



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FABRÍCIO AMARO AGUIAR DE OLIVEIRA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTIBACTERIANA DE
DERIVADOS DO CARVACROL**

Londrina
2020

FABRÍCIO AMARO AGUIAR DE OLIVEIRA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTIBACTERIANA DE
DERIVADOS DO CARVACROL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Mestrado em Química - Área de concentração Química Orgânica, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marcelle de Lima Ferreira Bispo

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Carla Cristina Perez

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

F126 Oliveira, Fabrício Amaro Aguiar de Oliveira.
SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTIBACTERIANA DE DERIVADOS DO CARVACROL / Fabrício Amaro Aguiar de Oliveira Oliveira. - Londrina, 2020.
128 f.

Orientador: Marcelle de lima Ferreira Bispo.
Coorientador: Carla Cristina Perez.
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2020.
Inclui bibliografia.

1. Síntese orgânica - Tese. 2. Química medicinal - Tese. 3. Avaliação biológica - Tese. I. de lima Ferreira Bispo, Marcelle. II. Cristina Perez, Carla. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

CDU 54

FABRÍCIO AMARO AGUIAR DE OLIVEIRA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTIBACTERIANA DE
DERIVADOS DO CARVACROL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Mestrado em Química - Área de concentração Química Orgânica, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Química.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Marcelle de Lima Ferreira Bispo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Alexandre Orsato
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Renato Márcio Ribeiro Viana
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
UTFPR

Londrina, 13 de março de 2020.

À Deus, meu pai celestial que sempre me estendeu sua mão ajudadora.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dra. Marcelle de Lima Ferreira Bispo, que aceitou me orientar nesse projeto, sem mesmo me conhecer e me transmitiu uma quantidade enorme de conhecimento e com muita paciência me acompanhou de perto em cada etapa;

À Prof.^a Dra. Carla Cristina Perez, por co-orientar esse projeto da melhor maneira possível com conhecimentos valiosos;

Aos membros da banca professor Dr. Alexandre Orsato e professor Dr. Renato Márcio Ribeiro Viana, meu muito obrigado pelas contribuições;

À Universidade Estadual de Londrina pelo espaço físico e ter me acolhido com amor, bem como a todos os professores que contribuíram para a minha formação;

A todos os colegas do Laboratório de Síntese de Moléculas Mediciniais (LaSMMed) pelo companheirismo, em especial meu amigo Wellington Silva pela amizade, e todo conhecimento que me transmitiu;

A todos os laboratórios que contribuíram com empréstimos de reagentes e equipamentos, como o Laboratório de Propriedade e Síntese de Substâncias Orgânicas (LAPSSO), e ao laboratório de Espectroscopia (ESPEC) pela obtenção dos espectros.

À Dra. Maria Cristina da Silva Lourenço do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI/FIOCRUZ – Rio de Janeiro) pelos ensaios biológicos bem como aos profissionais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina (CCB-UEL);

À toda minha família, que sempre me apoiou a seguir em frente;

Principalmente agradeço imensamente ao meu criador, meu pai celestial pela vida.

A todos que de um modo geral contribuíram para a realização desse trabalho, meu muito obrigado!

À bolsa concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Pois os dias do meu povo serão como os dias de uma árvore, e meus escolhidos tirarão pleno proveito do trabalho das suas mãos”.

Isaias 65:22b

Oliveira, F.A.A. de. **Síntese e avaliação antibacteriana de derivados do carvacrol**. 2020. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2020.

RESUMO

A tuberculose, causada pela micobactéria aeróbica *Mycobacterium tuberculosis*, é a principal doença infecciosa de origem bacteriana no mundo. Somente em 2018, cerca de 10 milhões de pessoas foram acometidas pela TB em todo o mundo, ocasionando aproximadamente 1,5 milhões de óbitos, sendo 251 mil desses em pessoas portadoras do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Além da saúde pública, outro setor afetado pela ação de micro-organismos é o do agronegócio. Nesse contexto, pode-se citar o cancro cítrico, causado pela bactéria Gram-negativa *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, que vem alertando pesquisadores e entidades governamentais, principalmente no Brasil, maior produtor mundial de laranja, além da mancha bacteriana em leguminosas como feijão e soja, causada por cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e a *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalyptorum* que causa grande prejuízo em plantações de eucalipto devido a mancha bacteriana. Diante desse contexto socioeconômico, a busca por substâncias com atividade biológica frente a esses patógenos faz-se necessária e urgente. Dados recentes da literatura relatam uma importante atividade antimicrobiana do monoterpene fenólico conhecido como carvacrol. Nesse sentido, este trabalho propõe a síntese de ésteres do carvacrol, que apresentam substituintes na porção acíclica com características estereoelétricas diversas, visando a realização de um estudo da relação estrutura-atividade. Esses derivados foram sintetizados usando diferentes metodologias para as reações de esterificação. Sendo assim, foram obtidos doze ésteres do carvacrol em rendimentos que variaram de 14 a 87%, sendo nove derivados benzoilados, dentre os quais seis são inéditos na literatura, um derivado acetilado e um derivado híbrido com o ácido *trans*-cinâmico. Todos os derivados obtidos foram devidamente caracterizados por ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas. Com relação à atividade antimicobacteriana, todos os derivados foram avaliados pelo método de microdiluição em caldo, usando o corante vital Alamar Blue. Os resultados mostraram que o derivado que contém o grupo metoxila na posição 2 do grupo benzoila apresentou uma concentração inibitória mínima (CIM) igual a 50 µg mL⁻¹, o que pode ser considerado um importante ponto de partida para o planejamento de novos derivados ainda mais ativos frente ao *M. tuberculosis*. Todas as substâncias sintetizadas ainda serão avaliadas frente às diferentes cepas de *Xanthomonas axonopodis*.

Palavras-chave: Carvacrol, tuberculose, agentes antibacterianos, fitopatógenos, agricultura.

OLIVEIRA, F.A.A. DE. **Synthesis and antibacterial evaluation of carvacrol derivatives.** 2020. Dissertation (master's degree in chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2020.

ABSTRACT

Tuberculosis, caused by the aerobic mycobacterium *Mycobacterium tuberculosis*, is the main infectious disease of bacterial origin in the world. In 2018, around 10 million people were affected by TB worldwide, causing approximately 1.5 million deaths, among that 251 thousand in people with the human immunodeficiency virus (HIV). In addition to public health, another sector affected by the action of microorganisms is that of agribusiness. In this context, it can be mentioned the citric cancer, caused by the gram-negative bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, which has been alerting researchers and government entities, mainly in Brazil, the world's largest orange producer. Other important phytopathogens are *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, which causes the bacterial stain in vegetable such as beans and soybeans, and *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalyptorum* that causes great damage in eucalyptus plantations. Given this socioeconomic context, the search for substances with biological activity against these pathogens is necessary and urgent. Recent data from the literature report an important antimicrobial activity of the phenolic monoterpene known as carvacrol. In this sense, this work proposes the synthesis of carvacrol esters, which have substituents in the acyl portion with different stereoelectronic characteristics, aiming to carry out a structure-activity relationship study. These derivatives were synthesized by different methodologies for the esterification reactions. Thus, twelve carvacrol esters were synthesized in a range of yields from 14 to 87%, among that nine benzoyl derivatives, one acetylated derivative and a hybrid derivative with trans-cinnamic acid. All derivatives obtained were properly characterized by nuclear magnetic resonance and mass spectrometry. Regarding antimycobacterial activity, all derivatives were evaluated by the broth microdilution method, using the vital dye Alamar Blue. The results showed that the derivative containing the methoxyl group at 2 position of the benzoyl group showed a minimum inhibitory concentration (MIC) of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, which can be considered an important starting point for planning more active derivatives against *M. tuberculosis*. All synthesized substances will still be evaluated against the different strains of *Xanthomonas axonopodis*.

Key-words: Carvacrol, tuberculosis, antibacterial agents, phytopathogens, agriculture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Parede celular de bactérias: A) Gram-negativas; B) Gram-positivas; C) Micobactérias	17
Figura 2 – Detecção fluorescente quantitativa do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	19
Figura 3 – Estruturas de fármacos utilizados no tratamento anti-TB: a) Estreptomicina e ácido <i>para</i> -aminossalicílico; b) Isoniazida e Pirazinamida e c) Rifampicina e Etambutol.....	21
Figura 4 – Estruturas dos fármacos de segunda escolha mais comumente utilizados no tratamento anti-TB: a) Capreomicina e etionamida; b) Levofloxacina e Amicacina.....	23
Figura 5 – a) sintomas do cancro cítrico b) mancha bacteriana em leguminosa c) mancha bacteriana na folha de eucalipto.....	25
Figura 6 – Possíveis mecanismos de ação do carvacrol: a) entrada do carvacrol em uma célula microbiana promove efeitos no citoplasma; b) alterações na membrana externa, composição química e desequilíbrio na hidrólise e síntese de ATP; c) desintegração da membrana externa em bactérias Gram-negativas	31
Figura 7 – Planejamento estrutural dos derivados do carvacrol com potencial atividade antimicrobiana frente ao <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e/ou às cepas de <i>Xanthomonas</i>	48
Figura 8 – Expansão do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da região de baixo campo do derivado 1d impuro.	57
Figura 9 – Expansão do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da região de alto campo do derivado 1d impuro	58
Figura 10 –Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do produto obtido na tentativa de síntese do derivado 4	60
Figura 11 – Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do derivado 1f	64
Figura 12 – Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) do derivado 1f	66
Figura 13 – Espectro de HSQC ampliado da região dos aromáticos do derivado 1f	67
Figura 14 – Espectro de HSQC ampliado da região de alto campo do derivado 1f	68

Figura 15 –Espectro de DEPT-135 do derivado 1f	69
Figura 16 – Espectro de DEPT-90 do derivado 1f	69
Figura 17 –Espectro de massas do derivado 1f por espectrômetro de massas acoplado a cromatografia gasosa (CG-EM).	72
Figura 18 – Reação de oxirredução do sal de resazurina promovida por células do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> que ocorre no método de Alamar Blue	73

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 Biossíntese de terpenóides: a) Rota do mevalonato; b) Rota do metileritritolfosfato.	27
Esquema 2 Rearranjo de Claisen do corismato em prefenato que ocorre pela ação da enzima Corismato mutase.	34
Esquema 3 Atividade biológica dos derivados I-V do carvacrol sintetizados por Alokam e colaboradores (2014) frente ao <i>M. tuberculosis</i> (H37Rv).....	35
Esquema 4 Obtenção de derivados éteres do carvacrol VI-XI relatada por Patil e colaboradores (2010).	36
Esquema 5 Obtenção dos derivados éteres XII-XVII e de derivados ésteres XVIII-XX conforme descrito por Nikumbh e colaboradores (2003).	37
Esquema 6 a) Síntese dos derivados sulfônico XXI , do sal sulfônico XXII e b) síntese do éster laurato XXIII a partir do carvacrol realizada por Bassanetti e colaboradores (2017).....	38
Esquema 7 Síntese dos derivados ésteres XXIV-XXX realizada por Mathela e colaboradores (2017)	39
Esquema 8 Rota sintética para obtenção dos derivados éteres XXXI-XXXV obtidos por CACCIATORE et al., 2015	41
Esquema 9 Rota sintética para obtenção dos derivados ésteres XXXVI e XXXVII realizada por CACCIATORE et al., 2015.	41
Esquema 10 Rota sintética para obtenção dos derivados ésteres XXXVIII , XXXIX e XL realizada por CACCIATORE et al., 2015.	42
Esquema 11 Derivados sulfonamidas XLI-XLIX obtidos por De Oliveira et al.,.....	43
Esquema 12 Obtenção do derivado éster L e do derivado éter LI obtidos por BKHAITAN et al., 2018.....	44
Esquema 13 Rota sintética para a obtenção dos ésteres do carvacrol 1b-c; 1e-i e 2	49
Esquema 14 Proposta mecanística para formação dos derivados ésteres 1b-c; 1e-i e 2	50
Esquema 15 Mecanismo proposto para esterificação de Fischer	50
Esquema 16 Rota sintética para a obtenção dos derivados 1a, 1d, 1j, 3 e 4	53
Esquema 17 Proposta mecanística para formação dos cloretos de acila	

correspondentes aos derivados 1a , 1d , 1j , 3 e 4	54
Esquema 18 Proposta mecanística de hidrólise do derivado 4 em meio ácido.....	59
Esquema 19 Proposta mecanística geral para reação de esterificação de Steglich	61
Esquema 20 Rota sintética para obtenção do derivado 1d	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fórmula estrutural e propriedades físico-químicas do carvacrol.....	28
Tabela 2 – Atividades antibacterianas do carvacrol relatadas na literatura	30
Tabela 3 – Concentração inibitória mínima (CIM) em $\mu\text{g mL}^{-1}$ para as sulfonamidas com melhores resultados frente a diferentes cepas resistentes de <i>S. aureus</i>	43
Tabela 4 – Identificação e rendimentos dos derivados 1b-c ; 1e-i e 2 sintetizados	52
Tabela 5 – Identificação e rendimentos dos derivados 1a , 1d , 1j , 3 e 4	55
Tabela 6 – Condições experimentais utilizadas nas tentativas de obtenção dos derivados 1d e 4	56
Tabela 7 – Deslocamentos químicos do RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), em ppm, relativos ao TMS em 0,00 ppm, da substância 1f	65
Tabela 8 – Deslocamentos químicos do RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3), DEPT-135 e DEPT-90, em ppm, relativos ao TMS em 0,00 ppm, da substância 1f	70
Tabela 9 – Deslocamentos químicos (δC) de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) em ppm, relativos ao TMS, em 0,00 ppm, número de átomos de hidrogênio (nH), multiplicidade (m) e constante de acoplamento (J) da substância 1f	71
Tabela 10 – Atividades <i>in vitro</i> dos ésteres do carvacrol (1a-j ; 2 e 3) e do carvacrol frente à cepa padrão (H37Rv) de <i>M. tuberculosis</i> (ATCC 27294), susceptível tanto à Rifampicina como à Isoniazida.....	73
Tabela 11 – Propriedades físico-químicas calculadas* na plataforma Molinspiration® para o carvacrol e seus derivados.....	76

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	TUBERCULOSE	18
1.2	BACTÉRIAS E A AGRICULTURA	24
1.3	CARVACROL	26
1.3.1	Carvacrol Como Substância Protótipo Para Descobertas De Novos Fármacos.....	29
1.3.2	Síntese De Derivados Do Carvacrol Com Potencial Atividade Antimicrobiana.....	33
1.4	PLANEJAMENTO ESTRUTURAL	45
2	OBEJTIVO	48
2.1	OBJETIVO GERAL	48
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
3.1	SÍNTESE DOS DERIVADOS 1B; 1C; 1E-I E 2	49
3.2	SÍNTESE DOS DERIVADOS 1A; 1D; 1J; 3 E 4	52
3.3	TENTATIVAS DE SÍNTESE DOS DERIVADOS 1D E 4.....	55
3.4	CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS SINTETIZADOS.....	62
3.5	ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA DOS DERIVADOS SINTETIZADOS.....	72
3.6	ATIVIDADE BIOLÓGICA FRENTE ÀS CEPAS DE XANTHOMONAS	77
4	CONCLUSÕES	79
5	METODOLOGIA	81
5.1	PROCEDIMENTOS GERAIS	81
5.2	MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO	81
5.3	MÉTODO GERAL PARA OBTENÇÃO DOS DERIVADOS ÉSTERES DO CARVACROL 1B; 1C; 1E-I E 2	82
5.4	MÉTODO GERAL PARA OBTENÇÃO DOS DERIVADOS 1A; 1J E 3	86
5.5	MÉTODO GERAL PARA OBTENÇÃO DOS DERIVADOS ÉSTERES DO CARVACROL 1D	88

5.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA	89
	REFERÊNCIAS	91
	APÊNDICES	98
	APÊNDICE A: Espectros de massas e RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), ^{13}C (100 MHz, CDCl_3), DEPT-135, DEPT-90 e HSQC dos derivados 1a-j; 2 e 3	98

1 INTRODUÇÃO

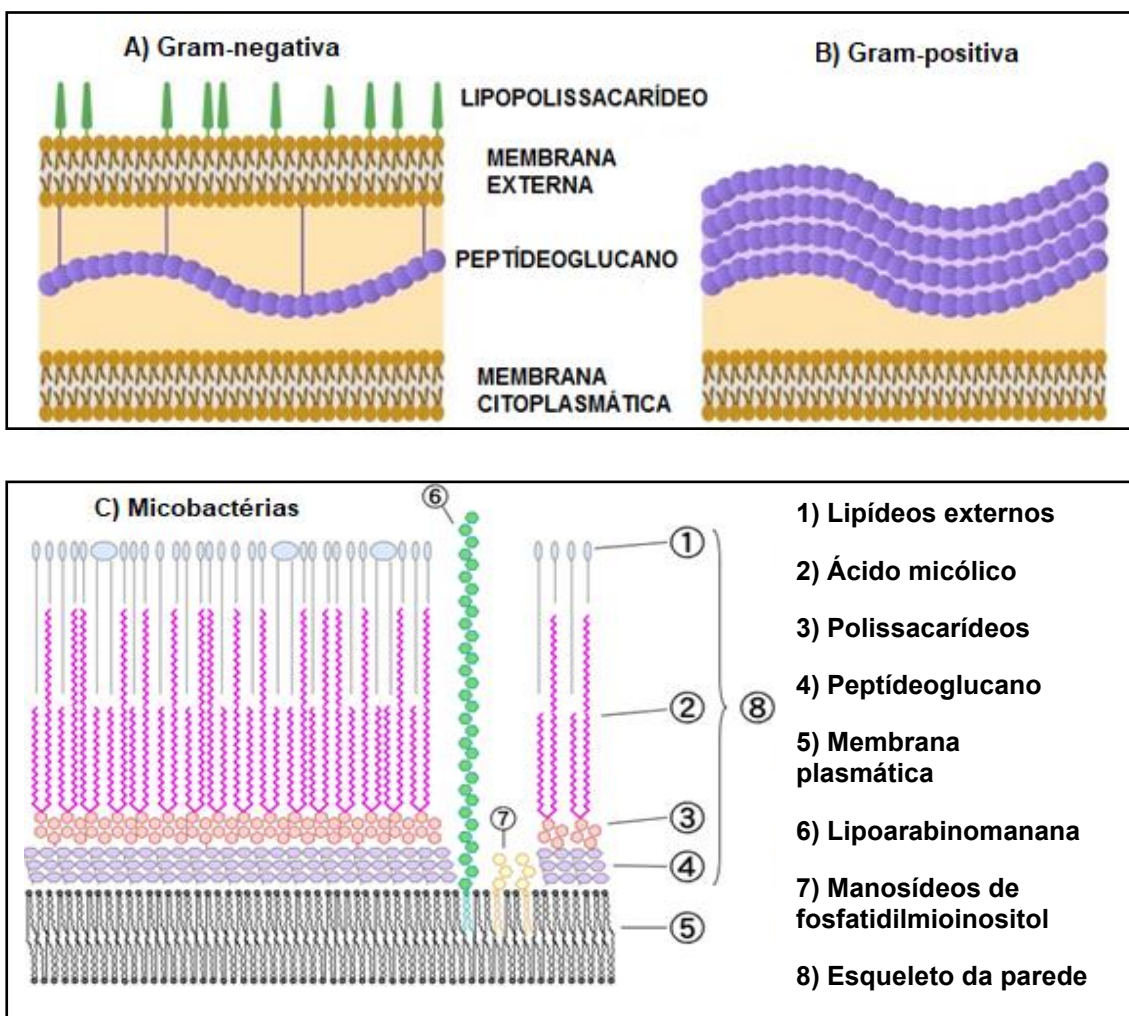
Bactérias são micro-organismos unicelulares que foram observados pela primeira vez na década de 1670 por Van Leeuwenhoek em seu microscópio rudimentar, o qual lhe permitia observar bactérias de 1 a 2 μm (BARDELL, 1983). A célula bacteriana é classificada como procarionte, não possui núcleo e o ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *deoxyribonucleic acid*) se encontra livre no citoplasma. Esse tipo de célula possui apenas uma organela citoplasmática, os ribossomos, que são constituídos de proteína e de ácido ribonucleico (RNA, do inglês *ribonucleic acid*). As demais organelas, assim como a membrana nuclear (carioteca), que forma o núcleo e protege o material genético, estão presentes apenas nas células eucariontes, como os fungos, protozoários, plantas e animais. (CALLAWAY, 2008).

A parede celular presente tanto em bactérias quanto em seres eucariontes, em células vegetais, alguns fungos e protozoários, é responsável pela forma, rigidez e manutenção osmótica da célula. Nas bactérias, a parede celular apresenta uma espessura de aproximadamente 10 a 20 μm , sendo constituída, principalmente, por um complexo macromolecular denominado peptidoglicano ou mureína, que tem importância prática na taxonomia bacteriana, uma vez que a composição química da parede celular permite diferenciar os tipos de bactérias (NOGUEIRA; MIGUEL, 2013).

Nas bactérias chamadas Gram-negativas (Figura 1A), este complexo representa uma fração menor do total da parede celular em relação às Gram-positivas (Figura 1B), as quais apresentam uma espessa camada de peptidoglicano contendo ácidos teicóicos, que regulam transporte de cátions e impedem a ruptura da parede durante o crescimento celular. A parede celular nas bactérias Gram-negativas é mais complexa, apresentando uma fina camada de peptidoglicano revestida por uma membrana externa, que por sua vez, é composta por lipoproteínas, fosfolípidos e lipopolissacarídeos, os quais são importantes para toxigenicidade e antigenicidade dessas bactérias (NOGUEIRA; MIGUEL, 2013).

Algumas bactérias possuem paredes estruturalmente semelhantes às Gram-positivas, mas possuem uma modificação importante que pode ser utilizada na taxonomia. Nessas bactérias, os lipídios, estão em maior quantidade (cerca de 60% do peso seco da parede), sendo os lipídeos hidrofóbicos denominados ácidos micólicos, os principais responsáveis pela inibição da entrada de corantes utilizados na coloração de Gram. Esses microorganismos, chamados de micobactérias (Figura 1C), pertencem ao gênero *Mycobacterium*, e são o exemplo mais importante de bactérias onde ocorre esta modificação, devido ao caráter hidrofóbico de sua parede celular (NOGUEIRA; MIGUEL, 2013).

Figura 1. Parede celular de bactérias: A) Gram-negativas; B) Gram-positivas; C) Micobactérias.



Fontes: <<https://www.editorasanar.com.br/blog/penicilinas-artigo-farmacia-tudo-que-voce-precisa-saber>> (figuras A e B); <<https://slideplayer.com.br/slide/14134614/>> figura C.

Embora a grande maioria das bactérias seja inofensiva, ou até mesmo importante para a vida em nosso planeta, uma pequena porcentagem pode ser considerada patogênica, ou seja, são capazes de causar enfermidades severas em plantas, animais e no homem, causando um impacto sócio-econômico muito grande. No entanto, a ideia de que bactérias e outros microorganismos poderiam causar doenças foi definida apenas no início do século XIX, quando por meio de experimentos, Louis Pasteur e Robert Koch estabeleceram a teoria dos germes ou teoria microbiana das doenças. (NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US), 2004).

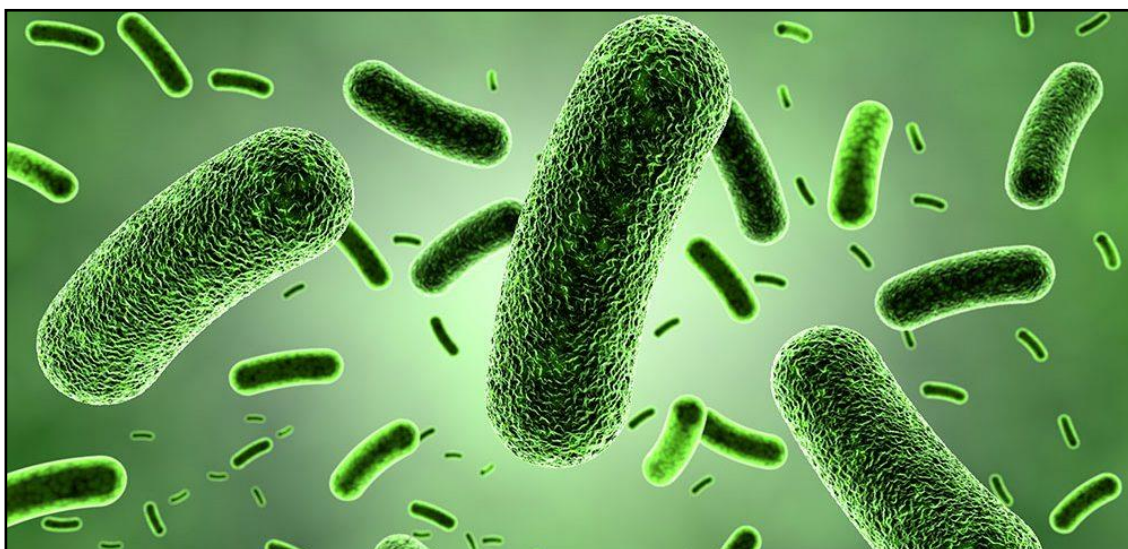
Além dessa importante contribuição científica, em 24 de março de 1882, Robert Koch também descobriu o bacilo causador da tuberculose, o *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), que em sua homenagem é denominado como bacilo de Koch. O Dia Mundial da Tuberculose foi lançado cem anos depois, em 1982, pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela União Internacional Contra Tuberculose e Doenças Pulmonares, para celebrar essa descoberta, que foi um grande passo na luta pelo controle e a eliminação da doença, tanto que Koch ganhou o prêmio Nobel de Medicina em 1905 (GONÇALVES, 2000).

1.1 TUBERCULOSE

A tuberculose (TB), causada pela micobactéria aeróbica *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), é a principal doença infecciosa de origem bacteriana no mundo (BRANCO; PINTO; BOECHAT, 2012). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de um terço da população mundial está infectada com o MTB (Figura 2), e estima-se que um em cada dez indivíduos infectados pode vir a desenvolver a TB em algum estágio de vida. Ainda de acordo com a OMS, somente em 2018, cerca de 10 milhões de pessoas foram acometidas pela TB ao redor do planeta. No mesmo ano, essa enfermidade ocasionou aproximadamente 1,5 milhões de óbitos, sendo 251 mil desses em pessoas portadoras do vírus da imunodeficiência humana (HIV). As principais

regiões do mundo afetadas são o Sudeste Asiático (44%), a África (24%) e o Pacífico Ocidental (18%), com porcentagens menores no Mediterrâneo Oriental (8%), nas Américas (3%) e na Europa (3%). Apesar da incidência nas Américas ser baixa comparada a outras regiões, no Brasil a situação epidemiológica da TB é preocupante, uma vez que é o único país do continente a estar na lista dos 30 países que concentram cerca de 80% de novos casos de TB no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

Figura 2. Detecção fluorescente quantitativa do *Mycobacterium tuberculosis*.



Fonte: <<https://www.rbcbioscienceusa.com/>>

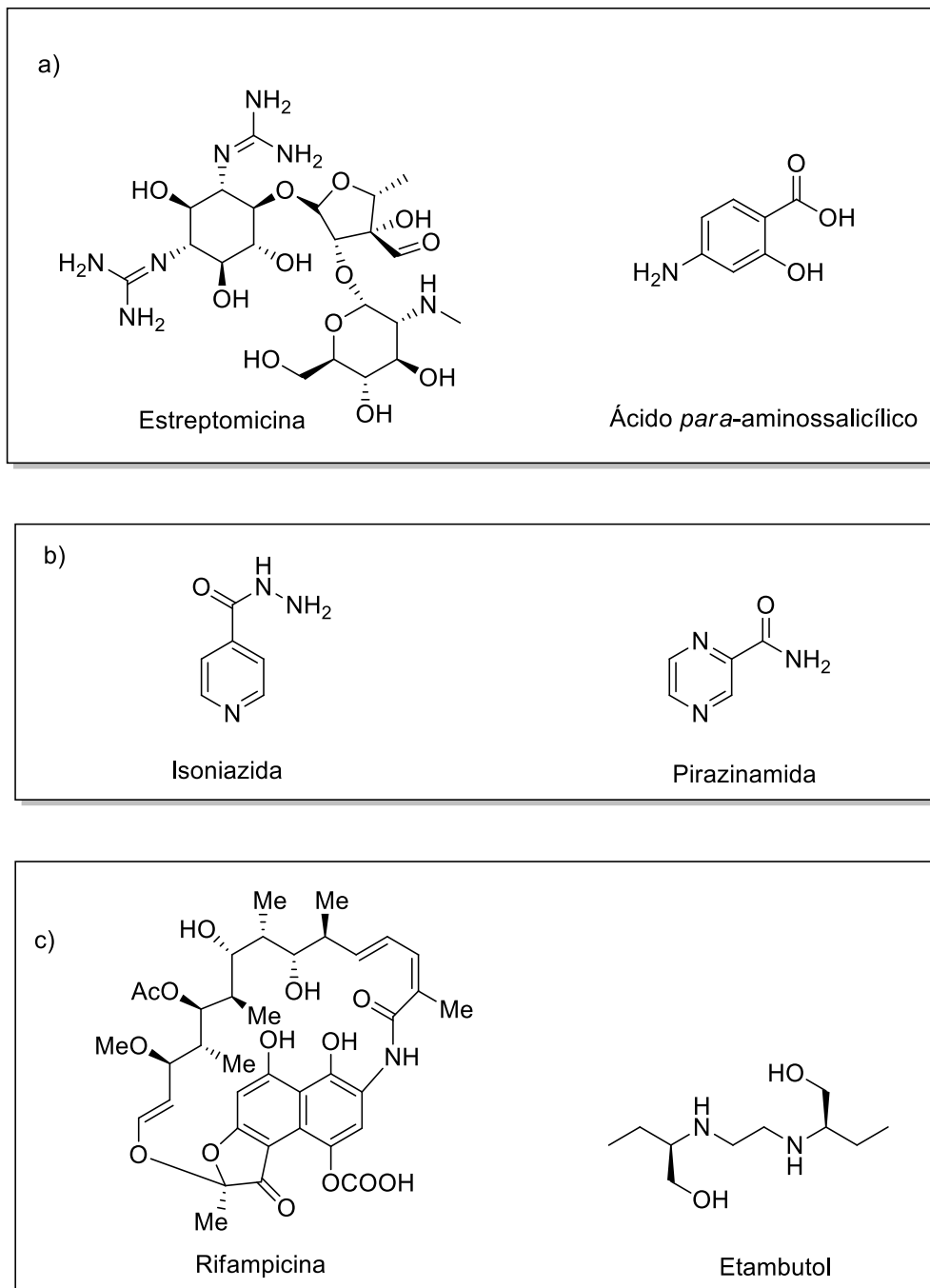
A forma pulmonar da doença é a mais prevalente, pois o tecido pulmonar, por ser rico em oxigênio, é bastante propício para o desenvolvimento do MTB. Sendo assim, esse micro-organismo é disseminado através da exteriorização de material biológico contaminado, em especial aqueles de origem pulmonar, por meio de aerossóis provenientes de espirros ou tosses, liberados por indivíduos que manifestam os sintomas da doença, que são comumente: tosse seca por mais de duas semanas, febre, sudorese noturna, cansaço, dor no peito, falta de apetite e emagrecimento. No entanto, o MTB é capaz de se manter em estado de baixo metabolismo (latência) mesmo em tecidos com baixa concentração de oxigênio, não respondendo adequadamente ao tratamento anti-TB e propiciando recidiva da doença, quando acontece alguma depressão no sistema imune (BRANCO; PINTO; BOECHAT, 2012).

Quanto ao tratamento quimioterápico antituberculose, na década de 1940, foi iniciada no Brasil a Campanha Nacional Contra a Tuberculose e, naquele período, dois medicamentos eram utilizados: a estreptomicina e o ácido *para*-aminossalicílico (Figura 3a). Na década de 1950, o Brasil optou por utilizar o esquema isoniazida e estreptomicina, duas vezes por semana. Nos anos 1960, diante da resistência bacteriana e da piora da mortalidade por tuberculose, foram iniciadas as padronizações de esquema terapêutico e foi adotado o uso de isoniazida, estreptomicina e pirazinamida (Figura 3b) por 18 meses. Em meados dos anos 1970, desenvolveu-se a quimioterapia antituberculose de curta duração, com rifampicina (Figura 3c), isoniazida e pirazinamida por 6 meses (RABAHI et al., 2017).

Vale ressaltar que o Brasil foi o primeiro país do mundo a padronizar o esquema de 6 meses na rede pública de saúde, com todos os fármacos administrados via oral e distribuídos gratuitamente. Durante os anos de 1980, as cápsulas com a combinação rifampicina/isoniazida foram implementadas, já com o objetivo de evitar resistência bacteriana adquirida. Em 2009, o Brasil introduziu o uso de comprimidos com dose fixa combinada (DFC) e adicionou o etambutol (Figura 3c) ao esquema anteriormente utilizado, pois segundo o Programa Nacional de Controle da tuberculose, foi reportado um aumento da resistência primária à isoniazida (de 4,4% para 6,0%). Adicionalmente, além da mudança da apresentação para DFC, as dosagens de isoniazida e pirazinamida dos comprimidos foram reduzidas na mudança do tratamento (de 400 mg para 300 mg e de 2,0 g para 1,6 g, respectivamente) (RABAHI et al., 2017).

Portanto, o esquema básico atualmente utilizado no Brasil para o tratamento de adultos com tuberculose sem suspeita clínica de resistência consiste de uma fase intensiva de 2 meses com administração de uma politerapia (isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol – Figura 3b e 3c), seguido por uma fase de manutenção de 4 meses, onde apenas isoniazida e rifampicina são utilizados (RABAHI et al., 2017).

Figura 3. Estruturas de fármacos utilizados no tratamento anti-TB: a) Estreptomicina e ácido *para*-aminossalicílico; b) Isoniazida e Pirazinamida e c) Rifampicina e Etambutol.



As reações adversas mais frequentes do esquema terapêutico de primeira escolha são: a mudança da coloração da urina (ocorre universalmente), intolerância gástrica (em 40% dos pacientes), alterações cutâneas (em 20%), icterícia (em 15%) e dores articulares (em 4%). Os principais

fatores associados a manifestação desses efeitos são idade (a partir da quarta década de vida), dependência química ao álcool (ingestão diária de álcool > 80 g), desnutrição (perda de mais de 15% do peso corporal), história de doença hepática prévia e coinfeção pelo HIV (RABAHI et al., 2017).

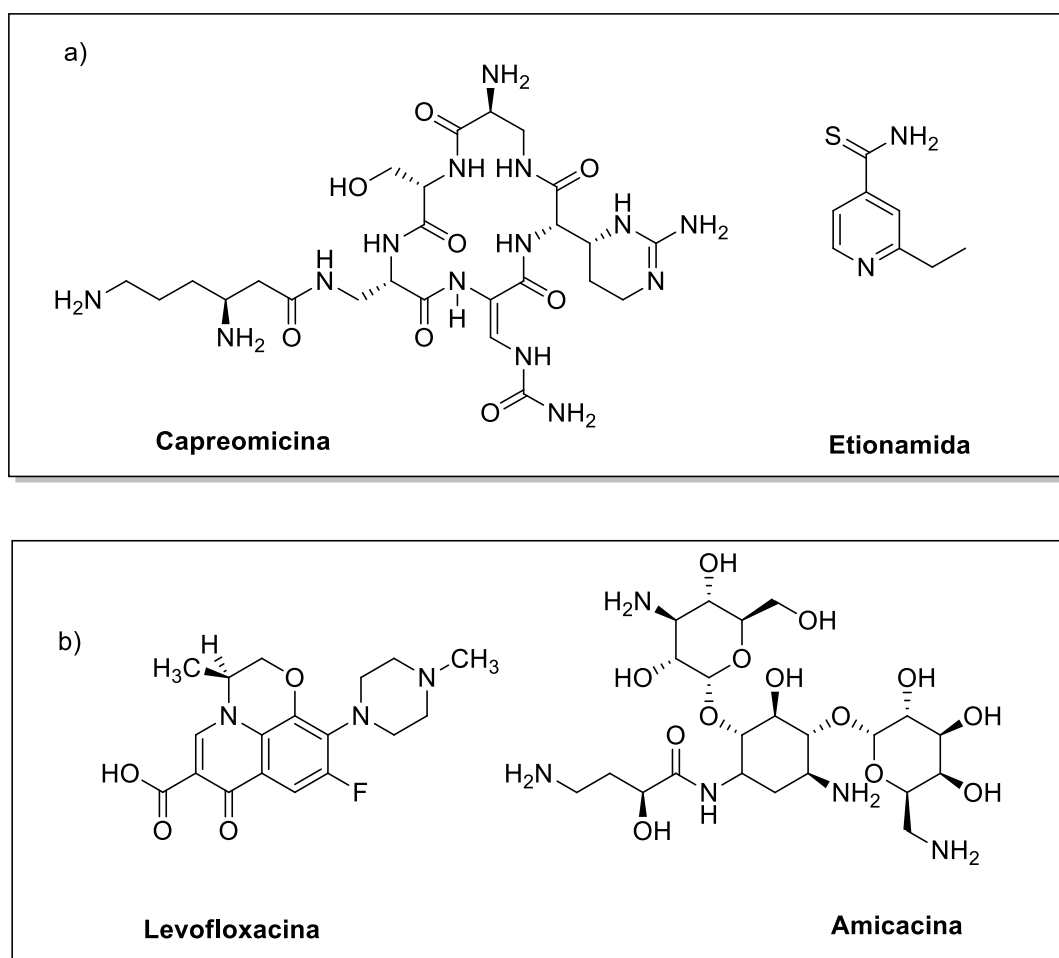
Além desses efeitos adversos, a longa duração do tratamento contribui para baixa adesão dos pacientes ao tratamento. O abandono do tratamento pode então levar ao aparecimento de cepas resistentes a esses fármacos de primeira escolha. Nesse contexto, a Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica a resistência micobacteriana em dois níveis: cepas de MTB multirresistentes (MDR-TB), resistentes a rifampicina e isoniazida, ou extensivamente resistentes (XDR-TB), resistentes a esses dois fármacos de primeira linha e também a um fármaco injetável de segunda escolha, como a capreomicina (Figura 4a) ou amicacina (Figura 4b), e a uma fluorquinolona, como a levofloxacina (Figura 4b).

Segundo a OMS, globalmente em 2018, cerca de 484 mil pessoas desenvolveram TB que era resistente à rifampicina (RR-TB), o medicamento de primeira escolha mais eficaz, dentre os quais 78% eram TB multirresistente (MDR-TB). Cerca de 8,5% dos casos de MDR-TB apresentavam resistência extensiva a medicamentos TB (XDR-TB). Dados preocupantes apontam que apenas 55% dos pacientes com MDR/RR-TB que iniciaram o tratamento em 2015 foram tratados com sucesso, enquanto 15% dos pacientes morreram e o tratamento falhou em 8% dos pacientes, enquanto que o êxito de tratamento em pacientes com XDR-TB foi de apenas 34% (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019b).

O tratamento da tuberculose resistente é menos eficiente, com graves efeitos adversos aos indivíduos infectados (BRANCO; PINTO; BOECHAT, 2012) e depende do tipo de resistência apresentada. Para o tratamento de MDR-TB é indicado o uso da capreomicina (Figura 4a), como medicação injetável, a etionamida (Figura 4a) e a fluorquinolona levofloxacina (figura 4b), conforme recomendações da OMS. Em pacientes que já usaram a capreomicina, utiliza-se amicacina (Figura 4b) como segunda opção. Em pacientes que não apresentem resistência a estreptomicina (Figura 3a) ao teste

de sensibilidade e que não a tenham usado, ela também pode ser considerada para uso (RABAHI et al., 2017).

Figura 4. Estruturas dos fármacos de segunda escolha mais comumente utilizados no tratamento anti-TB: a) Capreomicina e etionamida; b) Levofloxacina e Amicacina.



Além da TB pulmonar, as formas extrapulmonares da doença ocorrem principalmente em indivíduos com imunodeficiência, isto é, com o sistema imunológico com baixo potencial combativo. Esse quadro acomete, em especial, pacientes que possuem a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA ou AIDS, do inglês *acquired immunodeficiency syndrome*) causada pelo retrovírus chamado de vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *Human Immunodeficiency Virus*) (YANG et al., 2011). A coinfeção MTB-HIV é a principal causa de morte em pacientes portadores do HIV. Isso se deve ao fato dos dois micro-organismos atuarem de forma sinérgica para a debilitação do

indivíduo. Além disso, um fator que agrava este quadro é a interação medicamentosa entre os fármacos mencionados utilizados no tratamento anti-TB com alguns empregados na quimioterapia antirretroviral, pois a mesma enzima do citocromo P450 (CYP 3A4) é responsável pela metabolização destes fármacos (BRANCO, S. C. F; PINTO A. C. E BOECHAT, 2012).

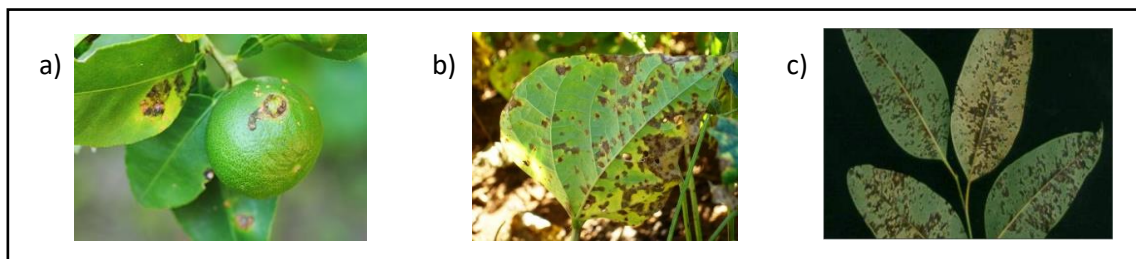
1.2 BACTÉRIAS E A AGRICULTURA

O setor do agronegócio pode ser considerado, atualmente, o mais competitivo e eficiente do Brasil no cenário econômico. Para efeito comparativo, o Produto Interno Bruto (PIB) do agronegócio brasileiro, calculado pelo Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA), da ESALQ/USP, em parceria com a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA), apresentou alta de 0,65% em maio de 2019, acumulando alta de 0,68% nos 5 primeiros meses desse ano (CNA, 2019), enquanto que o setor da construção civil, apresentou uma alta no PIB de 0,8% no ano todo, frustrando as expectativas que previam um crescimento de 2% para esse setor (FGV IBRE, 2019).

Entretanto, o agronegócio pode ser diretamente afetado por doenças causadas por micro-organismos nas plantações. Estima-se que as perdas ocasionadas por pragas introduzidas nas culturas em virtude da intensificação do fluxo comercial, cheguem à US\$ 250 bilhões. (EDUARDO; RANGEL, 2015). Nesse contexto, destacam-se as bactérias do gênero *Xanthomonas* que podem causar infecções em pelo menos 124 espécies de plantas monocotiledôneas e 208 dicotiledôneas e é responsável por doenças tão prejudiciais como o cancro cítrico (Figura 5a), causado por cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*; a mancha bacteriana (Figura 5b) que atinge plantações de leguminosas, como o feijão (*Phaseolus vulgaris*) e a soja (*Glycine max*), causada por cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseolis* e a mancha bacteriana (figura 5c) em plantações de eucalipto (*Eucalyptus*),

causada por cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalyptorum* (HARBORNE, 1994).

Figura 5. a) sintomas do cancro cítrico b) mancha bacteriana em leguminosa c) mancha bacteriana na folha de eucalipto.



Fontes: <<http://www.isaaa.org/kc>>; <<https://www.futurecobioscience.com>>; <[shttp://www.clonareucalipto.com.br](http://www.clonareucalipto.com.br)>.

No caso do cancro cítrico, há uma grande relevância econômica no cenário nacional, pois o Brasil é o maior produtor de laranja do mundo, responsável por cerca de 30% da produção da fruta e 53% de suco produzido mundialmente. Tal doença reduz a produtividade do pomar, provoca desfolha das plantas contaminadas e a queda prematura nos frutos, além de restringir o uso dos cultivares altamente suscetíveis à doença, sendo que a principal forma de controle, em áreas ainda indenes ou com baixíssimas incidências da doença, é a prevenção da sua entrada no pomar e a erradicação das plantas contaminadas após sua introdução (SANCHES et al., 2014).

No Paraná, foi implementado um programa de manejo integrado da doença envolvendo medidas como o uso de cultivares resistentes, quebra-ventos e pulverizações preventivas com bactericidas cúpricos como controle químico do cancro cítrico. Entretanto, o uso de cobre apresenta eficiência parcial, o que favorece o desenvolvimento epidêmico da doença, ademais, o uso prolongado de cúpricos pode levar à seleção de populações de *Xanthomonas* resistentes ao cobre. Além disso, o acúmulo desse metal pesado no solo pode causar fitotoxicidade e a contaminação ambiental (SILVA; CANTERI; LEITE JÚNIOR, 2012).

A mancha bacteriana, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap), é uma doença que acomete plantações de leguminosas como

o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), podendo ocorrer em qualquer estágio do desenvolvimento da planta, resultando em perdas de rendimento de 20 a 60%. O controle químico tem sido insatisfatório, principalmente em anos ou locais onde ocorrem condições favoráveis ao desenvolvimento da doença, além de ser muito oneroso ao produtor e nocivo ao meio ambiente (ZAPATA; BEAVER; PORCH, 2011)

No caso do eucalipto, o impacto também é grande, pois a demanda mundial por produtos derivados dessa planta, como celulose, papel, madeira utilizada na construção civil e ainda óleos essenciais é muito grande. O Brasil possui a maior área de plantação de eucalipto do mundo, com 5,1 milhões de hectares e como consequência, a maior produtividade, com 40,1 m³/ha/ano e apesar da alta produtividade, o setor vem sendo afetado por doenças como a mancha bacteriana, causada pela *Xanthomonas axonopodis* pv *eucalyptorum* que ocasionou um prejuízo de aproximadamente US\$ 8 milhões entre os anos de 2003 e 2008 no Brasil (NEVES et al., 2014).

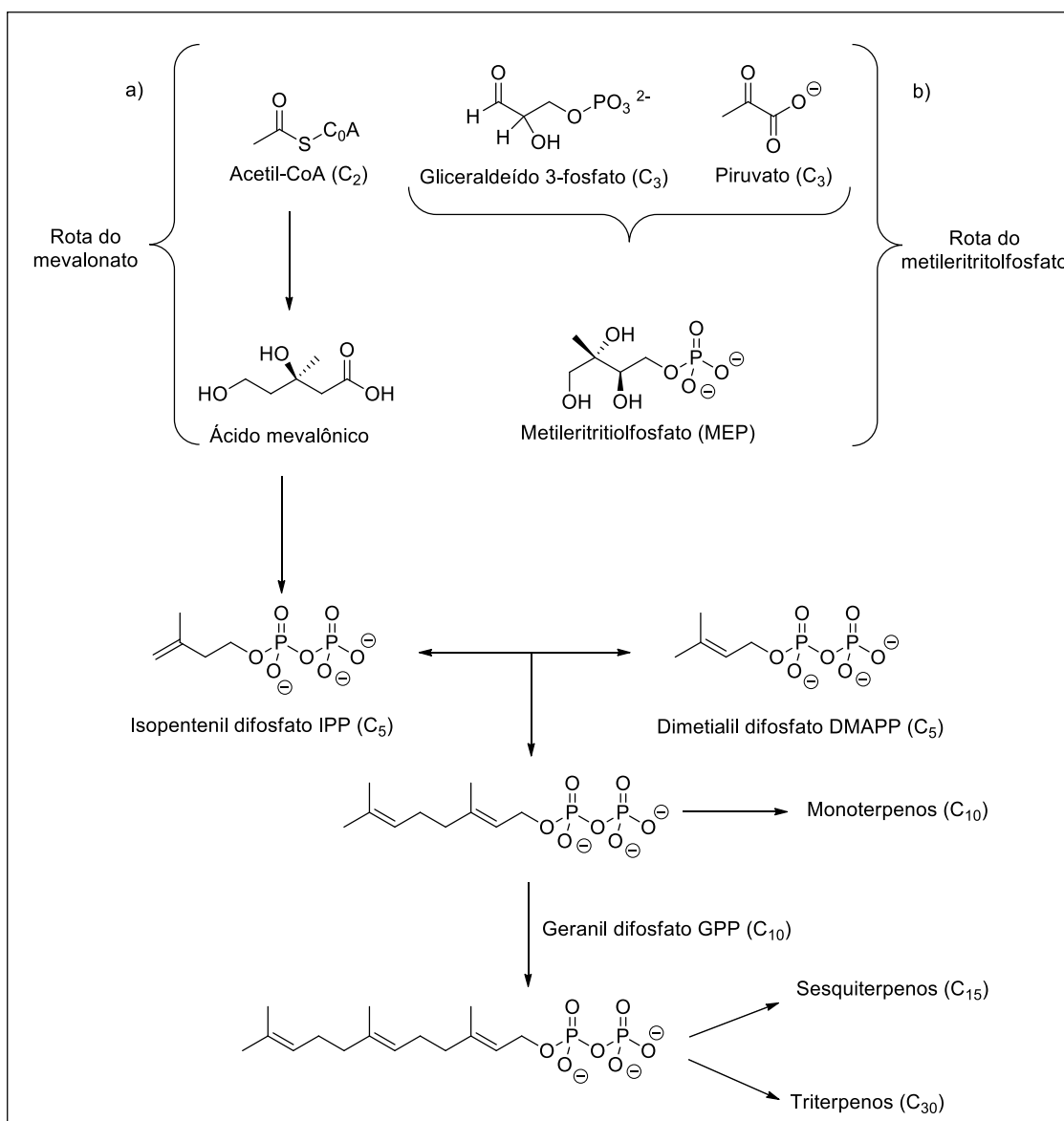
1.3 CARVACROL

Terpenos/terpenoides, como o carvacrol, são basicamente estruturados em blocos de cinco carbonos, unidades de isopreno (C₅H₈), normalmente ligadas entre si pela ordem “cabeça-a-cauda” (ligação 1-4), o que caracteriza a chamada regra do isopreno. Quimicamente, os terpenos podem ser definidos como alcenos naturais, ou até mesmo sintéticos, que apresentam uma dupla ligação carbono-carbono, sendo caracterizados como hidrocarbonetos insaturados. Entretanto, se um terpeno contém oxigênio, o mesmo é denominado de terpenoide, podendo apresentar diferentes funções químicas, como: ácidos carboxílicos, álcoois, aldeídos, cetonas, éteres, fenóis ou epóxidos terpênicos (O. FELIPE; L. BICAS, 2017).

De modo geral, a biossíntese dos terpenoides a partir do mais simples metabólito primário pode ser basicamente dividida em 4 etapas: (i) síntese dos precursores fundamentais IPP (pirofosfato de isopentinila) e DMAPP

(difosfato de dimetil-alila), que são produzidos por vias distintas, a via dependente do mevalonato, que opera no citosol das plantas e a via dependente do 2-C-metil-*D*-eritritol-4-fosfato, encontrado nos plastídeos; (ii) oligomerização das unidades de IPP para formação de séries homólogas de prenilas difosfatadas, por meio de adições eletrofilicas; (iii) ciclização destes prenil difosfatos alílicos resultando na formação dos esqueletos de sesquiterpenos e; (iv) modificações enzimáticas secundárias (majoritariamente reações redox) que fazem surgir as funções orgânicas das moléculas e a quimiodiversidade desta família de produtos naturais (PAVARINI; LOPES, 2016).

Esquema 1. Biossíntese de terpenoides: a) Rota do mevalonato; b) Rota do metileritritolfosfato.



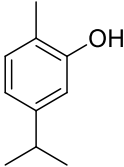
Fonte: TAIZ, ZEIGER, 2004.

Os óleos essenciais, contendo diferentes terpenos/terpenoides, têm sido amplamente utilizados como agentes antimicrobianos tanto na medicina humana quanto veterinária. Santurio e colaboradores, concluíram que os óleos essenciais de orégano, orégano mexicano, tomilho e canela apresentaram atividade bactericida frente à cepas de *Escherichia coli* isoladas de aves e bovinos; sendo que o óleo essencial de orégano apresentou atividade antimicrobiana superior aos óleos essenciais de orégano mexicano, tomilho e canela (SANTURIO et al., 2011).

O monoterpeno carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol, **Tabela 1**), objeto de estudo nesse trabalho, está presente em grandes quantidades em espécies vegetais como orégano (*Origanum vulgare L.*) e tomilho (*Thymus vulgaris L.*). A concentração de carvacrol nessas plantas pode variar dependendo de algumas condições, como por exemplo as técnicas de isolamento e purificação (solventes orgânicos, destilação ou procedimentos mecânicos) (SANTURIO et al., 2011).

O carvacrol se apresenta como um líquido amarelo pálido caracterizado por forte odor, sabor pungente, alta lipofilicidade, conforme observada experimentalmente com $\text{LogP} = 3,64$, baixa solubilidade em água ($0,11 \text{ mg mL}^{-1}$) e completamente solúvel em solventes orgânicos (MARINELLI; DI STEFANO; CACCIATORE, 2018). Outras propriedades físico-químicas, desse monoterpeno estão listadas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Fórmula estrutural e propriedades físico-químicas do carvacrol.

Propriedades	Estrutura/Valores
Fórmula estrutural	
Massa molar (g mol^{-1})	150,2
Solubilidade em água (mg mL^{-1})	0,11
Ponto de ebulição ($^{\circ}\text{C}$)	237–238
pKa	10,3
logP	3,64
Densidade (20°C)	$0,976 \text{ g mL}^{-1}$

Fonte: (KG, 2015).

1.3.1 CARVACROL COMO SUBSTÂNCIA-PROTÓTIPO PARA A DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS

Os terpenos, presentes em óleos essenciais, podem ser vistos como estruturas privilegiadas e servem como plataformas importantes e biologicamente pré-validadas para o projeto de quimiotecas de compostos na busca por novos candidatos a fármacos (DAVISON; BRIMBLE, 2019). Tendo em vista o surgimento de micobactérias resistentes aos fármacos existentes no mercado para o tratamento da tuberculose, bem como a ausência de agentes antimicrobianos eficazes contra fitopatologias como o cancro cítrico e a mancha bacteriana, faz-se necessário a busca por substâncias que sejam capazes de atuar no combate a cepas de *M. tuberculosis* e/ou a cepas de *Xanthomonas*.

Nesse contexto, o carvacrol tem se destacado no âmbito da química medicinal, uma vez que apresenta uma vasta gama de atividades biológicas, tais como: antimicrobiano, antioxidante, antitumoral, anti-inflamatório, antidepressivo e até mesmo modulador imunológico (SILVA et al., 2018). Portanto, foi relatado que o carvacrol age como agente antioxidante diminuindo os níveis de oxidação do DNA, prevenindo a peroxidação lipídica e a eliminação do óxido nitroso (NO), respectivamente (GUIMARÃES et al., 2010). Além disso, Aydin et al. também mostraram seu potencial anticancerígeno e efeito dose-dependente e não-citotóxico em células humanas (AYDIN; TÜRKEZ; KELEŞ, 2014). A ação anti-inflamatória, assim como a inibição da enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2), foi evidenciada por HOTTA et al. (2010). O mecanismo de ação do carvacrol como antidepressivo foi demonstrado no estudo de Jukic et al., em que o monoterpene apresentou atividade inibitória na enzima acetilcolinesterase (AChE) (JUKIC et al., 2007).

Com relação a sua atividade antimicrobiana, o carvacrol apresenta um grande potencial frente a uma grande variedade de espécies de bactérias, tanto bactérias Gram-positivas dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*, como Gram-negativas do gênero *Salmonella*, sendo amplamente documentado na literatura, como pode ser exemplificado na **Tabela 2**.

Tabela 2. Atividades antibacterianas do carvacrol relatadas na literatura.

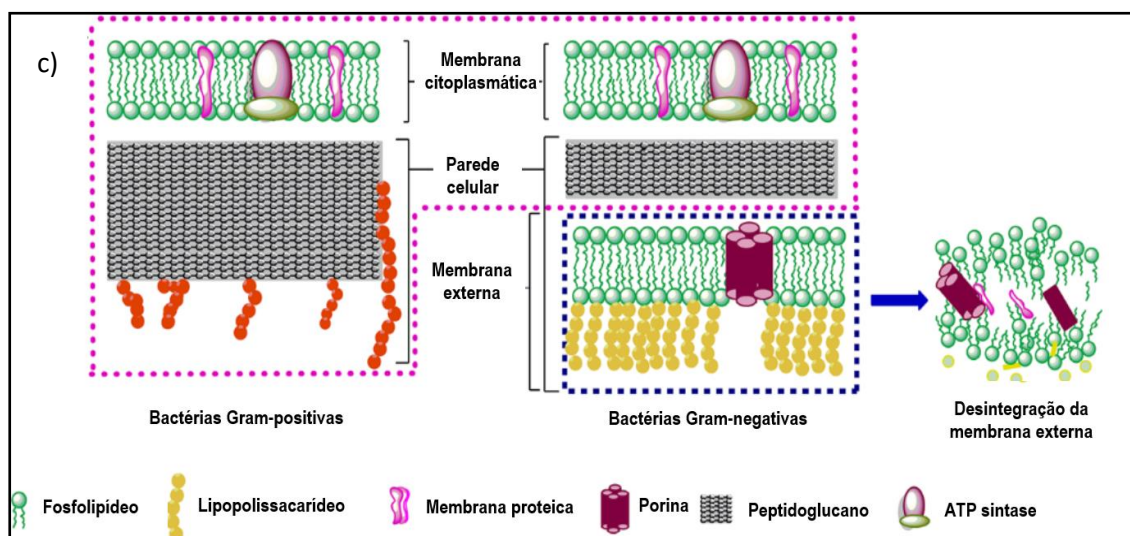
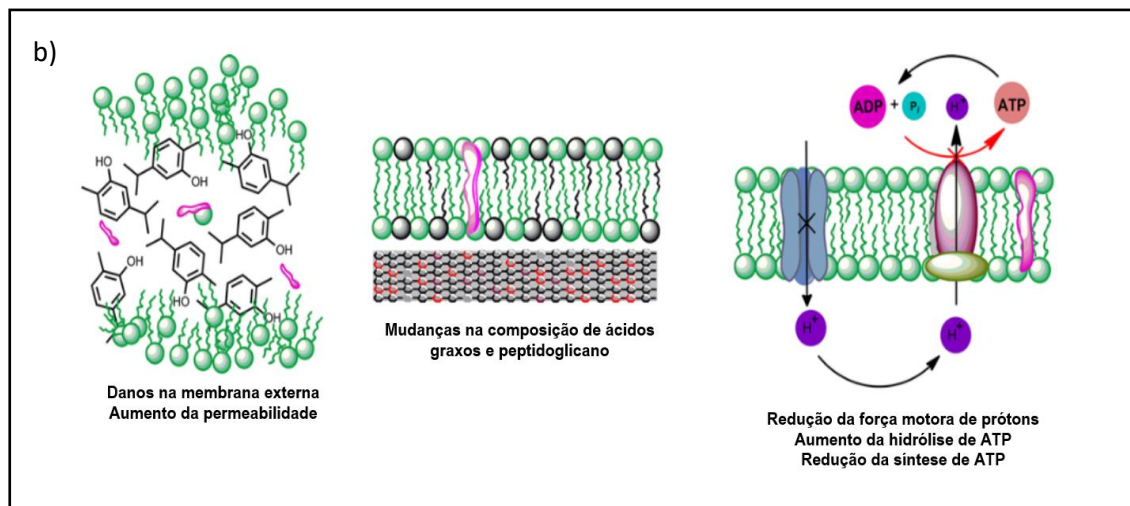
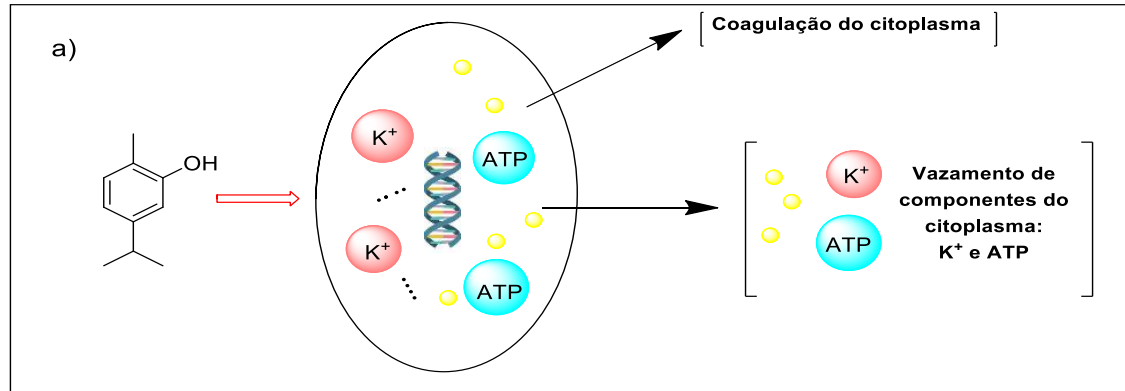
Espécies	Atividade antimicrobiana	Referência
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	CIB ^a = 303 - 1220 µg mL ⁻¹ CEB ^b = 1220 - 4885 µg mL ⁻¹	(NOSTRO et al., 2007)
<i>Streptococcus mitis</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. salivarius</i> e <i>S. mutans</i>	CIM ^c = 2500 µg mL ⁻¹ CBM ^d = 5000 µg mL ⁻¹	(BOTELHO et al., 2007)
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 6539	CIM ^c = 250 µg mL ⁻¹ CBM ^d = 250 µg mL ⁻¹	(KIM et al., 1995)
<i>S. typhimurium</i> ATCC 13311 <i>E. coli</i> ATCC 35150 (O157: H7)	CIM ^c = 150 µg mL ⁻¹ CIM ^c = 450 µg mL ⁻¹	(HELANDER et al., 1998)

^aCIB = concentração de inibição de biofilme; ^bCEB = concentração de erradicação de biofilme; ^cCIM = Concentração inibitória mínima; ^dCBM = concentração bactericida mínima.

Além de efeitos frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, o potencial antimicrobiano do Carvacrol também tem sido avaliado frente as micobactérias, sobretudo frente ao *Mycobacterium tuberculosis*. Nesse contexto, Andrade-Ochoa et al. (2015) avaliaram o papel do carvacrol e outros constituintes terpênicos e fenilpropânicos de óleos essenciais contra duas cepas diferentes de *Mycobacterium*. O bioensaio com o corante vital Alamar Blue® mostrou atividade antimicobacteriana proeminente do carvacrol com valores de CIM de 2,02 e 5,20 µg mL⁻¹ contra *M. tuberculosis* H37Rv e *M. Bovis* AN5, respectivamente. Além disso, eles também demonstraram que a citotoxicidade do carvacrol na linha celular J774A de macrófagos é baixa (CC₅₀: 900 µg mL⁻¹ e CC₉₀: 1950 µg mL⁻¹), sugerindo seu perfil de segurança quando usado como agente anti-micobacteriano (ANDRADE-OCHOA et al., 2015).

Portanto, é sabido que o carvacrol pode ser eficaz no controle de doenças infecciosas, porém os mecanismos moleculares envolvidos em sua ação antimicrobiana ainda não estão completamente elucidados. Algumas hipóteses estão sendo estudadas na tentativa de se compreender os mecanismos de ação desse monoterpeneo (Figura 6).

Figura 6. Possíveis mecanismos de ação do carvacrol: a) entrada do carvacrol em uma célula microbiana promove efeitos no citoplasma; b) alterações na membrana externa, composição química e desequilíbrio na hidrólise e síntese de ATP; c) desintegração da membrana externa em bactérias Gram-negativas.



Fonte: (MARINELLI; DI STEFANO; CACCIATORE, 2018) adaptado.

Nesse sentido, o envelope externo e a membrana citoplasmática interna das bactérias são considerados os principais locais de ação do carvacrol. Ao entrar em uma célula, o carvacrol, além de promover a coagulação do citoplasma, ocasiona também, o vazamento de componentes importantes como íons K^+ e adenosina trifosfato (ATP) (Figura 6a). Muitos estudos sugerem que o carvacrol, e compostos fenólicos em geral, podem exercer uma atividade inibitória no crescimento bacteriano, devido à sua capacidade, garantida por uma hidrofobicidade, de interagir com as cadeias acila relacionadas aos fosfolipídios de membrana. O acúmulo dessa molécula, impactando no arranjo íntimo e na estabilidade da bicamada fosfolipídica, cria uma expansão da membrana que se torna mais permeável (Figura 6b) (ALOKAM et al., 2014).

Outra hipótese relatada é que o grupo hidroxila (-OH) poderia ser considerado um grupo farmacofórico, pois permite ao carvacrol atuar como um trocador de íons trans-membranas, promovendo uma perturbação dos cátions nas células bacterianas. De fato, esse monoterpene em sua forma não carregada, após interagir e atravessar a membrana, atinge o citoplasma, onde perde o próton ácido. Neste compartimento, para substituir o H^+ perdido, o carvacrol se liga a um íon K^+ da bomba intracelular, permitindo atravessar novamente a membrana e retornar ao compartimento extracelular. Fora da célula bacteriana, o próton é restaurado no lugar do íon potássio. Este mecanismo contribui fortemente para a acumulação de íons K^+ no compartimento extracelular em detrimento ao intracelular, conforme pode-se visualizar na Figura 6b (ALOKAM et al., 2014).

Em relação às bactérias Gram-negativas (Figura 6c), Helander e colaboradores demonstraram os efeitos deletérios do carvacrol na membrana externa. Caracteristicamente, os eventos que indicam um dano à membrana externa são a inibição do crescimento, altos níveis de captação de 1-*N*-fenilnaftilamina (NPN), liberação de lipopolissacarídeo (LPS), aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática ao ATP e aumento da atividade do dodecil sulfato de sódio (DSS) e Triton-X detergentes (HELANDER et al., 1998).

Com relação ao *M. tuberculosis*, Vasconcelos e colaboradores (2018) relatam que as alterações morfológicas em *M. tuberculosis* H37Rv expostas ao carvacrol a uma concentração de 50% da concentração inibitória mínima (1/2 CIM) podem ser claramente observadas por microscopia eletrônica de varredura nos três tempos estudados (24, 48 e 72 h). O bacilo mudou de forma para áspero e também foi observada a tendência de criar aglomerados de bacilos. Os autores ressaltam que esses resultados são consistentes com as mudanças causadas por carvacrol em outras bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e que, de modo geral, os terpenos naturais podem causar alterações na bicamada lipídica da membrana celular, desestabilização dos ácidos graxos, interferência nas vias metabólicas essenciais, alteração do fluxo eletrolítico e transporte ativo, inativação das bombas de sódio e potássio, inibição da atividade enzimática e coagulação do conteúdo do citoplasma (NAKAMURA DE VASCONCELOS et al., 2018).

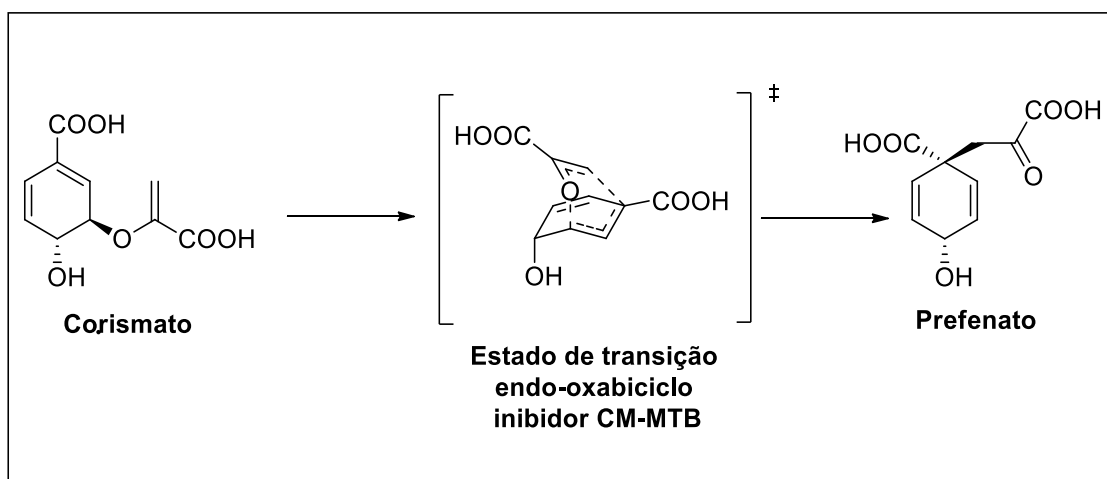
1.3.2 SÍNTESE DE DERIVADOS DO CARVACROL COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As estratégias de modificações estruturais ou síntese de novos derivados do carvacrol foram adotadas em muitos campos para superar várias dificuldades, como as barreiras fisiológicas, bem como o aprimoramento de propriedades físico-químicas e organolépticas, além da diminuição da citotoxicidade, uma vez que o carvacrol, por ser um composto fenólico, apresenta certa toxicidade (MARINELLI; DI STEFANO; CACCIATORE, 2018).

Nesse contexto, Alokán e colaboradores ressaltam a importância da biossíntese de aminoácidos como sendo um processo essencial para a vida das células, pois fornece os blocos de construção de polipeptídeos e importantes metabólitos primários e secundários. A via do chiquimato é uma via anabólica empregada por bactérias, fungos e plantas para sintetizar os aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano. Nesse sentido, a enzima *Corismato mutase* (CM; EC 5.4.99.5) exerce um papel importante, pois catalisa a conversão do corismato em prefenato, conforme o esquema 2. A

reação em si é um rearranjo de Claisen, que prossegue por um estado de transição *endo-oxabicyclo* com uma geometria semelhante a uma cadeira (ALOKAM et al., 2014).

Esquema 2. Rearranjo de Claisen do corismato em preferato que ocorre pela ação da enzima Corismato mutase.

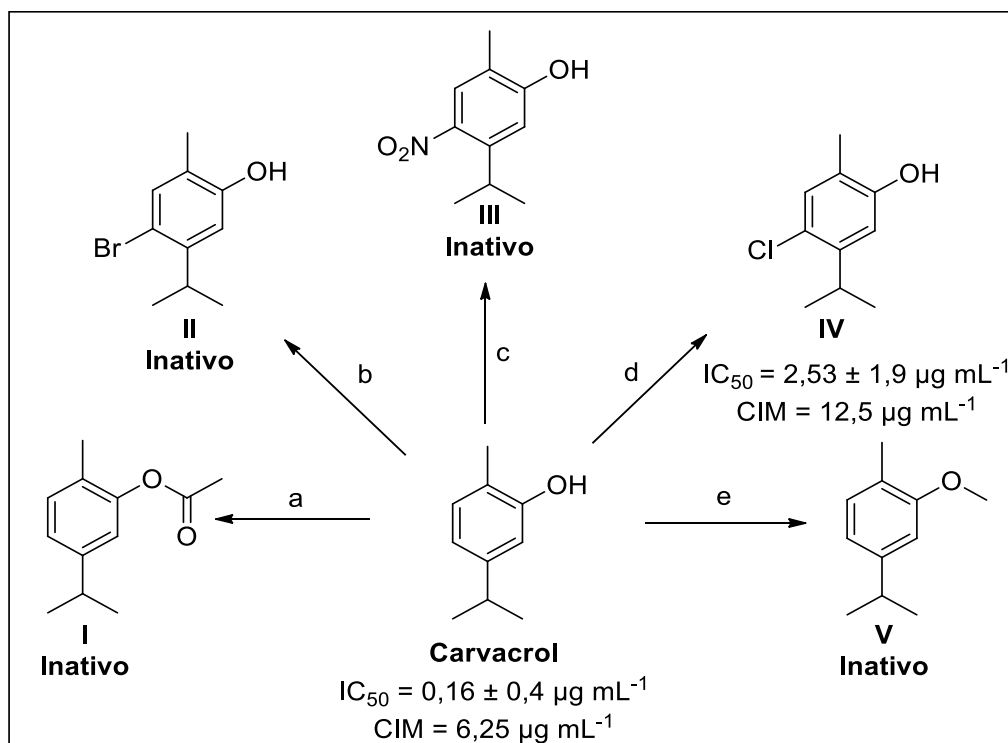


Fonte: (ALOKAM et al., 2014).

Como os vertebrados não possuem a via do chiquimato para a biossíntese de compostos aromáticos e, portanto, não possuem atividade de CM, essa enzima representa um alvo importante para o desenvolvimento de fármacos que possam ser utilizados no tratamento anti-TB (ALOKAM et al., 2014). Nesse sentido, os autores destacam que atualmente os melhores inibidores da CM mimetizam o ácido dicarboxílico *endo-oxabicyclo*, formado no estado de transição da conversão do chiquimato em preferato.

Esse fato corrobora a hipótese de que o processo enzimático prossegue por meio de uma estrutura de transição pericíclica. Com base nisso, os autores sintetizaram os derivados **I-V** do carvacrol (Esquema 3) e avaliaram *in vitro* a capacidade desses compostos de inibirem a corismato mutase do MTB bem como sua atividade antimicobacteriana e, com isso, realizaram um estudo da relação estrutura-atividade (ALOKAM et al., 2014).

Esquema 3. Atividade biológica dos derivados **I-V** do carvacrol sintetizados por Alokam e colaboradores (2014) frente ao *M. tuberculosis* (H37Rv).



Reagentes e condições: a) CH_3COCl , TEA, CH_2Cl_2 ; b) Br_2 , AcOH; c) HNO_3 , AcOH; d) SOCl_2 ; CCl_4 ; e) CH_3I , K_2CO_3 , Acetona, Refluxo.

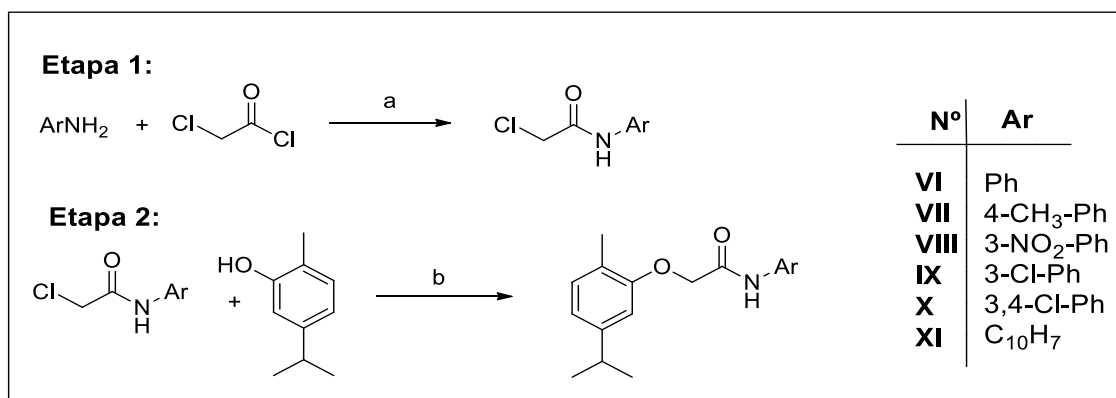
Todos os compostos foram testados quanto à sua atividade antimicrobiana *in vitro* contra o MTB H37Rv pelo bioensaio de Alamar Blue®. O composto-líder carvacrol, que mostrou excelente atividade de inibição enzimática, apresentou pouca atividade frente ao *M. tuberculosis*, com uma CIM de $6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$, fato esse que difere dos resultados demonstrado por Andrade-Ochoa et al (2015) citado anteriormente, mostrando a dificuldade da reprodutibilidade desses ensaios, muito provavelmente devido a volatilidade de terpenóides como o carvacrol.

Entretanto, verificou-se que todos os derivados do carvacrol obtidos nesse estudo foram menos potentes que o carvacrol como compostos anti-tuberculose, exceto o timol, que é equipotente ao carvacrol. O derivado **I** mostrou ser inativo, assim como o resultado obtido para esse mesmo composto (derivado **2**), também sintetizado nesse trabalho, conforme demonstrado mais adiante. Os autores ressaltam que quando comparados aos medicamentos

contra a tuberculose de primeira escolha como isoniazida (CIM: 0,26 $\mu\text{g mL}^{-1}$), rifampicina (CIM: 0,19 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e etambutol (CIM: 3,13 $\mu\text{g mL}^{-1}$), todos os compostos foram menos ativos. A falta de correlação entre a forte potência de inibição enzimática para a atividade antitubercular pode, provavelmente, ser atribuída à incapacidade dessas moléculas de penetrar a parede celular micobacteriana (ALOKAM et al., 2014).

Em um outro trabalho, Patil et al. (2010) propuseram a obtenção de derivados de carvacrol **VI-XI** por meio de ligações éter, que foram obtidos pela reação do carvacrol com várias α -cloro acetanilidas substituídas, previamente sintetizadas. Com a ajuda de técnicas de irradiação por microondas (MW), os produtos foram obtidos em bons rendimentos (90-94%), pureza adequada e em condições de reação moderadas (Esquema 4).

Esquema 4. Obtenção de derivados éteres do carvacrol **VI-XI** relatada por Patil e colaboradores (2010).



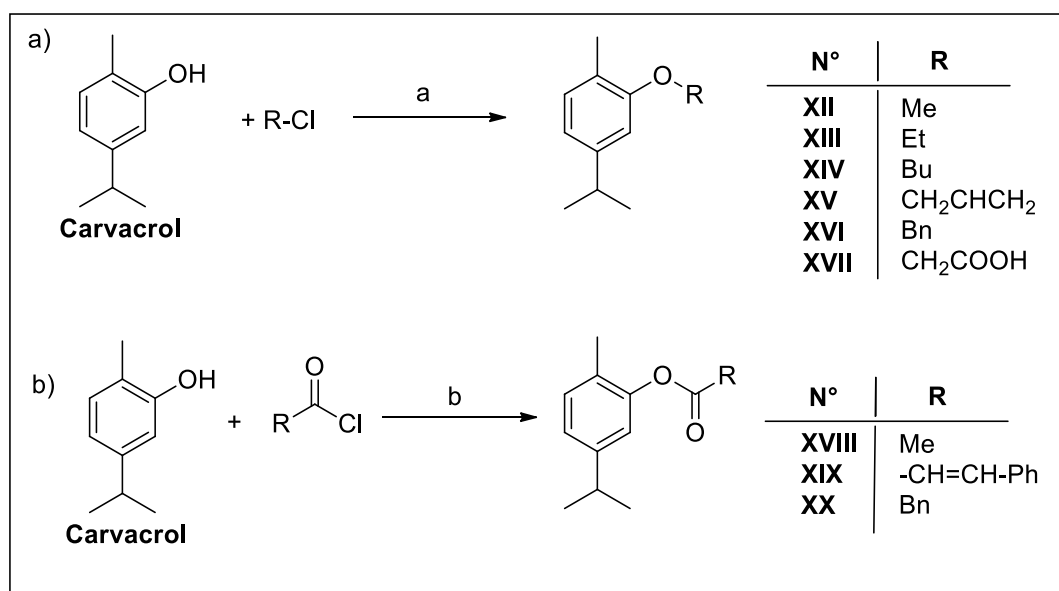
Reagentes e condições: a) K₂CO₃, Acetona, DMF; b) NaOH, Acetona, MW, 1-3h, 90-94%.

Os autores realizaram estudos antimicrobianos comparativos entre os éteres carvacrólicos obtidos e o próprio carvacrol contra quatro microorganismos Gram-positivos e Gram-negativos (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* e *Staphylococcus aureus*). Entre os derivados obtidos, os análogos 3-cloro-fenil **IX** e 3,4-dicloro-fenil **X** foram os mais ativos, com zonas de inibição de 21 e 18 mm respectivamente, frente ao *Bacillus subtilis*, resultado semelhante ao obtido em outro estudo com uma solução de clorexidina

(40000 $\mu\text{g mL}^{-1}$), uma clorofenil biguanida que possui atividade antimicrobiana baseada na capacidade de produzir alterações e danos irreversíveis na membrana microbiana (SILVA; JUNIOR, 2008). Entretanto, frente a *Escherichia coli*, ambos os compostos retêm a mesma inatividade verificada também no composto original. A atividade antimicrobiana entre o análogo naftil-substituído **XI** e o carvacrol mostrou ser semelhante (PATIL et al., 2010).

Outros derivados éteres **XII-XVII** (Esquema 5a) e ésteres **XVIII-XX** (Esquema 5b) foram sintetizados por Nikumbh et al. (2003) usando cadeias laterais alifáticas saturadas e não saturadas ou unidades aromáticas. Ambas as classes de compostos, testadas contra cepas bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas (*Bacillus megaterium*, *Bradyrhizobium japonic*, *Bacillus polymyxa* e *Bacillus subtilis*) permitiram apreciar uma resposta antimicrobiana maior em relação ao carvacrol, uma vez que todos os derivados apresentaram uma zona de inibição maior. (NIKUMBH; TARE; MAHULIKAR, 2003).

Esquema 5. Obtenção dos derivados éteres **XII-XVII** (rota a) e de derivados ésteres **XVIII-XX** (rota b) conforme descrito por Nikumbh e colaboradores (2003).

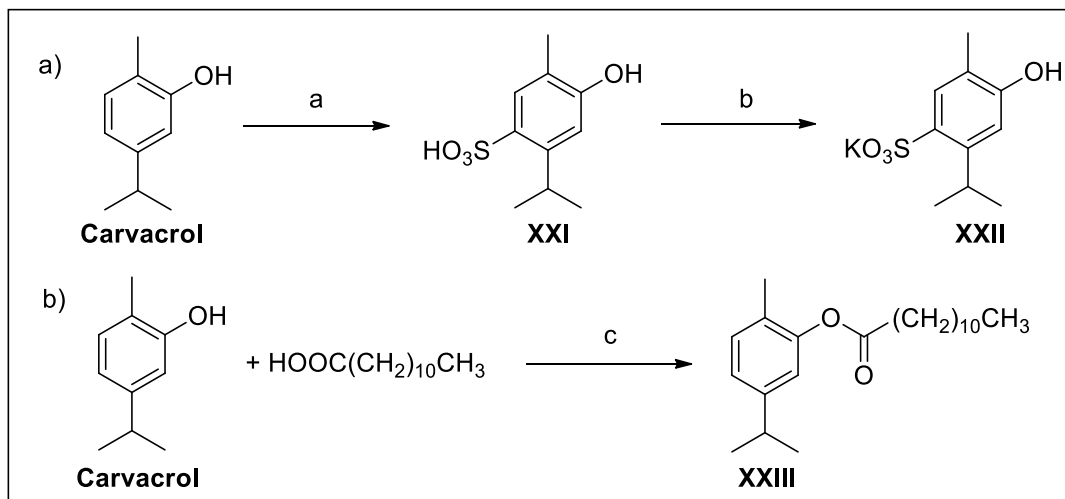


Reagentes e condições: a) NaOH 40%, refluxo, 4-5h, 83-90%; b) NaOH 40%, t.a., 2-3h, 85-92%.

Em um trabalho publicado por Bassanetti e colaboradores (2017), os derivados sulfônico **XXI**, sal sulfônico de potássio **XXII** (Esquema 6a)

e o derivado éster laurato **XXIII** (Esquema 6b) do carvacrol foram apresentados como uma série de moléculas híbridas desenvolvidas com o duplo objetivo de superar os conhecidos perfis físico-químicos desvantajosos dos constituintes de óleos essenciais e, ao mesmo tempo, reter sua atividade antimicrobiana.

Esquema 6. a) Síntese dos derivados sulfônico **XXI**, do sal sulfônico **XXII** e b) síntese do éster laurato **XXIII** a partir do carvacrol realizada por Bassanetti e colaboradores (2017).

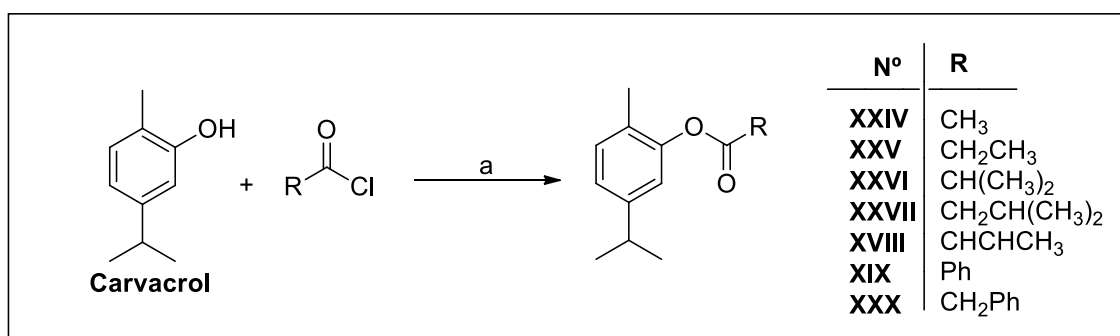


Reagentes e condições: a) H₂SO₄ 96% (m/v), 30 °C; 2h, 100%; b) MeOH, KOH (sol. Sat.), t.a. 95%; c) H₃PO₄ cat.; 150 °C, 12h, 51%.

Os autores testaram os compostos contra as estirpes de *Clostridium perfringens*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli*. Além do carvacrol que apresentou melhor perfil antimicrobiano (CIM e CBM com valores de $\leq 0,09$ a 0,75% (v/v)), os respectivos derivados exibiram atividade antimicrobiana reduzida, diminuindo na seguinte ordem: **XXI** com valores de CIM e CBM de 0,37 a 0,75% (v/v); **XXII** com valores de CIM e CBM de 0,37 a 5% (v/v) e o derivado **XXIII** com valores de CIM e CBM $> 10\%$ (v/v). Esses dados enfatizaram ainda mais a correlação entre o grupo hidroxila livre no anel fenólico e a potência antimicrobiana. Por outro lado, esses resultados foram apoiados por estudos de citotoxicidade, realizados em células humanas HT-29, revelando a maior segurança dessas novas entidades moleculares em relação ao carvacrol (BASSANETTI et al., 2017).

Mathela e colaboradores (2016) obtiveram derivados ésteres **XXIV-XXX** através da introdução dos grupos propionato, isobutirato, 3-metilbutanoato e but-2-enoato no lugar do grupo hidroxila, conforme o esquema 7. Entretanto, os dados destacaram que a inserção desses grupos estruturais no anel aromático do carvacrol resulta em uma diminuição da atividade antimicrobiana frente às seguintes cepas bacterianas avaliadas: *Streptococcus mutans* (MTCC 890), *Staphylococcus aureus* (MTCC 96), *Bacillus subtilis* (MTCC 121), *Staphylococcus epidermidis* (MTCC 435) e a bactéria Gram negativa *Escherichia coli* (MTCC 723). Dentre esses, o derivado **XXVII** apresentou o melhor resultado com uma CIM de 23,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$, frente a *Bacillus subtilis* (MTCC 121), entretanto, o valor é muito acima quando se comparado ao carvacrol (CIM = 11,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e também à ampicilina (CIM = 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (MATHELA; SINGH; GUPTA, 2016).

Esquema 7. Síntese dos derivados ésteres **XXIV-XXX** realizada por Mathela e colaboradores (2017).



Reagentes e condições: a) Et₃N, CH₂Cl₂ anidro, 0 °C/t.a., 10h, 75-85%.

A síntese de cofármacos permite obter novos derivados quiméricos com eficácia potencializada, proporcionando uma ação sinérgica entre as duas moléculas ligadas que, ao mesmo tempo, são capazes de exercer sua ação com diferentes mecanismos. Nesse campo, Cacciatore et al. (2015) sintetizaram dez derivados de carvacrol **XXXI-XL**, conjugando por meio de uma ligação éster o grupo hidroxila do carvacrol com a porção carboxila dos aminoácidos que contêm enxofre. A síntese dos cofármacos de carvacrol **XXXI-XL** foi realizada com sucesso usando *N,N'*-diciclo-hexilcarbodiimida (DCC), que

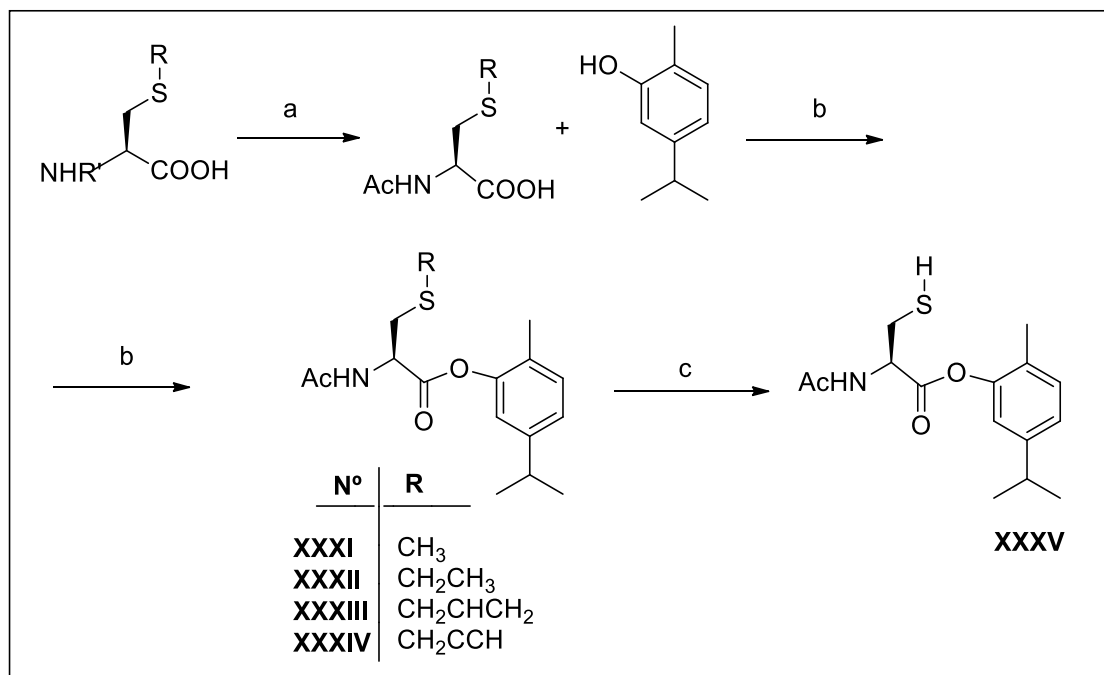
se mostrou um catalisador eficaz para a conversão de ácidos carboxílicos em ésteres e amidas conforme os esquemas 8, 9 e 10. (CACCIATORE et al., 2015).

As propriedades farmacocinéticas como solubilidade, lipofilicidade, cinética da hidrólise química, cinética da hidrólise enzimática, bem como as propriedades antimicrobianas dos derivados ésteres foram avaliadas *in vitro* frente a duas cepas de bactérias Gram-positivas (*S. aureus* ATCC 29213 e *S. epidermidis* ATCC 35984) e duas cepas de bactérias Gram-negativas (*E. coli* ATCC 8739 e *P. aeruginosa* ATCC 9027), e também uma cepa de fungo (*C. albicans* ATCC 10231).

Todos os compostos testados exibiram baixa solubilidade em água, boa estabilidade em ambiente ácido, no plasma humano e de rato e uma boa permeabilidade verificada pelo PAMPA-GI (ensaio de permeabilidade da membrana gastrointestinal artificial paralela). Com relação à atividade antimicrobiana, o derivado **XXXIII**, em comparação com os outros derivados, mostrou maior capacidade com valor de CIM e CBM correspondentes a 2,5 mg mL⁻¹, exceto frente à *Pseudomonas aeruginosa*, onde o mesmo apresentou valores de CIM e CBM de 5,0 e 10,0 mg mL⁻¹ respectivamente.

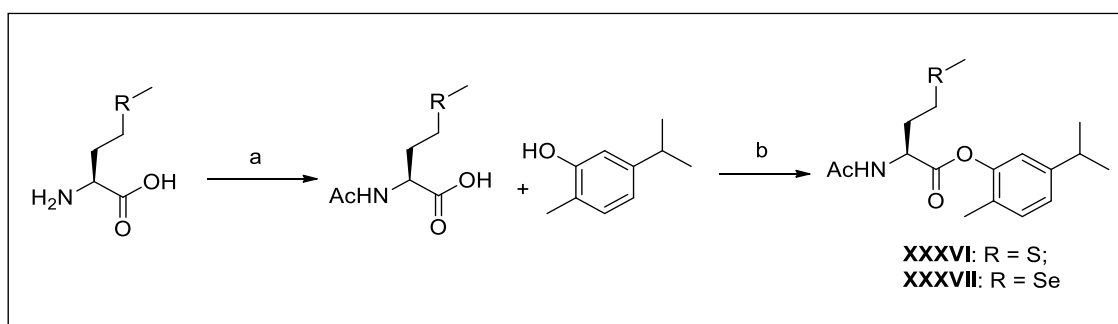
Enquanto isso, os outros derivados apresentaram valores de CIM e CBM de 5,0 e 10,0 mg mL⁻¹, respectivamente, na grande maioria dos casos, exceto o derivado **XXXIX** que apresentou um valor de CIM de 2,5 mg mL⁻¹ frente a *S. epidermidis* ATCC 35984 e um valor de CBM de 5,0 mg mL⁻¹ frente a mesma cepa. Embora a atividade antibacteriana desse derivado não seja particularmente boa, quando comparada ao carvacrol, que apresentou valores de CIM e CBM bem menores, entre 0,3 e 1,25 mg mL⁻¹ com relação às cepas testadas; os dados farmacocinéticos evidenciaram uma boa estabilidade em pH 1,3 em relação ao pH 7,4 na presença de pepsina e pancreatina, sugerindo que, após a absorção, seja possível liberar carvacrol e Ac-Cys(Alil)-OH devido à atividade enzimática (CACCIATORE et al., 2015).

Esquema 8. Rota sintética para obtenção dos derivados ésteres **XXXI-XXXV**, obtidos por CACCIATORE et al., 2015.



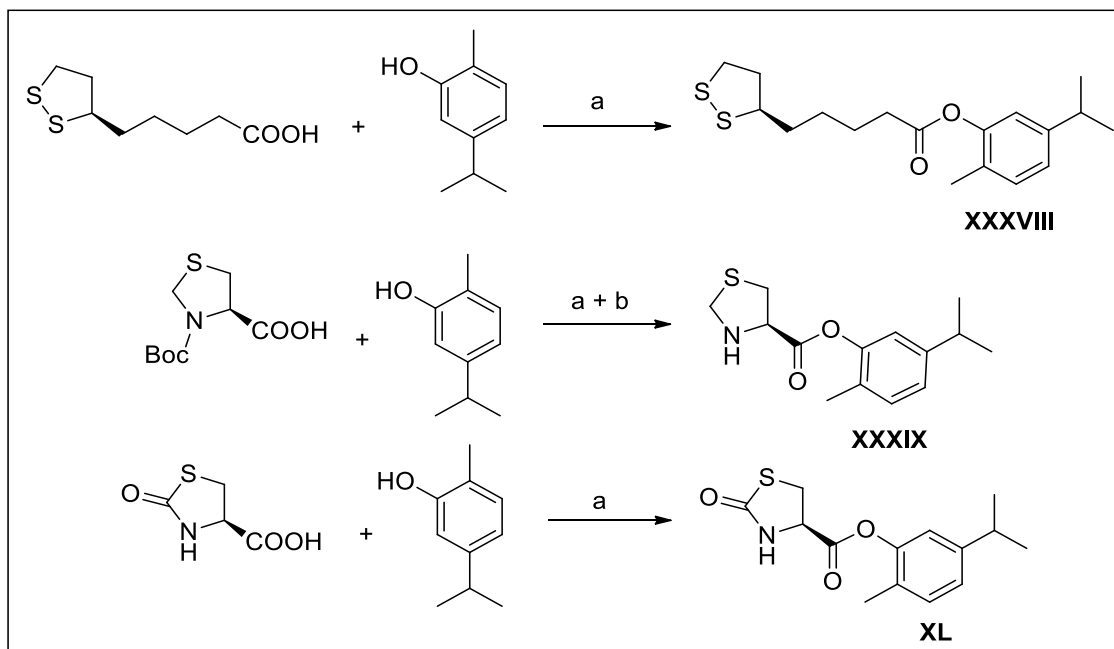
Reagentes e condições: a) Ac₂O, AcOH, t.a., 4 h, 59-99% para **XXXI**, **XXXII**, **XXXIII** e **XXXV**; KOH, Brometo de propargila, MeOH anidro, 60 °C, 1 h, 99% , para **XXXIV**; b) *N,N'*-dicio-hexilcarbodiimida (DCC) em DMF/CH₂Cl₂, t.a., 1 h, carvacrol; 4 -Dimetilaminopiridina (DMAP), t.a., 15 h; 30-42%; c) triisopropilsilano (TIPS), ácido trifluoracético (TFA) em CH₂Cl₂, t.a., 48 h, 88%.

Esquema 9. Rota sintética para obtenção dos derivados ésteres **XXXVI** e **XXXVII** realizada por CACCIATORE et al., 2015.



Reagentes e condições: a) Ac₂O, AcOH, t.a., 4h; b) *N,N'*-dicio-hexilcarbodiimida (DCC) em DMF/CH₂Cl₂, t.a., 1h, carvacrol, 4-dimetilaminopiridina (DMAP), t.a., 15h, 47% para X= S, 35% para X = Se.

Esquema 10. Rota sintética para obtenção dos derivados ésteres **XXXVIII**, **XXXIX** e **XL** realizada por CACCIATORE et al., 2015.



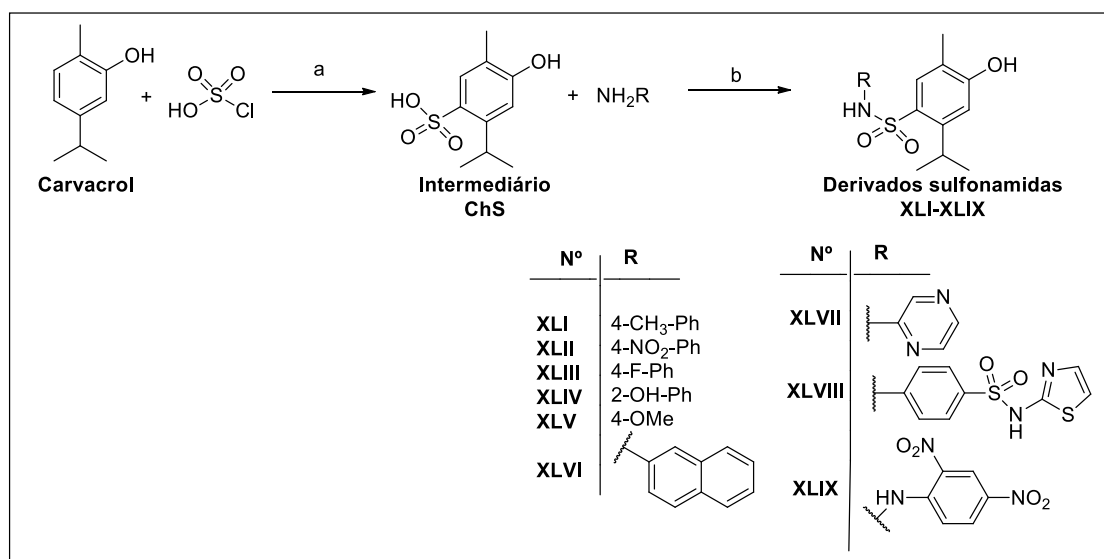
Reagentes e condições: a) *N,N'*-diciclo-hexilcarbodiimida (DCC) em DMF/CH₂Cl₂, 1 h, t.a., carvacrol, 4 -Dimetilaminopiridina (DMAP), t.a., 15 h, **XXXVIII** (38%), **XXXIX** (100%), **XL** (33%); b) ácido trifluoracético (TFA), 2 h, t.a.

De Oliveira et al. (2016) relataram a síntese e o perfil antimicrobiano *in vitro* de nove derivados de carvacrol **XLI-XLIX** obtidos pela inserção de aminas ao grupamento (ChS) ligado ao anel aromático do carvacrol previamente tratado com ácido clorossulfônico. A síntese dessas sulfonamidas **XLI-XLIX** foi realizada em duas etapas: primeiramente, a síntese do cloreto de 4-hidroxi-2-isopropil-5-metilbenzo-1-sulfonil (ChS); posteriormente, o ChS foi usado em reações com várias aminas, conforme o esquema 11 (DE OLIVEIRA et al., 2016).

Os resultados mostraram alta atividade antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25913), bem como a 8 cepas de *Staphylococcus aureus*, (S.a1; S.a2; S.a3; S.a4; S.a5; S.a6; S.a7 e S.a8) resistentes a meticilina, obtidos de material clínico coletado em um hospital, como parte de um estudo realizado em 2005 e 2006 (dados não publicados), em Itajaí, Santa Catarina, Brasil. Os derivados **XLI**, **XLIII** e **XLVIII**, contendo como

substituintes 4-tolueno, 4-fluorobenzeno e 4-amino-*N*-(tiazol-2-il) benzenossulfonamida, respectivamente, exibiram valores de CIM de 3,90 a 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o menor entre os compostos testados. Entretanto, quando comparados com o antibiótico de referência (vancomicina), possuem valores de CIM mais elevados, conforme a **Tabela 3** (DE OLIVEIRA et al., 2016).

Esquema 11. Derivados sulfonamidas **XLI-XLIX** obtidos por De Oliveira et al., 2016.



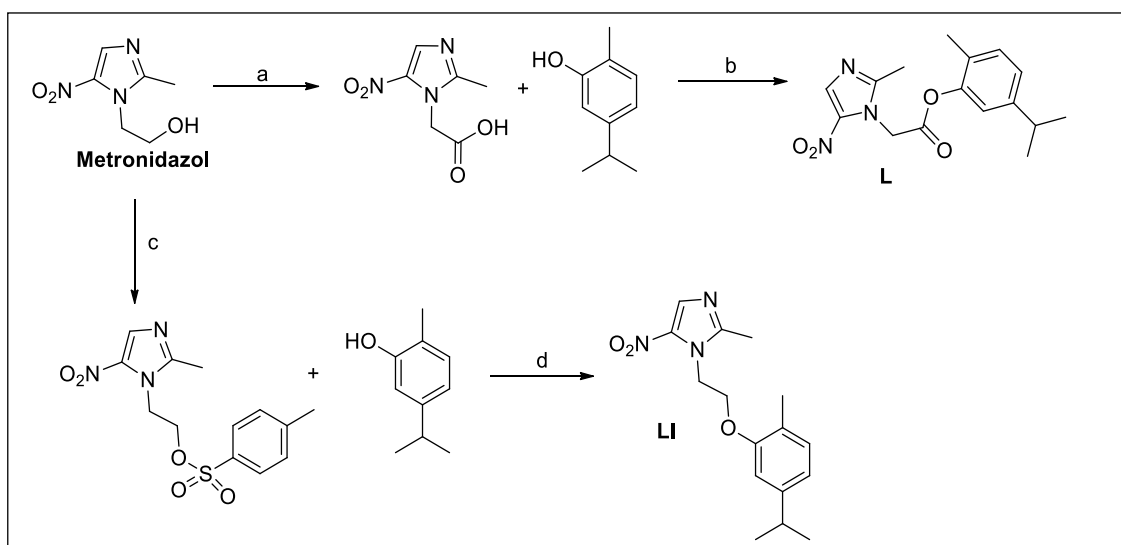
Reagentes e condições: a) 0 °C, instantânea; b) CH₂Cl₂, t.a., 3-6h, 76-92%.

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) em $\mu\text{g mL}^{-1}$ para as sulfonamidas com melhores resultados frente a diferentes cepas resistentes de *S. aureus*.

Compostos	<i>S.aureus</i>	S.a1	S.a2	S.a3	S.a5	S.a6	S.a8
Carvacrol	390,62	1562	1562,5	3125	781,2	1562,5	781,2
XLI	15,62	3,90	7,81	3,90	7,81	7,81	15,62
XLIII	31,25	7,81	62,50	7,81	31,25	7,81	31,25
XLVIII	31,25	7,81	31,25	31,25	62,50	15,62	62,50
Vancomicina	1,00	0,5	1,00	1,00	1,00	0,5	1,00

No combate a infecções anaeróbicas e parasitárias, Bkhaitan e colaboradores (2018) relatam que o metronidazol 2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etanol é um agente antimicrobiano bem conhecido e amplamente utilizado, sendo considerado o medicamento de escolha para infecções causadas por *Helicobacter pylori*. No entanto, pode ocorrer resistência bacteriana e ainda outros efeitos colaterais indesejados (BKHAITAN et al., 2018). Portanto, foram vários os esforços para desenvolver novos compostos nitroimidazóis que possuem atividade biológica melhorada. Nesse sentido, os autores sintetizaram um derivado de éster **L** e um derivado éter **LI** reagindo o metronidazol ou o seu ácido carboxílico correspondente, com carvacrol, conforme o esquema 12. (BKHAITAN et al., 2018)

Esquema 12. Obtenção do derivado éster **L** e do derivado éter **LI** obtidos por BKHAITAN et al., 2018.



Reagentes e condições: a) $K_2Cr_2O_7/H_2SO_4$, H_2O , t.a. overnight, 66% b) DCC/DMAP, $0\text{ }^\circ\text{C}$, 10 min, 40%; c) ácido *para*-tolueno sulfônico (APTS), CH_2Cl_2 , TEA, $0\text{ }^\circ\text{C}$, 5h, 51%; d) DMF, refluxo ($80\text{ }^\circ\text{C}$), 14-16h, 51%.

Ambos os compostos obtidos foram testados *in vitro* contra duas cepas de *H. pylori* (ATCC 26695 e P12) e uma de *Clostridium perfringens* (BKHAITAN et al., 2018). Os testes biológicos mostraram atividades apreciáveis para ambos os derivados, em especial para o derivado éter **LI**. Este composto

demonstrou excelentes atividades, atingindo 1,1 μM de atividade contra o *H. pylori* P12; 4900 μM frente a cepa ATCC 26695 e uma CIM de 2,7 μM frente a *Clostridium perfringens*. O composto **LI**, sendo o derivado mais promissor, foi testado quanto à sua seletividade contra fibroblastos fetais normais do pulmão humano e foi considerado seguro com um IC_{50} de 50 μM , ainda mais seguro que o composto de referência (metronidazol) que apresentou toxicidade de 49400 μM (BKHAITAN et al., 2018).

1.4 PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

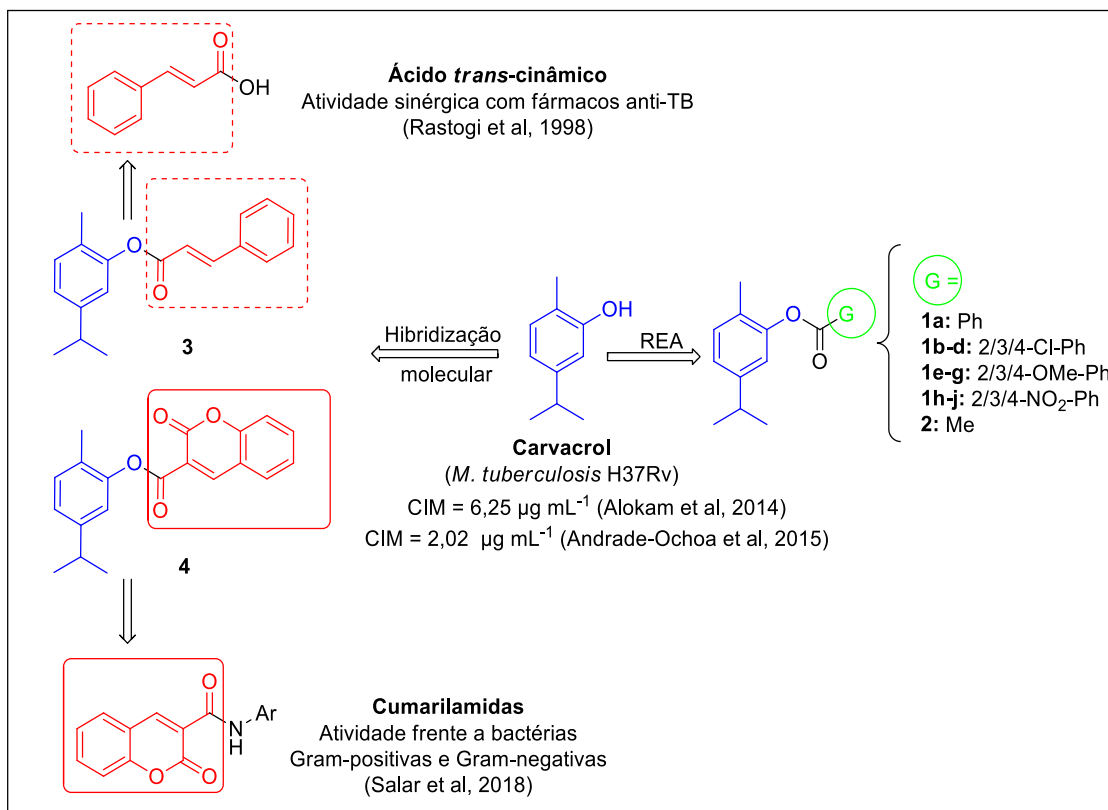
Conforme visto no ítem anterior, há uma grande variedade de estudos envolvendo derivados do carvacrol na busca por substâncias bioativas, sobretudo as que possuem atividade antimicrobiana. Diante desse cenário, pretende-se nesse trabalho explorar o potencial antimicrobiano desse terpenóide como substância-protótipo para a obtenção de análogos com propriedades físico-químicas e farmacológicas aprimoradas.

Sendo assim, o planejamento estrutural adotado com o intuito de se obter derivados do carvacrol com potencial atividade frente ao *Mycobacterium tuberculosis* e/ou à cepas de *Xanthomonas* foi baseado em duas estratégias bem conhecidas em Química Medicinal, conforme ilustrado na Figura 6.

A primeira estratégia (Figura 7, à direita) consiste na elaboração de um estudo de relação estrutura-atividade (REA) por meio da síntese de uma quimioteca de ésteres do carvacrol contendo em suas estruturas grupos alifáticos e aromáticos com diferentes características estereoelétricas a fim de se avaliar a influência desses grupos na atividade antimicrobiana. A funcionalização da hidroxila fenólica do carvacrol foi proposta com o intuito de se obter derivados com lipossolubilidade elevada, uma vez que conforme relatado pela literatura, seu mecanismo de ação envolve interação e desestabilização das membranas bacterianas, elementos celulares conhecidamente lipofílicos (MARINELLI; DI STEFANO; CACCIATORE, 2018).

A segunda estratégia (Figura 7, à esquerda) é denominada hibridização molecular, que consiste na união de duas ou mais unidades farmacofóricas presentes em determinadas substâncias bioativas, de modo a formar uma estrutura molecular híbrida que potencialize as atividades biológicas desejadas (VIEGAS-JUNIOR et al., 2007). Desse modo, a utilização dos grupamentos farmacofóricos *trans*-cinamoíla e 3-carboxi-cumarímico, que são reconhecidamente importantes para a atividade antimicrobiana (LI et al., 2012; RASTOGI et al., 1998) foi proposta nesse trabalho para se obter híbridos ainda mais eficazes frente aos patógenos-alvo.

Figura 7. Planejamento estrutural dos derivados do carvacrol com potencial atividade antimicrobiana frente ao *Mycobacterium tuberculosis* e/ou às cepas de *Xanthomonas*.



Legenda: Em azul: núcleo carvacrólico (Farmacofórico) mantido em todos os derivados propostos. Em Vermelho: grupos farmacofóricos utilizados para hibridização molecular, sendo o pontilhado *trans*-cinamoíla e o sólido 3-carboxicumarímico. Em verde: Grupos com diferentes características stereo-eletrônicas para construção da quimioteca visando realizar um estudo de relação estrutura-atividade (REA).

Embora saia do escopo desse trabalho por necessitar de ensaios *in vivo*, a produção de ésteres do carvacrol também pode ser justificada para diminuir a volatilidade e melhorar as propriedades organolépticas, tais como o odor e sabor pungentes do carvacrol através do processo de latenciação, que é a transformação do fármaco em forma de transporte inativo que, *in vivo*, mediante reação química ou enzimática, libera a porção ativa no local de ação ou próximo dele. Uma das formas latentes obtidas mediante este processo denomina-se pró-fármaco. Os pró-fármacos clássicos promovem a melhoria da atividade terapêutica por aumento de biodisponibilidade, diminuição da toxicidade, prolongamento da ação, aumento da seletividade, mediante a escolha de transportador adequado, geralmente de caráter lipofílico. Estes pró-fármacos são menos ativos quando comparados à molécula matriz e devem sofrer reação de hidrólise (química ou enzimática) para liberar a porção ativa (CHUNG et al., 2005).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Sintetizar ésteres do carvacrol e avaliar suas possíveis atividades antimicrobianas frente ao *Mycobacterium tuberculosis* e espécies do gênero *Xanthomonas*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

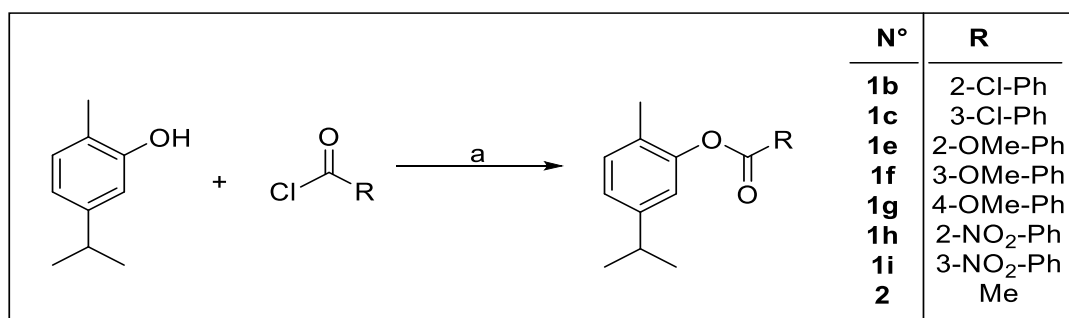
- Síntese de derivados do carvacrol através de metodologias eficientes de esterificações, seguras e de baixo custo;
- Avaliação *in vitro* do potencial antimicrobiano dessas substâncias frente ao *M. tuberculosis*, bem como frente às cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*; *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalyptorum*, fitopatógenos causadores do cancro cítrico, doença da mancha bacteriana em leguminosas e a mancha bacteriana no eucalipto, respectivamente.
- Realização de um estudo de relação estrutura-atividade visando mapear os pontos-chave para a atividade antimicrobiana.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 SÍNTESE DOS DERIVADOS ÉSTERES 1B; 1C; 1E-I E 2.

A rota sintética para a obtenção dos derivados do carvacrol foi baseada em uma reação de esterificação, onde essa substância reagiu com os cloretos de ácido correspondentes, disponíveis comercialmente, em diclorometano como solvente e trietilamina (Et_3N) como base (Esquema 13).

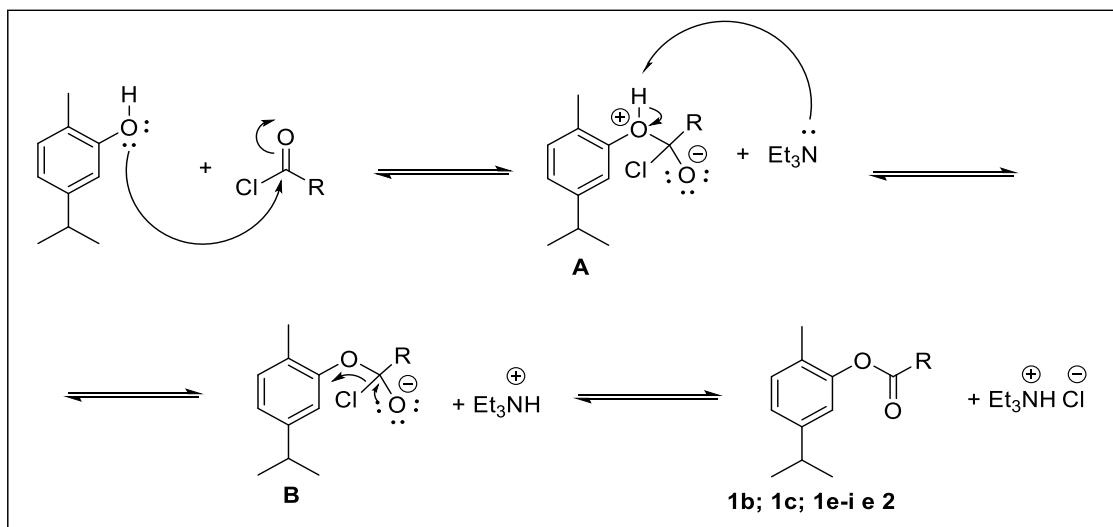
Esquema 13. Rota sintética para a obtenção dos ésteres do carvacrol **1b-c**; **1e-i** e **2**.



Reagentes e condições: CH_2Cl_2 , Et_3N , 0 °C, 4-5h, 61-87%.

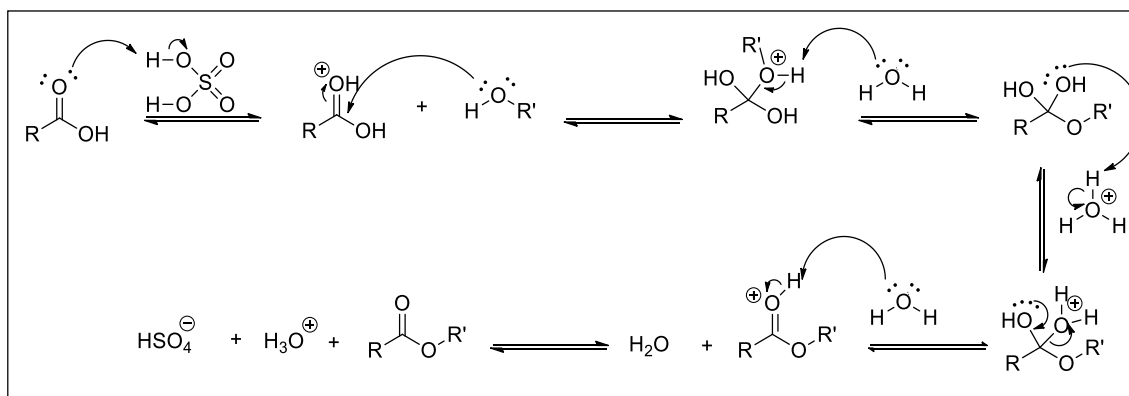
Essa reação se processa por meio de uma substituição nucleofílica acílica, conforme proposto no esquema 14. O mecanismo se inicia com o ataque nucleofílico do par de elétrons do oxigênio da hidroxila fenólica do carvacrol à carbonila do cloreto de acila, formando um intermediário tetraédrico protonado (**A**). Posteriormente, tal intermediário sofre uma desprotonação pela base Et_3N , formando o intermediário (**B**), que então colapsa, promovendo a saída do íon cloreto e regenerando a ligação dupla, o que leva à formação dos ésteres desejados (**1b-c**; **1e-i** e **2**).

Esquema 14. Proposta mecanística para a formação dos derivados ésteres **1b-c**; **1e-i** e **2**.



Classicamente, a obtenção de ésteres ocorre por meio de uma metodologia conhecida como esterificação de Fischer, que consiste no aquecimento de um ácido carboxílico e um álcool, ou um composto fenólico, na presença de um catalisador ácido, geralmente ácido sulfúrico (OLIVEIRA et al., 2014), conforme o mecanismo proposto (Esquema 15).

Esquema 15. Mecanismo proposto para esterificação de Fischer.



Segundo o princípio da reversibilidade microscópica, o mecanismo proposto para a formação do éster deve ser igual ao que ocorre na direção inversa, que é a hidrólise do éster formado. Então, como ocorre a formação de água durante o curso da reação e como o meio reacional está ácido,

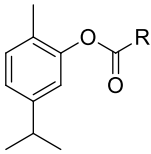
fatalmente ocorre uma reação de hidrólise do éster recém-formado. Portanto, para minimizar as perdas e aumentar os rendimentos dessa reação, uma estratégia utilizada é a remoção da água formada, o que pode ser feito por meio da utilização de agentes dessecantes, peneira molecular ou de um vidraria especial conhecida como Dean-Stark, a qual retira a água por destilação azeotrópica e, assim, favorece a formação do éster (OLIVEIRA et al., 2014). Além disso, outras estratégias como utilizar excesso do nucleófilo e o uso de elevadas temperaturas também podem auxiliar na obtenção dos ésteres, pois favorecem o deslocamento do equilíbrio no sentido da formação dos produtos.

Diante disso, optou-se pela rota sintética mencionada anteriormente (Esquema 13), que ocorre em condições mais brandas (em banho de gelo) e o nucleófilo é utilizado em quantidades estequiométricas, sendo inclusive o reagente limitante, e não mais o solvente da reação. Outro fato que contribuiu com essa escolha foi a alta reatividade dos cloretos de acila quando comparados aos ácidos correspondentes, o que permite a realização dessas reações sem a necessidade do uso de ácido como catalisador. A necessidade de um eletrófilo mais forte, também se faz necessário pois os fenóis são menos nucleofílicos do que um álcool secundário ou primário, que são normalmente os substratos típicos usados em esterificações de Fischer. Além disso, fenóis são excelentes grupos de saída, se comparados aos álcoois, o que favoreceria a hidrólise do éster nas condições de Fischer.

Por meio dessa metodologia (Sessão 5.3, p. 82), as substâncias (**1b-c**; **1e-i** e **2**) foram devidamente preparadas e purificadas por cromatografia em coluna, onde utilizou-se como eluente um gradiente de polaridade de hexano/acetato de etila, iniciando-se com hexano 100%, seguido do aumento da polaridade com adição de acetato de etila 2%; 5%; 10 e 20%, sendo devidamente monitorada por cromatografia em camada delgada.

Obteve-se então os produtos descritos acima, apresentando estes um aspecto oleoso, em rendimentos que variaram de moderados à ótimos (61 a 87%), conforme observado na **Tabela 4**.

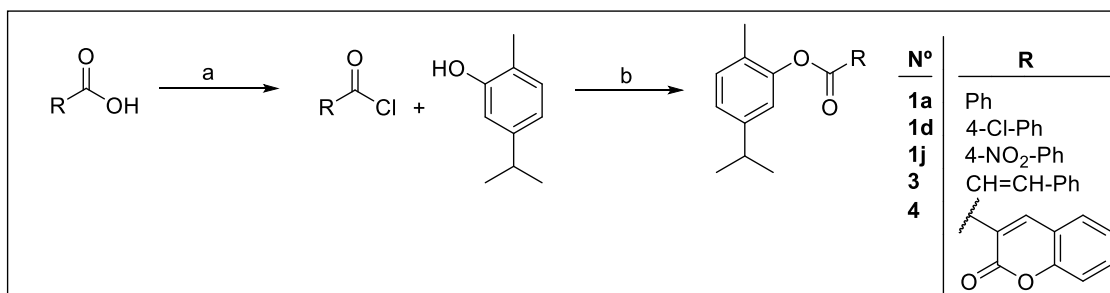
Tabela 4. Identificação e rendimentos dos derivados **1b-c**; **1e-i** e **2** sintetizados.

Substâncias		Características físicas	Rendimento (%)
	Onde R:		
1b	2-Cl-Ph	Líquido incolor	63
1c	3-Cl-Ph	Óleo amarelo	87
1e	2-OMe-Ph	Óleo amarelo	61
1f	3-OMe-Ph	Líquido incolor	73
1g	4-OMe-Ph	Líquido incolor	77
1h	2-NO ₂ -Ph	Óleo amarelo	63
1i	3-NO ₂ -Ph	Sólido branco	70
2	Me	Óleo amarelo	70

3.2 SÍNTESE DOS DERIVADOS 1A; 1D; 1J; 3 E 4

Para a obtenção dos derivados **1a**; **1d**; **1j**; **3** e **4** foi necessário utilizar uma rota sintética com mais uma etapa reacional, pois os cloretos de acila correspondentes não estavam disponíveis e, portanto, precisaram ser preparados previamente. Inicialmente, reagiu-se o ácido carboxílico correspondente com cloreto de tionila para a formação do cloreto de acila, onde utilizou-se diclorometano como solvente e *N,N*-dimetilformamida (DMF) como catalisador, sendo a mistura reacional mantida sob agitação magnética e atmosfera inerte (N₂) por uma hora. Com a formação do cloreto de acila correspondente, ocorre então a reação deste intermediário com o carvacrol para a obtenção do éster desejado (Esquema 16).

Esquema 16. Rota sintética para a obtenção dos derivados **1a**, **1d**, **1j**, **3** e **4**.

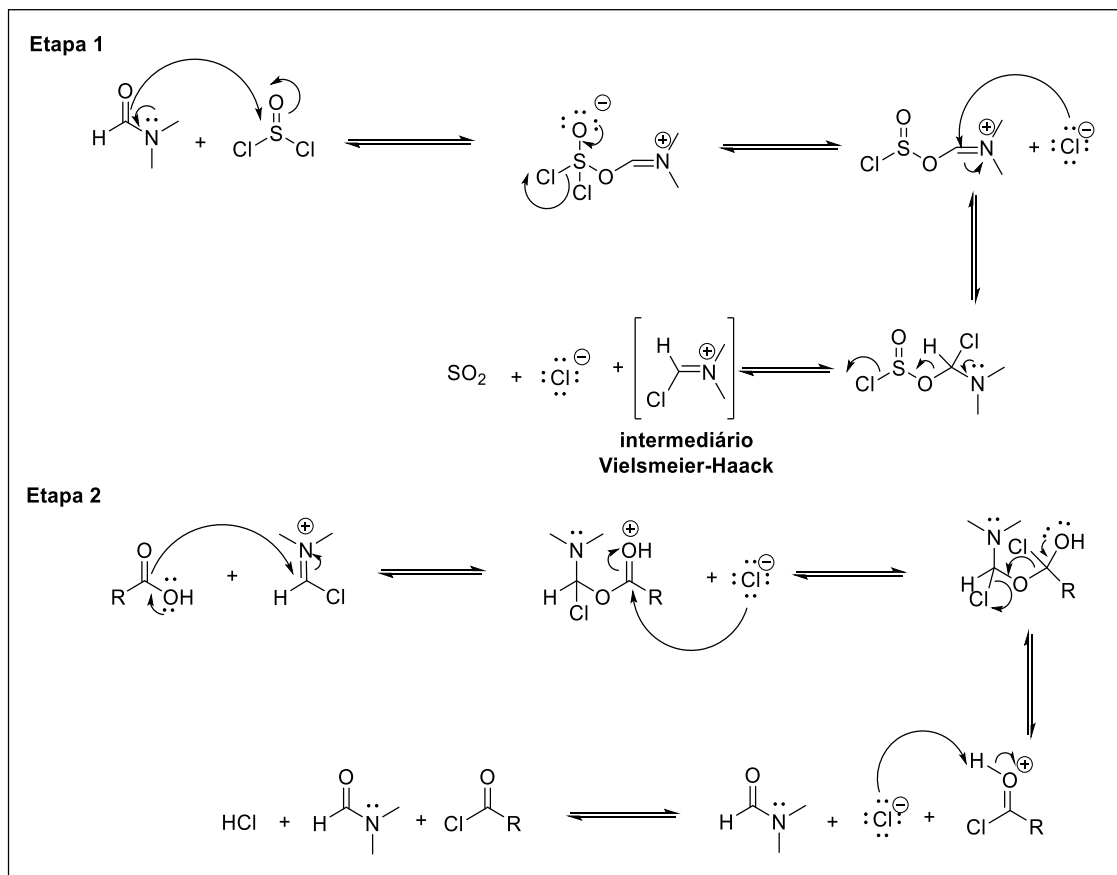


Reagentes e condições: a) SOCl₂ (3 eq) CH₂Cl₂, DMF, N₂, t.a. 1h. b) CH₂Cl₂, Et₃N, 39 °C, 3-4h, 21-67%.

A metodologia empregada para a obtenção do cloreto de acila utiliza DMF como catalisador, que por meio da reação com cloreto de tionila forma um intermediário, altamente reativo, análogo ao intermediário formado na reação de Vielsmeier-Haack (Esquema 17, etapa 1) (SINGH et al., 2005). Na sequência, acontece o ataque nucleofílico do ácido carboxílico ao átomo de carbono extremamente eletrofílico do intermediário previamente formado. Logo após, o íon cloreto volta ao centro reacional, formando um intermediário tetraédrico, que sofre um colapso com a volta do par de elétrons da hidroxila, regenerando assim o catalisador. Na sequência, o íon cloreto captura um próton, formando assim o cloreto de acila correspondente, juntamente com ácido clorídrico, conforme o esquema 17. A partir disso, para a formação do derivado éster desejado, a reação prossegue exatamente como no mecanismo proposto no Esquema 14 (p. 50).

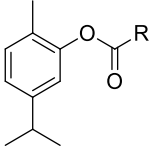
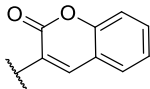
Além de se utilizar uma quantidade bem menor de cloreto de tionila (3 eq), em comparação com a metodologia clássica (DE VITA et al., 2016) para a obtenção de cloretos de ácido, que utiliza grande excesso de SOCl₂ (20 eq), a reação é muito mais rápida, ocorrendo em apenas uma hora e em atmosfera inerte, enquanto que na metodologia clássica, há a necessidade de aquecimento e refluxo por no mínimo 2,5 horas.

Esquema 17. Proposta mecanística para formação dos cloretos de acila correspondentes aos derivados **1a**; **1d**; **1j**; **3** e **4**.



Sendo assim, por meio dessa rota sintética (Sessão 5.4, p. 86), as substâncias (**1a**; **1j** e **3**) foram devidamente preparadas e purificadas por cromatografia em coluna, onde utilizou-se como eluente uma mistura de hexano/acetato de etila, assim como descrito anteriormente, e obtidas como óleo ou sólidos, em rendimentos que variaram de 21 a 67%, conforme observado na **Tabela 5**. Entretanto, os derivados **1d** e **4** não foram obtidos por meio dessa estratégia.

Tabela 5. Identificação e rendimentos dos derivados **1a**, **1d**, **1j**, **3** e **4**.

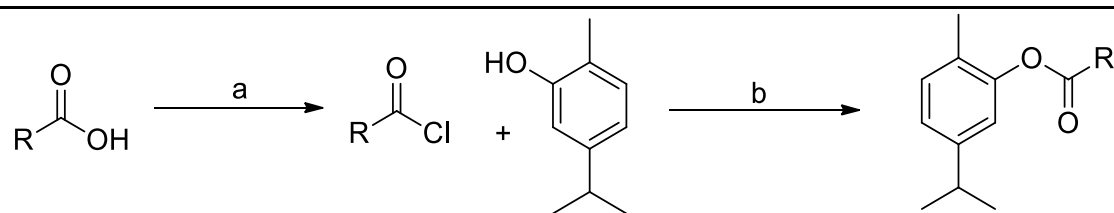
Substâncias	Estruturas		Rendimento* (%)
		Características físicas	
	Onde R:		
1a	Ph	óleo incolor	21
1d	4-Cl-Ph	-----	----
1j	4-NO ₂ -Ph	Sólido branco	34
3	-CH=CH-Ph	Sólido branco	67
4		-----	----

* em 2 etapas

3. 3 TENTATIVAS DE SÍNTESE DOS DERIVADOS 1d E 4.

Conforme mencionado na sessão anterior, os derivados **1d** e **4** não puderam ser obtidos por meio da metodologia descrita no Esquema 18. Portanto, visando obtenção das substâncias de interesse, realizaram-se algumas modificações na estequiometria da reação e na temperatura do meio reacional, principalmente, para que todo material de partida fosse consumido, e assim os produtos obtidos pudessem ser purificados via coluna cromatográfica ou recristalização (**Tabela 6**).

Tabela 6. Condições experimentais utilizadas nas tentativas de obtenção dos derivados **1d** e **4**.



Reagentes e condições: a) SOCl_2 , CH_2Cl_2 , DMF, N_2 , t.a. 1h. b) CH_2Cl_2 , Et_3N , 39°C , 3-4h, 21-67%.

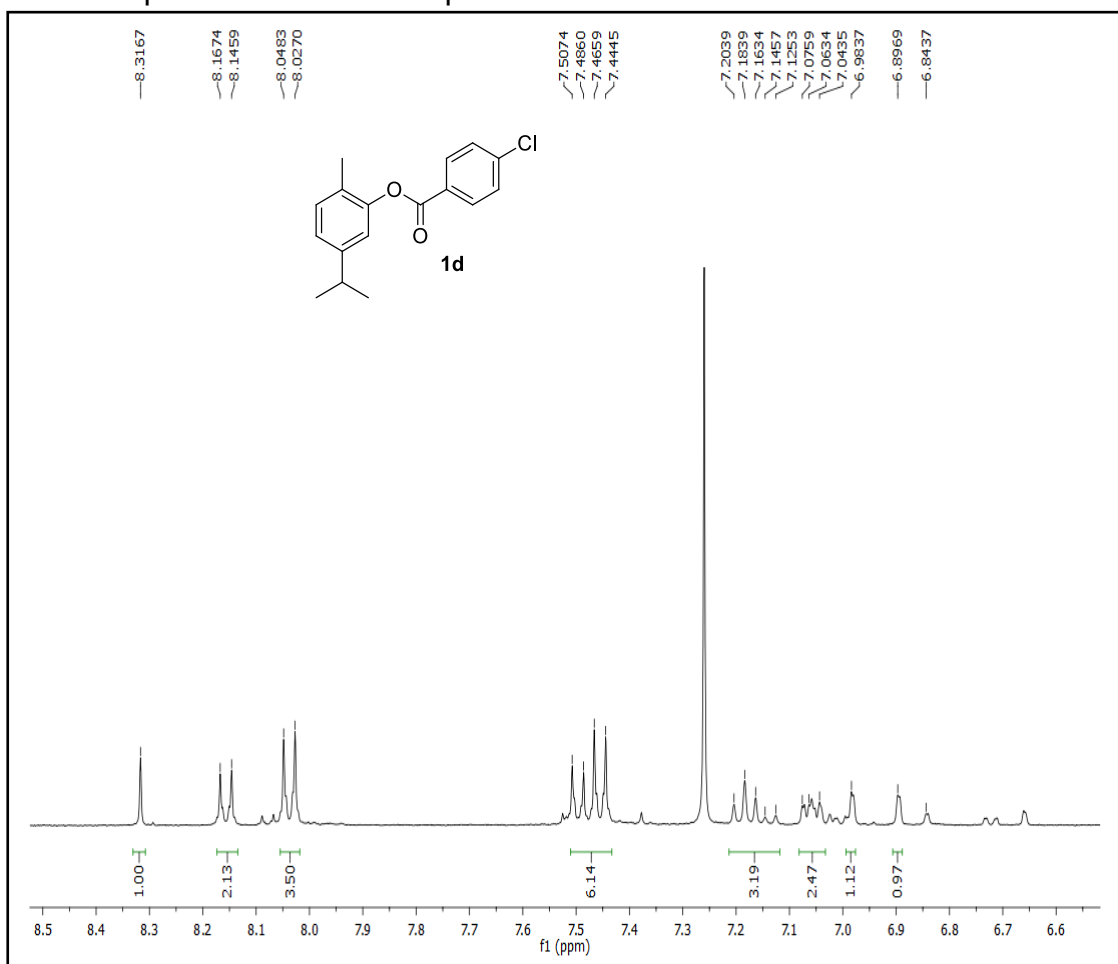
Entrada	Nº Equivalentes (ácido: SOCl_2 : Carvacrol)	Condições	Tempo (h)	Resultado*
1	3:9:1	Atmosfera inerte, t.a.	12	Carvacrol não consumido
2	3:18:1	Atmosfera inerte, t.a.	12	Carvacrol não consumido
3	6:9:1	Atmosfera inerte, t.a.	12	Carvacrol não consumido
4	3:9:1	refluxo	3	Consumo total de carvacrol

* Resultado observado por CCD, comparando-se uma alíquota do meio reacional com um padrão de carvacrol.

Como pode ser observado na tabela 6, nas entradas 1-3 manteve-se a reação sob atmosfera inerte por um período de 12 horas, variando-se apenas as proporções ácido/ SOCl_2 /carvacrol. Na entrada 2, duplicou-se a quantidade de SOCl_2 em relação a entrada 1, enquanto na entrada 3, o número de equivalentes de ácido foi duplicado. Entretanto, não houve um consumo total de material de partida nessas três tentativas, o que indica que as mudanças na estequiometria não foram eficazes para promover o término da reação. Assim, optou-se por mudar a condição reacional (Entrada 4), que antes era em atmosfera inerte a temperatura ambiente (Entrada 1) para aquecimento sob refluxo por 3 horas, onde observou-se o consumo total de carvacrol.

Entretanto, mesmo com o consumo total da matéria-prima sendo observado por CCD (cromatografia em camada delgada), não se obteve os compostos desejados após a purificação. No caso do derivado **1d**, mesmo após separação por coluna cromatográfica, onde utilizou-se como eluente hexano/acetato de etila (95:5) e 3 gotas de Et₃N, observou-se que o mesmo se encontrava impuro. Conforme pode-se notar na expansão da região dos hidrogênios ligados a anéis aromáticos entre 6,5-8,0 ppm do espectro de RMN de ¹H (figura 8), há muitos sinais sobrepostos e indefinidos com integrais que ultrapassam o número de hidrogênios da molécula.

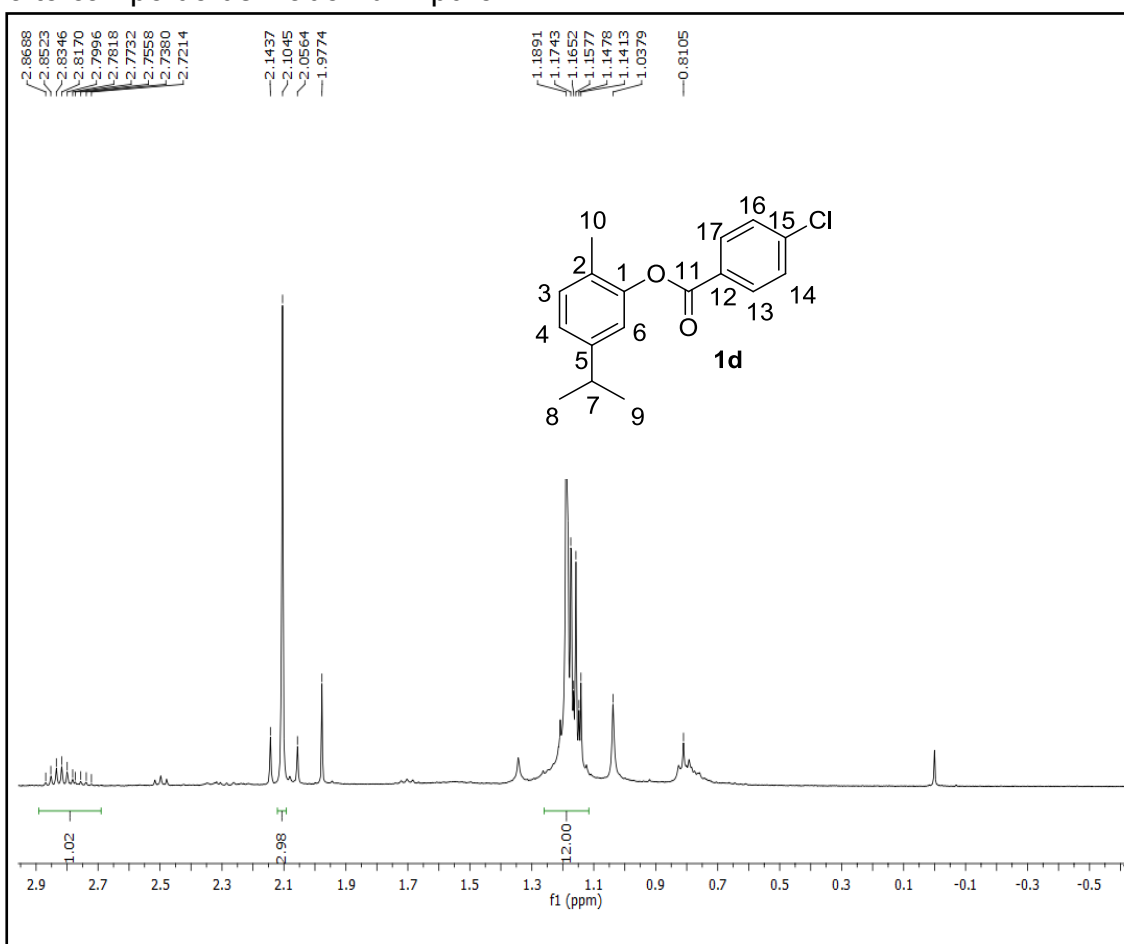
Figura 8. Expansão do espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) da região de baixo campo do derivado **1d** impuro.



Além disso, expandindo-se o espectro de RMN de ¹H (figura 9) foi possível observar que, na região entre 2,80-3,00 ppm, além do hepteto característico do hidrogênio metínico do grupo isopropila, estão presentes sinais

que indicam que o produto ainda está contaminado com carvacrol. É possível observar também, próximo ao simpleto em 2,09 ppm referente aos hidrogênios do grupo metila ligado ao anel aromático do carvacrol, a presença de sinais relativos a impurezas e por fim, um multiplete em 1,25-1,10 ppm com integral referente a 12 átomos de hidrogênio, corroborando ainda mais a hipótese de hidrólise do produto, pois era de se esperar, nessa região, apenas um duplete, com integral igual a 6, referente às metilas do grupamento isopropila. Essas evidências sugerem que pode ter ocorrido a hidrólise do éster, favorecida devido ao pH ácido, tanto do meio reacional após o isolamento do produto, como da sílica, utilizada como fase estacionária da cromatografia realizada na tentativa de purificação de **1d**.

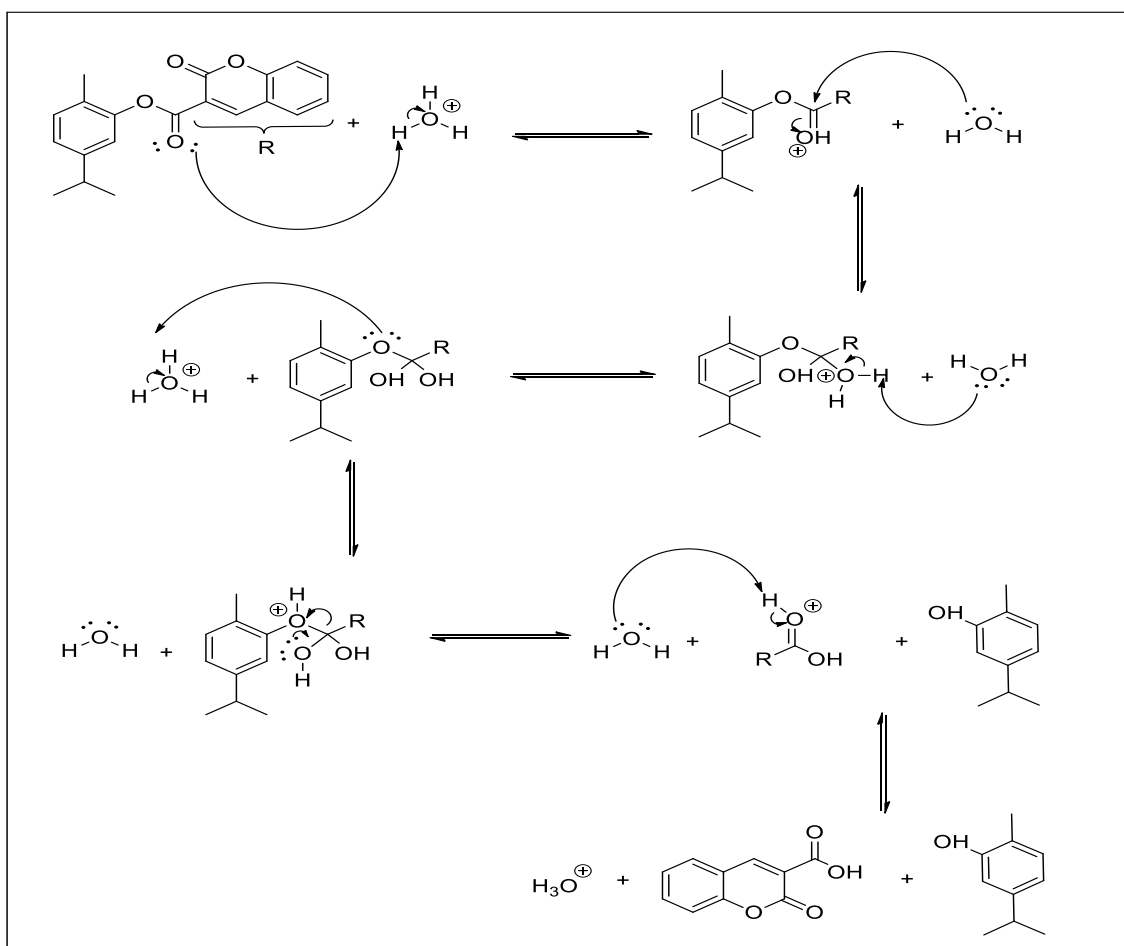
Figura 9. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da região de alto campo do derivado **1d** impuro.



Com relação ao derivado **4**, mesmo variando-se as condições reacionais, não foi possível a obtenção do produto desejado, pois devido a

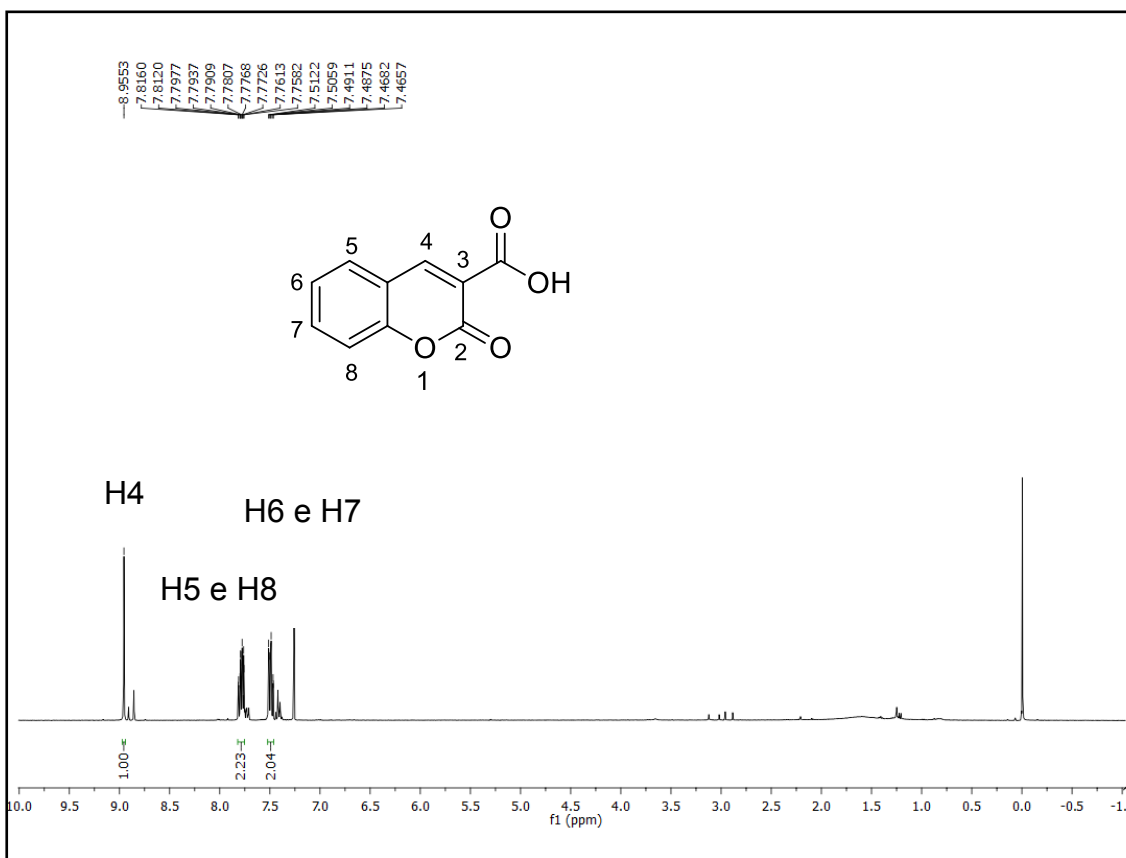
acidez do meio reacional, uma das possíveis hipóteses, seria a de que o produto provavelmente havia sofrido hidrólise durante o isolamento do produto, como proposto no esquema 18.

Esquema 18. Proposta mecanística da hidrólise do derivado **4** em meio ácido.



Entretanto, o espectro de RMN de ^1H (figura 10) sugere uma possível hidrólise do cloreto de acila formado na primeira etapa da reação, gerando o ácido 3-carboxi-cumarínico, pois nota-se a presença de sinais característicos do núcleo cumarínico e a ausência de sinais referentes ao carvacrol.

Figura 10. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do produto obtido na tentativa de síntese do derivado **4**.

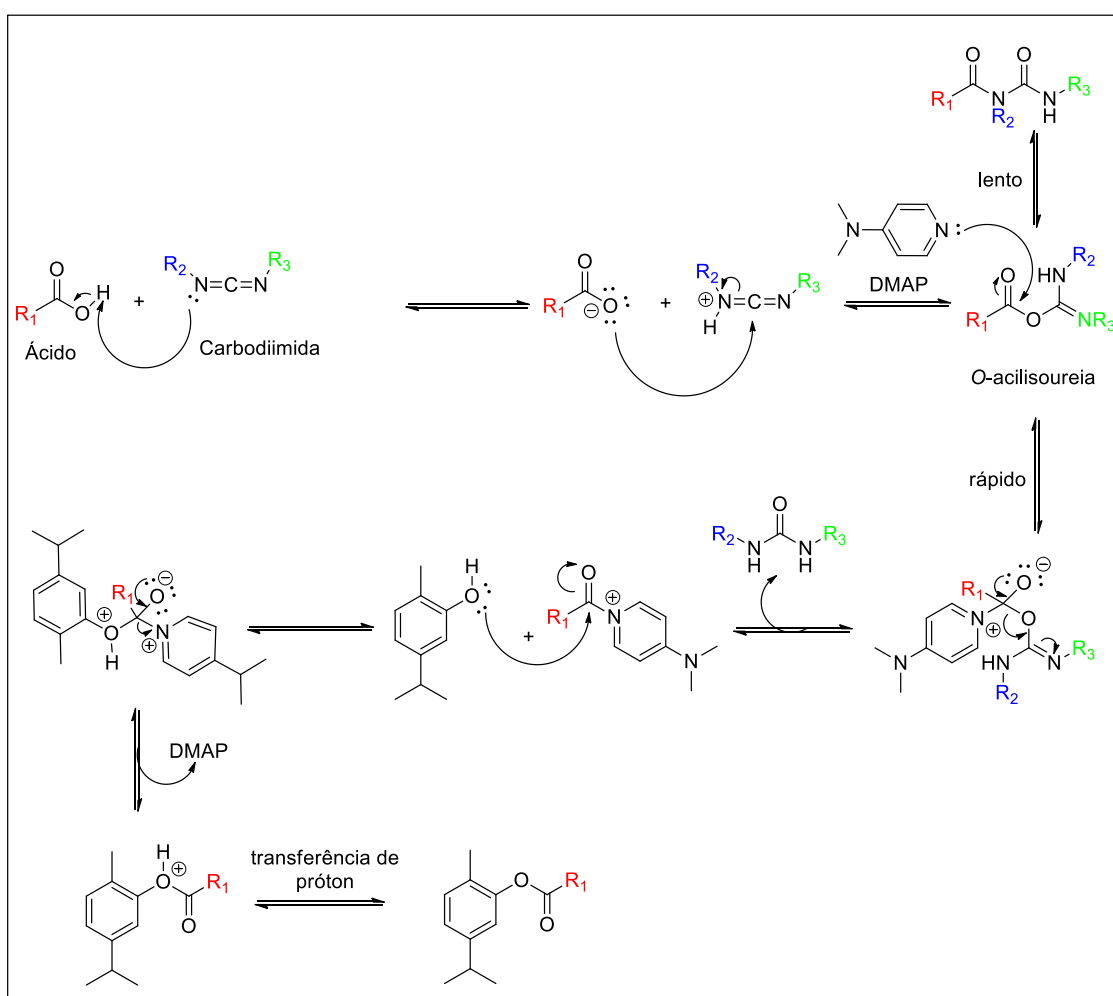


Devido ao insucesso nas tentativas de obtenção dos derivados **1d** e **4**, optou-se como alternativa para a obtenção desses derivados, a esterificação de Steglich, na qual ocorre um acoplamento de carbodiimida. Essa rota sintética tem sido utilizada para facilitar a esterificação de ácidos e vários álcoois e/ou fenóis, sem a necessidade de altas temperaturas ou intermediários reativos como cloretos de acila (LUTJEN et al., 2018).

A esterificação de Steglich (esquema 19) utiliza uma carbodiimida juntamente com *N*-(dimetilamino) piridina (DMAP) para ativar um ácido e permitir a formação de éster. Nesta reação, o ácido é ativado pela carbodiimida, no caso 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), que permite uma extração aquosa eficiente, elimina a necessidade de uma etapa de purificação por cromatografia e gera um subproduto de uréia que não apresenta riscos à saúde ou ao meio ambiente, para formar um intermediário *O*-acilisourea. Para a síntese de éster, a adição de *N*-(dimetilamino)piridina (DMAP) é

necessária para minimizar a formação do subproduto da migração acil, que compete com o ataque nucleofílico do álcool no intermediário *O*-acilisourea. A formação de subprodutos de migração acil intramolecular é lenta em comparação com o ataque nucleofílico dos grupos amino. Sob condições que utilizam um excesso de DMAP, forma-se um intermediário acilpiridínio, que reage com o álcool para regenerar o DMAP e formar o produto éster (LUTJEN et al., 2018).

Esquema 19. Proposta mecanística geral para reação de esterificação de Steglich.

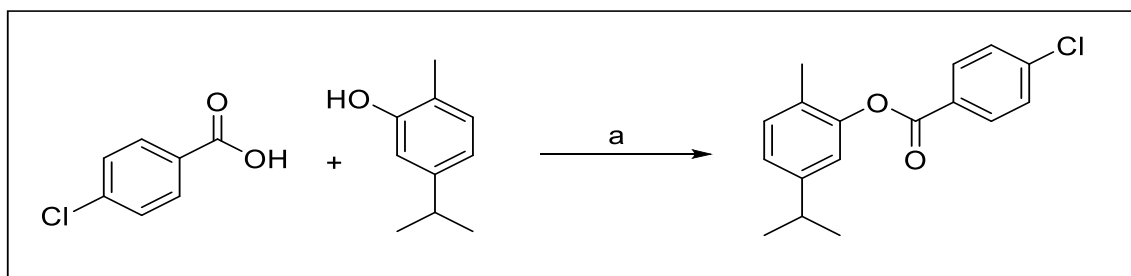


Fonte: Adaptado de (LUTJEN et al., 2018).

Utilizando-se dessa metodologia, foi possível a obtenção do derivado **1d**, onde o ácido 4-clorobenzóico (0,31 mmol, 1,2 eq), EDC (0,39 mmol, 1,5 eq), carvacrol (0,26 mmol, 1,0 eq) e DMAP (0,78 mmol, 3,0 eq) foram solubilizados em acetonitrila, previamente tratada. Após o consumo total do

carvacrol, detectado por CCD, o produto foi devidamente isolado, conforme descrito no ítem 5.5 (pg. 88) produzindo o éster correspondente em 14% de rendimento (esquema 20).

Esquema 20. Rota sintética para obtenção do derivado **1d**.



Reagentes e condições: a) EDC, DMAP, MeCN, N₂, t.a, 3h, 14%.

Devido ao baixo rendimento na obtenção do derivado **1d**, bem como ao alto custo da carbodiimida (EDC), optou-se por não seguir essa metodologia para obtenção do derivado **4**.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS SINTETIZADOS

Os derivados obtidos **1a-j**, **2** e **3** foram devidamente caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C, DEPT-135, DEPT-90 e HSQC, bem como por espectrometria de massas, cujo espectros encontram-se no apêndice A (pág. 98 a 128). De modo geral, os espectros de RMN de ¹H evidenciaram a formação dos produtos almejados, uma vez que os mesmos apresentaram sinais característicos do núcleo carvacrílico, tais como: um duplete em 7,20 ppm (H3), um duplo duplete em 7,06 ppm (H4) e outro duplete em 7,00 ppm (H6), contendo 1 hidrogênio cada, que correspondem aos hidrogênios aromáticos; outro sinal característico é o hepteto entre 3,07-2,84 pm, correspondente ao hidrogênio metínico (H7), um simpleto em 2,25 ppm, com integral igual a 3, referente aos hidrogênios do

grupamento metila ligado ao anel aromático (H10) e, por fim, um duplete em 1,25 ppm, com integral igual a 6, referente ao hidrogênios dos carbonos metílicos (H8 e H9), ambos do grupo isopropila.

Além desses sinais, os derivados **1a-j** e **3** apresentaram outros sinais com diferentes multiplicidades na região compreendida entre 7,30 a 8,0 ppm referentes aos hidrogênios ligados ao grupo benzoíla, dependendo do substituinte e da sua posição no anel aromático. Para o derivado acetilado **2**, observou-se a presença de um simpleto em 2,32 ppm, contendo 3 hidrogênios, relativo aos hidrogênios metílicos ligados à carbonila (H12). Para o híbrido com o ácido *trans*-cinâmico, derivado **3**, observou-se ainda dois dupletos, um em 7,90 ppm e outro entre 6,55 ppm, ambos com constantes de acoplamento $J = 15,9$ Hz, característicos de hidrogênios que se acoplam em configuração *trans*, pertencentes a carbonos com hibridização sp^2 .

Quanto aos espectros de RMN de ^{13}C , todos exibem com clareza os sinais referentes aos produtos esperados. Um sinal característico, cujo deslocamento químico está por volta de 160 ppm, pode ser atribuído à carbonila do éster formado. Entre 120 e 140 ppm, se encontram os sinais relacionados aos carbonos aromáticos. Além desses, sinais na região entre 25 e 35 ppm se referem aos carbonos do grupo isopropila, enquanto que o sinal em torno de 15 ppm corresponde à metila ligada diretamente ao núcleo carvacrólico. Ademais, os derivados **1e** (pág. 83), **1f** (pág. 84) e **1g** (pág. 84) apresentam um sinal entre 55,7-55,6 ppm característico do grupamento metoxila ligado ao grupo benzoíla.

Os espectros de massas reforçam a obtenção dos derivados, uma vez que apresentam os picos dos íons moleculares com razão/massa carga (m/z) variando de 299 a 192, que são condizentes às massas moleculares esperadas para os derivados obtidos.

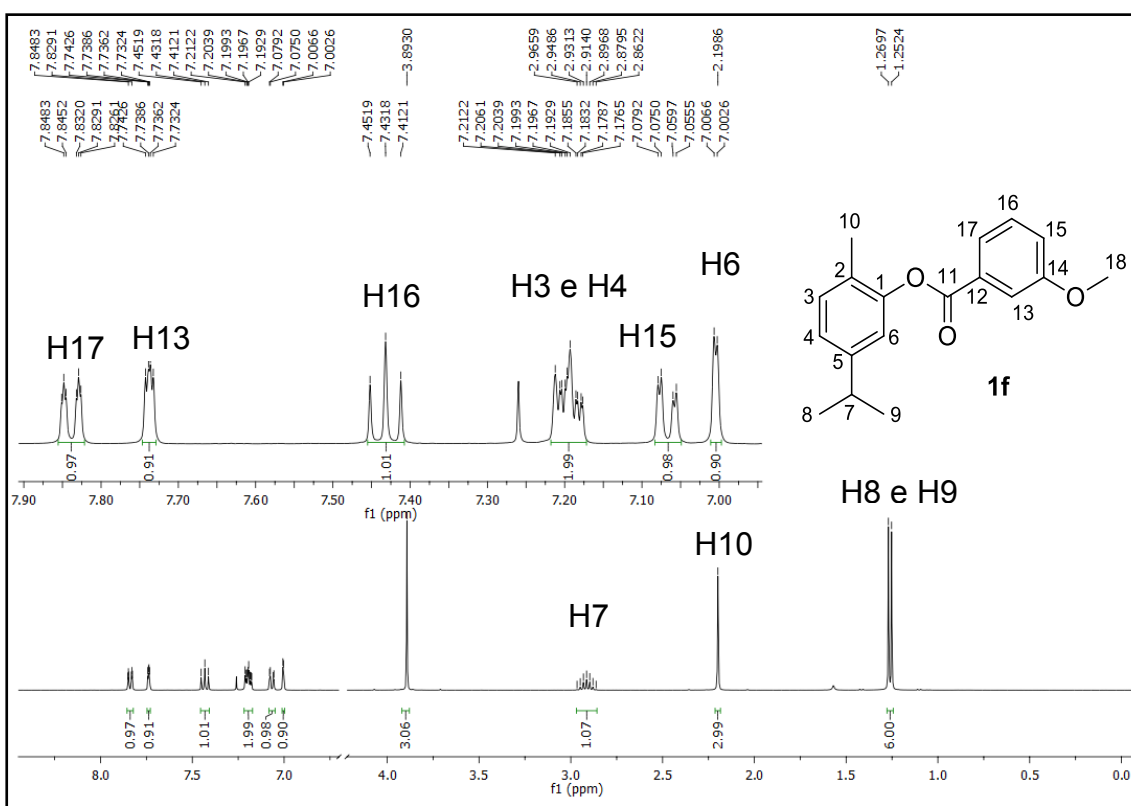
É válido ressaltar que os derivados **1b-c**; **1e-f** e **1h-i** são inéditos na literatura, sendo que **1e** apresentou atividade frente ao *Mycobacterium tuberculosis*, como detalhado mais adiante (Sessão 3.5) (pág. 72).

Sendo assim, apenas a título de exemplificação, o derivado **1f** será utilizado para mostrar como ocorreu a caracterização espectroscópica das substâncias sintetizadas.

O espectro de RMN de ^1H do derivado **1f** (Figura 11) apresentou um duplo tripleto em 7,83 ppm ($J = 7,8$ e $1,7$ Hz), com integração de 1H, referente ao H17, pois o mesmo, além de acoplar com H16, cujo sinal apresenta-se como tripleto em 7,43 ppm ($J = 8,0$ Hz) também acopla com o tripleto em 7,73 ppm ($J = 2,5$ e $1,7$ Hz), referente ao H13. Esse hidrogênio, por sua vez, além de acoplar com H17, também acopla com H15 (duplo duplete em 7,06 ppm, $J = 7,8$ e $1,7$ Hz), que por sua vez, acopla com H16 e H13.

Outros sinais presentes no espectro, característicos de hidrogênios ligados a anéis aromáticos são: o multipletto de deslocamento químico entre 7,21-7,17 ppm e integral de 2H, referente aos hidrogênios H3 e H4 e um duplete em 7,00 ppm ($J = 1,6$ Hz) com integral de 1H, referente ao H6.

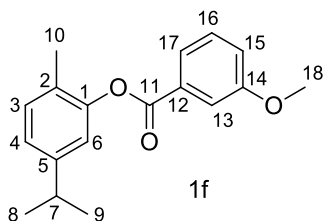
Figura 11. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do derivado **1f**.



Além desses sinais, observa-se um simpleto em 3,89 ppm e integral de 3H, referente aos hidrogênios H18 do grupo metoxila; um outro sinal característico em todos os derivados, é um hepteto com deslocamento químico entre 2,96-2,86 ppm ($J = 6,9$ Hz), com integral de 1H, referente ao H7, pois o mesmo acopla com os hidrogênios dos carbonos metílicos do grupamento isopropila ligados ao anel aromático do carvacrol. O próximo sinal, um simpleto com deslocamento químico de 3,00 ppm, com integral de 3H, referente aos hidrogênios H10 do grupo metila ligado ao anel aromático carvacrólico. Por fim, um duplete com constante de acoplamento $J = 6,9$ Hz e deslocamento químico em 1,25 ppm, com integral de 6H, referente aos hidrogênios H8 e H9 do grupamento isopropila ligado também ao anel aromático carvacrólico, totalizando assim os 20 átomos de hidrogênio pertencentes à molécula. Com todos esses dados, finaliza-se o assinalamento de todos os sinais presentes no espectro de RMN de ^1H do composto **1f**, que estão resumidos na **Tabela 7**, na sequência.

Tabela 7. Deslocamentos químicos do RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), em ppm, relativos ao tetrametilsilano (TMS) em 0,00 ppm, da substância **1f**.

	Nº do H	δH (nH, m, J em Hz)
	H17	7,83 (1H, dt, $J = 7,8$ e $1,7$ Hz)
	H13	7,73 (1H, dd, $J = 2,5$ e $1,7$ Hz)
	H16	7,43 (1H, t, $J = 8,0$ Hz)
	H3 e H4	7,21-7,17 (2H, m)
	H15	7,06 (1H, dd, $J = 7,8$ e $1,7$ Hz)
	H6	7,00 (1H, d, $J = 1,6$ Hz)
	H18	3,89 (3H, s)
	H7	2,91 (1H, hept, $J = 6,9$ Hz)
	H10	2,19 (3H, s)
	H8 e H9	1,25 (6H, d, $J = 6,9$ Hz)

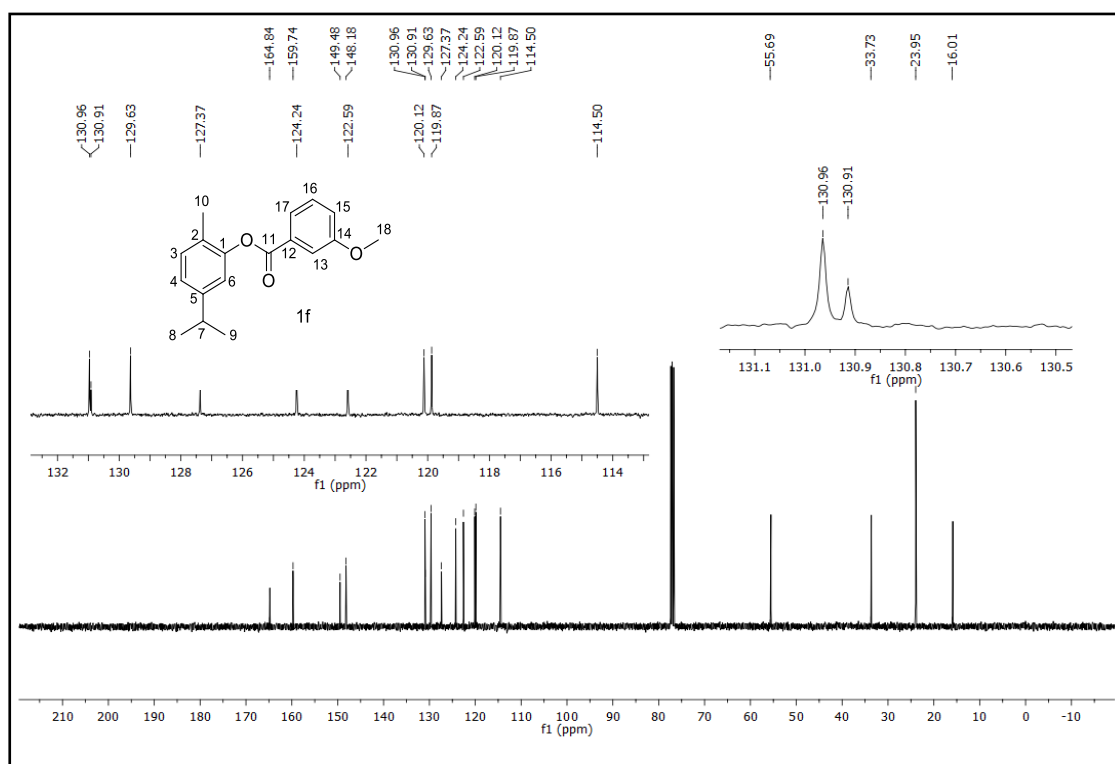


Quanto ao espectro de RMN de ^{13}C (figura 12), observa-se um sinal com maior deslocamento químico em 164,8 ppm, referente ao carbono da

carbonila do éster C11. Além desse, outros carbonos estão bastante desblindados por estarem ligados diretamente a átomos de oxigênio, que são os sinais em 159,7 ppm referente ao C1 e em 149,4 ppm, referente a C14. Um outro carbono um pouco menos desblindado é aquele com deslocamento químico em 148,2 ppm, que pode ser atribuído a C12, pois o mesmo se encontra adjacente à carbonila, sofrendo o efeito anisotrópico exercido por esse grupo funcional.

Quanto aos sinais referente aos carbonos C2 e C5, em 130,9 e 127,3 ppm, respectivamente, é possível diferenciá-los, haja visto que o carbono C2 encontra-se mais blindado que o carbono C5 devido as estruturas de ressonância de compostos fenólicos, onde observa-se uma maior densidade de carga negativa nas posições *orto* e *para*, portanto, é possível afirmar que o carbono C2, na posição *orto* em relação ao átomo de oxigênio, encontra-se mais blindado que o carbono C5, na posição *meta* em relação ao átomo de oxigênio.

Figura 12. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do derivado **1f**.



Pelo mesmo princípio, é possível diferenciar os sinais referentes aos carbonos C3 e C4. Nesse caso, o carbono C4, com sinal em 130,9 ppm, por estar na posição *para* em relação ao átomo de oxigênio, encontra-se

mais blindado, ou seja, com maior densidade eletrônica, enquanto que o carbono C3, na posição *meta* em relação ao átomo de oxigênio, com sinal em 120,1 ppm, encontra-se menos blindado em relação ao C4. O experimento de DEPT-135 (Figura 15), confirma que de fato os sinais em 130,9 e 127,3 ppm pertencem aos carbonos C2 e C5 respectivamente, uma vez que esses sinais estão ausentes nesse espectro, o que indica também, que se tratam de carbonos quaternários.

Os demais sinais com deslocamento químico entre 130,9 e 120,1 ppm, referem-se aos demais átomos de carbono pertencentes aos anéis aromáticos, ou seja, C6; C13; C15; C16 e C17. Entretanto, a atribuição precisa desses foi realizada após uma análise do espectro do experimento de HSQC (do inglês, *Heteronuclear Single Quantum Coherence*). Nesse experimento é possível observar as correlações entre os sinais presentes nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , respectivamente, conforme as figuras 13 e 14.

Figura 13. Espectro de HSQC ampliado da região dos aromáticos do derivado 1f.

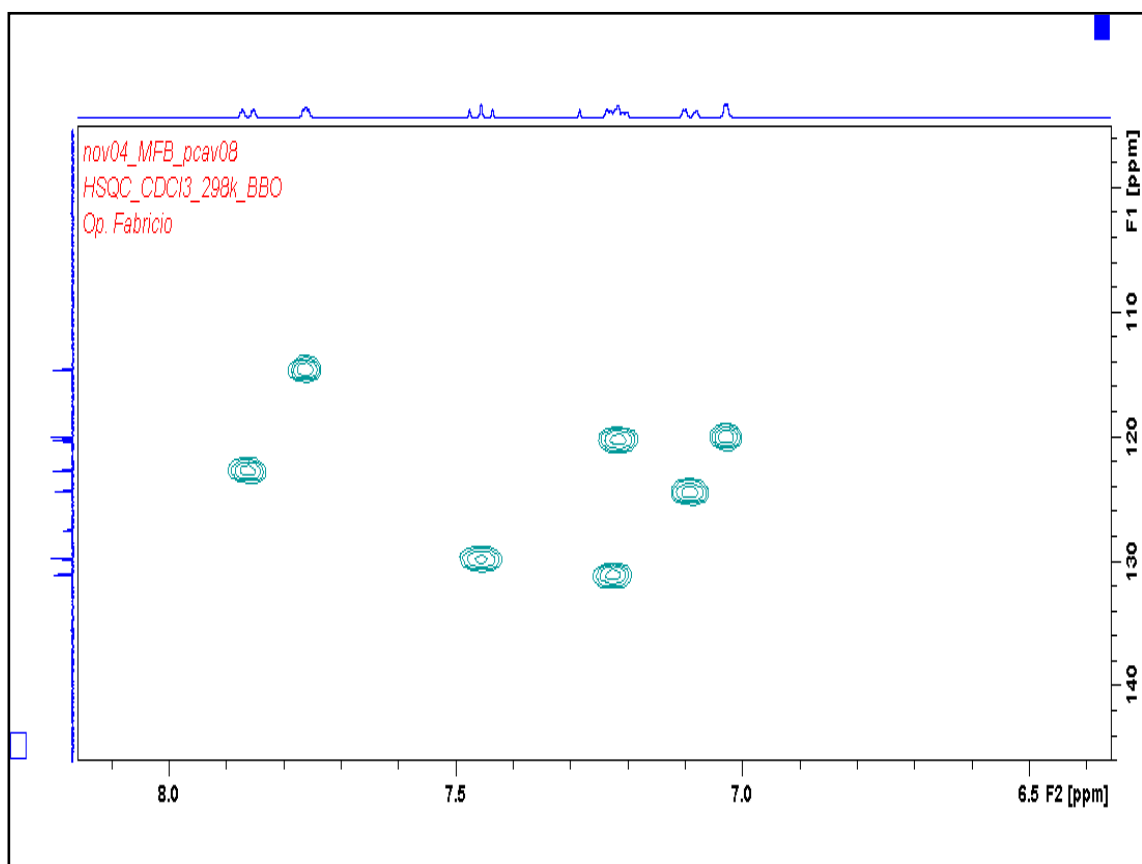
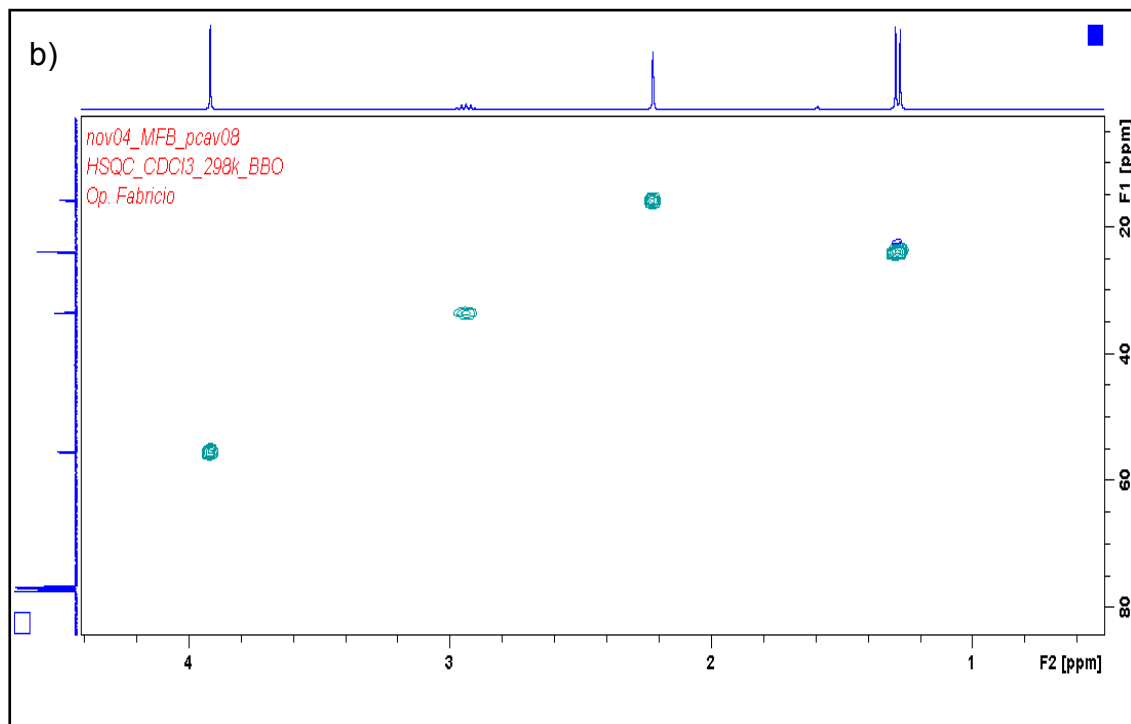


Figura 14. Espectro de HSQC ampliado da região de alto campo do derivado **1f**.



Ao analisar os espectros de HSQC é possível estabelecer, na figura 13a as seguintes correlações: a) o duplete em 7,00 ppm referente ao hidrogênio H6 com o sinal em 119,8 ppm; b) o duplo duplete em 7,73 ppm referente ao hidrogênio H13 com o sinal em 114,5 ppm; c) o duplo duplete em 7,06 ppm referente ao H15 com o sinal em 124,5 ppm; d) o tripleto em 7,43 ppm referente ao H16 com o sinal em 129,6 ppm referente, por fim, e) o duplo tripleto em 7,83 ppm referente ao H17 com o sinal em 122,5 ppm. Além dessas, pode-se correlacionar na figura 13b, os seguintes sinais: a) o simpleto em 3,89 ppm referente ao H18 com o sinal em 55,7 ppm; b) o hepteto em 2,91 ppm referente ao hidrogênio metínico H7 com o sinal em 33,7 ppm; c) o simpleto em 2,19 ppm referente aos hidrogênios metílicos H10 com o sinal em 16 ppm e d) o duplete em 1,25 ppm referente aos hidrogênios metílicos H8 e H9 com o sinal em 23,9 ppm.

Realizou-se também um experimento de DEPT-135 (figura 15), como mencionado, bem como o experimento de DEPT-90 (figura 16) para uma melhor caracterização e conseqüentemente, uma melhor atribuição dos sinais obtidos, uma vez que com esse experimento é possível observar os

deslocamentos químicos referentes aos carbonos metínicos, metilênicos (que não é o caso de nenhum dos derivados), bem como os carbonos metílicos.

Figura 15. Espectro de DEPT-135 de derivado **1f**.

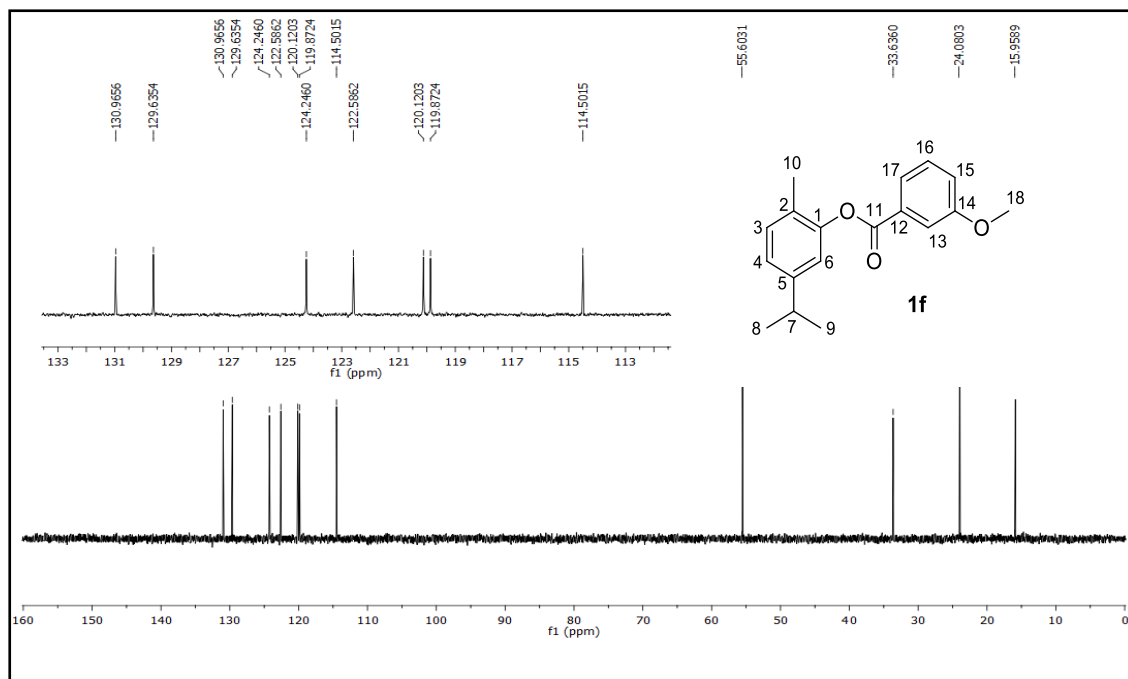
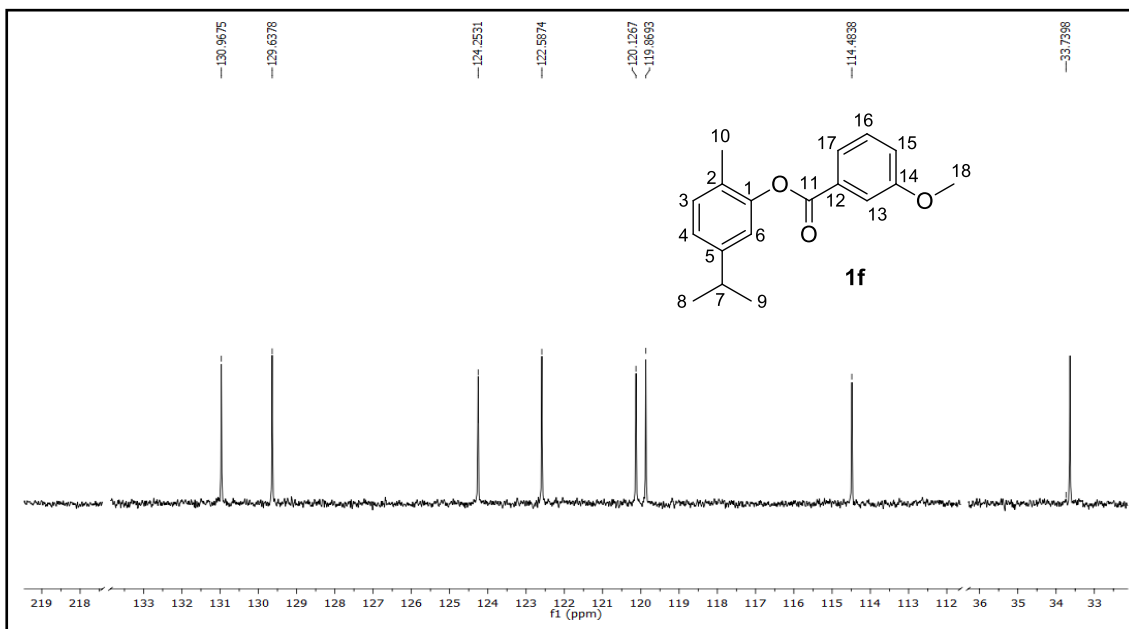


Figura 16. Espectro de DEPT-90 de derivado **1f**.

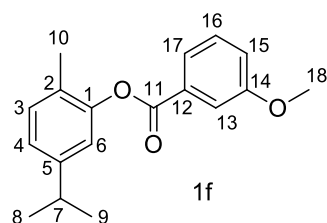


Nesses experimentos, observam-se os sete sinais entre 130,9 a 114,5 ppm, que se referem aos sete átomos de carbono metínicos dos anéis aromáticos. Outro ponto interessante nesses experimentos, foi a ausência dos sinais referentes aos carbonos C1; C2; C5; C11; C12 e C14, já que os mesmos

são referentes à carbonos quaternários, o que também comprova a obtenção do produto desejado. Deste modo, os deslocamentos químicos dos sinais desses experimentos, bem como suas atribuições são dispostas na **Tabela 8**.

Tabela 8. Deslocamentos químicos do RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3), DEPT-135 e DEPT-90, em ppm, relativos ao TMS em 0,00 ppm, da substância **1f**.

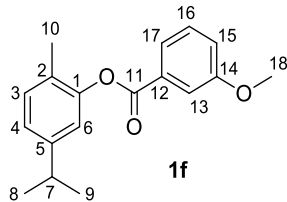
	Nº do C	δC	DEPT-135	DEPT-90
	C11	164,8	C ₀	-
	C1	159,7	C ₀	-
	C14	149,4	C ₀	-
	C12	148,2	C ₀	-
	C3	130,9	CH	CH
	C5	130,9	C ₀	-
	C16	129,6	CH	CH
	C2	127,3	C ₀	-
	C15	124,2	CH	CH
	C17	122,5	CH	CH
	C4	120,1	CH	CH
	C6	119,8	CH	CH
	C13	114,5	CH	CH
	C18	55,7	CH ₃	-
	C7	33,6	CH	CH
	C8 e C9	23,9	CH ₃	-
	C10	15,9	CH ₃	-



Todos esses dados confirmam a obtenção da substância **1f**, que foram resumidos em uma só tabela (**Tabela 9**), onde é possível observar a estrutura desse derivado com os átomos de carbono devidamente numerados, bem como seus deslocamentos químicos no espectro de RMN de ^{13}C e ainda o

deslocamento químico dos átomos de hidrogênios no espectro de RMN de ^1H , bem como a multiplicidade de cada átomo de hidrogênio e suas respectivas constantes de acoplamento.

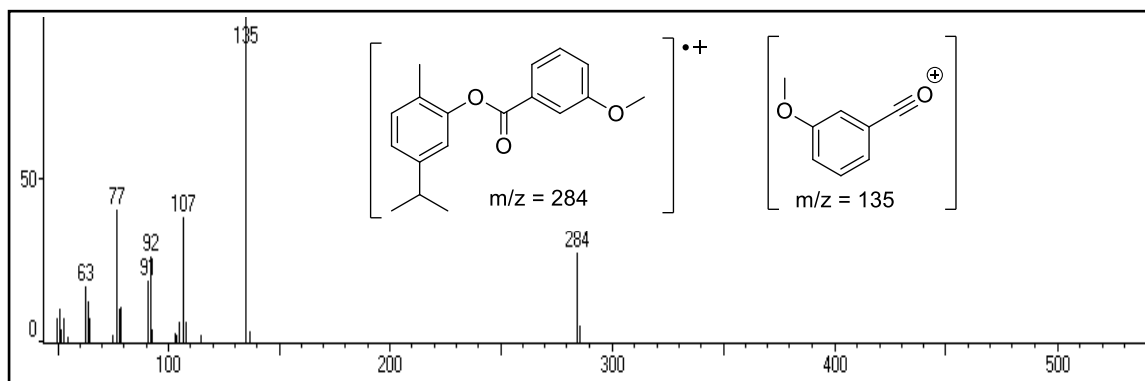
Tabela 9. Deslocamentos químicos (δC) de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) em ppm, relativos ao TMS, em 0,00 ppm, número de átomos de hidrogênio (nH), multiplicidade (m) e constante de acoplamento (J) da substância **1f**.

	Nº C/H	δC	δH (nH, m, J em Hz)
	C11	164,8	-
	C1	159,7	-
	C14	149,4	-
	C12	148,2	-
 <p>1f</p>	C3	130,9	7,21-7,17 (2H, m)
	C5	130,9	-
	C16	129,6	7,43 (1H, t, J = 8,0)
	C2	127,3	-
	C15	124,2	7,06 (1H, dd, J = 7,8 e 1,7)
	C17	122,5	7,83 (1H, dt, J = 7,8 e 1,7)
	C4	120,1	7,21-7,17 (2H, m)
	C6	119,8	7,00 (1H, d, J = 1,6)
	C13	114,5	7,73 (1H, dd, J = 2,5 e 1,7)
	C18	55,7	3,89 (3H, s)
	C7	33,6	2,91 (1H, hept, J = 6,9)
	C8 e C9	23,9	1,25 (1H, d, J = 6,9)
	C10	15,8	2,19 (3H, s)

Outra técnica utilizada na caracterização dos derivados obtidos foi a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Com relação ao derivado **1f**, o espectro de massas (figura 17) obtido exibe alguns picos relevantes, como o pico do íon molecular $m/z = 284$, condizente com a

massa molecular da substância, e o pico base com $m/z = 135$, muito comum em fragmentações α de compostos carbonilados.

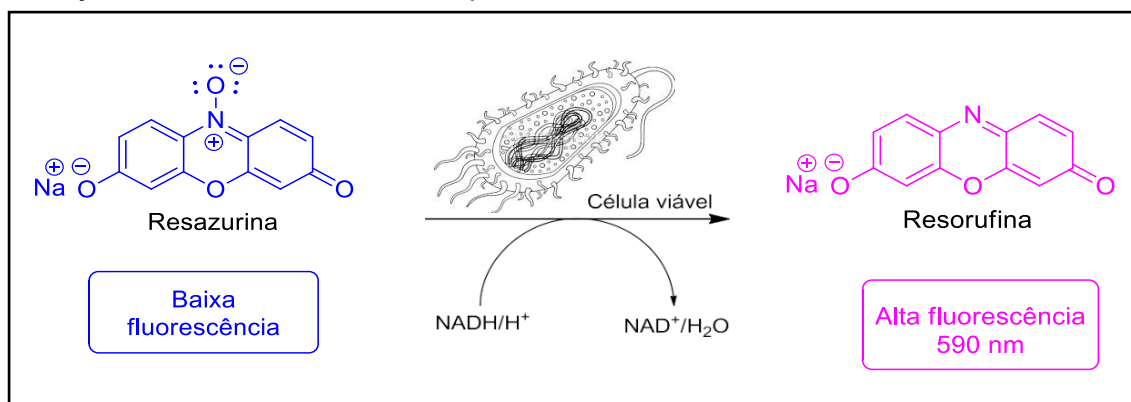
Figura 17. Espectro de massas do derivado **1f** por espectrômetro de massas acoplado a cromatografia gasosa (CG-EM).



3.5 ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA DOS DERIVADOS SINTETIZADOS.

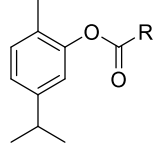
Para a avaliação da atividade biológica do carvacrol, bem como dos derivados sintetizados frente a cepa H37Rv do *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis* ATCC 27294) utilizou-se o método MABA (do inglês *Microplate Alamar Blue Assay*). O Alamar Blue® é um indicador fluorescente/colorimétrico com a propriedade redox. A forma oxidada é azul (não fluorescente/ célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável), conforme a figura 18 na sequência (RIBEIRO et al., 2004). Após o período de incubação necessário, a concentração inibitória mínima CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$) é determinada e definida como a menor concentração do fármaco capaz de impedir a mudança de cor, indicando que houve inibição do crescimento celular. Os resultados obtidos para os derivados testados, bem como o resultado do carvacrol, estão disponíveis na **tabela 10**.

Figura 18. Reação de oxirredução do sal de resazurina promovida por células de *Mycobacterium tuberculosis* que ocorre durante o método de Alamar blue.



Fonte: Adaptado de <<http://www.abpbio.com/product/cell-viability-assay-based-on-metabolic-activity/>>.

Tabela 10. Atividades *in vitro* dos ésteres do carvacrol (**1a-j**; **2** e **3**) e do carvacrol frente à cepa padrão (H37Rv) de *M. tuberculosis* (ATCC 27294), susceptível tanto à Rifampicina como à Isoniazida.

Substâncias	 Onde R:	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1a	Ph	>100
1b	2-Cl-Ph	>100
1c	3-Cl-Ph	>100
1d	4-Cl-Ph	n.r. ^a
1e	2-OMe-Ph	50
1f	3-OMe-Ph	>100
1g	4-OMe-Ph	>100
1h	2-NO ₂ -Ph	>100
1i	3-NO ₂ -Ph	>100
1j	4-NO ₂ -Ph	>100
2	Me	>100
3	-CH=CH-Ph	>100
Carvacrol	—	>100
Etambutol	—	12,5

^an.r. = não realizado.

Até o momento, apenas o derivado **1e**, que apresenta em sua estrutura um grupo doador de elétrons (-OMe) localizado na posição *orto* do grupo benzoíla, apresentou atividade antimicrobacteriana (CIM = 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), sendo quatro vezes menos ativo do que o fármaco de primeira escolha Etambutol. Esse resultado pode ser considerado um bom ponto de partida para a obtenção de derivados mais ativos, uma vez que observou-se que a presença de um grupo fortemente doador de elétrons nessa posição é essencial para a atividade antimicrobacteriana. Isso nos permite avaliar futuramente a influência do poder de doação de elétrons, comparando-se com os grupos hidroxila (-OH) e metila (-CH₃), que são doadores forte e fraco, respectivamente. A síntese desses derivados também permitirá avaliar o efeito estérico e de lipofilicidade sobre a atividade antimicrobacteriana. Além disso, pode-se sintetizar derivados dissubstituídos com grupos doadores de elétrons na porção benzoíla, com o intuito de se verificar se o aumento da quantidade de grupos desse tipo pode modular positivamente a atividade.

Um ponto importante, que contradiz com dados da literatura, como a CIM = 6,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ALOKAM et al., 2014) e a CIM = 2,02 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ANDRADE-OCHOA et al., 2015) é que o carvacrol não apresentou atividade no teste realizado em nosso trabalho, onde utilizou-se a mesma cepa do *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv), bem como o mesmo teste mencionado acima (MABA) com o corante vital Alamar Blue. Esse resultado experimental pode ser atribuído a alta volatilidade do carvacrol, o que acaba alterando a sua concentração durante o período de incubação e reflete diretamente no valor de CIM observado (> 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Essa hipótese pode ser corroborada quando as condições experimentais do teste realizado em nosso trabalho são comparadas àquelas realizadas por Andrade-Ochoa e colaboradores (2015). Foi possível notar que os referidos autores tomaram certos cuidados para prevenção da volatilização das substâncias durante o período de incubação, tais como a disposição de água deionizada estéril nos poços mais periféricos da placa de 96 poços, bem como a acomodação das placas em embalagens plásticas seladas durante os 7 dias de incubação a 37°C. Esses cuidados certamente previniram a volatilização do carvacrol, o que refletiu diretamente no valor de CIM observado naquele trabalho (2,02 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em relação ao nosso (> 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

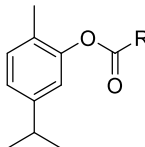
Outro ponto que evidencia o efeito da não-volatilidade sobre atividades antimicrobianas é que o derivado **2** apresentou uma CIM > 100 µg mL⁻¹, sendo o mesmo valor obtido por Alokam e colaboradores (2014), indicando que a substância em questão por ser menos volátil, não sofre influência das variações experimentais utilizadas durante os ensaios de Alamar Blue. (ALOKAM et al., 2014).

Essa dificuldade com a alta volatilidade do carvacrol só reforça a necessidade de se realizarem modificações estruturais que sejam capazes de otimizar essa propriedade indesejada, produzindo substâncias com melhores perfis farmacodinâmicos e farmacocinéticos. Nesse contexto, um fator a ser levado em consideração para o desenvolvimento de moléculas bioativas como agentes terapêuticos é a biodisponibilidade oral. Assim, as regras de Lipinski tem sido o principal guia para correlacionar propriedades físico-químicas com um perfil de biodisponibilidade oral adequados (LIPINSKI et al., 2012).

As Regras de Lipinski, ou a regra dos 5 como também é conhecida, estima a solubilidade e a permeabilidade de um composto, quando administrado por via oral, de acordo com sua estrutura química, ao descrever as características comuns de má absorção ou permeação de uma substância. Assim, uma substância para ser considerada um candidato com perfil farmacocinético adequado não deve apresentar mais do que uma violação entre as seguintes regras: massa molar (MM) acima de 500 g mol⁻¹; clog P acima de 5; mais de 10 aceptores de hidrogênio (N+O); mais de 5 grupos doadores de hidrogênio (NH+OH). Extensões as regras de Lipinski foram desenvolvidas e a mais significativa é a extensão de Veber, que sugere que uma molécula terá melhor biodisponibilidade oral se apresentar uma área superficial topológica (TPSA) não superior a 140 Å e menos de 10 ligações rotacionáveis (NLR) (LI; HOLSWORTH; HU, 2003).

Assim, a fim de verificar se as substâncias sintetizadas poderiam apresentar bom perfil de permeabilidade e, conseqüentemente, boa biodisponibilidade oral, as propriedades físico-químicas das mesmas foram calculadas *in silico* através da Molinspiration® (**Tabela 11**).

Tabela 11. Propriedades físico-químicas calculadas* na plataforma Molinspiration® para o carvacrol e seus derivados.

Substâncias		clogP	MM	DLH	ALH	TPSA	NLR
Onde R:							
1a	Ph	5,69	254,33	0	2	26,30	4
1b	2-Cl-Ph	5,99	288,77	0	2	26,30	4
1c	3-Cl-Ph	6,35	288,77	0	2	26,30	4
1d	4-Cl-Ph	6,37	288,77	0	2	26,30	4
1e	2-OMe-Ph	5,79	284,36	0	3	35,54	5
1f	3-OMe-Ph	5,73	284,36	0	3	35,54	5
1g	4-OMe-Ph	5,75	284,36	0	3	35,54	5
1h	2-NO ₂ -Ph	5,79	299,33	0	5	72,13	5
1i	3-NO ₂ -Ph	5,63	299,33	0	5	72,13	5
1j	4-NO ₂ -Ph	5,65	299,33	0	5	72,13	5
2	Me	3,38	192,26	0	2	26,30	3
3	-CH=CH-Ph	5,52	180,37	0	2	26,30	5
Carvacrol	—	3,81	150,2	1	1	20,23	1

* calculado em: <<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>>.

Como pode ser observado na tabela acima, os derivados apresentam maior lipofilicidade quando comparados ao carvacrol, pois, todos os derivados apresentam um valor de clog P maior que 5,00 violando assim, nesse quesito a regra de Lipinski, exceto o derivado **2** que apresentou clog P = 3,38, sendo portanto menos lipofílico que o carvacrol.

Com relação a massa molar (MM), os derivados se enquadram nas regras de Lipinski, pois todos apresentam uma massa molar menor que 500 g mol⁻¹, uma vez que variam de 180,37 à 299,33 g mol⁻¹. Pode-se observar que a MM dos derivados obtidos também é maior do que a do carvacrol, o que garante uma menor volatilidade a esses compostos, propriedade essa indesejável nesse contexto de candidatos à fármacos.

Todos os derivados também apresentam uma maior quantidade de grupos aceptores de ligação de hidrogênio (ALH) do que o carvacrol, entretanto não extrapolam a regra de Lipinski nesse quesito, pois o valor máximo permitido é 10.

Uma extensão a regra de Lipinski, e a mais significativa, é a extensão de Veber, que sugere que uma molécula terá melhor biodisponibilidade oral se apresentar uma área de superfície topológica não superior a 140 Å e menos de dez ligações rotacionáveis. Todos os derivados se encaixam perfeitamente em ambos os quesitos, pois apresentam valores de TPSA que variam de 26,30 a 72,13 Å e possuem no máximo cinco ligações rotacionáveis, o que sugere que esses derivados devem possuir propriedades farmacocinéticas adequadas.

3.6 ATIVIDADE BIOLÓGICA FRENTE ÀS CEPAS DE *XANTHOMONAS*

Para a avaliação da atividade biológica do carvacrol, bem como dos derivados sintetizados frente às cepas de *Xanthomonas* testadas, será utilizado o método de microdiluição em placa para a determinação do CIM (concentração inibitória mínima), por meio de diluição em série das substâncias.

Não foram obtidos, até o momento, os resultados das atividades biológicas, expressas em concentração inibitória mínima (CIM), frente às cepas de *Xanthomonas*.

Os relatos na literatura quanto à atividade biológica de substâncias orgânicas frente às cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalyptorum* utilizadas nesse estudo, são recentes (artigo *in press*) sendo que, os relatos adicionais são voltados à estudos genéticos, como caracterização morfológica, bioquímica e genética dessas estirpes de micro-organismos (KUMAR et al., 2020).

Entretanto, Silva e colaboradores relatam a atividade biológica de derivados ésteres do ácido gálico frente à uma cepa de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (IBSBF 1594), onde a concentração inibitória mínima (CIM) dos derivados obtidos variou de 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o derivado mais potente à 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o ácido gálico, sendo esse o menos potente. Nesse estudo utilizou-se como controle o antimicrobiano Canamicina, que apresentou concentração inibitória mínima (CIM) de 15,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (SILVA et al., 2013).

4. Conclusões

Adotando-se as metodologias descritas nesse trabalho, foram sintetizados 12 ésteres do carvacrol em rendimentos que variaram de 14 a 87%. Com relação a tais metodologia, os melhores resultados em termos de rendimento foi na obtenção dos derivados **1b-c**; **1e-i** e **2**, onde reagiu-se o carvacrol diretamente com o cloreto de acila correspondente em condições mais brandas, quando se comparada a metodologia utilizada na obtenção dos derivados **1a** e **1j**, na qual foram utilizados reagentes tóxicos como o cloreto de tionila, além do uso de refluxo por várias horas. A esterificação de Steglich utilizada na obtenção do derivado **1d** mostrou-se inviável devido ao baixo rendimento e ao alto custo do processo, gerado pela aquisição da carbodiimida. No entanto, uma vantagem dessa metodologia é que a mesma forneceu o derivado desejado em pureza satisfatória, sem a necessidade de purificação cromatográfica após o isolamento do produto.

É válido ressaltar que dentre os derivados aqui descritos, seis deles, **1b-c**; **1e-f**; **1h-i** são inéditos na literatura, sendo que todos foram devidamente caracterizadas por técnicas espectroscópicas como RMN de ^1H e ^{13}C , além do DEPT-135, DEPT-90 e HSQC que comprovaram a obtenção das substâncias planejadas em um grau de pureza adequado para a realização dos bioensaios. Entretanto, as metodologias para a obtenção de **1d** (esterificação de Steglich) obtido com baixíssimo rendimento e o derivado **4** ainda não obtido, precisam ser otimizadas.

Quanto à atividade antimicobacteriana, os derivados **1a-c**; **1f**; **1g-j**; **2** e **3** mostraram ser inativos, sendo que apenas o derivado **1e** apresentou atividade ($\text{CIM} = 50 \mu\text{g mL}^{-1}$). Apesar de não ter sido possível realizar um estudo completo de relação estrutura-atividade, esse resultado pode ser considerado um bom ponto de partida para o planejamento e síntese de novos derivados com o intuito de aprimorar a atividade antimicobacteriana observada com relação ao derivado **1e**.

Desde o estabelecimento da Equação de Hansch, em 1964, muitos trabalhos têm reconhecido que os efeitos eletrônicos transmitidos por grupos substituintes, influenciam a atividade biológica de fármacos. O entendimento da natureza destes efeitos bem como o seu dimensionamento são de importância fundamental para a compreensão das relações quantitativas entre a estrutura química e a atividade de compostos bioativos (TAVARES, 2004).

Nesse sentido, evidenciou-se a importância da presença de grupos doadores de elétrons como a metoxila (-OCH₃) na posição 2 da porção benzolila, portanto, como perspectivas desse trabalho, sugere-se a síntese de novos derivados, onde poderiam ser avaliados a força de doação de elétrons, efeito estérico e lipofilicidade. Propõem-se a síntese de derivados onde a metoxila (-OCH₃) da posição 2 será substituída pelos grupos hidroxila (-OH) e metila (-CH₃), bem como a síntese de derivados dissubstituídos com grupos doadores de elétrons na porção benzoila, com o intuito de se verificar se o aumento da quantidade de grupos desse tipo pode modular positivamente a atividade.

Além disso, como perspectivas, espera-se ainda realizar os ensaios dessas substâncias frente a frente às cepas de *Xanthomonas* de interesse agrícola.

5. Metodologia

5.1 PROCEDIMENTOS GERAIS

Os solventes de grau analítico foram utilizados sem nenhum tratamento prévio. Os solventes e reagentes, para fins sintéticos, foram tratados, destilados e secos, conforme necessidades requeridas nas metodologias adotadas e de acordo com os processos descritos por Armarego e Chai (2002) (ARMAREGO; LI; CHAI, 2002).

O processo de monitoramento das reações foi realizado através da cromatografia em camada delgada (CCD), em cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60 F-254 com espessura de 0,25 mm com indicador para UV (254 nm), marca Merck. Os eluentes foram preparados volume a volume (v/v) e a revelação das substâncias em CCD foi realizada em lâmpada de UV (254-366 nm) ou em vanilina sulfúrica. Para a purificação de substâncias por cromatografia em coluna aberta foi utilizada sílica gel 60 (63-200 μm , Merck) e sílica gel (35-75 μm , Sigma-Aldrich).

5.2 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

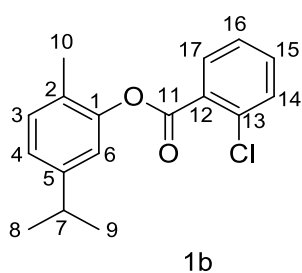
Os espectros de massas foram obtidos no cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM) Shimadzu modelo GCMS-QP5000, 99604 do Laboratório de Propriedades e Síntese de Substâncias Orgânicas (LAPSSO) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), os pontos de fusão foram determinados em um aparelho Microquímica MQAPF-302.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram obtidos em um espectrômetro Bruker modelo Avance III, operando a 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , equipado com sondas multinucleares de 5 mm. Utilizou-se clorofórmio deuterado (CDCl_3) como solvente e tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. O software utilizado para o processamento dos

espectros de RMN foi o MestReNova (Versão 6.0), exceto para os espectros de HSQC, onde utilizou-se o Top Spin (Versão 6.3.1). Para calibração do espectro de RMN de ^1H foram adotados os valores de 0,00 ppm para TMS e 7,26 ppm para CDCl_3 . As áreas dos sinais foram obtidas por integração eletrônica, por meio do próprio software e suas multiplicidades foram descritas da seguinte forma: simpleto (s), duplete (d), duplo-duplete (dd), tripleto (t), duplo-triplete (dt), triplo-duplete (td), duplo duplo-duplete (ddd) e multiplete (m). As constantes de acoplamento (J) foram relatadas em Hz.

5.3 MÉTODO GERAL PARA OBTENÇÃO DOS DERIVADOS ÉSTERES DO CARVACROL **1B-C**; **1E-I** E **2**.

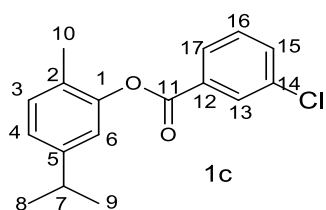
Em um balão de fundo redondo de 50 mL, solubilizou-se 0,20 g de carvacrol (Sigma-Aldrich, CAS 499-75-2) (1,33 mmol, 1eq.) em 8 mL de diclorometano. A mistura reacional foi resfriada a 0 °C e, sob agitação magnética, adicionou-se trietilamina (1,99 mmol, 1,5 eq.), seguido da adição dos cloretos de acila correspondentes (1,60 mmol, 1,2 eq.). Após a adição, a mistura foi lentamente aquecida até a temperatura ambiente e o progresso da reação foi monitorado por CCD (elutente hexano/ acetato de etila 9:1, revelador: vanilina sulfúrica). Ao término da reação, verteu-se a mistura reacional em gelo triturado e, em seguida, realizou-se extrações com diclorometano (3 x 15 mL). As fases orgânicas foram reunidas, lavadas com 15 mL de solução aquosa saturada de NaHCO_3 (1 x 15 mL), água destilada (1 x 15 mL), solução saturada de NaCl (1 x 15 mL) e seca com Na_2SO_4 anidro. Por fim, a fase orgânica foi evaporada à pressão reduzida. Os produtos obtidos foram devidamente purificados por cromatografia em coluna com sistema de eluição de gradiente hexano/acetato de etila (ALOKAM et al., 2014).



2-Clorobenzoato de 5-Isopropil-2-metilfenila (1b):

líquido incolor; 63%. **EM (m/z)**. 288 (21%), 141 (42%), 139 (100%). **RMN de ^1H [CDCl_3 , 400 MHz] δ** : 8,08 (1H, dd, $J = 7,7$; 1,7 Hz, H17); 7,54 (1H, dd, $J = 8,0$; 1,7 Hz, H14); 7,50 (1H, td, $J = 7,1$; 1,7, H15), 7,40 (1H, td, $J = 7,5$; 1,7 Hz, H16); 7,20 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H3); 7,07 (1H, dd, $J = 7,8$; 1,6 Hz, H4), 7,01 (1H, d, $J = 1,5$, H6); 2,91 (1H,

hept, $J = 6,9$ Hz, H7); 2,23 (3H, s, H10); 1,26 (6H, d, $J = 6,9$ Hz, H8 e H9); **Lit.:** **RMN de ^1H [CDCl_3 , 300 MHz] δ** : Molécula inédita. **RMN de ^{13}C [CDCl_3 , 100 MHz] δ** : 163,9 (C11), 149,2 (C1), 148,2 (C13), 134,4 (C12); 133,1 (C15); 131,9 (C17); 131,4 (C14); 131,0 (C3); 129,5 (C5); 127,3 (C2); 126,7 (C16); 124,4 (C4); 119,8 (C6); 33,5 (C7); 24,0 (C8 e C9); 16,2 (C10); **Lit.:** **RMN de ^{13}C [CDCl_3 , 100 MHz] δ** : Molécula inédita.

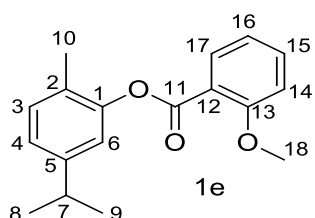


3-Clorobenzoato de 5-Isopropil-2-metilfenila (1c):

óleo amarelo; 87%. **EM (m/z)**: 288 (25%), 139 (100%).

RMN de ^1H [CDCl_3 , 400 MHz] δ : 8,21 (1H, t, $J = 1,8$ Hz H13); 8,11 (1H, dt, $J = 5,1$; 1,3 Hz, H17); 7,62 (1H, ddd, $J = 8,0$; 2,1; 1,1 Hz, H15); 7,47 (1H, t, $J = 7,9$ Hz, H16);

7,21 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H3), 7,07 (1H, dd, $J = 7,8$; 1,7 Hz, H4); 6,99 (1H, d, $J = 1,5$ Hz, H6); 2,91 (1H, hept, $J = 6,9$ Hz, H7); 2,19 (3H, s, H10); 1,26 (6H, d, $J = 6,9$ Hz, H8 e H9); **Lit.:** **RMN de ^1H [CDCl_3 , 500 MHz] δ** : Molécula inédita. **RMN de ^{13}C [CDCl_3 , 100 MHz] δ** : 163,8 (C11), 149,2 (C1), 148,3 (C14), 134,8 (C12); 133,5 (C15); 131,3 (C5); 131,0 (C3); 130,2 (C13); 129,9 (C16); 128,2 (C17); 127,2 (C2); 124,4 (C4); 119,7 (C6); 33,8 (C7); 24,0 (C8 e C9); 15,8 (C10); **Lit.:** **RMN de ^{13}C [CDCl_3 , 125 MHz] δ** : Molécula inédita.

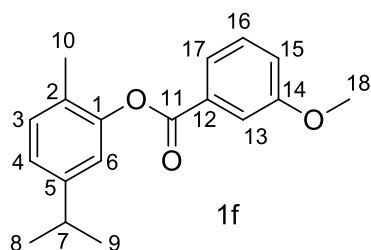


2-Metoxibenzoato de 5-Isopropil-2-metilfenila (1e):

óleo amarelo; 61%. **EM (m/z)**: 284 (8%), 135 (100%), 77 (37%). **RMN de ^1H [CDCl_3 , 400 MHz] δ** : 8,04 (1H, dd, $J = 7,9$; 1,7 Hz, H17); 7,54 (1H, td, $J = 7,9$; 1,7 Hz, H16); 7,17 (1H, d, $J = 7,9$ Hz, H14); 7,04-7,00 (4H, m, H15,

H3, H4 e H6); 3,93 (3H, s, H18), 2,89 (1H, hept, $J = 7,9$ Hz, H7); 2,22 (3H, s, H10), 1,24 (6H, d, $J = 6,9$ Hz, H8 e H9). **Lit.:** **RMN de ^1H [CDCl_3 , 500 MHz] δ** : Molécula inédita. **RMN de ^{13}C [CDCl_3 , 100 MHz] δ** : 164,2 (C11), 159,8 (C1), 149,6 (C13),

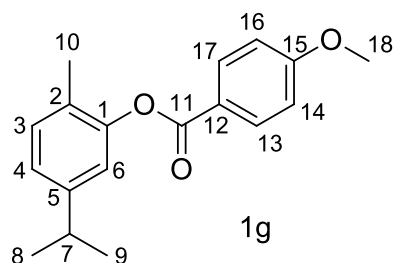
148,0 (C12); 134,07(C16); 132,2 (C17); 130,8 (C14); 127,4 (C5); 124,0 (C6); 120,4 (C4); 120,1 (C15); 119,3 (C2); 112,2 (C3); 56,0 (C18); 33,4 (C7); 23,9 (C8 e C9); 16,2 (C10) ; **Lit.: RMN de ^{13}C [CDCl_3 , 125 MHz] δ :** Molécula inédita.



3-Metoxibenzoato de 5-Isopropil-2-metilfenila

(1f): líquido incolor; 73%. **EM (m/z):** 288 (23%), 135 (100%). **RMN de ^1H [CDCl_3 , 400 MHz] δ :** 7,84 (1H, dt, $J = 7,8$ e $1,7$ Hz, H17); 7,73 (1H, dd, $J = 2,5$ e $1,7$ Hz, H13); 7,43 (1H, t, $J = 8,0$ Hz, H16); 7,21-7,17

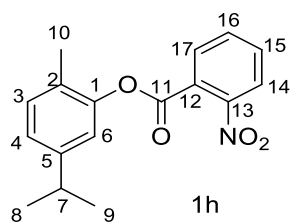
(2H, m, H3 e H4); 7,06 (1H, dd, $J = 7,8$; $1,3$ Hz, H15); 7,00 (1H, d, $J = 1,6$ Hz, H6); 3,89 (3H, s, H18); 2,91 (1H, hept, $J = 6,9$ Hz, H7); 2,19 (3H, s, H10); 1,25 (6H, d, $J = 6,9$ Hz, H8 e H9). **Lit.: RMN de ^1H [CDCl_3 , 500 MHz] δ :** Molécula comercialmente disponível, porém sem dados espectroscópicos disponíveis e sem nenhuma referência na literatura. **RMN de ^{13}C [CDCl_3 , 100 MHz] δ :** 164,8 (C11), 159,7 (C14), 149,5 (C1), 148,2 (C12); 130,9 (C3); 130,9 (C5); 129,6 (C16); 127,3 (C2); 124,2 (C15); 122,6 (C17); 120,1 (C4); 119,8 (C6); 114,5 (C13); 55,7 (C18); 33,7 (C7); 23,9 (C8 e C9); 16,0 (C10).



4-Metoxibenzoato de 5-Isopropil-2-metilfenila

(1g): líquido incolor; 77%. **EM (m/z):** 284 (14%), 135 (100%), 77 (36%). **RMN de ^1H [CDCl_3 , 400 MHz] δ :** 8,18 (2H, dt, $J = 8,8$; $2,8$ Hz, H13 e H17); 7,19 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H2); 7,05 (1H, dd, $J = 7,8$; $1,6$ Hz H4); 7,00 (3H, m, H6, H14 e H16); 3,90 (1H,

s, H18); 2,90 (1H, hept, $J = 6,9$ Hz, H7); 2,18 (3H, s, H10); 1,25 (6H, d, $J = 6,9$ Hz, H8 e H9). **Lit.: RMN de ^1H [CDCl_3 , 300 MHz] δ :** 8.20 (2H, d, $J = 8.8\text{Hz}$), 7.21 (1H, d, $J = 7.7\text{Hz}$), 7.07 (1H, d, $J = 7.8\text{Hz}$), 7.02, (3H, t), 3.92 (3H, s), 2.93 (1H, m), 2.21 (3H, s), 1.28 (6H, d, $J = 6.9\text{Hz}$) (MESQUITA et al., 2018). **RMN de ^{13}C [CDCl_3 , 100 MHz] δ :** 164,6 (C11), 163,8 (C1), 149,5 (C15), 148,1 (C-12); 132,2 (C13 e C17); 130,8 (C3); 127,4 (C5); 124,0 (C4); 122,0 (C2); 120,0 (C6); 113,8 (C14 e C16); 55,7 (C18); 33,7 (C7); 24,2 (C8 e C9); 16,00 (C10) ; **Lit.: RMN de ^{13}C [CDCl_3 , 75 MHz] δ :** 164,8; 164,1; 149,8; 148,3; 132,4; 131,1; 127,7; 124,2; 122,2; 120,2; 114,1; 55,7; 33,8; 24,1; 16,0 (MESQUITA et al., 2018).

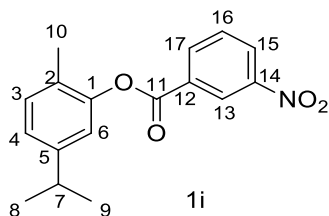


2-Nitrobenzoato de 5-Isopropil-2-metilfenila (1h): óleo

amarelo; 63%. **EM (m/z):** 299 (17%), 165 (19%), 150 (100%). **RMN de ^1H [CDCl_3 , 400 MHz] δ :** 8,00 (1H,dd, $J = 7,9; 1,2$ Hz, H17); 7,91 (1H,dd, $J = 7,5; 1,5$ Hz, H14); 7,75 (1H, td, $J = 7,5; 1,5$ Hz, H16); 7,70 (1H, td, $J = 7,7;$

1,5 Hz, H15); 7,18 (1H, d, $J = 8,3$ Hz, H3); 7,09-7,05 (2H, m, H4 e H6); 2,91 (1H, hept, $J = 6,9$ Hz, H7); 2,18 (3H, s, H10); 1,26 (6H, d, $J = 6,9$ Hz, H8 e H9); **Lit.:**

RMN de ^1H [CDCl_3 , 300 MHz] δ : Molécula inédita. **RMN de ^{13}C [CDCl_3 , 125 MHz] δ :** 163,7 (C11), 148,9 (C1), 148,4 (C12), 148,2 (C13); 133,1 (C16); 132,1 (C15); 131,0 (C3); 130,1 (C14); 127,4 (C5); 127,2 (C2); 124,6 (C4); 124,2 (C17); 119,4 (C6); 33,6 (C7); 24,2 (C8 e C9); 16,0 (C10); **Lit.:** **RMN de ^{13}C [CDCl_3 , 75.12 MHz] δ :** Molécula inédita.



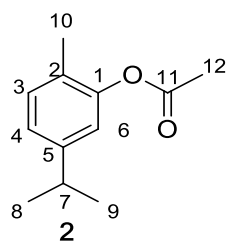
3-Nitrobenzoato de 5-Isopropil-2-metilfenila (1i):

sólido branco; 70%. **Pf:** 58-59°C **EM (m/z):** 299 (43%), 284 (13%), 150 (100%). **RMN de ^1H [CDCl_3 , 400 MHz] δ :**

9,05 (1H, t, $J = 1,9$ Hz, H13); 8,54 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H15); 8,51 (1H, ddd, $J = 8,0; 1,9$ Hz, H17); 7,74 (1H, t,

$J = 8,0$ Hz, H16); 7,22 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H3); 7,10 (1H, dd, $J = 7,8; 1,6$ Hz, H4); 7,00 (1H, d, $J = 1,6$ Hz, H6); 2,97-2,86 (1H, hept, $J = 6,9$ Hz, H7); 2,20 (3H, s, H10); 1,26 (6H, d, $J = 6,9$ Hz, H8 e H9); **Lit.:** **RMN de ^1H [CDCl_3 , 300 MHz] δ :**

Molécula inédita. **RMN de ^{13}C [CDCl_3 , 125 MHz] δ :** 162,8 (C11), 149,1 (C1), 148,4 (C12); 135,7 (C15); 131,4 (C3); 131,1 (C16); 129,9 (C5); 127,9 (C17); 127,1 (C2); 125,1 (C13); 124,8 (C4); 119,5 (C6); 33,7 (C7); 23,9 (C8 e C9); 16,0 (C10); **Lit.:** **RMN de ^{13}C [CDCl_3 , 75.12 MHz] δ :** Molécula inédita.



Acetato de 5-Isopropil-2-metilfenila (2): óleo amarelo; 70%.

EM (m/z): 192 (31%), 150 (60%), 135 (100%). **RMN de ^1H [CDCl_3 , 400 MHz] δ :** 7,15 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H3); 7,02 (1H, dd,

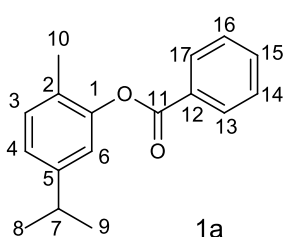
$J = 7,8; 1,7$ Hz, H4); 6,86 (1H, d, $J = 1,7$ Hz, H6); 2,88 (1H, hept, $J = 6,9$ Hz, H7); 2,32 (3H, s, H12); 2,15 (3H, s, H10); 1,24

(6H, d, $J = 6,9$ Hz, H8 e H9); **Lit.:** **RMN de ^1H [CDCl_3 , 300 MHz] δ :** 7,11 (1H, d, $J = 7,5$ Hz); 6,83 (1H, d, $J = 7,5$ Hz); 6,74 (1H, s); 2,89-2,91 (1H, m); 2,32 (3H, s); 2,23 (3H, s); 1,24 (6H, d, $J = 7,1$ Hz) (ALOKAM et al., 2014). **RMN de ^{13}C [CDCl_3 , 125 MHz] δ :** 169,3 (C11), 149,3 (C1), 148,1 (C5), 130,9 (C2), 127,4 (CH-

Ar), 127,3 (CH-Ar), 119,8 (CH-Ar), 33,7 (C-7), 24,2 (C8 eC9), 20,7 (C12), 15,6 (C10); **Lit.: RMN de ^{13}C [CDCl_3 , 75.12 MHz] δ :** 169,7 (C11), 147,8 (C1), 136,9 (C5), 136,3 (C2), 127,0 (CH-Ar), 126,4 (CH-Ar), 122,6 (CH-Ar), 27,0 (C7), 25,4 (C12), 22,9 (C8 e C9), 20,8 (C10), (MYANGAR; PATEL, 2014).

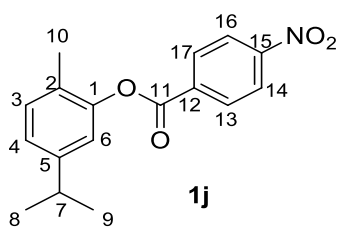
5.4 MÉTODO GERAL PARA OBTENÇÃO DOS DERIVADOS **1A**; **1J** E **3**.

Em um balão de 25 mL de fundo redondo, sob atmosfera inerte, suspendeu-se 0,15 g do ácido carboxílico correspondente (3,0 eq) em 2,5 mL de diclorometano. Então, adicionou-se ao meio, o cloreto de tionila (9,0 eq), e 3 gotas de *N,N'*-dimetilformamida (DMF). Essa mistura reacional foi mantida sob atmosfera inerte e agitação magnética constante por uma hora. Após esse período, o excesso de solvente foi removido em um evaporador rotatório (BISPO et al., 2012). Então, ressolubilizou-se o material formado em 2,5 mL de diclorometano e, em seguida, adicionou-se 0,039 g de carvacrol (0,263 mmol, 1,0 eq) e 0,15 mL de trietilamina (1,08 mmol, 4 eq). A mistura reacional foi mantida sob refluxo e agitação magnética por 3 horas, sendo o término da reação foi monitorado por CCD (elutente acetato de etila/hexano 8:2, revelador: uv e vanilina sulfúrica). Após o término da reação, evaporou-se o solvente em um evaporador rotatório. Em seguida, neutralizou-se o meio reacional por meio da adição de 10 mL de uma solução de NaHCO_3 a 1% (p/v), então, realizou-se extrações com diclorometano (3 x 15 mL). As fases orgânicas foram reunidas, secas com sulfato de sódio anidro e evaporadas à pressão reduzida. Os produtos obtidos foram devidamente purificados por cromatografia em coluna com sistema de eluição de gradiente hexano/acetato de etila (ALOKAM et al., 2014).



Benzoato de 5-Isopropil-2-metilfenila (1a): líquido incolor; 21%. **EM (m/z):** Não foi realizado até o momento. **RMN de ^1H [CDCl_3 , 400 MHz] δ :** 8,22 (2H, d, $J = 7,4$ Hz H13 e H17); 7,63 (1H, t, $J = 7,4$ Hz, H15); 7,51 (2H, t, $J = 7,7$ Hz, H14 e H16); 7,19 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H3); 7,05 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H4), 7,00 (1H, s, H6); 2,90 (1H, hept, $J = 6,9$ Hz, H7); 2,19 (3H, s,

H10); 1,25 (6H, d, $J = 6,9$ Hz, H8 e H9); **Lit.: RMN de ^1H [CDCl_3 , 500 MHz] δ :** 8,23 (2H, d, $J = 7,4$ Hz, H13 e H17); 7,65 (1H, t, $J = 7,5$ Hz, H15); 7,52 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, H14 e H16); 7,20 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H3); 7,06 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H4), 7,0 (1H, s, H6); 2,89-2,92 (1H, m, H7); 2,19 (3H, s, H10); 1,26 (6H, d, $J = 6,9$ Hz, H8 e H9), (MYANGAR; PATEL, 2014). **RMN de ^{13}C [CDCl_3 , 100 MHz] δ :** 164,9 (C=O), 149,5 (C-Ar), 148,2 (C-Ar), 136,5 (C-Ar), 130,9 (C-Ar), 130,2 (C-Ar), 129,7 (C-Ar), 128,6 (C-Ar), 127,4 (C-Ar), 124,2 (C-Ar), 119,9 (C-Ar), 33,7 (CH), 23,9 (2xCH₃), 16,0 (CH₃); **Lit.: RMN de ^{13}C [CDCl_3 , 125 MHz] δ :** 165,4 (C=O), 148,1 (C-Ar), 137,2 (C-Ar), 136,7 (C-Ar), 133,5 (C-Ar), 130,1 (2 x CH-Ar), 129,6 (CH-Ar), 128,6 (2 x CH-Ar), 127,2 (CH-Ar), 126,5 (CH-Ar), 122,9 (CH-Ar), 27,3 (CH), 23,1 (2xCH₃), 20,9 (CH₃) (MYANGAR; PATEL, 2014).

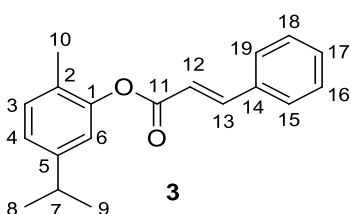


1j

4-Nitrobenzoato de 5-Isopropil-2-metilfenila (1j):

sólido branco; 34%. **Pf:** 50-51°C; **EM (m/z):** não realizado até o momento. **RMN de ^1H [CDCl_3 , 400 MHz] δ :** 8,40-8,34 (4H, m, H13, H17; H14 e H16); 7,20 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H3); 7,08 (1H, dd, $J = 7,8; 1,6$ Hz, H4); 6,99 (1H, d, $J = 1,6$ Hz, H6); 2,89 (1H, hept, $J = 6,9$ Hz, H7); 2,17 (3H, s, H10); 1,24 (6H, d, $J = 6,9$ Hz, H8 e H9); **Lit.: RMN de ^1H [CDCl_3 , 300 MHz] δ :**

8,40 (2H, d, $J = 9,1$ Hz), 8,37 (2H, d, $J = 8,6$ Hz), 7,23 (1H, d, $J = 7,8$ Hz), 7,11 (1H, dd, $J = 6,5; 1,4$ Hz), 2,93 (1H, m), 7,02 (1H, s), 2,21 (3H, s), 1,27 (6H, d, $J = 1,6$ Hz) (MESQUITA et al., 2018). **RMN de ^{13}C [CDCl_3 , 75 MHz] δ :** 163,0 (C11), 150,9 (C15), 149,1 (C1), 148,4 (C12); 135,0 (C5); 131,3 (C13 e C17); 131,1 (C3); 127,0 (C2); 124,7 (C4); 123,7 (C14 e C16); 119,5 (C6); 33,7 (C7); 23,9 (C8 e C9); 15,8 (C10); **Lit.: RMN de ^{13}C [CDCl_3 , 75,12 MHz] δ :** 163,2; 151,1; 149,3; 148,6; 135,2; 131,4; 131,3; 127,2; 124,9; 123,9; 119,8; 33,8; 24,1; 16,0 (MESQUITA et al., 2018).



3

Cinamato de 5-isopropil-2-metilfenila (3): sólido

branco; 67% **Pf:** 64-65°C; **Lit:** não caracterizado no artigo (NIKUMBH; TARE; MAHULIKAR, 2003). **EM (m/z):** Não foi realizado até o momento. **RMN de ^1H [CDCl_3 , 400 MHz] δ :**

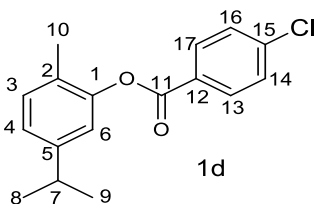
7,88 (1H, d, $J = 16,0$ Hz, H12);

7,62-7,57 (2H, m, H15 e H19); 7,44-7,40 (3H, m, H16, H18 e H6); 7,16 (1H, d, J

= 7,8 Hz, H3); 7,02 (1H, dd, $J = 7,8; 1,8$ Hz, H17); 6,93 (1H, d, $J = 1,7$ Hz, H4); 6,65 (1H, d, $J = 16,0$ Hz, H13); 2,88 (1H, hept, $J = 6,9$ Hz, H7); 2,16 (3H, s, H10); 1,23 (6H, d, $J = 6,9$ Hz, H8 e H9). **Lit.: RMN de ^1H [CDCl_3 , 300 MHz] δ :** não caracterizado no artigo (NIKUMBH; TARE; MAHULIKAR, 2003). **RMN de ^{13}C [CDCl_3 , 125 MHz] δ :** 165,2 (C11); 149,3 (C1); 148,2 (C14); 146,4 (C12); 134,2 (C5); 130,9 (C3); 130,6 (C6); 129,0 (C18 e C16); 128,3 (C15 e C19); 127,3 (C2); 124,1 (C17); 119,9 (C4); 117,3 (C13); 33,7 (C7); 23,9 (C8 e C9); 16,0 (C10). **Lit.: RMN de ^{13}C [CDCl_3 , 75.12 MHz] δ :** não caracterizado no artigo (NIKUMBH; TARE; MAHULIKAR, 2003).

5.5 MÉTODO GERAL PARA OBTENÇÃO DO DERIVADO ÉSTER DO CARVACROL **1d**.

Em um balão de fundo redondo de 25 mL, solubilizou-se o ácido 4-clorobenzoico (49 mg, 1,2 eq), EDC (75 mg, 1,5 eq), carvacrol (39 mg, 1 eq) e DMAP (95,5 mg, 1,5 eq) em 5,0 mL de acetonitrila, previamente tratada. A mistura de reação permaneceu sob constante agitação magnética e refluxo, sendo acompanhada por CCD, onde utilizou-se como eluente a mistura hexano/acetato de etila 8:2. Logo após, o solvente foi removido sob pressão reduzida. O resíduo foi dissolvido em éter dietílico (10 mL) e a solução foi lavada com uma solução de HCl 3M (2 x 10 mL), seguida de solução saturada de bicarbonato de sódio (2 x 10 mL) e de uma solução saturada de cloreto de sódio (10 mL). A camada orgânica foi seca com MgSO_4 anidro e filtrada, sendo o solvente removido sob pressão reduzida para produzir o éster correspondente (LUTJEN et al., 2018).



4-Clorobenzoato de 5-Isopropil-2-metilfenila (1d):

óleo incolor; 6%. **RMN de ^1H [CDCl_3 , 400 MHz] δ :** 8,21 (2H, dt, $J = 8,6; 18$ Hz H13 e H17); 7,42 (2H, dt, $J = 8,6; 18$ Hz H14 e H16); 7,12 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H3); 6,99 (1H, dd, $J = 7,8; 1,7$ Hz, H4); 6,91 (1H, d, $J = 1,7$ Hz, H6); 2,83 (1H, hept, $J = 6,9$ Hz, H7); 2,10 (3H, s, H10); 1,18 (6H, d, $J = 6,9$ Hz, H8 e H9); **Lit.: RMN de ^1H [CDCl_3 , 300 MHz] δ :** 8.32 (2H, d, $J = 7.7$ Hz), 7.51 (2H, d,

$J = 7.7\text{Hz}$), 7.21 (1H, d, $J = 7.7\text{Hz}$), 7.08 (1H, d, $J = 7.8\text{Hz}$), 7.01 (1H, s), 2.92 (1H, s), 2.20 (3H, s), 1.27 (6H, d, $J = 6.9\text{Hz}$) (MESQUITA et al., 2018). **RMN de ^{13}C [CDCl_3 , 100 MHz] δ :** 140,1 (C11), 149,3 (C1), 148,2 (C15), 140,0 (C12); 131,5 (C13 e C17); 131,0 (C3); 128,9 (C14 e C16); 128,0 (C5); 127,2 (C2); 124,4 (C4); 119,7 (C6); 33,7 (C7); 23,9 (C8 e C9); 16,0 (C10); **Lit.: RMN de ^{13}C [CDCl_3 , 75 MHz] δ :** 164,2; 149,5; 131,7; 131,2; 129,2; 128,5; 127,5; 124,5; 120,0; 33,8; 24,1; 16,0 (MESQUITA et al., 2018).

5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBATERIANA (FRANZBLAU et al., 1998)

Os testes de atividade antimicobacteriana foram realizados sob responsabilidade da pesquisadora Maria Cristina da Silva Lourenço no Departamento de Bacteriologia do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI/FIOCRUZ – Rio de Janeiro).

A cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 (American Type Culture Collection, Rockville, Md.) foi subcultivada no ágar Middlebrook 7H10 (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Md.). A suspensão foi preparada em 0,02% (v/v) de Tween 80 e 0,2% de albumina de soro bovino (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) e ajustada à uma turbidez correspondente a 1,0 da escala de McFarland. Posteriormente, a mistura foi diluída 1:25 em caldo 7H9GC (base de caldo Middlebrook 7H9) e casitona (Difco, Detroit, Michigan). As soluções dos compostos foram diluídas em meio 7H9GC até duas vezes o máximo da concentração final desejada no teste, antes da adição às microplacas. Subsequentemente, foram adicionados 200 μL de água deionizada e esterilizada em todo o perímetro exterior das placas de micropoços esterilizados (Nunclon™; Nunc A/S, Roskilde, Denmark), a fim de minimizar a evaporação do meio durante o período de incubação dos testes. As microplacas contendo 96 poços foram organizadas pelas linhas B a G, com colunas numeradas de 2 a 11, para receber 100 μL de meio 7H9GC. Em seguida, 100 μL de solução dos compostos teste foram adicionados nos poços das linhas B a G, nas colunas 2 e 3, utilizando uma pipeta de multicanal, sendo o conteúdo de

cada poço homogeneizado posteriormente. As diluições idênticas de 1:2 em série foram realizadas através das colunas restantes (exceto a coluna 11). Os intervalos de concentração final de composto foram de 100 a 3,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A inoculação do *M. tuberculosis* foi realizada através da adição de 100 μL de inóculo aos poços nas filas B a G nas colunas 2 a 11 utilizando uma pipeta de repetição, originando um volume final de 200 μL por poço. As placas (realizadas em triplicata) foram na sequência seladas com Parafilm® e incubadas a 37 °C durante 5 dias. O reagente de Alamar Blue e 10% de Tween 80 foram adicionados à coluna B11 (controle de viabilidade celular) e as placas reincubadas a 37 °C por 24h. Se o poço B11 adquiriu a coloração rosa, a mistura do reagente foi adicionada a todos os poços restantes das microplacas, sendo novamente vedadas com Parafilm® e incubadas durante mais 24 h a 37° C. Após este período, as cores de todos os poços foram registradas. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração de substância-teste que impediu uma mudança de cor de azul para rosa.

REFERÊNCIAS

ALOKAM, R. et al. Identification and structure–activity relationship study of carvacrol derivatives as Mycobacterium tuberculosis chorismate mutase inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 4, p. 547–554, 3 ago. 2014.

ANDRADE-OCHOA, S. et al. Quantitative structure-activity relationship of molecules constituent of different essential oils with antimycobacterial activity against Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1–11, 2015.

ARMAREGO, W. L. E.; LI, C.; CHAI, L. **PURIFICATION OF Fifth Edition**. [s.l.: s.n.].

AYDIN, E.; TÜRKEZ, H.; KELEŞ, M. S. The effect of carvacrol on healthy neurons and N2a cancer cells: Some biochemical, anticancerogenicity and genotoxicity studies. **Cytotechnology**, v. 66, n. 1, p. 149–157, 2014.

BARDELL, D. The roles of the sense of taste and clean teeth in the discovery of bacteria by Antoni van Leeuwenhoek. **Microbiological Reviews**, v. 47, n. 1, p. 121–126, 1983.

BASSANETTI, I. et al. Investigation of antibacterial activity of new classes of essential oils derivatives. **Food Control**, v. 73, p. 606–612, 2017.

BISPO, M. DE L. F. et al. Synthesis and Antitubercular Evaluation of N - Arylpyrazine and N,N' -Alkyl-diylpyrazine-2-carboxamide Derivatives. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 1317–1322, nov. 2012.

BKHAITAN, M. M. et al. Preparation and biological evaluation of metronidazole derivatives with monoterpenes and eugenol. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 92, n. 6, p. 1954–1962, 2018.

BOTELHO, M. A. et al. Antimicrobial activity of the essential oil from Lippia sidoides, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 3, p. 349–356, 2007.

BRANCO, S. C. F.; PINTO A. C. E BOECHAT, N. A química medicinal de novas moléculas para o tratamento da tuberculose. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, p. 172–207, 2012.

BRANCO, F. S. C.; PINTO, A. C.; BOECHAT, N. The medicinal chemistry of novel molecules in clinical trials for tuberculosis treatment. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, p. 287–328, 2012.

CACCIATORE, I. et al. Carvacrol codrugs: A new approach in the antimicrobial plan. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–20, 2015.

CALLAWAY, E. Cell biology: Bacteria's new bones. **Nature**, v. 451, n. 7175, p. 124–126, 9 jan. 2008.

CHUNG, M. C. et al. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 2, p. 155–179, 2005.

CNA, C. DA A. E P. DO B. DEMANDA EXTERNA GARANTE GERAÇÃO DE RENDA NA PECUÁRIA, E PIB DO AGRONEGÓCIO CRESCE 0,65% EM MAIO/2019. **PIB DO AGRONEGÓCIO**, 2019.

DAVISON, E. K.; BRIMBLE, M. A. Natural product derived privileged scaffolds in drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 52, p. 1–8, 2019.

DE OLIVEIRA, A. S. et al. New Sulfonamides Derived from Carvacrol: Compounds with High Antibacterial Activity against Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. **Journal of Biosciences and Medicines**, v. 04, n. 07, p. 105–114, 2016.

DE VITA, D. et al. Exploring the anti-biofilm activity of cinnamic acid derivatives in *Candida albicans*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 24, p. 5931–5935, 2016.

EDUARDO, L.; RANGEL, P. Perdas e danos para o agronegócio. **AGROANALYSIS**, p. 30–31, 2015.

FGV IBRE. Recuperação doméstica em curso , mas os desafios persistem. **Boletim macro**, p. 1–26, 2019.

FRANZBLAU, S. G. et al. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 362–366, 1998.

GUIMARÃES, A. G. et al. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 107, n. 6, p. 949–957, 2010.

HARBORNE, J. B. Book Reviews. **IEEE Concurrency**, v. 2, n. 2, p. 81–84, 1994.

HELANDER, I. M. et al. Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3590–3595, 1998.

HOTTA, M. et al. Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPAR α and suppresses COX-2 expression. **Journal of Lipid Research**, v. 51, n. 1, p. 132–139, 2010.

JUKIC, M. et al. In Vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 3, p. 259–261, mar. 2007.

KG, C. R. G. + C. Ficha de Dados de Segurança. v. 2006, p. 1–16, 2015.

KIM, J. M. et al. Antibacterial Activity of Carvacrol, Citral, and Geraniol against *Salmonella typhimurium* in Culture Medium and on Fish Cubes. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 6, p. 1364–1368, 1995.

KUMAR, A. et al. Polyphasic phenotypic and genetic analysis reveals clonal nature of *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae* causing pomegranate bacterial blight. **Plant Pathology**, v. 69, n. 2, p. 347–359, 2020.

LI, B. et al. Coumarin-Based Inhibitors of *Bacillus anthracis* and *Staphylococcus aureus* Replicative DNA Helicase: Chemical Optimization, Biological Evaluation, and Antibacterial Activities. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 24, p. 10896–10908, 27 dez. 2012.

LI, J. J.; HOLSWORTH, D. D.; HU, L. Y. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Chemtracts**, v. 16, n. 7, p. 439–442, 2003.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 4–17, 2012.

LUTJEN, A. B. et al. Synthesis of (E)-cinnamyl ester derivatives via a greener Steglich esterification. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, p. 5291–5298, 2018.

MARINELLI, L.; DI STEFANO, A.; CACCIATORE, I. Carvacrol and its derivatives as antibacterial agents. **Phytochemistry Reviews**, v. 17, n. 4, p. 903–921, 16 ago. 2018.

MATHELA, C. S.; SINGH, K. K.; GUPTA, V. K. Synthesis and in vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol derivatives. **Acta poloniae pharmaceutica**, v. 67, n. 4, p. 375–80, nov. 2016.

MESQUITA, B. et al. SYNTHESIS, LARVICIDAL AND ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITORY ACTIVITIES OF CARVACROL/THYMOL AND DERIVATIVES. **Química Nova**, v. 41, n. 4, p. 412–416, 2018.

MYANGAR, K. N.; PATEL, N. H. Synthesis and in vitro antibacterial activity of new. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 2, p. 101–106, 2014.

NAKAMURA DE VASCONCELOS, S. S. et al. Carvacrol activity & morphological changes in Mycobacterium tuberculosis. **Future Microbiology**, v. 13, n. 8, p. 877–888, 2018.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US). **Science, Medicine, and Animals**. [s.l.: s.n.].

NEVES, D. A. et al. Favorable conditions for Xanthomonas axonopodis infection in Eucalyptus spp. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 6, p. 428–433, 2014.

NIKUMBH, V. P.; TARE, V. S.; MAHULIKAR, P. P. Eco-friendly pest management using monoterpenoids-III: Antibacterial efficacy of carvacrol derivatives. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 62, n. 11, p. 1086–1089, 2003.

NOGUEIRA, J. M. DA R.; MIGUEL, L. DE F. S. Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde. In: FIOCRUZ, E. E (Ed.). **Bacteriologia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: [s.n.]. p. 222–397.

NOSTRO, A. et al. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 519–523, 2007.

O. FELIPE, L.; L. BICAS, J. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, v. 39, n. 2, p. 120–130, 2017.

OLIVEIRA, C. A. et al. Synthesis of fruity flavor esters: An experiment for undergraduate courses within one of the principles of green chemistry. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 1, p. 152–167, 2014.

PATIL, J. U. et al. Synthesis and antibacterial activity of carvacryl ethers. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 12, n. 2, p. 129–133, 2010.

PAVARINI, D. P.; LOPES, N. P. Chemical ecology and volatile terpenes biosynthesis of “Arnica-da-Serra” from Brazil. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 1, p. 242–261, 2016.

RABAHI, M. F. et al. Tuberculosis treatment. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 43, n. 6, p. 472–486, dez. 2017.

RASTOGI, N. et al. Synergistic activities of antituberculous drugs with cerulenin and trans-cinnamic acid against *Mycobacterium tuberculosis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 149–157, 1998.

RIBEIRO, M. O. et al. Avaliação de testes rápidos em microplacas usando indicadores de viabilidade celular para determinação da susceptibilidade de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* à isoniazida e rifampicina. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, n. 4, p. 365–370, 2004.

SANCHES, A. L. R. et al. Análise Econômica da Prevenção e Controle do Câncer Cítrico no Estado de São Paulo. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 52, n. 3, p. 549–566, 2014.

SANTURIO, D. F. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de

condimentos frente a amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves e bovinos. **Ciência Rural**, v. 41, n. 6, p. 1051–1056, 2011.

SILVA, E. R. et al. Pharmacological Effects Of Carvacrol In Vitro Studies: A Review. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 29, p. 3454–3465, 2018.

SILVA, I. C. et al. Antibacterial activity of alkyl gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 1, p. 85–94, 2013.

SILVA, M. R. L.; CANTERI, M. G.; LEITE JÚNIOR, R. P. Inseticida neonicotinóide induz resistência ao cancro cítrico em laranja doce. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, n. 1, p. 65–75, 2012.

SILVA, S. N. E; JUNIOR, E. C. S. AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DE DIVERSAS SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS NA DESINFECÇÃO DE SUPERFÍCIE. **Revista uningá**, v. 17, n. 1, 2008.

SINGH, K. et al. Vilsmeier-Haack reaction on hydrazones: A convenient synthesis of 4-formylpyrazoles. **Journal of Chemical Research**, n. 5, p. 316–318, 2005.

TAVARES, L. C. QSAR: a abordagem de Hansch. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 631–639, 2004.

VIEGAS-JUNIOR, C. et al. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. **Current medicinal chemistry**, v. 14, n. 17, p. 1829–52, 1 jul. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Summary for Policymakers. In: INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (Ed.). . **Climate Change 2013 - The Physical Science Basis**. Cambridge: Cambridge University Press, 2019a. p. 1–30.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Consolidated guidelines on MDR tuberculosis treatment**. [s.l: s.n.].

YANG, Z. et al. How dormant is *Mycobacterium tuberculosis* during latency? A study integrating genomics and molecular epidemiology. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 5, p. 1164–1167, 2011.

ZAPATA, M.; BEAVER, J. S.; PORCH, T. G. Dominant gene for common bean resistance to common bacterial blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. **Euphytica**, v. 179, n. 3, p. 373–382, 2011.

APÊNDICES

APÊNDICE A: Espectros de massas e RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), ^{13}C (100 MHz, CDCl_3), DEPT-135, DEPT-90 e HSQC dos derivados 1a-j; 2 e 3.

Figura A1. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância 1a.

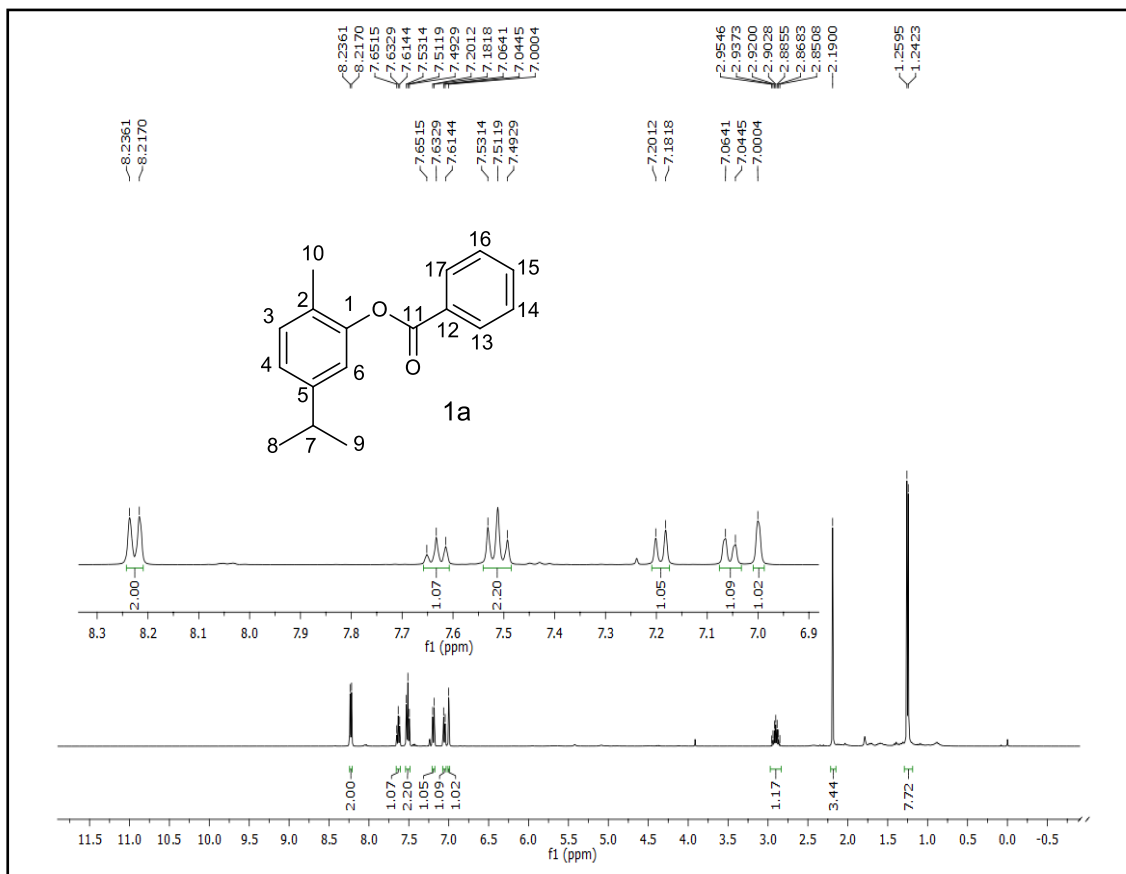


Figura A2. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância 1a.

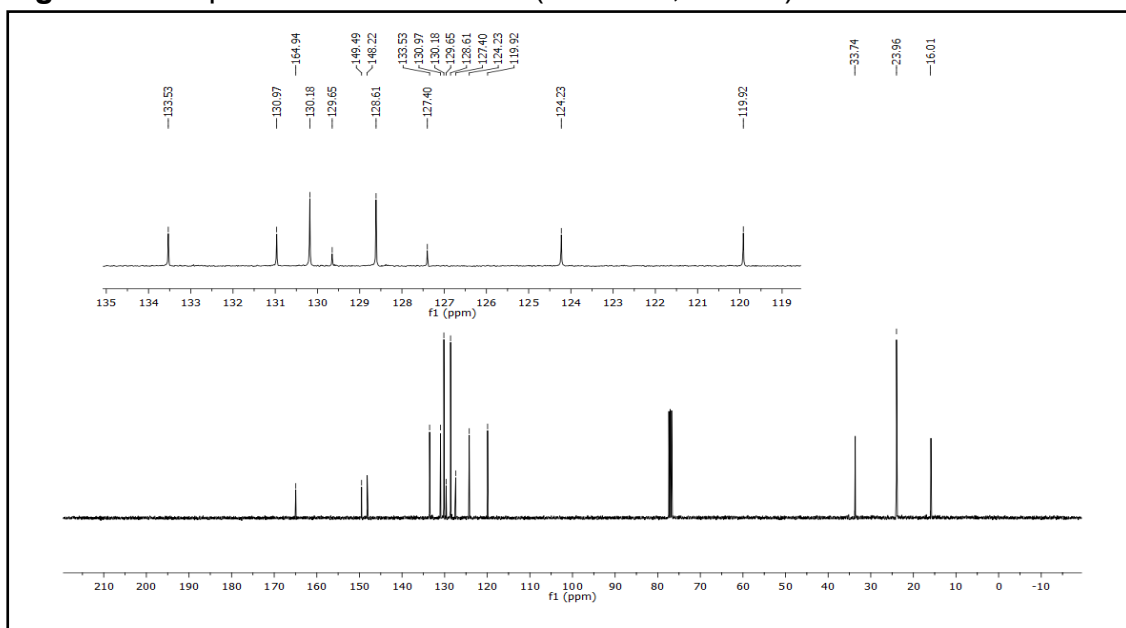


Figura A3. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **1b**.

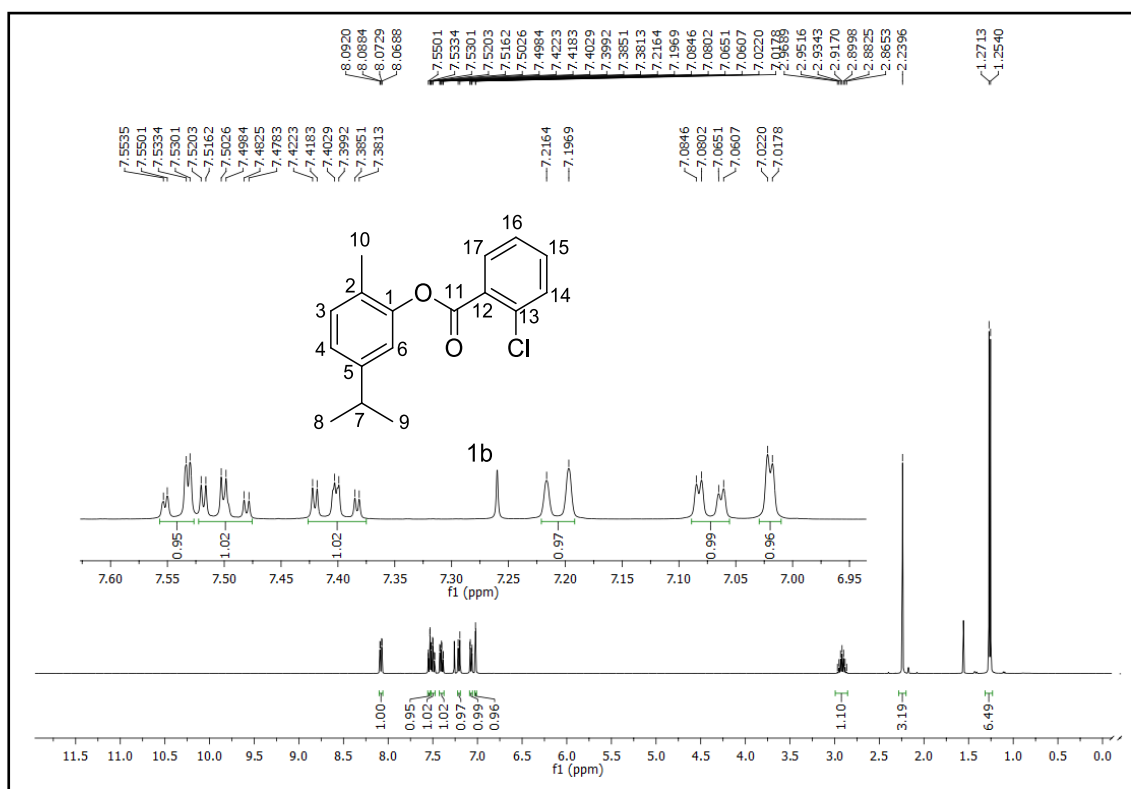


Figura A4. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância **1b**.

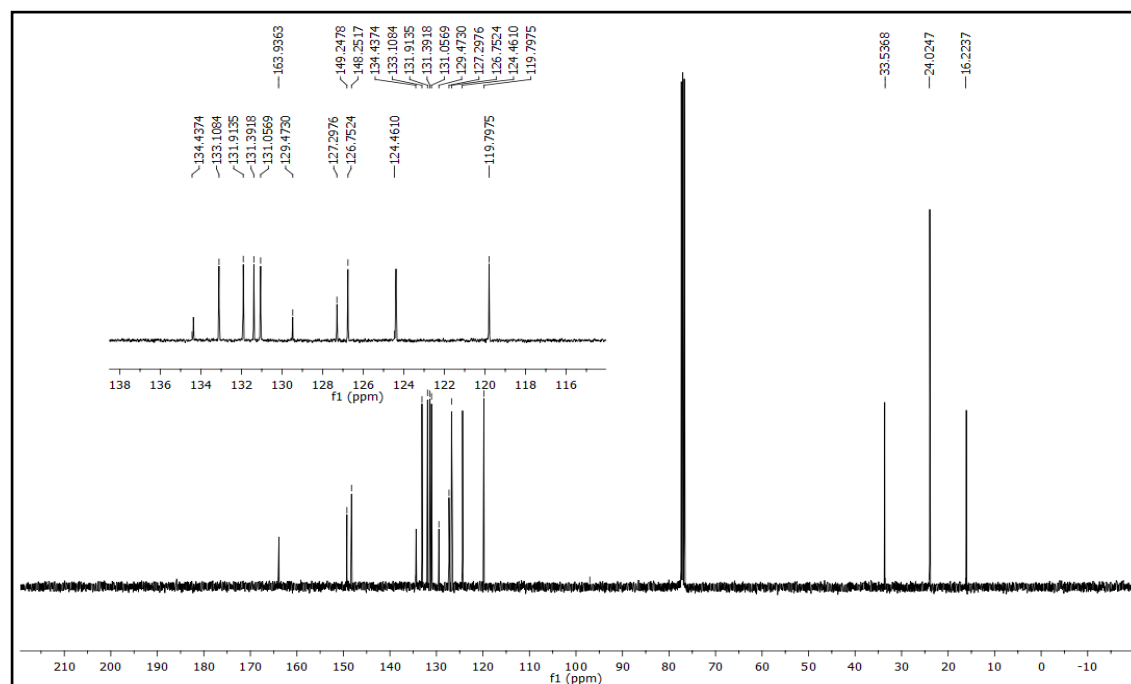


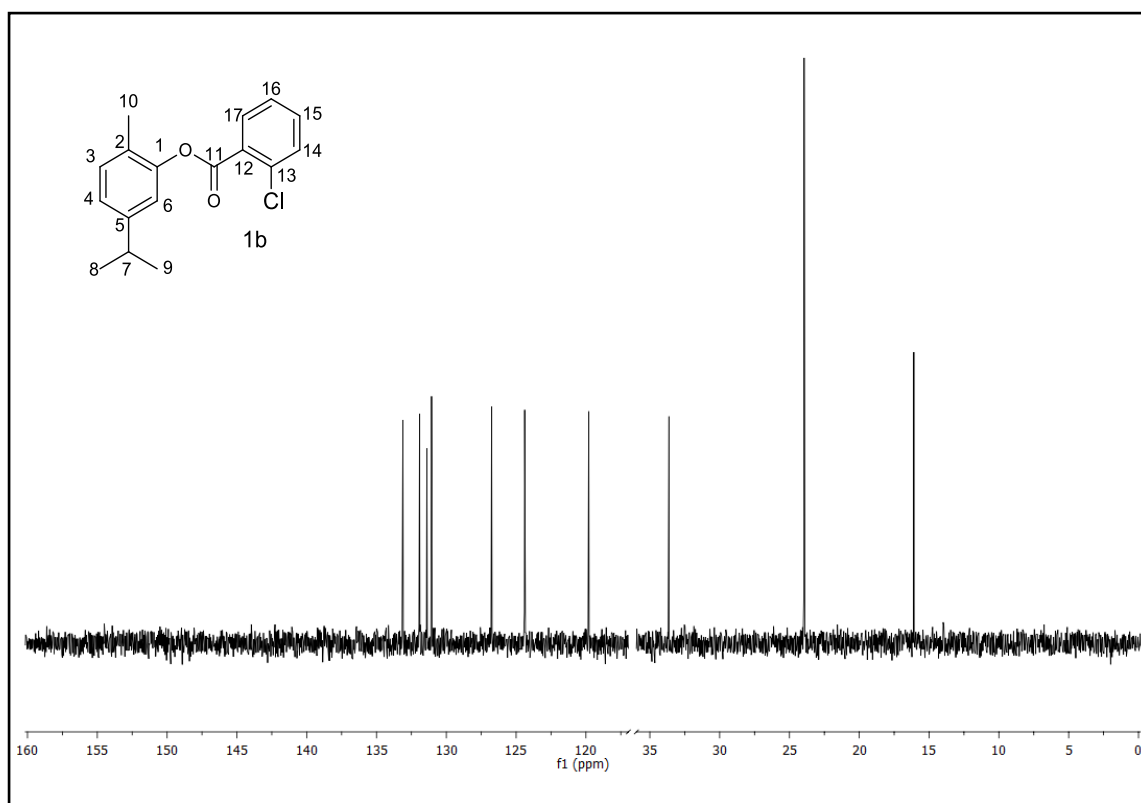
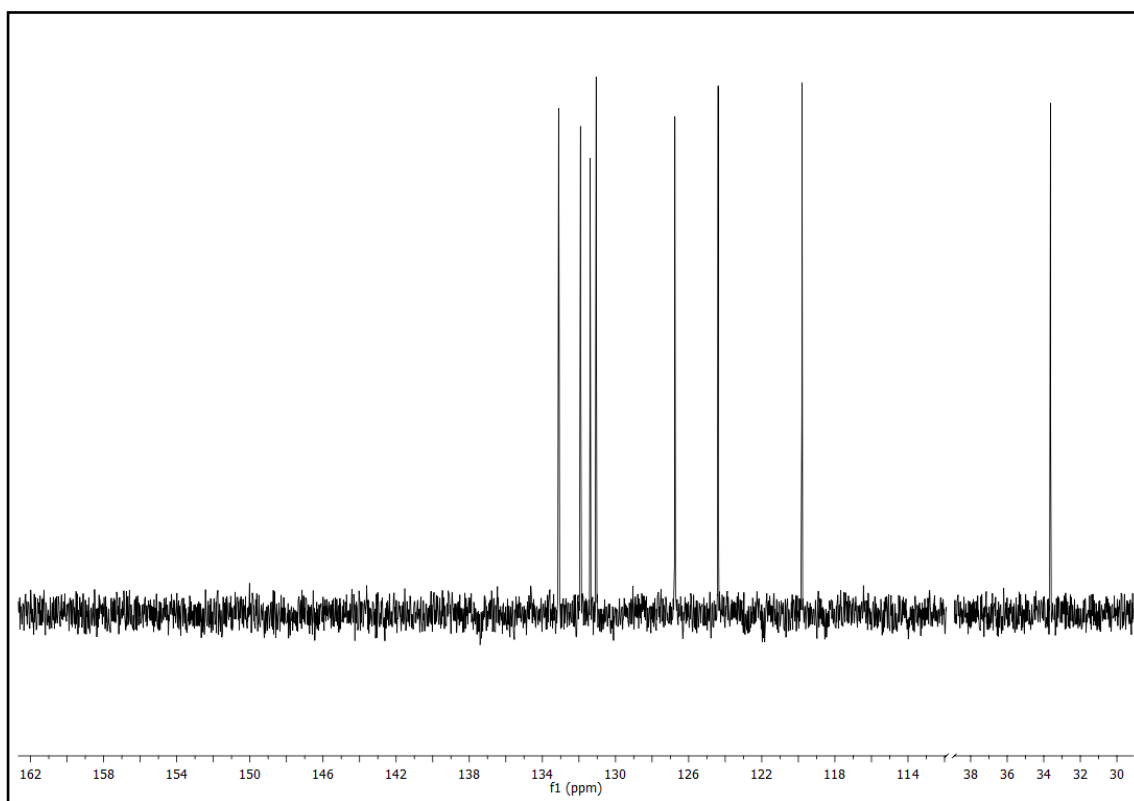
Figura A5. Espectro de DEPT135 da substância **1b**.**Figura A6.** Espectro de DEPT-90 da substância **1b**.

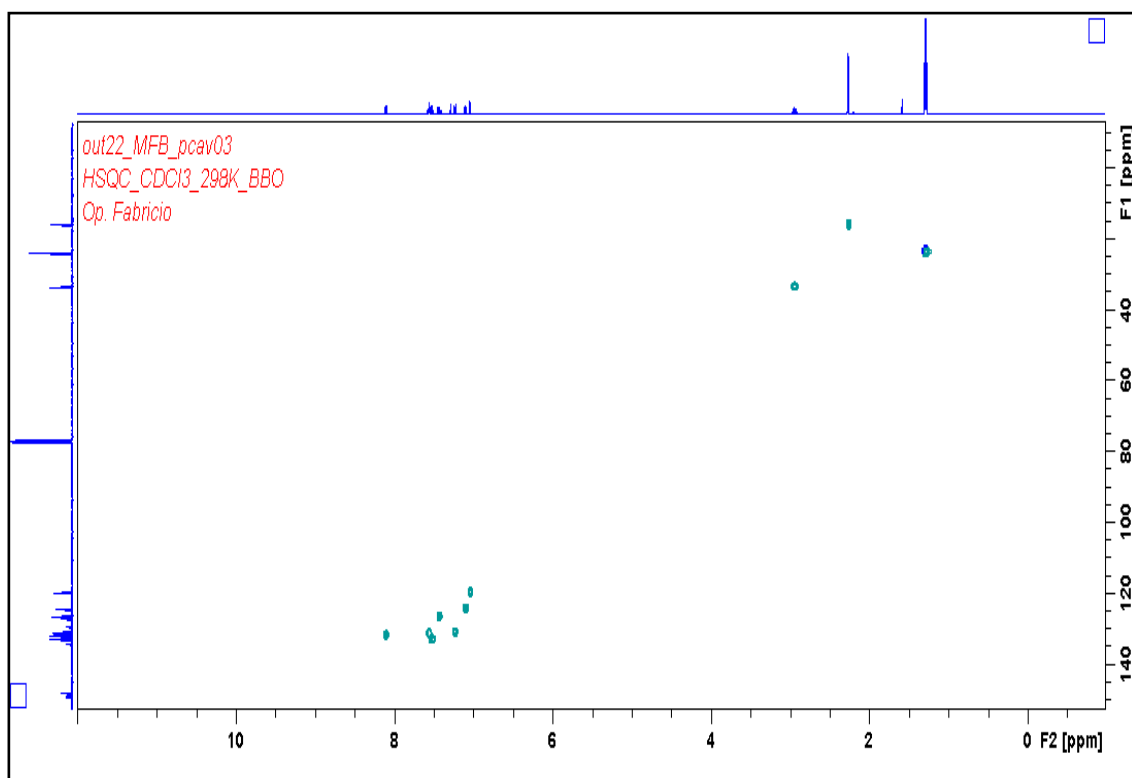
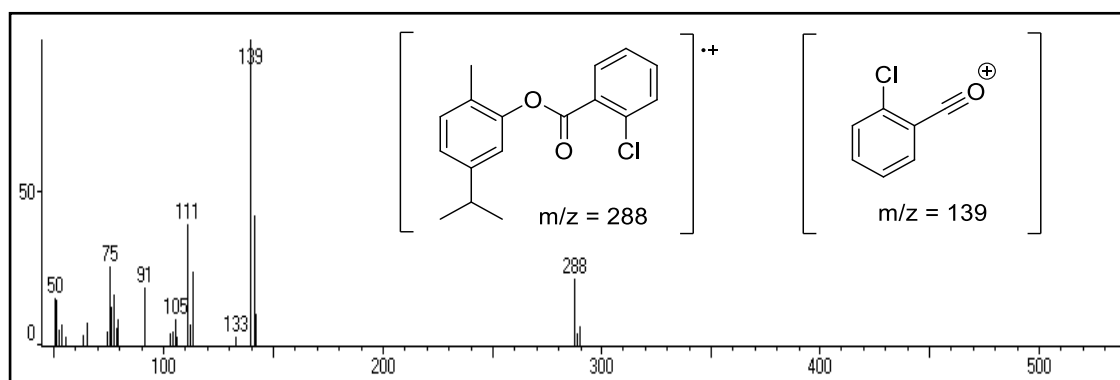
Figura A7. Espectro de HSQC da substância **1b**.**Figura A8.** Espectro de massas do composto **1b** por espectrômetro de massas acoplado a cromatografia gasosa (CG-EM).

Figura A9. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **1c**.

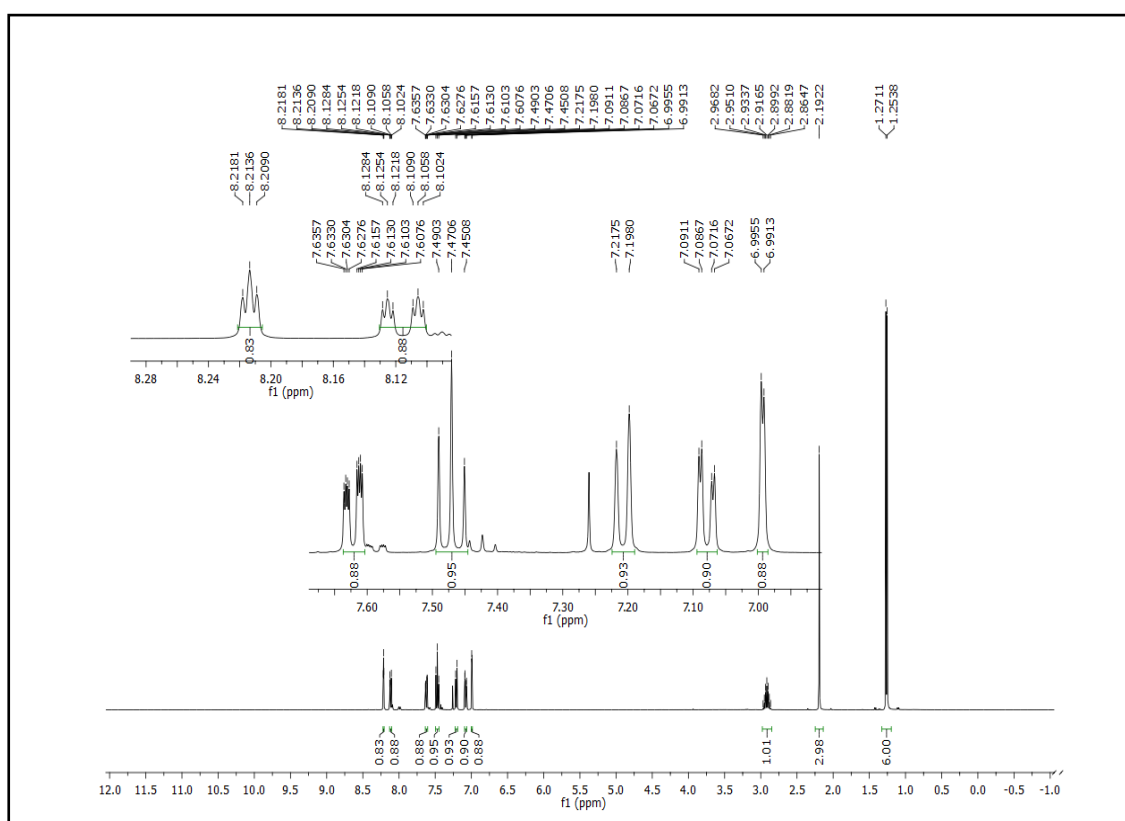


Figura A10. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância **1c**.

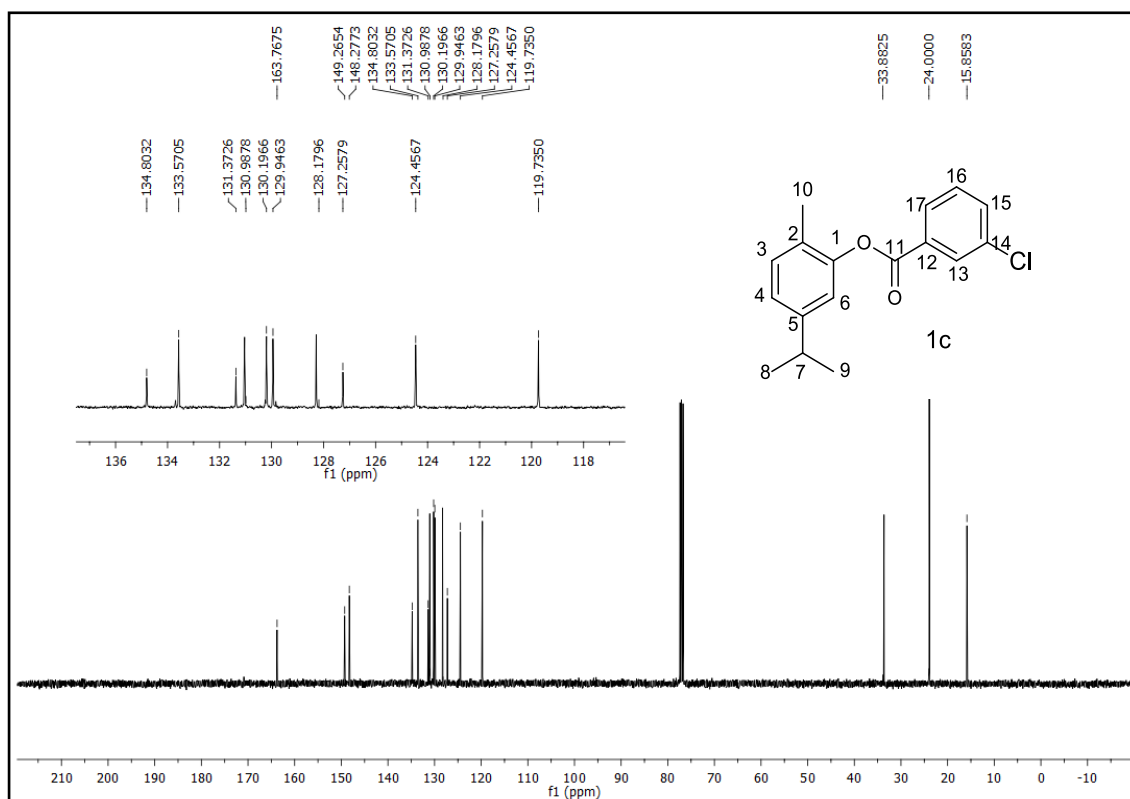


Figura A11. Espectro de DEPT-135 da substância **1c**.

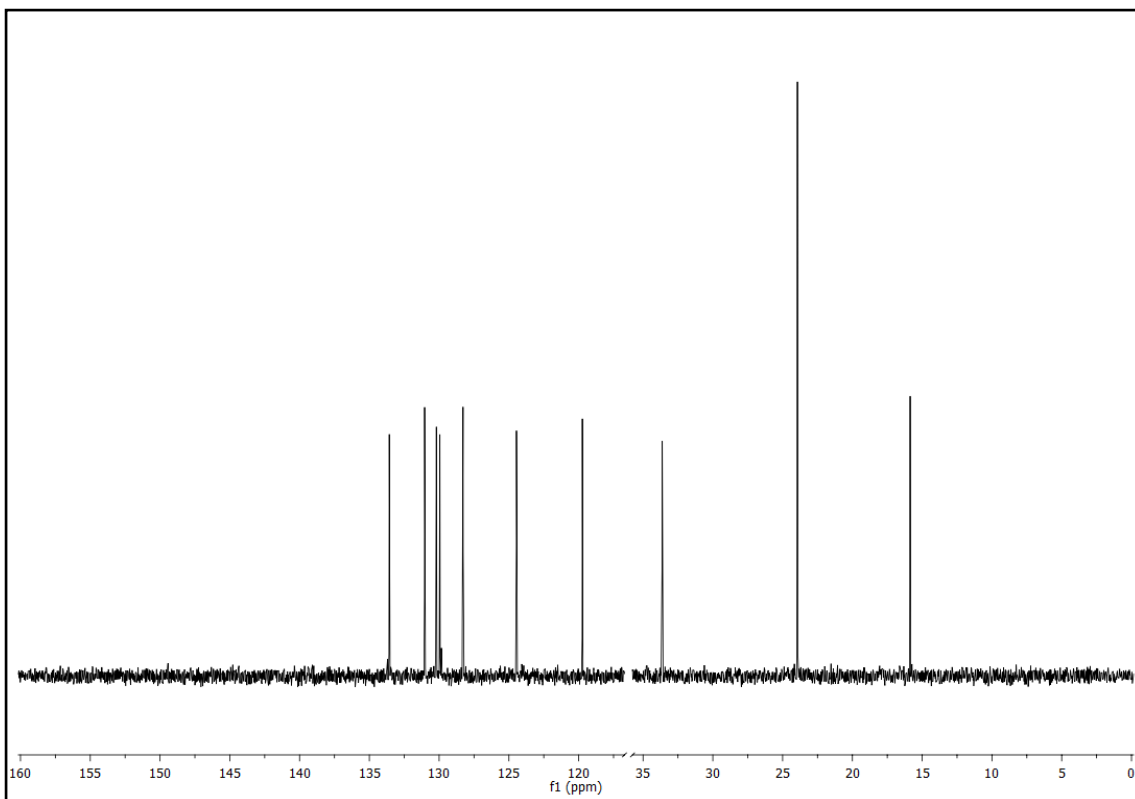


Figura A12. Espectro de DEPT-90 da substância **1c**.

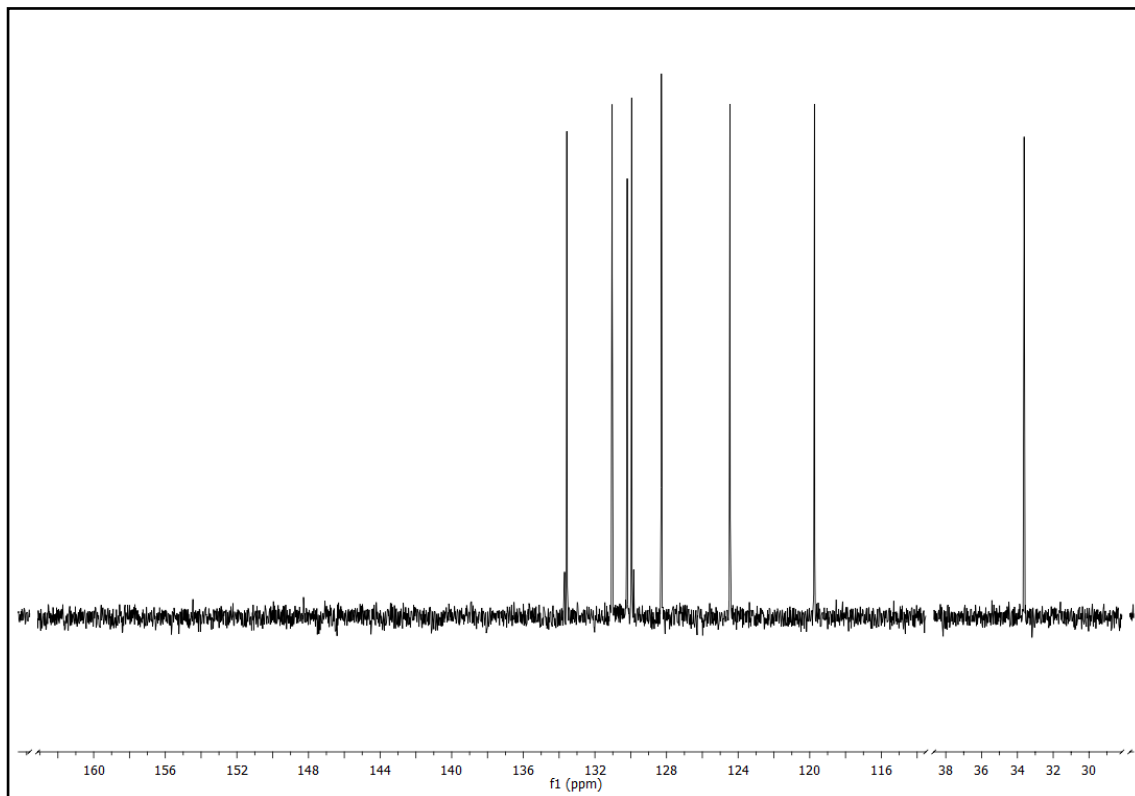


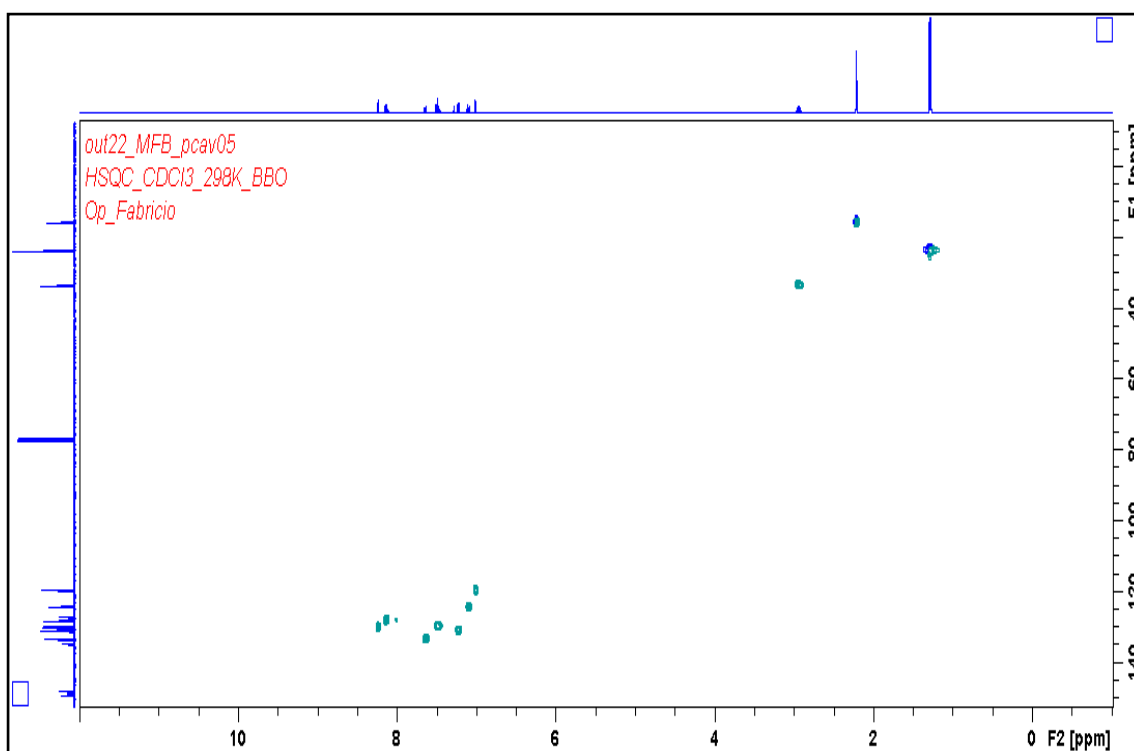
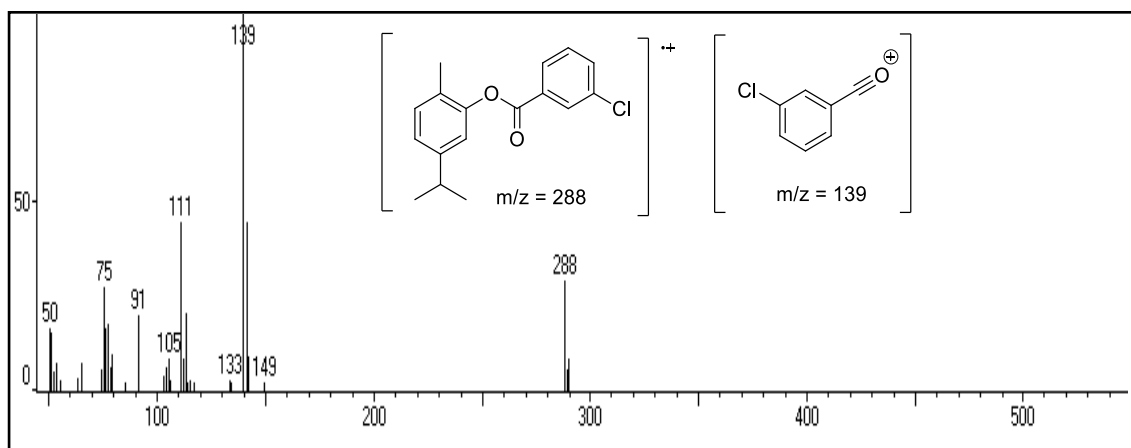
Figura A13. Espectro de HSQC da substância **1c**.**Figura A14.** Espectro de massas da substância **1c** por espectrômetro de massas acoplado a cromatografia gasosa (CG-EM).

Figura A16. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **1d**.

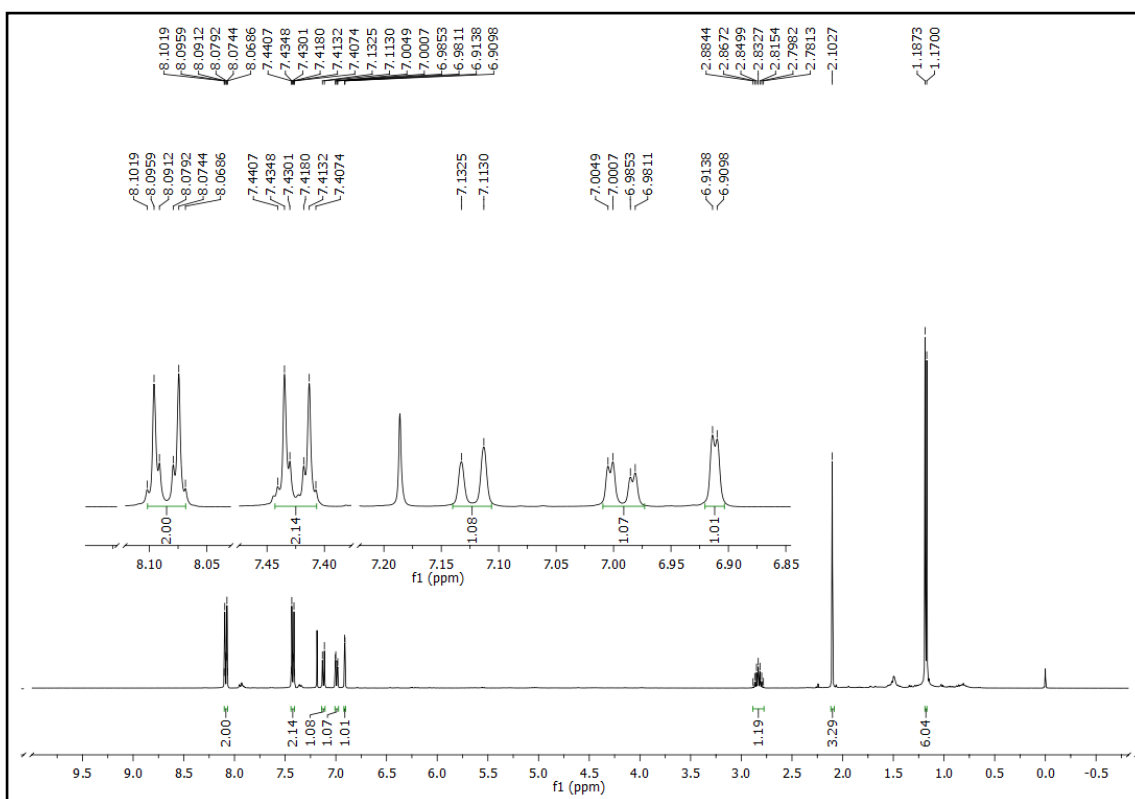


Figura A17. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância **1d**.

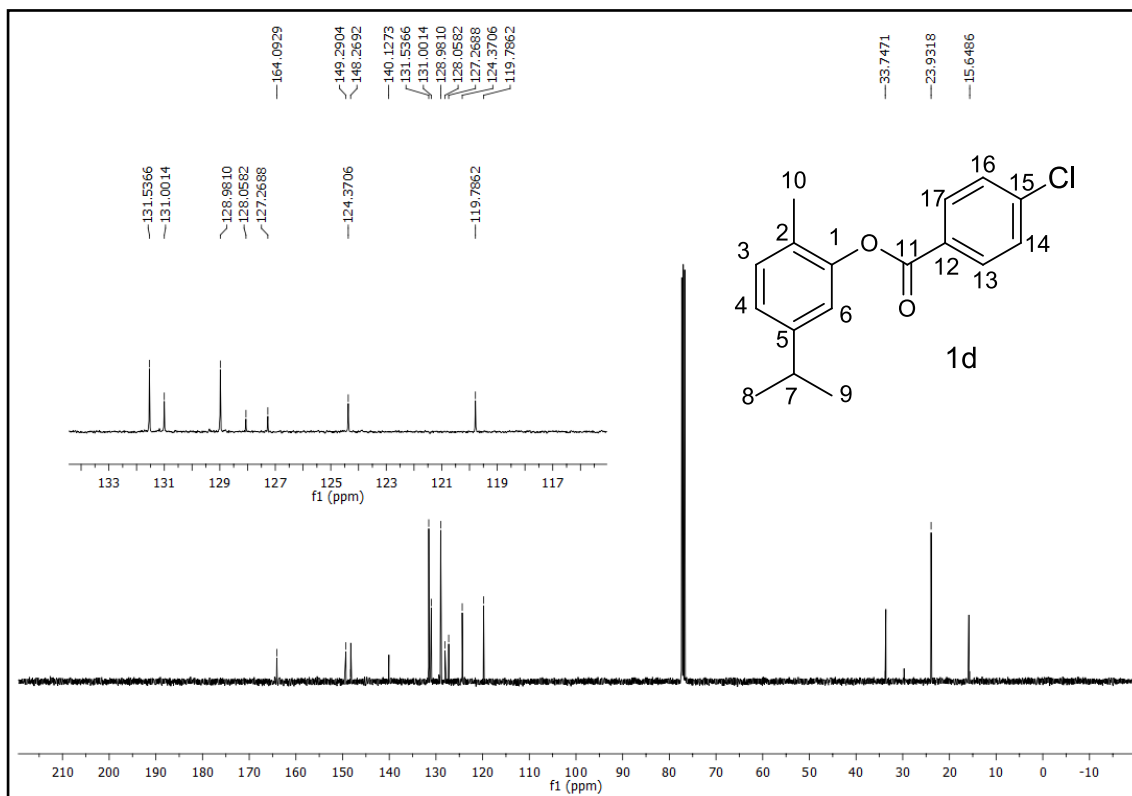


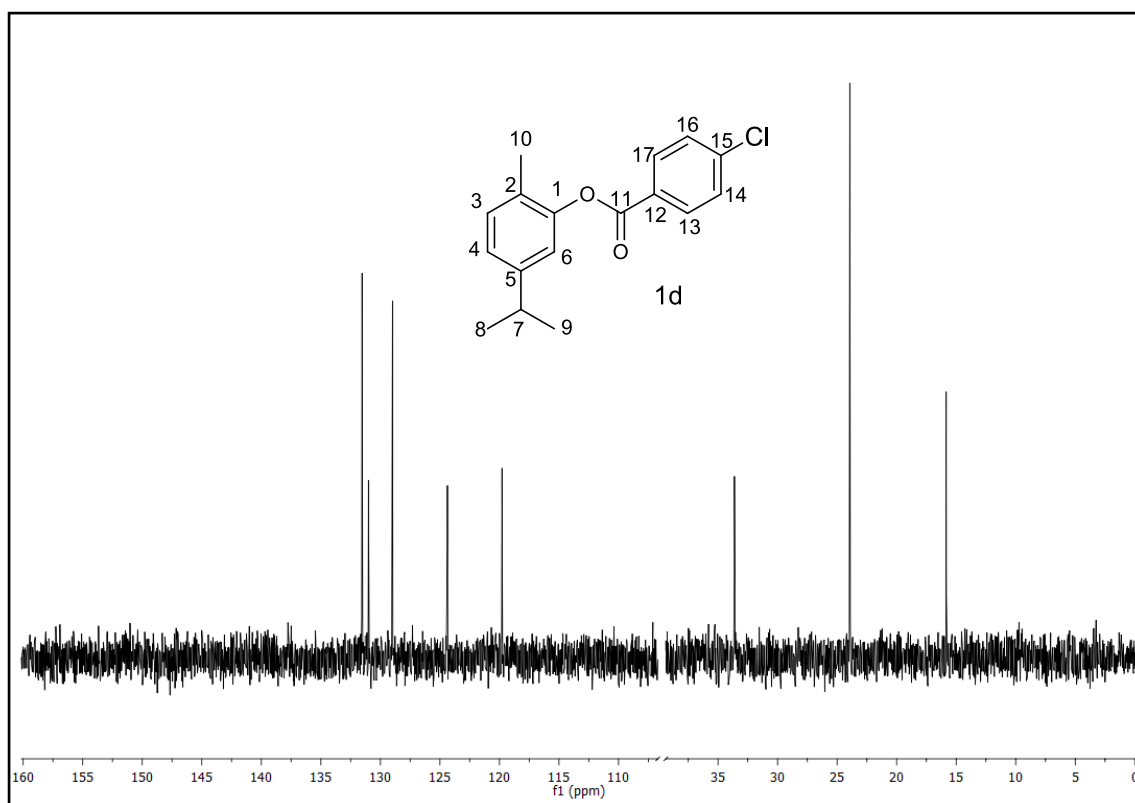
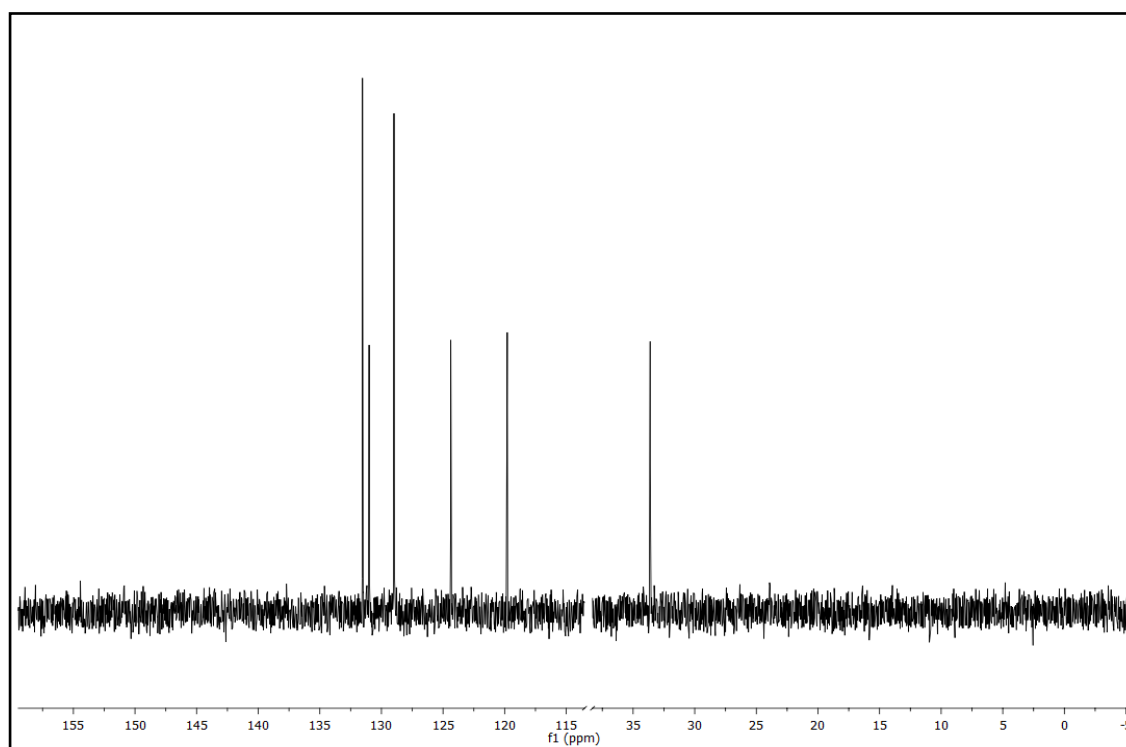
Figura A18. Espectro de DEPT-135 da substância **1d**.**Figura A19.** Espectro de DEPT-90 da substância **1d**.

Figura A20. Espectro de HSQC da substância **1d**.

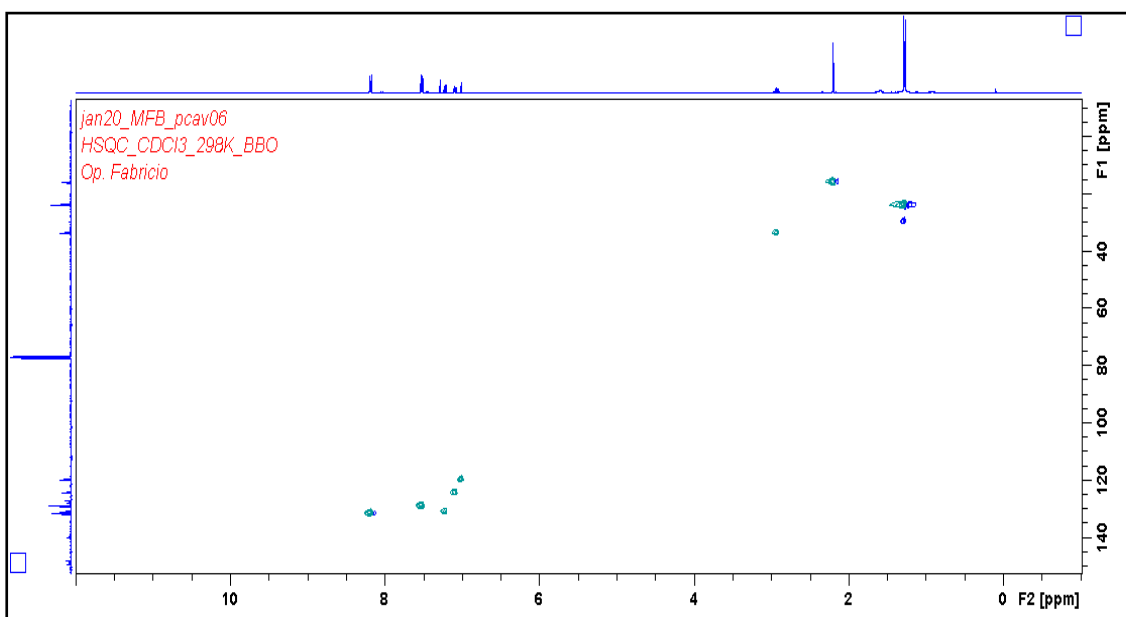


Figura 21. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **1e**.

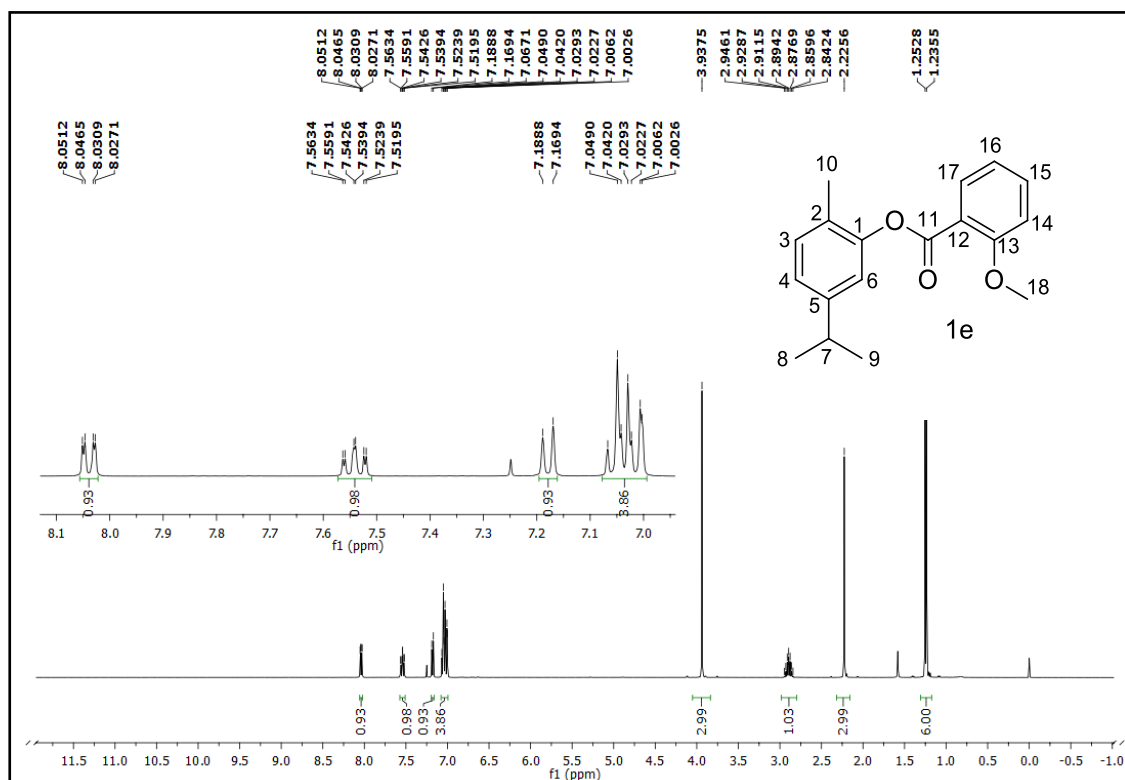


Figura A22. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância **1e**.

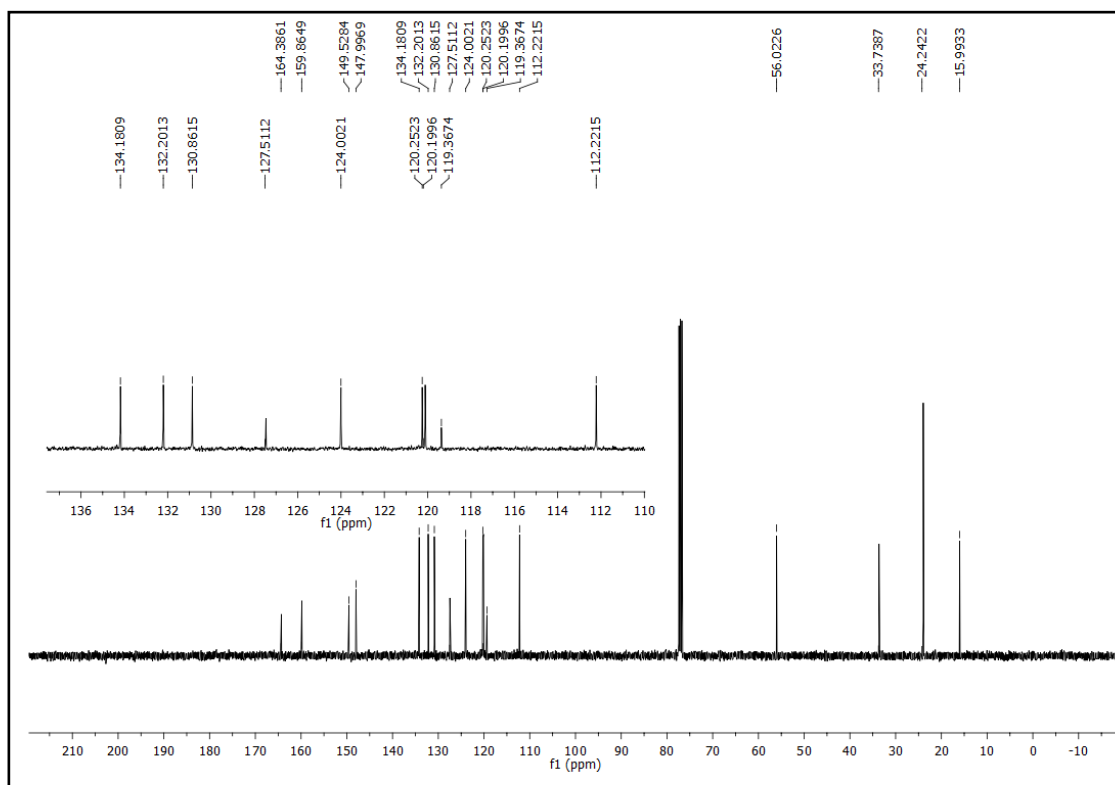


Figura A22. Espectro de DEPT-135 da substância **1e**.

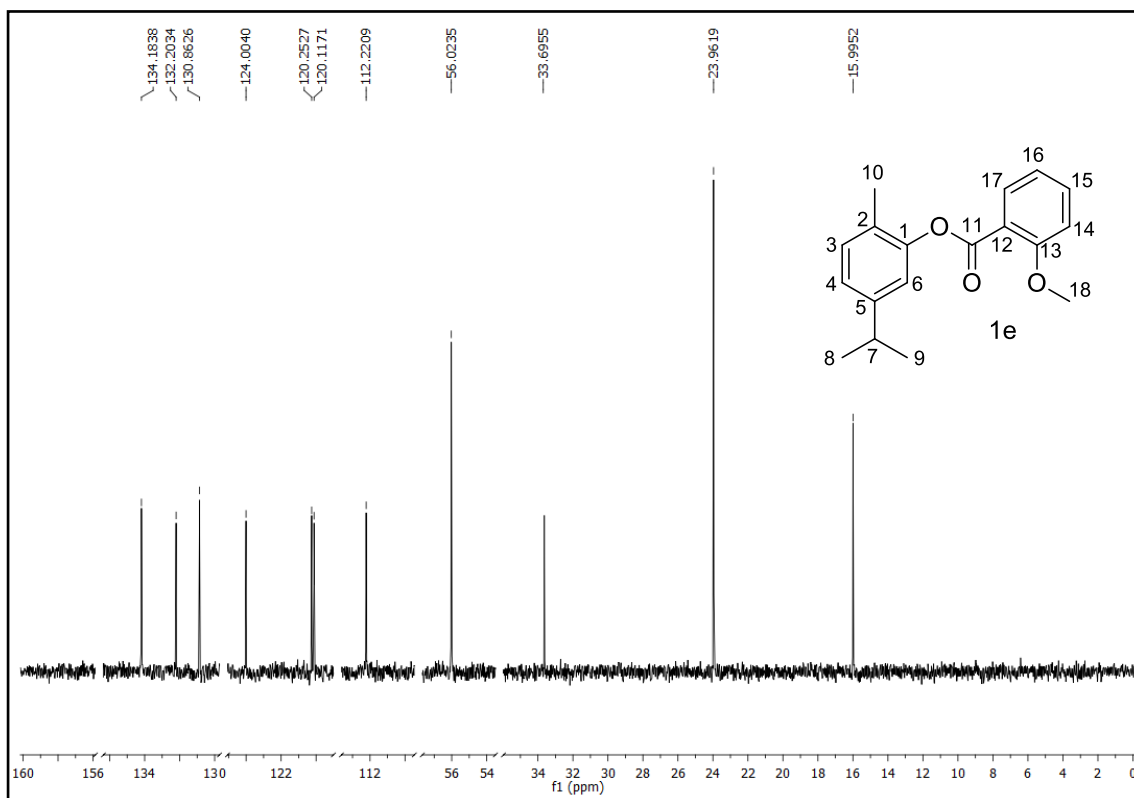


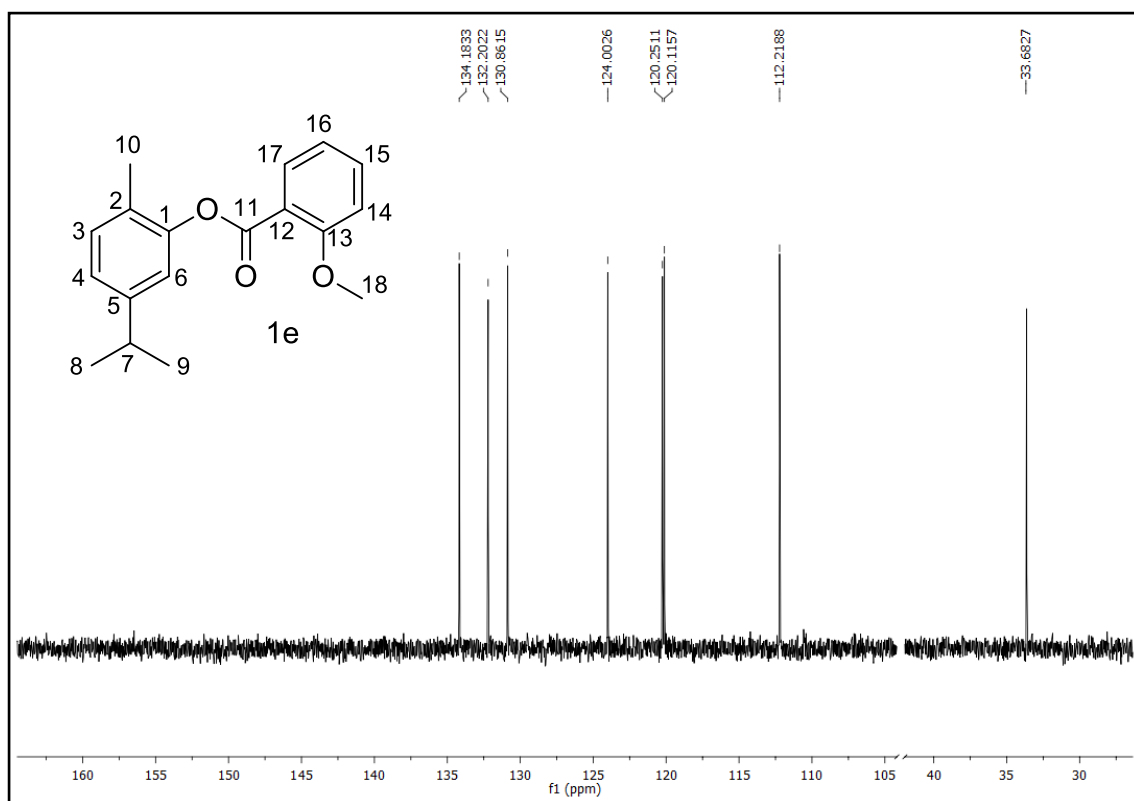
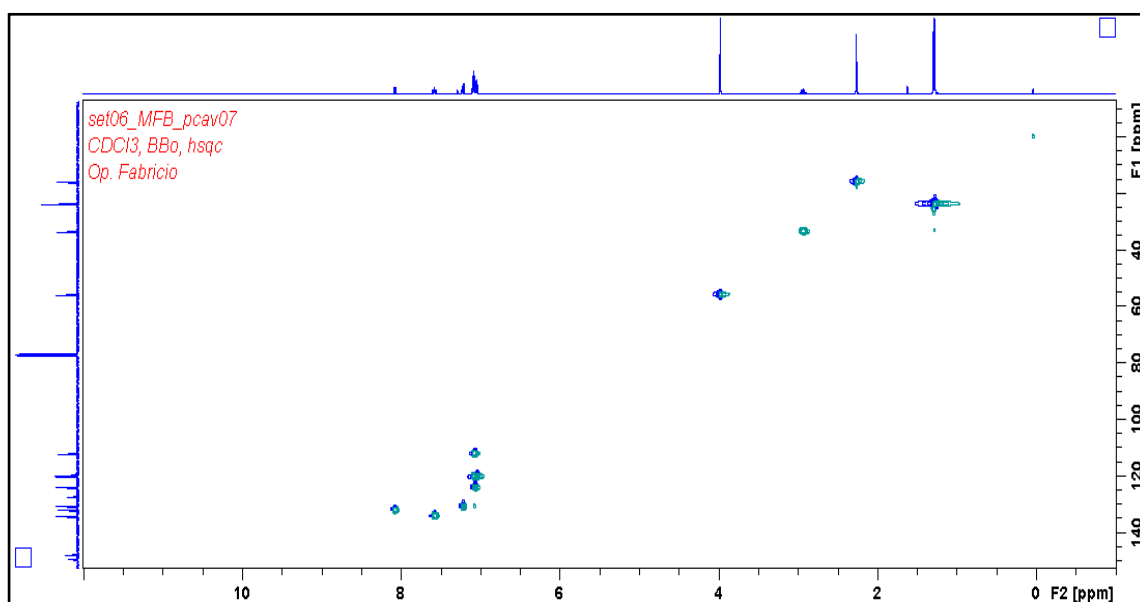
Figura A23. Espectro de DEPT-90 da substância **1e**.Figura A24. Espectro de HSQC da substância **1e**.

Figura A25. Espectro de massas da substância **1e** por espectrômetro de massas acoplado a cromatografia gasosa (CG-EM).

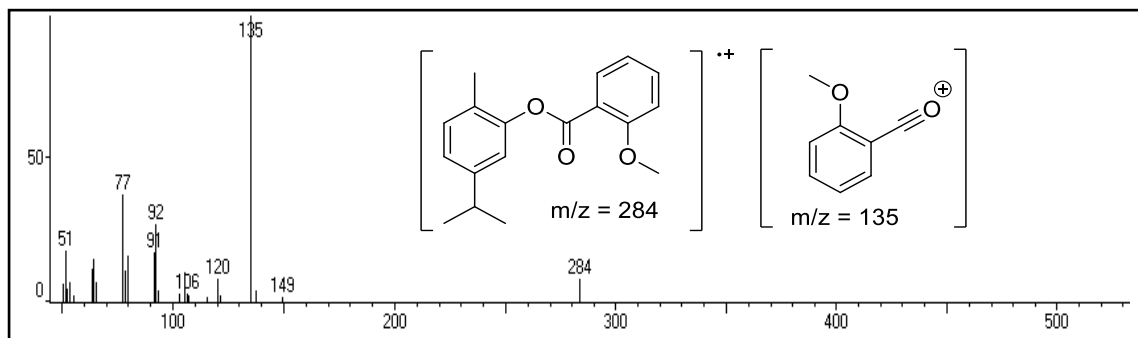


Figura A26 . Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **1f**.

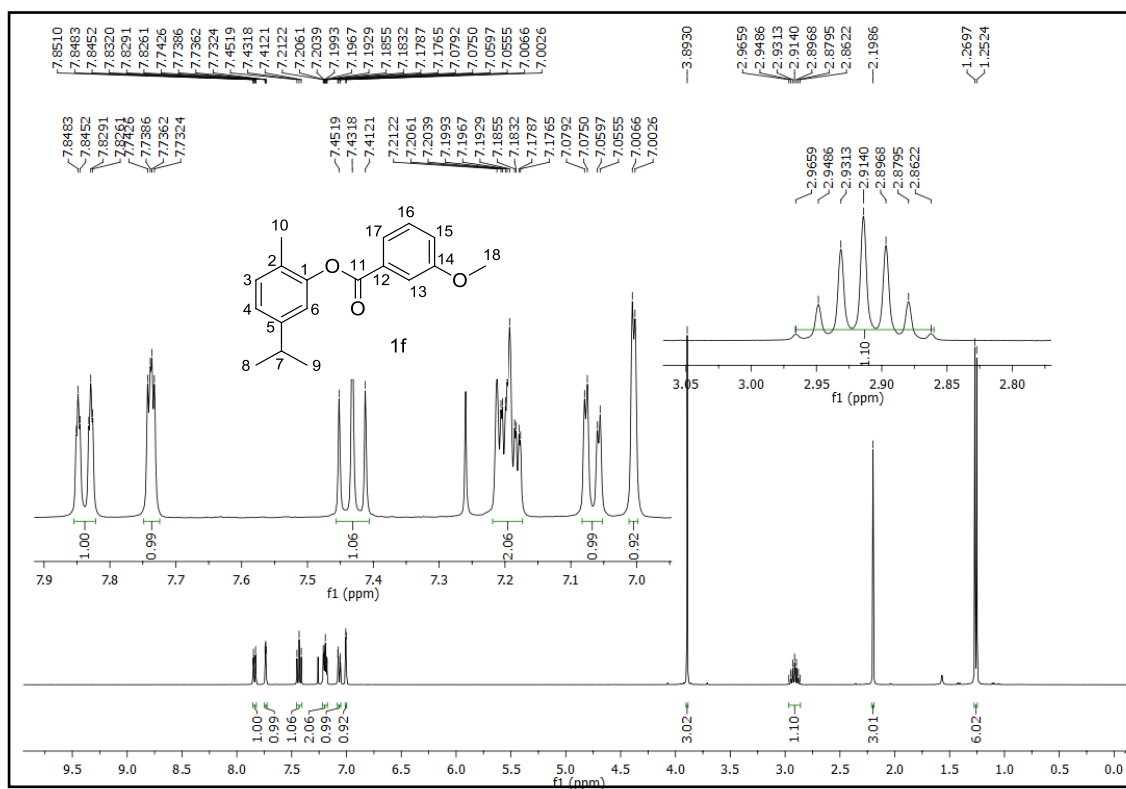


Figura A27. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância **1f**.

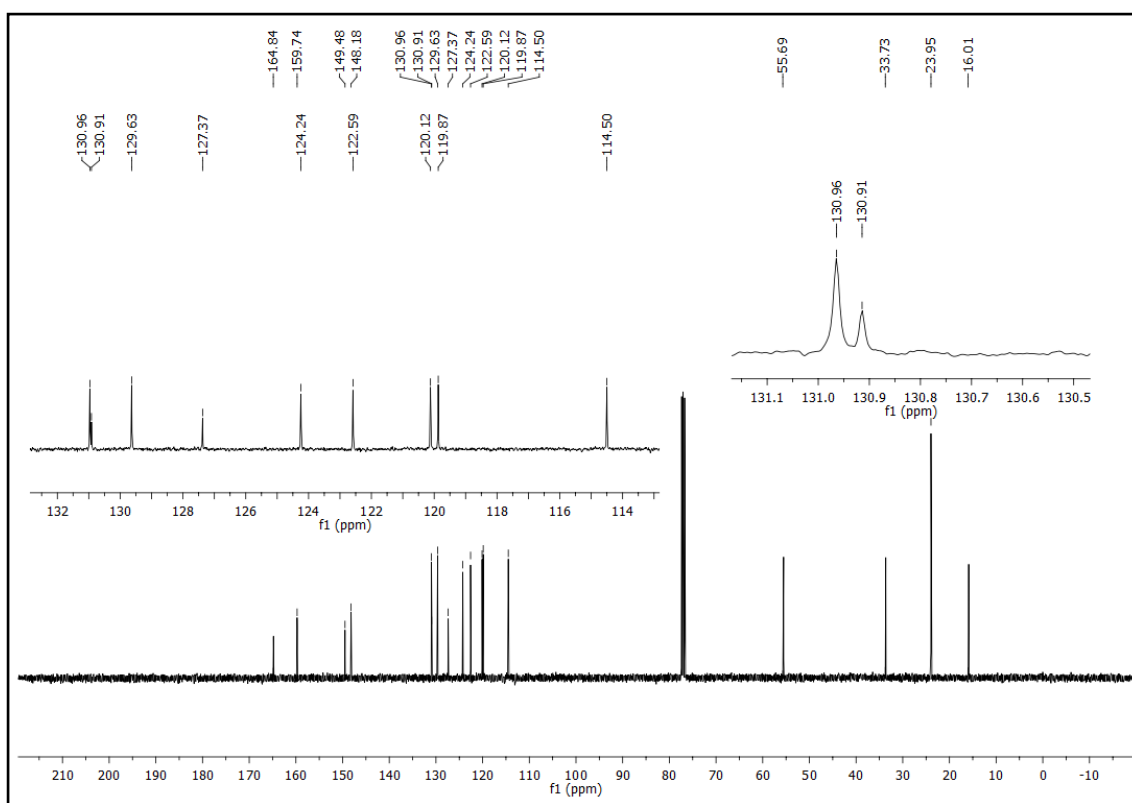


Figura A28. Espectro de DEPT-135 da substância **1f**.

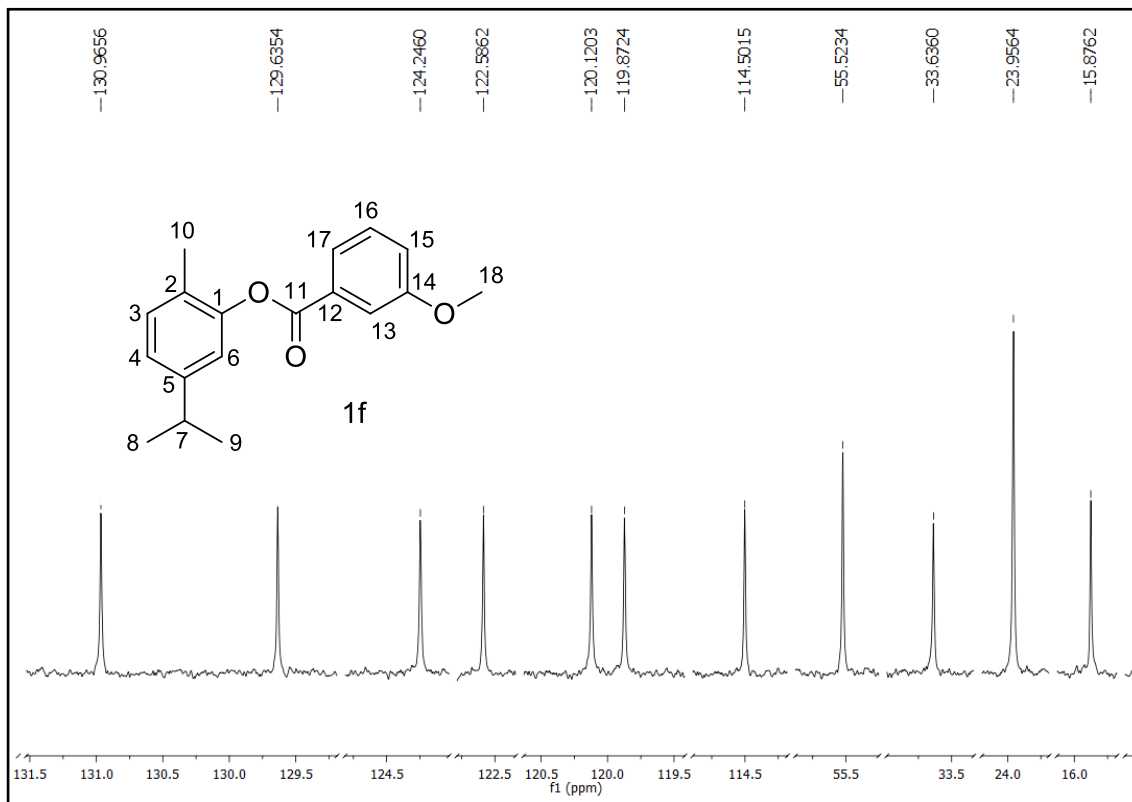


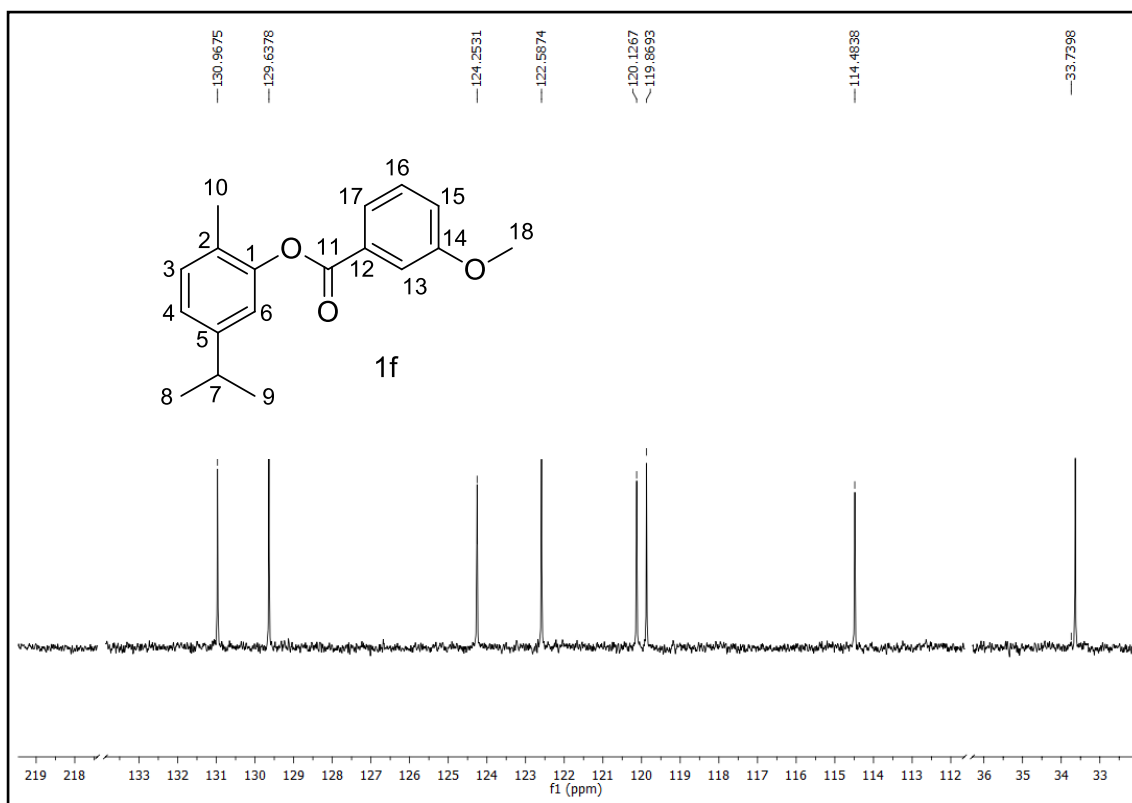
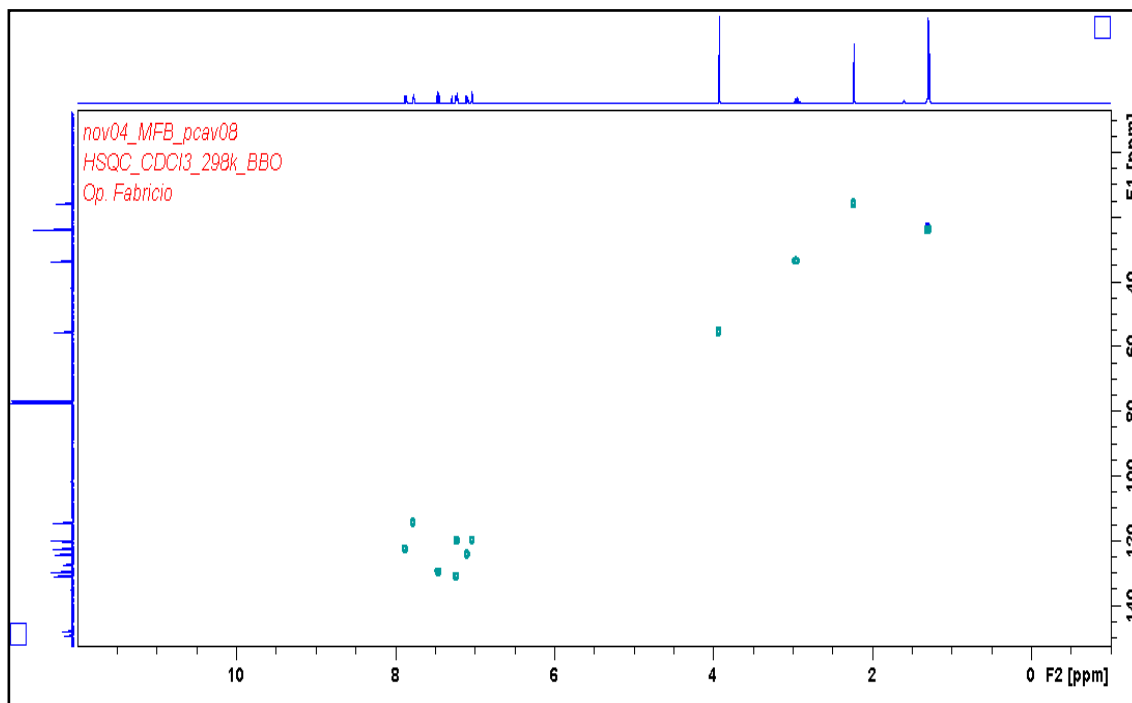
Figura A29. Espectro de DEPT-90 da substância **1f**.**Figura A30.** Espectro de HSQC da substância **1f**.

Figura A31. Espectro de massas da substância **1f** por espectrômetro de massas acoplado a cromatografia gasosa (CG-EM).

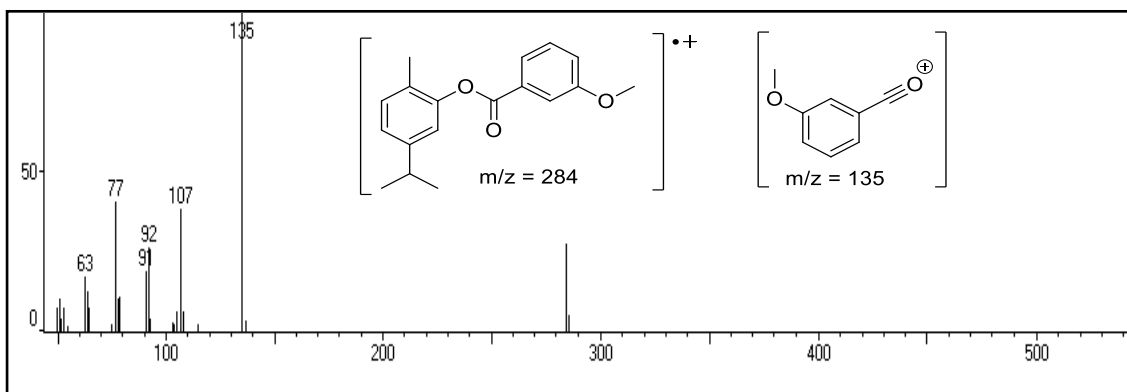


Figura A32. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **1g**.

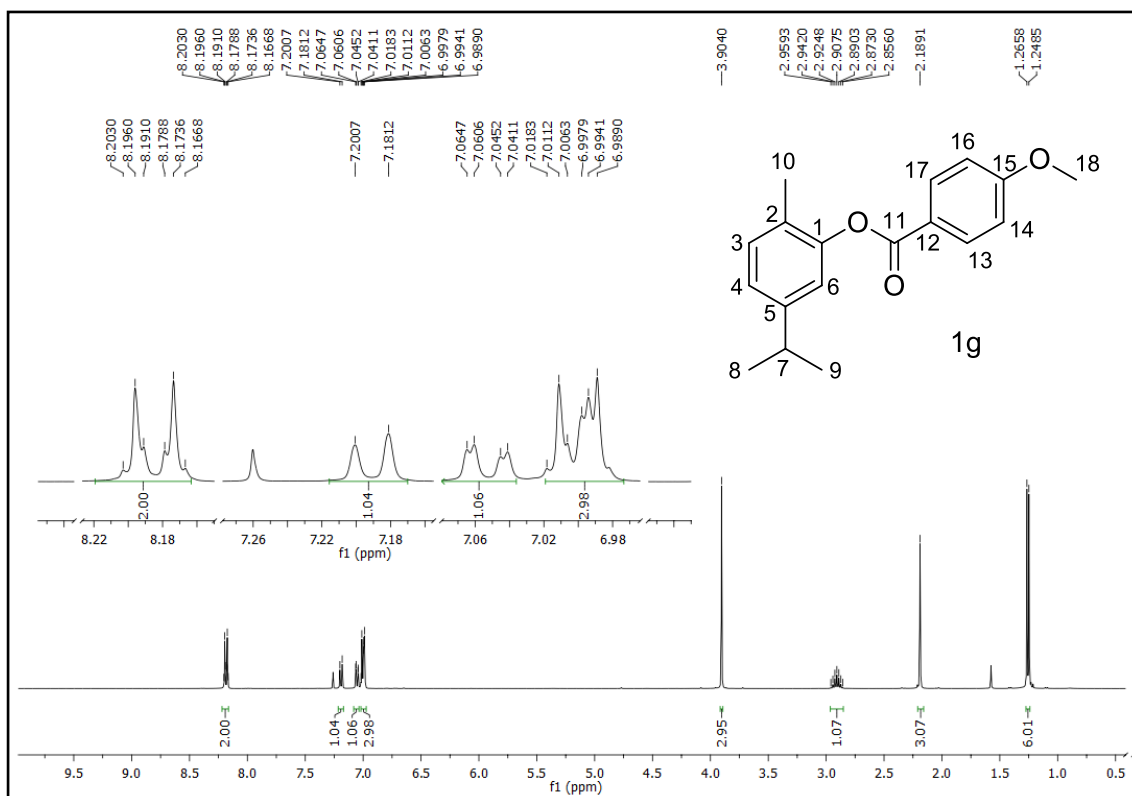


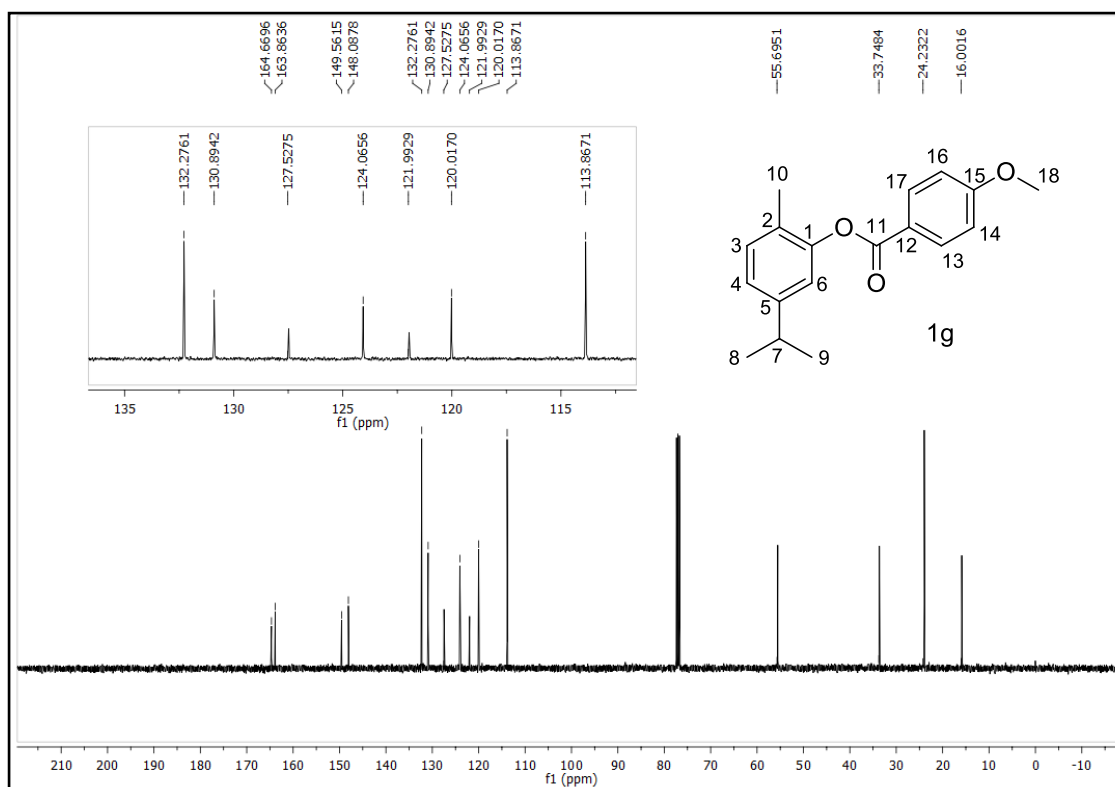
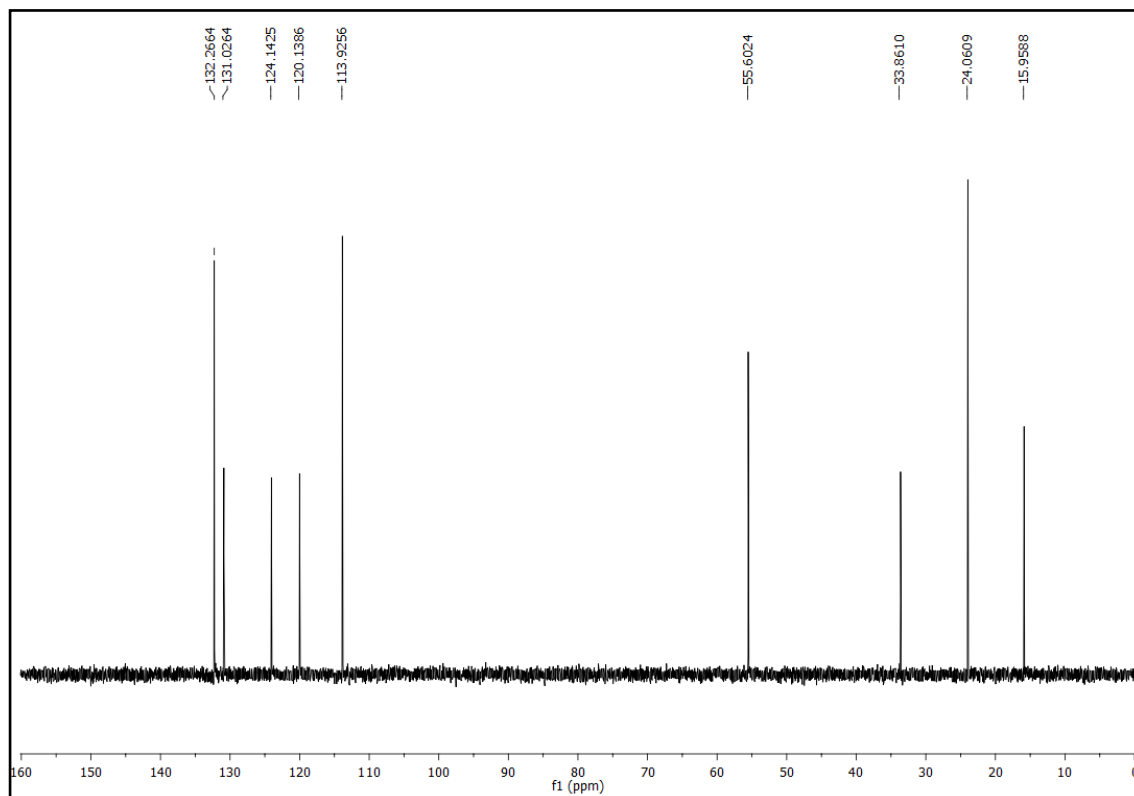
Figura A33. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância **1g**.**Figura A34.** Espectro de DEPT-135 da substância **1g**.

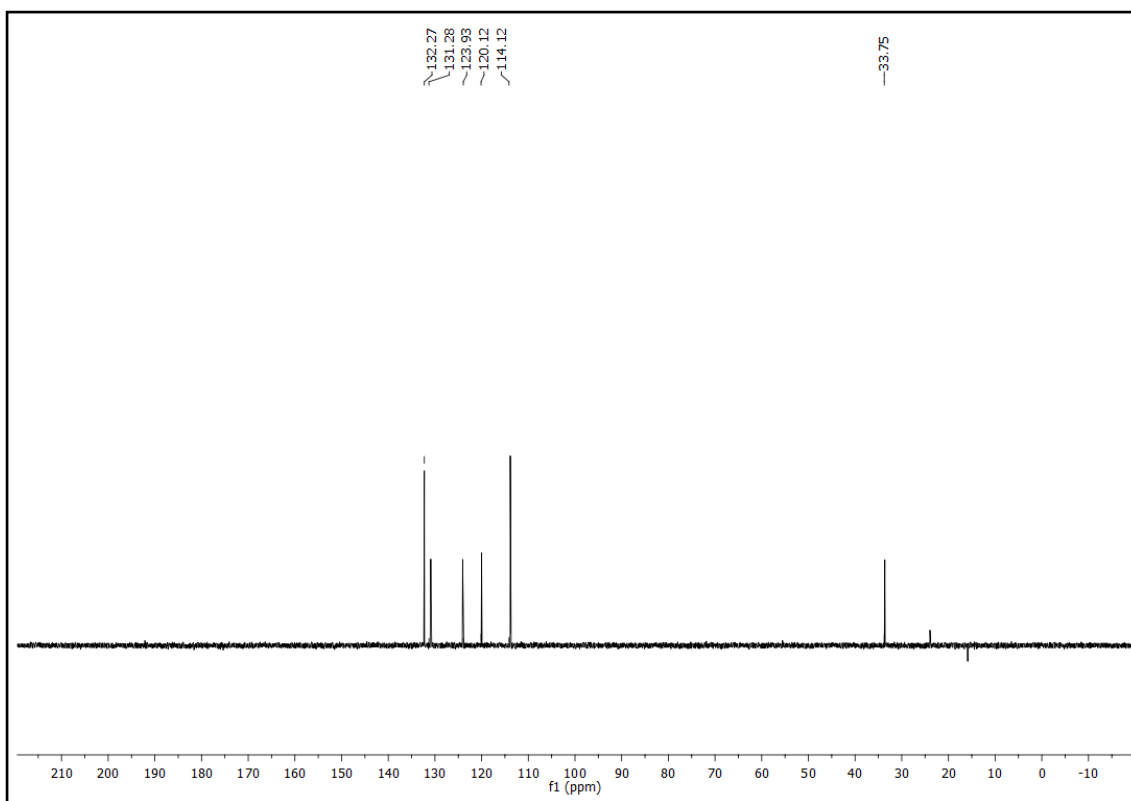
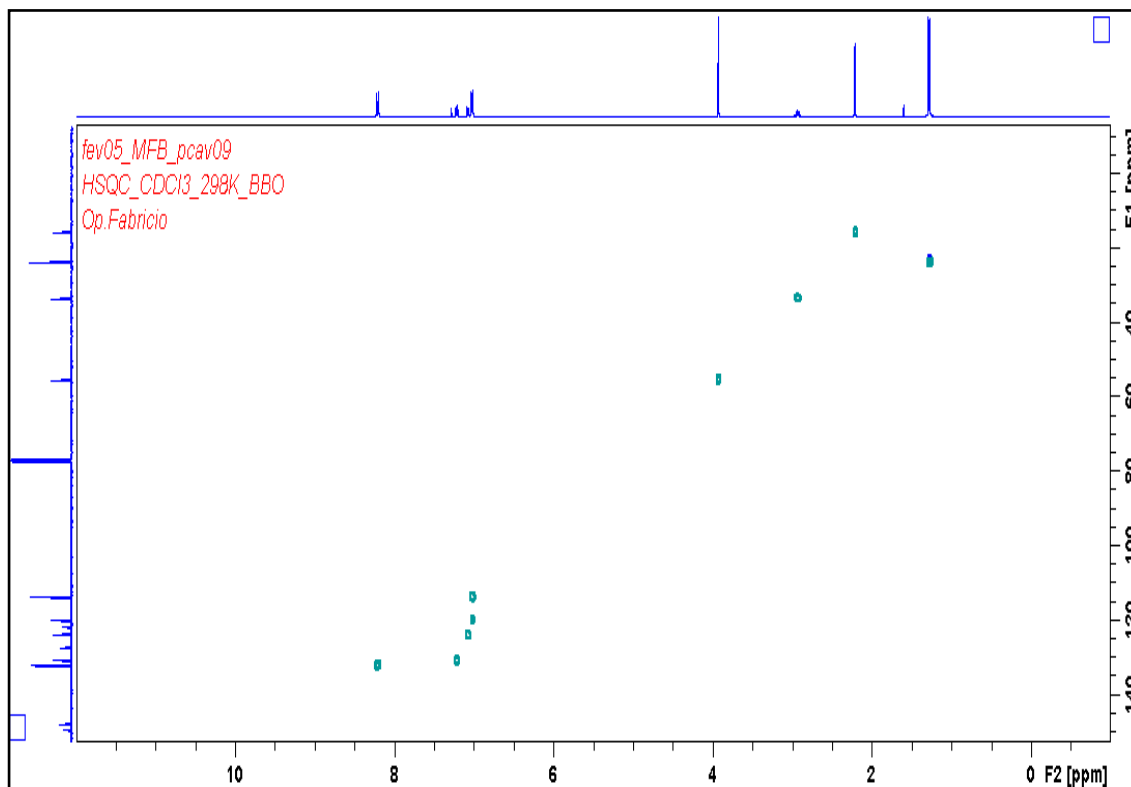
Figura A35. Espectro de DEPT-90 da substância **1g**.**Figura A36.** Espectro de HSQC da substância **1g**.

Figura A37. Espectro de massas da substância **1g** por espectrômetro de massas acoplado a cromatografia gasosa (CG-EM).

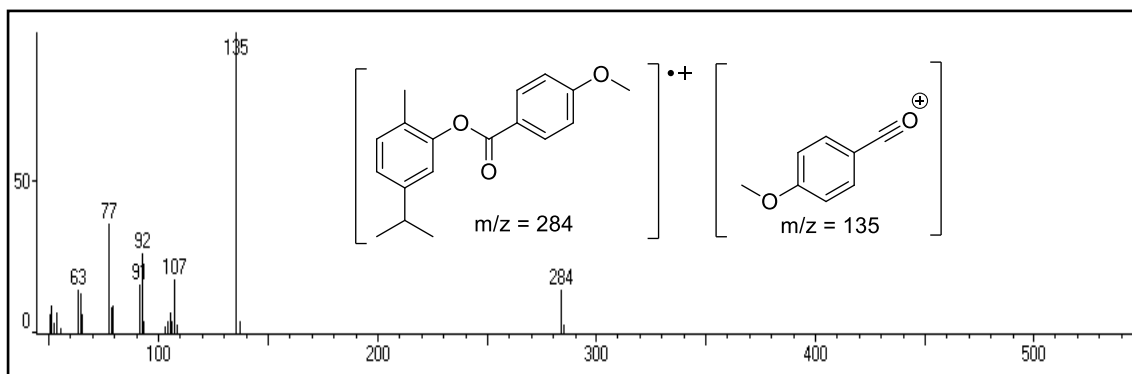


Figura A38. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **1h**.

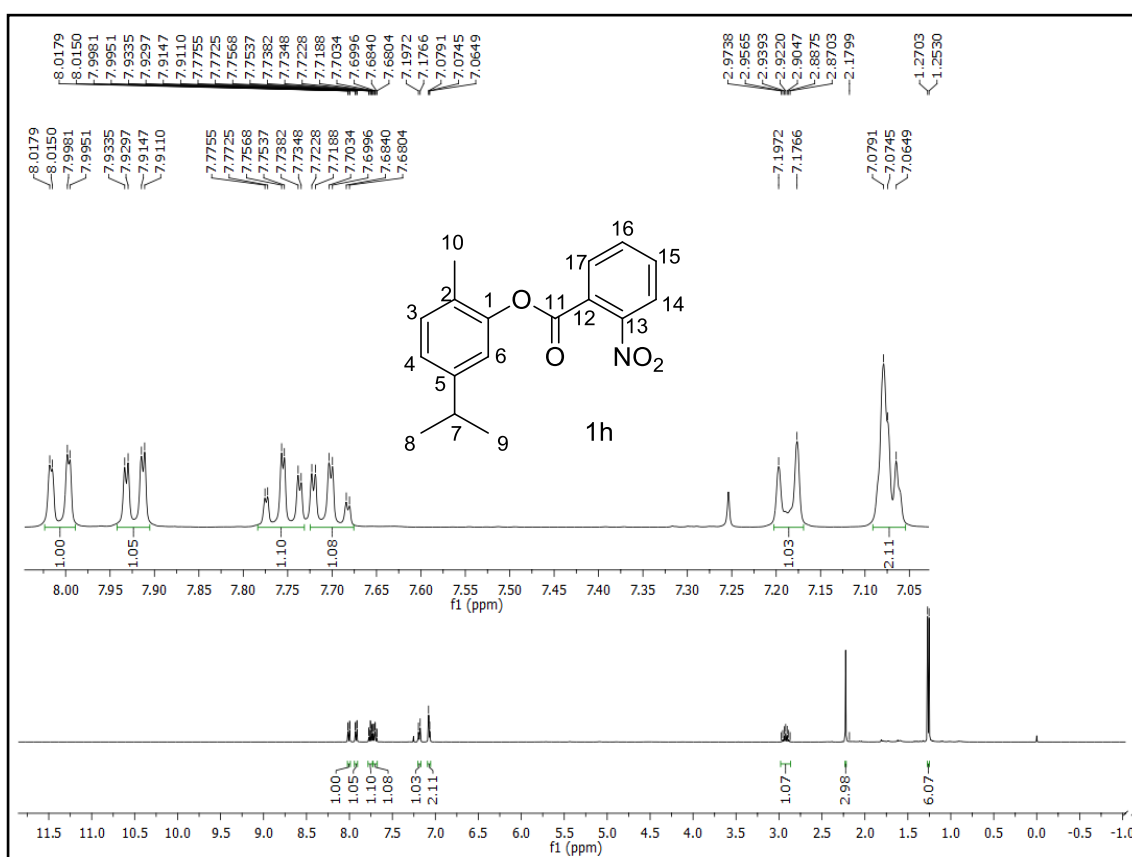


Figura A39. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância **1h**.

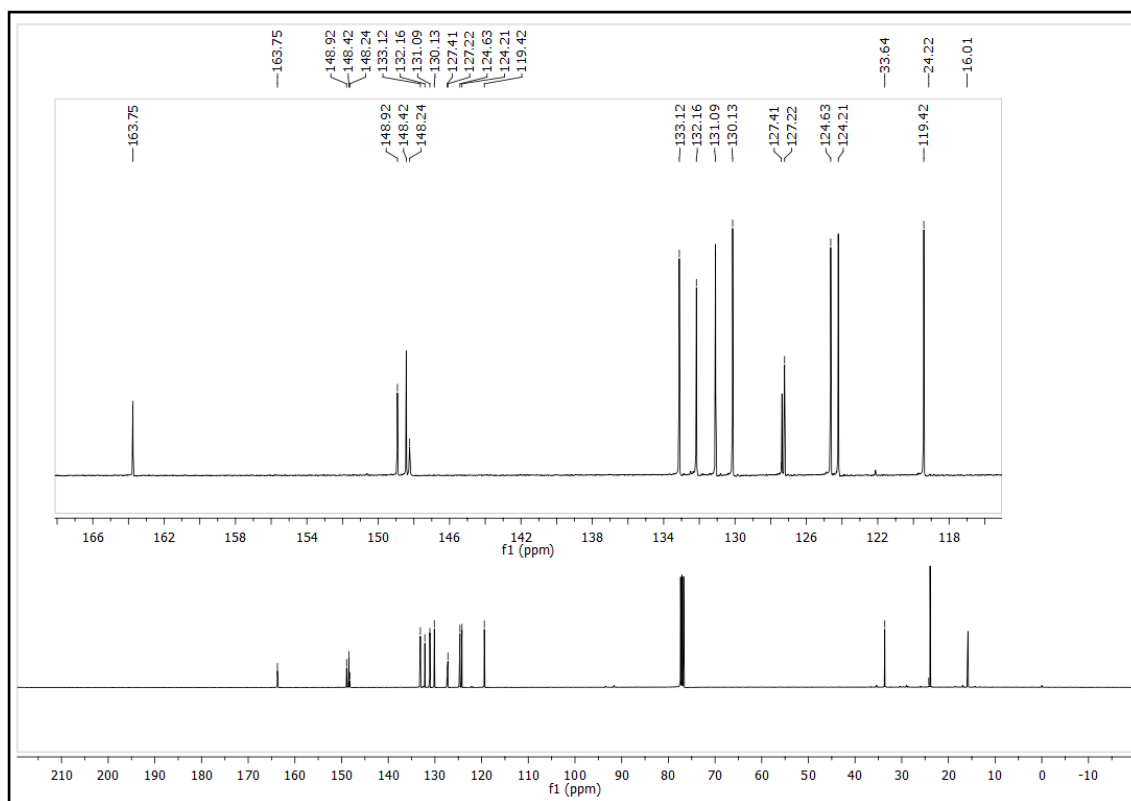


Figura A40. Espectro de DEPT-135 da substância **1h**.

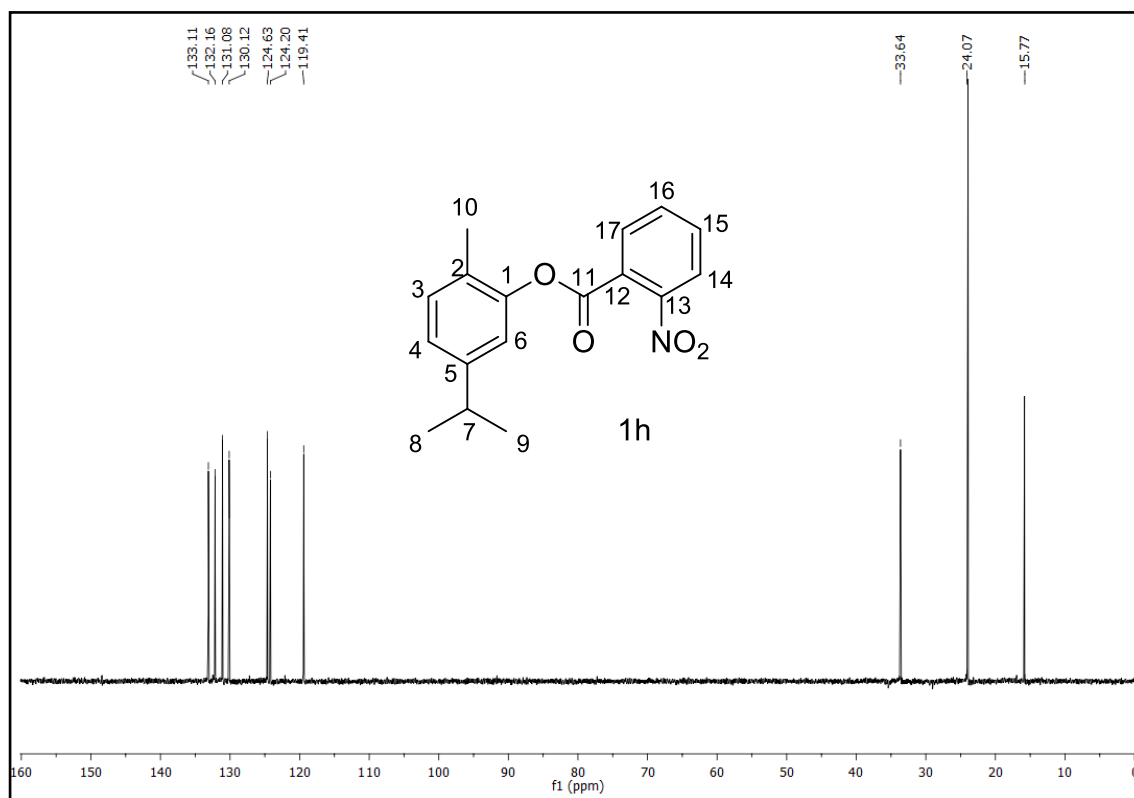


Figura A41. Espectro de DEPT-90 da substância 1h.

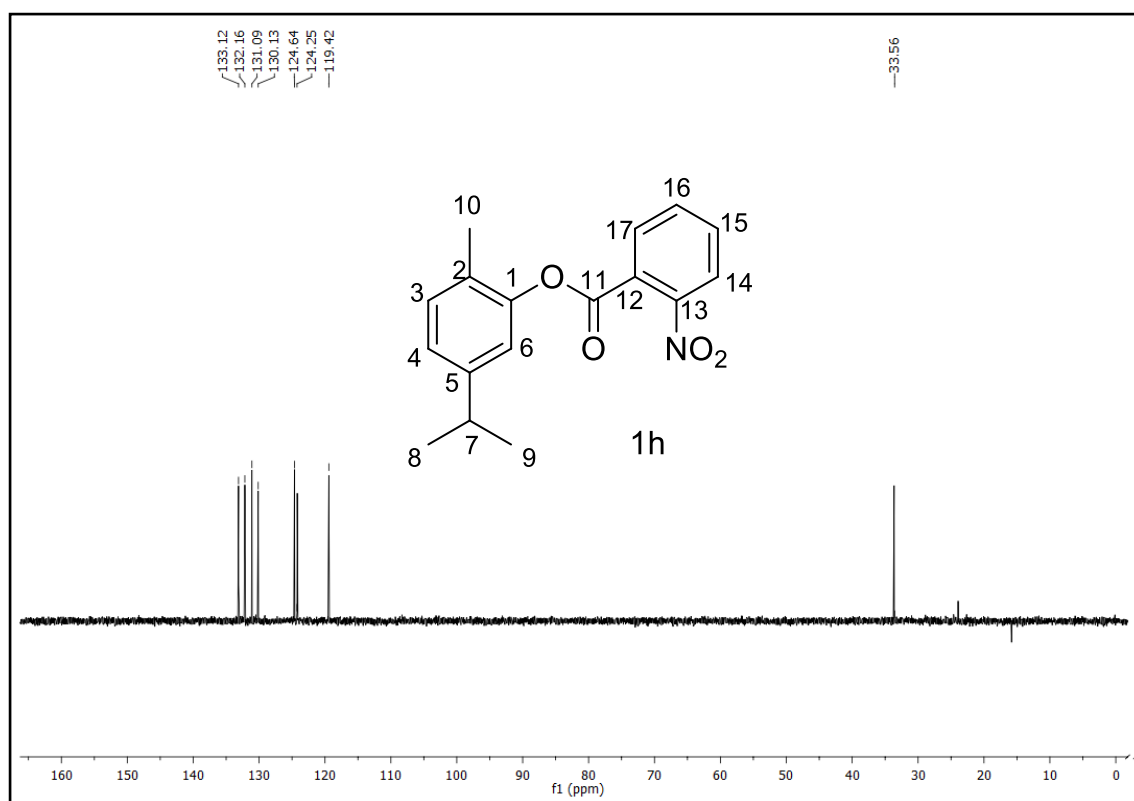


Figura A42. Espectro de HSQC da substância 1h.

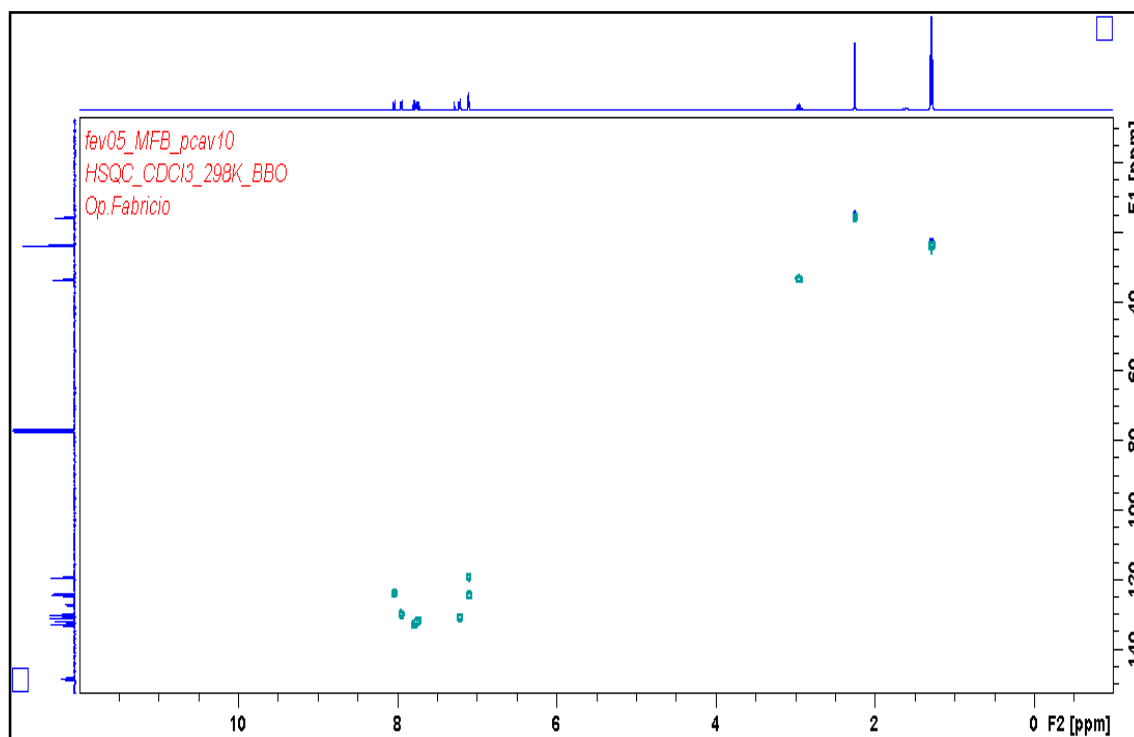


Figura A43. Espectro de massas da substância **1h** por espectrômetro de massas acoplado a cromatografia gasosa (CG-EM).

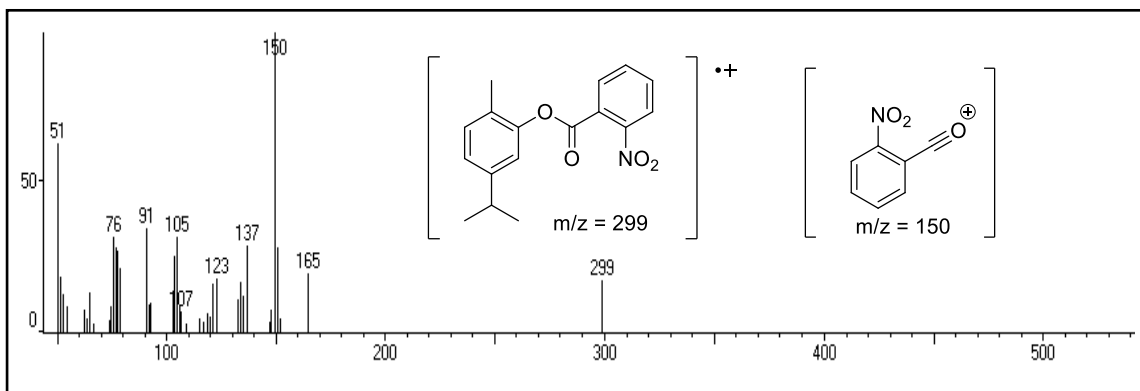


Figura A44. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **1i**.

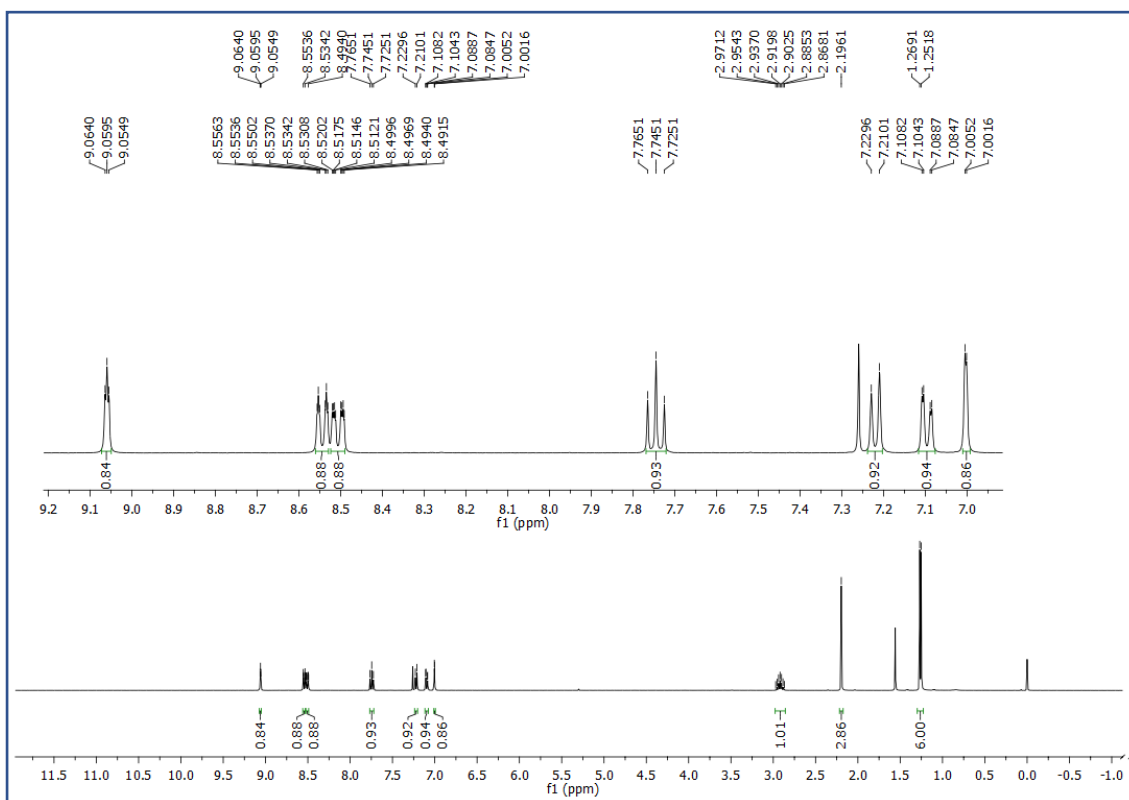


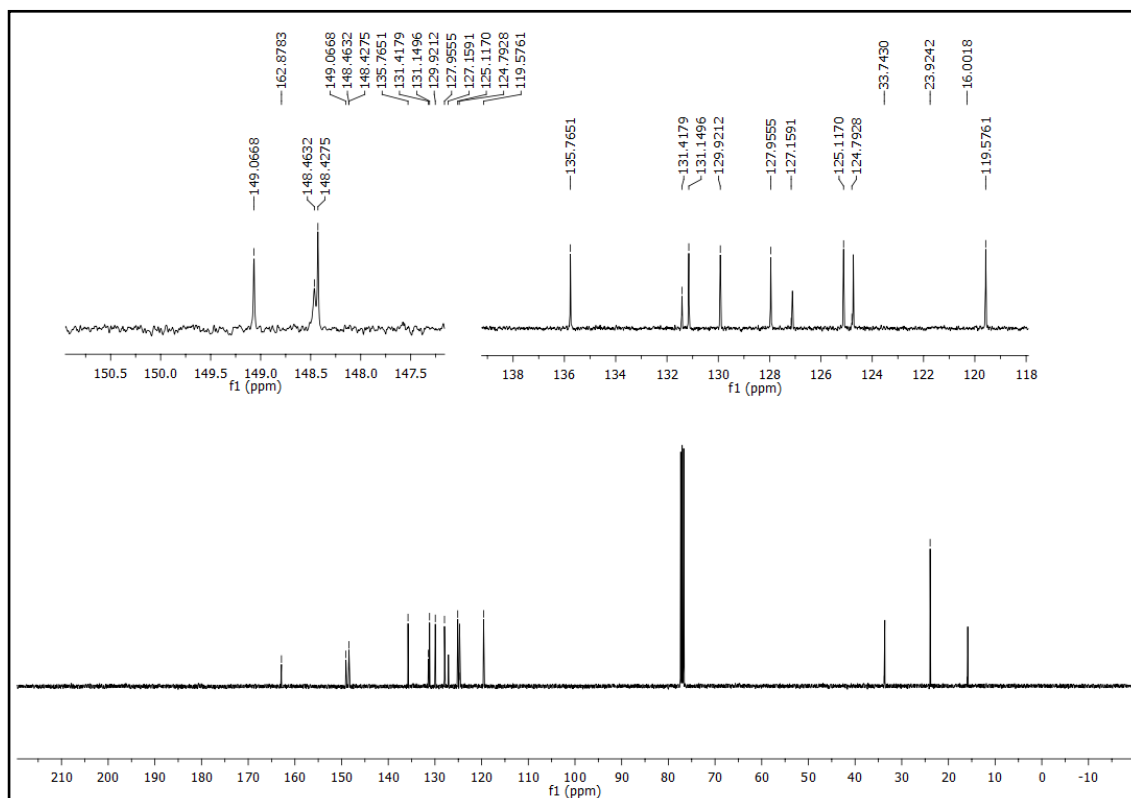
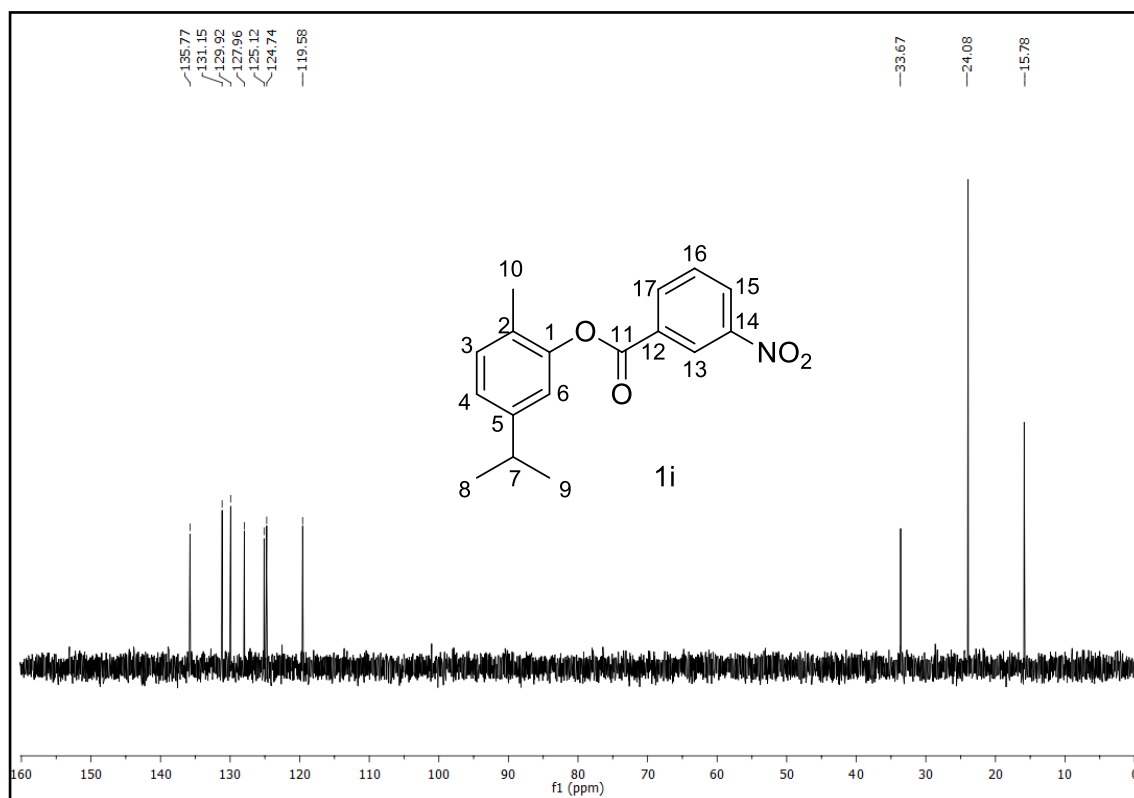
Figura A45. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância **1i**.Figura A46. Espectro de DEPT-135 da substância **1i**.

Figura A47. Espectro de DEPT-90 da substância 1i.

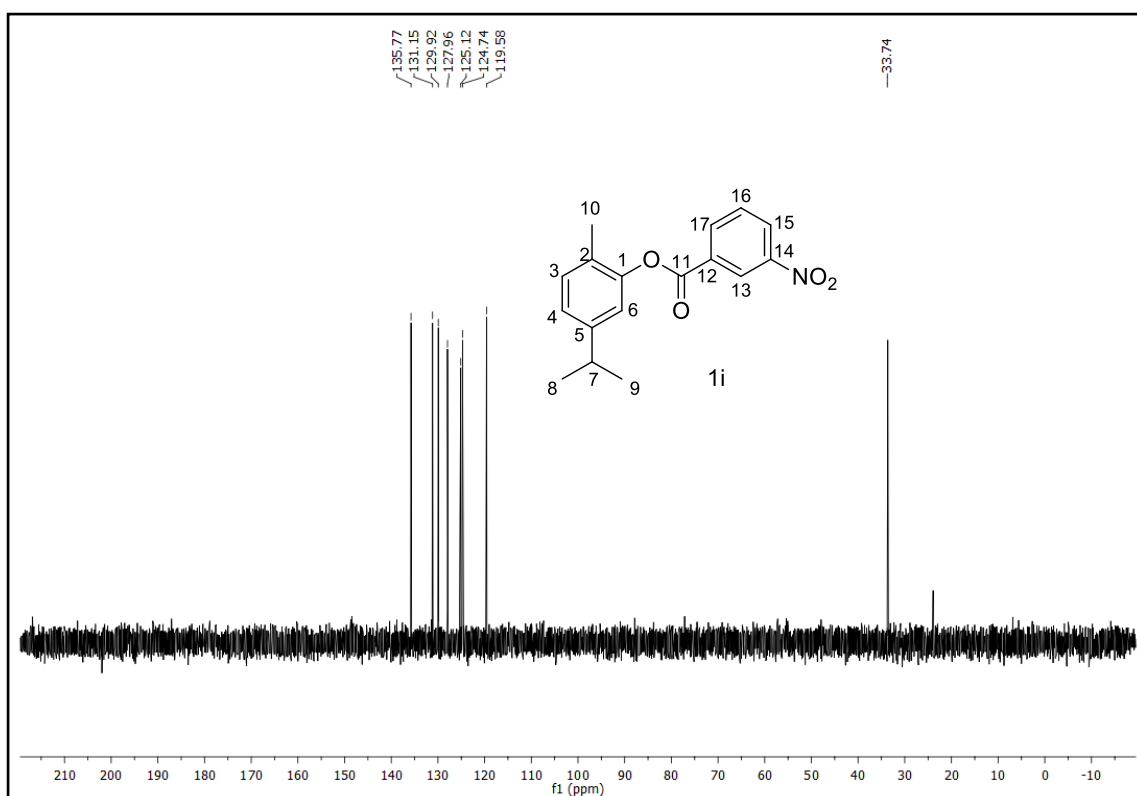


Figura 48. Espectro de HSQC da substância 1i.

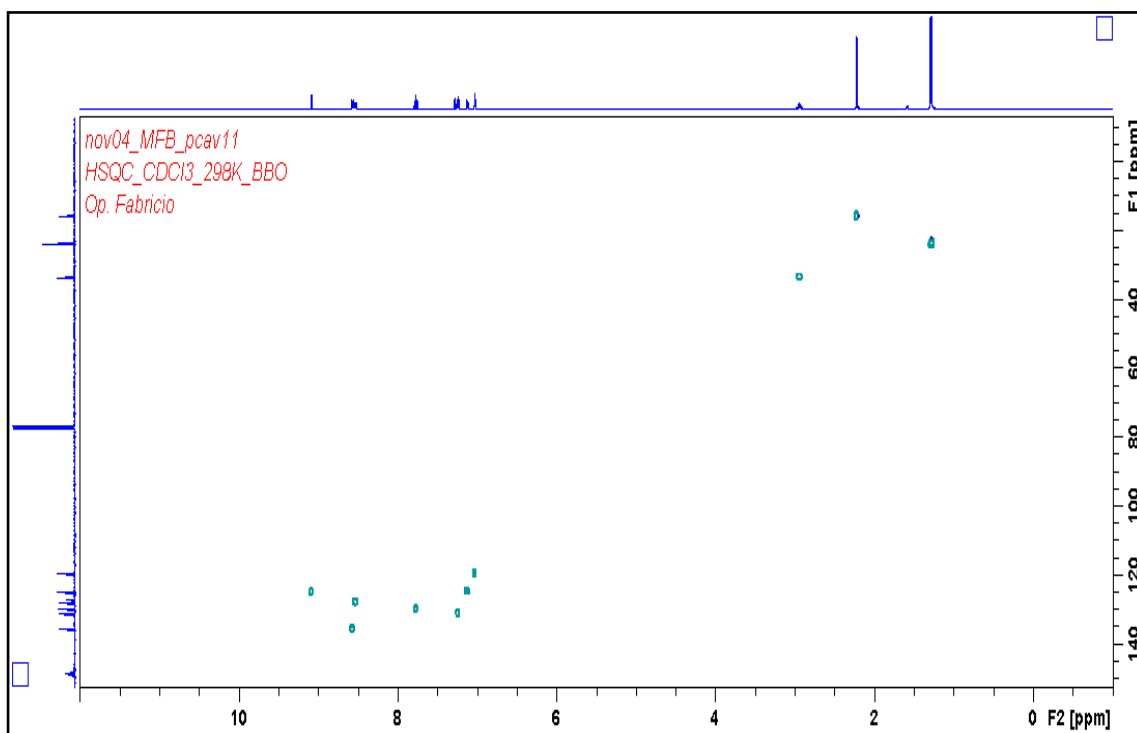


Figura A49. Espectro de massas da substância **1i** por espectrômetro de massas acoplado a cromatografia gasosa (CG-EM).

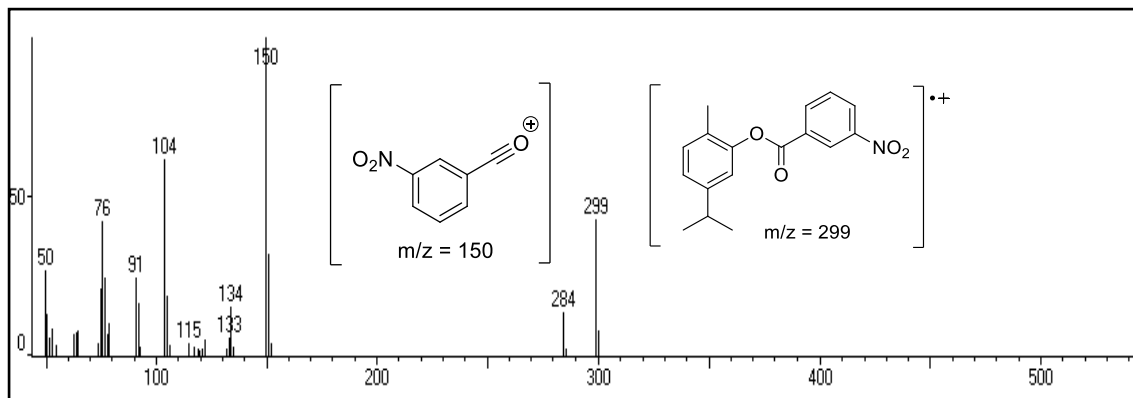


Figura A50. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **1j**.

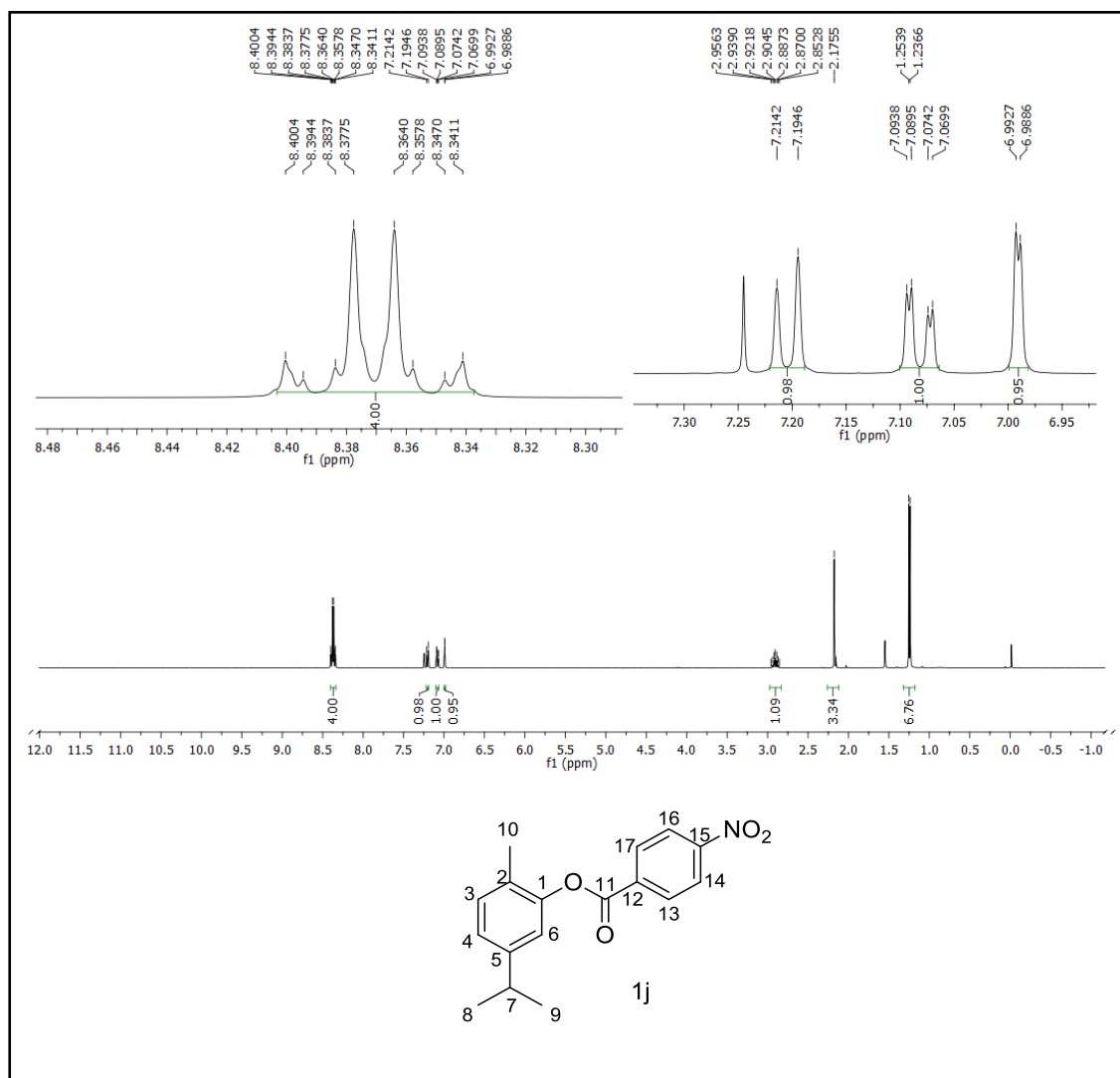


Figura A51. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância **1j**.

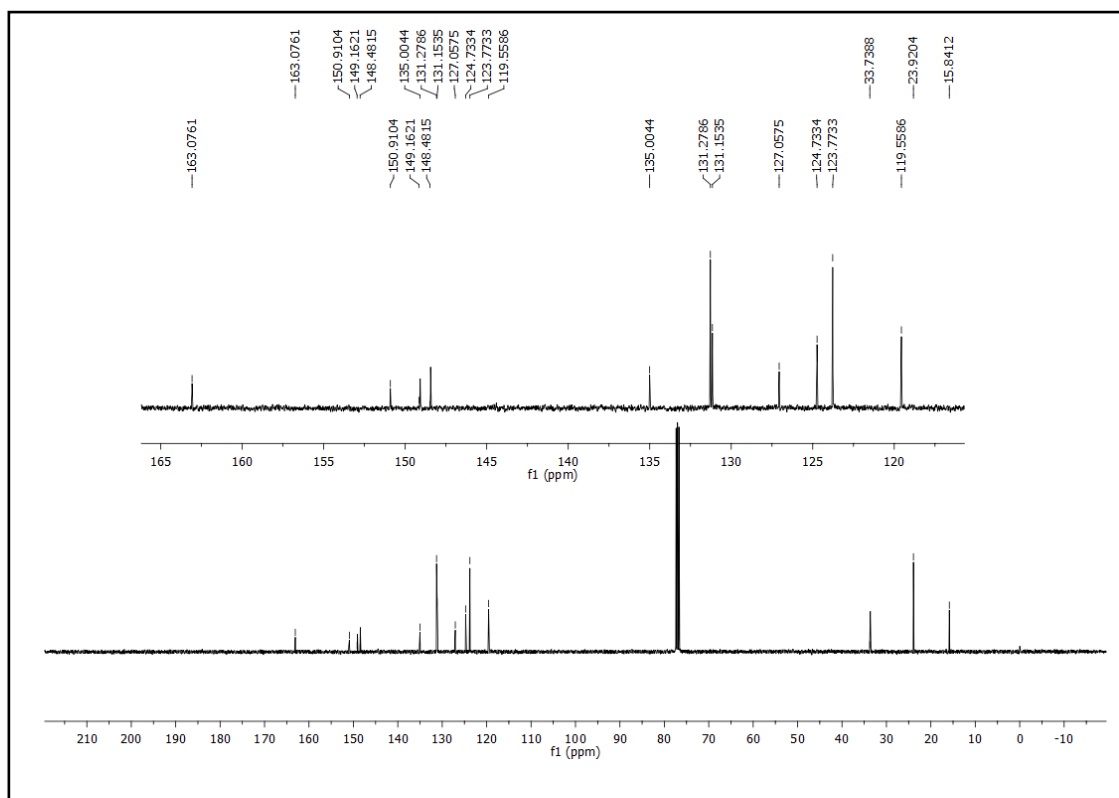


Figura A52. Espectro de DEPT-135 da substância **1j**.

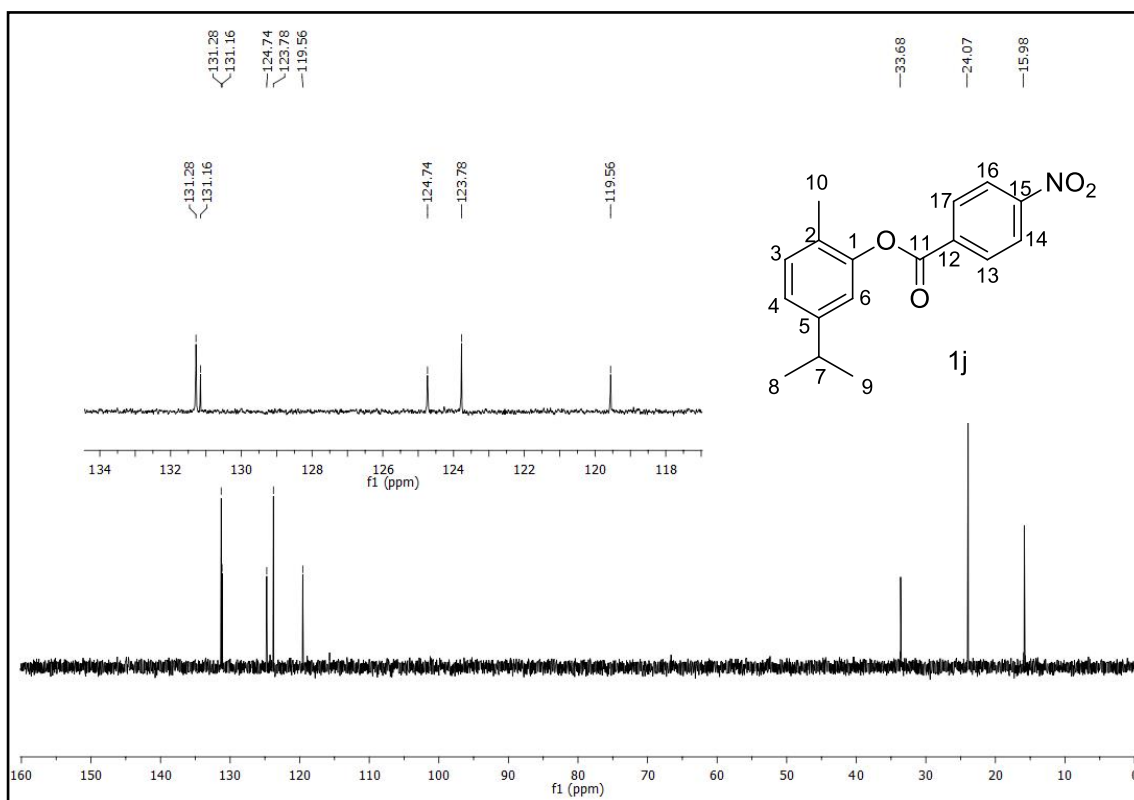


Figura A53. Espectro de DEPT-90 da substância 1j.

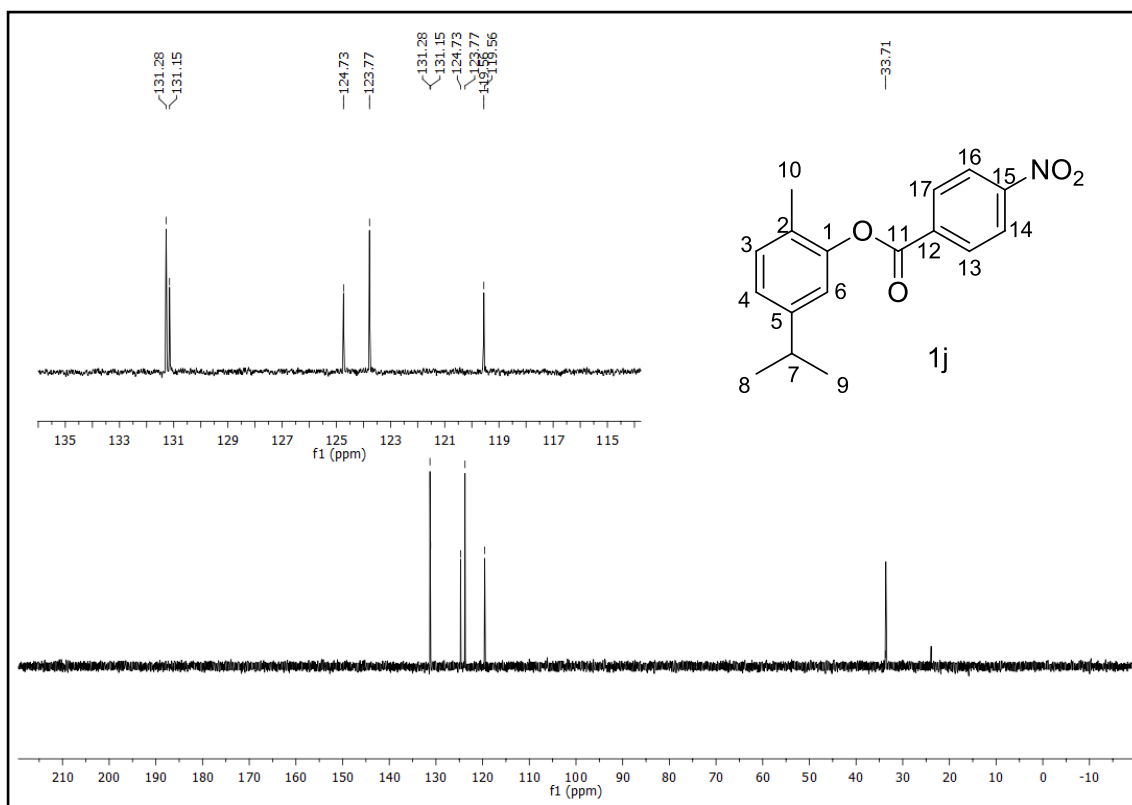


Figura A54. Espectro de HSQC da substância 1j.

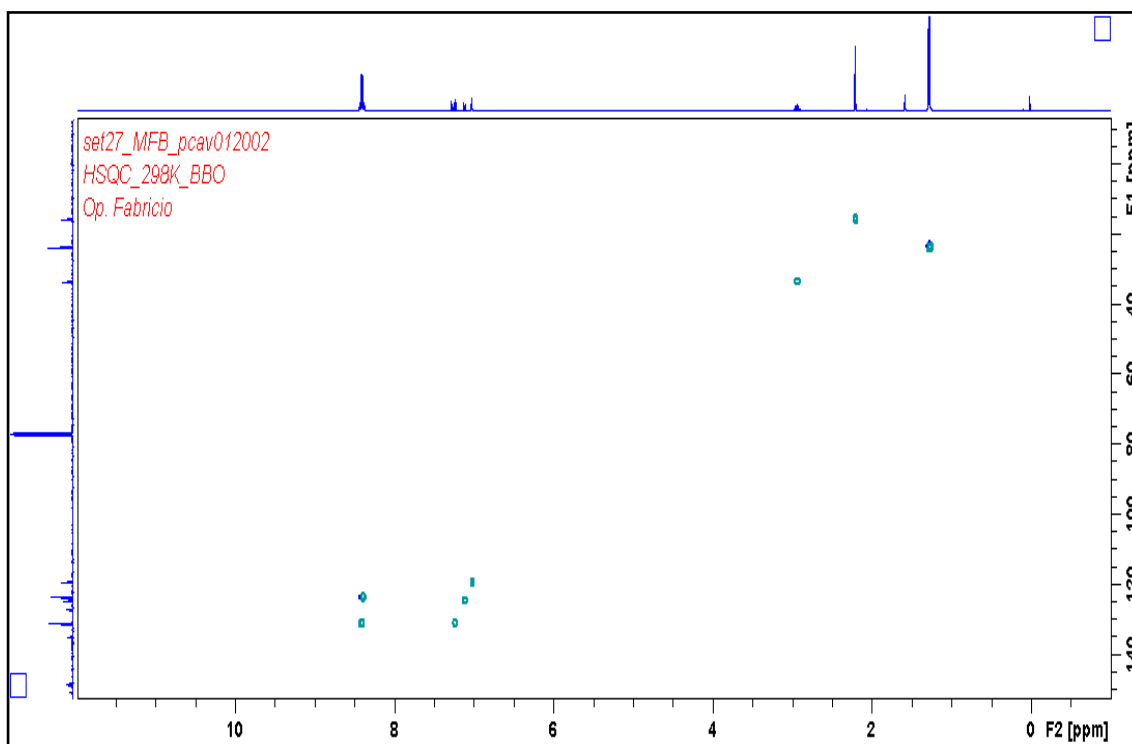


Figura A55. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **2**.

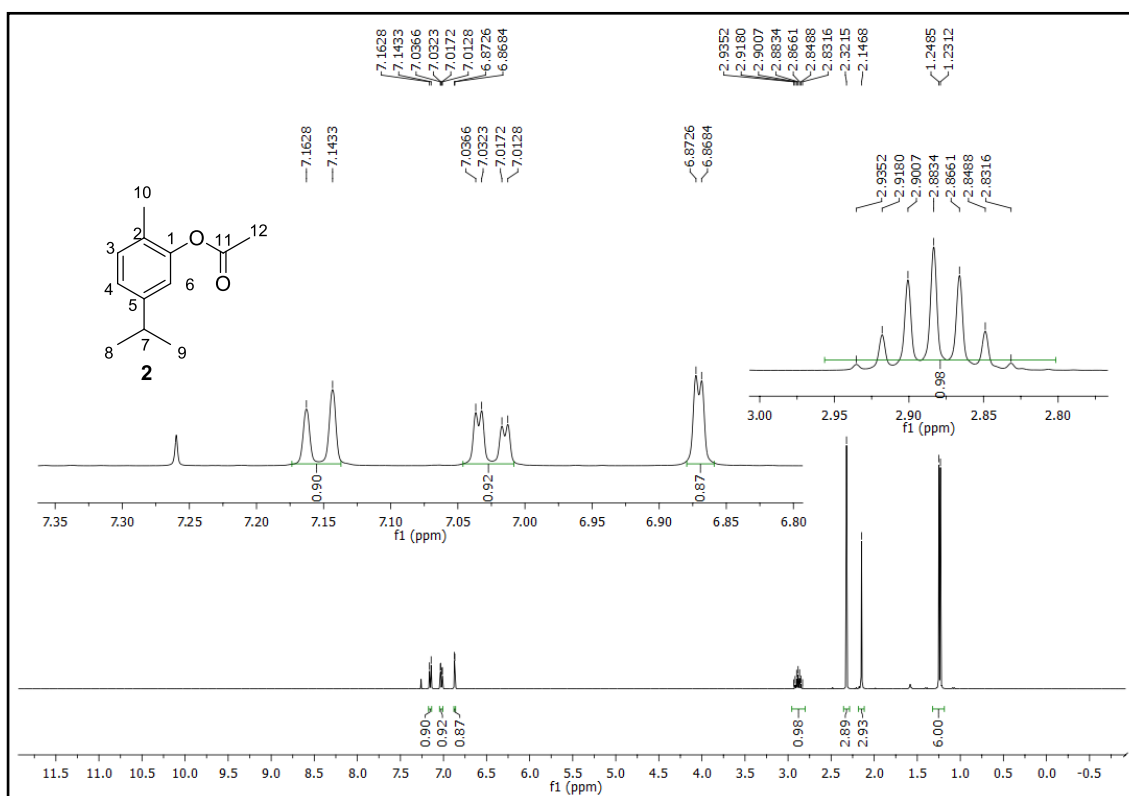


Figura A56. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância **2**.

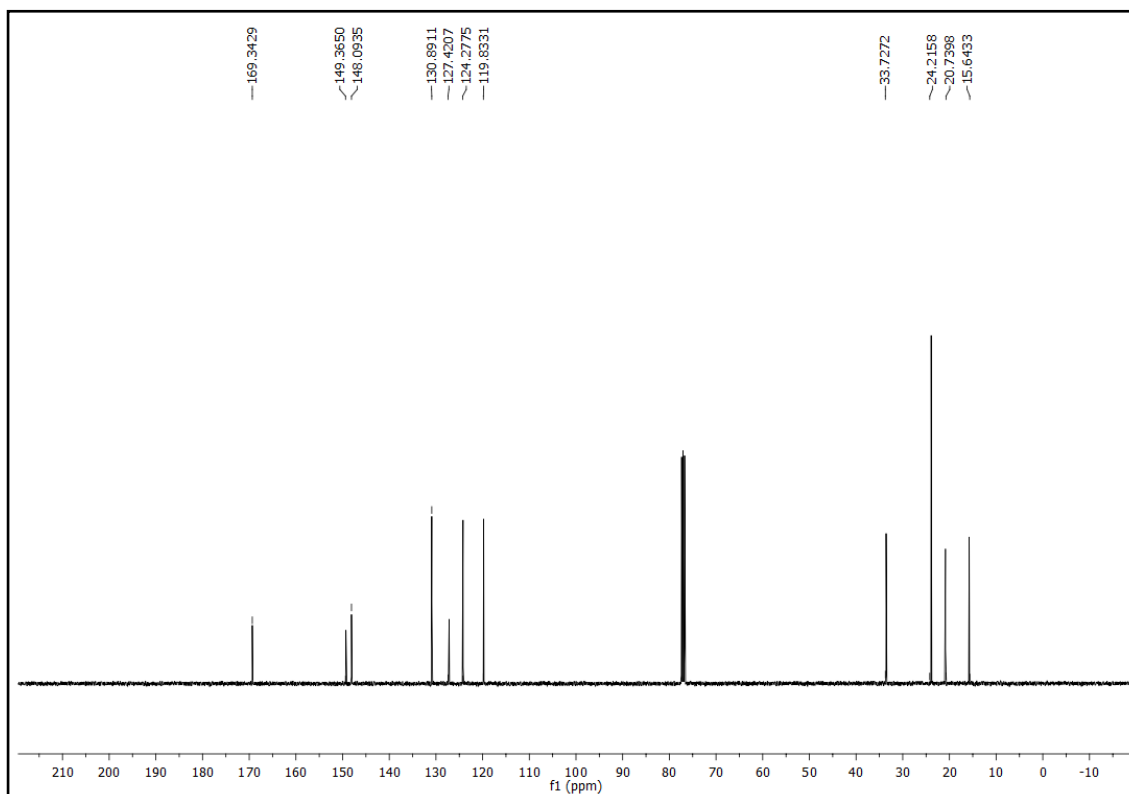


Figura A57. Espectro de DEPT-135 da substância 2.

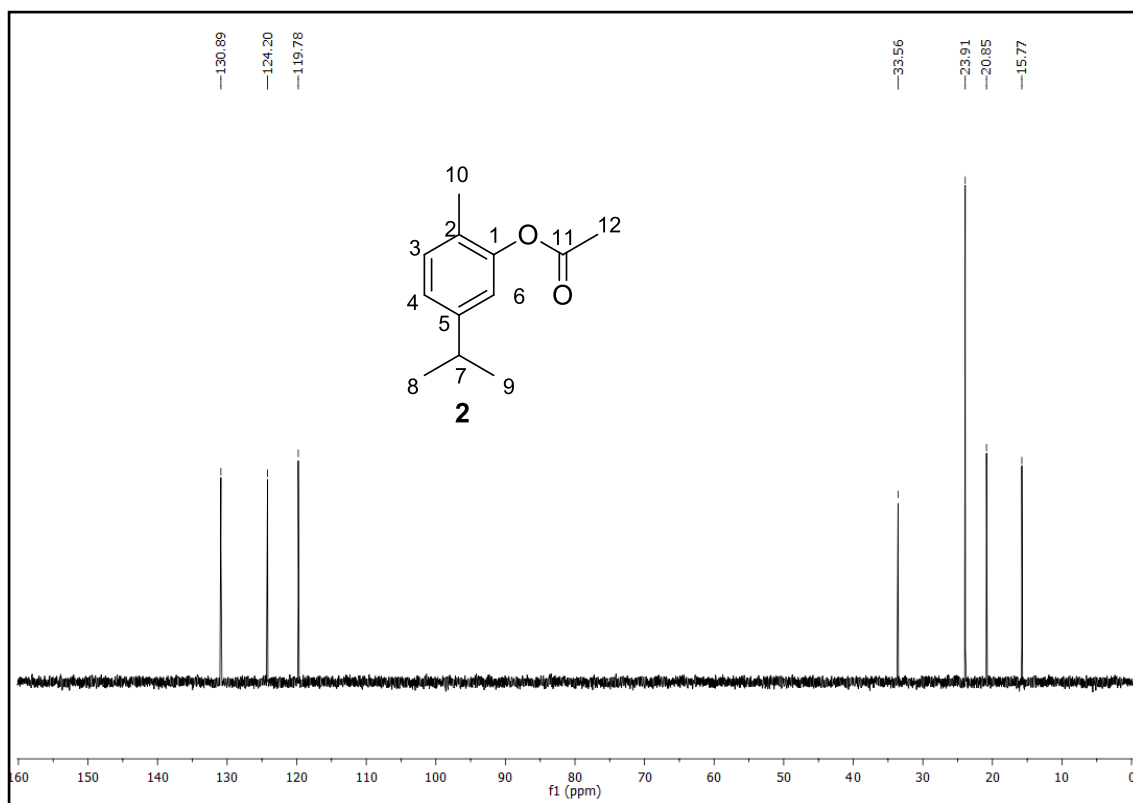


Figura A58. Espectro de massas da substância 2 por espectrômetro de massas acoplado a cromatografia gasosa (CG-EM).

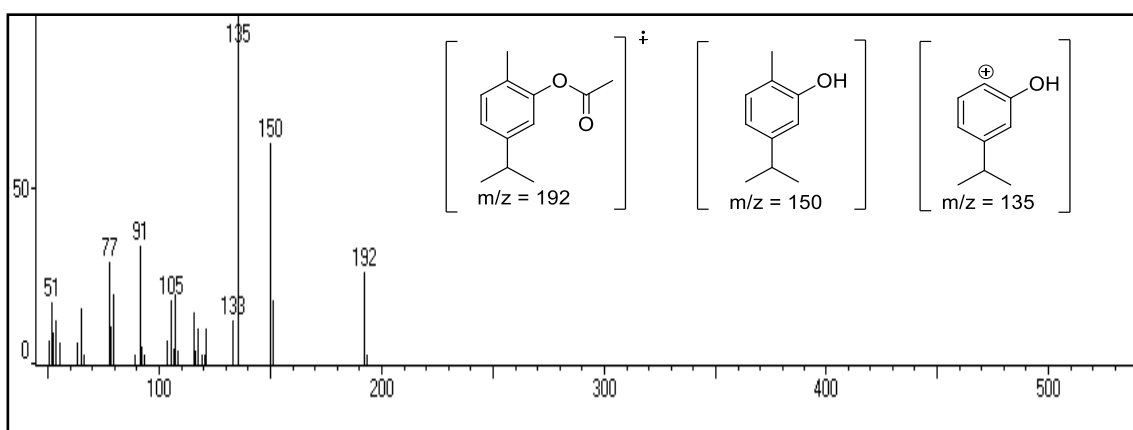


Figura A59. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **3**.

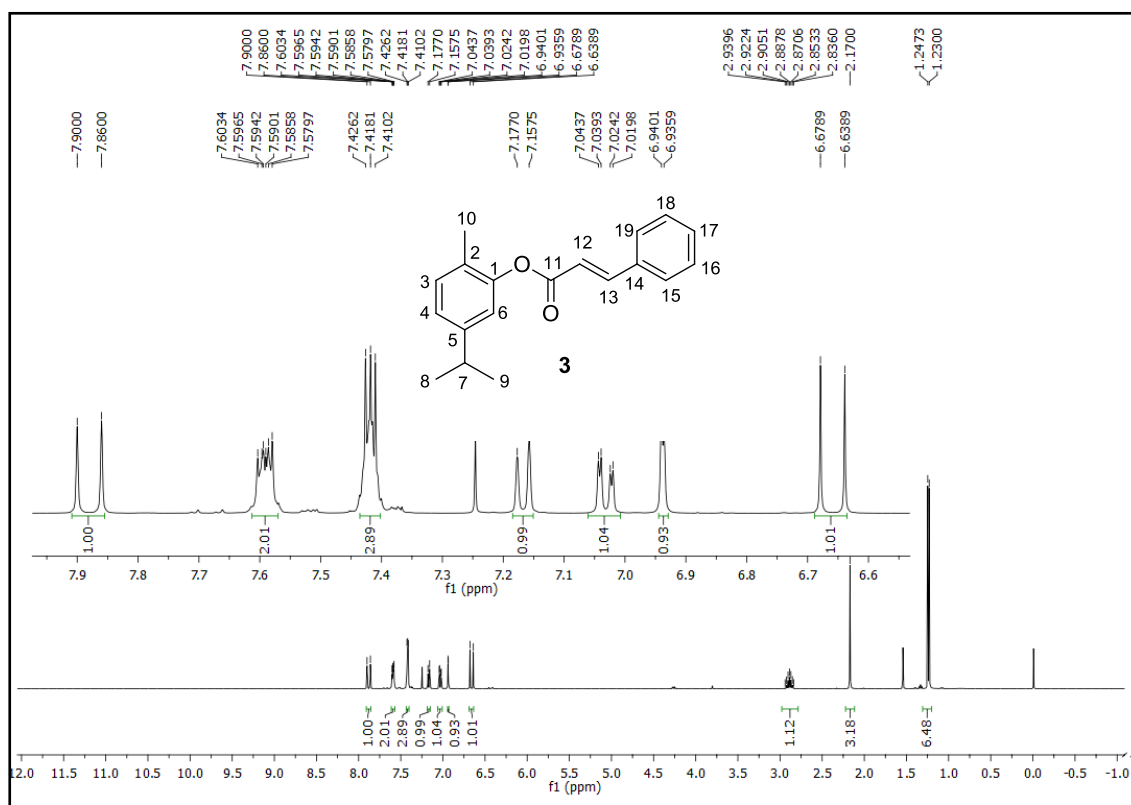


Figura A60. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância **3**.

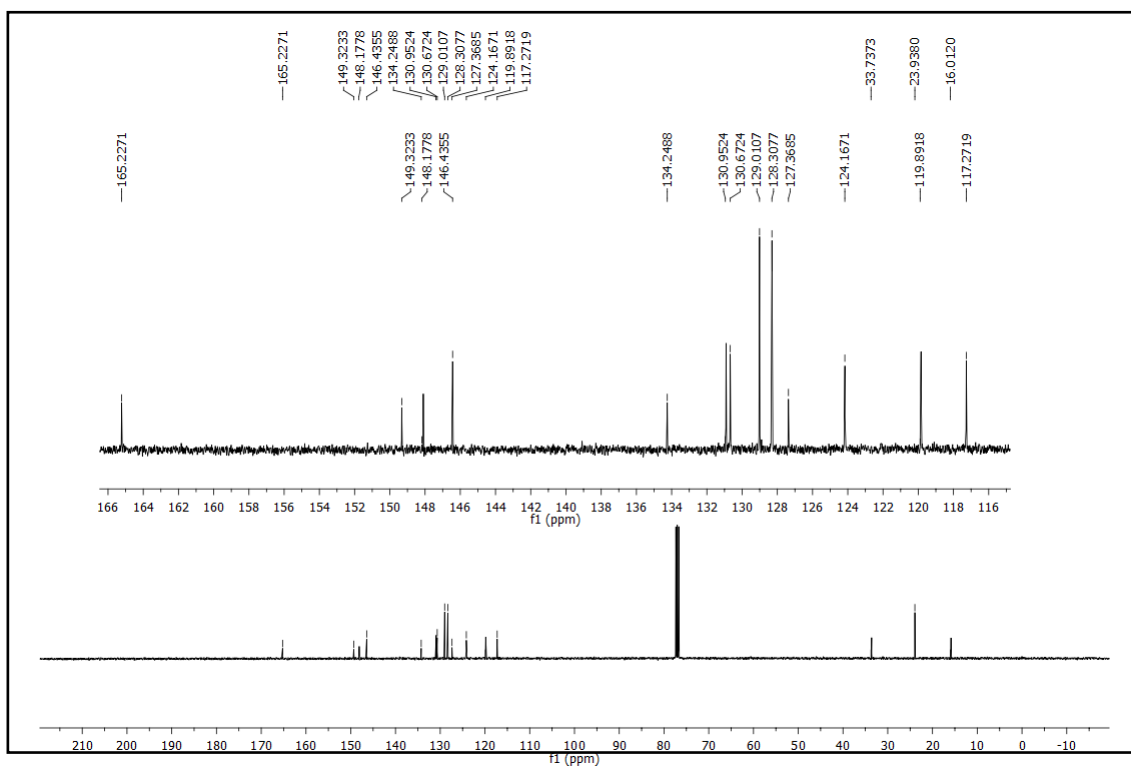


Figura A61. Espectro de DEPT-135 da substância 3.

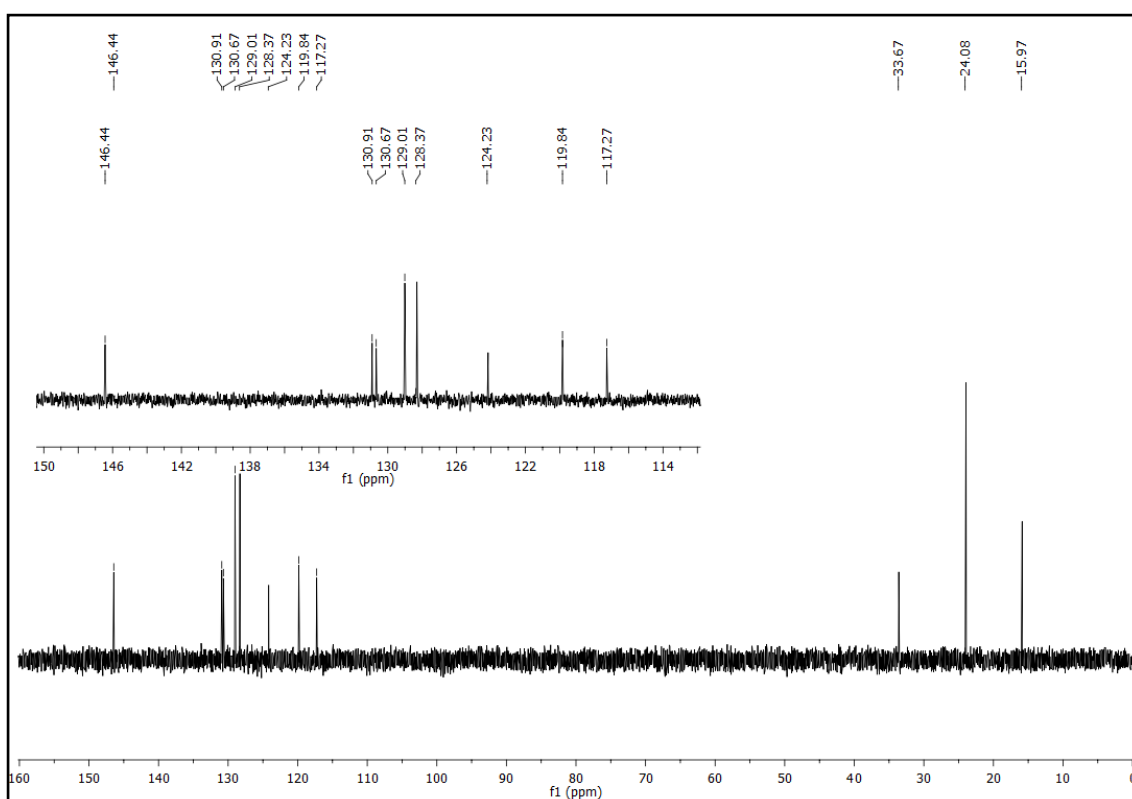


Figura A62. Espectro de DEPT-90 da substância 3.

