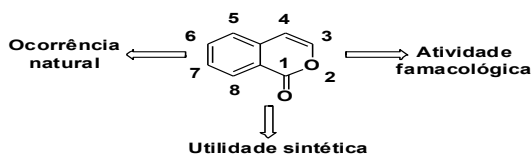


SÍNTESE E BIOTRANSFORMAÇÃO DE ISOCUMARINA ANÁLOGA À CITOSPORONA: AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANAIsabella de Faria Maranhão¹ & Adilson Beatriz²¹ Aluna do Curso de Farmácia da UFMS, bolsista de Iniciação Científica CNPq- PIBITI 2017/18² Professor da UFMS, Departamento de Química, e-mail: adilbeat@gmail.com**Resumo**

Objetivou-se através deste trabalho a obtenção de uma isocumarina sintética, pois assim como as naturais apresentam amplo espectro farmacológico, com atividades, antifúngica, antitumorais, antidiabéticas, fitotóxicas, antialérgicas, imunomoduladoras, anti-inflamatórias e antibacterianas. A síntese foi realizada seguindo o mecanismo de acoplamento de Sonogashira onde um alcino terminal (heptino) reage com haleto vinílico ou arílico (ácido *o*-iodo benzóico), catalisada por paládio no estado de oxidação zero. Após a formação da substância de interesse, foi realizada a biotransformação visando alterações químicas com a utilização da catálise através de enzimas de microorganismos, devido ao controle régio e estereosseletivo. Assim a biotransformação é um método eficiente na produção de compostos opticamente puros e no desenvolvimento de rotas eficientes para compostos alvos. Com o produto obtido conduziu-se o teste antimicrobiano, realizado com duas bactérias, sendo uma Gram-negativa (*Escherichia coli*) e uma Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*), onde visamos conhecer o espectro alcançado pela isocumarina obtida. De acordo com os resultados de ressonância magnética nuclear ¹H, comprovou-se a formação da 3-pentil-1*H*-isocromen-1-ona (isocumarina) através dos valores obtidos e comparados em cada um dos casos. A biotransformação não obteve um resultado significativo, pois a substância obtida não apresentou mudanças significativas na ressonância magnética nuclear ¹H nem no espectrômetro de massas. O teste antimicrobiano apresentou potencial moderado contra *Escherichia coli* somente, permanecendo a *Staphylococcus aureus* resistente.

Palavras-chave: isocumarina sintética; acoplamento de Sonogashira; catálise enzimática de microorganismos.**Apoio financeiro:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq**Trabalho selecionado para a JNIC:** UFMS**Introdução**

As isocumarinas, que podem ser naturais ou sintéticas (Zhang, W, et al., 2008. Guo, X-X, 2013), (figura 1) são um importante grupo de lactonas, sendo caracterizadas como substâncias heterocíclicas, devido ao seu anel heterocíclico oxigenado de seis membros. Podem ser extraídas de plantas, microorganismos e insetos. (Hill, R. A, 1986. Pochet, L, et al., 2004. Huang, Y.F, 2006). Elas possuem largo espectro em atividades farmacológicas, entre elas, antifúngica, antitumorais, antidiabéticas, fitotóxicas, antialérgicas, imunomoduladoras, anti-inflamatórias e antibacterianas. (Hill, R. A, 1986).

**Figura 1** : representação da estrutura de uma isocumarina.

A biotransformação de moléculas orgânicas pode ser definida como alterações químicas com a utilização da catálise através de enzimas de microorganismos. A incorporação da biotransformação em rotas sintéticas usando microorganismos e/ou enzimas isoladas está sendo bastante explorada por indústrias e pela comunidade acadêmica. A primeira consideração para o uso da biotransformação numa rota sintética é o controle régio e estereosseletivo, que podem ser alcançados através de reações catalisadas por enzimas ou microorganismos. A biotransformação é um método eficiente na produção de compostos opticamente puros e no desenvolvimento de rotas eficientes para compostos alvos. Além de proporcionar alternativas para a metodologia sintética clássica, representando uma ferramenta viável para a síntese orgânica. (Loughlin, W, 2000)

A seletividade apresentada pelos catalisadores naturais (quimiosseletividade, enantiosseletividade e regioseletividade), o amplo espectro de substâncias químicas que são aceitas para as reações de substratos, o

custo, as condições amenas e ecologicamente corretas, conferem aos mesmos algumas características fundamentais para sua utilização. (Faber, K. 2004) .

Metodologia

As isocumarinas foram sintetizadas de acordo com o procedimento relatado no trabalho de Subramanian e Batchu. (Woon, E. C. Y et al, 2006). Foi preparada uma mistura contendo 0,60g, (2,42 mmol) de iodo benzóico; 0,070g, (0,06 mmol) que equivale 10% Pd/C; 0,076 g, (0,28 mmol) de PPh₃; 0,028 g, (0,14 mmol) de CuI e 1,22 g, 1,8 mL, (12,1 mmol) de Et₃N e 30 mL em etanol, sob condições de 25°C, atmosfera de nitrogênio, durante 30min. A acetilação foi realizada pela adição gota a gota do alcino (heptino) que corresponde a 0,475 g, 0,64 mL, (4,84 mmol). A mistura foi mantida à 80 °C por 16 h, ao retirar deixou-se atingir temperatura ambiente e diluiu-se com 50mL de AcOEt, filtrada em celite e concentrada. O resíduo foi purificado em coluna cromatográfica (Hex:AcOEt – 15:2).

Realizou-se ressonância magnética nuclear ¹H

Biotransformação

Após a inoculação com *Aspergillus*, o meio líquido (150 mL) foi mantido em incubadora a 30°C com agitação a 150 rpm na ausência de luz. Após um período de 48 horas o substrato orgânico (150 mg) foi adicionado e monitorado por 15 dias. Foram utilizados três tipos de controles para as reações: apenas meio de cultura, meio de cultura e substrato, meio de cultura e fungo. O meio foi filtrado em celite para retirada dos micélio e os produtos extraídos com acetato de etila (3 x 50 mL), sendo a fase orgânica secada sobre MgSO₄ anidro e concentrado em evaporador rotativo. O resíduo da fase orgânica foi purificado por cromatografia de coluna em sílica gel, usando hexano/acetato de etila (2:1) como eluente. O produto bruto foi purificado por cromatografia de coluna em sílica gel usando-se hexano/acetato de etila (1:1) como eluente (Ito, F. M, 2009)

Atividade antimicrobiana

As placas de 96 poços (96-well plates) foram preparadas distribuindo 100 µL de caldo Mueller-Hinton (Sigma-Aldrich) em cada uma. Uma solução-mãe foi preparada na concentração de 2 mg mL⁻¹ e diluições seriadas foram realizadas para atingir uma concentração final na faixa de 1 a 1000 µg mL⁻¹, com um volume final de 100 µL em cada poço. Para gentamicina, a concentração final variou de 64 a 0,5 µg mL⁻¹. Os organismos de teste utilizados neste estudo foram *S. aureus* e *E. coli*. A cepa clínica foi doada pelo Laboratório de Bacteriologia do Centro de Análises Clínicas do Hospital Universitário da UFMS, em Campo Grande, Brasil, e os ensaios foram realizados no Sintmol (Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Química da UFMS). O inóculo, foi uma cultura deixada durante a noite de cada espécie bacteriana em ágar Mueller-Hinton (Sigma-Aldrich) diluído em solução salina estéril (0,45%) para uma concentração de aproximadamente 10⁸ UFC mL⁻¹. Esta solução foi diluída na proporção 1/10 em solução salina (0,45%) e foram adicionados 5 (10⁴ CFU mL⁻¹) a cada poço contendo as amostras de teste. Todas as experiências foram realizadas em triplicata e os tabuleiros de microdiluição foram incubados a 36 °C durante 18 h. Em seguida, 20 µL de uma solução aquosa (0,5%) de cloreto de trifênil tetrazólio (TTC) foram adicionados a cada poço e as placas foram novamente incubadas a 36 °C durante 2 h. Depois, os poços onde o crescimento bacteriano ocorreu, o TTC mudou de incolor para vermelho. A CIM foi definida como a menor concentração de cada substância em que não ocorreu alteração de cor e foi expressa em µg mL⁻¹. (Manda, Bhaskar, et al, 2018)

Resultados e Discussão

Como citado anteriormente as espécies contendo isocumarinas na estrutura são potencialmente reconhecidas e aplicadas na indústria devido as propriedades medicinais.

Para a obtenção da isocumarina (3-pentil-1*H*-isocromen-1-ona) Figura 4, partiu-se dos substratos ácido *o*-iodo do benzóico e o 1-heptino na proporção de 1:2, na presença da base trietilamina (Et₃N), os ligantes trifênil fosfina (PPh₃), as quantidades catalíticas do paládio suportado em carbono (Pd/C) e iodeto de cobre (CuI), utilizando como solvente etanol, essas condições reacionais foram empregadas por apresentarem resultados satisfatórios segundo o trabalho de Subramanian e Batchu. (Subramanian, V et al, 2005).

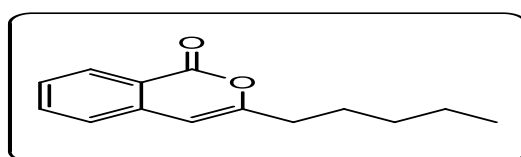
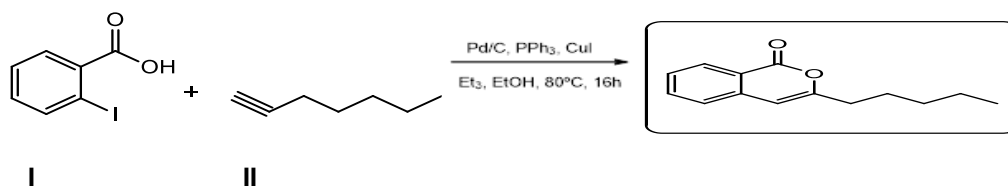


Figura 4 : Estrutura da isocumarina – 3-pentil-1*H*-isocromen-1-ona

O mecanismo envolvido na reação é do tipo acoplamento Sonogashira, esse tipo de acoplamento ocorre quando os reagentes de partida são um alcino terminal (heptino II) com haleto vinílico ou arílico (ácido *o*-iodo

benzóico I), catalisada por paládio no estado de oxidação zero. Esta catalise requer a formação de um complexo formado na presença de uma base (Et_3N) e tem como co-catalise o uso do iodeto de cobre (CuI). (Kundu, N. G et al, 1998)

Reação global exemplificada pelo esquema 1



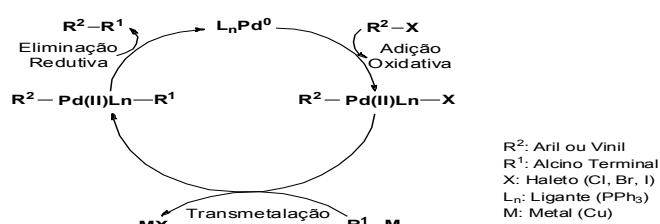
Esquema 1: Síntese da 3-pentil-1*H*-isocromen-1-ona por meio do acoplamento Sonogashira.

O mecanismo da reação é similar ao da reação de acoplamento Stille e Suzuki. Na adição oxidativa o haleto orgânico promove o catalisador o estado (II), este intermediário é submetido a transmetalização com o cobre-aquil, que é obtido a partir do alcino terminal, base e o iodeto de cobre. A eliminação reductiva seguida do acoplamento das duas espécies orgânicas, formando o produto e regenera o paládio ao estado zero. (Kundu, N. G et al, 1998)

O ciclo catalítico percorrido pelo catalisador (L_nPd^0) em que L_n são ligantes como por exemplo (PPh_3) utilizados para a formação de ligações C-C via acoplamento é demonstrado mais detalhadamente a sequência de etapas no esquema 2. (Teixeira, R. R, et al, 2007)

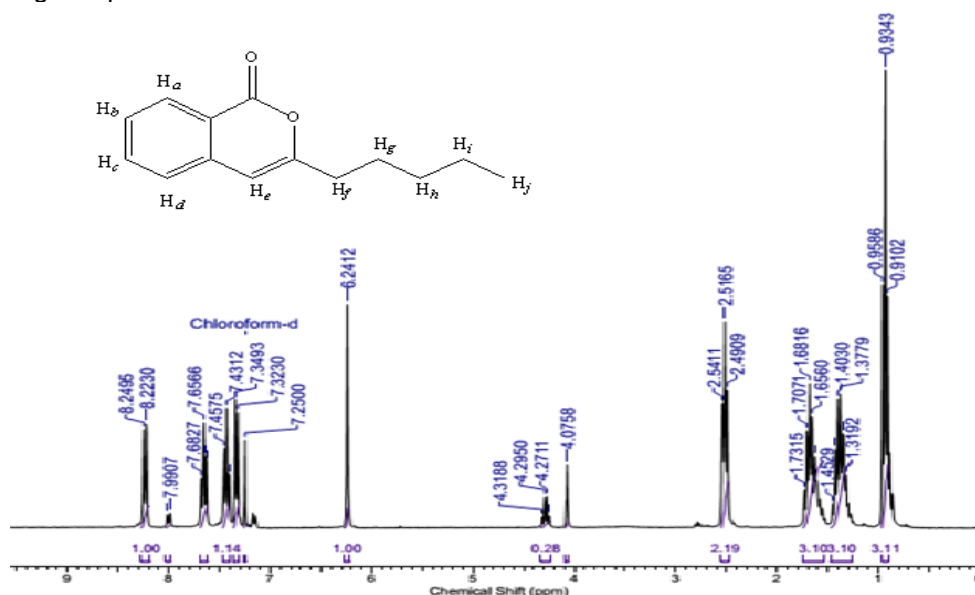
Esquema 2: Ciclo catalítico do paládio no mecanismo de acoplamento Sonogashira.

Fonte: Esquema adaptado¹



Caracterização da isocumarina 3-pentil-1*H*-isocromen-1-ona

A formação de 3-pentil-1*H*-isocromen-1-ona foi comprovada por RMN ^1H principalmente pelo sinal referente ao hidrogênio olefínico identificado na estrutura como H_e que aparece como singleto com δ 6,24 ppm, região típica de alcenos.



O teste de biotransformação do composto 3-pentil-1*H*-isocromen-1-ona não demonstrou nenhuma mudança molecular na molécula de origem, pois não houve nenhuma mudança efetiva no espectro de RMN ^1H nem no espectro de massas.

Ensaio Antimicrobiano

O composto 3-pentil-1*H*-isocromen-1-ona não demonstrou atividade quanto à espécie de bactéria Gram-

positiva *Staphylococcus aureus*, porém, frente à bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, a isocumarina sintetizada apresentou um potencial moderado (como pode ser visualizado na tabela 1), provavelmente devido a afinidade de polaridade pela membrana externa e porinas presentes desses tipos de bactérias, que pode tornar-se objeto de estudo para posteriores trabalhos na área, utilizando diferentes cepas com características semelhantes.

Composto	Microorganismo	
	<i>S. aureus</i> CIM (mg/mL)	<i>E. coli</i> CIM (mg/mL)
3-pentil-1 <i>H</i> -isocromen-1-ona	----	125

CIM: Concentração mínima inibitória

Conclusões

A formação da isocumarina (3-pentil-1*H*-isocromen-1-ona), teve sua caracterização comprovada com os resultados apresentados por RMN ¹H, principalmente pelo sinal referente ao hidrogênio olefínico identificado na estrutura como H_e que aparece como singleto com δ 6,24 ppm, região típica de alcenos. Espectro de massas onde obtivemos o pico do íon molecular igual a 216 m/z, correspondendo com a massa do composto 3-pentil-1*H*-isocromen-1-ona, confirmando assim a formação da molécula de interesse deste trabalho que apresenta massa molar de 216,28 g/mol e pelo Espectro de Infravermelho onde identificamos a banda da carbonila referente a ésteres em aproximadamente 1750 cm⁻¹, o que nos confirmou a formação do anel lactâmico de seis membros, que apresenta absorção da carbonila normalmente na região de 1760 cm⁻¹.

A biotransformação proposta neste trabalho a partir da isocumarina sintetizada (3-pentil-1*H*-isocromen-1-ona) não demonstrou nenhuma mudança molecular, pois não houve nenhuma mudança efetiva no espectro de RMN ¹H nem no espectro de massas que comprovasse alteração na molécula de origem. Provavelmente pelo fungo utilizado na biotransformação que foi o *Aspergillus sp* e não o *Mucor ramosissimus*, pois o mesmo estava desativado e havia acabado quando tentamos reativá-lo, nos levando a essa troca.

Foi realizado um teste antimicrobiano com duas espécies anabactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*. A isocumarina apresentou potencial moderado contra *Escherichia coli* e nenhuma atividade contra *Staphylococcus aureus*. Provavelmente a afinidade de polaridade pela membrana externa e porinas presentes na bactéria Gram-negativa tenha auxiliado para essa atividade antimicrobiana, o que pode ser um objeto de estudo para posteriores trabalhos na área, com utilização de cepas com características semelhantes.

Referências bibliográficas

- Faber, K. 2004. Biotransformations in organic chemistry. 5th ed.; Springer-verlag, New York
- Guo, X-X. Synthesis of isocoumarin derivatives by copper-catalyzed addition of *o*-halobenzoic acids to active internal alkynes. *J. Org. Chem.* 2013, 78, 1660-1664.
- Ito, F. M.; Mena, A. E. M.; Marques, Maria Rita; Lima, Denis Pires de; Beatriz, Adilson. Biotransformation of a cage-like Diels-Alder adduct and derivatives by *Mucor ramosissimus*. *Brazilian Journal of Microbiology (Impresso)* **JCR**, v. 40, p. 563-568, 2009
- Kundu, N. G.; Pal, M.; Nandi, B. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* 1998, 1, 561-568.
- Loughlin, W. A. Biotransformation in organic synthesis. *Bioresource technology*, 74, 49-62, 2000. 17 Ishige et al. 2005
- Manda, Bhaskar; Prasad, Avvari; Thatikonda, Narendar; Lacerda Jr, Valdemar; Barbosa, Layla; Santos, Heloia; Romão, Wanderson; Pavan, Fernando; Ribeiro, Camila; Dos Santos, Edson; Marques, Maria; De Lima, Denis; Micheletti, Ana; Beatriz, Adilson. Synthesis, Antibacterial and Antitubercular Evaluation of Cardanol and Glycerol Based β-Amino Alcohol Derivatives. *Journal of the Brazilian chemical society* **JCR** v. 29, p. 639-648, 2018
- (a) Pochet, L.; Frederick, R.; Masereel, B. *Curr. Pharm. Des.* 2004, 10, 3781-3796. (b) Canedo-Hernandez, L.; AcebalSarabia, C.; Garcia-Gravalos, D. PCT Int. Appl. WO 9627594, 1996; Chem. Abstr. 1996, 125, 273726. (c) Deck, L. M.; Vander Jagt, D. L.; Heynekamp, J. J. U.S. Pat. Appl. Publ. US 2006252823, 2006; Chem. Abstr. 2006, 145, 471397. (d) Bauta, W. E.; Cantrell, W. R.; Lovett, D. P. PCT Int. Appl. WO 2003004486, 2003; Chem. Abstr 2003, 138, 106599
- Subramanian, V.; Batchu, V. R.; Barange, D.; Pal, M. Synthesis of isocoumarins via Pd/C-Mediated Reactions of *o*-Iodobenzoic Acid with Terminal Alkynes. *J. Org. Chem.* 2005, 70, 4778-4783.
- Teixeira, R. R.; Barbosa, L. C. A.; Piló-Veloso, D. Reações de acoplamento cruzado de organossilanos catalisadas por paládio: aspectos históricos, sintéticos e mecanísticos. *Quím. Nova.* 30. 7 São Paulo 2007.
- Zhang, W.; Krohn, K.; Draeger, S.; Schulz, B. *J. Nat. Prod.* 2008, 71, 1078-1081.