

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

**Modificação estrutural de compostos fenólicos de origem natural e
avaliação de suas atividades biológicas**

FLÁVIA CORVELLO DA SILVA

PORTO ALEGRE, 2012.

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

**Modificação estrutural de compostos fenólicos de origem natural e
avaliação de suas atividades biológicas**

Dissertação apresentada por **Flávia
Corvello da Silva** para obtenção do GRAU DE
MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof^a. Dr.^a Gilsane L. von Poser
Co-orientadora: Prof^a. Dr.^a Vera L. Eifler-Lima

Porto Alegre, 2012.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 25 de setembro de 2012, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Daniel Fábio Kawano
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Marilise Brittes Rott
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Miriam Andres Apel
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Corvello da Silva, Flávia
Modificação estrutural de compostos fenólicos de
origem natural e avaliação de suas atividades
biológicas / Flávia Corvello da Silva. -- 2012.
85 f.

Orientadora: Gilsane Lino von Poser.
Coorientadora: Vera Lucia Eifler-Lima.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2012.

1. Farmacognosia. 2. Semi-síntese. 3. Compostos
fenólicos. 4. Protozoários. 5. Antioxidante. I. Lino
von Poser, Gilsane, orient. II. Eifler-Lima, Vera
Lucia, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido nos laboratório de Farmacognosia e Síntese Orgânica Medicinal do Departamento de Produção de Matéria Prima da Faculdade de Farmácia da UFRGS; e com a colaboração do Grupo de Química Medicinal da Udelar, Montivedéo, e Grupo de Pesquisa em Immunoparasitologia da Unisul, Tubarão. Este trabalho foi financiado pela CAPES, CNPQ e FAPERGS.

A autora recebeu bolsa de estudos da CAPES.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me conceder o maior de todos os presentes: a vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, pela excelência no ensino. Às pessoas que colaboraram para que este trabalho fosse possível, Prof. Hugo Cerecetto, Prof. José Maria Montserrat, Prof. Solange Garcia e Prof. Ruy Beck.

As minhas orientadoras, Prof. Vera e Prof. Gilsane, por me darem esta oportunidade tão sonhada de fazer o mestrado. Obrigada por me ensinarem que a maior parte do aprendizado é paciência e persistência. Agradeço também aos meus colegas dos laboratórios de Farmacognosia e Síntese Orgânica Medicinal pela amizade e conselhos, tanto de trabalho como pessoais. Agradeço pela disponibilidade em me ajudar e ensinar sempre que possível.

A minha família, que é minha base e referência, pelo amor e incentivo incondicional. Sem vocês nada disto seria possível. Amo muito vocês!

Ao Mateus, também responsável por eu estar aqui, pelo amor, incentivo e atenção constantes. Te muito e fico muito feliz por você ter dividido este sonho comigo!

As minhas amigas que estiveram comigo também me incentivando e compartilhando dúvidas e sonhos. Obrigada pela amizade e por serem estas pessoas maravilhosas!

RESUMO

Produtos naturais têm fornecido fármacos para uma grande variedade de doenças, como as parasitoses, que afetam aproximadamente 1 bilhão de pessoas. Os compostos fenólicos como a curcumina, as cumarinas e os benzopiranos, têm atraído considerável interesse visto que são reconhecidos pela ampla gama de atividades biológicas. Neste trabalho, foi realizada a hibridização molecular entre a curcumina e cumarina através da reação de Pechmann, que mostrou melhores resultados em aquecimento convencional que micro-ondas (90% de rendimento, 75 °C). O híbrido obtido, LASOM 135, apresentou forte atividade antioxidante frente a radicais peroxila ($IC_{50} < 0,5 \mu M$), mostrando que as duas porções farmacofóricas contribuíram para esta atividade biológica. Além disto, LASOM 135 apresentou atividade tripanomicida ($IC_{50} = 11,8 \mu M$). Os benzopiranos benzopyrans HP1 (6-isobutiril-5,7-dimetoxi-2,2-dimetil-benzopirano), HP2 (7-hidroxi-6-isobutiril-5-metoxi-2,2-dimetil-benzopirano) e HP3 (5-hidroxi-6-isobutiril-7-metoxi-2,2-dimetil-benzopirano), encontrados até o momento somente na planta nativa do Rio Grande do Sul *Hypericum polyanthemum* (Guttiferae), demonstram várias atividades biológicas, despertando considerável interesse no potencial terapêutico destas moléculas. Assim sendo, neste trabalho foi realizada a modificação estrutural de HP1, HP2 e HP3 através de aminação redutiva, se obtendo três derivados aminados inéditos com baixo a médio rendimento. Também se avaliou a atividade contra epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* dos três benzopiranos, onde se elegeu HP2 como o protótipo para obtenção de novas moléculas tripanomicidas. Além disso, a atividade larvicida em *Aedes aegypti* demonstrou que os benzopiranos HP1, HP2 e HP3 são os responsáveis pela atividade larvicida do extrato *n*-hexano de *H. polyanthemum*. Tanto HP1 como o extrato demonstraram atividade reguladora do crescimento.

Palavras-chave: *Hypericum polyanthemum*, benzopiranos, curcumina, cumarina, aminação redutiva, reação de Pechmann, micro-ondas, antioxidante, *Trypanosoma cruzi*, *Aedes aegypti*.

Structural modification of natural phenolic compounds and biological activities

Historically, natural products have been supplied drugs for a wide range of diseases, like the parasitic ones, which affect about 1 billion people. In this way, the phenolic compounds as curcumin, coumarins and benzopyrans, have attracted attention since they are recognized by their wide range of activities. In this study the molecular hybridization was performed between curcumin and coumarins through Pechmann reaction in conventional heating since it showed better results than the microwave one (90% yield, 75°C). The new hybrid, LASOM 135, presented strong antioxidant activity against peroxy radicals ($IC_{50} < 0.5 \mu M$) indicating a synergism of the curcumin and coumarin pharmacophoric moieties. Besides, LASOM 135 presented trypanocide activity ($IC_{50} = 11.8 \mu M$). The benzopyrans HP1 (6-isobutyryl-5,7-dimethoxy-2,2-dimethyl-benzopyran), HP2 (7-hydroxy-6-isobutyryl-5-methoxy-2,2-dimethyl-benzopyran) and HP3 (5-hydroxy-6-isobutyryl-7-methoxy-2,2-dimethyl-benzopyran) are found until this moment only in the native plant to Rio Grande do Sul *Hypericum polyanthemum* (Guttiferae), and showed many biologic activities. Thus, in this study are described the achievement of three amino derivatives by structural modification of these molecules through reductive amination with a low to medium yield. The activity against epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* was also evaluated by HP1, HP2 and HP3 and HP2 was elected as a hit to new trypanocide compounds. Besides, the larvicidal activity in *Aedes aegypti* was evaluated for the three benzopyrans. The benzopyrans demonstrated to be the responsible for the larvicidal activity of the extract. Both the HP1 as the extract demonstrated growth regulatory activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Algumas cumarinas e ácido <i>p</i> -hidróxi-cinâmico.	21
Figura 2. Desenho esquemático da reação de (a) Pechmann, (b) Perkin e (c) Knoevenagel.	21
Figura 3. Principais tipos de radicais gerados <i>in vitro</i> (Silva et al., 1999, adaptado).	23
Figura 4. Esquema geral da reação de Pechmann a partir da curcumina	28
Figura 5. Deslocamentos químicos de RMN H ¹ (a) e DEPT C ¹³ (b) (ppm) de LASOM 135 (DMSO, 300 MHz).	32
Figura 6. Atividade antioxidante frente a radicais peroxil da esculetina, curcumina e LASOM 135. Os resultados são representativos para os três experimentos (média ± SEM).	33
Figura 7. Perfil antioxidante de LASOM 135.	33
Figura 8. Percentual de inibição em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> a 25 µM.	34
Figura 9. Alguns benzopiranos com atividade antiprotozoária.	37
Figura 10. Benzopiranos isolados de <i>H. polyanthemum</i> .	39
Figura 11. Mecanismo esquemático da reação de aminação redutiva.	41
Figura 12. Pontos de fusão e deslocamentos químicos de RMN H ¹ (CDCl ₃) para os benzopiranos isolados de <i>H. polyanthemum</i> .	45
Figura 13. Produtos obtidos por aminação redutiva e seus respectivos deslocamentos químicos de RMN H ¹ , CDCl ₃ , LASOM 138 em 300 MHz, LASOM 170 e LASOM 137 em 60 MHz.	47
Figura 14. Percentual de inibição dos compostos testados em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABAP - 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropano);

ACAP – Capacidade antioxidante contra radicais peroxila;

DCF – dicloro-fluoresceína;

DEPT – Incremento sem distorção por transferência de polarização;

DMSO – Dimetilsulfóxido;

H₂DCF - 2',7'-dicloro-hidro-fluoresceína;

HMQC – Correlação Heteronuclear de quantum múltiplo;

HEPES - ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etano-sulfônico;

HP1 – 6-isobutiril-5,7-dimetoxi-2,2-dimetil-benzopirano;

HP2 – 7-hidroxi-6-isobutiril-5-metoxi-2,2-dimetil-benzopirano;

HP3 – 5-hidroxi-6-isobutiril-7-metoxi-2,2-dimetil-benzopirano;

p – nível de significância;

ROS – Espécies reativas de oxigênio;

v/v – relação volume/volume

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	12
CAPÍTULO 1: Síntese do novo híbrido curcumina-cumarina e atividade antioxidante e anti-<i>Trypanosoma cruzi</i>	16
INTRODUÇÃO.....	17
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
Curcumina e atividades biológicas.....	18
Cumarinas.....	20
Micro-ondas.....	22
Atividade antioxidante.....	23
<i>Trypanosoma cruzi</i>	24
OBJETIVOS.....	27
METODOLOGIA.....	28
Síntese do híbrido curcumina-cumarina (2) LASOM 135.....	28
Avaliação da atividade antioxidante.....	29
Atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	30
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
Síntese do híbrido curcumina-cumarina LASOM 135.....	31
Avaliação da atividade antioxidante.....	32
Atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	35
CAPÍTULO 2: Modificação estrutural de benzopiranos isolados de <i>Hypericum polyanthemum</i> Klotzsch ex Reichardt	36
INTRODUÇÃO.....	37
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	38
<i>Hypericum polyanthemum</i> e benzopiranos.....	38
Aminação redutiva.....	40
OBJETIVOS.....	41
METODOLOGIA.....	41
Isolamento dos benzopiranos a partir de <i>H. polyanthemum</i>	41
Aminação redutiva dos benzopiranos de <i>H. polyanthemum</i>	42

Avaliação da atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> dos benzopiranos isolados de <i>H. polyanthemum</i>	43
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
Isolamento e caracterização dos benzopiranos de <i>H. polyanthemum</i>	44
Aminação redutiva.....	45
Atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	48
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	49

CAPÍTULO 3: Avaliação da atividade larvicida do extrato de <i>H. polyanthemum</i> (Guttiferae) e seus compostos majoritários contra <i>Aedes aegypti</i> (Culicidae).....	50
DISCUSSÃO GERAL.....	54
CONCLUSÕES GERAIS.....	58
REFERÊNCIAS.....	60
ANEXOS.....	70

Historicamente, produtos naturais têm fornecido fármacos para uma grande variedade de doenças. Nos últimos 30 anos, dos novos fármacos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*), mais de 50% são de origem natural, derivados ou inspirados em moléculas de origem natural (Newman e Cragg, 2012).

Aproximadamente 1 bilhão de pessoas estão em risco de infecção por doenças parasitárias, sendo que 11 milhões de pessoas são afetadas pela doença de Chagas (WHO, 2010). A busca por novos agentes terapêuticos vêm sendo constante, pois os medicamentos presentes no mercado para o tratamento de parasitoses muitas vezes são ineficazes. Neste sentido, os compostos fenólicos têm atraído considerável interesse visto que são reconhecidos pela ampla gama de atividades biológicas que apresentam. Entre os representantes deste grupo de compostos estão os polifenóis, como a curcumina, as cumarinas e os benzopiranos, consolidados como moléculas com atividade antioxidante e antiparasitária (Marcucci et al., 2001; Leitão et al., 2004; Narender et al., 2004; Kaur et al., 2009; Severino et al., 2009; Pierson et al., 2010; Cargnin, 2011; Khalil et al., 2012; Nagajyothi et al., 2012; Vianna et al., 2012).

A curcumina, encontrada nas raízes de *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae), é uma molécula privilegiada, pois apresenta uma ampla variedade de atividades biológicas, como antioxidante (Masuda et al., 1999; Banerjee et al., 2008; Khalil et al., 2012) e anti-*T. cruzi* (Nagajyothi et al., 2012). Além disso, apresenta baixo peso molecular e baixa toxicidade, demonstrando ser uma molécula candidata a se tornar um fármaco. As cumarinas também são consideradas privilegiadas, pois como a curcumina, apresentam muitas atividades biológicas comprovadas, bem como anti-*T. brucei* (Leitão et al., 2004) e antioxidante (Vianna et al., 2012). Assim sendo, se planejou a hibridização molecular entre a curcumina e a cumarina a fim de avaliar a influência nas atividades antioxidante e antiparasitária.

Os benzopiranos HP1, HP2 e HP3 isolados de *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt, substâncias majoritárias do extrato *n*-hexano desta planta nativa do Rio Grande do Sul, demonstraram as atividades anti-*Trichomonas vaginalis* (Cargnin, 2011), antinociceptiva (Haas et al., 2010), antibacteriana

(Dall'agnol et al., 2005), acaricida do extrato hexano (Ribeiro et al., 2007), antiproliferativa (Ferraz et al., 2005; Grivicich et al., 2008) e inibidora da monoamino oxidase (Gnerre et al., 2001). Devido, então, às promissoras atividades biológicas apresentadas por estas substâncias, planejou-se a modificação estrutural através de aminação redutiva já que permite a geração de diversidade química, além de sais, o que é importante pois aumentaria a solubilidade destes compostos nos meios de teste *in vitro*.

Além disso, os benzopiranos de *H. polyanthemum* são similares estruturalmente aos precocenos, moléculas com atividades inseticida e reguladora do crescimento (Ayoade, 1996). A dengue é um problema de saúde pública crescente visto que já é relato resistência do vetor *Aedes aegypti* contra os inseticidas correntes. Dessa forma, se avaliou a atividade larvicida dos benzopiranos e extrato *n*-hexano de *H. polyanthemum* e reguladora da molécula mais ativa em *A. aegypti*.

Os objetivos específicos incluem:

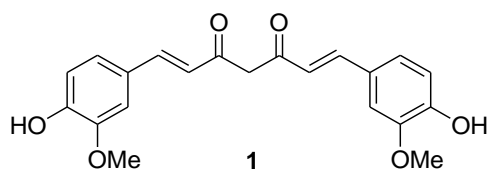
- ✓ Sintetizar um híbrido curcumina-cumarina e avaliar a influência do híbrido na atividade antioxidante e anti-*T. cruzi* assim como comparar a síntese em micro-ondas e aquecimento convencional;
- ✓ Isolar benzopiranos os HP1, HP2 e HP3 de *H. polyanthemum* e obter derivados aminados;
- ✓ Avaliar a atividade anti-*T. cruzi* dos benzopiranos de *H. polyanthemum*;
- ✓ Avaliar a atividade larvicida e reguladora do crescimento em *A. aegypti* dos benzopiranos e extrato *n*-hexano de *H. polyanthemum*.

Esta dissertação está dividida na forma de capítulos, os quais são na sequencia amplamente considerados em uma discussão geral.

CAPÍTULO 1: Síntese do novo híbrido curcumina-cumarina e atividade antioxidante e anti-*Trypanosoma cruzi*

INTRODUÇÃO

A curcumina (**1**) é encontrada nas raízes de *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae), planta nativa do sul da Ásia, e é utilizada como condimento e na medicina tradicional para diversas desordens (Ammon e Wahl, 1991; Adams et al., 2004). Além disso, estudos comprovaram seu amplo espectro de atividades biológicas (Babu et al., 1993; Barthelemy et al., 1998; Ishida et al., 2002; Adams et al., 2004; Bisht et al., 2010; González-Salazar et al., 2011; Pandey et al., 2011; Khalil et al., 2012).



A hibridização molecular é uma ferramenta útil no desenvolvimento de novos fármacos. É baseada na combinação de porções farmacofóricas de diferentes substâncias bioativas a fim de produzir um novo híbrido com afinidade e eficácia aumentadas quando comparadas com os farmacóforos isolados (Viegas-Junior et al., 2007). Além disto, o híbrido pode apresentar seletividade modificada, diferente ou ainda modos de ação diferentes com menor incidência de efeitos adversos. As cumarinas também apresentam amplo espectro de atividades farmacológicas (Sabry et al., 2011; Kontogiorgis et al., 2012), inclusive antioxidante (Vianna et al., 2012). Contudo, não são descritos na literatura derivados cumarínicos de curcumina, o que configuraria um híbrido molecular.

Cumarinas podem ser sintetizadas através de diversos protocolos (Pechmann, 1884; Perkin, 1877; Brufola et al., 1996; Garazd et al., 2005), entre os quais está o protocolo elaborado por Pechmann, que pode ser desenvolvido em aquecimento convencional ou micro-ondas (Frère et al., 2001; Tyagi et al., 2007).

Existem vários métodos para avaliação da atividade antioxidante, dentre os quais está o que avalia esta atividade contra radicais peroxila (ACAP), relacionados com a peroxidação lipídica (Gyçin, 2012). A atividade antioxidante é relevante visto

que o estresse oxidativo está relacionado a várias enfermidades (Bisht et al., 2010; González-Salazar et al., 2011; Pocernich et al., 2011; Lee et al., 2012).

Alguns autores relatam que a atividade antioxidante pode estar relacionada e contribuir com a atividade antiprotozoária de compostos e extratos de plantas (Paveto et al., 2004; Orhan et al., 2012). Um protozoário de grande importância é o *Trypanosoma cruzi*, agente causador da Doença de Chagas, que acomete milhões de pessoas na América Latina. Os tratamentos existentes para esta doença são insatisfatórios e não são eficazes na fase crônica da doença, fazendo-se necessária a descoberta de novos agentes terapêuticos. Há relatos desta atividade tanto para curcumina (Haddad et al., 2011; Nagajyothi et al., 2012) como para cumarinas (Camacho et al., 2004; Leitão et al., 2004; Oliaro-Bosso et al., 2007).

Assim sendo, este capítulo trata da síntese de um novo híbrido curcumina-cumarina, utilizando o protocolo desenvolvido por Pechmann, por aquecimento em micro-ondas e convencional. Também, avaliará a atividade antioxidante e anti-*T. cruzi* do novo híbrido, LASOM 135.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Curcumina e atividades biológicas

A curcumina (1) é encontrada nas raízes de *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae), nativa do sul da Ásia, e é utilizada como condimento e na medicina tradicional para desordens do fígado, indigestão, doenças do trato urinário, artrite reumatóide e picadas de insetos (Ammon e Wahl, 1991; Adams et al., 2004). Foi isolada pela primeira vez em 1870, sendo sua estrutura determinada em 1910 e subsequentemente obtida por síntese. Entretanto, os rendimentos dos protocolos desenvolvidos foram muito baixos (Pabon, 1964; Babu et al., 1994), sendo ainda extraída de sua fonte natural para comercialização.

Estudos comprovaram seus efeitos protetores no sistema cardiovascular (González-Salazar et al., 2011) e as atividades antitumoral (Ishida et al., 2002; Adams et al., 2004; Liang et al., 2009), antirretroviral (Barthelemy et al., 1998), antifúngica (Khalil et al., 2012), antibacteriana (Kumar et al., 2001; Pandey et al., 2011), anti-*Trypanosoma cruzi* (Haddad et al., 2011; Nagajyothi et al., 2012), neuroprotetora (Douna et al., 2012), antioxidante, anti-inflamatória e citoprotetora (Bisht et al., 2010; Douna et al., 2012; Khalil et al., 2012). Devido às diversas atividades biológicas apresentadas pela curcumina, ao baixo peso molecular e à baixa toxicidade, esta molécula pode ser considerada uma candidata para se tornar um fármaco. Entretanto, trabalhos têm relatado que seu uso *in vivo* é limitado visto que apresenta baixa potência e baixa absorção oral, além da instabilidade no meio biológico e rápida metabolização, sendo que os sítios de degradação por hidrólise e oxidação são os grupos fenólicos e a porção 1,3-dicarbonil (Sharma et al., 2005; Haddad et al., 2011). Estratégias para melhorar a biodisponibilidade e estabilidade da curcumina são a proteção da ionização dos grupos fenólicos e eliminação da delocalização eletrônica da estrutura (Wichitnithad et al., 2011).

Estruturalmente, a curcumina consiste em dois fenóis *orto*-metoxilados e uma porção β -dicetona, todas conjugadas. A captura de radicais ocorre primeiramente na porção fenol, como em outros compostos fenólicos antioxidantes, formando radicais de curcumina, que podem reagir consigo mesmo, ou outros radicais, para gerar produtos poliméricos estáveis como vanilina, ácido ferúlico e dímeros de curcumina, que também são capazes de capturar radicais (Masuda et al., 1999). A atividade antioxidante depende principalmente da estabilização do radical fenóxi formado para o qual a porção *para*-hidróxi é essencial. Substituintes eletrodoadores em *orto*, como metoxilas, e o aumento da extensão de conjugação também ajudam na estabilização, aumentando a atividade antioxidante (Youssef e El-Sherbeny, 2005).

A curcumina possui atividade antioxidante, como já descrito no parágrafo anterior, e pró-oxidante. Estudos revelaram que a curcumina induz formação de ROS e apoptose em células cancerígenas. Essa formação induzida pela curcumina foi suprimida pela adição de acetilcisteína, substrato para glutatona peroxidase e

transferase, entre outras, bem como antioxidante, indicando que curcumina é uma molécula com atividade antitumoral pela geração de ROS (Fujisawa et al., 2005).

Há relatos da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* tanto para curcumina (Haddad et al., 2011; Nagajyothi et al., 2012) como para cumarinas (Camacho et al., 2004; Leitão et al., 2004; Oliaro-Bosso et al., 2007). Nagajyothi e colaboradores (2012) descrevem que o tratamento com curcumina reduziu a parasitemia e o parasitismo do tecido cardíaco em camundongos, assim como reduziu a infiltração de macrófagos e a inflamação tanto no coração como no fígado, aumentando a sobrevivência para 100%, enquanto nos camundongos não tratados a taxa era de 60%. Isto ocorre provavelmente devido à inibição da transcrição do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLr), também utilizado pelo protozoário na invasão de células do hospedeiro definitivo (mamíferos), além de modular as consequências de sua infecção pelos efeitos protetores ao tecido cardíaco. Os autores também sugerem que tanto a curcumina como derivados podem ser fármacos adequados para o tratamento da doença de Chagas.

Há vários relatos na literatura sobre a obtenção de derivados da curcumina, principalmente com modificações na porção β -di-cetona e no padrão de substituição no anel arila (Nurfina et al., 1997; Barthelemy et al., 1998; Kumar et al., 2001; Ishida et al., 2002; Adams et al., 2004; Youssef e El-Sherbeny, 2005; Lin et al., 2006; Liang et al., 2009; Pandey et al., 2011; Zhang et al., 2011; Sahu et al., 2012). Contudo, não são descritos na literatura derivados cumarínicos de curcumina, o que configuraria um híbrido molecular.

Cumarinas

Cumarinas são lactonas do ácido *o*-hidróxi-cinâmico (Figura 1) que apresentam um espectro ultravioleta (UV) característico, sendo facilmente observadas por cromatografia em camada delgada (Simões et al., 2003).

São encontradas em diversos produtos como aromatizantes, e ocorrem em plantas, fungos, bactérias e algumas espécies de animais (Nijssen, 1996). São

relatadas na literatura várias atividades biológicas para estas moléculas e seus derivados, como as atividades anticoagulante (Di et al., 2004), antioxidante (Hoult e Payá, 1996; Vianna et al., 2012), anti-inflamatória (Kontogiorgis e Hadjipavlou-Litina, 2005), antimicrobiana, anti-HIV (Bedoya et al., 2005), tripanomicida (Camacho et al., 2004; Leitão et al., 2004), leishmanicida (Pierson et al., 2010), anti-plasmódica (Camacho et al., 2004; Kaur et al., 2009), antitumoral (Francisco et al., 2012), inibidora da acetilcolinesterase (Changwong et al., 2012) e inibidora da agregação β -amilóide (Piazzini et al., 2008).

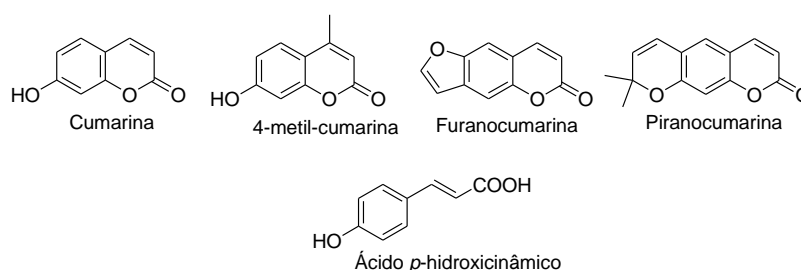


Figura 1. Algumas cumarinas e ácido *p*-hidróxi-cinâmico.

Estas moléculas podem ser sintetizadas através de diversos protocolos como Pechmann (Pechmann, 1884), Perkin (Perkin, 1877) e Knoevenagel (Brufola et al., 1996), entre outros (Figura 2). O protocolo desenvolvido por Pechmann permite a síntese de 4-metil-cumarinas pela condensação de um fenol com um β -ceto éster em presença de ácido de Lewis ou Brønsted (Pechmann, 1884; Garazd et al., 2005). Além disso, é relatada na literatura a síntese de cumarinas assistida por micro-ondas (Frère et al., 2001; Tyagi et al., 2007).

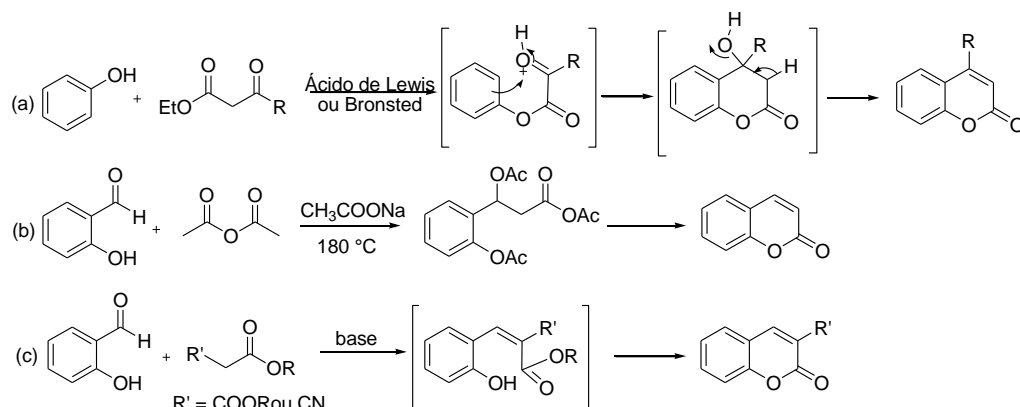


Figura 2. Desenho esquemático da reação de (a) Pechmann, (b) Perkin e (c) Knoevenagel.

Micro-ondas

A síntese assistida por micro-ondas oferece várias vantagens frente ao de aquecimento convencional (Bassyouni et al., 2012):

- Controle da energia empregada;
- Pouco volume de solvente e de resíduos;
- Menores tempos de reação;
- Menor número de subprodutos e;
- Maior rendimento.

Além disso, muitas reações que não ocorrem no método convencional, ocorrem em síntese por micro-ondas, uma vez que há rápido fornecimento de energia. Estas vantagens podem ser explicadas pelo rápido aquecimento a altas temperaturas limitando processos como a segregação de impurezas já que assim fornece energia suficiente para ultrapassar a barreira de energia de ativação da reação mais rapidamente que o método de aquecimento convencional. Ainda, o aquecimento por micro-ondas ocorre a nível molecular, ao contrário do método de aquecimento convencional, que ocorre através de correntes de convecção e condução de calor (Tierney e Lidström, 2005; Bassyouni et al., 2012).

Este aquecimento a nível molecular faz com que a molécula comece a girar, que depende de suas características dielétricas, pois a mesma tende a alinhar seu dipolo com o campo eletromagnético criado no reator, sendo o aquecimento consequência desta agitação. Assim, uma molécula se choca com a outra, e a reação ocorre. No aquecimento convencional, as moléculas se chocam pelo aumento de temperatura no meio que leva estas moléculas a agitação, que ocorre por condução e convecção de calor, como já citado (de la Hoz et al., 2005).

Atividade antioxidante

A atividade antioxidante é relevante visto que o estresse oxidativo está relacionado a várias enfermidades como as doenças neurodegenerativas (Pocernich et al., 2011), doenças cardiovasculares (González-Salazar et al., 2011; Lee et al., 2012) e processos inflamatórios (Bisht et al., 2010), entre outras.

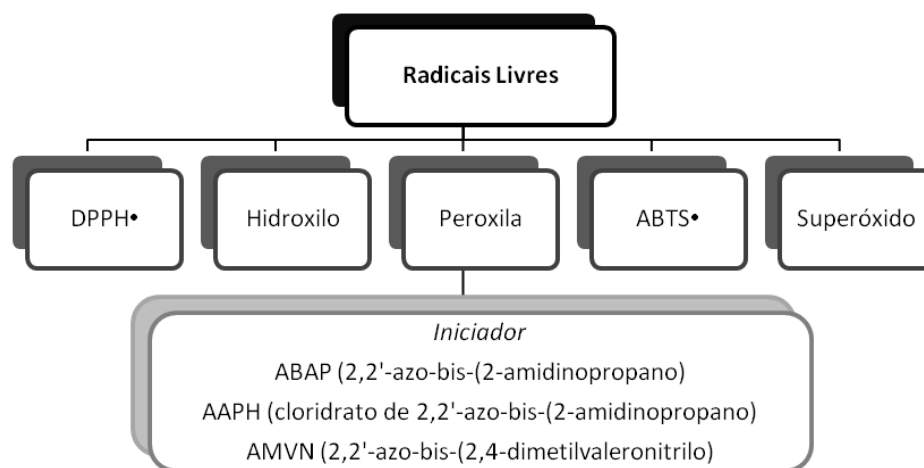


Figura 3. Principais tipos de radicais gerados *in vitro* (Silva et al., 1999, adaptado).

Existem diversos métodos propostos para a avaliação da atividade antioxidante *in vitro*, que variam de acordo com o tipo de radicais gerados, indicador escolhido e método para a sua detecção e quantificação (Figura 2). Ainda há os métodos eletroquímicos, como a coulometria e a voltametria, e outros que medem a lipoperoxidação, como o TBARS (teste do ácido 2-tiobarbitúrico, que reage com o malonaldeído gerado na oxidação de ácidos graxos), TRAP (potencial antioxidante total), FRAP (oxidação do ferro por radical peróxido), entre outros (Silva et al., 1999; Craft et al. 2012).

O ACAP, ou capacidade antioxidante contra radicais peroxila, é um método baseado na detecção de espécies reativas de oxigênio (ROS) através de fluorometria, utilizando como substrato 2',7'-dicloro-hidro-fluoresceína (H₂DCF). Os radicais peroxila são gerados por decomposição térmica a 37 °C do di-hidro-cloridrato de 2,2'-azobis(2-metil-propionamidina) (ABAP), adicionado às amostras

analisadas, e estes reagem com H₂DCF, emitindo sinal fluorescente. Este método é rápido, simples e confiável (Amado et al., 2009).

Sharma (1976), Wright (2002) e Chen et al. (2006), entre outros autores, observaram que as hidroxilas fenólicas são necessárias para a atividade antioxidante da curcumina e que quanto maior o número de hidroxilas ou metoxilas em *orto* a hidroxila, maior a sua atividade. A redução das duplas ligações não foi deletéria para a atividade (Anand et al., 2008).

Alguns autores relatam que a atividade antioxidante pode estar relacionada e contribuir com a atividade antiprotozoária de compostos e extratos de plantas (Paveto et al., 2004; Orhan et al., 2012). Um estudo desenvolvido por Orhan e colaboradores (2012) demonstrou que a coadministração de artesunato, fármaco que causa estresse oxidativo ao *Plasmodium* sp., e *N*-acetilcisteína, utilizada pelo protozoário como antioxidante, não diminuiu a eficácia do fármaco e melhora o prognóstico em malária severa. Além disso, outros compostos com reconhecida atividade antioxidante, como as catequinas, apresentaram boa atividade anti-*T. cruzi* (Paveto et al., 2004). Na literatura ainda não há explicações para estas constatações, sendo necessário um maior aprofundamento nesta linha de pesquisa.

Trypanosoma cruzi

O protozoário *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas (trípanossomíase americana, ou esquizotripanose), que constitui uma antropozoonose frequente nas Américas, principalmente na América Central e Latino (Neves et al., 2011).

O protozoário é transmitido por triatomíneos, sendo que das 141 espécies conhecidas, 63 foram identificadas no Brasil e são encontradas em todos os biomas. Com a interrupção da transmissão vetorial no Brasil por *Triatoma infestans*, quatro espécies têm importância na transmissão da doença ao homem: *T. brasiliensis*, *Panstrongylus megistus*, *T. pseudomaculata* e *T. sordida*. Espécies como o *T. rubrovaria*, no Rio Grande do Sul, e *Rhodnius neglectus*, em Goiás, têm sido

encontradas colonizando o domicílio. *Triatoma vitticeps* (Rio de Janeiro e Espírito Santo) e o *P. lutzi* (Ceará e Pernambuco) merecem atenção pelas altas taxas de infecção natural. Por sua vez, *R. nasutus* é frequentemente capturado no peridomicílio do nordeste brasileiro (Ceará e Rio Grande do Norte). Na Amazônia, as espécies mais encontradas são *R. pictipes*, *R. robustus*, *P. geniculatus*, *P. lignarius* e *T. maculata* (Ministério da Saúde, Brasil, 2012).

As espécies do gênero *Rhodnius* encontram-se predominantemente associadas a palmeiras, enquanto as espécies do gênero *Triatoma* e *Panstrongylus*, vivem preferencialmente em associação com hospedeiros terrestres. Algumas poucas espécies, ao longo de seu processo evolutivo, adaptaram-se aos domicílios e às estruturas construídas no peridomicílio, como galinheiros e chiqueiros, e tornaram-se mais importantes na transmissão da doença ao homem. A maioria das espécies de triatomíneos deposita seus ovos livremente no ambiente, entretanto, algumas possuem substâncias adesivas que fazem com que os ovos fiquem aderidos ao substrato. Essa é uma característica muito importante, uma vez que ovos aderidos às penas de aves e outros substratos podem ser transportados passivamente por longas distâncias, promovendo a dispersão da espécie (Ministério da Saúde, Brasil, 2012).

A doença de Chagas é causa de morbidade e mortalidade não só nas áreas endêmicas, mas também entre os imigrantes residentes nas áreas não endêmicas do mundo, sendo um grave problema médico-social. O protozoário afeta milhões de pessoas e mais de 30% dos indivíduos demonstram os sintomas da fase crônica da doença, a cardiomiopatia ou/e a doença gastrointestinal (Rassi et al., 2010; Nagajyothi et al., 2012).

O *T. cruzi* possui em seu ciclo biológico quatro formas: tripomastigotas, tripomastigotas metacíclicos, epimastigotas e amastigotas (Neves et al., 2011; Nagajyothi et al., 2012). Nos hospedeiros vertebrados se encontram as formas intracelular amastigota e extracelular tripomastigota; e nos invertebrados, são encontradas as formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas. A forma

tripomastigota metacíclica é a responsável por infectar o hospedeiro vertebrado (Neves et al., 2011).

O ciclo de vida do protozoário é heteroxênico. O triatomíneo ingere a forma não replicante tripomastigota do sangue do hospedeiro vertebrado que no vetor se transforma em epimastigota. Após aproximadamente 3 a 4 semanas, os epimastigotas se convertem em formas infecciosas, os tripomastigotas metacíclicos. A transmissão ocorre quando o triatomíneo pica o novo hospedeiro e elimina fezes e urina contaminadas, contendo os tripomastigotas metacíclicos que interagem com células das mucosas do nariz, cavidade oral, conjuntiva ou outras áreas vulneráveis. Neste local, ocorre a transformação dos tripomastigotas em amastigotas, que aí se multiplicam por divisão binária simples e, a seguir, se transformam em tripomastigotas, que são liberados da célula hospedeira caindo no interstício. Estes caem na corrente circulatória, atingem outras células de qualquer tecido ou órgão para cumprir novo ciclo celular ou são destruídos por mecanismos imunológicos do hospedeiro (Neves et al., 2011).

A transmissão da doença, além de ocorrer pela picada do triatomíneo, ocorre através de transmissão congênita, por transfusão sanguínea, amamentação, alimentos contaminados e transplantes (Neves et al., 2011; Nagajyothi et al., 2012).

No início da infecção em humanos, a parasitemia é mais elevada, podendo ocorrer morte do hospedeiro, principalmente em crianças. Quando o hospedeiro desenvolve resposta imune eficaz, a parasitemia diminui e a infecção tende a se cronificar, sendo os parasitas detectados somente por métodos especiais como xenodiagnóstico, hemocultura e inoculação em camundongos. A evolução e o desenvolvimento das diferentes formas clínicas da fase crônica da doença de Chagas ocorrem lentamente, após 10 a 15 anos de infecção ou mais (Neves et al., 2011).

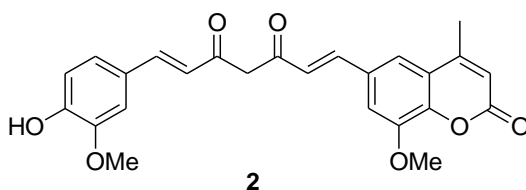
Os tratamentos existentes (benzonidazol e nifurtimox) são insatisfatórios visto que apresentam muitos efeitos adversos e não são eficazes na fase crônica da doença devido à dificuldade de atingir a forma amastigota intracelular, não

conseguindo suprimir a infecção por *T. cruzi*, além da diversidade genética do parasito. Por exemplo, nifurtimox é eficiente em chagásicos crônicos na Argentina, porém pouco eficaz em Minas Gerais (Neves et al., 2011).

O mecanismo de ação de benzonidazol e nifurtimox é o mesmo. Há indícios de que agem pela formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos. Nifurtimox age contra as formas sanguíneas e parcialmente contra as formas teciduais. Os efeitos colaterais são: anorexia, emagrecimento, náuseas, vômitos, alergia cutânea, mialgias, fraqueza, neuropatias periféricas, parestesias, dor de cabeça, entre outros. Benzonidazol possui efeitos apenas contra as formas sanguíneas. Os efeitos colaterais observados são: anorexia, perda de peso, vertigens, dermatites urticariformes, cefaléia, sonolência e dores abdominais, hiperexcitabilidade, depressão medular e polineuropatia (Brunton et al., 2008).

OBJETIVOS

Sintetizar, através de hibridação molecular, um novo híbrido curcumina-cumarina (**2**) por micro-ondas e aquecimento convencional além de avaliar as atividades antioxidante e anti-*T. cruzi*.



METODOLOGIA

Síntese do híbrido curcumina-cumarina (2) LASOM 135

A curcumina foi obtida comercialmente (Sigma Aldrich[®], St. Louis, MO, Estados Unidos). Esta, por apresentar percentual de pureza de 70%, foi pré-purificada através de coluna cromatográfica de sílica-gel 60, 70-230 mesh (Fluka-Sigma Aldrich[®], St. Louis, MO, Estados Unidos), e utilizando como sistema eluente, clorofórmio:metanol 80:2 ou diclorometano:metanol 99:1 (solventes para análise: Merck[®], Darmstadt, Germany; FMaia, Cotia, São Paulo, Brasil). Foi adicionado 1 eq. de acetoacetato de etila (Acros Organics[®], Nova Jersey, Estados Unidos) em presença de ácido clorídrico (HCl 37%, Nuclear[®], Diadema, SP, Brasil) ou trifluoreto de boro eterato (BF₃.Et₂O, Acros Organics[®], Nova Jersey, Estados Unidos), em quantidade catalítica, utilizando como solvente etanol (99%, Nuclear[®], Diadema, SP, Brasil). Foram testadas as condições de temperatura 100 °C, 75 °C e 60 °C e diferentes tempos de reação. Utilizou-se como aquecimento o método convencional e micro-ondas em *vesse/s* fechados (CEM Discover[®] Microwave). O esquema da reação é apresentado na Figura 4.

A molécula sintetizada foi identificada através de comparações com dados da literatura encontrados sobre a curcumina e curmarinas. Os equipamentos utilizados para caracterização foram ressonância magnética nuclear (RMN H¹ e C¹³ 300 MHz), infravermelho (Spectrum BX Perkin-Elmer[®], Waltham, MA, Estados Unidos) e ponto de fusão (Fisatom[®] 431, São Paulo, SP, Brasil).

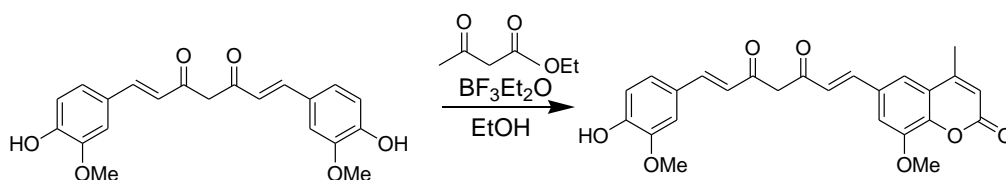


Figura 4. Esquema geral da reação de Pechmann a partir da curcumina.

Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada frente a radicais peroxila, em colaboração com o prof. Dr. José Maria Montserrat (Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Rio Grande).

As amostras (curcumina, LASOM 135 e esculetina) foram diluídas a 5 e 50 μM . Pipetou-se 10 μL de cada solução de amostra diluída para placa de 96 poços, seis poços por amostra. Os brancos foram preparados transferindo o mesmo volume de solvente utilizado para dissolver a amostra (DMSO) com e sem ABAP e com e sem H₂DCF. O tampão de reação (127,5 μL), contendo 30 mM de HEPES (pH 7.2), 200 mM de KCl e 1 mM de MgCl₂ foi adicionado às amostras. Após, 7,5 μL de ABAP 10 mM foram adicionados a três poços de cada amostra, enquanto o mesmo volume de água Milli-Q foi adicionado aos poços remanescentes. Imediatamente antes da leitura da placa foram adicionados 10 μL de H₂DCF (concentração final de 40 μM).

O diacetato de 2',7'-dicloro-hidro-fluoresceína (H₂DCF-DA, Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) foi previamente clivado através de hidrólise alcalina por 30 minutos, resultando no produto deacetilado H₂DCF. As microplacas foram lidas em um leitor de fluorescência (Victor2 D, Perkin-Elmer®, Waltham, MA, Estados Unidos) programado para manter a temperatura em 37 °C a fim de induzir a termólise do ABAP, produzindo então radicais peroxil. Após, o H₂DCF não fluorescente é oxidado pelos ROS ao composto fluorescente DCF, que é detectado nos comprimentos de onda 485 nm e 520 nm (excitação e emissão, respectivamente) por 90 minutos, com leituras a cada 5 minutos. A produção de fluorescência total é calculada de acordo com as equações descritas abaixo. Os resultados foram expressos em porcentagem.

$$\text{ACAP (\%)} = \frac{(\Delta\text{Branco} - \Delta\text{Amostra})}{\Delta\text{Branco}} \times 100$$

$$\Delta\text{Branco} = \text{NF branco com ABAP} - \text{NF branco sem ABAP}$$

$$\Delta\text{Amostra} = \text{NF amostra com ABAP} - \text{NF branco sem ABAP}$$

$$\text{NF (fluorescência líquida)} = \text{fluorescência com H2DCF} - \text{fluorescência sem H2DCF}$$

Para a análise estatística foi utilizado ANOVA de uma via seguida de Tukey. Diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,01$.

Atividade anti-*Trypanosoma cruzi*

Os experimentos foram realizados em colaboração com o Prof. Hugo Cerecetto, da Universidad de La República Uruguay.

Epimastigotas de *T. cruzi* foram acondicionados em meio axênico (BHT-triptose) com 5% de soro bovino fetal e mantidos a 28 °C. As células foram recolhidas na fase *log* de crescimento, resuspensas, contadas em câmara de Neubauer's e pipetadas para uma placa de 24 poços, sendo a concentração ajustada a $2,0 \times 10^6$ células/mL. Adicionou-se então a molécula em teste (curcumina ou LASOM 135) em uma concentração de 25 μM (água MilliQ com 1% de DMSO). Os controles foram realizados com e sem o veículo (água + 1% DMSO - controle negativo) e nifurtimox (25 μM - controle positivo). O crescimento celular foi mensurado a 610 nm em leitor de ELISA no dia 0 e no 5º dia. Os experimentos foram realizados em duplicata e o percentual de inibição calculado segundo a equação %*inibição* = $\left\{ 1 - \left[\frac{A_p - A_{0p}}{A_b - A_{0b}} \right] \right\} \times 100$, onde A_p e A_{0p} são as absorbâncias da

cultura com a molécula teste no 5º e 0 dia, respectivamente, e A_b e A_{0b} são a

absorbância do branco (controle negativo) no 5^o e 0 dia. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA de uma via seguida de Tukey. Diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,01$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Síntese do híbrido curcumina-cumarina LASOM 135

Nenhuma das reações em que se utilizou como catalisador HCl mostrou formação de produtos. Assim, foi necessário empregar um ácido de Lewis mais forte, como o $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$. Entretanto, não foi observado o consumo completo do material de partida. As condições testadas são descritas na tabela 1.

Tabela 1. Condições para a síntese do híbrido curcumina-cumarina.

	Convencional				Micro-ondas		
	100 °C	100 °C	75 °C	65 °C	100 °C	100 °C	100 °C
Temperatura	100 °C	100 °C	75 °C	65 °C	100 °C	100 °C	100 °C
Tempo	20 h	4 h	4 h	7h	5 min	2x5 min	2x5 min
Purificação	Filtração Recristalização CCDP	Colun a	Coluna	Coluna CCDP	Filtração, recristalização	Coluna	Coluna, CCDP
Rendimento	20%	58%	90%	32%	34%	34%	34%

CCDP: cromatografia em camada delgada preparativa.

Com base nos resultados encontrados (Tabela 1) é possível afirmar que quanto maior o tempo de reação e a temperatura, menor o rendimento. O baixo rendimento encontrado em 65 °C quando comparado a 75 °C é explicado pelo maior tempo de reação e etapas de purificação. Além disso, quando se compara os métodos de aquecimento, o rendimento em micro-ondas foi menor visto que possivelmente a temperatura alcançada dentro do vessel é maior (aquecimento de “dentro para fora”) que a alcançada dentro do balão de reação, que pode estar abaixo de 100 °C (aquecimento de “fora pra dentro”). Segundo Bassoyouni et al. (2012), se o aquecimento no micro-ondas for aplicado sem cuidado, este método pode destruir a mais robusta das reações já que o aquecimento ocorre a nível molecular, como

anteriormente citado. Além disso, os baixos rendimentos quando se emprega altas temperaturas e sucessivos processos de purificação podem ser explicados pela instabilidade inerente da curcumina, que degrada facilmente em presença de luz e a altas temperaturas (Mouloungui e Noiroto, 2010).

Assim sendo, as melhores condições para síntese do híbrido LASOM 135 são baixas temperaturas e curtos tempos de reação, em aquecimento convencional, 75 °C e 4 horas.

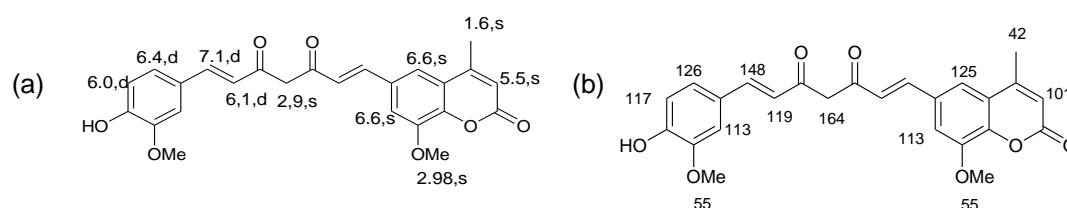


Figura 5. Deslocamentos químicos de RMN H¹ (a) e C¹³ (b) (ppm) de LASOM 135 (DMSO, 300 MHz).

O híbrido LASOM 135 foi obtido como um pó amorfo vermelho fluorescente, com ponto de fusão 110-114 °C (curcumina = 174-177 °C). Bandas características foram observadas em IV: hidroxila fenólica em 3478 cm⁻¹ e carbonila simétrica de lactona em 1718 cm⁻¹ e C-O de lactona em 1211 cm⁻¹ (Silverstein et al., 2005). Os sinais de RMN H¹ e C¹³ foram comparados com os dados encontrados na literatura para a curcumina (Anderson et al., 2000; Payton et al., 2007) e são apresentados na Figura 3. Além disso, está anexado a este trabalho a análise de correlação hidrogênio-carbono (HMQC).

Avaliação da atividade antioxidante

Foi avaliada a atividade antioxidante da curcumina, da esculetina (4), uma cumarina natural com reconhecida capacidade antioxidante (Leung et al., 2005), e do híbrido LASOM 135. Os resultados da atividade antioxidante são apresentados na Figura 6.

A atividade antioxidante das três moléculas testadas foram similares em 5 μM . Entretanto, em 50 μM , as atividades apresentadas pela curcumina e LASOM 135 foram superiores à esculetina. A fim de avaliar o perfil antioxidante de LASOM 135, foram testadas concentrações menores frente aos radicais peroxila, no intervalo de 0,5 μM a 50 μM (Figura 7).

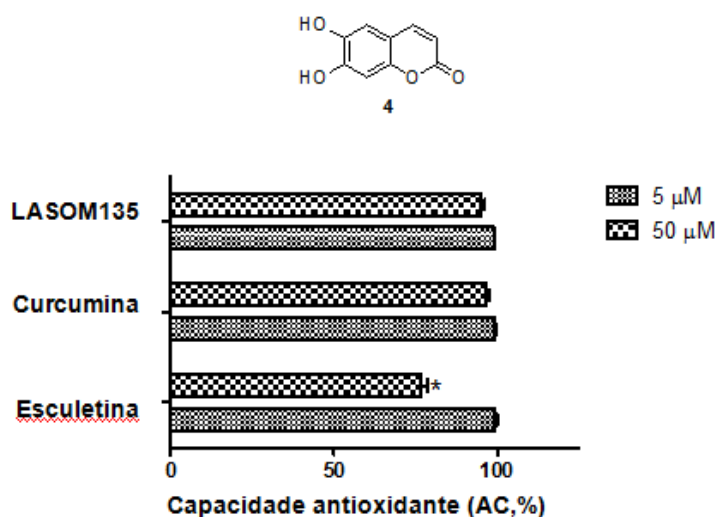


Figura 6. Atividade antioxidante frente a radicais peroxil da esculetina, curcumina e LASOM 135. Os resultados são representativos para os três experimentos (média \pm SEM).

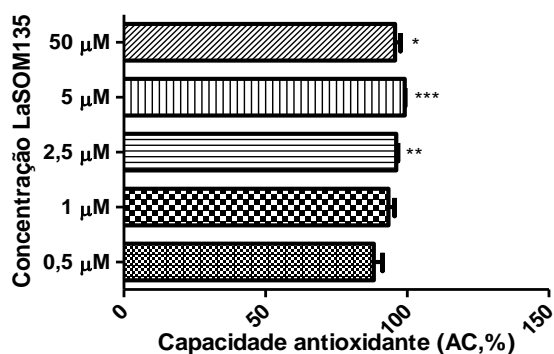


Figura 7. Perfil antioxidante de LASOM 135.

De acordo com os resultados obtidos, o novo híbrido demonstrou forte atividade antioxidante, apresentando mais de 80% desta capacidade na menor concentração (0,5 μM). Não foi possível calcular o IC_{50} , sendo necessários novos testes com concentrações menores para esta determinação.

Os resultados encontrados estão de acordo com os relatados na literatura. Vianna e colaboradores (2012) demonstraram que 4-metil-cumarinas apresentam boa atividade antioxidante frente a radicais peroxila, que está diretamente relacionada com o número de hidroxilas e grupos carbonilas. A esculetina é utilizada em vários trabalhos que avaliam a atividade antioxidante de cumarinas e apresenta um IC_{50} de 13 μ M frente a radicais peroxila (Hoult e Payá, 1996). Também, segundo Banerjee et al. (2008), a curcumina inibe a peroxidação lipídica, com valores de IC_{50} de 23,2 μ M. Além disso, a doação de um átomo de hidrogênio da porção β -di-cetona para um radical peroxila lipídico ou alquila é descrita como responsável pela maior parte da ação antioxidante da curcumina.

Assim, é provável que tenha ocorrido uma contribuição do anel 4-metil-cumarina na atividade antioxidante da curcumina na molécula LASOM 135 visto que o IC_{50} da mesma será menor que 0,5 μ M, valor inferior aos descritos na literatura para a curcumina e esculetina frente a radicais peroxila.

Atividade anti-*Trypanosoma cruzi*

Os resultados encontrados estão ilustrados na Figura 8. O híbrido LASOM 135 inibiu de forma similar à curcumina o crescimento de epimastigotas de *T. cruzi*, alcançando 97% de inibição a 25 μ M, atividade superior à nifurtimox, que inibiu 39% do crescimento de epimastigotas. Porém, LASOM 135 se mostrou menos potente que a curcumina, com $IC_{50} = 11,8 \mu$ M e 2,1 μ M, respectivamente.

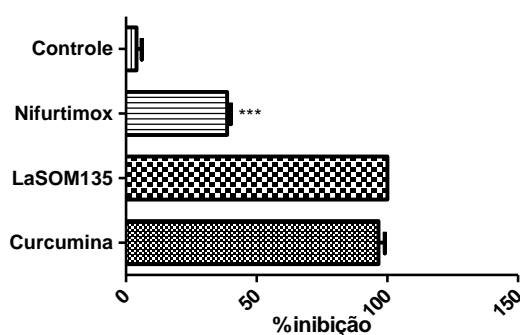


Figura 8. Percentual de inibição em epimastigotas de *T. cruzi* a 25 μ M. Os resultados são representativos de três experimentos (média \pm SEM).

Assim sendo, o novo híbrido pode ser considerada uma molécula promissora visto que inibiu 2,5 vezes mais o crescimento de epimastigotas que o fármaco de escolha para o tratamento da doença de Chagas, nifurtimox. Entretanto, estudos de citotoxicidade e seletividade fazem-se necessários para melhor avaliar esta atividade biológica.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Foi possível otimizar a síntese do novo híbrido LASOM 135, que foi obtido com ótimo rendimento (90%), sendo que as melhores condições são aquecimento convencional, 75 °C e 4 h de reação. Também se provou a formação do mesmo através de métodos espectroscópicos, como IV, RMN H¹ e C¹³.

O híbrido LASOM 135 apresentou forte atividade antioxidante frente a radicais peroxila, sendo mais potente que a curcumina e o padrão de cumarina utilizado (esculetina) quando comparado a dados da literatura. Novos testes com concentrações menores são necessários para o cálculo de IC₅₀ bem como outros testes de avaliação da atividade antioxidante para aprofundar o conhecimento do perfil de LASOM 135 (radicais peróxidos, hidroxila, etc).

Em relação à atividade anti-*Trypanosoma cruzi*, LASOM 135 se mostrou promissor visto que, apesar de apresentar IC₅₀ inferior à curcumina, apresentou percentual de inibição superior ao fármaco de escolha para o tratamento da doença de Chagas, nifurtimox. Para o híbrido LASOM 135 se tornar um protótipo de novos anti-chagásicos, a realização de testes de citotoxicidade e seletividade são necessários.

Ainda, como perspectiva, tem-se a possibilidade de síntese de um híbrido duplo (5) e assim tornar possível o estudo do efeito da hidroxila na atividade antioxidante da curcumina e LASOM 135.

CAPÍTULO 2: Modificação estrutural de benzopiranos isolados de *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt

INTRODUÇÃO

O gênero *Hypericum* (Guttiferae) possui cerca de 460 espécies, divididas em 30 seções e distribuídas em praticamente todas as regiões do mundo, exceto aquelas extremamente secas ou frias (Robson, 2006). Estudos fitoquímicos com estas espécies revelaram a presença de compostos fenólicos, sendo várias espécies utilizadas na medicina tradicional. A planta mais conhecida do gênero é *Hypericum perforatum* L., espécie européia utilizada para o tratamento da depressão leve a moderada (Bilia et al., 2002).

Hypericum polyanthemum Klotzsch ex Reichardt, uma das 18 espécies nativas do Rio Grande do Sul, possui como metabólitos secundários os benzopiranos HP1, HP2 e HP3 (Ferraz et al., 2001), encontrados até o momento somente nesta planta. São descritas várias atividades biológicas para esta espécie e seus compostos, dentre as quais a atividade anti-*Trichomonas vaginalis* (Cargnin, 2011), protozoário flagelado causador da doença sexualmente transmissível não viral mais frequente no mundo. Na literatura é possível encontrar outros benzopiranos com atividade antiprotozoária (Figura 9).

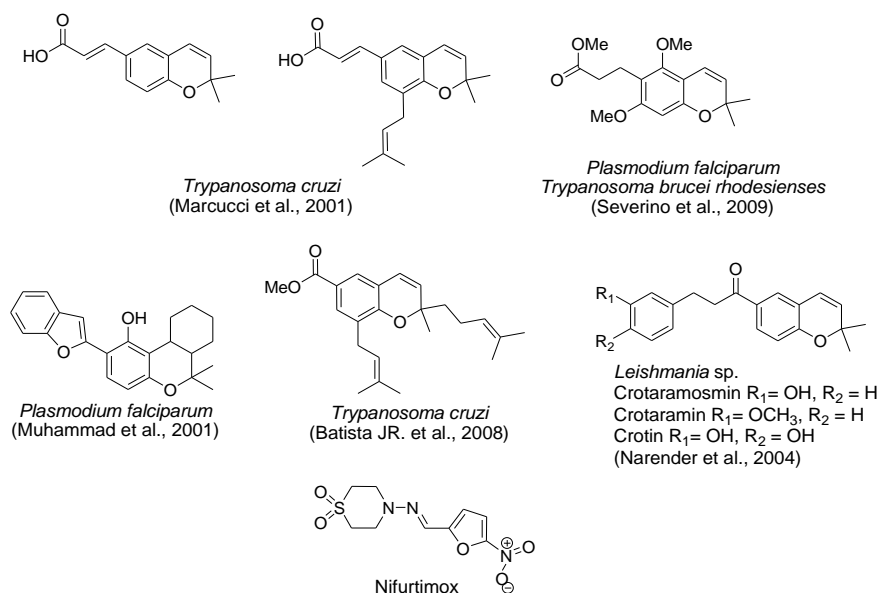


Figura 9. Alguns benzopiranos com atividade antiprotozoária.

Assim sendo, baseado nos benzopiranos e outras moléculas com atividade antiprotozoária, planejou-se a modificação estrutural dos benzopiranos isolados de *H. polyanthemum* através de aminação redutiva. Além disso, se avaliou a atividade anti-*T. cruzi* dos benzopiranos isolados para a seleção de um *hit* para novos derivados com potencial atividade tripanomicida.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

***Hypericum polyanthemum* e benzopiranos**

O gênero *Hypericum* (Guttiferae) possui cerca de 460 espécies, divididas em 30 seções e distribuídas em praticamente todas as regiões do mundo, exceto aquelas extremamente secas ou frias (Robson, 2006). No Brasil são encontradas 20 espécies, principalmente na região sul do país, sendo destas 18 nativas (Robson, 1990). Estudos fitoquímicos com estas espécies revelaram a presença de compostos fenólicos, como xantonas (Rocha et al., 1994), benzofenonas (Bernardi et al., 2005), benzopiranos (Ferraz et al., 2001), floroglucínóis (Rocha et al., 1994; Dall'agnol et al., 2005), xantonas (Hass, 2010), flavonóides, ácidos fenólicos e taninos (Kitanov e Nedialkov, 1998).

Várias espécies são utilizadas na medicina tradicional como antisséptica, diurética, digestiva, agentes de cicatrização, no tratamento de algumas doenças microbianas (von Poser et al., 2006). A planta mais conhecida do gênero é *Hypericum perforatum* L., espécie européia, utilizada para o tratamento da depressão leve a moderada (Bilia et al., 2002; Cervo et al., 2002). Além disso, a hiperforina, derivado de floroglucinol isolado desta planta, apresentou relevante atividade frente à *Plasmodium falciparum*, protozoário causador da malária (Verota et al., 2007). Derivados de floroglucinol de outra espécie, *H. erectum*, também apresentaram interessante atividade frente ao mesmo protozoário (Moon, 2010).

Hypericum polyanthemum Klotzsch ex Reichardt, uma das 18 espécies nativas do Rio Grande do Sul, possui como metabólitos secundários xantonas, flavonóides, taninos (Dall'agnol et al., 2003), um floroglucinol – uliginosina B (Nör et al., 2004) e os benzopiranos HP1, HP2 e HP3 (Ferraz et al., 2001), encontrados até o momento somente nesta planta (Figura 10).

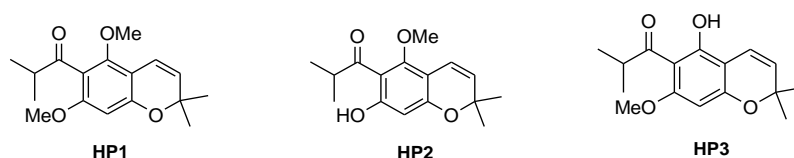


Figura 10. Benzopiranos isolados de *H. polyanthemum*.

O núcleo benzopirano, ou cromeno, está presente em vários produtos naturais e em protótipos farmacêuticos. A maioria dos benzopiranos com atividade biológica relatados até o momento pertencem à família 2,2-di-metil-2*H*-benzopirano, família a qual os benzopiranos encontrados em *H. polyanthemum* fazem parte (Govender et al., 2006).

São descritas várias atividades biológicas para *H. polyanthemum* e seus compostos, dentre as quais a atividade anti-*Trichomonas vaginalis* do extrato *n*-hexano e benzopiranos (Cargnin, 2011), efeito antinociceptivo mediado pelo sistema opióide do HP1 (Haas et al., 2010), atividade antibacteriana de HP2 e HP3 (Dall'agnol et al., 2005); atividade acaricida do extrato hexano (Ribeiro et al., 2007); atividade antiproliferativa de HP1, HP2 e HP3 (Ferraz et al., 2005; Grivicich et al., 2008) e atividade de HP3 como inibidor da monoamino oxidase (Gnerre et al., 2001).

Devido ao potencial terapêutico de *H. polyanthemum*, o seu cultivo *in vitro* e posterior cultivo a campo foram estabelecidos por Bernardi e colaboradores (2007, 2008), o que levou a um aumento de biomassa e acúmulo de metabólitos secundários. Além disso, a extração dos benzopiranos foi otimizada através de extração por fluido supercrítico, o que permite uma extração mais seletiva destas moléculas. Nas condições estabelecidas por Cargnin e colaboradores (2010), o rendimento destas moléculas em relação à massa de extrato chegou a 70,75%.

Como já citado anteriormente, Cargnin (2011) demonstrou que os benzopiranos isolados de *H. polyanthemum* apresentam atividade anti-*Trichomonas vaginalis*. Também foi demonstrado que estes benzopiranos provocam danos à membrana celular do protozoário e não são hemolíticos, evidenciando seletividade à membrana do parasito. Com base nos resultados obtidos por Cargnin (2011), é possível estabelecer uma relação estrutura atividade visto que somente HP1 e HP2 apresentaram atividade anti-*Trichomonas vaginalis*. Dessa forma é possível inferir que a presença ou não de hidroxilas influenciam na atividade antiprotozoária. Ao se buscar na literatura outros benzopiranos com atividade antiprotozoária (Figura 9), constata-se foi relatada a atividade contra *Plasmodium falciparum*, *Leishmania brasiliensis* e *Trypanosoma cruzi*. A lipofilicidade das moléculas é importante no que diz respeito ao desenvolvimento de novos fármacos antiparasitários, já que cadeias laterais longas de grupos alquilas permitem a interação da molécula com os lipídeos de membrana e a sua consequente penetração no citoplasma do parasito (Cargnin, 2011). Além disso, há presença de heteroátomos, principalmente nitrogênio, em moléculas com atividade antiprotozoária, como o nifurtimox.

Aminação redutiva

A aminação redutiva é o um dos métodos mais utilizados para a adição de átomos de nitrogênio com diferentes cadeias laterais a moléculas contendo grupo cetona ou aldeído (Clayden et al., 2001; McMurry, 2008).

Neste processo, há a formação de imina (amina primária), ou enamina (amina secundária), que é posteriormente reduzida à amina pelo cianoboroidreto de sódio, ou outros agentes redutores (Allinger et al., 1991; Clayden et al., 2001; McMurry, 2008). O uso de cianoboroidreto de sódio, apesar de sua maior toxicidade em relação a outros agentes redutores, é justificado pela sua maior reatividade com aminas do que com cetonas, sendo redutor somente do íon imínium formado (Figura 11) (Carey e Sundberg, 2007). A redução direta geralmente é escolhida visto que o grupo imina é muito instável, podendo ser facilmente hidrolisado durante o processo de purificação (Clayden et al., 2001).

A condição crítica para esta reação é o pH, que deve estar entre 4-5 para permitir a protonação da carbonila e formar a carbinolamina, facilitando a saída de água, e também evitar a total protonação da amina, que impediria a etapa de adição nucleofílica (Allinger et al., 1991; Clayden et al., 2001).

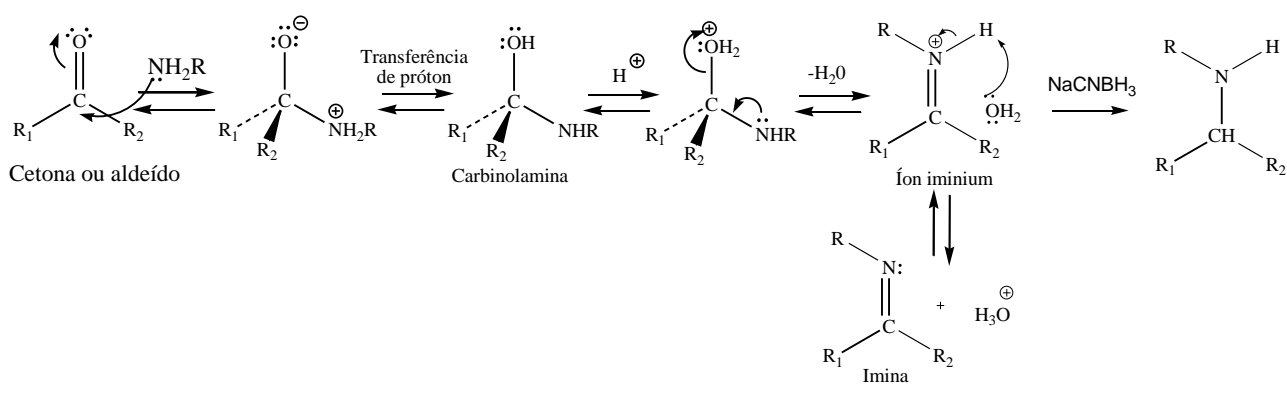


Figura 11. Mecanismo esquemático da reação de aminação redutiva.

OBJETIVOS

Avaliação da atividade anti-*T. cruzi* dos benzopiranos isolados de *H. polyanthemum* e modificar estruturalmente os mesmos através de aminação redutiva.

METODOLOGIA

Isolamento dos benzopiranos a partir de *H. polyanthemum*

As partes aéreas de *H. polyanthemum* foram coletadas no período de floração em Caçapava do Sul (RS, Brasil), em dezembro de 2010, sob autorização do CGEN/IBAMA 003/2008 P 02000.001717/2008-60. O material testemunha foi

depositado no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN Bordignon 3118). Após a coleta, as partes aéreas foram selecionadas, secas em temperatura ambiente e trituradas em moinho de facas (1 mm mesh).

O material vegetal particulado foi extraído por maceração estática a frio, com *n*-hexano, renovando-se o solvente a cada 24 horas, durante 5 dias. O extrato foi filtrado, concentrado em evaporador rotatório e tratado com acetona para remoção das ceras epicuticulares. Em seguida, submeteu-se o extrato a fracionamento por coluna cromatográfica *flash*. As frações contendo HP1, HP2 e HP3 foram submetidas novamente a coluna cromatográfica. Em ambos os casos utilizou-se sílica-gel 60 70-230 mesh (Merck®, Darmstadt, Alemanha) como adsorvente e diversos sistemas eluentes (hexano e diclorometano). Todos os solventes utilizados eram de grau para análise (FMaia, Cotia, SP, Brasil).

Aminação redutiva dos benzopiranos de *H. polyanthemum*

Foram utilizados dois protocolos para a aminação redutiva dos compostos. No protocolo desenvolvido por Graebin et al. (2010) com modificações, HP1, HP2 e HP3 foram solubilizados em diclorometano ou tolueno seco e reagidos com 4 eq. de propilamina (Acros Organics®, Nova Jersey, Estados Unidos) e ácido acético glacial (pH = 5,0, Merck®, Darmstadt, Alemanha) por 3 h, a temperatura ambiente. Após, adicionou-se 3 eq. de NaCNBH₃ (Fluka-Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, Estados Unidos), e a reação foi cessada em diferentes tempos.

Em micro-ondas (CEM Discover® Microwave), utilizou-se o protocolo desenvolvido por Dong et al. (2010). Os benzopiranos foram dissolvidos em etanol, adicionou-se 15 eq. de acetato de amônio (Acros Organics®, Nova Jersey, Estados Unidos) e 1,2 eq de NaCNBH₃, a 130 °C. A reação foi cessada em 2 e 15 minutos.

Após a reação, adicionou-se água, basificou-se com bicarbonato de sódio (solução saturada, Nuclear®, Diadema, SP, Brasil) e a fase orgânica foi extraída com acetato de etila (Vetec®, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Secou-se a fase orgânica com

Na₂SO₄ (Vetec[®], Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e concentrou-se a fase orgânica em evaporador rotatório. Para purificação, utilizou-se coluna cromatográfica utilizando como adsorvente sílica-gel (70-230 mesh, Merck[®], Darmstadt, Alemanha) e eluente clorofórmio (Merck[®], Darmstadt, Alemanha). Os produtos obtidos foram caracterizados por ponto de fusão (Fisatom[®] 431, São Paulo, SP, Brasil), quando aplicável, IV (Spectrum BX Perkin-Elmer[®], Waltham, MA, Estados Unidos) e RMN de H¹ (300 e 60 MHz).

Avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* dos benzopiranos isolados de *H. polyanthemum*

Os experimentos foram realizados em colaboração com o Prof. Hugo Cerecetto, da Universidad de La República Uruguay.

Epimastigotas de *T. cruzi* foram acondicionados em meio BHT com 5% de soro bovino fetal, a 28 °C. As células foram recolhidas na fase *log* de crescimento, resuspensas, contadas em câmara de Neubauer e pipetadas para uma placa de 24 poços, sendo a concentração ajustada a 2,0 x 10⁶ células/mL. Adicionou-se então a molécula em teste (HP1, HP2 ou HP3) em uma concentração de 25 µM (água MilliQ com 1% de DMSO). Os controles foram realizados com e sem o veículo (1% DMSO em água MilliQ) e nifurtimox (25 µM - controle positivo). O crescimento celular foi mensurado a 610 nm em leitor de ELISA no dia 0 e no 5º dia. Os experimentos foram realizados em duplicata e o percentual de inibição calculado segundo a equação

$$\%inibição = \left\{ 1 - \frac{A_p - A_{0p}}{A_b - A_{0b}} \right\} \times 100, \text{ onde } A_p \text{ e } A_{0p} \text{ são as absorbâncias da}$$

cultura com a molécula teste no 5º e 0 dia, respectivamente, e *A_b* e *A_{0b}* são a absorbância do branco (controle negativo) no 5º e 0 dia. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA de uma via seguida de Tukey. Diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,01$.

Aquelas moléculas em que o percentual de inibição foi superior a 50%, foi realizado o teste de citotoxicidade inespecífica em macrófagos de roedores (Castro et al., 2009), bem como o cálculo de seletividade relacionando a toxicidade em macrófagos e epimastigotas.

Células de macrófagos de roedores J-774 (ATCC, USA) foram mantidas por passagem em DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) contendo 4 mM de L-glutamina e suplementado com 10% de soro bovino fetal soro bovino fetal inativado por calor. As células J-774 foram semeadas em microplacas de 96 poços ($1,0 \times 10^5$ células por poço) com 200 μ L de meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro bovino fetal inativado por calor. As células foram deixadas em ar úmido com 5% CO₂/95% ar atmosférico, 37 °C por 48 h para adesão. Após, as células foram expostas aos compostos (1 – 400 μ M) por 48 h e então lavadas com tampão PBS e incubadas a 37 °C com MTT (0,4 mg/mL) por 3 h. O formazan foi dissolvido em DMSO (180 μ L) e a densidade óptica foi mensurada em 595 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento e caracterização dos benzopiranos de *H. polyanthemum*

Os benzopiranos foram isolados com rendimentos similares aos encontrados por Cargnin et al. (2010), sendo de 0,28% para HP1, 0,15% para HP2 e 0,19% para HP3, em relação a massa seca de planta. Os pontos de fusão para os mesmos foram determinados bem como os sinais de RMN H¹ atribuídos (Ferraz et al., 2001) (Figura 12).

Os espectros de infravermelho também estão de acordo com o relatado por Ferraz et al. (2001), sem a presença de banda de hidroxila tanto no espectro do HP2 como HP3. Este efeito ocorre devido a forte ponte de hidrogênio existente entre a carbonila e a hidroxila fenólica. Apesar disto, o espectro de RMN H¹ mostrou o sinal

referente à mesma, confirmando o isolamento de HP2 e HP3, que diferem em seus espectros somente no deslocamento do singlete do hidrogênio aromático, presente em campo mais alto no HP3 já que o próton é menos blindado pela metoxila do que pela hidroxila (HP2). O espectro de RMN H^1 do HP1 não mostra pico de hidroxila e sim singlete com integração de seis hidrogênios em 3.73 ppm referente às metoxilas, confirmando, também, o isolamento de HP1.

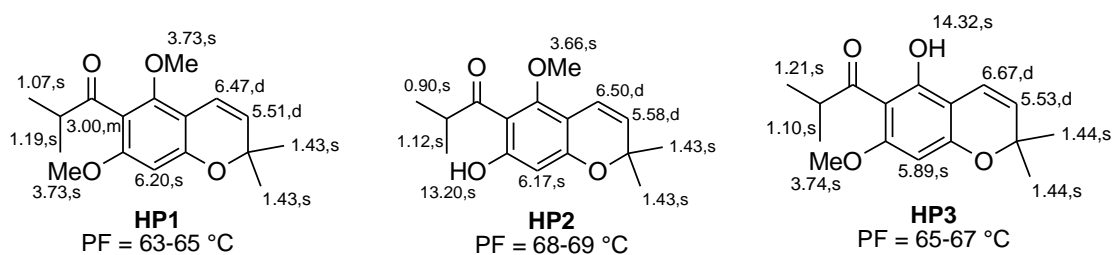


Figura 12. Pontos de fusão e deslocamentos químicos de RMN H^1 ($CDCl_3$) para os benzopiranos isolados de *H. polyanthemum*.

Aminação reductiva

Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 2. Em relação ao solvente utilizado, em diclorometano a reação não ocorreu. Isto pode ser explicado pela baixa reatividade dos benzopiranos isolados de *H. polyanthemum* uma vez que a presença de grupos desativadores no anel aromático (metoxila e hidroxila) diminui a reatividade da carbonila, havendo necessidade de utilizar solvente seco na reação para não deslocar o equilíbrio na etapa de formação do íon imínium (Figura 11). Além disso, a utilização de solventes apolares favorece a formação do produto desejado, já que não solvata a carbonila nem a amina que faz o ataque nucleofílico. Dessa forma, as reações foram novamente realizadas em tolueno seco, solvente mais indicado para este tipo de reação (McMurry, 2008). Os resultados das diferentes condições empregadas estão descritos na tabela 2.

Em tolueno seco, utilizando método convencional, foi possível observar a formação de produtos partindo-se de HP2 e HP3, sendo que este último foi o mais reativo e apresentou melhores rendimentos em apenas 2 dias de reação. O HP1

praticamente não reagiu, pois mesmo após três dias mostrou somente traços de produto formado. A baixa reatividade da carbonila destes benzopiranos é inerente, pois são aril-cetonas, e a presença dos grupos metoxila e hidroxila, que doam elétrons ao anel aromático, também desfavorecem a reação, resultando em baixo a médio rendimento (Dong et al., 2010). No caso do HP1, não há formação de ponte de hidrogênio pela ausência da hidroxila vizinha a carbonila, como ocorre em HP2 e HP3, fazendo com que a densidade eletrônica em torno da carbonila seja maior e assim dificulte a reação nas condições empregadas.

Tabela 2. Resultados obtidos nas aminações redutivas dos benzopiranos HP1, HP2 e HP3.

	Convencional									Micro-ondas	
	HP1	HP2				HP3			HP1		
		LASOM 170				LASOM 137			LASOM 138		
Tempo	8 d.	1 d	2 d	3 d	3,5 d	1 d	2 d	3 d	4 m	8 m	
Rendimento	*	36%	10%	38%	31%	44%	51%	36%	74%	16%	

*Traços de produto foram observados em CCD; d = dias, m = minutos.

Dessa forma, procedeu-se a reação em micro-ondas, conforme protocolo descrito por Dong et al. (2010) para aril-cetonas pouco reativas. Nas condições empregadas, obteve-se um bom rendimento do produto aminado em 4 minutos para HP1. Os benzopiranos HP2 e HP3 se mostraram sensíveis às condições reacionais, possivelmente devido à alta temperatura, formando muitos produtos intermediários.

No espectro de RMN de H^1 do LASOM 138 é possível observar leve alteração nos deslocamentos químicos dos hidrogênios próximos ao grupo alterado quando comparado ao HP1 além do aumento da integração de 6 para 9 e a presença de sinais sobrepostos em aproximadamente 3.6 ppm, confirmando a adição do grupo propilamina. O ponto de fusão também foi alterado (Figura 13).

No caso do LASOM 170, o ponto de fusão também foi alterado em relação ao HP2. Além disso, como em LASOM 137, o número de hidrogênios obtidos pela integração no espectro de RMN H^1 condiz com o número de hidrogênio da molécula sendo possível também observar mudanças no campo magnético da hidroxila

fenólica, que passou para de 14 ppm para 8 ppm, e nas metilas vicinais próximas a carbonila. Outros sinais que não estavam presentes no espectro do HP2 são visíveis, como o singlete do próton da amina em 3.52 ppm, o duplete em 4.98 ppm e os sinais de metilas em torno de 1 ppm. No espectro de IV foi possível observar o aparecimento de banda de hidroxila em 3251 cm^{-1} , que em HP2 não era visível, e de amina em 3411 cm^{-1} . Assim sendo, a síntese do LASOM 170 foi confirmada (Figura 13).

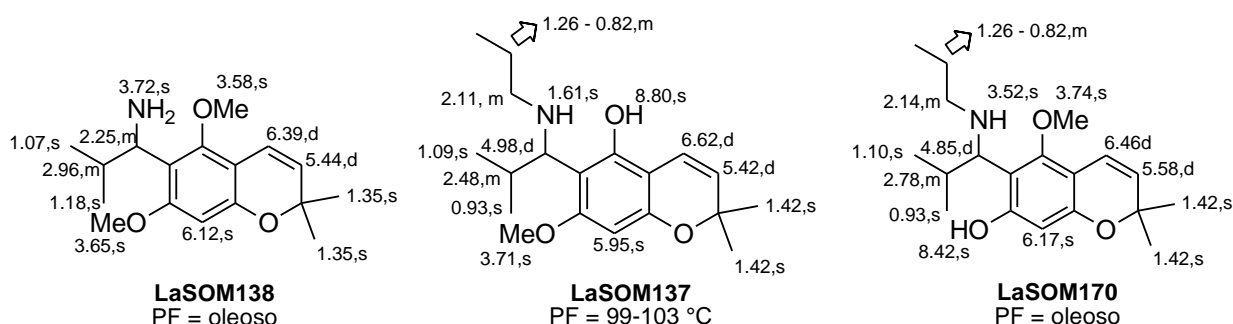


Figura 13. Produtos obtidos por aminação redutiva e seus respectivos deslocamentos químicos de RMN H^1 , CDCl_3 , LASOM 138 em 300 MHz, LASOM 170 e LASOM 137 em 60 MHz.

Em relação ao LASOM 137, o ponto de fusão foi alterado significativamente em relação ao HP3. O número de hidrogênios obtidos pela integração no espectro de RMN H^1 condiz com o número de hidrogênio da molécula. Além disso, foi possível observar mudanças no campo magnético principalmente na hidroxila fenólica, que passou para campo magnético mais alto (de 14 ppm para 8 ppm), e nas metilas vicinais próximas a carbonila. Além disto, outros sinais, que não estavam presentes no espectro do HP3, são visíveis, como o singlete* do próton da amina em 1.61 ppm, o duplete em 4.85 ppm e outros sinais de metilas em torno de 1 ppm. No espectro de IV foi possível observar o aparecimento de banda de hidroxila em 3250 cm^{-1} , que

* Em RMN H^1 , os prótons ligados ao nitrogênio são desacoplados do átomo de nitrogênio e dos prótons dos carbonos adjacentes, aparecendo no espectro como um singlete (Silverstein et al., 2005).

em HP3 não era visível, e de amina em 3408 cm^{-1} . Assim sendo, a síntese do LASOM 137 foi confirmada (Figura 13).

A frequência do próton da amina é diferente quando se compara os espectros de LASOM 170 e LASOM 137 devido à ponte de hidrogênio possivelmente mais forte entre a amina e a hidroxila em LASOM 170 que em LASOM 137. Este comportamento também pode ser evidenciado na diferença de reatividade entre HP2 e HP3, sendo que as reações de aminação redutiva partindo de HP2 apresentaram menor rendimento quando partindo de HP3.

Atividade anti-*Trypanosoma cruzi*

A atividade anti-*T. cruzi* foi avaliada a fim de eleger um *hit* entre os benzopiranos de *H. polyanthemum* e assim originar uma coleção de moléculas com potencial atividade contra epimastigotas de *T. cruzi*.

O HP2 foi a molécula mais ativa, mostrando percentual de inibição superior ao nifurtimox na dose de $25\text{ }\mu\text{M}$, fármaco de escolha no tratamento da doença de Chagas (Figura 14). Além disso, apresentou IC_{50} de $25\text{ }\mu\text{M}$ ($\text{IC}_{50}\text{ nifurtimox} = 39\text{ }\mu\text{M}$) e seletividade 2,5 vezes maior para células de epimastigotas que macrófagos. O ensaio de citotoxicidade mostrou $\text{IC}_{50} = 62,5\text{ }\mu\text{M}$, superior a dose que inibe 50% do crescimento de epimastigotas.

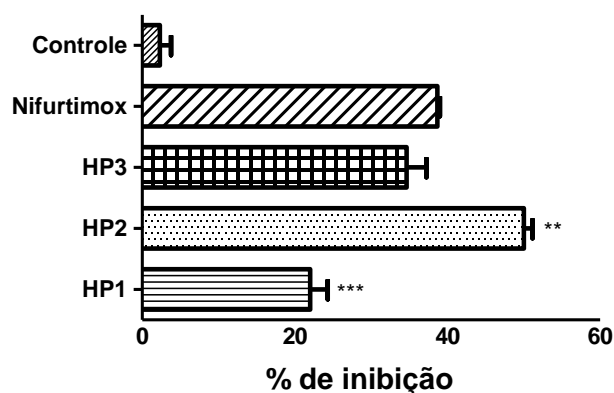


Figura 14. Percentual de inibição dos compostos testados em epimastigotas de *T. cruzi*.

Outros benzopiranos (Figura 9) também apresentaram esta atividade, como os isolados por Marucci e colaboradores (2001) do própolis brasileiro, testados frente tripomastigotas, forma circulante do protozoário no hospedeiro; por Severino e colaboradores (2009), de *Hortia oreadica* (Rutaceae), frente a *T. brucei rhodesienses* e por Batista e colaboradores (2008) frente a epimastigotas de *T. cruzi* ($IC_{50} = 2,82-558,3 \mu M$), entre outros.

Assim sendo, o HP2, por apresentar atividade superior ao nifurtimox e seletividade com baixa citotoxicidade, pode ser considerado um protótipo para futuras modulações químicas objetivando a obtenção de novos candidatos a fármacos com atividade anti-*T. cruzi*.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Foi possível isolar e caracterizar os benzopiranos HP1, HP2 e HP3 de *H. polyanthemum* bem como obter três moléculas inéditas destes compostos (LASOM 138, LASOM 170, LASOM 137), já caracterizados parcialmente, sendo ainda necessário realizar o espectro de RMN C^{13} . Também foi possível observar que os benzopiranos isolados são sensíveis a altas temperaturas e longos tempos de reação (maiores que 3 dias). Como perspectivas têm-se a adição de outras aminas, como benzilamina, hidrazina, etc., além de outras modificações, como a alquilação da hidroxila fenólica em HP2 e HP3, redução da dupla ligação do anel pirano com adição de grupos alquil-amina, entre outros.

Também foi possível eleger um novo *hit* para novas drogas com atividade anti-*T. cruzi*, já que HP2 mostrou seletividade para as células dos epimastigotas. Como perspectivas têm-se a obtenção de derivados aminados de HP2 e experimentos de avaliação da atividade destes compostos, além da obtenção de sais para os testes frente a *Trichomonas vaginalis*, onde as condições *in vitro* desfavorecem a aplicação de moléculas apolares.

CAPÍTULO 3: Avaliação da atividade larvívica do extrato de *H. polyanthemum* (Guttiferae) e seus compostos majoritários contra *Aedes aegypti* (Culicidae)

Aedes aegypti é um mosquito distribuído em todo mundo sendo responsável por transmitir o vírus da dengue e da febre amarela (Gubler, 2005). Nos países tropicais e subtropicais é estimado que 3,5 bilhões de pessoas estão em risco de infecção por dengue (Kyle e Herris, 2008). Além disto, o mosquito pode também transmitir arbovirose causada pelo vírus Chikungunya na Ásia (Schwartz e Albert, 2010; Singh e Unni, 2011). O controle de *A. aegypti* pode ser realizado pela eliminação dos criadouros, como água parada, e pelo uso de inseticidas. Muitos destes produtos agem no sistema nervoso central dos insetos pela interferência nos canais de sódio certos receptores e enzimas. O constante uso, entretanto, pode induzir resistência, que incluem a redução da penetração do inseticida, aumento na taxa enzimática e sensibilidade diminuída do sítio de ação (Braga e Vale, 2007).

Algumas espécies de *Hypericum* (Guttiferae) têm sido testadas contra larvas de importância medicinal e agrícola. O extrato hidrodestilado de *H. scabrum* se mostrou larvicida contra o vetor do vírus do Oeste do Nilo, *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) (Cetin et al., 2011). O extrato aquoso de *H. perforatum* demonstrou efeito na eclosão de ovos em diferentes estágios da mosca de importância aquícola, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) (Al-mazra'awi e Ateyyat, 2009), enquanto o extrato acetona:metanol mostrou atividade inseticida e reguladora do crescimento em *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera: Lygaeidae) (Alexenizer e Dorn, 2007).

O extrato lipofílico de *H. polyanthemum* tem como compostos majoritários os benzopiranos HP1, HP2 e HP3 (Ferraz et al., 2001). De acordo com a literatura, estas moléculas inibem algumas monoamina oxidases (Gnerre et al., 2001). Além disso, são estruturalmente similares aos precocenos, descritos como inibidores dos hormônios juvenilizantes e da alimentação em muitas espécies (Szczepanik et al., 2005; Bowers et al., 1976; Oliveira Filho et al., 1980; Wilson et al., 1983; Bitsch e Bitsch, 1984; Ayoade, 1996). Análogos de reguladores do crescimento ou hormônios juvenilizantes são considerados inseticidas alternativos uma vez que agem em doses subletais no desenvolvimento e reprodução dos insetos.

Então, considerando os aspectos estruturais dos benzopiranos e o fato de o gênero *Hypericum* não ter sido avaliado contra espécies de *Aedes*, este capítulo tem

como objetivo avaliar a atividade larvicida e reguladora do crescimento do extrato lipofílico de *H. polyanthemum* e compostos isolados, HP1, HP2 e HP3, em *A. aegypti*. Os resultados são apresentados e discutidos na forma de manuscrito científico.

Aedes aegypti é um mosquito distribuído em todo mundo sendo responsável por transmitir o vírus da dengue e da febre amarela (Gubler, 2005). Nos países tropicais e subtropicais é estimado que 3,5 bilhões de pessoas estão em risco de infecção por dengue (Kyle e Herris, 2008). Além disto, o mosquito pode também transmitir arbovirose causada pelo vírus Chikungunya na Ásia (Schwartz e Albert, 2010; Singh e Unni, 2011).

O controle de *A. aegypti* pode ser realizado pela eliminação dos criadouros, como água parada, e pelo uso de inseticidas. Muitos destes produtos agem no sistema nervoso central dos insetos pela interferência nos canais de sódio certosreceptores e enzimas. O constante uso, entretanto, pode induzir resistência, que incluem a redução da penetração do inseticida, aumento na taxa enzimática e sensibilidade diminuída do sítio de ação (Braga e Vale, 2007).

Algumas espécies de *Hypericum* (Guttiferae) têm sido testadas contra larvas de importância medicinal e agrícola. O extrato hidrodestilado de *H. scabrum* se mostrou larvicida contra o vetor do vírus do Oeste do Nilo, *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) (Cetin et al., 2011). O extrato aquoso de *H. perforatum* demonstrou efeito na eclosão de ovos em diferentes estágios da mosca de importância aquícola, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) (Al-mazra'awi e Ateyyat, 2009), enquanto o extrato acetona:metanol mostrou atividade inseticida e reguladora do crescimento em *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera: Lygaeidae) (Alexenizer e Dorn, 2007).

O extrato lipofílico de *H. polyanthemum* tem como compostos majoritários os benzopiranos HP1, HP2 e HP3 (Ferraz et al., 2001). De acordo com a literatura, estas moléculas inibem algumas monoamina oxidases (Gnerre et al., 2001). Além disso, são estruturalmente similares aos precocenos, descritos como inibidores dos hormônios juvenilizantes e da alimentação em muitas espécies (Szczepanik et al.,

2005; Bowers et al., 1976; Oliveira Filho et al., 1980; Wilson et al., 1983; Bitsch e Bitsch, 1984; Ayoade, 1996). Análogos de reguladores do crescimento ou hormônios juvenilizantes são considerados inseticidas alternativos uma vez que agem em doses subletais no desenvolvimento e reprodução dos insetos.

Então, considerando os aspectos estruturais dos benzopiranos e o fato de o gênero *Hypericum* não ter sido avaliado contra espécies de *Aedes*, este capítulo tem como objetivo avaliar a atividade larvicida e reguladora do crescimento do extrato lipofílico de *H. polyanthemum* e compostos isolados, HP1, HP2 e HP3, em *A. aegypti*. Os resultados serão descritos brevemente a seguir visto que o manuscrito científico foi submetido à revista "*Industrial Crops and Products*".

A atividade larvicida frente à *Aedes aegypti* do extrato *n*-hexano de *H. polyanthemum* e dos benzopiranos isolados HP1, HP2 e HP3 foi avaliada. HP2 e HP3 apresentaram atividade semelhante ($LC_{50} = 34$ e $41,4 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) enquanto que o HP1 foi dez vezes mais potente ($LC_{50} = 3,4 \mu\text{g/mL}$). Isto demonstra que a atividade do extrato *n*-hexano de *H. polyanthemum* ($LC_{50} = 121 \mu\text{g/mL}$) pode ser atribuída aos benzopiranos. Também é possível prever uma relação estrutura atividade já que as moléculas com grupos mais eletrodoadores, como -OH em HP2 e HP3, foi prejudicial para a atividade larvicida.

A atividade reguladora do crescimento foi avaliada quanto à eclosão de pupas e adultos durante 16 dias. Testou-se a molécula mais ativa, HP1, e o extrato *n*-hexano de *H. polyanthemum*. A atividade apresentada pelo extrato foi mais pronunciada que a do HP1, sendo que o primeiro alterou a eclosão de pupas de 5 dias (controle) para 7 e 14 dias ($LC_{10} = 53 \mu\text{g/mL}$ e $LC_{20} = 71 \mu\text{g/mL}$, respectivamente). Já HP1, alterou somente a eclosão de adultos, aumentando o período de desenvolvimento para 9 dias na $LC_{30} = 2,1 \mu\text{g/mL}$.

Com base nestes resultados, tanto o extrato *n*-hexano de *Hypericum polyanthemum* como o HP1 podem ser adequados no que diz respeito à busca e desenvolvimento de novos inseticidas.

O uso de plantas para o tratamento e alívio de sintomas é prática comum e crescente na medicina popular (Canter et al., 2005), sendo tão antigo quanto a espécie humana. Ao longo da história, os produtos naturais têm sido fonte de recursos terapêuticos devido a sua ampla diversidade química e biológica. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que de 60% da população mundial utiliza práticas da medicina tradicional, como plantas medicinais, para o tratamento de doenças (OMS, 2002).

Exemplos destas substâncias e das suas aplicabilidades no tratamento e cura de doenças são o emprego consolidado de diversos compostos isolados de plantas, obtidos diretamente da matéria prima vegetal ou a partir de síntese e semi-síntese de estruturas precursoras por elas produzidas. Os glicosídeos cardiotônicos, presentes em espécies do gênero *Digitalis*, são utilizados no tratamento de insuficiência cardíaca (Rahomtoola e Tak, 1996). O taxol, produto isolado de *Taxus brevifolia*, é um dos antineoplásicos mais empregados na terapia contra o câncer (Joshua et al., 2004). Ainda, *Hypericum perforatum* é uma planta largamente utilizada para o tratamento de depressão leve a moderada, provavelmente por ação dos compostos fenólicos hipericina, *pseudo*-hipericina e hiperforina (Cervo et al., 2002). Além disso, pode-se citar a galantamina, alcalóide obtido de vários gêneros da família Amaryllidaceae, empregada na postergação do desenvolvimento dos sintomas da doença de Alzheimer (Heinrich e Teoh, 2004), os ginkgolídeos, como agentes neuroprotetores produzidos por espécies do gênero *Panax* (Ye et al., 2009) e a artemisinina, de *Artemisia annua*, composto alvo de recentes inovações na tecnologia de fármacos antimaláricos (Kouznetsov e Gómez-Barrio, 2009).

A atividade antiparasitária de espécies da família Guttiferae contendo diferentes derivados de compostos fenólicos, especialmente os derivados de cumarinas e benzopiranos, vem se mostrando promissora, como discutido anteriormente. Também, a curcumina, extraída de *Curcuma longa* L., está presente em condimentos e vários alimentos como corante, demonstrou sua efetividade em testes pré-clínicos contra *Trypanosma cruzi* em camundongos, reduzindo a parasitemia e parasitismo nestes animais, além de aumentar a sobrevivência

(Nagajyothi et al., 2012). Neste sentido, planejou-se a hibridação molecular entre a curcumina e cumarina, além da obtenção de novos derivados aminados dos benzopiranos isolados de *Hypericum polyanthemum*. Em outra frente de trabalho, testou-se a atividade larvívica contra *Aedes aegypti* do extrato lipofílico de *H. polyanthemum* e benzopiranos isolados visto que os mesmos são similares aos precocenos, moléculas conhecidas pela sua atividade insetívica e larvívica (Bowers et al., 1976; Oliveira Filho et al., 1980; Wilson et al., 1983; Bitsch e Bitsch, 1984; Ayode, 1996; Szczepanik et al., 2005).

A hibridação molecular entre a curcumina e cumarina foi realizada com 90% de rendimento, a 75 °C, 4 h de reação, em aquecimento convencional. O uso do aquecimento em micro-ondas foi inferior ao convencional quando utilizado a 100 °C. Isso se deve provavelmente a maior temperatura alcançada no meio reacional em micro-ondas do que no convencional visto que o aquecimento ocorre “de dentro para fora” e a temperatura mensurada no aquecimento convencional pode ser superior ao interior do balão de reação. A atividade antioxidante e anti-*Trypanosoma* sp. foi relatada tanto para a curcumina (Masuda et al., 1999; Banerjee et al., 2008; Khalil et al., 2012; Nagajyothi et al., 2012) como para cumarinas (Hoult e Payá, 1996; Leitão et al., 2004; Vianna et al., 2012). Assim sendo, se avaliou se hibridação molecular contribuiria para a atividade dos farmacóforos isolados. O híbrido obtido apresentou forte atividade antioxidante, demonstrando que as porções farmacofóricas contribuíram para a atividade. Em relação à atividade tripanomicida, a mesma foi inferior à curcumina, entretanto superior ao nifurtimox. Para melhor avaliar a contribuição da hibridação molecular, testes de toxicidade se fazem necessários.

A obtenção de derivados aminados dos benzopiranos foi planejada a fim de aumentar a solubilidade pela presença de grupos amina, o que possibilita a formação de sais, e a lipofilia destes compostos, visto que HP1 e HP2 apresentaram atividade anti-*Trichomonas vaginalis* (Cargnin, 2011). Foram obtidas três moléculas inéditas: LASOM 138 de HP1, LASOM 170 de HP2 e LASOM 137 de HP3. As moléculas LASOM 170 e LASOM 137 foram obtidas com baixo a médio rendimento em longo tempo de reação, à temperatura ambiente. LASOM 138 foi obtida por

síntese assistida por micro-ondas visto que o HP1 é pouco reativo pela presença de grupos doadores de elétrons (-OMe) e ausência de ponte de hidrogênio entre a cetona aromática e outro grupo, como as hidroxilas presentes em HP2 e HP3.

A atividade larvica frente a *Aedes aegypti* do extrato *n*-hexano de *H. polyanthemum* e benzopiranos isolados era esperada visto que os benzopiranos são similares aos precocenos, descritos como inibidores dos hormônios juvenilizantes e da alimentação em muitas espécies (Bowers et al., 1976; Oliveira Filho et al., 1980; Wilson et al., 1983; Bitsch e Bitsch, 1984; Ayoade, 1996; Szczepanik et al., 2005). Análogos de reguladores do crescimento ou hormônios juvenilizantes são considerados inseticidas alternativos uma vez que agem em doses subletais no desenvolvimento e reprodução dos insetos. Assim sendo, testou-se a atividade larvica dos benzopiranos e extrato; e atividade reguladora do crescimento do benzopirano mais ativo e extrato. Neste teste são avaliadas concentrações subletais, sendo relacionada com os hormônios juvenilizantes. Em relação à atividade larvica, HP2 e HP3 apresentaram atividade similar, sendo o HP1 a molécula mais ativa. Estes resultados demonstraram, como o esperado, que os benzopiranos são os responsáveis pela atividade larvica do extrato. Por outro lado, a atividade reguladora do crescimento foi mais pronunciada no extrato do que no HP1, demonstrando que pode haver sinergismo entre os benzopiranos e outras moléculas neste teste.

CONCLUSÕES GERAIS

Foi possível sintetizar um novo híbrido cumarina-curcumina (LASOM 135), com um ótimo rendimento (90%). Este híbrido apresentou uma boa atividade antioxidante ($IC_{50} < 0,5 \mu M$), superior à curcumina, e tripanomicida ($IC_{50} = 11,8 \mu M$). Entretanto, outros experimentos em relação à atividade antioxidante e estudos de citotoxicidade são necessários para melhor caracterizar a atividade biológica desta molécula. Há, ainda, a perspectiva de síntese de um híbrido duplo cumarina-curcumina-cumaria (5), o que possibilitaria caracterizar a função da hidroxila fenólica nas atividades avaliadas.

Os benzopiranos HP1, HP2 e HP3 foram isolados de *H. polyanthemum*. HP2 demonstrou ser um novo *hit* para novos derivados em relação à atividade tripanomicida ($IC_{50} = 25 \mu M$) e HP1 apresentou ótima atividade larvicida ($LC_{50} = 3,4 \mu g/mL$), inclusive alterando o processo de desenvolvimento das larvas de *Aedes aegypti*. Em relação à atividade apresentada por HP1 frente à *A. aegypti*, experimentos de mecanismo de ação, como os que avaliam a atividade inibitória nas enzimas acetilcolinesterase e glutatona-S-transferase, são necessários.

Além disto, três derivados aminados (LASOM 138, LASOM 170 e LASOM 137) dos benzopiranos isolados de *H. polyanthemum* foram sintetizados e identificados por ponto de fusão, RMN H^1 e IV com médio a baixo rendimento. Está prevista a obtenção de outros derivados com diferentes alquil e aril aminas. Estas moléculas serão testadas frente aos protozoários *Trichomonas vaginalis* e *Trypanossoma cruzi*, e larvas de *Aedes aegypti*.

- Adams, B.K.; Ferstl, E.M.; Davis, M.C.; Herold, M.; Kurtkaya, S.; Camalier, R.F.; Hollingshead, M.G.; Kaur, G.; Sausville, E.A.; Rickles, F.R.; Snyder, J.P.; Liotta, D.C.; Shoji, M. Synthesis and biological evaluation of novel curcumin analogs as anti-cancer and anti-angiogenesis agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 3871-3883, 2004.
- Allinger, N.L.; Cava, M.P.; Jongh, D.C.; Johnson, C.R.; Lebel, N.A.; Stevens, C.L. **Química Orgánica**, 2.ed. Barcelona: Editorial Reverté S.A., 1991.
- Amado, L.L.; Garcia, M.L.; Ramos, P.B.; Freitas, R.F.; Zafalon, B.; Ferreira, J.L.R.; Yunes, J.S.; Monserrat, J.M. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 2115-2123, 2009.
- Ammon, H.P.; Wahl, M.A. Pharmacology of *Curcuma longa*. **Planta Medica**, v. 57, p. 1-7, 1991.
- Anand, P.; Thomas, S.G.; Kunnumakkara, A.B.; Sundaram, C.; Harikumar, K.B.; Sung, B.; Tharakan, S.T.; Misra, K.; Priyadarsini, I.K.; Rajasekharan, K.N.; Bharat, B.A. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and mother nature. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, p. 1590-1611, 2008.
- Anderson, A.M.; Mitchell, M.S.; Mohan, R.S. Isolation of curcumin from tumeric. **Journal of Chemical Education**, v. 77, p. 359-360, 2000.
- Ayoade, O.; Morooka, S.; Tojo, S. Induction of macroptery, precocious metamorphosis, and retarded ovarian growth by topical application of precocene II, with evidence for its non-systemic allatocidal effects in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. **Journal of Insect Physiology**, v. 42, p. 529-540, 1996.
- Babu, P.S.; Srinivasan, K. Influence of dietary spices on adreanal steroidogenesis in rats. **Nutrition Research**, v. 13, p. 435-444, 1993.
- Babu, K.V.D.; Rajasekharan, K.N. Simplified condition for synthesis of curcumin-I and other curcuminoids. **Organic Preparations and Procedures International**, v. 26, p. 674-677, 1994.
- Barnerjee, A.; Kunwar, A.; Mishr, B.; Priyadarsini, K.I. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin: studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. **Chemico-biological Interactions**, v. 174, p. 134-139, 2008.
- Barthelemy, S.; Vergnes, L.; Moynier, M.; Guyot, D.; Labidalle, S.; Bahraoui, E. Curcumin and curcumin derivatives inhibit Tat-mediated transactivation of type-1 human immunodeficiency virus long terminal repeat. **Research in Virology**, v. 149, p. 43-52, 1998.
- Bassyouni, F.A.; Abu-Bakr, S.M.; Rehim, M.A. Evolution of microwave irradiation and its application in green chemistry and biosciences. **Research on Chemical Intermediates**, v.38, p. 283-322, 2012.

- Batista Jr., J.M.; Lopes, A.A.; Ambrósio, D.L.; Regasini, L.O.; Kato, M.J.; Bolzani, V.S. Natural chromenes and chromene derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, p. 538-540, 2008.
- Bennet, G.T.; Lee, H.H. Xanthonenes from Guttiferae. **Phytochemistry**, v. 28, n. 4, p. 967–998, 1989.
- Bernardi, A.P.M.; Ferraz, A.B.F.; Albring, D.V.; Bordignon, S.A.L.; Schripsema, J.; Bridi, R.; Dutra-Filho, C.S.; Henriques, A.T.; von Poser, G.L. Benzophenones from *Hypericum carinatum*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 784-786, 2005.
- Bernardi, A.P.M.; Maurmann, N.; Rech, S.B.; von Poser, G. Benzopyrans in *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt cultured *in vitro*. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 19, p. 165-170, 2007.
- Bernardi, A.P.M.; Nunes, J.M.; Marchioro, M.K.; Rosa, L.M.G.; von Poser, G.L.; Rech, S.B. Phenolic compounds profiles during *ex vitro* acclimatization of micropropagated *Hypericum polyanthemum*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, p. 694-700, 2008.
- Bilia, A.R.; Gallori, S.; Vincieri, F.F. St. John's wort and depression efficacy, safety and tolerability-an update. **Life Sciences**, v. 70, p. 3077–3096, 2002.
- Bisht, K.; Wagner, K.-H.; Bulmer, A.C. Curcumin, resveratrol and flavonoids as anti-inflammatory, cyto- and DNA-protective dietary compounds. **Toxicology**, v. 278, p. 88-100, 2010.
- Brufola, G.; Fringuelli, F.; Piermatti, O.; Pizzo, F. Simple and Efficient One-Pot Preparation of 3-substituted coumarins in water. **Heterocycles**, v. 43, p. 1257-1266, 1996.
- Brunton, L.; Parker, K.; Blumenthal, D.; Buxton, I. **Goodman & Gilman: Manual of Pharmacology and Therapeutics**. 11.ed. New York: McGraw-Hill Companies, 2008.
- Camacho, M.R.; Phillipson, J.D.; Croft, S.L.; Yardley, V.; Solis, P.N. *In vitro* antiprotozoal and cytotoxic activities of some alkaloids, quinones, flavonoids and coumarins. **Planta Medica**, v. 70, p. 70-72, 2004.
- Canter, P.H.; Thomas, H.; Ernst, E. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology – Review. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n.4, p. 180-185, 2005.
- Carey, F.A.; Sundberg, R.J. Advanced organic chemistry – Part B: Reactions and Synthesis. 5.ed., New York: Springer, 2007.
- Cargnin, S.T.; Nunes, J.M.; Haas, J.S.; Baladão, L.F.; Cassel, E.; Vargas, R.F.; Rech, S.B.; von Poser, G.L. Supercritical fluid extraction and high performance liquid chromatographic determinations of benzopyrans and phloroglucinol derivative in *Hypericum polyanthemum*. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 83-87, 2010.

- Cargnin, S.T. Enriquecimento de metabólitos secundários ativos de *Hypericum polyanthemum* e avaliação da atividade anti-*Trichomonas vaginalis*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
- Castro, D.; Boiani, L.; Benitez, D.; Hernández, P.; Merlino, a.; Gil, C.; Olea-Azar, C.; González, M.; Cerecetto, H.; Porcal, W. Anti-trypanosomatid benzofuroxans and deoxygenates analogues: synthesis using polymer-supported triphenylphosphine, biological evaluation and mechanism of action studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.44, p. 5055-5065, 2009.
- Cervo, L.; Rozio, M.; Ekalle-Sopp, C.B.; Guiso, G.; Morazonni, P.; Caccia, S. Role of hyperforin in the antidepressant like activity of *Hypericum perforatum* extracts. **Psychopharmacology**, v. 164, p. 423-428, 2002.
- Chen, W.F.; Deng, S.L.; Zhou, B.; Yang, L.; Liu, Z.L. Curcumin and its analogues as potent inhibitors of low density lipoprotein oxidation: H-atom abstraction from the phenolic groups and possible involvement of the 4-hydroxy-3-methoxyphenyl groups. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, p. 526–535, 2006.
- Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P. **Organic Chemistry**. New York: Oxford University, 2001.
- Craft, B.D.; Kerrihard, A.L.; Amarowicz, R.; Pegg, R.B. Phenol-based antioxidants and the *in vitro* methods for their assessment. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, p. 148-173, 2012.
- Dall’Agnol, R.; Ferraz, A.; Bernardi, A.P.; Albring, A.; Nör, C.; Sarmiento, L.; Lamb, L.; Hass, M.; von Poser, G.; Schapoval, E.E.S. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. **Phytomedicine**, v. 10, p. 511–516, 2003.
- Dall’agnol, R.; Ferraz, A.; Bernardi, A.P.; Albring, D.; Nör, C.; Schopoval, E.E.S.; Von Poser, G.L. Bioassay-guided isolation of antimicrobial benzopyrans and phloroglucinol derivatives from *Hypericum* species. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 291-293, 2005.
- de la Hoz, A.; Díaz-Ortiz; Moreno, A. Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects. **Chemical Society Review**, v. 34, p. 164-178, 2005.
- Dong, L.; Aleem, S.; Fink, C.A. Microwave-accelerated reductive amination between ketones and ammonium acetate. **Tetrahedron Letters**, v. 51, p. 5210-5212, 2010.
- Douna, H.; Bacelaar, B.M.; Pellikaan, H.; Olivier, B.; Pieters, T. Neuroprotection in Parkinson’s disease: a systematic review of the preclinical data. **The Open Pharmacology Journal**, v. 6, p. 12-26, 2012.
- Filho, V.C.; Yunes, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99 – 105, 1998

- Ferraz, A.B.F.; Bordignon, S.A.L.; Staats, C.; Schripsema, J.; von Poser, G.L. Benzopyrans from *Hypericum polyanthemum*. **Phytochemistry**, v. 57, p. 1227-1230, 2001.
- Ferraz, A.; Grivicich, I.; Von Poser, G.L.; Faria, D.H.; Kayser, G.B.; Schwartzmann, G.; Henriques, A.T.; da Rocha, A. B. Antitumor activity of three benzopyrans isolated from *Hypericum polyanthemum*. **Phytomedicine**, v. 12, p. 112–115, 2005.
- Frère, S.; Thiéry, V.; Besson T. Microwave acceleration of the Pechmann reaction on graphite/montmorillonite K10: application on the preparation of 4 substituted 7-aminocoumarins. **Tetrahedron Letters**, v. 42, p. 2791-2794, 2001.
- Fujisawa, S.; Atsumi, T.; Murakami, Y.; Kadoma, Y. Dimerization, ROS formation, and biological activity of *o*-methoxyphenols. **Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis**, v. 53, p. 28-38, 2005.
- Garazd, M.M.; Garazd, Y.L.; Khilya, V.P. Neoflavones. 2. Methods for synthesizing and modifying 4-aryl-cumarins. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 41, p. 245-71, 2005.
- Gnerre, C.; von Poser, G.L.; Ferraz, A.; Viana, A.; Testa, B.; Rates, S.M.K. Monoamine oxidase inhibitory activity of some *Hypericum* species native to South Brazil. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, p. 1273-1279, 2001.
- González-Salazar, A.; Molina-Jijón, E.; Correa, F.; Zarco-Márquez, G.; Calderón-Oliver, M.; Tapia, E.; Zazueta, C.; Pedraza-Chaverri, J. Curcumin protects from cardiac reperfusion damage by attenuation of oxidant stress and mitochondrial dysfunction. **Cardiovascular Toxicology**, v. 11, p. 357-364, 2011.
- Govender, T.; Hojabri, L.; Moghaddam, F.M.; Arvidsson, P.I. Organocatalytic synthesis of chiral benzopyrans. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 17, p. 1763-1767, 2006.
- Graebin, C.S.; Madeira, M.F.; Yokoyama-Yasunaka, J.K.U.; Miguel, D.C.; Uliana, S.R.B.; Benitez, D.; Cerecetto, H.; González, M.; Rosa, R.G.; Eifler-Lima, V.L. Synthesis and *in vitro* activity of limonene derivatives against *Leishmania* and *Trypanosoma*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 1524-1528, 2010.
- Grivicich, I.; Ferraz, A.; Faria, D.H.; Regner, A.; Schwartzmann, G.; Henriques, A.T.; von Poser, G.L.; Da Rocha, A.B. Synergistic effect of three benzopyrans isolated from *Hypericum polyanthemum* in U-373 MG glioblastoma cell line. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 1577-1580, 2008.
- Gubler, D.J. The emergence of epidemic dengue fever and dengue hemorrhagic fever in the Americas: a case of failed public health policy. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 17, p. 221-224, 2005.
- Göçin, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, p. 345-391, 2012.

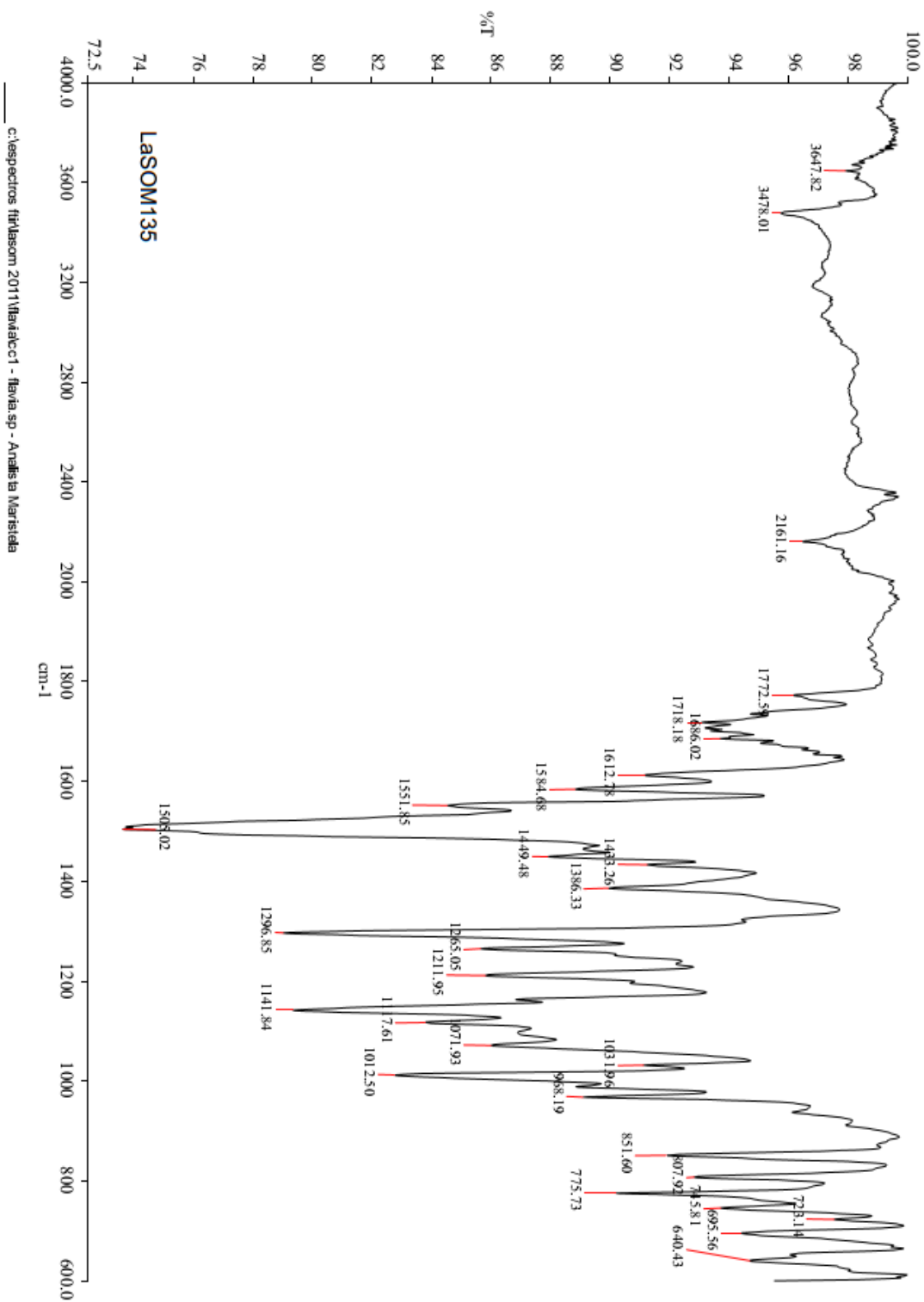
- Haas, J.S. Isolamento e avaliação biológica de compostos fenólicos em espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- Haas, J.S.; Viana, A.F.; Heckler, A.P.M.; von Poser, G.L.; Rates, S.M.K. The antinociceptive effect of a benzopyran (HP1) isolated from *Hypericum polyanthemum* in mice hot-plate test is blocked by naloxone. **Planta Medica**, v. 76, p. 1419-1423, 2010.
- Haddad, M.; Sauvain, M.; Deharo, E. Curcuma as a parasiticidal agent: a review. **Planta Medica**, v. 77, p. 672-678, 2011.
- Heinrich, M.; Teoh, H.L. Galanthamine from snowdrop - the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, n. 2-3, p.147-162, 2004.
- Hoult, J.R.S.; Payá, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. **General Pharmacology**, v. 27, p. 713-722, 1996.
- Ishida, J.; Ohtsu, H.; Tachibana, Y.; Nakanishi, Y.; Bastow, K.F.; Nagai, M.; Wang, H.-H.; Itokawa, H.; Lee, K.-H. Antitumor agents- Part 214: Synthesis and evaluation of curcumin analogues as cytotoxic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 3481-3487, 2002.
- Joshua, A.M.; Carter, J.R.; Beale, P. The use of taxanes in choriocarcinoma; a case report and review of the literature. **Gynecologic Oncology**, v. 94, n. 2, p. 581-583, 2004.
- Khalil, O.A.K.; Oliveira, O.M.M.F.; Velloso, J.C.R.; Quadros, A.U.; Dalposso, L.M.; Karam, T.K.; Mainardes, R.M.; Khalil, N.M. Curcumin antifungal and antioxidant activities are increased in the presence of ascorbic acid. **Food Chemistry**, v. 133, p. 1001-1005, 2012.
- Kitanov, G. M.; Nedialkov, P. T. Mangiferin and isomangiferin in some *Hypericum* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, n. 6, p. 647-653, 1998.
- Kontogiorgis, C.; Detsi, A.; Hadjipavlou-Litina, D. Coumarin-based drugs: a patent review (2008-present). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 22, p. 437-454, 2012.
- Kouznetsov, V.V.; Gómez-Barrio, A. Recent developments in the design and synthesis of hybrid molecules based on aminoquinoline ring and their antiplasmodial evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 3091-3113, 2009.
- Kumar, S.; Narain, U.; Tripathi, S.; Misra, K. Synthesis of curcumin bioconjugates and study of their antibacterial activities against β -lactamase-producing microorganisms. **Bioconjugate Chemistry**, v. 12, p. 464-469, 2001.
- Kyle, J.L., Harris, E. Global spread and persistence of dengue. **Annual Review of Microbiology**, v. 62, p. 71-92, 2008.

- Lee, R. Margaritis, M.; Channon, K.M.; Antoniadis, C. Evaluating oxidative stress in human cardiovascular disease: methodological aspects and considerations. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 2504-2520, 2012.
- Leitão, A.; Andricopulo, A.D.; Oliva, G.; Pupo, M.T.; Marchi, A.A.; Vieira, P.C.; Silva, M.F.G.F.; Ferreira, V.F.; Souza, M.C.B.V.; Sá, M.M.; Moraes, V.R.S.; Montanari, C.A. Structure–activity relationships of novel inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 2199-2204, 2004.
- Leung, K.; Leung, P.; Kong, L.; Leung, P. Immunomodulatory effects of esculetin (6,7-dihydroxycoumarin) on murine lymphocytes peritoneal macrophages. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 2, p. 181-187, 2005.
- Liang, G.; Shao, L.; Wang, Y.; Zhao, Z.; Chu, Y.; Xiao, J.; Zhao, Y.; Li, X.; Yang, S. Exploration and synthesis of curcumin analogues with improves structural stability both in vitro and in vivo as cytotoxic agents. **Biochemistry and Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 2623-2631, 2009.
- Marcucci, M.C.; Ferreres, F.; García-Viguera, C.; Bankova, V.S.; De Castro, S.L.; Dantas, A.P.; Valente, P.H.M.; Paulino, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 105-112, 2001.
- Masuda, T.; Hidaka, K.; Shinohara, A.; Maekawa, T.; Takeda, Y.; Yamaguchi, H. Chemical studies on antioxidant mechanism of curcuminoid: analysis of radical reaction products from curcumin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 71-77, 1999.
- McMurry, J. **Organic Chemistry**. 7.ed. Belmont: Thomson, 2008.
- Ministério da Saúde, Brasil. Doença de Chagas. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1530. Acesso: 21/09/2012.
- Moon, H.I. Antiplasmodial and cytotoxic activity of phloroglucinol derivatives from *Hypericum erectum* Thunb. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 941-944, 2010.
- Mouloungui, Z.; Noirot, V. Stabilization of curcumin by complexation with divalent cations in glycerol/water system. **Bioorganic Chemistry and Applications**, v. 2010, p. 1-8, 2010.
- Muhammad, I.; Li, X.-C.; Dunbar, D.C.; Elsohly, M.A.; Khan, I.A. Antimalarial (+)-*trans*-hexahydrodibenzopyran derivatives for *Machaerium multiflorum*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1322-1325, 2001.
- Nagajyothi, F.; Zhao, D.; Weiss, L.M.; Tanowitz, H.B. Curcumin treatment provides protection against *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology Research**, v. 110, p. 2491-2499, 2012.
- Narender, T.; Gupta, S.; Gupta, S. A convenient and biogenetic type synthesis of few naturally occurring chromeno dihydrochalcones and their *in vitro* antileishmanial activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 3913-3916, 2004.

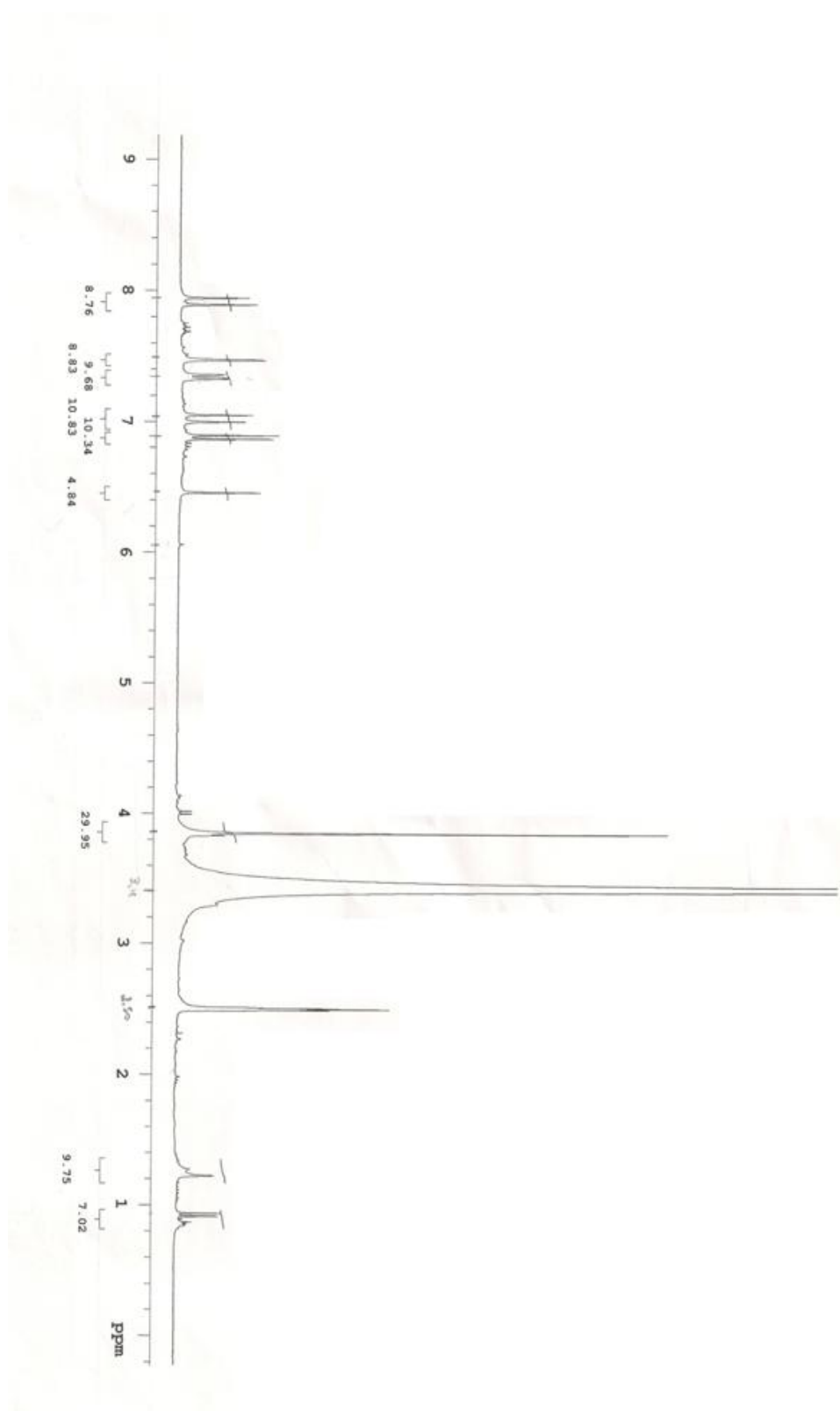
- Neves, D.P.; de Melo, A.L.; Linardi, P.M.; Vitor, R.W.A.. **Parasitologia Humana**. 12.ed., São Paulo: Atheneu, 2011.
- Newmann, D.J.; Cragg, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311-335, 2012.
- Nijssen, L.M. **Volatile compounds in food: qualitative and quantitative data**, 7.ed. Zeist, Netherlands: TNO-CIVO Food Analysis Institute, 1996.
- Nör, C.; Albring, D.; Ferraz, A. B. F.; Schripsema, J.; Pires, V.; Sonnet, P.; Guillaume, D.; von Poser, G. L. Phloroglucinol derivatives from four *Hypericum* species belonging to the Trigynobrathys section. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 517–519, 2004.
- Nurfina, A.N.; ReksHADiprodjo, M.S.; Timmerman, H.; Jenie, U.A.; Sugiyanto, D.; van der Goot, H. Synthesis of some symmetrical curcumin derivatives and their anti-inflammatory activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 32, p. 321-328, 1997.
- Oliaro-Bosso, S.; Viola, F.; Taramino, S.; Tagliapietra, S.; Barge, A.; Cravotto, G.; Balliano, G. Inhibitory effect of umbelliferone aminoalkyl derivatives on oxidosqualene cyclases from *S. cerevisiae*, *T. cruzi*, *P. carinii*, *H. sapiens*, and *A. thaliana*: a structure–activity study. **Pharmaceutical & Medicinal Chemistry**, v. 2, p. 226-233, 2007.
- OMS - Organización Mundial de la Salud. Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional. Ginebra, 75 p., 2002.
- Orhan, I.E.; Erdem, S.A.; Senol, F.S.; Kartal, M.; Sener, B. Exploration of cholinesterase and tyrosinase inhibitory, antiprotozoal and antioxidant effects of *Buxus sempervirens* L. (boxwood). **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 116-121, 2012.
- Pabon, H.J.J. Synthesis of curcumin and related compounds. **Journal of the Royal Netherlands Chemical Society**, v. 83, p. 379-389, 1964
- Pandey, A.; Gupta, R.K.; Bhargava, A.; Agrawal, B. Antibacterial activities of curcumin bioconjugates. **International Journal of Pharmacology**, v. 7, p. 874-879, 2011.
- Paveto, C.; Güida, M.C.; Esteva, M.I; Martino, V.; Coussio, J.; Flawiá, M.M.; Torres, H.N. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of Green Tea (*Camellia sinensis*) catequins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 169-174, 2004.
- Payton, F.; Sandusky, P.; Alworth, W.L. NMR study of the solution structure of curcumin. **Journal of Natural Products**, v. 7, p. 143-146, 2007.
- Pechmann, H.V. Neue bildungsweise der cumarine, synthese des daphnetins. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesselchaft**, v. 17, p. 929-936, 1884.
- Perkin, W.H. On the formation of coumarins and of cinnamic and of other analogous acids from the aromatic aldehydes. **Journal of the Chemical Society**, v. 31, p. 388-427, 1877.

- Pocernich, C.B.; Lange, M.L.B.; Sultana, R.; Butterfielf, D.A. Nutritional approaches to modulate oxidative stress in Alzheimer's disease. **Current Alzheimer Research**, v.8, p. 452-469, 2011.
- Rahimtoola, S.H.; Tak, T. The use of *Digitalis* in heart failure. **Current Problems in Cardiology**, v. 21, p. 781-853, 1996
- Rassi, A.; Rassi, A.Jr.; Marin-Neto, J.A. Chagas disease. **The Lancet** v. 375, p. 1388-1402, 2010.
- Ribeiro, V.L.S.; Toigo, E.; Bordignon, S.A.L.; Gonçalves K.; von Poser, G. Acaricidal properties of extracts from the aerial parts of *Hypericum polyanthemum* on the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 199-203, 2007.
- Robson, N. K. B. Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 8. Sections 29. Brathys (part 2) and 30. Trigynobrathys. **Bulletin British Museum Natural History. Botany Series**, v. 20, n. 1, p. 1-151, 1990.
- Robson, N. K. B. Studies in the genus *Hypericum* L. (Clusiaceae).¹ Section 9. *Hypericum sensu lato* (part 3): subsection 1. *Hypericum* series 2. *Senanensia*, subsection 2. *Erecta* and section 9b. *Graveolentia*. **Systematics and Biodiversity**, v. 4, n. 1, p. 19-98, 2006.
- Rocha, L.; Marston, A.; Potterat, O.; Kaplan, M.A.C.; Stoeckli-Evans, H.; Thull, U.; Testa, B.; Hotettmann, K. An antifungal gamma-pyrone and xanthenes with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 1381-1385, 1994.
- Sabry, N.M.; Mohamed, H.M.; Khattab, E.S.A.E.H.; Motlag, S.S.; El-Agrody, A.M. Synthesis of 4*H*-chromene, coumarin, 12*H*-chromeno[2,3-*d*]pyrimidine derivatives and some of their antimicrobial and cytotoxicity activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 765-772, 2011.
- Sahu, K.S.; Sahu, P.K.; Gupta, S.K.; Thaveselvam, D.; Agarwal, D.D. Synthesis and evaluation of microbial activity of 4*H*-pyrimido[2,1-*b*]benzothiazole, pyrazole and benzylidene derivatives of curcumin. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 366-378, 2012.
- Severino, V.G.P.; Casal, C.M.; Forim, M.R.; Das Graças, M.F.; Da Silva, F.; Rodrigues-Filho, E.; Fernandes, J.B.; Vieira, P.C. Isolation of secondary metabolites from *Hortia oreadica* (Rutaceae) leaves through high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 4275-4281, 2009.
- Sharma, O.P. Antioxidant activity of curcumin and related compounds. **Biochemical Pharmacology**, v. 25, p. 1811-1812, 1976.
- Sharma, R.A.; Gescher, A.J.; Steward, W.P. Curcumin: the story so far. **European Journal of Cancer**, v. 41, p. 1955-1968, 2005.
- Silva, F.A.M.; Borges, M.F.M.; Ferreira, M.A. Métodos para a avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, p. 94-103, 1999.

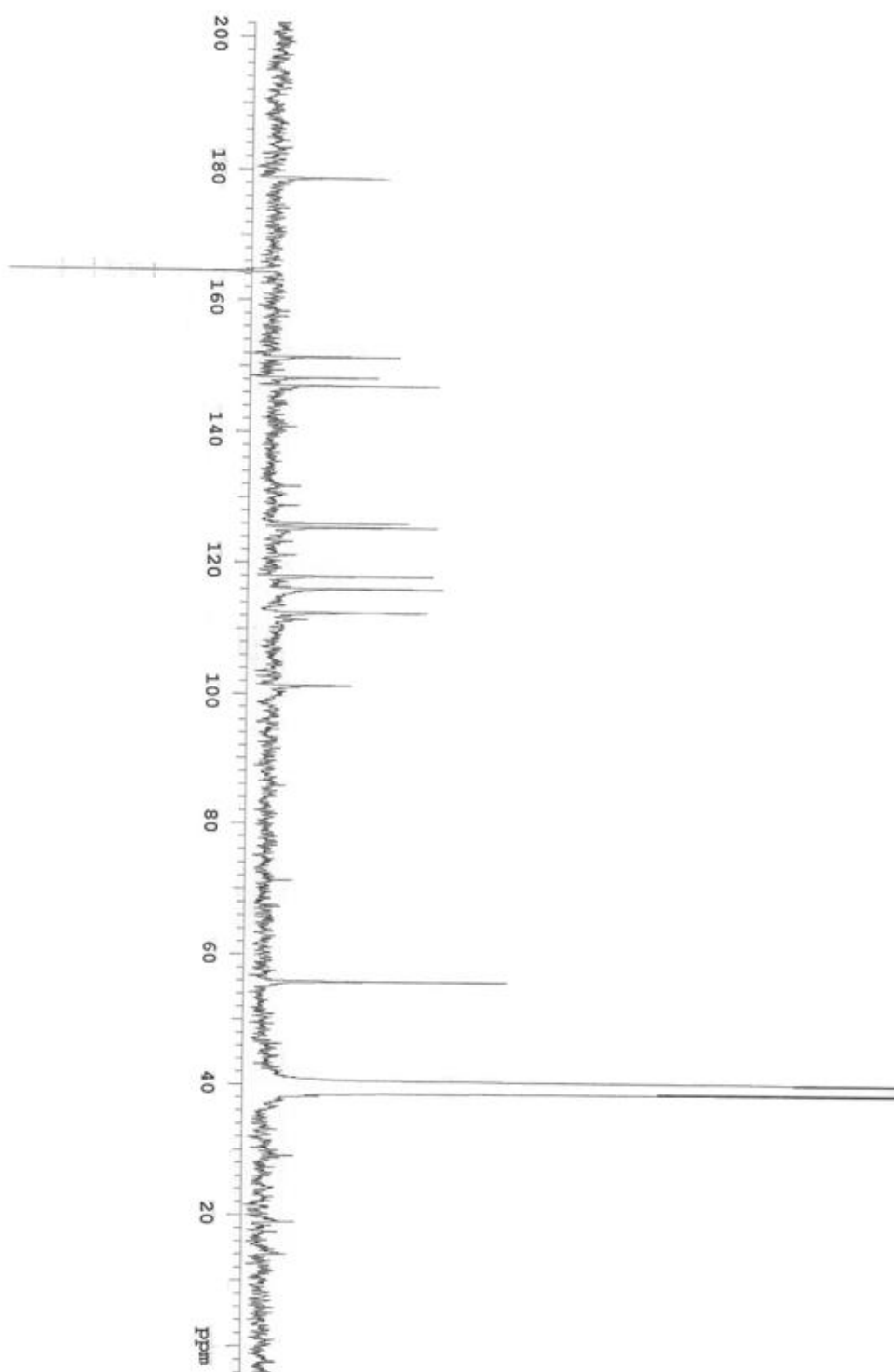
- Silverstein, R.M.; Webster, F.X.; Kiemle, D.J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7.ed. Danvers: John Wiley & Sons, 2005.
- Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS, 2003.
- Tierney, J.P.; Lidström, P. **Microwave Assisted Organic Synthesis**. Oxford: Blackwell Publishing, 2005.
- Tyagi, B.; Mishra, K.M.; Jasra, R.S. Synthesis of 7-substituted 4-methyl coumarins bay Pechmann reaction using nano-crystalline sulfated-zirconia. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 276, p. 47-56, 2007.
- Verrota, L.; Appendino, G.; Bombardelli, E.; Brun, R. In vitro antimalarial activity of hyperforin, a prenylated acylphloglucinol. A structure activity study. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 1544-1548, 2007.
- Vianna, D.R.; Bubols, G.; Meirelles, G.; Silva, B.V.; Rocha, A.; Lanznaster, M.; Monserrat, J.M.; Garcia, S.C.; von Poser, G.; Eifler-Lima, V.J. Evaluation of the antioxidant capacity of synthesized coumarins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 7260-7270, 2012.
- Viegas-Junior, C.; Danuello, A.; Bolzani, V.S.; Barreiro, V.S.; Barreiro, V.J.; Fraga, C.A.M. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1829-1852, 2007.
- von Poser, G.L.; Rech, S.B.; Rates, S.M.K. **Chemical and Pharmacological Aspects of Southern Brazilian Hypericum Species**. In: da Silva, J.A.T (Ed.). Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology - Advantages and Topical Issues, Volume IV. United Kingdom: Global Science Books, 2006.
- Watts, K.R.; Tenney, K.; Crews, P. The structural diversity and promise of antiparasitic marine invertebrate-derived small molecules. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 808-818, 2010.
- Wichitnithad, W.; Nimmannit, U.; Wacharasindhu, S.; Rojsitthisak, P. Synthesis, characterization and biological evaluation of succinate prodrugs for coloncancer treatment. **Molecules**, v. 16, p. 1888-1900, 2011.
- Wright, J.S. Predicting the antioxidant activity of curcumin and curcuminoids. **Journal of Molecular Structures**, v. 591, p. 207-217, 2002.
- Ye, R.; Li, L.; Han, J.; Kong, X.; Cao, R.; Rao, Z.; Zhao, G. Neuroprotective effects of ginsenoside Rd against oxygen-glucose deprivation in cultured hippocampal neurons. **Neuroscience Research**, v. 64, n. 3, p. 306-310, 2009.
- Youssef, K.M.; El-Sherbeny, M.A. Synthesis and antitumor activity of some curcumin analogs. **Archiv der Pharmazie - Chemistry in Life Science**, v. 338, p. 181-189, 2005.
- Zhang, Q.; Zhong Y.; Lin-Na, Y.; Sun, X.; Gong, T.; Zhang, Z.-R. Synthesis and preliminary evaluation of curcumin analogues as cytotoxic agents. **Biorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, p.1010-1014, 2011.



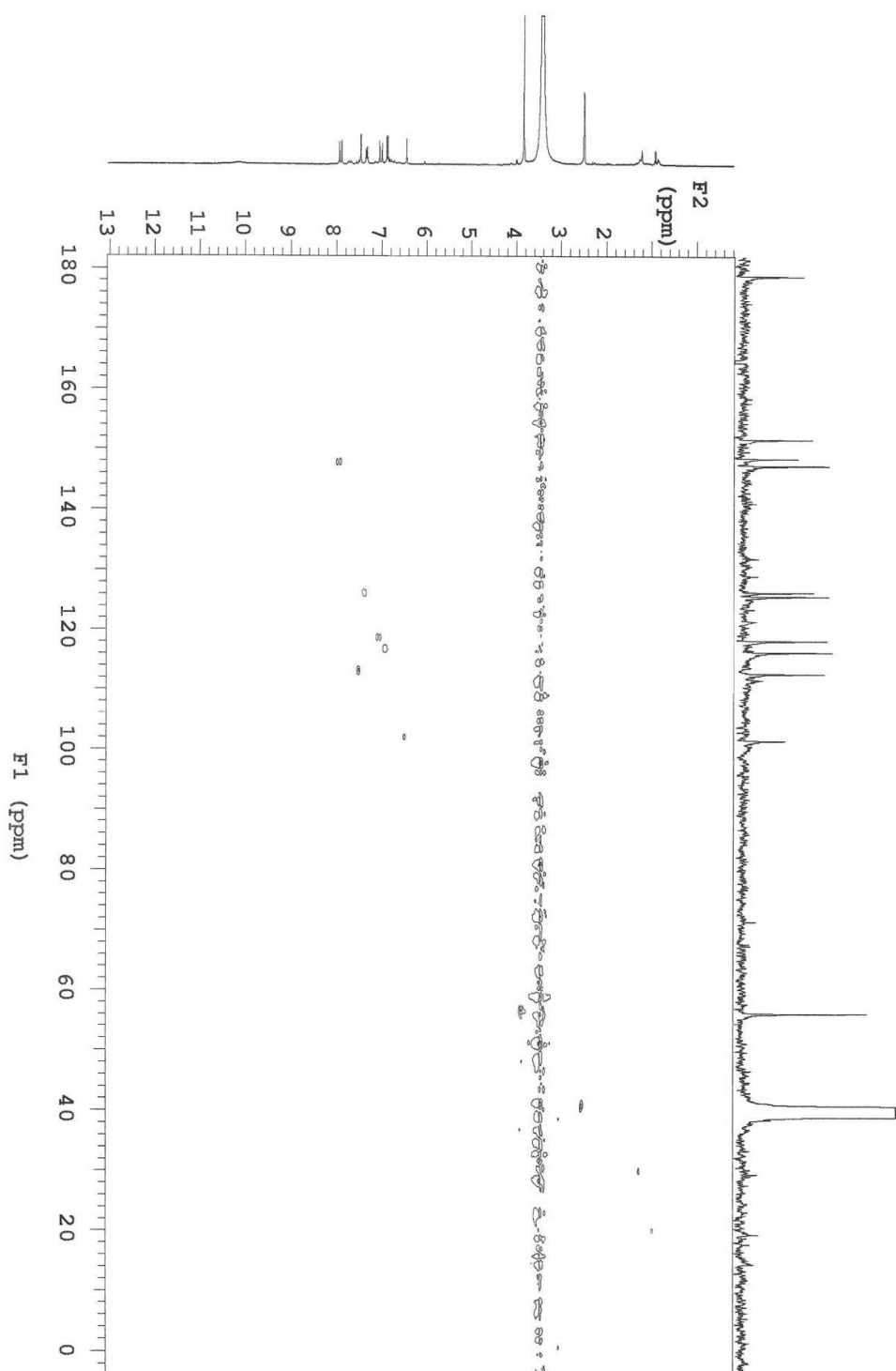
LASOM 135, espectro de infravermelho.



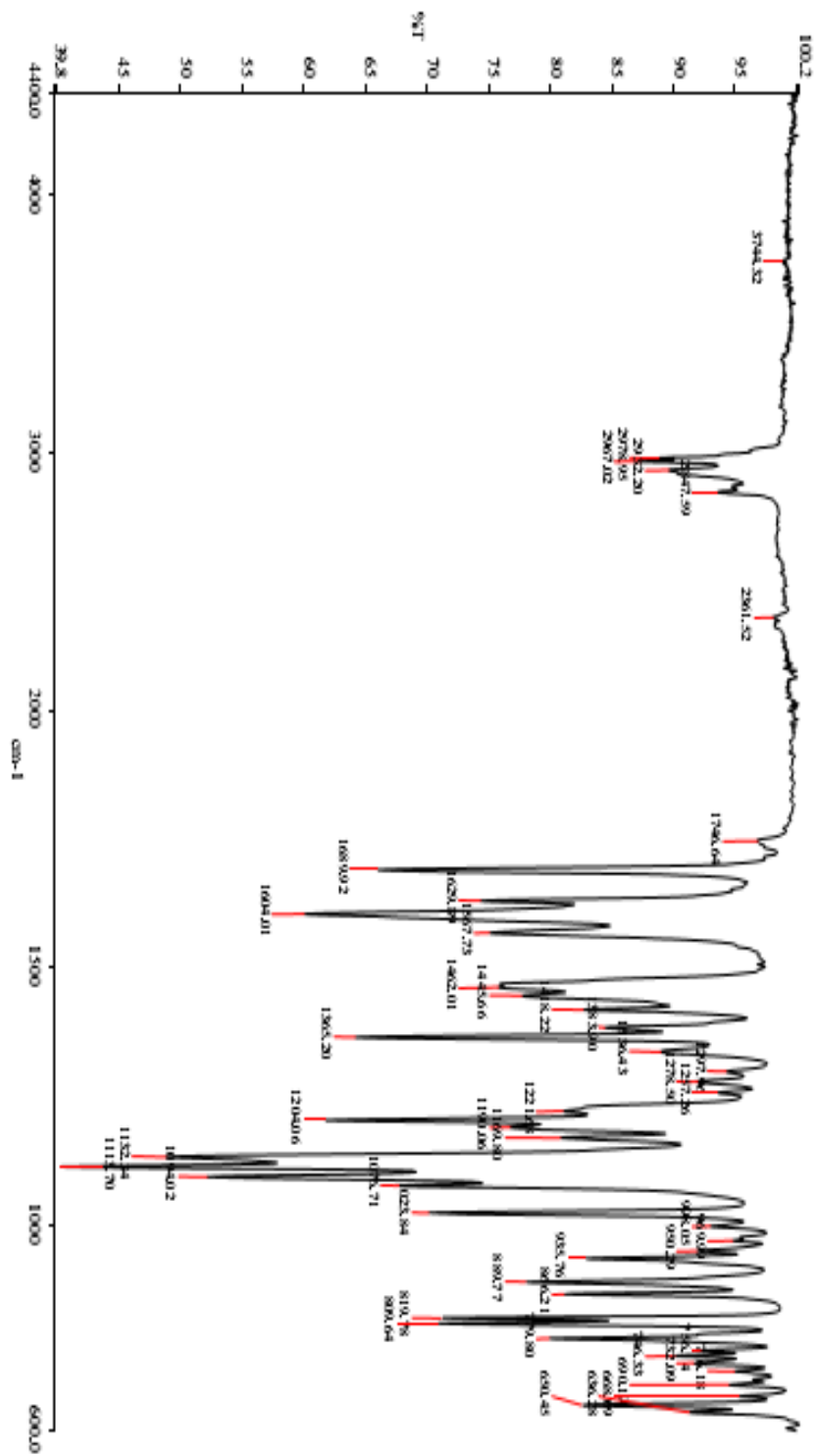
LASOM 135 RMN H^1 , DMSO, 300 MHz.



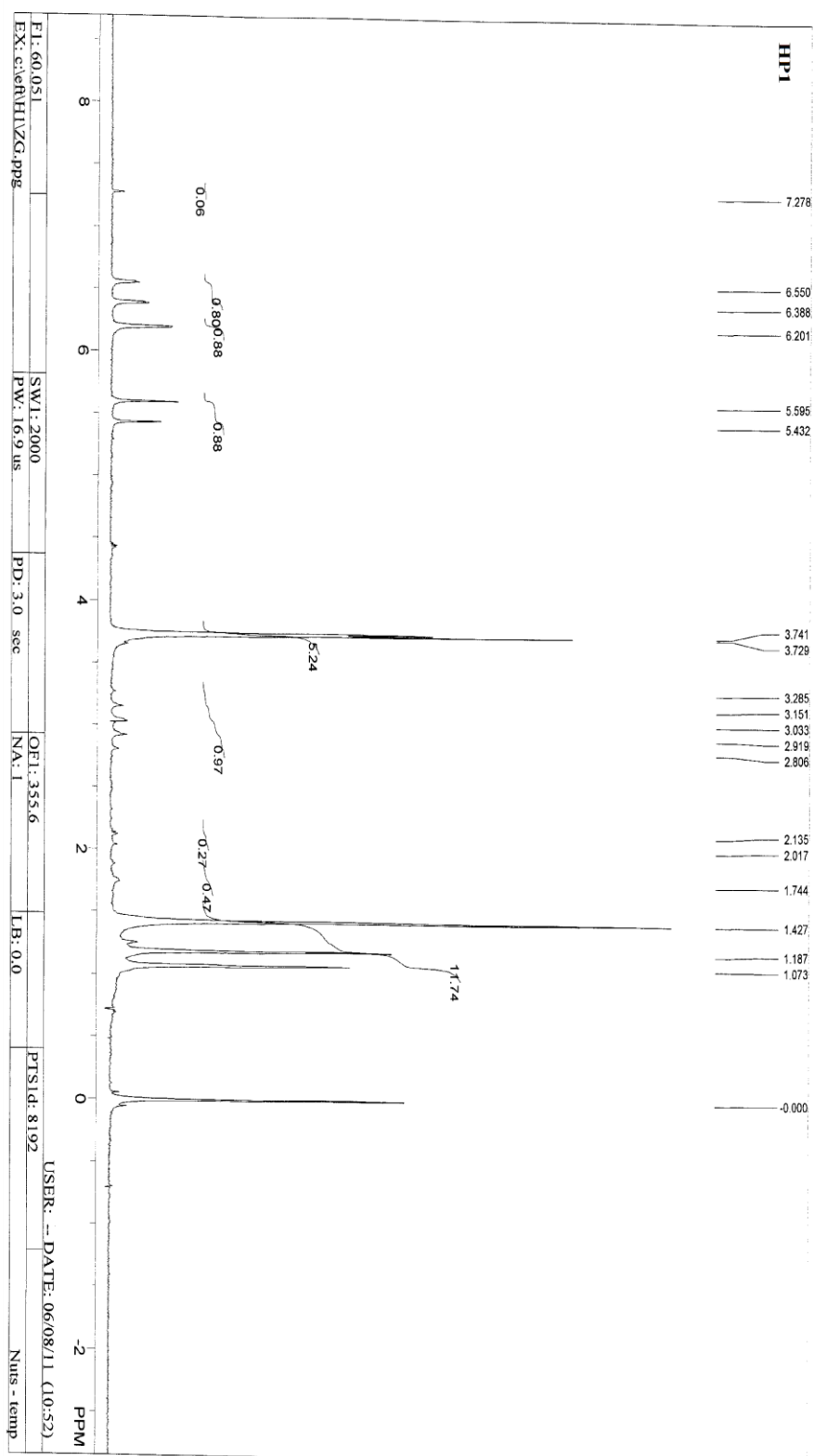
LASOM 135 DEPT C^{13} , DMSO, 75 MHz.

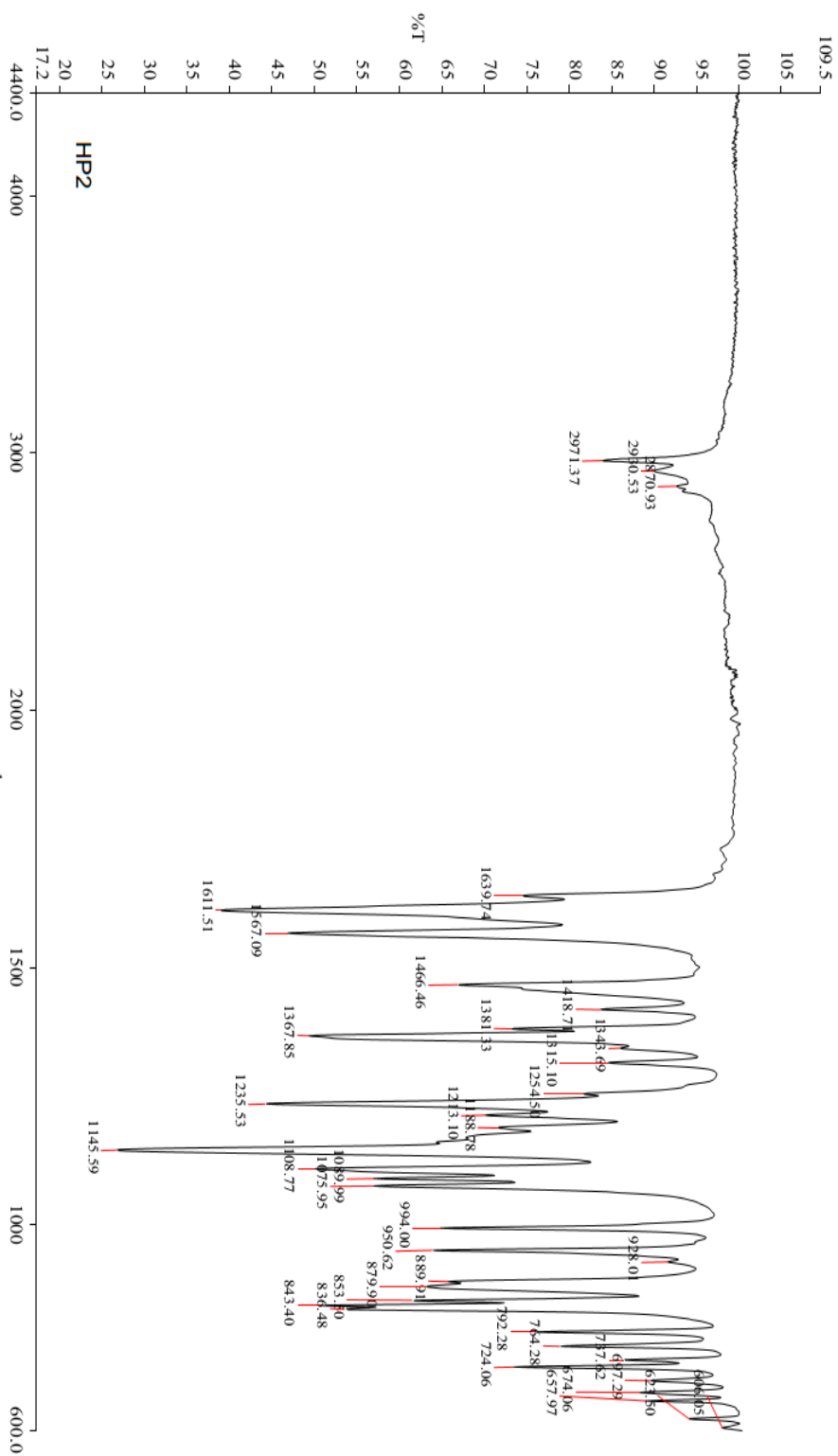


LASOM 135 HMQC, DMSO, 300 MHz.

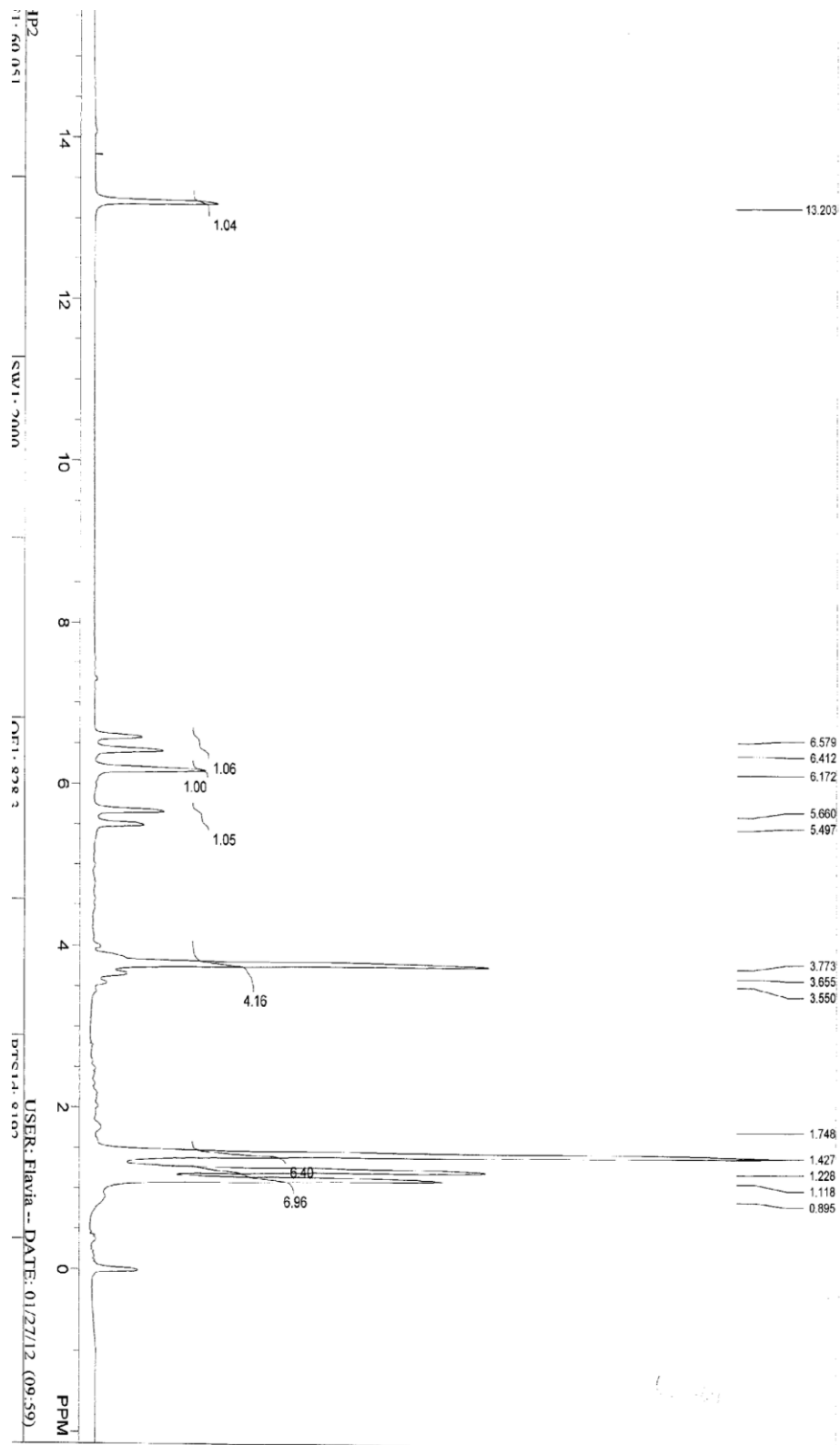


HP1, espectro de infravermelho.

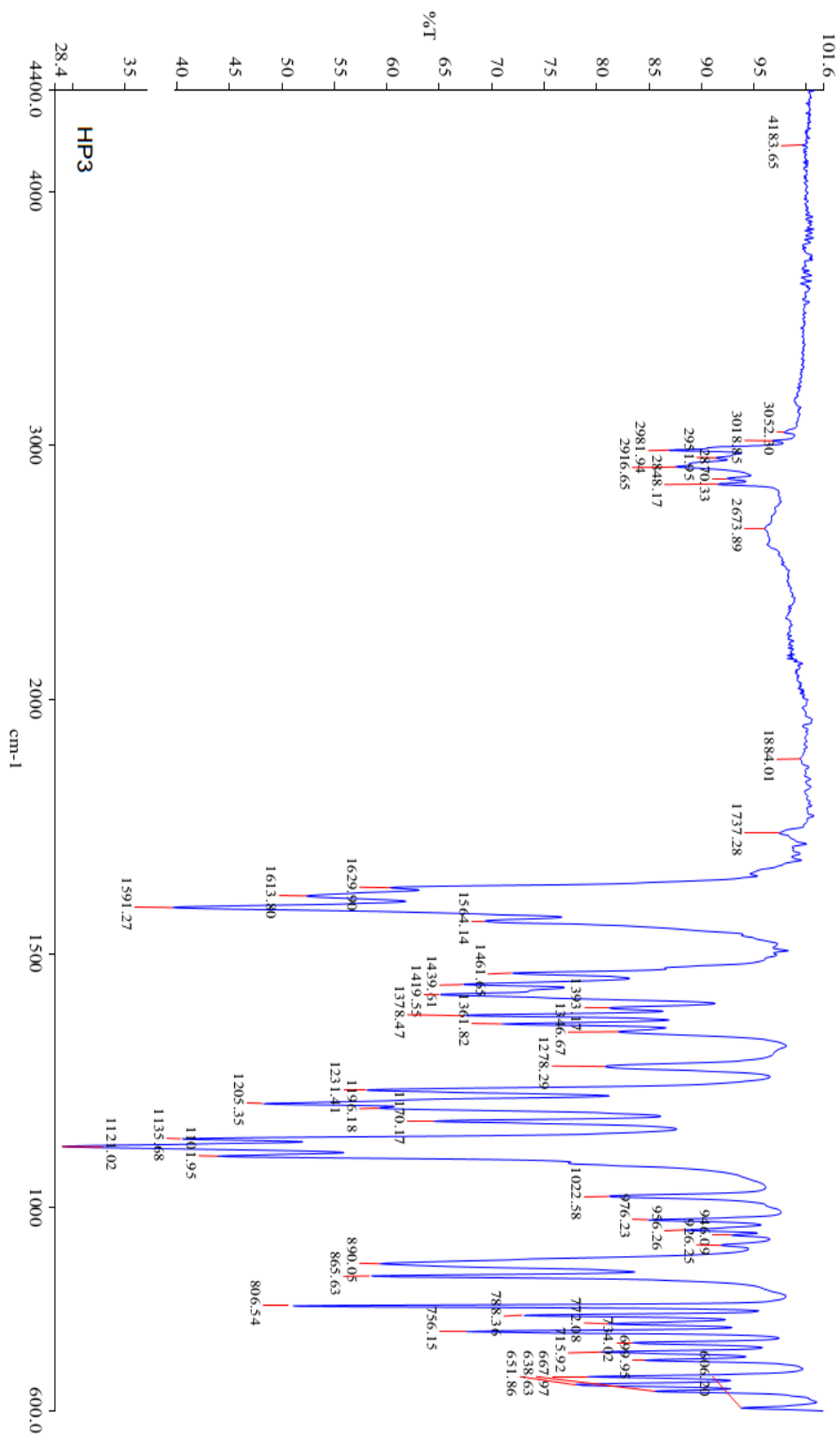
HP1, espectro de RMN H¹, CDCl₃, 60 MHz.



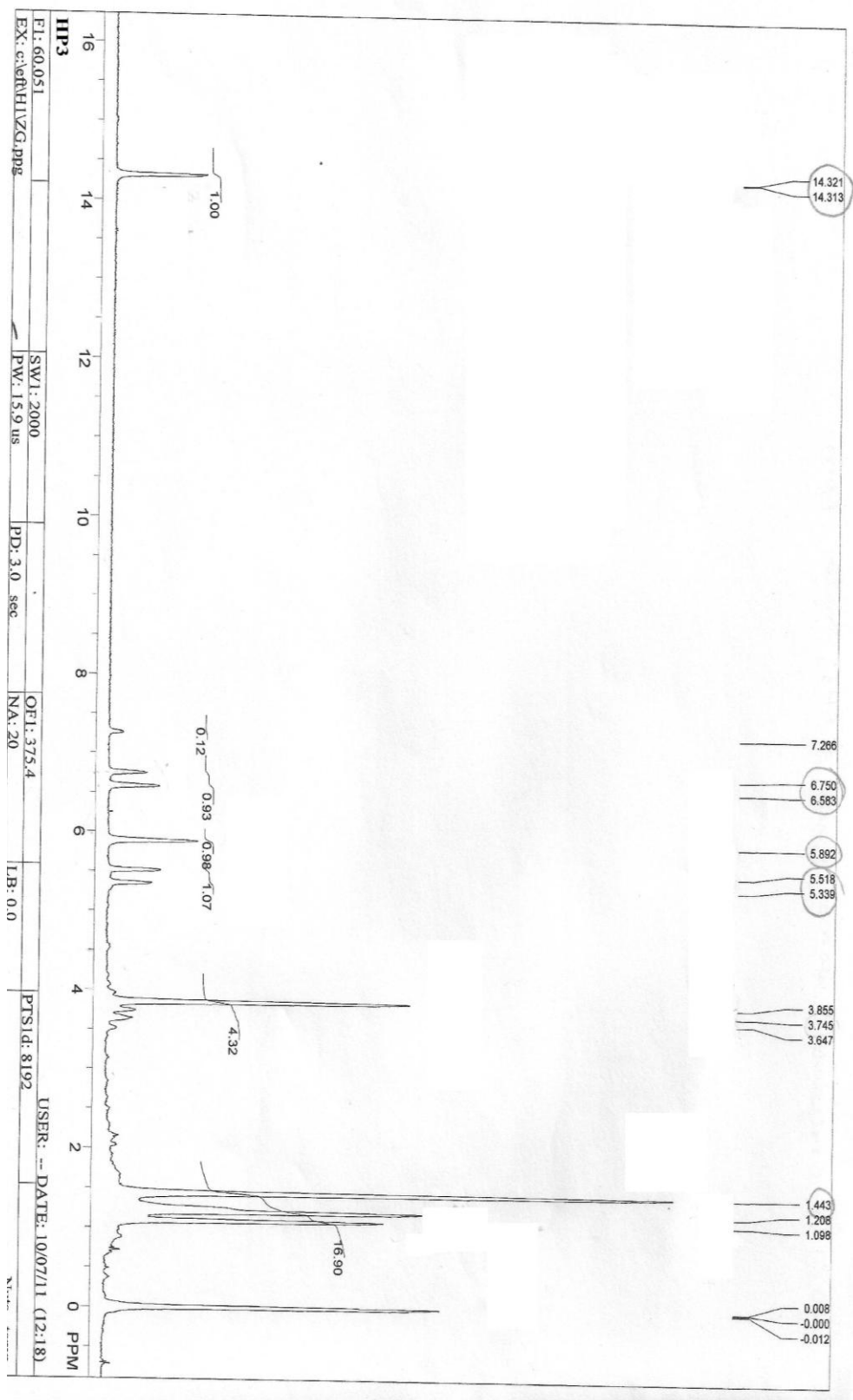
HP2, espectro de infravermelho.

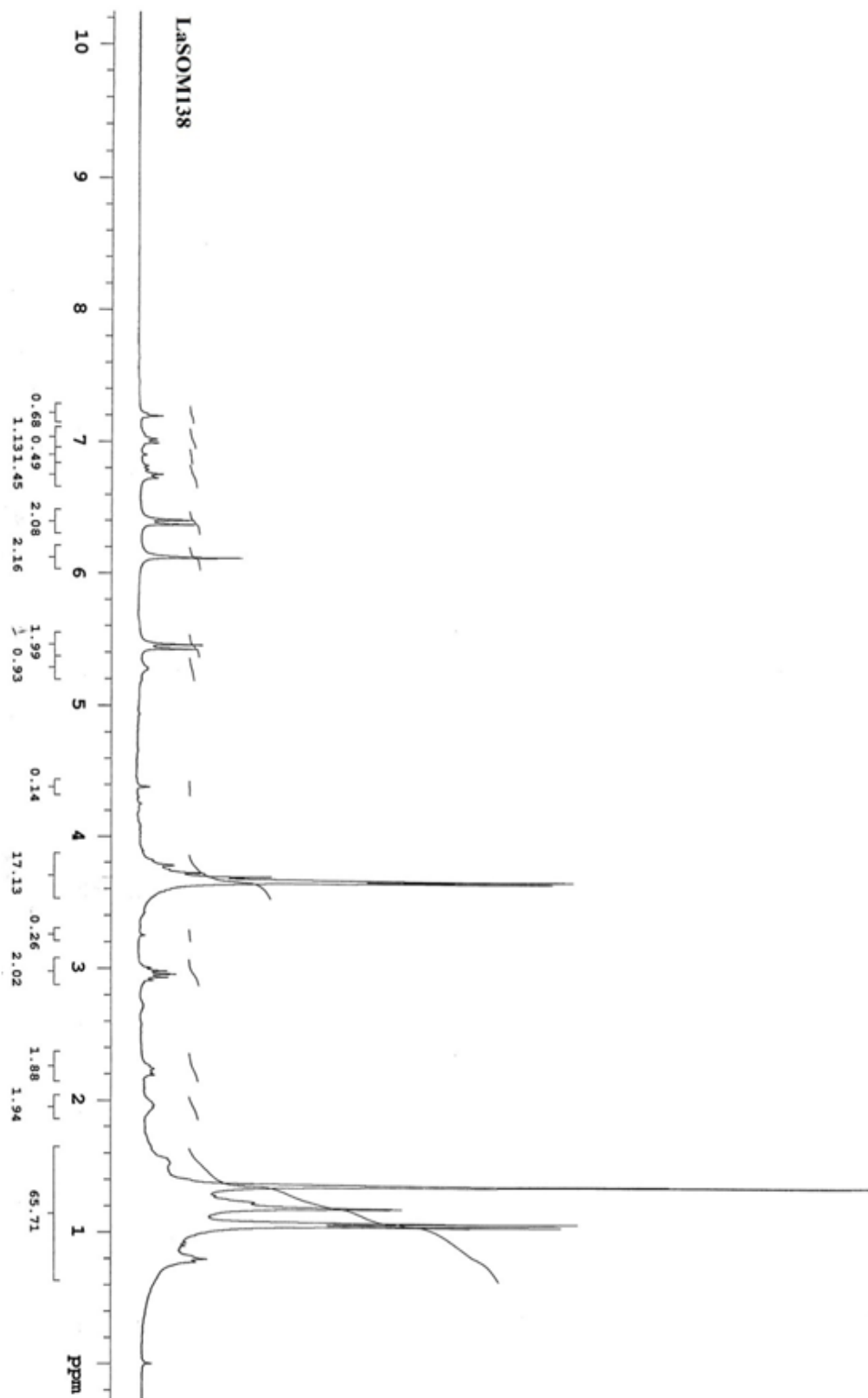


HP2, espectro de RMN H^1 , $CDCl_3$, 60 MHz.

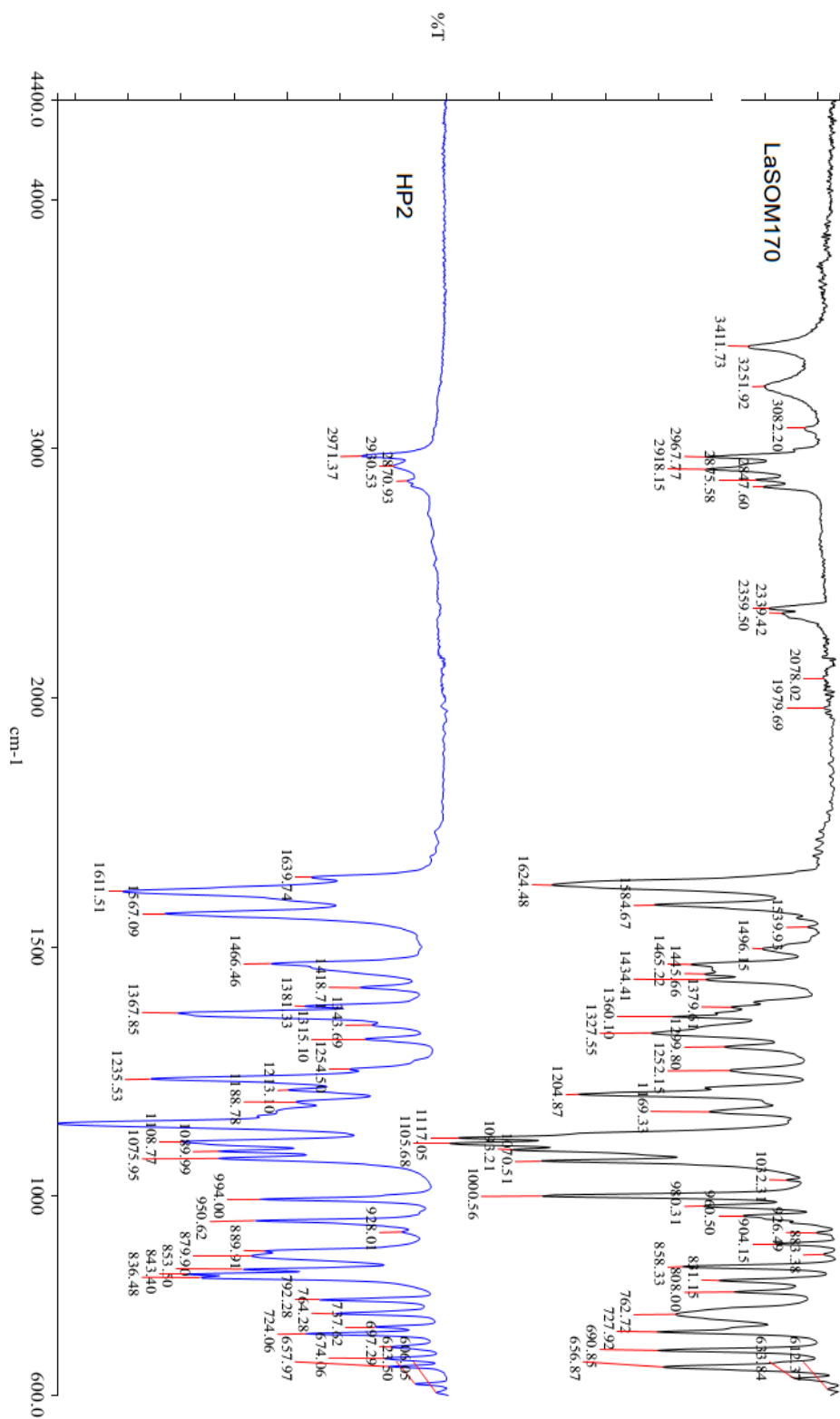


HP3, espectro de infravermelho.

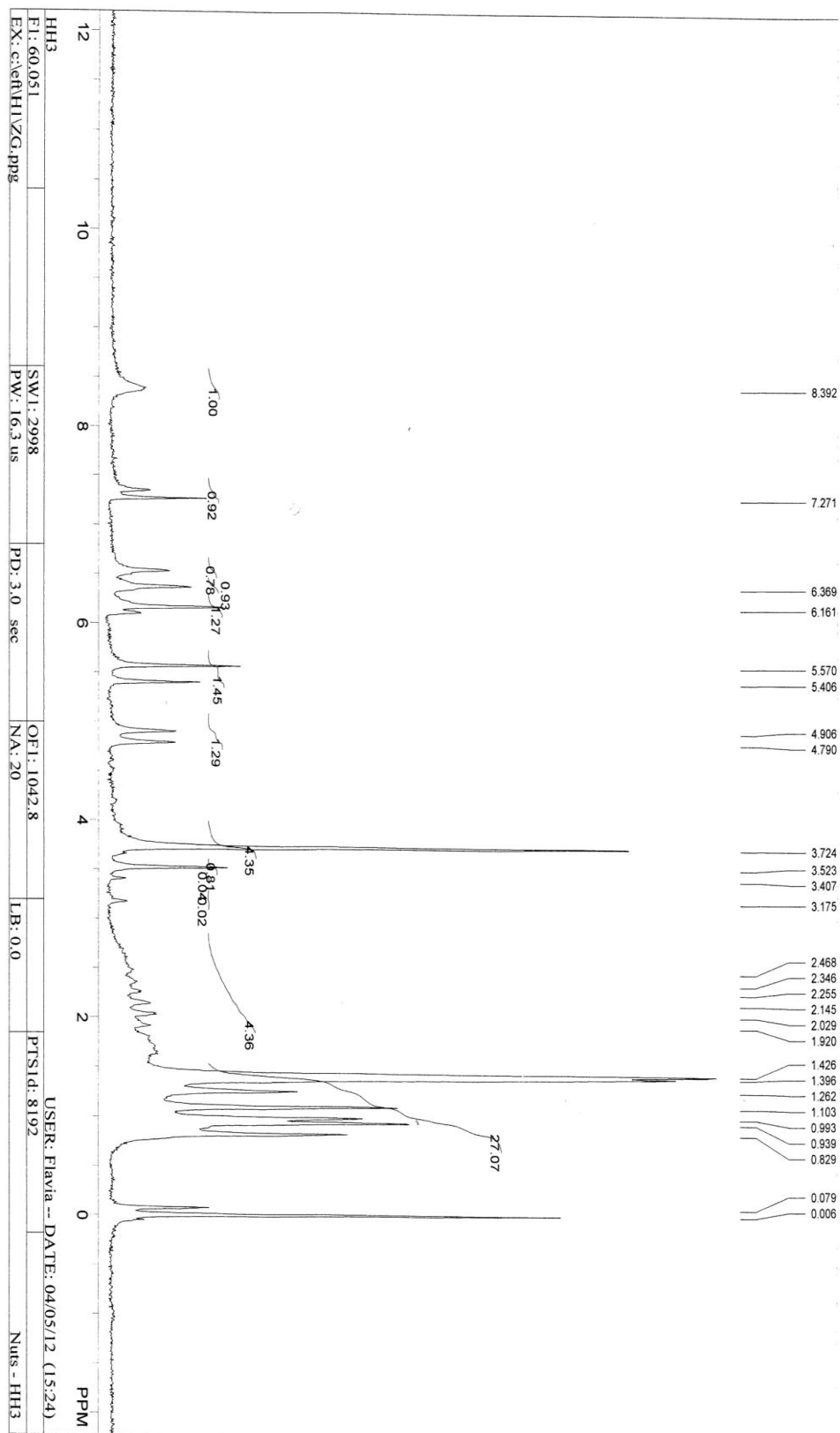
HP3, espectro de RMN H¹, CDCl₃, 60 MHz.



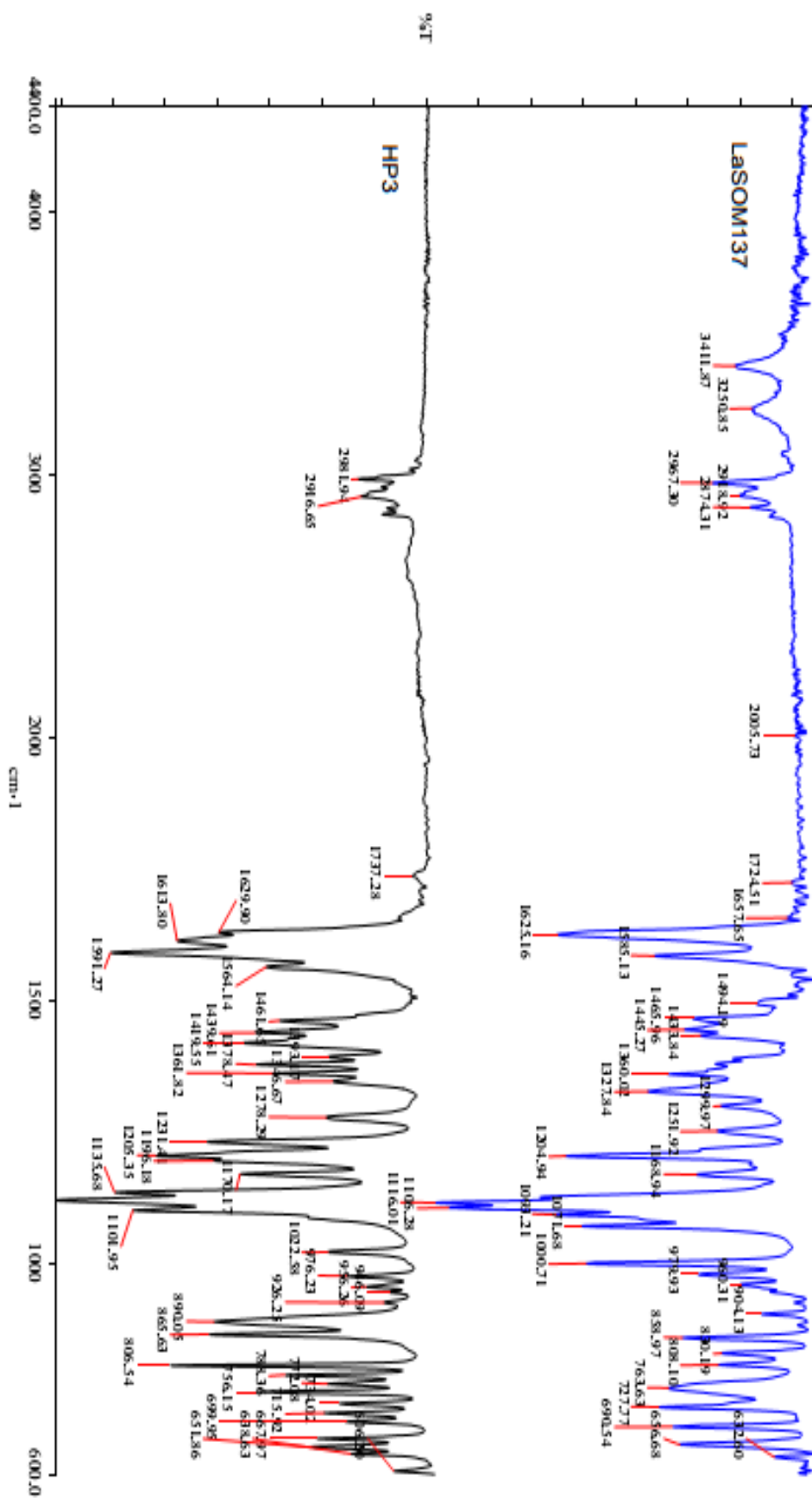
LASOM 138, espectro de RMN H^1 , $CDCl_3$, 300 MHz.



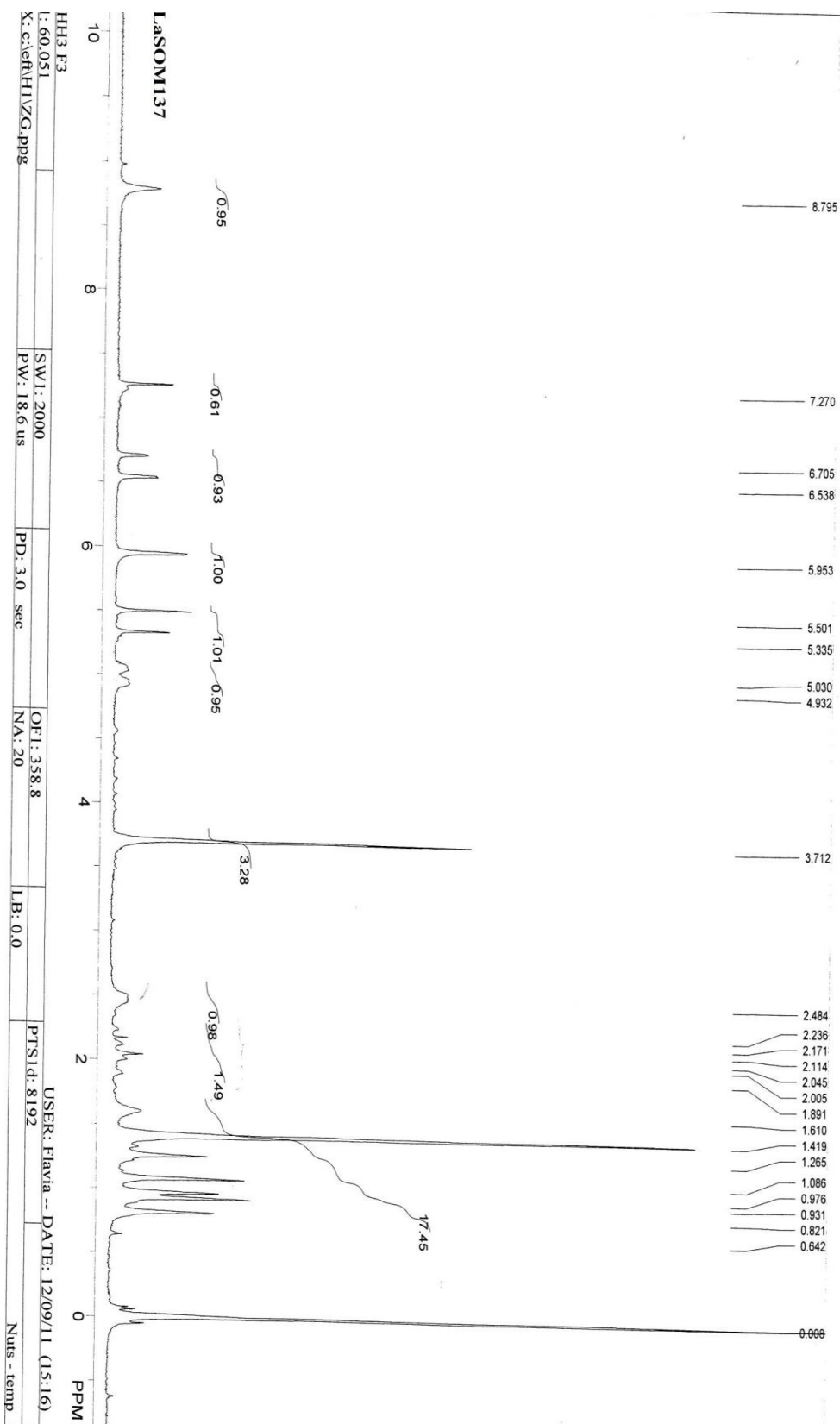
LASOM 170, espectro de infravermelho.



LASOM 170, espectro de RMN H^1 , $CDCl_3$, 60 MHz.



LASOM 137, espectro de infravermelho.



LASOM 137, espectro de RMN H^1 , $CDCl_3$, 60 MHz.