



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG**  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 – Alfenas/MG – CEP 37130-000  
Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063



**VANESSA SILVA GONTIJO**

**PLANEJAMENTO E SEMISSÍNTESE DE NOVOS ANÁLOGOS DA FUKUGETINA COM  
POTENCIAL ATIVIDADE ANTILEISHMANIA, ANTIOXIDANTE E  
ANTIPROTEOLÍTICA**

**ALFENAS – MG**

**2011**

**VANESSA SILVA GONTIJO**

**PLANEJAMENTO E SEMISSÍNTESE DE NOVOS ANÁLOGOS DA FUKUGETINA COM  
POTENCIAL ATIVIDADE ANTILEISHMANIA, ANTIOXIDANTE E  
ANTIPROTEOLÍTICA**

Dissertação, requisito parcial, para obtenção do título de mestre, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG. Área de concentração: Química Orgânica. Orientador: Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos. Co-orientador: Prof. Dr. Cláudio Viegas Jr.

**ALFENAS-MG  
2011**

Gontijo, Vanessa Silva.

Planejamento e semissíntese de novos análogos da Fukugetina com potencial atividade antileishmania, antioxidante e antiproteolítica / Vanessa Silva Gontijo. - 2011.

179 f. -

Orientador: Marcelo Henrique dos Santos.

Dissertação (mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2011.

Bibliografia.

1. Garcinia - química. 2. Biflavonóide – isolamento & purificação. 3. Leishmaniose. 4. Antioxidantes. 5. Peptídeos Hidrolases. 6. Interações Hidrofóbicas e Hidrofílicas. I. Santos, Marcelo Henrique. II. Título.

CDD: 547

**VANESSA SILVA GONTIJO**

**PLANEJAMENTO E SEMISSÍNTESE DE NOVOS ANÁLOGOS DA FUKUGETINA COM  
POTENCIAL ATIVIDADE ANTILEISHMANIA, ANTIOXIDANTE E  
ANTIPROTEOLÍTICA**

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. Dr. Marcelo Henrique dos Santos  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Wagner Alves de Souza Judice  
Instituição: Universidade de Mogi das Cruzes Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Diogo Teixeira Carvalho  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas Assinatura: \_\_\_\_\_

*Dedico este trabalho aos meus pais, Clarinda e Ailton,  
sem os quais jamais teria conseguido vencer mais esta luta.  
Amo e admiro muito vocês não apenas como filha, mas como mulher.*

*A mente que se abre a uma nova idéia  
jamais voltará ao seu tamanho original.*

*Albert Einstein*

## *Agradecimentos*

*Acredito que um trabalho se torna grandioso em função do empenho, participação e compromisso de uma equipe multidisciplinar. Este estudo só se tornou possível pela colaboração de algumas pessoas e órgãos a quem gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos:*

*À Deus pela sublime presença de em minha vida, importante força diretora de minha consciência, que ensina o amor e a linguagem silenciosa da vida, a fim de espraiar a luz ao próximo, dando-nos sentido da verdadeira felicidade; por me fortalecer nas angústias, por me enriquecer nos momentos de exaustão, por me ajudar a vencer todas as dificuldades encontradas na trajetória e principalmente por me iluminar com sua sabedoria o verdadeiro valor das minhas aspirações;*

*A Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) pela oportunidade oferecida;*

*Aos meus pais Clarinda e Ailton mesmo que geograficamente distantes, fizeram-se presentes em cada momento desta importante jornada da minha vida, merecendo assim minha eterna gratidão pelo amor e carinho;*

*Aos meus irmãos Cleiton e Raquel que me ajudaram a fortalecer meu ideal e que compartilharam comigo muitos momentos inesquecíveis;*

*Ao Diego, pelo companheirismo, dedicação e apoio que significou muito não por se tratar da finalização de um trabalho, mas por representar a concretização de um sonho;*

*Ao Professor Dr. Marcelo Henrique dos Santos pela sua preciosa orientação, compreensão e principalmente pela amizade conquistada nestes anos. Obrigada pela a confiança depositada, pelos conselhos e oportunidade. Sempre me lembrarei dos vários ensinamentos científicos e dos momentos de conversa. Obrigada!!!!*

*Ao Professor Dr. Cláudio Viegas Júnior não apenas pela co-orientação como também pela amizade e carinho que significaram muito na construção deste trabalho. Obrigada pela a confiança depositada na área científica e na área pessoal. Sentirei muitas saudades de seus conselhos e orientações, e claro da família VIEGAS também.*

*Aos Profs. Maria Aparecida Juliano (Unifesp-Sp) e Luís Juliano (Unifesp-Sp), pela parceria nos ensaios de avaliação da atividade enzimática, por disponibilizar o espectrofluorímetro, HPLC preparativo e espectrômetro de massas do Departamento de Biofísica, Unifesp.*

*Ao grupo do Laboratório de Biofísica da UNIFESP, em especial ao doutorando Diego Magno Assis, pela disponibilidade de ensinar os ensaios enzimáticos, boa vontade e principalmente da paciência e auxílio nos experimentos enzimáticos, muito obrigada!!*

*Ao Professor Wagner A. S. Judice e sua aluna Amanda de Carvalho Dosatti pela colaboração e interpretação dos ensaios em CPBs realizados no Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica da Universidade de Mogi das Cruzes, SP;*

*Ao grupo do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), pelo o auxílio e infraestrutura disponibilizada. Em especial ao Professor Marcos José Marques que disponibilizou seu Laboratório para realização dos ensaios leishmanicidas e auxílio na análise dos resultados obtidos; à Barbara Codonho e Ana Laura, pela ajuda e colaboração, e principalmente pela a amizade que construímos; ao aluno de doutorado Ivan Oliveira que em inúmeros momentos me auxiliou nas discussões e interpretações dos resultados, me aconselhou, me ouviu e me orientou. Muito obrigada pela dedicação, confiança e parceria dedicada;*

*Aos professores Dr. Marcelo Aparecido da Silva (UNIFAL-MG) e Dr. Marcos José Marques (UNIFAL-MG) pela participação na banca examinadora de qualificação e sugestões que tanto colaboraram neste trabalho;*

*Às professoras Dra. Márcia Paranho Veloso, Dra. Marisi Gomes Soares pelo auxílio na análise de alguns resultados e das sugestões muito válidas e ao prof. Dr. Ihosvany Camps pelo auxílio na realização das modelagens moleculares;*

*A auxiliar de limpeza do laboratório (LFQM) Glorinha pela grande amizade, sorrisos e pelo o cafezinho diário que nos mantinha aquecidos nos dias frios e ao mesmo tempo alertas;*

*As queridas amigas e irmãs Carol, Flávia e Hέλvia, por terem compartilhado comigo os momentos de felicidade e principalmente pela força em todos os momentos que precisei;*

*Aos amigos do Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal (LFQM) da UNIFAL-MG, pela amizade, ajudas constantes, momentos de alegria e descontração, durante todos estes anos de permanência. Em especial à Carla Coelho, Kamila, Tiago, Priscila, Patrícia, Poliane, Douglas Spuri, Margarete Zauli, Helineide, Flávia Viegas, Carlinha, Roberta, Rodrigo, Miguel, Maísa, Olívia, Cláudinha, Tânia, Natálie, Flávia Santa-Cecília, Lissara, Gustavo, Edérson, Isael, Francieli, Paloma, João, Bianca e Gabriel (agregado-bioquímica). Em especial à Jaqueline, Kris, Cláudia Mara, Maria Cecília e Danielle pelo constante incentivo- Muito obrigada pela a oportunidade de conhecê-las, sentirei muito a falta de vocês;*

*Ào aluno de iniciação científica Isael Aparecido Rosa pelo apoio oferecido durante os experimentos, sem você este trabalho não seria possível de ser concluído, muito obrigada pela colaboração. Sentirei muita sua falta, em especial das nossas conversas e do nosso trabalho;*

*Aos professores, funcionários e colegas do programa de Pós-Graduação em Química pela colaboração na realização do Mestrado;*

*A FAPEMIG pelo apoio financeiro e a CAPES pela bolsa concedida.*

*À todos que direta ou indiretamente me ajudaram na realização de mais este sonho, o meu sincero agradecimento. Obrigada!!!*

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo o estudo fitoquímico do extrato acetato de etila do epicarpo (EAEE) de *Garcinia brasiliensis*, modificação estrutural no biflavonoide natural fukugetina (**LFOM-109**) e ensaios de atividade antioxidante, leishmanicida e enzimático do composto natural **LFOM-109** e de seus análogos semissintéticos. A espécie *G. brasiliensis* pertence à família Guttifereae e é cultivada em todo o território brasileiro. É conhecida popularmente como bacuri, bacupari, porocó e bacuripari, no Brasil. É uma espécie nativa do Brasil, Paraguai e norte da Argentina. O fracionamento do EAEE levou ao isolamento dos compostos **LFOM-105**, **LFOM-106**, **LFOM-107**, **LFOM-108** e da **Fukugetina (LFOM-109)**. Os compostos isolados foram identificados por comparação com padrões autênticos e por técnicas espectrométricas e espectroscópicas usuais. A partir do composto natural fukugetina, reações de acilação e alquilação foram realizadas com o objetivo de obter derivados semissintéticos mais lipofílicos. Para avaliar a atividade antioxidante (Poder Redutor e Sequestrante de radicais DPPH) utilizaram-se concentrações de 400-12,5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e como padrões ácido ascórbico e BHT. Para a avaliação antiparasitária (formas promastigotas e amastigotas) utilizou-se concentrações entre 100-50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e como padrão pentamidina. Os resultados apresentados nos testes demonstraram uma redução do potencial antioxidante dos derivados semissintéticos comparado com o composto natural **LFOM-109**, provavelmente por possuir menor número de grupo hidroxilas fenólicas livres. Nos ensaios de atividade antiparasitária (formas promastigota e amastigota) foi observada uma potencialização da atividade dos derivados semissintéticos, possivelmente por serem mais lipofílicos que o composto de origem **LFOM-109**. Os ensaios enzimáticos foram realizados em cisteíno e serino proteases, observando-se uma atividade inibitória significativa dos derivados semissintéticos quando comparado ao precursor **LFOM-109**, indicando que o aumento da lipofilia favoreceu a ação nestas enzimas. O presente trabalho contribuiu desta forma, para o conhecimento da química e das atividades antioxidante, antiparasitária e enzimática dos compostos naturais obtidos de *G. brasiliensis* e semissintéticos da fukugetina.

**Palavras-chave:** *Garcinia brasiliensis*. Biflavonoide. Leishmanioses. Antioxidante. Peptídeos Hidrolases. Interações hidrofóbicas e hidrofílicas.

## ABSTRACT

This study aimed to the phytochemical study of ethyl acetate extract epicarp (EAEE) from *Garcinia brasiliensis*, structural change in the natural biflavonoids fukugetina (**LFOM-109**) and antioxidant activity assays, and enzymatic leishmanicidal of the natural compound and **LFOM-109** its semisynthetic analogues. The species *G. brasiliensis* belongs to the family Guttifereae and is cultivated throughout the Brazilian territory. It is popularly known as bacuri, bacupari, and Poroca bacuripari species in Brazil and Bolivia as guapomo. It is a native of Brazil, Paraguay and northern Argentina. Fractionation of EAEE led to the isolation of compounds **LFOM-105**, **LFOM-106**, **LFOM-107**, **LFOM-108** and Fukugetina (**LFOM-109**). The compounds were identified by comparison with authentic standards and by spectral and spectroscopic usual. From the natural compound fukugetina, alkylation and acylation reactions were performed in order to obtain more lipophilic semisynthetic derivatives. To evaluate the antioxidant activity (reducing power and DPPH radical scavenger) used concentrations of 400-12.5  $\mu\text{M}$  and standards as ascorbic acid and BHT. For evaluating antiparasitic (promastigote and amastigote form) used concentrations between 100-50  $\mu\text{M}$  as standard and pentamidine. The results showed a reduction in testing the antioxidant potential of semisynthetic derivatives compared with the natural compound **LFOM-109**, probably because reducing the number of phenolic hydroxyl in the structure with structural changes. In tests of antiparasitic activity (promastigote and amastigote forms) was observed an enhancement of the activity of semisynthetic derivatives, possibly by being more lipophilic than the parent compound **LFOM-109**. Assays were performed on cysteine and serine proteases, observing a significant inhibitory activity of semisynthetic derivatives compared to the precursor **LFOM-109**, indicating that the increased lipophilicity enhanced the action on these enzymes. This study has thus contributed to the knowledge of chemistry and the antioxidant, antiparasitic and natural compounds of enzyme obtained from *G. brasiliensis* and the semisynthetic fukugetin.

**Keywords:** *Garcinia brasiliensis*. Biflavonoids. Leishmaniasis. Antioxidant. Peptide Hydrolases. Hydrophobic and hydrophilic interactions.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1 -</b>	Imagens dos frutos e epicarpis de <i>G. brasiliensis</i> .....	27
<b>FIGURA 2 -</b>	Possíveis reações com o radical DPPH' .....	30
<b>FIGURA 3 -</b>	Estrutura do radical DPPH e de sua hidrazina correspondente.....	30
<b>FIGURA 4 -</b>	Reação de formação do complexo azul da Prússia.....	31
<b>FIGURA 5 -</b>	Flavonóides antioxidantes com múltiplas hidroxilas.....	32
<b>FIGURA 6 -</b>	Biflavonas clássicas conforme o local da ligação interflavonoil.....	35
<b>FIGURA 7 -</b>	Micrografia das formas morfológicas mais comuns de <i>Leishmania</i> spp. (A) Promastigota (B) Amastigotas	38
<b>FIGURA 8 -</b>	Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp .....	39
<b>FIGURA 9 -</b>	Diversidade de manifestações clínicas na LTA. A) Lesão cutânea típica B) Forma difusa C) Forma Mucosa	43
<b>FIGURA 10 -</b>	Flavonoide metoxilado de <i>Ageratum conyzoides</i> - 4'-hidroxi-5,6,7,3',5'-pentametoxyflavona	44
<b>FIGURA 11 -</b>	Mecanismo catalítico das serino-proteases.....	48
<b>FIGURA 12 -</b>	Mecanismo catalítico das cisteíno-proteases.....	49
<b>FIGURA 13 -</b>	Esquema representando o transporte de fármacos através da membrana pelas formas paracelular e transcelular	52
<b>FIGURA 14 -</b>	Modelo do mosaico fluído da membrana biológica.....	53
<b>FIGURA 15 -</b>	Esquema da obtenção dos extratos a partir do pericarpo de <i>G.brasiliensis</i> .....	59
<b>FIGURA 16 -</b>	Fracionamento do EAEE.....	61
<b>FIGURA 17 -</b>	Proposta de derivados semissintéticos.....	62
<b>FIGURA 18 -</b>	Esquema geral dos ensaios enzimáticos com o substrato fluorogênico Z-FR-MCA, mostrando o ponto de clivagem pelas proteases	69
<b>FIGURA 19 -</b>	Composto natural 1,3,6,7-tetraidroxixantona ( <b>LFQM-105</b> ).....	72
<b>FIGURA 20 -</b>	Espectro no IV (KBr) para o composto <b>LFQM-105</b> .....	73
<b>FIGURA 21 -</b>	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H a 400 MHz para <b>LFQM-105</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ).....	74
<b>FIGURA 22 -</b>	Mapa de contornos COSY a 400 MHz para <b>LFQM-105</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ).....	75
<b>FIGURA 23 -</b>	Mapa de contornos gHMQC a 400 MHz para <b>LFQM-105</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ).....	76
<b>FIGURA 24 -</b>	Mapa de contornos gHMBC a 400 MHz para <b>LFQM-105</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ).....	77

FIGURA 25 -	Composto natural ácido kójico ( <b>LFQM-106</b> ).....	78
FIGURA 26 -	Espectro no IV (KBr) para o composto <b>LFQM-106</b> .....	79
FIGURA 27 -	Estrutura molecular do ácido Kójico – <b>LFQM-106</b> analisada com o auxílio dos softwares ORTEP-3 e Mercury	80
FIGURA 28-	Estrutura cristalina do ácido kójico – <b>LFQM-106</b> analisada com o auxílio dos softwares ORTEP-3 e Mercury	80
FIGURA 29 -	Espectro no ultravioleta de <b>LFQM-106</b> . Curva de cor preta ( <b>LFQM-106+ EtOH</b> ); Curva de cor azul ( <b>LFQM-106+ EtOH+AlCl<sub>3</sub></b> ); Curva de cor vermelha ( <b>LFQM-106+ EtOH+AlCl<sub>3</sub>+HCl</b> )	82
FIGURA 30 -	Espectro no ultravioleta de <b>LFQM-106</b> . Curva de cor preta ( <b>LFQM-106+EtOH</b> ); Curva de cor azul ( <b>LFQM-106+ EtOH+NaOAc</b> ); Curva de cor vermelha ( <b>LFQM-106+ EtOH+NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b> )	82
FIGURA 31 -	Composto natural Fukugetina-4''- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glicosídeo ( <b>LFQM-107</b> ).....	83
FIGURA 32 -	Espectro no IV (KBr) para o composto <b>LFQM-107</b> .....	84
FIGURA 33 -	Espectro no ultravioleta de <b>LFQM-107</b> . Curva de cor preta ( <b>LFQM-107+ EtOH</b> ); Curva de cor azul ( <b>LFQM-107+ EtOH+AlCl<sub>3</sub></b> ); Curva de cor vermelha ( <b>LFQM-107+ EtOH+NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b> )	85
FIGURA 34 -	Espectro no ultravioleta de <b>LFQM-107</b> . Curva de cor preta ( <b>LFQM-107+EtOH</b> ); Curva de cor azul ( <b>LFQM-107+ EtOH+NaOAc</b> ); Curva de cor vermelha ( <b>LFQM-107+ EtOH+NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b> )	85
FIGURA 35 -	Espectrograma de massa do composto <b>LFQM-107</b> em sistema MALDI-TOF modo linear, faixa de 200 a 2000 m/z	86
FIGURA 36 -	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H a 400 MHz de <b>LFQM-107</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ).....	88
FIGURA 37 -	Mapa de contornos de COSY a 400 MHz de <b>LFQM-107</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ).....	89
FIGURA 38 -	Mapa de contornos de gHMQC a 400 MHz de <b>LFQM-107</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ).....	90
FIGURA 39 -	Mapa de contornos de gHMBC a 400 MHz de <b>LFQM-107</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ).....	91
FIGURA 40 -	Composto natural - Fukugetina-7''- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glicosídeo ( <b>LFQM-108</b> ).....	93
FIGURA 41 -	Espectro no IV (KBr) para o composto <b>LFQM-108</b> .....	94
FIGURA 42 -	Espectro no ultravioleta de <b>LFQM-108</b> . Curva de cor preta ( <b>LFQM-108+ EtOH</b> ); Curva de cor azul ( <b>LFQM-108+ EtOH+AlCl<sub>3</sub></b> ); Curva de cor vermelha <b>LFQM-108+ EtOH+AlCl<sub>3</sub>+HCl</b> ).	95
FIGURA 43 -	Espectro no ultravioleta de <b>LFQM-108</b> . Curva de cor preta ( <b>LFQM-108+EtOH</b> ); Curva de cor azul ( <b>LFQM-108+ EtOH+NaOAc</b> ); Curva de cor vermelha ( <b>LFQM-108+ EtOH+NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b> ).	95
FIGURA 44 -	Espectrograma de massa do composto <b>LFQM-108</b> em sistema MALDI-TOF modo linear, faixa de 200 a 2000 m/z	96
FIGURA 45 -	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H a 400 MHz de <b>LFQM-108</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ).....	97

FIGURA 46 -	Mapa de contornos de COSY a 400 MHz para <b>LFQM-108</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ).....	98
FIGURA 47 -	Mapa de contornos de gHMQC a 400 MHz para <b>LFQM-108</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ).....	99
FIGURA 48 -	Mapa de contornos de gHMBC a 400 MHz para <b>LFQM-108</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ).....	100
FIGURA 49 -	Composto natural - Fukugetina ( <b>LFQM-109</b> ).....	102
FIGURA 50 -	Espectro no IV (KBr, cm <sup>-1</sup> ) para a Fukugetina - <b>LFQM-109</b> .....	103
FIGURA 51 -	Espectro no ultravioleta de <b>LFQM-109</b> . Curva de cor preta ( <b>LFQM-109</b> + <b>EtOH</b> ); Curva de cor azul ( <b>LFQM-109</b> + <b>EtOH</b> + <b>AlCl<sub>3</sub></b> ); Curva de cor vermelha ( <b>LFQM-109</b> + <b>EtOH</b> + <b>AlCl<sub>3</sub></b> + <b>HCl</b> )	104
FIGURA 52 -	Espectro no ultravioleta de <b>LFQM-109</b> . Curva de cor preta ( <b>LFQM-109</b> + <b>EtOH</b> ); Curva de cor azul ( <b>LFQM-109</b> + <b>EtOH</b> + <b>NaOAc</b> ); Curva de cor vermelha ( <b>LFQM-109</b> + <b>EtOH</b> + <b>NaOAc</b> + <b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b> )	104
FIGURA 53 -	Espectrograma de massa do composto <b>LFQM-109</b> em sistema MALDI-TOF modo linear, faixa de 200 a 2000 m/z	105
FIGURA 54 -	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H a 400 MHz de <b>LFQM-109</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ).....	107
FIGURA 55 -	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C a 100 MHz de <b>LFQM-109</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ).....	107
FIGURA 56 -	Mapas de contornos gHMQC a 400 MHz de <b>LFQM-109</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ).....	108
FIGURA 57 -	Mapa de contornos gHMBC a 400 MHz de <b>LFQM-109</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ).....	109
FIGURA 58 -	Visão da fukugetina (ORTEP) <b>LFQM-109</b> que mostra o átomo rotulando arbitrário	111
FIGURA 59 -	Visão da fukugetina (MERCURY) <b>LFQM-109</b> e as moléculas de solvente da unidade assimétrica	112
FIGURA 60 -	Reação de obtenção do derivado <b>LFQM-110</b> .....	112
FIGURA 61 -	Espectro no IV (KBr) para o composto <b>LFQM-110</b> .....	113
FIGURA 62 -	Espectro no ultravioleta de <b>LFQM-110</b> . Curva de cor preta ( <b>LFQM-110</b> + <b>EtOH</b> ); Curva de cor azul ( <b>LFQM-110</b> + <b>EtOH</b> + <b>AlCl<sub>3</sub></b> ); Curva de cor vermelha ( <b>LFQM-110</b> + <b>EtOH</b> + <b>AlCl<sub>3</sub></b> + <b>HCl</b> )	114
FIGURA 63 -	Espectro no ultravioleta de <b>LFQM-110</b> . Curva de cor preta ( <b>LFQM-110</b> + <b>EtOH</b> ); Curva de cor azul ( <b>LFQM-110</b> + <b>EtOH</b> + <b>NaOAc</b> ); Curva de cor vermelha ( <b>LFQM-110</b> + <b>EtOH</b> + <b>NaOAc</b> + <b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b> )	115
FIGURA 64 -	Espectrograma de massa do composto <b>LFQM-110</b> em sistema MALDI-TOF modo linear, faixa de 200 a 2000 m/z	116
FIGURA 65 -	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H a 400 MHz para <b>LFQM-110</b> (CDCl <sub>3</sub> ).....	117
FIGURA 66 -	Mapa de contornos COSY a 400 MHz <b>LFQM-110</b> (CDCl <sub>3</sub> ) .....	118
FIGURA 67 -	Espectro de gHMQC a 400 MHz para <b>LFQM-110</b> (CDCl <sub>3</sub> ).....	119

FIGURA 68 -	Espectro de gHMBC a 400 MHz para <b>LFQM-110</b> (CDCl <sub>3</sub> ) .....	120
FIGURA 69 -	Reação de obtenção do derivado <b>LFQM-111</b> .....	122
FIGURA 70 -	Espectro no IV (KBr) para o composto <b>LFQM-111</b> .....	122
FIGURA 71 -	Espectro no ultravioleta de <b>LFQM-111</b> . Curva de cor preta ( <b>LFQM-111</b> + <b>EtOH</b> ); Curva de cor azul ( <b>LFQM-111</b> + <b>EtOH</b> + <b>AlCl<sub>3</sub></b> ); Curva de cor vermelha ( <b>LFQM-111</b> + <b>EtOH</b> + <b>AlCl<sub>3</sub></b> + <b>HCl</b> )	123
FIGURA 72 -	Espectro no ultravioleta de <b>LFQM-111</b> . Curva de cor preta ( <b>LFQM-111</b> + <b>EtOH</b> ); Curva de cor azul ( <b>LFQM-111</b> + <b>EtOH</b> + <b>NaOAc</b> ); Curva de cor vermelha ( <b>LFQM-111</b> + <b>EtOH</b> + <b>NaOAc</b> + <b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b> )	124
FIGURA 73 -	Espectrograma de massa do composto <b>LFQM-111</b> em sistema MALDI–TOF modo linear, faixa de 200 a 2000 m/z.	125
FIGURA 74 -	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H a 400 MHz para <b>LFQM-111</b> (CDCl <sub>3</sub> ) .....	126
FIGURA 75 -	Mapa de contornos COSY a 400 MHz <b>LFQM-111</b> (CDCl <sub>3</sub> ).....	127
FIGURA 76 -	Mapa de contornos gHMQC a 400 MHz para <b>LFQM-111</b> em (CDCl <sub>3</sub> ) .....	128
FIGURA 77 -	Mapa de contornos gHMBC a 400 MHz para <b>LFQM-111</b> em (CDCl <sub>3</sub> ) .....	128
FIGURA 78 -	Reação de obtenção do derivado <b>LFQM-112</b> .....	131
FIGURA 79 -	Espectro no IV (KBr) para o composto <b>LFQM-112</b> .....	132
FIGURA 80 -	Espectro no ultravioleta de <b>LFQM-112</b> . Curva de cor preta ( <b>LFQM-112</b> + <b>EtOH</b> ); Curva de cor azul ( <b>LFQM-112</b> + <b>EtOH</b> + <b>AlCl<sub>3</sub></b> ); Curva de cor vermelha ( <b>LFQM-112</b> + <b>EtOH</b> + <b>AlCl<sub>3</sub></b> + <b>HCl</b> )	133
FIGURA 81 -	Espectro no ultravioleta de <b>LFQM-112</b> . Curva de cor preta ( <b>LFQM-112</b> + <b>EtOH</b> ); Curva de cor azul ( <b>LFQM-112</b> + <b>EtOH</b> + <b>NaOAc</b> ); Curva de cor vermelha ( <b>LFQM-112</b> + <b>EtOH</b> + <b>NaOAc</b> + <b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b> )	133
FIGURA 82 -	Espectrograma de massa do composto <b>LFQM-112</b> em sistema MALDI–TOF modo linear, faixa de 200 a 2000 m/z	134
FIGURA 83 -	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H a 500 MHz para <b>LFQM-112</b> (CDCl <sub>3</sub> ).....	135
FIGURA 84 -	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C a 500 MHz para <b>LFQM-112</b> (CDCl <sub>3</sub> ).....	136
FIGURA 85 -	Mapa de contornos COSY a 500 MHz para <b>LFQM-112</b> (CDCl <sub>3</sub> ).....	137
FIGURA 86 -	Mapa de contornos gHMQC a 500 MHz para <b>LFQM-112</b> ( CDCl <sub>3</sub> ).....	138
FIGURA 87 -	Mapa de contornos gHMBC a 500 MHz para <b>LFQM-112</b> (CDCl <sub>3</sub> ).....	139
FIGURA 88 -	Reação de obtenção do derivado <b>LFQM-109/A</b> .....	141

<b>FIGURA 89 -</b>	Reação de obtenção do derivado <b><u>LFQM-109/B</u></b> .....	141
<b>FIGURA 90 -</b>	Reação de obtenção do derivado <b><u>LFQM-109/C</u></b> .....	142
<b>FIGURA 91 -</b>	Estruturas dos inibidores clássicos: <b>TLCK</b> (tosila-L-lisina clorometil cetona) e <b>E-64</b> ( <i>Trans</i> -Epoxisuccinil-L-Leucilamida(4-guanidino)-butano)	143
<b>FIGURA 92 -</b>	Potencial inibitório máximo dos compostos <b>LFQM-107/112</b> e do conhecido antioxidante BHT pelo teste de poder de redução. Os resultados representam a média ± D.P de três experimentos separados. Absorbância a 700 nm.	145

### LISTA TABELAS

<b>TABELA 1-</b>	Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C para <b><u>LFQM-105</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 400 e 100 MHz).....	77
<b>TABELA 2 -</b>	Dados cristalinos e refinamento de estrutura do <b>Ácido kójico – <u>LFQM-106</u></b> .....	81
<b>TABELA 3 -</b>	Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C para <b><u>LFQM-107</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 400 e 100 MHz).....	92
<b>TABELA 4 -</b>	Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C para <b><u>LFQM-108</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 400 e 100 MHz).....	101
<b>TABELA 5 -</b>	Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C para <b><u>LFQM-109</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 400 e 100 MHz).....	110
<b>TABELA 6 -</b>	Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C para <b><u>LFQM-110</u></b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 e 100 MHz) .....	120
<b>TABELA 7 -</b>	Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C para <b><u>LFQM-111</u></b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 e 100 MHz) .....	129
<b>TABELA 8 -</b>	Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C para <b><u>LFQM-112</u></b> (CDCl <sub>3</sub> , 500 e 125 MHz).....	139
<b>TABELA 9 -</b>	Atividade antioxidante dos compostos naturais e semissintéticos pelos testes de Sequestro de Radical DPPH e Poder Redutor	145
<b>TABELA 10 -</b>	Atividade do composto natural <b><u>LFQM-109</u></b> e seus derivados contra as formas promastigotas e amastigota de <i>L. amazonensis</i>	147
<b>TABELA 11 -</b>	Efeito inibitório dos compostos naturais e semissintéticos em cisteína protease (papaína) e serino protease (tripsina)	149
<b>TABELA 12 -</b>	Efeito inibitório dos compostos naturais e semissintéticos nas enzimas r-CPB2.8 e r-CPB3 de <i>L. mexicana</i> e em lisados de <i>L. (L.) amazonensis</i>	151
<b>TABELA 13 -</b>	Estrutura, nomenclatura e valores de QLog P octanol/água do composto natural <b><u>LFQM-109</u></b> e seus análogos semissintéticos	156

### LISTA DE QUADROS

<b>QUADRO 1</b>	Classes de flavonóides e suas principais características.....	34
<b>QUADRO 2 -</b>	Tipos de biflavonoides definidos conforme o local da ligação interflavonoil.....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\delta$ - Deslocamento químico	<i>dd</i> – Duplete duplo
$\delta_C$ - Deslocamento químico do carbono	DMF – N,N-dimetilformamida
$\mu\text{g}$ – Microgramas	DMSO – <i>d</i> <sub>6</sub> – Dimetilsulfóxido deuterado
$\delta_H$ - Deslocamento químico do hidrogênio	DNA – Ácido desoxirribonucléico
$\mu\text{M}$ - Micromolar	DPPH <sup>•</sup> – Radical 1,1-difenil-2-picrilidrazil (ou 2,2-difenil-1-picrilidrazil)
4-DMAP – 4-dimetilaminopiridina	DPPH-H - difenil-picrilidrazina
ABTS. <sup>+</sup> - Radical catiônico de 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina 6-sulfonada)	DRX – Difração de raios – X
AcOEt – Acetato de Etila	DTT - Ditioneitol
AcOH – Ácido acético	E-64 - <i>Trans</i> -Epoxisuccinil-LLeucilamida(4-guanidino)-butano
<b>LFQM-106</b> - Ácido Kójico	EAEE - Extrato acetato de etila do epicarpo
<b>LFQM-105</b> - 1, 3, 6, 7-tetraidroxixantona	EC <sub>50</sub> – Concentração efetiva de 50%
<b>LFQM-107</b> –Fukugetina-4''- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glicosídeo	EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
<b>LFQM-108</b> –Fukugetina-7''- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glicosídeo	EEE - Extrato Etanólico do Epicarpo
BOC <sub>2</sub> O - Anidrido di- <i>tert</i> -butoxicarbonila	EHE - Extrato Hexânico do Epicarpo
CAT – Catalase	ERNs – Espécies reativas de nitrogênio
CC – Cromatografia em coluna	EROs – Espécies reativas de oxigênio
CC <sub>50</sub> - Concentração citotóxica para 50% de macrófagos	<i>g</i> HMBC – correlação direta entre os núcleos de <sup>1</sup> H com os núcleos de <sup>13</sup> C a eles ligados a longa distância ( <sup>2</sup> <i>J</i> e <sup>3</sup> <i>J</i> )
CCD – Cromatografia em camada delgada	<i>g</i> HMQC – correlação direta entre os núcleos de <sup>1</sup> H com os núcleos de <sup>13</sup> C a eles diretamente ligados ( <sup>1</sup> <i>J</i> )
CDC – Laboratório de identificação de parasitas	GPx – Glutathione peroxidase
CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência	GSH – Glutathione reduzida
cm – Centímetros	HIV – Virus imunodeficiência humana
CoQH – Semiquinona	<i>Hz</i> - Hertz
COSY – correlação direta homonuclear <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H	IC <sub>100</sub> – Concentração inibitória de 100%
CS – Capacidade sequestrante	IC <sub>50</sub> – Concentração inibitória de 50%
<i>d</i> – Duplete	ICEX – Instituto de Ciências Exatas
DAFP – Deformação angular fora do plano	

IV – Infravermelho

*J* – Constante de acoplamento

LaBiQ – Laboratório Interdisciplinar de Química (UNIFAL-MG)

LAREMAR - Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução (UFMG)

LC – Leishmaniose cutânea

LFQM – Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

LV – Leishmaniose visceral

*m* – Múltiplo

MCA - 7-amino 4-metilcumarina

MeOH - Metanol

mm – Milímetros

NaOAc – Acetato de sódio

nm – Nanômetro

OMS – Organização Mundial da Saúde

ppm - Partes por milhão

REA – Relação estrutura atividade

*R<sub>f</sub>* – Fator de retenção em cromatografia em camada delgada

RMN de <sup>13</sup>C – Ressonância magnética nuclear de carbono

RMN de <sup>1</sup>H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RPMI - *meio de cultura*, Roswell Park Memorial Institute

*s* – Simples

SOD – Superóxido-desmutase

TCD<sup>+4</sup> – Linfócito CD4

TCD<sup>+8</sup> – Linfócito CD8

*T<sub>f</sub>* – Temperatura de fusão

TLCK - Tosila-L-lisina clorometil cetona

TMS – Tetrametilsilano

TRIS - Tri(hidroxi metil)aminometano

v/v – Volume por volume

**LFQM-109** - Fukugetina

**LFQM-110** - 7,4<sup>^</sup>,7<sup>^</sup>,3<sup>^^</sup>,4<sup>^^</sup>-penta-*O*-acetil-fukugetina

**LFQM-109/A** - 7,4<sup>^</sup>,7<sup>^</sup>,4<sup>^^</sup>-tetra-*O*-terc-butilcarbonila-fukugetina

**LFQM-111** - 7,4<sup>^</sup>,7<sup>^</sup>,3<sup>^^</sup>,4<sup>^^</sup>-penta-*O*-metil-fukugetina

**LFQM-112** - 7,4<sup>^</sup>,7<sup>^</sup>,3<sup>^^</sup>,4<sup>^^</sup>-tetra-*O*-butanoil-fukugetina

**LFQM-109/B** - 7,4<sup>^</sup>,7<sup>^</sup>,4<sup>^^</sup>-tetra-*O*-butoxi-fukugetina

**LFQM-109/C** - 4<sup>^</sup>,4<sup>^^</sup>-di-*O*-succinoil-fukugetina

Z-Phe-Arg-MCA-carbobenzoxicarbonil-Phe-Arg-7-amino-4-metilcumarina

$\lambda$  – Comprimento de onda

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>24</b>
<b>2.1 PLANTAS MEDICINAIS.....</b>	<b>24</b>
<b>2.2 FAMÍLIA GUTTIFERAE.....</b>	<b>25</b>
<b>2.3 O GÊNERO <i>Garcinia</i>.....</b>	<b>25</b>
<b>2.4 A ESPÉCIE <i>Garcinia brasiliensis</i>.....</b>	<b>26</b>
<b>2.5 ANTIOXIDANTES.....</b>	<b>27</b>
<b>2.5.1 Radicais Livres.....</b>	<b>28</b>
<b>2.5.2 Testes para a determinação da atividade antioxidante.....</b>	<b>29</b>
2.5.2.1 Atividade Seqüestrante de Radicais DPPH.....	29
2.5.2.2 Poder redutor.....	31
<b>2.5.3 Flavonóides como Antioxidantes.....</b>	<b>31</b>
<b>2.6 COMPOSTOS POLIFENÓLICOS.....</b>	<b>33</b>
<b>2.6.1 Flavonóides.....</b>	<b>33</b>
<b>2.6.2 Biflavonoides.....</b>	<b>34</b>
<b>2.7 A <i>Leishmania</i>.....</b>	<b>36</b>
<b>2.7.1 <i>Leishmania</i> – o parasito.....</b>	<b>37</b>
<b>2.7.2 As Leishmanioses.....</b>	<b>39</b>
2.7.2.1 Leishmaniose visceral (LV) – forma visceral.....	41
2.7.2.2 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) – forma cutânea.....	42
<b>2.7.3 O Tratamento da LTA.....</b>	<b>44</b>
<b>2.7.4 Radicais derivados de oxigênio e nitrogênio e sua importância para regular o parasitismo.....</b>	<b>45</b>
<b>2.8 PROTEASES .....</b>	<b>46</b>
2.8.1 Serino-Proteases: Tripsina.....	47
2.8.2 Cisteíno-Proteases: Papaína.....	48
2.8.3 Cisteíno-protease do gênero <i>Leishmania</i> .....	50
<b>2.9 MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS E ESTUDOS DE CORRELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE (REA).....</b>	<b>50</b>
<b>2.10 MEMBRANA BIOLÓGICA E O TRANSPORTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS.....</b>	<b>51</b>
<b>3 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>53</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>54</b>
<b>5 PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>56</b>
<b>5.1 MATERIAIS, MÉTODOS E INSTRUMENTOS.....</b>	<b>56</b>
<b>5.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....</b>	<b>58</b>

<b>5.3 ESTUDO FITOQUÍMICO.....</b>	<b>58</b>
5.3.1 Preparo dos extratos.....	58
5.3.2 Isolamento dos constituintes químicos do EAEE.....	59
<b>5.4 OBTENÇÃO DE DERIVADOS DA FUKUGETINA</b>	<b>61</b>
5.4.1 Derivado semissintético: 7,4',7'',3''',4'''-penta- <i>O</i> -acetil-Fukugetina <u>LFOM-110</u> .....	62
5.4.2 Derivado semissintético: 7,4',7'',3''',4'''-penta- <i>O</i> -metil-Fukugetina <u>LFOM-111</u> .....	62
5.4.3 Derivado semissintético: 7,4',7'',3''',4'''-penta- <i>O</i> -butanoil-Fukugetina <u>LFOM-112</u> .....	63
5.4.4 Derivado semissintético: 7,4',7'',4'''-tetra- <i>O</i> -terc-butoxicarbonil-Fukugetina <u>LFOM-109/A</u> .....	64
5.4.5 Derivado semissintético: 7,4',7'',4'''-tetra- <i>O</i> -butoxi-fukugetina <u>LFOM-109/B</u> .....	65
5.4.6 Derivado semissintético: 4',4'''-di- <i>O</i> -succinoil-fukugetina <u>LFOM-109/C</u> .....	65
<b>5.5 ENSAIOS DE ATIVIDADE.....</b>	<b>66</b>
5.5.1 Avaliação da Atividade Antioxidante <i>in vitro</i> .....	66
5.5.1.1 Avaliação do Poder Sequestrante de Radicais DPPH.....	66
5.5.1.2 Avaliação do Poder Redutor dos Constituintes Químicos.....	67
5.5.2 Testes Antiparasitários.....	68
5.5.2.1 Ensaio da atividade antipromastigota.....	68
5.5.2.2 Ensaio da atividade anti-amastigota.....	67
5.5.2.3 Avaliação Citológica.....	67
5.5.3 Ensaio Enzimáticos Fluorimétricos.....	69
5.5.3.1. Determinação do tempo necessário para a inibição enzimática.....	69
5.5.3.2 Papaína.....	69
5.5.3.3 Tripsina.....	69
5.5.3.4 Atividade inibitória contra as isoformas r-CPB2.8 e r-CPB3 de <i>L. mexicana</i> .....	70
5.5.3.5 Ensaio da atividade leishmanicida em lisados de <i>L. amazonensis</i> .....	71
<b>5.6 Análises Estatística.....</b>	<b>71</b>
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>72</b>
<b>6.1 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E DOS DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS.....</b>	<b>72</b>
6.1.2 Composto Natural: 1,3,6,7-tetraidroxixantona ( <u>LFQM-105</u> ).....	72
6.1.3 Composto Natural : Ácido kójico ( <u>LFQM-106</u> ).....	78
6.1.4 Composto Natural: Fukugetina-4'''- <i>O</i> - $\beta$ -D-glicosídeo ( <u>LFQM-107</u> ).....	83
6.1.5 Composto Natural: Fukugetina-7''- <i>O</i> - $\beta$ -D-glicosídeo ( <u>LFQM-108</u> ).....	93

6.1.6 Composto natural: Fukugetina ( <u>LFOM-109</u> ).....	102
6.1.7 Derivado semissintético: 7,4',7'',3''',4''''-penta- <i>O</i> -acetil-fukugetina ( <u>LFOM-110</u> )..	112
6.1.8 Derivado semissintético: 7,4',7'',3''',4''''-penta- <i>O</i> -metil-fukugetina ( <u>LFOM-111</u> ) ..	121
6.1.9 Derivado semissintético: 7,4',7'',3''',4''''-penta- <i>O</i> -butanoil-fukugetina ( <u>LFOM-112</u> ).....	130
6.1.10 Derivado semissintético: 7,4',7'',4''''-tetra- <i>O</i> -terc-butoxicarbonil-fukugetina ( <u>LFOM-109/A</u> ) ..	141
6.1.11 Derivado semissintético: 7,4',7'',4''''-tetra- <i>O</i> -butoxi-fukugetina ( <u>LFOM-109/B</u> )..	141
6.1.12 Derivado semissintético: 4',4''''-di- <i>O</i> -succinoil-fukugetina ( <u>LFOM-109/C</u> ).....	142
6.2 Ensaio de Atividade.....	142
6.2.1 Atividade Antioxidante.....	143
6.2.2 Testes Antiparasitários.....	146
6.2.2.1 Atividade leishmanicida contra as formas promastigotas e amastigotas de <i>L.(L.) amazonensis</i> .....	146
6.2.3 Ensaio Enzimático Fluorimétrico.....	147
6.2.3.1 Determinação do tempo de inibição enzimática pelos compostos naturais e semissintéticos.....	147
6.2.3.2 Proteases – Papaína e Tripsina.....	148
6.2.3.3 Atividade inibitória nas enzimas r-CPB2.8 e a isoforma r-CPB3 de <i>L. mexicana</i> e em lisados de <i>L. amazonensis</i> .....	149
6.4 RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE (REA).....	151
6.4.1 REA: Atividade Antioxidante.....	152
6.4.2 REA: Atividade Antiparasitária.....	153
6.4.3 REA: Atividade Enzimática.....	157
7 CONCLUSÕES.....	159
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	160
ANEXOS.....	172
A – Dados Espectroscópicos.....	172

## 1 INTRODUÇÃO

Desde as mais antigas civilizações o homem tem utilizado plantas para fins medicinais e alimentares. Todos os povos, em todos os continentes utilizam plantas com propriedades terapêuticas. É admirável que esse conjunto de conhecimentos tenha subsistido durante milênios, aprofundando-se e diversificando-se (CARVALHO, 2004).

O desenvolvimento dos fármacos a partir de plantas pode ser dividido em três períodos. O primeiro período entre 1800 e 1900 foi marcado pela descoberta de vários fármacos entre eles, morfina da *Papaver somniferum*, efedrina da *Ephedra sinica*, quinina da *Cinchona calisaya*, emetina e a cefaelina da *Cephalis ipeccacuanha*, e a salicina de *Salix alba* (que posteriormente originou o ácido acetilsalicílico). No segundo período, entre 1901 e 1970/80 aparecem somente os antibióticos obtidos dos fungos como produtos naturais de importância, sendo este período marcado pela síntese e consideração das plantas medicinais sem valor científico. No terceiro período, que compreende de 1970/80 até o presente, ocorre o retorno à busca de fitofármacos vegetais com a descoberta de inúmeros fármacos, citando como exemplos a artemisinina (presente na *Artemisia annua*) e o paclitaxel (taxol) isolado de *Taxus brevifolia* (YUNES et al., 2001).

Como diversidade estrutural é fundamental na pesquisa para atingir diferentes alvos biológicos, os pesquisadores voltaram aos estudos dos produtos naturais, considerando que durante os milhões de anos da evolução a seleção natural realizou um processo de química biológica realmente inigualável. Assim, embora cerca de 100 mil compostos oriundos de plantas, e aproximadamente 20 mil compostos de microorganismos, tenham sido isolados e caracterizados, as fontes de metabólitos secundários são extensas e variadas, o que aumentam as possibilidades de se encontrar novas e diferentes estruturas com atividades de extrema importância para a química medicinal e para a agricultura (YUNES et al., 2001).

Não somente plantas medicinais continuam sendo utilizadas em países em desenvolvimento, mas também em países onde a medicina convencional é predominante. Dados de 2006 revelam que o mercado mundial de fitoterápicos faturou US\$ 6,6 bilhões nos EUA e US\$ 8,5 bilhões na Europa, sendo a Alemanha o maior mercado mundial (VIEGAS et al., 2006). O interesse em medicamentos oriundos de

plantas deve-se a algumas razões como por ser de fácil acesso e de baixo custo, podendo levar ao uso abusivo e mesmo incorreto por parte da população, causando efeitos indesejáveis, além de muitos outros problemas (RATES, 2001). O potencial das plantas como alvo de pesquisa na busca por novos medicamentos, com novos mecanismos de ação, alta seletividade e atividade é ainda pouco explorado, uma vez que, entre cerca de 250.000–350.000 espécies de plantas existentes no mundo, aproximadamente 35.000, e menos que 2500 tem sido caracterizados como metabólitos secundários (CECHINEL-FILHO et al., 2001). Dentre as florestas tropicais do mundo, as quais possuem um valor estimado de 500.000 espécies de plantas, menos de 1% tem sido pesquisada para atividade medicinal (DI STASI et al., 1999).

A importância e a potencialidade química das plantas medicinais podem ser identificadas com dados obtidos em pesquisas científicas, onde se constata que aproximadamente 25% dos medicamentos prescritos em todo mundo, originam-se de plantas, sendo 121 compostos ativos utilizados em uso comum. De 252 medicamentos considerados como básicos e essenciais pela Organização Mundial da Saúde (OMS), 11% são exclusivamente obtidos de plantas medicinais e um número significativo são fármacos sintéticos obtidos de fonte natural (WHO, 2010). Ainda de acordo com a OMS, aproximadamente 80% da população mundial utiliza medicamentos tradicionais, básicos para a saúde, a maioria envolvendo uso de extrato de plantas ou compostos ativos isolados das mesmas (WHO, 2010). Vários produtos naturais isolados de plantas superiores, após vários estudos, tornaram-se agentes clínicos. Como exemplos pode-se citar os antimaláricos quinina e quinidina isolados da *Cinchona* spp, digoxina, um glicosídeo cardíaco, obtido da planta *Digitalis* spp, atropina da *Atropa belladonna*, morfina e codeína da *Papaver somniferum* além de muitas outras (PHILLIPSON, 2001).

Há crescente conscientização em torno do grande potencial benéfico que os compostos naturais trazem aos seres humanos, principalmente no que diz respeito à atividade antioxidante e leishmanicida. A eles são atribuídas atividades fisiológicas e/ou farmacológicas diversas, entre elas pode-se citar o efeito vasodilatador, o efeito sedativo em ratos, o efeito preventivo de trombose, os efeitos favoráveis à visão humana, entre outros. Na seleção de antioxidantes, leishmanicidas e de enzimáticos, são desejáveis que os possíveis fármacos possuíssem atividade em baixas concentrações; ausência de efeitos indesejáveis; compatibilidade e fácil aplicação; estabilidade nas condições de

processamento e armazenamento, e que o composto e seus produtos de oxidação não sejam tóxicos, mesmo em doses muito maiores das que normalmente seriam ingeridas ou administradas.

Porém o uso empírico e pouco cuidadoso das plantas, fora de seu contexto original e sem respaldo científico, se mostra inadequado para a implantação da fitoterapia. Como um sólido recurso terapêutico no atendimento de algumas das necessidades básicas dos serviços de saúde, como tem sido recomendado por órgãos governamentais (SOUZA et al., 2003).

Ainda nesta perspectiva, o avanço tecnológico do domínio das patentes internacionais sobre nossas plantas, os grandes investimentos da indústria nacional de fitoterápicos na pesquisa fitoquímica, farmacológica e clínica têm representado fator determinante na busca de novos fármacos (CECHINEL-FILHO et al., 2001).

É dentro desse contexto que o Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal (LFQM) da UNIFAL-MG, vêm contribuindo não somente para a fitoquímica clássica (isolamento e determinação estrutural), mas também realizando trabalhos que envolvem atividade biológica de plantas e compostos isolados das mesmas e que apresentem algum tipo de uso na medicina tradicional, além das modificações estruturais realizadas nestes compostos naturais com a finalidade de potencializar suas atividades biológicas.

Dentre as várias plantas empregadas na medicina tradicional brasileira, as pertencentes à família Guttiferae são utilizadas na cura de várias enfermidades. A espécie *G. brasiliensis* é empregada com finalidades terapêuticas pela população do Estado de Minas Gerais, principalmente contra artrites. Sendo, que esta espécie merece mais atenção, uma vez que a mesma é naturalmente encontrada em todo território brasileiro e pode vir a ser cultivada para garantir o desenvolvimento sustentável, uma vez agregado valor econômico aos compostos nela presente.

Neste sentido, este trabalho tem por objetivo o estudo químico do extrato acetato de etila do epicarpo (EAEE) dos frutos de *G. brasiliensis* e a obtenção de derivados semissintéticos do biflavonoide natural fukugetina, bem como, estudos da relação estrutura atividade, caracterização dos derivados e as avaliações das atividades antioxidante, antileishmania e antiproteolítica.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 PLANTAS MEDICINAIS

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenham sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa, merecendo destaque a civilização Egípcia, Greco-romana e Chinesa. A medicina tradicional chinesa desenvolveu-se com tal grandiosidade e eficiência que até hoje muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos (VIEGAS et al., 2006).

A natureza, de um modo geral, é a responsável pela produção da maioria das substâncias orgânicas conhecidas e o reino vegetal é responsável pela maior parcela da diversidade química conhecida e registrada na literatura científica. A variedade e a complexidade das macromoléculas que constituem os metabólitos secundários das plantas e organismos marinhos ainda são inalcançáveis por métodos laboratoriais. Isto seria a consequência direta de milhões de anos de evolução, atingindo um refinamento elevado de formas de proteção e resistência às intempéries do clima, poluição e predadores (MONTANARI et al., 2001).

A utilização das plantas como fonte de medicamentos para o tratamento das enfermidades que acometem a espécie humana, remonta à idade antiga. Além disso, devido ao elevado custo de muitos medicamentos, a população de muitos países pobres e em desenvolvimento, que não tem acesso à medicina moderna, tem se utilizado dos produtos naturais para o tratamento de suas enfermidades. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) cerca de 65% a 80% da população mundial (WHO, 2010) (estimada em 9 bilhões de pessoas) não têm acesso ao atendimento primário de saúde e recorre à medicina popular, especialmente às plantas medicinais, na procura do alívio para muitas doenças (SIMÕES et al., 2003; CALIXTO, 2003).

## 2.2 FAMÍLIA GUTTIFERAE

A família de Guttiferae, também conhecida como Clusiaceae, pertence à classe das angiospermas e é caracterizada pela presença significativa de látex na maioria de suas espécies. Esta família possui 47 gêneros (por exemplo: *Vismia*, *Garcinia*, *Clusia*, *Cratoxylum*, *Harungana*, *Mesua*, *Hypericum*, *Kielmeyera*) e mais de 1000 espécies que se agrupam em seis subfamílias que estão distribuídas amplamente por todo o Brasil (DEROGIS et al., 2008).

As plantas desta família são lenhosas, arbóreas ou arbustivas, com folhas inteiras de disposição alterna, oposta ou verticiladas, sem estípulas, com flores geralmente vistosas isoladas, ou reunidas em inflorescência. Flores cíclicas ou hemicíclicas, geralmente hermafroditas, ou de sexo separado, de simetria radial (JOLY, 1993).

A família Guttiferae é dotada de uma ampla variedade de metabólitos biologicamente ativos como: antraquinonas, flavonóides, xantonas, floroglucínóis e benzofenonas (OLIVEIRA et al., 2005). Graças a essa gama de constituintes, espécies desta família têm sido relatadas por Zagotoa et al. (2006) como antidepressiva, por Almeida et al. (2006) como antibacteriana, por Boonsria et al. (2006) como citotóxica, por Rao et al. (2004) como antimalárica e antioxidante, por Joseph et al. (2005) como antiaflatoxinogênica e por Lenta et al. (2007) como tripanocida.

## 2.3 O GÊNERO *Garcinia*

Vários estudos químicos vêm demonstrando que o gênero *Garcinia* é uma fonte importante com uma grande diversidade de metabólitos biologicamente ativos, incluindo benzofenonas polipreniladas, flavonóides, proantocianinas e xantonas, que têm ações comprovadas contra várias doenças (DEROGIS et al., 2008).

Extratos de *G. pedunculata* demonstraram atividade antioxidante e antimutagênica; a *G. cambogia* vem sendo utilizada no tratamento de obesidade (HAYAMIZU et al., 2003); o extrato aquoso de *G. mangostana* demonstrou *in vitro* atividade antileucêmica e o extrato de *G. pedicillata* apresentou atividade contra a forma amastigota de *L. amazonensis* (BILLO et al., 2005), assim como o extrato bruto hexânico de *G. lucida*, que apresentou atividade sobre formas promastigotas de *L.*

*donovani* e compostos isolados de *G. livingstonei*, que apresentaram atividade leishmanicida sobre formas amastigotas de *L. infantum* (FOTIE et al., 2007).

Dos frutos de *G. cowa*, isolaram as cowaxantonas A-E, e a elas foi atribuída atividade antibacteriana. Guttiferonas isoladas de diferentes gêneros e espécies da família Guttiferae demonstraram, *in vitro*, efeitos citopáticos contra o HIV. O ácido gambógico, isolado da resina extraída da árvore de *G. hanburyi*, apresentou atividade anticâncer; sementes de *G. kola* contêm uma complexa mistura de biflavonoides, benzofenonas preniladas e xantonas. Estudos químicos de frutos de *Rheedia gardneriana* demonstraram a presença de alguns constituintes com considerável poder antioxidante, como os biflavonoides (fukugetina e fukugesídeo), xantonas, benzofenonas poliisopreniladas, triterpenos e cumarinas (VIEIRA et al., 2001).

#### **2.4 A ESPÉCIE *Garcinia brasiliensis***

A espécie *G. brasiliensis* (Mart.), ou *Rheedia brasiliensis* Planch e Triana, é nativa da região Amazônica e é cultivada em todo o território brasileiro. É conhecida popularmente como bacuri, bacupari, porocó e bacuripari, no Brasil e como guapomo na Bolívia. É uma espécie nativa do Brasil, Paraguai e norte da Argentina (PEREIRA et al., 2010).

O bacuparizeiro é uma árvore em forma de pirâmide rica em um látex amarelo, com folhas em formato de lança e flores abundantes e polígamas. Os frutos são comestíveis (FIGURA 1A), ovais com a casca (FIGURA 1B) elástica e amarela que pode ser facilmente removida, a polpa é branca, suave, saborosa e possui 2 a 3 sementes (MORTON *et al.*, 1987). Como descrito por Villagómez Rojas (1990), as sementes apresentam forma elipsoidal, com coloração externa castanha e com linhas claras, longitudinalmente, bem visíveis, semelhantes a nervuras. Cerca de 8 a 9% do peso das sementes é referente ao óleo que é utilizado em cataplasmas para o tratamento de feridas e panarício (espécie de furúnculo). A infusão da polpa possui ação narcótica semelhante à nicotina (MORTON *et al.*, 1987). Os frutos são ainda utilizados no tratamento de tumores, inflamações do trato urinário, artrite e para aliviar dores.



FIGURA 1- Imagens dos frutos e epicarpis de *G. brasiliensis*.

Habitantes dos países Tailândia, Sirilanka, Malásia, Filipinas e Índia, usam o pericarpo ou o fruto maduro como opção em medicina tradicional para o tratamento de dor abdominal, diarreia, disenteria, infecção de feridas, supuração e ulcera crônica (CUI et al., 2010).

## 2.5 ANTIOXIDANTES

Atualmente existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo. A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Esses radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados espécies reativas de oxigênio (**EROs**) ou espécies reativas de nitrogênio (**ERNs**) (BARREIROS et al., 2006). No organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA. Dessa forma, encontram-se relacionados com várias patologias, tais como artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (BARREIROS et al., 2006).

O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. De acordo com Halliwell et al. (2000) “Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a

oxidação do mesmo”. Os antioxidantes produzidos pelo corpo agem enzimaticamente, a exemplo da GPx, CAT e SOD ou, não enzimaticamente a exemplo de GSH, peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina), ácido diidrolipóico e CoQH. Além dos antioxidantes produzidos pelo corpo, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina-E),  $\beta$ -caroteno (pro-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina-C), e compostos fenólicos onde se destacam os flavonóides e dímeros de flavonóides. Outro interesse voltado aos antioxidantes é a sua aplicação na indústria, para a indústria de cosméticos, fármacos e alimentos, prevenindo a decomposição oxidativa desses pela ação da luz, temperatura e umidade (BARREIROS et al., 2006).

### 2.5.1 Radicais Livres

O termo radical livre é frequentemente usado para designar qualquer átomo ou molécula com existência independente, contendo um ou mais elétrons não pareados, nos orbitais externos. Um elétron não pareado é aquele que ocupa um orbital atômico ou molecular isoladamente (VANNUCCHI et al., 1999).

A presença de um ou mais elétrons não pareados determina uma atração para um campo magnético e, algumas vezes, torna a substância altamente reativa. Radicais livres podem ser formados pela perda de um único elétron ou pelo ganho de um elétron de uma substância não radical. Eles podem ser formados quando uma ligação covalente é quebrada e um elétron de cada um dos pares permanece em cada átomo, em processo chamado **fissão homolítica**. A energia necessária para dissociar a ligação covalente pode ser fornecida pelo calor, radiação eletromagnética ou outras fontes. A grande maioria dos radicais livres possui como característica uma meia-vida muito curta, indo de minutos a nanossegundos, sendo capazes de reagir rapidamente com vários compostos ou atingir alvos celulares, como as membranas (VANNUCCHI et al., 1999).

Os radicais livres promovem reações com substratos biológicos podendo ocasionar danos às biomoléculas e, conseqüentemente, afetar a saúde humana. Ocorrendo na membrana, a oxidação de lipídeos interfere no transporte passivo e ativo normal através da membrana, ou ocasiona a ruptura dessas levando a morte celular (BARREIROS et al., 2006).

Para evitar os danos causados pelos radicais livres, o organismo desenvolveu vários mecanismos de defesa, isto é, potenciais de neutralização das ações dos radicais

livres, chamados antioxidantes. Estes antioxidantes estão em permanente atividade no organismo, visto que a produção de energia no organismo é uma das principais causas da formação de radicais, necessitando estarem presentes em quantidades suficientes para neutralizar os efeitos dos radicais livres normalmente produzidos. Quando esta equivalência não existe, dizemos que está ocorrendo um estresse oxidativo (VANNUCCHI et al., 1999).

## 2.5.2 Testes para a determinação da atividade antioxidante

É perfeitamente possível que um antioxidante atue como protetor em um determinado sistema, mas que falhe em outro, devido ao seu mecanismo de ação. Portanto para avaliar a atividade antioxidante de um composto é necessário testá-la sob diferentes mecanismos.

Dentre essas técnicas e/ou métodos mais comumente utilizados para avaliação da atividade antioxidante *in vitro*, por serem rápidos, sensíveis e demandarem pouca quantidade de amostra, estão aqueles que envolvem compostos cromogênicos de uma **EROs**. A presença do antioxidante leva ao desaparecimento destes radicais cromogênicos. Um exemplo é o DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila), um cromóforo extremamente estável que apresenta um pico de absorção no comprimento de onda de 517 nm em solução metanólica ou etanólica, pois possui uma coloração violeta intensa. Conforme o DPPH vai sendo reduzido por um antioxidante, seu elétron se torna emparelhado e a absorvidade desaparece. Outro método que avalia a atividade antioxidante é a determinação do poder de redução que apresenta um pico de absorção no comprimento de onda de 700 nm em solução metanólica ou etanólica, no qual se verifica modificação da coloração de amarelo para azul da Prússia, que indica a capacidade de um composto de doar elétrons, e conseqüentemente, de reduzir os intermediários oxidativos.

### 2.5.2.1 Atividade Sequestrante de Radicais DPPH

A atividade sequestrante de radicais DPPH<sup>•</sup> é considerada um método clássico, simples e rápido de avaliação da atividade antioxidante; principalmente de frutas, sucos e extratos vegetais. O método baseia-se na redução do radical DPPH<sup>•</sup> (roxo) na sua

hidrazina (amarelo) correspondente, através da sua reação com doadores de hidrogênio (RH), ou mesmo outros radicais (A<sup>•</sup>) (GÜLÇİN et al., 2005) (FIGURA 2)

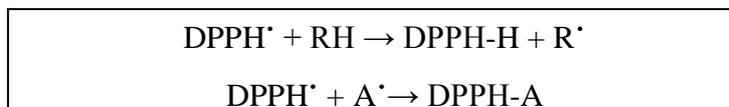


FIGURA 2 – Possíveis reações com o radical DPPH<sup>•</sup>.

A redução do radical à sua hidrazina correspondente é caracterizada pela mudança de cor da solução de roxo para amarelo, o que se traduz no decréscimo na absorvância determinado espectrofotometricamente no  $\lambda = 515\text{-}528\text{ nm}$  (FIGURA 3).

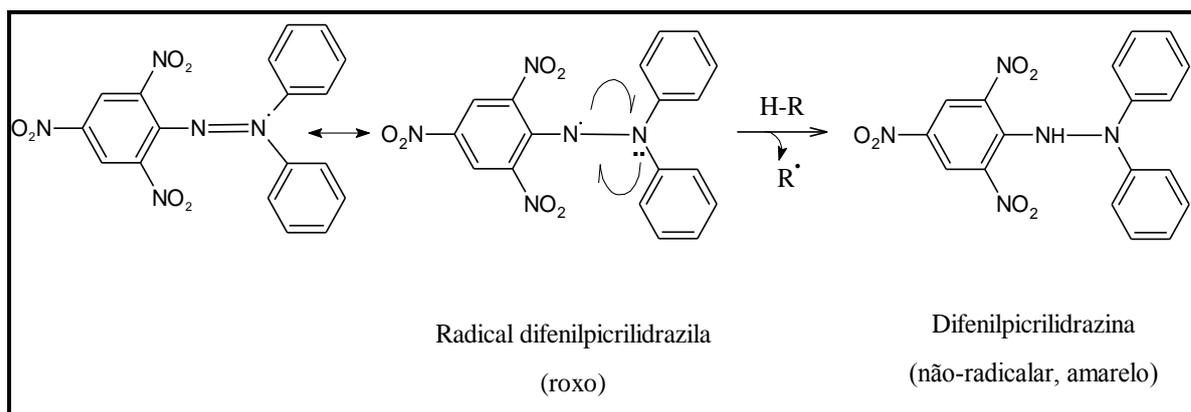


FIGURA 3 – Estrutura do radical DPPH e de sua hidrazina correspondente.

O radical é estável devido à deslocalização de um elétron livre ao longo de toda a molécula. Além disso, é um radical “pronto” para ser dissolvido, não precisa ser gerado, assim como o ABTS<sup>•+</sup>. O DPPH<sup>•</sup> pode ser apenas dissolvido em meio orgânico, especialmente alcoólico, o que resulta em uma limitação importante quanto ao seu uso para determinar a atividade antioxidante de compostos hidrofílicos (ARNAO, 2000).

A cinética de reação depende da natureza do composto antioxidante. O tempo de reação recomendado é de 30 minutos, mas existem trabalhos descrevendo 5 e 10 minutos. Dessa forma o ideal é acompanhar a cinética da reação até que se atinja o *plateau*. O tempo de reação tem sido proposto como um parâmetro importante na caracterização da atividade antioxidante (ARNAO, 2000).

A capacidade sequestrante (CS) tem sido expressa sob diferentes parâmetros como EC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>100</sub> ou porcentagem de DPPH reduzido. Entre eles, o mais recomendado à capacidade sequestrante em porcentagem e o seu cálculo é realizado de acordo com a equação:

$$CS\% = 100 \times \frac{(A_b - (A_{aa} - A_a))}{A_b}$$

$A_b$ : absorvância da solução de DPPH sem a presença do antioxidante. No lugar do antioxidante é acrescentado o veículo usado na sua preparação para atingir a mesma concentração final.

$A_{aa}$ : absorvância da solução de DPPH com o antioxidante em teste.

$A_a$ : absorvância da solução da amostra na mesma concentração final quando em solução com o radical, mas sem a presença do mesmo. Este item, acrescentado à equação, permite retirar a possível interferência da cor da própria amostra.

### 2.5.2.2 Poder redutor

O método de poder redutor é baseado na redução de  $Fe^{3+}$  do ferricianeto de potássio a  $Fe^{2+}$ . A espécie resultante da redução na presença de  $Fe^{3+}$ , acrescentado posteriormente através da adição de  $FeCl_3$ , forma uma complexo azul conhecido como azul da Prússia (FIGURA 4). Quanto maior o poder redutor, maior a formação do complexo azul e consequentemente maior será a absorvância determinada espectrofotometricamente a 700 nm.



FIGURA 4 – Reação de formação do complexo azul da Prússia.

### 2.5.3 Flavonóides como Antioxidantes

De modo geral, os polifenóis e em particular os flavonóides possuem estrutura ideal para o sequestro de radicais, sendo antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E. A atividade antioxidante dos flavonóides depende da sua estrutura e pode ser determinada por cinco fatores: reatividade como agente doador de H e elétrons, estabilidade do radical flavanoil formado, reatividade frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição e solubilidade e interação com as membranas.

A atividade de sequestro está diretamente ligada ao potencial de oxidação dos flavonóides e das espécies a serem sequestradas. Quanto menor o potencial de oxidação do flavonóide, maior é sua atividade como sequestrador de radicais livres. Quanto maior

o número de hidroxilas, maior a atividade como agente doador de H e de elétrons. Flavonóides monoidroxilados apresentam atividade muito baixa. Os flavonóides com múltiplas hidroxilas (FIGURA 5) como a quercetina (1), miricetina (2), luteolina (3), fustina (4), eriodictiol (5) e taxifolina (6) possuem forte atividade antioxidante quando comparados ao  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno, glutatona, ácido úrico e bilirrubina (HALLIWELL et al., 2000; YANG et al., 2001).

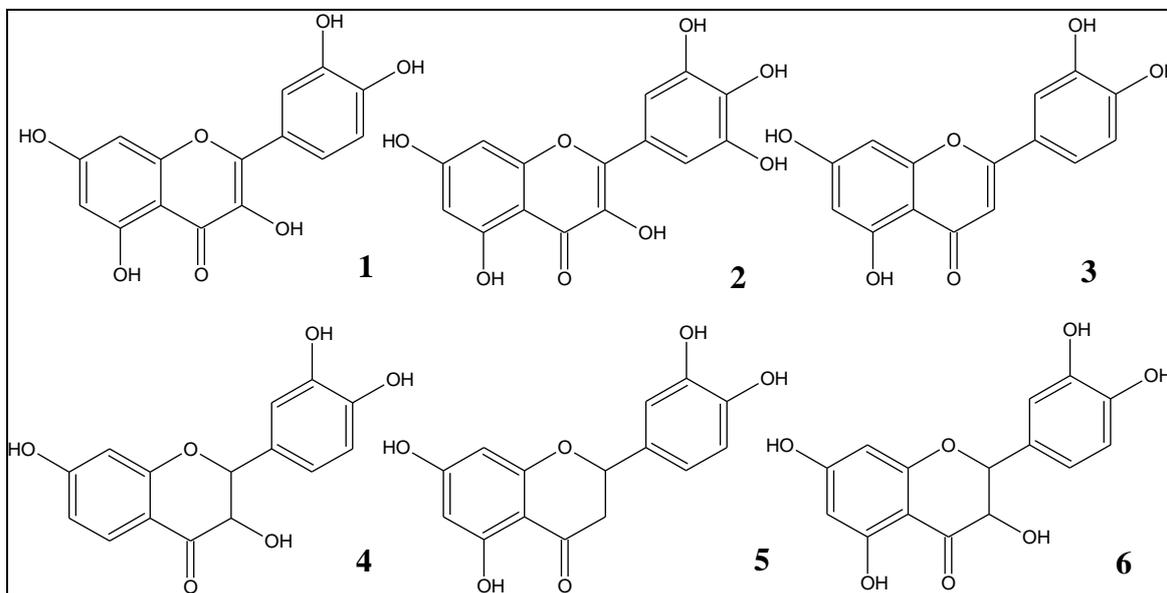


FIGURA 5 - Flavonoides antioxidantes com múltiplas hidroxilas

O último fator importante que influencia a atividade antioxidante dos flavonóides é a sua interação com as biomembranas. A lipofilicidade do flavonóide indica a incorporação desse pela membrana, que é alvo da maioria das **EROs** e **ERNs**. Assim, deve haver uma concentração mínima do flavonóide por ácido graxo, de modo a assegurar a presença de uma de suas moléculas próxima ao sítio de ataque do radical. Flavonóides que possuem uma cadeia de açúcares ligada em sua estrutura são muito polares, não sendo assimilados pela membrana, porém, nesta forma eles podem ser armazenados em vesículas, possuindo um tempo maior de permanência no organismo. Os flavonóides que são assimilados pelas membranas exercem a função de moduladores de fluidez. Restringindo essa fluidez os flavonóides geram um impedimento físico para a difusão das **EROs** e **ERNs**, de modo que decresce a cinética das reações responsáveis pelo estresse oxidativo (BARREIROS et al., 2006).

## 2.6 COMPOSTOS POLIFENÓLICOS

### 2.6.1 Flavonóides

Os flavonóides pertencem a um grupo de substâncias com variável estrutura fenólica e é encontrado em frutas, legumes, grãos, raízes, talos, flores, chá e vinho. O consumo destes produtos naturais era a muito tempo conhecido pelos efeitos benéficos na saúde. Mais de 4000 flavonóides já foram identificados, muitos dos quais são responsáveis pelas cores atrativas das flores, frutos e folhas. Pesquisas com flavonóides receberam impulso depois da descoberta do Paradoxo Francês, que reduziu a taxa de doenças cardiovasculares em populações do Mediterrâneo em associação com o consumo de vinho e de alimentos gordurosos. Os flavonóides do vinho são responsáveis, pelo menos em parte, por este efeito. Além disso, estudos de epidemiologia, sugerem um papel protetor dos flavonóides contra doenças do coração (NIJVELDT et al., 2001).

Até 50 anos atrás, informação sobre o mecanismo de ação dos flavonóides era desconhecida. Em 1930 uma nova substância foi isolada de laranjas, o qual se acreditava ser mais um membro da classe das vitaminas, que foi designada como vitamina P. Quando ficou claro que se tratava de um flavonoide (rutina) vários grupos de pesquisa iniciaram o isolamento do mesmo flavonóide ou de outros e o estudo do mecanismo de ação desse flavonóide.

A estrutura química geral dos flavonóides é facilmente reconhecida pela presença de um esqueleto aromático  $C_6-C_3-C_6$ , um anel cromano (anel benzênico-A + anel heteronuclear-C) ligado a um anel benzênico (anel B) (ROBBERS et al., 1997). O QUADRO 1 apresenta algumas das principais classes de flavonóides, assim como algumas das suas principais características.

QUADRO 1: Classes de flavonóides e suas principais características.

Classes	Número aproximado de estruturas conhecidas	Características
Flavonas, flavonóis e seus <i>O</i> -heterosídeos	1660	Copigmentação em flores, protetores contra raios UV nas folhas
Flavonas, flavonóis e seus <i>O</i> -heterosídeos	303	Copigmentação em flores; protetores contra raios UV em folhas
Antocianinas	256	Pigmentação do vermelho até o azul
Chalconas	197	Pigmentação amarela
Auronas	29	Pigmentação amarela
Di-hidro-flavonóis	110	Estão presentes freqüentemente em tecidos de madeiras
Flavanonas	319	Podem apresentar sabor amargo
Di-hidro-chalconas	71	Podem apresentar sabor amargo
Flavanas, leucoantocianidinas e proantocianidinas	309	Substâncias adstringentes com propriedades tanantes
Isoflavonóides	630	Propriedades estrogênicas e/ou antigústica
Neoflavonóides	70	-
Biflavonoides	1200	Propriedades antifúngicas
Outras estruturas	100	-

Sob o ponto de vista econômico, os flavonóides despertam grande interesse comercial por parte das indústrias alimentícias, de corantes e, sobretudo farmacêutica, devido às suas comprovadas atividades farmacológicas: antiinflamatória, antioxidante, antitumoral, antiviral, entre outros (SKIBOLA et al., 2000).

### 2.6.2 Biflavonoides

A primeira biflavona foi isolada em 1929, e é conhecida como Gingentina. Desde então, mais de mil biflavonoides foram isolados de plantas e muitas atividades biológicas têm sido relacionadas a essa classe de substâncias (SUZART et al., 2007).

Biflavonoides foram definidos como “dímeros de apigenina” e assim diferenciados de outros dímeros flavonoídicos, como as proantocianidinas, as quais possuem flavan-3-ol (catequina) como unidade monomérica (AGRAWAL et al., 1989). Biflavonas foram inicialmente classificadas de acordo com a ligação interflavonoil, sendo os principais grupos denominados amentoflavona (**7**), agathisflavona (**8**), robustaflavona (**9**) e hinokiflavona (**10**), consideradas as biflavonas clássicas (QUADRO 2 E FIGURA 6). No entanto, outros biflavonoides foram descobertos, formados por ligações entre flavona-flavanona, flavona-flavonol, flavona-flavanonol, flavona-isoflavona, flavonol-flavonol, flavonol-flavanona, flavanona-flavanona, flavonol-

isoflavona, os quais divergem das anteriores não apenas em seu padrão de hidroxilação nos anéis aromáticos, mas também quanto à substituição do heterocíclico central, com ligação interflavonoil entre diferentes unidades flavonoídicas.

Sua formação pode ser explicada em termos de acoplamento oxidativo de duas unidades de chalconas e subsequente modificação das unidades centrais C3 (ZUANAZZI et al., 2004).

Quanto à numeração desses compostos, pode ser feita de duas formas:

- Utiliza-se a numeração comum dos flavonóides para o primeiro monômero; e os mesmos números ordinários seguidos de duas linhas (') para os núcleos "A" e "C", e seguidos de três linhas (') para o núcleo "B" da segunda unidade;
- Utilizam-se os números romanos "I" e "II" para cada monômero, seguido da numeração comum dos flavonóides (ZUANAZZI et al., 2004).

QUADRO 2 – Tipos de biflavonoides definidos conforme o local da ligação interflavonoil.

<b>Estrutura</b>	<b>Biflavona</b>	<b>Ligação interflavonoil</b>
<b>7</b>	amentoflavona	I - 3', II - 8 (ou I - 5', II - 8)*
<b>8</b>	agathisflavona	I - 6, II - 8
<b>9</b>	robustaflavona	I - 3', II - 6 (ou I - 5', II - 6)*
<b>10</b>	hinokiflavona	I - 4'-O-II - 6

\* (Agrawal et al., 1989)

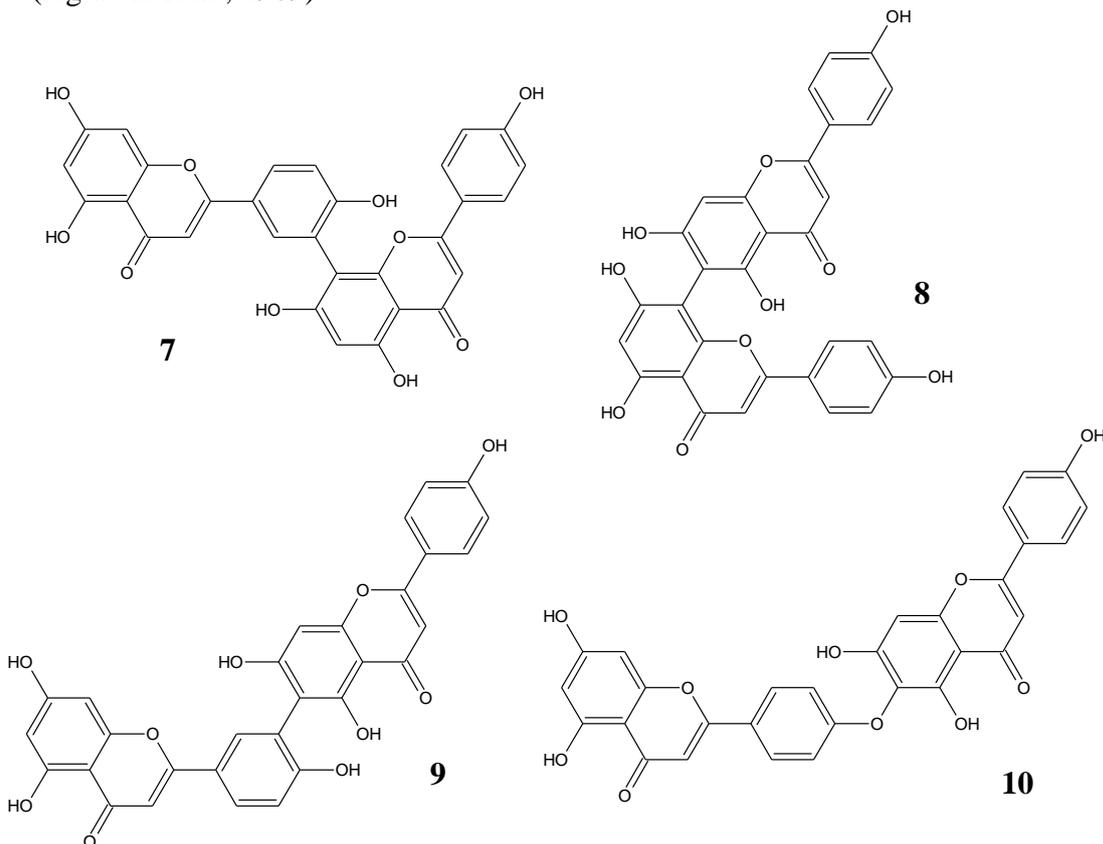


FIGURA 6 – Biflavonas clássicas conforme o local da ligação interflavonoil.

Estimam-se que os biflavonoides estejam dispersos principalmente entre as plantas gimnospermas e angiospermas, das quais se destacam as famílias Guttiferae, Ochnaceae e Anacardiaceae. Entre os gêneros, os biflavonoides são abundantes nas espécies de *Selaginella* (Selaginellaceae), *Calycopteris* (Combretaceae), *Daphne* (Thymelaeaceae), *Lophira* e *Ochna* (Ochnaceae) (BARBOSA et al., 2005).

Os biflavonoides ocorrem com ampla diversidade de acumulação nos tecidos vegetais, em folhas, raízes, pólen, frutos, lenho e sementes. Os que ocorrem nas folhas são conhecidos principalmente por possuírem ação de proteção contra radiação UV, assim como para proteger a planta de predadores como insetos e fungos.

Quanto à atividade farmacológica, a diversidade de alvos moleculares é tão ampla quanto as variações estruturais, apresentando ações como o bloqueio de efeitos inflamatórios de hepatotoxinas, supressão de atividade linfocitária, inibição de adesão plaquetária, inibição de ciclooxigenases, inibição da ligação de neurotransmissores, inibição de peroxidação lipídica, ação estimulante cardíaca, vasodilatação periférica, efeito hipoglicêmico, anticarcinogênico, antiespasmogênico, hepatoprotetor, antifúngico, antiviral, entre outras (KWAK et al., 2002).

## **2.7 A LEISHMANIA**

A leishmaniose é uma doença infecciosa zoonótica, amplamente distribuída em todo o mundo, que afeta o homem e os animais (RATH et al., 2003). Atualmente as leishmanioses afetam cerca de 12 milhões de pessoas em 88 países e aproximadamente 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em cinco países: Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil, atingindo principalmente populações pobres (CROFT et al., 2003). Como em outras doenças tropicais, estão relacionadas ao desenvolvimento econômico e a mudanças ambientais provocadas pelo homem que promovem a exposição de hospedeiros susceptíveis aos insetos infectados (vetores). Embora as leishmanioses sejam consideradas doenças rurais, o recente aparecimento destas enfermidades em grandes centros urbanos e a re-emergência em várias cidades do mundo representa um problema de saúde pública (MONTEIRO et al., 2005).

Assim, o uso de plantas para a obtenção de novos fármacos tem aumentado devido a necessidade de se combater microrganismos resistentes aos fármacos sintéticos atuais e maximizar o controle de doenças endêmicas, como é o caso da leishmaniose

tegumentar americana (SHARIEF et al., 2006). Os metabólitos secundários oriundos de plantas se mostraram eficazes em estudos *in vitro* sobre diferentes formas de *Leishmania* spp (SOARES et al., 2007) e podem ser viáveis para a obtenção de novos compostos para o combate desta enfermidade.

A difusão desse conhecimento no seio da população tem facilitado a aceitação popular de fitoterápicos ou plantas medicinais e a aderência terapêutica e sua adoção constitui-se numa importante alternativa no combate às leishmanioses, ganhando notória expansão por parte da comunidade científica, buscando-se reduzir consideravelmente a incidência dessa zoonose, combatendo o agente etiológico estabelecido nos reservatórios (RATH et al, 2003). Uma das principais aplicações da química de produtos naturais está direcionada para a descoberta de novas substâncias com potencial farmacológico, através do estudo de extratos de plantas ou por meio da síntese de moléculas análogas que possam ser, em ambos os casos, produzidos em escala industrial (MORAIS et al., 2007).

### **2.7.1 *Leishmania* – o parasito**

No ciclo epidemiológico, o inseto (flebotomíneo) representa o elo entre os reservatórios e o homem, no qual este inseto comporta apenas como hospedeiro acidental de *Leishmania*, não parecendo assumir papel relevante na transmissão da doença.

As leishmanias são parasitos dimórficos apresentando dois estágios evolutivos no seu ciclo de vida (amastigota e promastigota). Os parasitos do gênero *Leishmania* que se apresentam sob a forma amastigota (FIGURA 7B) são estruturas arredondadas ou ovaladas sem flagelos visíveis, alojam-se nos macrófagos onde vivem e se multiplicam por divisão assexuada até romperem a célula, disseminando-se pela via hematogênica e linfática, iniciando uma reação inflamatória e proporcionando a atração de outros macrófagos, gerando um ciclo vicioso. A outra forma do gênero *Leishmania* apresenta-se sob a forma flagelada promastigota (FIGURA 7A), encontrada no vetor flebotomíneo, reproduz-se extracelularmente no trato alimentar do inseto. Esta forma é cultivada *in vitro* em meios livres de células (axênicos) que mimetizam os nutrientes, o pH e a temperatura encontrados no trato digestivo do inseto (GONTIJO et al., 2003).

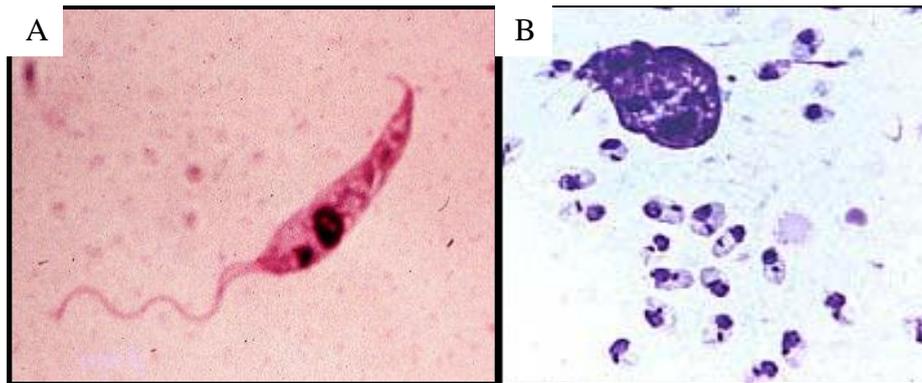


FIGURA 7: Micrografia das formas morfológicas mais comuns de *Leishmania* spp. (A) Promastigota (B) Amastigotas.

Fontes: (A) <http://www.med.unimarburg.de/stpg/ukm/lt/hygiene/schwarz/projects.html>. (B) <http://www.vet.upenn.edu/schoolresources/communications/publications/bellwether/48/foxhounds.html>.

Os vetores, por sua vez, são insetos da ordem díptera; família Psychodidae; subfamília Phlebotominae. São comumente chamados de flebotomíneos e popularmente conhecido por mosquito palha, birigui ou cangalhinha, que sugam junto ao sangue as formas amastigotas, do interior de macrófagos, de um animal infectado. De modo que apenas as fêmeas estão adaptadas com o respectivo aparelho bucal para picar a pele de vertebrados e sugar o sangue. As fêmeas necessitam de sangue para o desenvolvimento dos ovos e costumam picar a partir do pôr do sol até a madrugada.

Durante o trajeto pelo trato digestivo (FIGURA 8), os macrófagos se rompem liberando as amastigotas. Essas sofrem uma divisão binária e se transformam em promastigotas delgadas e longas que, também reproduzem por divisão binária, podendo seguir dois caminhos. No primeiro, as promastigotas pertencentes ao subgênero *Viannia* dirigem-se para o intestino onde se colonizam nas regiões do piloro e ileo (seção peripilária). Nesses locais, ocorre a transformação de promastigotas em paramastigotas que ainda se dividem. Novamente, há transformação de paramastigotas em promastigotas que migram através do estômago em direção e a faringe do inseto. No segundo, promastigotas pertencentes ao subgênero *Leishmania* multiplicam-se aderidas a parede do estômago (seção suprapilária), transformam-se em paramastigotas, colonizando no esôfago e na faringe. Neste ambiente diferenciam-se em promastigotas metacíclicos, constituindo-se em forma infectante para o hospedeiro vertebrado (GONTIJO et al., 2003).

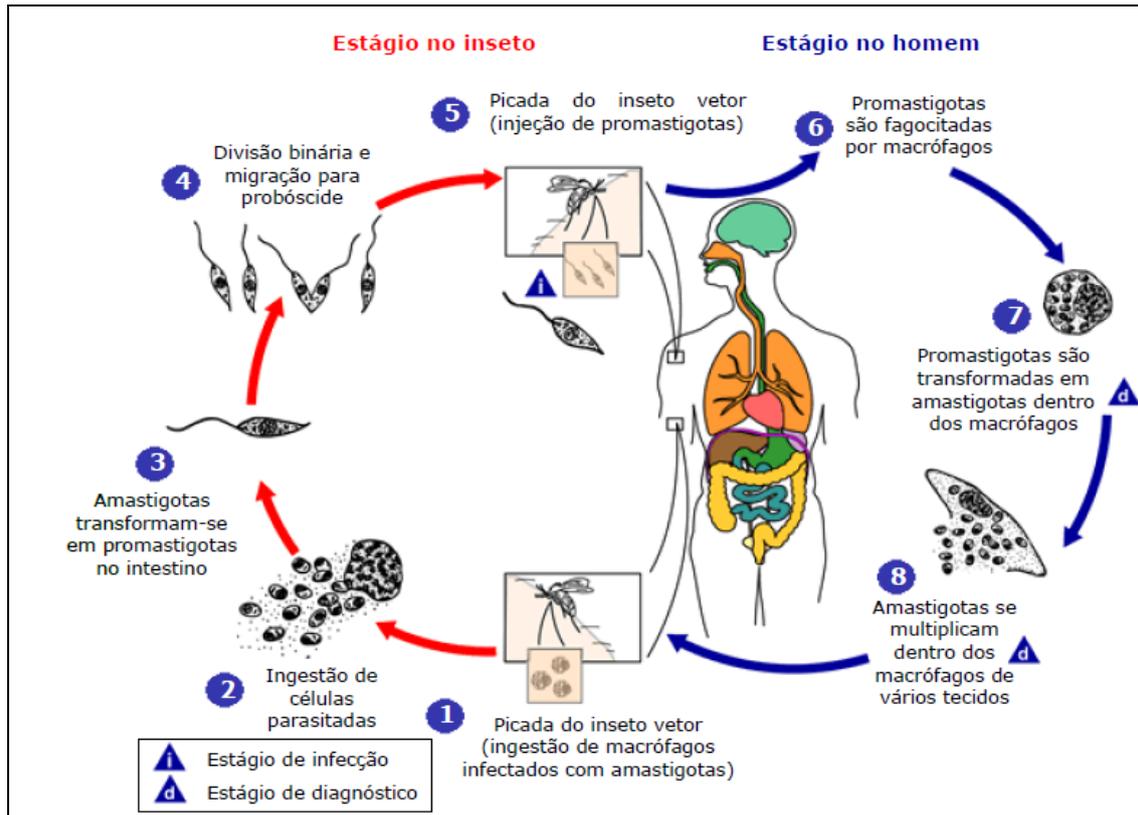


FIGURA 8 – Ciclo de vida de *Leishmania* spp. Fonte: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

Quando os insetos vão realizar novo repasto sanguíneo, as formas promastigotas são introduzidas no local da picada no vertebrado. Quatro a oito horas após a picada do inseto, o protozoário é encontrado no interior de macrófagos teciduais. A saliva do mosquito contém substâncias (neuropeptídeos vasodilatadores) com a função de promover imunossupressão do hospedeiro. No interior do macrófago, as promastigotas envoltas pelo vacúolo fagocitário, transformam-se em amastigotas que, resistentes a ação dos lisossomas, multiplicam-se até ocupar o citoplasma da célula. Ocorre em seguida, a ruptura da membrana do macrófago repleto de amastigotas, que por sua vez são novamente fagocitadas, gerando nova reação inflamatória (GENARO et al., 2005).

### 2.7.2 As leishmanioses

A incidência anual mundial de novos casos é de cerca de 2 milhões, sendo 1,5 milhões de casos de leishmaniose cutânea (LC) e 500 mil da leishmaniose visceral (LV) e, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o número de casos de leishmaniose não relatados é aproximadamente 5 vezes maior do que os números oficiais. As leishmanioses são doenças predominantes da classe pobre, do sexo

masculino, e de adultos. No Brasil, a leishmaniose atinge 19 estados, sendo que mais de 90% dos casos humanos da doença se concentram na região nordeste, havendo ainda focos importantes na região Centro-Oeste, Norte e Sudeste. Embora apresente baixa mortalidade, apresentam alta morbidade, intensificando ainda mais sua associação as desigualdades sociais, já que reduz drasticamente a qualidade de vida dos infectados.

As leishmanioses humanas consistem em um complexo de enfermidades que acometem vísceras e pele, apresentando amplo espectro clínico e podem ser classificadas em visceral e tegumentar. São causadas por diferentes espécies do gênero *Leishmania* e a maioria das infecções humanas esta relacionada com hábitos e atividades de indivíduos que exploram ou que habitam matas ou florestas. Recentemente tem ocorrido um aumento significativo dos casos de leishmaniose em áreas urbanas e periurbanas das grandes cidades do Brasil (SILVA-LÓPEZ, 2010).

As manifestações clínicas da doença são variáveis, dependendo da virulência da espécie infectante, susceptibilidade do hospedeiro e co-infecções. Podendo ser dividida em quatro grupos principais (DARDARI et al., 2004).

- i) Leishmaniose visceral: conhecida como Calazar, é a forma mais grave, sendo sistêmica pode atingir fígado, baço e medula óssea, levando o paciente à morte.
- ii) Leishmaniose cutânea: caracteriza-se por úlceras crônicas na pele, desenvolvidas no local da picada do inseto vetor.
- iii) Leishmaniose mucocutânea: caracteriza-se por úlceras crônicas similares a forma cutânea, porém tendem a reaparecer mesmo após cicatrização em mucosas do nariz e da boca, em geral associadas a infecções secundárias levando a destruição de grandes extensões de tecido.
- iv) Leishmaniose difusa: é caracterizada por lesões cutâneas, ricas em parasitas, de aspecto queloidiano por toda a pele. No diagnóstico diferencial das lesões cutâneas devem ser considerados a sífilis, hanseníase, tuberculose e o carcinoma espinocelular.

Os aspectos das leishmanioses variam ainda conforme região geográfica, provavelmente indicando interação entre propriedades dos parasitos locais, biologia dos vetores presentes na área e fatores da população. Com relação ao papel do hospedeiro; idade, estado nutricional, eficácia do sistema imune e co-infecções com HIV alteram significativamente as manifestações clinicas da doença (MURAY et al., 2005).

A co-infecção *Leishmania*/HIV é considerada uma ameaça emergente em diversos países. O aumento no número de casos na última década é marcante, levando a

mudanças na epidemiologia, apresentação e clínica das leishmanioses. O comprometimento do sistema imune do doente pode acarretar em manifestações clínicas em pacientes antes assintomáticos, assim como a evolução de casos complexos e de difícil tratamento, como a forma cutânea disseminada ou a visceral (CRUZ et al., 2006).

#### 2.7.2.1 Leishmaniose visceral (LV) – forma visceral

A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, é a forma mais grave das leishmanioses. As amastigotas residem em células do sistema retículo endotelial de vísceras, incluindo baço, fígado, linfonodos e intestino. A doença pode permanecer assintomática ou após um período de incubação de 2-4 meses apresentar sintomas como febre baixa de desenvolvimento lento, prostração geral, anemia e protusão do abdome devido aumento do fígado e baço (hepatoesplenomegalia) (MURAY et al., 2005).

A LV é causada tipicamente por *L. donovani* no subcontinente Indiano, Ásia e África e por *L. infantum* (sinônimo para *L. chagasi*) na região do Mediterrâneo, Sudeste e região central da Ásia e América do Sul. Países como Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil respondem por 90% dos casos de LV do globo (MURAY et al., 2005, DESJEUX, 2001). No Brasil, o calazar é documentado em Estados litorâneos do Pará ao Paraná e em Estados centrais como Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul. Em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul, não há registros de casos autóctones da LV (GENARO, 2003). A mortalidade global da leishmaniose visceral é oficialmente de 59.000 casos ao ano, contudo este número é subestimado. Uma vez que a notificação da LV não é obrigatória e que o diagnóstico da doença muitas vezes não é corretamente realizado, dados oficiais ficam defasados (HOTEZ et al., 2004).

Os mamíferos portadores de LV no ambiente rural são geralmente animais silvestres como a preguiça, o tamanduá, roedores e raposas sendo que grande parte das lesões nestes animais não é aparente (FUNASA, 2000). Em virtude da constante expansão dos aglomerados urbanos, o cão vem sendo apontado como o principal reservatório urbano representando assim, uma fonte de infecção para os vetores biológicos. Ademais, estes animais têm sido encontrados em focos da doença humana, sendo considerados os principais elos na cadeia de transmissão da LV (MOLANO et al., 2003).

### 2.7.2.2 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) – forma cutânea

A LTA é uma doença não contagiosa, de evolução crônica, que acomete as estruturas da pele e cartilaginosas da nasofaringe, de forma localizada ou difusa, causada por espécies do gênero *Leishmania* (MANUAL DE VIGILÂNCIA, 2006). Constitui um problema de saúde pública em 88 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com registro anual de 1,0 a 1,5 milhões de casos. É considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pelo seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades.

No Brasil, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma das afecções dermatológicas que merece mais atenção, devido à sua magnitude, assim como pelo risco de ocorrência de deformidades que pode produzir no ser humano, e também pelo envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional. Apresenta ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões brasileiras.

Um amplo espectro de manifestações clínicas envolvendo pele e mucosas pode ser visto na LTA, variando desde uma lesão auto-resolutiva a lesões múltiplas ou desfigurantes (FIGURA 9). De modo geral, a maioria das infecções leishmanióticas permanece localizada na pele ou linfonodos adjacentes. Entretanto, algumas espécies podem escapar para mucosas, múltiplos locais na pele ou para fígado, baços e linfonodos distantes. Os pontos de disseminação da doença variam principalmente, mas não exclusivamente, devido a diferentes propriedades do parasito: sensibilidade a temperatura, tropismo tecidual, capacidade de imunoevasão e persistência das infecções (MURAY et al., 2005).

Na leishmaniose cutânea, a infecção pode evoluir após o período de incubação de 1-12 semanas, em uma pápula que aumenta de tamanho e finalmente úlcera. A lesão típica é indolor e apresenta bordas salientes com fundo necrótico granuloso e úmido (FIGURA 9A).

A leishmaniose mucosa (FIGURA 9C), manifestação mais severa da LTA, nunca cura espontaneamente e é de difícil tratamento. Pode ocasionar destruição de cartilagens e tecidos moles, com possível desfiguração da face e perda do septo, palato e pavilhão auditivo. Nos casos mais graves, o paciente pode morrer por complicações respiratórias,

dificuldades de alimentação ou infecções secundárias. A disseminação, de espécies como *L. braziliensis*, para as mucosas ocorre em 1-10% das infecções, após 1-5 anos da cura das lesões cutâneas. Embora cerca de 90% dos pacientes com a forma mucosa apresentem uma cicatriz de lesão cutânea anterior, há alguns casos que coincidem com lesões ativas (MURAY et al., 2005).



FIGURA 9 – Diversidade de manifestações clínicas na LTA. A) Lesão cutânea típica B) Forma difusa C) Forma Mucosa. **Fonte:** MANUAL DE VIGILÂNCIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA-2007.

Outra manifestação da LTA, a leishmaniose cutânea difusa (FIGURA 9B), caracteriza - se por nódulos não ulcerados, repletos de parasitos que se disseminam do local original de infecção e pode cobrir todo o corpo do paciente (REITHINGER et al., 2007).

Atualmente é possível observar a coexistência de um duplo perfil epidemiológico, ocasionada pela manutenção de casos oriundos de focos antigos ou de áreas próximas a estes, e pelo surgimento de surtos epidêmicos. A ocorrência de tais surtos tem sido associada a fatores decorrentes de atividades econômicas, expansão de fronteiras agrícolas e extrativismo, e condições ambientais altamente favoráveis para o desenvolvimento do vetor e transmissão da doença (VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2010).

Para a leishmaniose cutânea é utilizado como tratamento a Miltefosina, mas a sua eficácia é questionada. Estes fatos justificam a necessidade urgente de novos medicamentos mais seguros, baratos e efetivos para o tratamento dos diferentes tipos de *Leishmania*. Estudos realizados com a 4<sup>h</sup>-hidroxi-5,6,7,3',5'-pentametoxiflavona (Ageconyflavona) (FIGURA 10) isolada de partes aéreas de *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) (AMAL et al., 2010), mostraram que este flavonóide apresentou atividade significativa ( $IC_{50} = 3,56 \mu\text{g/mL}$ ) *in vitro* contra promastigotas e amastigotas de

*Leishmania amazonensis* em citotoxicidade mensurável, sendo que estes resultados estão altamente coerentes com testes anteriores em flavonóides metoxilados que foram ativos em níveis de concentração semelhantes.

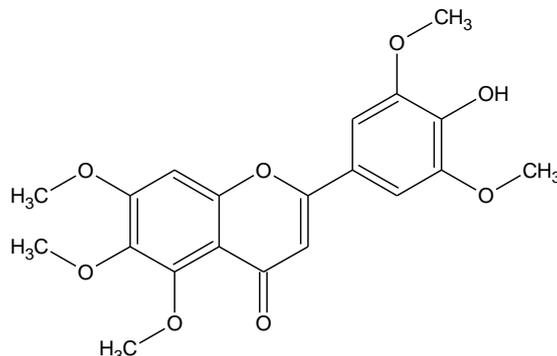


FIGURA 10 – Flavonoide metoxilado de *Ageratum conyzoides* - 4'-hidroxi-5,6,7,3',5'-pentametoxiflavona

### 2.7.3 Tratamento da LTA

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), assim como os outros tipos de leishmaniose, têm como tratamento de primeira linha dois antimoniais pentavalentes ( $\text{Sb}^{5+}$ ) que tem sido utilizado no tratamento desde o início do século XX e continuam sendo os fármacos de escolha para doenças cutânea e visceral, o estibogluconato de sódio (Pentostam®) e o antimoniato de meglumina (Glucantime®) (CRUZ et al., 2009; SILVA-LÓPEZ, 2010). Apesar de serem utilizados há tanto tempo, alguns detalhes de seu mecanismo de ação não estão claros (VIEIRA et al., 2005). É aceito que o antimônio pentavalente é um pro-fármaco, sendo reduzido a antimônio trivalente, que apresenta atividade leishmanicida (OUELLETTE et al., 2004; MALTEZOU, 2009). Foi encontrado ainda que os antimoniais pentavalentes induzam a morte celular programada do parasita por fragmentação do DNA (LEE et al., 2002). Estas, entre outras evidências, sugerem que os antimoniais pentavalentes podem matar a *Leishmania* tanto por mecanismos diretos como indiretos (OUELLETTE et al., 2004).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, o grande problema com este tratamento é o acesso aos medicamentos, pois além do alto custo, deve ser administrado em hospital por via intravenosa ou intramuscular durante quatro semanas (WHO, 2010). Além disso, drogas antimoniais parenterais estão relacionadas a uma série de efeitos colaterais severos, incluindo náusea, vômito, diarreia, erupções na pele, tontura, arritmia cardíaca, hipotensão, artralgia, mialgia, desconforto abdominal, dor de cabeça, elevação

reversível das enzimas hepáticas, ocasional anemia e trombocitopenia frequentemente dose dependente (GONZÁLEZ et al., 2008).

Em casos de resistência do parasito, a anfotericina B é a segunda opção de tratamento recomendada pelo Ministério da Saúde, sendo, entretanto, mais tóxica que o Pentostam e o Glucantime (WHO, 2010). A Anfotericina B trata-se de um antibiótico sistêmico efetivo que possui atividade antifúngica e leishmanicida. As *leishmanias* e os fungos possuem ergosterol como principal esteróide nas membranas plasmáticas, logo, a anfotericina B liga-se ao ergosterol, causando alteração na permeabilidade de membrana e do equilíbrio osmótico do parasito (CRUZ et al., 2009; SILVA-LÓPEZ, 2010).

Na tentativa de controlar a propagação das leishmanioses, diferentes tipos de intervenções têm sido investigados. Vários tipos de vacinas foram propostas, tanto para tratamento quanto para profilaxia da doença. Uma vacina anti-*Leishmania* ideal deve induzir respostas de linfócitos T CD<sup>4+</sup> e T CD<sup>8+</sup> a fim de produzir memória imunológica, e a maior concentração destes estudos estão nas vacinas de subunidades entregues como proteínas recombinantes, DNA, poli-proteína ou células dendríticas contendo antígenos de leishmania além de vacinas de parasitas mortos ou atenuados (KEDZIERSKI et al., 2009). Além de vacinas, alvos moleculares vêm sendo estudados para posterior identificação de substâncias capazes de modular suas atividades (DARDARI et al., 2004). Um bom alvo de drogas deve ser expresso em um estágio relevante do ciclo de vida do parasita e preencher um ou mais dos seguintes critérios: ser exclusivo do parasita, ser essencial para sua sobrevivência, ou ser essencial para sua virulência. É proposto ainda que um tratamento de sucesso para todos os tipos de leishmaniose depende da eliminação efetiva dos parasitas por ativação de macrófagos (KEDZIERSKI et al., 2009).

#### **2.7.4 Radicais derivados de oxigênio e nitrogênio e sua importância para regular o parasitismo**

O controle do crescimento intracelular da *Leishmania* em macrófagos ativado de camundongos depende fundamentalmente da ação de óxido nítrico (NO), sintetizado a partir de L-arginina pela ação de uma NO-síntase (iNOS) induzível por citocinas

ativadoras como interferons do tipo IFN- $\gamma$  e também do tipo I e TNF- $\alpha$  (LIEW e O'DONNELL, 1993).

Os radicais intermediários de oxigênio e nitrogênio foram eficientes no controle da infecção de macrófagos murinos por *L. donovani*, mostrando eficiente efeito leishmanicida mesmo para a espécie de *Leishmania* que pode determinar a doença visceral (MURRAY e NATHAN, 1999). A produção de NO também desempenha papel importante no controle são relativamente muito reduzidos da fase inicial da leishmaniose cutânea murina causada por *L. mexicana* (DIAZ et al., 2003).

Entretanto, na espécie humana os níveis de produção de NO por macrófagos ativados são relativamente muito reduzidos em comparação aos encontrados nos camundongos, embora haja expressão de mRNA para iNOS após estimulação por IFN- $\gamma$ . O controle da infecção intracelular por leishmania em macrófagos humanos ativados por citocinas parece depender da geração de radicais de oxigênio e nitrogênio de mecanismos independentes de oxigênio (MURRAY e TEITELBAUM, 1992). Todavia, outros autores descrevem ação parasiticida, aparentemente mediada por NO, exercida por macrófagos humanos sobre varias espécies de *Leishmania* (PANARO et al., 1999).

## 2.8 PROTEASES

De acordo com o comitê de nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUB), as proteases são classificadas em dois grupos principais, que são as exopeptidases e endopeptidases, dependendo do sítio de ação dessas enzimas. As exopeptidases iniciam o processo de degradação a partir das extremidades amino (N) ou carboxi-terminal (C) das proteínas, produzindo pequenos peptídeos ou mesmo aminoácidos. As endopeptidases clivam a proteína alvo na sua parte interna, longe das extremidades amino e carboxi-terminal, gerando dessa forma, peptídeos maiores. Baseado no tipo do grupo funcional presente no sitio catalítico da enzima, as proteases são classificadas ainda em quatro relevantes grupos, que são: serina, cisteíno, aspártico e metalo proteases (MENON et al., 1987). Com base nas suas sequências de aminoácidos, as proteases são ainda classificadas em famílias diferentes e também em clãs para acomodar os grupos de peptídeos que evoluíram de um antepassado em comum (RAWLINGS et al., 1993).

As proteases estão envolvidas em numerosos e importantes processos fisiológicos, incluindo proteínas volume de negócios, digestão, coagulação do sangue, fertilização, diferenciação e crescimento das células, sinalização celular, na resposta imune, apoptose, câncer, mal de Alzheimer, inflamação e artrite. Os inibidores de protease, portanto, têm uma utilidade considerável para intervenção terapêutica nestas doenças e em vários outros tipos (SAJID et al., 2002).

### **2.8.1 Serino-Proteases: Tripsina**

Serino-proteases são enzimas que possuem um resíduo de serina ativo no seu sítio catalítico (YOUSEF et al., 2003). As serino-proteases catalisam um ilimitado número de reações hidrolíticas, com ampla especificidade pelo substrato (NEURATH et al., 1984). Estas enzimas têm sido estudadas intensivamente nas últimas quatro décadas, resultando no acúmulo de informações de alta qualidade em relação às suas sequências de nucleotídeos e aminoácidos, às suas estruturas tridimensionais, constantes cinéticas e parâmetros termodinâmicos para as reações com seus substratos e inibidores, respectivamente.

A despeito da longa investigação sobre esta família os resultados de pesquisas recentes na área das serino-proteases são notáveis. As serino-proteases são classificadas em 5 famílias distintas de enzimas: a da quimotripsina, da subtilisina, da serino carboxipeptidase II, do citomegalovírus humano e do componente proteolítico ClpP da protease ATP-dependente (LIAO et al., 1992).

O mecanismo catalítico das serino-proteases (FIGURA 11) é caracterizado inicialmente pelo o ataque ao carbono carbonílico pela serina reativa da tríade catalítica, cuja nucleofilicidade é aumentada pela presença de uma histidina adjacente que atua funcionando como uma base catalisadora. A doação de um próton pela histidina ao novo grupo álcool formado resulta na dissociação do primeiro produto e na concomitante formação de um complexo covalente acil-enzima. A reação de deacilação ocorre pelo ataque nucleofílico da água, seguindo os mesmos passos da reação anterior. A água ataca o grupo carbonila, enquanto o próton é concomitantemente removido pela histidina, que atua agora como um catalisador ácido. Cada etapa ocorre através da formação de um intermediário tetraédrico, cuja estrutura se assemelha a um estado de transição de alta energia em ambas as reações (HEDSTROM, 2002).

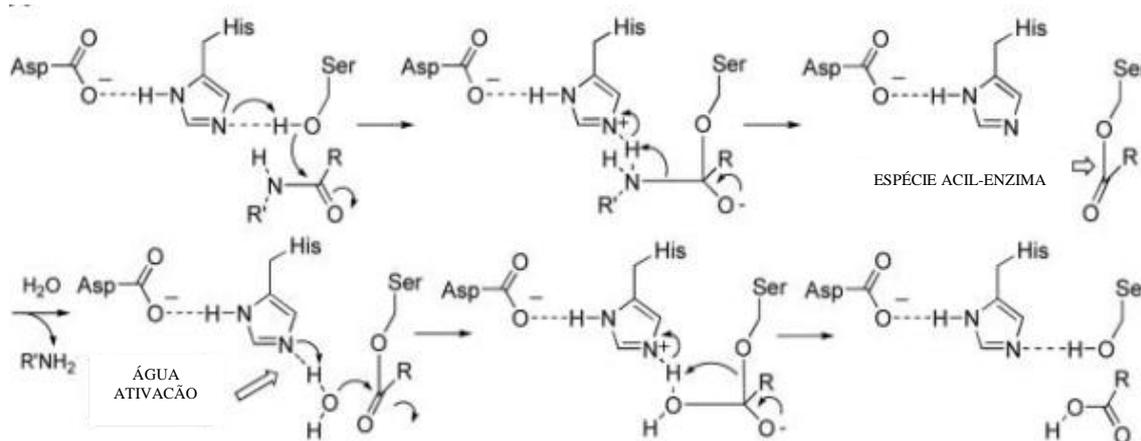


FIGURA 11 – Mecanismo catalítico das serino-proteases.

A tripsina (EC 3.4.2.1.4) é uma das serino-protease mais estudada e caracterizada, por isso, é uma das enzimas melhor compreendidas em termos estruturais, de sua especificidade e do seu mecanismo catalítico. Em virtude disso, a tripsina é uma enzima utilizada como modelo experimental para estudos de caracterização de outras serino-proteases. A especificidade da tripsina é atribuída às ligações peptídeas envolvendo as carboxilas dos aminoácidos básicos arginina e lisina. O seu centro ativo é constituído de um sítio aniônico, ao qual se ligam substratos ou inibidores hidrofóbicos que acomodam a cadeia hidrocarbonada dos substratos ou inibidores, e o sítio catalítico propriamente dito, que é constituído da tríade catalítica His57, Ser195 e Asp102 (GONTIJO, 2005).

## 2.8.2 Cisteíno-Proteases: Papaína

As cisteínas-proteases compreendem um complexo grupo, de variadas propriedades físicas e bioquímicas. Estão distribuídas em 44 famílias, classificadas de acordo com as relações evolucionárias e de similaridade estrutural e podem ser encontradas em bactérias, fungos, protozoários, plantas e mamíferos (GRZONKA et al., 2001; BARRET et al., 2002; CAMPBELL., 2002; RAWLINGS et al., 2006).

Em plantas, estas moléculas representam um grupo enzimático com propriedades similares, tais como peso molecular entre 20 e 30 kDa e pH ótimo entre 3,5 e 8,0 (GRZONKA et al., 2001). As cisteíno-proteases já foram isoladas de sementes de girassol, frutos de mamão (papaína) (EC 3.4.22.2), figo (ficina) (EC 3.4.22.3) e de abacaxi (bromelaína) (EC 3.4.22.4). Geralmente essas enzimas são encontradas nos

vacúolos e são responsáveis pela mobilização de proteínas estocadas no endosperma durante a germinação das sementes (ARAI *et al.*, 2002); elas também são encontradas no meio extracelular, tais como aquelas de mamão e figo (RAWLINGS, *et al.*, 2006).

O mecanismo catalítico das cisteíno-proteases (FIGURA 12) é caracterizado pela a formação de um intermediário tetraédrico covalente, a acil-enzima, resultante do ataque nucleofílico do grupo tiol da cisteína do sítio ativo (Cys25) sobre a carbonila da ligação peptídica que será hidrolisada. O grupo imidazol da cadeia lateral da histidina (his159) atua como acceptor de hidrogênios na catalise. A asparagina (Ans175) orienta o anel imidazólico da histidina. O ataque nucleofílico do grupo tiol da cadeia cisteína sobre o carbono da carbonila da ligação peptídica a ser hidrolisada gera um intermediário tetraédrico covalente entre a enzima e o substrato. Por uma reação de acilação, porção C-terminal do substrato é liberada, deixando a enzima acilada. Em seguida, em uma reação de deacilação, a acil-enzima reage com uma molécula de água liberando a parte N-terminal do substrato e a enzima se regenera (STORER e MÉNARD, 1994; BARRET *et al.*, 2002).

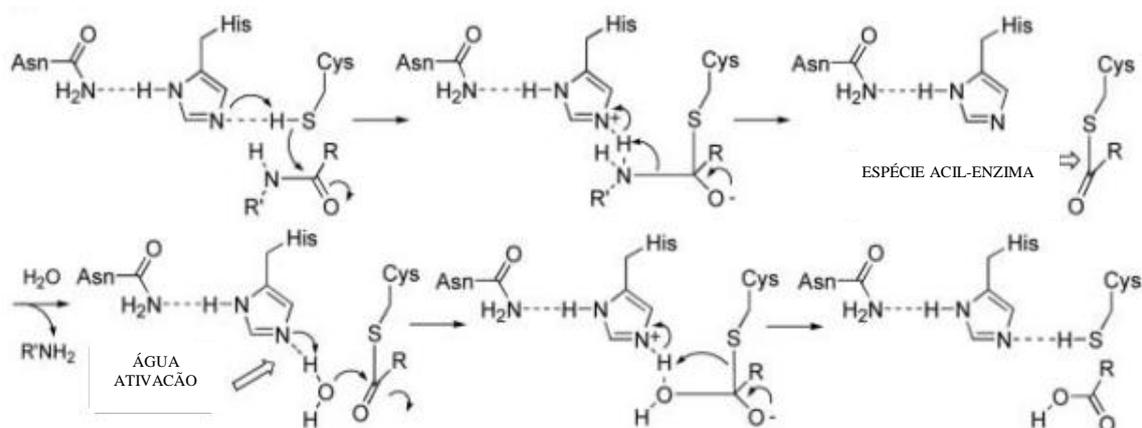


FIGURA 12 – Mecanismo catalítico das cisteíno-proteases.

Em 1879, a primeira enzima a ser classificada como cisteíno-protease foi isolada e purificada do látex do *Carica papaya*, mais conhecido como mamão papaia e, denominada então, papaína (EC 3.4.22.2) (SAJID, 2002). Foi à primeira enzima a ter sua estrutura tridimensional determinada por cristalografia de raios-X e hoje é o membro mais estudado da família (MONTI *et al.*, 2000). A estrutura da papaína apresenta dois domínios separados por uma fenda. Onde se encontra o sítio ativo. O domínio N-terminal consiste principalmente de  $\alpha$ -hélices, enquanto o domínio C-

terminal contém uma estrutura em barril- $\beta$ . Os resíduos catalíticos são: Cys25, His159 e Asp175 (GRZONKA et al., 2001; RAWLINGS et al., 2006).

### **2.8.3 Cisteíno-protease do gênero *Leishmania***

Diferentes tipos de proteases são expressos nos vários estágios do ciclo de vida de protozoários parasitas e estão envolvidas na replicação e na metamorfose. No caso do gênero *Leishmania*, as proteases melhor estudadas são três isoformas de cisteíno proteases, denominadas CPA e CPB, que são enzimas do tipo catepsina L (ROBERTSON e COOMBS, 1990) e CPC, que é uma enzima do tipo catepsina B (BART et al., 1995). Essas três enzimas são do tipo papaína e pertencem ao mesmo grupo de CPs (MOTTRAM et al., 1997). As enzimas do tipo CPB são encontradas nos megasomos (lisossomos largos), nos vacúolos parasitóforos e extracelularmente nas lesões, dando a estas enzimas a oportunidade de interagirem com as proteínas do hospedeiro (ILG et al., 1994).

Com a obtenção de linhagens de *Leishmania* mutantes que são deficientes dos genes que codificam a CPA, CPB e CPC, é possível estudar a importância dessas enzimas na interação parasito-hospedeiro. A CPB possui 100 aminoácidos na região C-terminal, e é codificada por vários genes, que variam de acordo com a espécie. Estas CPs são pouco expressas nas formas procíclicas, expressas nas formas metacíclicas e principalmente nas formas amastigotas do parasita (SOUZA et al., 1992). Elas são importantes fatores de virulência que modulam a resposta imune do hospedeiro e parecem possuir um papel vital na sobrevivência do parasita nos macrófagos (revisto por MOTTRAM et al., 2004).

## **2.9 MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS E ESTUDOS DE CORRELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE (REA)**

De modo geral, os fármacos disponíveis na terapêutica moderna são, em sua ampla maioria, de origem sintética. Se considerarmos, ainda, aqueles oriundos de processos de semissíntese, este percentual pode superar os 85%. A modificação estrutural constitui-se no método mais utilizado para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos, ou para otimizar a atividade de princípios ativos naturais.

Muitas mudanças podem ser introduzidas numa molécula e dependendo de seus centros reativos, três caminhos conhecidos poderão ser seguidos:

- a) simplificação da estrutura;
- b) variação de substituintes;
- c) aumento pela incorporação de novos grupamentos.

Sabe-se que a substituição de um átomo de H por um determinado substituinte (grupo alquila, nitro, ciano, carboxilato, halogênio, etc.) pode modificar profundamente a potência, duração e ainda a natureza do efeito farmacológico de uma molécula. Os estudos de estrutura-atividade, fundamentados no efeito do substituinte em um determinado anel aromático, são muito comuns na química medicinal, uma vez que mais de 50% dos fármacos ou compostos bioativos possuem este tipo de anel. As modificações produzidas pela introdução de um substituinte podem atingir várias propriedades físico-químicas da molécula, tais como hidrofobicidade, densidade eletrônica, conformação e propriedades farmacocinéticas, entre outras, cuja análise poderá orientar as sínteses a serem seguidas (CECHINEL-FILHO et al., 2001).

Os compostos naturais apresentam, geralmente, grupos hidroxilas, duplas ligações, grupos carbonilas e outros que são susceptíveis de serem modificados por reações extremamente simples. Tais modificações permitem obter rapidamente uma idéia da relação estrutura-atividade, especialmente com relação aos efeitos sobre a hidrofobicidade, densidade eletrônica, ligações de hidrogênio, etc. Assim, por exemplo, um grupo hidroxila pode ser transformado em metoxila, acetoxila, benziloxila, etc.; uma dupla ligação pode ser epoxidada ou hidrogenada, ou ainda sofrer uma reação de adição de diferentes grupos; um grupo carboxílico pode ser esterificado, pode formar amidas e outros derivados; um grupo carbonila pode ser reduzido a hidrocarboneto ou a álcool, além de participar em reações de condensação e formação de ligação C-C (CECHINEL-FILHO et al., 2001).

## **2.10 MEMBRANA BIOLÓGICA E O TRANSPORTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS**

A distribuição dos fármacos no organismo é dependente de suas interações com as membranas biológicas e, portanto a avaliação destas interações é um parâmetro chave no planejamento de fármacos (LÁZARO et al., 2006). A membrana biológica é uma barreira celular para a absorção de fármacos, a qual uma molécula bioativa deve ser

capaz de permear para conseguir exercer sua atividade biológica. A permeação da membrana pode ocorrer de forma paracelular e transcelular (FIGURA 13). A permeação paracelular envolve a difusão do fármaco ao redor ou entre as células que formam a barreira biológica. O transporte transcelular, por sua vez, envolve os mecanismos de permeação passiva, através da bicamada lipídica, transporte ativo, transporte facilitado (mediado por um carreador) e fagocitose.

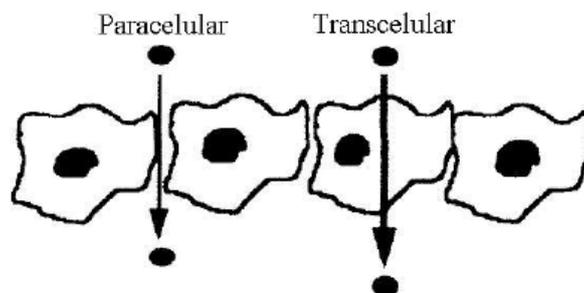


FIGURA 13 – Esquema representando o transporte de fármacos através da membrana pelas formas paracelular e transcelular.

O transporte passivo é parcialmente responsável pelo transporte para dentro de muitas células e a maioria dos fármacos atravessam a membrana por meio deste transporte (BILLO et al., 2005). Todos os compostos bioativos devem atravessar pelo menos uma barreira celular até encontrar seu sítio de ação, devido a isso, o estudo da absorção e distribuição de fármacos no organismo exige um conhecimento básico da composição e função das membranas. As membranas biológicas são estruturas assimétricas complexas, compostas de lipídeos, proteínas e carboidratos. São constituídas por bicamadas de fosfolipídeos unidas de forma não covalente e termodinamicamente estáveis (YANG et al., 1996). A interação de todas as moléculas que compõe a membrana (lipídeos, proteínas, carboidratos, água, metais, etc) forma o modelo mais aceito hoje em dia, chamado modelo do mosaico fluído (FIGURA 14).

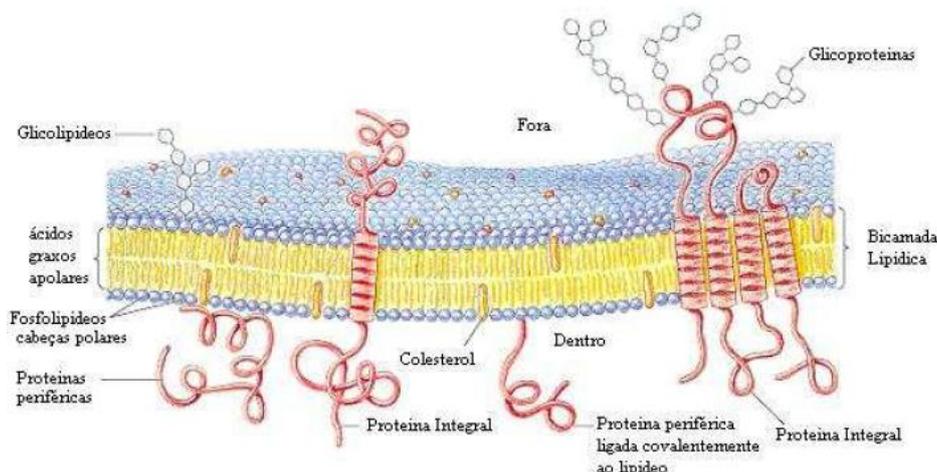


FIGURA 14 – Modelo do mosaico fluido da membrana biológica (LENINGER et al., 1995).

As proteínas, apesar de serem impermeáveis, podem agir como canais iônicos ou transportadores, facilitando a passagem de componentes polares de dentro da célula para fora e vice-versa. Os lipídeos presentes nas membranas contêm tanto regiões hidrofóbicas como hidrofílicas e, portanto são denominadas anfipáticas, são semipermeáveis, e a partição lipídeo-água (determinada pela lipofilia da molécula) é o fator mais importante que governa a capacidade da substância para difundir através da membrana celular. Sendo a membrana composta por bicamadas lipídicas possui caráter anfipático e, portanto, para ocorrer o transporte passivo a substância deve ser suficientemente solúvel em lipídeos e em água para estabelecer um gradiente de concentração adequado. A importância da lipofilia das moléculas tem sido reconhecida na ação de compostos bioativos (absorção, interação fármaco-receptor juntamente com os processos de dissociação/ionização, a lipofilia é responsável pelo transporte e distribuição das substâncias em sistemas biológicos (VALKÓ et al., 1998).

### 3 JUSTIFICATIVA

O estudo químico de plantas, sobretudo daquelas pertencentes à flora brasileira, constitui-se numa estratégia economicamente importante para o futuro da indústria de corantes, medicamentos e defensivos agrícolas, além de servir como direcionador do desenvolvimento sustentado do país. Desta maneira, é importante mencionar que as plantas, além de seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, têm contribuído, ao longo dos anos, para a obtenção de vários fármacos, até hoje

amplamente utilizados na clínica. Apesar do uso terapêutico de plantas ser tão antigo, o conhecimento de suas propriedades antioxidantes é relativamente recente. É observado um enorme crescimento da investigação científica nessa área, envolvendo o efeito de extratos brutos, de frações purificadas ou de componentes isolados destacando-se compostos fenólicos que, em muitos casos, têm demonstrado essa atividade.

Diante do alto custo envolvido no tratamento de doenças crônicas e degenerativas, ampla distribuição na flora brasileira da *G. brasiliensis* Mart. e dos possíveis efeitos farmacológicos associados a esta família de plantas, o planejamento e síntese de análogos da fukugetina com potencial de atividade anti-*Leishmania*, antioxidante e antiproteolítico, poderá fornecer resultados importantes que contribuirão para o tratamento de doenças associadas.

Este trabalho teve como proposta contribuir para o maior conhecimento da constituição química de espécies vegetais da flora brasileira, uma vez que propõe o estudo de produtos naturais, através do isolamento, identificação e modificação estrutural dos constituintes biflavônicos do epicarpo de *G. brasiliensis*. Além disto, utilização destes, no controle de processos oxidativos, leishmanicidas e inibição enzimática, com o uso de métodos de análise *in vitro*. Em trabalhos desenvolvidos anteriormente no LFQM (Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal) constatou-se que a fukugetina apresentou baixa ação em *Leishmania* (formas promastigotas e amastigotas), mas que se mostrou mais efetiva quando avaliada frente à proteases extraídas deste protozoário. Neste sentido, a modificação da lipofilicidade da molécula por reações de alquilação e acilação poderá aumentar a permeabilidade das mesmas através das membranas conferindo maior atividade leishmanicida. Paralelamente, vislumbra-se a correlação entre as estruturas modificadas e as atividades antioxidante, leishmanicida e inibitória enzimática, uma vez que isto poderá dar maior suporte à determinação do mecanismo de ação das mesmas em sistemas biológicos avaliados.

#### **4 OBJETIVOS**

A proposta deste trabalho consistiu na realização do estudo fitoquímico do epicarpo de *G. brasiliensis*. Obtenção de compostos através de modificações estruturais, que possam potencializar algumas atividades biológicas que se faz presente neste trabalho. Os experimentos utilizados neste trabalho envolveram:

- ✓ Isolamento e purificação do biflavonoide fukugetina a partir do EAEE de *G. brasiliensis*, por cromatografia e recristalização;
- ✓ Obtenção de derivados lipofílicos semissintéticos da fukugetina, por meio de reações de alquilação e acilação;
- ✓ Caracterização dos derivados semissintéticos e naturais por espectroscopia no Ultravioleta-visível (UV-Vis), no Infravermelho (IV), de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , COSY, gHMQC, gHMBC e DRX quando possível determinar;
- ✓ Avaliação das atividades antioxidante, antileishmania e antiproteolítica dos derivados obtidos e dos compostos naturais, além da determinação dos possíveis mecanismos de ação envolvidos;
- ✓ Estabelecimento da Relação Estrutura-Atividade (REA) para os compostos em estudo.

## 5 PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1 MATERIAIS, MÉTODOS E INSTRUMENTOS.

- ✓ Extratos foram obtidos por processos de extração contínua através de aparelho de Soxhlet e concentrados em evaporador rotatório.
- ✓ Nos processos de cromatografia em coluna (CC) utilizou-se gel de sílica 60 [70 a 230 Mesh (0,063 – 0,200 nm) ou 230 – 400 Mesh (0,200 – 0,360 nm), ASTM, Merck® em coluna de vidro de diâmetro interno adequado para cada caso. Utilizou-se também Sephadex LH20 Sigma-Aldrich para a purificação dos compostos isolados. Para a relação entre material cromatografado e a quantidade de sílica gel usada na coluna, adotou-se a proporção de 1:40.
- ✓ Nos processos de cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas placas de vidro com 0,25 mm de sílica gel 60 G Merck, com indicador de fluorescência UV254.
- ✓ Como reveladores foram utilizados vapor de iodo, solução etanólica de  $\text{FeCl}_3$  a 1% (m/v); luz ultravioleta ( $\lambda = 254$  ou  $365$  nm); solução (1:1- v/v) de vanilina a 1% em etanol com solução de ácido sulfúrico a 3% (v/v) em água destilada. Depois de borrifadas, as placas cromatográficas foram submetidas a aquecimento.
- ✓ As faixas de pontos de fusão obtidos em graus Celsius foram determinados em aparelho Metler PFM 2, pertencente ao LaBiQ da UNIFAL-MG.
- ✓ Os espectros na região do ultravioleta foram obtidos de espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu-2550), de feixe duplo. Os derivados e os compostos naturais foram solubilizados em etanol (0,1%) e analisados por varredura na faixa de  $\lambda = 500$  a  $200$  nm.
- ✓ Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro modelo Prestig-21 no LABIQ da UNIFAL-MG. As amostras foram preparadas

na forma de pastilhas de brometo de potássio (KBr) e as absorções expressas em número de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ ).

- ✓ Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , gHMQC, gHMBC e COSY foram obtidos em espectrômetro Bruker AVANCEDRX-9,4 Tesla operando em 400 Mhz ( $^1\text{H}$ ) e 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), do LAREMAR do Departamento de Química, UFMG e espectrômetro VARIAN DRX-11,74 Tesla operando em 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da UNESP- Araraquara. Ambos os espectrômetros são equipados com sonda multinuclear com gradiente de campo no eixo Z.
- ✓ Nos experimentos de RMN foi utilizado como referencial interno, o sinal relativo ao tetrametilsilano (TMS) para o qual o deslocamento químico do hidrogênio ( $\delta_{\text{H}}$ ) é igual ao do carbono ( $\delta_{\text{C}} = 0,00$  ppm). Os Solventes deuterados utilizados foram  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{DMSO-}d_6$ . Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) são expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento ( $J$ ), em Hertz (Hz).
- ✓ Os testes de atividade antioxidante *in vitro* foram realizados no LFQM (Departamento Farmácia - UNIFAL-MG). Foi utilizado espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu-2550), de feixe duplo. Os derivados foram solubilizados em etanol e analisados no  $\lambda = 517$  nm para a atividade sequestrante e de  $\lambda = 700$  nm para atividade redutora.
- ✓ Os testes antiparasitários *in vitro* (ensaios com promastigotas, amastigotas e de citotoxicidade) foram realizados nos Laboratórios de Biologia Molecular de Micro-organismos e de Parasitologia no Departamento de Ciências Biomédicas da UNIFAL-MG.
- ✓ No teste enzimático foi utilizado espectrofluorímetro Shimadzu RF-1501 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) no Laboratório de Biofísica da UNIFESP-SP sob colaboração da Prof. Dra. Maria Aparecida Juliano e do doutorando Diego Magno Assis. Também utilizou-se espectrofluorímetro VARIAN (Cary Eclipse) da UNIFAL-MG no Laboratório de Bioquímica sob colaboração da Prof. Dra. Máisa Ribeiro Pereira Lima Brigagão. Foi utilizado

MCA livre para calibração do espectrofluorímetro. Realizaram-se também ensaios em CPBs no Centro Interdisciplinar de Investigação (CIIB) da Universidade de Mogi da Cruzes sob orientação do professor Wagner Alves de Souza Judice.

- ✓ As análises por espectrometria de massas foram realizadas no Laboratório de Biofísica da UNIFESP-SP sob colaboração dos Profs. Dra. Maria Aparecida Juliano, Dr. Luís Juliano e do doutorando Diego Magno Assis, em um LC/MS utilizando LCMS-2020EV equipado com ESI-sonda (Shimadzu), que foi conectada ao circuito após a UFLC detector UV SPD-20A, 220 e 272 nm.
- ✓ As análises por difração de raios-X (DRX) foram realizadas no Departamento de Física e Informática da Universidade de São Paulo - São Carlos sob colaboração do Prof. Dr. Javier Ellena, e no Departamento de física da UFMG sob orientação do Prof. Dr. Carlos Alberto Lombardi Filgueiras.

## **5.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL**

Os frutos de *G. brasiliensis* foram coletados em fevereiro de 2010 na região de Viçosa, Minas Gerais, Brasil (latitude 20° 45' 14" sul e longitude 42° 52' 55" oeste). A identificação botânica foi realizada no horto botânico da Universidade Federal de Viçosa pelo Dr. João Augusto Alves Meira Neto. A espécie encontra-se catalogada pela exsicata sob o número VIC2604, depositada no herbário da Universidade Federal de Viçosa.

## **5.3 ESTUDO FITOQUÍMICO**

### **5.3.1 Preparo dos extratos**

Os epicarpós de *G. brasiliensis* foram secos em estufa com circulação de ar a uma temperatura de 40°C durante 8 dias com monitoramento de umidade. Após a secagem completa, o material foi pulverizado em moinho de facas, fornecendo 1052g e

submetido à extração exaustiva em extrator Soxhlet, com hexano, acetato de etila e etanol como solventes. A seguir os extratos foram filtrados à pressão reduzida, obtendo-se 93,25 g de extrato hexânico (EHE), 51,61 g de extrato acetato de etila (EAEE) e 30,60 g de extrato etanólico (EEE). O procedimento adotado na elaboração dos extratos está esquematizado na FIGURA 15.

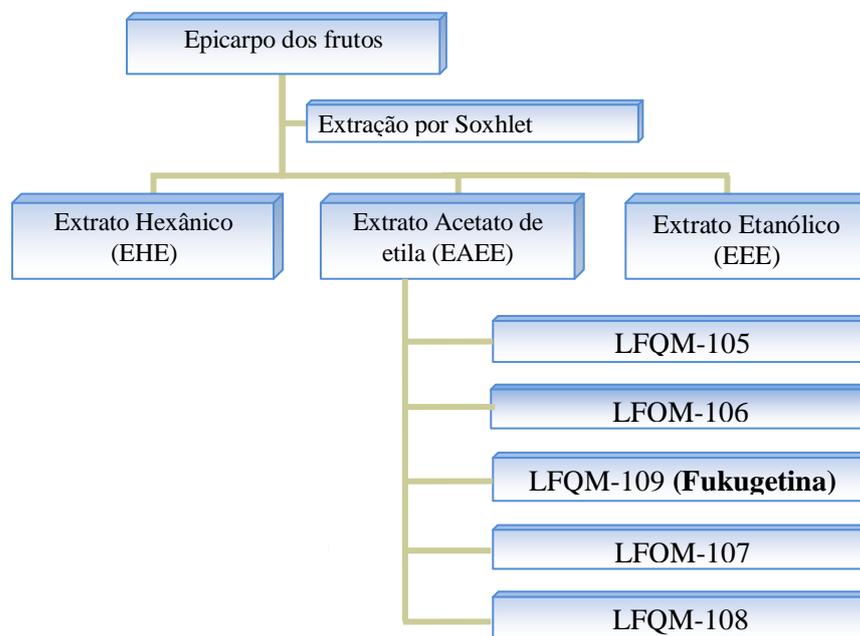


FIGURA 15 - Esquema da obtenção dos extratos a partir do epicarpo de *G. brasiliensis*

### 5.3.2 Isolamento dos constituintes químicos do EAEE

O EAEE (34,90 g) foi submetido à CC em coluna de vidro de 8 x 100 cm e eluída com misturas de hexano/acetato de etila/ácido acético em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 143 frações de 250 mL cada e analisadas por CCD (eluente: hexano/acetato de etila em diferentes proporções) e solução de vanilina em ácido sulfúrico e sob luz ultravioleta ( $\lambda = 254$  e  $365$  nm) como reveladores (FIGURA 16). As frações foram reunidas por similaridade em 6 grupos.

#### Grupo 1 (Frações 1 - 11)

O material deste grupo apresentou-se como um óleo viscoso e de cor escura. Análise por CCD mostrou que o grupo 1 tratava-se de uma mistura complexa. Este material, portanto, não foi trabalhado.

**Grupo 2 (Frações 12 e 13)-Obtenção da 1,3,6,7-tetraidroxixantona (LFOM-105)**

As frações 12 e 13 (grupo 2) forneceram um pó cristalino de coloração amarela (76 mg – rendimento de 0,22 %) aparentemente pura em CCD. A análise por IV e RMN de <sup>1</sup>H, COSY, gHMQC e gHMBC indicou que a substância se tratava da 1,3,6,7-tetraidroxixantona, que foi codificada como LFOM-105.

**Grupo 3 (Frações 26-38) – Obtenção do Ácido Kójico (LFOM-106)**

As frações 26-38 (grupo 3) forneceram um sólido cristalino em forma de agulhas de coloração alaranjado (395,65 mg – rendimento de 1,13%) aparentemente pura em CCD. A análise por dados cristalográficos (DRX) indicou que tratava-se do ácido Kójico, que foi codificada como LFOM-106.

**Grupo 4 (Frações 39 – 56) – Obtenção da Fukugetina (LFOM-109)**

As frações 39-56 (grupo 4) foram submetidas a uma nova cromatografia em coluna (CC) utilizando-se Sephadex LH-20, coluna de vidro de 40 cm de altura por 2,2cm e como eluente metanol. Foram obtidas 19 frações de 15 mL cada. O fracionamento foi acompanhado por CCD, utilizando-se hexano: acetato de etila: ácido acético (6:3:1) como eluentes e como revelador luz ultravioleta ( $\lambda = 254$  e  $365$  nm). As frações 9-19 desta purificação mostraram-se como sendo constituída por um único componente de coloração amarelo cristalino (1 g - rendimento de 2,86%), com faixa de ponto de fusão 255,4 – 257,8°C. A análise por IV e RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, gHMQC, gHMBC e DRX indicou que a substância tratava-se do biflavonoide fukugetina, que foi codificada como LFOM-109.

**Grupo 5 (Frações 78-93) – Obtenção da Fukugetina-4''-O- $\beta$ -D-glicosídeo (LFOM-107)**

As frações 78-93 (grupo 5) forneceram um sólido amarelo (192 mg – rendimento de 0,55%) aparentemente pura em CCD. A análise por IV e RMN de <sup>1</sup>H, COSY, gHMQC e gHMBC indicou que a substância se tratava da Fukugetina-4''-O- $\beta$ -D-glicosídeo, que foi codificada como LFOM-107.

### Grupo 6 (Frações 106-127) – Obtenção da Fukugetina-7`-O-β-D-glicosídeo (LFOM-108)

As frações 106-127 (grupo 6) forneceram um sólido amarelo cristalino (130 mg – rendimento de 0,37%) aparentemente pura em CCD. A análise por IV e RMN de <sup>1</sup>H, COSY, gHMQC e gHMBC indicou que a substância se tratava da Fukugetina-7`-O-β-D-glicosídeo, que foi codificada como **LFOM-108**.

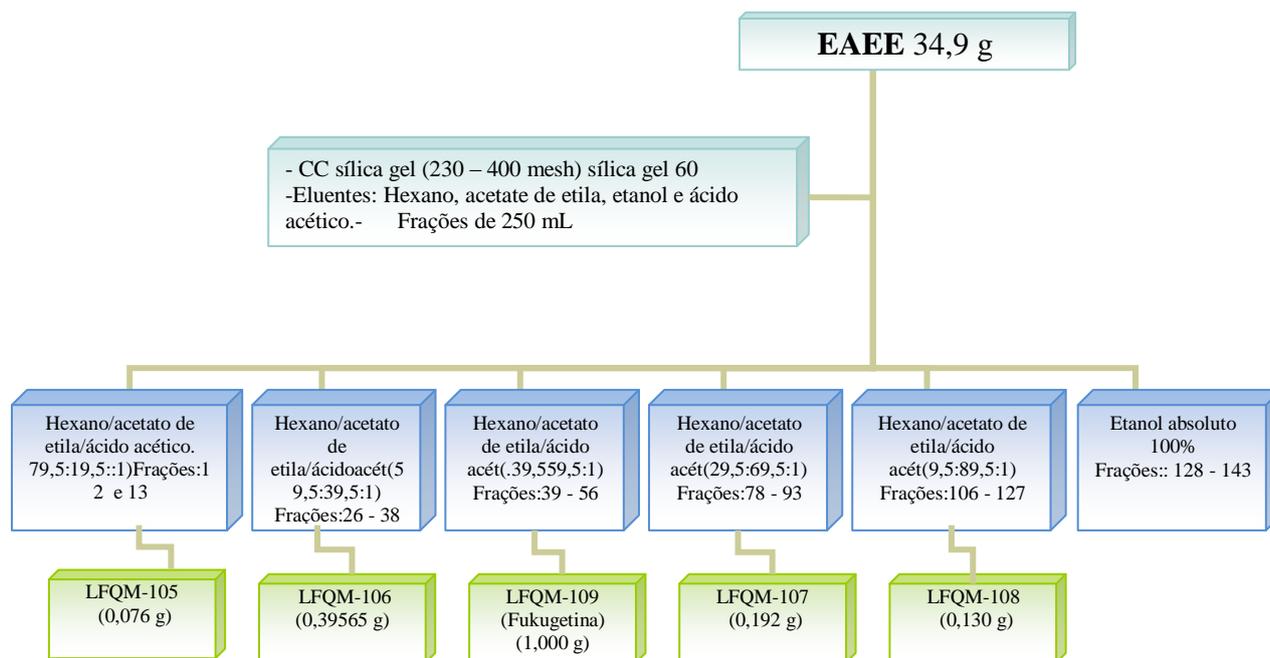
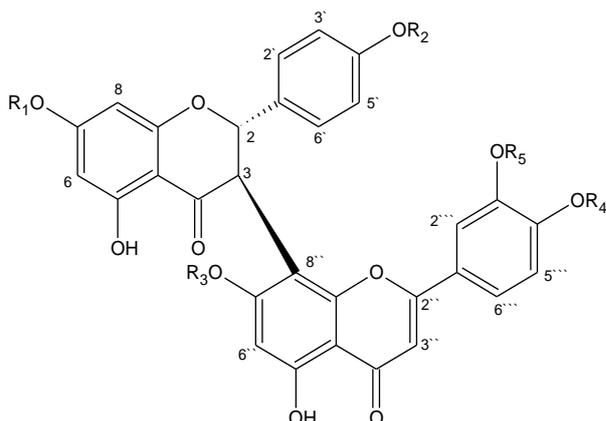


FIGURA 16 - Fracionamento do EAAE

## 5.4 OBTENÇÃO DE DERIVADOS DA FUKUGETINA

Por ser o metabólito mais abundante no EAAE, a fukugetina (**LFOM-109**) foi eleita como material de partida para a preparação de uma série de derivados modificados nos grupos hidroxílicos fenólicos. Estas modificações foram planejadas visando-se um estudo de relação-estrutura atividade, a partir da sugestão de que derivados mais lipofílicos poderiam ter sua atividade leishmanicida potencializada e uma ação inibitória enzimática. Para a obtenção dos derivados, planejou-se a série a partir da fukugetina – **LFOM-109** (FIGURA 17).



**LFQM-109** → R1 = R2 = R3 = R4 = R5 = H

**LFQM-110** → R1 = R2 = R3 = R4 = R5 = COCH<sub>3</sub>

**LFQM-111** → R1 = R2 = R3 = R4 = R5 = CH<sub>3</sub>

**LFQM-112** → R1 = R2 = R3 = R4 = R5 = COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

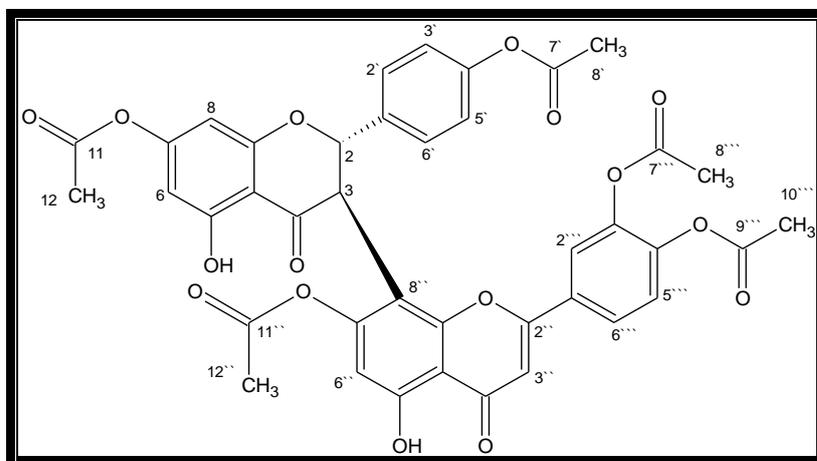
**LFQM-109/A** → R1 = R2 = R3 = R4 = R5 = COO(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>

**LFQM-109/B** → R1 = R2 = R3 = R4 = R5 = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

**LFQM-109/C** → R1 = R2 = R3 = R4 = R5 = COOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH

FIGURA 17 - Proposta de derivados semissintéticos

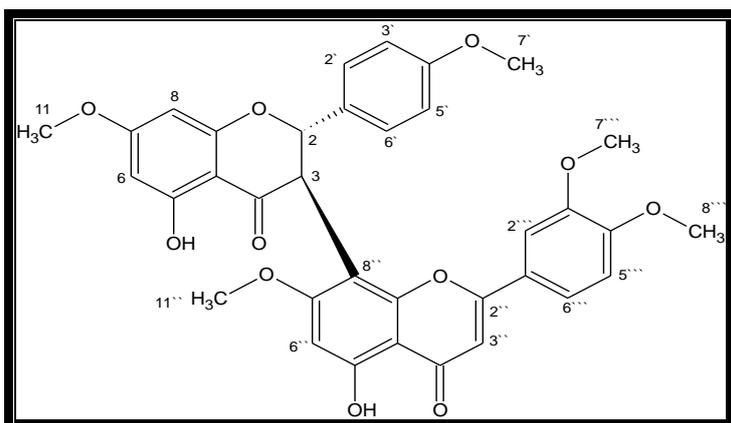
#### 5.4.1 Derivado semissintético: 7,4',7'',3''',4'''-penta-*O*-acetil-fukugetina **LFOM-110** (HANSEN et al, 1998)



Sólido amarelo cristalino  
 T<sub>f</sub>: 120 – 121,3 °C (decomposição)  
 Fórmula molecular: C<sub>40</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>  
 Massa Molar: 766,65 g/mol

Em um balão monotubulado de 50 mL de fundo redondo foram adicionados 100 mg (0,1798 mmol) de **LFOM-109**, dissolvidos em 5 mL de acetona, 0,4 mL (0,385 g; 3,77 mmol) de anidrido acético e 0,5 g (3,77 mmol) de 4-DMAP. O sistema foi mantido em agitação magnética a temperatura ambiente por 6 horas e monitoramento por CCD (hexano/acetato de etila 7:3). Ao final, o material reacional foi transferido para um funil de separação e extraído com acetato de etila (3 x 10 mL). As fases orgânicas combinadas foram neutralizadas com solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>, seca em sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por CCD semipreparativa, fornecendo 0,0728 g (0,107 mmol) do produto esperado **LFOM-110**, na forma de um sólido amarelo cristalino, com 53% de rendimento.

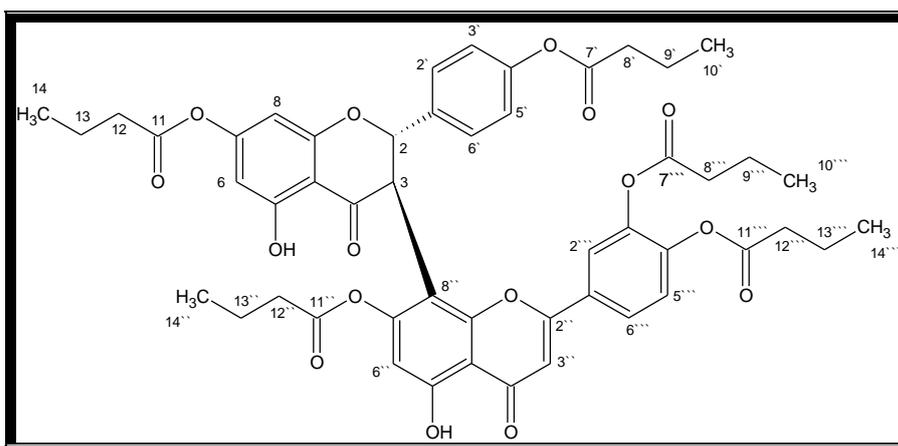
**5.4.2 Derivado semissintético: 7,4',7'',3''',4'''' -penta-O-metil-fukugetina LFOM-111** (HANSEN et al, 1998)



Sólido amarelo cristalino  
 T<sub>f</sub>: 289,9 – 290,1°C (decomposição)  
 Fórmula molecular C<sub>35</sub>H<sub>30</sub>O<sub>11</sub>  
 Massa Molar: 626,60 g/mol

Para a obtenção do derivado acetilado, adicionou-se em um balão monotubulado de 50 mL, 100 mg (0,1798 mmol) de **LFOM-109** o qual foi dissolvido em 5 mL de acetona, com 0,04 mL (0,052 g; 0,415 mmol) de sulfato de dimetila (Me)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 0,041 g (0,415 mmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. O sistema foi mantido em agitação magnética a temperatura ambiente por 1h40min e monitoramento por CCD (hexano/acetato de etila 7:3). Ao final, o material reacional foi transferido para um funil de separação e extraído com acetato de etila (3 x 10 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas em sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por CCD semipreparativa, fornecendo 0,0298 g (0,047 mmol) do produto esperado **LFOM-111**, na forma de um sólido amarelo cristalino, com 27% de rendimento.

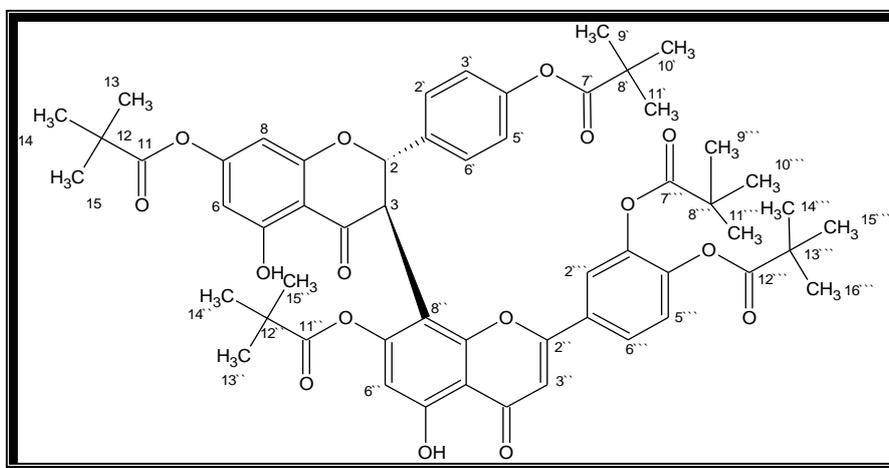
**5.4.3 Derivado semissintético: 7,4',7'',3''',4'''' -penta-O-butanoil-fukugetina LFOM-112** (HANSEN et al, 1998)



Aspecto: óleo amarelo claro  
 Fórmula molecular: C<sub>50</sub>H<sub>50</sub>O<sub>16</sub>  
 Massa Molar: 906,92 g/mol

O produto **LFOM-112** foi obtido por reação de acilação, no qual em um balão monotubulado de 50 mL de fundo redondo foram adicionados 100 mg (0,1798 mmol) de **LFOM-109** dissolvidos em 5 mL de acetona, com 0,4 mL (0,4024 g; 3,77 mmol) de cloreto de butanoíla (C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>ClO) e 0,4 g (3,77 mmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. O sistema foi mantido em agitação magnética a temperatura ambiente por 3 horas e monitoramento por CCD (hexano/acetato de etila 7:3). Ao final, o material reacional foi transferido para um funil de separação e extraído com acetato de etila (3 x 10 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas em sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por CCD semipreparativa, fornecendo 0,1122 g (0,124 mmol) do produto esperado **LFOM-112**, na forma de um óleo amarelo claro, com 70 % de rendimento.

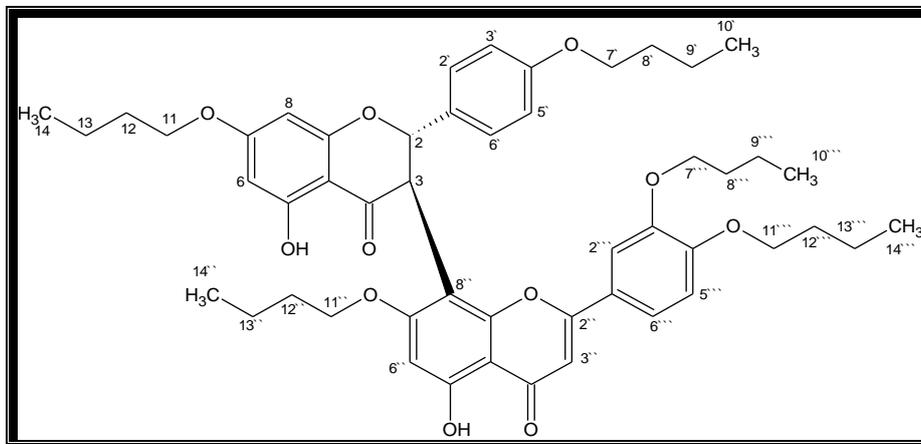
#### 5.4.4 Derivado semissintético: 7,4',7'',4'''-tetra-*O*-*tert*-butilcarbonil-fukugetina **LFOM-109/A** (HANSEN et al, 1998)



Como tentativa de obtenção do produto acilado **LFOM-109/A** foram adicionados 100 mg (0,1798 mmol) de **LFOM-109**, dissolvidos em 5 mL de acetona, com 0,81 mL (0,824 g; 3,77 mmol) de anidrido de di-*tert*-butoxicarbonila (BOC<sub>2</sub>O) e 0,5 g (3,77 mmol) de 4-DMAP, em um balão monotubulado de 50 mL de fundo redondo. O sistema foi mantido em agitação magnética a temperatura ambiente por 5 horas e monitoramento por CCD (hexano/acetato de etila 7:3). Ao final, o material reacional foi transferido para um funil de separação e extraído com acetato de etila (3 x 10 mL). As fases orgânicas combinadas foram neutralizadas com solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>, seca em sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida.

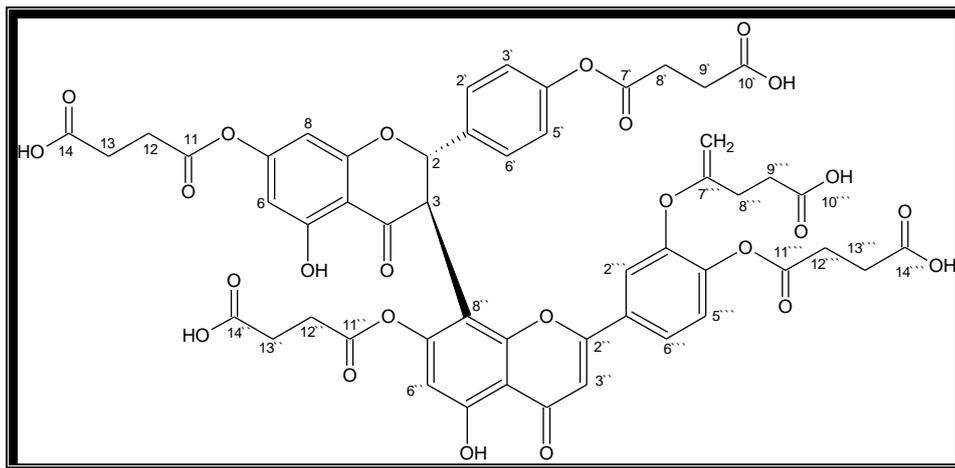
O produto bruto foi submetido à purificação por CC e CLAE semipreparativa, mas não foi possível a separação da mistura.

**5.4.5 Derivado semissintético: 7,4,7'',4''''-tetra-*O*-butoxil-fukugetina LFOM-109/B**  
(HANSEN et al, 1998)



Na tentativa de obtenção do derivado LFOM-109/B adicionou-se em um balão monotubulado de 50 mL de fundo redondo foram adicionados 100 mg (0,1798 mmol) de LFOM-109 dissolvidos em 5 mL de acetona, com 0,41 mL (0,52 g; 3,77 mmol) 1-bromobutano ( $C_4H_9Br$ ) e 0,4 g (3,77 mmol) de  $K_2CO_3$ . O sistema foi mantido em agitação magnética a temperatura ambiente por 3 horas e monitoramento por CCD (hexano/acetato de etila 7:3). Ao final, o material reacional foi transferido para um funil de separação e extraído com acetato de etila (3 x 10 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas em sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada a pressão reduzida. O produto bruto foi submetido à purificação por CC e CLAE semipreparativa, mas não foi possível a separação da mistura.

**5.4.6 Derivado semissintético: 4,4''''-di-*O*-succinil-fukugetina LFOM-109/C**  
(HANSEN et al, 1998)



O derivado **LFOM-109/C** teve sua tentativa de obtenção empregando em um balão monotubulado de 50 mL de fundo redondo 100 mg (0,1798 mmol) de **LFOM-109** dissolvidos em 5 mL de acetona, com 0,81 mL (0,824 g; 3,77 mmol) de anidrido succínico e 0,5 g (3,77 mmol) de 4-DMAP. O sistema foi mantido em agitação magnética a temperatura ambiente por 2 horas e monitoramento por CCD (hexano/acetato de etila 7:3). Ao final, o material reacional foi transferido para um funil de separação e extraído com acetato de etila (3 x 10 mL). As fases orgânicas combinadas foram neutralizadas com solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>, seca em sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada a pressão reduzida. O produto bruto foi submetido à purificação por CC e CLAE semipreparativa, mas não foi possível a separação da mistura.

## 5.5 ENSAIOS DE ATIVIDADE

### 5.5.1 Avaliação da Atividade Antioxidante *in vitro*

#### 5.5.1.1 Avaliação do Poder Sequestrante de Radicais DPPH

A medida da atividade sequestrante de radicais DPPH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Yen et al. (2005) com modificações. Adicionou-se 4,0 mL da solução das amostras (nas concentrações de 400, 200, 100, 50, 25 e 12,5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) em etanol, a serem testadas a 1,0 mL de solução do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila) (0,5 mM). A mistura foi agitada vigorosamente e mantida em repouso,

sob proteção de luz, por 30 minutos. Logo após, foram lidas as absorvâncias a 517 nm em espectrofotômetro UV/*vis.* (em triplicata).

O DPPH é um radical estável, de cor púrpura quando em solução etanólica apresenta uma banda de absorção a 517nm. Quando misturado a uma substância capaz de doar um hidrogênio e seqüestrar o seu radical, o DPPH passa a 1,1-difenil-2-picrilidrazina (DPPH-H) de cor amarela. Quanto menor a absorvância maior o potencial sequestrante. Para avaliar a atividade captadora do radical, foi obtida a porcentagem de inibição, de acordo com a equação: % de inibição = [(absorvância do controle - absorvância da amostra)/absorvância do controle] x 100.

A determinação da concentração de amostra ou padrão que causa 50% de inibição da concentração (CE<sub>50</sub>) inicial de DPPH foi obtida por regressão linear dos pontos plotados graficamente. Para a plotagem dos pontos, foram utilizados os valores das médias obtidas de triplicatas realizadas para cada uma das substâncias.

#### 5.5.1.2 Avaliação do Poder Redutor dos Constituintes Químicos

A avaliação do poder de redução das amostras foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Yen e Chen (2005) com modificações.

As amostras foram diluídas (nas concentrações de 400, 200, 100, 50, 25 e 12,5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e de cada uma foi retirada uma alíquota de 1,0 mL para tubos de ensaio de 25,0 mL. A esta alíquota foram adicionados misturas de 2,5 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 6,6); 2,5 mL de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (1%). A mistura foi mantida em banho-Maria a 45°C por 20 minutos. Uma porção de 2,5 mL de ácido tricloroacético (10%) foi adicionada à solução no tubo de ensaio, com posterior agitação. Uma quantidade de 2,5 mL da mistura foi pipetada e transferida para outro tubo de ensaio, no qual foram adicionados 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de  $\text{FeCl}_3$  (0,1%). A leitura da absorvância foi realizada a 700 nm em espectrofotômetro UV/Vis. Uma elevada absorvância indicando grande poder redutor. As amostras foram analisadas em triplicata.

A determinação de percentual inibitório máximo foi obtida por regressão linear dos pontos plotados graficamente. Para a plotagem dos pontos, foram utilizados os valores das médias obtidas de triplicatas realizadas para cada uma das substâncias.

## 5.5.2 Testes Antiparasitários

### 5.5.2.1 Ensaio da atividade antipromastigota

Formas promastigotas de *L.L. amazonensis* (MHOM/BR/71973/M2269) foram mantidas em meio Schneider's suplementado com 10% de soro fetal bovino em estufa a 25°C. Para a realização dos testes foram transferidas cerca de  $1 \times 10^6$  células/mL para placas de 24 poços, onde então foram adicionadas as substâncias a serem avaliadas em várias concentrações (40, 20, 10 e 5 µg/mL). Após 72 horas de incubação a 25°C os protozoários foram contados em câmara de Neubauer para a determinação do CI<sub>50</sub> (concentração inibitória de 50% do crescimento celular), tendo como controles protozoários em meio de cultura sem a adição dos compostos. Este CI<sub>50</sub> foi então comparado ao CI<sub>50</sub> do padrão pentamidina nas mesmas concentrações empregadas para as amostras (PEREIRA et al, 2010).

### 5.5.2.2 Ensaio da atividade anti-amastigota

Macrófagos foram isolados da cavidade peritoneal de camundongos, sendo estes sacrificados por deslocamento da coluna cervical, e as células contadas em câmara de Neubauer. Os macrófagos peritoneais murinos foram mantidos em meio RPMI1640 a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, em placas de 24 poços, os quais foram infectados com promastigotas de *L.L. amazonensis* na fase log de crescimento na razão de 10:1. A cada poço foram adicionadas as substâncias a serem avaliadas em várias concentrações (40, 20, 10 e 5 µg/mL), e incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 72 horas, quando então foram fixadas com metanol e coradas com Giensa a 10% para posterior análise por microscopia ótica e determinação da razão entre macrófagos infectados e não infectados para determinação do CI<sub>50</sub> em relação ao controle sem adição dos compostos. O resultado foi comparado ao CI<sub>50</sub> do padrão pentamidina nas mesmas concentrações empregadas para as amostras, e como controle foram utilizados macrófagos infectados sem a adição dos compostos (PEREIRA et al, 2010).

### 5.5.2.3 Avaliação Citotóxica

Para avaliar o efeito de citotoxicidade das substâncias sobre os macrófagos não infectados o cultivo foi feito como descrito acima (Ensaio da atividade anti-mastigota), com o diferencial de se ter empregado azul de tripan para avaliar a viabilidade celular. Foi determinada a concentração citotóxica de 50% (CC<sub>50</sub>). O controle foi “macrófago não infectado sem adição das substâncias” e os testes foram feitos em duplicatas.

### 5.5.3 Ensaio Enzimático Fluorimétrico

A hidrólise (FIGURA 18) do substrato peptídico fluorogênico (Z-FR-MCA) foi monitorada no  $\lambda_{ex} = 380$  nm e  $\lambda_{em} = 460$  nm (comprimento de onda de excitação e emissão para o MCA) e o espectrofluorímetro foi calibrado com soluções padrão de MCA. A solução estoque desses substratos (1mg/mL, em água: DMF/1:1) foi diluída diversas vezes no tampão específico para cada enzima.

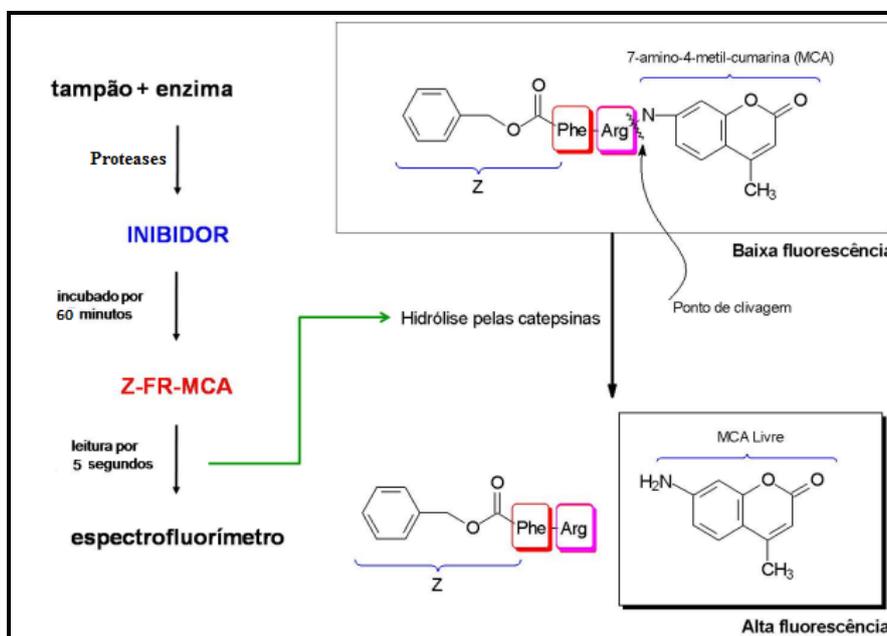


FIGURA 18 – Esquema geral dos ensaios enzimáticos com o substrato fluorogênico Z-FR-MCA, mostrando o ponto de clivagem pelas proteases.

#### 5.5.3.1. Determinação do tempo necessário para a inibição enzimática

Para a determinação do tempo necessário para a inibição, as enzimas foram diluídas no tampão de ensaio respectivo a cada enzima. Soluções estoques dos

compostos foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) os quais foram diluídos no mesmo tampão de forma a obter uma concentração fixa de inibidor no ensaio. O início da contagem do tempo procedeu-se no momento em que a enzima entrou em contato com o inibidor. Uma alíquota 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.

#### 5.5.3.2 Papaína

Papaína ( $0,025 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) foi pré-ativada com ditioneitol (DTT)  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  e incubada com as soluções, em concentrações pré-determinadas, dos compostos em tampão fosfato de sódio  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  (pH 6,8) contendo  $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$  de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), à  $25^\circ\text{C}$ . Uma alíquota desse pré-incubado foi diluída em cubeta no tampão (volume final de 1 mL). A dosagem da atividade enzimática foi iniciada pela adição do substrato Z-Phe-Arg-MCA ( $3,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ).

#### 5.5.3.3 Tripsina

Tripsina ( $0,025 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) foi incubada com os compostos em tampão Tris-HCl  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  (pH 8,0) contendo  $\text{CaCl}_2$   $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , à  $25^\circ\text{C}$ . Uma alíquota desse pré-incubado foi diluída no tampão. A dosagem da atividade enzimática foi iniciada pela adição de Z-Phe-Arg-MCA ( $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ).

#### 5.5.3.4 Atividade inibitória contra as isoformas r-CPB2.8 e r-CPB3 de *L. mexicana*

As enzimas r-CPB2.8 e sua isoforma r-CPB3 de *L. mexicana* foram expressas, purificadas e ativadas como descrito anteriormente (SANDERSON et al, 2000; ALVES et al, 2001). A concentração da solução enzimática foi determinada por titulação com cistatina C humana, que foi uma generosa doação de M. Abrahamson (Universidade de Lund, Suécia), utilizando Z-Phe-Arg-MCA como substrato. A hidrólise do substrato peptídeo fluorogênico pelas enzimas foi realizada em acetato de sódio  $0,1 \text{ M}$ , pH 5,5, a  $37^\circ\text{C}$ , contendo  $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de DTT para ativação enzimática por 10 min. A hidrólise do substrato foi monitorada através das medidas da fluorescência em  $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$  com

excitação de  $\lambda_{em} = 460$  nm usando um F-2500 espectrofluorímetro Hitachi. Os valores dos  $CI_{50}$  foram determinados usando o software Grafit 5,0 (Erithacus Software Ltda).

#### 5.5.3.5 Ensaio da atividade leishmanicida em lisados de *L. amazonensis*

A partir da obtenção das formas promastigota e amastigota descrita nos itens 5.5.2.1 e 5.5.2.2 estas foram usadas na determinação da atividade intracelular. Para a preparação dos lisados, realizou-se o procedimento descrito a seguir.

As soluções de promastigotas e amastigotas foram centrifugadas a 3500 rpm, separadas em eppendorfs contendo  $1 \times 10^9$  células/mL e congeladas a  $-20^{\circ}C$ . Os pellets foram ressuspensos em 100 mL de tampão NaCl (0,9 %), Triton X 100 (0,1%) e, mantidos em gelo seguido de ultrassonicação. A solução foi completada para 200 mL e centrifugada por 10 minutos. O sobrenadante foi separado do material depositado e utilizado nos ensaios cinéticos. Após este procedimento foi adicionado substrato Z-Phe-Arg-MCA na concentração de  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  para o acompanhamento da atividade enzimática. Os ensaios de inibição da atividade enzimática foram realizados nos pHs 5 e 8, os quais são semelhantes ao ambiente aonde são encontradas as formas amastigota e promastigota, respectivamente.

#### 5.6 Análises Estatísticas

Os valores de  $CE_{50}$  para a atividade sequestrante e poder redutor, foram calculados utilizando o software Grafit 5.0. e expressos como média  $\pm$  desvio padrão. A análise estatística para a atividade leishmanicida foi realizada usando regressão linear para se obter os valores de  $CI_{50}$  (concentração que inibe o crescimento de 50% dos microrganismos) e  $CC_{50}$  (concentração citotóxica para 50% de macrófagos) através do Teste de ANOVA. Os resultados foram mostrados em porcentagem de inibição em relação ao controle. Os  $CI_{50}$  da atividade inibitória enzimática foram demonstrados utilizando o software Grafit 5.0.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Elucidação estrutural das substâncias isoladas e dos derivados semissintéticos

#### 6.1.1 Composto Natural: 1,3,6,7-tetraidroxixantona (**LFQM-105**)

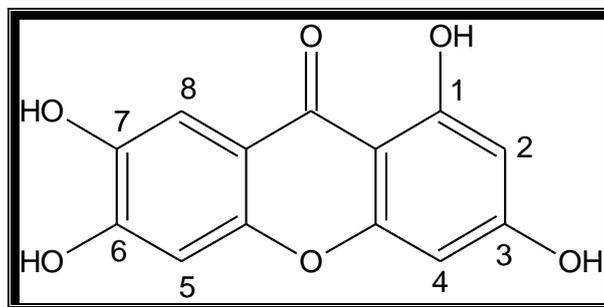


FIGURA 19 – Composto natural 1,3,6,7-tetraidroxixantona (**LFQM-105**).

A substância **LFQM-105** (FIGURA 19), isolada de EAEE, apresentou características, de acordo com o perfil cromatográfico, de xantona (SIMÕES et al., 2003) quando analisada por CCD e revelada sob luz ultravioleta e com solução sulfovanilínica. Sua proposta estrutural foi baseada em dados de RMN de  $^1\text{H}$ , gHMQC, gHMBC e COSY (SILVERSTEIN et al., 2006).

O espectro de absorção na região do IV (FIGURA 20) da **LFQM-105** evidenciou a natureza aromática do composto pelas bandas de absorção em  $3373\text{ cm}^{-1}$  característica de compostos aromáticos hidroxilados, uma banda larga e intensa;  $2967\text{ cm}^{-1}$  referente à deformação axial de C-H do anel aromático;  $1648$ ,  $1615$ ,  $1578$  e  $1480\text{ cm}^{-1}$  deformação axial de C=C do anel;  $1371\text{ cm}^{-1}$  deformação angular no plano de O-H, deformação axial de C-O em  $1300$  e  $1222\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular fora do plano de C-H em  $1009$  e  $973\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular fora do plano de C=C em  $785$  e  $706\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular fora do plano de O-H em  $618\text{ cm}^{-1}$ .

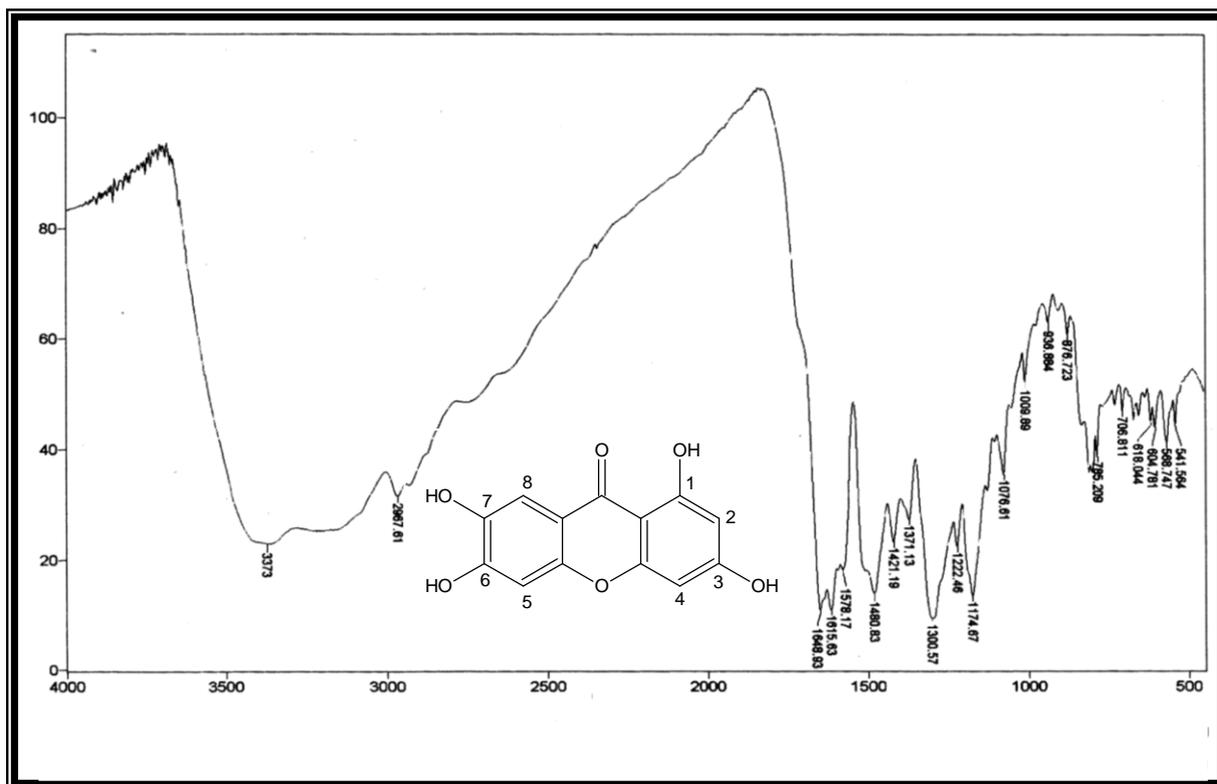


FIGURA 20- Espectro no IV (KBr) para o composto **LFOM-105**.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (SILVERSTEIN et al., 2006) (FIGURA 21 – TABELA 1) para **LFOM-105** foi obtido em  $\text{DMSO-}d_6$ , o qual apresentou sinais compatíveis para uma xantona.

A região entre  $\delta$  6,00-8,00 ppm – correspondente aos hidrogênios dos anéis aromáticos - apresentou sinais duplos (dupletos) em  $\delta$  6,32 ppm ( $J = 2,00$  Hz) e  $\delta$  6,17 ppm ( $J = 2,00$  Hz), referente aos H-4 e H-2 respectivamente, com integração para um hidrogênio cada um. As constantes de acoplamento observadas (entre 0-3 Hz) indicam uma relação *meta* entre esses hidrogênios. Estes sinais foram atribuídos aos hidrogênios H-4 e H-2 do anel com hidroxila substituída na posição 1 (1-OH). Também observou-se um singleto em  $\delta$  7,37 ppm referente ao H-8 do anel aromático 6,7-diidroxilado, o qual possui acoplamento com o H-5 que é um singleto em  $\delta$  6,92 ppm. A região em torno de  $\delta$  13 ppm corresponde aos hidrogênios da hidroxila quelatogênica presente no composto **LFOM-105**, ou seja, OH-1.

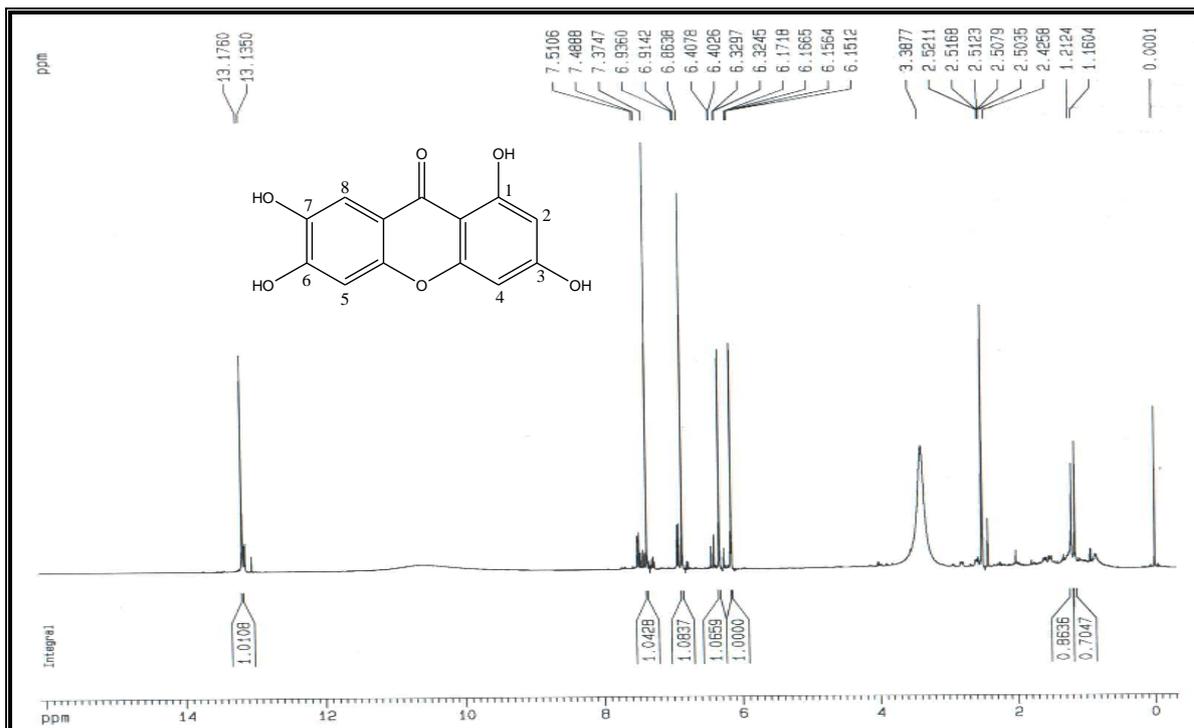


FIGURA 21– Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz para **LEOM-105** ( $\text{DMSO-}d_6$ ).

No experimento de **COSY** (FIGURA 22 – TABELA 1), observou-se acoplamentos entre  $\text{H-8} \rightarrow \text{H-5}$  ( $\delta$  7,37 ppm  $\rightarrow$   $\delta$  6,92 ppm) para o anel aromático dihidroxilado nas posições 6 e 7 (-OH), além da correlação entre  $\text{H-4} \rightarrow \text{H-2}$  ( $\delta$  6,32 ppm  $\rightarrow$   $\delta$  6,17 ppm) para o anel aromático dihidroxilado nas posições 1 e 3 (-OH) e que de acordo com a constante de acoplamento ( $J = 2$  Hz) encontram-se dispostos em *meta* um em relação ao outro, o qual também foi evidenciado no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ .

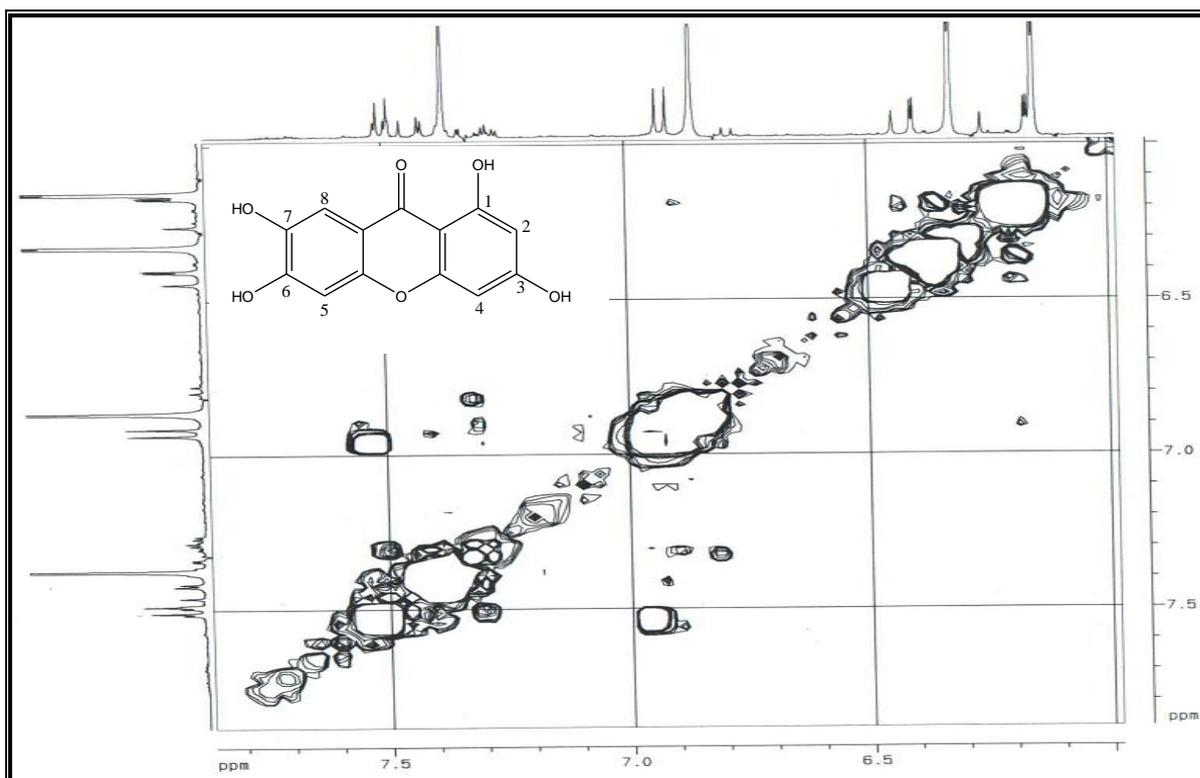


FIGURA 22– Mapa de contornos COSY –  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  a 400 MHz para **LEOM-105** ( $\text{DMSO-}d_6$ ).

O mapa de contornos  $g\text{HMQC}$  (FIGURA 23 – TABELA 1), mostrou correlações entre H-4 ( $\delta$  6,32 ppm) e C-4 ( $\delta$  94 ppm), H-8 ( $\delta$  7,37 ppm) e C-8 ( $\delta$  107,2 ppm), H-5 ( $\delta$  6,92 ppm) e C-5 ( $\delta$  112,6 ppm), H-2 ( $\delta$  6,17 ppm) e C-2 ( $\delta$  98,0 ppm).

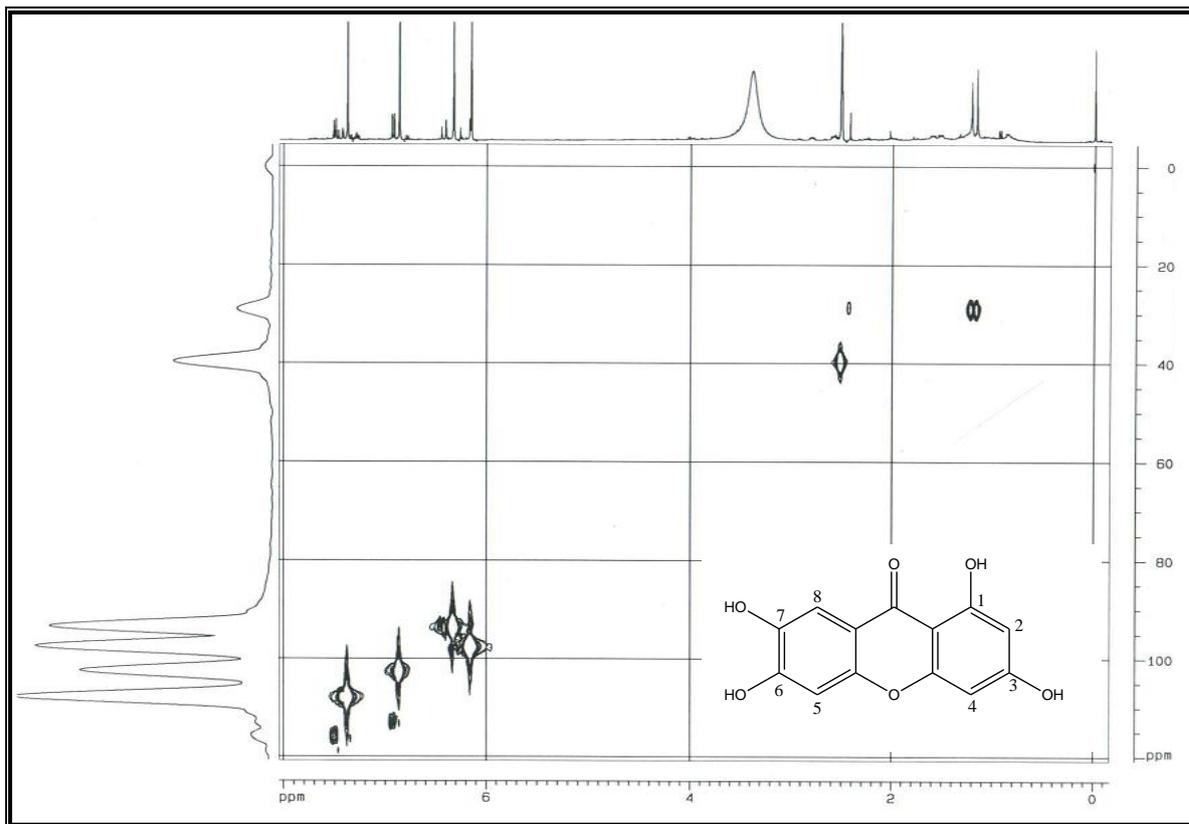


FIGURA 23 – Mapa de contornos gHMBC a 400 MHz para **LEOM-105** (DMSO- $d_6$ ).

O mapa de contornos gHMBC (FIGURA 24 – TABELA 1) mostrou correlações entre H-8 ( $\delta$  7,37 ppm) e C-7 ( $\delta$  143,0 ppm), C-9 ( $\delta$  117,0 ppm) ambos com  $^2J_{H-C}$ , H-8 ( $\delta$  7,37 ppm), C-10 ( $\delta$  151,0 ppm), C-6 ( $\delta$  157,0 ppm), C-13 ( $\delta$  179,0 ppm), todos com correlações  $^3J_{H-C}$ . Correlações entre H-5 ( $\delta$  6,92 ppm), C-10 ( $\delta$  147,0 ppm), C-6 ( $\delta$  154,0 ppm) com  $^2J_{H-C}$ , H-5 ( $\delta$  6,92 ppm) e C-7 ( $\delta$  143,0 ppm), C-9 ( $\delta$  117,0 ppm) com correlações  $^3J_{H-C}$ . Foram observados ainda correlações entre H-4 ( $\delta$  6,32 ppm), C-11 ( $\delta$  157,0 ppm), C-3 ( $\delta$  164,0 ppm) ambos com  $^2J_{H-C}$  e H-4 ( $\delta$  6,32 ppm), C-12 ( $\delta$  103,0 ppm), C-2 ( $\delta$  98,0 ppm) com correlação  $^3J_{H-C}$ . Por sua vez, correlações entre H-2 ( $\delta$  6,17 ppm), C-1 ( $\delta$  163,0 ppm), C-3 ( $\delta$  164,0 ppm) ambos com  $^2J_{H-C}$  e H-2 ( $\delta$  6,17 ppm), C-12 ( $\delta$  103,0 ppm) e C-4 ( $\delta$  94,0 ppm) com correlação  $^3J_{H-C}$ .

Sendo assim com estas correlações é possível inferir que tratava-se de uma xantona, que neste caso é 1,3,6,7-tetraidroxixantona, **LEOM-105** (FIGURA 19).

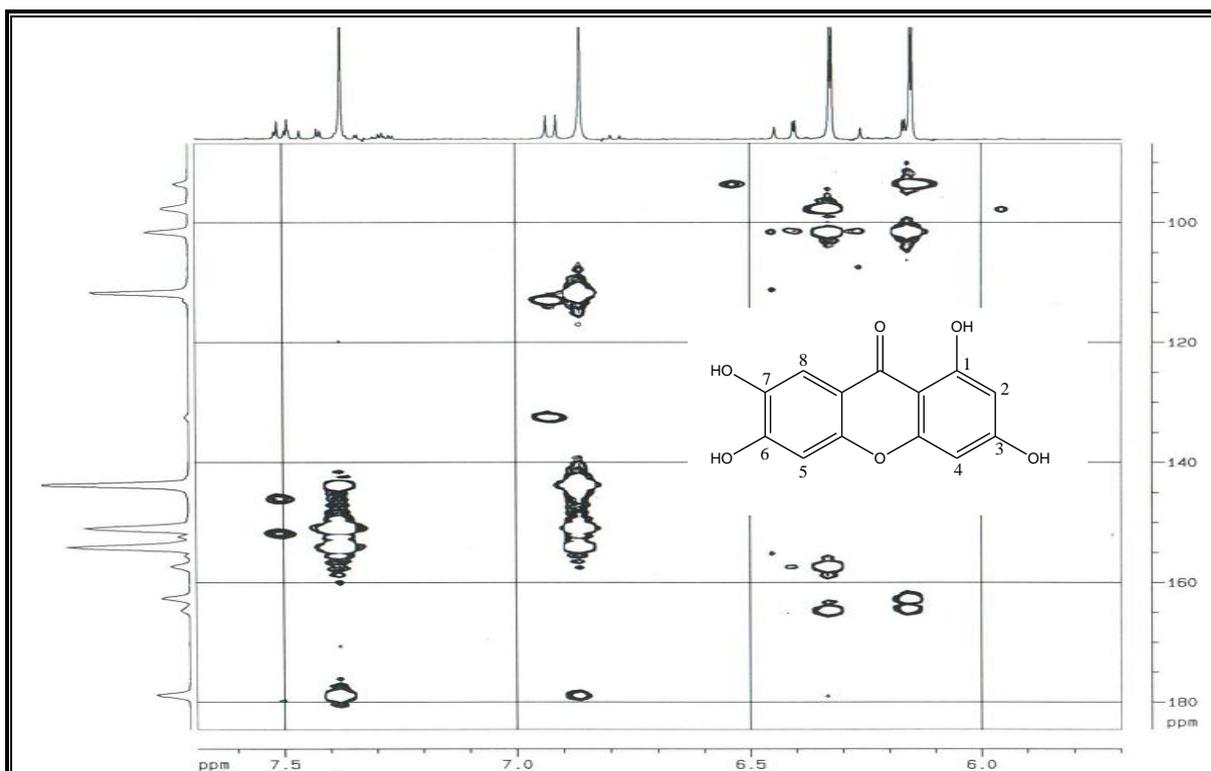


FIGURA 24 – Mapa de contornos gHMBC a 400 MHz para **LFOM-105** (DMSO- $d_6$ ).

TABELA 1- Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do **LFOM-105** (DMSO- $d_6$ , 400 e 100 MHz)

Posição	$\delta^{**}\text{C}$	$\delta^*\text{H}$ , $m$ , $J$	gHMQC ( $^1J_{\text{CH}}$ )	gHMBC ( $^2J_{\text{CH}}$ )	( $^3J_{\text{CH}}$ )
1	163,0	13,17	-	H-2	-
2	98,0	6,17; $d$ ; 2	H-2	-	H-4
3	164,0	-	-	H-4/H-2	-
4	94,0	6,32; $d$ ; 2	H-4	-	H-2
5	112,6	6,92; $s$	H-5	-	-
6	154,0	-	-	H-5	H-8
7	143,0	-	-	H-8	H-5
8	107,2	7,37; $s$	H-8	-	-
9	117,0	-	-	H-8	H-5
10	147,0	-	-	H-5	H-8
11	157,0	-	-	H-4	H-4
12	103,0	-	-	-	H-2
13	179,0	-	-	-	H-8

$\delta^*$  = valores expressos em ppm;  $J$  = constante de acoplamento, expressa em Hertz (Hz);  $m$  = multiplicidade;  $dd$  = duplo duplete,  $d$  = duplete,  $m$  = multiplete,  $s$  = simpleto.  $**$ Os deslocamentos químicos dos átomos de carbono foram obtidos dos mapas de contorno gHMQC e gHMBC.

### 6.1.3 Composto Natural: Ácido kójico (**LFOM-106**)

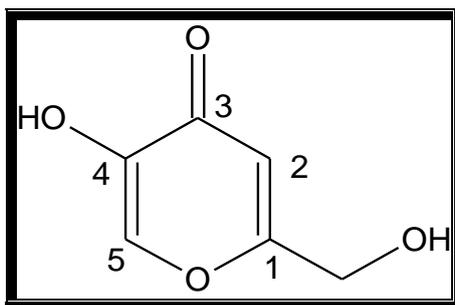


FIGURA 25 – Composto natural ácido kójico (**LFOM-106**).

O composto natural ácido kójico (**LFOM-106**) (FIGURA 25) foi isolado do EAEE como um sólido cristalino de coloração laranja. Sua estrutura cristalográfica foi determinada conforme os dados de difração de raios-X (DRX), cujo refinamento da estrutura encontra-se na TABELA 2, além das absorções na região do IV.

O espectro de absorção na região do IV (FIGURA 26) da **LFOM-106** evidenciou a presença de bandas de absorção entre  $3172 - 3000 \text{ cm}^{-1}$  característica de deformação axial de  $\text{Csp}^2\text{-H}$  do anel;  $1701 \text{ cm}^{-1}$  referente à deformação axial de  $\text{C=O}$ , a qual ocorre na mesma região de ésteres não conjugados de cadeia linear. Em  $1660$ ,  $1627$ ,  $1610$  e  $1581 \text{ cm}^{-1}$  referente à deformação axial de  $\text{C=C}$  do anel;  $1346 \text{ cm}^{-1}$  deformação angular no plano de  $\text{O-H}$ , deformação angular fora do plano de  $\text{C-H}$  em  $1141$  e  $1074 \text{ cm}^{-1}$ , deformação angular fora do plano de  $\text{C=C}$  em  $763$  e  $752 \text{ cm}^{-1}$ , deformação angular fora do plano de  $\text{O-H}$  em  $636 \text{ cm}^{-1}$ .

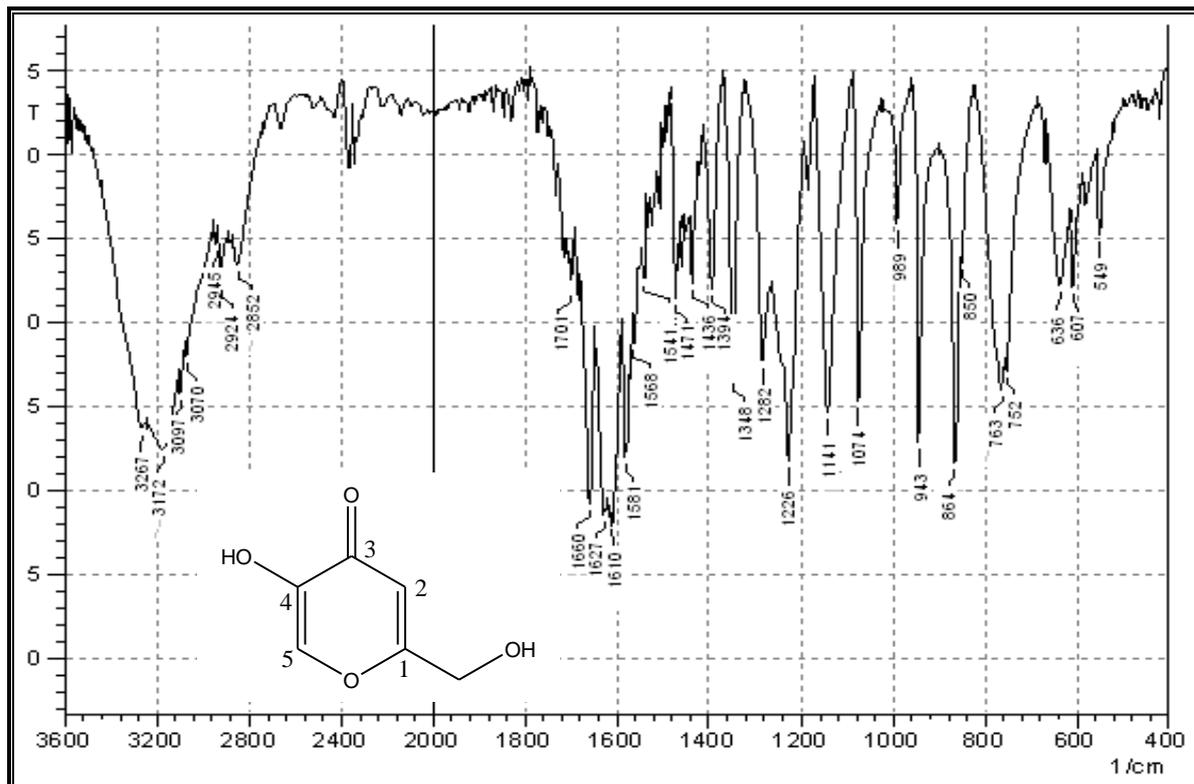


FIGURA 26- Espectro no IV (KBr) para o composto **LFOM-106**.

As estruturas molecular e cristalina do ácido kójico – **LFOM-106** (FIGURAS 27 e 28) foram analisadas com o auxílio dos softwares ORTEP-3 e Mercury, ambos de licença livre e amplamente utilizados para tal fim. Analisando a estrutura molecular, pode-se verificar que o anel A (C1 – C2 – C3 – O1 – C4 – C5) é completamente planar. E analisando a estrutura cristalina, observa-se a presença de ligações de hidrogênio intermoleculares estabilizando o empacotamento. Estas ligações arranjam as moléculas bidimensionalmente ao longo das direções [010] e [001]. O átomo O2 age como acceptor e doador de ligações de hidrogênio, enquanto os átomos O3 e O4 agem como doador e acceptor respectivamente.

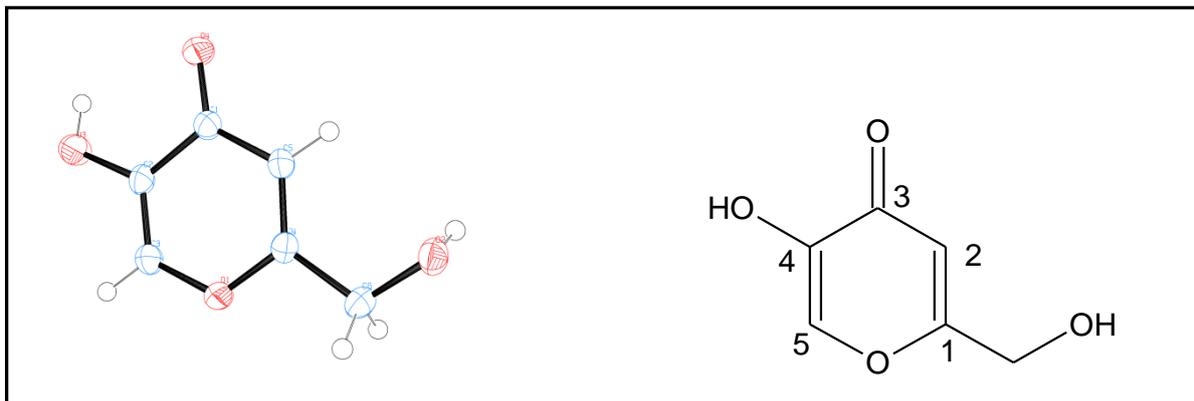


FIGURA 27 – Estrutura molecular do ácido Kójico – **LFOM-106** analisada com o auxílio dos softwares ORTEP-3 e Mercury.

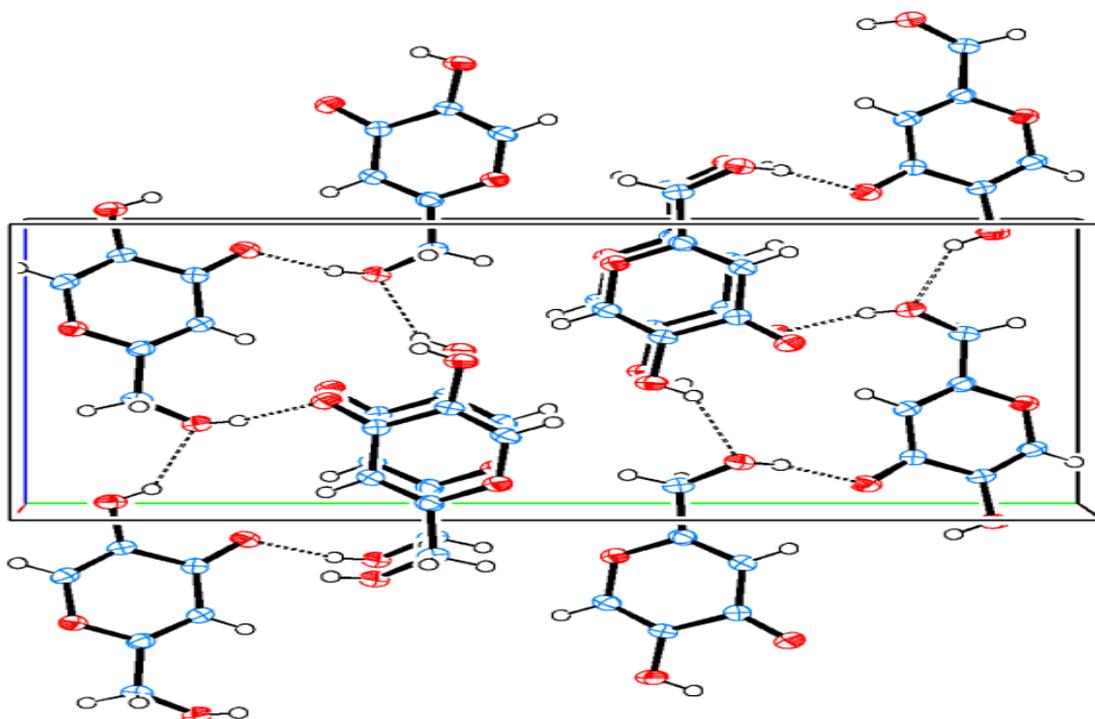


FIGURA 28 – Estrutura cristalina do ácido kójico – **LFOM-106** analisada com o auxílio dos softwares ORTEP-3 e Mercury.

TABELA 2 - Dados cristalinos e refinamento de estrutura do Ácido kójico – **LFOM-106**.

<b>Fórmula empírica</b>	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	
<b>Peso molecular</b>	142.11	
<b>Temperatura [K]</b>	293(2) K	
<b>Comprimento de onda [Å]</b>	0.71073 Å	
<b>Sistema Cristalino</b>	monoclínico	
<b>Grupo Espacial</b>	P21/n	
<b>Dimensões da célula unitária</b>	a = 3.8196(2) Å	alpha = 90 deg.
	b = 18.3954(7) Å	beta = 96.567(4) deg
	c = 8.5033(4) Å	gamma = 90 deg.
<b>Volume [Å<sup>3</sup>]</b>	593.55(5)	
<b>Z</b>	4	
<b>Densidade (calculado) [Mg/m<sup>3</sup>]</b>	1.590 Mg/m <sup>3</sup>	
<b>Coefficiente de absorvidade [mm<sup>-1</sup>]</b>	0.137 mm <sup>-1</sup>	
<b>F(000)</b>	296	
<b>Tamanho do cristal [mm]</b>	? x ? x ? mm	
<b>θ-Faixa de coleta de dados [°]</b>	3.27 to 29.36 deg.	
<b>Índices</b>	-5<=h<=5, -25<=k<=24, -9<=l<=11	
<b>Reflexões coletadas</b>	4871 / 1428 [R(int) = 0.0288]	
<b>Reflexões independentes</b>		
<b>Angulo complementar =28.12°</b>	87.0 %	
<b>Método de refinamento</b>	Total de matrizes em quadrado F <sup>2</sup>	
<b>Dados/refinamentos/parametros</b>	1428 / 0 / 94	
<b>Goodness-of-fit on F<sup>2</sup></b>	1.098	
<b>Final R pra I&gt;2σ(I)</b>	R1 = 0.0340, wR2 = 0.0906	
<b>Índices R (todos os dados)</b>	R1 = 0.0470, wR2 = 0.0949	
<b>Maiores picos de difrações [e.Å<sup>-3</sup>]</b>	0.265 e -0.179 e.Å <sup>-3</sup>	

Os espectros no ultravioleta (UV) do ácido kójico – **LFOM-106** (FIGURAS 29 e 30) mostraram bandas de absorções com  $\lambda_{\text{máx}}(\log \epsilon \{\text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}\})$  em 217 nm (5,72) e 270 nm (5,52). A adição de solução de AlCl<sub>3</sub> à solução provocou um deslocamento batocrômico nas bandas com  $\lambda_{\text{máx}}(\log \epsilon \{\text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}\})$  em 201 nm (5,73), 209 nm (5,85), 253 nm (5,19) e 305 nm (5,32), o que sugere a existência de grupo quelatogênico. A adição de solução de HCl não restaurou a banda para seu estado inicial, confirmando assim presença de grupo quelatogênico, com absorções com  $\lambda_{\text{máx}}(\log \epsilon \{\text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}\})$  em 252 nm (5,20), 305 nm (5,30) e 360 nm (6,85). Com a adição de NaOAc foi observado um desvio batocrômico nas bandas com  $\lambda_{\text{máx}}(\log \epsilon \{\text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}\})$  em 269 nm(5,27) e 315 nm (5,08), sugerindo a presença de hidroxila ácida. Na presença de NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> observou-se um desvio batocrômico em relação a solução inicial sem aditivos, com absorções com  $\lambda_{\text{máx}}(\log \epsilon \{\text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}\})$  em 270 nm (5,35) e 314 nm (4,91), indicando a presença de hidroxila ácida devido a não restauração da banda para seu estado inicial.

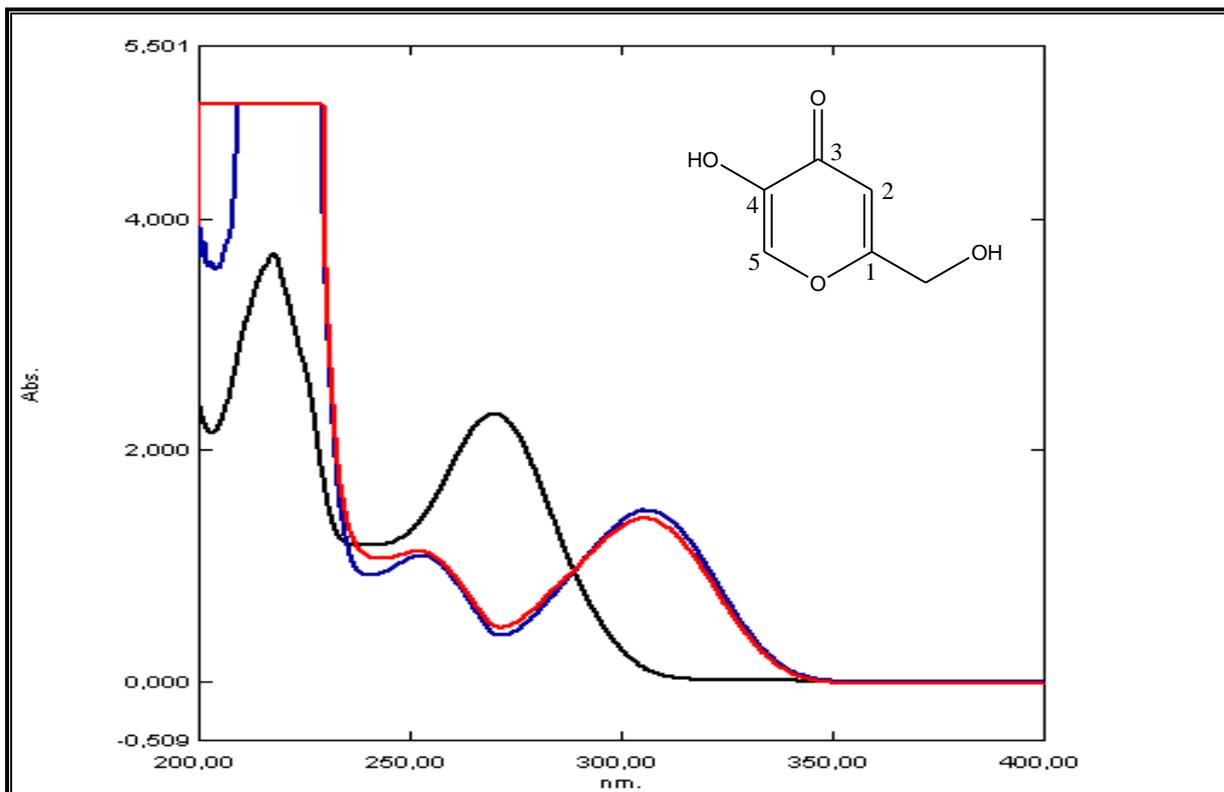


FIGURA 29 – Espectro no ultravioleta de **LFQM-106**. Curva de cor preta (**LFQM-106+ EtOH**); Curva de cor azul (**LFQM-106+ EtOH+AlCl<sub>3</sub>**); Curva de cor vermelha (**LFQM-106+ EtOH+AlCl<sub>3</sub>+HCl**).

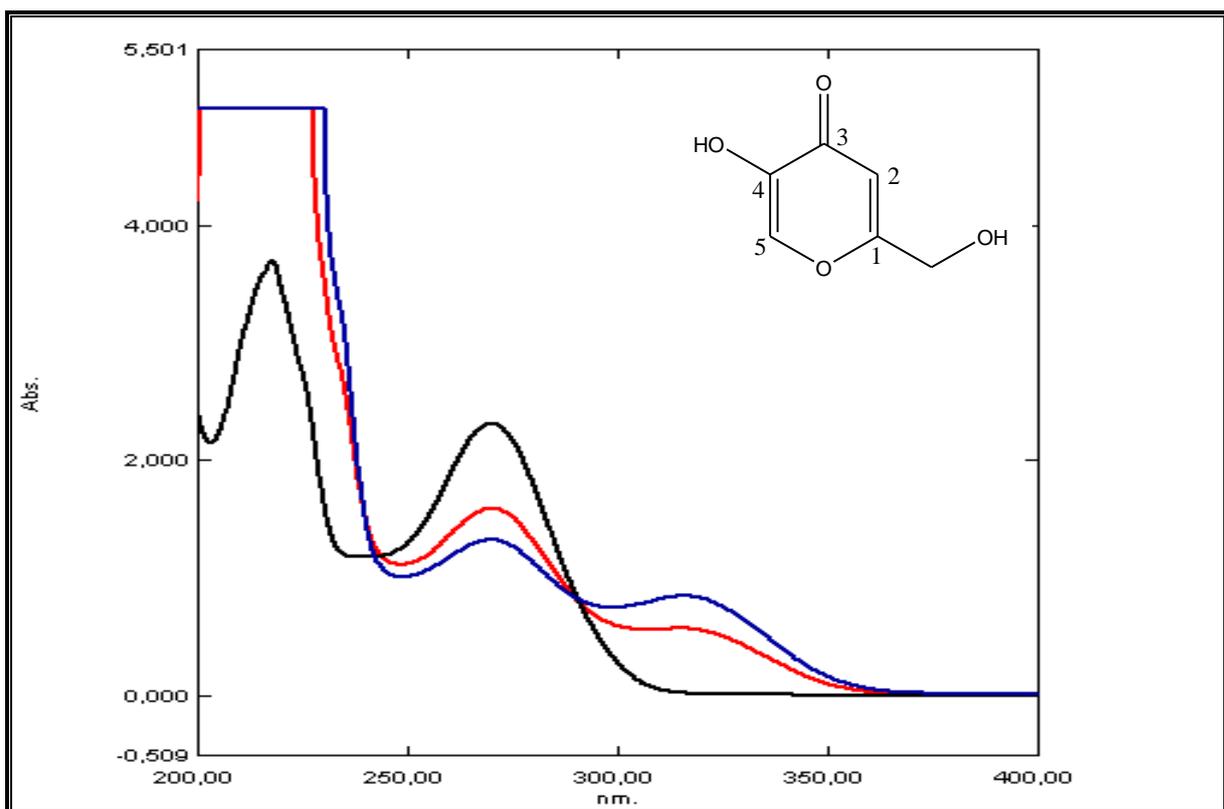


FIGURA 30– Espectro no ultravioleta de **LFQM-106**. Curva de cor preta (**LFQM-106+EtOH**); Curva de cor azul (**LFQM-106+ EtOH+NaOAc**); Curva de cor vermelha (**LFQM-106+ EtOH+NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>**).

### 6.1.4 Composto Natural: Fukugetina-4''''-O- $\beta$ -D-glicosídeo (**LFOM-107**)

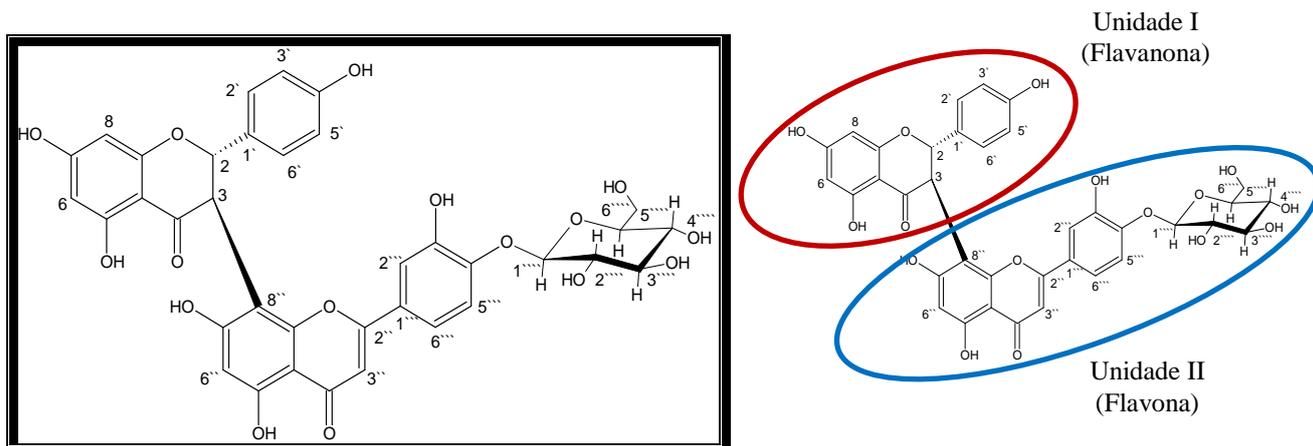


FIGURA 31 – Composto natural Fukugetina-4''''-O- $\beta$ -D-glicosídeo (**LFOM-107**).

A substância **LFOM-107** (FIGURA 31), isolada de EAEE, apresentou características de aromática de acordo com o perfil cromatográfico quando analisada por CCD e revelada sob luz ultravioleta e com solução sulfo-vanilínica. Sua proposta estrutural foi baseada em dados de RMN de  $^1\text{H}$ , gHMQC, gHMBC e COSY (SILVERSTEIN et al., 2006).

O espectro de absorção na região do IV (FIGURA 32) da **LFOM-107** mostrou características de substância aromática pelas bandas de absorção em  $3405\text{ cm}^{-1}$  característica do grupo hidroxila com uma banda intensa,  $1643\text{ cm}^{-1}$  referente à deformação axial de C=O que é influenciada pela deslocalização de elétrons pelo efeito de conjugação com o anel aromático e ligação de hidrogênio intramolecular (SILVERSTEIN et al., 2006); em  $1601$  e  $1518\text{ cm}^{-1}$ , deformação axial de C=C do anel aromático devido à conjugação da carbonila com a ligação C=C que desloca os valores para uma menor frequência; em  $1261\text{ cm}^{-1}$  deformação axial de C-O;  $1170$  e  $1085\text{ cm}^{-1}$  deformação angular fora do plano de C=C;  $836\text{ cm}^{-1}$  deformação angular fora do plano (DAFP) de C-H do anel aromático e em  $630$  e  $529\text{ cm}^{-1}$  deformação angular fora do plano de O-H.

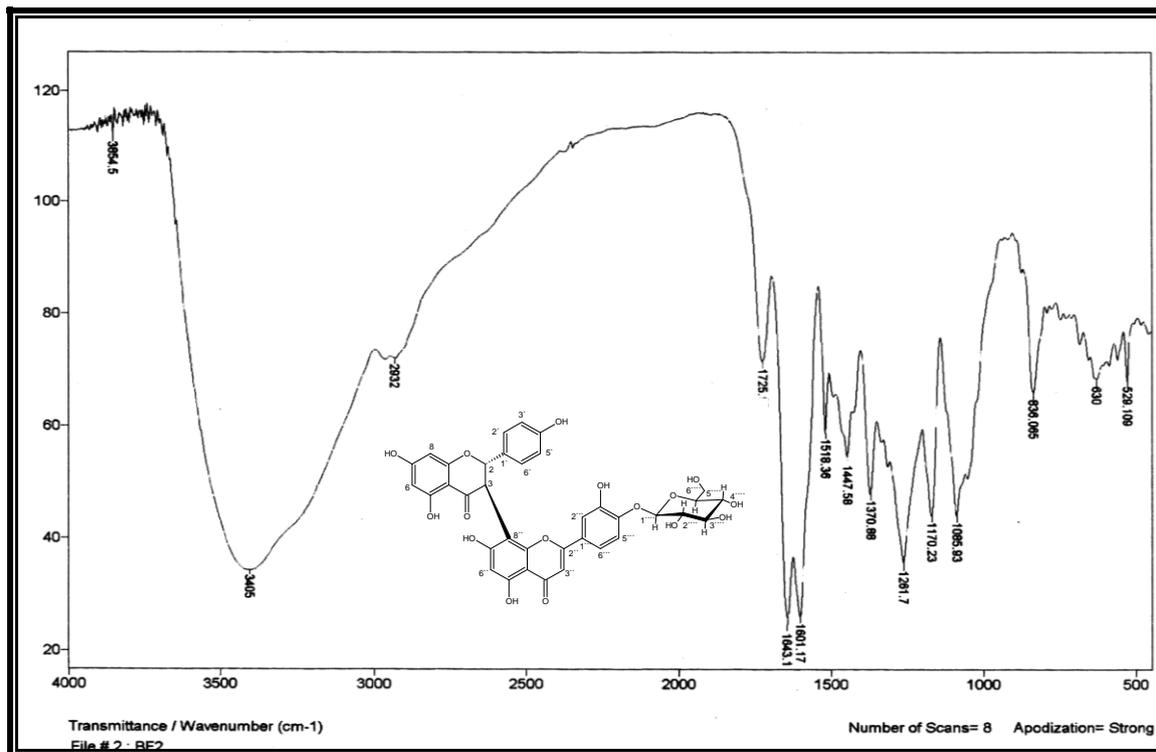


FIGURA 32- Espectro no IV (KBr) para o composto **LFOM-107**.

Os espectros no ultravioleta (UV) da **LFOM-107** (FIGURA 33 e 34) mostrou bandas de absorções com  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\log \epsilon \{ \text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \}$ ) em 204 nm (6,37), 257 nm (5,96), 274 nm (5,98), 291 nm (5,99) e 343 nm (5,86). A adição de solução de  $\text{AlCl}_3$  a solução provocou um deslocamento batocrômico, com absorções com  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\log \epsilon \{ \text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \}$ ) em 207 nm (6,36), 221 nm (6,33), 281 nm (6,05), 358 nm (5,70) e 400 nm (5,72), o que sugere a existência de hidroxilas em *orto* e/ou grupos quelatogênicos. A adição de solução de HCl não restaurou a banda para seu estado inicial, confirmando assim presença de grupos quelatogênicos, com absorções com  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\log \epsilon \{ \text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \}$ ) em 206 nm (6,38), 220 nm (6,34), 282 nm (6,03), 297 nm (6,00), 355 nm (5,77) e 392 nm (5,72). Com a adição de NaOAc foi observado um desvio batocrômico nas bandas com  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\log \epsilon \{ \text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \}$ ) em 204 nm (6,45), 254 nm (5,96), 274 nm (5,97), 289 nm (5,95) e 338 nm (5,87), sugerindo a presença de hidroxila ácidas (C-7 e C-7''). Na presença de NaOAc/ $\text{H}_3\text{BO}_3$  observou-se um desvio batocrômico em relação a solução inicial sem aditivos, com absorções com  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\log \epsilon \{ \text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \}$ ) em 207 nm (6,45), 265 nm (6,01) e 375 nm (5,75), indicando a presença do grupo *orto*-diidroxil devido a não restauração da banda para seu estado inicial. Desta forma, através da análise por ultravioleta verificou que se tratava de um esqueleto flavonoídico com hidroxilas fenólicas.

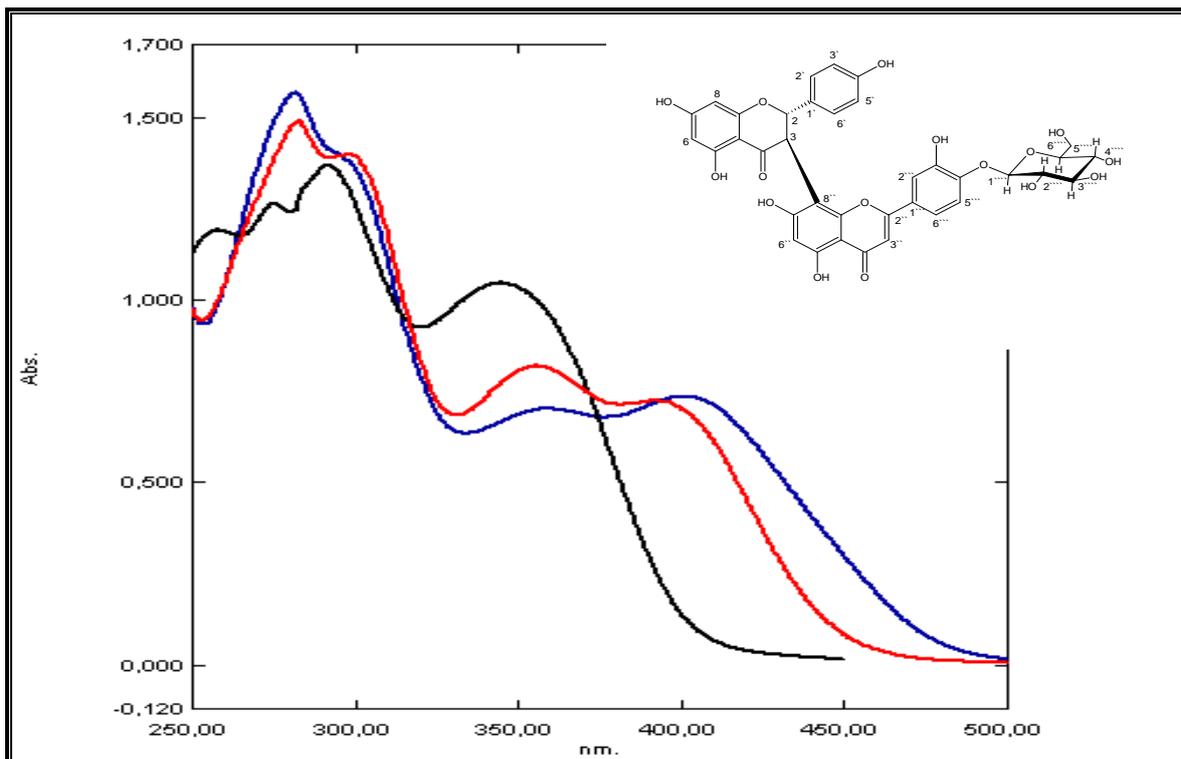


FIGURA 33 – Espectro no ultravioleta de **LFQM-107**. Curva de cor preta (**LFQM-107+ EtOH**); Curva de cor azul (**LFQM-107+ EtOH+AlCl<sub>3</sub>**); Curva de cor vermelha (**LFQM-107+ EtOH+AlCl<sub>3</sub>+HCl**).

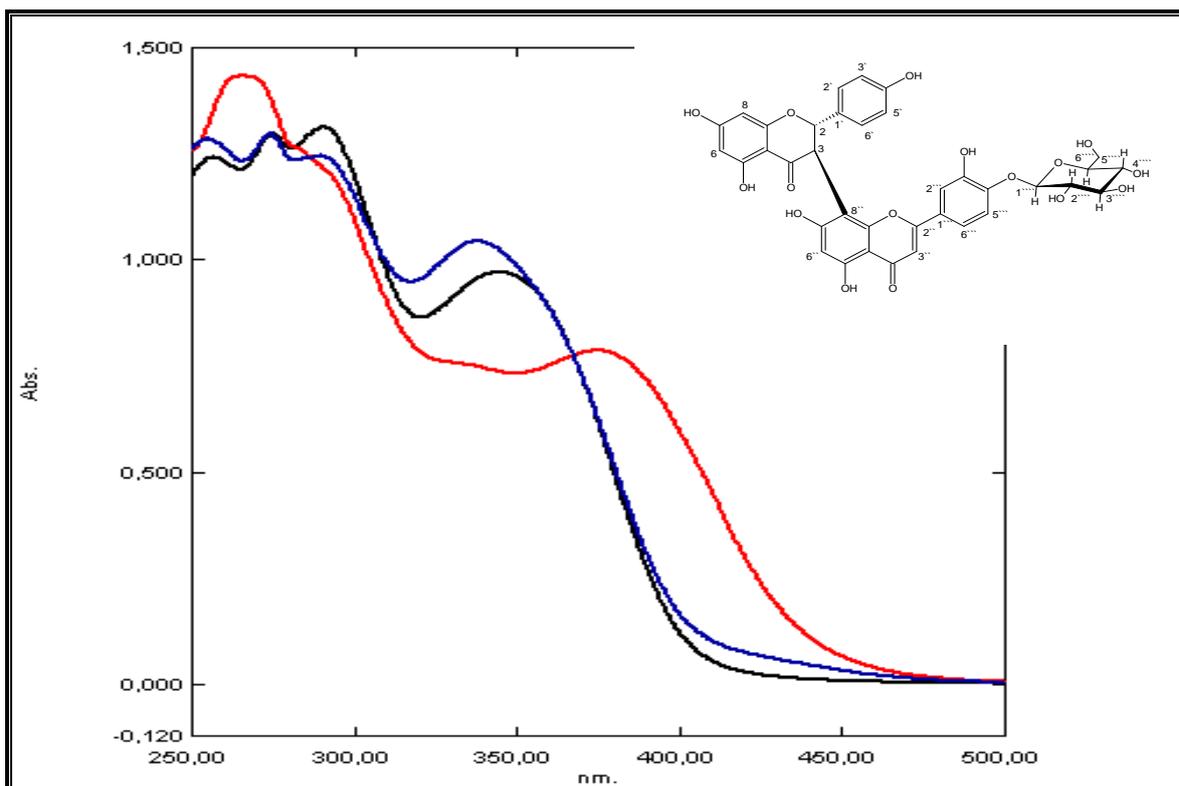


FIGURA 34 – Espectro no ultravioleta de **LFQM-107**. Curva de cor preta (**LFQM-107+EtOH**); Curva de cor azul (**LFQM-107+ EtOH+NaOAc**); Curva de cor vermelha (**LFQM-107+ EtOH+NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>**).

Para confirmação da massa molecular do composto **LFOM-107** foi obtido um perfil através das análises de espectrometria de massas em sistema MALDI-TOF. O espectrograma (FIGURA 35) apresentou um pico com relação massa e carga ( $m/z$ ) de 761,15, o qual é massa do composto **LFOM-107** acrescido de um íon cálcio e dois íons hidrogênio. Confirmada a massa molecular do composto **LFOM-107**, iniciou-se sua caracterização estrutural.

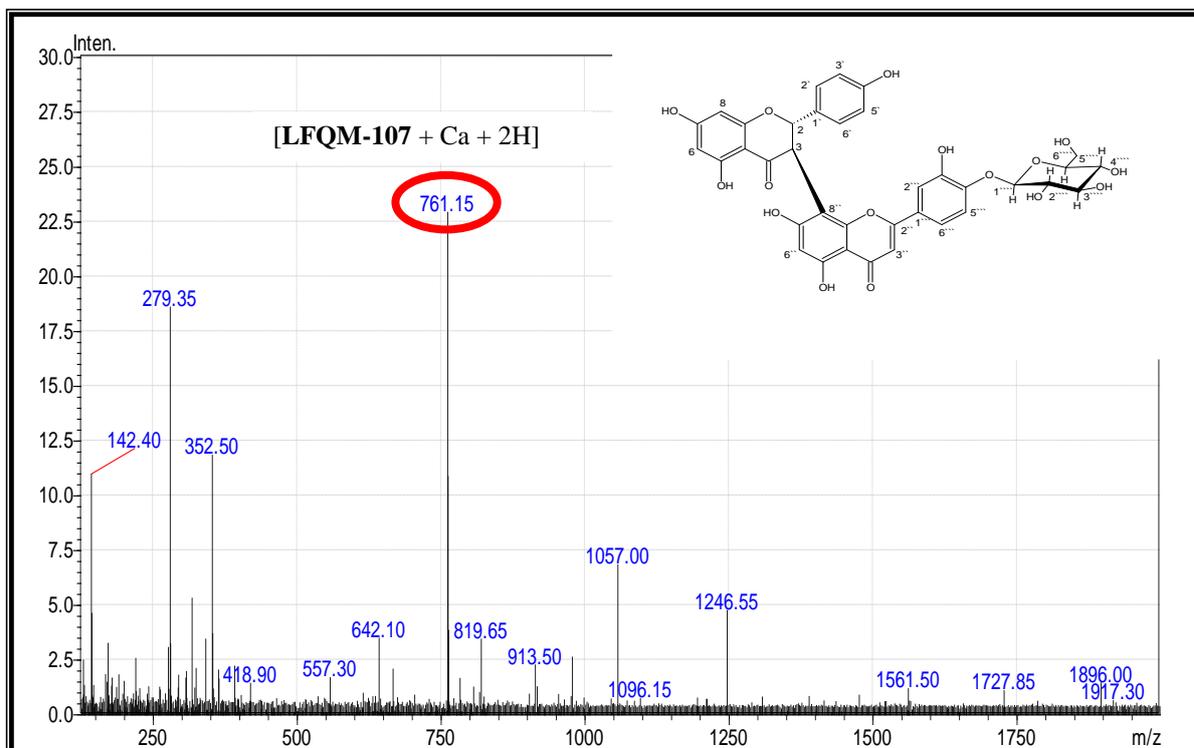


FIGURA 35 - Espectrograma de massa do composto **LFOM-107** em sistema MALDI-TOF modo linear, faixa de 200 a 2000  $m/z$ .

Análise dos espectros RMN de  $^1\text{H}$ ,  $g\text{HMBC}$ ,  $g\text{HMQC}$  e  $\text{COSY}$  (SILVERSTEIN et al., 2006) obtidos em  $\text{DMSO-}d_6$ , apresentou sinais compatíveis com um biflavonoide de natureza osídica, com uma unidade flavanona (unidade I) e outra flavona (unidade II) (FIGURA 31). Apesar das várias superposições encontradas nos espectros, a discriminação da estrutura em relação aos sinais pôde ser feito com base de técnicas modernas de RMN-2D ( $g\text{HMQC}$  e  $g\text{HMBC}$ ).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 36 - TABELA 3) têm-se sinais mais deslocados, ou seja, mais desblindados, como dois simpletos, um em  $\delta$  13,08 ppm e outro em  $\delta$  12,12 ppm correspondes aos hidrogênios das hidroxilas  $\text{OH-5}$  e  $\text{OH-5''}$  respectivamente, que se encontra em ligação de hidrogênio com o oxigênio da carbonila

em C-4 e C-4'', respectivamente. A região entre  $\delta$  6,00-8,00 ppm correspondente aos hidrogênios dos anéis aromáticos - apresentou sinais duplos (dupletos) em  $\delta$  6,63 ppm ( $J = 7,6$  Hz) e  $\delta$  7,15 ppm ( $J = 7,97$  Hz), com integração para dois hidrogênios cada um. As constantes de acoplamento observadas (6-10 Hz) indicam uma relação *orto* entre esses hidrogênios. Esses sinais foram atribuídos aos hidrogênios H-2'/6' e H-3'/5', característicos de um anel aromático mono substituído na posição 4' (OH-4'). Isso ocorre devido à simetria apresentada por este anel, fazendo com que os hidrogênios das posições H-2' e H-3' apresentem equivalência em deslocamento químico com os hidrogênios das posições H-6' e H-5', respectivamente.

Para o anel I-A foram observados dupletos em  $\delta$  5,94 ppm (H-6,  $J = 4,6$  Hz) e  $\delta$  6,53 ppm (H-8,  $J = 5$ Hz). A constante de acoplamento observada (4-6 Hz) confirma um acoplamento *meta* entre esses hidrogênios, mostrando tratar-se de um biflavonoide 5,7-dissubstituído. Além de um sinal duplo em  $\delta$  5,89 ppm (H-2,  $J = 12,61$  Hz) e outro em  $\delta$  4,93 ppm (H-3,  $J = 11,21$  Hz) sendo que a constante de acoplamento observada (entre 6-14 Hz) confirma um acoplamento *trans*-diaxial entre esses hidrogênios.

A região entre  $\delta$  2,0-5,0 ppm do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 33) mostrou multipletos entre  $\delta$  3,28-4,37 ppm e um dubleto em  $\delta$  4,85 ppm ( $J = 7,13$  Hz) atribuído a hidrogênio anomérico H-1''''', sugerindo a presença de uma unidade glicopiranosílica com configuração  $\beta$ . Esta unidade estrutural foi localizada no átomo de oxigênio ligado ao carbono C-4'''' da aglicona baseado no deslocamento químico do hidrogênio anomérico em  $\delta$  4,85 ppm (*d*,  $J = 7,13$  Hz, H-1''''') da unidade glicopiranosose em posição *trans*-diaxial),

Para o anel II-A foram observados sinais simples (singleto) em  $\delta$  6,59 ppm (H-6''), em  $\delta$  6,76 ppm (H-3'') para o anel II-C e em  $\delta$  13,08 ppm referente a hidroxila da posição C-7''. Para o anel II-B verifica-se sinais simples em  $\delta$  7,48 ppm (H-6''') e  $\delta$  7,32 ppm (H-2'''), além de um sinal duplo em  $\delta$  6,97 ppm (H-5''',  $J = 8,1$  Hz) confirmando um acoplamento em *orto* entre estes hidrogênios, mostrando tratar-se de um biflavonoíde 3''',4'''-diidroxilado.

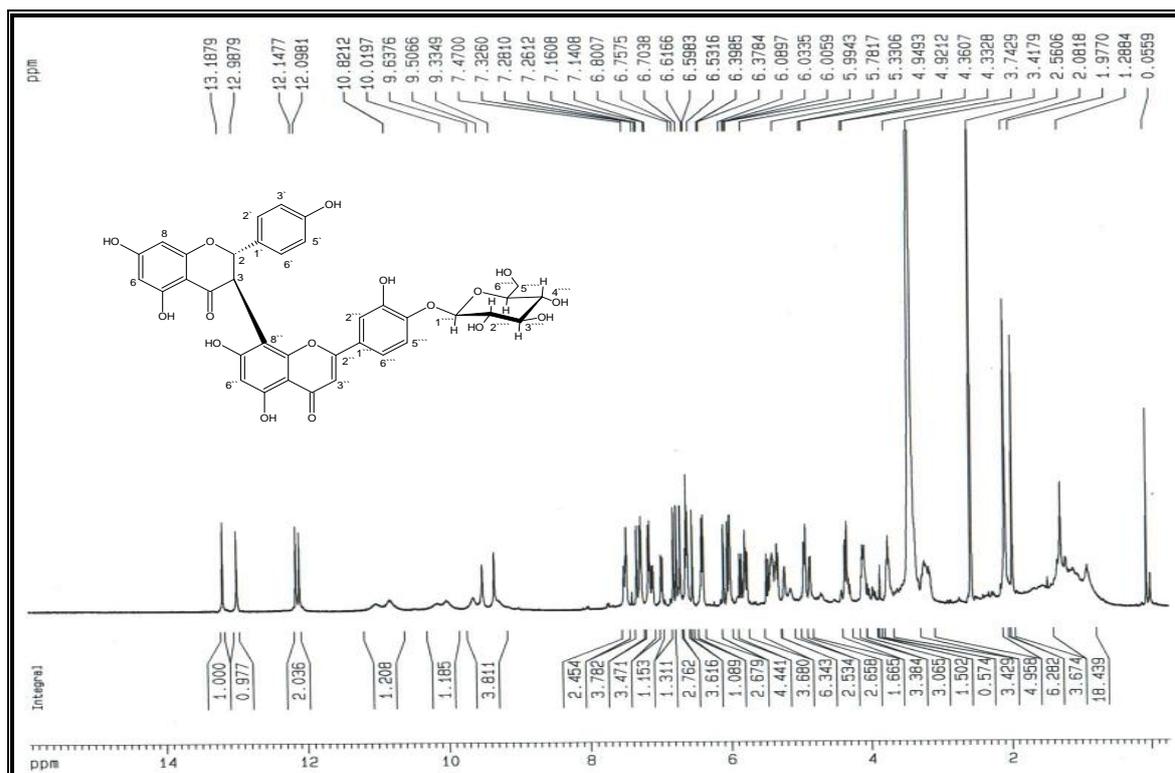


FIGURA 36 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz de **LEOM-107** ( $\text{DMSO-d}_6$ ).

No experimento de **COSY** (FIGURA 37 – TABELA 3), observou-se acoplamentos entre H-2 $\rightarrow$ H-3 ( $\delta$  5,89 ppm  $\rightarrow$   $\delta$  4,93 ppm) confirmando o padrão de centros estereogênicos para o anel I-C evidenciado no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . Da mesma forma observou-se a correlação entre H-2 $'$ /6 $'\rightarrow$  H-3 $'$ /5 $'$  ( $\delta$  6,63 ppm  $\rightarrow$   $\delta$  7,15 ppm), confirmando o padrão 4 $'$  (OH-4 $'$ ) para o anel I-B que também foi evidenciado no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . Correlação entre H-6 $''$  $\rightarrow$  H-5 $''$  ( $\delta$  7,48 ppm  $\rightarrow$   $\delta$  6,97 ppm), H-6 $''$   $\rightarrow$  H-2 $''$  ( $\delta$  7,48 ppm  $\rightarrow$   $\delta$  7,32 ppm), confirmando o padrão de substituição 3 $''$ -OH para o anel II-B. E os prótons da subunidade glicopiranosídica que correlacionam-se fortemente com acoplamentos entre H-1 $''''$   $\rightarrow$  H-2 $''''$  ( $\delta$  4,85 ppm  $\rightarrow$   $\delta$  3,41 ppm), H-3 $''''$   $\rightarrow$  H-4 $''''$  ( $\delta$  4,37 ppm  $\rightarrow$   $\delta$  4,1 ppm), H-5 $''''$   $\rightarrow$  H-6 $''''$  ( $\delta$  4,1 ppm  $\rightarrow$   $\delta$  3,75 ppm).

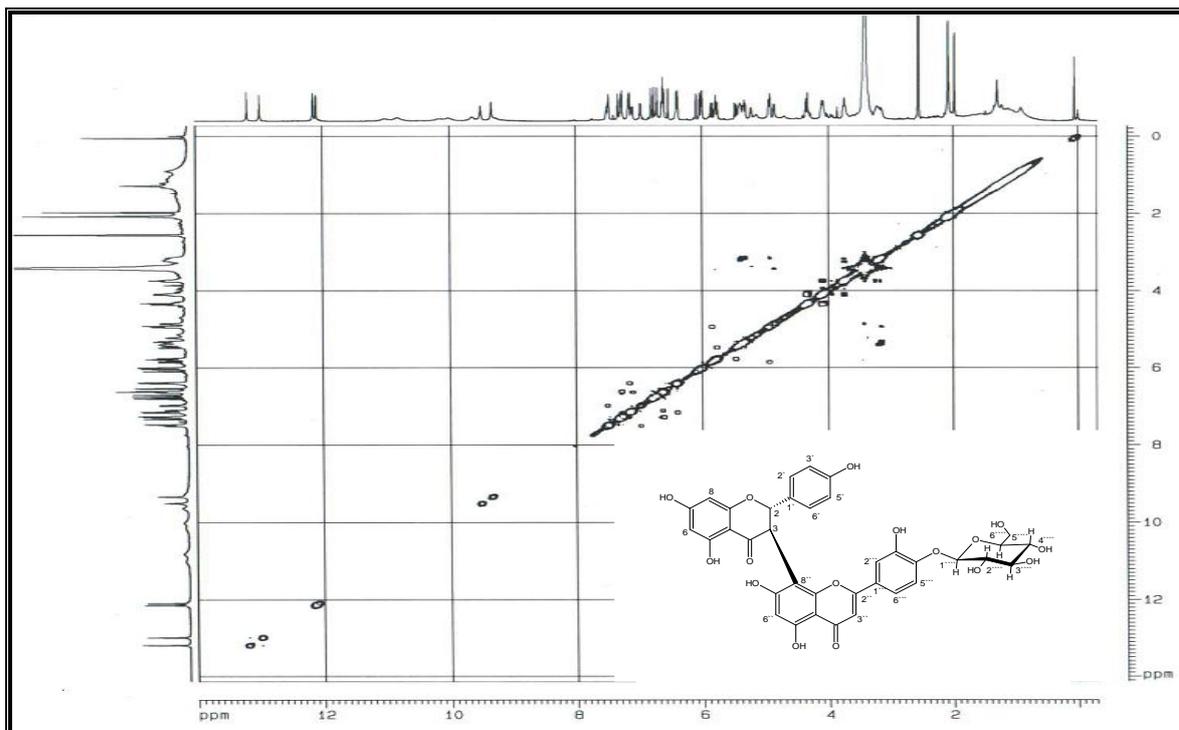


FIGURA 37 – Mapa de contornos de COSY a 400 MHz de **LEOM-107** (DMSO- $d_6$ ).

O mapa de contornos **gHMQC** (FIGURA 38 – TABELA 3) mostrou correlações entre H-3 ( $\delta$  4,93 ppm) e C-3 ( $\delta$  49,9 ppm), H-2 ( $\delta$  5,89 ppm) e C-2 ( $\delta$  82,0 ppm), H-6 ( $\delta$  5,94 ppm) e C-6 ( $\delta$  97,9 ppm), H-8 ( $\delta$  6,53 ppm) e C-8 ( $\delta$  96,0 ppm), H-2' e H-6' ( $\delta$  6,63 ppm) com C-2' e C-6' ( $\delta$  116,2 ppm), H-3' e H-5' ( $\delta$  7,15 ppm) com C-3' e C-5' ( $\delta$  127,0 ppm), H-3'' ( $\delta$  6,76 ppm) e C-3'' ( $\delta$  102,2 ppm), H-6'' ( $\delta$  6,59 ppm) e C-6'' ( $\delta$  102,9 ppm), H-5''' ( $\delta$  6,97 ppm) e C-5''' ( $\delta$  118,4 ppm), H-2''' ( $\delta$  7,32 ppm) e C-2''' ( $\delta$  114,5 ppm) com H-6''' ( $\delta$  7,48 ppm) e C-6''' ( $\delta$  122,6 ppm).

Também observou-se correlações direta ( $^1J_{H-C}$ ) entre os hidrogênios da subunidade glicopiranosídica entre H-1'''' ( $\delta$  4,85 ppm) e C-1'''' ( $\delta$  100,0 ppm), H-2'''' ( $\delta$  3,41 ppm) e C-2'''' ( $\delta$  63,0 ppm), H-3'''' ( $\delta$  4,4 ppm) e C-3'''' ( $\delta$  63,1 ppm), H-4'''' ( $\delta$  4,1 ppm) e C-4'''' ( $\delta$  62,0 ppm), H-5'''' ( $\delta$  3,75 ppm) e C-5'''' ( $\delta$  57,0 ppm), H-6'''' ( $\delta$  3,28 ppm) e C-6'''' ( $\delta$  70,0 ppm).

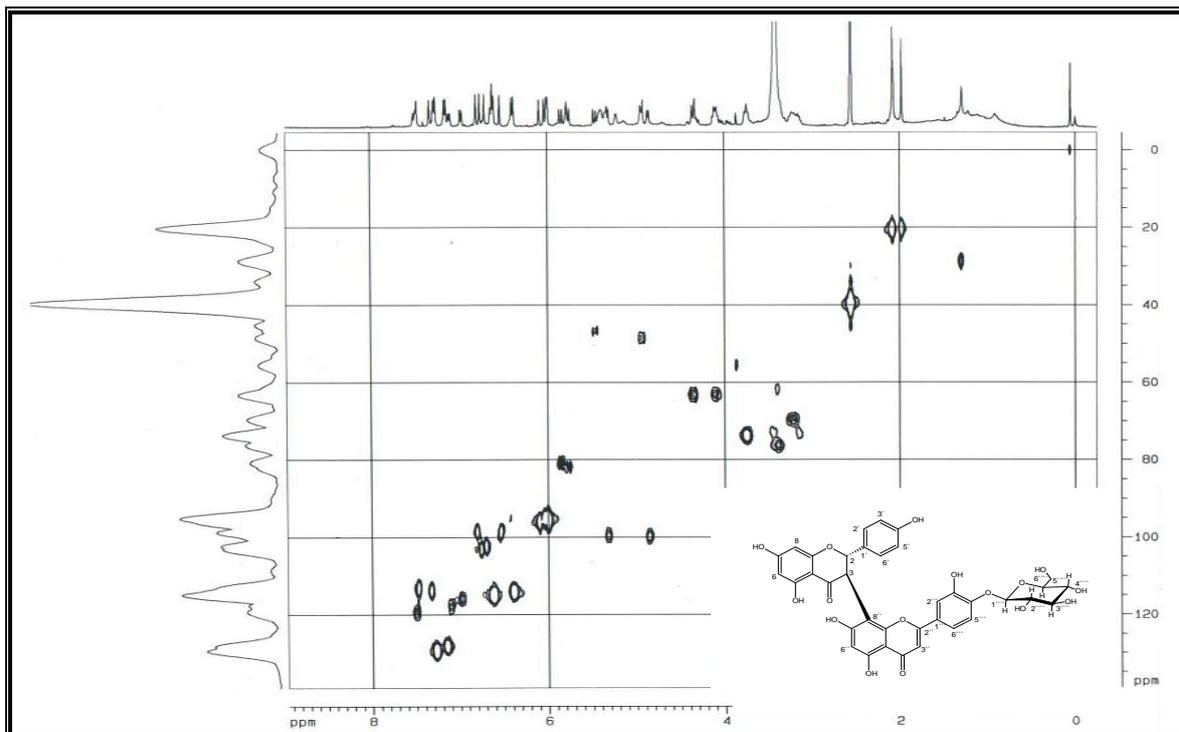


FIGURA 38 – Mapa de contornos de gHMBC a 400 MHz de **LEOM-107** (DMSO- $d_6$ ).

No mapa de contornos gHMBC (FIGURA 39 – TABELA 3) verificou-se correlações a longa distância com  $^3J_{\text{H-C}}$  entre H-1'''' ( $\delta$  4,85 ppm) da subunidade glicopiranosídica e C-4''' ( $\delta$  154,5 ppm) do composto **LEOM-107**, confirmando uma *O*-glicosilação na posição 4''' deste composto. As diversas correlações para os hidrogênios da subunidade glicopiranosídica não puderam ser estabelecidas devido à faixa espectral demonstrada não abranger os mesmos.

O espectro mostrou correlações a longa distância entre H-2 ( $\delta$  5,89 ppm), C-3 ( $\delta$  49,9 ppm) com  $^2J_{\text{H-C}}$  e H-2 ( $\delta$  5,89 ppm), C-9'' ( $\delta$  153,6 ppm), C-8'' ( $\delta$  103,9 ppm), C-4 ( $\delta$  195,6), C-9 ( $\delta$  162,6 ppm) todos com correlações  $^3J_{\text{H-C}}$ . Foram observados ainda correlações entre H-3 ( $\delta$  4,93 ppm), C-2 ( $\delta$  82,0 ppm), C-4 ( $\delta$  195,6 ppm) e C-8'' ( $\delta$  103,9 ppm) com  $^2J_{\text{H-C}}$  e H-3 ( $\delta$  4,93 ppm), C-9'' ( $\delta$  153,6 ppm), C-7'' ( $\delta$  160,7 ppm) com correlações  $^3J_{\text{H-C}}$ . Por sua vez, observou-se as correlações entre H-8 ( $\delta$  6,53 ppm), C-7 ( $\delta$  165,8 ppm) e C-9 ( $\delta$  162,6 ppm) ambos com  $^2J_{\text{H-C}}$  e H-8 ( $\delta$  6,53 ppm), C-6 ( $\delta$  97,9 ppm) e C-10 ( $\delta$  103,3 ppm) com correlações  $^3J_{\text{H-C}}$ . Correlações entre H-6 ( $\delta$  5,94 ppm), C-5 ( $\delta$  63,0 ppm), C-7 ( $\delta$  165,8 ppm) ambos com  $^2J_{\text{H-C}}$  e H-6 ( $\delta$  5,94 ppm), C-8 ( $\delta$  96,0 ppm), C-10 ( $\delta$  103,3 ppm) com correlações  $^3J_{\text{H-C}}$ . Além das correlações entre H-3' ( $\delta$  7,15 ppm), C-2' ( $\delta$  116,2 ppm) e C-4' ( $\delta$  158,7 ppm) com correlações  $^2J_{\text{H-C}}$  e H-3' ( $\delta$  7,15 ppm), C-1' ( $\delta$  128,9 ppm) e C-5' ( $\delta$  127,0 ppm) com correlações  $^3J_{\text{H-C}}$ . Sendo assim

com estas correlações propostas é possível inferir que trata-se da unidade I (Flavanona) do biflavonoide **LFOM-107**.

Já as correlações propostas para a unidade II (Flavona) do biflavonoide **LFOM-107** podem ser inferidas com as seguintes propostas: H-3'' ( $\delta$  6,76 ppm), C-4'' ( $\delta$  163,8 ppm) e C-2'' ( $\delta$  164,5 ppm) ambos com  $^2J_{H-C}$  e H-3'' ( $\delta$  6,76 ppm), C-10'' ( $\delta$  105,7 ppm) e C-1''' ( $\delta$  120,5 ppm) com correlações  $^3J_{H-C}$ . Foram observadas ainda correlações entre H-6'' ( $\delta$  6,40 ppm), C-7'' ( $\delta$  160,7 ppm) e C-5'' ( $\delta$  161,7 ppm) ambos com  $^2J_{H-C}$  e H-6'' ( $\delta$  6,40 ppm), C-8'' ( $\delta$  103,9 ppm) e C-10'' ( $\delta$  105,7 ppm) com correlações  $^3J_{H-C}$ . Além das correlações entre H-5''' ( $\delta$  6,97 ppm), C-6''' ( $\delta$  122,6 ppm) e C-4''' ( $\delta$  154,5 ppm) ambos com  $^2J_{H-C}$  e H-5''' ( $\delta$  6,97 ppm), C-1''' ( $\delta$  120,5 ppm) e C-3''' ( $\delta$  147,9 ppm).

Sendo assim com estas correlações é possível inferir que trata-se de um biflavonoide-*O*-glicosilado, que neste caso é **Fukugetina-4'''-*O*- $\beta$ -D-glicosídeo**, **LFOM-107**(FIGURA 31).

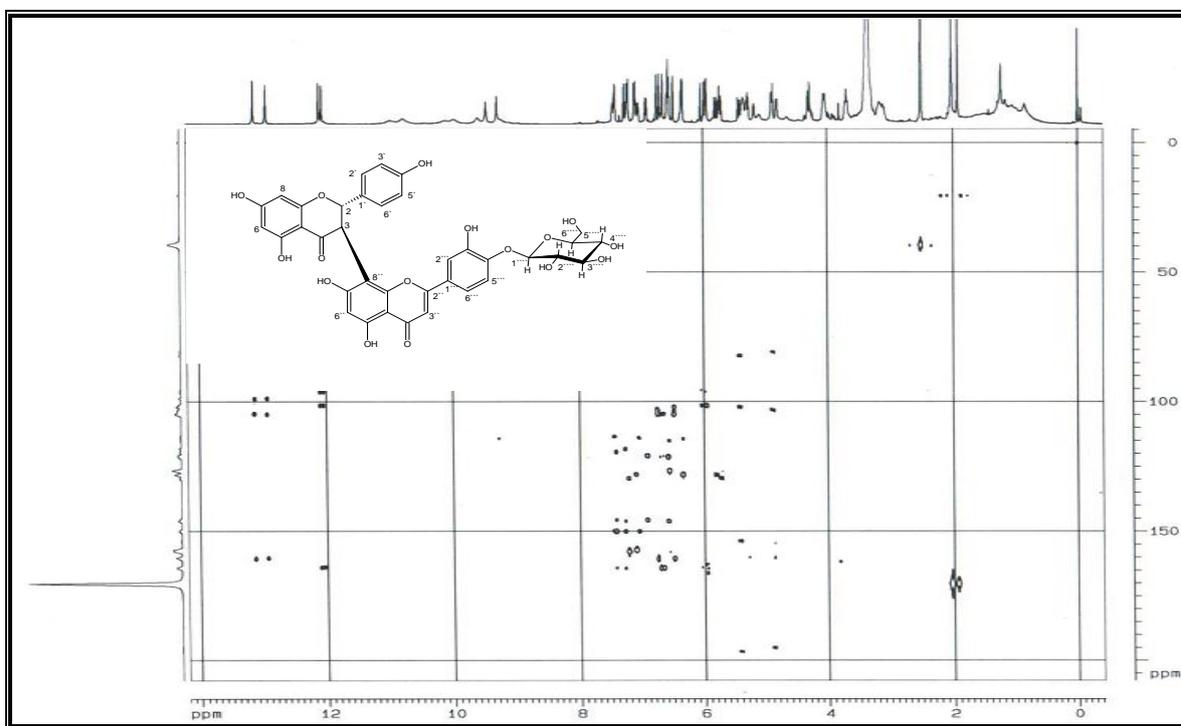


FIGURA 39 – Mapa de contornos de gHMBC a 400 MHz de **LFOM-107** (DMSO- $d_6$ ).

TABELA 3: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **LFOM-107** (DMSO- $d_6$ , 400 e 100 MHz)

Posição	$\delta^{**}\text{C}$	$\delta^*\text{H}, m, J$	$g\text{HMQC}$ ( $^1J_{\text{CH}}$ )	$g\text{HMBC}$ ( $^2J_{\text{CH}}$ )	$g\text{HMBC}$ ( $^3J_{\text{CH}}$ )
2	82,0	5,89; <i>d</i> ; 12,61	H-2	H-3	-
3	49,9	4,93; <i>d</i> ; 11,21	H-3	H-2	-
4	195,6	-	-	H-3	H-2
5	63,0	13,08	-	H-6	-
6	97,9	5,94; <i>d</i> ; 4,6	H-6	-	H-8
7	165,8	-	-	H-8; H-6	-
8	96,0	6,53; <i>d</i> ; 5	H-8	-	H-6
9	162,6	-	-	H-8	H-2
10	103,3	-	-	-	H-8; H-6
1 <sup>`</sup>	128,9	-	-	-	H-3 <sup>`</sup>
2 <sup>`</sup>	116,2	6,63; <i>dd</i> ; 7,6	H-2 <sup>`</sup> /6 <sup>`</sup>	H-3 <sup>`</sup>	-
3 <sup>`</sup>	127,0	7,15; <i>dd</i> ; 7,97	H-3 <sup>`</sup> /5 <sup>`</sup>	-	-
4 <sup>`</sup>	158,7	-	-	H-3 <sup>`</sup>	-
5 <sup>`</sup>	127,0	7,15; <i>dd</i> ; 7,97	H-3 <sup>`</sup> /5 <sup>`</sup>	-	H-3 <sup>`</sup>
6 <sup>`</sup>	116,2	6,63; <i>dd</i> ; 7,6	H-2 <sup>`</sup> /6 <sup>`</sup>	-	-
2 <sup>``</sup>	164,5	-	-	H-3 <sup>``</sup>	-
3 <sup>``</sup>	102,2	6,76; <i>s</i>	H-3 <sup>``</sup>	-	-
4 <sup>``</sup>	163,5	-	-	H-3 <sup>``</sup>	-
5 <sup>``</sup>	161,7	12,12	-	H-6 <sup>``</sup>	-
6 <sup>``</sup>	102,9	6,59; <i>s</i>	H-6 <sup>``</sup>	-	-
7 <sup>``</sup>	160,7	13,08	-	H-6 <sup>``</sup>	H-3
8 <sup>``</sup>	103,9	-	-	H-3	H-2; H-6 <sup>``</sup>
9 <sup>``</sup>	153,6	-	-	-	H-2, H-3
10 <sup>``</sup>	105,7	-	-	-	H-3 <sup>``</sup> ; H-6 <sup>``</sup>
1 <sup>'''</sup>	120,5	-	-	-	H-3 <sup>``</sup> ; H-5 <sup>'''</sup>
2 <sup>'''</sup>	114,5	7,32; <i>s</i>	H-2 <sup>'''</sup>	-	-
3 <sup>'''</sup>	147,9	-	-	-	H-5 <sup>'''</sup>
4 <sup>'''</sup>	154,5	-	-	H-5 <sup>'''</sup>	H-4 <sup>'''</sup>
5 <sup>'''</sup>	118,4	6,97; <i>d</i> ; 8,1	H-5 <sup>'''</sup>	-	-
6 <sup>'''</sup>	122,6	7,48; <i>d</i> ; 8,5	H-6 <sup>'''</sup>	H-5 <sup>'''</sup>	-
1 <sup>''''</sup>	100,0	4,85; <i>d</i> ; 7,13	H-1 <sup>''''</sup>	-	-
2 <sup>''''</sup>	63,0	3,41; <i>m</i>	H-2 <sup>''''</sup>	-	-
3 <sup>''''</sup>	63,0	4,37; <i>m</i>	H-3 <sup>''''</sup>	-	-
4 <sup>''''</sup>	62,0	4,1; <i>m</i>	H-4 <sup>''''</sup>	-	-
5 <sup>''''</sup>	57,0	3,75; <i>m</i>	H-5 <sup>''''</sup>	-	-
6 <sup>''''</sup>	70,0	3,28; <i>m</i>	H-6 <sup>''''</sup>	-	-

$\delta^*$  = valores expressos em ppm;  $J$  = constante de acoplamento, expressa em Hertz (Hz);  $m$  = multiplicidade;  $dd$  = duplo duplete,  $d$  = duplete,  $m$  = multiplete,  $s$  = simpleto. \*\*Os deslocamentos químicos dos átomos de carbono foram obtidos dos mapas de contorno  $g\text{HMQC}$  e  $g\text{HMBC}$ .

### 6.1.5 Composto Natural: Fukugetina-7''-O-β-D-glicosídeo (**LFQM-108**)

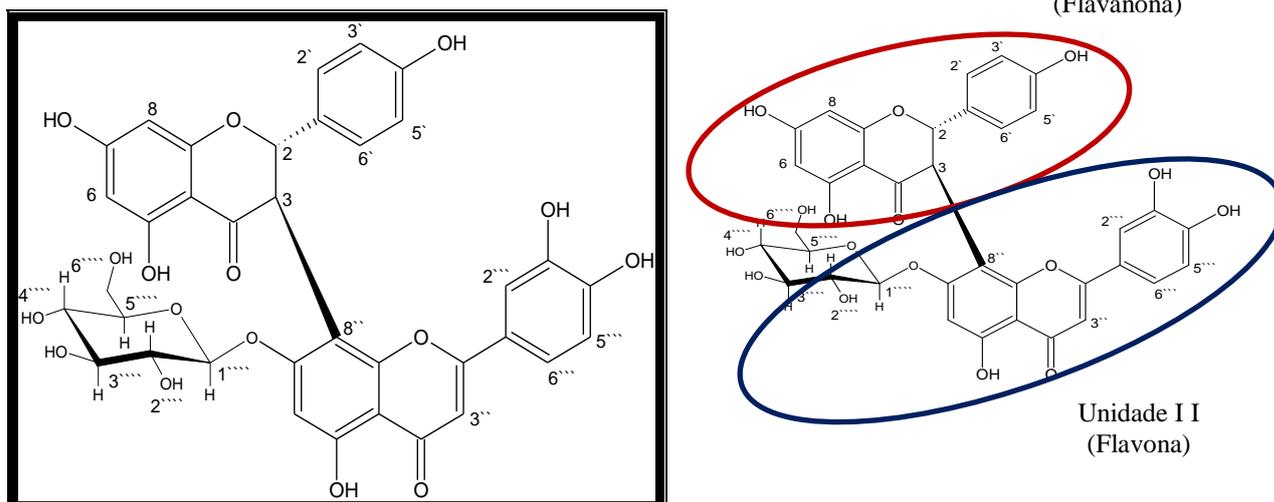


FIGURA 40 – Composto natural - Fukugetina-7''-O-β-D-glicosídeo (**LFQM-108**).

A substância **LFQM-108** (FIGURA 40), isolada de EAAE, apresentou características de flavonóide quando analisada por CCD e revelada sob luz ultravioleta e com solução sulfo-vanilínica. Sua proposta estrutural foi baseada em dados de RMN de  $^1\text{H}$ , gHMBC e COSY (SILVERSTEIN et al., 2006).

O espectro de absorção na região do IV (FIGURA 41) da **LFQM-108** evidenciou a natureza aromática do composto pelas bandas de absorção em  $3374\text{ cm}^{-1}$  característica do grupo hidroxila com uma banda larga e intensa;  $1644$  e  $1600\text{ cm}^{-1}$  duas bandas características de deformação axial de  $\text{C}=\text{C}$ ;  $1516$ ,  $1447$  e  $1300\text{ cm}^{-1}$  deformação angular no plano de  $\text{O}-\text{H}$ ;  $1261$  e  $1167\text{ cm}^{-1}$  deformação axial de  $\text{C}-\text{O}$ ;  $1071\text{ cm}^{-1}$  deformação angular fora do plano de  $\text{C}-\text{H}$ ;  $634\text{ cm}^{-1}$  deformação angular fora do plano de  $\text{C}=\text{C}$ ;  $605$  a  $429\text{ cm}^{-1}$  deformação angular fora do plano de  $\text{O}-\text{H}$ .

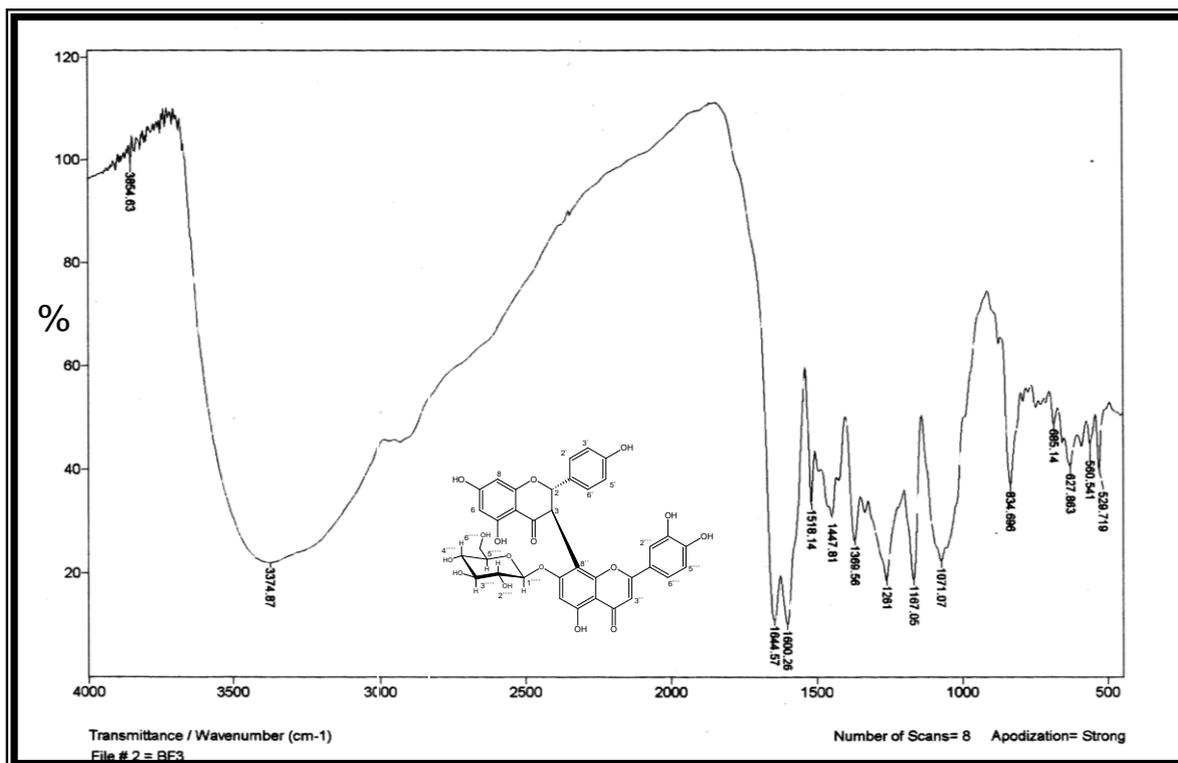


FIGURA 41- Espectro no IV (KBr) para o composto **LFOM-108**.

O espectro no ultravioleta (UV) da **LFOM-108** (FIGURA 42 e 343) mostrou bandas de absorções com  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\log \epsilon \{ \text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \}$ ) em 223 nm (6,11), 280 nm (5,75), 331 nm (5,42) e 399 nm (5,34). A adição de solução de  $\text{AlCl}_3$  a solução provocou um deslocamento batocrômico, com absorções com  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\log \epsilon \{ \text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \}$ ) em 224 nm (6,18), 278 nm (5,79) e 423 nm (5,50), o que sugere a existência de hidroxilas em *orto* e grupos quelatogênicos. A adição de solução de  $\text{HCl}$  não restaurou a banda para seu estado inicial, confirmando assim presença de grupos quelatogênicos, com absorções com  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\log \epsilon \{ \text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \}$ ) em 224 nm (6,21), 279 nm (5,76) e 357 nm (5,48). Com a adição de  $\text{NaOAc}$  foi observado bandas com absorções com  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\log \epsilon \{ \text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \}$ ) em 223 nm (6,11), 277 nm (5,72) e 421 nm (5,48), sugerindo a presença de hidroxila ácidas (C-7 e C-7'') ou um percentual destas hidroxilas ácidas. Na presença de  $\text{NaOAc}/\text{H}_3\text{BO}_3$  observou-se um desvio batocrômico em relação a solução inicial sem aditivos, com absorções com  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\log \epsilon \{ \text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \}$ ) em 224 nm (6,18), 277 nm (5,74) e 421 nm (5,48), indicando a presença do grupo *orto*-diidroxil no anel B devido a não restauração da banda para seu estado inicial. Desta forma, através da análise por ultravioleta verificou que se tratava de um esqueleto flavonoídico com hidroxilas fenólicas.

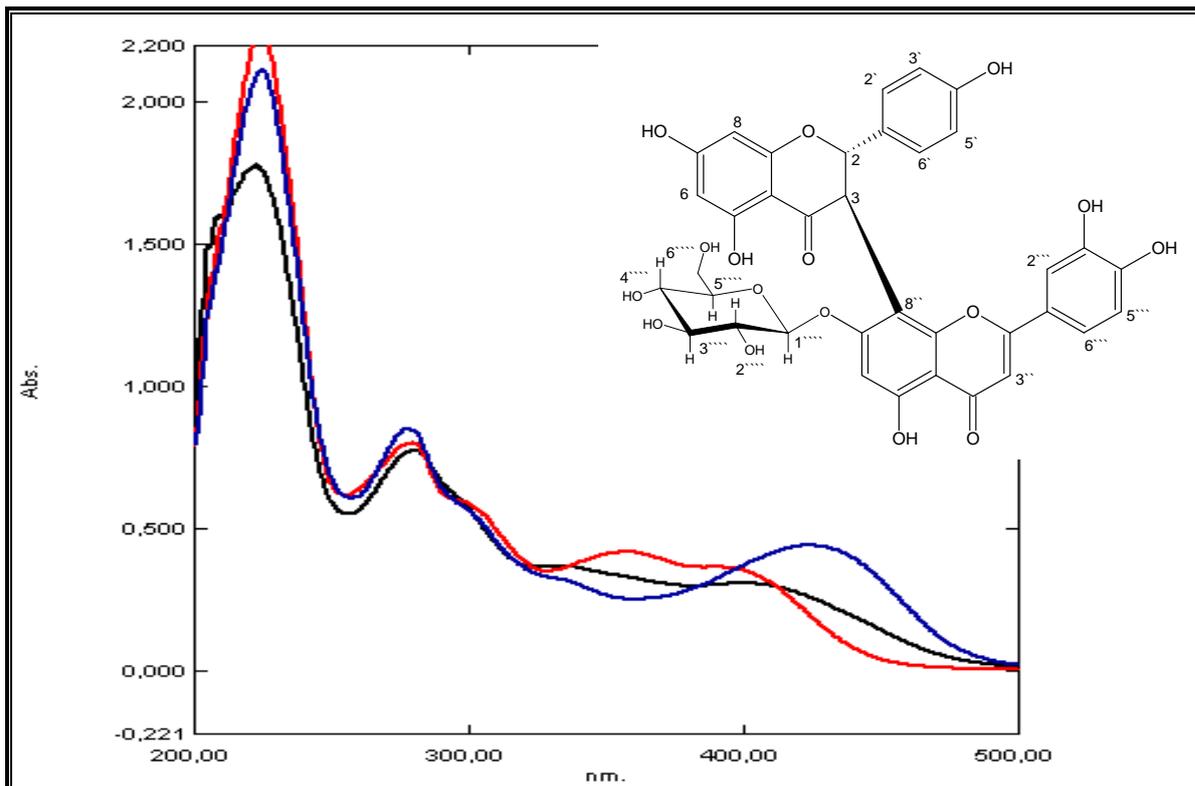


FIGURA 42– Espectro no ultravioleta de **LFQM-108**. Curva de cor preta (**LFQM-108**+ EtOH); Curva de cor azul (**LFQM-108**+ EtOH+AlCl<sub>3</sub>); Curva de cor vermelha (**LFQM-108**+ EtOH+AlCl<sub>3</sub>+HCl).

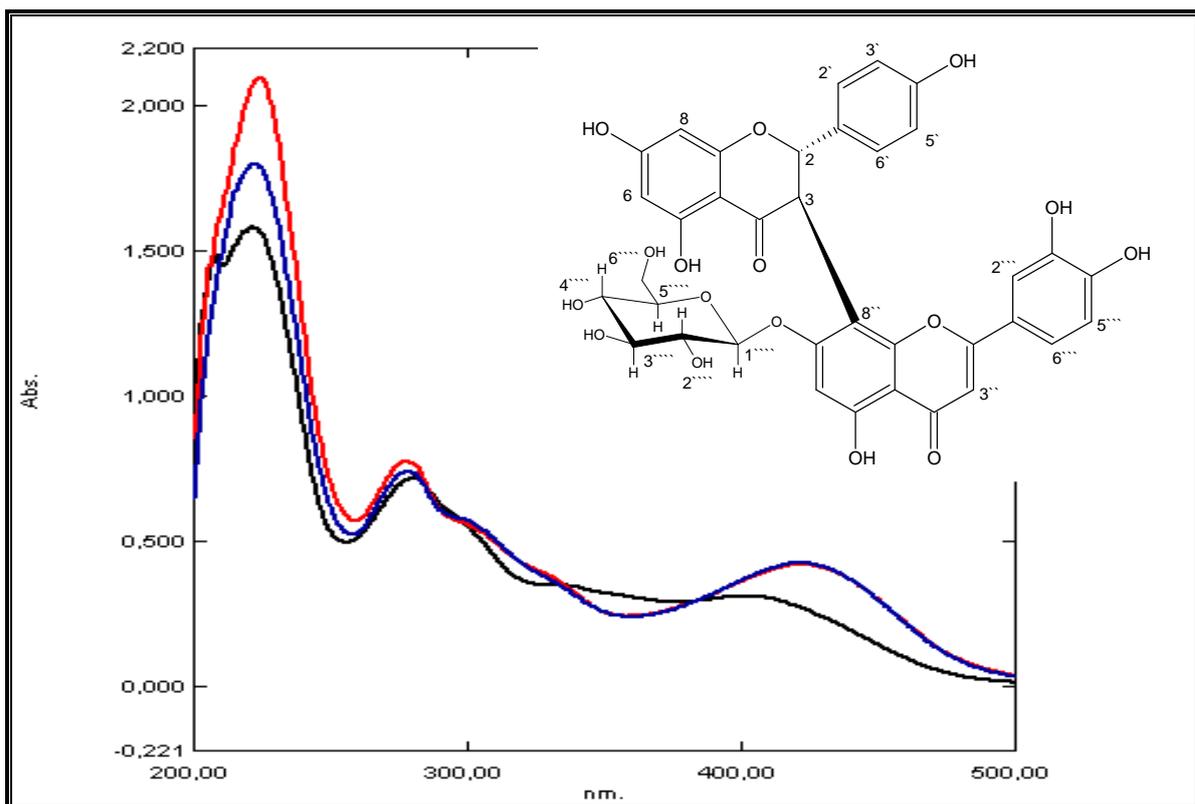


FIGURA 43 – Espectro no ultravioleta de **LFQM-108**. Curva de cor preta (**LFQM-108**+EtOH); Curva de cor azul (**LFQM-108**+ EtOH+NaOAc); Curva de cor vermelha (**LFQM-108**+ EtOH+NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>).

Para confirmação da massa molecular do composto **LFOM-108** foi obtido um perfil através das análises de espectrometria de massas em sistema MALDI-TOF. O espectrograma (FIGURA 44) apresentou um pico com relação massa e carga ( $m/z$ ) de 719,15, a qual é massa do composto **LFOM-108** acrescido de um íon hidrogênio. Confirmada a massa molecular do composto **LFOM-108**, iniciou-se sua caracterização estrutural.

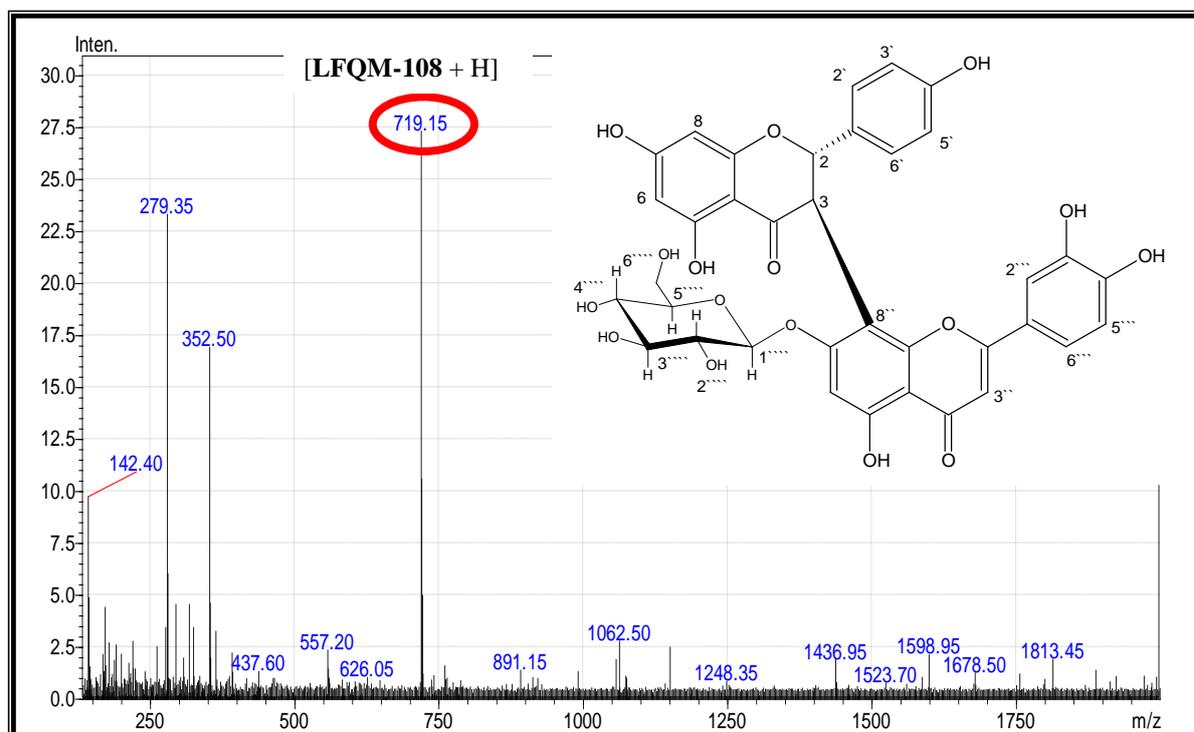


FIGURA 44 - Espectrograma de massa do composto **LFOM-108** em sistema MALDI-TOF modo linear, faixa de 200 a 2000  $m/z$ .

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 45 – TABELA 4) para **LFOM-108**, obtido em  $\text{DMSO-}d_6$ , no qual apresentou sinais compatíveis para um biflavonoide de natureza osídica. A região entre  $\delta$  6,00-8,00 ppm – correspondente aos hidrogênios dos anéis aromáticos - apresentou sinais duplos (duplo dupletos) em  $\delta$  7,19 ppm ( $J = 7,97$  Hz) e  $\delta$  6,58 ppm ( $J = 7,94$  Hz), com integração para dois hidrogênios cada um. As constantes de acoplamento observadas (6-10 Hz) indicam uma relação *orto* entre esses hidrogênios. Estes sinais foram atribuídos aos hidrogênios H-2'/6' e H-3'/5', característicos de um anel aromático substituído na posição 4' (padrão 4'-OH). Isso ocorre devido à simetria apresentada por este anel, fazendo com que os hidrogênios das posições 2' e 3' apresentem equivalência em deslocamento químico com os hidrogênios das posições 6' e 5', respectivamente.

Para o anel I-A foram observados dupletos em  $\delta$  6,94 ppm (H-6,  $J = 6,48$  Hz) e  $\delta$  6,04 ppm (H-8,  $J = 2,82$  Hz). A constante de acoplamento observada (entre 2-6 Hz) confirma um acoplamento *meta* entre esses hidrogênios, mostrando tratar-se de um flavonóide 5,7-diidroxilado no anel I-A. E para o anel I-C foi observado sinais duplos (dupletos) em  $\delta$  5,89 ppm (H-2,  $J = 11,95$  Hz) e  $\delta$  4,94 ppm (H-3,  $J = 11,96$  Hz). A constante de acoplamento observada (entre 6-14 Hz) confirma um acoplamento *trans*-diaxial entre esses hidrogênios. Apresentou também mutipletos entre  $\delta$  2,0-5,5 ppm e um dubleto em  $\delta$  4,81 ppm ( $J \sim 7,16$  Hz) atribuído ao hidrogênio anomérico H-1<sup>''''</sup>, sugerindo a presença de uma unidade glicopiranosílica com configuração  $\beta$ . Esta unidade estrutural foi localizada no átomo de oxigênio ligado ao carbono C-7<sup>''</sup> da aglicona baseado no deslocamento químico do hidrogênio em  $\delta$  4,81 (d,  $J = 7,13$  Hz, H-1<sup>''''</sup> da unidade glicopiranosose em posição *trans*-*diaxial*),

Para o anel II-A foi observado um sinal simples (simpleto) em  $\delta$  6,55 ppm referente ao H-6<sup>''</sup>. Para o anel II-C um único sinal simples em  $\delta$  6,74 ppm referente ao H-3<sup>''</sup>. E para o anel II-B foram observados sinais simples em  $\delta$  7,27 ppm referente ao H-2<sup>'''</sup> e sinais duplos em  $\delta$  6,93 ppm (H-5<sup>'''</sup>,  $J = 8,28$  Hz) e  $\delta$  7,46 ppm (H-6<sup>'''</sup>,  $J = 8,50$  Hz), sendo que a constante observada (entre 6–10 Hz) confirma um acoplamento em *orto* entre esses hidrogênios, mostrando tratar-se de um biflavonoide 3<sup>'''</sup>,4<sup>'''</sup>-diidroxilado.

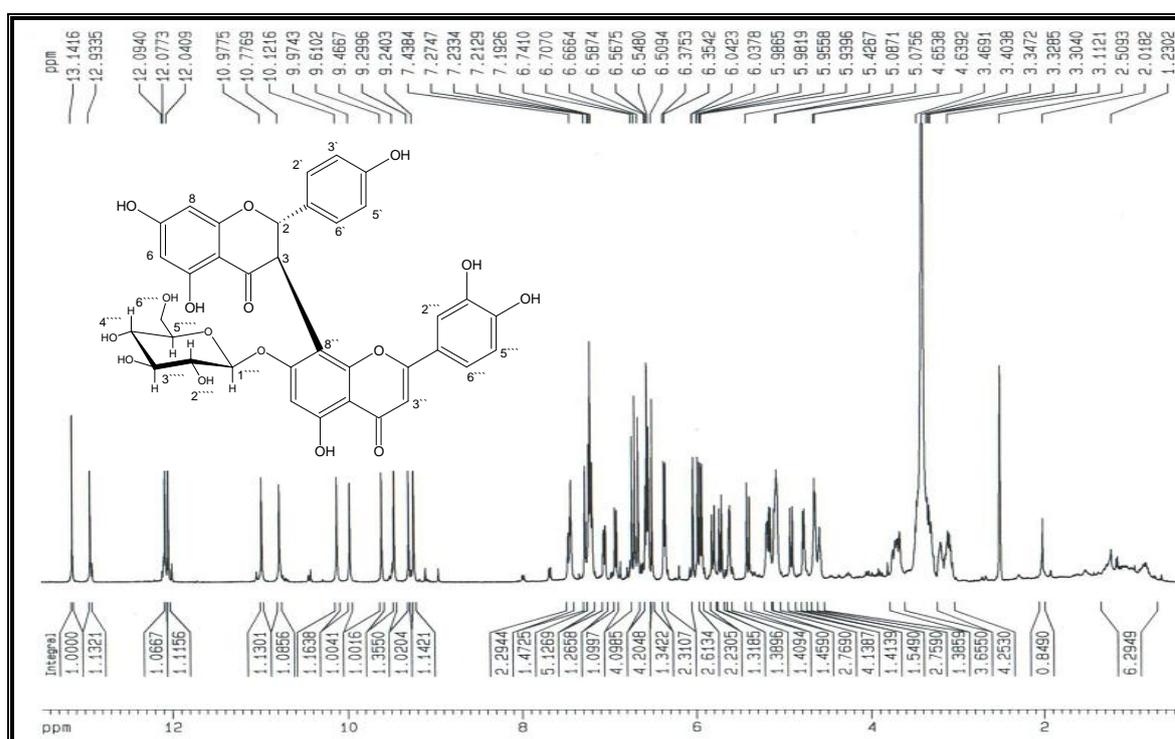


FIGURA 45 – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H a 400 MHz de **LEOM-108** (DMSO-*d*<sub>6</sub>).

No experimento de **COSY** (FIGURA 46), observou-se acoplamentos entre H-2→H-3 ( $\delta$  5,89 ppm →  $\delta$  4,94 ppm) confirmando o padrão de centros estereogênicos para o anel I-C evidenciado no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . Da mesma forma observou-se a correlação entre H-2'/6' → H-3'/5' ( $\delta$  7,19 ppm →  $\delta$  6,58 ppm), confirmando o padrão 4' (OH-4') para o anel I-B que também foi evidenciado no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . Correlação entre H-6'' → H-5'' ( $\delta$  7,46 ppm →  $\delta$  6,93 ppm), H-6'' → H-2'' ( $\delta$  7,46 ppm →  $\delta$  7,27 ppm), confirmando o padrão de substituição 3''-OH e 4''-OH para o anel II-B. Os prótons da subunidade glicopiranosídica correlacionam-se fortemente com acoplamentos entre H-1'''' → H-2'''' ( $\delta$  4,81 ppm →  $\delta$  3,35 ppm), H-3'''' → H-4'''' ( $\delta$  4,54 ppm →  $\delta$  3,72 ppm), H-5'''' → H-6'''' ( $\delta$  3,72 ppm →  $\delta$  3,47 ppm).

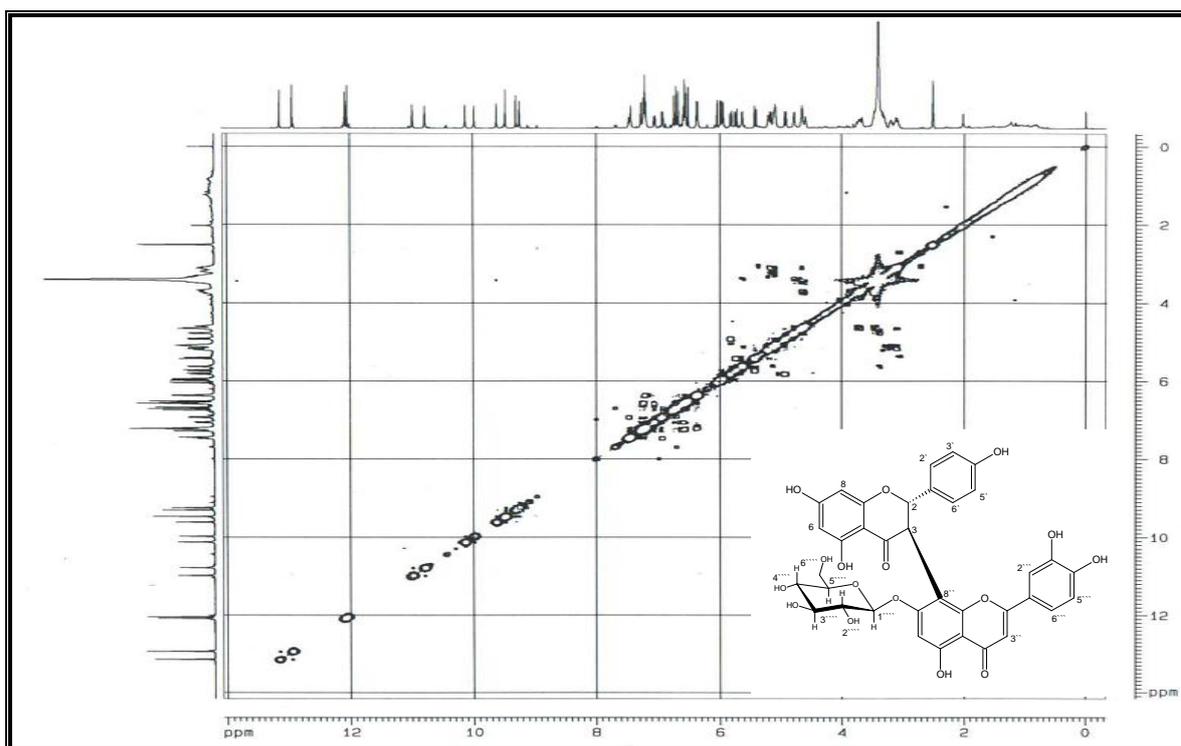


FIGURA 46– Mapa de contornos de COSY do composto **LEOM-108** (DMSO- $d_6$ ).

O mapa de contornos **gHMQC** (FIGURA 47- TABELA 4) mostrou correlações entre H-3 ( $\delta$  4,94 ppm) e C-3 ( $\delta$  49,1 ppm), H-2 ( $\delta$  5,89 ppm) e C-2 ( $\delta$  82,6 ppm), H-6 ( $\delta$  5,94 ppm) e C-6 ( $\delta$  98,1 ppm), H-8 ( $\delta$  6,04 ppm) e C-8 ( $\delta$  97,6 ppm), H-2'/H-6' ( $\delta$  7,19 ppm) com C-2'/C-6' ( $\delta$  128,6 ppm), H-3'/H-5' ( $\delta$  6,58 ppm) com C-3'/C-5' ( $\delta$  115,9 ppm), H-3'' ( $\delta$  6,74 ppm) e C-3'' ( $\delta$  104,1 ppm), H-6'' ( $\delta$  6,55 ppm) e C-6'' ( $\delta$  98,2 ppm), H-5'' ( $\delta$  6,97 ppm) e C-5'' ( $\delta$  117,3 ppm), H-2'''' ( $\delta$  7,27 ppm) e C-2'''' ( $\delta$  114,6 ppm), H-6'''' ( $\delta$  7,46 ppm) e C-6'''' ( $\delta$  121,0 ppm). Também observou-se correlações direta ( $^1J_{\text{H-C}}$ ) entre os hidrogênios da glicose entre H-1'''' ( $\delta$  4,81 ppm) e C-1'''' ( $\delta$

100,1 ppm), H-2'''' (δ 3,35 ppm) e C-2'''' (δ 73,0 ppm), H-3'''' (δ 4,54 ppm) e C-3'''' (δ 76,9 ppm), H-4'''' (δ 3,72 ppm) e C-4'''' (δ 70,9 ppm), H-5'''' (δ 3,47 ppm) e C-5'''' (δ 77,1 ppm), H-6'''' (δ 3,09 ppm) e C-6'''' (δ 62,1 ppm).

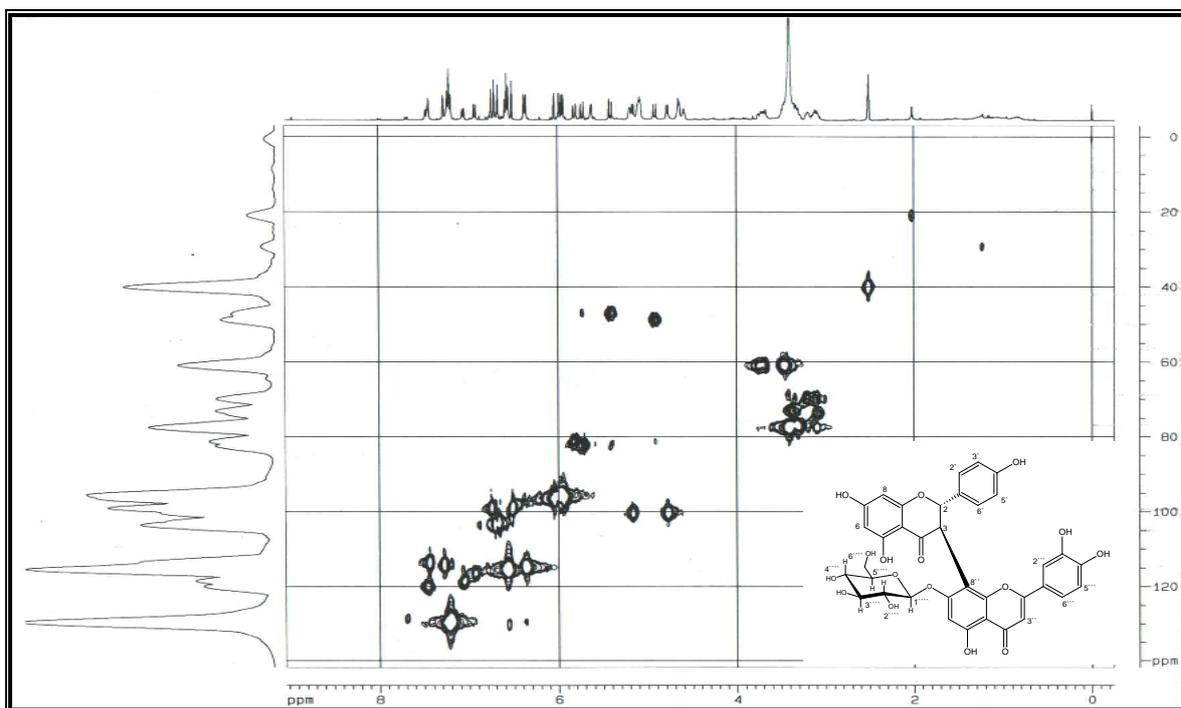


FIGURA 47– Mapa de contornos de gHMBC do composto **LFOM-108**(DMSO- $d_6$ ).

O mapa de contornos gHMBC (FIGURA 48 – TABELA 4) verificou-se correlações a longa distância com  $^3J_{H-C}$  entre H-1'''' (δ 4,81 ppm) da subunidade glicopiranosídica e C-7'' (δ 161,1 ppm) do composto **LFOM-108**, confirmando uma *O*-glicosilação na posição 7'' deste composto. As diversas correlações para os hidrogênios da subunidade glicopiranosídica não puderam ser estabelecidas devido à faixa espectral demonstrada não abranger os mesmos.

O espectro mostrou correlações à longa distância, para hidrogênios do anel I- A do núcleo biflavônico, entre o H-8 (δ 6,04 ppm) com C-9 (δ 166,0 ppm) e C-7 (δ 164,0 ppm) ambos com  $^2J_{H-C}$  e correlações entre H-8 (δ 6,04 ppm), C-6 (δ 98,1 ppm), C-10 (δ 102,8 ppm) todos com  $^3J_{H-C}$ . Foram observadas ainda correlações entre H-6 (δ 5,94 ppm) com C-5 (δ 162,0 ppm) e C-7 (δ 164,0 ppm), ambos com  $^2J_{H-C}$  e correlações entre H-6 (δ 5,94 ppm), C-10 (δ 102,8 ppm), C-8 (δ 97,6 ppm) todos com  $^3J_{H-C}$ . Correlações à longa distância, para hidrogênios do anel I-B núcleo biflavônico, entre H-2''/6'' (δ 7,19 ppm), C-1'' (δ 129,8 ppm), C-3''/5'' (δ 115,9 ppm) ambos com  $^2J_{H-C}$  e correlações entre H-2''/6'' (δ 7,19 ppm), C-4'' (δ 157,9 ppm), C-2 (δ 82,6 ppm) ambos com  $^3J_{H-C}$ . O anel I-C apresenta correlação a longa distância entre H-3 (δ 4,94 ppm) com C-7'' (δ 161,1 ppm)

e C-1' ( $\delta$  129,8 ppm) todos com  $^3J_{H-C}$ , além da correlação entre H-3 ( $\delta$  4,94 ppm) com C-4 ( $\delta$  198,0 ppm), C-9'' ( $\delta$  153,3 ppm), C-8'' ( $\delta$  83,5 ppm), C-2 ( $\delta$  82,6 ppm) todos com  $^2J_{H-C}$ .

Para os hidrogênios do anel II-A do núcleo biflavônico observou-se correlações entre H-6'' ( $\delta$  6,55 ppm) com C-7'' ( $\delta$  161,1 ppm) e C-5'' ( $\delta$  158,3 ppm) ambos com  $^2J_{H-C}$  e correlação entre H-6'' ( $\delta$  6,55 ppm), C-10'' (104,6 ppm), C-8'' ( $\delta$  83,5 ppm) ambos com  $^3J_{H-C}$ . Já para os hidrogênios do anel II-B temos correlações do H-2''' ( $\delta$  7,27 ppm) com os carbonos C-3''' ( $\delta$  145,4 ppm), C-1''' ( $\delta$  119,2 ppm) com  $^2J_{H-C}$  e entre H-2''' ( $\delta$  7,27 ppm), C-4''' ( $\delta$  149,7 ppm) e C-2'' ( $\delta$  163,7 ppm) ambos com  $^3J_{H-C}$ . Correlações de H-6''' ( $\delta$  7,43 ppm) foram observadas com os carbonos C-2'' ( $\delta$  163,7 ppm), C-4''' ( $\delta$  149,7 ppm) e C-3''' ( $\delta$  145,9 ppm) todos com  $^3J_{H-C}$ . O hidrogênio H-5''' ( $\delta$  7,23 ppm) apresentou correlação com C-4''' ( $\delta$  148,7 ppm) com  $^2J_{H-C}$ . E para o anel II-C observou-se correlações entre H-3'' ( $\delta$  6,74 ppm) com C-2'' ( $\delta$  162,3 ppm) e C-4'' ( $\delta$  183,5 ppm) com  $^2J_{H-C}$  e entre H-3'' ( $\delta$  6,74 ppm) com C-1''' ( $\delta$  119,2 ppm), C-10'' ( $\delta$  104,6 ppm) com  $^3J_{H-C}$ .

Sendo assim com estas correlações é possível inferir que trata-se de um biflavonoide-*O*-glicosilado, que neste caso é **Fukugetina-7''-*O*- $\beta$ -D-glicosídeo, LFOM-108** (FIGURA 40).

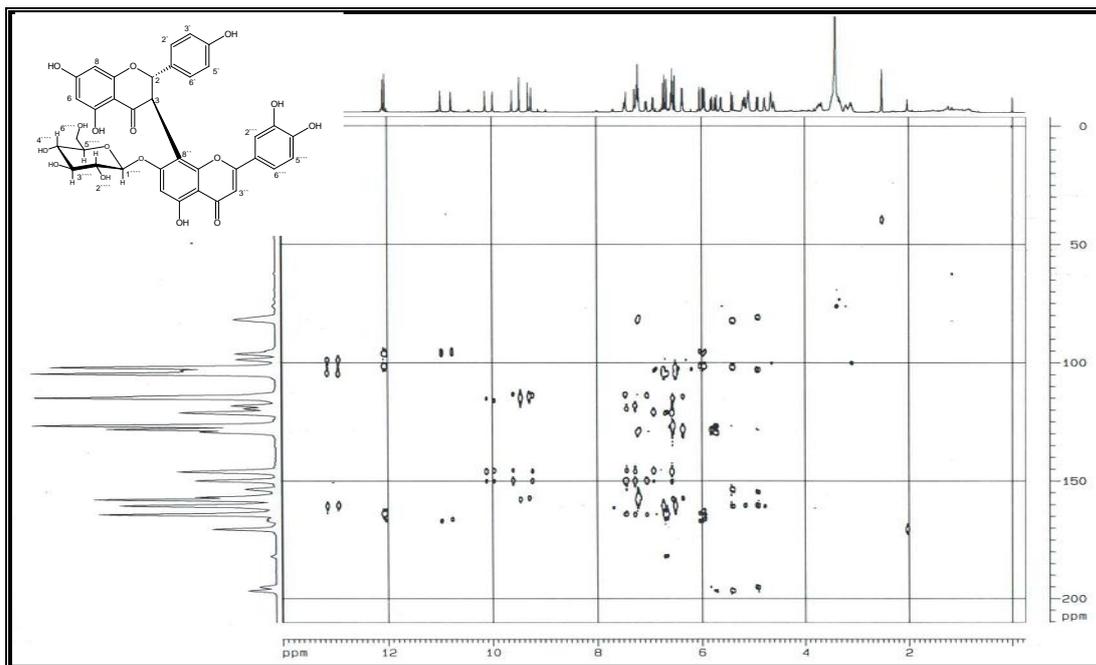


FIGURA 48 – Mapa de contornos de gHMBC a 300 MHz para **LFOM-108** (DMSO- $d_6$ ).

TABELA 4: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **LFOM-108** (DMSO- $d_6$ , 400 e 100 MHz)

Posição	$\delta^{**\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta^{*\text{H}}, m, J$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$g\text{HMQC}$ ( $^1J_{\text{CH}}$ )	$g\text{HMBC}$ ( $^2J_{\text{CH}}$ )	$g\text{HMBC}$ ( $^3J_{\text{CH}}$ )
2	82,6	82,84	5,89; <i>d</i> ; 11,95	5,74; <i>d</i> ; 11,6	H-2	H-3	H-2`/6`
3	49,1	51,01	4,94; <i>d</i> ; 11,96	4,83	H-3		
4	198,0	197,64	-	-	-	H-3	
5	162,0	164,82	12,09	-	-	H-6	
6	98,1	96,51	5,94; <i>d</i> ; 6,48	5,98; <i>s</i>	H-6		H-8
7	164,0	165,72	-	-	-	H-8/H-6	
8	97,6	97,70	6,04; <i>d</i> ; 2,82	5,93; <i>s</i>	H-8		H-6
9	166,0	168,33	-	-	-	H-8	
10	102,9	103,32	-	-	-		H-8/H-6
1`	129,8	130,39	-	-	-	H-2`/6`	H-3
2`	128,6	129,40	7,19; <i>dd</i> ; 7,97	7,10; <i>dd</i> ; 8,1	H-2`		
3`	115,9	115,46	6,58; <i>dd</i> ; 7,94	6,35; <i>dd</i> ; 8,1	H-3`	H-2`/6`	
4`	157,9	-	-	-	-		H-2`/6`
5`	115,9	115,46	7,06; <i>dd</i> ; 8,27	6,35; <i>dd</i> ; 8,1	H-5`	H-2`/6`	
6`	128,6	129,40	6,58; <i>dd</i> ; 7,94	7,10; <i>dd</i> ; 8,1	H-6`		
2``	162,3	166,10	-	-	-	H-3``	H-6``
3``	104,1	103,58	6,74; <i>s</i>	6,38; <i>s</i>	-		
4``	183,5	183,90	-	-	-	H-3``	
5``	158,3	162,71	13,14	-	-	H-6``	
6``	98,2	99,51	6,55; <i>s</i>	6,62; <i>s</i>	H-6``		
7``	161,1	161,64	-	-	-	H-6``	H-1````/H-3
8``	83,5	104,13	-	-	-	H-3	H-6``
9``	153,3	156,65	-	-	-	H-3	
10``	104,6	106,47	-	-	-		H-6``/H-3``
1``	119,2	123,05	-	-	-	H-2``	H-3``
2``	114,6	114,48	7,27; <i>s</i>	7,31; <i>s</i>	H-2``		H-2``
3``	145,4	146,72	-	-	H-3``	H-2``	H-6``
4``	148,7	151,13	-	-	-	H-5``	H-2`` H-6``
5``	117,2	116,87	6,93; <i>d</i> ; 8,28	6,87; <i>d</i> ; 8,3	H-5``		
6``	121,0	120,84	7,46; <i>d</i> ; 8,50	7,26; <i>d</i> ; 8,3	H-6``		
1``	100,1	101,52	4,81; <i>d</i> ; 7,17	5,15; <i>d</i> ; 7,5	H-1``		
2``	73,0	75,19	3,35; <i>m</i>	3,3–3,9; <i>m</i>	H-2``		
3``	76,9	78,32	4,54; <i>m</i>	3,3–3,9; <i>m</i>	H-3``		
4``	70,9	71,10	3,72; <i>m</i>	3,3–3,9; <i>m</i>	H-4``		
5``	77,1	78,52	3,47; <i>m</i>	3,3–3,9; <i>m</i>	H-5``		
6``	62,1	62,47	3,09; <i>m</i>	3,3–3,9; <i>m</i>	H-6``		

$\delta^*$  = valores expressos em ppm;  $J$  = constante de acoplamento, expressa em Hertz (Hz);  $m$  = multiplicidade;  $dd$  = duplo duplete,  $d$  = duplete,  $m$  = multiplete,  $s$  = simpleto. \*\*Os deslocamentos químicos dos átomos de carbono foram obtidos dos mapas de contorno  $g\text{HMQC}$  e  $g\text{HMBC}$ .<sup>a</sup> Dados da Literatura [Elfita *et al.*, 2009].

### 6.1.6 Composto natural: Fukugetina (**LFOM-109**)

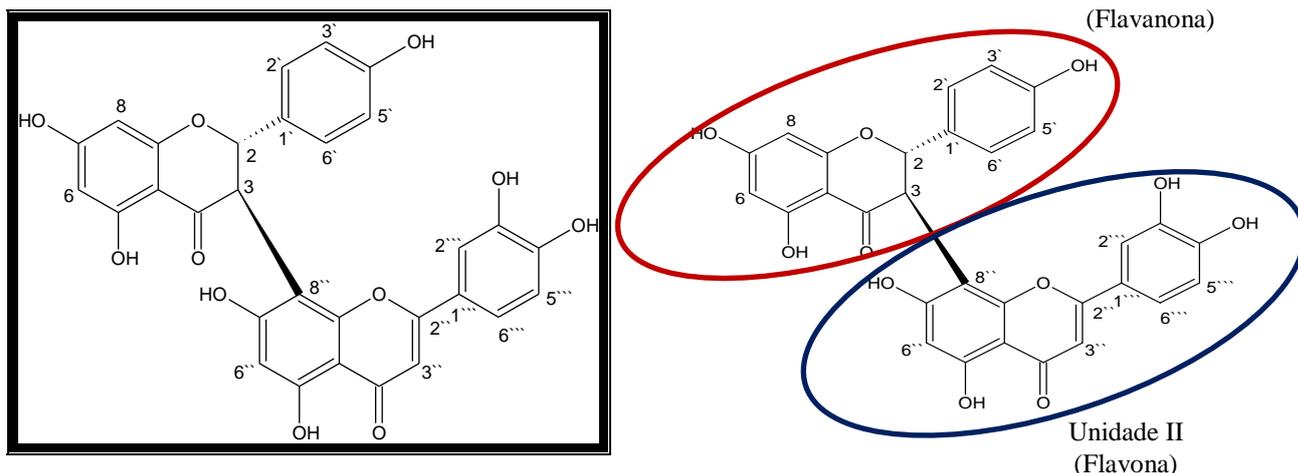


FIGURA 49 – Composto natural - Fukugetina (**LFOM-109**).

A substância **LFOM-109** (FIGURA 49), isolada de EAEE, apresentou características de flavonóide quando analisada por CCD e revelada sob luz ultravioleta e com solução sulfo-vanilínica. Sua proposta estrutural foi baseada em dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , gHMQC, gHMBC (SILVERSTEIN et al., 2006) e difração de raios X.

O espectro de absorção na região do IV (FIGURA 50) da **LFOM-109** mostrou características de substância aromática pelas bandas de absorção entre  $3288 - 3000 \text{ cm}^{-1}$  característica do grupo hidroxila com uma banda intensa,  $1641 \text{ cm}^{-1}$  referente à deformação axial de C=O que é influenciada pela ressonância, em  $1600 \text{ cm}^{-1}$  e  $1577 \text{ cm}^{-1}$ , deformação axial de C=C do anel aromático devido à conjugação da carbonila com a ligação C=C que desloca os valores para uma menor frequência, em  $1257 \text{ cm}^{-1}$  deformação axial de C-O e em  $835 \text{ cm}^{-1}$  deformação angular fora do plano (DAFP) de C-H do anel aromático.

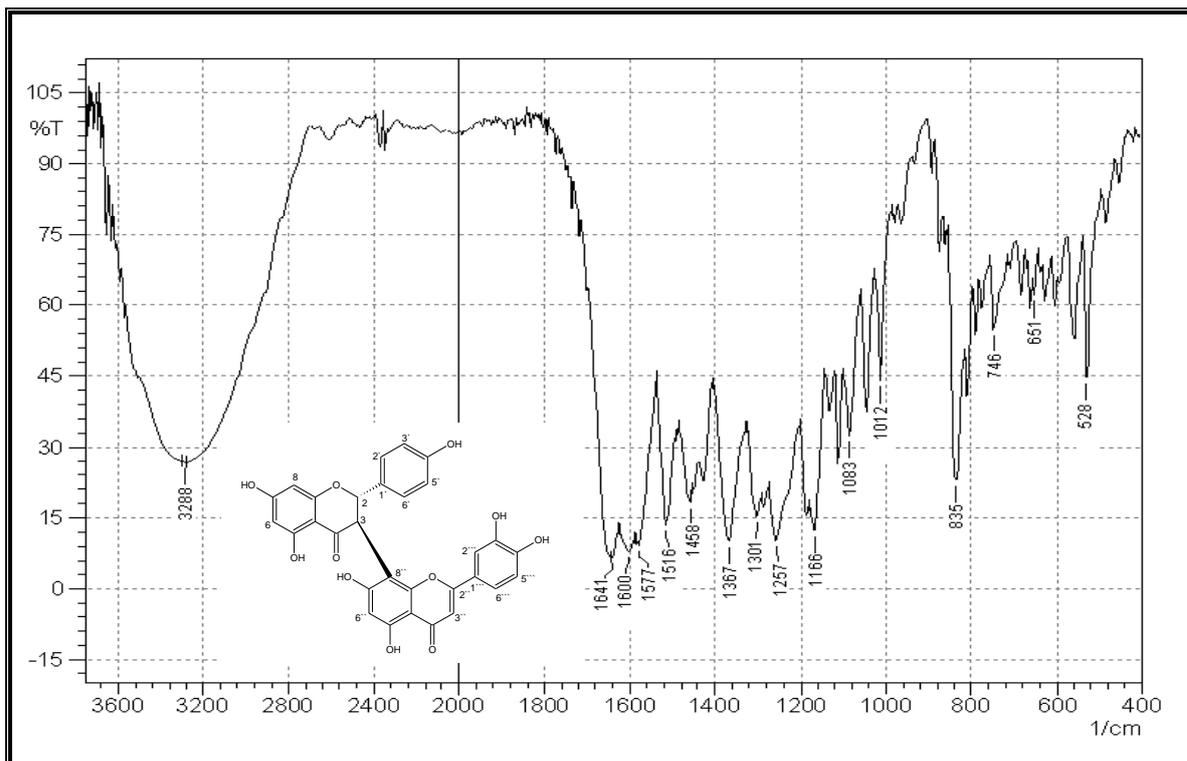


FIGURA 50 - Espectro no IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) para a Fukugetina – **LFOM-109**

O espectro no ultravioleta (UV) da fukugetina – **LFOM-109** (FIGURAS 51 e 52) mostrou bandas com absorções com  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\log \epsilon\{\text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}\}$ ) em 219 nm (5,69), 288 nm (5,45) e 347 nm (5,26). A adição de solução de  $\text{AlCl}_3$  à solução provocou um deslocamento batocrômico, com absorções com  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\log \epsilon\{\text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}\}$ ) em 225 nm (6,16), 282 nm (5,65) e 360 nm (5,13), o que sugere a existência de hidroxilas em *orto* e grupos quelatogênicos. A adição de solução de  $\text{HCl}$  não restaurou a banda para seu estado inicial, confirmando assim presença de grupos quelatogênicos, com absorções com  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\log \epsilon\{\text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}\}$ ) em 226 nm (6,27), 282 nm (5,69) e 355 nm (5,20). Com a adição de  $\text{NaOAc}$  foi observado bandas com absorções com  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\log \epsilon\{\text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}\}$ ) em 222 nm (5,94), 275 nm (5,49) e 282 nm (5,48), sugerindo a presença de hidroxila ácidas (C-7 e C-7''). Na presença de  $\text{NaOAc}/\text{H}_3\text{BO}_3$  observou-se um desvio batocrômico em relação a solução inicial sem aditivos, com absorções com  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\log \epsilon\{\text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}\}$ ) em 225 nm (6,19), 274 nm (5,63) e 327 nm (5,23), indicando a presença do grupo *orto*-diidroxil no anel B devido a não restauração da banda para seu estado inicial. Desta forma, através da análise por ultravioleta verificou que se tratava de um esqueleto flavonoídico com grupos fenólicos.

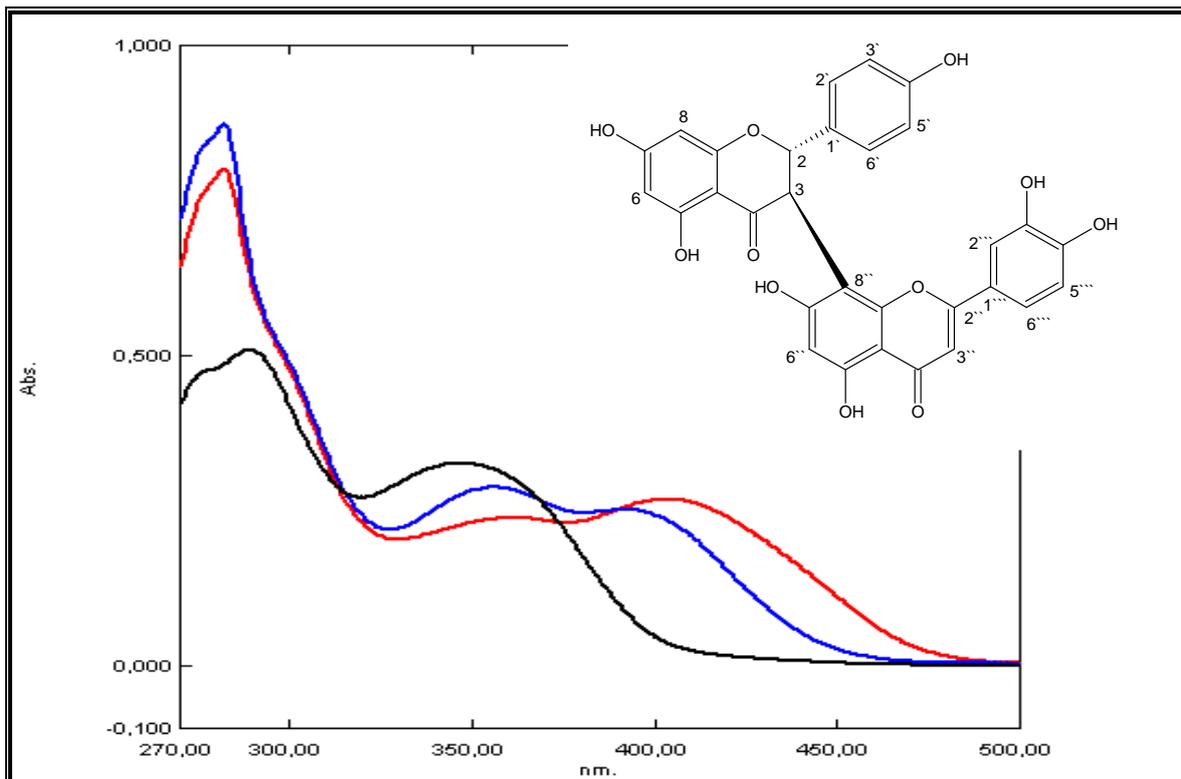


FIGURA 51 – Espectro no ultravioleta de **LFQM-109**. Curva de cor preta (**LFQM-109 + EtOH**); Curva de cor azul (**LFQM-109 + EtOH + AlCl<sub>3</sub>**); Curva de cor vermelha (**LFQM-109 + EtOH + AlCl<sub>3</sub> + HCl**).

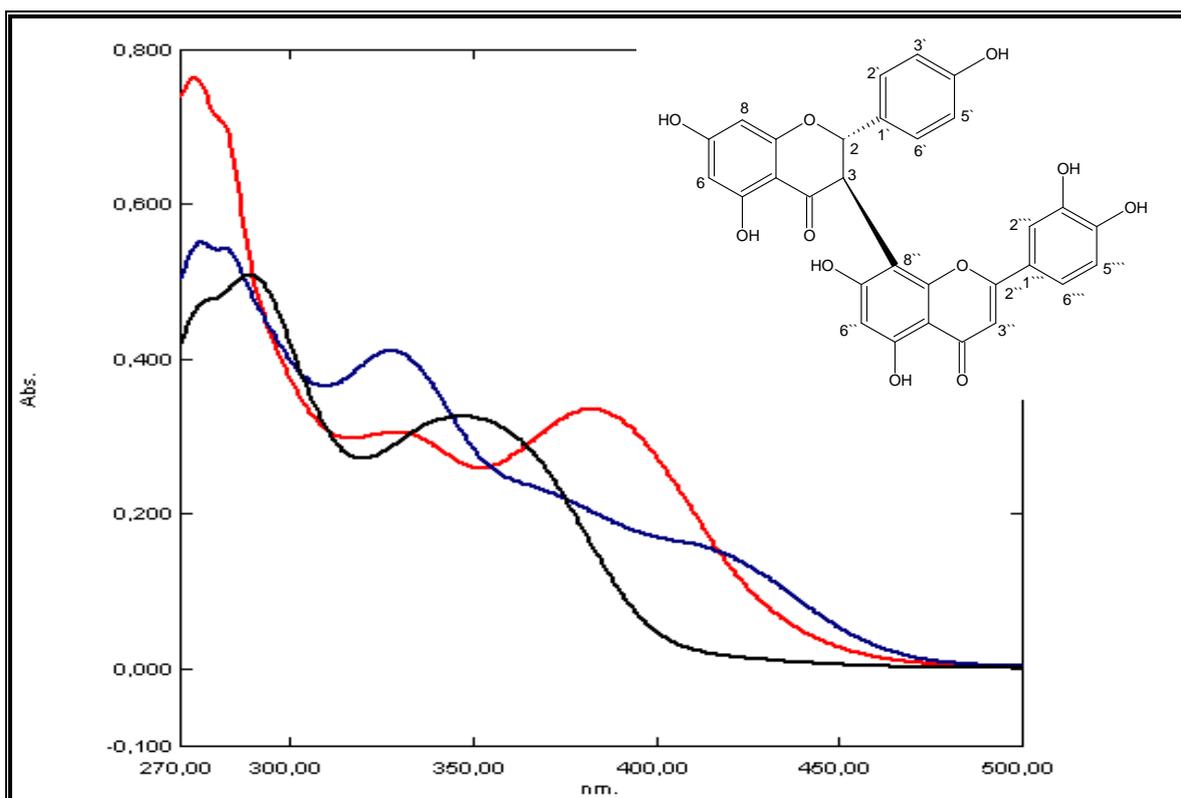


FIGURA 52 – Espectro no ultravioleta de **LFQM-109**. Curva de cor preta (**LFQM-109 + EtOH**); Curva de cor azul (**LFQM-109 + EtOH + NaOAc**); Curva de cor vermelha (**LFQM-109 + EtOH + NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>**).

Para confirmação da massa molecular do composto **LFOM-109** foi obtido um perfil através das análises de espectrometria de massas em sistema MALDI-TOF. O espectrograma (FIGURA 53) apresentou um pico com relação massa e carga ( $m/z$ ) de 557,30; o qual é massa do composto **LFOM-109** acrescido de um íon hidrogênio. Confirmada a massa molecular do composto **LFOM-109**, iniciou-se sua caracterização estrutural.

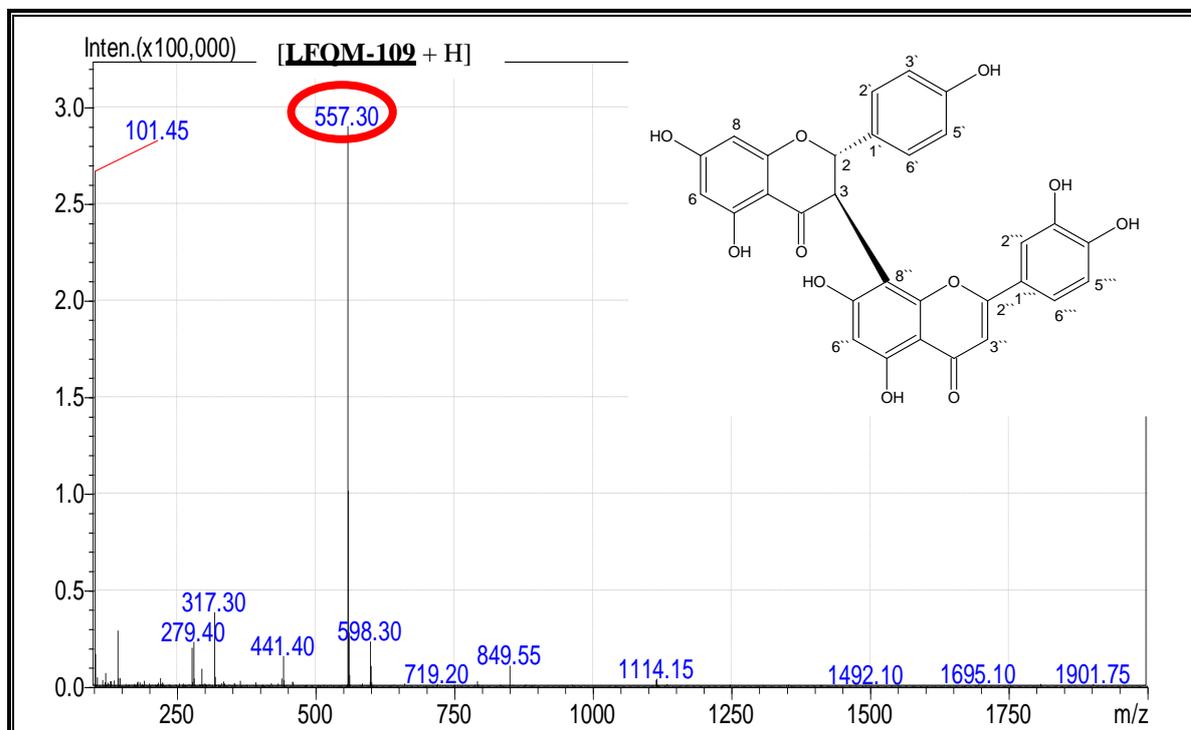


FIGURA 53 - Espectrograma de massa do composto **LFOM-109** em sistema MALDI-TOF modo linear, faixa de 200 a 2000  $m/z$ .

Análise dos espectros RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , gHMBC e gHMQC, obtidos em  $\text{DMSO-}d_6$ , apresentou sinais compatíveis com um biflavonoide, com uma unidade flavanona (unidade I) e outra flavona (unidade II) (FIGURA 49). Apesar das várias superposições encontradas nos espectros, a discriminação da estrutura em relação aos sinais pôde ser feito com base de técnicas modernas de RMN-2D (gHMQC e gHMBC).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 54 – TABELA 5) observam-se sinais mais deslocados, ou seja, mais desblindados, como dois simpletos, um em  $\delta$  12,60 ppm e outro em  $\delta$  12,03 ppm que corresponde aos hidrogênios das hidroxilas OH-5 e OH-5'' respectivamente, que se encontra em ligação de hidrogênio com o oxigênio da carbonila em C-4 e C-4''. A região entre  $\delta$  6,00-8,00 ppm correspondente aos hidrogênios dos anéis aromáticos - apresentou sinais duplos (dupletos) em  $\delta$  6,53 ppm ( $J = 8,09$  Hz) e  $\delta$

7,23 ppm ( $J = 7,00$  Hz), com integração para dois hidrogênios cada um. As constantes de acoplamento observadas (6-10 Hz) indicam uma relação *orto* entre esses hidrogênios. Esses sinais foram atribuídos aos hidrogênios H-2'/6' e H-3'/5' do anel I-B do biflavonoide, respectivamente, característicos de um anel aromático mono substituído na posição 4' (padrão I-OH-4'). Isso ocorre devido à simetria apresentada por este anel, fazendo com que os hidrogênios das posições H-2' e H-3' apresentem equivalência em deslocamento químico com os hidrogênios das posições H-6' e H-5', respectivamente. Para o anel I-A foram observados dupletos em  $\delta$  6,03 ppm (H-6,  $J = 5$  Hz) e  $\delta$  6,47 ppm (H-8,  $J = 5$  Hz). A constante de acoplamento observada (4 - 6 Hz) confirma um acoplamento *meta* entre esses hidrogênios, mostrando tratar-se de um biflavonoide 5,7-diidroxilado no anel I-A. Além de um sinal duplo em  $\delta$  5,87 ppm (H-2,  $J = 12,4$  Hz). A constante de acoplamento observada (entre 6-14 Hz) confirma um acoplamento *trans*-di axial entre esses hidrogênios.

Para o anel II-A foram observados sinais simples (singleto) em  $\delta$  6,40 ppm (H-6<sup>``</sup>) e em  $\delta$  13,08 ppm referente a hidroxila da posição C-7<sup>``</sup> e em  $\delta$  6,35 ppm (H-3<sup>``</sup>) para o anel II-C. Para o anel II-B verificou-se sinais simples em 7,49 ppm (H-6<sup>``</sup>) e  $\delta$  7,48 ppm (H-2<sup>``</sup>), além de um sinal duplo em  $\delta$  7,02 ppm (H-5<sup>``</sup>,  $J = 7,9$  Hz) confirmando um acoplamento em *orto* entre estes hidrogênios, mostrando tratar-se de um biflavonoide 3<sup>``</sup>,4<sup>``</sup>-diidroxilado.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 55 – TABELA 5) pode-se constatar a presença de 30 sinais de carbonos, sendo os valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dobrados e muito próximos, devido ao atropoisomerismo (é atribuído a um tipo de estereoisômerismo característico de sistemas onde a rotação livre em torno de uma ligação simples é impedida, produzindo uma barreira energética suficientemente elevada, de modo a permitir o isolamento ou simplesmente a detecção dos diferentes rotâmeros, chamados atropoisômeros) existente para este composto, complicando a interpretação dos espectros (SANTOS, et al., 2007). Os sinais observados em  $\delta$  197,2 ppm (C-4) e  $\delta$  183,1 ppm (C-4<sup>``</sup>) são característicos de carbonilas conjugadas, sugerindo assim a presença de duas unidades deste flavonóide. Além disso, os dados também indicaram a presença de dois anéis aromáticos dissustituído, mostrando a presença de dois carbonos em  $\delta$  94,4 ppm (C-8) e 101,8 ppm mais blindados, referentes aos anéis A das unidades I e II, respectivamente. Foi possível observar também dois outros carbonos  $\text{sp}^2$  não hidrogenados presentes em  $\delta$  163,3 ppm (C-9) e  $\delta$  155,8 ppm

(C-9''). Os deslocamentos destes carbonos mostraram que esta substância não era uma mistura de flavonóides, mas um dímero cujas unidades encontravam-se ligadas entre as posições C-3 e C-8''.

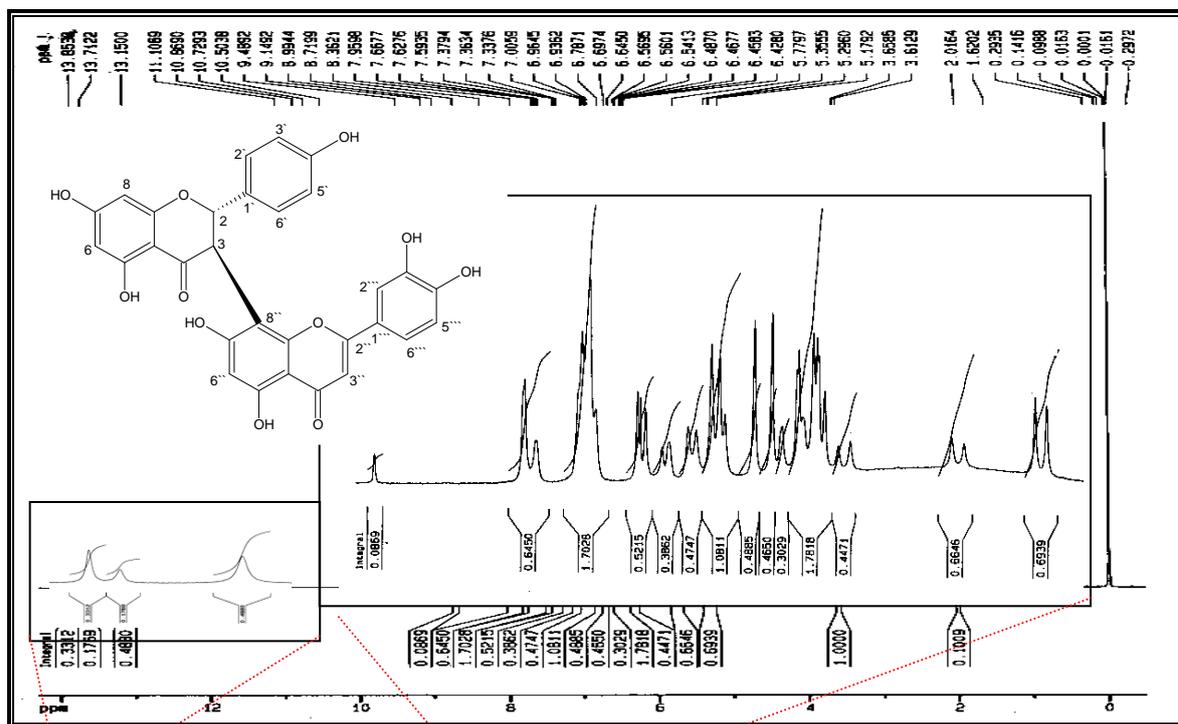


FIGURA 54 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz de **LEOM-109** ( $\text{DMSO-}d_6$ ).

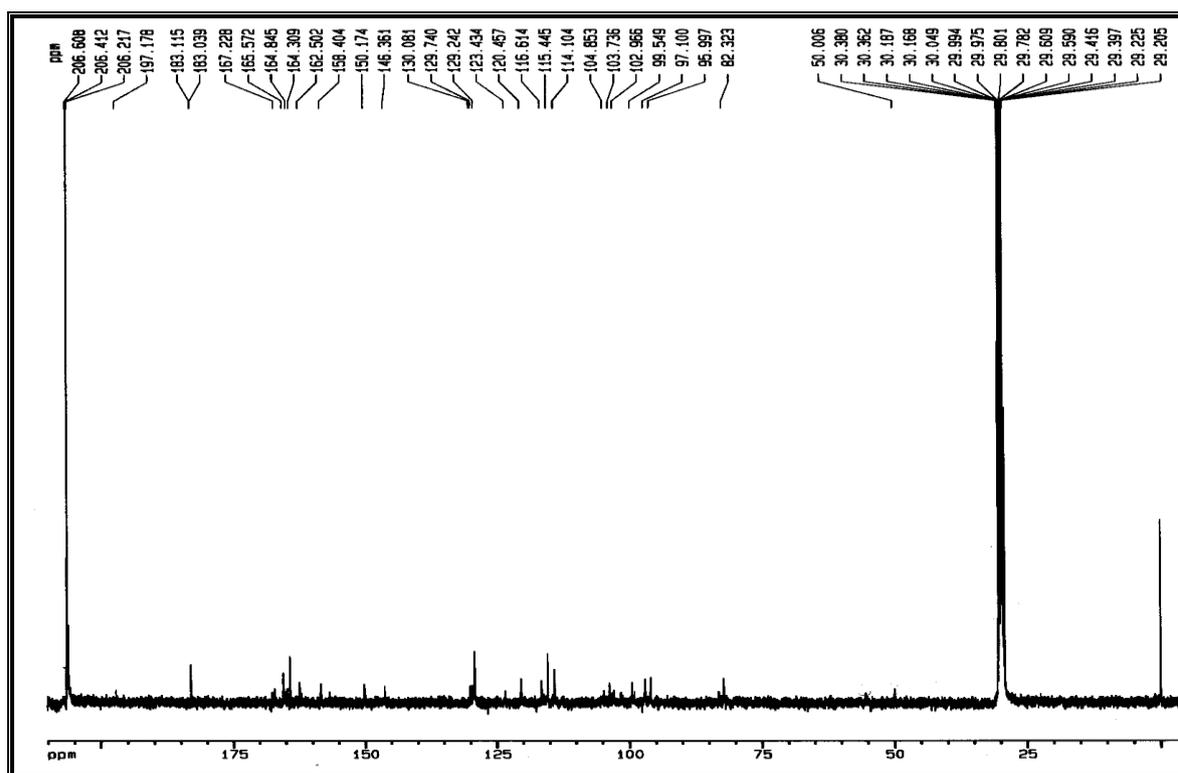


FIGURA 55 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 100 MHz de **LEOM-109** ( $\text{DMSO-}d_6$ ).

O mapa de contornos **gHMQC** (FIGURA 56 – TABELA 5) mostrou correlações entre H-3 ( $\delta$  4,98 ppm) e C-3 ( $\delta$  50,1 ppm), H-2 ( $\delta$  5,87 ppm) e C-2 ( $\delta$  82,2 ppm), H-6 ( $\delta$  6,03 ppm) e C-6 ( $\delta$  97,5 ppm), H-8 ( $\delta$  6,47 ppm) e C-8 ( $\delta$  94,4 ppm), H-2'/6' ( $\delta$  6,53 ppm) com C-2'/6' ( $\delta$  115,7 ppm), H-3'/5' ( $\delta$  7,23 ppm) com C-3'/5' ( $\delta$  129,7 ppm), H-3'' ( $\delta$  6,35 ppm) e C-3'' ( $\delta$  103,6 ppm), H-6'' ( $\delta$  6,40 ppm) e C-6'' ( $\delta$  99,2 ppm), H-5''' ( $\delta$  7,02 ppm) e C-5''' ( $\delta$  116,5 ppm), H-2''' ( $\delta$  7,48 ppm) e C-2''' ( $\delta$  114,8 ppm) com H-6''' ( $\delta$  7,49 ppm) e C-6'' ( $\delta$  119,4 ppm).

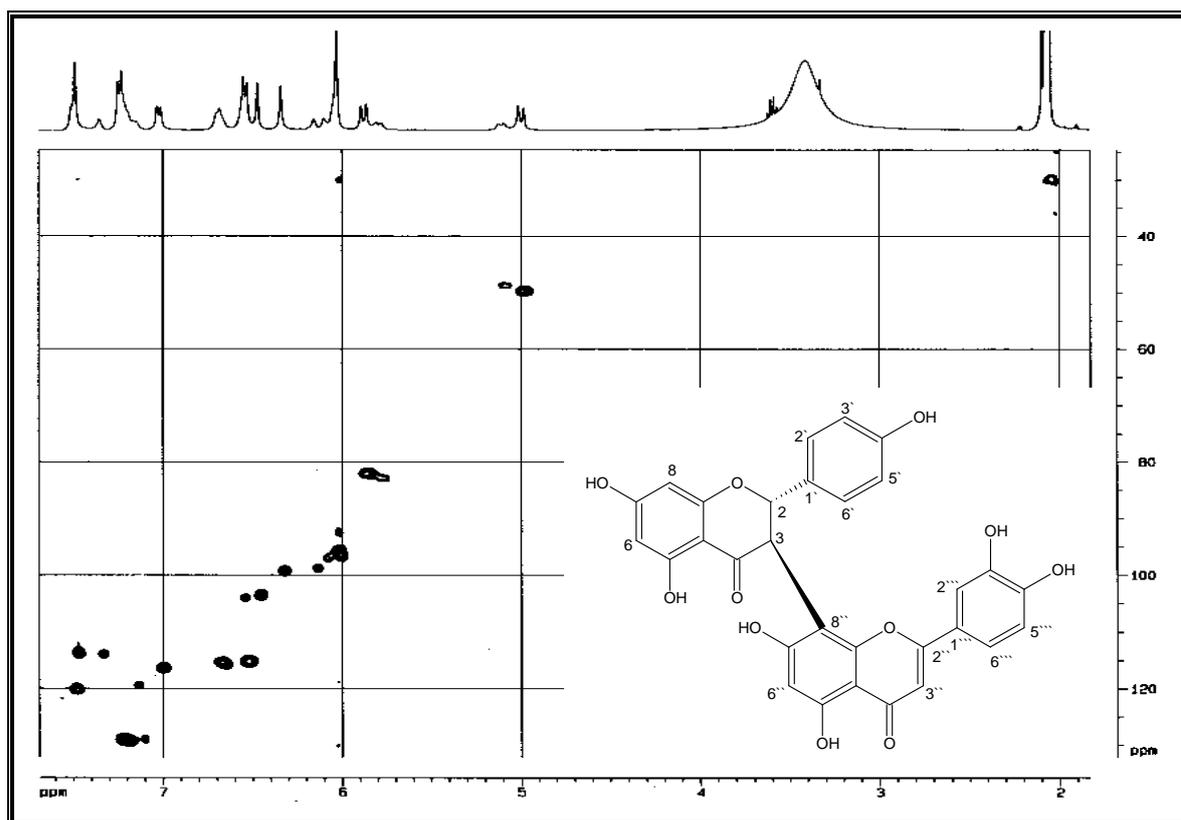


FIGURA 56 – Mapa de contornos **gHMQC** a 400 MHz de **LEOM-109** (DMSO- $d_6$ ).

O mapa de contornos **gHMBC** (FIGURA 57 – TABELA 5) mostrou correlações entre H-2 ( $\delta$  5,87 ppm), C-1' ( $\delta$  128,7 ppm) e C-3 ( $\delta$  4,98 ppm) ambos com  $^2J_{H-C}$  e H-2 ( $\delta$  5,87 ppm), C-2' ( $\delta$  115,7 ppm), C-6' ( $\delta$  115,7 ppm), C-4 ( $\delta$  197,2 ppm) e C-8'' ( $\delta$  101,8 ppm) todos com correlações  $^3J_{H-C}$ . Foram observados ainda correlações entre H-3 ( $\delta$  4,98 ppm), C-2 ( $\delta$  5,9 ppm), C-4 ( $\delta$  197,2 ppm) e C-8'' ( $\delta$  101,8 ppm) com  $^2J_{H-C}$  e H-3 ( $\delta$  4,98 ppm), C-10 ( $\delta$  102,8 ppm), C-7'' ( $\delta$  164,1 ppm), C-9'' ( $\delta$  155,8 ppm) e C-1' ( $\delta$  128,7 ppm) com correlações  $^3J_{H-C}$ . Por sua vez, observou-se as correlações entre H-8 ( $\delta$  6,47 ppm), C-7 ( $\delta$  168,6 ppm) e C-9 ( $\delta$  163,3 ppm) ambos com  $^2J_{H-C}$  e H-8 ( $\delta$  6,47

ppm), C-6 ( $\delta$  97,5 ppm) e C-10 ( $\delta$  102,8 ppm) com correlações  $^3J_{H-C}$ . Além das correlações entre H-3' ( $\delta$  7,23 ppm), C-2' ( $\delta$  115,7 ppm) e C-4' ( $\delta$  159,0 ppm) com correlações  $^2J_{H-C}$  e H-3' ( $\delta$  7,23 ppm), C-1' ( $\delta$  128,7 ppm) e C-5' ( $\delta$  129,7 ppm) com correlações  $^3J_{H-C}$ . Sendo assim com estas correlações propostas é possível inferir que trata-se da unidade I (Flavanona) do biflavonoide fukugetina **LFOM-109**.

Já as correlações propostas para a unidade II (Flavona) do biflavonoide **LFOM-109** podem ser inferidas com as seguintes propostas: H-3'' ( $\delta$  6,35 ppm), C-4'' ( $\delta$  183,1 ppm) e C-2'' ( $\delta$  164,1 ppm) ambos com  $^2J_{H-C}$  e H-3'' ( $\delta$  6,35 ppm), C-10'' ( $\delta$  104,6 ppm) e C-1''' ( $\delta$  122,8 ppm) com correlações  $^3J_{H-C}$ . Foram observadas ainda correlações entre H-6'' ( $\delta$  6,40 ppm), C-7'' ( $\delta$  164,1 ppm) e C-5''' ( $\delta$  161,1 ppm) ambos com  $^2J_{H-C}$  e H-6'' ( $\delta$  6,40 ppm), C-8'' ( $\delta$  101,8 ppm) e C-10'' ( $\delta$  104,6 ppm) com correlações  $^3J_{H-C}$ . Além das correlações entre H-5''' ( $\delta$  7,02 ppm), C-6''' ( $\delta$  119,4 ppm) e C-4''' ( $\delta$  151,4 ppm) ambos com  $^2J_{H-C}$  e H-5''' ( $\delta$  7,02 ppm), C-1''' ( $\delta$  122,8 ppm) e C-3''' ( $\delta$  147,4 ppm).

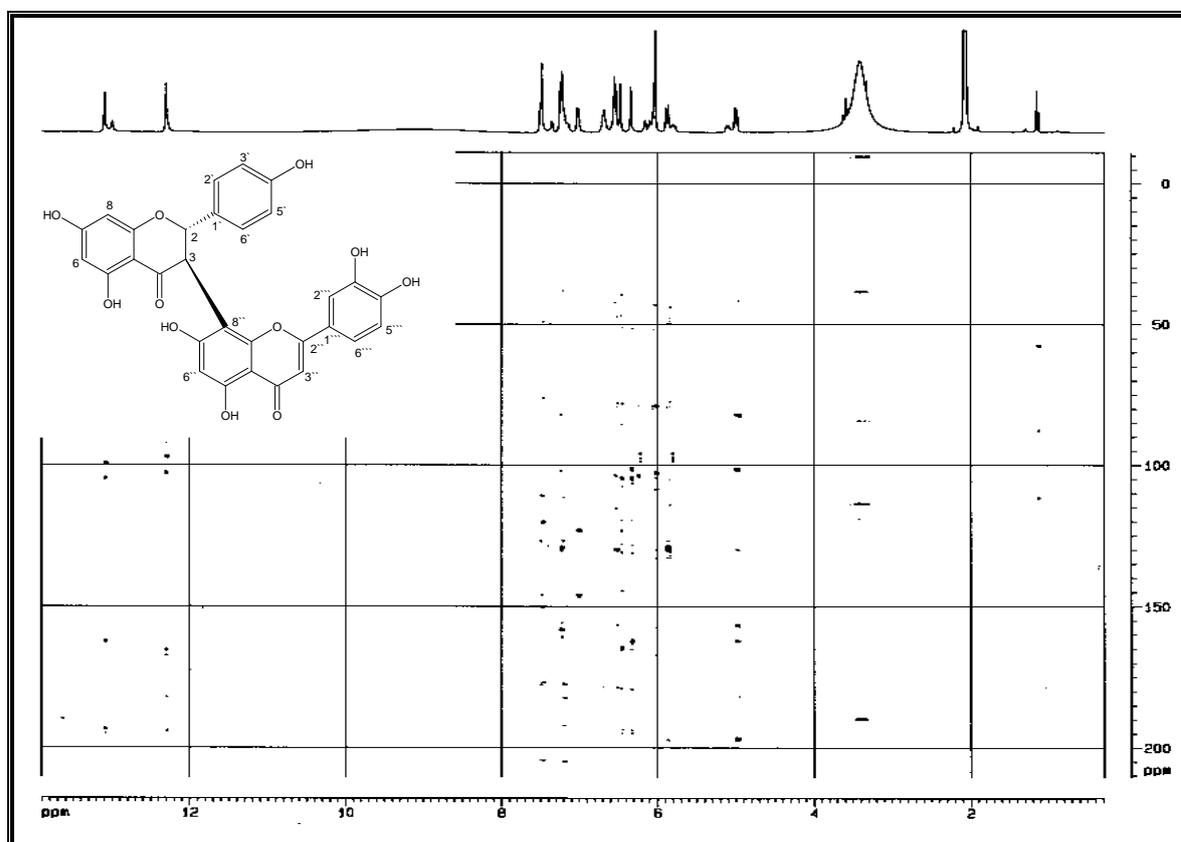


FIGURA 57 – Mapa de contornos gHMBC a 400 MHz de **LFOM-109** (DMSO- $d_6$ ).

TABELA 5 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **LEQM-109** (DMSO- $d_6$ , 400 e 100 MHz)

Posição	$\delta^{**}\text{C}$	$\delta\text{C}^a$	$\delta^*\text{H}, m, J$	$\delta\text{H}^a$	gHMQC ( $^1J_{\text{CH}}$ )	gHMBC ( $^2J_{\text{CH}}$ )	gHMBC ( $^3J_{\text{CH}}$ )
2	82,2	81,0	5,87; <i>d</i> ; 12,4	5,71; <i>d</i> ; 12	H-2	H-3	
3	50,1	48,4	4,98; <i>d</i> ; 12,4	4,89; <i>d</i> ; 12	H-3	H-2	
4	197,8	197,2	-	-	-	H-3	H-2
5	165,2	161,8	12,6	12,25; <i>s</i>	-		
6	97,5	95,4	6,03; <i>d</i> ; 5	5,97; <i>s</i>	H-6		H-8
7	168,6	163,6	-	-	-	H-8	
8	94,4	96,3	6,47; <i>d</i> ; 5	5,97; <i>s</i>	H-8		
9	163,3	166,6	-	-	-	H-8	
10	102,8	101,6	-	-	-		H-3/H-8
1`	128,7	128,2	-	-	-	H-2	H-3`
2`	115,7	128,6	6,53; <i>dd</i> ; 8,09	7,15; <i>dd</i> ; 8,3	H-2`/6`	H-3`	H-2
3`	129,7	114,5	7,23; <i>dd</i> ; 7	6,39; <i>dd</i> ; 8,3	H-3`/5`		H-3
4`	159,0	157,4	-	-	-	H-3`	
5`	129,7	114,5	7,23; <i>dd</i> ; 7	6,39; <i>dd</i> ; 8,3	H-3`/5`		H-3`
6`	115,7	128,6	6,53; <i>dd</i> ; 8,09	7,15; <i>dd</i> ; 8,3	H-2`/6`		H-2
2``	164,1	163,8	-	-	-	H-3``	
3``	103,7	102,3	6,35; <i>s</i>	-	H-3``		
4``	183,1	181,7	-	-	-	H-3``	
5``	161,9	160,6	12,03	13,07; <i>s</i>	-	H-6``	
6``	99,2	98,7	6,40; <i>s</i>	6,23; <i>s</i>	H-6``		
7``	164,1	162,9	-	-	-	H-6``	H-3
8``	101,8	100,6	-	-	-	H-3	H-2/H-6``
9``	155,8	155,3	-	-	-		H-3
10``	104,6	103,2	-	-	-		H-3``/H-6``
1````	122,8	121,1	-	-	-		H-3``/H-5````
2````	114,8	113,4	7,48; <i>s</i>	7,42; <i>s</i>	H-2````		
3````	147,4	145,7	-	-	-		H-5````
4````	151,4	149,8	-	-	-	H-5````	
5````	116,5	116,2	7,02; <i>d</i>	6,91; <i>d</i> ; 8,1	H-5````		
6````	119,4	119,4	7,49; <i>s</i>	7,43; <i>d</i> ; 8,0	H-6````	H-5````	

$\delta^*$  = valores expressos em ppm;  $J$  = constante de acoplamento, expressa em Hertz (Hz);  $m$  = multiplicidade;  $dd$  = duplo duplete,  $d$  = duplete,  $m$  = multiplete,  $s$  = simpleto. \*\*Os deslocamentos químicos dos átomos de carbono foram obtidos pelos mapas de contorno gHMQC e gHMBC.<sup>a</sup> Dados da Literatura (Li et al., 2002).

Comparando-se os valores obtidos no RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  em  $\text{DMSO-}d_6$  com dados da literatura (Li et al., 2002), temos que estes são semelhantes, podendo assim inferir que o composto natural **LFOM-109**, isolado do epicarpo de *G. brasiliensis*, trata-se do biflavonoide natural conhecido como **fukugetina** (FIGURA 49).

A estrutura também foi confirmada com a realização de difração de RX, do qual pode-se obter alguns parâmetros para sua confirmação estrutural. Os parâmetros geométricos principais da fukugetina com os seus átomos numerados (FIGURA 58) foram determinados com o emprego dos programas ORTEP-3 e Mercury. Os anéis I-A, I-C, II-A', II-B' e II-C' e seus respectivos vizinhos são, como esperados, planares. O anel I-B apresenta uma conformação de envelope com o átomo C1. A subunidade da molécula, considerando somente os átomos dos anéis A', B' e C' é quase planar. Então há três subunidades da molécula que podem ser consideradas individualmente quase planar; a subunidade 1 contendo os átomos presentes nos anéis I-A e I-B; a subunidade 2 contendo o anel I-C e a subunidade 3 contendo os átomos presentes nos anéis I-A', I-B' e I-C'. Outra importante informação relevante das análises cristalográficas de raio-X é a presença de duas águas de cristalização e uma molécula de metanol na estrutura do cristal (FIGURA 59). Desde então não foi possível determinar a estrutura absoluta por difração de radiografia usando radiação de MoK para estruturas contendo somente átomos leves como na fukugetina, a estereoquímica dos carbonos C1 e C2 não pode ser atribuída as análises cristalográficas.

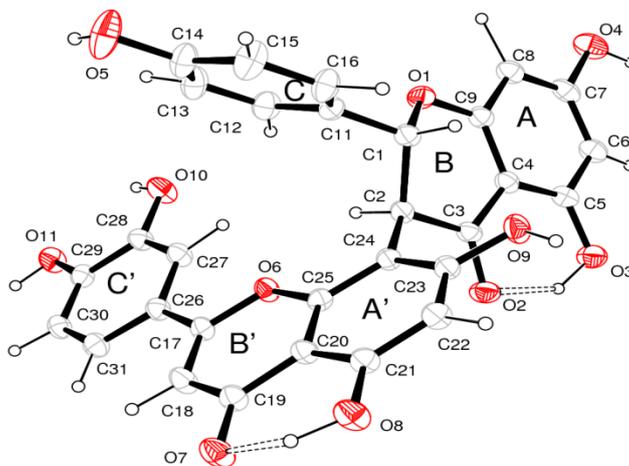


FIGURA 58 - Visão da fukugetina (ORTEP) **LFOM-109** que mostra o átomo rotulando arbitrário.

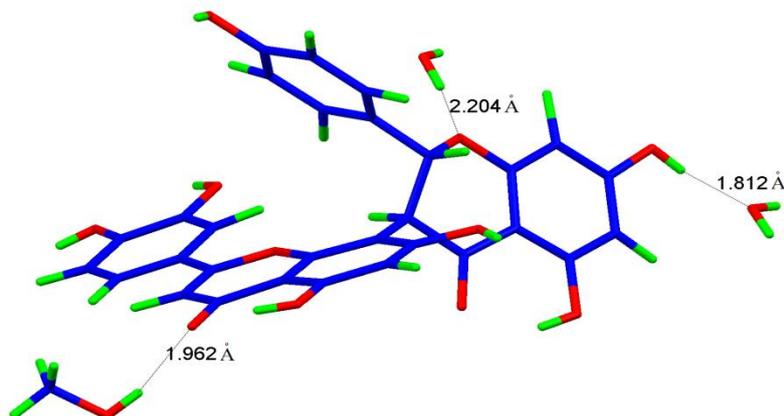


FIGURA 59 - Visão da fukugetina (MERCURY) **LFOM-109** e as moléculas de solvente da unidade assimétrica.

### 6.1.7 Derivado semissintético: 7,4',7'',3''',4'''-penta-*O*-acetil-fukugetina (**LFOM-110**)

Para obtenção do derivado **LFOM-110** foi realizado a reação da fukugetina **LFOM-109** e anidrido acético em presença de dimetilaminopiridina (4-DMAP) (FIGURA 55). O produto obtido resultou em um sólido amarelo e apresentou rendimento médio de 53%. Sua proposta estrutural foi baseada em dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , COSY,  $g\text{HMBC}$  e  $g\text{HMQC}$  (SILVERSTEIN et al., 2006).

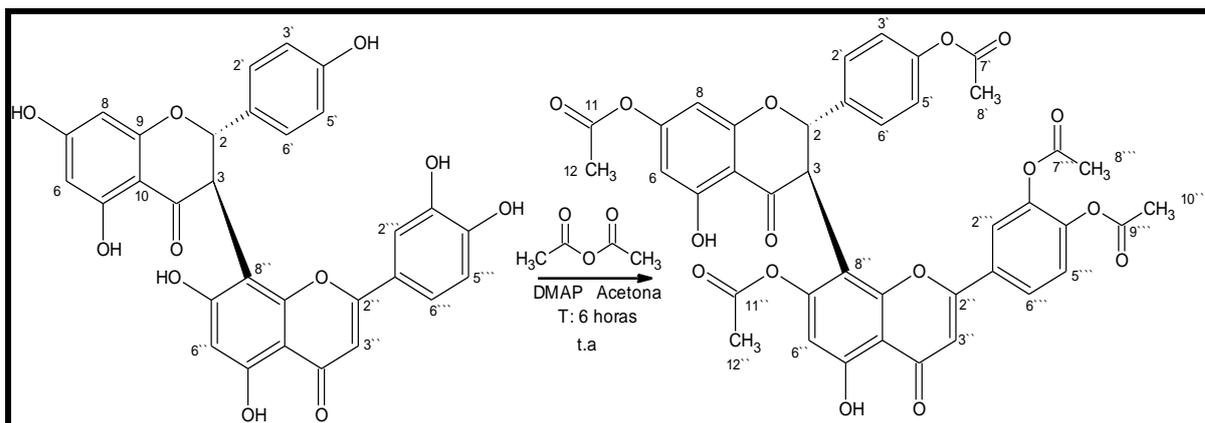


FIGURA 60 - Reação de obtenção do derivado **LFOM-110**

O espectro de absorção na região do IV (FIGURA 61) da **LFOM-110** evidenciou banda  $2935\text{ cm}^{-1}$  referente à deformação axial de  $\text{Csp}^3\text{-H}$  do anel aromático,  $1770\text{ cm}^{-1}$  banda característica de ésteres que é bastante intensa referindo-se a deformação axial de  $\text{C=O}$  no qual a constante de força da ligação carbonila é aumentada pela tendência do átomo de oxigênio adjacente de atrair elétrons (efeito indutivo).  $1645$  e  $1614\text{ cm}^{-1}$  deformação axial de  $\text{C=C}$  aromático,  $1504\text{ cm}^{-1}$  deformação axial da ligação  $\text{C=C}$  do

anel,  $1425\text{ cm}^{-1}$  de deformação axial assimétrica  $\text{CH}_3$ ,  $1369\text{ cm}^{-1}$  deformação axial simétrica  $\text{CH}_3$ ,  $1259\text{ cm}^{-1}$  deformação axial de  $\text{C(=O)-O}$  de acetato,  $1193\text{ cm}^{-1}$  deformação axial assimétrica de  $\text{O-C=C}$  e em  $846\text{ cm}^{-1}$  deformação angular fora do plano (DAFP) de  $\text{C-H}$  do anel aromático (SILVERSTEIN et al., 2006).

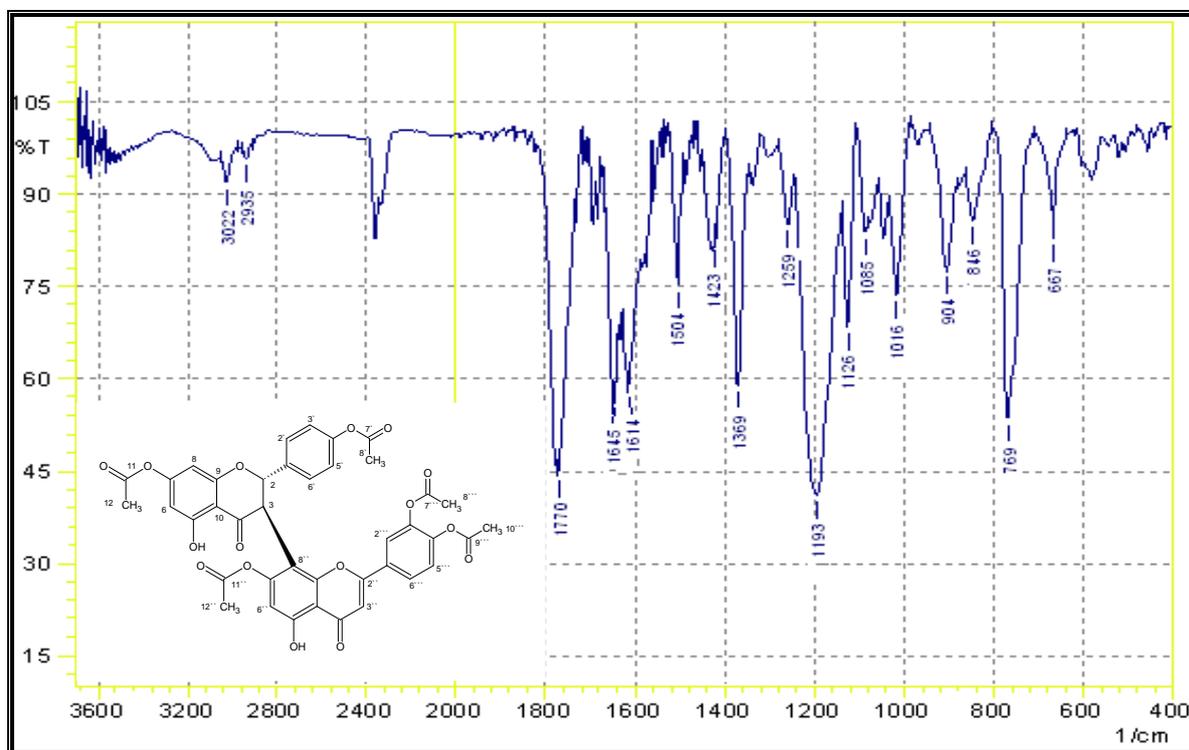


FIGURA 61- Espectro no IV (KBr) para o composto **LFOM-110**

Os espectros no ultravioleta (UV) do **LFOM-110** (FIGURAS 62 e 63) mostraram bandas com absorções com  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\log \epsilon\{\text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}\}$ ) em 202 nm (6,56), 262 nm (6,09) e 302 nm (5,98). A adição de solução de  $\text{AlCl}_3$  a solução provocou um deslocamento batocrômico, com absorções com  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\log \epsilon\{\text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}\}$ ) em 200 nm (6,58), 262 nm (6,07) e 302 nm (6,00), o que sugere a existência de hidroxilas em *orto* e/ou grupos quelatogênicos. A adição de solução de  $\text{HCl}$  não restaurou a banda para seu estado inicial, com absorções com  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\log \epsilon\{\text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}\}$ ) em 200 nm (6,58), 262 nm (6,07) e 283 nm (5,98), porém ficou semelhante a curva com o aditivo  $\text{AlCl}_3$  confirmando assim presença de grupos quelatogênicos. Com a adição de  $\text{NaOAc}$  não foi observado um desvio batocrômico, com absorções com  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\log \epsilon\{\text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}\}$ ) em 215 nm (6,58) e 263 nm (6,18), sugerindo que as hidroxila ácidas ( $\text{C-7}$  e  $\text{C-7'}$ ) foram substituídas pelos os grupamentos acetila. Na presença de  $\text{NaOAc}/\text{H}_3\text{BO}_3$  não observou novamente desvio batocrômico em relação a solução inicial sem aditivos, com

absorções com  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\log \epsilon \{ \text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \}$ ) em 263 nm (6,17) e 497 nm (6,58), indicando que o grupo *orto*-diidroxí no anel B encontra-se substituído pelo mesmo grupamento (MABRY, 1970).

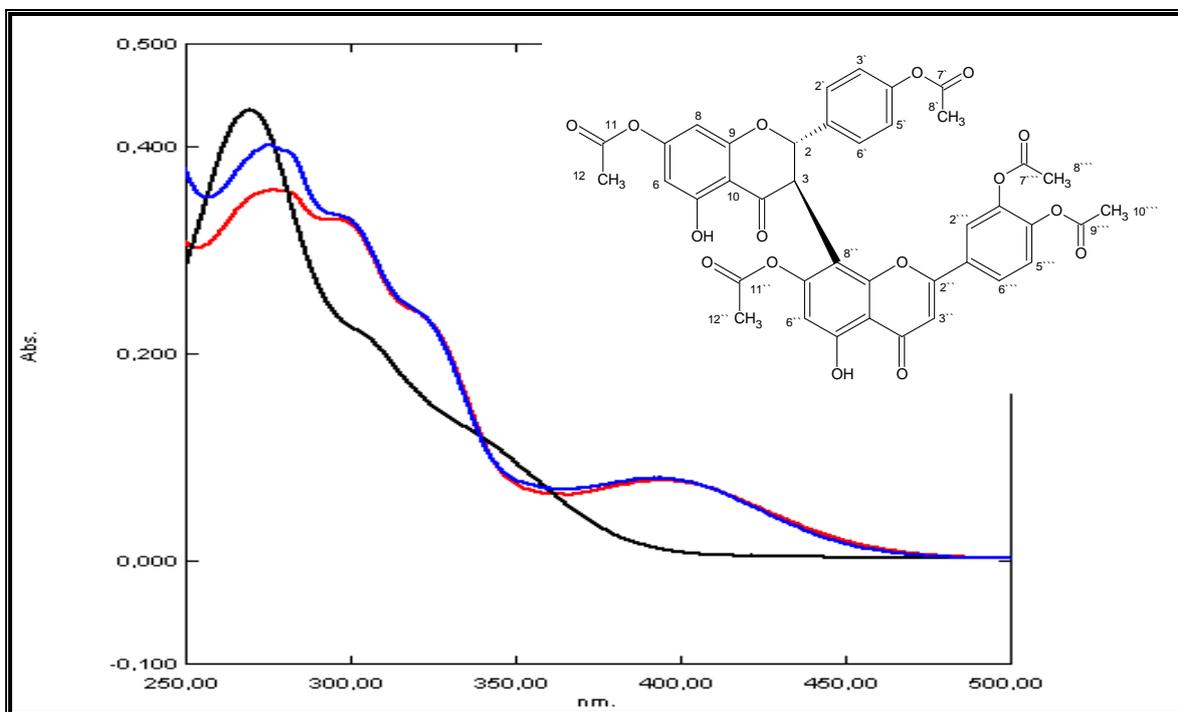


FIGURA 62 – Espectro no ultravioleta de **Lfom-110**. Curva de cor preta (**Lfom-110 + EtOH**); Curva de cor azul (**Lfom-110+EtOH+AlCl<sub>3</sub>**); Curva de cor vermelha (**Lfom-110+EtOH+AlCl<sub>3</sub>+HCl**).

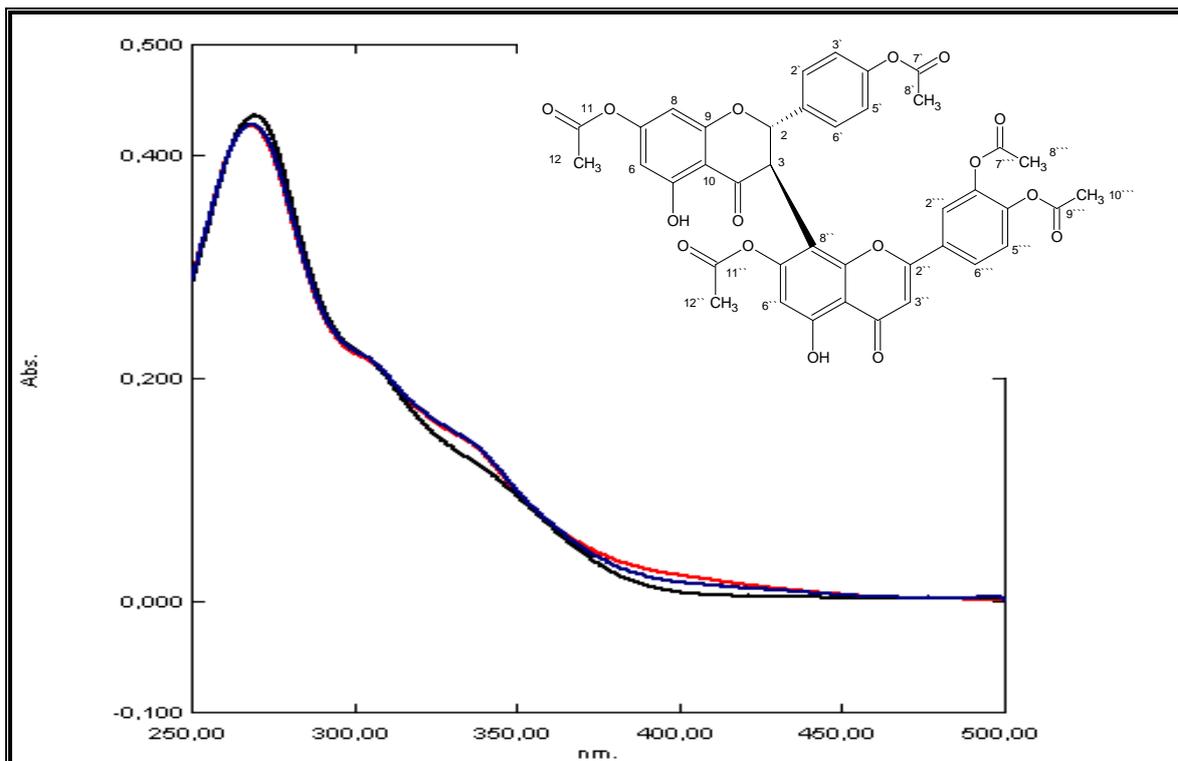


FIGURA 63 – Espectro no ultravioleta de **LFOM-110**. Curva de cor preta (**LFOM-110** + EtOH); Curva de cor azul (**LFOM-110** + EtOH + NaOAc); Curva de cor vermelha (**LFOM-110** + EtOH + NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>).

Para confirmação da massa molecular do composto **LFOM-110** foi obtido um perfil através das análises de espectrometria de massas em sistema MALDI-TOF. O espectrograma (FIGURA 64) apresentou um pico com relação massa e carga (m/z) de 767,20, o qual é massa do composto **LFOM-110** acrescido de um íon hidrogênio. Confirmada a massa molecular do composto **LFOM-110**, iniciou-se sua caracterização estrutural.

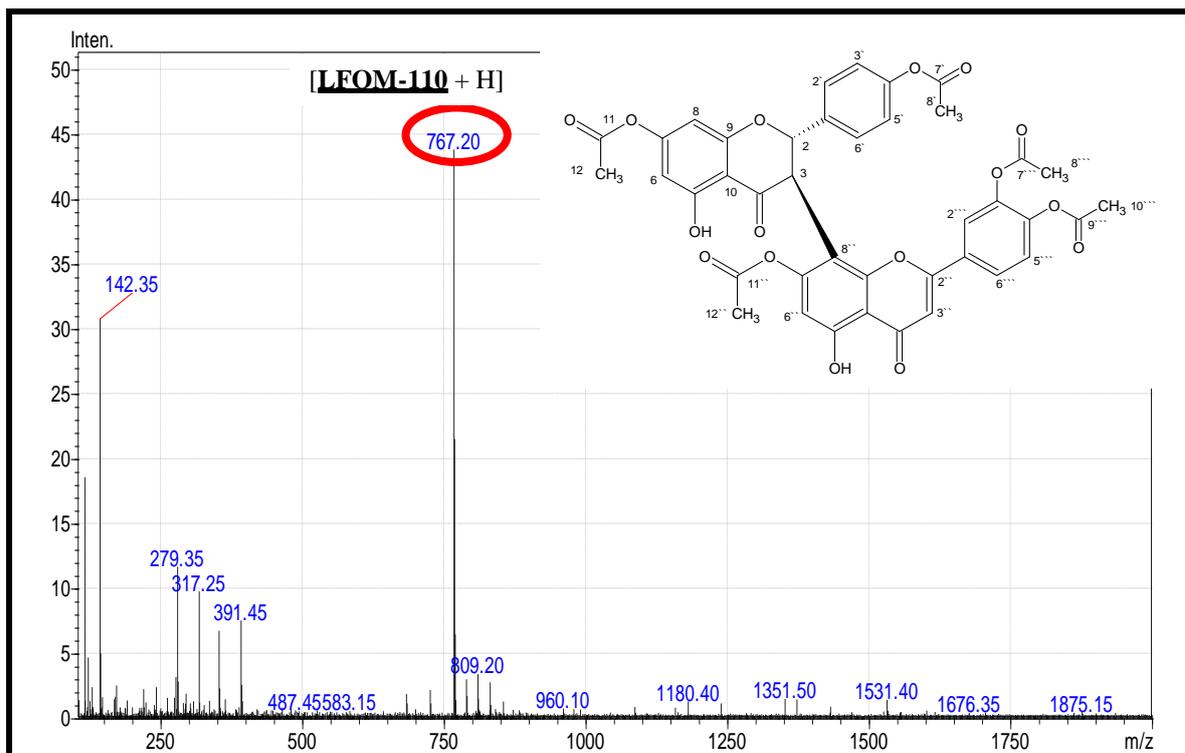


FIGURA 64 - Espectrograma de massa do composto **LFOM-110** em sistema MALDI-TOF modo linear, faixa de 200 a 2000 m/z.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 65 – TABELA 6) para **LFOM-110**, obtido em  $\text{CDCl}_3$ , apresentou sinais compatíveis para um biflavonoide. Com base nesse espectro foi possível verificar a presença de sinais do biflavonoide fukugetina **LFOM-109** (TABELA 5, p. 110), no qual foi submetido a modificações estruturais, além do sinal dos grupamentos acetila.

A região entre  $\delta$  2,0-3,0 ppm, apresentou sinais simples (singletos) em  $\delta$  2,28 ppm (H-12),  $\delta$  2,33 ppm (H-8'),  $\delta$  2,31 ppm (H-12''),  $\delta$  2,34 ppm (H-8'') e em  $\delta$  2,31 ppm (H-10'').

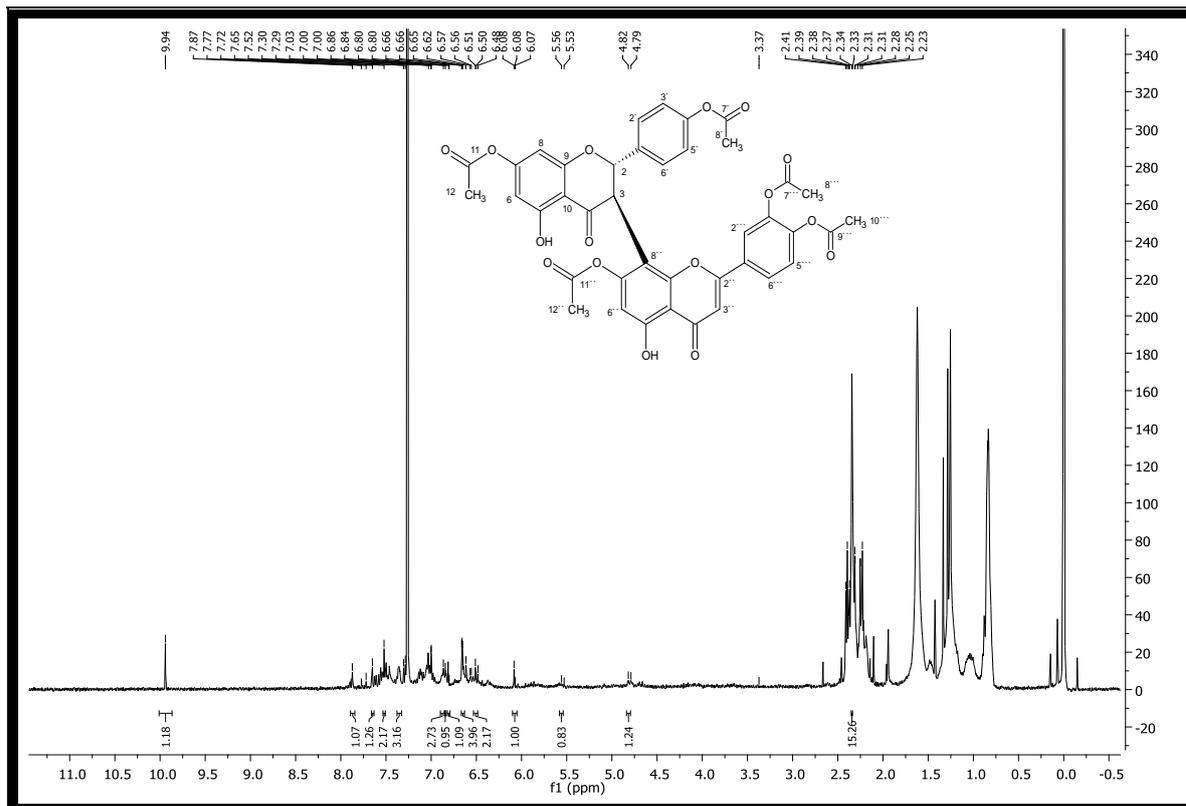


FIGURA 65 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz para o composto **LEOM-110** ( $\text{CDCl}_3$ ).

No experimento de **COSY**(FIGURA 66), observou-se acoplamentos entre H-2 $\rightarrow$ H-3 ( $\delta$  5,78 ppm  $\rightarrow$   $\delta$  4,79 ppm) confirmando o padrão de centros estereogênicos para o anel I-C evidenciado no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . Da mesma forma observou-se a correlação entre H-2'/6'  $\rightarrow$  H-3'/5' ( $\delta$  7,12 ppm  $\rightarrow$   $\delta$  6,77 ppm), confirmando o padrão 4'-O-(acetil) para o anel I-B que também foi evidenciado no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . Os prótons dos grupamentos acetila não correlacionam-se fortemente devido os mesmos não encontrarem-se em acoplamento.

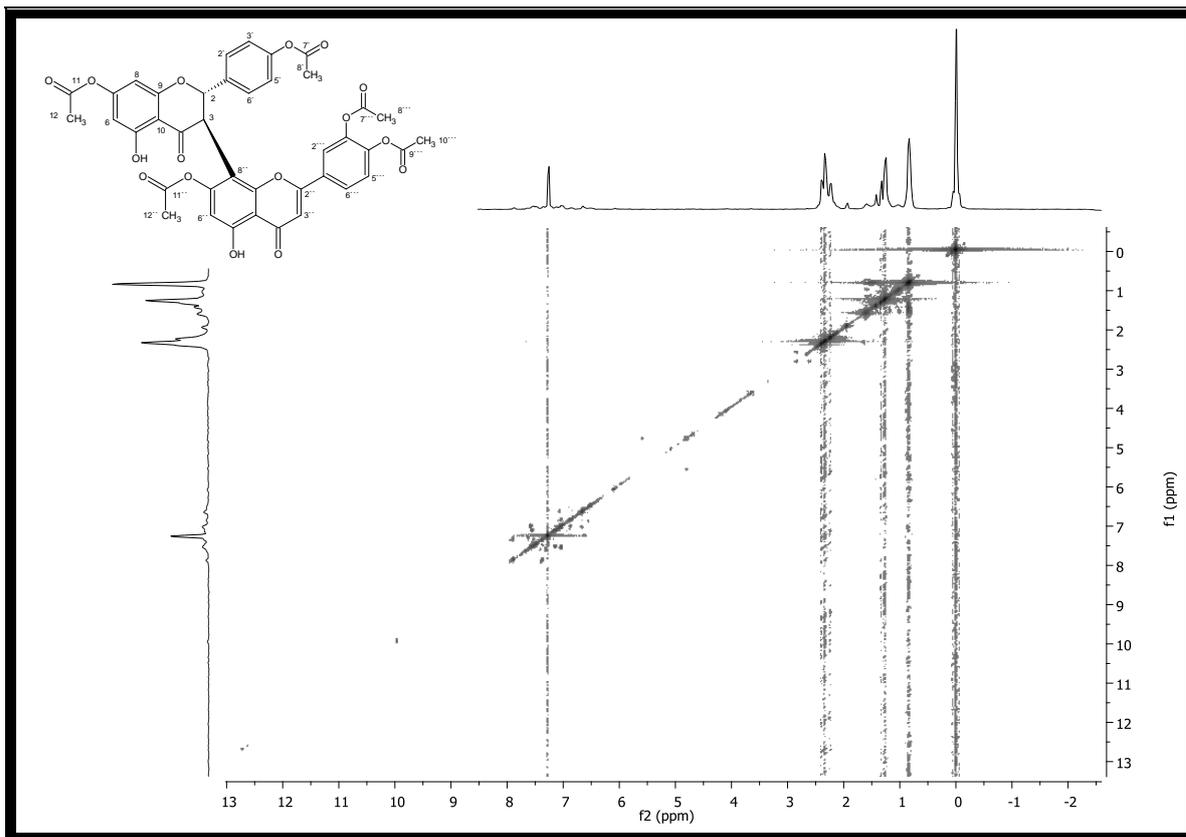


FIGURA 66 - Mapa de contornos COSY a 400 MHz para **LFOM-110** ( $\text{CDCl}_3$ ).

O mapa de contornos **gHMQC** (FIGURA 67 – TABELA 6) mostrou correlações do biflavonoide fukugetina **LFOM-109** como já citado anteriormente (p. 108) e as correlações referentes ao grupamento acetila inserido em sua estrutura. Assim, as correlações referentes ao grupamento foram: H-12 ( $\delta$  2,28 ppm) e C-12 ( $\delta$  20,8 ppm) que são semelhantes aos demais grupamentos do composto H-8` ( $\delta$  2,3 ppm) e C-8` ( $\delta$  20,2 ppm), H-12`` ( $\delta$  2,3 ppm) e C-12`` ( $\delta$  21,4 ppm), H-8`` ( $\delta$  2,3 ppm) e C-8`` ( $\delta$  20,8 ppm), além de H-10`` (2,3 ppm) e C-10`` ( $\delta$  21,6 ppm).

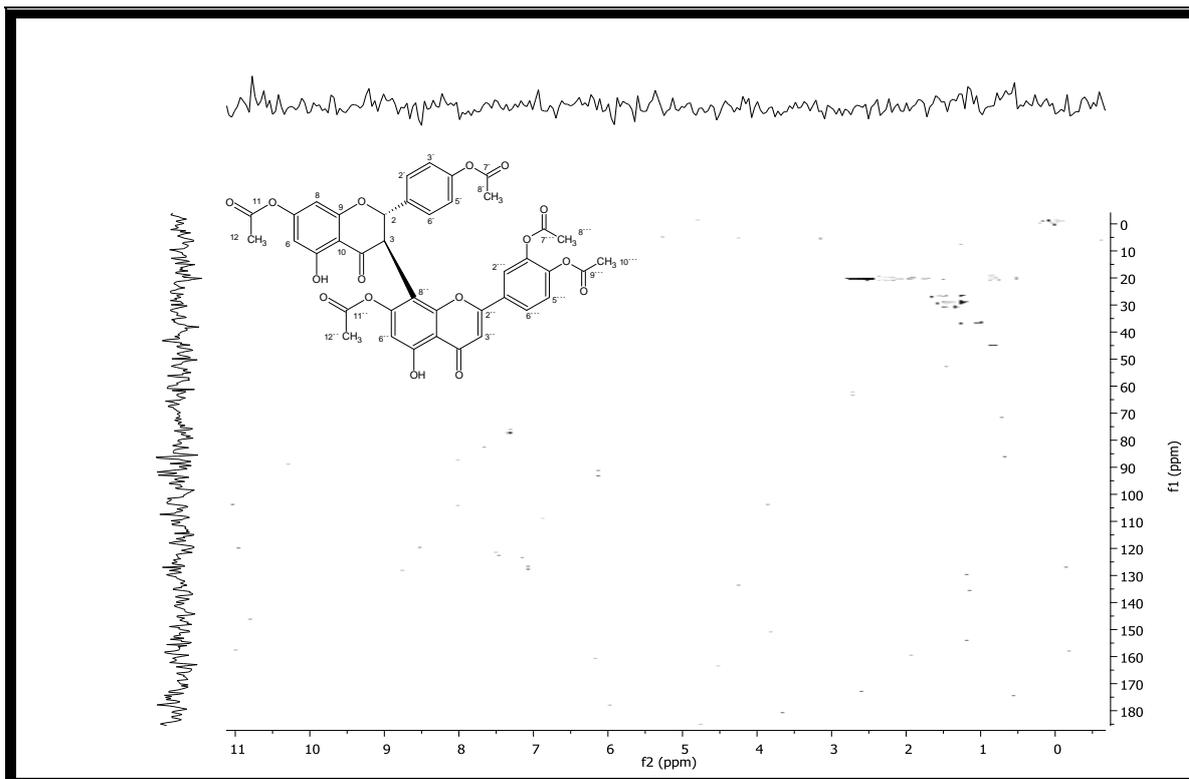


FIGURA 67 - Espectro de gHMBC a 400 MHz para **LFOM-110** (CDCl<sub>3</sub>).

Com o mapa de contornos gHMBC (FIGURA 68) foi possível estabelecer as correlações existentes do biflavonoide fukugetina **LFOM-109** (p. 109) e as correlações do grupamento acetila. As correlações para o grupamento foram: H-12 ( $\delta$  2,28 ppm) e C-11 ( $\delta$  168,8 ppm) que são semelhantes aos demais grupamentos do composto H-8' ( $\delta$  2,33 ppm) e C-7' ( $\delta$  169,1 ppm), H-12'' ( $\delta$  2,31 ppm) e C-11'' ( $\delta$  168,4 ppm), H-8''' ( $\delta$  2,34 ppm) e C-7''' ( $\delta$  168,8 ppm), além de H-10''' ( $\delta$  2,31 ppm) e C-9''' ( $\delta$  168,3 ppm). Todas as correlações foram  $^2J_{H-C}$ .

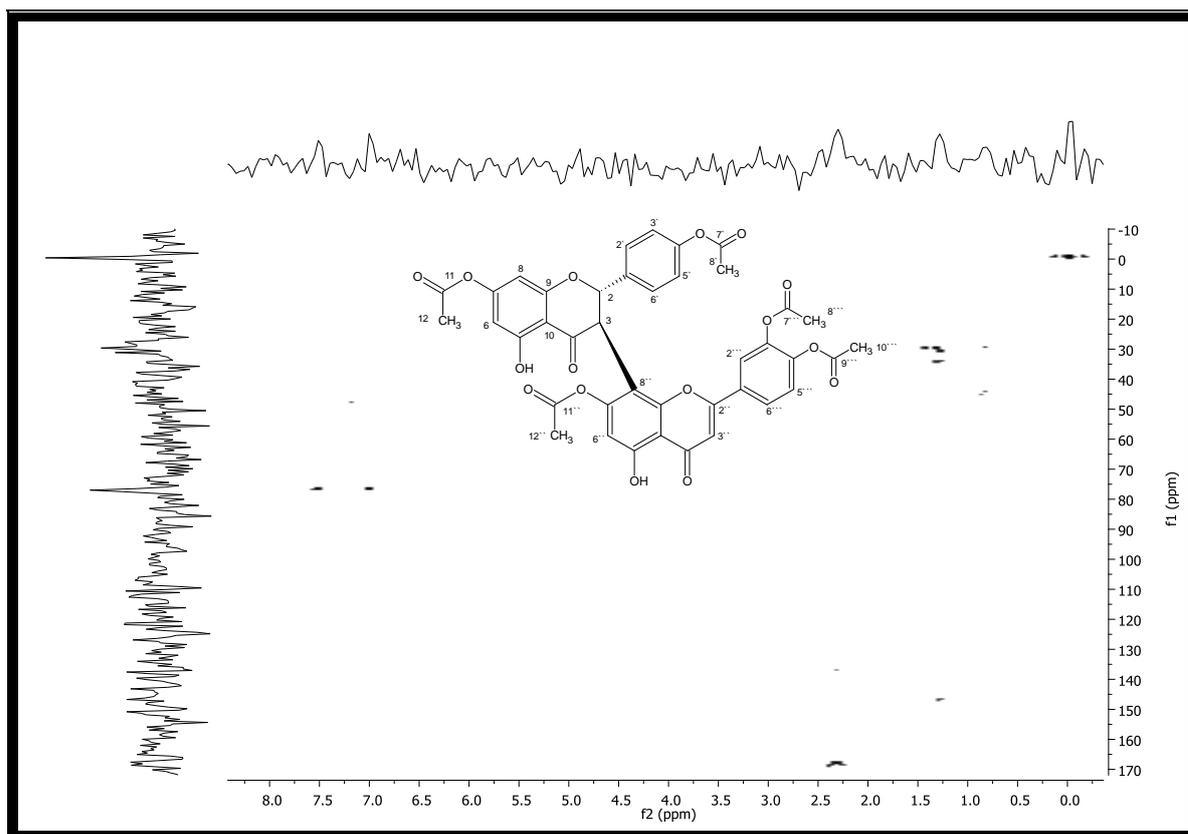


FIGURA 68 - Espectro de gHMBC a 400 MHz para **LFOM-110** (CDCl<sub>3</sub>).

TABELA 6 - Dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C para **LFOM-110** (CDCl<sub>3</sub>, 400 e 100 MHz)

Posição	$\delta^{**}_C$	$\delta^*_H, m, J$	gHMQC ( $^1J_{CH}$ )	gHMBC ( $^2J_{CH}$ )
<b>2</b>	81,5	5,56; <i>d</i> ; 12		
<b>3</b>	46,4	4,82; <i>d</i> ; 12		
<b>4</b>	195,9			
<b>5</b>	167,9	9,96; <i>s</i>		
<b>6</b>	108,7	6,51; <i>d</i> ; 4		
<b>7</b>	168,7			
<b>8</b>	100,3	6,08; <i>s</i>		
<b>9</b>	160,6	-		
<b>10</b>	114,4	-		
<b>11</b>	168,8	-		H-12
<b>12</b>	20,8	2,28; <i>s</i>	H-12	
<b>1'</b>	137,7	-		
<b>2'</b>	128,3	6,85; <i>dd</i> ; 8		
<b>3'</b>	121,5	7,03; <i>dd</i> ; 8		
<b>4'</b>	147,8	-		
<b>5'</b>	121,5	7,03; <i>dd</i> ; 8		
<b>6'</b>	128,3	6,85; <i>dd</i> ; 8		
<b>7'</b>	169,1	-		H-8'
<b>8'</b>	20,2	2,33; <i>s</i>	H-8'	

Posição	$\delta^{**c}$	$\delta^*_{H, m, J}$	Continuação	
			$gHMQC$ ( $^1J_{CH}$ )	$gHMBC$ ( $^2J_{CH}$ )
2 <sup>''</sup>	163,6	-		
3 <sup>''</sup>	103,6	6,66; <i>s</i>		
4 <sup>''</sup>	184,9	-		
5 <sup>''</sup>	156,1	9,96; <i>s</i>		
6 <sup>''</sup>	109,1	6,62; <i>s</i>		
7 <sup>''</sup>	159,3	-		
8 <sup>''</sup>	108,7	-		
9 <sup>''</sup>	161,7	-		
10 <sup>''</sup>	111,8	-		
11 <sup>''</sup>	163,4	-		H-12 <sup>''</sup>
12 <sup>''</sup>	21,4	2,31; <i>s</i>	H-12 <sup>''</sup>	
1 <sup>'''</sup>	127,3	-		
2 <sup>'''</sup>	123,4	7,72; <i>s</i>		
3 <sup>'''</sup>	144,7	-		
4 <sup>'''</sup>	145,3	-		
5 <sup>'''</sup>	126,7	7,62; <i>d</i> ; 8		
6 <sup>'''</sup>	127,3	7,73; <i>d</i> ; 8		
7 <sup>'''</sup>	168,8	-		H-8 <sup>'''</sup>
8 <sup>'''</sup>	20,8	2,34; <i>s</i>	H-8 <sup>'''</sup>	
9 <sup>'''</sup>	168,3	-		H-10 <sup>'''</sup>
10 <sup>'''</sup>	21,6	2,31; <i>s</i>	H-10 <sup>'''</sup>	

$\delta^*$  = valores expressos em ppm;  $J$  = constante de acoplamento, expressa em Hertz (Hz);  $m$  = multiplicidade;  $dd$  = duplo duplete,  $d$  = duplete,  $m$  = multiplete,  $s$  = simpleto. \*\*Os deslocamentos químicos dos átomos de carbono foram obtidos pelos mapas de contorno  $gHMQC$  e  $gHMBC$ .

### 6.1.8 Derivado semissintético: 7,4',7'',3''',4''''-penta-*O*-metil-fukugetina (**LFOM-111**)

Para obtenção do derivado **LFOM-111** foi realizado a reação de fukugetina **LFOM-109** e sulfato de dimetila em presença de carbonato de potássio (FIGURA 69). O produto obtido resultou em um sólido amarelo e apresentou rendimento médio de 27%. O derivado apresentou características de flavonóide quando analisada por CCD e revelada sob luz ultravioleta e com solução sulfo-vanilínica. Sua proposta estrutural foi baseada em dados de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$ , COSY,  $gHMBC$  e  $gHMQC$  (SILVERSTEIN, et al., 2006).

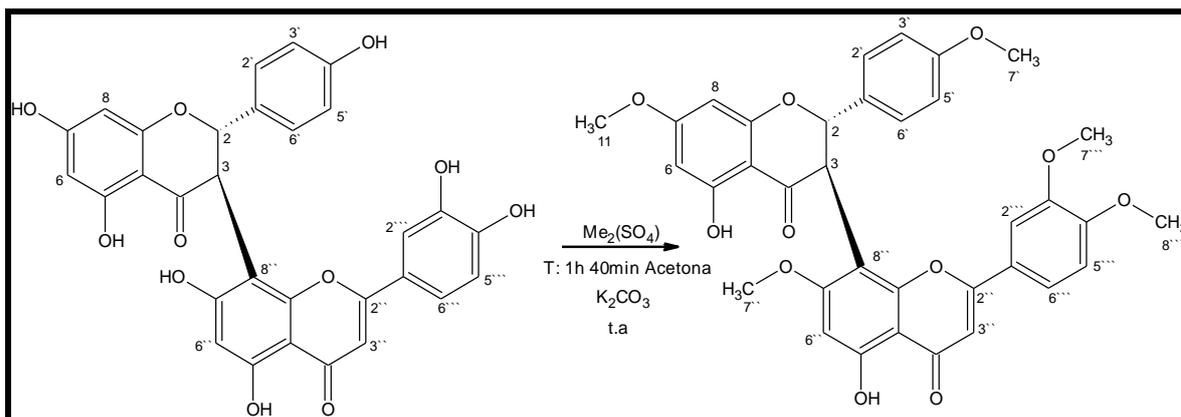


FIGURA 69 - Reação de obtenção do derivado **LEOM-111**

O espectro de absorção na região do IV (FIGURA 70) da **LEOM-111** evidenciou a natureza aromática do composto pelas bandas de absorção em  $3454\text{ cm}^{-1}$  característica do grupo hidroxila com uma banda larga;  $2962$ ,  $2929$  e  $2839\text{ cm}^{-1}$  referente à deformação axial da metila.  $1645\text{ cm}^{-1}$  referente deformação axial de  $\text{C}=\text{O}$ ,  $1612$  e  $1591\text{ cm}^{-1}$  deformação axial da ligação  $\text{C}=\text{C}$  do anel,  $1498$ - $1440\text{ cm}^{-1}$  de deformação axial assimétrica  $\text{CH}_3$ ,  $1375$ - $1327\text{ cm}^{-1}$  deformação axial simétrica  $\text{CH}_3$  e em  $823$ - $744\text{ cm}^{-1}$  deformação angular fora do plano (DAFP) de  $\text{C}-\text{H}$  do anel aromático.

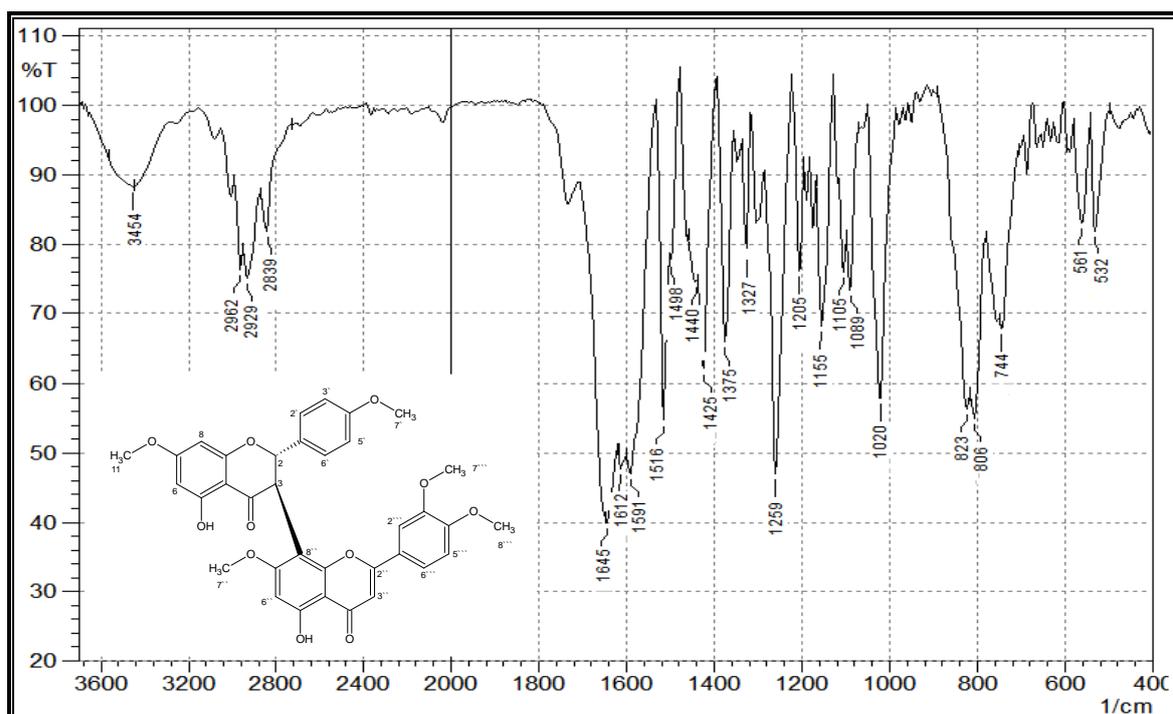


FIGURA 70 - Espectro no IV (KBr) para o composto **LEOM-111**

Os espectros no ultravioleta (UV) do **LFOM-111** (FIGURAS 71 e 72) mostraram bandas com absorções com  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\log \epsilon \{\text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}\}$ ) em 229 nm (6,42), 252 nm (6,02) e 286 nm (6,20). A adição de solução de  $\text{AlCl}_3$  à solução provocou um deslocamento batocrômico, com absorções com  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\log \epsilon \{\text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}\}$ ) em 227 nm (6,49), 284 nm (6,25) e 346 nm (5,96), o que sugere a existência de hidroxilas em *orto* e/ou grupos quelatogênicos. A adição de solução de  $\text{HCl}$  não restaurou a banda para seu estado inicial, com absorções com  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\log \epsilon \{\text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}\}$ ) em 226 nm (6,49), 283 nm (6,25) e 346 nm (5,96), porém ficou semelhante à curva com o aditivo  $\text{AlCl}_3$  confirmando assim presença de grupos quelatogênicos. Com a adição de  $\text{NaOAc}$  não foi observado um desvio batocrômico, com absorções com  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\log \epsilon \{\text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}\}$ ) em 229 nm (6,49), 285 nm (6,22) e 340 nm (5,96), sugerindo que as hidroxila ácidas (C-7 e C-7') foram substituídas pelos grupamentos metila. Na presença de  $\text{NaOAc}/\text{H}_3\text{BO}_3$  não observou novamente desvio batocrômico em relação a solução inicial sem aditivos, com absorções com  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\log \epsilon \{\text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}\}$ ) em 228 nm (6,48), 285 nm (6,20) e 339 nm (5,95), indicando que o grupo *orto*-diidroxila no anel B encontra-se substituído pelo mesmo grupamento já supracitado.

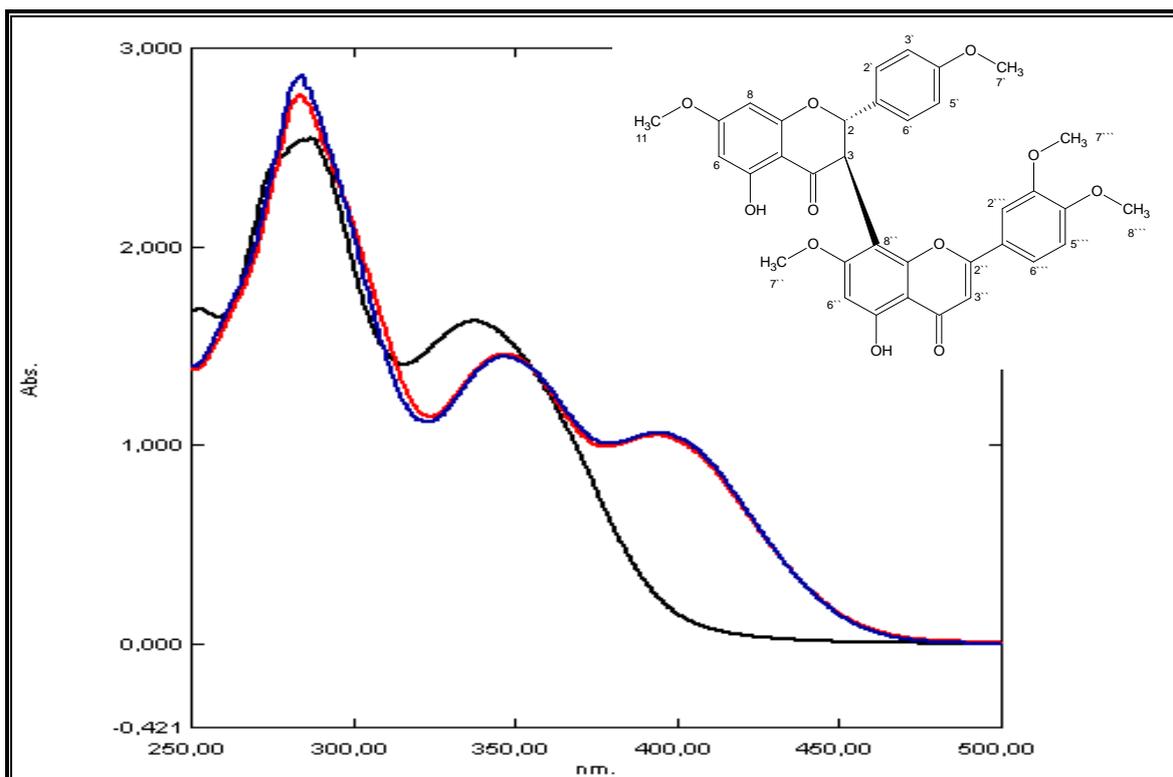


FIGURA 71 – Espectro no ultravioleta de **LFOM-111**. Curva de cor preta (**LFOM-111** + EtOH); Curva de cor azul (**LFOM-111** + EtOH +  $\text{AlCl}_3$ ); Curva de cor vermelha (**LFOM-111** + EtOH +  $\text{AlCl}_3$  +  $\text{HCl}$ ).

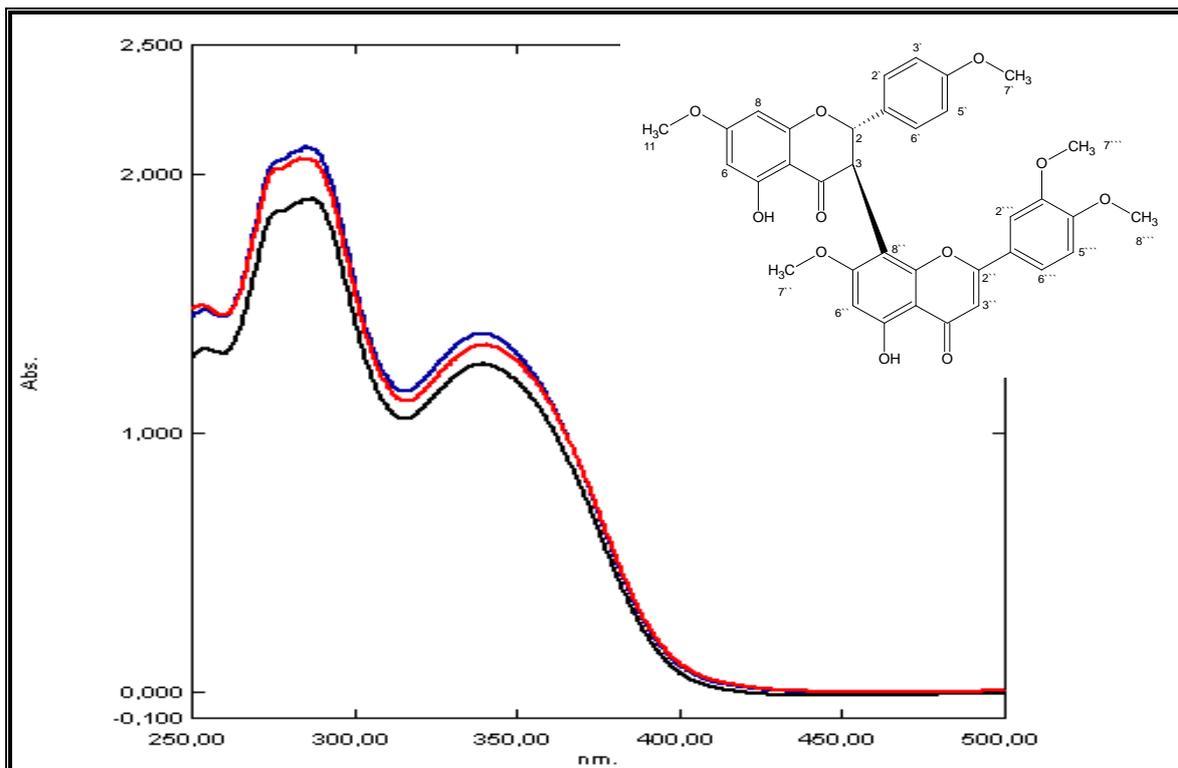


FIGURA 72 – Espectro no ultravioleta de **LFOM-111**. Curva de cor preta (**LFOM-111** + EtOH); Curva de cor azul (**LFOM-111**+ EtOH+NaOAc); Curva de cor vermelha (**LFOM-111**+ EtOH+NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>).

Para confirmação da massa molecular do composto **LFOM-111** foi obtido um perfil através das análises de espectrometria de massas em sistema MALDI-TOF. O espectrograma (FIGURA 73) apresentou um pico com relação massa e carga ( $m/z$ ) de 627,30, o qual é massa do composto **LFOM-111** acrescido de um íon hidrogênio. Confirmada a massa molecular do composto **LFOM-111**, inicializou-se sua caracterização estrutural.

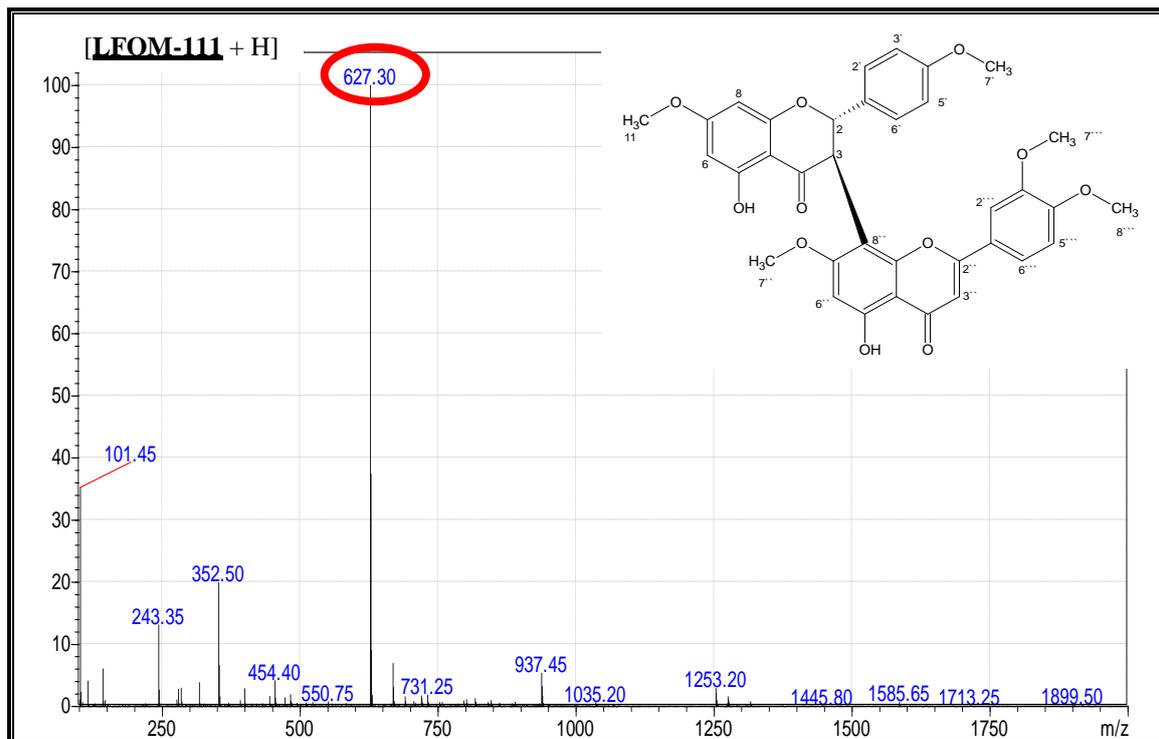


FIGURA 73 - Espectrograma de massa do composto **LFOM-111** em sistema MALDI-TOF modo linear, faixa de 200 a 2000 m/z.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 74 – TABELA 7) para **LFOM-111**, obtido em  $\text{CDCl}_3$ , apresentou sinais compatíveis para um biflavonoide. Com base nesse espectro foi possível verificar a presença de sinais do biflavonoide fukugetina **LFOM-109** (TABELA 5, p. 110), o qual foi submetido a modificações estruturais. Além dos sinais dos grupamentos metila.

A região entre  $\delta$  3,0-4,0 ppm, apresentou sinais simples (singletos) em  $\delta$  3,75 ppm (H-7'),  $\delta$  3,64 ppm (H-11),  $\delta$  3,77 ppm (H-11''),  $\delta$  3,82 ppm (H-7''') e em  $\delta$  3,87 ppm (H-8''').

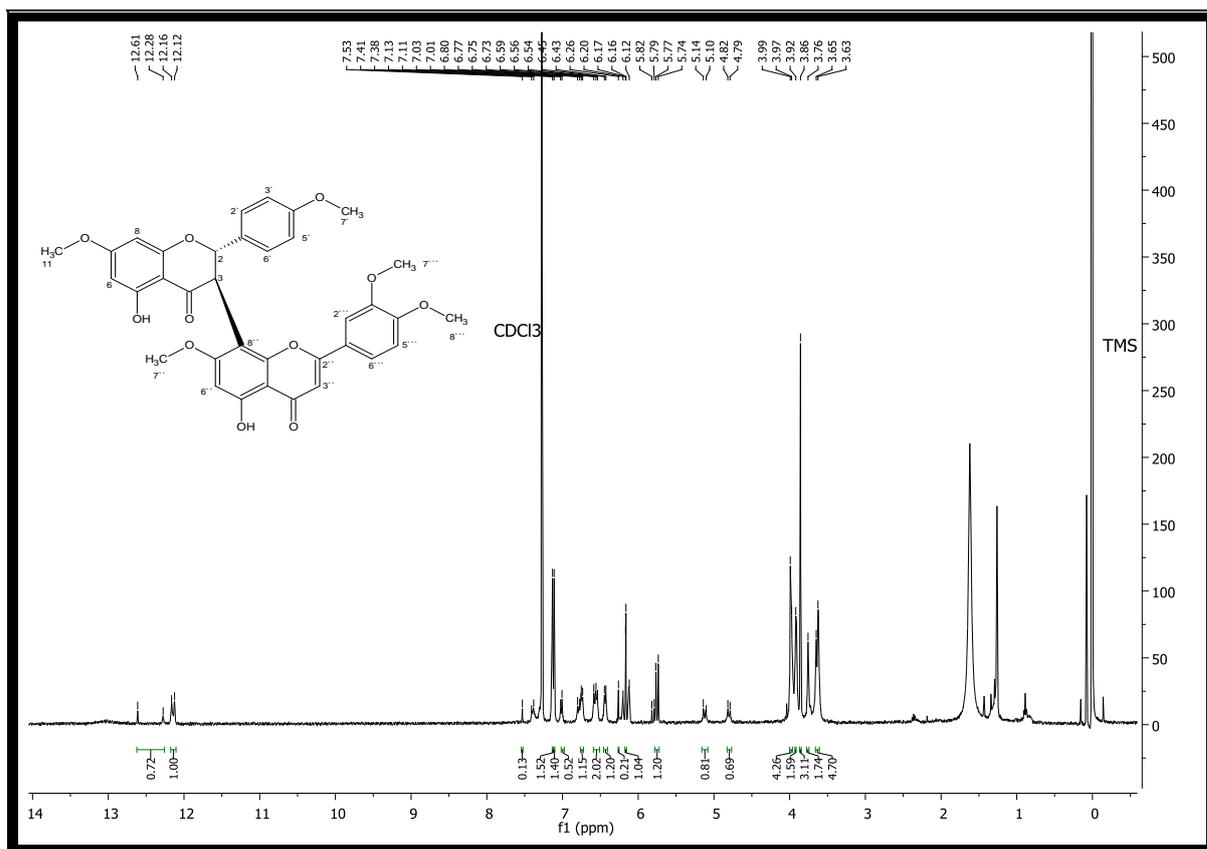


FIGURA 74 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz para **LEOM-111** ( $\text{CDCl}_3$ ).

No experimento de **COSY** (FIGURA 75), observou-se acoplamentos entre  $\text{H-2} \rightarrow \text{H-3}$  ( $\delta$  5,78 ppm  $\rightarrow$   $\delta$  4,79 ppm) confirmando o padrão de centros estereogênicos para o anel I-C evidenciado no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . Da mesma forma observou-se a correlação entre  $\text{H-2}'/6' \rightarrow \text{H-3}'/5'$  ( $\delta$  7,12 ppm  $\rightarrow$   $\delta$  6,77 ppm), confirmando o padrão 4'-O-(metil) para o anel I-B que também foi evidenciado no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . Os prótons dos grupamentos metila não se correlacionam fortemente, devido os mesmos não encontrarem-se em acoplamento.

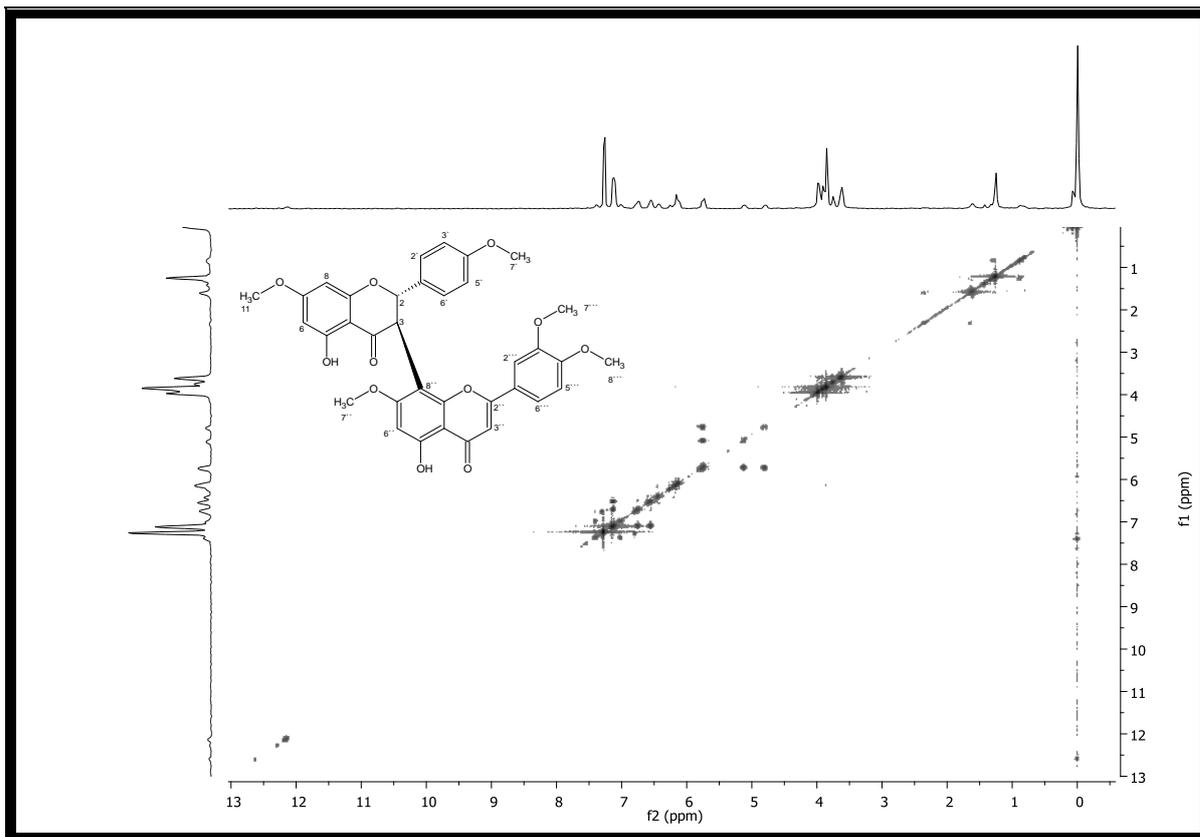


FIGURA 75 - Mapa de contornos COSY a 400 MHz do composto **LFOM-111** ( $\text{CDCl}_3$ ).

O mapa de contornos  $g\text{HMQC}$  (FIGURA 76 – TABELA 7) mostrou correlações do biflavonoide fukugetina **LFOM-109** como já citado anteriormente (p. 108) e as correlações referentes ao grupamento metila inserido em sua estrutura. Assim, as correlações referentes ao grupamento foram:  $\text{H-7}'$  ( $\delta$  3,75 ppm) e  $\text{C-7}'$  ( $\delta$  55,2 ppm) que são semelhantes para os demais grupamentos do composto  $\text{H-11}$  ( $\delta$  3,64 ppm) e  $\text{C-11}$  ( $\delta$  55,8 ppm),  $\text{H-11}''$  ( $\delta$  3,77 ppm) e  $\text{C-11}''$  ( $\delta$  55,0 ppm),  $\text{H-7}'''$  ( $\delta$  3,82 ppm) e  $\text{C-7}'''$  ( $\delta$  55,4 ppm),  $\text{H-8}'''$  ( $\delta$  3,87 ppm) e  $\text{C-8}'''$  ( $\delta$  55,9 ppm).

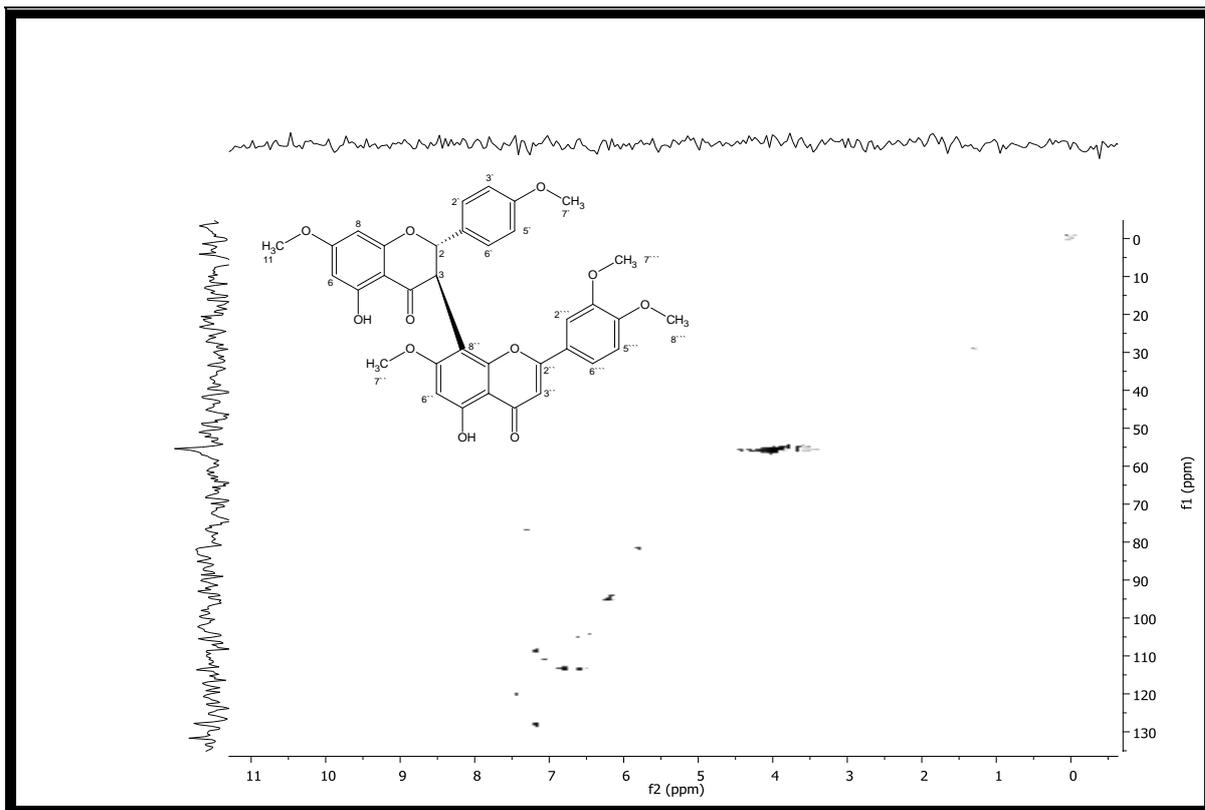


FIGURA 76 – Mapa de contornos gHMBC a 400 MHz para **LEOM-111** em (CDCl<sub>3</sub>).

O mapa de contornos gHMBC (FIGURA 77) foi possível estabelecer as correlações existentes do biflavonoide fukugetina **LEOM-109** (p. 109) e as correlações do grupamento metila. As correlações para o grupamento observadas no gHMBC foram: H-11 ( $\delta$  3,64 ppm) com C-7 ( $\delta$  167,9 ppm), H-7' ( $\delta$  3,75 ppm) com C-4' ( $\delta$  159,3), H-11'' ( $\delta$  3,77 ppm) com C-7'' ( $\delta$  164,8), H-7''' ( $\delta$  3,82 ppm) com C-3''' ( $\delta$  161,4), H-8''' ( $\delta$  3,87 ppm) com C-4''' ( $\delta$  162,2). Todos com correlações  $^3J_{H-C}$ .

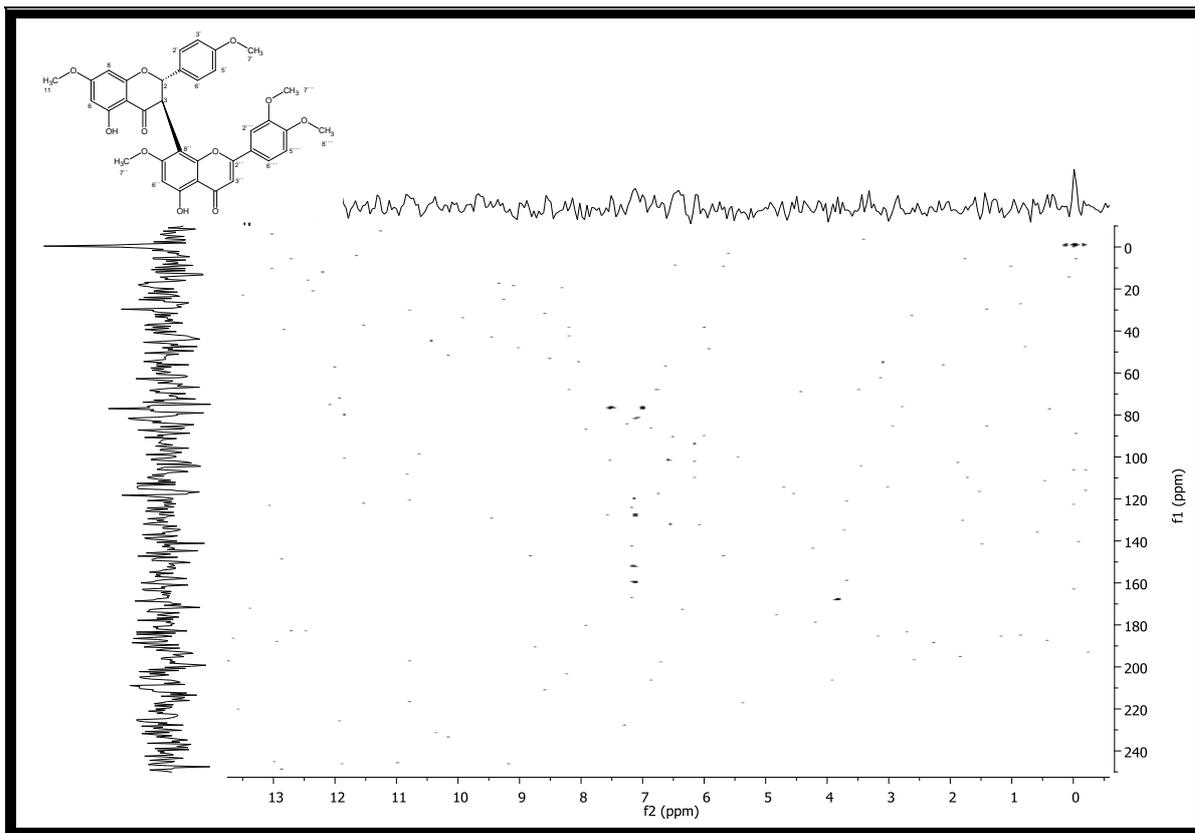


FIGURA 77 – Mapa de contornos gHMBC a 400 MHz para **LFOM-111** em (CDCl<sub>3</sub>).

TABELA 7: Dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C para **LFOM-111**(CDCl<sub>3</sub>, 400 e 100 MHz)

Posição	$\delta^*_C$	$\delta^*_H, m, J$	gHMQC ( $^1J_{CH}$ )	gHMBC ( $^3J_{CH}$ )
2	81,7	5,78; <i>d</i> ; 12		
3	54,9	4,79; <i>d</i> ; 12		
4	189,9	-		
5	158,1	12,28		
6	95,0	6,17; <i>d</i> ; 4		
7	167,9	-		H-11
8	94,3	6,12; <i>s</i>		
9	167,7	-		
10	109,8	-		
11	55,8	3,64	H-11	
1'	132,8	-		
2'	128,3	7,12; <i>dd</i> ; 8		
3'	113,6	6,77; <i>dd</i> ; 8		
4'	159,3	-		H-7'
5'	113,6	6,77; <i>dd</i> ; 8		
6'	128,3	7,12; <i>dd</i> ; 8	H-7'	
7'	55,2	3,75		
2''	164,2	-		

Posição	$\delta^*_C$	$\delta^*_H, m, J$	Continuação	
			$gHMQC$ ( $^1J_{CH}$ )	$gHMBC$ ( $^3J_{CH}$ )
3 <sup>''</sup>	113,4	6,8; <i>s</i>		
4 <sup>''</sup>	175,9	-		
5 <sup>''</sup>	149,2	12,14		
6 <sup>''</sup>	91,6	6,42; <i>s</i>		
7 <sup>''</sup>	164,8	-		H-11 <sup>''</sup>
8 <sup>''</sup>	104,4	-		
9 <sup>''</sup>	108,8	-		
10 <sup>''</sup>	105,1	-		
11 <sup>''</sup>	165,0	3,77	H-11 <sup>''</sup>	
1 <sup>'''</sup>	121,5	-		
2 <sup>'''</sup>	114,4	7,4; <i>s</i>		
3 <sup>'''</sup>	161,4	-		H-7 <sup>'''</sup>
4 <sup>'''</sup>	162,2	-		H-8 <sup>'''</sup>
5 <sup>'''</sup>	110,9	7,02; <i>d</i> ; 8		
6 <sup>'''</sup>	120,3	7,41; <i>d</i> ; 12		
7 <sup>'''</sup>	148,1	3,82	H-7 <sup>'''</sup>	
8 <sup>'''</sup>	55,9	3,87	H-8 <sup>'''</sup>	

$\delta^*$  = valores expressos em ppm;  $J$  = constante de acoplamento, expressa em Hertz (Hz) ;  $m$  = multiplicidade;  $dd$  = duplo duplete,  $d$  = duplete,  $m$  = multiplete,  $s$  = simpleto. \*\*Os deslocamentos químicos dos átomos de carbono foram obtidos pelos mapas de contorno  $gHMQC$  e  $gHMBC$ .

### 6.1.9 Derivado semissintético: 7,4<sup>''</sup>,7<sup>''</sup>,3<sup>'''</sup>,4<sup>'''</sup>-penta-*O*-butanoil-fukugetina (LFOM-112)

Para obtenção do derivado **LFOM-112** foi realizado a reação de fukugetina **LFOM-109** e cloreto de butanoíla (C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>ClO) em presença de carbonato de potássio (FIGURA 78). O produto obtido resultou em um sólido amarelo e apresentou rendimento médio de 69%. Sua proposta estrutural foi baseada em dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, COSY,  $gHMBC$  e  $gHMQC$  (SILVERSTEIN, et al., 2006).

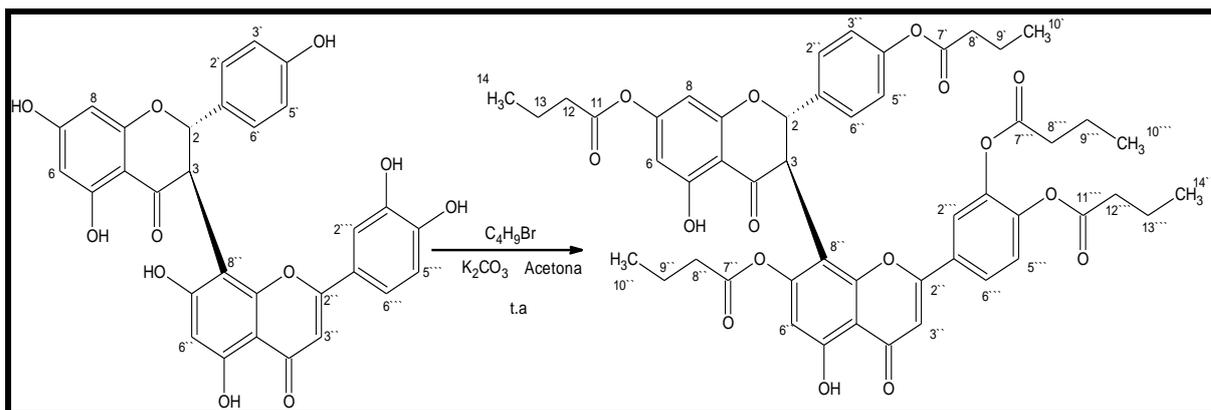


FIGURA 78 - Reação de obtenção do derivado **LFOM-112**

O espectro de absorção na região do IV (FIGURA 79) da **LFOM-112** evidenciou a natureza aromática do composto no qual os hidrogênios fenólicos são quelados pela carbonila na posição *peri* o que gera banda fraca entre  $3300 - 3400 \text{ cm}^{-1}$ ; observou-se bandas de absorção entre  $3091 \text{ cm}^{-1}$  característica de deformação axial de C-H aromático;  $2964$ ,  $2929$  e  $2875 \text{ cm}^{-1}$  referente à deformação axial de  $\text{Csp}^3\text{-H}$  do anel aromático, banda de absorção intensa em  $1770 \text{ cm}^{-1}$  referente a deformação axial de  $\text{C=O}$ , a frequência é mais elevada do que em ésteres normais devido a conjugação do grupo fenila com o oxigênio do grupo substituinte;  $1689 \text{ cm}^{-1}$  deformação axial de  $\text{C=O}$ ,  $1616 \text{ cm}^{-1}$  deformação axial da ligação  $\text{C=C}$  do anel,  $1426 \text{ cm}^{-1}$  de deformação axial assimétrica  $\text{CH}_3$ ,  $1363 \text{ cm}^{-1}$  deformação axial simétrica  $\text{CH}_3$ ,  $1257 \text{ cm}^{-1}$  deformação axial de  $\text{C(=O)-O}$  de butila,  $1126 \text{ cm}^{-1}$  deformação axial assimétrica de  $\text{O-C=C}$  e em  $842 \text{ cm}^{-1}$  deformação angular fora do plano (DAFP) de C-H do anel aromático.

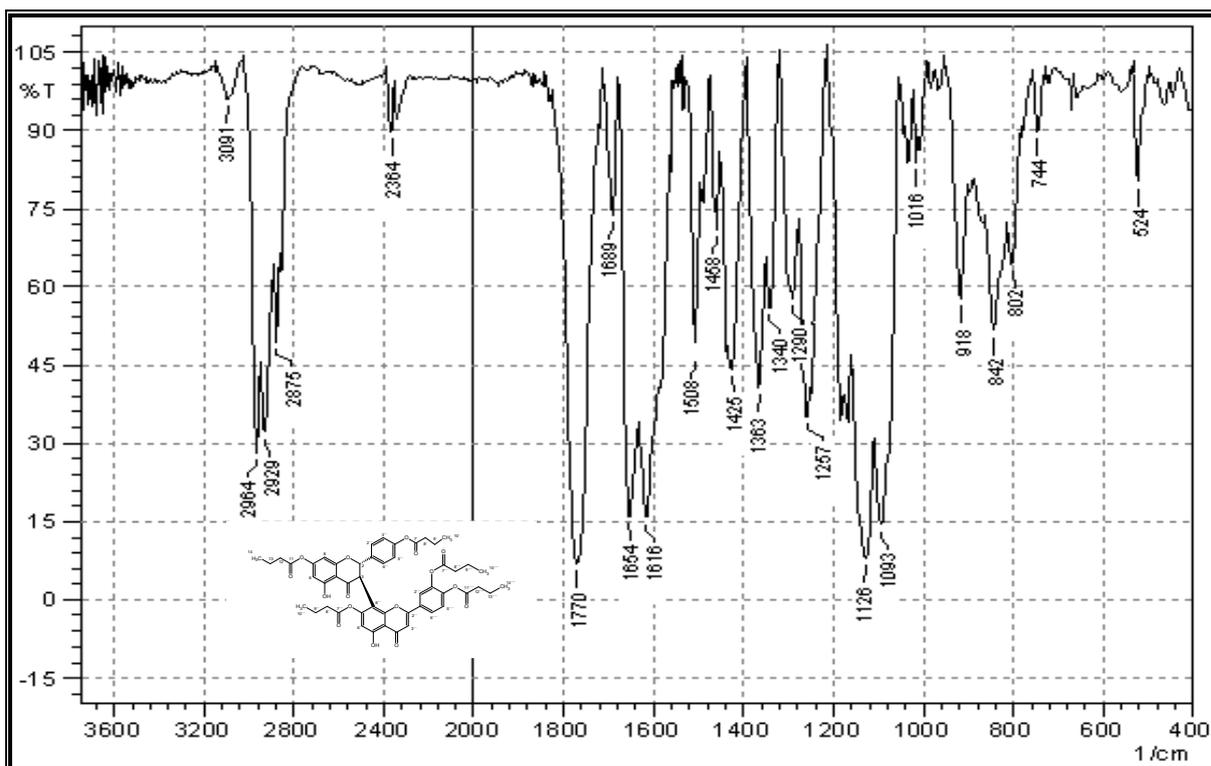


FIGURA 79 - Espectro no IV (KBr) para o composto **LFOM-112**.

O espectro no ultravioleta (UV) do **LFOM-112** (FIGURAS 80 e 81) mostrou bandas com absorções com  $\lambda_{\text{máx}}(\log \epsilon\{\text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}\})$  em 204 nm (5,86), 224 nm (5,95), 277 nm (5,71) e 328 nm (5,28). A adição de solução de  $\text{AlCl}_3$  à solução provocou um deslocamento batocrômico, com absorções com  $\lambda_{\text{máx}}(\log \epsilon\{\text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}\})$  em 206 nm (5,98), 224 nm (6,09), 281 nm (5,76) e 331 nm (5,40), o que sugere a existência de hidroxilas em *orto* e/ou grupos quelatogênicos. A adição de solução de HCl não restaurou a banda para seu estado inicial, com absorções com  $\lambda_{\text{máx}}(\log \epsilon\{\text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}\})$  em 204 nm (6,05), 225 nm (6,11), 281 nm (5,76) e 331 nm (5,39), porém ficou semelhante a curva com o aditivo  $\text{AlCl}_3$  confirmando assim presença de grupos quelatogênicos. Com a adição de NaOAc não foi observado um desvio batocrômico, com absorções com  $\lambda_{\text{máx}}(\log \epsilon\{\text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}\})$  em 206 nm (5,94), 223 nm (6,00), 276 nm (5,72) e 330 nm (5,32), sugerindo que as hidroxila ácidas (C-7 e C-7') foram substituídas pelos grupamentos butanoíla. Na presença de NaOAc/ $\text{H}_3\text{BO}_3$  não observou novamente desvio batocrômico em relação a solução inicial sem aditivos, com absorções com  $\lambda_{\text{máx}}(\log \epsilon\{\text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}\})$  em 205 nm (6,03), 224 nm (6,08), 275 nm (5,75) e 332 nm (5,29), indicando que o grupo *orto*-diidroxí no anel B encontra-se substituído pelo mesmo grupamento já supracitado.

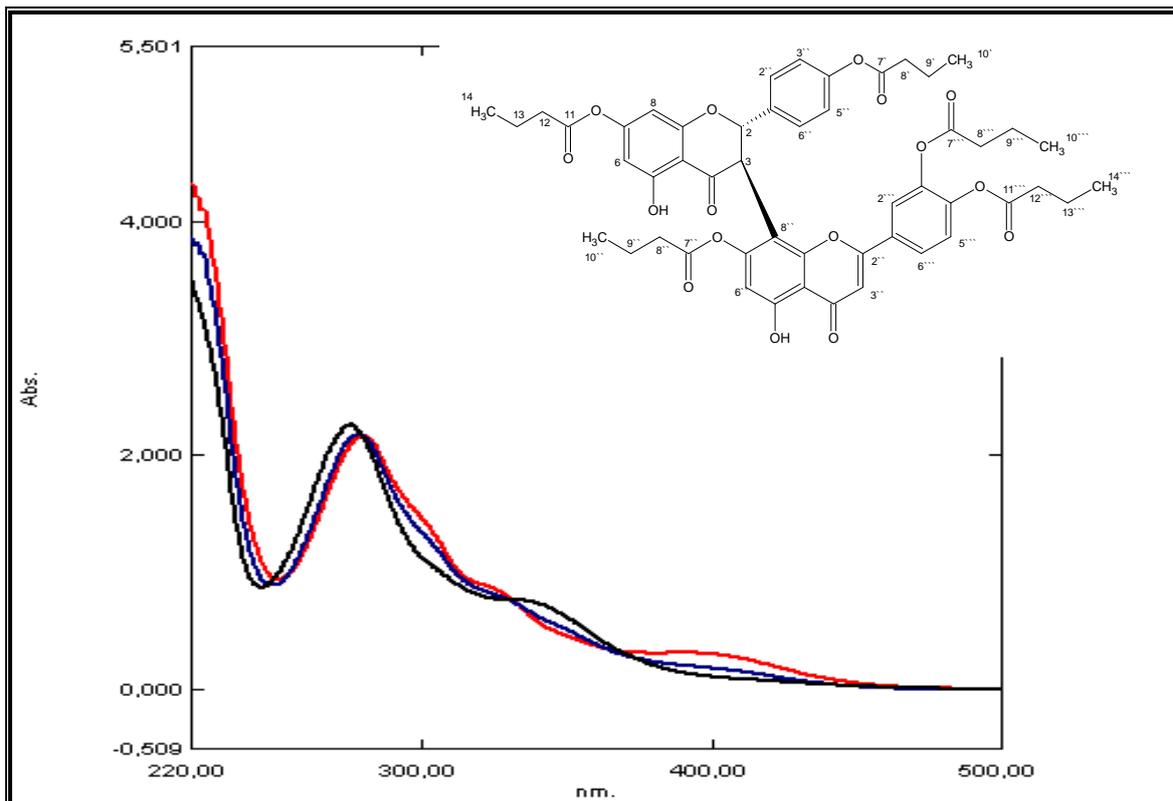


FIGURA 80 – Espectro no ultravioleta de **LEOM-112**. Curva de cor preta (**LEOM-112**+ EtOH); Curva de cor azul (**LEOM-112**+ EtOH+AlCl<sub>3</sub>); Curva de cor vermelha (**LEOM-112**+ EtOH+AlCl<sub>3</sub>+HCl).

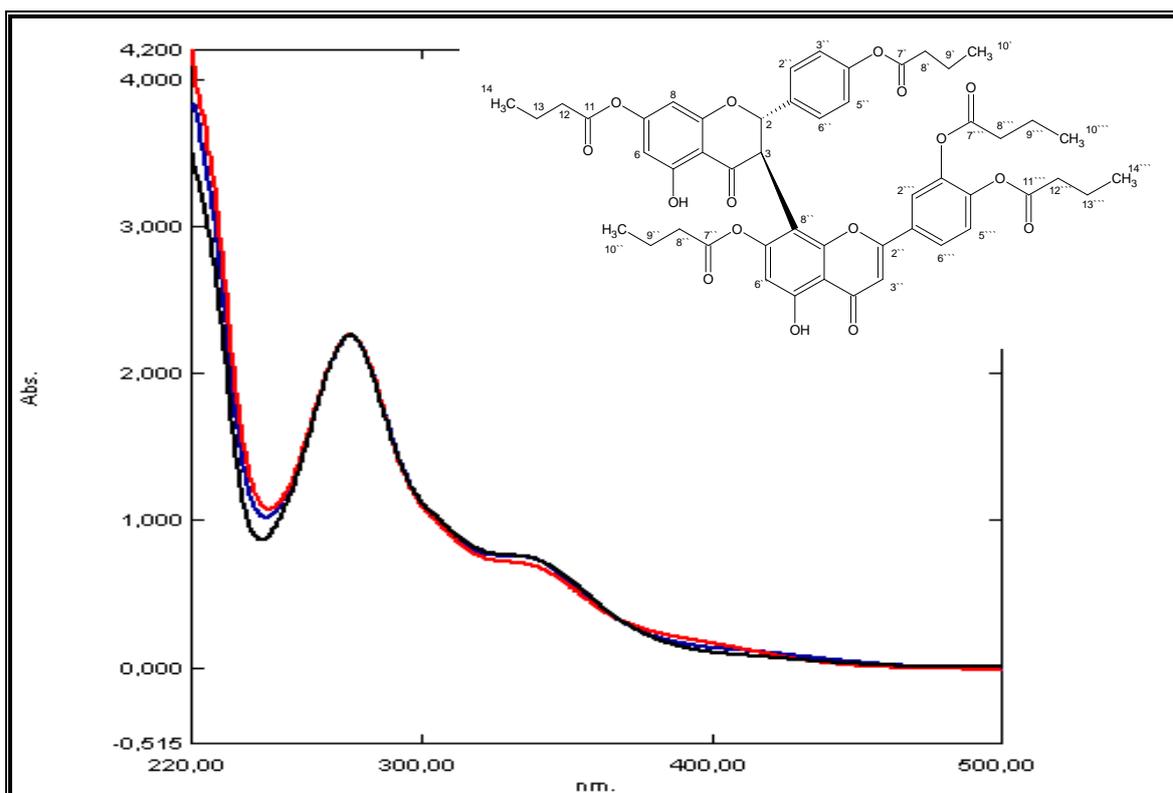


FIGURA 81 – Espectro no ultravioleta de **LEOM-112**. Curva de cor preta (**LEOM-112** + EtOH); Curva de cor azul (**LEOM-112**+EtOH+NaOAc); Curva de cor vermelha (**LEOM-112**+ EtOH+NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>).

Para confirmação da massa molecular do composto **LFOM-112** foi obtido um perfil através das análises de espectrometria de massas em sistema MALDI-TOF. O espectrograma (FIGURA 82) apresentou um pico com relação massa e carga ( $m/z$ ) de 907,25, o qual é massa do composto **LFOM-112** acrescido de um íon hidrogênio. Confirmada a massa molecular do composto **LFOM-112**, iniciou-se sua caracterização estrutural.

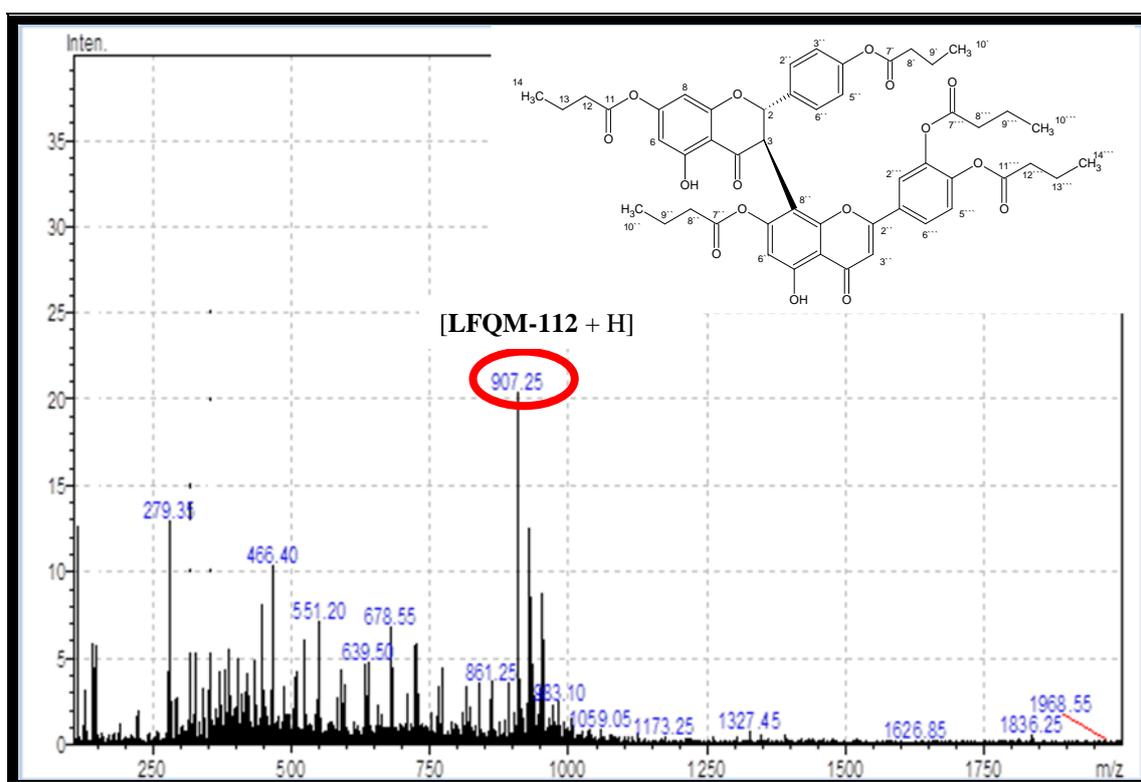


FIGURA 82 - Espectrograma de massa do composto **LFOM-112** em sistema MALDI-TOF modo linear, faixa de 200 a 2000  $m/z$ .

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 83 – TABELA 8) para **LFOM-112**, obtido em  $\text{CDCl}_3$ , apresentou sinais compatíveis para um biflavonoide. Com base nesse espectro foi possível verificar a presença de sinais do biflavonoide **LFOM-109** (TABELA 5, p. 110), no qual foi submetido a modificações estruturais. Além dos sinais dos grupamentos butanoíla.

A região entre  $\delta$  0,5-3,0 ppm, apresentou sinais triplos (triplete) referente a metilas ( $-\text{CH}_3$ ) terminal em  $\delta$  0,89 ppm ( $\text{H}-10'$ ,  $\text{H}-14''$ ,  $\text{H}-10'''$  e  $\text{H}-14''''$ ) e em  $\delta$  0,84 ppm ( $\text{H}-14$ ). Sinais sextos (sextetos) referente a carbonos metilínicos ( $-\text{CH}_2$ ) em  $\delta$  1,61 ppm ( $\text{H}-9'$  e  $\text{H}-9'''$ ),  $\delta$  1,71 ppm ( $\text{H}-13$ ),  $\delta$  1,56 ppm ( $\text{H}-13''$ ) e  $\delta$  1,58 ppm ( $\text{H}-13'''$ ).

Sinais triplos (tripleto) referente a carbonos metilênicos (-CH<sub>2</sub>) próximos a carbonila do grupamento butanoíla em  $\delta$  2,25 ppm (H-12),  $\delta$  2,48 ppm (H-8' e H-8''),  $\delta$  2,24 ppm (H-12'', e H-12''').

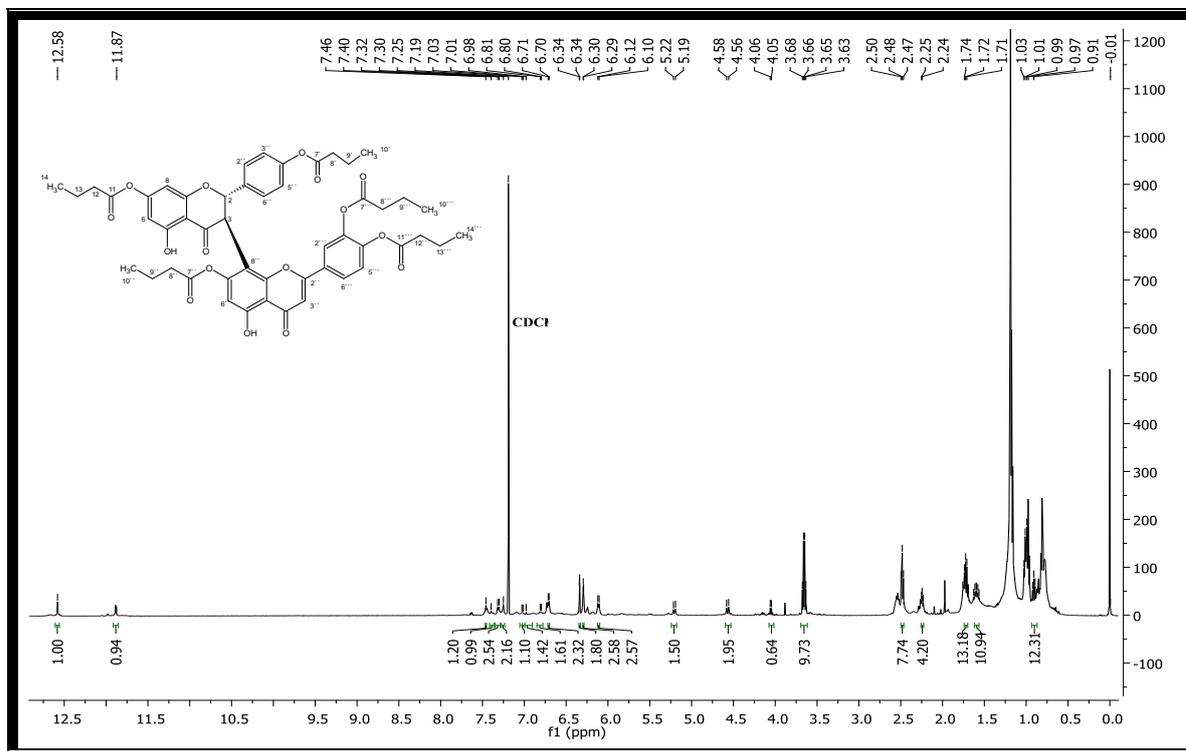


FIGURA 83 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>Ha 500 MHz para **LFOM-112** (CDCl<sub>3</sub>).

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C forneceu 50 sinais (FIGURA 84 – TABELA 8). Trinta destes sinais foram atribuídos aos carbonos do biflavonoide fukugetina **LFOM-109** (TABELA 5, p. 110) e os vinte restantes aos carbonos das cinco unidades de butanoíla. Sinais observados entre  $\delta$  158-172 ppm referente a carbonila de éster (C-11, C-7', C-11'', C-7''' e C-11''') bem como aqueles em  $\delta$  13,5 ppm referente aos carbonos das metilas terminal (C-14, C-10', C-14'', C-10''', C-14'''), além de em  $\delta$  18,3 ppm e  $\delta$  32,22 ppm referente a carbonos metilênicos (C-13, C-9', C-13'', C-9''', C-13''') e (C-12, C-8', C-12'', C-8''', C-12'''), correspondem aos deslocamentos químicos para os carbonos do grupo butanoíla. De acordo com os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos C-7, C-4', C-7'', C-3''' e C-4''', estes apresentam valores em uma frequência mais baixa, portanto, menos desblindado o que confirma que os carbonos C-7, C-4', C-7'', C-3''' e C-4''' possuem substituições por uma unidade de butanoíla que é possível de visualizar no espectro.

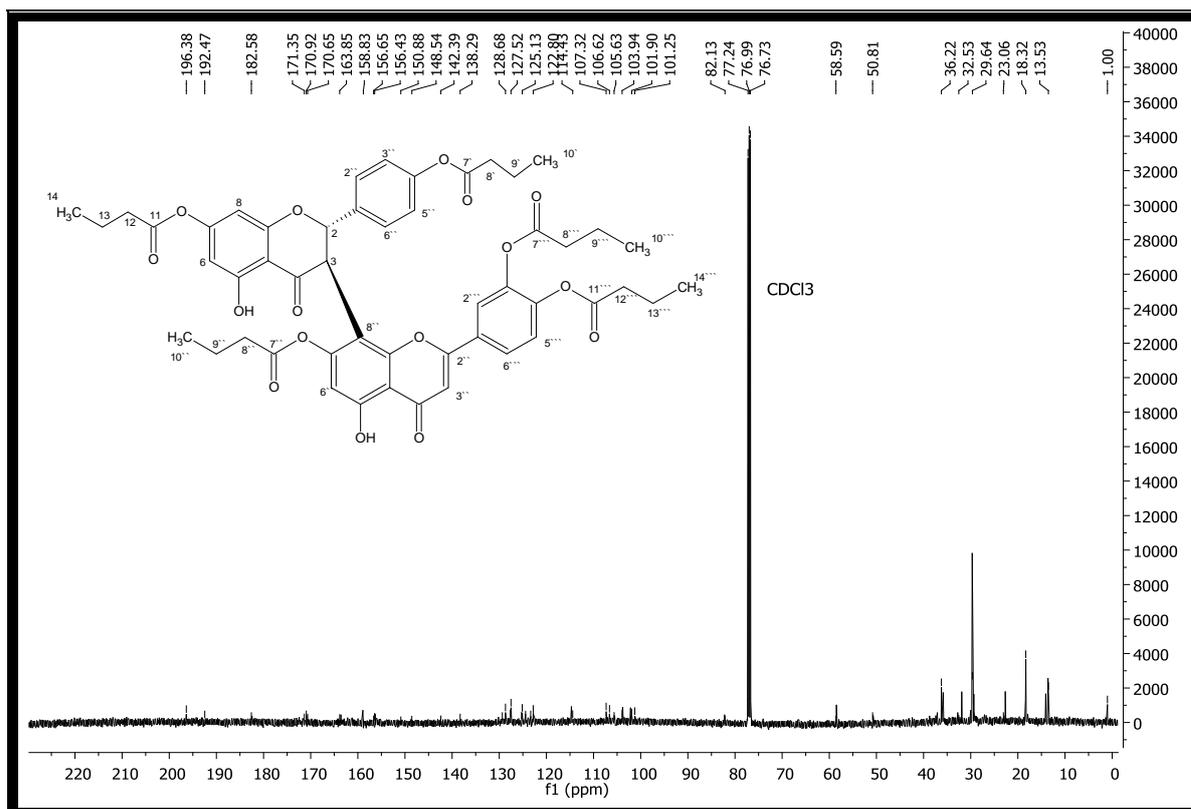


FIGURA 84 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 500 MHz para **LCOM-112** ( $\text{CDCl}_3$ ).

No experimento de **COSY** (FIGURA 85 – TABELA 8), observou-se acoplamentos entre  $\text{H-2} \rightarrow \text{H-3}$  ( $\delta$  5,21 ppm  $\rightarrow$   $\delta$  4,57 ppm) confirmando o padrão de centros estereogênicos para o anel I-C evidenciado no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . Da mesma forma observou-se a correlação entre  $\text{H-2}^{\prime}/6^{\prime} \rightarrow \text{H-3}^{\prime}/5^{\prime}$  ( $\delta$  6,71 ppm  $\rightarrow$   $\delta$  6,11 ppm), confirmando o padrão 4'-O-(butanoíla) para o anel I-B que também foi evidenciado no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . Os prótons dos grupamentos butanoíla correlacionam-se fortemente como os acoplamentos entre  $\text{H-13} \rightarrow \text{H-12}$  ( $\delta$  1,71 ppm  $\rightarrow$   $\delta$  2,25 ppm) e  $\text{H-13} \rightarrow \text{H-14}$  ( $\delta$  1,71 ppm  $\rightarrow$   $\delta$  0,89 ppm), que são semelhantes para os demais grupamento do composto ( $\text{C-9}^{\prime} \rightarrow \text{C-8}^{\prime}$  e  $\text{C-8}^{\prime} \rightarrow \text{C-7}^{\prime}$ ), ( $\text{C-13}^{\prime\prime} \rightarrow \text{C-12}^{\prime\prime}$  e  $\text{C-13}^{\prime\prime} \rightarrow \text{C-14}^{\prime\prime}$ ), ( $\text{C-8}^{\prime\prime\prime} \rightarrow \text{C-9}^{\prime\prime\prime}$  e  $\text{C-9}^{\prime\prime\prime} \rightarrow \text{C-10}^{\prime\prime\prime}$ ) e ( $\text{C-13}^{\prime\prime\prime} \rightarrow \text{C-12}^{\prime\prime\prime}$  e  $\text{C-14}^{\prime\prime\prime} \rightarrow \text{C-13}^{\prime\prime\prime}$ ).

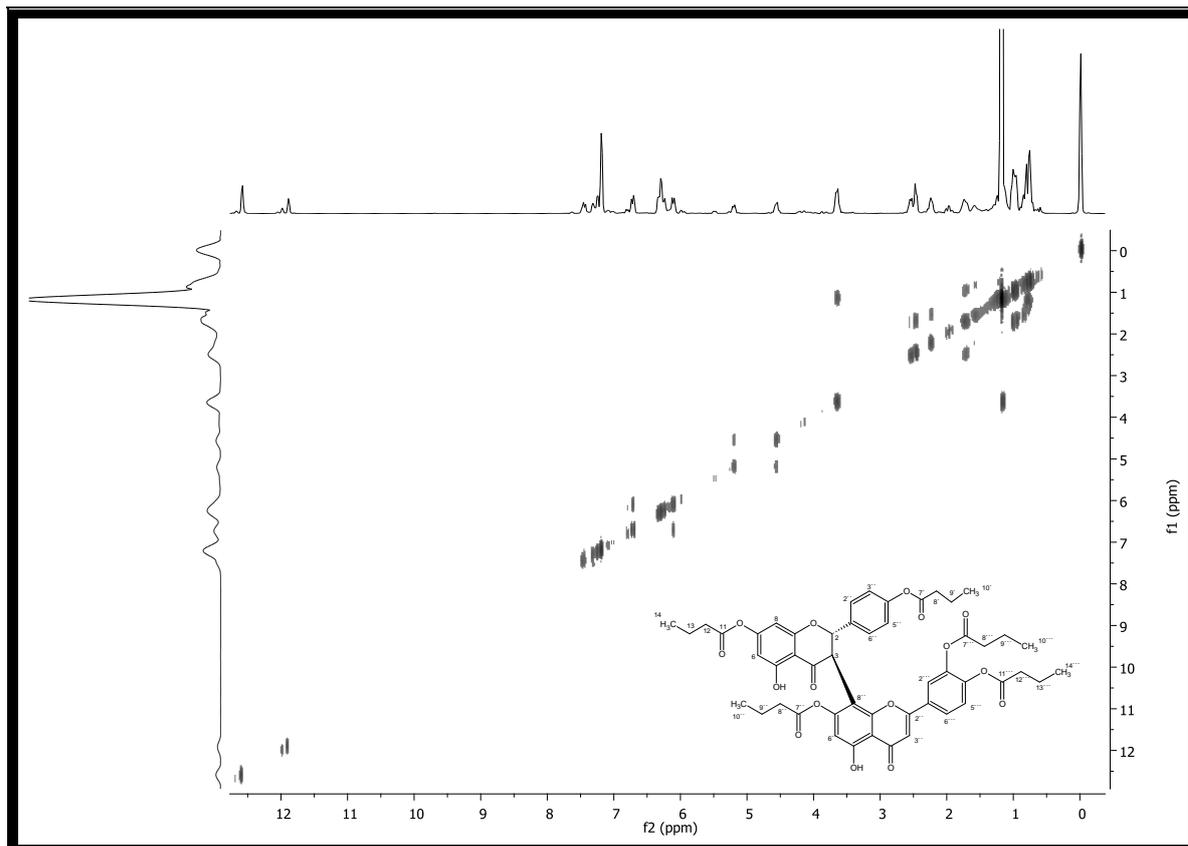


FIGURA 85 - Mapa de contornos COSY do composto **LFOM-112** ( $\text{CDCl}_3$ ).

O mapa de contornos  $g\text{HMQC}$  (FIGURA 86 – TABELA 8) mostrou correlações do biflavonoide **LFOM-109** como já citado anteriormente (p. 108) e as correlações referentes ao grupamento butanoíla inserido em sua estrutura. Assim, as correlações referentes ao grupamento foram: H-14 ( $\delta$  0,84 ppm) e C-14 ( $\delta$  13,5 ppm), H-13 ( $\delta$  1,7 ppm) e C-13 ( $\delta$  18,8 ppm), H-12 ( $\delta$  2,50 ppm) e C-12 ( $\delta$  36,3 ppm) que são semelhantes para os demais grupamentos do composto H-10` ( $\delta$  0,89 ppm) e C-10` ( $\delta$  13,5 ppm), H-9` ( $\delta$  1,61 ppm) e C-9` ( $\delta$  18,3 ppm), H-8` ( $\delta$  2,48 ppm) e C-8` ( $\delta$  36,2 ppm), H-14`` ( $\delta$  0,89 ppm) e C-14`` ( $\delta$  13,5 ppm), H-13`` ( $\delta$  1,56 ppm) e C-13`` ( $\delta$  18,3 ppm), H-12`` ( $\delta$  2,24 ppm) e C-12`` ( $\delta$  36,2 ppm), H-10`` ( $\delta$  0,89 ppm) e C-10`` ( $\delta$  13,5 ppm), H-9`` ( $\delta$  1,61 ppm) e C-9`` ( $\delta$  18,3 ppm), H-8`` ( $\delta$  2,48 ppm) e C-8`` ( $\delta$  36,2 ppm), H-14`` ( $\delta$  0,89 ppm) e C-14`` ( $\delta$  13,5 ppm), H-13`` ( $\delta$  1,58 ppm) e C-13`` ( $\delta$  18,3 ppm), H-12`` ( $\delta$  2,24 ppm) e C-12`` ( $\delta$  36,3 ppm).

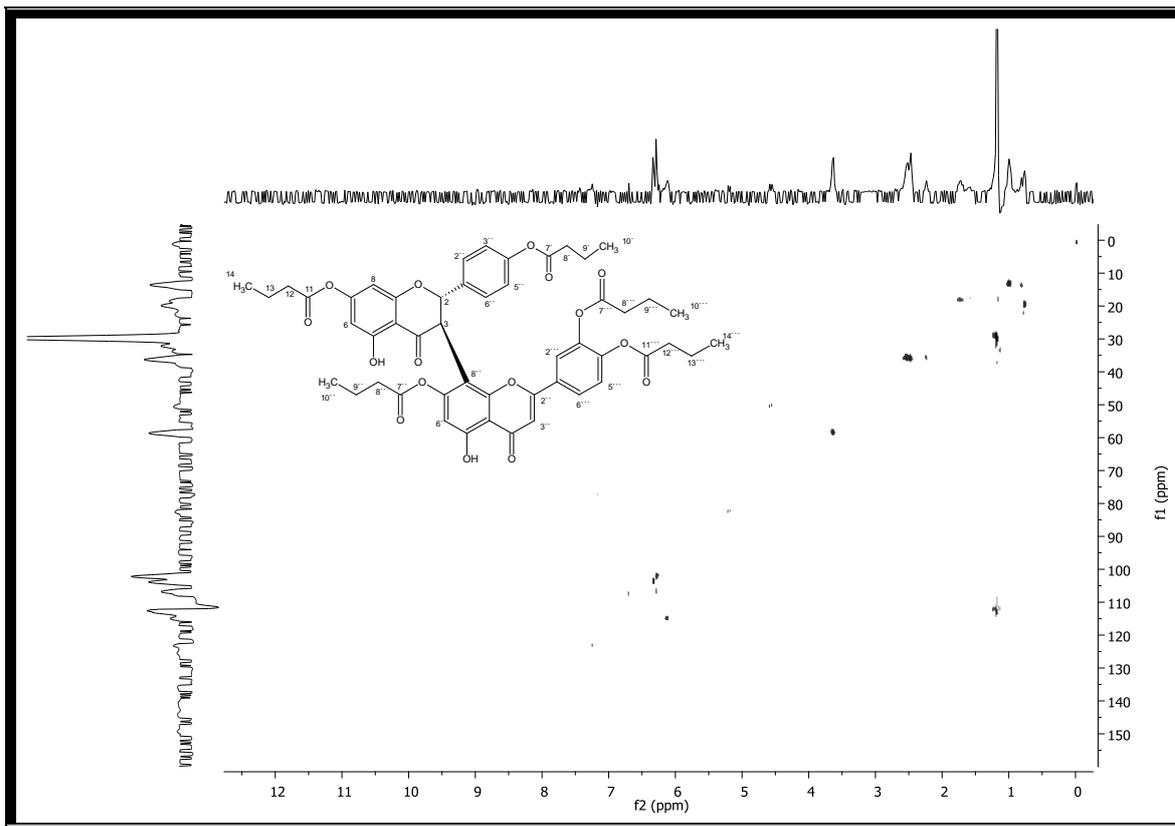


FIGURA 86 – Mapa de contornos gHMBC a 500 MHz para **LFOM-112** (CDCl<sub>3</sub>).

Com o mapa de contornos gHMBC (FIGURA 87 – TABELA 8) foi possível estabelecer as correlações existentes do biflavonoide **LFOM-109** (p. 109) e as correlações do grupamento butanoíla. As correlações para o grupamento observadas no gHMBC foram: H-14 ( $\delta$  0,84 ppm) e C-13 ( $\delta$  18,8 ppm), H-13 (1,56 ppm) com C-14 ( $\delta$  13,5 ppm) e C-12 ( $\delta$  36,3 ppm), H-12 ( $\delta$  2,25 ppm) com C-13 ( $\delta$  18,8 ppm) e C-11 ( $\delta$  158,8 ppm) todos com  $^2J_{H-C}$ . H-14 ( $\delta$  0,84 ppm) e C-12 ( $\delta$  36,3 ppm), H-13 ( $\delta$  1,56 ppm) e C-11 ( $\delta$  158,8 ppm), H-12 ( $\delta$  2,25 ppm) e C-14 ( $\delta$  13,5 ppm) todos com  $^3J_{H-C}$ . Correlações entre H-10' ( $\delta$  0,89 ppm) e C-9' ( $\delta$  18,3 ppm), H-9' (1,61 ppm) com C-8' ( $\delta$  36,2 ppm) e C-10' ( $\delta$  13,5 ppm), H-8' ( $\delta$  2,25 ppm) com C-7' ( $\delta$  158,8 ppm) e C-9' ( $\delta$  18,3 ppm) todos com  $^2J_{H-C}$ . H-10' ( $\delta$  0,89 ppm) e C-8' ( $\delta$  36,2 ppm), H-9' ( $\delta$  1,61 ppm) e C-7' ( $\delta$  158,8 ppm), H-8' ( $\delta$  2,25 ppm) e C-10' ( $\delta$  13,5 ppm) todos com  $^3J_{H-C}$ . Correlações entre H-14'' ( $\delta$  0,89 ppm) e C-13'' ( $\delta$  18,3 ppm), H-13'' (1,56 ppm) com C-14'' ( $\delta$  13,5 ppm) e C-12'' ( $\delta$  36,2 ppm), H-12'' ( $\delta$  2,24 ppm) com C-11'' ( $\delta$  170,7 ppm) e C-13'' ( $\delta$  18,3 ppm) todos com  $^2J_{H-C}$ . H-14'' ( $\delta$  0,89 ppm) e C-12'' ( $\delta$  36,2 ppm), H-13'' ( $\delta$  1,56 ppm) e C-11'' ( $\delta$  170,7 ppm), H-12'' ( $\delta$  2,24 ppm) e C-14'' ( $\delta$  13,5 ppm) todos com  $^3J_{H-C}$ .

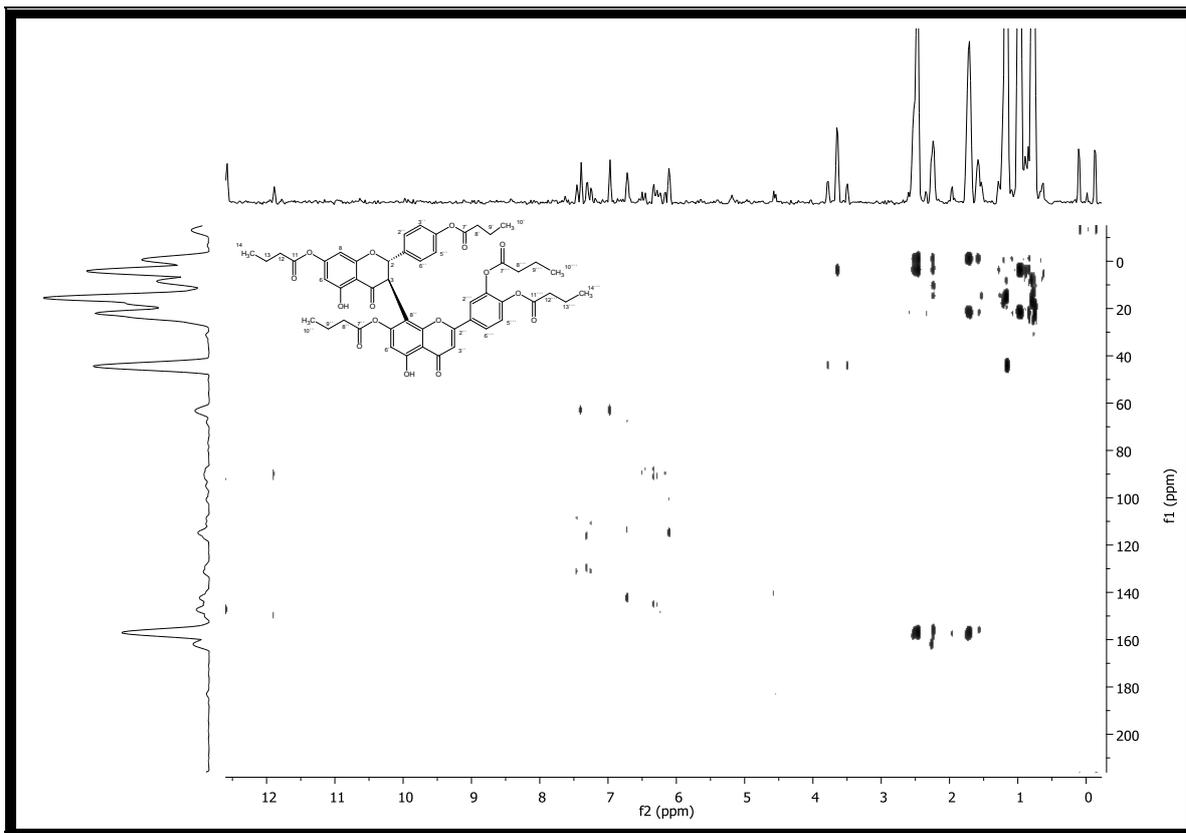


FIGURA 87 – Mapa de contornos gHMBC a 500 MHz para **LFOM-112** (CDCl<sub>3</sub>).

TABELA 8: Dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C para **LFOM-112** (CDCl<sub>3</sub>, 500 e 125 MHz)

Posição	$\delta^{**}C$	$\delta^*H, m, J$	gHMQC ( <sup>1</sup> J <sub>CH</sub> )	gHMBC ( <sup>2</sup> J <sub>CH</sub> )	gHMBC ( <sup>3</sup> J <sub>CH</sub> )
2	82,1	5,21; <i>d</i> ; 15			
3	50,8	4,57; <i>d</i> ; 10			
4	196,4	-			
5	163,8	12,58			
6	122,8	6,81; <i>d</i> ; 5			
7	171,4	-			
8	106,6	6,3; <i>s</i>			
9	163,9	-			
10	107,3	-			
11	158,8	-		H-12	H-13
12	36,3	2,25; <i>t</i>	H-12	H-13/H-12	H-14
13	18,3	1,71; <i>sex</i>	H-13	H-14	
14	13,5	0,84; <i>t</i>	H-14	H-13	H-12
1`	134,3	-			
2`	128,7	6,71; <i>dd</i> ; 5			
3`	125,1	6,11; <i>dd</i> ; 10			
4`	150,9	-			

Continuação

Posição	$\delta^{**c}$	$\delta^*_{H, m, J}$	$g$ HMBC		
			$(^1J_{CH})$	$(^2J_{CH})$	$(^3J_{CH})$
5`	125,1	6,11; <i>dd</i> ; 10			
6`	128,7	6,71; <i>dd</i> ; 5			
7`	158,8	-		H-8`	H-9`
8`	36,2	2,48; <i>t</i>	H-8`	H-9`	H-10`
9`	18,3	1,61; <i>sex</i>	H-9`	H-10`/H-8`	
10`	13,5	0,89; <i>t</i>	H-10`	H-9`	H-8`
2``	170,7	-			
3``	103,9	7,46; <i>s</i>			
4``	192,5	-			
5``	156,4	11,87			
6``	105,6	6,98; <i>s</i>			
7``	156,7	-			
8``	114,4	-			
9``	152,9	-			
10``	123,3	-			
11``	170,7	-		H-12``	H-13``
12``	36,2	2,24; <i>t</i>	H-12`	H-13``/H-12``	H-14``
13``	18,3	1,56; <i>sex</i>	H-13`	H-14``	
14``	13,5	0,89; <i>t</i>	H-14`	H-13``	H-12``
1````	127,7	-			
2````	124,4	7,46; <i>s</i>			
3````	142,3	-			
4````	138,3	-			
5````	125,3	7,03; <i>d</i>			
6````	127,5	7,4; <i>d</i>			
7````	170,9	-		H-8````	H-9````
8````	36,2	2,48; <i>t</i>	H-8````	H-9````/H-8````	H-10````
9````	18,3	1,61; <i>sex</i>	H-9````	H-10````	
10````	13,5	0,89; <i>t</i>	H-10````	H-9````	H-8````
11````	182,6	-		H-12````	H-13````
12````	36,2	2,24; <i>t</i>	H-12```	H-13````	H-14````
13````	18,3	1,58; <i>sex</i>	H-13````	H-14````/H-12```	
14````	13,5	0,89; <i>t</i>	H-14````	H-13````	H-12````

$\delta^*$  = valores expressos em ppm;  $J$  = constante de acoplamento, expressa em Hertz (Hz);  $m$  = multiplicidade; *dd* = duplo duplete, *d* = duplete, *m* = multiplete, *s* = simpleto. \*\*Os deslocamentos químicos dos átomos de carbono foram obtidos pelos mapas de contorno  $g$ HMQC e  $g$ HMBC.

### 6.1.10 Derivado semissintético: 7,4,7'',4''''-tetra-*O*-terc-butilcarbonil-fukugetina (LFQM-109/A)

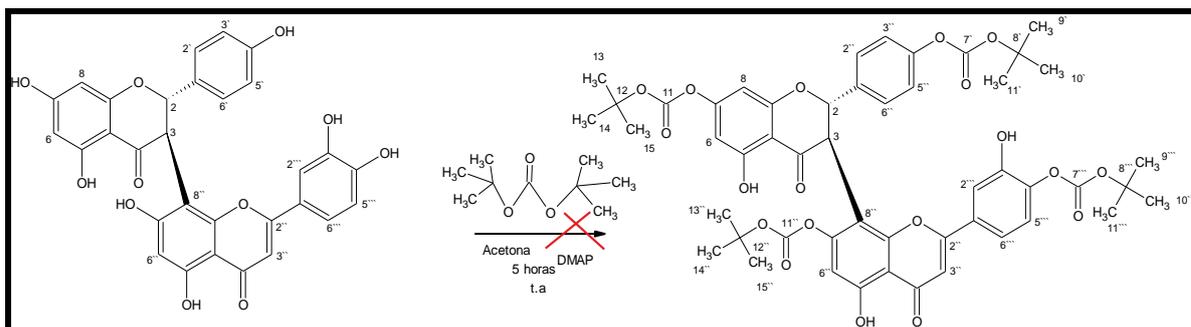


FIGURA 88 - Reação de obtenção do derivado LFQM-109/A

Na tentativa de obtenção do derivado LFQM-109/A foi realizado a reação do composto LFOM-109 e anidrido di-*tert*-butoxicarbonila ( $\text{BOC}_2\text{O}$ ) em presença de 4-DMAP (FIGURA 84). Entretanto, a análise por CCD deixou evidente a formação de mais de um produto de reação com valores de  $R_f$  (fator de retenção) muito próximos, e por este motivo não foi possível a separação e obtenção do produto, (a tentativa se deu por três métodos: cromatografia em coluna, CLAE semipreparativa e cromatografia em camada delgada preparativa).

### 6.1.11 Derivado semissintético: 7,4,7'',4''''-tetra-*O*-butoxil-fukugetina (LFOM-109/B)

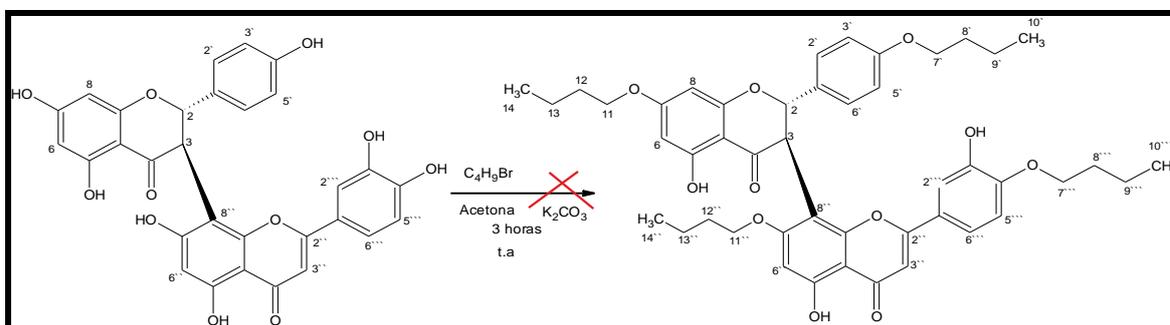


FIGURA 89 - Reação de obtenção do derivado LFOM-109/B

Na tentativa de obtenção do derivado LFOM-109/B foi realizado a reação do composto LFOM-109 e 1-bromobutano ( $\text{C}_4\text{H}_9\text{Br}$ ) em presença de carbonato de potássio (FIGURA 85). Entretanto, a análise por CCD deixou evidente a formação de mais de um produto de reação com valores de  $R_f$  muito próximos, e por este motivo não foi possível

a separação e obtenção do produto, (a tentativa pelos métodos: cromatografia em coluna, CLAE semipreparativa e cromatografia em camada delgada preparativa).

### 6.1.12 Derivado semissintético: 4',4''-di-*O*-succinil-fukugetina (**LFOM-109/C**)

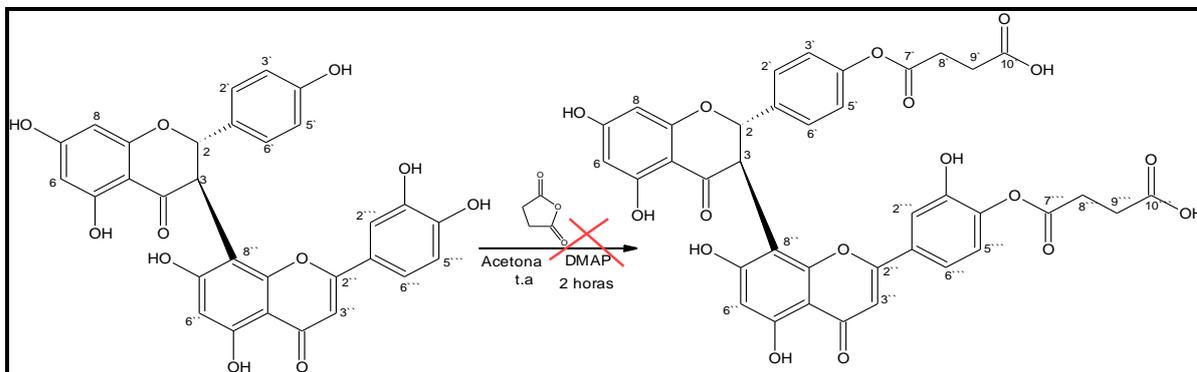


FIGURA 90 - Reação de obtenção do derivado **LFOM-109/C**

Na tentativa de obtenção do derivado **LFOM-109/C** foi realizado a reação do composto **LFOM-109** e anidrido succínico em presença de 4-DMAP (FIGURA 86). Entretanto, a análise por CCD deixou evidente a formação de mais de um produto de reação com valores de  $R_f$  muito próximos, e por este motivo não foi possível à separação e obtenção do produto, (a tentativa pelos métodos: cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada preparativa).

## 6.2 ENSAIOS DE ATIVIDADE

Foram realizados ensaios antioxidantes *in vitro* empregando as técnicas de avaliação do poder sequestrante de radicais DPPH e avaliação do poder redutor dos constituintes químicos. Os resultados foram expressos em valores de  $CE_{50}$  ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) para a capacidade sequestrante e em percentual de inibição máxima para o poder redutor. Os derivados semissintéticos obtidos a partir do biflavonoide **LFOM-109** foram comparados com os dados obtidos para os antioxidantes de referência, ácido ascórbico (AA) e butilhidroxitolueno (BHT). Estes valores de  $CE_{50}$  ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) foram comparados estatisticamente ao nível de significância de 5% utilizando uma análise de variância (ANOVA).

A realização de ensaios antiparasitários nos quais os resultados expressos em valores de  $CI_{50}$  ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) para os derivados semissintéticos obtidos a partir do biflavonoide **LFOM-109** e para os dois compostos biflavônicos glicosilados (**LFOM-**

**107** e **LFOM-108**) (TABELA 9), foram comparados com os dados obtidos com o fármaco de referência pentamidina. Estes valores de  $CI_{50}$  ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) foram comparados estatisticamente ao nível de significância de 5% utilizando uma análise de variância (ANOVA). Os compostos foram testados *in vitro* contra as formas extracelulares e intracelulares (promastigota e amastigota) de *L. amazonensis* e em macrófagos que determinam a atividade seletiva sobre o parasita (citotoxicidade), além de também ser avaliada a atividade em lisados de *L. amazonensis* (TABELA 12) em pHs 5 e 8, que simulam situação mais próxima do ambiente do parasita e nas isoformas enzimáticas r-CPB3 e r-CPB2.8 de *L. mexicana*.

Os ensaios enzimáticos tiveram seus resultados comparados com inibidores clássicos: E-64 (*Trans*-Epoxisuccinil-L-Leucilamida(4-guanidino)-butano) para papaína, TLCK (tosila-L-lisina clorometil cetona) para tripsina.

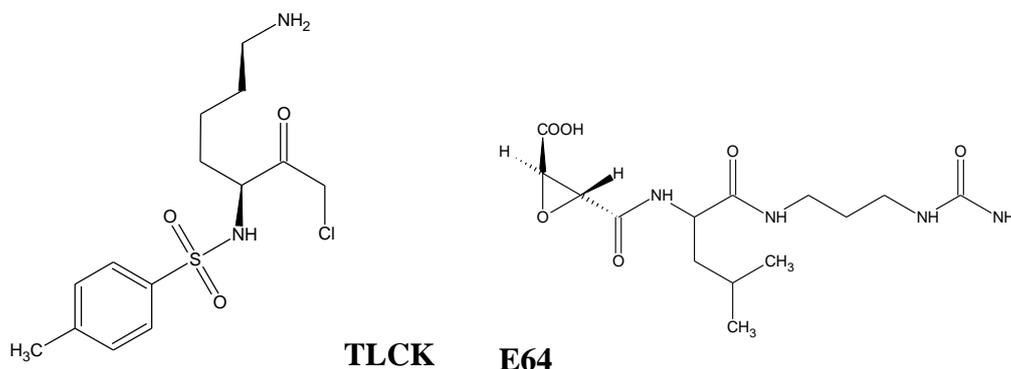


FIGURA 91 – Estruturas dos inibidores clássicos: **TLCK** (tosila-L-lisina clorometil cetona) e **E-64** (*Trans*-Epoxisuccinil-L-Leucilamida(4-guanidino)-butano)

### 6.2.1 Atividade Antioxidante

A atividade sequestrante de radicais pelo método de DPPH<sup>•</sup> é considerada um método clássico, simples e rápido de avaliação da atividade antioxidante e está baseado na redução do radical DPPH<sup>•</sup> (roxo) na hidrazina (amarelo) correspondente (Gülçin et al., 2005), o que é identificado pelo decréscimo na absorvância determinada espectrofotometricamente em  $\lambda = 515\text{-}528$  nm. Já o método de poder redutor é baseado na redução de  $\text{Fe}^{3+}$  do ferricianeto de potássio a  $\text{Fe}^{2+}$ , que é identificado pela formação um complexo azul. Quanto maior o poder redutor, maior a concentração do complexo formado, conseqüentemente, maior será a absorvância determinada em  $\lambda = 700$  nm.

De acordo com os resultados obtidos, expressos em  $CE_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) da capacidade sequestrante de radicais livres – DPPH (TABELA 9) e em percentual da absorbância do Poder Redutor dos Constituintes Químicos (FIGURA 92 – TABELA 9), tem-se que os derivados **LFOM-110**, **LFOM-111** e **LFOM-112** tiveram menores atividades antioxidantes comparados ao composto de partida **LFOM-109** e aos antioxidantes de referência, AA e BHT. Esta menor atividade esta associada à redução do número de hidroxilas fenólicas disponíveis quando comparadas à **LFOM-109**, já que estas foram substituídas por grupamentos lipofílicos que reduzem a atividade, no entanto confere maior apolaridade que facilita sua permeabilidade em membranas celulares. Dentre os derivados semissintéticos propostos o que apresentou maior atividade sequestrante de radicais livres – DPPH foi o derivado **LFOM-111** ( $CE_{50} = 37,07 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), seguido dos derivados **LFOM-110** ( $CE_{50} = 77,18 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e **LFOM-112** ( $CE_{50} > 400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Sendo que o derivado **LFOM-111** foi 2,1 e 10,8 vezes mais ativo que os derivados **LFOM-110** e **LFOM-112**, respectivamente. Entre os compostos naturais verificou-se que o composto **LFOM-109** ( $CE_{50} = 12,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) apresentou melhor atividade quando comparado aos compostos **LFOM-107** ( $CE_{50} = 26,08 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e **LFOM-108** ( $CE_{50} = 24,49 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). No entanto esses compostos naturais não foram superiores na atividade do padrão AA ( $CE_{50} = 5,51 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e, portanto superiores ao BHT ( $CE_{50} = 47,02 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

Já na avaliação do poder de redução dos constituintes químicos, comparando-se o composto protótipo e derivados semissintéticos o que apresentou maior atividade expresso em absorbância considerando-se a maior concentração ( $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), foi o composto natural **LFOM-109** com 0,71 de absorbância, seguido dos compostos **LFOM-111** com 0,477, **LFOM-110** com 0,43 e **LFOM-112** com 0,38. Sendo que o derivado **LFOM-111** foi 1,11 e 1,2 vezes mais ativo que os derivados **LFOM-110** e **LFOM-112**, respectivamente. Entre os compostos naturais verificou-se que o composto **LFOM-109** com 0,71 de absorbância apresentou melhor atividade quando comparado aos compostos **LFOM-108** com 0,41 e **LFOM-107** com 0,56. Sendo que o composto **LFOM-109** foi 1,7 vezes menos ativo que o composto **LFOM-108** e 1,3 vezes mais ativo que os compostos **LFOM-107**. Sendo assim, ordenando-se as atividades antioxidantes do composto natural **LFOM-109** e seus derivados têm-se: **LFOM-109**>**LFOM-111**>**LFOM-110**>**LFOM-112**.

Os  $CE_{50}$  dos compostos **LFQM-108**, **LFQM-109**, **LFQM-110**, **LFQM-111** e **LFQM-112** foram estatisticamente ao nível de significância de 5% significativos utilizando uma análise de variância (ANOVA) na capacidade sequestrante de radicais livres e todos sobre o poder de redução dos intermediários oxidativos. Sendo que esta significância foi comparada aos valores de  $CE_{50}$  de 5,51 e 47,02  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de AA e BHT, controles positivos em relação à capacidade sequestrante.

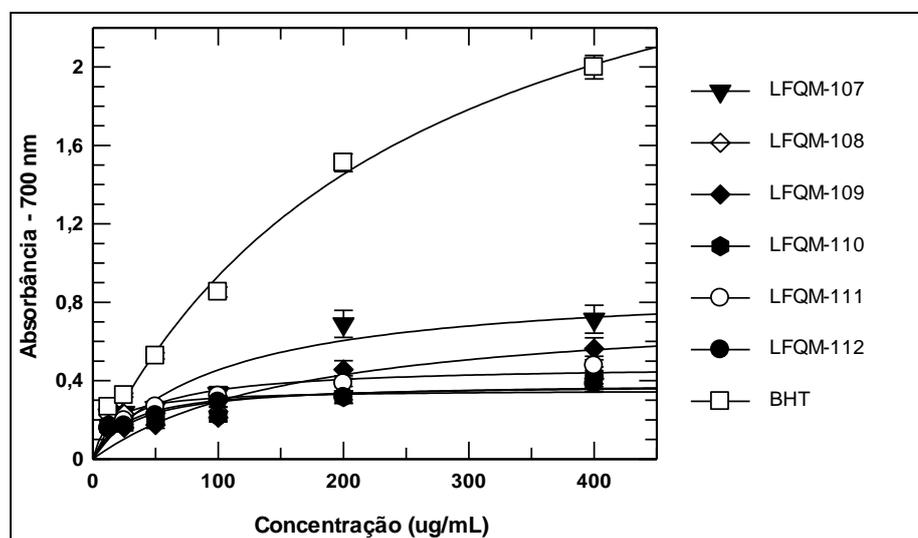


FIGURA 92 – Potencial inibitório máximo dos compostos **LFQM-107/112** e do conhecido antioxidante BHT pelo teste de poder de redução. Os resultados representam a média  $\pm$  D.P de três experimentos separados. Absorbância a 700 nm.

TABELA 9–Atividade antioxidante dos compostos naturais e semissintéticos pelos testes de Sequestro de Radical DPPH e Poder Redutor.

	Capacidade Sequestrante	Poder Redutor
	$CE_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) <sup>a</sup>	Absorbância - [400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]
<b>LFQM-107</b>	26,08 $\pm$ 2,72	0,56 $\pm$ 0,19
<b>LFQM-108</b>	24,49 $\pm$ 1,10*	0,41 $\pm$ 0,08
<b>LFQM-109</b>	12,21 $\pm$ 3,96*	0,71 $\pm$ 0,23
<b>LFQM-110</b>	77,18 $\pm$ 3,39*	0,43 $\pm$ 0,09
<b>LFQM-111</b>	37,07 $\pm$ 0,50*	0,48 $\pm$ 0,12
<b>LFQM-112</b>	> 400*	0,38 $\pm$ 0,09
AA <sup>b</sup>	5,51 $\pm$ 12,54*	-
BHT <sup>b</sup>	47,02 $\pm$ 1,19*	1,99 $\pm$ 0,70

<sup>a</sup>Cada valor de  $CE_{50}$  representa a média  $\pm$  desvio padrão da triplicata determinado pelo software Grafit 5.0. <sup>b</sup> Padrões Antioxidantes. \* $P < 0.05$  (ANOVA)

## 6.2.2 Testes Antiparasitários

### 6.2.2.1 Atividade leishmanicida contra as formas promastigotas e amastigotas de *L.(L.) amazonensis*

Os resultados (TABELA 10) mostram os valores de  $CI_{50}$  das três substâncias sintetizadas (**LFOM-110**, **LFOM-111** e **LFOM-112**) e dos compostos naturais **LFOM-107**, **LFOM-108** e **LFOM-109** frente às formas promastigotas e amastigotas de *L.(L.) amazonensis*. Todos os derivados semissintéticos mostraram alta atividade leishmanicida contra as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, quando comparados ao composto **LFOM-109**, no entanto, inferiores ao padrão de referência, pentamidina ( $CI_{50} = 1,29 \times 10^{-3} \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). O derivado **LFOM-110** ( $CI_{50} = 0,01 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), apresentou melhor atividade contra as formas promastigotas, com uma atividade de cerca de 1,28 e 2,74 vezes maior que os derivados **LFOM-112** ( $CI_{50} = 0,02 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , segundo mais ativo) e **LFOM-111** ( $CI_{50} = 0,04 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , terceiro mais ativo), respectivamente. Os compostos naturais glicosilados **LFOM-107** ( $CI_{50} = 0,05 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e **LFOM-108** ( $CI_{50} = 0,04 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) foram mais ativos (2,71 e 3,12 vezes, respectivamente) que o composto **LFOM-109** ( $CI_{50} = 0,14 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), no entanto menos ativos que o padrão de referência, pentamidina.

Nos ensaios da atividade anti-amastigotas, todos os compostos apresentaram excelente atividade, porém menores que a do medicamento de referência pentamidina ( $CI_{50} = 0,02 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). A melhor atividade leishmanicida contra as formas amastigotas de *L.(L.) amazonensis* foi mostrada pelo o derivado **LFOM-110** ( $CI_{50} = 0,04 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), sendo 1,4 e 1,5 vezes mais ativo que o derivado **LFOM-112** ( $CI_{50} = 0,06 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , segundo mais ativo) e **LFOM-111** ( $CI_{50} = 0,06 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , terceiro mais ativo), respectivamente. Apesar dos compostos **LFOM-107** e **LFOM-108** apresentarem melhor atividade que o **LFOM-109**, não foi realizados ensaios em amastigotas destes compostos, pois apresentaram menor atividade que a dos derivados (**LFOM-110**, **LFOM-111** e **LFOM-112**). Além disso, pelo o fato de o **LFOM-109** ser encontrado em maior abundância na espécie *G. brasiliensis* e apresentar em sua estrutura maior número de subunidades fenólicas passíveis de sofrerem modificações estruturais.

Devido à potente atividade, seletividade, ausência de toxicidade, e simples obtenção, os compostos semissintéticos **LFOM-110**, **LFOM-111** e **LFOM-112**, são

fortes candidatos para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da leishmaniose.

TABELA 10 - Atividade do composto natural **LFOM-109** e seus derivados contra as formas promastigotas e amastigota de *L.(L.) amazonensis*

Compostos	Promastigotas CI <sub>50</sub> (μmol.L <sup>-1</sup> )	Amastigotas <sup>a</sup> CI <sub>50</sub> (μmol.L <sup>-1</sup> )	Macrófagos <sup>b</sup> CC <sub>50</sub> (μmol.L <sup>-1</sup> )	Fator de Segurança (FS)
<b>LFQM-107</b>	0,05*	nd	nd	nd
<b>LFQM-108</b>	0,04*	nd	nd	nd
<b>LFQM-109</b>	0,14*	0,29*	0,29*	1
<b>LFQM-110</b>	0,01*	0,04*	> 0,38	9,05
<b>LFQM-111</b>	0,04*	0,07*	> 0,38	6,03
<b>LFQM-112</b>	0,02*	0,06*	> 0,38	6,44
Pentamidina	1,29 x 10 <sup>-3</sup> *	0,02*	0,011*	0,58

nd = não determinado

a- Concentração para decréscimo de 50% no tratamento dos macrófagos infectados vs células não tratadas

b- Concentração citotóxica para 50% dos macrófagos. FS = Razão entre CC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub>. \*P<0.05.

Os compostos **LFOM-107**, **LFOM-108**, **LFOM-109**, **LFOM-110**, **LFOM-111** e **LFOM-112** mostraram-se significativos em promastigotas e os compostos **LFOM-109**, **LFOM-110**, **LFOM-111** e **LFOM-112** sobre as formas amastigotas de *L.(L.) amazonensis*, quando comparados com valores de 1,29 x 10<sup>-3</sup> μmol.L<sup>-1</sup> e 0,02 μmol.L<sup>-1</sup> de pentamidina, controle positivo em relação às formas promastigotas e amastigotas, respectivamente. Além disso, a toxicidade dos compostos naturais e semissintéticos foram avaliadas em macrófagos peritoneais murinos, obtendo-se o fator de segurança (FS) a partir da relação entre toxicidade em macrófagos e atividade leishmanicida sobre formas amastigotas. Estes FS foram satisfatórios, mostrando que o composto de partida **LFOM-109** e seus derivados semissintéticos **LFOM-110**, **LFOM-111** e **LFOM-112** exibiram seletividade para as amastigotas em relação às células de mamíferos (TABELA 10). Na ausência de qualquer anúncio apropriado ou candidato a fármaco leishmanicida eficaz originário dos recursos naturais, os resultados do presente estudo apontam para o possível desenvolvimento de uma substância leishmanicida de fonte natural.

### 6.2.3 Ensaios Enzimáticos Fluorimétricos

6.2.3.1 Determinação do tempo de inibição enzimática pelos compostos naturais e semissintéticos (MARTINS *et al.*, 2009).

A determinação de um candidato a inibidor exige que conheçamos o tempo ou velocidade necessários para que ocorra a inibição enzima-substrato, ou seja, quanto tempo é necessário até que o inibidor consiga inibir ao máximo essa enzima. Desta forma, a incubação dos compostos com tripsina levou a uma rápida inibição, ocorrendo a inibição máxima em menos de 50 minutos de pré-incubação e para papaína inibição máxima de 30 minutos.

#### 6.3.3.2 Proteases – Papaína e Tripsina (MARTINS et al., 2009)

Os resultados (TABELA 11) indicam os valores de  $CI_{50}$  em  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , para os compostos naturais e semissintéticos (**LFOM-109**, **LFOM-110**, **LFOM-111**, **LFOM-112**, **LFOM-107** e **LFOM-108**) referente à inibição de serino e cisteíno proteases. Pode-se verificar que o composto **LFOM-112** inibiu avidamente as enzimas ensaiadas (tripsina e papaína) com diferentes graus de seletividade. É importante destacar que seu valor de  $CI_{50}$  ( $0,04 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) em papaína foi 14,36 vezes mais ativo que o inibidor clássico de cisteíno-proteases, E-64 ( $CI_{50} = 0,64 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Em tripsina o composto **LFOM-112** ( $CI_{50} = 0,07 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) foi 21,12 vezes mais ativo que o inibidor clássico de serino-proteases, TLCK ( $CI_{50} = 1,39 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Portanto, com efeitos quantitativos inibitórios que o potencializa como antiproteolítico.

Os derivados semissintéticos **LFOM-110** e **LFOM-111** apresentaram menores atividades inibitórias, com valores de  $CI_{50}$  para papaína de  $1,20 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e  $11,49 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , respectivamente. E para tripsina valores de  $0,09 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e  $2,34 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , respectivamente. Sendo que as razões de inibição aproximada entre **LFOM-109** e **LFOM-110**, **LFOM-109** e **LFOM-111** foram respectivamente, 11,11: 1 e 1,16: 1 para papaína; 60,18: 1 e 2,49: 1 para tripsina.

Já os compostos naturais **LFOM-107** ( $CI_{50} = 10,94 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e **LFOM-108** ( $CI_{50} = 23,51 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) não foram ativos em papaína, comparado ao inibidor clássico E-64 ( $CI_{50} = 0,64 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), ou seja, foram 17,20 e 36,97 vezes, respectivamente, menos ativos. Sendo que entre eles, o composto **LFOM-107** foi 2,15 vezes mais ativo que o composto **LFOM-108**. Em tripsina o composto **LFOM-107** ( $CI_{50} = 0,86 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) foi mais ativo, 1,62 vezes, que o inibidor clássico TLCK ( $CI_{50} = 1,39 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), já o composto **LFOM-108** ( $CI_{50} = 105,77 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) foi menos ativo, 75,89 vezes. De modo, que entre eles, o composto **LFOM-107** foi 123,1 vezes mais ativo que o composto

**LFQM-108**, confirmando que a posição do grupo glicosil na estrutura do composto influencia na potencial inibitório das proteases ensaiadas.

TABELA 11 – Efeito inibitório dos compostos naturais e semissintéticos em cisteíno protease (papaína) e serino protease (tripsina).

COMPOSTOS	VALORES DE $CI_{50}$ ( $\mu\text{mol.L}^{-1} \pm$ Desvio Padrão) <sup>a</sup>	
	Papaína	Tripsina
<b>LFQM-107</b>	10,94 ± 3,09	0,86 ± 0,15
<b>LFQM-108</b>	23,51 ± 4,46	105,77 ± 7,28
<b>LFQM-109</b>	13,36 ± 2,89	5,84 ± 0,38
<b>LFQM-110</b>	3,04 ± 1,20	0,09 ± 0,31
<b>LFQM-111</b>	11,49 ± 0,37	2,34 ± 0,83
<b>LFQM-112</b>	0,50 ± 0,04	0,07 ± 0,02
<b>TLCK<sup>b</sup></b>	-	1,39 ± 0,65
<b>E64<sup>b</sup></b>	0,64 ± 0,13	-

<sup>a</sup>Cada valor de  $CI_{50}$  representa a média ± desvio padrão da triplicata determinado pelo software Grafit 5.0.

<sup>b</sup>Os compostos TLCK e E64 foram usados como inibidores de referência para as proteases correspondentes que foram ensaiadas.

### 6.3.3.3 Atividade inibitória nas enzimas r-CPB2.8 e a isoforma r-CPB3 de *L.(L.) mexicana* e em lisados de *L.(L.) amazonensis*

Os resultados (TABELA 12) indicam os valores de  $CI_{50}$  para os compostos naturais e semissintéticos na inibição da r-CPB2.8 e na isoforma r-CPB3 (cisteíno-protease) de *L.(L.) mexicana*. A cisteíno-protease recombinante r-CPB2.8 e a isoforma r-CPB3 de *L.(L.) mexicana* foram fortemente inibidas pelo composto **LFQM-109** ( $CI_{50} \sim 0,35 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Em geral, os compostos semissintéticos apresentaram atividade inibitória distinta em ambas as enzimas. Os compostos **LFQM-107**, **LFQM-109** e **LFQM-112** são mais eficazes para a cisteíno-protease r-CPB3, por outro lado, o composto **LFQM-110** foi cerca de 2,33 vezes mais eficaz para r-CPB2.8 e o composto **LFQM-111** demonstrou a mesma atividade para ambas as enzimas. O derivado **LFQM-110** foi o mais ativo ( $CI_{50} = 0,67 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) em r-CPB2.8. A atividade dos derivados **LFQM-111** e **LFQM-112** estão muito próximos, quando levamos em conta os erros padrão, e os compostos **LFQM-107** ( $CI_{50} \sim 2,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e **LFQM-108** ( $CI_{50} \sim 4,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) demonstraram as piores atividades inibitórias sobre r-CPB2.8, quase 6 e 11 vezes menos ativo que o composto natural **LFQM-109**. Os resultados implicam que o grupo glicosil na estrutura dos compostos **LFQM-107** e **LFQM-108** influencia no

potencial inibitório sobre r-CPB2.8, diminuindo a inibição, e também sobre r-CPB3. De modo que este grupo glicosil nos compostos **LFOM-107** e **LFOM-108** conferiram 3 e 2,5 vezes menos eficácia de inibição. Analisando o efeito inibitório sobre r-CPB3, o derivado **LFOM-112** é o melhor, mas apenas 1,21 vezes mais ativo que o composto natural **LFOM-109**, e ambos são os melhores entre todos os compostos. Em geral, quase todos os compostos são mais eficazes para inibir a isoforma r-CPB3 que o r-CPB2.8. Assim tem-se que a ordem de atividade pode ser estabelecida como: **LFOM-109**>**LFOM-110**>**LFOM-107**>**LFOM-108**>**LFOM-112**>**LFOM-111**, para r-CPB2.8 e **LFOM-112**>**LFOM-109**>**LFOM-107**>**LFOM-111**>**LFOM-110**>**LFOM-108** para r-CPB3 de *L.(L.) mexicana*.

Para a atividade leishmanicida em lisados de *L.(L.) amazonensis* (TABELA 12) descobriu-se que os compostos **LFOM-109** e **LFOM-112** são os inibidores mais ativos no lisado de amastigostas em pH 5 (pH próximo ao pH do ambiente que vive o amastigota - vacúolo parasitóforo dentro do macrófago) com valores de  $CI_{50}$  próximos quando levamos em consideração os erros padrões. A mesma situação pode-se verificar em pH 8 (pH próximo ao ambiente dentro do mosquito - intestino do flebótomo, onde esta a forma promastigota), onde  $CI_{50}$  estão próximos para os compostos **LFOM-109** e **LFOM-112**, porém a atividade inibitória é cerca de 10 vezes menos eficaz do que em pH 5. Os derivados **LFOM-110** e **LFOM-111** são menos ativos que os compostos **LFOM-109** e **LFOM-112** em pH 5, por outro lado ambos os compostos **LFOM-107** e **LFOM-108** são menos ativos em quase 70 e 56 vezes em pH 5, respectivamente, e quase 4 e 6 vezes em pH 8 menos ativos, respectivamente, que os compostos **LFOM-109** e **LFOM-112**. Os valores de  $CI_{50}$  dos dois compostos em pH 5 e pH 8 são iguais quando considerado o desvio padrão. Em resumo, os compostos **LFOM-109** e **LFOM-112** tem a mesma atividade em pH 5 ( $CI_{50} \sim 0,75 \mu M$ ) e pH 8 ( $CI_{50} \sim 7,5 \mu M$ ). De modo que, para os derivados semissintéticos a ordem de atividade nos lisados em pH 5 e pH 8 foi, **LFOM-112**>**LFOM-110**>**LFOM-111**.

TABELA 12 – Efeito inibitório dos compostos naturais e semissintéticos nas enzimas r-CPB2.8 e r-CPB3 de *L.(L.) mexicana* e em lisados de *L. (L.) amazonensis*.

Compostos	Valores de CI <sub>50</sub> (µM) <sup>a</sup>			
	r-CPB2.8	r-CPB3	Lisados pH = 5	Lisados pH = 8
LFQM-107	2,44 ± 0,10	0,49 ± 0,01	59,08 ± 12,15	30,00 ± 5,77
LFQM-108	4,51 ± 0,22	1,87 ± 0,10	39,18 ± 3,53	46,10 ± 7,99
LFQM-109	0,42 ± 0,03	0,35 ± 0,04	0,84 ± 0,07	7,79 ± 1,03
LFQM-110	0,67 ± 0,04	1,57 ± 0,15	1,02 ± 0,05	11,11 ± 1,97
LFQM-111	1,27 ± 0,09	1,35 ± 0,17	1,09 ± 0,04	23,90 ± 0,48
LFQM-112	1,01 ± 0,02	0,28 ± 0,03	0,69 ± 0,05	8,10 ± 1,40

<sup>a</sup>Cada valor de CI<sub>50</sub> representa a média ± desvio padrão da triplicata determinados pelo software Grafit 5.0.

#### 6.4 RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE (REA)

A atividade biológica dos fármacos está intimamente ligada com a sua estrutura química. Isto significa que, compostos com estruturas químicas similares podem ter atividades semelhantes. Desta afirmação surge o conceito de REA que consiste na relação qualitativa entre a estrutura química e a atividade farmacológica de uma série de compostos.

O estudo das relações estrutura-atividade de um composto protótipo e seus análogos auxilia na determinação de quais partes da molécula são responsáveis pela atividade biológica, ou seja, o grupo farmacóforo. As relações estrutura-atividade geralmente são elaboradas alterando-se parte da estrutura química do protótipo e observando-se qual influência na atividade sob o ponto de vista qualitativo e quantitativo. Pode-se alterar a dimensão e a conformação do esqueleto de carbono, a natureza e o grau de substituição, ou ainda a estereoquímica (THOMAS, 2000).

As modificações estruturais realizadas na substância de partida devem na medida do possível ser realizadas levando em consideração o efeito sobre a solubilidade em água (lipofilicidade ou hidrofiliicidade), transportes através de membranas, metabolismo, capacidade inibitória e outras propriedades farmacocinéticas dos análogos (THOMAS, 2000).

#### 6.4.1 REA: Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante está altamente relacionada à capacidade de doação de elétrons. A etapa de transferência do hidrogênio tem se destacado, mas a atividade antioxidante não depende apenas da força de energia da ligação O-H. A estabilização das espécies cátion-radicalar e radicalar formadas também devem ser consideradas (THOMAS, 2000).

Muitos fatores influenciam a atividade antioxidante dos compostos de natureza fenólica, em especial a posição de substituição e o número de grupos hidroxila (OH), as propriedades de outros grupos substituintes e a possibilidade de formação de ligações de hidrogênio. A posição de substituição da hidroxila no anel fenólico, considerada em relação a uma posição fixa, influencia diretamente a atividade antioxidante.

Como os flavonóides são os compostos de maior interesse científico entre os fenólicos. Compostos com dois (mais comum) ou três substituintes grupos hidroxilas no anel benzênico possuem maior atividade antioxidante do que os monohidroxilados (SCOTTI et al., 2007). Desta forma de acordo com os valores obtidos nos ensaios antioxidantes, pode-se correlacionar tais atividades com a estrutura de cada derivado semissintético, no qual foram oriundos de reações de acilação ou alquilação.

De acordo com os resultados obtidos pelos ensaios de Poder Sequestrante de Radicais DPPH e do Poder Redutor dos Constituintes Químicos, verificou-se que o composto **LFOM-109** é o que possui maior atividade, nas duas análises empregadas com  $CE_{50}$  de  $12,21 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e percentual de inibição máxima 16,67%, respectivamente. Sua atividade pode ser determinada estruturalmente pela presença do grupo *orto*-diidroxil ou grupo catecólico que confere uma maior estabilidade a forma radicalar, pois contribui para a deslocalização dos elétrons e assim reduz os intermediários oxidativos. Verifica-se ainda insaturação  $\alpha, \beta$ -carbonila no anel II-B, a qual confere maior atividade devido ao aumento da deslocalização de elétrons a partir do anel B para o restante da estrutura do composto. A presença de hidroxilas nas posições C-5 e C-5'' promovem uma deslocalização de elétrons com o grupo 4-oxo, aumentando assim a atividade antioxidante por permitir a neutralização das **EROs**, além de também estarem envolvidas com o processo de quelatão de metais, conhecido como "*PERP*". Já as hidroxilas C7 e C-7'' são de menor importância para a atividade, mas conferem juntamente com as outras hidroxilas a atividade antioxidante. Já os compostos

glicosilados **LFOM-107**, que não possui o sistema catecólico, e **LFOM-108** que não possui hidroxila na posição C-7'', apresentaram menores atividades que o **LFOM-109** em razão do resíduo glicosil reduzir a atividade, uma vez que não irá permitir que se tenha alta deslocalização de elétrons ao longo da estrutura destes compostos.

Dentre os compostos semissintéticos analisados tem-se que o composto **LFOM-111** foi o mais ativo na atividade sequestrante de radicais DPPH, seguido dos compostos **LFOM-110** e **LFOM-112**, respectivamente. Já na atividade do Poder Redutor o composto mais ativo foi o **LFOM-111** seguido dos compostos **LFOM-110** e **LFOM-112**, respectivamente. Sendo que essas atividades estão relacionadas com a presença remanescente de hidroxilas fenólicas na estrutura. Os compostos **LFOM-110**, **LFOM-111** e **LFOM-112** ainda apresentam duas hidroxilas remanescentes, conferindo assim atividades antioxidantes de acordo com esse número de hidroxilas. Sendo que estes compostos (**LFOM-110**, **LFOM-111** e **LFOM-112**) apresentam a presença das hidroxilas quelatogênicas C-5 e C-5'' que permite ter deslocalização de elétrons com o grupo 4-oxo (C-4 e C-4''), além do fato do tamanho da cadeia carbônica inserida na estrutura do composto protótipo. Ou seja, com o aumento da cadeia carbônica inserida observou-se a diminuição da atividade antioxidante, possivelmente associado com o aumento da estabilidade, redução da reatividade e aumento da lipofilicidade. Com isso, a substituição da(s) hidroxila(s) fenólica por substituintes mais lipofílicos tornou a atividade antioxidante destes compostos reduzida, o que fica evidente a importância destas hidroxilas na estrutura destes derivados para a atividade analisada.

O mesmo comportamento é observado para derivados da rutina (VISKUPICOVA et al., 2010), no qual verificou-se decréscimo da atividade antioxidante com o aumento da lipofilicidade e extensão da cadeia carbônica em testes *in vitro*. Em que os compostos analisados tiveram um aumento da concentração necessária e período de indução (tempo que leva para ser completamente oxidado) para estabilizar a oxidação, devido ao aumento da cadeia carbônica inserida na estrutura da rutina.

#### **6.4.2 REA: Atividade Antiparasitária**

Na elucidação da relação estrutura-atividade, associada à atividade leishmanicida, lipofília e caráter estrutural, pode determinar que a atividade

antiparasitária seja maior naqueles compostos que possuem menor número de hidroxilas em sua estrutura, ou seja, aqueles que possuem maior lipofilicidade e menor atividade antioxidante. No qual, a lipofilicidade é uma variável significativa que pode ser um importante fator na atividade biológica (URZÚA et al., 2008). Pode-se verificar que todos os derivados semissintéticos apresentaram lipofilicidade maior e atividade antioxidante menor que o **LFOM-109**, sugerindo-se que tenham melhor atividade antiparasitária.

É sabido que as formas amastigotas proliferam-se nos macrófagos, as quais são células responsáveis pelo controle da produção de espécies radicalares, principalmente derivados do oxigênio e nitrogênio, assim, algumas destas espécies radicalares vem sendo estudadas pelo o seu potencial terapêutico no tratamento de leishmanioses cutâneas. Uma vez que a membrana dos macrófagos irá atuar como barreira física, secretando substâncias microbidas contra agentes agressores (BOS & KABSENBERG, 1986), ela reage aos estímulos antigênicos disparando o processo inflamatório e uma potente resposta de células T (LARREGINA et al., 2001). No qual, aqueles compostos (natural ou semissintético) que possuem menor atividade antioxidante, possivelmente terá maior ação parasitária por agir similarmente aos NOs, já que estas espécies produzidas pela a membrana dos macrófagos ativados serão fundamentais no controle *in situ* de patógenos intracelulares (BOGDAN, 2001), controlando o crescimento das *Leishmanias*.

Assim, o composto **LFOM-110**, que é entre os derivados o de menor lipofilicidade (QLogP = 1,893) (TABELA 13), foi o que apresentou a melhor atividade em ambas as formas do protozoário *L.(L.) amazonensis*. Possivelmente a baixa lipofília confere ao composto melhor e maior facilidade de sofrer transporte e ser distribuído pelo sistema biológico analisado, além dos grupamentos acetila conferirem um gradiente de concentração entre lipídeo/água mais adequado para que sua atividade fosse potencializada.

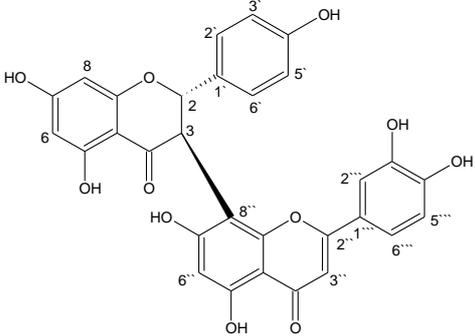
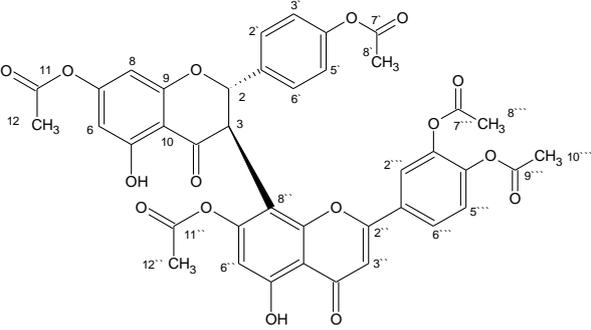
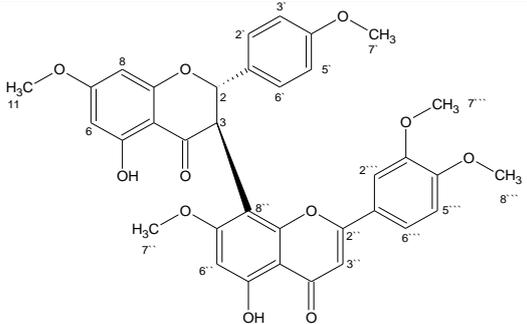
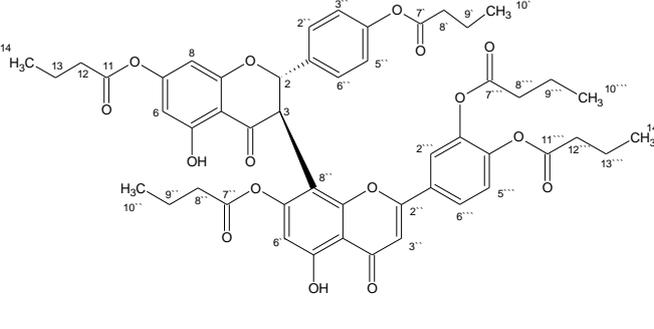
O composto **LFOM-112** que possui grupamentos *O*-butanoíla (quatro unidades de carbono) em sua estrutura, com cadeia carbônica maior que a do composto **LFOM-110** foi o segundo melhor composto, o que é contraditório com o esperado de acordo com o valor de QLogP (5,127) (TABELA 13). Pois acreditava-se que associado a uma alta lipofília e baixa atividade antioxidante fosse encontrada uma maior atividade antiparasitária, ou seja, fosse o melhor de todos os compostos analisados. De posse

deste resultado, a possibilidade para que este composto não fosse o mais ativo possivelmente esteja associado ao tamanho da cadeia carbônica. Desta forma o composto **LFOM-112** possui menor capacidade de sofrer transporte e ser distribuído pelo sistema biológico analisado. Associado a esse caráter estrutural sugere-se ainda que o composto não possua capacidade adequada de sofrer transporte passivo através da membrana celular, que possui características anfipáticas (regiões hidrofílicas como hidrofóbicas) (VALKÓ et al., 1998), devido não possuir um gradiente de concentração adequado entre lipídeo/água.

Já o composto **LFOM-111** no qual possui grupamentos metila (uma unidade de carbono) em sua estrutura, apresentou lipofilicidade intermediária QLogP (4,792) (TABELA 13) e uma menor atividade biológica nas duas formas (promastigota e amastigota) do protozoário *Leishmania*. Comparado aos demais compostos semissintéticos o composto **LFOM-111** possui em sua estrutura a menor unidade carbônica (metila) inserida, o que leva a crer ainda, que à medida que aumentamos o número de unidade carbônica inseridas em um composto, espera-se obter uma maior atividade antiparasitária. De acordo com os resultados obtidos está coerente essa afirmativa, já que os derivados **LFOM-110** (duas unidades de carbono) e **LFOM-112** (quatro unidades de carbono) foram mais ativos nas duas formas do protozoário *Leishmania* quando comparado ao derivado **LFOM-111** (uma unidade de carbono) e ao composto natural **LFOM-109**.

Em suma, todos os compostos agem por mecanismos diferentes no sistema biológico proposto de acordo com a lipofília e tamanho da cadeia carbônica inserida. Assim, de acordo com os resultados obtidos o aumento da cadeia carbônica confere um *plateau* de atividade, sendo que após atingir esse ápice o aumento da cadeia carbônica não é favorável para a atividade parasitária. Possivelmente, essa característica deve-se ao desequilíbrio do gradiente de concentração adequado entre lipídeo/água, que dificulta a permeação membranar. E dentre todos os compostos analisados (natural ou semissintético) o composto **LFOM-110** poderá torna-se um potencial fármaco de tratamento leishmanicida, já que possui alta atividade antiparasitária, baixa citotoxicidade, baixa atividade antioxidante e um alto valor de fator de segurança.

TABELA 13 – Estrutura, nomenclatura e valores de QLog P octanol/água do composto natural **LFOM-109** e seus análogos semissintéticos.

Nome do composto/Código	Estrutura molecular	Valores de QLog P octanol/água*
Fukugetina / <b>LFOM-109</b>		1,734
7,4',7'',3''',4''''-penta-O-acetil-fukugetina / <b>LFOM-110</b>		1,893
7,4',7'',3''',4''''-penta-O-metil-fukugetina / <b>LFOM-111</b>		4,792
7,4',7'',3''',4''''-penta-O-butanoila-fukugetina / <b>LFOM-112</b>		5,127

\*Calculado pelo o software Qikprop 3.2

### 6.4.3 REA: Atividade Enzimática

Ao analisar os compostos (semisintéticos e naturais) nas enzimas cisteínicas r-CPB2.8 e na sua isoforma r-CPB3 de *L.(L.) mexicana*, em enzimas obtidas de lisado das formas amastigota e promastigota de *L.(L.) amazonensis* nos pHs 5 e 8 e em proteases cisteínicas e serínicas (papaína e tripsina), verificou-se que o derivado semisintético **LFOM-112** foi mais ativo que o composto **LFOM-109** nos ensaios, excetuando-se em r-CPB2.8, o qual foi o terceiro mais ativo. Possivelmente sua maior potencialidade esteja relacionada à presença de grupos carbonílicos (centros eletrofílicos), os quais são susceptíveis aos ataques pelos grupos nucleofílicos das serino e cisteíno proteases, além da presença das cadeias carbônicas maiores que a dos demais derivados, que proporciona melhor ancoragem no sítio catalítico enzimático, conseqüentemente maior atividade (efeito). De modo, que a ação inibitória está associada à especificidade de cada interação com os aminoácidos presentes nos sítios catalíticos de cada enzima, o complexo enzima-inibidor formado pelo o composto **LFOM-112** e a enzima, confere maior estabilidade, interação e atividade inibitória (HEDSTROM, 2002).

O derivado **LFOM-110**, que também foi obtido por reação de acilação, foi o segundo mais ativo comparado ao composto **LFOM-109**, em tripsina e papaína, nos lisados de *L.(L.) amazonensis* em pH 8 (pH do ambiente interno do mosquito, onde encontra-se as formas promastigota) e em r-CPB2.8. Esta menor atividade, comparado ao **LFOM-112**, possivelmente esteja associada ao tamanho da cadeia dos grupamentos acetila (duas unidades de carbono) que acarreta uma perda de complementaridade estrutural com o sítio enzimático. Conseqüentemente, a ancoragem entre enzima/substrato é restrita estruturalmente e de menor interação intermolecular. Já em r-CPB3 de *L.(L.) mexicana* e no lisado de *L.(L.) amazonensis* em pH 5 (pH do vacúolo parasitóforo dentro do macrófago, onde encontra-se as formas amastigota) este derivado foi o menos ativo dentre todos os derivados, possivelmente devido os sítios catalíticos adotarem uma variedade de estados conformacionais específicos ao longo do caminho da reação enzimática, o que leva o composto ter dificuldade de interagir com o sítio catalítico e assim inibir esta enzima e potencializar a atividade biológica proposta.

O derivado **LFOM-111** obtido por reação de alquilação, como esperado foi o menos ativo comparado ao composto **LFOM-109** e os demais derivados, em todas as enzimas (cisteíno e serino proteases). Sabe-se que a presença de carbonos carbonílicos

favorece os ataques nucleofílicos devido ao seu maior caráter eletrofílico, permitindo assim aumento de polarização da densidade eletrônica na ligação dupla da carbonila. Conseqüentemente, a polarização aumenta as cargas negativas e positivas ao redor dos átomos de oxigênio e do carbono formando dipolo eletrônico, potencializando o ataque nucleofílico nos carbonos parcialmente carregados (MARTINS et al., 2009). De modo que esse conceito não pode ser aplicado ao derivado **LFOM-111**, devido ausência de carbono carbonílico susceptível de sofrer ataque nucleofílico e realizar ligação entre enzima-inibidor, além de possivelmente também ter uma perda de complementaridade com o sítio enzimático, dificultado a sua ancoragem.

Dentre os compostos naturais, **LFOM-107** e **LFOM-108**, verificou-se que o composto **LFOM-107** foi mais ativo em todas as proteases ensaiadas; tripsina e papaína, r-CPB3 e r-CPB2.8 de *L.(L.) mexicana* e no lisado de *L.(L.) amazonensis* em pH 8. Essa maior atividade do composto **LFOM-107** possivelmente esteja relacionado com a posição do resíduo de glicose que permite de forma mais favorável à interação com os resíduos de aminoácido destas enzimas. E o composto **LFOM-108** foi mais ativo apenas em lisados de *L.(L.) amazonensis* em pH 5, possivelmente neste pH o resíduo de glicose na posição C-7` é mais favorável para ocorrer a inibição.

A atividade dos compostos naturais e semissintéticos em lisados de *L.(L.) amazonensis* ainda é controversa. Visto que a enzima que está ativa em pH 8 poderá ser a mesma do pH 5, ou até mesmo ser duas enzimas diferentes atuando em pHs específicos, as quais podem ser ativas com o mesmo substrato nas mesmas condições. De acordo com os resultados obtidos pode-se verificar que não se trata da mesma enzima, visto que o potencial de inibição foi diferente nos dois pHs analisados. Além, da origem das formas leishmânicas possivelmente propiciar que enzimas diferentes estejam contidas nas formas promastigotas e amastigotas.

## 7 CONCLUSÕES

Mediante os resultados obtidos conclui-se que:

Do extrato acetato de etila obtido do epicarpo (EAEE) de *G. brasiliensis*, foi possível o isolamento e identificação de compostos conhecidos aqui denominados **LFQM-105**, **LFQM-106**, **LFQM-108** e **LFQM-109**, além do isolamento e identificação do composto com estrutura inédita **LFQM-107**.

Os compostos semissintéticos **LFQM-110**, **LFQM-111** e **LFQM-112** apresentaram maior potencial quanto à atividade antiparasitária (formas promastigota e amastigotas), comparados ao composto de partida Fukugetina (**LFQM-109**). Destacando-se o derivado **LFQM-110**, o qual se apresentou o mais ativo dentre os derivados, tornando-o assim potencial candidato a fármaco leishmanicida.

Nos ensaios antiproteolíticos verificou-se que todos os derivados foram mais ativos que o composto **LFQM-109**, destacando-se novamente grande potencial do derivado **LFQM-110**, possivelmente pelo ganho de centros eletrofilicos que são passíveis de sofrerem ataques nucleofilicos pelos resíduos de serino e cisteino protease, além de permitir uma suposta ancoragem no sítio catalítico mais eficiente. Tornando-o um possível inibidor de proteases no tratamento de diversas doenças a elas associadas.

Observou-se também pequena atividade antioxidante para os compostos semissintéticos em virtude da diminuição do número de hidroxilas fenólicas na estrutura dos compostos quando comparados ao da fukugetina. Além da redução da atividade antioxidante dos derivados semissintéticos à medida que se aumentava a lipofilicidade, o que permitiu potencializar a atividade antiparasitária.

Com base nestes resultados conclui-se que os compostos naturais obtidos a partir do EAEE de *G. brasiliensis* e os compostos semissintéticos da fukugetina, demonstraram significativo efeito leishmanicida nas concentrações testadas.

Em conjunto, os resultados do presente estudo indicam que os compostos obtidos de produtos naturais, especialmente aqueles obtidos de plantas medicinais, ainda têm e continuarão tendo um lugar importante no processo de descoberta de novos medicamentos, particularmente no desenvolvimento de fármacos com ação leishmanicida, antiproteolítica e antioxidante.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, P. K.; BANSAL, M. C. **Carbon-13 NMR of flavonoids**. New York: Elsevier, 1989, p.365.

ALMEIDA, L. S. B. et al. Antimicrobial activity of *Rheedia brasiliensis* and 7-epiclusianone against *Streptococcus mutans*. **Phytomedicine**, v. 15, p. 886-891, 2008.

ALVES, L. C. et al. S1 subsite specificity of a recombinant cysteine proteinase, CPB, of *Leishmania mexicana* compared with cruzain, human cathepsin L and papain using substrates containing non-natural basic amino acids. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, p. 1206-1212, 2001.

AMAL M. M. et al. The antiprotozoal activity of methylated flavonoids from *Ageratum conyzoides* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, p. 127-130, 2010.

ARAI, S. et al. Plant seed cystatins and their target enzymes of endogenous and exogenous origin. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6612-6617, 2002.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v. 11, p. 419-421, 2000.

AUGUSTINE, E. S. et al. Characterization of a multi-copy gene for a major stage-specific proteinase of *Leishmania mexicana*, **FESB**, v. 311, n. 2, p. 124-127, 1992.

BARBOSA, F. G.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R. Total NMR assignments of new [C<sub>7</sub>-O-C<sub>7</sub>]-biflavones from leaves of the limonene-carvone chemotype of *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown. **Magnance Ressonance Cheminty**, v. 43, p. 334-338, 2005.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativa e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p.113-123, 2006.

BART, C.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Isolation of *lmcpc*, a gene encoding a *Leishmania mexicana* cathepsin-B-like cysteine proteinase. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 73, n. 12, p. 271-274, 1995.

BEYRODT, C. G. P. et al. Characterization of an antigen from *Leishmania amazonensis* amastigotes able to elicit protective responses in a murine model. **Infection and immunity**, p. 2052–2059, 1997.

BILLO, A. et al. Screening of New Caledonian and Vanuatu medicinal plants for antiprotozoal activity. **Journal Ethnopharmacology**, v.96, p. 569-575, 2005.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunology**, v. 2, n. 10, p. 907-916, 2001.

BOONSRIA, S. et al. Antibacterial and cytotoxic xanthones from the roots of *Cratoxylum formosum*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 7, p. 723-727, 2006.

BOS, D. J.; KASENBERG, M. L. The skin immune system. **Immunology Today**, v. 7, p. 235-240, 1986.

BRAGA, F. G. et al. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal Ethnopharmacology**, v. 111, p. 396-402, 2007.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, 2003.

CARVALHO, J. C. T. Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. **Tecmed**, Ribeirão Preto. 2004.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Estudo químico de plantas medicinais orientado para a análise biológica. Obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos ativos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. 1 ed. Chapecó: Argos. 2001. p. 59-66.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis - current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v. 19, p. 502-508, 2003.

CRUZ, A. J. et al. Vascular effects of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Rheedia gardneriana*, on the rat aorta. **Phytomedicine**, v. 13, p. 442-445, 2006.

CRUZ, A. K. et al. Current treatment and drug discovery against *Leishmania spp.* and *plasmodium spp.*: A review. **Current Drug Targets**, v. 10, p. 178-192, 2009.

CUI, J. et al. New medicinal properties of mangostins: Analgesic activity and pharmacological characterization of active ingredients from the fruit hull of *Garcinia mangostana*. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** v. 95. p. 166-172, 2010.

DARDARI, Z. et al. Antileishmanial activity of a new 8-hydroxyquinoline derivative designed 7-[5'-(3'-phenylisoxazolino)methyl]-8-hydroxyquinoline: preliminary study. **Farmacognosia**, v. 59, p. 195-199, 2004.

DEROGIS, P. B. et al. Complete assignment of the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of garciniaphenone and keto-enol equilibrium statements for prenylated benzophenones. **Magnetic Resonance Chemistry**, v. 46, p. 278-282, 2008.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, v. 95, p. 239-43, 2001.

DI STASI, L. C.; GOMES, J. C.; VILEGAS, W. Studies on anti-allergic constituents in the leaves and stems of *Anchientia salutaris var. martiana* (Violaceae). **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, n. 6, p. 890-893, 1999.

DIAZ, N. L. *et al.* Nitric oxide and cellular immunity in experimental cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 28, n. 3, p. 288-93, 2003.

ELFITA, E. et al. Antiplasmodial and other constituents from four Indonesian *Garcinia spp.* **Phytochemistry**, v.70, p. 907-912, 2009.

FOTIE, J. D. et al. Trypanocidal and antileishmanial dihydrochelerythrine derivatives from *Garcinia lucida*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 10, p. 1650-1653, 2007.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (BRASIL). Manual de controle da leishmaniose tegumentar Americana. p. 62, 2000.

GENARO, O. Leishmaniose Tegumentar Americana. *In* **Parasitologia Humana** NEVES, D. P. 10<sup>a</sup> Ed. Atheneu, 2003. p. 97-100.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. American cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n.1, p.71-80, 2003.

GONTIJO, D. T. **Purificação e caracterização cinética da calicreína tecidual do rato (Rk1) com Os inibidores da tripsina: Benzamidina, 4-Aminobenzamidina e 4-Nitrobenzamidina. Síntese e caracterização da 4-nitrobenzamidina.** 2005. 123f. Dissertação de mestrado - Faculdade de Farmácia da UFMG. Belo Horizonte. 2005.

GONZÁLEZ, U. et al. Interventions for oldworld cutaneous leishmaniasis. Published by JohnWiley & Sons, Ltda, 2008.

GRZONKA, Z. et al. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, n. 1, p. 1-20, 2001.

GÜLÇİN, İ.; ALICI, H. A.; CESUR, M. Determination of *in vitro* Antioxidant and Radical Scavenging Activities of Propofol. **Chemical & Pharmaceutical bulletin**, v. 53, n. 3281, p. 281-285, 2005.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; CROSS, C. E. The antioxidant paradox. **The Lancet**, v. 355, p. 1179-1180, 2000.

HANSEN M. M.; RIGG, J. R. A Novel Protecting Group for Hindered Phenols. **Tetrahedron Letters**, v. 39, n.18, p.2705-2706, 1998.

HAYAMIZU, K. et al. Effects of *Garcinia cambogia* (Hydroxycitric Acid) on visceral fat accumulation: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **Current Therapeutic Research**, v. 64, n. 8, p. 551-567, 2003.

HEDSTROM, L. Serine Protease Mechanism and Specif. **Chemical Reviews**, v.102, p.4501-4523, 2002.

HOTEZ, P. J. et al. Combating tropical infectious diseases: report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 6, p. 871-8, 2004.

Monitoring and evaluation tool kit for indoor residual spraying. Disponível em: <http://apps.who.int/tdr/svc/diseases/leishmaniasis>. Acesso em: 21 de outubro de 2010.

ILG, T. et al. Distribution of parasite cysteine proteinases in lesions of mice infected with *Leishmania mexicana* amastigotes. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 67, n.2 , p. 193-203, 1994.

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

JOSEPH, G. S. Antiaflatoxic and antioxidant activities of *Garcinia* extracts. **International Journal of Food Microbiology**. v. 101, n. 2, p. 153-160. 2005.

KEDZIERSKI, L. et al. Leishmaniasis: Current treatment and prospects for new drugs and vaccines. **Journal Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 599-614, 2009.

KWAK, W. J. et al. Effects of ginkgetin from *Ginkgo biloba* leaves on cyclooxygenases and in vivoskin inflammation. **Planta Medica**, v. 68, n. 4, p. 316-321, 2002.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In W Peters, R Killick-Kendrick (eds), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, v. 1, **Academic Press**, London, 1987, p. 1-120.

LARREGINA, A. T.; L. D. FALO, Jr. Dendritic cells in the context of skin immunity. **In Dendritic Cells**, 2 ed. M. T. Lotze and A.T. Thomson, eds. Academic Press. London. 2001, p. 301-314.

LÁZARO, E. et al. Chromatographic estimation of drug disposition properties by means of immobilized artificial membranes (IAM) and C18 columns. **Journal of Medicinal chemistry**, v. 49, p. 4861-4870, 2006.

LEE, N. et al. Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. **Nature**, v. 9, p. 53-64, 2002.

LENINGER, A. et al. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Savier, p. 839, 1995.

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

Li, X. et al. Absolute configuration, conformation, and chiral properties of flavanone-(3→8'')-flavone biflavonoids from *Rheedia acuminata*. **Tetrahedron**, v. 58, p. 8709-8717, 2002.

LIAO, D. et al. Refined atomic model of wheat serine carboxypeptidase II at 2.2 Å resolution. **Biochemistry**. v. 31, p. 9796-9812, 1992.

LIEW, F. Y.; O'DONNELL, C. A. Immunology of leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 32, p. 161-259, 1993.

MABRY, T. J. et al. The Systematic Identification of flavonoids. **New York: Springer-Verlag**, 1970, p.35-230,

MALTEZOU, H. C. Drug resistance in visceral leishmaniasis. **Journal Biomedicine Biotechnologic**. v. 2010, p.8, 2009.

BRASIL. Ministerio da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. 6ª ed. Brasília-DF. 2006.

MARTINS, F. T.; ASSIS, D. M.; SANTOS, M. H. Natural polyprenylated benzophenones inhibiting cysteine and serine proteases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 1230-1239, 2009.

MENON, A. S.; GOLDBERG, A. L. Protein substrates activate the ATP-dependent protease La by promoting nucleotide binding and release of bound ADP. **J. Biological Chemistry**, v.262, p.14929-14934, 1987.

MOLANO, I. et al. A *Leishmania infantum* multicomponent antigenic proteins mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 92, p. 1-13, 2003.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento Racional de Fármacos baseado em Produtos Naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MONTEIRO, E. M. et al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 147-152, 2005.

MONTI, R. et al. Purification of papain from fresh latex of *Carica papaya*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, n. 5, p. 501-507, 2000.

MORAIS, S.; BRAZ FILHO, R. Produtos naturais: estudos químicos e biológicos. Fortaleza, Editora: UECE, 2007, p.105-122.

MORTON, J.; MOMBIN, P. Fruits of Warm Climate. Miami, p. 309-310, 1987.

MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H.; ALEXANDER, J. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 375-381, 2004.

MURAY, H.W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, p. 1561-77, 2005.

MURRAY, H. W.; NATHAN, C. F. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 4, p.741-746, 1999.

MURRAY, H. W.; TEITELBAUM, R. F. L. arginine-dependent reactive nitrogen intermediates and the antimicrobial effect of activated human mononuclear phagocytes. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 165, n. 3, p. 513-7, 1992.

NEURATH, H. Evolution of proteolytic enzymes. **Science**. v. 224, p. 350-357, 1984.

NIJVELDT, R. J. et al. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Society for Clinical Nutrition**, v. 74, p.418-25, 2001.

OLIVEIRA, T. T. et al. Atividade antidiabética de *Bauhinia sacra*, corantes naturais, ácido cinâmico e 7-epiclusianona. **News Laboratory**, v. 72, p. 172-190, 2005.

OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Immunomodulating activities of polysaccharide fraction from dried safflower petals. **Drug Resistance Updates**, v. 7, p. 257-266, 2004.

PANARO, M. A. et al. Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in *Leishmania infantum*-infected human macrophages stimulated with interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide. **International Journal of Clinical and Laboratory Research**, v. 29, n. 3, p. 122-127, 1999.

PEREIRA, I.O. et al. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. Fruits. **Phytomedicine**. v. 17; p. 339-345, 2010.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and Medicinal Plants. **Phytochemistry**, v. 56, n. 3, p. 237-243, 2001.

RAO, L. J. M. et al. Occurrence of antioxidant and radical scavenging proanthocyanidins from the Indian minor spice nagkesar (*Mammea longifolia* Planch and Triana syn). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 31-36, 2004.

RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 597-635, 1998.

RATES, S.M.K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 57-69, 2001.

RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, p. 550-555, 2003.

RAWLINGS, N. D.; BARRET, A. J. Evolutionary families of peptidases. **The Biochemical Journal**, v. 290, p. 205-218, 1993.

RAWLINGS, N. D.; BARRET, A. J. Families of cysteine protease. **Methods in Enzymology**, v. 244, p. 461-486, 1994.

RAWLINGS, N. D.; MORTON, F. R.; BARRET, A. J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 244, p. 270-272, 2006.

REITHINGER, R. et al. Cutâneos leishmaniasis. **Lancet**, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiotechnologia**. Colômbia: Editorial Premier. 1997, p. 352.

ROBERTSON, C. D.; COOMBS, G. H. Characterisation of three groups of cysteine proteinases in the amastigotes of *Leishmania mexicana*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 42, n. 2, p. 269-276, 1990.

SAJID, M.; MCKERRO, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 120, p. 1-21, 2002.

SANDERSON, S. J. et al. Expression and characterization of a recombinant cysteine proteinase of *Leishmania mexicana*. **Biochemical Journal**, v. 347, p. 383-388, 2000.

SANTA-CECÍLIA, F. V. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Garcinia brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 467-473, 2011.

SANTOS, A. R. et al. Atropoisomerismo: O Efeito da Quiralidade Axial em Substâncias Bioativas. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 125-135, 2007.

SCOTTI, L. et al. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 2, 2007.

SHARIEF, A. H. et al. *Leishmania donovani*: An *in vitro* study of antimony-resistant amphotericin B-sensitive isolates. **Experimental Parasitology**, v. 114, p. 247-252, 2006.

SILVA-LÓPEZ, R. E. Proteases de *Leishmania*: Novo salvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1541-1548, 2010.

SILVERSTEIN R. M. . **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 7. ed. John Wiley & Sons, Inc LTC: Rio de Janeiro. 2006.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**: Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. 5ed. Porto Alegre: UFGRS/UFSC, 2003, p.291-320.

SKIBOLA, C. F.; SMITH, M. T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. **Free Radical Biologic Medicine**. v. 29, p. 375-83, 2000.

SOARES, D. C. et al. Leishmanicidal activity of supercritical fluid fraction from *Tabernaemontana catharinensis*. **Parasitology International**, v. 56, p. 135-139, 2007.

SOUZA, M. M. et al. Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências**

**Farmacêuticas:** contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí: Univali, 2003.

SUZART, L. R.; JULIANA, F. S.; CARVALHO, D. M. Biodiversidade flavonoídica e aspectos farmacológicos em espécies dos gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia* (OCHNACEAE). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 984-987, 2007.

THOMAS, G. An introduction Chichester, **Medicinal chemistry**. Wiley and Sons. New York. p. 23-48, 2000.

URZÚA, A. et al. Antibacterial properties of 3 H-Spiro[1-benzofuran-2,10-cyclohexane derivatives from *Heliotropium filifolium*. **Molecules**, v. 13, p. 2385-2393. 2008.

VALK, K. et al. Relationships between the chromatographic indices and solute descriptors obtained by using several reversed-phase, dial, nitrile, cyclodextrin and immobilize artificial membrane-bonded high-performance liquid chromatography columns. **Journal of chromatography A**, v. 797, p. 41-55, 1998.

VANNUCCHI, H. et al. Role of nutrients on lipid peroxidation and antioxidant defense system. **Nutrição Clínica** v. 31, p. 31-44, 1999.

VIEGAS, Jr. C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIEIRA FILHO, S. A. et al. Total assignment of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of two 3,4-secofriedelanes from *Austroplenckia populnea*. **Magnetic Resonance in Chemistry**. v. 39, p. 155, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Leishmaniose tegumentar americana. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/svs/>>. Acesso em 21 de outubro de 2010.

VISKUPICOVA, J. et al. Lipophilic rutin derivatives for antioxidant protection of oil-based foods. **Food Chemistry**, v. 123 p. 45-50, 2010.

YANG, B. et al. **Chemistry Pharmacologic Bull.** v. 49, p. 747, 2001.

YANG, C.Y. et al. Immobilized Artificial Membranes – screens of drug membrane interactions. **Advanced Drug Reviews**, v. 23, p. 229-256, 1996.

YEN. W. J.; CHANG, L.; DUH, P. Antioxidant activity of peanut seed testa and its antioxidative component, ethyl protocatechuate. **Food Science and Technology**, v. 38, n. 3, p. 193-200, 2005.

YOUSEF, G. M. & DIAMANDIS, E. P. Human tissue kallikreins: a new enzymatic cascade pathway. **Biological Chemistry**, v 383, p.1045-1057, 2002.

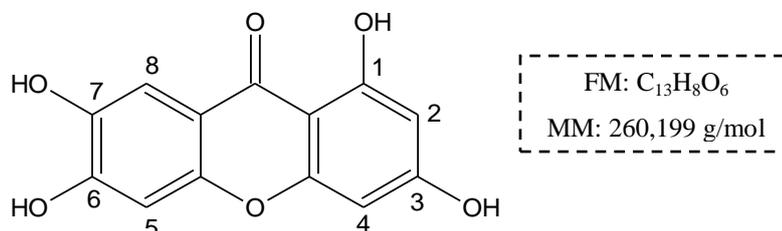
YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

ZAGOTOA, J. N. et al. Effects of the *Kielmeyera coriacea* extract on energy metabolism in the rat live. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, n.1-2, p. 47-54, 2006.

ZUANAZZI, J.A.S.; SIMÕES, C.M.O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3ed. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2004.

## ANEXOS

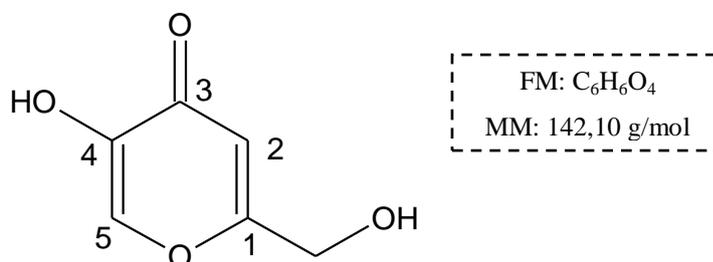
## A – Dados Espectroscópicos

**LFOM-105** → 1,3,6,7-tetraidroxixantona

RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz): 13,17 (*s*, 1OH, OH-1); 6,17 (*d*, 1H,  $J = 2$  Hz, H-2); 6,32 (*d*, 1H,  $J = 2$  Hz); 6,92 (*s*, 1H, H-5); 7,37 (*s*, 1H, H-8).

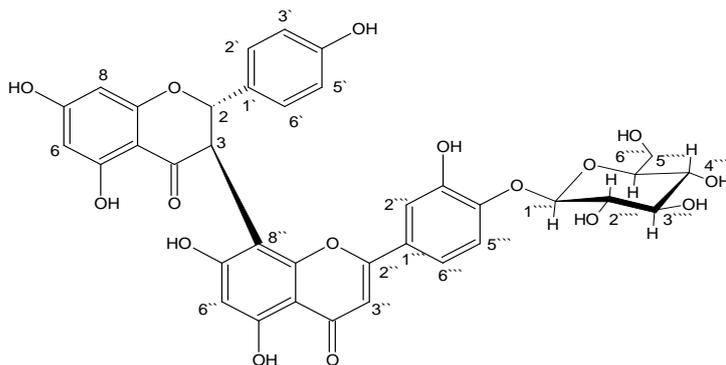
RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 100 MHz): 163 (OH, C-1); 98 (CH, C-2); 164 (OH, C-3); 94 (CH, C-4); 112,6 (CH, C-5); 154 (OH, C-6); 143 (OH, C-7); 107,2 (CH, C-8); 117 (C, C-9); 147 (C, C-10); 157 (C, C-11); 103 (C,C-12).

IV(KBr)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 3373 (O-H); 2967(C-H); 1648, 1615, 1578 e 1480(C=C); 1300 e 1222(C-O).

**LFOM-106** → Ácido Kójico

IV(KBr)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 3172(O-H); 2945-2852(C-H); 1660, 1627, 1610 e 1581(C=C); 1701 (C=O).

UV(EtOH, 0.1 %)  $\lambda_{\text{máx}}$ (log  $\epsilon$ { $\text{cm}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$ }): 217 nm (5,72), 270 nm (5,52), 201 nm (5,73), 209 nm (5,85), 253 nm (5,19), 305 nm (5,32), 252 nm (5,20), 305 nm (5,30), 360 nm (6,85), 269 nm (5,27), 315 nm (5,08), 270 nm (5,35) e 314 nm (4,91).

**LFOM-107** → Fukugetina-4''''-O-β-D-glicosídeoFM: C<sub>36</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>

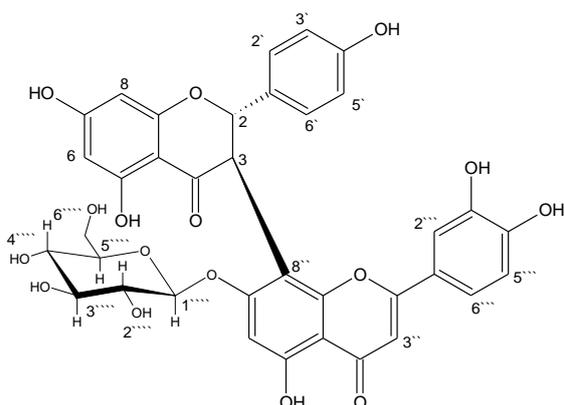
MM: 718,61 g/mol

RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz): 5,89 (*d*, 1H, *J* = 12,61 Hz, H-2); 4,93 (*d*, 1H, *J* = 11,21 Hz, H-3); 13,08 (*s*, 1OH, OH-5); 5,94 (*d*, 1H, *J* = 4,6Hz, H-6); 6,53 (*s*, 1H, *J* = 5 Hz, H-8); 6,63 (*dd*, 2H, *J* = 7,6 Hz, H-2'/6'); 7,15 (*dd*, 2H, *J* = 7,97 Hz, H-3'/5'); 6,76 (*s*, 1H, H-3''); 12,12 (*s*, 1OH, OH-5''); 6,59 (*s*, 1H, H-6''); 7,32 (*s*, 1H, H-2'''); 6,97 (*d*, 1H, *J* = 8,1 Hz, H-5'''); 7,49 (*d*, 1H, *J* = 8,50 Hz, H-6'''); 4,85 (*d*, 1H, *J* = 7,13 Hz, H-1'''); 3,41 (*m*, 1H, H-2'''); 4,37 (*m*, 1H, H-3'''); 4,1 (*m*, 1H, H-4'''); 3,75 (*m*, 1H, H-5'''); 3,28 (*m*, 1H, H-6'''); 12,01 (*m*, OH, OH-7''')

RMN de <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz): 82,6 (CH, C-2); 49,1 (CH, C-3); 198,0 (C-OH, C-4); 162,0 (C-OH, C-5); 98,1 (CH, C-6); 164,0 (C=O, C-7); 97,6 (CH, C-8); 166,0 (C, C-9); 102,8 (C, C-10); 129,8 (C, C-1'); 128,6 (CH, C-2'/6'); 115,7 (CH, C-3'/5'); 170,6 (C, C-2''); 104,1 (CH, C-3''); 183,5 (C=O, C-4''); 158,3 (CH, C-5''); 98,2 (CH, C-6''); 161,1 (CO, C-7''); 83,5 (C, C-8''); 153,3 (C, C-9''); 104,6 (C, C-10''); 119,2 (C, C-1'''); 114,6 (CH, C-2'''); 145,4 (CO, C-3'''); 148,7 (CO, C-4'''); 117,2 (CH, C-5'''); 121,0 (CH, C-6'''); 100,1 (CH, C-1'''); 73,0 (CH, C-2'''); 76,9 (CH, C-3'''); 62,1 (CH, C-4'''); 77,1 (CH, C-5'''); 70,9 (CH, C-6''').

IV(KBr)v<sub>máx</sub>/cm<sup>-1</sup>: 3405 (O-H); 1601 e 1518 (C=C); 1261 (C-O); 1725 e 1643 (C=O); 836 (C-H).

UV (EtOH, 0.1 %) λ<sub>máx</sub> (log ε {cm<sup>-1</sup>. L.mol<sup>-1</sup>}): 204 nm (6,37), 257 nm (5,96), 274 nm (5,98), 291 nm (5,99), 343 nm (5,86), 207 nm (6,36), 221 nm (6,33), 281 nm (6,05), 358 nm (5,70), 400 nm (5,72), 206 nm (6,38), 220 nm (6,34), 282 nm (6,03), 297 nm (6,00), 355 nm (5,77), 392 nm (5,72), 204 nm (6,45), 254 nm (5,96), 274 nm (5,97), 289 nm (5,95), 338 nm (5,87), 207 nm (6,45), 265 nm (6,01) e 375 nm (5,75).

**LEOM-108** → Fukugetina-7''-O-β-D-glicosídeoFM: C<sub>36</sub>H<sub>10</sub>O<sub>15</sub>

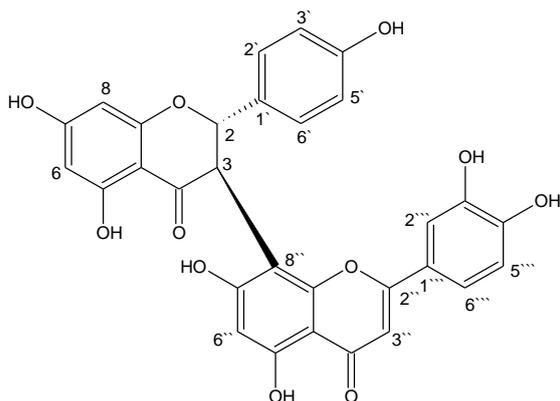
MM: 702,61 g/mol

RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): 5,89 (*d*, 1H, *J* = 11,95 Hz, H-2); 4,94 (*d*, 1H, *J* = 11,96 Hz, H-3); 12,09 (*s*, 1OH, OH-5); 5,04 (*d*, 1H, *J* = 6,48 Hz, H-6); 6,04 (*s*, 1H, *J* = 2,82 Hz, H-8); 7,19 (*dd*, 2H, *J* = 7,97 Hz, H-2'/6'); 6,58 (*dd*, 2H, *J* = 7,94 Hz, H-3'/5'); 6,74 (*s*, H, H-3''); 13,14 (*s*, 1OH, OH-5''); 6,55 (*s*, 1H, H-6''); 7,27 (*s*, 1H, H-2''); 6,93 (*d*, 1H, *J* = 8,28 Hz, H-5''); 7,46 (*d*, 1H, *J* = 8,50 Hz, H-6''); 4,81 (*d*, 1H, *J* = 7,17 Hz, H-1''); 3,35 (*m*, 1H, H-2''); 4,54 (*m*, 1H, H-3''); 3,72 (*m*, 1H, H-4''); 3,47 (*m*, 1H, H-5''); 3,09 (*m*, 1H, H-6''); 10,12 (*m*, OH, OH-7'')

RMN de <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz): 82,6 (CH, C-2); 49,1 (CH, C-3); 198,0 (OH, C-4); 162,0 (OH, C-5); 98,1 (CH, C-6); 164,0 (CO, C-7); 97,6 (CH, C-8); 166,0 (C, C-9); 102,8 (C, C-10); 129,8 (C, I-1'); 128,6 (CH, C-2'/6'); 115,7 (CH, C-3'/5'); 170,6 (C, C-2''); 104,1 (CH, C-3''); 183,5 (C=O, C-4''); 158,3 (CH, C-5''); 98,2 (CH, C-6''); 161,1 (CO, C-7''); 83,5 (C, C-8''); 153,3 (C, C-9''); 104,6 (C, C-10''); 119,2 (C, C-1'''); 114,6 (CH, C-2'''); 145,4 (CO, C-3'''); 148,7 (CO, C-4'''); 117,2 (CH, C-5'''); 121,0 (CH, C-6'''); 100,1 (CH, C-1'''); 73,0 (CH, C-2'''); 76,9 (CH, C-3'''); 62,1 (CH, C-4'''); 77,1 (CH, C-5'''); 70,9 (CH, C-6''').

IV(KBr)v<sub>máx</sub>/cm<sup>-1</sup>: 3374 (O-H); 2929 e 2858 (C-H); 1644 e 1600 (C=C); 1261 e 1167 (C-O); 1644 e 1600 (C=O); 1516, 1447 e 1300 (O-H).

UV(EtOH, 0.1 %)λ<sub>máx</sub> (log ε{cm<sup>-1</sup>. L.mol<sup>-1</sup>}): 223 nm (6,11), 280 nm (5,75), 331 nm (5,42), 399 nm (5,34), 224 nm (6,18), 278 nm (5,79), 423 nm (5,50), 224 nm (6,21), 279 nm (5,76), 357 nm (5,48), 223 nm (6,11), 277 nm (5,72), 421 nm (5,48), 224 nm (6,18), 277 nm (5,74) e 421 nm (5,48).

**LFOM-109** → Fukugetina

FM: C<sub>30</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>

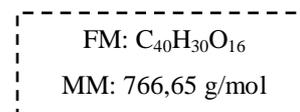
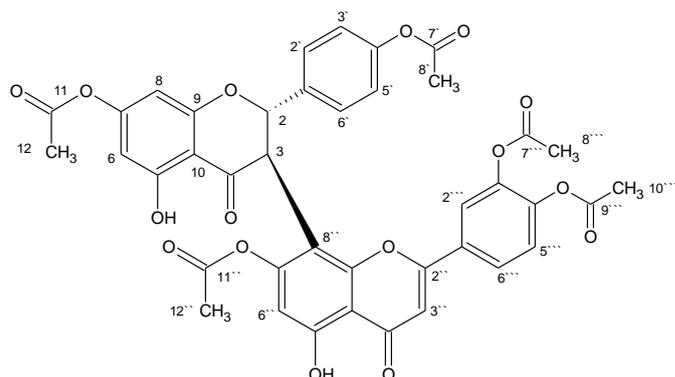
MM: 556,47 g/mol

RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): 5,87 (*d*, 1H, *J* = 12,4 Hz, H-2); 4,98 (*d*, 1H, *J* = 12,4 Hz, H-3); 12,6 (*s*, 1OH, OH-5); 6,03 (*d*, 1H, *J* = 5 Hz, H-6); 6,47 (*d*, 1H, *J* = 5 Hz, H-8); 6,53 (*dd*, 2H, *J* = 8,09 Hz, H-2'/6'); 7,23 (*dd*, 2H, *J* = 7 Hz, H-3'/5'); 6,35 (*s*, 1H, H-3''); 12,03 (*s*, 1OH, OH-5''); 6,40 (*s*, 1H, H-6''); 7,48 (*s*, 1H, H-2'''); 7,02 (*s*, 1H, H-5'''); 7,49 (*s*, 1H, H-6''').

RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): 82,2 (CH, C-2); 50,1 (CH, C-3); 197,2 (OH, C-4); 165,2 (OH, C-5); 97,5 (CH, C-6); 168,6 (CO, C-7); 94,4 (CH, C-8); 163,3 (C, C-9); 102,8 (C, C-10); 128,7 (C, C-1'); 115,7 (CH, C-2'/6'); 129,7 (CH, C-3'/5'); 164,1 (C, C-2''); 103,7 (CH, C-3''); 183,1 (C=O, C-4''); 161,9 (CH, C-5''); 99,2 (CH, C-6''); 164,1 (CO, C-7''); 101,8 (C, C-8''); 155,8 (C, C-9''); 104,6 (C, C-10''); 122,8 (C, C-1'''); 144,8 (CH, C-2'''); 147,4 (CO, C-3'''); 151,4 (CO, C-4'''); 116,5 (CH, C-5'''); 119,4 (CH, C-6''').

IV(KBr) ν<sub>máx</sub>/cm<sup>-1</sup>: 3288 (O-H); 2929 e 2858 (C-H); 1641 (C=O); 1600 e 1577 (C=C); 1257 (C-O); 835 (C-H do anel).

UV(EtOH, 0.1 %) λ<sub>máx</sub>(log ε{cm<sup>-1</sup>. L.mol<sup>-1</sup>}): 219 nm (5,69), 288 nm (5,45), 347 nm (5,26), 225 nm (6,16), 282 nm (5,65), 360 nm (5,13), 226 nm (6,27), 282 nm (5,69), 355 nm (5,20), 222 nm (5,94), 275 nm (5,49), 282 nm (5,48), 225 nm (6,19), 274 nm (5,63) e 327 nm (5,23).

**LFOM-110** → 7,4', 7'', 3''', 4''''-penta-*O*-acetil-fukugetina

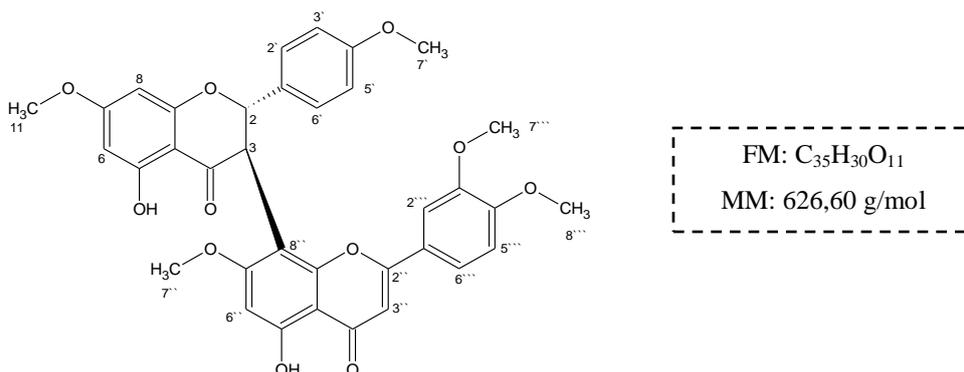
RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): 5,56 (*d*, 1H, *J* = 12 Hz, H-2); 4,82 (*d*, 1H, *J* = 12 Hz, H-3); 9,96 (*s*, 1OH, OH-5); 6,51 (*d*, 1H, *J* = 4 Hz, H-6); 6,08 (*s*, 1H, H-8); 6,85 (*dd*, 2H, *J* = 8 Hz, H-2'/6'); 7,03 (*dd*, 2H, *J* = 8 Hz, H-3'/5'); 6,66 (*s*, 1H, H-3''); 9,96 (*s*, 1OH, OH-5''); 6,62 (*s*, 1H, H-6''); 7,46 (*s*, 1H, H-2'''); 7,62 (*d*, 1H, *J* = 8 Hz, H-5'''); 7,73 (*d*, 1H, *J* = 8 Hz, H-6'''); 2,28 (*s*, 3H, H-12); 2,31 (*s*, 3H, H-12''); 2,33 (*s*, 3H, H-8'); 2,34 (*s*, 3H, H-8'''); 2,31 (*s*, 3H, H-10''').

RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): 81,5 (CH, C-2); 46,4 (CH, C-3); 195,9 (OH, C-4); 167,9 (OH, C-5); 108,7 (CH, C-6); 168,7 (CO, C-7); 100,3 (CH, C-8); 160,6 (C, C-9); 114,4 (C, C-10); 137,7 (C, C-1'); 128,3 (CH, C-2'/6'); 121,5 (CH, C-3'/5'); 168,8 (C=O, C-11); 20,8 (CH<sub>3</sub>, C-12); 163,6 (C, C-2''); 103,6 (CH, C-3''); 184,9 (C=O, C-4''); 156,1 (CH, C-5''); 109,1 (CH, C-6''); 159,3 (CO, C-7''); 108,7 (C, C-8''); 161,7 (C, C-9''); 111,8 (C, C-10''); 127,3 (C, C-1'''); 123,4 (CH, C-2'''); 144,7 (CO, C-3'''); 145,3 (CO, C-4'''); 126,7 (CH, C-5'''); 127,3 (CH, C-6'''); 163,4 (CO, C-11''); 21,4 (CH<sub>3</sub>, C-12''); 168,8 (CO, C-7'''); 20,8 (CH<sub>3</sub>, C-8'''); 168,3 (CO, C-9'''); 21,3 (CH<sub>3</sub>, C-10''').

IV(KBr)v<sub>máx</sub>/cm<sup>-1</sup>: 3022 e 2935 (C-H do anel); 1710 (C=O de éster); 1645 e 1614 (C=O); 1504 (C=C); 1425 e 1369 (CH<sub>3</sub>); 1259 C(=O)-O; 1193 (O-C=C); 846 (C-H do anel).

UV(EtOH, 0,1 %)λ<sub>máx</sub>(log ε{cm<sup>-1</sup>. L.mol<sup>-1</sup>}): 202 nm (6,56), 262 nm (6,09), 302 nm (5,98), 200 nm (6,58), 262 nm (6,07), 302 nm (6,00), 200 nm (6,58), 262 nm (6,07), 283 nm (5,98), 215 nm (6,58), 263 nm (6,18), 263 nm (6,17) e 497 nm (6,58).

**LFOM-111** → 7,4',7'', 3''',4''''-penta-*O*-metil-fukugetina

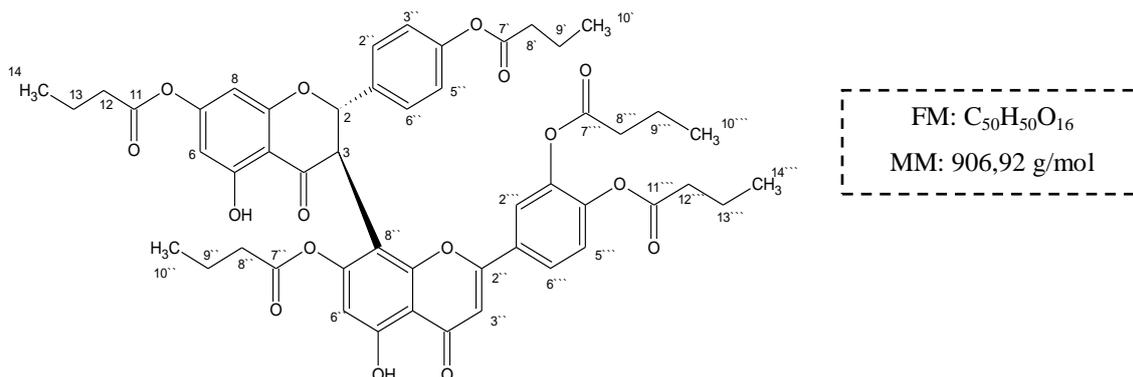


RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): 5,78 (*d*, 1H, *J* = 12 Hz, H-2); 4,79 (*d*, 1H, *J* = 12 Hz, H-3); 12,28 (*s*, 1OH, OH-5); 6,17 (*d*, 1H, *J* = 4 Hz, H-6); 6,12 (*s*, 1H, H-8); 7,12 (*dd*, 2H, *J* = 8 Hz, H-2'/6'); 6,77 (*dd*, 2H, *J* = 8 Hz, H-3'/5'); 3,77 (*s*, 3H, H-11); 6,8 (*s*, 1H, H-3''); 12,14 (*s*, 1OH, OH-5''); 6,42 (*s*, 1H, H-6''); 7,4 (*s*, 1H, H-2'''); 7,02 (*d*, 1H, *J* = 8, H-5'''); 7,41 (*d*, 1H, *J* = 12, H-6'''); 3,77 (*s*, 3H, H-11''); 3,75 (*s*, 3H, H-7'); 3,82 (*s*, 3H, H-7''); 3,87 (*s*, 2H, H-8''').

RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): 81,7 (CH, C-2); 54,9 (CH, C-3); 189,9 (OH, C-4); 158,1 (OH, C-5); 95,0 (CH, C-6); 167,9 (CO, C-7); 94,3 (CH, C-8); 167,7 (C, C-9); 109,8 (C, C-10); 132,1 (C, C-1'); 128,3 (CH, C-2'/6'); 113,6 (CH, C-3'/5'); 55,8 (CH<sub>3</sub>, C-11); 164,2 (C, C-2''); 113,4 (CH, C-3''); 175,9 (C=O, C-4''); 149,2 (CH, C-5''); 91,6 (CH, C-6''); 164,8 (CO, C-7''); 104,4 (C, C-8''); 108,8 (C, C-9''); 105,1 (C, C-10''); 121,5 (C, C-1'''); 114,4 (CH, C-2'''); 161,4 (CO, C-3'''); 162,2 (CO, C-4'''); 110,9 (CH, C-5'''); 120,3 (CH, C-6'''); 55,2 (CH<sub>3</sub>, C-7'); 165,0 (CH<sub>3</sub>, IC-11''); 148,1 (CH<sub>3</sub>, C-7''); 55,9 (CH<sub>3</sub>, C-8''').

IV(KBr) ν<sub>máx</sub>/cm<sup>-1</sup>: 3454 (OH); 2962, 2929 e 2839 (CH<sub>3</sub>); 1498 -1440 e 1375 - 1327 (CH<sub>3</sub>) 1645, 1612 e 1591 (C=C); 823 - 744 (CH do anel).

UV(EtOH, 0.1 %) λ<sub>máx</sub>(log ε{cm<sup>-1</sup> · L·mol<sup>-1</sup>}): 229 nm (6,42), 252 nm (6,02), 286 nm (6,20), 227 nm (6,49), 284 nm (6,25), 346 nm (5,96), 226 nm (6,49), 283 nm (6,25), 346 nm (5,96), 229 nm (6,49), 285 nm (6,22), 340 nm (5,96), 228 nm (6,48), 285 nm (6,20) e 339 nm (5,95).

**LFOM-112** → 7,4',7'',3''',4''''-penta-*O*-butanoil-fukugetina

RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): 5,21 (*d*, 1H, *J* = 15 Hz, H-2); 4,57 (*d*, 1H, *J* = 10 Hz, H-3); 12,58 (*s*, 1OH, OH-5); 6,81 (*d*, 1H, *J* = 5 Hz, H-6); 6,3 (*s*, 1H, H-8); 6,71 (*dd*, 2H, *J* = 5 Hz, H-2'/6'); 6,11 (*dd*, 2H, *J* = 10 Hz, H-3'/5'); 2,25 (*t*, 2H, H-12); 1,71 (*sex*, 2H, H-13); 0,84 (*t*, 3H, H-14); 2,48 (*t*, 2H, H-8''); 1,61 (*sex*, 2H, H-9''); 0,89 (*t*, 3H, H-10''); 7,46 (*s*, 1H, H-3''); 11,87 (*s*, 1OH, OH-5''); 6,98 (*s*, 1H, H-6''); 7,46 (*s*, 1H, H-2'''); 7,03 (*s*, 1H, H-5'''); 7,40 (*s*, 1H, H-6'''); 2,24 (*t*, 2H, H-12''); 1,56 (*sex*, 2H, H-13''); 0,89 (*t*, 3H, H-14''); 2,48 (*t*, 2H, H-8'''); 1,61 (*sex*, 2H, H-9'''); 0,89 (*t*, 3H, H-10'''); 2,24 (*t*, 2H, H-12'''); 1,58 (*sex*, 2H, H-13'''); 0,89 (*t*, 3H, H-14''').

RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): 82,1 (CH, C-2); 50,8 (CH, C-3); 196,4 (OH, C-4); 163,8 (OH, C-5); 122,8 (CH, C-6); 171,4 (CO, C-7); 106,6 (CH, C-8); 163,9 (C, C-9); 107,3 (C, C-10); 134,3 (C, C-1'); 128,7 (CH, C-2'/6'); 125,1 (CH, C-3'/5'); 158,8 (C=O, C-11); 36,3 (CH<sub>2</sub>, C-12); 18,3 (CH<sub>2</sub>, C-13); 13,5 (CH<sub>3</sub>, C-14); 158,8 (C=O, C-7); 36,2 (CH<sub>2</sub>, C-8''); 18,3 (CH<sub>2</sub>, C-9''); 13,5 (CH<sub>3</sub>, C-10''); 170,6 (C, C-2''); 103,9 (CH, C-3''); 192,5 (C=O, C-4''); 156,7 (CH, C-5''); 105,6 (CH, C-6''); 156,7 (CO, C-7''); 114,4 (C, C-8''); 152,9 (C, C-9''); 123,3 (C, C-10''); 127,7 (C, C-1''); 124,4 (CH, C-2''); 142,3 (CO, C-3''); 138,3 (CO, C-4''); 125,3 (CH, C-5''); 127,5 (CH, C-6''); 170,7 (C=O, C-7''); 36,2 (CH<sub>2</sub>, C-11''); 18,3 (CH<sub>2</sub>, C-12''); 13,5 (CH<sub>3</sub>, C-13''); 142,9 (CO, C-3'''); 170,9 (C=O, C-7'''); 36,2 (CH<sub>2</sub>, C-8'''); 18,3 (CH<sub>2</sub>, C-9'''); 13,5 (CH<sub>3</sub>, C-10'''); 138,8 (CO, C-11'''); 182,6 (C=O, C-12'''); 36,2 (CH<sub>2</sub>, C-13'''); 18,3 (CH<sub>2</sub>, C-14'''); 13,5 (CH<sub>3</sub>, C-15''').

IV(KBr)<sub>v</sub>max/cm<sup>-1</sup>: 3091 (C-H anel); 2964, 2929 e 2875 (C-H); 1770 (C=O); 1689 - 1616 (C=C); 1426 e 1363 (CH<sub>3</sub>); 1257 (C(=O)-O); 1126 (O-C=C).

UV(EtOH,0.1 %)  $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$ (log  $\epsilon$ { $\text{cm}^{-1}$ . L.mol $^{-1}$ }): 204 nm (5,86), 224 nm (5,95), 277 nm (5,71), 328 nm (5,28),206 nm (5,98), 224 nm (6,09), 281 nm (5,76), 331 nm (5,40), 204 nm (6,05), 225 nm (6,11), 281 nm (5,76), 331 nm (5,39), 206 nm (5,94), 223 nm (6,00), 276 nm (5,72), 330 nm (5,32), 205 nm (6,03), 224 nm (6,08), 275 nm (5,75) e 332 nm (5,29).