



Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas
Curso de Pós-Graduação em Química
Departamento de Química

CRISTIAN SOLDI

DERIVADOS SINTÉTICOS DOS TRITERPENOS α E β -AMIRINA E
AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANALGÉSICAS E ANTIFÚNGICAS

FLORIANÓPOLIS – SC

2007

CRISTIAN SOLDI

DERIVADOS SINTÉTICOS DOS TRITERPENOS α E β -AMIRINA E
AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANALGÉSICAS E ANTIFÚNGICAS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química no sistema ***Pós-graduação Integrada (PGI)***, conforme ***modalidade II*** estipulada pela resolução normativa N° 001/CPGQ/01.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientador: Moacir Geraldo Pizzolatti

Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis – SC

2007

Cristian Soldi

Derivados sintéticos dos triterpenos α e β -amirina e avaliação das propriedades analgésicas e antifúngicas

Dissertação julgada e aprovada, em 25 de março de 2007, pelo orientador e membros da banca como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química

Prof. Dr. Ademir Neves

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Química

Banca Examinadora

Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti
Orientador

Prof. Dr. Antonio Carlos Joussef

Prof. Dr. Josiel Barbosa Domingos

Prof. Dr. Ricardo José Nunes

Agradecimentos

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Departamento de Química pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao CNPQ e a Capes pelo apoio financeiro.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Moacir Pizzolatti, pela orientação, incentivo e liberdade de trabalho, proporcionando todas as condições para meu desenvolvimento intelectual e profissional.

Ao grupo do Professor Dr. Adair R. S. Santos do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina pelos ensaios de atividade antinociceptiva.

Ao grupo da Professora Dra. Maria A. Resende do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais pelos ensaios de atividade antifúngica.

À Professora Dra. Inês M. C. Brighentti do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina e ao Henrique Moresco pelos ensaios de citotoxicidade utilizando larvas de *Artemia Salina*.

Aos Professores Dr Antonio Carlos Joussef, Dr Josiel Barbosa Domingos e Dr Ricardo José Nunes, membros da Banca examinadora por gentilmente aceitar o convite para avaliar e contribuir com o nosso trabalho.

Ao Ângelo e à Eliane da Central de análises pelo obtenção dos espectros de RMN e IV.

Não tenho palavras para agradecer o imenso carinho e compreensão da Alexandra e do Denys neste momento.

Aos demais Professores do Departamento de Química.

Aos meu pais Enelides C. Soldi e Nelson Soldi e ao meu Irmão Fernando Soldi pela educação, apoio e incentivo durante toda a minha vida.

Aos amigos do Laboratório de Química de Produtos Naturais os quais eu não conseguiria citar todos aqui, pois são tantas as pessoas que chegam e que saem mas sempre deixando valiosas contribuições.

Aos grandes amigos de todos os momentos e de todos os lugares.

*“As pessoas criam uma realidade
e depois tornam-se vítimas dela”*

Heron Ryan

Índice

1. Introdução.....	13
1.1. Justificativa.....	13
1.2. O papel da química orgânica sintética.....	15
1.3. Relações estrutura-atividade (SAR).....	16
1.4. Triterpenos.....	17
1.5. Atividade antinociceptiva	19
1.6. Atividade antifúngica contra espécies de <i>Cândida</i>	20
1.7. Bioensaio de toxicidade utilizando larvas de <i>Artemia salina</i>	22
2. Objetivos.....	24
3. Parte experimental.....	25
3.1. Materiais e equipamentos.....	25
3.2. Modificação estrutural na mistura de triterpenos α e β -amirina.....	26
3.2.1. Procedimento geral para acilação com cloreto de ácido.....	26
3.2.1.1. Formiato de α e β -amirina (2).....	26
3.2.1.2. Propanoato de α and β -amirina (4)	27
3.2.1.3. Butanoato de α e β -amirina (5)	27
3.2.1.4. Hexanoato de α e β -amirina (6)	28
3.2.1.5. Octanoato de α e β -amirina (7).....	29
3.2.1.6. Decanoato de α e β -amirina (8).....	29
3.2.1.7. Palmitato de α e β -amirina (9).....	30
3.2.1.8. Benzoato de α e β -amirina (10).....	30
3.2.1.9. p-bromobenzoato de α e β -amirina (11).....	31
3.2.1.10. p-clorobenzoato de α e β -amirina (12).....	31
3.2.2. Procedimento geral para acilação com anidridos de ácido carboxílico.....	32
3.2.2.1. Acetato de α e β -amirina (3).....	32
3.2.2.2. 2-carboxibenzoato de α e β -amirina (13).....	33
3.2.3. Procedimento para a preparação do derivado 3-oxo α e β amirina (14).....	33
3.2.3.1. Preparo do reagente PCC.....	33
3.2.3.2. 3-oxo α e β amirina (14).....	34
3.2.4. Procedimento para a preparação do derivado 3,11-dioxo α e β -amirina (15).....	34
3.2.4.1. Preparação do reagente cromato de t-butila.....	34

3.2.4.2. 3,11-dioxo α e β -amirina (15).....	35
3.2.5. Procedimento para a preparação do derivado Acetato de 11-oxo α e β -amirina (16).....	35
3.2.5.1. Acetato de 11-oxo α e β -amirina (16)	35
3.3. Ensaio biológicos.....	36
3.3.1. Atividade antinociceptiva.....	36
3.3.1.1. Nocicepção induzida pelo ácido acético.....	37
3.3.1.2. Nocicepção induzida pela formalina.....	38
3.3.1.3. Avaliação da atividade locomotora.....	38
3.3.2. Atividade antifúngica.....	39
3.3.2.1. Solventes usados na solubilização dos produtos naturais.....	39
3.3.2.2. Reagente usado para a revelação dos testes.....	40
3.3.2.3. Meios de cultura.....	40
3.3.2.4. Origem dos microrganismos.....	40
3.3.2.5. Preparo do inóculo.....	40
3.3.2.6. Método de Microdiluição para a Determinação da Quantidade Inibitória Mínima (QIM) e da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	41
3.3.2.7. Teste de adesão.....	42
3.3.3. Atividade citotóxica frente a larvas de <i>Artemia salina</i>	44
4. Resultados e discussão.....	45
4.1. Caracterização dos compostos sintetizados.....	47
4.2. Atividade antinociceptiva.....	52
4.3. Atividade antifúngica	59
4.4. Atividade citotóxica frente a larvas de <i>Artemia salina</i>	63
4.5. Relação entre a lipofilicidade dos derivados de α e β -amirina e a atividade biológica.....	66
4.5.1. Atividade antinociceptiva vs Log P.....	67
4.5.2. Atividade antifúngica vs Log P.....	69
4.5.3. Atividade tóxica vs Log P.....	70
5. Perspectivas.....	72
5.1. Derivados dos triterpenos α e β -amirina.....	72
5.2. Síntese de novas moléculas biologicamente ativas utilizando 6-estiril-2-pironas isoladas de <i>Polygala sabulosa</i> A. W. Benett como modelo.....	75
5.2.1. Justificativa.....	75

5.2.2. Metodologia.....	79
5.2.2.1. Derivados do heterociclo 2-piranona.....	79
5.2.2.2. Derivados do heterociclo 2-piridona.....	86
5.2.2.3. Derivados do heterociclo 2-furanona.....	90
5.2.2.4. Derivados do heterociclo 2-pirrolidona.....	92
5.2.3. Atividade biológica.....	93
6. Referências bibliográficas.....	95

Índice de tabelas

Tabela 1 - atividade biológica determinada com a mistura de α e β -amirina em diferentes proporções de cada triterpeno.....	18
Tabela 2 - efeito antinociceptivo dos derivados estruturais da mistura de triterpenos pentacíclicos α e β -amirina no modelo de dor induzida por ácido acético.....	54
Tabela 3 – efeito do derivado octanoato de α e β -amirina (7) na atividade locomotora.....	57
Tabela 4 – concentração inibitória mínima (nmol mL^{-1}) da mistura de α e β -amirina e dos seus derivados contra diferentes espécies de <i>Candida</i>	60
Tabela 5 – dose letal da mistura de α e β -amirina e seus derivados frente a larvas de <i>Artemia salina</i>	64

Índice de figuras

Figura 1 - fotos de pacientes com candidíase oral.....	21
Figura 2 - estruturas dos triterpenos α -amirina (esqueleto tipo ursano) e β -amirina (esqueleto tipo oleanano).....	46
Figura 3 – equação química para a síntese dos derivados ésteres de cadeia linear da mistura de α -amirina e β -amirina.....	48
Figura 4 – equação química para a síntese dos derivados ésteres de ácido benzóico da mistura de α -amirina e β -amirina.....	50
Figura 5 – equação química para a síntese dos derivados oxidados da mistura de α -amirina e β -amirina.....	51
Figura 6 - gráfico de 1/atividade antinociceptiva (em $(\mu\text{mol /kg})^{-1}$) vs derivados de α e β -amirina.....	55

Figura 7 – gráfico de 1/ atividade antinociceptiva vs log P teórico para os ésteres de cadeia linear de α e β -amirina.....	68
Figura 8 - gráfico de Log 1/ concentração inibitória mínima vs Log P (calculado) para os ésteres de cadeia linear de α e β -amirina contra a levedura <i>Candida tropicalis</i>	70
Figura 9 - gráfico de Log 1/ dose letal vs Log P (calculado) para os derivados de α e β -amirina.....	71
Figura 10 – derivados de α e β -amirina a ser preparados.....	74
Figura 11 – dihidro e estiril-lactonas previamente isoladas da espécie <i>Polygala sabulosa</i> A. W. Bennett.....	77
Figura 12 – análogos de estiril-lactonas – proposta de síntese.....	78
Figura 13 – equações químicas para a preparação do composto 4-hidroxi-6-metil-2-pirona (HMP).....	81
Figura 14 – esquemas para as reações de bromação envolvendo o ácido dehidroacético e o composto MMP.....	84
Figura 15 – equações químicas para a preparação do sal de trifenilfosfônio derivado do 4-metóxi-6-metil-2-piranona.....	84
Figura 16 – equações químicas para a síntese de (E)-6-estiril-2-pirona e (E)-6-dihidroestiril-2-pirona.....	85
Figura 17 - equação química para a síntese de CINP com espaçador de dois carbonos na cadeia.....	86
Figura 18 – equação química para a síntese do composto 2,2,6-trimetil-4H-1,3-dioxan-4-ona (DIOX).....	86
Figura 19 – equações químicas para a preparação do composto 3-acetil-4-hidroxi-6-metil-2-piridona (MPD).....	89
Figura 20 – equação química para a síntese do heterociclo estiril-2-furanona.....	91
Figura 21 – esquema para a síntese do sistema 4-estiril-2-furanona.....	92
Figura 22 – equações químicas para a síntese do sistema dienil-2 furanonas.....	93

Resumo

Quinze derivados de uma mistura dos triterpenos α e β -amirina (1:2) foram preparados através de acilação com anidridos de ácido carboxílico apropriados ou cloreto de acila e oxidação na presença de cromato de *t*-butila ou clorocromato de piridínio. As estruturas moleculares dos compostos obtidos foram confirmadas através dos espectros de IV e ¹H RMN. Os compostos foram avaliados quanto sua atividade antinociceptiva e antifúngica. A atividade antinociceptiva foi avaliada no modelo de dor induzida por ácido acético. Os derivados 3-*O*-acilados propanoato de α e β -amirina **4**, hexanoato de α e β -amirina **6** e octanoato de α e β -amirina **7** foram os compostos mais ativos da série. Surpreendentemente, a substância octanoato de α e β -amirina **7** foi 24180 vezes mais potente que a aspirina e 427 vezes mais potente, no modelo de dor testado, que a morfina e não produziu nenhuma alteração comportamental nos ratos. A atividade antifúngica foi avaliada contra diferentes espécies de *Candida* e, adicionalmente, a inibição da adesão de *Candida Albicans* nas células epiteliais bucal *in vitro* foi determinada para o composto mais ativo. Entre os quinze compostos, formiato de α e β -amirina **2** e acetato de α e β -amirina **3** foram os mais ativos, inibindo todas as espécies de *Candida* testadas. Adicionalmente, formiato de α e β -amirina **2**, foi tão efetivo quanto fluconazol, droga comercialmente disponível, em inibir a adesão de *Candida Albicans* nas células epiteliais bucal. Este estudo demonstrou que, na fase pré-clínica, os derivados da mistura de triterpenos pentacíclicos α e β -amirina exibiram significativa atividade antinociceptiva, utilizando o modelo de dor induzida por ácido acético, e significativa atividade antifúngica contra diferentes espécies de *Candida*.

Abstract

Fifteen different derivatives of an α and β -amyirin triterpenes mixture (1:2) were prepared by acylation with appropriate anhydride or acid chlorides and oxidation in the presence of the *t*-butyl chromate or pyridinium chlorochromate (PCC). Molecular structure of obtained compounds was confirmed by means of IR and ^1H NMR spectra. The compounds were screened for antinociceptive and antifungal activity. The antinociceptive activity was evaluated using the acetic acid pain model. The 3-O-acyl derivatives α and β -amyirin propionate **4**, α and β -amyirin hexanoate **6** and α and β -amyirin octanoate **7** were found to be the most active compounds of the series. Surprisingly, the substance α and β -amyirin octanoate **7** was 8,000 times more potent than aspirin and 223 times more potent, in the pain model tested, than morphine and did not produce any behavioral alteration in the rats. The antifungal activity was evaluated against *Candida* species and, additionally, the inhibition of adhesion of *Candida albicans* to human epithelial cells *in vitro* was determined for the most active compound. Among the 15 derivatives, α and β -amyirin formiate **2** and α and β -amyirin acetate **3** were the most active, inhibiting all the *Candida* species tested. Additionally, α and β -amyirin formiate **2** were as effective as fluconazole, drug commercially available, in inhibiting the adhesion of *Candida albicans* to buccal epithelial cells. This study demonstrated that, before of the assays in the clinical phase, the derivatives of α and β -amyirin pentacyclic triterpenes exhibited significant antinociceptive activity, using the acetic acid pain model, and antifungal activity against *Candida* species.

1.Introdução

1.1.Justificativa

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais^(1,2).

No Brasil, pelo menos trezentas plantas medicinais fazem parte do arsenal terapêutico da população. Desconhecida, desdenhada ou até abominada pelos médicos, as plantas medicinais são consumidas tanto pelos favelados como pela classe de maior poder econômico, constituindo no Brasil um mercado de US\$ 400 milhões. Devido a grande importância na vida das pessoas, a ONU, relatou que 2/3 da população da Terra utiliza plantas medicinais e, também recomenda o uso desses medicamentos naturais⁽³⁾.

Muitos fármacos de prescrição importante como morfina, codeína, quinina e digitalis são derivados de produtos naturais. Embora a química sintética moderna esteja muito sofisticada, o homem ainda não pode competir com a imensa variedade de espécies de plantas que a natureza desenvolveu através de bilhões de anos de evolução⁽⁴⁾.

As informações existentes sobre a magnitude do mercado de compostos de origem vegetal mostram a importância dessas substâncias naturais. No período entre 1981 e 2002, 5% das 1031 substâncias químicas aprovadas como fármacos

pela Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos foram produtos naturais, e outros 23% foram moléculas derivadas de produtos naturais⁽⁵⁾. Durante este período, Newman e colaboradores⁽⁶⁾ apontam o importante papel dos produtos naturais no desenvolvimento de novos fármacos, principalmente nas áreas do câncer e doenças infecciosas, onde 60 e 75% destas substâncias, respectivamente, são de origem natural.

No Brasil, estima-se que 25% dos US\$ 8 bilhões de faturamento, em 1996, da indústria farmacêutica nacional sejam originados de medicamentos derivados de plantas. Apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bio-ativos e 1100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais. As informações anteriores revelam a necessidade de se buscar alternativas para superar a dependência externa, principalmente quando se confrontam os altos preços médios praticados no Brasil em comparação com aqueles praticados nos países desenvolvidos. O panorama brasileiro nessa área mostra que 84% de todos os fármacos são importados e que 78% da produção brasileira é feita por multinacionais⁽⁷⁾.

Embora as técnicas em síntese orgânica estejam evoluindo muito rapidamente, as substâncias candidatas a fármacos continuam sendo obtidas a partir de matérias primas vegetais^(8, 9). O método da descoberta de fármacos pela modificação estrutural de substâncias ativas conhecidas leva a identificação de novos compostos-protótipos que podem atuar pelo mecanismo farmacológico do primeiro⁽¹⁰⁾. Assim, enquanto o homem não consegue imitar a natureza, podemos aproveitar a imensa variedade de substâncias naturais e, a partir destas, preparar derivados e análogos na busca de uma substância com a atividade biológica

melhorada.

Os triterpenos pentacíclicos, são compostos caracterizados por exibir uma ampla faixa de atividades biológicas incluindo atividade antioxidante, anti-alérgica, anti-inflamatória, antitumoral, antibacteriana, antinociceptiva, gastroprotectiva, hepatoprotectiva e cardioprotectiva^(11 - 21). Dado a importância da presença de triterpenos em uma grande variedade de espécies vegetais, as modificações estruturais e preparo de análogos são estratégias fundamentais no estudo destas moléculas ativas, contribuindo para o aumento do conhecimento de suas propriedades biológicas e ao esclarecimento dos mecanismos de ação.

1.2.O papel da química orgânica sintética

A necessidade do desenvolvimento de novos fármacos, que sejam efetivos contra algumas patologias ainda sem tratamento adequado, e que possam substituir os existentes, porém a custos menores e dotados de menores efeitos adversos, tem impulsionado a comunidade científica a novas e incessantes pesquisas nesta área. A síntese orgânica tem contribuído significativamente neste aspecto, sendo responsável por cerca de 75% dos fármacos existentes no mercado farmacêutico. Cabe ressaltar, porém, que muitos destes fármacos são oriundos de protótipos advindos de produtos naturais, especialmente de plantas, que têm, ao longo dos anos, possibilitado a descoberta de inúmeras moléculas bio-ativas⁽²²⁾.

As vias sintéticas parciais na busca de um composto com potencial atividade biológica, também são de grande interesse para a indústria farmacêutica. Os principais métodos baseiam-se em compostos produzidos por transformações

microbiológicas, pelo uso de enzimas e pela extração de produtos naturais. Estes métodos são usados para produzir materiais iniciais porque geralmente cortam o custo da produção e geram compostos cujas estruturas possuem centros quirais com as configurações necessárias. Por exemplo, a síntese total de fármacos esteroidais não é viável devido aos muitos centros quirais encontrados em suas estruturas. Em conseqüência, a síntese parcial é a abordagem normal para produzir novos análogos e para a manufatura de fármacos esteroidais⁽²³⁾.

1.3.Relações estrutura-atividade (SAR)

Uma vez que a estrutura de um composto biologicamente ativo está determinada, pode-se orientar o trabalho para estudos envolvendo a relação entre a estrutura e a atividade biológica do composto. As relações estrutura-atividade geralmente são determinadas fazendo-se pequenas alterações na estrutura do composto, seguidas da avaliação do efeito que isto teve sobre a atividade biológica. Dependendo da estrutura do composto protótipo, pode-se simplificar, conservar e aumentar a estrutura do composto pela incorporação de novos grupamentos. Estas modificações podem alterar as propriedades físico-químicas da molécula como a hidrofobicidade, densidade eletrônica, conformação estrutural e propriedades farmacocinéticas. Investigações SAR tradicionais são realizadas preparando-se um grande número de análogos do protótipo que são testados para atividade biológica. Ao longo dos anos, vários compostos protótipos já foram investigados, e da massa de dados, é possível fazer generalizações amplas sobre os efeitos biológicos de alterações estruturais específicas^(23, 24).

1.4. Triterpenos

Os triterpenos são compostos com um esqueleto carbonado construído a partir de seis unidades de isopreno. Essas moléculas geralmente tetracíclicas ou pentacíclicas derivam biogeneticamente do esqualeno, um hidrocarboneto acíclico com trinta carbonos^(25, 26). Esta é uma vasta classe de produtos naturais cuja diversidade estrutural inclui uma larga disposição de grupos funcionais. Muitos compostos deste grupo possuem interessantes atividades biológica, farmacológica ou medicinal. Contudo, em muitos casos, a potência destes triterpenos é relativamente fraca⁽²⁷⁾.

Muitos trabalhos são encontrados na literatura relatando o isolamento e atividade biológica de uma grande diversidade de triterpenos. A maioria deles trata de compostos derivados dos esqueletos oleanano, ursano e lupano. Poucos trabalhos avaliam a atividade biológica dos triterpenos α e β -amirina e entre estes, a grande maioria trabalha com a mistura dos triterpenos. A tabela 1 apresenta diferentes proporções de mistura de α e β -amirina, o material de onde as substâncias foram obtidas e a atividade biológica avaliada. O rendimento apresentado é referente a massa (em gramas) da mistura obtida a partir de 100 g de biomassa seca.

Na literatura, encontram-se poucos estudos sistemáticos de relação estrutura-atividade baseado em modificações químicas dos triterpenos α e β -amirina. A maioria dos trabalhos relata modificações na estrutura de triterpenos ácidos como ácido oleanólico^(27 – 35) e ácido ursólico^(27, 34 – 36).

Tabela 1 - Atividade biológica determinada com a mistura de α e β -amirina em diferentes proporções de cada triterpeno

Proporção α : β (rendimento %)	Material vegetal	Atividade biológica	Ref.
2 : 1 (2,25)	<i>Protium heptaphyllum</i>	Ansiolítica e antidepressiva	[37]
2 : 1 (XX)*	<i>Protium heptaphyllum</i>	Antinociceptiva	[38]
2 : 1 (25,2)	<i>Protium heptaphyllum</i>	hepatoprotectiva	[19]
X : X (0,016)*	<i>Hippocratea excelsa</i>	Anti-úlceras	[39]
2 : 1 (42,25)	<i>Protium heptaphyllum</i>	Inibe prurido	[15]
1 : 1 (0,28)	<i>Protium Kleinii</i>	Anti-inflamatória	[40]
0 : 1 (0,18)	<i>Maytenus senegalensis</i>	Anti-inflamatória	[41]

*Porcentagem ou proporção não determinada pelos autores.

Mallavadhani e colaboradores⁽⁴²⁾ relataram a síntese de derivados de uma mistura de α e β -amirina obtida da espécie vegetal *Diospyros malanoxylon*, na proporção 3:1 (α : β). Foram preparados os ésteres de cadeia linear a partir da reação da mistura dos triterpenos com os ácidos graxos C₁₂, C₁₄, C₁₆ e C₁₈ na presença de DCC (1,3-diciclohexilcarbodiimida) e DMAP (4-N,N-dimetilaminopiridina) em CH₂Cl₂, com rendimentos que vão de 80 a 95%. Estes derivados exibiram uma potente atividade antimicrobiana contra a bactéria Gram negativa *Pseudomonas syringae* e uma moderada atividade contra as bactérias Gram positivas *Bacillus sphaericus* e *Bacillus subtilis*.

1.5.Atividade antinociceptiva

A dor é um processo fisiológico essencial para a sobrevivência dos seres, pois é o alerta de que alterações fisiológicas importantes estão acontecendo colocando em risco a saúde do indivíduo. Entretanto, embora a dor seja um processo natural, é relatada como uma sensação desagradável e às vezes até insuportável, e o controle da dor é uma das mais importantes prioridades terapêuticas levando pesquisadores a buscar substâncias com efeitos analgésicos que possam livrar o indivíduo dos inconvenientes do processo doloroso^(43, 44).

O tratamento do processo doloroso é atualmente bastante diversificado, mas exibe uma vasta lista de efeitos adversos e/ou colaterais, os quais impedem o usuário de fazerem uso crônico dos mesmos sem limitações. Além disso, muitos processos dolorosos permanecem sem efeito eficaz, fazendo com que a abordagem terapêutica seja meramente paliativa^(43, 44).

Uma das formas de avaliar os efeitos antinociceptivos de novas substâncias é induzir dor em camundongos através da injeção de ácido acético (0,6%) e verificar as contorções abdominais após o tratamento com os compostos candidatos a drogas analgésicas. A atividade analgésica é determinada tomando-se como base, a inibição do número de contorções abdominais dos animais pré-tratados com as diferentes doses dos compostos com potencial atividade analgésica, comparando-se com o número de contorções abdominais dos animais controles⁽⁴³⁾.

O modelo foi proposto por Collier e colaboradores⁽⁴⁵⁾, e apesar de ser um modelo de nocicepção simples, ele permite avaliar a ação antinociceptiva de várias substâncias que atuam tanto em nível central, como a morfina, quanto em nível

periférico, como os antiinflamatórios não esteroidais e glicocorticóides⁽⁴³⁾.

1.6.Atividade antifúngica contra espécies de *Cândida*

A incidência de infecções fúngicas humanas tem aumentado muito durante as duas últimas décadas. Os fungos implicados nestas infecções podem ser fungos verdadeiramente patógenos ou fungos patógenos oportunistas. Estes últimos são fungos com baixa virulência e que se manifestam em pacientes imunodeprimidos e que em alguns casos levam o paciente à morte. Uma das infecções fúngicas mais comuns em pacientes imunodeprimidos é a candidíase oral^(46, 47).

Candidíase oral (figura 1) é uma infecção oportunista causada pela levedura do gênero *Candida*, sendo a mais comum a *Candida albicans*. A candidíase está normalmente limitada à pele e à membrana mucosa. Um sistema imunitário saudável mantém esta infecção sob controle. A candidíase pode ocorrer em pacientes como resultado das imunodeficiências associadas com a AIDS, quimioterapia, transplantes em idosos e neonatos. Além disso, o uso freqüente de procedimentos evasivos como nutrição parenteral, diálise e hemodiálise, tratamento a longo tempo com antibióticos e o uso de corticóides também predispõe o paciente a esta infecção. Apesar da medicina ter conseguido aumentar a sobrevivência de pacientes imunodeprimidos, os pacientes acabam manifestando infecções fúngicas que causam a morte de um grande número destes indivíduos^(46, 48, 49).



Figura 1 - fotos de pacientes com candidiase oral⁽⁵⁰⁾

Cândida albicans, e outras espécies de leveduras patogênicas têm se tornado resistente aos agentes antifúngicos, em particular a compostos da classe dos triazóis⁽⁵¹⁾. Embora a quantidade de compostos naturais e sintéticos relatados como antifúngicos por revistas científicas seja muito grande, para uso humano, existem limitadas opções terapêuticas as quais apresentam sérios problemas. A anfotericina B, depois de 30 anos de uso, é ainda um fármaco usado para tratar infecções fúngicas. Entretanto é extremamente tóxica para células humanas, produzindo calafrios e febre, e seu consumo crônico leva a nefrotoxicidade*. O cetoconazol e outros azóis (fluconazol, miconazol, itraconazol, etc.) produzem hepatite e

*A nefrotoxicidade é ocasionada por determinadas substâncias, como os antibióticos que podem gerar danos nos rins.

problemas endócrinos e a 5-flucitosina produz hepatotoxicidade* e problemas cerebrais. Além disso, alguns destes fármacos são fungistáticos e não fungicidas produzindo recorrência e outros desenvolvem resistência o que é um verdadeiro problema quando os tratamentos são prolongados. Esta situação leva à um consenso geral de que são necessários novos compostos antifúngicos mais potentes, mas sobretudo mais seguros que os em uso atualmente^(46, 52).

1.7.Bioensaio de toxicidade utilizando larvas de *Artemia salina*

Muitos métodos de ensaios biológicos se utilizam de numerosos organismos, na maioria dos testes, tendo a necessidade de manter as culturas permanentes, dificultando a criação e manutenção destes organismos no laboratório. Desta forma, o bioensaio que utiliza *Artemia salina* merece atenção especial por ser um procedimento bastante simples, podendo ser desenvolvido em laboratórios clássicos de produtos naturais. *A. salina* é um micro crustáceo conhecido como larva de camarão. Seus ovos permanecem viáveis por vários anos, se forem estocados em condições secas e assim não há necessidade de manter culturas de organismos. O bioensaio de toxicidade frente a larvas de *A. salina* tem boa reprodutibilidade e apresenta boa correlação com outros ensaios de toxicidade e antitumoral. Devido a grande sensibilidade de *A. salina*, esse ensaio está estreitamente relacionado com a atividade biológica em geral, pois todo composto que possui alguma atividade, também apresenta certo nível tóxico⁽⁵³⁾.

Em trabalhos realizados com compostos antitumorais apresentando resultados positivos, mostrou-se que o bioensaio com *A. salina* tem boa utilidade

*A Hepatotoxicidade (de toxicidade hepática) é um dano no fígado.

como um “prescreening” para a atividade antitumoral. O “screening” de extratos de material vegetal pode mostrar a atividade citotóxica de muitas plantas e monitorar o isolamento de compostos bioativos^(54 – 56).

2. Objetivos

O objetivo principal deste trabalho é preparar derivados da mistura de triterpenos α e β -amirina e avaliar os efeitos analgésico e antifúngico de cada substância. Diante dos resultados, nosso interesse é verificar a relação entre a estrutura dos compostos e a atividade biológica.

Com a finalidade de alterar propriedades físico-químicas da mistura de triterpenos, como a hidrofobicidade, efeitos eletrônicos e estéricos, nossa proposta é preparar ésteres de α e β -amirina utilizando ácidos carboxílicos de cadeia linear e ácidos benzóicos substituídos e ainda derivados oxidados nas posições C3 e C11.

Os derivados, devidamente caracterizados, serão avaliados quanto a sua atividade antinociceptiva no modelo de dor induzida por ácido acético, e quanto a sua atividade antifúngica contra espécies de *Cândida*, no modelo da concentração mínima que inibe o crescimento das leveduras.

Como um ensaio preliminar para avaliar a toxicidade dos compostos, os derivados da mistura de α e β -amirina serão submetidos ao ensaio de letalidade frente a larvas de *Artemia salina*.

3.Parte experimental

3.1.Materiais e equipamentos

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Perkin Elmer FTIR 16 PC utilizando-se pastilhas comprimidas de brometo de potássio anidro.

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em aparelho Bruker AC a 200 MHz para hidrogênio (RMN ^1H) e 50 MHz para carbono-13 (RMN ^{13}C) e em espectrômetro Varian Mercury Plus à 400 MHz para hidrogênio (RMN ^1H) e a 100 MHz para carbono -13 (RMN ^{13}C).

Para o fracionamento cromatográfico em coluna foi utilizando sílica gel de granulação 70-230 mesh (0,063-0,2 mm) da Merck. Para cromatografia em camada fina (ccf) foram utilizadas placas Alugram Sil G/UV₂₅₄ com 0.20 mm de espessura da Macherey-Nagel. Os compostos nas placas cromatográficas foram visualizados sob lâmpada de ultravioleta a 254 nm e por imersão das placas em anisaldeído sulfúrico e/ou solução de sulfato de cério 2N em ácido sulfúrico seguido de aquecimento da placa.

Os solventes utilizados para separações cromatográficas em coluna de sílica gel, em camada delgada e partição líquido/líquido foram de qualidade PA e não passaram por processos de purificação adicional ou secagem. Nas separações cromatográficas em coluna, as frações eluídas foram concentradas em evaporador rotatório e o solvente destilado foi reutilizado no processo cromatográfico sem

qualquer purificação ou secagem. Isso diminui os custos na purificação dos produtos e ainda evita a contaminação do meio ambiente, já que diminui a quantidade de resíduos químicos. Os solventes utilizados como meio de reações passaram por processos de secagem quando necessário. Os solventes foram evaporados em evaporador rotatório da Quimis à pressão reduzida e temperatura controlada.

3.2. Modificação estrutural na mistura de triterpenos α e β -amirina

3.2.1. Procedimento geral para acilação com cloreto de ácido

Uma porção da mistura de triterpenos α e β -amirina (1eq) foi dissolvida em piridina e tratada com um excesso do cloreto de ácido apropriado. A mistura reacional foi aquecida e mantida sob refluxo, em agitação, e monitorada por cromatografia em camada fina (SiO_2 , Hexano 95:5 AcOEt como eluente) até o consumo total do substrato. Então, foi adicionado uma solução aquosa (100 mL) pH aproximadamente 2,0 com ácido clorídrico. O produto bruto foi extraído com clorofórmio (3 x 15 mL), lavado com solução saturada de NaHCO_3 (4 x 25 mL), seco com Na_2SO_4 anidro e purificado em coluna cromatográfica (SiO_2), eluindo com hexano:acetato de etila (95:5), para obter os derivados acilados dos triterpenos α e β -amirina.

3.2.1.1. Formiato de α e β -amirina (2)

O composto **2** foi preparado conforme procedimento descrito no item 4.2.1 utilizando uma solução da mistura de α e β -amirina (100,9 mg, 0,236 mmol) e cloreto de formila (0,1 mL, 1,550 mmol) em piridina (5 mL). O produto purificado foi obtido

como um sólido branco amorfo (49,6 mg, 46%). Rf = 0,66 utilizando a mistura hexano 95: 5 AcOEt como eluente e sílica como fase estacionária. IV (pastilha de KBr): δ (cm⁻¹) = 1715 (C=O). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 0,80 – 2,20 (perfil característico do triterpeno), 4,65 (m, H-3), 5,12 (m, H-12 do derivado de β -amirina), 5,19 (m, H-12 do derivado de α -amirina), 8,12 (s, H do aldeído). CG [t.r. min]: 16,8 (34%) formiato de α -amirina e 17,6 (66%) formiato de β -amirina.

3.2.1.2. Propanoato de α and β -amirina (4)

O composto **4** foi preparado conforme procedimento descrito no item 4.2.1 utilizando uma solução da mistura de α e β -amirina (302,7 mg, 0,710 mmol) e cloreto de propionila (0,1 mL, 1,151 mmol) em piridina (5 mL). O produto purificado foi obtido como um sólido branco amorfo (263,7 mg, 77%). Rf = 0,66 utilizando a mistura hexano 95: 5 AcOEt como eluente e sílica como fase estacionária. IV (pastilha de KBr): ν (cm⁻¹) = 1734 (C=O). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm); 0,80 – 2,20 (perfil característico do triterpeno), 2,32 (q, J = 7,6 Hz, H-2'), 4,51 (m, H-3), 5,13 (m, H-12 do derivado de α -amirina), 5,18 (m, H-12 do derivado de β -amirina). CG [t.r. min]: 17,5 (34%) propanoato de α -amirina e 18,3 (66%) propanoato de β -amirina.

3.2.1.3. Butanoato de α e β -amirina (5)

O composto **5** foi preparado conforme procedimento descrito no item 4.2.1 utilizando uma solução da mistura de α e β -amirina (152,4 mg, 0,358 mmol) e cloreto de butanoila (0,1 mL, 0,963 mmol) em piridina (5 mL). O produto purificado foi obtido

como um sólido branco amorfo (78,3 mg, 64%). Rf = 0,70 utilizando a mistura hexano 95: 5 AcOEt como eluente e sílica como fase estacionária. Espectro IV (pastilha de KBr): $\nu(\text{cm}^{-1}) = 1728,0$ (C=O). Espectro RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm}) = 0,90 - 2,20$ (perfil característico do triterpeno), 2,28 (t, J = 7,2 e 7,6 Hz, H-2'), 4,50 (m, H3), 5,13 (m, H-12 do derivado de β -amirina), 5,18 (m, H-12 do derivado de α -amirina). CG [t.r. min.]: 21,8 (35%) butanoato de α -amirina e 23,0 (65%) butanoato de β -amirina.

3.2.1.4. Hexanoato de α e β -amirina (6)

O composto **6** foi preparado conforme procedimento descrito no item 4.2.1 utilizando uma solução da mistura de α e β -amirina (312,4 mg, 0,733 mmol) e cloreto de hexanoila (0,15 mL, 1068 mmol) em piridina (5 mL). O produto purificado foi obtido como um sólido branco amorfo (253,5 mg, 67%). Rf = 0,74 utilizando a mistura hexano 95 : 5 AcOEt como eluente e sílica como fase estacionária. Espectro IV (pastilha de KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1729 (C=O). Espectro RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm}) = 0,90 - 2,20$ (perfil característico do triterpeno), 2,28 (m, H-2'), 4,51 (m, H-3), 5,13 (m, H-12 do derivado de β -amirina), 5,19 (m, H-12 do derivado de α -amirina). CG [t.r. min.]: 25,5 (34%) hexanoato de α -amirina e 27,2 (66%) hexanoato de β -amirina .

3.2.1.5. Octanoato de α e β -amirina (7)

O composto **7** foi preparado conforme procedimento descrito no item 4.2.1 utilizando uma solução da mistura de α e β -amirina (156,6 mg, 0,368 mmol) e cloreto de octanoila (0,1 mL, 0,586 mmol) em piridina (5 mL). O produto purificado foi obtido como um sólido branco amorfo (172,4 mg, 85%). Rf = 0,77 utilizando a mistura hexano 95 : 5 AcOEt como eluente e sílica como fase estacionária. Espectro IV (pastilha de KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1729 (C=O). Espectro RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm})$ = 0,90 – 2,20 (perfil característico do triterpeno), 2,30 (t, J = 7,6 Hz, H- 2'), 4,51 (m, H-3), 5,13 (m, H-12 do derivado de β -amirina), 5,19 (m, H-12 do derivado de α -amirina). CG [t.r. min]: 40,1 (34%) octanoato de α -amirina e 43,1 (66%) octanoato de β -amirina.

3.2.1.6. Decanoato de α e β -amirina (8)

O composto **8** foi preparado conforme procedimento descrito no item 4.2.1 utilizando uma solução da mistura de α e β -amirina (281,6 mg, 0,661 mmol) e cloreto de decanoila (0,2 mL, 0,964 mmol) em piridina (5 mL). O produto purificado foi obtido como um sólido branco amorfo (306,7 mg, 80%). Rf = 0,81 utilizando a mistura hexano 95 : 5 AcOEt como eluente e sílica como fase estacionária. Espectro IV (pastilha de KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1734 (C=O). Espectro RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm})$ = 0,90 – 2,20 (perfil característico do triterpeno), 2,29 (m, H-2'), 4,51 (m, H-3), 5,12 (m, H-12 do derivado de β -amirina), 5,18 (m, H-12 do derivado de α -amirina). CG [t.r. min]: 57,0 (36%) decanoato de α -amirina e 61,7 (64%) decanoato de β -amirina.

3.2.1.7. Palmitato de α e β -amirina (9)

O composto **9** foi preparado conforme procedimento descrito no item 4.2.1 utilizando uma solução da mistura de α e β -amirina (100,5 mg, 0,236 mmol) e cloreto de palmitoila (0,2 mL, 0,659 mmol) em piridina (5 mL). O produto purificado foi obtido como um sólido branco amorfo (121,4 mg, 79%). $R_f = 0,84$ utilizando a mistura hexano 95 : 5 AcOEt como eluente e sílica como fase estacionária. Espectro IV (pastilha de KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1734 (C=O). Espectro RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm}) = 0,90 - 2,20$ (perfil característico do triterpeno), 2,29 (m, H-2'), 4,51 (m, H-3), 5,12 (m, H-12 do derivado de β -amirina), 5,18 (m, H-12 do derivado de α -amirina). CG t.r. não determinado.

3.2.1.8. Benzoato de α e β -amirina (10)

O composto **10** foi preparado conforme procedimento descrito no item 4.2.1 utilizando uma solução da mistura de α e β -amirina (100,7 mg, 0,236 mmol) e cloreto de benzoila (0,15 mL, 1,293 mmol) em piridina (5 mL). O produto purificado foi obtido como um sólido branco amorfo (99,7 mg, 80%). $R_f = 0,74$ utilizando a mistura hexano 95 : 5 AcOEt como eluente e sílica como fase estacionária. Espectro IV (pastilha de KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1712 (C=O). Espectro RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm}) = 0,80 - 2,20$ (perfil característico do triterpeno), 4,75 (m, H-3), 5,13 (m, H-12 do derivado de β -amirina), 5,19 (m, H-12 do derivado de α -amirina), 7,40 - 7,60 (m, H3', H4' e H5'), 8,05 (m, H2'e H6'). CG [t.r. min]: 44,0 (32%) benzoato de α -amirina e 47,3 (68%) benzoato de β -amirina.

3.2.1.9. *p*-bromobenzoato de α e β -amirina (11)

O composto **11** foi preparado conforme procedimento descrito no item 4.2.1 utilizando uma solução da mistura de α e β -amirina (149,0 mg, 0,349 mmol) e cloreto de *p*-bromobenzoila (150,0 mg, 0,683 mmol) em piridina (5 mL). O produto purificado foi obtido como um sólido branco amorfo (122,6 mg, 56%). R_f = 0,82 utilizando a mistura hexano 95 : 5 AcOEt como eluente e sílica como fase estacionária. Espectro IV (pastilha de KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1712 (C=O). Espectro RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 0,80 – 2,20 (perfil característico do triterpeno), 4,73 (m, H-3), 5,12 (m, H-12 do derivado de β -amirina), 5,18 (m, H-12 do derivado de α -amirina), 7,57 (d, J = 8,4 Hz, H3' and H5'), 7,89 (d, J = 8,4 Hz, H2' and H6'). CG t.r. não determinado.

3.2.1.10. *p*-clorobenzoato de α e β -amirina (12)

O composto **12** foi preparado conforme procedimento descrito no item 4.2.1 utilizando uma solução da mistura de α e β -amirina (156,0 mg, 0,366 mmol) e cloreto de *p*-clorobenzoila (0,1 mL, 0,414 mmol) em piridina (5 mL). O produto purificado foi obtido como um sólido branco amorfo (147,7 mg, 71%). R_f = 0,82 utilizando a mistura hexano 95: 5 AcOEt como eluente e sílica como fase estacionária. Espectro IV (pastilha de KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1719 (C=O). Espectro RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 0,80 – 2,20 (perfil característico do triterpeno), 4,73 (m, H-3), 5,13 (m, H-12 do derivado de β -amirina), 5,19 (m, H-12 do derivado de α -amirina), 7,40 (d, J = 8,4 Hz, H3' e H5'), 7,97 (d, J = 8,4 Hz, H2' e H6'). CG t.r. não determinado.

3.2.2. Procedimento geral para acilação com anidridos de ácido carboxílico

A uma solução da mistura de triterpenos α e β -amirina (1eq) em acetato de etila foi adicionado uma quantidade em excesso do anidrido de ácido carboxílico apropriado e uma quantidade catalítica de 4-N,N-dimetilaminopiridina (DMAP). A mistura foi mantida em agitação sob refluxo e a formação do produto foi monitorada por cromatografia em camada delgada (SiO_2), utilizando sistema de eluente hexano 95 : 5 AcOEt, até que todo o substrato fosse consumido. A evaporação do solvente forneceu um sólido amorfo de coloração branca. Este resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (SiO_2) utilizando a mistura hexano:acetato de etila (95:5) como eluente, resultando nos derivados acilados de α e β -amirina.

3.2.2.1. Acetato de α e β -amirina (3)

O composto **3** foi preparado conforme procedimento descrito no item 4.2.2, utilizando uma solução da mistura de α e β amirina (608,7 mg, 1,428 mmol) e anidrido acético (8,0 mL, 84,7 mmol) em acetato de etila (20 mL). O produto purificado foi obtido como um sólido branco amorfo (638,0 mg, 100%). $R_f = 0,60$ utilizando a mistura hexano 95: 5 AcOEt como eluente e sílica como fase estacionária. Espectro IV (pastilha de KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1734 (C=O). Espectro RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm}) = 0,80 - 2,20$ (perfil característico do triterpeno), 2,05 (s, CH_3 acetil), 4,50 (m, H-3), 5,13 (m, H-12 do derivado de β -amirina), 5,18 (m, H-12 do derivado de α -amirina). CG [t.r. min]: 17,2 (38%) acetato de α -amirina e 18,1 (62%) acetato de β -amirina.

3.2.2.2. 2-carboxibenzoato de α e β -amirina (13)

O composto **13** foi preparado conforme procedimento descrito no item 4.2.2, utilizando uma solução da mistura de α e β amirina (105,5 mg, 0,247 mmol) e anidrido ftálico (45,0 mg, 0,304 mmol) em acetato de etila (10 mL). O produto purificado foi obtido como um sólido branco amorfo (50,0 mg, 50%). $R_f = 0,15$ utilizando a mistura hexano 90 : 10 AcOEt como eluente e sílica como fase estacionária. Espectro IV (pastilha de KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3434 (banda larga, OH do ácido), 1724 e 1704 (C=O). Espectro RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm}) = 0,80 - 2,20$ (perfil característico do triterpeno), 4,76 (m, H-3), 5,13 (m, H-12 do derivado de β -amirina), 5,19 (m, H-12 do derivado de α -amirina), 7,57 (m, H-3' e H-4'), 7,73 (m, H-5'), 7,88 (m, H-2'). CG t.r. não determinado.

3.2.3. Procedimento para a preparação do derivado 3-oxo α e β amirina (14)

3.2.3.1. Preparo do reagente PCC

À 1,4 mL de HCl 6M foram adicionados 736 mg de anidrido crômico rapidamente e com agitação por cerca de 5 min. A solução homogênea foi esfriada em banho de gelo onde 0,6 mL de piridina foram adicionadas, cuidadosamente e sob agitação, formando um sólido alaranjado que foi coletado em um funil de vidro sinterizado e seco. O reagente foi guardado em dessecador ao abrigo da luz⁽⁵⁷⁾.

3.2.3.2.3-oxo α e β amirina (14)

À uma solução de 500,0 mg de amirina em diclorometano, foram adicionados 336,6 mg de PCC. A solução foi mantida sob agitação à temperatura ambiente, até que todo o substrato fosse consumido. À mistura adicionou-se éter etílico ocasionando a formação de um precipitado escuro, que foi lavado várias vezes com esse mesmo solvente. Essa solução de éter foi filtrada em coluna de sílica gel e o eluato foi evaporado resultando em 452,7 mg (91%) de 3-oxoamirina, na forma de um óleo incolor. $R_f = 0,57$ utilizando a mistura hexano 95 : 5 AcOEt como eluente e sílica como fase estacionária. Espectro IV (pastilha de KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1704 (C=O). Espectro RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm}) = 0,80 - 2,20$ (perfil característico do triterpeno), 2,46 (m, 2H-2), 5,12 (m, H-12 do derivado de β -amirina), 5,18 (m, H-12 do derivado de α -amirina). CG [t.r. min]: 15,2 (38,2%) 3-oxo α -amirina e 15,8 (61,8%) 3-oxo β -amirina.

3.2.4. Procedimento para a preparação do derivado 3,11-dioxo α e β -amirina (15)**3.2.4.1. Preparação do reagente cromato de *t*-butila**

À 10,0 mL de *t*-butanol resfriado em banho de gelo foram adicionados 3,784 g de anidrido crômico. Após a solução ter atingido a temperatura ambiente foram adicionados 26,0 mL de CCl_4 . A mistura foi deixada em repouso para permitir a separação de uma pequena fase aquosa escura na superfície. A fase inferior foi recolhida, seca sob sulfato de sódio anidro e estocada à $\pm 5\text{ }^\circ\text{C}^{(58)}$.

3.2.4.2.3,11-dioxo α e β -amirina (15)

À uma solução de 504,2 mg (1,18 mmol) de amirina em clorofórmio foram adicionados 9,0 mL de anidrido acético, 12,8 mL de ácido acético e 9,0 mL do reagente cromato de t-butila. O sistema foi mantido sob refluxo até que todo substrato fosse consumido. Após atingir a temperatura ambiente, adicionou-se mais 130,0 mL de clorofórmio. Esta solução foi extraída repetidas vezes com solução aquosa de ácido oxálico 5% até que todo o excesso de sais dissolvidos na fase orgânica fosse completamente eliminado. A fase orgânica foi lavada com uma solução aquosa de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) 5%, seca sob sulfato de magnésio anidro, o solvente evaporado sob pressão reduzida e o produto bruto foi filtrado em coluna de sílica gel rendendo 414,0 mg (80%) do composto 3,11-dioxoamirina, na forma de um óleo de coloração amarelada. $R_f = 0,24$ utilizando a mistura hexano 95 : 5 AcOEt como eluente e sílica como fase estacionária. Espectro IV (pastilha de KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1708 (C=O), 1658 (C=C). Espectro RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm}) = 0,80 - 2,20$ (perfil característico do triterpeno), 5,58 (s, H-12 do derivado de β -amirina), 5,63 (s, H-12 do derivado de α -amirina). CG [t.r. min]: 19,2 (22,8%) 3,11-dioxo α -amirina e 19,8 (77,2%) 3,11-dioxo β -amirina.

3.2.5. Procedimento para a preparação do derivado Acetato de 11-oxo α e β -amirina (16)**3.2.5.1. Acetato de 11-oxo α e β -amirina (16)**

À uma solução de 205,7 mg (0,439 mmol) de acetato de amirina (**3**) em clorofórmio foram adicionados 9,01 mL de anidrido acético, 18,2 mL de ácido acético e 9,01 mL

do reagente cromato de t-butila. O sistema foi mantido sob refluxo por aproximadamente 6 horas. À mistura foram adicionados 130 mL de CHCl_3 a qual foi extraída repetidas vezes com uma solução aquosa de ácido oxálico a 5% até que todo o excesso de sais de cromo dissolvido na fase orgânica fosse completamente eliminado. A fase orgânica foi lavada com uma solução aquosa de bicarbonato de sódio a 5%, seca com sulfato de magnésio anidro, evaporada sob pressão reduzida e filtrada em coluna de sílica gel resultando em 132,2 mg (62%) de acetato de 11-oxo α e β -amirina, na forma de um sólido de coloração amarelada. $R_f = 0,38$ utilizando a mistura hexano 95 : 5 AcOEt como eluente e sílica como fase estacionária. Espectro IV (pastilha de KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1734 (C=O, ester) and 1655 (C=C). Espectro RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm}) = 0,80 - 2,20$ (perfil característico do triterpeno), 2,05 (s, CH_3 acetil), 2,34 (s, H-9), 4,53 (m, H-3), 5,54 (s, H-12 do derivado de β -amirina), 5,58 (s, H-12 do derivado de α -amirina). CG [t.r. min]: 22,2 (30%) acetato de 11-oxo α -amirina e 23,2 (70%) acetate de 11-oxo β -amirina.

3.3. Ensaio biológicos

3.3.1. Atividade antinociceptiva

A atividade antinociceptiva dos derivados de α e β -amirina foram determinadas pelo grupo do Professor Adair R. S. Santos do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.3.1.1. Nocicepção induzida pelo ácido acético

A nocicepção induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético (0,45 ml, 0,6%) foi realizada de acordo com os procedimentos previamente descritos^(59, 60), resultando na contração da musculatura abdominal juntamente com a extensão de uma das patas posteriores. Grupos de animais foram pré-tratados pela via intraperitoneal com diferentes doses (0,0001 - 30,0 mg kg⁻¹) dos derivados da mistura de α e β -amirina **2 – 16**, 30 min. antes da realização dos experimentos. Um grupo de animais controle foi tratado somente com uma solução salina, via intraperitoneal, com dose similar aos outros grupos (10 ml kg⁻¹). Um outro grupo foi tratado pela via intraperitoneal com diferentes doses (10 – 100 mg kg⁻¹) de aspirina, e ainda, um outro grupo recebeu diferentes doses (0,1 – 5 mg kg⁻¹) de morfina pela via subcutânea para controle positivo. Para avaliar a biodisponibilidade do composto quando administrado por via oral, octanoato de α e β -amirina **7** (1 – 30 mg kg⁻¹), foi administrado oralmente 60 min. antes da injeção de ácido acético. Os animais controle receberam uma dose similar da solução salina (10 mL kg⁻¹) via oral. A solução de morfina foi preparada em solução salina (NaCl 0,9%) e os derivados da mistura de α e β -amirina foram dissolvidos em tween 80 mais solução salina. Na solução final, a concentração de tween não excede a 5%. Após a injeção do ácido acético os camundongos foram colocados individualmente em cilindros de vidro de 20 cm de diâmetro e o número de contorções abdominais foi cumulativamente quantificado durante um período de 20 min. A atividade antinociceptiva foi determinada pela inibição do número das contorções abdominais observadas nos animais pré-tratados sistemicamente, intraperitoneal ou via oral, com os derivados da mistura de α e β -amirina.

3.3.1.2. Nocicepção induzida pela formalina

A metodologia utilizada foi essencialmente a mesma descrita por Santos e Calixto (1997)⁽⁶¹⁾. Os animais utilizados foram individualmente ambientados em funis de vidro. Um volume de 20 μ L de solução de formalina 2,5% (0,92% formaldeído) em salina foi injetado intraplantarmente na superfície ventral da pata direita do animal, sendo individualmente observado o tempo que os animais permaneceram lambendo ou mordendo a pata injetada de 0-5 min (fase neurogênica) e de 15-30 min (fase inflamatória) após a injeção da formalina. O tempo em que o animal permanece lambendo ou mordendo a pata injetada é considerado como indicativo de nocicepção. Os animais tratados receberam uma injeção intraperitoneal do composto octanoato de α e β -amirina **7** em diferentes doses (0,1 – 30 mg kg⁻¹) ou de solução salina (0,9% NaCl, 10 mL kg⁻¹, grupo controle) 30 min antes da administração da formalina.

3.3.1.3. Avaliação da atividade locomotora

Com o objetivo de avaliar o possível efeito sedativo ou relaxante não específico do derivado octanoato de α e β -amirina, os camundongos pré-tratados foram submetidos ao teste de campo aberto⁽⁶²⁾. O comportamento exploratório foi avaliado no teste do campo aberto como descrito previamente por RODRIGUES e colaboradores (1996)⁽⁶⁰⁾. O aparato consiste em uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm. O assoalho da arena é dividido em 12 quadrados iguais, e o número de cruzamentos (“crossings”) com as 4 patas foi contado cumulativamente durante 6

min. Os animais foram tratados via intraperitoneal (em doses de 0,1 – 30 mg kg⁻¹) ou oral (em doses de 10 – 300 mg kg⁻¹) com o derivado octanoato de α e β -amirina 7 e foram submetidos ao teste no campo aberto 30 e 60 min após o tratamento, respectivamente. Os animais controle receberam, intraperitonealmente, um volume similar do veículo (salina 0,9% NaCl, 10 mL kg⁻¹) 30 min antes da realização do experimento.

3.3.2. Atividade antifúngica

Os ensaios para determinar a atividade antifúngica foram realizados pelo grupo da Professora Maria A. Resende do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

3.3.2.1. Solventes usados na solubilização dos produtos naturais

Para dissolver e diluir os derivados da mistura dos triterpenos α e β -amirina, utilizou-se a mistura hexano - dimetilsulfóxido (DMSO) ou somente DMSO. Nos testes em que o solvente manteve contato com o microrganismo-teste (microdiluição), foi utilizado apenas dimetilsulfóxido por ser menos tóxico. Nos testes de bioautografia, onde o solvente é evaporado antes do contato com o microrganismo, foram usados hexano e DMSO.

3.3.2.2. Reagente usado para a revelação dos testes

Para a revelação dos testes de bioautografia direta foi usada uma suspensão

a 0,5 mg mL⁻¹ do sal de *p*-iodonitrotetrazolium Violet (INT) (Sigma), em etanol a 70%.

3.3.2.3. Meios de cultura

O meio de Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) foi utilizado para a manutenção das culturas fúngicas, o caldo Sabouraud para os testes de bioautografia, o Ágar Batata Dextrose foi para as curvas de crescimento dos fungos e o meio de RPMI 1640 (Sigma) tamponado com ácido morfolinepropano sulfônico (MOPS) (Sigma) para os testes de microdiluição.

3.3.2.4. Origem dos microrganismos

Os microrganismos utilizados foram os seguintes: *Candida albicans* (ATCC 18804), *C. glabrata* (ATCC 2001), *C. krusei* (ATCC 200298), *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *C. tropicalis* (ATCC 22019), além dos seguintes isolados clínicos de *C. albicans* (22, 25, 84, 119A e 119 B).

3.3.2.5. Preparo do inóculo

Para as espécies de *Candida* as amostras foram repicadas em estrias, 24 horas antes da realização dos testes e para *C. neoformans* 48 horas, em ASD e mantidas à 35°C. O inóculo foi feito de acordo com o documento NCCLS M27-A (2002).

Para o teste de microdiluição as amostras foram ressuspendidas, com o auxílio de uma alça de Henle, em solução fisiológica esterilizada e homogeneizadas em vórtex e ajustadas à turbidez de 0,5 da escala de Mc Farland, equivalente a

1×10^6 – 5×10^6 UFC/mL. A partir deste inóculo foram feitas diluições 1:50 e 1:20, correspondendo a um inóculo de 1×10^3 - 5×10^3 UFC/mL para as amostras de *Candida* spp. e *C. neoformans*. Para o *S. schenckii* foi feita apenas a diluição 1:50, correspondendo a 1×10^5 - 5×10^5 UFC/mL.

3.3.2.6. Método de Microdiluição para a Determinação da Quantidade Inibitória Mínima (QIM) e da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A QIM foi determinada pelo método de microdiluição em RPMI. Para os derivados da mistura de triterpenos α e β -amirina foi obtida a QIM e para a anfotericina B, a CIM.

Os derivados foram dissolvidos em 200 μ L do solvente específico para cada caso, e adicionados a 1800 μ L de RPMI. Posteriormente foram feitas diluições seriadas dos produtos naturais usando como diluente o próprio RPMI, e foi mantido o volume constante de 1000 μ L em cada tubo. Assim, as substâncias foram testadas em oito concentrações que variaram de 1000 a 7,8 μ g mL⁻¹. De cada diluição, alíquotas de 100 μ L foram distribuídas em orifícios da placa de microdiluição. Como controle de crescimento e de esterilidade foi usado somente o RPMI sem a adição do extrato e solvente. Como controle de toxidez do solvente foi usado o meio de cultura juntamente com o solvente. Como controles positivos foram usados o RPMI adicionado de anfotericina B. As concentrações do antifúngico de referência usadas variaram, desta forma, de 0,12 a 64,0 μ g mL⁻¹. Após a montagem das placas, cada orifício teste e controle de crescimento recebeu 100 μ L do inóculo microbiano. As placas foram incubadas e lidas após 48 horas para as amostras de *Candida* spp. a

temperatura de a 35 °C⁽⁶³⁾.

As CIMs e as QIMs foram consideradas como a menor concentração do produto natural ou antifúngico que inibiu totalmente o crescimento do microrganismo, em relação ao controle de crescimento, após a incubação e foram expressas em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Com derivado da mistura de α e β -amirina que apresentou um resultado mais promissor testou-se a eficácia contra isolados clínicos de *Candida albicans* de CIM \leq 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ao fluconazol.

3.3.2.7. Teste de adesão

Para a prévia exposição ao composto formiato de α e β -amirina **2**, este foi dissolvido em DMSO e caldo Sabouraud em quantidade suficiente para se obter uma solução final correspondente a QIM do derivado contra o fungo testado. Como controle positivo foi utilizado o fluconazol pelo método descrito por Ellepola e colaboradores (1999)⁶⁴. O fluconazol foi dissolvido em água e diluído em caldo Sabouraud dextrose em quantidade suficiente para obter uma solução final de 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Esta concentração foi escolhida por ter sido capaz de inibir o crescimento dos isolados a serem testados. As leveduras foram repicadas em ágar Sabouraud dextrose e incubadas a 37 °C por 24h. Preparou-se então uma suspensão de células em tampão fosfato a uma densidade óptica de 1,5 a 520 nm. Dessa suspensão de células, 1 ml foi adicionado a tubos contendo 4ml de caldo Sabouraud dextrose (controle) e 4 ml da solução do formiato de α e β -amirina/caldo Sabouraud dextrose, o que proporcionou uma suspensão final de 10^6 a 10^7 células/ml. Os tubos foram

incubados sob agitação a 37 °C por uma hora. Após essa breve exposição, o derivado de α e β -amirina foi removido por dois ciclos de diluição com tampão fosfato esterilizado. A suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 3000 xg e o pelet suspenso em 3 ml de tampão fosfato esterilizado. Esse procedimento reduz em 10000 vezes a concentração do formiato de α e β -amirina **2**, minimizando, assim, qualquer efeito residual. Antes do teste de adesão, o número de células controle foi reconstituído conforme a necessidade para que se obtivesse uma concentração comparável àquela da suspensão de células expostas ao Fluconazol e ao composto testado.

O método preconizado por Kimura e Pearsall (1978)⁽⁶⁵⁾ modificado foi utilizado para a preparação das células epiteliais bucais (CEB) utilizadas no teste de adesão. Células bucais humanas de adultos jovens saudáveis, não portadores de leveduras do gênero *Candida* na cavidade oral, foram coletadas pela manhã, no mesmo horário do dia, com o auxílio de dois swabs esterilizados, e depositados em 10 ml de tampão fosfato. A suspensão de CEB foi lavada quatro vezes em tampão fosfato esterilizado (3000xg por 10 min) para a remoção de microrganismos aderidos. As CEB foram então suspensas a uma concentração de 10^5 células/ml, contadas com o auxílio de uma câmara de Neubauer, e foram utilizadas imediatamente para o teste de adesão.

Para o teste, 0,5ml da suspensão de CEB e 0,5 ml da suspensão de leveduras foram misturados delicadamente e incubados sob agitação a 37 °C por uma hora. A mistura foi então filtrada em um filtro de policarbonato de poros de 12 μ m adicionando-se ainda 100ml de tampão fosfato para remoção de leveduras não aderidas. O filtro foi retirado com o auxílio de uma pinça e pressionado contra uma

lâmina de vidro. Após 10s, o filtro foi removido delicadamente, deixando as CEB aderidas à lâmina de vidro. A preparação foi seca, fixada pelo calor e corada com cristal violeta. O número de leveduras aderidas a 50 CEB foi quantificado por microscopia óptica. Células dobradas ou sobrepostas foram excluídas.

3.3.3. Atividade citotóxica frente a larvas de Artemia salina

A citotoxicidade dos derivados da mistura de α e β -amirina foi determinada no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Departamento de Química na Universidade Federal de Santa Catarina, sob a orientação da Professora Inês M. C. Brighenti. Este teste consiste em transferir aproximadamente 7-10 larvas para tubos de ensaio contendo salina e o composto a ser testado em diferentes concentrações (10 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Após 24 horas de contato conta-se os animais mortos. A DL_{50} foi obtida através do gráfico da % de animais mortos em função do logaritmo da dose testada. Foi conduzido um controle negativo (solvente onde foi diluído os compostos) e um controle positivo ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, $DL_{50} \sim 20\text{-}40 \mu\text{g mL}^{-1}$). O teste foi feito em triplicata.

4.Resultados e discussão

O tema desta dissertação é a utilização de uma mistura dos triterpenos α e β -amirina como modelo para a síntese de derivados estruturais. A mistura de α e β -amirina, na proporção 1:2, foi obtida do breu branco (resina de *Protium Heptaphyllum*) com 41% de rendimento, e caracterizada conforme procedimentos descritos por Susunaga e colaboradores (2001)⁽⁶⁶⁾. Além da síntese, reportamos aqui, a determinação da atividade farmacológica dos derivados sintéticos.

Os compostos sintetizados neste trabalho são simples do ponto de vista da química orgânica sintética. No entanto, há um interesse da indústria farmacêutica em investir na busca de moléculas pequenas e simples, com potencial terapêutico elevado, e que possam ser obtidas a partir de processos rápidos a baixo custo e sem complicações nas etapas de preparação e purificação.

Sabemos que o isolamento e a purificação são geralmente necessários quando se pretende determinar as propriedades biológicas da substância modelo. No entanto, a mistura de triterpenos α e β -amirina, na maioria das vezes é obtida sob a forma de uma mistura onde a proporção da cada um dos triterpenos vai depender da espécie vegetal. O triterpeno α -amirina possui um esqueleto básico do tipo ursano e o triterpeno β -amirina possui um esqueleto do tipo oleanano onde a única diferença entre eles é a posição de uma metila no anel E como mostrado na figura 2^(25, 26). Devido a semelhança estrutural, não foi possível separar essas duas substâncias por métodos cromatográficos convencionais como cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada preparativa. Desse modo, a pureza do

substrato está relacionada a presença de apenas esses dois compostos

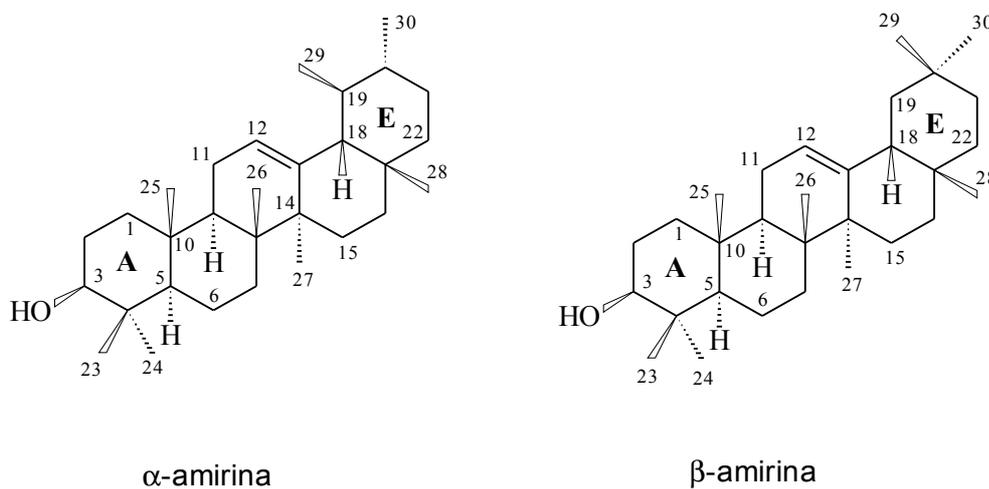


Figura 2 - estruturas dos triterpenos α -amirina (esqueleto tipo ursano) e β -amirina (esqueleto tipo oleanano)

Os derivados de α e β -amirina foram preparados mediante pequenas modificações estruturais, através de métodos convencionais descrito na literatura. Os compostos foram obtidos com rendimentos que vão de 35 a 100%, com elevado grau de pureza. Todos os compostos sintetizados neste trabalho foram caracterizados através dos dados espectroscópicos de RMN de ^1H e IV.

4.1. Caracterização dos compostos sintetizados

A caracterização estrutural de um produto obtido através de reações simples e bem conhecidas onde o substrato pode ser transformado apenas em poucas posições da molécula, torna-se mais simples do que a caracterização de um produto natural isolado diretamente da fonte vegetal. Em nosso trabalho, uma mistura dos triterpenos α e β -amirina foi submetida a modificações estruturais sobre o grupo OH em C3 e oxidação do carbono 11.

Desse modo, a maioria dos derivados são caracterizados através da análise dos espectros de IV e RMN ^1H juntamente com técnicas de cromatografia em camada delgada e cromatografia gasosa. O ponto de fusão dos derivados não foi determinado porque o composto de partida é uma mistura, com duas substâncias, que pode ser obtida em diferentes proporções dependendo da espécie vegetal de trabalho.

A primeira série de substâncias derivadas da mistura dos triterpenos pentacíclicos α e β -amirina foi uma série de ésteres de cadeia acíclica linear. Os derivados 3-O-acil de cadeia linear **2 - 9** (fig. 3) foram sintetizados para avaliar o parâmetro hidrofóbico sobre a atividade biológica. Os compostos foram preparados via equação química da figura 3. A esterificação do grupo OH livre em C3 ocorreu sob agitação e refluxo da mistura de α e β -amirina com os respectivos cloretos de acila em piridina, exceto para acetilação que foi realizada com anidrido acético e DMAP, e com rendimentos que variaram de 46 a 100%. No espectro de IV destes derivados, observamos principalmente o desaparecimento da banda atribuída ao

estiramento OH em aproximadamente 3296 cm^{-1} e o aparecimento de uma banda de carbonila cuja frequência é observada em 1715 cm^{-1} para o formil derivado e na região de 1735 cm^{-1} para os demais acil derivados (**4 – 9**). As estruturas foram confirmadas, por RMN ^1H , observando o deslocamento do sinal referente ao H3 para campo mais baixo (de $\sim 3,20$ ppm na mistura de α e β -amirina para $\sim 4,5$ ppm no acil derivado) devido ao efeito de desproteção anisotrópica conferido pela carbonila acíclica quando da acilação do grupo OH em C3. Na região de 0,8 a 2,0 ppm, os espectros de RMN ^1H de todos os derivados se mostraram semelhantes ao espectro do substrato (**1**).

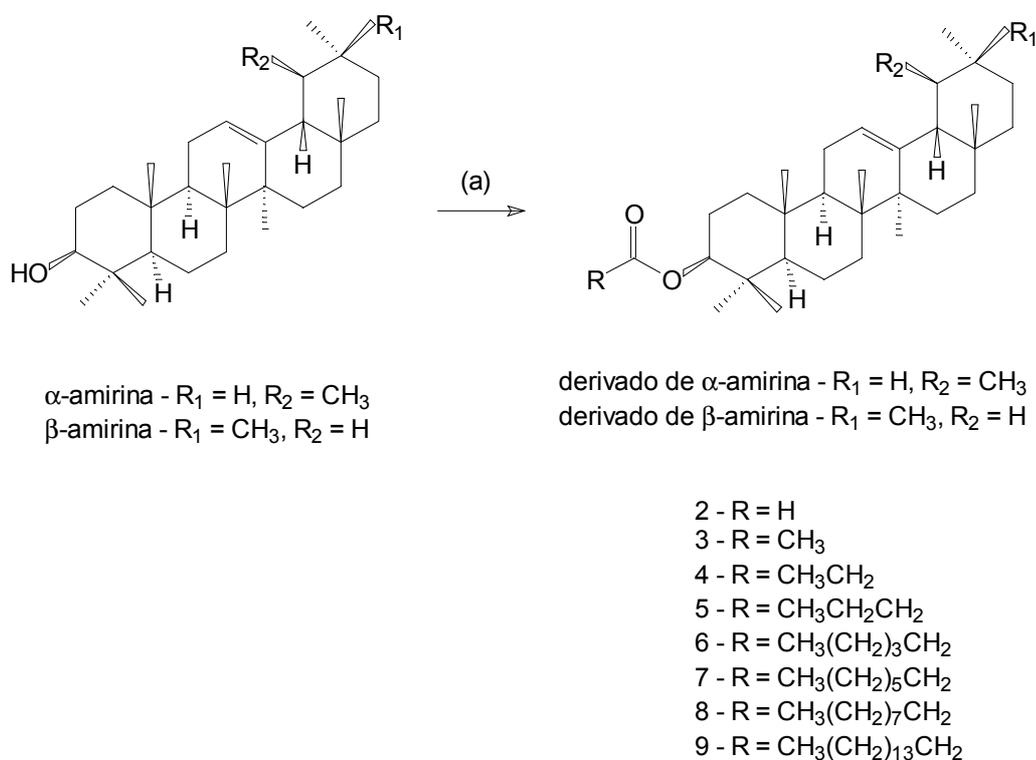


Figura 3 – equação química para a síntese dos derivados ester de cadeia linear da mistura de α -amirina ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{CH}_3$) e β -amirina ($R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{H}$). a) anidrido acético, DMAP, AcOEt para composto 3 e cloreto de acila, piridina para os outros compostos (2 e 4 – 9).

Sob as mesmas condições de reação, os derivados benzoilados de α e β -amirina 10, 11 e 12 foram preparados com os respectivos cloretos de benzoila em piridina. A substância 2-carboxi benzoato de α e β -amirina (13) foi preparada a partir da agitação, sob refluxo, do composto 1 com anidrido ftálico e DMAP em acetato de etila. Os derivados de ácido benzóico foram preparados numa tentativa de avaliar as influências eletrônicas e estéricas de grupos inseridos no anel aromático, e correlacionar a atividade biológica com os valores das constantes de Hammett dos substituintes. Essa correlação entre as constantes de Hammett e os valores da atividade biológica podem fornecer valiosas informações a respeito das interações do composto com seu alvo biológico. Quando o fármaco atinge seu alvo terapêutico, a distribuição de elétrons em sua estrutura ditará os tipos de interações que serão formadas com o sítio ativo, podendo também afetar a potência da atividade biológica^(23, 24). Os poucos derivados de ácido benzóico preparados até o momento não apresentaram nenhuma correlação significativa. Os compostos 10 - 13 foram preparados de acordo com a equação química da figura 4. A formação dos produtos indicados foi observada através dos espectros de IV mostrando o aparecimento de bandas de absorção para o grupo carbonila de ester na região entre 1700 e 1720 cm^{-1} , além do desaparecimento da banda de absorção do grupo OH presente no composto 1. As estruturas destes derivados foram confirmadas, por RMN ^1H , pela presença do sinal na região de 4,75 ppm atribuído ao H3, deslocado para campo mais baixo devido ao efeito de desproteção anisotrópica da carbonila, além dos sinais para os hidrogênios de anel aromático que exibiram deslocamentos químicos e constantes de acoplamento previstas para cada substituinte.

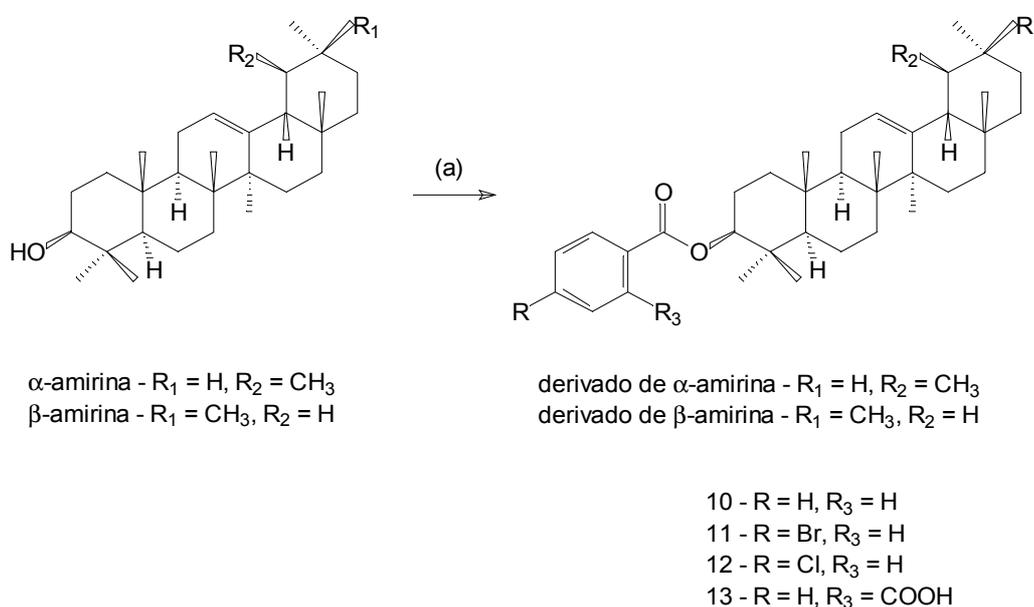


Figura 4 – equação química para a síntese dos derivados ésteres de ácido benzóico da mistura de α -amirina ($R_1 = H, R_2 = CH_3$) e β -amirina ($R_1 = CH_3, R_2 = H$). a) anidrido ftálico, DMAP, AcOEt para composto **13** e cloreto de acila, piridina para os outros compostos (**10 – 12**).

Os derivados oxidados de α e β -amirina foram sintetizados conforme esquemas apresentados na figura 5. O composto 3-oxo α e β -amirina (**14**) foi preparado, em 91% de rendimento, pela oxidação de **1** com o reagente PCC (clorocromato de piridínio) em diclorometano. PCC foi facilmente preparado pela adição de piridina a uma solução de anidrido crômico (CrO_3) em HCl 6M seguido de filtração onde se obtém um sólido laranja. O composto **15** foi sintetizado pela oxidação do C3 e do C11 com cromato de *t*-butila em 80% de rendimento. Este agente oxidante é um bom reagente para a oxidação de carbonos alílicos e é preparado a partir de anidrido crômico, álcool *t*-butílico e tetracloreto de carbono. O

composto **3** foi utilizado como substrato para a preparação do derivado acetato de 11-oxo- α e β -amirina (**16**) através da oxidação do carbono alílico com cromato de *t*-butila, em 62% de rendimento. No espectro de IV destes derivados observamos o aparecimento de bandas atribuídas as carbonilas de grupo cetona. No espectro de RMN ^1H , observamos o desaparecimento dos sinais em 3,21 ppm, para **14** e **15**, atribuídos ao H3. Além disso, a mudança na multiplicidade do sinal de H12 de **15** e **16**, que com a oxidação em C11 passou de tripleto pra singlete, além do aparecimento de um sinal em 2,4 ppm, atribuído ao H9, que nestes derivados sofre a influência de desproteção anisotrópica da carbonila em C11, confirmam a estrutura destes compostos.

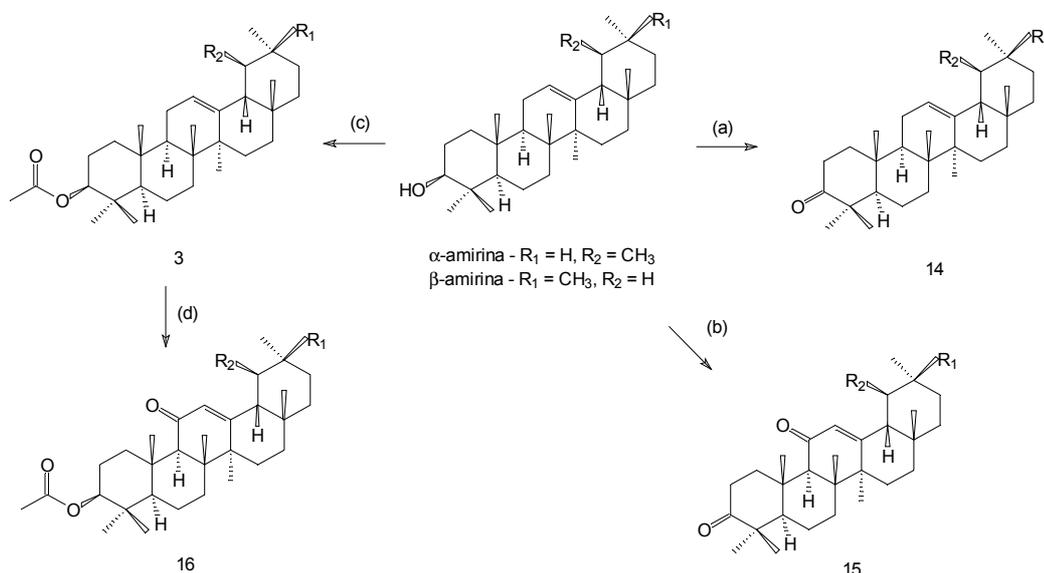


Figura 5 – equação química para a síntese dos derivados oxidados da mistura de α -amirina ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{CH}_3$) e β -amirina ($R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{H}$). a) PCC, CH_2Cl_2 ; b) cromato de *t*-butila, CHCl_3 , Ac_2O , AcOH , refluxo durante 6 horas; c) Ac_2O , AcOEt , DMAP, refluxo; d) cromato de *t*-butila, CHCl_3 , Ac_2O , AcOH , refluxo durante 6 horas

Os triterpenos α e β -amirina e os derivados foram submetidos a análise por cromatografia gasosa. Nos cromatogramas, observamos sempre a presença de dois picos na proporção 1:2. O primeiro pico é referente ao triterpeno α -amirina e o segundo pico à β -amirina. Embora as duas estruturas sejam muito parecidas, conseguimos separar essas substâncias por cromatografia gasosa, já que a interação da ligação dupla com a fase estacionária em α -amirina é diminuída pelo posicionamento da metila 29. A posição da metila em C19 no triterpeno α -amirina aumenta o impedimento estéreo próximo à ligação dupla, diminuindo sua interação com a fase estacionária em relação a β -amirina. A reatividade do metileno alílico C-11 também é afetada como pode ser observado pela proporção de α e β -amirina na formação dos derivados oxidados na posição C11 (**15** e **16**) onde os derivados de α -amirina se formaram em uma quantidade menor do que a do substrato.

4.2. Atividade antinociceptiva

Os efeitos antinociceptivos da mistura de α e β -amirina e seus derivados estruturais foram verificados no teste das contorções abdominais induzidas por injeção intraperitoneal de ácido acético. Os resultados farmacológicos (DI_{50} calculadas com limite de confiança de 95%) da potência analgésica são apresentados na tabela 2. Como substâncias padrão para comparação, foi incluído o efeito antinociceptivo da aspirina e da morfina.

O teste de nocicepção induzida por injeção de ácido acético consiste em induzir dor em camundongos através da injeção de ácido acético (0,6%) e verificar as contorções abdominais, que é a resposta à dor que os camundongos estão

sentindo, após o tratamento com os compostos candidatos a drogas analgésicas. A atividade analgésica é determinada tomando-se como base, a inibição do número de contorções abdominais dos animais pré-tratados com as diferentes doses dos derivados da mistura dos triterpenos α e β -amirina, comparando-se com o número de contorções abdominais dos animais controle. Desse modo, quanto menor for a dose do derivado de α e β -amirina capaz de inibir 50% (DI_{50}) das contorções abdominais dos camundongos, maior é a atividade antinociceptiva do composto. Na tabela 2 estão relacionados os resultados expressos em DI_{50} .

O tratamento intraperitoneal dos animais com todos os derivados sintetizados (incluindo a mistura de α e β -amirina) não produziram nenhuma alteração comportamental nos camundongos, sugerindo a ausência de alguma ação no sistema nervoso central. No entanto, exibiram significativa inibição das contorções abdominais, induzidas por injeção de ácido acético, na forma dependente da dose.

Tabela 2 - Efeito antinociceptivo dos derivados estruturais da mistura de triterpenos pentacíclicos α e β -amirina no modelo de dor induzida por ácido acético

Composto	Log P (Calculado ^c)	DI ₅₀ (mg kg ⁻¹)	Mm (g mol ⁻¹)	DI ₅₀ (μ mol kg ⁻¹)	Inibição (%)
1 ^a	8,73 (\pm 0,72)	0,79 (0,63–1,01)	426	1,85	84 \pm 3
2	8,97 (\pm 0,79)	2,93 (2,29–3,74)	454	6,45	94 \pm 3
3	9,38 (\pm 0,78)	2,65 (2,24–3,13)	468	5,66	80 \pm 5
4	9,77 (\pm 0,86)	0,42 (0,26–0,68)	482	0,87	95 \pm 2
5	10,19 (\pm 0,99)	2,81 (1,82–4,35)	496	5,66	87 \pm
6	10,70 (\pm 1,30)	0,54 (0,30–0,97)	524	1,04	95 \pm 3
7	11,38 (\pm 1,65)	0,003 (0,001–0,005)	552	0,0055	85 \pm 5
8	12,02 (\pm 2,21)	2,44 (1,82–3,26)	580	4,20	96 \pm 3
9	13,44 (\pm 3,54)	2,60 (2,11–3,19)	664	3,91	80 \pm 6
10	10,49 (\pm 1,15)	2,84 (2,29–3,52)	530	5,26	94 \pm 3
11	10,72 (\pm 1,40)	2,86 (1,82–4,50)	609	4,69	93 \pm 3
12	10,75 (\pm 1,41)	5,36 (4,25–6,76)	564	9,49	91 \pm 6
13	9,92 (\pm 1,45)	16,37 (11,65–23,02)	574	28,52	70 \pm 13
14	8,48 (\pm 0,57)	2,63 (1,72–4,03)	424	6,0	89 \pm 4
15	7,18 (\pm 0,83)	3,17 (2,56–3,93)	438	7,23	86 \pm 6
16	8,07 (\pm 0,93)	2,20 (1,92–2,52)	482	4,56	76 \pm 9
Aspirina ^b	1,34 (\pm 0,16)	24,0 (13,1–43,8)	180	133	83 \pm 1
Morfina	1,14 (\pm 0,66)	0,67 (0,56–0,81)	285	2,35	100 \pm 0

Dados de ^a[40] e ^b[67]. ^cCalculado no programa alogps in <http://vcclab.org/lab/alogps>.

Na figura 6 estão representados os gráficos de 1/atividade antinociceptiva contra os derivados de α e β -amirina. No gráfico A, estão representados os resultados em escala normal que mostra os valores de DI_{50} para todos os compostos destacando a potente inibição nociceptiva do composto octanoato de α e β -amirina (**7**). No gráfico B, mostramos o zoom do gráfico A no intervalo de DI_{50} entre 0 e 2,0, para conseguir visualizar o restante dos compostos e fazer uma análise comparativa entre a atividade com a estrutura química dos derivados.

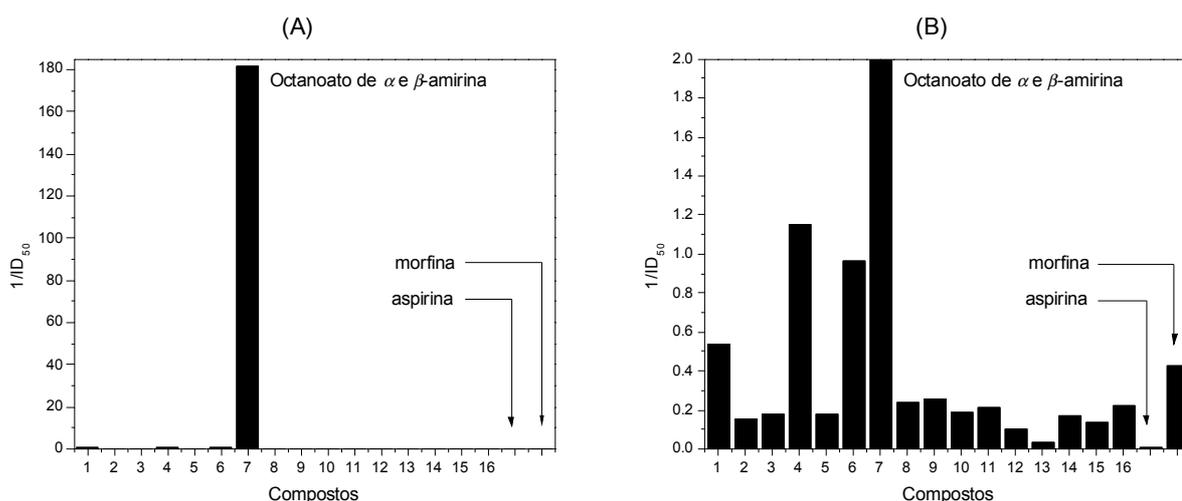


Figura 6 - gráfico de 1/atividade antinociceptiva (em $(\mu\text{mol}/\text{kg})^{-1}$) vs derivados de α e β -amirina. A) Gráfico com escala total. B) Zoom do gráfico A.

A acilação na posição 3 da mistura de α e β -amirina introduzindo os grupos formil (**2**), acetil (**3**), butanoil (**5**), decanoil (**8**), palmitoil (**9**), benzoil (**10**), p-bromobenzoil (**11**) e p-clorobenzoil (**12**) formou compostos que se mostraram menos ativos em relação à mistura de α e β -amirina, neste modelo de dor, o que também foi

observado para os compostos oxidados (**14**, **15** e **16**). Além disso, a acilação na posição 3 introduzindo um grupo 2-carboxibenzoil (**13**) resultou em uma significativa redução na atividade antinociceptiva, embora o composto seja 4,66 vezes mais potente que a aspirina. Por outro lado, a atividade antinociceptiva dos derivados propanoil (**4**), hexanoil (**6**) e octanoil (**7**) foi encontrada ser **2,16**, **1,77** e **336** vezes mais potente (em $\mu\text{mol/ kg}$) quando comparadas à atividade da mistura de α e β -amirina (**1**).

O modelo de dor induzida por injeção de ácido acético apresenta boa sensibilidade, mas mostra pobre especificidade devido ao fato de que as contorções abdominais podem ser inibidas por relaxantes musculares abrindo espaço para má interpretação dos resultados. Este problema pode ser evitado complementando o teste com outros modelos de nocicepção e testes de atividade locomotora. Por esta razão o composto testado mais potente, octanoato de α e β -amirina (**7**), também foi avaliado quanto a sua ação no modelo de dor induzida por injeção intraplantar de formalina (2,5%) e no teste de atividade locomotora em campo aberto.

Quando avaliado no teste da formalina, foi possível confirmar a ação antinociceptiva do derivado octanoato de α e β -amirina (**7**). O modelo de nocicepção induzida pela formalina permite avaliar dois tipos distintos de nocicepção: a de origem neurogênica (estimulação direta das fibras nociceptivas) e a de origem inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios)^(68, 69). De forma evidente, pôde ser observado que o derivado octanoato de α e β amirina (**7**) possui ação antinociceptiva maior na fase inflamatória com DI_{50} $9,71 \mu\text{mol kg}^{-1}$ e uma inibição de $89,6 \pm 6\%$ a uma dose de 30 mg kg^{-1} , sugerindo que o composto possa ter inibido o edema da pata associado a fase inflamatória. Por outro lado, o derivado

7 não aumentou a inibição, na primeira fase da formalina, em relação ao grupo controle.

O derivado octanoato de α e β -amirina (**7**) quando administrado tanto pela via oral quanto pela via intraperitoneal não ocasionou nenhuma mudança na atividade locomotora dos ratos, uma vez que, não houve diferença significativa entre o controle e os grupos tratados. Os resultados da tabela 3 indicam que quando os ratos receberam diferentes doses do derivado octanoato de α e β -amirina (**7**), tanto via oral como intraperitoneal, o número de cruzamentos dos quadrados do campo não alterou significativamente em relação ao grupo que não recebeu a dose do derivado **7** (0 mg kg^{-1}).

Tabela 3 – Efeito do derivado octanoato de α e β -amirina (**7**) na atividade locomotora

Dose (mg kg^{-1})	Rota	Campo aberto (número de cruzamentos)
0	ip	$120,7 \pm 6,5$
0,1	ip	$127,6 \pm 16,6$
1	ip	$122,3 \pm 26,5$
10	ip	$96,8 \pm 22,2$
30	ip	$87,2 \pm 16,8$
0	op	$156,0 \pm 13,8$
10	op	$146,7 \pm 10,7$
30	op	$131,7 \pm 16,9$
100	op	$174,0 \pm 22,4$
300	op	$114,5 \pm 25,6$

ip – rota intraperitoneal; op – rota oral

O efeito antinociceptivo do derivado octanoato de α e β -amirina (**7**) também foi avaliado quando o composto foi administrado por via oral, no modelo de dor induzida por ácido acético. A avaliação da atividade por via oral é importante porque esta é a principal via de entrada de medicamentos. Além disso, o meio pelo qual os fármacos entram no corpo é importante para determinar o efeito final dos compostos. A administração oral do derivado octanoato de α e β -amirina (**7**) 60 min antes da injeção irritante (doses de 1 – 30 mg kg⁻¹), reduziu significativamente as contorções induzidas pelo ácido acético. A DI₅₀ calculada foi 12,95 (10,76 – 15,57) μ mol kg⁻¹ e a inibição observada foi de 72,0 \pm 9% a uma dose de 30 mg kg⁻¹. Assim, este resultado demonstrou que o derivado octanoato de α e β -amirina (**7**) foi menos potente em inibir a nocicepção causada por ácido acético quando ele foi administrado oralmente em comparação com a administração intraperitoneal.

Nos modelos experimentais pré-clínicos utilizados neste trabalho para avaliar a atividade antinociceptiva, contorção abdominal causada pela injeção de ácido acético 0,6% e nocicepção induzida por injeção intraplantar de formalina (2,5%), todos os compostos apresentaram-se mais potentes que analgésicos comuns. Com relação a aspirina, os derivados testados foram de **4,6** a **24180** (em μ mol/ kg) vezes mais potentes. Além disso, os derivados propanoato de α e β -amirina (**4**), hexanoato de α e β -amirina (**6**) e octanoato de α e β -amirina (**7**) exibiram importante efeito analgésico sendo, respectivamente, **2,7**, **2,2** e **427** (em μ mol/ kg) vezes mais potentes que a morfina. É importante destacar que a atividade analgésica dos derivados da mistura de α e β -amirina não envolve componente central, mas provavelmente é devido a um efeito periférico como demonstrado pelo teste de atividade locomotora nos ratos.

4.3. Atividade antifúngica

Neste trabalho, a atividade antifúngica foi avaliada contra 5 diferentes espécies de *Candida*. A concentração inibitória mínima da mistura de α e β -amirina e seus derivados estruturais (tabela 4) foi determinada contra *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Os compostos onde os resultados da concentração inibitória mínima ficaram acima de 1000 nmol mL⁻¹ foram considerados inativos.

Este ensaio consiste em determinar a menor concentração, do derivado da mistura de α e β -amirina ou antifúngico utilizado como substância padrão, que inibe totalmente o crescimento do microrganismo em relação ao controle de crescimento. Desse modo, o composto mais ativo será o que apresentar uma concentração inibitória mínima menor.

Entre os quinze derivados de α e β -amirina, obtivemos interessantes resultados para as espécies de *Candida* testadas. Os compostos ativos ficaram na faixa de concentração em nanomolar e os resultados mais promissores são aqueles abaixo de 150 nmol mL⁻¹. A tabela 4 apresenta estes resultados expressos em CIM (nmol mL⁻¹).

Tabela 4 – Concentração inibitória mínima (nmol mL⁻¹) da mistura de α e β -amirina e dos seus derivados contra diferentes espécies de *Candida*

Composto	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida kruzei</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
1	293,42	70,42	293,42	586,85	140,00
2	132,15	66,07	550,66	132,15	550,66
3	534,18	267,09	534,18	64,10	534,18
4	na	124,48	na	124,48	518,67
5	na	na	na	252,01	na
6	na	na	na	238,54	na
7	na	452,89	452,89	452,89	452,89
8	862,06	215,51	431,03	215,51	431,03
9	na	na	na	753,01	na
10	na	943,39	na	235,84	na
11	na	410,50	na	98,52	na
12	na	221,63	221,63	53,19	53,19
13	na	na	na	na	na
14	na	na	na	na	na
15	na	na	na	na	na
16	na	na	na	578,70	na
Fluconazol	6,37	104,57	3,26	6,37	0,54
Anfotericina B	0,27	0,54	1,08	1,08	2,94

na – Composto não ativo contra a espécie de *Candida* testada.

Dos compostos testados, os derivados α e β -amirina (**1**), formiato de α e β -amirina (**2**), acetato de α e β -amirina (**3**) e decanoato de α e β -amirina (**8**), inibiram todas as espécies de *Candida* testadas, em concentrações que vão de 66 a 862 nmol mL⁻¹. A levedura *Candida Krusei* foi a espécie mais sensível para os compostos **1** e **2**, e a espécie *Candida tropicalis* mostrou maior sensibilidade para o composto **3**. O derivado decanoato de α e β -amirina (**8**) não exibiu resultados muito significantes, apresentando valores próximos de 1000 nmol mL⁻¹, embora tenha inibido todas as espécies de *Candida* testadas.

O derivado *p*-clorobenzoato de α e β -amirina (**12**) também exibiu significativa atividade antifúngica contra *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*, sendo que foi o composto mais ativo da série com uma concentração inibitória mínima de 53,19 nmol mL⁻¹. No entanto, mostrou-se inativo contra as outras três espécies de *Candida* testadas.

Apenas os derivados 2-carboxibenzoato de α e β -amirina (**13**), 3-oxo- α e β -amirina (**14**) e 3,11-dioxo- α e β -amirina (**15**) não exibiram atividade antifúngica contra as espécies de *Candida* testadas. O derivado acetato de 11-oxo- α e β -amirina (**16**), também não exibiu uma atividade antifúngica significativa, inibindo somente a espécie *Candida tropicalis* a uma concentração de 578,70 nmol mL⁻¹. Estes resultados sugerem que as conformações dos anéis “A” e “C” dos triterpenos α e β -amirina exercem um papel importante no grupo farmacofórico e que as interações dos grupos carbonílicos dos derivados **14**, **15** e **16** não são de grande importância na interação com o receptor. Este fato fica mais evidente quando comparamos o derivado acetato de α e β -amirina (**3**) com o derivado acetato de 11-oxo α e β -amirina (**16**). Quando o composto **3** é oxidado na posição alílica (C11), formando o

derivado **16**, há uma significativa diminuição na atividade antifúngica contra a espécie *Candida tropicalis*. Da mesma forma, quando oxidamos o grupo OH na posição C3 do composto **1**, obtivemos o composto **14** que não apresentou atividade antifúngica contra as espécies de *Candida* testadas. A oxidação adicional na posição C11 do composto 3-oxo α e β -amirina (**14**) não produziu um composto com melhor atividade antifúngica contra as 5 diferentes espécies de *Candida* que foram testadas neste trabalho.

O derivado formiato de α e β -amirina (**2**) exibiu o melhor resultado para atividade antifúngica contra *C. albicans*. Isso nos levou a testar a sua capacidade de inibir a adesão desta espécie de *Candida* em células epiteliais bucal humanas. O composto **2** inibiu a adesão de *C. albicans* nas células epiteliais bucal em 65,3%. Este resultado é comparado ao fármaco fluconazol, que há muito tempo já está disponível comercialmente para o tratamento da candidíase oral, que apresentou porcentagem de inibição de 63,5%. A anfotericina B que também é um fármaco muito utilizado como antifúngico inibiu a adesão de *C. albicans* em 93,4%. O DMSO, que foi utilizado como controle, inibiu a adesão em 17,5%.

Estes resultados obtidos com espécies oportunistas de *Candida* são interessantes, porque o fluconazol e a anfotericina B são amplamente usados na terapia de infecções por *Candida*. Contudo, *C. krusei* e *C. glabrata* tem uma alta propensão a desenvolver resistência a anfotericina B⁵¹. *Candida krusei* é também resistente a fluconazol e, segundo Kromery e Barmes⁷⁰, 30% das espécies resistentes a fluconazol também são resistentes a anfotericina B.

4.4. Atividade citotóxica frente a larvas de *Artemia salina*

Antes de uma droga ser submetida a triagens clínicas, ela deve ter sua toxicidade determinada. Uma avaliação segura geralmente inicia com teste *in vitro* e *in vivo* para examinar os efeitos na reprodução das células e identificar potenciais carcinógenos. No entanto, os testes de toxicidade envolvem uma grande variedade de diferentes testes *in vitro* e *in vivo* que são capazes de revelar diferentes tipos de toxicidade. Desse modo, esses métodos não são infalíveis e ainda um novo e inesperado efeito tóxico pode aparecer durante as triagens clínicas que exigirão o desenvolvimento de um novo teste. Por exemplo, quando a talidomida foi desenvolvida, ninguém imaginava que alguma droga poderia causar deformidades no feto e então não havia nenhum teste para isso²⁴.

Embora o ensaio de toxicidade frente larvas de *Artemia salina* é uma ferramenta muito utilizada para o isolamento de compostos bioativos, ele pode ser empregado como um screening inicial para determinar a citotoxicidade de candidatos a drogas. O ensaio é de baixo custo, não é complicado para realizar e de fácil manuseio, não requerendo equipamentos especiais ou técnicas assépticas. Se alguns fatores como temperatura, composição e salinidade do meio e ainda a idade das larvas são consideradas, os resultados exibirão uma reprodutibilidade satisfatória. Estas vantagens tornam o ensaio com *Artemia salina* atrativo embora possua uma limitação quanto a elucidação de mecanismos de ação⁵⁶.

A letalidade de *Artemia salina* frente a mistura de triterpenos α e β -amirina e de seus derivados são apresentados na tabela 5.

Tabela 5 – Dose letal da mistura de α e β -amirina e seus derivados frente a larvas de *Artemia salina*

Composto	DL ₅₀ [$\mu\text{g mL}^{-1}$] (limite de confiança)	DL ₅₀ ($\mu\text{mol mL}^{-1}$)
1	151,30 (134,40–170,45)	0,355
2	223,87 (174,78–286,75)	0,493
3	169,82 (140,38–205,45)	0,363
4	85,11 (70,80–102,31)	0,176
5	147,91 (131,22–166,72)	0,298
6	89,12 (70,93–111,98)	0,170
7	131,82 (117,84–147,47)	0,238
8	104,71 (82,98–132,14)	0,181
9	102,33 (2,11–3,19)	0,154
10	81,28 (66,82–98,89)	0,153
11	69,18 (52,37–91,41)	0,113
12	100,00 (78,41–127,53)	0,177
13	81,28 (69,79–94,67)	0,141
14	75,86 (68,26–84,31)	0,179
15	97,72 (84,03–113,65)	0,223
16	87,10 (77,57–97,79)	0,180
K ₂ Cr ₂ O ₇	24,40 (18,78–35,60)	0,082

Todas as substâncias testadas apresentaram atividade citotóxica para larvas de *Artemia salina*, porém nenhuma teve seu valor de DL₅₀ próximo da substância controle (K₂Cr₂O₇, DL₅₀ = 0,082 μmol mL⁻¹). De todos os quinze derivados testados, apenas os compostos formiato de α e β-amirina (**2**) e acetato de α e β-amirina (**3**) apresentaram um nível de toxicidade menor que o composto de partida. Todos os outros derivados são mais tóxicos que a mistura de α e β-amirina e o composto mais tóxico foi o *p*-bromobenzoato de α e β-amirina (**11**).

Os derivados oxidados **14** – **16** apresentaram interessante atividade citotóxica. A oxidação de **1** na posição C3 levou a um aumento da potência de cerca de 2 vezes em relação a substância de partida. No entanto, a oxidação adicional levando ao 3,11-dioxo α e β-amirina (**15**) causou um decréscimo na atividade citotóxica em relação a **14**, mas ainda assim cerca de 1,5 vezes mais potente que a mistura de α e β-amirina (**1**).

Embora estes resultados sejam preliminares e exijam testes complementares, são interessantes porque nem o composto octanoato de α e β-amirina (**7**) e nem o composto formiato de α e β-amirina (**2**) exibiram alta toxicidade e são promissores candidatos a drogas com ação analgésica e antifúngica, respectivamente.

4.5. Relação entre a lipofilicidade dos derivados de α e β -amirina e a atividade biológica

A lipofilicidade é uma propriedade físico-química bem conhecida que influencia a atividade biológica afetando a absorção, transporte, distribuição e excreção do composto no organismo humano. Esta propriedade tem um importante efeito sobre as fases farmacocinética e farmacodinâmica das moléculas. Acredita-se que o aumento da atividade em função do aumento do número de grupamentos metileno provavelmente deve-se a um aumento na lipossolubilidade do análogo, o que produz uma melhor difusão do composto através das membranas. Inversamente, atribui-se uma diminuição de atividade em função do aumento do número de grupamentos metileno à redução de sua solubilidade no meio aquoso intra e extracelular^(23, 24).

Para um estudo preliminar de correlação estrutura molecular e atividade biológica, utilizamos o programa ALOGPS 2.1 (disponível on-line: <http://vcclab.org/lab/alogps>) para calcular o Log P de cada derivado de α e β -amirina. Os programas on-line da "Virtual Computational Chemistry Laboratory (www.vcclab.org)" tem sido utilizado por vários autores^(71 - 74) para complementar os resultados apresentando boa correlação com os dados experimentais.

4.5.1. Atividade antinociceptiva vs Log P

Na tentativa de avaliar se a lipofilicidade está relacionada com a atividade antinociceptiva, foram utilizados os resultados obtidos no modelo de dor induzida por injeção de ácido acético na forma de Log 1/ DI₅₀ vs Log P.

Nos gráficos da figura 7, apresentamos o plot de Log 1/DI₅₀ versus os valores calculados de Log P para os derivados de α e β -amirina. No gráfico A (figura 7), foram plotados todos os derivados testados os quais apresentaram Log P entre 7 e 14. Considera-se que os valores ideais de Log P sejam abaixo de 3 pois assim os compostos seriam mais solúveis no meio aquoso o que facilitaria o transporte no organismo.. Entre os compostos testados, não podemos concluir algo quanto aos derivados benzoílicos (**10, 11, 12, 13**) e aos derivados oxidados (**14, 15 e 16**) que apresentaram um nível semelhante de atividade antinociceptiva.

Considerando que esses derivados podem exercer também outros efeitos como efeitos eletrônicos, além da lipofilicidade, plotamos no gráfico B da figura 7 somente os ésteres de cadeia alquílica linear. A diferença entre os compostos testados **1 – 9** é o tamanho da cadeia alquílica que mostra um aumento linear da lipofilicidade conforme aumenta o tamanho da cadeia carbonada. Estes compostos podem apresentar uma boa correlação entre a atividade antinociceptiva e Log P.

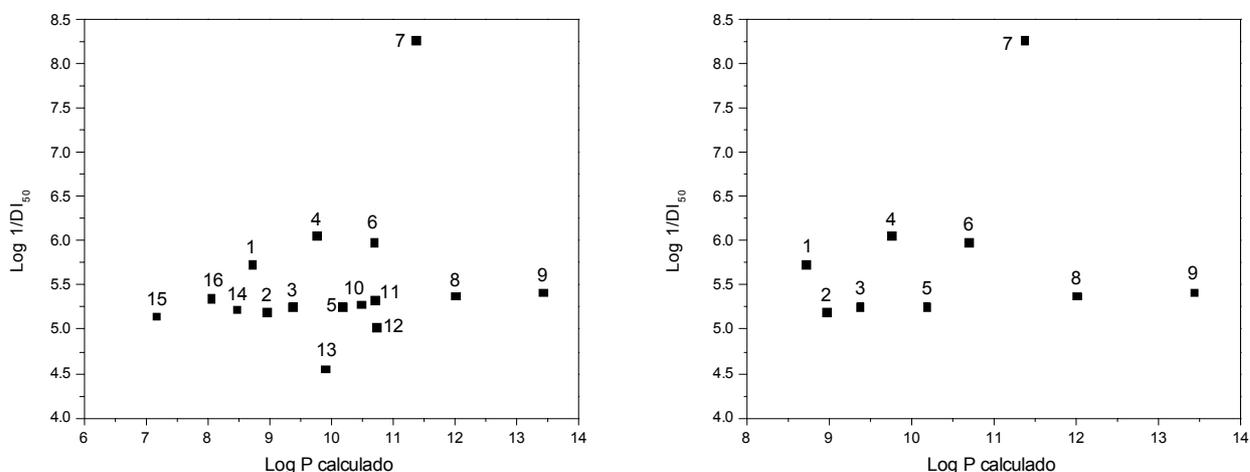


Figura 7 – gráfico de 1/ atividade antinociceptiva vs log P teórico para os ésteres de cadeia linear de α e β -amirina

Nos gráficos da figura 7, um importante efeito hidrofóbico pode ser observado com um efeito máximo para o derivado octanoil (**7**) apresentando uma interação hidrofóbica crítica na atividade antinociceptiva dos derivados de α e β -amirina. A existência de um valor máximo com oito carbonos, implica que a estrutura do derivado octanoato de α e β -amirina (**7**) possui um equilíbrio apropriado entre a hidro e a lipossolubilidade. Por outro lado, a grande potência deste derivado pode também estar relacionada com uma forte interação com uma bolsa hidrofóbica* na proteína receptor, fazendo com que o composto **7** apresente uma atividade destacada em relação aos demais derivados.

* Região da proteína receptor composto principalmente por aminoácidos apolares arranjados de tal forma que se forma um bolso para o sítio ativo.

4.5.2. Atividade antifúngica vs Log P

Os resultados obtidos para atividade antifúngica contra espécies de *Candida* não permitiram fazer uma correlação entre a lipofilicidade dos derivados de α e β -amirina e atividade antifúngica porque vários compostos se mostraram inativos contra as espécies de *Candida* testadas. A espécie mais sensível aos derivados testados foi *Candida tropicalis* a qual teve seu crescimento inibido pelos derivados **1** – **12** o que possibilita relacionar o Log P dos derivados ésteres de cadeia alquílica linear (**1** – **9**) com a atividade antifúngica.

No gráfico da figura 8 foram plotados os valores de atividade antifúngica dos derivados de α e β -amirina contra a levedura *Candida tropicalis*. Os valores estão expressos na forma de Log 1/ CIM vs Log P.

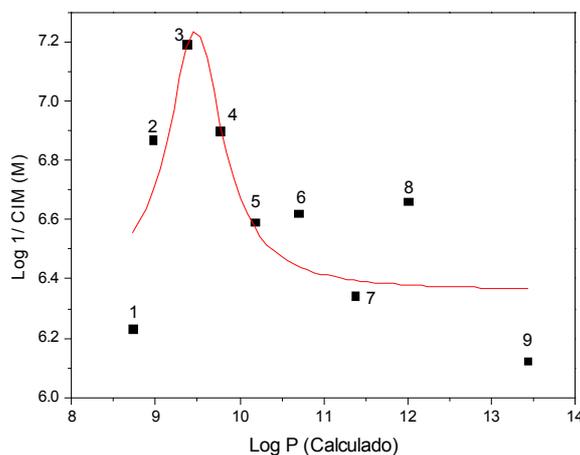


Figura 8 - gráfico de Log 1/ concentração inibitória mínima vs Log P (calculado) para os ésteres de cadeia linear de α e β -amirina contra a levedura *Candida tropicalis*.

Um perfil interessante pode ser observado no gráfico acima que indica que o derivado acetato de α e β -amirina (3) apresenta um efeito máximo entre os derivados indicando que há equilíbrio apropriado entre a lipo e a hidrosolubilidade. A linha no gráfico é apenas um guia para evidenciar a tendência do comportamento dos derivados e da atividade antifúngica.

4.5.3. Atividade tóxica vs Log P

Os resultados para a atividade citotóxica também foram utilizados na tentativa de obter uma correlação linear entre a atividade citotóxica e a lipofilicidade. Os gráficos da figura 9 expressam esses dados preliminares na forma de Log 1/DL₅₀ vs Log P, onde a dose letal foi expressa em concentração molar.

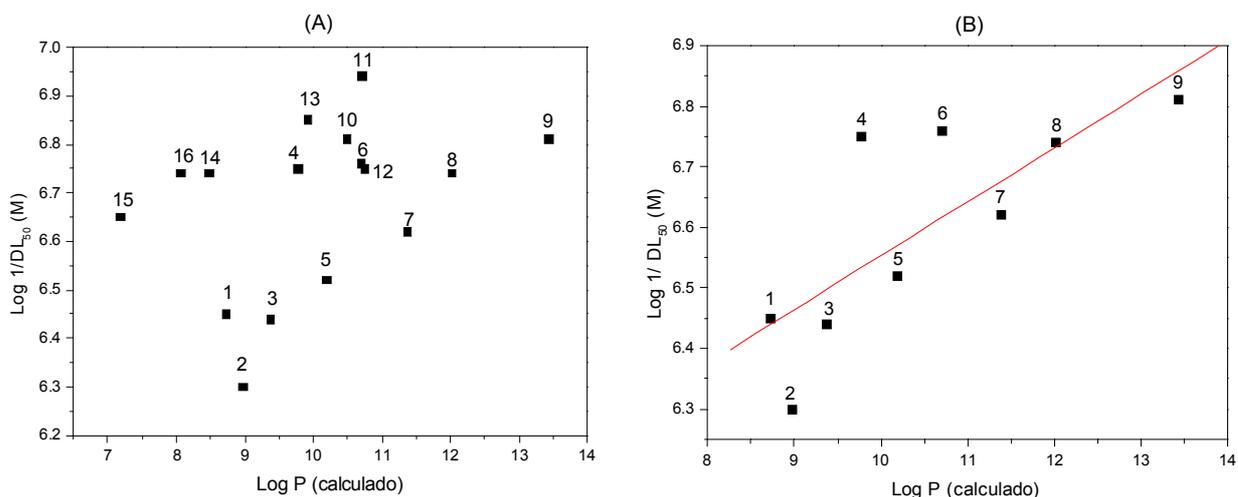


Figura 9 - gráfico de Log 1/ dose letal vs Log P (calculado) para os derivados de α e β -amirina. A) Todos os derivados testados. B) Derivados ésteres de cadeia alquílica linear.

Na Figura 9A, a atividade citotóxica de todos os 16 derivados foram plotados contra Log P. Não foi observado nenhuma relação linear indicando que podem haver outros efeitos. No entanto, na Figura 9B, onde plotamos somente os derivados ésteres de cadeia alquílica linear, é evidente que há uma tendência de aumentar a toxicidade dos compostos conforme aumenta-se a lipofilicidade. A linha no gráfico serve como um guia para destacar a tendência linear.

Os resultados obtidos são muito interessantes e promissores como modelo para o desenvolvimento de equações que possam prever a atividade biológica de um derivado de α e β -amirina. O próximo passo será avaliar as correlações estrutura atividade com a definição dos parâmetros hidrofóbicos experimentais ($\log P^o$), parâmetros estéricos, e ainda outros descritores que possam estar influenciando nos resultados das atividades biológicas.

5.Perspectivas

Esta dissertação foi desenvolvida como requisito parcial para o título de Mestre em Química no sistema **Pós-graduação Integrada (PGI)**, conforme **modalidade II** estipulada pela resolução normativa N° 001/CPGQ/01. Segundo esta resolução, na modalidade II, a dissertação deve ser apresentada com uma breve justificativa, com resultados e discussão e ainda uma parte experimental sucinta. Além disso, deve ser incluído um projeto que será realizado durante o período de doutorado que poderá servir como um exame de qualificação se for aprovado como tal pela banca examinadora.

Desse modo, apresentamos abaixo as perspectivas do projeto descrito nesta dissertação (semi-síntese de produtos naturais) e em seguida apresentamos um projeto que será desenvolvido durante o período de doutorado (síntese total de produtos naturais). Este último será desenvolvido em paralelo com o trabalho dos derivados dos triterpenos α e β -amirina.

5.1.Derivados dos triterpenos α e β -amirina

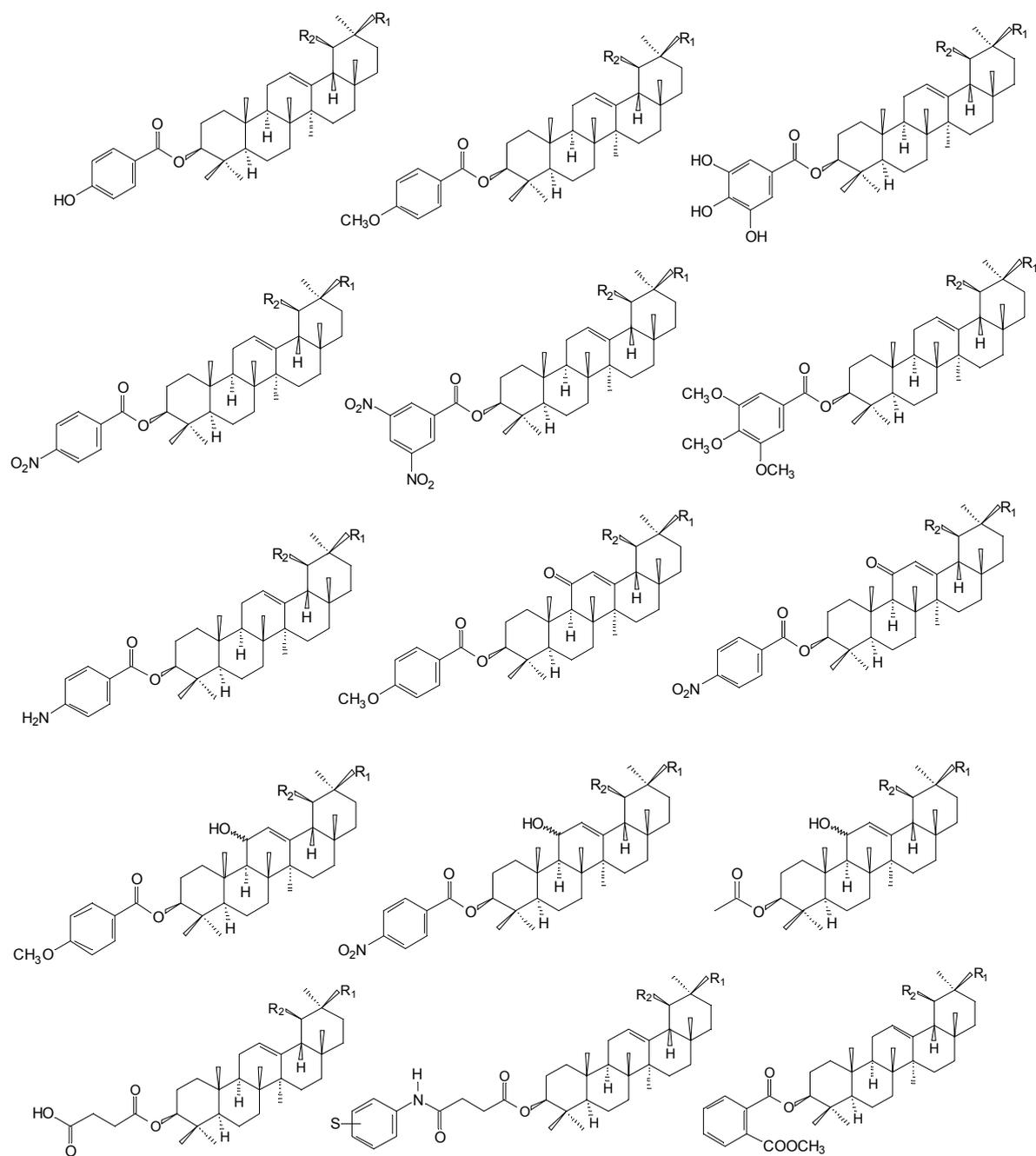
Embora já tenhamos obtido significantes resultados com os derivados da mistura de α e β -amirina, esses dados são preliminares e nos orientam no prosseguimento do trabalho. O objetivo maior é conseguir correlacionar a estrutura dos compostos sintetizados com os resultados para a atividade biológica e também estudar os mecanismos de ação dos compostos mais ativos.

É de nosso interesse também ampliar o espectro de ação biológica dos

derivados da mistura de α e β -amirina trabalhando em colaboração com outros grupos de pesquisa.

Em colaboração com o grupo do Professor Eduardo Dalmarco, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da FURB, avaliar a atividade antibacteriana contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os derivados de α e β -amirina **2 – 16** estão sendo testados e embora os resultados sejam interessantes, ainda não conseguimos encontrar um composto com uma atividade antibacteriana promissora. Assim, os resultados obtidos até o momento, podem nos orientar na preparação de novos derivados de α e β -amirina, buscando um fármaco com potencial atividade antibacteriana.

Nossa idéia é preparar novos derivados benzoilados bem como novos derivados oxidados que permitam um estudo de correlação estrutura-atividade biológica. Até o momento, pensamos em preparar os derivados apresentados na figura 10.

Figura 10 – derivados de α e β -amirina a ser preparados.

Outros trabalhos poderão se realizados em colaboração com o grupo do Professor Dr. Carlos Zani da FIOCRUZ, que se dispõe em avaliar as atividades antitumoral, tripanotona redutase e leishmanicida com todos os derivados preparados.

Novas propostas de síntese podem ainda surgir de acordo com o andamento do trabalho novas colaborações podem ser feitas ampliando o espectro de ação biológico dos derivados da mistura de triterpenos α e β -amirina.

5.2.Síntese de novas moléculas biologicamente ativas utilizando 6-estiril-2-pironas isoladas de Polygala sabulosa A. W. Bennett como modelo

5.2.1.Justificativa

Os produtos naturais têm fornecido compostos biologicamente ativos por muitos anos. E ainda hoje, muitos dos remédios também são obtidos diretamente de uma fonte natural ou foram desenvolvidos a partir de um composto protótipo originalmente obtido da natureza. Em geral, os produtos naturais possuem uma característica especial de fornecer novas estruturas químicas as quais nenhum químico sonhou em sintetizar⁽²⁴⁾. Quando as estruturas dos compostos naturais são muito complexas, a síntese em laboratório se torna inviável. No entanto, estas substâncias podem servir como base para a semi-síntese de compostos biologicamente ativos. Os compostos naturais que possuem um esqueleto mais simples podem ser sintetizados em laboratório evitando assim o problema de obter

pequenas quantidades, em massa, de cada composto isolado da planta. A síntese de produtos naturais é um ótimo caminho para a obtenção de substâncias com potencial atividade biológica.

Inúmeras espécies de plantas utilizadas na medicina folclórica têm sido avaliadas quanto a sua atividade biológica. Entre elas, está a espécie *Polygala sabulosa* onde estudos fitoquímicos e biológicos revelaram a presença de metabólitos secundários com atividade biológica promissora. A presença de cumarinas, dihidro-estirilpironas e estilpironas foram recentemente descritas por Pizzolatti e colaboradores^(75, 76).

A kava-kava, uma espécie nativa das ilhas do Pacífico, é extensivamente usada para o tratamento da ansiedade em todo mundo. Estudos têm mostrado suas propriedades tranqüilizantes e ansiolíticas^(77, 78) sendo estes efeitos atribuídos aos seus principais constituintes, as kavalactonas. No entanto, a kava-kava foi retirada do mercado farmacêutico de alguns países devido a uma suposta hepatotoxicidade. As estilpironas possuem o esqueleto carbonado fundamental das kavalactonas e assim podemos ver a espécie *P. sabulosa* como uma planta de potencial atividade no sistema nervoso central e aplicação no tratamento de distúrbios de ansiedade. De fato, em trabalhos recentes publicados por nosso grupo envolvendo a espécie vegetal *P. sabulosa*, da qual foram isoladas e identificadas (figura 11) três dihidroestiril-lactonas (S1-S3) e quatro estilpironas (S4-S7)⁽⁷⁶⁾, relatamos uma importante ação central incluindo efeito ansiolítico, hipnosedativo e anticonvulsivante dos compostos isolados⁽⁷⁹⁾. Os compostos S1 e S7 foram os compostos mais potentes exibindo efeito ansiolítico similar à droga disponível comercialmente diazepam.

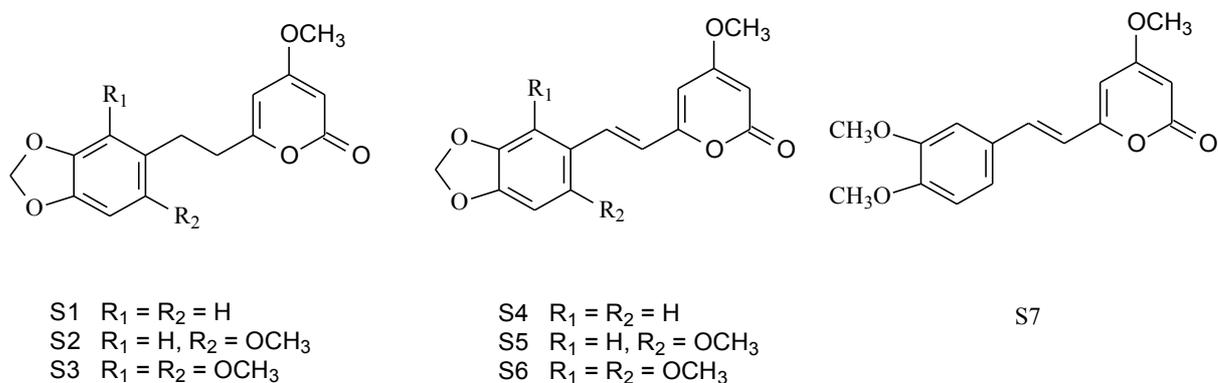


Figura 11 – dihidro e estiril-lactonas previamente isoladas da espécie *Polygala sabulosa* A. W. Bennett.

Diante desses resultados, nossa proposta é sintetizar uma série de análogos das estiril-lactonas, conforme apresentado na figura 12, e avaliar o efeito destas substâncias no sistema nervoso central. Na tentativa de definir os grupos farmacofóricos, serão avaliados os efeitos dos substituintes no grupo fenil utilizando o método topliss, a distância entre os anéis e a influência da conjugação estendida de um anel ao outro. Também será avaliada a substituição do sistema estiril-2-pirona pelos sistemas estiril-2-piridona, estiril-2-furanona e estiril-2-pirrolidona e ainda pela inserção dos grupos fenóximetileno, anilínometileno e fenotióximetileno nos sistemas 4-metoxi-2-piranona, 4-metoxi-2-furanona, 3,4-dimetoxi-2-piridona e 3,4-dimetoxi-2-pirrolidona.

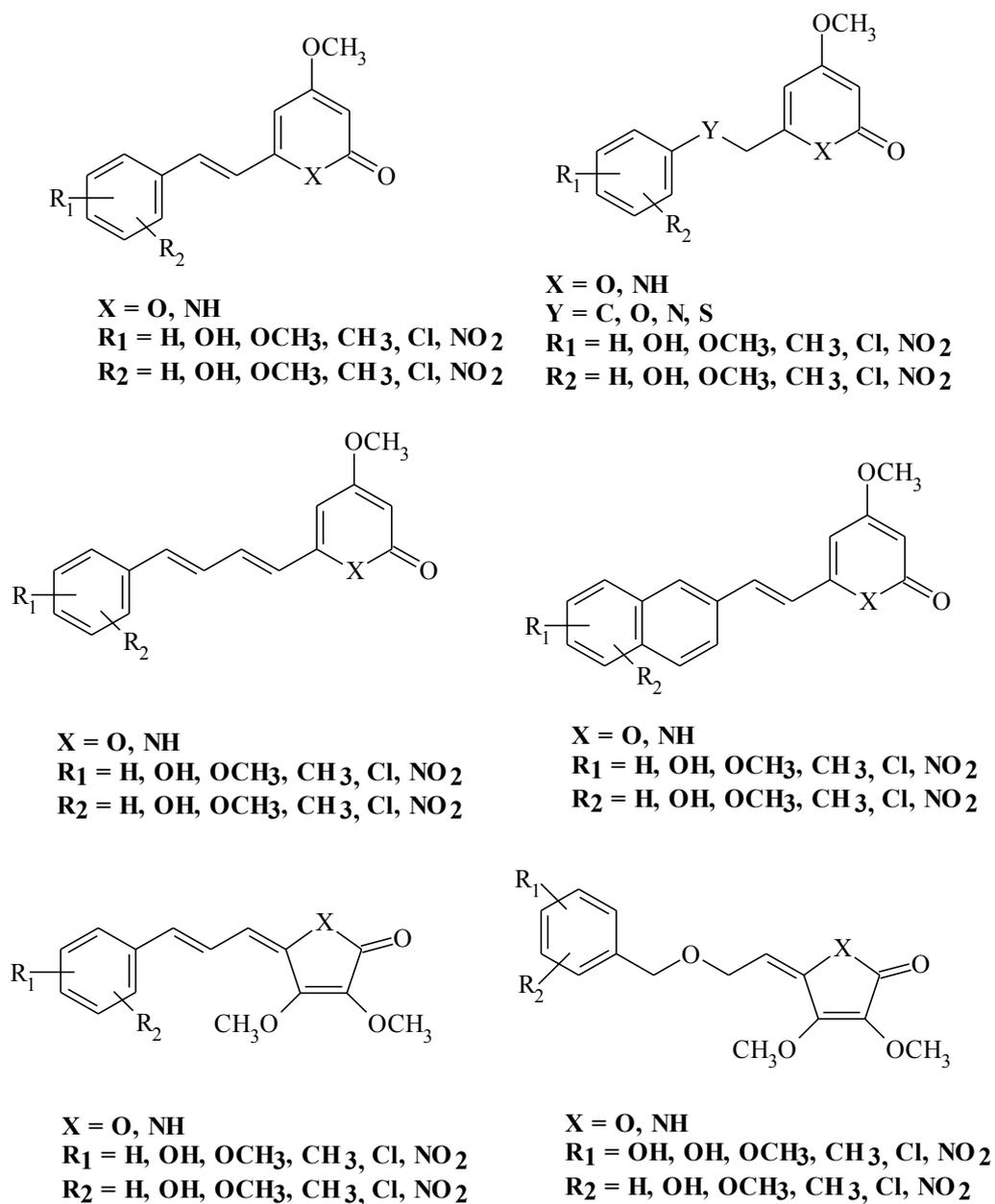


Figura 12 – análogos de estiril-lactonas – proposta de síntese

Assim, buscando principalmente fontes alternativas para o tratamento da ansiedade, nosso interesse neste estudo é a utilização dos compostos isolados da espécie *Polygala sabulosa* como modelo para a síntese total de uma série de análogos das dihidriestiril-lactonas, estiril-lactonas com potencial atividade antidepressiva e ansiolítica.

5.2.2. Metodologia

5.2.2.1. Derivados do heterociclo 2-pirano

O heterociclo 4-hidroxi-6-metil-2-pirano (**HMP**) pode ser sintetizado por várias formas. Nagawade e colaboradores⁽⁸⁰⁾ relataram a síntese do ácido dehidroacético (**ADA**) através da condensação de duas moléculas de acetoacetato de etila na presença de bicarbonato de sódio obtendo o produto com 35% de rendimento. O aquecimento (130 °C) de **ADA** em meio de ácido sulfúrico (90%) formou o composto **HMP** com 86% de rendimento (figura 13A).

Effenberger e colaboradores⁽⁸¹⁾ e Butt e Elvidge⁽⁸²⁾ sintetizaram o composto **HMP** a partir da reação de cloreto de malonila com acetilacetona em meio ácido (figura 13B). Outros autores⁽⁸³⁾ ainda prepararam o composto 4-hidroxi-6-metil-2-pirano (**HMP**) reagindo ácido de Meldrum com diceteno e trietilamina em clorofórmio (figura 13C).

Pela simplicidade da metodologia, optamos por utilizar a metodologia descrita por Nagawade e colaboradores⁽⁸⁰⁾ para preparar ácido dehidroacético (**ADA**). No entanto, não conseguimos alcançar o rendimento de 35% conforme descrito pelos autores. O ácido dehidroacético (**ADA**), foi sintetizado com um rendimento muito

baixo e não foi possível prosseguir e preparar o composto **HMP**. Desse modo, vamos tentar preparar o composto **HMP** diretamente utilizando a metodologia descrita por Effenberger e colaboradores⁽⁸¹⁾. O ácido dehidroacético (**ADA**) também é disponível comercialmente por um valor acessível, assim não haverá problemas. O composto **HMP** será então utilizado para a preparação do sistema estiril-lactona e dihidro-estiril-lactona. O passo seguinte é a metilação da hidroxila em C4, produzindo o composto 4-metoxi-6-metil-2-pirona (**MMP**), que pode ser realizada com iodeto de metila, diazometano e também dimetilsulfato. A metodologia descrita por Yoo e colaboradores⁽⁸⁴⁾, consiste na reação de **HMP** com iodeto de metila e carbonato de potássio em acetona, ocorrendo assim a metilação na hidroxila em C4.

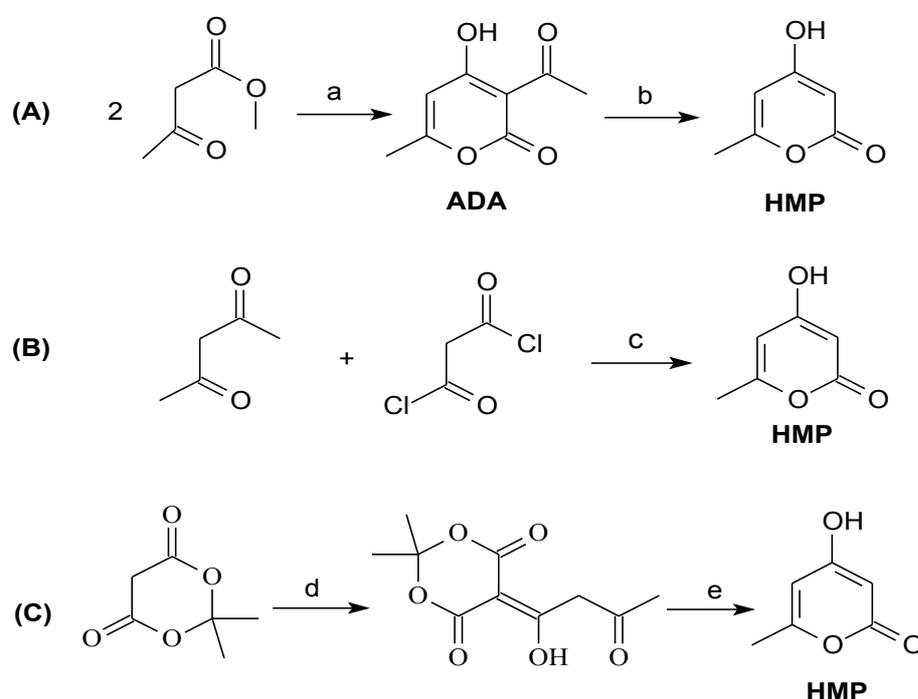


Figura 13 – equações químicas para a preparação do composto 4-hidroxi-6-metil-2-pirona (HMP); a) NaHCO_3 , refluxo durante 8 horas; b) H_2SO_4 ; c) H_2SO_4 ; d) diceteno, trietilamina; e) CHCl_3 , PhCl .

A metodologia para a construção dos derivados do sistema 6-estiril-2-pirona poderá basear-se na reação de Wittig entre os sais de trifetilfosfônio de **MMP** e uma série de benzaldeídos substituídos sob condições básicas⁽⁸⁴⁾. Assim, o primeiro passo será a bromação na posição alílica C7 de **MMP**. Uma metodologia descrita por Bloomer e colaboradores⁽⁸⁵⁾ poderá ser utilizada para a bromação alílica formando o composto **7-BMP**. Os autores sintetizaram o composto **7-BMP** através de refluxo do composto 4-metoxi-6-metil-2-pirona (**MMP**) com N-bromosuccinimida e peróxido de di-*terc*-butila em tetracloreto de carbono obtendo **7-BMP** como produto majoritário e compostos bromados no anel (**3-BMP**, **5-BMP**, **5,6-DBMP**) como minoritários. No entanto, em 1985 March e colaboradores⁽⁸⁶⁾ relataram que encontraram dificuldades em reproduzir a metodologia publicada por Bloomer (1974)⁽⁸⁵⁾, principalmente porque a bromação em C3 e C5 formando os compostos 3-bromo-4-metoxi-6-metil-2-pirona e 5-bromo-4-metoxi-6-metil-2-pirona constitui em uma reação com uma séria competição com a bromação em C7. Desse modo, o composto bromado na posição C3 (**3-BMP**) e C5 (**5-BMP**) também são formados e dependendo das condições, em quantidades superiores a **7-BMP**. Além desse relato de March (1985)⁽⁸⁶⁾, Bacardit e colaboradores (1982)⁽⁸⁷⁾ reportaram que seria muito mais fácil preparar o composto 7-bromo utilizando o ácido dehidroacético (**ADA**) como composto de partida do que utilizando o composto 6-metil-4-metoxi-2-pirona (**MMP**) como composto de partida. Assim, com o ácido 7-bromodehidroacético (**BADA**) em mãos, pode-se fazer a deacetilização e após fazer a metilação do OH na posição C4 para obter o composto **MMP**.

Em dois trabalhos publicados, primeiro pelo grupo de Bacardit (1982)⁽⁸⁷⁾ e depois pelo grupo de March (1985)⁽⁸⁶⁾, uma série de reações de bromação utilizando

o 4-metoxi-6-metil-2-pirona (**MMP**) e também o ácido dehidroacético (**ADA**) como composto de partida foram estudadas. Inúmeras condições utilizando diferentes reagentes foram testadas com o objetivo de definir as melhores opções para preparar o produto de interesse. Eles encontraram que condições de alta diluição favorecem a preparação de **6-BMP** mas, dificultam o processo em grande escala devido a alta quantidade de solvente que se utilizaria na reação. Variando a diluição e a razão de NBS/MMP eles prepararam os compostos **3-BMP**, **7-BMP**, **3,7-DBMP**, e **7,7-DBMP** (figura 14) e mostraram que as proporções de cada produto depende inteiramente das condições empregadas. Uma outra rota que foi estudada, é a que utiliza o ácido dehidroacético (**ADA**) como composto de partida. Harris e colaboradores (1970)⁽⁸⁸⁾ reportaram a síntese do composto **7-BADA** (23%), depois utilizada por Bacardit (1985)⁽⁸⁷⁾, pelo tratamento de **ADA** com N-bromosuccinimida em tetracloreto de carbono, a temperatura ambiente e na presença de luz de uma “sun lamp” de 275 W.

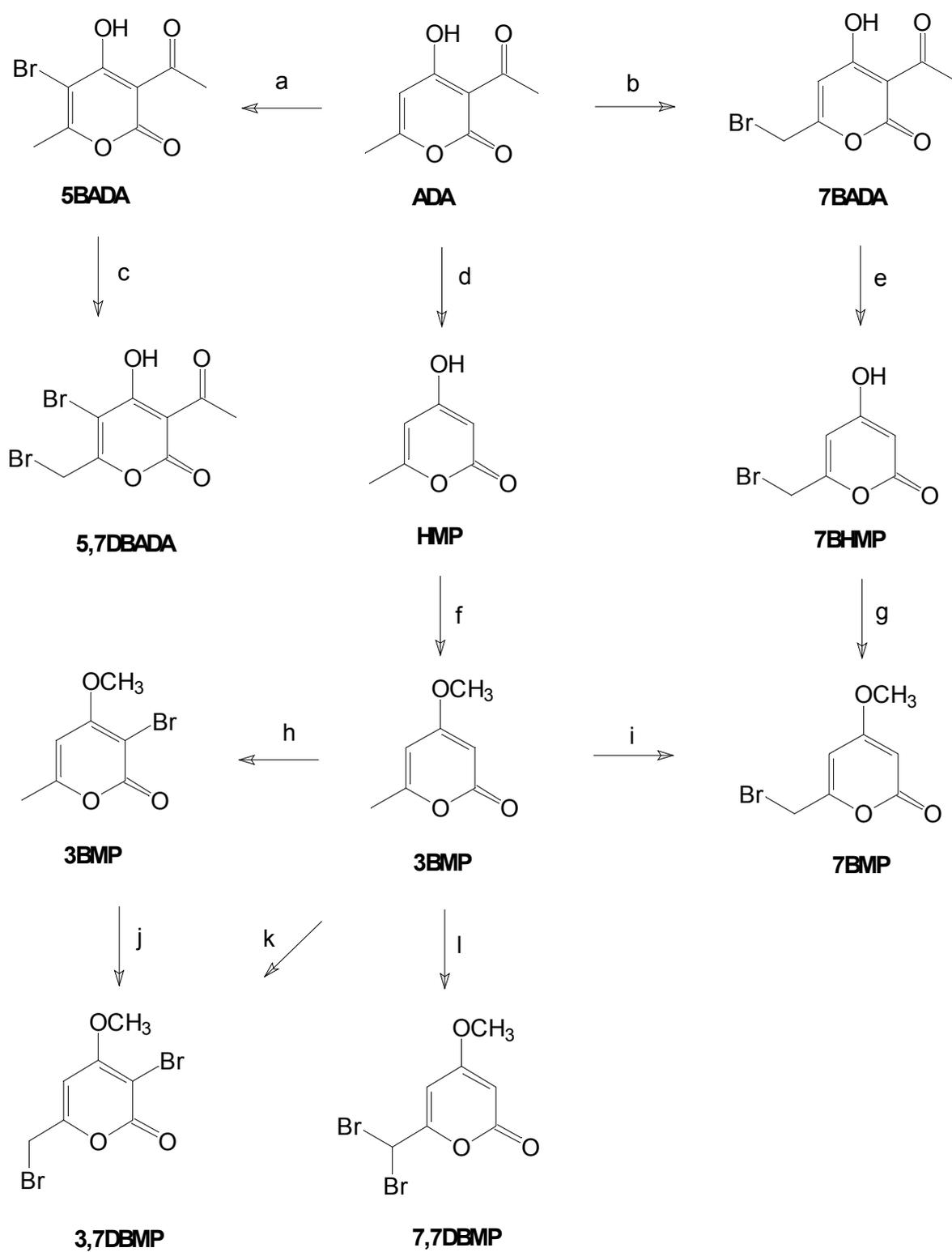


Figura 14 – esquemas para as reações de bromação envolvendo o ácido dehidroacético e o composto MMP.

De acordo com os trabalhos já publicados, talvez teremos uma certa dificuldade em obter o composto **6-BMP** via reação radicalar. No entanto vamos tentar reproduzir as reações descritas e também tentar otimizar as condições para obter o produto desejado com um rendimento melhor. O composto **6-BMP** será utilizado na preparação do sal de trifetilfosfônio **PMP** a partir da reação com trifetilfosfina em meio básico⁽⁸⁴⁾(Figura 15). Este sal poderá ser isolado e estocado já que vai ser utilizado na síntese de toda a série das estirilpironas.

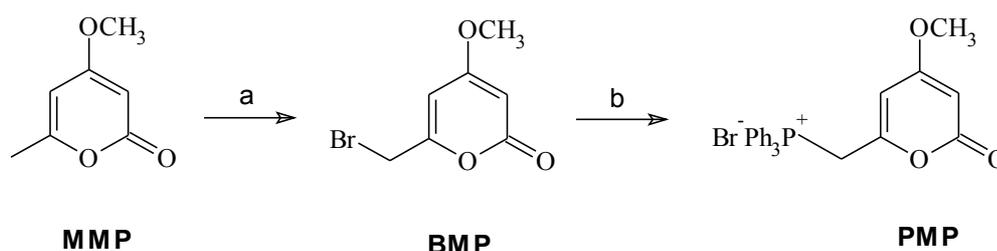


Figura 15 – equações químicas para a preparação do sal de trifetilfosfônio derivado do 4-metóxi-6-metil-2-piranona. a) NBS, peróxido de benzoíla, CCl₄. b) PPh₃, CH₃CN.

Utilizando o ílideo **PMP**, poderemos preparar uma série de 6-estiril-2-pironas (**STY**) a partir da reação com benzaldeídos substituídos conforme equação química da figura 16. Estes compostos serão a primeira série de interesse dos análogos das estirilpironas isoladas da espécie *Polygala sabulosa*. Com essa metodologia otimizada, poderemos preparar uma série de estirilpironas utilizando vários benzaldeídos substituídos conforme o método descrito por Topplis⁽⁸⁹⁾. Assim, poderemos avaliar o efeito dos substituintes na atividade biológica tentando

relacionar as propriedades físico-químicas de cada composto com os resultados da atividade biológica. Uma outra parte do trabalho, será a preparação dos produtos naturais mais ativos S1 e S7 que foram isolados de *P. Sabulosa* e trabalhar com modificações estruturais com a finalidade de encontrar compostos com atividade biológica ainda melhor.

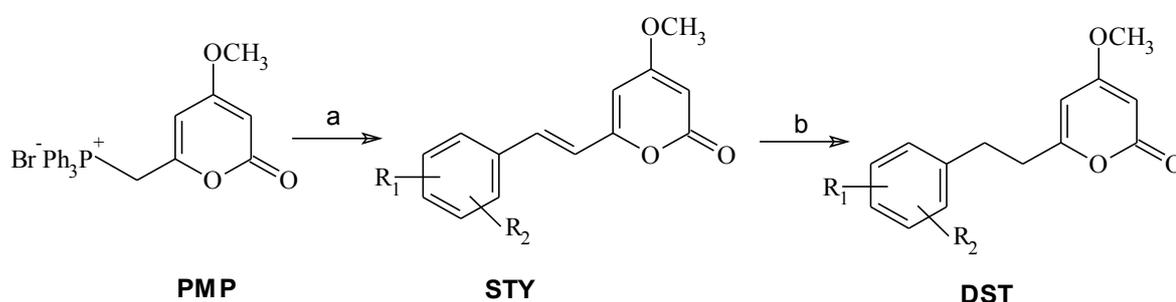


Figura 16 – equações químicas para a síntese de (E)-6-estiril-2-pirona e (E)-6-dihidroestiril-2-pirona; a) R₁, R₂-ArCHO, Et₃N, tolueno; b) H₂, PD-C, EtOH.

Com o objetivo de avaliar o quanto a conjugação estendida que envolve os dois anéis é importante para a atividade biológica, vamos tentar quebrar essa conjugação reduzindo a ligação dupla. Se conseguirmos realizar a redução com sucesso, poderemos então reduzir toda a série de estirilpironas para dihidroestirilpironas e comparar os resultados para a atividade biológica. Fátima e colaboradores⁽⁹⁰⁾ reduziram um sistema semelhante através de hidrogenação com Pd-C (10%) em etanol (figura 16).

Através da reação, sob as mesmas condições, do sal de trifenilfosfônio **PMP** com derivados do cinalmaldeído, poderemos inserir um espaçador de 2 carbonos na cadeia e avaliar o efeito da distância entre os anéis na atividade biológica (figura 17).

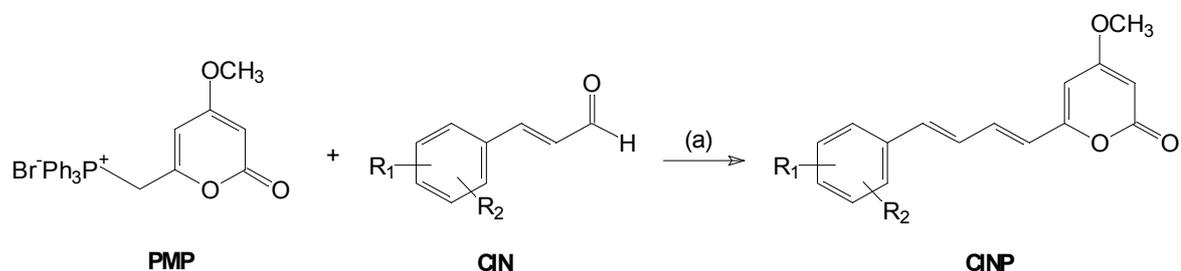


Figura 17 - equação química para a síntese de CINP com espaçador de dois carbonos na cadeia. a) R₁, R₂-ArCHO, Et₃N, tolueno.

5.2.2.2. Derivados do heterociclo 2-piridona

Carrol e Bader⁽⁹¹⁾, em 1953, relataram a síntese de um “aduto diceteno-acetona”, 2,2,6-trimetil-1,3-dioxin-4-ona (**DIOX**), a partir da reação de diceteno com acetona na presença de um catalisador ácido como o ácido *p*-toluenosulfônico (figura 18). Este aduto (**DIOX**) pode ser utilizado na preparação de uma grande variedade de compostos e ainda é utilizado para muitos fins.

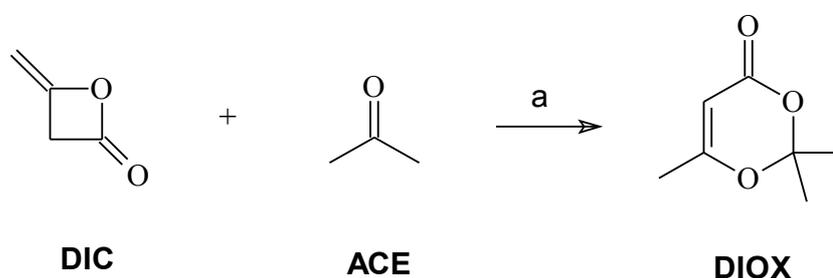


Figura 18 – equação química para a síntese do composto 2,2,6-trimetil-4H-1,3-dioxan-4-ona (**DIOX**). a) *p*-TsOH, refluxo durante 3 horas.

Em 1983, Sato e colaboradores⁽⁹²⁾ trataram este “aduto” com diferentes amidas para sintetizar *N*-acil-acetoacetamidas (**NAAA**)(figura 19A). Vários procedimentos para esse fim estão disponíveis na literatura, mas nem sempre os resultados obtidos são satisfatórios. Dependendo das condições e dos reagentes, os autores prepararam o composto 3-acetil-4-hidroxi-6-metil-2-piridona (**MPD**) que vai ser utilizado na preparação dos análogos das estirilpironas derivados do sistema 2-piridona. Quando acetoacetamida foi aquecida com **DIOX** sem a presença de solvente ocorreu a formação do composto 3-acetil-4-hidroxi-6-metil-2-piridona (**MPD**) com 46% de rendimento (figura 19B). O composto **MPD** também foi sintetizado com 60% de rendimento quando *N*-formilacetoacetamida (**FACA**) foi tratada com a substância **DIOX** na presença de *N,N*-dimetilanilina (figura 19C), e com 50% de rendimento sem a presença de solvente (figura 19D).

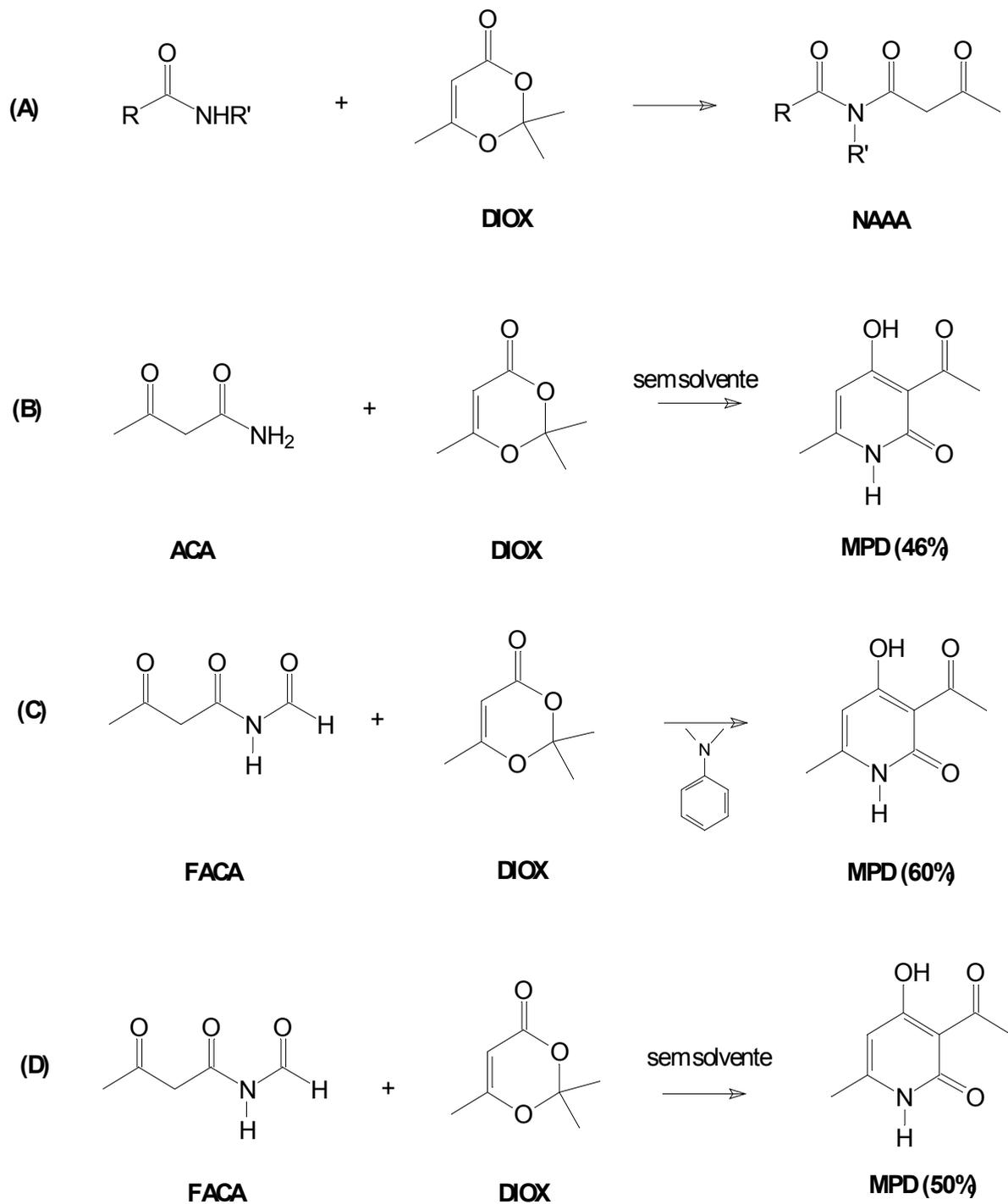


Figura 19 – equações químicas para a preparação do composto 3-acetil-4-hidroxi-6-metil-2-piridona (MPD).

O composto 3-acetil-4-hidroxi-6-metil-2-piridona (**MPD**) vai ser utilizado na síntese do sistema 6-estiril-2-piridona. O composto **MPD** deverá ser tratado com ácido sulfúrico para ocorrer a deacetilação, metilado no oxigênio da posição C4 com iodeto de metila e bromado na posição alílica C6. Esse derivado bromado será utilizado na construção do sistema estiril-2-piridona através da reação de Wittig com aldeídos substituídos. As etapas envolvidas são semelhantes às da preparação dos compostos **STY** e **DST** apresentadas nos esquemas das figuras 16 e 17.

5.2.2.3. Derivados do heterociclo 2-furanona

Os derivados do heterociclo 2-furanona apresentados na figura 12 serão preparados com o objetivo de verificar a importância do anel de 6 membros para a atividade biológica. Eles podem ser preparados a partir de um esqueleto pronto como o do ácido ascórbico (**ASC**). Alguns autores^(93 - 95) já descreveram a síntese de derivados do ácido tetrônico (4-hidroxi-[5H]-2-furanona) através de reações clássicas como proteção de grupo 1,2-diol, metilação, desidratação, oxidação com PCC e olefinação de Wittig (figura 20) formando o sistema 6-estiril-5-metileno-3,4-dimetoxi-2-furanona (**STF**).

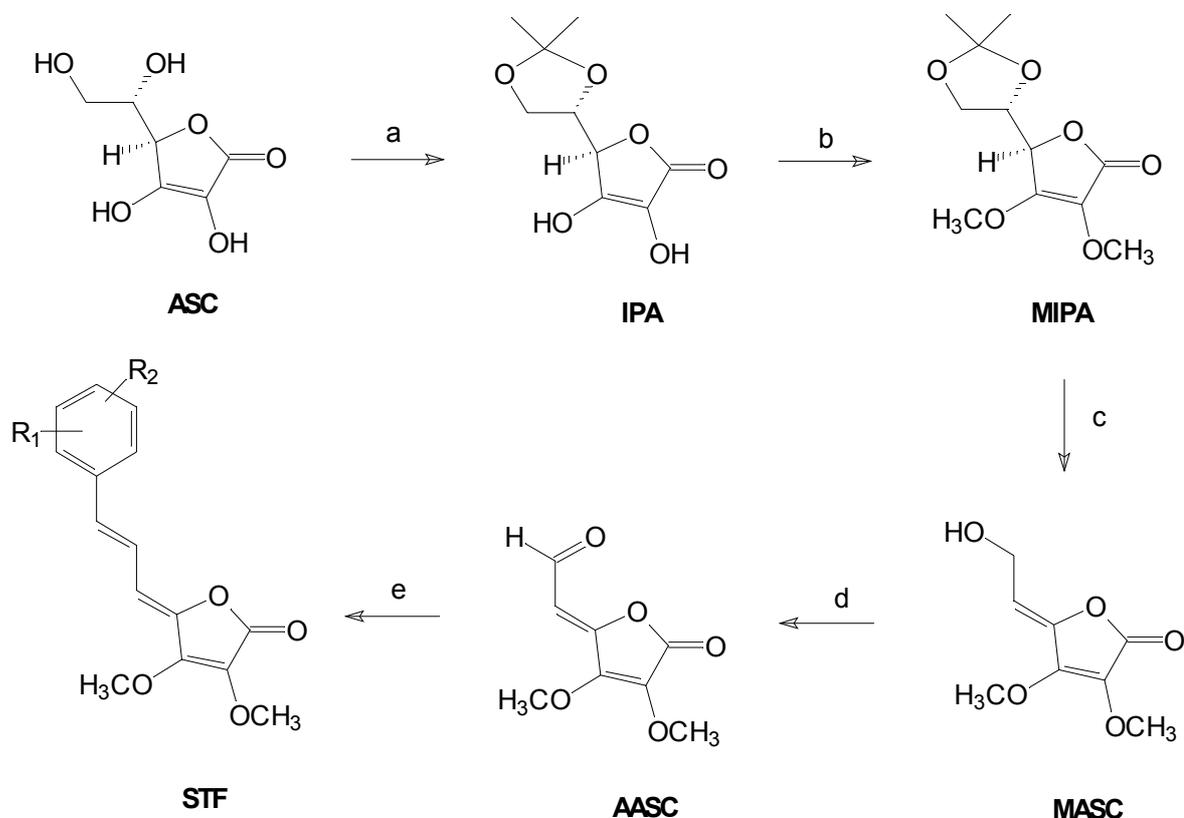


Figura 20 – equação química para a síntese do heterociclo estiril-2-furanona; a) cloreto de acetila, acetona, 30 °C; b) CH₃I, Acetona:DMSO (4:1), 30 °C; c) DBU, THF, 0-30 °C; d) PCC, CH₂Cl₂, 0 °C; e) Et₃N, benziltripenifosfonio, THF.

Outra rota para a construção do sistema estiril-2-furanonas seria sintetizar o heterociclo 3-hidroxi-4-metil-2-fura-3-en-ona (**4MF**) através da ciclização de propanoato de etila com dietil oxalato seguida de adição de fosgênio e acidificação com HCl (figura 21) conforme metodologia descrita por Ottinger e colaboradores⁽⁹⁶⁾. O sistema estiril-2-furanona será construído após metilação do grupo hidroxila em C3 com iodeto de metila, bromação alílica com NBS e peróxido de benzoíla e ainda pela reação de Wittig entre benzaldeídos substituídos e o sal de fosfônio **P4MF**.

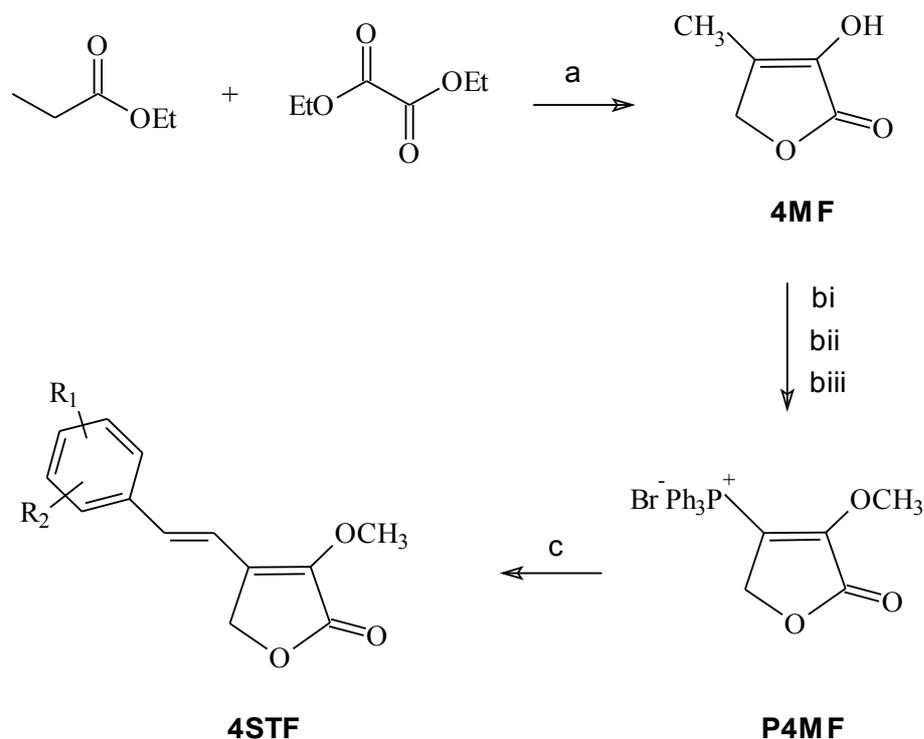


Figura 21 – esquema para a síntese do sistema 4-estiril-2-furanona; a) EtONa, EtOH, HCHO, HCl, H₂O; bi) CH₃I, K₂CO₃, acetona; bii) NBS, peróxido de benzoíla, CCl₄; biii) PPh₃, CH₃CN; c) R₁, R₂-ArCHO, Et₃N, tolueno.

5.2.2.4. Derivados do heterociclo 2-pirrolidona

O heterociclo 2-pirrolidona pode ser preparado aproveitando a seqüência de reações descrita por Singh^(93, 94), Olabisi⁽⁹⁵⁾, Khan⁽⁹⁷⁾ e colaboradores, nas quais foram sintetizados derivados do ácido tetrônico (4-hidroxi-5H-2-furanona). O sistema 2-pirrolidona foi obtido a partir da abertura do anel lactama com amônia ou qualquer amina substituída em etanol seguida de reciclagem, agora na forma de lactama formando o derivado 5-hidroxi. As hidroxipirrolidonas (**HPRD**) foram então desidratadas com ácido *p*-toluenosulfônico aos respectivos derivados dienil-2

furanonas **STPR** (figura 22).

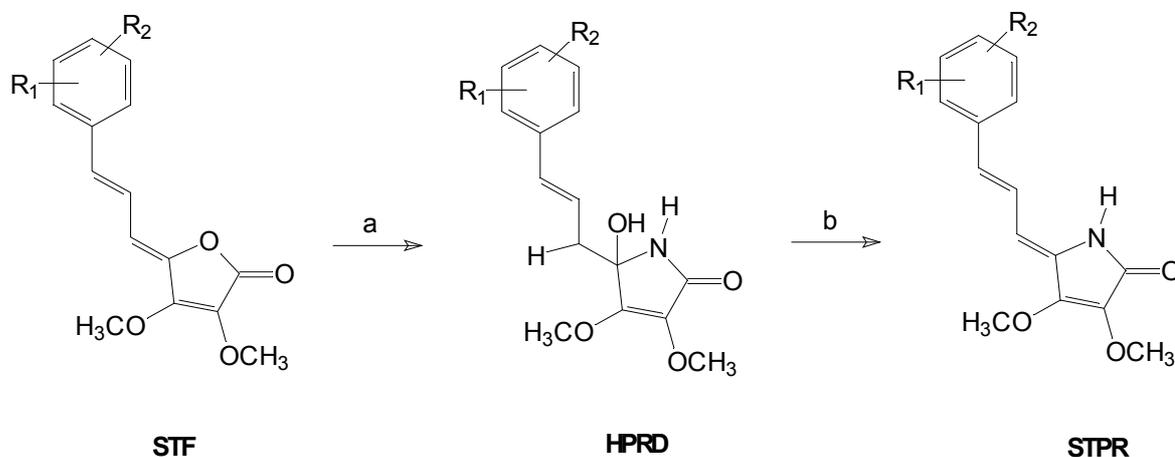


Figura 22 – equações químicas para a síntese do sistema dienil-2 furanonas a) NH₃, EtOH, 30 °C; b) PTSA, 30 °C.

5.2.3. Atividade biológica

Após os compostos estarem completamente purificados e caracterizados, serão realizados os ensaios de atividade biológica.

Os compostos sintéticos, análogos das estilil e dihidroestirilpironas previamente isoladas de *Polygala sabulosa* A. W. Bennett, serão avaliados quanto a sua atividade ansiolítica e antidepressiva. Os ensaios com os compostos serão realizados em colaboração com o grupo da Professora Dr. Thereza C.M. De Lima no Laboratório de Neurofarmacologia do Departamento de Farmacologia da UFSC.

Outras atividades tais como citotóxica, antifúngica e antibacteriana serão também avaliadas conforme o andamento do trabalho.

6.Referências bibliográficas

- [1] Viegas Jr., C., Bolzani, V. S., Barreiro, E. J.; Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, vol. 29, No 2, 326-337 (2006).
- [2] Maciel, M. A. M., Pinto, A. C., Veiga Jr., V. F., Grynberg, N. F., Echevarria,; A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, vol. 25, No 3, 429-438 (2002).
- [3] Barata, L. E. S. Fitoterápicos (2001). Disponível em:
<<http://www.comciencia.br/reportagens/farmacos/farma16.htm>>Acesso em:
11/03/2007.
- [4] Abelson, P. H. Medicine from plants. *Science*, vol. 247, No 4942, 513 (1990).
- [5] Clardy, J., Walsh, C.; Lessons from natural molecules. *Nature*, vol. 432, 829-837 (2004).
- [6] Newman, D. J., Cragg, G. M., Snader, K. M.; Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, Vol. 66, No. 7, 1022-1037 (2003).
- [7] Guerra, M. P., Nodari, R. O.; Biodiversidade, fitoterápicos e fitofármacos. in: Simões, C. M. O. (Org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC. 5. ed. 1102 pgs (2004).
- [8] Barreiro, E. J., Fraga, C. A. M.; Química Medicinal. As bases moleculares da ação dos fármacos. Porto Alegre: Artmed Editora, 2ed., 1000 pgs (2001).
- [9] Schenkel, E.P., Gosmann, G., Petrovick, P.R., Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In Simões, C. M. O. (Org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/ Florianópolis. Editora da UFRGS/ Editora da UFSC. 5 ed. 1102 pgs (2004).

- [10] Barreiro, E. J., Fraga, C. A. M.; A questão da inovação em fármacos no Brasil: proposta da criação do programa nacional de fármacos (PRONFAR). *Química Nova*, Vol. 28, Suplemento, S56-S63 (2005).
- [11] Susunaga, G. S.; Estudo químico e biológico da resina produzida pela espécie *Protium heptaphyllum* March. (Burseraceae). Tese de Doutorado, Universidade do Amazonas. Manaus, Brasil, 155 pgs. (1996).
- [12] Ukiva, M., Akihisa, T., Tokuda, H., Suzuki, H., Mukainaka, T., Ichiishi, E., Yasukawa, K., Kasahara, Y., Nishino, H.; Constituents of Compositae plants: III. Anti-tumor promoting effects and cytotoxic activity against human cancer cell lines of triterpene diols and triols from edible chrysanthemum flowers. *Cancer Letters*, Vol. 177, No. 1, 7–12 (2002).
- [13] Katerere, D. R., Grev, A. I., Nash, R. J., Waigh, R.D.; Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae. *Phytochemistry*, Vol. 63, No. 1, 81– 88 (2003).
- [14] Oliveira, F. A., Lima-Júnior, R. C. P., Cordeiro, W. M., Vieira-Júnior, G. M., Chaves, M. H., Almeida, F. R. C., Silva, R. M., Santos, F. A., Rao, V. S. N., Pentacyclic triterpenoids, α,β -amyrins, suppress the scratching behavior in a mouse model of pruritus. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, Vol. 78, No 4, 719–725 (2004).
- [15] Oliveira, F. A, Vieira-Junior, G. M., Chaves, M. H., Almeida, F. R. C., Florêncio, M. G., Lima-Junior, R. C. P., Silva, R. M., Santos, F. A., Rao, V. S. N.; Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats, *Pharmacological Research*, Vol. 49, No. 2, 105–111 (2004).
- [16] Otuki, M. F., Ferreira, J., Vieira-Lima, F., Silva, C. M., Malheiros, A., Muller, L.A., Cani, G. S., Santos, A. R. S., Yunes, R. A., Calixto, J.B., Antinociceptive Properties of Mixture of α -Amyrin and β -Amyrin Triterpenes: Evidence for Participation of Protein Kinase C and Protein Kinase A Pathways. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Vol. 313, No. 1, 310–318 (2005).

- [17] Otuki, M. F., Vieira-Lima, F., Malheiros, A., Yunes, R. A., Calixto, J. B.; Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and α -amyirin pentacyclic triterpene, *European Journal of Pharmacology*, Vol. 507, No. 1-3, 253-259 (2005).
- [18] Pawar, R. S., Bhutani, K. K.; Effect of oleanane triterpenoids from *Terminalia arjuna* — a cardioprotective drug on the process of respiratory oxyburst, *Phytomedicine*, Vol. 12, No 5, 391–393 (2005).
- [19] Oliveira, F. A., Chaves, M. H., Almeida, F. R. C., Lima Jr., R. C. P., Silva, R. M., Maia, J. L., Brito, G. A. A. C., Santos, F. A., Rao, V. S., Protective effect of α - and β -amyirin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 98, No. 1-2, 103–108 (2005).
- [20] Lima-Junior, R. C., Oliveira, F. A., Gurgel, L. A., Cavalcante, I. J., Santos, K. A., Campos, D. A., Vale, C. A., Silva, R. M., Chaves, M, H., Rao, V. S., Santos, F. A.; Attenuation of visceral nociception by alpha- and beta-amyirin, a triterpenoid mixture isolated from the resin of *Protium heptaphyllum*, in mice. *Planta Medica*, Vol. 72, No 1, 34-39 (2006).
- [21] Otuki, M. F., Lima, F. V., Malheiros, A., Cechinel-Filho, V., Delle Monac, F., Yunes, R. A., Calixto, J. B.; Evaluation of the antinociceptive action caused by ether fraction and a triterpene isolated from resin of *Protium kleinii*. *Life Science*, Vol. 69, No 19, 2225-2236 (2001).
- [22] Cechinel Filho, V., Campos, F., Corrêa, R., Yunes, R. A., Nunes, R. J.; Chemical aspects and therapeutic potential of cyclic imides: a review. *Química Nova*, vol.26, No.2, 230-241 (2003).
- [23] Thomas, G.; *Química Medicinal: Uma introdução*; Rio de Janeiro, RJ, Editora Guanabara Koogan, 413 pgs. (2003)
- [24] Patrick, G. L.; *An introduction to medicinal chemistry*; Oxford, New York, Oxford University Press, 602 pgs. (2001).

- [25] Ugaz, O. L., Investigación Fitoquímica. Métodos em el estudio de productos naturales; Lima, Peru. Segunda edicion. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Catolica del Peru. 300 pgs (1994).
- [26] Dewick, P. M., Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach. John Wiley and Sons. England. 463 pgs. (1997).
- [27] Honda, T., Rounds, B. V., Bore, L., Finlay, H.J., Favaloro Jr., F. G., Suh, N., Wang Y., Sporn, M. B., Gribble, G. W.; Synthetic Oleanane and Ursane Triterpenoids with Modified Rings A and C: A Series of Highly Active Inhibitors of Nitric Oxide Production in Mouse Macrophages. *Journal of Medicinal Chemistry*, Vol 43, No 22, 4233-4246 (2000).
- [28] Chen, J., Liu, J., Zhang, L., Wu, G., Hua, W., Wu, X., Sun, H.; Pentacyclic triterpenes. Part 3: Synthesis and biological evaluation of oleanolic acid derivatives as novel inhibitors of glycogen phosphorylase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 16, No 11, 2915-2919 (2006).
- [29] Sánchez, M., Theoduloz, C., Schmeda-Hirschmann, G., Razmilic, I., Yáñez, T., Rodriguez, J. A.; Gastroprotective and ulcer-healing activity of oleanolic acid derivatives: in vitro-in vivo relationships. *Life Sciences*, Vol. 79, No 14, 1349-1356 (2006).
- [30] Huang, D., Ding, Y., Li, Y., Zhang, W., Fang, W., Chen, X.; Anti-tumor activity of a 3-oxo derivative of oleanolic acid. *Cancer Letters*, Vol. 233, No 2, 289-296 (2006).
- [31] Zhang, Y., Li, J., Zhao, J., Wang, S., Pan, Y., Tanaka, K., Kadota, S.; Synthesis and activity of oleanolic acid derivatives, a novel class of inhibitors of osteoclast formation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 15, No 6, 1629-1632 (2005).
- [32] Turkmen, Z., Klymchenko, A. S., Oncul, S., Duportail, G., Topcu, G., Demchenko, A. P.; A triterpene oleanolic acid conjugate with 3-hydroxiflavone derivative as a new membrane probe with two color ratiometric response. *Journal of Biochemical and Biophysical methods*, Vol. 64, No 1, 1-18 (2005).

- [33] Hichri, F., Jannet, H. B., Cheriaa, J., Jegham, S., Mighri, Z.; Antibacterial activities of few prepared derivatives of oleanolic acid and other natural triterpenic compounds. *Comptes Rendus Chimie*, Vol. 6, No. 4, 473-483 (2003).
- [34] Honda, T, Gribble, G. W., Suh, N., Finlay, H. J., Rounds, B. V., Bore, L., Favalaro Jr., F. G., Wang, Y., Sporn, M. B. Novel Synthetic Oleanane and Ursane Triterpenoids with Various Enone Functionalities in Ring A as Inhibitors of Nitric Oxide Production in Mouse Macrophages. *Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 43, No. 9, 1866-1877 (2000).
- [35] Farina. C., Pinza, M., Pifferi, G.; Synthesis and anti-ulcer activity of new derivatives of glycyrrhetic, oleanolic and ursolic acids. *Il Farmaco*, Vol. 53, No. 1, 22-32 (1998).
- [36] Ma, C., Cai, S., Cui, J., Wang, R., Tu, P., Hattori, M., Daneshtalab, M.; The cytotoxic activity of ursolic acid derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 40, No. 6, 582-589 (2005).
- [37] Aragão, G. F., Carneiro, L. M. V., Junior, A. P. F., Vieira, L. C., Bandeira, P. N., Lemos, T. L.G., Viana, G. S. B.; A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, Vol. 85, No. 4 , 827-834 (2006).
- [38] Oliveira, F. A., Costa, C. L. S., Chaves, M. H., Almeida, F. R. C., Cavalcante, Í. J. M., Lima, A. F., Lima Jr., R. C. P., Silva, R. M., Campos, A. R., Santos, F. A., Rao, V. S. N. Attenuation of capsaicin-induced acute and visceral nociceptive pain by α - and β -amyrin, a triterpene mixture isolated from *Protium heptaphyllum* resin in mice. *Life Sciences*, Vol. 77, No 23, 2942-2952 (2005).
- [39] Navarrete, A., Trejo-Miranda, J. L., Reyes-Trejo, L.; Principles of root bark of *Hippocratea excelsa* (Hippocrataceae) with gastroprotective activity. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 79, No. 3, 383-388 (2002).
- [40] Otuki, M. F., Vieira-Lima, F., Malheiros, A., Yunes, R. A., Calixto, J. B.; Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and α -amyrin pentacyclic triterpene. *European Journal of Pharmacology*, Vol. 507, No. 1-3, 253-259 (2005).

- [41] Sosa, S., Morelli, C. F., Tubazo, A., Cairoli, P., Speranza, G., Manitto, P.; Anti-inflammatory activity of *Maytenus senegalensis* root extracts and of maytenoic acid. *Phytomedicine*, Vol. 14, No 2-3, 109-114 (2007).
- [42] Mallavadhani, U. V., Mahapatra, A., Jamil, K., Reddy, P. S.; Antimicrobial activity of some pentacyclic triterpenes and their synthesized 2-O-lipophilic chains. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 27, No. 10, 1576-1579 (2004).
- [43] Oliveira, G. L.; Determinação do mecanismo da ação analgésica da agmatina em camundongos. Dissertação de Mestrado. Universidade do Vale do Itajaí, Brasil, 98 pgs (2005).
- [44] Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Moore, P. K.; Pharmacology. Loanhead, Scotland, 5 ed. Churchill Livingstone, 797 pgs. (2003).
- [45] Collier, H. O. J, Dinneen, J. C., Johnson, C.A., Schneider, C.; The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse, *British journal of pharmacology and chemotherapy*, Vol. 32, No. 2, 295-310 (1968).
- [46] Zachino, S.; Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: Yunes, R. A., Calixto, J. B. (orgs). Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Argos, 500 pgs. (2001).
- [47] Dorocka-Bobkowska, B., Konopka, K., Düzgünes, N.; Influence of antifungal polyenes on the adhesion of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to human epithelial cells in vitro. *Archives of Oral Biology*, Vol. 48, No. 12, 805-814 (2003).
- [48] Newman, S., Holly,; A. *Candida albicans* is phagocytosed, killed, and processed for antigen presentation by human dendritic cells. *Infection and Immunity*, Vol. 69, No. 11, 6813-6822 (2001).
- [49] Arango, A.C.M., Sánchez, J.G.B., Galviz, L.A.B.; Productos naturales com actividad antimicótica. *Revista Española de Quimioterapia*, Vol. 17, No. , 325-331 (2004).

- [50] Imagem retirada de: http://gdev.ufp.pt/gimed_ps/index.php?id=1020. Acessado em 17/01/2007.
- [51] Sanglard, D. Odds, F.C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *The Lancet infectious diseases*, Vol. 2, No. 2, 73-85 (2002).
- [52] Odds, F.C., Brown, A.J.P., Gow, N.A.R. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends in Microbiology*, Vol. 11, No. 6, 272-279 (2003).
- [53] Verdi, L. G.; Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 174 pgs (2005).
- [54] Caldwell, G. S., Bentley, M. G., Olive, P. J. W.; The use of a brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay to assess the toxicity of diatom extracts and short chain aldehydes. *Toxicon*, Vol. 42, No. , 301-306 (2003).
- [55] Jiménez, G., Hasegawa, M., Rodríguez, M., Estrada, O., Méndez, J., Castillo, A., Gonzalez-Mujica, F., Motta, N., Vásquez, J., Romero-Vecchione, E.; Biological screening of plants of the Venezuelan Amazons. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 77, No. 1, 77-83 (2001).
- [56] Hartl, M., Humpf, H. U.; Toxicity assessment of fumonisins using the brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay. *Food and chemical toxicology*, Vol. 38, No. 12, 1097-1102 (2000).
- [57] Corey, E. J., Suggs, J. W.; Pyridinium chlorochromate. An efficient reagent for oxidation of primary and secondary alcohols to carbonyl compounds. *Tetrahedron Letters*, Vol. 16, No. 31, 2647-2650 (1975).
- [58] Pinto, A. C., Pereira, A. L., Kelecom, A., Porreca, L. M., Ribeiro, N. M., Barnes, R. A.; Oxidation of terpenoid compounds with *tert*-butyl chromate. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 32, No. 12, 4689-4692 (1988).

- [59] Koster, R., Anderson, M., Beer, E.J. Acetic acid for analgesic screening. *Federation Proceedings*, Vol 18, 412 (1959).
- [60] Santos, A. R. S.; Miguel, O. G. ; Yunes, R. A. ; Calixto, J. B. . Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8,10-di-n-propyllobelidiol hydrochloride dehydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence of the mechanism of action. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 289, No. 1, 417-426 (1999).
- [61] Santos, A. R. S., Calixto, J. B., Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neuropeptides*. Vol. 31, No. 4, 381-389 (1997).
- [62] Rodrigues, A.L.S., Rocha, J.B.T., Mello, C.F., Souza, D.O. Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in openfield and two-way avoidance tasks. *Pharmacology and Toxicology*, Vol 79, No , 150–6 (1996).
- [63] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2. NCCLS,Villanova, PA, USA.(2002).
- [64] Ellepola, A.N.B., Panagoda, G.L, Samaranayake, L.P. Adhesion of oral *Candida* species to human buccal epithelial cells following brief exposure to nystatin. *Oral Microbiology And Immunology*, Vol. 14, No. 6, 358-353 (1999).
- [65] Kimura, L.H., Pearsall, N.N. Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. *Infection and Immunity*, Vol. 21, No. 1, 64-68 (1978).
- [66] Susunaga, G. S., Siani, A. C., Pizzolatti, M. G., Yunes, R. A., Delle Monache, F.; Triterpenes from the resin of *Protium heptaphyllum*. *Fitoterapia*, Vol. 72, No. 6, 709-711(2001).
- [67] Vaz, Z. R., Cechinel Filho, V., Yunes, R. A., Calixto, J. B.; Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxylene derivative on chemical and thermal models of nociception in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Vol. 278, No. 1, 304-312 (1996).

- [68] Hunskar, S., Hole, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, Vol. 30, No. 1, 103-114 (1987).
- [69] Tjolsen A., Berge, O.G.,Hunskar, S., Rosland, J.H.,Hole, K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, Vol. 51. No. 1. 5-17 (1992).
- [70] Kromery, V.A., Barnes, A.J. Non-*albicans Candida* spp. causing fungemia: pathogenicity and antifungal resistance. *The Journal of hospital infection*, Vol. 50, No. 4, 243-260 (2002).
- [71] Zhao, M., Li, Z., Peng, Li, Tang, Y., Wang C., Zhang, Z., Peng S.; Novel 1-oxyl-2-substitutedphenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolines: Synthesis, selectively analgesic action, and QSAR analysis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Vol. 15, No 8, 2815-2826 (2007).
- [72] Du, L., Li, M., You, Q., Xia, L.; A novel structure-based virtual screening model for the hERG channel blockers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 355, No 4, 889-894 (2007).
- [73] Kim, S., Vilela, G. V. M. A., Bouajila, J., Dias, A. G., Cyrino, F. Z. G. A., Bouskela, E., Costa, P. R. R., Nepveu, F.; α -Phenyl-*N-tert*-butyl nitron (PBN) derivatives: Synthesis and protective action against microvascular damages induced by ischemia/reperfusion. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Vol. 15. No. 10. 3572-3578 (2007).
- [74] Zhao, M., Li, Z., Wu, Y., Tang, Y., Wang, C., Zhang, Z., Peng, S.; Studies on log *P*, retention time and QSAR of 2-substituted phenylnitronyl nitroxides as free radical scavengers. *European Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 42. No. 7. 955-965 (2007).
- [75] Pizzolatti, M. G., Cunha Jr., A., Pereira, W. S., Delle Monache, F.; A new styryl-2-pyrone derivative from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, Vol. 32, No. 6, 603-606 (2004).
- [76] Pizzolatti, M. G., Luciano, C., Delle Monache, F.; Styryl- and dihydrostyryl-2-pyrones derivatives from *Polygala sabulosa*. *Phytochemistry*, Vol. 55, No. 7, 819-822 (2000).

- [77] Bilia, A. R., Gallori, S., Vincieri, F. F.; Kava-kava and anxiety: Growing knowledge about the efficacy and safety. *Life Sciences*, Vol. 70, No 22, 19, 2581-2597 (2002).
- [78] Rex, A., Morgenstern, E., Fink, H.; Anxiolytic-like effects of Kava-Kava in the elevated plus maze test—a comparison with diazepam. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, Vol. 26, No. 5, 855-860 (2002).
- [79] Duarte, F. S., Duzzioni, M., Mendes, B. G., Pizzolatti, M. G., Lima, T. C. M.; Participation of dihydrostyryl-2-pyrone and styryl-2-pyrone in the central effects of *Polygala sabulosa* (Polygalaceae), a folk medicine topical anesthetic. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, Vol. 86, No. 1, 150-161(2007).
- [80] Nagawade, R. R., Khanna, V. V., Bhagwat, S. S., Shinde, D. B.; Synthesis of new series of 1-Aryl-1,4-dihydro-4-oxo-6-methyl pyridazine-3-carboxylic acid as potential antibacterial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 40, No. 12, 1325-1330 (2005).
- [81] Effenberger, F., Schoenwaelder, K. H., Stezowski, J. J.; A new way to phloroglucinols - synthesis, structure and reactions of [n](2,4)phloroglucinophanes. *Angewandte Chemie*, Vol. 94, No. 11, 863-864 (1982).
- [82] Butt, M. A., Elvidge, J. A.; Heterocyclic syntheses with malonyl chloride VIII. Hydroxypyrones from 1,3-diketones. *Journal of the Chemical Society*, Vol. Setembro, 4483-4489 (1963).
- [83] Zhang, X., Hua, D., Wang, D., Chen, W.; Syntheses of 4-hydroxy-6-methyl-2-pyrone and its 3-carboxy derivative. *Nongyaoxue Xuebao*, Vol. 1, No, 2, 82-84 (1999).
- [84] Yoo, H., Lee, J. Y., Park, J. H., Chung, B. Y., Lee, Y. S.; Synthesis of styrylbenzofuran derivatives as styrylquinoline analogues for HIV-1 integrase inhibitor. *Il Farmaco*, Vol. 58, No. 12, 1243-1250 (2003).
- [85] Bloomer, J. L., Zaidi, S. M. H., Strupezewski, J. T., Brosz, C. S., Gudzyk, L. A. A new polyketide synthon. *Journal of Organic Chemistry*. Vol. 39. No. 24. 3615-3616 (1974).

[86] March, P., Moreno-Mañas, M., Pi, R., Ripoll, I., Sánchez-Ferrando, F. Brominated derivatives of 4-hydroxy- and 4-methoxy-6-methyl-2H-pyran-2-ones. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. Vol. 22, No. 6, 1537-1542 (1985).

[87] Bacardit, R., Moreno-Mañas, M., Pleixats, R. Functionalization at C-5 and at C-6 methyl group of 4-methoxy-6-methyl-2-pyrone. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. Vol. 19. No. 1. 157-160 (1982).

[88] Harris, T. M., Harris, C. M., Brush, C. K. Bromination of dehydroacetic acid. *Journal Of Organic Chemistry*. Vol. 35. No. 5. 1329-1333 (1970).

[89] Topliss, J.G., A manual method for applying the Hansch approach to drug design. *Journal of Medicinal Chemistry*. Vol. 20, No. 4, 463-469 (1977).

[90] Fátima, A., Kohn, L. K., Carvalho, J. E., Pilli, R. A.; Cytotoxic activity of (S)-goniothalamin and analogues against human cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Vol. 14, No. 3, 622–631 (2006).

[91] Carrol, M. F., Bader, A. R.; The reactions of diketene with ketones. *Journal of American Chemical society*, Vol. 75, No. 21, 5400-5402 (1953).

[92] Sato, M., Kanuma, N., Kato, T.; Synthesis of N-acylacetoacetamide using 2,2,6-trimethyl-1,3-dioxin-4-one. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 30, No. 4, 1315-1321 (1982).

[93] Singh, B. K., Bisht, S. S., Tripathi, R. P.; An efficient synthesis of tetramic acid derivatives with extended conjugation from L-ascorbic acid. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, Vol. 2, No. 24, (2006). [disponível em <http://bjoc.beilstein-journals.org/content/2/1/24>].

[94] Singh, B. K., Verma, S. S., Dwivedi, N., Tripathi, R. P.; L-Ascorbic acid in organic synthesis: DBU-catalysed one-pot synthesis of tetramic acid derivatives from 5,6-O-isopropylidene ascorbic acid. *Tetrahedron Letters*, Vol. 47, No. 13, 2219-2222 (2006).

- [95] Olabisi, A. O., Wimalasena, K.; Rational approach to selective and direct 2-O-
alquilation of 5,6-O-isopropylidene-l-ascorbic acid. *Journal of Organic Chemistry*, Vol. 69, No.
21, 7026-7032 (2004).
- [96] Ottinger, H., Soldo, T., Hofmann, T.; Systematic studies of structure and physiological
activity of cyclic α -ketoenamines, a novel class of "cooling" compounds. *Agricultural and
Food Chemistry*, Vol. 49, No. 11, 5383-5390 (2001).
- [97] Khan, M. A., Adams, H.; The formation of lactams from L-ascorbic acid. *Carbohydrate
Research*, Vol. 322, No. 3-4, 279-283 (1999).