



**Universidade Federal de Santa Catarina**  
**Centro de Ciências Físicas e Matemáticas**  
**Departamento de Química**  
**Curso de Pós-Graduação em Química**

***SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA  
DE COMPOSTOS DERIVADOS DO ÁCIDO GÁLICO.***

**PAULO CÉSAR LEAL**

**Florianópolis – 2004**

**PAULO CÉSAR LEAL**

***SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA  
DE COMPOSTOS DERIVADOS DO ÁCIDO GÁLICO.***

**Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da  
Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial a obtenção  
do grau de Mestre em Química.**

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo José Nunes**

**Co-orientador: Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes**

**Florianópolis - 2004**

**PAULO CÉSAR LEAL**

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE  
COMPOSTOS DERIVADOS DO ÁCIDO GÁLICO.**

Esta dissertação foi julgada e aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química no programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

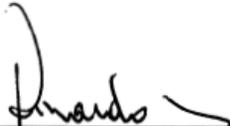
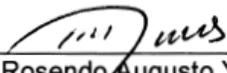
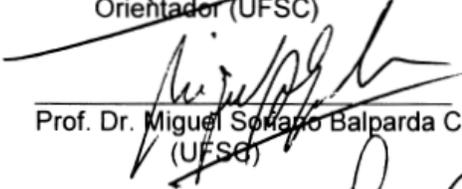
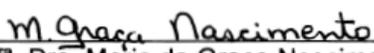
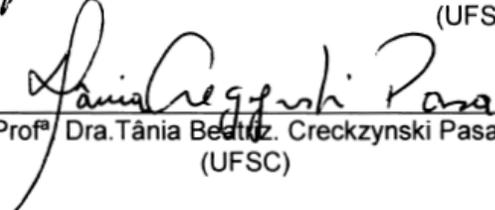
Florianópolis, 13 de Fevereiro de 2004.



Prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera

Coordenador do Programa

**BANCA EXAMINADORA**

  
Prof. Dr. Ricardo José Nunes  
Orientador (UFSC)  
Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes  
Co-orientador (UFSC)  
Prof. Dr. Miguel Soriano Balparda Caro  
(UFSC)  
Prof.ª Dra. Maria da Graça Nascimento  
(UFSC)  
Prof.ª Dra. Tânia Beatriz Creckzynski Pasa  
(UFSC)

A minha mãe (Ilda) pelo constante apoio.

***“Não basta ter belos sonhos para realizá-los,  
Mas ninguém realiza grandes obras se não for capaz  
de sonhar grande. Podemos mudar nosso destino,  
se nos dedicarmos à luta pela realização de nossos ideais.  
É preciso sonhar, mas com a condição de crer em nosso sonho;  
De examinar com atenção a vida real;  
De confrontar nossa observação com nosso sonho;  
De realizar escrupulosamente nossa fantasia.  
Sonhos, acredite neles”.***

***(Lenin)***

# ***AGRADECIMENTOS***

- ✓ À Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC;
- ✓ Ao Departamento de Química da UFSC;
- ✓ A CAPES pela bolsa de estudos concedida e a outras agências de fomento como CNPq, por viabilizarem a execução deste trabalho;
- ✓ À Central de Análises do Departamento de Química da UFSC, por fornecer condições necessárias para identificação dos compostos;
- ✓ A Prof<sup>a</sup>. Dr. Susana A. Zacchino da Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacêuticas, Universidad del Rosario, Argentina, pela realização dos testes antifúngicos apresentados nesta Dissertação;
- ✓ Aos funcionários da Biblioteca Setorial e Secretaria da Pós-graduação em Química, Graça e Jadir, pela atenção e bom humor; a Márcia pela colaboração durante a realização deste trabalho;
- ✓ Aos professores e funcionários do Departamento de Química;
- ✓ A todos os colegas do Departamento de Química;
- ✓ Aos companheiros dos laboratórios (302-309), que foram acima de tudo amigos;
- ✓ A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

# SUMÁRIO

<b>1.0 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>1.1 Química Medicinal .....</b>	<b>20</b>
<b>1.2 Fármacos: Passado, Presente e Futuro .....</b>	<b>21</b>
<b>1.3 Uso de produtos naturais como precursores de fármacos .....</b>	<b>22</b>
<b>1.4 Importância dos Compostos fenólicos .....</b>	<b>26</b>
<b>2.0 REVISÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>3.0 INFECÇÕES FÚNGICAS .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Aspectos históricos .....</b>	<b>36</b>
<b>3.2 Classificação clínica das micoses .....</b>	<b>38</b>
<b>3.3 As doenças causadas por fungos patogênicos primários podem ser classificadas em quatro grupos naturais. ....</b>	<b>38</b>
<b>3.3.1 Micoses superficiais.....</b>	<b>39</b>
<b>3.3.2 Micoses cutâneas .....</b>	<b>39</b>
<b>3.3.3 Micoses subcutâneas .....</b>	<b>40</b>
<b>3.3.4 Micoses sistêmicas .....</b>	<b>40</b>
<b>3.3.5 Micoses oportunistas .....</b>	<b>41</b>

<b>4.0</b>	<b><i>Fármacos utilizados para o tratamento das infecções fúngicas.....</i></b>	<b>42</b>
4.1	Detecção de compostos com atividade antifúngica in vitro. ....	44
4.1.1	Detecção de compostos antifúngicos com ensaios sem alvos específicos.....	44
4.1.2	Métodos de difusão.....	44
4.1.3	Método de diluição.....	45
4.2	A Importância da pesquisa de novos agentes antifúngicos. ....	45
4.3	COEFICIENTE DE PARTIÇÃO.....	47
4.4	Definição de coeficiente de partição.....	48
4.5	OBJETIVOS.....	53
<b>5.0</b>	<b><i>PARTE EXPERIMENTAL.....</i></b>	<b>54</b>
5.1	Materiais e Métodos .....	54
5.2	Síntese dos derivados do ácido gálico.....	55
5.2.1	Preparação do ácido gálico triacetila (04).....	55
5.2.2	Preparação do Ácido 3,4,5-trimetóxi benzóico (05) .....	56
5.2.3	Preparação do 3, 4,5-trimetóxi benzoato de etila (06) .....	57
5.2.4	Procedimento experimental geral para a síntese dos galatos (07-12)...	58
5.2.5	Procedimento experimental geral para a síntese dos galatos (13-20)...	59

<b>6.0</b>	<b>AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA: Atividade antifúngica.....</b>	<b>61</b>
6.1	Microorganismos.....	61
6.2	Ensaio antifúngicos.....	62
<b>7.0</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
	Mecanismo de esterificação do ácido gálico catalisada por ácido.....	63
7.2	Estruturas e dados espectroscópicos dos compostos sintetizados (os valores de Log P foram calculados com auxílio do programa TSAR. <sup>48</sup> ).....	64
7.2.1	Pirogalol (1,2,3-trihidroxibenzeno) – 01. ....	64
7.2.2	Ácido gálico (Ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) – 02. ....	65
7.2.3	Ácido chiquímico – 03.....	66
7.2.4	Ácido 3,4,5-triacetilbenzoico – 04. ....	67
7.2.5	Ácido 3,4,5-trimetóxicoibenzoico – 05.....	68
7.2.6	3,4,5-trimetóxicoibenzoato de etila – 06.....	69
7.2.7	Galato de metila (3,4,5-trihidroxibenzoato de etila) – 07.....	70
7.2.8	Galato de etila (3,4,5-trihidroxibenzoato de etila) – 08.....	71
7.2.9	Galato de propila (3,4,5-trihidroxibenzoato de propila) – 09.....	72
7.2.10	Galato de butila (3,4,5-trihidroxibenzoato de butila) – 10.....	73
7.2.11	Galato de pentila (3,4,5-trihidroxibenzoato de pentila) – 11.....	74

7.1.12 Galato de hexila (3,4,5-trihidroxibenzoato de hexila) – 12. ....	75
7.2.13 Galato de heptila (3,4,5-trihidroxibenzoato de heptila) – 13.....	76
7.2.14 Galato de octila (3,4,5-trihidroxibenzoato de octila) – 14.....	77
7.2.15 Galato de decila (3,4,5-trihidroxibenzoato de decila) – 15.....	78
7.2.16 Galato de undecila (3,4,5-trihidroxibenzoato de undecila) – 16. ....	79
7.2.17 Galato de dodecila (3,4,5-trihidroxibenzoato de dodecila) – 17. ....	80
7.2.18 Galato de tetradecila (3,4,5-trihidroxibenzoato de tetradecila) – 18.....	81
7.2.19 Galato de hexadecila (3,4,5-trihidroxibenzoato de hexadecila) – 19. ..	82
7.2.20 Galato de octadecila (3,4,5-trihidroxibenzoato de octadecila) – 20.....	83
<b>7.3. Resultados das atividades frente a diversos tipos de fungos. ....</b>	<b>84</b>
<b>7.4 Esquema geral dos compostos sintetizados e discussão dos dados obtidos. ....</b>	<b>87</b>
<b>7.5 Apresentação dos valores do Coeficiente de Partição ótimo contra cada fungo. ....</b>	<b>90</b>
7.5.1 Dados da atividade antifúngica contra <i>Candida albicans</i> .....	90
7.5.2 Dados da atividade antifúngica contra <i>Candida tropicalis</i> .....	92
7.5.3 Dados da atividade antifúngica contra <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	94
7.5.4 Dados da atividade antifúngica contra <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	96

7.5.5	Dados da atividade antifúngica contra <i>Aspergillus fumigatus</i> . .....	98
7.5.6	Dados da atividade antifúngica contra <i>Aspergillus flavus</i> . .....	100
7.5.7	Dados da atividade antifúngica contra <i>Aspergillus niger</i> .....	102
7.5.8	Dados da atividade antifúngica dos compostos contra <i>Candida albicans</i> , <i>Cândida tropicalis</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i> .....	104
7.5.9	Dados da atividade antifúngica contra <i>Microsporum canis</i> . .....	106
7.5.10	Dados da atividade antifúngica contra <i>Microsporum gypseum</i> . .....	108
7.5.11	Dados da atividade antifúngica contra <i>Epidermophyton floccosum</i> ...	110
7.5.12	Dados da atividade antifúngica contra <i>Trichophyton rubrum</i> . .....	112
7.5.13	Dados da atividade antifúngica contra <i>Trichophyton mentagrophytes</i> .	114
7.5.14	Dados da atividade antifúngica contra <i>Microsporum canis</i> , <i>Microsporum gypseum</i> , <i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> e <i>Trichophyton mentagrophytes</i> . .....	116
<b>8.0</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>122</b>
<b>9.0</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>124</b>
<b>10</b>	<b>Anexos</b> .....	<b>133</b>

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Domínios da Farmacologia. ....	20
Figura 2 Produção da Progesterona a partir da Diosgenina. ....	23
Figura 3 Estrutura do galotanino $\beta$ -1,2,3,4,6-pentagaloil-D-glicose. ....	27
Figura 4 Paciente soropositivo (SIDA) com lesão conhecida como “sapinho” ou candidíase. ....	42
Figura 5 Farmacodinâmica e farmacocinética. ....	48
Figura 6 Métodos para a determinação do Coeficiente de Partição. ....	50
Figura 7 Gráfico Log 1/[C] versus Log P. ....	52
Figura 8 Preparação do ácido gálico triacetila (04). ....	55
Figura 9 Preparação do ácido 3,4,5-trimetóxi benzóico (05). ....	56
Figura 10 Preparação do 3,4,5-trimetóxi benzoato de etila (06). ....	57
Figura 11 Procedimento experimental geral para a síntese dos galatos (07-12). ....	58
Figura 12 Procedimento experimental geral para a síntese dos galatos (13-20). ....	59
Figura 13 Mecanismo de esterificação do ácido gálico catalisada por ácido. ....	63
Figura 14 Estrutura do 1,2,3-trihidroxibenzeno (01). ....	64
Figura 15 Estrutura do ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico (02). ....	65
Figura 16 Estrutura do ácido chiquímico (03). ....	66
Figura 17 Estrutura do ácido 3,4,5-triacetilbenzoico (04). ....	67
Figura 18 Estrutura do ácido 3,4,5-trimetóxi benzóico (05). ....	68
Figura 19 Estrutura do 3,4,5-trimetóxi benzoato de etila. ....	69
Figura 20 Estrutura do 3,4,5-trihidroxibenzoato de metila (07). ....	70
Figura 21 Estrutura do 3,4,5-trihidroxibenzoato de etila (08). ....	71
Figura 22 Estrutura do 3,4,5-trihidroxibenzoato de propila (09). ....	72
Figura 23 Estrutura do 3,4,5-trihidroxibenzoato de butila (10). ....	73
Figura 24 Estrutura do 3,4,5-trihidroxibenzoato de pentila (11). ....	74
Figura 25 Estrutura do 3,4,5-trihidroxibenzoato de hexila (12). ....	75
Figura 26 Estrutura do 3,4,5-trihidroxibenzoato de heptila (13). ....	76
Figura 27 Estrutura do 3,4,5-trihidroxibenzoato de octila (14). ....	77
Figura 28 Estrutura do 3,4,5-trihidroxibenzoato de decila (15). ....	78
Figura 29 Estrutura do 3,4,5-trihidroxibenzoato de undecila (16). ....	79
Figura 30 Estrutura do 3,4,5-trihidroxibenzoato de dodecila (17). ....	80
Figura 31 Estrutura do 3,4,5-trihidroxibenzoato de tetradecila (18). ....	81
Figura 32 Estrutura do 3,4,5-trihidroxibenzoato de hexadecila (19). ....	82
Figura 33 Estrutura do 3,4,5-trihidroxibenzoato de octadecila (20). ....	83
Figura 34 Figura ilustrativa dos compostos sintetizados. ....	87
Figura 35 Espectro de RMN $^1\text{H}$ do ácido 3,4,5-trimetóxi benzóico em DMSO- $d_6$ . ....	133
Figura 36 Espectro de RMN $^1\text{H}$ do 3,4,5-trimetóxi benzoato de etila em $\text{CDCl}_3$ . ....	134
Figura 37 Espectro de RMN $^1\text{H}$ do 3,4,5-trihidroxibenzoato de dodecila em DMSO- $d_6$ . ....	134
Figura 38 Espectro no <i>infravermelho</i> do 3,4,5-trihidroxibenzoato de undecila. ....	135

# ***LISTA DE TABELAS***

Tabela 1 Compostos antifúngicos usados para o tratamento de micoses em humanos. <sup>40</sup> .....	43
Tabela 2 Resultados das CIM's em µg/mL contra diversos fungos. ....	84
Tabela 3 Comparação das concentrações dos galatos mais ativos (13-14) contra os fármacos: Anfotericina B (21), Cetoconazol (22) e Terbinafina 23). ....	89

# LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Log 1/[CIM] vs Log P contra <i>Candida Albicans</i> . .....	90
Gráfico 2 Log 1/[CIM] vs Log P contra <i>Cândida albicans</i> dos compostos (02,07-12, 16-18 e 20). .....	91
Gráfico 3 Log 1/[CIM] vs Log P contra <i>Candida tropicalis</i> dos compostos (02,07-18 e 20). .....	92
Gráfico 4 Log 1/[CIM] vs Log P contra <i>Candida tropicalis</i> dos compostos (02,07-12, 16-18 e 20). .....	93
Gráfico 5 Log 1/[CIM] vs Log P contra <i>Saccharomyces cerevisiae</i> dos compostos (02,07-18, 20). .....	94
Gráfico 6 Log 1/[CIM] vs Log P contra <i>Saccharomyces cerevisiae</i> dos compostos (02,07-12, 16-18, 20). .....	95
Gráfico 7 Log 1/[CIM] vs Log P contra <i>Cryptococcus neoformans</i> dos compostos (02,07-18, 20). .....	96
Gráfico 8 Log 1/[CIM] vs Log P contra, <i>Cryptococcus neoformans</i> dos compostos (02,07-12, 17,18, 20). .....	97
Gráfico 9 Log 1/[CIM] vs Log P contra <i>Aspergillus fumigatus</i> dos compostos (02,07-18, 20). .....	98
Gráfico 10 Log 1/[CIM] vs Log P contra <i>Aspergillus fumigatus</i> dos compostos (02,07-12, 16, 18, 20). .....	99
Gráfico 11 Log 1/[CIM] vs Log P contra <i>Aspergillus flavus</i> dos compostos (02, 07-18, 20). .....	100
Gráfico 12 Log 1/[CIM] vs Log P contra, <i>Aspergillus flavus</i> dos compostos (02,07-12, 15-18, 20). .....	101
Gráfico 13 Log 1/[CIM] vs Log P contra <i>Aspergillus niger</i> dos compostos (02,07-18, 20). .....	102
Gráfico 14 Log 1/[CIM] vs Log P contra <i>Aspergillus niger</i> dos compostos (02,07-12, 14-18, 20). .....	103
Gráfico 15 Log 1/[CIM] vs Log P contra <i>Candida albicans</i> , <i>Cândida tropicalis</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i> dos compostos (02-18 e 20). .....	104
Gráfico 16 Log 1/[CIM] vs Log P contra <i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i> dos compostos (02,07- 12, 17, 18 e 20). .....	105
Gráfico 17 Log 1/[CIM] vs Log P contra <i>Microsporium canis</i> dos compostos (02,07-15,20). .....	106
Gráfico 18 Log 1/[CIM] vs Log P contra <i>Microsporium canis</i> dos compostos (02,07-13, 15,20). .....	107
Gráfico 19 Log 1/[CIM] vs Log P contra <i>Microsporium gypseum</i> , dos compostos (02,07-18, 20). .....	108
Gráfico 20 Log 1/[CIM] vs Log P contra <i>Microsporium gypseum</i> , dos compostos (02,07-12,14-18, 20). .....	109
Gráfico 21 Log 1/[CIM] vs Log P contra <i>Epidermophyton floccosum</i> dos compostos (02,07-18, 20). .....	110
Gráfico 22 Log 1/[CIM] vs Log P contra <i>Epidermophyton floccosum</i> dos compostos (02,07-12, 15-18, 20). .....	111
Gráfico 23 Log 1/[CIM] vs Log P contra <i>Trichophyton rubrum</i> dos compostos (02,07-18, 20). .....	112
Gráfico 24 Log 1/[CIM] vs Log P contra <i>Trichophyton rubrum</i> dos compostos (02,07-18, 20). .....	113
Gráfico 25 Log 1/[CIM] vs Log P contra <i>Trichophyton mentagrophytes</i> dos compostos (02,07-18, 20). .....	114
Gráfico 26 Log 1/[CIM] vs Log P contra <i>Trichophyton mentagrophytes</i> dos compostos (02,07-18, 20). .....	115
Gráfico 27 Log 1/[CIM] vs Log P contra <i>Microsporium canis</i> , <i>Microsporium gypseum</i> , <i>Epidermophyton</i> <i>floccosum</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> e <i>Trichophyton mentagrophytes</i> dos compostos (02,07-18, 20). .....	116
Gráfico 28 Log 1/[CIM] vs Log P contra <i>Microsporium canis</i> , <i>Microsporium gypseum</i> , <i>Epidermophyton</i> <i>floccosum</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> e <i>Trichophyton mentagrophytes</i> dos compostos (02,07-18, 20). .....	117

# ***ANEXOS***

Anexos 01 – Espectros de  $^1\text{H}$ -NMR e Infravermelho (IV)\_\_\_\_\_ 133.

## **RESUMO**

O número de agentes antifúngicos úteis é relativamente pequeno quando comparado aos agentes antibacterianos. A razão desta discrepância reside na estreita relação entre os fungos patogênicos e seus hospedeiros mamíferos. Muitas vias bioquímicas, que servem como importantes alvos para agentes antibacterianos, simplesmente estão ausentes nos fungos e as vias existentes, as quais poderiam atuar como alvos são partilhadas pelo hospedeiro. Por essas razões, muitos compostos exibem atividade antifúngica significativa *in vitro* não podem ser utilizados terapeuticamente em virtude de sua toxicidade para o hospedeiro. O principal alvo dos agentes quimioterápicos é a membrana do fungo. A maioria dos fungos contém ergosterol como principal esteroide da membrana.

Os fungos também são responsáveis por perdas incalculáveis na agricultura, em alimentos, bem como causadores de doenças em animais.

Diante da necessidade de novos agentes antifúngicos com maior atividade e menor toxicidade para os hospedeiros, propõe-se a síntese de derivados do ácido gálico, um produto natural obtido pela hidrólise de taninos, como modelo para o desenvolvimento de novas moléculas que atuem sistematicamente na terapêutica antifúngica. Os compostos derivados do ácido gálico foram testados contra: *Cândida albicans*, *Cândida tropicalis*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus*

*niger*, *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*.

Os resultados das Concentrações Inibitórias Mínicas (CIM's) foram relacionados com valores do Coeficiente de partição (Log P) e demonstraram claramente haver uma relação polinômica entre tamanho da cadeia alquílica dos ésteres e os resultados das CIM's para os fungos testados. Estes dados indicam que a atividade antifúngica para os compostos: galato de heptila, octila e decila, apresentam um desvio positivo na correlação. Logo, podemos dizer que a atividade não é governada apenas por fatores ligados a lipofilicidade (Log P), mais provavelmente inibindo alguma enzima no microorganismo. Este fato ainda será explorado com ensaios contra alvos específicos futuramente.

# **ABSTRACT**

The number of useful antifungal agents relatively small when compared to the antibacterial agents. The reason of this discrepancy lies in the narrow relationship between the fungi that cause disease and their hosts mammals. Many biochemical roads that serve as important objectives for antibacterial agents are simply in the mushrooms, and the existent roads that they could act as objectives, they are shared by the host. For those reasons, many compounds that exhibit significant antifungal activity *in vitro* therapeutically cannot be used because of their toxicity for the host. The antifungal chemotherapeutic agent's main objective is the membrane of the fungi. Most of them contain ergosterol as main sterol of the membrane.

Fungi are also responsible for incalculable loses in the agriculture, in foods, as well as causes of animals diseases.

The synthesis of Gallic acid derivatives occurs due to the need of new antifungal agents with larger a smaller toxicity for the hosts. The Gallic acid derivatives were tests against: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrun* and *Trichophyton mentagrophytes*.

The results of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC's) were plotted against the values of the Partition Coefficient (Log P) and clearly demonstrated that there is a polynomic relationships between the size of the alkyl chain of the derivatives and the (MIC's) for the tested fungi. These data indicate that the antifungal activity for the gallate presents a positive deviation in the correlation. Therefore, the activity is not just governed by lipofilicity (Log P), but also inhibits some enzyme where it is taking place. This fact will be explored better hereafter with against specific objectives.

## 1.0 INTRODUÇÃO

### 1.1 Química Medicinal

Levado ao senso previdente a Química Medicinal relaciona o desenho e produção de combinações que possam ser usadas em medicina para a prevenção, tratamento ou cura de doenças humanas bem como, vegetais e animais. De um ponto de vista puramente etimológico pode-se dizer que a Química Medicinal é uma de farmacologia ('pharmakon' + 'logos' = estudo de fármacos). A Farmacologia envolve várias áreas do conhecimento como: Figura 1. Levado ao senso retrospectivo, a Química Medicinal inclui o estudo de fármacos já existentes; das suas propriedades biológicas e suas relações de estrutura-atividade.

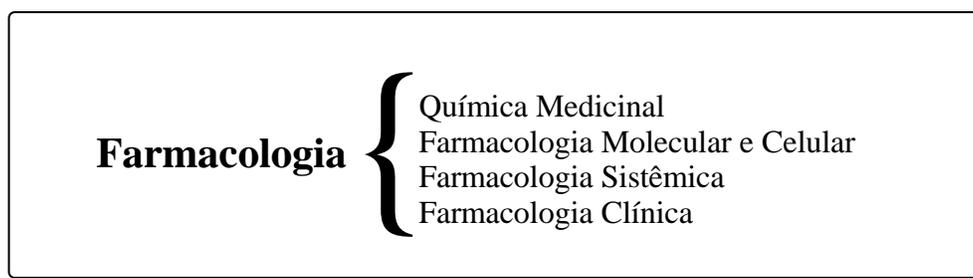


Figura 1 Domínios da Farmacologia.

Uma definição de Química Medicinal adotada pela IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) por uma comissão especializada; é discutida a seguir.

Química Medicinal consiste na descoberta, desenvolvimento, identificação e interpretação do modo de ação de combinações biologicamente ativas ao nível molecular. Os interesses da Química Medicinal não se restringem aos fármacos, mas também aos compostos bioativos em geral. Química Medicinal também está relacionada ao estudo, identificação, e síntese dos produtos metabólicos destas drogas e suas combinações relacionadas.<sup>1</sup>

## **1.2 Fármacos: Passado, Presente e Futuro**

Durante muitos séculos a procura por medicamentos foi o centro das investigações. No século XIX, o advento da química analítica e sintética sinalizou uma mudança importante em direção de algumas substâncias naturais que foram sintetizadas moléculas como ácido de acetilsalicílico. A Química Medicinal começou em 1930 com a preparação de sulfonamidas: drogas antibacterianas. A história da medicina será desde então, até este tempo, dominada pela síntese de novas moléculas medicinais: fármacos.

Hoje existe a cura para um grande número de doenças, ou controla-se através de terapia com fármacos. Assim, a briga contra bactérias e infecções por

fungos, foi um processo ganho parcialmente, e significativamente foram efetuados tratamentos para doenças mentais, pulmonares, gastrintestinais, inflamatórias, e cardiovasculares. Além disso, alguns cânceres e certas formas de leucemia foram curados através de quimioterapia.

No início do século XX, um médico precisava saber aproximadamente as características de talvez uma dúzia de fármacos. Hoje em dia, a memória humana não é mais suficiente, e o clínico recorre habitualmente a farmacopéias para suas consultas.

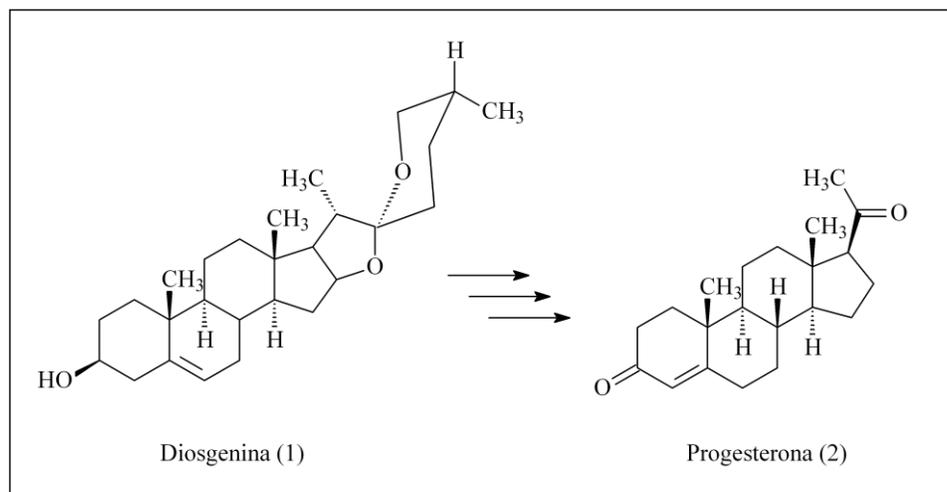
Embora a procura por novos fármacos seja governada por técnicas racionais e de alto processamento, descobertas ao acaso ainda acontecem, como nos velhos dias das ervas medicinais.

Os critérios pelo qual a qualidade de uma droga é julgada mudaram, não só sua eficiência, mas também, sua segurança deve ser levada em conta, assim como a qualidade de vida do paciente. Atualmente leis mais rígidas governam a descoberta de medicamentos, gerando conseqüências óbvias para a indústria farmacêutica.<sup>1</sup>

### **1.3 Uso de produtos naturais como precursores de fármacos**

Os pioneiros no uso de produtos naturais como matéria-prima para a síntese de fármacos foram Russell E. Marker<sup>2</sup>, de grande importância na síntese

de hormônios esteroidais, e.x. progesterona (2), a partir da diosgenina (1) que é componente abundante em cactus mexicanos (*Diiscorea macrostachya*) (Figura 2).



**Figura 2 Produção da Progesterona a partir da Diosgenina.**

Como este processo não foi interessante para a indústria norte americana, Marker fundou no México a Companhia Syntex para a produção industrial de progesterona, que foi a provedora deste produto e de seus derivados até o começo dos anos 70. O processo se baseia no tratamento da diosgenina (1) com anidrido acético á 200 °C em autoclave, formando o diacetato. A oxidação crômica ataca quimioseletivamente a dupla ligação da cadeia lateral e produz um cetoéster que, por tratamento com ácido acético, origina o acetato de 16-de-hidropregnenolona. Sua redução catalítica quimioseletiva conduz ao acetato de pregnenolona, que se transforma em progesterona por hidrólise alcalina e posterior oxidação de Oppenauer.

A 16-de-hidropregmonolona é também precursora da di-hidroepiandrosterona, uma molécula chave para a preparação da testosterona, os andrógenos e anabolizantes que dela se derivam: os estrógenos, estrona e estradiol. Ainda, a progesterona pode ser transformada em cortisona e outros corticóides. A exploração irracional das discoreas mexicanas, as melhores fontes de diosgenina (1) pressionaram a indústria farmacêutica a buscar outras fontes de esteróides, suscetíveis a serem transformados em produtos úteis. O processo Upjohn obtém a progesterona com um rendimento global de 69%, utilizando o estigmasterol (um esteroide abundante no óleo de soja).<sup>3</sup>

Os trabalhos de Marker foram decisivos, para a esteróide-terapia e contribuiu significativamente para a subsequente descoberta da pílula contraceptiva feminina. Diversas classes de produtos naturais têm sido empregadas como matéria-prima para a síntese de diferentes substâncias bioativas.<sup>1,3</sup>

“A diversidade molecular que a natureza nos oferece é incalculável...”<sup>3</sup>

Entre os produtos naturais de origem vegetal, por exemplo, encontram-se amplas e diversas arquiteturas moleculares como ilustram os terpenos, bioformados pela mesma rota biosintética geral. A variedade de padrões estruturais que se encontram nas distintas classes de produtos naturais como polifenóis, flavonóides, isoflavonóides, lignanas, neolignanas, glicosídeos, cumarinas, cromonas, isocromonas, quinonas, alcalóides de diversas categorias, entre outros, atestam sua excepcional diversidade molecular, fonte inesgotável de

modelos originais de arquitetura molecular. A importância dos produtos naturais como substâncias-protótipos de fármacos pode ser comprovada em outras classes terapêuticas distintas. Inúmeros exemplos complementares poderiam ser incluídos para ilustrar a importância dos produtos naturais como protótipos de diversos fármacos sintéticos empregados na terapêutica moderna.<sup>1</sup>

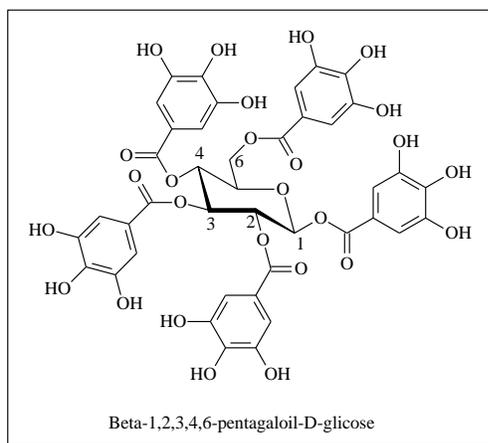
A síntese de análogos de produtos naturais ativos tem contribuído para a obtenção de novos medicamentos <sup>4</sup> A química combinatória não conseguiu, pelo menos até o presente, seu objetivo de ser a fonte primária e única de diversidade de estruturas moleculares. Como a diversidade estrutural é fundamental na pesquisa para atingir diferentes alvos biológicos, os cientistas voltaram aos estudos de produtos naturais, considerando que durante milhões de anos da evolução biológica a seleção natural realizou um processo de química combinatória realmente inigualável. Assim, embora cerca de 100 mil compostos oriundos de plantas, e aproximadamente 20 mil compostos obtidos de microrganismo, tenham sido determinados, as fontes de metabólitos secundários parecem ser inesgotáveis em relação às possibilidades de se encontrar novas e diferentes estruturas com atividade de extrema importância à química medicinal e à agricultura.<sup>3</sup>

## 1.4 Importância dos Compostos fenólicos

Historicamente, a importância das plantas ricas em taninos está ligada às suas propriedades de transformar a pele de animais em couro. Atualmente o curtimento das peles também é industrialmente conseguido com compostos minerais, entretanto, por vários milênios esse processo requeria exclusivamente o uso de plantas que contém taninos. Durante o curtimento são formadas ligações entre as fibras de colágeno na pele animal, a qual adquire resistência ao calor, água e abrasivos. Esta capacidade dos taninos em combinar-se com macromoléculas explica a capacidade deles precipitarem celulose, pectinas e proteínas. Essas propriedades são as bases da definição clássica dos taninos: substâncias fenólicas solúveis em água com massa molecular entre 500 e cerca de 3000 Daltons, as quais apresentam a habilidade de formar complexos insolúveis em água com alcalóides, gelatina e outras proteínas. Estes compostos são particularmente importantes componentes gustativos, sendo responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais. A complexação entre taninos e proteínas é a base para suas propriedades como fatores de controle de insetos, fungos e bactérias tanto quanto para suas atividades farmacológicas.<sup>5</sup>

Os taninos hidrolisáveis são caracterizados por um poliol central, geralmente  $\beta$ -D-glicose, cujas funções hidroxilas são esterificadas com o ácido gálico. O composto  $\beta$ -1,2,3,4,6-pentagaloi-D-glicose (Figura 3) representa o padrão máximo de substituição alcançado, sendo considerado o precursor

imediate para ambas as classes de taninos hidrolisáveis (galotaninos e elagitaninos).<sup>5</sup>



**Figura 3 Estrutura do galotanino  $\beta$ -1,2,3,4,6-pentagalloyl-D-glicose.**

Compostos fenólicos pertencem a uma classe que inclui uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, que possuem pelo menos um anel aromático no qual, ao menos, um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. Eles estão amplamente distribuídos no reino vegetal e nos microorganismos, fazendo também parte do metabolismo animal. No entanto, os animais, em princípio, são incapazes de sintetizar o anel aromático, e os compostos fenólicos produzidos em pequena quantidade pelos mesmos utilizam o anel benzênico de substâncias presentes nas dietas alimentares. Por outro lado, os vegetais e a maioria dos microorganismos têm a capacidade de sintetizar o anel benzênico, e, a partir dele, principalmente, compostos fenólicos. Dentre os compostos fenólicos pertencentes ao metabolismo secundário dos vegetais são encontradas estruturas tão variadas quanto às dos ácidos fenólicos, derivados da cumarina, dos pigmentos hidrossolúveis das flores, dos frutos e das folhas. Além

disso, essa classe de compostos abrange as ligninas e os taninos, polímeros com importantes funções nos vegetais. As estruturas fenólicas são também encontradas fazendo parte de proteínas, alcalóides e terpenóides.<sup>5</sup>

## 2.0 REVISÃO

Alimentos são contaminados por microrganismos por diferentes fontes naturais ou seres humanos durante o controle ou processo de fabricação. A adição de agentes antimicrobianos nos alimentos é um método primário para prevenir a deterioração biológica dos alimentos, especialmente alimentos que não podem ser tratados pelo calor, pois podem causar a desnaturação, degradação das vitaminas ou mudança na textura, sabor ou aroma. Estudos descrevem a efetividade dos ésteres do ácido gálico como reguladores da contaminação microbiológica.<sup>6</sup>

O ácido gálico é um trifenol amplamente distribuído em materiais de plantas naturais como a amora-preta, hena, chá e uva; e é freqüentemente um componente de taninos hidrolisável em muitas plantas. O ácido gálico e seus n-alquil ésteres, especialmente propila, octila e dodecila, são extensamente usados como aditivos de alimentos e como sequestrante de espécies de oxigênio reativo (ROS), inclusive peróxido de hidrogênio, anion superóxido e radical hidroxila.<sup>7</sup>

Na realidade, o ácido gálico e seus ésteres reduzem os danos na célula induzidos por radical hidroxila e peróxido de hidrogênio na *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*<sup>8</sup> e células de fibroblastos dermais.<sup>9</sup> Surpreendentemente, o ácido gálico e seus ésteres induzem apoptose em células humanas com leucemia HL60RG e grandes efeitos citotóxicos em outras linhagens de células. Postula-se que a geração de ROS pode contribuir para a iniciação da apoptose.<sup>10,11</sup>

Durante os estudos das relações de estrutura-atividade de uma série de n-alquila ésteres do ácido gálico, alguns exibiram atividade antifúngica contra *Saccharomyces cerevisiae*.<sup>6</sup> O ácido gálico não mostrou atividade antifúngica, considerando que os ésteres de n-alquila do ácido gálico mostraram maior atividade antifúngica. A atividade fungicida máxima contra *S. cerevisiae* foi demonstrada pelo galato de nonila. Segundo Kubo e col., o galato de dodecila não demonstrou nenhuma atividade antifúngica.<sup>12</sup> Isto poderia, segundo os autores, estar principalmente ligado a um equilíbrio entre o grupo hidrófilico polar e a porção apolar hidrofóbica da molécula. Os grupos fenólicos dos ésteres do ácido gálico agrupam-se e formam ligações de hidrogênio intermoleculares com um grupo nucleofílico na membrana; rompendo a fluidez da bicamada na membrana plasmática. O estudo da morte da célula do fermento *S. cerevisiae* induzida pelo galato de nonila foi centrado na formação de ROS e os danos na membrana plasmática, usando galato de dodecila por comparação, não mostrou nenhuma atividade antifúngica.<sup>13</sup>

O galato de dodecila exibiu atividade antioxidante preventiva potente. A porção pirogalol foi responsável por ambas as atividades. O galato de dodecila previne a geração de radicais superóxidos através da xantina oxidase, e esta atividade vem de sua habilidade para inibir a enzima.<sup>14</sup>

O galato de octila exibiu atividade antifúngica contra *S. cerevisiae* e *Zygosaccharomyces bailii*, além de uma potente atividade antioxidante. A atividade fungicida primária do galato de octila vem de sua habilidade de agir

como surfactante não-íonico. O tamanho da cadeia do grupo alquila não é o principal contribuinte, mas tem um importante papel na atividade.<sup>15</sup>

Ésteres do ácido gálico pertencem, a classe de compostos fenólicos que são abundantes em vinho tinto. Neste estudo galatos inibiram a ativação de citocina-induzida de um fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e assim reduz expressão de moléculas de adesão endotelial-leucócítica em cultura células endoteliais de veia umbilicais humanas (HUVECs). O pré-tratamento de HUVECs com galato de etila (3 a 10  $\mu$ mol/L) suprimiu significativamente interleucina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) ou necrose de fator- $\alpha$  tumoral.<sup>16</sup>

Ésteres de N-alquila do ácido gálico como (etila, octila, dodecila e cetila) foram avaliados como inibidores da enzima recombinante de rato, esqualeno epoxidase (ES), uma enzima limitante da taxa da biogênese de colesterol. O galato de dodecila ( $IC_{50} = 0,061 \mu$ M), mostrou-se o inibidor mais potente do que as mais potentes galocatequinas de ocorrência natural.<sup>17</sup>

A atividade antifúngica do galato de propila (C-3), octila (C-8) e dodecila (C-12) ou (3,4,5-trihidroxibenzoatos) foram testados contra *Saccharomyces cerevisiae* ATCC7754 e *Zygosaccharomyces bailii* ATCC 60483. O galato de octila foi o único composto com a concentração fungicida mínima de 25  $\mu$ g/mL (89  $\mu$ M) contra *S. cerevisiae* e de 50  $\mu$ g/ml (177  $\mu$ M) contra *Z. bailii*, respectivamente. Estas atividades fungicidas não foram influenciadas pelo pH.<sup>18</sup>

Foram observados efeitos antitumorais promovidos pelas frutas de *Caesalpinia ferrea* Mart.(Leguminosa) que foram testados *in vitro* contra o vírus

Epstein-Barr, o antígeno (EBV-EA) nos ensaios de ativação, e seus componentes ativos foram identificados como ácido gálico e galato de metila.<sup>19</sup>

Ésteres isoprênicos do ácido gálico foram sintetizados e usados como substratos para a enzima esqualeno epoxidase recombinante. Os galatos de isoprenila mostraram boa inibição ( $IC_{50} = 1.5\mu M$ ), tão potente quanto os análogos, já descritos previamente, enquanto galatos de fenil-alkila foram inibidores moderados da enzima ( $IC_{50} = 12\mu M$ ).<sup>20</sup>

Derivados do ácido gálico com um grupo lipofílico (galato de farnesila hidrogenado, galato de laurila, laurilamida do ácido gálico e galato de colesterila) foram examinados para sua habilidade, em induzir apoptose em células leucêmicas monoblásticas humanas U937. O éster farnesila foi o indutor de apoptose mais potente entre as combinações examinadas, e os resultados sugerem que o derivado lipídico possa aumentar a atividade de apoptose induzida por ácido gálico que depende da estrutura. Estes resultados proverão informações úteis para o desenvolvimento de agentes antitumorais.<sup>21</sup>

Foram avaliados os ésteres do ácido gálico como inibidores da enzima hidroxilase do p-hidroxibenzoato recombinante, uma flavina-monoxigenase NADPH-dependente da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, o e galato de n-dodecila apresentou atividade na concentração de ( $IC_{50} = 16\mu M$ ).<sup>22</sup>

É importante salientar que a combinação de imidazóis com galato de propila forneceu (CIM) 10-150 vezes mais baixos do que somente com imidazóis, para 40 linhagens de *Candida albicans*.<sup>23</sup>

O galato de laurila (C-12, antioxidante usado em alimentos) previne a formação de tumores da pele induzidos pelo dimetil-benzantraceno, em ratos, e matam seletivamente células tumorais em tumores já estabelecidos. O resultado é a total remissão da massa tumoral depois da aplicação tópica, sem afetar o tecido circunvizinho.<sup>24</sup>

Alguns derivados do ácido gálico demonstraram efeito como inibidores da cadeia respiratória do *Trypanossoma cruzi* um parasita causador da doença de Chagas.<sup>25</sup>

O ácido gálico e seus derivados têm atividade tripanocida contra *Trypanossoma brucei* nas formas de circulação sanguínea e procíclica *in vitro*. Estudos estruturais relacionaram que estas combinações sugerem que a porção pirogalol (1,2,3-trifenol) pudesse ser a responsável por esta atividade.<sup>26</sup>

O extrato metanólico de *Mitracarpus scaber* e alguns de seus componentes foram avaliados contra espécies de *Staphylococcus aureus* e de *Candida albicans*. Alguns desses compostos como: ácido gálico e ácido 3,4,5-trimetóxi-benzóico, inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* (MIC 3,90 e 0,97 µg/mL) respectivamente.<sup>27</sup>

Um novo método foi descoberto para aumentar a biodisponibilidade da combinação farmacêutica administrada, usando ésteres do ácido gálico.<sup>28</sup>

As reações para obtenção dos ésteres do ácido gálico: (C-8, C-12, C-14, C-16, C-18) foram efetuadas sem o uso de solventes, utilizando irradiação por microondas, obtendo-se os ésteres com bons rendimentos.<sup>29</sup>

Devido à grande importância dos galatos de alquila apresentada em vários artigos especializados, existem metodologias patenteadas para a obtenção dos mesmos: os galatos de (C-1 a C-20) foram preparados, reagindo-se material contendo taninos com o correspondente álcool em meio fortemente ácido com bons rendimentos.<sup>30</sup> Ésteres do ácido gálico também podem ser preparados com ação da enzima tanase.<sup>31</sup>

O galato de dodecila (C12) possui atividade antioxidante e anti-escurecimento, inibindo a oxidação da 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) catalisando a inibição da tirosinase.<sup>32</sup>

A enzima tannase do *Aspergillus niger*, imobilizada em Celite foi usada para a síntese do antioxidante utilizado em alimentos, galato de propila, por transterificação direta do ácido tânico, com rendimento de 86%.<sup>33</sup>

O galato de dodecila (C12), possui atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas.<sup>34</sup>

Nosso grupo vem estudando as propriedades analgésicas de derivados do ácido gálico, utilizando um modelo de QSAR altamente satisfatório para estimar a potência analgésica destes compostos.<sup>35</sup>

### 3.0 INFECÇÕES FÚNGICAS

Os fungos obtêm o alimento como saprófitas, organismos que vivem sobre a matéria orgânica morta ou parasitando a matéria viva. Em ambos os casos, as substâncias nutritivas são ingeridas por absorção após terem sido parcialmente digeridas por meio de enzimas.<sup>36</sup>

A maioria dos fungos é constituída de espécies saprófitas que desempenham a importante função de decomposição na biosfera, degradando produtos orgânicos e devolvendo carbono, nitrogênio e outros componentes ao solo, tornando assim disponíveis às plantas. Cerca de 100 espécies de fungos produzem doenças no homem e quase o mesmo número em animais, a maioria das quais são enfermidades superficiais da pele ou de seus apêndices. No entanto, mais de 8.000 espécies de fungos causam doenças em plantas, sendo que todas as plantas são atacadas por algum tipo de fungo. Cada um dos fungos, parasitas, ataca a um ou mais tipos de plantas, causando assim, grandes perdas na produção agrícola.<sup>36</sup>

Muitos dos fungos passíveis de causar micoses vivem em associação com o homem como comensais e estão presentes no meio ambiente; todavia, até recentemente, as infecções superficiais graves eram relativamente raras, ao passo que as infecções sistêmicas eram, em verdade, muito raras, pelo menos nas zonas de clima frio e temperado. Nessas regiões, uma infecção fúngica geralmente significava a ocorrência de “pé-de-atleta” ou candidíase oral e vaginal, que causavam desconforto, mas que dificilmente ameaçavam a vida do indivíduo.

Todavia, nos últimos 30 anos, houve um aumento uniforme na incidência de infecções fúngicas sistêmicas secundárias graves. Um fator envolvido nesse aumento tem sido o uso disseminado dos antibióticos de amplo espectro, que eliminam ou reduzem as populações bacterianas não patogênicas que normalmente competem com os fungos. Outros importantes fatores, como o aumento no número de indivíduos com redução das respostas imunes devido à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) ou à ação de agentes imunossupressores utilizados na quimioterapia do câncer e isso levou a um aumento na prevalência de infecções oportunistas, isto é, infecções por fungos que normalmente são inócuos ou facilmente dominados em indivíduos imunocompetentes.<sup>37</sup>

### **3.1 Aspectos históricos**

Possivelmente um dos primeiros relatos de doença causada por fungos foi relatada por Eurípedes (456-450 a.C.) sobre uma mãe e três filhos que morreram após comer um fungo.

Robert Hooke, em 1665, publicou a *Micrografia*, com a primeira ilustração microscópica de um fungo.

Pietro Antonio Michelli, botânico de Florença publicou, em 1729, “*Nova plantarum genera justa tornefortii methodum disposita*”, descrevendo 900 fungos.

Hipócrates (V a. C) descreveu o “sapinho”, lesão oral de *Candida* e Celso (30 a.D) referiu-se ao favo (tinha do couro cabeludo), micose que, em 1834, foi reconhecida por Remak.

David Gruby, em Paris, entre 1941 e 1944, descreveu o agente etiológico do favo do couro cabeludo, *Trychophyton schoenleinii*, reproduzindo a doença em outra criança, preenchendo com antecedência desta maneira os postulados de Henle-Koch.

Na segunda metade do século XIX, com a teoria de Pasteur (1859), inicia-se a associação de microrganismo específico para doença específica. No século XX continuaram as descobertas micológicas: Darling (1906), influenciado pelas descobertas de Leishman (Calcutá) e Donovan (Madras), descobriu a histoplasmose, julgando descrever nova protozoose. Em 1908, Lutz descreveu a paracoccidioidomicose. Em 1910, Carini reconheceu o *Pneumocystis carinii*, confundido como protozoário.

Na história da micologia, não se deve esquecer-se de mencionar mestres que influenciaram o curso das pesquisas; como Raimond Sabouraud (1864-1938), Norman Conant (1908-1984), Chester Emmons (1900-1985) e Libero Ajello.<sup>38</sup>

### **3.2 Classificação clínica das micoses**

As micoses humanas podem ser causadas por fungos patogênicos primários ou por patogênicos oportunistas:

Os patogênicos primários são aqueles que têm a capacidade de invadir os tecidos de um hospedeiro normal;

Os oportunistas, somente são invasores de tecidos de indivíduos com alterações graves do sistema imunológico do organismo.

### **3.3 As doenças causadas por fungos patogênicos primários podem ser classificadas em quatro grupos naturais.**

- ✓As micoses superficiais;
- ✓As micoses cutâneas;
- ✓As micoses subcutâneas;
- ✓As micoses sistêmicas.

**\*As micoses por fungos oportunistas se agrupam sob a denominação de micoses oportunísticas.**

### **3.3.1 Micoses superficiais**

São infecções causadas por fungos que invadem apenas as camadas superficiais da capa córnea da pele ou da haste livre dos pêlos; cujas lesões se manifestam como mancha pigmentar na pele ou nódulo nos pelos, e nas quais a forma invasiva do fungo é uma hifa característica de uma micose ou de micoses agrupadas sob um nome comum.

Cinco são as micoses superficiais: piedra negra, piedra branca, pitiríase versicolor e tinha negra (duas micoses porque são causadas por dois fungos).<sup>38</sup>

### **3.3.2 Micoses cutâneas**

Resultam do acometimento de fungos nos tecidos queratinizados da pele, pêlo e unha. Embora a lesão esteja confinada à camada da pele e anexos mortos, cornificados, a destruição dos tecidos é extensa e a reação imunológica do hospedeiro é severa. São cinco as micoses cutâneas: dermatofitose, candidose, hialo-hifomicose, feo-hifomicose e ceratomicose.

Os dermatófitos, principais agentes de micoses cutâneas, num certo sentido, são saprófitas especializados, por não invadirem tecido vivo, utilizando somente estruturas mortas, queratinizadas do hospedeiro (pêlo, pele, unha). A doença clínica resulta de reação tóxica e alérgica do hospedeiro à presença do fungo e de seus metabólitos.<sup>38</sup>

### **3.3.3 Micoses subcutâneas**

São grupos heterogêneos de doenças causadas por ampla variedade de fungos que invadem tecidos cutâneos e subcutâneos após implante traumático. São sete as micoses subcutâneas: cromoblastomicoses, esporotricose, feohifomicoses, lobomicose, micetomas, rinosporidiose e zigomicoses por Entomophthorales.

Os agentes de micoses subcutâneas têm invasibilidade limitada. São implantados no organismo traumáticamente e podem levar anos para desenvolver doença aparente, tempo para a adaptação ao ambiente tissular. Algumas infecções se mantêm localizadas, expandindo-se lentamente aos tecidos contíguos (cromoblastomicose, micetoma), enquanto em outras (esporotricose) a propagação linfática é freqüente.<sup>38</sup>

### **3.3.4 Micoses sistêmicas**

São basicamente doenças pulmonares, em que a porta de entrada dos propágulos fúngicos é quase invariavelmente pulmonar. Os fungos são dimorficos; na natureza são filamentosos, e no hospedeiro ou a 37°C, no laboratório, apresentam forma de lêvedo. Quatro são as micoses sistêmicas: blastomicose, coccidioidomicose, histoplasmose e paracoccidioidomicose.

Os agentes destas micoses são patógenos primários. Tem capacidade de causar doença no hospedeiro normal, na dependência da densidade de propágulos no ambiente e no tempo de exposição (dose infectante). Paralelamente às defesas do hospedeiro determinam o caráter de progressividade e a gravidade da doença. Nestas micoses, todos os órgãos vitais podem ser atacados e as lesões podem ser extensas. As formas cutâneas e subcutâneas resultam de disseminação hematogênica, raramente consequência de inoculação direta após traumatismo, especialmente como acidente laboratorial.<sup>38</sup>

### **3.3.5 Micoses oportunistas**

Tiveram um incremento marcado na medicina atual. O advento de drogas citotóxicas, a corticoterapia prolongada e o uso de drogas imunossupressoras permitiram um aumento no número de agentes e agravaram o curso dessas micoses.

Hoje, todo fungo isolado de um paciente imunocomprometido deve ser considerado potencialmente patogênico. Oito são as micoses oportunistas principais: aspergilose, candidose, criptococose, feo-hifomicose, hialo-hifomicose, pneumocistose, pseudallescheriose e zigomicose.<sup>38</sup> Por exemplo, o paciente soropositivo com lesão conhecida como “sapinho” ou candidíase causada por fungos (Figura 4.). A candidíase é vista mais frequentemente como uma placa branca ou branco-amarelada, que pode ser removida por raspagem, deixando uma área vermelha com ou sem sangramento. Pode ser encontrada em qualquer lugar da boca e normalmente não causa dor.<sup>39</sup>



**Figura 4** Paciente soropositivo (SIDA) com lesão conhecida como “sapinho” ou candidíase.

#### **4.0 Fármacos utilizados para o tratamento das infecções fúngicas.**

Se levar em consideração a quantidade de compostos naturais e sintéticos relatados como antifúngicos por revistas científicas, pode-se pensar que se conta atualmente com uma variedade enorme de fármacos para o tratamento das infecções fúngicas. Entretanto, a realidade é muito diferente. Para uso humano, existem limitadas opções terapêuticas:

Tabela 1 Compostos antifúngicos usados para o tratamento de micoses em humanos.<sup>40</sup>

Composto antifúngicos	Grupo químico	Micoses nos quais são utilizados
Anfotericina B	Polieno	Tratamento inicial da maioria das infecções sistêmicas: blastomicosis, candidíase, coccidiomicosis, criptococosis, histoplasmosis, paracoccidiomicosis, sporotrichosis e fusariosis
5-Flucitosina	Pirimidina fluorada	Usa-se em combinação com Anfotericina B, no tratamento de candidíase, fusariosis e criptococosis
Cetoconazol	Imidazol	Candidasis, histoplasmosis, blastomicosis, coccidiomicosis e paracoccidiomicosis
Miconazol	Imidazol	Candidasis, histoplasmosis, blastomicosis, coccidiomicosis e paracoccidiomicosis
Fluconazol	Triazol	Criptococosis, candidasis
Itraconazol	Triazol	Criptococosis, candidasis, sporotrichosis, histoplasmosis, paracoccidiomicosis, coccidiomicosis, aspergilosis

Existe um consenso geral de que são necessários novos agentes antifúngicos mais potentes, mas sobre tudo com menos efeitos colaterais que os em uso atualmente. A busca se orienta no sentido de compostos que atuem de modo seletivo, que causem a inibição de um processo no patógeno que não exista no hospedeiro ou seja suficientemente diferentes, para que seu metabolismo seja pouco afetado.<sup>40</sup>

#### **4.1 Detecção de compostos com atividade antifúngica *in vitro*.**

Para detectar agentes antifúngicos *in vitro* usam-se diferentes tipos de ensaios, dentre eles:

##### **4.1.1 Detecção de compostos antifúngicos com ensaios sem alvos específicos.**

A maioria dos trabalhos de pesquisa de atividade antifúngica, já realizados com os compostos atuais, utiliza métodos celulares sem alvo específico. Eles são úteis para detectar compostos que inibem o crescimento (fungistáticos) ou matam o fungo (fungicida), mas não dão informações sobre seu modo de ação.

Os métodos mais usados são:

##### **4.1.2 Métodos de difusão**

O composto a ser testado é colocado num reservatório (discos de papel, poços no meio de cultura ou cilindro sobre a superfície), em contato com um meio sólido (por ex. agar), inoculado com um determinado fungo. Após um tempo adequado de incubação, mede-se o diâmetro ou raio da zona clara (onde não houve o crescimento fúngico) em volta do reservatório. A teoria deste método já foi descrita com detalhe, assim como os fatores que influenciam sua realização.<sup>40</sup>

A informação obtida é qualitativa, útil para estabelecer a sensibilidade do microrganismo, mas não para estabelecer uma comparação da potência

antimicrobiana das amostras e dos antibióticos. O método apresenta problemas com as substâncias que não difundem no meio.<sup>40</sup>

#### **4.1.3 Método de diluição**

Neste tipo de método, uma quantidade fixa de amostra a ser testada é dissolvida homogeneamente em um meio conveniente, como por exemplo, agar, caldo etc. Usualmente, utilizam-se diluições da amostra original, a cada uma das quais se inocula o fungo a ser testado. Determina-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM), que é a menor concentração que inibe o crescimento do microrganismo. Este método tem a vantagem de ser quantitativo e de poder ser usado, tanto para amostra solúvel em água, quanto lipossolúvel. O teste pode ser estendido para fornecer informações sobre a concentração fúngica mínima (CFM).<sup>40</sup>

#### **4.2 A Importância da pesquisa de novos agentes antifúngicos.**

Durante as duas últimas décadas, houve um aumento significativo das infecções fúngicas humanas, como resultado das imunodeficiências associadas com a SIDA, quimioterapia anticancerígena, transplantes, doenças de idosos e neonatos. A medicina em geral auxiliou no aumento da sobrevivência de pacientes imunodeprimidos, paradoxalmente eles acabam falecendo por infecções fúngicas que causam a morte de um grande número destes indivíduos. Os fungos

implicados nestas infecções podem ser verdadeiramente patógenos ou patógenos oportunistas. Estes últimos são fungos com baixa virulência e que manifestam sua patogenicidade em pacientes imunodeprimidos e que, em alguns casos, levam à morte.<sup>40</sup>

Também os animais podem ser atacados esporadicamente por fungos muito difíceis de serem combatidos. Além disto, as infecções fúngicas em plantas representam perdas incalculáveis para a produção agrícola.<sup>40</sup>

Números cada vez maiores de cepas fúngicas estão tornando-se resistentes a fármacos antifúngicos atualmente utilizados. Felizmente, a resistência a fármacos não é transferível nos fungos, constituindo um pequeno conforto para o paciente infectado por uma cepa resistente. Outro problema é representado pelo aparecimento de novas cepas de fungos, comensais que se tornaram patogênicos. Por conseguinte, estão sendo pesquisados novos e melhores agentes antifúngicos.<sup>40</sup>

A maioria dos fármacos, antifúngicos convencionais atuam sobre a membrana plasmática do fungo, interferindo, na maioria das vezes, no metabolismo do ergosterol (p. ex. flucitosina, azóis, terbinafina). Um novo azol, o voriconazol, está sendo objeto de estudo clínico de fase III; possui ação fungistática contra todos os fungos, incluindo as cepas resistentes, sendo fungicida contra *Aspergillus*. É também pesquisada uma proteína do milho que aumenta a permeabilidade da membrana celular dos fungos.<sup>37</sup>

### 4.3 COEFICIENTE DE PARTIÇÃO.

As primeiras descrições de ação dos fármacos se resumiam aos efeitos tônicos ou tóxicos destas no organismo. A partir do surgimento do conceito de receptores farmacológicos e de sua comprovação através de experimentos, houve um aumento na importância das propriedades químicas dos fármacos e a sua relação com a resposta farmacológica. Por exercerem um papel importante na determinação da ação biológica dos fármacos, é apropriado referir-se a estas propriedades como propriedades biofarmacêuticas, a exemplo de: solubilidade, coeficiente de partição (Log de P), grau de ionização (pKa) e difusão.<sup>41</sup>

Para um dado fármaco, as propriedades físico-químicas de determinados grupamentos funcionais são de fundamental importância, uma vez que, podem alterar a ação biológica, dos mesmos, afetando sua farmacodinâmica e farmacocinética (Figura 5).

Uma das principais propriedades físico-químicas é o coeficiente de partição, que expressa a lipofilicidade relativa de uma substância. O coeficiente de partição é definido como a razão entre a concentração da substância na fase orgânica e na fase aquosa em um sistema de dois compartimentos sob condições de equilíbrio. Quanto maior o coeficiente de partição, maior a afinidade da substância pela fase orgânica e maior facilidade para atravessar as biomembranas.

O coeficiente de partição entre água ou tampão e 1-octanol é a medida amplamente usada para avaliar a lipofilicidade de compostos químicos.<sup>41</sup>

Porque usar n-octanol?

As propriedades do 1-octanol assemelham-se as bicamadas lipídicas das membranas.

A distribuição de substâncias químicas em 1-octanol simula certa habilidade de atravessar as membranas biológicas.

A lipofilicidade é o fator chave para determinar o comportamento das drogas in vivo. <sup>41</sup>

- **Farmacocinética:**
  - Permeabilidade das membranas fisiológicas (absorção, distribuição)
  - Ligação de proteínas plasmáticas
  - Volume de distribuição
- **Farmacodinâmica:**
  - Reconhecimento de alvos
  - Afinidade com alvos
  - Especificidade dos alvos

**Figura 5 Farmacodinâmica e farmacocinética.**

#### **4.4 Definição de coeficiente de partição.**

O coeficiente de partição (Equação 01) de uma substância química fornece uma medida termodinâmica do balanço da hidrofiliabilidade-lipofiliabilidade. No

laboratório, uma pequena quantidade de um composto foi adicionada a um sistema de dois líquidos imiscíveis, uma fase consiste em água ou tampão e a outra na fase orgânica.

Uma vez que o composto entra em equilíbrio com os dois solventes, o coeficiente de partição pode ser calculado dividindo a quantidade de composto presente na fase orgânica pela quantidade de composto presente na fase aquosa e aplica-se o logaritmo.

Por exemplo:

Coeficiente de partição  $P = \frac{[Orgânica]}{[Aquosa]}$  onde  $[\ ] = \text{concentração}$   
(01)

$\text{Log } P = \log_{10} (\text{Coeficiente de partição})$

Nota:

$\text{Log } P = 1$  corresponde 10:1 Fase orgânica / Fase aquosa;

$\text{Log } P = 0$  corresponde 1:1 Fase orgânica / Fase aquosa;

$\text{Log } P = -1$  corresponde 1:10 Fase orgânica / Fase aquosa;

Vários métodos podem ser utilizados para a determinação do coeficiente de partição (Figura 6).<sup>42</sup>

- **Método direto:**
  - "Shake-flask"(Distribuição do composto entre 1-octanol e tampão)
- **Método indireto:**
  - Cromatográfico
  - Titulação eletrométrica
- **Métodos computacionais:**
  - CLog P
  - MLog P

**Figura 6 Métodos para a determinação do Coeficiente de Partição.**

O valor do coeficiente de partição (Log P) é um parâmetro freqüentemente usado em estudos de QSAR, (Quantitative Structure-Activity Relationships) como medida quantitativa da lipofilicidade de compostos bioativos. O valor do Log P de um composto, pode ser interpretado como sendo a somatória de dois termos: um relacionado com volume (estéricos) e o outro com interações intermoleculares (interações dipolo-dipolo e ligações por hidrogênio). A investigação da natureza e grandeza destes termos pode contribuir para uma compreensão do comportamento farmacocinético de drogas candidatas a fármacos.<sup>42</sup>

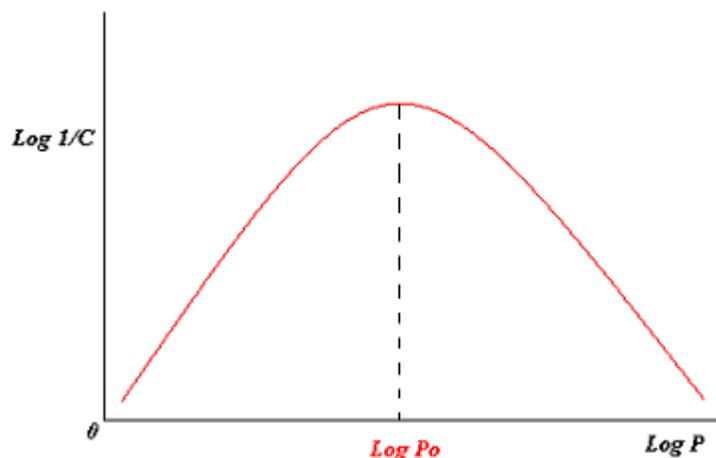
O sucesso no desenvolvimento de novos fármacos requer não apenas estudos de otimização das interações ligante-receptor, como também é preciso que o fármaco atinja seu alvo. Assim, por não apresentarem a biodisponibilidade adequada, muitos compostos candidatos a fármacos que são bastante ativos *in vitro*, mas apresentam-se inativos *in vivo*. Assim, recomenda-se considerar os parâmetros ADME (Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção) já no início do planejamento, ou seja, já na fase de otimização da estrutura fundamental. Por

outro lado, sabe-se que a distribuição de um composto tem relação direta com sua lipossolubilidade, podendo esta ser expressa por seu coeficiente de partição, Log P.<sup>42</sup>

O crescente aumento nos valores de P poderia insinuar que a atividade biológica aumentaria até o infinito, na realidade, isto não acontece. Existem várias razões para isto. Por exemplo, a droga pode ficar tão hidrofóbica e assim tornar-se pouco solúvel ou pode ser retida em depósitos de gorduras, nunca chegar ao local planejado. Finalmente, drogas hidrofóbicas são freqüentemente mais suscetíveis ao metabolismo e subsequente eliminação.<sup>42</sup>

Uma relação direta entre valores de P e atividade biológica foi observada em muitos estudos de QSAR, pois os valores de P estudados são freqüentemente estreitos.

Por exemplo, um estudo com soro albumina sérica, restringiu-se a combinações que têm valores de P ou Log P entre 0,78 a 3,82. Se estes estudos fossem estendidos para incluir combinações com valores muito altos de Log P, então seria observado um quadro diferente. O gráfico seria parabólico, como apresentado na (Figura 7). Nesta figura a atividade biológica aumenta com valores de P, até que valor o máximo seja obtido. Os valores de Log P máximo denominam-se ( $P^0$ ) e representa o coeficiente de partição ótimo para dada atividade biológica, até que em algum ponto, um aumento dos valores de Log P resulta em uma diminuição da atividade biológica.<sup>42</sup>



**Figura 7 Gráfico Log 1/[C] versus Log P.**

Em algumas situações o coeficiente de partição é o único fator que influencia a atividade biológica, e a curva parabólica acima pode ser expressa pela (Equação matemática 02):

$$\text{Log}(1/C) = -k_1 (\text{Log } P)^2 + k_2 \text{Log } P + k_3. \quad (02)$$

Note que termo de  $(\text{Log } P)^2$  tem um sinal negativo a sua frente. Quando P for pequeno, o termo de  $(\text{Log } P)^2$  é muito menor e a equação é dominada pelo termo Log P. Este representa a primeira parte do gráfico onde um aumento da atividade aumenta o valor de P. Quando P for grande, o termo de  $(\text{Log } P)^2$  é mais significativo e eventualmente "subjuga" o valor do termo em P. Este termo representa a última parte do gráfico onde a atividade diminui com o aumento do Log P.  $k_1$ ,  $k_2$ , e  $k_3$  são constantes e podem ser determinados através de um bom programa de computador.<sup>42</sup>

Existem relativamente poucos fármacos onde a atividade esta relacionada somente a valores de P. Esses fármacos tendem a operar em membranas de

células onde a hidrofobicidade é a característica dominante e que controla a ação delas. Os melhores exemplos de fármacos que operam em membranas de células são os anestésicos gerais.<sup>42</sup>

#### 4.5 OBJETIVOS

- ✓ Sintetizar derivados do ácido gálico, dentre eles uma série de ésteres com diferentes tamanhos na cadeia alquílica variando o álcool utilizado desde metila até octadecila.
- ✓ Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* contra alguns fungos que causam doenças em animais, plantas e seres humanos, como: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*;
- ✓ Calcular o coeficiente de partição teórico utilizando métodos computacionais com auxílio do programa TSAR 3D;<sup>48</sup>
- ✓ Determinar o coeficiente de partição ótimo para cada fungo;
- ✓ Comparar a atividade dos compostos sintetizados frente a fármacos utilizados em clínica médica.

## 5.0 PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1 Materiais e Métodos

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram obtidos em espectrômetro Bruker (200 MHz), usando-se solventes deuterados adquiridos comercialmente (Aldrich) e tetrametilsilano como padrão interno de referência. Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  (partes por milhão – ppm) em relação ao tetrametilsilano. As multiplicidades são expressas como: singlete (s), duplete (d), tripleto (t), quarteto (q) e multiplete (m). Os espectros de massas dos compostos foram obtidos por injeção direta em espectrômetro Shimadzu CG/MS-2000<sup>a</sup> 70 eV. Os pontos de fusão foram determinados em equipamentos Microquímica AP-300 e não foram corrigidos. Os espectros de infravermelho foram obtidos em espectrômetro Perkin-Elmer Spectrum FT-16, com pastilhas de KBr.

Usou-se cromatoplaças de sílica UV<sub>254</sub> (Merck) como adsorvente, para acompanhar as reações e verificar a pureza dos compostos sintetizados. A sílica utilizada para as colunas cromatográficas foi a Gel 60 (Merck). Os solventes hexano, acetato de etila foram utilizados como eluentes, foram usados puros ou em misturas com grau de pureza analítica de procedência, Reagen ou Nuclear. Quando necessário, os solventes foram purificados utilizando métodos previamente descritos na literatura.<sup>43</sup> Os cromatogramas foram revelados por aspersão de uma solução alcoólica 10% de cloreto férrico, fornecendo uma

coloração azul característica em contato com os compostos fenólicos ou visualizadas com luz de ultravioleta ( $UV_{254}$ ) de comprimento de onda curto.

## 5.2 Síntese dos derivados do ácido gálico.

Os compostos: pirogalol (01), ácido gálico (02) e ácido chiquímico (03), foram adquiridos da VETEC, e ALDRICH respectivamente, com grau de pureza analítico.

### 5.2.1 Preparação do ácido gálico triacetila (04).

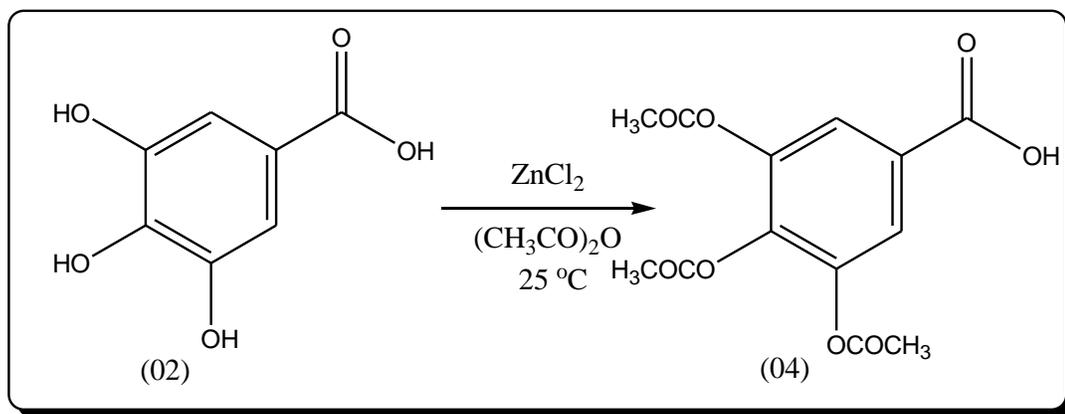


Figura 8 Preparação do ácido gálico triacetila (04).

Ao ácido gálico (02) (0,5 g) em anidrido acético (5mL), foi adicionado cloreto de zinco (0,05 g). A mistura foi mantida sob agitação por 6 horas a temperatura ambiente. Após, água (50 mL) foi adicionada e a solução mantida sob agitação

sob a temperatura ambiente durante a noite. O sólido foi filtrado, lavado com água gelada e colocado em forno de secagem sob vácuo (Buchi TO-51) à 60°C.

### 5.2.2 Preparação do Ácido 3,4,5-trimetóxi benzóico (05)

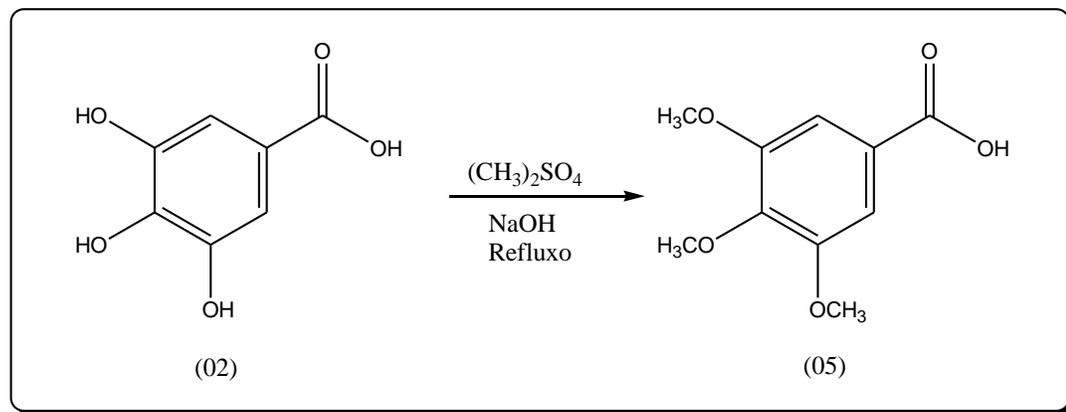


Figura 9 Preparação do ácido 3,4,5-trimetóxi benzóico (05).

Adicionou-se (8 g) de hidróxido de sódio em 100 mL de água resfriada (5 °C), em um balão de 500 mL. Após adicionou-se (5 g) de ácido gálico (02) e o frasco foi fechado imediatamente, agitando-se ocasionalmente até a total dissolução do ácido. Após, adicionou-se (8,9g) (6,7 mL) de sulfato de dimetila, agitando-se por 20 minutos, sendo resfriado em banho de água fria para que a temperatura não ultrapasse 30-35 °C. O frasco foi ocasionalmente aberto para liberar a pressão. Uma segunda porção de (8,9g) de sulfato de dimetila foi adicionada e a solução foi agitada durante 10 minutos e a temperatura foi a 40-45 °C. Ao balão foi conectado um condensador de refluxo e deixou-se sob ebulição por duas horas. Para evitar que uma pequena porção do éster fosse formada, adicionou-se (2 g) de hidróxido de sódio e 20 ml de água e assim o refluxo foi

mantido por mais duas horas. A mistura reacional foi resfriada e acidificou-se com ácido clorídrico diluído e o ácido 3,4,5-trimetóxi benzóico (5) precipitou, foi filtrado em funil de büchner sob vácuo e lavado com água gelada. O sólido foi recristalizado em água quente utilizando carvão ativado.<sup>45</sup>

### 5.2.3 Preparação do 3, 4,5-trimetóxi benzoato de etila (06)

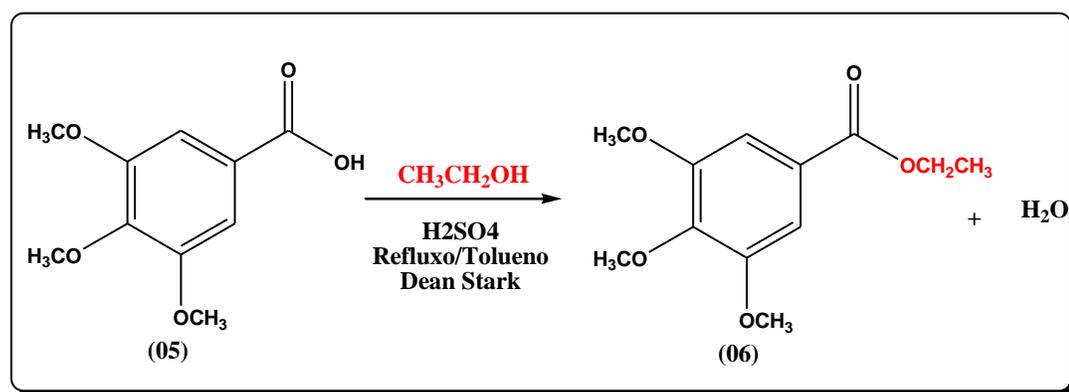


Figura 10 Preparação do 3,4,5-trimetóxi benzoato de etila (06).

Ao ácido 3,4,5-trimetóxi benzóico (05), (2,12 g) (10 mmol), o álcool etílico (40 mmol) e tolueno (70 mL), foi adicionado lentamente H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,2 mL) e a mistura aquecida sob refluxo. A mistura reacional foi mantida sob refluxo (Dean-Stark foi usado para separar a água da mistura reacional) por um período entre 12 horas. Após, foi evaporado o solvente sob vácuo e o resíduo foi dissolvido em éter etílico e extraído com água (50 mL). Extraíu-se com solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3x30 mL) e água (40 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado sob vácuo. O produto foi recristalizado em água quente.<sup>47</sup> A

reação foi acompanhada por CCD utilizando como eluente hexano/acetato de etila e como revelador cloreto férrico 10%.

#### 5.2.4 Procedimento experimental geral para a síntese dos galatos (07-12).

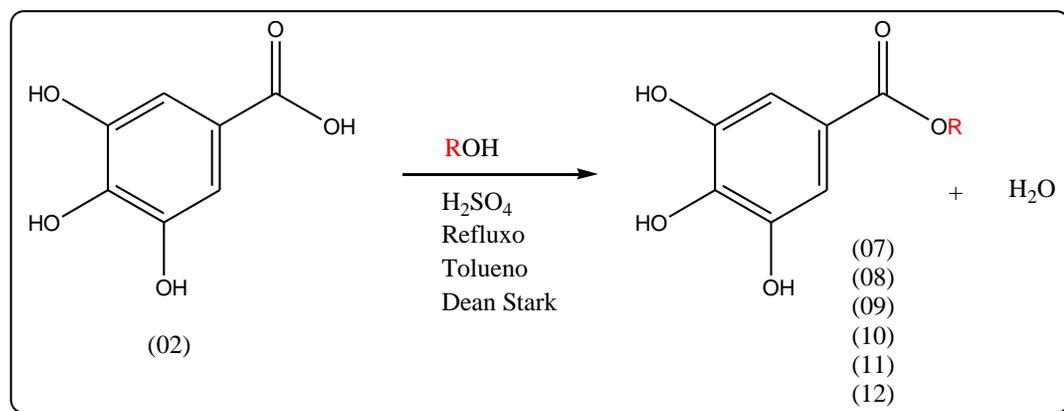
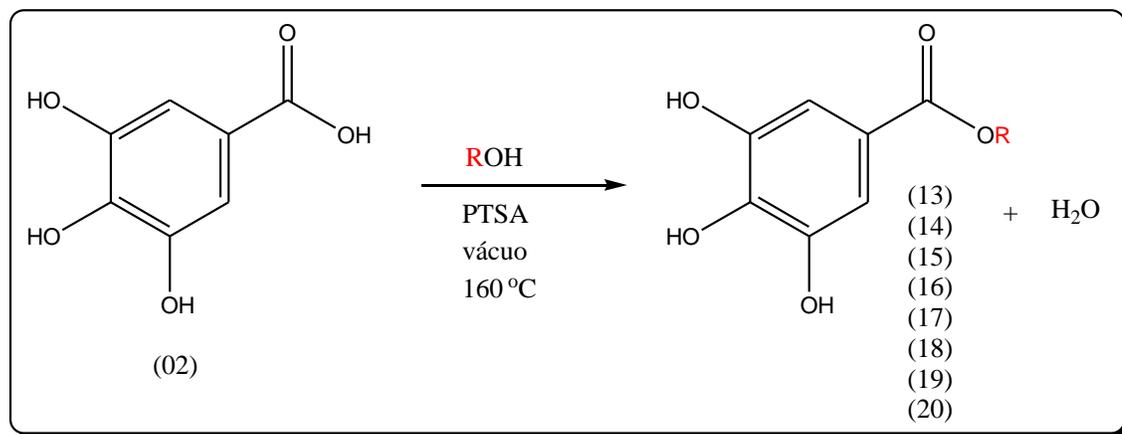


Figura 11 Procedimento experimental geral para a síntese dos galatos (07-12).

Ao ácido gálico (02), (0,85 g) (5 mmol), foi adicionado o álcool apropriado (15 mmol) e tolueno (70 mL), foi adicionado lentamente  $H_2SO_4$  (0,2 mL) e a mistura foi aquecida até refluxo. A mistura reacional foi mantida sob refluxo (Dean Stark foi usado para separar a água da mistura reacional) por um período entre 8-12 horas, de acordo com o álcool empregado. Após, evaporou-se o solvente sob vácuo e o resíduo foi dissolvido em éter etílico e extraído com água (50 mL). Extraiu-se com solução saturada de  $NaHCO_3$  (3x30 mL), e água (40 mL). Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado sob vácuo. Os produtos foram recristalizados em éter de petróleo.<sup>47</sup>

### 5.2.5 Procedimento experimental geral para a síntese dos galatos (13-20).



**Figura 12 Procedimento experimental geral para a síntese dos galatos (13-20).**

Para a preparação dos derivados (13-20) foi empregado o procedimento adaptado da literatura de patentes, utilizando ácido sulfúrico como catalisador a mistura reacional apresentou-se difícil de purificar, assim optou-se em utilizar o ácido p-tolueno sulfônico (PTSA) como catalisador.<sup>47</sup>

Ao ácido gálico (0,1701g, 1 mmol), foi adicionado o álcool apropriado (3 mmol) e PTSA (0,019g, 0,1 mmol), e 10 mL de (1,4-dioxano ou acetona) para solubilizar a mistura, que foi aquecida à 160°C em banho com fluido térmico, sob vácuo em rotaevaporador. A mistura azeotrópica (água e álcool) destila. O tempo de reação variou (2-4 horas) de acordo com o álcool empregado e pode ser acompanhado por CCD utilizando como eluente hexano acetato de etila e . Evidenciado o término na reação por CCD, resfriou-se a mistura reacional e adicionou-se 2x20mL de éter de petróleo que foi aquecido aproximadamente 50°C

e filtrou-se a quente. O filtrado foi concentrado em rotaevaporador e purificado em coluna de sílica gel com gradientes de solventes Acetato/Hexano.

## 6.0 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA: Atividade antifúngica.

Os testes microbiológicos foram realizados pela professora Dra. Suzana Zacchino na Facultad de Bioquímica y Farmácia da Universidad Nacional del Rosário, Argentina.

### 6.1 Microorganismos

Os microorganismos usados na avaliação antifúngica foram adquiridos da American Type Collection (Rockville), da CEREMIC ou ATCC.

- ✓(Ca) *Candida albicans* ATCC 10231;
- ✓(Ct) *Candida tropicalis* C131;
- ✓(Sc) *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763;
- ✓(Cn) *Cryptococcus neoformans* ATCC 32264;
- ✓(A.fu) *Aspergillus fumigatus* ATCC 26934;
- ✓(A.fl) *Aspergillus flavus* ATCC 9170;
- ✓(An) *Aspergillus niger* ATCC 9029;
- ✓(Mc) *Microsporium canis* C112;
- ✓(Mg) *Microsporium gypseum* C115;
- ✓(Ef) *Epidermophyton floccosum* C114;
- ✓(Tr) *Trichophyton rubrum* C113;

✓(Tm) *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972.

## 6.2 Ensaio antifúngicos

A atividade fungistática dos derivados do ácido gálico foram avaliadas empregando-se o método de diluição em agar cloranfenicol-Saboureaud.

Os ensaios foram realizados em placas de petri 96-well microtiter. Os derivados do ácido gálico foram dissolvidos em DMSO (em triplicata) e adicionados ao meio de agar fundido, resultando em diferentes concentrações variando entre 1 e 250  $\mu\text{g/mL}$ . A concentração final de DMSO não excedeu 2% nos ensaios. Usando uma micropipeta, o inoculo (5 $\mu\text{L}$ ) foi adicionado ao meio de agar. Os reagentes antifúngicos Anfotericina B (A), Cetoconazol (B) e Terbinafina (C), foram empregados como padrões positivos nos ensaios. Uma solução sem qualquer composto foi utilizada como controle. As placas foram incubadas 24, 48 ou 72 horas a 30°C (de acordo com o crescimento dos fungos). A CIM foi definida como a menor concentração individual de cada composto na qual não foi observado crescimento fúngico visível após o período de incubação.<sup>40</sup>

## 7.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Mecanismo de esterificação do ácido gálico catalisada por ácido.

Na Figura 13, apresentamos o mecanismo de esterificação do ácido gálico catalisado por ácido.

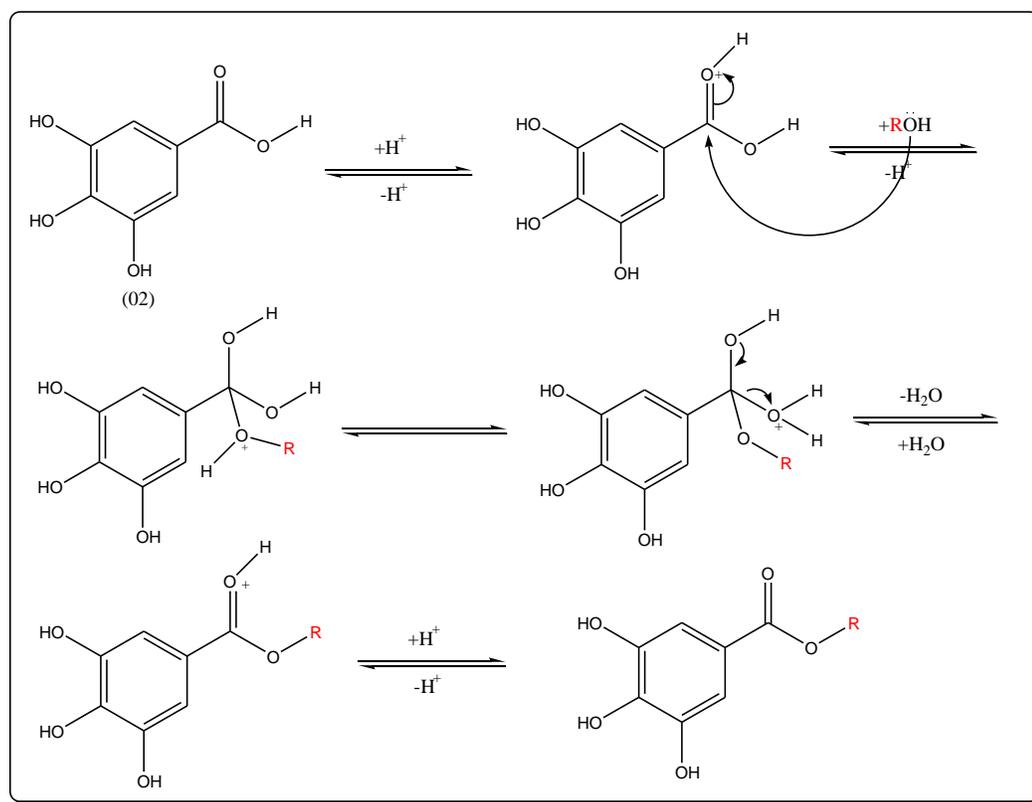


Figura 13 Mecanismo de esterificação do ácido gálico catalisada por ácido.

**7.2 Estruturas e dados espectroscópicos dos compostos sintetizados (os valores de Log P foram calculados com auxílio do programa TSAR.<sup>48</sup>).**

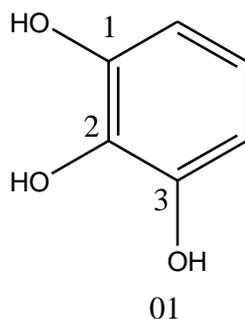
Os compostos 01, 02 e 03 foram obtidos comercialmente (01, 02 – VETEC, 03 – ALDRICH).

**7.2.1 Pirogalol (1,2,3-trihidroxibenzeno) – 01.**

**Massa molecular:** 126,12 g/Mol.

**Ponto de fusão:** 131-132 °C.

**Log P:** 1,1934.



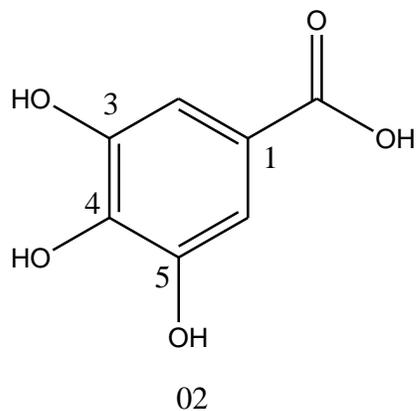
**Figura 14 Estrutura do 1,2,3-trihidroxibenzeno (01).**

### 7.2.2 Ácido gálico (Ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) – 02.

**Massa molecular:** 170,13 g/Mol.

**Ponto de fusão:** 254-255 °C.

**Log P:** 0,8918.



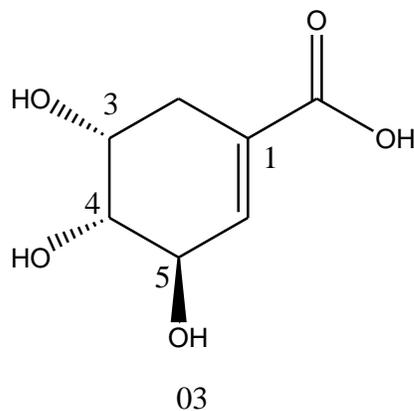
**Figura 15 Estrutura do ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico (02).**

### 7.2.3 Ácido chiquímico – 03.

**Massa molecular:** 174,17 g/Mol.

**Ponto de fusão:** 183-185 °C.

**Log P:** -0,9488.



**Figura 16 Estrutura do ácido chiquímico (03).**

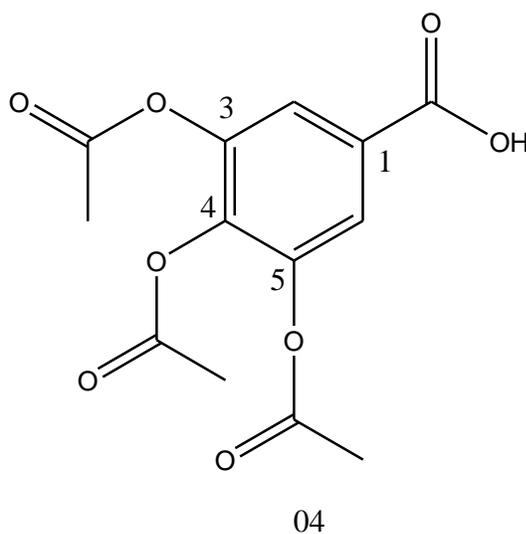
### 7.2.4 Ácido 3,4,5-triacetilbenzóico – 04.

**Massa molecular:** 296,25 g/Mol.

**Ponto de fusão:** 171-172 °C.

**Log P:** 0,2417.

**Rendimento:** 93%.



**Figura 17** Estrutura do ácido 3,4,5-triacetilbenzóico (04).

**<sup>1</sup>H-RMN: DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz:** δ 7,76 (s, 2H, ArH), 2,33 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,30 (s, 6H, CH<sub>3</sub>C=O).

**IV (λ; cm<sup>-1</sup>):** 3565, 2919, 2629, 1784, 1695, 1432, 1321, 1208, 1180, 1053.

**EI-MS (m/z):** 296 [M]<sup>+</sup>, 279, 254, 237, 212, 194, 170, 152, 126, 113, 45.

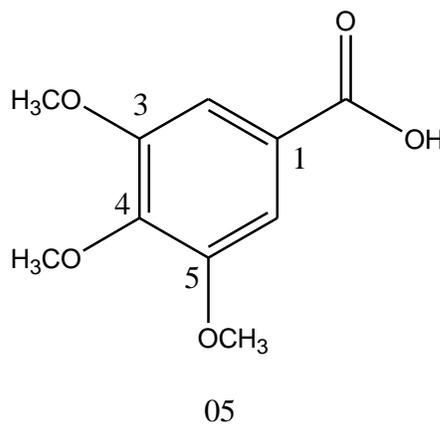
### 7.2.5 Ácido 3,4,5-trimetóxi benzóico – 05.

**Massa Molecular:** 212,22 g/Mol.

**Ponto de fusão:** 165-168 °C.

**Log P:** 0,9869.

**Rendimento:** 80%.

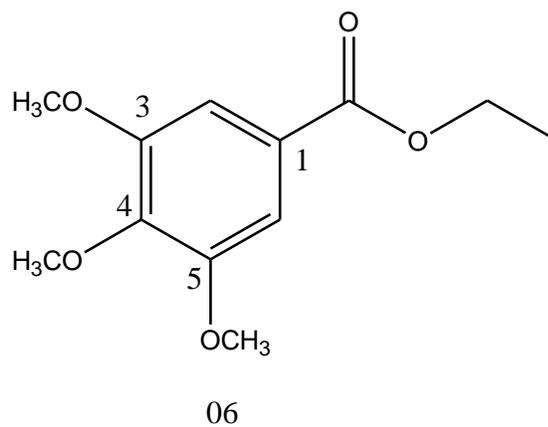


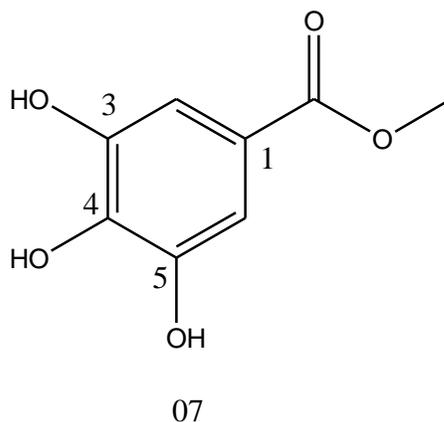
**Figura 18** Estrutura do ácido 3,4,5-trimetóxi benzóico (05).

**<sup>1</sup>H-RMN: DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz:** δ 12,92 (s, 1H, OH), 7,23 (s, 2H, ArH), 3,82 (s, 6H, 2xOCH<sub>3</sub>), 3,72 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).

**IV (λ; cm<sup>-1</sup>):** 3460, 2960, 2836, 2644, 2518, 1685, 1587, 1464, 1416, 1327, 1227, 1124.

**EI-MS (m/z):** 212 [M]<sup>+</sup>, 197, 141, 111, 96, 66.

**7.2.6 3,4,5-trimetóxi benzoato de etila – 06.****Massa molecular:** 240,28 g/Mol.**Ponto de fusão:** 200-202 °C.**Log P:** 1,3611.**Rendimento:** 70%.**Figura 19 Estrutura do 3,4,5-trimetóxi benzoato de etila.****<sup>1</sup>H-RMN: CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz:**  $\delta$  7,30 (s, 2H, ArH), 4,37 (q, 2H, OCH<sub>2</sub>), 3,91 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 1,39 (t, 3H, CH<sub>3</sub>).**IV ( $\lambda$ ; cm<sup>-1</sup>):** 3393, 2962, 2838, 1706, 1591, 1459, 1414, 1331, 1227, 1131.**EI-MS (m/z):** 240 [M]<sup>+</sup>, 225, 195, 141, 93, 66, 53.

**7.2.7 Galato de metila (3,4,5-trihidroxibenzoato de etila) – 07.****Massa molecular:** 184,16 g/Mol.**Ponto de fusão:** 150-152 °C.**Log P:** 0,9235**Rendimento:** 79%.**Figura 20 Estrutura do 3,4,5-trihidroxibenzoato de metila (07).****<sup>1</sup>H-RMN: DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz:** δ 6,96 (s, 2H, ArH), 3,76 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).**IV (λ; cm<sup>-1</sup>):** 3515, 3458, 3350, 3342, 3234, 1693, 1618, 1537, 1373, 1326, 1261, 1197, 1053.**EI-MS (m/z):** 184 [M]<sup>+</sup>, 153, 125.

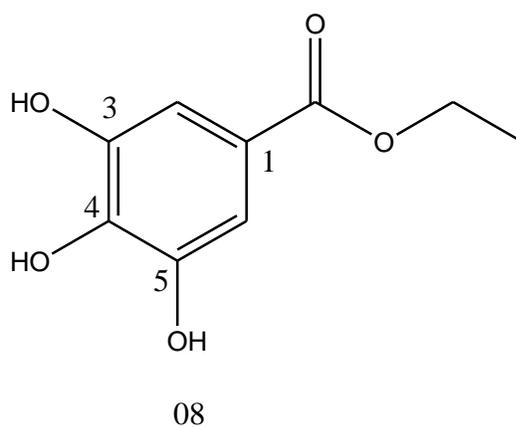
**7.2.8 Galato de etila (3,4,5-trihidroxibenzoato de etila) – 08.**

**Ponto de fusão:** 148-150 °C.

**Massa molecular:** 198,19 g/Mol.

**Log P:** 1,2660.

**Rendimento:** 80%.

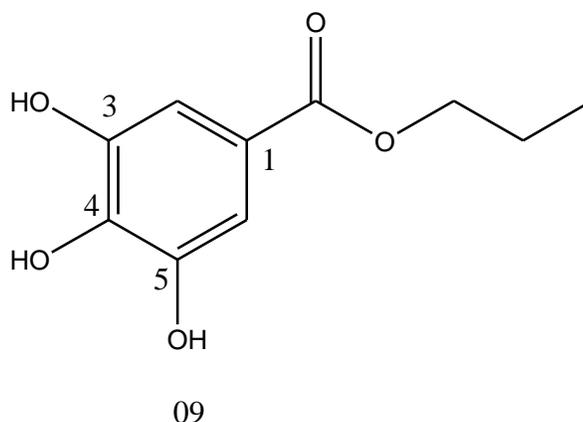


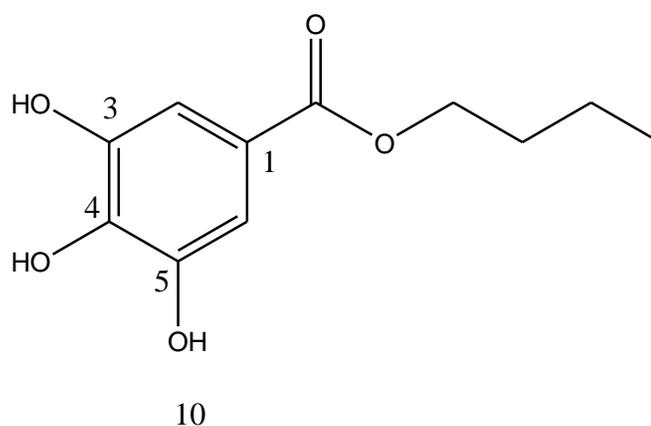
**Figura 21 Estrutura do 3,4,5-trihidroxibenzoato de etila (08).**

**<sup>1</sup>H-RMN: DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz:** δ 6,94 (s, 2H, ArH), 4,20 (q, 2H, OCH<sub>2</sub>), 1,27 (t, 3H, CH<sub>3</sub>).

**IV (λ; cm<sup>-1</sup>):** 3452, 3296, 3292, 1706, 1620, 1535, 1384, 1315, 1255, 1199, 1041, 1027.

**EI-MS (m/z):** 198 [M]<sup>+</sup>, 153, 125.

**7.2.9 Galato de propila (3,4,5-trihidroxibenzoato de propila) – 09.****Massa molecular:** 212,22 g/Mol.**Ponto de fusão:** 145-146 °C.**Log P:** 1,7346.**Rendimento:** 74%.**Figura 22 Estrutura do 3,4,5-trihidroxibenzoato de propila (09).****<sup>1</sup>H-RMN: DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz:**  $\delta$  6,98 (s, 2H, ArH), 4,13 (t, 2H, OCH<sub>2</sub>), 1,66 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 0,96 (t, 3H, CH<sub>3</sub>).**IV ( $\lambda$ ; cm<sup>-1</sup>):** 3616, 3469, 3188, 3176, 1651, 1606, 1537, 1328, 1299, 1265, 1209, 1166, 1029.**EI-MS (m/z):** 212 [M]<sup>+</sup>, 170, 153, 125.

**7.2.10 Galato de butila (3,4,5-trihidroxibenzoato de butila) – 10.****Massa molecular:** 226,25 g/Mol.**Ponto de fusão:** 126-127 °C.**Log P:** 2,1309.**Rendimento:** 72%.**Figura 23 Estrutura do 3,4,5-trihidroxibenzoato de butila (10).****<sup>1</sup>H-RMN: DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz:**  $\delta$  6,94 (s, 2H, ArH), 4,16 (t, 2H, OCH<sub>2</sub>), 1,64 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,42 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 0,92 (t, 3H, CH<sub>3</sub>).**IV ( $\lambda$ ; cm<sup>-1</sup>):** 3450, 3387, 1685, 1616, 1539, 1471, 1319, 1247, 1207, 1024.**EI-MS (m/z):** 226 [M]<sup>+</sup>, 170, 153.

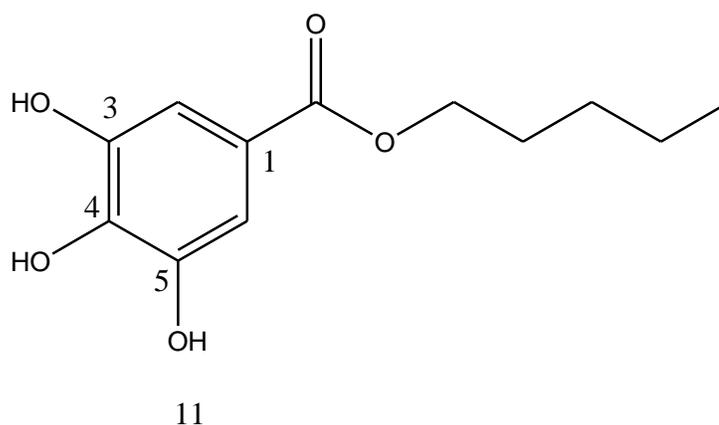
**7.2.11 Galato de pentila (3,4,5-trihidroxibenzoato de pentila) – 11.**

Massa molecular: 240,28 g/Mol.

Ponto de fusão: 123-124 °C.

**Log P:** 2,5272.

**Rendimento:** 69%.

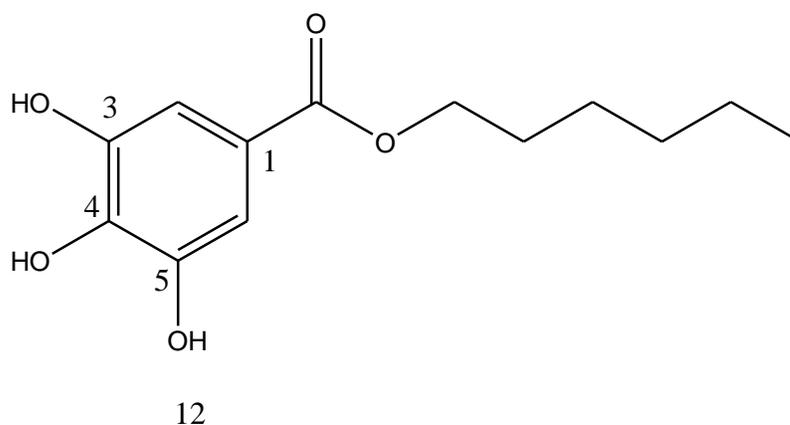


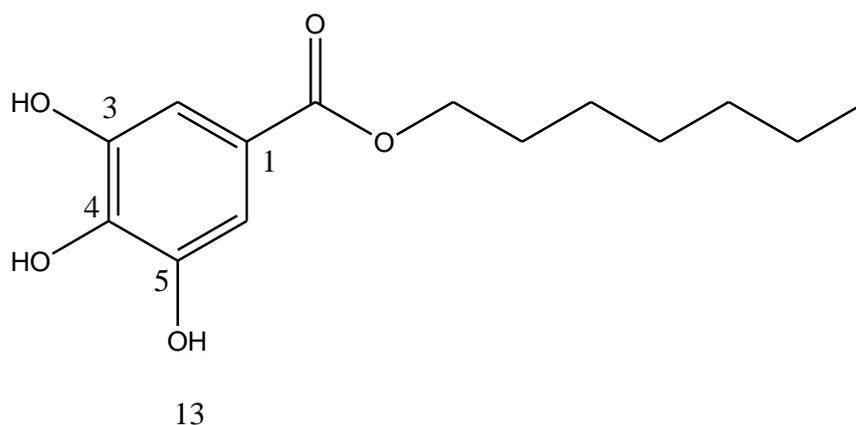
**Figura 24 Estrutura do 3,4,5-trihidroxibenzoato de pentila (11).**

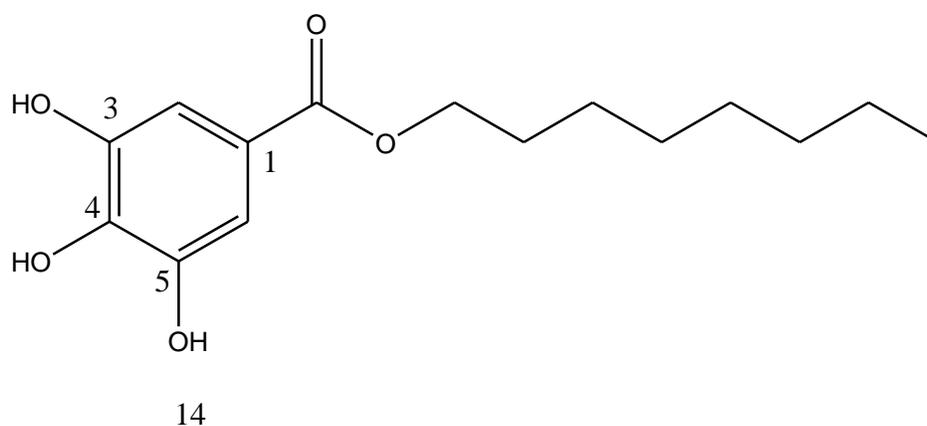
**<sup>1</sup>H-RMN: DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz:**  $\delta$  6,94 (s, 2H, ArH), 4,18 (t, 2H, OCH<sub>2</sub>), 1,73 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,55 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 0,93 (t, 3H, CH<sub>3</sub>).

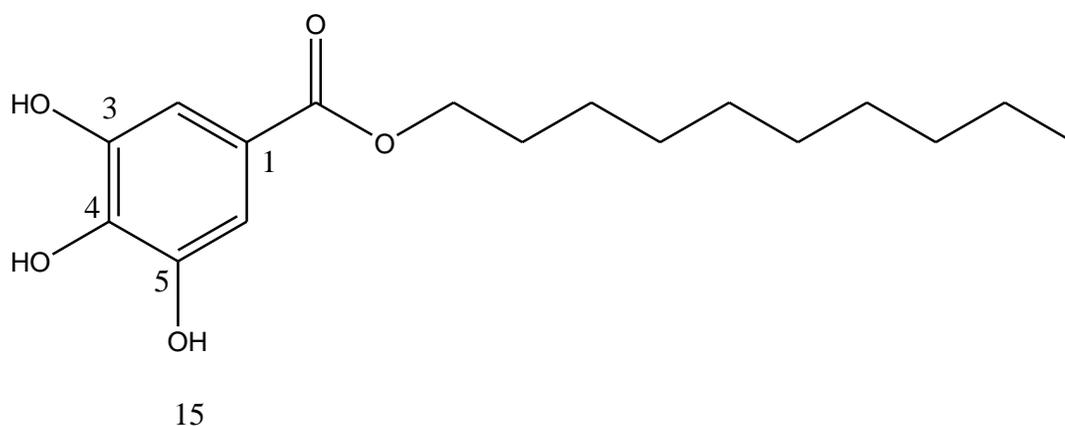
**IV ( $\lambda$ ; cm<sup>-1</sup>):** 3477, 3469, 3361, 3357, 3234, 1695, 1612, 1537, 1462, 1402, 1340, 1251, 1045, 1037.

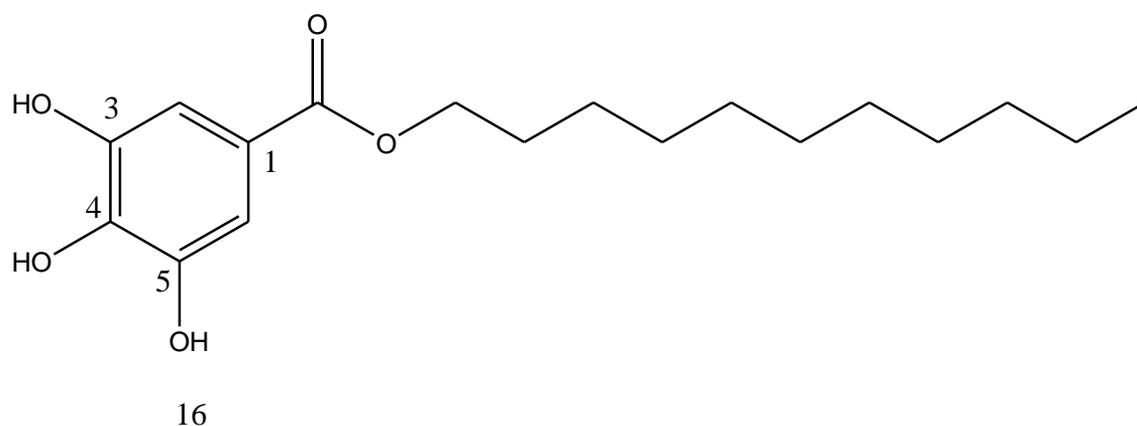
**EI-MS (m/z):** 240 [M]<sup>+</sup>, 170, 153.

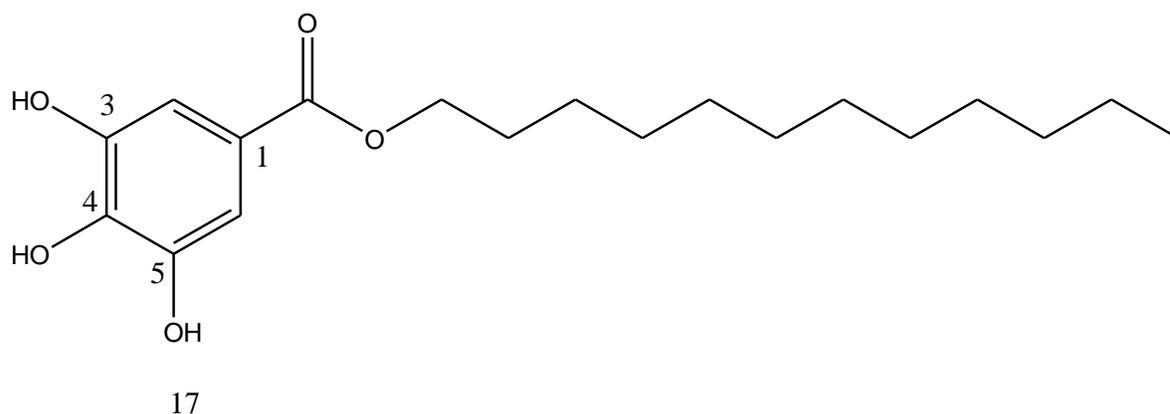
**7.1.12 Galato de hexila (3,4,5-trihidroxibenzoato de hexila) – 12.****Massa molecular:** 254,31 g/Mol.**Ponto de fusão:** 92-93 °C.**Log P:** 2,9235.**Rendimento:** 67%.**Figura 25 Estrutura do 3,4,5-trihidroxibenzoato de hexila (12).****<sup>1</sup>H-RMN: DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz:**  $\delta$  6,94 (s, 2H, ArH), 4,15 (t, 2H, OCH<sub>2</sub>), 1,64 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,31 (m, 6H, 3xCH<sub>2</sub>), 0,87 (t, 3H, CH<sub>3</sub>).**IV ( $\lambda$ ; cm<sup>-1</sup>):** 3569, 3492, 3431, 3369, 1681, 1616, 1315, 1253, 1026.**EI-MS (m/z):** 254 [M]<sup>+</sup>, 170, 153.

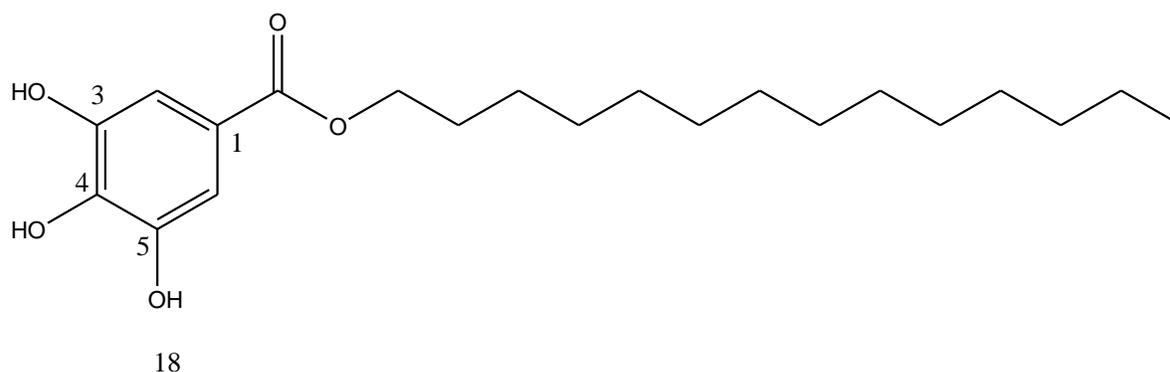
**7.2.13 Galato de heptila (3,4,5-trihidroxibenzoato de heptila) – 13.****Massa molecular:** 268,34 g/Mol.**Ponto de fusão:** 90-91 °C.**Log P:** 3,3198.**Rendimento:** 85%.**Figura 26 Estrutura do 3,4,5-trihidroxibenzoato de heptila (13).****<sup>1</sup>H-RMN: DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz:** δ 6,97 (s, 2H, ArH), 4,16 (t, 2H, OCH<sub>2</sub>), 1,66 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,27 (m, 10H, 5xCH<sub>2</sub>), 0,86 (t, 3H, CH<sub>3</sub>).**IV (λ; cm<sup>-1</sup>):** 3576, 3498, 3332, 3107, 2926, 2852, 1664, 1612, 1453, 1404, 1339, 1254, 1024.**EI-MS (m/z):** 268 [M]<sup>+</sup>, 170, 153, 125, 79, 55, 41.

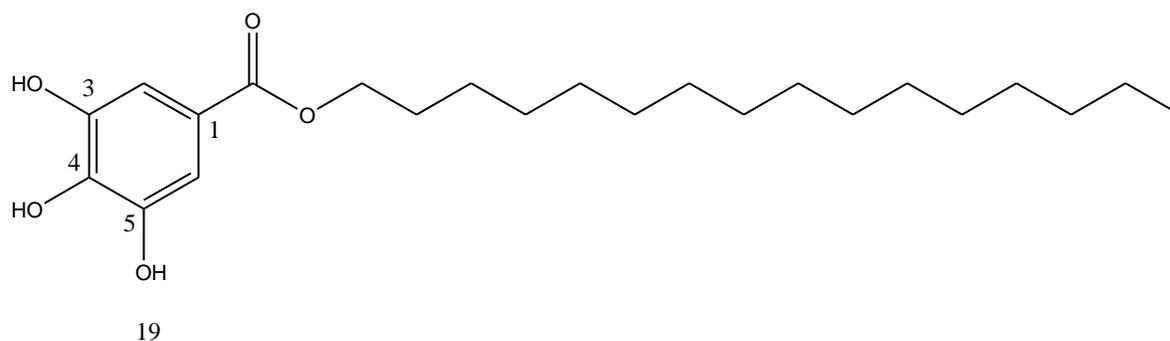
**7.2.14 Galato de octila (3,4,5-trihidroxibenzoato de octila) – 14.****Massa molecular:** 282,37 g/Mol.**Ponto de fusão:** 90-91 °C.**Log P:** 3,7161.**Rendimento:** 81%.**Figura 27 Estrutura do 3,4,5-trihidroxibenzoato de octila (14).****<sup>1</sup>H-RMN: DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz:** δ 6,95 (s, 2H, ArH), 4,09 (t, 2H, OCH<sub>2</sub>), 1,61 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,30 (m, 10H, 5xCH<sub>2</sub>), 0,89 (t, 3H, CH<sub>3</sub>).**IV (λ; cm<sup>-1</sup>):** 3398, 2960, 2928, 2860, 1688, 1616, 1537, 1463, 1312, 1243, 1026.**EI-MS (m/z):** 282 [M]<sup>+</sup>, 170, 153, 125, 79, 70, 41.

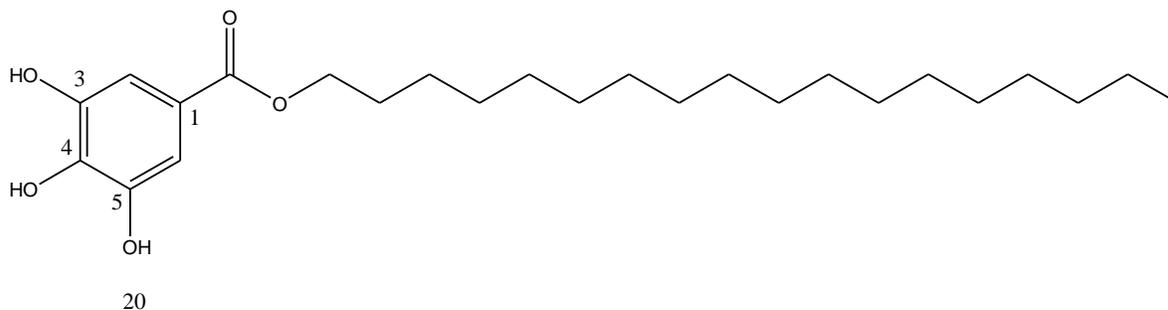
**7.2.15 Galato de decila (3,4,5-trihidroxibenzoato de decila) – 15.****Massa molecular:** 310,43 g/Mol.**Ponto de fusão:** 94-95 °C.**Log P:** 4,5087.**Rendimento:** 78%.**Figura 28 Estrutura do 3,4,5-trihidroxibenzoato de decila (15).****<sup>1</sup>H-RMN: DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz:** δ 6,93 (s, 2H, ArH), 4,14 (t, 2H, OCH<sub>2</sub>), 1,63 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,24 (m, 14H, 7xCH<sub>2</sub>), 0,84 (t, 3H, CH<sub>3</sub>).**IV (λ; cm<sup>-1</sup>):** 3449, 3347, 2915, 2848, 1668, 1609, 1532, 1467, 1411, 1378, 1305, 1257, 1029.**EI-MS (m/z):** 310 [M]<sup>+</sup>, 170, 153, 125, 79, 41.

**7.2.16 Galato de undecila (3,4,5-trihidroxibenzoato de undecila) – 16.****Massa molecular:** 324,46 g/Mol.**Ponto de fusão:** 89-91 °C.**Log P:** 4,9050.**Rendimento:** 80%.**Figura 29 Estrutura do 3,4,5-trihidroxibenzoato de undecila (16).****<sup>1</sup>H-RMN: DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz:**  $\delta$  6,95 (s, 2H, ArH), 4,15 (t, 2H, OCH<sub>2</sub>), 1,65 (m, 14H, 7xCH<sub>2</sub>), 1,24 (m, 16H, 5xCH<sub>2</sub>), 0,85 (t, 3H, CH<sub>3</sub>).**IV ( $\lambda$ ; cm<sup>-1</sup>):** 3488, 3442, 3438, 3334, 1668, 1604, 1531, 1467, 1404, 1363, 1299, 1255, 1197, 1022.**EI-MS (m/z):** 324 [M]<sup>+</sup>, 170, 153.

**7.2.17 Galato de dodecila (3,4,5-trihidroxibenzoato de dodecila) – 17.****Massa molecular:** 338,49 g/Mol.**Ponto de fusão:** 94-96 °C.**Log P:** 5,3013.**Rendimento:** 75%.**Figura 30 Estrutura do 3,4,5-trihidroxibenzoato de dodecila (17).****<sup>1</sup>H-RMN: DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz:** δ 6,94 (s, 2H, ArH), 4,14 (t, 2H, OCH<sub>2</sub>), 1,64 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,23 (m, 18H, 09xCH<sub>2</sub>), 0,85 (t, 3H, CH<sub>3</sub>).**IV (λ; cm<sup>-1</sup>):** 3450, 3348, 2917, 2848, 1669, 1607, 1532, 1468, 1406, 1377, 1302, 1258, 1028.**EI-MS (m/z):** 338 [M]<sup>+</sup>, 170, 153, 125, 69, 55, 41.

**7.2.18 Galato de tetradecila (3,4,5-trihidroxibenzoato de tetradecila) – 18.****Massa molecular:** 366,55 g/Mol.**Ponto de fusão:** 97-98 °C.**Log P:** 6,0939.**Rendimento:** 85%.**Figura 31 Estrutura do 3,4,5-trihidroxibenzoato de tetradecila (18).****<sup>1</sup>H-RMN: DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz:**  $\delta$  6,94 (s, 2H, ArH), 4,14 (t, 2H, OCH<sub>2</sub>), 1,64 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,23 (m, 22H, 11xCH<sub>2</sub>), 0,84 (t, 3H, CH<sub>3</sub>).**IV ( $\lambda$ ; cm<sup>-1</sup>):** 3481, 3450, 3346, 1670, 1606, 1531, 1467, 1406, 1381, 1301, 1257, 1228, 1195, 1145, 1101, 1058, 1049, 1037.**EI-MS (m/z):** 366 [M]<sup>+</sup>, 170, 153.

**7.2.19 Galato de hexadecila (3,4,5-trihidroxibenzoato de hexadecila) – 19.****Massa molecular:** 394,61 g/Mol.**Ponto de fusão:** 99-101 °C.**Log P:** 6,8865.**Rendimento:** 72%.**Figura 32 Estrutura do 3,4,5-trihidroxibenzoato de hexadecila (19).****<sup>1</sup>H-RMN: DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz:** δ 6,94 (s, 2H, ArH), 4,14 (t, 2H, OCH<sub>2</sub>), 1,64 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,23 (m, 26H, 13xCH<sub>2</sub>), 0,84 (t, 3H, CH<sub>3</sub>).**IV (λ; cm<sup>-1</sup>):** 3520, 3482, 3447, 3330, 2918, 2848, 1704, 1683, 1650, 1612, 1537, 1468, 1399, 1339, 1309, 1265, 1199, 1030.**EI-MS (m/z):** 394 [M]<sup>+</sup>, 170, 153, 125, 97, 83, 69, 55, 43.

**7.2.20 Galato de octadecila (3,4,5-trihidroxibenzoato de octadecila) – 20.****Massa molecular:** 422,67 g/Mol.**Ponto de fusão:** 102-104 °C.**Log P:** 7,6791.**Rendimento:** 73%.**Figura 33 Estrutura do 3,4,5-trihidroxibenzoato de octadecila (20).****<sup>1</sup>H-RMN: DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz:**  $\delta$  6,94 (s, 2H, ArH), 4,14 (t, 2H, OCH<sub>2</sub>), 1,65 (m, 30H, 15xCH<sub>2</sub>), 1,23 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 0,85 (t, 3H, CH<sub>3</sub>).**IV ( $\lambda$ ; cm<sup>-1</sup>):** 3405, 2918, 1849, 1708, 1655, 1536, 1468, 1323, 1226, 1092, 1026.**EI-MS (m/z):** 422 [M]<sup>+</sup>, 170, 153, 125, 97, 83, 69, 55, 43.





	250	200	200	100	>250	>250	>250	na	125	na	125	100
17	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	na	>250	na	>250	>250
18	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	na	100	na	50	50
19	na	na	na									
20	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	250	250	>250
21	0,75	0,62	6,25	0,40	3,0	3,0	0,90	50	6,25	0,30	25	6,25
22	8,0	5,0	5,0	2,0	20	30	12,5	15	6,25	25	15	12,5
23	--	--	--	--	--	--	--	0,01	0,04	0,004	0,01	0,04

\*Os compostos: (21) Anfotericina B (924,1 g/Mol), (22) Cetoconazol (517,41 g/Mol) e (23) Terbinafina (327,89 g/Mol), foram utilizados como padrões positivos nos ensaios antifúngicos e são utilizados como fármacos correntes no tratamento das infecções fúngicas. na = não avaliado. Nos ensaios de atividade antifúngica, os compostos mais ativos devem exibir atividade < 20µg/mL.

#### 7.4 Esquema geral dos compostos sintetizados e discussão dos dados obtidos.

Apresentamos na Figura 35, um esquema geral dos compostos sintetizados.

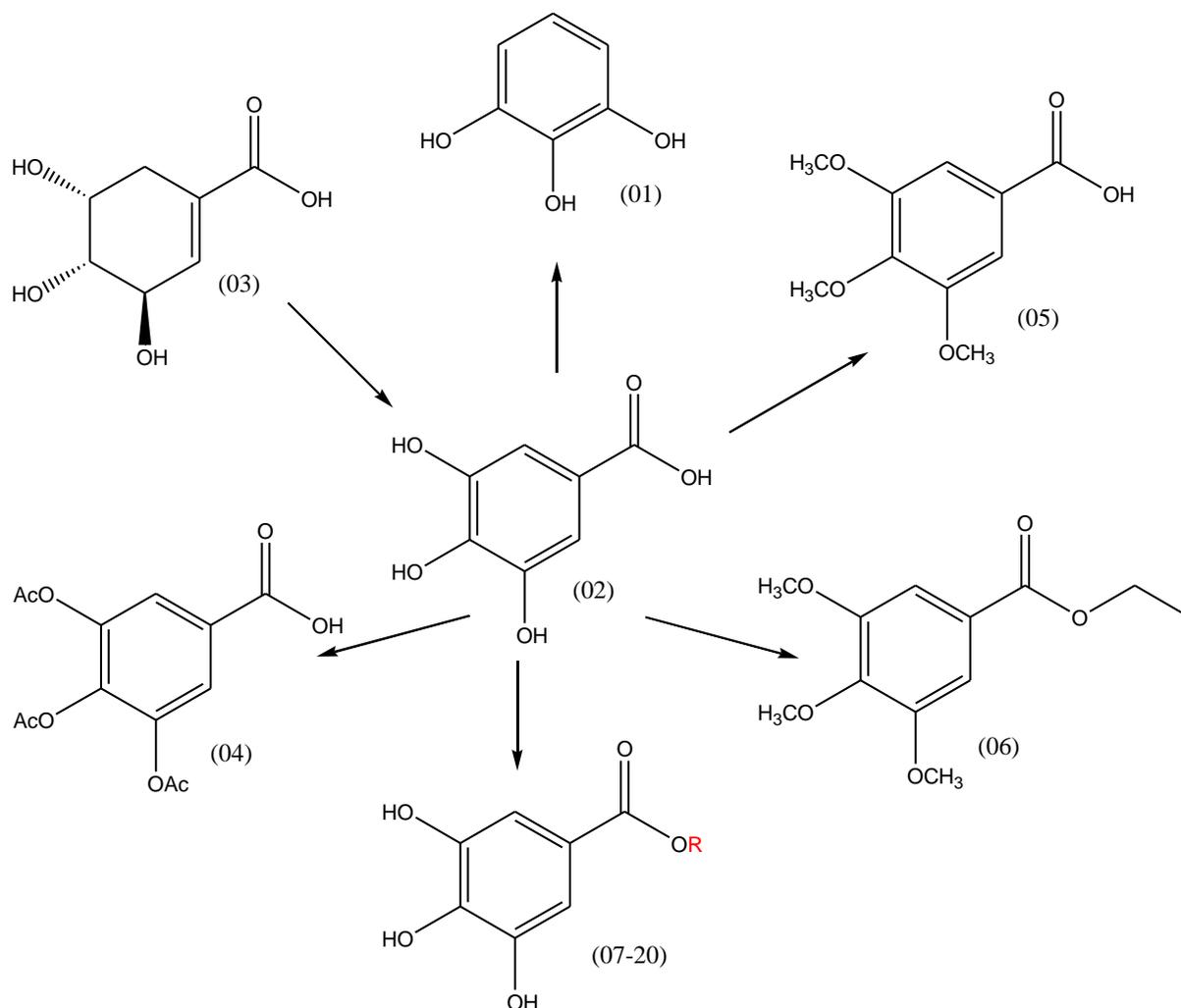


Figura 34 Figura ilustrativa dos compostos sintetizados.

O Pirogalol (01) exibiu atividade antifúngica maior que o ácido gálico (02) para todos os fungos: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces*

*cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum*.

O ácido chiquímico (03), precursor do ácido gálico na sua rota Biosintética, exibe atividade contra *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*, com valores de CIM: 125, 100, 100 e 125 µg/mL, respectivamente.

O ácido 3,4,5-trimetóxi benzóico (05), o mesmo não exibiu qualquer atividade contra todos os fungos, mas o composto (06) o 3,4,5-trimetóxi benzoato de etila, exibiu atividade contra *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* com valores de CIM: 100, 50 e 62,5 µg/mL, respectivamente. O mecanismo de ação pode ser diferente dos compostos com as hidroxilas fenólicas livres.

Dentre os ésteres sintetizados os mais ativos foram: o galato de heptila (13) contra *Aspergillus niger*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, com valores de CIM: 100; 6,25; 6,25; 6,25; 6,25 e 12,5 µg/mL respectivamente. O galato de octila (14), exibiu atividade contra: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, com valores de CIM: 62,5; 62,5; 50; 50; 62,5 e 62,5 µg/mL respectivamente. Na Tabela 03 foram comparadas as atividades dos galatos (13) e (14) frente aos compostos utilizados em clínica médica Anfotericina B (21),

Cetoconazol (22) e Terbinafina (23) em  $\mu\text{Molar}$  contra os seguintes fungos: *Candida albicans* (Ca), *Candida tropicalis* (Ct), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Cryptococcus neoformans* (Cn), *Aspergillus fumigatus* (Afu), *Aspergillus flavus* (Afl), *Aspergillus niger* (An), *Microsporium canis* (Mc), *Microsporium gypseum* (Mg), *Epidermophyton floccosum* (Ef), *Trichophyton rubrum* (Tr), *Trichophyton mentagrophytes* (Tm), respectivamente.

**Tabela 3 Comparação das concentrações dos galatos mais ativos (13-14) contra os fármacos: Anfotericina B (21), Cetoconazol (22) e Terbinafina 23).**

Compostos	Fungos ( $\mu\text{M}$ ).											
	Ca	Ct	Sc	Cn	A.fu	A.fl	An	Mc	Mg	Ef	Tr	Tm
13	--	--	--	--	--	--	372,6	23,3	23,3	23,3	23,3	46,5
14	221,3	221,3	177	177	221,3	221,3	--	--	--	--	--	--
21	0,81	0,67	6,76	0,43	3,24	3,24	0,97	54,1	6,76	0,32	27	6,76
22	15,4	9,6	9,6	3,8	38	57,9	24,1	28,9	12	48,3	28,9	24,1
23	--	--	--	--	--	--	--	0,03	0,12	0,012	0,03	0,012

O composto (13) galato de heptila foi aproximadamente duas vezes mais ativo do que a Anfotericina para o seguinte fungo: *Microsporium canis* e mais ativo e contra *Trichophyton rubrum*. Comparando o Cetoconazol com o galato de heptila (13), observou-se maior atividade do galato de heptila contra os fungos: *Microsporium canis*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum*.

O medicamento mais ativo é a Terbinafina para os seguintes fungos testados: *Microsporum canis* (Mc), *Microsporum gypseum* (Mg), *Epidermophyton floccosum* (Ef), *Trichophyton rubrum* (Tr), *Trichophyton mentagrophytes* (Tm).

## 7.5 Apresentação dos valores do Coeficiente de Partição ótimo contra cada fungo.

### 7.5.1 Dados da atividade antifúngica contra *Candida albicans*.

No Gráfico 1, podemos observar os dados de Log 1/[CIM] vs Log P dos compostos sintetizados (02, 07-18 e 20) para *Candida albicans*.

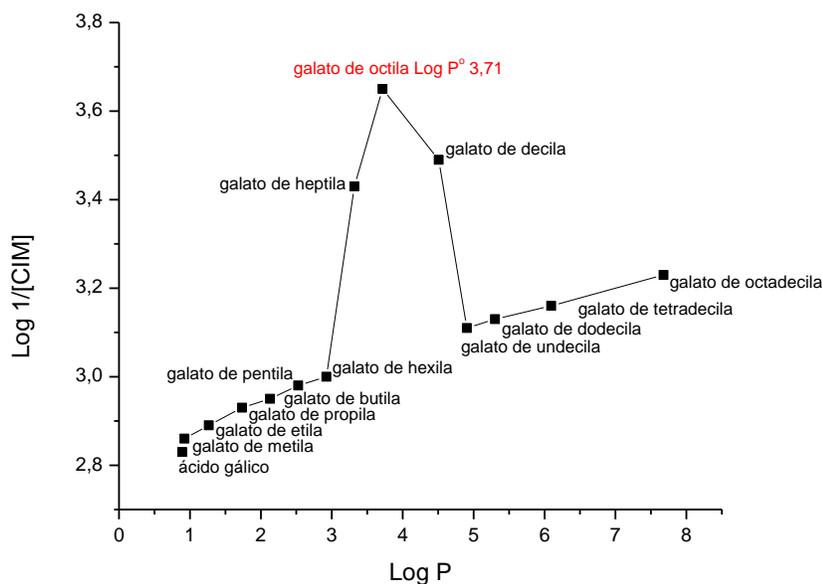
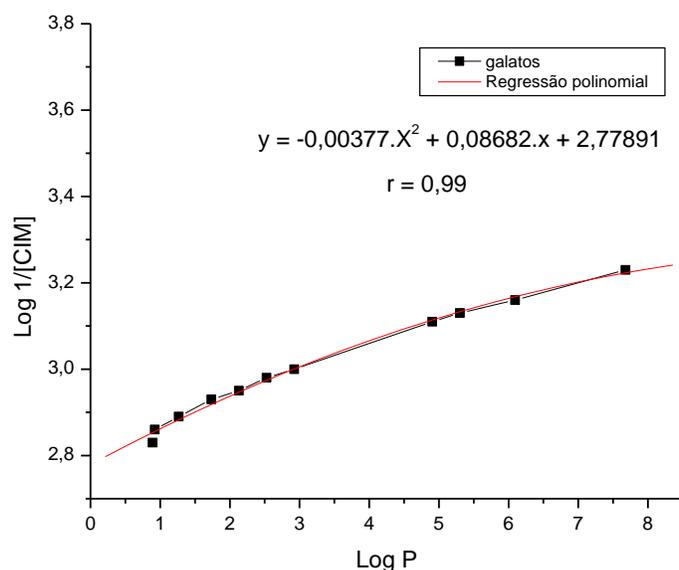


Gráfico 1 Log 1/[CIM] vs Log P contra *Candida Albicans*.

No Gráfico 2, podemos observar os dados de Log 1/[CIM] vs Log P dos compostos sintetizados (02, 07-12, 16-19 e 20) para *Candida albicans*.



**Gráfico 2 Log 1/[CIM] vs Log P contra *Cândida albicans* dos compostos (02,07-12, 16-18 e 20).**

Observando o perfil do Gráfico 1, podemos concluir que o valor do coeficiente de partição ótimo contra *Candida albicans* é Log P<sup>o</sup> 3,71 que corresponde a máxima atividade antifúngica do composto 3,4,5-trihidroxibenzoato de octila (14). Descartando os valores referentes ao galato de heptila, octila e decila e efetuando uma regressão polinomial no Gráfico 2, obtemos uma correlação  $r = 0,99$ . Com equação polinômica:  $y = -0,00377.X^2 + 0,08682.X + 2,77891$ . Este comportamento demonstra que os galatos de heptila, octila e decila apresentam outro mecanismo de ação a mais do que aquele que é comum a todos os outros galatos sintetizados neste trabalho.

### 7.5.2 Dados da atividade antifúngica contra *Candida tropicalis*.

No Gráfico 3, podemos observar os dados de Log 1/[CIM] vs Log P dos compostos sintetizados (02, 07-18 e 20) para *Candida tropicalis*.

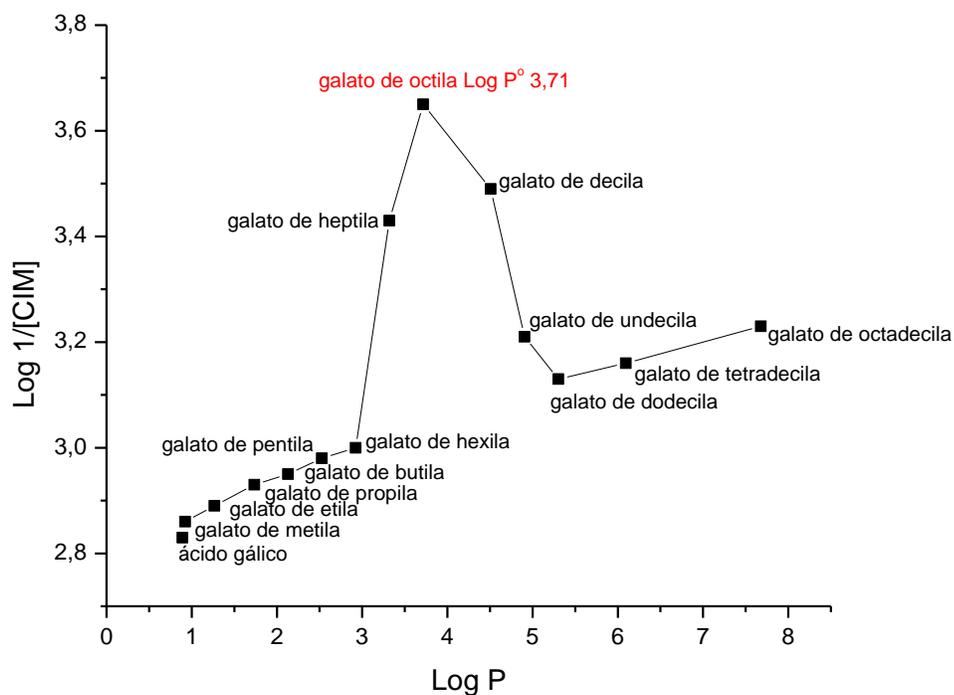
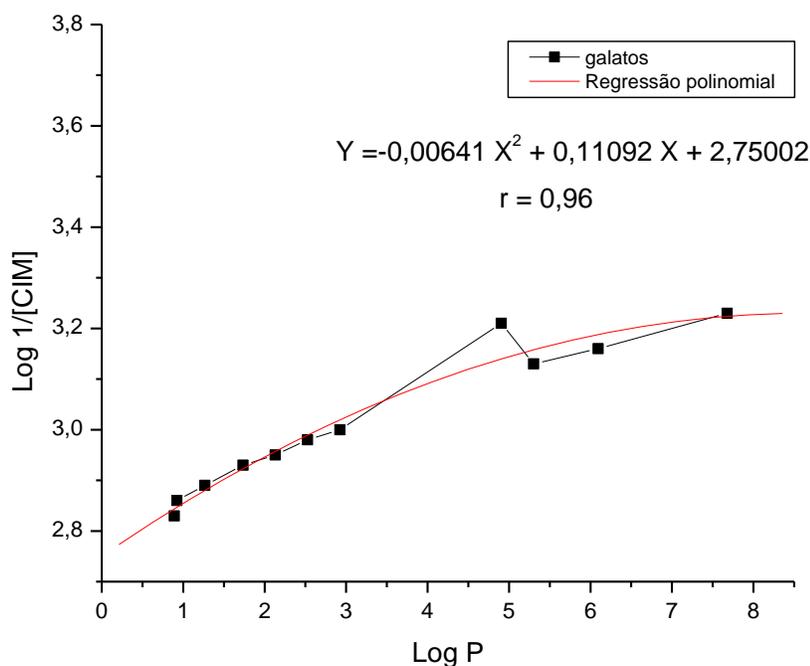


Gráfico 3 Log 1/[CIM] vs Log P contra *Candida tropicalis* dos compostos (02,07-18 e 20).



**Gráfico 4 Log 1/[CIM] vs Log P contra *Candida tropicalis* dos compostos (02,07-12, 16-18 e 20).**

Observando o perfil do Gráfico 3, podemos concluir que o valor do coeficiente de partição ótimo para a atividade antifúngica contra *Candida Tropicalis* é Log P<sup>o</sup> 3, que corresponde a máxima atividade antifúngica do composto 3,4,5-trihidroxibenzoato de octila (14). Descartando os valores dos galatos de heptila, octila e decila e efetuando uma regressão polinomial no Gráfico 4, obtemos uma correlação de  $r = 0,96$ . Com a equação polinômica:  $Y = -0,00641.X^2 + 0,11092.X + 2,75002$ . Este comportamento demonstra que os galatos de heptila, octila e decila apresentam outro mecanismo de ação a mais do que aquele que é comum a todos os outros galatos sintetizados neste trabalho.

### 7.5.3 Dados da atividade antifúngica contra *Saccharomyces cerevisiae*.

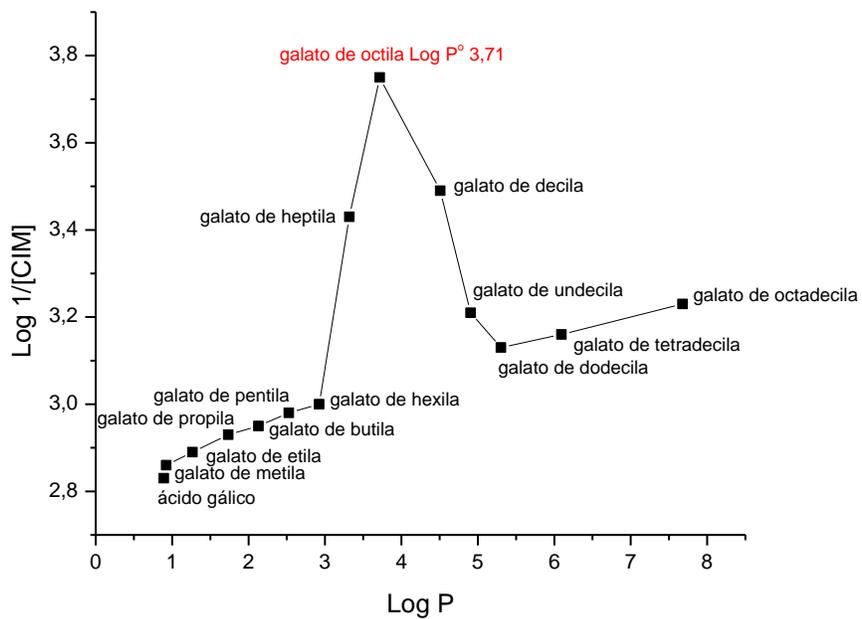
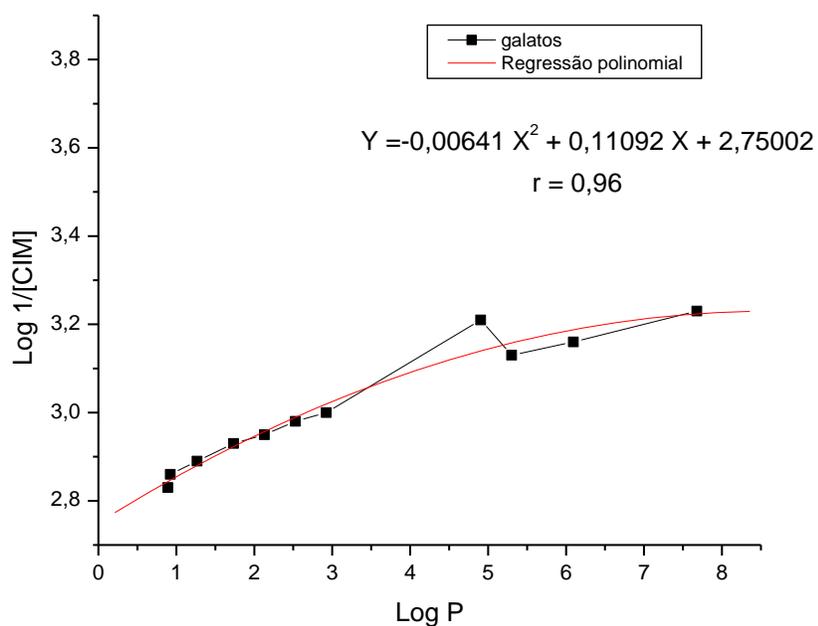


Gráfico 5 Log 1/[CIM] vs Log P contra *Saccharomyces cerevisiae* dos compostos (02,07-18, 20).



**Gráfico 6 Log 1/[CIM] vs Log P contra *Saccharomyces cerevisiae* dos compostos (02,07-12, 16-18, 20).**

No gráfico 5, podemos concluir que o valor do coeficiente de partição ótimo para a atividade antifúngica contra *Saccharomyces cerevisiae* é Log P<sup>o</sup> 3,71 que corresponde ao 3,4,5-trihidroxibenzoato de octila (14). Descartando os valores correspondentes aos galatos de heptila, octila e decila e efetuando uma regressão polinomial no Gráfico 6, obtemos uma correlação de  $r = 0,96$ . com equação polinômica:  $Y = -0,00641.X^2 + 0,11092.X + 2,75002$ .

### 7.5.4 Dados da atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans*.

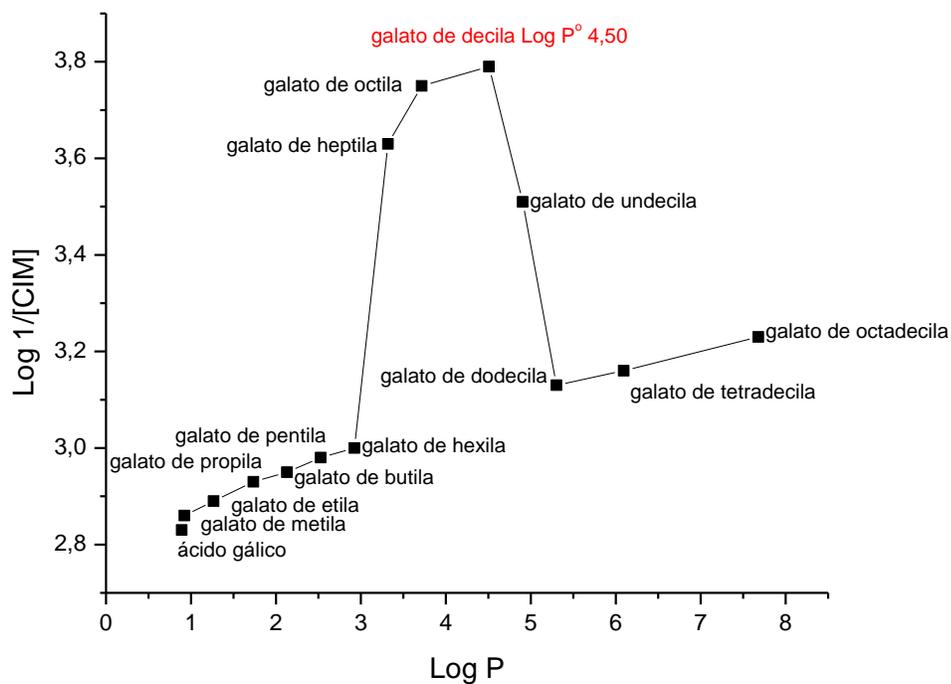
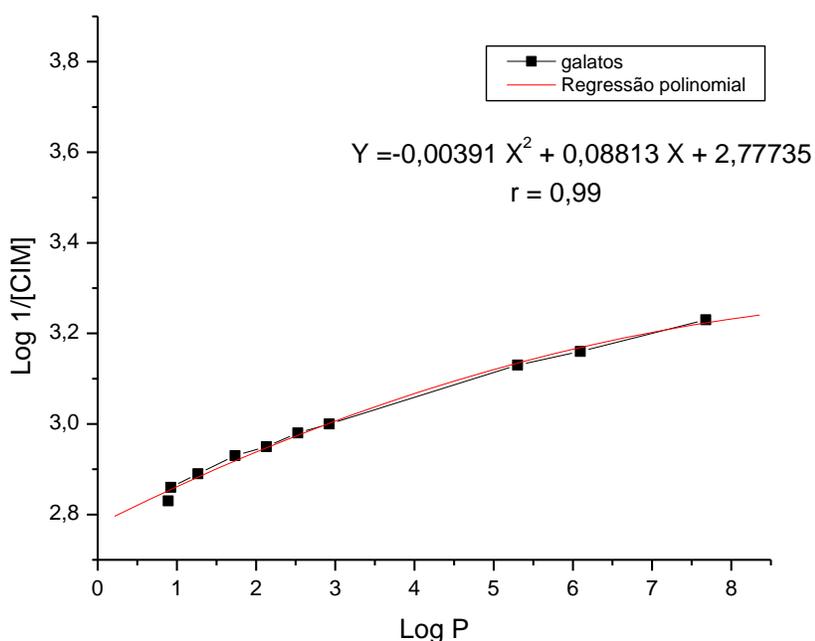


Gráfico 7 Log 1/[CIM] vs Log P contra *Cryptococcus neoformans* dos compostos (02,07-18, 20).



**Gráfico 8 Log 1/[CIM] vs Log P contra, *Cryptococcus neoformans* dos compostos (02,07-12, 17,18, 20).**

Segundo o Gráfico 7, podemos concluir que o valor do coeficiente de partição ótimo para a atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans* é Log P<sup>o</sup> 4,50 que corresponde ao 3,4,5-trihidroxibenzoato de decila (15). Descartando os valores referentes aos galatos de heptila, octila, decila e undecila e efetuando uma regressão polinomial no Gráfico 8, obtemos uma correlação de  $r = 0,99$ . Com equação polinômica:  $Y = -0,00391.X^2 + 0,08813.X + 2,77735$ .

### 7.5.5 Dados da atividade antifúngica contra *Aspergillus fumigatus*.

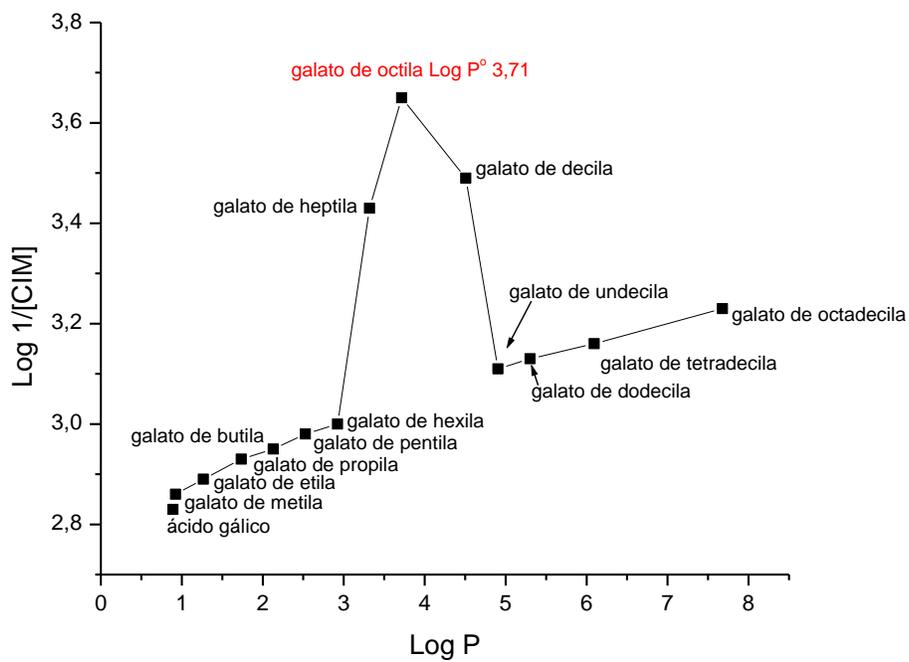
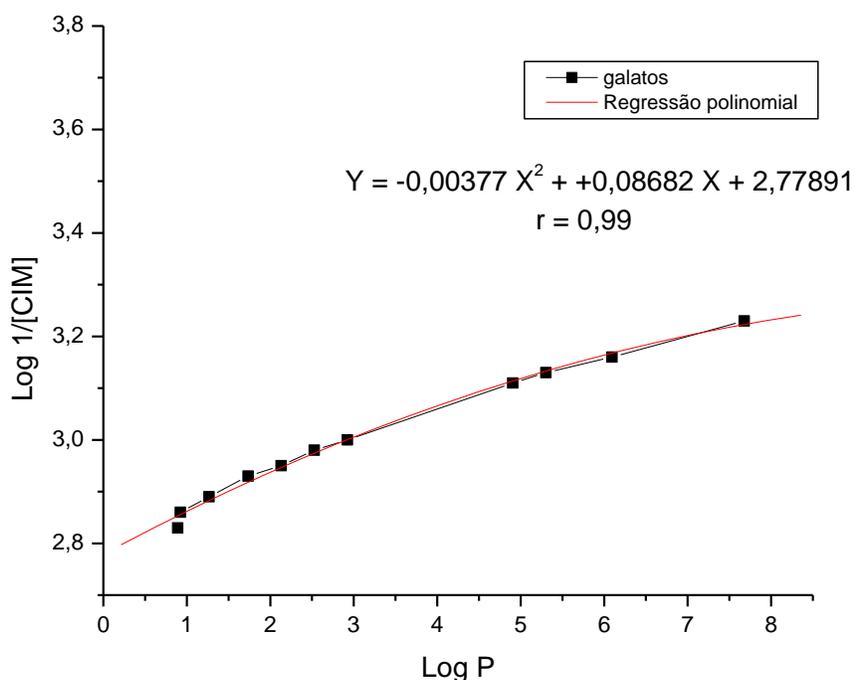


Gráfico 9 Log 1/[CIM] vs Log P contra *Aspergillus fumigatus* dos compostos (02,07-18, 20).



**Gráfico 10 Log 1/[CIM] vs Log P contra *Aspergillus fumigatus* dos compostos (02,07-12, 16, 18, 20).**

Observando o perfil do Gráfico 9, podemos concluir que o valor do coeficiente de partição ótimo para a atividade antifúngica contra *Aspergillus fumigatus* é Log P<sup>o</sup> 3,71 que corresponde ao 3,4,5-trihidroxibenzoato de octila (14). Descartando os valores correspondentes aos galatos de heptila, octila e decila e efetuando uma regressão polinomial no Gráfico 10, obtemos uma correlação de r = 0,99. Com equação:  $Y = -0,00377 X.^2 + 0,08682.X + 2,77891$ .

### 7.5.6 Dados da atividade antifúngica contra *Aspergillus flavus*.

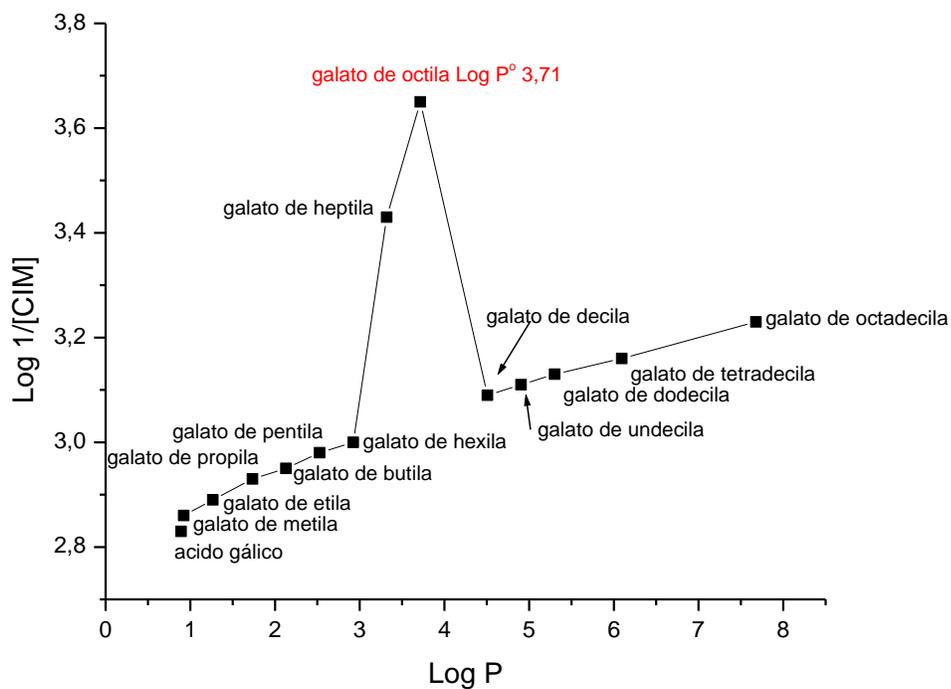
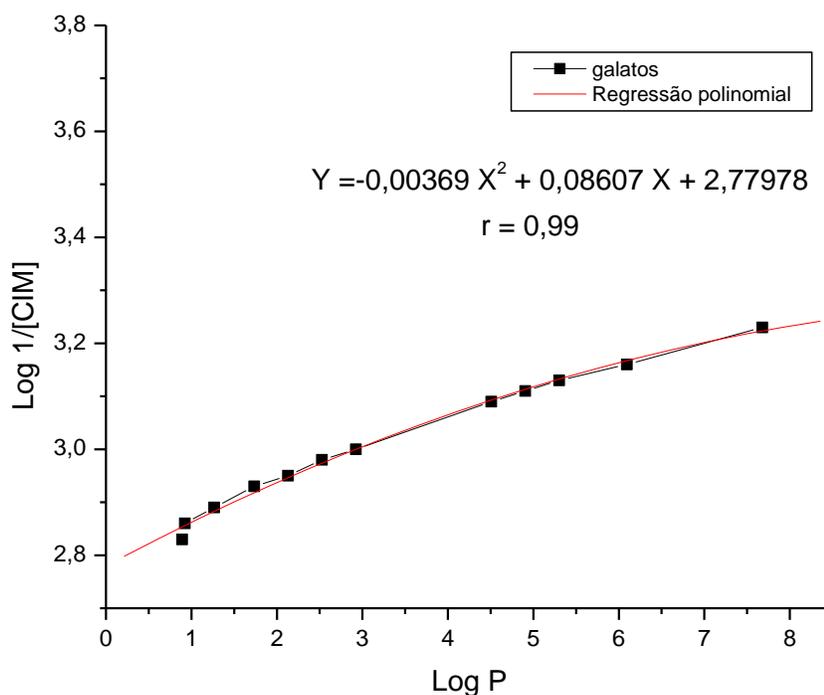


Gráfico 11 Log 1/[CIM] vs Log P contra *Aspergillus flavus* dos compostos (02, 07-18, 20).



**Gráfico 12 Log 1/[CIM] vs Log P contra, *Aspergillus flavus* dos compostos (02,07-12, 15-18, 20).**

No perfil do Gráfico 11, podemos concluir que o valor do coeficiente de partição ótimo para a atividade antifúngica contra *Aspergillus flavus* é Log P<sup>o</sup> 3,71 que corresponde ao 3,4,5-trihidroxibenzoato de octila (14). Descartando os valores correspondentes aos galatos de heptila e octila e efetuando uma regressão polinomial no Gráfico 12, obtemos uma correlação de r = 0,99. Com equação polinomial:  $Y = -0,00369 X^2 + 0,08607.X + 2,77978$ .

### 7.5.7 Dados da atividade antifúngica contra *Aspergillus niger*.

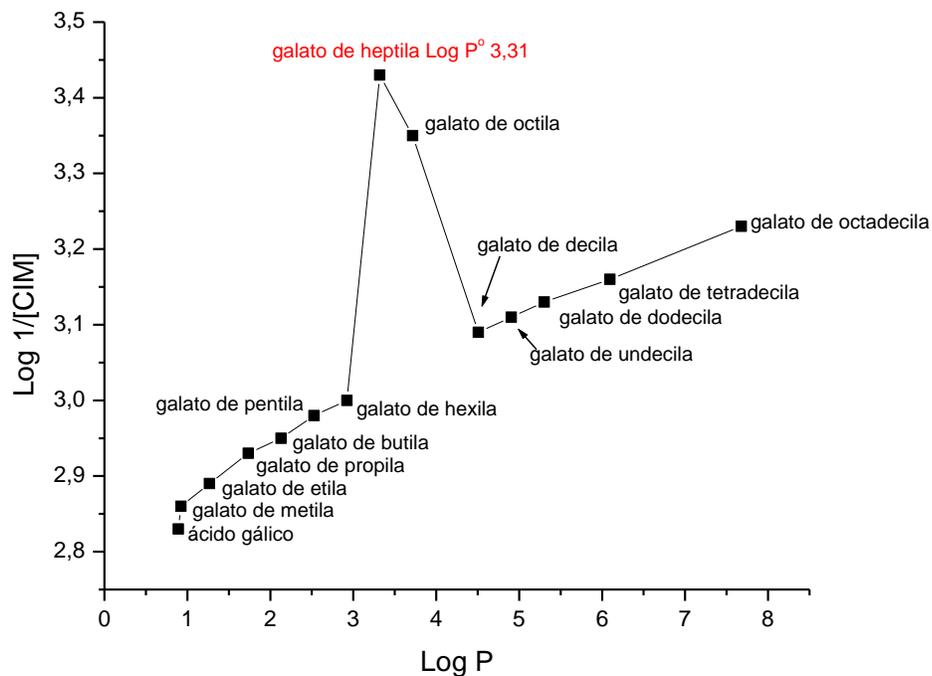
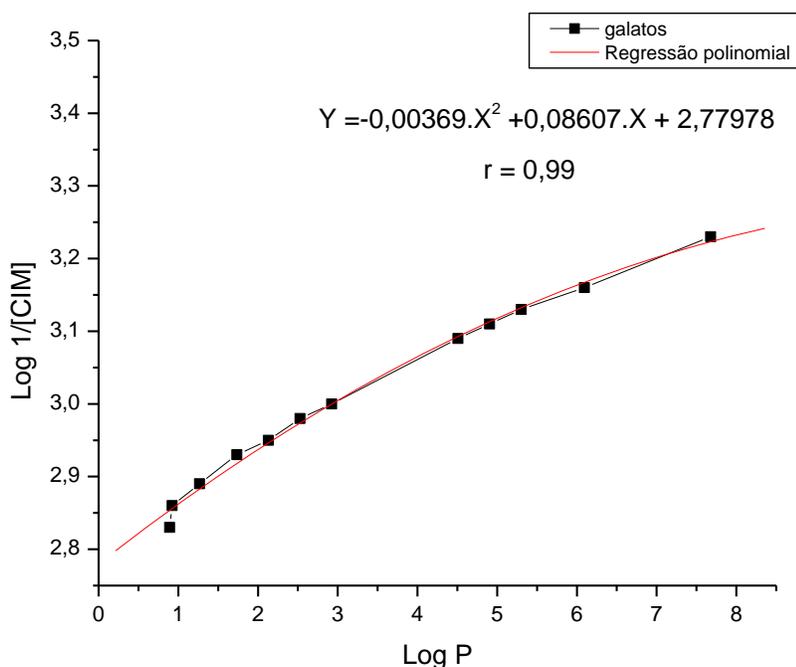


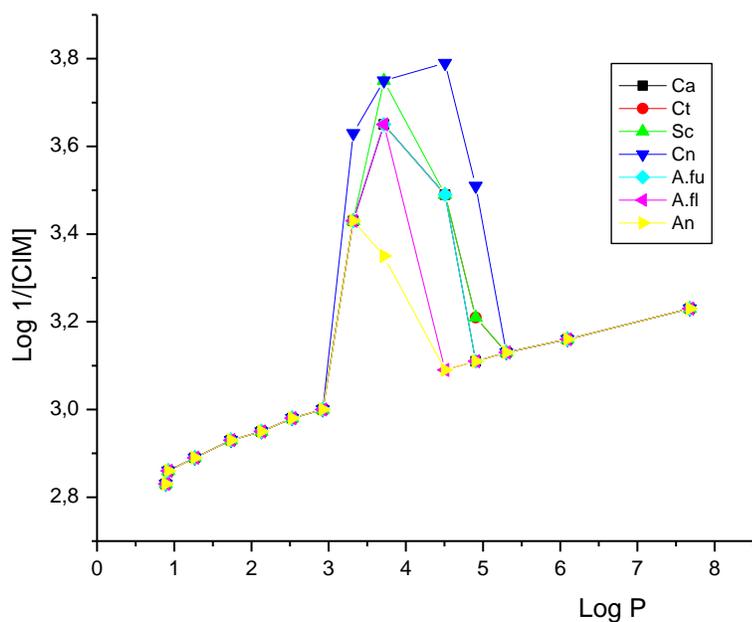
Gráfico 13 Log 1/[CIM] vs Log P contra *Aspergillus niger* dos compostos (02,07-18, 20).



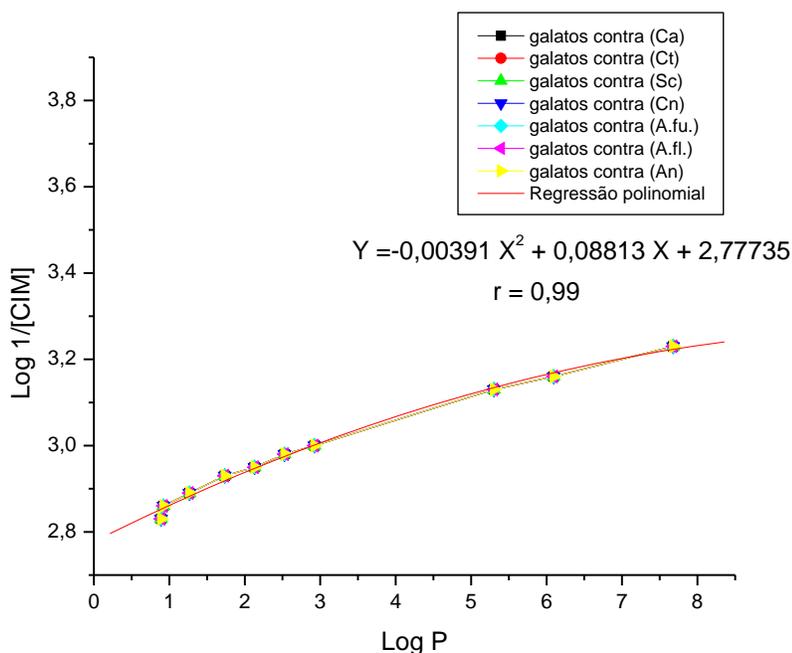
**Gráfico 14 Log 1/[CIM] vs Log P contra *Aspergillus niger* dos compostos (02,07-12, 14-18, 20).**

A partir dos dados obtidos no Gráfico 13, podemos concluir que o valor do coeficiente de partição ótimo para a atividade antifúngica contra *Aspergillus niger* foi Log P<sup>o</sup> 3,31 que corresponde ao 3,4,5-trihidroxibenzoato de heptila (13). Descartando os valores correspondentes aos galatos de heptila e octila e efetuando uma regressão polinômica no Gráfico 14, obtemos uma correlação de r = 0,99. Com equação polinomial: Y = -0,00369.X<sup>2</sup> + 0,08607.X + 2,77978.

**7.5.8 Dados da atividade antifúngica dos compostos contra *Candida albicans*, *Cândida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*.**



**Gráfico 15 Log 1/[CIM] vs Log P contra *Candida albicans*, *Cândida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* dos compostos (02-18 e 20).**



**Gráfico 16 Log 1/[CIM] vs Log P contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* dos compostos (02,07-12, 17, 18 e 20).**

Os dados plotados no Gráfico 15, nos levam a concluir, que os valores do coeficiente de partição ótimo para a atividade antifúngica contra *Candida albicans*, *Cândida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, esta entre 3,31 a 4,50, que correspondem a faixa de compostos com cadeia alquílica de 7 a 10 carbonos, os compostos (13-15). Descartando os valores referentes aos galatos mais ativos, obtemos no Gráfico 15, uma correlação de  $r = 0,99$ . Com equação polinômica:  $Y = -0,00391 X^2 + 0,08813 X + 2,77735$ .

### 7.5.9 Dados da atividade antifúngica contra *Microsporium canis*.

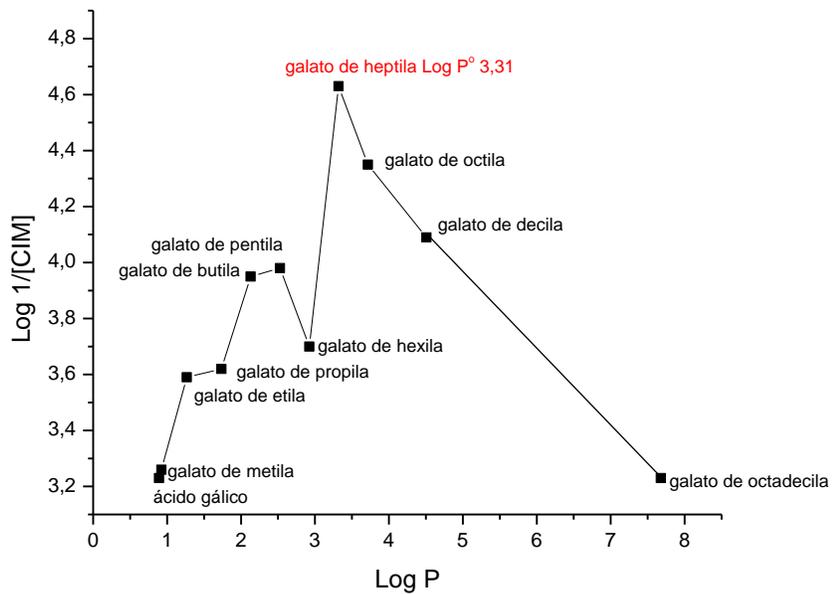
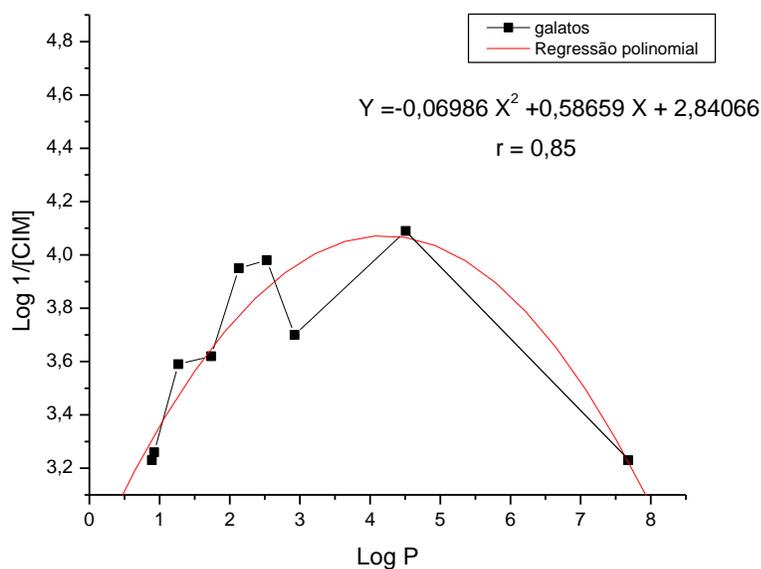


Gráfico 17 Log 1/[CIM] vs Log P contra *Microsporium canis* dos compostos (02,07-15,20).



**Gráfico 18 Log 1/[CIM] vs Log P contra *Microsporum canis* dos compostos (02,07-13, 15,20).**

Segundo o Gráfico 17, podemos concluir que o valor do coeficiente de partição ótimo para a atividade antifúngica contra, *Microsporum canis* é Log P<sup>o</sup> 3,31 que corresponde ao 3,4,5-trihidroxibenzoato de heptila (13). Descartando os valores referentes aos galatos mais ativos (heptila e octila), obtemos no Gráfico 18, uma correlação de r = 0,85. Com equação polinômica: Y = -0,06986 X<sup>2</sup> + 0,58659 X + 2,84066.

### 7.5.10 Dados da atividade antifúngica contra *Microsporium gypseum*.

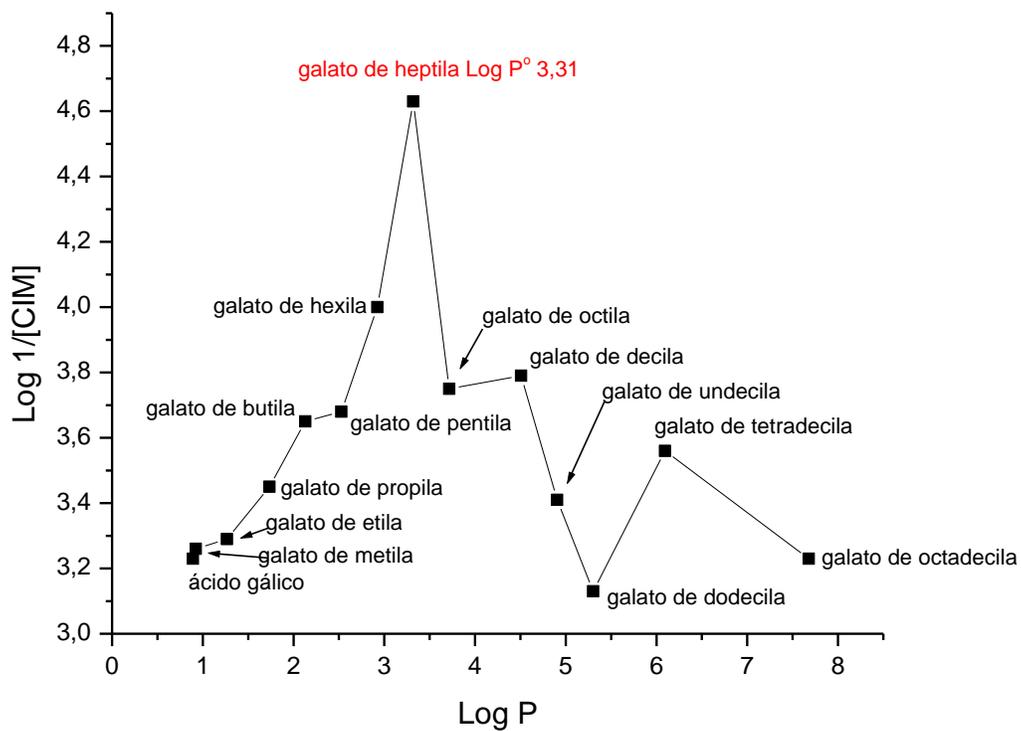
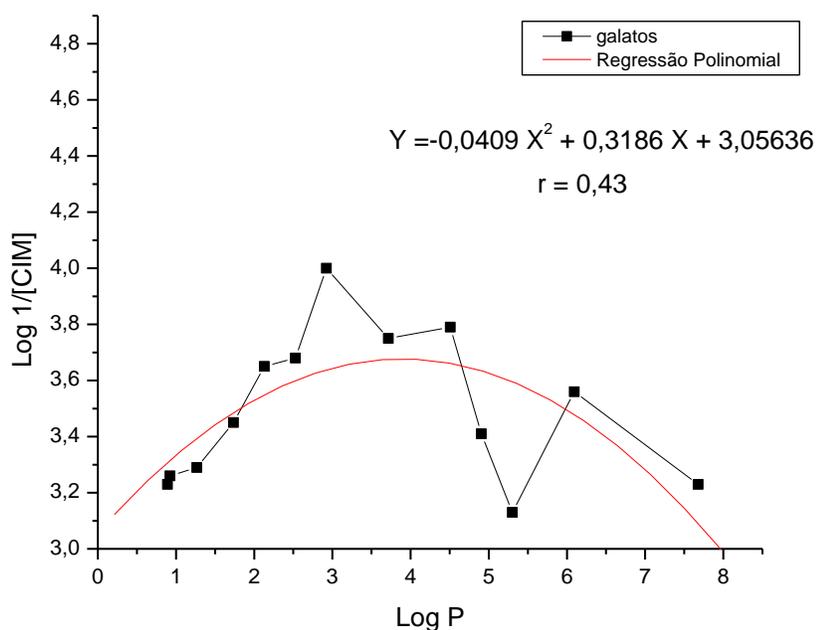


Gráfico 19 Log 1/[CIM] vs Log P contra *Microsporium gypseum*, dos compostos (02,07-18, 20).



**Gráfico 20 Log 1/[CIM] vs Log P contra *Microsporum gypseum*, dos compostos (02,07-12,14-18, 20).**

No Gráfico 19, podemos concluir que o valor do coeficiente de partição ótimo para a atividade antifúngica contra, *Microsporum gypseum*, é o Log P<sup>o</sup> 3,31 que corresponde ao 3,4,5-trihidroxibenzoato de heptila (13). Descartando os valores referentes ao galato mais ativo (heptila), obtemos no Gráfico 20, uma correlação de r = 0,43. Com equação polinômica: Y = -0,0409 X<sup>2</sup> + 0,3186 X + 3,05636.

### 7.5.11 Dados da atividade antifúngica contra *Epidermophyton floccosum*.

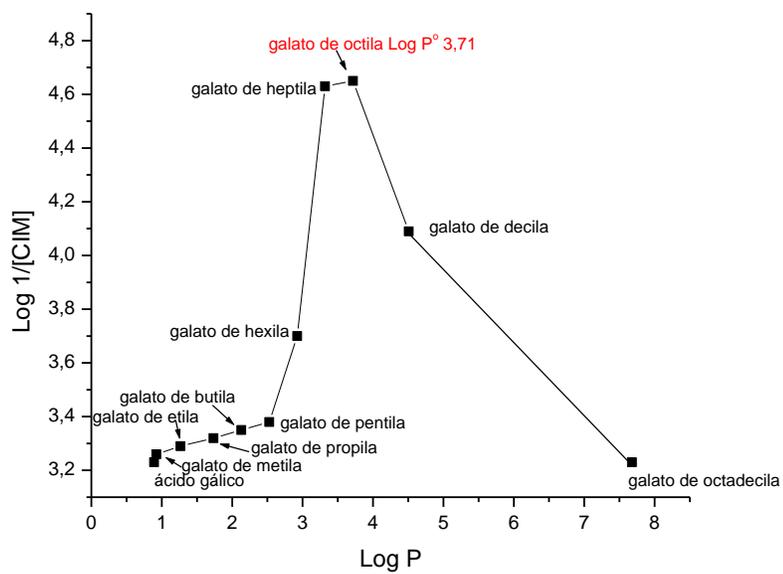
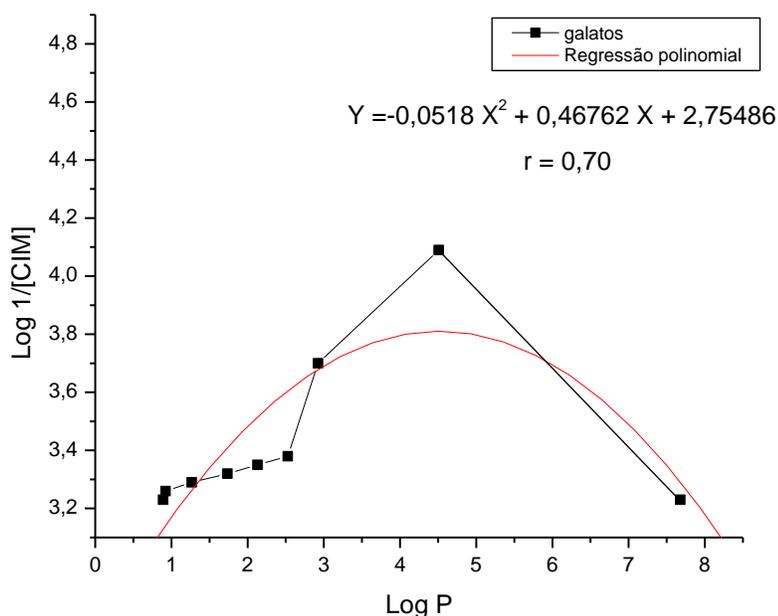


Gráfico 21 Log 1/[CIM] vs Log P contra *Epidermophyton floccosum* dos compostos (02,07-18, 20).



**Gráfico 22 Log 1/[CIM] vs Log P contra *Epidermophyton floccosum* dos compostos (02,07-12, 15-18, 20).**

Observando o perfil do Gráfico 21, podemos concluir que o valor do coeficiente de partição ótimo para a atividade antifúngica contra, *Epidermophyton floccosum* é o Log P<sup>o</sup> 3,71 que corresponde ao 3,4,5-trihidroxibenzoato de octila (14). Descartando os valores referentes aos galatos mais ativos (heptila e octila), obtemos no Gráfico 22, uma correlação de r = 0,43. Com equação polinômica: Y = -0,0518 X<sup>2</sup> + 0,46762 X + 2,75486.

### 7.5.12 Dados da atividade antifúngica contra *Trichophyton rubrum*.

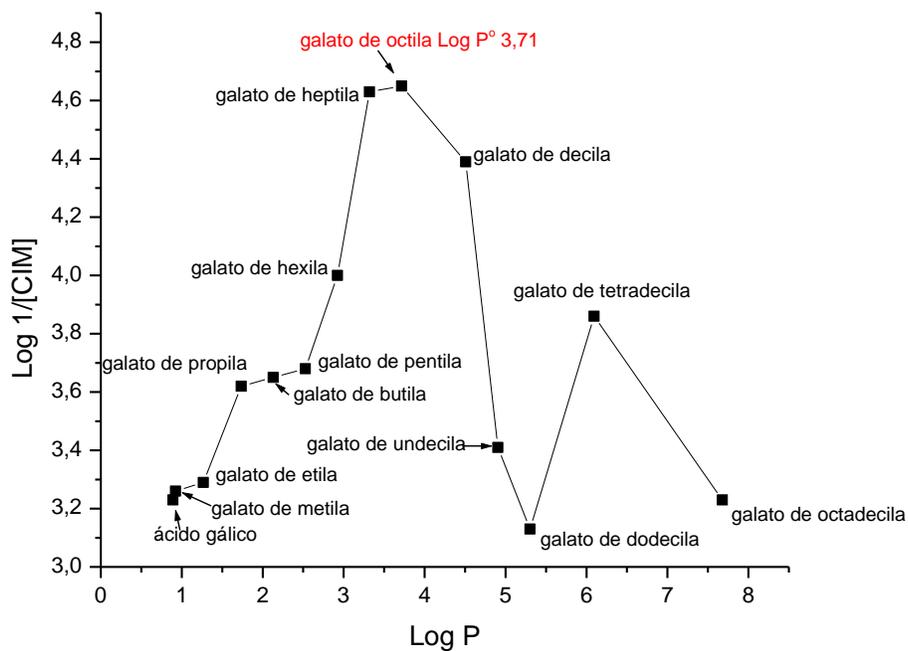
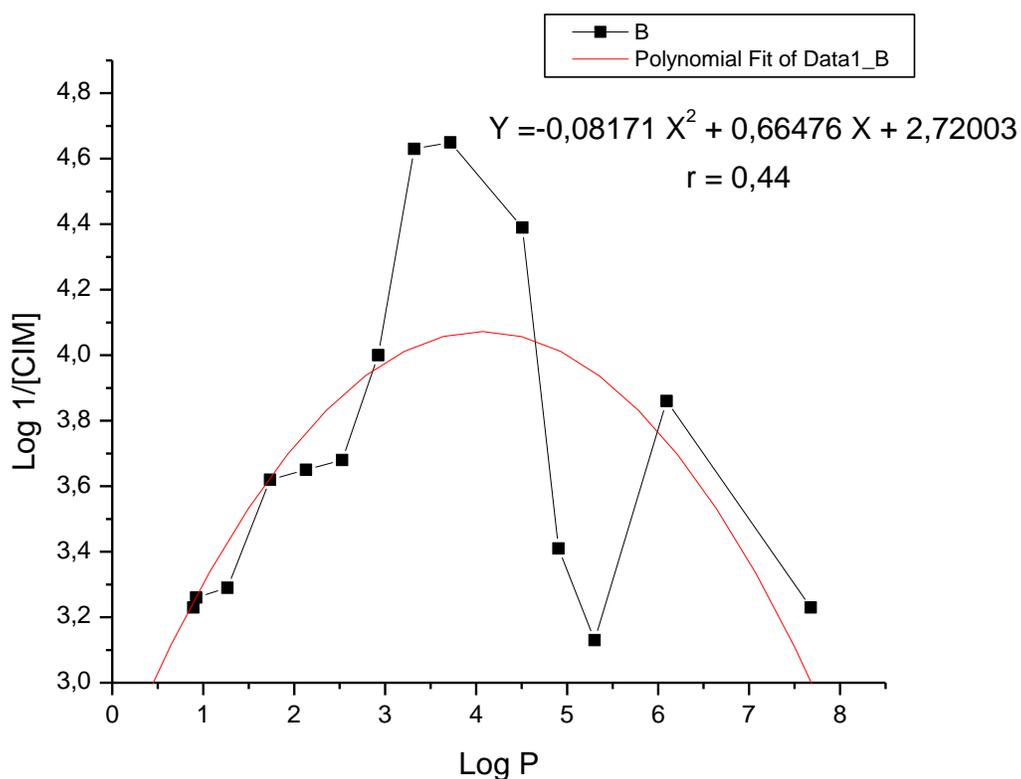


Gráfico 23 Log 1/[CIM] vs Log P contra *Trichophyton rubrum* dos compostos (02,07-18, 20).



**Gráfico 24 Log 1/[CIM] vs Log P contra *Trichophyton rubrum* dos compostos (02,07-18, 20).**

No Gráfico 23, podemos concluir que o valor do coeficiente de partição ótimo para a atividade antifúngica contra *Trichophyton rubrum*, é o Log P<sup>o</sup> 3,71 que corresponde ao 3,4,5-trihidroxibenzoato de octila (14). Efetuando uma regressão polinômica no Gráfico 24, encontramos uma correlação de  $r = 0,44$ . Com equação polinômica:  $Y = -0,08171 X^2 + 0,66476.X + 2,7200$ .

### 7.5.13 Dados da atividade antifúngica contra *Trichophyton mentagrophytes*.

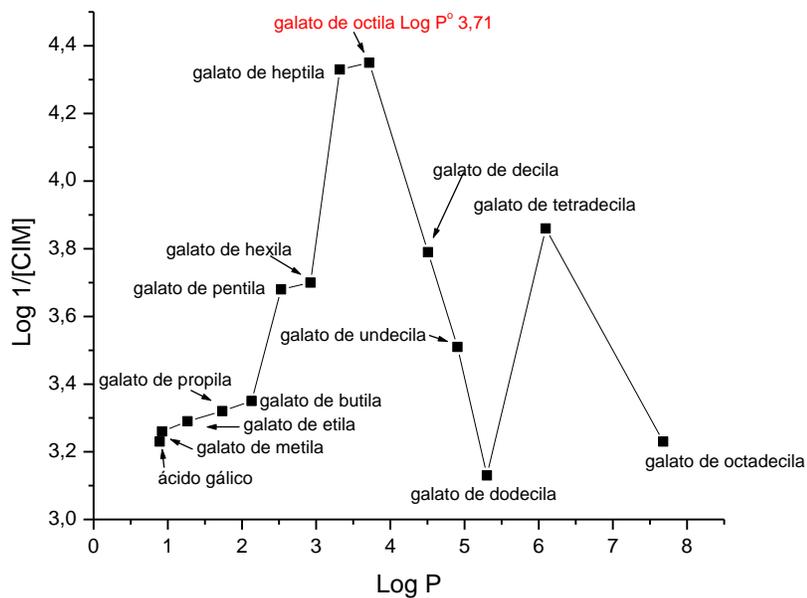
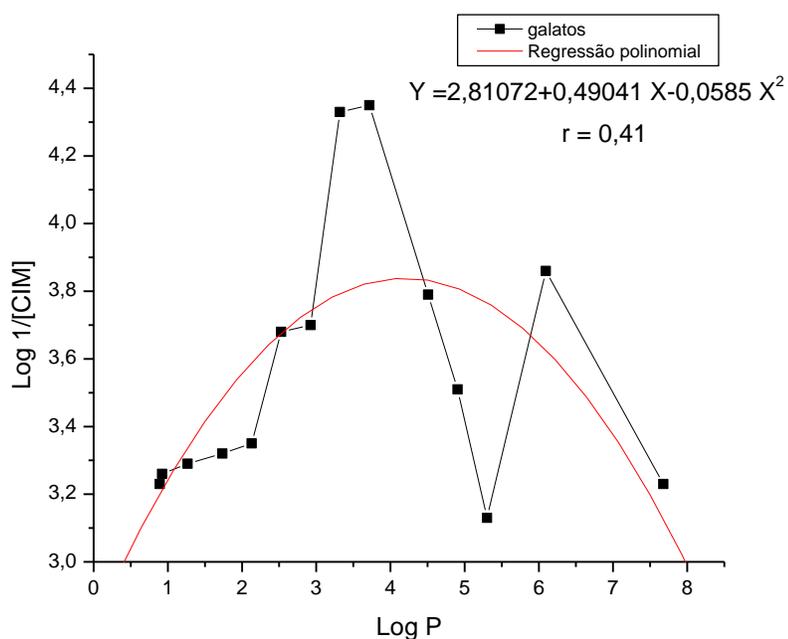


Gráfico 25 Log 1/[CIM] vs Log P contra *Trichophyton mentagrophytes* dos compostos

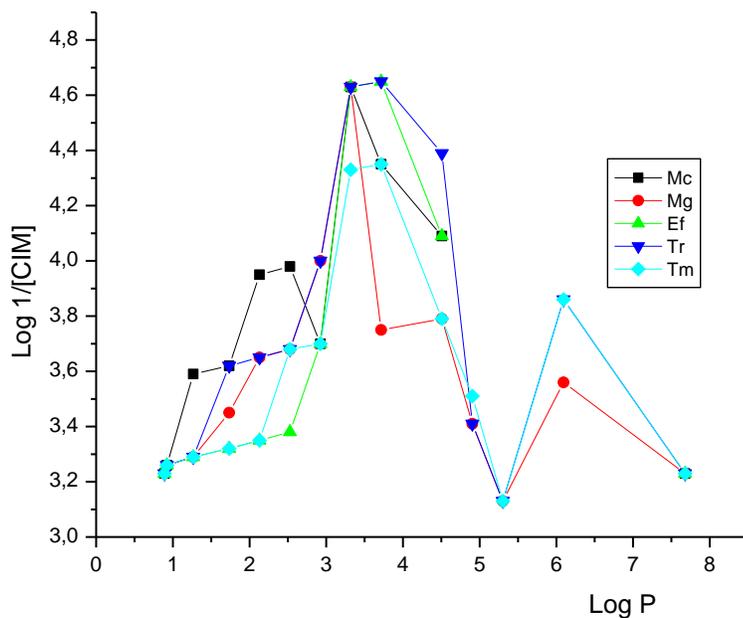
(02,07-18, 20).



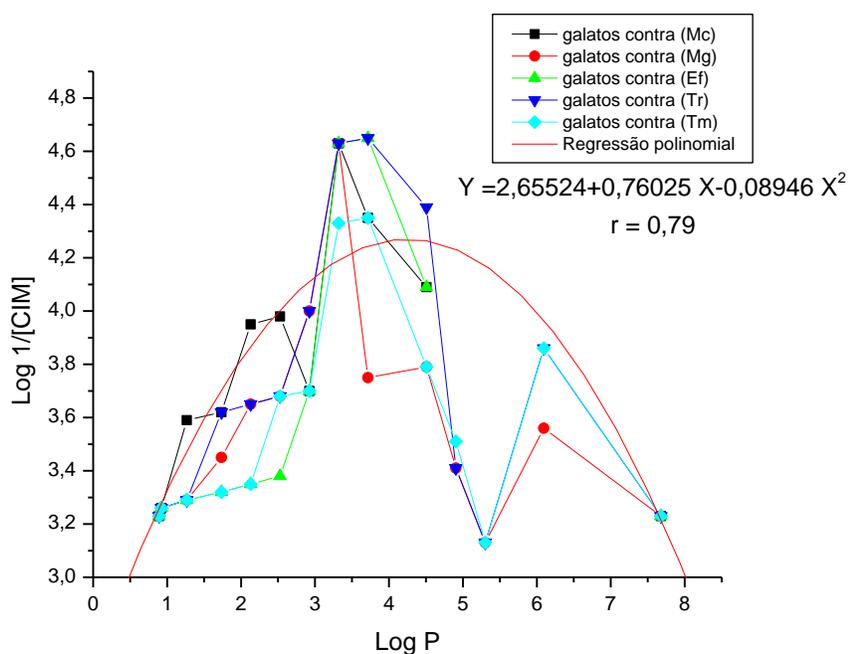
**Gráfico 26 Log 1/[CIM] vs Log P contra *Trichophyton mentagrophytes* dos compostos (02,07-18, 20).**

Conforme o perfil do Gráfico 25, podemos concluir que o valor do coeficiente de partição ótimo para a atividade antifúngica contra *Trichophyton mentagrophytes*, é o Log P<sup>o</sup> 3,71 que corresponde ao 3,4,5-trihidroxibenzoato de octila (14). Efetuando uma regressão polinômica no Gráfico 26, encontramos uma correlação de r = 0,41. Com equação polinômica:  $Y = -0,0585.X^2 + 0,49041.X + 2,81072$ .

**7.5.14 Dados da atividade antifúngica contra *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*.**



**Gráfico 27 Log 1/[CIM] vs Log P contra *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* dos compostos (02,07-18, 20).**



**Gráfico 28 Log 1/[CIM] vs Log P contra *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* dos compostos (02,07-18, 20).**

Segundo Gráfico 28, podemos concluir que os valores do coeficiente de partição ótimo para a atividade antifúngica contra *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* está entre 3,31 a 3,71, que correspondem a faixa de compostos com cadeia alquílica de 7 a 8 carbonos, referente aos compostos: galato de heptila e octila (13,14). Efetuando uma regressão polinômica no Gráfico 26, encontramos uma correlação de  $r = 0,79$ . Com equação polinômica:  $Y = 2,65524 + 0,76025 X - 0,08946 X^2$ .

Fungos estão envolvidos nos processos de fermentação e na manufatura de alimentos como pão, cerveja, vinho, vinagre, queijo, etc. Também estão envolvidos em muitos processos patológicos em humanos e animais. Galatos de propila, octila e dodecila são compostos usados como antioxidantes em alimentos.

O Trabalho de Fujita e Kubo<sup>16</sup> tem demonstrado que a atividade antioxidante não depende do tamanho da cadeia alquílica dos ésteres derivados do ácido gálico. No entanto, eles também afirmam que a atividade antimicrobiana depende da mesma.

O pesquisadores Kubo e colaboradores<sup>47</sup> demonstraram que o efeito dos galatos não é causado pela hidrólise que gera alcoóis de cadeia longa considerando que os benzoatos de alquila, 4-hidroxibenzoatos de alquila e 3,5-dihidroxibenzoatos de alquila não apresentam nenhum efeito antifúngico. Demonstraram também que tanto os 3,4,5-trihidroxibenzoatos como os 3,4-dihidroxibenzoatos apresentam atividade semelhante. Este fato indica que estruturas do tipo catecol (1,2-dihidroxi) ou pirogallol (1,2,3-trihidroxi) estão especialmente associadas à atividade antifúngica. Segundo Kubo e colaboradores, a cabeça e a extremidade do galato de octila é semelhante à estrutura de álcoois graxos (álcoois de cadeia longa). O efeito antifúngico dos álcoois é devido a sua capacidade de quebrar a associação da membrana celular a proteínas como um surfactante não iônico. O galato de octila pode funcionar como um surfactante não iônico que num primeiro momento deve ligar-se por seus oxigênios eletronegativos. Estes oxigênios são aceptores de pontes de hidrogênio que podem quebrar ligações de hidrogênio existentes entre as proteínas que estão

em torno da membrana celular e a mesma membrana. (Outras forças que atuam são a hidrofobicidade e eletrostáticas). As ligações de hidrogênio das proteínas podem ser quebradas pelo galato de octila e assim à conformação das proteínas podem mudar e conseqüentemente a H-ATPase pode perder sua conformação funcional. O efeito do galato de octila seria inespecífico.

Kubo e col. demonstraram estes fatos, mas não estudaram uma ampla faixa de galatos de alquila que permita conhecer a função da hidrofobicidade da cadeia alquílica no efeito antifúngico. Assim eles observaram um fenômeno de perda de potência antifúngica à medida que aumenta o comprimento da cadeia alquílica (fenômeno denominado de “cutoff” no caso dos anestésicos.<sup>\*\*\*</sup>

<sup>\*\*\*</sup>SHING, J. MA, S., KAMAYA, K., UEDA, I. *Anesthesia Cutoff Phenomenon: Interfacial Hydrogen Bonding. Science, v. 24, p. 583-585, 1990.*

Este foi o objetivo fundamental deste trabalho, razão pela qual os galatos foram estudados, desde o galato de metila até o galato de octadecila; para realizar uma correlação entre atividade ( $\text{Log } 1/[\text{CIM}]$ ) e  $\text{Log } P$  ( $\text{Log } P$  que mede a hidrofobicidade). Analisando a curva de  $\text{Log } 1/[\text{CIM}]$  versus  $\text{Log } P$  para *Cândida albicans*, que foi similar a todos os outros fungos estudados. Observamos que existe um comportamento polinômico que vai desde o galato de metila até o galato de hexila; neste ponto com o galato de heptila existe um desvio positivo que atingiu seu máximo no galato de octila e decresce no galato de decila e finalmente volta a um comportamento polinômico apartir do galato de dodecila. Sem

considerar os galatos de heptila, octila e decila a curva da uma correlação muito boa ( $r = 0,99$ ) com a equação polinômica:  $y = -0,00377.X^2 + 0,08682.X + 2,77891$ .

Este comportamento demonstra que os galatos de heptila, octila e decila apresentam outro mecanismo de ação a mais do que aquele que é comum a todos os galatos é que não existe até o galato de octadecila o fenômeno de “cutoff” indicado por Kubo e colaboradores. Este fenômeno possivelmente possa ser observado com ésteres de cadeia alquílica maior.

O mecanismo comum pode ser interpretado, considerando sua correlação com Log P, como uma ruptura da associação da membrana celular e com as proteínas ao seu redor e assim algumas das funções como as da H-ATPase podem ser prejudicadas.

Os pesquisadores Fujita e Kubo demonstraram que a inibição da H-ATPase da membrana plasmática não pode explicar sozinha o efeito fungicida do galato de nonila. Também demonstraram que os galatos inibem a respiração de oxigênio via a interferência com o transporte de elétrons na mitocôndria. Este efeito também não explica o efeito antifúngico.

A diferença de quase 10 vezes na atividade do galato de octila frente ao galato de hexila em quase todos os fungos e o aumento da atividade de somente 04 galatos muito similares seriam indicativo de um efeito sobre alguma enzima. Abe e col.<sup>15</sup> demonstraram que ésteres do ácido gálico (galato de etila, octila, dodecila e caprila) inibem a esqualeno-epoxidase recombinante de ratos. Isto nos leva a pensar que os galatos de heptila, octila, nonila e decila podem atuar por

inibição de alguma oxigenase inibindo a síntese do ergosterol e assim danificando a membrana celular o qual explicaria parte do efeito antifúngico destes compostos.

## 8.0 CONCLUSÕES

Foram sintetizados 17 compostos derivados do ácido gálico com bons rendimentos e foram testados contra alguns fungos patogênicos.

Todos os compostos sintetizados foram purificados e analisados por modernas técnicas espectroscópicas (IV, GC-MS e RMN  $^1\text{H}$ ) a fim de garantir sua identidade.

Diante dos resultados obtidos, podemos afirmar quais são os valores do coeficiente de partição ótimo para cada fungo e também o tamanho da cadeia alquílica a qual corresponde tal atividade.

Considerando que a atividade antifúngica dos derivados do ácido gálico esteja relacionada diretamente com a parte fenólica, o incremento no tamanho da cadeia alquílica também é um dos fatores importantes para tal atividade.

Para os derivados onde as hidroxilas fenólicas (3,4,5) foram protegidas, observou-se que sua atividade frente aos fungos não foi satisfatória, provando assim a grande importância da porção fenólica na atividade antifúngica.

O galato de heptila foi mais ativo que a Anfotericina e Cetoconazol para alguns fungos, mesmo que estes tenham mecanismos de ação diferentes, seja eles inibindo a síntese do ergosterol ou atuando na membrana plasmática do fungo.

Com os dados levantados neste trabalho podemos nos orientar para a síntese de novas substâncias mais ativas contra fungos, pois existe um consenso mundial de que necessitamos o mais rápido possível de moléculas mais eficientes e mais seguras para o uso em clínica médica.

Novos estudos serão realizados contra alvos específicos para determinar em que via do metabolismo os galatos estão atuando.

O ácido gálico mostrou-se um bom modelo de produto natural para a síntese de compostos antifúngicos.

## 9.0 REFERÊNCIAS

- 01- WERMUTH, C. G. The Practice of Medicinal Chemistry. San Diego, Academic Press Inc., 1996, p. 03-10.
- 02- MARKER, R. E., WAGNER R. B., ULSHAFFER, P. R., WITTBECKER, E. L., GOLDSMITH, D. P. J.; RUOF, C. H. Steroidal Sapogenins. J. Am. Chem. Soc., v. 69, p. 2167-2230, 1947.
- 03- AVEDANÕ, C. Introducci3n a la Qu3mica Farmac3utica. 2 ed., Espa1a, McGraw-Hill. Interamericana de Espa1a, 2001, p. 746.
- 04- YUNES, R. A., CALIXTO, J. B. Plantas Medicinai: sob a 3tica da Qu3mica Medicinal Moderna. Chapec3, Argos - Editora Universit3ria UNOESC, 2001, p. 436-479.
- 05- SIM3ES, C. M. O. Farmacognosia: da planta ao medicamento, 3 ed., Porto Alegre / Florian3polis, UFRGS / UFSC, 2001, P. 125-148, 527-554.
- 06- KUBO, I. Molecular design of antioxidative and antimicrobial agents. Chemtech, v. 29, p. 37-42, 1999.
- 07- VAN DER MEEREN, H. L. Dodecyl gallate, permitted in food, is a strong sensitizer. Contact Dermatitis, v. 16, p. 260-262, 1987.

- 08- NAKAYAMA, T., HIRAMITSU, M., OSAWA, T., KAWAKISHI, S. The protective role of gallic acid esters in bacterial cytotoxicity and SOS responses induced by hydrogen peroxide. *Mutation Research*, v. 303, p. 29-34, 1993.
- 09- MASAKI, H., OKAMOTO, N., SAKAI, S., SAKURAI, H. Protective effects of hydroxybenzoic acids and their esters on cell induced by hydroxyl radicals and hydrogen peroxides. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 20, p. 304-308, 1997.
- 10- SERRANO, A., PALÁCIOS, C., ROY, G., CESPON, C., VILLAR, M. L., NOCITO, M., GONZALEZ-PORQUE, P. Derivatives of gallic acid induces apoptosis in tumoral cell lines and inhibits lymphocyte proliferation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 350, p. 49-54, 1998.
- 11- SAKAGUCHI, N., INOUE, M., ISUZUGAWA, K., OGIHARA, Y., HOSAKA, K. Cell death-inducing activity by gallic acid derivatives. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 22, p. 471-475, 1999.
- 12- KUBO, I., MUROI, H., KUBO, A. Structural functions of antimicrobial long-chain alcohols and phenols. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 3, p. 873-880, 1995.
- 13- FUJITA, K., KUBO, I. Plasma membrane injury induced by nonyl gallate in *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Applied Microbiology*. v. 92, P. 1035-1042, 2002.

- 14- KUBO, I., MASUOKA, N., XIAO, P., HARAGUCHI, H. Antioxidant Activity of Dodecyl Gallate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 3533-3539, 2002.
- 15- KUBO, I., XIAO, P., FUJITA, K. Antifungal Activity of Octyl Gallate: Structural Criteria and Mode of Action. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 11, p. 347-350, 2001.
- 16- MURASE, T., KUME, N., HASE, T., SHIBUYA, Y., NISHIZAWA, Y., TOKIMITSU, I., KITA, T. Gallates Inhibit Cytokine-Induced Nuclear Translocation of NF- $\kappa$ B and Expression of Leukocyte Adhesion Molecules in Vascular Endothelial Cells. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, v. 19, p. 1412-1420, 1999.
- 17- ABE, I., SEKI, T., NOGUCHI, H. Potent and Selective Inhibition of Squalene Epoxidase by Synthetic Galloyl Esters. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 270, p. 137-140, 2000.
- 18- FUJITA, K., KUBO, I. Antifungal activity of octyl gallate. *International Journal of Food Microbiology*, v. 79, p. 193-201, 2002.
- 19- NAKAMURA, E., KURASAKI, F., ARISAWA, M., MUKAINAKA, T., OKUDA, M., TOKUDA, H., NISHINO, H., PASTORE JR, F. Cancer chemo preventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. *Cancer Letters*, v. 177, p. 119-124, 2002.

- 20- ABE, I., KASHIWAGI, Y., NOGUCHI, H. Vertebrate Squalene Epoxidase by Isoprenyl Gallates and Phenylalkyl Gallates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 10, p. 2525-2528, 2000.
- 21- SAEKI, K., YOU, A., ISEMURA, M., ABE, I., SEKI, T., NOGUCHI, H. Apoptosis-inducing activity of lipid derivatives of gallic acid. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 23, p. 1391-1394, 2000.
- 22- ABE, I., KASHIWAGI, K., NOGUCHI, H. Antioxidative galloyl esters as enzyme inhibitors of p-hydroxybenzoate hydroxylase. *Febbs Letters*, v. 483, p. 131-134, 2000.
- 23- STRIPOLLI, V., D'AURIA, F. D., TECCA, M., CALLARI, A., SIMONETTI, G. Propyl gallate increases *in vitro* antifungal imidazole activity against *Candida albicans*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 16, p. 73-76, 2000.
- 24- ORTEGA, E., SADABA, M. C., ORTIZ, A. I., CESPON, C., ESCOLANO, J. M., ROY, G., VILLAR, L. M., PORQUE-GONZALEZ, P. Short Communication: Tumoricidal activity of lauryl gallate towards chemically induced skin tumors in mice. *British Journal of Cancer*, v. 88, p. 940-943, 2003.
- 25- LETELIER, M. E., RODRIGUEZ, E., WALACE, A., LORCA, M., REPETTO, Y., MORELLO, A., ALDUNATE, J. Trypanosome cruzi: A possible control of transfusion-induced chagas disease by phenolic antioxidants. *Experimental Parasitology*, v. 71, p. 357-363, 1990.

- 26- KOIDE, T., NOSE, M., INOUE, M., OGIHARA, Y., YABU, Y., OHTA, N. Trypanocidal Effects of Gallic Acid and related Compounds. *Planta Medica*, v. 64, p. 27-30, 1998.
- 27- BISIGNANO, G., SANOGO, R., MARINO, A., AQUINO, R., D'ANGELO, V., GERMANO, M. P., DE PASQUALE, R., PIZZA, C. Antimicrobial activity of *Mitracarpus scaber* extract and isolated constituents. *Letters in Applied Microbiology*, v. 30, p. 105-108, 2000.
- 28- ANMAX, INC., San Francisco, CA., United States, WACHER, V. J., BENET, L. Z. Use of Gallic Acid Esters to Increase bioavailability of Orally Administered Pharmaceutical compounds. United States Patent – 6,180,666 B1, 30 jan. 2001. Instituto Nacional de Propriedade Intelectual.
- 29- LIN, H. X., ZHANG, L. X., CHENG, L. S. The Synthesis of Gallic Esthers of Higher Fatty Alcohols under Solvent-Free Conditions Using Microwave Irradiation. *Chinese Chemical Letters*, v. 10, p. 915-916, 1999.
- 30- BASF AKTIENGESELLSCHAFT, Ludwigshafen, Fed. Rep. of Germany, HIRSCHBERG, W. R., MUTTERSTADT, H. N. Preparation of Alkyl Gallates. United States Patent - 4,4613,683, 23 September 1986. *United States Patent and Trademark Office*.
- 31- CORNING GLASS WORKS, Houghton Park, New York, United States WEETALL, H. H. Enzymatic synthesis of gallic acid esters. *European*

Patent Application – 0137601, 19 de July 1984. Instituto Nacional de Propriedade Intelectual.

- 32- KUBO, I., CHEN, Q., NIHEI, K. Molecular design of antibrowning agents: antioxidative tyrosinase inhibitors. *Food Chemistry*, V. 81, P. 241-247, 2003.
- 33- Sharma, S., Gupta, M. N. Synthesis of Antioxidant Propyl Gallate Using Tannase from *Aspergillus niger* van Teighem in Nonaqueous Media. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 13, p. 395-397, 2003.
- 34- KUBO, I., FUJITA, K., NIHEI, K., MASUOKA, N. Non-antibiotic Antibacterial Activity of Dodecyl Gallate. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 11, p. 573-580, 2003.
- 35- KROGH, R., YUNES, R. A., ANDRIOCOPULO, A. D. Structure-activity relationships for the analgesic activity of gallic acid derivatives. *Short Communications, Il Farmaco*, v. 55, p. 730-735, 2000.
- 36- MICHEREFF, S. J. Fungos como agentes de Doenças de Plantas. UFRP, Depto. Agronomia, Fitopatologia, [online]. Disponível em: <http://www.ufrpe.br:6789/fitopatologia/Fungos%20como%20Agentes%20de%20Doen%20E7as%20de%20Plantas.pdf> Acesso em: 11 de Janeiro 2004.

- 37- RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M. Farmacologia. 4<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001, p. 605.
- 38- VERONESI, R., FOCACCIA, R. Tratado de Infectologia. São Paulo, Atheneu, 1996, p. 1015-1016.
- 39- Fotografia de um paciente soropositivo com candidíase oral: [online]. Disponível em: <<http://www.soropositivo.org/fatos/sadebuca.htm>> Acesso em: 11 de Janeiro de 2004.
- 40- AMARAL, A.T., OLIVEIRA, A. C., NEIDLEIN, R., GALLACCI, M., CAPRARA, L., MIYAZAKI, Y., Physicochemical parameters involved in the lethal toxicity of N,N-[(dimethylamino)ethyl]-4-substituted benzoate hydrochlorides: a QSAR study. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 32, p. 433-443, 1997.
- 41- RAMINELLI, C., SIQUEIRA, L. J. A., POLICASTRO, D. S., MALVEZZI, A., BRUNS, R. E., AMARAL, A. T. Resumo 23<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Planejamento Fatorial para estudo da Influência das interações intramoleculares na lipofilicidade de análogos da procainamida. Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, USP, Instituto de Química, UNICAMP, 2000, [online]. Disponível em: <<http://www.s bq.org.br/ranteriores/23/resumos/0183/>> Acesso em: 11 de Janeiro de 2004.

- 42- GRAHAM, L. P. Introduction to Medicinal Chemistry. New York, Oxford University Press, 1995, p. 129-133.
- 43- ARMAREGO, WILFRED, L.F.; CHAI, CHRISTINA, L.L. Purification of Laboratory Chemicals (5th Edition). Elsevier, 2003.
- 44- KROGH, R. Identificação Química e Estudos Farmacológicos dos Constituintes da Espécie *Ipomoea pé-caprae* (Convolvulaceae). Estudos em Química Medicinal de Análogos do Ácido Gálico. 2001. 160 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2001.
- 45- MAUTHNER, F. Trimethylgallic Acid. Organic Syntheses, CV 1, p. 537, 1941.  
[online]:Disponível em:  
<[http://www.orgsyn.org/orgsyn/default.asp?formgroup=basenp\\_form\\_grou p&dataaction=db&dbname=orgsyn](http://www.orgsyn.org/orgsyn/default.asp?formgroup=basenp_form_grou p&dataaction=db&dbname=orgsyn)> Acesso em: 11 de Janeiro de 2004.
- 46- VOGEL, A. I. A Text-Book of Practical Organic Chemistry. 3 ed., John Wiley & Sons Inc., 1966, p. 780-782.
- 47- KEMIN INDUSTRIES, INC., Des Moines, IA, United States, SAS, B., COPPENS, B., VAN HEMEL, J. Method of synthesizing Alkyl Gallates. Patente: (World Intellectual Property Organization) WO 01/30299 A2, 03 de Maio de 2003. Instituto Nacional de Propriedade Intelectual.

- 48- TOOLS FOR STRUCTURE ACTIVITY RELATIONSHIPS. (TSAR 3D), Oxford Molecular Ltd, Copyright © 2000.
- 49- KUBO, I., XIAO, P., FUJITA, K. Antifungal activity of octyl gallate: Structural criteria and mode of action. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 3, p. 347-350, 2001.
- 50- GOTTILLIB, H. E., KOTLYAR, V., NUDELMAN, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *Journal Organic Chemistry*, v. 62, p. 7512-7515, 1997.

## 10 Anexos

Anexo 01 - Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN do ácido 3,4,5-trimetoxibenzóico (05), 3,4,5-trimetoxibenzoato de etila (06), 3,4,5-trihidroxibenzoato de dodecila (17) e espectro no infravermelho do 3,4,5-trihidroxibenzoato de undecila (16).

Os deslocamentos referentes aos traços dos solventes.<sup>50</sup>

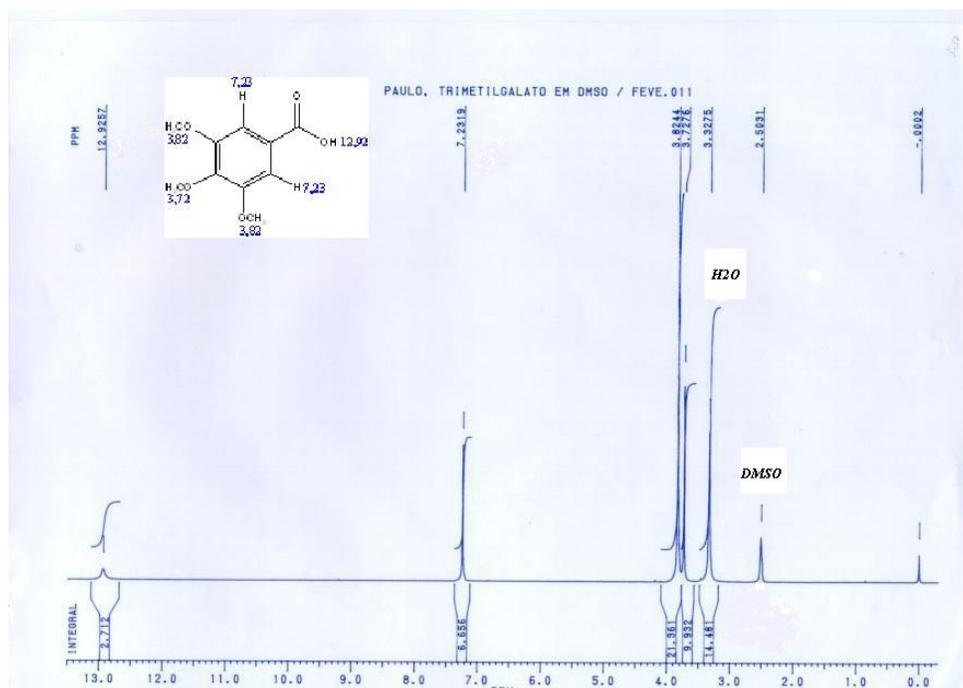


Figura 35 Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do ácido 3,4,5-trimetóxi-benzóico em DMSO- $\text{d}_6$ .

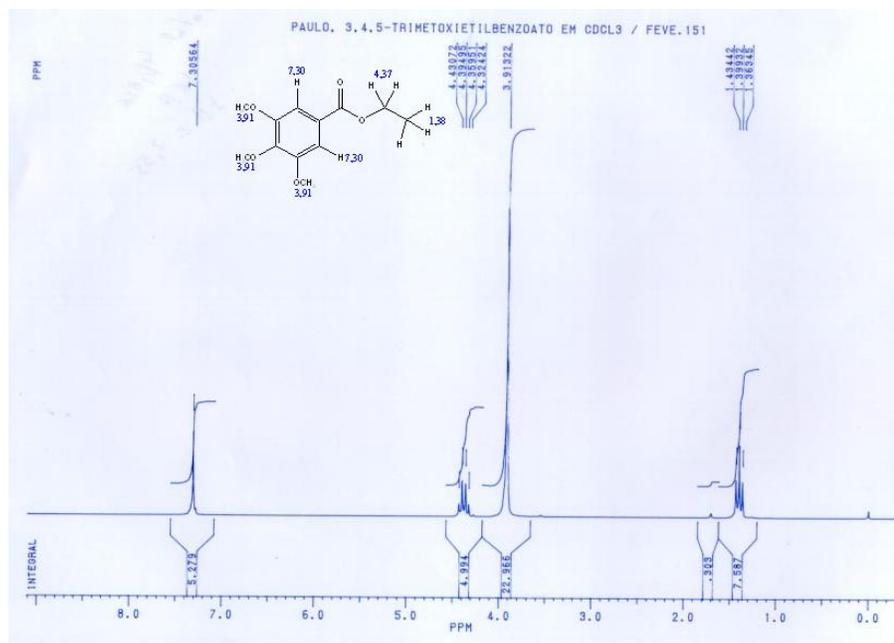


Figura 36 Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do 3,4,5-trimetóxicoato de etila em  $\text{CDCl}_3$ .

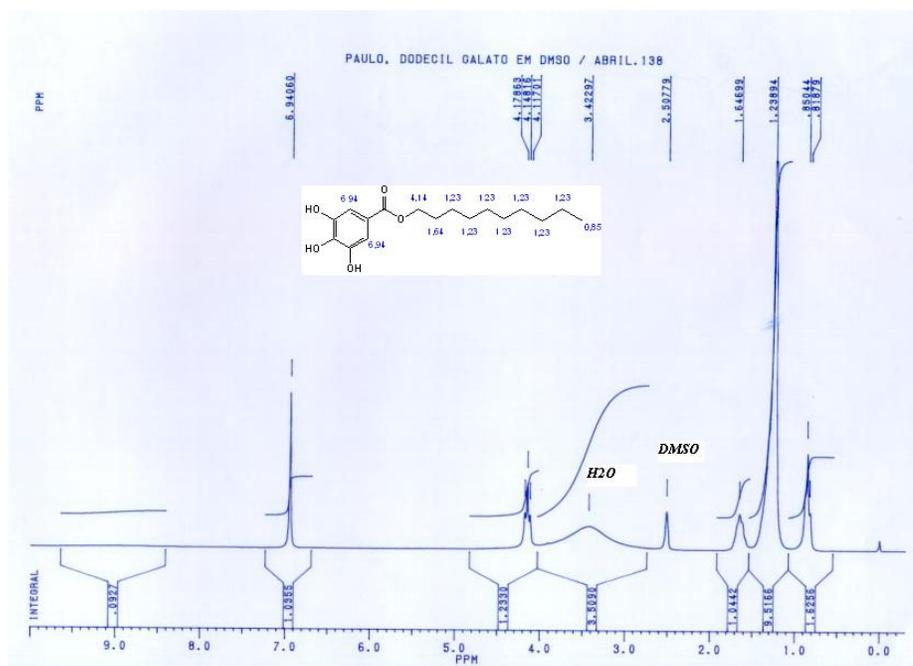


Figura 37 Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do 3,4,5-trihidroxiato de dodecila em  $\text{DMSO-d}_6$ .

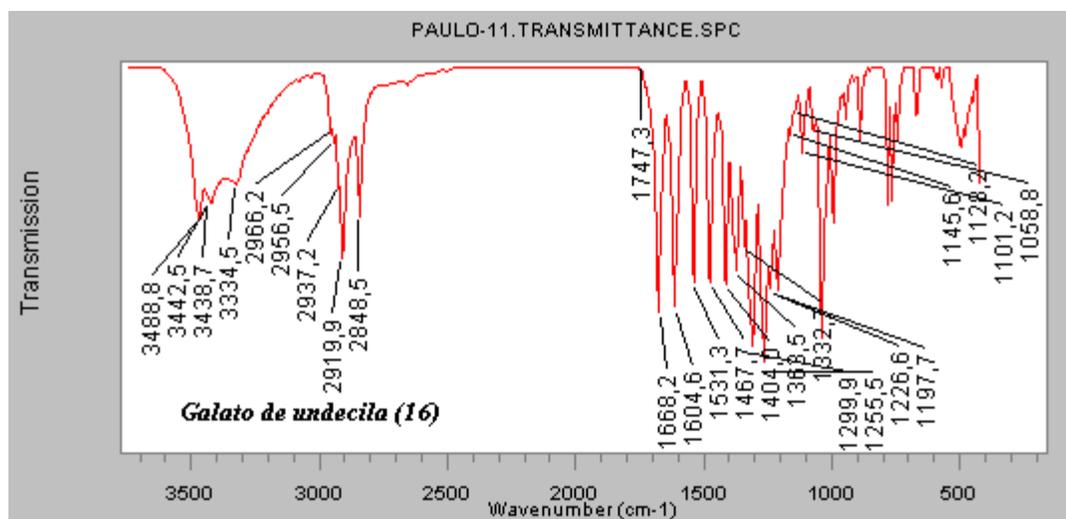


Figura 38 Espectro no *infravermelho* do 3,4,5-trihidroxibenzoato de undecila em pastilha de KBr.