



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS



JAQUELINE PEREIRA JANUÁRIO

**OBTENÇÃO DE DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS A PARTIR DE BENZOFENONA
NATURAL E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROTEOLÍTICO**

MESTRADO EM QUÍMICA

ALFENAS-MG
2011

JAQUELINE PEREIRA JANUÁRIO

**OBTENÇÃO DE DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS A PARTIR DE BENZOFENONA
NATURAL E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROTEOLÍTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal de Alfenas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Claudio Viegas Junior

ALFENAS-MG

2011

JAQUELINE PEREIRA JANUÁRIO

**OBTENÇÃO DE DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS A PARTIR DE BENZOFENONA
NATURAL E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROTEOLÍTICO**

A Banca examinadora, abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Química Orgânica.

Aprovada em:

Prof.: Marcelo Henrique dos Santos

Instituição: Universidade Federal de Alfenas Assinatura: _____

Prof(a): Rossimiriam Pereira de Freitas

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais Assinatura: _____

Prof.: Diogo Teixeira Carvalho

Instituição: Universidade Federal de Alfenas Assinatura: _____

*Àqueles que não mediram esforços, que
confiaram e apoiaram nos momentos mais
importantes: meus pais Aparecido e Inês*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade oferecida.

Ao professor e orientador Marcelo Henrique dos Santos pela paciência na orientação, pelo apoio e incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor e co-orientador Claudio Viegas Junior, pela colaboração, por sua presença e ajudas constantes.

Ao professor Diogo Teixeira Carvalho, pelo apoio científico. Obrigada pela confiança e pela mão estendida sempre que precisei.

Aos professores e alunos do Laboratório de Biofísica da Unifesp, em especial ao doutorando Diego Magno Assis, pela incansável paciência e boa vontade.

A todos do Laboratório de Bioquímica da Unifal, por me receberem e pela disposição em me ajudar, ao Gabriel especialmente.

Aos amigos do Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal (LFQM), pela amizade, companheirismo e acima de tudo pelo apoio nas horas difíceis. Em especial as queridas amigas Kris, Danielle, Vanessa, Maria Cecília e Claudia Mara e ao mano Rodrigo pelo carinho e força, pela presença nos momentos mais importantes, por "contar" com vocês! Pelos favores, risadas e confidências.

As companheiras Camila, Dayene, Roberta e Carolina, pela paciência e apoio, pelo carinho constante, por terem se tornado a minha família neste período.

Ao meu grande amigo Felipe, por ser o ombro que sempre precisei, pelas palavras de apoio, por me ouvir e só me ouvir sempre.

Ao meu namorado Leandro, pelo amor, apoio, amizade, colo e principalmente paciência. Obrigada por tudo!

Aos meus pais, amigos e familiares, por serem amigos, incentivadores e compreensivos nos momentos difíceis ou de ausência.

E, finalmente, a DEUS pela oportunidade em compartilhar tamanha experiência. O que seria de mim sem a fé que eu tenho nele.

RESUMO

O gênero *Garcinia*, também conhecido como *Rheedia*, é o mais numeroso da família *Clusiaceae* e rico em uma considerável diversidade de compostos, tais como benzofenonas polipreniladas, flavonóides, proantocianinas e xantonas. A espécie *Garcinia brasiliensis* é uma planta nativa da região amazônica e seus frutos são popularmente conhecidos como “bacupari”. Neste trabalho, a partir do extrato acetato de etila das sementes de *Garcinia brasiliensis*, foi possível isolar a benzofenona natural poliprenilada guttiferona-A. Modificações moleculares nas hidroxilas fenólicas deste composto levaram a obtenção de sete derivados semissintéticos inéditos, os quais foram avaliados quanto à atividade antiproteolítica, através de ensaios sobre as enzimas tripsina e papaína. O interesse pela busca de inibidores de proteases justifica-se pela comprovada relação desta classe de enzimas a uma série de patologias, incluindo entre outras, o câncer e a AIDS. A guttiferona-A, apresentou resultados relevantes para as duas enzimas testadas, demonstrando a importância dos grupos prenila e hidroxila da molécula. Além disso, os derivados acilados também apresentaram valores significativos de IC₅₀ comparados ao produto de partida, com destaque dois deles, sendo possível ainda relacionar a atividade inibitória dessas moléculas com a presença do grupo carbonílico.

Palavras-chave: Benzofenona. Inibidores. Proteases.

ABSTRACT

The genus *Garcinia* also known as *Rheedia*, is the biggest of the family Clusiaceae and rich in a considerable variety of compounds such as benzophenones polipreniladas, flavonoids, and xanthones proanthocyanins. The species *Garcinia brasiliensis* is a plant native to the Amazon region and its fruits are popularly known as "bacupari". In this work, from the ethyl acetate extract of the seeds of *Garcinia brasiliensis* were isolated the natural poliprenilada benzophenone guttiferone-A. Molecular changes in the phenolic hydroxyl of this compound led to the formation of seven novel semisynthetic derivatives, which were evaluated for anti-proteolytic activity, through experiments on the enzymes trypsin and papain. The interest in the search of protease inhibitors is justified by the proven link between this class of enzymes to a variety of diseases, including among others, cancer and AIDS. The guttiferone-A, showed significant results for the two enzymes tested, demonstrating the importance of the prenyl and hydroxyl groups of the molecule. Furthermore, the acylated derivatives also showed a significant IC_{50} compared to original product, especially two of them, is still possible to relate the inhibitory activity of these molecules in the presence of carbonyl group.

Key words: Benzophenone. Inhibitors. Proteases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Núcleo difenilmetanona.....	18
Figura 2 -	Em negrito, o anel biciclo[3.3.1]noneno como resultado da oxigenação tripla e ciclização do sistema difenilmetanona.....	18
Figura 3 -	Estrutura química de benzofenonas preniladas.....	19
Figura 4 -	Guttiferonas A (1), E (4), F (5), G (6), H (7), I (8), J (9), K(10) e L (11).....	22
Figura 5 -	Estrutura química da xantoxilina e derivados.....	24
Figura 6 -	Classificação das proteases conforme o local de hidrólise do substrato. (Adaptada de Turk, 2006).....	25
Figura 7 -	Representação esquemática da ligação do substrato à protease segundo Schechter e Berger (1967). (Adaptado de Turk, 2006).....	26
Figura 8 -	Mecanismo proposto para serino-protease. (Adaptado Lee, 2004)....	27
Figura 9 -	Mecanismo proposto para cisteino-protease. (Adaptado de Lee, 2004).....	28
Figura 10 -	Proposta de semissíntese para a obtenção dos derivados.....	30
Figura 11 -	Frutos de <i>Rheedia brasiliensis</i>	32
Figura 12 -	Extração da semente de <i>Rheedia brasiliensis</i> obtido por maceração	33
Figura 13 -	Cromatografia em camada delgada (CCD).....	33
Figura 14-	A atividade proteolítica pode ser acompanhada na presença de um substrato fluorogênico (peptidil-MCA), o qual mediante clivagem pela enzima em estudo libera o peptídeo e MCA livre resultando na emissão de fluorescência.....	45
Figura 15 -	Espectro no IV da benzofenona natural guttiferona-A 1	46
Figura 16 -	Espectro de RMN de ¹ H (piridina-d ₅ ; 400 MHz) do composto 1	47

Figura 17 -	Espectro de RMN de ^{13}C (piridina- d_5 ; 100 MHz) do composto <u>1</u>	47
Figura 18 -	Espectro de massas do composto guttiferona-A <u>1</u>	48
Figura 19 -	Espectro no ultravioleta do composto <u>1</u> com AlCl_3 e HCl como aditivos.....	48
Figura 20 -	Espectro no ultravioleta do composto <u>1</u> com NaOAc e H_3BO_3 como aditivos.....	49
Figura 21 -	Reação de obtenção do derivado <u>14</u>	49
Figura 22 -	Espectro de absorção na região do infravermelho de <u>14</u>	50
Figura 23 -	Espectro de massas do derivado <u>14</u>	50
Figura 24 -	Íon molecular do derivado <u>14</u> (m/z 686).....	51
Figura 25 -	Fragmentação proposta para o derivado <u>14</u>	51
Figura 26 -	Espectro de RMN de ^1H de <u>14</u> (CDCl_3 ; 400 MHz).....	53
Figura 27 -	Espectro de RMN de ^{13}C <u>14</u> (CDCl_3 ; 100 MHz).....	53
Figura 28 -	Espectro no ultravioleta de <u>14</u> com AlCl_3 e HCl como aditivos.....	54
Figura 29 -	Espectro no ultravioleta de <u>14</u> com NaOAc e H_3BO_3 como aditivos...	55
Figura 30 -	Reação de obtenção do derivado <u>15</u>	55
Figura 31 -	Espectro de absorção na região do infravermelho de <u>15</u>	56
Figura 32 -	Espectro de massas do derivado <u>15</u>	56
Figura 33 -	Fragmentação proposta para o derivado <u>15</u>	57
Figura 34 -	Espectro de RMN de ^1H de <u>15</u> (CDCl_3 ; 400 MHz).....	58
Figura 35 -	Espectro de RMN de ^{13}C de <u>15</u> (CDCl_3 ; 100 MHz).....	59
Figura 36 -	Espectro no ultravioleta de <u>15</u> com AlCl_3 e HCl como aditivos.....	59
Figura 37 -	Espectro no ultravioleta de <u>15</u> com NaOAc e H_3BO_3 como aditivos...	60
Figura 38 -	Reação de obtenção do derivado <u>16</u>	60
Figura 39 -	Espectro de absorção na região do infravermelho de <u>16</u>	61

Figura 40 -	Espectro de massas do derivado 16	61
Figura 41 -	Fragmentação proposta para o derivado 16	62
Figura 42 -	Espectro de RMN de ¹ H de 16 (CDCl ₃ ; 400 MHz).....	63
Figura 43 -	Espectro no ultravioleta de 16 com AlCl ₃ e HCl como aditivos.....	63
Figura 44 -	Espectro no ultravioleta de 16 com NaOAc e H ₃ BO ₃ como aditivos...	64
Figura 45 -	Reação de obtenção do derivado 17	64
Figura 46 -	Espectro de absorção na região do infravermelho de 17	65
Figura 47 -	Espectro de massas do derivado 17	65
Figura 48 -	Fragmentação proposta para 17	66
Figura 49 -	Espectro de RMN de ¹ H de 17 (CDCl ₃ ; 400 MHz).....	67
Figura 50 -	Espectro no ultravioleta de 17 com AlCl ₃ e HCl como aditivos.....	67
Figura 51 -	Espectro no ultravioleta de 17 com NaOAc e H ₃ BO ₃ como aditivos...	68
Figura 52 -	Reação de obtenção do derivado 18	68
Figura 53 -	Espectro de absorção na região do infravermelho de 18	69
Figura 54 -	Espectro de massas do derivado 18	69
Figura 55 -	Íon molecular <i>m/z</i> 702 do derivado 18	70
Figura 56 -	Fragmentação proposta para o derivado 18	71
Figura 57 -	Espectro de RMN de ¹ H de 18 (CDCl ₃ ; 400 MHz).....	72
Figura 58 -	Espectro no ultravioleta de 18 com AlCl ₃ e HCl como aditivos.....	72
Figura 59 -	Espectro no ultravioleta de 18 com NaOAc e H ₃ BO ₃ como aditivos...	73
Figura 60 -	Reação de obtenção do derivado 19	73
Figura 61 -	Espectro de absorção na região do infravermelho de 19	74
Figura 62 -	Espectro de massas do derivado 19	74
Figura 63 -	Fragmentação proposta para 19	75
Figura 64 -	Espectro de RMN de ¹ H de 19 (CDCl ₃ ; 400 MHz).....	76

Figura 65 -	Espectro no ultravioleta de <u>19</u> com AlCl ₃ e HCl como aditivos.....	76
Figura 66 -	Espectro no ultravioleta de <u>19</u> com NaOAc e H ₃ BO ₃ como aditivos...	77
Figura 67 -	Reação de obtenção do derivado <u>20</u>	77
Figura 68 -	Espectro de absorção na região do infravermelho de <u>20</u>	78
Figura 69 -	Espectro de massas do derivado <u>20</u>	78
Figura 70 -	Fragmentação proposta para o derivado <u>20</u>	79
Figura 71 -	Espectro de RMN de ¹ H de <u>20</u> (CDCl ₃ ; 400 MHz).....	80
Figura 72 -	Espectro de RMN de ¹³ C de <u>20</u> (CDCl ₃ ; 100 MHz).....	81
Figura 73 -	Reação de tentativa de obtenção do derivado <u>21</u>	81
Figura 74 -	Reação de tentativa de obtenção do derivado <u>22</u>	82
Figura 75 -	Varição da atividade de papaína em função do tempo quando incubada com os derivados 1, 14, 15 e 16 (<u>A</u>) e 17, 18, 19, 20 (<u>B</u>)..	83
Figura 76 -	Varição da atividade de tripsina em função do tempo quando incubada com os derivados 1, 14, 15 e 16 (<u>C</u>) e 17, 18, 19, 20 (<u>D</u>)..	83
Figura a -	Varição da atividade enzimática da <u>papaína</u> em função da concentração dos inibidores <u>1</u> , <u>14</u> , <u>15</u> , <u>16</u> , <u>17</u> , <u>18</u> , <u>19</u> e <u>20</u>	91
Figura b -	Varição da atividade enzimática da <u>tripsina</u> em função da concentração dos inibidores <u>1</u> , <u>14</u> , <u>15</u> , <u>16</u> , <u>17</u> , <u>18</u> , <u>19</u> e <u>20</u>	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Alguns dos fragmentos presentes no espectro de massas do derivado 14	51
Tabela 2-	Alguns dos fragmentos presentes no espectro de massas do derivado 15	57
Tabela 3-	Alguns dos fragmentos presentes no espectro de massas do derivado 16	62
Tabela 4-	Alguns dos fragmentos presentes no espectro de massas do derivado 17	66
Tabela 5-	Alguns dos fragmentos presentes no espectro de massas do derivado 18	70
Tabela 6-	Alguns dos fragmentos presentes no espectro de massas do derivado 19	75
Tabela 7-	Alguns dos fragmentos presentes no espectro de massas do derivado 20	79
Tabela 8-	Valores de IC ₅₀ resultantes da inibição papaína e tripsina.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ	- Deslocamento químico (RMN) / deformação angular (IV)
°C	- Graus Celsius
BOC	- <i>Terc</i> -butoxicarbonila
BOC ₂ O	- Anidrido de di- <i>terc</i> -butoxicarbonila
BzCl	- Cloreto de benzoíla
CC	- Cromatografia em coluna
CCD	- Cromatografia em camada delgada
CG-EM	- Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência
COX-2	- Cicloxigenase-2
d	- Duplete
dd	- Duplo duplete
DMAP	- 4- <i>N,N</i> -Dimetilaminopiridina
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DTT	- Ditioneitol
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
EM	- Espectrometria de massas
FF	- Faixa de fusão
FM	- Fórmula molecular
Hz	- Hertz
IC ₅₀	- Concentração de inibição em 50%
iNOS	- Óxido Nítrico Sintase Induzida
IV	- Infravermelho
<i>J</i>	- Constante de acoplamento escalar
LFQM	- Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal
m	- Multiplete
m/v	- Massa por volume
<i>m/z</i>	- Razão massa/carga elétrica do fragmento
MCA	- 7-amino 4-metilcumarina
MHz	- Mega Hertz

MM	- Massa molar
Rf	- Fator de Retenção em cromatografia em camada delgada
RMN de ¹³ C	- Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN de ¹ H	- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	- Simpleto
THF	- Tetraidrofurano
TMS	- Tetrametilsilano
UV	- Ultravioleta
v/v	- Volume por volume
ν	- Número de onda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	<i>Garcinia brasiliensis</i> Pl.&Tr.....	17
2.2	Benzofenonas preniladas.....	18
2.2.1	Guttiferonas.....	20
2.3	Modificações estruturais.....	23
2.4	Proteases.....	24
2.4.1	Serino-proteases: tripsina.....	27
2.4.2	Cisteíno-proteases: papaína.....	28
3	JUSTIFICATIVAS.....	29
4	OBJETIVOS.....	30
5	PARTE EXPERIMENTAL.....	31
5.1	Materiais, métodos e instrumentos.....	31
5.2	Coleta do material vegetal.....	32
5.3	Estudo fitoquímico.....	32
5.3.1	Obtenção da guttiferona-A <u>1</u>	32
5.4	Reações de semissíntese.....	34
5.4.1	Preparo e caracterização de 13,14-di-O-acetil-guttiferona-A <u>14</u>	34
5.4.2	Preparo e caracterização de 4,13,14-tri-O-metil-guttiferona-A <u>15</u>	35
5.4.3	Preparo e caracterização de 14-O-butil-guttiferona-A <u>16</u>	37
5.4.4	Preparo e caracterização de 13,14-di-O-butanoil-guttiferona-A <u>17</u>	38
5.4.5	Preparo e caracterização de 14-O- <i>terc</i> -butoxicarbonil-guttiferona-A <u>18</u>	39
5.4.6	Preparo e caracterização de 14-O-octanoil-guttiferona-A <u>19</u>	40
5.4.7	Preparo e caracterização de 13,14-di-O-benzoil-guttiferona-A <u>20</u>	41
5.4.8	Tentativa de síntese de 14-O-prenil-guttiferona-A <u>21</u>	43
5.4.9	Tentativa de síntese de 14-O-octil-guttiferona-A <u>22</u>	43
5.5	Avaliação da atividade inibitória.....	44

5.5.2	Determinação do tempo necessário para a inibição enzimática.....	45
5.5.3	Determinação da IC ₅₀	45
6.1	Caracterização dos compostos	46
6.1.1	Guttiferona-A 1	46
6.1.2	Derivado 13,14-di- <i>O</i> -acetil-guttiferona-A 14	49
6.1.3	Derivado 4,13,14-tri- <i>O</i> -metil-guttiferona-A 15	55
6.1.4	Derivado 14- <i>O</i> -butil-guttiferona-A 16	60
6.1.5	Derivado 14,15-di- <i>O</i> -butanoil-guttiferona-A 17	64
6.1.6	Derivado 14- <i>O</i> - <i>terc</i> -butoxicarbonil-guttiferona-A 18	68
6.1.7	Derivado 14- <i>O</i> -octanoil-guttiferona-A 19	73
6.1.8	Derivado 13,14-di- <i>O</i> -benzoil-guttiferona-A 20	77
6.1.9	Tentativa de síntese de 14- <i>O</i> -prenil-guttiferona-A 21	81
6.1.10	Tentativa de síntese de 14- <i>O</i> -octil-guttiferona-A 22	82
6.2	Ensaio biológico	82
6.2.1	Determinação do tempo de inibição enzimática pelos derivados.....	82
6.2.2	Determinação da IC ₅₀	83
7	CONCLUSÕES	86
	REFERÊNCIAS	87
	ANEXOS	91
	Anexo A - Determinação de IC₅₀	91

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são utilizadas no tratamento e na cura de enfermidades desde a antiguidade. Pela sua riqueza química e farmacológica, atribuídas a atividades fisiológicas, é crescente a conscientização em torno do grande potencial benéfico que os compostos naturais trazem aos seres humanos, o que leva o mercado de fitoterápicos a um crescimento surpreendente, o qual tem despertado grande interesse na investigação fitoquímica (CECHINEL; YUNES, 1998).

Neste contexto, se destacam estudos com as plantas da flora brasileira usadas na medicina popular com finalidades terapêuticas. Tais estudos visam a obtenção de substâncias ativas com potencial terapêutico que possam ser futuramente usadas como protótipos para a síntese de substâncias de interesse medicinal. A utilização de diversas técnicas de extração, de análise, e modificação química estrutural, tem permitido o desenvolvimento de produtos úteis para a indústria de alimentos, de medicamentos, entre outras (PINTO et al., 2002).

Papaína e tripsina se inserem na família das proteases, enzimas responsáveis por catalisar a clivagem de ligações peptídicas. São enzimas bastante conhecidas, sendo consideradas modelo no estudo sobre cisteíno e serino-proteases, respectivamente (NEURATH, 1986). As proteases estão envolvidas em muitas doenças, incluindo o câncer e a AIDS, devido ao descontrole ocorrido durante a proteólise (AVRIL et al., 1995). Torna-se, portanto, de grande relevância a busca por inibidores de proteases, o que justifica a avaliação da atividade inibitória de substâncias sobre estas enzimas com a finalidade de se obter possíveis candidatos a inibidores eficazes de cisteíno e serino-proteases (POWERS et al., 2002).

O presente trabalho teve como proposta, obter derivados semissintéticos da benzofenona natural poliprenilada, guttiferona-A **1**, bem como estudos da relação estrutura-atividade, caracterização dos derivados e a avaliação da atividade inibitória sobre as enzimas proteolíticas papaína e tripsina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Garcinia brasiliensis* Pl.&Tr.

A vasta biodiversidade de plantas encontradas no Brasil pode ser uma fonte importante de novos agentes farmacológicos (BASSO et al., 2005). *Garcinia*, também conhecido como *Rheedia*, é o gênero mais numeroso da família Guttiferae também chamada de Clusiaceae, que representa uma grande família de plantas medicinais subdivididas no território brasileiro por 47 gêneros (*Vismia*, *Garcinia*, *Clusia*, *Cratoxylum*, *Harungana*, *Mesua*, *Hypericum*, *Kielmeyera*, dentre outros) com mais de 1000 espécies amplamente distribuídas na Ásia tropical, África, Nova Caledônia, Polinésia e Brasil (PICCINELLI et al., 2005).

A espécie *Garcinia brasiliensis* Planch. & Triana (*Rheedia brasiliensis* Mart.) é nativa da região Amazônica e é cultivada em todo o território brasileiro, sendo caracterizada pela presença significativa de látex (JOLY, 1993) possui frutos comestíveis e de sabor agradável, sendo conhecida popularmente como bacupari, bacuri, porocó e bacuripari. Na medicina popular a folha de *G. brasiliensis* é utilizada no tratamento de tumores, inflamações do trato urinário, artrite e para aliviar dores (SANTOS et al., 1999).

O gênero *Garcinia*, engloba árvores, arbustos e ervas. São plantas de distribuição geográfica variando entre a zona temperada até a tropical, apresentando comportamentos auto-sustentáveis na maioria das vezes (AMPOFO; WATERMAN, 1986).

A família Guttiferae apresenta uma variedade de metabólitos biologicamente ativos, como por exemplo, derivados oxigenados e fenóis prenilados, incluindo xantonas, flavonóides, ácidos fenólicos e benzofenonas (DELLE MONACHE et al., 1983; SANTOS et al., 1999). Alguns destes apresentam várias atividades biológicas, como propriedades antimicrobiana, (NALDONI et al. 2009; SORDAT-DISERENS et al., 1991), antiinflamatórias (KHANUM et al. 2004), antitumorais (DIAZ-CARBALHO et al., 2003), antioxidantes (MERZA et al., 2004) e antiplasmodial (PEREIRA et al., 2010), além de atuarem na inibição de proteases (MARTINS et al., 2009).

2.2 Benzofenonas preniladas

As benzofenonas poliisopreniladas caracterizam-se pela presença do núcleo difenilmetanona (FIGURA 1) substituído por grupo(s) isoprenila (3-metil-2-butenila). Muitos dos representantes desta classe apresentam um padrão de oxigenação tríplice em um dos anéis aromáticos de difenilmetanona e uma ciclização intramolecular, que juntos são responsáveis pela formação do anel biciclo[3.3.1]noneno (FIGURA 2) (MARTINS et al., 2009).

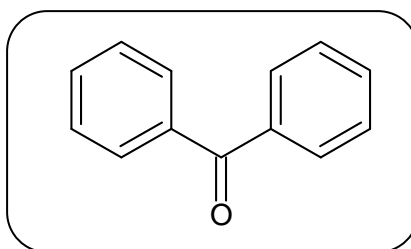


Figura 1- Núcleo difenilmetanona.

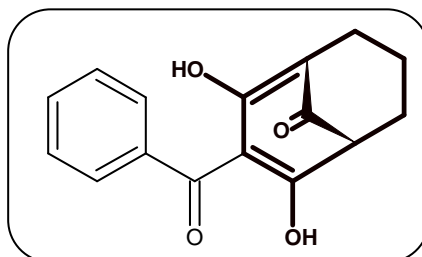


Figura 2 - Em negrito, o anel biciclo[3.3.1]noneno como resultado da oxigenação tripla e ciclização do sistema difenilmetanona.

O extrato hexânico do pericarpo dos frutos de *Rheedia brasiliensis* forneceu a benzofenona tripenilada chamada 7-epiclusianona (**2**) (FIGURA 3), e uma fração líquida contendo sesquiterpenos, α -copaeno, α -muroleno, γ -cadineno e cadineno. Alguns constituintes na forma pura e/ou misturas, puderam ser avaliados quanto ao seu potencial para controle de agentes patogênicos (ervas daninhas, bactérias e nematóides) *in vitro*, e destes, a 7-epiclusianona e o ácido oleanólico mostraram-se os mais eficientes (SANTOS et al., 1999).

A garciniafenona (**3**) (FIGURA 3), cujo isolamento e elucidação estrutural foram descritos por Derogis e colaboradores (2008), é muito semelhante a 7-

epiclusianona (**2**), diferindo apenas pela ausência de um grupamento prenila. Compostos como a guttiferona-A (**1**), 7-epiclusianona (**2**) e garciniafenona (**3**), se assemelham por apresentar em sua estrutura o anel biciclo[3.3.1]noneno (FIGURA 3) (CIOCHINA; GROSSMAN, 2006).

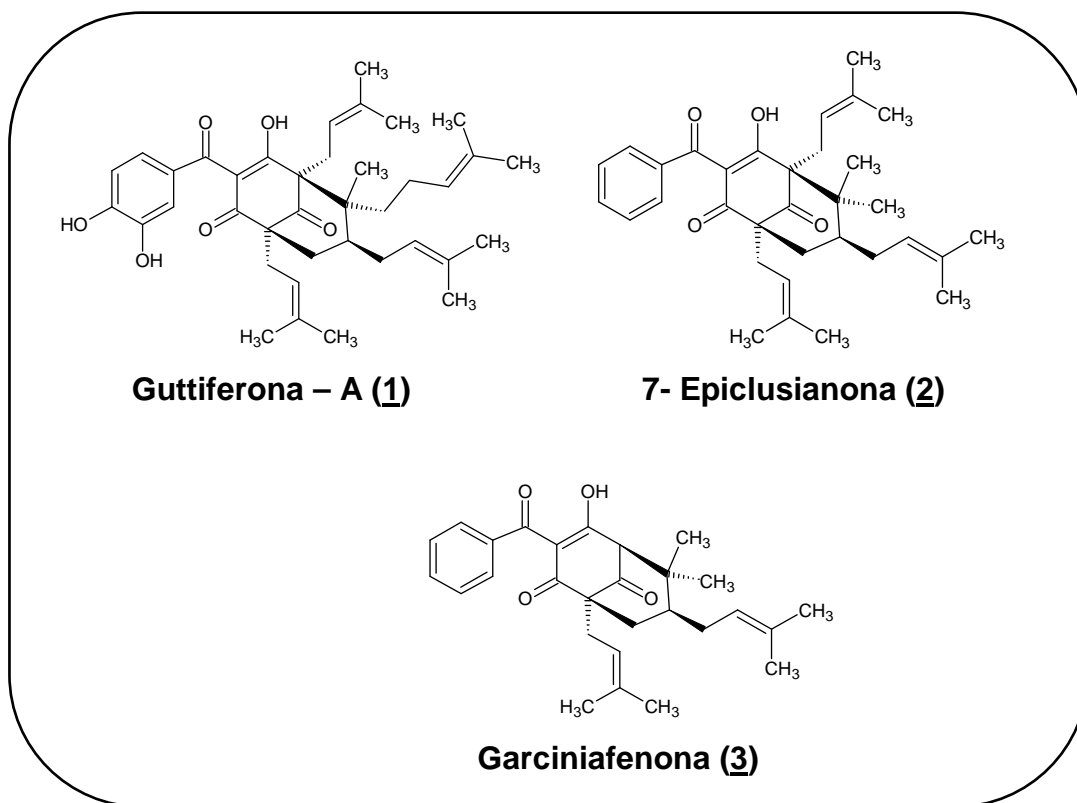


Figura 3 - Estrutura química de benzofenonas preniladas.

Foram realizados testes visando avaliar a ação da 7-epiclusianona (**2**) sobre formas tripomastigotas do protozoário *Trypanosoma cruzi*, *in vitro*. Os resultados obtidos indicaram redução de 92% da parasitemia em amostra de sangue contaminado, na concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, entretanto, a substância foi inativa quando no teste *in vivo* (camundongos infectados). A 7-epiclusianona foi inativa contra o fungo não patogênico *Cladosporium sphaerospermum* e também inativa contra *Biomphalaria glabrata*, ambos os testes *in vitro*. No teste para *Artemia salina*, que é usado para correlacionar com a citotoxicidade de substâncias, a amostra mostrou-se ativa com IC_{50} de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (ALVES et al., 1999).

Foram realizados testes de sensibilidade, *in vitro*, de fitobactérias e enterobactérias patogênicas, quando cultivadas em meios contendo a 7-epiclusianona. Houve a inibição total do crescimento, *in vitro*, de *Pseudomonas* sp, a

10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* a 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e das enterobactérias *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* a 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (SANTOS et al., 1999).

2.2.1 Guttiferonas

Vários derivados de benzofenonas poliisopreniladas com propriedades anti-HIV, denominadas de guttiferonas, foram isoladas anteriormente de extratos de plantas da família Guttiferae, principalmente de três gêneros distintos: *Garcinia*, *Clusia* e *Symphonia* (WATERMAN, 1986). Uma destas benzofenonas poliisopreniladas, guttiferona-A, foi inicialmente isolada de *Symphonia globulifera* como um composto ativo contra HIV, sendo posteriormente isolada de *Garcinia intermedia* (ABE et al., 2004; GUSTAFSON et al., 1992).

O amplo espectro de atividades biológicas de guttiferonas inclui a inibição de efeitos deletérios às células hepáticas decorrentes da infecção *in vitro* causada por HIV; efeito seqüestrador de radicais livres; inibição da expressão de iNOS e COX-2, enzimas envolvidas no processo de inflamação, no carcinoma de cólon intestinal; indução da apoptose e propriedades antiulcerosas, antioxidantes e tripanocidas (ABE et al., 2004; GUSTAFSON et al., 1992; PAN et al., 2001; TANAKA et al., 2000; YAMAGUCHI et al., 2000).

Segundo Abe e colaboradores (2004), a guttiferona-A extraída das folhas de *Garcinia intermedia* e do cerne de *Calophyllum brasilienses* foi avaliada com base em sua atividade tripanocida contra as formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, frente às quais demonstrou excelente atividade.

Isolada a partir das cascas das sementes de *Symphonia globulifera*, guttiferona-A apresentou atividade antiparasitária contra cepas de *Plasmodium falciparum* e atividade antioxidante (NGOUELA et al., 2006). Guttiferona A (**1**) isolada de *Garcinia macrophylla* apresentou atividade anticarcinogênica com $\text{IC}_{50} = 6,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Naldoni e colaboradores (2009) isolaram a benzofenona poliprenilada guttiferona-A (**1**) dos extratos etanólico e hexânico de sementes e cascas de *Garcinia brasiliensis*. A substância apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*. Os autores sugeriram que os compostos pertencentes a

essa classe química apresentam efeitos relevantes contra bactérias Gram positivas devido ao seu caráter lipofílico conferido a molécula pela presença dos grupos prenila, resultando em uma maior permeabilidade na membrana.

Pereira e colaboradores (2010) demonstraram a atividade leishmanicida dos extratos (hexânico, acetato de etila e etanólico) e de benzofenonas preniladas, entre elas a isolada do pericarpo dos frutos de *Garcinia brasiliensis*. O extrato hexânico apresentou uma atividade superior sobre as formas extracelular (promastigotas) e intracelular (amastigotas) de *Leishmania amazonensis*, quando comparados aos outros extratos. A guttiferona A (**1**) apresentou resultado relevante sobre a forma amastigota de *Leishmania amazonensis* com $IC_{50} = 2,93 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

A Guttiferona E (**4**), isolada de *Garcinia pyrifera* apresentou atividade anticarcinogênica em células orais com $IC_{50} = 10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e se mostrou eficiente na inibição da despolimerização dos microtúbulos da tubulina (GEY et al., 2007).

A Guttiferona F (**5**), isolada de *Allanblackia monticola* e *Allanblackia gabonensis*, apresentou atividade antiviral frente a HIV-1, atividade antimicrobiana contra uma variedade de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e apresentou também atividade leishmanicida (AZEBAZE et al., 2008; LENTA et al., 2007).

A Guttiferona G (**6**), isolada de *Garcinia Macrophylla* apresentou atividade anticarcinogênica com $IC_{50} = 8,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A Guttiferona H (**7**), isolada de *Garcinia xanthochymus*, também apresentou atividade anticarcinogênica (PROTIVA, et al., 2008). A Guttiferona I (**8**), isolada de *Garcinia smeathmannii*, apresentou atividade antimicrobiana com $CIM = 0,61-1,22 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (KUETE et al., 2007). A Guttiferona J (**9**), isolada de *Garcinia virgata* apresentou atividade anticarcinogênica com $IC_{50} = 5,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (MERZA et al., 2006). Guttiferona K (**10**), isolada de *Garcinia yunnanensis* apresentou atividade anticarcinogênica em células cervicais com $IC_{50} = 20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (XU et al., 2008). A Guttiferona L (**11**), isolada de *Rheedia Calcicola*, apresentou atividade anticarcinogênica em células ovarianas com $IC_{50} = 3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (CAO et al., 2007).

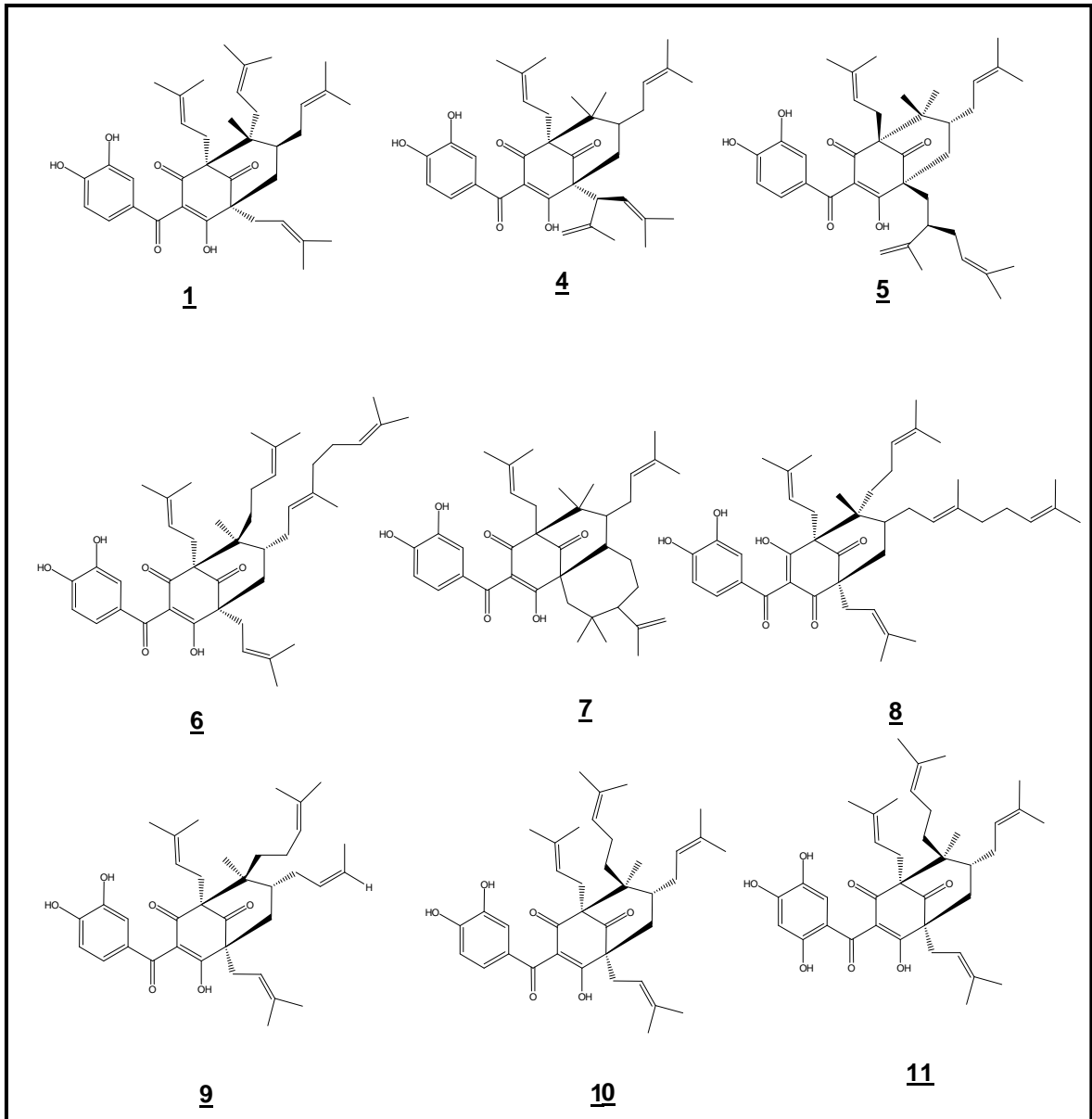


Figura 4 - Guttiferonas A (1), E (4), F (5), G (6), H (7), I (8), J (9), K(10) e L (11).

2.3 Modificações estruturais

Uma vez obtido um composto biologicamente ativo, pode-se lançar mão de estudos de relação estrutura-atividade envolvendo modificação na molécula original. Também chamada de variação molecular, se constitui, certamente, no método mais usado e recompensador para otimizar essa atividade, dependendo de seus grupos reativos aliados à avaliação farmacológica. A modificação molecular visa à otimização do perfil farmacológico, o entendimento do mecanismo de ação e o desenvolvimento de novos derivados candidatos a fármacos com propriedades melhoradas em relação ao produto natural original (CECHINEL et al., 1999).

Em sua maioria, os produtos naturais apresentam uma grande diversidade e complexidade molecular, com vários grupos funcionais de diferentes naturezas e reatividade, susceptíveis a modificações por uma variedade de reações. Sabe-se que a substituição de um átomo de hidrogênio por um determinado grupo, pode modificar profundamente a potência, duração, natureza do efeito farmacológico da molécula e suas propriedades físico-químicas tais como hidrofobicidade, densidade eletrônica, conformação estrutural, dentre outros fatores relacionados às propriedades farmacodinâmicas, além de propriedades farmacocinéticas (BOECK, 2005).

Inicialmente, realizam-se modificações procurando introduzir grupos que conferem ao composto em estudo uma maior, ou menor hidrofobicidade ou grupos doadores e/ou aceptores de elétrons, permitindo posteriormente a aplicação de algum método de correlação entre a estrutura química e a atividade biológica, que pode ser qualitativa ou quantitativa. A aplicação destes métodos auxilia na predição de qual novo grupo ou átomo pode ser introduzido em determinada molécula para torná-la mais ativa, proporcionando assim muitas vantagens na otimização do perfil de atividade de uma substância candidata a protótipo de fármaco (CECHINEL et al., 1999).

As benzofenonas apresentam grupo hidroxila, duplas ligações, grupos carbonila e outros que são susceptíveis a modificações. Tais modificações permitem obter rapidamente uma idéia da relação estrutura-atividade, especialmente com respeito aos efeitos sobre a hidrofobicidade, densidade eletrônica, ligações de hidrogênio, entre outros (CALIXTO; YUNES, 2001).

ligações peptídicas nas extremidades amino e carboxila terminal das proteínas, enquanto que as endopeptidases, também chamadas proteinases, efetuam a clivagem no meio da cadeia polipeptídica, como ilustrado na Figura 6.

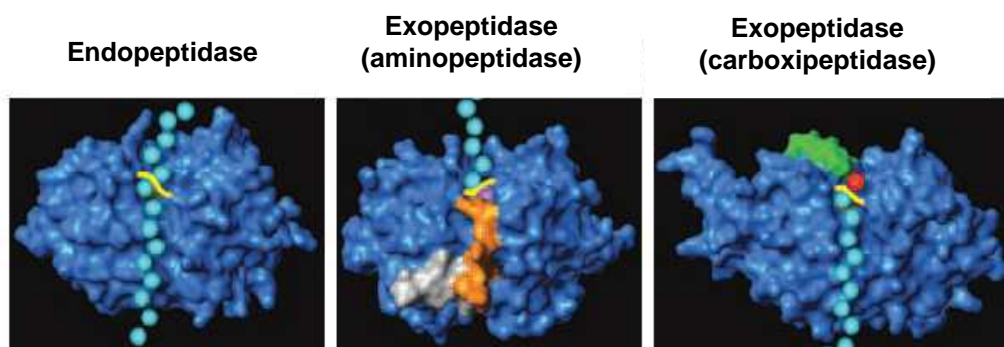


Figura 6 - Classificação das proteases conforme o local de hidrólise do substrato. (Adaptado de Turk, 2006).

Estas enzimas podem ainda ser classificadas em cinco grandes grupos ou famílias de acordo com os aminoácidos presentes no sítio ativo envolvidos na catálise. São classificadas como serino, cisteíno, aspartato, metalo e treonina-proteases. As enzimas que apresentam características comuns como, por exemplo, estrutura primária homóloga e aminoácidos importantes para o mecanismo de catálise são agrupadas em famílias e clãs (NEURATH, 1986; BEYNON; BOND, 1989).

As proteases catalisam a hidrólise das ligações peptídicas, mas com diferentes especificidades pelas cadeias laterais que compreendem a ligação peptídica a ser clivada. Na convenção descrita por Schechter e Berger (1967), o resíduo P1 corresponde ao sítio de especificidade, sendo que os resíduos de aminoácidos em direção ao N-terminal da ligação a ser hidrolisada, são denominados Pn...P3-P2-P1, enquanto aqueles em direção ao C-terminal são P1'-P2'-P3'...Pn'. O sítio catalítico está flanqueado por aminoácidos do substrato, e cada subsítio é capaz de acomodar a cadeia lateral de um único aminoácido, sendo denominados S1-S2-S3...Sn e S'1-S'2-S'3'...Sn', como representado pelo esquema da Figura 7.

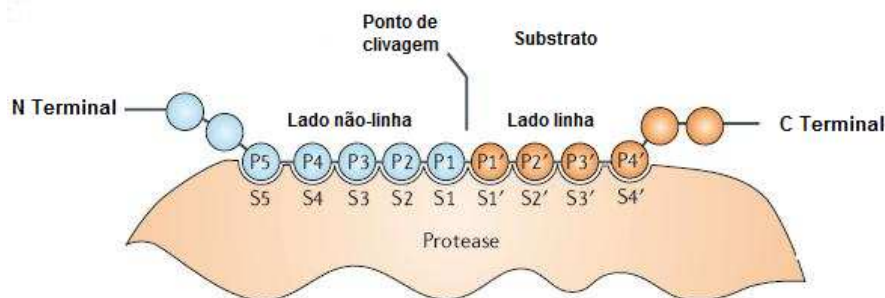


Figura 7 - Representação esquemática da ligação do substrato à protease segundo Schechter e Berger (1967). (Adaptado de Turk, 2006).

Em termos numéricos, as serino-proteases foram mais extensamente investigadas. Este é considerado o grupo mais caracterizado entre todas as subdivisões de proteases (OTTO; SCHIRMEISTER, 1997). Cisteíno-proteases, também conhecidas como tiol-proteases, já foram encontradas em vírus, bactérias, protozoários, plantas e mamíferos (BARRET; SALVESEN, 1986). Recentemente, cisteíno-proteases têm sido encontradas em fungos (SHARMA et al., 1989).

Proteases estão envolvidas em vários processos biológicos importantes, incluindo a inflamação, infecção, degradação da matriz extracelular, coagulação sanguínea e cicatrização de feridas, lesões de tecidos, digestão, fertilização, diferenciação e crescimento das células, resposta imune e apoptose (HAQ et al., 2010). Descontrolada, não regulamentada, ou proteólise indesejada pode levar a vários estados de doença, incluindo enfisema, acidente vascular cerebral, infecções virais, câncer, mal de Alzheimer, inflamação e artrite (POWERS et al., 2002).

A atividade dessas proteases pode ser regulada por meio de inibidores de protease, sendo possível, portanto, prever a importância da procura por inibidores cada vez mais eficientes de proteases, já que estes têm um potencial considerável para intervenção terapêutica em uma variedade de doenças (POWERS et al., 2002; SHEN; CHOU, 2009).

O planejamento de inibidores, muitas vezes ou na maioria das vezes, se dá pelo conhecimento do mecanismo de ação das enzimas, especificidade de substrato, e a estrutura do sítio ativo. A estrutura do substrato é muitas vezes utilizada como ponto de partida no planejamento de inibidores da enzima, por meio da modelagem molecular, com base no conhecimento de estruturas tridimensionais do alvo, enzimas e do complexo enzima-substrato (FEAR et al., 2007).

2.4.1 Serino-proteases: tripsina

As serino-proteases são caracterizadas pela presença de um resíduo de serina no sítio ativo da enzima, acompanhado de um resíduo de ácido aspártico e outro de histidina formando uma tríade catalítica, comum nessa família. A catálise ocorre via formação de um estado de transição tetraédrico durante as etapas de acilação e desacilação. A tripsina, a quimiotripsina, a elastase e as calicreínas são exemplos de serino-proteases (POWERS, et al., 2002).

A serino-protease mais estudada até o momento é a tripsina (E.C. 3.4.21.4). Esta enzima tem especificidade para ligações peptídicas contendo resíduos de cadeia lateral carregados positivamente, tais como arginina (Arg) e lisina (Lys), na posição P1 do substrato (BEYNON; BOND, 1989).

O mecanismo catalítico das serino-proteases ocorre por um processo de duas etapas hidrolíticas e baseia-se em um ataque nucleofílico às ligações peptídicas por um resíduo de serina (FIGURA 8). A propriedade nucleofílica do grupo hidroxila da serina é incrementada pela presença de um resíduo de histidina, mantida num “estado receptor de prótons” por um resíduo aspartato (Asp). O evento de acilação libera uma parte do substrato como produto. A segunda etapa enzimática envolve a reação da acil-enzima com uma molécula de água resultando no segundo produto de hidrólise, em um processo que regenera a enzima (LEE; MOBASHERY, 2004).

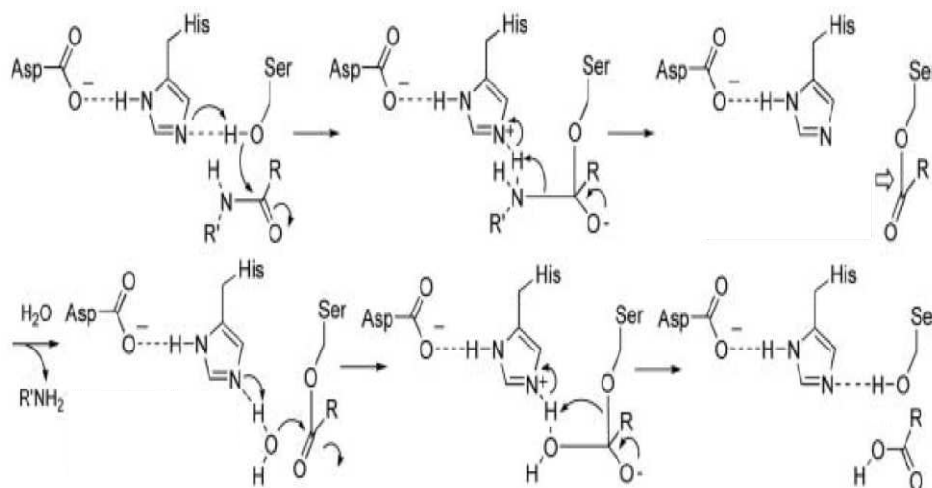


Figura 8 - Mecanismo proposto para serino-protease (Adaptado Lee, 2004).

2.4.2 Cisteíno-proteases: papaína

Entre as cisteíno-proteases, a mais investigada é a papaína (EC 3.4.22.2), oriunda do látex de *Carica papaya*. Papaína é um polipeptídeo monomérico com peso molecular de 23406 Da e consiste de uma cadeia de 212 resíduos de aminoácidos com três ligações dissulfeto (Cys22-Cys63, Cys56-Cys95, Cys153-Cys200). A papaína é particularmente eficaz na clivagem de peptídeos contendo resíduos de arginina e lisina (P1), mas o subsítio que reconhece estes resíduos provenientes do substrato peptídico tem uma especificidade muito menos definida que S2, o qual prefere resíduos hidrofóbicos como fenilalanina. O subsítio S2 da papaína é uma bolsa hidrofóbica formada por resíduos dos aminoácidos Trp69, Tyr67, Phe207, Pro68, Ala160, Val133 e Val157. Papaína é isolada na forma inativa e a sua ativação é possível por reações das pontes dissulfeto intramoleculares com tiol-reagentes ou agentes redutores (COHEN et al., 1986).

O mecanismo catalítico das cisteíno-proteases é semelhante ao mecanismo das serino-proteases, diferindo-se pela presença do resíduo de cisteína na tríade catalítica de resíduos do sítio ativo (Asn-His-Cys) sendo que o ataque nucleofílico ocorre por este resíduo, mostrado na Figura 9 (BEYNON; BOND, 1989).

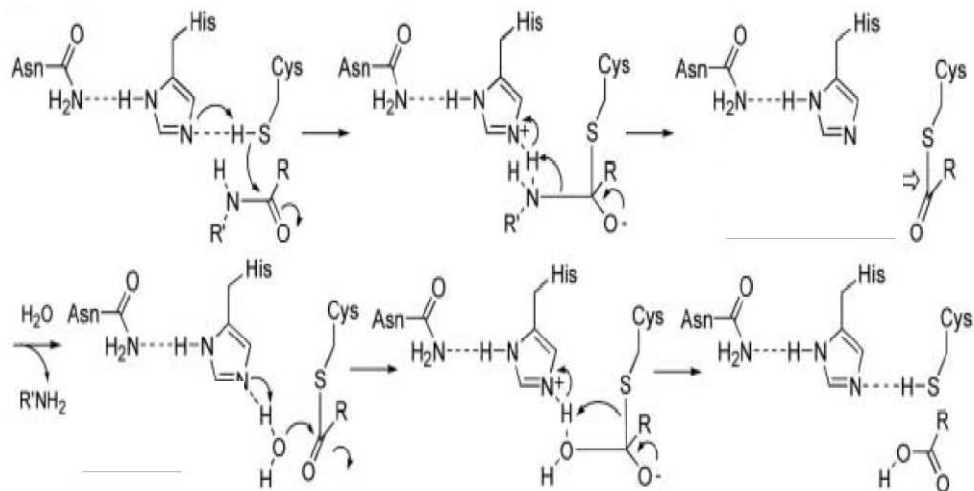


Figura 9 - Mecanismo proposto para cisteíno-protease.(Adaptado de Lee, 2004).

3 JUSTIFICATIVAS

A busca de substâncias terapêuticas mais eficazes, com baixa toxicidade e maior especificidade, tem intensificado os estudos para a descoberta de novos fármacos. Compostos naturais que se apresentam inativos ou poucos ativos em determinado modelo farmacológico, podem ser levados a compostos com atividade relevante, através de modificações estruturais simples (CECHINEL et al., 1999).

Com isso, o laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal – LFQM da Unifal-MG vem, ao longo de sua existência na instituição, isolando produtos naturais e obtendo moléculas semissintéticas a partir dos mesmos com grande potencial farmacológico.

Considerando que a guttiferona-A 1, segundo Martins e colaboradores (2009), tem se mostrado eficaz na inibição de enzimas como a catepsina B e a catepsina G, o presente projeto visou a síntese e o estudo de derivados semissintéticos da guttiferona-A 1 e a avaliação da atividade inibitória dos mesmos sobre proteases, enzimas envolvidas em diversas patologias como o câncer, inflamação, osteoporose e AIDS. Os ensaios de inibição foram realizados com papaína e tripsina – enzimas proteolíticas utilizadas como modelo para a elucidação de componentes importantes na seletividade, para a concepção de inibidores específicos de serino e cisteíno-proteases e estudo de relação estrutura-atividade (SAR), uma vez que estas enzimas possuem uma grande quantidade de informações estruturais (LALONDE et al., 1998).

A proposição dos derivados com crescente aumento da cadeia lateral teve por objetivo estudar o efeito dos volumes das moléculas bem como a maior ou menor hidrofobicidade sobre a atividade biológica. Ao mesmo tempo a reatividade destes grupos poderia ser avaliada, uma vez que não há estudos relatados na literatura de reações para a guttiferona-A 1.

4 OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo o isolamento da benzofenona natural poliprenilada, guttiferona-A **1** a partir do extrato acetato de etila das sementes de *Rheedia brasiliensis*. E por modificação nas hidroxilas fenólicas, a obtenção dos derivados semissintéticos, na qual foram introduzidos grupos alquila e acila, de forma a aumentar o tamanho da cadeia e modificar suas propriedades lipofílicas, a fim de relacionar a estrutura-atividade dos derivados obtidos sobre enzimas proteolíticas (tripsina e papaína).

Para a obtenção dos derivados, planejou-se a seguinte série a partir da guttiferona-A (FIGURA 10):

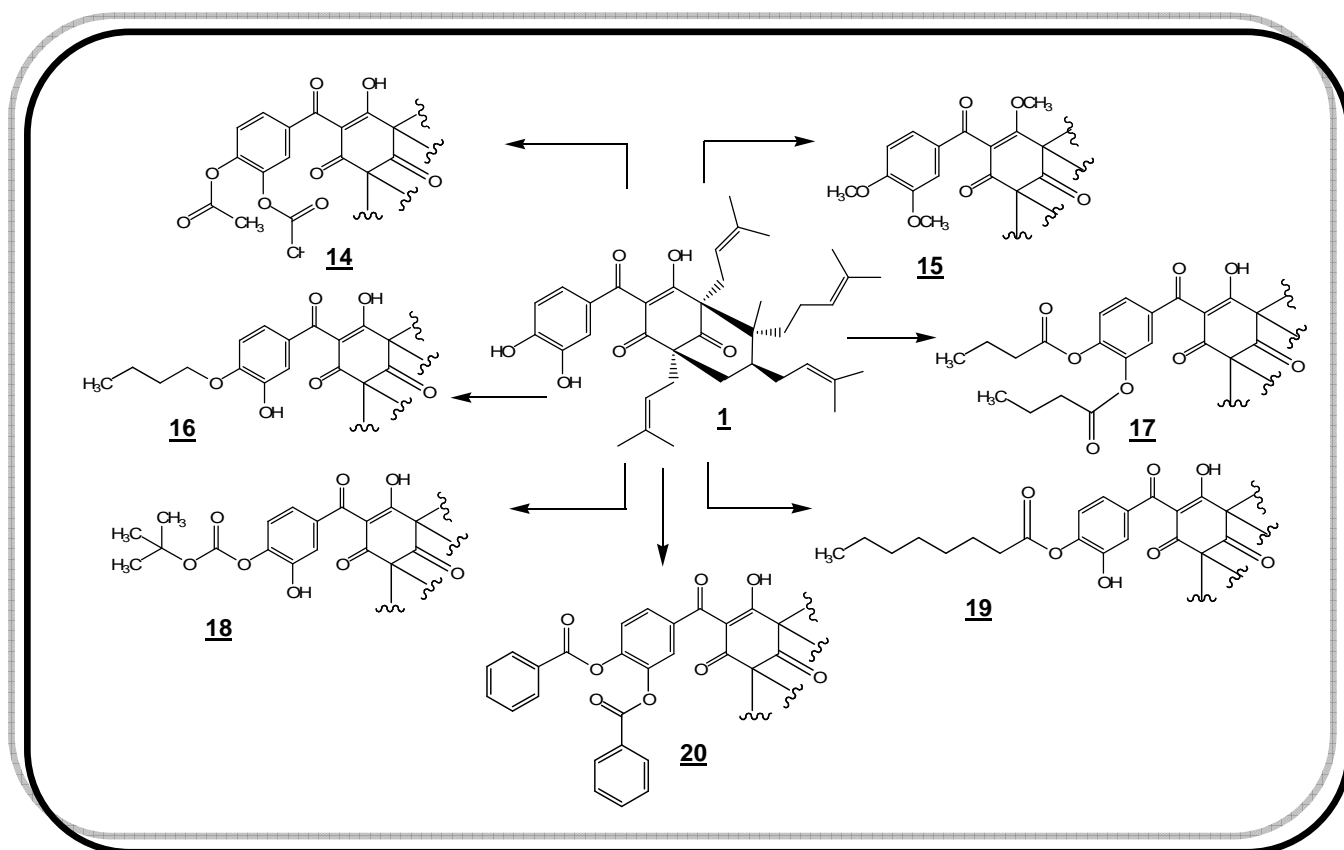


Figura 10 - Proposta de semissíntese para a obtenção dos derivados.

5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Materiais, métodos e instrumentos

- ✓ Nos processos de cromatografia em coluna (CC) foi utilizada sílica gel 60 [70 a 230 Mesh (0,063 – 0,200 nm) ou 230 – 400 Mesh (0,200 – 0,360 nm), ASTM], Merck[®], em suporte de vidro de diâmetro interno adequado para cada caso.
- ✓ Nos processos de cromatografia em camada delgada (CCD) foi utilizada sílica gel 60 G Merck[®], na espessura de 0,25 mm (analítica).
- ✓ Como reveladores foram utilizados vapores de iodo sublimado, solução etanólica de FeCl₃ a 1% (m/v) ou luz ultravioleta ($\lambda = 254$ ou 365 nm).
- ✓ O critério de pureza adotado para a guttiferona-A 1 foi a análise do perfil cromatográfico comparado ao padrão.
- ✓ Os espectros de absorção na região do ultravioleta foram obtidos em Espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu - 2550), de feixe duplo. As substâncias analisadas foram solubilizadas em etanol 0,1% (m/v) e analisadas por varredura na faixa de 200 a 500 nm.
- ✓ Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em Espectrômetro Shimadzu modelo Prestig-21, no Laboratório Interdisciplinar de Química (LABIQ) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL) em pastilhas de brometo de potássio (KBr) e as absorções expressas em números de ondas (cm⁻¹).
- ✓ Os espectros de massas foram obtidos em cromatógrafo a gás acoplado a detector de massas (CG-EM) Shimadzu modelo QP5050A, no departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa, UFV.
- ✓ Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C foram obtidos em espectrômetro BRUKER Avance DRX400, no Departamento de Química, ICEX, UFMG, utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Os deslocamentos químicos (δ) são

expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

✓ O teste enzimático foi realizado em espectrofluorímetro Varian modelo Cary Eclipse. Foi utilizado 7-amino-4-metilcumarina (MCA) para calibração do espectrofluorímetro.

5.2 Coleta do material vegetal

Os frutos de *Rheedia brasiliensis* foram coletados no *campus* da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais e identificadas por um botânico. A exsicata está depositada no Horto Botânico da UFV (número VIC2604). Os frutos foram separados em cascas e sementes. Foi realizada a limpeza necessária do material, retirando-se as sementes estragadas e contaminadas. Uma vez lavadas as sementes foram descascadas e colocadas em local arejado ao abrigo da luz.

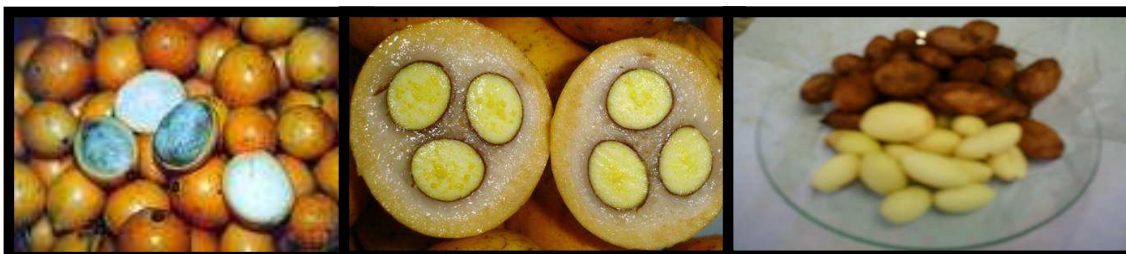


Figura 11 - Frutos de *Rheedia brasiliensis*.

5.3 Estudo fitoquímico

5.3.1 Obtenção da guttiferona-A 1

Preparo do extrato

As sementes de *Rheedia brasiliensis* foram trituradas em liquidificador industrial e submetidas à extração a frio por maceração com acetato de etila, para obtenção dos extratos brutos. A cada três dias de maceração, a mistura foi filtrada por filtração simples, concentrada sob pressão reduzida à 45 °C. Posteriores

renovações do solvente extrator nos frascos contendo as sementes trituradas foram feitas, repetindo-se esse processo até que o material fosse extraído exaustivamente.



Figura 12 - Extração da semente de *Rheedia brasiliensis* obtido por maceração.

Isolamento e purificação da guttiferona-A

O isolamento da guttiferona-A **1** foi realizado a cada 50 g do extrato acetato de etila das sementes de *Rheedia brasiliensis*, por CC, segundo a metodologia descrita por SANTOS et al., 1999. A eluição das substâncias iniciou-se com hexano e a polaridade foi aumentada gradativamente (a cada 1%) com adição de acetato de etila. As frações foram coletadas em volumes de 250 mL e analisadas por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 95:5; reveladores: solução etanólica de FeCl_3 , vapor de iodo sublimado e sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm). As frações foram agrupadas por comparação por CCD (FIGURA 13). Em seguida, foram tratadas com hexano e, após algum tempo de repouso, foi observada a decantação de um sólido amarelo (4g de guttiferona-A **1**, com rendimento de 8%).

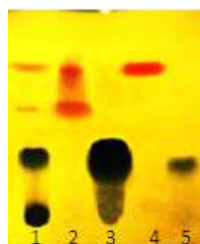
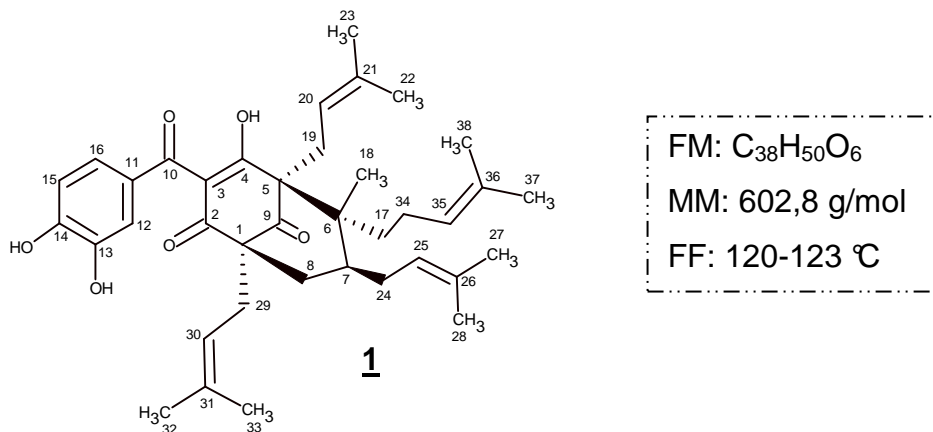


Figura 13 - Cromatografia em camada delgada (CCD): 1) extrato bruto acetato de etila de sementes de *R. brasiliensis*; 2) Fração contendo 7-epiclusianona; 3) Fração contendo guttiferona- A; 4) Padrão de 7-epiclusianona; 5) Padrão de guttiferona-A.



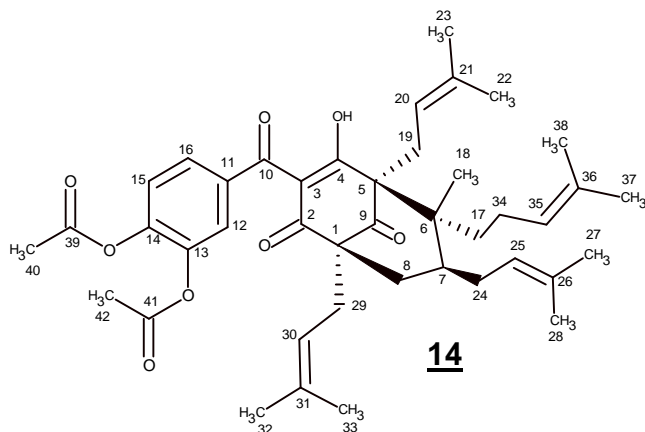
IV(KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3267 (O-H); 2929 e 2858 (C-H); 1610 (C=C); 1197 (C-O); 1730 (C=O).

UV (EtOH, 0,1 %) λ_{\max} (log ϵ): 229 (3,45), 277 (3,44) nm.

5.4 Reações de semissíntese

5.4.1 Preparo e caracterização de 13,14-di-O-acetil-guttiferona-A **14** (HANSEN; RINGS, 1999).

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 200 mg (0,332 mmol) de **1** dissolvidos em 5 mL de acetona, 0,5 mL (0,4 g; 3,98 mmol) de anidrido acético e 24 mg (0,199 mmol) de DMAP. O sistema foi mantido em agitação magnética em temperatura ambiente por 4 horas e monitorado por CCD (hexano/acetato de etila 7:3). Os reveladores utilizados foram solução etanólica de FeCl₃ e luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm. Ao final da reação, foram adicionados ao meio reacional 30 mL de solução de HCl 1% (v/v) e 20 mL de acetato de etila. As fases foram separadas, a fase aquosa foi extraída com acetato de etila (4x 20 mL) e a fase orgânica reunida foi neutralizada com solução saturada de NaHCO₃, secada em sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. Foi obtido 0,18 g (0,26 mmol) de **14**, na forma de um óleo vermelho. (78% de rendimento).



RMN de ¹H (CDCl₃, 400MHz): 1,48 (s, 2H, H-17); 1,70-1,52 (m, 24H, H-22, 23, 27, 28, 32, 33, 37 e 38); 2,04 (s, 3H, H-18); 2,08-2,05 (m, 1H, H-7); 2,08-2,06 (m, 2H, H-34); 2,29 (s, 6H, H-40 e H-42); 2,53 (dd, 1H, *J* 9,1 e 13,8 Hz, H-8); 2,63 (d, 1H, *J* 8,0 Hz, H-8); 2,72-2,63 (m, 4H, H-19 e 29); 2,79-2,75 (m, 2H, H-24); 5,05-5,00 (m, 2H, H-25 e H-35); 5,13-5,09 (m, 1H, H-30); 5,19-5,15 (m, 1H, H-20); 7,20 (d, 1H, *J* 8,5 Hz, H-15); 7,43 (dd, 1H, *J* 1,9 e 6,3 Hz, H-12); 7,46 (d, 1H, *J* 2,0 Hz, H-16).

RMN de ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): 18,1 (C-37); 18,3 (C-22); 18,4 (C-32); 18,8 (C-28); 19,7 (C-40); 20,9 (C-17); 22,7 (C-42); 24,3 (C-34); 25,9 (C-27); 26,0 (C-38); 26,2 (C-24); 26,05 (C-23 e 33); 28,8 (C-19); 31,2 (C-29); 36,7 (C-18); 38,7 (C-8); 40,2 (C-7); 51,2 (C-6); 63,3 (C-1); 69,8 (C-5); 116,8 (C-15); 118,6 (C-12); 119,1 (C-3); 120,5 (C-20); 122,9 (C-30); 123,9 (C-25); 124,3 (C-16); 124,5 (C-35); 128,2 (C-11); 132,2 (C-36); 133,1 (C-26); 133,7 (C-21); 134,8 (C-31); 145,6 (C-14); 145,8 (C-13); 167,7 (C-41); 168,0 (C-39); 193,6 (C-4); 194,6 (C-2); 197,8 (C-10); 207,9 (C-9).

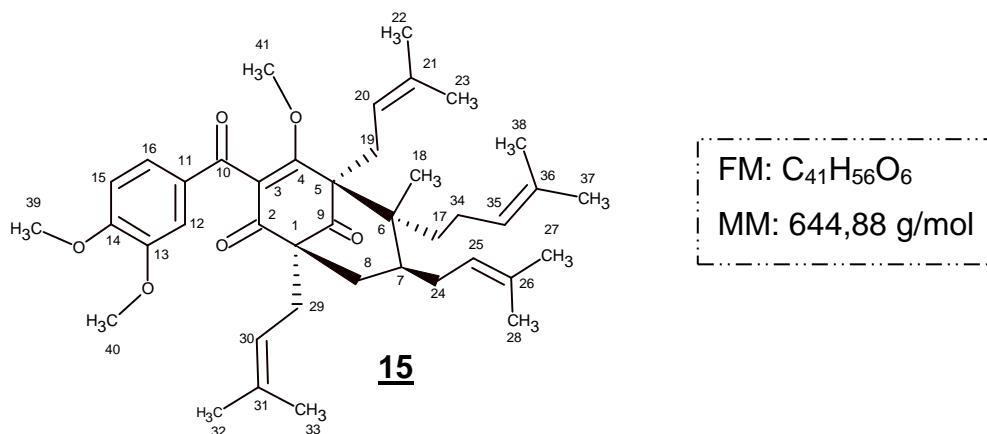
IV(KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 2970 e 2922 (C-H); 1778 (C=O); 1666 e 1608 (C=C); 1201 (O-C=C).

UV (EtOH, 0,1 %) $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ): 248 (4,12), 293 (3,98) nm.

CG-EM *m/z* (%): 686 (1), 617 (4), 575 (9), 231 (33), 137 (39), 69 (100), 55 (23).

5.4.2 Preparo e caracterização de 4,13,14-tri-O-metil-guttiferona-A **15** (UNANGST et al., 1996).

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 50 mg (0,083 mmol) de **1** dissolvidos em 4mL de acetona. Foram acrescentados 0,02 mL (0,04 g; 0,498 mmol) de iodeto de metila e 50 mg (0,498 mmol) de carbonato de potássio. O sistema foi mantido sob agitação magnética em temperatura ambiente por 72 horas e monitorado por CCD (hexano/acetato de etila 7:3). Os reveladores utilizados foram solução etanólica de FeCl₃ e luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm. Decorrido este tempo, foram adicionados ao meio de reação 30 mL de água destilada e 20 mL de acetato de etila. As fases foram separadas, a fase aquosa foi extraída com acetato de etila (4 x 20 mL) e a fase orgânica reunida foi secada em sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada em rotavapor. Foram obtidos 46,6 mg (0,072 mmol) de **15**, na forma de um óleo amarelo, que corresponde a 87% de rendimento.



RMN de ¹H (CDCl₃, 400MHz): 1,52 (s, 2H, H-17); 1,72-1,56 (m, 24H, H-22, 23, 27, 28, 32, 33, 37 e 38); 2,00 (s, 3H, H-18); 2,10-2,06 (m, 1H, H-7); 2,17-2,14 (m, 2H, H-34); 2,45 (dd, 1H, *J* 7,5 e 14,2 Hz, H-8); 2,51 (d, 1H, *J* 8,0 Hz, H-8); 2,70-2,62 (m, 4H, H-19 e 29); 2,79-2,74 (m, 2H, H-24); 3,64 (s, 3H, H-40); 3,65 (s, 3H, H-39); 3,91 (s, 3H, H-41); 5,04-4,99 (m, 2H, H-25 e H-35); 5,15-5,09 (m, 1H, H-30); 5,55-5,53 (m, 1H, H-20); 7,24 (d, 1H, *J* 6,7 Hz, H-15); 7,55 (dd, 1H, *J* 1,6 e 15 Hz, H-12); 7,71 (d, 1H, *J* 2,3 Hz, H-16).

RMN de ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): 17,6 (C-37); 18,0 (C-22); 18,1 (C-28); 18,4 (C-32); 20,1 (C-17); 22,8 (C-34); 25,0 (C-23 e 33); 25,9 (C-38); 26,2 (C-24); 26,2 (C-27); 29,5 (C-19); 31,4 (C-29); 37,4 (C-18); 39,5 (C-7); 40,1 (C-8); 50,3 (C-6); 56,1 (C-39 e 40); 60,1 (C-41); 62,8 (C-1); 68,9 (C-5); 115,8 (C-15); 119,8 (C-12); 120,0 (C-3); 120,5 (C-20); 123,9 (C-30); 124,0 (C-16); 125,2 (C-25); 125,4 (C-35); 131,8 (C-11);

132,5 (C-36); 132,8 (C-26); 133,6 (C-21); 134,2 (C-31); 149,2 (C-13); 153,6 (C-14); 194,2 (C-4); 194,3 (C-2); 196,0 (C-10); 208,3 (C-9).

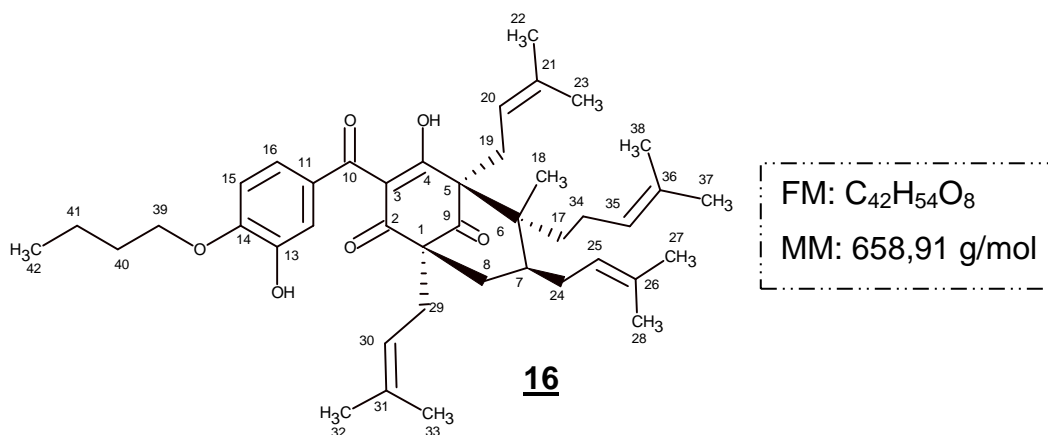
IV(KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 2926 e 2854 (C-H); 1745 (C=O); 1647 e 1670 (C=C); 1269 (C-O-C).

UV (EtOH, 0,1 %) $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ): 231 (4,13), 277 (3,94) nm.

CG-EM m/z (%): 575 (25), 491 (5), 383 (25), 245 (45), 165 (95), 137 (39), 69 (100), 55 (23).

5.4.3 Preparo e caracterização de 14-O-butil-guttiferona-A **16** (UNANGST et al., 1996).

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 50 mg (0,083 mmol) de **1** dissolvidos em 5 mL de acetona, 0,6 mL (0,071 g; 0,498 mmol) de 1-bromobutano e 50 mg (0,498 mmol) de carbonato de potássio. O sistema foi mantido sob agitação magnética em temperatura ambiente por 11 horas e monitorado por CCD (hexano/acetato de etila 8:2). Os reveladores utilizados foram solução etanólica de FeCl_3 e luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm. Decorrido este tempo, foram adicionados ao meio de reação 30 mL de água destilada e 20 mL de acetato de etila. As fases foram separadas, a fase aquosa foi extraída com acetato de etila (4 x 20 mL) e a fase orgânica reunida foi secada em sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. Foram obtidos 45,4 mg (0,069 mmol) de **16**, na forma de um óleo amarelo, que corresponde a 83% de rendimento.



RMN de ^1H (CDCl_3 , 400MHz): 0,88 (s, 3H, H-42); 1,23-1,26 (m, 4H, H-40 e 41); 1,49 (s, 2H, H-17); 1,79-1,59 (m, 24H, H-22, 23, 27, 28, 32, 33, 37 e 38); 2,04-2,00 (m, 2H, H-34); 2,07 (s, 3H, H-18); 2,17-2,11 (m, 1H, H-7); 2,32 (dd, 1H, J 7,6 e 16,3 Hz, H-8); 2,47 (d, 1H, J 7,2 Hz, H-8); 2,53-2,50 (m, 4H, H-19 e 29); 2,69-2,62 (m, 2H, H-24); 3,98-4,01 (m, 2H, H-39); 4,90-4,85 (m, 2H, H-25 e H-35); 5,15-5,17 (m, 1H, H-30); 5,36-5,33 (m, 1H, H-20); 7,48 (d, 1H, J 1,6 Hz, H-15); 7,70 (dd, 1H, J 3,2 e 5,8 Hz, H-12); 8,0 (d, 1H, J 8,6 Hz, H-16).

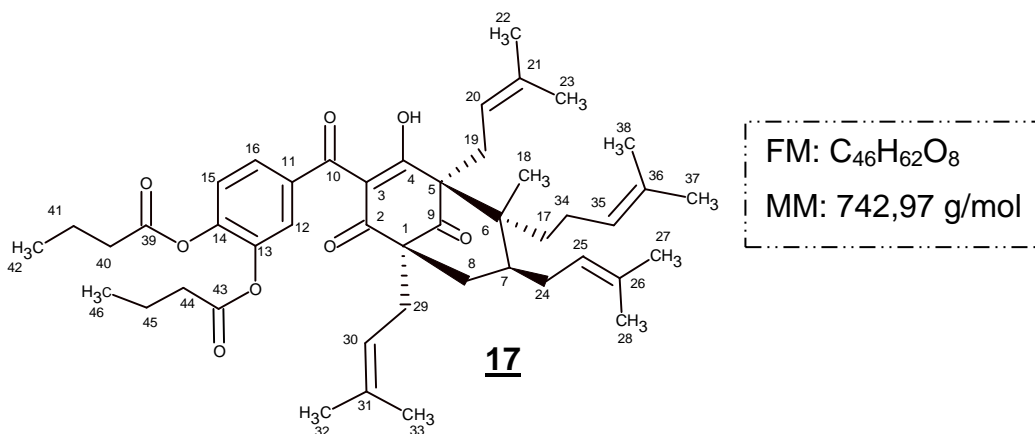
IV(KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 2964 e 2927 (C-H); 1724 (C=O); 1645 e 1664 (C=C); 1276 (C-O-C).

UV (EtOH, 0,1 %) $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ): 228 (4,24), 277 (4,28) nm.

CG-EM m/z (%): 589 (13), 507 (11), 397 (15), 193 (24), 69 (100), 55 (20).

5.4.4 Preparo e caracterização de 13,14-di-O-butanoil-guttiferona-A **17** (UNANGST et al., 1996)

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 50 mg (0,083 mmol) de **1** dissolvidos em 5 mL de acetona, 0,10 mL (0,11g; 0,996 mmol) de cloreto de butanoíla e 195 mg (0,996mmol) de carbonato de potássio. O sistema foi mantido sob agitação magnética em temperatura ambiente por 4 horas e monitorado por CCD (hexano/acetato de etila 8:2). Os reveladores utilizados foram, solução etanólica de FeCl_3 e luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm. Decorrido este tempo, foram adicionados ao meio de reação 30 mL de água destilada e 20 mL de acetato de etila. As fases foram separadas, a fase aquosa foi extraída com acetato de etila (4 x 20 mL) e a fase orgânica reunida foi secada em sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. Foram obtidos 49,7 mg (0,074mmol) de **17**, na forma de um óleo vermelho, o que corresponde a 89% de rendimento.



RMN de ¹H (CDCl₃, 400MHz): 0,97 (s, 6H, H-42 e 46); 1,49 (s, 2H, H-17); 1,77-1,56 (m, 24H, H-22, 23, 27, 28, 32, 33, 37 e 38); 1,79 (m, 4H, H-40 e H-44); 2,04 (s, 3H, H-18); 2,11-2,06 (m, 2H, H-34); 2,17-2,13 (m, 1H, H-7); 2,33 (dd, 1H, *J* 8,2 e 14,8 Hz, H-8); 2,51 (d, 1H, *J* 7,0 Hz, H-8); 2,53 (m, 4H, H-41 e H-45); 2,69-2,61 (m, 2H, H-19 e 29); 2,78-2,75 (m, 2H, H-24); 5,15-5,13 (m, 2H, H-25 e H-35); 5,21-5,15 (m, 1H, H-30); 5,23-5,17 (m, 1H, H-20); 7,20 (d, 1H, *J* 8,4 Hz, H-15); 7,40 (dd, 1H, *J* 7,9 e 20,1 Hz, H-12); 7,70 (d, 1H, *J* 2,2 Hz, H-16).

IV(KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 2968 e 2929 (C-H); 1774 (C=O); 1662 e 1608 (C=C); 1259 (O=C=C).

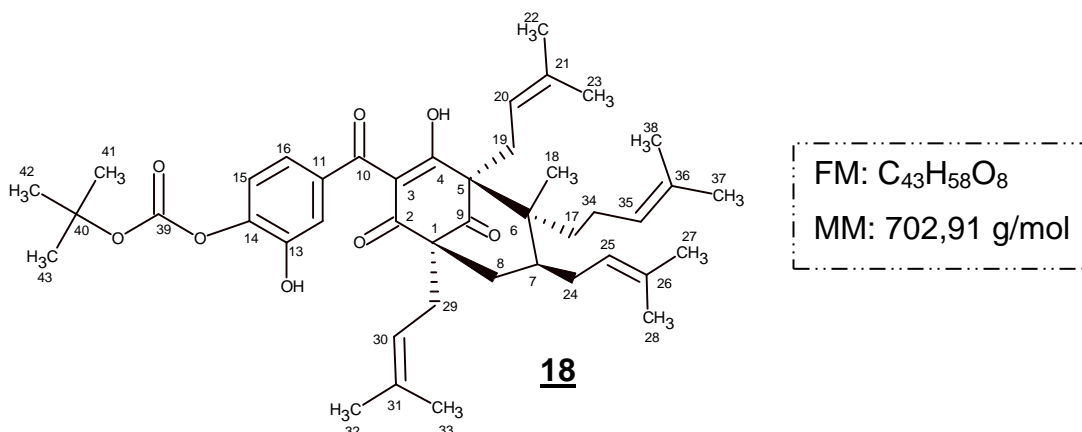
UV (EtOH, 0,1 %) $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ): 260 (3,89), 323 (3,33) nm.

CG-EM *m/z* (%): 673 (26), 411 (30), 285 (12), 231 (31), 69 (100), 55 (28).

5.4.5 Preparo e caracterização de 14-*O*-*tert*-butoxicarbonil–guttiferona-A **18** (HANSEN; RINGS, 1999)

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 200 mg (0,332 mmol) de **1** dissolvidos em 5 mL de acetona, 0,85 mL (0,864 g; 3,98 mmol) de anidrido de *tert*-butoxicarbonila (Boc₂O) e 24 mg (0,199 mmol) de DMAP. O sistema foi mantido sob agitação magnética em temperatura ambiente por 12 horas e monitorado por CCD (hexano/acetato de etila 8:2). Os reveladores utilizados foram, solução etanólica de FeCl₃ e luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm. Ao final da reação, foram adicionados ao meio reacional 30 mL de solução de HCl 1%

(v/v) e 20 mL de acetato de etila. As fases foram separadas, a fase aquosa foi extraída com acetato de etila (4x 20 mL) e a fase orgânica reunida foi neutralizada com solução saturada de NaHCO_3 , secadas em sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. Foram obtidos 32 mg (0,045 mmol) de **18**, na forma de um óleo incolor, o que corresponde a 55% de rendimento.



RMN de ^1H (CDCl_3 , 400MHz): 1,13 (s, 9H, H-41,42 e 43); 1,48 (s, 2H, H-17); 1,75-1,53 (m, 24H, H-22, 23, 27, 28, 32, 33, 37 e 38); 2,04 (s, 3H, H-18); 2,10-2,06 (m, 2H, H-34); 2,17-2,13 (m, 1H, H-7); 2,57 (dd, 1H, J 7,7 e 15,1 Hz, H-8); 2,65 (d, 1H, J 9,4 Hz, H-8); 2,68-2,62 (m, 2H, H-19 e 29); 2,75-2,73 (m, 2H, H-24); 4,89-4,87 (m, 2H, H-25 e H-35); 5,17-5,14 (m, 1H, H-30); 5,25-5,23 (m, 1H, H-20); 7,38 (d, 1H, J 2,0 Hz, H-15); 7,42 (dd, 1H, J 2,0 e 12,0 Hz, H-12); 7,46 (d, 1H, J 2,3 Hz, H-16).

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3446 (O-H); 2981 e 2931 (C-H); 1766 (C=O); 1647 e 1579 (C=C); 1257 (O-C=C).

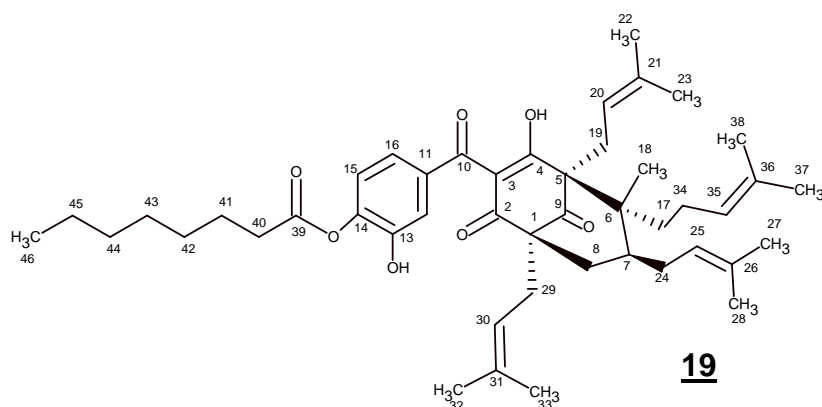
UV (EtOH, 0,1 %) $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ): 250 (3,65), 275 (3,63) nm.

CG-EM m/z (%): 702 (1), 533 (29), 341 (50), 231 (49), 137 (31), 69 (100), 55 (49).

5.4.6 Preparo e caracterização de 14-O-octanoil-guttiferona-A **19** (UNANGST et al., 1996)

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 50 mg (0,083 mmol) de **1** dissolvidos em 5 mL de acetona, 0,085 mL (0,014 g; 0,498 mmol) de cloreto de octanoíla e 50 mg (0,498 mmol) de carbonato de potássio. O sistema foi mantido sob

agitação magnética em temperatura ambiente por 4 horas e monitorado por CCD (hexano/acetato de etila 7:3). Os reveladores utilizados foram, solução etanólica de FeCl_3 e luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm. Decorrido este tempo, foram adicionados ao meio de reação 30 mL de água destilada e 20 mL de acetato de etila. As fases foram separadas, a fase aquosa foi extraída com acetato de etila (4 x 20 mL) e a fase orgânica foi secada em sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. Foram obtidos 46,8 mg (0,064 mmol) de **19**, na forma de um óleo amarelo, o que corresponde a 78% de rendimento.



RMN de ^1H (CDCl_3 , 400MHz): 0,89 (s, 3H, H-46); 1,49 (s, 2H, H-17); 1,73-1,56 (m, 24H, H-22, 23, 27, 28, 32, 33, 37 e 38); 2,04 (s, 3H, H-18); 2,11-2,07 (m, 2H, H-34); 2,20-2,17 (m, 1H, H-7); 2,27 (dd, 1H, J 2,7 e 7,6 Hz, H-8); 2,34 (m, 2H, H-40); 2,52 (d, 1H, J 7,4 Hz, H-8); 2,66-2,63 (m, 2H, H-19 e 29); 2,79-2,73 (m, 2H, H-24); 5,06-4,99 (m, 2H, H-25 e H-35); 5,16-5,11 (m, 1H, H-30); 5,23-5,18 (m, 1H, H-20); 7,20 (d, 1H, J 2,4 Hz, H-15); 7,37 (dd, 1H, J 2,0 e 8,5 Hz, H-12); 7,64 (d, 1H, J 1,9 Hz, H-16).

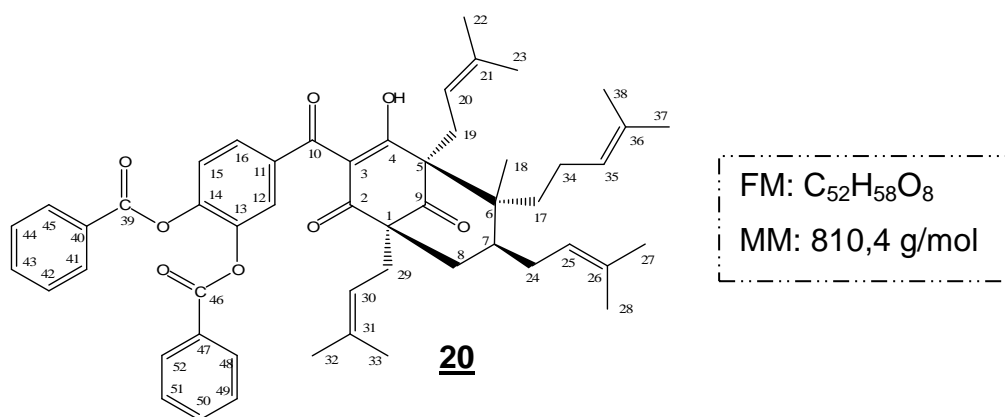
IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 2956 e 2929 (C-H); 1710 (C=O); 1282 (O-C=C).

UV (EtOH, 0,1 %) $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ): 224 (3,18), 259 (3,11) nm.

CG-EM m/z (%): 659 (11), 577 (6), 467 (14), 341 (10), 69 (100).

5.4.7 Preparo e caracterização de 13,14-di-O-benzoil-guttiferona-A **20** (UNANGST et al., 1996)

Em um balão foram dissolvidos 100 mg (0,17 mmol) de guttiferona-A (1) em 5 mL de acetona, seguido da adição de 33,3 mg (0,32 mmol) de K_2CO_3 e de 0,04 mL (0,32 mmol) de cloreto de benzoíla. O sistema reacional foi mantido sob agitação magnética em temperatura ambiente por 12 horas e a reação foi monitorada por CCD (hexano/acetato de etila 7:3). Ao final, foram adicionados 30 mL de água e a mistura reacional foi extraída com (4 x 20 mL) de acetato de etila, a fase orgânica foi secada em sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida fornecendo um produto bruto que foi purificado em coluna. O produto obtido apresentou-se como um óleo amarelo, com rendimento de 51%.



RMN de 1H ($CDCl_3$, 400MHz): 1,49-1,45 (m, 2H, H-17); 1,74-1,58 (m, 24H, H-22, 23, 27, 28, 32, 33, 37 e 38); 2,03 (s, 3H, H-18); 2,16-2,02 (m, 2H, H-34); 2,17-2,15 (m, 1H, H-7); 2,44 (dd, 1H, J 2,7 e 14,2 Hz, H-8); 2,53-2,51 (m, 2H, H-19 e 29); 2,59 (d, 1H, J 14,2 Hz, H-8); 2,63-2,61 (m, 2H, H-24); 5,08-5,01 (m, 2H, H-25 e H-35); 5,18-5,13 (m, 1H, H-30); 5,36-5,32 (m, 1H, H-20); 7,35 (d, 1H, J 7,8 Hz, H-15); 7,52 (t, 2H, J 7,5 Hz, H-43 e 50); 7,58 (t, 1H, J 7,4 Hz, H-42, 44, 49 e 51); 7,64 (dd, 1H, J 2,0 e 8,4 Hz, H-12); 7,82 (d, 1H, J 1,9 Hz, H-16); 8,03-8,00 (m, 4H, H-41, 45, 48, 52).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz): 17,6 (C-37); 18,2 (C-28); 18,4 (C-22); 18,4 (C-32); 19,9 (C-17); 22,8 (C-34); 25,0 (C-23 e 33); 25,7 (C-38); 26,0 (C-27); 26,3 (C-24); 29,7 (C-19); 31,0 (C-29); 35,2 (C-18); 37,7 (C-7); 39,7 (C-8); 51,0 (C-6); 55,4 (C-1); 70,7 (C-5); 115,3 (C-15); 117,6 (C-12); 119,3 (C-3); 123,3 (C-20); 123,7 (C-30); 123,8 (C-25); 125,3 (C-16); 127,9 (C-35); 128,5 (C-49 e 51); 128,6 (C-42 e 44); 130,2 (C-47); 130,4 (C-40); 131,9 (C-11); 132,1 (C-36); 132,8 (C-26); 133,7 (C-21); 133,8 (C-31); 134,1 (C-48 e 52); 134,2 (C-41 e 45); 135,1 (C-50); 135,6 (C-43); 146,5

(C-13); 161,3 (C-14); 163,5 (C-46); 167,1 (C-39); 190,5 (C-4); 190,6 (C-2); 195,7 (C-10); 206,8 (C-9).

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 2964 e 2916 (C-H); 1749 (C=O); 1600 e 1681 (C=C); 1246 (O-C=C).

CG-EM m/z (%): 810 (1), 741 (6), 606 (3), 345 (13), 105 (100), 69 (56).

5.4.8 Tentativa de síntese de 14-O-prenil-guttiferona-A **21** (UNANGST et al., 1996)

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 100 mg (0,166 mmol) de **1** dissolvidos em 5 mL de acetona, 0,12 mL (0,15 g; 0,996 mmol) de brometo de 3,3-dimetilalila e 97 mg (0,996 mmol) de carbonato de potássio. O sistema foi mantido sob agitação magnética em temperatura ambiente por 24 horas e monitorado por CCD (hexano/acetato de etila 7:3). Os reveladores utilizados foram solução etanólica de FeCl_3 e luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm. Decorrido este tempo, foram adicionados ao meio de reação 30 mL de água destilada e 20 mL de acetato de etila. As fases foram separadas, a fase aquosa foi lavada por acetato de etila (4 x 20 mL) e a fase orgânica reunida foi secada em sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi submetido à purificação por CC e CLAE semi-preparativa, mas não foi possível a separação da mistura.

5.4.9 Tentativa de síntese de 14-O-octil-guttiferona-A **22** (UNANGST et al., 1996)

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 50 mg (0,083 mmol) de **1** dissolvidos em 5 mL de acetona, 0,08 mL (0,016 g; 0,498 mmol) de 1-bromo-octano e 50 mg (0,498 mmol) de carbonato de potássio. O sistema foi mantido em agitação magnética por 21 horas e monitorado por CCD (hexano/acetato de etila 8:2). Os reveladores utilizados foram, solução etanólica de FeCl_3 e luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm. Decorrido este tempo, foram adicionados ao meio de reação 30 mL de água destilada e 20 mL de acetato de etila. As fases foram separadas, a fase aquosa foi lavada por acetato de etila (4 x 20 mL) e a fase orgânica reunida foi secada em sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob

pressão reduzida. O resíduo obtido foi submetido à purificação por CC e CLAE semi-preparativa, mas não foi possível a separação da mistura.

5.5 Avaliação da atividade inibitória

Os ensaios de inibição de papaína e tripsina foram realizados no Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo em colaboração com a Prof. Dra. Maria Aparecida Juliano e o doutorando Diego Magno Assis, e no Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Alfenas em colaboração com a professora Dra. Máisa Ribeiro Pereira Lima Brigagão, seguindo a técnica descrita por Martins e colaboradores (2009).

5.5.1 Ensaio: papaína e tripsina

Os ensaios com papaína foram realizados em tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ (pH 6,8) contendo 1,0 mmol.L⁻¹ de EDTA. Papaína foi previamente ativada com DTT 10 mmol.L⁻¹ por 10 minutos enquanto que, os ensaios com tripsina foram realizados em tampão Tris-HCl 50 mmol.L⁻¹ (pH 8,0) contendo CaCl₂ 10 mmol.L⁻¹, ambos à 25°C. E-64 foi utilizado como inibidor clássico de cisteíno-proteases e TLCK foi utilizado como inibidor clássico de serino-proteases.

Os derivados semissintéticos (1mg) foram dissolvidos em 1 mL de dimetilformamida (DMF) e o substrato fluorescente Z-Phe-Arg-MCA (1 mg) foi dissolvido em 1 mL de uma solução água/DMF 1:1. A concentração final foi ajustada conforme a necessidade de cada ensaio.

A atividade proteolítica foi monitorada por meio da hidrólise do substrato peptídico fluorogênico Z-Phe-Arg-MCA, através da liberação de (MCA) em comprimentos de onda de excitação de 380 nm e emissão de 460 nm (em $\lambda_{ex} = 380$ nm e $\lambda_{em} = 460$ nm). Os ensaios foram realizados em espectrofluorímetro (Varian modelo Cary Eclipse) previamente calibrado com soluções padrão de MCA.

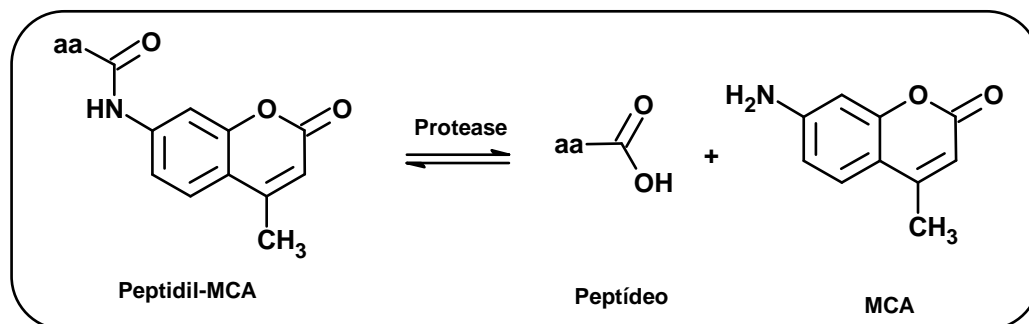


Figura 14 - A atividade proteolítica pode ser acompanhada na presença de um substrato fluorogênico (peptidil-MCA), o qual mediante clivagem pela enzima em estudo libera o peptídeo e MCA livre resultando na emissão de fluorescência.

5.5.2 Determinação do tempo necessário para a inibição enzimática

Para a determinação do tempo de inibição, as enzimas foram incubadas no tampão de ensaio respectivo a cada enzima em uma concentração final de 25 nmol.L⁻¹ contendo os compostos semissintéticos em uma concentração fixa de 50 μmol.L⁻¹. A contagem do tempo se iniciou no momento em que a enzima entrou em contato com o inibidor. Uma alíquota de 50 μL desse pré-incubado foi então diluída no tampão em cubeta (volume final de 1 mL) e a dosagem da atividade enzimática foi iniciada pela adição de substrato Z-Phe-Arg-MCA (10 μmol.L⁻¹). As leituras foram realizadas em 10, 25, 35 e 45 minutos e os resultados foram expressos como porcentagem da atividade enzimática (atividade residual) em função do tempo.

5.5.3 Determinação da IC₅₀

Para a determinação da IC₅₀, papaína e tripsina foram solubilizadas no tampão de ensaio respectivo a cada enzima (concentração final - 2.5 nmol.L⁻¹) e a solução estoque dos derivados semissintéticos (inibidores) foram adicionadas a este incubado resultando em concentrações finais de 1, 5, 10, 20 e 50 μmol.L⁻¹. Fixou-se o tempo de contato de inibidores e enzima, de acordo com o tempo necessário para inibição obtido no item acima.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Caracterização dos compostos

Os compostos foram caracterizados por espectrometria de absorção no IV, Massas, RMN de ^1H e ^{13}C e UV.

6.1.1 Guttiferona-A **1**

A substância isolada apresentou-se como um sólido amarelo com faixa de fusão de 120-123°C. O espectro de absorção na região do IV (FIGURA 15) apresentou bandas de 2929 e 2858 cm^{-1} , características de deformação axial de C-H, e em 1429 cm^{-1} , referentes à deformação angular de C-H. A banda observada em 3267 cm^{-1} é típica de deformação axial da ligação O-H de fenol. Também foram identificadas bandas de deformação axial de C=C de anel aromático em 1610 cm^{-1} , de deformação axial assimétrica de C-O em 1197 cm^{-1} , além de banda em 1730 cm^{-1} de C=O.

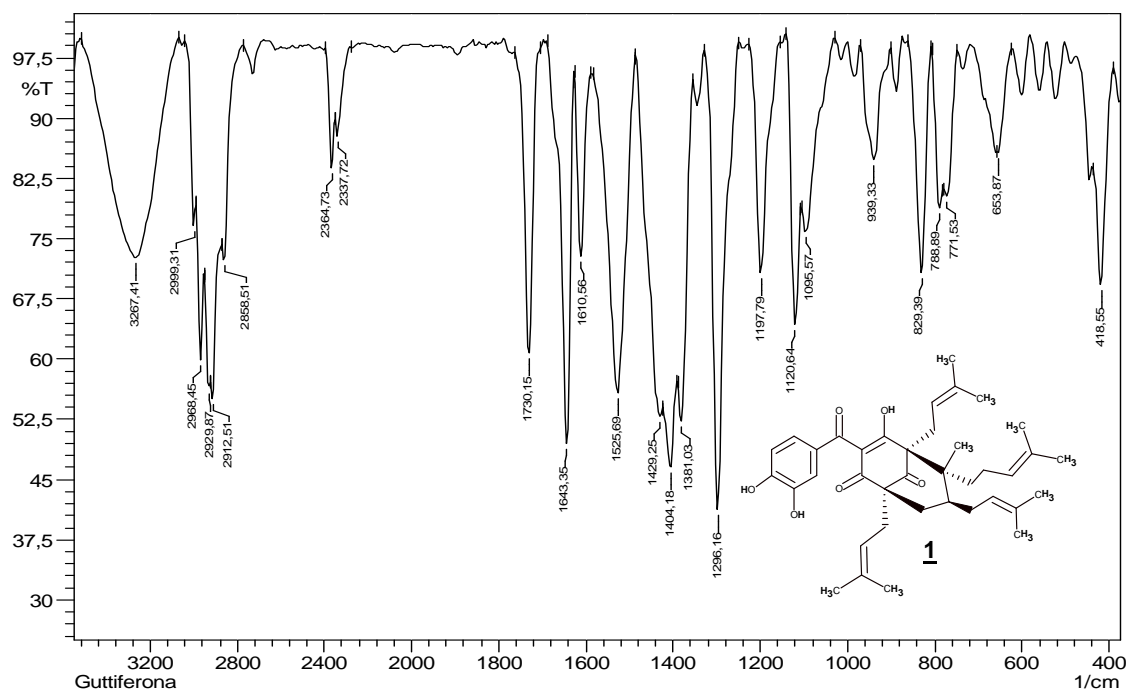


Figura 15 - Espectro no IV da benzofenona natural guttiferona-A **1**.

Martins e colaboradores (2007) isolaram a guttiferona-A de sementes de *Rheedia brasiliensis*, identificando-a através de métodos como RMN e massas. Os dados dos espectros (FIGURAS 16, 17 e 18) foram utilizados neste trabalho para fins de comparação com os dados obtidos para os derivados semissintéticos.

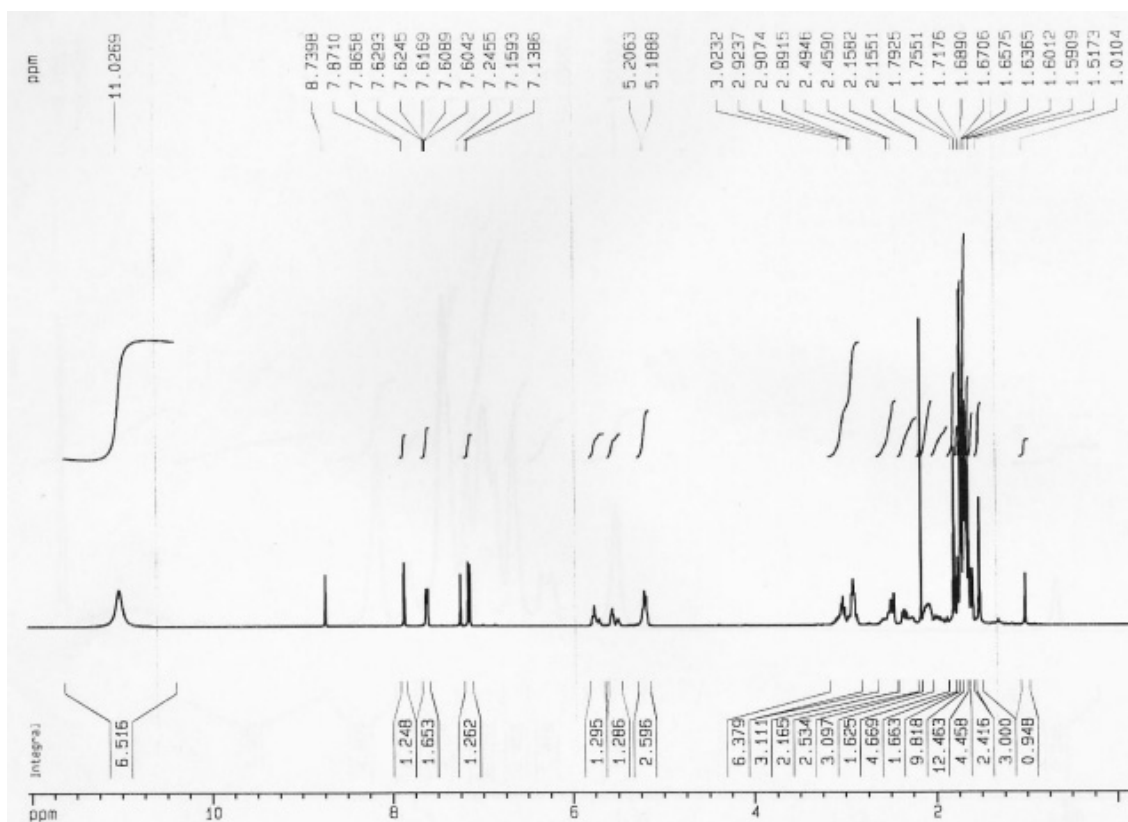


Figura 16 - Espectro de RMN de ^1H (piridina- d_5 ; 400 MHz) do composto **1**.

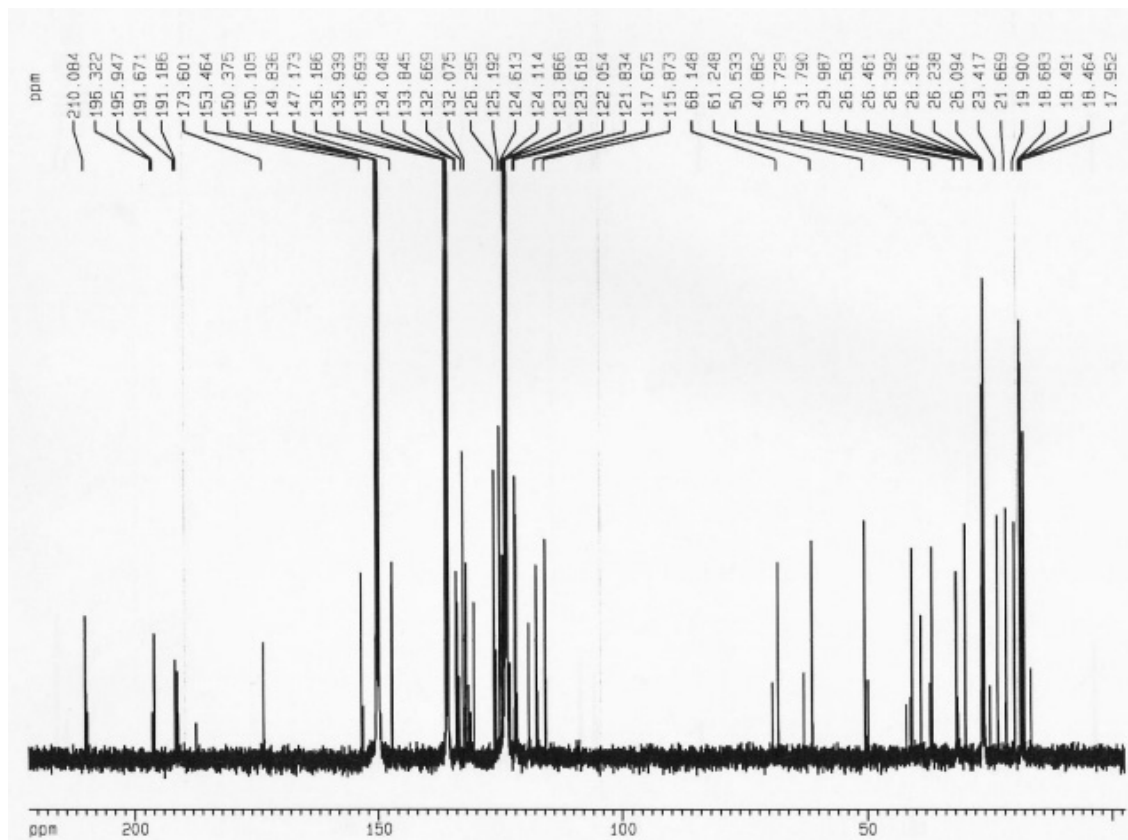


Figura 17 - Espectro de RMN de ^{13}C (piridina- d_5 ; 100 MHz) do composto **1**.

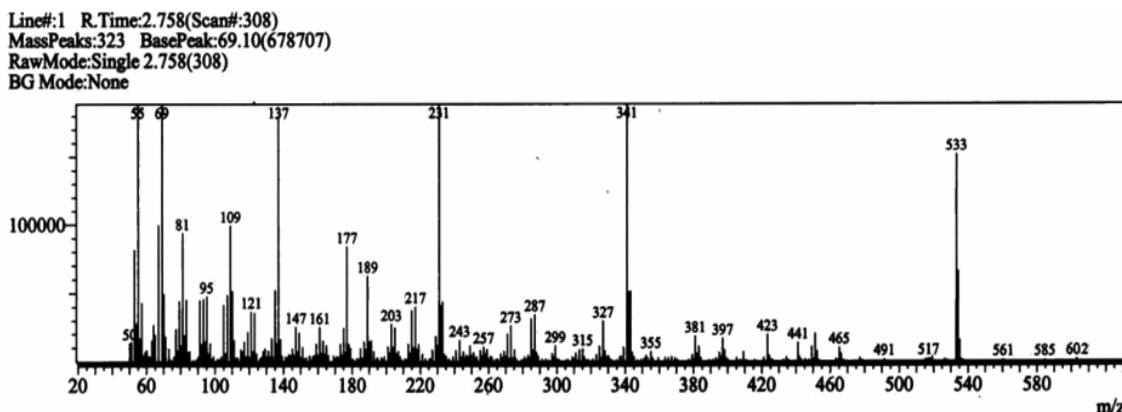


Figura 18 - Espectro de massas do composto guttiferona-A 1.

As bandas de absorção no espectro de ultravioleta (229, 277 nm) (FIGURAS 19 e 20) foram características de bandas de absorção de esqueletos benzofenônicos. O uso de aditivos comprovou a presença de hidroxilas fenólicas pelo deslocamento batocrômico, sendo que uma hidroxila ácida foi sugerida pelo deslocamento batocrômico causado pelo aditivo NaOAc e, em sequência, o uso de H_3BO_3 não causou a regeneração da curva original, sugerindo um sistema com di-hidroxilas em posição *orto*. Por fim, o uso de $AlCl_3$ possibilitou constatar a presença de hidroxila quelada, pelo deslocamento na curva, e sua não regeneração quando do uso subsequente de HCl (MABRY et al., 1970).

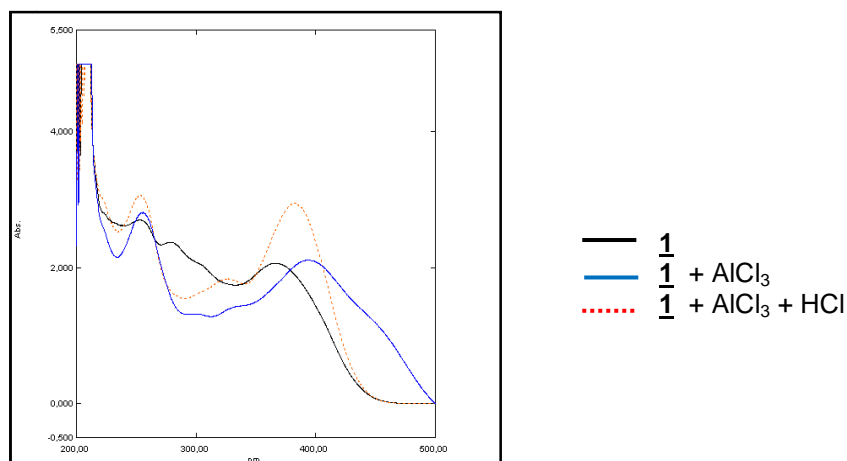


Figura 19 - Espectro no ultravioleta do composto 1 com $AlCl_3$ e HCl como aditivos.

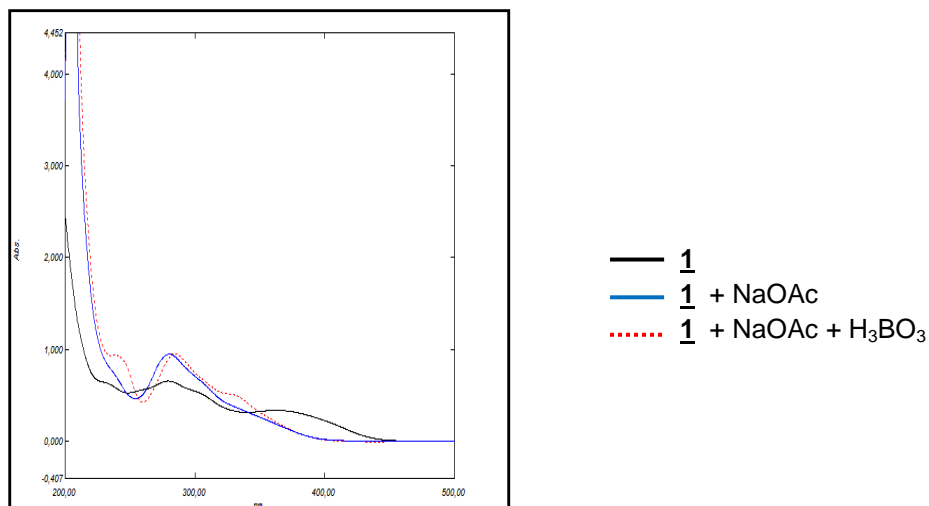


Figura 20 - Espectro no ultravioleta do composto **1** com NaOAc e H_3BO_3 como aditivos.

6.1.2 Derivado 13,14-di-O-acetil-guttiferona-A **14**

O derivado **14** foi obtido através da reação de guttiferona-A **1**, anidrido acético e DMAP (HANSEN; RINGS, 1999) (FIGURA 21). O produto foi obtido como um óleo vermelho e com rendimento de 78%.

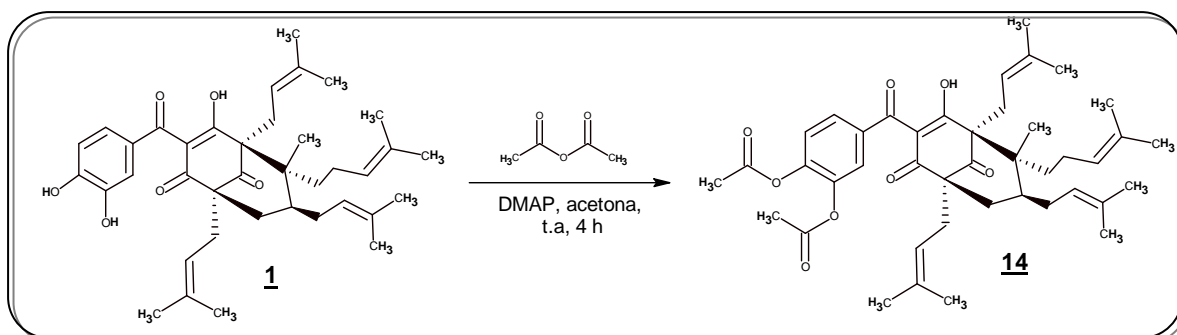


Figura 21 - Reação de obtenção do derivado **14**.

No espectro de absorção no IV do derivado **14** (FIGURA 22) foi observado, em comparação com o espectro do material de partida guttiferona-A o aparecimento de uma banda de absorção em 1778 cm^{-1} , correspondente ao estiramento de C=O de éster, o que confirma a acetilação. Também foram identificadas bandas de deformação axial assimétrica de C–H de metila em 2970 e 2922 cm^{-1} , deformação axial de C=C de aromático em 1668 e 1608 cm^{-1} e deformação axial assimétrica de O–C=C em 1201 cm^{-1} .

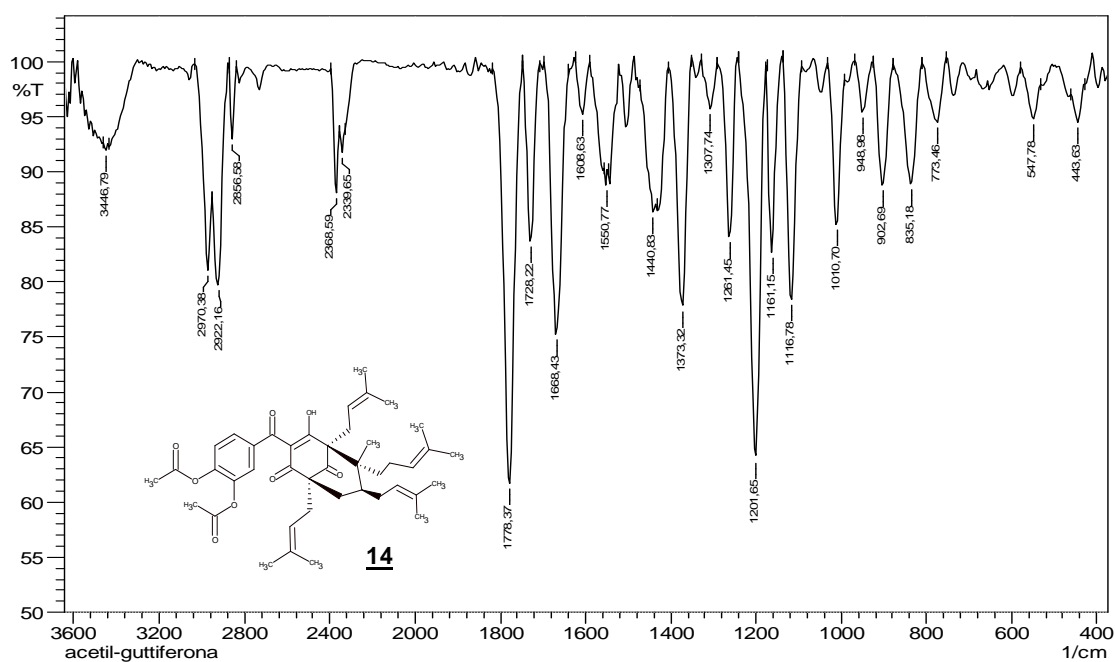


Figura 22 - Espectro de absorção na região do infravermelho de **14**.

No espectro de massas (FIGURA 23), foram identificados os fragmentos mais importantes para elucidação estrutural deste composto, além de suas massas e intensidades relativas dos principais fragmentos (TABELA 1). O pico do íon molecular do composto apresenta-se em m/z 686 (FIGURA 24) e o pico base em m/z 69. A fragmentação proposta está apresentada na Figura 25.

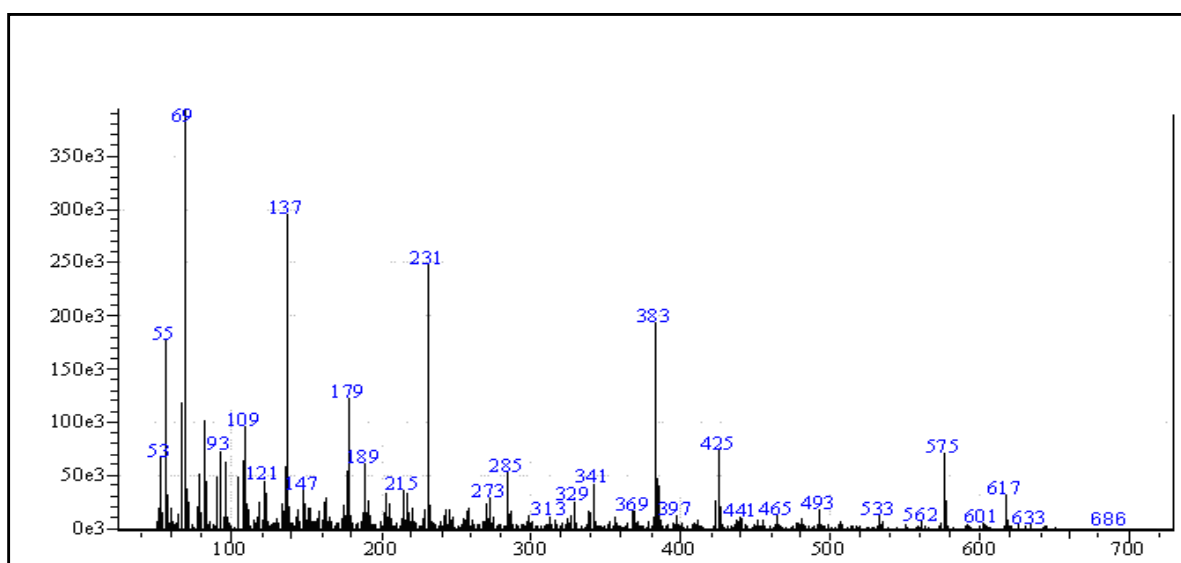
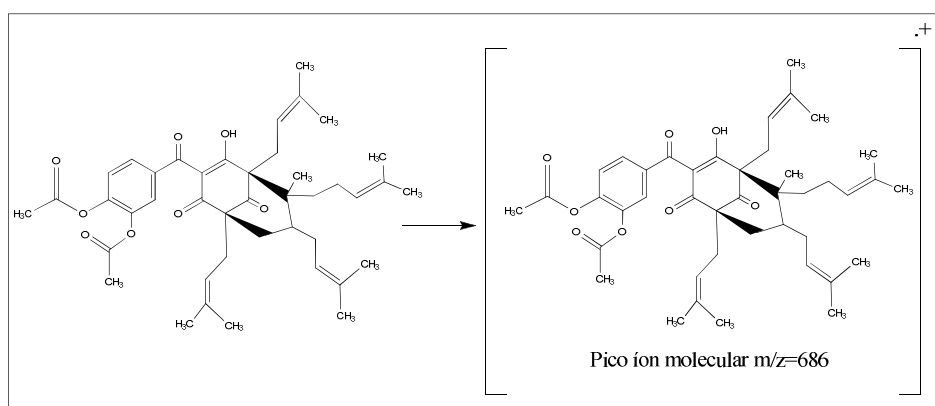
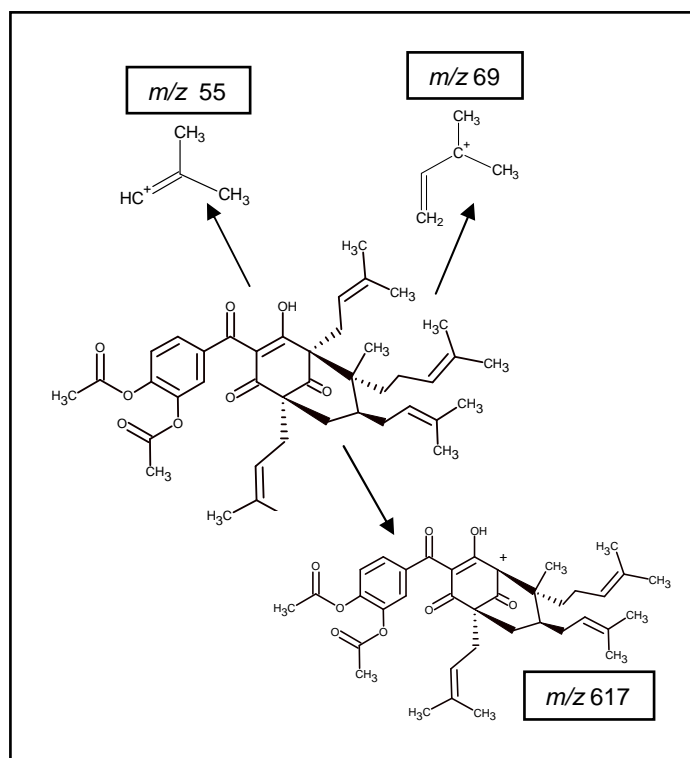


Figura 23 - Espectro de massas do derivado **14**.

Tabela 1 – Alguns dos fragmentos presentes no espectro de massas do derivado **14**.

m/z	Fragmento	Intensidade Relativa
55	$[C_4H_7]^+$	23,76
69	$[C_5H_9]^+$	100
617	$[C_{37}H_{44}O_8]^+$	4,33
686	$[C_{42}H_{54}O_8]^+$	1

Figura 24 - Íon molecular do derivado **14** (m/z 686).Figura 25 - Fragmentação proposta para o derivado **14**.

No espectro de RMN de ^1H do composto acetilado **14** (FIGURA 26) foi observado em δ 7,46 e 7,20 ppm, dupletos que foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos H-12 e H-15 respectivamente; em 7,43 ppm, um duplo duplete referente a H-16, também hidrogênio aromático. Entre δ 5,19 e 5,00 ppm observam-se três multipletos que foram atribuídos aos hidrogênios olefínicos dos grupos prenila, H-20, H-30, H-25 e H-35. Foram observados multipletos na região de δ 2,79-2,53 ppm referentes aos H-24, H-19, H-29 e H-8. Foi observado um simpleto em δ 2,29 ppm, que foi atribuído aos hidrogênios metílicos dos grupos acetilas (H-40 e H-42), confirmando portanto a modificação nas hidroxilas fenólicas. Entre δ 2,08-2,05, δ 2,08-2,06, δ 2,15-2,07 ppm, observaram-se multipletos referentes aos hidrogênios H-7 e H-34 e um simpleto em δ 2,04 ppm referente a H-18. Os hidrogênios metílicos dos grupos prenila foram observados como multipletos na região de δ 1,70 – 1,52 ppm.

No espectro de RMN de ^{13}C do composto acetilado **14** (FIGURA 27), foram observados os sinais de ressonância dos carbonos dos grupos carbonila em δ 207,9; 197,8; 194,6 ppm referente a C-9; C-10; C-2. Os sinais observados em δ 168,0 e 167,7 ppm, foram atribuídos aos carbonos carbonílicos do grupo acetila (C-39 e C-41), confirmando portanto a modificação nas hidroxilas fenólicas. Os sinais observados entre δ 145,7 – 128,1 ppm, referentes aos carbonos não hidrogenados, foram atribuídos aos carbonos C-14; C-13; C-31; C-21; C-26; C-36 e C-11. O sinal observado em δ 124,5 ppm foi atribuído a C-35, em δ 123,9 ppm, referente a C-25, em δ 124,3 ppm, o sinal referente a C-16. O sinal em δ 122,9 ppm foi atribuído a C-30, em δ 120,5 ppm, a C-20, em δ 119,1 ppm, a C-3, as sinais em δ 118,6 e δ 116,8 ppm, são referentes aos carbonos aromáticos C-12 e C-15. Foram atribuídos ainda sinais entre δ 69,8-51,2 ppm, referentes aos carbonos não hidrogenados C-5; C-1 e C-6. Os carbonos hidrogenados C-18; C-29; C-19 e C-24 foram atribuídos aos sinais entre δ 36,7-26,2 ppm e os sinais de ressonância na região δ 26,0-24,3 ppm foi atribuído a C-23; C-33; C-38 e C-34 referente aos carbonos das metilas presente nas prenilas. Foram observados sinais em δ 19,7 e 22,7 ppm, atribuídos aos C-40 e 42, referente aos carbonos das metilas do grupo acetila. Os sinais entre δ 18,3-18,0 ppm foram atribuídos aos carbonos metílicos C-32; C-28; C-22 e C-37.

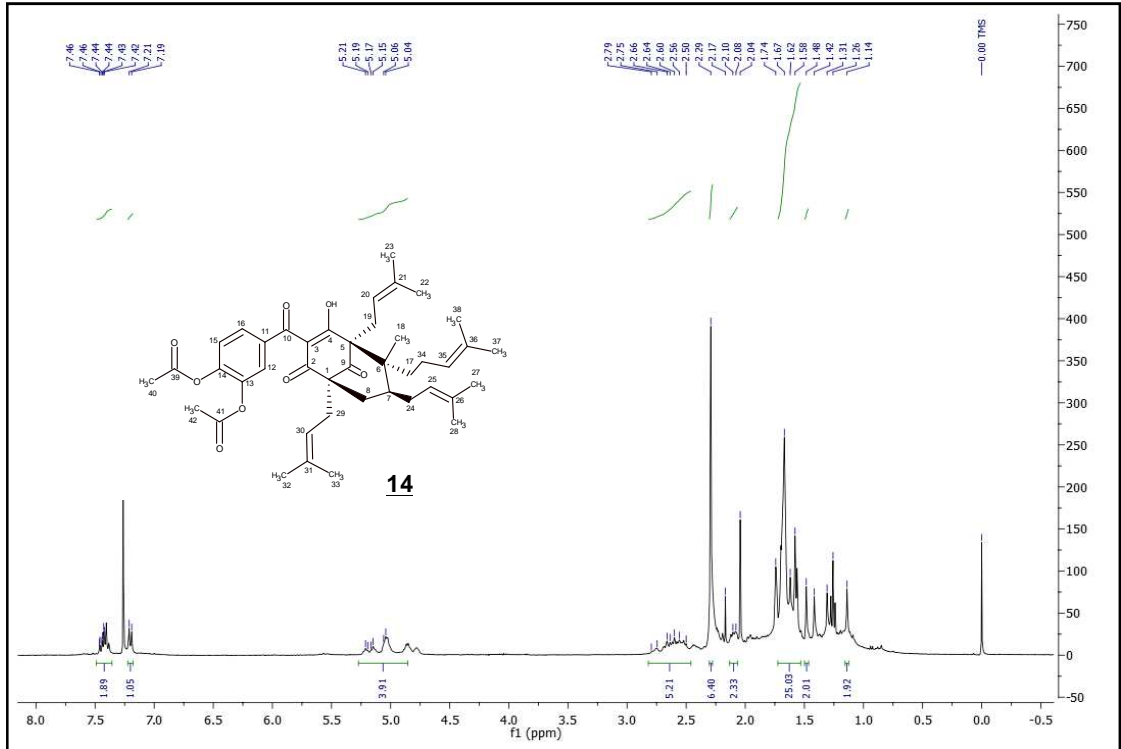


Figura 26 - Espectro de RMN de ¹H de **14** (CDCl₃; 400 MHz).

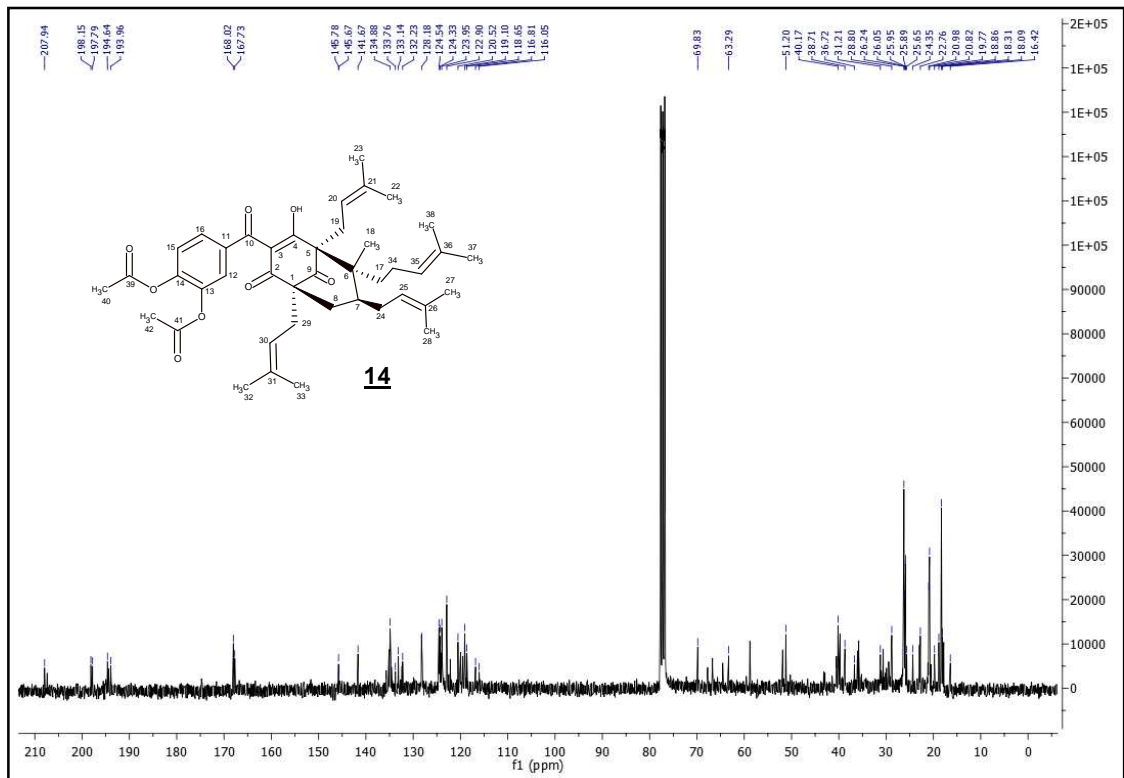


Figura 27 - Espectro de RMN de ¹³C **14** (CDCl₃; 100 MHz).

No espectro de UV, a adição de AlCl_3 produz um deslocamento batocrômico (320 nm) devido à provável complexação ou nos sistemas carbonila e hidroxila β -enona ou nas hidroxilas em *orto*. A adição de HCl não restitui o espectro, portanto, ainda existe o sistema carbonila e hidroxila β -enona, ou seja, não ocorreu modificação na hidroxila deste sistema (FIGURA 28). A adição de NaOAc modifica o espectro, conseqüência do aumento da composição fracionária da espécie desprotonada, devido a existência da hidroxila β -enona. A adição de H_3BO_3 não modifica esse espectro devido a não existência de hidroxilas em *orto*, ou seja, a modificação ocorreu nas hidroxilas fenólicas, em uma ou em ambas as hidroxilas (FIGURA 29).

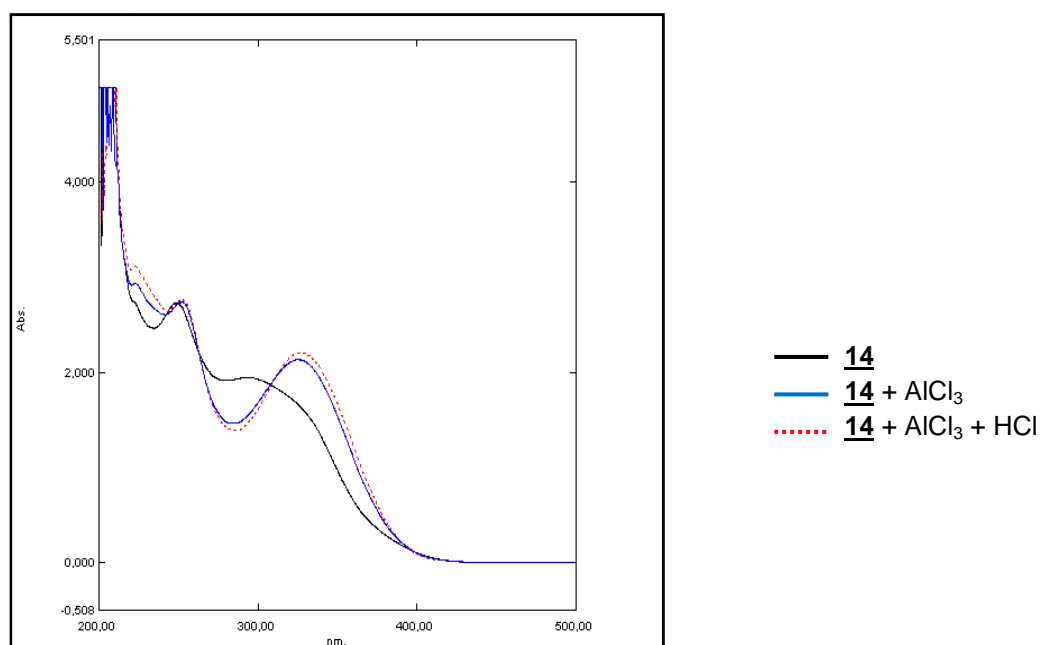


Figura 28 - Espectro no ultravioleta de **14** com AlCl_3 e HCl como aditivos.

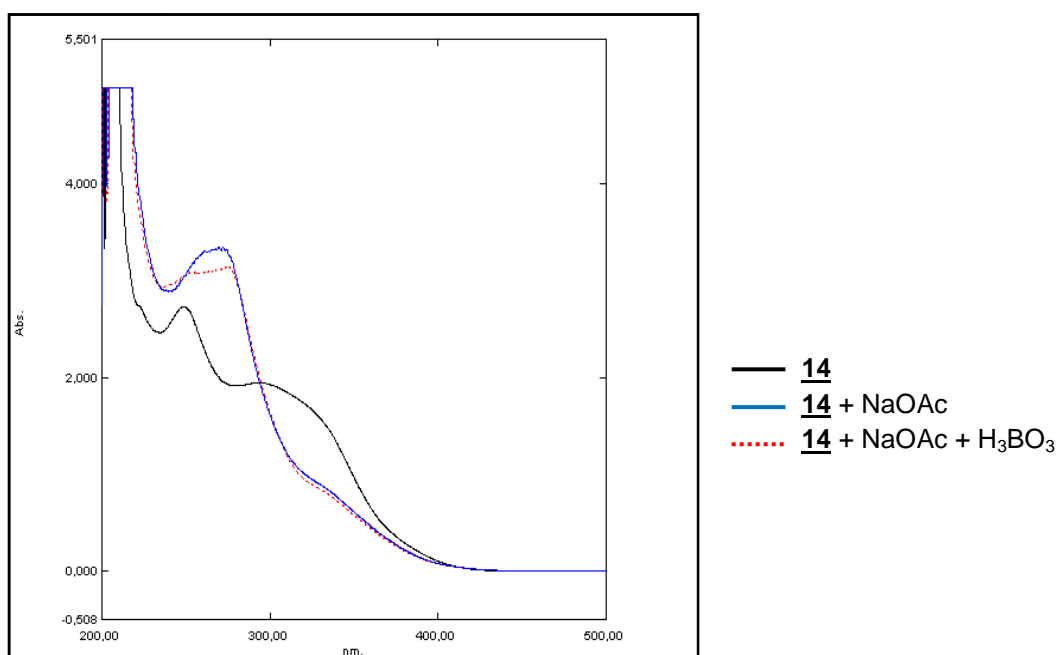


Figura 29 - Espectro no ultravioleta de **14** com NaOAc e H_3BO_3 como aditivos.

6.1.3 Derivado 4,13,14-tri-*O*-metil-guttiferona-A **15**

O derivado **15** foi obtido pela reação de substituição nucleofílica bimolecular ($\text{S}_{\text{N}}2$) de guttiferona-A **1** e iodeto de metila em presença de carbonato de potássio (UNANGST et al., 1996) (FIGURA 30). O produto foi obtido como um óleo amarelo e apresentou rendimento médio de 87%.

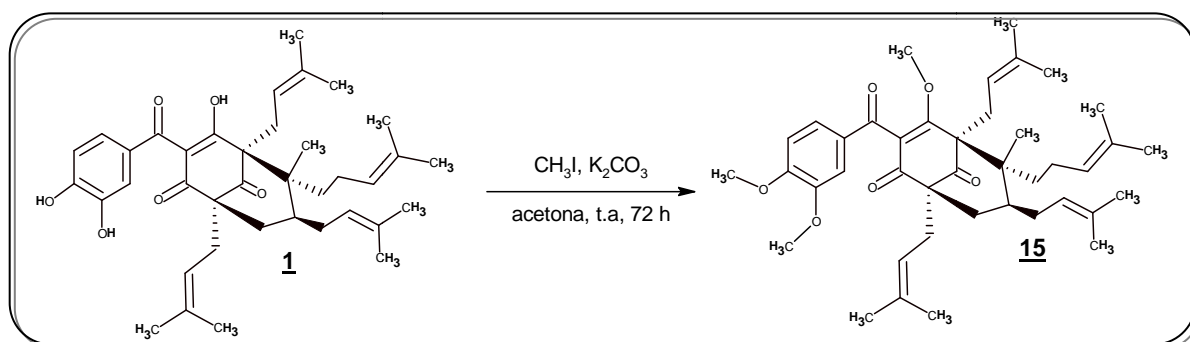


Figura 30 - Reação de obtenção do derivado **15**.

Pela análise do espectro de absorção na região do IV (FIGURA 31) do derivado **15** foram identificadas, entre outras as bandas de deformação axial assimétrica de C–H de metila em 2.926 cm^{-1} e 2.854 cm^{-1} , deformação axial

assimétrica de C–O–C em 1.269 cm^{-1} , deformação axial simétrica de C–O–C em 1.024 cm^{-1} e banda de deformação axial de C=O em 1745 cm^{-1} , além de bandas de deformação axial de C=C de anel aromático em 1.647 e 1.670 cm^{-1} .

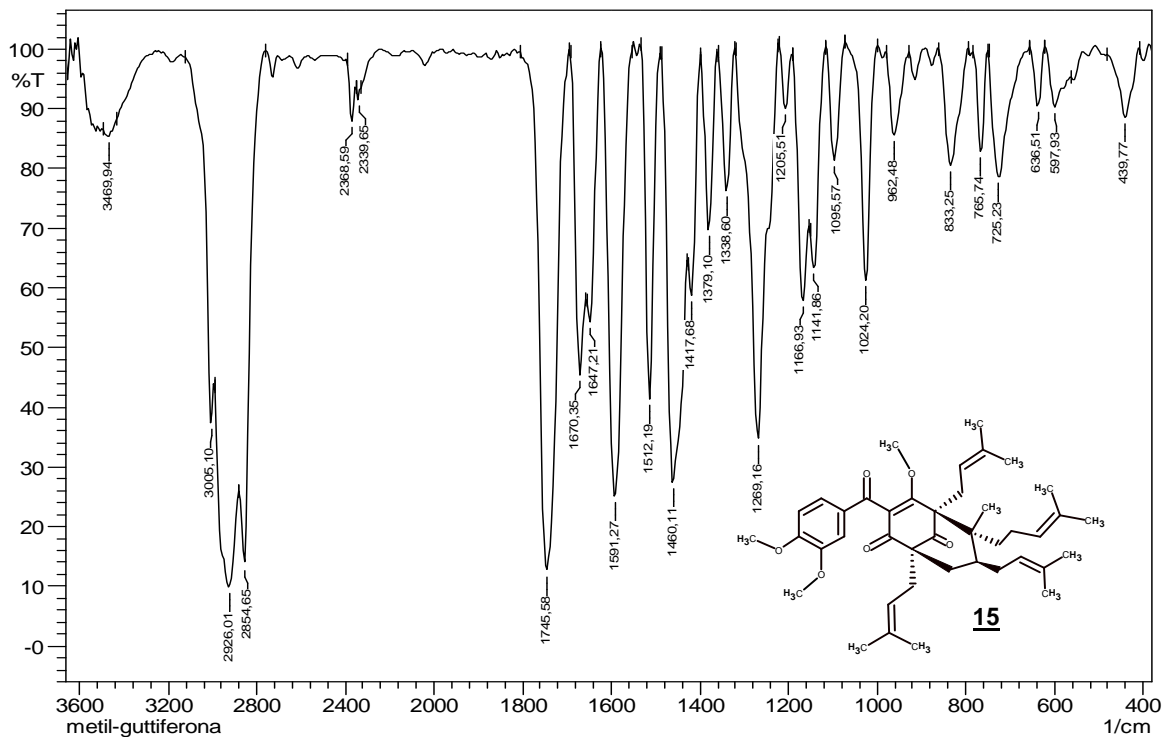


Figura 31 - Espectro de absorção na região do infravermelho de **15**.

O derivado **15** também foi caracterizado por espectrometria de massas, cujo espectro está apresentado na Figura 32, além das massas e intensidades relativas dos principais fragmentos (TABELA 2), na qual foi identificado o pico base m/z 69. A fragmentação proposta está apresentada na Figura 33.

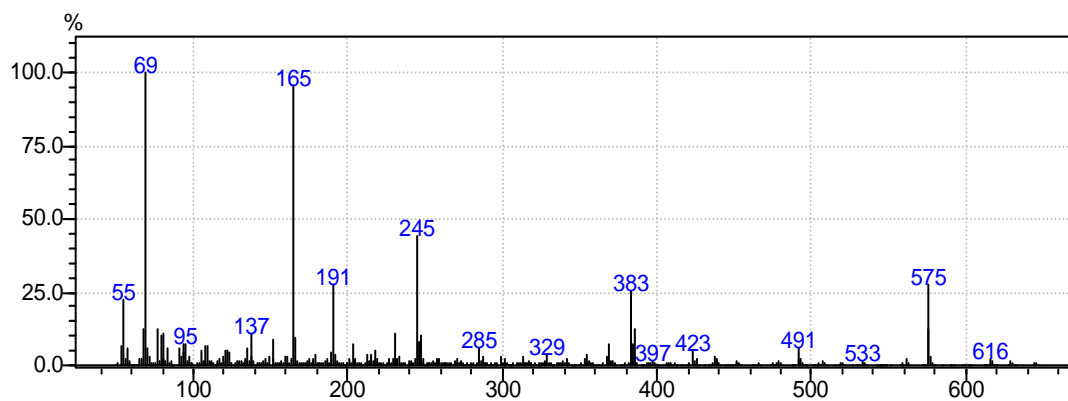
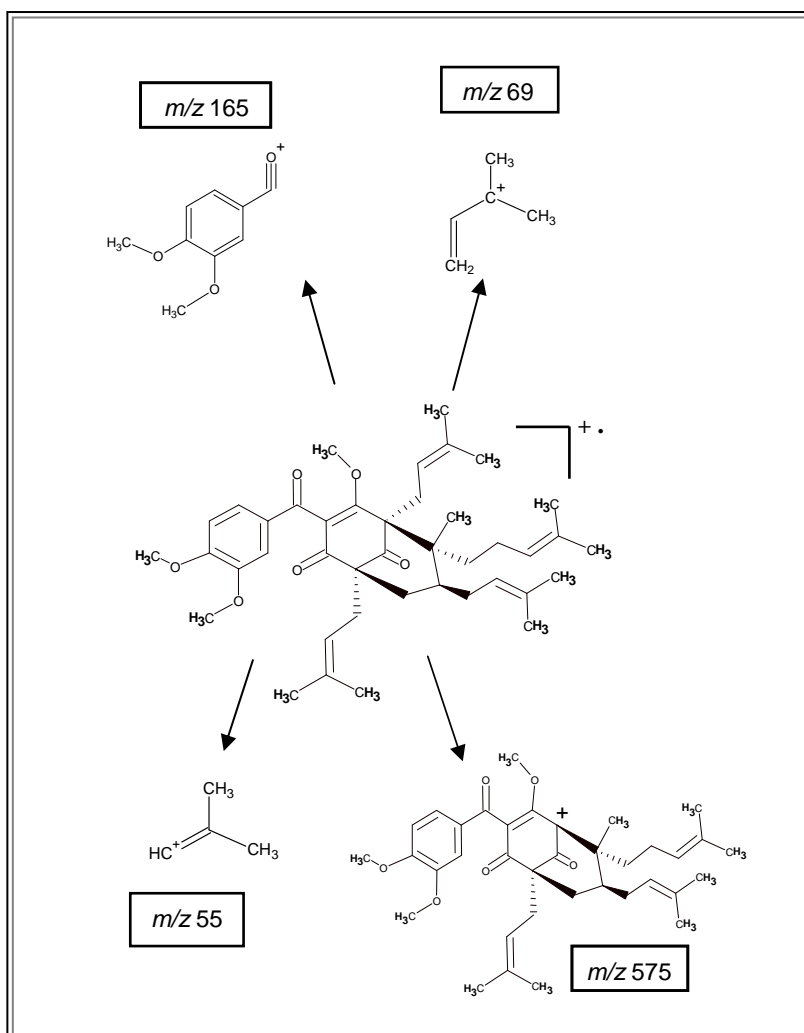


Figura 32 - Espectro de massas do derivado **15**.

Tabela 2 – Alguns dos fragmentos presentes no espectro de massas do derivado **15**.

m/z	Fragmento	Intensidade Relativa (%)
55	$[C_4H_7]^+$	23,76
69	$[C_5H_9]^+$	100
165	$[C_9H_9O_3]^+$	95
575	$[C_{36}H_{47}O_6]^+$	25,8

Figura 33 - Fragmentação proposta para o derivado **15**.

No espectro de RMN de ^1H do composto metilado **15** (FIGURA 34) foram observados, além de outros, sinais intensos em δ 3,65 e δ 3,64 ppm referentes aos hidrogênios dos grupos metila H-39 e H-40. O sinal observado em δ 3,91 ppm foi atribuído a H-41 da metoxila, o que sugere a modificação ocorrida nas três hidroxilas presentes na molécula.

No espectro de RMN de ^{13}C de **15** (FIGURA 35) foram observados, entre outros, os sinais em δ 60,1 ppm, referente ao carbono C-41 e em δ 56,1 ppm, atribuído a C-39 e C-40, referente aos carbonos das duas metoxilas do anel aromático. Isso confirma, portanto, a modificação realizada nas três hidroxilas.

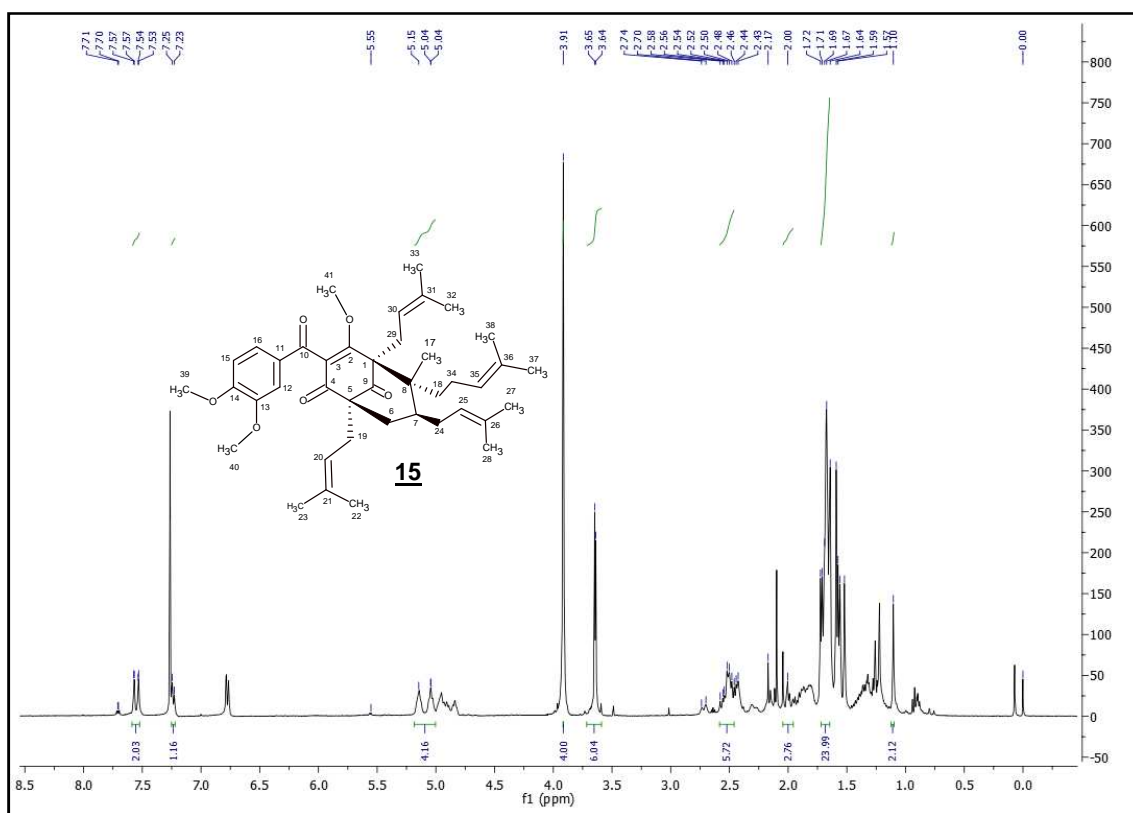


Figura 34 - Espectro de RMN de ^1H de **15** (CDCl_3 ; 400 MHz).

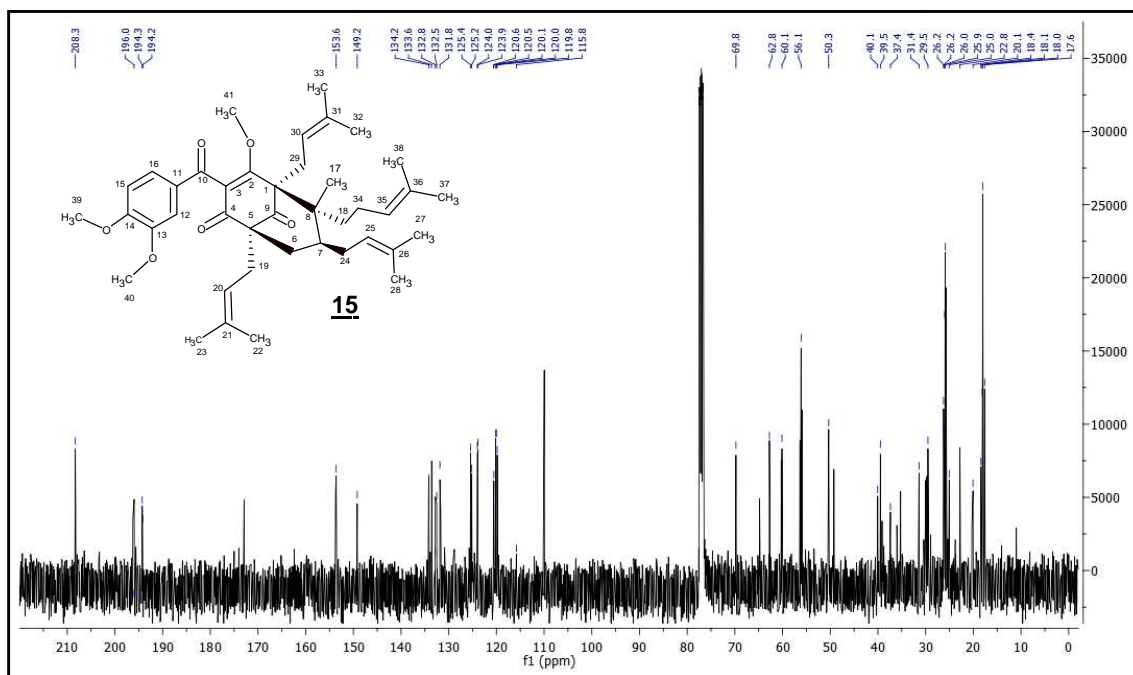


Figura 35 - Espectro de RMN de ^{13}C de **15** (CDCl_3 ; 100 MHz).

Nos espectros de UV (FIGURAS 36 e 37), com a adição de AlCl_3 não se observa deslocamento batocrômico, o que sugere que a modificação ocorreu na hidroxila β -enona e em uma das hidroxilas fenólicas ou em ambas. Com a adição de NaOAc e H_3BO_3 também não ocorre o deslocamento, confirmando que as hidroxilas β -enona e em *orto*, se encontram modificadas.

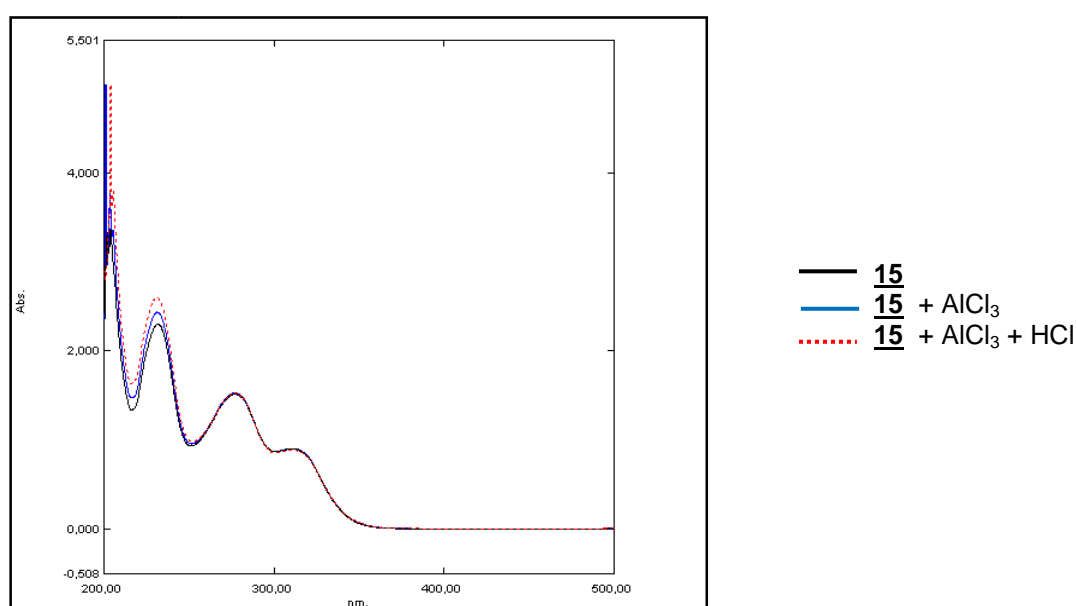


Figura 36 - Espectro no ultravioleta de **15** com AlCl_3 e HCl como aditivos.

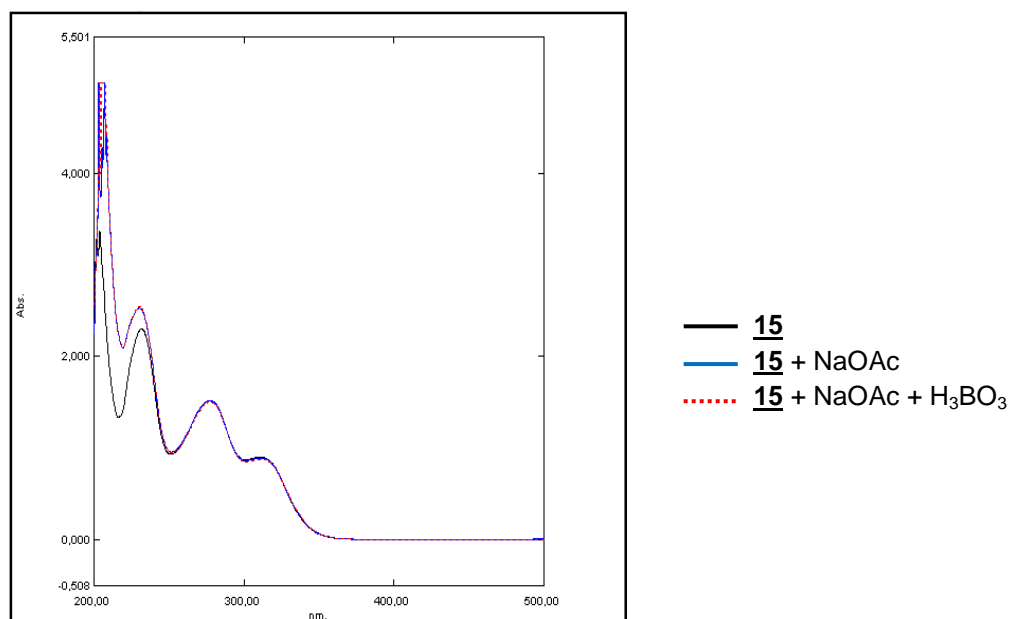


Figura 37 - Espectro no ultravioleta de **15** com NaOAc e H₃BO₃ como aditivos.

6.1.4 Derivado 14-O-butil-guttiferona-A **16**

O derivado **16** foi obtido pela reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) de guttiferona-A **1** e 1-bromo-butano em presença de carbonato de potássio (UNANGST et al., 1996) (FIGURA 38). O produto **16** foi obtido como um óleo amarelo e apresentou rendimento de 83%.

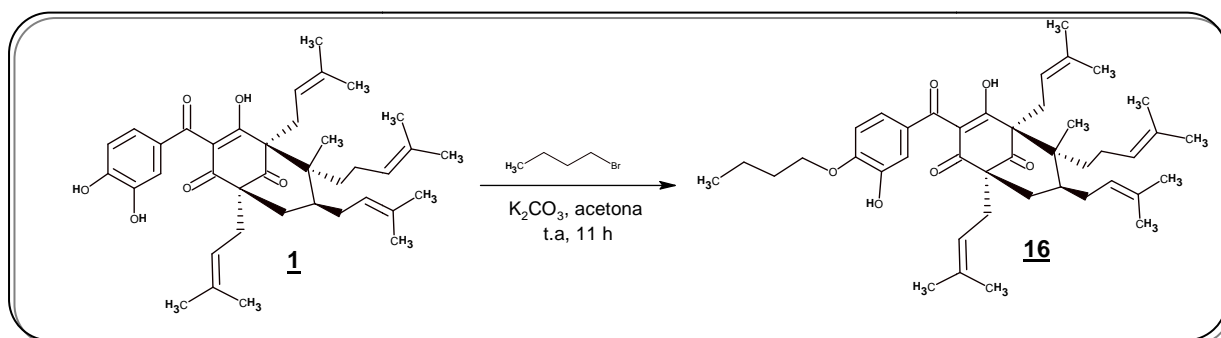


Figura 38 - Reação de obtenção do derivado **16**.

No espectro no IV (FIGURA 39) do derivado **16** foram identificadas bandas de deformação axial assimétrica de C–H de metila em 2964 cm⁻¹ e 2927 cm⁻¹, deformação axial assimétrica de C–O–C em 1276 cm⁻¹, deformação axial simétrica de C–O–C em 1128 cm⁻¹ bandas de deformação axial de C=O em 1724 cm⁻¹ além de bandas de deformação axial de C=C de anel aromático em 1645 e 1664 cm⁻¹.

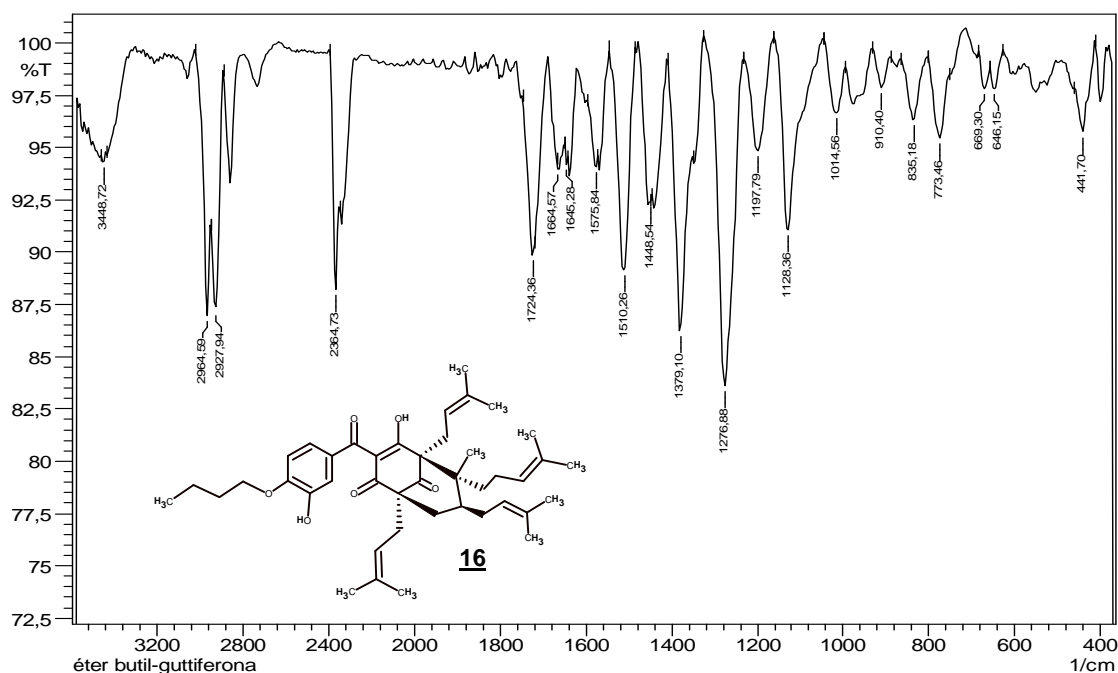


Figura 39 - Espectro de absorção na região do infravermelho de **16**.

O espectro de massas do derivado **16** está apresentado na Figura 40, onde foi identificado o pico base m/z 69. A fragmentação proposta está apresentada na Figura 41, assim como suas massas e intensidades relativas dos principais fragmentos (TABELA 3).

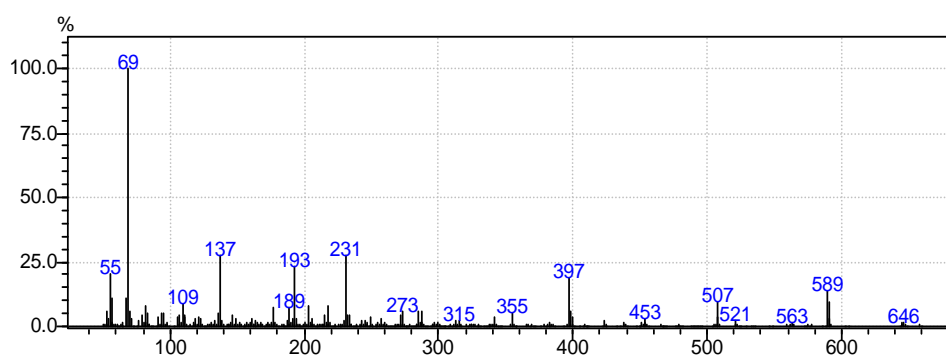
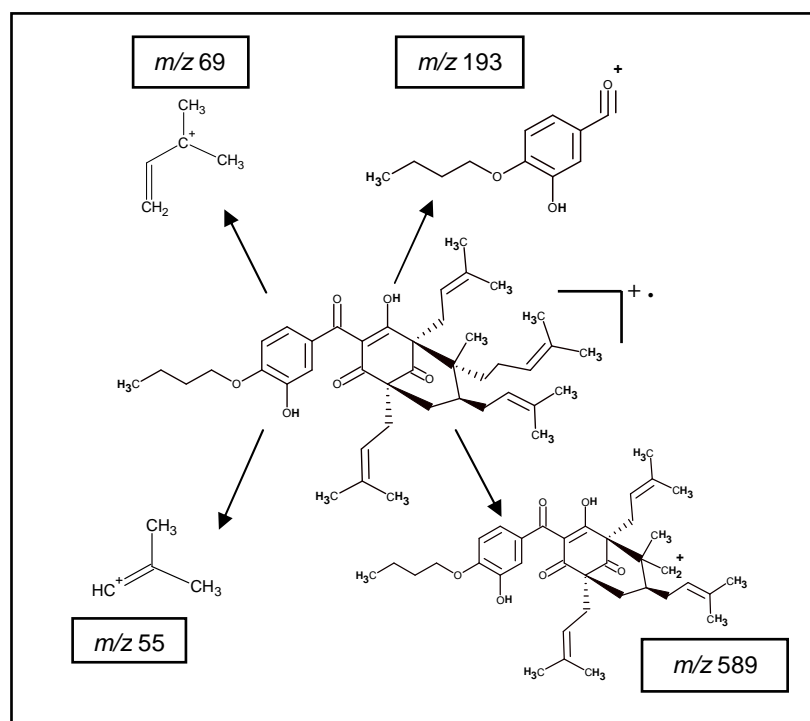


Figura 40 - Espectro de massas do derivado **16**.

Tabela 3 – Alguns dos fragmentos presentes no espectro de massas do derivado **16**.

m/z	Fragmento	Intensidade Relativa
55	$[C_4H_7]^+$	20,1
69	$[C_5H_9]^+$	100
193	$[C_{11}H_{13}O_3]^+$	24,5
589	$[C_{37}H_{49}O_6]^+$	13,2

Figura 41 - Fragmentação proposta para o derivado **16**.

No espectro de RMN de 1H do composto **16** (FIGURA 42) foi observado, entre outros, sinais na região δ 3,98-4,01 ppm, que foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos, H-39, da cadeia butílica. Os hidrogênios metilênicos H-40 e 41 foram observados na região de δ 1,26–1,23 ppm e em δ 0,88 observou-se um sinal referente aos hidrogênios metílicos da mesma cadeia (H-42).

Nos espectros de UV (FIGURAS 43 e 44), a adição de $AlCl_3$ produziu um deslocamento batocrômico devido a existência dos sistemas quelatogênicos carbonila e hidroxila β -enona e/ou hidroxilas fenólicas em *orto*. A adição de HCl não

restituiu o espectro, comprovando existir o sistema carbonila e hidroxila β -enona, ou seja a reação não ocorreu na hidroxila desse sistema. A adição de H_3BO_3 não modifica o espectro, sugerindo que a reação ocorreu em uma ou em ambas as hidroxilas fenólicas.

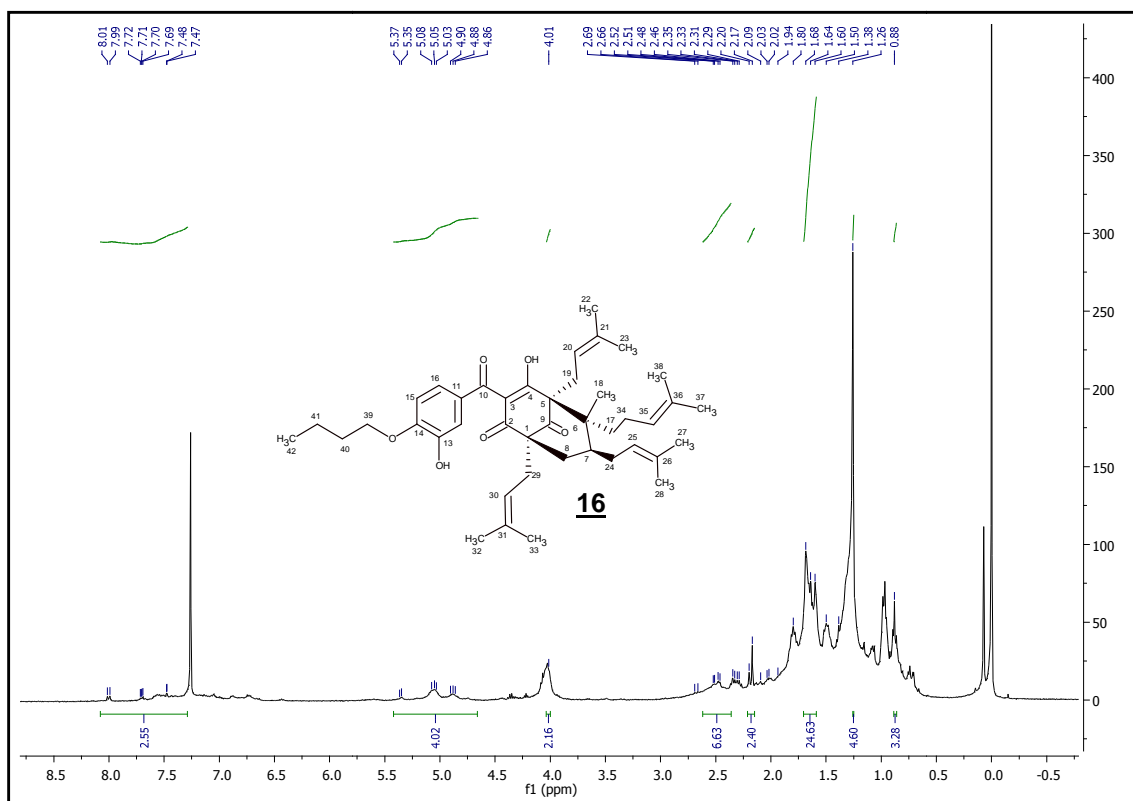


Figura 42 - Espectro de RMN de ^1H de **16** (CDCl_3 ; 400 MHz).

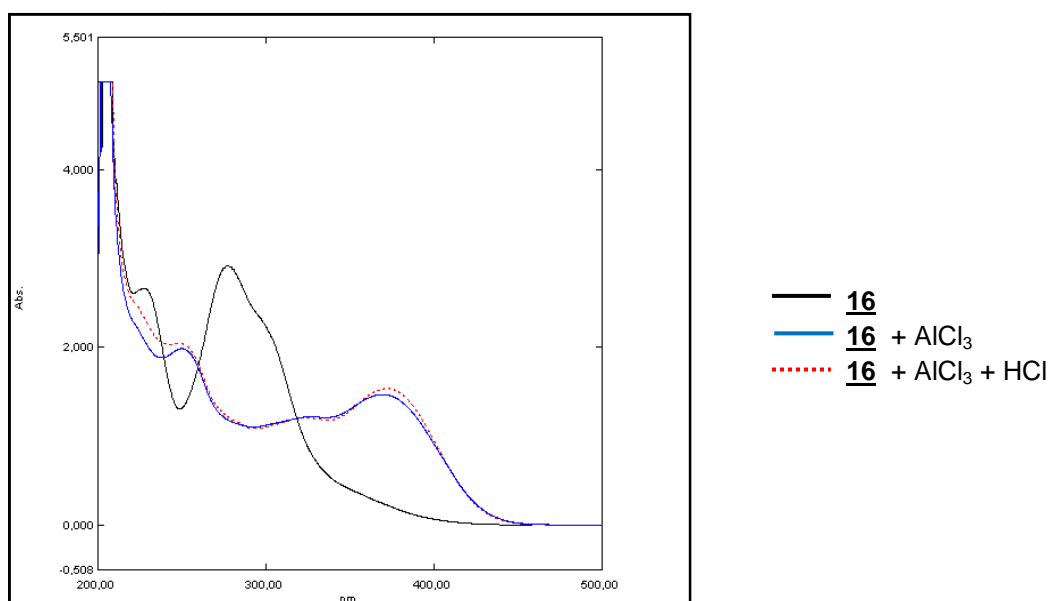


Figura 43 - Espectro no ultravioleta de **16** com AlCl_3 e HCl como aditivos.

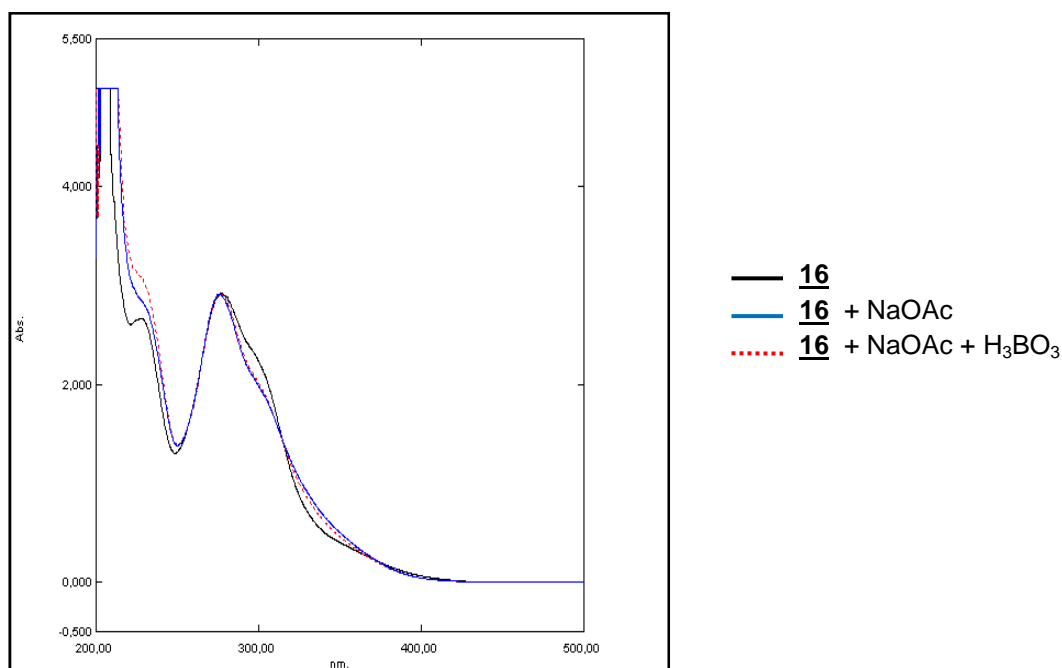


Figura 44 - Espectro no ultravioleta de **16** com NaOAc e H_3BO_3 como aditivos.

6.1.5 Derivado 14,15-di-O-butanoil-guttiferona-A **17**

O derivado **17** foi obtido pela reação de guttiferona-A **1**, cloreto de butanoíla e carbonato de potássio (FIGURA 45). O produto **17** foi obtido como um óleo vermelho e apresentou rendimento médio de 89%.

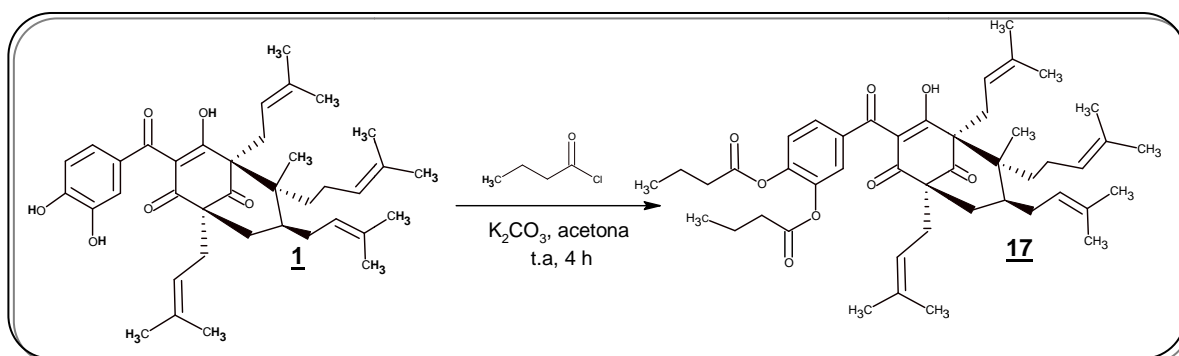


Figura 45 - Reação de obtenção do derivado **17**.

No espectro de absorção no IV (FIGURA 46) do derivado **17** foi observado, entre outros, o aparecimento de uma banda de absorção em 1774 cm^{-1} , correspondente ao estiramento de $C=O$ de éster. Também foram identificadas bandas de deformação axial assimétrica de $C-H$ de metila em 2968 e 2929 cm^{-1} ,

deformação axial de C=C de aromático em 1662 e 1608 cm^{-1} , deformação axial assimétrica de O=C=C em 1259 cm^{-1} .

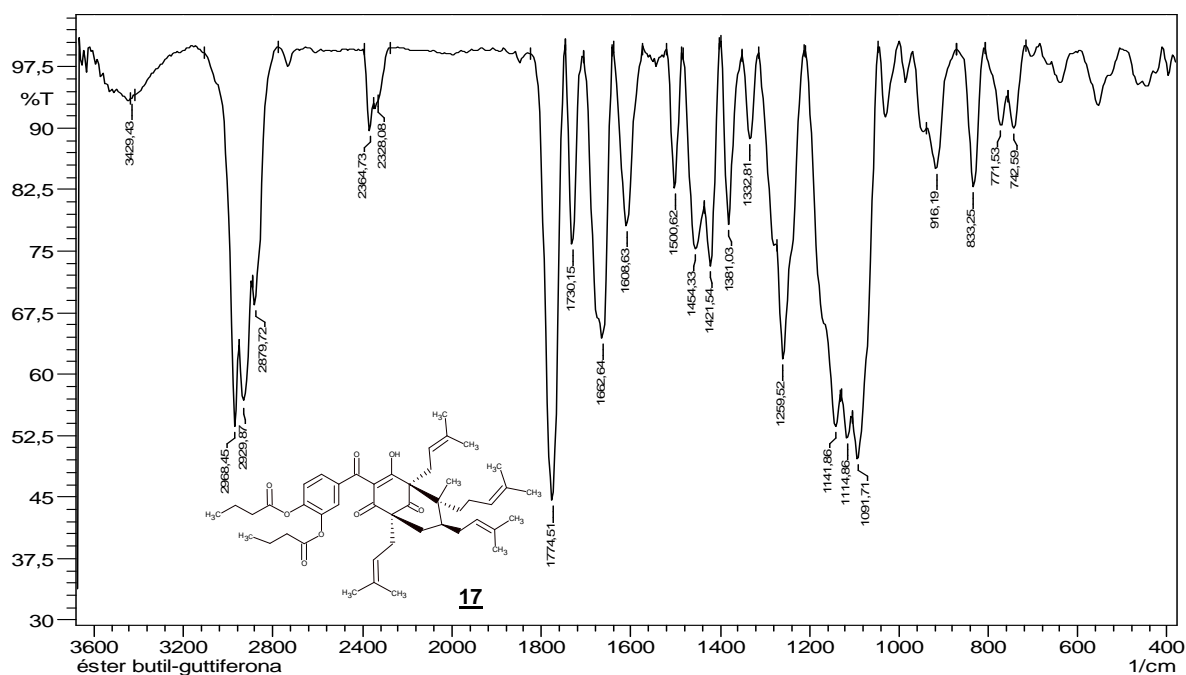


Figura 46 - Espectro de absorção na região do infravermelho de **17**.

No espectro de massas (FIGURA 47), foram identificados os fragmentos mais importantes para elucidação estrutural deste composto, além de suas massas e intensidades relativas dos principais fragmentos (TABELA 4). Além disso, foi identificado o pico base em m/z 69. A fragmentação proposta está apresentada na Figura 48.

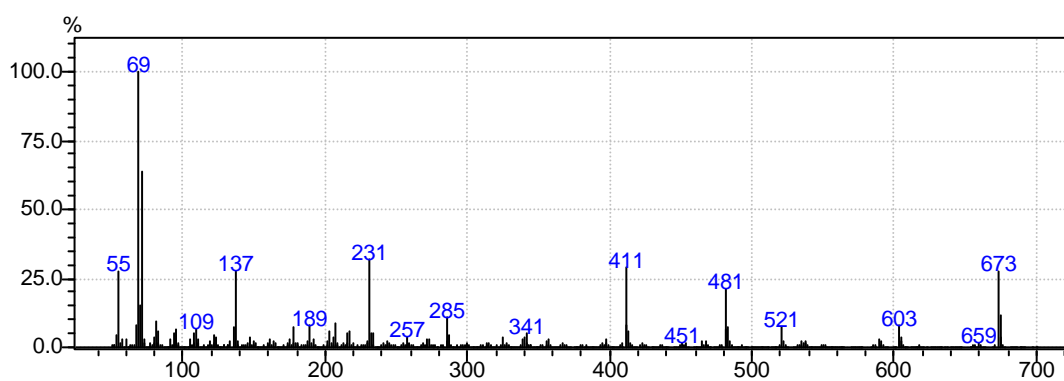
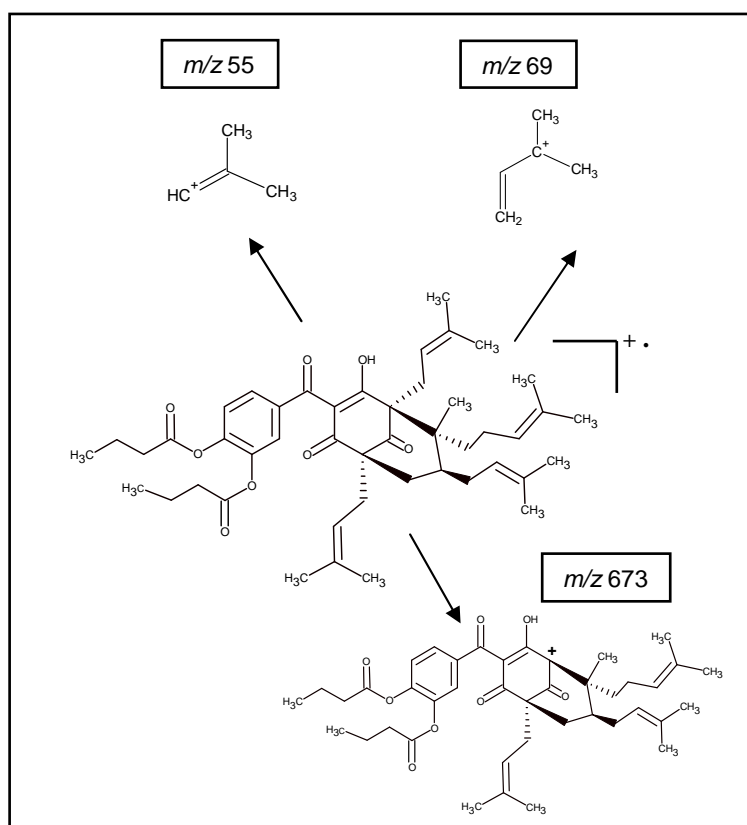


Figura 47 - Espectro de massas do derivado **17**.

Tabela 4 – Alguns dos fragmentos presentes no espectro de massas do derivado **17**.

m/z	Fragmento	Intensidade Relativa
55	$[C_4H_7]^+$	28
69	$[C_5H_9]^+$	100
673	$[C_{41}H_{54}O_8]^+$	26,5

Figura 48 - Fragmentação proposta para **17**.

No espectro de RMN de 1H do derivado **17** (FIGURA 49), foi observado entre outros sinais, um sinal em $\delta 1,79$ ppm, que foi atribuído aos hidrogênios metilênicos H-41 e 45, e em $\delta 2,53$ ppm (H-40 e 44), sinal característico de hidrogênio ligado a carbono vizinho de carbonila (SILVERSTEIN, 2007). Foi observado também um sinal em $\delta 0,97$ ppm referente ao hidrogênio metílico do grupo substituinte.

A adição de $AlCl_3$ produz um deslocamento batocrômico devido a existência dos sistemas quelatogênicos carbonila e hidroxila β enona e/ou hidroxilas em *orto*. A adição de HCl não restituiu o espectro, comprovando ainda existir o sistema carbonila e hidroxila β -enona, ou seja a reação não ocorreu na hidroxila desse sistema

(FIGURA 50). A adição de H_3BO_3 não modificou o espectro, portanto, não existem mais hidroxilas fenólicas em *orto*, ou seja, a reação ocorreu em uma ou em ambas as hidroxilas fenólicas (FIGURA 51).

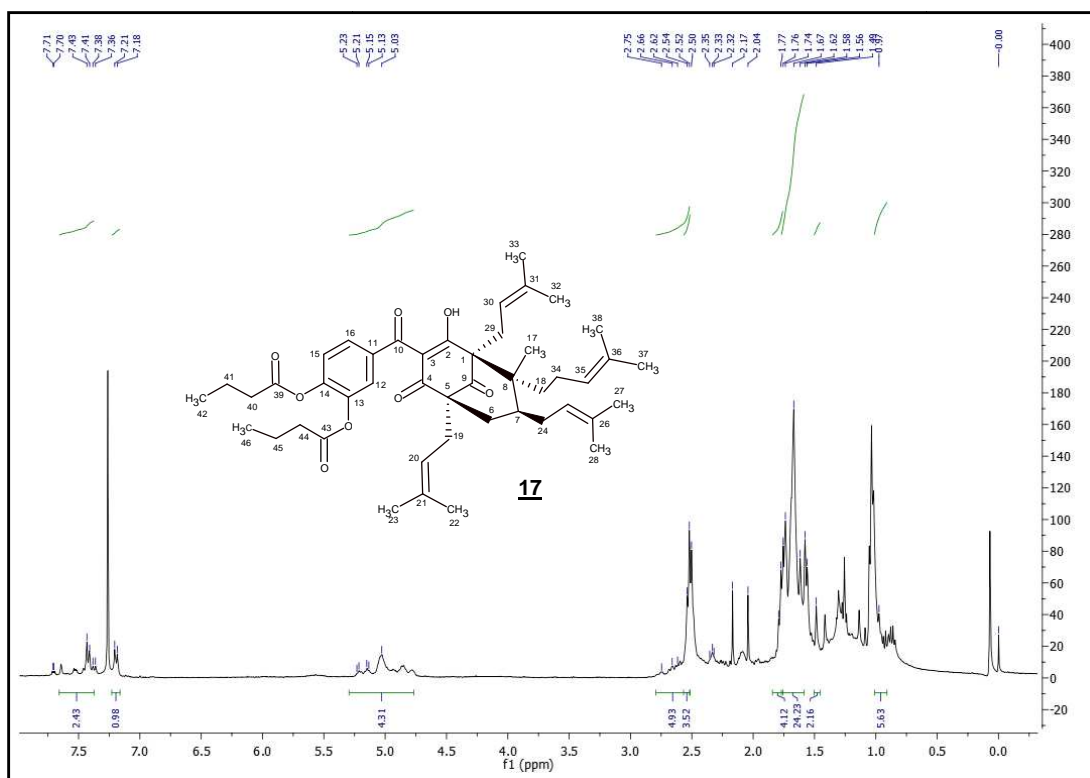


Figura 49 - Espectro de RMN de ^1H de **17** (CDCl₃; 400 MHz).

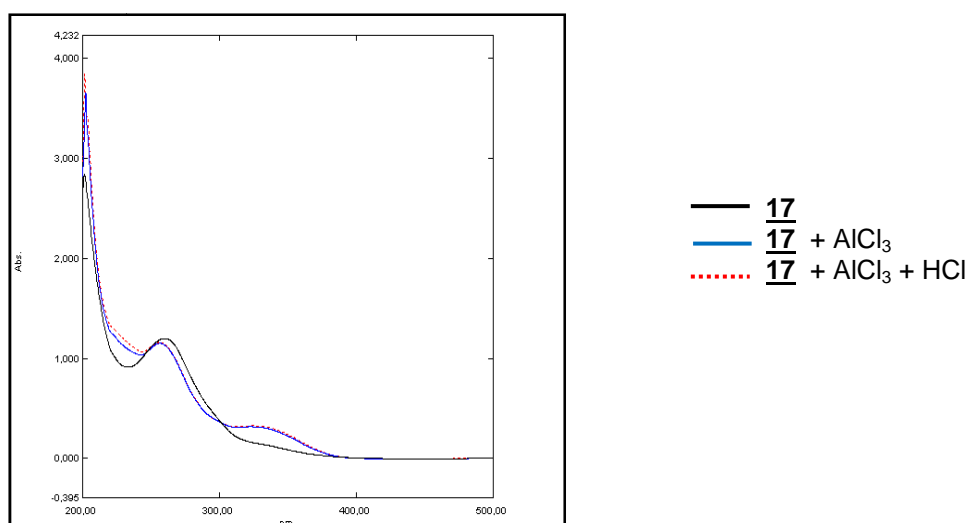


Figura 50 - Espectro no ultravioleta de **17** com Al₃Cl e HCl como aditivos.

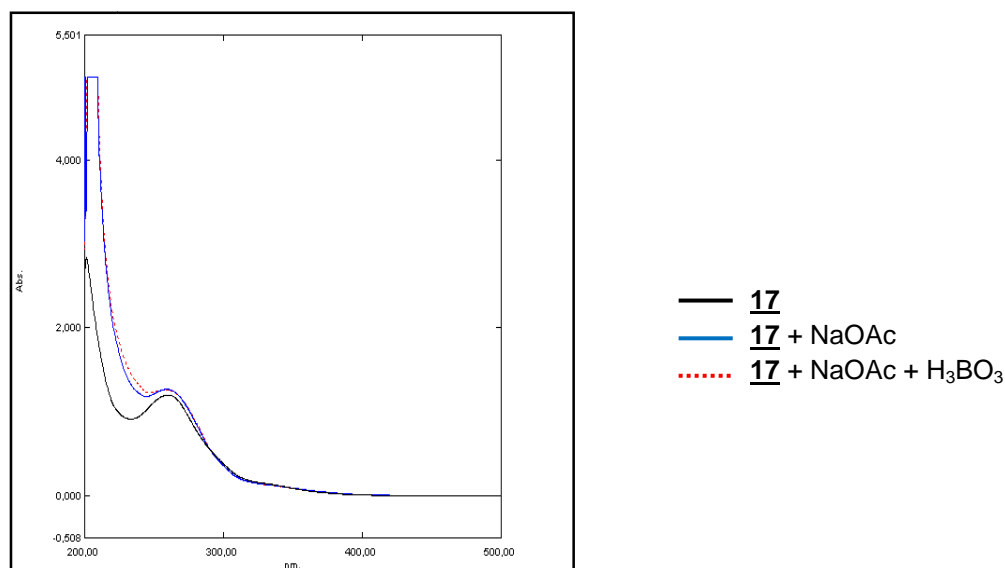


Figura 51 - Espectro no ultravioleta de **17** com NaOAc e H_3BO_3 como aditivos.

6.1.6 Derivado 14-O-*tert*-butoxicarbonil-guttiferona-A **18**

O derivado **18** foi obtido pela reação de guttiferona-A **1**, anidrido de *tert*-butoxicarbonila (Boc_2O) e DMAP (HANSEN; RINGS, 1999) (FIGURA 52). O produto foi obtido na forma de um óleo incolor e apresentou rendimento médio de 55%.

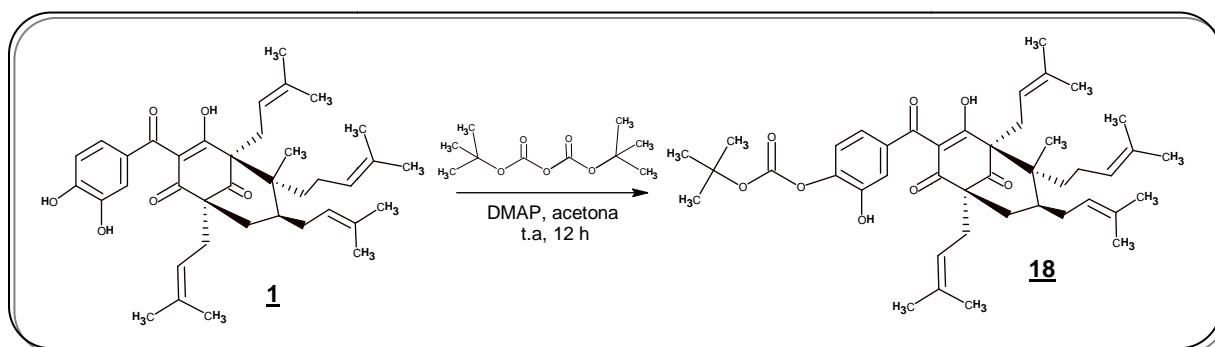


Figura 52 - Reação de obtenção do derivado **18**.

No espectro de absorção na região do IV (FIGURA 53) foi identificada uma banda de absorção em 3.446 cm^{-1} , referente às vibrações de deformação axial do grupo OH, indicando que não ocorreu a substituição de todas as hidroxilas. Observou-se também uma banda de absorção em 1766 cm^{-1} , correspondente ao estiramento de C=O de éster. Foram ainda identificadas bandas de deformação axial assimétrica de C-H de metila em 2981 e 2931 cm^{-1} , deformação axial de C=C de

aromático em 1647 e 1579 cm^{-1} , deformação axial assimétrica de O=C=C em 1257 cm^{-1} .

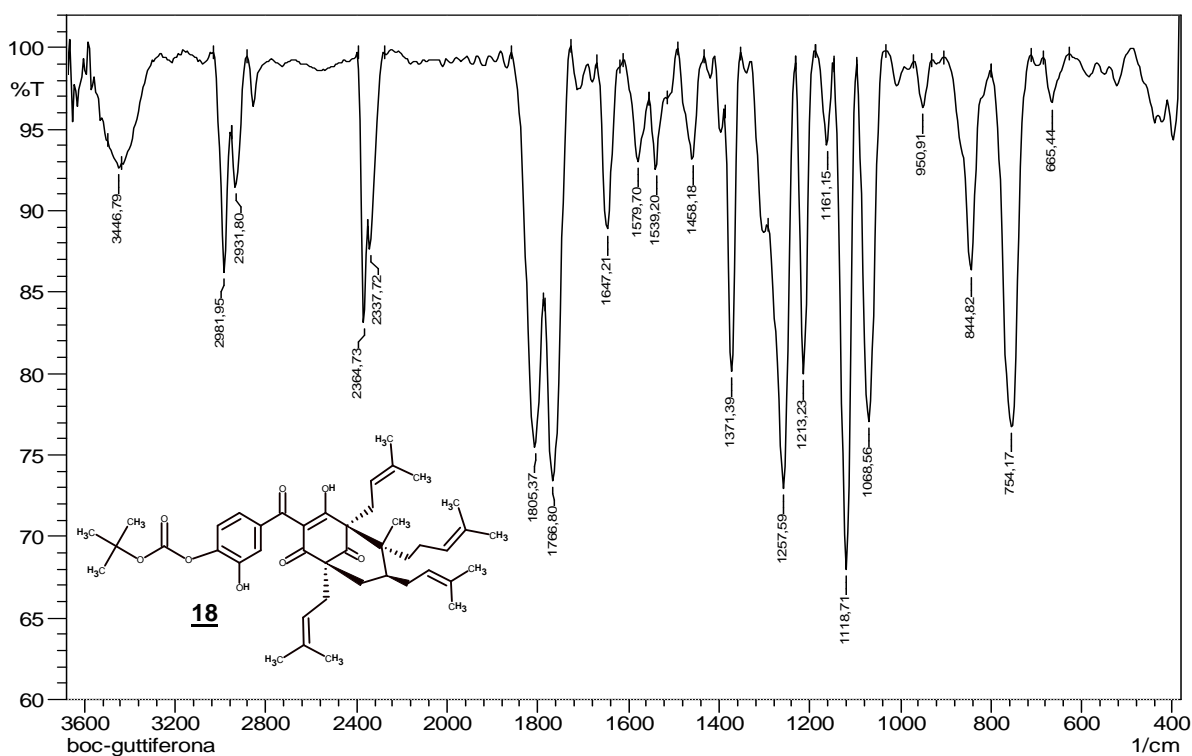


Figura 53 - Espectro de absorção na região do infravermelho de **18**.

O espectro de massas do derivado **18** está apresentado na Figura 54, foram identificados os fragmentos mais importantes para elucidação estrutural deste composto, além de suas massas e intensidades relativas dos principais fragmentos (TABELA 5). O pico do íon molecular do composto apresenta-se em m/z 702 (FIGURA 55) e o pico base em m/z 69. A fragmentação proposta está apresentada na Figura 56.

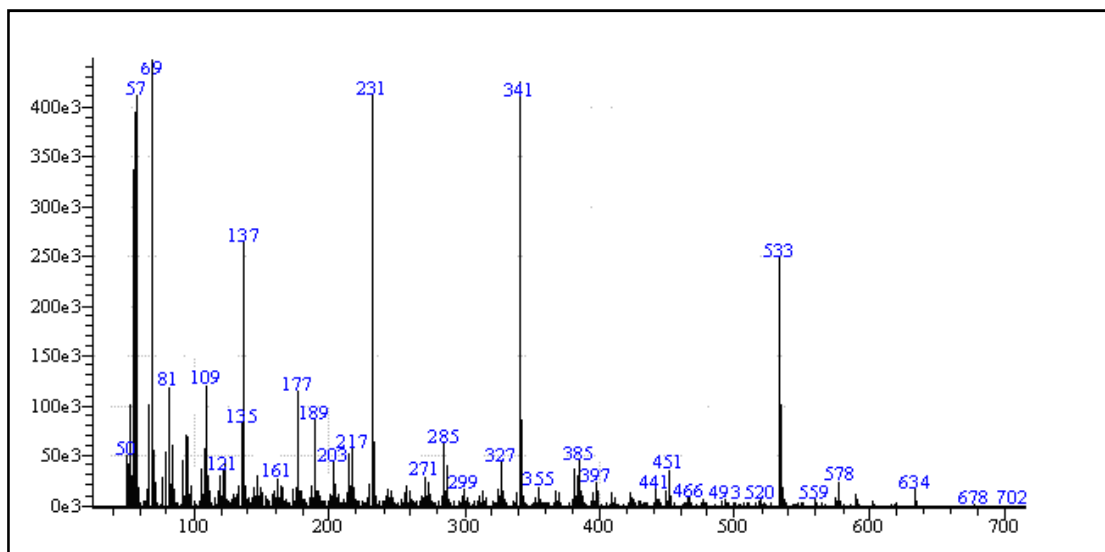


Figura 54 - Espectro de massas do derivado **18**.

Tabela 5 – Alguns dos fragmentos presentes no espectro de massas do derivado **18**.

m/z	Fragmento	Intensidade Relativa
57	$[C_3H_7]^+$	49,15
69	$[C_5H_9]^+$	100,00
533	$[C_{33}H_{40}O_6]^+$	29,54
702	$[C_{43}H_{58}O_8]^+$	1,00

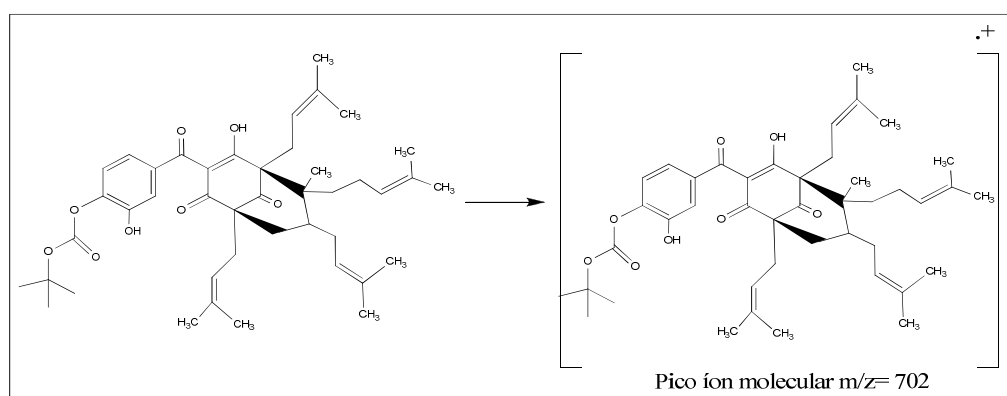


Figura 55 - Íon molecular m/z 702 do derivado **18**.

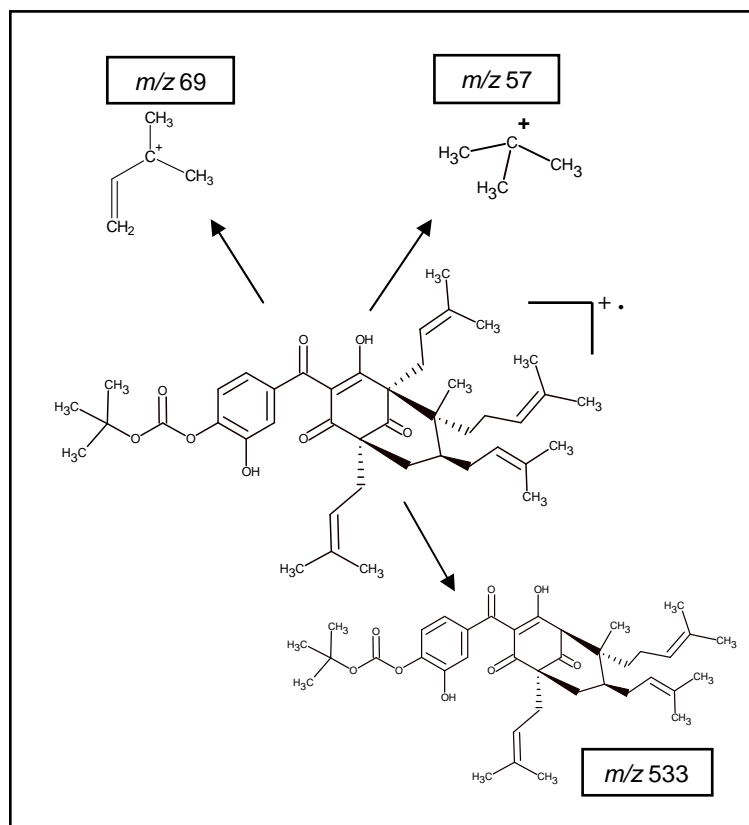


Figura 56 - Fragmentação proposta para o derivado **18**.

No espectro de RMN de ^1H do derivado **18** (FIGURA 57) foi observado, além de outros, um sinal intenso em $\delta 1,13$ ppm que foi atribuído aos hidrogênios metílicos do grupo terc-butila H-41, H-42 e H-43, sugerindo portanto a modificação.

Nos espectros de UV (FIGURAS 58 e 59), a adição de AlCl_3 produz um deslocamento batocrômico (280 nm para 340 nm) devido à existência dos sistemas quelatogênicos carbonila e hidroxila β -enona e/ou hidroxilas em *orto*. A adição de HCl não restitui o espectro comprovando ainda existir o sistema carbonila e hidroxila β -enona, ou seja, a reação não ocorreu na hidroxila desse sistema. A adição de H_3BO_3 não modifica o espectro, sugerindo que a reação ocorreu em uma ou em ambas as hidroxilas fenólicas.

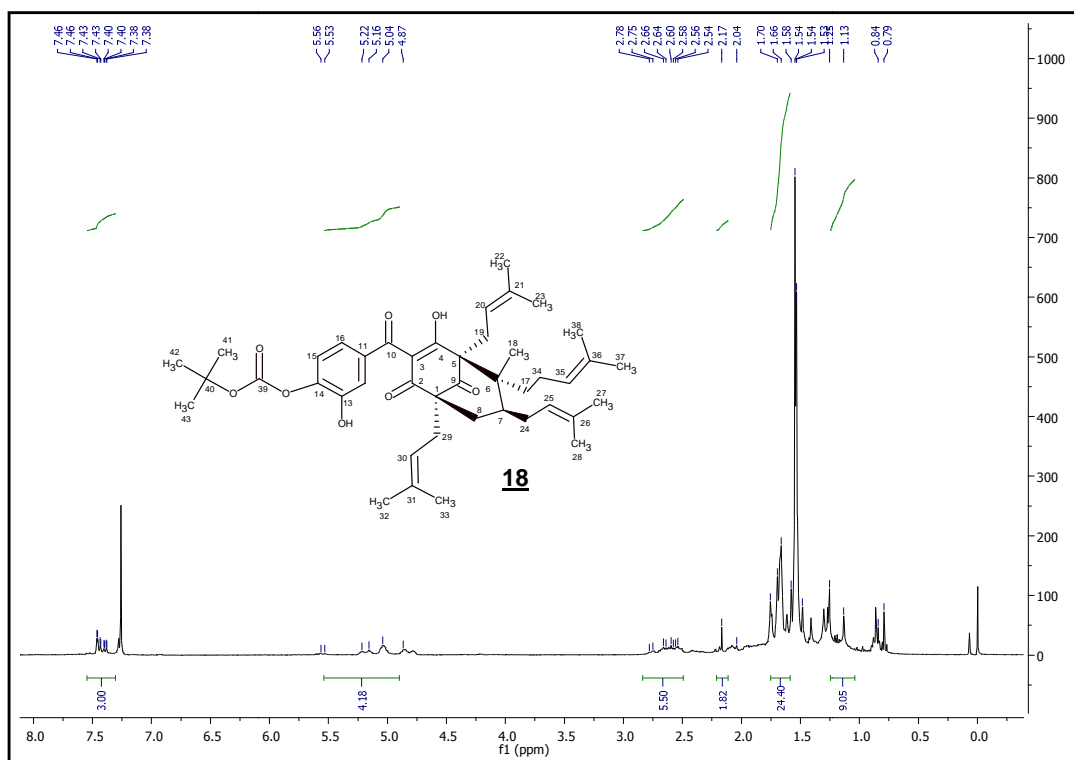


Figura 57 - Espectro de RMN de ^1H de **18** (CDCl_3 ; 400 MHz).

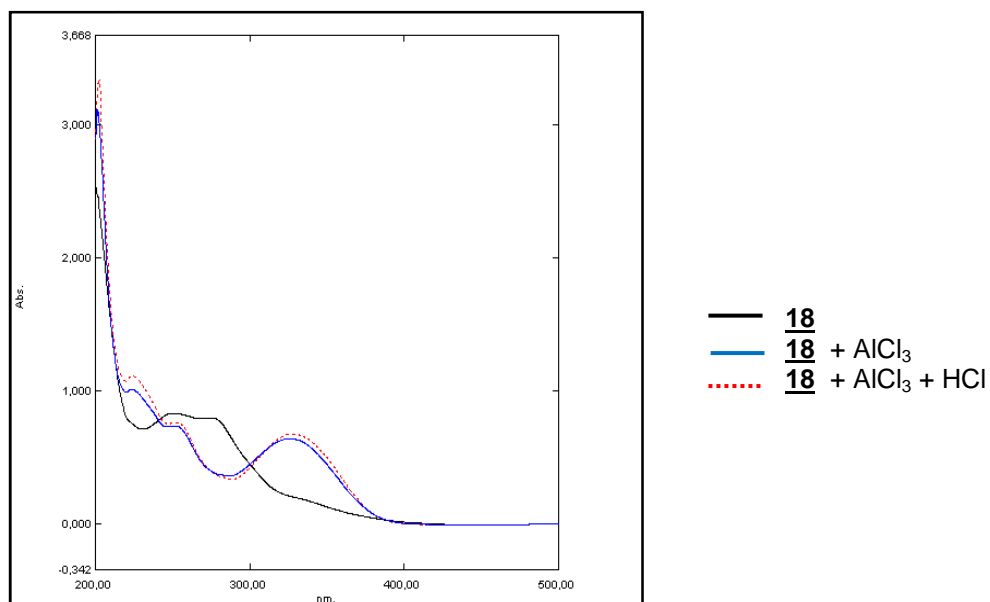


Figura 58 - Espectro no ultravioleta de **18** com AlCl_3 e HCl como aditivos.

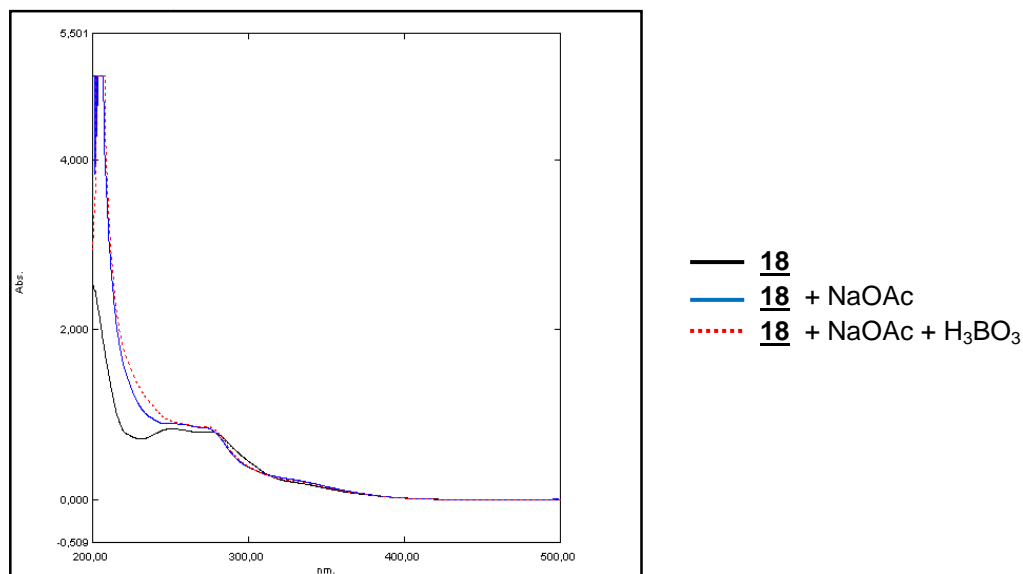


Figura 59 - Espectro no ultravioleta de **18** com NaOAc e H_3BO_3 como aditivos.

6.1.7 Derivado 14-O-octanoil-guttiferona-A **19**

Para obtenção do derivado **19** foi realizada a reação de guttiferona-A **1** e cloreto de octanoíla em presença de carbonato de potássio (FIGURA 60). O produto foi obtido como um óleo amarelo e apresentou rendimento médio de 78%.

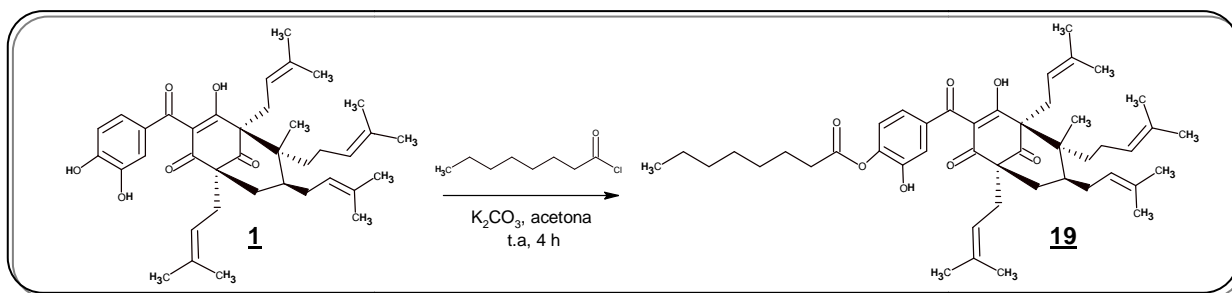


Figura 60 - Reação de obtenção do derivado **19**.

No espectro de absorção na região do IV (FIGURA 61) de **19** foram identificadas bandas de deformação axial assimétrica de C–H de metila em 2956 cm^{-1} e 2929 cm^{-1} , deformação axial assimétrica de O–C=C em 1282 cm^{-1} , bandas de deformação axial de C=O em 1710 cm^{-1} .

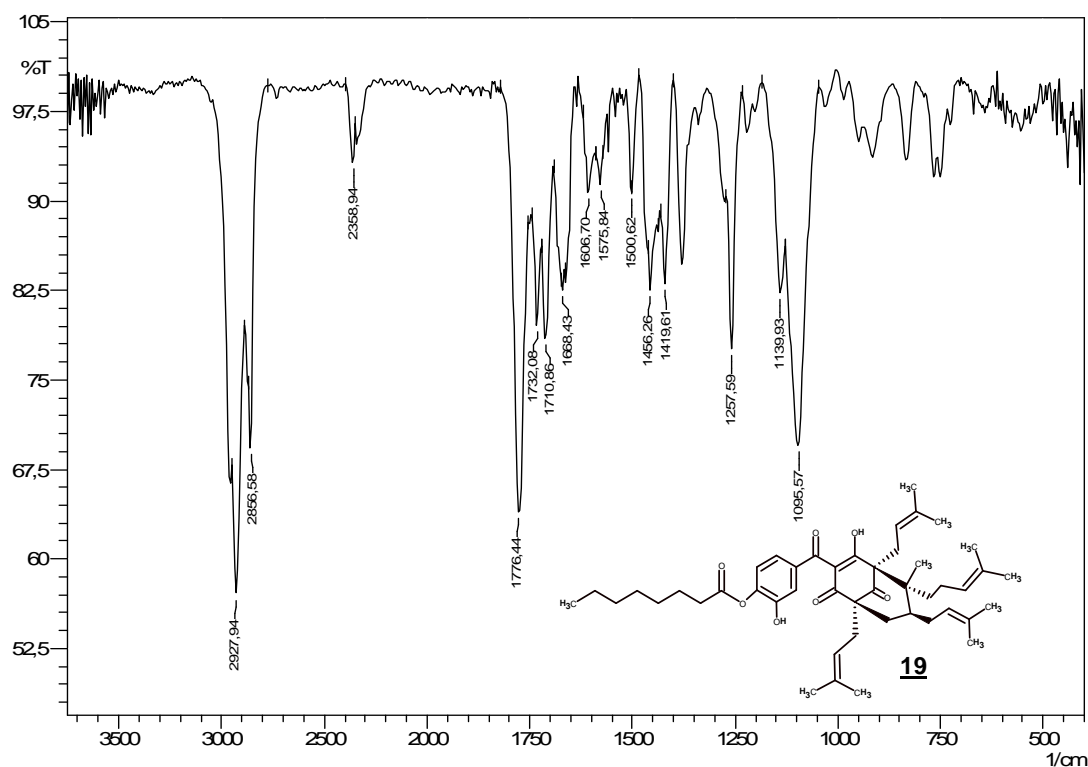


Figura 61 - Espectro de absorção na região do infravermelho de **19**.

O espectro de massas do derivado **19** está apresentado na Figura 62, onde foi identificado o pico base em m/z 69 e os fragmentos mais importantes para elucidação estrutural deste composto, além de suas massas e intensidades relativas dos principais fragmentos (TABELA 6). A fragmentação proposta está apresentada na Figura 63.

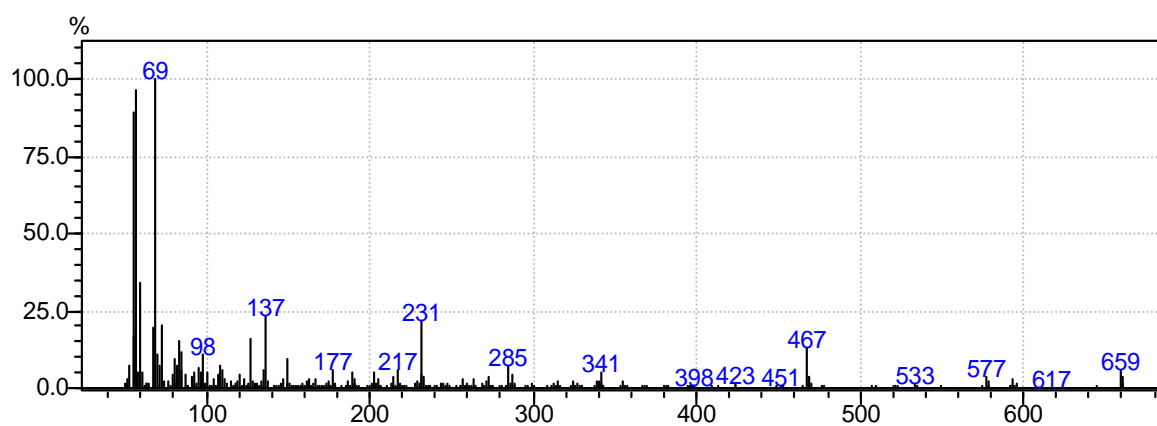
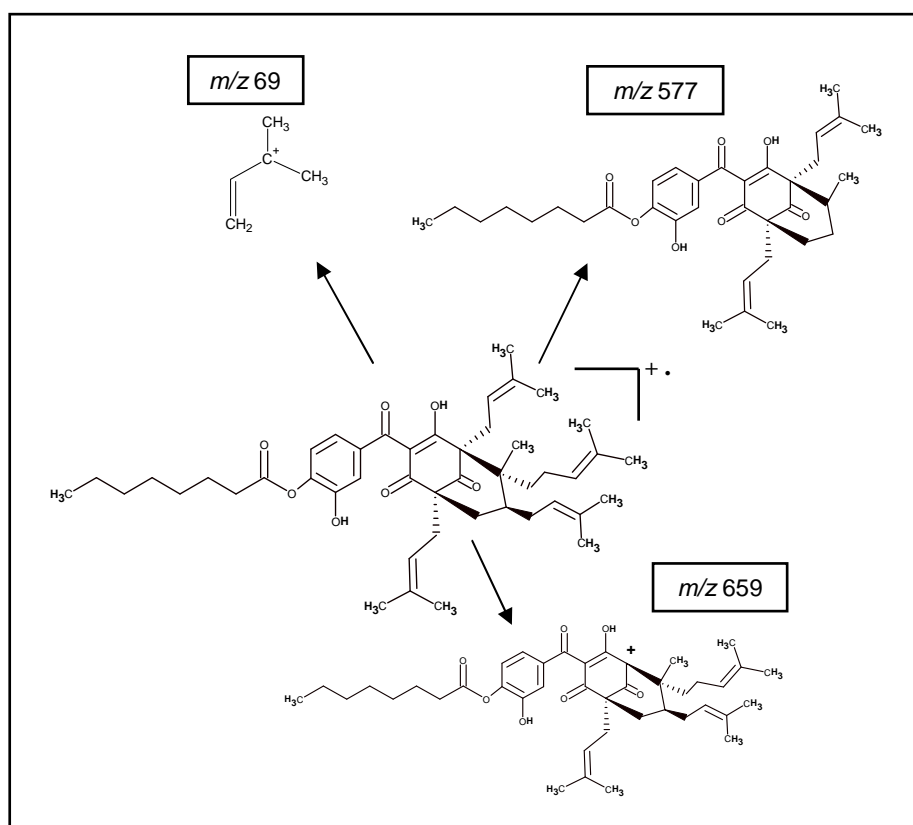


Figura 62 - Espectro de massas do derivado **19**.

Tabela 6 – Alguns dos fragmentos presentes no espectro de massas do derivado **19**.

m/z	Fragmento	Intensidade Relativa
69	$[C_5H_9]^+$	100,00
231	$[C_{14}H_{15}O_3]^+$	21,5
659	$[C_{41}H_{55}O_7]^+$	11,4

Figura 63 - Fragmentação proposta para **19**.

O espectro de RMN de 1H (FIGURA 64) apresenta um sinal em δ 2,34 ppm atribuído aos hidrogênios ligados ao carbono vizinho à carbonila do éster. Foi também observado um sinal em δ 0,89 ppm referente ao H-46 da metila do grupo substituinte.

Nos espectros de UV (FIGURAS 65 e 66), a adição de $AlCl_3$ produz um deslocamento batocrômico devido a existência dos sistemas quelatogênicos carbonila e hidroxila β -enona e/ou hidroxilas em *orto*. A adição de HCl não restituiu o espectro comprovando ainda existir o sistema carbonila e hidroxila β -enona, ou seja

a reação não ocorreu na hidroxila desse sistema. Com a adição de H_3BO_3 observa-se que o espectro não sofre modificação, portanto, não existem mais hidroxilas em *orto*, ou seja, a reação ocorreu em uma ou em ambas as hidroxilas fenólicas.

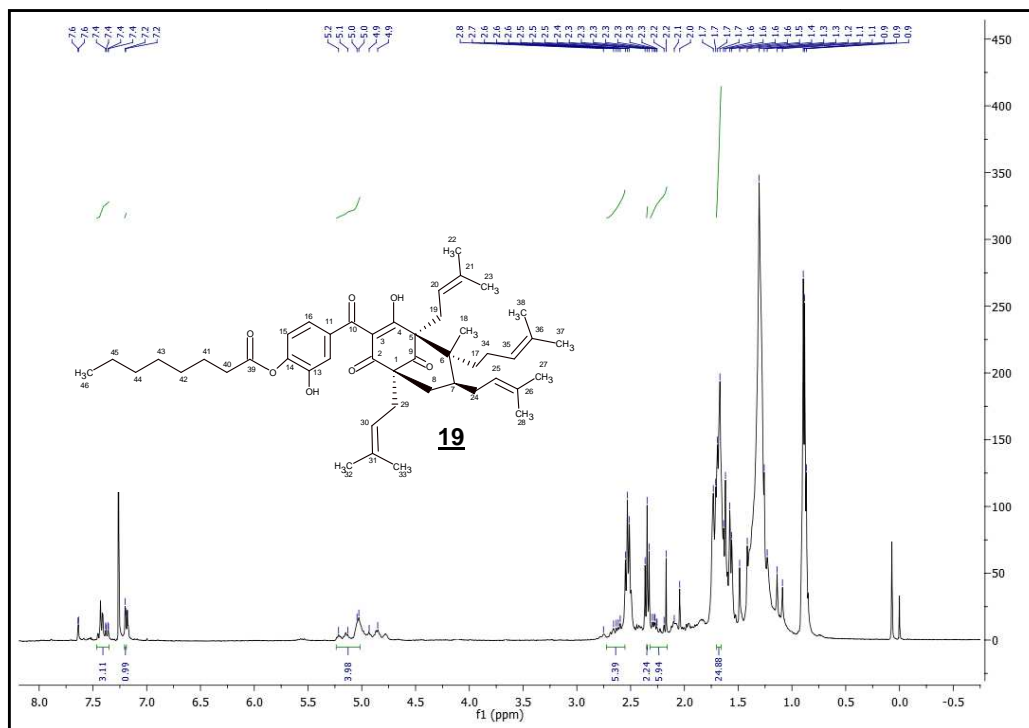


Figura 64 - Espectro de RMN de ^1H de **19** (CDCl_3 ; 400 MHz).

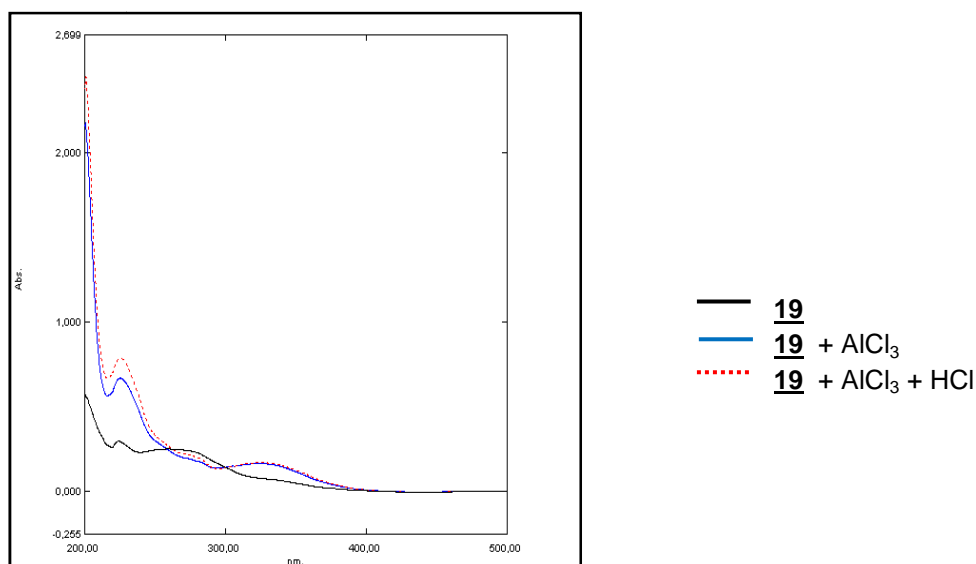


Figura 65 - Espectro no ultravioleta de **19** com AlCl_3 e HCl como aditivos.

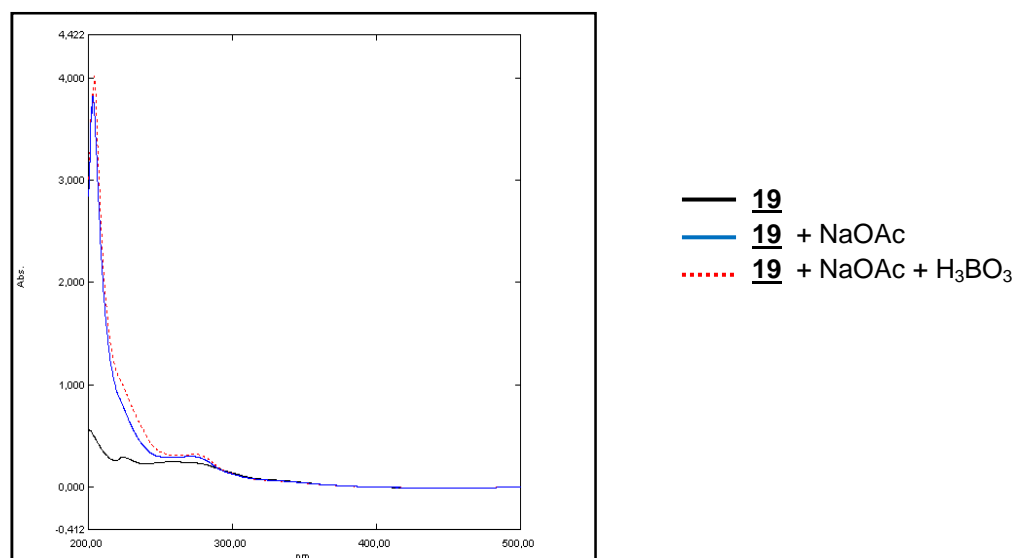


Figura 66 - Espectro no ultravioleta de **19** com NaOAc e H_3BO_3 como aditivos.

6.1.8 Derivado 13,14-di-O-benzoil-guttiferona-A **20**

O derivado **20** foi obtido por reação de guttiferona-A **1** com cloreto de benzoíla e K_2CO_3 em acetona (FIGURA 67). O produto obtido apresentou-se como um óleo amarelo após purificação com rendimento de 51%.

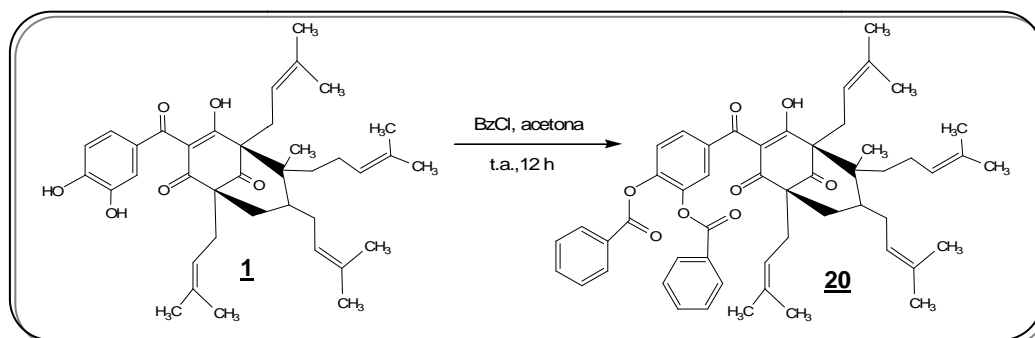


Figura 67 - Reação de obtenção do derivado **20**.

No espectro no infravermelho (FIGURA 68) não foram observadas bandas referentes às vibrações de deformação axial do grupo OH, indicando que ocorreu a substituição nas hidroxilas fenólicas. Foram observadas bandas em 1749 cm^{-1} referente à deformação axial de C=O de éster e em 1246 cm^{-1} referente a deformação axial C-O.

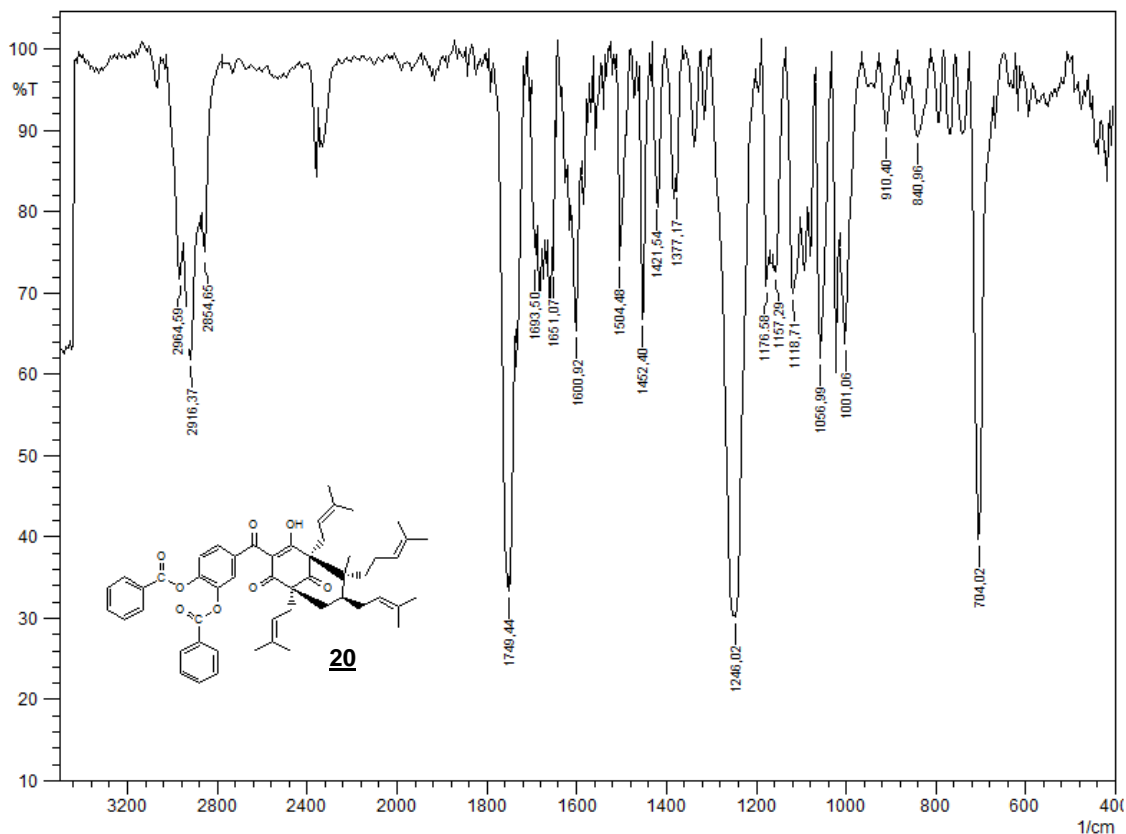


Figura 68 - Espectro de absorção na região do infravermelho de **20**.

O espectro de massas do derivado **20** está apresentado na Figura 69, onde foram identificados o pico do íon molecular m/z 810 e o pico base m/z 105. Foram identificados também os fragmentos mais importantes para elucidação estrutural deste composto, além de suas massas e intensidades relativas dos principais fragmentos (TABELA 7). A fragmentação proposta está apresentada na Figura 70.

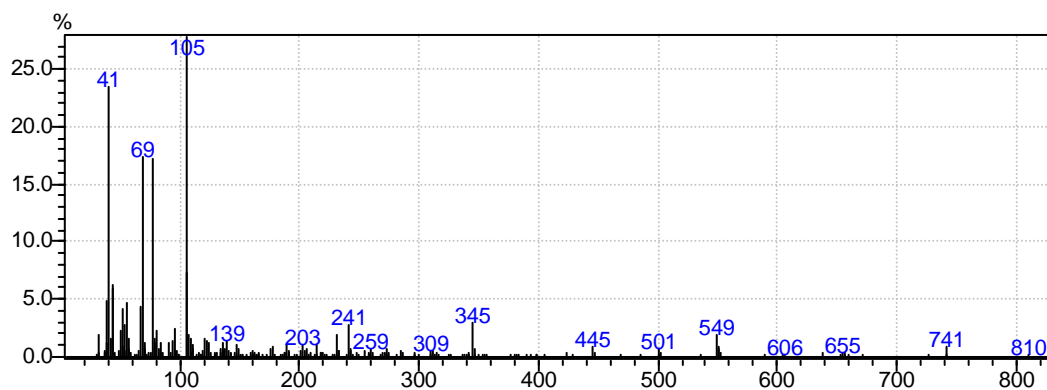
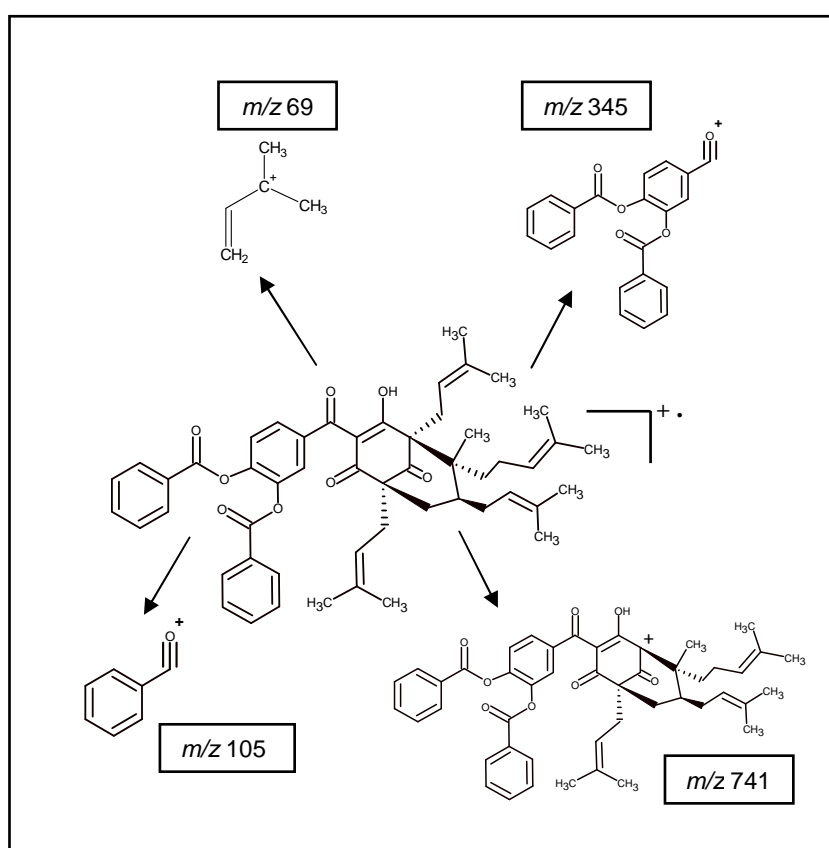


Figura 69 - Espectro de massas do derivado **20**.

Tabela 7 – Alguns dos fragmentos presentes no espectro de massas do derivado **20**.

m/z	Fragmento	Intensidade Relativa
69	$[C_5H_9]^+$	56,6
105	$[C_7H_6O]^+$	100,0
345	$[C_{21}H_{14}O_5]^+$	13,3
741	$[C_{47}H_{50}O_8]^+$	6,6
810	$[C_{52}H_{58}O_8]^+$	1,0

Figura 70 - Fragmentação proposta para o derivado **20**.

No espectro de RMN de 1H do derivado **20** (FIGURA 71) foram observados, além de outros, sinais entre δ 8,03-7,52 ppm, que foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos dos grupos substituintes: entre δ 8,03-8,00 ppm, um multipletto referente aos hidrogênios *orto* em relação à carbonila do grupo benzoato (H-41, H-45, H-48 e H-52); em δ 7,58 ppm, um triplete, atribuído aos hidrogênios em *meta* à

carbonila (H-42,44, 49 e 51), e em δ 7,52 ppm, um sinal atribuído ao hidrogênio em *para* em relação à carbonila (H-43 e 50).

No espectro de RMN de ^{13}C de **20** (FIGURA 72) foram atribuídos aos carbonos *orto* à carbonila do grupo benzoíla, os sinais de ressonância em δ 134,2 ppm (C-41 e 45) e em δ 134,1 ppm (C-48 e 52); os sinais em δ 128,6 ppm (C-42 e 44) em 128,5 (C-49 e 51) foram atribuídos aos carbonos *meta* em relação à carbonila; os sinais referentes aos carbonos em *para* foram observados em δ 135,1 ppm (C-50) e em δ 135,6 ppm (C-43). Em δ 163,5 ppm e em δ 167,1 ppm foram observados os sinais de ressonância dos carbonos carbonílicos (C-39 e C-46); e em δ 130,4 e 130,2 ppm foram observados os sinais de ressonância para os carbonos *ipso* (C-40 e C-47), respectivamente.

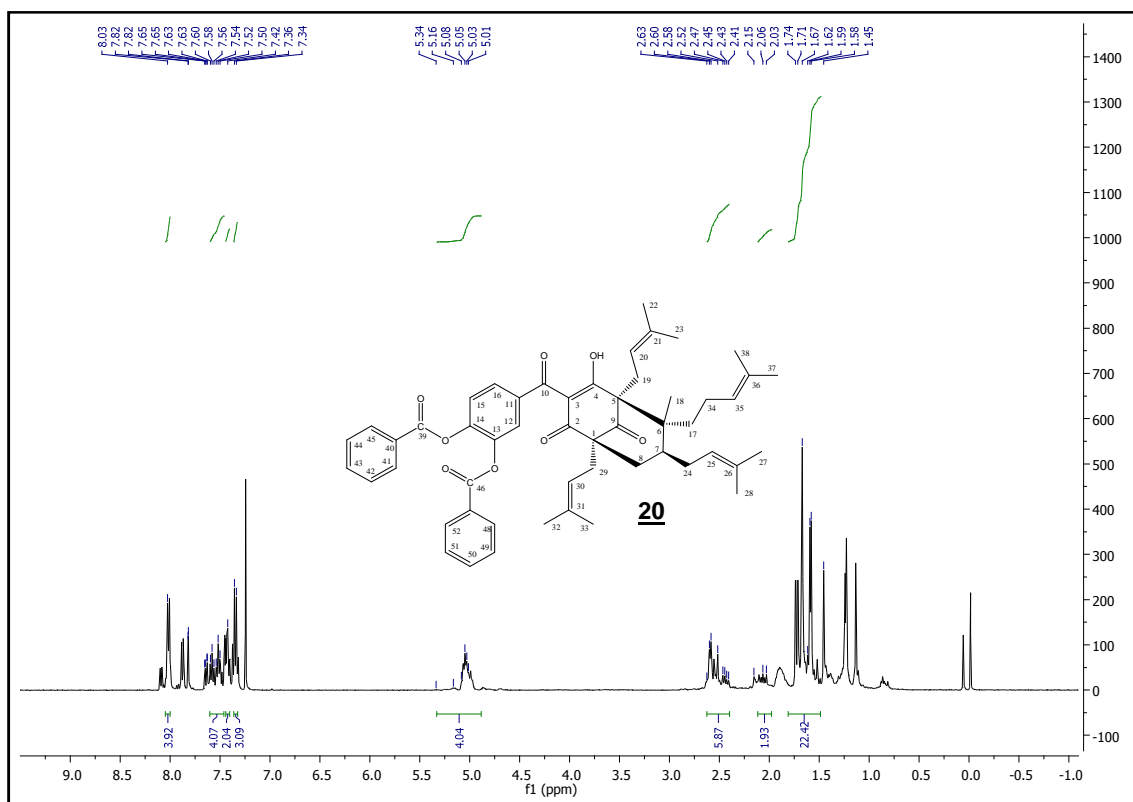


Figura 71- Espectro de RMN de ^1H de **20** (CDCl_3 , 400 MHz).

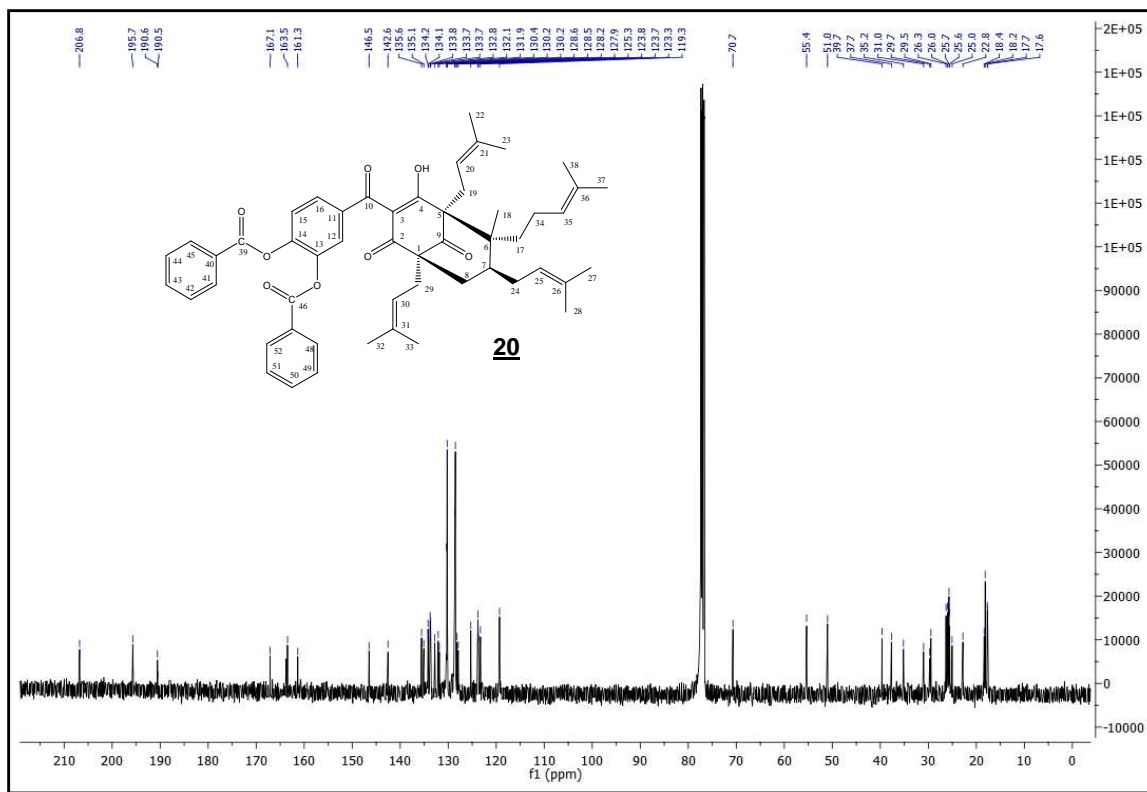


Figura 72 - Espectro de RMN de ^{13}C de **20** (CDCl_3 , 100 MHz).

6.1.9 Tentativa de síntese de 14-O-prenil-guttiferona-A **21**

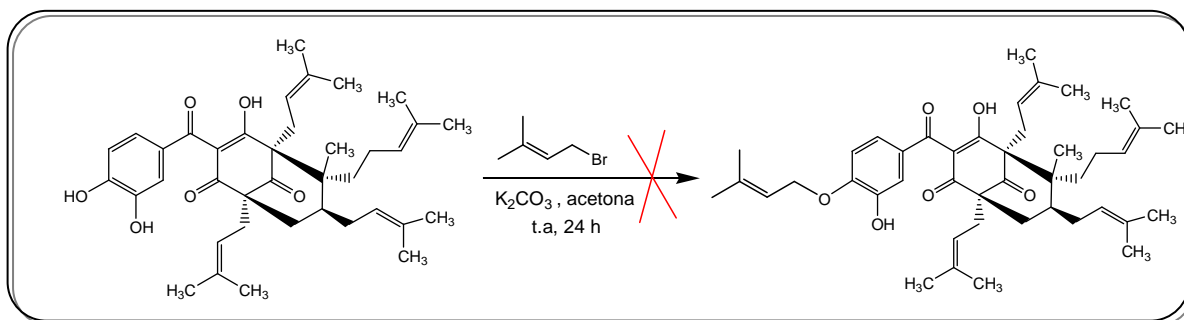


Figura 73 - Reação de tentativa de obtenção do derivado **21**.

Na tentativa de obtenção do derivado **21** foi realizada a reação do composto **1** e brometo de 3,3-dimetilalila em presença de carbonato de potássio (UNANGST et al., 1996) (FIGURA 73). Entretanto, a análise por CCD deixou evidente a formação de mais de um produto de reação com valores de R_f muito próximos, e não foi possível a separação e obtenção do produto (a tentativa se deu por dois métodos: cromatografia em coluna e CLAE semi-preparativa).

6.1.10 Tentativa de síntese de 14-O-octil-guttiferona-A **22**

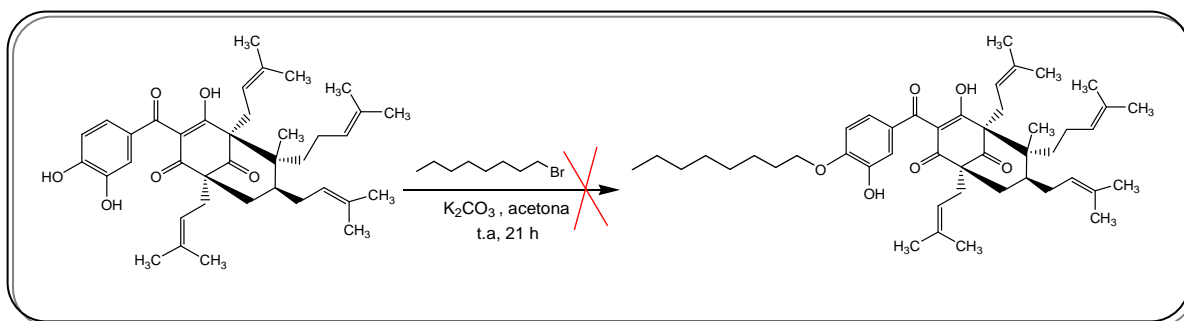


Figura 74 - Reação de tentativa de obtenção do derivado **22**.

Na tentativa de obtenção do derivado **22** foi realizada a reação do composto **1** e 1-bromo-octano em presença de carbonato de potássio (UNANGST et al., 1996) (FIGURA 74). Foram realizados os mesmos métodos utilizados para **21**, e não foi possível a purificação e isolamento do composto esperado.

6.2 Ensaios biológicos

Os derivados **14**, **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20**, juntamente com o produto de partida, a guttiferona-A **1**, foram testados com a finalidade de avaliar seu potencial de inibição de tripsina e papaína, bem como o tempo necessário para inibir estas enzimas.

6.2.1 Determinação do tempo de inibição enzimática pelos derivados

Primeiramente, foi necessário determinar a velocidade em que a reação de inibição ocorreria, ou seja, a variação da atividade da enzima em função do tempo, a fim de avaliar a cinética de reação de inibição conforme a classe das enzimas estudadas e também a estrutura do inibidor.

Como pode ser visto nas Figuras 75 e 76, a atividade da enzima no controle permanece em 100 % durante todo o tempo do experimento enquanto que na presença dos inibidores, a atividade residual sofre uma diminuição nos primeiros 10 minutos e se mantém na mesma faixa percentual transcorridos 45 minutos de incubação com a papaína. Com a tripsina, também ocorre diminuição brusca da atividade nos primeiros 10 minutos e uma pequena diminuição nos demais tempos. O mesmo comportamento se repetiu com todos os derivados e, desta forma, o

máximo de inibição em uma determinada concentração de inibidor antecedeu os 10 minutos.

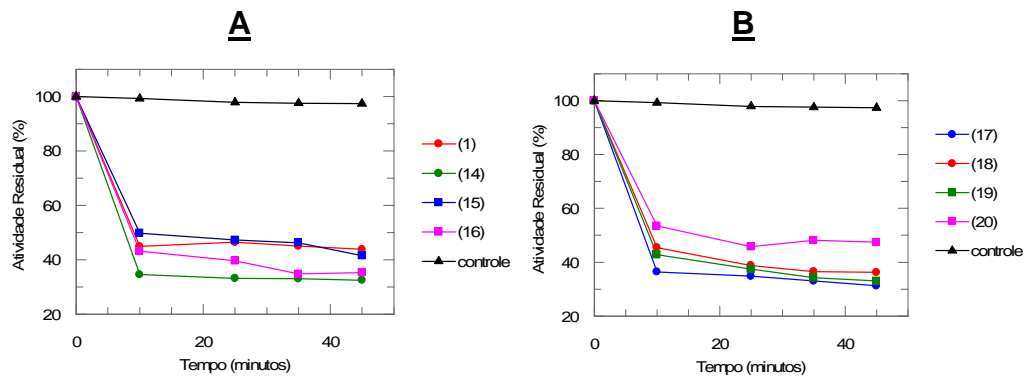


Figura 75 - Variação da atividade de papaína em função do tempo quando incubada com os derivados 1, 14, 15 e 16 (A) e 17, 18, 19, 20 (B).

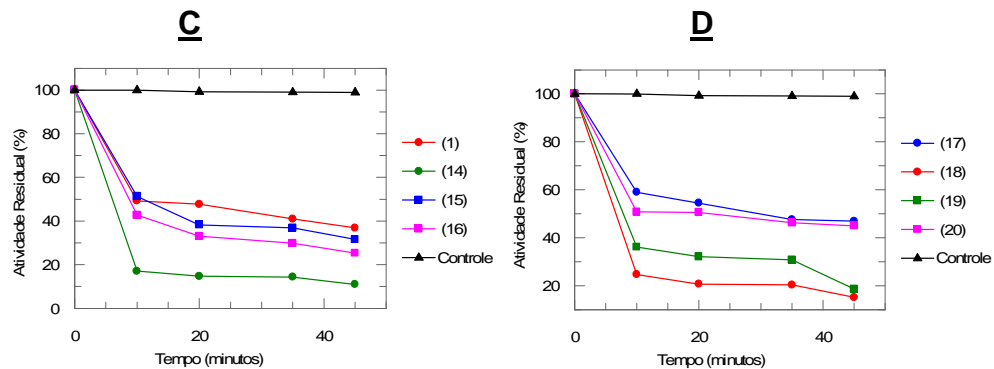


Figura 76 - Variação da atividade de tripsina em função do tempo quando incubada com os derivados 1, 14, 15 e 16 (C) e 17, 18, 19, 20 (D).

6.2.2. Determinação da IC₅₀

A fim de quantificar a inibição, obtendo valores numéricos mensuráveis de modo a comparar a especificidade e a eficácia de um composto candidato a inibidor de protease, calculou-se a concentração capaz de inibir 50% da atividade enzimática (IC₅₀). O IC₅₀ corresponde à concentração de inibidor em que a atividade enzimática é a metade da atividade inicial e foi calculada pela equação abaixo, utilizando o software Grafit 5.0.

$$\text{Atividade residual (\%)} = \frac{100\%}{1 + (x/IC_{50})^s}$$

onde x representa a concentração de inibidor e s representa o fator de diminuição da atividade.

Para a determinação de IC_{50} , as enzimas papaína e tripsina foram incubadas com os derivados em teste nas concentrações de 1, 5, 10, 20 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, por 10 minutos (tempo necessário para inibição obtido no experimento anterior) e a leitura foi realizada após a adição do substrato Z-Phe-Arg-MCA ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$). O comportamento obtido com os derivados foi semelhante ao da guttiferona-A **1**. Ocorreu uma variação exponencial da atividade enzimática em função da concentração do inibidor conforme pode ser visto nas Figuras a e b no anexo (páginas 91 e 92).

Pode-se observar pela análise dos resultados de inibição (TABELA 8), que a benzofenona natural, guttiferona-A **1**, inibe significativamente tanto a tripsina (serino-protease) quanto a papaína (cisteíno-protease), confirmando o relato da literatura (MARTINS et al., 2009) e apresentando um IC_{50} na faixa de $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para a papaína e $7 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para tripsina. Quanto à relação entre a estrutura e a atividade inibitória, os resultados demonstram que os grupamentos prenila e as hidroxilas em C13 e C14 da guttiferona-A **1** são importantes à atividade inibitória. Possivelmente, esses grupamentos presentes na guttiferona-A **1** são cruciais na interação com algum subsítio específico dessas enzimas.

Tabela 8 - Valores de IC_{50} resultantes da inibição de papaína e tripsina

Compostos	IC_{50} (μM)	
	Papaína	Tripsina
Gut-A(1)	1,19±0,23	7,40±2,50
(14)	5,84±0,97	28,65±2,34
(15)	22,01±1,71	32,40±24,87
(16)	7,71±2,01	22,17±9,59
(17)	0,52±0,08	12,69±2,79
(18)	8,91±1,15	69,43±15,56
(19)	1,26±0,78	165,97±68,79
(20)	8,12±1,20	32,31±3,20
E-64¹	0,027±0,04	
TLCK²		0,078±0,23

1- Inibidor clássico de Papaína; 2 Inibidor clássico de Tripsina.

Analisando os resultados de inibição dos derivados sintetizados, observa-se que a maioria não foi tão eficaz para inibir tripsina e papaína quanto a guttiferona-A

1, confirmando a importância das hidroxilas fenólicas, uma vez que as modificações diminuíram a atividade. Por outro lado, observando os resultados, pode-se perceber que para os derivados acilados (**14**, **17** e **19**) obtiveram-se melhores resultados, sendo possível supor que o grupo carbonílico pode sofrer reações nucleofílicas com o resíduo de serina da tripsina e de cisteína da papaína, como descrito pelos mecanismos (apresentados nas FIGURAS 8 e 9, páginas 27 e 28). O derivado **17** apresentou um IC_{50} de $0,52 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para papaína e $12,69 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para tripsina, relevante para ambas as enzimas sendo que para a papaína obteve-se um valor de inibição cerca de 2,3 vezes maior que o produto de partida. O derivado **19** também apresentou bons resultados de inibição, mas somente para a papaína, com IC_{50} de $1,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

O composto **18**, que também apresenta grupo carbonílico, não apresentou bons resultados comparado aos demais. Isso sugere que a diferença talvez se dê pela presença dos grupos volumosos adicionados, dificultando interações no sítio ativo da enzima por impedimento estérico, o que é observado também para o composto **20**.

Os derivados alquilados apresentaram valores de inibição inferiores, o que demonstra novamente a importância do grupo carbonila na molécula. Vale ressaltar, para os derivados alquílicos, que o derivado **16** apresentou bons resultados para a tripsina, até melhores que os derivados acilados. Com isso, pode-se sugerir que a presença de uma hidroxila, ou seja, a modificação ocorrida somente em uma das hidroxilas fenólicas, seja importante e esta participa de interações no bolso hidrofóbico da enzima, como descrito para a guttiferona-A **1**.

Ainda, quando se compara a inibição quanto à especificidade, ou seja, se o inibidor consegue diferir as classes de enzimas ou mesmo cada enzima, observa-se que guttiferona-A **1** apresenta uma faixa de IC_{50} para papaína de $1,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ alterando com a tripsina para cerca de $7,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$. As modificações realizadas não apresentaram aumento da capacidade inibitória perante a tripsina, ou melhor, as modificações resultaram em uma diminuição das interações com a tripsina resultando, em um aumento do IC_{50} . Por outro lado, nos ensaios realizados com papaína, o composto **17** apresentou uma diminuição do IC_{50} e os demais compostos permaneceram com IC_{50} abaixo de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$, com exceção do composto **15**. Assim, embora a guttiferona-A não faça distinção entre as duas classes de enzimas, os compostos modificados demonstraram uma determinada seletividade entre elas.

7 CONCLUSÕES

- Neste trabalho foi relatado o isolamento da benzofenona natural poliprenilada, guttiferona-A **1** a partir do extrato acetato de etila das sementes de *Rheedia brasiliensis*, e a obtenção dos derivados semissintéticos **14**, **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20**, obtidos por modificações moleculares nos grupos hidroxila da guttiferona **1**.
- Os compostos foram caracterizados por espectrometria de absorção no IV, Massas, RMN de ^1H e ^{13}C e UV.
- Os derivados foram testados para avaliar o potencial para inibir as enzimas proteolíticas papaína e tripsina.
- Os resultados de inibição de todos os compostos foram significativos principalmente os derivados acilados **14**, **17** e **19**, comparado ao produto de partida **1** que apresentou bons resultados para as duas enzimas.
- Este resultado pode ser relacionado à presença dos grupos prenila e também ao grupo carbonílico conferido à molécula após a modificação estrutural.

REFERÊNCIAS

- ABE, F. et al. Trypanocidal Constituents in Plants 3. ¹⁾Leaves of *Garcinia intermedia* and Heartwood of *Calophyllum brasiliensis*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 27, p. 141-143, 2004.
- ALVES, T. M. A. et al. Biological activities of 7-epiclusianone. **J. Nat. Prod.**, v. 62, p. 369-371, 1999.
- AMPOFO, S. A.; WATERMAN, P. G. Xanthones from three *Garcinia* species. **Phytochem.**, v. 25, p. 2351-2355, 1986.
- AVRIL, L. E. et al. Inhibition of U-937 membrane-associated cathepsin G by GP 120 (IIIB) and V3 loop-derived peptides from several strains of HIV-1. **FEBS Letters**, v. 367, p. 251–256, 1995.
- AZEBAZE, A. G. B. et al.; Antimicrobial and antileishmanial xanthones from the stem bark of *Allanblackia gabonensis*. **Chem. Nat. Comp.**, v. 44, p. 582-587, 2008.
- BARRETT, A.; SALVESEN, G. **Proteinase Inhibitors**. Amsterdam:Elsevier, 1986.
- BASSO, L. A. et al. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases - A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 100, p. 575–606, 2005.
- BEYNON, R.J.; BOND, J.S. **Proteolytic enzymes: a practical approach**. Liverpool: Oxford University, 1989.
- BOECK, P. **Obtenção de moléculas bioativas a partir de substâncias naturais e sintéticas**. Tese (Doutorado em Química)-UFSC, Florianópolis – SC, 2005. 233f.
- CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, p. 500, 2001.
- CAO, S. et al. Guttiferones K and L, antiproliferative compounds of *Rheedia calcicola* from the Madagascar rain forest. **J. Nat. Prod.** v. 70, p. 686-688, 2007.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Quim. Nova**, v. 21, p. 99-105, 1998.
- CIOCHINA, R.; GROSSMAN, R. B. Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinols. **Chem. Rev.**, v. 106, p. 3963-3986, 2006.
- COHEN, L. W.; COGHLAN, V. M.; DIHEL, L. C. Cloning and sequencing of papain-encoding cDNA. **Gene**, v. 48, p. 219-227, 1986.
- DELLE MONACHE, G. et al. Chemical investigation of the genus *Rheedia*. II Prenylated xanthones from *Rheedia gardneriana*. **J. Nat. Prod.**, v. 46, p. 655–659, 1983.

DEROGIS, P. B. M. C. et al. Complete assignment of the ^1H and ^{13}C NMR spectra of garciniaphenone and keto-enol equilibrium statements for prenylated benzophenones. **Magn. Reson. Chem.**, v. 46, p. 278-282, 2008.

DIAZ-CARBALLO, D. et al. Novel antitumoral compound isolated from *Clusia rosea*. **Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 41, p. 622-623, 2003.

FEAR, G.; KOMARNYTSKY, S.; RASKIN, I. Protease inhibitors and their peptidomimetic derivatives as potential drugs. **Pharmacol. & Therapeutics**, v. 113, p. 354–368, 2007.

GEY, C. et al. Phloroglucinol derivatives guttiferone G, aristoforin, and hyperforin: Inhibitors of human sirtuins SIRT1 and SIRT2. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 46, p. 5219–5222, 2007.

GUSTAFSON, K. R. et al. The guttiferones, HIV inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea*. **Tetrahedron**, v. 48, p. 10093–10102, 1992.

HANSEN, M. M.; RIGGS, J. R. A novel protecting group for hindered phenols. **Tetrahedron Lett.**, v. 39, p. 2705-2706, 1998.

HAQ, S. K. et al. Protease Inhibitors: A Panacea? **J. Biochem. Mol. Toxicol.** v. 4, p. 217-277, 2010.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 6. ed. São Paulo: Editora Nacional, p. 332-334, 1993.

KHANUM, S.A.; SHASHIKANTH, S.; DEEPAK, A.V. Synthesis and anti-inflammatory activity of benzophenone analogues. **Bioorg. Chem.**, v. 32, p. 211-222, 2004.

KUETE, V. et al. Antimicrobial components of the methanolic extract from the stem bark of *Garcinia smeathmannii* Oliver (Clusiaceae). **South African Journal of Botany**, v. 73, p. 347–354, 2007.

LALONDE, J. M. et al. Use of papain as a model for the structure-based design of cathepsin K inhibitors: Crystal structures of two papain-inhibitor complexes demonstrate binding to S'-Subsites. **J. Med. Chem.**, v. 41, p. 4567-4576, 1998.

LEE, M.; FRIDMAN, R.; MOBASHERY, S. Extracellular proteases as targets for treatment of cancer metastases. **Chem. Soc. Rev.**, v. 33, p. 401–409, 2004.

LENTA, B. N. et al. Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds from *Allanblackia monticola* and *Symphonia globulifera*. **Molecules**, v. 12, p. 1548-1557, 2007.

MABRY, T. J. et al. **The Systematic Identification of flavonoids**. New York: Springer-Verlag, 1970.

MARTINS, F. T. et al. Natural polyprenylated benzophenones inhibiting cysteine and serine proteases. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 44, p. 1230-1239, 2009.

MARTINS, F. T. et al. Natural polyprenylated benzophenones: keto-enol tautomerism and stereochemistry. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 18, p. 1515-1523, 2007.

MERZA, J. et al. Prenylated xanthenes and tocotrienols from *Garcinia virgata*. **Phytochem.**, v. 65, p. 2915–2920, 2004.

MERZA, J. et al. New cytotoxic guttiferone analogues from *Garcinia virgata* from New Caledonia. **Planta Med.**, v. 72, p. 87-89, 2006.

NALDONI, F. J. et al. Antimicrobial Activity of Benzophenones and Extracts from the Fruits of *Garcinia brasiliensis*. **J. Med. Food**, v. 12, p. 403-407, 2009.

NEURATH, H. The versatility of proteolytic enzymes. **J. Cell. Biochem.**, v. 32, p. 35-49, 1986.

NGOUELA, S. et al. Anti-plasmodial and antioxidant activities of constituents of the seed shells of *Symphonia globulifera* Linn f. **Phytochem.**, v. 67, p. 302–306, 2006.

OTTO, H.; SCHIRMEISTER, T. Cysteine Proteases and Their Inhibitors. **Chem. Rev.** v. 97, p. 133-171, 1997.

PAN, M. H. et al. Induction of apoptosis by garcinol and curcumin through cytochrome c release and activation of caspases in human leukemia HL-60 cells. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 1464–1474, 2001.

PEREIRA, I. O. et al. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. fruits. **Phytomed.**, v. 17, p. 339–345, 2010.

PICCINELLI, A. L. et al. Structural revision of clusianone and 7-epi-clusianone and anti-HIV activity of polyisoprenylated benzophenones. **Tetrahedron**, v. 61, p. 8206-8211, 2005.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quím. Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

POWERS, J. C. et al. Irreversible Inhibitors of Serine, Cysteine, and Threonine Proteases. **Chem. Rev.**, v. 102, p. 4639–4750, 2002.

PROTIVA, P. et al. Growth inhibition of colon cancer cells by polyisoprenylated benzophenones is associated with induction of the endoplasmic reticulum response. **Int. J. Cancer**, v. 123, p. 687–694, 2008.

SANTOS, M. H. et al. 7-epiclusianona: a nova benzofenona tetraprenilada e outros constituintes químicos dos frutos de *Rheedia gardneriana*. **Quím. Nova.**, v. 22, n. 5, p. 654–660, 1999.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteinases. I. Papain. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 27, p. 157-162, 1967.

SHARMA, A.; PADWAL-DESAI, S.; NINJOOR, V. Intracellular hydrolases of *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 159, p. 464-471, 1989.

SHEN, H. B.; CHOU, K. C. Identification of proteases and their types. **Anal. Biochem.**, v. 385, p. 153–160, 2009.

SILVERSTEIN R. M., WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro:LTC, 2007.

SORDAT-DISERENS, I. et al. Prenylated xanthenes from *Garcinia livingstonei*. **Phytochem.**, v. 31, p. 313-316, 1991.

TANAKA, T. et al. Prevention of colonic aberrant crypt foci by dietary feeding of garcinol in male F344 rats. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 1183–1189, 2000.

TURK B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 5, p. 785-799, 2006.

UNANGST, P. C.; CONNOR, D. T.; MILLER, S. R. Synthesis of novel 3-alkoxy-and 3-alkylthioindole and -benzofuran-2-carboxamides. **J. Heter. Chem.**, v. 33, n. 6, p. 2025-2030, 1996.

VIEGAS JR., C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quim. Nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

WATERMAN, P. G. A phytochemist in the African rain forest. **Phytochem.**, v. 25, p. 3-17, 1986.

XU, G.; FENG, C. et al. Bioassay and ultraperformance liquid chromatography/mass spectrometry guided isolation of apoptosis-inducing benzophenones and xanthone from the pericarp of *Garcinia yunnanensis* Hu. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 11144-11150, 2008.

YAMAGUCHI, F. et al. Free radical scavenging activity and antiulcer activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, p. 2320–2325, 2000.

ANEXOS

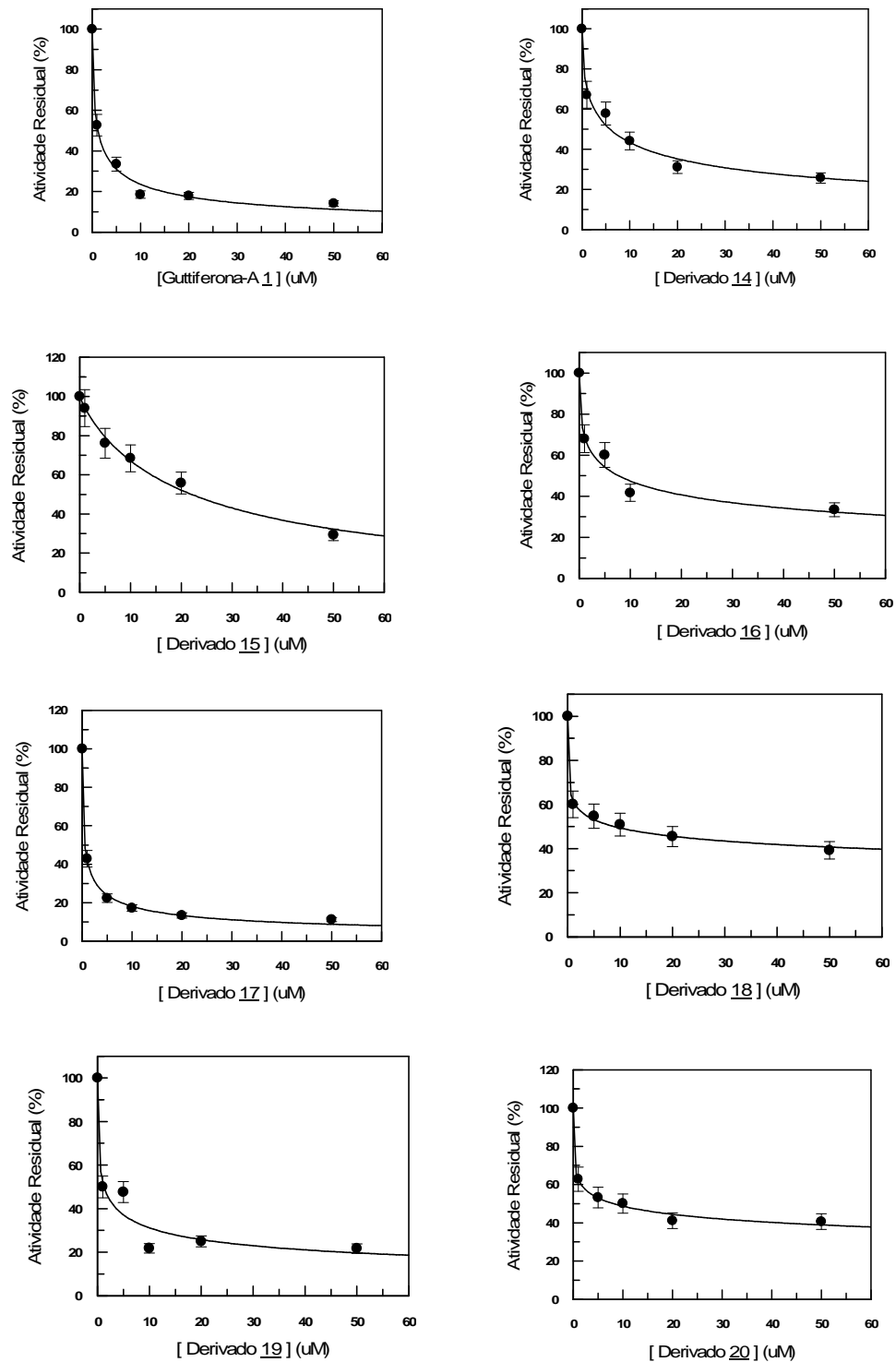
Anexo A - Determinação de IC₅₀

Figura a: Variação da atividade enzimática da papaína em função da concentração dos inibidores 1, 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20. Condições: Tampão Fosfato de Sódio 50 mmol.L⁻¹ (pH 6,8), EDTA 1 mmol.L⁻¹. Papaína (1mg.mL⁻¹). Incubação à 25°C com concentrações variadas de inibidores seguida da adição do substrato Z-Phe-Arg-MCA (3,4 μmol.L⁻¹).

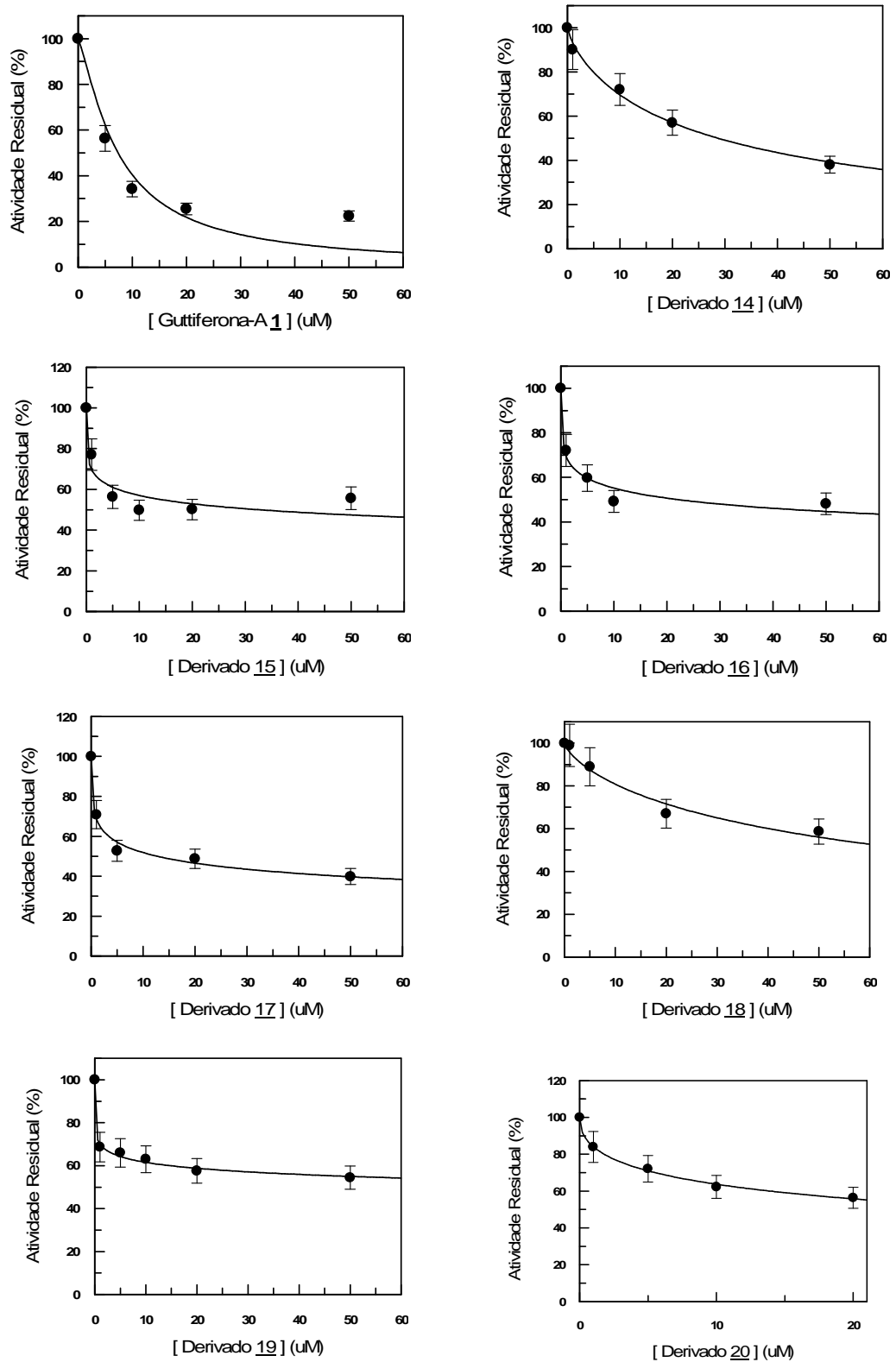


Figura b: Variação da atividade enzimática da tripsina em função da concentração dos inibidores 1, 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20. Condições: Tampão Tris-HCl 50 mmol.L⁻¹ (pH 8,0), CaCl₂ 10 mmol.L⁻¹. Tripsina (1mg.mL⁻¹). Incubação à 25°C com concentrações variadas de inibidores seguida da adição do substrato Z-Phe-Arg-MCA (3,4 μmol.L⁻¹).