

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Identificação Química e Estudos Farmacológicos dos Constituintes da
Espécie *Ipomoea pes-caprae* (Convolvulaceae).
Estudos em Química Medicinal de Análogos do Ácido Gálico.

Renata Krogh

Orientador: Rosendo Augusto Yunes

Co-Orientador: Eugene H. Cordes

Tese submetida a Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do Grau de “Doutor em Química”

Florianópolis, junho de 2001

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Identificação Química e Estudos Farmacológicos dos Constituintes da
Espécie *Ipomoea pes-caprae* (Convolvulaceae).
Estudos em Química Medicinal de Análogos do Ácido Gálico.**

Renata Krogh

Prof. Dr. ROSENDO AUGUSTO YUNES
Orientador

Prof. Dr. VALDIR SOLDI
Coordenador da Pós-Graduação em Química

Banca Examinadora:

Prof. Dr. ROSENDO AUGUSTO YUNES
Universidade Federal de Santa Catarina

Profª. Dra. LUCE MARIA BRANDÃO TORRES
Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dr. ANTÔNIO EUZÉBIO GOULART SANT'ANA
Universidade Federal de Alagoas

Profª. Dra. MARIA DA GRAÇA NASCIMENTO
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. RICARDO JOSÉ NUNES
Universidade Federal de Santa Catarina

Profª. Dra. VILMA E. F. HEINZEN
Universidade Federal de Santa Catarina

Aos meus pais, Hans e Regina Krogh, pelo
apoio incondicional e pelo grande
carinho que nos une.

Ao meu marido, Adriano Andricopulo, que
com seu conhecimento contribuiu
imensamente neste trabalho de Tese, e
principalmente, por ser o meu melhor amigo.

Aos orientadores, Professores
Drs. Rosendo Yunes e Eugene Cordes,
meus agradecimentos sinceros pela
orientação impecável, amizade, generosidade,
paciência, e principalmente por acreditarem em
minha capacidade para desenvolver este
trabalho de Tese.

AGRADECIMENTOS

- Ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, aos professores, colegas de laboratório e funcionários, pela colaboração e suporte durante este trabalho de Tese;
- Ao *College of Pharmacy* e *Department of Chemistry*, da *University of Michigan*, pelo suporte oferecido para o desenvolvimento deste trabalho;
- Ao Prof. Dr. Richard Lawton, do *Department of Chemistry* da *University of Michigan*, pela grande contribuição durante o desenvolvimento do trabalho de síntese dos análogos do ácido gálico;
- Aos Profs. Drs. James Woods e John Traynor, do *Pharmacology Department* da *University of Michigan*, pela orientação e suporte na realização dos testes farmacológicos dos análogos do ácido gálico;
- Ao Prof. Dr. Franco Delle-Monache, do *Centro Chimica Recettori* de Roma, pela grande colaboração na elucidação estrutural dos compostos isolados de *Ipomoea pes-caprae*;
- À Profa. Dra. Susana Zacchino, da *Facultad de Bioquímica y Farmacia* da *Universidad Nacional de Rosario*, pela realização dos testes antifúngicos apresentados nesta Tese;
- Ao Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho, do Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí, pela colaboração nos estudos da espécie *Ipomoea pes-caprae*;
- À Profa. Dra. Márcia Maria de Souza, da Faculdade de Farmácia da Universidade do Vale do Itajaí, pela realização dos testes farmacológicos da espécie *Ipomoea pes-caprae*;

- Ao Prof. Dr. João Batista Calixto, do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, e ao Prof. Dr. Adair Roberto dos Santos, do Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí, pela realização dos testes farmacológicos no modelo da formalina para os análogos do ácido gálico;
- À Profª. Dra. Luce Maria Brandão Torres, da Universidade Federal de São Paulo, Relatora desta Tese, pela contribuição significativa neste trabalho de Tese;
- Ao Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana, da Universidade Federal de Alagoas, pela contribuição significativa neste trabalho de Tese;
- Aos Prof. Drs. Maria da Graça Nascimento, Ricardo José Nunes e Vilma E. F. Heinzen, da Universidade Federal de Santa Catarina, pela contribuição inestimável neste trabalho de Tese;
- Aos funcionários da Pós-Graduação em Química, Graça e Jadir, pela contínua atenção e colaboração;
- À amiga Rachel Magnago por sua amizade;
- Às minhas irmãs Karin e Erika por todo o carinho e amizade que sempre demonstraram comigo;
- À família Andricopulo pelo apoio, incentivo e amor;
- À Deus.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Substâncias ativas das plantas	2
A. Um breve aspecto histórico	2
B. Perspectiva de novos fármacos a partir de fontes naturais	9
C. Antecedentes	14
1.2. Plantas do gênero <i>Ipomoea</i> (Convolvulaceae)	20
A. Levantamento bibliográfico	20
B. Posição sistemática de <i>Ipomoea pes-caprae</i> (L.) R. Br.	24
C. Características e distribuição geográfica de <i>Ipomoea pes-caprae</i> (L.) R. Br.	24
1.3. O desenvolvimento de fármacos na indústria farmacêutica	26
A. Estratégias utilizadas pelas companhias farmacêuticas	28
B. Investimentos em novas tecnologias para a descoberta de fármacos	29
1.4. A Química Medicinal e o desenvolvimento de fármacos	31
1.5. Ácido gálico: uma molécula modelo para estudos em Química Medicinal	32

CAPÍTULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL	38
2.1. Materiais e métodos	38
2.2. Estudos da espécie <i>Ipomoea pes-caprae</i>	39
A. Principais cuidados a serem tomados na seleção do material vegetal	39
B. Material botânico	40
2.2.1. Isolamento e identificação dos princípios ativos	40
2.2.2. Ensaio farmacológicos	47
A. Modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético	48
B. Modelo de dor induzida pela formalina	49
2.3. Análogos do ácido gálico	51
2.3.1. Síntese	51
A. Preparação dos análogos do ácido gálico GA002-GA007	52
B. Preparação dos análogos do ácido gálico GA008-GA009	54
C. Preparação do ácido gálico triacetila (I)	55
D. Preparação do cloreto de galoila triacetila (II)	56
E. Síntese dos análogos do ácido gálico GA010-GA034	57
F. Síntese dos análogos do ácido gálico GA035-GA047	64
G. Síntese do análogo do ácido gálico GA048 e identificação do análogo GA049	68
2.3.2. Avaliação farmacológica: atividade analgésica	70
A. Modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético	70

B. Modelo de dor induzida pela formalina	71
2.3.3. Avaliação microbiológica: atividade antifúngica	72
2.3.4. Modelo de QSAR	74

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
3.1. Estudos fitoquímicos e farmacológicos da espécie <i>Ipomoea pes-caprae</i>	78
3.2. Estudos em Química Medicinal de análogos do ácido gálico	97
3.2.1. Síntese dos análogos do ácido gálico	98
A. Análogos do ácido gálico GA002-GA007	99
B. Análogos do ácido gálico GA008 e GA009	101
C. Análogos do ácido gálico GA010-GA034	104
D. Análogos do ácido gálico GA035-GA047	108
E. Análogos do ácido gálico GA048-GA049	110
3.2.2. Avaliação farmacológica: atividade analgésica	112
A. Modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético	115
B. Modelo de dor induzida pela formalina	121
3.2.3. Avaliação microbiológica: atividade antifúngica	125
3.2.4. Modelo de QSAR para a atividade analgésica de uma série de análogos do ácido gálico	132

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSÕES	143
---------------	-----

CAPÍTULO V

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	146
PUBLICAÇÕES REFERENTES AO TRABALHO DE TESE	159

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Números conhecidos e estimados de espécies biológicas.

Tabela 2. Drogas de sucesso a partir da etnomedicina.

Tabela 3. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (200 MHz) da glochidona (35), em CDCl_3 .

Tabela 4. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (200 MHz) da isoquercitrina (44), em CD_3OD .

Tabela 5. Efeitos antinociceptivos dos constituintes isolados de *I. pes-caprae* e dos fármacos padrões aspirina e paracetamol, administrados intraperitonealmente na dose de 10 mg/kg.

Tabela 6. Efeito analgésico do extrato aquoso e de compostos isolados de *I. pes-caprae*, no modelo de contorções abdominais causadas pelo ácido acético 0,6% em camundongos.

Tabela 7. Efeito analgésico do extrato metanólico no modelo de contorções abdominais causadas pelo ácido acético.

Tabela 8. Efeito da indometacina e dos compostos isolados de *I. pes-caprae*, administrados intraperitonealmente em camundongos, no teste da formalina.

Tabela 9. Efeito antinociceptivo do extrato metanólico obtido de *Ipomoea pes-caprae* e do padrão de referência aspirina, no teste da formalina.

Tabela 10. Efeito analgésico do ácido gálico e de seus análogos sintéticos no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6%, em camundongos.

Tabela 11. Valores da DI_{50} para o galato de metila no modelo da formalina.

Tabela 12. Efeito dos análogos do ácido gálico, administrados intraperitonealmente na dose de 30 mg/kg, na primeira e segunda fase da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos.

Tabela 13. Efeito dos análogos do ácido gálico administrados oralmente, na dose de 50 mg/kg, na primeira e segunda fase da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos.

Tabela 14. Valores da CIM ($\mu\text{g/mL}$) para a atividade antifúngica de uma série de análogos do ácido gálico.

Tabela 15. Logaritmo do coeficiente de partição (P) calculado para o ácido gálico e uma série de seus análogos.

Tabela 16. Valores medidos, estimados e preditos da potência analgésica de uma série de análogos do ácido gálico.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Fruto da papoula oriental *Papaver somniferum*.
- Figura 2. Planta medicinal dedaleira.
- Figura 3. *Lophophora williamsii*, cactus sagrado mexicano *Huichols*.
- Figura 4. Aspectos gerais da *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br.
- Figura 5. Processo de desenvolvimento de novos fármacos nos Estados Unidos: média de custos e tempo das etapas do processo.
- Figura 6. Camundongo após 30 minutos da injeção intraperitoneal do ácido acético.
- Figura 7. Cromatograma da mistura de acetatos de α - e β -amirina.
- Figura 8. Espectro de RMN ^1H da glochidona, em CDCl_3 .
- Figura 9. Espectro de RMN ^{13}C da glochidona, em CDCl_3 .
- Figura 10. Espectro de RMN ^1H da isoquercitrina, em CD_3OD .
- Figura 11. Espectro de RMN ^{13}C da isoquercitrina, em CD_3OD .
- Figura 12. Esquema demonstrativo das áreas específicas e inter-relações envolvidas em nossos estudos: química orgânica, farmacologia, microbiologia e química computacional. A Química Medicinal é o centro deste processo.
- Figura 13. Preparação dos análogos do ácido gálico GA002-GA007.
- Figura 14. Mecanismo de esterificação do ácido gálico catalisado por ácido.
- Figura 15. Preparação dos análogos GA008 e GA009 a partir de GA003.
- Figura 16. Mecanismo de hidrólise de GA008 catalisado por base.
- Figura 17. Esquema reacional para a preparação do cloreto de galoila triacetila (II).
- Figura 18. Síntese dos análogos GA010-GA033.

Figura 19. Estruturas dos análogos GA010-GA033.

Figura 20. Síntese de GA034.

Figura 21. Estruturas dos análogos GA035-GA047.

Figura 22. Síntese do anidrido gálico (GA048).

Figura 23. Estrutura molecular do anidrido acético gálico (GA049).

Figura 24. Esquema ilustrativo das características estruturais e físico-químicas do conjunto de 49 compostos derivados do protótipo ácido gálico.

Figura 25. Estudo do efeito analgésico e correlações de SAR para os compostos relacionados estruturalmente: GA001, GA016 e GA034.

Figura 26. Efeito do $\log P$ na atividade antifúngica da série estudada.

Figura 27. Diferentes combinações dos sub-conjuntos empregados em cada um dos três modelos de QSAR desenvolvidos. Cada modelo emprega 2 sub-conjuntos como conjunto treino (círculos azuis) e 1 sub-conjunto como conjunto teste (círculos vermelhos).

Figura 28. Relações básicas envolvidas no processo de modelagem de QSAR. O conjunto treino, do qual obtem-se os valores estimados, é empregado para prever os valores da DI_{50} para os compostos pertencentes ao conjunto teste.

Figura 29. Gráfico dos valores medidos do $\log DI_{50}$ contra os correspondentes valores estimados e preditos para um conjunto de análogos do ácido gálico.

ABSTRACT

Ipomoea pes-caprae, known in Brazil as “salsa-da-praia” or “batateira-da-praia”, is a medicinal plant used in many countries as a herbal remedy to cure inflammations, colic, diuretic disorders, painful processes, etc. The present study describes the isolation, identification and antinociceptive effects of several constituents, such as glochidone, betulinic acid, α - and β -amirin acetate, isoquercitrin, etc, as well as the antinociceptive effects of the methanolic extract and two fractions (ethyl acetate and aqueous) from aerial parts of this plant. The results indicate that both isolated compounds and methanolic extract and two fractions exhibit considerable antinociceptive activity in two classical models of pain in mice. These findings support, at least in part, the popular use of *I. pes-caprae* for the treatment of painful processes.

A series of 49 compounds, including esters, amides and anhydrides, has been synthesized using gallic acid as a model, and their analgesic activity determined using two classical models of pain, the writhing and formalin test in mice. The pharmacological results show that among these are compounds having potency comparable to or greater than that of agents, including aspirin and acetaminophen, employed in clinical medicine. These compounds were also evaluated for antifungal activity by the agar dilution model. The biological results show that some of the compounds exhibit a broad spectrum of activities against dermatophytes, in particular against *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Tricophyton mentagrophytes*, *Tricophyton rubrum*, and *Epidermophyton floccosum*.

Values of ID_{50} for the set of 49 structurally-related gallic acid derivatives have been employed to create a predictive quantitative structure-activity relationship (QSAR) which links structure to values of analgesic potency. The QSAR model developed has substantial predictive power for the design of novel gallic acid derivatives having improved analgesic potency.

Ipomoea pes-caprae, conhecida como “salsa-da-praia” ou “batateira-da-praia”, é uma planta medicinal usada em muitos países para o tratamento de diversas enfermidades, incluindo processos inflamatórios e dolorosos, cólicas, desordens diuréticas, entre outros. O presente estudo descreve o isolamento, identificação e efeitos antinociceptivos de diversos constituintes de *I. pes-caprae*, como a glochidona, ácido betulínico, acetato de α - e β -amirina, isoquercitrina, etc., bem como os efeitos antinociceptivos do extrato metanólico e das frações acetato de etila e aquosa, das partes aéreas da planta. Os resultados farmacológicos indicam que tanto os compostos isolados de *I. pes-caprae* como o extrato metanólico e as duas frações exibem efeitos antinociceptivos significantes em dois modelos clássicos de dor em camundongos. Tais resultados confirmam, pelo menos em parte, o uso popular de *I. pes-caprae* no tratamento de processos dolorosos e inflamatórios.

Uma série de 49 compostos, incluindo ésteres, amidas e anidridos, foram sintetizados usando o ácido gálico como modelo. As propriedades analgésicas desta série de análogos foram estudadas em dois modelos clássicos de dor em camundongos, o modelo de contorções abdominais e o modelo da formalina. Os resultados farmacológicos mostram que nesta série existem compostos apresentando potência analgésica comparável ou maior do que a apresentada pela aspirina e paracetamol, fármacos amplamente utilizados na clínica médica. Tais compostos foram também avaliados quanto a sua atividade antifúngica usando o método de diluição em ágar. Os resultados biológicos mostram que alguns dos compostos exibem um largo espectro de atividade contra fungos do grupo dos dermatófitos, em particular contra

Microsporium canis, *Microsporium gypseum*, *Tricophyton mentagrophytes*, *Tricophyton rubrum*, e *Epidermophyton floccosum*.

Valores da DI_{50} para o conjunto de 49 análogos do ácido gálico foram empregados para criar um modelo preditivo de relações quantitativas entre a estrutura e atividade (QSAR), o qual relaciona a estrutura aos valores da potência analgésica. O modelo de QSAR desenvolvido apresenta poder preditivo substancial para o planejamento de novos análogos do ácido gálico possuindo maior potência analgésica.

OBJETIVOS

O trabalho de Tese tem dois objetivos fundamentais:

1. Estudo químico e farmacológico da espécie *Ipomoea pes-caprae* (Convolvulaceae), principalmente:
 - Isolar os fitoconstituintes, com alto grau de pureza, a partir dos extratos brutos de *I. pes-caprae*. Identificar estruturalmente os compostos isolados através de métodos comparativos e da aplicação de métodos físicos e espectroscópicos;
 - Realização de testes farmacológicos com os extratos e frações para identificar os compostos responsáveis pelas propriedades analgésicas da planta;
 - Contribuir para estudos farmacológicos posteriores das moléculas identificadas e de seus mecanismos de ação.
2. Obter novas moléculas bioativas usando como modelo o ácido gálico, composto natural ativo isolado de plantas do gênero *Phyllanthus*, e avaliar a atividade analgésica e antifúngica dos compostos sintetizados. Desenvolver estudos das relações entre a estrutura química e a atividade (SAR e QSAR) dos derivados obtidos.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

1.1. Substâncias ativas das Plantas Medicinais

A. Um breve aspecto histórico

Por milhares de anos tem se usado plantas ou extratos de plantas para fins medicinais, onde o herbalismo e a medicina popular, ambos antigo e moderno, constituem-se como fontes de importante valor terapêutico. Muitas das plantas medicinais usadas atualmente, tanto em sua forma pura como através de formulações, foram empregadas pelo homem, originalmente para outros fins, como por exemplo, em cultos religiosos, rituais espirituais e outras práticas semelhantes, também como poções e venenos, ou ainda, como cosméticos. Exemplos de tais produtos incluem o ópio, a beladona, a casca de cinchona, o ergot, o curare, a dedaleira e a noz-moscada.^{1,2}



Figura 1. Fruto da papoula oriental *Papaver somniferum*.

O ópio, obtido da seiva dos frutos da papoula oriental *Papaver somniferum* (Figura 1), produz forte ação depressora sobre o sistema nervoso central, induzindo a dependência física e psíquica. No ópio existem mais de 20 alcalóides naturais, todos considerados narcóticos. A morfina e a codeína são os mais importantes e ainda muito utilizados na clínica médica.^{1,3}

A beladona (*Atropa belladonna* L.), da família das Solanáceas, era utilizada pelos romanos para dilatar a pupila, realçando sua beleza, daí derivando o nome específico (do italiano *belladonna*) dado a planta. As partes ativas contém 1% de alcalóides ativos derivados do tropano, ácido atrópico, beladonina e escopolamina. Os extratos ou tinturas obtidos da planta eram empregados como sedativo, e também apresentavam propriedades antiespasmódicas e antiasmáticas.⁴

Da casca de cinchona, gênero de árvore pertencente a família das Rubiáceas, extraem-se vários alcalóides, dentre os quais os mais importantes são a quinina, a quinidina, a cinchonina e a cinchonidina. Desde o século XVII, foi reconhecida a importância medicinal da cinchona como agente antimalarial. Apresentava ainda propriedades antiespasmódicas e tranquilizante do sistema cardiovascular. Enquanto a quinina foi o alcalóide antimalarial mais potente, a quinidina produziu a maior atividade sobre o sistema cardiovascular. A quinina é usada clinicamente para o tratamento da malária, especialmente em infecções por parasitas que são resistentes as drogas sintéticas comuns de escolha.⁵

A Idade Média foi marcada por uma série de pragas e uma delas ficou conhecida como “Fogo Sagrado”. Aqueles acometidos por tal praga, sofreram sérios problemas neurológicos, incluindo fortes ataques epiléticos e terríveis alucinações. Consta que mais de 40 mil pessoas morreram desta epidemia.⁶ O agente causador desta praga foi um fungo denominado ergot (*Claviceps purpurea*), um contaminante comum no centeio e em outros cereais. Este fungo biossintetiza uma classe de metabólitos secundários conhecidos como alcalóides do ergot, que exercem atividades no sistema nervoso central e vasoconstritor. A ergometrina, um dos alcalóides da família do ergot, foi aquele que

revelou possuir maior atividade vasoconstritora. Investigações posteriores transformaram um perigoso agente da medicina popular em um fármaco clinicamente útil, já que a ergometrina é a droga de escolha para o tratamento de hemorragias pós-parto. Pesquisas envolvendo os componentes ativos do ergot, levaram o cientista suíço Hoffman, em 1943, à descoberta de uma das substâncias químicas mais notáveis, o LSD (dietilamina do ácido lisérgico).^{6,7}

O curare (do latim *curare*, que significa para cuidar ou sanar), veneno muito forte utilizado pelos índios sul-americanos para envenenar flechas, é uma combinação de alcalóides extraídos de vários arbustos da família das Loganiáceas, principalmente das espécies *Strychnos castelnaui*, *S. crevauxiana* e *S. toxifera*. Foi utilizado como anestésico geral e relaxante muscular. O curare produz paralisia interferindo na transmissão dos impulsos nervosos no músculo esquelético.^{8,9}

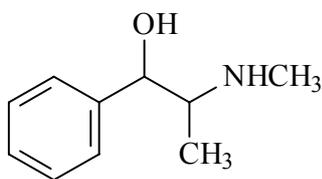


Figura 2. Planta medicinal dedaleira

A dedaleira (Figura 2), ou simplesmente digitalis (*Digitalis purpurea L.*), foi utilizada para o tratamento de edemas e inchaços, causados por hidropsia (retenção de água pelo organismo devido ao bombeamento ineficaz do coração).¹⁰ Apresentou um efeito primário único sobre o coração, aumentando a contração do músculo cardíaco, sendo muito usada no tratamento de pacientes com insuficiência cardíaca severa.¹¹

A noz-moscada, semente seca que se encontra no fruto de uma árvore tropical, a moscadeira (*Myristica fragrans*), é utilizada largamente como tempero no mundo inteiro. Entretanto, o óleo da noz-moscada contém vários precursores sintéticos de compostos pertencentes a classe das fenetilaminas, como a miristicina, a elemicina e o safrol. Estes óleos não-amínicos podem ser convertidos, *in vivo*, para as formas amínicas correspondentes, originando assim, intensa atividade psicotrópica.^{12,13}

Estima-se que o uso mais antigo de uma planta medicinal foi o da erva conhecida como *Ma Huang*, uma espécie de Éfedra usada na China para fins medicinais, por mais de 5000 anos.¹ O principal constituinte desta planta é a efedrina (**1**), utilizada no tratamento da hipotensão sanguínea, choque, hemorragias, para aliviar a febre do feno, asma e congestão nasal.



(1)

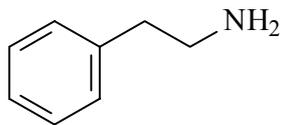
Vários outros alcalóides, estruturalmente relacionados à efedrina, que apresentam importância medicinal, podem ser encontrados em muitas outras plantas.^{1,14} Por exemplo, a β -fenetilamina (**2**), um agente regulatório da pressão sanguínea, ocorre em *Viscum ambum* L.; a hordelina (**3**), ocorre em *Hordeum vulgare* L.; a dopamina (**4**), outro alcalóide relacionado aqueles tipo β -fenetilaminas e que tem função neurotransmissora importante na coordenação motora através do sistema nervoso central, é encontrada na banana; a mescalina

(5), outro agente regulatório da pressão sanguínea, está presente em peyote *Lophophora williamsii*, conhecido como o cactus sagrado mexicano *Huichols* (Figura 3).

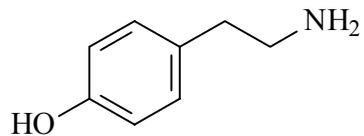


Figura 3. *Lophophora williamsii*, cactus sagrado mexicano *Huichols*.

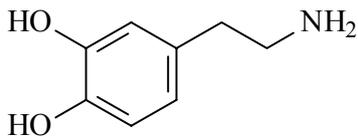
A mescalina é o agente responsável pelas fortes alucinações causadas por este tipo de cactus, sendo uma das drogas psicotomiméticas mais conhecidas, que produz mudanças na percepção e humor, embora, não cause distúrbios maiores no sistema nervoso autônomo. É usada em tratamentos psiquiátricos para produzir sintomas de catalepsia.



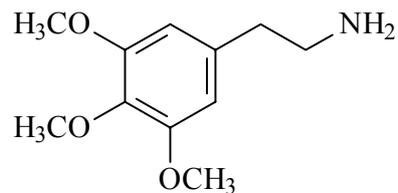
B-fenetilamina
(2)



Hordelina
(3)

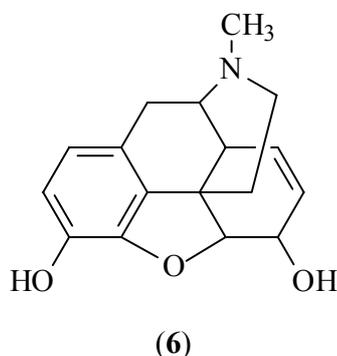


Dopamina
(4)



Mescalina
(5)

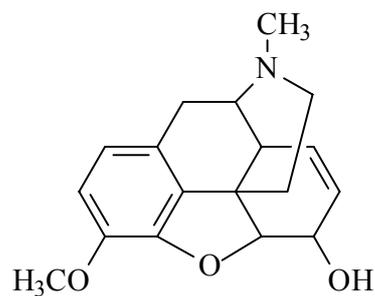
Um outro alcalóide, também pertencente a classe das β -fenetilaminas, com estrutura química, todavia, muito mais complexa, é a morfina (6), constituinte principal do ópio. A morfina foi o primeiro alcalóide isolado de plantas em uma forma relativamente pura, por Serturmer, em 1805. É usada amplamente para o alívio da dor, produzindo efeitos fisiológicos e psíquicos complexos. O hábito de ingerir ópio como narcótico foi estabelecido na Europa Oriental no século XVII. Apesar desta tendência de uso perigosa, a morfina é uma das drogas mais importantes de todos os tempos na clínica médica.



A codeína (7), presente também em *Papaver somniferum*, é utilizada largamente no campo médico, para fins analgésicos e supressores da tosse. Em comparação a morfina, a codeína produz menos analgesia, menos sedação e depressão respiratória.

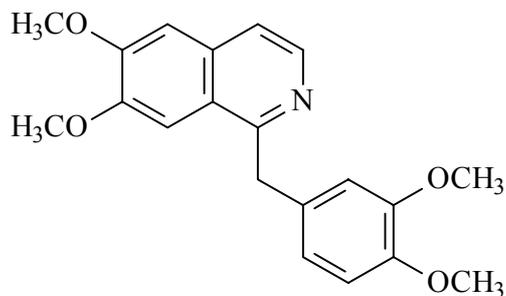
Os alcalóides presentes no ópio podem ser divididos em duas classes, com efeitos marcadamente diferentes.

A primeira, dos alcalóides fenantrenos, são representados principalmente pela morfina e codeína, foram discutidos anteriormente. Na segunda classe encontram-se os alcalóides isoquininos.

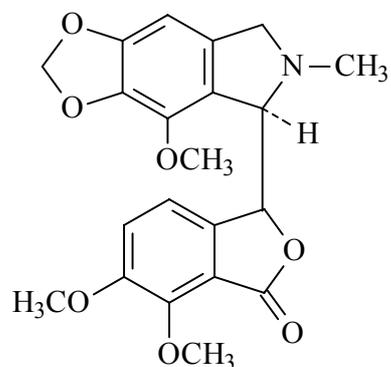


Codeína
(7)

Os alcalóides isoquininos são representados pela papaverina (8), poderoso relaxante intestinal, e pela noscapina (9), conhecido supressor da tosse. Ambos os compostos, administrados nas doses recomendadas, possuem fraca influência sobre o sistema nervoso central, porém, em doses elevadas, podem causar ação narcótica semelhante àquela apresentada pelo ópio.



(8)



(9)

Atualmente, são conhecidos 25 alcalóides isolados do ópio, contudo, com excessão da morfina e da codeína (morfina metil éter), os demais alcalóides são de limitada importância na clínica médica.^{1,3,15}

Em tempos passados, as drogas originadas de plantas forneciam muitos dos diuréticos, anti-reumáticos, produtos dermatológicos, expectorantes, digestivos e preparações hemorroidais (que não são discutidos nesta breve introdução). Embora as drogas originárias de plantas ainda sejam bastante usadas para muitos destes fins, as drogas de origem sintética constituem atualmente a maior parte dos produtos no mercado farmacêutico. As plantas, contudo, ainda constituem-se em uma importante parte dos medicamentos em uso nos dias de hoje.¹⁶ Pode-se avaliar neste contexto a importância dos fitoterápicos no mercado mundial, onde é estimado que esta forma de terapia medicinal, que vem crescendo muito nos últimos anos, fatura cerca de 22 bilhões de dólares.¹⁷ Vale ressaltar que, com o constante aumento no desmatamento das florestas do mundo, particularmente nos trópicos, as propriedades medicinais ainda não descobertas das plantas, estariam assim ameaçadas de extinção, uma inestimável perda para sempre. Se isto vier a ocorrer, ainda que em uma projeção indeterminada, muitos dos possíveis fármacos e outros produtos das plantas, não seriam descobertos, e um número apreciável e importante de estruturas químicas com potencial biológico produzidos pela diversidade genética das plantas poderiam estar de forma definitiva fora do alcance dos futuros químicos medicinais.¹

B. Perspectiva de novos fármacos a partir de fontes naturais

Na busca por novos fármacos, os produtos naturais tem sido fontes produtivas de moléculas modelo por muitas décadas e, o interesse nesta classe, permanece elevado apesar do surgimento de diversas modalidades competindo pela geração de protótipos.

As regiões tropicais e subtropicais do mundo são, atualmente, as mais produtivas para a exploração e contém a maior fonte conhecida de biodiversidade inexplorada. Em nações desenvolvidas, a ênfase contemporânea está, especialmente, nos ingredientes puros. Em nações em desenvolvimento, um recurso extensivo para fármacos etnobotânicos existe ao lado dos sistemas médicos ocidentais. Entretanto, com poucas exceções, as tecnologias mais avançadas de investigação para o desenvolvimento dessas moléculas modelo e, o grande mercado para a venda dos frutos desse trabalho, encontram-se fora de suas fronteiras. A divergência entre a disponibilidade de recursos e a habilidade para o desenvolvimento de fármacos, tem se colocado como uma barreira frente ao progresso científico.¹⁸

Exemplos de alguns produtos em desenvolvimento são citados para mostrar como a universidade e os médicos utilizam a medicina, baseada em produtos naturais, para tirar vantagem da biodiversidade disponível para trazer novos fármacos ao mercado.

O desenvolvimento de novos fármacos a partir de fontes naturais (derivadas da cultura popular) tem se tornado uma alvo promissor para a indústria farmacêutica a nível mundial.¹⁹

As plantas medicinais são usadas basicamente em duas formas: i) como misturas contendo vários constituintes (infusões, óleos essenciais, tinturas, extratos, etc); ou, ii) como princípios ativos puros e quimicamente definidos. Os compostos puros são empregados quando os princípios ativos de uma planta medicinal exibem alta e específica atividade e/ou têm um pequeno índice terapêutico, requerendo dosagens precisas e reprodutíveis. Por outro lado, o uso de extratos, tinturas e outros, é apropriado para plantas que exibem atividades farmacológicas por diferentes constituintes e mecanismos. Estes preparados fitofarmacêuticos são muito populares em países onde há forte tradição no uso de

medicamentos vegetais e onde existe dispositivos legais para os seus registros, como por exemplo, na Alemanha, França e Suíça.²⁰

O potencial de plantas superiores como fontes de novos fármacos, ainda está muito inexplorado. Entre as 850.000 espécies de plantas estimadas, apenas um pequeno número percentual foi investigado fitoquimicamente, e a fração submetida à investigação biológica ou farmacológica é ainda menor. Para exemplificar a complexidade envolvida nesta questão, podemos ressaltar que o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, investigou a atividade antitumoral de cerca de 35.000 espécies de plantas nos anos de 1957 a 1981 e, embora esteja atualmente adquirindo cerca de 20.000 novas espécies da América Latina, África e sudoeste da Ásia, estas plantas ainda não serão consideradas investigadas com respeito a qualquer outra atividade farmacológica.²¹

Atualmente, algumas das principais áreas de pesquisa em plantas bioativas são o tratamento do câncer; atividade anti-infecciosa; controle de doenças tropicais; regulação da fertilidade; inflamação e alergia; imunomodulação e atividade adaptogênica; hepatoproteção e atividade sobre o sistema nervoso central.

A busca por compostos antivirais tem sido estimulada pela rápida disseminação da AIDS. Na área das doenças tropicais, estão sendo desenvolvidos programas para a avaliação de uma grande número de atividades biológicas. Estes incluem antiprotozoários (malária, amebíase, leishmaniose, tripanossomíase), moluscidas, cercaricidas, esquistossomicidas, larvicidas e inseticidas. Programas de pesquisa sobre a regulação da fertilidade, desenvolvidos na Índia e na República Popular da China, buscam substâncias capazes de inibir a espermatogênese e a maturação dos espermatozoides; com atividade espermicida ou

inibidoras do sistema enzimático dos espermatozóides. Quanto à regulação da fertilidade feminina, busca-se a inibição da ovulação e da implantação.²⁰

Complementada pela informação botânica, o conhecimento popular sobre o uso das plantas se constitui no mais importante critério de seleção de material para o estudo químico, visando sua aplicação medicinal. Um grande número de plantas têm sido usadas, muitas vezes com êxito, principalmente no meio rural. Infelizmente, esse tipo de informação tende a desaparecer por influência das comunidades mais evoluídas, cujos costumes, levados ao meio rural através dos meios de comunicação de massa, substituem progressivamente os velhos hábitos.²²

Levantamentos realizados junto à população brasileira demonstram que muitas plantas ainda são utilizadas para fins terapêuticos.²³⁻²⁶ Estima-se que o Brasil possua entre 60.000 e 250.000 espécies vegetais, e que provavelmente 40% destas, possam apresentar propriedades terapêuticas.^{21,27}

Muitos trabalhos têm sido realizados recentemente no que diz respeito à exploração de novas ou tradicionais espécies para produtos farmacêuticos potencialmente importantes. Muitos desses agentes derivados de produtos naturais têm sido obtidos de mais de uma espécie ou fonte e, tem demonstrado eficácia no tratamento de inúmeras doenças, incluindo, por exemplo, compostos antitumorais e compostos ativos no tratamento da infecção pelo vírus HIV e diabetes, apresentando desse modo, biodiversidade em ambos, origem e uso.

Biodiversidade é o melhor, mas menor recurso desenvolvido para inovação biotecnológica do nosso planeta. Nisto abrange-se todas as formas de vida, ecossistemas, processos ecológicos e recebimento de toda hierarquia genética, taxonômica e níveis de ecossistema.²⁸

Ultimamente a biotecnologia têm sido dominada por avanços espetaculares em biologia celular, tecnologia de recombinação do DNA e exames baseados em bibliotecas combinatórias.

Um fato negligenciado é que cerca de 25 por cento das drogas prescritas, em uso hoje, são originadas de recursos naturais. Ainda resta uma grande e inexplorada área de biodiversidade que pode fornecer novos fármacos e combater doenças. É esquecido, muitas vezes, que a natureza ainda é a maior e mais diversificada biblioteca combinatória disponível.²⁹

C. Antecedentes

Um inventário dos números estimados e conhecidos das espécies em cada grupo de seres vivos é mostrado na Tabela 1.³⁰

Tabela 1. Números conhecidos e estimados de espécies biológicas.

Grupo	Conhecido	Estimado	% Conhecido
vírus	5000	130000	4
bactéria	4760	40000	12
fungo	69000	1500000	5
alga	40000	60000	67
briófita	17000	25000	68
gimnosperma	750	270000	0,2
angiosperma	250000	270000	93
protozoa	30800	100000	31
porífera	5000	-	-
cnidária	9000	-	-
nematode	15000	500000	3
crustáceo	38000	-	-
inseto	800000	≅ 10000000	8 - 13
Outros vertebrados	132460	-	-
molusco	50000	-	-
equinodermo	6100	-	-
anfíbio	4184	-	-
réptil	6380	-	-
peixe	19000	21000	90
pássaro	9198	-	≅ 100
mamífero	4178	-	≅ 100

Como pode ser observado na Tabela 1, a porcentagem de espécies conhecidas nas formas de vida microbianas é muito baixa e ainda existe uma tremenda perspectiva no isolamento e exame de extratos microbianos como candidatos a drogas. Além disso, o atual inventário de biodiversidade é bastante incompleto como pode ser observado nos espaços em branco da Tabela 1. Mesmo que a maioria dos seres superiores tenha sido descoberto, existem muitas oportunidades remanescentes na análise dos extratos de plantas e organismos marinhos.

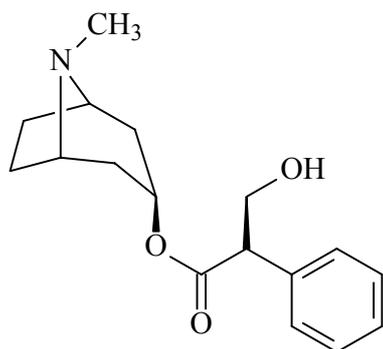
A maioria das estimativas são baseadas em correlações empíricas, tais como a estimativa de 1,5 milhões de espécies de fungos que é baseada numa razão de 1:6 de plantas vasculares para fungos. A estimativa de bactérias e vírus é mais difícil por causa da detecção e recuperação do meio ambiente não ser sempre possível e também devido ao incompleto conhecimento sobre associação microbiana e uma certa falta de conceitos das espécies desses grupos.

O número de espécies vegetais é muito menor que o de espécies microbianas, contudo, a investigação de extratos de plantas apresenta suas próprias complexidades. Os extratos variam de acordo com os vários órgãos da planta, variações sazonais e o habitat de onde o vegetal foi isolado. Portanto, o número de amostras no exame das espécies de plantas, se feito ao acaso, é astronômico e torna-se muito consumidor de tempo. Um exame racional é necessário para limitar-se o número de amostras durante o processo de exame.

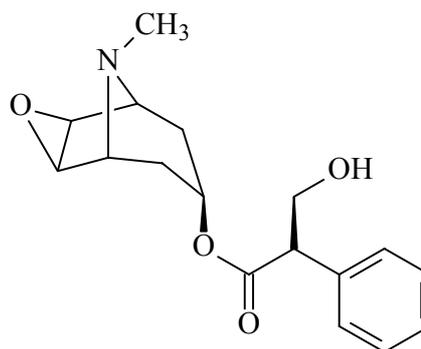
Uma base para o estabelecimento de um exame racional é a análise de classes conhecidas de plantas que são fontes de diversos metabólitos secundários conhecidos por serem boas fontes de atividade biológica, tais como: Celastraceae, Simaroubaceae, Apocynaceae e **Convolvulaceae**.

Outra fonte racional de análise é a etnomedicina ou medicina popular. Práticas etnomedicinais tem predito práticas médicas modernas por milhares de anos. Um grande volume de informações sobre as propriedades medicinais de vários extratos de plantas e animais existe em várias culturas étnicas e pode ser utilizado no estabelecimento de exames racionais com sucesso.

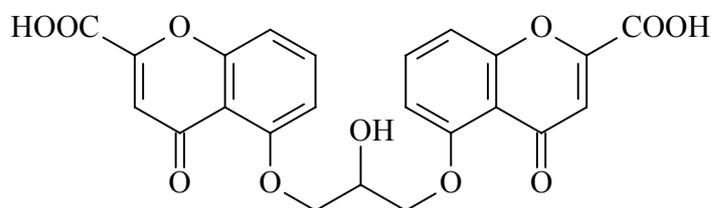
Alguns exemplos de drogas em uso, baseadas nas práticas etnomedicinais são: a atropina (10) e a escopolamina (11), antagonistas da acetilcolina que foram isoladas do gênero Solanácea e tem uma longa história no uso etnomedicinal no Oriente Médio e Europa por aliviarem cólicas, dilatarem as pupilas e como venenos. A cromolina (12) derivada de *Ammi visnaga* foi introduzida nos anos 70, primeiramente como preventivo para asma brônquica e outras alergias. A planta têm sido usada na medicina popular no Mediterrâneo Oriental no tratamento da congestão brônquica. Atualmente, o mercado para o produto excedeu os 100 milhões de dólares ao ano. A quinina (13) e a artemisinina (14) são agentes antimalariais que vem sendo usados durante centenas de anos na América do Sul e na etnomedicina chinesa. Uma das drogas mais vendidas no Mundo, a cloroquina, é um agente antimalarial análogo à quinina.²¹



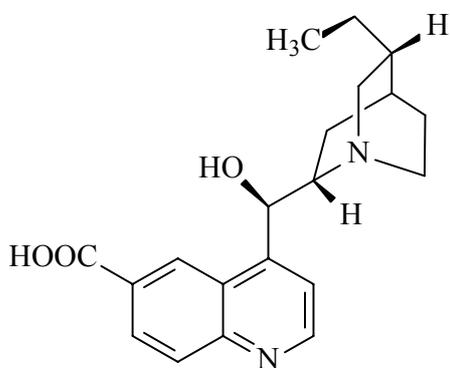
Atropina
(10)



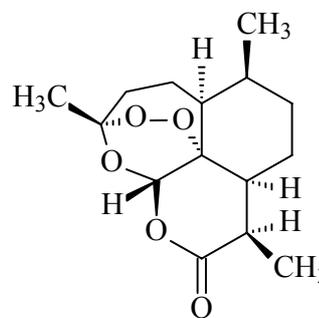
Escopolamina
(11)



Cromolina
(12)



Quinina
(13)



Artemisinina
(14)

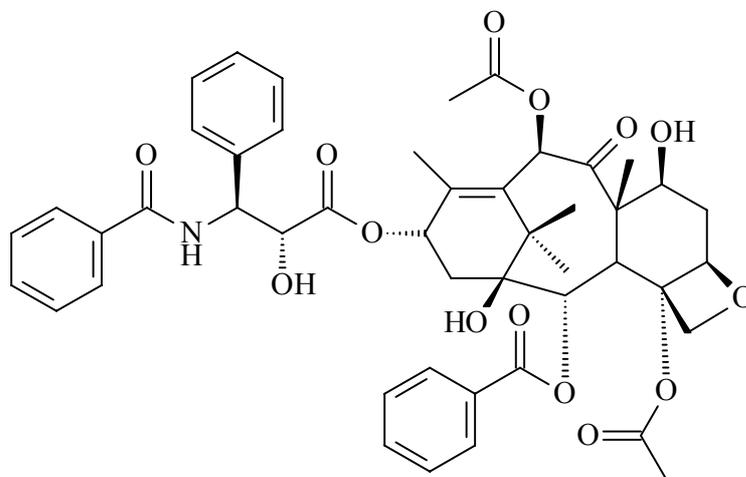
Algumas classes de parasitas malariais tornaram-se resistentes às quininas. Portanto, a descoberta de novas drogas antimalariais com diferentes mecanismos de ação são urgentemente necessários. *Artemisia annua* (Asteracea) é fonte de uma droga antimalarial

alternativa, a artemisina (5), uma lactona sesquiterpênica com um grupo endoperóxido essencial à sua atividade, isolada pela primeira vez em 1972 por cientistas chineses. A planta *Artemisia annua* tem sido usada por mais de 2000 anos na China como antifebrífugo e no tratamento da malária.²² As estórias de sucesso estão sumarizadas na Tabela 2.

Tabela 2. Drogas de sucesso a partir da etnomedicina.

Drogas	Fonte na Medicina Tradicional	Aplicação
Atropina (10)	Europa, Oriente Médio	antiespasmódico e dilatação da pupila
Escopolamina (11)	Europa, Oriente Médio	antiespasmódico e dilatação de pupila
Cromolina (12)	Mediterrâneo Oriental	asma brônquica
Quinina (13)	Peru	malária
Artemisina (14)	China	malária

O diterpenóide taxol (15) é um dos compostos mais promissores que surgiram das pesquisas básicas em busca de agentes antitumorais a partir de produtos naturais. Isolado pela primeira vez por Wall e colaboradores no Instituto de Pesquisas Triângulo, a partir da casca do caule de *Taxus brevifolia* Nutt (Taxaceae), o composto também foi encontrado em outras espécies de *Taxus*, como *T. baccata*.³¹



Taxol
(15)

Há poucos anos atrás, algumas companhias biotecnológicas investiram em estratégias de planejamento racional de fármacos baseado na análise de produtos naturais. Novos compostos, estruturalmente complexos, podem ser descobertos apenas pela análise de produtos naturais. Seria muito pouco provável que fossem planejados de forma racional. A desvantagem deste método consiste no árduo e longo tempo de trabalho envolvido, que na grande maioria dos casos, leva a um número falso de moléculas modelo.

O planejamento racional de drogas e a análise de produtos naturais não são mutuamente exclusivos. As vantagens do planejamento racional de drogas são que a especificidade pode ser planejada e acompanhada pela equipe de pesquisadores e, nos estágios iniciais necessitam apenas de um computador e algoritmos poderosos, que hoje são amplamente conhecidos.³²

1.2. Plantas do gênero *Ipomoea* (Convolvulaceae)

A. Levantamento bibliográfico

A família Convolvulaceae é formada principalmente de ervas trepadeiras e arbustos, algumas vezes com seiva leitosa. Compreende cerca de 85 gêneros e 2800 espécies que são caracterizadas por quase sempre possuírem flores solitárias e folhas simples.

Muitas espécies de *Ipomoea* tem sido utilizadas constantemente pela medicina popular em diferentes partes do mundo, especialmente como purgativa.³³ Estudos farmacológicos dos extratos dessas plantas demonstraram efeitos antimicrobianos, analgésicos, espasmogênicos, espasmolíticos, hipotensivos, psicomiméticos e antitumorais.³⁴

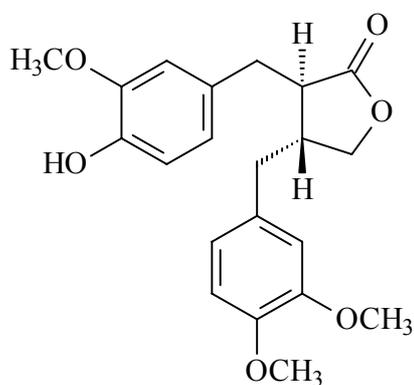
Vários estudos iniciados por Hofmann^{35,36} tiveram o objetivo de investigar a presença de alcalóides indólicos em algumas espécies de *Ipomoea*, como: *I. violaceae*, *I. pestigridis*, *I. carnea*, *I. uniflora*, *I. pentaphylla*, *I. pilosa*, *I. fistulosa*, *I. muricata*, *I. quamoclit*, *I. pescaprae*, entre outras.³⁷ Os resultados de tais estudos demonstraram a ocorrência de alcalóides do tipo ácido lisérgico como, agroclavina, piroclavina, ergotamina, elimoclavina, setoclavina e ergometrina.

As sementes de *Ipomoea violaceae* (L.) têm sido usadas desde o tempo dos Astecas com propósitos divinos e halucinógenos. Está estabelecido que os agentes psicomiméticos ativos nessas sementes são derivados da ergolina (ácido lisérgico) com relação muito próxima ao LSD.

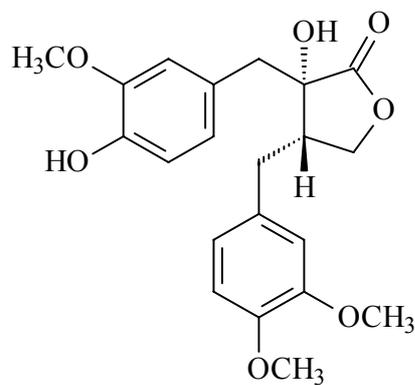
A descoberta de alcalóides ergóticos em plantas superiores foi de interesse considerável, desde que compostos desse tipo só haviam sido demonstrados anteriormente em um número muito restrito de fungos, particularmente, nas espécies *Claviceps*.³⁸

A natureza alelopática de *I. tricolor*, especialmente os efeitos supressivos no crescimento das sementes de batata-doce, já foi sugerida em estudos anteriores.³⁹

A partir do extrato metanólico de *I. cairica* foram isolados dois lignanolídeos, arctigenina (16) e trachelogenina(17), ambos compostos exibiram forte atividade anti-HIV *in vitro*.⁴⁰

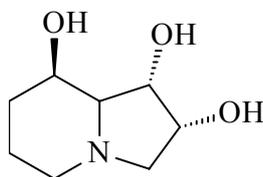


(16)



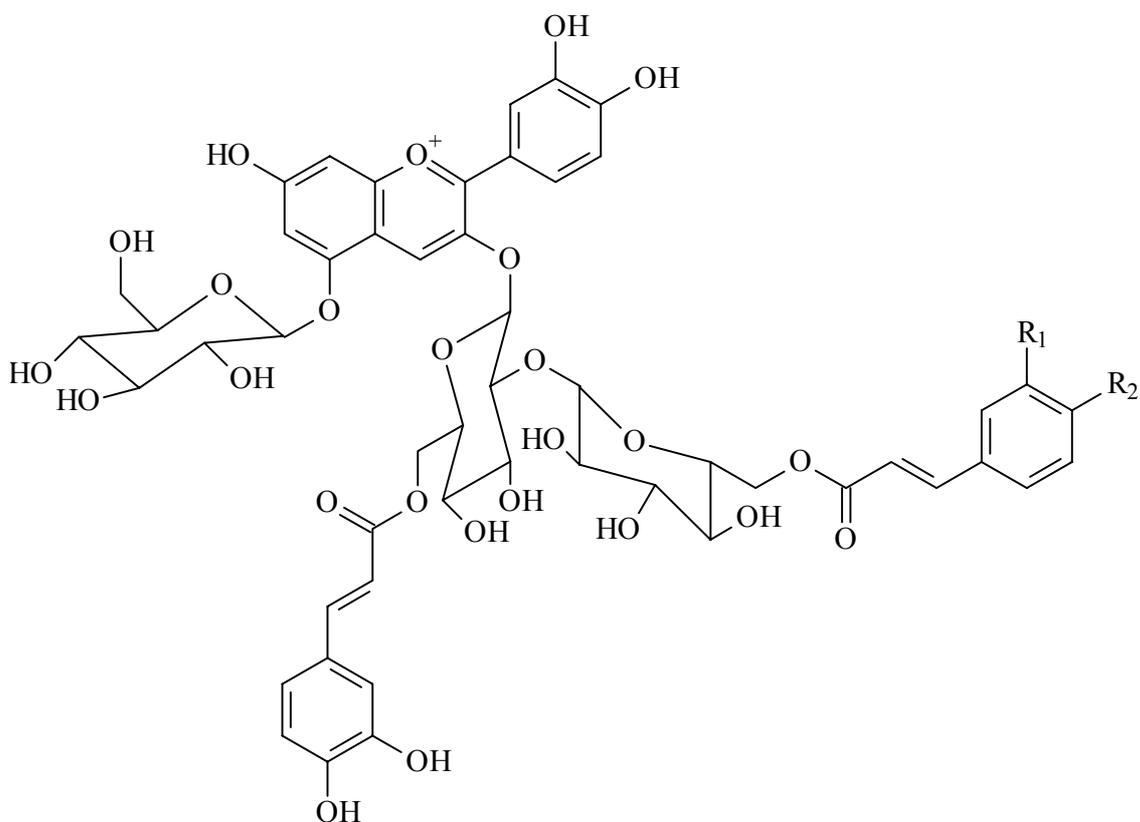
(17)

Das sementes de *I. calobra* foi isolado o alcalóide swainsonina (18), inibidor da enzima glicosidase.⁴¹



(18)

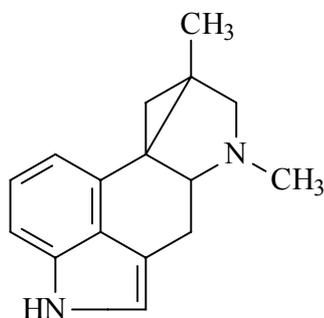
Das flores de *I. assarifolia* foram isoladas duas antocianinas, a cianidina 3-O-[2-O-(6-O-(E-cafeoil)- β -D-glucopiranosil)-6-O-(E-cafeoil)- β -D-glucopiranosida]-5-O[β -D-glucopiranosida](**19**) e uma nova estrutura, a cianidina 3-O-[2-O-(6-O-(E-P-cumaril)- β -D-glucopiranosida)-6-O-(E-cafeoil)- β -D-glucopiranosida]-5-O-[β -D-glucopiranosida] (**20**).



(**19**) $R_1 = R_2 = \text{OH}$

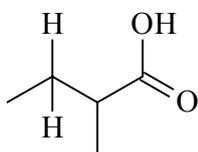
(**20**) $R_1 = \text{H}; R_2 = \text{OH}$

Das sementes de *I. hildebrandtii* foi isolado o alcalóide cicloclavina (**21**).

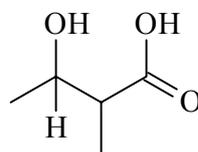


(21)

Do extrato bruto metanólico de *I. bahiense* foram isolados o ácido tiglico (**22**) e ácido 3-hidroxi-2-metilbutírico (**23**) que revelaram significativa atividade no tratamento do Sarcoma 180 em camundongos.⁴²

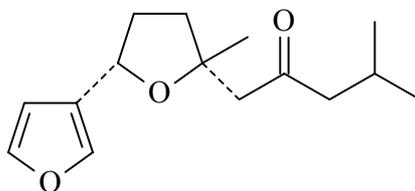


(22)



(23)

Das raízes de *I. batatas* foi isolado o furanosesquiterpeno, ipomeamarona (**24**).⁴³



(24)

B. Posição sistemática de *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br.

DIVISÃO: Magnoliophyta

CLASSE: Magnoliopsida

SUB-CLASSE: Asteridae

ORDEM: Solanales

FAMÍLIA: Convolvulaceae

NOME POPULAR: Railroad vine, Beach Morning Glory, Salsa-da-Praia, Pé-de-Cabra, Batateira-da-Praia.

C. Características e distribuição geográfica de *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br.

Ao longo das dunas de todo o litoral brasileiro, a "salsa-da-praia" figura entre as espécies obrigatórias (Figura 4). Suas folhas assemelham-se com os cascos de um animal, sendo, por isso, também conhecida como "pé-de-cabra". Assim, como outras plantas que vivem nas dunas, o caule dessa espécie corre paralelo ao solo, produzindo raízes ao longo de seu comprimento. Dessa forma, assegura-se a fixação da planta junto ao terreno pouco uniforme das praias, onde as partículas de areia, por ação dos ventos, encontram-se em constante movimento.

Suas folhas de coloração verde-escura e nervuras bem evidentes, dispõem-se alternadamente ao longo do caule. As delicadas flores arroxeadas em forma de sino, com até 10 cm de comprimento, nascem nos ramos rastejantes e parecem ter sido salpicadas sobre a areia.



Figura 4. Aspectos gerais da *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br.

Os frutos são cápsulas arredondadas, com sementes negras. Além das raízes comuns de fixação, a salsa-da-praia produz tubérculos ricos em reservas de amido.

As dunas altas dessas regiões podem causar graves problemas quando avançam em direção às cidades litorâneas. Por essa razão, costuma-se cultivar sobre elas a salsa-da-praia, a fim de se evitar sua movimentação.⁴⁴

A *I. pes-caprae* pode ser encontrada nas áreas costeiras de boa parte do globo. Esta espécie contém várias e importantes substâncias ativas e é tradicionalmente usada na medicina popular como tônica e purgativa. Decocção das raízes e folhas dessa planta são utilizadas também no tratamento do reumatismo, gota e gonorrea. Além disso, acredita-se que apresenta propriedades anti-envelhecimento. O suco é dado como diurético nos casos de gota. A pasta das folhas é aplicada externamente para o tratamento de bolhas e furúnculos. O

chá das folhas é aplicado localmente nas juntas para aliviar as dores do reumatismo, e no abdômem, para alívio de cólicas.⁴⁵

O efeito insulínogênico e hipoglicemiante do extrato alcoólico das folhas de *I. pes-caprae* foi comprovado em estudo comparativo com o fármaco hipoglicêmico de referência cloropropamida, cujos resultados demonstraram que o extrato alcoólico das folhas de *I. pes-caprae* estimula a liberação de insulina *in vitro* e *in vivo*.⁴⁶

A *I. pes-caprae* também tem uso no tratamento de vários tipos de inflamações, incluindo dermatites causadas por veneno de água-viva (animais do filo Coelenterata), através do extrato éter de petróleo das suas folhas, denominado IPA, que exibe atividade antagonista da histamina e veneno de *Jelly-fish*.^{45,47,48,49}

1.3. O desenvolvimento de fármacos na indústria farmacêutica

A descoberta e o desenvolvimento de fármacos são a base fundamental para o desenvolvimento farmacêutico, e o crescimento de receitas para a indústria a nível mundial.

O processo de desenvolvimento de fármacos é complexo, consome muito tempo, é de alto risco e extremamente caro. O número abundante de etapas individuais deve ser acompanhado, contemplando-se todos os aspectos das ciências químico-farmacêuticas.⁵⁰ Neste contexto complexo, a descoberta de novas entidades químicas (NCE, do inglês *new chemical entities*) é a chave principal para o sucesso do processo. Tais moléculas devem ser testadas pré-clinicamente quanto à sua atividade farmacológica e segurança, em animais. Considerando-se uma NCE a partir da concepção até a sua introdução no mercado farmacêutico, são gastos cerca de 12 anos,^{51,52} com custos totais da ordem de 350-500

milhões de dólares⁵³⁻⁵⁵ (incluindo o sucesso e os fracassos do processo). Uma representação destes dados no processo de desenvolvimento de fármacos é mostrada na Figura 5.⁵⁶ Pode ser observado o afinilamento no processo, onde apenas um número muito pequeno de moléculas atinge as triagens clínicas. Este é um negócio imperativo no qual apenas as moléculas com a mais alta probabilidade de sucesso deixam o banco de pesquisas para testes adicionais.⁵⁷

A descoberta e o planejamento de fármacos são a base para o aumento de moléculas inovativas de relevante sucesso, que são de fundamental importância para o crescimento e desenvolvimento da indústria farmacêutica.^{51,58-60}

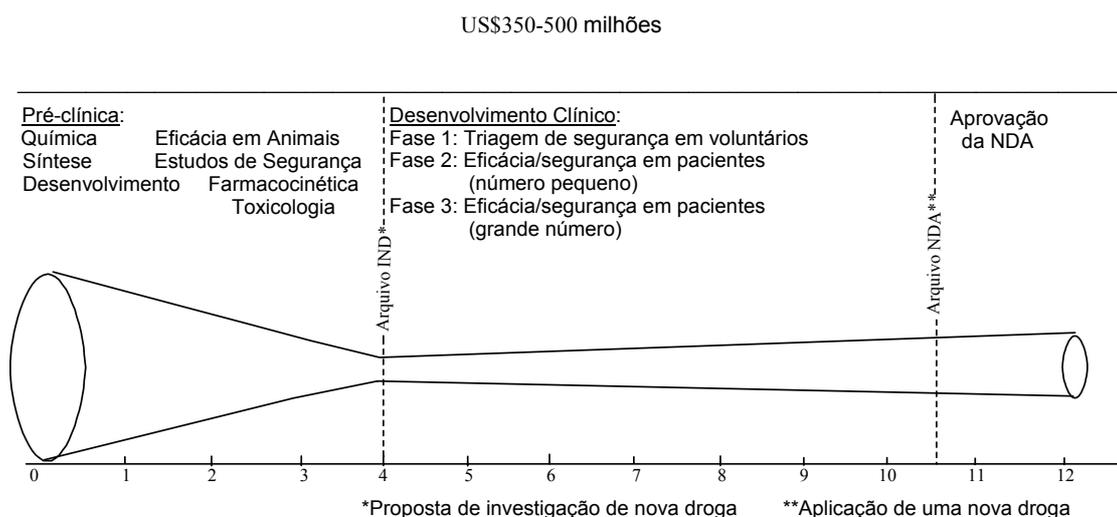


Figura 5. Processo de desenvolvimento de novos fármacos nos Estados Unidos: média de custos e tempo das etapas do processo.

Uma forte tendência é a contribuição das substâncias ativas das plantas, como fonte de novas moléculas líderes com ação biológica específica definida, no processo de

descoberta de fármacos. A partir desta descoberta, novos agentes com melhor perfil terapêutico, incluindo as propriedades farmacocinéticas e/ou toxicológicas, seriam sintetizados, obtendo-se assim, novas entidades químicas a partir dos precursores ativos naturais. Isto seria a otimização da molécula (estrutura) líder, utilizando as técnicas clássicas em Química Medicinal: síntese combinatória, ensaios em massa, química orgânica sintética medicinal, planejamento racional de fármacos, entre outras. Estas estratégias viabilizariam a descoberta de novas moléculas com o perfil terapêutico desejado. Neste sentido, poderia-se verificar a tendência pela busca de moléculas mais simples frente a síntese de moléculas naturais de estruturas complexas.⁶¹

A. Estratégias utilizadas pelas companhias farmacêuticas

Para manter as metas de crescimento projetadas pelas companhias farmacêuticas para a próxima década, as direções de P&D (Pesquisa e Desenvolvimento) deverão realizar maiores investimentos em pessoal e pesquisa, caso contrário não alcançarão as esperadas metas de lucros. De acordo com dados da *Pharmaceutical Research & Manufacturers of America* (PhRMA), foi realizado um investimento total de cerca de 20,6 bilhões de dólares em P&D no ano de 1998, o que representa um aumento de 11% em relação ao ano de 1997.⁶² Por exemplo, para manter um crescimento de 10% ao ano, aproximadamente 1 bilhão de dólares em novas receitas, o grupo alemão Bayer investiu cerca de 935 milhões de dólares no ano de 1998 em P&D. A Eli Lilly e a Pfizer realizaram investimentos de 1,4 e 1,9 bilhões de dólares em P&D, respectivamente, cerca de 16% de suas vendas, enquanto a SmithKline

Beecham investiu 11% de suas vendas em P&D no ano de 1998, cerca de 1,4 bilhões de dólares.⁶²

Para encontrar as exigências de produtividade impostas pelos níveis de investimentos em P&D, as maiores companhias farmacêuticas têm adotado como uma de suas principais estratégias o investimento em novas tecnologias para a descoberta de fármacos, que consiste basicamente no aumento da produtividade em P&D, como uma forma de reduzir os custos e o tempo de descoberta.⁵¹

B. Investimentos em novas tecnologias para a descoberta de fármacos

Tem sido desenvolvido várias tecnologias promissoras para facilitar e acelerar o processo de descoberta de fármacos. Principalmente, entre estas, encontram-se química combinatória e ensaios em massa, planejamento racional de fármacos, e os estudos das relações quantitativas estrutura-atividade (QSAR).⁶³

As relações estrutura-atividade (SAR) e estrutura-propriedade (SPR) estão integradas ao planejamento racional de fármacos. A idéia das relações quantitativas estrutura-atividade ou estrutura propriedade (QSAR/QSPR) foi introduzida por Hansch e colaboradores em 1963 e aplicada originalmente na análise da importância da lipofilicidade na potência biológica.⁶⁴⁻

⁶⁶ Métodos quantitativos assumem que a atividade biológica está correlacionada com a estrutura química ou com as propriedades da estrutura, e que a conseqüente atividade pode ser modelada em função de atributos físico-químicos calculáveis.

As técnicas de QSAR vêm provando serem importantes no processo de descoberta de fármacos.^{67,68} Um número grande de revisões sobre QSAR está disponível na literatura.^{69,70} O

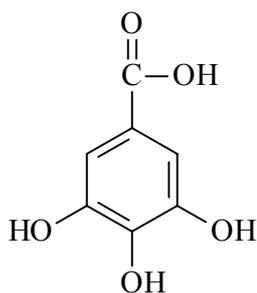
desafio para a próxima década é a geração de tecnologias de QSAR capazes de prever a atividade biológica de compostos ainda não sintetizados. Estas poderosas ferramentas serão importantes no rápido e eficiente progresso da química sintética moderna no planejamento e racionalização de novos e poderosos terapêuticos.

A habilidade para criar modelos preditivos de QSAR seria de fundamental importância na descoberta de fármacos. Poderia prever-se o valor de determinada propriedade para novos compostos e depois sintetizar somente aqueles que encontrassem um padrão pré-determinado de interesse.⁷¹ Contudo, modelos de QSAR, enquanto preditivos em alguma região do espaço estrutural, têm limitado poder preditivo, que geralmente não é claro, fora destes limites. Conseqüentemente, a proposta preditiva do QSAR tem sido limitada, e, portanto, o maior interesse do QSAR tem sido na área de correlações de dados.⁷² Permanece claro que, modelos preditivos de QSAR, confiáveis para um determinado espaço estrutural, seriam uma revolução no desenvolvimento de fármacos.⁷³ Esta Tese apresenta a construção de um conjunto padrão de dados e o desenvolvimento de um modelo preditivo empregando uma nova tecnologia do QSAR.⁷⁴

1.4. A Química Medicinal e o desenvolvimento de fármacos

Historicamente, os fármacos vem sendo introduzidos na terapêutica, principalmente, por um dos seguintes processos: acaso, triagem empírica, extração de princípios ativos de fontes naturais, modificação estrutural e planejamento racional.^{75,76} A Química Medicinal tem evoluído consideravelmente durante as últimas 2 décadas e hoje conquista a atenção de pesquisadores de diversas áreas, trabalhando conjuntamente na complexa busca por novos fármacos. A Química Medicinal apresenta um caráter inter e multi-disciplinar, compreende a descoberta e o desenvolvimento, a identificação e a interpretação do modo de ação dos compostos biologicamente ativos ao nível molecular. Deve-se ressaltar que o interesse do químico medicinal não se restringe somente aos fármacos, mas abarca também os compostos biologicamente ativos, compreende o isolamento, a caracterização e a síntese de novos compostos e derivados, com a finalidade da seleção de compostos modelos, que são moléculas líderes com grande potencial de ser investigadas e exploradas no processo de desenvolvimento de novos fármacos. A Química Medicinal é uma ciência cujas raízes se encontram em todos os ramos da química e das ciências farmacêuticas em geral.^{77,78}

A Química Medicinal está presente neste trabalho de Tese nos estudos que envolvem a síntese, a caracterização, a determinação da atividade biológica e o desenvolvimento de relações quantitativas entre a estrutura e a atividade (QSAR) de uma série de moléculas análogas ao ácido gálico (**25**), composto natural ativo utilizado como modelo em nossos estudos.



Ácido Gálico
(25)

1.7. Ácido gálico: uma molécula modelo para estudos em Química Medicinal

Um aspecto interessante no que tange ao estudo de plantas medicinais envolve a utilização dos compostos naturais ativos como modelo para a síntese de novas substâncias análogas mais potentes e seletivas. Muitos fármacos disponíveis atualmente no mercado farmacêutico foram obtidos sinteticamente baseados em estruturas naturais ativas. Vários exemplos da utilização de princípios naturais ativos em estudos químico-medicinais são descritos na literatura.⁷⁵ Um dos objetivos deste trabalho de Tese é a utilização do ácido gálico (25), isolado de *Phyllanthus urinaria* (também do galato de etila, isolado em nossos laboratórios de *Phyllanthus sellowianus*),⁷⁹ como modelo para a obtenção de séries análogas simples, para estudos em química medicinal.

Polifenóis de plantas são metabólitos secundários distribuídos amplamente em vários setores do reino das plantas superiores e, são muito conhecidos por apresentarem diversas atividades biológicas e farmacológicas, como atividade antiviral, antiinflamatória e antioxidativa.⁸⁰

O ácido gálico (ácido 3, 4, 5-trihidroxibenzóico) é mais frequentemente encontrado em plantas na forma de éster como um tanino hidrolisável, que exhibe atividades

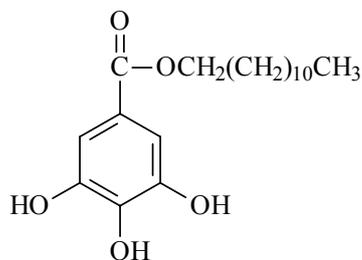
similares.^{81,82,83} Uma atividade muito especial apresentada pelo ácido gálico é a indução de morte celular (apoptose) em células cancerosas com alta seletividade, muito maior que em células normais.⁸⁴ Além disso, o ácido gálico induz apoptose em células de leucemia promielocítica HL-60RG.⁸⁵ A evolução destes estudos, levou a recente demonstração de que o galato de dodecila (**26**), agente antioxidante largamente utilizado como aditivo em produtos alimentícios, induz apoptose em linfoma das células B Wehi 231, em camundongos. Este composto demonstrou interessante efeito inibitório da cinase de tirosina proteica (PTK) em células, com maior eficiência do que outros inibidores bastante conhecidos, como a herbimicina ou genistein.⁸⁶

O ácido gálico, os galatos de etila (**27**) e propila (**28**) apresentaram atividade citotóxica contra espécies de *Trypanosoma brucei* em suas duas formas, corrente sanguínea e procíclica.⁸⁷

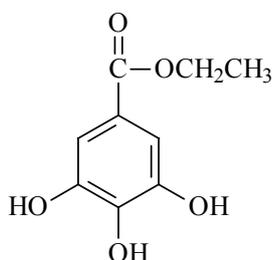
Análises recentes da ocorrência de diversos metabólitos secundários isolados de *Phyllanthus urinaria*, na traquéia de porquinhos da Índia pré-contraída pela histamina, demonstram os compostos responsáveis pela resposta na relaxação causada pelo extrato hidroalcoólico dessa espécie. A adição de ácido gálico, galato de metila (**29**) ou de etila, isolados do extrato acetato de etila de *P. urinaria*, produziu, em cada caso, relaxação concentração-dependente na traquéia de porquinhos da Índia.^{88,89} A ordem de potência (CE₅₀) foi: ácido gálico, 0,7 µM, > galato de metila, 1,8µM, > galato de etila, 50 µM.

O galato de metila, o de propila e o pirogalol (**30**) foram demonstrados por serem altamente ativos contra viroses provocadas por *Herpes simplex in vitro*. Apesar do recente progresso na elucidação da estrutura genômica do vírus da herpes, o entendimento do mecanismo molecular da infecção e replicação das viroses herpéticas permanecem sem

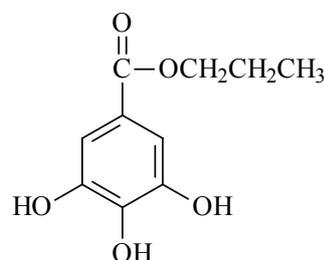
conclusão. O galato de metila foi caracterizado como potente inibidor de HSV-2 *in vitro* e, foi isolado da árvore chinesa *Sapium sebiferum*.⁹⁰



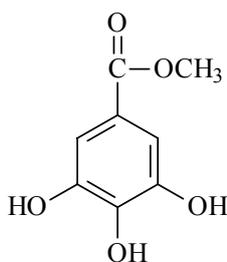
Galato de Laurila
(26)



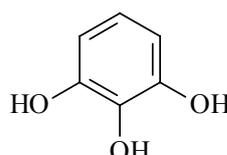
Galato de Etila
(27)



Galato de Propila
(28)



Galato de Metila
(29)



Pirogalol
(30)

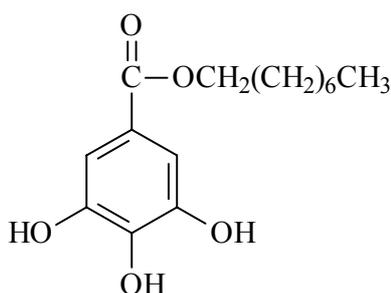
A atividade antitumoral das folhas de *Acer negundo* L. (Aceraceae) foi confirmada após o isolamento do galato de metila, que provou ser efetivo no tratamento do melanoma B16 em camundongos.⁹¹

O galato de metila ocorre freqüentemente na família Aceraceae, bem como em outras famílias de plantas. Foi demonstrado anteriormente que este composto inibe a leucemia L1210 *in vivo*.⁹²

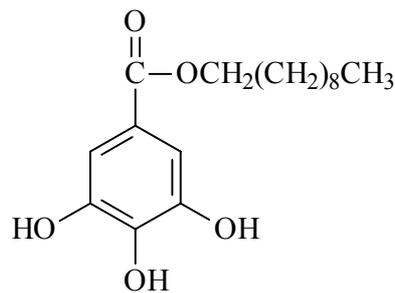
Estudos envolvendo *Acacia nilotica* (L.) Willd, uma das plantas taníferas mais importantes da África, demonstraram que essa espécie possui potente atividade moluscicida devido a presença do ácido gálico e do galato de metila em suas cascas e frutos.^{93,94}

O galato de propila foi ativo como antioxidante, sendo usado em alimentos⁹⁵ e também como ingrediente na composição de cosméticos.⁹⁶ Uma atividade antiinflamatória marcante foi observada quando o galato de propila foi administrado sistematicamente em ratos,⁹⁷ camundongos⁹⁸ ou topicamente no homem.⁹⁹

Alguns ésteres do ácido gálico, com diferentes cadeias alquílicas alifáticas variando entre 1 e 10 carbonos, produziram potente inibição na conversão do ácido araquidônico no metabólito da lipooxigenase, o 5-HETE. Os galatos de octila (**31**) e decila (**32**) foram os inibidores mais potentes da 15-lipooxigenase, com valores de concentração necessários para 50% do efeito inibitório em cerca de 10 μ M.¹⁰⁰



(31)



(32)

Ésteres de cadeia alquílica do ácido gálico (etila, octila, dodecila,...), foram avaliados em estudos recentes, como inibidores da epoxidase esqualeno recombinante, uma enzima monooxigenase flavoproteica, que catalisa a conversão do esqualeno em 2,3-oxidoesqualeno, uma etapa limitante da biossíntese do colesterol.¹⁰¹

Por outro lado, ésteres do ácido gálico foram planejados como inibidores da p-hidroxibenzoato hidrolase (PHBH), uma monooxigenase flavina NADPH-dependente, de *Pseudomonas aeruginosa*.¹⁰²

Das folhas de *Swintonia foxworthyi* (Anacardiaceae) foi isolado o galato de metila, que apresentou atividade antiplasmodiana, com valores de CI_{50} de 2,0 e 3,5 $\mu\text{g/ml}$ contra W2 e D6 *Plasmodium falciparum*, respectivamente.¹⁰³

Uma grande variedade de atividades biológicas foram atribuídas ao galato de metila, incluindo antibacteriana *in vitro*,¹⁰⁴ antioxidante,¹⁰⁵ antiviral,¹⁰⁶ citotóxica¹⁰⁷ e atividade antitumoral *in vivo*.¹⁰⁸

O ácido gálico apresentou atividade antiinflamatória no modelo de edema de pata de camundongos induzido pelo zymosan,¹⁰⁹ além de atividades antimutagênica,¹¹⁰ anticarcinogênica¹¹¹ e efeito bloqueador de canais iônicos.¹¹²

O galato de etila isolado de *Phyllanthus urinaria*, foi investigado em diferentes modelos antinociceptivos em camundongos e ratos, para elucidação do possível mecanismo de ação envolvendo sua ação analgésica.¹¹³ Foi demonstrado que o galato de etila pode exercer sua ação via ativação dos canais de potássio, e por um mecanismo $G_{i/o}$ pertussis toxin-sensitive.¹¹⁴

Diante do amplo espectro de atividades biológicas e farmacológicas apresentadas pelo ácido gálico e seus derivados simples nesta introdução, fica evidenciado o interesse químico medicinal no estudo contínuo desta classe de compostos. Estabelece-se assim, o entendimento do uso do ácido gálico como uma molécula modelo de grande potencial, em um dos temas deste trabalho de Tese, para estudos em Química Medicinal

CAPÍTULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Materiais e métodos

Os espectros de infravermelho foram obtidos em espectrômetro Perkin-Elmer Spectrum FT-16 PC, em pastilhas de KBr. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetros Bruker ou Varian a frequências de 200 ou 300 MHz, e 50 MHz, respectivamente, usando solventes deuterados adquiridos comercialmente e tetrametilsilano como padrão interno de referência. Os deslocamentos químicos são expressos em unidades δ em partes por milhão em relação ao padrão interno de referência. Multiplicidades são expressas como: s, singlete; d, dublete; t, triplete; q, quarteto; m, multiplete. Os espectros de massa dos compostos **40** e **41** foram obtidos em espectrometro Shimadzu CG/MS-2000A 70 eV, no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina. Os espectros de massa de alta resolução (EM-AR) foram obtidos em espectrômetros VG 70-250-S Micromass Corp, no *Mass Spectrometry Laboratory* da *University of Michigan*. Os espectros de massa de ionização química (CI) foram obtidos usando NH_3 como gás reagente. Os pontos de fusão foram determinados em equipamentos Microquímica AP-300 ou Fisher-Johns e não foram corrigidos. Análise elementar foi realizada no *Elemental Analysis Laboratory*, do *Department of Chemistry* da *University of Michigan*. Os valores encontrados estão dentro do limite $\pm 0,4$ dos valores calculados correspondentes.

Para a avaliação preliminar do grau de pureza dos produtos isolados da espécie *Ipomoea pes-caprae*, foi empregada cromatografia em camada delgada (CCD), usando como adsorvente sílica gel 60 da Merck e, como eluentes, solventes puros ou misturas de solventes

de grau de pureza analítica, de procedência da Merck, Reagen ou Grupo Química. A revelação dos cromatogramas foi realizada por aspersão do revelador anisaldeído com posterior aquecimento a 110°C por 10 minutos em estufa. O grau de pureza dos compostos isolados desta espécie foi verificado também através de experimentos de cromatografia gasosa e, por avaliação de seus espectros de massa e de RMN de ^1H e ^{13}C .

Os compostos sintéticos (análogos do ácido gálico) foram avaliados analiticamente por CCD usando placas pré-cortadas de sílica gel 60 da *Aldrich Chemicals* de 0,25 mm de espessura. As placas de CCD foram visualizadas por luz UV de curto comprimento de onda, ou reveladas usando-se uma solução alcoólica 10% de cloreto férrico. Os compostos foram identificados e avaliados quanto a seu grau de pureza, através dos espectros de RMN de ^1H , massa de alta resolução, e por análise elementar.

2.2. Estudos da espécie *Ipomoea pes-caprae*

A. Principais cuidados a serem tomados na seleção do material vegetal

A coleta do material biológico é crítica para o sucesso do programa de exame do produto natural. Um dos cuidados que deve ser levado em conta envolve informações sobre possíveis efeitos tóxicos da planta a ser selecionada. Plantas que tenham o nome popular de mata-boi, mata-cavalo, etc, devem ser vistas com restrições, já que a presença de constituintes tóxicos pode comprometer todo o estudo realizado.

A planta a ser investigada deve ser classificada com segurança e a coleta deve ser feita com muito cuidado para não serem agregadas outras espécies diferentes. Também deve

ser levada em consideração a quantidade de planta que viceja no local da coleta para que os estudos não fiquem prejudicados. A secagem em estufa (40°C) ou à sombra (temperatura ambiente) deve ser procedida logo após a coleta para evitar proliferação de fungos. Caso se deseje armazenar o material vegetal, o mesmo pode ser acondicionado em freezer. Na preparação dos extratos, a planta deve estar completamente fresca ou totalmente seca para definir com melhor exatidão o rendimento tanto da massa bruta como dos constituintes químicos.⁷⁵

B. Material botânico

As partes aéreas de *I. pes-caprae* foram coletadas nas dunas da praia de Jurerê Internacional na cidade de Florianópolis, Brasil, em março de 1997. A planta foi classificada pelo prof. Dr. Ademir Reis, do horto botânico da Universidade Federal de Santa Catarina e arquivada no Herbário Barbosa Rodrigues (HBR) em Itajaí, sob o código VC Filho 009.

2.2.1. Isolamento e identificação dos princípios ativos

As partes aéreas frescas de *I. pes-caprae* (6,5 kg) foram cortadas em pequenos pedaços e maceradas em metanol, a temperatura ambiente por 10 dias. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida até o volume desejado e o extrato metanólico foi então particionado sucessivamente com hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e água, respectivamente, de acordo com metodologia previamente descrita.²⁸

Após a evaporação dos solventes, foram obtidas as respectivas frações. A fração acetato de etila (8,0 g) apresentou considerável atividade antinociceptiva e o melhor rendimento, sendo assim selecionada para as análises fitoquímicas.

Uma parte dessa fração (7,5 g) foi cromatografada em coluna de sílica gel eluída com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ com gradiente crescente de polaridade. As frações que demonstraram perfis similares por cromatografia em camada delgada (CCD) foram combinadas de acordo com suas polaridades e sucessivamente recromatografadas utilizando cromatografia em coluna fornecendo os seguintes compostos: estigmasterol (**33**) (12 mg), β -sitosterol (**34**) (49 mg), glochidona (**35**) (58 mg), acetato de α - e β -amirina (**36** e **37**) (19,5 mg), α -amirina (**38**) (24,5 mg), β -amirina (**39**) (12,0 mg), xantoxilina (**40**) (16,6 mg), 2,4-dihidroxi-6-metoxi acetofenona (**41**) (41,1 mg), ácido serfíco (**42**) (21,6 mg), ácido betulínico (**43**) (4,0 mg), isoquercitrina (**44**) (171,4 mg), quercetina (**45**) (35,6 mg), ácido salicílico (**46**) (86,3 mg) e solasodina (**47**) (124,4 mg). Os compostos foram identificados através dos dados espectroscópicos de IV e RMN (^1H e ^{13}C), espectrometria de massas, por comparação direta com amostras autênticas e determinação dos pontos de fusão. Os compostos **33**, **34** e **36-39** foram analisados por cromatografia gasosa de alta resolução (CG-AR), por co-injeção com amostras autênticas. Os compostos **33-40** também foram detectados nas frações de hexano e diclorometano, não sendo determinadas as suas concentrações.

Estigmasterol (33): RMN ^{13}C e ^1H (50 MHz e 200 MHz, CDCl_3) δ : 37,3 (C-1), 31,7 (C-2), 71,8 (C-3)(3,5, m, 1H), 42,3 (C-4), 140,8 (C-5), 121,7 (C-6)(5,3, m, 1H), 31,9 (C-7), 31,9 (C-8), 50,2 (C-9), 36,5 (C-10), 21,1 (C-11), 39,7 (C-12), 42,3 (C-13), 56,9 (C-14), 24,3 (C-15), 28,9 (C-16), 56,0 (C-17), 12,0 (C-18)(0,69, s, 3H), 19,4 (C-19)(1,01, s, 3H), 40,5 (C-20),

21,1 (C-21)(1,02, d, $J = 6,6$ Hz, 3H), 138,3 (C-22)(5,7, m, 1H), 129,3 (C-23)(5,6, m, 1H), 51,2 (C-24), 31,9 (C-25), 21,2 (C-26)(0,84, d, $J = 6,6$ Hz, 3H), 19,0 (C-27)(0,79, d, $J = 6,6$ Hz, 3H), 25,4 (C-28), 12,3 (C-29)(0,8, t, $J = 7,9$ Hz, 3H). P.f. 164-166⁰C (lit.¹¹⁵ p.f. 165-167⁰C).

β -sitosterol (34): RMN ¹³C e ¹H (50 MHz e 200 MHz, CDCl₃) δ : 37,3 (C-1), 31,7 (C-2), 71,8 (C-3)(3,5, m, 1H), 42,3 (C-4), 140,8 (C-5), 121,7 (C-6)(5,3, m, 1H), 31,9 (C-7), 31,9 (C-8), 50,1 (C-9), 36,5 (C-10), 21,1 (C-11), 39,8 (C-12), 42,3 (C-13), 56,7 (C-14), 24,3 (C-15), 28,2 (C-16), 56,1 (C-17), 11,9 (C-18)(0,68, s, 3H), 19,4 (C-19)(1,00, s, 3H), 36,2 (C-20), 18,8 (C-21)(0,92, d, $J = 6,5$ Hz, 3H), 33,9 (C-22), 26,1 (C-23), 46,0 (C-24), 28,9 (C-25), 19,8 (C-26)(0,83, d, $J = 6,8$ Hz, 3H), 19,0 (C-27)(0,81, d, $J = 6,8$ Hz, 3H), 23,1 (C-28), 12,3 (C-29)(0,84, t, $J = 7,2$ Hz, 3H). P.f. 138-140⁰C (lit.¹¹⁵ p.f. 139-142⁰C).

Glochidona (35): IV (KBr, cm⁻¹): 2936 (CH₂ e CH₃), 1669 (C=O α , β -insaturada), 878 (=CH₂). RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ : 7,09 (d, 1H, $J = 9,8$ Hz, H-2), 5,76 (d, 1H, $J = 9,8$ Hz, H-1), 4,69 e 4,58 (d, 2H, =CH₂), 1,65-1,38 (m, 17H, 8x CH₂, 1x CH), 1,69 (s, 3H, H-30), 1,12 (s, 3H, H-23), 1,11 (s, 3H, H-28), 1,07 (s, 3H, H-27), 1,06 (s, 3H, H-26), 0,95 (s, 3H, H-24), 0,79 (s, 3H, H-25). RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ : 125,1 (C-1), 159,8 (C-2), 205,6 (C-3), 39,9 (C-4), 44,4 (C-5), 19,1 (C-6), 35,4 (C-7), 41,7 (C-8), 53,4 (C-9), 39,5 (C-10), 21,1 (C-11), 25,1 (C-12), 42, 9 (C-13), 43,1 (C-14), 29,7 (C-15), 33,7 (C-16), 44,6 (C-17), 48,11 (C-18), 47,8 (C-19), 150,6 (C-20), 27,7 (C-21), 38,1 (C-22), 27,3 (C-23), 18,0 (C-24), 18,19 (C-

25), 16,4 (C-26), 14,4 (C-27), 19,3 (C-28), 109,5 (C-29), 21,2 (C-30). P.f. 165-166⁰C (lit.¹¹⁶ p.f. 164-165⁰C).

Acetato de α - e β -amirina (36 e 37): IV (KBr, cm⁻¹): 1725 e 1240 (grupo éster), 2920 e 2880 (estiramento C-H de metilas e metilenos), 1470 (deformação C-H de grupo metila), 1380 e 1370 (deformação C-H de grupo gem-dimetila). RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ : 5,23 (t, 1H, prótons olefínicos), 4,53 (t, 1H, próton metínico adjacente ao acetato), 2,04 (s, 3H, metila do acetato), e sinais para 8 metilas em 1,13 (s, 3H), 0,97 (s, 6H), 0,87 (s, 12H), 0,83 (s, 3H). RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ : 38,24 (C-1), 23,62 (C-2), 80,95 (C-3), 37,55 (C-4), 55,30 (C-5), 18,8 (C-6), 32,56 (C-7), 39,80 (C-8), 47,57 (C-9), 36,83 (C-10), 23,47 (C-11), 121,76 (C-12), 145,33 (C-13), 41,69 (C-14), 28,33 (C-15), 26,10 (C-16), 32,41 (C-17), 47,23 (C-18), 46,79 (C-19), 31,00 (C-20), 34,70 (C-21), 37,13 (C-22), 27,99 (C-23), 16,72 (C-24), 14,46 (C-25), 16,62 (C-26), 25,85 (C-27), 26,87 (C-28), 33,24 (C-29), 23,62 (C-30), 21,19 (CH₃-), 171,12 (-CO₂-). O uso de CG-AR indicou quantidade similar de ambos compostos.

α -amirina (38): RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ : 38,7 (C-1), 27,2 (C-2), 78,3 (C-3), 38,7 (C-4), 55,2 (C-5), 18,3 (C-6), 32,9 (C-7), 40,0 (C-8), 47,7 (C-9), 36,9 (C-10), 23,3 (C-11), 124,3 (C-12), 139,3 (C-13), 42,0 (C-14), 28,7 (C-15), 26,6 (C-16), 33,7 (C-17), 58,9 (C-18), 39,6 (C-19), 39,6 (C-20), 31,2 (C-21), 41,5 (C-22), 28,1 (C-23), 15,6 (C-24), 15,6 (C-25), 16,8 (C-26), 23,3 (C-27), 28,1 (C-28), 17,4 (C-29), 21,3 (C-30). P.f. 184-185⁰C (lit.¹¹⁷ p.f. 186⁰C).

β -amirina (39): RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ : 38,7 (C-1), 27,3 (C-2), 79,0 (C-3), 38,8 (C-4), 55,3 (C-5), 18,5 (C-6), 32,8 (C-7), 38,8 (C-8), 47,7 (C-9), 37,6 (C-10), 23,6 (C-11), 121,8 (C-12), 145,1 (C-13), 41,8 (C-14), 26,2 (C-15), 27,0 (C-16), 32,5 (C-17), 47,4 (C-18), 46,9 (C-19), 31,1 (C-20), 34,8 (C-21), 37,2 (C-22), 28,2 (C-23), 15,5 (C-24), 15,6 (C-25), 16,9 (C-26), 26,0 (C-27), 28,4 (C-28), 33,3 (C-29), 23,7 (C-30). P.f. 193-195 $^{\circ}\text{C}$ (lit.¹¹⁸ p.f. 195-196 $^{\circ}\text{C}$).

Xantoxilina (40): IV (KBr, cm^{-1}): 3460, 2925, 1640 e 1385. RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ : 14,03 (s, 1H, OH), 6,06 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H, ArH), 5,92 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H), 3,85 (s, 3H, CH_3O), 3,82 (s, 3H, CH_3O), 2,60 (s, 3H, CH_3CO). EM (m/z , intensidade relativa): 196 (30), 181 (100), 166 (8,2), 138 (8). P.f. 81-82 $^{\circ}\text{C}$ (lit.¹¹⁹ p.f. 81 $^{\circ}\text{C}$).

2,4-dihidroxi-6-metóxiacetofenona (41): IV (KBr, cm^{-1}): 3350-3050 (OH), 1637 (C=O), 1560 (C=C, Ar), 1359 (CH_3). RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ : 13,90 (s, 1H, OH), 6,00 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H, ArH), 5,90 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H, ArH), 5,45 (s, 1H, OH), 3,80 (s, 3H, OCH_3), 2,60 (s, 3H, CH_3).¹²⁰ EM (m/z , intensidade relativa): 182 (28), 167 (100), 152 (8,7), 124 (7,5).

Ácido serícico (42): RMN ^{13}C e ^1H (50 MHz e 200 MHz, piridina- d_5) δ : 47,3 (C-1), 68,6 (C-2)(4,3, ddd, $J = 4,9, 10,5$ Hz, 1H), 85,7 (C-3)(3,5, d, $J = 10,5$ Hz, 1H), 43,9 (C-4), 56,5 (C-5)(2,8, dd, $J = 4, 11$ Hz, 1H), 19,3 (C-6), 33,5 (C-7), 40,0 (C-8), 48,4 (C-9), 38,4 (C-10), 24,4 (C-11), 123,3 (C-12)(5,5, m, 1H), 144,9 (C-13), 42,0 (C-14), 29,0 (C-15), 28,3 (C-16), 46,0

(C-17), 44,7 (C-18)(3,6, d, $J = 3$ Hz, 1H), 81,1 (C-19)(3,6, d, $J = 3$ Hz, 1H), 35,7 (C-20), 29,0 (C-21), 33,5 (C-22), 24,1 (C-23), 65,5 (C-24)(4,5 e 3,72, d, $J = 10,5$ Hz, 1H cada), 17,3 (C-25), 17,1 (C-26), 24,7 (C-27), 180,8 (C-28), 28,8 (C-29), 24,7 (C-30). P.f. 279-280⁰C (lit.¹²¹ p.f. 282⁰C).

Ácido betulínico (43): RMN ¹³C e ¹H (50 MHz e 200 MHz, piridina-*d*₅) δ: 39,2 (C-1), 28,2 (C-2), 78,0 (C-3)(3,48, dd, $J = 2$ e 7,6 Hz, 1H), 39,4 (C-4), 55,8 (C-5), 18,7 (C-6), 34,7 (C-7), 41,0 (C-8), 50,8 (C-9), 37,5 (C-10), 21,1 (C-11), 26,0 (C-12), 38,5 (C-13), 42,7 (C-14), 31,1 (C-15), 32,8 (C-16), 56,5 (C-17), 47,7 (C-18)(2,7, dd, $J = 2$ e 9 Hz, 1H), 49,6 (C-19)(3,5, ddd, $J = 3, 3$ e 9 Hz, 1H), 161,3 (C-20), 30,1 (C-21), 37,5 (C-22), 28,6 (C-23), 16,1 (C-24), 16,4 (C-25), 16,3 (C-26), 14,8 (C-27), 178,8 (C-28), 109 (C-29)(4,6 e 4,7, 2d, $J = 2$ Hz, 1H cada), 19,4 (C-30)(1,8, s, 3H). P.f. 298-300⁰C (lit.¹²² p.f. 295-298⁰C)

Isoquercitrina (44): RMN ¹H (200 MHz, CD₃OD) δ: 7,90 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz, H-2'), 7,72 (d,d, 1H, $J = 2,1$ e 8,5 Hz, H-6'), 7,07 (d, 1H, $J = 8,5$, H-5'), 6,57 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz, H-9), 6,39 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz, H-7), 5,42 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz, H-1''), 3,85-3,55 (m, 5H). RMN ¹³C (50 MHz, CD₃OD) δ: 159,2 (C-2), 135,9 (C-3), 179,7 (C-4), 163,3 (C-5), 100,2 (C-6), 166,6 (C-7), 95,0 (C-8), 158,7 (C-9), 105,8 (C-10), 123,2 (C-1'), 116,2 (C-2'), 146,2 (C-3'), 150,1 (C-4'), 117,8 (C-5'), 123,4 (C-6'); 3-O-Glc: 104,6 (C-1), 76,0 (C-2), 78,4 (C-3), 71,4 (C-4), 78,6 (C-5), 62,8 (C-6). P.f. 216-218⁰C (lit.¹²³ p.f. 216-218⁰C).

Quercetina (45): RMN ^1H (200 MHz, CD_3OD) δ : 7,82 (d, 1H, ArH), 7,68 (dd, 1H, ArH), 7,01 (d, 1H, ArH), 6,52 (d, 1H, ArH), 6,27 (d, 1H, ArH). RMN ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) δ : Anel A: 165,95 (C-5), 98,40 (C-6), 164,10 (C-7), 93,40 (C-8), 156,43 (C-9), 103,30 (C-10); anel C: 145,26 (2C α), 135,95 (3C β), 176,05 (4 CO); anel B: 122,33 (C-1), 115,39 (C-2), 145,26 (C-3), 147,89 (C-4), 115,89 (C-5), 120,35 (C-6). P.f. 310-312 $^{\circ}\text{C}$ (lit.¹²⁴ p.f. 312-314 $^{\circ}\text{C}$).

Ácido salicílico (46): RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ : 6,87 (t, 1H, *a*ArH), 6,93, (d, 1H, *b*ArH), 7,44 (t, 1H, *c*ArH), 7,85 (d, 1H, *d*ArH). RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ : 172,0, 161,3, 134,9, 130,0, 118,4, 116,6, 112,5. P.f. 158-160 $^{\circ}\text{C}$ (lit.¹²⁵ p.f. 158-160 $^{\circ}\text{C}$).

Solasodina (47): IV (KBr, cm^{-1}): 3350, 1255, 1040. RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ : 37,2 (C-1), 31,6 (C-2), 71,7 (C-3), 42,3 (C-4), 140,8 (C-5), 121,4 (C-6), 32,2 (C-7), 31,4 (C-8), 50,1 (C-9), 36,6 (C-10), 20,9 (C-11), 39,9 (C-12), 40,5 (C-13), 56,5 (C-14), 32,1 (C-15), 78,8 (C-16), 62,9 (C-17), 16,5 (C-18), 19,4 (C-19), 41,3 (C-20), 15,3 (C-21), 98,4 (C-22), 34,1 (C-23), 30,4 (C-24), 31,5 (C-25), 47,7 (C-26), 19,4 (C-27). P.f. 200-201 $^{\circ}\text{C}$ (lit.¹²⁶ p.f. 200-201 $^{\circ}\text{C}$).

As estruturas dos compostos isolados de *I. pes-caprae* (33-47) são apresentadas no Capítulo III (Resultados e Discussão) desta Tese.

2.2.2. Ensaios farmacológicos

Os testes farmacológicos dos compostos isolados da espécie *Ipomoea pes-caprae* foram realizados no Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR) da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), pela professora Dra. Márcia Maria de Souza.

Animais: foram utilizados nos ensaios farmacológicos camundongos Swiss Webster de ambos os sexos com uma média de 2 a 3 meses de idade e peso entre 20 e 30 gramas. Todos os animais foram criados e mantidos em ambiente com ciclos claro/escuro de 12 horas e temperatura controlada ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$). Água e alimento foram fornecidos *ad libitum* exceto durante os testes farmacológicos.

Drogas: para os ensaios farmacológicos foram utilizadas as seguintes drogas diluídas em solução salina (0,9%) ou Tween (20%), quando necessário: ácido acético (0,6%); formalina (2,5%); naloxona e morfina (Sigma Chemicals).

A. Modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

No modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético foi administrado uma solução 0,6 % intraperitonealmente em camundongos Swiss Webster.¹²⁷ Os animais foram pré-tratados com os compostos intraperitonealmente (i.p.) (10 mg/kg), 30 minutos antes da injeção de ácido acético. Animais do grupo controle receberam um volume similar

de 0,9% de NaCl (10 mL/kg, i.p.). Todos experimentos foram conduzidos a temperatura de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$. A resposta nociceptiva foi induzida utilizando-se o chamado “writhing test”, administrando-se ácido acético 0,6% intraperitonealmente. Pares de camundongos foram colocados em caixas separadas e o número de contorções dos músculos abdominais juntamente com a extensão de uma das patas posteriores (ver Figura 6 para um exemplo ilustrativo) foram acumuladamente contadas num período de 20 minutos. A atividade antinociceptiva foi expressa pela redução do número de contorções abdominais entre animais do grupo controle e camundongos pré-tratados com os compostos em estudo.

Figura 6. Camundongo após 30 minutos da injeção intraperitoneal de ácido acético. As fotos (a) e (b) mostram o camundongo estendendo seu corpo junto ao solo juntamente com a extensão das patas posteriores. As fotos (c) e (d) mostram outro camundongo respondendo ao writhing teste que inclui contorções e rotações dos músculos abdominais.

B. Modelo de dor induzida pela formalina

O procedimento foi similar ao descrito anteriormente por Hunskaar e col., (1985).^{128,129} Animais da mesma linhagem foram anestesiados com éter, exceto quando usados para analisar a primeira fase da dor induzida pela formalina. Uma solução aquosa 2,5% de formalina (20 µl) foi injetada sub-cutâneamente na região intraplantar da pata posterior esquerda com uma seringa Hamilton. Os animais foram aclimatados por pelo menos 24 horas antes dos experimentos. Dois camundongos (controle e tratado) foram observados simultâneamente de 0 a 30 minutos após a injeção da formalina. Os efeitos nociceptivos preliminares normalmente se iniciam depois de 5 minutos (primeira fase, representando a dor neurogênica), e de 15-30 minutos depois da injeção de formalina (segunda fase, representando a dor inflamatória).¹²⁹ Os animais foram tratados com solução salina 0,9% (10 mL/kg, i.p.) ou com compostos isolados de *I.pes-caprae* (10 mg/kg, i.p.) 60 minutos antes da injeção de formalina. Após a aplicação intraplantar de formalina, os animais foram colocados imediatamente num cilindro de vidro (20 cm de diâmetro). O tempo gasto pelos animais lambendo ou mordendo a pata injetada foi observado e considerado indicativo de dor.

Após os experimentos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e ambas as patas retiradas e pesadas para a avaliação da redução ou não dos edemas.

Análise estatística: todos os resultados foram apresentados como a média E.P.M. e analisados estatisticamente por análise de variância ANOVA, seguida de teste de Dunnett de múltiplas variações. Valores de P menores que 0.05 foram considerados indicativos de dor.

2.3. Análogos do ácido gálico

2.3.1. Síntese

Ácido gálico (**GA001**), adquirido da Aldrich Chemicals, foi empregado na síntese das séries análogas. Os fenóis, álcoois benzílicos, álcoois fenéticos e anilinas derivadas foram adquiridos da Aldrich ou Sigma Chemicals com o maior grau de pureza disponível. Solventes em geral foram adquiridos com alto grau de pureza da Aldrich Chemicals ou Fisher Inc. Quando necessário, os solventes foram purificados ou secos utilizando-se procedimentos padrões da literatura. Anidrido acético gálico (**GA049**) foi sintetizado pelo professor Richard Lawton da *University of Michigan* e gentilmente cedido para os nossos testes farmacológicos.

A. Preparação dos análogos do ácido gálico GA002-GA007

Procedimento experimental geral

Foi empregado para a preparação dos análogos **GA002-GA007**, procedimento similar aos descritos anteriormente na literatura.^{130,131} Ao ácido gálico (15 mmol), o álcool apropriado (45 mmol) e benzeno seco (50-75 mL), foi adicionado lentamente H₂SO₄ (0,4 mL) e a mistura foi aquecida até refluxo. A mistura reacional foi mantida sob refluxo (Dean Stark foi usado para separar a água da mistura reacional) por um período entre 8 e 12 horas, de acordo com o álcool empregado. Após, evaporou-se o solvente sob vácuo e o resíduo foi dissolvido em éter etílico e extraído com água (50 mL). Extraiu-se com solução saturada de NaHCO₃ (3x 30 mL), e com água (40 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado sob vácuo. Os produtos foram recristalizados em éter de petróleo.

Galato de metila (GA002): Rdt = 79%, p.f. 200-201⁰C (lit.¹³² p.f. 200-202⁰C). RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6,94 (s, 2H, ArH), 3,83 (s, 3H, OCH₃). EM-AR, IE, (M⁺): calculado para C₈H₈O₅: 184,0372, encontrado: 184,0381. Análise: calculado para C₈H₈O₅: C, 52,18; H, 4,38; encontrado: C, 52,19; H, 4,16.

Galato de etila (GA003): Rdt = 80%, p.f. 151-153⁰C (lit.¹³³ p.f. 150-152⁰C). RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6,94 (s, 1H, ArH), 4,22 (q, 2H, OCH₂), 1,24 (t, 3H, CH₃). EM-AR, IE, (M⁺): calculado para C₉H₁₀O₅: 198,0528, encontrado: 198,0536. Análise: calculado para C₉H₁₀O₅: C, 54,55; H, 5,09; encontrado: C, 54,39; H, 4,91.

Galato de propila (GA004): Rtd = 74%, p.f. 149-151⁰C (lit.¹³⁴ 148-150⁰C). RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6,94 (s, 2H, ArH), 4,22 (t, 2H, OCH₂), 1,74 (m, 2H, CH₂), 1,01 (t, 3H, CH₃). EM-AR, IE, (M⁺): calculado para C₁₀H₁₂O₅: 212,0685, encontrado: 212,0672. Análise: calculado para C₁₀H₁₂O₅: C, 56,60; H, 5,70; encontrado: C, 56,49; H, 5,56.

Galato de butila (GA005): Rdt = 72%, p.f. 143-144⁰C (lit.¹³⁴ p.f. 145-146⁰C). RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6,93 (s, 2H, ArH), 4,17 (t, 2H, OCH₂), 1,56 (m, 2H, CH₂), 1,29 (m, 2H, CH₂), 0,88 (t, 3H, CH₃). EM-AR, IE, (M⁺): calculado para C₁₁H₁₄O₅: 226,0841, encontrado: 226,0828. Análise: calculado para C₁₁H₁₄O₅: C, 58,40; H, 6,24; encontrado: C, 58,12; H, 6,01.

Galato de pentila (GA006): Rdt = 69%, p.f. 127-128⁰C (lit.¹³⁴ p.f. 126-127⁰C). RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6,92 (s, 2H, ArH), 4,23 (t, 2H, OCH₂), 1,60 (m, 2H, CH₂), 1,34 (m, 4H, 2xCH₂), 0,90 (t, 3H, CH₃). EM-AR, IE, (M⁺): calculado para C₁₂H₁₆O₅: 240,0998, encontrado: 240,0979. Análise: calculado para C₁₂H₁₆O₅: C, 59,99; H, 6,71; encontrado: C, 59,90; H, 6,81.

Galato de hexila (GA007): Rdt = 67%, p.f. 94-95⁰C (lit.¹³⁵ p.f. 93,5⁰C). RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6,92 (s, 2H, ArH), 4,22 (t, 2H, OCH₂), 1,58 (m, 2H, CH₂), 1,36 (m, 6H, 3xCH₂), 0,87 (t, 3H, CH₃). EM-AR, IE, (M⁺): calculado para C₁₃H₁₈O₅: 254,1154, encontrado: 254,1166. Análise: calculado para C₁₃H₁₈O₅: C, 61,41; H, 7,13; encontrado: C, 61,22; H, 6,91.

B. Preparação dos análogos do ácido gálico GA008-GA009

Galato de etila tribenzila (GA008). Procedimento similar ao descrito por Clinton e Geissman.¹³⁶ Ao galato de etila (**GA003**) (0,01 mol) foi adicionado, sob atmosfera de nitrogênio, 50 mL de acetofenona seca e a mistura foi aquecida a 100⁰C. Sob constante agitação foi adicionado K₂CO₃ (0,032 mol) previamente seco em estufa a 140⁰C por 2 horas. Cloreto de benzila re-destilado (0,032 mol) foi adicionado lentamente através de funil de adição por um período de cerca de 30 minutos. A mistura foi aquecida a 140-150⁰C e mantida sob agitação por um período de 7 horas. Após, adicionou-se água (100 ml) e a mistura foi extraída com éter (3 x 100 mL). A fase orgânica foi tratada com solução aquosa de NaCl 5% (3 x 100 mL), seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada e evaporada sob vácuo. Cromatografia flash (30% éter em hexano) foi empregada fornecendo **GA008**. Rdt = 70%, p.f. 109-110⁰C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7,30-7,21 (m, 15H, ArH), 6,94 (s, 2H, ArH), 4,49 (s, 2H, OCH₂Ar), 4,23 (q, 2H, OCH₂), 1,24 (t, 3H, CH₃). EM-AR, IE, (M⁺): calculado para C₃₀H₂₈O₅: 468,1937, encontrado: 468,1918. Análise: calculado para C₃₀H₂₈O₅: C, 76,90; H, 6,02; encontrado: C, 76,79; H, 5,88.

Ácido gálico tribenzila (GA009). Procedimento similar ao descrito por Clinton e Geissman.¹³⁶ Saponificação do galato **GA008** com solução aquosa de hidróxido de sódio forneceu o composto **GA009**. O produto foi recristalizado em benzeno-éter de petróleo. Rdt = 78%, p.f. 193-194⁰C (lit.¹³⁶ p.f. 196-196,5⁰C). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7,31-7,20 (m, 15H, ArH), 6,98 (s, 2H, ArH), 4,48 (s, 2H, OCH₂). EM-AR, IE, (M⁺): calculado para C₂₈H₂₄O₅: 440,1624, encontrado: 440,1622. Análise: calculado para C₂₈H₂₄O₅: C, 76,35; H, 5,49; encontrado: C, 74,39; H, 5,71.

C. Preparação do ácido gálico triacetila (I)

Procedimento similar ao descrito por Fischer e col. (1918).¹³⁷ Ao ácido gálico (5 g) em anidrido acético (50 mL), foi adicionado cloreto de zinco (0,5 g). A mistura foi mantida sob agitação por 6 horas a temperatura ambiente. Após, água (50 mL) foi adicionada e a solução mantida sob agitação a temperatura ambiente durante a noite. O sólido formado foi filtrado, lavado várias vezes com água gelada e colocado em dessecador sob P₂O₅. Rdt = 95%, p.f. 169-170⁰C (lit.¹³⁷ p.f. 171-172⁰C). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7,79 (s, 2H, ArH), 2,35 (s, 3H, COCH₃), 2,30 (s, 6H, 2x COCH₃). EM-AR, IE, (M⁺): calculado para C₁₃H₁₂O₈: 296,0532, encontrado: 296,0518.

D. Preparação do cloreto de galoila triacetila (II)

Procedimento similar ao descrito por Fischer e col.¹³⁷ Ao ácido gálico triacetila (I) (5 g) em tetracloreto de carbono (50 mL) foi adicionado lentamente pentacloreto de fósforo (PCl₅) (4 g). A mistura foi aquecida a 60^oC (em banho maria) e mantida sob agitação (HCl é vigorosamente liberado) por um período de 3 horas (solução torna-se amarela cristalina). Após, a solução foi decantada eliminando-se o material insolúvel. Ao decantado adicionou-se cuidadosamente éter de petróleo (50 mL), ocorrendo a formação de cristais em agulha incolores de II. Resfriou-se a solução em banho de gelo e os cristais foram coletados por filtração à vacuo. Lavou-se os cristais com pequena quantidade de éter de petróleo e deixou-se secar em dessecador. Rdt = 95%, p.f. 106-107^oC (lit.¹³⁷ 106-107^oC). EM-AR, IE, (M⁺): calculado para C₁₃H₁₁ClO₇: 314,0193 encontrado: 314,0208.

E. Síntese dos análogos do ácido gálico GA010-GA034

Procedimento experimental geral

Procedimento experimental de acordo com o descrito por Feldman e col.¹³⁸ O álcool ou fenol apropriado (50 mmol), piridina (50 mmol) e DMAP (10 mmol), foram adicionados sucessivamente sob agitação a uma solução de cloreto de galoila triacetila (II) (45 mmol) em

CH₂Cl₂ anidrido (100 mL) a 0^oC (banho de gelo). A mistura foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 2-6 horas. Após, colocou-se a mistura em água gelada e extraiu-se com CH₂Cl₂. A fase orgânica foi extraída com HCl aquoso 4%, água e com solução de NaHCO₃ 5%. Secou-se com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se sob vácuo. O sólido obtido foi colocado em uma solução MeOH-H₂O-CH₂Cl₂ (5:1:1, 140 mL) a 0^oC, seguido de K₂CO₃ (244 mmol) sob constante e vigorosa agitação. Quando um precipitado foi formado, a mistura reacional foi mantida a temperatura ambiente sob agitação por 1 hora. Após, a mistura foi cuidadosamente acidificada com HCl, diluída com AcOEt (100 mL), lavada com NaCl, seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada sob vácuo. O resíduo oleoso obtido foi purificado em coluna cromatográfica (1:1, AcOEt/éter de petróleo). Os produtos foram recristalizados em éter de petróleo.

Galato de etilenoglicol (GA010): Rdt = 64%, p.f. 165-167^oC. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6,94 (s, 2H, ArH), 4,44 (t, 2H, OCH₂), 3,91 (t, 2H, CH₂OH). EM-AR, IE, (M⁺): calculado para C₉H₁₀O₆: 214,0477, encontrado: 214,0490. Análise: calculado para C₉H₁₀O₆: C, 50,47; H, 4,71; encontrado: C, 50,35; H, 4,67.

Galato de 1,3-propanodiol (GA011): Rdt = 66%, p.f. 148-149^oC. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6,94 (s, 2H, ArH), 4,34 (d, 2H, OCH₂), 3,74 (t, 2H, CH₂OH), 1,14 (m, 2H, CH₂). EM-AR, IE, (M⁺): calculado para C₁₀H₁₂O₆: 228,0634, encontrado: 228,0624. Análise: calculado para C₁₀H₁₂O₆: C, 52,63; H, 5,30; encontrado: C, 52,49; H, 5,30.

Galato de isobutila (GA012): Rdt = 64%, p.f. 135-136⁰C (lit.¹³⁴ p.f. 131-132⁰C). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6,95 (s, 2H, ArH), 4,02 (d, 2H, OCH₂), 1,92 (m, 1H, CH), 0,95 (d, 6H, 2x CH₃). EM-AR, IE, (M⁺): calculado para C₁₁H₁₄O₅: 226,0841, encontrado: 226,0841. Análise: calculado para C₁₁H₁₄O₅: C, 58,40; H, 6,24; encontrado: C, 58,22; H, 6,07.

Galato de fenila (GA013): Rdt = 59%, p.f. 118-119⁰C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7,40 (t, 2H, ArH), 7,22-7,14 (m, 3H, ArH), 7,10 (s, 2H, ArH). EM-AR, IE, (M⁺): calculado para C₁₃H₁₀O₅: 246,0528, encontrado: 246,0514. Análise: calculado para C₁₃H₁₀O₅: C, 63,42; H, 4,09; encontrado: C, 63,70; H, 4,18.

Galato de *p*-metilfenila (GA014): Rdt = 59%, p.f. 127-128⁰C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7,20 (d, 2H, ArH), 7,10 (s, 2H, ArH), 7,01 (d, 2H, ArH), 2,34 (s, 3H, CH₃). EM-AR, IE, (M⁺): calculado para C₁₄H₁₂O₅: 260,0685, encontrado: 260,0694. Análise: calculado para C₁₄H₁₂O₅: C, 64,61; H, 4,65; encontrado: C, 64,87; H, 4,45.

Galato de *m*-metilfenila (GA015): Rdt = 57%, p.f. 102-103⁰C. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7,28-7,13 (m, 3H, ArH), 7,09 (s, 2H, ArH), 6,99 (s, 1H, ArH), 2,36 (s, 3H, ArCH₃). EM-AR, IE, (M⁺): calculado para C₁₄H₁₂O₅: 260,0685, encontrado: 260,0699. Análise: calculado para C₁₄H₁₂O₅: C, 64,61; H, 4,65; encontrado: C, 64,68; H, 4,54.

Galato de *p*-hidróxifenila (GA016): Rdt = 66%, p.f. 193-194⁰C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7,38 (d, 2H, ArH), 7,07 (s, 2H, ArH), 6,96 (d, 2H, ArH). EM-AR, IE, (M⁺): calculado para C₁₃H₁₀O₆: 262,0477, encontrado: 262,0492. Análise: Calculado para C₁₃H₁₀O₆: C, 59,55; H, 3,84; Encontrado: C, 60,12; H, 3,73.

Galato de *p*-metóxifenila (GA017): Rdt = 65%, p.f. 134-135⁰C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7,42 (d, 2H, ArH), 7,07 (s, 2H, ArH), 6,98 (d, 2H, ArH), 3,84 (s, 3H, OCH₃). EM-AR, CI (NH₃) [M+H]⁺: calculado para C₁₄H₁₃O₆: 277,0712, encontrado: 277,0722. Análise: calculado para C₁₄H₁₂O₆: C, 60,87; H, 4,38; encontrado: C, 60, 69; H, 4,12.

Galato de *p*-clorofenila (GA018): Rdt = 54%, p.f. 146-128⁰C. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7,46 (d, 2H, ArH), 7,19 (d, 2H, ArH), 7,10 (s, 2H, ArH). EM-AR, IE, (M⁺): calculado para C₁₃H₉ClO₅: 280,0138, encontrado: 280,0119. Análise: calculado para C₁₃H₉ClO₅: C, 55,63; H, 3,23; encontrado: C, 55,80; H, 3,40.

Galato de *p*-bromofenila (GA019): Rdt = 54%, p.f. 137-138⁰C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7,71 (d, 2H, ArH), 7,14 (d, 2H, ArH), 7,09 (s, 2H, ArH). EM-AR, IE, (M⁺): calculado para C₁₃H₉BrO₅: 292,0457, encontrado: 292,0451. Análise: calculado para C₁₃H₉BrO₅: C, 48,03; H, 2,79; Br, 24,58; encontrado: C, 48,17; H, 2,71; Br, 24, 41.

Galato de *p*-nitrofenila (GA020): Rdt = 40%, p.f. 197-198⁰C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8,42 (d, 2H, ArH), 7,62 (d, 2H, ArH), 7,20 (s, 2H, ArH). EM-AR, CI (NH₃) [M+H]⁺: calculado para C₁₃H₁₀NO₇: 292,0457, encontrado: 292,0466. Análise: calculado para C₁₃H₉NO₇: C, 53,62; H, 3,12; N, 4,81; encontrado: C, 53,44; H, 3,08; N, 4,77.

Galato de benzila (GA021): Rdt = 69%, p.f. 146-147⁰C (p.f.¹³⁸ 148⁰C). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7,48-7,30 (m, 5H, ArH), 7,02 (s, 2H, ArH), 5,28 (s, 2H, OCH₂). EM-AR, CI (NH₃) [M+H]⁺: calculado para C₁₄H₁₃O₅: 261,0763, encontrado: 261,0783. Análise: calculado para C₁₄H₁₂O₅: C, 64,61; H, 4,65; encontrado: C, 64,33; H, 4,57.

Galato de *p*-metilbenzila (GA022): Rdt = 66%, p.f. 192-193⁰C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7,26 (d, 2H, ArH), 7,21 (d, 2H, ArH), 7,03 (s, 2H, ArH), 5,24 (s, 2H, OCH₂), 2,30 (s, 3H, ArCH₃). EM-AR, CI (NH₃) [M+NH₄]⁺: calculado para C₁₅H₁₈NO₅: 292,1185, encontrado: 292,1198. Análise: calculado para C₁₅H₁₄O₅: C, 65,69; H, 5,14; encontrado: C, 65,84; H, 5,99.

Galato de *m*-metilbenzila (GA023): Rdt = 60%, p.f. 183-184⁰C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7,40-7,18 (m, 4H, ArH), 7,04 (s, 2H, ArH), 5,22 (s, 2H, OCH₂), 2,14 (s, 2H, ArCH₃). EM-AR, CI (NH₃) [M+NH₄]⁺: calculado para C₁₅H₁₈NO₅: 292,1185, encontrado: 292,1172. Análise: calculado para C₁₅H₁₄O₅: C, 65,69; H, 5,14; encontrado: C, 65,84; H, 5,99.

Galato de *p*-metóxi benzila (GA024): Rdt = 67%, p.f. 153-154⁰C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7,37 (d, 2H, ArH), 7,03 (s, 2H, ArH), 6,98 (d, 2H, ArH), 5,27 (s, 2H, OCH₂), 3,80 (s, 3H, OCH₃). EM-AR, CI (NH₃) [M+NH₄]⁺: calculado para C₁₅H₁₈NO₆: 308,1134, encontrado: 308,1118. Análise: calculado para C₁₅H₁₄O₆: C, 62,07; H, 4,86; encontrado: C, 62,21; H, 5,04.

Galato de *m*-metóxi benzila (GA025): Rdt = 59%, p.f. 140-141⁰C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7,42-7,32 (m, 2H, ArH), 7,03 (s, 2H, ArH), 7,00-6,98 (m, 2H, ArH), 5,26 (s, 2H, OCH₂). EM-AR, CI (NH₃) [M+NH₄]⁺: calculado para C₁₅H₁₈NO₆: 308,1134, encontrado: 308,1122. Análise: calculado para C₁₅H₁₄O₆: C, 62,07; H, 4,86; encontrado: C, 61,85; H, 4,76.

Galato de *m*-fenóxi benzila (GA026): Rdt = 48%, p.f. 248-249⁰C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7,40-7,25 (m, 4H, ArH), 7,16-7,04 (m, 7H, ArH), 5,30 (s, 2H, OCH₂Ar). EM-AR, CI (NH₃) [M+H]⁺: calculado para C₂₀H₁₇O₆: 353,1025, encontrado: 353,1034. Análise: calculado para C₂₀H₁₆O₆: C, 68,18; H, 4,58; encontrado: C, 68,39; H, 4,00.

Galato de *p*-cloro benzila (GA027): Rdt = 60%, p.f. 158-159⁰C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7,54 (d, 2H, ArH), 7,48 (d, 2H, ArH), 7,06 (s, 2H, ArH), 5,29 (s, 2H, OCH₂). EM-AR, CI (NH₃) [M+NH₄]⁺: calculado para C₁₄H₁₅ClNO₅: 312,0639, encontrado:

312,0648. Análise: calculado para $C_{14}H_{11}ClO_5$: C, 57,06; H, 3,76; encontrado: C, 56,80; H, 3,56.

Galato de *m*-clorobenzila (GA028): Rdt = 58%, p.f 131-132⁰C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7,52-7,36 (m,4H, ArH), 7,06 (s, 2H, ArH), 5,31 (s, 2H, OCH₂). EM-AR, CI (NH₃) [M+NH₄]⁺: calculado para $C_{14}H_{15}ClNO_5$: 312,0639, encontrado: 312,0646. Análise: calculado para $C_{14}H_{11}ClO_5$: C, 57,06; H, 3,76; encontrado: C, 56,87; H, 3,71.

Galato de *p*-bromobenzila (GA029): Rdt = 56%, p.f. 149-150⁰C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7,62 (d, 2H, ArH), 7,48 (d, 2H, ArH), 7,06 (s, 2H, ArH), 5,29 (s, 2H, OCH₂). EM-AR, CI (NH₃) [M+NH₄]⁺: calculado para $C_{14}H_{15}BrNO_5$: 356,0133, encontrado: 356,0144. Análise: calculado para $C_{14}H_{11}BrO_5$: C, 49,58; H, 3,27; encontrado: C, 49,71; H, 3,50.

Galato de *p*-nitrobenzila (GA030): Rdt = 46%, p.f. 197-198⁰C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8,38 (d, 2H, ArH), 7,81 (d, 2H, ArH), 7,16 (s, 2H, ArH), 5,39 (s, 2H, OCH₂). EM-AR, CI (NH₃) [M+NH₄]⁺: calculado para $C_{14}H_{15}N_2O_7$: 323,0879, encontrado: 323,0869. Análise: calculado para $C_{14}H_{11}NO_7$: C, 55,09; H, 3,63; N, 4,59; encontrado: C, 55,36; H, 4,66; N, 4,49.

Galato de fenetila (GA031): Rdt = 70%, óleo viscoso. RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 7,31-7,18 (5H, m, ArH), 6,98 (s, 2H, ArH), 4,22 (t, 2H, OCH₂), 2,98 (t, 2H, CH₂Ar). EM-AR, IE, (M^+): calculado para C₁₅H₁₄O₅: 274,0841, encontrado: 274,0846. Análise: calculado para C₁₅H₁₄O₅: C, 65,69; H, 5,14; encontrado: C, 65,84; H, 5,04.

Galato de *p*-metilfenetila (GA032): Rdt = 66%, óleo incolor. RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 7,18 (d,d, 4H, ArH), 6,98 (s, 2H, ArH), 4,23 (t, 2H, OCH₂), 2,32 (s, 3H, CH₃). EM-AR, IE, (M^+): calculado para C₁₆H₁₆O₅: 288,0998, encontrado: 288,0988. Análise: calculado para C₁₆H₁₆O₅: C, 66,66; H, 5,59; encontrado: C, 66,41; H, 5,42.

Galato de *p*-metóxfenetila (GA033): Rdt = 68%, p.f. 32-33⁰C. RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 7,21 (d, 2H, ArH), 7,00 (d, 2H, ArH), 6,98 (s, 2H, ArH), 4,22 (t, 2H, OCH₂), 3,81 (s, 3H, OCH₃), 2,90 (t, 2H, CH₂Ar). EM-AR, IE, (M^+): calculado para C₁₆H₁₆O₆: 304,0947, encontrado: 304,0962. Análise: calculado para C₁₆H₁₆O₆: C, 63,15; H, 5,30; encontrado: C, 63,00; H, 5,32.

di-galato de 1,4-benzenodiol (GA034): Utilizou-se 90 mmol do cloreto de galoila triacetilado (**II**) e 100 mmol de piridina. Rdt = 46%, p.f. 223-224⁰C. RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 7,46 (s, 4H, ArH), 7,08 (s, 4H, ArH). EM-AR, CI (NH₃) [$\text{M}+\text{H}$]⁺: calculado para C₂₀H₁₅O₁₀: 415,0665, encontrado: 415,0682. Análise: calculado para C₂₀H₁₄O₁₀: C, 57,98; H, 3,41; encontrado: C, 58,21; H, 3,44.

F. Síntese dos análogos do ácido gálico GA035-GA047

Procedimento experimental de acordo com o descrito por Feldman e col.¹³⁸ Utilizou-se metodologia similar a descrita para a síntese dos análogos do ácido gálico **GA010-GA034**. A única modificação significativa foi a não utilização de piridina na reação.

N-hidroxi galamida (GA035): Rdt = 81%, p.f. 229-230⁰C. EM-AR, CI (NH₃) [M+H]⁺: calculado para C₇H₉NO₅: 187,0480, encontrado: 184,0464. Análise: calculado para C₇H₈NO₅: C, 45,17; H, 4,33; N, 7,52; encontrado: C, 45,36; H, 4,17; N, 7,28.

N-cicloexil galamida (GA036): Rdt = 80%, p.f. 189-190⁰C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6,94 (s, 2H, ArH), 3,14 (m, 1H, CH), 1,91-1,68 (m, 4H, 2x CH₂), 1,45-1,11 (m, 6H, 3x CH₂). EM-AR, CI (NH₃) [M+H]⁺: calculado para C₁₃H₁₈NO₄: 252,1236, encontrado: 252,1248. Análise: calculado para C₁₃H₁₇NO₄: C, 62,14; H, 6,82; N, 5,57; encontrado: C, 62,32; H, 6,69; N, 5,53.

N-fenil galamida (GA037): Rdt = 73%, p.f. 206-207⁰C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7,66 (d, 2H, ArH), 7,42 (t, 2H, ArH), 7,23 (t, 1H, ArH), 7,10 (s, 2H, ArH). EM-AR, CI (NH₃) [M+H]⁺: calculado para C₁₃H₁₂NO₄: 246,0766, encontrado: 246,0766. Análise: calculado para C₁₃H₁₁NO₄: C, 63,67; H, 4,52; N, 5,71; encontrado: C, 63,41; H, 4,40; N, 5,87.

N-p-metóxfenilgalamida(GA038): Rdt = 75%, p.f. 210-211⁰C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7,68 (d, 2H, ArH), 7,08 (s, 2H, ArH), 7,01 (d, 2H, ArH), 3,81 (s, 3H, OCH₃). EM-AR, CI (NH₃) [M+H]⁺: calculado para C₁₄H₁₄NO₅: 276,0872, encontrado: 276,0862. Análise: calculado para C₁₄H₁₃NO₅: C, 61,09; H, 4,76; N, 5,09; encontrado: C, 61,35; H, 4,55; N, 5,01.

N-m-metóxfenilgalamida (GA039): Rdt = 70%, p.f. 189-190⁰C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7,53-7,34 (m, 3H, ArH), 7,12 (d, 1H, ArH), 7,08 (s, 2H, ArH), 3,81 (s, 3H, OCH₃). EM-AR, CI (NH₃) [M+H]⁺: calculado para C₁₄H₁₄NO₅: 276,0872, encontrado: 276,0886. Análise: calculado para C₁₄H₁₃NO₅: C, 61,09; H, 4,76; N, 5,09; encontrado: C, 61,43; H, 4,63; N, 5,28.

N-p-fenóxfenilgalamida (GA040): Rdt = 67%, p.f. 258-259⁰C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7,70 (d, 2H, ArH), 7,24-7,03 (m, 9H, ArH). EM-AR, CI (NH₃) [M+H]⁺: calculado para C₁₉H₁₆NO₅: 338,1028, encontrado: 338,1002. Análise: calculado para C₁₉H₁₅NO₅: C, 67,65; H, 4,48; N, 4,15; encontrado: C, 67,83; H, 4,18; N, 4,42.

N-m-fenóxfenilgalamida (GA041): Rdt = 62%, p.f. 241-242⁰C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7,38-7,24 (m, 4H, ArH), 7,16-7,02 (m, 7H, ArH). EM-AR, CI (NH₃) [M+H]⁺: calculado para C₁₉H₁₆NO₅: 338,1028, encontrado: 338,1016. Análise: calculado para C₁₉H₁₅NO₅: C, 67,65; H, 4,48; N, 4,15; encontrado: C, 67,48; H, 4,29; N, 4,11.

N-p-clorofenilgalamida (GA042): Rdt = 65%, p.f. 217-218⁰C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7,81 (d, 2H, ArH), 7,42 (d, 2H, ArH), 7,10 (s, 2H, ArH). EM-AR, CI (NH₃) [M+H]⁺: calculado para C₁₃H₁₁ClNO₄: 280,0377, encontrado: 280,0388. Análise: calculado para C₁₃H₁₀ClNO₄: C, 55,83; H, 3,60; N, 5,01; encontrado: C, 55,65; H, 3,38; N, 4,91.

N-m-clorofenilgalamida (GA043): Rdt = 63%, p.f. 153-154⁰C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7,69-7,50 (m, 4H, ArH), 7,10 (s, 2H, ArH). EM-AR, CI (NH₃) [M+H]⁺: calculado para C₁₃H₁₁ClNO₄: 280,0377, encontrado: 280,0386. Análise: calculado para C₁₃H₁₀ClNO₄: C, 55,83; H, 3,60; N, 5,01; encontrado: C, 55,77; H, 3,80; N, 4,82.

N-p-bromofenilgalamida (GA044): Rdt = 64%, p.f. 232-234⁰C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7,81 (d, 2H, ArH), 7,61 (d, 2H, ArH), 7,10 (s, 2H, ArH). EM-AR, CI (NH₃) [M+H]⁺: calculado para C₁₃H₁₁BrNO₄: 323,9871, encontrado: 323,9888. Análise: calculado para C₁₃H₁₀BrNO₄: C, 48,17; H, 3,11; N, 4,32; encontrado: C, 47,99; H, 3,08; N, 4,24.

N-m-bromofenilgalamida (GA045): Rdt = 60%, p.f. 167-168⁰C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7,74-7,54 (m, 4H, ArH), 7,10 (s, 2H, ArH). EM-AR, CI (NH₃) [M+H]⁺: calculado para C₁₃H₁₁BrNO₄: 323,9871, encontrado: 323,9881. Análise: calculado para C₁₃H₁₀BrNO₄: C, 48,17; H, 3,11; N, 4,32; encontrado: C, 48,03; H, 3,00; N, 4,49.

N-p-nitrofenilgalamida (GA046): Rdt = 53%, p.f. 174-175⁰C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8,30 (d, 2H, ArH), 7,82 (d, 2H, ArH), 7,17 (s, 2H, ArH). EM-AR, CI (NH₃) [M+H]⁺: calculado para C₁₃H₁₁N₂O₆: 291,0617, encontrado: 291,0636. Análise: calculado para C₁₃H₁₀N₂O₆: C, 53,80; H, 3,47; N, 9,65; encontrado: C, 54,07; H, 3,20; N, 9,93.

N-m-nitrofenilgalamida (GA047): Rdt = 54%, p.f. 197-198⁰C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8,71 (s, 1H, ArH), 8,38-8,31 (m, 2H, ArH), 7,77 (t, 1H, ArH), 7,18 (s, 2H, ArH). EM-AR, CI (NH₃) [M+H]⁺: calculado para C₁₃H₁₁N₂O₆: 291,0617, encontrado: 291,0626. Análise: calculado para C₁₃H₁₀N₂O₆: C, 53,80; H, 3,47; N, 9,65; encontrado: C, 53,87; H, 3,32; N, 9,99.

G. Síntese do análogo do ácido gálico GA048 e identificação do análogo GA049

Anidrido gálico (GA048): a mistura entre o cloreto de galoila (**II**) (10 mmol), ácido gálico triacetila (**I**) (10 mmol), 2 mL de piridina seca e diclorometano anidro (50 mL) foi aquecida em banho maria (45⁰C) sob agitação por 30 minutos. Após a mistura foi colocada sobre água e gelo (100 mL) e o precipitado foi separado por filtração a vácuo. O precipitado obtido foi colocado em uma solução MeOH-H₂O-CH₂Cl₂ (5:1:1, 200 mL) a 0⁰C, seguido de K₂CO₃ (20 mmol) sob constante e vigorosa agitação. Quando um precipitado foi formado, a mistura reacional foi mantida a temperatura ambiente sob agitação por 1 hora. Após, a mistura foi cuidadosamente neutralizada com HCl, diluída com AcOEt (100 mL), lavada com NaCl, seca

com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada sob vácuo. O resíduo obtido foi purificado em coluna cromatográfica (20% AcOEt/hexano). O produto foi recristalizado em benzeno seco. Rdt = 32%, p.f. 196-197⁰C. EM-AR, FAB [M+Na]⁺: calculado para C₁₄H₁₀NaO₉: 345,0222, encontrado: 345,0240. Análise: calculado para C₁₄H₁₀O₉: C, 52,18; H, 3,13; encontrado: C, 52,01; H, 3,29.

Anidrido acético gálico (GA049): EM-AR, FAB [M+H]⁺: calculado para C₉H₉O₆: 213,0399, encontrado: 213,0412. Análise: calculado para C₉H₈O₆: C, 50,95; H, 3,80; encontrado: C, 50,79; H, 3,66.

2.3.2. Avaliação farmacológica: atividade analgésica

A. Modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

Os testes farmacológicos foram realizados no departamento de farmacologia do *Medical Center da University of Michigan*, sob a supervisão dos professores Dr. James Woods e Dr. John Traynor.

O modelo utilizado foi o de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos.^{127,139} Camundongos *Swiss* machos (20-25 g) foram mantidos sob temperatura controlada (25⁰C) e iluminação em ciclos de 12 horas (claro/escuro), com ração e água *ad libitum*. A resposta nociceptiva foi induzida administrando-se os compostos (diluídos em DMSO 10%) subcutâneamente nas doses de 1; 3,2; 10; 32 e 100 mg/kg. Para cada dose individual para cada composto testado foram utilizados grupos de 6 animais. Animais do grupo controle receberam um volume similar de 10% DMSO (10 mL/Kg via subcutânea). Após 15 minutos, a solução de ácido acético 0,6% foi injetada intraperitonealmente na dose padrão de 0,4 mL e após 5 minutos iniciou-se a contagem das contorções abdominais por um período de 5 minutos. A atividade antinociceptiva foi expressa pela redução do número de contorções abdominais dos animais pré-tratados com os compostos em estudo em relação ao número de contorções abdominais dos animais do grupo controle.

Os animais foram sacrificados imediatamente após os experimentos com uma dose de 0,2 mL de pentobarbital administrada intraperitonealmente.

Os resultados da DI_{50} (dose do composto que reduz a resposta em 50% em relação ao grupo controle) foram determinados a partir de experimentos individuais por interpolação gráfica, com o auxílio de programas estatísticos disponíveis no laboratório.

B. Modelo de dor induzida pela formalina

Os testes farmacológicos foram realizados no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo professor Dr. Adair dos Santos, nos laboratórios do professor Dr. João Batista Calixto.

O procedimento experimental empregado foi descrito no item 2.2.2. B, págs. 49-50.

2.3.3. Avaliação microbiológica: atividade antifúngica

Os testes microbiológicos foram realizados na *Facultad de Bioquímica y Farmacia* da *Universidad Nacional de Rosario*, pela professora Dra. Susana Zacchino.

Microorganismos e meio de cultura

Os microorganismos usados na avaliação antifúngica foram adquiridos da American Type Culture Collection (Rockville), da CEREMIC ou ATCC.

Ensaio antifúngico

A atividade fungistática dos análogos do ácido gálico foi avaliada empregando-se o método de diluição em ágar, usando ágar Saboureaud, conforme descrito anteriormente por Zacchino e col.¹⁴⁰

Os ensaios foram realizados em placas de petri de 96 poços de titulação. Os análogos do ácido gálico foram dissolvidos em DMSO (em duplicata) e adicionados ao meio de ágar fundido, resultando em diferentes concentrações variando entre 1 e 250 µg/mL. A concentração final de DMSO não excedeu 2% nos ensaios. Usando uma micropipeta, o inóculo (5 µL) foi adicionado ao meio de ágar. Os agentes antifúngicos cetoconazol e anfotericina B foram empregados como padrões nos ensaios. Uma solução sem qualquer composto foi utilizada como controle. As placas foram incubadas 24, 48, ou 72 horas a 30⁰C

(de acordo com o crescimento dos fungos). CIM foi definida como a menor concentração individual de cada composto na qual não foi observado crescimento fúngico visível após o período de incubação.

2.3.4. Modelo de QSAR

Os estudos de QSAR foram realizados no *Department of Chemistry da University of Michigan*, sob a orientação do Prof. Dr. Eugene H. Cordes.

Os modelos de QSAR foram desenvolvidos de acordo com os procedimentos anteriormente descritos na literatura.¹⁴¹⁻¹⁴⁴ Um conjunto de descritores moleculares foi calculado para uma única conformação otimizada para cada composto no conjunto de dados. O conjunto de descritores empregado no processo de modelagem inclui cerca de 200 descritores 2D e 3D geralmente empregados em cálculos de QSAR, descritores S-keys que identificam e definem o tipo e número de átomos ou grupos nas estruturas (por exemplo: metil, etil, carbonil, heteroátomos,...), e cerca de 300 descritores moleculares derivados da tecnologia *Transferable Atom Equivalent* (TAE),^{145,146} baseados na distribuição eletrônica, e enfocam as propriedades locais derivadas a partir da densidade eletrônica. A ferramenta computacional empregada na realização deste trabalho é denominada WINSIMS.¹⁴⁷ Um número de *softwares* é disponível em WINSIMS para obter conformações consistentes dentro do conjunto treino.

A nossa rotina de modelagem foi a seguinte: i) derivar preliminarmente conformações 3D empregando CONCORD e MOPAC; ii) computar os descritores moleculares. O uso de WINSIMS possibilitou calcular e gravar automaticamente os valores para os descritores 3D, 2D e S-keys. Um conjunto de descritores moleculares foi calculado pelo Dr. Curt Breneman (*do SCT - Scientific Computing Team*) e incluído neste arquivo. Precisamente, a mesma sequência de operações foi efetuada para cada membro do conjunto de dados. Os modelos de QSAR para cada sub-conjunto foram qualificados a cerca de sua habilidade em prever os

valores da propriedade (DI_{50}) para cada molécula no conjunto treino mas fora do sub-conjunto, empregando um dos diversos conjuntos de descritores moleculares. Somente aqueles sub-conjuntos passando por este critério foram conservados. Modelos estatísticos *Partial Least Squares* (PLS) foram desenvolvidos e otimizados para cada sub-conjunto qualificado. Os modelos PLS passando por estas barreiras de qualificação foram então incorporados em um modelo-de-matriz (MOM). O MOM foi então empregado para prever os valores da propriedade para aquelas moléculas fora do conjunto treino, ou seja, aquelas pertencentes ao conjunto teste. As ferramentas computacionais utilizadas na modelagem estatística são disponíveis em um único banco de dados de fácil comunicação. O pacote de *softwares* aplicativos, completamente integrado e funcional, é denominado PERCOLATOR.¹⁴⁸

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O capítulo de Resultados e Discussão, para uma melhor compreensão, foi dividido em duas partes:

3.1. Estudos fitoquímicos e farmacológicos da espécie *Ipomoea pes-caprae*

3.2. Estudos em Química Medicinal de análogos do ácido gálico

3.2.1. Síntese dos análogos do ácido gálico

3.2.2. Avaliação farmacológica: atividade analgésica

3.2.3. Avaliação microbiológica: atividade antifúngica

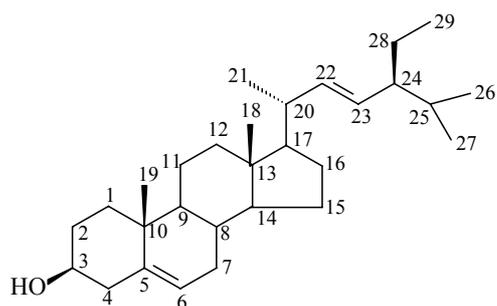
3.2.4. Modelo de QSAR para a atividade analgésica de uma série de análogos do ácido gálico

3.1. Estudos fitoquímicos e farmacológicos da espécie *Ipomoea pes-caprae*

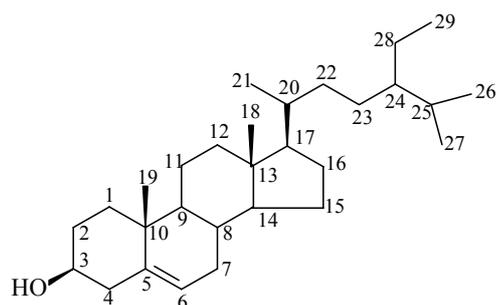
A espécie *I. pes-caprae*, conhecida como "salsa-da-praia", abundante ao longo das dunas de todo o litoral brasileiro e, particularmente no litoral de Santa Catarina, na praia de Jurerê Internacional (onde foi coletada para realização de nossos estudos), foi investigada fitoquimicamente e farmacologicamente, como demonstrado a seguir.

Os efeitos antinociceptivos promissores mostrados anteriormente pelo extrato hidroalcoólico obtido de *I. pes-caprae*¹⁴⁹ nos encorajou a determinar e identificar os principais fitoconstituintes que poderiam ser responsáveis por essas ações farmacológicas. Desta forma, foi preparado um extrato metanólico bruto e o mesmo foi particionado com solventes de polaridade crescente, hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e água, a fim de se obter diferentes frações de constituintes distintos com o objetivo de separar, seletivamente, os princípios ativos presentes na planta. Neste contexto, a fração acetato de etila foi selecionada, numa primeira etapa, para as análises fitoquímicas, uma vez que apresentou significativa ação antinociceptiva e o melhor rendimento. Procedimentos usuais de cromatografia (CC, CCD e CG) levaram ao isolamento de 15 compostos que foram identificados com base nos seus dados espectroscópicos e por comparação com amostras autênticas (ver Capítulo II). Estes foram: estigmasterol (33), β -sitosterol (34), glochidona (35), acetato de α - e β -amirina (36 e 37), α -amirina (38), β -amirina (39), xantoxilina (40), 2,4-dihidroxi-6-metoxi acetofenona (41), ácido serícico (42), ácido betulínico (43), isoquercitrina (44), quercetina (45), ácido salicílico (46) e solasodina (47). Alguns destes compostos foram avaliados como antinociceptivos em dois modelos clássicos de dor em camundongos. Os extratos metanólico e aquoso também foram avaliados em modelos de

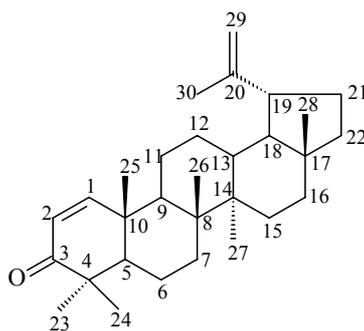
analgésia. Os compostos **33-40** também foram detectados nas frações hexano e diclorometano. Os compostos **44** e **45** foram detectados na fração butanólica, mas devido ao baixo rendimento destas frações, estes compostos não foram determinados quantitativamente.



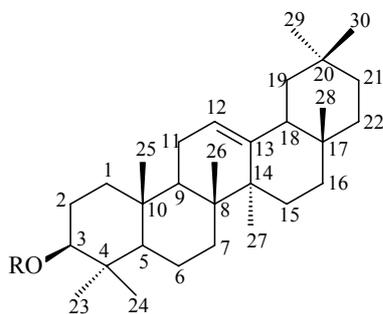
Estigmasterol
(33)



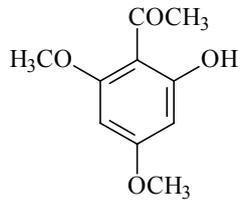
B-sitosterol
(34)



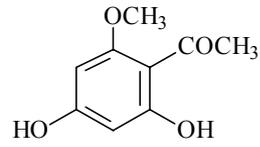
Glochidona
(35)



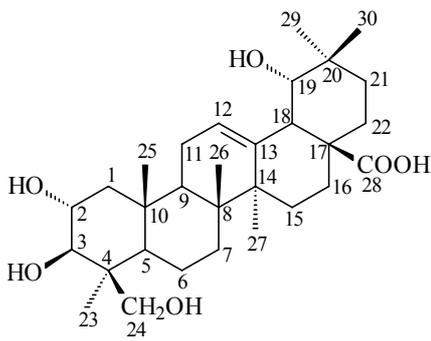
- (36) acetato de *a*-amirina, R = Ac, 30 = H
 (37) acetato de *B*-amirina, R = Ac, 30 = CH₃
 (38) *a*-amirina, R = H, 30 = H
 (39) *B*-amirina, R = H, 30 = CH₃



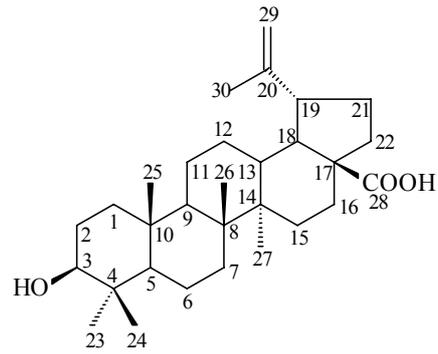
Xantoxilina
(40)



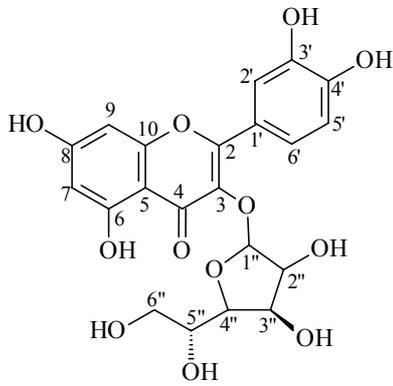
2,4-dihidroxi-6-metóxi acetofenona
(41)



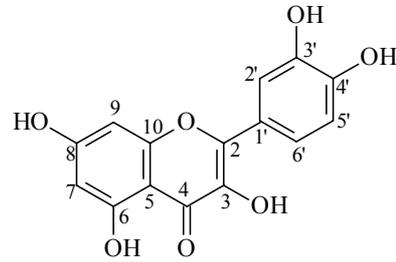
Ácido serícico
(42)



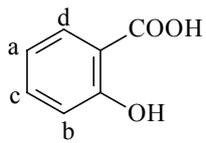
Ácido betulínico
(43)



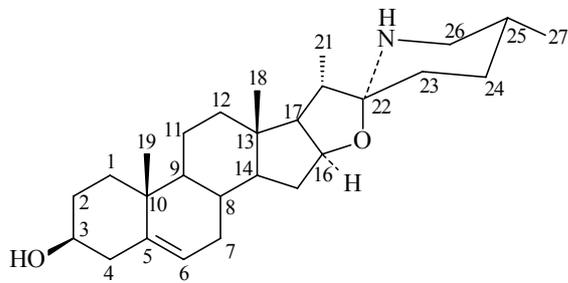
Isoquercitrina
(44)



Quercetina
(45)



Ácido salicílico
(46)



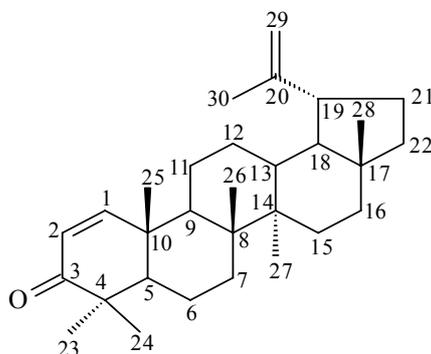
Solasodina
(47)

O efeito analgésico dos compostos **33**,¹⁵⁰ **34**,¹⁵⁰ **38**,¹⁵¹ **39**,¹⁵¹ **40**,¹⁵² **41**,¹⁵² **42**,¹⁵³ **45**¹⁵⁴ e **46**¹⁵⁵ já foi demonstrado anteriormente, deste modo, não será apresentado nesse estudo. A glochidona (**35**), acetato de α - e β -amirina (**36** e **37**), ácido betulínico (**43**), isoquercitrina (**44**) e solasodina (**47**) foram estudados em modelos de analgesia. Os dados físicos e espectroscópicos destes compostos foram descritos no Capítulo II (págs. 42-47). Os dados não serão discutidos em detalhes, uma vez que os mesmos são descritos extensivamente na literatura, o que nos serviu de base comparativa para a confirmação estrutural. No entanto, é interessante observar que a proporção dos componentes da mistura de acetato de α - e β -amirina (**36** e **37**) foi determinada através de cromatografia gasosa de alta resolução (CG-AR). A Figura 7 mostra o cromatograma onde os compostos aparecem em quantidades equivalentes na mistura.

De forma ilustrativa, apresentam-se os espectros de RMN (^1H e ^{13}C) da glochidona (**35**) e da isoquercitrina (**44**), acompanhados dos dados espectroscópicos correspondentes na Tabela 3, Figuras 8 e 9, (para a glochidona), e na Tabela 4, Figuras 10 e 11 (para a isoquercitrina).

Figura 7. Cromatograma da mistura de acetatos de α - e β -amirina.

Tabela 3. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (200 MHz) da glochidona (**35**), em CDCl_3 .

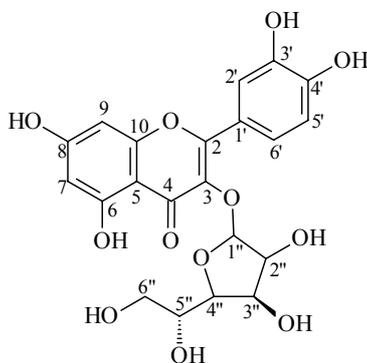


<i>H</i>	δ (ppm)	<i>C</i>	δ (ppm)
2	7,09 (d, 1H, $J = 9,8$ Hz)	1	125,1
1	5,76 (d, 1H, $J = 9,8$ Hz)	2	159,8
29	4,69 e 4,58 (d, 2H)	3	205,6
30	1,69 (s, 3H)	4	39,9
23	1,12 (s, 3H)	5	44,4
28	1,11 (s, 3H)	6	19,1
27	1,07 (s, 3H)	7	35,4
26	1,06 (s, 3H)	8	41,7
24	0,95 (s, 3H)	9	53,4
25	0,79 (s, 3H)	10	39,5
		11	21,3
		12	25,0
		13	42,9
		14	43,06
		15	29,7
		16	33,7
		17	44,6
		18	48,1
		19	47,8
		20	150,6
		21	27,7
		22	38,1
		23	27,3
		24	18,0
		25	18,9
		26	16,4
		27	14,4
		28	19,3
		29	109,5
		30	21,2

Figura 8. Espectro de RMN ^1H da glochidona (**35**), em CDCl_3 .

Figura 9. Espectro de RMN ^{13}C da glochidona (**35**), em CDCl_3 .

Tabela 4. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (200 MHz) da isoquercitrina (**44**), em CD_3OD .



<i>H</i>	δ (ppm)	<i>C</i>	δ (ppm)
7	6,39 (d, 1H, $J = 1,9$ Hz)	2	159,2
9	6,57 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz)	3	135,9
2'	7,90 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz)	4	179,7
5'	7,07 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz)	5	163,3
6'	7,72 (d,d, 1H, $J = 2,1$ e $8,5$ Hz)	6	100,2
1''	5,42 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz)	7	166,6
2''-6''	3,85-3,55 (m, 5H)	8	95,0
		9	158,7
		10	105,8
		1'	123,2
		2'	116,2
		3'	146,2
		4'	150,1
		5'	117,8
		6'	123,4
		1''	104,6
		2''	76,0
		3''	78,4
		4''	71,4
		5''	78,6
		6''	62,8

Figura 10. Espectro de RMN ^1H da isoquercitrina (**44**), em CD_3OD .

Figura 11. Espectro de RMN ^{13}C da isoquercitrina (**44**), em CD_3OD .

O efeito antinociceptivo de vários constituintes isolados de *I. pes-caprae* no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6 % em camundongos, é mostrado na Tabela 5. Como pode ser observado, a fração aquosa, a fração acetato de etila, a glochidona e o ácido betulínico, inibiram significativamente o número de contorções abdominais em relação ao grupo controle (10 mg/kg, i.p.) com taxas inibitórias percentuais de 71; 81; 75,5 e 88,1, respectivamente. A mistura de acetatos de α - e β -amirina, a isoquercitrina e a solasodina, exibiram atividade moderada com taxas inibitórias percentuais de 54,4; 34,5 e 44,5, respectivamente. No mesmo modelo, a aspirina e o paracetamol, fármacos empregados amplamente na clínica médica¹⁵⁶ e utilizados em nossos estudos para efeito de comparação, foram menos eficazes que os constituintes de *I. pes-caprae*, com exceção da isoquercitrina, que apresentou efeito analgésico comparável aos fármacos padrões (Tabela 5).

Tabela 5. Efeitos antinociceptivos dos constituintes isolados de *I. pes-caprae* e dos fármacos padrões aspirina e paracetamol, administrados intraperitonealmente na dose de 10 mg/kg.

Compostos	Número de contorções	Inibição (%)
Controle	35,3 ± 4,2	–
Fração aquosa	9,2 ± 1,5	71
Fração acetato de etila	6,7 ± 3,2	81
Glochidona	8,7 ± 1,4	75,5
Acetato de α - e β -amirina	15,9 ± 1,6	54,4
Ácido betulínico	4,2 ± 1,6	88,1
Isoquercitrina	23,1 ± 3	34,5
Solasodina	19,6 ± 2,4	44,5
Aspirina	22,9 ± 2	35
Paracetamol	21,9 ± 1	38

Cada grupo representa a média \pm s.e.m. de 6-8 experimentos.

Os resultados farmacológicos demonstram que a planta *I. pes-caprae* produz vários compostos ativos que são responsáveis pelos efeitos analgésicos apresentados pela planta.

Posteriormente, foram determinados valores da DI_{50} (dose necessária para inibir 50% das contorções abdominais) para uma série de compostos isolados de *I. pes-caprae*. Os resultados da potência analgésica, no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos, são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Efeito analgésico do extrato aquoso e de compostos isolados de *I. pes-caprae*, no modelo de contorções abdominais causadas pelo ácido acético 0,6% em camundongos.

Compostos	DI₅₀ (mg/kg)	DI₅₀ (μmol/kg)	Inibição Máxima
Extrato metanólico	33,8 (18,4-61,6)	–	58,7 ± 2
Isoquercitrina	39,7 (32,1-49,5)	91,9 (74,3-114,58)	71,2 ± 2,9
Glochidona	3 (1,1-5,9)	7,1 (2,4-14)	93,9 ± 1,3
Solasodina	24,7 (9-47,4)	59,8 (21,8-113,8)	89,3 ± 0,8
Aspirina	23,9 (13,1-44,5)	133 (73-247)	83 ± 2
Paracetamol	18,9 (15,7-37,8)	125 (104-250)	88 ± 1

Cada grupo representa a média ±s.e.m de 6-8 experimentos.

Como pode ser observado, o extrato metanólico e os compostos isolados de *I. pes-caprae* apresentam efeito analgésico significativo, sendo mais potentes que a aspirina e o paracetamol. O composto mais ativo, a glochidona (DI₅₀ = 7,1 μmol/kg), foi aproximadamente 18 vezes mais potente que os fármacos padrões. A solasodina (DI₅₀ = 59,8 μmol/kg) e a isoquercitrina (DI₅₀ = 91,9 μmol/kg), foram respectivamente cerca de 2,2 e 1,5 vezes mais potentes que os fármacos padrões. Além disso, é interessante observar o efeito farmacológico significante apresentado pelo extrato metanólico. A administração intraperitoneal do extrato metanólico (10-60 mg/kg) nos animais 30 minutos antes da administração do ácido acético causou inibição dose-dependente das contorções abdominais nos camundongos. O valor da DI₅₀ calculado foi de 33,8 mg/kg com inibição máxima de 58,7%. Este valor é comparável aqueles de DI₅₀ apresentados pela aspirina e paracetamol,

fármacos analgésicos e antiinflamatórios não-esteroidais, que exibiram DI_{50} de aproximadamente 20 mg/kg nas mesmas condições de medidas experimentais (Tabela 6).

O extrato metanólico, quando administrado por via oral na dose de 200 mg/kg em camundongos, causou pronunciada ação antinociceptiva no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, reduzindo em 68,4% o número de contorções abdominais em relação ao grupo controle, indicando que os princípios ativos da planta podem ser absorvidos pelo trato gastrointestinal. O resultado é apresentado na Tabela 7.

Tabela 7. Efeito analgésico do extrato metanólico no modelo de contorções abdominais causadas pelo ácido acético.

Tratamento	Dose (mg/kg) ^a	Inibição (%)
Extrato metanólico	200	68,4 ± 4

^a administrado por via oral.

Quando avaliados no teste da formalina, um modelo no qual duas fases distintas de dor podem ser distingüidas (neurogênica - 1^a fase; e inflamatória - 2^a fase),^{128,129} foi possível confirmar a ação antinociceptiva dos constituintes de *I. pes-caprae*. A Tabela 8 apresenta o efeito da fração acetato de etila, glochidona, acetato de α - e β -amirina, ácido betulínico, isoquercitrina e indometacina no modelo da formalina.

Tabela 8. Efeito da indometacina e dos compostos isolados de *I. pes-caprae*, administrados intraperitonealmente em camundongos, no teste da formalina.

Dose (10 mg/kg, i.p.)	1ª Fase	Inibição (%)	2ª Fase	Inibição (%)
Controle	78,2 ± 6,2	–	204,3 ± 6,8	–
Fração acetato de etila	54 ± 7,8	30,9	33,0 ± 4,6	83,8
Glochidona	46,6 ± 4	40,4	34,7 ± 3,8	83
Acetato de α - e β -amirina	32,1 ± 5	58,9	4,5 ± 2,3	97,8
Ácido betulínico	73,2 ± 3,3	6,5	102,2 ± 4,2	50
Isoquercitrina	40,7 ± 3,8	47,9	109,5 ± 5,2	46,4
Indometacina	70,4 ± 1,8	10	61,3 ± 3,4	70

Cada grupo representa a média ± s.e.m. de 6-8 experimentos.

Como pode ser observado, a fração acetato de etila e os compostos glochidona, acetato de α - e β -amirina e isoquercitrina, inibiram ambas fases de dor induzida pela formalina. As taxas inibitórias percentuais foram de 30,9; 40,4; 58,9 e 47,9 na primeira fase e de 83,8; 83; 97,8 e 46,4 na segunda fase, respectivamente. De forma clara, a ação antinociceptiva dos componentes foi maior na fase inflamatória da resposta induzida pela formalina. Por outro lado, vale ressaltar que todos os componentes testados, com exceção do ácido betulínico, foram substancialmente mais eficazes que o fármaco padrão na fase neurogênica. A indometacina, fármaco padrão de ação periférica, e o ácido betulínico, inibiram efetivamente somente a fase inflamatória no teste da formalina, com inibição percentual de 70 e 50, respectivamente.

A Tabela 9 apresenta valores da DI_{50} determinado para o extrato metanólico e aspirina no modelo de dor induzida pela formalina. O extrato metanólico exerceu inibição dose-dependente significativa em ambas fases neurogênica (1ª fase) e inflamatória (2ª fase).

Tabela 9. Efeito antinociceptivo do extrato metanólico obtido de *Ipomoea pes-caprae* e do padrão de referência aspirina, no teste da formalina.

Tratamento	DI_{50} (mg/kg, i.p.)	IM ^a (%)	2ª Fase	
			1ª Fase	IM (%)
Extrato metanólico	37,6 (20,5-68,7)	66,5 ± 5	12,5 (6,8-22,9)	88 ± 5
Aspirina	Inativo	—	22,1 (13,9-33)	88 ± 3

^a Inibição máxima.

Os valores obtidos para ambas fases foram 37,6 (20,5-68,7) e 12,5 (6,8-22,9) mg/kg, respectivamente. Em comparação com a aspirina ($DI_{50} = 22,1$ mg/kg), o extrato metanólico foi cerca de duas vezes mais potente em relação à fase inflamatória de dor. Tanto a aspirina quanto outros fármacos antiinflamatórios não-esteroidais têm demonstrado eficácia na segunda fase do teste da formalina, o que pode ser atribuído a inibição da síntese de prostaglandinas na regulação da dor.¹²⁹ Por outro lado, o extrato metanólico não interferiu em edema de pata induzido pela formalina,¹⁵⁷ sugerindo que a ação antinociceptiva do extrato metanólico de *I. pes-caprae* na segunda fase do teste da formalina não está associada ao edema de pata. Uma vez que o extrato metanólico foi ativo nas fases neurogênica e inflamatória do teste da formalina, o que pode ser um indicativo de possíveis interações com o sistema opióide,^{128,158} animais foram pré-tratados posteriormente com naloxona, um antagonista do sistema opióide, extrato metanólico ou morfina. Os resultados mostraram que

a naloxona reverteu o efeito antinociceptivo produzido pela morfina no teste das contorções abdominais, mas não casou influência na ação produzida pelo extrato metanólico. Tais resultados sugerem que o extrato metanólico de *I. pes-caprae* contém substâncias com ação antinociceptiva que aparentemente não são relacionadas com a ativação dos sistemas opióides. Porém, outros estudos serão necessários para elucidar o mecanismo de ação analgésica do extrato metanólico de *I. pes-caprae*.

Embora todos os compostos já tenham sido quimicamente identificados anteriormente, é interessante mencionar que vários deles exibiram tipos diferentes de atividades biológicas. Neste contexto, a xantoxilina, que foi isolada anteriormente em nossos laboratórios da *Sebastiania schottiana* Muell. Arg, com rendimento de 0,25 %, resultou ser o principal componente antiespasmódico dessa planta.^{119,153} O ácido serfíco, isolado de *Vochysia divergens* Pohl, possui ação antibacteriana e antifúngica contra microorganismos patogênicos^{121,159} e, possui também propriedades antinociceptivas.¹⁶⁰ A quercetina e a isoquercitrina são flavonóides comuns presentes em várias plantas e alimentos. Muitas propriedades farmacológicas ou biológicas desses flavonóides já foram demonstradas anteriormente.^{151,161-163} A α -amirina e a β -amirina, mostraram propriedades antiinflamatórias e antiartríticas. Os fitoesteróis, estigmasterol e β -sitosterol, constituintes bem conhecidos e distribuídos amplamente em plantas superiores, possuem variadas propriedades farmacológicas, principalmente entre estas, a analgésica⁷⁵ e antiinflamatória.¹⁶⁴ Estudos recentes demonstraram a eficácia terapêutica desses esteróis no tratamento de pacientes com hiperplasia benigna de próstata(HBP).^{165,166}

O ácido betulínico, um triterpeno bem conhecido do tipo lupano, tem recebido atenção especial de vários pesquisadores por causa de suas atividades farmacológicas e/ou

biológicas promissoras. Embora este composto já tenha sido identificado em muitas plantas, tais propriedades só foram demonstradas recentemente, como antitumoral,¹⁶⁷ espasmogênica,¹⁶⁸ antiinflamatória,^{169,170} anti HIV¹⁷¹ e antimalarial.¹⁷²

É importante ressaltar que este é o primeiro trabalho que demonstra a ação antinociceptiva da glochidona, acetatos de α - e β -amirina, ácido betulínico, isoquercitrina e solasodina, além dos estudos do extrato metanólico e das frações de acetato de etila e aquosa.

Por fim, os resultados apresentados neste trabalho demonstraram claramente que a planta *I. pes-caprae* produz muitos compostos ativos, o que comprova, pelo menos em parte, o seu uso na medicina popular no combate a diferentes doenças, em particular, aquelas associadas a processos dolorosos e inflamatórios. Futuras investigações deverão ser realizadas em nossos laboratórios para confirmar esses efeitos por outras vias de administração e também para caracterizar o mecanismo de ação antinociceptiva desses compostos.

3.2. Estudos em Química Medicinal de análogos do ácido gálico

Os estudos envolvendo o ácido gálico e seus análogos simples tem avançado significativamente nos últimos anos, devido principalmente as suas múltiplas e interessantes atividades biológicas e farmacológicas, muitas destas exploradas no Capítulo I deste trabalho (págs 31-36).

Um dos temas desta Tese é a utilização do ácido gálico, composto ativo de origem natural, como modelo para a síntese de vários análogos simples, que serão a base geradora dos estudos em Química Medicinal. Além da síntese, tais estudos envolvem a determinação da atividade biológica e farmacológica dos análogos sintéticos, e estudos das relações entre a estrutura química e a atividade biológica (SAR e QSAR).

É importante observar o caráter multidisciplinar que a Química Medicinal nos proporciona neste estudo, interligando diferentes áreas das ciências químico-farmacêuticas. O entendimento de que cada área específica ocupa um importante espaço neste contexto é fundamental para a realização deste trabalho com sucesso. A Figura 12 apresenta um esquema ilustrativo das áreas interligadas pela Química Medicinal e exploradas neste trabalho: química orgânica, farmacologia, microbiologia e química computacional. O papel do químico medicinal é essencial neste trabalho, sendo o elemento responsável pela ligação deste conjunto diverso. É necessário entender neste processo as limitações de cada componente nas outras áreas específicas, o que torna de fundamental importância o trabalho conjunto efetivo para superar estas limitações.

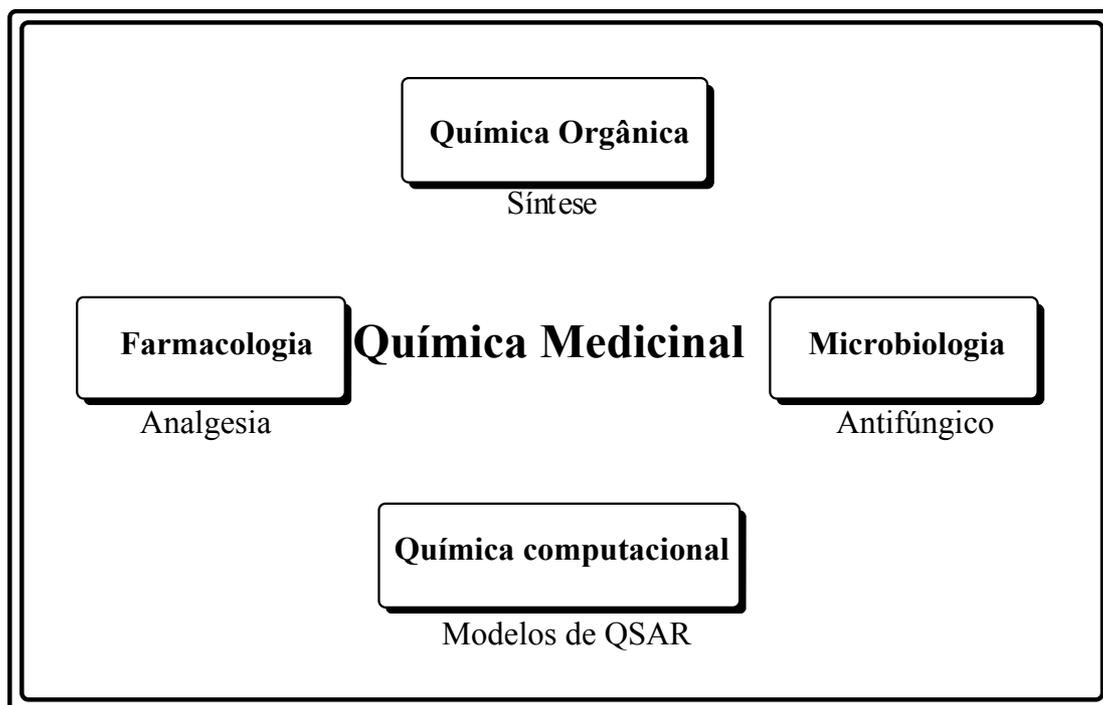


Figura 12. Esquema demonstrativo das áreas específicas e inter-relações envolvidas em nossos estudos: química orgânica, farmacologia, microbiologia e química computacional. A Química Medicinal é o centro deste processo.

3.2.1. Síntese dos análogos do ácido gálico

Nosso objetivo é a síntese de um conjunto de compostos estruturalmente relacionados para estudos em Química Medicinal, explorando muito do potencial apresentado na Figura 12. Os compostos sintetizados neste trabalho são simples do ponto de vista da química orgânica sintético, viabilizando assim, a obtenção de uma série grande de análogos. Vale ressaltar que a indústria farmacêutica a nível mundial, vem cada vez mais investindo na descoberta de moléculas pequenas e simples com potencial terapêutico elevado. Tais

moléculas fornecem a base para o tratamento de diversas doenças no homem, trazendo benefícios e qualidade de vida às diferentes populações.

A síntese dos análogos do ácido gálico foi planejada de acordo com métodos convencionais (mediante pequenas modificações) descritos na literatura. Os compostos foram obtidos geralmente em bons rendimentos, com elevado grau de pureza. A determinação da pureza é um fator importante para a avaliação biológica e farmacológica. Todos os compostos sintetizados neste trabalho foram avaliados através dos dados espectroscópicos de RMN de ^1H , espectrométricos de massa de alta resolução, e análise elementar. Os respectivos valores calculados e encontrados de CHN estão dentro do limite $\pm 0,4$, revelando um padrão de pureza adequado para a análise biológica.

A. Análogos do ácido gálico GA002-GA007

A primeira série de análogos preparada foi a dos ésteres do ácido gálico, onde a cadeia alcoólica é constituída por álcoois de cadeia alquílica linear crescente (metil, etil, propil,...). Estes compostos foram preparados pela esterificação direta do ácido gálico (**GA001**) com o álcool primário apropriado em meio ácido, de acordo com o método anteriormente descrito na literatura¹³⁰ (Figura 13). Os compostos foram obtidos em bons rendimentos que variam entre 67 e 81%. O mecanismo de reação é apresentado na Figura 14.

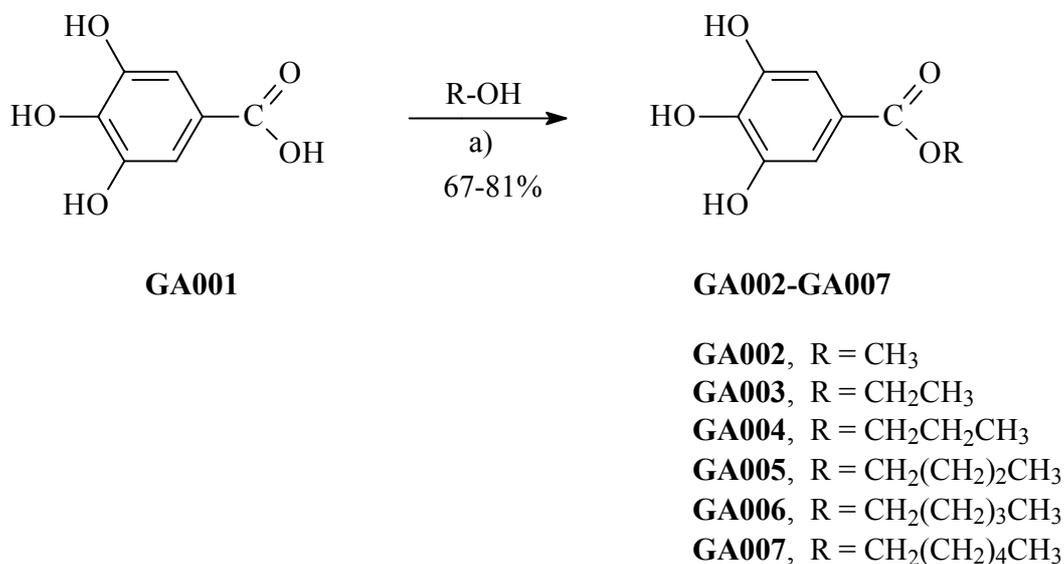


Figura 13. Preparação dos análogos do ácido gálico **GA002-GA007**. a) benzeno, H₂SO₄, refluxo, 8-12 horas.

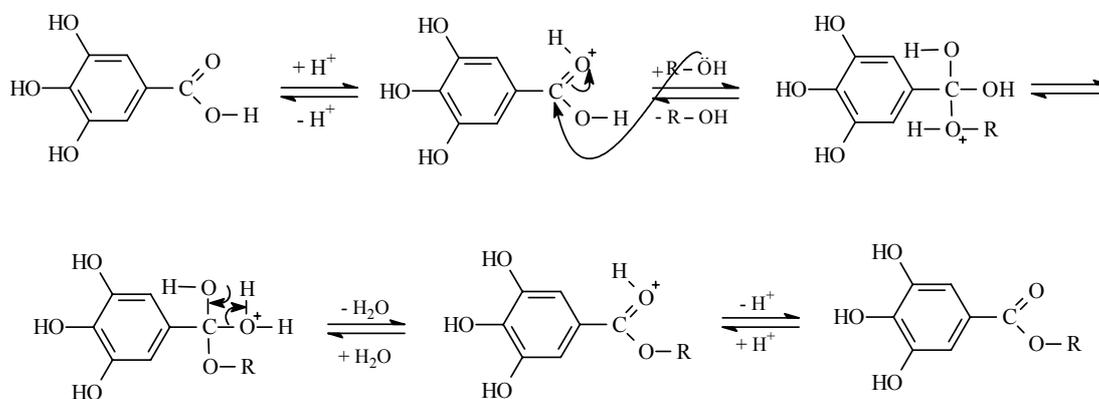


Figura 14. Mecanismo de esterificação do ácido gálico catalisado por ácido.

O equilíbrio é atingido em algumas horas quando o ácido gálico e o álcool correspondente são colocados em refluxo com uma pequena quantidade de ácido sulfúrico. Uma vez que a posição de equilíbrio controla a quantidade do éster formado (Figura 14), o uso de excesso do álcool desloca o equilíbrio na direção da formação do éster, levando a um aumento no rendimento baseado no reagente limitante. Rendimentos melhores foram alcançados também pela remoção da água do meio reacional através de destilação azeotrópica, favorecendo assim a formação do éster no equilíbrio.

B. Análogos do ácido gálico GA008 e GA009

Os compostos **GA008** e **GA009**, planejados com a finalidade da avaliação da influência dos grupos hidroxilas do ácido gálico na atividade farmacológica, foram preparados a partir do galato de etila (**GA003**) como mostra a Figura 15. A benzilação dos três grupos hidroxilas de **GA003** foi obtida em bom rendimento fornecendo **GA008**, com a reação sendo completada em 7 horas. A utilização de acetofenona como solvente foi fundamental para o bom rendimento da reação. Os procedimentos convencionais de benzilação de fenóis empregando acetona como solvente,¹³⁶ levam evidentemente a temperaturas máximas de reação baixas e a necessidade de longo tempo reacional. Os rendimentos obtidos por este método são baixos. O emprego da acetofenona permitiu a elevação da temperatura de reação e possibilitou a obtenção do produto num tempo reduzido, com um aumento considerável do rendimento da reação. O éster **GA008** foi convertido ao ácido correspondente **GA009**, através de hidrólise básica, em bom rendimento (Figura 15). O mecanismo de reação é ilustrado na Figura 16.

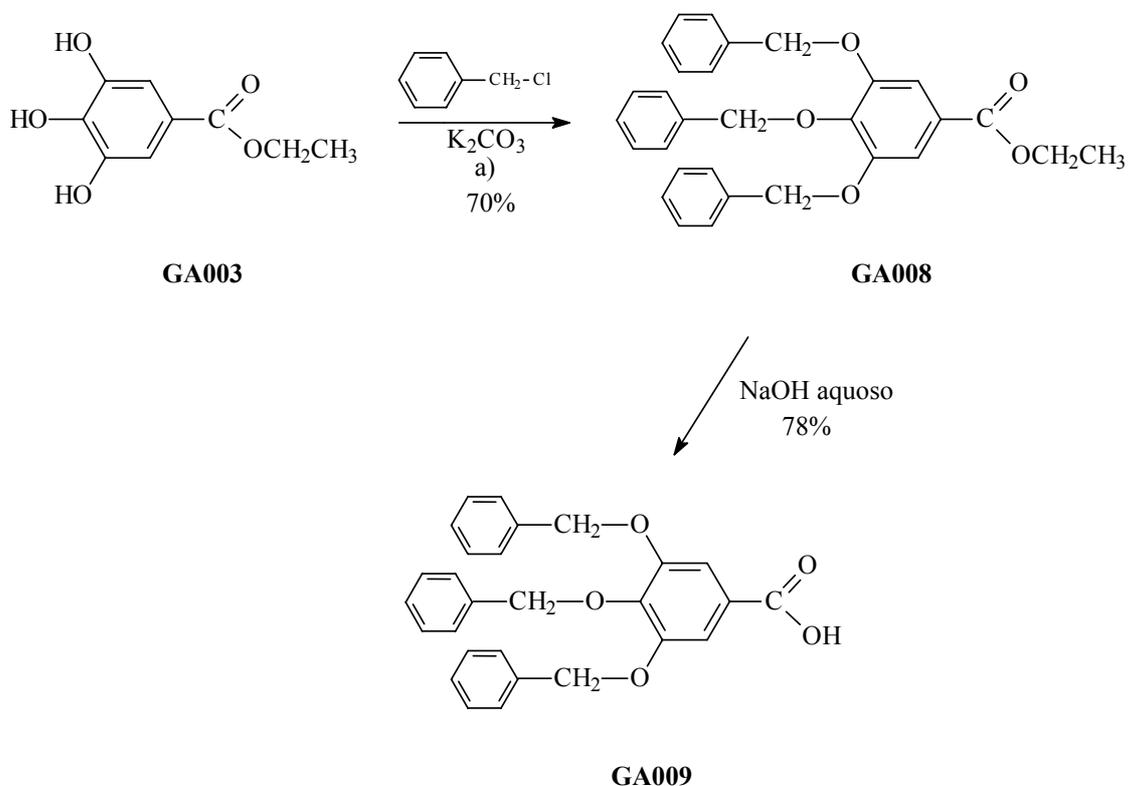


Figura 15. Preparação dos análogos **GA008** e **GA009** a partir de **GA003**. a) acetofenona, refluxo, 7 horas.

Se considerarmos o caminho inverso da reação mostrada na Figura 14, teremos a hidrólise do éster do ácido gálico catalisada por ácido. Ésteres, porém, não sofrem apenas hidrólise ácida, e são sujeitos a hidrólise promovida por base, também conhecida como saponificação.

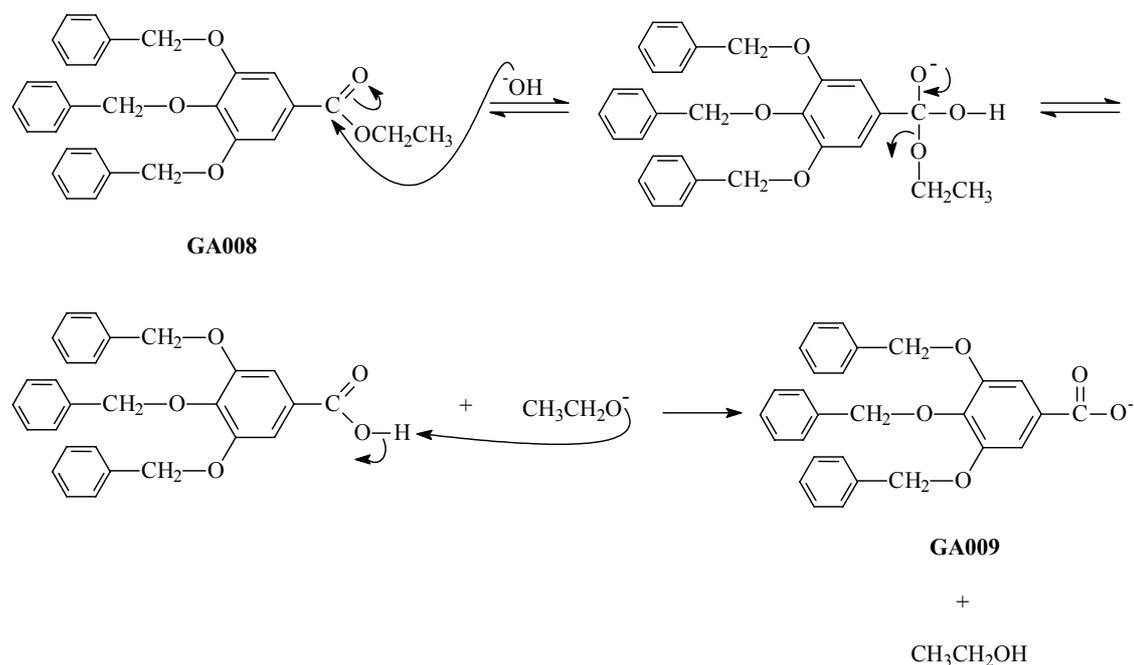


Figura 16. Mecanismo de hidrólise de **GA008** catalisado por base.

Como pode ser observado na Figura 16, o mecanismo de hidrólise básica envolve a substituição nucleofílica no carbono carbonílico de **GA008**. O íon carboxilato formado não é reativo frente a substituição nucleofílica por estar carregado negativamente. A hidrólise em meio básico, conseqüentemente, é uma reação essencialmente irreversível. Pode ser verificado também, de forma comparativa, o contraste existente em relação ao mecanismo de hidrólise em meio ácido (caminho inverso, Figura 14), onde a reação é reversível e a posição de equilíbrio depende das concentrações relativas de água e de álcool.

C. Análogos do ácido gálico GA010-GA034

O método de esterificação direta, discutido anteriormente para a preparação dos análogos **GA002-GA007**, provou ser conveniente quando empregados álcoois primários contendo até seis átomos de carbono. Por outro lado, foi observado no presente trabalho que este método de esterificação não foi efetivo quando empregou-se fenol ou álcool benzílico. Além do difícil isolamento dos respectivos produtos, o rendimento foi baixo (resultados não apresentados). Contudo, tais ésteres podem ser sintetizados pela reação do cloreto do ácido gálico com o fenol ou álcool apropriado. O cloreto do ácido gálico é muito mais reativo frente a substituição nucleofílica que o ácido gálico. Desta forma, a esterificação do ácido gálico com fenóis, álcoois benzílicos e fenílicos derivados, foi conduzida de forma eficaz através de um método indireto de esterificação que envolve:

- i) a proteção dos grupos hidroxila fenólicos (acetilação) do ácido gálico, obtendo-se o ácido gálico triacetila (**I**);
- ii) o tratamento de (**I**) com pentacloreto de fósforo para formar o cloreto de galoila triacetila (**II**);
- iii) reação do cloreto (**II**) com os nucleófilos (fenóis e álcoois substituídos);
- iv) os ésteres preparados em (iii) são desacetilados fornecendo os produtos finais desejados.

O ácido gálico triacetila (**I**) e o cloreto de galoila triacetila (**II**) foram obtidos em excelentes rendimentos (95%) (Figura 17).

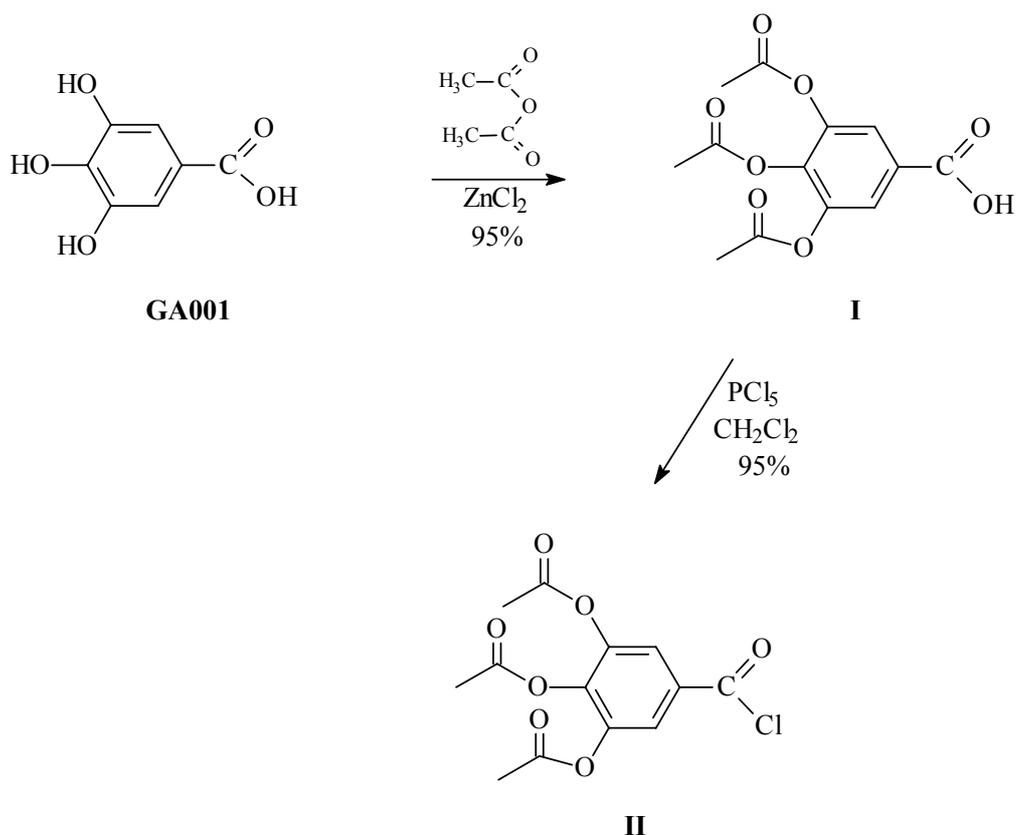


Figura 17. Esquema reacional para a preparação do cloreto de galoila triacetila (**II**).

Os análogos **GA010-GA033**, foram preparados através do tratamento do cloreto de galoila (**II**) com os nucleófilos correspondentes: dióis, fenóis, álcoois benzílicos ou álcoois fenéticos derivados, em diclorometano a temperatura ambiente. Piridina e DMAP foram utilizados para catalisar a reação e reagir com o HCl formado, prevenindo o desenvolvimento de alta concentração ácida. Os compostos foram obtidos em rendimentos que variam entre 40 e 70%. O esquema reacional é apresentado na Figura 18.

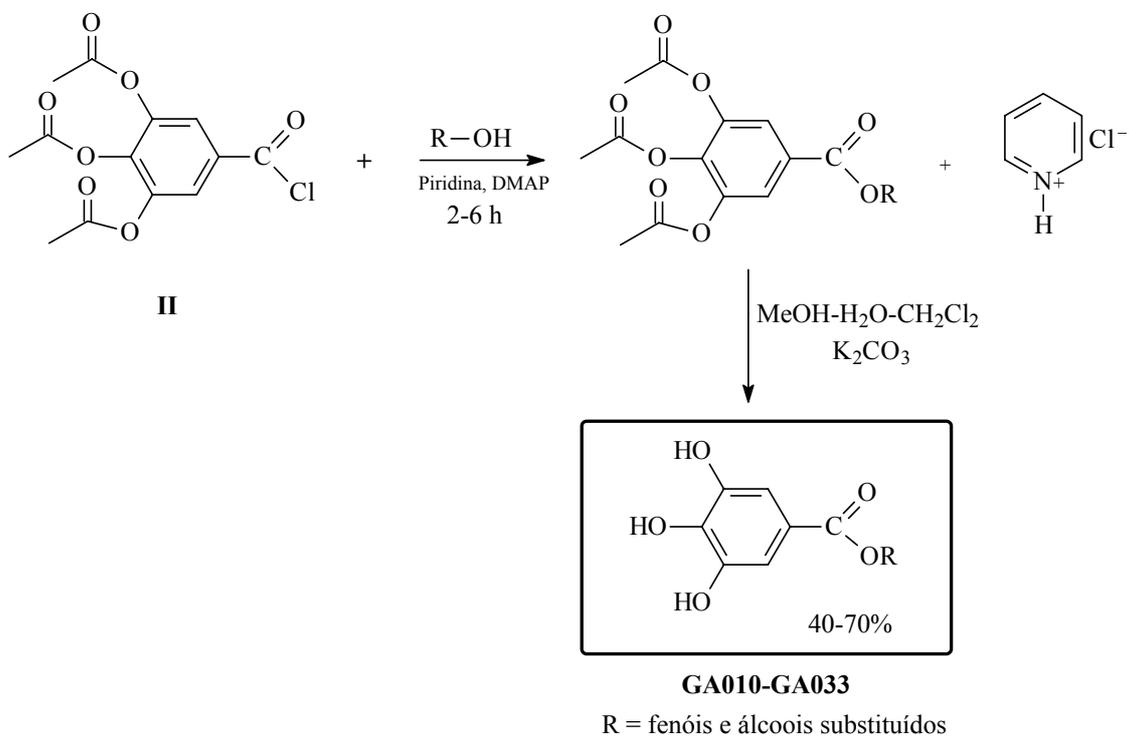


Figura 18. Síntese dos análogos **GA010-GA033**.

Deve ser notado que os rendimentos das reações na síntese dos análogos **GA010-GA033** são referentes aos rendimento global de duas etapas reacionais sucessivas, partindo-se do cloreto de galoila triacetila (**II**) até os produtos finais, conforme mostra a Figura 18. As espécies triacetiladas correspondentes não foram isoladas. As estruturas dos compostos **GA013-GA033** são mostradas na Figura 19.

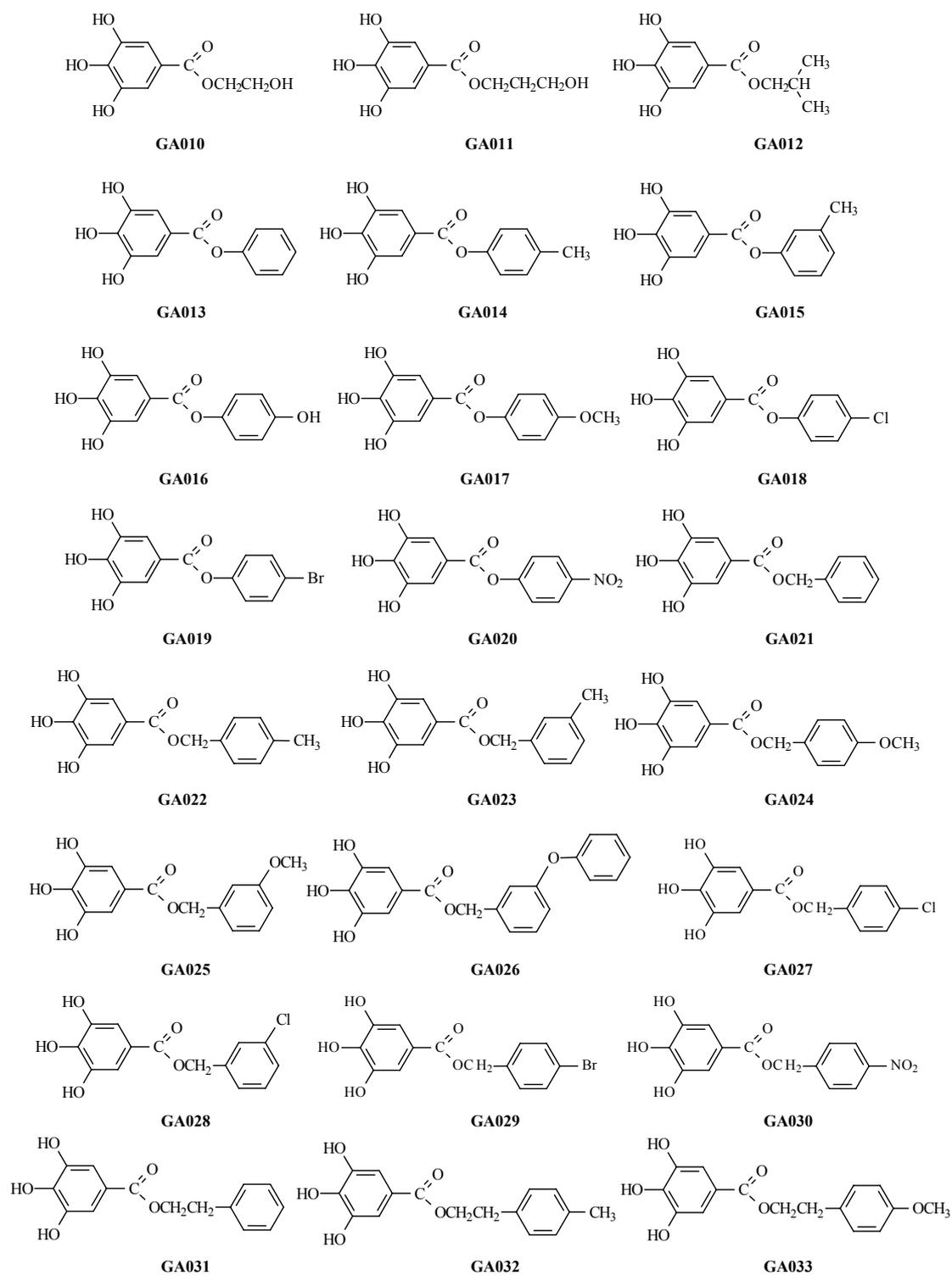


Figura 19. Estruturas dos análogos GA010-GA033.

O composto **GA034** foi sintetizado empregando-se metodologia similar a usada na preparação dos análogos **GA010-GA033**. Contudo, foi usado 2 equivalentes do cloreto **II** e 2 equivalentes de piridina em relação a espécie dinucleofílica hidroquinona (1 equivalente). Pode ser notado na Figura 20 que cada um dos grupos hidroxila fenólicos (posições 1 e 4) reagiu com 1 equivalente do cloreto **II** fornecendo **GA034**.

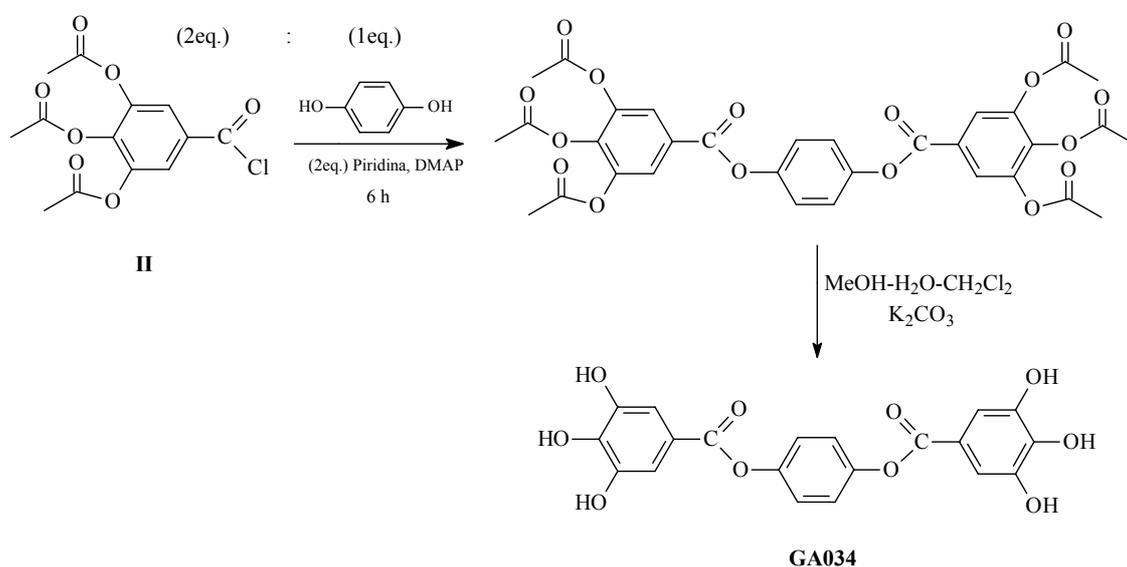


Figura 20. Síntese de **GA034**.

D. Análogos do ácido gálico GA035-GA047

As amidas derivadas do ácido gálico, representadas pela série análoga **GA035-GA047**, foram sintetizadas de acordo com a metodologia de esterificação indireta discutida anteriormente no item C (3.2.1.), partindo-se do cloreto de galoila triacetila (**II**). Não foi usada piridina para a reação de N-acilação, ao contrário do que ocorreu no caso da síntese

dos ésteres, onde foi usada piridina para favorecer a O-acilação. Em geral, os cloretos de ácido reagem mais rapidamente com grupos amino fornecendo amidas em alto rendimento, devido ao maior poder nucleofílico do nitrogênio dos grupos amino. A Figura 21 mostra as estruturas dos análogos **GA035-GA047**. Os compostos foram obtidos em bons rendimentos que variam entre 53 e 81%.

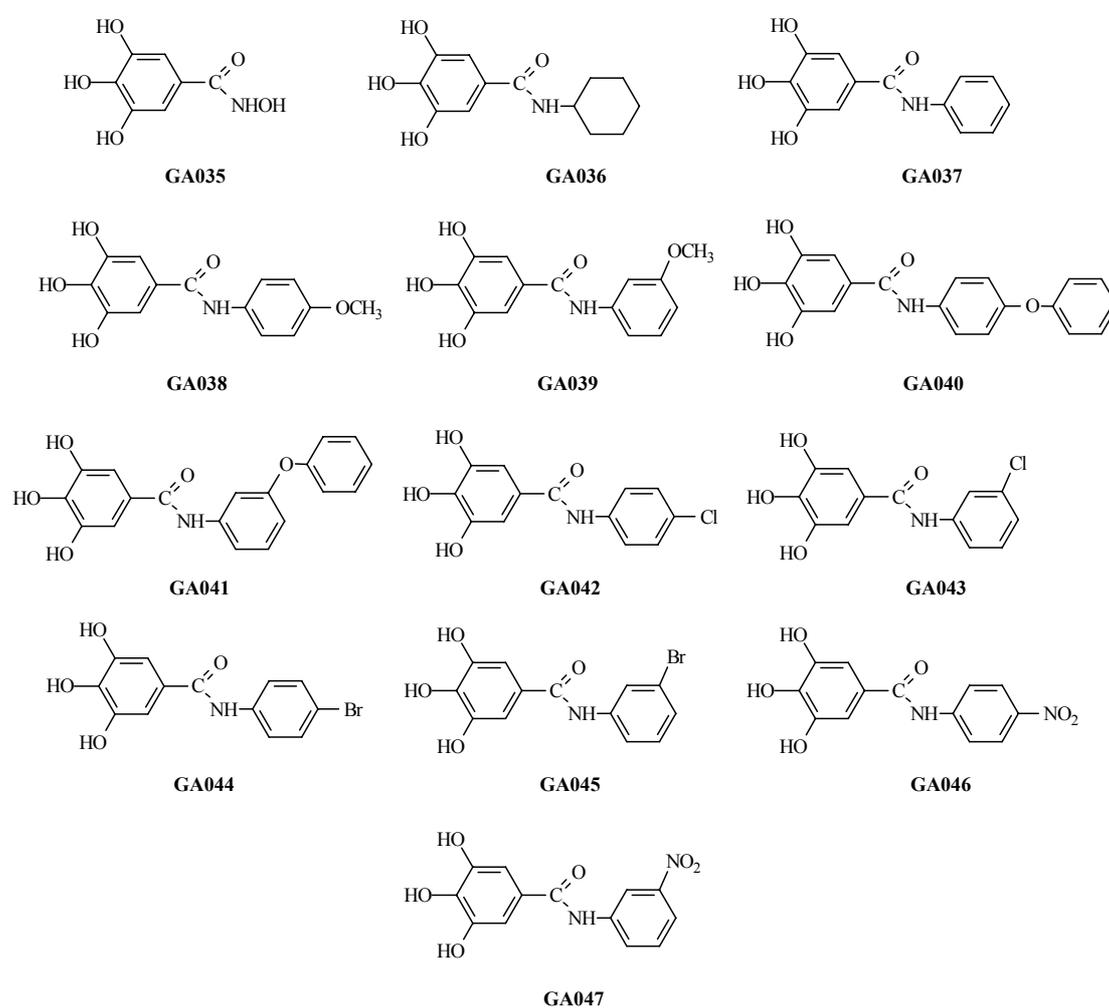


Figura 21. Estruturas dos análogos **GA035-GA047**.

E. Análogos do ácido gálico GA048 e GA049

O último análogo sintetizado neste trabalho foi o anidrido gálico (**GA048**), que juntamente com o anidrido acético gálico (**GA049**), forma a pequena série dos anidridos derivados do ácido gálico. A Figura 22 mostra o esquema reacional para a síntese de **GA048**.

A Figura 23 mostra a estrutura do anidrido **GA049**.

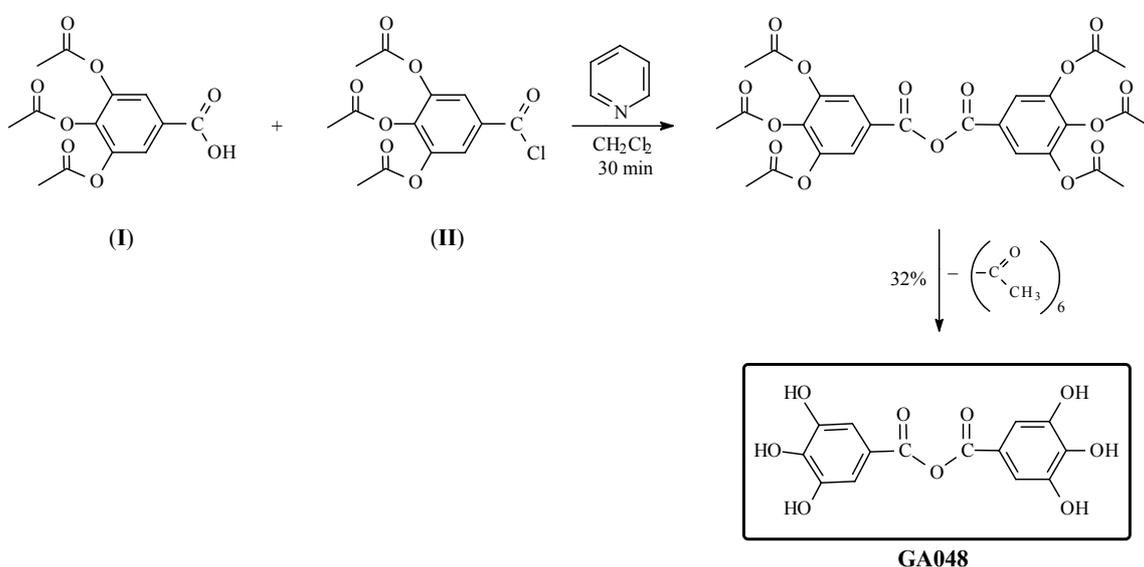


Figura 22. Síntese do anidrido gálico (**GA048**).

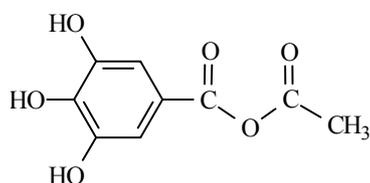


Figura 23. Estrutura molecular do anidrido acético gálico (**GA049**).

Os ácidos carboxílicos reagem com cloretos de ácido na presença de piridina fornecendo anidridos. Assim, o anidrido gálico (**GA049**) foi preparado pela reação entre o ácido gálico triacetila (**I**) e o cloreto de galoila triacetila (**II**), em piridina. A desacetilação dos grupos hidroxilas fenólicos forneceu **GA049** com rendimento apenas satisfatório, uma vez que a reação de hidrólise do anidrido gálico compete com esta reação, produzindo ácido gálico.

3.2.2. Avaliação farmacológica: atividade analgésica

Polifenóis de plantas destacam-se entre as diversas classes de produtos naturais que tem recebido atenção especial durante a última década devido as suas interessantes e múltiplas atividades biológicas e farmacológicas (Capítulo I, págs. 32-36).⁸⁰ O ácido gálico é um composto de origem natural que exhibe diversas atividades biológicas.⁸¹⁻⁸³ Análogos simples do ácido gálico apresentaram um amplo espectro de atividades biológicas, incluindo por exemplo, antitumoral,^{91,108} antiviral,^{90,106} antiinflamatória,¹⁰⁹ entre outras.

O ácido gálico foi usado como protótipo para a síntese de vários análogos simples com potencial para estudos em Química Medicinal (item 3.2.1., deste Capítulo). Os compostos sintetizados foram avaliados farmacologicamente quanto as suas propriedades analgésicas em dois modelos clássicos de nocicepção. Dentro da série de compostos sintetizados, destacam-se:

- i) os ésteres análogos **GA002-GA007**, onde as cadeias alcoólicas são formadas por álcoois de cadeia alquílica linear crescente, começando com o grupo metil (**GA002**) e estendendo-se na ordem até o grupo hexil (**GA007**);
- ii) os análogos **GA008** e **GA009** que possuem os 3 grupos hidroxilas fenólicos protegidos com grupos benzila;
- iii) uma série de 24 ésteres, apresentando cadeias alcoólicas variadas: dióis, etilenoglicol (**GA010**) e 1,3-propanodiol (**GA011**); um de cadeia alquílica ramificada (**GA012**); fenol (**GA013**) e outros 7 derivados *m*- ou *p*-substituídos (**GA014-GA020**); álcool benzílico (**GA021**) e outros 9 derivados *m*- ou *p*-

- substituídos (**GA022-GA030**); álcool fenetílico (**GA031**) e 2 derivados *p*-substituídos (**GA032** e **GA033**);
- iv) um éster di-gálico (**GA034**);
- v) uma série de 18 amidas, onde as cadeias amínicas são formadas por: hidroxiamina (**GA035**); ciclo-hexilamina (**GA036**); anilina (**GA037**) e uma série de anilinas *m*- ou *p*-substituídas (**GA038-GA047**);
- vi) por fim, 2 anidridos derivados do ácido gálico, o anidrido gálico (**GA048**) e o anidrido acético gálico (**GA049**).

As modificações estruturais realizadas a partir do protótipo ácido gálico (**GA001**), através das séries sintetizadas demonstradas, resultaram em conjunto de compostos estruturalmente relacionados, que possuem, contudo, individualmente ou em pequenos sub-conjuntos, atributos físico-químicos e estruturais diferentes, que conferem a este conjunto uma característica estrutura/propriedade interessante para estudos em Química Medicinal. Pode ser observado de forma ilustrativa na Figura 24, algumas características físico-químicas e estruturais de cada sub-conjunto derivado que compõem o conjunto final de 49 compostos derivados do protótipo.

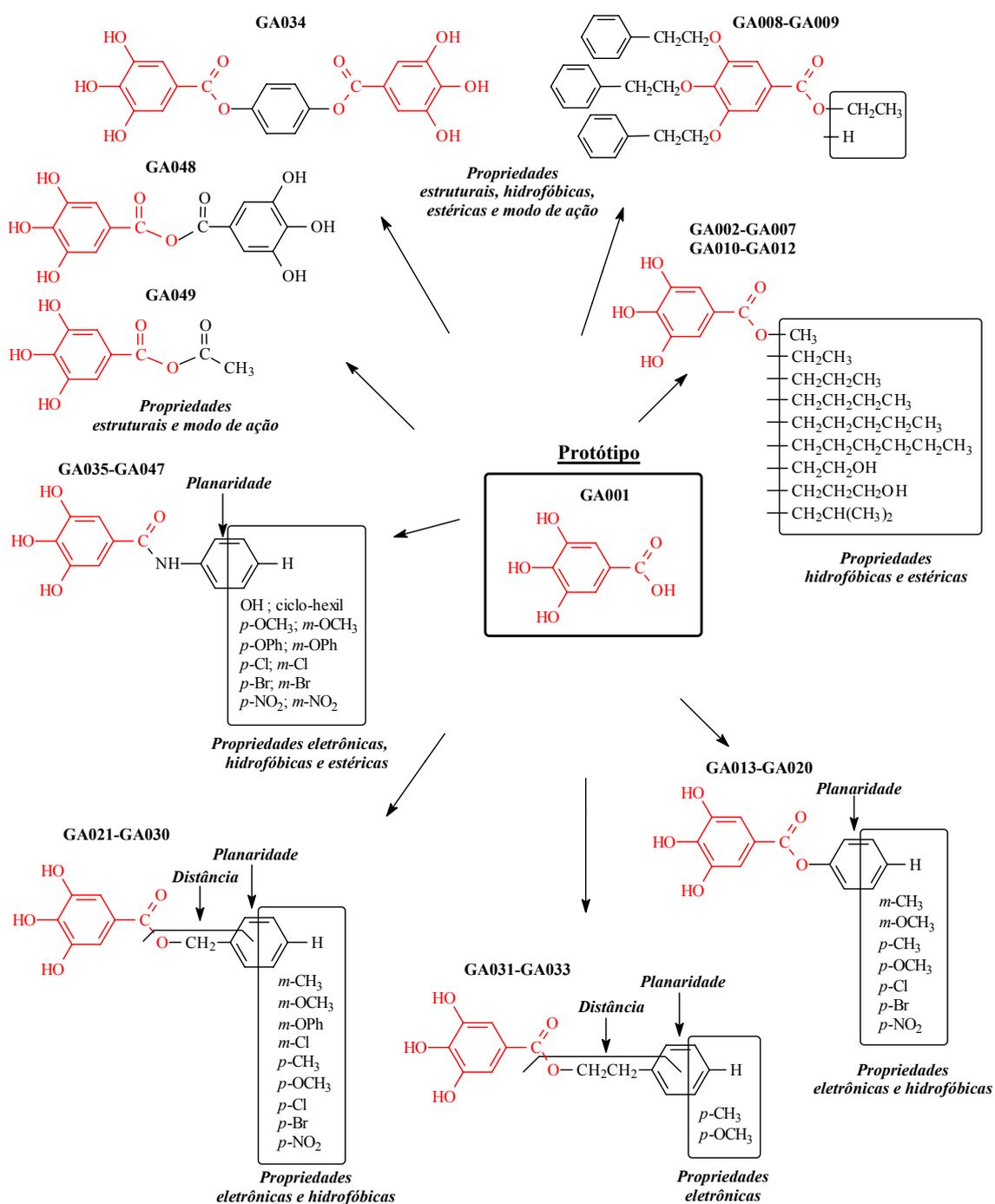


Figura 24. Esquema ilustrativo das características estruturais e físico-químicas do conjunto de 49 compostos derivados do protótipo ácido gálico.

A. Modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

A atividade analgésica da série de 49 análogos do ácido gálico (incluindo o ácido gálico) (Figura 24) foi avaliada no modelo de dor induzida pelo ácido acético em camundongos. Os resultados farmacológicos da potência analgésica (DI_{50}) são apresentados na Tabela 10. Como padrão comparativo, foi incluído o efeito analgésico da aspirina e paracetamol.

Tabela 10. Efeito analgésico do ácido gálico e de seus análogos sintéticos no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6%, em camundongos.

<i>Composto</i>	DI_{50} ($\mu\text{mol/kg}$)	DI_{50} (mg/kg)
GA001	30,4 (20,5-40,3)	9 (6-12)
GA002	242 (176-318,3)	47,9 (35-63)
GA003	175,1 (141,3-196,8)	34,7 (28-39)
GA004	190,6 (170,3-207,6)	40,4 (35-44)
GA005	30,9 (17,6-52,9)	7,0 (4-12)
GA006	223,8 (170,9-241,7)	53,7 (41-58)
GA007	307 (281,9-321,1)	78,4 (72-82)
GA008	> 999	> 100
GA009	> 999	> 100
GA010	28,7 (13,9-41,7)	6,2 (3-9)
GA011	73,4 (42,3-118,6)	26 (15-42)

GA012	89,4 (75,2-106,2)	20,2 (17-24)
GA013	46,2 (40,8-62,5)	17,1 (15-23)
GA014	43,3 (31,1-54,4)	16,7 (12-21)
GA015	39,5 (31,2-62,3)	15,2 (12-24)
GA016	22,6 (14,7-29,4)	9,2 (6-12)
GA017	43,8 (34,8-54,7)	17,6 (14-22)
GA018	39,2 (22,7-45,4)	13,8 (8-16)
GA019	17,5 (8,8-24,3)	7,9 (4-11)
GA020	17,9 (7,2-26,2)	7,5 (3-11)
GA021	31,2 (18-38,6)	12,1 (7-15)
GA022	15,6 (10-27,6)	6,2 (4-11)
GA023	20,2 (5-40)	8,1 (2-16)
GA024	15,1 (9,6-24)	6,3 (4-10)
GA025	39,5 (26,5-55,4)	16,4 (11-23)
GA026	10,8 (8,3-16,7)	5,2 (4-8)
GA027	21,1 (14,2-33,2)	8,9 (6-14)
GA028	17,6 (7,1-23,8)	7,4 (3-10)
GA029	12,6 (6,4-15)	5,9 (3-7)
GA030	24,5 (16,2-30)	10,6 (7-13)
GA031	171,7 (127,6-211,4)	47,1 (35-58)
GA032	37,9 (29-48,3)	15,7 (12-20)
GA033	46,9 (28-95,2)	20,2 (12-41)
GA034	3,9 (1,5-7,5)	2,6 (1-5)

GA035	23,6 (16,2-38,8)	7,3 (5-12)
GA036	15,2 (8-24)	5,7 (3-9)
GA037	27,8 (18,9-35,1)	10,3 (7-13)
GA038	29,2 (20-57,4)	11,7 (8-23)
GA039	17,2 (10-25)	6,9 (4-10)
GA040	11,7 (8,7-23,8)	5,4 (4-11)
GA041	6,6 (4,2-15)	3,1 (2-7)
GA042	35,5 (22,2-44,4)	14,4 (9-18)
GA043	11,4 (7,4-19,9)	4,6 (3-8)
GA044	12,7 (6,7-24,5)	5,7 (3-11)
GA045	11,2 (6,6-24,1)	5,1 (3-8)
GA046	14,3 (9,7-24,2)	5,9 (4-10)
GA047	4,9 (2,2-9,8)	2,0 (0,9-4)
GA048	14,2 (10,4-22,5)	8,2 (6-13)
GA049	229,8 (188,7-255)	48,7 (40-54)
Aspirina	133 (73-247)	24 (13-44)
Paracetamol	125 (104-250)	19 (16-23)

Cada grupo representa a média de seis a oito animais. Valores da DI_{50} são apresentados com limite de 95% de confiança.

Como pode ser notado, os compostos exibem ação analgésica significativa e dose dependente. Dentro do conjunto de 49 compostos avaliados, pode-se destacar algumas relações importantes entre a estrutura e a atividade (SAR). Tais relações são descritas a seguir.

Os ésteres de cadeia alquílica linear crescente (**GA002-GA007**) são os que apresentam a atividade analgésica mais modesta do grupo testado. Com exceção do galato de butila (**GA004**), que foi cerca de 4 vezes mais potente que os fármacos padrões e apresentou atividade similar a do ácido gálico (**GA001**), os demais compostos foram entre 1,3 e 2,3 vezes menos potentes que os fármacos utilizados para efeito comparativo e entre 5 e 10 vezes menos potentes que o ácido gálico.

Os compostos **GA008** e **GA009** são os únicos inativos até a dose de 100 mg/kg, um contraste notável dentro do conjunto estudado. Apesar de serem derivados de compostos que possuem atividade analgésica, como o galato de etila (**GA003**) e o ácido gálico (**GA001**), respectivamente, os compostos **GA008** e **GA009** apresentam uma característica estrutural única dentro do conjunto estudado, já que possuem os grupos hidroxila fenólicos ligados a grupamentos benzila. Neste caso, os resultados farmacológicos sugerem que os grupos fenólicos livres são essenciais para a atividade analgésica exibida pelo ácido gálico (representada pela comparação entre **GA001** e **GA009**), ou de forma mais geral, pelo ésteres simples (representada pela comparação entre **GA003** e **GA008**).

Os ésteres **GA013-GA020**, que apresentam as cadeias alcoólicas formada por fenol e seus derivados substituídos, exibem significante atividade analgésica com valores da DI_{50} sendo entre 3 e 7,5 vezes menores do que os valores da DI_{50} da aspirina e o do paracetamol.

Os ésteres que possuem cadeias alcoólicas formada por álcoois benzílicos (**GA021-GA030**) exibem potente efeito analgésico. Um destes compostos (**GA026**) foi cerca de 12 vezes mais potente que a aspirina e o paracetamol, agentes usados como analgésicos e antiinflamatórios na clínica médica. Um aspecto estrutural interessante relacionado com a atividade analgésica, que pode-se destacar nesta série em comparação com a série de ésteres

GA013-GA020, é a distância entre o oxigênio (do éster) e o anel aromático (Figura 24). No caso da série dos álcoois benzílicos, a distância é igual a 1 (grupo CH₂), em contraste com a distância zero para os ésteres derivados do fenol, que possuem o oxigênio ligado diretamente ao anel aromático. Por comparação direta, por exemplo, entre os compostos *para*-substituídos por grupos metil (**GA014** e **GA022**), verifica-se que o derivado benzílico é aproximadamente 3 vezes mais potente que o derivado fenólico correspondente. Para outros casos onde comparações são possíveis, como por exemplo, nos casos de **GA015** e **GA023** (*m*-substituídos por CH₃), **GA017** e **GA024** (*p*-substituídos por OCH₃), **GA018** e **GA028** (*m*-substituídos por Cl), **GA019** e **GA029** (*p*-substituídos por Br), esta mesma ordem de potência é seguida. A única exceção observada foi para o par **GA020** e **GA030** (*p*-substituídos por NO₂), cujo derivado benzílico foi 1,4 vezes menos potente que o correspondente derivado fenólico. Em comparação com os derivados fenéticos (**GA031-GA033**), cuja distância é igual a 2 (dois grupos CH₂), os correspondentes derivados benzílicos foram substancialmente mais potentes. Por exemplo, o galato de benzila foi cerca de cerca de 12 vezes mais potente que o galato de fenetila, já o derivado benzílico *para*-substituído por CH₃ foi cerca de 2,5 vezes mais potente que o correspondente derivado fenético. A mesma relação foi observada para os compostos *para*-substituídos por grupos OCH₃. Tais resultados sugerem que a distância de um grupo CH₂ entre o anel aromático e o oxigênio do éster parecer ser um fator importante relacionado a atividade analgésica dentro da série de análogos (**GA013-GA033**) em questão.

O composto mais ativo da série de 49 compostos avaliados farmacologicamente, o digalato **GA034** (DI₅₀ = 3,9 µmol/kg), é na relação molar cerca de 33 vezes mais potente que os fármacos padrões. Se compararmos a estrutura de **GA034** com as estruturas de **GA001** e

GA016 (frações estruturais precursoras), verifica-se que o protótipo está presente na construção estrutural contribuindo de forma significativa no composto de maior potência da série. Esta relação é ilustrada na Figura 25.

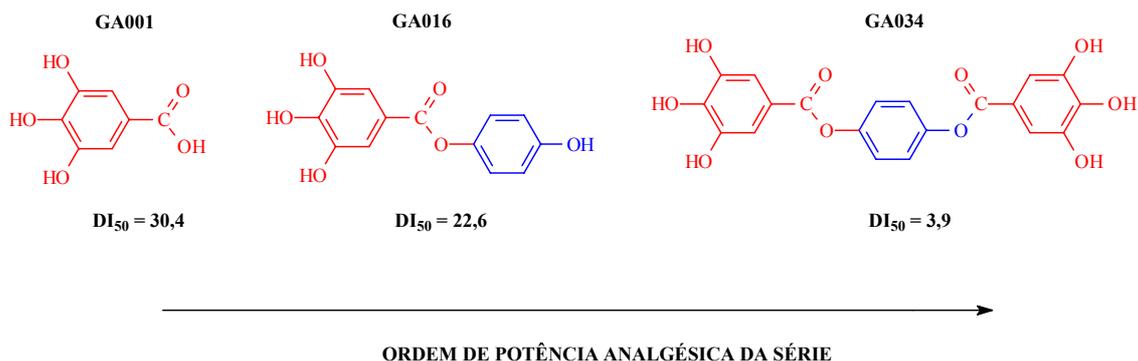


Figura 25. Estudo do efeito analgésico e correlações de SAR para os compostos relacionados estruturalmente: **GA001**, **GA016** e **GA034**. Valores da DI_{50} em $\mu\text{mol/kg}$.

As amidas derivadas do ácido gálico (**GA035-GA037**) exibem significativa atividade analgésica, sendo várias vezes mais potentes que os fármacos padrões. O composto mais potente desta série (**GA047**) foi cerca de 26 vezes mais ativo que a aspirina e o paracetamol. Um fator importante em relação a atividade analgésica observada nesta série, é a posição do substituinte no anel aromático da anilina. Por exemplo, analisando-se o par **GA042** e **GA043**, respectivamente *p*- e *m*-substituídos por grupos CH_3 , verifica-se que o derivado *meta*-substituído é o mais ativo por um fator de potência superior a 3 vezes. Observação similar ocorre nos pares **GA046** e **GA047** (*p*- e *m*-substituídos por NO_2), **GA044** e **GA045** (*p*- e *m*-substituídos por Br), **GA040** e **GA041** (*p*- e *m*-substituídos por OPh), e **GA038** e **GA039** (*p*-

e *m*-substituídos por OCH₃), onde os análogos *m*-substituídos são os mais ativos em todos os casos.

Por fim, os anidridos derivados do ácido gálico exibem efeitos analgésicos opostos. Enquanto o anidrido gálico (**GA048**) apresenta pronunciada ação analgésica, com DI₅₀ = 14,2 μmol/kg, sendo cerca de 9 vezes mais ativo que os fármacos padrões, o anidrido metil gálico (**GA049**), por sua vez, não exibe atividade analgésica importante, sendo menos ativo que os fármacos padrões e caracterizando-se como o compostos ativo de menor potência analgésica na série estudada. Pode-se observar, uma vez mais, que o protótipo contribui de forma significativa na atividade analgésica apresentada pelo composto **GA048** (Figura 24).

Os dados estrutura/atividade obtidos neste estudo foram utilizados para o desenvolvimento de um modelo preditivo de QSAR. Os resultados são apresentados no item 3.2.4. deste Capítulo da Tese.

B. Modelo de dor induzida pela formalina

O galato de metila (**GA002**), administrado por via intraperitoneal (10-300 mg/kg) ou por via oral (50-500 mg/kg), foi avaliado no modelo de dor induzida pela formalina. Os valores da DI₅₀ e da inibição máxima são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Valores da DI_{50} para o galato de metila no modelo da formalina.

Composto	Via	1ª Fase	IM ^a (%)	2ª Fase	IM ^a
		DI ₅₀ (mg/kg)		DI ₅₀	(%)
<i>GA002</i>	i.p. ^b	125,7 (103,8-152,2)	61,4 ± 4	32 (20-53)	88 ± 4
	v.o. ^c	—	42 ± 6	59,2 (40,7-86)	55 ± 7

Cada grupo representa a média de 12-16 animais. ^a Inibição máxima. ^b Intraperitoneal, ^c oral.

Como pode ser observado, o galato de metila causou inibição de forma significativa e dose dependente tanto da dor neurogênia quanto da dor inflamatória causada pela formalina, sendo contudo mais efetivo em relação a segunda fase desse modelo.

O interessante efeito analgésico exibido pelo galato de metila, nos levou a estender nossos estudos a outros compostos da série. A Tabela 12 apresenta o efeito analgésico de uma série de análogos do ácido gálico no teste da formalina.

Tabela 12. Efeito dos análogos do ácido gálico, administrados intraperitonealmente na dose de 30 mg/kg, na primeira e segunda fases da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos.

Composto	1ª Fase Inibição (%)	2ª Fase Inibição (%)
GA013	29 ± 11	Inativo
GA018	48 ± 14	Inativo
GA019	54 ± 6	8 ± 5
GA021	99 ± 1	100
GA026	50 ± 5	26 ± 16
GA037	Inativo	51 ± 7
GA040	53 ± 3	99 ± 1
GA041	51 ± 6	39 ± 5
GA047	22 ± 8	Inativo
GA048	51 ± 4	94 ± 1

Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 4-6 animais.

Os resultados farmacológicos mostram que os análogos testados inibem de forma efetiva a dor induzida pela formalina, sendo que o galato de benzila (**GA021**), o galato de *m*-fenóxibenzila (**GA026**), a *N-p*-fenóxifenilgalamida (**GA040**), a *N-m*-fenóxifenilgalamida (**GA041**) e o anidrido gálico (**GA048**) inibiram tanto a primeira quanto a segunda fase da dor induzida pela formalina. Tais resultados promissores nos levaram a avaliar a ação analgésica

destes 5 análogos administrados pela via oral, em camundongos. Os resultados são mostrados na Tabela 13.

Tabela 13. Efeito dos análogos do ácido gálico administrados oralmente, na dose de 50 mg/kg, na primeira e segunda fases da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos.

Composto	1ª Fase Inibição (%)	2ª Fase Inibição (%)
GA021	40 ± 6	34 ± 5
GA026	39 ± 9	Inativo
GA040	25 ± 11	39 ± 11
GA041	32 ± 5	17 ± 9
GA048	22 ± 8	34 ± 11

Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 4-6 animais.

Pode-se verificar que os resultados confirmam a ação antinociceptiva deste 5 análogos. Os análogos foram efetivos na nocicepção neurogênica e inflamatória causada pela formalina, quando administrados pela via oral, em camundongos. Contudo a eficácia analgésica dos derivados foi maior quando administrados pela via intraperitoneal (Tabela 12).

3.2.3. Avaliação microbiológica: atividade antifúngica

O uso de antibióticos e imunossupressivos mais efetivos aumentaram a sobrevivência e melhoraram a qualidade de vida de milhões de pacientes com diversas enfermidades no mundo todo. No entanto, o aparecimento de sérias infecções oportunistas causadas por fungos trouxeram reflexos diretos no aumento da morbidade e mortalidade ao longo das duas últimas décadas, principalmente por fatores como transplante de órgãos, evolução das infecções pelo vírus HIV e outras condições imunossupressivas sérias.¹⁷³⁻¹⁷⁵ O tratamento de tais infecções fúngicas pelos fármacos mais importantes, como por exemplo, anfotericina B e cetoconazol, tornou-se crítica em termos da perda da eficácia nos longos períodos de tratamento, toxicidade, espectro de ação e o desenvolvimento de cepas resistentes aos antifúngicos. Assim, a procura por novas classes de compostos antifúngicos é de grande importância para a clínica médica.¹⁷⁶

Com o objetivo de estender nossos estudos explorando a atividade biológica dos análogos do ácido gálico, uma série destes foi avaliada quanto a sua atividade antifúngica contra vários fungos patogênicos ao homem (Tabela 14). Ensaios de diluição em ágar¹⁴⁰ foram usados para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos análogos em concentrações entre 1 e 250 µg/mL.

Nenhum dos compostos testados (**GA001-GA010, GA013, GA019, GA020-GA026, GA029, GA031, GA036, GA037, GA042, GA048**) foi ativo até a concentração de 250 µg/mL contra as leveduras *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae* ou *Cryptococcus neoformans*, ou contra os fungos filamentosos *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* ou *Aspergillus flavus* (resultados não apresentados). Por outro lado,

resultados mais promissores foram obtidos para os compostos testados contra os fungos do grupo dos dermatófitos, causadores das dermatofitoses no homem, que são micoses superficiais que afetam indivíduos de todas as idades, através de quadros clínicos diversos, variando entre leves e graves. Os resultados da avaliação antifúngica são mostrados na Tabela 14. Valores da CIM da anfotericina B e cetoconazol, fármacos amplamente utilizados na clínica médica, foram incluídos na Tabela 14 como padrão comparativo.

Tabela 14. Valores da CIM ($\mu\text{g/mL}$) para a atividade antifúngica de uma série de análogos do ácido gálico.

Composto	<i>Microsporum canis</i>	<i>Microsporum gypseum</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Epidermophyton floccosum</i>
GA001	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
GA002	100	100	> 100	100	> 100
GA003	$50 \geq \text{CIM} > 25$	100	> 100	100	> 100
GA004	≤ 50	75	$100 \geq \text{CIM} > 50$	$50 \geq \text{CIM} > 25$	> 100
GA005	≤ 25	$50 \geq \text{CIM} > 25$	$100 \geq \text{CIM} > 50$	$50 \geq \text{CIM} > 25$	> 100
GA006	≤ 50	≤ 50	$100 \geq \text{CIM} > 50$	$50 \geq \text{CIM} > 25$	$100 \geq \text{CIM} > 50$
GA007	$50 \geq \text{CIM} > 25$	≤ 25	≤ 50	25	≤ 50
GA010	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
Anfotericina B	> 50	6,25	6,25	25	0,3
Cetoconazol	15	6,25	12,5	15	25

Como pode ser observado, de maneira geral, todos os dermatófitos analisados foram inibidos a concentrações máximas de 250 $\mu\text{g/mL}$ (com exceção de **GA010**), e em muitos casos a concentrações muitas vezes menores. Em particular, os análogos do ácido gálico

GA002-GA007, que possuem cadeias alcoólicas alquílicas crescentes nesta ordem: metil, etil, propil, butil, pentil e hexil, respectivamente, mostraram significativa atividade contra todos os dermatófitos testados, com CIMs < 100 µg/mL na maioria dos casos. Além disso, pode-se notar que estes compostos são ligeiramente mais ativos contra *M. canis* em comparação aos demais dermatófitos. Dentro da série **GA002-GA007**, o galato de hexila (**GA007**) foi o mais ativo, inibindo significativamente todos os dermatófitos testados com CIMs ≤ 50 µg/mL. Em particular, **GA007** possui atividade comparável ou pouco menor do que a apresentada pelos fármacos padrões anfotericina B e cetoconazol, e foi o único composto da série que apresentou atividade significativa contra *E. floccosum*, com CIM ≤ 50 µg/mL. Considerando-se que o protótipo (**GA001**) precursor desta série possui CIM > 100 µg/mL para todos os dermatófitos testados, sendo assim, consideravelmente menos ativo que qualquer de seus análogos da série **GA002-GA007**, nossos estudos tem o mérito da identificação de compostos com atividade antifúngica a partir de um precursor de pouca atividade. Ainda dentro desta série, a atividade antifúngica torna-se mais pronunciada a medida que a cadeia alquílica aumenta, onde o composto **GA007** foi o que apresentou o melhor perfil fungistático contra os dermatófitos testados (Tabela 14). Tal perfil interessante de atividade sugere que fatores hidrofóbicos podem estar associados a atividade antifúngica dentro desta série. Tal observação é confirmada quando analisado o composto **GA010**, que apresenta-se inativo frente a todos dermatófitos testados em concentrações de até 250 µg/mL. Em comparação com os compostos da série análoga **GA002-GA007**, o composto **GA010** é marcadamente menos hidrofóbico, assim como o próprio ácido gálico **GA001**. A Tabela 15 apresenta os valores de log *P* calculados para a série de antifúngicos em análise.

Tabela 15. Logaritmo do coeficiente de partição (P) calculado para o ácido gálico e uma série de seus análogos.

Composto	Log P^*
GA001	0,892
GA002	0,924
GA003	1,266
GA004	1,735
GA005	2,131
GA006	2,527
GA007	2,924
GA010	0,480

*calculado usando WINSIMS e Mopac.

Pode ser verificado que os valores calculados de $\log P$ crescem na série **GA001- GA007**, como resultado do aumento da cadeia alquílica. Por outro lado, para o composto **GA010**, que possui um grupo OH terminal, o valor de $\log P$ é substancialmente menor, pela característica mais hidrofílica (mais solúvel em água) desta molécula. Vale lembrar que os valores de $\log P$ calculados são uma aproximação eficaz dos valores experimentais determinados no sistema 1-octanol/água, que constitui-se em um excelente modelo amplamente usado para simular a lipofilicidade de compostos *in vivo*.

De maneira ilustrativa, o perfil do efeito do $\log P$ (Tabela 15) na atividade antifúngica dos compostos analisados é apresentado na Figura 26.

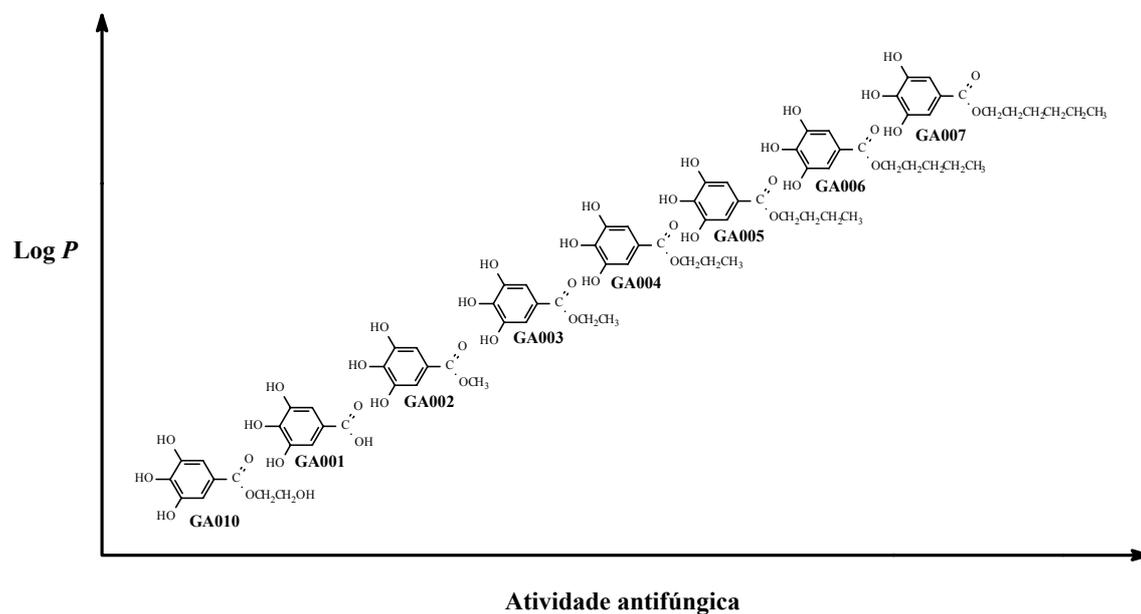


Figura 26. Efeito do $\log P$ na atividade antifúngica da série estudada.

O perfil ilustrado na Figura 26 mostra que a característica hidrofóbica é um fator importante associado a atividade antifúngica desta série de compostos. Embora o mecanismo de ação fungistática desta série análoga não seja conhecido, é importante considerar o seguinte:

- i) o principal mecanismo de ação do grupo dos poliênicos, representados pela anfotericina B, envolve a ligação da droga com a membrana citoplasmática do fungo, especificamente nos sítios contendo o ergosterol, levando a importantes alterações na permeabilidade da membrana e nutrição do fungo, resultando na inibição do crescimento fúngico (efeito fungistático) ou na formação de um poro por onde flui o conteúdo intracelular do fungo, levando a morte (efeito fungicida);

ii) por outro lado, o principal mecanismo de ação do grupo dos azólicos, como o cetoconazol, é a inibição da biossíntese do ergosterol, comprometendo a fluidez e permeabilidade da membrana citoplasmática do fungo, o que resulta na inibição do crescimento fúngico.^{174,176}

Considerando que os mecanismos de ação fungistática envolvem geralmente a interação da droga com a membrana lipídica do fungo, nossos resultados indicam nesta direção que:

- i) os compostos que apresentam o melhor perfil fungistático são os que possuem os maiores valores do $\log P$. Neste caso, claramente, quanto maior o valor do $\log P$ (mais lipofílico) maior será a interação com a membrana lipídica do fungo.
- ii) em contraste, os compostos que possuem os menores valores do $\log P$ (mais solúveis em água), **GA010**, **GA001** e **GA007**, são os menos ativos da série.

Assim pode-se sugerir que o mecanismo de ação fungistática dos análogos do ácido gálico pode envolver a ligação dos compostos a membrana citoplasmática do fungo, resultando na inibição do crescimento fúngico. Tal ligação droga-membrana fúngica é associada diretamente com as características hidrofóbicas dos antifúngicos em questão. Embora os resultados dos estudos de SAR apresentados neste trabalho possam ser úteis na identificação e entendimento estrutural mínimo necessário para a ação antifúngica, novos estudos são necessários para elucidar o mecanismo de ação antifúngica e confirmar nossas observações preliminares.

3.2.4. Modelo de QSAR para a atividade analgésica de uma série de análogos do ácido gálico

Anteriormente (itens 3.2.1. e 3.2.2., deste Capítulo) foi demonstrada a síntese e a atividade analgésica de uma série de análogos do ácido gálico. Entre estes, encontram-se compostos apresentando potência analgésica comparável ou maior do que a apresentada pela aspirina e paracetamol, fármacos padrões amplamente utilizados na terapêutica. Dentro desta série, foram coletados dados suficientes estrutura/potência para o desenvolvimento de um modelo quantitativo relacionando estrutura e atividade (QSAR). Um modelo de QSAR com poder preditivo substancial seria extremamente útil para o planejamento de novos derivados apresentando maior potência analgésica. Neste contexto, foi desenvolvido um interessante modelo de QSAR, empregando-se os valores da DI_{50} obtidos experimentalmente para a série de 49 análogos do ácido gálico (no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético). As estruturas dos compostos foram apresentadas nas Figuras 13, 15, 18-21 e 24. Os correspondentes valores medidos da DI_{50} foram mostrados na Tabela 10. O grupo de análogos examinado possui moderada diversidade estrutural. Além do próprio ácido gálico, um grupo de ésteres, amidas e anidridos derivados do ácido gálico, compõem o conjunto. Este conjunto de derivados apresenta valores da DI_{50} que variam de 3,91 a 999 $\mu\text{Mol/Kg}$, um fator de potência de 255 vezes.

Para o propósito da modelagem, o conjunto de dados foi dividido em três sub-conjuntos arbitrários, dois destes contendo 16 e um terceiro contendo 17 compostos. O primeiro sub-conjunto contém aqueles compostos **001**, **004**, **007** e **010**... da Tabela 16; o segundo contém aqueles compostos **002**, **005**, **008** e **011**... da Tabela 16; o terceiro contém aqueles compostos

003, 006, 009 e 012... da Tabela 16; e assim por diante seguindo esta ordem. A propriedade usada na modelagem foi o logaritmo da potência analgésica, com valores dentro do limite: $0,59 \leq \log DI_{50} \leq 3,00$; estendendo-se por duas ordens e meia de grandeza. O erro padrão da medida experimental da potência analgésica é estimado por ser $\pm 0,2$ unidades logarítmicas. Três frações de modelos de QSAR foram desenvolvidos, cada uma empregando como conjunto treino uma das três possíveis combinações de dois dos três sub-conjuntos. O conjunto remanescente foi, em cada caso, empregado como conjunto teste. Portanto, 32 ou 33 compostos foram empregados no conjunto treino para predizer valores do $\log DI_{50}$ para 16 ou 17 compostos, respectivamente, como membros do conjunto teste. Cada composto apareceu uma única vez no conjunto teste (valor predito) e duas vezes no conjunto treino (valor estimado). Quando os três modelos foram completados, o valor do $\log DI_{50}$ foi estimado duas vezes para cada composto como membro do conjunto treino, e predito uma única vez para cada composto membro do conjunto teste.

A Figura 27 ilustra uma representação das 3 combinações de sub-conjuntos empregadas como conjunto treino (círculos azuis) e o sub-conjunto empregado como conjunto teste (círculos vermelhos) para cada um dos três modelos de QSAR desenvolvidos.

	1 ^o Modelo	2 ^o Modelo	3 ^o Modelo
s	16	16	16
u	16	16	16
b	16	16	16
-	16	16	16
c	16	16	16
o	16	16	16
n	16	16	16
j	16	16	16
u	16	16	16
n	16	16	16
t	16	16	16
o	16	16	16
s	16	16	16

Figura 27. Diferentes combinações dos sub-conjuntos empregados em cada um dos três modelos de QSAR desenvolvidos. Cada modelo emprega 2 sub-conjuntos como conjunto treino (circulos azuis) e 1 sub-conjunto como conjunto teste (circulos vermelhos).

Basicamente, os valores estimados são obtidos a partir das correlações realizadas para os compostos pertencentes ao conjunto treino, nos quais são conhecidos os descritores moleculares, as estruturas químicas e os valores medidos correspondentes da DI_{50} . Os valores preditos (onde os valores medidos da DI_{50} não são conhecidos durante o processo de modelagem de QSAR) são obtidos empregando-se estatística avançada baseada nos dados do conjunto treino, das estruturas químicas e dos descritores moleculares calculados para os compostos pertencentes aos conjuntos teste. A Figura 28 apresenta as relações envolvidas entre o conjunto treino e teste, no processo de modelagem.

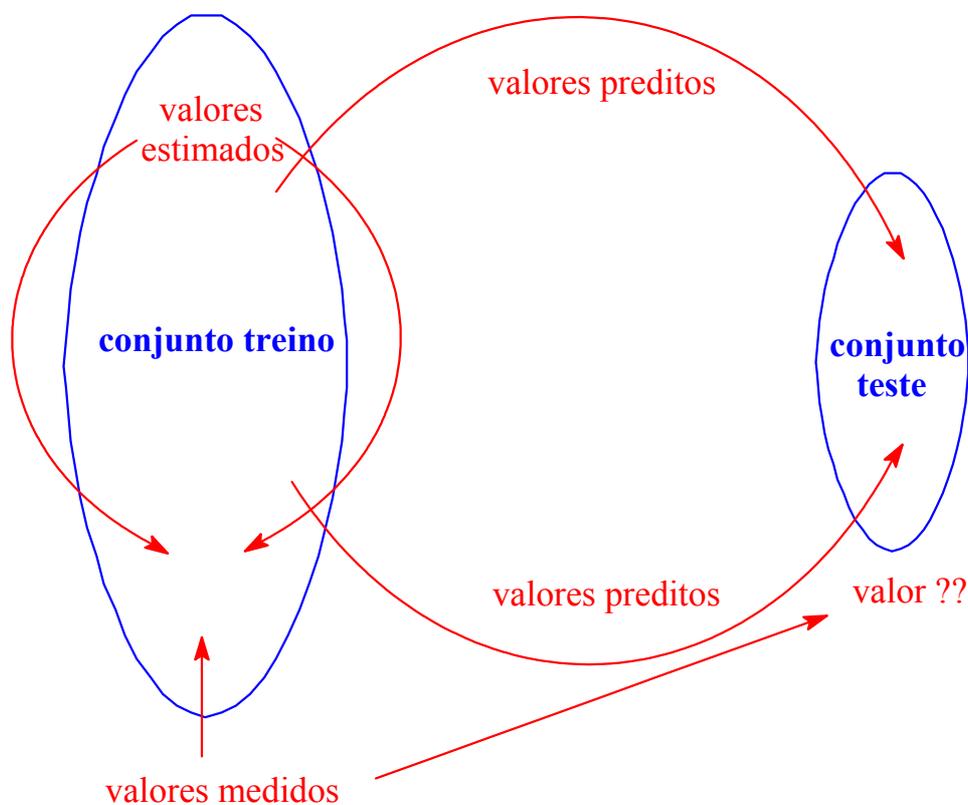


Figura 28. Relações básicas envolvidas no processo de modelagem de QSAR. O conjunto treino, do qual obtem-se os valores estimados, é empregado para prever os valores da DI_{50} para os compostos pertencentes ao conjunto teste.

Para cada composto do conjunto de dados, os valores medidos, estimados e preditos do $\log DI_{50}$ são mostrados na Tabela 16, e são apresentados como a média de dois valores estimados e um valor predito único. A diferença entre os valores medidos e estimados ou preditos está incluída também na Tabela 16. Os resultados da modelagem são apresentados graficamente na Figura 29, através da representação do logaritmo dos valores estimados e preditos da DI_{50} contra os correspondentes valores medidos.

Tabela 16. Valores medidos, estimados e preditos da potência analgésica de uma série de análogos do ácido gálico.

Composto	DI₅₀ (μmol/kg)	log DI₅₀ Medido	log DI₅₀ Estimado^a	log DI₅₀ Predito	Δ Estimado^b	Δ Predito^c
GA001	30,4	1,48	1,51	1,50	-0,03	-0,02
GA002	242,0	2,38	2,31	2,27	0,07	0,11
GA003	175,1	2,24	2,22	2,21	0,02	0,03
GA004	190,6	2,28	2,25	2,32	0,03	0,03
GA005	30,97	1,49	1,70	1,76	-0,21	-0,27
GA006	223,84	2,35	2,26	2,07	0,09	0,28
GA007	307	2,49	2,35	2,17	0,14	0,32
GA008	999	3,00	2,95	2,97	0,05	0,03
GA009	999	3,00	2,99	2,81	0,01	0,19
GA010	28,7	1,46	1,63	1,56	-0,23	-0,10
GA011	73,45	1,86	1,95	1,86	-0,09	0
GA012	89,42	1,95	2,04	2,04	-0,09	-0,09
GA013	46,2	1,66	1,65	1,64	0,01	0,02
GA014	43,26	1,63	1,56	1,59	0,07	0,04
GA015	39,48	1,60	1,48	1,47	0,12	0,13
GA016	22,59	0,96	1,18	1,15	-0,22	-0,19
GA017	43,76	1,64	1,55	1,61	0,09	0,03
GA018	39,26	1,59	1,47	1,36	0,12	0,23
GA019	17,51	1,24	1,41	1,23	-0,17	0,01

GA020	17,96	1,25	1,31	1,26	-0,06	-0,01
GA021	31,16	1,49	1,58	1,55	-0,09	-0,06
GA022	15,55	1,19	1,41	1,44	-0,22	-0,25
GA023	20,15	1,30	1,46	1,46	-0,16	-0,16
GA024	15,14	1,18	1,35	1,39	-0,17	-0,21
GA025	39,50	1,60	1,47	1,41	0,13	0,19
GA026	10,85	1,03	1,08	0,98	-0,05	0,05
GA027	21,05	1,32	1,43	1,49	-0,11	-0,17
GA028	17,62	1,25	1,36	1,43	-0,11	-0,18
GA029	12,62	1,10	1,32	1,38	-0,22	-0,28
GA030	24,5	1,39	1,29	1,37	0,10	0,02
GA031	171,67	2,23	1,95	1,90	0,28	0,33
GA032	37,87	1,58	1,66	1,58	-0,08	0
GA033	46,93	1,67	1,67	1,51	0	0,16
GA034	3,91	0,59	0,57	0,57	0,02	0,02
GA035	23,60	1,37	1,36	1,37	0,01	0
GA036	15,20	1,18	1,22	1,37	-0,04	-0,19
GA037	27,79	1,44	1,33	1,33	0,11	0,11
GA038	29,17	1,46	1,59	1,59	-0,13	-0,13
GA039	17,16	1,23	1,27	1,32	-0,04	-0,09
GA040	11,66	1,07	1,01	0,95	0,06	0,12
GA041	6,63	0,82	0,84	0,96	-0,02	-0,14
GA042	35,50	1,55	1,35	1,27	0,20	0,28

GA043	11,46	1,06	1,10	1,11	-0,05	-0,05
GA044	12,73	1,10	1,10	1,23	0	-0,12
GA045	11,24	1,05	1,11	1,04	-0,06	0,01
GA046	14,28	1,15	1,06	1,09	0,09	0,06
GA047	4,90	0,69	0,91	0,91	-0,22	-0,22
GA048	14,23	1,15	1,14	0,86	0,01	0,29
GA049	229,8	2,36	2,23	2,13	0,13	0,23

^a Média de duas estimativas. ^b A diferença entre o logaritmo do valor medido e estimado. ^c A diferença entre o logaritmo do valor medido e predito.

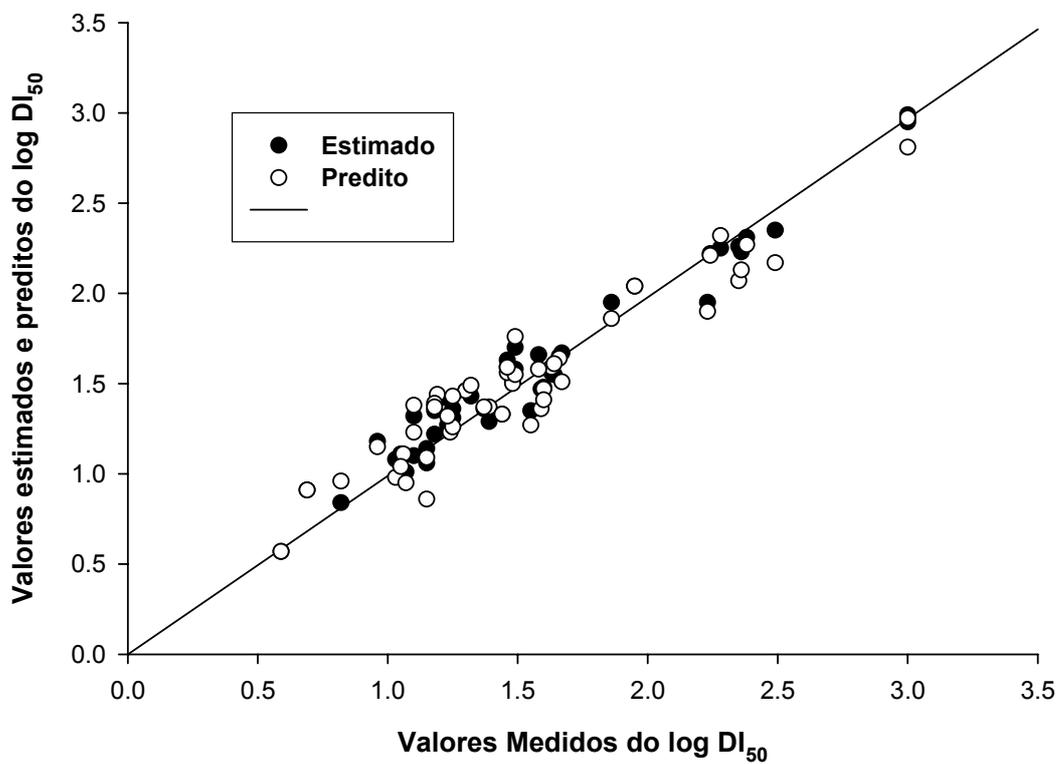


Figura 29. Gráfico dos valores medidos do $\log DI_{50}$ contra os correspondentes valores estimados e preditos para um conjunto de análogos do ácido gálico.

O modelo de QSAR criado neste estudo é bastante satisfatório (Tabela 16 e Figura 29). O modelo correlaciona os dados muito bem. Para todos os 49 compostos do conjunto de dados, os valores estimados da potência analgésica para os membros do conjunto treino diferem dos valores medidos por menos de 1,5 vezes o desvio padrão do erro experimental de medida ($\pm 0,2$ unidades logarítmicas). O modelo criado apresenta também bom poder preditivo para a potência analgésica para aqueles compostos membros do conjunto teste. Para somente 2 dos 49 compostos, os valores preditos diferem dos valores medidos por mais de 1,5 vezes o desvio padrão do erro experimental da medida. Contudo, os valores preditos para estes dois compostos encontram-se próximos deste limite: 1,60 vezes o desvio padrão para o compostos **GA007** e 1,65 vezes o desvio padrão para o composto **GA031**. Não existem valores fora destes limites.

A princípio, este é um conjunto de dados difícil de ser modelado satisfatoriamente. Deve-se considerar alguns pontos importantes. Primeiro, o conjunto de dados é baseado em um ensaio de potência analgésica *in vivo*, sofrendo assim a variação natural de animal para animal, portanto, suscetível a um erro experimental acompanhado de variações não pertinentes de medida. Segundo, o mecanismo de analgesia dos derivados do ácido gálico estudados não é conhecido, desta forma, é possível que exista mais de um mecanismo envolvido para os diferentes compostos pertencentes ao conjunto. Terceiro, na série estuda encontram-se ésteres, amidas e anidridos derivados do ácido gálico. Como tais moléculas orgânicas, são susceptíveis a hidrólise enzimática e não enzimática, rendendo o ácido gálico, um composto analgésico ativo. Assim, estes compostos possuem atividade analgésica própria (observe que muitos são substancialmente mais potentes que o próprio ácido gálico) e possivelmente atuam conjuntamente como pró-drogas para o ácido gálico. Por fim, o acesso

de cada um destes compostos ao sítio da atividade analgésica pode variar de composto para composto.

Apesar dos desafios apresentados por este conjunto de dados, o processo de modelagem de QSAR, como notado através dos resultados apresentados, foi bem sucedido. O modelo de QSAR desenvolvido, é promissor como guia para futuras pesquisas em Química Medicinal, envolvendo o planejamento e a síntese de novos compostos análogos do ácido gálico.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSÕES

- ◆ A espécie *I. pes-caprae*, coletada na praia de Jurerê Internacional no estado de Santa Catarina, produz muitos compostos ativos, como demonstrado através dos estudos fitoquímicos e farmacológicos, como por exemplo, a ação antinociceptiva da glochidona, acetato de α - e β -amirina, ácido betulínico, isoquercitrina e solasodina, além dos estudos farmacológicos do extrato metanólico e das frações acetato de etila e aquosa. A identificação das propriedades analgésicas dos diferentes constituintes de *I. pes-caprae*, confirma, pelo menos em parte, o seu uso na medicina popular no combate a diferentes doenças, em particular, aquelas associadas à processos dolorosos e inflamatórios;
- ◆ Os estudos farmacológicos e de SAR mostraram alguns fatores estruturais importantes relacionados a atividade analgésica dos análogos do ácido gálico. Tais fatores poderão contribuir no futuro para a síntese de novos compostos mais potentes e seletivos, assim como, para a elucidação do mecanismo de ação analgésica desta classe de compostos;
- ◆ A avaliação antifúngica e os estudos de SAR para uma série de análogos do ácido gálico são promissores na identificação e entendimento estrutural mínimo necessário para a ação antifúngica desta classe de compostos;
- ◆ O modelo de QSAR desenvolvido para a atividade analgésica dos análogos do ácido gálico é promissor para futuras pesquisas envolvendo o planejamento e a síntese de novos análogos apresentando potente ação analgésica.

CAPÍTULO V

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Foye, O.W.; Lemke, T.L.; Williams, D.A. *Principles of Medicinal Chemistry*, 4^a Edição, Williams & Wilkins, Media, Philadelphia, págs. 1-11, **1995**.
2. Burger, A. *Medicinal Chemistry*, 3^a Edição, Wiley-Interscience, New York, págs. 2-10, **1970**.
3. Kapoor, L.D. *Handbook of Ayurvedic Medicinal Plants*, CRC Press, Inc., Florida, págs. 256-257, **1990**.
4. James, L.F.; Keeler, R.F.; Bailey, Jr., E.M.; Cheek, P.R.; Hegarty, M.P. *Poisonous Plants: Proceedings of the Third International Symposium*, Iowa State University Press, Iowa, pág. 76, **1992**.
5. Iwu, M.M. *Handbook of African Medicinal Plants*, CRC Press, Inc., Florida, págs. 152-154, **1993**.
6. Mann, J. *Murder, Magic and Medicine*, Oxford University Press, Oxford, **1996**.
7. Mann, J. *Poison, Potions and Pharmacy*, Chemistry Reviews, 2-9, **1994**.
8. Bisset, N.G.; Leeuwenberg, A.J.M. *Lloydia*, 31, 208-217, **1969**.
9. Bisset, N.G.; Khalik, A.A. *Phytochemistry*, 15, 1973-1976, **1976**.
10. Aronson, J.K. *The Discovery of Foxglove as a Therapeutic Agent*, Chemistry in Britain, 23, pág. 33, **1987**.
11. Balick, M.J.; Cox, P.A. *Plants, People and Culture*, Scientific American Library, New York, **1997**.
12. Fawell, W.N.; Thompson, G. *N. Engl. J. Med.*, 289, 108-109, **1973**.

13. Pecevski, J.; Savkovic, N.; Radivojevic, D.; Vuksanovic, L. *Toxicol. Lett.*, **7**, 239-244, **1980**.
14. Farnsworth, N.R. *Plants and Modern medicine: Where Science and Folklore Meet, Traditional Medicine*, World Health Forum, **6**, 76, **1985**.
15. Ganellin, C.R.; Roberts, S.M. *Medicinal Chemistry: The Role of Organic Chemistry in Drug Research*, 2^a edição, Academic Press Inc., San Diego-CA, págs. 121-125, **1993**.
16. Atta-ur-Rahman; Choudhary, M.I. *Pure Appl. Chem.*, **71**, 1079-1081, **1999**.
17. Yunes, R.A.; Pedrosa, R.; Cechinel Filho, V. *Quím. Nova*, **24**, 147-152, **2001**.
18. IUPAC, *Pure and Appl. Chem.*, **68**, 2325-2332, **1996**.
19. Pandey, R.C. *Xechem, Inc., Research Laboratories: Pharmaceuticals from Natural Sources*, págs. 333-346, **1998**.
20. Hamburger, M.; Hostettmann, K. *Phytochemistry*, **30**, 3864-3874, **1991**.
21. Matos, F.J.A. *Introdução à Fitoquímica Experimental*. Fortaleza: EUFC, **1988**.
22. Braz Filho, R. *Quím. Nov.*, **17**, 405-445, **1994**.
23. Valette, C. *Riquezas Mediciniais da Flora Brasileira*. São Paulo: Editora Cupolo, **1940**.
24. Correa, M. P. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil, e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: MEC, **1975**.
25. Lainetti, R.; Brito, N.R.S. *A Saúde Pelas Plantas e Ervas do Mundo Inteiro*. Rio de Janeiro: Ed. TecnoPrint, **1980**.
26. Oliveira, M.; Adeodato, S.; Modernell, R. *Globo Ciência*, **3**, 32-39, **1992**.
27. *Biotechnology Law Report*, 582, july-august, **1995**.

28. Pandey, R.C.; Yankov, L.K.; Poulev, A.; Nair, R.; Caccamese, S. *J. Nat. Prod.*, *61*, 57-63, **1998**.
29. Boyd, M.R.; Pauli, K. D. *Drug Develop. Res.*, *34*, 91-109, **1995**.
30. Bull, A.T.; Goodfellow, M.; Slater, J.H. *Ann. Rev. Microbiol.*, *46*, 219-252, **1992**.
31. Heinstein, P.F.; Chang, C.J. *Annu. Rev. Plant. Phys.*, *45*, 663-674 **1994**.
32. Burt, C.; Richards, W.G.J. *Comput.-Aided Mol. Design*, *4*, 231-238, **1990**.
33. Ono, M.; Kawasaki, T.; Miyahara, K. *Chem. Pharm. Bull.*, *37*, 3209-3213, **1989**.
34. Bieber, L. W.; da Silva Filho, A. A.; Correa Lima, R. M. O. *Phytochemistry*, *25*, 1077-1081, **1986**.
35. Hofmann, A. *Planta Med.*, *12*, 341-352, **1964**.
36. Genest, K.; Sahasrabudhe, M. R. *Economic Botany*, *20*, 416-428, **1966**.
37. Banerjee, S. K.; Bhatnagar, S. P. *Indian J. Pharm.*, *36*, 44-46, **1974**.
38. Nikolin, B.; Nikolin, A. *Acta Pharm. Jug.*, *21*, 109-112, **1971**.
39. Anaya, A. L.; Calera, M. R.; Mata, R.; Pereda-Miranda, R. *J. Chem. Ecol.*, *16*, 2145-2152, **1990**.
40. Schroder, H.C.; Merz, H.; Steffen, R.; Muller, W.F.G.; Sarin, P.S.; Trumm, S.; Schulz, J.; Eich, E.Z. *Naturforsch*, *45*, 1215-1221, **1990**.
41. Mollneux, R.J.; James, L.F. *Science*, *216*, 190-191, **1982**.
42. Bieber, L.W.; Lima, R.M.O.C.; Chiappeta, A.A.; Nascimento, S.C.; Veith, H.J. *Phytochemistry*, *25*, 1077-1081, **1986**.
43. Burka, L.T.; Kuhnert, L.; Wilson, J.B.; Harris, T.M. *J. Am. Chem. Soc.*, *99*, 2302-2305, **1977**.

44. Assis, C.; Toledo, C. B.; Neto, S. R.; Cordeiro, I. *Nossas Plantas (Mata Atlântica)*, Ed. FTD S.A., São Paulo, págs. 66-67, **1994**.
45. Wasuwat, S. *Nature*, 225, 758-758, **1970**.
46. Kahn, M.M.; Ahmad, F.; Rastogi, A.K.; Kidwai, J.R.; Lakshmi, V.; Bhakuni, D.S. *Fitoterapia*, 65, 231-235, **1994**.
47. Pongprayoon, U.; Baeckstrom, P.; Jacobsson, U.; Lindstrom, M.; Bohlin, L. *Planta Med.*, 57, 515-518, **1991**.
48. Pongprayoon, U.; Baeckstrom, P.; Jacobsson, U.; Lindstrom, M.; Bohlin, L. *Phytoter. Res.*, 6, 104-107, **1992**.
49. Pongprayoon, U.; Bohlin, L.; Wasuwat, S. *J. Ethnopharmacol.*, 35, 65-69, **1991**.
50. Bendis, I. *Pharmacy Times*, November, 86-90, **1997**.
51. Andersen Consulting, Pharmaceutical & Medical Products, Drug Discovery: The Quest for Innovation and Productivity, **1997**.
52. DiMasi, J.; Hansen, R.W.; Grabowski, H.G.; Lasagna, L. *J. Health Econ.*, 10, 107-142, **1991**.
53. Engel, S.; Jalkiewicz, J.F. *Medical Advertising News*, 12, 10-16, **1993**.
54. Nichols, N.A. *Harvard Business Review*, January-February, 89-99, **1994**.
55. Binder, G.M. *Harvard Business Review*, September–October, 47-50, **1994**.
56. The Pharmaceutical Industry, *The Economist*, February, 1-17, **1998**.
57. Pharmaceutical Researchers and Manufacturers of America, PhRMA, Industry Profile, Washington DC, March, **1997**.
58. Kleinberg, M.L. & Wanke, L.A. *Am. J. Health-Syst. Pharm.*, 52, 1323-1336, **1995**.

59. Roussel, P.A., Soad, K.N., Erickson, T.J. Third Generation R&D Harvard Business School Press, Cambridge, MA, **1991**.
60. Klimstra, P.D.; Raphael, A.T. *Res. Technol. Mang.*, *35*, 22-28, **1992**.
61. Cordell, G.A. *Phytochemistry*, *55*, 463-480, **2000**.
62. Thayer, A.M. *C&EN*, February, 25-37, **1998**.
63. Drews, J. *Science*, *287*, 1960-1964, **2000**.
64. Hansch, C.; Muir, R.M.; Fujita, T.; Maloney, P.P.; Geiger, E.; Streich, M. *J. Am. Chem. Soc.*, *85*, 2817-2824, **1963**.
65. Hansch, C.; Fujita, T. *J. Am. Chem. Soc.*, *86*, 1616-1626, **1964**.
66. Hansch, C. *J. Am. Chem. Soc.*, *19*, 1-6, **1976**.
67. van de Waterbeemd, H. *Quant. Struct.-Act. Rel.*, *11*, 200-204, **1992**.
68. van de Waterbeemd, H. *Drug Discov.*, *9*, 277-281, **1993**.
69. Hansch, C.; Hoekman, D.; Gao, H. *Chem. Rev.*, *96*, 1045-1075, **1996**.
70. Hansch, C., Leo, A. Exploring QSAR: Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology, Heller, S.R., Ed., American Chemical Society, Washington, DC, USA, **1995**.
71. Cordes, E.H. Drug Discovery: Innovation, Consulting Documents, **1999**.
72. Cordes, E.H.; Frazer, J.W. The QSAR Paradigm, Kodak Scientific Computing Team (SCT), USA, **1998**.
73. Cordes, E.H.; Frazer, J.W. Creating Predictive QSAR Models: The Beginnings of an Algorithm, Kodak Scientific Computing Team, USA, **1998**.
74. Frazer, J.W.; Cordes, E.H. A New QSAR Modeling Paradigm, Kodak Scientific Computing Team, USA, **1997**.

75. Cechinel Filho, V.; Yunes, R.A. *Quím. Nov.*, *21*, 99-105, **1998**.
76. Sarel, S.; Mechoulam, R.; Agranat, I. *Trends in Medicinal Chemistry' 90*, Blackwell Scientific Publications, Massachusetts, USA, **1992**.
77. Silverman, R.B. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, Academic Press, Inc, California, USA, **1992**.
78. Patrick, G.L. *An Introduction to Medicinal Chemistry*, Oxford Press, Inc, New York, USA, **1995**.
79. Calixto, J.B.; Santos, A.R.S.; Cechinel Filho, V.; Yunes, R.A. *Med. Res. Rev.*, *18*, 225-258, **1998**.
80. Okuda, T.; Yoshida, T; Hatano, T. *Plant Research*, vol. 5, Academic Press, California, pág. 129, **1991**.
81. Chung, K.T.; Chou, M.W. *Food Chem. Toxicol.*, *36*, 1053-1060, **1998**.
82. Huang, M.; Chang, R.L.; Wood, A.W.; Newmark, H.L; Sayer, J.M.; Yagi, H.; Jerina, D.M.; Conney, A.H. *Carcinogenesis*, *6*, 1127-1133, **1985**.
83. Sakaguchi, N.; Inoue, M.; Isuzugawa, K.; Ogihara, Y.; Hosaka, K. *Biol. Pharm. Bull.*, *22*, 471-475, **1999**.
84. Inoue, M.; Suzuki, R.; Sakaguchi, N.; Li, Z.; Takrda, T.; Ogihara, Y.; Jiang, B.Y.; Chen, Y. *Biol. Pharm. Bull.*, *18*, 1526-1530, **1995**.
85. Inoue, M.; Suzuki, R.; Koide, T.; Sakaguchi, N.; Ogihara, Y.; Yabu, Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *204*, 898-904, **1994**.
86. Roy, G.; Lombardía, M.; Palacios, C.; Serrano, A.; Cespón, C.; Ortega, E.; Eiras, P.; Lujan, S.; Revilla, Y.; Gonzales-Porqué, P. *Arch. Biochem. Biophys.*, *383*, 206-214, **2000**.

87. Kuzoe, F.A.S. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 24, 706-711, **1993**.
88. Paulino, N. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, pág. 156, **1996**.
89. Paulino, N.; Cechinel Filho, V.; Yunes, R.A.; Calixto, J.B. *J. Pharm. Pharmacol.*, 48, 1158-1163, **1996**.
90. Kane, C.J.M.; Menna, J.H.; Yeh, Y.C. *Biosci. Rep.*, 8, 85-94, **1988**.
91. Bailey, A.E.; Asplund, R.O.; Ali, M.S. *J. Nat. Prod.* 49, 1149-1150, **1986**.
92. Elford, H.L.; Wamper, G.L.; Van't Riet, B. *Cancer Res.*, 39, 844-851, **1979**.
93. Ayoub, S.M.H. *Planta Med.*, 46, 181-183, **1982**.
94. Bashir, A.K.; Sulaiman, S.M.; el-Sheikh, S.H.; el-Kheiry, Y.M. *Fitoterapia*, 58, 51-58, **1987**.
95. Dzedzic, S.Z.; Robinson, J.L.; Hudson, B.U.F. *Biosci. Rep.*, 6, 1027-1029, **1986**.
96. Cusano, F.; Capozzi, M.; Errico, G. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 17, 308-309, **1987**.
97. Franzone, J. S.; Natale, T.; Cirillo, R.; Torrielli, M.V. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 56, 2439-2444, **1980**.
98. Nakadate, T.; Yamamoto, S.; Aizu, E.; Kato, R. *Gann*, 75, 214-222, **1984**.
99. Fickweiler, E.; Barth, J.; Mockel, P. *Pharmazie*, 41, 671-671, **1986**.
100. Christow, S.; Luther, H.; Ludwig, P.; Gruner, S.; Schewe, T. *Pharmazie*, 46, 282-283, **1991**.
101. Ikuro, A.; Seki, T., Noguchi, H. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 270, 137-140, **2000**.
102. Ikuro, A.; Kashiwagi, K.; Nogushi H. *FEBS Lett.*, 483, 131-134, **2000**.
103. Horgen, F.D.; Madulid, D.A.; Angerhofer, C.K.; Pezzuto, J.M.; Soerjato, D.D.; Farnsworth, N.R. *Phytomedicine*, 4, 352-356, **1997**.

104. Saxena, G.; Mc Cutcheon, A.R.; Farmer, S.; Towers, G.H.N.; Hancock, R.E.W. *J. Ethnopharmacol.*, *42*, 95-99, **1994**.
105. Su, J.D.; Osawa, T.; Kawakishi, S.; Namiki, M. *Phytochemistry*, *27*, 1315-1319, **1988**.
106. Kane, C.J.M.; Menna, J.H.; Sung, C.C.; Yeh, Y.C. *Biosci. Rep.*, *8*, 95-102, **1988**.
107. Nakayama, T.; Hiramitsu, M.; Osawa, T.; Kawakishi, S. *Mutat. Res.*, *301*, 29-34, **1993**.
108. Ferreira, J.; Coloma, L.; Fones, E.; Letelier, M.E.; Repetto, Y.; Morello, A.; Aldunate, J. *FEBS Lett.*, *234*, 485-488, **1988**.
109. Kroes, B.H.; van den Berg, A.J.J.; van Ufford, H.C.; van Dijk, H.; Labadie, R.P. *Planta Med.*, *58*, 499-505, **1992**.
110. Grichnert, T.; Pospisil, F.; Veleminsky, V.; Volkeova, V.; Volke, J. *Folia Microbiol.*, *32*, 55-62, **1987**.
111. Mirvish, S.S.; Cardesa, A.; Wallcave, L.; Shubik, P. *J. Natl. Cancer Inst.*, *55*, 633-636, **1975**.
112. Woll, K.H.; Leibowitz, M.D.; Neumcke, B.; Hille, B. *Pflugers Arch.*, *410*, 632-640, **1987**.
113. Santos, A.R.S.; De Campos, R.O.P.; Miguel, O.G.; Cechinel Filho, V.; Yunes, R.A.; Calixto, J.B. *Eur. J. Pharmacol.*, *379*, 7-17, **1999**.
114. Paulino, N.; Pizollatti, M.G.; Yunes, R.A.; Cechinel Filho, V.; Creczynski-Pasa, T.B.; Calixto, J.B. *Arch. Pharmacol.*, *360*, 331-336, **1999**.
115. Weast, R.C.E.; Astle, M.J. *CRC. Handbook of Data on Organic Compounds*, vol. 2. Florida: CRC Press, Inc., **1987**.
116. Ganguly, A.K.; Govindacari, P.A.; Mohamed, A.D.; Rahimilla, A.D.; Viswanathan, N. *Tetrahedron*, *22*, 1513-1599, **1966**.

117. Seo, S.; Tomita, Y.; Tori, K. *J. Am. Chem. Soc.*, *103*, 2075-2080, **1981**.
118. Knight, S. A. *Org. Magn. Reson.*, *6*, 603-611, **1974**.
119. Calixto, J. B.; Miguel, O.G.; Yunes, R.A.; Rae, G.A. *Planta Med.*, *56*, 31-35, **1990**.
120. Niero, R.; Amaral, F.L.; Pizzolatti, M.G.; Calixto, J.B.; Cechinel Filho, V.; Delle-Monache, F.; Yunes, R.A. *Acta Farm. Bon.*, *15*, 239-242, **1996**.
121. Hess, S.C.; Brum, R.L.; Honda, N.K.; Cruz, A.B.; Moretto, E.; Cruz, R.C.B.; Messana, I.; Ferrari, F.; Cechinel Filho, V.; Yunes, R.A. *J. Ethnopharmacol.*, *47*, 97-100, **1995**.
122. Sholichin, M.; Yamasaki, K.; Kasai, R.; Tanaka, O. *Chem. Pharm. Bull.*, *28*, 1006-1008, **1980**.
123. Chen, L.J.; Hrazdina, G. *Phytochemistry*, *20*, 297-303, **1981**.
124. Marbry, T.J.; Markham, K.R.; Thomas, M.B. *The Systematic Identification of Flavonoids*, 363-363, **1970**.
125. Lenga, R.E. The Sigma-Aldrich of Chemical Safety Data, 1^a Edição, **1995**.
126. Ripperger, H.; Porzel, A. *Phytochemistry*, *31*, 1837-1839, **1992**.
127. Collier, R.F.; Dinnen, H.O.J.; Johnson, C.A.; Schneider, C. *Br. J. Pharmacol.*, *32*, 295-310, **1968**.
128. Hunskar, S.; Fasmal, O.B.; Hole, K. *J. Neurosci. Meth.*, *14*, 69-76, **1985**.
129. Hunskar, S.; Hole, K. *Pain*, *30*, 103-114, **1987**.
130. Vogel, A.I. A Text-Book of Practical Organic Chemistry, 3^a Edição John Wiley & Sons Inc., págs. 780-782, **1966**.
131. Christiansen, W.G. *J. Am. Chem. Soc.*, *48*, 1358-1365, **1926**.

132. Kang, S.S.; Kim, J.S.; Kim, E.M.; Yung-Choi, H.S. *Kor. J. Pharmacogn*, 22, 215-218, **1991**.
133. Yun-Choi, H.S.; Kang, S.S.; Kim, M.H.; Chung, K.H. *Yakhak Hoeji*, 37, 453-457, **1993**.
134. Yung-Choi, H.S.; Kim, M.H.; Jung, K.H. *Arch. Pharm. Res.*, 19, 66-70, **1996**.
135. Morris, G.S.; Riemenschneider, R.W. *J. Am. Chem. Soc.*, 68, 500-5001, **1946**.
136. Clinton, R.O.; Geissman, T.A. *J. Am. Chem. Soc.*, 65, 85-87, **1943**.
137. Fisher, E.; Bergmann, M.; Lipschitz, W. *Ber.*, 51, 45-49, **1918**.
138. Feldman, K.S.; Quideau, S.; Appel, H.M. *J. Org. Chem.*, 61, 6656-6665, **1996**.
139. Traynor, J. *Protocols for Pharmacological Assays*, 2^o Edition, University of Michigan, **1995**.
140. Zacchino, S.; Rodríguez, G.; Pezzenati, G.; Orellana, G. *J. Nat. Prod.*, 60, 659-662, **1997**.
141. Frazer, J.W.; Heckler, C.E.; Honton, J.; Mattes, K. *Abstr. Am. Chem. Soc.*, 210:48-Comp, Part 1, Agosto, **1995**.
142. Farutin, V.; Materson, L.; Andricopulo, A.D.; Chemg, J.; Riley, B.; Hakimi, R.; Frazer, J.W.; Cordes, E.H. *J. Med Chem.*, 42, 2422-2431, **1999**.
143. Andricopulo, A.D.; Yunes, R.A.; Cechinel Filho, V.; Nunes, R.J.; Frazer, J.W.; Cordes, E.H. *Pharmazie*, 54, 698-704, **1999**.
144. Andricopulo, A.D.; Yunes, R.A. *Chem. Pharm. Bull.*, 49, 10-17, **2001**.
145. Breneman, C.M.; Rhem, M. *J. Comp. Chem.*, 18, 182-197, **1997**.
146. Breneman, C.M.; Thompson, T.; Rhem, M.; Dung, M. *Computers Chem.*, 19, 161-179, **1995**.
147. WINSIMS 3.1: Copyright by Eastman Kodak Company, **1997**.

148. PERCOLATOR 62: A Macro Sequencing Program for the Generation of Qualified Matrices of Models for Property Prediction and Optimization. Copyright by Eastman Kodak Company, **1998**.
149. Madeira, A.O.; Berti, C.; Souza, M.M.; Cechinel Filho, V.; Krogh, R. *II Seminário Integrado de Iniciação Científica*, pág. 127, Itajaí (UNIVALI), **1997**.
150. Santos, A.R.S.; Niero, R.; Cechinel Filho, V.; Yunes, R.A.; Pizzolatti, M.G.; Delle-Monache, F.; Calixto, J.B. *Planta Med.*, *61*, 329-332, **1995**.
151. Meyre Silva, C.; Mora, T.C.; Biavatti, M.W.; Santos, A.R.S.; Dal Magro, J.; Yunes, R.A.; Cechinel Filho, V. *Phytomedicine*, *5*, 109-113, **1998**.
152. Cechinel Filho, V.; Vaz, Z. R.; Zunino, L.; Calixto, J. B.; Yunes, R. A. *Eur. J. Med. Chem.*, *31*, 833-839, **1996**.
153. Hess, S.C.; Brum, R.L.; Honda, N.K.; Cechinel Filho, V.; Pizzolatti, M.G.; Yunes, R.A.; Santos, A.R.S.; Calixto, J.B. XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Florianópolis, pág. 97, Brasil, **1996**.
154. Cechinel Filho, V.; Santos, A.R.S.; Campos, R.O.P.; Miguel, O.G.; Yunes, R.A.; Ferrari, F.; Messana, I.; Calixto, J.B. *J. Pharm. Pharmacol.*, *48*, 1231-1236, **1996**.
155. Davison, C. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, *179*, 249-263, 1971.
156. Cechinel Filho, V.; Breviglieri, E.; Willain Filho, A.; Santos, A.R.S. *Rev. Bras. Farm.*, *76*, 115-117, **1995**.
157. Souza, M.M.; Cechinel Filho, V. Comunicação pessoal, não publicado.
158. Vaz, Z.R.; Cechinel filho, V.; Yunes, R.A.; Calixto, J.B. *J. Pharm. Exp. Therapeut.* *278*, 304-312, **1996**.

159. Hess, S.C.; Brum, R.L.; Honda, N.K.; Morais, V.M.F.; Gomes, S.T.A.; Lima, E.O.; Cechinel Filho, V.; Yunes, R.A. *Fitoterapia*, *66*, 549-553, **1995**.
160. Mustich, G. *Terpenes. Ger. offen.*, *2*, 503, 135 (CI. C07C, A61K), 31 jul **1975**.
161. Alcaraz, M.J.; Jimenez, M.J. *Fitoterapia*, *59*, 25-29, **1988**.
162. Pathak, D.; Pathak, K.; Sigla, A.K. *Fitoterapia*, *62*, 371-377, **1991**.
163. Hollman, P.C.H.; Hertog, M.G.L.; Katan, M.B. *Food Chem.*, *57*, 43-46, **1996**.
164. Handa, S.S.; Chawla, A.S.; Sharma, A.K. *Fitoterapia*, *63*, 3-9, **1992**.
165. Bergers, R.R.; Windler, J.; Trampisch, H.J.; Senge, T. *Lancet*, *345*, 1529-1532, **1995**.
166. Lowe, F.C.; Ku, J.C. *Urology*, *48*, 12-20, **1996**.
167. Pisha, E.; Chai, H.; Lee, I.S.; Chagwedera, T.E.; Farnsworth, M.R.; Cordell, G.A.; Beecher, C.W.; Fong, H.H.; Kinghorn, A.D.; Brown, D.M.; Wani, M.C.; Wall, M.E.; Hicken, T.J.; Gupta, T.K.; Pezzuto, J.M. *Nature Med.*, *1*, 10461051, **1995**.
168. Bejar, E.; Amarquaye, A.; Che, C.T.; Malone, M.H.; Fong, H.H.S. *Int. J. Pharmacog.*, *33*, 25-32, **1995**.
169. Recio, M.C.; Giner, R.M.; Manez, S.; Gueho, J.; Julien, H.R.; Hostettmann, K.; Rios, J.L. *Planta Med.*, *61*, 96-96, **1995**.
170. Safayhi, H.; Sailer, E.R. *Planta Med.*, *63*, 487-493, **1997**.
171. Fujioka, T.; Kashiwada, Y.; Kilkuskie, R.E.; Cosentino, L.M.; Ballas, L.M.; Jiang, J.B.; Jonzen, W.P.; Chen, I.S.; Lee, K.H. *J. Nat. Prod.*, *57*, 243-247, **1994**.
172. Bringmann, G.; Saeb, W.; Assi, L.A.; François, G.; Narayanan, A.S.S.; Peters, K.; Peters, E.M. *Planta Med.*, *63*, 255-257, **1997**.
173. Beck-Sague, C.M.; Jarvis, W.R. *J. Infect. Dis.*, *167*, 1247-1257, **1993**.
174. Hay, R.J. *Antimicrob. Chemother.*, *28*, 17-25, **1991**.

175. Pfaller, M.A. *Clin. Infect. Dis.*, 19, S8-S13, **1994**.

176. Kauffman, C.A.; Carver, P.L. *Drugs*, 53, 539-549, **1997**.

PUBLICAÇÕES REFERENTES AO TRABALHO DE TESE

1. **Renata Krogh**, Rosendo A. Yunes, Adriano D. Andricopulo. Structure-Activity Relationships for the Analgesic Activity of Gallic Acid Derivatives, *Il Farmaco*, 55, 730-735, **2000**.
2. Alexandre Madeira, Cristiane Berti, Márcia M. de Souza, **Renata Krogh**, Rosendo A. Yunes, Valdir Cechinel Filho. Antinociceptive Properties of the Methanolic Extract Obtained From *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br.; *Ethnopharmacology*, 69, 85-90, **2000**.
3. **Renata Krogh**, Roselene Kroth, Cristiane Berti, Alexandre Madeira, Márcia M. de Souza, Valdir Cechinel Filho, Franco Delle-Monache, Rosendo A. Yunes. Isolation and Identification of Compounds with Antinociceptive Action From *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br.; *Pharmazie*, 54, 464-466, **1999**.
4. Márcia M. de Souza, Alexandre M. de Oliveira, Valdir Cechinel Filho, Cristiane Berti, Rosendo A. Yunes, **Renata Krogh**. Estudos Preliminares da Propriedade Antinociceptiva de *Ipomoea pes-caprae* (L.) em Modelos Farmacológicos Específicos; *Alcance*, 5, 53-57, **1999**.