



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Madalena Figueiredo Cunha e Silva

**DESENVOLVIMENTO DE POTENCIAIS AGENTES
ANTIBACTERIANOS ATRAVÉS DE ESTRATÉGIAS
SINTÉTICAS SUSTENTÁVEIS**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Medicinal orientada pela Professora Doutora Maria Miguéns Pereira e coorientada pelo Doutor Rui Miguel Barroso Carrilho apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2022

Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade de Coimbra

Desenvolvimento de Potenciais Agentes Antibacterianos através de Estratégias Sintéticas Sustentáveis

Madalena Figueiredo Cunha e Silva

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Medicinal orientada
pela Professora Doutora Maria Miguéns Pereira e coorientada pelo
Doutor Rui Miguel Barroso Carrilho apresentada ao Departamento de
Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de
Coimbra.

Setembro de 2022



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Agradecimentos

A realização desta Dissertação permitiu-me, não só adquirir conhecimentos em diferentes áreas científicas, assim como crescer tanto a nível pessoal como profissional. Desta forma, gostava de expressar a minha gratidão a todos aqueles que contribuíram e permitiram tornar este percurso possível.

À minha orientadora, a Professora Doutora Mariette Pereira, os meus mais sinceros agradecimentos pela confiança e oportunidade de desenvolver este trabalho, por todo o conhecimento e sabedoria que me transmitiu, assim como por todas as trocas de ideias para superar e solucionar todos os desafios que foram aparecendo ao longo do caminho.

Ao Doutor Rui Carrilho por toda a coorientação e experiência que me transmitiu durante este ano, como toda a paciência e a disponibilidade. Muito obrigada por todo o apoio, conversas e conselhos que me forneceu, não podendo deixar de referir todas as observações dadas que me permitiram crescer enquanto pessoa e cientista.

Ao meu tutor Rafael Aroso pela valiosa ajuda e espírito crítico na interpretação dos resultados, assim como pela partilha de conhecimentos, especialmente na área da microbiologia, permitindo-me expandir os meus horizontes em diversos conceitos.

À Professora Doutora Gabriela Silva por me permitir realizar os estudos de suscetibilidade antibacteriana e de aPDT no seu laboratório, tornando esta Dissertação multidisciplinar. Aos restantes membros do laboratório por tornarem o ambiente do mais acolhedor e pela ajuda prestada.

Ao Pedro Cruz do serviço de Ressonância Magnética Nuclear do Centro de Química de Coimbra (CCC-NMR) pela colaboração na obtenção dos espetros de RMN.

Ao Doutor Fábio Schaberle, por todo o conhecimento que me transmitiu e enorme disponibilidade na explicação de conceitos de fotofísica e fotoquímica e pelo auxílio no manuseamento dos aparelhos.

Aos meus colegas do grupo de Catálise e Química Fina pelo convívio diário e ambiente de amizade que proporcionaram, assim como todos os ensinamentos e conselhos a nível académico e pessoal. Um agradecimento especial ao Doutor Fábio Rodrigues por todo o apoio e enorme disponibilidade na explicação de alguns conceitos de química de fluxo contínuo.

A todos os meus amigos pelo imenso apoio e amizade, pela motivação para continuar, pelos momentos passados, pelos conselhos e companhia. Um especial obrigado à Fénix e ao Diogo por toda a força, inspiração e energia positiva, por estarmos sempre lado a lado na vida. Sem eles, este ano não seria o mesmo.

À Quantunna e aos meus companheiros tunantes, por todas as vivências e ensinamentos, foi um gosto aprender e tocar convosco. Um agradecimento especial aos meus padrinhos e madrinhas por estarem sempre lá para mim.

Aos meus pais por todo o amor, força, compreensão, esforço e sacrifício, por todos os valores transmitidos, por sempre me apoiarem e acreditarem em mim. À minha irmã, o meu porto seguro, muito obrigada por toda a paciência e apoio constante nas horas boas e menos boas, mas também por todos os momentos únicos de vivemos juntas. Estou-vos eternamente grata.

Índice

Índice	i
Abreviaturas e símbolos	iii
Resumo	vii
Abstract	ix
Nomenclatura	xi
Capítulo 1: Introdução	1
1.1 – Resistência aos antibióticos	1
1.2 – Desenvolvimento de novos agentes antibacterianos e a importância da função aldeído/acetal	4
1.3 – Redes pro-antimicrobianas via degradação de acetais (PANDAs)	14
1.4 – Processos sintéticos de acetalização em fluxo contínuo	18
1.5 – Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT)	23
1.6 – Hipótese de trabalho	25
1.7 – Referências	27
Capítulo 2: Processos de síntese de precursores de antibacterianos em fluxo contínuo	39
2.1 – Preparação de acetais alílicos como potenciais precursores para desenvolvimento de PANDAs	39
2.1.1 – Seleção do catalisador ácido em sistemas <i>batch</i>	41
2.1.2 – Reações de acetalização em sistemas de fluxo contínuo	43
2.2 – Ensaio de suscetibilidade antibacteriana	55
2.2.1 – Método de difusão em disco	55
2.3 – Conclusões	58
2.4 – Referências	60
Capítulo 3: Síntese de fotossensibilizadores e terapia fotodinâmica antimicrobiana	63
3.1 – Síntese de fotossensibilizadores do tipo porfirina catiónica	63
3.1.1 – Síntese de trans-di-imidazolil porfirinas catiónicas	64

3.2 – Estudos fotofísicos e fotoquímicos	68
3.2.1 – Determinação dos coeficientes de absorção molar	70
3.2.2 – Determinação do rendimento quântico de oxigênio singuleto	72
3.3 – Terapia fotodinâmica antimicrobiana	75
3.4 – Terapia Dual	78
3.5 – Conclusões	81
3.6 – Referências	83
Capítulo 4: Experimental	87
4.1 – Solventes e reagentes	87
4.2 – Instrumentação e Técnicas	88
4.3 – Síntese de acetais alílicos	91
4.3.1 – Acetalização em modo <i>batch</i> /convencional	91
4.3.2 – Acetalização em modo <i>batch</i> com recurso ao aparato de Dean-Stark	91
4.3.3 – Acetalizações em fluxo contínuo	91
4.4 – Síntese de di-imidazolil porfirinas catiónicas	93
4.4.1 – Síntese da 5,15-bis(1,3-dimetilimidazol-2-il)porfirina 3.2	93
4.4.2 – Síntese da Síntese da 5,15-bis(1-metil-3-(1,1,1-trifluoropropil)imidazol-2-il)porfirina 3.3	94
4.4.3 – Síntese da 5,15-bis(1-metil-3-(3-hidroxipropil)imidazol-2-il)porfirina 3.4	94
4.5 – Ensaio de suscetibilidade antibacteriana: Método de difusão de disco	95
4.6 – Fotoinativação de bactérias planctónicas	96
4.7 – Terapia Dual	96
4.8 – Referências	97

Abreviaturas e Símbolos

ϵ	Coeficiente de absorvidade molar
λ	Comprimento de onda
δ	Desvio químico
η	Rendimento
ϕ_{Δ}	Rendimento quântico de formação de oxigênio singuleto
$\phi_{\Delta}^{\text{Ref}}$	Rendimento quântico de formação de oxigênio singuleto da referência
[] / c	Concentração
CAT.	Catalisador
A_1	Fator pré-exponencial
A_{ref}	Absorção da referência
A/Abs	Absorvância
aPDT	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (do inglês <i>Antimicrobial Photodynamic Therapy</i>)
ATCC	do inglês <i>American Type Culture Collection</i>
C_i	Conversão interna
CIP	Ciprofloxacina
CIS	Cruzamento intersistemas
dd	Duplo duplete
ddt	Duplo duplo triplete
DMF	<i>N, N</i> – Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
ESI	Ionização por <i>Electrospray</i> (do inglês <i>Electrospray Ionization</i>)
FDA	do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FID	Detetor de Ionização de Chama (do inglês <i>Flame Ionization Detector</i>)
GC	Cromatografia Gasosa (do inglês <i>Gas Chromatography</i>)
GC-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa (do inglês <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
l	Percurso ótico

I	Intensidade de luz após passar pela amostra
I_0	Intensidade de luz antes de passar pela amostra
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
LED	Díodo emissor de luz (do inglês <i>Light-Emitting Diode</i>)
m	Multiplete
Me-THF	2-Metiltetrahidrofurano
MH	Muller Hinton
MIC	Concentração mínima inibitória (do inglês <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)
MRSA	Staphylococcus aureus resistente à metilina (do inglês <i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>)
HRMS	Espectrometria de massa de alta resolução (do inglês <i>High Resolution Mass Spectrometry</i>)
$[M]^+$	ião molecular
$[M+H]^+$	ião molecular protonado
m/z	Razão massa/carga
OEs	Óleo essencial
OMS	Organização Mundial de Saúde
PANDAs	Redes poliméricas pro-antimicrobiana via degradação de acetais (Do inglês <i>Pro-antimicrobial Network via Degradable Acetals</i>)
ppm	Partes por milhão
PS	Fotossensibilizador (do inglês <i>Photosensitizer</i>)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN- ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Protão
RMN- ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN- ¹⁹ F	Ressonância Magnética Nuclear de Flúor-19
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic acid</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>)
Rv	Relaxação vibracional

S	Declive da reta que relaciona o fator pré-exponencial do decaimento do oxigênio singleto com a intensidade do laser para a amostra
s	Singleto
S ₀	Estado singleto fundamental
S ₁	Estado singleto excitado de primeira ordem
S _n	Estado singleto excitado de ordem n
S _{N2}	Substituição nucleofílica biomolecular
S _{ref}	Declive da reta que relaciona o fator pré-exponencial do decaimento do oxigênio singleto com a intensidade do laser para a referência
STY	Do inglês <i>Space time yield</i>
T	transmitância
t	Tripleto
T ₁	Estado tripleto excitado de primeira ordem
TLC	Cromatografia de Camada Fina (do inglês <i>Thin Layer Chromatography</i>)
UFC	Unidades formadoras de colônias
UV-Vis	Espectroscopia Ultravioleta-visível

Resumo

O aumento do aparecimento de casos de bactérias multirresistentes tem conduzido a uma necessidade crescente de desenvolver novas entidades químicas e/ou terapias alternativas. No âmbito do desenvolvimento de novas entidades químicas, moléculas com a função acetal podem ser incorporadas em redes pro-antimicrobianas de libertação sustentada de um agente antibacteriano com a função aldeído, integrando uma área de investigação de elevado interesse científico. Numa outra vertente, o uso de terapias alternativas como a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) têm revelado resultados promissores no tratamento de infeções localizadas. Assim, o objetivo principal do trabalho apresentado nesta Dissertação visa a síntese e avaliação biológica de compostos com potencial aplicação como agentes antibacterianos e precursores de polímeros pro-antimicrobianos de entrega e libertação gradual dos mesmos.

No Capítulo 1 é abordada a problemática da resistência aos antibióticos e os seus mecanismos associados. De seguida são apresentados diversos estudos com moléculas funcionalizadas com a função aldeído ou acetal com atividade antibacteriana descrita até à atualidade. São ainda discutidas as redes pro-antimicrobianas via degradação de acetais (PANDAs), qual o seu princípio de ação, assim como a análise dos resultados descritos na literatura. Finalmente, é apresentada uma estratégia sintética sustentável para reações de acetalização, reações estas que permitem o desenvolvimento de acetais, função estrutural presente em precursores de PANDAs.

O Capítulo 2 apresenta-se subdividido em duas principais secções: a preparação de acetais alílicos como potenciais precursores de PANDAs e ensaios de suscetibilidade antibacteriana. No que toca à síntese de acetais alílicos, primeiramente é descrita a seleção do catalisador ácido heterogéneo reutilizável e a transposição das reações de acetalização para sistemas de fluxo contínuo. O substrato modelo para esta última foi o 3-fenilpropanal **1.9**, tendo-se selecionado a resina Montmorillonite K10 como catalisador ácido. Após otimização, obteve-se conversões de 97% para um tempo de residência de 10 min. De seguida, uma vez otimizada a reação, foi estudada a sua

transposição para outros substratos, nomeadamente para o cinamaldeído **1.10** (sem conversão) e o nonanal **1.11** (97% conversão). Uma vez que a preparação dos acetais alílicos foi concebida com o propósito de desenvolver novos PANDAs, não tendo sido possível o seu desenvolvimento por limitações temporais, avaliou-se a atividade dos aldeídos que seriam libertados como agentes antibacterianos após hidrólise do acetal. Do conjunto de moléculas testadas contra *E. coli* ATCC 25922, os aldeídos **1.9** e **1.10** foram os que apresentaram os valores mais elevados de diâmetro de inibição, com um valor médio de 14 mm para uma quantidade de $7,5 \times 10^{-6}$ mol ($\approx 1 \mu\text{L}$).

O Capítulo 3 descreve-se a síntese de novos fotossensibilizadores (PS) catiónicos do tipo *trans*-di-imidazolil porfirina, cuja anfifilicidade foi modulada numa tentativa de desenvolver moléculas com estruturas e propriedades otimizadas para uso em terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT). A família de porfirinas catiónicas desenvolvida foi preparada pela cationização da 5,15-bis(1-metilimidazol-2-il)porfirina com iodometano para **3.2**, 1,1,1-trifluoro-3-iodopropano para **3.3** e 3-iodopropanol para **3.4**, obtendo-se rendimentos finais de 82%, 84% e 59%, respetivamente. Os estudos fotofísicos e fotoquímicos realizados revelaram elevadas absorvidades molares ($\log \epsilon = 3,17 - 4,73$) e rendimentos quânticos de formação de oxigénio singuleto entre 0,27 - 0,63. Posteriormente, prosseguiu-se para estudos de fotoinativação da *E. coli* ATCC 25922, utilizando diferentes concentrações de PS, para uma dose de luz de $1,36 \text{ J/cm}^2$. Para a concentração mínima estudada (100 nM), o valor de fotoinativação mais elevado ($4 \log_{10}$) foi obtido para **3.4**. De modo a potenciar o efeito bactericida da aPDT, a ação fotodinâmica deste PS (50 nM, $1,36 \text{ J/cm}^2$) foi combinada com **1.10** (1 mg/mL). Os estudos de terapia dual apresentaram-se bastante promissores, ocorrendo inativação completa ($>6 \log_{10}$) da *E. coli* nestas condições, evidenciando um relevante efeito sinérgico.

No capítulo 4 são descritas todas as técnicas e procedimentos experimentais envolvidos na síntese e caracterização dos compostos sintetizados nesta Dissertação.

Palavras-chave: Resistência aos antibióticos; Função aldeído e acetal; PANDAs; Acetalização em fluxo contínuo; Porfirinas catiónicas em aPDT

Abstract

The increasing emergence of multidrug-resistant bacteria has led to a growing need to develop new chemical entities and/or alternative therapies. Within the scope of the development of new chemical entities, molecules with the acetal function can be incorporated in pro-antimicrobial networks for sustained release of an antibacterial agent with the aldehyde function, which constitute a research area of high scientific interest. In another aspect, the use of alternative therapies such as antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) has shown promising results in the treatment of localized infections. Thus, the main objective of the work presented in this dissertation aimed at the synthesis and biological evaluation of compounds with potential application as antibacterial agents and precursors of pro-antimicrobial biopolymers for their gradual release.

Chapter 1 addresses the issue of antibiotic resistance and its associated mechanisms. Then, the several studies regarding functionalized molecules with aldehyde or acetal function with antibacterial activity reported to date are presented. Pro-antimicrobial network via degradable acetals (PANDAs) are also discussed, as well as their principle of action and the analysis of the results described in the literature. Finally, a sustainable synthetic strategy for acetalization reactions is presented, which allows the development of acetals, a structural function present in PANDA precursors.

Chapter 2 is divided into two main sections: the preparation of allylic acetals as potential precursors of PANDAs and antibacterial susceptibility assays. Regarding the synthesis of allylic acetals, the selection of the reusable heterogeneous acid catalyst and the transposition of the acetalization reactions to continuous flow systems are described. The model substrate used for the optimization of the acetalization reaction was 3-phenylpropanal **1.9** and the selected resin for the acid catalyst was Montmorillonite K10. After the optimization of this reaction, conversions of 97% were obtained for a residence time of only 10 min. Then, the acetalization reaction was transposed to other substrates, namely cinnamaldehyde **1.10** (no conversion) and nonanal **1.11** (97% conversion). Since the preparation of allylic acetals was designed

with the purpose of developing new PANDAs, although their development was not possible due to time limitations, the activity of the aldehydes that would be released as the antibacterial agent after hydrolysis of the acetal was evaluated. Among the set of aldehydes tested against *E. coli* ATCC 25922, **1.9** and **1.10** showed the highest values of inhibition diameter, with an average value of 14 mm for an amount of 7.5×10^{-6} mol (≈ 1 μ L).

Chapter 3 describes the synthesis of new cationic *trans*-di-imidazolyl porphyrin-based photosensitizers, whose amphiphilicity was modulated in attempt to develop molecules with optimized structures and properties for use in antimicrobial photodynamic therapy (aPDT). The family of cationic porphyrins developed was prepared by the cationization of 5,15-bis(1-methylimidazol-2-yl)porphyrin with iodomethane for **3.2**, 1,1,1-trifluoro-3-iodopropane for **3.3** and 3-iodopropanol for **3.4**, obtaining a final yield of 82%, 84% and 59%, respectively. The photophysical and photochemical studies performed revealed high molar absorptivities ($\log \epsilon = 3.17 - 4.73$) and quantum yields of singlet oxygen formation between 0.27 – 0.63. Subsequently, we proceeded with the photoinactivation studies of *E. coli* ATCC 25922, using different concentrations of photosensitizer, for a light dose of 1.36 J/cm². For the minimum concentration studied (100 nM), the highest photoinactivation value (4 log₁₀) was obtained for photosensitizer **3.4**. In order to potentiate the bactericidal effect of aPDT, the photodynamic action of this photosensitizer (50 nM, 1.36 J/cm²) was combined with cinnamaldehyde (1 mg/mL). These dual therapy studies were very promising, with a complete inactivation (>6 log₁₀) of *E. coli* occurring under these conditions, evidencing a relevant synergistic effect.

In Chapter 4 all the techniques and experimental procedures involved in the synthesis and structural characterization of all the compounds synthesized in this dissertation are described.

Keywords: Antibiotic resistance; Aldehyde and acetal function; PANDAs; Continuous flow acetalization; Flow chemistry; Cationic porphyrins in aPDT

Nomenclatura

Nesta Dissertação de Mestrado foram seguidas as recomendações da IUPAC para a numeração e nomeação dos compostos.

Para a designação das porfirinas utilizadas e sintetizadas, foi utilizado o sistema de numeração IUPAC,¹ que consiste na numeração de todos os átomos de carbono do macrociclo de 1 a 20 e os azotos internos de 21 a 24 (figura I). Também foi adotada a terminologia de Fischer,² que designa as posições 5, 10, 15 e 20 como *meso* e as posições 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 e 18 como posições β .

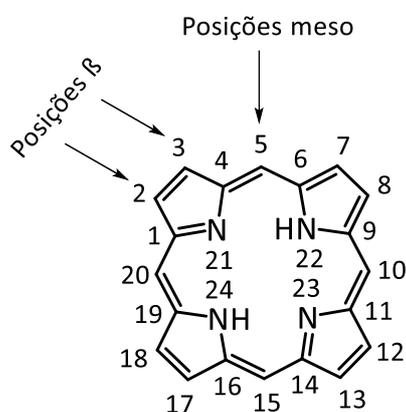


Figura I – Sistema de numeração IUPAC utilizado para porfirinas e respectivas designações segundo a terminologia de Fischer

Uma vez que as porfirinas utilizadas foram não-simétricas com dois substituintes diferentes nas posições *meso* do macrociclo (tipo A_2B_2), será adotada a designação *trans* quando estes grupos se localizam nas posições 5 e 15.

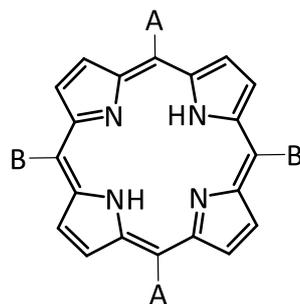


Figura II – Designação para porfirina *trans* meso-substituídas do tipo A₂B₂

[1] Moss, G. P. (1987). Nomenclature of tetrapyrroles (Recommendations 1986). *Pure and Applied Chemistry*, 59(6), 779-832.

[2] Fischer, H., & Orth, H. (1934). Die Chemie des Pyrrols, Bd. I, Akad. Verlagsges., Leipzig

Capítulo 1

Introdução

1.1. Resistência aos antibióticos

Os antibióticos são fármacos que matam ou inibem o crescimento bacteriano, ou seja, são medicamentos capazes de combater infecções causadas por bactérias. A descoberta pioneira da penicilina por Alexander Flemming, a partir do fungo *Penicillium notatum*, e a sua introdução para uso terapêutico, em 1940, representou um dos maiores avanços da medicina no século XX, impulsionando a descoberta de novas moléculas com atividade antibacteriana.¹ A maioria das classes de antibióticos, em uso clínico, foi descoberta entre 1940 e 1970, sendo estas décadas conhecidas como a “era dos antibióticos”. De uma forma geral, os mecanismos de ação dos antibacterianos focam-se nos seguintes pontos (figura 1.1): inibição do metabolismo/antimetabolitos, inibição da síntese da parede celular, inibição da síntese de proteínas e inibição da síntese ou função dos ácidos nucleicos.²

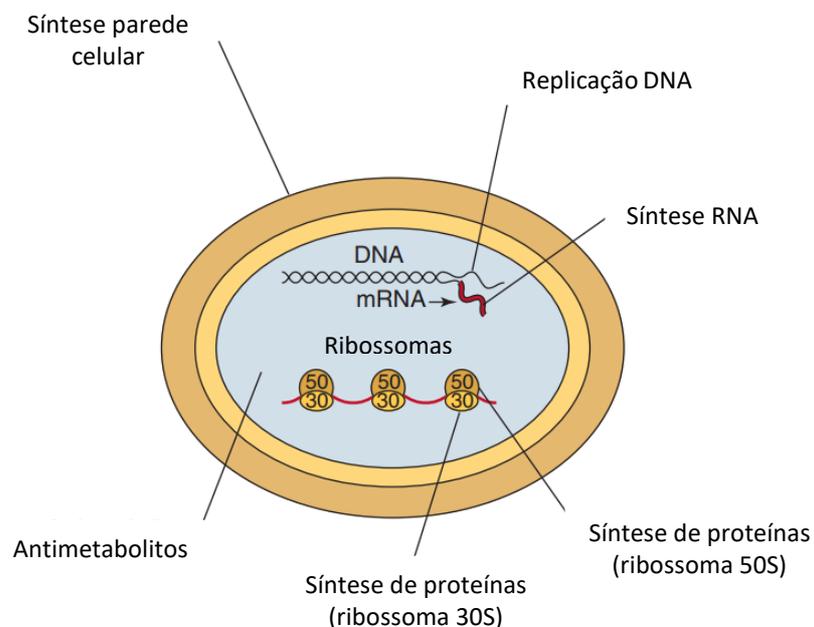


Figura 1.1 - Locais de ação dos antibacterianos; adaptado de Murray, P., Rosenthal, K., Pfaller, M. (2016). Medical Microbiology. 8th Edition, Elsevier Health Sciences.

Contudo, o uso e o abuso inadequado dos antibióticos ao longo do tempo, assim como a ocorrência de mutações genéticas conduziram ao desenvolvimento de mecanismos de resistência por parte dos microrganismos. A resistência bacteriana é definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma resistência do microrganismo a um medicamento antibacteriano que antes servia para tratar eficazmente a infecção por esse microrganismo.^{3, 4} Esta problemática apresenta uma ameaça crescente à saúde pública, morrendo cada vez mais pessoas por infecções de bactérias resistentes. Segundo dados estatísticos, estima-se que, em 2019, 4,95 milhões de mortes se tenham encontrado associadas a síndromes infecciosas causados por superbactérias, incluindo 1,27 milhões de mortes efetivamente atribuídas a infecções multirresistentes. Adicionalmente, sem antibióticos eficazes seria, por exemplo, demasiado arriscado realizar transplantes de órgãos, procedimentos cirúrgicos rotineiros e quimioterapia, intensificando o papel essencial dos antibióticos no tratamento e prevenção de doenças infecciosas e a importância do desenvolvimento de novos agentes antibacterianos eficazes e menos suscetíveis aos mecanismos de resistência.^{5, 6, 7}

Na figura 1.2, apresenta-se um gráfico representante do número global de mortes atribuídas e associadas a resistência desenvolvida por microrganismos. Na lista de microrganismos resistentes podemos encontrar bactérias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre outras, para as quais é urgente a investigação e desenvolvimento de novos agentes antibacterianos.

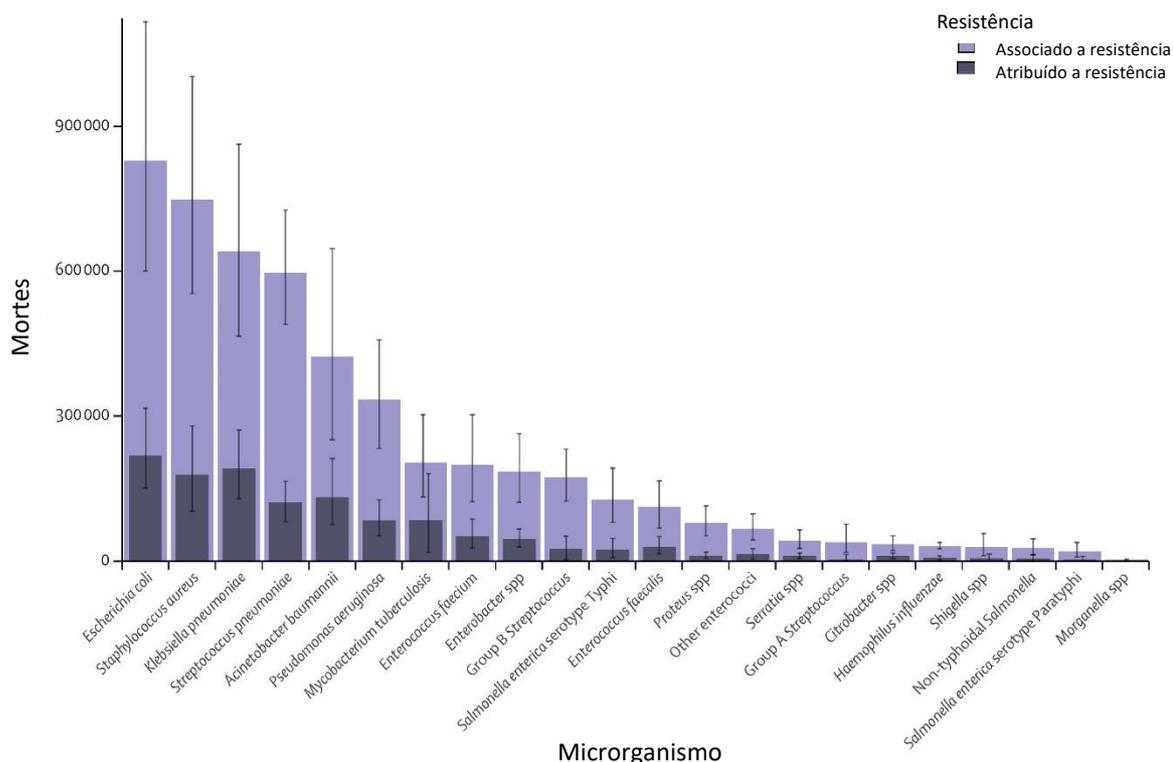


Figura 1.2 - Número global de mortes atribuídas e associadas a resistência desenvolvida por microrganismos; adaptado de Murray et al. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629-655.

A OMS tem continuamente alertado para a urgência em desenvolver tratamentos novos e eficazes, evidenciando a necessidade de diminuir a incidência da resistência bacteriana aos antibióticos. Segundo as previsões desta organização, caso não haja alterações na política atualmente seguida no consumo de antibióticos até 2050, ocorrerão cerca de 10 milhões de mortes por ano causadas por bactérias resistentes. Contudo, apesar dos apelos e esforços realizados por várias organizações e trabalhadores de saúde, farmacêuticos, investigadores e pela comunidade em geral, para a prevenção da resistência aos antibióticos, esta permanece um dos maiores desafios da atualidade e, seguramente, também do futuro.^{8,9}

Desde a descoberta da penicilina foram desenvolvidas inúmeras famílias de antibióticos, algumas das quais incluem funções estruturais aldeído e/ou acetal que desempenham um papel essencial na inibição do crescimento bacteriano. Sendo um dos objetivos fulcrais desta Dissertação de Mestrado, o desenvolvimento de processos

sustentáveis, baseados em química de fluxo, para a síntese de acetais provenientes de aldeídos como potenciais precursores/monómeros para a preparação de redes poliméricas pro-antibacterianas, via degradação de acetais (PANDAs, do inglês *Pro-Antimicrobial Network via Degradable Acetals*), apresenta-se na secção seguinte alguns dos exemplos mais relevantes de aldeídos e acetais com efeitos antibacterianos já observados.

1.2. Desenvolvimento de novos agentes antibacterianos e a importância da função aldeído/acetal

O design e projeção racional de compostos bioativos está intimamente relacionada com a sua estrutura. As propriedades físico-químicas das moléculas provem, em parte, das características hidrofóbicas e hidrofílicas dos diversos grupos funcionais, que desempenham um papel chave na atividade biológica, neste caso atividade antibacteriana, de cada composto. Vários grupos funcionais foram relatados como essenciais para a atividade antibacteriana de um conjunto variado de moléculas, destacando-se os éteres, álcoois, aldeídos, acetais e fenóis.^{10, 11}

Tal como referido anteriormente, a presença de grupos funcionais específicos desempenha um papel importante na prevenção ou retardação do crescimento bacteriano. O grupo aldeído encontra-se presente em vários materiais e moléculas, cuja atividade antibacteriana foi comprovada contra inúmeras estirpes de bactérias. Diversos estudos confirmaram que os grupos formilo da função aldeído exibem elevada atividade antibacteriana por possuírem grande versatilidade, podendo reagir com um conjunto variado de moléculas com diferentes grupos funcionais, como por exemplo proteínas e DNA bacteriano. Ao reagir com estes componentes, o funcionamento normal do DNA e das proteínas bacterianas é inibido, o que provoca lesões/danos celulares, desencadeando um conjunto de processos biológicos que conduzem à morte celular.^{10,}

¹²

Os óleos essenciais (OEs) são produtos complexos derivados de plantas ricos em compostos bioativos, como aldeídos, álcoois, compostos fenólicos e outros terpenos, sendo amplamente estudados pela sua atividade antibacteriana.¹³ Existe uma

diversidade extensa de aldeídos de ocorrência natural, cuja atividade contra diferentes espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas já foi comprovada. Estes aldeídos podem ser derivados do benzaldeído, apresentando diversos substituintes, destacando-se os grupos hidroxilo e metoxilo. Para além destes, destacam-se outros aldeídos que integram cadeias alifáticas saturadas e insaturadas.^{14, 15}

Na figura 1.3 apresenta-se a estrutura química de aldeídos de ocorrência natural, nomeadamente do 4-metoxibenzaldeído **1.1**^{14, 15}, do cuminaldeído **1.2**^{15, 16, 17}, 2-hidroxi-4-metoxibenzaldeído **1.3**¹⁸, da vanilina **1.4**¹⁹, do 2,5-dihidroxibenzaldeído **1.5**²⁰, do 2-hidro-5-metoxibenzaldeído **1.6**²⁰, do 4-hidroxibenzaldeído **1.7**²¹, do mirtenal **1.8**¹⁵, do 3-fenilpropanal **1.9**²¹, do cinamaldeído **1.10**^{15, 19, 20, 22}, do nonanal **1.11**^{23, 24, 25}, do citral **1.12**¹⁵ e do citronelal **1.13**¹⁵, que exibem alguma atividade antibacteriana contra diversas estirpes de bactérias, destacando-se as espécies *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, MRSA (do inglês, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Haemophilus influenzae*, entre outras.

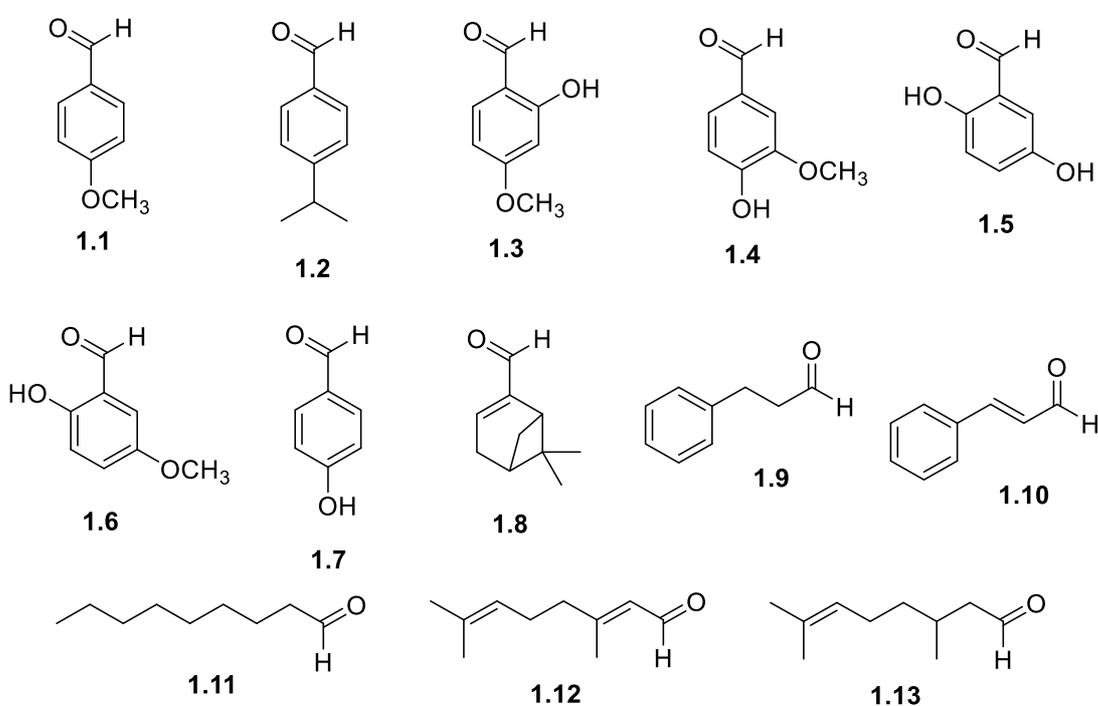


Figura 1.3 – Estrutura química de aldeídos de ocorrência natural com atividade antibacteriana significativa contra um amplo espectro de estirpes bacterianas, incluindo bactérias Gram-negativas e Gram-positivas

Os mecanismos de ação deste tipo de aldeídos ainda não se encontram completamente elucidados, porém pode ser explicado por diferentes abordagens: 1) Desnaturação ou alteração da estrutura de proteínas através da rutura de ligações de hidrogénio e/ou dissulfeto; 2) Desnaturação das proteínas presentes na membrana celular ou dissolução da bicamada lipídica; 3) Impedimento da formação da parede celular; 4) Prevenção de processos celulares como replicação, transcrição ou transdução; 5) alteração de processos metabólicos (figura 1.4).^{10, 26}

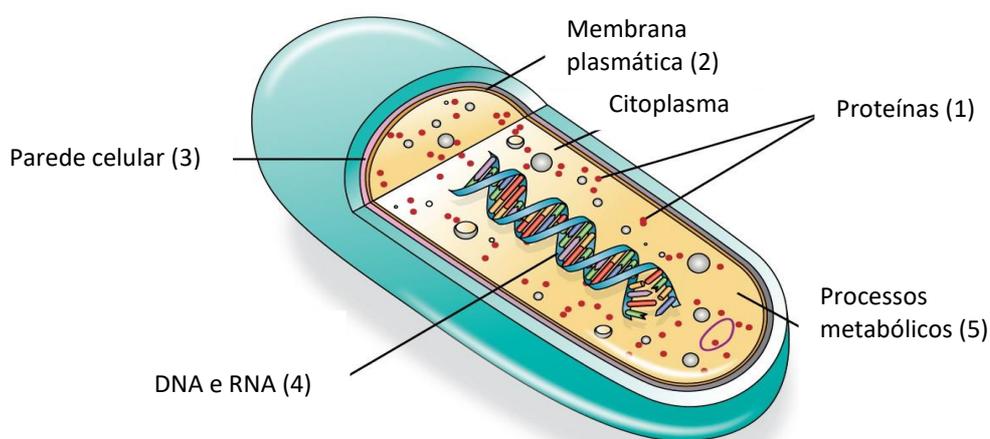
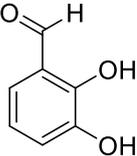
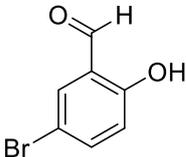
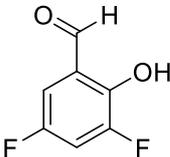
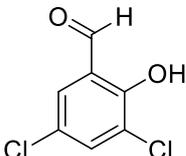
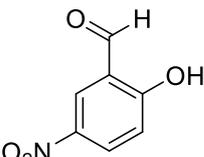


Figura 1.4 – Alvos terapêuticos das diferentes abordagens para a explicação do mecanismo de ação dos aldeídos derivados de óleos essenciais; adaptado de

<https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/mechanisms-of-antibacterial-drugs/>

Tendo por base a observada atividade antibacteriana dos aldeídos de ocorrência natural, foram projetados estudos de estrutura-atividade com derivados dos mesmos. Pelttari et al. (2007) avaliou as propriedades antimicrobianas de 2-hidroxibenzaldeídos substituídos e compostos relacionados, de modo a correlacionar o efeito dos grupos funcionais dos diferentes substituintes com a sua atividade. Neste estudo, os autores variaram o grupo funcional, o número e a posição dos substituintes no anel aromático do aldeído base, avaliando posteriormente a atividade antibacteriana do conjunto de derivados sintetizados. O efeito dos substituintes em alguns dos casos foi bastante significativo, tendo a halogenação, hidroxilação e substituição nitro produzido compostos com atividade considerável.²⁷ A título de exemplo, apresenta-se na tabela 1.1 a estrutura química e os resultados obtidos para os derivados mais promissores.

Tabela 1.1 – Estrutura química e resultados obtidos para os derivados mais promissores do 2-hidroxibenzaldeído

Entrada	Derivado	Bactéria	Diâmetro de inibição
1	<p>2,3-di-hidroxibenzaldeído</p>  <p>1.14</p>	<i>B. cereus</i>	29 mm
		<i>E. coli</i>	23 mm
		<i>P. aeruginosa</i>	15 mm
		<i>S. epidermidis</i>	26 mm
2	<p>5-bromo-2-hidroxibenzaldeído</p>  <p>1.15</p>	<i>B. cereus</i>	26 mm
		<i>E. coli</i>	32 mm
		<i>P. aeruginosa</i>	12 mm
		<i>S. epidermidis</i>	22 mm
3	<p>3,5-difluoro-2-hidroxibenzaldeído</p>  <p>1.16</p>	<i>B. cereus</i>	23 mm
		<i>E. coli</i>	21 mm
		<i>P. aeruginosa</i>	10 mm
		<i>S. epidermidis</i>	>30 mm
4	<p>3,5-dicloro-2-hidroxibenzaldeído</p>  <p>1.17</p>	<i>B. cereus</i>	29 mm
		<i>E. coli</i>	34 mm
		<i>P. aeruginosa</i>	8 mm
		<i>S. epidermidis</i>	33 mm
5	<p>2-hidroxi-5-nitrobenzaldeído</p>  <p>1.18</p>	<i>B. cereus</i>	20 mm
		<i>E. coli</i>	24 mm
		<i>P. aeruginosa</i>	8 mm
		<i>S. epidermidis</i>	49 mm

Nota: Concentração = 40 mg/mL

Como era expectável pelos dados descritos na tabela 1.1, observa-se que os diâmetros de inibição bacteriana dos diferentes derivados variam de acordo com a estirpe bacteriana, assim como o número e grupo funcional dos diversos substituintes. Os efeitos destes na atividade antibacteriana dos compostos não são facilmente previsíveis, nem podem ser extrapolados de um microrganismo para outro, tornando o desenvolvimento de novos derivados consideravelmente mais difícil.²⁴ No entanto, os estudos apresentados, tanto a nível dos aldeídos de ocorrência natural, assim como dos seus derivados sintéticos, contribui para o desenvolvimento de novas entidades químicas e suporta a sua potencial aplicação no desenvolvimento futuro de novos agentes antibacterianos.

Apesar do vasto espetro de ação antibacteriana dos aldeídos derivados de óleos essenciais, o seu uso é restrito devido à sua baixa solubilidade em água, alta volatilidade, alguma instabilidade e elevada concentração necessária para alcançar atividade antibacteriana significativa. De modo a contornar estes problemas, os aldeídos têm sido integrados como agentes antibacterianos em polímeros, como redes poliméricas pro-antimicrobianas via degradação de acetais (PANDAs). Estas redes poliméricas funcionam como pro-fármaco e visam aumentar a biodisponibilidade e eficácia antibacteriana do aldeído nela integrado pela formação de acetais, que consistem numa forma protegida de libertação lenta dos aldeídos em meio biológico.^{10, 14, 28}

No que diz respeito à função acetal, esta é bastante empregue em química orgânica com o propósito de proteger grupos carbonilo em aldeídos. Além disso, esta função estrutural também pode ser aplicada na síntese e desenvolvimento de fármacos, existindo diversos agentes terapêuticos antibacterianos já comercializados que incorporam a função acetal na sua estrutura, nomeadamente, a vancomicina **1.19**, a amicacina **1.20**, a claritromicina **1.21**, a telitromicina **1.22** e a rifampicina **1.23** (figura 1.5).^{2, 29}

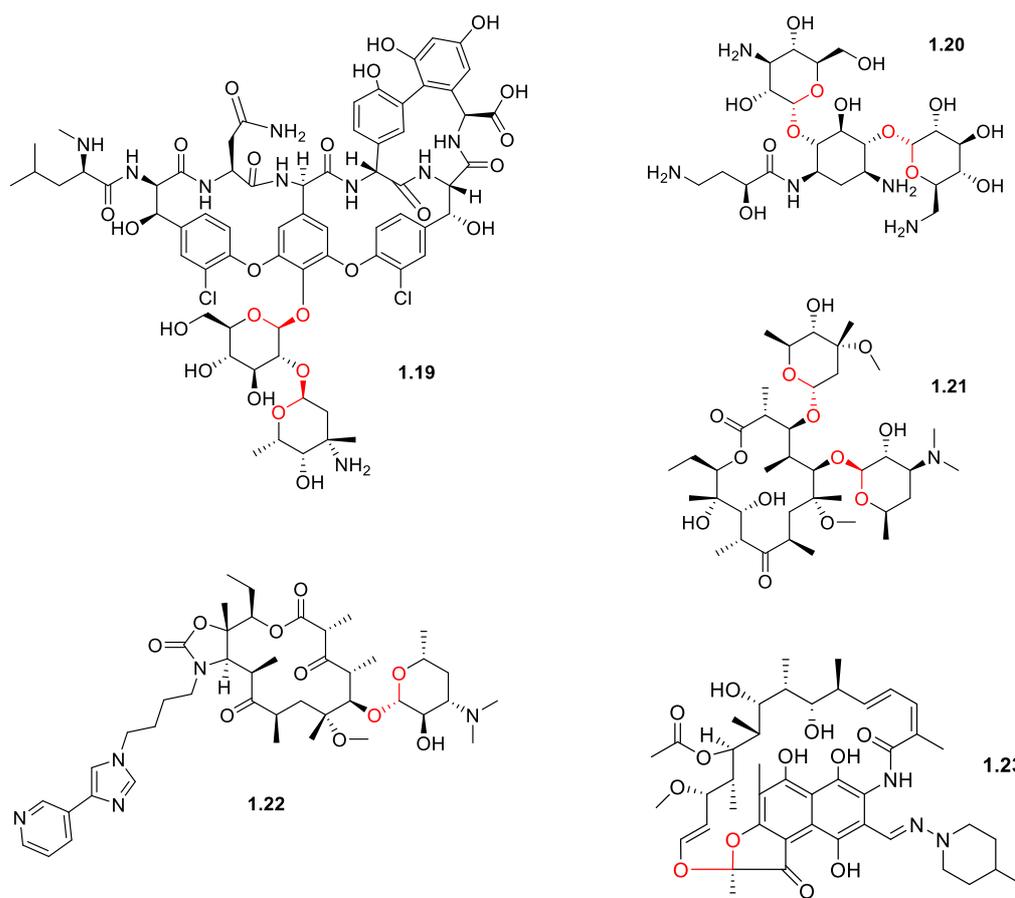


Figura 1.5 - Estrutura química da vancomicina **1.19**, da amicacina **1.20**, da claritromicina **1.21**, da telitromicina **1.22** e da rifampicina **1.23**, com ênfase à sua função estrutural acetal

Resumidamente, a vancomicina **1.19** é um glicopeptídeo complexo cuja atividade antibacteriana provém da sua capacidade de interromper a síntese de peptidoglicano, um dos principais constituintes da parede celular bacteriana.³⁰ A amicacina **1.20**, a claritromicina **1.21** e a telitromicina **1.22** são antibióticos que inibem a síntese proteica bacteriana, podendo atuar interagindo a nível da subunidade ribossômica 30S ou 50S.^{31, 32} Por fim, a rifampicina **1.23** liga-se à RNA polimerase dependente de DNA, inibindo-a, impedindo, assim, a síntese de RNA bacteriano.³³ A função acetal permite, nos primeiros quatro casos, a ligação de estruturas básicas características de cada fármaco. Por outro, no último caso, esta função fornece uma conformação macrocíclica bioativa favorável, promovendo a interação entre o composto e o seu alvo terapêutico.

Para além dos exemplos acima referidos de antibióticos aplicados em clínica que contêm na sua estrutura a função acetal, ao longo das últimas décadas tem surgido uma investigação *in vitro* intensa objetivando o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos integrando esta função estrutural. Deste modo, apresenta-se uma revisão da literatura que inclui a estrutura e os resultados de ação antibacteriana contra diferentes estirpes de bactérias de moléculas funcionalizadas com a função acetal.

Jordão *et al.* (2013) descreveu a síntese de *N,O* e *N,S*-acetais derivados da 2-amino-1,4-naftoquinona como potenciais agentes antibacterianos. A ação antibacteriana dos derivados sintetizados foi avaliada contra estirpes bacterianas hospitalares Gram-positivas (*S. aureus*, MRSA, *Oxacillin-resistant S. aureus*, *Oxacillin-resistant S. epidermidis* e *Oxacillin-resistant S. haemolyticus*) e Gram-negativas (*K. pneumonia* e *P. aeruginosa*). O derivado com atividade antibacteriana mais promissora designa-se de 2-(metoxometil)-amino-1,4-naftoquinona **1.24**, apresentando-se a sua estrutura química na figura 1.6. Este apresenta valores de diâmetros de inibição entre os 14 – 24 mm e MIC's (do inglês, *Minimum Inhibitory Concentration*) entre 8 – 16 µg/mL, não sendo praticamente ativos contra as estirpes bacterianas Gram-negativas estudadas.³⁴

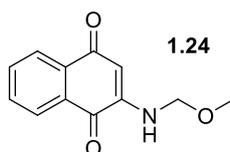


Figura 1.6 - Estrutura química do 2-(metoximetil)-amino-1,4-naftoquinona **1.24**, derivado com atividade antibacteriana mais promissora

Novais *et al.* (2020) conduziram estudos com *N,O*-acetais derivados da 2-amino-1,4-naftoquinona contra MRSA, estirpe bacteriana resistente. O derivado 2-(etoximetil)-amino-1,4-naftoquinona **1.25** (figura 1.7) apresentou os melhores valores de atividade antibacteriana, com MIC igual a 64 µg/mL. Adicionalmente, estudou-se o impacto dos derivados na formação de biofilmes de MRSA, tendo o mesmo derivado exibido um impacto significativo, reduzindo a formação do biofilme por 80%.³⁵

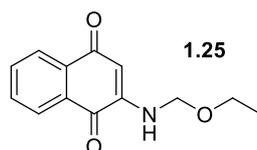


Figura 1.7- Estrutura química do 2-(etoximetil)-amino-1,4-naftoquinona **1.25**, derivado com atividade antibacteriana mais promissora

Sapozhnikoy *et al.* (2021) estudou a atividade antibacteriana de derivados de piridoxina de amónia quaternária funcionalizados com acetais cíclicos de 6 membros para o desenvolvimento de antimicrobianos suaves (do inglês, *soft antimicrobials*), isto é, substâncias que são prontamente degradadas em produtos não tóxicos e biologicamente inativos, tanto *in vivo* quanto no meio ambiente. De todos os derivados sintetizados e estudados, os derivados **1.26** e **1.27**, cujas estruturas químicas se encontram na figura 1.8, exibiram os resultados mais promissores contra as espécies de bactérias estudadas (Gram-positivas: *S. aureus*, *B. subtilis* e *M. luteus*; Gram-negativas: *E. coli* e *P. aeruginosa*). O derivado **1.26** apresentou valores de MIC entre 1 – 2 µg/mL e 4 – 32 µg/mL para as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas, respetivamente. Do mesmo género, o derivado **1.27** demonstrou valores de MIC entre os 1 – 2 µg/mL para as bactérias Gram-positivas estudadas, enquanto para as bactérias Gram-negativas os valores de MIC se encontram entre 8 – 64 µg/mL.³⁶

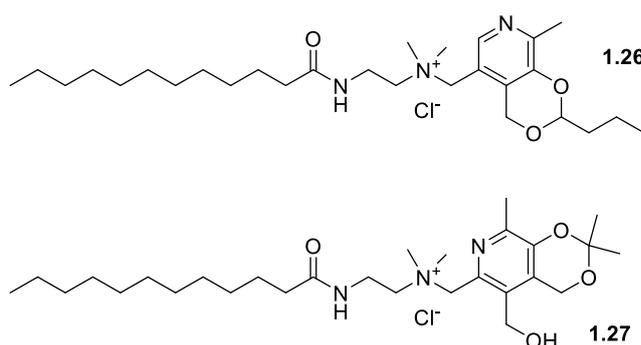


Figura 1.8 - Estrutura química dos derivados de piridoxina de amónia quaternária funcionalizados com acetais cíclicos de 6 membros

Priem *et al.* (2017) desenvolveu um estudo com análogos de Gramicidina S, um peptídeo antibacteriano, funcionalizado com acetais cíclicos de cinco membros. Apenas o análogo **1.28** (figura 1.9) mostrou atividade antibacteriana significativa contra todas as estirpes de bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. faecalis*), com valores de MIC entre os 4 – 8 µg/mL, e atividade ligeiramente reduzida contra as estirpes de bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*), com valores de MIC mais elevados, entre os 64 – 128 µg/mL. Os restantes análogos ou foram inativos ou apresentaram atividade mínima contra ambas as espécies de bactérias.³⁷

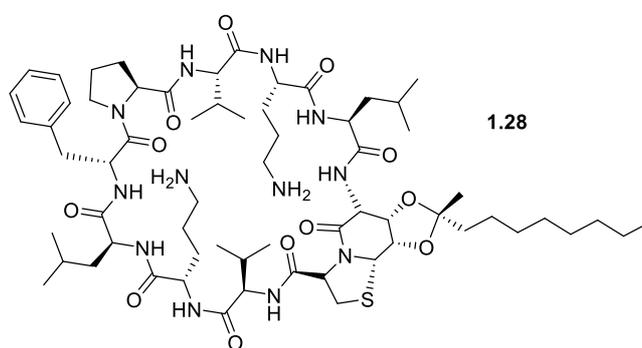


Figura 1.9 - Estrutura química do derivado da Gramicidina S **1.28**

Küçük *et al.* (2011) sintetizou derivados de 1,3-dioxolano a partir de salicilaldeído e dióis comercialmente disponíveis, formando entidades químicas funcionalizadas com acetais cíclicos de cinco membros. A maioria dos derivados exibiram atividade contra as estirpes de bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. faecalis*), tendo apenas três dos derivados demonstrado atividade contra *P. aeruginosa* (bactéria Gram-negativa). Dentro de os derivados sintetizados, o composto **1.29** apresentou os melhores resultados, com valores de MIC de 625 µg/mL para *S. epidermidis*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa* e de 312,5 µg/mL para *S. aureus*.³⁸

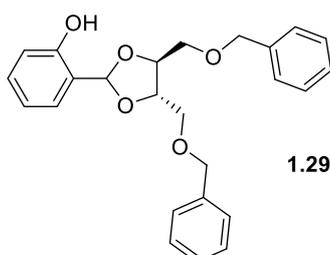


Figura 1.10 - Estrutura química do derivado do 1,3-dioxolano com melhor atividade antibacteriana

Ovsyannikova *et al.* (2013) desenvolveu um conjunto de acetais cíclicos com diferentes substituintes nas posições 2 e 4 no anel de dioxolano, sintetizados pela condensação de glicerol e etilenoglicol com diferentes aldeídos. A atividade antibacteriana dos derivados foi medida através da área de zona estéril, obtidos através dos diâmetros de inibição, contra as bactérias *E. coli* (estirpe bacteriologicamente selvagem – K12 e hospitalar) e *S. albus*. A estrutura química do derivado **1.30** que exibiu atividade antibacteriana mais promissora encontra-se na figura 1.11 tendo apresentado uma área de inibição de 804 e 1256 mm² para *E. coli* estirpe hospitalar e bacteriologicamente selvagem, respetivamente, e 865 mm² para *S. albus*.³⁹



Figura 1.11 - Estrutura química do derivado **1.30** que exibiu atividade antibacteriana mais promissora

Zahra *et al.* (2019) estudou a atividade antibacteriana de diversos derivados de 1,3-dioxolano preparados a partir de ácido L-tartárico. De um modo geral, todos os compostos apresentaram atividade antibacteriana moderada contra as diferentes bactérias testadas (*Enterobacter sp*, *V. cholerae* e *Klebsiella sp*). O derivado **1.31** foi o que apresentou os melhores resultados, tendo apresentado, para uma concentração de 1000 µg/mL, diâmetros de inibição de 29, 30 e 31 mm para as bactérias *Enterobacter sp*, *V. cholerae* e *Klebsiella sp*, respetivamente. Para concentrações mais baixas, os valores de diâmetros de inibição decrescem gradualmente com a redução da concentração.⁴⁰

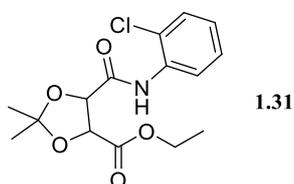


Figura 1.12 - Estrutura química do **1.31**, cuja atividade antibacteriana foi a mais promissora

Como podemos observar pelos exemplos supracitados, diversas moléculas funcionalizadas com o grupo aldeído e/ou acetal apresentam atividade antibacteriana contra diversas estirpes bacterianas. Uma vez que os estudos de atividade biológica são realizados em diferentes espécies de bactérias e sob diferentes concentrações torna-se

complicado comparar os resultados obtidos entre os trabalhos destacados. No entanto, alguns dos autores postulam que a atividade antibacteriana dos compostos pode estar correlacionada com a sua atividade antirradicalar e depender do carácter anfílico da molécula em estudo. Apesar da difícil comparação o amplo espectro de atividade antibacteriana dos compostos apresentados é vantajoso por revelar atividade biológica contra estirpes de bactérias resistentes de elevada importância médica, sugerindo um ponto de partida para o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos.

Como referido anteriormente, os acetais são uma forma protegida de aldeídos, permitindo contornar problemas relacionados com a sua solubilidade em meio biológico, biodisponibilidade, estabilidade e eficácia antibacteriana destes compostos, como referido anteriormente. Um dos mecanismos empregues para ultrapassar estas dificuldades compreende o desenvolvimento de acetais alílicos como monómeros em polímeros que permitem a libertação gradual do aldeído como agente antibacteriano, através da degradação da função acetal, os PANDAs. Na secção seguinte, apresenta-se o estado da arte do design, projeção, desenvolvimento, mecanismo de ação e potenciais aplicações de redes poliméricas pro-antimicrobianas via degradação de acetais (PANDAs).

1.3. Redes pro-antimicrobianas via degradação de acetais (PANDAs)

As redes pro-antimicrobianas via degradação de acetais (PANDAs) compreendem uma alternativa terapêutica ao uso corrente dos antibióticos, tendo ganho bastante atenção nos últimos anos. Estas redes pro-antimicrobianas permitem a entrega e libertação controlada, sustentada e continuada de um agente antimicrobiano pela degradação de ligações acetais. Estas ligações unem o agente antimicrobiano formando uma rede polimérica que se degrada sob alterações do pH, permitindo assim que o agente incorporado exerça a sua ação aquando da sua libertação.⁴¹

Os PANDAs baseiam-se na hidrólise de ligações acetais para a libertação lenta de um agente antimicrobiano. Os acetais, após clivagem, geram subprodutos (aldeídos) potencialmente ativos contra diversos microrganismos. A incorporação de aldeídos

derivados de plantas e de óleos essenciais em PANDAs tem sido alvo de investigação como uma nova plataforma de entrega de agentes antibacterianos.⁴²

Usualmente, o desenvolvimento destas redes poliméricas envolve duas etapas: 1) reação de acetalização do aldeído usado como agente antibacteriano, originando o monómero (acetal alílico) deste polímero e 2) polimerização sob irradiação UV na presença de um agente de reticulação e de um fotoiniciador. As ligações acetais que unem o agente antibacteriano sofrem hidrólise sob condições ácidas, permitindo uma libertação sustentada e controlada sob graus de acidez intermédios a neutros (figura 1.13).

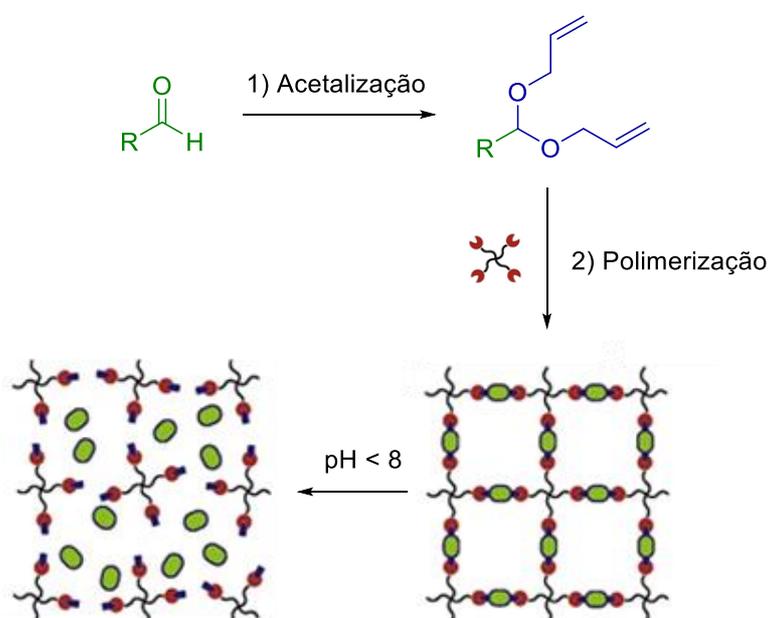
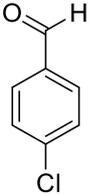
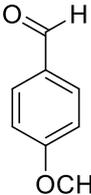
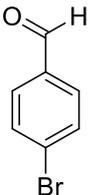


Figura 1.13 – Esquema geral simplificado da formação e degradação de PANDAs; adaptado de Amato, D. V., Amato, D. N., Blancett, L. T., Mavrodi, O. V., Martin, W. B., Swilley, S. N., Sandoz, M. J., Shearer, G., Mavrodi, D., & Patton, D. L. (2018). A bio-based pro-antimicrobial polymer network via degradable acetal linkages. *Acta biomaterialia*, 67, 196-205.

Na tabela 1.2 apresenta-se uma revisão crítica da literatura focada nos PANDAs desenvolvidos até à atualidade, incluindo qual o agente antibacteriano (aldeído) integrado, as estirpes de bactérias estudadas e qual a eficácia na inibição do crescimento bacteriano.

Tabela 1.2 – Aldeídos incorporados em redes poliméricas pro-antimicrobianas pela degradação de acetais (PANDAs) e qual a sua eficácia na inibição do crescimento bacteriano

Entrada	Aldeído	Bactéria	Eficácia
1 ⁴³	<i>p</i> -clorobenzaldeído  1.32	<i>B. subtilis</i> <i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> <i>Burkholderia cenocepacia</i>	6 log (em 12h)
2 ⁴⁴	<i>p</i> -anisaldeído  1.33	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> <i>S. typhi</i>	5 log (em 48h)
3 ⁴⁵	<i>p</i> -anisaldeído + <i>p</i> -bromobenzaldeído  1.34	<i>P. aeruginosa</i>	6 log (em 12h)

Amato et al. (2017) descreveu a incorporação do *p*-clorobenzaldeído **1.32**, um aldeído comercial, num PANDA. Após a sua formação, efetuaram estudos sobre a degradação das ligações acetais formadas e a subsequente libertação de **1.32**, assim como a atividade antibacteriana deste último. Os estudos de degradação foram realizados sob diferentes alterações de pH, a pH = 6 e pH = 7,4, correspondendo a percentuais de libertação de 80 e 70%, respetivamente, após 120 h. De seguida, prosseguiu-se com a avaliação de atividade antibacteriana de **1.32** contra estirpes de bactérias Gram-positivas (*B. subtilis* e *S. aureus*) e Gram-negativas (*P. aeruginosa*, *E. coli*)

e *B. cenocepacia*). O *p*-clorobenzaldeído **1.32** libertado aquando da degradação do PANDA foi capaz de inibir eficazmente ($6 \log_{10}$) o crescimento bacteriano de todas as estirpes testadas após 12 h de incubação (tabela 1.2, entrada 1).⁴³

Amato et al. (2018) relatou um estudo semelhante ao anteriormente descrito, tendo alterado o agente antibacteriano integrado no PANDA para o *p*-anisalaldeído **1.33**, um aldeído de origem natural extraído do anis-estrelado (*Pimpinella anisum*). Neste caso, o estudo cinético referente à degradação das ligações acetal foi monitorizado por 38 dias a pH = 7,4 (pH fisiológico), observando-se uma libertação consistente e gradual do agente antibacteriano (percentual de libertação de 90%). Relativamente à avaliação da atividade inibitória do crescimento bacteriano, o aldeído **1.33** libertado exibiu potente atividade contra as espécies de bactéria *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. typhi*, inibindo o seu crescimento por $5 \log_{10}$ após 48 h de incubação. Contudo, o mesmo não se observou para a bactéria *S. aureus*, tendo esta mantido a sua concentração constante a 10^5 UFC/mL (UFC = unidades formadoras de colónias) (tabela 1.2, entrada 2).⁴⁴

No mesmo ano (2018), Amato et al. descreveu um estudo sobre o uso do sinergismo de aldeído com atividade antibacteriana para a construção de PANDAs e posterior avaliação da atividade antibacteriana dos aldeídos libertados. Segundo os dados reportados, observou-se um efeito sinérgico nas seguintes combinações de aldeídos: *p*-anisalaldeído **1.33** + *p*-bromobenzaldeído **1.34**, cinamalaldeído **1.10** + *p*-anisalaldeído **1.33** e *p*-cianobenzaldeído + *p*-bromobenzaldeído **1.34**, tendo a combinação **1.33** + **1.34**, numa proporção de 60:40, a escolhida para o desenvolvimento da rede polimérica estudada (figura 1.14). Tal como nos casos anteriores, foi estudada a degradação/libertação do agente antibacteriano e sua atividade inibitória do crescimento bacteriano. Os estudos de degradação acetal decorreram por 48 horas, tendo-se observado um percentual de libertação de 29% e de 41% para **1.33** e **1.34**, respetivamente. Os aldeídos libertados foram eficazes na inibição do crescimento bacteriano da *P. aeruginosa*, inibindo o seu crescimento por $6 \log_{10}$ após 12 h de incubação (tabela 1.2, entrada 3).⁴⁵

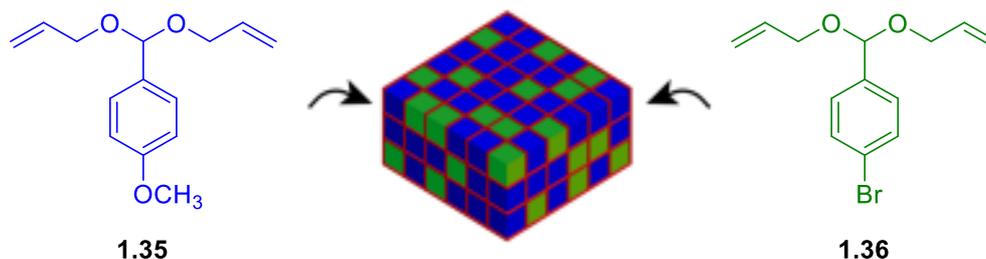


Figura 1.14 – Ilustração do PANDA construído a partir da sinergia do p-anisalaldeído (pAA) e do p-bromobenzaldeído (pBA); adaptado de Amato, D. N., Amato, D. V., Adewunmi, Y., Mavrodi, O. V., Parsons, K. H., Swilley, S. N., Braasch, D. A., Walker, W. D., Mavrodi, D. V., & Patton, D. L. (2018). Using aldehyde synergism to directly the design of degradable pro-antimicrobial networks. *ACS Applied Bio Materials*, 1(6), 1983-1991.

Os dados e os resultados apresentados no estado da arte sobre PANDAs apoiam e incitam a projeção e o desenvolvimento de novos sistemas pro-antibacterianos de libertação sustentada e controlada. Estas redes poliméricas totalmente degradáveis podem incorporar diversos aldeídos bioativos como agentes antibacterianos, despertando interesse para o uso destes biomateriais nas indústrias farmacêutica e biomédica (ex. tratamento de infeções cutâneas, revestimento de ferramentas médicas, etc), cosmética, alimentar, agrícola, entre outras.³⁹

Uma vez que a primeira etapa no desenvolvimento de PANDAs compreende uma reação de acetalização com o álcool alílico, apresenta-se na secção seguinte a via sintética para a formação de moléculas funcionalizadas com a função acetal, assim como o uso de uma metodologia sustentável para a sua síntese.

1.4. Processos sintéticos de acetalização em fluxo contínuo

As reações de acetalização podem ser realizadas com recurso a metodologias convencionais em sistemas *batch* ou metodologias sustentáveis, como é o caso da química de fluxo contínuo. Esta última apresenta características intrínsecas que facilitam e fornecem reprodutibilidade a uma ampla gama de processos químicos, sendo uma alternativa à síntese convencional. A tecnologia de química de fluxo baseia-se no uso de canais ou tubos para conduzir uma reação em fluxo contínuo em vez de reatores contendo todos os reagentes em simultâneo (*batch*), fornecendo um controlo exclusivo

sobre os parâmetros de reação, nomeadamente, pressão, temperatura e fluxo.⁴⁶ Comumente, o uso de sistemas de fluxo contínuo promove uma transferência de calor e massa muito eficiente, o que permite acelerar a velocidade da reação de forma que a produtividade seja geralmente bastante melhor comparativamente aos sistemas tradicionais. Esta tecnologia possibilita ainda o uso de pequenas quantidades de solvente, o que melhora significativamente a segurança do processo. Além disso, devido ao design inerente a esta metodologia, torna-se possível assegurar condições de reação inalcançáveis se realizadas convencionalmente, isto é, o sistema fechado permite a manipulação mais segura de reagentes tóxicos e/ou inflamáveis, bem como efetuar reações sobreaquecidas através da aplicação de pressão. Por outro lado, o uso desta tecnologia permite uma melhoria na qualidade do produto obtido e diminuição das suas impurezas, tal como um menor custo e tempo de reação.^{47, 48} Adicionalmente, esta técnica integra um conjunto de conceitos que reduz/elimina o uso/geração de substâncias perigosas na conceção, fabrico e aplicação de produtos químicos, denominados por princípios da química verde. Estes princípios visam prevenir e auxiliar o combate contra os problemas ambientais relacionados com a poluição química e esgotamento de recursos. Atualmente, as estratégias sintéticas sustentáveis, como a química de fluxo, são vistas como uma poderosa ferramenta, sendo o seu uso impulsionado pelas suas características e pelos seus impactos ambientais positivos.^{49, 50} De uma forma geral, os sistemas de química de fluxo contínuo são constituídos por três componentes essenciais: i) Bombas, responsáveis por introduzir as soluções de reagente e solventes no sistema controlando a sua velocidade de entrada (fluxo); ii) Reatores, onde a transformação química acontece às condições de reação desejadas, estes podem assumir várias formas como colunas, tubos, chips, entre outros; iii) Regulador de pressão, componente responsável por fechar o sistema e controlar a pressão interna. Para além destes componentes essenciais existem ainda outros como válvulas e misturadores que permitem a manipulação e controlo das correntes à entrada e saída do sistema de fluxo.⁵¹ Na figura 1.15 encontra-se demonstrada, de forma esquemática, uma plataforma de fluxo contínuo.

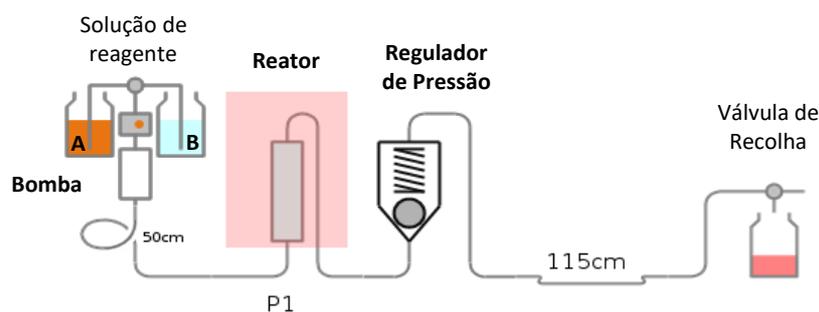


Figura 1.15 – Representação esquemática de um sistema de fluxo contínuo

No que diz respeito às reações de acetalização com recurso à química de fluxo, existem diversos estudos descritos na literatura.⁵²⁻⁵⁹ Em geral, estes estudos integram catalisadores heterogêneos, salientando-se os trabalhos reportados por Rigo *et al.* (2019/2020)^{60, 61} e por Guidi *et al.* (2016)⁶² por apresentarem estudos com resinas ácidas (tabela 1.3).

Tabela 1.3 - Reações de acetalização com recurso à química de fluxo contínuo

Entrada	Substrato	Catalisador	Condições reacionais
1 ⁶⁰	Ésteres de isopropenol e dióis	Amberlite-15	T = 50 °C Fluxo: 0,1 mL/min 96% conversão com 57% de seletividade para o acetal
2 ⁶¹	Dióis derivados da N-acetilação de glicerol	Amberlite-15, AlF ₃ · 3H ₂ O e o zeólito HY	T = 30 – 150 °C Fluxo: 0,1 – 0,3 mL/min Até 99% conversão
3 ⁶²	Glicerol e acetona ou 2-butanona	AlF ₃ · 3H ₂ O e Amberlite-36	T = 100 °C e 78% conversão (CAT.: AlF ₃ · 3H ₂ O) T = 25°C e 97% conversão (CAT.: Amberlite-36)

Rigo et al. (2019) reportaram a preparação de acetais a partir de ésteres de isopropenilo e 1,2-dióis renováveis (propileno glicol e o etileno glicol) em fluxo contínuo, recorrendo a catálise ácida. A reação de propileno glicol com acetato de isopropenilo, na presença de Amberlite-15 como catalisador, um fluxo de 0,1 mL/min e $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, permitiu a mono transesterificação irreversível do glicol, produzindo acetona. Por sua vez, a acetona reagiu com outra molécula de glicol, promovendo a sua acetalização. É de realçar que a transposição para sistemas de fluxo contínuo permitiu aumentar a escala da reação em 10 vezes, atingindo-se uma conversão de 96% e uma seletividade para a formação do acetal de 57%, tendo o catalisador mantido a sua atividade em produção contínua por 160 h (tabela 1.3, entrada 1).⁶⁰

No ano seguinte (2020), Rigo et al. reportou a acetalização de dióis derivados da N-acetilação de glicerol. A reação de N-acetilação do glicerol foi realizada convencionalmente, tendo a acetalização da mistura reacional com acetona sido efetuada sob fluxo contínuo (figura 1.16). Os autores efetuaram estudos com diferentes parâmetros de reação, alterando a temperatura e o fluxo. Para além disso, foi também estudada a atividade de diversos catalisadores ácidos (Amberlite-15, $\text{AlF}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e o zeólito HY) no decorrer da reação de acetalização. Após otimização das condições de reação, concluiu-se que os valores de conversão mais elevados (99% para ambos os acetais) foram obtidos com a resina Amberlite-15 para $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fluxo = 0,1 – 0,6 mL/min (tabela 1.3, entrada 2).⁶²

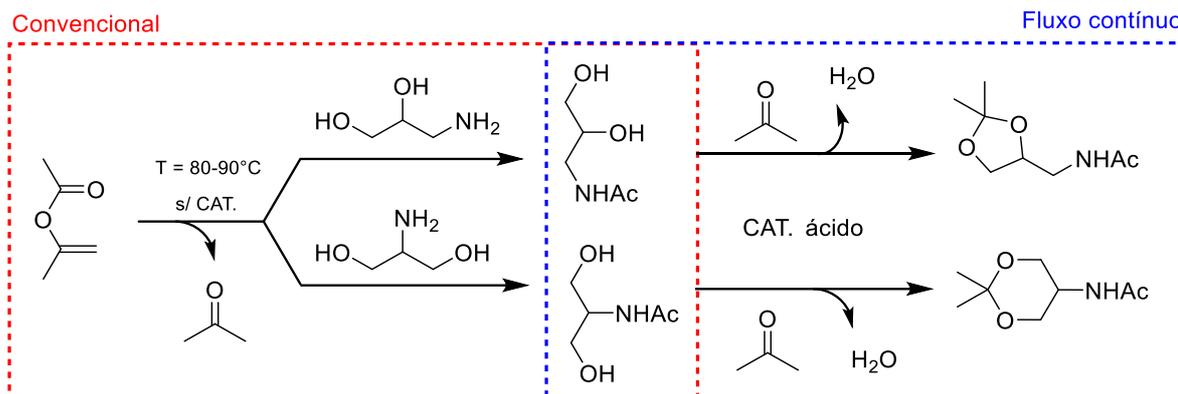


Figura 1.16 – Representação esquemática das reações sequencial de N-acetalização do glicerol e acetalização com acetona; Adaptado de Rigo, D., Carmo Dos Santos, N. A., Perosa, A., & Selva, M. (2020). Concatenated Batch and Continuous Flow Procedures for the Upgrading of Glycerol-Derived Aminodiols via N-Acylation and Acetalization Reactions. *Catalysts*, 11(1), 21

Guidi et al. (2016) descreveram um estudo relativo a reações de acetalização em sistemas de fluxo contínuo, usando como substratos glicerol e cetonas (acetona e 2-butanona). Os autores avaliaram a atividade de dois catalisadores ácidos, nomeadamente, a Amberlite-36 o fluoreto de alumínio tri-hidratado ($\text{AlF}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$). Este último conduziu a uma conversão de 78% a $T = 100\text{ }^\circ\text{C}$, enquanto a Amberlite-36 permitiu alcançar conversões de 97% para $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$, não tendo um aumento da temperatura melhorado o resultado obtido à temperatura ambiente. De realçar que ambos os catalisadores mantiveram a sua atividade ao longo do tempo, tendo a Amberlite-36 demonstrado ser o sistema catalítico mais eficiente para as reações em estudo (tabela 1.3, entrada 3).⁶²

Baseado neste conhecimento e, no contexto das reações de acetalização com recurso à química de fluxo, conclui-se que o uso desta metodologia possibilita a incorporação facilitada de catalisadores heterogéneos, através do uso de reatores de coluna. Consequentemente, a filtração necessária num processo em *batch* torna-se dispensável, evitando assim possíveis perdas e contaminações. Além disso, neste tipo de reações, a química de fluxo contínuo apresenta vantagens quando comparada aos processos de síntese convencionais.⁶³

Como referido anteriormente, existe uma necessidade urgente e crescente em desenvolver novas entidades químicas com atividade antibacteriana e terapias alternativas eficazes e menos suscetíveis aos mecanismos de resistência bacteriana, descrevendo-se no subcapítulo seguinte uma das terapias alternativas mais promissoras descritas até à atualidade.

1.5. Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT)

Uma das abordagens mais promissora para a prevenção do surgimento de novos mecanismos de resistência centra-se no desenvolvimento de novos fármacos ou de alternativas terapêuticas, que combinem múltiplos mecanismos de ação. Tal visa dificultar a aquisição de resistência, visto que a ocorrência simultânea de múltiplas mutações genéticas que inviabilizam a ação antibacteriana tem uma mínima probabilidade de ocorrência. De entre as estratégias terapêuticas alternativas salienta-se a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT, do inglês *Antimicrobial Photodynamic Therapy*).^{64, 65} Esta baseia-se na administração de um fotossensibilizador (PS, do inglês *Photosensitizer*) que, após irradiação com uma fonte de luz apropriada, origina espécies citotóxicas que desencadeiam múltiplos mecanismos de morte bacteriana.⁶⁶⁻⁶⁹ O PS, quando irradiado, transita para um estado excitado singuleto de maior energia, podendo o retorno para o estado fundamental singuleto ocorrer de forma direta, através da emissão de luz ou transferência de energia, ou de forma indireta, por cruzamento intersistemas para o estado tripleto (Figura 1.17). Neste, o PS pode interagir com o oxigénio molecular através de dois mecanismos: I) transferência de eletrões para o oxigénio molecular, formando espécies reativas de oxigénio, como radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radicais hidroxilo ($OH\cdot$), peróxido de hidrogénio (H_2O_2), etc⁷⁰; II) transferência de energia para o oxigénio molecular, originando oxigénio singuleto (1O_2).^{71, 72}

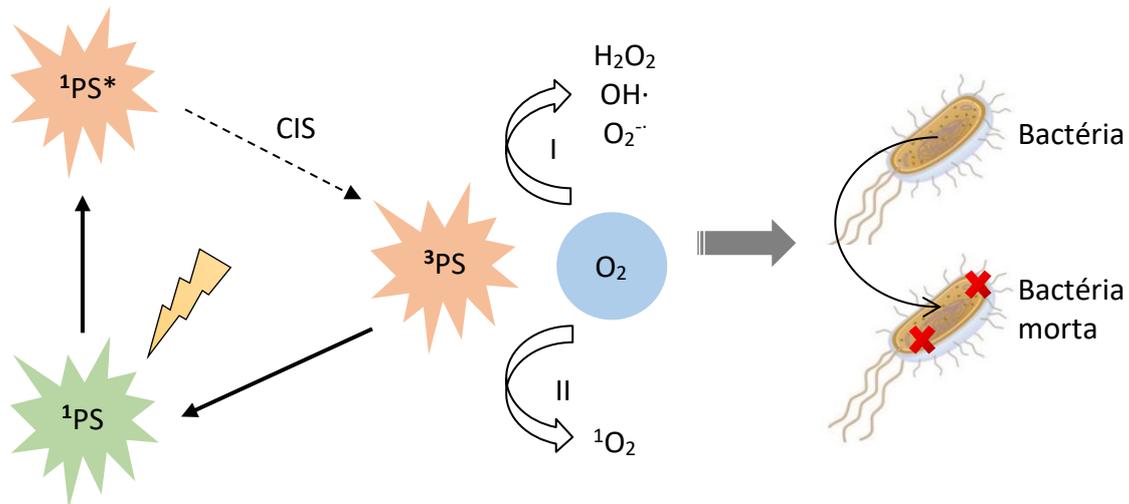


Figura 1.17 – Esquema resumido do comportamento de um fotossensibilizador em aPDT; CIS – cruzamento intersistemas

Um fator de extrema importância nesta estratégia terapêutica envolve o design de um PS com propriedades e características apropriadas. Deste modo, para o desenvolvimento de PSs eficazes é necessário ter em conta as características básicas de um PS ideal, sendo essas: 1) não ser citotóxico nem fototóxico em células humanas nas concentrações e doses de luz utilizadas em terapêutica; 2) elevada capacidade de absorção de luz (elevados valores de ϵ); 3) elevada fotoestabilidade durante a irradiação; 4) elevada capacidade de formação de ROS; 5) alguma hidrofiliicidade e/ou cargas positivas para aumentar a afinidade e capacidade de interação com as paredes bacterianas carregadas negativamente e 6) elevado espectro de ação microbicida, permitindo o tratamento de infecções provocadas simultaneamente por múltiplas espécies bacterianas.^{73, 74}

De entre os PSs ideais, os macrociclos tetrapirrólicos (porfirinas) são moléculas aromáticas altamente conjugadas com fácil capacidade de modulação estrutural, sendo amplamente utilizadas como PSs em aPDT. Usualmente, devido à necessidade de alguma hidrofiliicidade e/ou cargas positivas no PS, as porfirinas aplicadas nesta estratégia terapêutica são porfirinas catiónicas, com o objetivo de aumentar a afinidade e a capacidade de interação com a membrana celular carregada negativamente das bactérias.^{75, 76, 77} Diversos autores relataram a eficiência da inativação bacteriana em culturas planctónicas por porfirinas catiónicas⁷⁸⁻⁸⁹, salientando-se o trabalho descrito

por Vinagreiro et al. (2020), onde comparou a aplicação entre porfirinas catiónica do tipo 1-metilimidazol-2-il e *N*-metil-4-piridil enquanto PS para aPDT. Os estudos foram realizados sob várias concentrações de PS (0,01; 0,1 e 1 μ M), usando uma baixa dose de luz (1,36 J/cm²). Os resultados obtidos variaram de acordo com a concentração e bactéria em estudo, sendo de destacar os resultados obtidos pela di-iodeto 5,15,-(1,3-dimetilimidazol-2-il) porfirinato de zinco (II), onde se obteve uma fotoinativação de 2 log₁₀ e >6 log₁₀ da *E. coli* para 0,1 e 1 μ M, respetivamente.⁹⁰

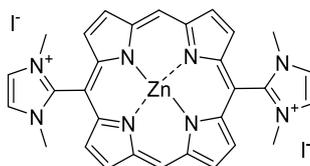


Figura 1.18 – Estrutura química da porfirina catiónica com resultados bastante promissores nos estudos de fotoinativação descritos por Vinagreiro *et al.* (2020)

Tendo em conta o estado da arte, torna-se evidente a elevada eficiência do uso de porfirinas catiónicas como PSs na inativação fotodinâmica de bactérias resistentes e não resistentes. Para além das características favoráveis e atraentes deste tipo de moléculas, estas podem ser diversamente moduladas, abrindo portas para o desenvolvimento de novas entidades químicas promissoras para possível aplicação clínica na terapêutica e em novas terapias.

Da análise crítica da literatura e do interesse do grupo de Catálise e Química Fina em desenvolver novas estratégias de síntese para potenciais agentes antibacterianos, resultou a proposta de projeto desenvolvida nos estudos que conduziram à escrita desta Dissertação.

1.6. Proposta de trabalho

Compilando todos os conhecimentos supracitados e, como tentativa de contribuir para a prevenção e resolução da problemática apresentada ao longo da introdução desta Dissertação de Mestrado, o trabalho desenvolvido visa o desenvolvimento de metodologias de síntese sustentável de acetais e avaliação biológica de compostos com potencial aplicação como agentes antibacterianos e

precursores de polímeros de entrega e libertação prolongada e gradual dos mesmos. Para este fim, procedeu-se à síntese de acetais alílicos, em sistemas de fluxo contínuo, para potencial aplicação como monómeros de redes poliméricas pro-antimicrobianas via degradação de acetais (PANDAs) a partir de aldeídos descritos com atividade antibacteriana. Com o objetivo de aumentar a sustentabilidade deste processo, nas reações de acetalização otimizou-se o processo com recurso a catalisadores do tipo resinas ácidas, nomeadamente, resinas ácidas reutilizáveis.

Uma vez que os agentes antibacterianos estudados nesta proposta de trabalho compreendem aldeídos de ocorrência natural, com mecanismos de ação antibacteriana alternativos por interferência com diversos alvos moleculares, objetiva-se ainda a combinação dos aldeídos com melhor atividade a fotossensibilizadores do tipo porfirina catiónica em terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT). Esta combinação visa o desenvolvimento de uma terapia dual que inibisse o crescimento bacteriano e/ou provocasse a morte microbiana pelo efeito sinérgico em aPDT entre o fotossensibilizador e o aldeído.

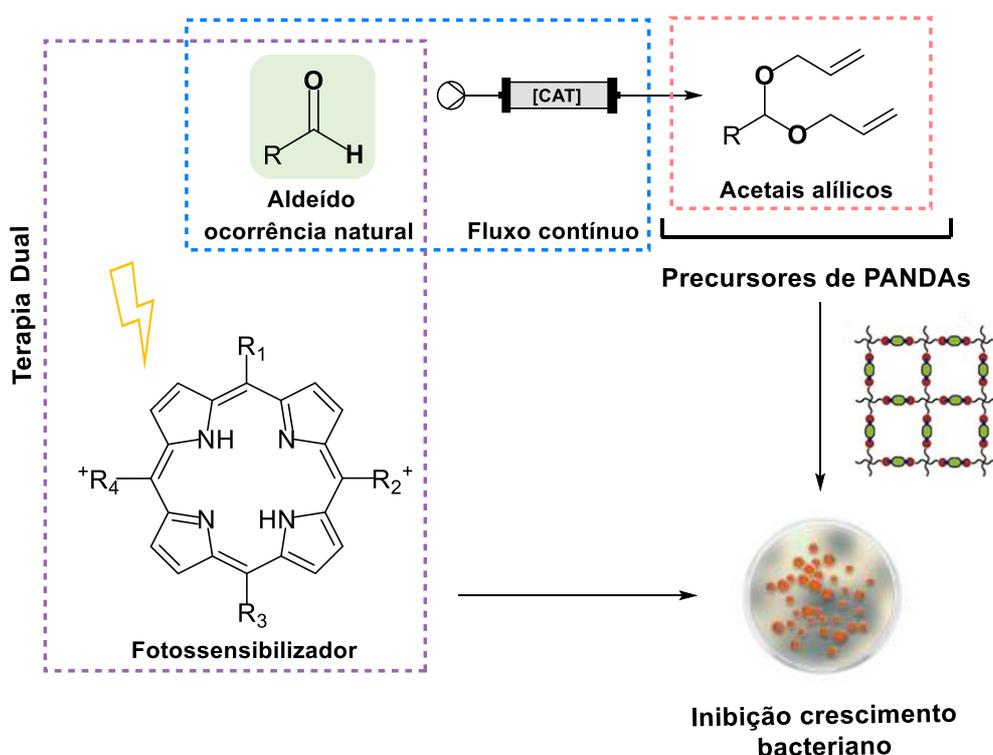


Figura 1.19 – Representação esquemática da hipótese de trabalho desta Dissertação de Mestrado

1.7. Referências

- [1] Lobanovska, M., & Pilla, G. (2017). Focus: drug development: Penicillin's discovery and antibiotic resistance: lessons for the future?. *The Yale journal of biology and medicine*, 90(1), 135.
- [2] Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2016). *Medical Microbiology*. 8th Edition, Elsevier Health Sciences.
- [3] Theuretzbacher, U. (2013). Global antibacterial resistance: The never-ending story. *Journal of global antimicrobial resistance*, 1(2), 63-69.
- [4] Levy, S. B., & Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature medicine*, 10(12), S122-S129.
- [5] Murray et al. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629-655.
- [6] Woolhouse, M., Ward, M., Van Bunnik, B., & Farrar, J. (2015). Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. *Philosophical transactions of the royal society B: Biological Sciences*, 370(1670), 20140083.
- [7] Van Boeckel, T. P., Pires, J., Silvester, R., Zhao, C., Song, J., Criscuolo, N. G., Gilbert, M., Bonhoeffer, S., & Laxminarayan, R. (2019). Global trends in antimicrobial resistance in animals in low-and middle-income countries. *Science*, 365(6459), eaaw1944.
- [8] Shrivastava, S. R., Shrivastava, P. S., & Ramasamy, J. (2018). World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *Journal of medical society*, 32(1), 76-77.
- [9] de Kraker, M. E., Stewardson, A. J., & Harbarth, S. (2016). Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050?. *PLoS medicine*, 13(11), e1002184.
- [10] Ahamed, M. I., & Prasad, R. (Eds.). (2021). *Advanced antimicrobial materials and applications*. Singapore: Springer.

- [11] Boakye, Y. D., Osafo, N., Danquah, C. A., Adu, F., & Agyare, C. (2019). Antimicrobial agents: antibacterial agents, anti-biofilm agents, antibacterial natural compounds, and antibacterial chemicals. *Antimicrobials, antibiotic resistance, antibiofilm strategies and activity methods*, 75.
- [12] Fitzgerald, D. J., Stratford, M., Gasson, M. J., & Narbad, A. (2005). Structure-function analysis of the vanillin molecule and its antifungal properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53, 1769–1775.
- [13] Bhavaniramy, S., Vishnupriya, S., Al-Aboody, M. S., Vijayakumar, R., & Baskaran, D. (2019). Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. *Grain & oil science and technology*, 2(2), 49-55.
- [14] Adewunmi, Y., Namjilsuren, S., Walker, W. D., Amato, D. N., Amato, D. V., Mavrodi, O. V., Patton, D. L., & Mavrodi, D. V. (2020). Antimicrobial activity of, and cellular pathways targeted by, p-anisaldehyde and epigallocatechin gallate in the opportunistic human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and environmental microbiology*, 86(4), e02482-19.
- [15] Reichling, J., Suschke, U., Schneele, J., & Geiss, H. K. (2006). Antibacterial activity and irritation potential of selected essential oil components—structure-activity relationship. *Natural product communications*, 1(11), 1934578X0600101116.
- [16] Wongkattiya, N., Sanguansermisri, P., Fraser, I. H., & Sanguansermisri, D. (2019). Antibacterial activity of cuminaldehyde on food-borne pathogens, the bioactive component of essential oil from *Cuminum cyminum* L. collected in Thailand. *Journal of complementary and integrative medicine*, 16(4).
- [17] Iacobellis, N. S., Lo Cantore, P., Capasso, F., & Senatore, F. (2005). Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(1), 57-61.

- [18] Wang, J., Liu, H., Zhao, J., Gao, H., Zhou, L., Liu, Z., Chen, Y., & Sui, P. (2010). Antimicrobial and antioxidant activities of the root bark essential oil of *Periploca sepium* and its main component 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde. *Molecules*, *15*(8), 5807-5817.
- [19] Arya, S. S., Rookes, J. E., Cahill, D. M., & Lenka, S. K. (2021). Vanillin: a review on the therapeutic prospects of a popular flavouring molecule. *Advances in traditional medicine*, *21*(3), 1-17.
- [20] Doyle, A. A., & Stephens, J. C. (2019). A review of cinnamaldehyde and its derivatives as antibacterial agents. *Fitoterapia*, *139*, 104405.
- [21] Wong, S. Y., Grant, I. R., Friedman, M., Elliott, C. T., & Situ, C. (2008). Antibacterial activities of naturally occurring compounds against *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. *Applied and environmental microbiology*, *74*(19), 5986-5990.
- [22] Chang, S. T., Chen, P. F., & Chang, S. C. (2001). Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of ethnopharmacology*, *77*(1), 123-127.
- [23] Üçüncü, O. S. M. A. N., Cansu, T. B., Özdemir, T. U. R. A. N., Karaoğlu, Ş. A., & Yayli, N. (2010). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of mosses (*Tortula muralis* Hedw., *Homalothecium lutescens* (Hedw.) H. Rob., *Hypnum cupressiforme* Hedw., and *Pohlia nutans* (Hedw.) Lindb.) from Turkey. *Turkish journal of chemistry*, *34*(5), 825-834.
- [24] Wood, W. F., & Szewczak, J. M. (2007). Volatile antimicrobial compounds in the pelage of the Mexican free-tailed bat, *Tadarida brasiliensis mexicana*. *Biochemical systematics and ecology*, *35*(9), 566-568.
- [25] Oyedeji, O. A., Afolayan, A. J., & Eloff, J. N. (2005). Comparative study of the essential oil composition and antimicrobial activity of *Leonotis leonurus* and *L. ocyimifolia* in the Eastern Cape, South Africa. *South african journal of botany*, *71*(1), 114-116.

- [26] Mutlu-Ingok, A., & Karbancioglu-Guler, F. (2017). Cardamom, cumin, and dill weed essential oils: Chemical compositions, antimicrobial activities, and mechanisms of action against *Campylobacter* spp. *Molecules*, *22*(7), 1191.
- [27] Pelttari, E., Karhumäki, E., Langshaw, J., Peräkylä, H., & Elo, H. (2007). Antimicrobial properties of substituted salicylaldehydes and related compounds. *Zeitschrift für Naturforschung C*, *62*(7-8), 487-497.
- [28] Namivandi-Zangeneh, R., Yang, Y., Xu, S., Wong, E. H., & Boyer, C. (2019). Antibiofilm platform based on the combination of antimicrobial polymers and essential oils. *Biomacromolecules*, *21*(1), 262-272.
- [29] Wu, Y. J., & Meanwell, N. A. (2021). Geminal Diheteroatomic Motifs: Some Applications of Acetals, Ketals, and Their Sulfur and Nitrogen Homologues in Medicinal Chemistry and Drug Design. *Journal of medicinal chemistry*, *64*(14), 9786-9874.
- [30] Levine, D. P. (2006). Vancomycin: a history. *Clinical infectious diseases*, *42*(Supplement_1), S5-S12.
- [31] Becker, B., & Cooper, M. A. (2013). Aminoglycoside antibiotics in the 21st century. *ACS chemical biology*, *8*(1), 105-115.
- [32] Zhanel, G. G., Dueck, M., Hoban, D. J., Vercaigne, L. M., Embil, J. M., Gin, A. S., & Karlowsky, J. A. (2001). Review of macrolides and ketolides. *Drugs*, *61*(4), 443-498.
- [33] Goldstein, B. P. (2014). Resistance to rifampicin: a review. *The Journal of antibiotics*, *67*(9), 625-630.
- [34] Jordão, A. K., Novais, J., Leal, B., Escobar, A. C., dos Santos Júnior, H. M., Castro, H. C., & Ferreira, V. F. (2013). Synthesis using microwave irradiation and antibacterial evaluation of new N, O-acetals and N, S-acetals derived from 2-amino-1, 4-naphthoquinones. *European journal of medicinal chemistry*, *63*, 196-201.

- [35] Novais, J. S., Carvalho, M. F., Ramundo, M. S., Beltrame, C. O., Geraldo, R. B., Jordão, A. K., Ferreira, V. F., Castro, H. C., & Figueiredo, A. M. S. (2020). Antibiofilm effects of N, O-acetals derived from 2-amino-1, 4-naphthoquinone are associated with downregulation of important global virulence regulators in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Scientific reports*, *10*(1), 1-13.
- [36] Sapozhnikov, S. V., Sabirova, A. E., Shtyrlin, N. V., Druk, A. Y., Agafonova, M. N., Chirkova, M. N., Kazakova, R. R., Grishaev, D. Y., Nikishova, T. V., Krylova, E. S., Nikitina, E. V., Kayumov, A. R., & Shtyrlin, Y. G. (2021). Design, synthesis, antibacterial activity and toxicity of novel quaternary ammonium compounds based on pyridoxine and fatty acids. *European journal of medicinal chemistry*, *211*, 113100.
- [37] Priem, C., Wuttke, A., Berditsch, M., Ulrich, A. S., & Geyer, A. (2017). Scaling the amphiphilic character and antimicrobial activity of gramicidin S by dihydroxylation or ketal formation. *The Journal of organic chemistry*, *82*(23), 12366-12376.
- [38] Küçük, H. B., Yusufoglu, A., Mataracı, E., & Döşler, S. (2011). Synthesis and biological activity of new 1, 3-dioxolanes as potential antibacterial and antifungal compounds. *Molecules*, *16*(8), 6806-6815.
- [39] Ovsyannikova, M. N., Vol'eva, V. B., Belostotskaya, I. S., Komissarova, N. L., Malkova, A. V., & Kurkovskaya, L. N. (2013). Antibacterial activity of substituted 1, 3-Dioxolanes. *Pharmaceutical chemistry journal*, *47*(3), 142-145.
- [40] Zahra, B., Momin, K., Khan, S. W., Muhammad, I., Noor, R., Umar, M. N., Atif, K., & Turghun, M. (2019). Synthesis, characterization, antifungal and antibacterial activities of novel amide derivatives of 1, 3-dioxolane. *International journal of chemistry*, *11*(1), 71-78.
- [41] Hibbitts, A., & O'Leary, C. (2018). Emerging nanomedicine therapies to counter the rise of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Materials*, *11*(2), 321.

- [42] Shinde, D. B., Pawar, R., Vitore, J., Kulkarni, D., Musale, S., & S Giram, P. (2021). Natural and synthetic functional materials for broad spectrum applications in antimicrobials, antivirals and cosmetics. *Polymers for advanced technologies*, 32(11), 4204-4222.
- [43] Amato, D. N., Amato, D. V., Mavrodi, O. V., Martin, W. B., Swilley, S. N., Parsons, K. H., Mavrodi, D. V. & Patton, D. L. (2017). Pro-Antimicrobial Networks via Degradable Acetals (PANDAs) Using Thiol–Ene Photopolymerization. *ACS Macro Letters*, 6(2), 171-175.
- [44] Amato, D. V., Amato, D. N., Blancett, L. T., Mavrodi, O. V., Martin, W. B., Swilley, S. N., Parsons, K. H., Mavrodi, D. V., & Patton, D. L. (2018). A bio-based pro-antimicrobial polymer network via degradable acetal linkages. *Acta biomaterialia*, 67, 196-205.
- [45] Amato, D. N., Amato, D. V., Adewunmi, Y., Mavrodi, O. V., Parsons, K. H., Swilley, S. N., Braasch, D. A., Walker, W. D., Mavrodi, D. V., & Patton, D. L. (2018). Using aldehyde synergism to direct the design of degradable pro-antimicrobial networks. *ACS applied bio materials*, 1(6), 1983-1991.
- [46] Plutschack, M. B., Pieber, B., Gilmore, K., & Seeberger, P. H. (2017). The hitchhiker’s guide to flow chemistry II. *Chemical reviews*, 117(18), 11796-11893.
- [47] Porta, R., Benaglia, M., & Puglisi, A. (2016). Flow chemistry: recent developments in the synthesis of pharmaceutical products. *Organic process research & development*, 20(1), 2-25.
- [48] Plouffe, P., Macchi, A., & Roberge, D. M. (2014). From Batch to Continuous Chemical Synthesis – A Toolbox Approach. *Organic process research & development*, 18(11), 1286-1294.
- [49] Guidi, M., Seeberger, P. H., & Gilmore, K. (2020). How to approach flow chemistry. *Chemical society reviews*, 49(24), 8910-8932.

- [50] Newman, S. G., & Jensen, K. F. (2013). The role of flow in green chemistry and engineering. *Green chemistry*, 15(6), 1456-1472.
- [51] Hone, C. A., & Kappe, C. O. (2021). Towards the Standardization of Flow Chemistry Protocols for Organic Reactions. *Chemistry-Methods*, 1(11), 454-467.
- [52] Carter, C. F., Baxendale, I. R., O'Brien, M., Pavey, J. B., & Ley, S. V. (2009). Synthesis of acetal protected building blocks using flow chemistry with flow IR analysis: preparation of butane-2, 3-diacetal tartrates. *Organic & biomolecular chemistry*, 7(22), 4594-4597.
- [53] Lyons, D. J. M., Crocker, R. D., Enders, D., & Nguyen, T. V. (2017). Tropylium salts as efficient organic Lewis acid catalysts for acetalization and transacetalization reactions in batch and flow. *Green chemistry*, 19(17), 3993-3996.
- [54] Xu, G., Cao, J., Zhao, Y., Zheng, L., Tao, M., & Zhang, W. (2017). Phosphorylated polyacrylonitrile fibers as an efficient and greener acetalization catalyst. *Chemistry – an asian journal*, 12(19), 2565-2575.
- [55] Jia, J., Yang, C., Xu, F., Xu, S., & Zhang, X. (2021). Metal organic frameworks as solid catalyst for flow acetalization of benzaldehyde. *Microchemical journal*, 165, 106113.
- [56] Kowalska-Kuś, J., Held, A., & Nowińska, K. (2020). A continuous-flow process for the acetalization of crude glycerol with acetone on zeolite catalysts. *Chemical engineering journal*, 401, 126143.
- [57] Zhou, B., Song, F., Ma, X., & Wang, L. (2021). Batch and Continuous-Flow Preparation of Biomass-Derived Furfural Acetals over a TiO₂ Nanoparticle-Exfoliated Montmorillonite Composite Catalyst. *ChemSusChem*, 14(11), 2341-2351.
- [58] Domínguez-Barroso, V., Herrera, C., Larrubia, M. Á., González-Gil, R., Cortés-Reyes, M., & Alemany, L. J. (2019). Continuous-flow process for glycerol conversion to solketal using a brönsted acid functionalized carbon-based catalyst. *Catalysts*, 9(7), 609.

- [59] Cornejo, A., Campoy, M., Barrio, I., Navarrete, B., & Lázaro, J. (2019). Solketal production in a solvent-free continuous flow process: scaling from laboratory to bench size. *Reaction chemistry & engineering*, 4(10), 1803-1813.
- [60] Rigo, D., Fiorani, G., Perosa, A., & Selva, M. (2019). Acid-Catalyzed Reactions of Isopropenyl Esters and Renewable Diols: A 100% Carbon Efficient Transesterification/Acetalization Tandem Sequence, from Batch to Continuous Flow. *ACS sustainable chemistry & engineering*, 7(23), 18810-18818.
- [61] Rigo, D., Carmo Dos Santos, N. A., Perosa, A., & Selva, M. (2020). Concatenated Batch and Continuous Flow Procedures for the Upgrading of Glycerol-Derived Aminodiols via N-Acetylation and Acetalization Reactions. *Catalysts*, 11(1), 21.
- [62] Guidi, S., Noè, M., Riello, P., Perosa, A., & Selva, M. (2016). Towards a rational design of a continuous-flow method for the acetalization of crude glycerol: Scope and limitations of commercial amberlyst 36 and AIF3 · 3H₂O as model catalysts. *Molecules*, 21(5), 657.
- [63] Gambacorta, G., Sharley, J. S., & Baxendale, I. R. (2021). A comprehensive review of flow chemistry techniques tailored to the flavours and fragrances industries. *Beilstein journal of organic chemistry*, 17(1), 1181-1312.
- [64] Hamblin, M. R., & Hasan, T. (2004). Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?. *Photochemical & photobiological sciences*, 3(5), 436-450.
- [65] Hamblin, M. R.; Jori, G. (2011). Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens. *The royal society of chemistry: Cambridge*.
- [66] Hamblin, M. R. (2016). Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Current opinion in microbiology*, 33, 67-73.
- [67] Wainwright, M., Maisch, T., Nonell, S., Plaetzer, K., Almeida, A., Tegos, G. P., & Hamblin, M. R. (2017). Photoantimicrobials—are we afraid of the light?. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(2), e49-e55.

- [68] Wang, Y., Wang, Y., Wang, Y., Murray, C. K., Hamblin, M. R., Hooper, D. C., & Dai, T. (2017). Antimicrobial blue light inactivation of pathogenic microbes: State of the art. *Drug resistance updates*, 33, 1-22.
- [69] Jori, G., Camerin, M., Soncin, M., Guidolin, L., & Coppelotti, O. (2011). Antimicrobial photodynamic therapy: basic principles. *Photodynamic inactivation of microbial pathogens: Medical and environmental applications*, 83-160.
- [70] Dąbrowski, J. M., & Arnaut, L. G. (2015). Photodynamic therapy (PDT) of cancer: from local to systemic treatment. *Photochemical & photobiological sciences*, 14(10), 1765-1780.
- [71] Silva, E. F., Serpa, C., Dąbrowski, J. M., Monteiro, C. J., Formosinho, S. J., Stochel, G., Urbanska, K., Simões, S., Pereira, M. M., & Arnaut, L. G. (2010). Mechanisms of singlet-oxygen and superoxide-ion generation by porphyrins and bacteriochlorins and their implications in photodynamic therapy. *Chemistry—A european journal*, 16(30), 9273-9286.
- [72] Arnaut, L. G., Pereira, M. M., Dabrowski, J. M., Silva, E. F., Schaberle, F. A., Abreu, A. R., Rocha, L. B., Barsan, M. M., Urbanska, K., Stochel, G., & Brett, C. M. (2014) Photodynamic therapy efficacy enhanced by dynamics: the role of charge transfer and photostability in the selection of photosensitizers. *Chemistry-A european journal*, 20(18), 5346-5357.
- [73] Castano, A. P., Demidova, T. N., & Hamblin, M. R. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 1(4), 279-293.
- [74] Detty, M. R., Gibson, S. L., & Wagner, S. J. (2004). Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Journal of medicinal chemistry*, 47(16), 3897-3915.

- [75] Alves, E., Faustino, M. A., Neves, M. G., Cunha, A., Nadais, H., & Almeida, A. (2015). Potential applications of porphyrins in photodynamic inactivation beyond the medical scope. *Journal of photochemistry and photobiology C: photochemistry reviews*, 22, 34-57.
- [76] Amos-Tautua, B. M., Songca, S. P., & Oluwafemi, O. S. (2019). Application of porphyrins in antibacterial photodynamic therapy. *Molecules*, 24(13), 2456.
- [77] Sobotta, L., Skupin-Mrugalska, P., Piskorz, J., & Mielcarek, J. (2019). Porphyrinoid photosensitizers mediated photodynamic inactivation against bacteria. *European journal of medicinal chemistry*, 175, 72-106.
- [78] Xuan, W., Huang, L., Wang, Y., Hu, X., Szewczyk, G., Huang, Y. Y., El-Hussein, A., Bommer, J. C., Nelson, M. L., Sarna, T., & Hamblin, M. R. (2019). Amphiphilic tetracationic porphyrins are exceptionally active antimicrobial photosensitizers: In vitro and in vivo studies with the free-base and Pd-chelate. *Journal of biophotonics*, 12(8), e201800318.
- [79] Alenezi, K., Tovmasyan, A., Batinic-Haberle, I., & Benov, L. T. (2017). Optimizing Zn porphyrin-based photosensitizers for efficient antibacterial photodynamic therapy. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 17, 154-159.
- [80] Marciel, L., Mesquita, M. Q., Ferreira, R., Moreira, B., PMS Neves, M. G., F Faustino, M. A., & Almeida, A. (2018). An efficient formulation based on cationic porphyrins to photoinactivate *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Future medicinal chemistry*, 10(15), 1821-1833.
- [81] Hurst, A. N., Scarbrough, B., Saleh, R., Hovey, J., Ari, F., Goyal, S., Chi, R. J., Troutman, J. M., & Vivero-Escoto, J. L. (2019). Influence of cationic meso-substituted porphyrins on the antimicrobial photodynamic efficacy and cell membrane interaction in *Escherichia coli*. *International journal of molecular sciences*, 20(1), 134.

- [82] Caruso, E., Malacarne, M. C., Banfi, S., Gariboldi, M. B., & Orlandi, V. T. (2019). Cationic diarylporphyrins: In vitro versatile anticancer and antibacterial photosensitizers. *Journal of photochemistry and photobiology B: biology*, *197*, 111548.
- [83] Sułek, A., Pucelik, B., Kobielski, M., Barzowska, A., & Dąbrowski, J. M. (2020). Photodynamic inactivation of bacteria with porphyrin derivatives: Effect of charge, lipophilicity, ROS generation, and cellular uptake on their biological activity in vitro. *International journal of molecular sciences*, *21*(22), 8716.
- [84] Lesar, A., Mušković, M., Begić, G., Lončarić, M., Tomić Linšak, D., Malatesti, N., & Gobin, I. (2020). Cationic porphyrins as effective agents in photodynamic inactivation of opportunistic plumbing pathogen *Legionella pneumophila*. *International journal of molecular sciences*, *21*(15), 5367.
- [85] Moreira, X., Santos, P., Faustino, M. A. F., Raposo, M. M. M., Costa, S. P., Moura, N. M., Gomes, A. T. P. C., Almeida, A., & Neves, M. G. P. M. S. (2020). An insight into the synthesis of cationic porphyrin-imidazole derivatives and their photodynamic inactivation efficiency against *Escherichia coli*. *Dyes and pigments*, *178*, 108330.
- [86] Seeger, M. G., Ries, A. S., Gressler, L. T., Botton, S. A., Iglesias, B. A., & Cargnelutti, J. F. (2020). In vitro antimicrobial photodynamic therapy using tetra-cationic porphyrins against multidrug-resistant bacteria isolated from canine otitis. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, *32*, 101982.
- [87] Hurst, A. N., Scarbrough, B., Saleh, R., Hovey, J., Ari, F., Goyal, S., Chi, R. J., Troutman, J. M., & Vivero-Escoto, J. L. (2019). Influence of cationic meso-substituted porphyrins on the antimicrobial photodynamic efficacy and cell membrane interaction in *Escherichia coli*. *International journal of molecular sciences*, *20*(1), 134.
- [88] Ziganshyna, S., Guttenberger, A., Lippmann, N., Schulz, S., Bercker, S., Kahnt, A., Ruffer, T., Voigt, A., Gerlach, K., & Werdehausen, R. (2020). Tetrahydroporphyrin-tetratosylate (THPTS)-based photodynamic inactivation of critical multidrug-resistant bacteria in vitro. *International journal of antimicrobial agents*, *55*(6), 105976.

[89] Taslı, H., Akbıyık, A., Topaloğlu, N., Alptüzün, V., & Parlar, S. (2018). Photodynamic antimicrobial activity of new porphyrin derivatives against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of microbiology*, 56(11), 828-837.

[90] Vinagreiro, C. S., Zangirolami, A., Schaberle, F. A., Nunes, S. C., Blanco, K. C., Inada, N. M., da Silva, G. J., Pais, A. A. C. C., Bagnato, V. S., Arnaut, L. G., & Pereira, M. M. (2020). Antibacterial photodynamic inactivation of antibiotic-resistant bacteria and biofilms with nanomolar photosensitizer concentrations. *ACS infectious diseases*, 6(6), 1517-15

Capítulo 2

Processos de síntese de precursores de antibacterianos em fluxo contínuo

2.1. Preparação de acetais alílicos como potenciais precursores para desenvolvimento de PANDAs

A síntese de acetais para o desenvolvimento de potenciais redes poliméricas pro-antimicrobianas, seguida da sua degradação para liberação prolongada e sustentada de um agente antibacteriano, compreende uma área de investigação de elevado interesse científico.^{1, 2, 3} O estado da arte focado nestas redes, descrito anteriormente, incitou o aprimoramento da síntese de novos acetais alílicos, de modo a desenvolver redes poliméricas inovadoras, com a finalidade de suprimir problemas relacionados com a resistência bacteriana aos antibióticos atualmente comercializados.^{4, 5, 6}

Tal como referido no capítulo 1, a síntese de acetais compreende a adição nucleofílica de um excesso de álcool a uma molécula de aldeído ou cetona, requerendo a presença de um catalisador para a ocorrência da reação. Neste capítulo é descrita a otimização da síntese de novos acetais alílicos derivados de aldeídos de ocorrência natural com potencial atividade antibacteriana, através de reações conduzidas em condições *batch* e de fluxo contínuo, usando diferentes catalisadores ácidos heterogêneos (figura 2.1).

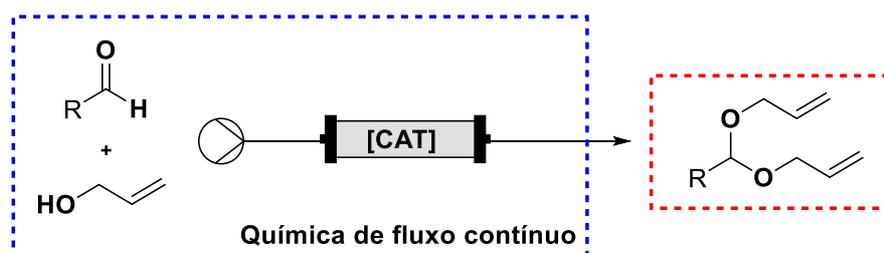


Figura 2.1 - Reações de acetalização para obtenção de acetais alílicos através da química de fluxo contínuo

Atualmente, o uso de sistemas de fluxo contínuo como estratégia sintética sustentável é um tema de grande interesse dentro da comunidade científica, devido à necessidade crescente de diminuir o impacto ambiental negativo resultante dos processos químicos. A incorporação da química de fluxo contínuo, teve como objetivo ultrapassar problemas relacionados com os métodos de síntese convencionais e aumentar a sustentabilidade dos processos de síntese.

Neste estudo, os substratos selecionados foram o 3-fenilpropanal **1.9**, o cinamaldeído **1.10** e o nonanal **1.11** (figura 2.2).

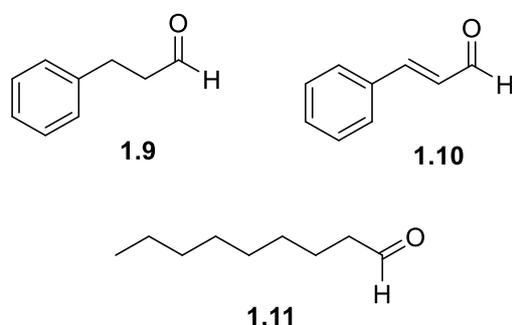


Figura 2.2 – Estrutura química dos aldeídos usados para a síntese dos acetais alílicos

Tendo por base que a síntese de acetais necessita da ativação do grupo carbonilo presente no substrato da reação com catalisadores, foram selecionados dois catalisadores heterogêneos: a Amberlite IR-120 (figura 2.3a) e a Montmorillonite K10 (figura 2.3b). Estas resinas ácidas apresentam como principais vantagens a sua fácil recuperação e reutilização, conduzindo a uma maior sustentabilidade do processo; capacidade de remoção de moléculas de água do meio reacional, tornando-o anidro e evitando, assim, a consequente hidrólise dos acetais formados.

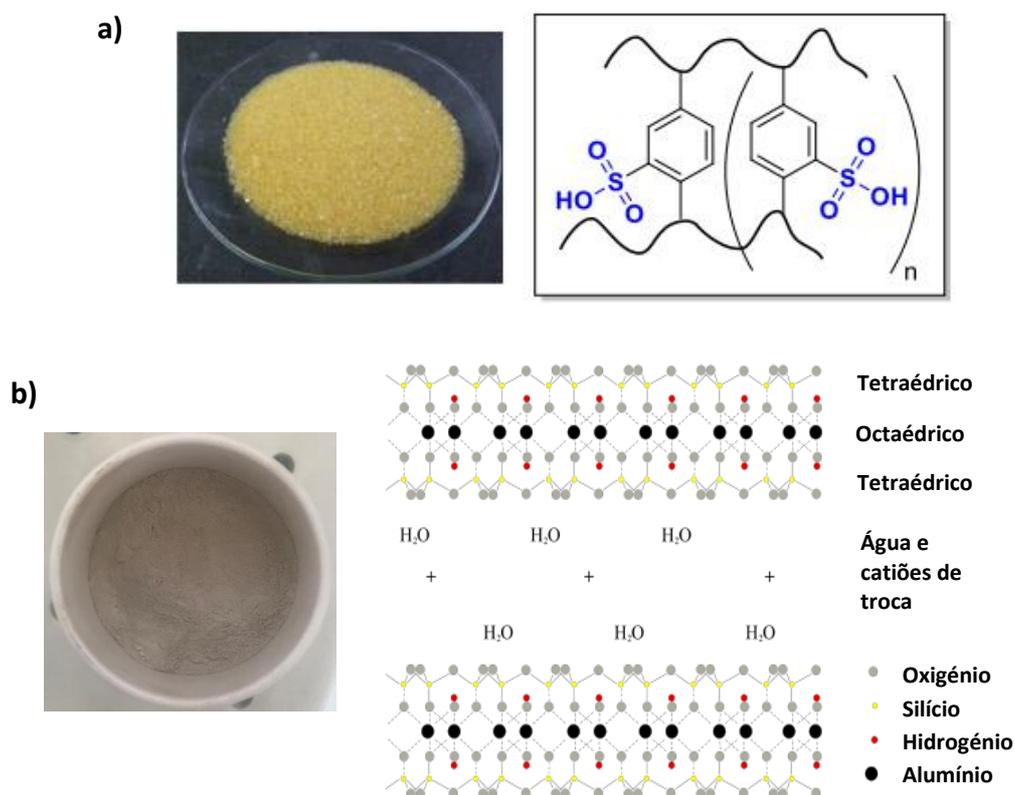


Figura 2.3 – a) Imagem e estrutura geral da resina Amberlite IR-120; adaptado de <https://en.wikipedia.org/wiki/Amberlite> e Meyer, L. E., Brundiek, H., & von Langermann, J. (2020). *Integration of ion exchange resin materials for a downstream-processing approach of an imine reductase-catalyzed reaction*. *Biotechnology Progress*, 36(5), e3024. b) Imagem e estrutura geral da resina Montmorillonite K10; adaptado de <https://en.wikipedia.org/wiki/File:Montmorillonite-en.svg>

2.1.1. Seleção do catalisador ácido em sistemas *batch*

Os estudos iniciaram-se com a seleção do catalisador ácido da reação de acetalização com o álcool alílico, usando o 3-fenilpropanal **1.9** como substrato modelo. Considerando a otimização das condições reacionais para a acetalização deste substrato com o metanol descrita pelo grupo de investigação de Catalise e Química Fina do Departamento de Química da Universidade de Coimbra⁷, selecionou-se primeiramente como catalisador ácido heterogéneo, a resina reutilizável Amberlite IR-120.

Inicialmente, seguiu-se o procedimento descrito para a acetalização em *batch* do 3-fenilpropanal **1.9**, onde num balão de fundo redondo se adicionou o aldeído, o álcool alílico, usado simultaneamente como solvente e reagente, e o catalisador em estudo

(figura 2.4). A mistura reacional foi colocada sob agitação, em refluxo, a 70 °C. Após 5 h de reação, foi retirada uma pequena alíquota da mistura reacional para análise por cromatografia gasosa (GC), observando-se uma conversão de 70%. A reação foi terminada após um período de 24 h, não se tendo observado qualquer diferença no valor de conversão, pressupondo-se a entrada da reação em equilíbrio.

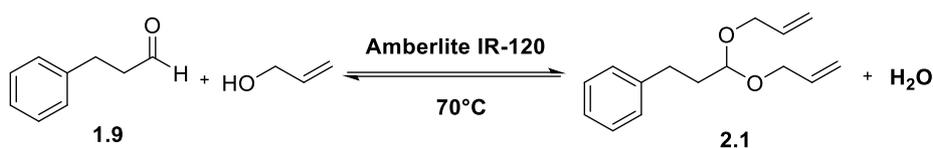


Figura 2.4 – Reação de acetalização do 3-fenilpropanal **1.9** com o álcool alílico, usando como catalisador a resina Amberlite IR-120.

(3-fenilpropanal = 2,3 mmol; 10 mL álcool alílico; $m_{\text{cat}} = 77,5$ mg (25% m/m em relação do substrato); T = 70 °C; t = 24 h)

De modo a contornar este problema, recorreu-se ao aparato de Dean-Stark, que permite recolha contínua da água formada durante a reação de acetalização através de uma destilação azeotrópica. Para tal, utilizou-se tolueno como solvente, permitindo a acumulação da água no aparato de Dean-Stark por ser menos denso que a água.

Numa primeira aproximação, a reação de acetalização com recurso ao aparato de Dean-Stark foi realizada com o mesmo substrato e catalisador ácido utilizado anteriormente, adicionando-se tolueno como solvente. Seguiu-se o mesmo procedimento experimental, colocando-se o aparato de Dean-Stark e deixando-se a mistura reacional em refluxo, a 120 °C, durante 4 h, sob agitação e atmosfera inerte. Após este período foi retirada uma amostra e, após análise por GC, obteve-se uma conversão de 93%. Numa segunda aproximação, de modo a aumentar a seletividade para a formação do acetal **2.1**, efetuou-se o mesmo procedimento, porém utilizando a resina ácida Montmorillonite K10 como catalisador. Após o mesmo período de reação, foi igualmente retirada uma pequena alíquota da mistura reacional para análise por GC, onde se verificou uma conversão 99%. A comparação dos resultados obtidos com ambas as resinas encontra-se descrita na tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Efeito dos catalisadores ácidos na reação de acetalização do 3-fenilpropanal **1.9**.^a



Entrada	Catalisador	Rendimento ^b
1	Amberlite IR-120	93%
2	Montmorillonite K10	99%

^{a)} **Condições reacionais:** 3-fenilpropanal = 1,5 mmol; 5 mL álcool alílico; 15 mL tolueno; $m_{\text{cat}} = 37,5$ mg (25% m/m em relação do substrato); $T = 120$ °C; $t = 4$ h

^{b)} Rendimentos obtidos por GC em relação ao substrato

Da análise dos resultados, pode concluir-se que a resina ácida Montmorillonite K10 foi o catalisador mais ativo para promover a reação de acetalização do 3-fenilpropanal **1.9**. Contudo, problemas como a incapacidade de remoção do solvente (tolueno) do produto da reação, assim como dificuldades na remoção total da resina heterogénea do meio reacional foram observados em ambos os casos. Para ultrapassar estes problemas e tendo por base os resultados obtidos, os estudos prosseguiram com a otimização da síntese de acetais alílicos em sistemas de fluxo contínuo, descritos na secção seguinte.

2.1.2. Reações de acetalização em sistemas de fluxo contínuo

O uso de sistemas de fluxo contínuo apresenta um conjunto de características intrínsecas, que facilitam e fornecem reprodutibilidade a uma ampla gama de processos químicos. As vantagens inerentes a esta metodologia, como a segurança, a elevada transferência de calor e massa, assim como, a possibilidade de transposição de processos sintéticos em sistemas de *batch* para sistemas de fluxo sem necessidade de aumento do tamanho dos reatores, estimulou um grande interesse pelas diversas indústrias, em particular para a indústria farmacêutica.⁸ Assim, e sendo esta uma metodologia sustentável, o uso de sistemas de fluxo representa uma estratégia sintética alternativa vantajosa para a síntese dos monómeros de acetais alílicos formadores das redes poliméricas pro-antimicrobianas via degradação de acetais.

Acetalização do 3-fenilpropanal (1.9)

Os estudos em sistemas de fluxo contínuo iniciaram-se com a otimização da acetalização do 3-fenilpropanal **1.9**, utilizando um sistema easy-MedChem da Vapourtec®. Atendendo os resultados obtidos na otimização do catalisador ácido em sistemas de *batch*, efetuou-se, do mesmo modo, duas experiências teste/modelo, de modo a corroborar os dados anteriormente estabelecidos. Neste âmbito, efetuou-se a preparação de um reator de coluna com a resina ácida empacotada, pesando-se aproximadamente 2 g de resina que foram inseridas dentro do reator (figura 2.5). Após montagem, o reator foi pesado de modo a determinar a massa de coluna seca. Posteriormente, o reator foi colocado no sistema de fluxo contínuo, utilizando um solvente em fluxo inverso de modo a compactar o catalisador dentro do reator de coluna e a remover o ar contido do seu interior. Após este procedimento, o reator foi novamente pesado, obtendo-se assim a massa de coluna contendo o catalisador e o solvente. A diferença entre o valor das massas obtidas permite determinar a massa de solvente que permaneceu dentro do reator, obtendo-se a partir da densidade o volume morto do reator a utilizar, sendo este valor posteriormente utilizado para calcular o tempo de residência de cada reação estudada. O procedimento de empacotamento foi executado sempre que se preparou uma nova coluna. De referir que para todas as reações efetuadas foi calculado o seu STY (do inglês *Space Time Yield*). Esta medida representa uma boa métrica para a comparação de reatores de diferentes tamanhos ou construções, podendo ser definida pela equação 2.1:⁹

$$STY = \frac{n^{\circ} \text{ de moles de produto}}{\text{volume do reator} \times \text{tempo de operação}} \quad (2.1)$$

Para todos os STYs calculados o volume de reator foi considerado como o volume morto do reator em coluna utilizado, que compreende o volume de solvente remanescente no reator após o empacotamento da resina.

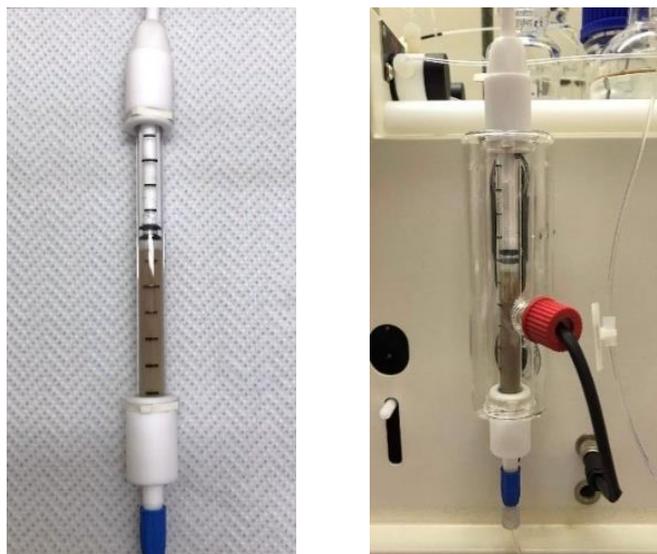


Figura 2.5 – Reator de coluna compactado com a resina ácida Montmorillonite K10, à esquerda, e o mesmo equipado com a manta de aquecimento conectado ao sistema de fluxo contínuo, à direita.

Numa primeira aproximação, procedeu-se à otimização da reação de acetalização do 3-fenilpropanal **1.9**, iniciando-se o processo com as mesmas condições utilizadas em sistemas de *batch*. De acordo com o a imagem apresentada na figura 2.6, que representa o sistema de fluxo utilizado, a solução de aldeído desejado dissolvido em álcool alílico contida num frasco conectado ao sistema é bombeada através da ação de uma bomba peristáltica a um fluxo constante. O tempo de residência da solução no reator depende do volume morto do reator em questão e do fluxo definido, fator que pode ser alterado aquando da otimização do processo pela alteração do fluxo de entrada da solução. A reação em estudo dá-se a uma temperatura de 70 °C, bombeando-se, previamente à entrada dos reagentes no reator, apenas solvente até o reator atingir a temperatura requerida. Após atingida a temperatura desejada segue-se a entrada da solução com os reagentes no reator de coluna, onde se encontra o catalisador heterogéneo. Após o tempo definido como tempo de residência, ou seja, o tempo que a mistura reacional permanece no reator de coluna à temperatura pretendida, o fluxo segue pela tubagem do sistema, sendo o produto recolhido num frasco de recolha e posteriormente analisado por GC.

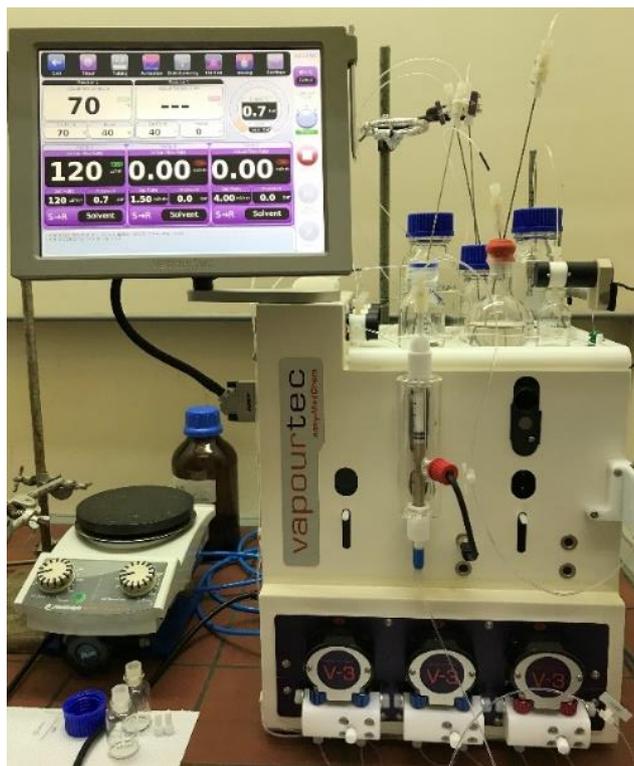
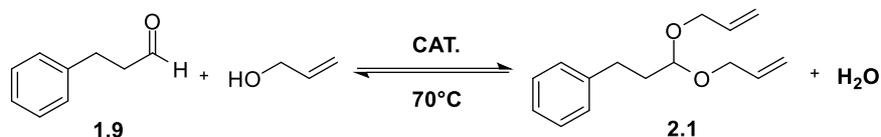


Figura 2.6 – Fotografia do sistema de fluxo contínuo utilizado nas reações de acetalização.

De modo a corroborar os resultados obtidos na reação de acetalização em sistemas de *batch* com recurso ao aparato de Dean-Stark, realizou-se a acetalização do 3-fenilpropanal **1.9** usando como catalisador heterogéneo a resina ácida Amberlite IR-120 e a Montmorillonite K10 em sistemas de fluxo contínuo. Os resultados obtidos no estudo reacional com estes catalisadores apresentam-se na tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Estudo do efeito dos catalisadores ácidos na reação de acetalização do 3-fenilpropanal **1.9** em sistemas de fluxo contínuo.^a


Entrada	Tempo de residência (min)	Catalisador	Rendimento (%) ^b	STY ^c (mol dm ⁻³ h ⁻¹)
1	5	Amberlite IR-120	70	0,9
2	10	Amberlite IR-120	70	0,4
3	5	Montmorillonite K10	93	1,1
4	10	Montmorillonite K10	91	0,5

^a) **Condições reacionais:** [3-fenilpropanal] = 0,1 M; 15 mL álcool alílico; $m_{\text{cat}} = 2$ g; $T = 70$ °C

^b) Rendimentos obtidos por GC em relação ao substrato

^c) STY – Do inglês *Space Time Yield* (mol de produto/volume reator/tempo de operação)

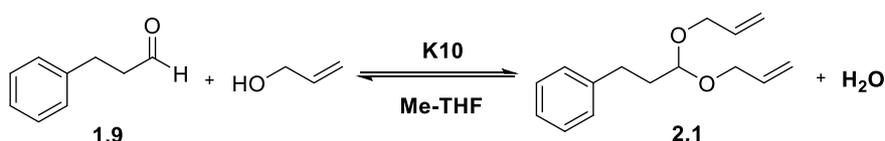
Assim como nos resultados obtidos em sistemas de *batch*, a resina Montmorillonite K10 demonstrou ser a mais ativa e seletiva para promover a reação de acetalização do 3-fenilpropanal **1.9**. Relativamente ao estudo realizado para a resina ácida Amberlite IR-120, efetuou-se duas reações à mesma temperatura (70 °C). A primeira reação deu-se a um fluxo contínuo constante correspondente a um tempo de residência de 5 min. Nestas condições, obteve-se uma conversão de 70% (Tabela 2.2, entrada 1). Em seguida, diminuiu-se o fluxo de modo a aumentar o tempo de residência no reator de coluna para 10 min, tendo-se obtido o mesmo valor de conversão (Tabela 2.2, entrada 2). Do mesmo modo que para a resina Amberlite IR-120, para a resina Montmorillonite K10 também de efetuaram duas reações nas mesmas condições. Para um tempo de residência de 5 min, obteve-se uma conversão de 93% (tabela 2.2, entrada 3), enquanto para um tempo de residência de 10 min, a conversão obtida foi de 91% (tabela 2.2, entrada 4). De mencionar que, para a resina Montmorillonite K10 e um tempo de residência de 5 min, com o reator de coluna utilizado foi possível obter um

STY de 1,1 mol/dm³·h, ou seja, este permite a preparação de 1,1 mol de acetal por hora por litro.

Os valores de conversão obtidos em sistemas de fluxo contínuo para a resina ácida Amberlite IR-120 foram consideravelmente menores, comparativamente aos obtidos em sistemas de *batch* com recurso ao aparato de Dean-Stark. No entanto, os valores alcançados com a resina Montmorillonite K10 mantiveram-se semelhantes, tendo o processo em fluxo sido energeticamente mais vantajoso por ser realizado a uma temperatura mais baixa. Tendo por base estes resultados, os estudos em sistemas de fluxo contínuo prosseguiram com a otimização da reação de acetalização de **1.9**, utilizando como catalisador heterogéneo a resina ácida Montmorillonite K10.

Após seleção do catalisador a utilizar no sistema de fluxo contínuo, as condições da reação de acetalização de **1.9** foram otimizadas, tendo-se prosseguido com o estudo de diversos parâmetros, nomeadamente, a proporção álcool alílico/solvente, o tempo de residência e a temperatura. Os resultados obtidos para a otimização desta reação encontram-se descritos na tabela 2.3.

Tabela 2.3 – Otimização das condições da reação de acetalização do 3-fenilpropanal **1.9** em sistemas de fluxo contínuo. ^a



Entrada	Solvente (v/v)	Tempo de residência (min)	Rendimento ^b (%)	STY ^c (mol dm ⁻³ h ⁻¹)
1	Álcool alílico/Me-THF (1:1)	5	89	1,0
2	Álcool alílico/Me-THF (1:1)	10	97	0,6
3	Álcool alílico/Me-THF (1:2)	10	89	0,5

4	Álcool alílico/Me-THF (1:2)	15	95	0,4
5	Álcool alílico/Me-THF (1:4)	10	84	0,5
6	Álcool alílico/Me-THF (1:4)	15	88	0,3
7	Álcool alílico/Me-THF (1:7)	10	83	0,5
8	Álcool alílico/Me-THF (1:7)	15	87	0,4
9	Álcool alílico/Me-THF (1:7)	10 (T = 100°C)	83	0,5

^{a)} **Condições reacionais:** [3-fenilpropanal] = 0,1 M; $m_{\text{cat}} = 2$ g; T = 70 °C, salvo indicação em contrário

^{b)} Rendimentos obtidos por GC em relação ao substrato

^{c)} STY – Do inglês *Space Time Yield* (mol de produto/volume reator/tempo de operação)

Numa primeira aproximação, manteve-se a temperatura em 70 °C e efetuou-se a reação utilizando como solvente 2-metiltetra-hidrofurano (Me-THF). Uma vez que o álcool alílico utilizado nas reações de acetalização em estudo é relativamente tóxico, diminuiu-se a sua proporção, de modo a aumentar a segurança do processo. Inicialmente, utilizou-se uma solução com uma proporção 1:1 de álcool alílico/Me-THF, onde o aldeído **1.9** se encontrava dissolvido. Esta foi bombeada a um fluxo correspondente a tempo de residência 5 min, tendo-se observado uma conversão de 89% (Tabela 2.3, entrada 1). Numa tentativa de otimizar este resultado, aumentou-se o tempo de residência para 10 min, mantendo-se as restantes condições. Esta alteração conduziu à obtenção de uma conversão de 97% (tabela 2.3, entrada 2). De modo a corroborar este resultado e observar a eficiência da resina ácida heterogénea Montmorillonite K10 ao longo de períodos de operação mais longos, realizou-se uma segunda corrida sob as mesmas condições, com 160 min de tempo de operação. De forma a controlar o valor de conversão ao longo do processo, foram retiradas amostras do fluxo de saída em intervalos de tempo regulares e analisadas por GC e os resultados

apresentam-se na figura 2.7. Na figura pode observar-se que o estado estacionário da reação foi atingido por volta dos 50 min de operação, alcançando-se novamente uma conversão de 97%. É de salientar que este valor permaneceu constante ao longo dos restantes 110 min de operação, demonstrando boa eficiência do catalisador.

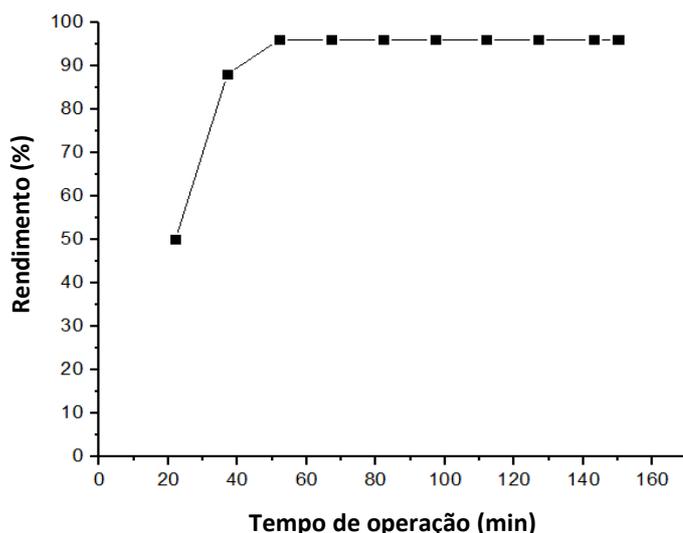


Figura 2.7 – Gráfico representando da eficiência da resina ácida Montmorillonite K10 ao longo do processo de acetilização de **1.9** (conversão em função do tempo de operação) ([3-fenilpropanal = 0,1 M; $m_{\text{cat}} = 2$ g; $T = 70$ °C; 1:1 álcool alílico/Me-THF; tempo de residência = 10 min)

Após os resultados obtidos para uma proporção de 1:1 de álcool alílico/Me-THF, com o intuito de otimizar a segurança do processo, manteve-se a temperatura e alterou-se esta proporção para 1:2 de álcool alílico/Me-THF. Tendo por base os resultados descritos no parágrafo anterior, realizou-se uma reação nas condições onde se obteve os valores de conversão mais elevados. A alteração da proporção de álcool alílico/Me-THF, para um tempo de residência de 10 min, conduziu uma conversão de 89% (tabela 2.3, entrada 3). Tal como anteriormente, numa tentativa de aumentar a conversão, mantiveram-se as condições e aumentou-se o tempo de residência para 15 min, onde se obteve uma conversão de 95% (tabela 2.3, entrada 4).

Com o mesmo objetivo apresentado anteriormente, mantendo a temperatura em 70 °C, alterou-se a proporção de álcool alílico/Me-THF de 1:2 para 1:4. Para 10 min de tempo de residência alcançou-se uma conversão de 84% (tabela 2.3, entrada 5). Uma vez que este resultado foi relativamente semelhante ao obtido sob as mesmas condições para uma proporção de 1:2 de álcool alílico/Me-THF (tabela 2.3, entrada 3), aumentou-se o tempo de residência para 15 min, obtendo-se uma conversão de 88% (tabela 2.3, entrada 6).

Por último, mantendo a temperatura em 70 °C, alterou-se a proporção de álcool alílico/Me-THF para 1:7, e para um tempo de residência de 10 min, obteve-se 83% de conversão (tabela 2.3, entrada 7). O aumento do tempo de residência para 15 min levou à obtenção de uma conversão de 87% (tabela 2.3, entrada 8). Apesar deste resultado ser ligeiramente superior ao obtido para um menor tempo de residência, a diferença entre os valores obtidos é inferior a 5%, encontrando-se dentro do erro inerente ao equipamento da GC. Numa tentativa de otimizar este resultado e observar o efeito do aumento da temperatura de conversão, mantiveram-se as condições de reação para o tempo de residência de 10 min, e aumentou-se a temperatura para 100 °C. Este aumento de temperatura conduziu a uma conversão de 83% (tabela 2.3, entrada 9), valor igual ao obtido para uma temperatura de 70 °C.

Da análise dos resultados descritos na tabela 2.3 pode concluir-se que as condições ótimas compreendem uma proporção de 1:1 de álcool alílico/Me-THF e 70 °C de temperatura com um tempo de residência de 10 min, uma vez que o aumento da quantidade de Me-THF para além da proporção de 1:1 leva a uma ligeira diminuição da conversão e que tanto um aumento do tempo de residência como um aumento da temperatura de reação, não conduzem a uma melhoria significativa do resultado obtido. Salienta-se ainda que no reator de coluna utilizado, para as condições ótimas, se obtém 0,6 mol de acetal por hora por litro (STY).

O acetal **2.1** obtido através da reação em fluxo contínuo sob as condições ótimas, com uma conversão de 97%, foi purificado por evaporação do solvente e extração com éter etílico/água destilada e caracterizado por RMN-¹H, RMN-¹³C e espectrometria de massa de elevada resolução, obtendo-se um rendimento isolado de 54%. A caracterização do acetal **2.1** encontra-se descrita na secção experimental (Capítulo 4). Na figura 2.8 apresenta o espectro de RMN-¹H do composto **2.1** obtido em clorofórmio deuterado.

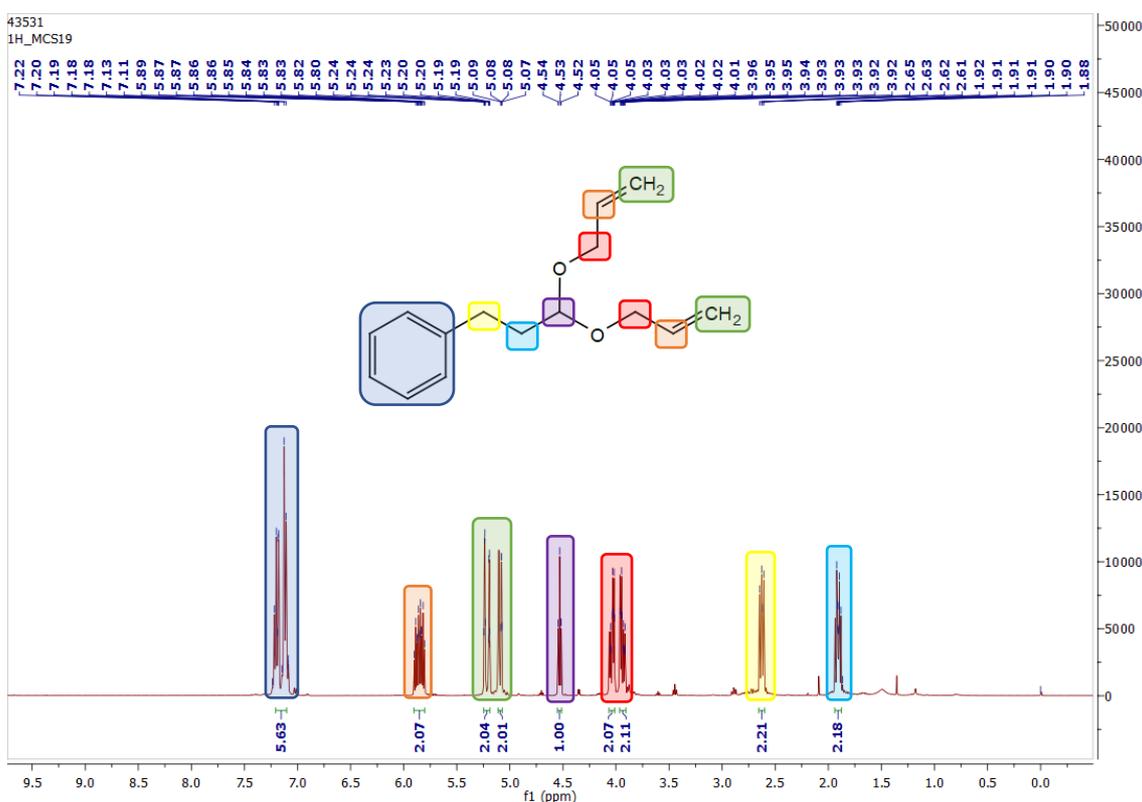


Figura 2.8 – Espectro de RMN-¹H do acetal **2.1** em CDCl₃

No espectro de RMN-¹H apresentado observam-se claramente os picos com desvios químicos entre os 7-8 ppm, atribuídos aos prótons aromáticos do acetal **2.1**, encontrando-se destacados a azul-escuro. Já na região compreendida entre os 1,5 e 3,0 ppm observam-se os sinais atribuídos aos prótons alquílicos que seguem o anel aromático na estrutura do acetal **2.1**, destacados a azul-claro e amarelo. Salientam-se os sinais intermédios a 4,0 e 4,5 ppm atribuídos aos prótons dos carbonos que procedem (sombreado a vermelho) e antecedem (sombreado a roxo) as ligações aos oxigénios, respetivamente. Os restantes sinais intermédios a 5,1 e 5,8 ppm, zona típica dos prótons

vinílicos, são atribuídos aos prótons vinílicos sombreados a verde e a laranja, como indicado na estrutura de **2.1**.

O acetal **2.1** foi ainda caracterizado por HRMS-ESI (ESI) (figura 2.9), onde se pode observar como pico maioritário o íon molecular $[M+Na]^+$ com um $m/z = 255,1356$, correspondente ao composto em estudo cationizado com sódio (1+).

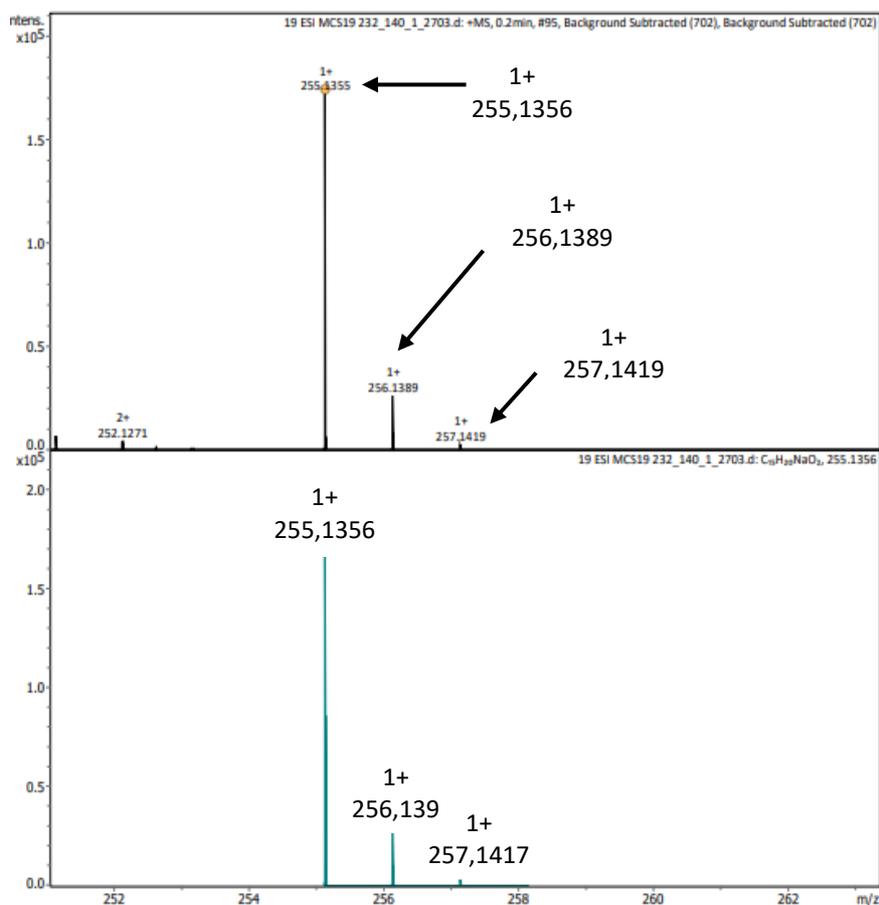


Figura 2.9 – Espectro de massa exata (ESI) do acetal **2.1**

Transposição para outros substratos

Depois da otimização da reação da acetalização com álcool alílico para o 3-fenilpropanal **1.9**, esta foi transposta para outros substratos, nomeadamente para o cinamaldeído **1.10** e para o nonanal **1.11**.

Numa primeira aproximação, procedeu-se à reação de acetalização de **1.10** com álcool alílico (figura 2.10).

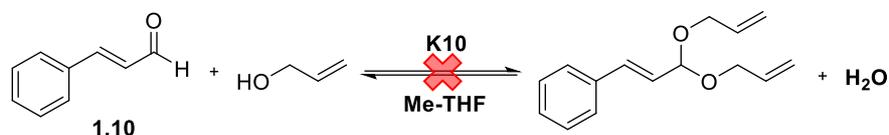


Figura 2.10 – Reação de acetalização do cinamaldeído **1.10** em sistemas de fluxo contínuo sob as condições ótimas.

(Condições reacionais: [cinamaldeído] = 0,1 M; $m_{\text{cat}} = 2$ g; T = 70 e 100 °C)

No entanto, sob as condições ótimas obtidas anteriormente, a reação de acetalização de **1.10** com álcool alílico resultou numa mistura de produtos complexa que foram analisados por GC-MS. Efetuou-se uma outra reação, tendo-se aumentado a temperatura para 100 °C, porém não se observaram alterações significativas nos diversos picos obtidos anteriormente. Após a análise por GC-MS, verificou-se que o pico maioritário a 9,3 min equivalia ao aldeído de partida **1.10** e que nenhum dos subprodutos formados correspondia ao acetal desejado

Numa segunda aproximação, os estudos foram estendidos à reação de acetalização do nonanal **1.11**. Esta reação foi realizada nas condições ótimas obtidas na otimização acima descrita, encontrando-se os resultados obtidos na figura 2.11.



Figura 2.11 – Reação de acetalização do nonanal **1.11** em sistemas de fluxo contínuo sob as condições ótimas.

(Condições reacionais: [nonanal] = 0,1 M em álcool alílico/Me-THF 1:1; $m_{\text{cat}} = 2$ g; T = 70 °C)

^{b)} Rendimentos obtidos por GC em relação ao substrato

^{c)} STY – Do inglês *Space Time Yield* (mol de produto/volume reator/tempo de operação)

A reação de acetalização de **1.11** em sistema de fluxo contínuo sob as condições anteriormente otimizadas conduziu a uma conversão de 97%, resultado igual ao obtido para a reação de acetalização de **1.9** sob as mesmas condições (tabela 2.4, entrada 1). De salientar que, sob estas condições e com o reator de coluna utilizado, foi possível obter um STY de 0,6 mol/dm³·h. O acetal **2.2** obtido através da reação sumarizada na tabela 2.4 foi purificado por simples evaporação do solvente e caracterizado por RMN-¹H, RMN-¹³C e espectrometria de massa, alcançando-se um rendimento final de 97%. A caracterização de **2.4** apresenta-se descrita na secção experimental (Capítulo 4).

Uma vez que a preparação dos acetais alílicos descritos ao longo deste subcapítulo foi concebida com o propósito de desenvolver novos PANDAs, os estudos prosseguiram com a avaliação a atividade dos aldeídos que seriam libertados como agentes antibacterianos após hidrólise do acetal e outros aldeídos de ocorrência natural que poderiam ser integrados como agente antibacteriano em PANDAs.

2.2. Ensaio de suscetibilidade antibacteriana

A resistência crescente aos antibióticos por parte das bactérias tem vindo a limitar as opções terapêuticas, verificando-se, em geral, uma tendência na redução da suscetibilidade a todos os grupos de antibióticos. Para além da necessidade premente de abordagens antimicrobianas alternativas capazes de inativar os microrganismos eficientemente, sem o risco de induzir resistência, surge também a necessidade de encontrar novos agentes antibacterianos de forma a contrariar a redução da suscetibilidade aos antibióticos atuais e diminuir a resistência bacteriana.^{10, 11}

2.2.1. Método de difusão em disco

O método de difusão em disco é considerado um método padrão para avaliar a suscetibilidade de estirpes bacterianas aos antibacterianos. De um modo geral, este método permite avaliar qualitativamente a atividade antibacteriana de um composto nas estirpes selecionadas para estudo. No caso em questão selecionou-se a estirpe bacteriana *Escherichia coli* ATCC 25922. O protocolo iniciou-se pela preparação da suspensão bacteriana a partir de colónias puras crescidas em meio Muller Hinton (MH).

De seguida, com recurso a uma zaragatoa, inoculou-se a superfície de uma caixa de Petri com agar de MH, tendo-se aplicado discos de papel estéreis para onde se pipetou $7,5 \times 10^{-6}$ mol, correspondendo a volumes de 0,914 – 13,2 μL de composto em estudo. Por último, incubou-se as caixas de Petri 37 °C durante 24 h. Após esse período, mediu-se os diâmetros das zonas de inibição (mm) em redor dos discos, que correspondem às zonas onde não foi observado crescimento bacteriano. Assim, para uma mesma quantidade de agente antibacteriano, um maior diâmetro de zona de inibição corresponderá a uma maior atividade antibacteriana (figura 2.12).

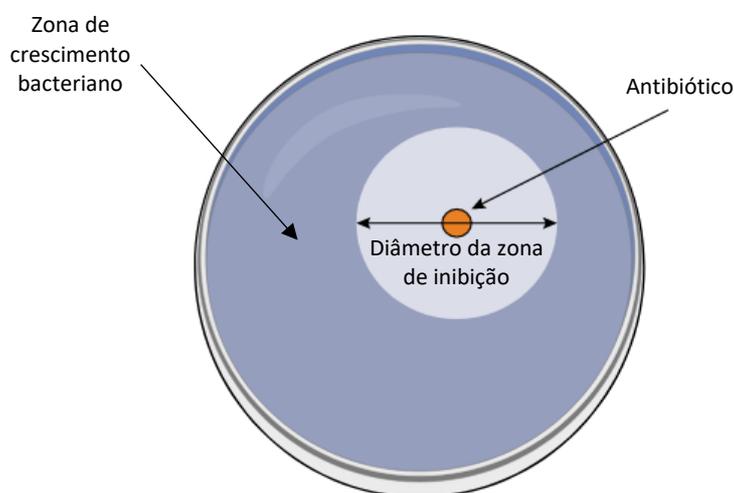


Figura 2.12 – Representação esquemática do diâmetro da zona de inibição num ensaio realizado pelo método de difusão em disco

Os compostos avaliados neste ensaio compreendem aldeídos de ocorrência natural obtidos comercialmente, nomeadamente o *p*-metoxibenzaldeído **1.1**, o 3-fenilpropanal **1.9**, o cinamaldeído **1.10** e o nonanal **1.11**. Este ensaio foi efetuado em triplicado para cada molécula, estando os resultados apresentados na figura 2.13.

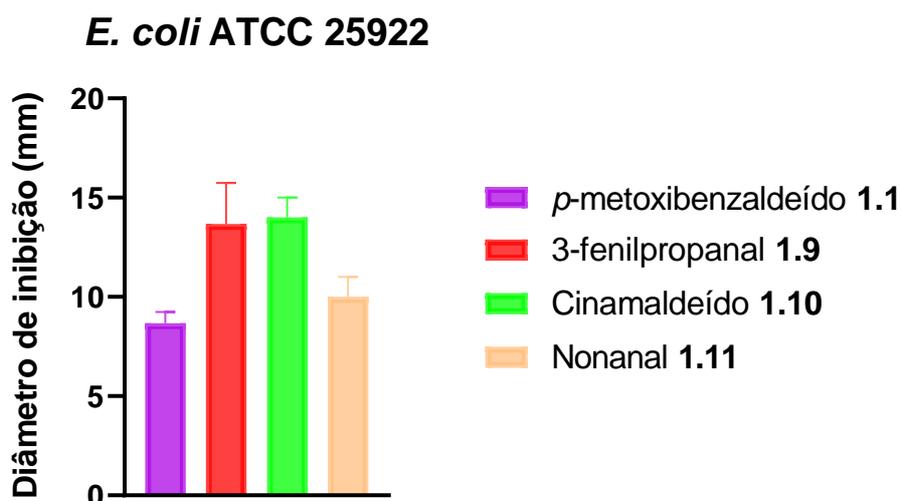


Figura 2.13 – Diâmetros de zona de inibição do crescimento da *E. coli* ATCC 25922 para os compostos estudados

Como podemos observar pelo gráfico acima, todos os aldeídos testados apresentaram alguma atividade antibacteriana contra *E. coli*. O 3-fenilpropanal **1.9** e o cinamaldeído **1.10** exibiram os valores de diâmetros de inibição mais elevados, com valores médios de 14 mm para ambos os casos. Já o *p*-metoxibenzaldeído **1.1** e o nonanal **1.11** apresentaram valores de diâmetros de inibição inferiores, com um valor médio de 9 mm e 10 mm, respetivamente.

Um estudo semelhante ao realizado nesta Dissertação de Mestrado foi descrito por Jiang et al. (2011), onde avaliaram a atividade antibacteriana do cinamaldeído **1.10** e seus derivados em estirpes de *E. coli* ATCC 25922. Para esta bactéria Gram-negativa, Jiang obteve diâmetros de inibição de 5,5, 10,3 e 16,2 mm para 200, 400 e 600 mg/L, respetivamente.¹² Apesar do uso de diferentes quantidades de composto, o resultado obtido para 600 mg/L é similar aos resultados por nós obtidos, corroborando a atividade antibacteriana mediana do cinamaldeído **1.10**.

O estudo de suscetibilidade antibacteriana dos aldeídos **1.1**, **1.9**, **1.10** e **1.11** foi realizado no âmbito de avaliar a atividade antibacteriana dos mesmos. Uma vez que os compostos **1.9** e **1.10** exibiram atividade antibacteriana moderada, estes são aldeídos promissores para o desenvolvimento de novas redes poliméricas pro-antimicrobiana via

degradação de acetais (PANDAs), permitindo assim ultrapassar problemas de biodisponibilidade, entre outros problemas mencionados no Capítulo 1.

2.3. Conclusões

Neste capítulo são descritos estudos de otimização de reações de acetalização em sistemas de fluxo contínuo, procedendo-se inicialmente à otimização da resina ácida heterogénea utilizada como catalisador. Após este processo realizou-se a avaliação biológica de aldeídos de ocorrência natural com atividade antibacteriana descrita na literatura.

Inicialmente, procedeu-se à seleção do catalisador ácido usado nas reações de acetalização, estudando-se a atividade catalítica de duas resinas heterogéneas, a Amberlite IR-120 e a Montmorillonite K10. Esta seleção teve por base a conversão do substrato **1.9** na reação de acetalização com álcool alílico em *batch* com recurso ao aparato de Dean-Stark, tendo-se obtido elevadas conversões para ambas as resinas (93% e 99%, respetivamente). Uma vez que os valores de conversão são consideravelmente semelhantes e devida às adversidades acopladas ao uso de sistemas *batch* com recurso ao aparato de Dean-Stark, esta reação foi transportada para sistemas de fluxo contínuo onde se avaliou novamente a atividade das diferentes resinas para o mesmo substrato. Neste caso, para um tempo de residência de 5 min, os valores de conversão divergiram numa gama de 20%, obtendo-se uma conversão de 70% para a Amberlite IR-120 e de 93% para a Montmorillonite K10.

Os estudos de otimização da reação de acetalização do 3-fenilpropanal **1.9** com álcool alílico em sistemas de fluxo contínuo, recorrendo à resina heterogénea Montmorillonite K10 como catalisador ácido. Após a alteração de diversos parâmetros de reação, concluiu-se que as condições ótimas de reação compreendiam uma proporção de 1:1 de álcool alílico/Me-THF, temperatura igual 70 °C e 10 min de tempo de residência, obtendo-se sob estas condições uma conversão de 97% e um STY de 0,6 mol/dm³·h. Durante o processo de otimização foi simultaneamente realizado um estudo da atividade do catalisador ao longo do tempo de reação, tendo a resina Montmorillonite K10 mantido a sua atividade durante mais de 2 h e 30 min de reação.

Após a otimização das condições de reação, esta foi transposta para diferentes substratos, como o cinamaldeído **1.10** e o nonanal **1.11** e. A reação de acetalização do nonanal **1.11** sob as condições ótimas resultou numa conversão de 97% e um STY igual a 0,6 mol/dm³·h, valores iguais aos obtidos para **1.9**. Relativamente à reação de **1.10**, esta apresentou resultados não conclusivos, verificando-se após análise por GC-MS que nenhum dos subprodutos formados correspondia ao acetal desejado.

Os estudos apresentados em sistemas de fluxo contínuo demonstraram claramente a sua eficiência, conseguindo-se obter valores de conversão praticamente completa para os substratos **1.9** e **1.11** em curtos períodos de tempo. Estes resultados abrem novas perspectivas para o desenvolvimento de processos sintéticos em fluxo para a síntese de acetais com relevância farmacêutica na preparação de monómeros de redes poliméricas de entrega e libertação sustentada através da degradação da ligação acetal (PANDAs).

Uma vez que o agente antibacteriano incorporado nas redes poliméricas descritas ao longo desta Dissertação compreendem aldeídos, usualmente derivados de óleos essenciais, procedeu-se à avaliação da atividade antibacteriana de um conjunto de aldeídos que poderiam ser integrados em PANDAs. Este estudo foi realizado sob a estirpe *E. coli* ATCC 25922 através de ensaios de suscetibilidade antibacteriana com recurso ao método de difusão em disco. Dos aldeídos testados, o **1.9** e o **1.10** foram os que apresentaram melhor atividade antibacteriana, apresentando diâmetros de inibição com um valor médio de 14 mm. Apesar do valor de inibição do crescimento bacteriano em redor dos discos ser mediano, estes aldeídos são possíveis pontos de partida para o desenvolvimento de novas PANDAs, assim como novas terapias menos suscetíveis a mecanismos de resistência.

2.4. Referências

- [1] Wu, Y. J., & Meanwell, N. A. (2021). Geminal Diheteroatomic Motifs: Some Applications of Acetals, Ketals, and Their Sulfur and Nitrogen Homologues in Medicinal Chemistry and Drug Design. *Journal of medicinal chemistry*, 64(14), 9786-9874.
- [2] Ahamed, M. I., & Prasad, R. (Eds.). (2021). *Advanced antimicrobial materials and applications*. Singapore: Springer.
- [3] Shinde, D. B., Pawar, R., Vitore, J., Kulkarni, D., Musale, S., & S Giram, P. (2021). Natural and synthetic functional materials for broad spectrum applications in antimicrobials, antivirals and cosmetics. *Polymers for advanced technologies*, 32(11), 4204-4222.
- [4] Amato, D. N., Amato, D. V., Mavrodi, O. V., Martin, W. B., Swilley, S. N., Parsons, K. H., Mavrodi, D. V., Patton, D. L. (2017). Pro-Antimicrobial Networks via Degradable Acetals (PANDAs) Using Thiol–Ene Photopolymerization. *ACS macro letters*, 6(2), 171-175.
- [5] Amato, D. V., Amato, D. N., Blancett, L. T., Mavrodi, O. V., Martin, W. B., Swilley, S. N., Sandoz, M. J., Shearer, G., Mavrodi, D. V., Patton, D. L. (2018). A bio-based pro-antimicrobial polymer network via degradable acetal linkages. *Acta biomaterialia*, 67, 196-205.
- [6] Amato, D. N., Amato, D. V., Adewunmi, Y., Mavrodi, O. V., Parsons, K. H., Swilley, S. N., Braach, D. A., Walker, W. D, Mavrodi, D. V., Patton, D. L. (2018). Using aldehyde synergism to direct the design of degradable pro-antimicrobial networks. *ACS applied bio materials*, 1(6), 1983-1991.
- [7] Felgueiras, A. P. *Catalisadores para desenvolvimento de processos sequenciais sustentáveis*. Dissertação de Mestrado. Coimbra University, 2021.
- [8] Porta, R., Benaglia, M., & Puglisi, A. (2016). Flow chemistry: recent developments in the synthesis of pharmaceutical products. *Organic process research & development*, 20(1), 2-25.

[9] Hone, C. A., & Kappe, C. O. (2021). Towards the Standardization of Flow Chemistry Protocols for Organic Reactions. *Chemistry – Methods*, 1(11), 454-467.

[10] Shahid, M., & Malik, A. (2003). Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring R-plasmids and AmpC β -lactamases isolated from hospitalised burn patients in a tertiary care hospital of North India. *FEMS microbiology letters*, 228(2), 181-186.

[11] Shahid, M., Malik, A., Akram, M., Agrawal, L. M., Khan, A. U., & Agrawal, M. (2008). Prevalent phenotypes and antibiotic resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* at an Indian tertiary care hospital: plasmid-mediated ceftioxin resistance. *International journal of infectious diseases*, 12(3), 256-264.

[12] Wei, Q. Y., Xiong, J. J., Jiang, H., Zhang, C., & Ye, W. (2011). The antimicrobial activities of the cinnamaldehyde adducts with amino acids. *International journal of food microbiology*, 150(2-3), 164-170.

Capítulo 3

Síntese de fotossensibilizadores e terapia fotodinâmica antimicrobiana

3.1. Síntese de fotossensibilizadores do tipo porfirina catiónicas

Os fotossensibilizadores (PS, do inglês *Photosensitizer*) são entidades químicas capazes de absorver luz e produzir espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*), funcionando como agentes intermediários em terapias, como a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT). Resumidamente, esta terapia baseia-se na administração de um PS, seguida de irradiação com uma fonte de luz apropriada, desencadeando múltiplos mecanismos de morte bacteriana por oxidação das suas biomoléculas.^{1, 2, 3}

De entre os PSs ideais, os macrociclos tetrapirrólicos (porfirinas) são moléculas aromáticas altamente conjugadas com fácil capacidade de modulação estrutural, sendo amplamente utilizadas como PSs em aPDT. Usualmente, devido à necessidade de alguma hidrofiliabilidade e/ou cargas positivas no PS, de modo a aumentar a afinidade e a capacidade de interação com os resíduos carregados negativamente da membrana celular das bactérias, especialmente das bactérias Gram-negativas, as porfirinas aplicadas nesta estratégia terapêutica são porfirinas catiónicas. Este tipo de PS com uma ou mais cargas positivas intrínsecas, usualmente em átomos de azoto quaternários, proporcionam uma inativação mais eficiente de bactérias, tanto Gram-positivas como Gram-negativas.^{4, 5, 6}

Neste âmbito, o objetivo deste subcapítulo centra-se na síntese de PS do tipo porfirina catiónica, derivados da 5,15-bis(1-metilimidazol-2-il)porfirina **3.1** e na modulação da anfifilicidade dos mesmos, numa tentativa de desenvolver derivados com estruturas e propriedades otimizadas para aPDT, de modo a promover a permeação membranar, aumentando conseqüentemente, a sua atividade antibacteriana (figura 3.1).

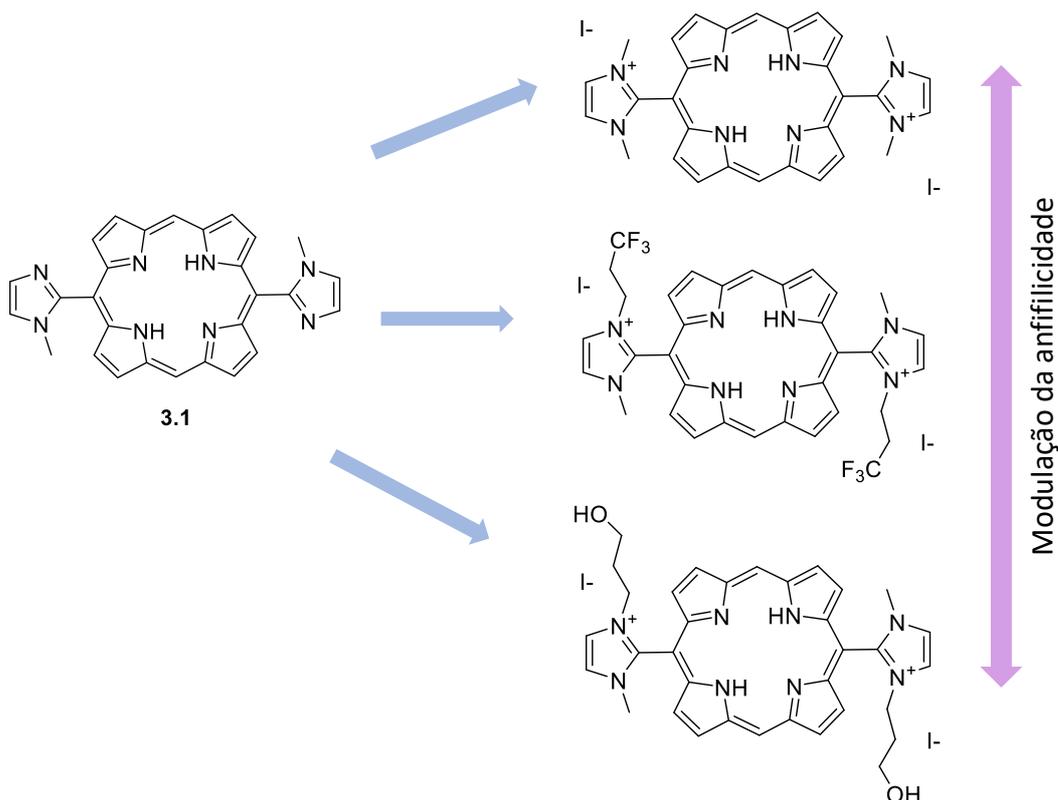


Figura 3.1 – Modulação estrutural pretendida de porfirinas catiónicas do tipo *trans*-di-imidazolil, obtidas a partir de **3.1**

3.1.1. Síntese de *trans*-di-imidazolil-porfirinas catiónicas

No sentido de desenvolver novos fotossensibilizadores com estruturas otimizadas para aPDT, preparou-se um conjunto de *trans*-di-imidazolil-porfirinas catiónicas, cuja anfifilicidade foi modulada de modo a facilitar a permeação de membranas e inativação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

O trabalho descrito nesta secção centra-se na reação de cationização da 5,15-bis(1-metilimidazol-2-il)porfirina **3.1**, obtida comercialmente, com diversos agentes cationizantes, nomeadamente, iodometano, 1,1,1-trifluoro-3-iodopropano e 3-iodopropanol. Estes agentes foram selecionados com o propósito de tentar estabelecer uma relação entre a anfifilicidade dos compostos e a sua atividade biológica, tendo também em consideração as suas características fotofísicas e fotoquímicas mais relevantes (coeficiente de absorvidade molar e rendimento quântico de formação de oxigénio singuleto).

Numa primeira aproximação, procedeu-se à cationização da porfirina **3.1** com iodometano, obtendo-se a 5,15-bis(1,3-dimetilimidazol-2-il)porfirina **3.2**. Esta foi preparada pela dissolução da porfirina base em DMF e adição do iodometano à mistura reacional, deixando-se a mesma sob agitação durante 24 horas a 30 °C (figura 3.2). Terminada a reação, a porfirina **3.2** foi precipitada pela adição de éter dietílico, tendo-se seguido uma filtração. A dicationização foi confirmada por RMN de protão e por espetrometria de massa (ESI positivo), tendo-se obtido um rendimento final de 82%.

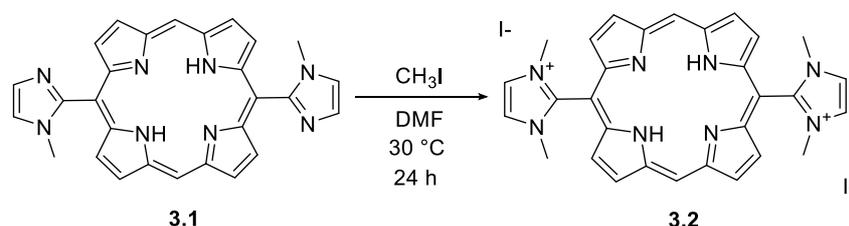


Figura 3.2 – Metodologia sintética seguida na preparação da 5,15-bis(1,3-dimetilimidazol-2-il)porfirina **3.2**

De seguida, preparou-se a 5,15-bis(1-metil-3-(1,1,1-trifluoropropil)imidazol-2-il)porfirina **3.3**, através da cationização da porfirina **3.1** com 1,1,1-trifluoro-3-iodopropano. Para tal dissolveu-se a porfirina de partida em DMF e adicionou-se faseadamente 100 equivalentes do agente cationizante (1,1,1-trifluoro-3-iodopropanol), deixando-se a mistura reacional sob agitação durante 72 horas a 60 °C (figura 3.3). Após um processo de purificação semelhante ao descrito previamente, a porfirina catiónica **3.3** foi obtida com um rendimento final de 84%.

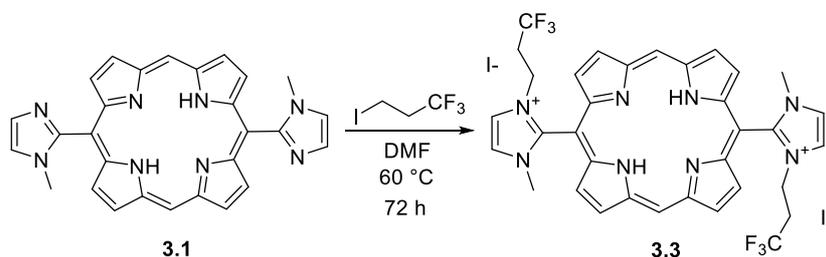


Figura 3.3 – Metodologia sintética seguida na preparação da 5,15-bis(1-metil-3-(1,1,1-trifluoropropil)imidazol-2-il)porfirina **3.3**

Por fim, procedeu-se à síntese da 5,15-bis(1-metil-3-(3-hidroxiopropil)imidazol-2-il)porfirina **3.4**, por meio da cationização da porfirina base **3.1** com 3-iodopropanol. Esta reação requer a dissolução da porfirina **3.1** em acetona e adição faseada do agente cationizante, 3-iodopropanol, à mistura reacional (figura 3.4). A mistura foi deixada sob agitação, à temperatura ambiente, durante 15 dias. Após termino da reação, evaporou-se o solvente e precipitou-se o produto com 2-metiltetra-hidrofurano. Tal como nas reações de cationização anteriores, a dicationização foi confirmada por RMN de próton e por massa (ESI positivo), obtendo-se um rendimento final de 59%.

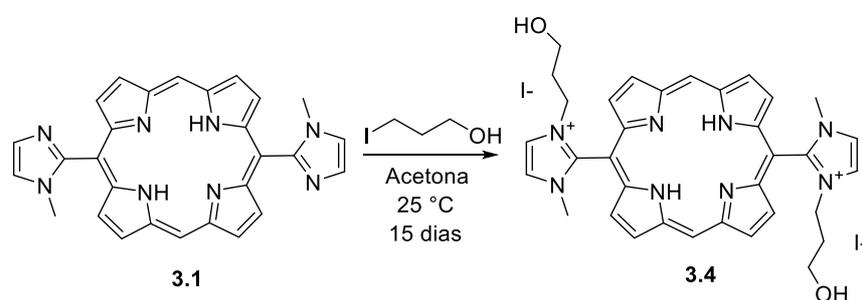


Figura 3.4 – Metodologia sintética seguida na preparação 5,15-bis(1-metil-3-(3-hidroxiopropil)imidazol-2-il)porfirina **3.4**

Todas as porfirinas catiónicas sintetizadas foram obtidas com rendimentos finais moderados a altos (59-84%). A caracterização completa das porfirinas **3.2** – **3.4** encontra-se descrita na secção experimental (Capítulo 4), apresentando-se a título de exemplo na figura 3.5 o espetro de RMN-¹H de **3.4** e uma proposta de atribuição dos sinais observados.

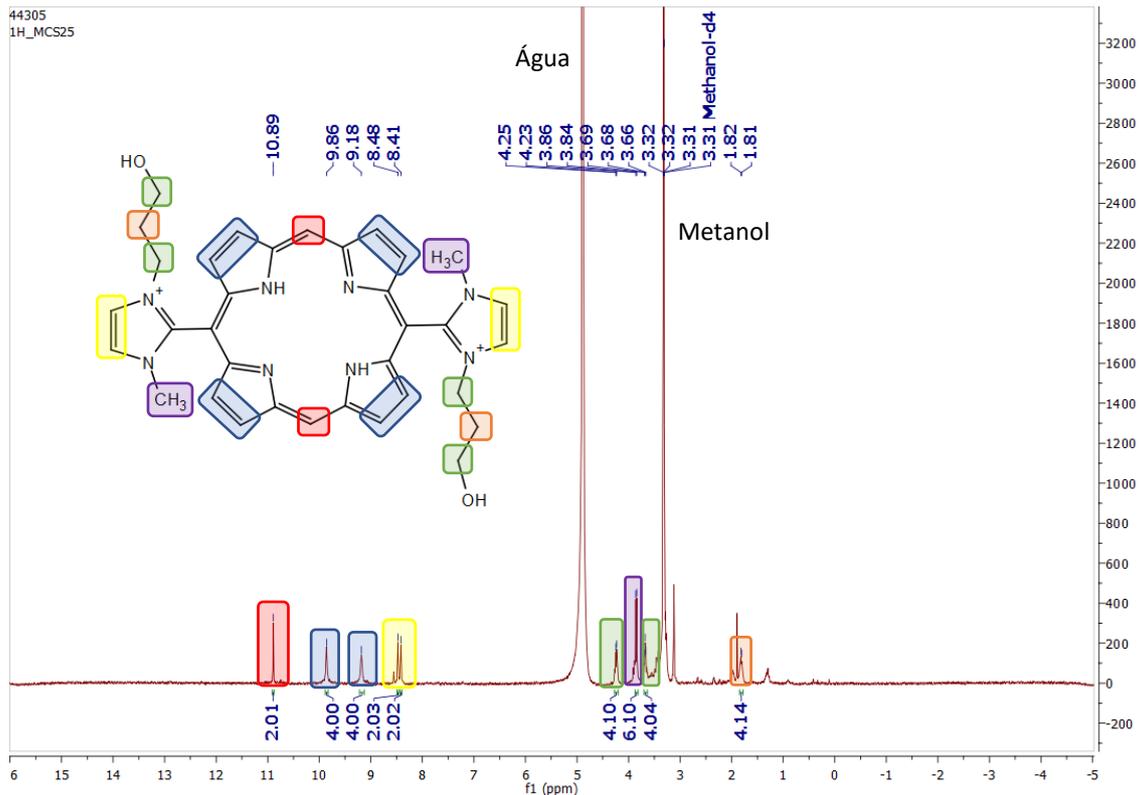


Figura 3.5 – Espectro de RMN-¹H do fotossensibilizador **3.4** em CD₃OD

O espectro de RMN-1H apresenta na região compreendida entre os 9 e os 11 ppm os prótons aromáticos do macrociclo central (*beta* e *meso*), que se encontram especialmente desblindados devido à elevada conjugação presente nestes macrocilos. Deste modo, os dois picos a 9,18 e 9,86 ppm, cada um integrando 4 prótons, podem ser atribuídos aos prótons *beta* e o pico a 10,89 ppm aos 2 prótons *meso*, representados a azul-escuro e vermelho, respetivamente.

Na proximidade deste encontram-se os picos referentes aos prótons aromáticos dos anéis imidazol presentes nas posições *meso* 5 e 15, a 8,48 e 8,41 ppm, encontrando-se destacados a amarelo com uma integração total de quatro (dois prótons em cada). Numa região intermédia, entre os 3,5 e os 4,5 ppm, apresentam-se três picos, sombreados a verde e a roxo. O pico destacado a roxo integra seis hidrogénios, a 3,85 ppm, correspondendo aos grupos metilo ligados ao azoto dos anéis imidazol. Já os picos a verde, a 4,24 e 3,68 ppm, referem-se aos CH₂ da cadeia carbonada do grupo cationizante ligados ao N do imidazol e ao grupo hidroxilo, integrando quatro hidrogénios cada pico. Uma vez que ambos se encontram ligados a grupos atratores de

eletrões, torna-se inexecutável fazer uma atribuição inequívoca sem recurso a outras técnicas. Por fim, o sinal a 1,82 ppm, destacado a laranja, corresponde ao CH₂ intermédio do grupo cationizante. Este sinal apresenta um desvio químico menor que os restantes CH₂ por os seus hidrogénios se apresentarem mais protegidos, uma vez que o carbono ao qual estão ligados não se encontra diretamente ligado a um átomo eletronegativo.

Tendo por base que as imidazolil porfirinas catiónicas **3.2**, **3.3** e **3.4** sintetizadas foram desenvolvidas com o objetivo de projetar novos potenciais fotossensibilizadores para terapia fotodinâmica antimicrobiana, foram realizados estudos fotofísicos e fotoquímicos com as mesmas, encontrando-se estes descritos no subcapítulo seguinte.

3.2. Estudos fotofísicos e fotoquímicos

Na secção anterior foi discutida a síntese de uma família de *trans*-di-imidazolil porfirina catiónica com diferentes características estruturais, o que poderá levar conseqüentemente a propriedades fotofísicas e fotoquímicas distintas. Uma vez que este conjunto de moléculas foi projetado no âmbito de desenvolver novos fotossensibilizadores, torna-se importante frisar algumas características essenciais de fotossensibilizadores destinados a terapia fotodinâmica antimicrobiana, como elevados coeficientes de absorção molar e rendimentos quânticos de formação de oxigénio singuleto.

Para uma compreensão mais clara sobre os fenómenos envolvidos no mecanismo de ação da terapia fotodinâmica antimicrobiana, apresenta-se na figura 3.6 um diagrama de Jablonski esquematizado, que nos permite analisar os fenómenos resultantes das interações do fotossensibilizador com a luz. Tipicamente, as moléculas encontram-se num estado singuleto, que corresponde ao seu estado fundamental (S₀). Quando esta molécula absorve luz transita para um estado vibracional excitado (S₁...S_n) de maior energia. Segundo a regra de Kasha, apesar de a transição mencionada ser possível para todos os estados excitados, ocorre um decaimento por processos não radiativos para o estado excitado de mais baixa energia (S₁).⁷ A partir deste nível, o retorno para o estado fundamental singuleto (S₀) pode ocorrer de forma direta, através

da emissão de luz (fluorescência), por transferência de energia (ci, conversão interna) ou de forma indireta (cis, conversão intersistemas para o estado tripleto T_1). Este estado pode decair não radiativamente por conversão interna ou radiativamente por emissão de fosforescência. No caso da terapia fotodinâmica antimicrobiana, este estado pode ainda reagir com o oxigênio do meio através de dois mecanismos: I) transferência de elétrons para o oxigênio molecular, gerando radicais hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), aniões superóxido (O_2^-),⁸ II) transferência de energia para o oxigênio molecular, levando à passagem do oxigênio do estado fundamental (tripleto) para o estado excitado singuleto ($^1\text{O}_2$).^{9, 10} Estas espécies reativas de oxigênio, quando formadas em meios biológicos, possuem uma grande capacidade oxidativa que origina reações irreversíveis que desencadeiam processos de morte celular.¹¹

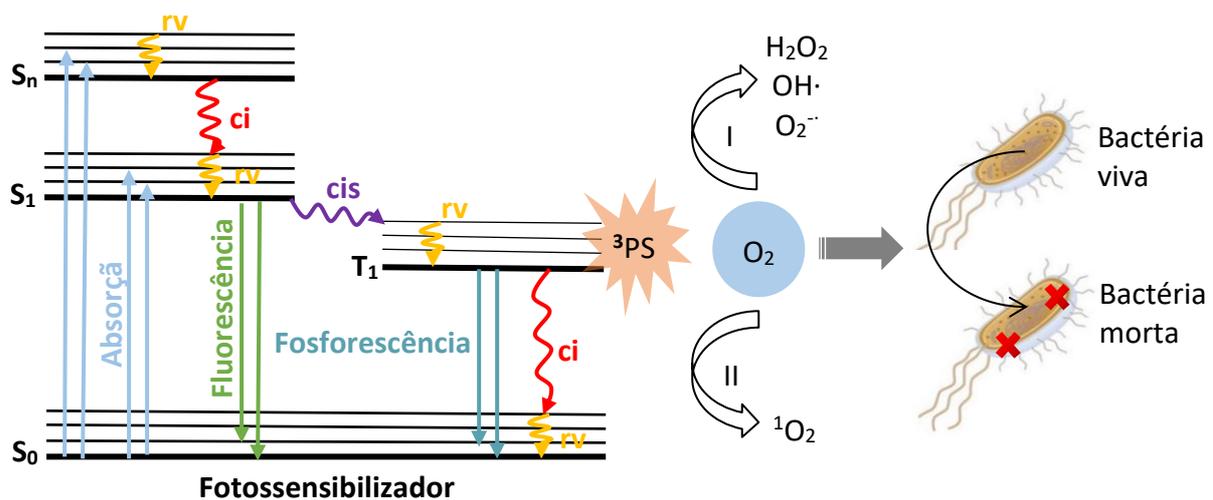


Figura 3.6 – Diagrama de Jablonski simplificado onde se encontram representados os principais fenômenos radiativos e não-radiativos de um fotossensibilizador: absorção, fluorescência, conversão interna (ci), relaxação vibracional (rv), cruzamento intersistemas (cis), fosforescência e transferência de energia para o oxigênio molecular (estado tripleto)

Deste modo, será apresentado nos subcapítulos seguintes os estudos das absortividades molares e rendimentos quânticos de formação de oxigênio singuleto, que constituem dois parâmetros fotofísicos e fotoquímicos fundamentais para o sucesso destes fotossensibilizadores em aPDT.

3.2.1. Determinação coeficientes de absorção molar

A determinação dos coeficientes de absorção molar (ϵ) foi baseada na utilização da Lei de Beer-Lambert (equação 3.1).

$$A(\lambda) = -\log(T) = -\log \frac{I}{I_0} = \epsilon \ell c \quad (3.1)$$

Esta lei estabelece uma relação entre a absorvância (A) e a transmitância (T), sendo esta última calculada pela razão entre a intensidade da luz antes (I_0) e após (I) incidir na amostra. A absorvância, por sua vez, relaciona-se linearmente com a concentração da amostra (c), o comprimento ótico (ℓ) e a absorção molar (ϵ).¹² Assim, é possível calcular este coeficiente para cada banda de absorção característica de um espectro de absorção de porfirinas, nomeadamente, para a *Soret* e para as quatro bandas Q. Como título de exemplo, apresenta-se na figura 3.7 os espectros de absorção das porfirinas **3.1** e **3.4**, usando etanol como solvente.

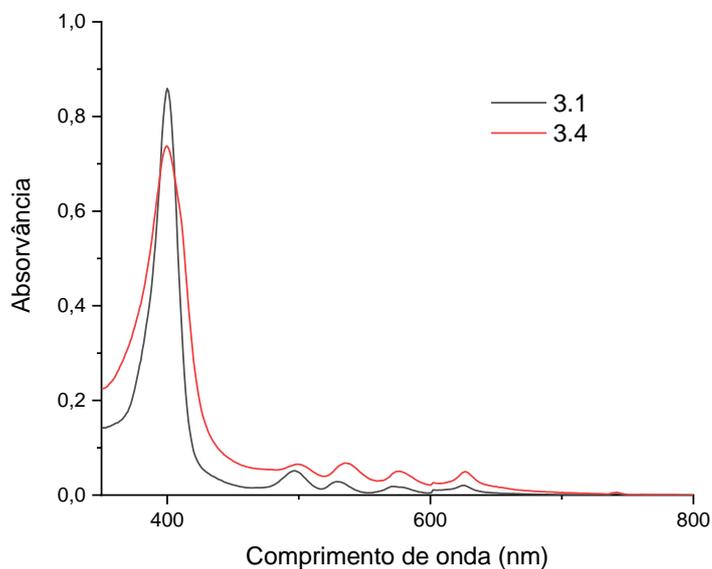


Figura 3.7 – Espectros de absorção das porfirinas **3.1** e **3.4** em etanol

Como podemos verificar pela figura 3.7, em ambos os casos um espectro típico de porfirinas é observado. O padrão da banda *Soret* e das quatro bandas Q de ambos os espectros apresentados estão em concordância com a literatura.¹³ De notar que as bandas Q de **3.1** e **3.4** possuem intensidades relativas semelhantes, enquanto **3.4** apresenta um pequeno alargamento da banda *Soret* comparativamente a **3.1**.

Para avaliar a absorção de luz através do coeficiente de absorção molar é necessário ter alguns cuidados na aplicação da Lei de Beer-Lambert (equação 3.1), de entre os quais a preparação de soluções com concentrações que permitam obter picos de absorção entre os 0,1 e 1,0. De modo a obter uma relação linear entre todos os pontos, foram preparadas soluções com concentrações bem definidas (10^{-6} – 10^{-5} M) de **3.2**, **3.3** e **3.4**, usando etanol como solvente. Como exemplo, apresenta-se na figura 3.8 os espectros obtidos para as várias soluções no caso da porfirina **3.4** e o respetivo ajuste linear entre as concentrações e a absorvância para a banda *Soret*, onde o declive representa o coeficiente de absorção molar (ϵ).

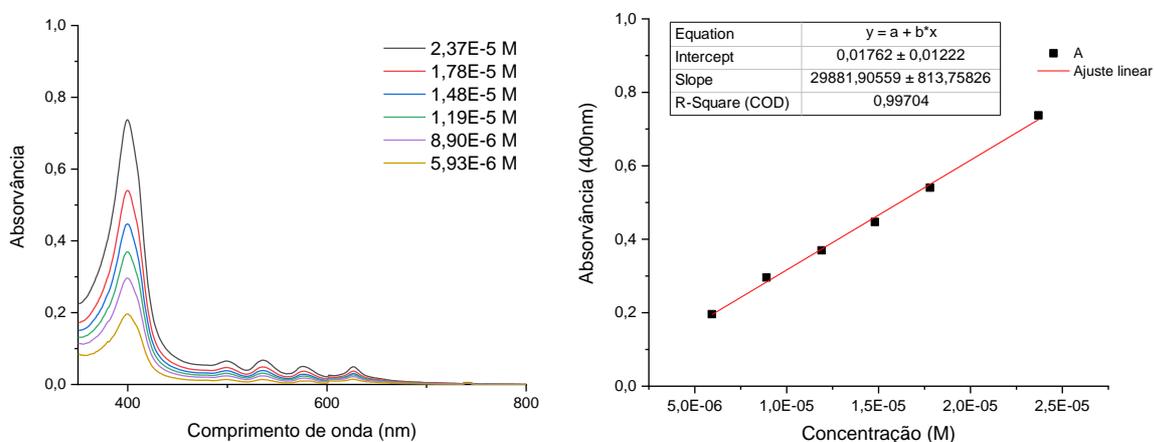
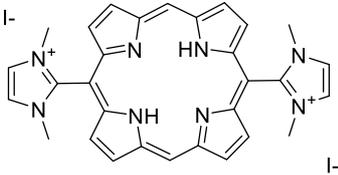
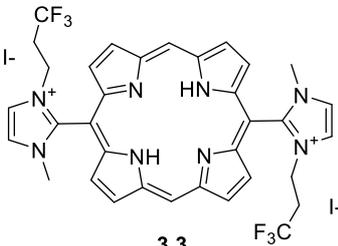
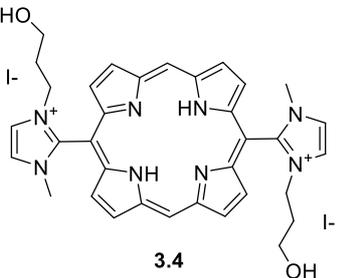


Figura 3.8 – Espectro de UV-Vis de todas as soluções de **3.4** em etanol e relação obtida entre concentrações e absorvância a 400 nm com respetivo ajuste linear

Os valores de ϵ obtidos para cada banda de absorção das porfirinas em estudo encontram-se descritos na secção experimental (Capítulo 4) e sumarizados na tabela 3.1, estando de acordo com a literatura para *meso*-aril porfirinas catiónicas.^{10, 14}

Tabela 3.1 – Valores ϵ obtidos em etanol para cada porfirina em estudo

Amostra	ϵ (λ)
	$5,4 \times 10^4$ (395 nm)
 <p style="text-align: center;">3.2</p>	$4,6 \times 10^3$ (496 nm)
	$5,0 \times 10^3$ (532 nm)
	$2,2 \times 10^3$ (572 nm)
	$4,1 \times 10^3$ (625 nm)
	$5,2 \times 10^4$ (395 nm)
 <p style="text-align: center;">3.3</p>	$3,5 \times 10^3$ (498 nm)
	$4,0 \times 10^3$ (533 nm)
	$1,5 \times 10^3$ (572 nm)
	$3,1 \times 10^3$ (626 nm)
	$3,0 \times 10^4$ (400 nm)
 <p style="text-align: center;">3.4</p>	$2,8 \times 10^3$ (499 nm)
	$3,0 \times 10^3$ (536 nm)
	$2,2 \times 10^3$ (576 nm)
	$1,9 \times 10^3$ (627 nm)

3.2.2. Determinação do rendimento quântico de oxigênio singuleto

O rendimento quântico de formação de oxigênio singuleto (ϕ_{Δ}) é uma forma de avaliar a capacidade de os fotossensibilizadores produzirem espécies reativas de oxigênio mediante a exposição a uma fonte de luz. Para a determinação deste parâmetro utilizou-se como referência a fenalenona, tendo-se optado pelo uso da técnica de emissão de fosforescência resolvida no tempo, uma vez que este método permite a medição direta da emissão de fosforescência do oxigênio singuleto a 1270 nm

para diferentes energias de pulso do laser. Salienta-se que estes estudos foram realizados sob o apoio tutorial de Fábio Schaberle.

Os estudos para a determinação do rendimento quântico de formação de oxigênio singuleto foram realizados usando etanol como solvente, porém não se encontrou descrito na literatura o rendimento quântico da referência em etanol. Por isso, considerou-se o valor do solvente com polaridade mais próxima (ϕ_{Δ} fenalenona = 0,95 em metanol).¹⁵ Deste modo, foram preparadas soluções das amostras e da referência (fenalenona) com absorvância aproximada de 0,2 a 355 nm, com a finalidade de obter um equilíbrio entre a intensidade do sinal e evitar fenômenos de agregação. Posteriormente, para cada energia do laser foi obtido um decaimento da fosforescência do oxigênio singuleto, sendo estes ajustados a uma exponencial (figura 3.9).

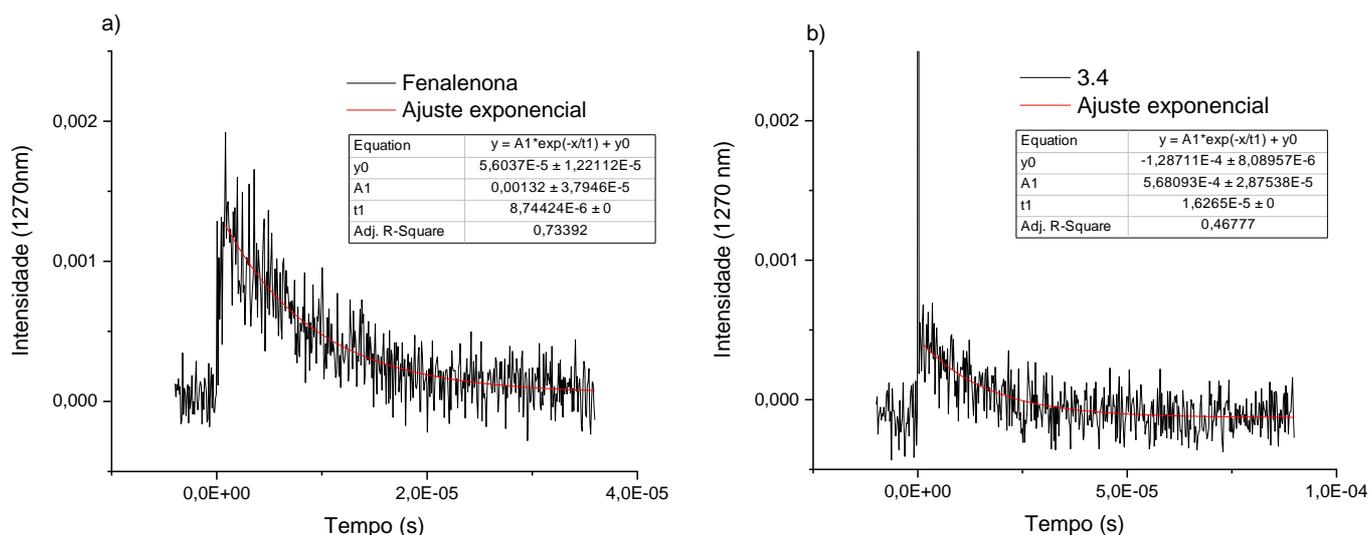


Figura 3.9 – Intensidade de fosforescência do oxigênio singuleto ao longo do tempo medida a 1270 nm utilizando iguais intensidades de laser: a) Fenalenona (MeOH); b) **3.4** (EtOH)

Da equação de ajuste obtida foi retirado o valor do pré-exponencial (A_1) e o respectivo erro, sendo estes valores utilizados para a construção de um novo gráfico do valor de A_1 em função da energia do laser (figura 3.10). A este gráfico foi realizado um ajuste linear dos valores e retirado o respectivo declive da reta (S).

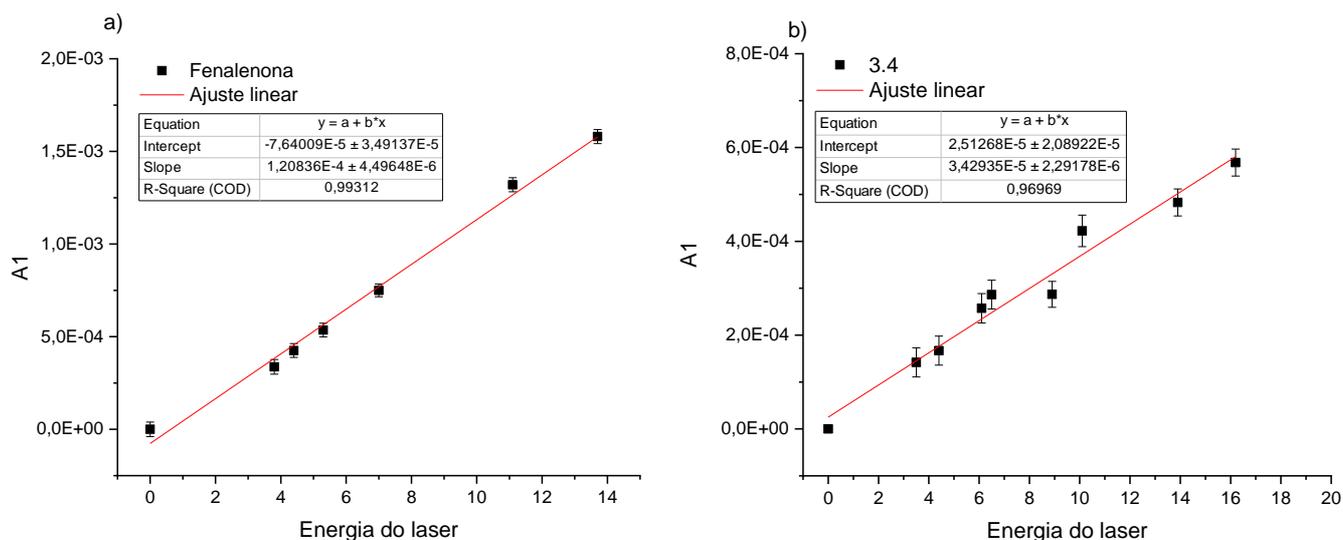


Figura 3.10 – Ajuste linear do valor pré-exponencial (A_1) em função da energia do laser: a) Fenalenona (MeOH); b) **3.4** (EtOH)

Uma vez que o rendimento quântico de formação de oxigênio singuleto é definido como a razão entre o número de moléculas de oxigênio singuleto produzidas e o número total de fótons absorvidos pela amostra, este pode ser calculado por um método comparativo através da equação 3.2:¹⁶

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta}^{Ref} \frac{S}{1 - 10^{-A}} \cdot \frac{1 - 10^{-A_{Ref}}}{S_{Ref}} \quad (3.2)$$

Onde Φ_{Δ}^{Ref} corresponde ao rendimento quântico de formação de oxigênio singuleto da referência, S e S_{Ref} representam o declive da reta obtida através do ajuste linear da amostra e da referência, respectivamente. A e A_{Ref} correspondem à absorvância da amostra e da referência ao comprimento de onda de excitação (355 nm), respectivamente. Os valores de Φ_{Δ} obtidos para cada amostra encontram-se resumidos na tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Valores de ϕ_{Δ} obtidos em etanol para cada porfirina em estudo

Amostra	ϕ_{Δ}
3.2	0,63
3.3	0,46
3.4	0,27

Os resultados obtidos permitem concluir que, nos compostos estudados, se observa uma diminuição considerável dos rendimentos quânticos de formação de oxigênio singuleto com o aumento da cadeia alquílica e da anfifilicidade do grupo cationizante. Os decréscimos nos valores de ϕ_{Δ} podem ser devidos a efeitos de agregação, dado que **3.4** apresenta um espectro de UV-Vis com a banda *Soret* mais alargada. Todavia, os resultados de ϕ_{Δ} para **3.2** e **3.3** encontram-se de acordo com os dados anteriormente reportados referentes a porfirinas catiónicas do tipo diimidazolil.^{17, 18} Relativamente a **3.4**, estudos adicionais respeitantes ao efeito do solvente, encontram-se, de momento, em curso.

Finalmente, as porfirinas catiónicas **3.2**, **3.3** e **3.4** foram estudadas do ponto de vista biológico, tendo-se avaliado o seu potencial como fotossensibilizadores para aplicação em terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT). Deste modo, os estudos prosseguiram com a avaliação da fotoinativação de microorganismos pelos compostos sintetizados, assim como estudos de terapia dual conjuntamente com os aldeídos de ocorrência natural estudados no Capítulo anterior (Capítulo 2).

3.3. Terapia fotodinâmica antimicrobiana

Considerando o número crescente de microrganismos resistentes aos antibióticos atualmente comercializados, o uso de terapias alternativas eficientes e menos suscetíveis a mecanismos de resistência são extremamente relevantes. Uma abordagem alternativa bastante promissora é a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), não existindo, até ao momento, estudos reportados de indução de resistência a aPDT após tratamentos consecutivos com doses subletais.^{19, 20} Nesse sentido, ao longo

deste subcapítulo serão apresentados e discutidos os estudos de inativação bacteriana do conjunto de fotossensibilizadores do tipo porfirina catiónica sintetizados.

As bactérias Gram-negativas são das mais difíceis de erradicar e das mais resistentes aos antibióticos comumente utilizados, tendo a OMS reportado recentemente um relatório onde destacou três tipos de bactérias Gram-negativas para as quais o desenvolvimento de novas moléculas e terapias antimicrobianas é de prioridade crítica. De entre as bactérias mencionadas destaca-se a *Escherichia coli*, uma bactéria da microbiota intestinal normal, existindo, no entanto, estirpes patogénicas que podem causar feridas crónicas, infeções do trato urinário, entre outras.²¹ Tendo por base este conhecimento, selecionou-se a estirpe *E. coli* ATCC 25922 da *American Type Culture Collection* para determinar e comparar os efeitos antibacterianos das porfirinas catiónicas **3.2**, **3.3** e **3.4**.

O protocolo para os estudos de fotoinativação iniciou-se pela preparação da suspensão bacteriana a partir de colónias puras crescidas *overnight*, de forma a alcançar um padrão de turbidez equivalente a 0,5 na escala de McFarland, correspondendo a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colónias (UFC)/mL. De seguida, uma placa de 96 poços estéril foi preparada com poços contendo soluções aquosas com diferentes concentrações dos fotossensibilizadores **3.2-3.4** (100 nM e 1 μ M), aos quais foram adicionados 10 μ L do inóculo anteriormente preparado. A placa foi colocada sob agitação durante 1 hora no escuro, sendo posteriormente exposta à luz (1,36 J/cm²). Para o protocolo no escuro (fotossensibilizador sem irradiação), a placa foi incubada coberta de papel de alumínio durante o mesmo tempo de irradiação dos grupos de aPDT. Após irradiação, as amostras foram diluídas, homogeneizadas e adicionadas a placas de Petri. Por fim, estas últimas foram incubadas na estufa a 37 °C durante 24 horas. Após este período, a viabilidade das bactérias foi avaliada através da contagem do número de colónias formadas (UFC/mL). Para cada fotossensibilizador, o ensaio foi realizado em triplicado, encontrando-se os resultados obtidos na figura 3.11.

E. coli ATCC 25922

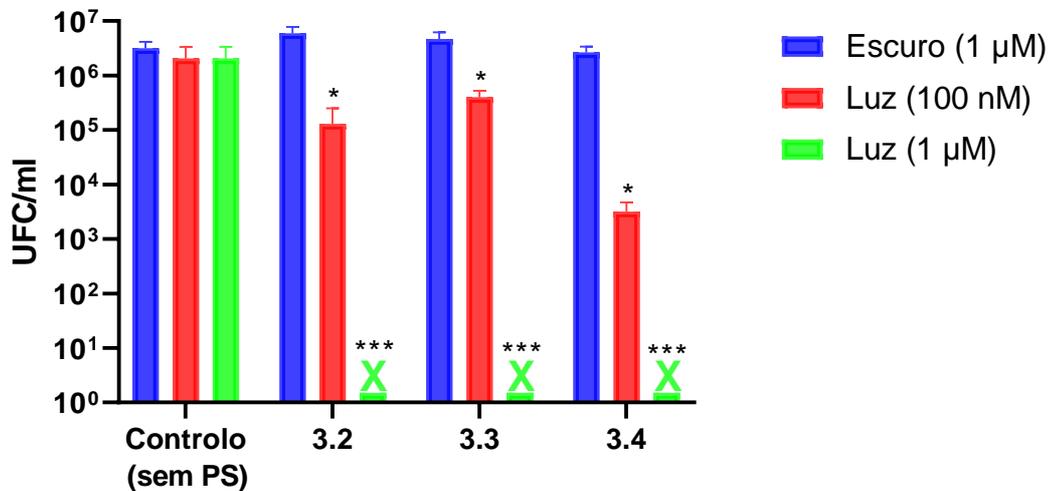


Figura 3.11 – Efeito da inativação fotodinâmica em função da concentração para a *E. coli* para uma dose de luz de 1,36 J/cm²; “X” denota a inativação completa do inóculo; os rótulos * (p < 0,05), ** (p < 0,01) e *** (p < 0,001) representam a diferença estatística relativamente ao grupo controlo.

Fazendo uma análise comparativa, pode notar-se que na concentração máxima estudada (1 µM) todas as porfirinas catiónicas estudadas inativaram eficientemente a *E. coli*, promovendo uma redução de 7 log₁₀ na sua viabilidade. Relativamente à concentração de fotossensibilizador de 100 nM, o valor de fotoativação mais elevado foi obtido para o PS 3.4, atingindo uma redução de UFC/mL em 4 log₁₀ de *E. coli*. Os PSs 3.2 e 3.3 apresentam valores de inativação menores, alcançando uma redução de 3 e 2 log₁₀, respetivamente. No que diz respeito à incubação no escuro com uma concentração de 1 µM de fotossensibilizador, nenhum dos compostos testados apresentou toxicidade.

Tendo por base os resultados apresentados, conclui-se que o fotossensibilizador mais ativo revelou ser a porfirina catiónica 3.4. Comparando os fotossensibilizadores 3.2 e 3.3, a alteração de um grupo metilo para uma cadeia alquílica maior com término num grupo funcional haloalquí (CF₃), não promoveu uma diferença significativa na inativação da *E. coli*. No entanto, a modificação do grupo funcional no término da cadeia alquílica de um grupo mais lipófilo (CF₃; fotossensibilizador 3.3) para um grupo mais hidrofílico

(OH; fotossensibilizador **3.4**) conduziu a um aumento da fotoativação. Apesar de **3.4** apresentar valores de coeficientes de absorção molar e de rendimento quântico de formação de oxigênio singuleto menores relativamente a **3.2** e **3.3**, este fotossensibilizador demonstra ser o mais promissor nos estudos de fotoativação. Tal pode dever-se a uma melhor interação de **3.4** com os componentes da membrana bacteriana comparativamente aos restantes PSs estudados.

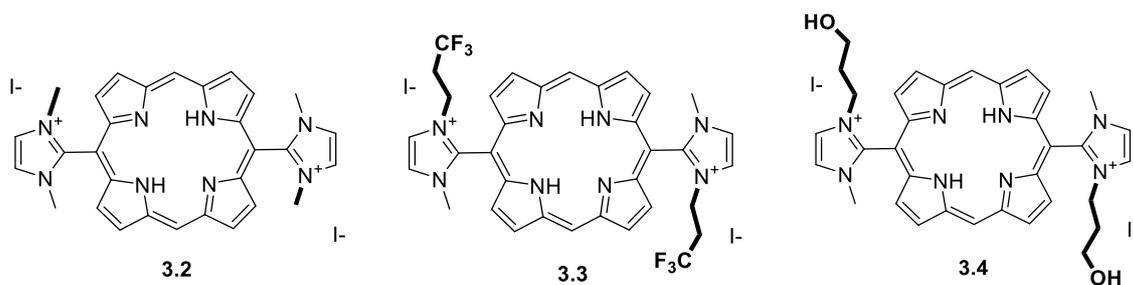


Figura 3.12 – Estrutura química das porfirinas catiónicas testadas como fotossensibilizadores, com ênfase nos seus grupos cationizantes.

Considerando todos os resultados apresentados, torna-se possível concluir que o efeito da modulação da anfifilicidade das diferentes cadeias cationizantes nos fotossensibilizadores não é facilmente previsto, tornando o desenvolvimento de novos compostos consideravelmente mais difícil. No entanto, para um melhor entendimento sobre a potencialidade das porfirinas catiónicas sintetizadas como fotossensibilizadores, estudos, como estudos de internalização celular bacteriana e estudos de citotoxicidade no escuro e fototoxicidade em células humanas, seriam necessários. Todavia, os resultados apresentados abrem portas e oferecem informações relevantes para a síntese de entidades químicas inovadoras e futuras investigações no âmbito da resistência bacteriana.

3.4. Terapia dual

Como mencionado no capítulo 1 desta Dissertação, uma das melhores maneiras de evitar a resistência aos antibacterianos compreende a combinação de múltiplos mecanismos de ação, de modo que sejam necessárias múltiplas mutações nos diversos alvos moleculares para gerar resistência, diminuindo drasticamente a sua probabilidade de ocorrência. Com base nestas premissas, conjugou-se o aldeído **1.10**, que apresentou

melhor diâmetro de inibição bacteriana, com o fotossensibilizador **3.4**, considerado o mais eficaz nos estudos de aPDT em culturas bacterianas planctônicas de *E. coli*, descritos no subcapítulo anterior.

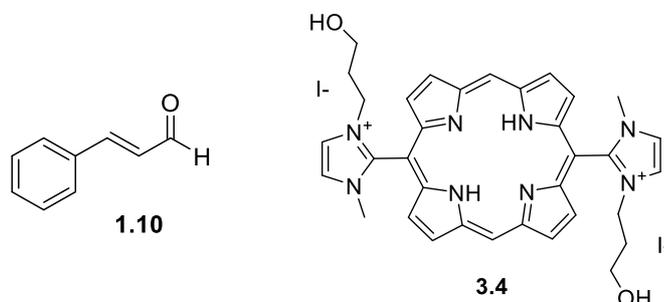


Figura 3.13 – Estrutura química do aldeído **1.10** usado em combinação com a porfirina **3.4** como fotossensibilizador nos estudos de terapia dual

Do mesmo modo que nos ensaios de aPDT, o protocolo iniciou-se pela incubação no escuro (1 h) de uma suspensão bacteriana de *E. coli* com: i) uma solução aquosa sem PS ou aldeído (controlo, figura 3.13); ii) uma solução aquosa de PS **3.4** a 50 – 100 nM (**3.4** 0% DMSO; figura 3.13); iii) uma solução aquosa com 5% de DMSO de PS **3.4** a 50 – 100 nM (**3.4** 5% DMSO; figura 3.13); iv) uma solução aquosa com 5% de DMSO de PS **3.4** a 50 – 100 nM e com o aldeído **1.11** a 1 mg/mL (**3.4** + **1.11** 5% DMSO; figura 3.13). De seguida, todos os grupos foram irradiados com um LED azul ($\lambda = 415 \text{ nm}$; $1,36 \text{ J/cm}^2$). Após irradiação, o número de UFC/mL presente em cada amostra foi determinado de acordo com o procedimento descrito previamente. Este ensaio foi realizado em triplicado, apresentando-se os resultados obtidos na figura 3.14.

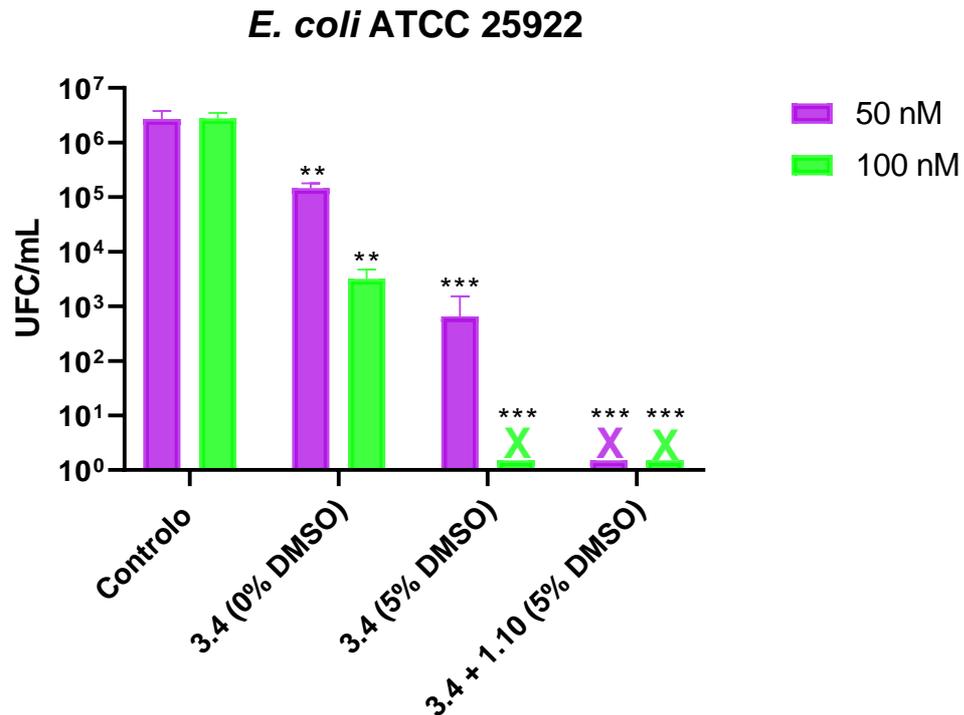


Figura 3.14 – Efeito terapia dual para a *E. coli* para uma dose de luz de 1,36 J/cm²; “X” denota a inativação completa do inóculo; os rótulos * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$) representam a diferença estatística relativamente ao grupo controlo

Numa primeira aproximação, testou-se uma concentração de fotossensibilizador de 100nM (concentração mínima testada nos estudos de fotoinativação). Como podemos observar pelo gráfico apresentado na figura 3.13, sob esta concentração, o Fotossensibilizador **3.4** manteve a sua atividade na inativação da *E. coli* (4 log₁₀). Já para a sua combinação com 5% de DMSO e com o aldeído **1.10** (5% DMSO) observou-se uma fotoinativação completa do inóculo, o que não nos permite retirar nenhuma conclusão sob a eventual atividade sinérgica entre aPDT usando **3.4** e **1.10**. Tal deve-se ao facto de esta percentagem de DMSO possuir alguma atividade antimicrobiana, sendo, no entanto, necessária para a dissolução do aldeído. Tendo por base este resultado, numa segunda aproximação, diminuiu-se a concentração de PS para 50 nM. Para esta observou-se uma menor atividade fotodinâmica contra *E. coli* quando o fotossensibilizador **3.4** foi utilizado em regime de monoterapia, atingindo apenas aproximadamente uma inativação de 1 log₁₀ (0% DMSO) e 3 log₁₀ (5% DMSO). Quando foi efetuada a terapia

dual utilizando **3.4** + **1.10** (5% DMSO), ocorreu uma inativação completa ($>6 \log_{10}$) da estirpe estudada.

Considerado os resultados obtidos, podemos concluir que apenas para a concentração de fotossensibilizador de 50 nM foi possível obter informações relativas às potencialidades da utilização de **3.4** + **1.10** em aPDT. Nesta combinação, foi notável um efeito sinérgico, que resultou num decréscimo do número de UFC/mL de *E. coli* comparativamente com a aPDT em regime de monoterapia. Estudos prévios reportaram que **1.10** exerce a sua atividade antibacteriana através da destruição da estrutura da membrana celular bacteriana. No entanto, os seus alvos moleculares ainda não são bem compreendidos.²² Todavia, a interação sinérgica observada nesta terapia dual pode ser devida a uma rutura na integridade da membrana celular, por ação conjunta dos ROS (peroxidação lipídica) com o aldeído em estudo.

3.5. Conclusões

O objetivo fulcral deste capítulo centra-se na síntese de *trans*-di-imizadoil porfirinas catiónicas funcionalizados com múltiplos grupos funcionais visando obter compostos com diferentes anfifilicidades, de modo a desenvolver novos fotossensibilizadores para aplicação em terapia fotodinâmica antibacteriana. Posteriormente, numa tentativa de evitar o aparecimento de resistência bacteriana procedeu-se a estudos de terapia dual, conjugando terapias e moléculas com múltiplos mecanismos de ação.

Inicialmente, começou-se por sintetizar um conjunto de fotossensibilizadores do tipo porfirina catiónica (**3.2**, **3.3**, **3.4**) derivados da porfirina **3.1**, que serviu de base para as diferentes modulações estruturais selecionadas de acordo com as características pretendidas. As di-imidazolil porfirinas catiónicas **3.2**, **3.3** e **3.4** foram obtidas com rendimentos entre 59-84%, tendo as diferentes reatividades dos agentes cationizantes utilizados (iodometano para **3.2**, 1,1,1-trifluoro-3-iodopropanol para **3.3** e 3-iodopropanol para **3.4**) influenciado as condições de cada reação (temperatura e tempo de reação).

Após efetuar a síntese das moléculas desejadas, foram realizados estudos fotofísicos e biológicos, avaliando-se propriedades essenciais na projeção de fotossensibilizadores para aPDT, nomeadamente, coeficientes de absorção molar, rendimentos quânticos de formação de oxigénio singuleto e fotoinativação de uma bactéria gram-negativa (*E. coli* ATCC 25922). Relativamente ao primeiro ponto, todos os compostos apresentam um valor de ϵ dentro da mesma ordem de valores, tendo a porfirina catiónica **3.2** os valores mais elevados para a banda *Soret*. Do mesmo modo, o maior rendimento quântico de formação de oxigénio singuleto foi também obtido para **3.2**. Relativamente aos estudos de biológicos, para a concentração de 100 nM e 1,36 J/cm² de dose de luz, o composto **3.4** foi o que apresentou os melhores valores de fotoinativação (4 log₁₀) da *E. coli*.

Por fim, realizou-se uma experiência de terapia dual em *E. coli*, através da combinação de aPDT usando a porfirina catiónica **3.4** com o aldeído **1.10**, avaliado previamente quanto à sua atividade antibacteriana. Após a análise do efeito da concentração de **3.4**, concluiu-se que a combinação de doses sub-bactericidas de aPDT usando o fotossensibilizador **3.4** (50 nM a 1,36 J/cm²) com o aldeído **1.10** (1 mg/mL), levou à inativação total do inóculo (>6 log₁₀), o que evidencia um relevante efeito sinérgico.

Em suma, os resultados obtidos neste capítulo são um bom ponto de partida e abrem caminho para o desenvolvimento de novos fotossensibilizadores do tipo porfirina catiónica anfifílica, com propriedades estruturais moduladas para aumentar a sua atividade antibacteriana, assim como terapias alternativas, enfatizando-se a terapia dual, que promove a atividade de agentes antimicrobianos com um potencial menor de suscetibilidade ao desenvolvimento mecanismos de resistência.

3.6. Referências

- [1] Hamblin, M. R., & Hasan, T. (2004). Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?. *Photochemical & photobiological sciences*, 3(5), 436-450.
- [2] Hamblin, M. R.; Jori, G. (2011). Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens. *The royal society of chemistry: Cambridge*.
- [3] Jori, G., Camerin, M., Soncin, M., Guidolin, L., & Coppelotti, O. (2011). Antimicrobial photodynamic therapy: basic principles. *Photodynamic inactivation of microbial pathogens: Medical and environmental applications*, 83-160.
- [4] Alves, E., Faustino, M. A., Neves, M. G., Cunha, A., Nadais, H., & Almeida, A. (2015). Potential applications of porphyrins in photodynamic inactivation beyond the medical scope. *Journal of photochemistry and photobiology C: Photochemistry reviews*, 22, 34-57.
- [5] Amos-Tautua, B. M., Songca, S. P., & Oluwafemi, O. S. (2019). Application of porphyrins in antibacterial photodynamic therapy. *Molecules*, 24(13), 2456.
- [6] Sobotta, L., Skupin-Mrugalska, P., Piskorz, J., & Mielcarek, J. (2019). Porphyrinoid photosensitizers mediated photodynamic inactivation against bacteria. *European journal of medicinal chemistry*, 175, 72-106.
- [7] Kasha, M. (1950). Characterization of electronic transitions in complex molecules. *Discussions of the Faraday society*, 9, 14-19.
- [8] Dąbrowski, J. M., & Arnaut, L. G. (2015). Photodynamic therapy (PDT) of cancer: from local to systemic treatment. *Photochemical & photobiological sciences*, 14(10), 1765-1780.

- [9] Silva, E. F., Serpa, C., Dąbrowski, J. M., Monteiro, C. J., Formosinho, S. J., Stochel, G., Urbanska, K., Simões, S., Pereira, M. M., & Arnaut, L. G. (2010). Mechanisms of singlet-oxygen and superoxide-ion generation by porphyrins and bacteriochlorins and their implications in photodynamic therapy. *Chemistry – A european journal*, *16*(30), 9273-9286.
- [10] Arnaut, L. G., Pereira, M. M., Dąbrowski, J. M., Silva, E. F., Schaberle, F. A., Abreu, A. R., Rocha, L. B., Barsan, M. M., Urbanska, K., Stochel, G., & Brett, C. M. (2014). Photodynamic therapy efficacy enhanced by dynamics: the role of charge transfer and photostability in the selection of photosensitizers. *Chemistry – A european journal*, *20*(18), 5346-5357.
- [11] Castano, A. P., Demidova, T. N., & Hamblin, M. R. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one — photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, *1*(4), 279-293.
- [12] Atkins, P., & Overton, T. (2010). *Shriver and Atkins' inorganic chemistry*. 5th ed. Oxford University Press, USA.
- [13] Vinagreiro, C. S., Zangirolami, A., Schaberle, F. A., Nunes, S. C., Blanco, K. C., Inada, N. M., da Silva, G. J., Pais, A. A. C. C., Bagnato, V. S., Arnaut, L. G., & Pereira, M. M. (2020). Antibacterial photodynamic inactivation of antibiotic-resistant bacteria and biofilms with nanomolar photosensitizer concentrations. *ACS infectious diseases*, *6*(6), 1517-1526.
- [14] Mandal, A. K., Taniguchi, M., Diers, J. R., Niedzwiedzki, D. M., Kirmaier, C., Lindsey, J. S., Bocian, D. F., & Holten, D. (2016). Photophysical properties and electronic structure of porphyrins bearing zero to four meso-phenyl substituents: New insights into seemingly well understood tetrapyrroles. *The journal of physical chemistry A*, *120*(49), 9719-9731.

- [15] Schmidt, R., Tanielian, C., Dunsbach, R., & Wolff, C. (1994). Phenalenone, a universal reference compound for the determination of quantum yields of singlet oxygen O₂ ($^1\Delta_g$) sensitization. *Journal of photochemistry and photobiology A: Chemistry*, 79(1-2), 11-17.
- [16] Vinagreiro, C. S., Síntese de conjugados de sulfonamidas e macrociclos tetrapirrólicos com potencial aplicação dual em químio- e fototerapia. Dissertação de Mestrado. Coimbra University, 2015.
- [17] Arnaut, Z. A., Development of cationic photosensitizers for photoinactivation of microorganisms. Dissertação de Mestrado. Coimbra University, 2021.
- [18] Aroso, R. T., Computational design and synthesis of molecules for application in antimicrobial therapies. Tese de Doutorado. Coimbra University, 2022
- [19] Kashef, N., & Hamblin, M. R. (2017). Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation?. *Drug Resistance Updates*, 31, 31-42.
- [20] Tavares, A., Carvalho, C., Faustino, M. A., Neves, M. G., Tomé, J. P., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A. S., Cunha, A., Gomes, N. C. M., Alves, E. & Almeida, A. (2010). Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. *Marine drugs*, 8(1), 91-105.
- [21] Aroso, R. T., Dias, L. D., Blanco, K. C., Soares, J. M., Alves, F., da Silva, G. J., Arnaut, L. G., Bagnato, V. S., & Pereira, M. M. (2022). Synergic dual phototherapy: Cationic imidazolyl photosensitizers and ciprofloxacin for eradication of in vitro and in vivo E. coli infections. *Journal of photochemistry and photobiology B: Biology*, 233, 112499.
- [22] Pang, D., Huang, Z., Li, Q., Wang, E., Liao, S., Li, E., Zou, Y., & Wang, W. (2021). Antibacterial Mechanism of Cinnamaldehyde: Modulation of Biosynthesis of Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylglycerol in Staphylococcus aureus and Escherichia coli. *Journal of agricultural and food chemistry*, 69(45), 13628-13636.

Capítulo 4

Experimental

Neste Capítulo é fornecida toda a informação relativa aos reagentes, solventes, técnicas e instrumentação utilizada nesta Dissertação de Mestrado, bem como os procedimentos de síntese e caracterização dos compostos sintetizados.

4.1 Solvente e Reagentes

Todos os compostos foram comercialmente obtidos da Merck, Fluka, Strem ou Sigma Aldrich, exceto quando indicado. Reagentes sensíveis ao ar e humidade foram manuseados em atmosfera de argón ou nitrogénio, num sistema de vácuo, usando técnicas de Schlenk. Todo o material de vidro foi seco por aquecimento numa estufa a 150 °C. Todos os solventes foram purificados por destilação simples ou, quando necessário, devidamente secos e destilados pelos procedimentos padrões descritos¹ em baixo.

2-Metiltetra-hidrofurano (Me-THF)

O solvente foi colocado num balão com sódio e benzofenona. A mistura foi mantida em refluxo até a observação de uma cor azul forte. Após destilação, o solvente foi recolhido e guardado, em atmosfera inerte, num frasco contendo peneiros moleculares ativados (3 Å).

Tolueno

O tolueno foi colocado num balão com sódio e benzofenona. A mistura foi mantida em refluxo até a observação de uma cor azul forte. Após destilação, o solvente foi recolhido e guardado, em atmosfera inerte, num frasco contendo peneiros moleculares ativados (3 Å).

4.2 Instrumentação e Técnicas

Cromatografia de camada fina (TLC)

Cromatografia de camada fina (TLC) foi realizada em placas de alumínio cobertas por gel de sílica 60 (Fluka) como indicador de fluorescência UV254.

Cromatografia gasosa (GC)

A cromatografia gasosa foi realizada num aparelho Agilent-7820 equipado com uma coluna capilar apolar HP-5 (5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano), com 30 m de comprimento e 0,32 mm de diâmetro interno, utilizando um detetor FID (Departamento de Química, Universidade de Coimbra).

GC-FID (Cromatógrafo Agilent-7820 equipado com uma coluna HP-5); programa: temperatura inicial 70 °C (tempo de espera 5 min), rampa de temperatura 35 °C/min até 275 °C (tempo de espera 10 min); gás de arraste: azoto.

Tempos de retenção

3-fenilpropanal (**1.9**): 8,7 min

(3,3-bis(aliloxi)propil benzeno (**2.1**): 10,6 min

Cinamaldeído (**1.10**): 9,3 min

Nonanal (**1.11**): 8,2 min

1,1-bis(aliloxi)nonano (**2.2**): 10,4 min

Ultrassons

Para facilitar a dissolução dos compostos foi utilizado um equipamento de ultrassom Bandelin Sonorex TK52.

Espetroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram realizados num espectrómetro Bruker Avance 400 (Departamento de Química, Universidade de Coimbra), utilizando clorofórmio deuterado (CDCl_3) e metanol deuterado (MeOD) como solventes deuterados, de acordo com a solubilidade dos compostos. Os desvios químicos ^1H e ^{13}C , expressos em ppm, são relativos a um padrão interno de TMS.

Espetrometria de massa (HRMS, do inglês High Resolution Mass Spectrometry)

Os espectros de massa foram obtidos através de um espectrómetro Bruker Microtof, equipado com um detetor ESI (ionização em electrospray), pertencente a Unidade de Masas e Proteómica da Universidade de Santiago de Compostela.

Espetroscopia de absorção no ultravioleta-visível (UV-Vis)

Os espectros de UV-Visível foram obtidos num espectrofotómetro Shimadzu 2100, usando células de quartzo com percurso ótico de 1 cm.

Os coeficientes de absorção molar foram determinados após a preparação de soluções com concentração entre 10^{-6} e 10^{-5} M em etanol. Representou-se graficamente a absorção para o máximo da banda considerada em função da concentração das diferentes soluções, obtendo-se uma reta cujo valor do declive corresponde ao valor do coeficiente de absorvância molar. Esta analogia é transmitida pela lei de Beer-Lambert, $A = \epsilon \ell c$, onde A é a absorvância, ϵ é o coeficiente de absorvância molar, ℓ é o caminho ótico percorrido pela luz e c é a concentração da solução.

Rendimento quântico de formação de oxigénio singuleto

O rendimento quântico de formação de oxigénio singuleto foi determinado através de um método comparativo por deteção da fosforescência do oxigénio singuleto a 1270 nm.² Foi utilizado um espectrómetro de fotólise por relâmpago da Applied Photophysics LKS.60, constituído por um laser Nd-YAG Spectra-Physics Quanta Ray GCR-

130, um osciloscópio Hewlett Packard Infinium e como detetor um fotomultiplicador Hamamatsu R5509-42, arrefecido a 193 K por azoto líquido. Como referência foi utilizada a fenalenona ($\Phi_{\Delta Ref}$ (metanol) = 0,95).³ As soluções de cada amostra foram preparadas em etanol e da referência em metanol, com absorvância aproximada de 0,2 a 355 nm. Esta técnica permite obter o decaimento da fosforescência ao longo do tempo, podendo ser ajustada uma exponencial. Para cada solução, foram obtidos cerca de 10 decaimentos a diferentes intensidades de laser de excitação. Após o ajuste exponencial para cada decaimento feito com recurso ao OriginPro 2019b, foram retirados os fatores pré-exponenciais (A_1) e representados em função da intensidade do laser. Os declives das retas obtidos para a amostra (S) e para a referência (S_{Ref}) podem ser relacionados com o rendimento quântico de oxigénio singlete da amostra (Φ_{Δ}) através da expressão:⁴

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta}^{Ref} \frac{S}{1 - 10^{-A}} \cdot \frac{1 - 10^{-A_{Ref}}}{S_{Ref}}$$

Em que A e A_{Ref} correspondem à absorvância da amostra e da referência, respetivamente.

Dispositivo de irradiação para ensaios de aPDT

Para a realização dos estudos planctónicos na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra foi utilizado, como fonte de irradiação, um LED com um máximo de emissão a 415 nm e com uma potência constante de 6 mW/cm².

Equipamento de fluxo contínuo

As reações em fluxo contínuo foram realizadas num equipamento easy-MedChem E-Series da Vapourtec® equipado com 3 bombas peristálticas V-3. Nos estudos realizados foi utilizado e um reator de coluna ajustável de 6,6 mm de diâmetro interno e 100 mm de comprimento da Omnifit® contendo o catalisador heterogéneo. O esquema da configuração do equipamento utilizada nos estudos encontrasse representada na Figura 4.1.

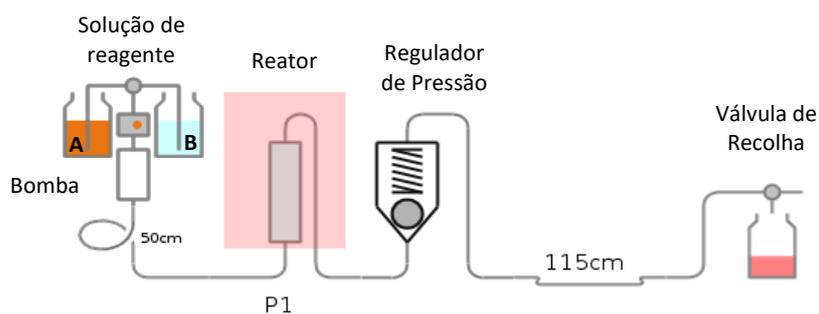


Figura 4.1 – Representação esquemática do sistema de fluxo contínuo utilizado

4.3 Síntese de acetais alílicos

As reações de acetalização de aldeídos foram realizadas, partindo dos aldeídos obtidos comercialmente. Estas reações foram efetuadas em sistemas em *batch* e/ou em sistemas em fluxo contínuo, estando descritas em pormenor nos parágrafos seguintes.

4.3.1 Acetalização em modo *batch*/convencional

A um balão foi adicionado o catalisador ácido (Amberlite IR-120) e adicionado álcool alílico (10 mL). Em seguida é adicionado o aldeído (3-fenilpropanal, 2,3 mmol) obtidos comercialmente. A mistura foi deixada em agitação a 70 °C durante 24 h. Após o fim da reação, foi retirada uma pequena alíquota para análise em GC.

4.3.2 Acetalização em *batch* com recurso ao aparato de Dean-Stark

A um balão foi adicionado o catalisador ácido (Amberlite IR-120 e Montmorillonite K10) e adicionado tolueno (15 mL), álcool alílico (5 mL) e, em seguida, o aldeído (3-fenilpropanal) obtido comercialmente. Com recurso ao aparato de Dean-Stark, a mistura foi deixada em refluxo, sob agitação, a 120 °C durante 4 h. Após o término da reação, foi retirada uma pequena alíquota para análise em GC.

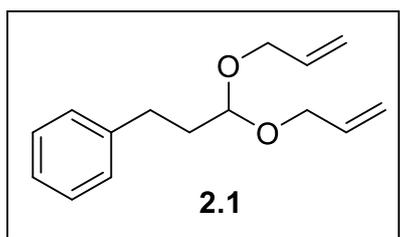
4.3.3 Acetalizações em fluxo contínuo

As soluções para a reação foram preparadas ao dissolver os aldeídos desejados (0,1 M) numa solução com uma proporção volumétrica de 1:1 de álcool alílico/2-metiltetra-hidrofurano (equivalentes de álcool/aldeído em mol - 73:1). O reator

utilizado foi um reator de coluna compactado com 2 g da resina Montmorillonite K10, usando 2-metiltetra-hidrofurano como solvente. A reação deu-se a 70 °C, com tempo de residência no reator de 10 minutos. No final de cada experiência, a amostra foi analisada por GC. Este procedimento diz respeito as condições experimentais após otimização.

Síntese do (3,3-bis(aliloxi)propil) benzeno (2.1)

A preparação do acetal **2.1** por fluxo contínuo seguiu o procedimento acima descrito, tendo o produto sido analisado por GC, obtendo-se uma conversão de 97%. Posteriormente, evaporou-se o solvente e realizou-se uma extração com éter etílico e água destilada, obtendo-se um rendimento final de 54% (0,256 g). O acetal foi caracterizado por RMN-¹H, RMN-¹³C e espectrometria de massa.



Rendimento: 54%

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7,24 – 7,09 (m, 5H), 5,89 – 5,82 (m, 2H), 5,24 – 5,19 (m, 2H), 5,09-5,07 (m, 2H), 4,53 (t, *J* = 5,7 Hz; 1H), 4,04 (ddt, *J* = 12,7; 5,4; 1,4 Hz; 2H), 3,94 (ddt, *J* = 12,8; 5,7; 1,4 Hz; 2H), 2,65 – 2,61

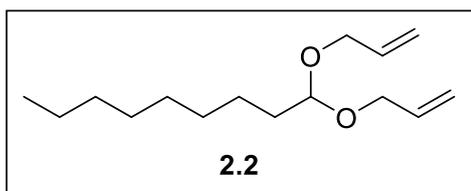
(m, 2H), 1,92 – 1,87 (m, 2H)

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 141,64; 134,77; 128,44; 128,27; 125,92; 116,68; 101,58; 66,36; 35,02; 31,02.

ESI-MS m/z: obtido 255,1356 [M+Na]⁺; calculado para C₁₅H₂₀NaO₂⁺ 255,1356

Síntese do 1,1-bis(aliloxi)nonano (2.2)

A preparação do acetal **2.2** por fluxo contínuo seguiu o procedimento acima descrito, tendo o produto sido analisado por GC, obtendo-se uma conversão de 97%. Posteriormente, evaporou-se o solvente e obteve-se o produto isolado com um rendimento final de 97% (0,408 g). O acetal foi caracterizado por RMN-¹H, RMN-¹³C e espectrometria de massa.



Rendimento: 97%

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 5,85 – 5,95 (m, 2H), 5,30 – 5,25 (dd, *J* = 17,2; 1,5 Hz; 2H), 5,16 – 5,13 (dd, *J* = 10,4; 1,0 Hz; 2H), 4,58 (t, *J* = 5,8 Hz;

1H), 4,08 (dd, *J* = 12,7; 5,4 Hz; 2H), 4,00 (dd, *J* = 12,8; 5,8 Hz; 2H), 1,61 – 1,66 (m, 2H), 1,26 – 1,37 (m, 12H), 0,87 (t, *J* = 6,8 Hz; 3H)

RMN ¹³C (101 mHz, CDCl₃) δ/ppm: 134,93; 116,65; 102,23; 66,20; 33,47; 31,96; 29,60; 29,56; 29,33; 24,82; 22,75; 14,18

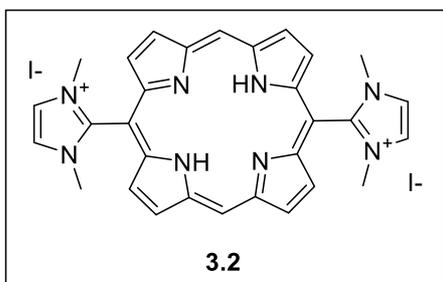
ESI-MS m/z: obtido 263,1985 [M+Na]⁺; calculado para C₁₅H₂₀NaO₂⁺ 263,1982

4.4 Síntese de di-imidazolil porfirinas catiónicas

A síntese de di-imidazolil porfirinas catiónicas foi efetuada através de reações padrão, usando a 5,15-bis(1-metilimidazol-2-il)porfirina como material de partida e diferentes haloalcanos. As condições específicas de cada reação encontram-se mencionadas abaixo.

4.4.1 Síntese da 5,15-bis(1,3-dimetilimidazol-2-il)porfirina **3.2**

Num balão de fundo redondo dissolveu-se a 5,15-bis(1-metilimidazol-2-il)porfirina (100 mg; 0,21 mmol) em DMF (0,35 mL) e adicionou-se iodometano (1,36 mL; 22 mmol). A mistura reacional foi mantida em agitação durante 24 horas a 25 °C. Terminado este período, precipitou-se o produto com éter dietílico, obtendo-se um rendimento final de 82% (0,074 g). Os dados espectroscópicos encontram-se de acordo com a literatura.⁵



Rendimento: 82%

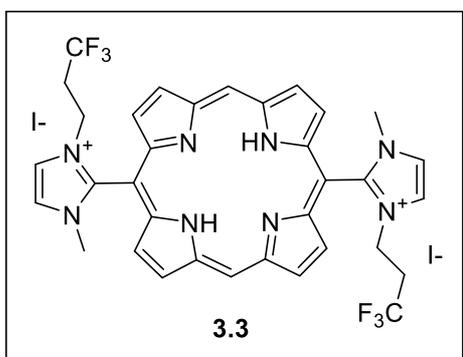
RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ/ppm: 10,90 (s, 2H), 9,88-9,86 (m, 4H), 9,20-9,13 (m, 4H), 8,39 (s, 4H), 3,85 (s, 12H), -2,20 (s, 2H).

ESI-MS m/z: obtido 250,1218 [M-2I]²⁺/2; calculado para [C₃₀H₂₈N₈]²⁺/2 250,1213

UV/Vis (EtOH) λ_{max Abs} (log ε): 395 nm (4,73); 496 nm (3,66); 532 nm (3,70); 572 nm (3,34); 625 nm (3,61)

4.4.2 Síntese da 5,15-bis(1-metil-3-(1,1,1-trifluoropropil)imidazol-2-il)porfirina**3.3**

Num balão de fundo redondo dissolveu-se a 5,15-bis(1-metilimidazol-2-il)porfirina (50 mg; 0,1 mmol) em DMF (0,2 mL) e adicionou-se faseadamente 100 equivalentes de 1,1,1-trifluoro-3-iodopropano (1,25 mL; 10,6 mmol). A mistura reacional foi mantida em agitação durante 72 horas 60 °C. Terminado este período, precipitou-se o produto com éter dietílico, obtendo-se um rendimento final de 84% (0,082 g).



Rendimento: 84%

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ/ppm: 10,93 (s, 2H), 9,90 (s, 4H), 9,18 (s, 4H), 8,64-8,45 (m, 4H), 4,50-4,41 (m, 4H), 3,97-3,87 (m, 6H), 2,77-2,61 (m, 4H)

RMN ¹⁹F (400 MHz, CD₃OD) δ/ppm: -66,72 a -66,75 (m, 6F)

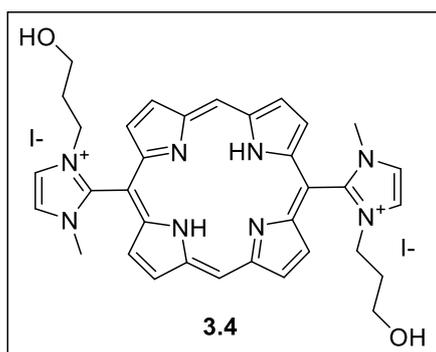
ESI-MS m/z: obtido 664,2492 [M-2I]²⁺/2;

calculado para [C₃₄H₃₀F₆N₈]²⁺/2 664,2487

UV/Vis (EtOH) λ_{max} Abs (log ε): 395 nm (4,72); 498 nm (3,54); 533 nm (3,60); 572 nm (3,17); 626 nm (3,49)

4.4.3 Síntese da 5,15-bis(1-metil-3-(3-hidroxipropil)imidazol-2-il)porfirina 3.4

Num balão de fundo redondo contendo uma solução da 5,15-bis(1-metilimidazol-2-il)porfirina (30 mg, 0,064 mmol) em acetona (0,2 mL), adicionou-se faseadamente 5 equivalentes de 3-iodopropanol (35 equivalentes total; 0,2 mL; 0,32 mmol). A mistura foi deixada sob agitação, à temperatura ambiente, durante 15 dias. O solvente foi evaporado sob vácuo e o sólido resultante dissolvido em metanol para precipitação da porfirina cationizada com Me-THF, obtendo-se um rendimento final de 59% (0,022 g).



Rendimento: 59%

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ/ppm: 10,89 (s, 2H), 9,86 (s, 4H), 9,18 (s, 4H), 8,48 (s, 2H), 8,41 (s, 2H), 4,25-4,23 (m, 4H), 3,86-3,84 (m, 6H), 3,69-3,66 (m, 4H), 1,82-1,81 (m, 4H)

ESI-MS m/z: obtido 587,2858 [M-2I-H]⁺; calculado para [C₃₄H₃₅N₈O₂]⁺ 587,2877

UV/Vis (EtOH) λ_{max} Abs (log ε): 400 nm (4,47); 499 nm (3,45); 536 nm (3,47); 576 nm (3,35); 627 nm (3,28)

4.5. Ensaio de suscetibilidade antibacteriana – Método de difusão em disco

Os ensaios de suscetibilidade aos diferentes agentes com atividade antibacteriana foram realizados pelo método de difusão em disco, em meio Muller Hinton (MH), com base no método de Kirby-Bauer,⁶ e de acordo com os procedimentos adaptados do *Clinical and Laboratory Standards Institute*.⁷ Trata-se de um método qualitativo e flexível, sendo amplamente usado em laboratórios de microbiologia para bactérias de crescimento rápido. Este consiste na difusão do composto teste depositado num disco estéril de papel de filtro, estando o procedimento experimental descrito no seguinte parágrafo.

A técnica de difusão em disco iniciou-se com a preparação de um inóculo contendo uma suspensão bacteriana a partir de colónias de *E. coli* ATCC 25922 crescidas a partir do dia anterior, durante 16 – 24 h a 37 °C. A turbidez da suspensão foi ajustada ao padrão de 0,5 na escala de McFarland, equivalente a aproximadamente 1,5x10⁸ UFC/mL. Posteriormente, mergulhou-se uma zaragatoa esterilizada na suspensão bacteriana preparada e inoculou-se a superfície de uma placa de MH. Após a secagem do inóculo, aplicaram-se os discos de antibiótico padrão ou discos estéreis, com o auxílio de uma pinça sobre a superfície do meio de cultura. Foi utilizado como controlo positivo um disco de ciprofloxacina (CIP 5 µg) e como grupos teste discos estéreis com pipetou 7,5 x 10⁻⁶ mol, correspondendo a volumes de 0,914 – 13,2 µL de composto. Consecutivamente, incubaram-se as placas a 37 °C durante 24 h. Por último, com o auxílio de uma régua, mediu-se os diâmetros de inibição, em milímetros, para cada

composto segundo as normas do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*.⁸

4.6. Fotoinativação de bactérias planctónicas

Para experiências de aPDT, foram adicionados 10 µL de um inóculo preparado de acordo com 4.5 a placas de 96 poços contendo 100 µL de diferentes concentrações dos fotossensibilizadores (100 nM e 1 µM). Os poços usados como controlos foram incubados apenas com água destilada. As placas de 96 poços foram incubadas no escuro por 60 minutos, à temperatura ambiente. De seguida, as placas dos grupos de aPDT foram iluminadas com a fonte de luz (1,36 J/cm²), enquanto os controlos no escuro foram cobertos com papel de alumínio durante o tempo de irradiação dos grupos de aPDT. Após irradiação ou incubação no escuro, as amostras foram diluídas em água destilada e homogeneizadas. Alíquotas foram retiradas, diluídas, adicionadas a placas de Petri e incubadas a 37 °C por 24 horas no escuro. Após este tempo, as colónias foram contadas. Foram realizados 3 ensaios independentes, utilizando poços em triplicados. A análise estatística foi realizada no GraphPad Prism 8.

4.7. Terapia dual

Para experiências de terapia dual, foram adicionados 10 µL de um inóculo preparado de acordo com 4.5 a placas de 96 poços contendo 100 µL de diferentes concentrações dos fotossensibilizadores (50 nM e 100 nM). De seguida, foram adicionados 5 µL de uma solução de aldeído 20 mg/mL em DMSO (terapia dual) ou de DMSO puro (controlo da toxicidade da formulação). As placas de 96 poços foram incubadas no escuro por 60 minutos, à temperatura ambiente. De seguida, as placas dos grupos de aPDT foram iluminadas com a fonte de luz (1,36 J/cm²), enquanto os controlos no escuro foram cobertos com papel de alumínio durante o tempo de irradiação dos grupos de aPDT. Após irradiação ou incubação no escuro, as amostras foram diluídas em água destilada e homogeneizadas. Alíquotas foram retiradas, diluídas, adicionadas a placas de Petri e incubadas a 37 °C por 24 horas no escuro. Após este tempo, as colónias foram contadas. Foram realizados 3 ensaios independentes, utilizando poços em triplicados. A análise estatística foi realizada no GraphPad Prism 8.

4.8. Referências

- [1] Burrows, H. D & Pereira, M. M., Síntese e Estrutura, Escolar Editora, Lisboa, 2005.
- [2] Dąbrowski, J. M., Pereira, M. M., Arnaut, L. G., Monteiro, C. J., Peixoto, A. F., Karocki, A., Urbanska, K., & Stochel, G. (2007). Synthesis, photophysical studies and anticancer activity of a new halogenated water-soluble porphyrin. *Photochemistry and photobiology*, 83(4), 897-903.
- [3] Schmidt, R., Tanielian, C., Dunsbach, R., & Wolff, C. (1994). Phenalenone, a universal reference compound for the determination of quantum yields of singlet oxygen O₂ (1Δg) sensitization. *Journal of photochemistry and photobiology A: Chemistry*, 79(1-2), 11-17.
- [4] Vinagreiro, C. S. Síntese de Conjugados de Sulfonamidas e Macrociclos Tetrapirrólicos com Potencial Aplicação Dual em Químio- e Fototerapia. Dissertação de Mestrado. Coimbra University, 2015.
- [5] Vinagreiro, C. S., Zangirolami, A., Schaberle, F. A., Nunes, S. C., Blanco, K. C., Inada, N. M., da Silva, G. J., Pais, A. A. C. C., Bagnato, V. S., Arnaut, L. G., & Pereira, M. M. (2020). Antibacterial photodynamic inactivation of antibiotic-resistant bacteria and biofilms with nanomolar photosensitizer concentrations. *ACS infectious diseases*, 6(6), 1517-1526.
- [6] Biemer, J. J. (1973). Antimicrobial susceptibility testing by the Kirby-Bauer disc diffusion method. *Annals of clinical & laboratory science*, 3(2), 135-140.
- [7] CLSI - Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco - difusão: Norma Aprovada. 8ª Ed. U.S.A.: Norma M2-A8 (2010). [Acedido a 07 de março de 2022]. Disponível na internet: http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf

[8] CLSI - Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco - difusão: Norma Aprovada. 8ª Ed. U.S.A.: Norma M2-A8 (2010). [Acedido a 07 de março de 2022]. Disponível na internet: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf