5: AB1.

Sob (-)-epicatequina (100 mg; 0,3448 mmol) foi adicionado DMF anidro (3 ml), após adicionou-se anidrido butírico (566,4 μl ; 3,448 mmol), em seguida

DMAP (84,25 mg 0,6896 mmol). Então esta mistura permaneceu agitando à temperatura ambiente por 30 min. O produto reacional foi extraído sucessivamente com solução saturada de NaCl (2 x 20 ml) e água (1 x 20 ml) e CH₂Cl₂ (2 x 20 ml). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄, filtrada e após evaporada em evaporador rotatório.

O resíduo bruto foi purificado através de cromatografia em coluna de gel de sílica utilizando cicloexano - acetato de etila (80:20) como fase móvel. Desta maneira o composto oleoso **AB1** foi obtido (211 mg), com 95% de rendimento. Log P: 6.40 ± 0.45; IV: 1765(C=O de éster), 1264 (CH₃CO) cm⁻¹; m/z 658, 7671 [M+H₂O]⁺ consistente com a fórmula molecular C₃₅H₄₄O₁₁·H₂O (Calculado para 658,7376); RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 0,7-1,1(m, 15H, 5CH₃), 1,4-1,8 (m, 10H, 5CH₂), 2,1-2,6 (m, 10H, 5CH₂), 2,94 (m, 2H, CH₂, H₄), 5,12 (brs, 1H, CH, H₂), 5,41 (brs, 1H, CH, H₃), 6,55(d, J = 2,1 Hz ,1H, CH, H₆), 6,68 (d, J = 2,0 Hz 1H, CH, H₈), 7,20 (d, J = 8,2 Hz 1H, CH, H₅), 7,26 (m, 1H, CH, H₆), 7,33 (brs, 1H, CH, H₂); APT (125 MHz, CDCl₃): δ 13,3 (CH₃), 13,6 (4CH₃), 18,2(CH₂), 18,4 (4CH₂), 26,1 (CH₂, C₄), 35,8 (CH₂), 35,9 (2CH₂), 36,0 (CH₂), 36, 2 (CH₂), 66,5 (CH,C₃), 76,5 (CH, C₂), 108,0 (CH, C₈), 108,7 (CH, C₆), 109,5 (Cq, C₁₀), 122,0 (CH, C₂'), 123,2 (CH, C₅'), 124,4 (CH, C₆'), 135,8 (Cq, C₁'), 141,9 (Cq, C₃'), 142,1 (Cq, C₄'), 149,7(Cq, C₇), 149,8(Cq, C₅), 155,0 (Cq, C₉), 170,7 (Cq, C=O), 170,8 (Cq, C=O), 171,2 (Cq, C=O), 171,7 (Cq, C=O), 173,0 (Cq, C=O).

✓ Síntese de **AIB1** 2-(3,4-bis (isobutiriloxi)fenil)cromano-3,5,7-trialtris(2metilpropanoato) (Figura 6):

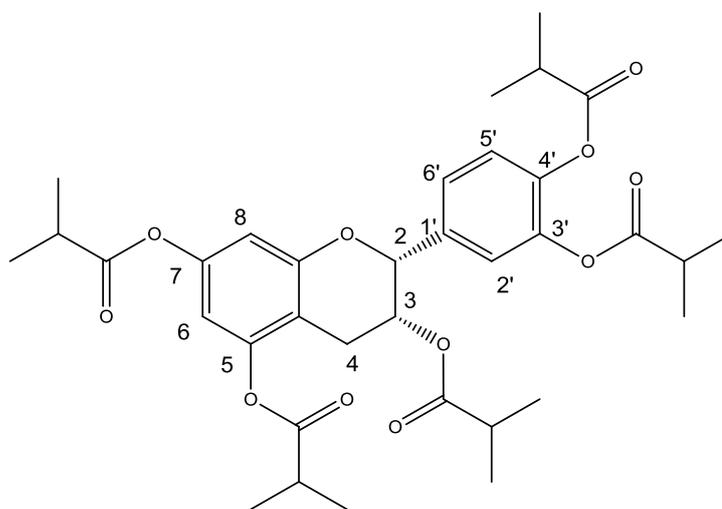


Figura 6: AIB1.

Sob (-)-epicatequina (100 mg; 0,3448 mmol) foi adicionado DMF anidro (3 ml), após adicionou-se anidrido isobutírico (574,2 μ l; 3,448 mmol), em seguida DMAP (84,25 mg 0,6896 mmol). Então esta mistura permaneceu agitando a temperatura ambiente por 30 min. O produto reacional foi extraído sucessivamente com solução saturada de NaCl (2 x 20 ml) e água (1 x 20 ml) e CH_2Cl_2 (2 x 20 ml). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 , filtrada e após evaporada em evaporador rotatório.

O resíduo bruto foi purificado através de cromatografia em coluna de gel de sílica utilizando cicloexano - acetato de etila (80:20) como fase móvel. Desta maneira o composto oleoso **AIB1** foi obtido (205 mg), com 93 % de rendimento. Log P: 5.48 ± 0.47 ; IV: 1761(C=O de éster), 1264 (CH_3CO) cm^{-1} ; m/z 663, 7181 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ consistente com a fórmula molecular $\text{C}_{35}\text{H}_{44}\text{O}_{11}\cdot\text{Na}$ (Calculado para 663, 7163); RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 0,9-1,35 (m, 30H, CH_3), 2,5-2,95 (m, 5H, CH), 2,95 (m, 2H, CH_2 , H_4), 5,14 (brs, 1H, CH, H_2), 5,41 (brs, 1H, CH, H_3), 6,53 (s, $J = 2,0$ Hz 1H, CH, H_6), 6,69 (s, $J = 2,0$ Hz, 1H, CH, H_8), 7,17 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, CH, H_5), 7,27(brs, 1H, CH, H_6'), 7,30 (brs, 1H, CH, H_2'); APT (125 MHz, CDCl_3): δ 18,2 (CH_3), 18,5 (CH_3), 19-18,7 (8 CH_3), 25,9 (CH_2 , C_4), 33,8 (CH), 33,9 (CH), 34 (CH), 34,1 (CH), 34,2 (CH), 66,5 (CH, C_3), 76,5 (CH, C_2),

107,8 (CH, C₈), 108,6 (CH, C₆), 109,5 (Cq, C₁₀), 121,6 (CH, C_{2'}), 123,2 (CH, C_{5'}), 124,1 (CH, C_{6'}), 135,8 (Cq, C_{1'}), 142,2 (Cq, C_{3'}), 142,1 (Cq, C_{4'}), 149,8(Cq, C₇), 149,9(Cq, C₅), 155,0 (Cq, C₉), 174(Cq, C=O), 174,2(Cq, C=O), 174,6(Cq, C=O), 175,2 (Cq, C=O), 176,4 (Cq, C=O).

- ✓ Síntese de **AC1** (2E,2'E,2''E)-2-(3,4-bis(E)-but-2-enoiloxi)fenil)cromano-3,5,7-trial tris(but-2-enoato) (Figura 7):

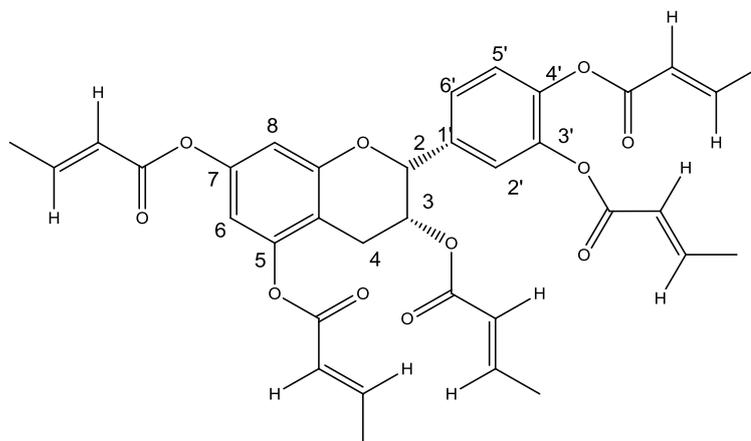


Figura 7: AC1.

Sob (-)-epicatequina (100 mg; 0,3448 mmol) foi adicionado DMF anidro (3 ml), após adicionou-se anidrido crotônico(511,1 µl; 3,448 mmol), em seguida DMAP (84,25 mg 0,6896 mmol). Então esta mistura permaneceu agitando a temperatura ambiente por 30 min. O produto reacional foi extraído sucessivamente com solução saturada de NaCl (2 x 20 ml) e água (1 x 20 ml) e CH₂Cl₂ (2 x 20 ml). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄, filtrada e após evaporada em evaporador rotatório.

O resíduo bruto foi purificado através de cromatografia em coluna de gel de sílica utilizando cicloexano - acetato de etila (80:20) como fase móvel. Desta maneira o composto oleoso **AC1** foi obtido (166 mg), com 76% de rendimento. Log P: 5.63 ± 0.76; IV: 1738(C=O de éster), 1264 (CH₃CO) cm⁻¹; m/z 653, 2404 [M+Na]⁺ consistente com a fórmula molecular C₃₅H₃₄O₁₁·Na (Calculado para 653, 7163); RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 2,0-1,75 (m, 15H, 5CH₃), 2,97 (m,

2H, CH₂, H₄), 5,14 (brs, 1H, CH, H₂), 5,45 (brs, 1H, CH, H₃), 5,69 (brs, 1H, CH), 5,73 (brs, 1H, CH), 5,95-6,05 (m, 3H, 3CH), 6, 62 (s, $J = 2.0$ Hz, 1H, CH, H₆), 6,71 (s, $J = 2.0$ Hz, 1H, CH, H₈), 6,85 (m, 2H, 2CH), 7,15 (m, 3H, 3CH), 7,21 (m, 1H, CH, H₅), 7,27 (m, 1H, CH, H₆), 7,35 (s, 1H, CH, H₂); APT (125 MHz, CDCl₃): δ 18,3-18,2 (4CH₃), 18,8 (CH₃), 26,5 (CH₂, C₄), 66,5 (CH, C₃), 76,8 (CH, C₂), 76,8 (CH, C₂), 76,8 (CH, C₂), 76,8 (CH, C₂), 108,0 (CH, C₈), 109,0 (CH, C₆), 109,8 (Cq, C₁₀), 121,3 (2CH), 121,4 (CH), 121,8 (CH), 121,9 (CH), 122,0 (CH, C₂), 123,2 (CH, C₅), 124,2 (CH, C₆), 135,7 (Cq, C₁), 142,2 (Cq, C₃), 142,1 (Cq, C₄), 145,9 (CH), 147,2 (CH), 147,6 (2CH), 147,8 (CH), 149,8 (2Cq, C₇C₅), 155,0 (Cq, C₉), 163,4 (Cq, C=O), 163,5 (Cq, C=O), 163,7 (Cq, C=O), 164,4 (Cq, C=O), 165,6 (Cq, C=O).

4.4.3. Síntese de derivados da delphinidina

- ✓ Acetilação da epicatequina **MA01** (2*R*,3*R*)-2-(3,4-diacetoxifenil)cromano-3,5,7-triacetato). Obtido conforme já descrito na secção 4.4.2. Síntese dos derivados acilados (Figura 2).
- ✓ Síntese de **MABr1** (2*R*,3*R*)-8-bromo-2-(3,4-diacetoxifenil)cromano-3,5,7-triacetato (Figura 8):

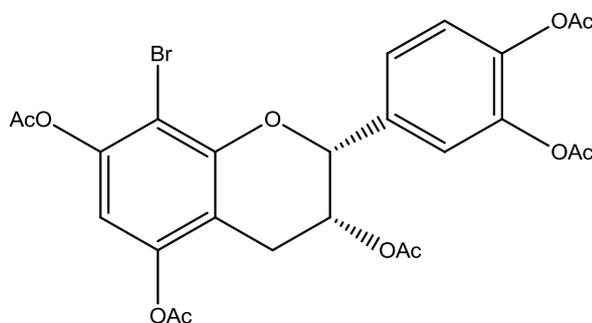


Figura 8: MABr1.

Na solução de epicatequina acetilada (**MA01**) (100 mg; 0,2 mmol) em CH_2Cl_2 (2 ml) a 0°C , NBS (0,2 mmol; 35,6 mg) foi adicionado. Então esta mistura permaneceu a temperatura ambiente agitando por 4h. A reação foi interrompida com adição de solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e agitada por 10 min até haver separação das fases. A fase aquosa foi extraída com CH_2Cl_2 . A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 filtrada e concentrada a vácuo. O resíduo bruto foi purificado para retirada de pequenas impurezas através de cromatografia em camada delgada preparativa utilizando cicloexano- AcOEt (85:15) como fase móvel.

Desta maneira o composto **MABr1** foi obtido, resultando em um sólido amarelado, com 94% de rendimento. Log P: 1.76 ± 0.54 ; RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 1,91-2,29 (s, 15H, 5 CH_3), 2,93 (m, 2H, CH_2 , H_4), 5,11 (brs, 1H, CH, H_2), 5,39 (brs, 1H, CH, H_3), 6,67 (brs, 1H, CH, H_6), 7,20 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, CH, H_5), 7,26 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, CH, H_6'), 7,35 (brs, 1H, CH, H_2'); APT (125 MHz,

CDCI₃): δ 20,6-21,0 (5CH₃), 26,0 (CH₂, C₄), 66,5 (CH,C₃), 76,5 (CH, C₂), 108,0 (Cq, C₈), 108,8 (CH, C₆), 109,6 (Cq, C₁₀), 122,1 (CH, C_{2'}), 123,2 (CH, C₅), 124,4 (CH, C_{6'}), 135,8 (Cq, C_{1'}), 141,9 (Cq, C_{3'}), 142,1(Cq, C_{4'}), 149,6 (Cq, C₇), 149,5 (Cq, C₅), 155,0 (Cq, C₉), 167,8 (2Cq, C=O), 168,4 (Cq, C=O), 169 (Cq, C=O), 170,4 (Cq, C=O).

- ✓ Síntese de **MABrGS** (2*R*,3*S*)-8-bromo-2-(3,4-diacetoxifenyl)-4-(etoximetoxi)cromano-3,5,7-trial triacetato (Figura 9):

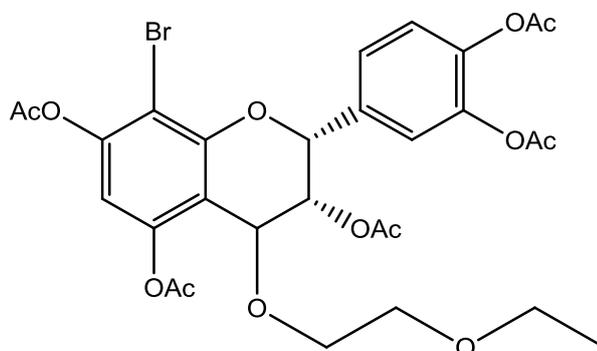


Figura 9: MABrGS.

A uma solução de **MABr1** (100 mg; 0,2 mmol) em THF (3 ml) e 2-etoxietanol (250 µl) a 0°C sob atmosfera de N₂, foi adicionado gota a gota DDQ (0,4 mmol; 90,8 mg), previamente solubilizado em THF(2ml), então esta mistura permaneceu a temperatura ambiente agitando por 2h. O produto reacional foi extraído sucessivamente com solução saturada de NaCl (2 x 20 ml) e água (1 x 20 ml) e CH₂Cl₂ (2 x 20 ml). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄, filtrada e após concentrado.

Mesmo sob diversos sistemas de solventes, não foi possível separar o reagente de partida MABr1 do produto MABrGS, desta maneira o composto **MABrGS** foi obtido, mesmo em mistura com o reagente de partida, resultando em um sólido castanho, em mistura com o reagente de partida ao redor de

50%. Log P: 1.56 ± 0.63 ; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 1,20(m, 3H, CH_3), 1,91-2,27 (s, 15H, 5CH_3), 2,92 (m, 2H, CH_2 , H_4), 3,51 (m, 2H, CH_2), 3,71(m, 4H, CH_2), 5,09 (brs, 1H, CH, H_2), 5,37 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H, CH, H_3), 6,65 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, CH, H_6), 7,18 (dd, $J = 8,4; 1,8$ Hz, 1H, CH, H_5), 7,24(brs, 1H, CH, H_6), 7,33 (brs, 1H, CH, H_2); ^{13}C (101 MHz, CDCl_3): δ 15,1 (CH_3), 20,6 (CH_3), 20,8-20,7 (2CH_3), 21,1(CH_3), 25,5 (CH_3), 26,0 (CH_2 , C_4 , MABr1), 61,9 (CH_2), 66,5 (CH, C_3), 66,6 (CH_2), 67,8 (CHO, C_4 , MABrGS), 71,5 (CH_2), 76,5 (CH, C_2), 108,0 (Cq, C_8), 108,8 (CH, C_6), 109,6 (Cq, C_{10}), 122,0 (CH, C_2), 123,2 (CH, C_5), 124,5 (CH, C_6), 135,8 (Cq, $\text{C}_{1'}$), 141,8 (Cq, C_3), 141,9 (Cq, C_4), 149,6 (Cq, C_7), 149,7 (Cq, C_5), 155,0 (Cq, C_9), 168,3 (Cq, $\text{C}=\text{O}$), 168,4 (Cq, $\text{C}=\text{O}$), 168,5(Cq, $\text{C}=\text{O}$), 169 (Cq, $\text{C}=\text{O}$), 170,5 (Cq, $\text{C}=\text{O}$).

- ✓ Tentativa de Síntese do Dímero (**Di01**) (*2R,2'R,3R,3'R*)-8-bromo-2,2'-bis(3,4-diacetoxifenil)-[4,8'-bicromano]-3,3',5,5',7,7'-hexaacetato (Figura 10):

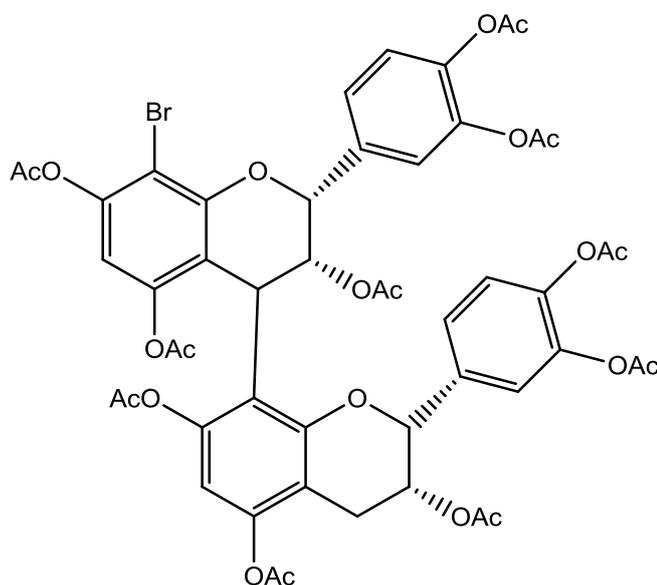


Figura 10: Di01.

A uma mistura de **MABrGS** (50 mg; 0,0763mmol) e **MA01** (57,3 mg; 0,114 mmol) em THF (2ml) foi adicionado TMSOTf (13,8 μl ; 0,0749 mmol) gota a gota a -78°C por 1h, sob atmosfera de N_2 . A reação continuou a temperatura

ambiente pelas próximas 3 horas e foi interrompida pela adição de solução saturada de NaHCO_3 . O produto reacional foi extraído sucessivamente com solução saturada de NaCl (2 x 20 ml) e água (1 x 20 ml) e CH_2Cl_2 (2 x 20 ml). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 , filtrada e após concentrado.

Por CCD pode-se perceber que não houve alteração de R_f comparado com o reagente de partida MABrGS1. Os espectros de RMN de H^1 e C^{13} não demonstraram mudança se comparado com MABrGS1. Concluímos que não houve formação do produto desejado.

A mesma reação de acoplamento foi testada com diversos ácidos de Lewis (TiCl_4 , $\text{BF}_3\text{-OEt}_2$, TMSOTf), em diferentes condições reacionais e se comportou da mesma forma. Esta reação será discutida a seguir.

4.5. Resultados e Discussão

A partir dos estudos já com catequinas e suas promissoras atividades biológicas já relatadas, a síntese destas duas séries de compostos foi proposta, de modo a alterar os substituintes, o grau de substituição e de insaturação das moléculas protótipos.

Sobre a síntese de derivados da epicatequina, usando diversos anidridos não há muitos registros na literatura, dando origem a derivados acilados. A síntese de compostos derivados da delphinidina, é mais explorada, entretanto, não foi encontrada relatos da síntese destes compostos visando à atividade de inibição da formação do biofilme.

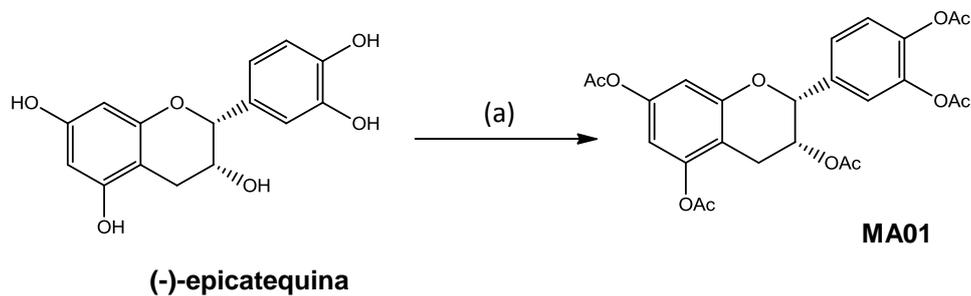
Através da reação de acilação obtivemos seis derivados, destes, cinco são inéditos (AP1, AIV1, AB1, AIB1, AC1). Esta reação consiste na esterificação das hidroxilas da epicatequina com anidridos diversos e ocorre através do ataque nucleofílico da hidroxila sobre o carbono carbonílico do anidrido, seguido de eliminação do ácido correspondente.

A primeira molécula desta série a ser sintetizada, foi o MA01 para isso utilizou-se piridina como solvente e catalisador, porém mesmo com extração exaustiva em meio aquoso a piridina continuava presente sendo retirada apenas em bomba de vácuo, por um tempo prolongado. Assim para as reações subsequentes utilizamos DMAP como catalisador e DMF como solvente, assim a reação se processou rapidamente, sem problemas posteriores.

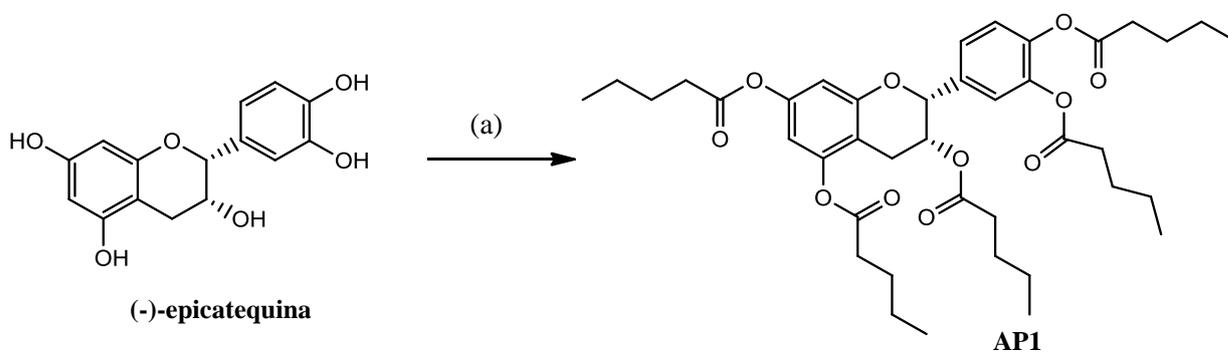
As reações com os anidridos utilizados são rápidas, se processam a temperatura ambiente, são fáceis de purificar, fornecem excelentes rendimentos (todos acima de 75%), desta forma obtivemos os produtos puros e em quantidades suficientes para andamento da pesquisa em relação a avaliação da atividade biológica proposta e a avaliação da toxicidade celular dos mesmos.

Para obtenção destes derivados foram utilizados anidridos comerciais dentro das condições experimentais apresentadas no esquema a seguir (Esquema 5).

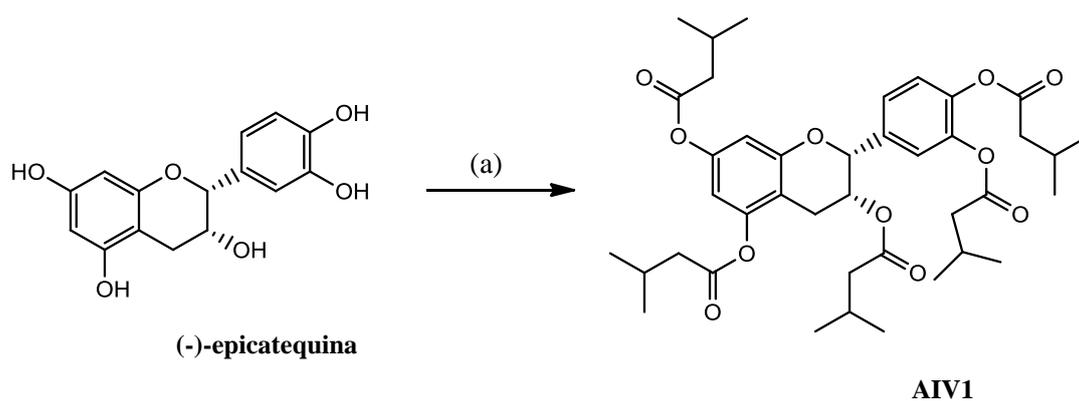
(A) Síntese de **MA01**. Condições de reação: (a) Ac_2O , Piridina, 0°C -ta, 24 h.



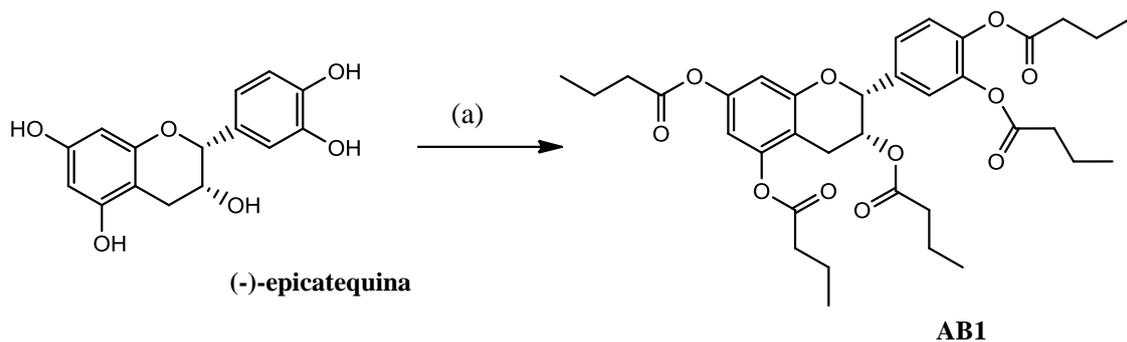
(B) Síntese de **AP1**. Condições de reação: (a) anidrido pentanóico, DMF, DMAP, ta, 30 min.



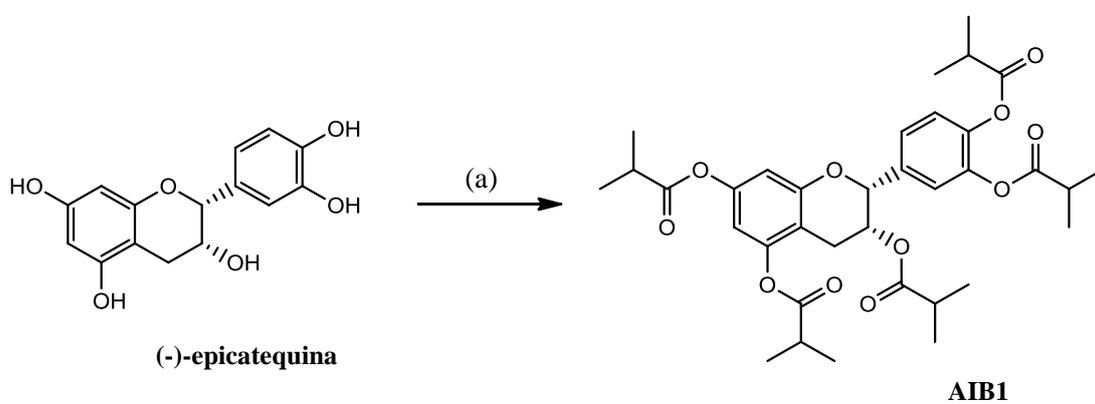
(C) Síntese de **AIV1**. Condições de reação: (a) anidrido isovalérico, DMF, DMAP, ta, 30 min.



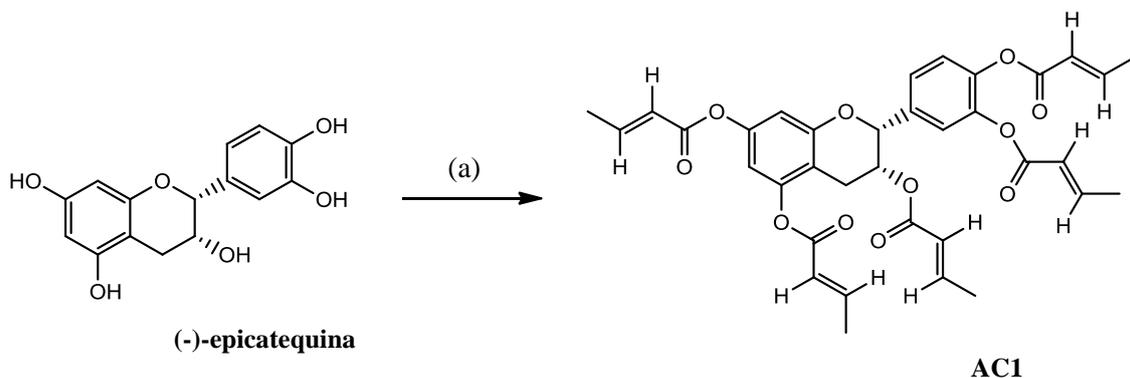
(D) Síntese de **AB1**. Condições de reação: (a) anidrido butírico, DMF, DMAP, ta, 30 min.



(E) Síntese de **AB1**. Condições de reação: (a) anidrido isobutírico, DMF, DMAP, ta, 30 min.



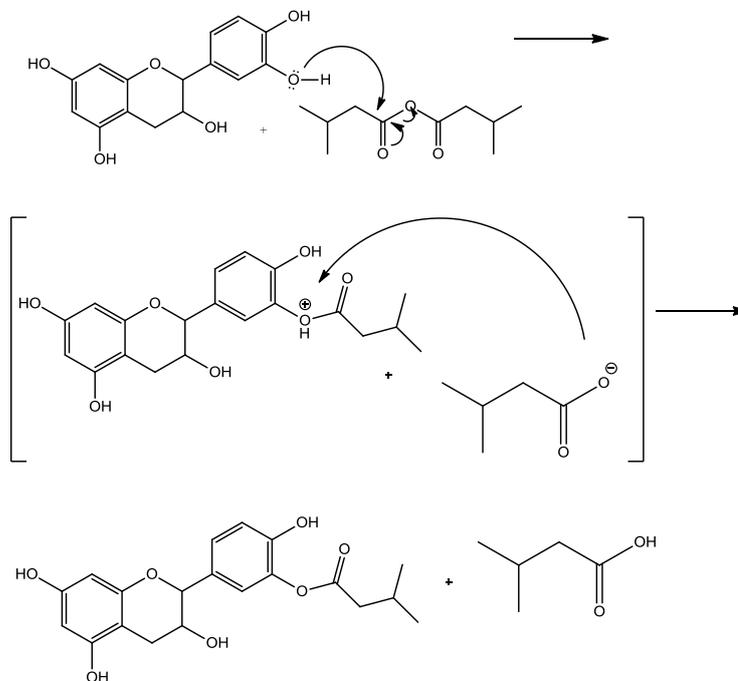
(F) Síntese de **AC1**. Condições de reação: (a) anidrido crotônico, DMF, DMAP, ta, 30 min.



Esquema 5: Síntese de derivados acilados da epicatequina.

O mecanismo proposto para reação de acilação se dá por meio de uma substituição nucleofílica. Primeiramente ocorre o ataque do nucleófilo (OH^-) da epicatequina ao carbono carbonílico do anidrido ocorrendo quebra da ligação C-O do anidrido pelo deslocamento dos elétrons. Após ocorre rearranjo dos

elétrons e a ligação C=O se refaz, formando um intermediário carregado negativamente que imediatamente capta H⁺ para se estabilizar. Assim temos a formação de um ácido carboxílico e de um aril éster (SOLOMOS, 2001) (Esquema 6).



Esquema 6: Mecanismo de reação de acilação para síntese dos derivados acilados.

A seguir serão apresentados os resultados e discussão da caracterização dos compostos sintetizados via acilação.

Na síntese de **MA01**, por CCD pode-se perceber que houve mudança no R_f comparado com o reagente de partida epicatequina e que houve formação de um produto majoritário mais apolar que ao ser revelado com anisaldeído apresentava coloração alaranjada. MA01 possui Log *P*: 1.08 ± 0.45 e foi obtido como um sólido bege, com 89% de rendimento. Apresentou um pico do íon molecular em *m/z* 523,1417 [M+Na]⁺ consistente com a fórmula molecular C₂₅H₂₄O₁₁Na. O espectro de infravermelho (IV) apresentou a banda de deformação axial da ligação C=O de éster 1767 cm⁻¹ e banda referente às metilas de acila em 1202 cm⁻¹ (Figura 11). O espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) (500 MHz, CDCl₃) de ¹H apresentou sinais

correspondentes aos hidrogênios aromáticos do anel A e B da (-)-epicatequina em δ 5,39 (brs, 1H, CH-OH, H₃), 5,11 (brs, 1H, CH, H₂), 6,57 (brs, 1H, CH, H₆), 6,67 (brs, 1H, CH, H₈), 7,20 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, CH, H₅), 7,26 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H, CH, H_{6'}), 7,35 (brs, 1H, CH, H_{2'}), e os sinais do anel C da (-)-epicatequina, δ 2,93 (m, 2H, CH₂, H₄). Ainda, podemos observar as cinco metilas de acila (CH₃CO) formadas após reação de acilação com anidrido acético em δ 1,91 (1CH₃) e 2,29 (4CH₃) (Figura 12). No espectro de APT (Figura 13) os sinais característicos da (-)-epicatequina podem ser visualizados em δ 26,0 (CH₂, C₄), 66,5 (CH, C₃), 76,5 (CH, C₂), 108,0 (CH, C₈), 108,8 (CH, C₆), 109,6 (Cq, C₁₀), 122,1 (CH, C_{2'}), 123,2 (CH, C₅), 124,4 (CH, C_{6'}), 135,8 (Cq, C_{1'}), 141,9 (Cq, C_{3'}), 142,1 (Cq, C_{4'}), 149,6 (Cq, C₇), 149,7 (Cq, C₅), 155,0 (Cq, C₉). As metilas de acila foram observadas em δ 20,6 (2CH₃) 20,7(2CH₃), 21,2(CH₃) e os sinais de C=O de éster tiveram deslocamento em δ 167,8 (2Cq), 168,4 (Cq), 169 (Cq), 170,4 (Cq) característicos deste grupo funcional. Estas atribuições foram possíveis através das correlações ¹H e ¹³C observadas no espectro de gHSQC (Figura 14) muito importante para atribuição dos substituintes.

Os dados espectrais de infravermelho e ressonância foram atribuídos conforme literatura específica (TASUMI, 2014; PAVIA, 2013; SOLOMOS, 2001 LAGE, 2011; ISHIHARA, 2014).

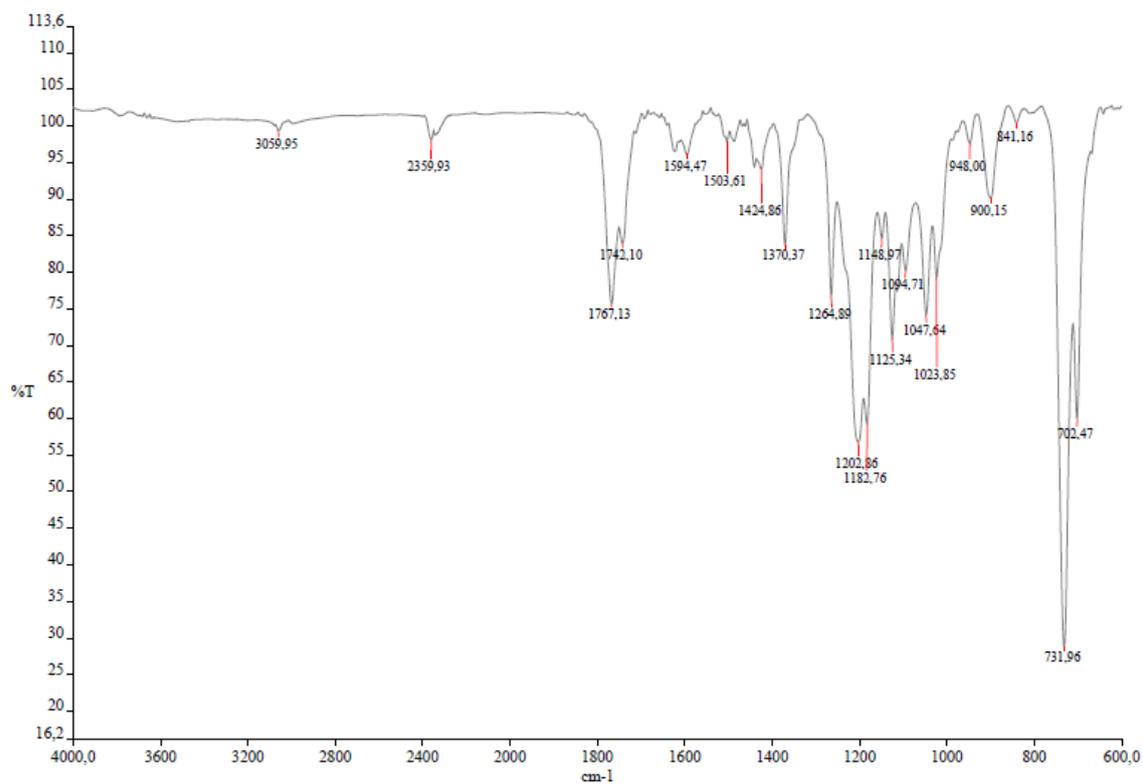


Figura 11: Figura: Espectro de infravermelho do composto MA01.

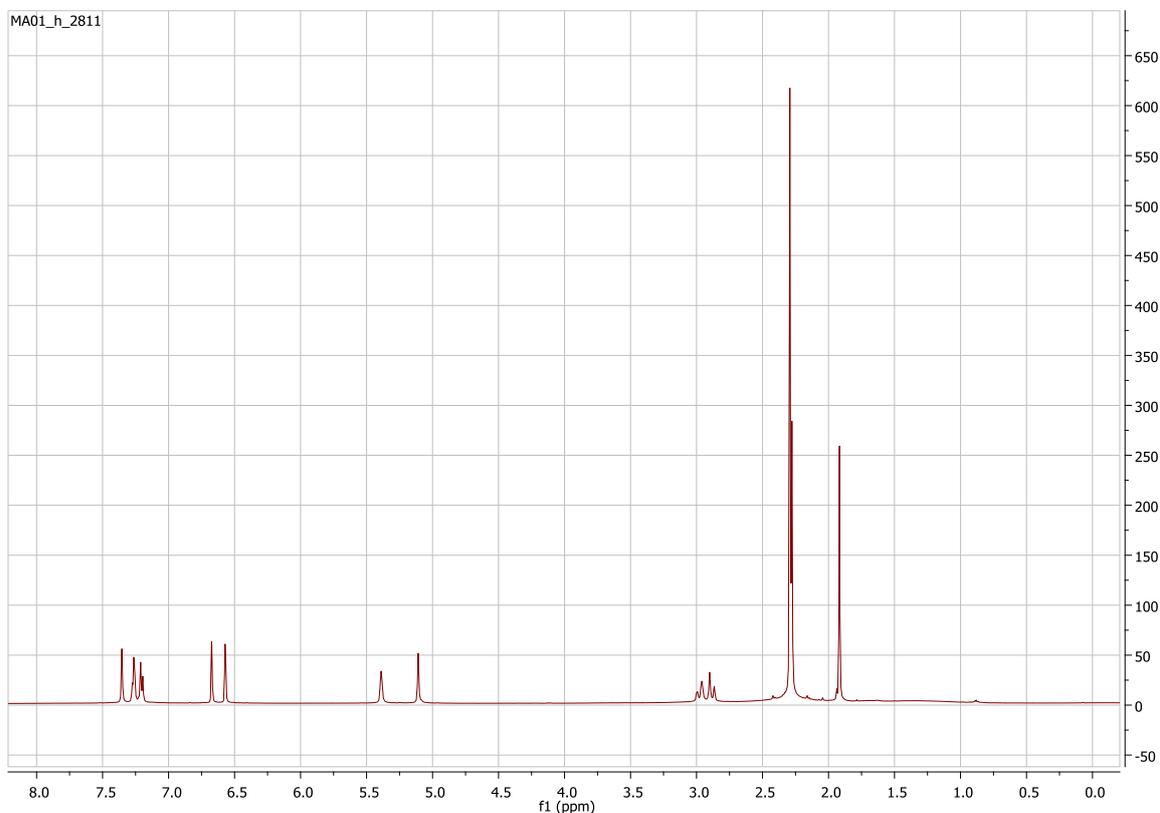


Figura 12: Espectro de RMN de ^1H do composto MA01 (CDCl_3 , 500 MHz).

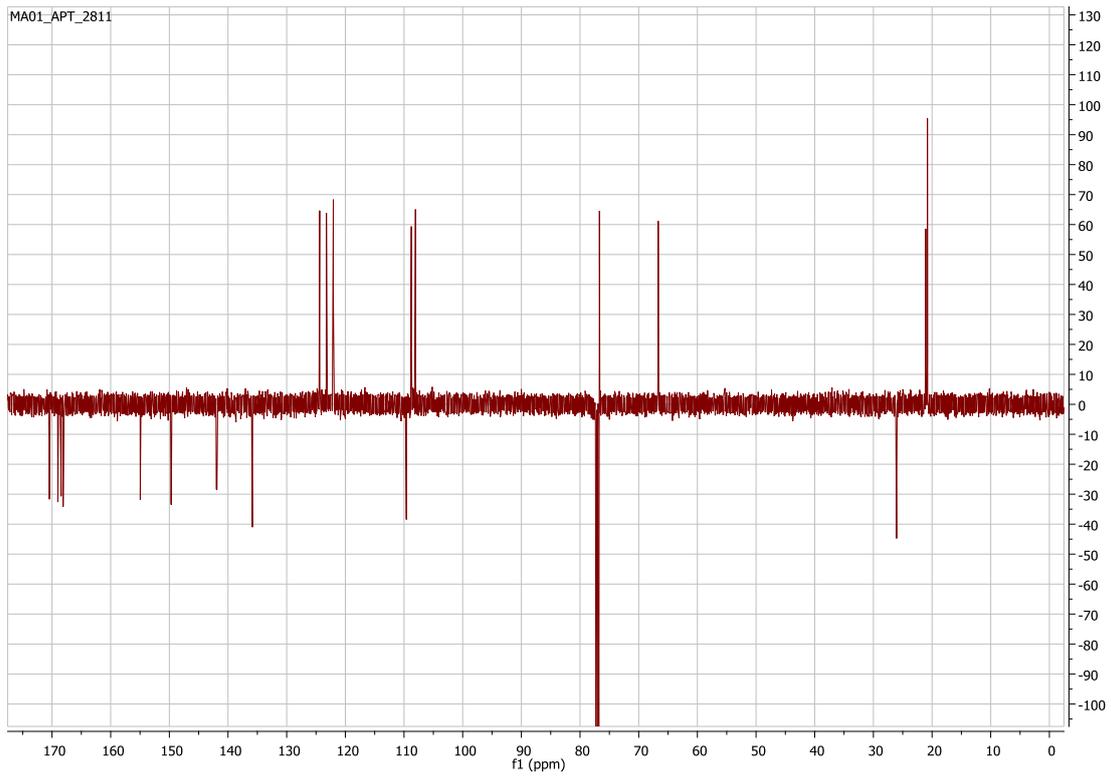


Figura 13: Espectro de APT do composto MA01 (CDCl_3 , 125 MHz).

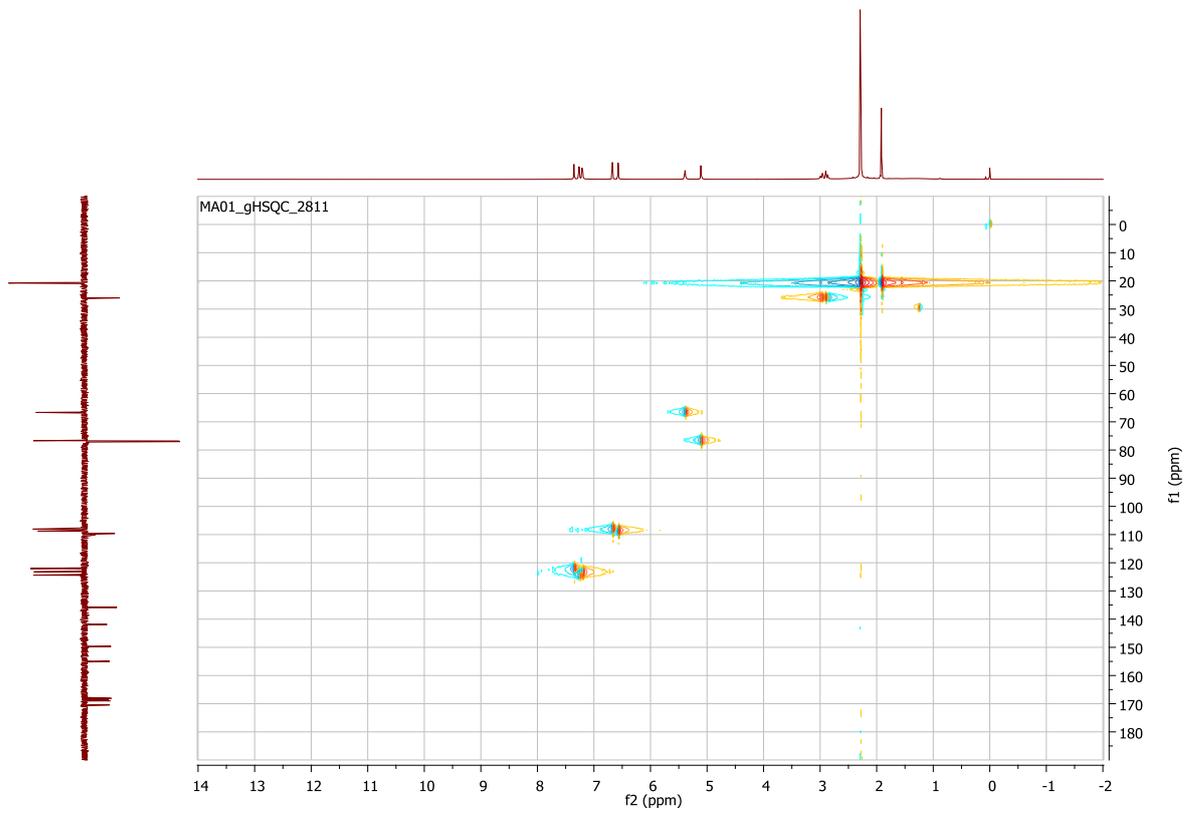


Figura 14: Espectro de gHSQC do composto MA01 (CDCl_3).

O composto inédito, **AP1** possui Log *P*: 9.29 ± 0.45 assim por CCD pode-se perceber que houve mudança no R_f comparado com o reagente de partida epicatequina e que houve formação um produto majoritário mais apolar, que ao ser revelado com anisaldeído apresentava coloração alaranjada. O composto **AP1** foi obtido como um produto oleoso amarelado, com 83,75% de rendimento, apresentou um pico do íon molecular em *m/z* 728, 9089 [M+H₂O]⁺ consistente com a fórmula molecular C₄₀H₅₄O₁₁·H₂O. O espectro de infravermelho (IV) apresentou a banda de deformação axial da ligação C=O de éster 1709 cm⁻¹ e banda referente às metilas de acila em 1264 cm⁻¹ (Figura 15). O espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H apresentou sinais referentes aos hidrogênios aromáticos do anel A e B da epicatequina, bem como sinais característicos do anel C, como descrito anteriormente em MA01. O composto AP1 se diferencia por apresentar sinais característicos dos substituintes como os sinais referentes aos CH₂ que podem ser vistos no espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H (Figura 16) com δ 1,15- 1,5 (m, 10H, 5CH₂), 1,60-1,80 (m, 10H, 5CH₂), 2,17-2,54(m, 10H, 5CH₂), ainda podemos observar δ 0,7-1,0 as cinco metilas formadas após reação de acilação com anidrido pentanóico.

No espectro de APT (Figura 17) os sinais característicos da epicatequina continuam presentes conforme descrito anteriormente, porém além dos sinais referentes da epicatequina, AP1 se diferencia por apresentar as metilas terminais observadas em 13,5 (CH₃), 13,6(3CH₃), 13,7 (CH₃), e os sinais de carbono quaternário de C=O de éster tiveram deslocamento 170,8 (2Cq), 171,3 (Cq), 171,9 (Cq), 173,3 (Cq) bem característico deste grupo funcional. Os CH₂ presentes observados com δ de 34,0 (CH₂), 33,8 (CH₂), 33,7 (3CH₂) são atribuídos a C-CH₂CO; δ 26,9 (CH₂), 26,7 (3CH₂), 26,6 (CH₂) foram atribuídos a C-CH₂-C; já os sinais com δ de 22,2 (CH₂), 22,2(2CH₂), 22,1 (CH₂), 21,9 (CH₂) foram atribuídos aos CH₂ vizinhos das metilas terminais (CH₂-CH₂-CH₃). O espectro de gHSQC (Figura 18) nos traz a correlação ¹H e ¹³C muito importante para atribuição dos substituintes, neste, podemos visualizar a

correlação dos CH₂ com δ de 34, 0-33,7 atribuídos aos C-CH₂CO com os hidrogênios característicos δ de 2,17-2,54, bem como a correlação dos CH₂ com δ de 26,9- 26,6 atribuídos aos C-CH₂-C, com seus hidrogênios característicos com δ de 1,60-1,80, a correlação dos CH₂ com δ de 22,2- 21,9 atribuídos aos CH₂-CH₂-CH₃ com seus hidrogênios característicos com δ 1,15-1,5. Os sinais das metilas no RMN de ¹H com δ de 0,7-1,0 correspondem aos δ de 13,7 -13,5 no ¹³C.

Os dados espectrais de infravermelho e ressonância foram atribuídos conforme literatura específica (TASUMI, 2014; PAVIA, 2013; SOLOMOS, 2001 LAGE, 2011; ISHIHARA, 2014).

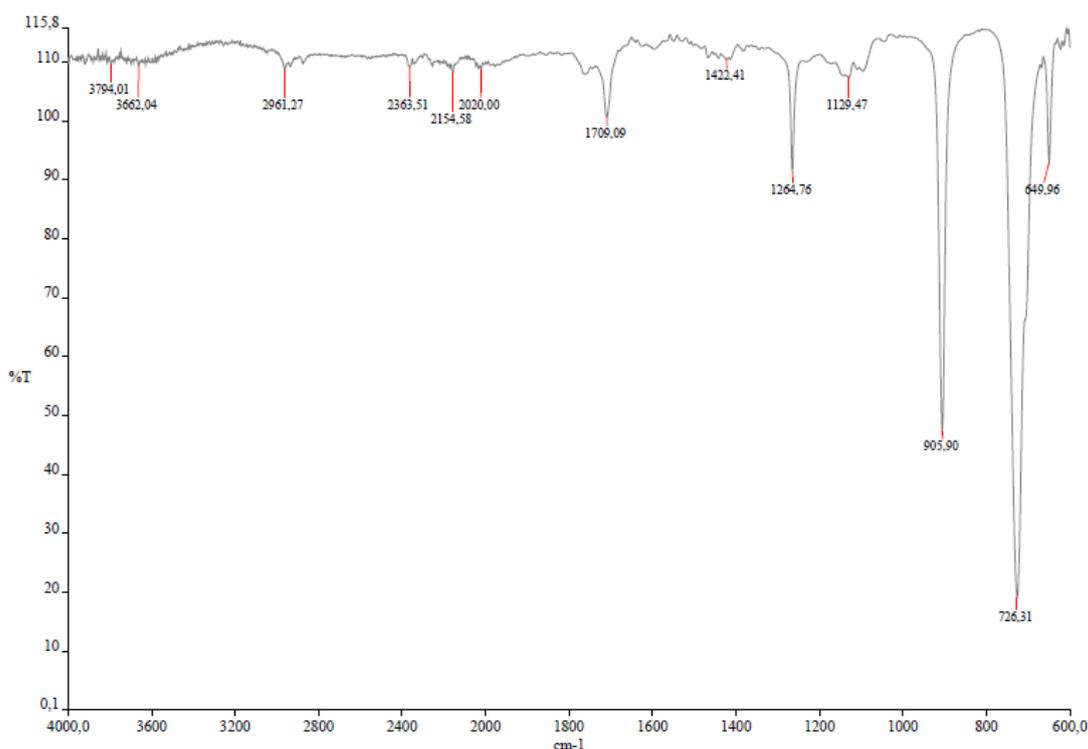


Figura 15: Espectro de infravermelho do composto AP1.

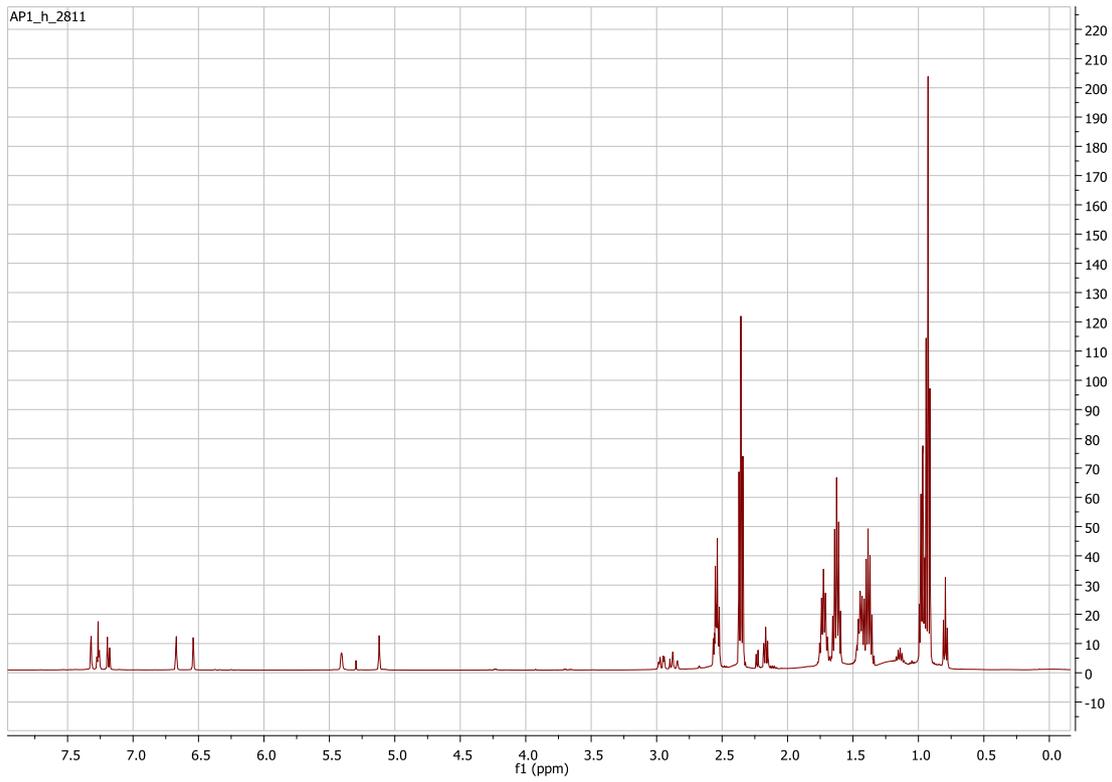


Figura 16: Espectro de RMN de ^1H do composto AP1 (CDCl_3 , 500 MHz).

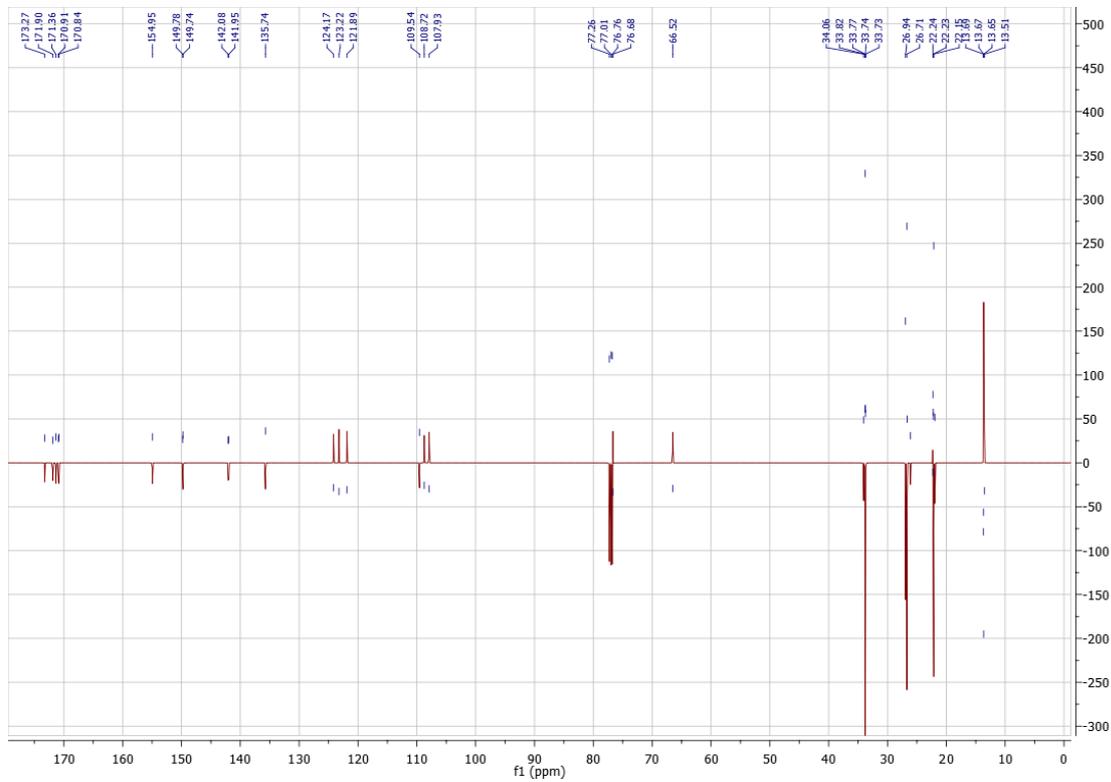


Figura 17: Espectro de APT do composto AP1 (CDCl_3 , 101 MHz).

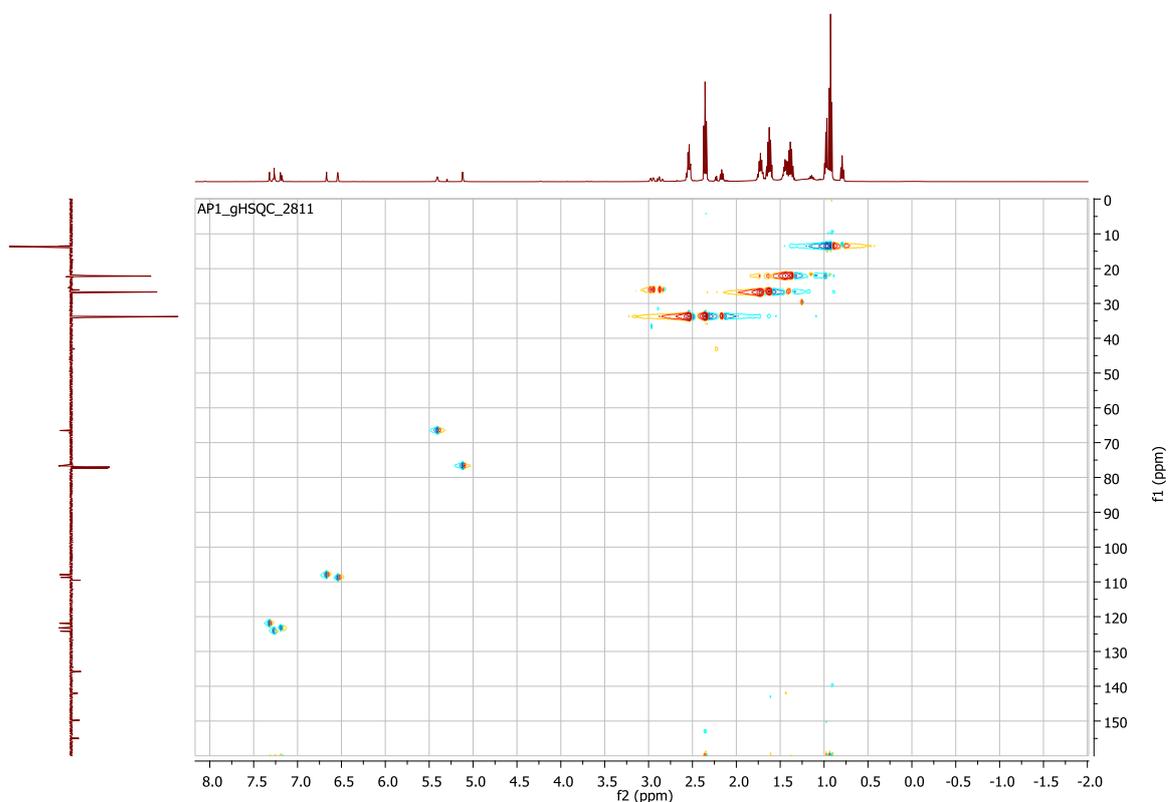


Figura 18: Espectro de gHSQC do composto AP1 (CDCl_3).

O composto inédito, **AIV1** possui $\text{Log P } 8.13 \pm 0.47$; assim por CCD pode-se perceber que houve mudança no Rf comparado com o reagente de partida epicatequina e que houve formação um produto majoritário mais apolar, que ao ser revelado com anisaldeído apresentava coloração alaranjada. O composto **AIV1** foi obtido como um produto oleoso amarelado, com 98,5 % de rendimento, apresentou um pico do íon molecular em m/z 728, 9068 $[\text{M}+\text{H}_2\text{O}]^+$ consistente com a fórmula molecular $\text{C}_{40}\text{H}_{54}\text{O}_{11}\cdot\text{H}_2\text{O}$. O espectro de infravermelho (IV) apresentou a banda de deformação axial da ligação $\text{C}=\text{O}$ de éster 1760 cm^{-1} e banda referente às metilas de acila em 1264 cm^{-1} (Figura 19). O espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H apresentou sinais referentes aos hidrogênios aromáticos do anel A e B da epicatequina, bem como sinais característicos do anel C, como descrito anteriormente em MA01.

O composto **AIV1** se diferencia por apresentar sinais característicos dos substituintes como os sinais referentes aos CH que podem ser vistos no espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H (Figura 20) com δ 2,0-2,23 (m, 5H, 5CH) os sinais referentes aos CH_2 com δ de 2,24-2,5 (m, 10H, 5 CH_2) e ainda é possível observar em δ 0,7-1,1 as dez metilas terminais formadas após reação de acilação com anidrido isovalérico. No espectro de APT (Figura 21) os sinais característicos da epicatequina continuam presentes conforme descrito anteriormente, porém além dos sinais referentes da epicatequina, AIV1 se diferencia por apresentar as metilas terminais observadas em 21,9 (CH_3), 22,1 (CH_3), 22,5-22,3 (8 CH_3), e os sinais de carbono quaternário de C=O de éster tiveram deslocamento de 170,1(2Cq), 170,6 (Cq), 171,3 (Cq), 172,6 (Cq) bem característico deste grupo funcional. Os CH_2 presentes são observados com δ de 43,3 (CH_2), 43,1(CH_2), 43,0(CH_2), 42,9 (2 CH_2), que foram atribuídos a C- CH_2 CO; os sinais em δ 25,8 (CH), 25,7 (CH), 25,6 (CH), 25,5 (CH), 25,4 (CH), foram atribuídos aos C-CH vizinhos das metilas terminais. O espectro de hsqCAD (Figura 22) nos traz a correlação ^1H e ^{13}C muito importante para atribuição dos substituintes, neste, podemos visualizar a correlação dos CH_2 com δ 43,3 -42,9 atribuídos aos C- CH_2 CO com os hidrogênios característicos com δ 2,24-2,5, bem como a correlação dos CH δ 25,8- 25,4 atribuídos aos C-CH, com seus hidrogênios característicos δ 2,0-2,23. Os sinais das metilas no RMN de ^1H com δ 0,7-1,1 correspondem a δ 22,5-21,9 no ^{13}C .

Os dados espectrais de infravermelho e ressonância foram atribuídos conforme literatura específica (TASUMI, 2014; PAVIA, 2013; SOLOMOS, 2001 LAGE, 2011; ISHIHARA, 2014).

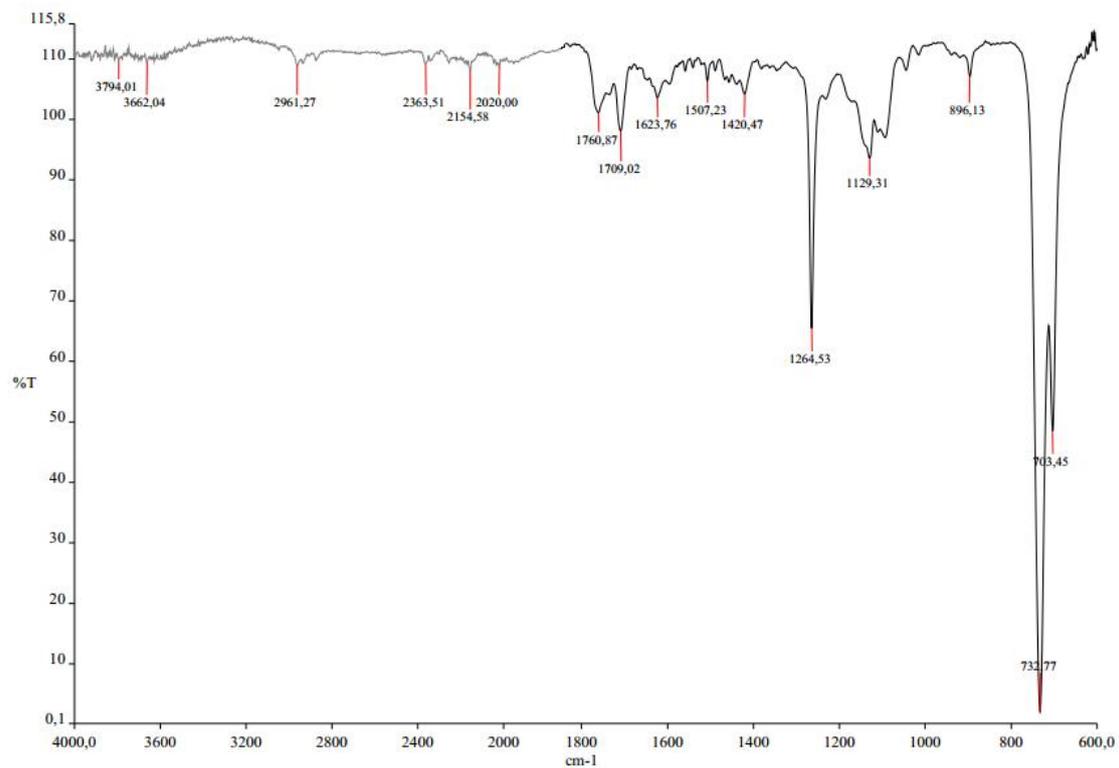


Figura 19: Espectro de infravermelho do composto AIV1.

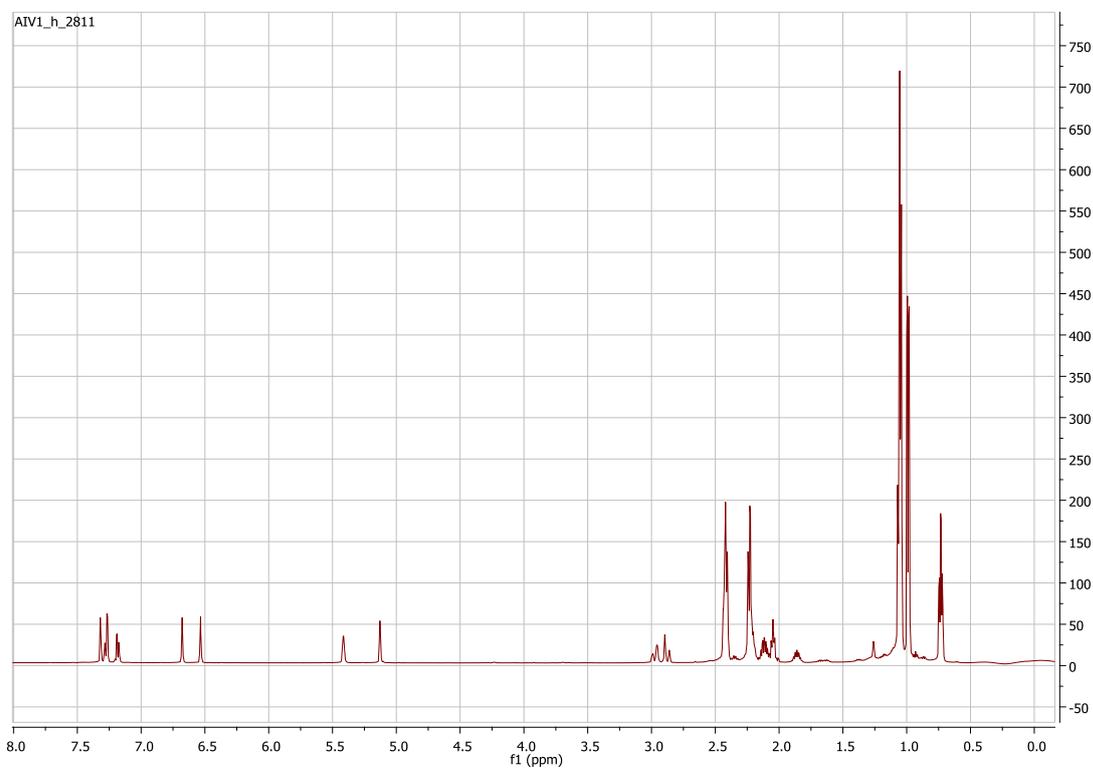


Figura 20: Espectro de RMN de ^1H do composto AIV1 (CDCl_3 , 500 MHz).

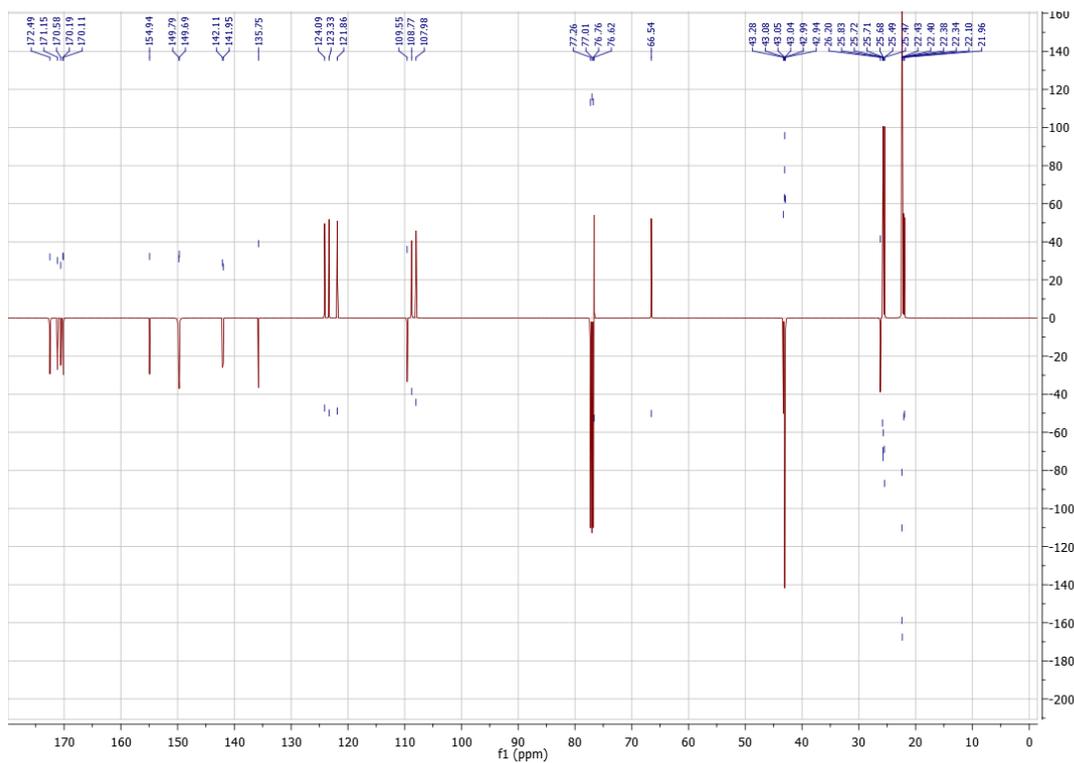


Figura 21: Espectro de APT do composto AIV1 (CDCl_3 , 101 MHz).

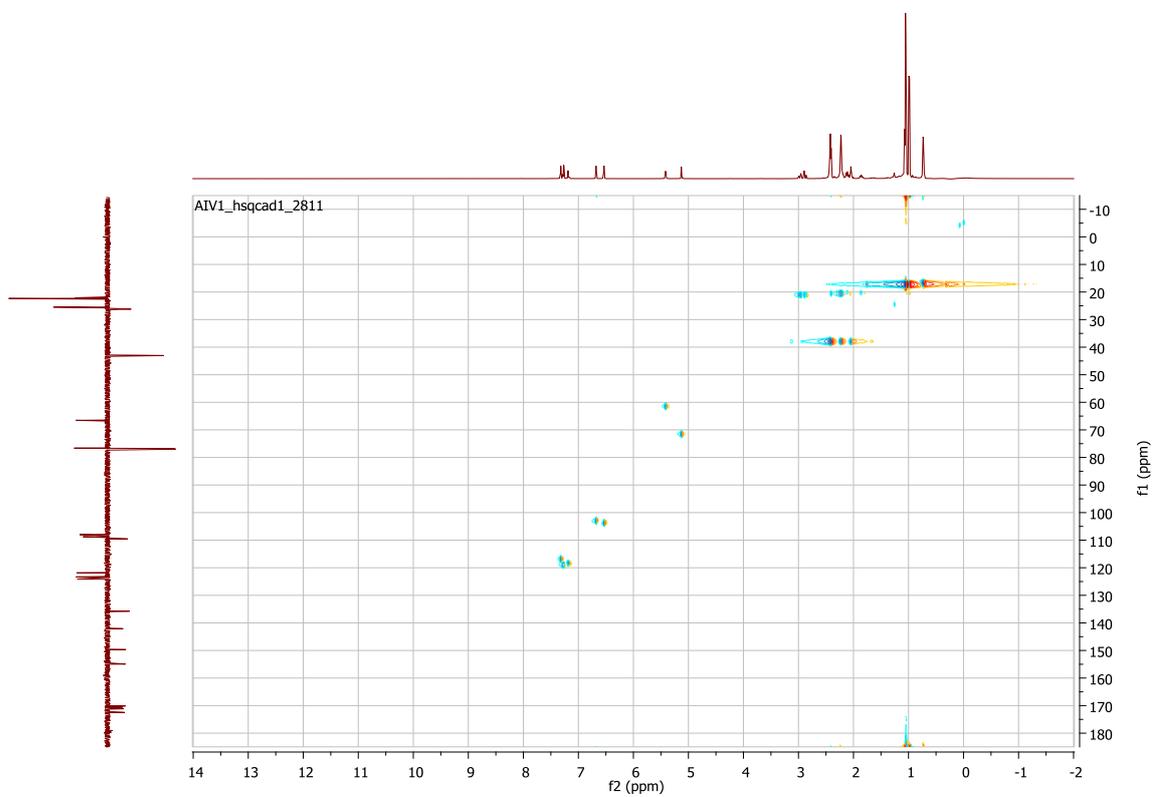


Figura 22: Espectro de hsqCAD do composto AIV1 (CDCl_3).

O composto inédito, **AB1** possui Log P: 6.40 ± 0.45 , assim por CCD pode-se perceber que houve mudança no Rf comparado com o reagente de partida epicatequina e que houve formação um produto majoritário mais apolar, que ao ser revelado com anisaldeído apresentava coloração alaranjada. O composto **AB1** foi obtido como um produto oleoso esbranquiçado, com 95,5% de rendimento, apresentou um pico do íon molecular em m/z 658, 7671 $[M+H_2O]^+$ consistente com a fórmula molecular $C_{35}H_{44}O_{11} \cdot H_2O$. O espectro de infravermelho (IV) apresentou a banda de deformação axial da ligação C=O de éster 1765 cm^{-1} e banda referente às metilas de acila em 1264 cm^{-1} (Figura 23). O espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H apresentou sinais referentes aos hidrogênios aromáticos do anel A e B da epicatequina, bem como sinais característicos do anel C, como descrito anteriormente em MA01. O composto AB1 se diferencia por apresentar sinais característicos dos substituintes como os sinais referentes aos CH_2 que podem ser vistos no espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H (Figura 24) com δ 1,4-1,8 (m, 10H, 5 CH_2), 2,1-2,6 (m, 10H, 5 CH_2), ainda podemos observar em torno de δ 0,7-1,1 as cinco metilas formadas após reação de acilação com anidrido butírico. No espectro de APT (Figura 25) os sinais característicos da epicatequina continuam presentes conforme descrito anteriormente, porém AB1 se diferencia por apresentar as cinco metilas terminais observadas em 13,3 (CH_3), 13,6 (4 CH_3) e os sinais de carbono quaternário de C=O de éster tiveram deslocamento para 170,7 (Cq), 170,8 (Cq), 171,2 (Cq), 171,7 (Cq), 173 (Cq) bem característico deste grupo funcional. Os CH_2 presentes observados com δ 36,2 (CH_2), 36,0 (CH_2), 35,9 (2 CH_2), 35,8 (CH_2) foram atribuídos aos C- CH_2 CO; δ 26,9 (CH_2), 26,7 (3 CH_2), 26,6 (CH_2) foram atribuídos aos C- CH_2 -C; os sinais com δ 18,4 (4 CH_2), 18,2(CH_2) foram atribuídos aos CH_2 vizinhos das metilas terminais (CH_2 - CH_2 - CH_3). O espectro de gHSQC (Figura 26) nos traz a correlação ^1H e ^{13}C muito importante para atribuição dos substituintes, neste, podemos visualizar a correlação dos CH_2 com δ 36, 2- 35,8 atribuídos aos C- CH_2 CO com os hidrogênios característicos com δ 2,1-2,6, bem como a correlação dos CH_2 com δ 26,9- 26,6 atribuídos aos C- CH_2 -C, com seus

hidrogênios característicos com δ 1,4-1,8. Os sinais das metilas no RMN de ^1H com δ 0,7-1,1 correspondem aos sinais δ 13,6- 13,3 no APT.

Os dados espectrais foram atribuídos conforme literatura específica (TASUMI, 2014; PAVIA, 2013; SOLOMOS, 2001 LAGE, 2011; ISHIHARA, 2014).

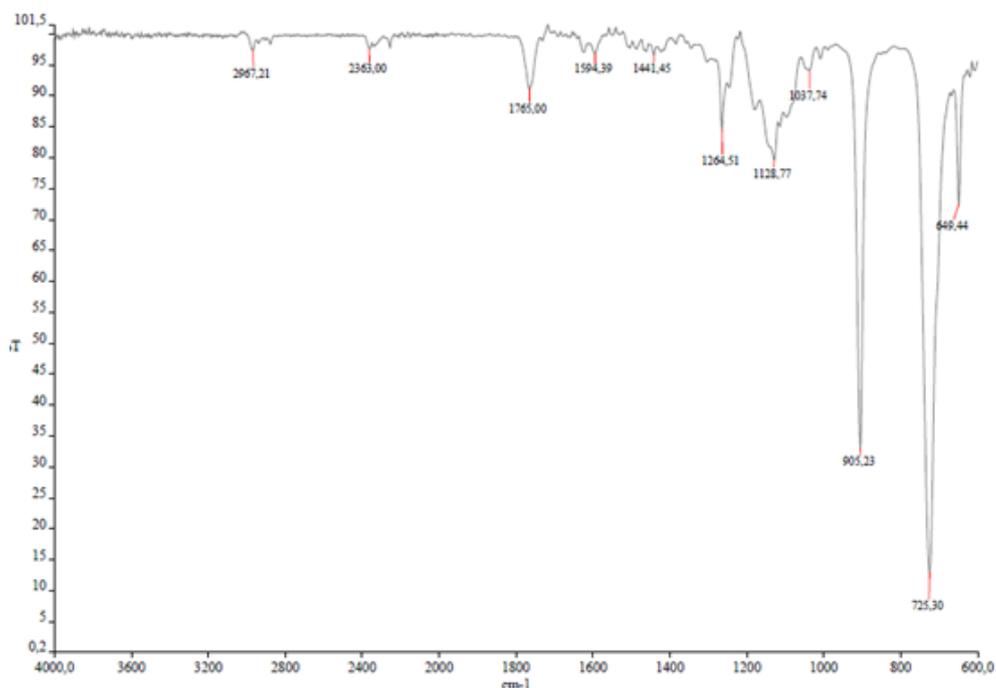


Figura 23: Espectro de infravermelho do composto AB1.

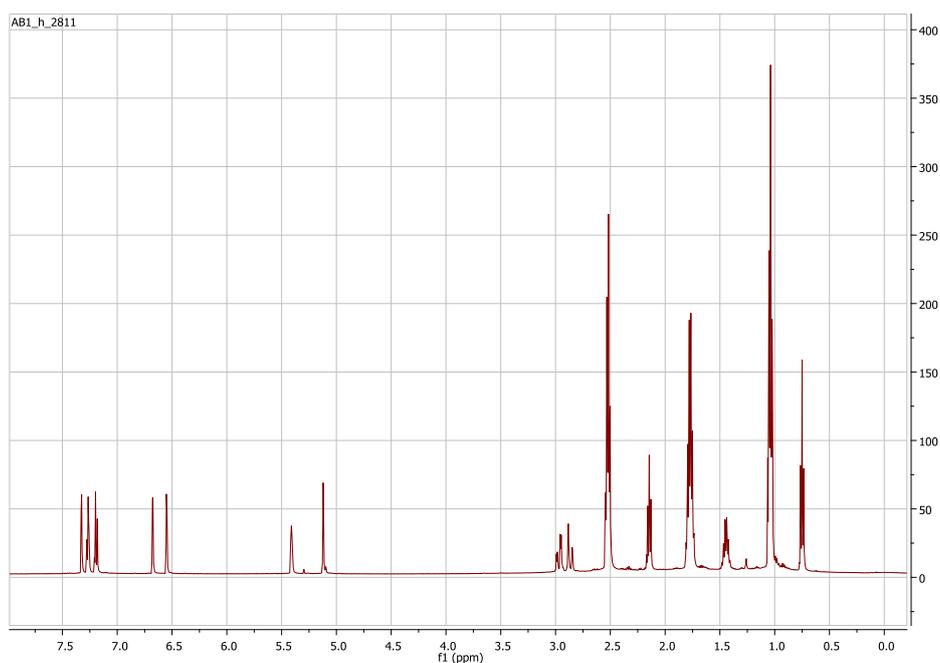


Figura 24: Espectro de RMN de ^1H do composto AB1 (CDCl_3 , 500 MHz).

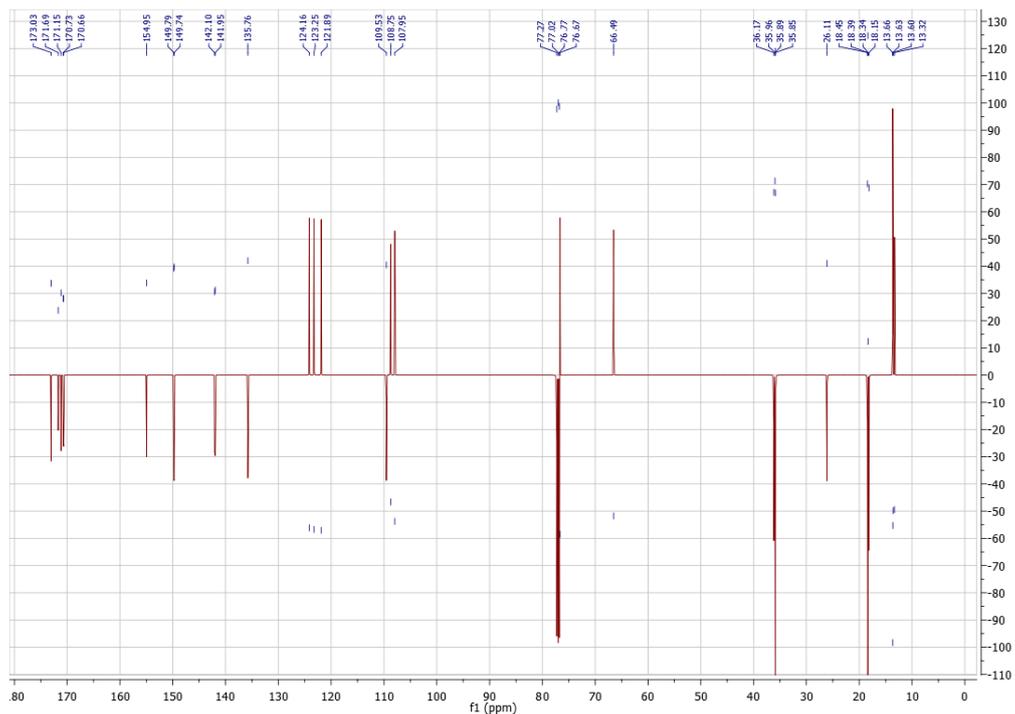


Figura 25: Espectro de APT do composto AB1 (CDCl_3 , 101 MHz).

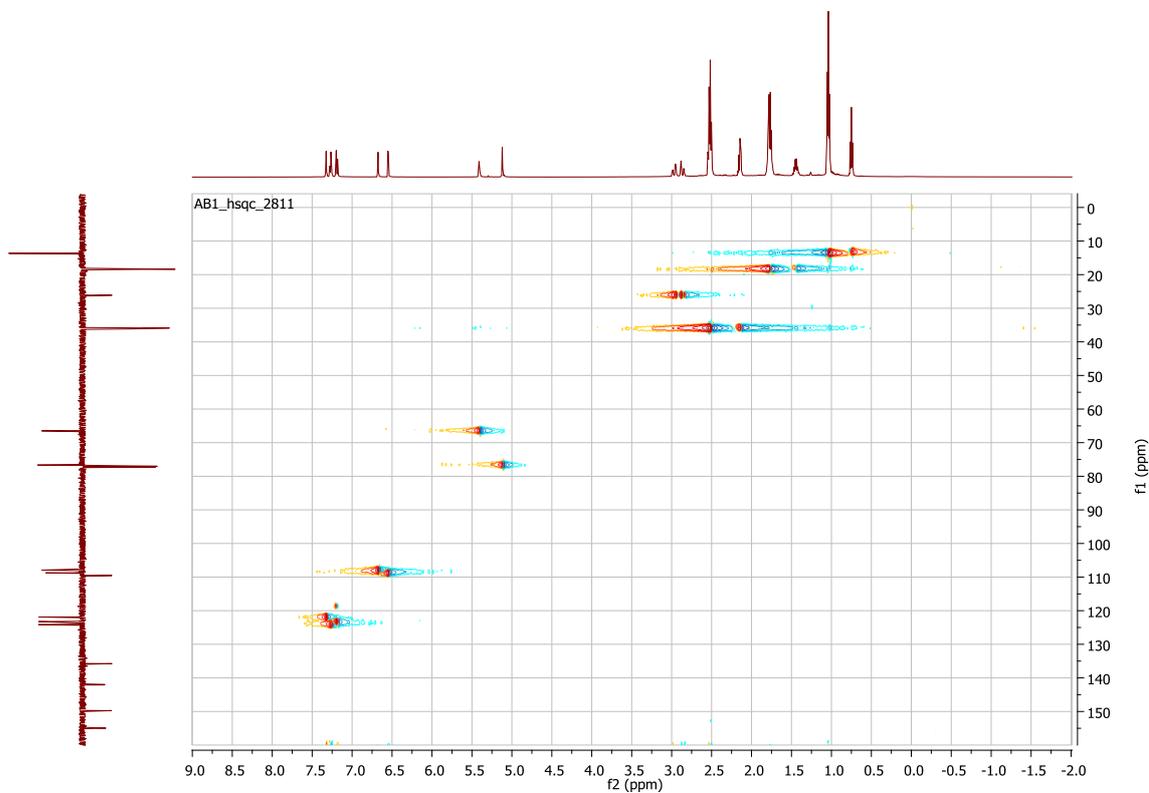


Figura 26: Espectro de HSQC do composto AB1 (CDCl_3).

O composto inédito, **AIB1** possui Log P: 5.48 ± 0.47 ; assim por CCD pode-se perceber que houve mudança no Rf comparado com o reagente de partida epicatequina e que houve formação um produto majoritário mais apolar, que ao ser revelado com anisaldeído apresentava coloração alaranjada. O composto **AIB1** foi obtido como um composto oleoso esbranquiçado, com 93 % de rendimento, apresentou um pico do íon molecular em m/z 663, 7181 $[M+Na]^+$ consistente com a fórmula molecular $C_{35}H_{44}O_{11} \cdot Na$. O espectro de infravermelho (IV) apresentou a banda de deformação axial da ligação C=O de éster 1761 cm^{-1} e banda referente às metilas de acila em 1264 cm^{-1} (Figura 27). O espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de 1H apresentou sinais referentes aos hidrogênios aromáticos do anel A e B da epicatequina, bem como sinais característicos do anel C, como descrito anteriormente em MA01.

O composto **AIB1** se diferencia por apresentar sinais característicos dos substituintes como os sinais referentes aos CH que podem ser vistos no espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de 1H (Figura 28) com δ 2,5-2,95 (m, 5H, CH), os sinais em torno de δ 0,9-1,35 que correspondem as dez metilas terminais formadas após reação de acilação com anidrido isobutírico. No espectro de APT (Figura 29) os sinais característicos da epicatequina continuam presentes conforme descrito anteriormente, porém **AIB1** se diferencia por apresentar as metilas terminais observadas em 19-18,7 (8CH₃), 18,5 (CH₃), 18,2 (CH₃) e os sinais de carbono quaternário de C=O de éster tiveram deslocamento para 174(Cq), 174,2(Cq), 174,6(Cq), 175,2 (Cq), 176,4 (Cq) bem característicos deste grupo funcional. Os CH presentes são observados com δ 34,2-34,0 (4CH), 33,8 (CH) são atribuídos aos CO-CHC. O espectro de gHSQC (Figura 30) nos traz a correlação 1H e ^{13}C muito importante para atribuição dos substituintes, neste, podemos visualizar a correlação dos CH com δ 34,2-33,8 atribuídos CO-CHC com os hidrogênios característicos com δ 2,5-2,95. Os sinais das metilas no RMN de 1H δ 0,9-1,35 correspondem δ de 19-18,2 no APT.

Os dados espectrais de infravermelho e ressonância foram atribuídos conforme literatura específica (TASUMI, 2014; PAVIA, 2013; SOLOMOS, 2001 LAGE, 2011; ISHIHARA, 2014).

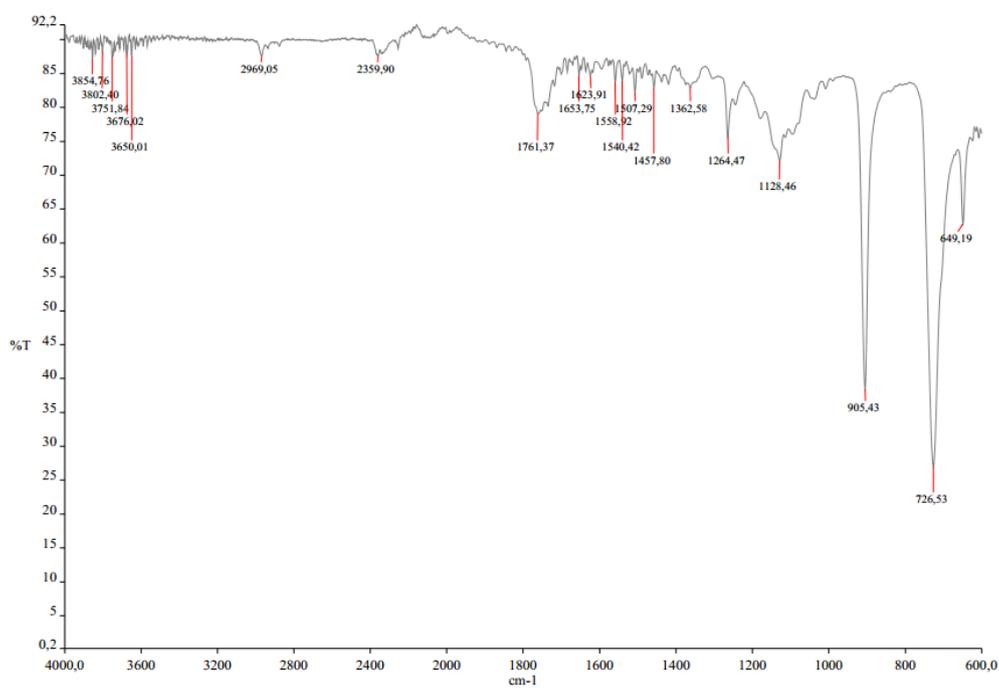


Figura 27: Espectro de infravermelho do composto AIB1.

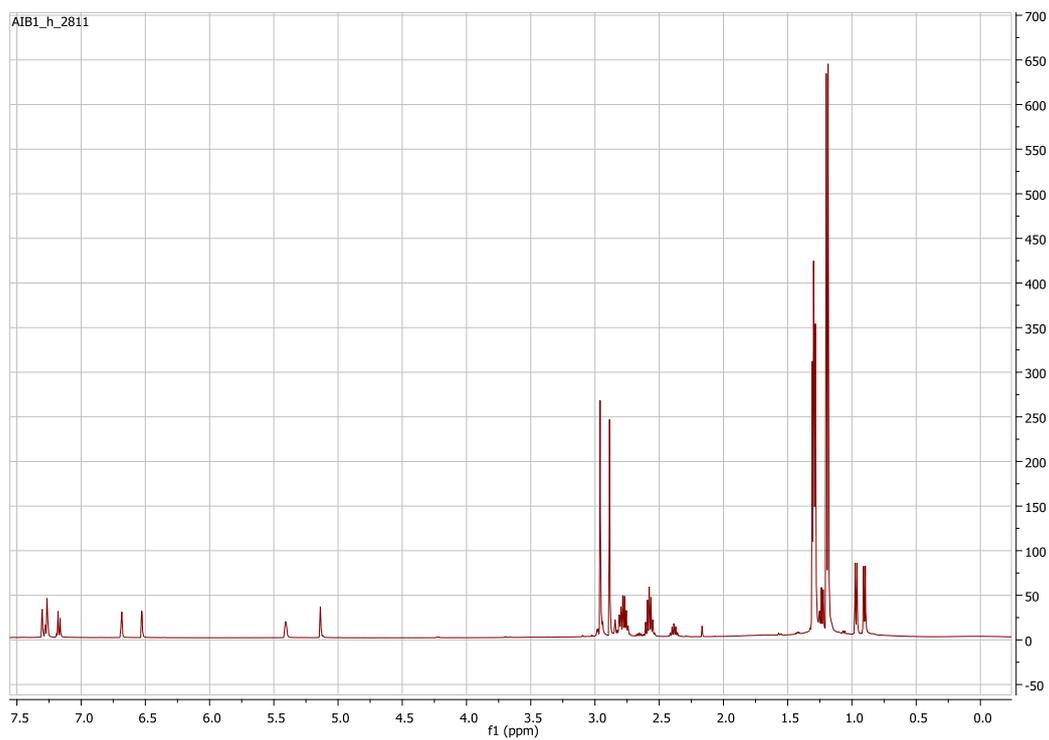


Figura 28: Espectro de RMN de ^1H do composto AIB1 (CDCl_3 , 500 MHz).

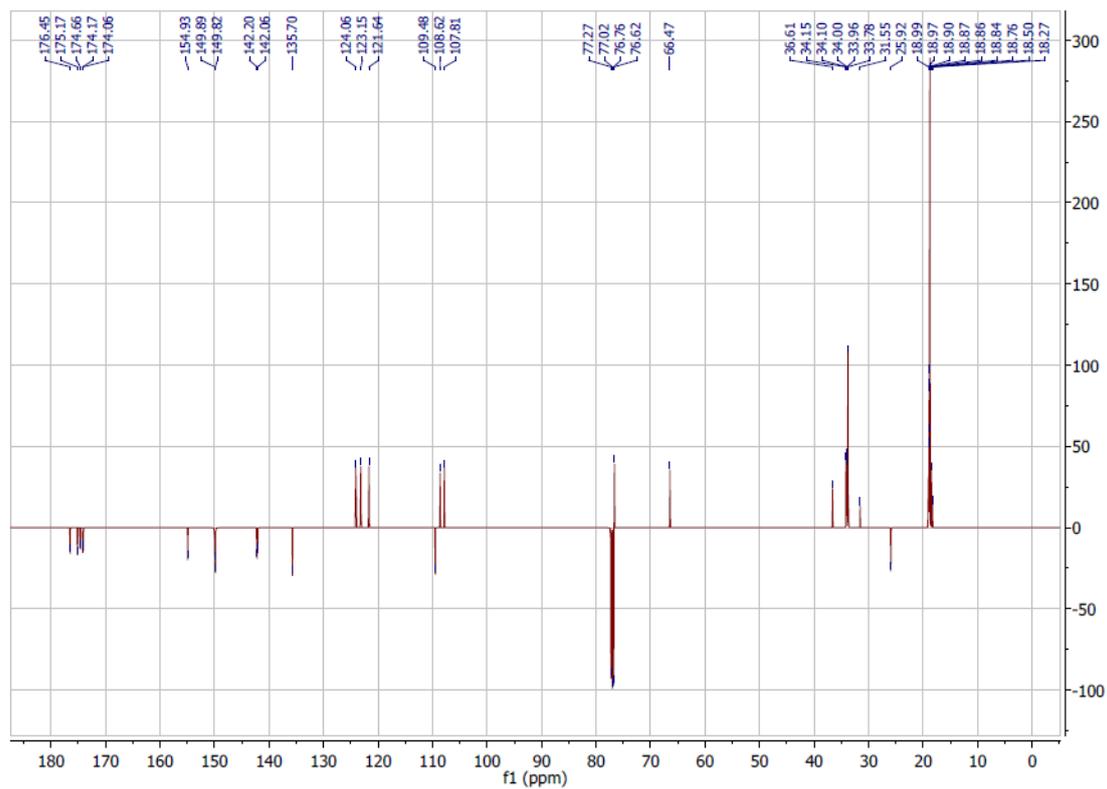


Figura 29: Espectro de APT do composto AIB1 (CDCl_3 , 101 MHz).

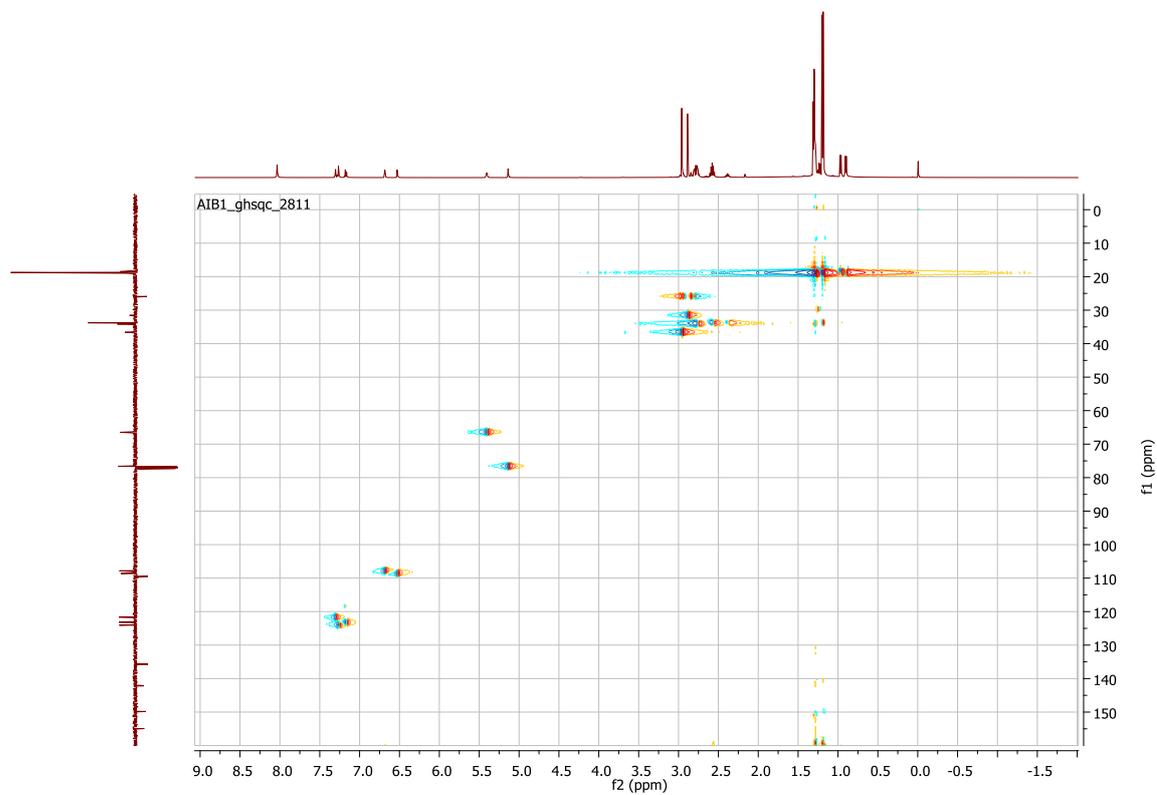


Figura 30: Espectro de gHSQC do composto AIB1 (CDCl_3).

O composto inédito, **AC1** possui Log P: 5.63 ± 0.76 ; assim por CCD pode-se perceber que houve mudança no Rf comparado com o reagente de partida epicatequina e que houve formação um produto majoritário mais apolar, que ao ser revelado com anisaldeído apresentava coloração alaranjada. O composto **AC1** foi obtido como um composto oleoso esbranquiçado, com 76,4 % de rendimento, apresentou um pico do íon molecular em m/z 653, 2404 $[M+Na]^+$, consistente com a fórmula molecular $C_{35}H_{34}O_{11} \cdot Na$. O espectro de infravermelho (IV) apresentou a banda de deformação axial da ligação C=O de éster 1738 cm^{-1} e banda referente às metilas de acila em 1264 cm^{-1} (Figura 31). O espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de 1H apresentou sinais referentes aos hidrogênios aromáticos do anel A e B da epicatequina, bem como sinais característicos do anel C, como descrito anteriormente em MA01. O composto **AC1** se diferencia por apresentar sinais característicos dos substituintes como os sinais referentes aos CH que podem ser vistos no espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de 1H (Figura 32) com δ 5,69 (brs,1H,CH), 5,73 (brs,1H, CH), 5,95-6,05 (m, 3H, 3CH), 6,85 (m,2H, 2CH), 7,15 (m,3H, 3CH), 2,5-2,95 (m, 5H, CH), os sinais em torno de δ 2,0-1,75 que correspondem as cinco metilas terminais formadas após reação de acilação com anidrido crotônico. No espectro de APT (Figura 33) os sinais característicos da epicatequina continuam presentes conforme descrito anteriormente, porém **AC1** se diferencia por apresentar as metilas terminais observadas em 18 (CH_3), 18,3-18,2 ($4CH_3$), e os sinais de carbono quaternário de C=O de éster que tiveram deslocamento 163,4 (Cq), 163,5 (Cq), 163,7 (Cq), 164,4 (Cq), 165,6 (Cq) bem característicos deste grupo funcional. Os CH presentes são observados com δ de 147,8 (CH), 147,6 (2CH), 147,2 (CH), 145,9 (CH) são atribuídos aos CO-CH-CH, os CH com δ de 121,9-121,8 (2CH), 121,4 (CH), 121,3 (2CH) são atribuídos aos CO-CH-CH-C. O espectro de gHSQC (Figura 34) nos traz a correlação 1H e APT muito importante para atribuição dos substituintes, neste, podemos visualizar a correlação dos CH com δ 147,8-145,9 atribuídos aos CO-CH-CH, com os hidrogênios característicos com δ 6,85- 7,15, bem como a correlação dos CH com δ 121,9-121,3 atribuídos aos CO-CH-CH-C, com os hidrogênios característicos com δ

5,69-6,05 ppm. Os sinais das metilas no RMN de ^1H com δ de 2,0-1,75 correspondem aos δ de 18,8-18,2 no APT.

Os dados espectrais de infravermelho e ressonância foram atribuídos conforme literatura específica (TASUMI, 2014; PAVIA, 2013; SOLOMOS, 2001 LAGE, 2011; ISHIHARA, 2014).

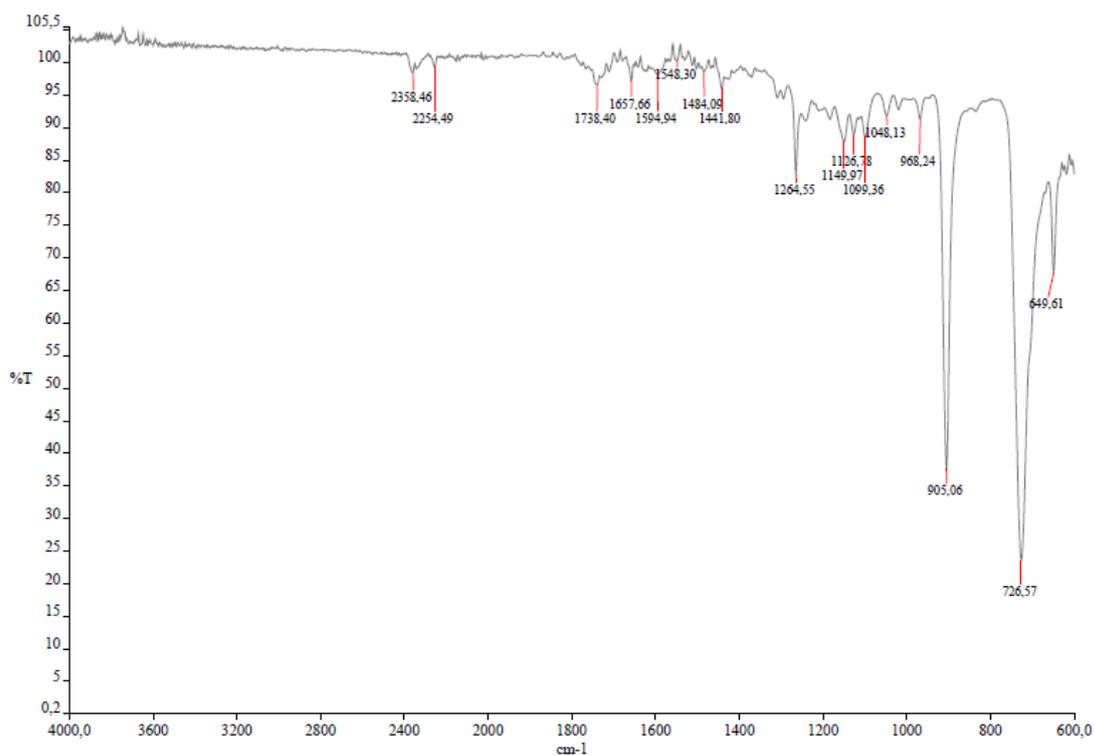


Figura 31: Espectro de infravermelho do composto AC1.

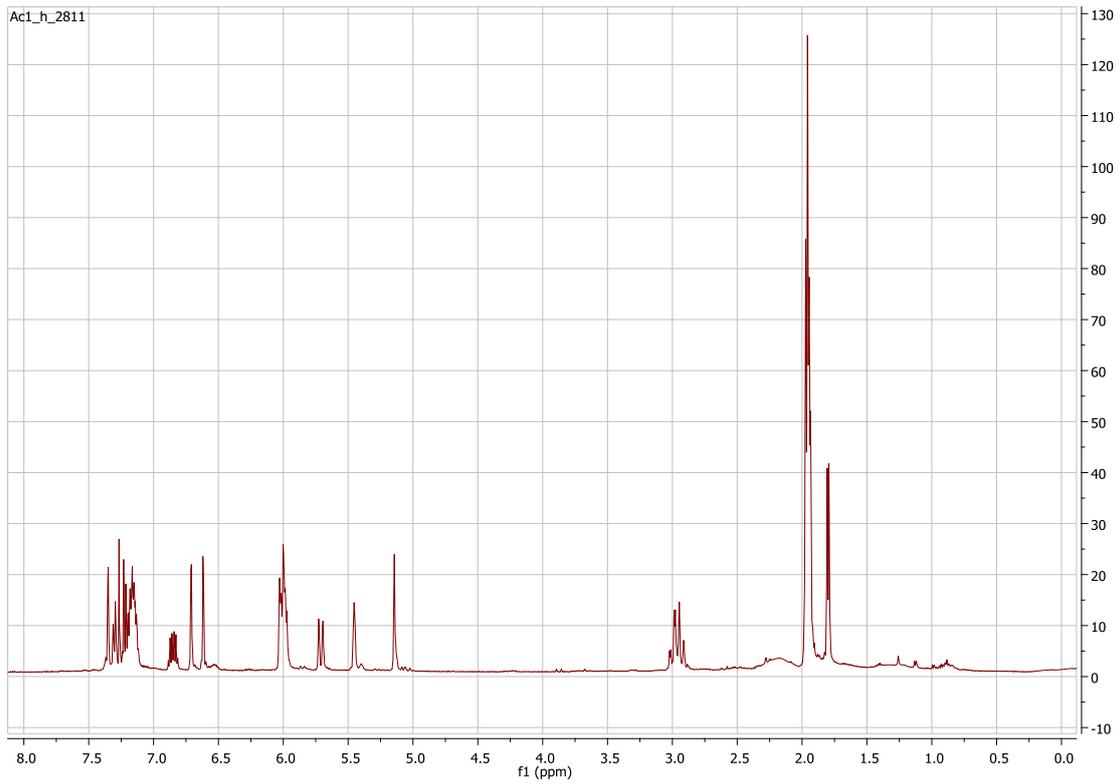


Figura 32: Espectro de RMN de ^1H do composto AC1 (CDCl_3 , 500 MHz).

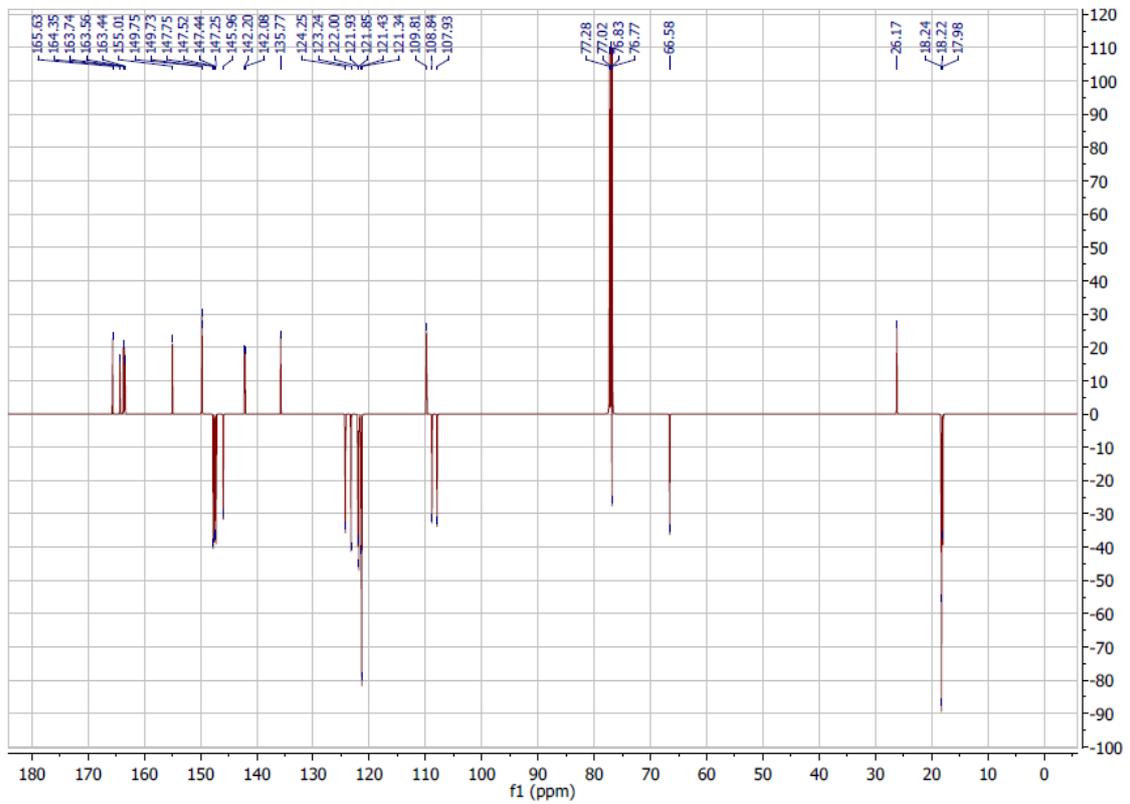


Figura 33: Espectro de APT do composto AC1 (CDCl_3 , 101 MHz).

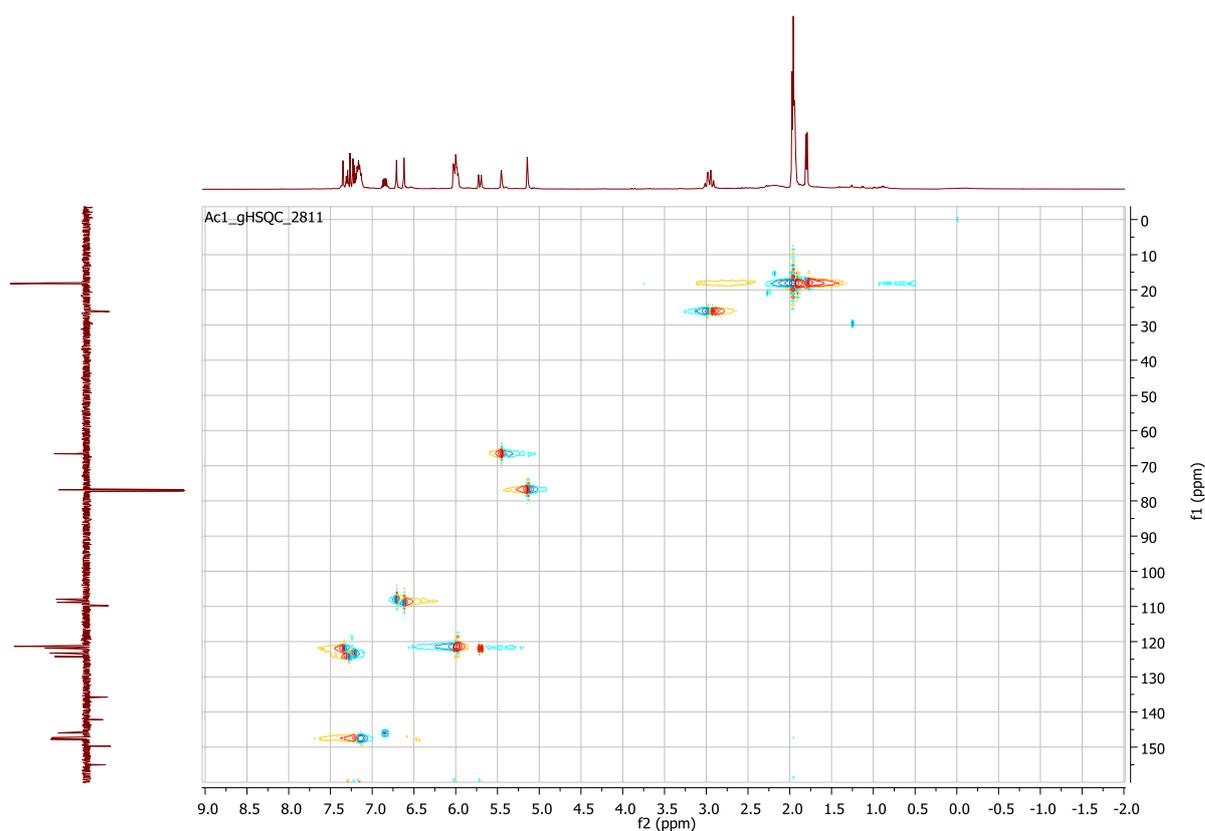


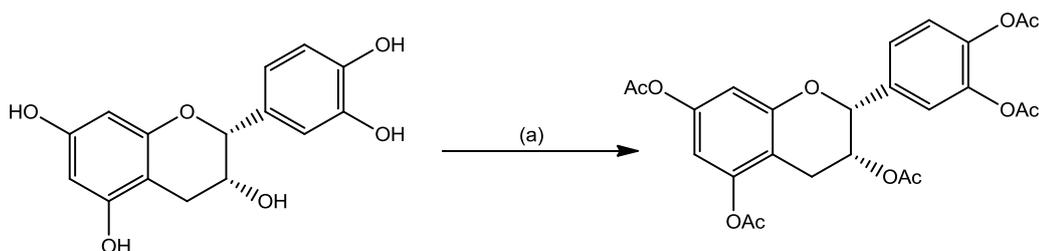
Figura 34: Espectro de gHSQC do composto AC1 (CDCl_3).

A fim de avaliarmos os derivados da delphinidina frente a atividade de inibição da formação do biofilme, do crescimento bacteriano e da erradicação do biofilme, a rota sintética de formação de dímeros a partir de catequinas foi proposta.

O primeiro passo desta rota sintética como já comentado acima, é a proteção dos grupamentos hidroxilas. O grupo benzila é o grupo mais utilizado para proteger as hidroxilas na síntese de procianidinas. No enquanto esta síntese não foi possível devido à formação de diversos subprodutos dificilmente purificáveis, do baixíssimo rendimento apresentado (<10%) e devido a instabilidade encontrada durante a proteção das catequinas com o grupo benzila, provavelmente atribuída a reatividade dos grupamentos fenólicos, como já relatado anteriormente por ISHIHARA, S. e colaboradores. Mesmo alterando vários parâmetros reacionais como: equivalentes, tempo,

temperatura, ordem de adição de reagentes não tivemos resultados satisfatórios. Assim, outro método de proteção dos grupamentos hidroxila foi proposto, neste caso a acetilação de flavan-3-ol de proantocianidinas foi satisfatória e atendeu aos requisitos mínimos necessários para realizar uma reação de proteção que deve ser facilmente realizada, caracterizada, purificada, os grupos protetores devem ser estáveis nas condições variadas das reações subsequentes, deve ser de fácil e seletiva remoção (ISHIHARA, 2014; GREENE, 2007).

A acetilação é uma reação fácil e que proporciona o derivado acetilado em rendimento quantitativo. A reação (Esquema 7) se procede em meio a anidrido acético e piridina quantitativamente adicionados ao reagente inicial (ISHIHARA, 2014).

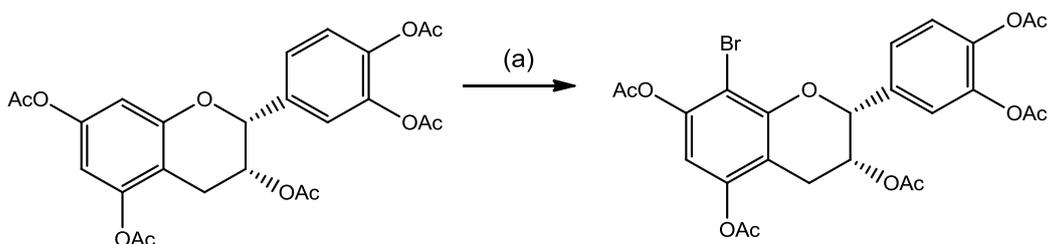


Esquema 7: Acetilação dos grupamentos hidroxila. Condição de reação: a) Ac_2O , Pyr, 0°C -ta, 24h.

A discussão da caracterização de MA01 já foi apresentada anteriormente, pois faz parte da série de compostos sintetizados via acilação.

O passo seguinte é a adição de halogênio no C8 da epicatequina, funcionando assim como um grupo de bloqueio na síntese seletiva de dímeros de catequina. Segundo metodologias recentes, os autores afirmam a importância deste bromo em C8 por ele diminuir o caráter nucleofílico do anel flavanol da catequina, assim este evitaria a oligomerização descontrolada. Outro fator importante atribuído à adição do bromo no C8 é a formação do dímero onde, neste caso, a reação se processará em quantidades equimolares dos parceiros eletrófilo e nucleófilo, sem haver assim, a necessidade de excesso de nucleófilo como antes era necessário (TARASCOU, 2006; QUIDEAU, 2011; DENNIS, 2012; OHMORI, et al., 2004).

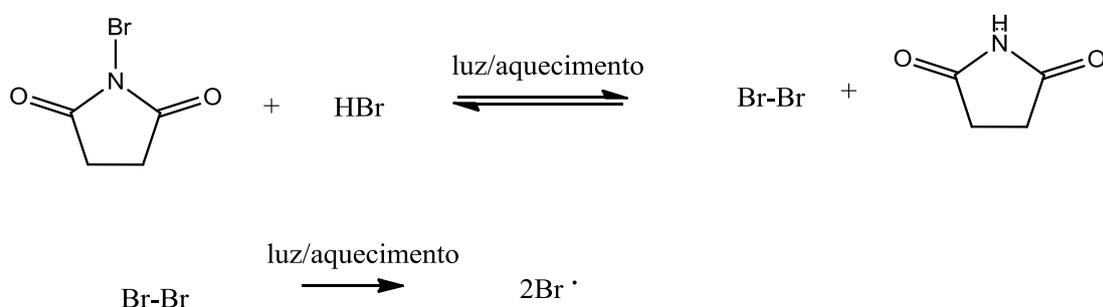
A reação seletiva de bromação em C8 do derivado acetilado MA01 foi obtido em rendimento quantitativo por tratamento de MA01 com 1 equivalente de NBS recristalizado, CH_2Cl_2 a 0°C , esta reação permanece agitando ao longo de 4 horas à temperatura ambiente (Esquema 8).



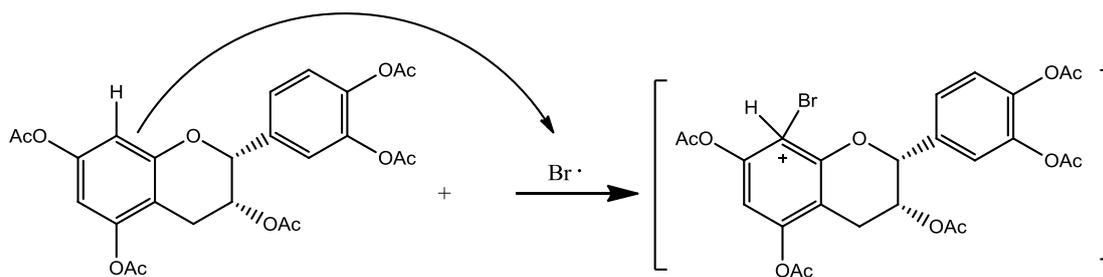
Esquema 8: Adição de Br^- no C8. Condição de reação: a) NBS, CH_2Cl_2 , 0°C -ta, por 4h.

Esta reação envolve a substituição eletrofílica do bromo no C8 da epicatequina. O NBS possui certa quantidade de HBr suficiente para reagir sob luz ou aquecimento e formar succinamida e Br_2 . O radical bromo por ter carga positiva parcial age como um eletrófilo. Os elétrons do anel aromático atraem o eletrófilo, ao receber o eletrófilo o bromo fica neutralizado, porém o carbono fica carregado positivamente, ocorre deslocamento dos elétrons π do anel aromático pra estabilizar esta carga positiva. O átomo de H^+ se desloca regenerando assim a dupla ligação. (Esquema 9) (CLAYDEN, 2012, CAREY, 2014).

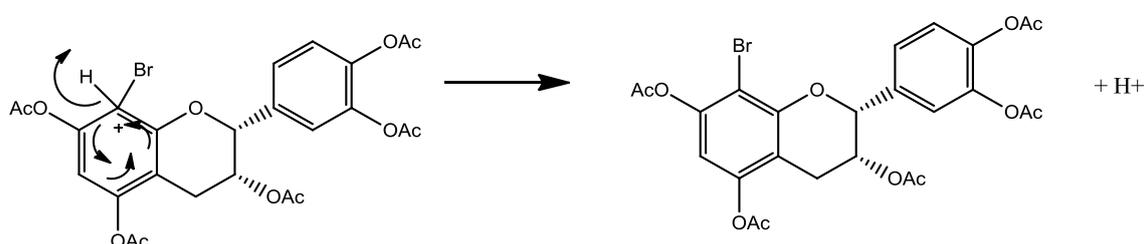
Etapa 1: Etapa de iniciação- NBS fornece Br_2 :



Etapa 2: Elétrons do anel aromático atraem o eletrófilo, carbono fica carregado positivamente:



Etapa 3: Ocorre rearranjo dos elétrons π do anel aromático, o H^+ se desloca e regenera-se a dupla ligação:



Esquema 9: Mecanismo de substituição eletrofílica de bromo no C8 da epicatequina.

O espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de 1H apresentou sinais referentes aos hidrogênios aromáticos do anel A e B da epicatequina, bem como sinais característicos do anel C, como descrito anteriormente em MA01. O composto **MABr1** se diferencia por apresentar sinais característicos da ligação de um bromo na posição C8 do anel A da epicatequina. No espectro de RMN de 1H (Figura 35) não se visualiza mais o sinal 6,67 atribuído ao H8 no produto de partida, sendo observada a presença de um sinal em torno de δ 6,57 (brs, 1H, CH, H₆) atribuído ao H₆. No espectro de APT (Figura 36) o sinal δ 108,0 atribuído ao C8 (CH) de MA01 não é visualizado, sendo observado o sinal de um carbono quartenário de MABr1 atribuído ao C₈, mostrando que houve o desaparecimento de H8. Os dados espectrais foram atribuídos conforme literatura específica (TASUMI, 2014; PAVIA, 2013; SOLOMOS, 2012, LAGE, 2011; ISHIHARA, 2014).

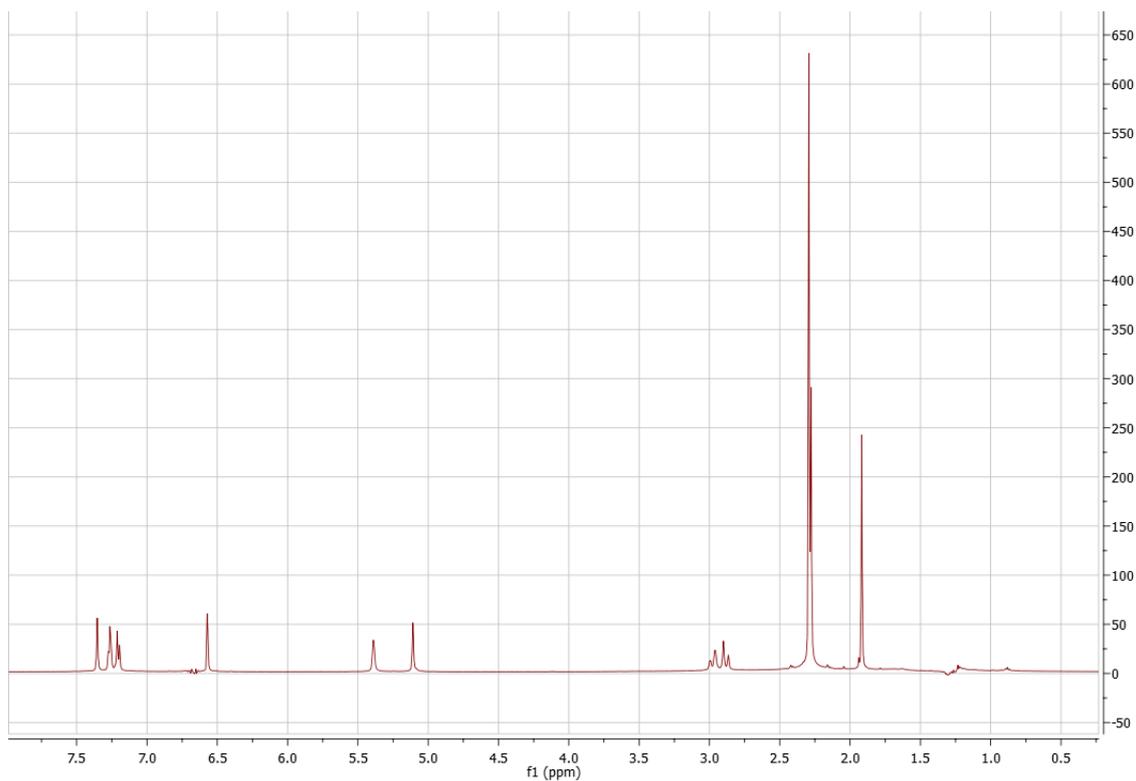


Figura 35: Espectro de RMN de ^1H do composto **MABr1** (CDCl_3 , 500 MHz).

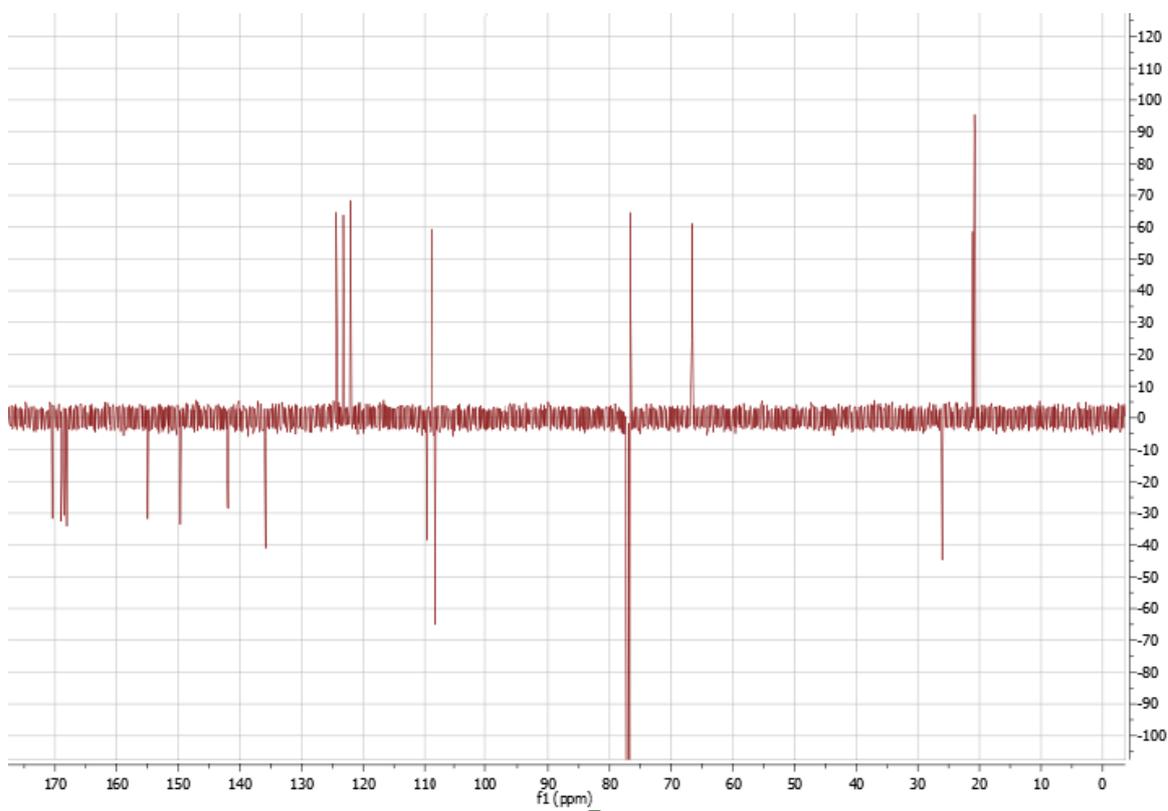
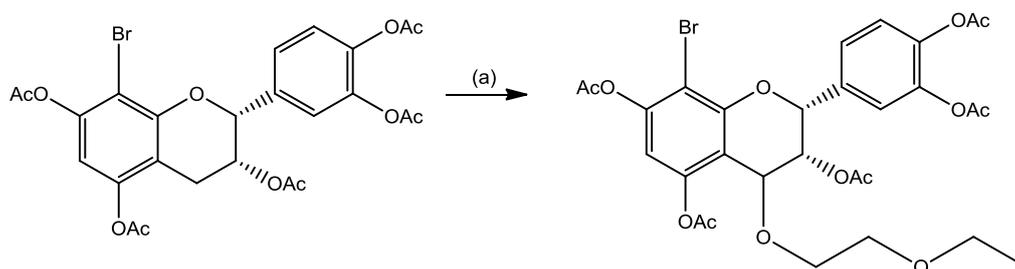


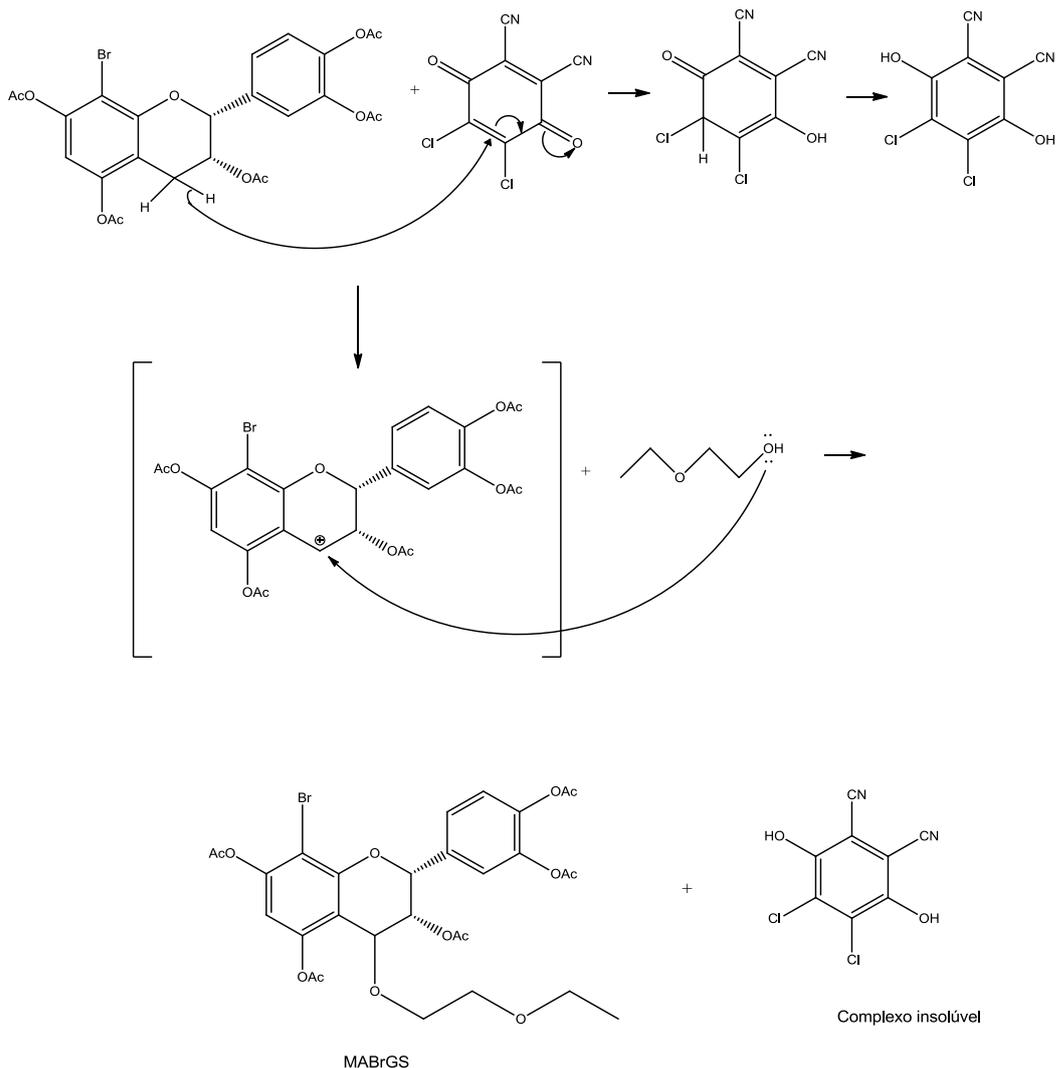
Figura 36: Espectro de APT do composto **MABr1** (CDCl_3 , 125 MHz).

O passo subsequente é a adição de um grupamento de saída em C4. A adição do grupamento de saída em C4 de MABr1 foi obtido por tratamento de MABr1 com 2 equivalentes de DDQ, THF anidro e excesso de 2-etoxietanol a 0 ° C. A reação se processou durante 2 horas à temperatura ambiente(Esquema 10) (DENNIS, 2012).



Esquema 10: Adição do grupamento de saída. Condição de reação: a) DDQ, THF, 2-etoxietanol, 0°C-TA, por 2h.

O mecanismo proposto envolve a produção de um eletrófilo que é alcançada através da oxidação do C4 pelo DDQ, formando um intermediário deficiente em elétrons, seguido do ataque de um nucleofílico. Esta reação requer epicatequina previamente protegida e a presença de um álcool que agirá como nucleófilo (DENNIS, 2012; CAREY, 2014; MCMURRY, 2012).



Esquema 11: Mecanismo de oxidação do C4 da epicatequina e adição do grupamento de saída.

As tentativas para cristalizar o produto utilizando as condições descritas por Saito, et al., 2004, resultaram na co-cristalização das impurezas. O produto formado era insolúvel em diversas condições de solventes, exceto CH_2Cl_2 ou CHCl_3 . O material tende a cristalizar a partir da solução no topo da coluna cromatográfica de gel de sílica, quando tentamos a utilização de sistemas de solvente a base de hexano. Sistemas de solventes à base de CH_2Cl_2 ou CHCl_3 , previnem a cristalização do produto, porém não são eficazes para purificação do produto, sendo que a mistura de MABr1+MAGSBr permanece inalterada. Como resultado, a mistura do produto bruto sólido de coloração acastanhado

obtido foi utilizado nos passos seguintes para formação do pretendido dímero sem purificação adicional. (DENNIS, 2010).

Mesmo sob diversos sistemas de solventes, não foi possível separar o reagente de partida MABr1 do produto MABrGS, desta maneira o composto **MABrGS** foi obtido, mesmo em mistura com o reagente de partida, resultando em um sólido castanho. Log P: 1.56+/- 0.63. O espectro de RMN de ^1H apresentou sinais referentes aos hidrogênios aromáticos do anel A e B da epicatequina, bem como sinais característicos do anel C, como descrito anteriormente em MA01. O composto **MABrGS** se diferencia por apresentar sinais característicos da ligação do grupamento de saída na posição C4 do anel C da epicatequina, bem como preservar o bromo no C8, sendo assim persiste o sinal único em δ 6,55 (brs, 1H, CH, H₆). Os sinais do grupamento de saída podem ser vistos no espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H (Figura 37) onde temos adição de sinais com deslocamento de 3,51 (m, 2H, CH₂), 3,71(m, 4H, CH₂) e 1,20(m, 3H, CH₃), porém a mistura com o reagente de partida (MABr1) permanece, como é observado pela presença do sinal em δ 2,92 (m, 2H, CH₂, H₄). No espectro de APT (Figura 38) os sinais característicos do grupamento de saída também podem ser observados com δ de 71,5 (CH₂), 66,6 (CH₂), 61,9 (CH₂), bem como os sinais característicos de C4 com deslocamento de 67,8 (CHO, C₄, MABrGS) e 26 (CH₂, C₄, MABr1). A metila terminal do grupamento de saída é observada com δ de 15,1 ppm. Os dados espectrais foram atribuídos conforme literatura específica (TASUMI, 2014; PAVIA, 2013; CAREY, 2014; SOLOMOS, 2012; LAGE, 2011; ISHIHARA, 2014).

Assim podemos concluir que temos uma mistura do reagente de partida MABr1 e do produto desejado MABrGS, que a reação ocorreu parcialmente mesmo alterando equivalentes de DDQ e/ou condições reacionais. Ainda assim esta mistura não pôde ser separada, pois apresentava polaridade semelhante frente a diversos sistemas de solventes.

A existência de mistura é observada tanto pelos sinais do grupamento de saída como pela coexistência no RMN de ^1H do sinal δ 2, 92 que corresponde ao C4, posição onde há ligação do grupamento de saída, do

mesmo modo que pelo RMN de ^{13}C podemos perceber que há sinal de deslocamento para o CH-O em δ 67,8 e em δ 26 para CH_2 do produto de partida, este ultimo sinal de deslocamento já era visto no reagente de partida (MABr1).

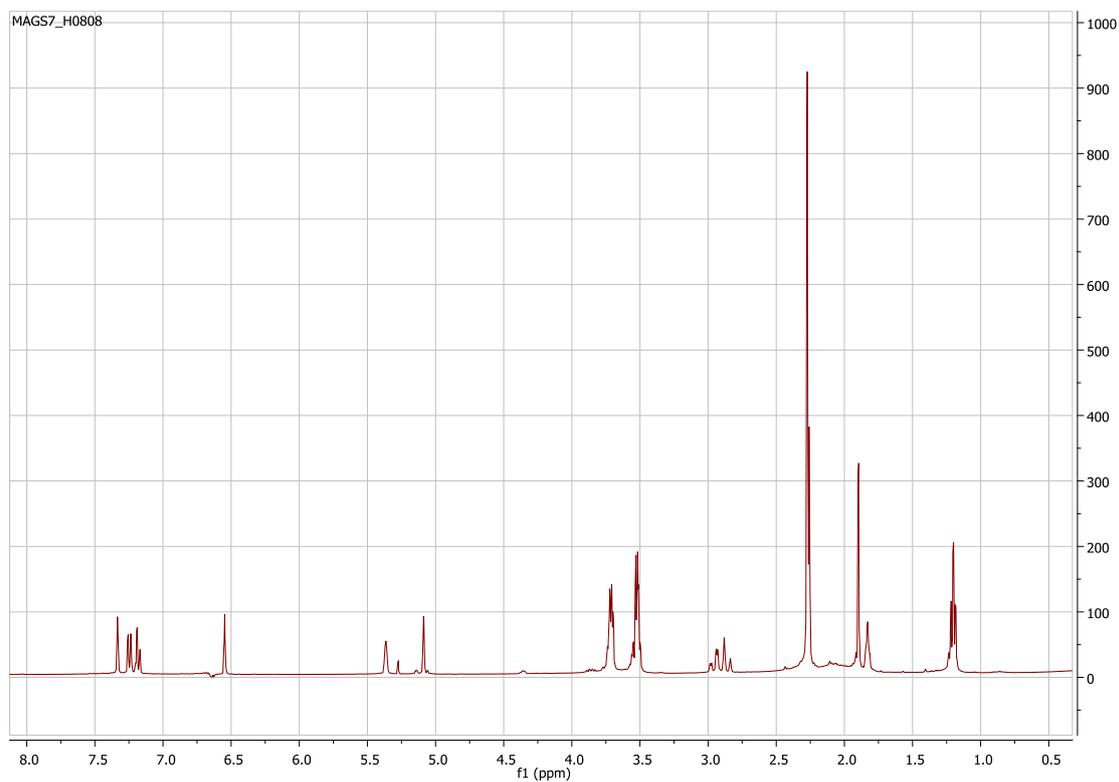


Figura 37: Espectro de RMN de ^1H do composto **MABrGS** (CDCl_3 , 400 MHz).

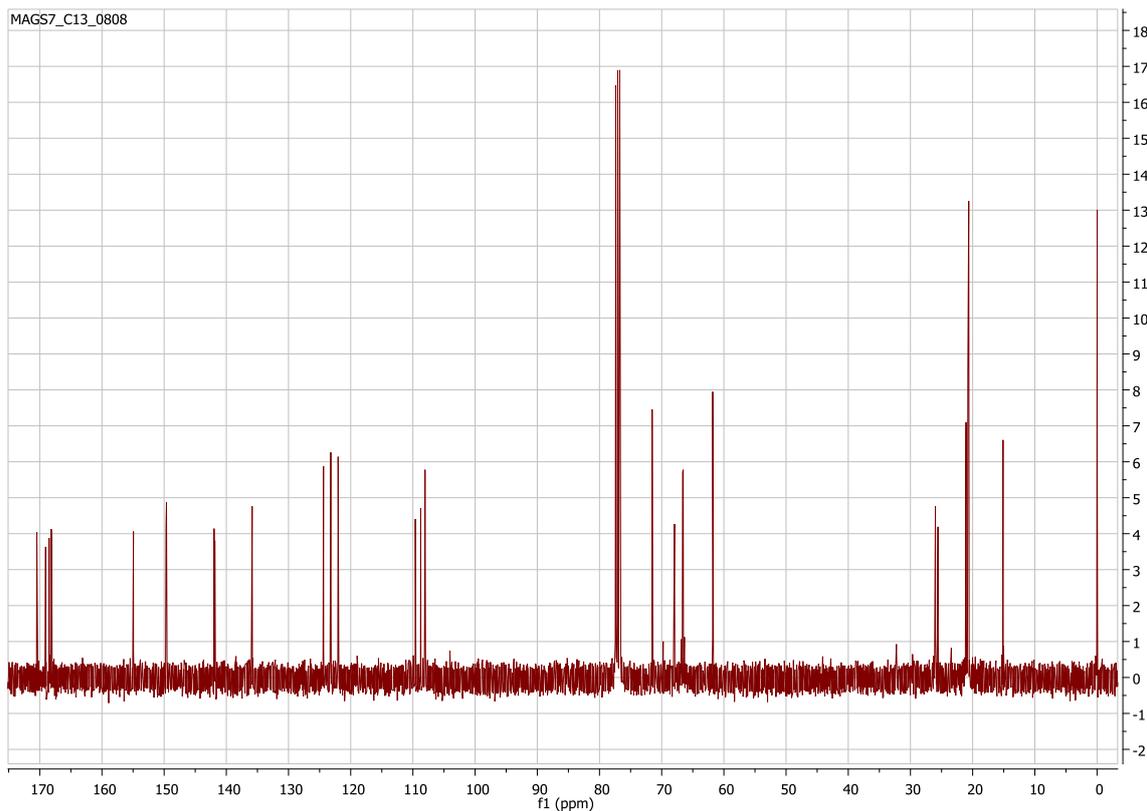
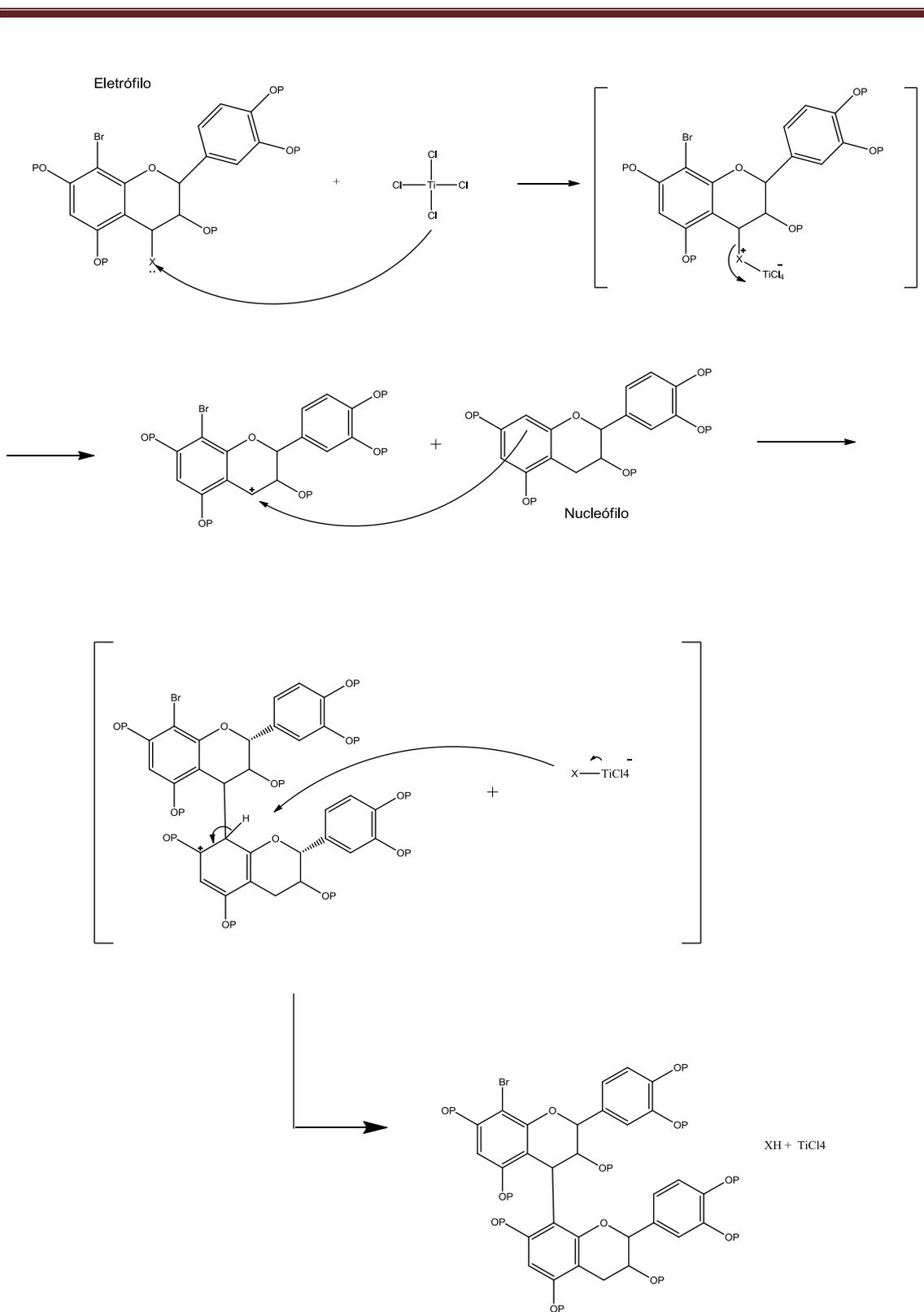


Figura 38: Espectro de ^{13}C do composto **MABrGS** (CDCl_3 , 101 MHz).

O passo sequencial para a rota dos derivados da delphinidina é a formação do respectivo dímero. O dímero é formado a partir da condensação de duas moléculas de epicatequina previamente protegidas, onde uma agirá como eletrófilo (MABrGS) e a outra como nucleófilo(MA01).

A reação ocorre por meio de uma substituição eletrofílica aromática na presença de um promotor, o ácido de Lewis. A reação ocorre pelo tratamento de um equivalente de MABrGS agindo como eletrófilo e leve excesso, 1,5 equivalentes de MA01 (nucleófilo), sobre esta mistura é adicionado 1 equivalente do ácido de Lewis TMSOTf a -78°C , a reação é deixada agitar em torno de 3h a temperatura ambiente (Esquema 12) (DENNIS, 2012).



Esquema 13: Mecanismo de formação da ligação C4-C8 através de alquilação de Friedel-Crafts. Onde X: grupamento de saída; TiCl_4 , ácido de Lewis formação do dímero.

Vários ácidos de Lewis já foram usados para tal fim e foram eficientemente seletivos. Deste modo, o acoplamento entre MABrGS e MA01 poderia ser realizado usando quantidades estequiométricas ou catalíticas, quer de TMSOTf, $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ou TiCl_4 como ácido de Lewis, em uma ampla variedade de solventes, como CH_2Cl_2 , tolueno, THF.

Em todas as reações, no entanto, o ácido de Lewis foi adicionado a uma solução sob agitação de MABrGS e MA01 à temperatura especificada, e, em seguida, agitada nos intervalos de tempo indicados, seguido por arrefecimento brusco com solução saturada de NaHCO_3 , de acordo com os protocolos encontrados (DENNIS, 2012; OHMORI, et al., 2004; TARASCOU, 2006; SAITO, 2004; KATOH, 2012; KOZIKOWSKI, 2000; QUIDEAU, 2011). A análise por CCD da mistura da reação a intervalos regulares indicaram que ambos os materiais de partida estavam presentes inalterados. Mesmo após adição de mais equivalentes de ácido de Lewis ou de maior tempo reacional, não houve alteração na CCD, o produto reacional bruto foi submetido a análise por RMN de ^1H e ^{13}C onde não foi possível visualizar os sinais característicos do dímero. A tabela abaixo (Tabela 1) apresenta as várias tentativas de formar o dímero, o produto destas reações nestes casos apresentava o mesmo R_f do composto de partida e por RMN de ^1H e ^{13}C onde não foi possível visualizar os sinais característicos do dímero.

Há relatos que tratam que há uma grande dificuldade experimental para se obter o dímero puro pois a separação da espécie dimérica e dos monômeros não é trivial devido as polaridades semelhantes dos reagentes de partida e do produto desejado, o dímero (DENNIS, 2010).

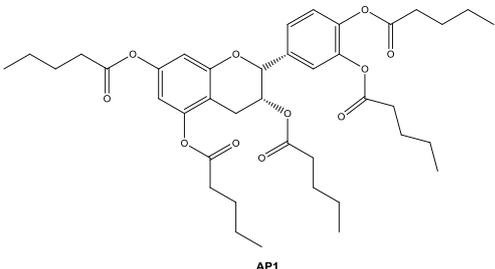
Assim devido às evidências reacionais, acreditamos que não obtivemos o produto desejado. Novos estudos e maior tempo de pesquisa serão necessários para dar continuidade a este trabalho para prosseguir em busca deste produto final.

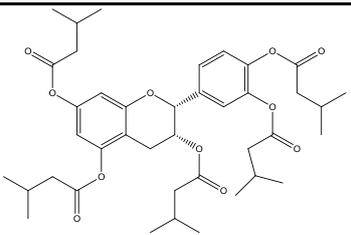
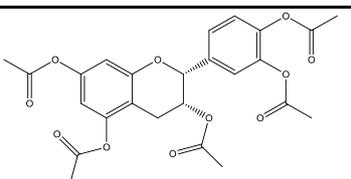
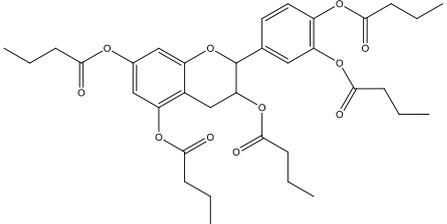
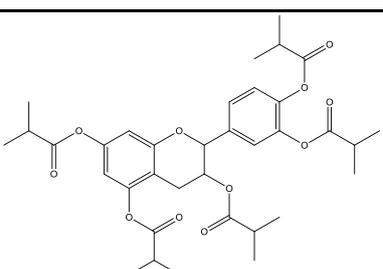
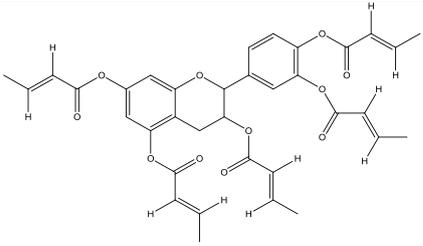
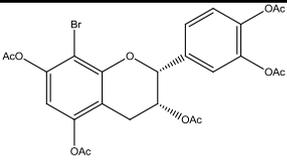
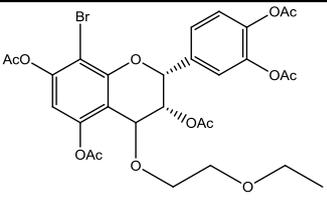
Tabela 1: Tentativas reacionais para promover a ligação 4 → 8.

Referência	MABrGS	MA01	Ácido de Lewis	Solvente	Condições
OHMORI, et al., 2004.	1 eq.	1.2 eq.	NIS 1 eq.	CH ₂ Cl ₂	-78→-30°C por 2h.
OHMORI, et al., 2004.	1 eq.	1.3 eq.	BF ₃ .OEt ₂ 1.5 eq.	CH ₂ Cl ₂	-78→-45°C por 30 min.
TARASCOU, 2006; KOZIKOWSKI, 2000; SAITO, 2004.	1 eq.	1.5 eq.	TiCl ₄ (1M em Tolueno) 2 eq.	CH ₂ Cl ₂	0°C→TA por 2h.
SAITO, 2002.	1 eq.	4.5 eq.	TiCl ₄ (1M em Tolueno) 4 eq.	CH ₂ Cl ₂	0°C→TA por 2h.
DENNIS, 2012.	1 eq.	1.5 eq.	TMSOTf 1 eq.	THF	-78°C-1h→TA por 3h
SAITO, 2002.	1 eq.	4.5 eq.	TMSOTf 2 eq.	THF	-78°C-1h→TA por 3h

A seguir, apresentamos uma tabela com os produtos obtidos neste trabalho (Tabela 2).

Tabela 2: Derivados sintetizados:

Estrutura	Nomenclatura	Identificação
 AP1	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-2-(3,4-bis(pentanoiloxi)fenil)cromano-3,5,7-tripentanoato	AP1

	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-2-(3,4-bis((3-metilbutanoil)oksi)fenil)cromano-3,5,7-trialtris(3-metilbutanoato)	AIV1
	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-2-(3,4-diacetoxifenil)cromano-3,5,7-triacetato	MA01
	2-(3,4-bis(butiriloxi)fenil)cromano-3,5,7-tributirato	AB1
	2-(3,4-bis(isobutiriloxi)fenil)cromano-3,5,7-trialtris(2-metilpropanoato)	AIB1
	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i> ,2'' <i>E</i>)-2-(3,4-bis(<i>E</i>)-but-2-enoiloxi)fenil)cromano-3,5,7-trial-tris(but-2-enoato)	AC1
	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-8-bromo-2-(3,4-diacetoxifenil)cromano-3,5,7-triacetato	MABr1
	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-8-bromo-2-(3,4-diacetoxifenil)-4-(etoximetoxi)cromano-3,5,7-trial-triacetato	MABrGS

4.6. Conclusões

O planejamento de novos compostos, visando à atividade frente às atividades propostas, seguiu uma estratégia racional a partir de estudos já realizados anteriormente.

Assim, a partir da epicatequina foram obtidos uma série de derivados acilados e inéditos. Esses derivados resultaram em produtos facilmente obtidos com altos rendimentos (>70%), e foram planejados de forma a proporcionar uma diversidade química suficiente para avaliar o potencial de antiformação de biofilme, de crescimento bacteriano, de erradicação do biofilme e potencial citotóxico desta série de compostos.



5. CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS ACILADOS FRENTE AO BIOFILME E TOXICIDADE CELULAR

Neste capítulo abordaremos as atividades biológicas avaliadas dos compostos obtidos via acilação e do reagente de partida epicatequina, as metodologias empregadas para tal e apresentaremos a discussão dos resultados alcançados. Esta série, caracterizada por seis compostos foi avaliada frente à atividade antiformação de biofilme, avaliação do composto frente ao crescimento bacteriano, a capacidade dos compostos de erradicar biofilmes e também a avaliação da citotoxicidade destes compostos frente a linfócitos humanos.

5.1. Introdução

Devido às atividades promissoras atribuídas as catequinas, como já discutido anteriormente, a epicatequina foi escolhida como composto de partida no planejamento da síntese de candidatos ativos. Assim, foi realizada a avaliação biológica e citotóxica dos compostos obtidos via acilação no capítulo anterior, pois estes nos renderam altos rendimentos, são facilmente purificáveis e caracterizados. Portanto temos seis compostos (MA01, AP1, AIV1, AB1, AIB1, AC1), destes, cinco são inéditos, com rota sintética definida, amostras puras e em quantidade suficiente para avaliação biológica.

Uma das atividades testadas e relatadas a seguir é a atividade antiformação do biofilme. Esta atividade avalia a capacidade da amostra de impedir que o biofilme se forme e conseqüentemente colonize outras células ou superfícies. Sabemos que a adesão e colonização são pré-requisitos para o estabelecimento da infecção bacteriana e patogênese do biofilme. Uma vez que a adesão tenha ocorrido em dispositivos médicos implantados ou tecido danificado, microrganismos podem sofrer alterações moleculares específicas para se tornar patogênicos e estabelecer biofilmes. É bem conhecido que a formação de biofilme envolve o anexo e acumulação de células microbianas, dentro de uma matriz extracelular própria, em uma superfície sólida. Estas características demonstram o caráter defensivo do biofilme com uma maior resistência das bactérias

associadas ao biofilme o que torna difícil o tratamento de infecções causadas por biofilmes bacterianos. Um dos nossos objetivos foi avaliar a capacidade dos compostos em erradicar o biofilme já formado, a fim de que possa ser utilizado como tratamento em infecções associadas ao biofilme (TRENTIN, 2013; COSTERTON, et al., 2002; DAVIES, 2003; PARSEK & SINGH, 2003).

A avaliação do crescimento bacteriano também foi analisada, uma vez que um dos grandes desafios da química medicinal é a busca de novos antibacterianos, em função dos graves casos de resistência já relatados e a dificuldade em encontrar novos agentes antibacterianos com mecanismos inovadores de ação, incluindo atividade antiaderente ou que sejam eficazes na eliminação do biofilme já formado.

O ensaio preliminar de citotoxicidade utilizou linfócitos humanos e foi realizado com o objetivo de avaliar se os compostos sintetizados possuem algum potencial citotóxico nas concentrações testadas.

5.2. Metodologia

5.2.1. Avaliação da atividade dos compostos acilados frente ao biofilme, ao crescimento microbiano e a erradicação do biofilme:

➤ **Cepas bacterianas e condições de cultivo:**

Os ensaios bacteriológicos foram realizados em microplacas de poliestireno de 96 poços estéreis (Costar 3599, Nalge Nunc Internacional). *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Staphylococcus aureus* ATCC 25904, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 foram cultivadas em ágar sangue e uma suspensão bacteriana em NaCl a 0,9% estéril, correspondendo a uma densidade óptica a 600 nm (OD600) de 0,150 (3×10^8 UFC/ mL), foi utilizada nos ensaios.

➤ **Compostos a serem testados**

Os compostos (Epicatequina, MA01, AP1, AIV1, AB1, AIB1, AC1) foram dissolvidos em dimetilsulfóxido 99,5% (DMSO, Sigma-Aldrich, EUA) obtendo solução estoque nas concentrações de 25 e 2,5 mM. Utilizou-se nos ensaios 4 µL desta solução para fornecer no poço a concentração de 500 e 50 µM dos compostos a serem testados, respectivamente, e 2% de DMSO, sendo esta concentração de veículo compatível com a viabilidade das quatro cepas bacterianas utilizadas neste estudo.

➤ **Atividade antiformação de biofilme:**

A adesão bacteriana e formação de biofilme foram avaliadas utilizando o ensaio do cristal violeta, conforme protocolo proposto por Trentin e colaboradores (2011) (TRENTIN, 2011).

Em cada poço adicionou-se 4 µL da solução estoque, 76 µL de água milliQ estéril, 40 µL de meio de cultura e 80 µL da suspensão bacteriana, obtendo concentração final nos poços de 50 e 500 µM. Para *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* o meio de cultura foi caldo de triptona de soja (TSB, Oxoid Ltd., Inglaterra); e para *S. aureus*, o meio utilizado foi o caldo de infusão cérebro coração (BHI, Oxoid Ltd., Inglaterra). Após o período de incubação (37 °C durante 24 h), o conteúdo dos poços foi removido e os poços foram lavados três vezes com solução salina estéril. O biofilme aderido foi fixado por calor (60 °C durante 1 h) e posteriormente corado com 0,4% de cristal violeta durante 15 min à temperatura ambiente. O corante ligado às células foi solubilizado com 99,5% de DMSO e absorbância foi medida a 570 nm. Para o controle da formação de biofilme, os compostos foram substituídos pelo veículo DMSO (concentração no poço de 2%), representando 100% da formação do biofilme.

➤ **Avaliação do crescimento bacteriano**

O crescimento bacteriano foi avaliado nas microplacas de poliestireno através da diferença das médias aritméticas da OD600 entre os poços contendo os compostos a serem avaliados, TSB ou BHI e suspensão bacteriana e os poços contendo os compostos a serem avaliados, TSB ou BHI e solução salina estéril (sem inóculo), após 24 h (tempo de incubação). Desta forma, a interferência da cor da amostra nos resultados foi evitada. Como controles para o crescimento bacteriano utilizou-se o veículo 2% de DMSO e 8 ug/mL de rifampicina (Sigma-Aldrich, EUA) para *S. epidermidis*, 8 ug/mL de vancomicina para *S. aureus* (Sigma-Aldrich, EUA), e 8 ug/mL de gentamicina (Sigma-Aldrich, EUA) para *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*.

➤ **Atividade erradicadora de biofilmes**

A capacidade de erradicação de biofilmes também foi avaliada pelo método do cristal violeta. No entanto, nesta metodologia, primeiramente o biofilme é formado nos poços da microplaca, adicionando-se 80 µL da suspensão bacteriana, 80 µL de água milliQ estéril e 40 uL de meio de cultura (para *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, o meio TSB e; para *S. aureus*, o meio BHI). Após o período de incubação (37 °C durante 24 h), o conteúdo dos poços foi removido para retirar as células planctônicas e as células aderidas foram tratadas a 37 °C durante 24 h com 4 µL da solução estoque, 76 µL de água milliQ estéril, 40 uL de meio de cultura e 80 µL de solução salina estéril obtendo concentração final nos poços de 50 e 500 µM. Após este período o conteúdo dos poços for removido e os poços foram lavados três vezes com solução salina estéril. O biofilme aderido foi fixado por calor (60 °C durante 1 h) e posteriormente corado com 0,4% de violeta cristal durante 15 min à temperatura ambiente. O corante ligado às células foi solubilizado com 99,5% de DMSO e absorbância foi medida a 570 nm. Para o controle da formação de biofilme, os compostos foram substituídos pelo veículo DMSO (concentração no poço de 2%), representando 100% da biomassa remanescente.

➤ **Análise estatística**

Os ensaios biológicos foram realizados em triplicata e os dados são apresentados como médias aritméticas ou percentuais \pm desvio padrão. Diferenças em relação às amostras tratadas com o veículo (DMSO 2%) foram analisadas pelo teste *t* de Student e um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo (TRENTIN, 2011).

5.2.2. Ensaio de Citotoxicidade:

➤ **Materiais**

RPMI 1640, penicilina/estreptomicina, Histopaque®, DMSO e azul Tripán foram adquiridos da Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). SFB (soro fetal bovino) e Fungizona/ Anfotericina B foram adquiridos da Gibco (Gibco BRL, Grand Island, NY). Todas as substâncias químicas e solventes utilizados foram de grau analítico.

➤ **Diluição das amostras**

Os compostos epicatequina, MA01, AP1, AIV1, AB1, AIB1, AC1 foram previamente solubilizados em DMSO 100%, formando uma solução estoque na concentração de 10.000 μ M. Foram retiradas alíquotas destas amostras e diluídas em meio RPMI 1640 contendo 10% de Soro Fetal Bovino, para obter as concentrações de 10, 25, 50, 100, 250 e 500 μ M. Ao final das diluições obteve-se uma concentração máxima de DMSO por poço de 0,005% durante os tratamentos.

➤ **Ensaio de citotoxicidade**

Os linfócitos humanos foram separadas a partir de sangue venoso heparinizado de diferentes doadores. Os linfócitos foram isoladas por centrifugação com gradiente Histopaque®, centrifugadas e lavadas três vezes com meio RPMI 1640. Ao final das

lavagens, as células mononucleadas foram ressuspensas em 5 mL de meio RPMI contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). Células viáveis foram contadas utilizando azul tripan em câmara de Neubauer. As células mononucleares foram novamente ressuspensas em meio RPMI contendo 10% de SFB em uma concentração de 5×10^5 células viáveis por mL. Essa suspensão de células foi adicionada a uma microplaca de 96 poços (100 μ L em cada poço). Após 48 horas foram adicionadas as amostras nas concentrações de 10 a 500 μ M (100 μ L por poço). Os experimentos foram realizados em triplicata a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. A contagem das células foi determinada por citometria de fluxo. As análises foram conduzidas em citômetro BD FACSVerse™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) equipado com laser azul de 488nm, contador volumétrico e software BD FACSuite (Modificado de PAIM, C., S., et al., 2011). Os resultados foram expressos como % em relação ao controle negativo DMSO. Foram consideradas citotóxicas as amostras capazes de reduzir em 50% o número de células quando comparadas ao controle nas concentrações testadas. O IC₅₀ é obtido através da equação da reta, onde substitui-se o valor de y por 50 para obtenção da concentração da amostra com capacidade de reduzir 50% das células. O valor do IC₅₀ apresentado foi obtido com o programa GraphPad Prism. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFRGS (666.665/2014) (Anexo 8.1).

➤ **Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão e analisados estatisticamente por Análise da Variância (ANOVA) seguidos de *post test* Tukey. $P < 0,05$ foram considerados como indicativo de significância.

5.3. Resultados e Discussões

Para a avaliação do biofilme e o crescimento bacteriano foram avaliadas 4 cepas bacterianas, sendo duas Gram negativas, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* e duas Gram positivas, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*. Todas estas bactérias são cepas ATCC e foram avaliadas frente à antiformação de biofilme, ou seja, aqueles compostos capazes de prevenir a formação de biofilme, avaliar a influência do composto no crescimento bacteriano e avaliar a eficácia dos compostos em erradicar um biofilme já formado.

Em comparação com o antibacteriano, gentamicina na dose de 8 µg/mL, usado como controle positivo para analisar a inibição da formação do biofilme para bactéria Gram negativa *K. pneumoniae* apenas AP1 diferiu significativamente ($P < 0,05$) na dose de 500 µM do controle negativo DMSO (Figura 1).

Várias amostras diferiram significativamente ($P > 0,05$) do controle no crescimento bacteriano (Figura 1), porém se comparado ao controle positivo pode-se perceber que os compostos não possuem atividade promissora e que as doses estão muito acima de uma importância terapêutica. No entanto estes dados podem ser utilizados para propor uma relação estrutura atividade visando otimização de uma nova série de compostos, como será discutido adiante.

Na avaliação da erradicação do biofilme previamente formado, o composto AP1 na concentração de 500 µM, foi o único composto que apresentou diferença significativa do controle (Figura 2). AP1 foi capaz de erradicar em $15,6\% \pm 4,6$ o biofilme formado. AP1 é o composto mais apolar desta série de derivados acilados, apresentando Log *P* de aproximadamente 9.29. Em relação às características estruturais, AP1 possui como substituintes cinco cadeias lineares saturadas com cinco carbonos, segundo CHOKR, A., et al., compostos com característica mais lipofílica tendem a causar aumento da fluidez ou desordem da estrutura da membrana, além de poder agir sobre enzimas presentes na membrana celular bacteriana (CHOKR, A., 2005).

Pode se perceber ainda que neste caso após o biofilme já estar estabelecido, nem mesmo a gentamicina, nestas concentrações, possui capacidade expressiva de erradicar o biofilme, mesmo sendo significativo em relação ao controle.

Como já discutido anteriormente estes resultados corroboram que as células bacterianas em biofilmes são extremamente resistentes ao tratamento com antibióticos principalmente devido à penetração insuficiente de antimicrobianos e a dificuldade de reação imunológica do hospedeiro, a velocidade de crescimento e alteração do estágio metabólico, o que garante a sobrevivência de tais células em ambientes hostis. Devido a isso muitas vezes nos tratamentos das infecções há necessidade de doses muito altas do antimicrobiano, levando assim muitas vezes à resistência bacteriana (ZANIN, 2006).

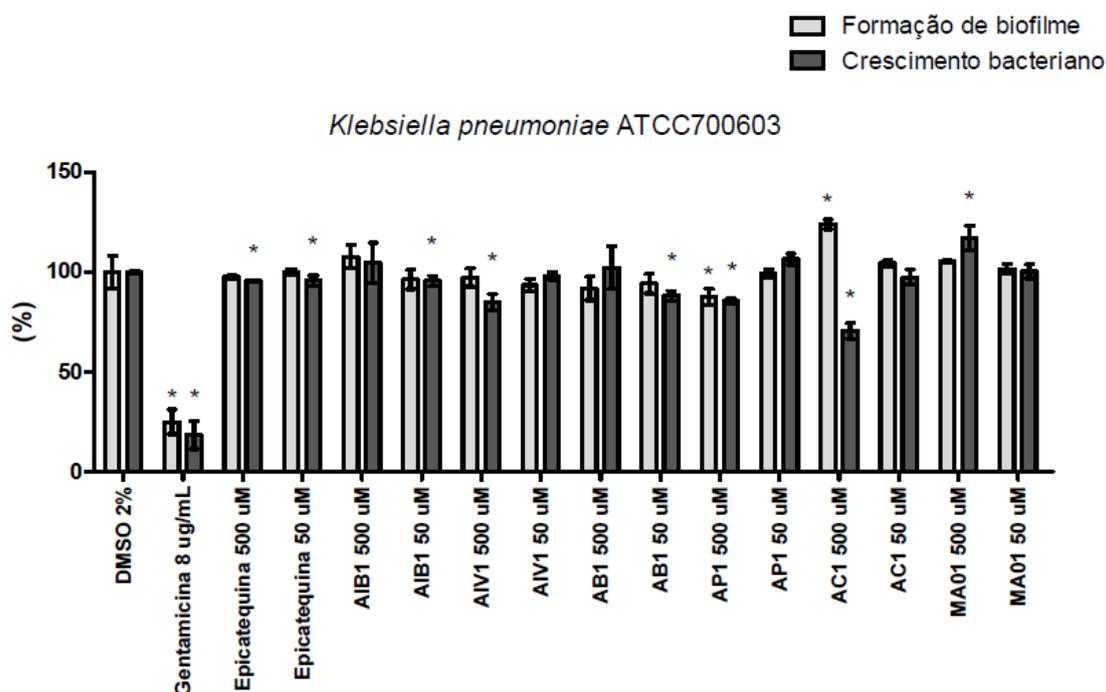


Figura 1: Avaliação do percentual de formação do biofilme e do crescimento bacteriano de *K. pneumoniae*. Controle positivo gentamicina 8µg/ml. Controle negativo DMSO 2%. * Significativamente diferente do controle (P <0,05).

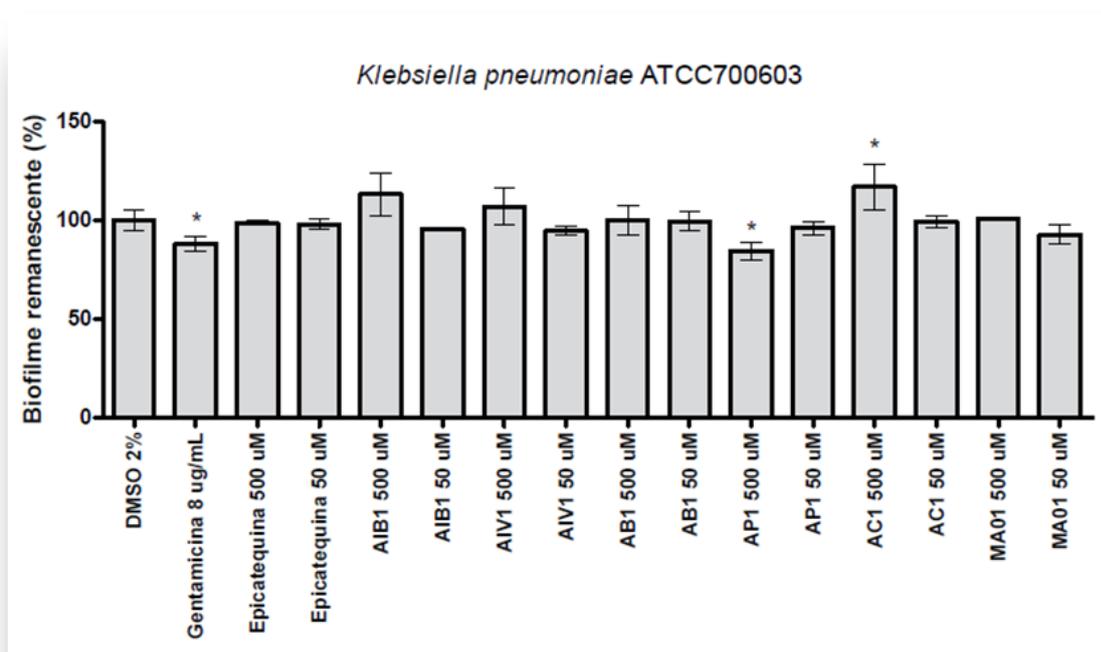


Figura 2: Avaliação do percentual de biofilme remanescente de *K. pneumoniae* após tratamento com os compostos. Controle positivo gentamicina 8µg/ml. Controle negativo DMSO 2%. *Significativamente diferente do controle (P <0,05).

Na avaliação de formação do biofilme frente à bactéria gram negativa *P. aeruginosa*, apenas AIB1 e AIV1, ambos de cadeia ramificada, foram capazes de inibir a formação do biofilme em 22%±4,7 e 37%±3,6, respectivamente, ambos nas concentrações de 50 µM dentro de 24h (Figura 3).

Várias amostras diferiram significativamente (P> 0,05) do controle no crescimento bacteriano (Figura 3), porém se comparado ao controle positivo pode-se perceber que os compostos não possuem atividade promissora. Neste caso apenas os compostos AP1 na dose de 500 µM, e AB1 na dose de 50 µM foram capazes de inibir o crescimento bacteriano em aproximadamente 51% e 28% respectivamente. Ambos os compostos possuem substituintes com cadeias lineares e saturadas e se diferenciam quanto ao número de carbonos dos substituintes, AP1 possui como substituintes cinco cadeias lineares saturadas com cinco carbonos, já AB1 possui como substituintes cinco cadeias lineares saturadas com quatro carbonos.

Na avaliação da erradicação do biofilme previamente formado (Figura 4), nenhum dos compostos nas concentrações avaliadas foi capaz de erradicar um biofilme já estabelecido se comparado ao controle negativo.

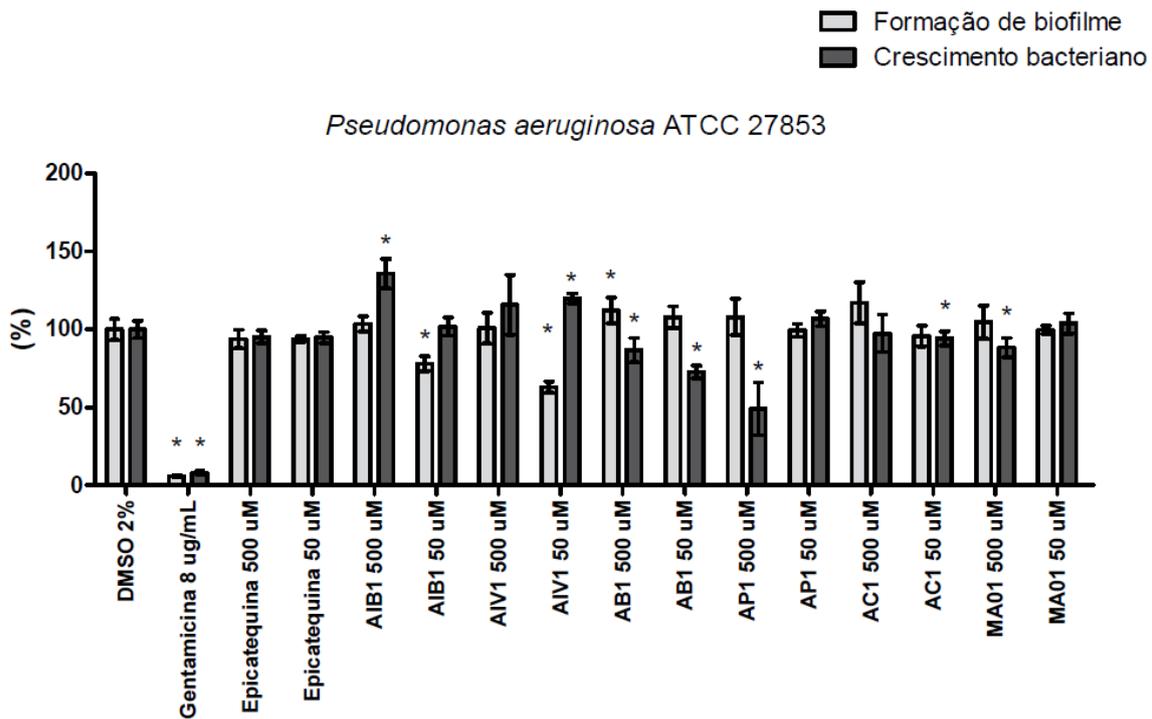


Figura 3: Avaliação do percentual de formação do biofilme e do crescimento bacteriano de *P. aeruginosa*. Controle positivo gentamicina 8µg/ml. Controle negativo DMSO 2%. * Significativamente diferente do controle (P <0,05).

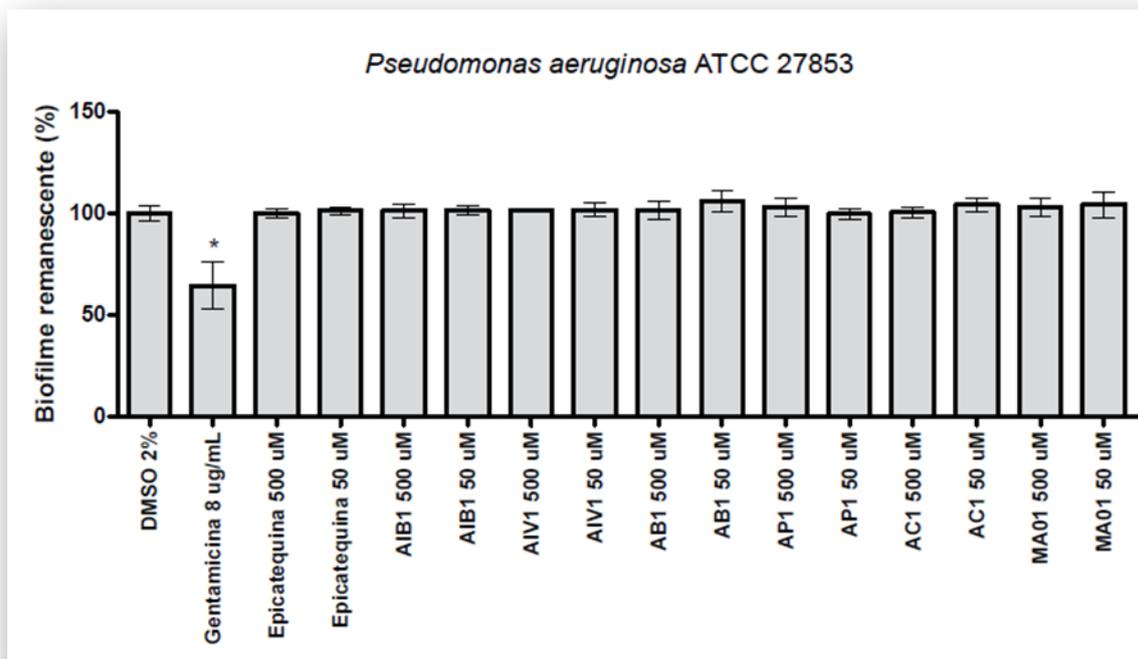


Figura 4: Avaliação do percentual de biofilme remanescente de *P. aeruginosa* após tratamento com os compostos. Controle positivo gentamicina 8µg/ml. Controle negativo DMSO 2%. *Significativamente diferente do controle (P <0,05).

Em comparação com o antibacteriano, vancomicina na dose de 8 $\mu\text{M}/\text{mL}$, usado como controle positivo para analisar a inibição da formação do biofilme para bactéria Gram positiva *S. aureus*, os compostos a seguir diferiram significativamente do controle negativo: AIB1 na concentração de 50 μM apresentou inibição da formação de biofilme de $29,6\% \pm 3,5$, AIV1 nas concentrações de 50 μM e 500 μM , foi capaz de inibir $36,1\% \pm 10,9$ e $24,4\% \pm 1,9$ respectivamente e AP1 inibiu $52,7\% \pm 12$ na concentração de 500 μM (Figura 5).

Várias amostras diferiram significativamente ($P > 0,05$) do controle na avaliação do crescimento bacteriano (Figura 5). Na avaliação da erradicação do biofilme previamente formado, os compostos não apresentaram potencial para tal atividade (Figura 6). Neste caso após o biofilme já estar estabelecido, nem mesmo a vancomicina, nestas concentrações, possui capacidade de erradicar o biofilme.

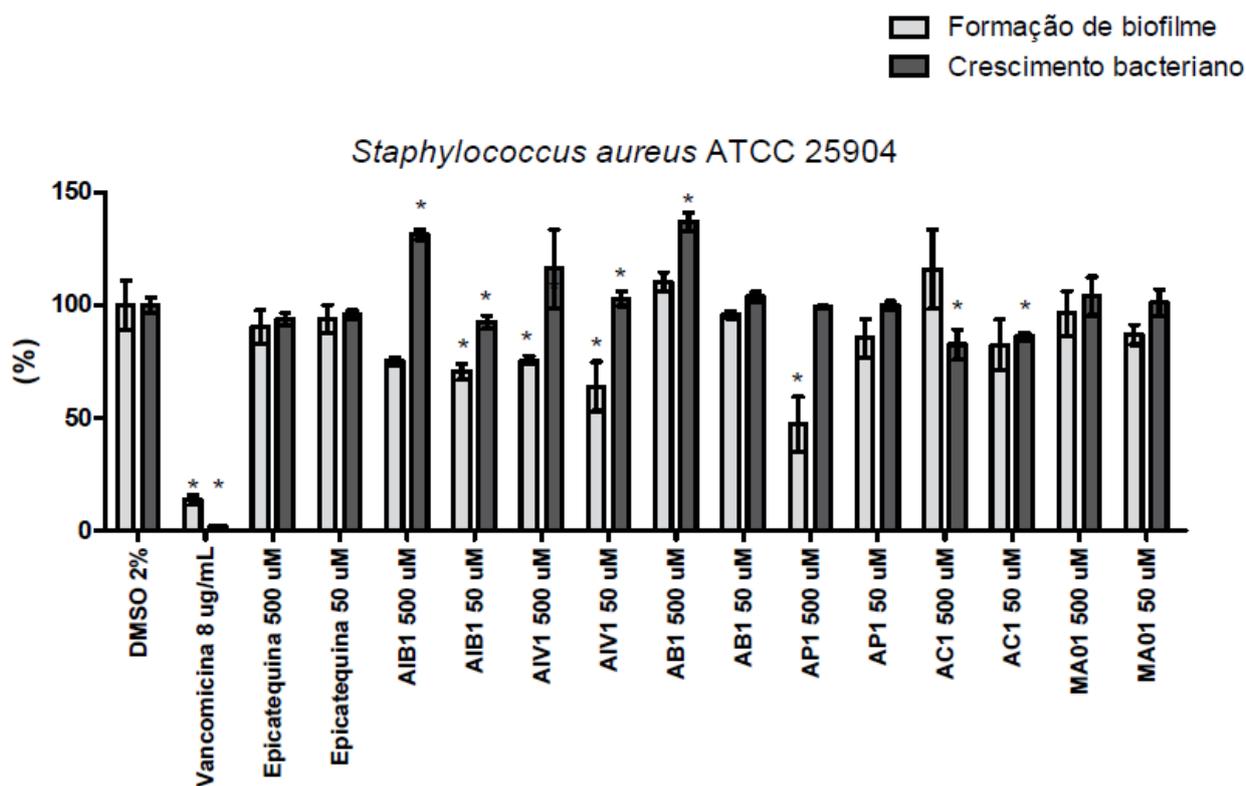


Figura 5: Avaliação do percentual de formação do biofilme e do crescimento bacteriano de *S. aureus*. Controle positivo vancomicina $8\mu\text{g}/\text{mL}$. Controle negativo DMSO 2%. * Significativamente diferente do controle ($P < 0,05$).

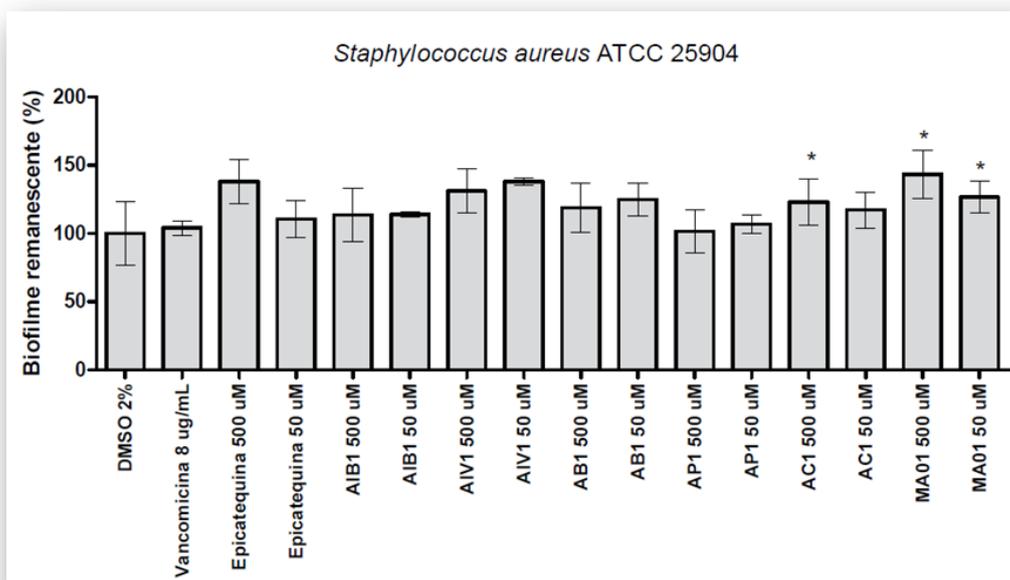


Figura 6: Avaliação do percentual de biofilme remanescente de *S. aureus* após tratamento com os compostos. Controle positivo vancomicina 8µg/mL. Controle negativo DMSO 2%. *Significativamente diferente do controle (P <0,05).

Em comparação com o antibacteriano, rifampicina, na dose de 8 µg/mL, usado como controle positivo para analisar a inibição da formação do para bactéria Gram positiva *S. epidermidis*, apenas AP1 diferiu significativamente (P < 0,05) na dose de 500 µM, apresentando inibição da formação de biofilme de 38,1%±7,9 (Figura 7).

Várias amostras diferiram significativamente (P > 0,05) do controle no crescimento bacteriano (Figura 7), porém se comparado ao controle positivo pode-se perceber que os compostos não possuem atividade promissora. Neste caso, apenas os compostos AIV1, AP1 e AC1 apresentaram inibição frente ao crescimento bacteriano. AIV1 na dose de 50 µM apresentou inibição de aproximadamente 17%, AP1 e AC1 ambas nas doses de 500 µM inibiram o crescimento em aproximadamente 56% e 52%, respectivamente.

Na avaliação da erradicação do biofilme previamente formado (Figura 8), nenhum dos compostos nas concentrações avaliadas foi capaz de erradicar um biofilme já estabelecido se comparado ao controle negativo.

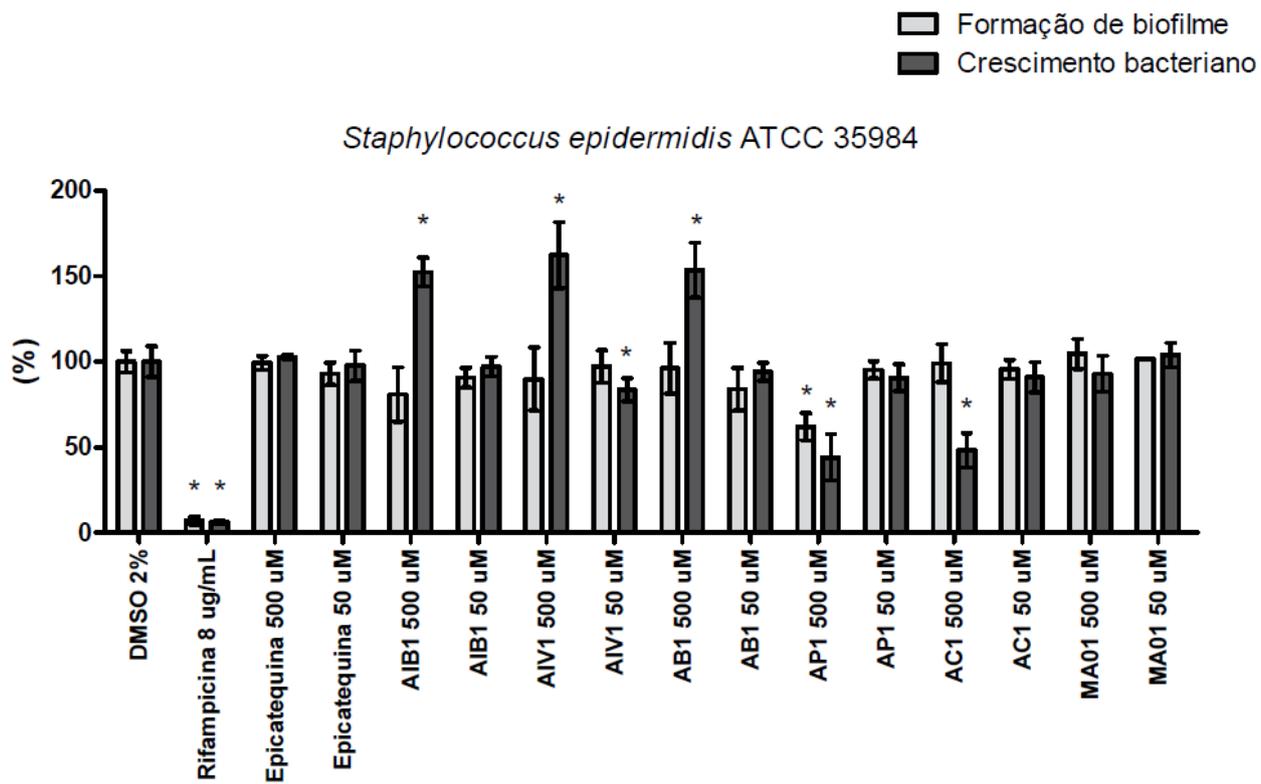


Figura 7: Avaliação do percentual de formação do biofilme e do crescimento bacteriano de *S. epidermidis*. Controle positivo rifampicina 8µg/ml. Controle negativo DMSO 2%. * Significativamente diferente do controle (P <0,05).

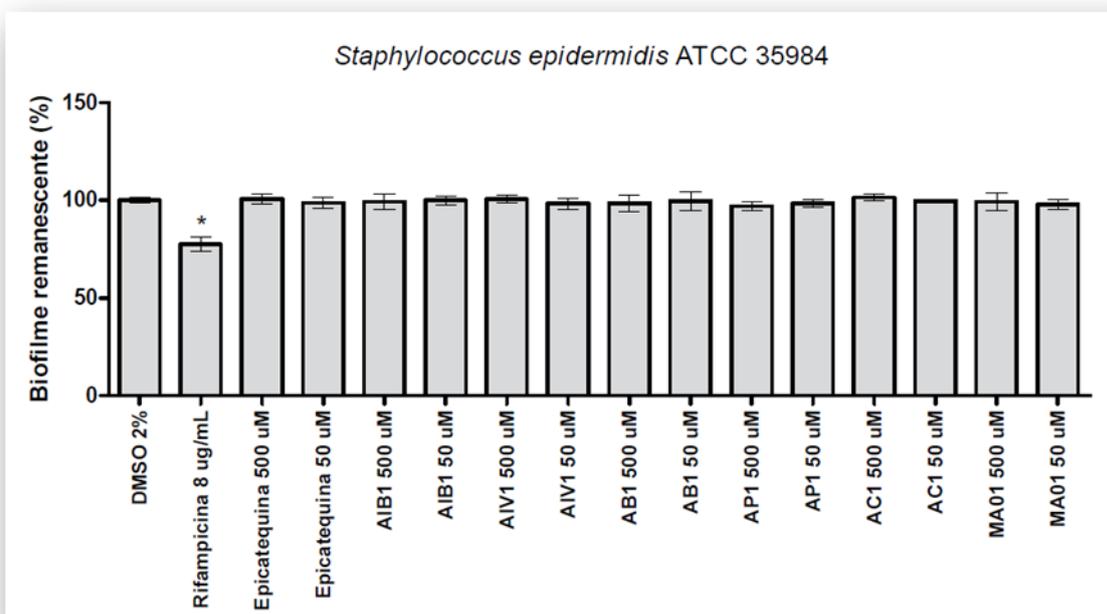


Figura 8: Avaliação do percentual de biofilme remanescente de *S. epidermidis* após tratamento com os compostos. Controle positivo rifampicina 8µg/ml. Controle negativo DMSO 2%. *Significativamente diferente do controle (P <0,05).

Em geral, podemos perceber que o composto AP1 foi o que apresentou melhores resultados frente às atividades propostas neste estudo. AP1 é o único derivado desta série que apresenta como características estruturais cinco substituintes de cadeia linear, saturada e com cinco carbonos.

Os estudos de relação estrutura atividade com catequinas visando biofilme são bem restritos. Alguns estudos de química medicinal recentes identificaram características estruturais que melhoram as propriedades antibacterianas e antiadesão de superfícies, o que preveniria a formação e o estabelecimento de comunidades em biofilme. O estabelecimento de tais relações é essencial para otimizar as atividades avaliadas.

Há uma evidência crescente de que os flavonóides sejam capazes de interferir com vários fatores de virulência bacteriana, incluindo enzimas, toxinas e receptores de sinal (CUSHNIE & LAMB, 2011).

Segundo o autor MATSUNAGA, T., et al., dentre todas as catequinas estudadas, as catequinas com o grupo galoil (epicatequina galato, epigalocatequina galato) se destacaram, pois foram capazes de interferir expressivamente na formação do biofilme de

Eikenella corrodens, sugerem ainda que esta atividade pode estar envolvida com as suas propriedades antioxidantes, pois desta forma as catequinas agiriam afetando a interação entre as células bacterianas (MATSUNAGA, 2010).

Do mesmo modo outro estudo avaliou o efeito das catequinas sobre o biofilme de *Candida albicans*. Uma vez que um biofilme foi estabelecido, todos os três compostos (epigallocatequina-3-galato, epigallocatequina e epicatequina-3-galato) foram capazes de perturbar uma comunidade biofilme pré-formado dentro de um período de 24 horas (BRAUN & CALABRESE, 2009).

Os autores JANECKI & KOLODZIE, avaliaram a influência das catequinas sobre a adesão bacteriana de *Streptococcus* grupo A e sugeriram uma correlação estrutura atividade. Primeiramente foi avaliado o potencial antiadesivo de análogos estruturais de flavan-3-óis, incluindo a (-) – epicatequina (1), (-) – epigallocatequina (2) e (-) - epigallocatequina-3-O-galato (3), neste caso o composto 3 apresentou maior redução (40%), sobre a adesão microbiana, seguido de 2 (cerca de 15%), enquanto que 1 não mostrou efeitos significantes. Os autores atribuíram que esta atividade antiadesiva de flavan-3-óis é associada à presença do elemento pirogalol, com anel B triidroxilado e potencializado com a presença do grupo galoil na molécula. Ainda neste trabalho foi avaliada a atividade antiadesão de proantocianidinas, os autores associaram a presença de ao menos uma unidade de epigallocatequina com o aumento do potencial antiadesão bacteriano. Também, a presença do grupamento galato aumenta significamente a atividade antiadesão do monómero (-) - epigallocatequina-3-O-galato se comparado a (-) – epigallocatequina, bem como a presença de no mínimo dois elementos do tipo pirogalol podem ser considerados como determinantes estruturais necessárias para inibição de adesão *Streptococcus* grupo A ao tecido (JANECKI & KOLODZIEJ, 2010).

Outro estudo baseia-se no uso de açúcares, que possuem elevado peso molecular para interagir sobre o potencial adesivo de bactérias como, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Porphyromonas gingivalis*. Como a adesão bacteriana é geralmente mediada por interações proteína-hidratos de carbono o uso de dispositivos médicos envolvidos por hidratos de carbono poderiam afetar esta interação e inibir a aderência entre a superfície do microrganismo e a célula. Estudos prévios demonstraram que as adesinas reconhecem estruturas glicosiladas e de que ocorre uma interação eletrostática

dos polímeros carregados negativamente com as respectivas adesinas (WIRRSCHIER, 2007).

Para continuar os estudos acerca destes compostos foi realizado um ensaio de toxicidade celular utilizando linfócitos humanos (Figura 9). Para este ensaio são consideradas citotóxicas aquelas amostras que diminuíram em 50% o número de células quando comparados ao controle negativo DMSO.

A epicatequina apresentou diminuição significativa na contagem de células a partir de 50 μM quando comparada ao controle DMSO e apresentou IC_{50} de 214 μM .

O composto MA01 diminuiu significativamente o número de células a partir de 25 μM quando comparada ao controle DMSO. Entretanto foi considerado citotóxico em concentrações acima do IC_{50} de 82 μM .

AP1 e AIV1 diminuíram significativamente o número de linfócitos a partir de 10 μM quando comparada ao controle DMSO, entretanto não apresentou citotoxicidade nas concentrações testadas, apresentando um $\text{IC}_{50} > 500 \mu\text{M}$.

O composto AB1 diminuiu significativamente o número de células a partir de 100 μM quando comparada ao controle DMSO e apresentou um IC_{50} de 258 μM . Já seu isômero AIB1 apresentou diferença significativa no número de células apenas em 500 μM ($76,81\% \pm 3,39$) quando comparada ao controle DMSO e IC_{50} superior a 500 μM .

O composto AC1 no ensaio de contagem de linfócitos humanos apresentou diferença significativa acima de 10 μM quando comparada ao controle DMSO e IC_{50} de 24 μM . O composto AC1 demonstrou ser o composto mais citotóxico quando comparado aos outros compostos sintetizados neste trabalho e é o único derivado que possui instauração ao longo da cadeia lateral.

Avaliando estes resultados podemos fazer uma correlação entre citotoxicidade frente aos linfócitos e as características estruturais dos compostos. Este estudo preliminar demonstrou que a epicatequina, apresentou IC_{50} de 214 μM . Se compararmos a epicatequina, que possui cinco hidroxilas livres, sendo quatro hidroxilas aromáticas e uma hidroxila secundária no C3, com o MA01, derivado acetilado nas cinco hidroxilas, temos um aumento no potencial citotóxico nestas concentrações, MA01 possui IC_{50} de 82 μM . O composto MA01 na concentração de 50 μM , apresenta $23,6\% \pm 0,81$ de contagem celular, ou seja, este composto com as hidroxilas acetiladas apresenta mais que o dobro de toxicidade que a epicatequina que possui hidroxilas livres (Figura 9).

O composto AB1 apresentou diferença significativa no número de linfócitos a partir da concentração de 100 μM com IC_{50} de 258 μM já seu isômero estrutural AIB1 apresentou um IC_{50} >500 μM . AB1 apresenta cinco substituintes com cadeia linear, saturada de quatro carbonos, já AIB1, difere apenas por possuir cadeia ramificada. O composto AC1 apresentou IC_{50} de 24 μM , sendo que. AC1 difere de AB1, por possuir insaturação ao longo da cadeia.

Os isômeros AP1 e AIV1 no ensaio de contagem celular em linfócitos humanos apresentaram IC_{50} >500 μM não sendo considerados desta forma citotóxicos dentro da curva de concentração avaliada. AP1 se diferencia de AIV1, por possuir cinco substituintes com cadeia linear, saturada de cinco carbonos, já AIV1, difere por possuir cadeia ramificada.

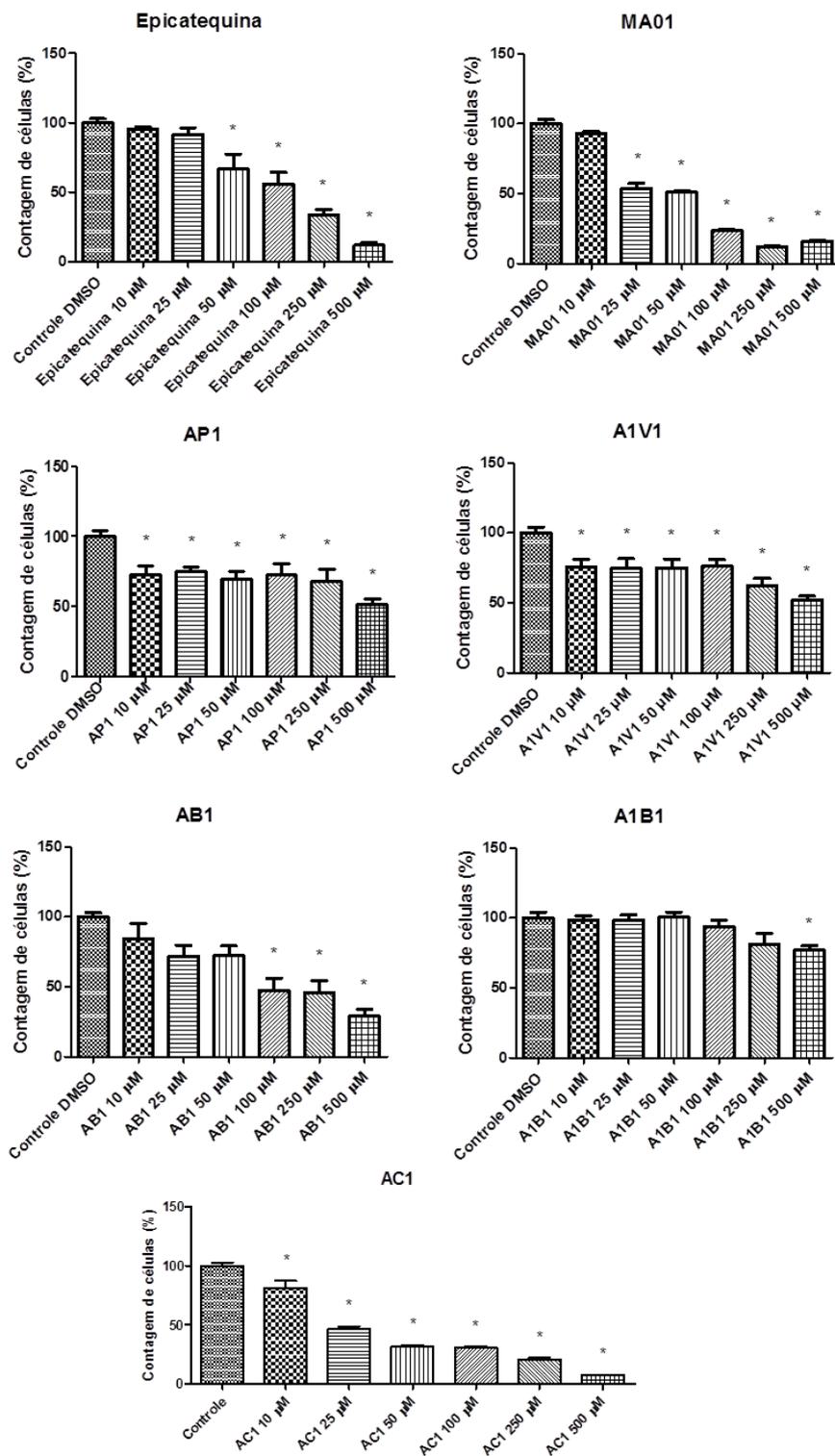


Figura 9: Avaliação da citotoxicidade em células mononucleares humanas por 24h frente aos compostos: Epicatequina, MA01, AP1, A1V1, AB1, A1B1, AC1. Onde Controle negativo DMSO. *Significativamente diferente do controle (P < 0,05) (ANOVA de 1 via seguida pelo teste de Tukey), n=3.

5.4. Conclusão

Os estudos de relação estrutura-atividade com catequinas visando atividade antibiofilme são bem restritos. Alguns estudos de química medicinal recentes identificaram características estruturais que melhoram as propriedades antibacterianas e antiadesão de superfícies, o que preveniria a formação e o estabelecimento de comunidades em biofilme. O estabelecimento de tais relações é essencial para otimizar as atividades avaliadas.

Segundo os resultados obtidos podemos perceber que o composto AP1 foi o que apresentou melhores resultados na concentração de 500 μM frente à inibição da formação do biofilme de *K. pneumoniae*, *S. aureus* e *S. epidermidis* e a inibição do crescimento bacteriano de *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *S. epidermidis*. Considerando a concentração tóxica aquela que causa a diminuição de 50% das células, o composto AP1 não demonstrou ser citotóxico nas concentrações avaliadas ($\text{IC}_{50} > 500 \mu\text{M}$), AP1 é o único derivado desta série que apresenta como características estruturais cinco substituintes de cadeia linear, saturada e com cinco carbonos.

No ensaio de citotoxicidade, os compostos AP1, AIV1 e AIB1 apresentaram IC_{50} superior a 500 μM frente aos linfócitos humanos.

Pode-se perceber ainda que mesmo alguns compostos apresentando diferença significativa do controle não apresentaram atividade promissora frente à erradicação de um biofilme já formado. Ainda podemos observar que nem mesmo os antibióticos testados, nestas concentrações, possuem tal atividade, sendo este comportamento de acordo com o que já foi descrito pela literatura científica.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, compostos acilados foram obtidos por síntese orgânica usando uma estratégia simples, eficiente e que apresenta altos rendimentos. Estes compostos foram planejados de forma a proporcionar uma diversidade química suficiente para avaliar a atividade antiformação do biofilme, o crescimento bacteriano, a erradicação do biofilme e o potencial citotóxico desta série de compostos.

A utilização de moléculas que tenham ação específica contra formação do biofilme ou erradicação de um biofilme já formado pode proporcionar uma poderosa ferramenta contra infecções. Dado o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos, a prevenção da invasão de microrganismos pode evitar muitos problemas clínicos e reduzir o custo da terapia. Adesão bacteriana às células epiteliais é o passo fundamental em infecções, permitindo subsequente colonização, invasão de patógenos nos tecidos. Os agentes antiadesivo são, portanto, potenciais ferramentas profiláticas contra infecções bacterianas.

Os estudos de relação estrutura-atividade com catequinas visando atividade antibiofilme são bem restritos. Alguns estudos de química medicinal recentes identificaram características estruturais como, a presença de açúcares e do grupamento galato, que melhoram as propriedades antibacterianas e antiadesão de superfícies, o que preveniria a formação e o estabelecimento de comunidades em biofilme. O estabelecimento de tais relações é essencial para otimizar as atividades avaliadas. Estes estudos merecem uma análise mais aprofundada, para um melhor entendimento das interações das moléculas com os microrganismos.

Neste estudo podemos perceber que o composto AP1 foi o que apresentou melhores resultados na concentração de 500 μM frente à inibição da formação do biofilme de *K. pneumoniae*, *S. aureus* e *S. epidermidis* e a inibição do crescimento bacteriano de *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *S. epidermidis*. Considerando a concentração tóxica aquela que causa a diminuição de 50% das células, AP1 possui $\text{IC}_{50} > 500 \mu\text{M}$. AP1 é o único derivado desta série que apresenta como características estruturais cinco substituintes de cadeia linear, saturada e com cinco carbonos.

Na avaliação da citotoxicidade, os compostos AP1, AIV1 e AIB1 demonstraram IC_{50} superior a 500 μM frente aos linfócitos humanos.

Pode-se perceber ainda que mesmo alguns compostos apresentando diferença significativa do controle não apresentaram atividade promissora frente à erradicação de um biofilme já formado. Ainda podemos observar que nem mesmo os antibióticos testados, nestas concentrações, possuem tal atividade, sendo este comportamento de acordo com o que já foi descrito pela literatura científica.

Enfim propomos como perspectiva de melhora de atividade, modificações estruturais nos compostos acilados, como por exemplo, a substituição da posição C3 do composto de partida pelo grupamento galoil ou por açúcares, que como já discutido anteriormente, podem ser considerados alvos para melhora das atividades biológicas propostas.

Propomos ainda a continuação do trabalho com a síntese dos derivados da delfinidina com mais especificidade e maior estudo para promover a ligação C4-C8, para formação do dímero desejado.

7. REFERÊNCIAS

ANTUNES, A., et. al. High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters.. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 106, p. 51-55, 2011.

BARREIRO, E. et. al. Química Medicinal. Porto Alegre: Artmed, 2008.

BENNETT, E., R. Predicting physical properties of emerging compounds with limited physical and chemical data: QSAR model uncertainty and applicability to military munitions. Chemosphere, v. 77, p. 1412-1418, 2009.

BRAUN, P., C. & CALABRESE, N., A. The effects of tea polyphenols on *Candida albicans*: inhibition of biofilm formation and proteasome inactivation. Biology Faculty Publications, v. 12, 2009.

BRYERS, J. Medical Biofilms. Biotechnology and Bioengineering, v. 100, p. 1-18, 2008.

BUSSCHER, H., et. al. Biomaterial-associated infection: locating the finish line in the race for the surface. Science Translational Medicinal, v. 4, p. 1-11, 2012.

CAREY, F. Organic Chemistry. 9th ed. Editora New York: McGraw-Hill, 2014.

CHOKR, A., et. al. Correlation between biofilm formation and production of polysaccharide intercellular adhesin in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. Int. J. Med. Microbiol. Int. J. Med. Microbiol. , v. 296, p. 381-388, 2005.

CHUNG, K., T., et. al. Tannins and human health: a review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., v. 38, p. 421-464, 2008.

CLAYDEN, J. Química Orgânica. 7ª ed. Oxford: s.n., 2012.

COSTERTON, J., STEWART, P. & GREENBERG, E. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infectious. Science, v. 284, p. 1318-1322, 2002.

CROFT, K. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 854, p. 435-442, 1998.

CUSHNIE, T. & LAMB, A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 38, p. 99-107, 2011.

DAVIES, D., et. al. Understanding biofilm resistance to antimicrobial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 2, p. 114-122, 2003.

DENNIS, E. Synthesis of Procyanidin Oligomers. Development and Application of Cross-Coupling Reactions using Novel C8-organometallic Derivatives. Tese de doutorado. Flinders University, South Australia, 2010.

DENNIS, E., et. al. Procyanidin oligomers. A new method for 4/8 interflavan bond formation using C8-boronic acids and iterative oligomer synthesis through a boron-protection strategy. *Tetrahedron*, v. 68, p. 340-348, 2012.

DONLAN, R. & COSTERTON, J. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 15, p.167-193, 2002.

EVENSEN, A., N. & BRAUN, C., P. The effects of tea polyphenols on *Candida albicans*: inhibition of biofilm formation and proteasome inactivation. *Can. J. Microbiol.*, v. 55, p. 1033–1039, 2009.

GREENE, T., W., P. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*. 4^a ed., editora Wiley, New Jersey, 2007.

GREENE, T., W. & WUTS, P., G., M. *Synthesis, Protective Groups in Organic*. Editora Wiley, New York., 1999.

HOIBY, N., et. al. The clinical impact of bacterial biofilms. *International Journal of Oral Sciences*, v. 3, p. 55-65, 2011.

HUBER, et. al. *Z. Naturforsch*, v. 58, p. 879–884, 2003.

ISENMANN, A. *Princípios da Síntese Orgânica*, 2013.

ISHIHARA, S., et. al. Development of a new synthetic strategy for procyanidin dimer condensation using peracetylated electrophiles. *Heterocycles*, v. 88, p. 1595 – 1602, 2014.

JAGANI, S., CHELIKANI, R., & KIM, D. Effects of phenol and natural phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling*, v. 23, p. 321–324, 2009.

JANECKI, A., & KOLODZIEJ, H. Anti-Adhesive Activities of Flavan-3-ols and Proanthocyanidins in the Interaction Group A- Streptococci and Human Epithelial Cells. *Molecules*, v. 15, p. 7139-7152, 2010.

KATOH, M., et. al. Synthesis of Procyanidin B1, B2, and B4 and Their Anti-Inflammatory Activity: The Effect of 4-Alkoxy Group of Catechin and/or Epicatechin Electrophiles for Condensation. *Letters in Organic Chemistry*, v. 9, p. 233-238, 2012.

KERR, K. & SNELLING, A. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *The Journal of Hospital Infection*, v. 73, p. 338-344, 2009.

KOZIKOWSKI, A., W., G., C. Studies in Polyphenol Chemistry and Bioactivity. 2.1 Establishment of Interflavan Linkage Regio- and Stereochemistry by Oxidative Degradation of an O-Alkylated Derivative of Procyanidin B2 to (R)-(-)-2,4-Diphenylbutyric Acid. *J. Org. Chem*, v. 65, p. 5371-5381, 2000.

LAGE, G., A. Isolamento, identificação química e bioprospecção de metabólitos secundários nas folhas de *Annona crassiflora* Mart. Dissertação Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

LEWIS, K. Persister cells: molecular mechanisms related to antibiotic tolerance. *Handbook of Experimental Pharmacology*, v. 211, p. 121-133, 2012.

LISBOA, T., et. al. Prevalência de infecção nosocomial em Unidades de Terapia Intensiva do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, v. 19, p. 414-420, 2007.

LYCZAK, J., CANNON, C. & PIER, G. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 15, p. 194–222, 2002.

MACEDO, A., & ABRAHAM, W. Can infectious biofilm be controlled by blocking bacterial communication?. *Medicinal Chemistry*, v. 5, p. 517-528, 2009.

MADSEN, J., et. al. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 65, p. 183-195, 2012.

MARRA, A., et. al. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 49, p. 1866-1871, 2011.

MARRIE, T., NELLIGAN, J., & COSTERTON, J. A scanning and transmission electron microscopic study of and infected endocardial pacemaker lead. *Circulation*, v. 66, p. 1339-1341, 1982.

MATSUDA, T., et. al. Biofilm formation inhibitor and treatment device thereof. United States Patent, 2013.

MATSUNAGA, T., et. al. The Inhibitory Effects of Catechins on Biofilm Formation by the Periodontopathogenic Bacterium, *Eikenella corrodens*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v. 74, p. 2445-2450, 2010.

MCMURRY, J. Química Orgânica. São Paulo: 7^a ed., 2012.

MEIER, L. Desenvolvimento de uma metodologia para acetilação de nucleosídeos e α -metileno- β -hidróxi ésteres (derivados de morita-baylis-hillman) empregando catálise heterogênea. Florianópolis-SC: Dissertação submetida à Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

MUELLER-HARVEY, I. Analysis of hydrolysable tannins. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v. 91, p. 3-20, 2001.

NEIDELL, M., et. al. Costs of healthcare and community-associated infections with antimicrobial-resistant versus antimicrobial-susceptible organisms. *Clinical Infectious Disease*, v. 55, p. 807-815, 2012.

NIH, National Institutes of Health [Internet]. Available from: <http://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/PA-03-047.html>. Acesso em janeiro 2015.

NORDMANN, P., & CORNAGLIA, G. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a call for action!. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 18, p. 411-412, 2012.

OHMORI, L., USHIMARU, N., & SUZUKI, K. Oligomeric catechins: An enabling synthetic strategy by orthogonal activation and C(8) protection. *PNAS*, v. 101, p. 12002–12007, 2004.

OIZUMI, Y., et. al. Synthesis of procyanidins C2 and C1 using lewis acid mediated equimolar condensation. *Heterocycles*, v. 85, p. 2241-2250, 2012.

OKAMOTO, S., et. al. Inhibitory Activity of Synthesized Acetylated Procyanidin B1 Analogs against HeLa S3 Cells Proliferation. *Molecules*, v. 19, p. 1775-1785, 2014.

PAIM, C., S., et. al. Gemifloxacin mesylate(GFM) stability evaluation applying a validated bioassay method and in vitro cytotoxic study. *Talanta*, v. 83, p. 1774-1779, 2011.

PARSEK, M., & SINGH, P. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Ann Rev Microbiol*, v. 57, p. 677–701, 2003.

PAVIA, D., L., et. al. Introduction to spectroscopy. 5^a ed., editora: Washington, 2013.

PAYNE, D., et. al. Tannic acid inhibits *Staphylococcus aureus* surface colonization in an IsaA-dependent manner. *Infect Immun.*, v. 81, p. 496-504, 2013.

PLYUTA, V., et. al. Effect of plant phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *APMIS*, 2013.

QUIDEAU, S., et. al. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angew. Chem. Int.* , v. 50, p. 586 – 621, 2011.

ROCHFORD, E., RICHARDS, R., & MORIARTY, T. Influence of material on the development of device-associated infections. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 18, p. 1162-1167, 2012.

SAITO, A., et. al. Synthetic studies of proanthocyanidins. Part 2: Stereoselective gram-scale synthesis of procyanidin-B3. *Tetrahedron*, v. 58, p. 7829–7837, 2002.

SAITO, A., et. Al. Systematic synthesis of four epicatechin series procyanidin trimers and their inhibitory activity on the Maillard reaction and antioxidant activity. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 12, p. 4783–4790, 2004.

SAMOILOVA, Z., et. al. Medicinal plant extracts can variously modify biofilm formation in *Escherichia coli*. *Antonie van Leeuwenhoek* , v. 105, p. 709–722, 2014.

SCHOFIELD, P., MBUGUA, D., & PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Sci Technol*, v. 91, p. 21-40, 2011.

SILVA, et. al., 2013. Two series of new semisynthetic triterpene derivatives: differences in anti-malarial activity, cytotoxicity and mechanism of action. *Malaria Journal*, v. 12, p. 2-7, 2013.

SINGH, D., V., et. al. Curcumin Conjugates Induce Apoptosis Via a Mitochondrion Dependent Pathway in MCF-7 and MDA-MB-231 Cell Lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v.14, p. 5797-5804, 2013.

-
- SOLOMOS, T., G. Quimica Orgânica. 10^a ed. Rio de Janeiro, 2012.
- STEWART, P. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. International Journal of Medical Microbiology, v. 292, p. 107-113, 2002.
- STEWART, P. & FRANKLIN, M. Physiological heterogeneity in biofilms. Nature Reviews Microbiology, v. 6, p. 199-210, 2008.
- STONDLEY, et. al. J. of Ind. Microbiology and Biotechnology, v. 29, p. 361- 368, 2004.
- TARASCOU, I., et. al. An Improved Synthesis of Procyanidin Dimers: Regio- and Stereocontrol of the Interflavan Bond. Eur. J. Org. Chem, p. 5367–5377, 2006.
- TASUMI, M., et. al. Introduction to Experimental Infrared Spectroscopy. Ed: Wiley-Blackwell, 2014.
- TRENTIN, D., S., et. al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semiarid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. J. Ethnopharmacol, v. 137, p. 327-335, 2011.
- TRENTIN, D., S., GIORDANI, R. B. & MACEDO, A., J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. Revista Liberato, v. 14, p.113-238, 2013.
- TRENTIN, S., D., et. al. Tannins Possessing Bacteriostatic Effect Impair *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion and Biofilm Formation. PLOS ONE, v. 8, 2013.
- TRETER, J. & MACEDO, A. Catheters: a suitable surface for biofilm formation. Science against Microbial Pathogens, p. 835-842, 2011.
- UÇKAY, I., et. al. Foreign body infections due to *Staphylococcus epidermidis*. Annals of Medicine, v. 41, p. 109-119, 2009.
- WENZEL, R. Health care-associated infections: major issues in the early years of the 21st century. Clinical Infectious Disease, v. 45, p. 85-88, 2007.
- WIRRSCHIER, N., et. al. Large molecules as anti-adhesive compounds against pathogens. Journal of Pharmacy and Pharmacology , v. 59, p. 777–786, 2007.

YU, D., et. al. Anti-AIDS Agents 69. Moronic Acid and Other Triterpene Derivatives as Novel Potent Anti-HIV Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 49, p. 5462-5469, 2006.

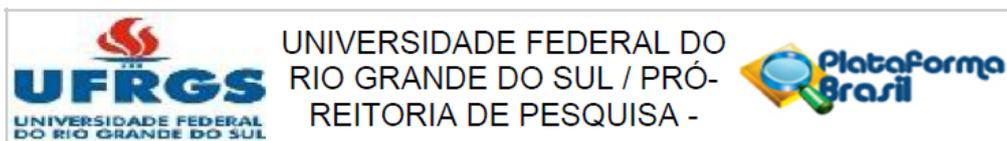
ZANIN, I., et. al. *Eur. J. Oral Sci.*, v. 114, p. 64-69, 2006.

ZIMMER, R., K. Atividade antibiofilme e antibiótica da cera dos ovos e de metabólitos produzidos por bactérias associadas ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.



8. ANEXO:

8.1.Parecer do comitê de ética:



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação toxicológica de moléculas naturais e sintéticas

Pesquisador: Grace Gosmann

Área Temática:

Versão: 6

CAAE: 13193513.3.0000.5347

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL/COMITÊ DE ÉTICA EM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 666.655

Data da Relatoria: 05/06/2014

Apresentação do Projeto:

Em atendimento à solicitação, a nova versão do projeto de pesquisa possui introdução fundamentada. Os pesquisadores solicitam, em declaração enviada como anexo, que o Projeto seja confidencial considerando que as substâncias a serem testadas são originais e esses resultados são inéditos.

Objetivo da Pesquisa:

O projeto de pesquisa pretende avaliar a atividade toxicológica de compostos naturais e sintéticos em células mononucleares de sangue periférico humano.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequadamente apresentados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa com mérito e adequada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Em atendimento à solicitação, a nova versão do TCLE deixa claro ao leitor a realização de apenas uma coleta de sangue, em volume de 10 mL. Foram acrescentadas no projeto completo a relação das substâncias que serão testadas. No parecer anterior foi solicitada a inclusão de informação referente as substâncias que serão testadas, em linguagem simples, clara e apropriada ao

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-060
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL / PRÓ-
REITORIA DE PESQUISA -



Continuação do Parecer: 666.655

entendimento do doador, o que foi atendido.

Recomendações:

Projeto em condições de aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto em condições de aprovação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado.

PORTO ALEGRE, 29 de Maio de 2014

Assinado por:
José Artur Bogo Chies
(Coordenador)

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-060
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propeq.ufrgs.br