

SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DO COMPOSTO ISOCARIOLÂNICO (8R, 9R)-8-METOXI-ISOCARIOLAN-9-OL

Synthesis and antimicrobial evaluation of the isocaryolane compound (8R, 9R)-8-methoxy-isocaryolan-9-ol

Stefany de Sousa Quintino¹, Erika Izumi², Jociani Ascari³

RESUMO

A síntese orgânica é um processo que envolve a construção ou transformação de substâncias orgânicas a partir de precursores mais simples, permitindo a criação de moléculas de diferentes complexidades. Sesquiterpenos com esqueleto do tipo isocariolano possuem características estruturais importantes e são relevantes devido ao seu potencial efeito fungistático contra o fitopatógeno *Botrytis cinerea*. O objetivo deste estudo foi sintetizar, purificar, elucidar estruturalmente e avaliar a atividade antimicrobiana do composto (8R, 9R)-8-metoxi-isocariolan-9-ol. Utilizou-se técnicas cromatográficas para purificar e a técnica de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear para elucidar a estrutura. A atividade antimicrobiana do composto foi avaliada em relação a diversos tipos de microrganismos, incluindo bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, e leveduras como *Candida Albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* e *Cryptococcus gattii* por meio do ensaio de Concentração Inibitória Mínima. Os resultados evidenciaram um significativo potencial antimicrobiano, especialmente contra *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* e *Candida Krusei*, microrganismos comumente associados a infecções hospitalares com resistência a antibióticos e antifúngicos tradicionais. Essas descobertas indicam que o composto pode ser uma promissora base para o desenvolvimento de novos fármacos, contribuindo para enfrentar desafios relacionados à resistência microbiana.

PALAVRAS-CHAVE: atividade antimicrobiana; isocariolano; síntese orgânica.

ABSTRACT

Organic synthesis is a process that involves the construction or transformation of organic substances from simpler precursors, allowing the creation of molecules of different complexities. Sesquiterpenes with an isocaryolane-type skeleton have important structural characteristics and are relevant due to their potential fungistatic effect against the phytopathogen *Botrytis cinerea*. The objective of this study was to synthesize, purify, structurally elucidate and evaluate the antimicrobial activity of the compound (8R, 9R)-8-methoxy-isocaryolan-9-ol. Chromatographic techniques were used to purify and the Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy technique to elucidate the structure. The antimicrobial activity of the compound was evaluated against several types of microorganisms, including bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and yeasts such as *Candida Albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* and *Cryptococcus gattii* using the Minimum Inhibitory Concentration assay. The results showed a significant antimicrobial potential, especially against *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* and *Candida Krusei*, microorganisms commonly associated with hospital infections with resistance to traditional antibiotics and antifungals. These findings indicate that the compound can be a promising basis for the development of new drugs, contributing to facing challenges related to microbial resistance.

KEYWORDS: antimicrobial activity; isocaryolane; organic synthesis.

¹ Bolsista da Fundação Araucária. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brasil. E-mail: stefanyquintino@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 0813965684600716.

² Docente no curso de Ciências Biológicas. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brasil. E-mail: erikaizumi@utfpr.edu.br. ID Lattes: 4256803942936872.

³ Docente no curso de Ciências Biológicas. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brasil. E-mail: jascari@utfpr.edu.br. ID Lattes: 2679876816448668.

INTRODUÇÃO

A síntese orgânica envolve a criação ou transformação de substâncias orgânicas usando precursores simples, resultando em moléculas mais complexas. Sínteses de compostos orgânicos podem ser realizadas por diferentes razões. Na indústria química, são realizadas buscando meios economicamente viáveis para a obtenção de novos compostos e compostos já conhecidos. Na indústria farmacêutica, novas moléculas orgânicas são sintetizadas e desenvolvidas na expectativa de serem novos fármacos úteis (MCMURRY, 2016; SOLOMONS; FRYHLE; SNYDER, 2018).

Sesquiterpenos com esqueleto isocariolânico possuem importantes características estruturais, apresentando uma diversidade de grupos funcionais que contribuem para uma variedade de atividades biológicas e químicas. Muitos desses sesquiterpenos têm demonstrado atividades biológicas importantes, incluindo propriedades antimicrobianas. Todavia, há uma escassez de dados existentes na literatura sobre estes compostos. (RACERO; COLLADO; MACIAS, 2004).

A determinação estrutural de substâncias desempenha um papel fundamental na química orgânica. Quando se obtém uma substância, é essencial confirmar sua estrutura, e isso pode ser realizado por meio da técnica de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), que realiza a identificação do esqueleto carbono-hidrogênio de uma substância orgânica. Na RMN, prótons em um campo magnético assumem estados de energia diferentes (spin α e β). Irradiando com energia correspondente à diferença de energia, prótons α são promovidos a β e, ao retornar, emitem sinais com frequências dependentes dessa diferença. O espectrômetro de RMN registra esses sinais em um gráfico de intensidade versus frequência, criando um espectro de RMN. As análises dos espectros de RMN baseiam-se em acoplamento spin-spin, integração dos picos e deslocamento químico. A espectroscopia de RMN frequentemente revela a estrutura completa de moléculas desconhecidas (BRUICE, 2006; PAVIA, 2010; SILVERSTEIN, 2019).

A resistência bacteriana é uma preocupação global em saúde pública, sendo reconhecida por governos e pela indústria farmacêutica internacional. O uso indiscriminado de antibióticos e antifúngicos tem levado ao surgimento de cepas multirresistentes, tornando muitos medicamentos antimicrobianos ineficazes. Isso tem impulsionado a necessidade de encontrar novos agentes antimicrobianos (BLACK; BLACK, 2021).

A concentração inibitória mínima (CIM) é o principal parâmetro usado para otimizar terapias antimicrobianas. Ela representa a menor concentração de um antimicrobiano que impede o crescimento de um microrganismo em um intervalo de tempo específico. Outros parâmetros incluem a concentração bactericida mínima (CBM) e a concentração fungicida mínima (CFM), que indicam as concentrações mais baixas capazes de matar bactérias e fungos (MACHADO et al., 2019; VERMELHO et al., 2019).

Os compostos isocariolânicos têm sido objeto de estudo devido ao seu potencial como agentes biológicos, incluindo atividade antimicrobiana. Compostos com estruturas semelhantes aos isocariolânicos foram previamente avaliados quanto à capacidade de inibir a infecção e replicação do vírus do mosaico do tabaco (TMV) *in vitro*, revelando um efeito inibitório moderado (CHEN et al., 2009). Além disso, esses compostos têm demonstrado atividade antimicrobiana contra patógenos, incluindo bactérias e fungos.

OBJETIVOS

Síntese, purificação, elucidação estrutural e avaliação da atividade antimicrobiana do composto isocariolânico (8R, 9R)-8-metoxi-isocariolan-9-ol.

MATERIAIS E MÉTODOS

TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

No monitoramento do avanço das reações, foi empregada a técnica Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Utilizaram-se placas cromatográficas de sílica gel 60 HG/254 com indicador fluorescente. A revelação ocorreu pela aplicação de uma solução de ácido sulfúrico, água destilada e ácido acético na proporção 4:16:80, seguida por aquecimento das placas e visualização sob uma lâmpada UV a 254 nm. As análises utilizaram diferentes proporções de hexano e acetato de etila como fase móvel. Utilizando a técnica de Cromatografia em Coluna de Vidro (CCV) isolou-se e purificou-se os produtos de síntese. Uma coluna cromatográfica de vidro com sílica gel 230-400 Mesh foi empregada, utilizando solventes hexano e acetato de etila com polaridades crescentes como fase móvel. O processo foi monitorado por CCD, possibilitando uma avaliação visual do progresso da purificação.

TÉCNICA ESPECTROSCÓPICA – RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

A elucidação estrutural do composto (8R, 9R)-8-metoxi-isocariolan-9-ol foi realizada através da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C . Os espectros foram adquiridos no espectrômetro Bruker DRX-400, linha AVANCE do Departamento de Química-UEM, registrando os deslocamentos químicos em unidades δ e as constantes de acoplamento J em Hz. O padrão de referência interno utilizado foi o composto tetrametilsilano (TMS), com clorofórmio deuterado como solvente.

REAÇÕES DE SÍNTESES ORGÂNICAS

Duas reações de síntese orgânica foram realizadas. Na primeira, o composto 5α -hidroxycariofil-4(12),8(13)-dieno foi obtido a partir do 4β , 5α -epoxicariofil-8(13)-eno, utilizando acetona, LiBr e TCNE como reagentes. O progresso foi monitorado por CCD, e o composto foi purificado por CCV de sílica gel. Na segunda reação, o composto (8R, 9R)-8-metoxi-isocariolan-9-ol foi obtido a partir do 5α -hidroxycariofil-4(12),8(13)-dieno, usando metanol e TCNE. O progresso também foi monitorado por CCD, e o composto foi purificado por CCV de sílica gel.

AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA

A avaliação antimicrobiana foi realizada no Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Santa Helena. O teste antimicrobiano do composto (8R, 9R)-8-metoxi-isocariolan-9-ol foi realizado frente aos seguintes microrganismos: bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecium* ATCC 6569, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e Gram-negativas

Escherichia coli ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27587, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 em comparação com o antibiótico Cloranfenicol; leveduras *Candida Albicans* tubo UEL ATCC 10231, *Candida tropicalis* TOL ATCC 28707, *Candida glabrata* ATCC 2001, *Candida dubliniensis* ATCC 656 MYA, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 34135 e *Cryptococcus gattii* ATCC 56990, em comparação com o antifúngico Fluconazol.

A determinação da concentração inibitória mínima foi efetuada por meio do ensaio de microdiluição em caldo, utilizando microplacas de 96 poços, em conformidade com as diretrizes estabelecidas pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Utilizou-se os meios de cultivo Mueller Hinton para bactérias e Rosalind Park Memorial Institute (RPMI) + Ácido 4-Morfolino Propano Sulfônico (MOPS) para leveduras. Inóculo para bactérias com aproximadamente 5.10^5 células/mL e para leveduras cerca de $2,5.10^3$ células/mL. A CIM foi testada no solvente DMSO, com concentração máxima de 1,2% nos poços.

Poços de controle, tanto com microrganismos quanto sem, foram empregados para assegurar a adequada avaliação do crescimento microbiano e a ausência de contaminação. Após a incubação “overnight”, 35°C por 24h e 100 µl no poço para bactérias - 35°C por 48h e 200 µl no poço para leveduras, determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O composto (8R, 9R)-8-metoxi-isocariolan-9-ol foi sintetizado, purificado por técnicas cromatográficas e elucidado por RMN em trabalhos anteriores pelo nosso grupo de pesquisa. O objetivo deste trabalho foi obter maior quantidade do composto através da síntese para realizar os testes antimicrobianos.

Os testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram realizados em diferentes cepas bacterianas, utilizando DMSO como solvente, revelando diferenças significativas nos valores para as bactérias testadas. Os resultados dos testes com o composto demonstraram uma variação significativa na sensibilidade das diferentes cepas bacterianas.

Entre as bactérias testadas, a *K. pneumoniae* ATCC 10031 apresentou a CIM mais elevada, atingindo 1000 µg/mL, indicando menor sensibilidade ao composto. As cepas de *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27587 e *S. aureus* ATCC 29213 mostraram CIMs intermediárias, todas com valores de 500 µg/mL. Por outro lado, *E. faecalis* ATCC 29212 e *E. faecium* ATCC 6569 apresentaram as CIMs mais baixas, 125 µg/mL e 250 µg/mL, respectivamente, sugerindo uma maior sensibilidade ao composto em comparação com as outras bactérias testadas (Quadro 1).

Quadro 1. Concentração Inibitória Mínima (µg/mL) - Bactérias

Bactérias	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 27587	<i>K.</i> <i>pneumoniae</i> ATCC 10031	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. faecium</i> ATCC 6569
(8R, 9R)-8-metox i-isocariola	500	500	1000	500	125	250

n-9-ol						
Cloranfenicol	4	64	16	8	8	8

Fonte: elaborado pelos autores (2023).

Além dos testes em bactérias, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do composto também foi avaliada em leveduras. Os resultados revelaram um potencial antifúngico promissor do composto, com CIMs variando de 62,5 a 500 µg/mL, com destaque para *C. krusei* ATCC 34135 com uma CIM de 62,5 µg/mL, próximo ao valor do antifúngico Fluconazol, que foi de 64 µg/mL. Outras leveduras demonstraram CIMs mais elevadas, sugerindo possível menor sensibilidade ou exigência de concentrações diferentes para inibição (Quadro 2).

Quadro 2. Concentração Inibitória Mínima (µg/mL) - Leveduras

Leveduras	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. tropicalis</i> ATCC 28707	<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	<i>C. dubliniensis</i> ATCC 646	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C. krusei</i> ATCC 34135	<i>Cryptococcus gattii</i> ATCC 56990
(8R, 9R)-8-metoxi-isocariolan-9-ol	500	500	250	500	500	62,5	125
Fluconazol	8	4	8	0,5	4	64	4

Fonte: elaborado pelos autores (2023).

Os resultados indicam que o composto (8R, 9R)-8-metoxi-isocariolan-9-ol apresenta maior eficácia contra cepas Gram-positivas, especialmente *E. faecalis* ATCC 29212 e *E. faecium* ATCC 6569, bactérias associadas a infecções hospitalares e com alta resistência a diversos antibióticos tradicionais (GAMA, 2008). O composto também apresentou também grande eficácia contra *C. krusei* ATCC 34135, que é naturalmente resistente ao antifúngico fluconazol (KHALIFA, 2022).

CONCLUSÃO

A partir das sínteses realizadas o composto isocariolânico (8R, 9R)-8-metoxi-isocariolan-9-ol foi obtido, purificado, por meio da Ressonância Magnética Nuclear sua elucidação estrutural foi realizada e através da avaliação de atividade antimicrobiana contra os microrganismos testados foi possível evidenciar seu potencial como agente antimicrobiano.

Agradecimentos

Agradeço a UTFPR pelo fornecimento dos materiais e equipamentos que desempenharam um papel essencial na elaboração deste trabalho científico. Além disso, desejo estender meus agradecimentos à professora Jociani Ascari por sua orientação ao

longo deste processo e à Fundação Araucária pela bolsa concedida, a qual desempenhou um papel significativo no apoio financeiro necessário para a realização deste projeto.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

- BLACK, J. G.; BLACK, L. J. **Microbiologia - Fundamentos e Perspectivas**. 10 ed. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2021.
- BRUICE, P. **Química Orgânica**. 4. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006. p. 19-624.
- FARIAS, Cayque De Souza et al.. **Potencial antimicrobiano do dimetilsulfóxido (dmso) frente a diversas cepas bacterianas**. Anais III CONBRACIS... Campina Grande: Realize Editora, 2018. Disponível em: <<https://www.editorarealize.com.br/index.php/artigo/visualizar/41292>>. Acesso em: 28 ago. 2023.
- GAMA, B. **Análise da resistência antimicrobiana e de genes de virulência de Enterococcus spp**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – UFRGS, Porto Alegre, p. 73. 2008.
- KHALIFA, H. O. *et al.* **Prevalence of Antifungal Resistance, Genetic Basic of Acquired Azole and Echinocandin Resistance, and Genotyping of Candida krusei Recovered from an Internacional Collection**. Antimicrobial Agents And Chemotherapy, American Society for Microbiology, v. 66, n. 2, 15 fev. 2022.
- MACHADO, O. V. O. *et al.* **Antimicrobianos: revisão geral para graduandos e generalistas**. 1. ed. Fortaleza: EdUnichristus, 2019.
- MCMURRY, J. **Química Orgânica - Combo: Tradução da 9ª edição norte-americana**. São Paulo: Cengage Learning Brasil, 2016. E-book. ISBN 9788522125876. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788522125876/>. Acesso em: 26 ago. 2023.
- PAVIA, D. L. *et al.* **Introdução à Espectroscopia**. 4 ed. Cengage Learning, 2010.
- RACERO, J. C.; COLLADO, I. G.; MACIAS, A. J. **Síntesis de sesquiterpenos isocariolânicos con potencial actividad antifúngica frente a Botrytis cinerea**. Soc. Méx, Cidade do México, v. 48, n. 1, p. 58-66, março/2004.
- SILVERSTEIN, R. M. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 8 ed. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2019. E-book. ISBN 9788521636472. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788521636472/>. Acesso em: 26 ago. 2023.
- SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B.; SNYDER, S. A. **Química Orgânica**. v.1. 12 ed. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2018. E-book. ISBN 9788521635536. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788521635536/>. Acesso em: 29 ago. 2023.
- VERMELHO, A. B.; PEREIRA, A. F.; COELHO, R. R. R.; SOUTO-PADRÓN, T. **Práticas de Microbiologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2019. E-book. ISBN 9788527735575. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788527735575/>. Acesso em: 26 ago. 2023.