

ESTUDO DAS RELAÇÕES ENTRE ESTRUTURA E ATIVIDADE DE PARABENOS: UMA AULA PRÁTICA

João Paulo dos Santos Fernandes*, Giovanna Savino e André Cortinas Gonçalves Amarante

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Presbiteriana Mackenzie, R. Consolação, 930, 01302-907 São Paulo – SP, Brasil

Milena Rodrigues de Sousa e Geane Ramos da Silva

Universidade Camilo Castelo Branco, R. Carolina Fonseca, 584, 08230-030 São Paulo – SP, Brasil

Maria Eliza Cianciulli

Universidade do Grande ABC, Av. Industrial, 3330, 09080-501 Santo André – SP, Brasil

Michelle Fidelis Corrêa e Márcio Ferrarini

Centro Universitário São Camilo, Av. Nazaré, 1501, 04263-100 São Paulo – SP, Brasil

Recebido em 12/6/12; aceito em 7/12/12; publicado na web em 12/3/13

STUDY OF THE STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS OF PARABENS: A PRACTICAL CLASS. Parabens are *p*-hydroxybenzoic acid esters widely used as preservatives. With the aim of teaching the structure-activity relationships (SAR) knowledge in a practical form, this paper proposed a practical class to view the SAR of parabens as antimicrobial agents. Methyl, ethyl, *n*-propyl, isopropyl and isopentyl paraben compounds were synthesized and their respective antimicrobial activities were assessed through determination of minimum inhibitory concentrations (MIC) against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922 stains. With the MIC values, it was possible to verify their correlation with calculated lipophilicity (ClogP). This method can be applied in practical Medicinal Chemistry classes.

Keywords: parabens; drug synthesis; SAR.

INTRODUÇÃO

Os conservantes são usados em muitos cosméticos para aumentar a vida útil dos produtos, impedindo o desenvolvimento de microrganismos que podem causar doenças ou, simplesmente, prejudicar o bom aspecto do produto final. Um conservante ideal deve ser efetivo em uma concentração baixa e não tóxica; apresentar boa solubilidade em água; compatibilidade com outros excipientes; não ter características organolépticas adequadas; apresentar um amplo espectro de atividade para bactérias e fungos; e custo razoável.¹

Dentre os conservantes mais utilizados em formulações farmacêuticas e cosméticas, destacam-se os parabens. Parabens são ésteres do ácido *p*-hidroxibenzoico que apresentam características como amplo espectro de atividade, boa solubilidade em água e são incolores, inodoros e insípidos.^{1,2} Sabe-se que a atividade antimicrobiana desses compostos aumenta com o aumento da cadeia carbônica do substituinte do éster, entretanto sua solubilidade em água decresce proporcionalmente.³ São mais ativos contra fungos do que contra bactérias.¹ Entre os parabens mais utilizados como conservantes, estão o metilparabeno (1) e o propilparabeno (3) (Figura 1).

O mecanismo de ação antimicrobiana dos parabens é desconhecido, porém bastante complexo. Propõe-se que os parabens apresentem ação sobre a síntese de DNA e RNA,⁴ sobre enzimas-chave como ATPases e fosfotransferases⁵ ou, ainda, sobre os mecanismos de transporte pelas membranas.⁶

O estudo das relações entre estrutura química e atividade biológica (REA) de moléculas bioativas é uma prática muito comum em Química Farmacêutica Medicinal. Os primeiros estudos deste tipo foram feitos por Crum-Brown e Fraser em 1869,⁷ quando demonstraram que compostos contendo uma amina terciária (como a estricnina, morfina, atropina e nicotina) se tornavam bloqueadores neuromusculares quando metilados e, assim, transformados nos respectivos

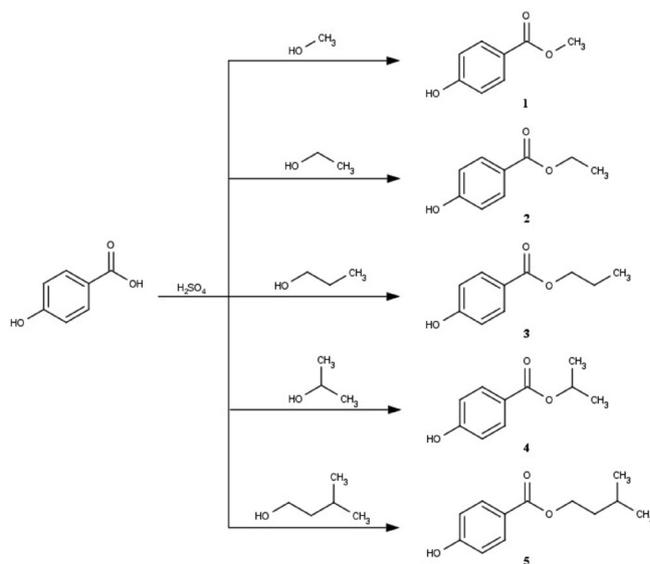


Figura 1. Esquema sintético das reações realizadas para obtenção dos parabenos 1-5

quaternários de amônio. Desta forma, concluíram (mesmo que de maneira precipitada) que o grupo amônio quaternário era necessário para a atividade bloqueadora neuromuscular.⁸ A partir de então, a exploração de grupos funcionais em moléculas biologicamente ativas tornou-se uma prática comum entre os químicos medicinais.

O objetivo principal de estudar as REA é determinar que partes da molécula são importantes para a atividade biológica, e como a natureza dessas partes pode influenciar na mesma. Isto é feito sintetizando uma série de compostos análogos, que variam de acordo com pequenas diferenças da molécula protótipo, e avaliando a atividade desses compostos. Se a alteração ou retirada de um determinado grupo da molécula protótipo gera uma atividade baixa ou nula, conclui-se

*e-mail: joao.fernandes@mackenzie.br

que o grupo é importante para a mesma. Por outro lado, se a atividade permanece inalterada ou modifica muito pouco, é porque tal grupo não tem grande influência.⁸

Na prática acadêmica, transmitir a importância do estudo das REA a alunos é uma tarefa às vezes não muito fácil. Muitas vezes os alunos compreendem o significado de tais “regras”, porém, não conseguem facilmente vislumbrar como são determinadas na prática. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi propor uma aula prática para a disciplina de Química Farmacêutica que demonstre todas as etapas do desenvolvimento de uma molécula bioativa, como a síntese, determinação estrutural e avaliação da atividade antimicrobiana e determinação das REA.

PARTE EXPERIMENTAL

Todos os materiais de partida utilizados na síntese foram obtidos comercialmente em pureza adequada para tal. O ponto de fusão dos produtos obtidos foi medido no aparelho de ponto de fusão capilar Spencer Scientific modelo PFM II. Os espectros de RMN-¹H foram obtidos em equipamento Bruker modelo DPX-300, operando a 300 MHz, com tetrametilsilano como referência e utilizando CDCl₃ como solvente; os deslocamentos químicos foram determinados em ppm e as constantes de acoplamento em Hz.

Procedimento geral para a síntese de parabenos

Em um balão de fundo redondo equipado com condensador de refluxo e aquecimento com agitação magnética, foram adicionados 10 mmol de ácido 4-hidróxibenzoico em 15 mL do álcool apropriado (ou em 15 mL de diclorometano, com quantidades estequiométricas do álcool isopentílico na síntese do isopentilparabeno). A seguir, 0,5 mL de ácido sulfúrico concentrado foram adicionados e a solução foi deixada em refluxo por 1 h. Ao final, a solução foi neutralizada com solução de Na₂CO₃ (até pH 8-9) e o produto precipitado foi filtrado, lavado com água destilada e seco em dessecador. Os esquemas das reações são mostrados na Figura 1.

Metilparabeno (1)

Sólido branco. p.f. 126-129 °C. RMN-¹H (CDCl₃, δ = ppm, 300 MHz): 3,87 (s, 3H, CH₃), 6,86 (d, 2H, J = 8,7 Hz, H-3/5), 7,24 (s, 1H, OH), 7,93 (d, 2H, J = 8,7 Hz, H-2/6).

Etilparabeno (2)

Sólido branco. p.f. 113-117 °C. RMN-¹H (DMSO-d₆, δ = ppm, 300 MHz): 1,36 (t, 3H, J = 7,2 Hz, CH₃), 4,33 (q, 2H, J = 7,2 Hz, CH₂), 6,86 (d, 2H, J = 8,7 Hz, H-3/5), 7,19 (s, 1H, OH), 7,93 (d, 2H, J = 8,7 Hz, H-2/6).

Propilparabeno (3)

Sólido branco. p.f. 93-98 °C. RMN-¹H (CDCl₃, δ = ppm, 300 MHz): 1,02 (t, 3H, J = 7,2 Hz, CH₃), 1,77 (sext, 2H, J = 7,2 Hz, CH₂CH₂CH₃), 4,30 (t, 2H, J = 7,2 Hz, OCH₂), 6,88 (d, 2H, J = 8,6 Hz, H-3/5), 7,11 (s, 1H, OH), 7,93 (d, J = 8,6 Hz, H-2/6).

Isopropilparabeno (4)

Sólido branco. p.f. 85-88 °C. RMN-¹H (CDCl₃, δ = ppm, 300 MHz): 1,33 (d, 6H, J = 6,4 Hz, CH₃), 5,20 (sept, 1H, J = 6,4 Hz, CH), 6,84 (d, 2H, J = 8,6 Hz, H-3/5), 7,14 (s, 1H, OH), 7,93 (d, J = 8,6 Hz, H-2/6).

Isopentilparabeno (5)

Sólido levemente amarelado. p.f. 59-63 °C. RMN-¹H (CDCl₃, δ = ppm, 300 MHz): 0,88 (d, 6H, J = 6,3 Hz, CH₃), 1,49-2,70 (m, 3H,

CH₂CH), 4,24 (t, 2H, J = 6,6 Hz, OCH₂), 6,80 (d, J = 8,6 Hz, H-3/5), 7,09 (s, 1H, OH), 7,93 (d, J = 8,6 Hz, H-2/6).

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM contra cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922 foi determinada utilizando-se a técnica de macrodiluição em tubos, preconizada pelo Clinical Laboratories Standards Institute.⁹ Foram preparadas soluções em etanol absoluto a 100, 75 ou 50 mg/mL dos parabenos a serem testados (dependendo da solubilidade). A seguir, foram enumerados 12 tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI) estéril cada. Os tubos 11 e 12 são, respectivamente, controle negativo (contendo apenas meio de cultura) e controle positivo (contendo meio e inóculo). As diluições preparadas em cada tubo são apresentadas na Tabela 1. Os alunos devem ser estimulados a calcular as concentrações finais dos compostos em cada tubo.

O inóculo foi preparado adicionando-se uma colônia isolada do microorganismo diretamente em meio de cultura e este foi incubado a 35 °C por tempo necessário para o crescimento entre 1 e 2 x 10⁸ UFC/mL (determinado espectrofotometricamente a 625 nm como absorbância entre 0,08 e 0,13).⁹ A cada tubo foram então adicionados 30 µL do inóculo, e os tubos incubados a 35 °C por 24 h. A CIM é determinada como a menor concentração do composto capaz de inibir completamente o crescimento visível do microorganismo.

Determinação do coeficiente de partição octanol/água calculado (ClogP)

As estruturas dos parabenos obtidos foram construídas no programa MarvinBeans,¹⁰ e o ClogP determinado pelo plugin logP. O programa permite calcular o logP através dos métodos de Viswanadhan et al., Klopman et al. e da base de dados do PhysProp, e fazer uma média ponderada dos valores.¹⁰ Neste trabalho, o peso de cada metodologia seguiu as configurações padrão do programa, sendo iguais para cada metodologia de cálculo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos realizados são feitos utilizando recursos comuns de laboratórios de aula prática (com exceção do equipamento de RMN) e reagentes de baixo custo. Como a proposta tem objetivo de aula prática, o custo é um fator relevante para a viabilidade da mesma. Entretanto, cabe ressaltar que são necessários pelo menos dois laboratórios e, desta forma, os procedimentos devem ser divididos para serem realizados em dias diferentes. Em nossa experiência, dividimos a aula em quatro momentos: síntese dos compostos (realizado em laboratório de química ou outro apropriado para síntese orgânica); discussão dos espectros de RMN e determinação do ponto de fusão dos produtos (realizado em laboratório de química); determinação da atividade antimicrobiana (realizado em laboratório de microbiologia); cálculo do logP e construção do gráfico de correlação (realizado em laboratório de informática). Sugerimos a divisão da turma em 5 grupos, sendo que cada grupo trabalhará com um composto desde a síntese até a determinação da atividade antimicrobiana. Os resultados devem ser compartilhados com os outros alunos, de forma que todos os alunos da sala devem ter acesso aos resultados obtidos no último momento, quando se realiza a parte computacional do experimento.

Os parabenos sintetizados no procedimento anteriormente descrito usam como estratégia sintética a reação de esterificação de Fischer.¹¹ Tal reação baseia-se na ativação da carbonila com catalizador ácido, que favorece o ataque nucleofílico do álcool reagente. O mecanismo da reação deve ser discutido com os alunos, de forma

Tabela 1. Diluições realizadas a partir da solução-teste

	Tubos									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Solução teste (μL)	200	180	160	140	120	100	80	60	40	20

a avaliar possíveis alternativas para aumentar o rendimento sintético. Deve ser levada em conta nessa discussão a quantidade utilizada dos reagentes, bem como o custo de cada um deles e a viabilidade na etapa de purificação.¹¹ O mecanismo da esterificação de Fischer é apresentado na Figura 2. Na reação de obtenção do isopentilparabeno, pode-se discutir a importância da estequiometria na etapa de purificação, já que o álcool isopentílico apresenta alto ponto de ebulição ($\sim 131\text{ }^\circ\text{C}$) e solubilidade semelhante ao produto obtido.

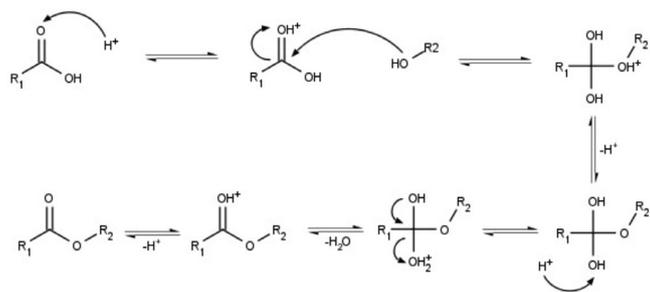


Figura 2. Mecanismo geral da esterificação de Fischer

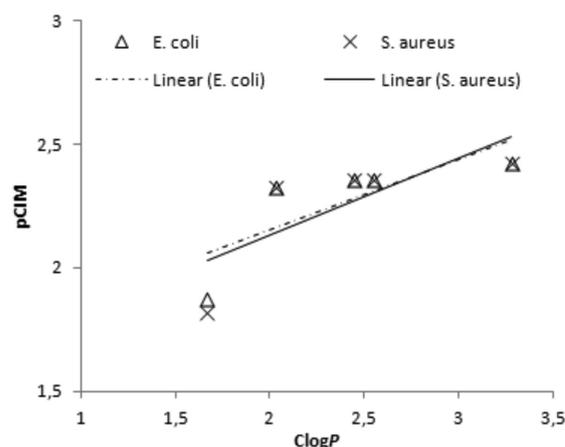
Após os procedimentos sintéticos, a provável formação do produto desejado pode ser verificada pela simples verificação do ponto de fusão e comparação com os dados da literatura.¹² Para confirmar a estrutura dos produtos, pode ser realizada uma análise de RMN- ^1H e de suas características físicas, como ponto de fusão e solubilidade. Os parabenos utilizados são moléculas simples que permitem aos alunos a fácil verificação dos sinais referentes aos prótons da cadeia lateral, bem como suas integrais, multiplicidade e acoplamentos. Esse tipo de experimento permite ao aluno vislumbrar de maneira cinestésica a utilidade da RMN para a determinação estrutural de moléculas orgânicas, bem como o desenvolvimento de conhecimento inicial sobre a interpretação de espectros de hidrogênio.

Com a estrutura dos compostos determinada, pode ser realizada a etapa de avaliação da atividade biológica. Para facilitar a determinação das REA com relação direta, a unidade de concentração da CIM foi transformada para unidade milimol/L. Diante dos resultados obtidos (Tabela 2), é possível definir algumas REA desses compostos. Como pode ser observado na Tabela 2, quanto maior a cadeia alquílica do éster, maior a atividade antimicrobiana. Esses dados corroboram as REA reportadas na literatura,^{1,2} porém, o aluno pode visualizar como é realizado o raciocínio para determinação das mesmas. Além disso, pode-se observar que os parabenos realmente são compostos de amplo espectro,¹ uma vez que têm atividade semelhante em *S. aureus* (Gram-positiva) e *E. coli* (Gram-negativa).

Tabela 2. Resultados da CIM e do ClogP para os parabenos avaliados

Composto	CIM <i>S. aureus</i> (mmol/L)	CIM <i>E. coli</i> (mmol/L)	ClogP
Metilparabeno (1)	15,18	13,34	1,67
Etilparabeno (2)	4,75	4,75	2,03
Propilparabeno (3)	4,38	4,38	2,55
Isopropilparabeno (4)	4,38	4,38	2,45
Isopentilparabeno (5)	3,79	3,79	3,28

Um dado não relatado na literatura, mas que pode ser definido através destes experimentos, é que a ramificação da cadeia alquílica não altera de maneira significativa a atividade antimicrobiana, uma vez que o propilparabeno e o isopropilparabeno apresentaram a mesma CIM, porém, ambos os compostos apresentam lipofilicidade semelhante. Diante disso, os alunos são encorajados a calcular o ClogP dos compostos e relacioná-lo com a atividade antimicrobiana. Isso pode ser feito através da construção de um simples gráfico de correlação e sua posterior visualização (Figura 3). Para manter a linearidade, os valores de CIM devem ser transformados para unidade mol/L e, a seguir, em pCIM ($-\log\text{CIM}$). O ClogP pode ser facilmente obtido através de vários programas disponíveis na internet, como o MarvinBeans,¹⁰ utilizado neste trabalho, ou outros como Molinspiration,¹³ ALOGPS¹⁴ e Osiris.¹⁵ Os dados do ClogP dos compostos são apresentados na Tabela 2. Assim, pode ser levantada uma discussão da importância do logP para a atividade biológica desses compostos.

Figura 3. Gráfico de correlação entre o ClogP e o pCIM para *S. aureus* e *E. coli* dos compostos sintetizados

CONCLUSÃO

A partir da experiência realizada com alunos de graduação, é possível concluir que o experimento apresentado é uma atividade prática e, principalmente, de baixo custo para a apresentação dos processos envolvidos no desenvolvimento de fármacos, especificamente das etapas de síntese, purificação, caracterização, determinação da atividade biológica e das REA de compostos bioativos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. M. J. Politi (IQ-USP) pela disponibilização das análises de RMN- ^1H e ao empenho dos alunos envolvidos em todas as etapas do trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Aulton, M. E.; *Delineamento de Formas Farmacêuticas*, 2ª ed., Artmed: Porto Alegre, 2005; Pinto, T. J. A.; Kaneko, T. M.; Ohara, M. T.; *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos*, 2ª ed., Atheneu: São Paulo, 2003.

2. Soni, M. G.; Burdock, G. A.; Taylor, S. L.; Greenberg, N. A.; *Food Chem. Toxicol.* **2001**, *39*, 513.
3. Fukahori, M.; Akatsu, S.; Sato, H.; Yotsuyanagi, T.; *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, *44*, 1567.
4. Nes, I. F.; Eklund, T.; *J. Appl. Bacteriol.* **1983**, *54*, 237.
5. Ma, Y.; Marquis, R. E.; *Lett. Appl. Microbiol.* **1996**, *23*, 329.
6. Freese, E.; Sheu, C. W.; Galliers, E.; *Nature* **1973**, *241*, 321; Kamaraju, K.; Sukharev, S.; *Biochemistry* **2008**, *47*, 10540.
7. Crum Brown, A.; Fraser, T.; *Trans. Roy. Soc. Edinburgh* **1869**, *25*, 693.
8. Knittel, J. J.; Zavod, R. M. Em *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*; Lemke, T.; Williams, D.A., eds.; 6th ed., Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2007, chap. 2; Patrick, G. L.; *An Introduction to Medicinal Chemistry*, 4th ed., Oxford University Press: Oxford, 2009.
9. Clinical Laboratory Standards Institute; *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, 7th ed., CLSI: Wayne, 2006.
10. Chemaxon Ltd.; MarvinBeans version 5.3, Budapeste, Hungria, 2010; Viswanadhan, V. N.; Ghose, A. K.; Revankar, G. R.; Robins, R. K.; *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1989**, *29*, 163; Klopman, G.; Li, J.; Wang, S.; Dimayuga, M.; *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1994**, *34*, 752.
11. Fischer, E.; Speier, A.; *Chemische Berichte* **1895**, *28*, 3252; March, J.; *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure*, John Wiley & Sons: New York, 1992; Solomons, T. W. G.; Fryhle, C. B.; *Química Orgânica*, LTC: Rio de Janeiro, 2009.
12. O'Neil, M. J., ed.; *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, 14th ed., Merck: New Jersey, 2006.
13. <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>, acessada em Fevereiro 2013.
14. <http://www.vcclab.org/lab/alogps/>, acessada em Fevereiro 2013.
15. <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>, acessada em Fevereiro 2013.