

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**OBTENÇÃO DE DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS TRITERPÊNICOS DO  
ÁCIDO URSÓLICO VISANDO ATIVIDADE BIOLÓGICA**

**LAURA CARDOZO VIEIRA**

Porto Alegre, 2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**OBTENÇÃO DE DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS TRITERPÊNICOS DO  
ÁCIDO URSÓLICO VISANDO ATIVIDADE BIOLÓGICA**

Dissertação apresentada por  
Laura Cardozo Vieira para  
obtenção do GRAU DE MESTRE  
em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Profa. Dr. Simone Cristina Baggio Gnoatto

Co-orientador: Profa Dr. Bibiana Verlindo de Araújo

Porto Alegre, 2013

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 26/02/2013, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Eduardo Miranda Ethur

Universidade Univates

Profa. Dr. Grace Gosmann

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Juliane Deise Fleck

Universidade Feevale

Vieira, Laura Cardozo  
Obtenção de Derivados Semissintéticos  
Triterpênicos do Ácido Ursólico Visando Atividade  
Biológica / Laura Cardozo Vieira. -- 2013.  
85 f.  
Orientadora: Simone Criastina Baggio Gnoatto.  
Coorientadora: Bibiana Verlindo Araújo.  
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2013.  
1. Ácido Ursólico. 2. Semissíntese. 3.  
Microbiologia. 4. Análise Morfológica de Moléculas.  
I. Gnoatto, Simone Criastina Baggio, orient. II.  
Araújo, Bibiana Verlindo, coorient. III. Título.

Agradecimentos ao CNPq/à CAPES/à FAPERGS/à ANVISA, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho, e ao Laboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica que disponibilizou Equipamentos e material necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente dissertação/tese



## AGRADECIMENTOS

A aos meus familiares pelo carinho e incentivo de todos os momentos decisivos na minha vida, se não fossem eles jamais teria chegado a lugar algum.

À minha “Vó Lela”, em especial, que me recebeu em Porto Alegre para estudar em meados de 1997 e me recebe até hoje com tanto amor e cuidado.

Aos meus pais Marília de Mendonça Cardozo e Eden Cogno Vieira por toda educação que me proporcionaram à custa de muito sacrifício e esforço bem como todo amor, incentivo e boas energias que me mandam a vida inteira.

Ao meu irmão Paulo, que tanto amo, por todos incentivos e, principalmente pela parceria e por acreditar em mim sempre, eu realmente, não tenho palavras para expressar o que sinto.

Às minhas colegas Bruna Bento Casanova, Denise Diedrich, Lucimara Nardi Comunello, Estér Lopes, Adrine Maria Innocente e Glória Narjara Silva dos Santos pelas demonstrações de coleguismo e amizade e por muito trabalho realizado, sábados, domingos e feriados para a conclusão desta dissertação. Não tem preço o que vocês fizeram por mim com vocês aprendi que não se constrói nada sozinho!

Às meninas do Laboratório 105 eu não tenho palavras para agradecer todo carinho e atenção que sempre me dispensaram, mas principalmente pela amizade que eu julgo tão sincera e espero que duradoura.

À Professora Grace Gosmann por me apresentar o mundo da pesquisa e principalmente por me dar oportunidade de estar num grupo tão valoroso e profissional.

À Professora Simone Cristina Baggio Gnoatto pela orientação e por toda dedicação, carinho e compreensão nesta etapa tão significativa da minha vida. Agradeço imensamente as oportunidades e o incentivo às minhas idéias.

À Professora Marisa da Costa que, onde, no seu grupo do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, no laboratório 165, pude compreender que não existem acasos na vida e sim pessoas que se aproximam por ter algo muito bom pra nos ensinar. MUITO OBRIGADO pela recepção e atenção sempre!

À Ana Paula Cappra Silva pelas contribuições e por toda atenção dispensada para que este trabalho pudesse ser complementado com sucesso.

Ao professor Alexandre Macedo e Karine Zimmer pelas contribuições que foram tão importantes para o fechamento deste estudo.

Ao INCT-if e à CAPES pela bolsa de estudos nestes dois anos de trabalho, a qual proporcionou a realização do mestrado com dedicação exclusiva.

E aos meus amigos de luz por toda orientação espiritual e cuidados.

Acima de tudo à vida, por me proporcionar momentos tão especiais vividos intensamente.



## RESUMO

As infecções por bactérias representam um grave problema hoje e para o futuro, devido ao fato de que estes microrganismos desenvolvem mecanismos de resistência aos antibióticos ao longo do tempo de uso. A formação de biofilmes também é um fator a ser discutido no cenário atual por estar associado a muitas infecções bacterianas humanas, principalmente àquelas envolvendo dispositivos médicos aumentando assim os riscos de infecções hospitalares. O ácido ursólico (AU) é um triterpeno conhecido por suas atividades biológicas relatadas. Apresenta moderada atividade antibacteriana, porém tem demonstrado importante citotoxicidade frente a algumas linhagens celulares. Em vista disso, neste trabalho se desenvolveu uma série de novas moléculas derivadas do AU com alterações nas posições C-3 e C-28. Quatro moléculas com substituição em C-3 (derivados **2**, **3**, **4** e **5**) e uma com substituição em C-3 e C-28 (derivado **6**) foram comparadas ao AU (**1**) quanto a atividade antibacteriana. As cepas utilizadas foram *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*. Os compostos **3** e **6** apresentaram melhor perfil inibitório de forma geral, onde **3** apresentou-se bactericida para *S. aureus* e *S. epidermidis* (Gram positivas) e para *P. mirabilis* (Gram negativa) apresentou-se bacteriostático.

**Palavras-chave:** Ácido Ursólico, semissíntese, infecções bacterianas, triterpenos, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. mirabilis*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*.



## ABSTRACT

The ursolic acid (UA) is a triterpene known for their biological activities reported. Thus, become useful techniques semi-synthesis starting from natural products extracted, for example residue industries in order to improve the pharmacological properties decreasing toxicity. The bacterial infections are a serious problem today and in the future due to the fact that these organisms develop resistance mechanisms to antibiotics over time of use. The formation of biofilms is also a factor to be discussed in the current scenario because of being responsible for a very high number of rejections and other prosthetic devices by increasing the risk of nosocomial infections. The AU has a moderate antibacterial activity reported in the literature, but showed significant cytotoxicity against some cell lines. In view of this it developed a series of new molecules derived from AU residues extracted from apples (*Mallus domestica*) from the juice industry by promoting the so-called green chemistry. The molecules undergo changes in C-3 and C-28. Four molecules with substitution at C-3 (derived from **2**, **3**, **4** and **5**) and one with substitution at C-3 and C-28 (derived **6**) were compared with au (**1**). The strains used in the tests of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration were *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. Compounds **3** and **6** had better inhibitory profile in general, where three presented bactericidal to *S. aureus* and *S. epidermidis* (Gram positive) and *P. mirabilis* (Gram negative) appeared bacteriostatic.

**Keywords:** Ursolic acid, semi-synthesis, bacterial infections, triterpenes, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. mirabilis*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*.



## LISTA DE FIGURAS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>FIGURA 1.</b> ESTRUTURA DO ÁCIDO URSÓLICO (AU), ÁCIDO OLEANÓLICO (AO) E ÁCIDO BETULÍNICO (AB).....   | <b>12</b> |
| <b>FIGURA 2.</b> ESTRUTURAS (1) $R^1=H, R^2=H, R^3=COOH$ ; (2) $R^1=H, R^2=H, R^3=CH_3$ .....   | <b>16</b> |
| <b>FIGURA 3.</b> ESTRUTURA DO 22B-HIDROXILUPEOL.....  | <b>17</b> |
| <b>FIGURA 4.</b> ÁCIDO BETULÍNICO ( $R=OH$ ) À ESQUERDA E SEUS DERIVADOS MODIFICADOS EM C-28 INDICANDO OS RADICAIS INSERIDOS E NUMERADOS DE 8-14.....   | <b>18</b> |
| <b>FIGURA 5.</b> ESTRUTURAS (15) $R^1=H, R^2=BR, R^3=H$ ; (16) $R^1=R^2=BR, R^3=H$ ; (17) $R^1=H, R^2=BR, R^3=COOME$ ; (18) $R^1=R^2=BR, R^3=COOME$ ; (22) $R^1=H, R^2=H, R^3=H$ ; (23) $R^1=H, R^2=H, R^3=COOME$ .....   | <b>19</b> |
| <b>FIGURA 6.</b> ESTRUTURAS (19) $R^1=BR, R^2=H$ ; (20) $R^1=H, R^2=BR$ ; (21) $R^1=H, R^2=H$ .....   | <b>19</b> |
| <b>FIGURA 7.</b> DERIVADOS (24) E (25).....   | <b>20</b> |
| <b>FIGURA 8.</b> OS DERIVADOS DO AU COM AS SEGUINTE SUBSTITUIÇÕES NO DERIVADO (26) $R^1=COCH_3, R^2=H$ E NO DERIVADO(27) $R^1=H, R^2=CH_3$ .....  | <b>21</b> |
| <b>FIGURA 9.</b> FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DO AU.....  | <b>25</b> |
| <b>FIGURA 10.</b> ESTRUTURA DOS DERIVADOS ACILADOS DO AU OBTIDOS NESTE ESTUDO ATRAVÉS DE REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO.....  | <b>26</b> |
| <b>FIGURA 11.</b> ESTRUTURA QUÍMICA DO DERIVADO 6.....  | <b>28</b> |
| <b>FIGURA 12.</b> ESQUEMA DE OBTENÇÃO DOS DERIVADOS ACILADOS (2, 3, 4 E 5) ONDE A: T.A., PIRIDINA, ANDRIDO ACÉTICO, 24 H; B: T.A., PIRIDINA, ANDRIDO SUCCÍNICO, 24H; C: T.A., PIRIDINA, ANDRIDO ISOBUTÍRICO, 24 H E D: T.A., PIRIDINA, ANDRIDO DICLOROACÉTICO, 24H..... | <b>37</b> |
| <b>FIGURA 13.</b> FIGURA ILUSTRATIVA DAS CCDs REALIZADAS PARA MONITORAMENTO DAS REAÇÕES DE OBTENÇÃO DOS DERIVADOS 3, 4 E 5.....   | <b>38</b> |
| <b>FIGURA 14.</b> SOBREPOSIÇÃO DOS ESPECTROS DE IV, ONDE LINHA PRETA É REFERENTE AO DERIVADO 2, LINHA AZUL DERIVADO 3, LINHA VERMELHA, DERIVADO 4 E LINHA VERDE, DERIVADO 5.....  | <b>39</b> |
| <b>FIGURA 15.</b> ESQUEMA DA REAÇÃO DE OBTENÇÃO DA PIPERAZINA PROTEGIDA.....  | <b>44</b> |
| <b>FIGURA 16.</b> EXTRAÇÃO DO BAPP-BOC.....   | <b>44</b> |
| <b>FIGURA 17.</b> ESPECTROS DE IV DA REAÇÃO DO ACOPLAMENTO .....  | <b>45</b> |
| <b>FIGURA 18.</b> TERMOGRAMAS DA ANÁLISE DOS DERIVADOS 2 (A), 3 (B), 4(C) E 5 (D).....  | <b>47</b> |
| <b>FIGURA 19.</b> TERMOGRAMAS DA ANÁLISE DE RECRISTALIZAÇÃO DO DERIVADO 2 (A.1) E DO DERIVADO 5(D.1).....   | <b>49</b> |
| <b>FIGURA 20.</b> FOTOMICROSCOPIAS APRESENTADAS PARA AS AMOSTRAS 2(A), 3 (B), 4 (C) E 5 (D) DO CAMPO DE ANÁLISE (I) E DE UMA DETERMINADA PARTÍCULA (II).....  | <b>51</b> |
| <b>FIGURA 21.</b> AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME E CRESCIMENTO DE <i>S. EPIDERMIDIS</i> ATCC 35984.....  | <b>55</b> |
| <b>FIGURA 22.</b> IMAGENS DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE <i>S. EPIDERMIDIS</i> ATCC 35984 POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA FRENTE AO TRATAMENTO COM O DERIVADO 3, ONDE (A)=SEM TRATAMENTO, (B)= 50 MG/ML, (C)= 100 MG/ML, (D)= 200 MG/ML E (E)= 400 MG/ML.....       | <b>57</b> |



## LISTA DE TABELAS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>TABELA 1.</b> VALORES DE CIM DOS ÁCIDOS URSÓLICO (AU), OLEANÓLICO (AO) E BETULÍNICO (AB) FRENTE A CEPAS DE <i>E. COLI</i> , <i>S. AUREUS</i> , <i>E. FAECALIS</i> E <i>P. AERUGINOSA</i> .....  | <b>13</b> |
| <b>TABELA 2.</b> VALORES DE VIABILIDADE CELULAR (IC50) DOS ÁCIDOS URSÓLICO (AU), OLEANÓLICO(AO) E BETULÍNICO (AB).....   | <b>14</b> |
| <b>TABELA 3.</b> VALORES DE CITOTOXICIDADE (CC <sub>50</sub> ) DOS ÁCIDOS URSÓLICO (AU), OLEANÓLICO (AO) E BETULÍNICO (AB) FRENTE ÀS LINHAGENS CELULARES HaCAT E MRC-5. OS COMPOSTOS FORAM TESTADOS NAS CONCENTRAÇÕES DE 256 µG/ML POR 24, 48 E 168 H..... | <b>15</b> |
| <b>TABELA 4.</b> VALORES DO HALO DE INIBIÇÃO DOS DERIVADOS DE ÁCIDO BETULÍNICO <b>9 A 14</b> ) .....   | <b>18</b> |
| <b>TABELA 5.</b> ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS DERIVADOS 15 A 25 .....  | <b>20</b> |
| <b>TABELA 6.</b> VALORES DE CIM DO EXTRATO DICLOROMETANO E COMPOSTOS AU, AO, AU+AO (MISTURA DE AO E AU), 25, 26 .....  | <b>22</b> |
| <b>TABELA 7.</b> DADOS DE TEMPERATURA (T <sub>ONSET</sub> (°C)) E VARIAÇÃO DE ENTALPIA (ΔH(J/G)) DAS AMOSTRAS <b>2, 3, 4 E 5</b> RESULTANTES DA ANÁLISE TÉRMICA POR DSC.....   | <b>48</b> |
| <b>TABELA 8.</b> TABELA DE RESULTADOS DOS ENSAIOS DE CIM E CBM .....   | <b>53</b> |





## Sumário

|   |    |
|---|----|
| • I. INTRODUÇÃO .....   | 19 |
| • II. OBJETIVOS.....  | 5  |
| • III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....   | 7  |
| III.1. BACTÉRIAS.....   | 8  |
| III.2. TRITERPENOS .....  | 11 |
| III.2.1. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÁCIDO URSÓLICO, DO ÁCIDO OLEANÓLICO E DO ÁCIDO BETULÍNICO.....                           | 12 |
| III.2.2. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE TRITERPENOS ISOLADOS E SEUS DERIVAOS.....  | 15 |
| • IV. MATERIAIS E MÉTODOS.....  | 23 |
| IV.1. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS.....  | 24 |
| IV.2. MATERIAL VEGETAL .....  | 24 |
| IV.2.1. OBTENÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA .....   | 24 |
| IV.3. MATERIAL QUÍMICO .....  | 26 |
| IV.3.1. OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS ACILADOS EM C-3 .....  | 26 |
| IV.3.2. OBTENÇÃO DO DERIVADO N-{3-[4-(3-AMINOPROPIL)PIPERAZINIL]PROPIL}-3-O-ACETILURSOLAMIDA (6) (GNOATTO ET AL., 2008) ..... | 27 |
| IV.4. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA .....   | 28 |
| IV.5. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL .....   | 28 |
| IV.6. CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA POR CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA (DSC) .....  | 29 |
| IV.7. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....  | 29 |
| IV.8. MATERIAL BIOLÓGICO .....  | 29 |
| IV.8.1. MICRORGANISMOS .....  | 29 |
| IV.8.2. MANUTENÇÃO DAS BACTÉRIAS.....   | 30 |
| IV.8.3. MEIOS DE CULTIVO.....   | 30 |
| IV.9. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA .....  | 31 |
| IV.9.1. PREPARO DOS INÓCULOS .....  | 31 |
| IV.9.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA .....  | 31 |
| IV.10. DETERMINAÇÃO DA CBM .....  | 32 |
| IV.11. ATIVIDADE ANTIBIOFILME.....  | 32 |
| IV.11.1. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA .....  | 33 |
| • V. DISCUSSÃO E RESULTADOS.....  | 35 |
| V.1. OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS .....   | 36 |

|   |    |
|---|----|
| V.2.CARACTERIZAÇÃO POR CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA..... | 46 |
| V.4.CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) .....                    | 52 |
| V.5.RELAÇÃO ESTRUTURA/ATIVIDADE .....                             | 59 |
| • VI. CONCLUSÃO .....   | 63 |
| • VII. PERSPECTIVAS.....  | 65 |
| • VIII. REFERÊNCIAS .....   | 67 |

## I. INTRODUÇÃO

---

As infecções bacterianas em humanos e em animais vêm aumentando alarmantemente nas últimas décadas. A resistência destes patógenos aos fármacos disponíveis atualmente tem gerado um cenário mundial ainda mais preocupante fazendo com que a busca por novas estratégias terapêuticas torne-se cada vez mais importante.<sup>[2]</sup>

A resistência aos fármacos antibacterianos é uma consequência natural da habilidade da população bacteriana de se adaptar. O uso indiscriminado de compostos conhecidos como ativos aumenta a pressão seletiva, bem como oportuniza o contato das bactérias com tais medicamentos, facilitando assim a aquisição de mecanismos de resistência.<sup>[4]</sup>

Na Europa e na América do Norte, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Staphylococcus pneumoniae* não susceptível à penicilina (PNSSP), *Enterococos* resistente à vancomicina (VRE) e *Enterobacteriaceae* produtoras de beta-lactamase de espectro ampliado (ESBL) têm emergido e se espalhado nos hospitais e nas comunidades.<sup>[5]</sup>

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em 23 de julho de 2009, divulgou um boletim informando dados de resistência bacteriana em 80 hospitais brasileiros onde, das 5406 notificações que ocorreram no período de julho de 2006 a junho de 2008, 47% foram infecções de corrente sanguínea em pacientes de unidade de tratamento intensivo (UTI) pelo gênero *Staphylococcus*. Dos 2406 microrganismos testados frente ao antibiótico oxacilina, apenas 20% dos *Staphylococcus* coagulase-negativa e 39% dos *S. aureus*, apresentaram sensibilidade. Estes dados demonstram a importância do gênero *Staphylococcus* entre as infecções resistentes e multi-resistentes aos antimicrobianos disponíveis.<sup>[6]</sup>

Nosso grupo de pesquisa vem trabalhando desde o ano de 2002 com triterpenos semissintéticos visando à obtenção de novos compostos líderes para diversas atividades farmacológicas, especialmente antiprotozoária, antifúngica e antitumoral.<sup>[7]</sup>

Foi neste contexto que criamos uma das hipóteses de trabalho desta dissertação: **DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DE TRITERPENOS SERIAM UMA ALTERNATIVA NA BUSCA DE NOVOS COMPOSTOS ANTIBACTERIANOS?** A fim de

encontrar subsídios para sustentar esta hipótese foi realizada uma ampla revisão bibliográfica sobre o tema, que será apresentada a seguir (Sessão 2).

Resumidamente, os triterpenos apresentam uma modesta, mas promissora atividade. Conseqüentemente, modificações sistemáticas nestes compostos representam uma estratégia promissora para identificar novos compostos com atividade antibacteriana.

O presente trabalho descreve nossos esforços para sintetizar compostos a fim de potencializar a atividade antibacteriana do esqueleto triterpênico. Apresentaremos a obtenção da matéria-prima, síntese e avaliação farmacológica e uma breve proposta de relação estrutura atividade (REA) para os derivados obtidos. O planejamento deste trabalho consistiu primeiramente na obtenção dos derivados semissintéticos através modificações na posição C-3 do ácido ursólico (AU); em seguida, na avaliação da atividade antibacteriana e da citotoxicidade *in vitro* dos derivados obtidos; e finalmente na busca por um mecanismo de ação para os compostos ativos.



## II. OBJETIVOS

---

Os objetivos deste trabalho foram:

- Extração de Ácido Ursólico a partir de *Mallus domestica* e sua purificação;
- Planejamento e obtenção de uma série de novos derivados triterpênicos pentacíclicos através do uso da semissíntese partindo do ácido ursólico realizando alterações nas moléculas buscando potencializar suas atividades antibacteriana e antibiofilme;
- Elucidar os compostos realizando um estudo de análise morfológica e estrutural;
- Avaliar as moléculas produzidas quanto à atividade antibacterina e antibiofilme.



### **III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---

### III.1.BACTÉRIAS

As infecções comunitárias e hospitalares estão hoje entre as dez principais causas de morte no mundo, sendo 1% a causa básica do óbito. O avanço da medicina bem como seus recursos tem aumentado a expectativa de vida da população mundial, crescendo o número de doenças neoplásicas e imunodeficiências fazendo do homem um hospedeiro vulnerável a infecções.

A descoberta de novos fármacos com atividade antibacteriana não está em evidência nos dias atuais e a resistência aos antibacterianos utilizados na prática clínica evolui independentemente da classe química ou alvo molecular do fármaco. Apesar de várias bactérias serem ameaças à saúde pública, a indústria farmacêutica e de biotecnologia deixou esta área de pesquisa por muitos motivos, mas a verdade é que um melhor retorno sobre os investimentos pode ser feito em outras áreas de doenças, pelo menos baseando-se na análise e previsão comercial. As rigorosas exigências regulatórias e um ambiente comercial competitivo são de grande importância nos cálculos, especialmente para empresas públicas, que tem responsabilidades de compartilhamento de informações. Outro fator relevante é o tempo necessário para produzir um novo fármaco antibacteriano, assim como a dificuldade técnica para tal produção, sendo um fator que não se altera em função de uma mudança no cenário comercial nem mesmo pelas políticas públicas.<sup>[8-9]</sup>

Nos estudos atuais, que utilizaram a genômica para obtenção de seus resultados de pesquisas, os agentes antibacterianos mais relevantes inibem uma pequena lista de alvos celulares. Os antibacterianos são classificados por suas estruturas químicas em oposição ao alvo que inibem, modificações estruturais nessas moléculas já conhecidas é o método de escolha para aumentar a eficácia de medicamentos já conhecidos, porém não muda, historicamente, a interação da molécula com o alvo, portanto, apesar de os derivados serem capazes de melhorar a eficácia, os mecanismos de resistência subjacentes, quer sejam alvo base ou de efluxo mediado por enzimas ainda estão presentes no meio ambiente.<sup>[8]</sup>

Nesta breve revisão nosso intuito é justificar a escolha das bactérias com as quais trabalhamos, demonstrando a importância das cepas escolhidas no

cenário da saúde pública, bem como também a carência de estudos que relatem ensaios para descobrir mecanismos de ação de novos compostos com atividade antibacteriana. Embora todo o conhecimento de genômica bacteriana que se tem atualmente ainda é extremamente difícil a descoberta de novas moléculas com mecanismos de ação inovadores.

Os membros do gênero *Staphylococcus sp.* fazem parte do grupo das bactérias Gram-positivas, apresentam-se morfológicamente na forma de cacho de uva e não produzem esporos, são anaeróbios facultativos produtores de catalase e pertencem a família *Micrococcaceae*.

### **Staphylococcus aureus**

*Staphylococcus aureus* permanece como um dos patógenos mais comuns em infecções sistêmicas. A relevância para a saúde pública se deve ao fato de *S. aureus* produzir enterotoxinas estando frequentemente envolvido em intoxicações alimentares, além de causar outras patologias. A propriedade fundamental do *S. aureus* é a habilidade de colonizar indivíduos saudáveis assintomaticamente, sendo aproximadamente 30% dos humanos são carreadores nasais assintomáticos. Esses carreadores geram um alto risco de causar infecção na população. <sup>[10]</sup>

### **Staphylococcus epidermidis**

*Staphylococcus epidermidis*, um dos principais colonizadores inócuos da pele e das mucosas humanas, é atualmente reconhecido como um importante patógeno em infecções nosocomiais associadas a cateteres venosos centrais e outros dispositivos médicos. Este microrganismo é considerado um dos mais importantes patógenos em ambiente hospitalar sendo responsável por 40-90% das infecções associadas com dispositivos de longa permanência em todo mundo. A importância de *S. epidermidis* como patógeno está relacionada com sua habilidade em formar biofilmes, um processo de várias etapas que envolve determinantes genéticos. <sup>[11]</sup>

Os biofilmes são comunidades complexas microbianas aderidas a superfícies bióticas e abióticas. São responsáveis por um grande número de mortes no mundo já que microrganismos vivendo nessas comunidades são altamente recalcitrantes à antibioticoterapia e às defesas imunes do hospedeiro

infectado. São necessárias concentrações de 1000-1500 vezes maiores do agente antimicrobiano para ter-se um efeito satisfatório contra os biofilmes o que gera normalmente altos custos de saúde. As possíveis soluções para impedir o crescimento de biofilmes microbianos ocorrem por alteração das superfícies de adesão impedindo a ligação de um microrganismo ou interferindo na ligação entre células microbianas, outra opção é inibir o *quorum-sensing* que é a forma de comunicação das bactérias ou ainda pela forma clássica utilizando antibióticos.<sup>[12]</sup>

### **Proteus mirabilis**

*Proteus mirabilis* é uma bactéria Gram negativa, dimórfica pertencente à família Enterobacteracea muito estudada pela sua capacidade de se diferenciar em células que expressam milhares de flagelos. O *P. mirabilis* é o agente principal da pielonefrite, prostatite, urolitíase e está associado a infecções de cateter urinário (ICU), sendo responsável por 3% de todas as infecções hospitalares e até 44% de infecções de ICU nos Estados Unidos da América (EUA).<sup>[13-14]</sup>

### **Acinetobacter baumannii**

*Acinetobacter baumannii* é uma bactéria também do grupo das Gram negativas, um patógeno oportunista, reconhecida em hospitais por causar pneumonias, infecções na corrente sanguínea bem como infecções nas meninges e no trato urinário principalmente em pacientes imunocomprometidos presentes em Unidade de Tratamento Intensivo (UTI). É resistente aos antimicrobianos comercialmente disponíveis (aminoglicosídeos, cefalosporinas, quinolonas e imipenem), sendo um importante problema terapêutico.<sup>[15-16]</sup>

### **Pseudomonas aeruginosa**

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria ambiental capaz de infectar uma grande variedade de plantas e de hospedeiros animais. Nos seres humanos é responsável por infecções fatais e crônicas em pacientes com fibrose cística, bem como infecções agudas graves em indivíduos imunocomprometidos. É a terceira principal causa de infecções hospitalares provavelmente, devido a sua capacidade de se adaptar a diferentes ambientes. Esta bactéria tem sido utilizada como modelo bem estabelecido de estudo de

formação de biofilme. Este patógeno está intimamente relacionado a infecções em pacientes com fibrose cística, vítimas de queimaduras, pacientes com câncer e pessoas que requerem estadias extensas em unidades de terapia intensiva.<sup>[17]</sup>

### **Escherichia coli**

*Escherichia coli* é uma bactéria anaeróbia facultativa comumente encontrada no trato intestinal de mamíferos. A maioria das cepas de *E. coli* são comensais, no entanto algumas cepas podem ser patogênicas para seres humanos podendo provocar colite hemorrágica. Estima-se que, a cada ano, 60 pessoas morrem devido à infecção por *E. coli* e 73000 pessoas são acometidas por doenças causadas por esta bactéria nos EUA e o gasto anual com colite hemorrágica chega a 1 bilhão de dólares.<sup>[8]</sup>

### **Salmonella Typhimurium**

A salmonelose é um problema de saúde pública nos EUA, causando doença por transmissão alimentar.<sup>[3]</sup> A *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium (*S. typhimurium*) sobrevive no trato digestivo de aves, muitas vezes sem causar doença sistêmica significativa. A contaminação de carcaças de frango durante o processamento é uma causa importante contaminação de alimentos. Estima-se que até 26% dos casos de intoxicações alimentares relatados nos EUA são devido ao consumo de alimentos contaminados por *Salmonella*.<sup>[18]</sup>

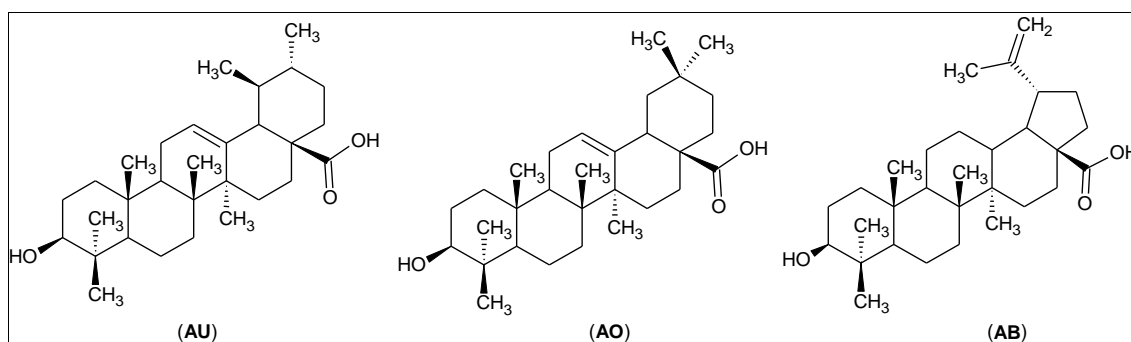
## III.2. TRITERPENOS

Os triterpenos são uma parte da família dos terpenoides, amplamente distribuídos no reino vegetal especialmente nas plantas clorofiladas, alguns dos mais encontrados são os ácidos oleanólico, betulínico e ursólico.

Esses compostos possuem propriedades farmacológicas relatadas na literatura, como anti-inflamatória, antifúngica, antiviral, antitumoral, antidiabética, anti-ulcerogênica, hepatoprotetora, neuroprotetora, antiparasitárias analgésica, antioxidante e antibacteriana, entre outras.<sup>[1]</sup>

### III.2.1.ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÁCIDO URSÓLICO, DO ÁCIDO OLEANÓLICO E DO ÁCIDO BETULÍNICO

O ácido ursólico (AU), ácido oleanólico (AO) e ácido betulínico (AB) (Figura 1) são triterpenos derivados da estrutura do isopreno. Muitos extratos utilizados na medicina popular contêm estes triterpenos e/ou seus derivados semissintéticos. Dados de estudos publicados nas últimas três décadas têm demonstrado promissora atividade do AU, do AO e do AB frente a diversas cepas de bactérias Gram positivas e Gram negativas utilizando ensaios de antibiograma.



**Figura 1:** Estrutura do Ácido ursólico (AU), Ácido Oleanólico (AO) e Ácido Betulínico (AB).

A espécie *Mallotus pelatus*, da família Euphorbiaceae, é um exemplo de espécie muito usada na medicina no sul e leste da Ásia, rica em AU. Seu extrato bruto metanólico das folhas demonstrou moderada atividade antibacteriana apresentando Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 128 a 2000µg/mL frente a cepas isoladas de *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *E. faecalis*, *B. subtilis* e *P. mirabilis*.<sup>[19]</sup>

Na fração acetona do extrato de *Salvia officinalis*, uma espécie nativa do Mediterrâneo, pertencente a família Lamiaceae, Horiuchi e colaboradores (2007) descobriram atividade antibacteriana frente às cepas de *Enterococcus* sp. Vancomicina-Resistente (EVR) apresentando uma CIM de 256-512 µg/mL. Após esses resultados o grupo isolou e identificou AO e AU como produtos majoritários desta fração, os testes foram realizados novamente frente ao EVR obtendo CIM de 8 e 4 µg/mL respectivamente.<sup>[20]</sup>

Os relatos acima são alguns exemplos ilustrativos de extratos contendo os triterpenos AU, AO e AB testados até o momento e que se mostram ativos frente a diversas cepas bacterianas. Nossa revisão da literatura aprofundou-se no sentido de confirmar que a atividade atribuída a estes extratos seria devido à presença dos triterpenos.

Foram isolados e caracterizados os terpenos AU e AB extraídos das folhas de *Vitex negundo*, uma espécie comum no sul da Ásia pertencente a família Verbenaceae, conhecida como árvore das cinco folhas, a qual são atribuídos muitos efeitos biológicos conhecidos, dentre os quais o antibacteriano. O grupo indiano de Chamdramu e colaboradores (2003) testaram AU e AB frente a cepas de *B. subtilis* e *E. coli* utilizando o método de difusão em disco. Nas diluições testadas, 1000 a 125 µg/disco, AU foi mais efetivo, em todas as diluições testadas, na inibição destes microrganismos. [21]

Em 2008, Fontanay e colaboradores testaram AU, AO e AB em suas apresentações comerciais frente a cepas de *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25923 e ATCC 29213), *E. faecalis* (ATCC 29212), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) e cinco isolados clínicos *E. coli* produtora de penicilinase, *S. aureus* metilicina resistente, *E. faecium* (gene vanB), *E. faecalis* (gene vanA) e *P. aeruginosa* (com super-expressão de bomba de efluxo). Os ensaios foram realizados utilizando a técnica de microdiluição em placas segundo diretrizes do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI). Foram encontrados valores de CIM (**Tabela 1**) que demonstram potente atividade do AU e do AO frente às cepas ATCCs de *S. aureus* e de *E. faecalis*, porém nos isolados clínicos não houve CIM em nenhum dos produtos testados. [22]

**Tabela 1.** Valores de CIM dos ácidos ursólico (AU), oleanólico (AO) e betulínico (AB) frente a cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa*. [9]

| Compostos | CIM(µg/mL)                      |                                   |                                   |                                  |                                    |
|-----------|---------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
|           | <i>E. coli</i><br>ATCC<br>25922 | <i>S. aureus</i><br>ATCC<br>25923 | <i>S. aureus</i><br>ATCC<br>29213 | <i>E. faecalis</i><br>ATCC 29212 | <i>P. aeruginosa</i><br>ATCC 27853 |
| AU        | <256                            | 8                                 | 8                                 | 4                                | 256                                |
| AO        | <256                            | 64                                | 32                                | 8                                | 256                                |
| AB        | <256                            | <256                              | <256                              | <256                             | 256                                |

Neste estudo foi realizado também um ensaio de viabilidade celular ( $IC_{50}$ ) utilizando o reagente [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2-il)-2,5difeniltetrazolio] (MTT) (**Tabela 2**) e também um teste de citotoxicidade ( $CC_{50}$ ) utilizando o ensaio de incorporação do vermelho neutro (**Tabela 3**) frente a linhagens celulares MRC-5 e HaCaT, respectivamente. MRC-5 é uma linhagem celular de câncer de pulmão de feto humano e HaCaT é uma linhagem de queratinócitos normais imortalizados. Pode-se constatar a partir destes resultados de alta toxicidade e fraca atividade antibacteriana concomitante. O AB possui índices de seletividade menores que o AU e que o AO, que apresentaram índices semelhantes com melhores valores de CIM para o AU e melhores valores de  $IC_{50}$  para o AO.

**Tabela 2.** Valores de viabilidade celular ( $IC_{50}$ ) dos ácidos ursólico (AU), oleanólico (AO) e betulínico (AB) frente às linhagens celulares HaCaT e MRC-5. Os compostos foram testados nas concentrações de 256  $\mu\text{g/ml}$  por 24, 48 e 168 h. Os resultados contidos na tabela estão em ( $\mu\text{g/ml}$ ).

| T (h)      | AU        |        | AO        |        | AB        |        |
|------------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|
|            | $IC_{50}$ |        | $IC_{50}$ |        | $IC_{50}$ |        |
|            | HaCaT     | MRC -5 | HaCaT     | MRC -5 | HaCaT     | MRC -5 |
| <b>24</b>  | 7,5       | 15,1   | 52,4      | 25,2   | 1,4       | 1      |
| <b>48</b>  | 6         | 11,2   | 44,1      | 24,7   | 1         | <1     |
| <b>168</b> | 5,1       | 11,3   | 50,8      | 19,4   | <1        | <1     |



**Tabela 3.** Valores de citotoxicidade (CC<sub>50</sub>) dos ácidos ursólico (AU), oleanólico (AO) e betulínico (AB) frente às linhagens celulares HaCaT e MRC-5. Os compostos foram testados nas concentrações de 256 µg/ml por 24, 48 e 168 h. Os resultados contidos na tabela estão em (µg/ml).

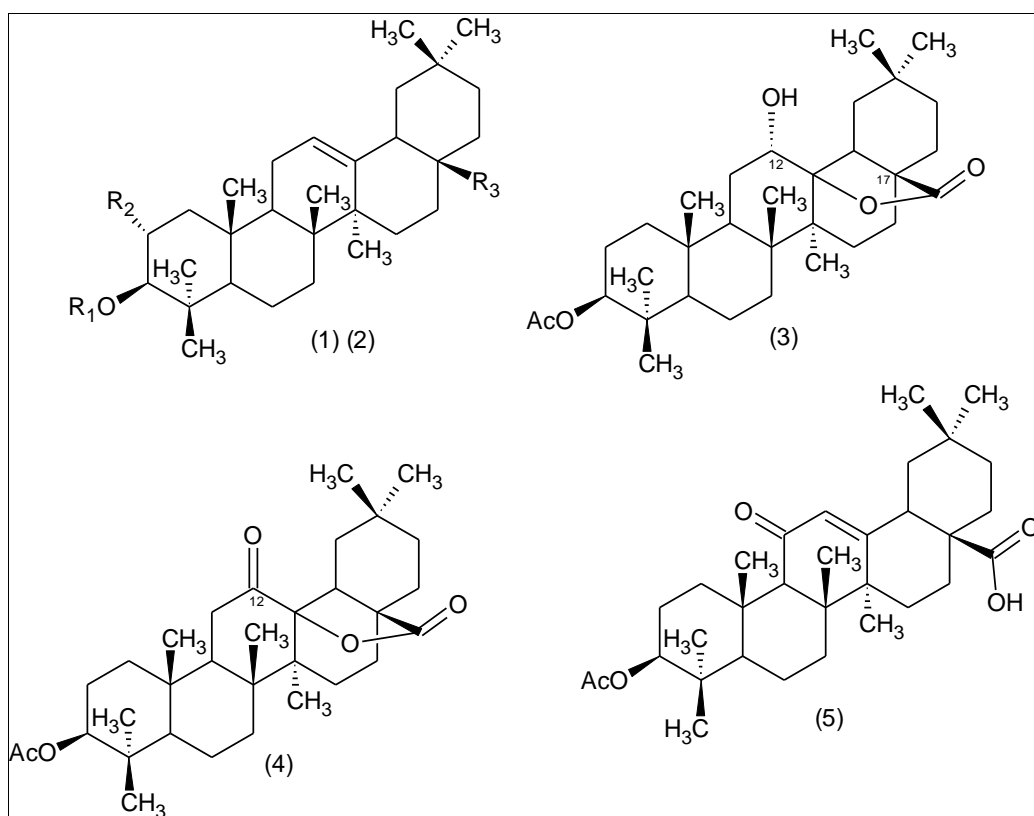
| T (h)      | AU               |       | AO               |        | AB               |        |
|------------|------------------|-------|------------------|--------|------------------|--------|
|            | CC <sub>50</sub> |       | CC <sub>50</sub> |        | CC <sub>50</sub> |        |
|            | HaCaT            | MRC-5 | HaCaT            | MRC -5 | HaCaT            | MRC -5 |
| <b>24</b>  | 3,9              | 8     | 23,9             | 31,9   | 4,4              | 4,5    |
| <b>48</b>  | 2,9              | 5,6   | 32,9             | 30,8   | 2,3              | 4      |
| <b>168</b> | 4,2              | 7,2   | 40,5             | 40,6   | <1               | 2,73   |

Demonstrando que os estudos com AU são de importância na atualidade, Min Jung Kim e colaboradores (2011) testaram AU comercial frente a cepas de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* isolados clínicos. A atividade antibacteriana foi avaliada através de ensaio de CIM segundo padrão de microdiluição NCCLS (2000). O AU teve efeito bactericida para *S. mutans* (ATCC 25175<sup>T</sup>) e *S. sobrinus* (ATCC 33478<sup>T</sup>) com CIM de 4 e 8 µg/mL respectivamente. A viabilidade celular com ensaio de MTT em células KB de carcinoma epitelial oral demonstrou que nas concentrações que houve CIM não ocorreu efeito tóxico; que só foi observado em concentrações acima de 16 µg/mL.<sup>[23]</sup>

### III.2.2.ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE TRITERPENOS ISOLADOS E SEUS DERIVAOS

Partindo de compostos isolados é possível a realização de modificações estruturais a fim de potencializar a atividade. A seguir são apresentados os relatos encontrados na literatura sobre a atividade dos triterpenos isolados e de alguns derivados semissintéticos.

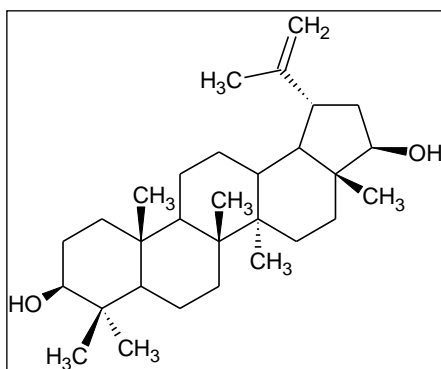
Hichem e colaboradores (2003) avaliaram a atividade de alguns derivados semissintéticos do AO frente a cepas de *S. typhimurium*, *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* e *P. aeruginosa*(ATCC 27853). Foram realizados ensaios de microdiluição em caldo Mueller-Hinton usando Tween 80 na concentração máxima de 5%. Os compostos ativos **1**, **2**, **3** e **4** (**Figura 2**) exibiram atividade frente a *S. typhimurium* com valores de CIM de 65, 95, 65 e 97  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, e de concentração bactericida mínima (CBM) de 300  $\mu\text{g/mL}$ . Enquanto que para as demais cepas testadas os valores de CIM foram considerados moderados variando entre 85 e 97  $\mu\text{g/mL}$ . Concluindo-se que a conversão do C-17 para uma função lactona C<sub>13</sub>-C<sub>17</sub> com a formação de um grupo  $\alpha$ -hidroxilou cetona no C-12 como nos compostos **3** e **4** respectivamente compensou a ausência da hidroxila no C<sub>3</sub>. Os compostos **5**, **6** e **7** não apresentaram atividade antibacteriana significativa.<sup>[24]</sup>



**Figura 2.** Estruturas (1)  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = \text{H}$ ,  $R^3 = \text{COOH}$ ; (2)  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = \text{H}$ ,  $R^3 = \text{CH}_3$  (3, 4, 5, 6 e 7)

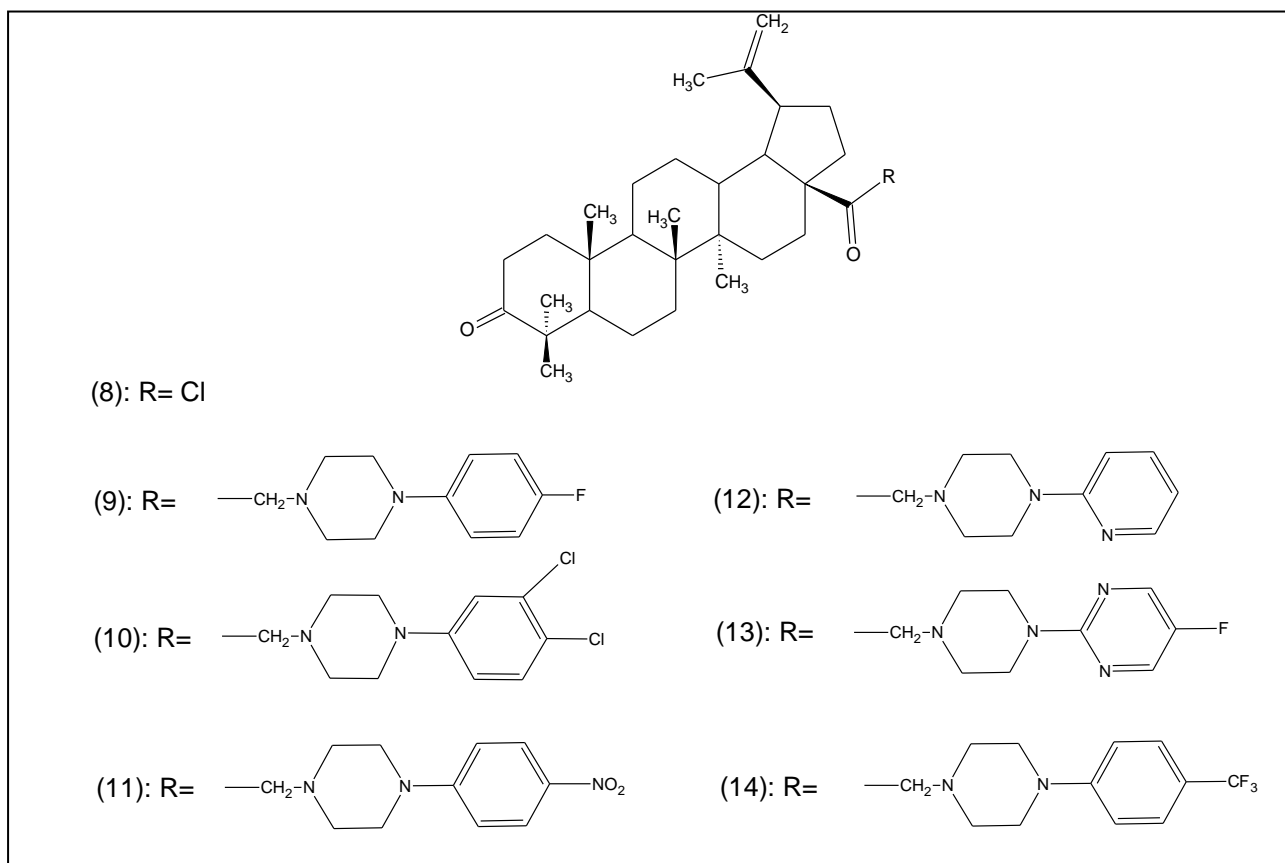
Um grupo de pesquisadores brasileiros isolou em 2007 um novo triterpeno, o 22 $\beta$ -hidroxilupeol (**Figura 3**) extraído de *Moldenhawera nutans* uma espécie da família Leguminales: Caesalpinoideae, endêmica no nordeste

do Brasil e representada por dez espécies. Após estudo fitoquímico de *M. nutans*, no qual foram isolados alguns diterpenos e este novo triterpeno inédito, foram realizados testes antibacterianos. O 22 $\beta$ -hidroxilupeol (**Figura 3**) não apresentou atividade antibacteriana na concentração de 90  $\mu\text{g}/\text{disco}$  frente a cepas de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Salmonella choleraesuis* e *Vibrio parahaemolyticus* através do ensaio de inibição de crescimento.<sup>[25]</sup>



**Figura 3.** Estrutura do 22 $\beta$ -hidroxilupeol

Chue e colaboradores usaram AB como produto de partida para sintetizar novos compostos derivados piperazínicos (**Figura 4**). Foram obtidos sete compostos com substituintes em C-28. Neste estudo os produtos foram testados frente a cepas de *Ochrobactrum anthropi*, *Ochrobactrum intermedium*, *P. aeruginosa*, *Stenotrophomonas matophilia* e *Stenotrophomonas nitritireducens* mostrando que os derivados **10** e **14** polihalogenados demonstraram maior espectro e, quando comparados com a gentamicina, melhor atividade no ensaio de difusão em disco conforme representado na **Tabela 4**.<sup>[26]</sup>



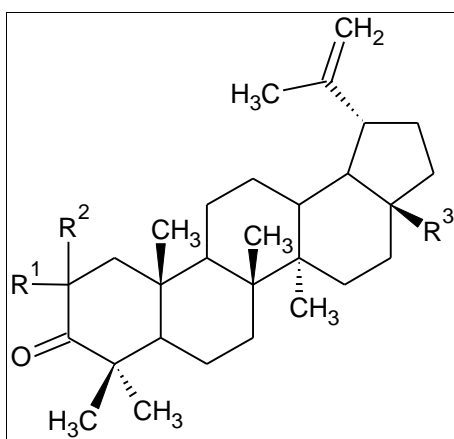
**Figura 4.** Ácido betulínico (R=OH) à esquerda e seus derivados modificados em C-28 indicando os radicais inseridos e numerados de **8-14**.

**Tabela 4.** Valores do halo de inibição dos derivados de Ácido betulínico (**9 a 14**) utilizando uma solução-mãe de 1 mg/mL aplicando 16  $\mu$ L em disco de 8 mm. <sup>[26]</sup>

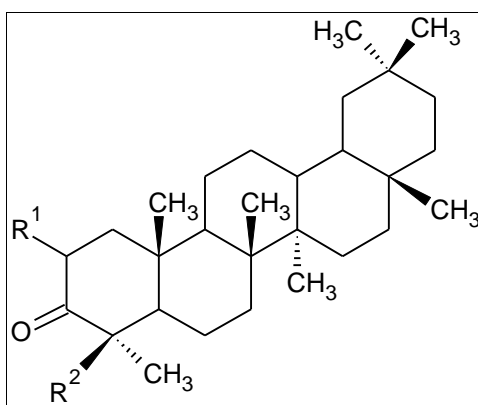
| Compostos          | Diâmetro da Zona de crescimento (mm) |                       |                      |                      |                           |
|--------------------|--------------------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|---------------------------|
|                    | <i>O. anthropi</i>                   | <i>O. intermedium</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>S. matophilia</i> | <i>S. nitritireducens</i> |
| (8)                | -                                    | -                     | -                    | -                    | -                         |
| (9)                | -                                    | -                     | -                    | -                    | 11                        |
| (10)               | 15                                   | 14                    | 13                   | 13                   | 15                        |
| (11)               | 12                                   | 13                    | -                    | 11                   | 13                        |
| (12)               | 12                                   | 10                    | -                    | 10                   | 11                        |
| (13)               | 13                                   | 10                    | -                    | 10                   | 11                        |
| (14)               | 15                                   | 14                    | 14                   | 14                   | 16                        |
| <b>Gentamicina</b> | 19                                   | 17                    | 18                   | 16                   | 21                        |

(-) Não apresentou inibição

Em outro estudo, uma série derivados de triterpenos pentacíclicos foi desenvolvida visando obtenção de alternativas de inibição de microrganismos patogênicos. Os derivados de **15** a **25**, com substituições em C-2, C-3 e C-28 (**Figura 5 e 6**), foram testados frente a cepas de *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* sendo que todos os compostos apresentaram atividade moderada (**Tabela 5**) verificada através do ensaio de difusão em disco utilizando discos de 6mm de diâmetro impregnado com 10  $\mu$ L de cada amostra (40mg/ml) em dimetilsulfóxido (DMSO). Os derivados **24** e **25** (**Figura 7**) não demonstraram inibição em comparação com os outros compostos, ressaltando a importância da posição C-3 do AB independente do esqueleto triterpênico para a atividade. [27]



**Figura 5.** Estruturas (15)  $R^1=H$ ,  $R^2=Br$ ,  $R^3=H$ ; (16)  $R^1=R^2=Br$ ,  $R^3=H$ ; (17)  $R^1=H$ ,  $R^2=Br$ ,  $R^3=COOMe$ ; (18)  $R^1=R^2=Br$ ,  $R^3=COOMe$ ; (22)  $R^1=H$ ,  $R^2=H$ ,  $R^3=H$ ; (23)  $R^1=H$ ,  $R^2=H$ ,  $R^3=COOMe$



**Figura 6.** Estruturas (19)  $R^1=Br$ ,  $R^2=H$ ; (20)  $R^1=H$ ,  $R^2=Br$ ; (21)  $R^1=H$ ,  $R^2=H$ .

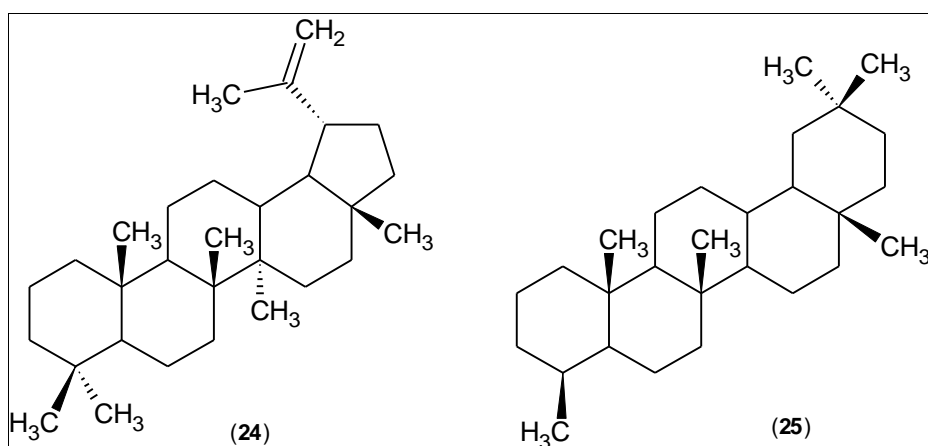


Figura 7. Derivados (24) e (25).

Tabela 5. Atividade antibacteriana dos derivados 15 a 25. <sup>[27]</sup>

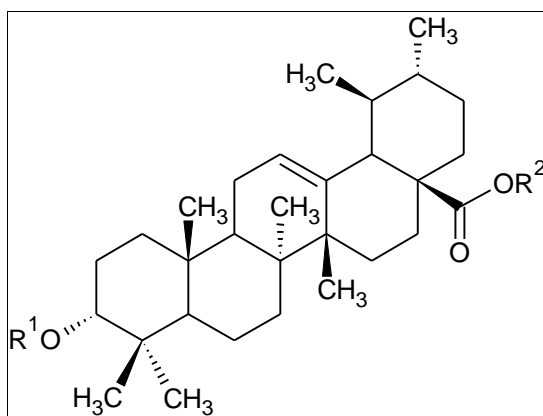
| Compostos | Bactérias [Zona de Inibição em milímetros (mm)] |                |                 |                     |
|-----------|---|----------------|-----------------|---------------------|
|           | <i>B. subtilis</i>                              | <i>E. coli</i> | <i>S.aureus</i> | <i>P.aeruginosa</i> |
| 15        | 6   | -              | 7               | -                   |
| 16        | 6   | -              | 7               | -                   |
| 17        | -   | -              | 7               | -                   |
| 18        | -   | -              | 8               | -                   |
| 19        | 6   | 6              | -               | 7                   |
| 20        | 6   | 6              | -               | 6                   |
| 21        | 7   | -              | 7               | -                   |
| 22        | -   | -              | 7               | -                   |
| 23        | 6   | 6              | -               | 7                   |

15, 16, 17, 18, 22 e 23: Derivados do ácido betulínico; 19, 20 e 21: Derivados do ácido oleanólico; (-) Não apresentou inibição

No mesmo contexto a *Miconia ligustroides* é uma espécie da família Melastomaceaea, com nome popular de pixirica no Rio Grande do Sul, dela também se extrai AU e AO. Cunha e colaboradores (2010) testaram o extrato diclorometânico, os triterpenos isolados, os triterpenos em associação bem como derivados do AU com modificações em C-3e C-28. As alterações

realizadas em C-3e C-28do AU foram através da reação de acetilação em C-3 e esterificação em C-28 gerando dois derivados, um acetilado (25) e outro metil éster (26).<sup>[28]</sup>

Os compostos foram testados, frente a cepas de *B. cereus*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella choleraesuis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Streptococcus psneumoniae* através dos ensaios de CIM, pela técnica de microdiluição em caldo (NCCLS, 2008). Os compostos isolados apresentaram melhor atividade quando comparados à associação dos isômeros ou mesmo aos derivados **26** e **27** (**Figura 8**) (**Tabela 6**).<sup>[28]</sup>



**Figura 8.** Os derivados do AU com as seguintes substituições no derivado (**26**) R<sup>1</sup>= COCH<sub>3</sub> R<sup>2</sup>= H e no derivado(**27**) R<sup>1</sup>= H R<sup>2</sup>= CH<sub>3</sub>

**Tabela 6.** Valores de CIM do extrato diclorometano e compostos AU, AO, AU+AO (mistura de AO e AU), 25, 26. <sup>[28]</sup>

|  | CIM (µg/mL)      |                      |                        |                      |                    |
|--|------------------|----------------------|------------------------|----------------------|--------------------|
|  | <i>B. cereus</i> | <i>K. pneumoniae</i> | <i>S. choleraesuis</i> | <i>S. pneumoniae</i> | <i>V. Cholerae</i> |
| Extrato<br>CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | 625              | >1000                | >1000                  | >1000                | >1000              |
| AU   | 20               | 1000                 | 1000                   | 1000                 | >1000              |
| AO   | >1000            | >1000                | >1000                  | 50                   | >1000              |
| AU+AO                                      | >1000            | >1000                | >1000                  | 50                   | >1000              |
| 26   | 80               | 1000                 | 1000                   | 80                   | >1000              |
| 27   | >1000            | 1000                 | 1000                   | >10000               | >1000              |
| Controle +                                 | 0,18(v)          | 2,95 (i)             | 0,36(g)                | 0, 18(v)             | 0,73(g)            |

Controle + = (g) Gentamicina, (i) Imipenem, (v) Vancomicina

Considerando os estudos contidos nesta revisão que demonstram o potencial do ácido ursólico como agente antibacteriano tanto frente a bactérias Gram positivas como Gram negativas e a atividade citotóxica deste composto em algumas linhagens celulares humanas, este trabalho propõe novas alterações na molécula deste triterpeno visando potencializar a atividade e diminuir a citotoxicidade frente a células normais.



## **IV. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

## IV.1 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

- Calorímetro Diferencial Exploratório (DSC) com compensação de potência - Shimadzu<sup>®</sup> DSC 60 acoplado a microprocessador de controle ThermalAnalysis
- Espectrômetro da Região de Infravermelho (IV) - Perkin FT-IR System Spectrum BX
- Espectrômetro de Massas (EM) - UltrOTOF (BrukerDaltonics)
- Aparelho de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H – Varian Inova 300 e Varian VNMRS 300 usando TMS como padrão interno
- Espectrômetro - Spectramax M2e Multimo de Microplate Reader, Molecular Devices, USA
- Microscópio eletrônico de varredura (MEV) Jeol<sup>®</sup>, modelo 6060
- Microscópio eletrônico de varredura – Costar 3599 Corning, Inc. NY, USA)

## IV.2. MATERIAL VEGETAL

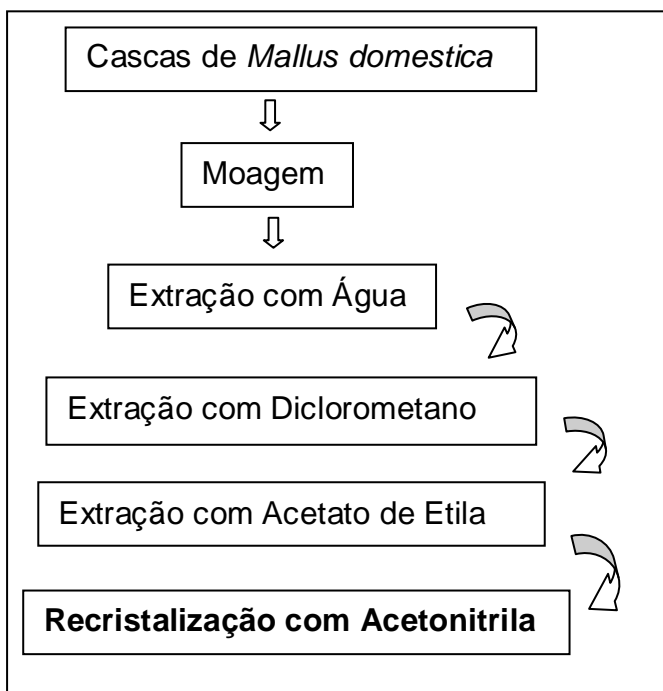
### IV.2.1. OBTENÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

A matéria-prima foi obtida de cascas de maçã, a *Mallus domestica*, resíduo da indústria de sucos **Tecnovin** do Brasil Ltda, da cidade de Vacaria, estado do Rio Grande do Sul. A torta proveniente da indústria, rica em cascas, foi seca em estufa de ar circulante por 24hs a 50°C e após foi triturada em moinho de facas. Realizaram-se extrações com água quente para retirada dos açúcares, onde 500g de pó de cascas moídas foram infundidas com 1,5L de água quente substituindo-a a cada fervura. Esse processo foi repetido por cinco vezes. Após, secou-se novamente o material em estufa de ar circulante por 24hs a 50°C.

#### IV.2.1.1.EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO AU

Na **Figura 9** é apresentado um esquema geral da extração do AU. O resíduo seco da planta moída sem conteúdo de açúcar sofreu extração a quente sob refluxo utilizando primeiramente o solvente diclorometano puro (p.a.) por 2 h, a proporção de 90g de planta para 400mL de solvente foi utilizada. Filtrou-se sobre auxílio de papel filtro e um funil para retirada do solvente diclorometano e substituiu-se por 400mL de solvente acetato de etila (p.a.) para nova extração a quente ainda sob refluxo. A fração acetato de etila foi seca utilizando evaporador rotatório a baixa pressão e cristalizada em solvente acetonitrila (p.a.). O AU foi purificado através de sucessivas recristalizações com acetonitrila. O produto foi identificado por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) comparado com padrão comercial Extrassíntese®, Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV), Espectrometria de Massas (EM) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $C^{13}$  e  $H^1$ .

Os solventes utilizados em todo o processo de extração e purificação, o diclorometano, acetato de etila e acetonitrila, foram recuperados utilizando o aparelho de rota-evaporador.



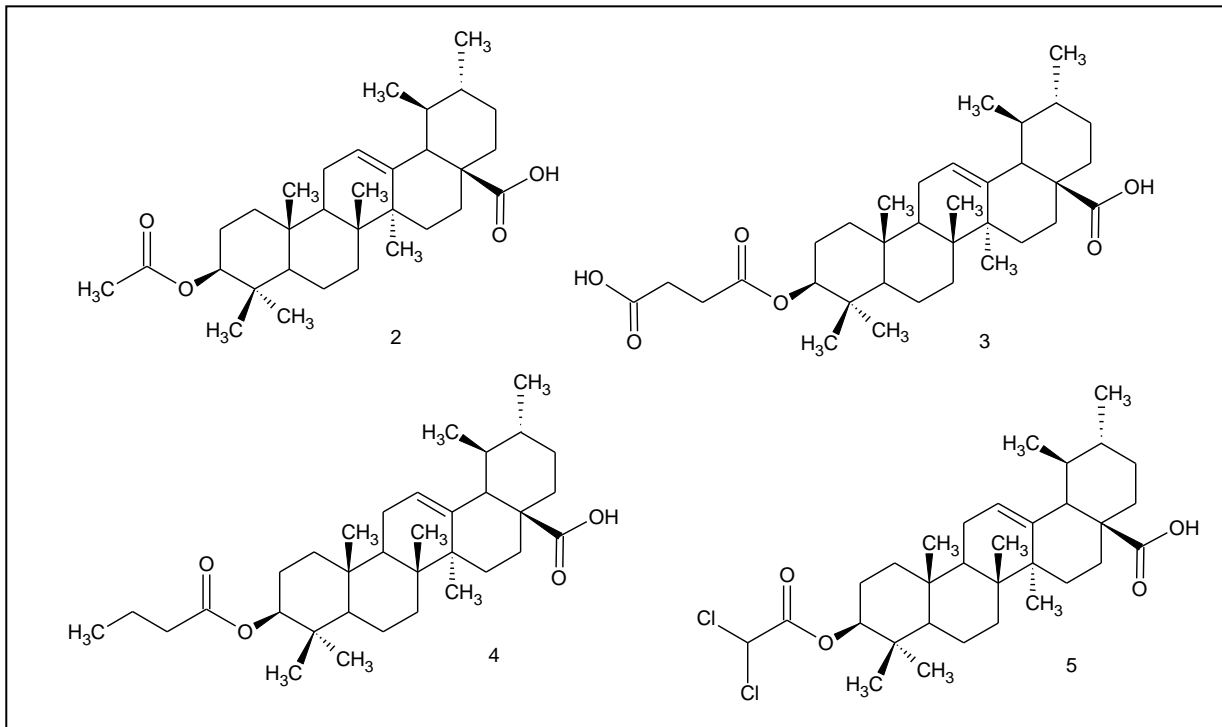
**Figura 9.** Fluxograma de Extração do AU, utilizando sistema partição com diferentes solventes (água: diclorometano:acetato de etila) sob refluxo em todas as etapas do processo.

## IV.3.MATERIAL QUÍMICO

### IV.3.1.OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS ACILADOS EM C-3

Para obtenção dos derivados (**Figura 10**) foram utilizados os anidridos acético para o derivado **2**, succínico para o derivado **3**, butírico para o derivado **4** e dicloroacético para o derivado **5**, respectivamente, na proporção de 1 eq. de AU (**1**) para 5 eq. de anidrido. Empregou-se piridina como solvente e catalizador da reação (10 mL) em um balão de fundo redondo fechado e sob agitação. Foi realizada CCD para acompanhar a reação até a conversão completa de **1** nos derivados acilados. O tempo reacional variou de 3 a 24 horas. Após a conversão completa de **1** nos derivados acilados, a reação foi tratada com solução de ácido clorídrico (HCl) 30%.

Os derivados **2**, **3**, **4** e **5** foram purificados através de cromatografia em coluna (CC) de gel de sílica 60 utilizando gradiente de polaridade crescente de solventes com ciclohexano:diclorometano:metanol.



**Figura 10.** Estrutura dos derivados acilados do AU obtidos neste estudo através de reações de esterificação.

#### IV.3.2.OBTENÇÃO DO DERIVADO N-{3-[4-(3-AMINOPROPIL)PIPERAZINIL]PROPIL}-3-O-ACETILURSOLAMIDA

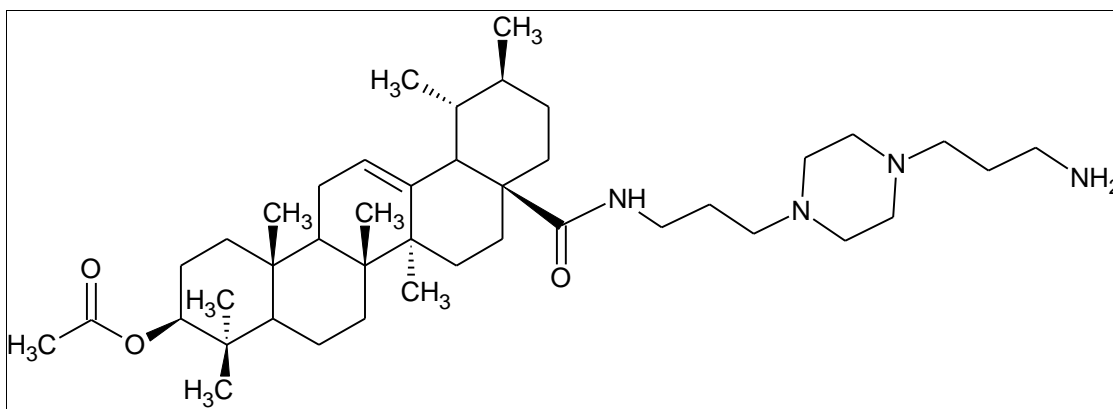
Partiu-se do composto **2** para obtenção do derivado **6** como foi previamente estabelecido pelo estudo de Gnoatto e colaboradores.

Realizou-se, previamente a proteção da bisaminopropilpiperazina comercial (BAPP) (1eq.) utilizando o grupamento di-*tert*-butilcarbamato (BOC) (0,5 eq.) em metanol com tempo reacional de 48hs em temperatura ambiente sob atmosfera inerte.

A reação do acoplamento peptídico foi realizada em duas etapas, inicialmente foi adicionado cloreto de oxalila (3 eq.) ao derivado **2** (1 eq.). Essa reação foi monitorada por Espectroscopia na região do IV. Após 30 minutos de reação adicionou-se trietilamina (TEA) (6 eq.) e bisaminopropilpiperazina previamente protegida por um grupamento (BAPP-BOC) em uma das aminas e o meio reacional foi mantido sob agitação por 24 horas.

O solvente empregado foi diclorometano destilado e o meio reacional foi mantido sob agitação em atmosfera inerte, em temperatura ambiente, exceto durante a adição dos reagentes quando manteve-se a 0°C. O produto desta reação foi purificado através de cromatografia em coluna de gel de sílica 60, utilizando um gradiente de polaridade crescente de solventes ciclohexano:diclorometano:metanol.

O grupo aminoprotetor BOC então foi removido por tratamento com uma mistura de ácido trifluoroacético (TFA) a 10% em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. O meio reacional foi mantido sob agitação por 3h, em temperatura ambiente, resultando no derivado **6** (**Figura 11**).O Derivado **6** foi purificado por recristalização utilizando diclorometano.



**Figura 11.** Estrutura química do Derivado 6

#### **IV.4.CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA**

Sistemas cromatográficos empregados:

Sistema 1. Diclorometano: Metanol (90:10) e revelação com ácido fosfomolibdico 6 % em etanol, para AU e compostos acilados.

Sistema 2. Diclorometano: Metanol (95:5) e revelação com anisaldeído sulfúrico, para o derivado piperazínico ainda protegido por um grupamento BOC.

Sistema 3. Acetato de etila:MeOH (60:40) e revelação em cuba de iodo, para BAPP e BAPP-BOC.

#### **IV.5.ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL**

Todos os compostos obtidos tiveram sua estrutura elucidada por DSC, Espectroscopia na Região do IV, EM e RMN H<sup>1</sup> e RMNC<sup>13</sup>.

## **IV.6.CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA POR CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA (DSC)**

A caracterização do comportamento térmico dos derivados triterpênicos foi realizada utilizando calorimetria diferencial exploratória (DSC) com compensação de potência (equipamento Shimadzu<sup>®</sup> DSC 60 acoplado a microprocessador de controle Thermal Analysis). Quantidades conhecidas de amostra foram pesadas, acondicionadas em panela de alumínio selada e submetidas à análise nas seguintes condições: faixa de aquecimento de 25 a 300 °C, taxa de aquecimento de 10 °C/min e fluxo de gás nitrogênio de 50 ml/min, após a calibração da linha de base com índio (156,63°C).

Para estudo de recristalização, quantidades de **2** e **5** foram pesadas e saturadas com diclorometano (DCM) com auxílio de ultra-som e agitação. O material insolúvel foi filtrado e o filtrado foi submetido ao processo de recristalização sob refrigeração ( $8 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Após a evaporação do solvente, os cristais resultantes foram submetidos a temperaturas de 50°C de aquecimento para eliminar a interferência do solvente na análise de caracterização térmica.

## **IV.7.MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)**

A avaliação da morfologia externa das moléculas foi observada utilizando microscópio eletrônico de varredura Jeol<sup>®</sup>, modelo 6060. Quantidades pequenas das amostras foram aplicadas em fita adesiva condutora dupla face sobre suporte (*stub*). As amostras foram metalizadas com fina camada de ouro em ambiente a vácuo e analisadas.

## **IV.8.MATERIAL BIOLÓGICO**

### **IV.8.1.MICROORGANISMOS**

Os microrganismos utilizados como cepas padrões para a realização dos ensaios de atividade antibacteriana foram:

- Bactérias Gram-positivas:

*Staphylococcus aureus* (isolados clínicos)

*Staphylococcus epidermidis* (isolados clínicos)

*Staphylococcus epidermidis* ATCC 35987

- Bactérias Gram-negativas:

*Acinetobacter baumannii* (isolados clínicos)

*Escherichia coli* ATCC 11/05

*Salmonella typhimurium* ATCC 14028

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

*Proteus mirabilis* ATCC 80

#### **IV.8.2.MANUTENÇÃO DAS BACTÉRIAS**

As bactérias foram mantidas em Agar Triptona de Soja (TSA) e conservadas sob refrigeração ( $\pm 8^{\circ}\text{C}$ ) no Laboratório de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS. Essas foram transferidas para novo TSA em intervalos menores que 15 dias para manter as colônias viáveis.

#### **IV.8.3.MEIOS DE CULTIVO**

Os meios de cultura que foram utilizados nos ensaios de atividade antibacteriana e antibiofilme foram:

- Ágar Muller-Hinton (Merck)

- Ágar Triptona de Soja (Merck)

- Caldo Müller-Hinton (Merck)



## IV.9.ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos foi realizada pelo método da microdiluição em caldo.

### IV.9.1.PREPARO DOS INÓCULOS

Para preparo dos inóculos bacterianos foram utilizadas bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e Gram-negativas: *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Cada bactéria foi transferida do meio de manutenção para o meio Agar Müller-Hinton e incubada por 18-24 horas para realização da cultura. Após, foi selecionada uma ou mais colônias da bactéria e estas foram transferidas para um tubo contendo caldo Müller-Hinton, sob agitação, de forma que a turbidez é de 0,5 segundo escala de McFarland, que equivale a  $1,5 \times 10^8$  células/mL. Em seguida foi realizada novadiluição centesimal de forma a obter-se uma concentração final no caldo de  $1,5 \times 10^6$  células/mL.

### IV. 9.2.DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A sensibilidade das bactérias frente aos derivados triterpênicos foi determinada de acordo com as normas instituídas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008) através da metodologia de microdiluição em caldo Muller-Hinton (CMH) em placas de 96 poços, com emprego de diluições seriadas. Estes valores variaram de 128 - 0,25 µg/mL. Preparou-se, primeiramente, as soluções-mãe em dimetil sulfóxido (DMSO) de cada um dos compostos **1**, **2**, **3**, **4**, **5** e **6** a serem testados de forma que a concentração obtida seja de 2,56 mg/mL de DMSO. Previamente aos testes, as cepas foram inoculadas em meio TSA e incubadas de 18 a 24h a  $35 \pm 2$  °C. Para preparo das diluições nas placas de 96 poços, adicionou-se 100 µL de CMH em todos

os poços com exceção da primeira linha da placa onde se colocou 190 µL. Na linha 1 da placa foi adicionado 10 µL da solução-mãe em DMSO de cada composto. Os ensaios foram realizados em duplicadas em cada placa. A partir dessa linha, após homogeneizar as soluções com uma micropipetadora multicanal foi realizado a diluição para as próximas linhas com coletas de 100 µL na sequência de linhas até a de número dez, sendo descartada a última diluição. As linhas 11 e 12 foram os controles positivo e negativo respectivamente onde no controle positivo somente foi colocado meio de cultura e bactéria e no controle negativo somente meio de cultura. Volumes de 100 µL do inóculo preparado na concentração de  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL foram adicionados nos poços já contendo as diluições dos compostos nas doses de 128; 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25 µg/mL dos compostos e incubada por 24 h.

#### IV.10.DETERMINAÇÃO DA CBM

Dos poços do ensaio de CIM onde não houve crescimento bacteriano, em função de o meio ficar límpido (sem turvação) coletou-se 10 µL e inoculou-se em placas de TSA, incubando por 24 h. Foram consideradas bactericidas as concentrações que não apresentaram crescimento bacteriano neste ensaio.

#### IV.11.ATIVIDADE ANTIBIOFILME

O método do cristal violeta foi utilizado para quantificação de biofilme em microplacas de poliestireno estéreis de 96 poços (Costar 3599, Corning, Inc., USA), segundo protocolo de Zimmer et al. (2013) com pequenas modificações. *S. epidermidis* ATCC 35984 foi cultivada em agar Mueller-Hinton por 18 h, a 37 °C, e utilizou-se uma suspensão bacteriana em NaCl a 0,9 % correspondendo a escala 1 de McFarland ( $3 \times 10^8$  UFC/mL). Colocou-se 80 µL da suspensão de bactérias nas placas, 80 µL do composto **3** (na concentração de 400 µg/mL solubilizado em DMSO 2 %) e 40 µL de caldo de triptona de soja (TSB). Após

incubação a 37 °C por 24 h, o conteúdo dos poços foi removido e estes foram lavados três vezes com solução salina estéril a 0,9 %. As bactérias aderidas aos poços da microplaca foram fixadas pelo calor (60 °C) durante 1 h. A camada de biofilme aderida foi corada com cristal violeta a 0,4 % durante 15 minutos à temperatura ambiente. O corante ligado as células bacterianas aderidas foi solubilizado com 99,5 % de DMSO e a leitura da absorbância foi realizada a 570 nm. Na amostra não-tratada (controle: 100 % da formação de biofilme), o composto **3** foi substituído por 80 µL de DMSO 2 % Rifampicina 8 µg/mL (Sigma-Aldrich Co., EUA) foi utilizado como controle de inibição do crescimento bacteriano. O crescimento bacteriano foi avaliado pela diferença da leitura da absorbância a 600 nm realizada no início (tempo zero) e no final (tempo 24 h) do experimento.

#### **IV.11.1.MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA**

O biofilme formado por *S. epidermidis* ATCC 35984 foi cultivado em microplacas de 96 poços com uma peça de Permanox (superfície mimetizando o poliestireno) (Costar 3599 Corning, Inc. NY, USA) usando caldo triptona de soja (TSB) e DMSO 2% na amostra controle (sem tratamento) e caldo TSB com o composto **3** (nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 µg/mL) no grupo tratado por 24 h a 37 °C. As amostras foram lavadas com solução salina estéril 0,9 % para remoção das células planctônicas. Em seguida, o biofilme foi fixado com 2,5 % de glutaraldeído por 3 h, e lavado com 100 mM de tampão cacodilato de sódio pH 7,2. As amostras foram desidratadas com um gradiente crescente de acetona, secas com a técnica do ponto crítico de CO<sub>2</sub> usando um aparato Bal-Tec 030 (CPD 030 Balzers, Liechtenstein), e colocadas sobre uma base de montagem. Finalmente, as amostras foram revestidas com ouro e analisadas utilizando microscópio eletrônico de varredura (modelo JEOL Instrumento JSM-6060) a 10 kV. <sup>[29]</sup>

### **Análise estatística**

Três ensaios independentes foram realizados (n=4) e os dados são demonstrados como média  $\pm$  desvio padrão. Significância estatística foi avaliada por teste tStudent bicaudal não-pareado (GraphPadPrism<sup>®</sup> version 5.00). Um  $P \leq 0,05$  foi considerado significativo.

## V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

## V.1.OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS

A espécie *Mallus domestica* é uma árvore frutífera muito comum do estado do Rio Grande do Sul, especialmente na micro-região dos Campos de Cima da Serra. Seu fruto, a maçã gala, é largamente empregado na indústria alimentícia, especialmente de sucos e geléias. A produção de suco se dá através de um processo que inicia pela seleção das frutas e trituração em moinho para obtenção da polpa, também chamada de purê. Em seguida o purê sofre duas prensagens para a extração completa do suco e para a separação da matéria seca em cascas e sementes restando deste processo um resíduo identificado como torta (comunicação pessoal, Paulo Crippa).

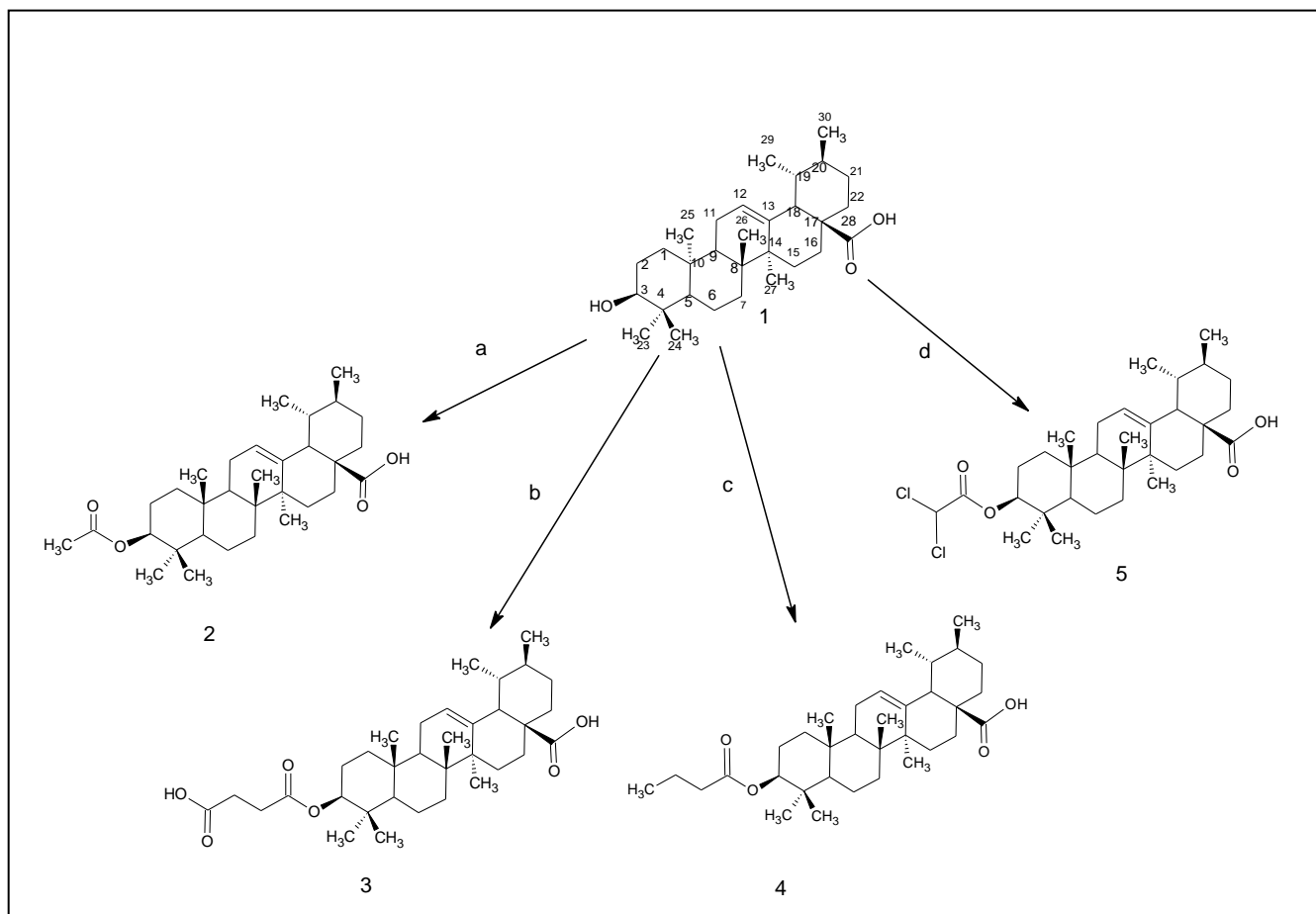
A eliminação de subprodutos é um grande problema enfrentado pela indústria alimentícia no mundo inteiro. Atualmente há a tendência em explorar estes subprodutos como fonte para novos produtos, segundo Kong e colaboradores (2011), porém no Brasil existem poucos relatos desta utilização.<sup>[30]</sup>

A torta produzida a partir do processo de obtenção de suco de maçã é descartada pela indústria e vem sendo empregada apenas como adubo agrícola. Deste resíduo foi extraído o AU 1 utilizado neste trabalho. Esta abordagem teve dois aspectos positivos, de um lado, ajudou a reduzir o problema da gestão de resíduos na indústria e, por outro lado, reduziu o alto custo de obtenção do ácido ursólico para síntese (1 g de AU comercial (Sigma-Aldrich®) = R\$ 3.190, 00). O AU 1 pode ser obtido de diversas fontes, porém neste caso tivemos reaproveitamento de produtos que seriam considerados lixo, situação que se enquadra atualmente como química verde.

O AU 1 foi obtido como um sólido branco em forma de pó. A extração foi realizada com solventes de diferentes polaridades. Iniciou fazendo-se uma extração aquosa exaustiva para a remoção dos açúcares presentes em grande quantidade na fruta. O processo foi otimizado e a remoção completa do conteúdo glicosídico ocorreu depois de cinco extrações. Após, o material vegetal, livre de açúcares, foi submetido a refluxo com diclorometano para a

remoção de ceras e, finalmente, empregou-se acetato de etila para a obtenção de AU com rendimento de 4 % a partir do peso seco.

O triterpeno AU **1** depois de isolado e purificado foi esterificado com quatro diferentes anidridos e produziu-se os derivados acilados **2**, **3**, **4** e **5** (Figura 12).

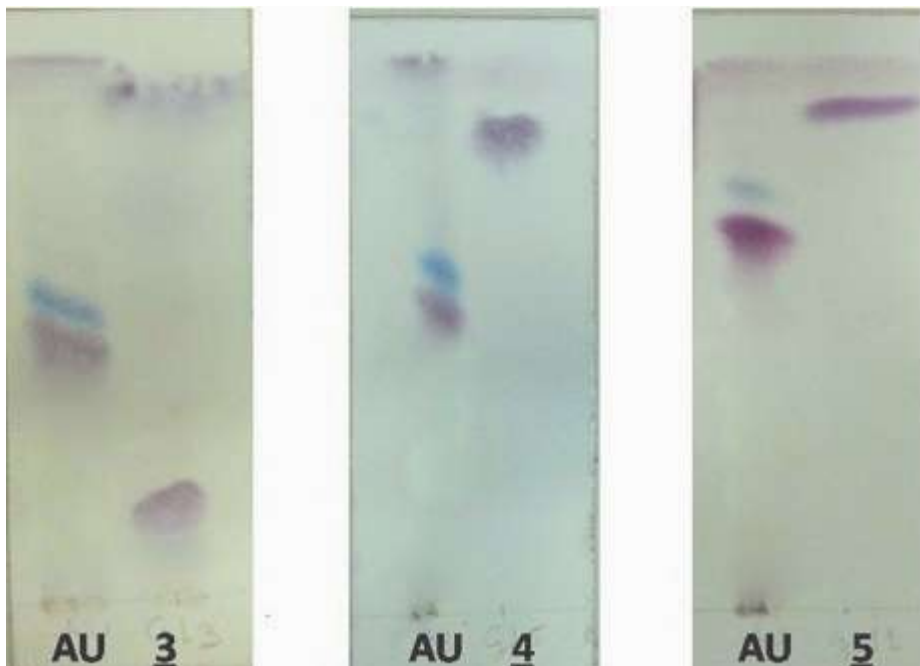


**Figura 12.** Esquema de Obtenção dos Derivados Acilados (**2**, **3**, **4** e **5**) onde a: T.A., piridina, anidrido acético, 24 h; b: T.A., piridina, anidrido succínico, 24h; c: T.A., piridina, anidrido isobutírico, 24 h e d: T.A., piridina, anidrido dicloroacético, 24h.

O monitoramento das reações foi realizado por CCD, IV e RMN de  $^1\text{H}$ , usando em todos os casos o AU (**1**) como referência.

Na CCD onde foi aplicada uma alíquota de cada meio reacional comparados com o padrão de AU (**1**) foi observado o desaparecimento da mancha em Rf 0,6 (AU) e aparecimento de manchas com Rf entre (0,2 e 0,9) de

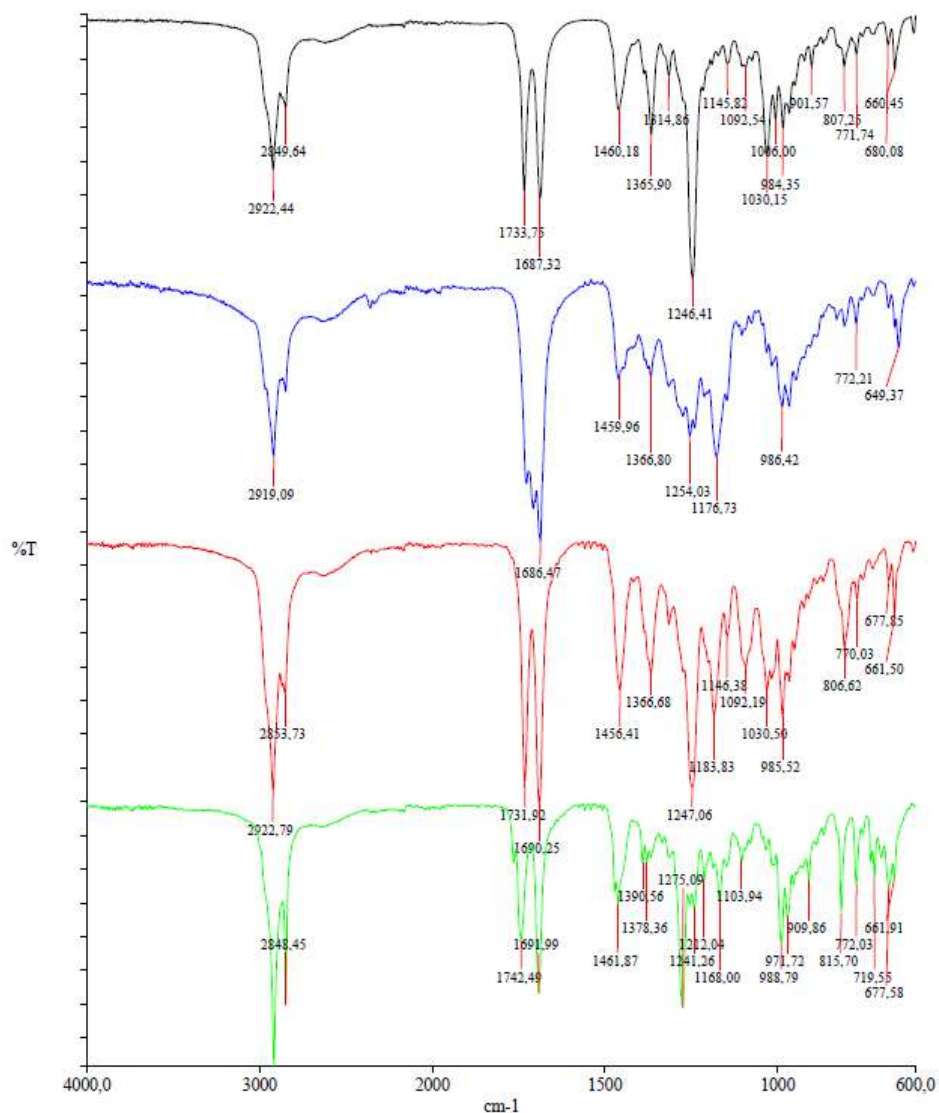
acordo com a polaridade do composto obtido, empregando-se os sistema cromatográfico 1 (Sessão 4. Materiais e Métodos). (Figura 13)



**Figura 13.** Figura ilustrativa das CCDs realizadas para monitoramento das reações de obtenção dos derivados 3, 4 e 5. Utilizou como fase móvel um sistema Diclorometano:metanol (96:4), como fase estacionária sílica gel e como revelador anisaldeído sulfúrico

No espectro de IV do AU (1) são observadas as bandas características de estiramento C-O de C=O e de estiramento O-H de ácido carboxílico em  $1687\text{ cm}^{-1}$  e de estiramento O-H de álcool em  $1733$ . A presença de uma banda adicional e característica  $\nu_{\text{C=O}}$  no espectro de IV indicou a presença de uma função éster que foi observada em  $1732\text{ cm}^{-1}$  para o derivado 2, em  $1708\text{ cm}^{-1}$  para o 3, em  $1736\text{ cm}^{-1}$  para o 4 e em  $1730\text{ cm}^{-1}$  para o 5. (Figura. 14)





**Figura 14.** Sobreposição dos espectros de IV, onde linha preta é referente ao derivado **2**, linha azul derivado **3**, linha vermelha, derivado **4** e linha verde, derivado **5**

No espectro RMN  $H^1$  desses compostos os produtos esterificados podem ser identificados pelo sinal mais desblindado do H-3 ( $\delta$  3,7 – 4,7) comparado com o H-3 livre ( $\delta$  3,1- 3,4) do AU **(1)**.

As estruturas de todos os compostos foram confirmadas por espectroscopia de IV, DSC, EM e RMN de  $H^1$  e  $C^{13}$  conforme será descrito a seguir.

Através da espectrometria de massas obtiveram-se os seguintes resultados:

Para o derivado **2** massa calculada: 497.7370, massa obtida: 497.3635

Para o derivado **3** massa calculada: 579.7879, massa obtida: 579.3656

Para o derivado **4** massa calculada: 525.8103, massa obtida: 525.4118

Está sendo realizada análise elementar para finalizar a identificação do derivado clorado **5**.

A elucidação estrutural do derivado **2** (**ácido 3-O-acetilursólico**) foi realizada seguindo dados da literatura. [28]

O derivado **3** (**ácido 3-O-succinilursólico**) apresentou na espectroscopia de infravermelho (IV) as seguintes bandas características: em 2924 ppm uma banda larga referente a OH de ácido carboxílico; em 1708 ppm uma banda intensa referente a C=O de éster e em 1688 ppm uma banda intensa de C=O de ácido carboxílico.

No espectro de RMN <sup>1</sup>H além do duplo duplete diagnóstico em δ4,49 atribuído ao H-3 pode-se observar a presença de cinco simpletos (δ0,70, 0,76, 0,88, 0,97 e 1,06 atribuídos as metilas 25, 24, 26, 23 e 27, respectivamente. As demais metilas foram caracterizadas pelos dupletos em δ0,81 (CH<sub>3</sub>-30) e δ1,01 (CH<sub>3</sub>-29). Foram observados oito tripletos em δ0,67, 0,90, 1,43, 1,56, 1,59, 1,81, 2,48 e 2,58 atribuídos aos CH-5, CH<sub>2</sub>-11, CH<sub>2</sub>-21, CH<sub>2</sub>-15, CH<sub>2</sub>-1, CH<sub>2</sub>-16, CH<sub>2</sub>-32 e CH<sub>2</sub>-33, respectivamente. Cinco multipletos foram observados em δ 0,88, 1,24, 1,27, 1,34 e 1,46 atribuídos aos CH-20, CH<sub>2</sub>-7, CH-19, CH<sub>2</sub>-2, CH<sub>2</sub>-6, respectivamente. Ainda um simpleto em δ1,47 atribuído ao CH-9, um duploduplete em δ 1,86 atribuído ao CH<sub>2</sub>-22, um duplete em δ 2,13 atribuído ao CH-18 e um tripleto largo em δ 5,40 atribuído ao CH-12.

Através do RMN<sup>13</sup>C foram observados os seguintes sinais com suas respectivas atribuições: δ 15,7 (C-25); δ 16,9 (C-26 e C-29); δ 18,3 (C-6); δ 21,3 (C-30); δ 22,4 (C-23 e C-24); δ 23,4 (C-2, C-11 e C-27); δ 23,8 (C-16); δ 28,1 (C-15); δ 28,2 (C-32 e C-33); δ 30,7 (C-21); δ 33,0 (C-7); δ 36,8 (C-10 e C-22); δ 37,1 (C-4); δ 37,9 (C-20); δ 38,4 (C-1 e C-19); δ 39,0 (C-8); δ 42,1 (C-14); δ 47,6 (C-17 e C-9); δ 52,7 (C-18); δ 55,5 (C-5); δ 80,8 (C-3); δ 125,9 (C-12); δ 138,1 (C-13); δ 173,9 (C-31); δ 180,2 (C-34); δ 184,5 (C-28).

O derivado **4** (**ácido3-O-butanoilursólico**) apresentou na espectroscopia de infravermelho (IV) as seguintes bandas características: em 2928 ppm uma banda larga referente a OH de ácido carboxílico; em 1736ppm uma banda intensa referente a C=O de éster e em 1689 ppm uma banda intensa de C=O de ácido carboxílico.

No espectro de RMN <sup>1</sup>H além do duplo duplete diagnóstico em  $\delta$ 4,49 atribuído ao H-3 pode-se observar a presença de cinco simpletos ( $\delta$ 0,70, 0,75, 0,88, 0,94 e 1,05 atribuídos às metilas 25, 24, 26, 23 e 27, respectivamente. As demais metilas foram caracterizadas pelos dupletos em  $\delta$ 0,80 (CH<sub>3</sub>-30). Foram observados oito tripletos em  $\delta$ 0,68, 0,92, 1,50, 1,57, 1,58, 1,83, 2,23 e 1,63 atribuídos aos CH-5, CH<sub>2</sub>-11, CH<sub>2</sub>-21, CH<sub>2</sub>-15, CH<sub>2</sub>-1, CH<sub>2</sub>-16, CH<sub>2</sub>-32 e CH<sub>2</sub>-33, respectivamente. Cinco multipletos foram observados em  $\delta$  0,90, 1,23, 1,26, 1,43 e 1,48 atribuídos aos CH-20, CH<sub>2</sub>-7, CH<sub>2</sub>-2, CH-19, CH<sub>2</sub>-6, respectivamente. Ainda um simpleto em  $\delta$ 1,49 atribuído ao CH-9, um duploduplete em  $\delta$  1,85 atribuído ao CH<sub>2</sub>-22, um duplete em  $\delta$  2,18 atribuído ao CH-18 e um tripleto largo em  $\delta$  5,28 atribuído ao CH-12.

Através do RMN<sup>13</sup>C foram observados os seguintes sinais com suas respectivas atribuições:  $\delta$  14 (C-25);  $\delta$  16,6 (C-26);  $\delta$  16,9 (C-29);  $\delta$  18,1 (C-6);  $\delta$  18,6 (C-30);  $\delta$  21,1 (C-23 e C-24);  $\delta$  23,2(C-11);  $\delta$  24(C-16 e C-33);  $\delta$  28 (C-15);  $\delta$  30,5 (C-21);  $\delta$  32,8 (C-7, C-32 e C-34);  $\delta$  36,7 (C-22);  $\delta$  37,7 (C-4);  $\delta$  39 (C-20);  $\delta$  38,2 (C-10);  $\delta$  38,8 (C-19);  $\delta$  39,0 (C-20);  $\delta$  39,5 (C-8);  $\delta$  41,9 (C-14);  $\delta$ 47,3 (C-9);  $\delta$ 47,9 (C-17);  $\delta$ 52,5 (C-18);  $\delta$ 55,3 (C-5);  $\delta$ 80,5 (C-3);  $\delta$  125,7 (C-12);  $\delta$ 137,9 (C-13);  $\delta$  173,5 (C-31);  $\delta$ 184 (C-28).

O derivado **5** (**ácido3-O-dicloroacétilursólico**) apresentou na espectroscopia de infravermelho (IV) as seguintes bandas características: em 2925 ppm uma banda larga referente a OH de ácido carboxílico; em 1730ppm uma banda intensa referente a C=O de éster e em 1687 ppm uma banda intensa de C=O de ácido carboxílico.

No espectro de RMN <sup>1</sup>H além do duplo duplete diagnóstico em  $\delta$ 4,64 atribuído ao H-3 pode-se observar a presença de cinco simpletos ( $\delta$ 0,74 (CH<sub>3</sub>-23 e 24),  $\delta$ 0,87(CH<sub>3</sub>-26),  $\delta$  0,94 (CH<sub>3</sub>-25),  $\delta$  1,04 (CH<sub>3</sub>-27)). As demais metilas

foram caracterizadas pelos dupletos em  $\delta$ 0,79 (CH<sub>3</sub>-30). Foram observados cinco tripletos em  $\delta$ 0,92, 1,55, 1,57, 1,83 e 5,25 atribuídos aos CH-11, CH<sub>2</sub>-15, CH<sub>2</sub>-1, CH<sub>2</sub>-16 e CH<sub>2</sub>-12 respectivamente. Quatro multipletos foram observados em  $\delta$  0,92 (CH-20), 1,23 (CH<sub>2</sub>-7), 1,27 (CH<sub>2</sub>-2 e CH-19) e 1,53 (CH<sub>2</sub>-6, CH<sub>2</sub>-9 e CH<sub>2</sub>-21). Ainda um simpleto em  $\delta$ 5,98 atribuído ao CH-32, dois duplodupletos um em  $\delta$  1,86 atribuído ao CH<sub>2</sub>-22 e outro em  $\delta$  4,64 atribuído ao CH-3, um duplete em  $\delta$  2,19 atribuído ao CH-18 e um tripleto largo em  $\delta$  5,25 atribuído ao CH-12.

Através do RMN<sup>13</sup>C foram observados os seguintes sinais com suas respectivas atribuições:  $\delta$  15,4 (C-25);  $\delta$  16,5 (C-26);  $\delta$  16,8 (C-29);  $\delta$  18,0 (C-6);  $\delta$  21,1 (C-30);  $\delta$  23 (C-23 e C-24);  $\delta$  23,2 (C-27);  $\delta$  23,5 (C-11);  $\delta$  23,9 (C-16);  $\delta$  24,0 (C-2);  $\delta$  27,9 (C-15);  $\delta$  30,5 (C-21);  $\delta$  32,8 (C-7);  $\delta$  36,6 (C-22);  $\delta$  36,8 (C-10);  $\delta$  37,9 (C-4);  $\delta$  38,1 (C-1);  $\delta$  38,8 (C-20);  $\delta$  38,9 (C-19);  $\delta$  39,5 (C-8);  $\delta$  41,9 (C-14);  $\delta$  47,4 (C-9);  $\delta$  48,0 (C-17);  $\delta$  52,5 (C-18);  $\delta$  55,2 (C-5);  $\delta$  64,7 (C-32);  $\delta$  85,0 (C-3);  $\delta$  125,7 (C-12);  $\delta$  137,8 (C-13);  $\delta$  164,3 (C-31);  $\delta$  184,2 (C-28).

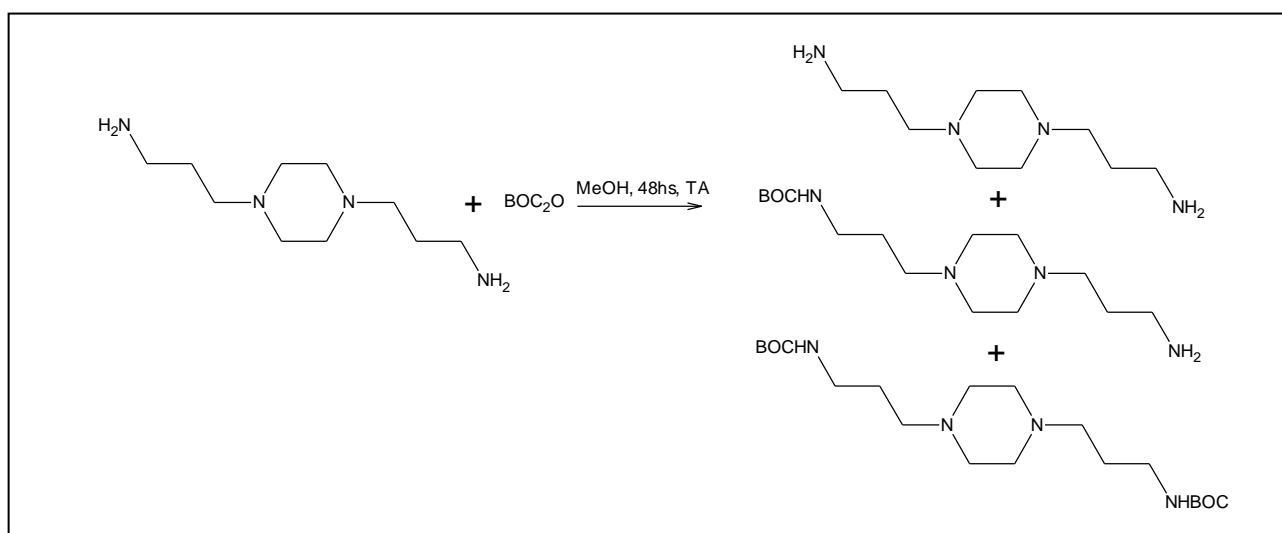
Nas reações de obtenção dos derivados acilados **2**, **3**, **4** e **5** encontramos rendimentos relativamente baixos. Para a reação de obtenção do derivado **2** foi obtido rendimento de 65 % enquanto a literatura relata rendimento de 98 %.<sup>[23]</sup> Já para o derivado **3** o rendimento foi de 19 %, para obtenção do derivado **4** o rendimento foi de 18,5 % e para o derivado **5** obtivemos um valor menor, de 9,4 %, o que sugere a necessidade de otimização do processo de purificação uma vez que as reações foram monitoradas e observou-se a completa conversão do material de partida em produto. Quando comparamos com resultados da literatura e demonstram rendimentos que variaram de 27 a 95 % para obtenção de 23 compostos derivados do AU com substituição em C-3.<sup>[31]</sup>

Para obtenção do derivado piperazínico **6** (N-{3-[4-(3-aminopropil)piperazinil] propil}-3-O-acetilursolamida) foi necessário obter previamente o N-1,4-(3-bisaminopropil)piperazina, protegido somente em uma das aminas da molécula(BAPP-BOC). Gnoatto e colaboradores (2008) utilizaram condições

reacionais descritas e obtiveram rendimento de 28 %.<sup>[39]</sup> Neste trabalho obtivemos a piperazina monoprottegida da mesma forma onde o *di-tert*-butilcarbonato (0,5 equiv.) em metanol (MeOH) foi lentamente adicionado a solução de *N*-1,4-(3-bisaminopropil)piperazina (1 equiv.) em metanol a 0 °C, a reação foi mantida sob agitação por 24 h. Porém a purificação desta reação foi realizada de maneira diferente dos autores acima, a fim de otimizar os rendimentos.<sup>[32]</sup>

O grande limitante desta reação de proteção é o fato de se obter, invariavelmente, uma mistura de três produtos. Devido à simetria do material de partida são obtidos BAPP-BOC e BAPP protegida em ambas as aminas e, devido à estequiometria da reação se obtém também BAPP desprotegida (**Figura 15**). Portanto, após a reação, a etapa crucial é a separação destes produtos a fim de se obter apenas o produto monoprottegido ou uma mistura com diprottegido, que é inerte na etapa de acoplamento peptídico seguinte. Porém é essencial a retirada da BAPP desprotegida, pois está afetará o rendimento da etapa subsequente. A extração é necessária em função de ter utilizado 0,5 equivalentes de *di-tert*-butildicarbonato para cada equivalente de *N*-1,4-(3-bisaminopropil)piperazina com a finalidade de evitar que obtivéssemos o produto com ambas as aminas protegidas em excesso.

No novo processo de purificação, após 24hs o solvente da reação foi removido com vácuo e o resíduo sólido dissolvido em diclorometano e extraído com água. As extrações foram monitoradas por CCD, nesta extração as moléculas desprotegidas tendem a ficar na fração aquosa. No acompanhamento por CCD a mancha referente à *N*-1,4-(3-bisaminopropil)piperazina, presente no ponto de aplicação devido a sua polaridade, desaparece ao longo das sucessivas extrações (**Figura 16**). Após a extração completada a fase orgânica foi seca a vácuo e obteve-se um sólido amarelado, onde se identificou a presença de BAPP mono e diprottegida.



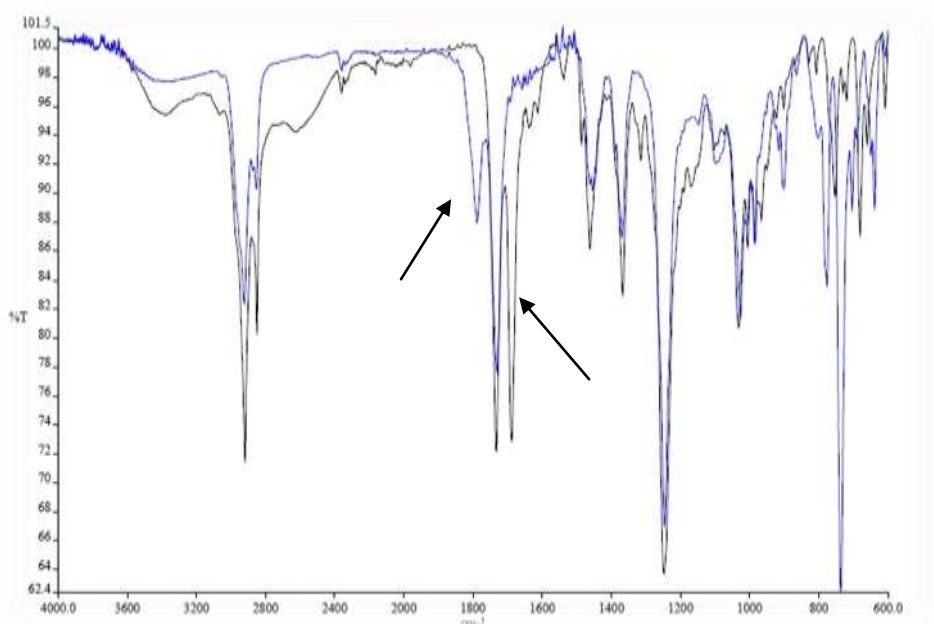
**Figura 15.** Esquema da reação de obtenção da piperazina protegida



**Figura 16.** Extração do BAPP-BOC, onde o P representa o produto da reação com duas bandas, a primeira, uma banda no ponto de aplicação (esquerda) representado a piperazina sem proteção e a banda E(direita) representando o produto após extração realizada com diclorometano/água onde a banda do ponto de aplicação desaparece permanecendo na fase aquosa. Sistema cromatográfico Acetato de etila:Metanol (60:40), revelação em câmara de iodo.

A reação do acoplamento do BAPP-BOC com o composto **2** a primeira reação é de formação do sal cloreto de ácido na carboxila do C-28 do composto **2** com a adição de cloreto de oxalila (3 equiv. ). Esta etapa foi

monitorada por IV, onde observou-se a completa conversão da banda da carbonila do ácido carboxílico do C-28 (1680 ppm, **Figura 17**. Linha preta) na banda da carbonila do cloreto ácido em C-28 (1800 ppm, **Figura 17**. Linha azul). Logo, a trietilamina foi adicionada em excesso (3 equiv. para cada equiv. de cloreto de oxalila) para consumir o cloreto de oxalila restante e após colocou-se o BAPP-BOC para então ocorrer o acoplamento, sempre sob atmosfera inerte e utilizou-se como solvente metanol destilado. A reação permaneceu por 24 h sob agitação. Após a realização do acoplamento foi realizada coluna cromatográfica de sílica gel 60 para purificação utilizando-se um gradiente dos solventes Ciclohexano:Diclorometano:Metanol.



**Figura 17.** Espectros de IV da reação do acoplamento realizados a fim de acompanhar a formação do cloreto ácido em C-28. Na linha preta está representado o AU e na linha azul o cloreto de AU.

Após secagem em evaporador rotatório e purificação por cromatografia em coluna foi necessário retirar o grupamento BOC presente no composto e para isso utilizou-se solução de ácido trifluoroacético (TFA) a 10% em diclorometano sob agitação a temperatura ambiente, após 3hs a reação foi interrompida e logo, realizou-se secagem utilizando evaporador rotatório.

A elucidação estrutural do composto **6** foi realizada com sucesso comparando-se os dados obtidos com os dados da literatura. <sup>[33]</sup>

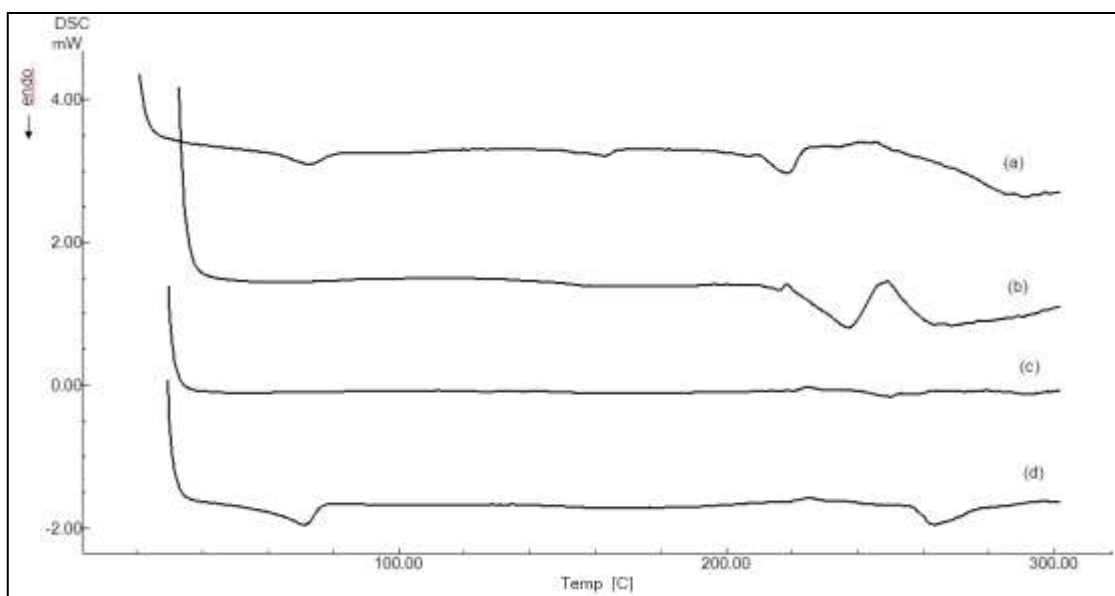
Este composto foi previamente sintetizado pelo nosso grupo de pesquisa e teve sua atividade antimalárica descrita frente às cepas FcB1 de *Plasmodium falciparum*, com IC<sub>50</sub> = 167 nM. Foi realizado teste também utilizando cepa de *Plasmodium falciparum* Thai, sensível a cloroquina e foram observados baixos índices de resistência cruzada à cloroquina. Além do composto **6**, outros derivados produzidos pelo nosso grupo com a finalidade de potenciais fármacos antimaláricos foram testados e demonstraram a capacidade de inibir a formação de β-hematina *in vitro* e *in silico* indicando que este é o provável mecanismo de ação destes derivados. [7]

## V.2.CARACTERIZAÇÃO POR CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA

A **Figura 18** ilustra a caracterização térmica dos derivados **2**, **3**, **4** e **5** através da técnica de Calorimetria diferencial exploratória (DSC). Ao observar os resultados, nota-se comportamento térmico diferenciado para as amostras analisadas.

O termograma obtido da amostra **2** (a) apresentou quatro eventos endotérmicos. O primeiro, em 62 °C, identificado como evento I (**Tabela 6**), apresenta-se característico de água de cristalização, uma vez que durante o processo de síntese empregou-se uma solução de ácido clorídrico (HCl) 30 % para interromper a reação. O segundo evento endotérmico, em 153 °C, pode ser resultante da presença de piridina na amostra, utilizada como solvente e catalisador da reação de acetilação. Pode-se sugerir que a amostra **2** apresenta polimorfismo, com a presença de dois eventos endotérmicos (evento III e IV) de fusão da amostra, indicativo da existência de transição sólido-sólido que ocorre entre as fases cristalinas da amostra. [34-35]





**Figura 18.** Termogramas da análise dos derivados 2 (a), 3 (b), 4(c) e 5 (d)

A análise térmica do derivado 3 (**Figura18 (b)**), demonstrou característica de polimorfismo com a presença de dois eventos endotérmicos, III e IV (**Tabela 7**), de fusão da amostra. Análise por DSC pode gerar indício qualitativo da presença de impurezas na amostra. A endoterma de fusão (219°C) alargada do evento IV pode sugerir que a amostra não se encontra pura. Não ocorrendo presença de resíduo de solvente utilizado na síntese, uma vez que não houve nenhum evento endotérmico na faixa de 60 e 160°C. [34-36]

O termograma representando o derivado 4 (**Figura18 (c)**), sugere a presença de fase amorfa nesta amostra, uma vez que apresentou evento exotérmico em 221 °C, característico de transição vítrea (Tg), ou seja, a passagem de estado amorfo para sólido, através da liberação de calor para o meio, com variação de entalpia positiva de 0,82 J/g (**Tabela 7**). O evento endotérmico seguinte à Tg é característico de ponto de fusão (evento IV). Podemos sugerir que a fase amorfa presente na amostra cristalizou e fundiu a 241°C. Pode-se sugerir também que em 4 não houve presença de resíduo de solvente utilizado na síntese, uma vez que não houve nenhum evento endotérmico na faixa de 60 e 160 °C. [37-38]

**Tabela 7.** Dados de temperatura ( $T_{\text{onset}}(^{\circ}\text{C})$ ) e variação de entalpia ( $\Delta H(\text{J/g})$ ) das amostras **2**, **3**, **4** e **5** resultantes da análise térmica por DSC.

| Amostras | Eventos endotérmicos e exotérmicos   |                        |                                      |                        |                                      |                        |                                      |                        |
|----------|--------------------------------------|------------------------|--------------------------------------|------------------------|--------------------------------------|------------------------|--------------------------------------|------------------------|
|          | Evento I                             |                        | Evento II                            |                        | Evento III                           |                        | Evento IV                            |                        |
|          | $T_{\text{onset}}(^{\circ}\text{C})$ | $\Delta H(\text{J/g})$ | $T_{\text{onset}}(^{\circ}\text{C})$ | $\Delta H(\text{J/g})$ | $T_{\text{onset}}(^{\circ}\text{C})$ | $\Delta H(\text{J/g})$ | $T_{\text{onset}}(^{\circ}\text{C})$ | $\Delta H(\text{J/g})$ |
| <b>2</b> | 62,70                                | -<br>12,54             | 153,64                               | -4,03                  | 200,84                               | -0,79                  | 210,40                               | -<br>11,34             |
| <b>3</b> | -                                    | -                      | -                                    | -                      | 217,02                               | -0,70                  | 219,05                               | -<br>40,74             |
| <b>4</b> | -                                    | -                      | -                                    | -                      | 221,21                               | 0,82                   | 241,81                               | -1,46                  |
| <b>5</b> | 62,47                                | -<br>16,61             | -                                    | -                      | 219,77                               | 1,97                   | 258,55                               | -<br>11,73             |

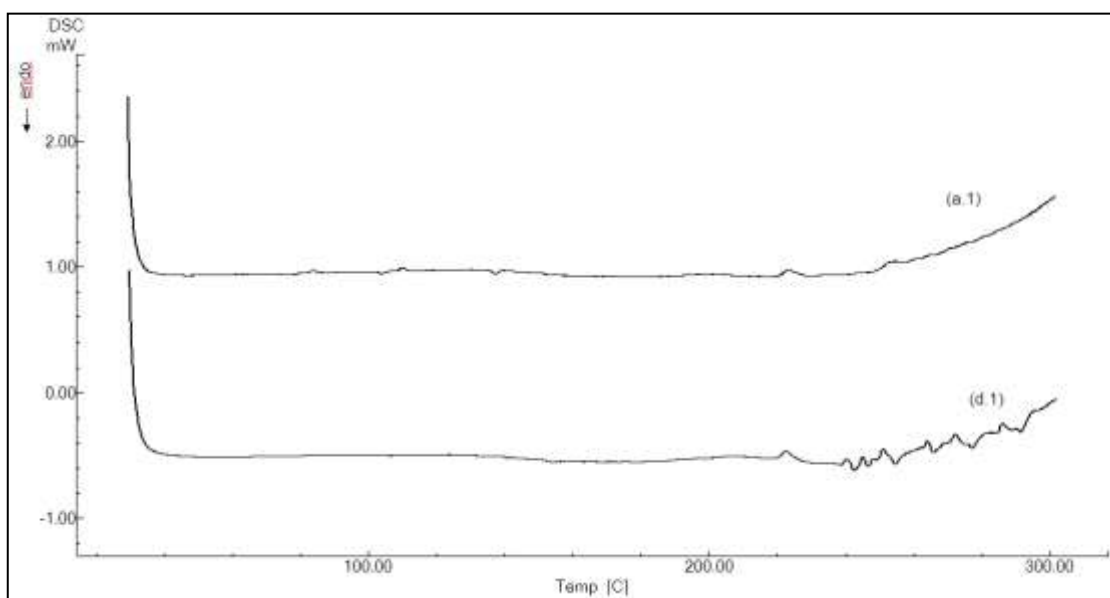
O composto **5** apresentou três eventos, conforme termograma ilustrado na **Figura 18(d)**. O primeiro evento, endoterma em  $62^{\circ}\text{C}$ , sugere que seja água de cristalização presente na amostra, similar ao ocorrido no composto **2**, uma vez que durante o processo de síntese utilizou-se HCl para interromper a reação. Pode-se observar neste termograma a possível presença de fase amorfa nesta amostra, com  $T_g$  em  $219^{\circ}\text{C}$ . O quarto evento está associado ao ponto de fusão do composto **5**, com endoterma em  $258^{\circ}\text{C}$ , após a passagem da fase amorfa para fase cristalina. <sup>[38-35]</sup>

Pode se observar os termogramas na **Figura 18** que todas as amostras analisadas, **2**, **3**, **4** e **5** apresentaram degradação após o ponto de fusão,  $210,40^{\circ}\text{C}$ ,  $219,05^{\circ}\text{C}$ ,  $241,81^{\circ}\text{C}$  e  $258,55^{\circ}\text{C}$ , respectivamente.

Para confirmar a presença de solventes oriundos da síntese dos derivados **2** e **5** e descartar a possibilidade de impurezas sólidas, foram realizados estudos de recristalização com estes compostos. A evaporação do diclorometano, solvente utilizado neste processo, foi feita sob refrigeração para que os cristais tivessem maior tempo de contato com o solvente, normalmente

formando compostos de maior de tamanho de partícula do que os formados sob temperatura ambiente ou aquecimento. [39]

Conforme a **Figura 19**, ambos compostos recristalizados apresentaram-se na fase amorfa, sem presença de fase cristalina, com Tg de 220 °C para ambas **2** e **5** recristalizadas, o mesmo valor de Tg da fase amorfa do composto **5** antes da recristalização. Compostos formados em temperatura ambiente normalmente são obtidos na forma mais estável, assim como compostos recristalizados em condições mais severas de temperatura, como aquecimento ou refrigeração, por exemplo, normalmente obtém a forma menos estável, como fase amorfa, que apresenta menor estabilidade, porém maior solubilidade. [40]



**Figura 19.** Termogramas da análise de recristalização do derivado **2** (a.1) e do derivado **5**(d.1).

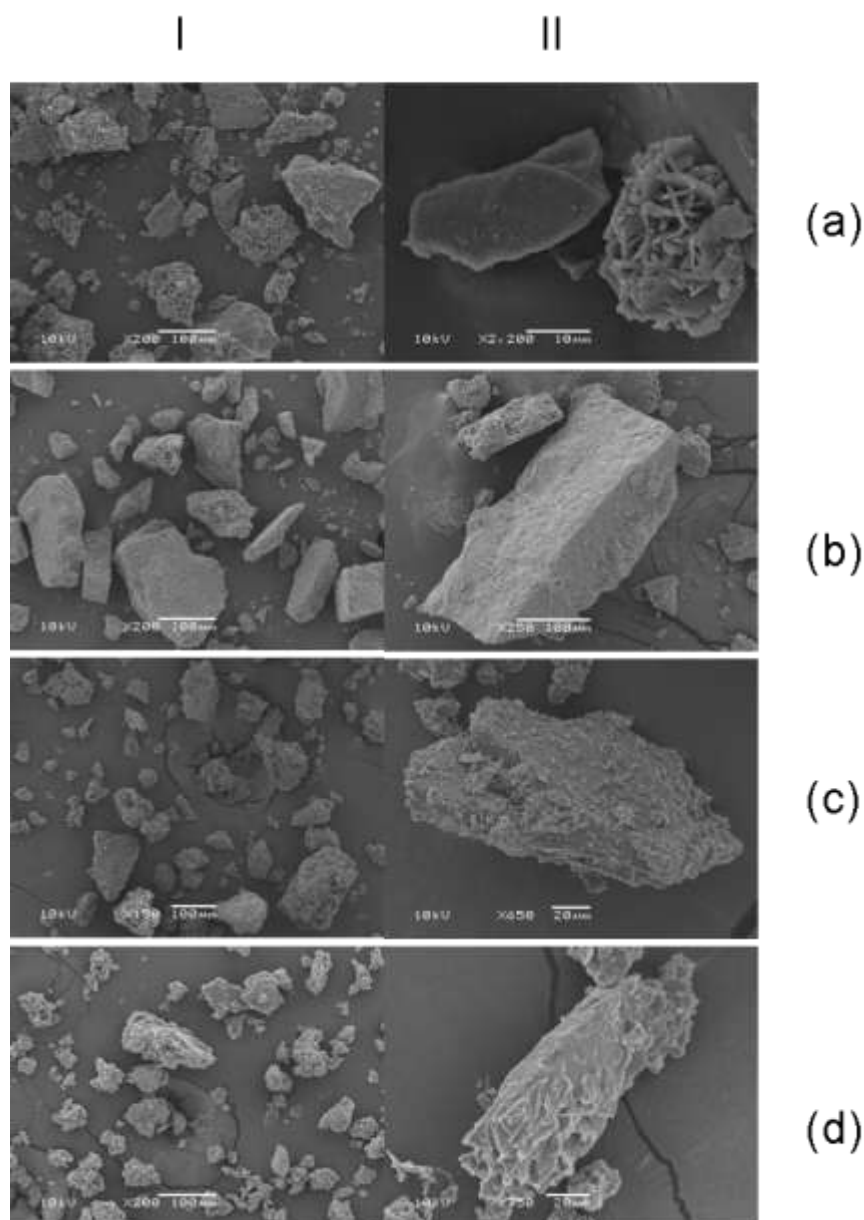
Também pode ser observado que os eventos endotérmicos apresentados na faixa de 60 a 160°C, supostamente atribuídos a água de hidratação e solventes residuais do processo de síntese, não são mais observados após a recristalização destas amostras.

Todas as amostras serão submetidas à análise de difração de Raios X (DRX) para caracterização cristalográfica dos compostos.

### V.3.MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A possível diferença polimórfica e a presença de fase amorfa nas amostras, como sugeriram as análises por DSC, faz com que o crescimento cristalino do sólido seja diferenciado, refletindo assim na diferença na morfologia do cristal. O que deve ser considerado para a forma de crescimento do cristal está relacionado com a trama do cristal da molécula sólida, os efeitos do solvente de escolha e aditivos no processo de crescimento cristalino. Deste modo, o crescimento cristalino é um processo camada por camada, da qual a evolução destas camadas está definida pelo empacotamento da célula unitária do cristal.<sup>[41]</sup>

Através da análise por microscopia eletrônica por varredura, podemos visualizar diferenças morfológicas, sugerindo assim que algumas amostras apresentaram hábitos cristalinos distintos entre si. As fotomicroscopias apresentadas na **Figura 20** ilustram as diferenças morfológicas das amostras **2**, **3**, **4** e **5** do campo de análise e de uma determinada partícula.



**Figura 20.** Fotomicroscopias apresentadas para as amostras 2(a), 3 (b), 4 (c) e 5 (d) do campo de análise (I) e de uma determinada partícula (II).

Conforme **Figura 20**, os compostos 2 (a), 4 (c) e 5 (d) apresentam tendência em formar cristal prismático tabular. Pode-se observar também que a molécula do ácido 3-O-acetilursólico (a) demonstrou tendência em formar aglomerados nas condições de síntese realizada. Nesta amostra, quando visualizou-se o campo de análise, a distribuição do tamanho de partícula pareceu de forma heterogênea, sendo que as menores com tendência a formar aglomerados. As moléculas 4 (c) e 5 (d) apresentam superfície irregular com

bastante rugosidade. Pode-se observar no campo de análise que estas moléculas apresentam diferenças de tamanho de partícula também, porém não foi observada a aglomeração das partículas, mas sim a sobreposição das pequenas nas partículas maiores.

Por sua vez, a molécula **2** (b), apresentou hábito cristalino distinto das demais, tendendo a formação de placas pontiagudas com superfície mais homogênea e menos rugosa. Este composto também demonstrou distribuição do tamanho de partícula heterogêneo.

#### V.4.CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

As infecções por bactérias resistentes a terapêutica atual são um grave problema de saúde pública no mundo todo, mas em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, como no caso do Brasil, as estatísticas demonstram uma situação alarmante, fazendo-se necessário o aumento nas pesquisas e o desenvolvimento de novos fármacos. (ANVISA)

Neste estudo foram utilizadas as cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. mirabilis*, *S. Tiphymurium*, *P. aeruginosa*, *E. colieA.baumannii*. Estas cepas foram selecionadas em função de ser relevantes causadoras de infecções graves na comunidade e em ambiente hospitalar, sendo responsáveis por inúmeros óbitos de indivíduos em situações de comprometimento imunológico.

Os resultados dos ensaios de CIM com cepas que apresentaram alguma sensibilidade estão relacionados na **Tabela 8**. O ensaio foi realizado em duplicata e os resultados foram reprodutíveis.

**Tabela 8.** Tabela de resultados dos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e de Concentração Bactericida Mínima (CBM)

| Compostos | <i>S. aureus</i><br>CIM**<br>(µg/mL) | <i>S. aureus</i><br>CBM*<br>(µg/mL) | <i>S. epidermidis</i><br>CIM**<br>(µg/mL) | <i>S. epidermidis</i><br>CBM*<br>(µg/mL) | <i>P. mirabilis</i><br>CIM**<br>(µg/mL) | <i>P. mirabilis</i><br>CBM*<br>(µg/mL) |
|-----------|--------------------------------------|-------------------------------------|---|--|---|--|
| <u>1</u>  | -                                    | -                                   | 32  | >128                                     | 32                                      | >128                                   |
| <u>2</u>  | -                                    | -                                   | 128                                       | >128                                     | -                                       | -                                      |
| <u>3</u>  | 128                                  | 128                                 | 64  | 64                                       | 64                                      | >128                                   |
| <u>4</u>  | -                                    | -                                   | -   | -  | -                                       | -                                      |
| <u>5</u>  | -                                    | -                                   | 128                                       | >128                                     | -                                       | -                                      |
| <u>6</u>  | 64                                   | 128                                 | 64  | >128                                     | 64                                      | >128                                   |

\*CIM: Concentração Inibitória Mínima, \*\* CBM: Concentração Bactericida Mínima.

Em relação à CIM dos compostos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 é observado que os compostos 3 e 6 foram os mais efetivos frente a *S. aureus* onde com o composto 3 obteve-se CIM e CBM na dose mais alta testada de 128µg/mL e o composto 6 apresentou CIM de 64 µg/mL e CBM como o 3. Estes dados nos levam a propor mecanismos diferentes de ação entre os compostos, já que 3 é bactericida enquanto 6 é bacteriostático para esta cepa.

As cepas de *S. epidermidis* demonstraram maior sensibilidade aos compostos, quanto comparadas às cepas de *S. aureus*. Somente o composto 4 não apresentou inibição e o composto que apresentou a menor CIM (32 µg/mL) foi o 1. Já para o composto 3 os mesmos valores para CIM e CBM (64 µg/mL) foram obtidos, sendo o único a apresentar CBM para esta cepa, nas concentrações testadas. Este comportamento é semelhante ao observado para a cepa de *S. aureus*, porém em dose mais baixa o que poderia sugerir um perfil

tóxico para *S. epidermidis* ou uma maior sensibilidade desta cepa. O composto **3** também mostrou-se ativo frente a *P. mirabilis* com CIM de 64 µg/mL.

Para as cepas de *P. mirabilis* o AU **1** demonstrou melhor perfil de inibição (CIM de 32 µg/mL) quando comparado com os derivados **2** (inativo), **3** (64 µg/mL), **4**, **5** (inativos) e **6**(64 µg/mL).

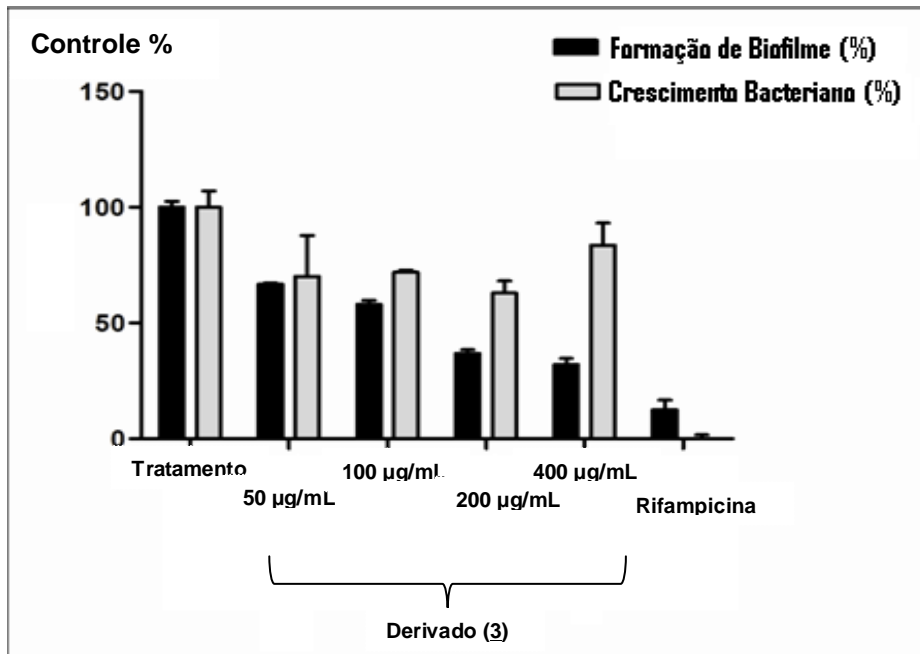
No caso das outras bactérias Gram negativas testadas *S. typhimurium*, *E. coli*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa* foram realizados ensaios de CIM frente aos derivados, porém não houve sensibilidade. As concentrações dos compostos não foram aumentadas em função da não viabilidade e provável toxicidade para células eucarióticas além de levar em conta Fontanay e colaboradores, quando relatam que doses por volta de 50 µg/mL são consideradas moderadas, onde o ideal, segundo este autor, seriam doses abaixo de 10 µg/mL.

Por apresentar um perfil de atividade antimicrobiana promissor o composto **3** foi escolhido para ensaios de atividade antibiofilme. O efeito antiadesão bacteriana do composto **3** está demonstrado na **Figura 21**, onde houve inibição do crescimento bacteriano nas concentrações testadas, porém a inibição da formação de biofilme foi mais pronunciada principalmente nas concentrações mais altas (200 e 400 µg/mL). Esse tipo de atividade se faz muito interessante já que dispositivos médicos hospitalares, como por exemplo cateteres, próteses e enxertos são comumente infectados por biofilmes de *S. epidermidis*. Apesar de ser uma bactéria presente na microbiota natural de humanos e normalmente não causar infecções, em pacientes imunocomprometidos esse patógeno é de extrema relevância sendo responsável por grande parte de infecções hospitalares no mundo. <sup>[42]</sup>

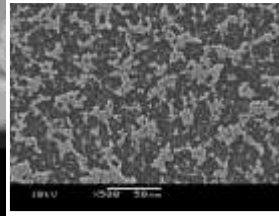
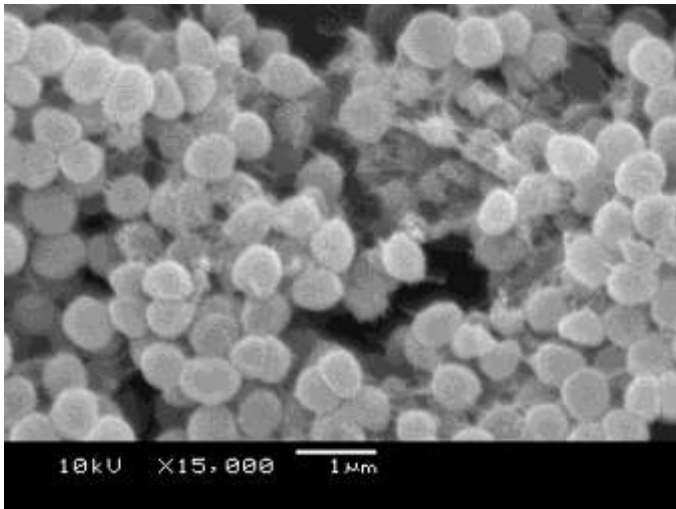
O ensaio de microscopia eletrônica de varredura (**Figura 22**) corroborou os resultados obtidos no ensaio antibiofilme (**Figura 21**). Na amostra não-tratada (**Figura 22a**) há a formação de um biofilme característico sobre a superfície de Permanox com presença de matriz envolvendo as células bacterianas. Contrariamente, nas células tratadas com o composto **3**, em diferentes concentrações, há uma redução significativa nas células aderentes principalmente nas concentrações de 200 e 400 µg/mL onde pode-se notar a



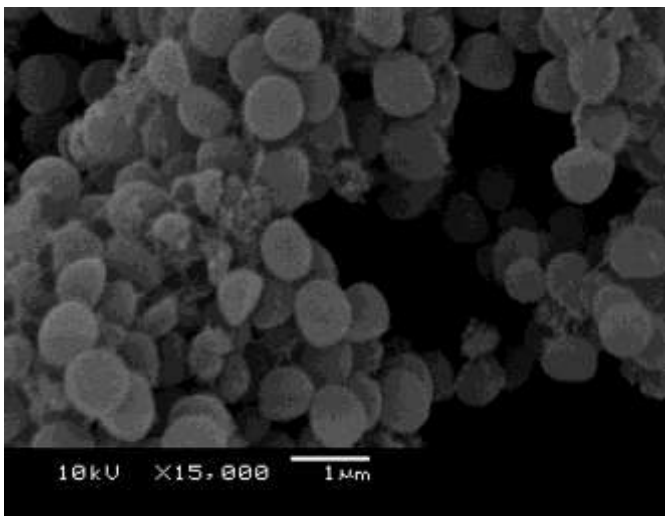
presença de pequenos agregados bacterianos ou células individuais sobre a superfície (**Figura 22d e 22e**).



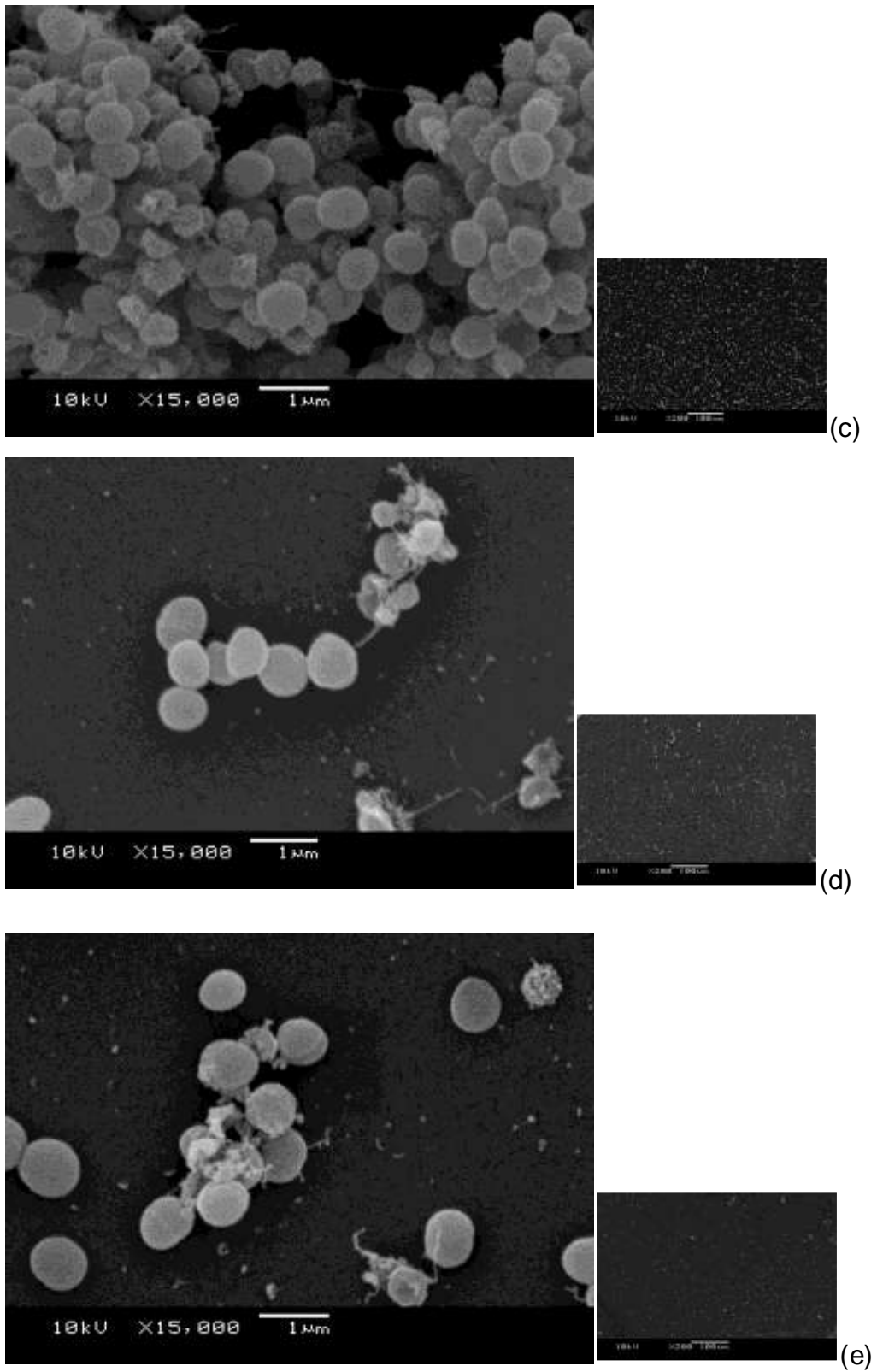
**Figura 21.** Avaliação da formação de biofilme e crescimento de *S. epidermidis* ATCC 35984. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio de três ensaios independentes. \* diferença significativa comparada a amostra sem tratamento considerando um  $P \leq 0,05$ .



(a)



(b)



**Figura 22.** Imagens da formação de biofilme de *S. epidermidis* ATCC 35984 por microscopia eletrônica de varredura frente ao tratamento com o derivado **3**, onde (a)=sem tratamento, (b)= 50  $\mu\text{g/mL}$ , (c)= 100  $\mu\text{g/mL}$ , (d)= 200  $\mu\text{g/mL}$  e (e)= 400  $\mu\text{g/mL}$ .

O aumento no número de infecções causadas por patógenos resistentes a múltiplos fármacos é considerado um dos principais problemas da medicina moderna. O descompasso entre a capacidade de desenvolver novos antibióticos e a necessidade real desses medicamentos torna a era pós-antibiótica cada vez mais próxima. Assim os resultados de inibição de biofilme obtidos neste estudo são muito interessantes e mostram-se promissores. Ao invés de focalizar em terapêuticas que têm como alvo o crescimento bacteriano, como antibióticos convencionais, uma abordagem alternativa é a busca por novos mecanismos de ação, tendo como alvos funções bacterianas essenciais para a infecção, ou seja, os fatores de virulência. <sup>[43-44]</sup>

Assim, esforços no desenvolvimento de terapias antivirulência têm como objetivo 'desarmar' o patógeno através da inibição de fatores de virulência que podem causar danos diretos ao hospedeiro, tornando mais fácil para o sistema imune deste hospedeiro libertar-se da infecção. Esta abordagem tem várias vantagens potenciais, incluindo a expansão do repertório de alvos bacterianos e podendo preservar a microbiota do hospedeiro. Uma potencial vantagem desta abordagem (embora ainda não comprovada) é que estes novos agentes antimicrobianos poderiam impor uma menor pressão seletiva, resultando assim em resistência bacteriana diminuída. Além disso, estes fármacos antivirulência poderiam potencialmente ser utilizados em combinação com agentes antimicrobianos já estabelecidos de uma forma sinérgica, para assim estender o tempo de vida destes. <sup>[43-45]</sup>

Alguns dos principais alvos das pesquisas antivirulência ou anti-infectivas são toxinas, *Quorum sensing*, biofilme, sistema envolvendo c-di-GMP, sistema de secreção tipo II e III e adesão.

## V.5.RELAÇÃO ESTRUTURA/ATIVIDADE

A formação de polimorfos, moléculas que apresentam a mesma estrutura química, porém com diferente estrutura cristalográfica, pode ser resultante na síntese de novos compostos. A importância do conhecimento do polimorfo formado se dá em função de possíveis alterações na biodisponibilidade das moléculas já que os arranjos formados podem conter características diferentes para cada repetição de síntese no laboratório. Polimorfos que apresentam maior solubilidade, por exemplo, tendem a apresentar menor estabilidade e menor ponto de fusão. <sup>[46]</sup>

A outra formação possível de uma síntese é a obtenção de uma substância na fase amorfa, onde as moléculas não apresentam arranjo com padrão de repetição ordenado. Essas substâncias amorfas também apresentam diferentes características físico-químicas, normalmente com maior solubilidade e menor estabilidade, em relação ao mesmo composto apresentado na fase cristalina.

A biodisponibilidade dos compostos pode sofrer alteração conforme as propriedades físico-químicas dos polimorfos estando, dessa forma, em formas mais ou menos estáveis. Sendo assim necessário o conhecimento de qual polimorfo é mais ativo frente ao alvo biológico desejado.

É possível também que, durante o processo de cristalização de substâncias, moléculas do solvente fiquem retidas no retículo cristalino. No caso do processo das moléculas **2**, **3**, **4** e **5** ocorre um tratamento da reação com solução de HCl para finalizar a reação e formar os cristais. Desta forma, pode-se sugerir que a massa (em gramas) dos derivados **2** e **5** utilizada para realização dos ensaios biológicos não tenha sido a massa real em função de que as moléculas podem estar hidratadas, no caso destes derivados isso foi proposto devido ao termograma obtido onde, o primeiro evento em 62°C é característico da água de hidratação. O número de moléculas de água de hidratação não pode ser estabelecido pela técnica de DSC sendo necessária análise de Termogravimetria (TGA). Estes ensaios estão entre nossas

perspectivas de conclusão deste trabalho uma vez que os valores de CIM destes compostos podem ser alterados significativamente.

Para o derivado **3**, as características apresentadas pela análise térmica são de polimorfismo porém essa conclusão somente poderá ser definida após a análise por difração de Raios X dos derivados e a identificação cristalográfica dos polimorfos.

Os derivados **2** e **4** diferem apenas pelo tamanho da cadeia lateral ligada em C-3. Os resultados do ensaio de CIM demonstram que o alongamento da cadeia lateral é prejudicial para a atividade antimicrobiana.

Na análise da atividade demonstrada pelo composto **3**, podemos constatar a importância do grupo ácido na cadeia lateral. Este grupamento parece compensar a diminuição da atividade causada pela proteção da hidroxila em C-3 por ésteres. Grupamentos ácidos carboxílicos são bons doadores de ligação de hidrogênio, podendo ser esta característica responsável pela melhor atividade deste composto comparativamente aos outros derivados. Estudos subsequentes visando à elucidação do mecanismo de ação em nível molecular deste composto também fazem parte das perspectivas deste trabalho.

O grupamento ácido carboxílico extra na molécula também é responsável por alterações no ponto de vista físico-químico, especialmente na constante de dissolução e coeficiente de partição. Em um estudo preliminar *in silico* avaliando o coeficiente de partição octanol/água pelo programa ACD: Spectral data were Obtained from Advanced Chemistry Development, Inc. observou-se que, de maneira geral, estes compostos apresentam altos valores de coeficiente de partição, em torno de 8 (dados não apresentados), exceto para o composto **3** que possui Log P=9,71.

Chue e colaboradores (2011) verificaram melhores atividades antibacterianas frente a derivados do AB com substituintes em C-28 com piperazinas halogenadas, porém não observamos atividade promissora no derivado **5** que possui dois átomos de cloros na cadeia substituída em C-3 nos ensaios realizados neste estudo. Para o derivado **5** foi observada atividade

apenas para a cepa de *S. epidermidis* e somente na concentração mais alta testada sendo esta bacteriostática.

O derivado **6** foi projetado racionalmente visando atividade antimalárica pelo nosso grupo. Sabendo da existência de uma relação entre fármacos com atividade antimalárica e antibacteriana, o grupo das quinolonas é um exemplo de fármaco utilizado no tratamento de malária e muito eficiente como antibacteriano decidimos testar a atividade antibacteriana. Os resultados para esta molécula foram promissores demonstrando que para o *S. aureus* demonstrou-se bactericida na concentração de 128 µg/mL e para o *S. epidermidis* e *P. mirabilis* apresentou-se bacteriostático na concentração de 64 µg/mL demonstrando que o grupamento piperazínico presente no C-28 desta molécula é importante para atividade antibacteriana, já que o ácido ursólico acetilado no C-3 não revelou resultados inibitórios frente às cepas testadas neste estudo.<sup>[7-46]</sup>





## VI. CONCLUSÃO

---

O presente trabalho demonstrou sucesso na extração bem como no processo de purificação do ácido ursólico (AU) a partir de resíduos de *Mallus domestica* obtendo bons rendimentos.

Os experimentos de síntese foram bem sucedidos e o planejamento racional das moléculas produzidas foi de sucesso, tendo em vista os resultados alcançados tanto nos testes de atividade antibacteriana (CIM e CBM) quanto nos ensaio de atividade antibiofilme.

Foi possível obter dois compostos com importante atividade antibacteriana. Os compostos **3** (ácido 3-O-succinilursólico) e **6** N-{3-[4-(3-aminopropil)piperazinil]propil}-3-O-acetilursolamida) foram os ativos frente a cepas selvagens de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. mirabilis*.

Não houve inibição das cepas ATCCs de *P. aeruginosa*, *E. coli*, *A. baumannii*, *S. tiphymurium* com nenhum dos compostos testados.

Foi obtido um composto com atividade antibiofilme frente a *S. epidermidis*: o composto **3** (ácido 3-O-succinilursólico).

A análise de DSC mostrou-se eficiente para identificar o ponto de fusão dos compostos **2**, **3**, **4** e **5**. Através dos resultados, pode-se sugerir a presença de fase amorfa para os compostos **4** e **5**, de polimorfismo nos compostos **2** e **3**, e, presença de água de cristalização para os compostos **2** e **5**.

A MEV foi eficiente para caracterizar morfológicamente as partículas. **2**, **4** e **5** apresentaram hábito cristalino prismático tabular e o composto **3** mostrou tendência em formar cristal placóide pontiagudo. Todas as amostras demonstraram heterogeneidade do tamanho de partícula.

## **VII. PERSPECTIVAS**

---

Este trabalho tem como perspectivas:

- A realização de testes para verificar mecanismos de ação das moléculas ativas;
- Realização de ensaios de sinergismo de todos os derivados triterpênicos que constam nesta dissertação frente a cepas resistentes utilizando fármacos antibacterianos conhecidos na clínica médica;
- Verificar citotoxicidade de todos os compostos frente a células sadias;
- Promover novas alterações na estrutura dos compostos visando aumentar a atividade antibacteriana, realizando substituições no C-28.
- Realizar análise por DRX para complementação da análise estrutural e cristalográfica.

## VIII. REFERÊNCIAS

---

[1] GONZALES, A.; LÓPEZ, C.; SANTANA, O.; REINA, M.; FRAGA, B. M. Triterpene-based plant defenses. *Phytochemistry*, v.10, p. 245-260, 2010.

[2] KUREK, A.; NADKOWSKA, P.; PLISKA, S.; WOLSKA, K. I. Modulation of antibiotic resistance in bacterial pathogens by oleanolic acid and ursolic acid. *Phytomedicine*, v.19, p. 515-519, 2012.

[3] VOETSCH, A. C.; GILDER, T. J.; ANGULO, F. J.; FARLEY, M. M.; SHALLOW, S.; MARCUS, R.; CIESLAK, P. R.; DENEEN, V. C.; TAUXE, R. V. FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. *CID*, v. 38, p. 127-134, 2004.

[4] LUS, R. G.; Evolution of bacterial resistance to antibiotics during the last three decades. *International Microbiology*, v.1, p. 279-284, 1998.

[5] SANTOS, N. Q.; A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. *Texto e Contexto Enfermagem*, v.13, p. 64-70, 2004.

[6] Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA  
[http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/busca!ut/p/c5/jZDJboNADla fhQelxqFhKEcyLMMSIhTCckEQAKUQoCVqRzx9QOo1qPbJ-vXZ8odStHSf\\_zR1\\_miGPu9QjFKcWT41dABecoN3BYxDcKaSRVxtv1\\_yBGfwo mRYaaLL9CDay4yPBAXdcLDguwDuH\\_0y5\\_9ze2P7Nm2itO6GYvkvUq4tUwa5 VITIPM1H6GjBm-6gN6pJCv-UeLZw8t7aqpRYIIoDkRNghZdO9az4bHcZfe2760mFx6aPXF7KvmYlz5CWpYX9gtOGcBjZ0-qY8kdte0r83CRfdKQQ9Hqe9vAmm\\_4dehvw6HxHobxfGsrmeOeNybe4g!/?1dmy&urile=wcm%3apath%3a//Anvisa%20Portal/Anvisa/Sala%20de%20Imprensa/Assunto%20de%20Interesse/Noticias/Indicadores%20tracam%20panorama%20da%20resistencia%20no%20Brasil](http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/busca!ut/p/c5/jZDJboNADla fhQelxqFhKEcyLMMSIhTCckEQAKUQoCVqRzx9QOo1qPbJ-vXZ8odStHSf_zR1_miGPu9QjFKcWT41dABecoN3BYxDcKaSRVxtv1_yBGfwo mRYaaLL9CDay4yPBAXdcLDguwDuH_0y5_9ze2P7Nm2itO6GYvkvUq4tUwa5 VITIPM1H6GjBm-6gN6pJCv-UeLZw8t7aqpRYIIoDkRNghZdO9az4bHcZfe2760mFx6aPXF7KvmYlz5CWpYX9gtOGcBjZ0-qY8kdte0r83CRfdKQQ9Hqe9vAmm_4dehvw6HxHobxfGsrmeOeNybe4g!/?1dmy&urile=wcm%3apath%3a//Anvisa%20Portal/Anvisa/Sala%20de%20Imprensa/Assunto%20de%20Interesse/Noticias/Indicadores%20tracam%20panorama%20da%20resistencia%20no%20Brasil) ( acesso em 21/01/2013)

[7]GNOATTO, S. C. B.; SUSPLUGAS, S.; VECHIA, L. D.; FERREIRA, T. B.; DASSONVILLE-KLIMPT, A.; ZIMMER, K. R.; DEMAILLY, C.; NASCIMENTO, S.; GUILLON, J.; GRELLIER, P.; VERLI, H.; GOSMANN, G.; SONNET, P. Pharmacomodulation on the 3-acetylursolic acid skeleton: Design, synthesis, and biological evaluation of novel n-{3-[4-3-aminopropyl]piperazinyl}propyl}-3-O-acetylursolamide derivatives as antimalarial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.16, p. 771-782, 2008.

[8] CALLAWAY, T. R.; CARR, M. A.; EDRINGTON, T. S.; ANDERSON, R. C.; NISBET, D. J. Diet, *Escherichia coli*O157:H7, and cattle: A review after 10 years. *Current Issues in Molecular Biology*, v. 11, p. 67-80, 2009.

[9]PAYNE, D. J.; GWYNN, M. N.; HOLMES, D. J.; POMPLIANO, D. L. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial Discovery. *Nature Reviews/Drug Discovery*, v.6, p. 27-39, 2007.

[10]CHAMBERS, H. F.; DeLEO, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus* in the antibiotic era. *Nature Review Microbiology*, v. 7, p.629-641, 2009.

[11]ROLO, J.; MIRAGAIA, M.; TURLEJ-ROGACKA, AGATA; EMPEL, J.; BOUCHAMI, O.; FARIA, N. A.; TAVARES, A.; HRYNIEWICZ, W.; FLUIT, A. C.; LENCRASTE, H. High genetic diversity among community-associated *Staphylococcus aureus* in Europe: Results from a multicenter study. *Plos One*, v. 7(4), e34768, 2012.

[12]ESTRELA, A. B.; HECK, M. G.; ABRAHAM, W-R. Novel approaches to control biofilm infections. *Current Medicinal Chemistry*, v. 16, p. 1512-1530, 2009.

[13] ARMBRUSTER, C. E.; MOBLEY, H. L. T. Merging mytology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. *Nature Review Microbiology*, v. 10, p. 743-754, 2012.

[14] SANTOS, C. A. L.; CAMPOS JR., F. F.; PIZZOLITTO, A. C.; PIZZOLITTO, E. L.; Formação de biofilme cristalino de *Proteus mirabilis* em cateter urológico. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*, v.26, N.2, p.91-98, 2010.

[15] LEVIN, A. S.; LEVY, C. E.; MANRIQUE, A. E., MEDEIROS, E. A. S.; COSTA, S. F. Severe nosocomial infections with imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* treated with ampicilin/sulbactam. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.21, p. 58-62, 2003.

[16] HÉRITIER, C.; POIREL, L.; FOURNIER, P.,-E; CLAVERIE, J.-M.; ROULT, D.; NORDMANN, P. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agentes and Chemotheraty*, v.49, No. 10, p. 4174-4179, 2006.

[17] FERNÁNDEZ, L.; GOODERHAM, J.; BAINS, M.; McPHEE, J. B.; WIEGAND, I.; HANCOCK, R. E. W. Adaptative resistance to the “Last Hope” antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54, No. 8, p. 3372-3382, 2010.

[18] HENNEBRY, S. C.; SAIT, L. C.; MANTENA, R.; HUMPHREY, T. J.; YANG, J.; SCOTT, T.; KUPZ, A.; RICHARDSON, S. J.; STRUGNELL, R. A. Salmonella typhimurium’s transthyretin-like protein is a host-specific factor important in fecal survival in chickens. *Plosone*, v.7,p. e46675, 2012.



[19] WOLSKA, K.I.; GRUDNIAK, A.M.; FIECEK, B.; KRACZKIEWICZ-DOWJAT, A.; KUREK, A. Antibacterial activity of oleanolic and ursolic acids and their derivatives. *Central European Journal of Biology*, v.5(5), p. 543-553, 2010.

[20] HORIUCHI, K.; SHIOTA, S.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; KURODA, T.; TSUCHICA, T. Antimicrobial activity of oleanolic acid from *salvia officinalis* and related compounds on Vancomycin-resistant Enterococci (VRE). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v.30(6), p. 1147-1149, 2007.

[21] CHANDRAMU, C.; MANOHAR, R. D. ; KRUPADANAM, D. G. L.; DASHAVANTHA, R. V. Isolation, characterization and biological activity of betulinic acid and ursolic acid from *Vitex negundo L.* *Phytotherapy Research*, v.17, p. 129-134, 2003.

[22] FONTANAY, S.; GRARE, M.; MAYER, J.; FINANCE, C.; DUVAL, R. E. Ursolic, oleanolic and betulinic acids: Antibacterial spectra and selectivity indexes. *Journal of Ethnopharmacology*, v.120, p. 272-276, 2008.

[23] KIM, M. J.; KIM, C. S.; PARK, J.-Y.; LIM, Y. K.; PARK, S.-N.; AHN, S.-J.; JIN, D.-C.; KIM, T. H.; KOOK, J. K. Antimicrobial effects of ursolic acid against mutans Streptococci isolated from Koreans. *International Journal of Oral Biology*, v.36, No 1, p.7-11, 2011.

[24] HICHRI, F.; JANNET, H. B.; CHERIAA, J.; JEGHAM, S.; MIGHRI, Z. Antibacterial activities of a few prepared derivatives of oleanolic acid and of other natural triterpenic compounds. *Comptes Rendus Chimie*, v.6, p. 473-483, 2003.

[25] DAVID, J. P.; FERRARI, J., DAVID, J. M.; GUIMARÃES, A. G.; LIMA, F. W. M.; SOUZA, G. L. S. New triterpenes and antibacterial labdenoic acid derivatives from *Moldenhawera nutans*. *Journal Brazilian Society Chemistry*, v.18, No. 8, p. 1585-1589, 2007.

[26] CHUE, K.-T. ; CHANG, M.-S. ; TEN, L. N. ; Synthesis and antibacterial activity of betulinic acid amides with piperazine derivatives. *Chemistry of Natural Compounds*, v.47, No. 5, 2011.

[27] GHOSH, P.; CHAKRABORTY, P. ; BASAK, G. ; Antibacterial, antifungal and phytotoxic screening of some prepared derivatives of triterpenoids in comparison to their respective bromo-keto precursors. *Pelagia Research Library*, v.2(4) p.1-8, 2011.

[28] CUNHA, W. R.; MATOS, G. X.; SOUZA, M. G. M.; TOZATTI, M. G.; ANDRADE ESILVA, M.; MARTINS, C. H. G.; SILVA, R.; DA SILVA FILHO, A. A. Evaluation of the antibacterial activity of the methylene chloride extract of *Miconia ligustroides*, isolated triterpene acid, and ursolic acid derivatives. *Pharmaceutical Biology*, v.48(2), p.166-169, 2010.

[29] ZIMMER, K, R.; MACEDO, A. J.; GIORDANI, R.B., CONCEIÇÃO, J. M.; NICASTRO, G. G.; BOECHAT, A. L.; BALDINI, R.L.; ABRAHAM, W-R.; TERMIGNONI, C. A steroid molecule present in the egg wax of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inhibits bacterial biofilms. Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Lt. ,2013.

[30]KONG, K. W.; ISMAIL, A. Lycopene content and lipophilic antioxidant capacity of by-products from *Psidiumguajava* fruits produced during puree production industry. *Food an Bioproducts Precessing*, v. 89, p. 53-61, 2011.

[31]MA, C-M; CAI, S-Q.; CUI, J-R.; WANG, R-Q.; TU, P-F.; HATTORI, M.; DANESHTALAB, M. The cytooxic activity of ursolic acid derivatives. *European Medicinal Chemistry*, v.40, p. 582-589, 2005.

[32]GNOATTO, S.C. B.; VECHIA, L. D.; LENCINA, C. L.; DASSONVILLE-KLIMPT, A.; NASCIMENTO, S.; MOSSALAYI, D.; GUILLON, J.; GOSMANN, G.; SONNET, P. Synthesis and preliminary evaluation of new ursolic and oleanolic acids derivatives as antileishmanial agents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v.23(5), p.604-610, 2008.

[33]INNOCENTE, A. M.; SILVA, G. N. S.; CRUZ, L. N.; MORAES, M. S.; NAKABASHI, M.; SONNET, P.; GOSMANN, G.; GARCIA, C. R. S.; GNOATTO, S. C. B. Synthesis and antiplasmodial activity of betulinic acid and ursolic acid analogues. *Molecules*, v. 17, p. 12003-12014, 2012.

[34]QI, S.; AVALLE, P.; SAKLATVALA, R.; CRAIG, DMQ. An investigation into the effects of thermal history on the crystallization behaviour of amorphous paracetamol. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 69, p. 364-371, 2008.

[35]SAKATA, Y.; SHIRAI, S.; OTSUKA, M. Characterization of dehydration behavior of untreated and pulverized creatine monohydrate powders. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. v. 35, p.185-191, 2004.

[36] WADKE, D.A.; SERAJUDDIN, A.T.M.; JACOBSON, H. Preformulation Testing. In: LIEBERMAN, H.A.; LACHMAN, L.; SCHWARTZ, J.B. *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*. v.1, 2 ed. New York: Marcel Dekker, 1990, p. 1-69.

[37] BUCKTON, G.; Propriedades do Estado Sólido. In: MICHAEL E. AULTON *Delineamento de Formas Farmacêuticas*. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 152-156.

[38] COSTANTINO, H.R.; CURLEY, J.G.; WU, S.; HSU, C.C. Water sorption behavior of lyophilized protein–sugar systems and implications for solid-state interactions. *International Journal of Pharmaceutics*.v.166, p.211–221, 1998.

[39] VIPPAGUNTA, S.R.; BRITAIN, H.G.; GRANT, J.W. Crystalline solids. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 48, p. 3-26, 2001.

[40] ALTONEN, J.; ALLESØ, M.; MIRZA, S.; KORADIA, V.; GORDON, K.C.; RANTANEN, J. Solid form screening – A review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 71, p. 23-37, 2009.

[41] BLAGDEN, N.; de MATAS, M.; GAVAN, P.T.; YORK, P. Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, p. 617-630, 2007.

[42] KAISER, T. D. L.; PEREIRA, E. M.; SANTOS, K. R. N.; MACIEL, E. L. N.; SCHUENCK, R. P., NUNES, A. P. F. Modification of the congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. *Diagnostic Microbiology and Infections Disease*, 2013.

[43] CLATWORTHY, A.E.; PIERSON, E. & HUNG, D.T. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature Chemical Biology*, 3: 541-548, 2007.

[44] WILLIAMS, K.J. & BAX, R.P. Challenges in developing new antibacterial drugs. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 10: 157-163, 2009.

[45] RASKO, D.A. & SPERANDIO, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nature Reviews Drugs Discovery*, 9: 117-128, 2010.

[46] PUKRITTAYAKAMEE, S.; IMWONG, M.; LOOAREESUWAN, S.; WHITE, N. J. Therapeutic responses to antimalarial and antibacterial drugs in vivax malaria. *Acta Tropica*, v. 89, p. 351-356, 2004.