ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL –
PNQM28

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ÉSTERES DERIVADOS DO ÁCIDO CAFÉICO CONTRA ESPÉCIES DE CANDIDA

M. C. MORAIS¹, M. A. de OLIVEIRA¹, C.U.S. CARVALHO¹, S. P. LOPES¹,
A. L. A. L. PÉREZ², A. P. B. BEZERRA², E. D. LIMA² e D. P. de SOUSA¹

¹ Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Química Farmacêutica, 58051-900 João Pessoa-PB, Brasil;

² Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Micologia, 58051-900 João Pessoa-PB, Brasil.

E-mail para contato: mayaracastrodemorais@gmail.com

RESUMO – Os ésteres derivados do ácido caféico possuem um amplo espectro de atividades farmacológicas, dentre elas, a atividade antifúngica. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de dezesseis ésteres derivados do ácido caféico sobre diferentes espécies de *Candida*. Os ésteres alquílicos e arílicos derivados do ácido caféico foram preparados através da esterificação de Fischer, reação com haletos de alquila e arila, e reação de Mitsunobu. Na caracterização dos produtos utilizou-se métodos espectroscópicos de infravermelho, ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C, bem como espectrometria de massas de alta resolução para os derivados inéditos. Todos os ésteres foram submetidos a testes antimicrobianos pelo método microdiluição em caldo, tendo como controle antimicrobiano o cloranfenil e a nistatina. Obteve-se 16 ésteres do ácido caféico, com rendimentos variando entre 11,82-93,06%, sendo 6 derivados inéditos na literatura. Seis ésteres apresentaram atividade antifúngica, enquanto todos os compostos foram bioativos no teste da atividade antibacteriana. Assim, os ésteres ME7 e ME13 demonstraram as melhores atividades antifúngicas (128 e 256 µg/mL, respectivamente). Enquanto nos testes antibacterianos, os resultados foram mais sensíveis frente à cepa Gram negativa (50 a 400 µg/mL), com melhores resultados para os ésteres alquílicos ME3, ME6 e ME7, e para os arílicos ME10, ME13, ME14 e ME16. Esses resultados mostram que substituintes alquílicos de cadeia mediana e determinados grupos arílicos potencializam a atividade antimicrobiana.

Palavras-chaves: ésteres, ácido caféico, antifúngico, antibacteriano

ABSTRACT - Esters derived from caffeic acid have a large spectrum of pharmacological activities, including antifungal activity. Therefore, the objective of this work was to evaluate the antimicrobial activity of sixteen esters derived from caffeic acid on different species of *Staphylococcus*, *Escherichia* and *Candida*. Alkyl and aryl esters derived from caffeic acid were prepared by Fischer esterification, reaction with alkyl and aryl halides, and Mitsunobu reaction. In the characterization of the products were used infrared spectroscopic methods, ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance, as well as high resolution mass spectrometry for the inedited derivatives. All the esters were submitted to

antimicrobial tests by broth microdilution, with chloramphenyl and nystatin as antimicrobial control. 16 esters of caffeic acid were obtained in yields varying from 11.82-93.06%, 6 were inedited in the literature. Six esters presented antifungal activity, while all compounds were bioactive in the test of antibacterial activity. Thus, esters ME7 and ME13 demonstrated the best antifungal activities (128 and 256 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectively). While in the antibacterial tests, the results were more sensitive to the Gram negative strain (50 to 400 $\mu\text{g} / \text{mL}$), with better results for the alkyl esters ME3, ME6 and ME7, and for the aryl ME10, ME13, ME14 and ME16. These results show that middle chain alkyl substituents and certain aryl groups potentiate antimicrobial activity.

Keywords: Esters, Caffeic acid, Antifungal, Antibacterial.

1. INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas causadas por fungos são ainda um problema de saúde global proeminente, em especial nos países em desenvolvimento, de baixa renda (BYGBJERG, 2012; COKER et al., 2011).

Os derivados fenilpropanóides formam um grupo de substâncias naturais com diferentes propriedades farmacológicas e biológicas. O ácido cafêico é o mais abundante dos ácidos cinâmicos presente no reino vegetal (NARDINI et al., 1998), e apresenta grupos hidroxilas na posição 3 e 4 do anel arílico. É encontrado na natureza em várias formas tais como ácido, ésteres e amidas (FU et al., 2010). Muitas pesquisas têm sido realizadas para o desenvolvimento de métodos de preparação de compostos análogos do ácido cafêico, devido a sua grande variedade de atividades, a exemplo da atividade antimicrobiana.

O objetivo do presente trabalho foi preparar uma série de ésteres derivados do ácido cafêico **ME1-ME16** e avaliar suas atividades antifúngica frente aos microrganismos *Candida albicans* (ATCC 76645, LM-120 e LM-106), *Candida tropicalis* (ATCC-13803, LM-14 e LM-7A) e *Candida krusei* (LM-08 e LM-13), com o intuito de estudar a relação entre atividade antimicrobiana e estrutura química, a fim de obter um derivado sintético com melhor perfil antimicrobiano.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Etapa química

Os compostos foram obtidos por três tipos de reação: a esterificação de Fischer; reação utilizando haletos alquílicos e arílicos, e reação de Mitsunobu.

2.1.2 Esterificação de Fischer

A primeira reação utilizada foi a Esterificação de Fischer com a produção de oito compostos (**ME1 a ME8**), os quais foram obtidos a partir da reação entre o ácido cafêico, com álcool em excesso, utilizando ácido sulfúrico (H_2SO_4) como catalisador sob refluxo, monitorado por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), segundo a metodologia de SANDERSON e colaboradores (2013). Os álcoois utilizados nas reações foram: metanol, etanol, n-propanol, n-butanol, n-pentanol, álcool isopropílico, etilenoglicol e isopentílico.

2.2.2 Reação utilizando haletos alquílicos e arílicos

O segundo grupo de ésteres (**ME9**, **ME12**, **ME14** e **ME16**) foi obtido a partir da reação entre o ácido caféico, com acetona anidra na presença trietilamina (Et_3N) sob refluxo, utilizando haletos de alquila e arila como reagente, monitorado por CCDA, segundo a metodologia de BOECK e colaboradores (2005) e LI e colaboradores (2012). Os haletos utilizados nas reações foram: 1-bromo-decano, cloreto de 4-clorobenzila, cloreto de 4-metóxi-benzila e bromo-difenil-metano.

Na obtenção do terceiro grupo de ésteres (**ME9**, **ME12**, **ME13**, **ME14**, **ME15**), utilizou-se o ácido caféico e a base carbonato de potássio (K_2CO_3), juntamente com dimetilformamida (DMF) como solvente e o haleto de alquila e arila como reagente, sob agitação magnética à temperatura ambiente, até o consumo do material de partida, monitorados por CCDA, segundo a metodologia de SHI e colaboradores (2014). Os haletos utilizados nas reações foram: 1-bromo-decano, cloreto de 4-clorobenzila, cloreto de 4-metóxi-benzila.

2.2.3 Reação de Mitsunobu

Os ésteres (**ME10**, **ME11**, **ME14**) foram obtidos por um quarto método, a reação de Mitsunobu, em que o ácido caféico e o álcool aromático foram dissolvidos com tetrahidrofurano (THF) a 0°C . Em seguida, trifetilfosfina (TEPP) e o azodicarboxilato de diisopropila (DIAD) foram adicionados a temperatura ambiente, monitorados por CCDA, segundo a metodologia de HANDIQUE e colaboradores (2013). Os álcoois utilizados nas reações foram: álcool benzílico, álcool de 4-metil-benzil, álcool de 4-metóxi-benzil.

2.2 Métodos de Identificação

Todos os derivados do ácido caféico foram identificados por métodos espectroscópicos de Infravermelho, RMN de ^1H e ^{13}C e Espectrometria de Massas de Alta Resolução para os produtos inéditos na literatura.

2.3. Etapa Biológica

A avaliação da atividade antifúngica dos ésteres derivados do ácido caféico foi realizada pela técnica da microdiluição em caldo de acordo com o protocolo do CLSI (2008), utilizando oito cepas de *Candida*: *C. albicans* ATCC 76645; *C. albicans* LM-106; *C. albicans* LM-120; *C. tropicalis* ATCC-13803; *C. tropicalis* LM-14; *C. krusei* LM-7A; *C. krusei* LM-08 e *C. krusei* LM-13 (HOLETZ et al., 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esquema 1: Ésteres obtidos derivados do ácido cafêico.

A atividade antifúngica (**Tabela 1**) dos produtos foi interpretada e considerada ativa ou não de acordo com os seguintes parâmetros: 50-100 µg/mL = boa atividade; 100-500 µg/mL = atividade moderada; 500-1000 = fraca atividade; > 1000 µg/mL = produto inativo (HOLETZ et al., 2002).

Tabela 1. Resultados da Avaliação da Concentração Inibitória Mínima – CIM (µg/mL) de dezesseis substâncias sobre leveduras do gênero *Candida* – Técnica da Microdiluição.

Éster µg/mL	<i>Candida albicans</i> ATCC-76645	<i>Candida albicans</i> LM-120	<i>Candida albicans</i> LM-106	<i>Candida tropicalis</i> ATCC-13803	<i>Candida tropicalis</i> LM-14	<i>Candida tropicalis</i> LM-7A	<i>Candida krusei</i> LM-08	<i>Candida krusei</i> LM-13
ME1	512	512	512	512	512	512	512	512
ME2	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024
ME3	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024
ME4	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024
ME5	+	+	+	+	+	+	+	+
ME6	+	+	+	+	+	+	+	+
ME7	128	128	128	128	128	128	128	128
ME8	+	+	+	+	+	+	+	+
ME9	+	+	+	+	+	+	+	+
ME10	+	+	+	+	+	+	+	+
ME11	+	+	+	+	+	+	+	+
ME12	+	+	+	+	+	+	+	+
ME13	256	256	256	256	256	256	256	256
ME14	+	+	+	+	+	+	+	+
ME15	+	+	+	+	+	+	+	+
ME16	+	+	+	+	+	+	+	+
Micro-organismo	+	+	+	+	+	+	+	+
Nistatina	-	-	-	-	-	-	-	-

Diante dos resultados obtidos, os compostos mais sensíveis foram **ME7** e **ME13** com atividade moderada, enquanto que os compostos **ME1**, **ME2**, **ME3** e **ME4** apresentaram fraca atividade de acordo com o protocolo Holetz et al., 2002, os demais compostos foram inativos para as cepas testadas. A relação estrutura-atividade desses compostos mostra que o produto com cadeia lateral alquílica mediana com cinco átomos de carbono, assim como o substituinte cloreto no anel aromático apresentaram a melhores atividades antifúngicas encontradas.

4. CONCLUSÃO

Na análise da relação estrutura-atividade nos radicais de cadeias alquílicas, os testes antimicrobianos demonstraram melhores atividades para os compostos com cadeia linear mediana, sendo o melhor resultado para os fungos do gênero *Candida*, o **ME7**. Para os radicais arílicos, o **ME13** foi um dos compostos que teve atividade antimicrobiana superior em relação aos demais, seu diferencial foi à presença do radical cloreto benzílico na posição *para* do anel caféico.

5. REFERÊNCIAS

BINDER, S.; LEVITT, A. M.; SACKS, J. J.; HUGHES, J. M. Emerging infectious diseases: public health issues for the 21st century. *Science*, v. 284, n. 5418, p. 1311–1313, 1999.

BOECK, P.; SÁ, M. M.; DE SOUZA, B. S.; CERCENÁ, R.; ESCALANTE, A. M.; ZACHINO, S. A.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. A simple synthesis of kaurenoic esters and other derivatives and evaluation of their antifungal activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 16, n. 6B, p. 1360-1366, 2005.

BYGBJERG, I. C. Double burden of noncommunicable and infectious diseases in developing countries. *Science*, v. 337, n. 6101, p. 1499–1501, 2012.

COKER, R. J.; HUNTER, B. M.; RUDGE, J. W.; LIVERANI, M.; HANVORAVONGCHAI, P. Emerging infectious diseases in southeast Asia: regional challenges to control. *Lancet*, v. 377, n. 9765, p. 599–609, 2011.

FU, J.; CHENG, K.; ZHANG, Z. M.; FANG, R. Q.; ZHU, H. L. Synthesis, structure and structure-activity relationship analysis of caffeic acid amides as potencial antimicrobials. *European Journal of Medical Chemistry*, v. 45, n. 6, p. 2638-2643, 2010.

HANDIQUE, J. G.; MAHANTA, D.; DEVI, A.; BORUAH, M. P. Synthesis and Electrochemical Behavior of Some Dendritic Polyphenols as Antioxidants. *Letters in Organic Chemistry*, v. 10, n. 1, p. 53-59, 2013.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2002, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

NARDINI, M.; PISU, P.; GENTILI, V.; NATELLA, F.; DI FELICE, M.; PICCOLELLA, E.; SCACCINI, C. Effect of caffeic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress in U937. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 25, n. 9, p. 1098–1105, 1998.

SANDERSON, J. T.; CLABAULT, H.; PATTON, C.; LASSALLE-CLAUX, G.; JEAN-FRANÇOIS, J.; PARÉ, A. F.; HÉBERT, M. J.; SURETTE, M. E.; TOUAIBIA, M. Antiproliferative, antiandrogenic and cytotoxic effects of novel caffeic acid derivatives in LNCaP human androgen-dependent prostate cancer cells. **Bioorganic & Medical Chemistry**, v. 21, n. 22, p. 7182–7193, 2013.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida? **Uso racional de medicamentos: temas selecionados**, v. 1, n. 4, 2004.

6. AGRADECIMENTOS