



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS – ICE
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

Maria Luísa Forasteiro Mota

**Alquilcatecóis derivados do piperonal e *orto*-vanilina:
síntese e avaliação da atividade antimicrobiana**

Manaus –AM, 2023



Maria Luísa Forasteiro Mota

**Alquilcatecóis derivados do piperonal e *orto*-vanilina:
síntese e avaliação da atividade antimicrobiana**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Química Bacharelado da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como requisito para obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Alisson Meza Novais

Manaus –AM, 2023

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M917a	Mota, Maria Luísa Forasteiro Alquilcatecóis derivados do piperonal e orto-vanilina: síntese e avaliação da atividade antimicrobiana / Maria Luísa Forasteiro Mota . 2023 36 f.: 31 cm. Orientador: Alisson Meza Novais TCC de Graduação (Química - CH Bacharelado) - Universidade Federal do Amazonas. 1. Alquilcatecóis. 2. O-vanilina. 3. Cadeia alquílica. 4. Antimicrobianos. I. Novais, Alisson Meza. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título
-------	--

Maria Luísa Forasteiro Mota

Alquilcatecóis derivados do piperonal e *orto*-vanilina: síntese e avaliação da atividade antimicrobiana

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Química Bacharelado da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Química.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 10/11/2023.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 ALISSON MEZA NOVAIS
Data: 19/11/2023 18:15:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Alisson Meza Novais - UFAM
Orientador

Documento assinado digitalmente
 MARCOS BATISTA MACHADO
Data: 20/11/2023 10:41:57-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Marcos Batista Machado
Membro da Coordenação do Curso IE11 - UFAM

Prof. Dr. Joel Aparecido Passo
Membro da Comissão de Estágios, Monografia e Atividades Complementares



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS – ICE
COORDENAÇÃO DO CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

À minha mãe, Lesly Neves
Forasteiro Mota, pelo incentivo
para realização da graduação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos Seres de Luz por terem me auxiliado a alcançar esse objetivo e esse sonho de fazer graduação em uma Universidade Federal.

À minha família, pelo apoio, mas principalmente, à minha mãe que nunca mediu esforços e palavras de apoio para que eu chegasse até aqui, desde a prestação do vestibular até a conclusão desse curso.

À Universidade Federal do Amazonas, pelo ensino de qualidade e pelas oportunidades geradas.

À FINEP, CAPES, FAPEAM e CNPq, pelos incentivos financeiros para a infraestrutura dos laboratórios onde ocorreram os experimentos desse trabalho.

Ao professor Doutor Alisson Meza Novais, que foi meu orientador desde o estágio supervisionado e que sempre demonstrou apoio e me orientou da maneira mais leve possível, sendo presente e compreensível.

À Central Analítica da UFAM e ao Laboratório de Abertura de Amostras e Ensaio Químicos (LAEQ) pela infraestrutura e disponibilidade para realização desse trabalho.

Aos meninos que me acompanharam e auxiliaram na realização desse trabalho, bem como tornaram os dias no laboratório mais leves: Pedro Tavares, Ederson Costa, Felipe Brito e Felipe Fonseca.

Ao projeto Educação Solidária, do grupo de jovens Juventude Solidária Cristã, pelo cursinho preparatório, gratuito, para os vestibulares. E aos amigos, e família, que fiz provenientes desse projeto. Aos professores: Wagner William Amorim, Guilherme e Marcos Salazar, e Isaías Bessa que marcaram minha trajetória de vestibulanda e a todos os outros professores e pessoas que ajudaram na realização do Educação Solidária.

Aos amigos que fiz na Universidade que me apoiaram e que tornaram essa caminhada muito mais leve e divertida: Natália Fonsêca, Bianca Santos, Liciane Assis, Jéssica do Nascimento, Brenda Mendonça, Lucas Maciel, Vitória Cavalcante, Yasmin

Luchini, Maria Clara Pinheiro, Lucas Silva, Laura Merklein, Fernanda Maciel, René Gomes, Albert Santos e Ianni Oliveira.

À ECoA Química Júnior, que foi minha segunda casa por 3 anos e 6 meses, e que me preparou não só para o mercado de trabalho, mas também para vida acadêmica e vida pessoal, por ter me proporcionado experiências novas e aprendizados das mais diversas áreas do empreendedorismo e das interações interpessoais, além de ter me proporcionado, também, autoconhecimento.

À minha melhor amiga, Victória Judy Silva, e sua família, por ter me acolhido em sua casa, em meio ao desespero porque meu computador estava inviável e tinha um seminário a preparar.

À Sarah Flores por ter me auxiliado com as interpretações de espectros de Ressonância Magnética Nuclear.

À Vitória Cavalcante por ter me ajudado com os ensaios antimicrobianos.

E à Isabelly Santos e ao Kidney Neves pela realização das análises de Ressonância Magnética Nuclear.

RESUMO

Os lipídios fenólicos ou alquilfenóis compreendem uma ampla classe de produtos naturais produzidos por vegetais, bactérias, fungos e alguns animais, e apresentam diversas atividades biológicas, como a atividade antimicrobiana e antiproliferativa de células cancerígenas. Esse potencial se deve principalmente pela capacidade de interação dos alquilfenóis com os fosfolipídios de membranas biológicas, o que pode provocar em última instância eventos biológicos que resultam na morte celular. Com isso, esse trabalho teve como objetivo principal sintetizar alquilcatecóis do tipo 3-(1-hidroxiálquil)catecóis com variações no tamanho da cadeia alquílica a partir da *orto*-vanilina, bem como 4-(1-hidroxiálquil)catecóis a partir de reações de hidrólise do grupo 1,3-dioxolano proveniente de 5-(1-hidroxiálquil)-1,3-benzodioxóis previamente sintetizados a partir do piperonal. As análises estruturais foram feitas através de espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C . As reações de hidrólise do grupo acetal 1,3-dioxolano, testadas via tratamento dos materiais de partida com AlCl_3 , BF_3 e *p*-TsOH, não aconteceram como esperado, sendo que o primeiro método resultou na remoção não apenas do grupo acetal mas também da cadeia alquílica, e a reação com *p*-TsOH levou à formação de dímeros. Por outro lado, as sínteses de derivados de alquilcatecóis a partir da *o*-vanilina foram realizadas via reação de Grignard com êxito, onde três derivados foram sintetizados a partir dos brometos de hexil, octil e decilmagnésio. Os três derivados de alquilcatecóis sintetizados foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida parapsilosis*, não tendo sido ativos contra as bactérias, mas moderadamente ativos contra *C. parapsilosis*.

Palavras-chave: alquilcatecóis; *o*-vanilina; cadeia alquílica; antimicrobianos.

ABSTRACT

Phenolic lipids or alkylphenols comprise a broad class of natural products isolated from plants, bacteria, fungi, and some animals, and have many biological activities, such as antimicrobial and antiproliferative. These activities are mainly due to the ability of alkylphenols to interact with the phospholipids in biological membranes, which can result in biological events that lead to cell death. In this sense, this work aimed to synthesize alkylcatechols, specifically 3-(1-hydroxyalkyl)catechols with variable size of the alkyl side chain from *ortho*-vanillin, and 4-(1-hydroxyalkyl)catechols from the hydrolysis of the 1,3-dioxolane moiety of 5-(1-hydroxyalkyl)-1,3-benzodioxoles previously synthesized from piperonal. The structural analyzes were conducted by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. The hydrolysis reactions, carried out by treating the starting materials with AlCl_3 , BF_3 and *p*-TsOH, did not lead to the expected products, where the first promoted not only the removal of the acetal group, but also of the alkyl side chain, and the reaction with *p*-TsOH resulted in the formation of dimers. On the other hand, the synthesis of alkylcatechols from *o*-vanillin was successfully conducted through Grignard reactions, where three derivatives were synthesized from hexyl, octyl and decylmagnesium. These products were evaluated for antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida parapsilosis*, and were found to be not active against bacteria, but moderately active against *C. parapsilosis*.

Keywords: alkylcatechols; *ortho*-vanillin; alkyl chain; antimicrobials.

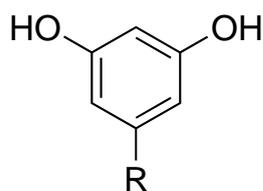
SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	OBJETIVOS.....	12
2.1	Objetivo Geral.....	12
2.2	Objetivos Específicos.....	12
3	METODOLOGIA.....	12
3.1	Reações de hidrólise do grupo 1,3-dioxolano.....	14
3.2	Reações de Grignard.....	16
3.3	Ensaio Antimicrobiano.....	17
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
4.1	Reações de hidrólise do grupo 1,3-dioxolano.....	18
4.2	Reações de Grignard.....	29
4.3	Ensaio Antimicrobiano.....	33
5	CONCLUSÃO.....	34
	REFERÊNCIAS.....	34

1 INTRODUÇÃO

Os lipídios fenólicos são produzidos por plantas (trigo, cevada, etc.), fungos, bactérias e alguns animais, sendo amplamente distribuídos na natureza. Sua estrutura baseia-se em polifenóis lipofílicos (Figura 1), notadamente o tipo alquil-resorcinol (em decorrência via biossintética policetídica), e apresentam muitas atividades biológicas, como antimicrobiana, antitumoral, antioxidante, antiparasitária e antidislipidêmica (Zabolotneva et al., 2022). Ao analisar grãos integrais, é notório que entre seus componentes mais predominantes encontram-se alquil-resorcinóis, os quais apresentam propriedades antiproliferativas contra a transformação e desenvolvimento de células cancerígenas em humanos (Zhu; Sang, 2017).

Figura 1: Estrutura geral de alquil-resorcinóis.

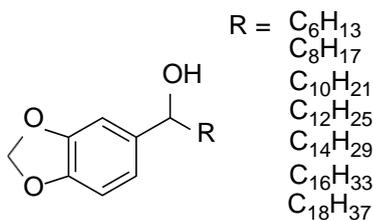


O grupo R ligado ao anel fenólico é quem dá o caráter anfifílico às substâncias, visto que poderá ter variações quanto ao tamanho e forma de sua cadeia de hidrocarboneto. Quanto maior a cadeia, maior é, por exemplo, a atividade antioxidante do composto, pois verifica-se que os alquilfenóis podem ser inseridos nas membranas de forma mais eficaz, e assim, o anel fenólico interage com as cabeças hidrofílicas dos fosfolipídios por meio de ligações de hidrogênio. Com isso, a estrutura de tais fosfolipídios é modificada, o que faz com que se tornem resistentes à oxidação (Tian et al., 2020). Outro benefício decorrente da presença de lipídios fenólicos na dieta é a observação de que a lipoproteína de baixa densidade (LDL), cuja concentração plasmática aumentada está associada à aterogênese (formação de placas de ateroma nas artérias), tem a sua formação diminuída (Fukuhara et al., 2006).

Os alquilfenóis podem ter seus anéis aromáticos derivados de outros compostos fenólicos a depender de rotas biossintéticas que ocorrem nas plantas/microrganismos, entre eles, estão os catecóis, as hidroquinonas, os pirogalóis, etc. (Kozubek; Tyman, 1999).

O grupo de pesquisa NEQUIMA/UFAM vem trabalhando com a síntese de lipídios fenólicos a partir da vanilina e do piperonal (Brito, 2023), e atualmente dispõe de derivados de 4-(1-hidroxiálquil)catecóis cujos grupos hidroxila encontram-se protegidos como acetais metilênicos do tipo 1,3-dioxolano (Figura 2), isto é, 5-(1-hidroxiálquil)-1,3-benzodioxóis. Assim, esse trabalho partiu destes compostos como materiais de partida para estudos de desproteção química dos grupos hidroxila via hidrólise do 1,3-dioxolano, bem como realizou a síntese de outros alquilcatecóis a partir de reações de Grignard da *orto*-vanilina.

Figura 2: Estruturas de 5-(1-hidroxiálquil)-1,3-benzodioxóis (Brito, 2023).

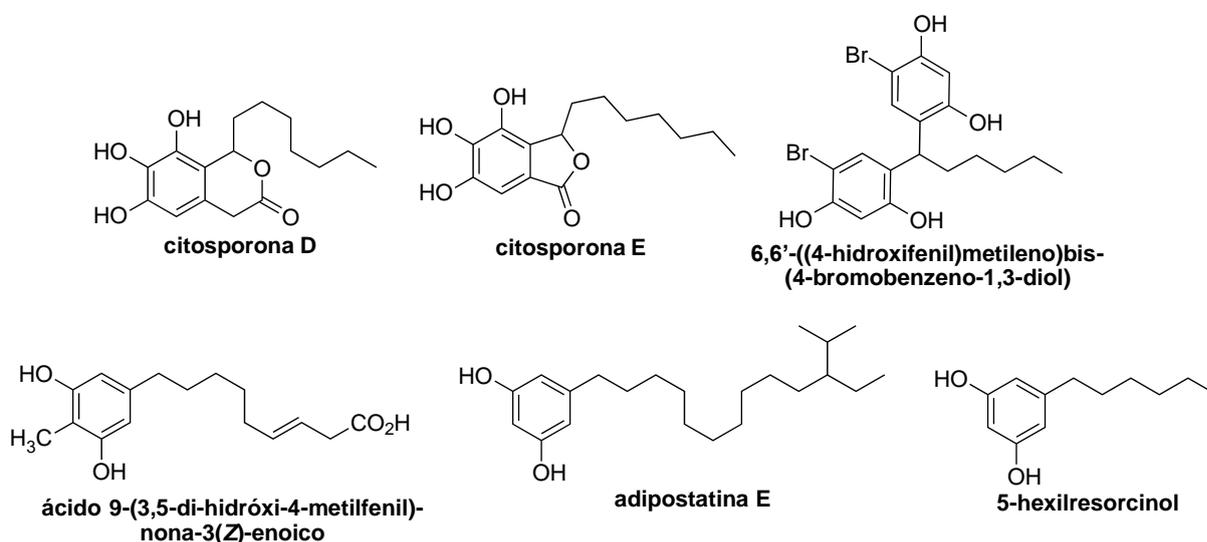


Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2017), a resistência microbiana a antimicrobianos é um problema grave que causa sérios danos à saúde da população. A resistência microbiana trata-se da capacidade de bactérias, fungos, vírus e parasitas de resistirem à medicamentos antimicrobianos. Ou seja, esses microrganismos vêm criando mecanismos de defesa contra substâncias que são comumente utilizadas para combatê-los, as quais, geralmente, são de origem natural, o que faz com que chame a atenção do ramo da síntese química para produção de compostos que venham a apresentar atividades antimicrobianas.

Lipídios fenólicos naturais ou sintéticos apresentam atividade antimicrobiana bem documentada. Entre alguns dos muitos exemplos, destacam-se as citosporonas D e E, isoladas em 2000 a partir de um fungo endofítico do gênero *Cytospora* sp. (Brady et al., 2000) e o dímero de resorcinol bromado 6,6'-((4-

hidroxifenil)metileno)bis(4-bromobenzeno-1,3-diol) (Bouthenet et al., 2011), ativos contra leveduras do gênero *Candida*. Exemplos de alquilfenóis ativos contra bactérias são o ácido 9-(3,5-di-hidróxi-4-metilfenil)nona-3(Z)-enoico (Luís et al., 2013), as adipostatinas, como a adipostatina E (Gómez-Rodríguez et al., 2020), e o 5-hexilresorcinol, o qual foi usado como adjuvante em combinação com outros antimicrobianos comerciais, potencializando as suas atividades antimicrobianas, sobretudo contra cepas de bactérias resistentes (Nikolaev et al., 2020). Estes exemplos encontram-se ilustrados na Figura 3.

Figura 3. Exemplos de lipídios fenólicos ativos contra microrganismos



Com isso, este trabalho de monografia focou na síntese de novos alquilcatecóis, especificamente com esqueletos básicos do tipo 3- e 4-(1-hidroalquil)catecóis, a fim de estudar a atividade antimicrobiana dos produtos obtidos. Por meio dessa abordagem, foi possível ter o contato e o entendimento sobre uma pesquisa científica de importância na área da química orgânica com aplicações na saúde, o que agregou conhecimento formativo acerca da pesquisa com a síntese e a purificação de compostos orgânicos, funcionamento da técnica espectroscópica de ressonância magnética nuclear e aprendizado sobre ensaios biológicos envolvendo microrganismos de importância clínica.

2 OBJETIVOS

Os objetivos estão organizados em geral e específicos, como segue.

2.1 Objetivo Geral

Sintetizar e avaliar a atividade antimicrobiana de alquilcatecóis do tipo 2- e 4-(1-hidroxiálquil)catecóis.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar métodos de hidrólise do grupo 1,3-dioxolano de 5-(1-hidroxiálquil)-1,3-benzodioxóis para a produção de 4-(1-hidroxiálquil)catecóis;
- Sintetizar novos 1-O-metil-3-(1-hidroxiálquil)catecóis por meio da reação de Grignard entre brometos de alquilmagnésio e a *orto*-vanilina.
- Avaliar o potencial antimicrobiano dos produtos sintetizados sobre cepas de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e cepas da levedura *Candida*.

3 METODOLOGIA

Materiais e equipamentos:

- Balões de vidro de fundo redondo de 25 e 50mL, de uma e de duas bocas;
- Espátulas de metal;
- Balança analítica Ohaus, modelo AR2140;
- Chapas elétricas de agitação e aquecimento Ika, modelo RH Basic 2;
- Rotaevaporador Fisaton, modelo 802;
- Cromatofolhas de sílica-gel 60 G com suporte de alumínio, da marca Macherey - Nagel, para análises por cromatografia em camada delgada (CCD);
- Condensadores de vidro tipo Allihn;
- Funil de adição de vidro;
- Funil de separação de vidro;
- Seringas de vidro;
- Barras magnéticas.

- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear, marca Bruker Avance IIIHD, com frequência para o ^1H em 500,13 MHz e para ^{13}C em 125 MHz e equipado com uma sonda BBFO Plus SmartProbe, localizado no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear – NMRLab – da Central Analítica do CAM, UFAM.

Reagentes:

- 5-(1-hidroxiálquil)-1,3-benzodioxóis disponíveis no laboratório (Brito, 2023);
- Cloreto de alumínio (AlCl_3), Sigma-Aldrich;
- Trifluoreto de Boro (BF_3), Sigma-Aldrich;
- Ácido *p*-toluenossulfônico (*p*-TSOH), Sigma-Aldrich;
- Ácido clorídrico (HCl), Nuclear;
- Diclorometano, Nuclear;
- Tolueno, Honeywell;
- Hexano, Honeywell;
- Acetato de etila, Synth;
- Sílica-gel 60-G com 13% de gesso da marca Macherey – Nagel, para confecção de placas para cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) em suporte de vidro, 10×20 cm;
- Éter dietílico, Honeywell;
- *Orto*-vanilina, Sigma-Aldrich;
- 1-Bromoexano ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{Br}$), Sigma-Aldrich;
- 1-Bromo-octano ($\text{C}_8\text{H}_{17}\text{Br}$), Sigma-Aldrich;
- 1-Bromodecano ($\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{Br}$), Sigma-Aldrich;
- Cloreto de trifenil tetrazólio, Dinâmica;

O trabalho experimental envolvendo a síntese e purificação dos produtos foi conduzido no Laboratório de Abertura de Amostras e Ensaio Químicos - LAEQ, ao passo que os ensaios antimicrobianos foram realizados no Laboratório de Bioensaios e Microrganismos da Amazônia, LABMICRA, ambos localizados na Central Analítica/CAM da UFAM.

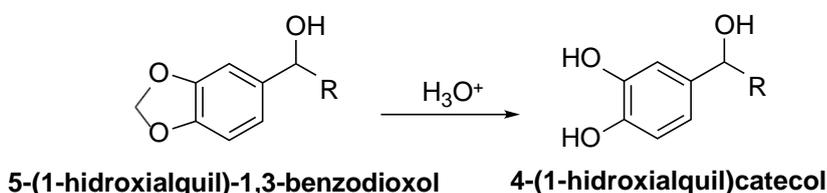
Métodos:

A metodologia utilizada na execução desta monografia consistiu em revisão bibliográfica, reações de hidrólise do grupo 1,3-dioxolano (ação 1), reações de Grignard (ação 2) e ensaio antimicrobiano (ação 3):

3.1 Reações de hidrólise do grupo 1,3-dioxolano

A hidrólise ácida do grupo 1,3-dioxolano dos 5-(1-hidroxiálquil)-1,3-benzodioxóis (Figura 4) foi estudada por três métodos diferentes, sendo que os dois primeiros empregaram os ácidos de Lewis AlCl_3 e BF_3 e o terceiro o ácido *p*-toluenossulfônico, *p*-TsOH.

Figura 4: Desproteção do grupo acetal 1,3-dioxolano.



sintetizados via reação de Grignard ao piperonal por Brito, 2023.

- **Método 1:** Empregou-se o protocolo proposto por Mitchell e colaboradores (1981). Utilizou-se como material de partida o 5-(1-hidroxiundecil)-1,3-benzodioxol (**GRG-10**) contendo uma cadeia lateral de hidrocarbonetos de 11 átomos de carbono proveniente da reação de Grignard realizada entre o brometo de decilmagnésio e o piperonal (Brito, 2023). O material de partida foi utilizado na reação na forma bruta, assim como obtido por Brito. Em um balão de fundo redondo de 50 mL, adicionaram-se 16 mL de tolueno, 2,0268 g de GRG-10, 2,4512 g de cloreto de alumínio (AlCl_3). Assim que o AlCl_3 foi adicionado, houve liberação de calor e a coloração da solução que antes era amarela, tornou-se vermelha intensa. A reação foi feita em temperatura de 50°C. Foram feitas placas de cromatografia em camada delgada (CCD) para

acompanhar o andamento da reação, e em 7 horas de duração, notou-se que o material de partida havia sido consumido, com isso, a reação foi finalizada. Para a extração, adicionou-se lentamente água destilada ao balão contendo a reação, o qual apresentou liberação de calor. Posteriormente, adicionou-se uma solução de 23mL de água e ácido clorídrico (HCl) (20:3). Com isso, fases foram formadas e as mesmas separadas com o auxílio de um funil de separação. A fase aquosa foi lavada seis vezes com 10 mL de acetato de etila (AcOEt). As fases orgânicas foram reunidas, posteriormente evaporadas em rotaevaporador e formou-se assim um precipitado, o qual foi lavado com hexano gelado. O sólido que permaneceu insolúvel foi filtrado em papel de filtro. O filtrado foi armazenado na geladeira com o intuito de verificar a precipitação de mais produto, o qual passou por filtração novamente. Esse procedimento foi feito quatro vezes, resultando em 284 mg de um sólido acinzentado. O sólido foi analisado por espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C (em acetona- d_6).

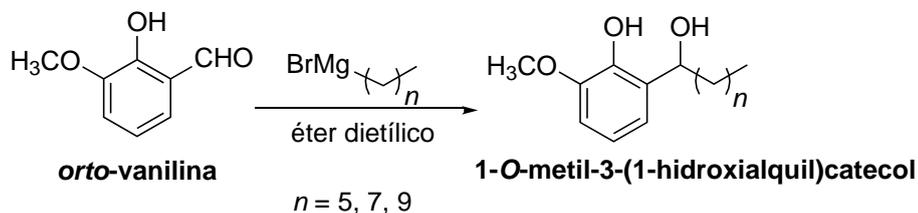
- **Método 2:** Utilizou-se como material de partida o 5-(1-hidroxiheptil)-1,3-benzodioxol (**GRG-6**) contendo uma cadeia lateral de hidrocarbonetos de 7 átomos de carbono proveniente da reação de Grignard realizada entre o brometo de hexilmagnésio e o piperonal (Brito, 2023). O material de partida foi utilizado na reação na forma bruta, assim como obtido por Brito. Em um balão de fundo redondo, adicionaram-se 8 mL de tolueno, 0,200 g de GRG-6 e 1,16 g de trifluoreto de boro (BF_3). A reação ocorreu em temperatura de 50°C , e de acordo com as análises por CCD realizadas durante o procedimento, detectou-se substâncias diferentes do material de partida sendo formadas durante a reação. A extração foi feita da mesma maneira como na desproteção 1, onde obteve-se um produto de consistência oleosa. Aplicou-se uma parte do produto obtido (solubilizado em AcOEt) em uma placa de cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) (10 × 20cm) com sílica-gel, utilizando o eluente de hexano:AcOEt (3:1), em que separou-se uma mancha. Esta foi removida da placa por raspagem, lavada com acetato de etila e filtrada. O produto foi analisado por RMN ^1H (em CDCl_3).

- **Método 3:** Utilizou-se como material de partida o 5-(1-hidroxiundecil)-1,3-benzodioxol (**GRG-10**) contendo uma cadeia lateral de hidrocarbonetos de 11 átomos de carbono proveniente da reação de Grignard realizada entre o brometo de hexilmagnésio e o piperonal (Brito, 2023). O material de partida foi utilizado na reação na forma bruta, assim como obtido por Brito. Em um balão de fundo redondo de 50 mL, adicionaram-se 10 mL de uma solução de água destilada e tetraidrofurano (THF) (50:50, v:v), 0,100 g de GRG-10 e 0,9 mg de ácido *p*-toluenossulfônico (*p*-TsOH). O balão contendo a reação foi vedado e mantido em banho de gelo. O andamento da reação foi acompanhado por CCD a cada 30 minutos nas primeiras 1,5 horas de duração, e de acordo com a análise das CCDs, não houve aparente consumo do material de partida. Com isso, adicionou-se mais 0,9 mg de *p*-TsOH e a reação foi submetida a aquecimento primeiramente em 34 °C, e depois a 50 °C por 15 horas. O processo de *workup* foi feito de forma semelhante à extração feita para a desproteção 1. Após a evaporação, o produto bruto obtido, o qual apresentou consistência oleosa, foi solubilizado em AcOEt e purificado por CCDP (10 × 20 cm), utilizando o eluente de hexano:AcOEt (3:1, v:v). Separaram-se 4 amostras diferentes por CCDP: G1M1 (0,018 g), G1M2 (0,0021 g), G1M3 (0,027 g) e G1M4 (0,007 g – material de partida). As frações foram analisadas por RMN ¹H (em CDCl₃).

3.2 Reações de Grignard

Utilizou-se como referência o trabalho de Zhu e colaboradores (2017). As vidrarias e o magnésio em aparas utilizados nessas reações foram deixados secando em estufa a 100 °C durante a noite anterior para remoção da umidade. Foram feitas três reações de Grignard com a *orto*-vanilina seguindo o mesmo protocolo, tendo sido utilizados os brometos de hexila, octila e decila, em cada um (Figura 5).

Figura 5: Reações de Grignard realizadas com a *orto*-vanilina.



- Procedimento padrão: Em um balão de fundo redondo de duas bocas, foram colocados 4,2 equivalentes em mol de magnésio em aparas, uma solução constituída por 4,0 equivalentes em mol de brometo de alquila em 4,0 mL de éter dietílico anidro, uma barra magnética, e uma pequena quantidade de iodo. O balão foi acoplado a um condensador e um funil de adição, um em cada boca do balão, ambos conectados a um suporte de metal sobre uma chapa aquecedora e agitadora. Após 5 horas de duração da formação do brometo de alquilmagnésio, adicionou-se uma solução de *orto*-vanilina (1 equivalente em mol) em 5,0 mL de éter dietílico e a reação se manteve em *overnight*. Após esse tempo, os produtos foram tratados com solução aquosa de HCl a 3%, sendo extraídos com acetato de etila (3 × 20 mL). A fase orgânica foi concentrada em rotaevaporador. Foram feitas purificações por CCDP de todos os produtos obtidos, utilizando como eluente uma mistura de hexano:acetato de etila (10:1, v:v).

3.3 Ensaios Antimicrobianos

Foram feitos ensaios antimicrobianos sobre as bactérias *Escherichia coli* (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* (Gram-positivas) e sobre a levedura (*Candida parapsilosis*) das amostras intituladas como G1M4 (5-(1-hidroxiundecenil)-1,3-benzodioxol), e os produtos das reações de Grignard sobre a *o*-vanilina, GRG01, GRG02 e GRG03, de acordo com as metodologias contidas nos documentos M27-A3 (2008) e M07-A10 (2015) do *Clinical and Laboratory Standards Institute*[®] (CLSI).

Inicialmente, foram adicionados 100 µL de meio de cultura caldo Mueller-Hinton em todos os poços de placas de 96 poços de fundo côncavo, e a seguir, 100 µL de

soluções a 1 mg/mL de cada composto teste solubilizados em DMSO foram adicionados aos primeiros poços da coluna 1, em duplicata. Na sequência, procedeu-se as microdiluições seriadas 1:2 de todas as amostras até a concentração de 1 µg/mL. O antimicrobiano utilizado como controle sobre as bactérias foi a ceftriaxona, e sobre o fungo foi o cetoconazol. Também foi feito um controle com diluições sucessivas de DMSO para verificar o comportamento das bactérias e da levedura na presença do solvente.

Os inóculos microbianos foram preparados suspendendo-se culturas de 24 horas em ágar BHI (infuso de cérebro e coração) dos microrganismos em soro fisiológico estéril até que se atingisse turbidez compatível com a escala 0,5 de McFarland. A seguir, adicionaram-se 10 µL dos inóculos em cada um dos poços. As placas foram mantidas em BOD em 36 °C por 24 horas. Para revelação dos resultados, foram adicionados 10 µL de solução de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio a 1% a todos os poços (teste CTT). Após 3 horas, os resultados foram lidos.

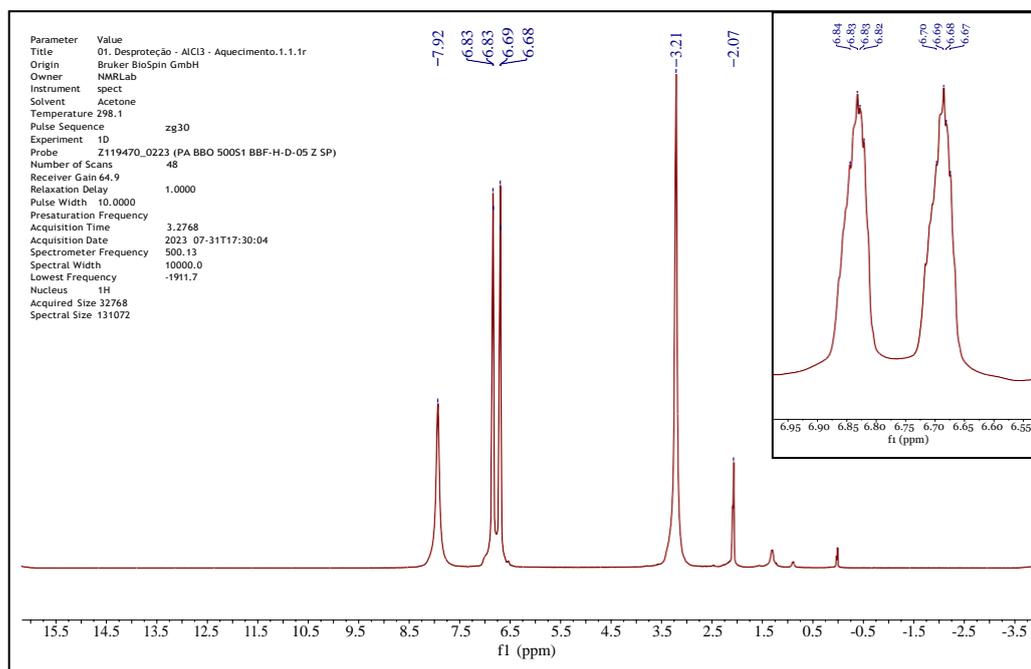
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão divididos conforme experimentos realizados.

4.1 Reações de hidrólise do grupo 1,3-dioxolano

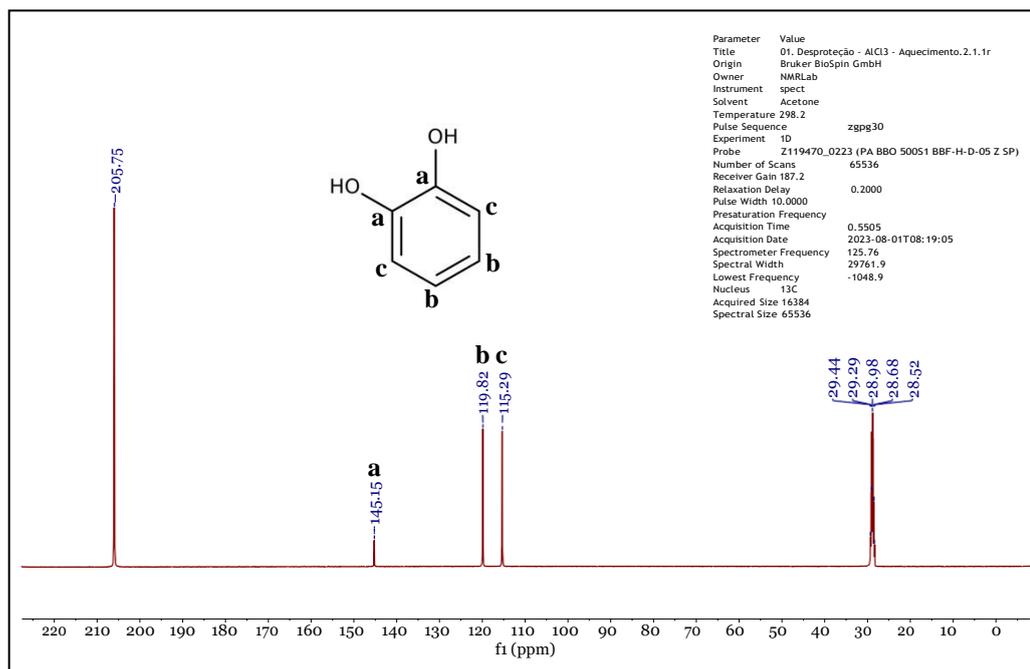
O espectro de RMN ¹H para a amostra intitulada como D1, o sólido obtido pela primeira tentativa de desproteção do grupo acetal com AlCl₃ e o GRG-10, está apresentado na Figura 6.

Figura 6: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, acetona- d_6) da amostra D1, com ampliação.



O espectro apresenta apenas um par de multipletos entre 6,60-6,70 ppm, o que sugere um sistema *orto*-dissubstituído de um anel aromático simétrico, além de um simpleto largo em 7,92 ppm (OH). A ausência do sinal do metileno do grupo dioxolano em aproximadamente 6,00 ppm e de qualquer sinal com integral razoável abaixo de 3,00 ppm (excluindo os sinais do solvente e de alguma impureza) levou a considerar que não apenas houve a desproteção das hidroxilas do catecol, como a total perda do grupo 1-hidroxiundecil do material de partida. Para confirmação, foi solicitada análise por espectroscopia de RMN de ^{13}C (Figura 7).

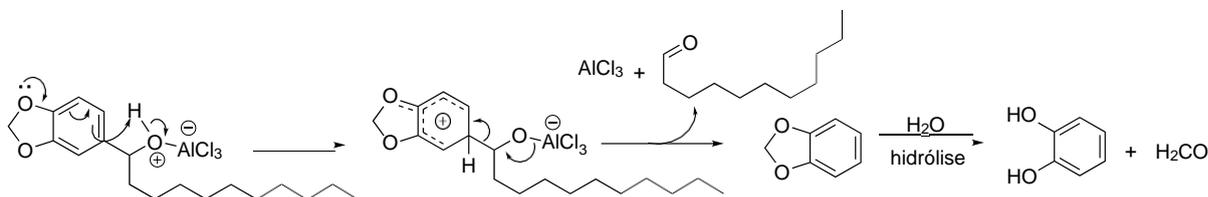
Figura 7: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, acetona- d_6) da amostra D1.



O espectro de carbono confirmou a hipótese, onde foi possível verificar três sinais referentes ao anel simétrico de catecol: um sinal em 115,3 ppm, proveniente dos carbonos em posição *orto* às hidroxilas, influenciados pelo efeito protetor das mesmas no anel; um sinal em 119,8 ppm referente aos carbonos em posição *meta* às hidroxilas; e um sinal menos intenso em 145,1 ppm refere-se aos carbonos ligados diretamente às hidroxilas, visto que sofrem desproteção por conta de estarem ligados diretamente ao oxigênio, mais eletronegativo. O sinal em 29,0 ppm trata-se das metilas residuais provenientes do solvente acetona, e o sinal em 205,8 ppm trata-se do carbono proveniente da carbonila, também da acetona.

Diante do resultado, foi proposto o mecanismo apresentado na Figura 8 para explicar o processo de desalquilação ocorrido. O ácido de Lewis AlCl_3 , que atua como catalisador, pode favorecer a protonação do anel aromático concomitante à desprotonação da hidroxila da cadeia alquílica. Nessas condições, a substituição nucleofílica aromática do grupo alquil pelo próton é favorecida pelo grupo dioxolano, o qual ativa o anel aromático por deslocalização. Dessa forma, a cadeia lateral pode ser removida do anel aromático na forma de undecanal, sendo que o 1,3-benzodioxol resultante estaria livre para ser hidrolisado a catecol a partir disso.

Figura 8. Mecanismo proposto para a formação do catecol a partir do 5-(1-hidroxiheptil)-1,3-benzodioxol e AlCl_3 .



Com relação ao segundo método de desproteção das hidroxilas do anel de catecol tentado neste trabalho, o espectro de RMN ^1H do produto obtido a partir do tratamento do 5-(1-hidroxiheptil)-1,3-benzodioxol com BF_3 está apresentado na Figura 9, sendo que na Figura 10 há uma ampliação deste espectro juntamente com o espectro de RMN ^1H do material de partida, 5-(1-hidroxiheptil)-1,3-benzodioxol, para comparação. O espectro do material de partida apresenta sinais do solvente acetato de etila.

Figura 9: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da amostra D2.

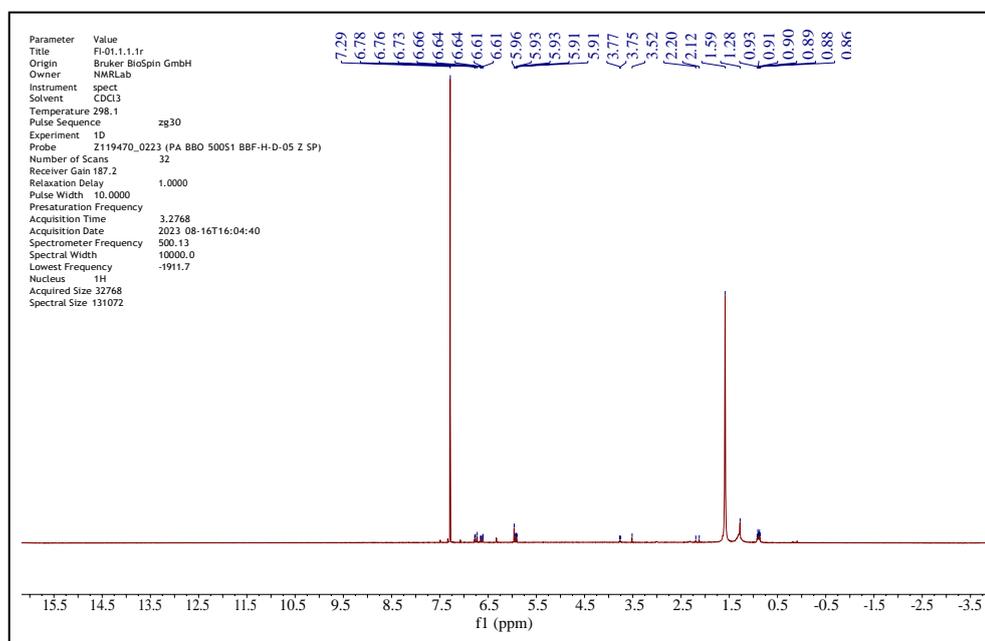
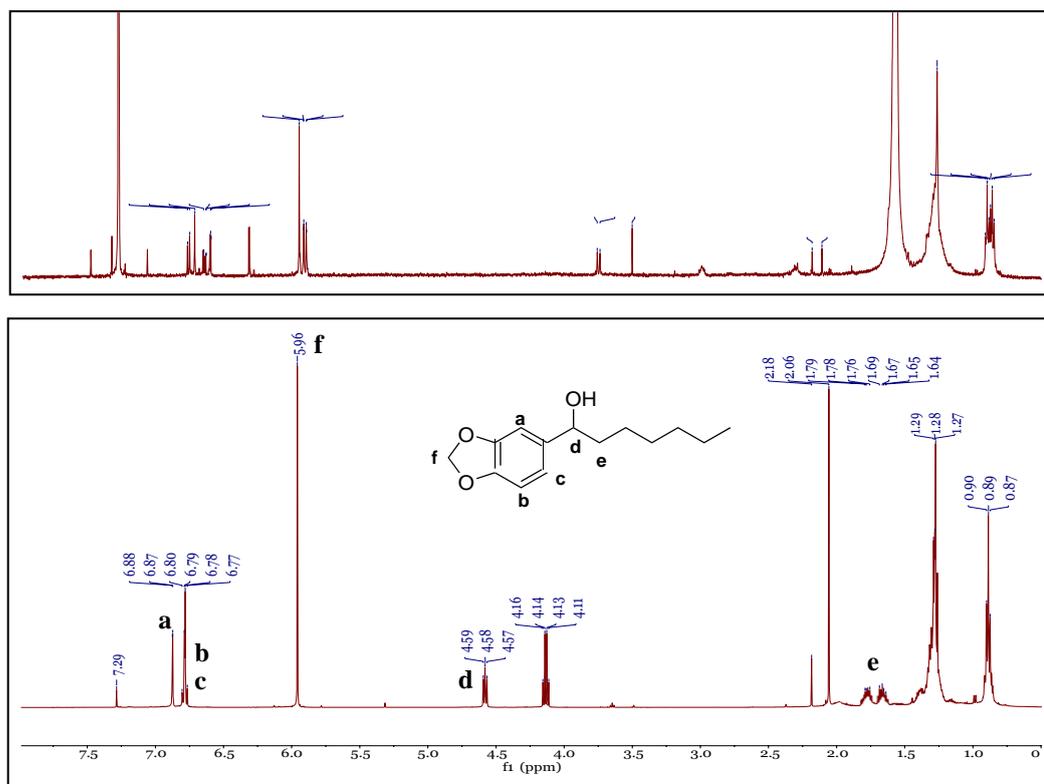
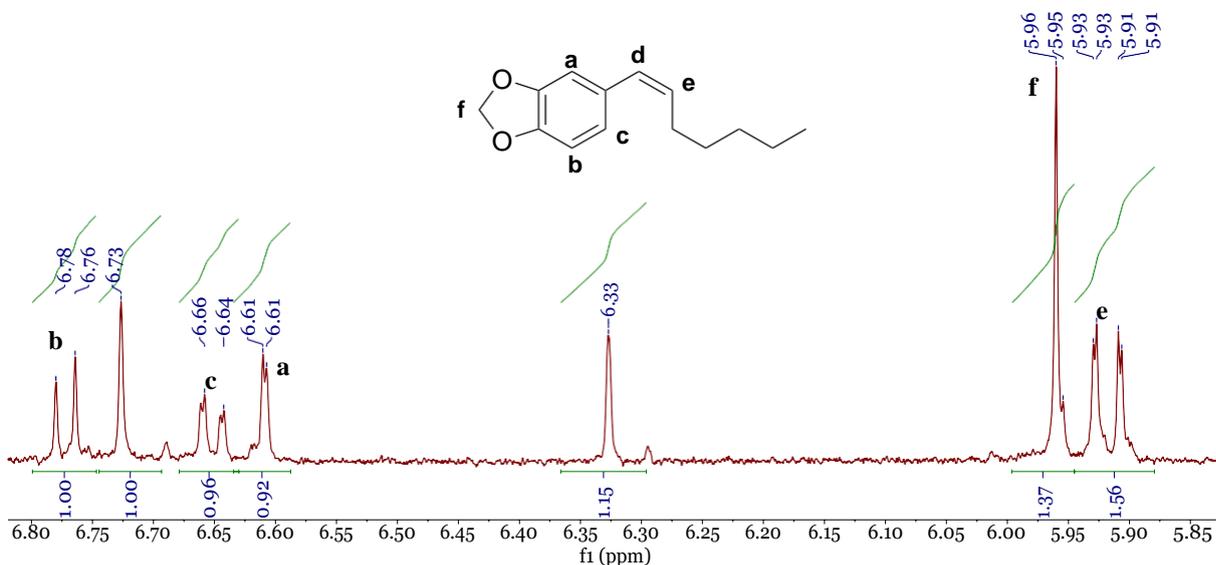


Figura 10: Espectros de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da amostra D2 (ACIMA) e do material de partida (ABAIXO) para comparação.



Não foi possível elucidar a estrutura do produto a partir apenas do espectro de RMN ^1H do produto, porém, é possível observar sinais em aproximadamente 6,00 ppm, o que parecem ser os hidrogênios provenientes do grupo acetal do composto GRG-6. Essa constatação leva à conclusão de que não houve hidrólise do grupo acetal do composto, e o objetivo principal não foi alcançado com esse método. Ao mesmo tempo, é possível verificar que o tripleto em 4,58 ppm referente ao hidrogênio carbinólico do material de partida não está presente no espectro do produto, além dos multipletos diastereotópicos acima de 1,50 ppm, dados que indicam que houve modificação da cauda de 1-hidroxiptil do material de partida. A condição ácida do ambiente reacional submetida a um substrato que apresenta uma hidroxila benzílica remete imediatamente à possibilidade de desidratação, tanto por E1 como por E2. Uma ampliação da região entre 5,80 e 6,80 ppm do espectro de RMN ^1H encontra-se na Figura 11.

Figura 11. Ampliação da região entre 5,80 e 6,80 ppm do espectro de RMN ^1H do produto D2.



Observa-se que os sinais referentes aos hidrogênios ligados ao anel aromático aparentam ter caído mais separados e resolvidos do que os mesmos hidrogênios no material de partida (na Figura 10), que caem apenas como um multiplete em 6,79 ppm referente a H_b e H_c e um duplete ($J_{meta} = 1,3$ Hz) em 6,88 ppm referente a H_a . No produto D2, verificam-se um duplete em 6,77 ppm ($J_{orto} = 7,9$ Hz) compatível com H_b , um duplo-duplete em 6,65 ppm ($J_{orto} = 7,8$ Hz; $J_{meta} = 1,5$ Hz) compatível com H_c , e um duplete em 6,61 ($J_{meta} = 1,5$ Hz) compatível com H_a , com integral para 1 hidrogênio, cada um. Além disso, há um duplo-duplete em 5,92 ppm, cujos valores da constante de acoplamento coadunam com o de um hidrogênio vinílico de uma ligação dupla com geometria *cis*, como desenhado na Figura 11 ($J_{cis} = 10,3$ Hz e $J_{vicinal} = 1,4$ Hz). Entretanto, um sinal referente ao hidrogênio H_d como um duplete ($J = 10,3$ Hz) acima de 6,00 ppm não foi identificado, fato que foi impeditivo para que pudéssemos atribuir a estrutura de um produto de desidratação com geometria *cis* com certeza. Especula-se que esse sinal possa ter caído coalescendo com os sinais entre 5,80 e 6,00 ppm. Experimentos de RMN de ^{13}C estão sendo providenciados para auxiliar com a elucidação da estrutura deste produto.

O AlCl_3 e BF_3 atuam como ácidos de Lewis, recebendo um par de elétrons dos átomos de oxigênio, dois deles ligados ao grupo acetal, e um como uma hidroxila

benzílico. Ao adicionar o ácido clorídrico e água durante *workup*, tem-se a protonação desses oxigênios concomitante com ataques nucleofílicos das moléculas de água direcionados ao carbono do acetal, com concomitante hidrólise e eliminação dos grupos AlCl_3 e BF_3 , formando assim, hidroxilas. Pela análise dos resultados, podemos especular que os ácidos empregados tiveram grande afinidade pela hidroxila ligada a C1 do grupo alquil, provocando desidratações e desalquilações mais facilmente do que a hidrólise do acetal propriamente dita.

A terceira tentativa de hidrólise do grupo dioxolano foi realizada com ácido *para*-toluenossulfônico (*p*-TsOH) e o 5-(1-hidroxiéptil)-1,3-benzodioxol. Foram obtidas três frações, G1M2, G1M3 e G1M4, sendo que a última diz respeito ao material de partida recuperado sem reação. Os três espectros inteiros estão apresentados nas Figuras 12, 13 e 14. Como as soluções das amostras G1M2 e G1M3 estavam muito diluídas durante análise por RMN, a linha de base dos espectros não se encontra razoável assim como integrais. Ampliações de regiões importantes dos três espectros encontram-se na Figura 15.

Figura 12: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da amostra G1M2.

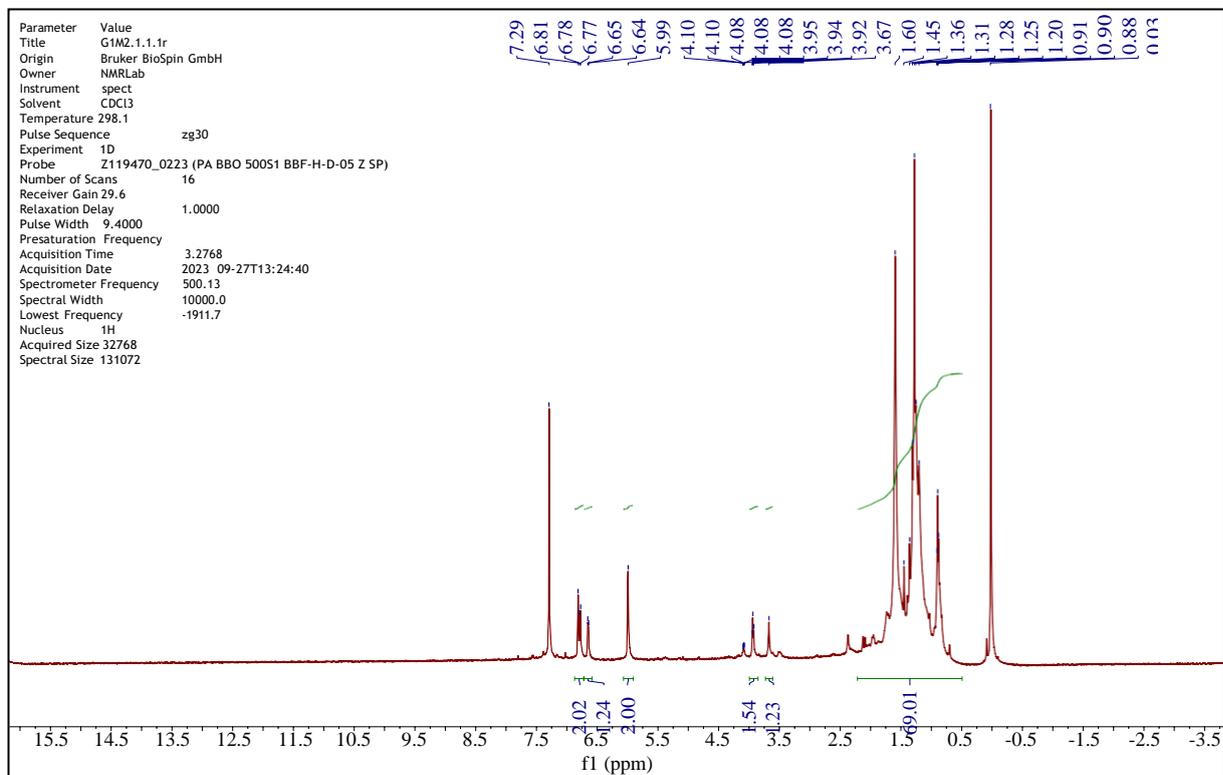


Figura 13: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da amostra G1M3.

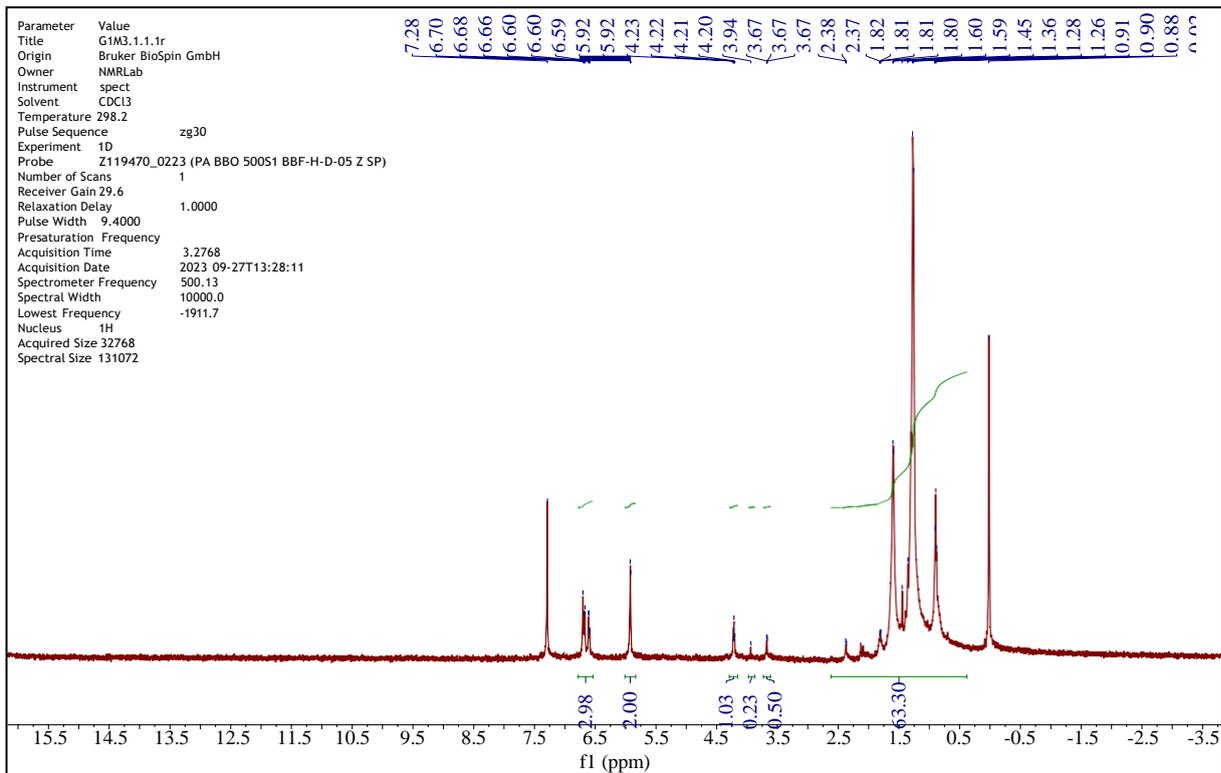


Figura 14: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da amostra G1M4.

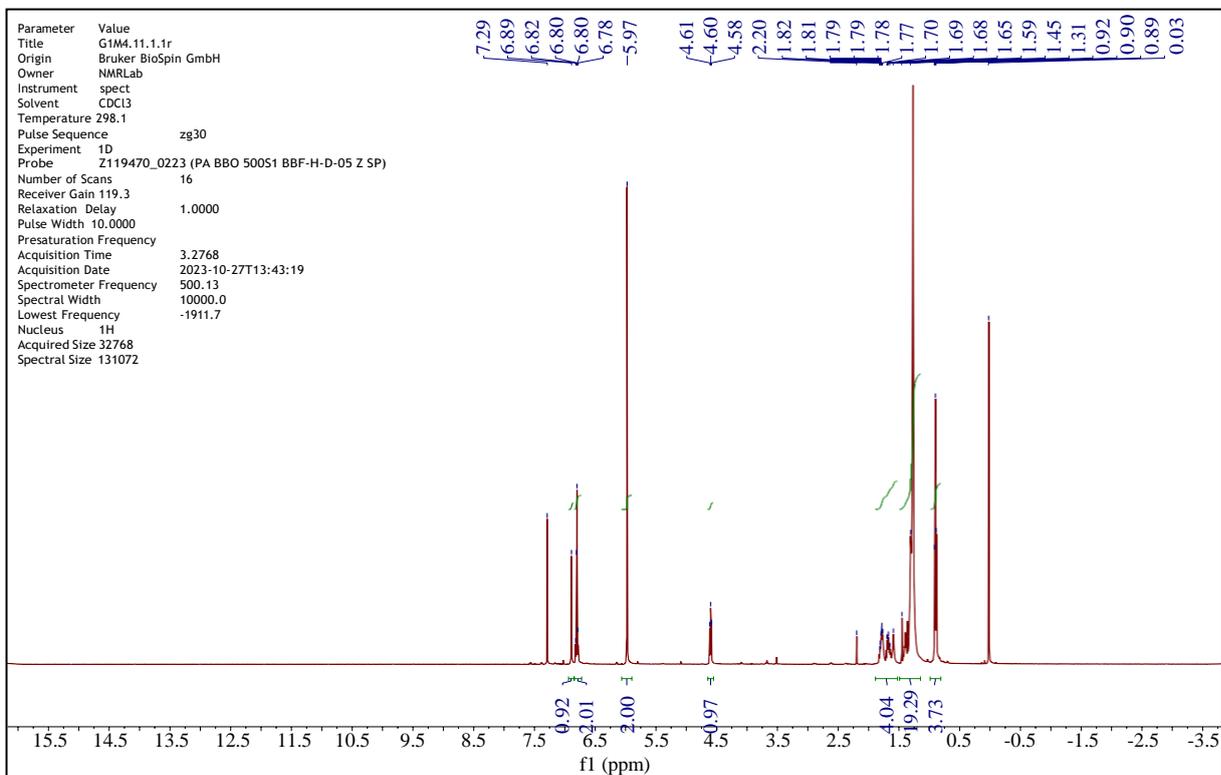
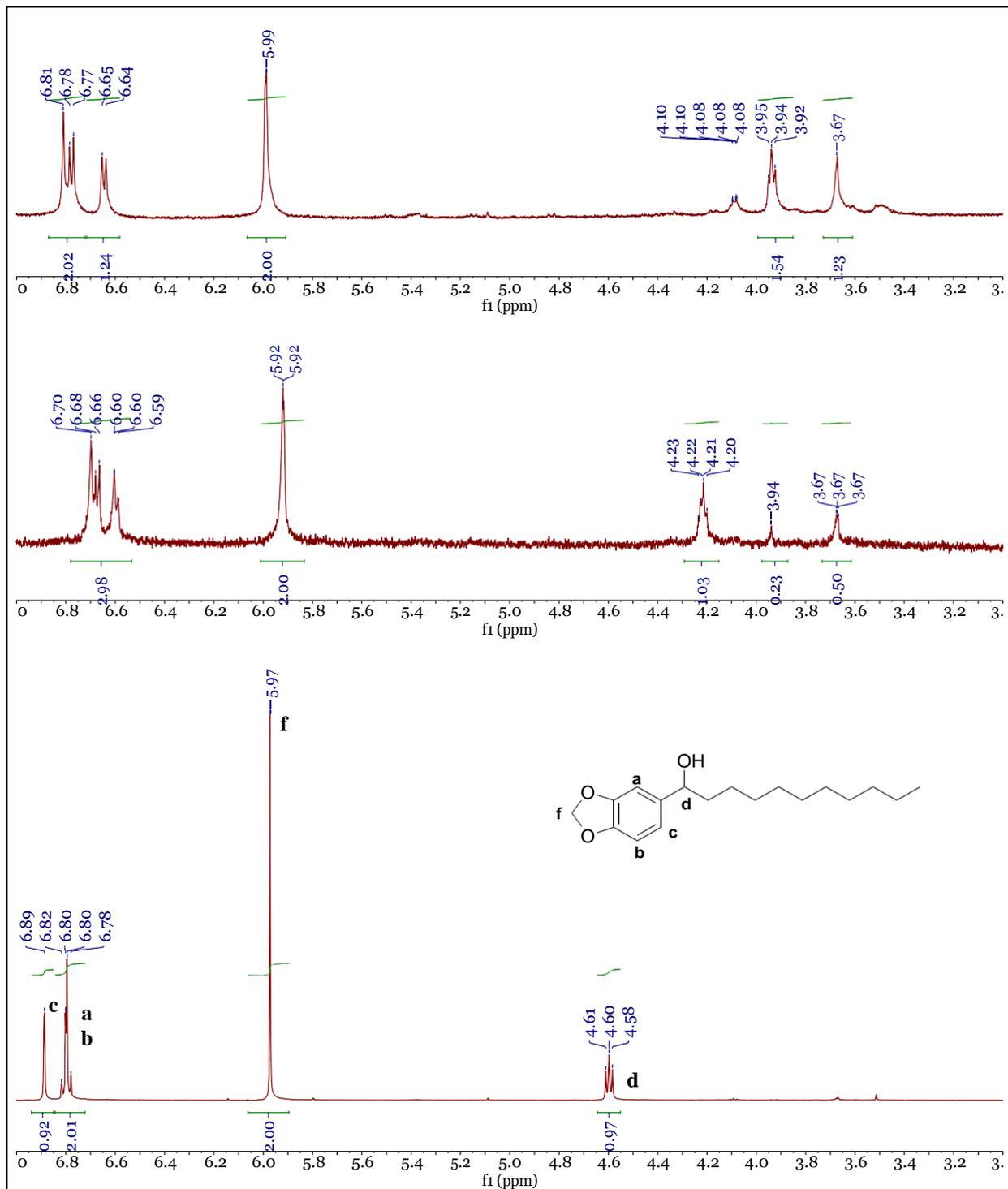


Figura 15. Ampliações dos espectros de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) das amostras G1M2 (acima), G1M3 (ao meio) e G1M4 (material de partida, abaixo).

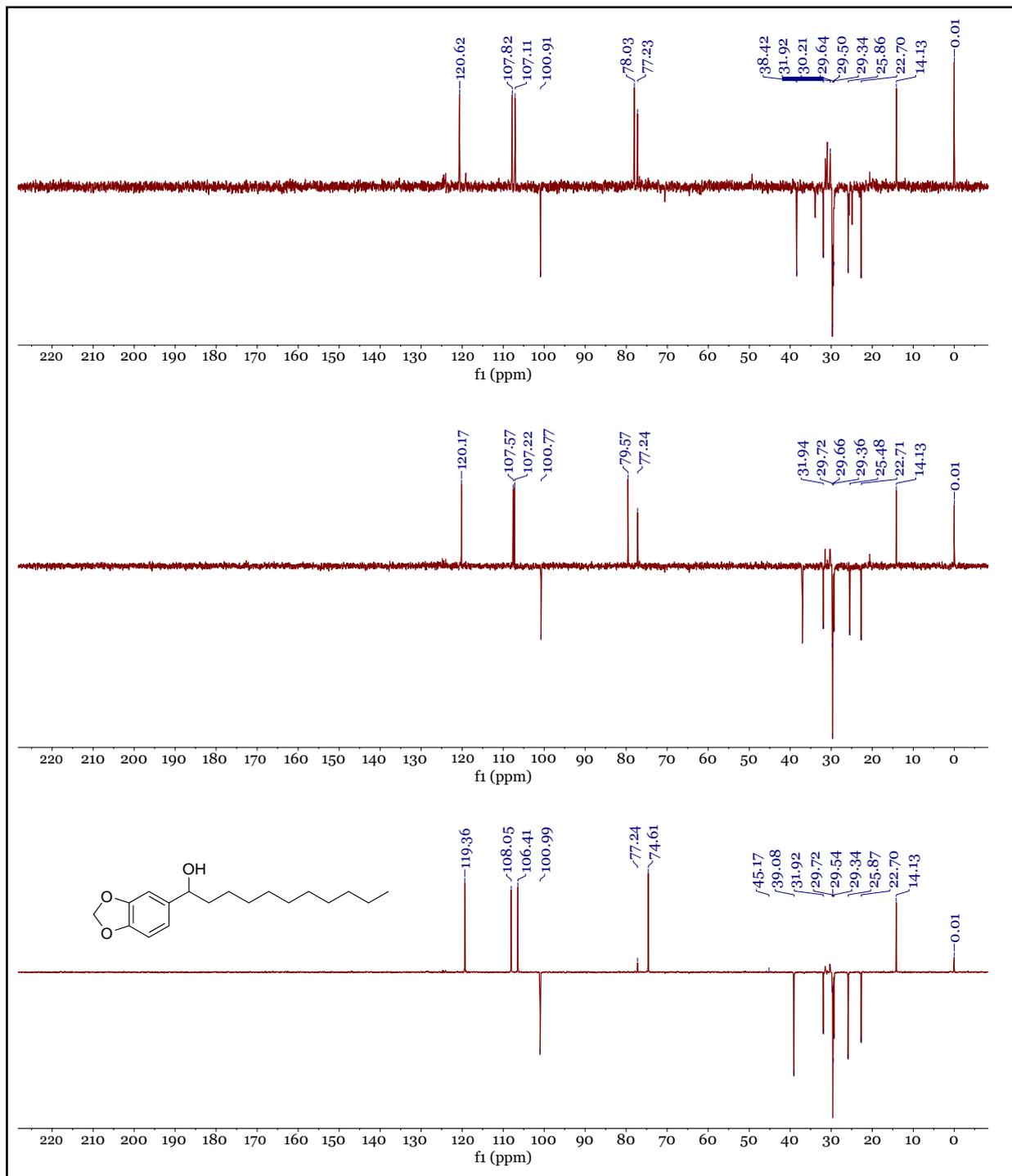


Pela análise dos espectros, verifica-se que houve alguma alteração nos deslocamentos químicos dos sinais da porção dos hidrogênios ligados ao anel aromático, embora o padrão geral do anel se mantenha. O simpleto referente ao

metileno do grupo 1,3-dioxolano continua presente em todas as amostras. Entretanto, a principal modificação aconteceu na porção alquílica. O tripleto referente ao hidrogênio carbinólico em 4,60 ppm do material de partida não está presente nos espectros dos produtos G1M2 e G1M3, porém, um grupo de sinais aparece entre 3,60 e 4,20 ppm. Ambas as amostras apresentam um multipletto em 3,67 ppm, mas G1M2 apresenta um tripleto em 3,94 ppm (que aparece apenas de forma residual no espectro de G1M3), ao passo que G1M3 possui um multipletto em 4,21 (que também aparece de forma residual no espectro de G1M2). Essa constatação levou a considerar que ambas as amostras poderiam se tratar de isômeros. Além disso, o processo de separação cromatográfica demonstrou que as manchas referentes às duas eluíram de forma muito próxima. Espectros de RMN ^{13}C e DEPT-135 foram solicitados, onde os resultados dos experimentos DEPT-135 das três amostras encontram-se na Figura 16.

Os sinais da cadeia de hidrocarboneto mantiveram-se sem grandes alterações nas contagens de carbono nos três casos, sendo uma metila em aproximadamente 14,1 ppm e as demais unidades metilênicas aparecendo entre 22,7 e 45,0 ppm. A porção do anel aromático também se mostra compatível com o esperado para um anel do tipo 1,3-benzodioxol, com os carbonos CH do anel aparecendo em 106,4, 108,0 e 119,4 no material de partida, mas dois destes caindo próximos em mais ou menos 107 e o terceiro caindo por volta de 120 ppm nos produtos. O carbono metilênico do grupo 1,3-dioxolano aparece em 101,0 ppm no material de partida, mas em 100,8 e em 100,9 nos dois produtos. Esses dados corroboram para a tese de que G1M2 e G1M3 podem tratar-se de isômeros. Por fim, o carbono carbinol do material de partida aparece em 74,6 ppm no material de partida, mas o mesmo carbono aparece bem mais desblindado nos produtos, caindo em 78,0 ppm em G1M2 e em 79,6 ppm em G1M3, comprovando alteração nessa região (o sinal em 77,2 é carbono-13 residual do solvente, aparecendo mais intenso nos espectros dos produtos muito diluídos).

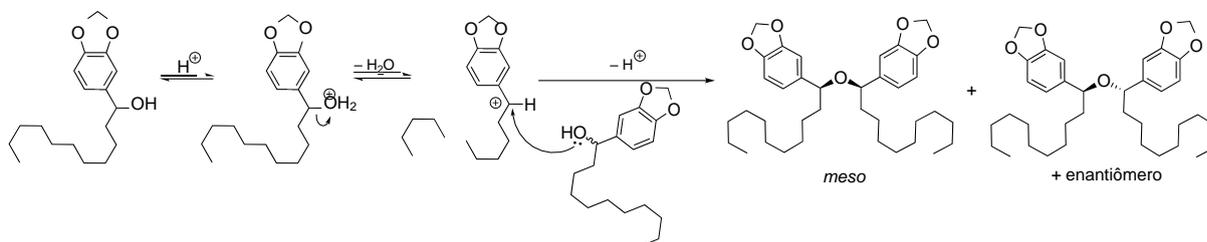
Figura 16. Espectros de RMN DEPT-135 (125 MHz, CDCl₃) das amostras G1M2 (acima), G1M3 (ao meio) e G1M4 (material de partida, abaixo).



Diante desses resultados, foi proposto que houve a dimerização do material de partida via formação de ligação do tipo éter catalisada pelo ácido *p*-toluenossulfônico. Dessa forma, existe a possibilidade de formação de um par de enantiômeros do

produto dimérico, bem como de um outro diastereoisômero destes, que se constitui em uma substância *meso*. A partir dessa inferência, pode-se concluir que a separação dos diastereoisômeros foi possível por cromatografia em camada delgada, mantendo-se a mistura de enantiômeros como majoritária em uma amostra e o produto *meso* como majoritário na outra. O mecanismo proposto para essa transformação, do tipo S_N1, encontra-se na Figura 17.

Figura 17. Mecanismo proposto para a formação de G1M2 e G1M3 a partir do 5-(1-hidroxiundecil)-1,3-benzodioxol e *p*-TsOH.



4.2 Reações de Grignard

Foram realizadas três reações de Grignard neste trabalho, sendo que os brometos de hexil-, octil- e decilmagnésio foram preparados *in situ* e colocados para reagir com o substrato *orto*-vanilina em condições anidras. Em todos os casos, uma parte do produto bruto foi purificada por CCDP, sendo separadas 3 substâncias em todos os casos, sendo que uma delas representou o produto esperado de adição pelo reagente de Grignard.

Os espectros de RMN ¹H dos produtos, com algumas ampliações, estão apresentados nas Figuras 18, 19 e 20. Em todos os casos, verifica-se que um simpleto acima de 9,0 ppm, referente ao hidrogênio do grupo aldeído da *orto*-vanilina, está ausente, bem como constata-se o aparecimento de um grupo de sinais abaixo de 2,50 ppm, o que é indicativo de sucesso na inserção da cauda de hidrocarboneto na estrutura do material de partida. Além disso, o hidrogênio carbinólico do centro quiral formado na estrutura dos produtos pode ser verificado sempre acima de 4,50 ppm. Este sinal aparece como um duplo-dupletto com *J*₁ em torno de 7,8 Hz e *J*₂ em torno

de 5,8 Hz, uma vez que o hidrogênio carbinólico acopla com os dois hidrogênios diastereotópicos vicinais com constantes de acoplamento diferentes.

Figura 18: Espectros de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da amostra GRG1 (produto da reação da *o*-vanilina com brometo de hexilmagnésio) com ampliações.

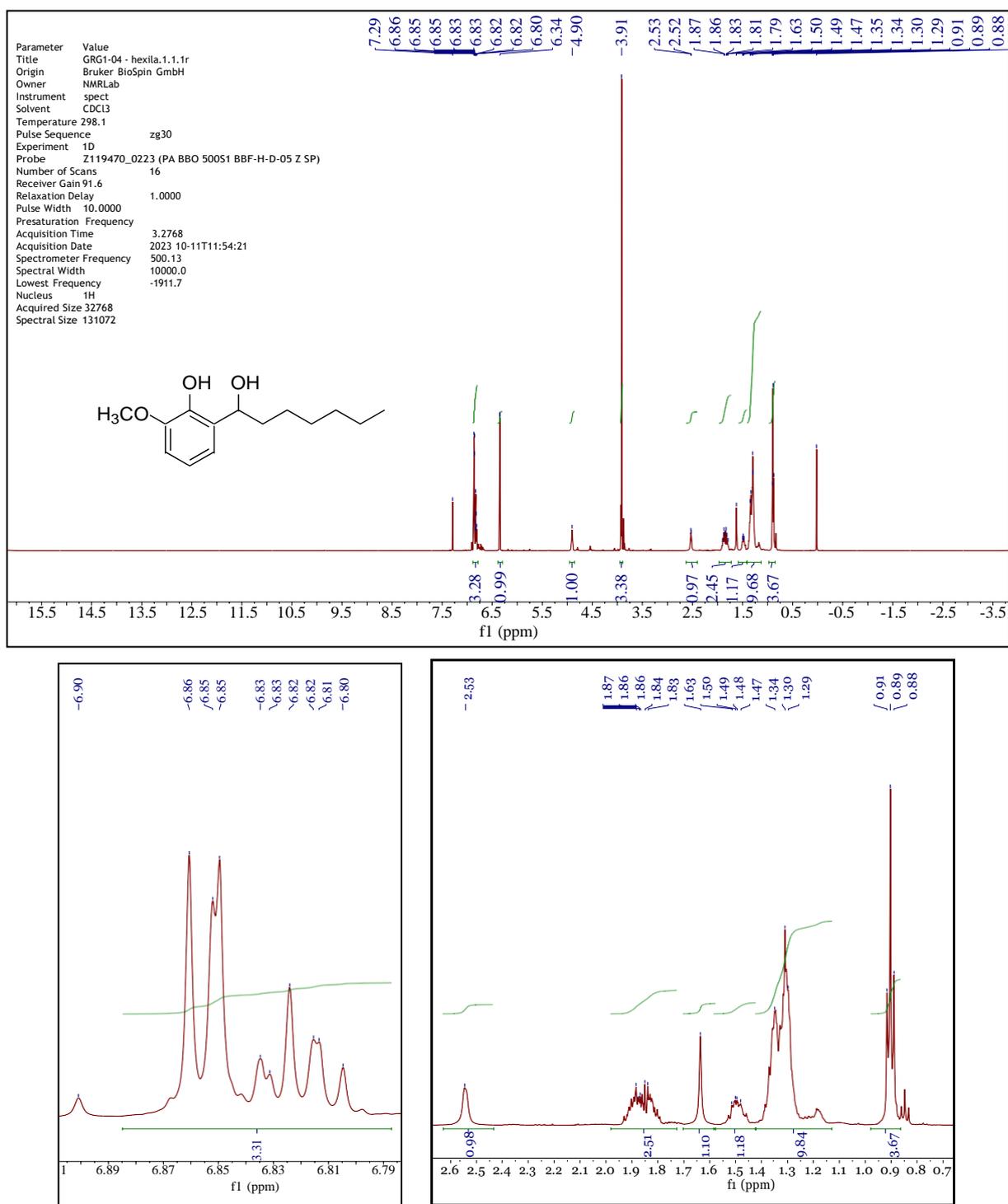


Figura 19: Espectros de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da amostra GRG2 (produto da reação da *o*-vanilina com brometo de octilmagnésio) com ampliações.

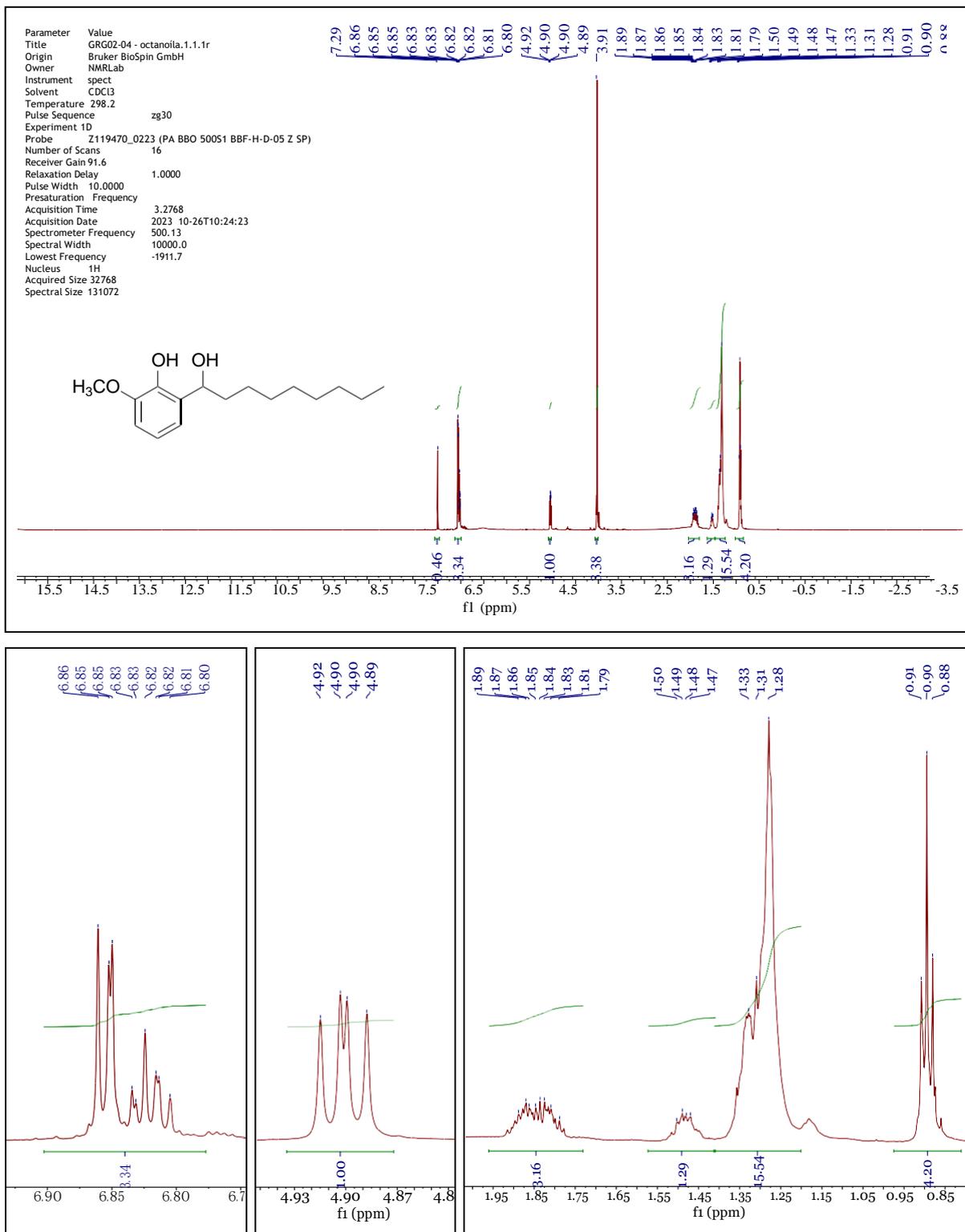
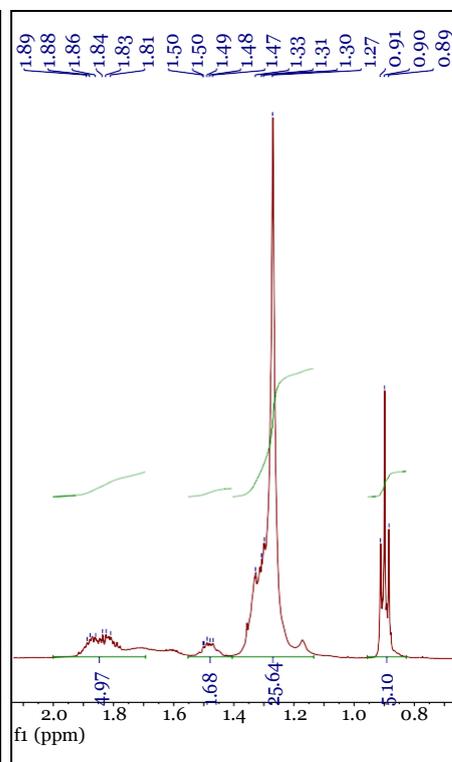
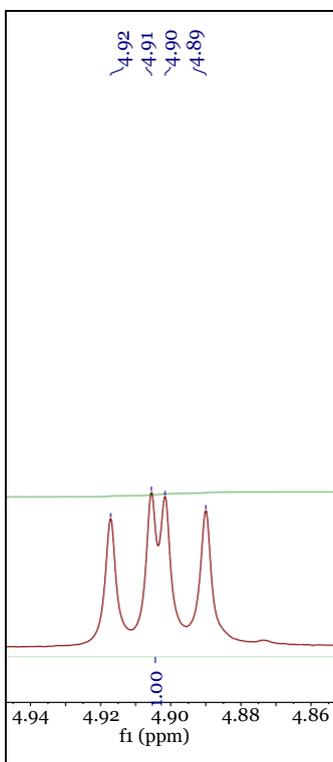
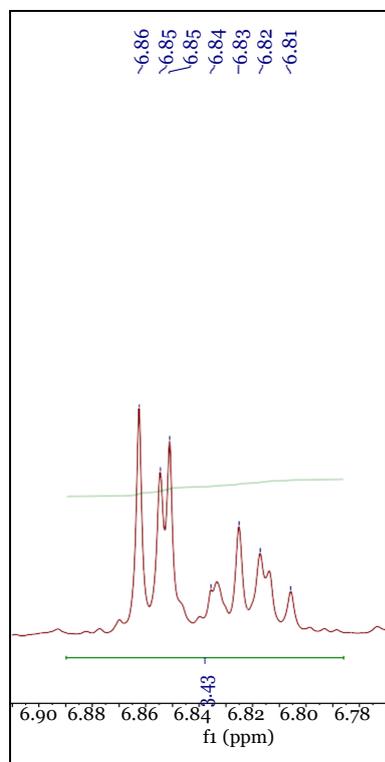
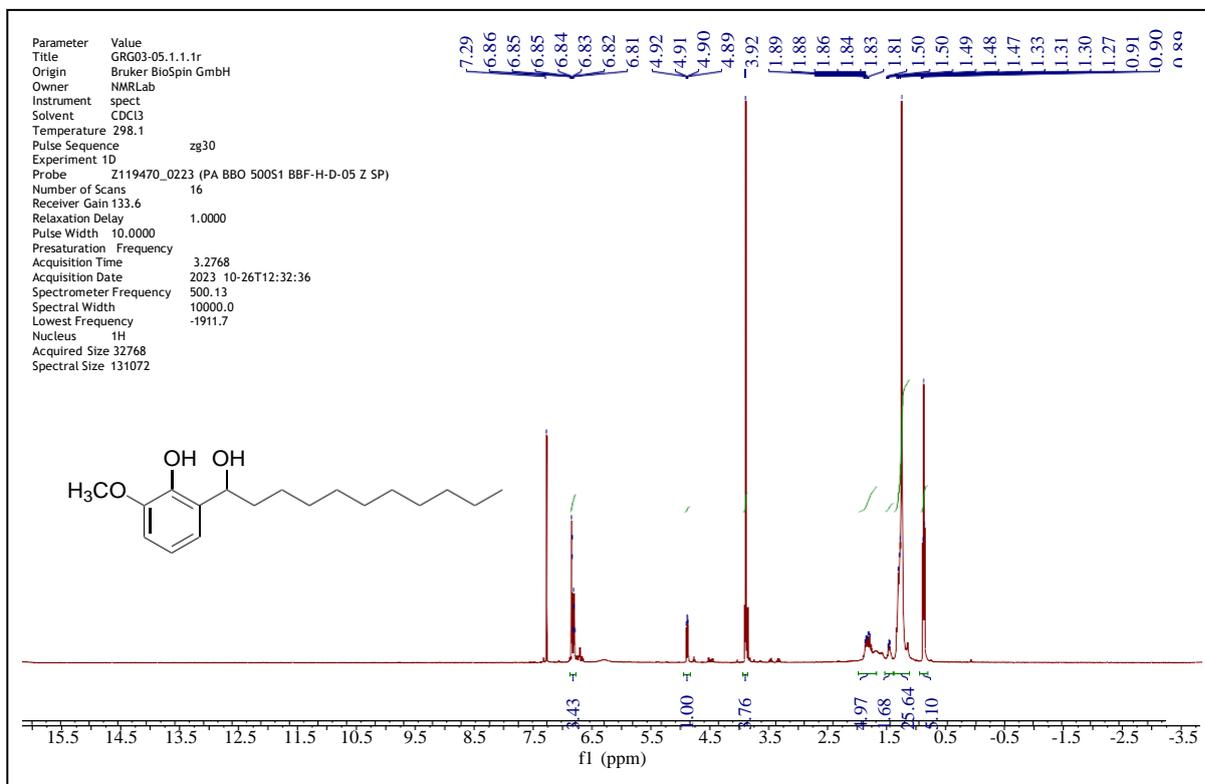


Figura 20: Espectros de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da amostra GRG3 (produto da reação da o-vanilina com brometo de decilmagnésio) com ampliações.



De uma forma geral, as reações de Grignard foram eficientes em levar à formação dos produtos de interesse, mesmo com a existência de hidrogênio fenólico ácido na estrutura da *orto*-vanilina, tendo sido usado excesso do reagente de Grignard no protocolo das reações por este motivo.

4.3 Ensaios Antimicrobianos

Contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, todas as substâncias testadas não apresentaram atividade significativa, inibindo o crescimento microbiano apenas na concentração de 250 µg/mL. Já para *Candida parapsilosis*, a amostra G1M4 (material de partida 5-(1-hidroxiptil)-1,3-benzodioxol) apresentou atividade antimicrobiana moderada em 32 µg.mL⁻¹, e as amostras GRG01-04, GRG02-04 e GRG03-05 apresentaram atividade antifúngica moderada, todas de 62,5µg/mL.

Chama a atenção que os compostos analisados apresentaram de baixa a moderada atividade antifúngica, o que permite especular que derivados fenólicos com mais do que duas hidroxilas livres apresentam maior probabilidade de inibição de *Candida* (Bouthenet et al., 2011; Clardy et al., 2000), em que os anéis fenólicos parecem interagir melhor e inibir os fungos. Neste trabalho, os compostos avaliados não possuíam mais do que uma hidroxila fenólica livre, sendo que os produtos da reação de Grignard sobre a *orto*-vanilina possuíam apenas uma. Por outro lado, é válido mencionar que a presença do grupo acetal fez com que G1M4 tivesse melhor resultado antifúngico do que as estruturas derivadas da *orto*-vanilina, o que também sugere que não apenas a presença e o número de hidroxilas fenólicas livres nos compostos é importante, mas também a disposição destes grupos e da cadeia lateral no anel aromático.

5 CONCLUSÃO

Os métodos de remoção do grupo acetal, utilizando ácidos de Lewis e Brønsted-Lowry não foram eficazes para esse objetivo. Porém, foi possível produzir moléculas diferentes e interessantes, e que serão mais bem estudadas pelo grupo de pesquisa futuramente.

O primeiro método de desproteção, utilizando o $AlCl_3$, foi possível, de acordo com os dados obtidos nos espectros de RMN, identificar a produção do catecol, que teve sua cadeia alquílica removida. O método utilizando o pTsOH, por outro lado, levou à formação de dímeros do material de partida. Já as reações de Grignard ocorreram com êxito, evidenciadas pelos dados obtidos nos espectros de RMN dos produtos.

Os produtos das reações de Grignard, os quais possuem os grupos metoxila, hidroxila e 1-hidroxialquil em padrão de substituição 1,2,3 no anel aromático apresentaram baixa atividade antimicrobiana, sendo no entanto mais ativos contra a levedura *Candida parapsilosis* do que contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*. Porém, o material de partida utilizado para as reações de desproteção, o GRG-10 (isolado como G1M4) apresentou melhor atividade, o que torna possível conjecturar que a disposição 1,2,4 de substituição do anel aromático, incluindo a presença do grupo acetal, possuam um diferencial em relação à interação com as células fúngicas.

REFERÊNCIAS

BOUTHENET, E.; OH, K-B.; PARK, S.; NAGI, N. K.; LEE, H.-S.; MATTHEWS, S. E. **Synthesis and antimicrobial activity of brominated resorcinol dimers**. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011, 21, 7142-7145.

BRADY, S. F.; WAGENNAR, M. M.; SINGH, M. P.; JANSO, J. E.; CLARDY, J. **The cytosporones, new octaketide antibiotics isolated from an endophytic fungus**. *Org. Lett.* 2000, 2, 4043-4046.

BRITO, F. O. **Síntese e avaliação antitumoral de novos alquil-resorcinóis derivados da vanilina e piperonal.** 2023. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Química – PPGQ/UFAM.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third Edition.** CLSI document M27-A3, Vol. 28, No. 14. Wayne, Pennsylvania, 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Tenth Edition.** CLSI document M07-A10, Vol. 35, No. 2. Wayne, Pennsylvania, 2015.

FUKUHARA, K.; NAGAKAWA, M.; NAKANISHI, I.; OHKUBO, K.; IMAI, K.; URANO, S.; FUKUZUMI, S.; OZAWA, T.; IKOTA, N.; MOCHIZUKI, M.; MIYATA, N.; OKUDA, H. **Structural basis for DNA-cleaving activity of resveratrol in the presence of Cu(II).** 2006, Bioorganic & Medicinal Chemistry Volume 14, Issue 5, 1 March 2006, Pages 1437-1443.

GÓMEZ-RODRÍGUEZ, L.; SCHULTZ, P. J.; TAMAYO-CASTILLO, G.; DOTSON, G. D.; SHERMAN, D. H.; TRIPATHI, A. **Adipostatins E-J, new potente antimicrobials identified as inhibitors of coenzyme-A biosynthesis.** Tetrahedron Lett. 2020, 61, 151469.

KOZUBEK, A.; TYMAN, J. H. P. **Resorcinolic lipids, the natural non-isoprenoid phenolic amphiphiles and their biological activity.** Chem. Rev. 1999, 99, 1-26.

LUÍS, A.; CRUZ, C.; DUARTE, A. P.; DOMINGUES, F. **An alkenylresorcinol derivative from *Hakea sericea* fruits and their antimicrobial activity.** Nat. Prod. Comm. 2013, 8, 1459-1462

MITCHELL, A. R.; AVERY, A.; VERLANDER, M. S.; GOODMAN, M. **Synthesis of Ring-Alkylated Isoproterenol Derivatives.** J. Org. Chem. 1981,46,4859-4863.

NIKOLAEV, Y. A.; TUTEL'YAN, A. V.; LOIKO, N. G.; BUCK, J.; SIDORENKO, S. V.; LAZAREVA, I.; GOSTEV, V.; MANZEN'YUK, O. Y.; SHEMYAKIN, I. G.; ABRAMOVICH, R. A.; HUWYLER, J.; EI'-REGISTAN, G. I. **The use of 4-hexylresorcinol as antibiotic adjuvant.** PLoS ONE. 2020, 15, e0239147.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Antimicrobial resistance.** Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>>. Acesso em 28 de outubro de 2023.

TUAN, M; FERRANO, T. **Phenolic Compounds in Food and Cancer Prevention,** Phenolic compounds in food and their effects on health II, 1992, II, pg 8-26.

ZABOLOTNEVA, A. A.; SHATOVA, O. P.; SADOVA, A. A.; SHESTOPALOV, A. V.; ROUMIANTSEV, S. A. **An overview of alkylresorcinols biological properties and effects.** J. Nutr. Metab. 2022, 4667607, 2022.

ZHU, Y.; SANG, S. **Phytochemicals in whole grain wheat and their health-promoting effects,** Molecular Nutrition & Food Research , vol. 61, nº. 7, 2017.