



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL -MG



CLAUDIA MARA MACIEL REZENDE

**SÍNTESE DE DERIVADOS BENZOFENÔNICOS COM
POTENCIAL ANTIFÚNGICO E ANTI-LEISHMANIA**

MESTRADO EM QUÍMICA

Alfenas -MG
2012

CLAUDIA MARA MACIEL REZENDE

**SÍNTESE DE DERIVADOS BENZOFENÔNICOS COM
POTENCIAL ANTIFÚNGICO E ANTI-LEISHMANIA**

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

ALFENAS

2012

Maciel-Rezende, Claudia Mara.

Síntese de derivados benzofenônicos com potencial antifúngico e anti-leishmania / Claudia Mara Maciel Rezende. - 2012.

138 f. -

Orientador: Marcelo Henrique dos Santos

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2012.

Bibliografia.

1. Benzofenonas. 2. Bactérias. 3. Fungos. 4. Leishmania. I. Santos, Marcelo Henrique dos. II. Título.

CDD: 547

CLAUDIA MARA MACIEL REZENDE

**SÍNTESE DE DERIVADOS BENZOFENÔNICOS COM
POTENCIAL ANTIFÚNGICO E ANTI-LEISHMANIA**

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

Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof^a. Amanda Latércia Tranches Dias
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Teodorico de Castro Ramalho
Instituição: Universidade Federal da Lavras

Alfenas-MG
2012

*Dedico esse trabalho Àquela que sempre
me ensinou a ser forte, a lutar pelos meus
objetivos, a correr atrás das conquistas.....*

E, hoje não está mais aqui conosco.

DOROTÉA, “uma eterna Mestre”

“Não é o que você faz, mas quanto amor você dedica no que faz que realmente importa.”

(Madre Tereza de Calcutá)

AGRADECIMENTOS

Agora é o momento de agradecer a muitos familiares, amigos e também aqueles que se revelaram ao longo desse tempo. Sei que corro o risco de não dar conta desse “muito obrigado” como é merecido, porque será difícil exprimir tudo o que se passou.

Por tudo isso destaca-se também um sentido: o da formação de uma verdadeira rede de solidariedade e de muito, muito afeto. Para maior percepção desse sentido devo contar que esta não foi uma caminhada breve, mas uma travessia que parecia sem fim, principalmente pelas ocorrências pessoais de toda ordem, que me atropelaram. Essas na quais impulsionaram-me com mais força.

*Talvez esta tese seja o resultado mais visível desse processo de construção em meio a uma combinação de afetos e amizades. Dessa forma, quero agradecer àqueles que dela fazem parte **direta** ou **indiretamente** ou, ainda, pelo fato de simplesmente existirem.*

- ❖ *A **Deus**, que por sua presença, luz e força sempre me abençoa e capacita para tudo aquilo que ele me destina;*

- ❖ *Aos meus pais **Amadeu e Romilda**, uma referência para as filhas e netos por uma vida de dedicação, amor, trabalho e que sempre possibilitaram a nós a oportunidade de realizar sonhos e conquistas;*

- ❖ *Ao meu marido **Joaquim Leonel** pelo apoio incondicional, companheiro de todas as horas que sempre esteve ao meu lado, inclusive nos momentos mais difíceis... Gostaria de agradecê-lo pelo carinho e pela confiança que depositou em mim durante todo esse período;*

- ❖ *Aos meus queridos e amados filhos **Marina e Thiago**, motivo de satisfação e orgulho na minha vida, por compreender toda minha ausência durante esse período, sem o amor e a compreensão deles nada disso teria acontecido;*

- ❖ *As minhas irmãs **Tereza e Graziela**, meus cunhados **Júnior e Cláudio** exemplos de dignidade, bondade e caráter e que muito me ajudaram e apoiaram nos momentos difíceis;*

- ❖ *Os meus “sobrinhos” Ana Gabriela, Guilherme, Flávia , Bruna, Bianca, Michele, Gabriela, Tayara, Vinícius e Neto pela força e pensamentos positivos;*
- ❖ *A minha sobrinha e afilhada Ana Paula, que sempre torceu por mim e sempre muito carinhosa procurava me incentivar a chegar ao fim dessa jornada;*
- ❖ *Inês, Suzana e Paulo pelo apoio incondicional em todos os momentos e sempre torceram por mim;*
- ❖ *Ao meu Professor e orientador Dr. Marcelo Henrique dos Santos pela confiança depositada, pela paciência, pelo exemplo de ética, pela dedicação ao longo de todos estes anos. Acima de tudo, por ter acreditado em mim e possibilitado a realização deste trabalho;*
- ❖ *Ao professor e co-orientador Dr. Claudio Viegas Junior por não medir esforços nas correções e nas discussões deste trabalho e sempre se mostrar preocupado e querendo o melhor para seus alunos;*
- ❖ *As professoras do Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal (LFQM) Dra. Marisi Gomes Soares e Dra. Márcia Paranho Veloso pelo incentivo constante;*
- ❖ *A uma pessoa que se fez presente desde o começo deste trabalho, Danielle Ferreira Dias que muito contribuiu na minha pesquisa com seu conhecimento e ricas discussões sobre a elaboração do projeto e das etapas sintéticas.*
- ❖ *Aos amigos do Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal (LFQM) pela amizade. Em especial Carla, Fabiano, Flávia Viegas, Isael, Ítalo, João Luiz, Paloma, Olívia e Tânia Mara. E por fazerem parte de toda essa caminhada as “Super Melhores Amigas (SMA)” pelas conversas, pelos momentos de alegria, pela torcida, pelos incentivos e acima de tudo por vocês existirem e fazerem parte dessa conquista: Aline, Bianca, Dani, Jaqueline, Kris, Maria Cecília, e Vanessa.*
- ❖ *Aos alunos de iniciação científica Éderson D’Martin, Francieli Ribeiro Pires e Milene Bueno pelo apoio durante os experimentos. Sem vocês este trabalho não seria possível de ser concluído;*

- ❖ *A todos os colegas do curso de pós-graduação (Mestrado) em especial **Iara Landre, Gabriel Isaac e Carla Toledo** no qual pude conviver e partilhar minhas experiências no decorrer deste curso;*
- ❖ *As **Profª. Drª. Márcia Paranho Veloso e Dra. Amanda Latércia Tranches Dias** que, como membros da banca de qualificação, contribuíram com importantes e enriquecedoras sugestões;*
- ❖ *Aos laboratórios parceiros de **Microbiologia e Imunologia de Ciências Biomédicas (UNIFAL) e Laboratório de Biologia Molecular (UNIFAL)** pela realização dos ensaios biológicos;*
- ❖ *Ao **Profº Dr. Marcos José Marques** e sua aluna **Letícia Almeida** que muito me auxiliaram no entendimento dos microrganismos parasitos (*Leishmanias*);*
- ❖ *Aos Sacerdotes **Pe. Donizzetti de Brito, Pe. Weberton dos Reis Magno, Seminarista Rovilson Angelo da Silva** e todas as **Irmãs Concepcionistas Missionárias do ensino** que me ensinaram que o **AMOR** jamais acaba (*Cor. 13*) e que **Deus** dá a prova do amor para conosco (*Apóstolo Paulo*);*
- ❖ *A **Universidade Federal de Alfenas** e ao **Programa de Pós-Graduação em Química** pela oportunidade oferecida;*
- ❖ *Aos professores **Dr. Teodorico de Castro Ramalho** (*Universidade Federal de Lavras*) e **Dra. Amanda Latércia Tranches Dias** por terem aceitado o convite e fazerem parte da banca de mestrado.*

RESUMO

As benzofenonas são amplamente utilizadas como intermediários sintéticos na indústria química e farmacêutica. Elas são alvo de contínuas investigações de interesse biológico devido a propriedades, tais como: inseticida, anti-agregação plaquetária, inibitória de xantine oxidase, antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatório e anti-proliferativo. Neste trabalho é descrita a síntese dos derivados metilados, butilados e prenilados das benzofenonas 2,4-diidroxibenzofenona, 4-hidroxibenzofenona e 4,4'-diidroxibenzofenona, seguido da caracterização por técnicas espectroscópicas e espectrométricas (infravermelho, ultravioleta-visível e ressonância magnética nuclear, e espectrometria de massas). Os derivados foram submetidos aos testes de atividade antioxidante pelo mecanismo de captação de radicais livres DPPH, inibitória de xantina oxidase e antimicrobiana (bactérias, fungos e leishmania) a fim de se relacionar a estrutura química com a atividade biológica dos compostos analisados. Os derivados testados não apresentaram resultados significantes para a atividade antioxidante em relação ao padrão ácido ascórbico, uma vez que as substituições aumentaram o caráter lipofílico das moléculas em relação ao padrão ácido ascórbico. No teste de inibição de xantina oxidase, os derivados obtidos não foram avaliados devido a sua não solubilidade no meio. Para a atividade antibacteriana (Gram-positivas e Gram-negativas), os derivados também não apresentaram atividade inibitória nos microrganismos testados. Na atividade antifúngica, o derivado butilado foi mais ativo do que o fluconazol. Na atividade leishmanicida (forma promastigota), os derivados metilados e prenilados apresentaram atividade inibitória significativa quando comparados à Anfotericina-B. Os resultados obtidos evidenciaram que a variação da lipofilicidade da molécula é um ponto importante para a atividade biológica e que algumas modificações estruturais realizadas nas benzofenonas levaram a derivados mais potentes, seletivos e pouco tóxicos contra diferentes tipos de microrganismos patogênicos.

Palavras-chave: Benzofenonas. Antimicrobiana. Bactérias. Fungos. Leishmania.

ABSTRACT

The benzophenones are used largely as synthetic intermediary in the chemical and pharmaceutical industry. They are objective of continuous investigations of biological interest due to properties, such as: insecticide, anti-aggregation platelet, inhibitory of xanthine oxidase, antioxidant, anti-microbial, anti-inflammatory and anti-proliferative. In this work it is described the synthesis of the methyl, butyl and prenyl derivatives of the benzofenones 2,4-dihydroxybenzofenone, 4-hydroxybenzofenone and 4,4'-di-hydroxybenzofenone, following by the characterization for techniques spectroscopic and spectrometric (infrared, ultraviolet-visible and nuclear magnetic resonance and mass spectrometry). The compounds were submitted to the tests of antioxidant activity for the mechanism of scavenging of free radicals DPPH, inhibitory of xanthine oxidase and anti-microbial (bacteria, fungi and Leishmania) in order to link the chemical structure with the biological activity of the analyzed compositions. Flowed tested they didn't present significant results for the antioxidant activity in relation to the ascorbic acid pattern, once the substitutions increased the lipophilic character of the molecules in relation to the ascorbic acid pattern. In the test of inhibition of xanthine oxidase, flowed obtained they were not appraised due to yours no solubility in the middle. For the anti-bacterial (Gram-positive and Gram-negatives) activity, derived them didn't also present inhibitory activity in the tested microorganisms. In the activity anti-fungal, the butyl derivative was more active than the fluconazole. In the activity leishmanicida (promastigote form), the methyl and prenyl derivatives presented significant inhibitory activity when compared to amphotericin-B. The obtained results evidenced that the variation of the lipophilicity of the molecules is an important point for the biological activity and that some structural modifications accomplished in the benzofenonas took her flowed more potent, selective and little toxic against different types of microorganisms pathogenic.

Keywords: Benzophenones. Anti-microbial. Bacter. Fungi. Leishmania.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sistema difenilmetanona.....	21
Figura 2 - Sistema biciclo[3.3.1]noneno.....	22
Figura 3 - Exemplos de benzofenonas polipreniladas naturais.....	22
Figura 4 - Reação de Friedel-Crafts de cloreto de acila com derivados de benzeno.....	23
Figura 5 - Reações químicas responsáveis pela formação das espécies reativa de oxigênio..	25
Figura 6 - Doenças associadas à ação de agentes oxidantes.....	25
Figura 7 - Estrutura geral das flavonas.....	26
Figura 8 - Proposta de mecanismo de ação para xantina-oxidase.....	27
Figura 9 - Degradação do ácido úrico a ácido alantóico.....	28
Figura 10 - Representação esquemática da parede celular de bactéria Gram-positiva.....	30
Figura 11 - Representação esquemática da parede celular de bactéria Gram-negativa.....	31
Figura 12 - Exemplos de antifúngicos utilizados no tratamento de infecções por <i>Candida</i>	35
Figura 13 -Micrografia das formas morfológicas mais comuns de <i>Leishmania spp</i>	37
Figura 14 - Ciclo de vida de <i>Leishmania spp</i>	38
Figura 15 - Diversidade de manifestações clínicas na LTA.....	42
Figura 16 - 4`-hidroxi-5,6,7,3`,5`-pentametoxiflavona.....	43
Figura 17 - Estrutura das benzofenonas preniladas 13, 14, e 15.....	44
Figura 18 - Sais derivados de benzofenonas.....	45
Figura19 - Estrutura das benzofenonas di e triidroxiladas, com atividade inibitória de XO.....	47
Figura 20 - Representação da estrutura da parede celular fúngica.....	50
Figura 21 - Proposta de síntese.....	54
Figura 22 - Estrutura química da xantoxilina e derivados.....	55
Figura 23 - Estrutura química do flavonóide astilbina e seus derivados.....	56
Figura 24 - Derivado benzofurânico da xantoxilina.....	57
Figura 25 - Reação de obtenção do derivado LFQM-115.....	61
Figura 26 - Reação de obtenção do derivado LFQM-116.....	62
Figura 27.- Reação de obtenção do derivado LFQM-117.....	63
Figura 28 - Reação de obtenção do derivado LFQM-118.....	64
Figura 29 - Reação de obtenção do derivado LFQM-119.....	65
Figura 30 - Reação de obtenção do derivado LFQM-120.....	66

Figura 31 - Reação de obtenção do derivado LFQM-121.....	67
Figura 32 - Reação de obtenção do derivado LFQM-122.....	68
Figura 33 - Reação de obtenção do derivado LFQM-123.....	69
Figura 34 - Ensaio microbiológico.....	75
Figura 35 - Derivado sintético LFQM-115.....	77
Figura 36 - Espectro no ultravioleta do derivado LFQM-115 com AlCl ₃ e HCl.....	78
Figura 37 - Espectro no ultravioleta do derivado LFQM-115 com NaOAc e H ₃ BO ₃	78
Figura 38 - Espectro de absorção na região do infravermelho de LFQM-115.....	79
Figura 39 - Espectro de massas do derivado LFQM-115.....	80
Figura 40 - Espectro de RMN de ¹ H de LFQM-115 (CDCl ₃ ; 200 MHz).....	81
Figura 41 - Espectro de RMN de ¹³ C de LFQM-115 (CDCl ₃ ; 50 MHz).....	82
Figura 42 - Derivado sintético LFQM-116.....	82
Figura 43 - Espectro no ultravioleta do derivado LFQM-116 com AlCl ₃ e HCl.....	83
Figura 44 - Espectro no ultravioleta do derivado LFQM-116 com NaOAc e H ₃ BO ₃	84
Figura 45 - Espectro de absorção na região do infravermelho de LFQM-116.....	85
Figura 46 - Espectro de massas do derivado LFQM-116.....	85
Figura 47 - Espectro de RMN de ¹ H a 200 MHz de LFQM-116 (CDCl ₃ ; 200 MHz).....	87
Figura 48 - Espectro de RMN de ¹³ C de LFQM-116 (CDCl ₃ ; 50 MHz).....	88
Figura 49 - Derivado sintético LFQM-117	88
Figura 50 - Espectro no ultravioleta do derivado LFQM-117 com AlCl ₃ e HCl.....	89
Figura 51 - Espectro no ultravioleta do derivado LFQM-117 com NaOAc e H ₃ BO ₃	90
Figura 52 - Espectro de absorção na região do infravermelho de LFQM-117.....	91
Figura 53 - Espectro de massas do derivado LFQM-117	91
Figura 54 - Espectro de RMN de ¹ H de LFQM-117 (CDCl ₃ ; 200 MHz).....	93
Figura 55 - Espectro de RMN de ¹³ C de LFQM-117 (CDCl ₃ ; 50 MHz).....	94
Figura 56 - Derivado sintético LFQM-118.....	94
Figura 57 - Espectro no ultravioleta do derivado LFQM-118 com NaOAc e H ₃ BO ₃	95
Figura 58 - Espectro de absorção na região do infravermelho de LFQM-118	96
Figura 59 - Espectro de massas do derivado LFQM-118	96
Figura 60 - Espectro de RMN de ¹ H de LFQM-118 (CDCl ₃ ; 200 MHz).....	97
Figura 61 - Espectro de RMN de ¹³ C de LFQM-118 (CDCl ₃ ; 50 MHz).....	98
Figura 62 - Derivado sintético LFQM-119.....	98
Figura 63 - Espectro no ultravioleta do composto LFQM-119 com NaOAc e H ₃ BO ₃	99
Figura 64 - Espectro de absorção na região do infravermelho de LFQM-11.....	100

Figura 65 - Espectro de massas do derivado LFQM-119	101
Figura 66 - Espectro de RMN de ^1H de LFQM-119 (CDCl_3 ; 200 MHz).....	102
Figura 67 - Espectro de RMN de ^{13}C de LFQM-119 (CDCl_3 ; 50 MHz).....	103
Figura 68 - Derivado sintético LFQM-120.....	104
Figura 69 - Espectro no ultravioleta do derivado LFQM-120 com NaOAc e H_3BO_3	104
Figura 70 - Espectro de absorção na região do infravermelho de LFQM-120	105
Figura 71 - Espectro de massas do derivado LFQM-120	105
Figura 72 - Espectro de RMN de ^1H de LFQM-120 (CDCl_3 ; 200 MHz)	107
Figura 73 - Espectro de RMN de ^{13}C de LFQM-120 (CDCl_3 ; 50 MHz)	108
Figura 74 - Derivado sintético LFQM-121.....	108
Figura 75 - Espectro de absorção na região do infravermelho de LFQM-121	109
Figura 76 - Espectro de massas do derivado LFQM-121	110
Figura 77 - Espectro de RMN de ^1H de LFQM-121 (CDCl_3 ; 200 MHz)	111
Figura 78 - Espectro de RMN de ^{13}C de LFQM-121 (CDCl_3 ; 50 MHz)	112
Figura 79 - Derivado sintético LFQM-122.....	112
Figura 80 - Espectro de absorção na região do infravermelho de LFQM-122.....	113
Figura 81 - Espectro de RMN de ^1H de LFQM-122 (CDCl_3 ; 200 MHz)	114
Figura 82 - Espectro de RMN de ^{13}C de LFQM-122 (CDCl_3 ; 50 MHz)	115
Figura 83 - Derivado sintético LFQM-123.....	115
Figura 84 - Espectro de absorção na região do infravermelho de LFQM-123.....	116
Figura 85 - Espectro de RMN de ^1H de LFQM-123 (CDCl_3 ; 200 MHz)	117
Figura 86 - Espectro de RMN de ^{13}C de LFQM-123 (CDCl_3 ; 50 MHz)	118
Figura 87 - Efeito antioxidante dos derivados de CM-A.....	120
Figura 88 - Efeito antioxidante dos derivados de CM-B.....	121
Figura 89 - Efeito antioxidante dos derivados de CM-C.....	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diluições dos derivados para avaliação antibacteriana e antifúngica.....	74
Tabela 2 - Principais fragmentos presentes no espectro de massa do derivado LFQM-115..	80
Tabela 3 - Principais fragmentos presentes no espectro de massa do derivado LFQM-116..	86
Tabela 4 - Principais fragmentos presentes no espectro de massa do derivado LFQM-117..	92
Tabela 5 - Principais fragmentos presentes no espectro de massa do derivado LFQM-118..	97
Tabela 6 - Principais fragmentos presentes no espectro de massa do derivado LFQM- 119.....	101
Tabela 7 - Principais fragmentos presentes no espectro de massa do derivado LFQM-120.....	106
Tabela 8 - Principais fragmentos presentes no espectro de massa do derivado LFQM-121.....	110
Tabela 9 - Atividade antioxidante dos derivados CM-A.....	120
Tabela 10 - Atividade antioxidante dos derivados CM-B.....	121
Tabela 11 - Atividade antioxidante dos derivados CM-C.....	122
Tabela 12 - Resultados de inibição de XO.....	123
Tabela 13 - Resultados de inibição de XO por alopurinol.....	123
Tabela 14 - Resultados da atividade antibacteriana.....	126
Tabela 15 - Resultados da atividade antifúngica.....	127

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação dos principais fármacos antibióticos de acordo com o seu mecanismo de ação.....	48
Quadro 2 - Classificação dos principais fármacos antifúngicos de acordo com o seu mecanismo de ação.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

δ	- Deslocamento químico
δ_C	- Deslocamento químico do carbono
δ_H	- Deslocamento químico do hidrogênio
μg	- Microgramas
CC	- Cromatografia em coluna
CCD	- Cromatografia em camada delgada
cm	- centímetros
CM-A	- 2,4-diidroxibenzofenona
CM-B	- 4-hidroxibenzofenona
CM-C	- 4,4'-diidroxibenzofenona
CoQH	- Semiquinona
DMF	- Dimetilformamida
DMSO	- d_6 – Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	-Ácido desoxirribonucléico
DPPH \cdot	- Radical 1,1-difenil-2-picrilidrazil (ou 2,2-difenil-1-picrilidrazil)
DPPH-H	- difenil-picrilidrazina
ERNs	- Espécies reativas de nitrogênio
EROs	- Espécies reativas de oxigênio
GPx	- Glutathione peroxidase
GSH	- Glutathione reduzida
HIV	- <i>Human imuni virus</i>
Hz	- Hertz
IC ₁₀₀	- Concentração inibitória que causa 100% do efeito
IC ₅₀	- Concentração inibitória que causa 50% do efeito
IV	- Infravermelho
J	- Constantes de acoplamento
LABiQ	- Laboratório interdisciplinar de Química (UNIFAL-MG)
LAREMAR	- Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução (UFMG)
LC	- Leishmaniose cutânea
LFQM	- Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal

LTA	- Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	- Leishmaniose visceral
LFQM-115	- 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona
LFQM-116	- 2-hidroxi-4-butoxibenzofenona
LFQM-117	- 2-hidroxi-4-preniloxibenzofenona
LFQM-118	- 4-metoxibenzofenona
LFQM-119	- 4-butoxibenzofenona
LFQM-120	- 4-preniloxibenzofenona
LFQM-121	- 4,4' - dimetoxibenzofenona
LFQM-122	- 4,4' - dibutoxibenzofenona
LFQM-123	- 4,4' - dipreniloxibenzofenona
nm	- Nanômetro
ppm	- Partes por milhão
REA	- Relação estrutura atividade
RMN de ^{13}C	- Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN de ^1H	- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
SOD	- Superóxido-desmutase
TMS	- Tetrametilsilano
TRIS	- Tri(hidroximetil)aminometano
v/v	- Volume por volume
λ	- Comprimento de onda
XO	- xantina oxidase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1	ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS BENZOFENONA.....	24
2.1.1	Atividade antioxidante	24
2.1.2	Atividade inibitória de xantina oxidase	26
2.1.3	Atividade antimicrobiana	29
2.1.3.1	Atividade antibacteriana.....	29
2.1.3.1.1	<i>Bactérias Gram-positivas</i>	31
2.1.3.1.2	<i>Bactérias Gram-negativas</i>	32
2.1.3.2	Antifúngica.....	33
2.1.3.2.1	<i>Leveduras</i>	34
2.1.3.3	Atividade Anti-Leishmania.....	36
2.1.3.3.1	<i>Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) – forma cutânea</i>	39
2.1.3.3.2	<i>Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) – forma cutânea difusa</i>	40
2.1.3.3.3	<i>Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) – forma mucosa</i>	41
2.1.3.3.4	<i>Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) – forma visceral</i>	41
2.1.3.3.5	<i>Tratamento</i>	42
2.2	MECANISMO DE AÇÃO.....	45
2.2.1	Antioxidantes	46
2.2.2	Xantina oxidase	46
2.2.3	Agentes antibacterianos	47
2.2.4	Agentes antifúngicos	50
2.2.5	Leishmaniose	52
3	JUSTIFICATIVA	53
4	OBJETIVOS	58
4.1	OBJETIVOS GERAIS.....	58
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	58
5	PARTE EXPERIMENTAL	59
5.1	MÉTODOS GERAIS.....	59
5.2	OBTENÇÃO DE DERIVADOS.....	60

5.3	ETAPA SINTÉTICA.....	61
5.3.1	Síntese de 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (LFQM-115).....	61
5.3.2	Síntese de 2-hidroxi-4-butoxibenzofenona (LFQM-116).....	62
5.3.3	Síntese de 2-hidroxi-4-preniloxibenzofenona (LFQM-117).....	63
5.3.4	Síntese de 4-metoxibenzofenona (LFQM-118).....	64
5.3.5	Síntese de 4-butoxibenzofenona (LFQM-119)	65
5.3.6	Síntese de 4-preniloxibenzofenona (LFQM-120)	66
5.3.7	Síntese de 4-4'-dimetoxibenzofenona (LFQM-121).....	67
5.3.8	Síntese de 4-4'-dibutoxibenzofenona (LFQM-122)	68
5.3.9	Síntese de 4-4'-dipreniloxibenzofenona (LFQM-123)	69
5.4	AVALIAÇÕES DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	70
5.4.1	Atividade antioxidante.....	70
5.4.1.1	Avaliação do poder sequestrante de radicais DPPH.....	70
5.4.1.2	Avaliação do poder redutor dos constituintes químicos.....	71
5.4.2	Atividade inibitória de xantina oxidase.....	71
5.4.2.1	Tampão TRIS	71
5.4.2.2	Solução estoque de xantina.....	71
5.4.2.3	Xantina em TRIS.....	72
5.4.2.4	Xantina oxidase.....	72
5.4.2.5	Preparo do alopurinol	72
5.4.2.6	Preparo de 2,4-diidroxibenzofenona.....	72
5.4.2.7	Preparo de 2-hidroxi-4-butoxibenzofenona	72
5.4.3	Avaliação da atividade antimicrobiano.....	73
5.4.3.1	Bactérias e fungos	73
5.4.3.2	Leitura e interpretação dos resultados.....	74
5.4.4	Avaliação da atividade antiparasitária.....	75
5.4.4.1	Leishmaniose (teste promastigota).....	75
5.4.4.2	Determinação de IC ₅₀ em promastigotas de <i>L. amazonenses</i>	75
5.4.4.3	Avaliação da citotoxicidade.....	76
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	77
6.1	RESULTADOS DAS ETAPAS SINTÉTICAS.....	77
6.1.1	Derivado LFQM-115 (2-hidroxi-4-metoxibenzofenona).....	77
6.1.2	Derivado LFQM-116 (2-hidroxi-4-butoxibenzofenona).....	82
6.1.3	Derivado LFQM-117 (2-hidroxi-4-preniloxibenzofenona).....	88

6.1.4	Derivado LFQM-118 (4-metoxibenzofenona)	94
6.1.5	Derivado LFQM-119 (4-butoxibenzofenona)	93
6.1.6	Derivado LFQM-120 (4-preniloxibenzofenona)	98
6.1.7	Derivado LFQM-121 (4,4'-dimetoxibenzofenona)	108
6.1.8	Derivado LFQM-122 (4,4'-dibutoxibenzofenona)	112
6.1.9	Derivado LFQM-123 (4,4'-dipreniloxibenzofenona)	115
6.2	RESULTADOS DOS ENSAIOS biológicos	118
6.2.1	Antioxidante	118
6.2.2	Inibitória de xantina oxidase	122
6.2.3	Avaliação do efeito antibacteriano	123
6.2.3.1	Ação sobre a parede celular.....	123
6.2.4	Avaliação do efeito antifúngico	124
6.2.5	Avaliação do efeito Antiparasitário	125
6.2.5.1	Atividade leishmanicida contra as formas promastigotas.....	125
7	CONCLUSÃO	128
8	PERSPECTIVAS	129
	REFERÊNCIAS	130

1 INTRODUÇÃO

As benzofenonas são compostos orgânicos, amplamente utilizados como intermediários sintéticos na indústria química e tem grande importância na perfumaria, na fotoquímica e, quando substituídas, no ramo farmacêutico (MARVEL et al.,1941). A benzofenona mais simples, também conhecida como difenilmetanona (1), é uma substância cristalina branca com odor de rosas, insolúvel em água, apresentando ponto de fusão de 49°C e ponto de ebulição de 305-306°C (COOK et al., 2001), (Figura1).

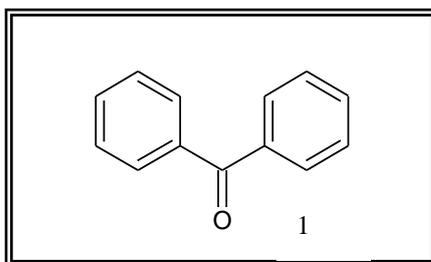


Figura 1- Sistema difenilmetanona.
Fonte: COOK et al., 2001.

Muitas benzofenonas são utilizadas na indústria, em cosméticos, em medicina e na agricultura devido à sua habilidade de absorver e espalhar radiação ultravioleta de forma inofensiva, protegendo produtos e humanos dos efeitos danosos da radiação UV (SWEETMAN et al., 2007). Esta classe de compostos, muitas vezes combinados com um protetor solar de uma classe diferente, pode ser utilizada para evitar queimaduras solares e têm sido utilizados como protetores solar desde 1965 (COX et al.,2008).

As benzofenonas podem ser agrupadas de acordo com a estrutura do seu núcleo e classificadas como: simples, simples polipreniladas e polipreniladas (Figura 2) (BEERHUES, 1996) pela presença de um sistema biciclo [3.3.1] noneno.

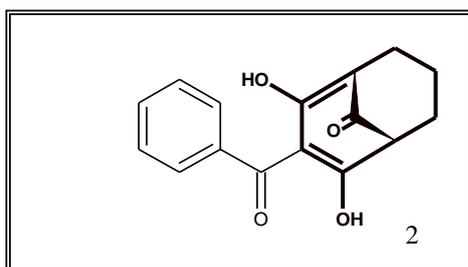


Figura 2 - Em negrito, o sistema biciclo[3.3.1]noneno.
Fonte: BEERHUES, 1996.

As benzofenonas polipreniladas são também classificadas com acilfloroglucínóis poliprenilados policíclicos do tipo B. Como exemplos, pode-se citar a guttiferona-A (**3**), o garcinol (**4**), a 7-epiclusianona (**5**) e a garcineofenona (**6**) (FIGURA 3) (CIOCHINA et al., 2006).

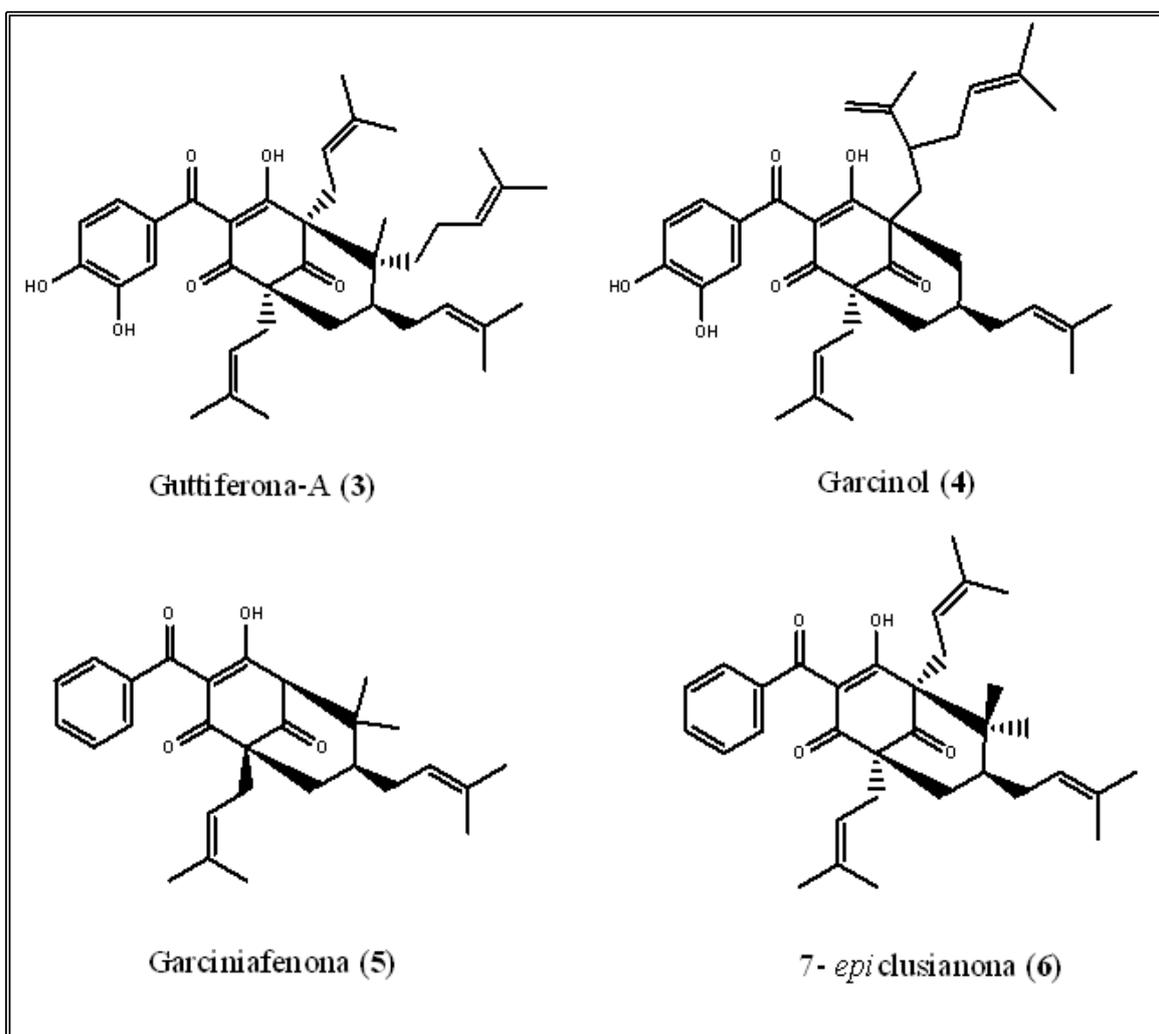


Figura 3 - Exemplos de benzofenonas polipreniladas naturais.
 Fonte: CIOCHINA et al., 2006.

Geralmente, as benzofenonas e seus derivados são preparados por alquilação de Friedel-Crafts de compostos aromáticos (Figura 4) catalisada com ácidos de Lewis, como BF_3 , AlCl_3 , TiCl_4 , ou ZnCl_2 (KOWALSKI et al., 2004). No entanto, esta reação exige mais do que uma quantidade estequiométrica de um ácido de Lewis, devido ao consumo deste através da coordenação com os produtos. Além disso, todos estes ácidos têm desvantagens, como por exemplo, serem tóxicos, corrosivos e poluentes, são difíceis de serem reutilizados, podendo ainda causar problemas durante o isolamento de produtos.

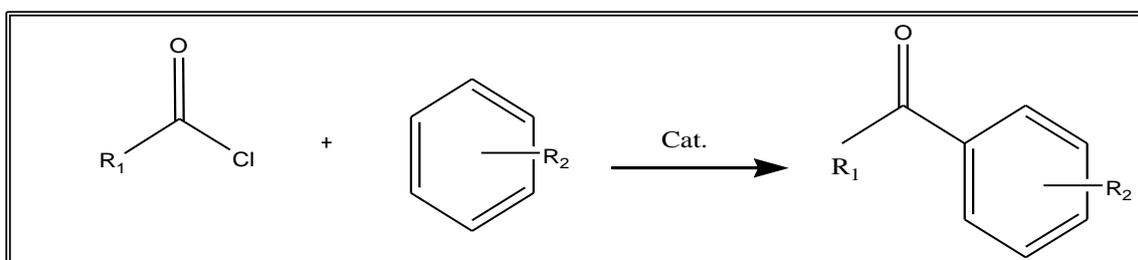


Figura 4 - Reação de Friedel-Crafts de cloreto de acila com derivados de benzeno.
 Fonte: KOWALSKI et al., 2004.

Uma outra abordagem sintética envolve a cisão oxidativa de ligações $\text{C}=\text{C}$ e tem grande utilidade por permitir a inserção simultânea de uma função carbonila (LEE et al., 1991; KUHN et al., 2004). Este critério de transformação é geralmente obtido por duas abordagens principais: ozonólise e a Reação Lemieux-Johnson (BAILEY, 1978).

O presente projeto visa o estudo da relação estrutura-atividade de derivados benzofenônicos, obtidos por reação de alquilação de benzofenonas hidroxiladas comerciais, especialmente no que se refere à modificação das características de hidro/lipofilicidade, através da inserção de grupos substituintes nas hidroxilas fenólicas. Após purificação e caracterização dos derivados, estes serão submetidos a ensaios para verificação do potencial da atividade antioxidante, inibitória de xantina oxidase (XO) e antimicrobiana.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS BENZOFENONAS

As benzofenonas são alvo de contínuas investigações de interesse biológico devido às suas propriedades inseticidas, inibitória da agregação plaquetária e inibitória de XO (SHEU et al., 1999). Destacam-se também os efeitos antioxidantes (SANG et al., 2002), antimicrobiano (BAKANA et al., 1987; RUBIO et al., 1999; FULLER et al., 1999), anti-inflamatório (DORIGUETTO et al., 2007; KHANUM et al., 2004) e antiproliferativo (SEO et al., 2000; ITO et al., 2003).

2.1.1 Atividade Antioxidante

Atualmente existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo e de seu envolvimento em inúmeros processos bioquímicos e fisiopatológicos. O termo radical livre é frequentemente usado para designar qualquer átomo ou molécula com existência independente, contendo um ou mais elétrons não pareados, nos orbitais externos. Um elétron não pareado é aquele que ocupa um orbital atômico ou molecular isoladamente (VANNUCCHI et al., 1999).

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

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica (Figura 5).

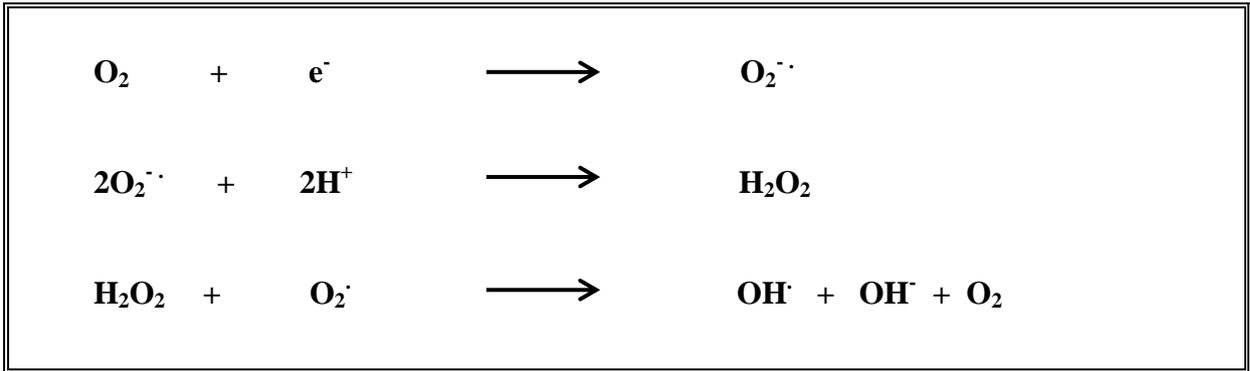


Figura 5 - Reações químicas responsáveis pela formação das espécies reativas de oxigênio.
 Fonte: HALLIWELL, et al., 2000.

Esses radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados EROs ou ERNs (BARREIROS et al., 2006).

No organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA. Dessa forma, encontram-se relacionados com várias patologias (Figura 6), tais como artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (BARREIROS et al., 2006).

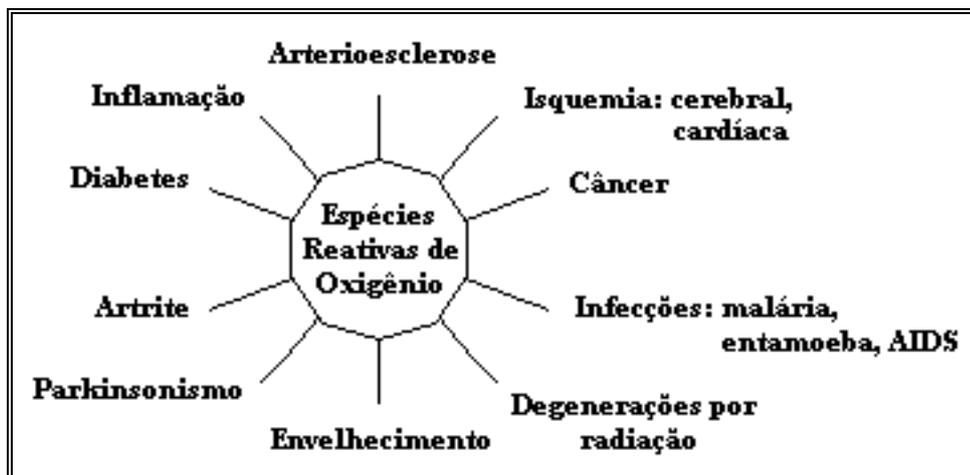


Figura 6 - Doenças associadas à ação de agentes oxidantes.
 Fonte: SHAHIDI, 1997.

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

Os medicamentos com ação antioxidante estão sendo amplamente propostos como bases para o desenvolvimento de novas abordagens de regulação farmacológica do desequilíbrio homeostático e peroxi-antioxidativo, responsável pelo desenvolvimento de várias desordens como a hepatite, inflamação, arterosclerose, isquemia e carcinogênese (NAKAI et al., 2006).

Tem sido descrito na literatura que compostos contendo anéis aromáticos, contendo diversos padrões estruturais, podem apresentar atividade antioxidante. Entre estes, foram estudadas cumarinas (LIN et al., 2000), flavonóides (NAGAO et al., 1999), flavonas (COTELLE et al., 1996; CONSTANTINO et al., 1996) e benzofenonas (CASTRO et al., 2004). É bem documentado que a presença do grupo hidroxila livre na posição C-3 em flavonóides determinam grande potencial como agente antioxidante (COS et al., 1998). Cotelle e colaboradores descreveram a obtenção de 24 derivados de flavonas com substituição OH ou OCH₃ nos anéis A e B com potente ação antioxidante (Figura 7) (COTELLE et al., 1996).

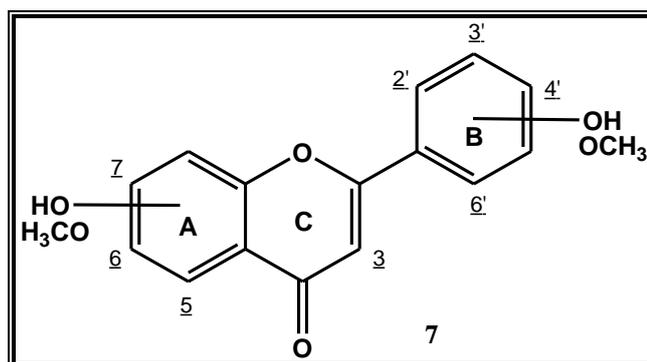


Figura 7 - Estrutura geral das flavonas.
Fonte: COTELLE et al., 1996.

2.1.2 Atividade inibitória de xantina oxidase

A xantina oxidase (XO) é a enzima que está presente no fígado e catalisa a transformação sucessiva de hipoxantina a ácido úrico. É uma enzima complexa, da classe das metaloflavoproteínas, e contém em cada uma de suas subunidades um centro com um átomo de molibdênio (Mo), um centro dinucleotídeo adenosina e flavina (FAD) e dois centros ferro-enxofre (2Fe/2S) (HILLE et al., 1987). O mecanismo de ação, para a formação do ácido úrico, ocorre no centro molibdênico (Figura 8). Inicialmente, um sítio básico abstrai o hidrogênio do grupo Mo-OH da enzima e este realiza um ataque nucleofílico na posição C-8 do substrato, simultaneamente ocorre a transferência do hidreto do substrato ao grupo Mo=S da enzima. Esse intermediário inicial se dissocia, pela transferência de elétrons para outro centro oxidante ativo na enzima, e é formada a espécie Mo (V), seguido pelo deslocamento do intermediário pelo íon hidróxido do meio celular para a formação do produto e retornar a enzima ao estado inicial (HILLE et al., 1987; CHOI et al., 2004).

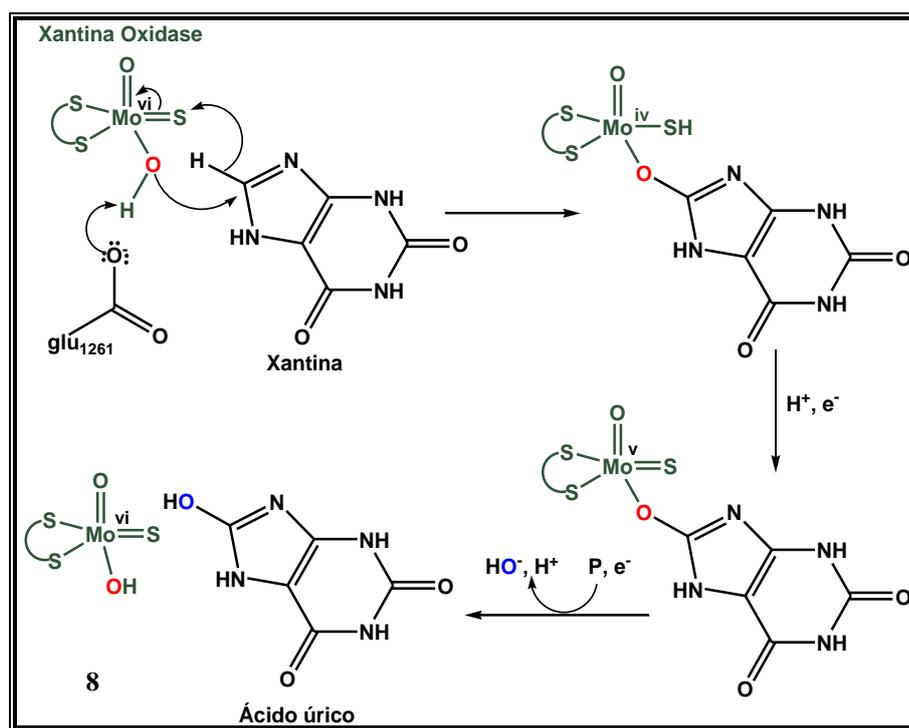


Figura 8 - Proposta de mecanismo de ação para xantina-oxidase.
Fonte: HILLE et al., 1987; CHOI et al., 2004.

Em alguns peixes, pássaros e muitos répteis a degradação do ácido úrico é auxiliada pela participação de outra enzima, a uricase, produzindo alantoína, ácido alantóico, uréia e glioxilato. Entretanto, primatas, incluindo os seres humanos, são incapazes de degradar o

ácido úrico à alantoína, portanto o ácido úrico é o produto da degradação das purinas nessas espécies (Figura 9) (KOOLMAN et al., 2000).

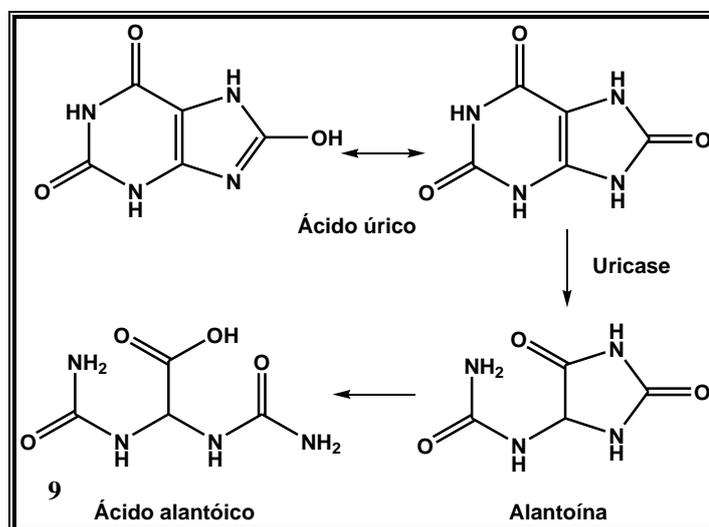


Figura 9 - Degradação do ácido úrico a ácido alantóico.

Fonte: KOOLMAN et al., 2000.

O excesso de atividade da XO resulta em uma superprodução de ácido úrico, que ao se acumular no sangue, pode ocasionar o desenvolvimento da hiperuricemia. O ácido úrico é pouco solúvel no sangue, assim quando atinge o limite de solubilidade ocorre a precipitação de cristais de uratos nas articulações, ocasionando a gota (BURKE et al., 2006). A gota é um dos distúrbios metabólicos mais comuns que afetam os seres humanos e é o principal causador de artrite reumatóide. Ela é o resultado da deposição de urato monossódico em fluidos do corpo hiperuricêmico e quando depositado nos rins resulta em artrite gotosa e nefrolitíase (WRIGHT et al., 2003; TERKELTAUB et al., 1993; TOWNES, 1999; WORTMAN, 1998). O aumento do risco de hiperuricemia também tem sido associado ao desenvolvimento de hipertensão, hiperlipidemia, câncer, diabetes e obesidade (LIN et al., 2000).

Os sintomas clássicos de gota são episódios recorrentes de artrite aguda que são intercalados com períodos assintomáticos, resultando em inflamação e inchaço. O ataque inicial ocorre frequentemente durante a noite e pode ser extremamente doloroso (TOWNES, 1999). O estágio da gota se torna crônico, após vários anos de artrite gotosa aguda, em que são observados depósitos (tofós) de urato monossódico em tecidos moles (TERKELTAUB et al., 1993; WRIGHT et al., 2003). Os tofos são nódulos que podem aparecer nas articulações,

deformando-as pelo excesso de ácido úrico, podendo ainda se depositar no tecido sinovial, ossos, tendões, superfícies extensoras e articulações ou ainda no rim, o órgão extra-articular mais afetado pela gota (TOWNES, 1999).

Estimativas recentes sugerem que a incidência e a prevalência da gota dobraram nos últimos 40 anos. Cerca de 80% dos pacientes com gota apresentaram também características de síndrome metabólica (obesidade central, hipertensão, hipertrigliceridemia, hiperglicemia e baixo índice de HDL-lipoproteína de alta densidade) (WRIGHT et al., 2003). Estudos epidemiológicos têm confirmado que o consumo de álcool (especialmente cerveja) e dietas ricas em carnes vermelhas e mariscos são fatores de risco para o desenvolvimento de gota, enquanto dietas ricas em laticínios são protetoras (WRIGHT et al., 2003).

2.1.3 Atividade antimicrobiana

Muitos microrganismos são agentes patogênicos causadores de doenças, que a cada ano afetam mais de cinco milhões de pessoas nos países desenvolvidos, infectados por bactérias, fungos e protozoários. Dentre algumas doenças de alto impacto em saúde pública estão as doenças bacterianas, as infecções fúngicas e algumas parasitárias, como a leishmaniose. A atividade antimicrobiana envolve uma série de propriedades que, por mecanismos de ação variados tem por objetivo o controle desses agentes patogênicos (TRABULSI et al., 1999).

2.1.3.1 Atividade Antibacteriana

As bactérias são os mais simples organismos encontrados na maioria dos ambientes naturais, ocorrendo como células esféricas ou em forma de bastonetes curtos com tamanhos variados. Seu material genético não está envolto por uma membrana nuclear e por essa razão são chamadas de procarioto (TORTORA, 2005). A parede celular de uma célula bacteriana é responsável pela forma da célula e de acordo com a constituição da parede, as bactérias podem ser divididas em dois grandes grupos: Gram-positivas e Gram-negativas. As diferenças entre esses dois grupos residem principalmente em suas propriedades de permeabilidade e nos componentes de superfície. A parede celular das bactérias Gram-positivas (Figura10) consiste em uma espessa camada de peptidoglicano, um dissacarídeo repetitivo unido por

polipeptídios, além de ácidos teicóicos que consistem primariamente em uma porção álcool e um grupamento fosfato.

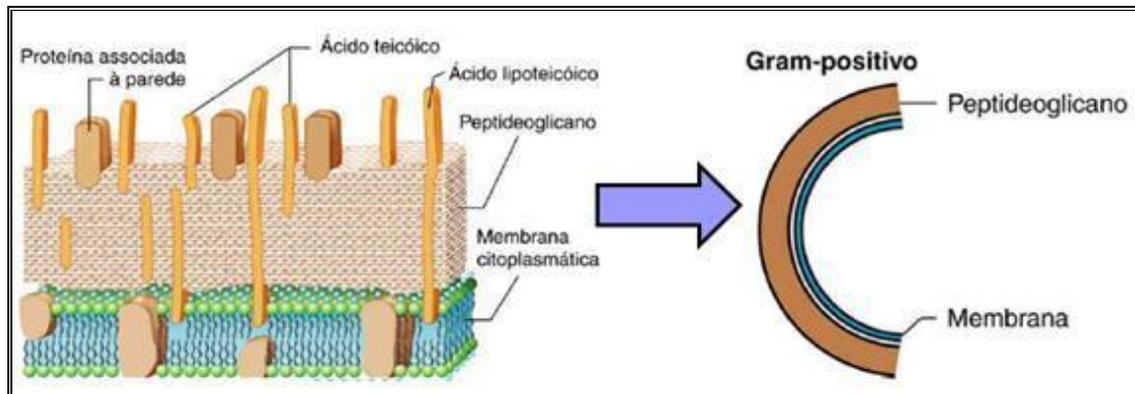


Figura 10 - Representação esquemática da parede celular de bactéria Gram-Positiva.
Fonte: TORTORA, 2003.

Já a parede celular das bactérias Gram-negativas (Figura 11), consiste de uma ou poucas mais camadas de peptidoglicano e uma membrana externa formada por lipoproteínas, lipopolissacarídeos e fosfolipídeos (TRABULSI, 1999). O seu interior possui características hidrofóbicas devido à presença de ácidos graxos e a parte polissacarídica externa constitui um ambiente hidrofílico que constitui uma barreira adicional à entrada de algumas substâncias como antibióticos (SCHAECHTER, 2002). Devido à membrana externa apresentar características lipoprotéicas, as bactérias necessitam dispor de mecanismos que permitam a entrada de compostos hidrofílicos como açúcares, aminoácidos e certos íons. Por isso, sua membrana externa possui canais especiais chamados de porinas, que permitem a difusão passiva de compostos hidrofílicos (TORTORA, 2005).

O sistema de dupla membrana das bactérias Gram-negativas origina um espaçamento entre a membrana citoplasmática e a membrana externa, esse espaçamento é chamado de espaço periplasmático.

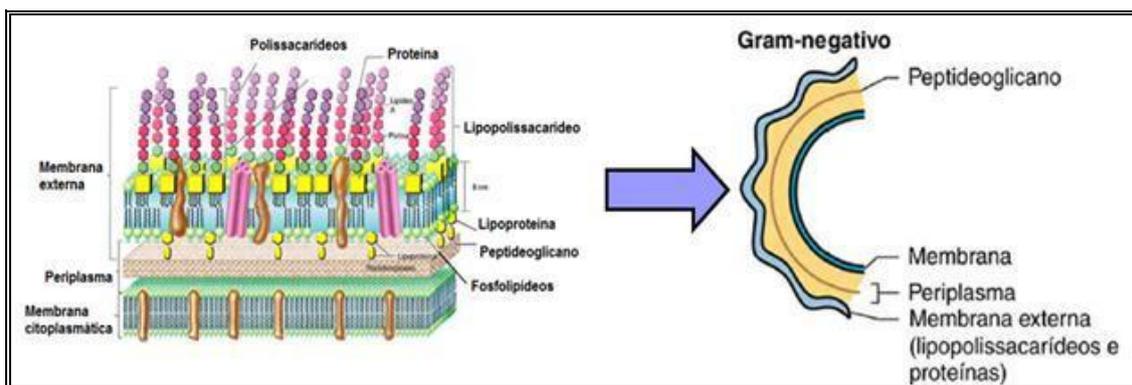


Figura 11 - Representação esquemática da parede celular de bactéria Gram-Negativa.

Fonte: TORTORA, 2003.

As bactérias, de modo geral, são causadoras de diversas patologias, cuja gravidade da infecção depende de diversos fatores: a espécie causadora, a imunidade do hospedeiro, o local da infecção e a resistência da bactéria à farmacoterapia. As bactérias implicadas nestas infecções podem ser verdadeiramente patógenas ou patógenas oportunistas (TRABULSI, et al., 1999).

Existem relatos que as benzofenonas possuem uma boa atividade contra bactérias como a *Escherichia coli* ($IC_{50} = 0,5-2,0$ mg/L), atuando por inibição da membrana bacteriana, não sendo citotóxico para as células de mamíferos, (VOOTURI et al., 2009).

2.1.3.1.1 Bactérias Gram-positivas

As bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* são patógenos de várias espécies de mamíferos, incluindo o homem. Os *S. aureus*, uma das espécies mais importantes deste gênero, são cocos Gram-positivos aeróbios ou anaeróbios facultativos, coagulase-positiva, que crescem melhor em anaerobiose e que ocorrem tipicamente em agrupamento na forma de cachos nos esfregaços corados. O *S. aureus* é o patógeno humano mais importante dentre os estafilococos, sendo amplamente distribuído na natureza, ocorrendo em diversos tipos de ambientes ou como habitantes comensais da pele, mucosas e outros sítios corpóreos do homem. Embora faça parte da microbiota humana normal, pode produzir infecções oportunistas importantes em condições apropriadas, a exemplo de furúnculos, abscessos, osteomielite, artrite infecciosa e intoxicação alimentar.

É um dos mais importantes agentes etiológicos de processos infecciosos adquiridos, tanto em pacientes ambulatoriais, como em pacientes hospitalizados, apresentando vários fatores que contribuem para sua virulência, como toxinas e enzimas características que

contribuem para a patogenicidade da bactéria, aumentando sua habilidade de invadir e danificar os tecidos (KONEMAN, 2001).

Um exemplo disso é uma enterotoxina responsável pela ocorrência de vômitos e náuseas, sendo a causa mais comum de intoxicações alimentares. Infecções em procedimentos cirúrgicos invasivos são problemas comuns em hospitais, onde a habilidade dos microrganismos em desenvolver resistência rapidamente aos antibióticos convencionais, como as penicilinas, contribui para o aumento de sua patogenicidade (CATÃO et al., 2006).

O *S.epidermidis* faz parte da flora normal da pele e da mucosa de seres humanos e animais superiores, bem menos virulenta que o *S aureus*. Esta espécie não produz a coagulase e algumas cepas apresentam a produção muito tímida de certas enzimas proteolíticas. Todavia, isto não significa que *S epidermidis* não seja patogênico (JAWETZ et al.,1998). Esta espécie tem muitos fatores de adesão e forma facilmente biofilmes, sendo perigosa para pacientes que fazem uso de material invasivo de plástico (cateteres, próteses, *stents*, etc.). O *S. epidermidis* é um risco para pacientes imunocomprometidos e para usuários de drogas intravenosas, podendo causar endocardite e infecções generalizadas, peritonite, ventriculite e infecções em locais com prótese (SHENS et al., 2004).

O gênero *Bacillus* é constituído em sua maioria por microrganismos saprófitas, que prevalecem no solo, na água, no ar e na vegetação, podendo desenvolver-se em alimentos e produzir uma enterotoxina responsável por intoxicações alimentares. Algumas vezes estes microrganismos podem produzir patologias em seres humanos imunossuprimidos, como meningite, endocardite, conjuntivite e gastroenterite aguda (JAWETZ et al.,1998).

2.1.3.1.2 Bactérias Gram-negativas

Dentre as diversas espécies de bactérias Gram-negativas, a *E. coli* é um dos microrganismos mais prolíficos no trato intestinal humano, de natureza anaeróbia facultativa. Normalmente, é inofensiva, mas pode gerar algumas linhagens patogênicas que possuem fímbrias especializadas que permitem sua ligação a certas células do epitélio intestinal, podendo também produzir toxinas que causam distúrbios gastrointestinais, como a gastroenterite por *E. coli* (CATÃO et al., 2006). Esta bactéria é o agente infeccioso mais comum em infecção do trato urinário, sendo responsável por cerca de 90% das primeiras infecções das vias urinárias em mulheres (SHENS et al.,2004). Algumas linhagens patogênicas de *E. coli* podem provocar diarreia, sendo classificadas pelas suas propriedades

de virulência, provocando diarreia por mecanismos diferentes, dependendo do grupo a que pertence (SCHAECHTER et al., 2002).

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae, constituído por bastonetes Gram-negativos, anaeróbios facultativos, os quais são os principais agentes causadores das afecções gastrointestinais, apresentando altos níveis de metabolismo em comparação com outras bactérias. As salmoneloses de origem alimentar podem estar limitadas a um único indivíduo ou a um pequeno grupo de indivíduos relacionados, como podem também estar associadas a surtos de grandes proporções, envolvendo milhares de pessoas. É importante lembrar que os animais podem ser afetados por *Salmonella*, resultando em grandes prejuízos para os criadores. Os sintomas causados pela salmonelose tendem a aparecer cerca de 24 horas após a contaminação, podendo incluir febre, náuseas, vômito e diarreia. Os patógenos se fixam à parede do intestino delgado, mais precisamente nas células M (microcílios), onde se multiplicam e se manifestam. De um modo geral, os sorotipos de *Salmonella* causam, no adulto normal, apenas uma enterocolite que evolui sem complicações e desaparece dentro de uma semana ou menos. Entretanto, se o hospedeiro é uma criança, a infecção pode evoluir de maneira diferente, podendo ser grave (TORTORA et al., 2005).

O gênero *Pseudomonas* compreende grande número de espécies sendo que 90% dos isolamentos das amostras clínicas correspondem a *P. aeruginosa*, *P. maltophilia* e *P. cepacia*, sendo a primeira responsável por 70 % das infecções. Uma das características da espécie é a capacidade de produzir um pigmento azul-esverdeado, denominado piocianina e pioverdina. A *P. aeruginosa* habita solo, água e vegetais, podendo ser encontrada também na pele, fezes, garganta em 3 a 5 % dos indivíduos normais. Em pacientes hospitalizados a colonização pode ser bastante elevada. Este microrganismo causa infecções tipicamente oportunistas, em processos cirúrgicos, queimaduras, pós-cateterização urinária, pneumonias principalmente após procedimentos de entubação, podendo resultar em bacteremias severas. A *Pseudomonas* sp é naturalmente resistente aos antimicrobianos beta-lactâmicos, às tetraciclina, cloranfenicol, clotrimoxazol, dentre outros, incluindo ainda os aminoglicosídeos e algumas penicilinas semissintéticas (KONEMAN et al., 2001).

2.1.3.2 Atividade Antifúngica

Os fungos são organismos eucariotos, cujas células possuem um núcleo definido que contém o material genético (DNA), circundado por um envelope especial chamado de

membrana nuclear. Eles podem ser unicelulares como as leveduras ou multicelulares como os fungos filamentosos (TOTORA et al., 2005).

2.1.3.2.1 Leveduras

As leveduras são fungos unicelulares, não-filamentosos, esféricos ou ovais, amplamente encontradas na natureza. São capazes de crescimento anaeróbico facultativo, podendo utilizar oxigênio ou um componente orgânico como aceptor final de elétrons. Esse é um atributo valioso porque permite uma grande capacidade de adaptação, garantindo a sobrevivência destes fungos em vários ambientes (PASSOS et al., 2006).

A candidíase é uma infecção provocada por leveduras do gênero *Candida*, principalmente *C. albicans*. A maior parte dessas infecções é de origem endógena, ou seja, são causadas por microrganismos que fazem parte da microbiota normal do ser humano. A transmissão exógena ocorre principalmente em pacientes debilitados pelo tratamento com antibióticos, fármacos imunossupressores e no decurso de doenças crônicas (TRABULSI, 1999).

As candidíases podem ser superficiais ou profundas, com localização cutânea, mucosa, mucocutânea, visceral ou sistêmica. Na candidíase mucocutânea os tecidos da mucosa oral e vaginal são os mais atingidos. A candidíase cutânea envolve as áreas da pele das mãos, virilhas e axilas, enquanto que na candidíase sistêmica, o fungo pode invadir diversos órgãos causando candidíase pulmonar, endocardite, fungemia e nefrite. A literatura é bastante rica em dados sobre tais micoses, principalmente correlacionadas com a AIDS ou outras imunodeficiências (SATO, 2004).

O gênero *Candida* compreende fungos imperfeitos, subdivisão Deuteromycotina, classe Blastomycetes e família Cryptococcaceae. Neste gênero, há mais de 150 espécies, mas somente cerca de 10% são potenciais causadoras de infecções no homem e destas, somente 3 ou 4 espécies são responsáveis pela ocorrência de mais de 90% das micoses humanas (KURTZMAN, 1998). A maioria destas espécies pode ser isolada da microbiota normal da pele, trato gastrintestinal, trato geniturinário, respiratório e do ambiente tais como do ar e de superfícies inanimadas (EGGIMANN et al, 2003).

As diversas espécies de *Candida* apresentam variado grau de suscetibilidade aos agentes antifúngicos. Por exemplo, *C. lusitaniae* é menos sensível à anfotericina B e *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* são menos sensíveis ao fluconazol que outras espécies (KURTZMAN, 1998).

Atualmente, a anfotericina-B (10, Figura 12), um polienopoliidroxilado e o fluconazol (11, Figura 12), um composto azólico, são os dois fármacos mais comumente utilizados no tratamento de infecções por *Candida* (EGGIMANN, 2003). Ambos os antifúngicos estão associados a altos custos e a alta diversidade de efeitos colaterais e, em alguns casos, à resistência.

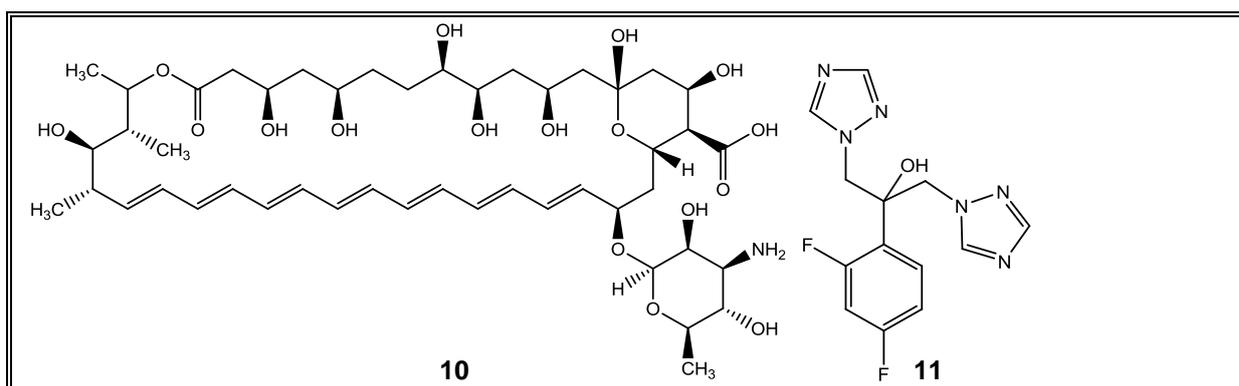


Figura 12 - Anfotericina (10) e fluconazol (11).
Fonte: EGGIMANN, 2003.

O uso indiscriminado e inadequado de antifúngicos tem levado ao isolamento de linhagens resistentes de *C. albicans*, resultando em ineficiência frente a diversos medicamentos antifúngicos. A maioria dos indivíduos saudáveis desenvolve defesas imunológicas que impedem a proliferação e progressão da candidíase. Entretanto, infecções por leveduras do gênero *Candida* representam um grave problema em hospitais e têm emergido como as principais micoses responsáveis pela morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos (YANG, 2005).

C. albicans é uma levedura que cresce, frequentemente, nas mucosas da boca, do trato intestinal e genital, causando a candidíase. As infecções usualmente são resultados do supercrescimento oportunista, quando a microbiota competidora é suprimida por antibióticos, por alteração de pH e outros fatores (PASSOS et al., 2006). Nos anos 80, a espécie *C. albicans* foi o 7º patógeno mais freqüente em infecções nosocomiais da corrente sanguínea e, a partir da década de 90, estas leveduras tornaram-se a 3ª principal causa de infecção hospitalar (BAKER, 2004). No Brasil, a epidemiologia da candidemia ainda não é muito estudada e a incidência nos hospitais varia de 1,49 - 3,18 % (BAKER, 2004).

As benzofenonas também são usadas como agentes antifúngicos, e suas propriedades contra diferentes espécies de *Candida* foi demonstrada por Orsi (UZEL et al., 2005).

2.1.3.3 Atividade anti-Leishmania

Uma das características mais marcantes do gênero *Leishmania* é a diversidade das manifestações clínicas. As formas cutâneas, que se caracterizam por lesões únicas ou múltiplas na pele, geralmente no rosto, braços e pernas; a forma cutânea difusa, com lesões nodulares persistentes, no corpo inteiro; a forma mucocutânea, que afeta de maneira preponderante as mucosas da face, como fossas nasais e o palato; e as formas viscerais, que se caracterizam pelo aumento no volume do fígado e baço, anemia, perda de peso e febre, e que, se não tratadas a tempo, podem ser fatais (HEPBURN, 2000).

No Brasil, a média de casos de leishmaniose visceral (LV) no período de 2005 a 2009, foi de 3.679 casos/ano, com uma taxa de letalidade de 5,8% em 2009. A LV é uma doença crônica e sistêmica e que, quando não tratada, pode evoluir para o óbito em mais de 90% dos casos (WHO, 2010; PELISARI et al., 2011). Na última década, foi observada a expansão das áreas consideradas endêmicas para as leishmanioses, assim como a eclosão de surtos epidemiológicos em regiões antes consideradas livres dessas doenças. Entre os fatores que contribuem para este crescimento, temos indivíduos que visitam áreas endêmicas ou indivíduos portadores que migram para outras regiões (SCHWARTZ et al., 2006), além de surtos epidêmicos associados à aceleração do desmatamento para as expansões agrícolas e urbanas, entre outras atividades (DESJEUX, 2001).

A leishmaniose visceral clássica acomete pessoas de todas as idades, mas na maior parte das áreas endêmicas 80% dos casos registrados ocorrem em crianças com menos de 10 anos. Em alguns focos urbanos estudados existe uma tendência de modificação na distribuição dos casos por faixa etária, com ocorrência de altas taxas também no grupo de adultos jovens (SILVA et al., 2001).

A principal forma de transmissão do parasita para o homem e outros hospedeiros mamíferos é através da picada de fêmeas de mosquitos da família Psychodidae, sub-família Phlebotominae, conhecidos por flebotomíneos. Sabe-se que os ciclos de transmissão da leishmaniose variam de acordo com a região geográfica, envolvendo uma diversidade de espécies de parasito, vetores, reservatórios e hospedeiros (BRASIL, 2007). Atualmente, a LV é endêmica em 62 países, com um total estimado de 200 milhões de pessoas sob risco de

adquirirem a infecção, sendo que aproximadamente 90% dos casos de todas as leishmanioses no mundo ocorrem em somente 5 países: Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil (WHO, 2011).

As leishmanias são parasitos dimórficos, com dois estágios evolutivos no seu ciclo de vida (amastigota e promastigota). Os parasitos do gênero *Leishmania* que apresentam-se sob a forma amastigota (Figura 13B) são estruturas arredondadas ou ovaladas sem flagelos visíveis, alojam-se nos macrófagos onde vivem e se multiplicam por divisão assexuada até romperem a célula, disseminando-se pela via hematogênica e linfática, iniciando uma reação inflamatória e proporcionando a atração de outros macrófagos, reiniciando o ciclo. A outra forma do gênero *Leishmania*, promastigota, apresenta-se sob a forma flagelada (Figura 13A), é encontrada no vetor flebotomíneo e reproduz-se extracelularmente no trato alimentar do inseto. Esta forma é cultivada *in vitro* em meios livres de células (axênicos) que mimetizam os nutrientes, o pH e a temperatura encontrados no trato digestivo do inseto (GONTIJO et al., 2003).

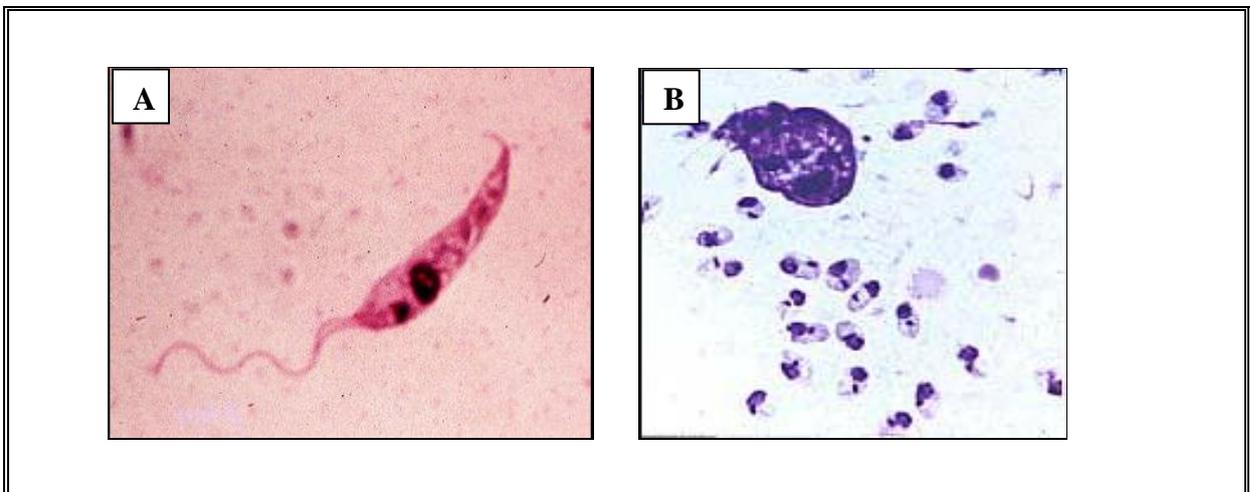


Figura 13. Micrografia das formas morfológicas mais comuns de *Leishmania* spp.

(A) Promastigota

(B) Amastigotas.

Fontes: (A) <http://www.med.unimarburg.de/stpg/ukm/lt/hygiene/schwarz/projects.html>.

(B) <http://www.vet.upenn.edu/schoolresources/communiCations/publIcations/bellwether/48/foxhounds.html>.

Durante o trajeto pelo trato digestivo (Figura 14), os macrófagos se rompem liberando amastigotas, que sofrem uma divisão binária e se transformam em promastigotas delgadas e longas que, também reproduzem por divisão binária, podendo seguir dois caminhos. No

primeiro, as promastigotas pertencentes ao subgênero *Viannia* dirigem-se para o intestino onde colonizam nas regiões do piloro e íleo (seção peripilária). Nesses locais, ocorre a transformação de promastigotas em paramastigotas, que ainda se dividem. Novamente, há transformação de paramastigotas em promastigotas, que migram através do estômago em direção e a faringe do inseto. No segundo, promastigotas pertencentes ao subgênero *Leishmania* multiplicam-se aderidas a parede do estômago (seção suprapilária), transformam-se em paramastigotas, colonizando no esôfago e na faringe. Neste ambiente, diferenciam-se em promastigotas metacíclicos, constituindo a forma infectante para o hospedeiro vertebrado (GONTIJO et al., 2003).

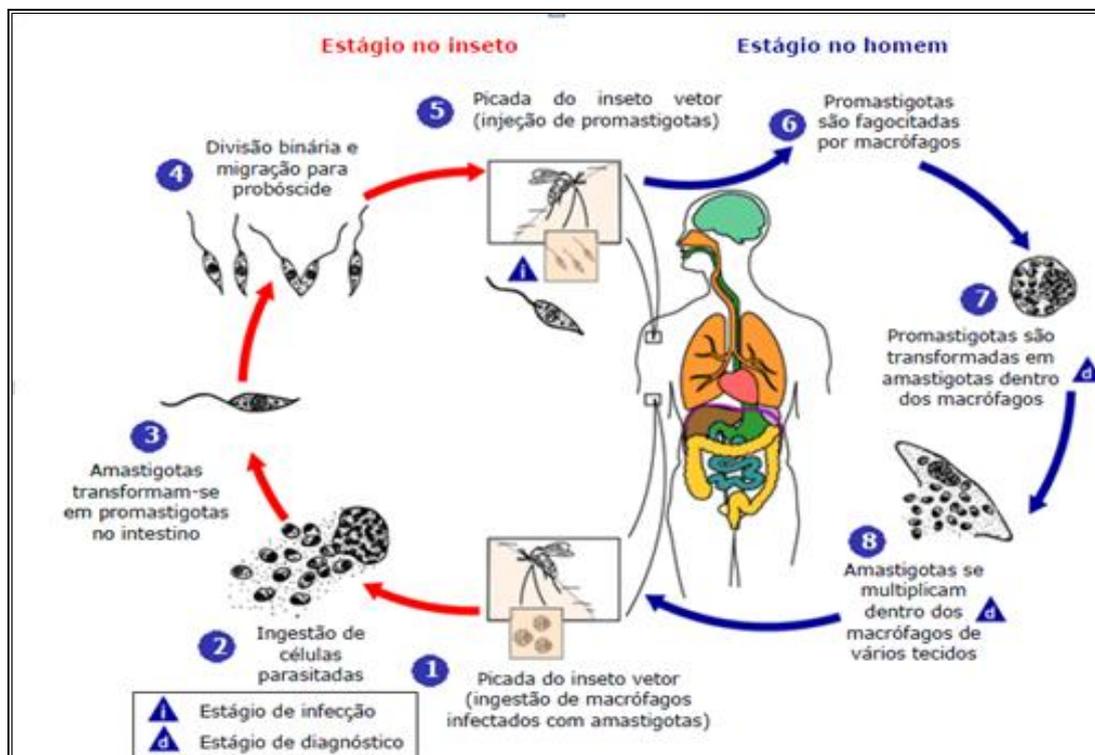


Figura 14 - Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

Fonte: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

Quando os insetos realizam novo repasto sanguíneo, as formas promastigotas são introduzidas no local da picada no vertebrado e de quatro a oito horas após a picada do inseto, o protozoário é encontrado no interior de macrófagos teciduais. A saliva do mosquito contém substâncias (neuropeptídeos vasodilatadores) com a função de promover imunossupressão do hospedeiro. No interior do macrófago, as promastigotas envoltas pelo vacúolo fagocitário transformam-se em amastigotas que, resistentes a ação dos lisossomas, multiplicam-se até

ocupar o citoplasma da célula. Ocorre em seguida, a ruptura da membrana do macrófago repleto de amastigotas, que por sua vez são novamente fagocitadas, gerando nova reação inflamatória (GENARO et al., 2005).

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

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

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

A co-infecção *Leishmania*/HIV é considerada uma ameaça emergente em diversos países. O aumento no número de casos na última década é marcante, levando a mudanças na epidemiologia, apresentação e clínica das leishmanioses. O comprometimento do sistema imune do doente pode acarretar em manifestações clínicas em pacientes antes assintomáticos, assim como a evolução de casos complexos e de difícil tratamento, como a forma cutânea disseminada ou a visceral (CRUZ et al., 2006).

2.1.3.3.1 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) – forma cutânea

A LTA é uma doença não contagiosa, de evolução crônica, que acomete as estruturas da pele e cartilaginosa da nasofaringe, de forma localizada ou difusa, causada por espécies

do gênero *Leishmania* (MANUAL DE VIGILÂNCIA, 2006). Constitui um problema de saúde pública em 88 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com registro anual de 1,0 a 1,5 milhões de casos. É considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pelo seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades.

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

Um amplo espectro de manifestações clínicas envolvendo pele e mucosas pode ser visto na LTA, variando desde uma lesão auto-resolutiva a lesões múltiplas ou desfigurantes (Figura 15). De modo geral, a maioria das infecções leishmanióticas permanece localizada na pele ou linfonodos adjacentes. Entretanto, algumas espécies podem escapar para mucosas, múltiplos locais na pele ou para fígado, baços e linfonodos distantes. Os pontos de disseminação da doença variam principalmente, mas não exclusivamente, devido a diferentes propriedades do parasito: sensibilidade a temperatura, tropismo tecidual, capacidade de imunoevasão e persistência das infecções (MURAY et al., 2005).

Na leishmaniose cutânea, a infecção pode evoluir após o período de incubação de 1-12 semanas, em uma pápula que aumenta de tamanho e finalmente úlcera. A lesão típica é indolor e apresenta bordas salientes com fundo necrótico granuloso e úmido (Figura 16A).

2.1.3.3.2 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) – forma cutânea difusa

Outra manifestação da LTA, a leishmaniose cutânea difusa (Figura 16B), caracteriza-se por nódulos não ulcerados, repletos de parasitos que se disseminam do local original de infecção e pode cobrir todo o corpo do paciente (REITHINGER et al., 2007).

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

2.1.3.3.3 *Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) – forma mucosa*

A leishmaniose mucosa (Figura 16C), manifestação mais severa da LTA, nunca cura espontaneamente e é de difícil tratamento. Pode ocasionar destruição de cartilagens e tecidos moles, com possível desfiguração da face e perda do septo, palato e pavilhão auditivo. Nos casos mais graves, o paciente pode morrer por complicações respiratórias, dificuldades de alimentação ou infecções secundárias. A disseminação, de espécies como *L. braziliensis*, para as mucosas ocorre em 1-10% das infecções, após 1-5 anos da cura das lesões cutâneas. Embora cerca de 90% dos pacientes com a forma mucosa apresentem uma cicatriz de lesão cutânea anterior, há alguns casos que coincidem com lesões ativas (MURAY et al., 2005).

2.1.3.3.4 *Leishmaniose visceral (LV) – forma visceral*

A leishmaniose visceral (Figura 16D), também conhecida como calazar, é a forma mais grave das leishmanioses. As amastigotas residem em células do sistema retículo endotelial de vísceras, incluindo baço, fígado, linfonodos e intestino. A doença pode permanecer assintomática ou após um período de incubação de 2-4 meses apresentar sintomas como febre baixa de desenvolvimento lento, prostração geral, anemia e protusão do abdomen devido aumento do fígado e baço (hepatoesplenomegalia) (MURAY et al., 2005).

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

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

focos da doença humana, sendo considerados os principais elos na cadeia de transmissão da LV (MOLANO et al., 2003).

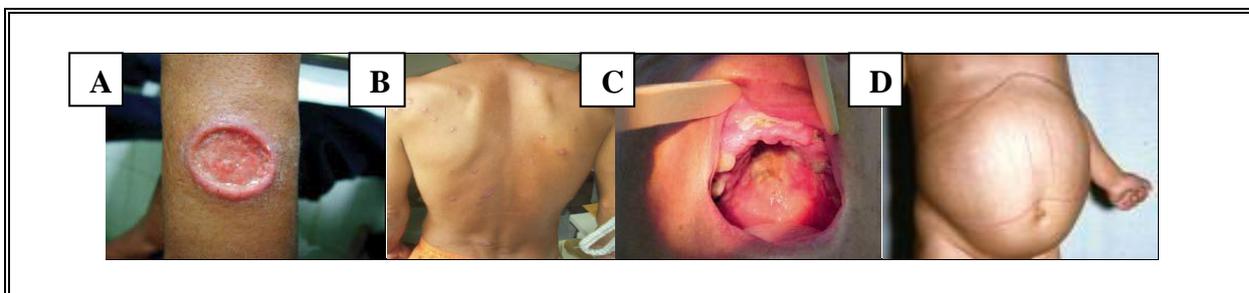


Figura 15 – Diversidade de manifestações clínicas na LTA.

A) Forma cutânea

B) Forma difusa

C) Forma mucosa

D) Forma visceral

Fonte: Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana-2007.

2.1.3.3.5 Tratamento

Para a leishmaniose cutânea é utilizado como tratamento a miltefosina, mas a sua eficácia é questionada. Estes fatos justificam a necessidade urgente de novos medicamentos mais seguros, baratos e efetivos para o tratamento dos diferentes tipos de *Leishmania*. Estudos realizados com a 4'-hidroxi-5,6,7,3',5'-pentametoxiflavona (Ageconyflavona) (Figura 16) isolada de partes aéreas de *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) (AMAL et al., 2010), mostraram que este flavonóide apresentou atividade significativa ($IC_{50} = 3,56 \mu\text{g/mL}$) *in vitro* contra promastigotas e amastigotas de *Leishmania* e sem citotoxicidade mensurável. Estes resultados são coerentes com estudos anteriores que identificaram flavonóides metoxilados ativos em níveis de concentração semelhantes.

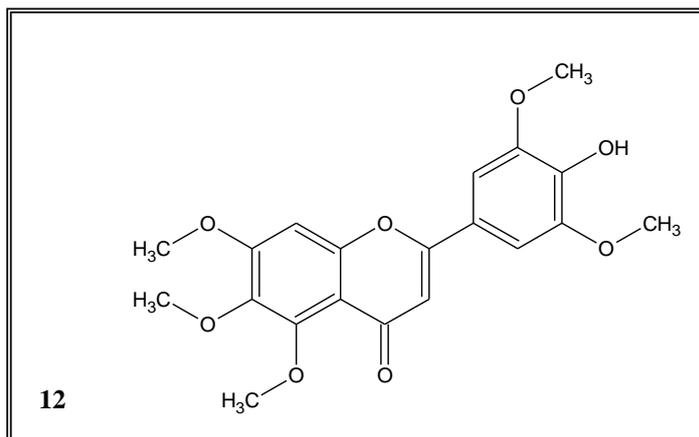


Figura 16 - 4'-hidroxi-5,6,7,3',5'-pentametoxiflavona.
Fonte: AMAL et al., 2010.

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

Segundo a OMS, o grande problema com este tratamento é o acesso aos medicamentos, pois além do alto custo, devem ser administrados em hospital, por via intravenosa ou intramuscular, durante quatro semanas (WHO, 2010). Além disso, drogas antimoniais parenterais estão relacionadas a uma série de efeitos colaterais severos, incluindo náusea, vômito, diarreia, erupções na pele, tontura, arritmia cardíaca, hipotensão, artralgia, mialgia, desconforto abdominal, dor de cabeça, elevação reversível das enzimas hepáticas, ocasional anemia e trombocitopenia frequentemente dose dependente (GONZÁLEZ et al., 2008).

Em casos de resistência do parasito, a anfotericina B é a segunda opção de tratamento recomendada pelo Ministério da Saúde, sendo, entretanto, mais tóxica que o Pentostam e o Glucantime (WHO, 2010). A anfotericina B trata-se de um antibiótico sistêmico efetivo, que

possui atividade antifúngica e leishmanicida. As *leishmanias* e os fungos possuem ergosterol como principal esteróide nas membranas plasmáticas, e é este o alvo molecular do medicamento, que causa alteração na permeabilidade de membrana e do equilíbrio osmótico do parasito (CRUZ et al., 2009; SILVA-LÓPEZ, 2010).

Na tentativa de controlar a propagação das leishmanioses, diferentes tipos de intervenções têm sido investigados. Vários tipos de vacinas foram propostas, tanto para tratamento, quanto para profilaxia da doença. Uma vacina anti-*Leishmania* ideal deve induzir respostas de linfócitos T CD⁴⁺ e T CD⁸⁺, a fim de produzir memória imunológica, e a maior concentração destes estudos estão nas vacinas de subunidades entregues como proteínas recombinates, DNA, poliproteína ou células dendríticas contendo antígenos de leishmania além de vacinas de parasitas mortos ou atenuados (KEDZIERSKI et al., 2009). Além de vacinas, alvos moleculares vêm sendo estudados para posterior identificação de substâncias capazes de modular suas atividades (DARDARI et al., 2004). Um bom alvo de drogas deve ser expresso em um estágio relevante do ciclo de vida do parasito e preencher um ou mais dos seguintes critérios: ser exclusivo do parasita, ser essencial para sua sobrevivência, ou ser essencial para sua virulência. É proposto ainda que um tratamento de sucesso para todos os tipos de leishmaniose depende da eliminação efetiva dos parasitas por ativação de macrófagos (KEDZIERSKI et al., 2009).

Pereira e colaboradores (2010) relataram que existem benzofenonas naturais derivadas com caráter lipofílico, sendo que a 7-*epi*-clusianona (Figura 17) é mais ativa quando comparada à guttiferona A (Figura 18) que possui 4 grupos prenila, que também lhe confere lipofilicidade necessária para ser ativa contra *L. amazonensis*.

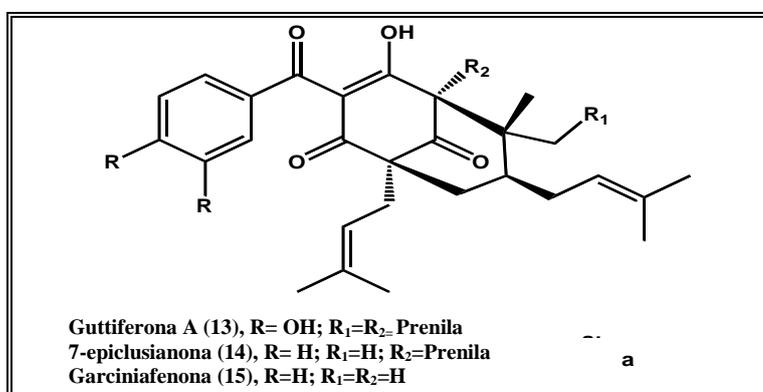


Figura 17 - Estruturas de algumas benzofenonas preniladas.
 Fonte: PEREIRA et al., 2010.

Existem poucos relatos de benzofenonas sintéticas com potencial anti-Leishmania. Román Luque-Ortega e colaboradores (2010) sintetizaram sais derivados de benzofenonas (Figura 18) onde as estruturas 16, 17 e 18 são naturais e a estrutura 19 é sintética. Variando-se os grupos substituintes R, foi observado que os grupos mais lipofílicos apresentaram maior atividade.

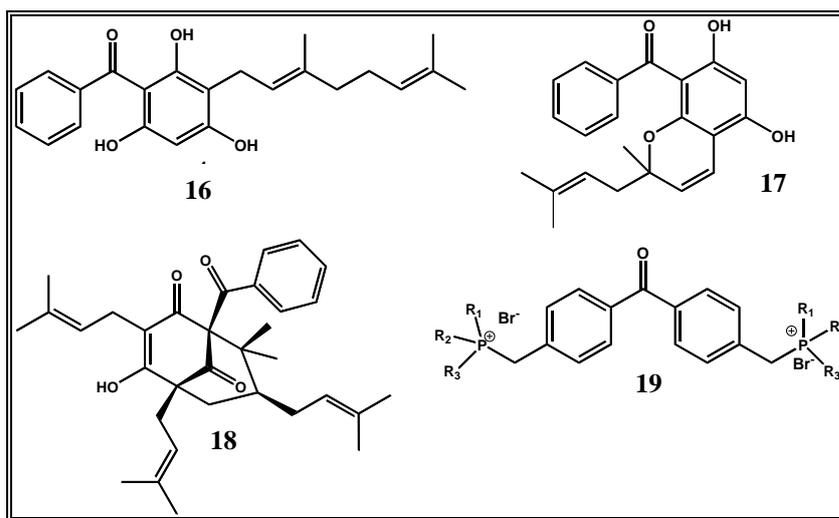


Figura 18 - Benzofenonas naturais (16, 17 e 18), benzofenona sintética (19)
 Fonte: ROMÁN LUQUE-ORTEGA et al., 2010.

2.2 MECANISMOS DE AÇÃO

As propriedades físico-químicas das substâncias bioativas estão relacionadas à presença de grupos funcionais com características diversas, tais como acidez, basicidade, volume, lipofilicidade entre outros. Sob o ponto de vista biológico, os grupos funcionais presentes numa molécula podem ser responsáveis por interações de entre a micromolécula e as biomacromoléculas (e.g. receptores, enzimas), permitindo seu reconhecimento e desencadeando uma resposta biológica associada a a sítios receptores específicos nos alvos de interesse. Desta forma, os conhecimentos do mecanismo de ação aliados às propriedades estruturais dos protótipos podem auxiliar na proposição de modificações químicas, visando o aumento da atividade (CALIXTO et al., 2001).

2.2.1 Antioxidantes

Os antioxidantes produzidos pelo corpo agem enzimaticamente, a exemplo da GPx, CAT e SOD ou, não enzimaticamente a exemplo de GSH, peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina), ácido diidrolipóico e CoQH. Além dos antioxidantes produzidos pelo corpo, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (pró-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), e compostos fenólicos, com destaque aos flavonóides e dímeros de flavonóides. Outro interesse voltado aos antioxidantes é a sua aplicação na indústria, para a proteção de cosméticos, fármacos e alimentos, prevenindo a decomposição oxidativa pela ação da luz, temperatura e umidade (BARREIROS et al., 2006).

Para evitar os danos causados pelos radicais livres, o organismo desenvolveu vários mecanismos de defesa, neutralizando ou capturando espécies radiculares naturalmente produzidos (endógenos) ou provenientes do ambiente externo (exógenos), evitando danos celulares e tissulares. Estes processos antioxidantes estão em permanente atividade no organismo, visto que a produção de energia no organismo é uma das principais causas da formação de radicais, necessitando estarem presentes em quantidades suficientes para neutralizar os efeitos dos radicais livres endógenos. Quando esta equivalência não existe, dizemos que esta ocorrendo um estresse oxidativo (VANNUCCHI et al., 1999).

2.2.2 Xantina oxidase

Castro e colaboradores (2004) relataram a inibição da XO pelas benzofenonas 2,4-diidroxibenzofenona (20) e 2,3,4-triidroxibenzofenona (21) (Figura 19), com IC_{50} de 184 e 112 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente. Estes autores propuseram também que o grupo hidroxila na posição C-5 e C-7 nas flavonas corresponderia aos grupos hidroxila em *orto* e *para* nas benzofenonas. Além disso, foi observado que a estrutura planar no caso das benzofenonas é importante e que derivados de flavonas, flavonóides e benzofenonas são potenciais inibidores de XO (COTELLE et al., 1996; CONSTANTINO et al., 1996; COS et al., 1998; NAGAO et al., 1999; CASTRO et al., 2004).

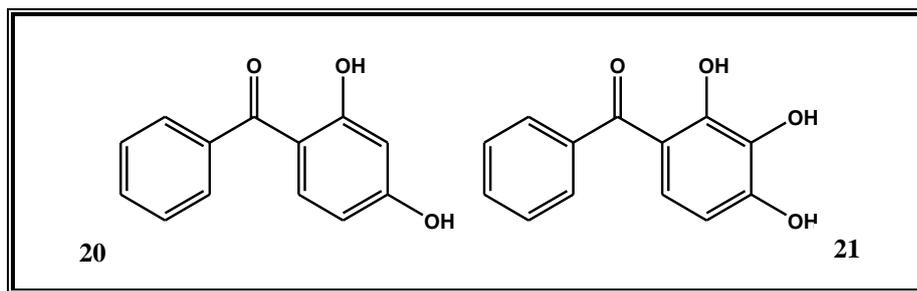


Figura 19 - 2,4- diidroxibenzofenona (20) e 2,3,4-triidroxibenzofenona (21) .
Fonte: CASTRO et al., 2004.

Derivados mais lipofílicos de benzofenonas estudados por Castro e colaboradores (2004) demonstraram alta atividade na inibição da XO.

2.2.3 Agentes antibacterianos

Os antibacterianos podem ser classificados seguindo diversos critérios como estrutura química, mecanismo de ação, espectro de ação entre outros (SCHAECHTER et al., 2002). Segundo o mecanismo de ação os grupos de agentes antibacterianos, podem ser classificados em:

i. Inibidores da síntese de parede celular bacteriana

O sítio de ataque dos agentes que agem contra a parede celular é a camada de proteção de peptidoglicano que reveste a membrana celular bacteriana. Os antibióticos que agem sobre a síntese da parede celular atuam produzindo uma parede com defeitos estruturais e por agirem sobre o processo de replicação celular causando dano ou perdas nesta camada, alterando sua rigidez da parede celular e resultam na morte celular. Esta ação é seletiva, visto que as células dos hospedeiros mamíferos não apresentam parede celular (RANG, 1997).

ii. Inibidores da membrana citoplasmática

A membrana citoplasmática esta localizada abaixo da parede celular e circunda o citoplasma. Apresenta dupla camada lipídica (33 % de lipídeos) com elevado conteúdo de proteínas (66 %), estando os lipídeos com seus grupos polares orientados para fora e as cadeias apolares voltadas para o interior da membrana e possuem permeabilidade seletiva que controla a passagem de substâncias e nutrientes para dentro da célula e a saída de catabólitos (SCHAECHTER et al., 2002). Os antibióticos que atuam por alterações físico-químicas da

membrana citoplasmática assemelham-se aos detergentes catiônicos, graças à presença em suas moléculas de grupamentos básicos protonados (NH_3^+) e de uma cadeia lateral de ácido graxo. Quando alcançam a membrana citoplasmática, o ácido graxo mergulha na sua parte lipídica e a porção básica permanece na superfície. A intercalação das moléculas do antibiótico na membrana provoca sua desorganização alterando sua permeabilidade seletiva com a saída de elementos vitais à célula como fosfatos, íons, purinas e ácidos nucleicos ou a entrada de substâncias nocivas ao metabolismo bacteriano, resultando em morte celular (TRABULSI, et al., 1999).

iii. Inibidores da síntese de ácidos nucleicos

Agentes antimicrobianos podem interferir em diferentes níveis na síntese de ácidos nucleicos. A inibição pode ser da síntese de nucleosídeos. Para iniciar a síntese de DNA é necessária a ativação prévia de uma enzima para desenrolar a dupla fita de DNA e introduzir uma superespiral negativa. Esta enzima é a DNA-girase ou topoisomerase II, e a polimerase pode interferir na replicação e transcrição do DNA (SCHAECHTER et al., 2002).

iv. Inibidores da função dos ribossomos

Alguns agentes se ligam à subunidade ribossomal 30S e inibem a ligação do aminoacil-tRNA nos sítios dos ribossomos bacterianos, outros inibem a subunidade 50S ribossomal, diminuindo a formação do peptídeo por ligação à enzima peptidiltransferase nessa subunidade.

v. Inibidores do metabolismo dos folatos:

Agentes que interferem com o metabolismo de folato na célula bacteriana por competitividade bloqueando a biossíntese da tetraidrofolato, o qual é necessário para o término da síntese do DNA, RNA e proteínas da parede celular.

Alguns exemplos dos antibióticos mais comuns na terapêutica atual estão apresentados no Quadro 1, classificados pelo mecanismo de ação.

Classe dos antimicrobianos	Mecanismo de ação	Exemplos
Penicilinas (β -lactâmicos)	Agem na parede celular bacteriana	Ampicilina, amoxicilina/clavulonato, penicilina, oxacilina, piperacilina/tazobactan
Monolactams (β -lactâmicos)		Aztreonam
Cefens (β -lactâmicos)		Cefalexina, cefalotina, cefepime, cefotaxima, cefoxitina, ceftazidima, ceftriaxona
Carbapenes (β -lactâmicos)		Imipenem, meropenem
Glicopeptídeos		Vancomicina
Aminoglicosídeos	Afetam a síntese de proteína bacteriana	Amicacina, canamicina, estreptomicina, gentamicina, neomicina, tobramicina
Lincosaminas		Clindamicina
Fenicolis		Cloranfenicol
Macrolídeos		Claritromicina, eritromicina, azitromicina
Tetraciclínas	Tetraciclínas	
Quinolonas	Afetam a síntese de ácidos nucleicos	Ácido nalidixico, ciprofloxacina, levofloxacina, norfloxacina, ofloxacina, perfloxacina
Ansamícinas		Rifampicina
Sulfonamidas	Inibem a via metabólica dos folatos	Sulfanilamida, sulfadiazina, sulfisoxazol, sulfametazol/trimetropim, sulfacetamida

2.2.4 Agentes antifúngicos

Os antifúngicos existentes no mercado atualmente possuem limitações terapêuticas, principalmente quando se levam em consideração efeitos colaterais como a nefro e a hepatotoxicidade (ZACCHINO et al., 2003).

Muitos dos fármacos atualmente disponíveis apresentam efeitos colaterais indesejáveis, eficácia duvidosa contra fungos re-emergentes ou desenvolvem uma rápida resistência sendo necessária, urgentemente, uma nova geração de agentes antifúngicos. As pesquisas estão orientadas na investigação de fármacos antifúngicos, que possam atuar seletivamente na célula fúngica sem inibir nenhum sistema bioquímico do hospedeiro. Os fungos possuem paredes celulares (Figura 21), sendo uma estrutura essencial para eles, diferentemente das células dos mamíferos, e este fato faz com que todos os sistemas enzimáticos que fazem parte da síntese e montagem da parede celular fúngica se transformem em alvo útil para o descobrimento e desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos com maior especificidade. As células fúngicas e humanas apresentam muitas semelhanças, compartilham a maioria das vias de metabolismo intermediário, utilizando enzimas muito similares não sendo fácil encontrar alvos que ofereçam a seletividade requerida para obter-se um antifúngico seguro. Os alvos que apresentam maior possibilidade de levar a antifúngicos seletivos são os inibidores da biossíntese do ergosterol, a inibição das topoisomerasas fúngicas e a inibição da parede celular fúngica (LACAZ, 2002).

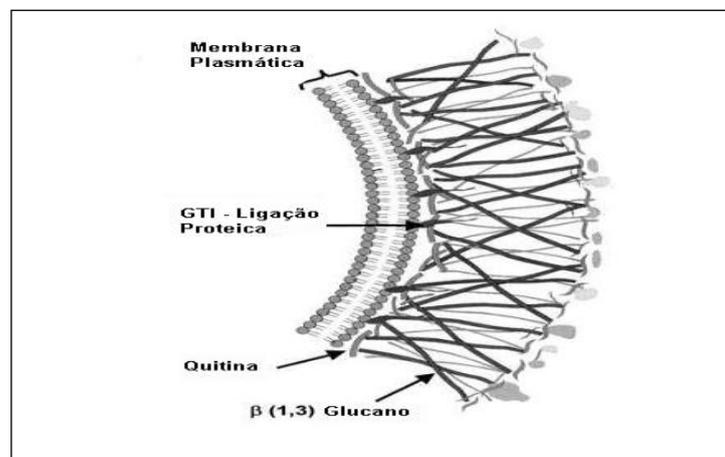


Figura 20 - Representação da estrutura da parede celular fúngica.
Fonte: Lacaz, 2002.

Os agentes antifúngicos podem ser classificados em duas categorias:

i. Os que afetam a membrana celular e os que atuam intracelularmente

Interrompendo processos celulares vitais, como síntese de DNA, RNA ou proteínas (SCHAECHTER et al., 2002) (Quadro 2). Como exemplos de drogas que afetam a membrana celular tem-se os derivados poliênicos, representados pela anfotericina-B (1). Estas substâncias combinam-se com esteróis da membrana, rompendo a mesma ou tornando-a incapaz de efetuar suas funções de permeabilidade e transporte. A droga forma poros na membrana e o centro hidrófilo da molécula cria um canal iônico transmembrânico. Podem ocorrer alterações na permeabilidade celular e causar a perda de constituintes essenciais das células como K^+ , açúcares, proteínas, fosfatos inorgânicos, ácidos carboxílicos e ésteres de fosfato (TRABULSI et al., 1999).

ii. Inibição da esterol 14- α -demetilase

Baseia-se em um sistema enzimático microsomal dependente do citocromo P450, que prejudica a síntese do ergosterol na membrana citoplasmática e leva ao acúmulo de 14- α -metilesteróis. Estes metilesteróis não possuem a mesma forma e propriedades físicas que o ergosterol e levam à formação da membrana com propriedades alteradas, que não desempenha as funções necessárias ao desenvolvimento do fungo.

As alilaminas, representadas pela terbinafina, agem inibindo a esqualeno epoxidase envolvida na síntese do lanosterol, que é o precursor do ergosterol. O mecanismo de ação da griseofulvina ocorre através da sua penetração na célula fúngica, por um processo energia-dependente. Por conseguinte, interage com os microtúbulos desfazendo o fuso mitótico, provocando uma inibição no processo de mitose fúngica e conseqüentemente na multiplicação do microrganismo (TRABULSI et al., 1999).

Quadro 02 - Classificação dos principais fármacos antifúngicos de acordo com o seu mecanismo de ação

Antifúngico		Alvo	
Nicomicina		Parede celular	
Caspofungina			
Anfotericina B		Função de membrana celular- ligações aos esteróis	
Nistatina			
Natamicina			
Terbinafina		Síntese do lanosterol	
Tolnaftato			
Azóis	Imidazóis	Miconazol	Função de membrana celular- ligações aos esteróis
		Cetoconazol	
	Triazóis	Fluconazol	
		Itraconazol	

2.2.5 Leishmaniose

i. Ação na bioenergética

Interferem na bioenergética das formas amastigotas de *Leishmania*. Tanto a glicólise, quanto a oxidação dos ácidos graxos, processos localizados em organelas peculiares, são inibidos, sendo que esta inibição é acompanhada de redução na produção de ATP e GTP (VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2010).

ii. Destruição das camadas intra e extracelular

Apresenta ação na forma Amastigota e promastigotas do parasito destruindo a célula de maneira intra e extracelular (VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2010).

3 JUSTIFICATIVA

A busca de substâncias terapêuticas mais eficazes, com baixa toxicidade e maior especificidade, tem intensificado os estudos para a descoberta de novos fármacos. Neste contexto, o laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal – LFQM da Unifal-MG vem, ao longo de sua existência na instituição, obtendo uma grande quantidade de substâncias, advindas de produtos naturais, rotas de síntese e semi-síntese com propriedades biológicas de interesse, algumas já com pedido de patente solicitado.

Estudos realizados em nosso grupo de pesquisa mostraram que as benzofenonas naturais guttiferona-A (13, Figura 17), 7-*epi*-clusianona (14, Figura 17) e garciniafenona (15, Figura 18) isoladas dos frutos de *Garcinia brasiliensis* possuem atividade leishmanicida nas formas amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis* (SANTOS et al., 1999). Neste trabalho, foi possível correlacionar a atividade leishmanicida com o caráter lipofílico destas moléculas oriundo da presença de grupos prenila, além da ausência de toxicidade quando avaliadas em macrófagos. Estas moléculas também exibiram atividade antibacteriana e antioxidante (NALDONI et al., 2009; DEROGIS, 2008). Com base nestes resultados, decidiu-se explorar o esqueleto benzofenônico presente naqueles produtos naturais, para o planejamento de novos análogos sintéticos, estruturalmente simplificados, na expectativa que pudessem exibir atividades semelhantes às observadas, mantendo a baixa toxicidade e com fácil acesso sintético.

No presente trabalho é relatada a síntese de derivados de 2,4-diidroxibenzofenona, 4-hidroxibenzofenona e 4,4'-diidroxibenzofenona (Figura 21) e sua avaliação da atividade antioxidante pelo mecanismo de captação de radicais livres DPPH, inibitória de xantina oxidase e antimicrobiana. As benzofenonas poli-hidroxiladas estão relacionadas às atividades supracitadas uma vez que os processos de captação de radicais livres estão associados com as hidroxilas fenólicas que neutralizam ou estabilizam espécies radicalares de nitrogênio (ERNs) ou oxigênio (EROs).

Ao mesmo tempo sabe-se que compostos lipofílicos podem possuir maior atividade do que seus precursores, visto que possibilitam uma melhor difusão através da membrana celular. Neste sentido, espera-se que as reações de alquilação (Figura 21) nas benzofenonas hidroxiladas resultam de uma melhoria da atividade biológica apesar de algumas vezes diminuir a atividade antioxidante.

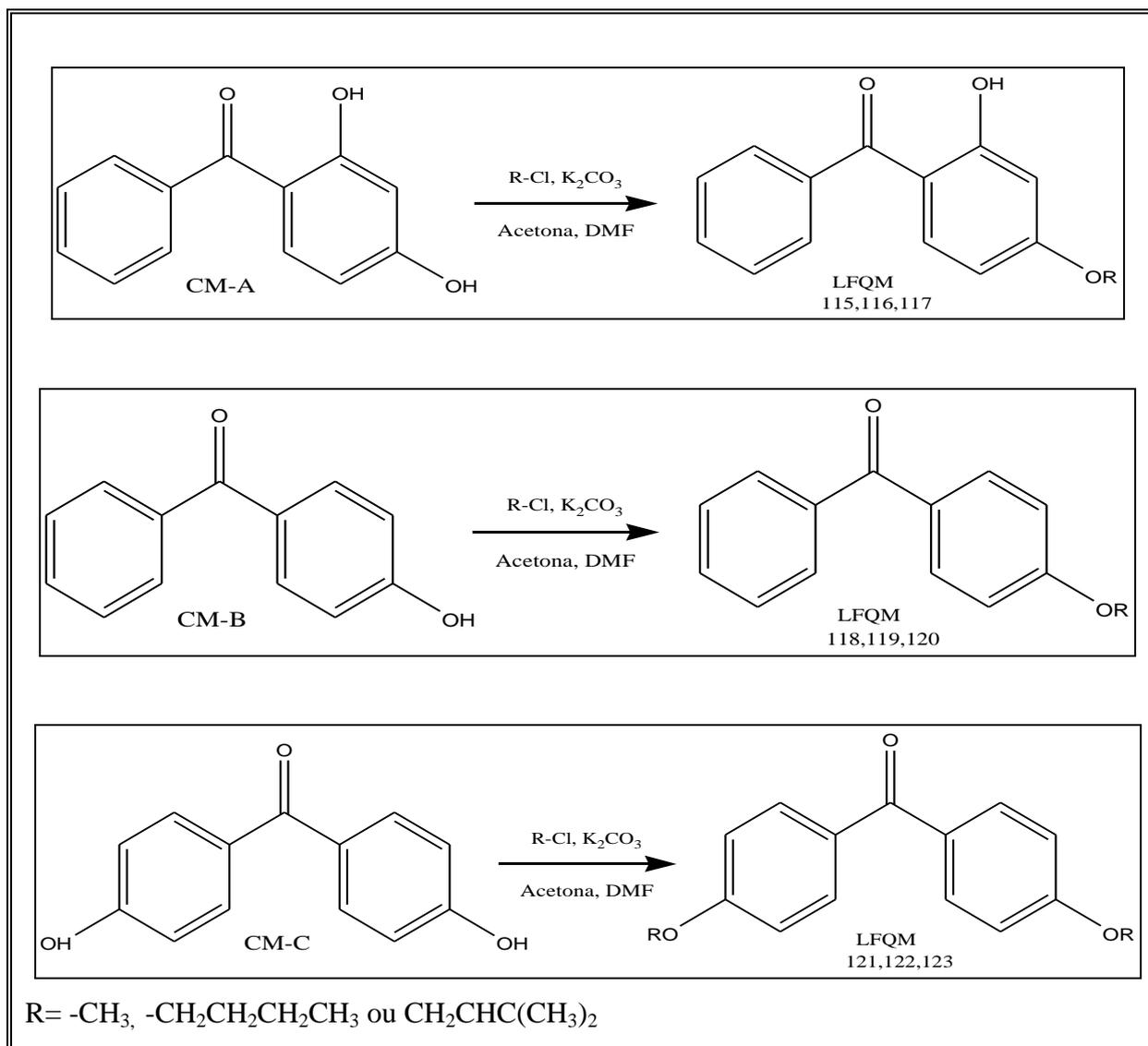


Figura 21 - Proposta de síntese.

As benzofenonas apresentam grupos hidroxilas, duplas ligações, grupo carbonila que são susceptíveis de serem quimicamente modificados. Tais modificações permitem obter rapidamente uma idéia da relação estrutura-atividade, especialmente com respeito aos efeitos sobre a lipofilicidade, hidrofobicidade, densidade eletrônica, ligações de hidrogênio (CALIXTO et al., 2001).

Sabe-se que a modificação de um átomo de hidrogênio por um determinado substituinte, pode modificar profundamente a potência, duração, natureza do efeito farmacológico da molécula e suas propriedades físico-químicas.

Inicialmente, realizam-se modificações procurando introduzir grupos que conferem ao composto em estudo uma maior, ou menor hidrofobicidade ou grupos doadores e/ou aceptores de elétrons, permitindo posteriormente a aplicação de algum método de correlação entre a

estrutura química e a atividade biológica, que pode ser qualitativa ou quantitativa. A aplicação destes métodos auxilia na predição de qual novo grupo ou átomo pode ser introduzido em determinada molécula para torná-la mais ativa, proporcionando assim muitas vantagens na otimização do perfil de atividade de uma substância candidato a protótipo de fármaco (CECHINEL et al., 1998).

Através de modificações, podemos obter dados importantes sobre a importância do grupo modificado na atividade da molécula e na identificação de grupos farmacofóricos. Por exemplo, a xantoxilina (Figura 22-22), um produto natural antiespasmódico isolado da *Sebastiania schottiana* (sarandi negro) teve seu efeito farmacológico notavelmente aumentado quando grupos benzilas contendo substituintes hidrofóbicos e doadores de elétrons foram introduzidos (Figura 22-23) (CECHINEL et al., 1998).

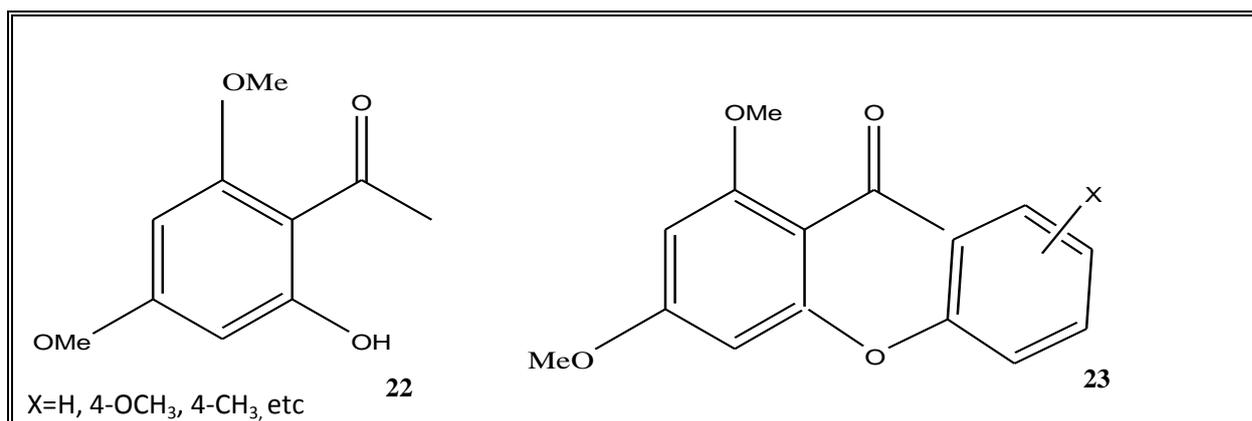


Figura 22 - Estrutura química da xantoxilina e derivados.
Fonte: CECHINEL et al., 1998.

A astilbina (Figura 23-24), um flavonóide glicosilado isolado de *Hymenaea martiana* (jatobá) com alto rendimento, após hidrólise ácida foi transformada na taxifolina (Figura 23-25), molécula muito mais efetiva como analgésica do que a própria astilbina. A metilação da taxifolina forneceu a taxifolina tetrametilada (Figura 23-26), que apresentou efeito analgésico muito mais potente do que várias drogas tradicionalmente usadas na clínica (VAZ et al., 1998).

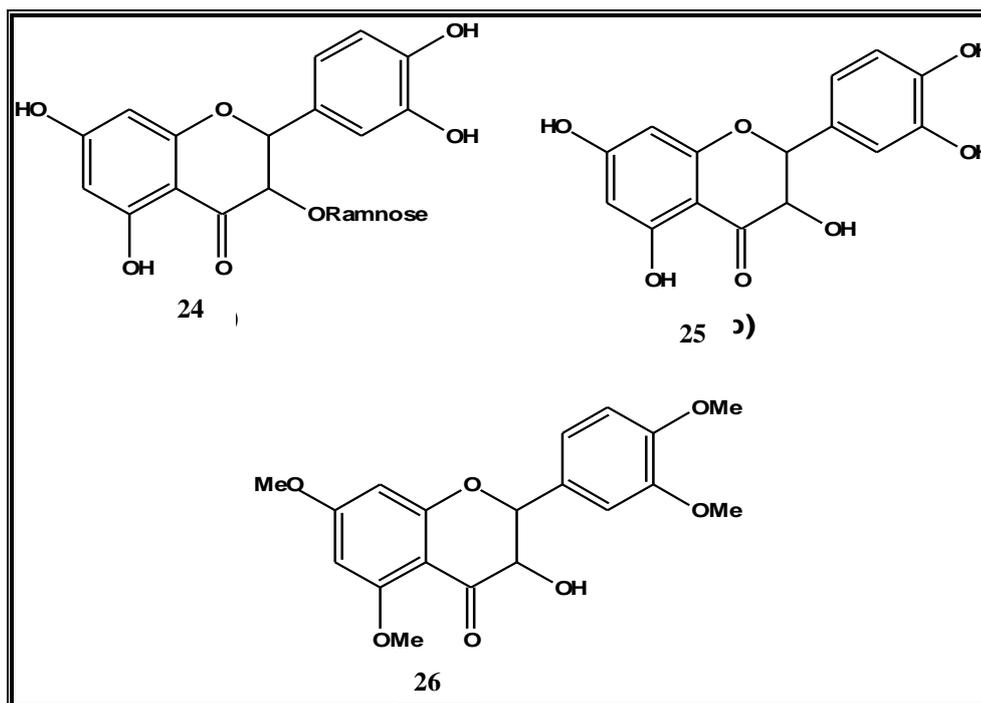


Figura 23 - Estrutura química do flavonóide astilbina e seus derivados.
Fonte: CECHINEL et al., 1998.

Outro aspecto importante que vale ressaltar é que a partir de compostos inativos em determinado modelo farmacológico, com pequenas modificações estruturais, empregando o critério da similaridade com compostos de reconhecida ação biológica, pode-se sintetizar compostos de relevantes efeitos biológicos. Como exemplo deste caso, podemos citar a síntese do derivado benzofurânico da xantoxilina (Figura 24), baseada na reconhecida atividade farmacológica de compostos do tipo benzofurano. Este composto apresentou efeito analgésico extremamente potente quando testado em diferentes modelos de dor em camundongos, sendo cerca de 130 vezes mais ativo do que a aspirina e o acetaminofeno no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, e parece atuar por um novo mecanismo de ação analgésica, diferente dos conhecidos mecanismos da aspirina e da morfina (VAZ et al., 1998).

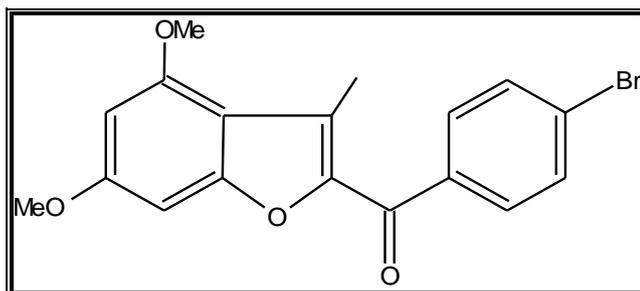


Figura 24 - Derivado benzofurânico da xantoxilina.

Fonte: CECHINEL et al., 1998.

Uma vez obtido um composto biologicamente ativo, pode-se lançar mão de estudos envolvendo modificação molecular, também chamada de variação molecular ou manipulação molecular, que se constitui, certamente, no método mais usado e recompensador para otimizar essa atividade dependendo de seus grupos reativos (CECHINEL et al., 1998).

4 OBJETIVOS

4.1. OBJETIVOS GERAIS

- ❖ Sintetizar derivados *O*-substituídos a partir de 2,4-diidroxibenzofenona, 4-hidroxibenzofenona, 4,4'-diidroxibenzofenona por reação de alquilação;
- ❖ Avaliar as atividades antioxidante, inibição de xantina oxidase e antimicrobiana, buscando estabelecer um relação estrutura-atividade.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Preparação de intermediários *O*-alquílicos a partir das benzofenonas 2,4-diidroxibenzofenona, 4-hidroxibenzofenona e 4,4'-diidroxibenzofenona;
- ❖ Caracterizar os compostos sintetizados por meio de técnicas espectrométricas e espectroscópicas usuais (UV, IV, EM e RMN);
- ❖ Determinar a atividade antioxidante dos compostos utilizando o ensaio captação de radicais livres DPPH[•];
- ❖ Determinar a atividade dos compostos obtidos na inibição de xantina oxidase;
- ❖ Determinar atividade antibacteriana dos compostos obtidos;
- ❖ Determinar atividade antifúngica dos compostos obtidos;
- ❖ Determinar atividade anti-Leishmania dos compostos obtidos;
- ❖ Determinar citotoxicidade em macrófagos;
- ❖ Relacionar estrutura química-atividade biológica dos compostos analisados;

5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 MÉTODOS GERAIS

- ❖ Para cromatografia em coluna (CC) realizada para a purificação dos compostos utilizou-se sílica-gel 60 230 – 400 Mesh (0,200 – 0,360 nm), em coluna de vidro de diâmetro interno adequado para cada caso.
- ❖ Nos processos de cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatoplasmas de sílica gel 60 G com 0,25 mm de espessura em base de alumínio, com indicador de fluorescência UV254.
- ❖ Como reveladores foram utilizados vapor de iodo sublimado; solução etanólica de FeCl_3 a 1%; luz ultravioleta ($\lambda = 254$ ou 365 nm).
- ❖ Os pontos de fusão obtidos em graus Celsius foram determinados em aparelho Metler PFM 2, no Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal-LFQM- da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).
- ❖ Os espectros de absorção na região do ultravioleta (UV) foram obtidos em espectrofotômetro UV-visível de feixe duplo (Shimadzu-2550), no Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal (LFQM) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Os derivados foram solubilizados em etanol e analisados por varredura na faixa de $\lambda = 500$ a 200 nm.
- ❖ Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro Shimadzu modelo Prestig-21 no Laboratório Interdisciplinar de Química- (LABIQ) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL- MG). As amostras foram preparadas na forma de pastilhas de KBr e as absorções expressas em número de onda (cm^{-1}).
- ❖ Os espectros de massas foram obtidos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), cromatógrafo Shimadzu modelo QP5050A no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa, UFV.
- ❖ Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H , ^{13}C , foram obtidos em espectrômetro BRUKER *Avance* DPX 200, do Laboratório de Ressonância Magnética

Nuclear de Alta Resolução (LAREMAR) do Departamento de Química, UFMG. Os espectros foram obtidos em CDCl_3 e TMS como referencial interno. Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J), Hertz (Hz).

❖ Os testes de atividade antioxidante *in vitro* foram realizados no Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal (LFQM) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Foi utilizado espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu-2550), de feixe duplo. As substâncias analisadas foram solubilizadas em etanol e analisadas em $\lambda = 517$ nm para a atividade sequestrante de radicais livres e de $\lambda = 700$ nm para atividade redutora.

❖ No teste enzimático foi utilizado espectrofotômetro UV-visível RF-1501 do Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal (LFQM) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).

❖ Os ensaios microbiológicos de fungos e bactérias foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Imunologia de Ciência Biomédicas (UNIFAL-MG) e as leituras dos resultados foram feitas em leitor automático de microplacas (Zenith - modelo 200 rt).

❖ Os ensaios microbiológicos de *Leishmania* realizados no Laboratório de Biologia Molecular (UNIFAL-MG) e as leituras dos resultados foram feitas em leitor automático de microplacas (Zenith - modelo 200 rt).

5.2 OBTENÇÃO DOS DERIVADOS

As reações para a obtenção dos derivados foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal (LFQM) da Unifal-MG a partir da 2,4-diidroxibenzofenona (CM-A), 4-hidroxibenzofenona (CM-B) e 4,4'-diidroxibenzofenona (CM-C) comerciais (Sigma Aldrich®).

5.3 ETAPA SINTÉTICA

Para a preparação dos derivados planejados, foram realizadas reações de alquilação sobre as hidroxilas fenólicas dos substratos de partida, segundo metodologia geral descrita por YANG e colaboradores (2009). As benzofenonas de partida e o agente alquilante foram dissolvidos numa mistura de acetona e dimetilformamida (DMF), utilizando K_2CO_3 como base.

5.3.1 Síntese de 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (LFQM-115)

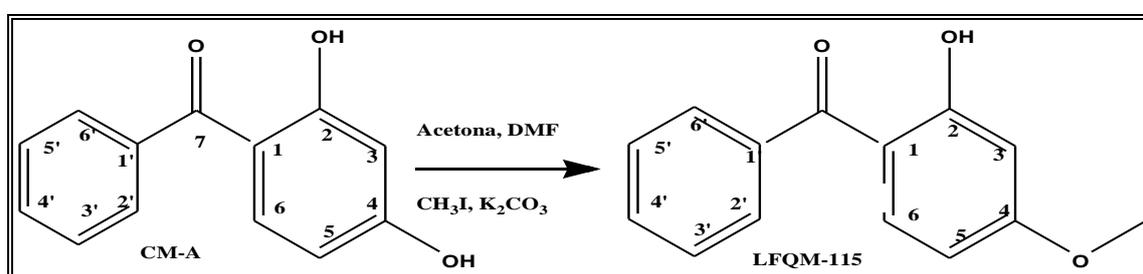


Figura 25 - Reação de obtenção do derivado LFQM-115.

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 100 mg (0,467 mmol) de 2,4-diidroxibenzofenona (CM-A), dissolvidos em 2 mL de acetona (0,02 mmol), 1 mL de DMF (0,01 mmol) e foi acrescentado 93 mg de K_2CO_3 (0,0009 mmol). O sistema foi mantido sob agitação magnética à t.a., e após 30 minutos foi acrescentado 0,5 mL (0,93 mmol) de CH_3I . O sistema foi mantido por 12 h em agitação magnética à t.a., monitorado por CCD (hexano/acetato de etila 75:25), até que foi verificado que a reação não mais evoluía. A mistura reacional foi vertida em um funil de separação, seguido da adição de 5 mL de água (1 x 5 mL) e extração com AcOEt (3x10mL). A fase aquosa foi adicionalmente extraída com acetato de etila (4x 20 mL) e as fases orgânicas reunidas foram secas sob sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. Foram obtidos 40 mg (0,17 mmol) de LFQM-115, na forma de um sólido amarelo com 37,6% de rendimento (YANG et al., 2009 adaptado).

UV (EtOH, 0,1 %) $\lambda_{max}(\log \epsilon)$: 416 (12,5); 324 (0,25); 286 (0,16); 242 (0,24) nm.

IV(KBr) $\nu_{max}cm^{-1}$: 2864 ($\nu C-H$); 1807 e 1643 ($\nu C=O$); 1256 ($\nu C-O-C$).

CG-EM m/z (%): 105(5), 77(14), 228(25), 31(100).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 200MHz): δ 3,8(s, H-8); 6,3(d, $J = 2,4$ Hz, H-3); 6,4(d, $J=2,4$ Hz, H-5); 6,5 (t, $J=2,4$ Hz, H-6); 7,5(t, $J= 0,8$ Hz, H-3' e H-5'); 7,6(d, $J= 2,0$ Hz, H-2' e H-6').

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz): δ 56,9 (C-3); 108,6 (C-5); 114,4 (C-1); 129,5 (C-2' e C-6'); 130,1 (C-3' e C-5'); 132,7 (C-4'); 136,5 (C-1'); 139,5 (C-6'); 167,5 (C-2); 167,6 (C-4); 201,3 (C-7).

5.3.2 Síntese de 2-hidroxi-4-butoxibenzofenona (LFQM-116)

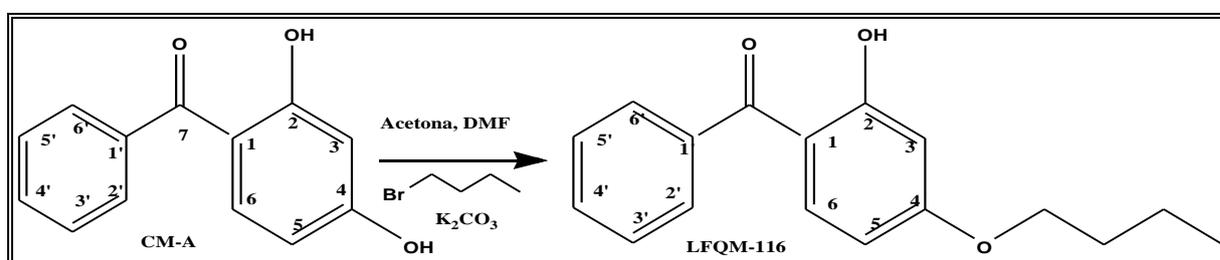


Figura 26 - Reação de obtenção do derivado LFQM-116.

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 200 mg (0,934 mmol) de 2,4-diidroxibenzofenona (CM-A) dissolvidos em 2mL de acetona (0,02 mmol), 1 mL de DMF (0,01 mmol) e acrescentado 186 mg de K_2CO_3 (0,001 mmol). O sistema foi mantido sob agitação magnética à t.a., e após 30 minutos foi acrescentado 0,20 mL (1,86mmol) de $\text{C}_4\text{H}_9\text{Br}$. O sistema foi mantido em agitação magnética à t.a., por 10 h e monitorado por CCD (hexano/acetato de etila 75:25) até que foi verificado que a reação não mais evoluía. A mistura reacional foi vertida em um funil de separação, seguido da adição de 5 mL de água (1 x 5 mL) e extração com AcOEt (3x10mL). A fase aquosa foi adicionalmente extraída com acetato de etila (4x 20 mL) e as fases orgânicas reunidas foram secas sob sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. Foram obtidos 210 mg (0,77mmol) de LFQM-116 na forma de um sólido amarelo, com 83,3% de rendimento (YANG *et al.*, 2009 adaptado).

UV (EtOH, 0,1 %) λ_{max} (log ϵ): 324 (0,24), 289 (0,15) e 243 (0,21) nm.

IV(KBr) ν_{max} cm^{-1} : 2800 ($\nu\text{C-H}$); 1624 ($\nu\text{C=O}$); 1266 ($\nu\text{C-O-C}$).

CG-EM m/z (%): 105(5), 77(14), 228(25), 31(100).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 200MHz): δ 0,98(t, $J= 7,3\text{Hz}$, H-11); 1,4(sex., $J= 7,2\text{ Hz}$, H-10); 1,7(q, $J= 7,5\text{ Hz}$, H-9); 4,0(t, $J= 6,5\text{ Hz}$, H-8); 6,4 (H-3 e H-5); 7,7 (d, $J=2,4\text{ Hz}$, H-6); 7,5(d, $J= 6,2\text{ Hz}$, H-2' e H6'); 7,7 (t, $J= 4\text{Hz}$, H-4).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz): δ 16,0 (C-11); 17,4 (C-10); 21,8(C-9); 70,7 (C-8); 96,8 (C-3); 102,7 (C-5); 113,9 (C-1); 130,1 (C-3' e C-5'); 129,7(C-2' e C-6'); 129,5 (C-6); 135,3 (C-1'); 151,2 (C-2); 167,6 (C-4); 202,3 (C-7).

5.3.3 Síntese de 2-hidroxi-4-preniloxibenzofenona (LFQM-117)

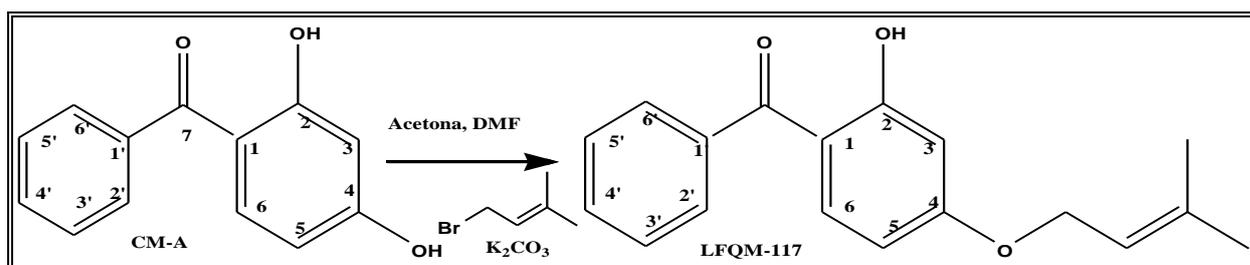


Figura 27 - Reação de obtenção do derivado LFQM-117.

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 200 mg (0,934 mmol) de 2,4-dihidroxibenzofenona (CM-A), dissolvidos em 2mL de acetona (0,02 mmol), 1 mL de DMF (0,01 mmol) e acrescentado 186 mg (0,001 mmol) de K_2CO_3 . Esperou-se 30 minutos em agitação magnética à t.a., e acrescentou 0,22 mL(1,95mmol) ($\text{C}_5\text{H}_9\text{Br}$). O sistema foi mantido em agitação magnética à t.a., por 11h e monitoramento por CCD (hexano/acetato de etila75:25) até que foi verificado que a reação não mais evoluía. A mistura reacional foi vertida em um funil de separação, seguido da adição de 5 mL de água (1 x 5 mL) e extração com AcOEt (3x10mL). A fase aquosa foi adicionalmente extraída com acetato de etila (4x 20 mL) e as fases orgânicas reunidas foram secas sob sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. Foram obtidos 120 mg (0,42mmol) de LFQM-117, na forma de um sólido esbranquiçado, com 45,6% de rendimento (YANG *et al.*, 2009 adaptado).

UV (EtOH, 0,1 %) λ_{max} (log ϵ): 322 (0,25), 288 (1,70) e 243 (0,22) nm.

IV(KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 2914 (ν C-H); 1600 (ν C=O); 1271 (ν C-O-C).

CG-EM m/z (%): 282(1), 77(5), 105(5), 137(6), 69(50), 213(60), 41(100).

RMN de ¹H (CDCl₃, 200MHz): δ 1,8 (s, H-11); 1,8 (s, H-12); 4,5 (d, $J=6,8$; H-8); 5,4 (m, H-9); 6,4 (d, $J=2,0$ Hz, H-3); 6,5(d, H-5); 6,6 (d, H-6); 7,5 (m, H-4'); 7,6 (t, $J= 2,9$ Hz, H-3' e H-5'); 7,7 (d, $J= 1,6$ Hz, H-2' e H-6').

RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz): δ 18,9 (C-11); 23,0 (C-12); 66,1 (C-8); 120,1 (C-9); 141,9 (C-10); 104,3 (C-3); 105,7 (C-5); 110,7 (C-1); 129,1 (C-3' e C-5'); 129,7 (C-6); 163,8 (C-4); 130,1 (C-2' e C-6'); 133,4 (C-4'); 137,4 (C7).

5.3.4 Síntese de 4-metoxibenzofenona (LFQM-118)

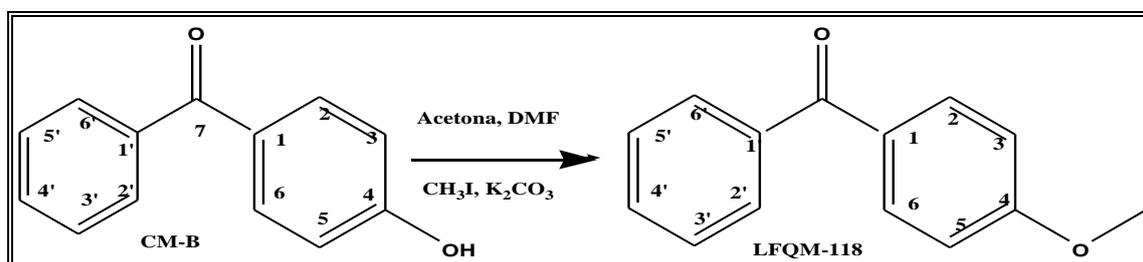


Figura 28 - Reação de obtenção do derivado LFQM-118.

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 200 mg (0,934 mmol) de 4-hidroxibenzofenona (CM-B), dissolvidos em 2mL de acetona (0,02 mmol), 1 mL de DMF (0,01 mmol) e foi acrescentado 210 mg (0,002 mmol) de K₂CO₃. Esperou-se 30 minutos em agitação magnética à t.a., e acrescentou 0,12 mL (1,83mmol) de CH₃I. O sistema foi mantido em agitação magnética à t.a., por 48 h monitoramento por CCD (hexano/acetato de etila 75:25) até que foi verificado que a reação não mais evoluía. A mistura reacional foi vertida em um funil de separação, seguido da adição de 5 mL de água (1 x 5 mL) e extração com AcOEt (3x10mL). A fase aquosa foi adicionalmente extraída com acetato de etila (4x 20 mL) e as fases orgânicas reunidas foram secas sob sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada

sob pressão reduzida. Foram obtidos 108mg (0,5 μ mol) de LFQM-118 na forma de um sólido amarelo com 48,4% de rendimento (YANG et al., 2009 adaptado).

UV (EtOH, 0,1 %) $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$: 416 (25), 288 (0,13), 252 (0,24), 224 (0,20) e 204 (0,09) nm.

IV(KBr) $\nu_{\max}\text{cm}^{-1}$: 2968, 2935 e 2845 ($\nu\text{C-H}$); 1649 ($\nu\text{C=O}$); 1259 ($\nu\text{C-O-C}$).

CG-EM m/z (%): 69(50), 31(90),41(100), 212(100).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 200MHz): δ 3,8 (s, H-8); 6,9 (d, $J = 8,6$ Hz, H-3 e H-5); 7,4 (d, $J = 6,8$ Hz, H-2 e H-6); 7,5 (t, $J = 6,5$ Hz, H-3' e H-5'); 7,8 (t, $J = 8,8$ Hz, H-4').

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz): δ 56,9 (C-8); 117,7 (C-3 e C-5); 129,2 (C-2 e C-6); 131,4 (C-2 e C-6); 129,8 (C-2' e C-6') 138,7 (C-4'); 143,5 (C-1'); 169,4 (C-4); 201,5 (C-7)

5.3.5 Síntese de 4-butoxibenzofenona (LFQM-119)

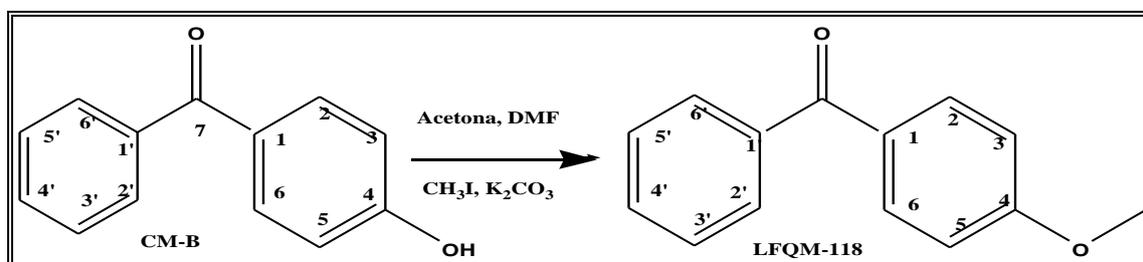


Figura 29 - Reação de obtenção do derivado LFQM-119.

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 300 mg (0,934 mmol) de 4-hidroxibenzofenona (CM-B), dissolvidos em 2,6 mL de acetona (0,02 mmol), 1,3 mL de DMF (0,01 mmol) e foi acrescentado 151 mg (0,001 mmol) de K_2CO_3 . Esperou-se 30 minutos em agitação magnética à t.a., e acrescentou 0,24mL (2,23mmol) de $\text{C}_4\text{H}_9\text{Br}$. O sistema foi mantido em agitação magnética à t.a., por 36 h monitoramento por CCD (hexano/acetato de etila75:25) até que foi verificado que a reação não mais evoluía. A mistura reacional foi vertida em um funil de separação, seguido da adição de 5 mL de água (1 x 5 mL) e extração com AcOEt (3x10mL). A fase aquosa foi adicionalmente extraída com acetato de

etila (4x20 mL) e as fases orgânicas reunidas foram secas sob sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. Foram obtidos 243mg (0,95mmol) de LFQM-119 na forma de um sólido amarelo com 63,3% de rendimento (YANG et al., 2009 adaptado).

UV (EtOH, 0,1 %) $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$: 416 (0,0005), 290 (0,09), 226 (0,09) e 204 (0,2) nm.

IV(KBr) $\nu_{\max}\text{cm}^{-1}$: 2962 e 2926 ($\nu\text{C-H}$); 1635 ($\nu\text{C=O}$); 1247 ($\nu\text{C-O-C}$).

CG-EM m/z (%): 77(30), 105(25), 121(100), 254(1).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 200MHz): δ 1,0 (t, $J= 7,3$ Hz, H-11) 1,5 (sex, $J= 7,2$ Hz, H-10); 1,7(q, $J= 8\text{Hz}$, H-9); 4,0(t, $J= 6,5$ Hz, H-8); 6,9 (d, $J= 8,8$ Hz H-3 e H-5); 7,7 (d, $J= 2,4$ Hz, H-2 e H-6); 7,5 (d, $J= 7,4$ Hz, H-2' e H6'); 7,4 (t, $J= 7,1$ Hz, H-3' e H-5'); 7,5 (t, $J= 6,5$ Hz, H-4').

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz): δ 14,3 (C-11); 20,4 (C-10); 32,4 (C-9); 66,9 (C-8); 115,2 (C-3 e C-5); 129,4 (C-2 e C-6); 130,9 (C-3' e C-5'); 132,8 (C-4'); 133,6 (C-1'); 166,4 (C-4); 195,5 (C-7).

5.3.6 Síntese de 4-preniloxibenzofenona (LFQM-120)

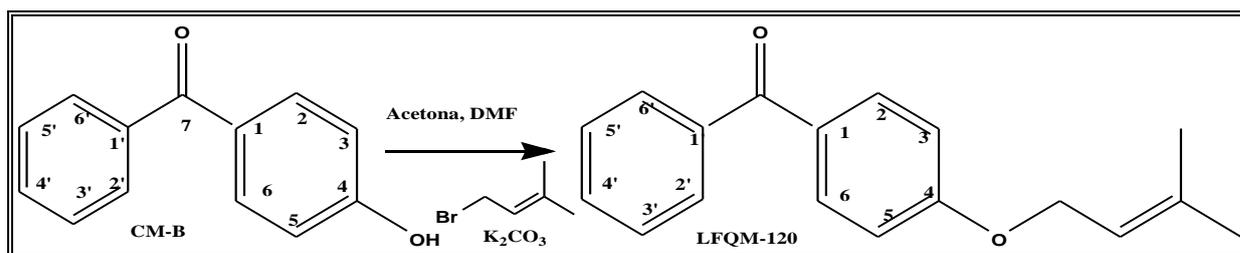


Figura 30 - Reação de obtenção do derivado LFQM-120.

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 200 mg (0,934 mmol) de 4-hidroxibenzofenona (CM-B), dissolvidos em 2 mL de acetona (0,02 mmol), 1 mL de DMF(0,01 mmol) e acrescentado 202 mg (0,002 mmol) de K_2CO_3 . Esperou-se 30 minutos em agitação magnética à t.a., e acrescentou 0,12 mL(1,06 mmol) de $\text{C}_5\text{H}_9\text{Br}$. O sistema foi mantido em agitação magnética à t.a., por 20 h monitoramento por CCD (hexano/acetato de etila 75:25) até que foi verificado que a reação não mais evoluía. A mistura reacional foi

vertida em um funil de separação, seguido da adição de 5 mL de água (1 x 5 mL) e extração com AcOEt (3x10mL). A fase aquosa foi adicionalmente extraída com acetato de etila (4x20 mL) e as fases orgânicas reunidas foram secas sob sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. Foram obtidos 137 mg (0,51 mmol) de LFQM-120 de, na forma de um sólido esbranquiçado, com 51,5% de rendimento (YANG et al., 2009 adaptado).

UV (EtOH, 0,1 %) $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$: 416 (-0,0005), 290 (0,02) e 250 (0,01) nm.

IV(KBr) $\nu_{\max}\text{cm}^{-1}$: 2976 e 2943($\nu\text{C-H}$); 1598 ($\nu\text{C=O}$); 1255 ($\nu\text{C-O-C}$).

CG-EM m/z (%): 266(1), 41(15), 105(20), 198(55), 121(65), 69(73)

RMN de ^1H (CDCl_3 , 200MHz): δ 1,7 (s, H-11 ou H-12); 4,5 (d, $J= 6,8$ Hz, H-8); 5,5 (t, $J= 6,8$ Hz, H-9); 6,9 (d, $J=8,8$ Hz, H-3 e H-5); 7,4 (d, $J= 7,2$ Hz, H-2 e H-6); 7,5 (d, $J= 7,2$ Hz, H-2' e H-6'); 7,5 (d, $J= 7,2$ Hz, H-3 e H-5); 7,7 (t, $J= 3,3$ Hz, H-4').

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz): δ 19,5 (C-11); 27,1 (C-12); 66,3 (C-8); 120,2 (C-9); 139,1(C-10); 115,5 (C-3 e C-5); 129,4 (C-2, C-6); 133,0 (C-1); 131,2 (C-2' e C-6); 133,1 (C-4'); 163,8 (C-4); 195,9 (C-7).

5.3.7 Síntese de 4,4'-dimetoxibenzofenona (LFQM-121)

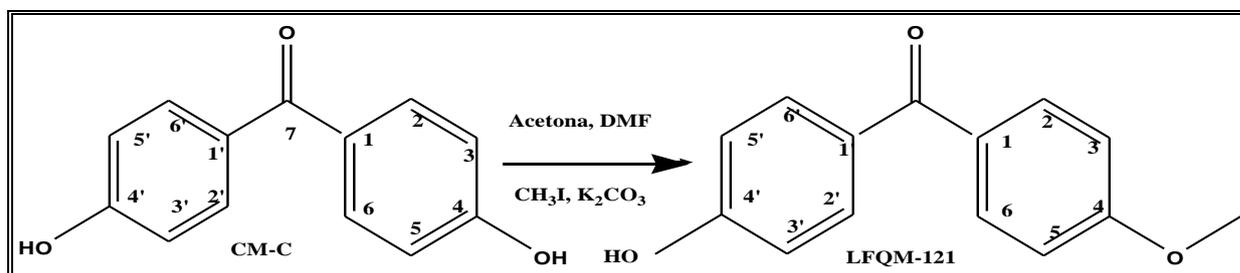


Figura 31 - Reação de obtenção do derivado LFQM-121.

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 300 mg (0,934 mmol) de 4,4'-diidroxibenzofenona (CM-C), dissolvidos em 2,6 mL de acetona (0,02 mmol), 1,3 mL de DMF (0,01 mmol) e foi acrescentado 390 mg (0,003 mmol) de K_2CO_3 . Esperou-se 30

minutos em agitação magnética à t.a., e acrescentou 0,26 mL de CH₃I. O sistema foi mantido em agitação magnética à t.a., por 27 h monitoramento por CCD (hexano/acetato de etila 75:25) até que foi verificado que a reação não mais evoluía. A mistura reacional foi vertida em um funil de separação, seguido da adição de 5 mL de água (1 x 5 mL) e extração com AcOEt (3x10mL). A fase aquosa foi adicionalmente extraída com acetato de etila (4x20 mL) e as fases orgânicas reunidas foram secas sob sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. Foram obtidos 300 mg (0,51 mmol) de LFQM-121 de, na forma de um sólido esbranquiçado, com 90,6% de rendimento (YANG et al., 2009 adaptado).

IV(KBr) ν_{\max} cm⁻¹ : 2924 (ν C-H); 1637(ν C=O); 1253 (ν C-O-C)

CG-EM m/z (%): 242(1), 77(10), 135(25), 31(100).

RMN de ¹H (CDCl₃, 200MHz): δ 3,8 (s, H-8 e H-8'); 6,9 (d, J = 8,8 Hz, H-3, H-5 e H-3', H-5'); 7,8 (d, J = 8,8 Hz, H-2, H-6 e H-2', H-6').

RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz): δ 56,7 (C-11); 114,4 (C-3, C-5 C-3' e C-5'); 131,7 (C-2, C-6, C-2' e C-6'); 133,4 (C-4 e C-4'); 195,7 (C-7).

5.3.8 Síntese de 4,4-dibutoxibenzofenona (LFQM-122)

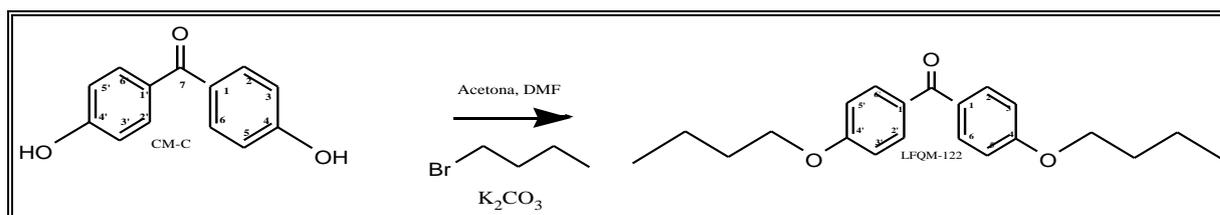


Figura 32 - Reação de obtenção do derivado LFQM-122.

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 100 mg (0,934 mmol) de 4,4'-diidroxibenzofenona (CM-C), dissolvidos em 6 mL (0,06 mmol) de acetona (0,002 mmol), 3 mL (0,03mmol) de DMF e foi acrescentado 260 mg (0,02 mmol) de K₂CO₃. Esperou-se 30 minutos em agitação magnética à t.a., e acrescentou 0,12 mL de C₄H₉Br. O sistema foi mantido em agitação magnética à t.a., por 32 h monitoramento por CCD (hexano/acetato de etila 75:25) até que foi verificado que a reação não mais evoluía. A mistura reacional foi

vertida em um funil de separação, seguido da adição de 5 mL de água (1 x 5 mL) e extração com AcOEt (3x10mL). A fase aquosa foi adicionalmente extraída com acetato de etila (4x20 mL) e as fases orgânicas reunidas foram secas sob sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. . Foram obtidos 150mg (0,46 mmol) de LFQM-122 na forma de um sólido amarelo com 73% de rendimento (YANG et al., 2009 adaptado).

IV(KBr) $\nu_{\max} \text{cm}^{-1}$: 2933 ($\nu\text{C-H}$); 1637 ($\nu\text{C=O}$); 1249 ($\nu\text{C-O-C}$).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz): δ 0,9 (t, $J= 7,3$ Hz, H-11 e H-11'); 1,4 (sex, $J= 7,3$ Hz, H-10 e H-10'); 1,8(d, $J= 7,2$ Hz, H-9 e H-9'); 4,0 (t, $J= 6,4$ Hz, H-8 e H-8'); 6,9 (d, $J= 8,8$ Hz, H-3, H-5 e H-3'), 7,0 (d, $J= 8,8$ Hz H-2, H-6 e H-2', H-6').

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz): δ 14,6 (C-11 e C-11'); 19,9 (C-10 e C-10'); 31,4 (C-9 e C-9'); 68,7 (C-8 e C-8'); 114,6 (C-3, C-5, C-3' e C-5'); 131,3 (C-2, C-6 e C-2', C-6'); 132,9 (C-1 e C-1'); 163,2 (C-4 e C-4'); 195,2 (C-7).

5.3.9 Síntese de 4,4'-dipreniloxibenzofenona (LFQM-123)

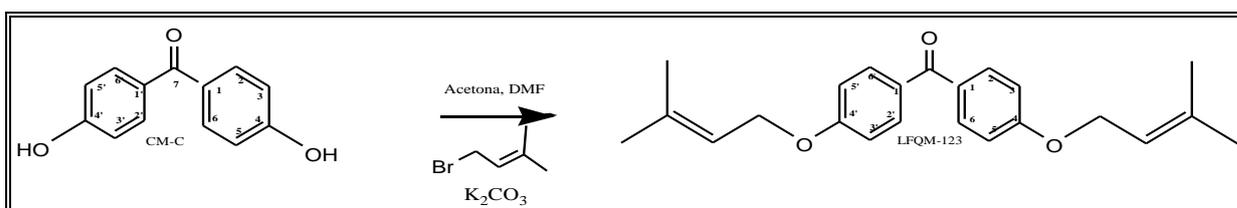


Figura 33 - Reação de obtenção do derivado LFQM-123.

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 200 mg (0,934 mmol) de 4-hidroxi-benzofenona (CM-A), dissolvidos em 2 mL (0,02mmol) de acetona, 1 mL de DMF (0,01 mmol) e acrescentado 260 mg (0,002 mmol) de K_2CO_3 . Esperou-se 30 minutos em agitação magnética à t.a., e acrescentou 0,27 mL (2,39 mmol) de $\text{C}_5\text{H}_9\text{Br}$. O sistema foi mantido em agitação magnética à t.a., por 5 h e monitoramento por CCD (hexano/acetato de etila 75:25) até que foi verificado que a reação não mais evoluía. A mistura reacional foi vertida em um funil de separação, seguido da adição de 5 mL de água (1 x 5 mL) e extração com AcOEt (3x10mL). A fase aquosa foi adicionalmente extraída com acetato de etila (4 x

20 mL) e as fases orgânicas reunidas foram secas sob sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. Foram obtidos 24 mg (0,06 mmol) de LFQM-123 na forma de um sólido esbranquiçado, com 76,2% de rendimento (YANG et al., 2009 adaptado).

IV(KBr) $\nu_{\max}\text{cm}^{-1}$: 2933 ($\nu\text{C-H}$); 1637 ($\nu\text{C=O}$); 1249 ($\nu\text{C-O-C}$).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz): δ 1,7(s, H-11,H-11', H-12 e H-12'); 4,5 (d, $J= 6,8$ Hz, H-8 e H-8'); 5,5 (t, H-9 e H-9'); 6,9 (d, $J= 8,8$ Hz, H-3, H-5 e H-3' e H-5'); 7,7 (d, $J= 8,8$ Hz, H-2, H-2' e H-6, H-6').

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz): δ 18,8 (C-11 e C-11'); 26,4 (C-12 e C-12'); 65,5 (C-8 e C-8'); 119,6 (C-9 e C-9'); 139,3 (C-10 e C-10'); 114,6 (C-3, C-5 e C-3', C-5'); 131,2 (C-2, C-6 e C-2',C-6'); 132,7 (C-1 e C-1'); 162,7 (C-4 e C-4'); 195 (C-7).

5.4 AVALIAÇÕES DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

5.4.1 Atividade antioxidante

5.4.1.1 Avaliação do Poder Sequestrante de Radicais DPPH

A medida da atividade sequestrante de radicais DPPH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por YEN et al (2005), com modificações. Adicionou-se 4,0 mL da solução das amostras (nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) a serem testadas a 1,0 mL de solução (0,5 mM) do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila). A mistura foi agitada vigorosamente e mantida em repouso, sob proteção de luz, por 30 minutos. Logo após, foram lidas as absorvâncias a 517 nm em espectrofotômetro UV/*vis.* (em triplicata).

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

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

5.4.1.2 Avaliação do Poder Redutor dos Constituintes Químicos

Avaliação do poder de redução das amostras foi realizada de acordo com a metodologia descrita por YEN et al (2005) com modificações.

As amostras foram diluídas (nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e de cada uma foi retirada uma alíquota de 1,0 mL para tubos de ensaio de 25,0 mL. A esta alíquota foi adicionado: 2,5 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 6,6); 2,5 mL de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1%). A mistura foi mantida em banho-Maria a 45°C por 20 minutos. Uma porção de 2,5 mL de ácido tricloroacético (10%) foi adicionada à solução no tubo de ensaio, com posterior agitação. Uma quantidade de 2,5 mL da mistura foi pipetada e transferida para outro tubo de ensaio, no qual foram adicionados 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de FeCl_3 (0,1%). A leitura da absorbância foi realizada a 700 nm em espectrofotômetro UV/Vis. Uma elevada absorbância indicando grande poder redutor. As amostras foram analisadas em triplicata. A determinação de percentual inibitório máximo foi obtida por regressão linear dos pontos plotados graficamente. Para a plotagem dos pontos, foram utilizados os valores das médias obtidas de triplicatas realizadas para cada uma das substâncias.

5.4.2 Avaliação da atividade inibitória de xantina oxidase (XO) (Castro e colaboradores (2004).

5.4.2.1 Tampão TRIS 5 $\mu\text{mol/L}$

Os ensaios com xantina oxidase foram realizados em tampão TRIS 157 gmol^{-1} em 200 mL de água (H_2O), adicionou-se NaOH 1% (m/v) em pH 8,1 e completou-se o volume com H_2O q.s.p. 500 mL.

5.4.2.2 Solução estoque de xantina

A solução estoque de xantina 11 mg ($152,11 \text{ gmol}^{-1}$) foi solubilizada em 800 μL de NaOH 1% (m/v) e completou-se o volume com tampão TRIS 5 $\mu\text{mol/l}$ até 10,0 mL.

5.4.2.3 Xantina 27,0 μ M em TRIS 5 mM

Diluiu-se 373 μ L da solução estoque de xantina no tampão TRIS q.s.p. em aproximadamente 80 mL, acertou-se o pH para 8,1 e completou-se até 100 mL de tampão TRIS.

5.4.2.4 XO 0,2 U/mL

Diluiu-se 12 μ L de solução de XO 5 U/0,2 mL em tampão TRIS q.s.p. 1,5 mL

5.4.2.5 Preparo do Alopurinol

Solubilizou-se 0,0122 g de Alopurinol (PM=136,1116 g mol⁻¹) em q.s.p. 10 mL de DMSO (8,96 μ M). Foram feitas diluições 1/2 (4,48 μ M), 1/4 (2,24 μ M) e 1/8 (1,12 μ M).

As concentrações finais na mistura reacional foram: 3,73 μ M; 7,47 μ M; 14,9 μ M e 29,9 μ M.

5.4.2.6 Preparo de 2,4-diidroxibenzofenona

Foram solubilizados 0,0100 g de 2,4-diidroxibenzofenona (CM-A) (PM = 214,217 g mol⁻¹) em q.s.p. 0,5 mL de DMSO (93,4 mM). Foram feitas diluições 1/2 (46,7 mM), 1/4 (23,3 mM) e 1/8 (11,7 mM). As concentrações finais na mistura reacional foram 0; 38,9 μ M; 77,8 μ M; 156 μ M e 311 μ M.

5.4.2.7 Preparo de 2-hidroxi-4-butoxibenzofenona

Foram solubilizados 0,0106 g de 2-hidroxi-4-butoxibenzofenona (270 g mol⁻¹) em q.s.p. 0,5 mL de DMSO. Foram feitas diluições 1/8 e 1/16. As soluções mais concentradas precipitaram.

5.4.2.8 Procedimento

Em uma cubeta de quartzo adicionou-se 3 mL de Xantina 27 μ M em TRIS 5 mM, retirou-se 110 μ L da solução e adicionou-se 10 μ L de DMSO. A reação foi inicializada adicionando 100 μ L da solução de XO 0.2 U/mL. As leituras foram feitas a 290 nm de 5 em 5 segundos durante 10 minutos contra um branco preparado de 3 mL, menos 10 μ L, mais 10 μ L de DMSO. Quando foi utilizado o inibidor substituiu-se o DMSO nas soluções do branco e da amostra pela solução do inibidor.

5.4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana

5.4.3.1 Bactérias e fungos

As amostras microbianas de bactérias e leveduras utilizadas na avaliação da atividade antimicrobiana das substâncias em estudo pertencem à coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da UNIFAL-MG. As amostras de bactérias e leveduras são linhagens padrões da *American Type Culture Collection* (ATCC).

As determinações do perfil de sensibilidade, concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM), concentração fungicida mínima (CFM) dos derivados foram realizadas de acordo com a metodologia de microdiluição em caldo RPMI 1640 para fungos conforme documento M27A3, CLSI, 2008) e microdiluição em caldo Mueller Hinton para bactérias conforme documento M7A6,

CLSI, 2003), com algumas modificações. Os meios de cultura utilizados foram: caldo Mueller Hinton para bactérias e caldo RPMI 1640 para fungos. As substâncias foram testadas em 10 concentrações (μ g/mL). Os valores de IC50 (menor concentração inibitória de 50% do crescimento microbiano) e IC100 (menor concentração inibitória de 100% do crescimento microbiano).

Os meios de cultura Mueller Hinton e o caldo RPMI 1640 acrescidos de DMSO nas mesmas concentrações finais propostas para os derivados foram utilizados como controle negativo no teste com bactérias e no teste com fungos, respectivamente. A droga padrão utilizada como controle positivo no teste foi o antifúngico fungistático Fluconazol e o antibiótico bacteriostático cloranfenicol. Os ensaios foram realizados em duplicata sobre bactérias e fungos Os ensaios foram realizados sobre fungos e bactérias padrões *American Type Culture Collection* (ATCC).

Os microrganismos escolhidos são oportunistas e ou patogênicos.

Bactéria Gram positiva: *Bacillus subtilis* (ATCC6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923); *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 1228).

Bactérias Gram negativas: *Escherichia coli* (ATCC 8739); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027); *Salmonella thyphimurium* (ATCC 14028).

Fungos: Leveduras do gênero *Candida*: *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida albicans* (ATCC 64548), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida tropicalis* (ATCC 750), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019).

Os derivados foram solubilizados em DMSO. As soluções em DMSO foram diluídas 100x no meio de cultura utilizado no ensaio, reduzindo a concentração final do solvente para 1%. O DMSO nesta concentração e sem os derivados foi utilizado no ensaio como controle da diluição.

Tabela 1: Diluições sequenciais dos derivados para a avaliação de seus potenciais antibacterianos e antifúngicos

Concentração (µg/mL) Cloranfenicol	Concentração (µg/mL) fluconazol	Concentração (µg/mL) dos derivados LFQM
125,0	64,0	100,0
62,5	32,0	62,5
31,2	16,0	31,2
15,6	8,0	15,6
7,8	4,0	7,8
3,9	2,0	3,9
1,9	1,0	1,9
0,9	0,5	0,4
0,4	0,2	0,2
0,1	0,1	0,06
	0,03	

5.4.3.2 Leitura e interpretação dos resultados

A leitura foi feita verificando a concentração inibitória mínima, ou seja, determinando a concentração das amostras capaz de inibir 50% (CIM₅₀) e 100% (CIM₁₀₀) do crescimento microbiano. Essa leitura foi feita após 24 horas para as bactérias, e leveduras e após 5 dias para os fungos filamentosos. As leituras foram feitas a 530 nm em leitora espectrofotométrica de microplacas. Os testes foram realizados em duplicata.

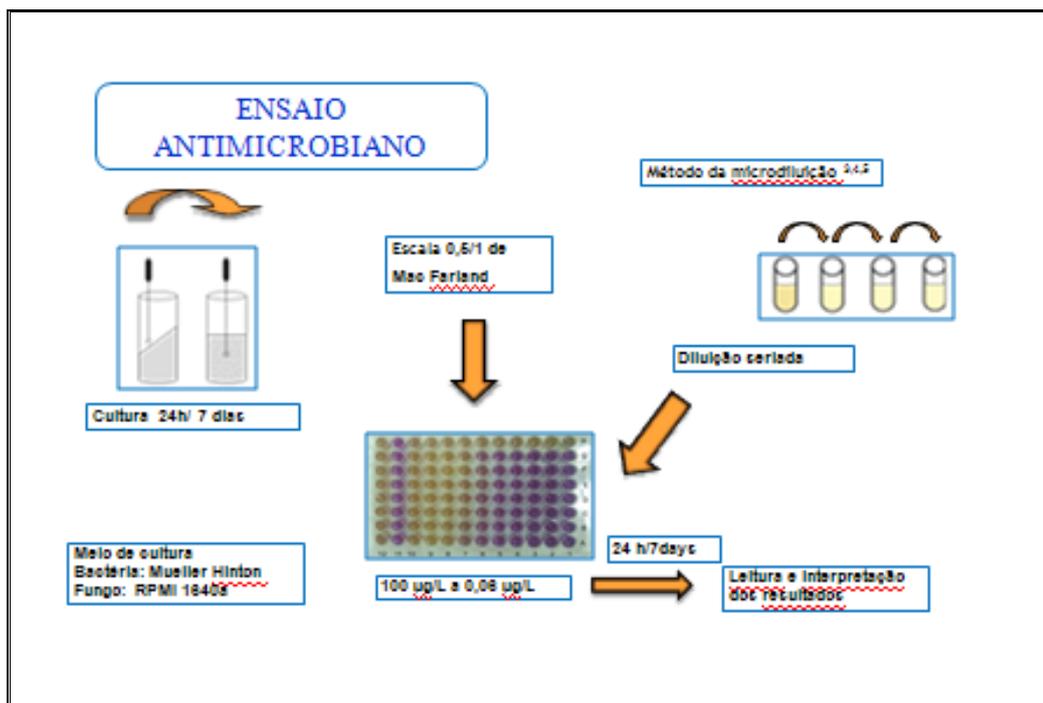


Figura 34 - Ensaio microbiológico.

5.4.4 Avaliação da atividade antiparasitária

5.4.4.1 Leishmaniose (Teste Promastigota)

Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram mantidas em meio LIT suplementado com 10% de soro fetal bovino em estufa a 25°C. Para a realização dos testes foram transferidas à razão de 1×10^6 células/mL para placas de 24 poços, onde então foram adicionadas as substâncias avaliadas nas concentrações de 20 µg/mL e 40 µg/ml, para que fosse feita uma triagem dos compostos com melhor atividade leishmanicida. Após 72 horas de incubação a 25°C, os protozoários foram contados em câmara de Neubauer para a determinação da porcentagem de inibição, tendo como controle, protozoários em meio de cultura sem a adição de drogas. Os compostos que apresentaram porcentagem de inibição significativa foram submetidos aos demais testes mencionados abaixo.

5.4.4.2 Determinação de IC₅₀ em promastigotas de *L. amazonenses*

Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram mantidas em meio LIT suplementado com 10% de soro fetal bovino em estufa a 25°C. Para a realização dos testes foram transferidas à razão de 1×10^6 células/mL para placas de 24 poços, onde então foram adicionadas as substâncias a serem avaliadas nas concentrações que variavam de 0,1 a 40,0 µg/ml. Após 72 horas de incubação a 25°C, os protozoários foram contados em câmara de Neubauer, em triplicata, para a determinação do IC₅₀, tendo como controle, protozoários em meio de cultura sem a adição das drogas. Este IC₅₀ foi então comparado ao IC₅₀ da droga padrão anfotericina B (PEREIRA et al., 2010).

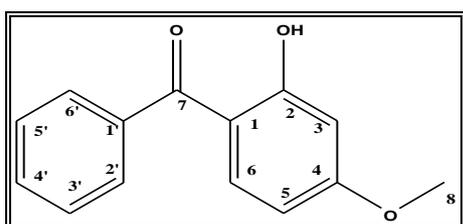
5.4.4.3 Avaliação da citotoxicidade

Para avaliação da citotoxicidade, foram utilizados macrófagos peritoneais murinos mantidos em meio RPMI 1640 a 37°C e 5% de CO₂, dispostos em placas de 24 poços na razão de 8×10^5 por poço, aos quais foram adicionadas as substâncias a serem avaliadas em concentrações de 0,1 a 40,0 µg/ml e incubados por 72 horas. Após o período de incubação foi adicionado 50,0 µL de MTT (3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium brometo) a cada poço, com nova incubação por 4 horas, então as células foram lisadas com DMSO e avaliadas em espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu, duplo-feixe, modelo 2550 à 570nm para determinação do CC₅₀ por comparação ao controle sem adição de drogas (PEREIRA et al., 2009)

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 RESULTADOS DAS ETAPAS SINTÉTICAS

6.1.1 Derivado LFQM-115 (2-hidroxi-4-metoxibenzofenona)



FM: C₁₄H₁₂O₃
MM: 228,08 g/mol

Figura 35 - Derivado sintético LFQM -115.

O derivado LFQM-115 foi obtido por uma reação de alquilação, pela qual reagiu-se a 2,4-diidroxibenzofenona CM-A com CH₃I, na presença de K₂CO₃ (YANG et al., 2009) (Figura 35). O produto foi obtido como um sólido amarelo (p.f. 58 °C), com rendimento de 37,6%.

O espectro no ultravioleta (UV) do LFQM-115 (Figuras 36 e 37) mostrou bandas com absorções com $\lambda_{\text{máx}}$ ($\log \epsilon\{\text{LFQM-115.L.mol}^{-1}\}$) em 416 nm (-12,5), 324nm (0,25), 286 nm (0,16), 242nm(0,24). A adição de solução de AlCl₃ a solução provoca um deslocamento batocrômico, com absorções com $\lambda_{\text{máx}}$ ($\log \epsilon\{\text{LFQM-115.L.mol}^{-1}\}$) em 315nm (0,20), 288 nm (0,19) e 242 nm (0,27), o que sugere a existência de hidroxila em um sistema quelatogênico. A adição de solução de HCl não restaurou a banda para seu estado inicial, com absorções com $\lambda_{\text{máx}}$ ($\log \epsilon\{\text{LFQM-115.L.mol}^{-1}\}$) em 312 nm (0,19), 291 nm (0,20) e 242 nm (0,28), porém ficou semelhante a curva com o aditivo AlCl₃ confirmando assim presença de grupo quelatogênico. Com a adição de NaOAc verificou-se que não houve deslocamento batocrômico com absorções nos $\lambda_{\text{máx}}$ ($\log \epsilon\{\text{LFQM-115.L.mol}^{-1}\}$) em 326 nm (0,26), 286 nm (0,18) e 241nm(0,26), sugerindo que a hidroxila ácida (C-4) foi substituída pelo o grupamento metil. Na presença de NaOAc/H₃BO₃ não observou novamente desvio batocrômico em

relação a solução inicial sem aditivos, com absorções com $\lambda_{\text{máx}}$ ($\log \epsilon$ {LFQM-115.L.mol⁻¹}) em 325 nm (0,26), 286 nm (0,18) e 241nm (0,26) indicando que o grupo *para*-hidroxi no anel B encontra-se substituído pelo mesmo grupamento (MABRY, 1970).

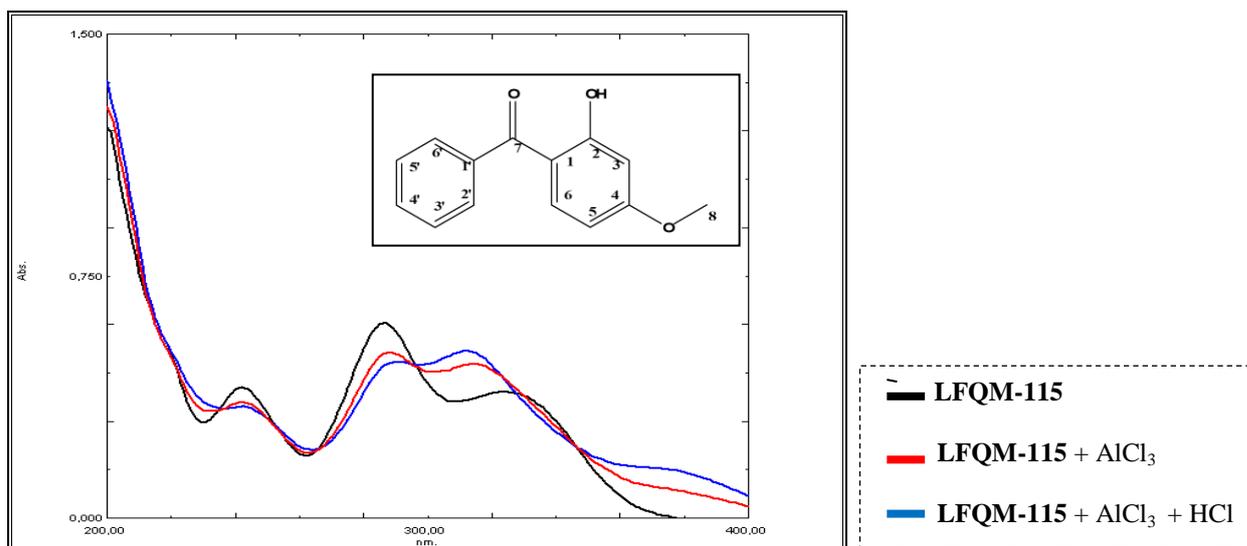


Figura 36 - Espectro no ultravioleta do composto LFQM-115.

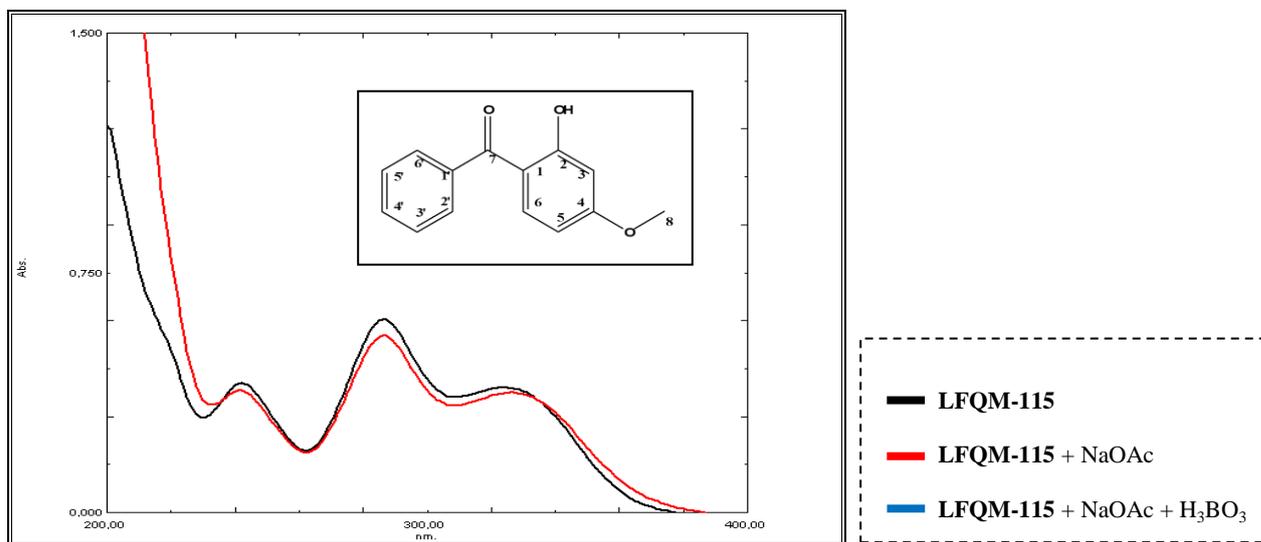


Figura 37 - Espectro no ultravioleta do composto LFQM-115 com NaOAc e H₃BO₃ como aditivos.

O espectro de absorção no IV (figura 38) do derivado LFQM-115 evidenciou banda de deformação axial de OH em 3350 cm⁻¹, bandas fracas em 3061 cm⁻¹ e 2995 cm⁻¹ características de deformação axial de ligação C-H de aromático e em 2864 cm⁻¹ uma banda

característica de deformação axial de ligação C-H do grupo metila. em 1807 cm^{-1} e 1643 cm^{-1} de C=O de carbonila. Banda forte de deformação axial em 1256 cm^{-1} de C-O-C de éter aromático (SILVERSTEIN et al., 2006).

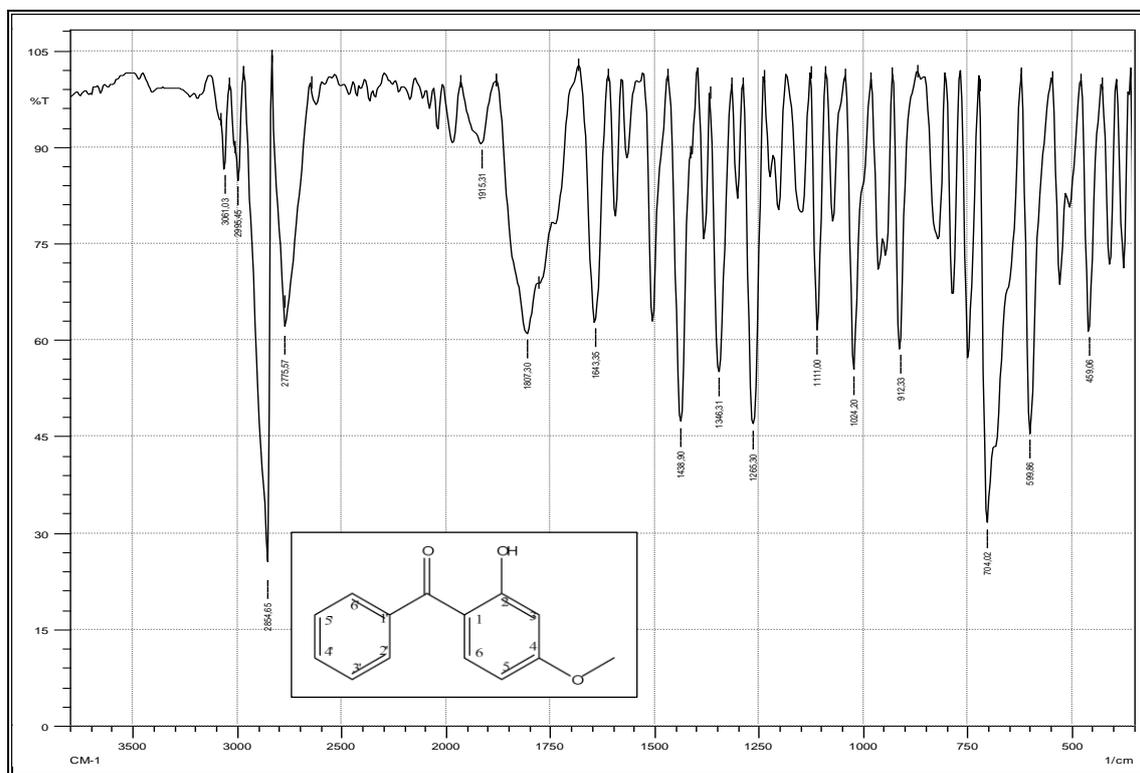


Figura 38 - Espectro de absorção na região do infravermelho de LFQM-115.

No espectro de massas (Figura 39), foram identificados os fragmentos mais importantes para elucidação estrutural deste composto, além de suas massas e intensidades relativas (Tabela 2). O pico do íon molecular do composto apresenta-se em m/z 228 (Figura 39) e o pico base em m/z 31 (SILVERSTEIN et al., 2006).

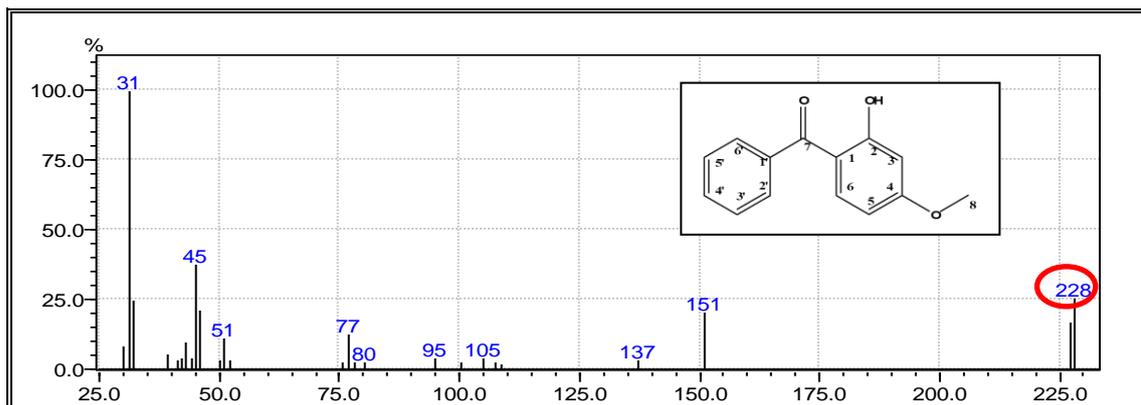


Figura 39 - Espectro de massas do derivado LFQM-115.

Tabela 2 - Principais fragmentos presente no espectro de massa do derivado LFQM-115

m/z	Fragmento	Intensidade Relativa
31	$[\text{CH}_3\text{O}]^+$	100
77	$[\text{C}_6\text{H}_5]^+$	14
105	$[\text{C}_7\text{H}_5\text{O}]^+$	5
228	$[\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_3]^+$	25

Pela análise do espectro de RMN de ^1H de LFQM-115 (Figura 40) foi observado um singleto intenso em δ 3,8 ppm referente ao hidrogênio metílico H-8, comprovando a modificação estrutural. O duplete em δ 6,3 ppm com $J = 2,4\text{Hz}$ é referente aos hidrogênios aromáticos H-3. Um sinal de duplete em δ 6,4 ppm foi atribuído ao hidrogênios H-5 com $J=2,4\text{Hz}$. Em δ 6,5 ppm um sinal de tripleto referente aos hidrogênios H-6 com $J=2,4\text{ Hz}$. Em δ 7,5 ppm um sinal de tripleto referente aos hidrogênios H-3' e H-5' com $J= 0,8\text{ Hz}$. Em δ 7,6 ppm um sinal de duplete referente aos hidrogênios H-2' e H-6' com $J= 2,0\text{ Hz}$.

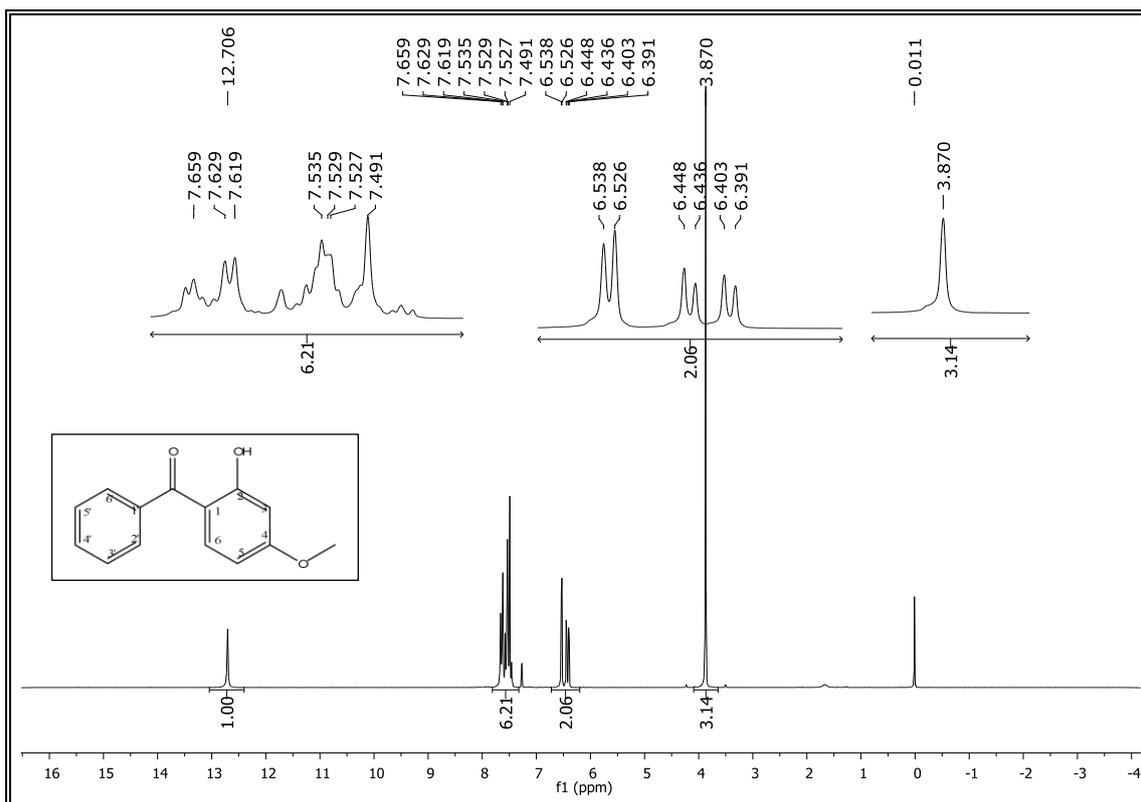


Figura 40 - Espectro de RMN de ^{13}C a 200 MHz de LFQM-115 (CDCl_3 ; 200 MHz).

No espectro de RMN de ^{13}C de LFQM-115 (Figura 40) foi observado um sinal em δ 56,9 ppm referente ao carbono metilênico C-8. Em δ 105,2 ppm foi observado um sinal atribuído aos carbonos C-3. Em δ 108,6 ppm um sinal para o carbono C-5. Em δ 114,4 ppm um sinal para os carbonos C-1. Em δ 129,5 ppm um sinal para os carbonos C-2' e C-6'. Em δ 130,1 ppm um sinal para o carbono C-3' e C-5' do anel aromático A. Em δ 132,7 ppm um sinal para o carbono C-4'. Em δ 136,5 ppm um sinal do carbono aromático C-1' do anel aromático B. Em δ 139,5 ppm um sinal para o carbono carbonílico C-6' do anel aromático B. Em δ 167,5 ppm um sinal para o carbono C-2. Em δ 167,6 ppm um sinal para o carbono C-4. Em δ 201,3 ppm um sinal para o carbono C-7.

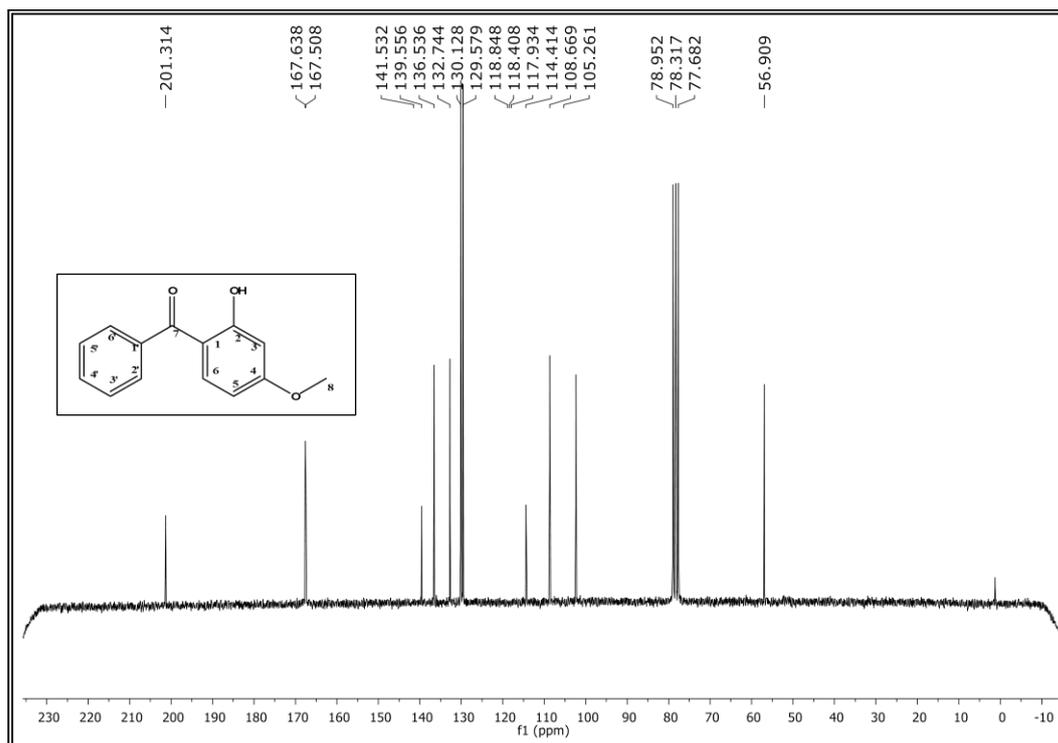


Figura 41 - Espectro de RMN de ^{13}C a 200 MHz de LFQM-115 (CDCl_3 ; 200 MHz).

6.1.2 Derivado LFQM-116 (2-hidroxi-4-butoxibenzofenona)

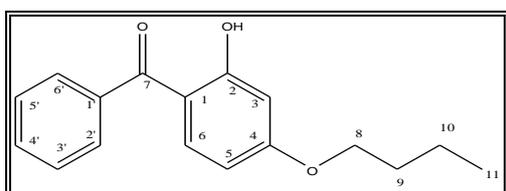


Figura 42 - Derivado sintético LFQM-116.

FM: $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_3$

MM: 270,32 g/mol

O derivado LFQM-116 foi obtido por uma reação de alquilação, pela qual reagiu-se 2,4-diidroxibenzofenona CM-A com $\text{C}_4\text{H}_9\text{Br}$ na presença de K_2CO_3 (YANG et al., 2009) (Figura 42). O produto foi obtido como um sólido amarelo (p.f. 71°C), com rendimento de 83,3%.

O espectro no ultravioleta (UV) do LFQM-116 (Figuras 43 e 44) mostrou bandas com absorções com $\lambda_{\text{máx}}$ ($\log \epsilon \{\text{LFQM-116.L.mol}^{-1}\}$) em 324 nm (0,24), 289 nm (0,15) e 243 nm (0,21). A adição de solução de AlCl_3 a solução provoca um deslocamento batocrômico, com absorções com $\lambda_{\text{máx}}$ ($\log \epsilon \{\text{LFQM-116.L.mol}^{-1}\}$) em 315m (0,18), 291 nm (0,19), o que

sugere a existência de hidroxila em um sistema quelatogênico. A adição de solução de HCl não restaurou a banda para seu estado inicial, com absorções com $\lambda_{\text{máx}}$ ($\log \varepsilon$ {LFQM-116.L.mol⁻¹}) em 314nm (0,16) e 206nm (0,046), porém ficou semelhante a curva com o aditivo AlCl₃ confirmando assim presença de grupo quelatogênico. Com a adição de NaOAc verificou-se que não houve deslocamento batocrômico com absorções nos $\lambda_{\text{máx}}$ ($\log \varepsilon$ {LFQM-116.L.mol⁻¹}) em 325 nm (0,24), 287 nm (0,16) e 239nm(0,17), sugerindo que a hidroxila ácida (C-4) foi substituída pelo o grupamento butila. Na presença de NaOAc/H₃BO₃ não observou novamente desvio batocrômico em relação a solução inicial sem aditivos, com absorções com $\lambda_{\text{máx}}$ ($\log \varepsilon$ {LFQM-116.L.mol⁻¹}) em 324 nm (0,25), 287 nm (0,16), indicando que o grupo *para*-hidroxi no anel B encontra-se substituído pelo mesmo grupamento (MABRY, 1970).

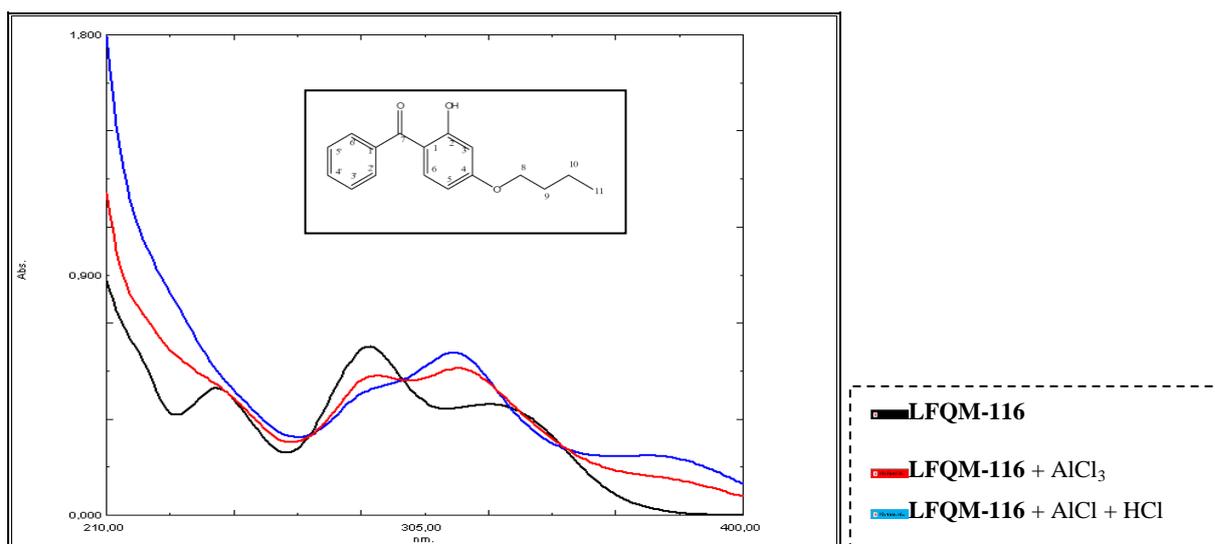


Figura 43 - Espectro no ultravioleta do composto LFQM-116 com AlCl₃ e HCl como aditivos.

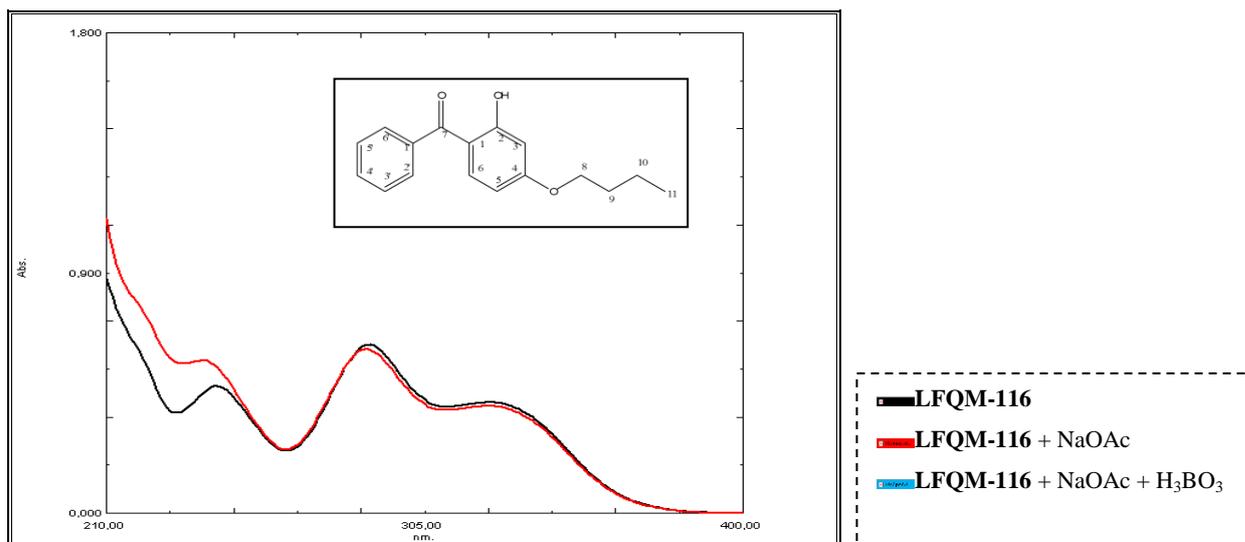


Figura 44 - Espectro no ultravioleta do composto LFQM-116 com NaOAc e H₃BO₃ como aditivos.

No espectro de absorção no IV No espectro de absorção no IV (Figura 45) do derivado do derivado LFQM-116 apresenta banda forte de deformação axial de OH em 3600 cm⁻¹, banda forte em 3082 cm⁻¹ característico de deformação axial de C-H de aromático e em 2960 cm⁻¹ característico de deformação axial de C-H de metila. Apresenta bandas em 1598 cm⁻¹ de C=O de carbonila e em 1261 cm⁻¹ de C-O-C de éter aromático.

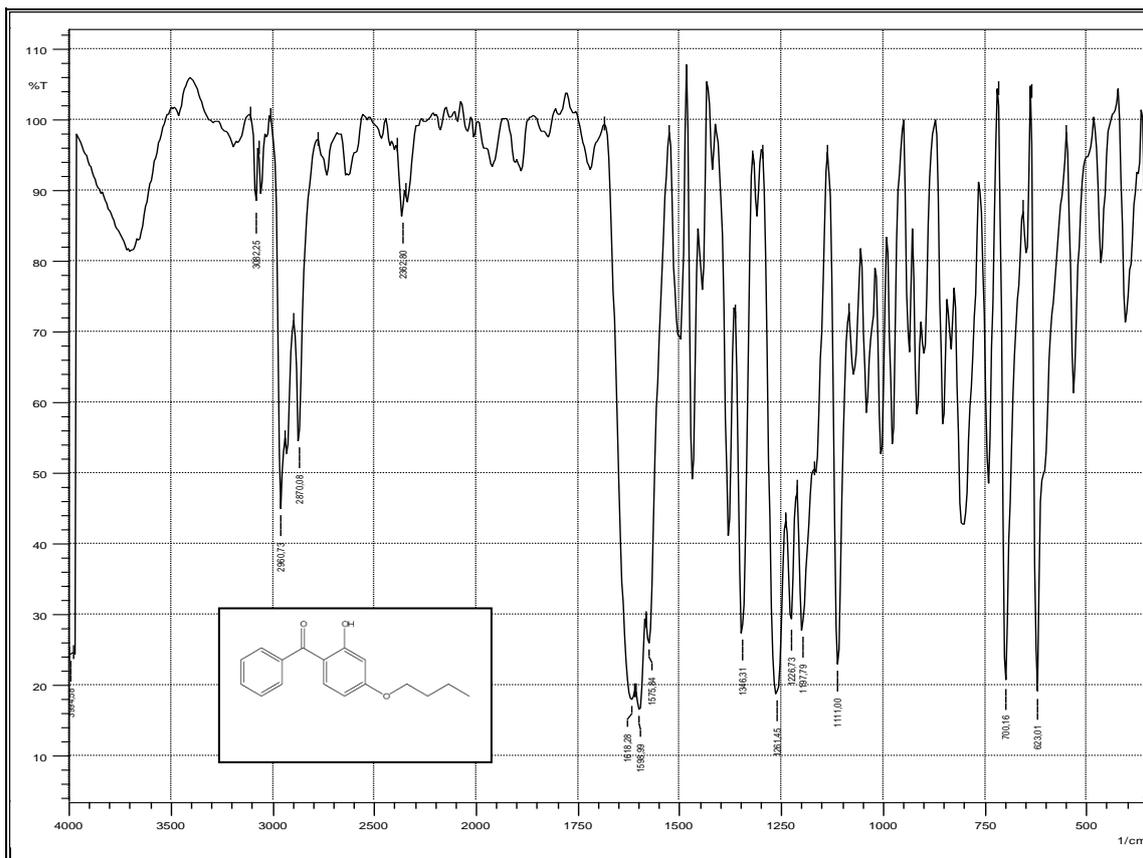


Figura 45 - Espectro de absorção na região do infravermelho de LFQM-116.

No espectro de massas (Figura 46), foram identificados os fragmentos mais importantes para elucidação estrutural deste composto, além de suas massas e intensidades relativas (Tabela 3). O pico do íon molecular do composto apresenta-se em m/z 270 e o pico base em m/z 213.

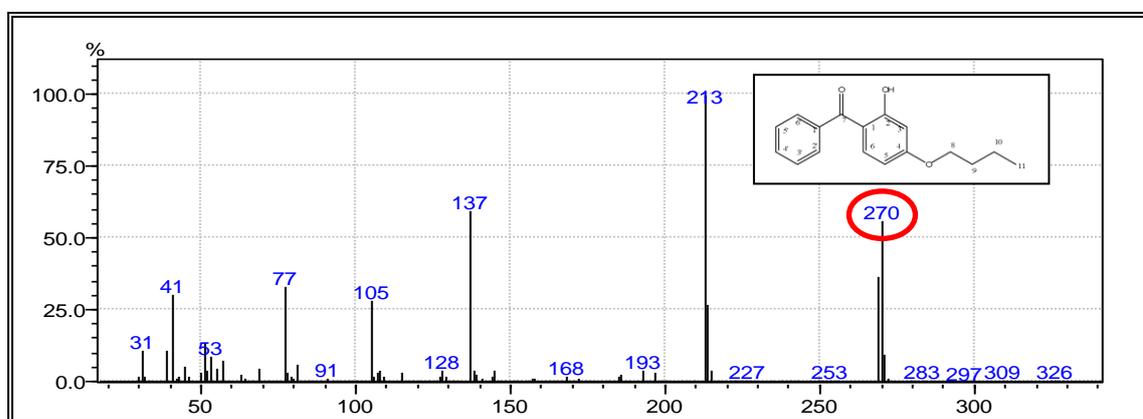


Figura 46 - Espectro de massas do derivado LFQM-116.

Tabela 3 - Principais fragmentos presente no espectro de massa do derivado LFQM-116

m/z	Fragmento	Intensidade Relativa
77	$[\text{C}_6\text{H}_5]^+$	35
105	$[\text{C}_7\text{H}_5\text{O}]^+$	25
213	$[\text{C}_{13}\text{H}_9\text{O}_3]^+$	100
270	$[\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_3]^+$	50

Pela análise do espectro de RMN de ^1H de LFQM-116 (figura 47), foi observado um sinal intenso de tripleto em δ 0,98 ppm referente ao hidrogênio metílico H-11 com $J=7,3\text{Hz}$ comprovando a modificação estrutural. Em δ 1,4 ppm foi observado sinal de sexteto referente ao hidrogênio metilênico H-10 com $J=7,2\text{ Hz}$. Um sinal de quinteto em δ 1,7 ppm referente ao H-9 com $J= 7,5\text{ Hz}$. Um sinal de tripleto em δ 4,0 ppm referente ao H-8 com $J=6,5\text{Hz}$. Um sinal de duplete em δ 6,4 ppm referente ao hidrogênio H-3 e H-5. Um sinal de duplete em δ 7,7 ppm referente ao H-6 com $J=2,4\text{ Hz}$. Um sinal de duplete em δ 7,5 ppm referente aos H-2' e H6' com $J=6,2\text{ Hz}$. Em δ 7,7 ppm um sinal de tripleto referente ao H-4 com $J= 4\text{Hz}$.

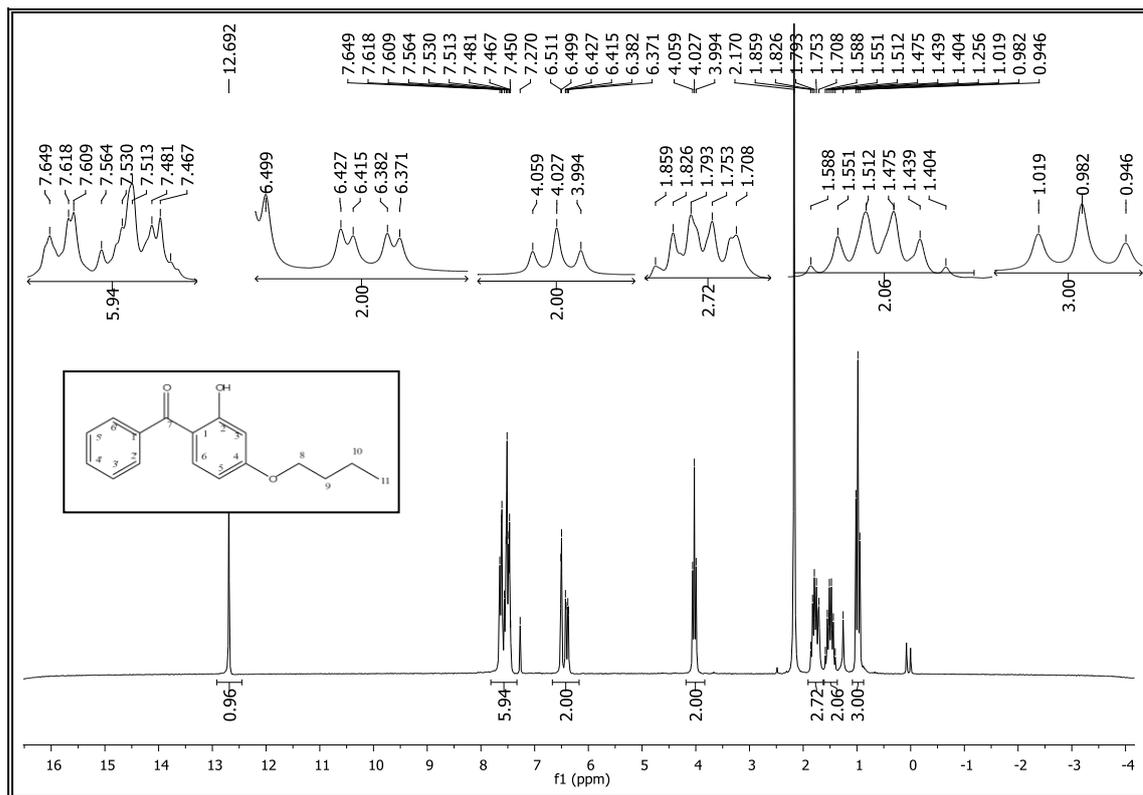


Figura 47 - Espectro de RMN de ¹H a 200 MHz de LFQM-116 (CDCl₃; 200 MHz).

No espectro de RMN de ¹³C de LFQM-116 (Figura 48) foi observado um sinal em δ 16,2 ppm referente ao grupo metílico C-11. Em δ 17,4 ppm, δ 21,8 ppm e δ 70,7 ppm indicam a presença de grupo metilênico C-10, C-9 e C-8 confirmando a modificação estrutural. Em δ 96,8 ppm foi observado o carbono C-3'. Em δ 102,7 ppm foi observado o carbono C-5'. Em δ 113,9 ppm foi observado o carbono C-1'. Em δ 130,1 ppm foram observados os carbonos C-3' e C-5' referentes. Em δ 129,7 ppm foram observados os carbonos C-2' e C-6'. Em δ 135,3 ppm foi observado o carbono C-1'. Em δ 151,2 ppm e δ 167,6 ppm foram observados os carbonos C-2 e C-4. E em δ 202,3 ppm foi observado o carbono carbonílico C 7.

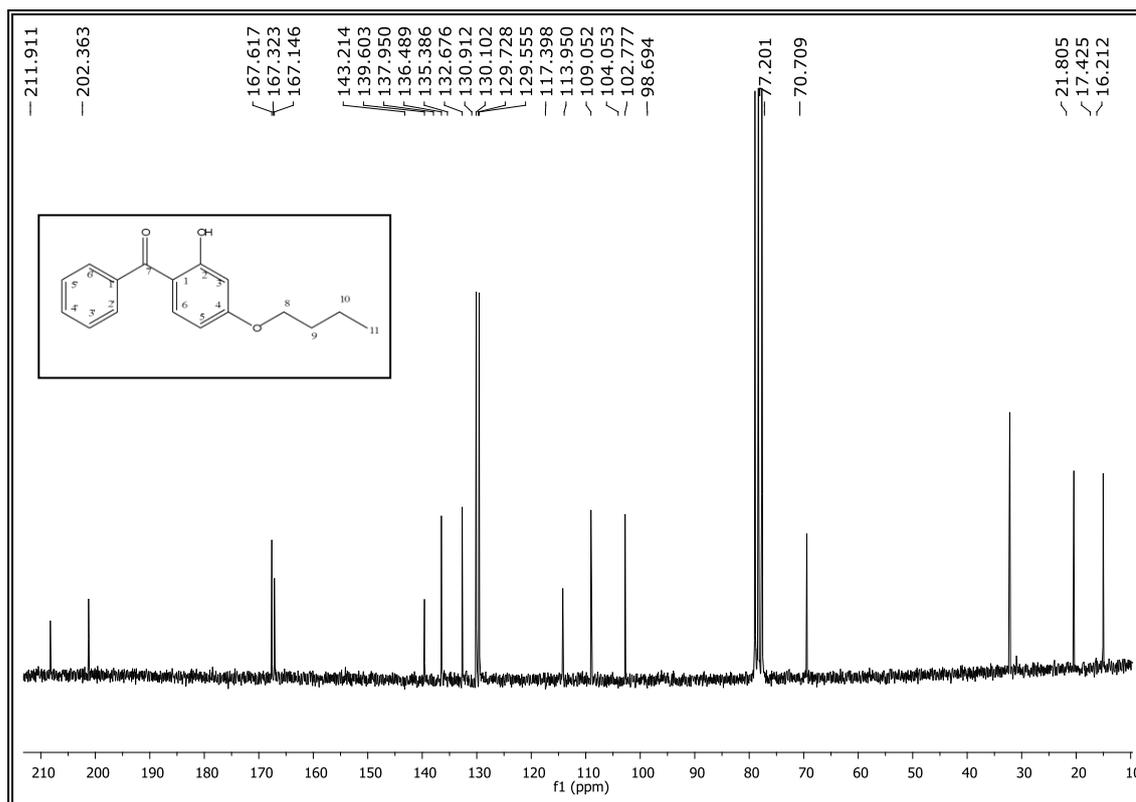


Figura 48 - Espectro de RMN de ^{13}C a 200 MHz de LFQM-116 (CDCl_3 ; 200 MHz).

6.1.3 Derivado LFQM-117 (2-hidroxi-4-preniloxibenzofenona)

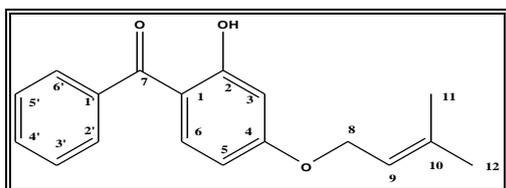


Figura 49 - Derivado sintético LFQM-117.

FM: $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_3$

MM: 282,13 g/mol

O derivado LFQM-117 foi obtido por uma reação de alquilação, pela qual reagiu-se 2,4-diidroxibenzofenona CM-A com $\text{C}_5\text{H}_9\text{Br}$ na presença de K_2CO_3 (YANG et al., 2009) (Figura 49). O produto foi obtido como um sólido amarelo (p.f. $45,6^\circ$) com rendimento de 45,6%.

O espectro no ultravioleta (UV) do LFQM-117 (Figuras 50 e 51) mostrou bandas com absorções com $\lambda_{\text{máx}}$ ($\log \epsilon\{\text{LFQM-117.L.mol}^{-1}\}$) em 322 nm (0,25), 288 nm (1,70) e 243 nm (0,22). A adição de solução de AlCl_3 a solução provoca um deslocamento batocrômico, com

absorções com $\lambda_{\text{máx}}$ ($\log \epsilon\{\text{LFQM-117.L.mol}^{-1}\}$) em 315nm (0,23), 289 nm (0,18) e 234nm(0,23), o que sugere a existência de hidroxila em um sistema quelatogênico. A adição de solução de HCl não restaurou a banda para seu estado inicial, com absorções com $\lambda_{\text{máx}}$ ($\log \epsilon\{\text{LFQM-117.L.mol}^{-1}\}$) em 314 nm (0,21), 289 nm (0,19) e 243 nm (0,23), porém ficou semelhante a curva com o aditivo AlCl_3 confirmando assim presença de grupo quelatogênico. Com a adição de NaOAc verificou-se que não houve deslocamento batocrômico com absorções nos $\lambda_{\text{máx}}$ ($\log \epsilon\{\text{LFQM-117.L.mol}^{-1}\}$) em 320 nm (0,26), 288 nm (0,17) e 242 nm (0,22), sugerindo que a hidroxila ácida (C-4) foi substituída pelo o grupamento prenila. Na presença de NaOAc/ H_3BO_3 não observou novamente desvio batocrômico em relação a solução inicial sem aditivos, com absorções com $\lambda_{\text{máx}}$ ($\log \epsilon\{\text{LFQM-117.L.mol}^{-1}\}$) em 320 nm (0,25), 288 nm (0,17) e 242nm(0,21), indicando que o grupo *para*-hidroxi no anel B encontra-se substituído pelo mesmo grupamento (MABRY,1970).

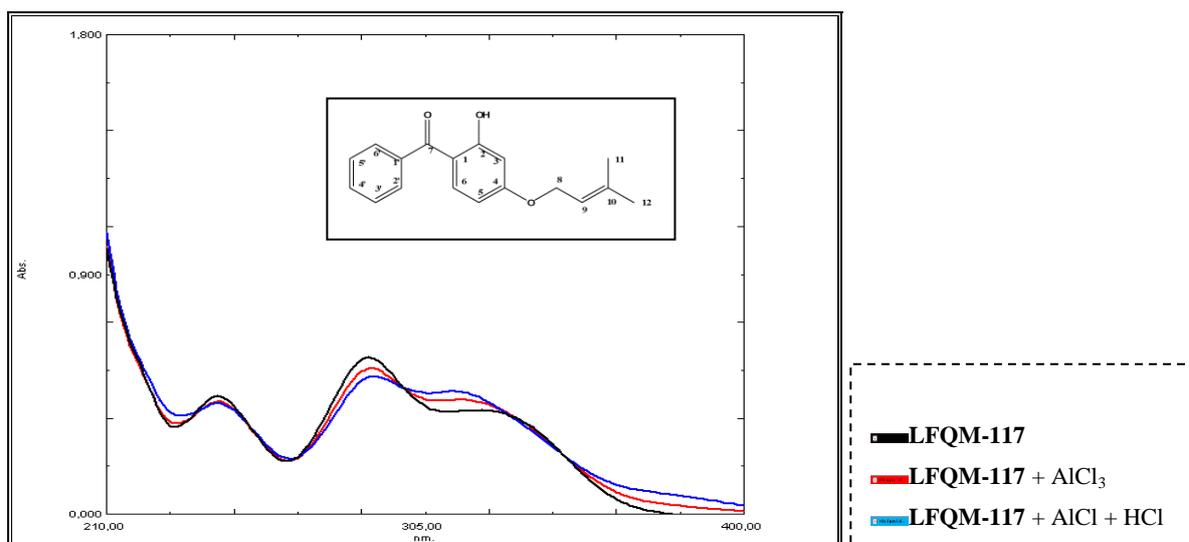


Figura 50 - Espectro no ultravioleta do composto LFQM-117 com AlCl_3 e HCl como aditivos.

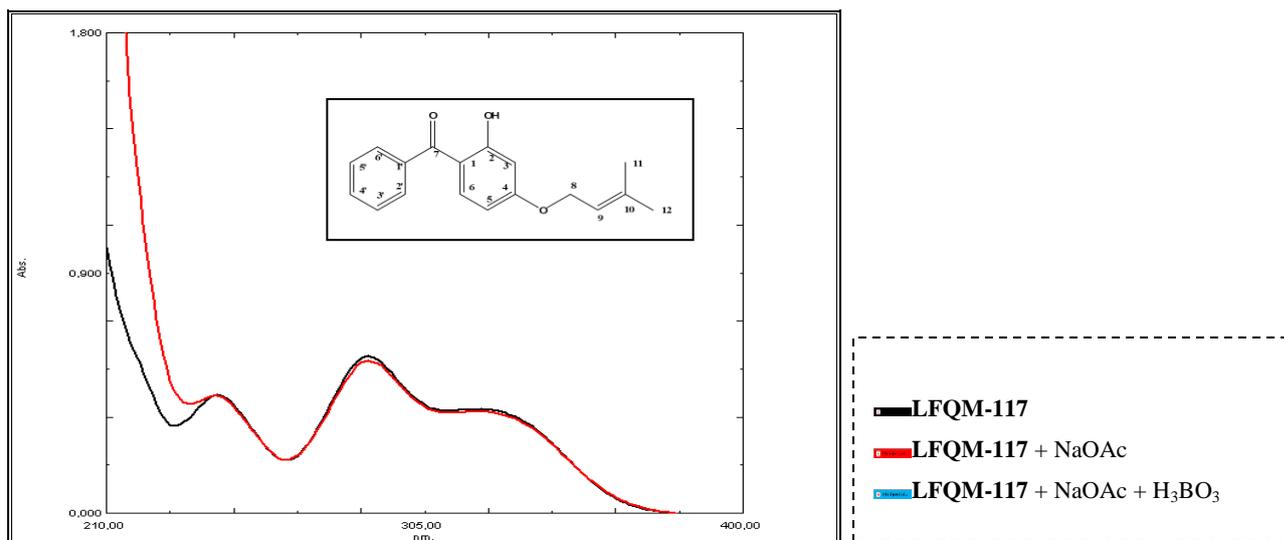


Figura 51 - Espectro no ultravioleta do composto LFQM-117 com NaOAc e H₃BO₃ como aditivos.

O espectro na região do IV (figura 52) apresenta banda forte de deformação axial em 3700 cm⁻¹, banda em 3674 cm⁻¹ característico de deformação axial de C-H de aromático e em 2929 cm⁻¹, 2914 cm⁻¹ característico de deformação axial de C-H de metila. Em 1600 cm⁻¹ banda de deformação axial C=O de carbonila. Banda forte de deformação axial em 1271 cm⁻¹ de C-O-C de éter aromático.

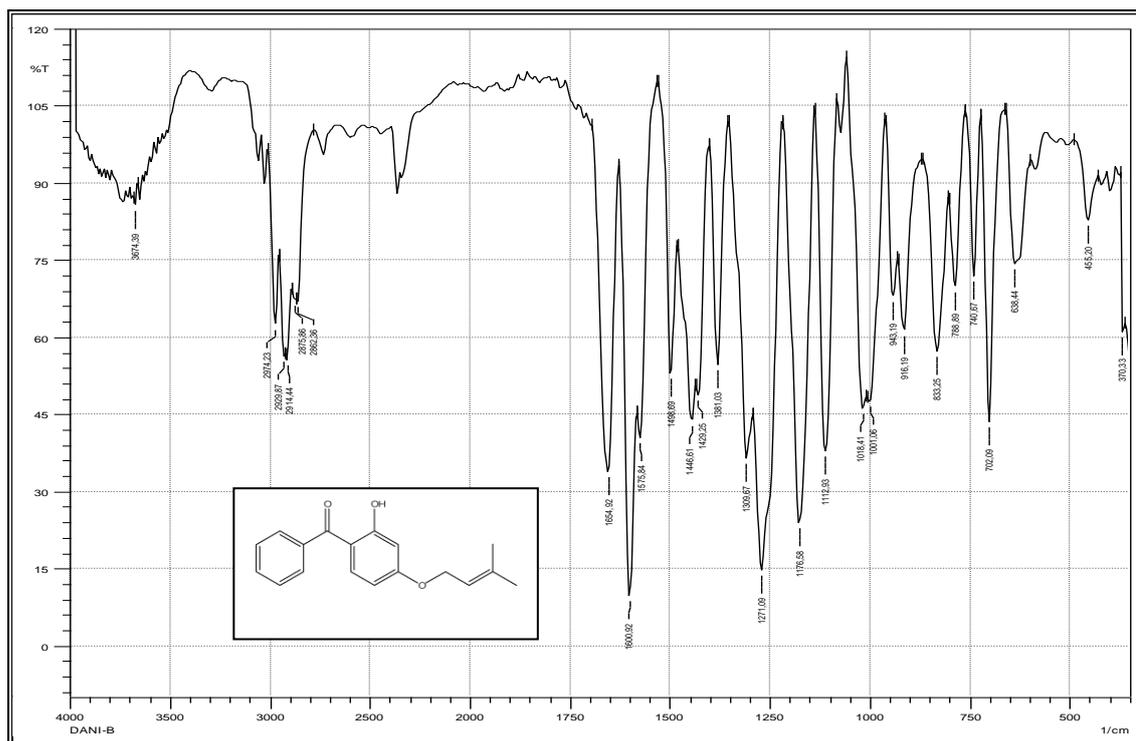


Figura 52 - Espectro de absorção na região do infravermelho de LFQM-117.

No espectro de massas (Figura 53), foram identificados os fragmentos mais importantes para elucidação estrutural deste composto, além de suas massas e intensidades relativas (Tabela 4). O pico do íon molecular do composto apresenta-se em m/z 282 (Figura 41) e o pico base em m/z 41.

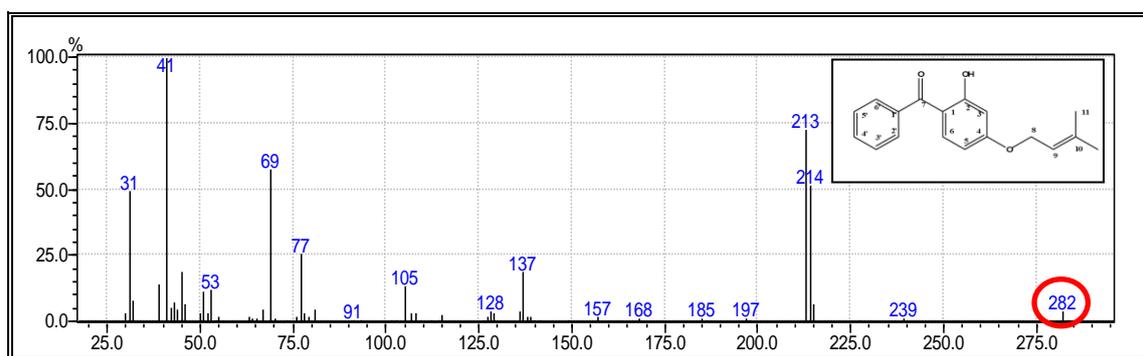


Figura 53 - Espectro de massas do derivado LFQM-117.

Tabela 4 - Principais fragmentos presente no espectro de massa do derivado LFQM-117

m/z	Fragmento	Intensidade Relativa
41	$[\text{C}_3\text{H}_5]^+$	100
69	$[\text{C}_5\text{H}_9]^+$	50
77	$[\text{C}_6\text{H}_5]^+$	5
105	$[\text{C}_7\text{H}_5\text{O}]^+$	5
213	$[\text{C}_{13}\text{H}_9\text{O}_3]^+$	60
282	$[\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_3]^+$	1

Pela análise do espectro de RMN de ^1H de LFQM-117 (figura 54), foi observado um sinal intenso de singleto em δ 1,7 ppm referente ao hidrogênio do grupo metílico H-11 e um outro singleto em δ 1,8 ppm referente ao hidrogênio do grupo metílico H-12. Em δ 4,5 ppm foi observado um sinal intenso de duplete referente ao hidrogênio metilênico H-8 com $J=6,8$ Hz. Em δ 5,4 um sinal de multiplete referente ao hidrogênio H-9 comprovando a substituição. Em δ 6,4 ppm um sinal de duplete referente aos hidrogênios H-3 com $J=2,0$ Hz. Em δ 6,5 ppm um sinal de duplete referente ao hidrogênio H-5. Em δ 6,6 ppm um sinal de duplete referente ao hidrogênio H-6. Em δ 7,5 ppm um sinal de multiplete referente ao hidrogênio H-4'. Em δ 7,6 ppm um sinal de tripleto referente ao hidrogênio H-3' e H-5' com $J= 2,9$ Hz. Em δ 7,7 ppm um sinal de duplete referente ao hidrogênio H-2' e H-6' com $J=1,6$ Hz.

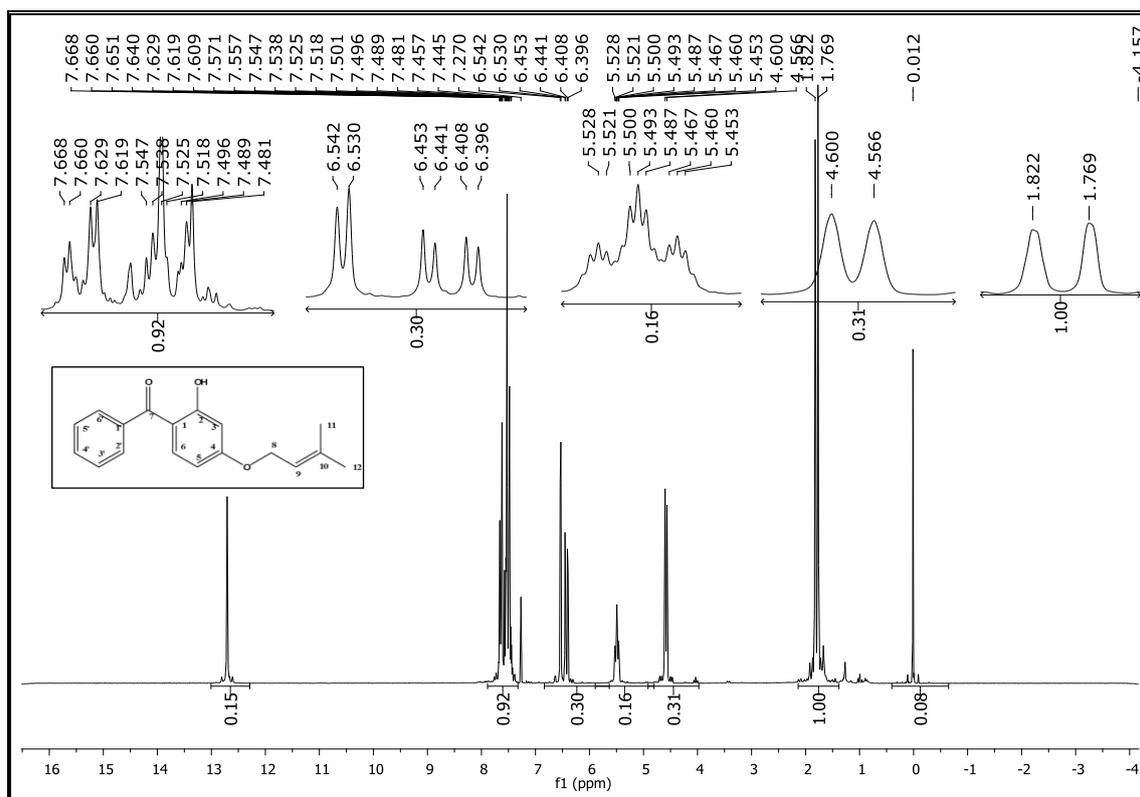


Figura 54 - Espectro de RMN de ^1H a 200 MHz de LFQM-117 (CDCl_3 ; 200 MHz).

No espectro de RMN de ^{13}C de LFQM-117 (Figura 55) observou-se sinal em δ 18,9 ppm referente ao carbono metílico C-11. Em δ 23,0 um outro sinal de carbono metilênico C-12. Em δ 66,1 ppm, δ 120,1 ppm e δ 141,9 ppm sinais referentes aos carbonos C-8, C-9 e C-10. Em δ 104,3 ppm foi observado um sinal atribuído ao carbono aromático C-3. Em δ 105,7 ppm um sinal atribuído a C-5. Em δ 110,7 ppm um sinal atribuído ao C-1, em δ 129,1 ppm um sinal atribuído aos carbonos C-3' e C-5', em δ 129,7 ppm um sinal atribuído ao carbono C-6, em δ 163,8 ppm um sinal de H-4, em δ 130,1 ppm um sinal atribuído aos carbonos C-2' e C-6', em δ 133,4 ppm um sinal atribuído ao carbono C-4' e em δ 137,4 ppm um sinal atribuído ao carbono C-7.

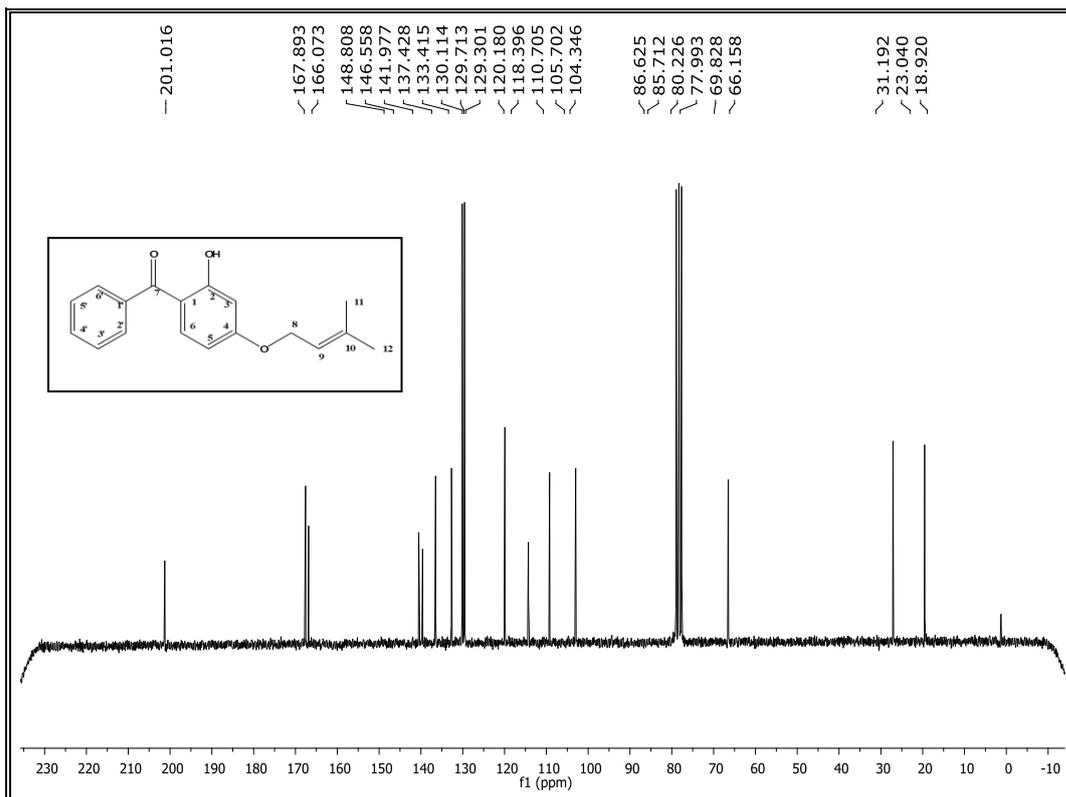


Figura 55 - Espectro de RMN de ^{13}C a 200 MHz de LFQM-117 (CDCl_3 ; 200 MHz).

6.1.4 Derivado LFQM-118 (4-metoxibenzofenona)

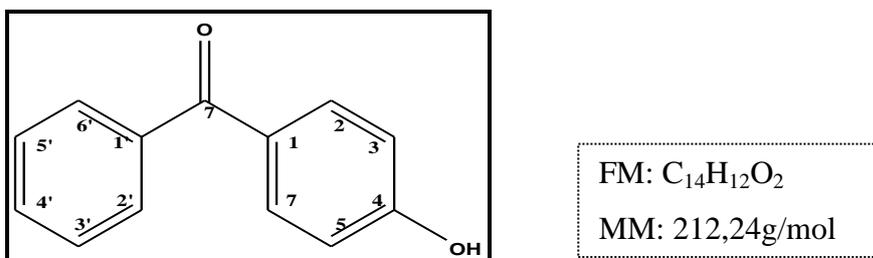


Figura 56 - Derivado sintético LFQM-118.

O derivado LFQM-118 foi obtido por uma reação de alquilação, pela qual reagiu-se 4-hidroxibenzofenona CM-B com CH_3I na presença de K_2CO_3 (YANG et al., 2009) (Figura 56). O produto foi obtido como um sólido amarelo (p.f. 65°C) com rendimento de 48,4%.

O espectro no ultravioleta (UV) do LFQM-118 (Figuras 57) mostrou bandas com absorções com $\lambda_{\text{máx}}$ ($\log \epsilon\{\text{LFQM-118.L.mol}^{-1}\}$) em 416 nm (-25), 288 nm (0,13), 252 nm (0,24), 224 nm(0,20) e 204 nm(0,09). Com a adição de NaOAc verificou-se que não houve deslocamento batocrômico com absorções nos $\lambda_{\text{máx}}$ ($\log \epsilon\{\text{LFQM-118.L.mol}^{-1}\}$) em 416 nm (-20), 285 nm (0,13), 224 nm(0,12) e 205 nm(0,06), sugerindo que a hidroxila ácida (C-4) foi substituída pelo o grupamento metila. Na presença de NaOAc/H₃BO₃ não observou novamente desvio batocrômico em relação a solução inicial sem aditivos, com absorções com $\lambda_{\text{máx}}$ ($\log \epsilon\{\text{LFQM-118.L.mol}^{-1}\}$) em 416 nm (-20), 285 nm (0,13) e 225nm (0,10) indicando que o grupo *para*-hidroxi no anel B encontra-se substituído pelo mesmo grupamento (MABRY, 1970).

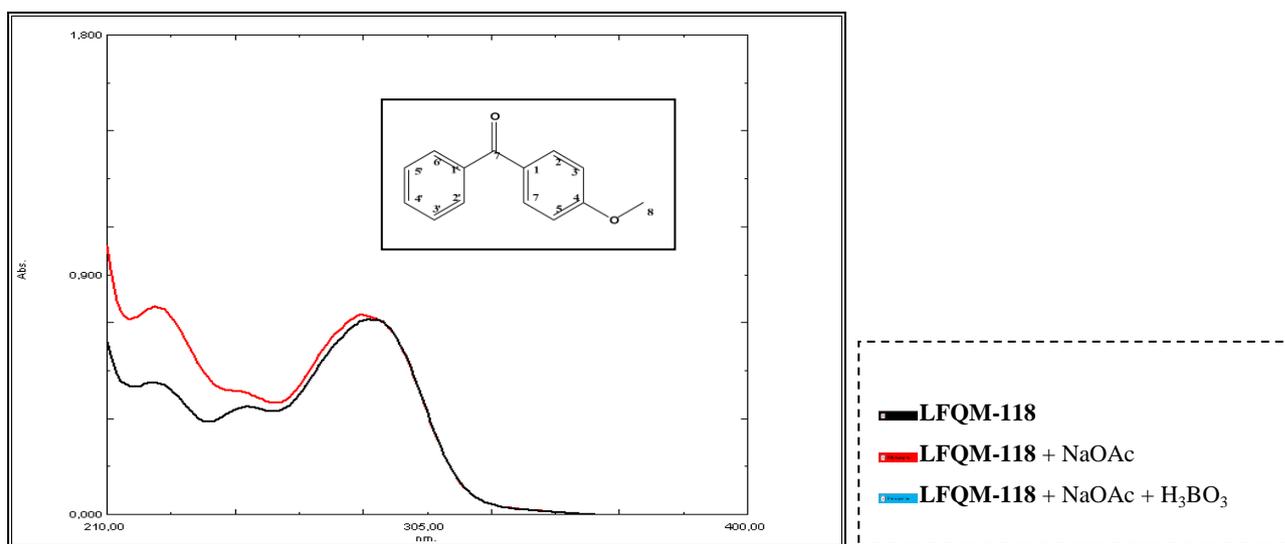


Figura 57 - Espectro no ultravioleta do composto LFQM-118 com NaOAc e H₃BO₃ como aditivos.

O espectro na região do IV (figura 58) apresenta bandas fracas em 3059 cm⁻¹ e 3014 cm⁻¹ característico de deformação axial de C-H de aromático e em 2968 cm⁻¹, 2935 cm⁻¹, 2845 cm⁻¹ característico de deformação axial de C-H de metila. Apresenta banda forte de deformação axial em 1649 cm⁻¹ de C=O de carbonila. Banda forte de deformação axial em 1259 cm⁻¹ de C-O-C de éter aromático.

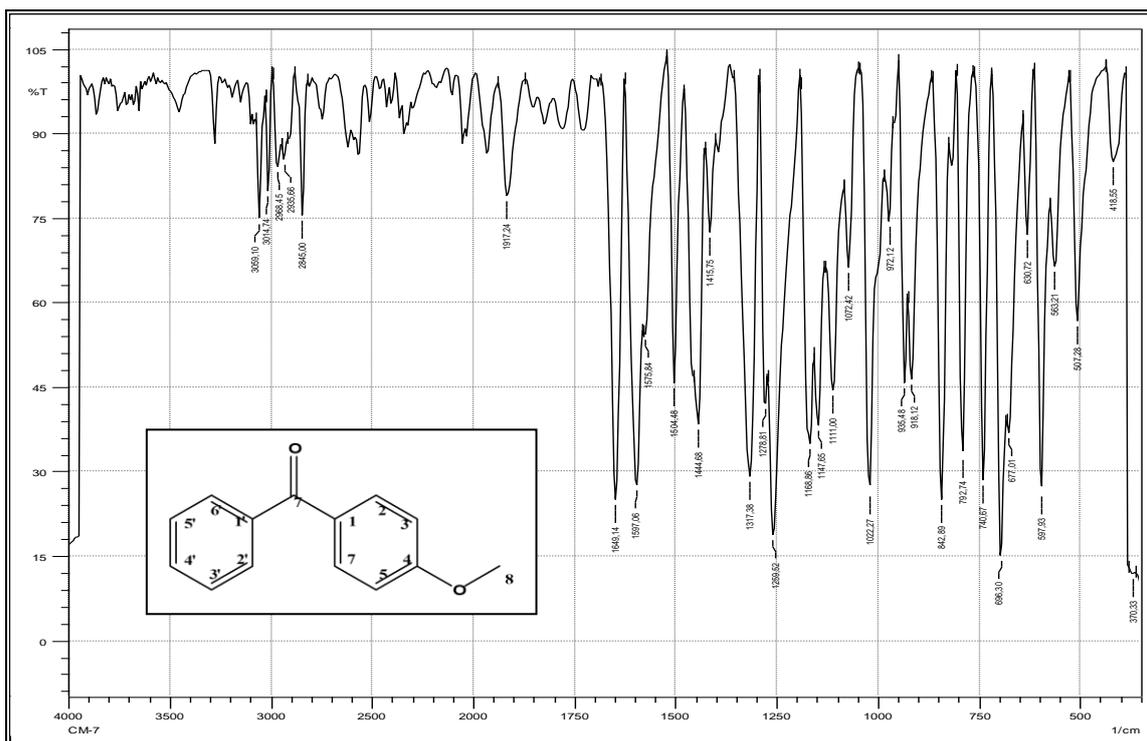


Figura 58 - Espectro de absorção na região do infravermelho de LFM-118.

No espectro de massas (Figura 59), foram identificados os fragmentos mais importantes para elucidação estrutural deste composto, além de suas massas e intensidades relativas (Tabela 4). O pico do íon molecular do composto apresenta-se em m/z 212 (Figura 59) e o pico base em m/z 41.

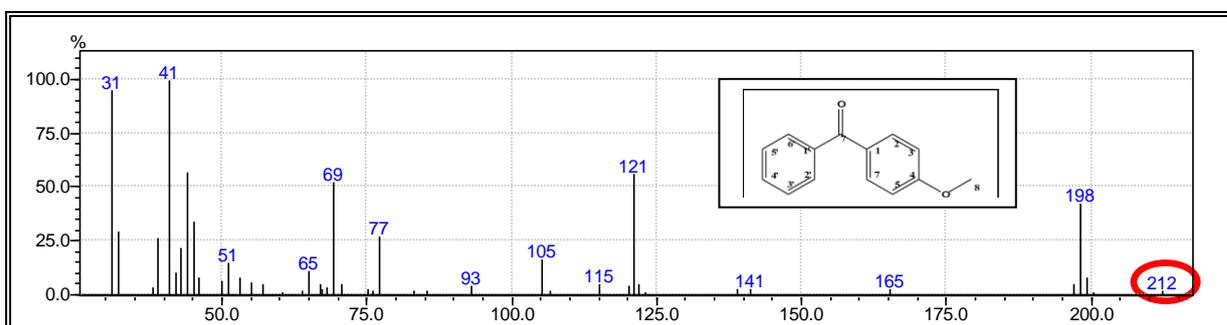
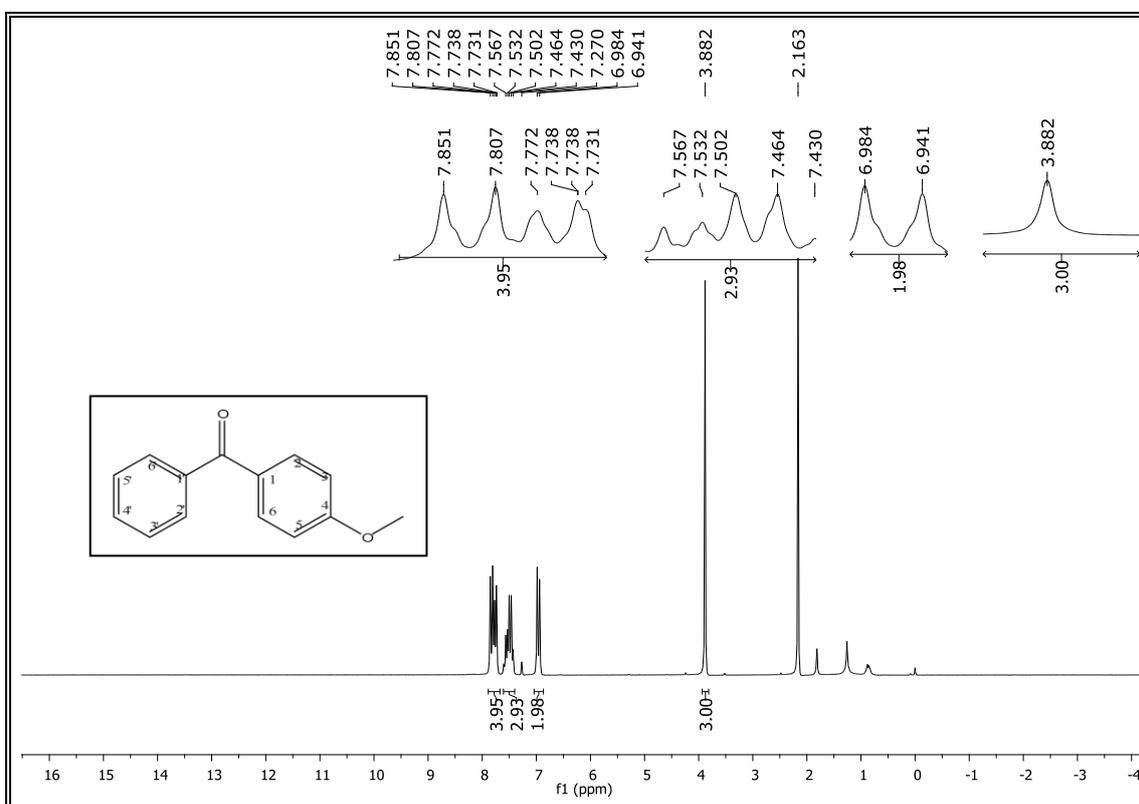


Figura 59 - Espectro de massas do derivado LFM-118.

Tabela 5 - Principais fragmentos presente no espectro de massa do derivado LFQM-118

m/z	Fragmento	Intensidade Relativa
121	$[C_7H_5O_2]^+$	55
31	$[C_7H_5O]^+$	90
41	$[C_3H_5]^+$	100
212	$[C_{14}H_{12}O_2]^+$	12

Pela análise do espectro de RMN de 1H de LFQM-118 (figura 60) foi observado um singleto intenso em δ 3,8 ppm referente aos hidrogênios metílicos H-8, comprovando a modificação estrutural. O duplete em δ 6,9 ppm com $J=8,6Hz$ é referente aos hidrogênios aromáticos H-3 e H-5 do anel B. Um sinal de duplete em δ 7,4 ppm foi atribuído aos hidrogênios H-2 e H-6 com $J=6,8Hz$. Em δ 7,5 ppm um sinal de tripleto referente aos hidrogênios H-3' e H-5' com $J=6,5 Hz$. E em δ 7,8 ppm um tripleto referente ao hidrogênio H-4' com $J= 8,8 Hz$.

Figura 60 - Espectro de RMN de 1H a 200 MHz de LFQM-118 ($CDCl_3$; 200 MHz).

No espectro de RMN de ^{13}C de LFQM-118 (Figura 61) foi observado um sinal em δ 56,9 ppm referente ao carbono metilênico C-8. Em δ 117,7 ppm foi observado um sinal atribuído aos carbonos C-3' e C-5'. Em δ 129,2 ppm um sinal para os carbonos C-2 e C-6. Em δ 131,4 ppm um sinal para os carbonos C-2' e C-6'. Em δ 138,7 ppm um sinal para o carbono C-4'. Em δ 143,5 ppm um sinal para o carbono C-1'. Em δ 169,4 ppm um sinal do carbono aromático C-4. E em δ 201,5 ppm um sinal para o carbono carbonílico C-7.

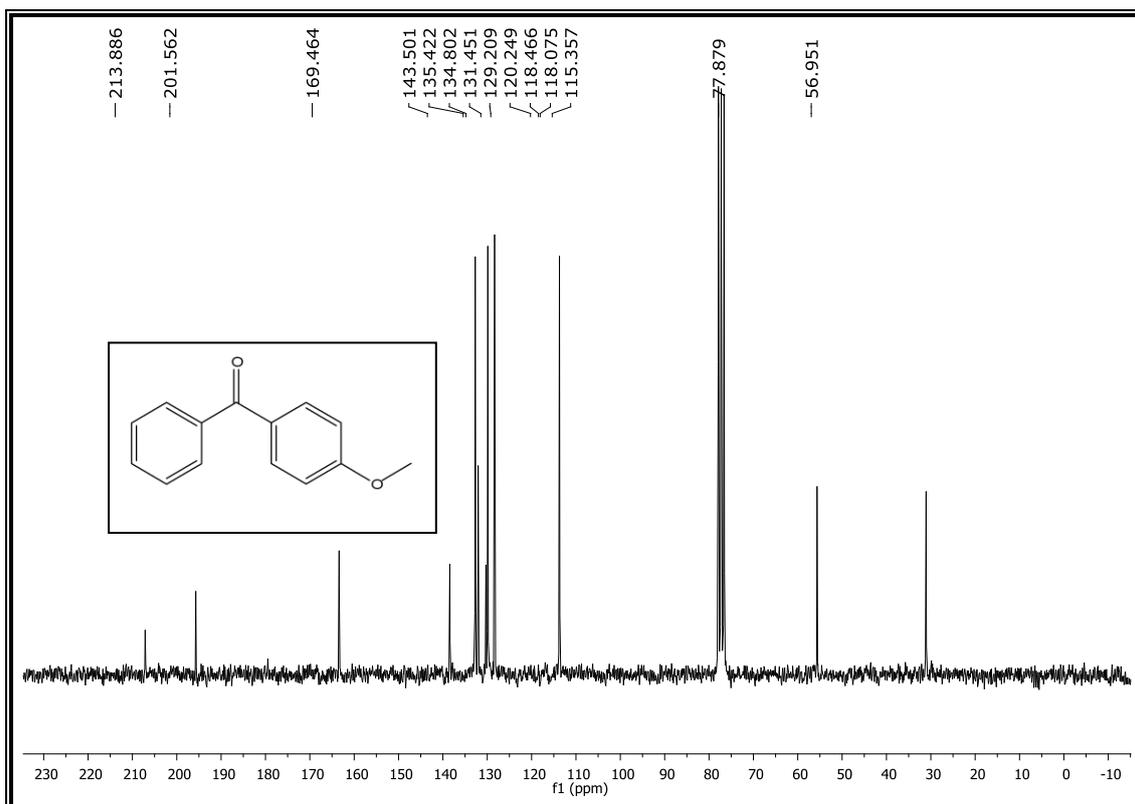


Figura 61 - Espectro de RMN de ^{13}C a 200 MHz de LFQM-118 (CDCl_3 ; 200 MHz).

6.1.5 Derivado LFQM-119 (4-butoxibenzofenona)

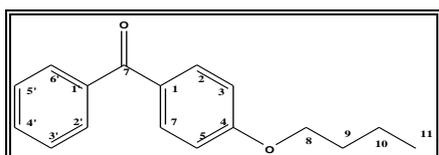


Figura 62 - Derivado sintético LFQM-119.

FM: $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_2$

MM: 254,13 g/mol

O derivado LFQM-119 foi obtido por uma reação de alquilação, pela qual reagiu-se 4-hidroxibenzofenona CM-B com C_4H_9Br na presença de K_2CO_3 (YANG et al., 2009) (Figura 62). O produto foi obtido como um sólido amarelo (p.f.179° C) com rendimento de 63,3%.

O espectro no ultravioleta (UV) do LFQM-119 (Figuras 63) mostrou bandas com absorções com $\lambda_{m\acute{a}x}$ ($\log \epsilon\{LFQM-119.L.mol^{-1}\}$) em 415 nm (-0,0004), 292nm (0,09), 251 nm (0,04), 225 nm(0,06) e 204 nm(0,13). Com a adição de NaOAc verificou-se que não houve deslocamento batocrômico com absorções nos $\lambda_{m\acute{a}x}$ ($\log \epsilon\{LFQM-119.L.mol^{-1}\}$) em 416 nm (-0,0005), 290 nm (0,09), 226 nm (0,09) e 204 nm (0,2), sugerindo que a hidroxila ácida (C-4) foi substituída pelo o grupamento butila. Na presença de NaOAc/ H_3BO_3 não observou novamente desvio batocrômico em relação a solução inicial sem aditivos, com absorções com $\lambda_{m\acute{a}x}$ ($\log \epsilon\{LFQM-119.L.mol^{-1}\}$) em 416 nm (-0,0004), 286 nm (0,09), 225 nm (0,10) e 205 nm (0,24) indicando que o grupo *para*-hidroxi no anel B encontra-se substituído pelo mesmo grupamento (MABRY, 1970).

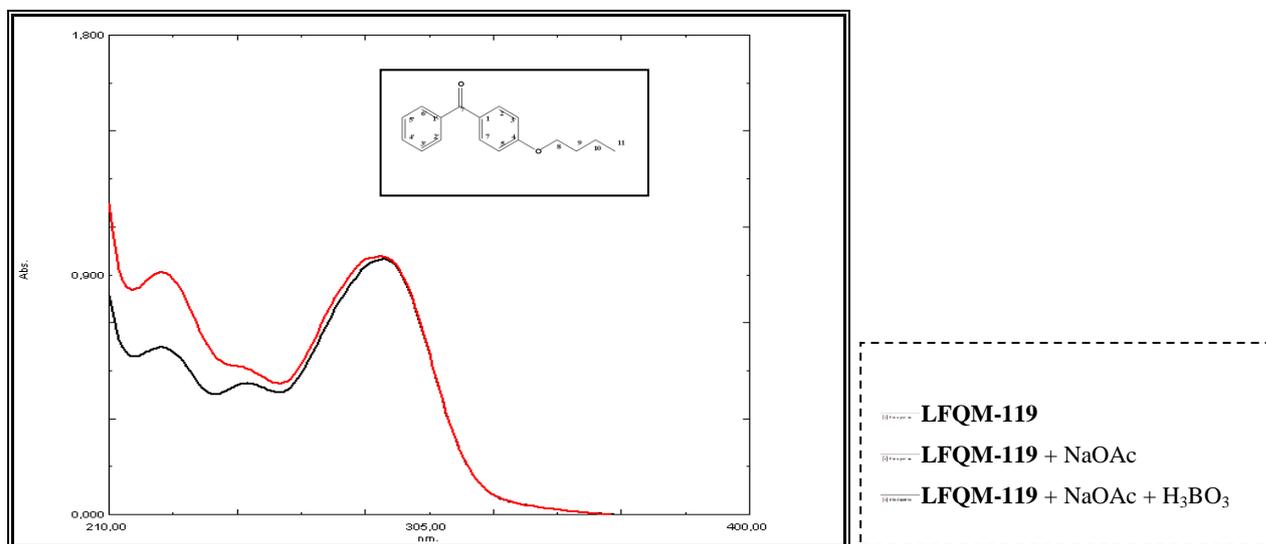


Figura 63 - Espectro no ultravioleta do composto LFQM-119 com NaOAc e H_3BO_3 como aditivos.

O espectro na região do IV (figura 64) apresenta banda fraca em 3057 cm^{-1} característico de deformação axial de C-H de aromático e em 2970 cm^{-1} característico de

deformação axial de C-H de metila. Apresenta banda forte de deformação axial em 1649 cm^{-1} de C=O de carbonila. Banda forte de deformação axial em 1259 cm^{-1} de C-O-C de éter aromático.

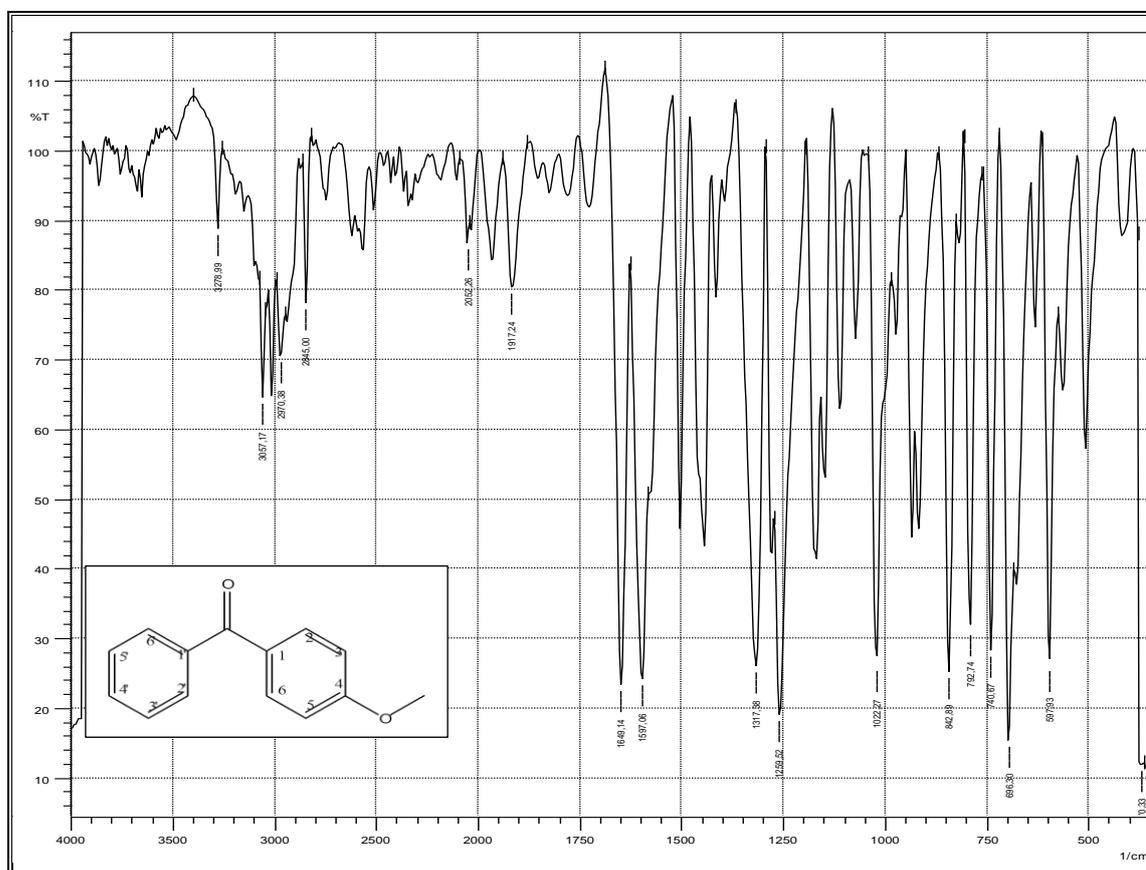


Figura 64 - Espectro de absorção na região do infravermelho de LFQM-119.

No espectro de massas (Figura 65), foram identificados os fragmentos mais importantes para elucidação estrutural deste composto, além de suas massas e intensidades relativas (Tabela 5). O pico do íon molecular do composto apresenta-se em m/z 254 (Figura 65) e o pico base em m/z 121.

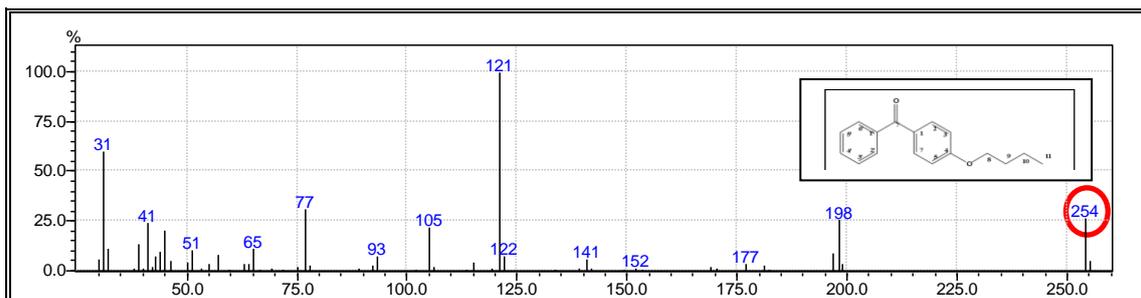


Figura 65 - Espectro de massas do derivado LFQM-119.

Tabela 6 - Principais fragmentos presente no espectro de massa do derivado LFQM-119

m/z	Fragmento	Intensidade Relativa
77	$[C_6H_5]^+$	30
105	$[C_7H_5O]^+$	25
121	$[C_7H_5O_2]^+$	100
254	$[C_{15}H_{14}O_3]^+$	25

Pela análise do espectro de RMN de 1H de LFQM-119 (figura 66), foi observado um sinal intenso de tripleto em δ 1,0 ppm referente ao hidrogênio metílico H-11 com $J=7,3Hz$. Em δ 1,5 ppm foi observado sinal de sexteto em referente ao hidrogênio metilênico H-10 com $J=7,2 Hz$. Um sinal de quinteto em 1,7 ppm referente ao H-9 com $J=8Hz$. Um sinal de tripleto em 4,0 ppm referente ao H-8 com $J=6,5Hz$, comprovando a modificação estrutural. Um sinal de duplete em 6,9 ppm referente aos hidrogênios H-3 e H-5 com $J=8,8 Hz$. Um sinal de duplete em 7,7 ppm referente aos hidrogênios H-2 e H-6 do anel aromático B com $J=2,4 Hz$. Um sinal de duplete em 7,5 ppm referente aos H-2' e H6' com $J=7,4 Hz$ do anel aromático A. Em 7,4 ppm um sinal de tripleto referente aos H-3' e H-5' com $J= 7,1 Hz$. E em δ 7,5 ppm um sinal de tripleto referente ao H-4' com $J=6,5 Hz$.

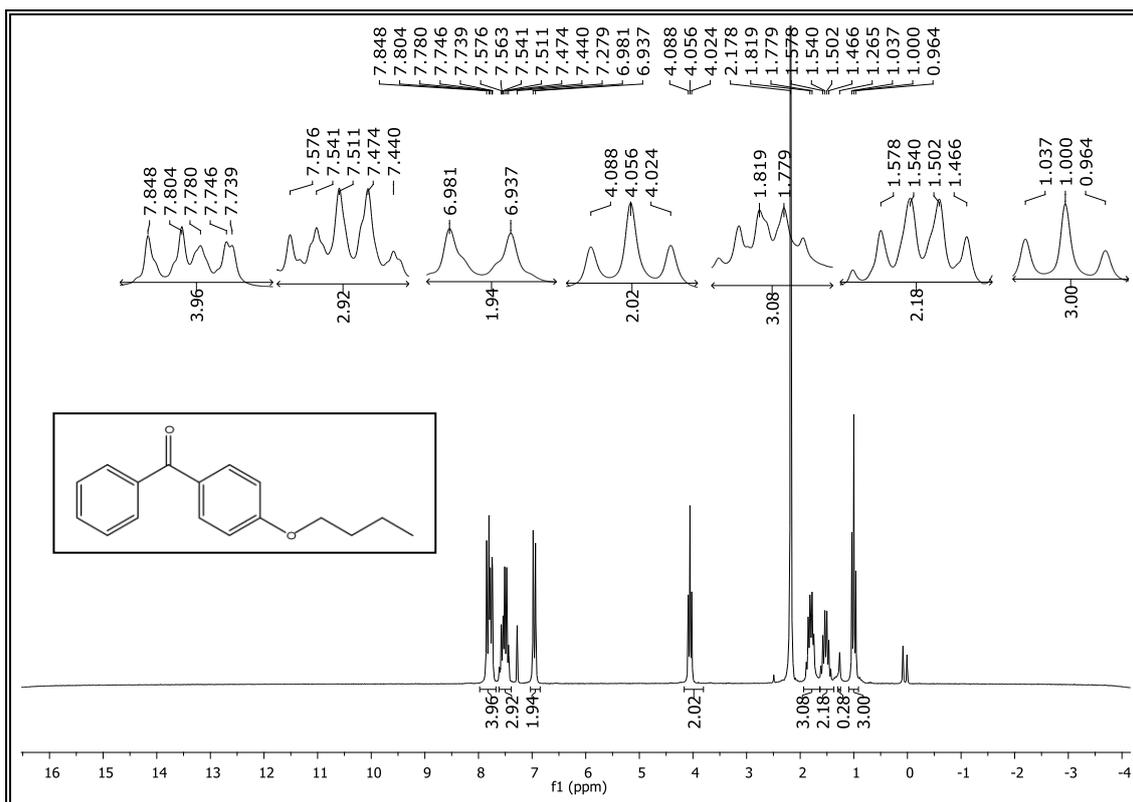


Figura 66 - Espectro de RMN de ¹H a 200 MHz de LFQM-119 (CDCl₃; 200 MHz).

No espectro de RMN de ¹³C de LFQM-119 (Figura 67) foi observado um sinal em δ 14,3ppm referente ao grupo metílico C-11. Em δ 20,4 ppm, δ 32,4 ppm e δ 66,9 ppm indicam a presença de grupo metilênico C-10, C-9 e C-8 confirmando a modificação estrutural. Em δ 115,2 ppm foram observados os carbonos C-3 e C-5. Em δ 129,4 ppm foram observados os carbonos C-2 e C-6. Em δ 130,9 ppm foram observados os carbonos C-3' e C-5'. Em δ 132,8 ppm foi observado os carbonos C-4'. Em δ 133,6 ppm foi observado o carbono C-1'. Em δ 166,4 ppm foi observado o carbono C-4. Em δ 195,5 foi observado o carbono carbonílico C-7.

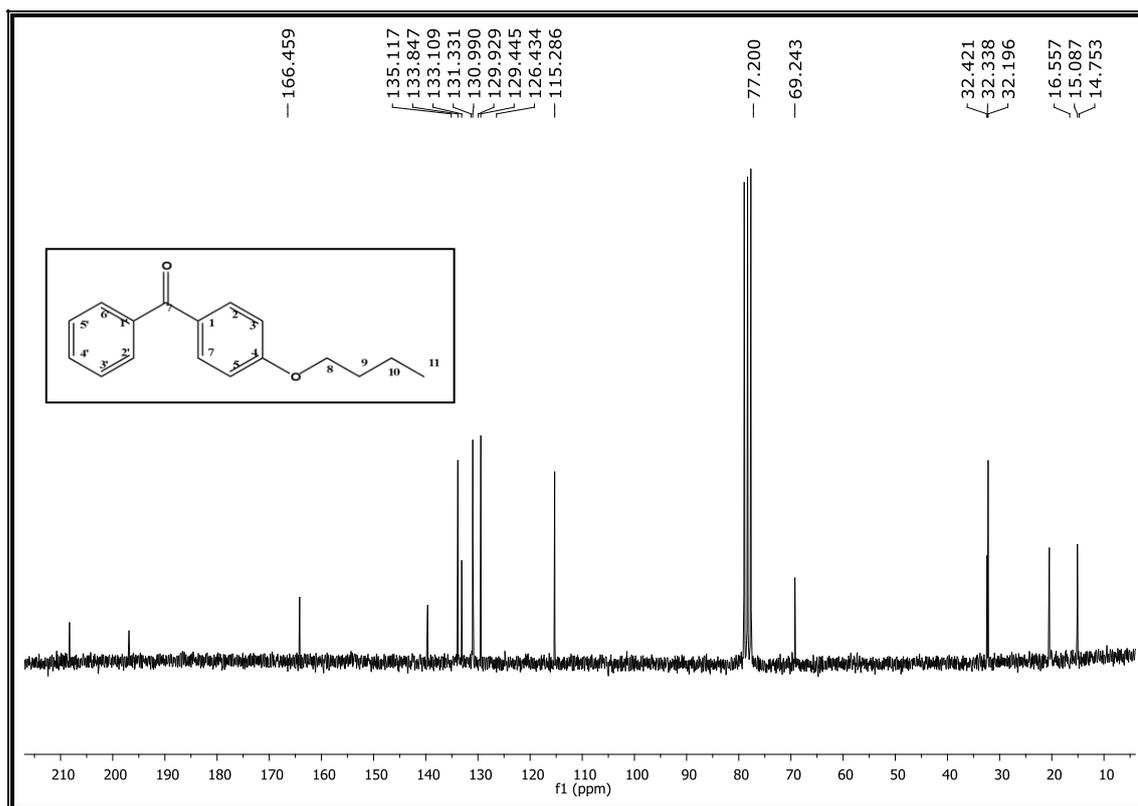
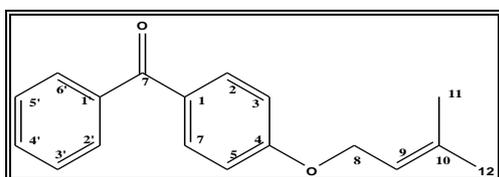


Figura 67 - Espectro de RMN de ^{13}C a 200 MHz de LFQM-119(CDCl_3 ; 200 MHz).

6.1.6 Derivado LFQM-120 (4-preniloxibenzofenona)



FM: $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_2$

MM: 266,33g/mol

Figura 68 - Derivado sintético LFQM-120.

O derivado LFQM-120 foi obtido por uma reação de alquilação, pela qual reagiu-se 4-hidroxibenzofenona CM-B com $\text{C}_5\text{H}_9\text{Br}$ na presença de K_2CO_3 (YANG et al., 2009) (Figura 62). O produto foi obtido como um sólido amarelo (p.f. 68°C) com rendimento de 51,5%.

O espectro no ultravioleta (UV) do LFQM-120 (Figura 69) mostrou bandas com absorções com $\lambda_{\text{máx}}$ ($\log \epsilon\{\text{LFQM-120.L.mol}^{-1}\}$) em 416 nm (0,0005), 290 nm (0,02) e 250 nm (0,01). Com a adição de NaOAc verificou-se que não houve deslocamento batocrômico com absorções nos $\lambda_{\text{máx}}$ ($\log \epsilon\{\text{LFQM-120.L.mol}^{-1}\}$) em 416 nm (-0,0005), 288 nm (0,02),

225nm(0,03) e 204 nm(0,1), sugerindo que a hidroxila ácida (C-4) foi substituída pelo o grupamento butila. Na presença de NaOAc/H₃BO₃ não observou novamente desvio batocrômico em relação a solução inicial sem aditivos, com absorções com $\lambda_{\text{máx}}$ ($\log \epsilon\{\text{LFQM-120.L.mol}^{-1}\}$) em 416 nm (-0,0004), 287 nm (0,02), 226nm (0,03) e 204nm (0,09) indicando que o grupo *para*-hidroxi no anel B encontra-se substituído pelo mesmo grupamento (MABRY, 1970).

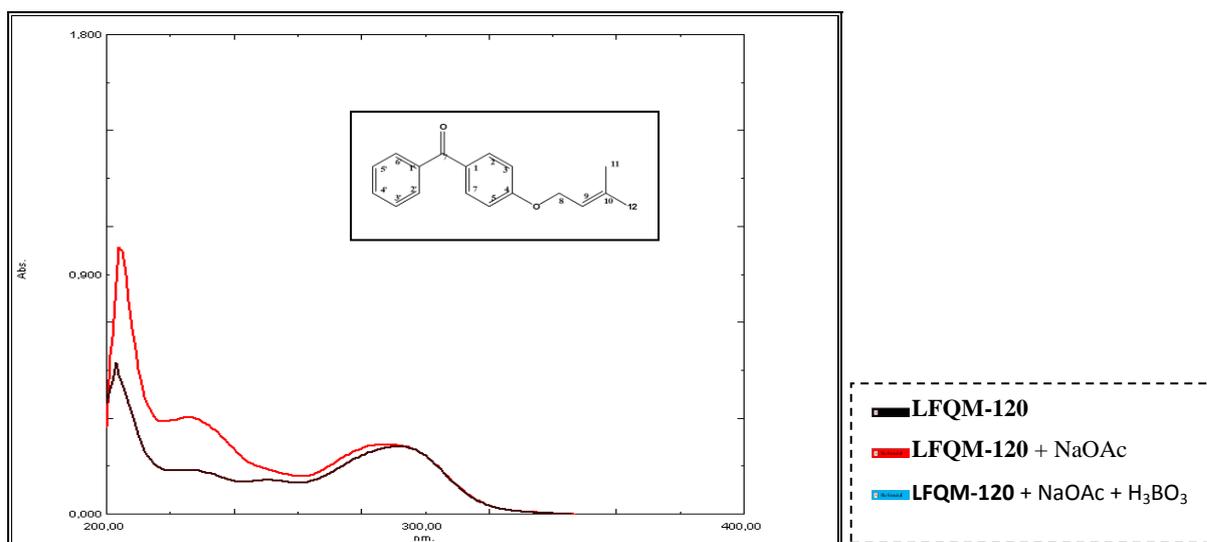


Figura 69 - Espectro no ultravioleta do composto LFQM-120 com NaOAc e H₃BO₃ como aditivos.

O espectro na região do IV (figura 70) apresenta banda fraca em 3061 cm⁻¹ característico de deformação axial de C-H de aromático e em 2976 cm⁻¹, 2943 cm⁻¹ característico de deformação axial de C-H de metila. Apresenta banda forte de deformação axial em 1598 cm⁻¹ de C=O de carbonila. Banda forte de deformação axial em 1255 cm⁻¹ de C-O-C de éter aromático.

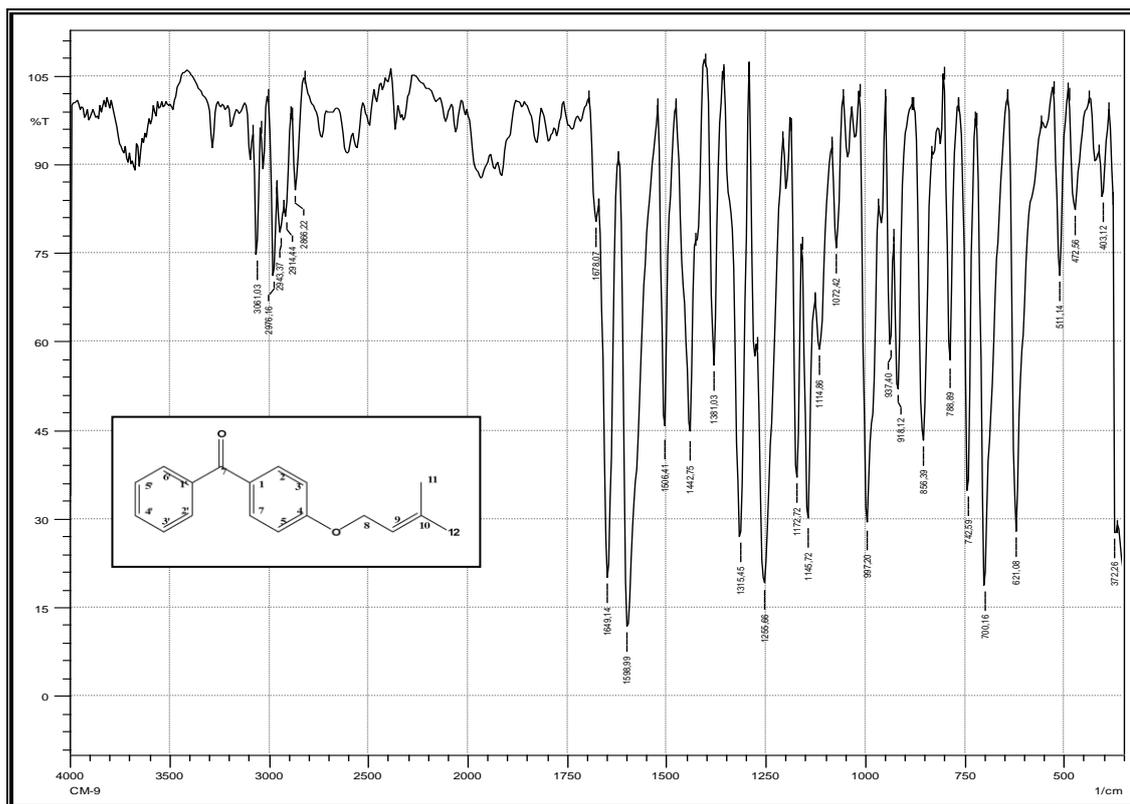


Figura 70 - Espectro de absorção na região do infravermelho de LFQM-120.

No espectro de massas (Figura 71), foram identificados os fragmentos mais importantes para elucidação estrutural deste composto, além de suas massas e intensidades relativas (Tabela 6). O pico do íon molecular do composto apresenta-se em m/z 266 (Figura 71) e o pico base em m/z 41.

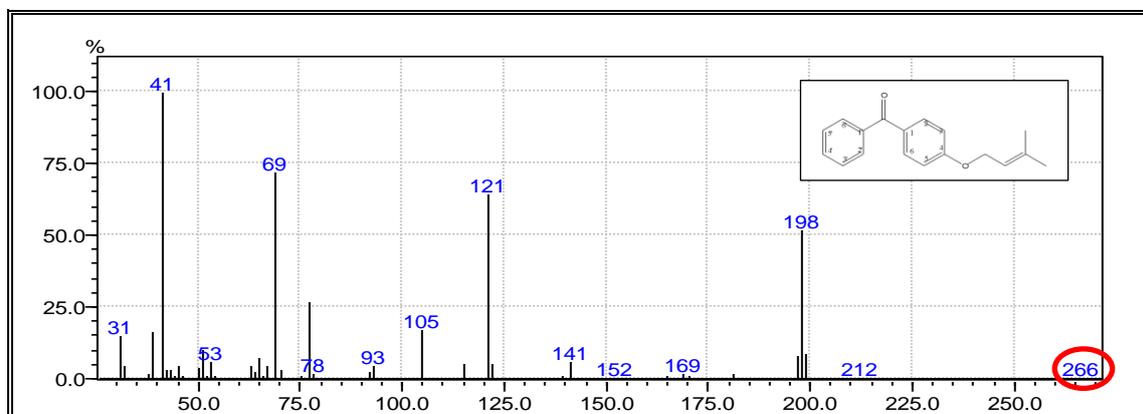


Figura 71 - Espectro de massas do derivado LFQM-120.

Tabela 7 - Principais fragmentos presente no espectro de massa do derivado LFQM-120

m/z	Fragmento	Intensidade Relativa
41	$[\text{C}_3\text{H}_5]^+$	15
69	$[\text{C}_5\text{H}_9]^+$	73
105	$[\text{C}_7\text{H}_5\text{O}]^+$	20
121	$[\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_2]^+$	65
266	$[\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_2]^+$	1

Pela análise do espectro de RMN de ^1H de LFQM-120 (figura 72), foi observado um sinal intenso de singlete em δ 1,7 ppm referente ao hidrogênio do grupo metílico H-11 ou H-12. Em δ 4,5 ppm foi observado um sinal intenso de duplete referente ao hidrogênio metilênico H-8 com $J=6,8$ Hz. Em δ 5,5 um sinal de tripleto referente ao hidrogênio H-9 com $J=3,3$ Hz comprovando a substituição. Em δ 6,9 ppm um sinal de duplete referente aos hidrogênios H-3 e H-5 do anel aromático com $J=8,8$ Hz. Em δ 7,4 ppm um sinal de duplete referente ao hidrogênio H-2 e H-6 do anel aromático com $J=7,2$ Hz. Em δ 7,5 ppm um sinal de duplete referente ao hidrogênio H-2' e H-6' do anel aromático com $J=7,2$ Hz. Em δ 7,7 ppm um sinal de tripleto referente ao hidrogênio H-4' com $J=3,3$ Hz. E em $\delta =7,5$ ppm um sinal de duplete referente aos hidrogênios H-3 e H-5 referentes aos hidrogênios do anel aromático com $J=7,2$ Hz.

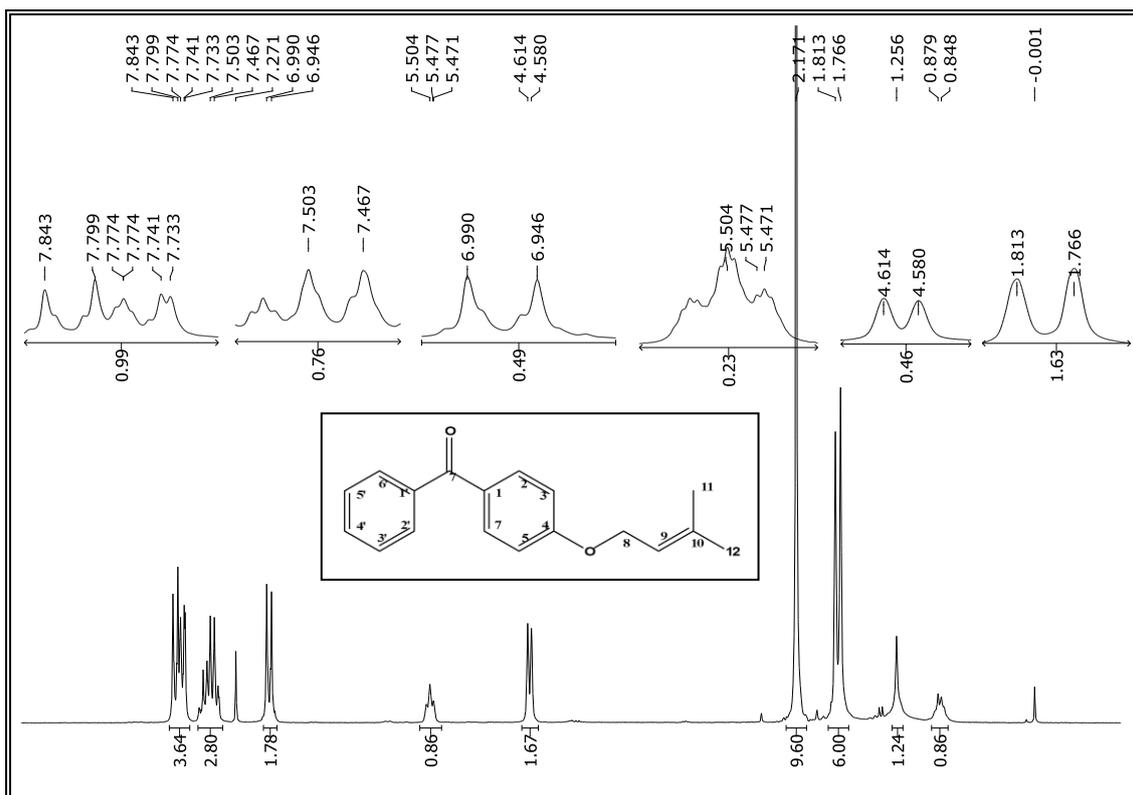


Figura 72 - Espectro de RMN de ^1H a 200 MHz de LFQM-120 (CDCl_3 ; 200 MHz).

No espectro de RMN de ^{13}C de LFQM-120 (Figura 73) observou-se sinal em δ 19,5ppm referente ao carbono metílico C-11. Em δ 27,1 um outro sinal de carbono metilênico C-12. Em δ 66,3 ppm, δ 120,2 ppm e δ 139,1 ppm sinais referentes aos carbonos C-8, C-9 e C-10. Em δ 115,5 ppm foi observado um sinal atribuído aos carbonos aromáticos C-3 e C-5, em δ 129,4 ppm um sinal atribuído a C-2, C-6 em δ 133,0 ppm um sinal atribuído ao C-1 em δ 131,2 ppm um sinal atribuído aos carbonos C-2' e C-6, em δ 133,1 ppm ao carbono C-4', em δ 163,8 ppm um sinal de H-4 e em δ 195,9 ppm um sinal de C-7 referente ao carbono carbonílico.

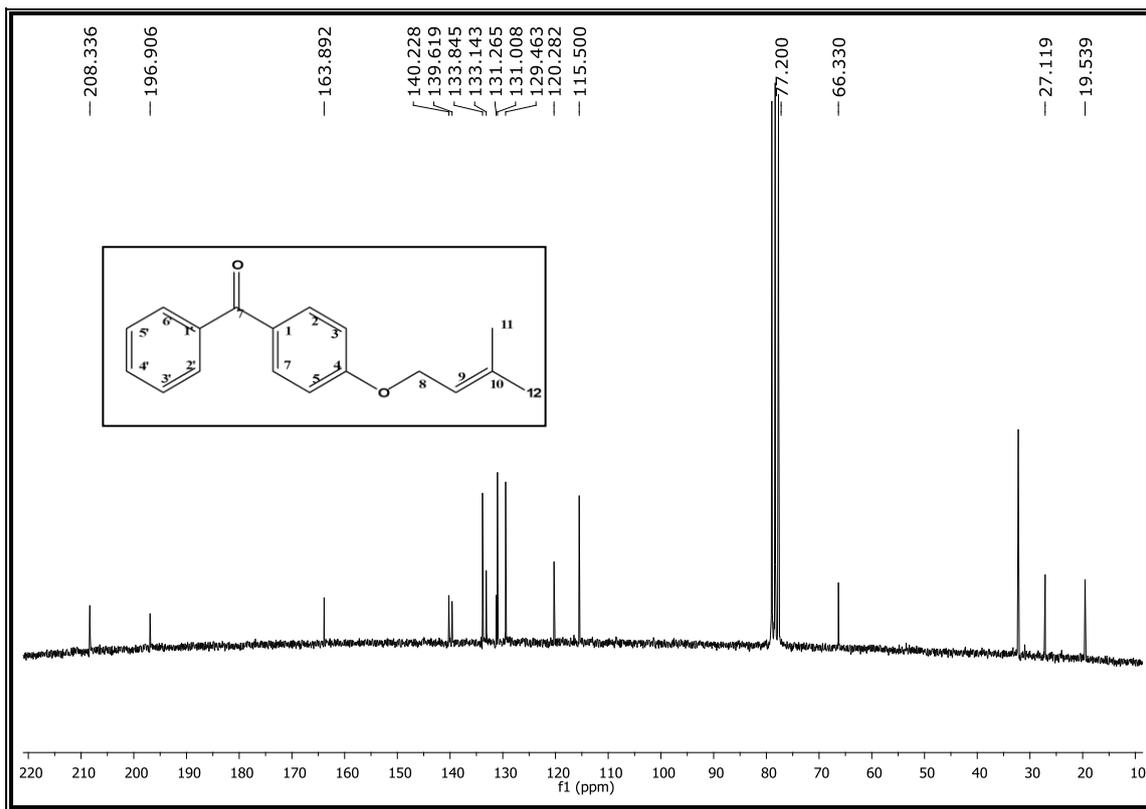


Figura 73 - Espectro de RMN de ^{13}C a 200 MHz de LFQM-120 (CDCl_3 ; 200 MHz).

6.1.7 Derivado LFQM-121 (4,4'-dimetoxibenzofenona)

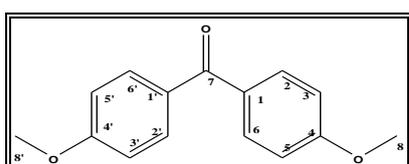


Figura 74 - Derivado sintético LFQM-121.

FM: $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_3$

MM: 242 g/mol

O derivado LFQM-121 foi obtido por uma reação de alquilação, pela qual reagiu-se 4,4'-diidroxibenzofenona CM-C com CH_3I na presença de K_2CO_3 (YANG et al., 2009) (Figura 62). O produto foi obtido como um sólido amarelo (p.f. 183°C) com rendimento de 90,6%.

O espectro na região do IV (Figura 66) apresenta banda fraca em 3057 cm^{-1} característico de deformação axial de C-H de aromático e em 2970 cm^{-1} característico de deformação axial de C-H de metila. Apresenta banda forte de deformação axial em 1649 cm^{-1}

de C=O de carbonila. Banda forte de deformação axial em 1259 cm^{-1} de C-O-C de éter aromático.

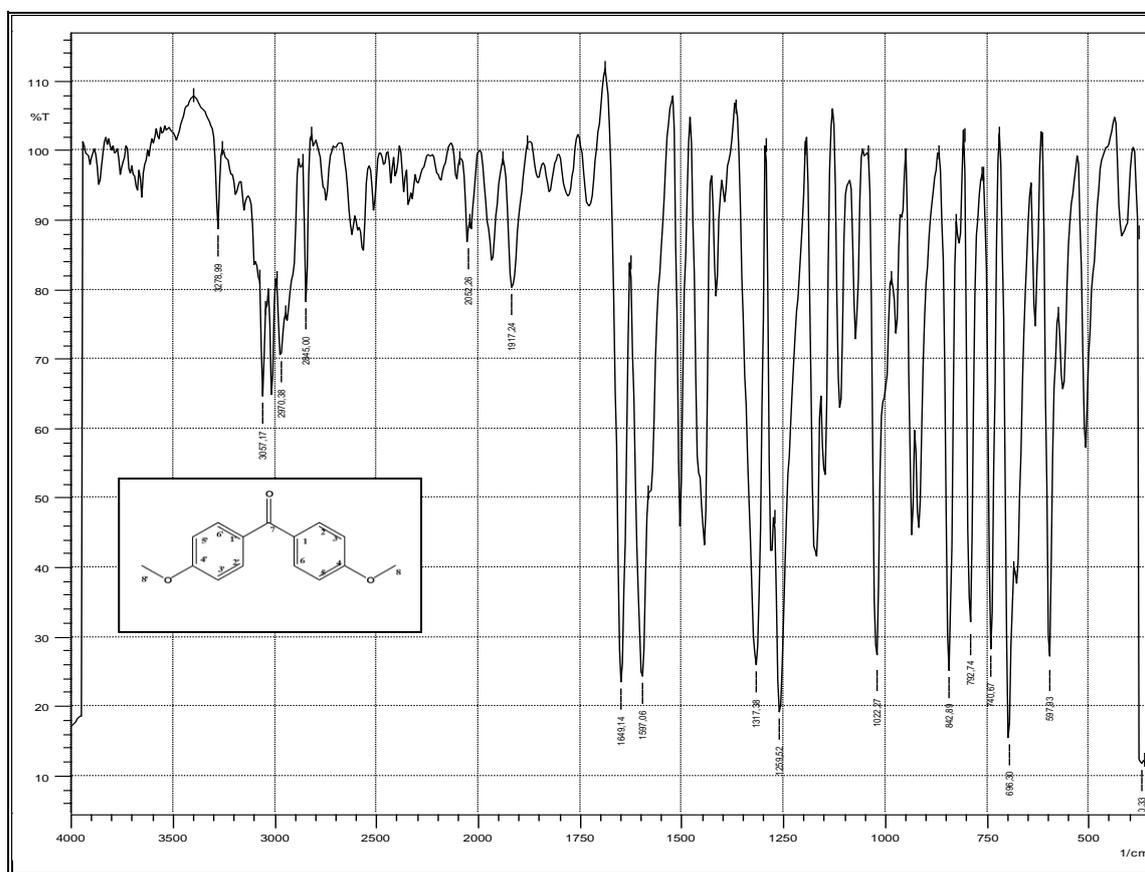


Figura 75 - Espectro de absorção na região do infravermelho de LFQM-121.

No espectro de massas (Figura 76), foram identificados os fragmentos mais importantes para elucidação estrutural deste composto, além de suas massas e intensidades relativas (Tabela 8). O pico do íon molecular do composto apresenta-se em m/z 242 (Figura 75) e o pico base em m/z 31.

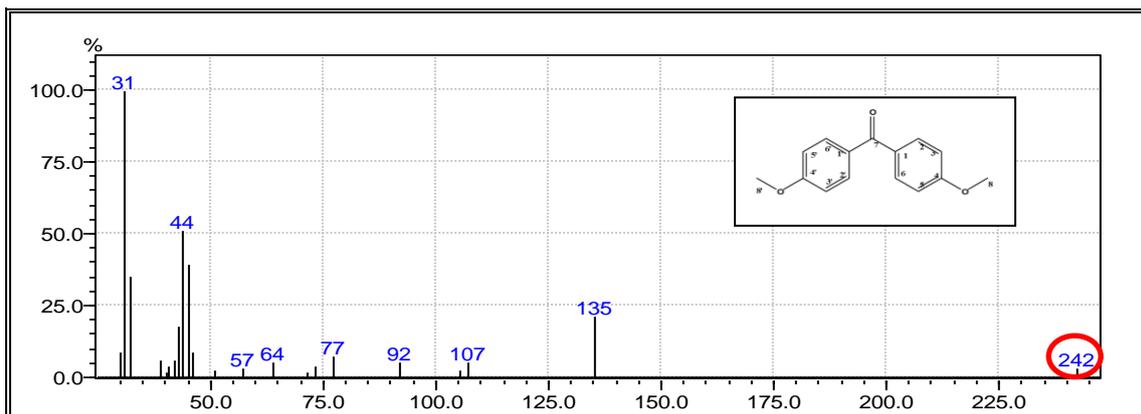


Figura 76 - Espectro de massas do derivado LFQM-121.

Tabela 8 - Principais fragmentos presente no espectro de massa do derivado LFQM-121

m/z	Fragmento	Intensidade Relativa
31	$[\text{CH}_3\text{O}]^+$	100
77	$[\text{C}_6\text{H}_5]^+$	10
135	$[\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_2]^+$	25
242	$[\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_3]^+$	1

Pela análise do espectro de RMN de ^1H de LFQM-121 (figura 77), foi observado um sinal intenso de singleto em δ 3,8 ppm referente aos H-8 e H-8'. Em δ 6,9 ppm um sinal de duplete referente aos hidrogênios H-3, H-5 e H-3', H-5', $J=8,8$ Hz. Em δ 7,8 ppm um sinal de duplete referentes aos hidrogênios H-2, H-6 e H-2', H-6' com $J=8,8$ Hz.

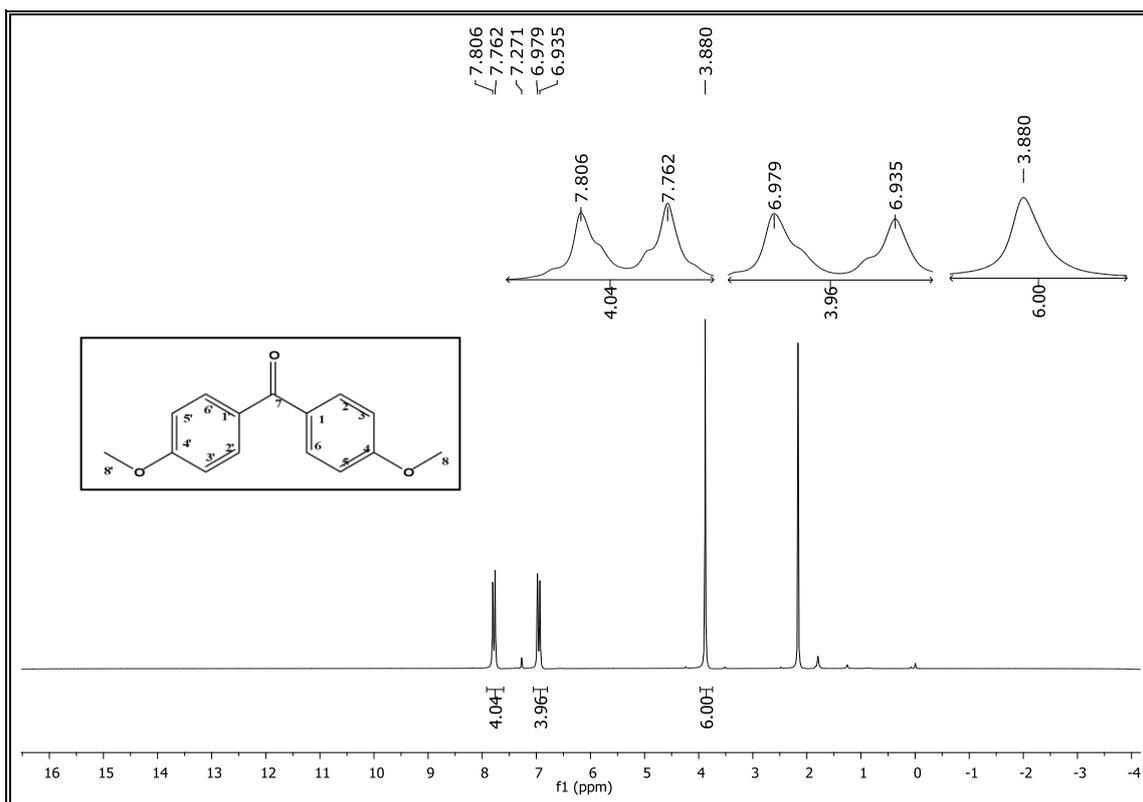


Figura 77 - Espectro de RMN de ^1H a 200 MHz de LFQM-121 (CDCl_3 ; 200 MHz).

No espectro de RMN de ^{13}C de LFQM-121 (Figura 78) observou-se sinal em δ 56,7ppm referente ao grupo metílico C-8. Em δ 114,4 ppm um sinal referente aos carbonos aromáticos C-3, C-5 C-3' e C-5'. Em δ 131,7 ppm referente aos carbonos C-2, C-6, C-2' e C-6'. Em δ 133,4 um sinal referente aos carbonos C-4 e C-4'. Em δ 195,7 ppm um sinal referente ao carbono carbonílico C-7.

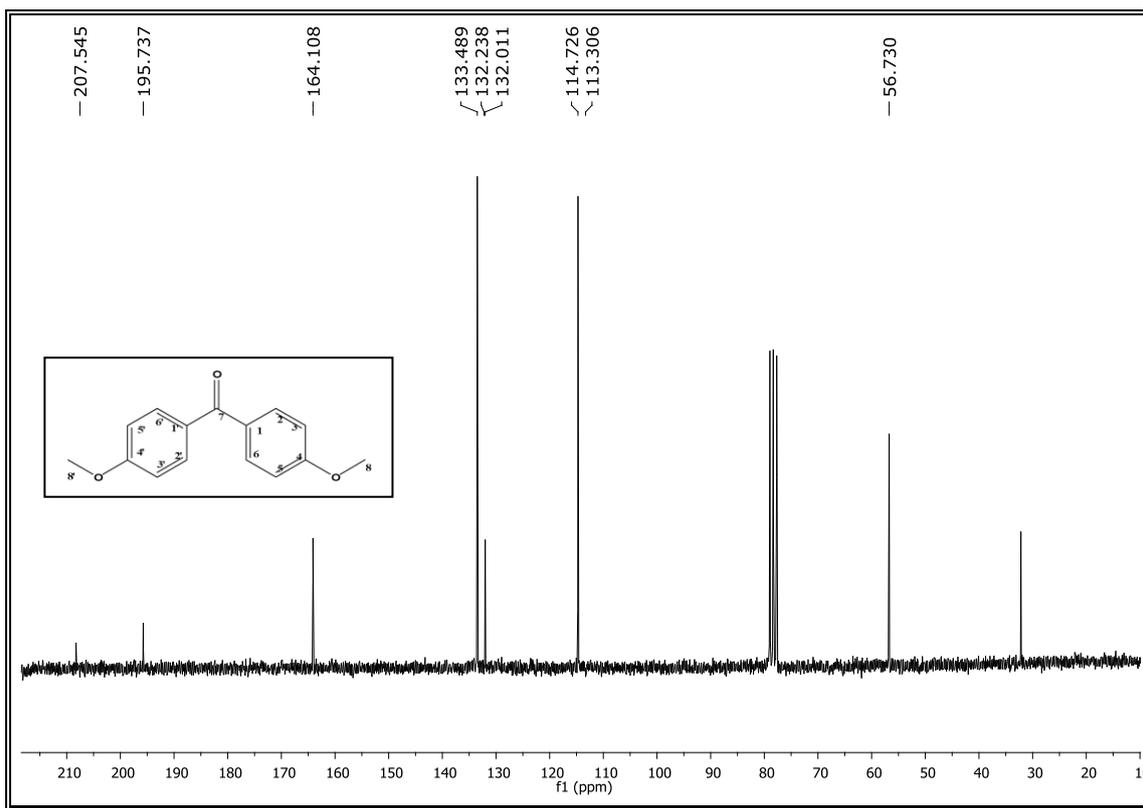
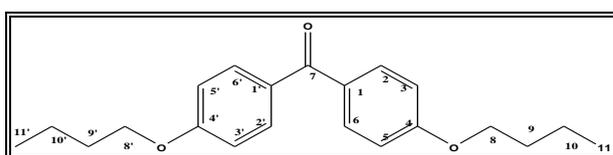


Figura 78 - Espectro de RMN de ^{13}C a 200 MHz de LFQM-121 (CDCl_3 ; 200 MHz).

6.1.8 Derivado LFQM-122 (4,4'-Dibutoxibenzofenona)



FM: $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_3$

MM: 326 g/mol

Figura 79 - Derivado sintético LFQM-122.

O derivado LFQM-122 foi obtido por uma reação de alquilação, pela qual reagiu-se 4,4'-diidroxibenzofenona CM-C com $\text{C}_4\text{H}_9\text{Br}$ na presença de K_2CO_3 (YANG *et al.*, 2009) (Figura 62). O produto foi obtido como um sólido amarelo (p.f. 151°C) com rendimento de 73,0%.

O espectro na região do IV (figura 80) apresenta bandas fracas em 2965 cm^{-1} característico de deformação axial de C-H de aromático e em 2954 cm^{-1} característico de deformação axial de C-H de metila. Apresenta banda forte de deformação axial em 1637 cm^{-1}

de C=O de carbonila. Banda forte de deformação axial em 1250 cm^{-1} de C-O-C de éter aromático.

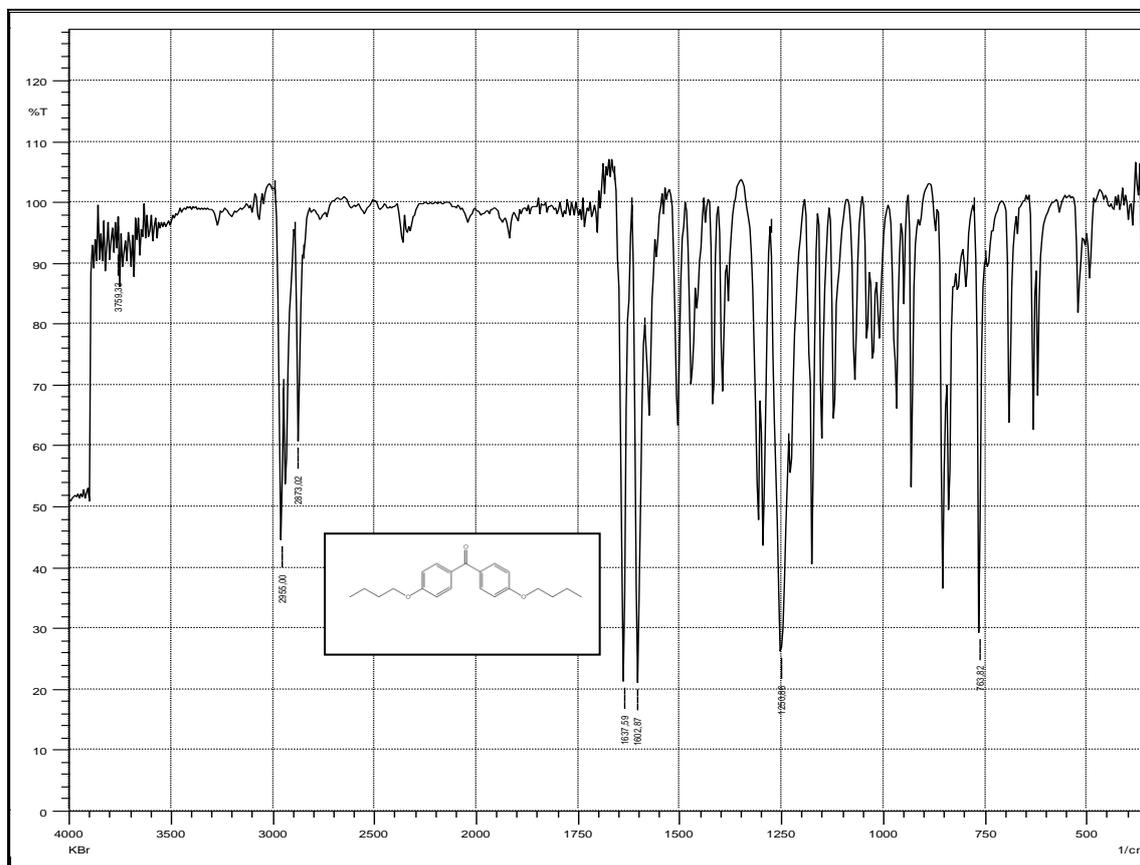


Figura 80 - Espectro de absorção na região do infravermelho de LFQM-122.

Pela análise do espectro de RMN de ^1H de LFQM-122 (figura 81), foi observado um sinal intenso de tripleto em δ 0,9 ppm referente aos hidrogênios H-11 e H-11' com $J=7,3\text{Hz}$. Em δ 1,4 ppm um sinal de sexteto referente aos hidrogênios H-10 e H-10' com $J=7,3\text{ Hz}$. Em δ 1,8 ppm um sinal de quinteto referente aos hidrogênios H-9 e H-9' com $J=7,2\text{ Hz}$. Em δ 4,0 ppm um sinal de tripleto referente aos hidrogênios H-8 e H-8' com $J=6,4\text{Hz}$. Em δ 6,9 ppm um sinal de duplete referente aos hidrogênios H-3, H-5 e H-3', H-5' com $J=8,8\text{ Hz}$. Em δ 7,0 ppm um sinal de duplete referente aos hidrogênios H-2, H-6' e H-2', H-6' com $J=8,8\text{ Hz}$.

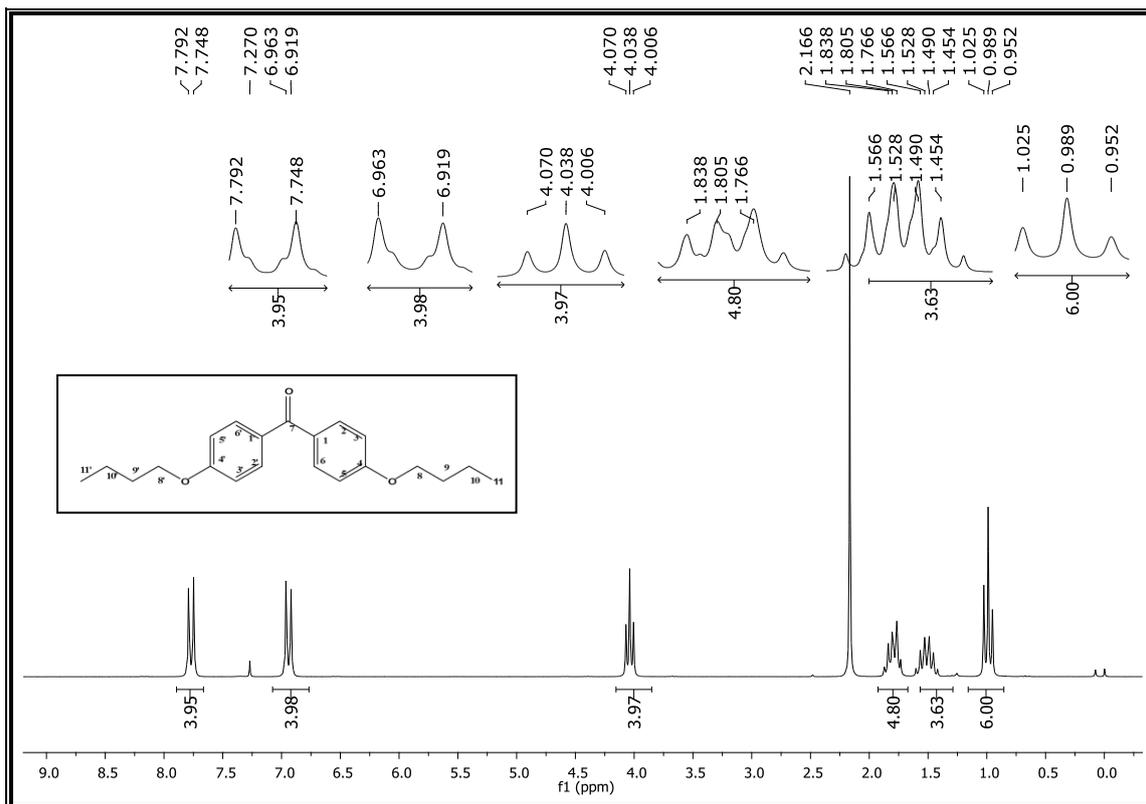


Figura 81 - Espectro de RMN de ^1H a 200 MHz de LFQM-122 (CDCl_3 ; 200 MHz).

No espectro de RMN de ^{13}C de LFQM-122 (Figura 82) foi observado um sinal em δ 14,6ppm referente ao grupo metílico C-11 e C-11'. Em δ 19,9 ppm, δ 31,4 ppm e δ 68,7 ppm indicam a presença de grupo metilênico C-10 e C-10', C-9 e C-9', C-8 e C-8'. Em δ 114,6 ppm foram observados os carbonos do anel aromático C-3, C-5, C-3' e C-5'. Em δ 131,3 ppm foram observados os carbonos C-2, C-6 e C-2', C-6'. Em δ 132,9ppm foram observados os carbonos C-1 e C-1'. Em δ 163,2 ppm o carbonos C-4 e C-4'. Em δ 195,2 ppm o carbono carbonílico C-7.

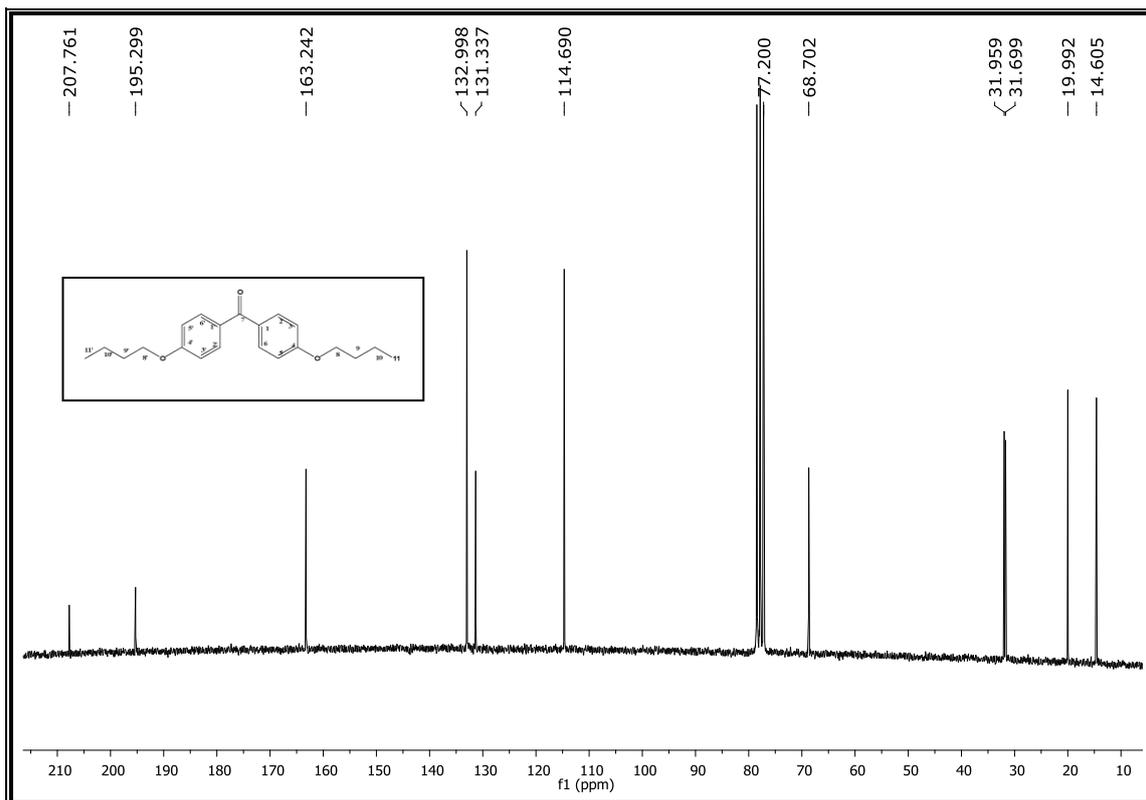


Figura 82 - Espectro de RMN de ^{13}C a 200 MHz de LFQM-122₂(CDCl_3 ; 200 MHz).

6.1.9 Derivado LFQM-123 (4,4'-Dipreniloxibenzofenona)

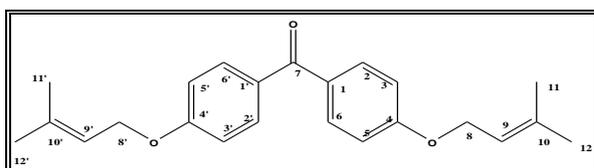


Figura 83 - Derivado sintético LFQM-123.

FM: $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{O}_3$
MM: 350,19g/mol

O derivado LFQM-123 foi obtido por uma reação de alquilação, pela qual reagiu-se 4,4'-diidroxibenzofenona CM-C com $\text{C}_5\text{H}_9\text{Br}$ na presença de K_2CO_3 (YANG et al., 2009) (Figura 83). O produto foi obtido como um sólido amarelo (p.f. 99°C) com rendimento de 76,2%.

O espectro na região do IV (Figura 84) apresenta bandas fracas em 2966 cm^{-1} característico de deformação axial de C-H de aromático e em 2925 cm^{-1} característico de deformação axial de C-H de metila. Apresenta banda forte de deformação axial em 1600 cm^{-1}

de C=O de carbonila. Banda forte de deformação axial em 1247 cm^{-1} de C-O-C de éter aromático.

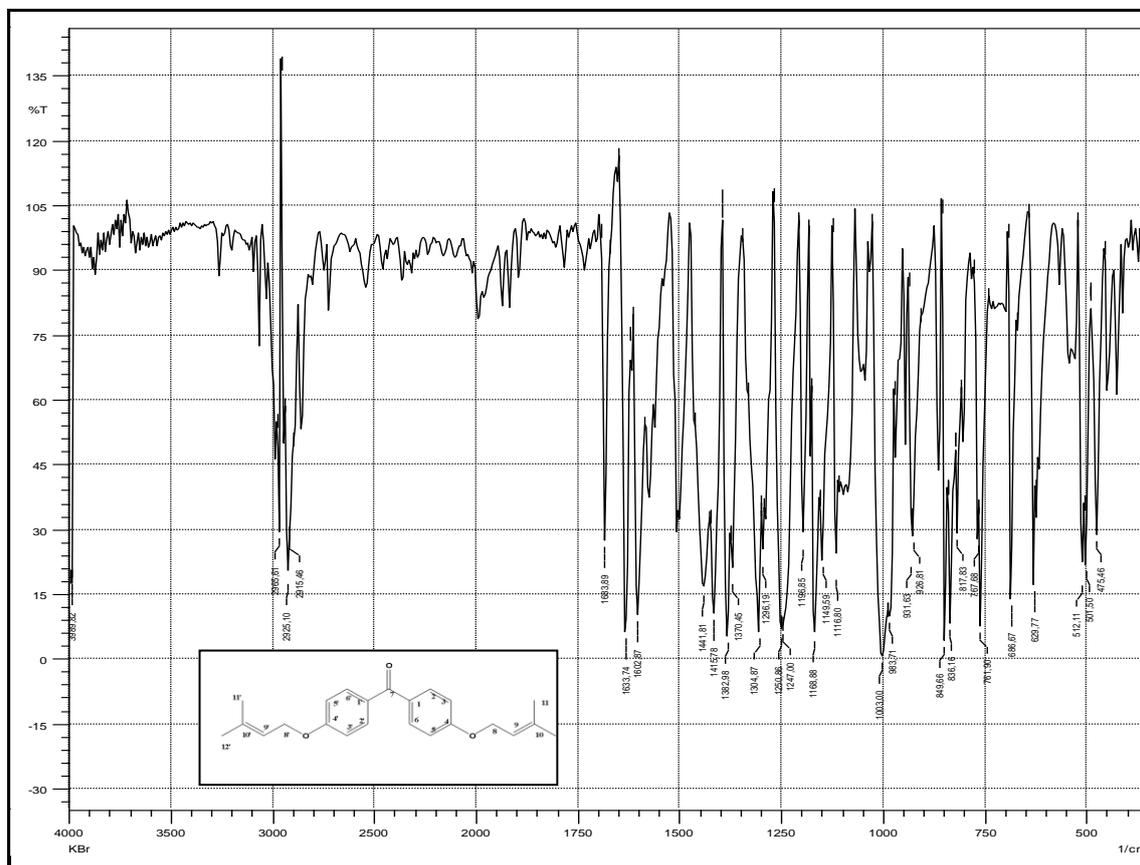


Figura 84 - Espectro de absorção na região do infravermelho de LFQM-123.

Pela análise do espectro de RMN de ^1H de LFQM-123 (figura 85), foi observado um sinal intenso de singleto em $\delta 1,7\text{ ppm}$ referente aos hidrogênios carbonílicos H-11, H-11', H-12 e H-12'. Em $\delta 4,5\text{ ppm}$ um sinal de duplete referente aos hidrogênios H-8 e H-8' com $J=6,8\text{ Hz}$. Em $\delta 5,5\text{ ppm}$ um sinal de tripleto referente aos hidrogênios H-9 e H-9'. Em $\delta 6,9\text{ ppm}$ um sinal de duplete referente aos hidrogênios H-3, H-5 e H-3' e H-5' com $J=8,8\text{ Hz}$. Em $\delta 7,7\text{ ppm}$ um sinal de duplete referente aos hidrogênios H-2, H-2' e H-6, H-6' com $J=8,8\text{ Hz}$.

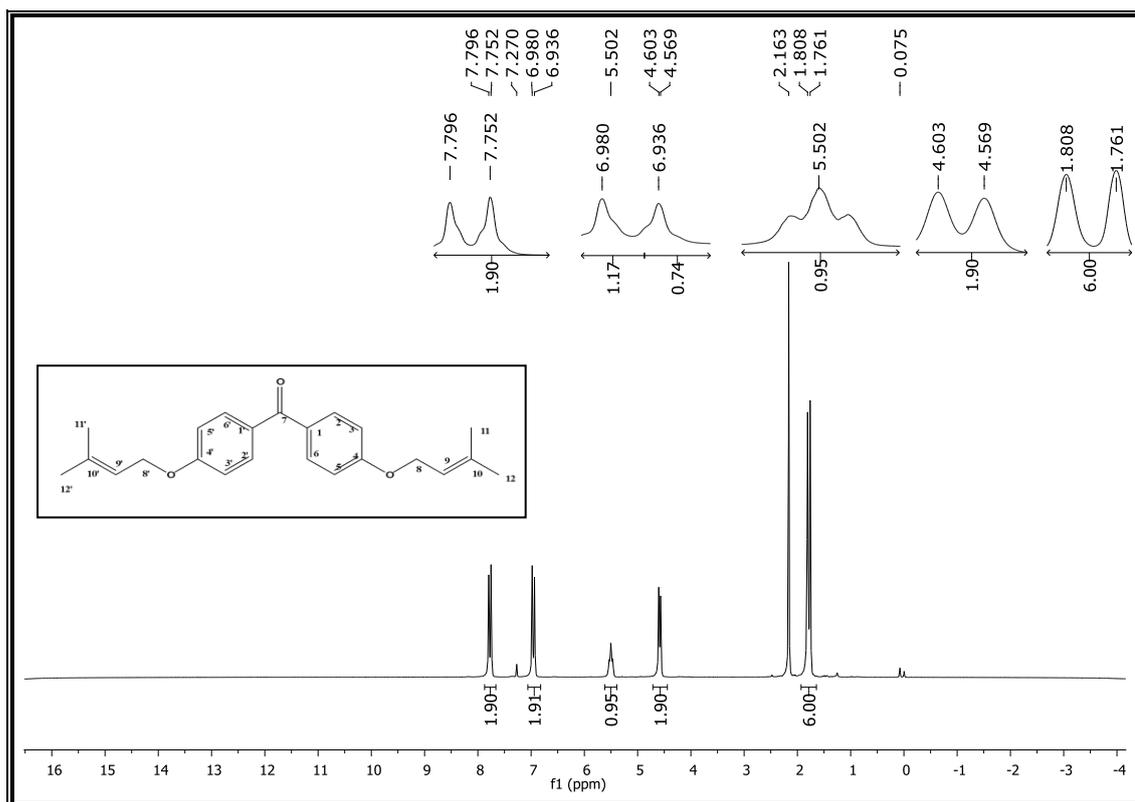


Figura 85 - Espectro de RMN de ^1H a 200 MHz de LFQM-123 (CDCl_3 ; 200 MHz).

No espectro de RMN de ^{13}C de LFQM-123 (Figura 86) foi observado um sinal em δ 18,8 ppm referente ao grupo metílico C-11 e C-11'. Em δ 26,4 ppm um sinal referente ao grupo metílico C-12 e C-12'. Em δ 65,5 ppm, δ 119,6 ppm e δ 139,3 ppm foram observados sinais referentes aos carbonos C-8 e C-8', C-9 e C-9', C-10 e C-10'. Em δ 114,6 ppm sinais referentes aos hidrogênios C-3, C-5 e C-3', C-5'. Em δ 131,2 ppm sinais referentes aos carbonos C-2, C-6 e C-2', C-6'. Em δ 132,7 ppm sinais referentes aos C-1 e C-1'. Em δ 162,7 ppm sinais referentes aos C-4 e C-4'. Em δ 195 ppm sinal do carbono carbonílico C-7.

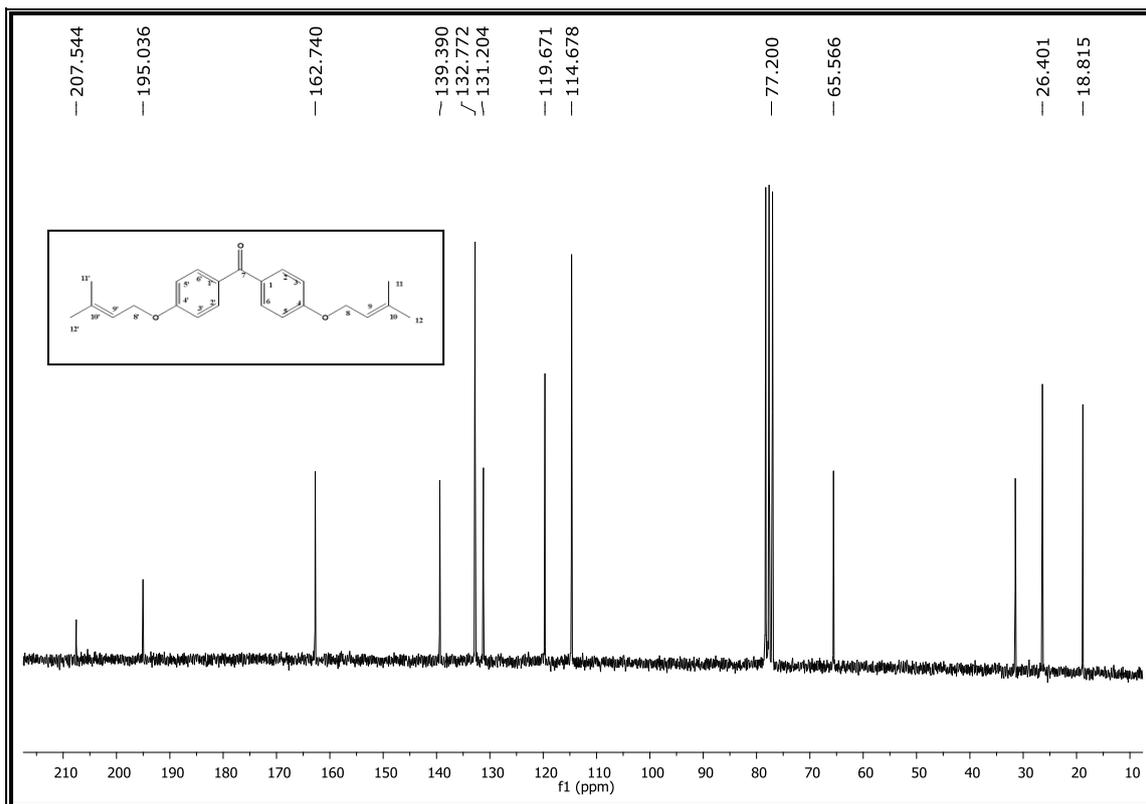


Figura 86 - Espectro de RMN de ^{13}C a 200 MHz de LFQM-123 (CDCl_3 ; 200 MHz).

6.2 RESULTADOS DOS ENSAIOS BIOLÓGICOS

6.2.1 Antioxidante

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

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

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

Compostos com dois (mais comum) ou três substituintes hidroxila no anel benzênico possuem maior atividade antioxidante do que os monoidroxilados (SCOTTI et al., 2007). Portanto, de acordo com os valores obtidos nos ensaios antioxidantes, pode-se correlacionar tais atividades com a estrutura de cada derivado semissintético, no qual foram oriundos de reações de alquilação.

De acordo com os resultados obtidos, expressos em percentual da capacidade sequestrante de radicais livres – DPPH (Figura 87), pode-se observar que os derivados de LFQM-115, LFQM-116 e LFQM-117 diminuíram suas atividades antioxidantes quando comparados ao composto o precursor CM-A e ao padrão ácido ascórbico (AA). Este resultado é coerente, devendo estar associado à redução do número de hidroxilas fenólicas presentes na estrutura do protótipo CM-A, já que estas foram substituídas, reduzindo a atividade antioxidante. No entanto, a inserção de grupamentos alquílicos pode resultar numa maior lipofilicidade, facilitando sua permeabilidade em membranas celulares e compensando a menor atividade antioxidante.

Dentre os derivados sintéticos propostos, o que apresentou maior atividade sequestrante de radicais livres – DPPH numa concentração de $4,0 \times 10^{-4}$ mol/L, foi o derivado protótipo CM-A (2,4-diidroxibenzofenona) com 30% de capacidade sequestrante, seguido do derivado LFQM-115 com 20% de capacidade sequestrante, respectivamente contra o padrão ácido ascórbico que numa concentração de $4,0 \times 10^{-4}$ mol/L apresenta 95% de capacidade sequestrante de radicais livres. Para os derivados LFQM-116, LFQM-117, LFQM-118, LFQM-119, LFQM-120, LFQM-122 e 123 pode-se afirmar que permaneceram com valores constantes para avaliação antioxidante com o aumento de suas concentrações, assim como o derivado CM-B também teve seu resultado constante com o aumento da concentração.

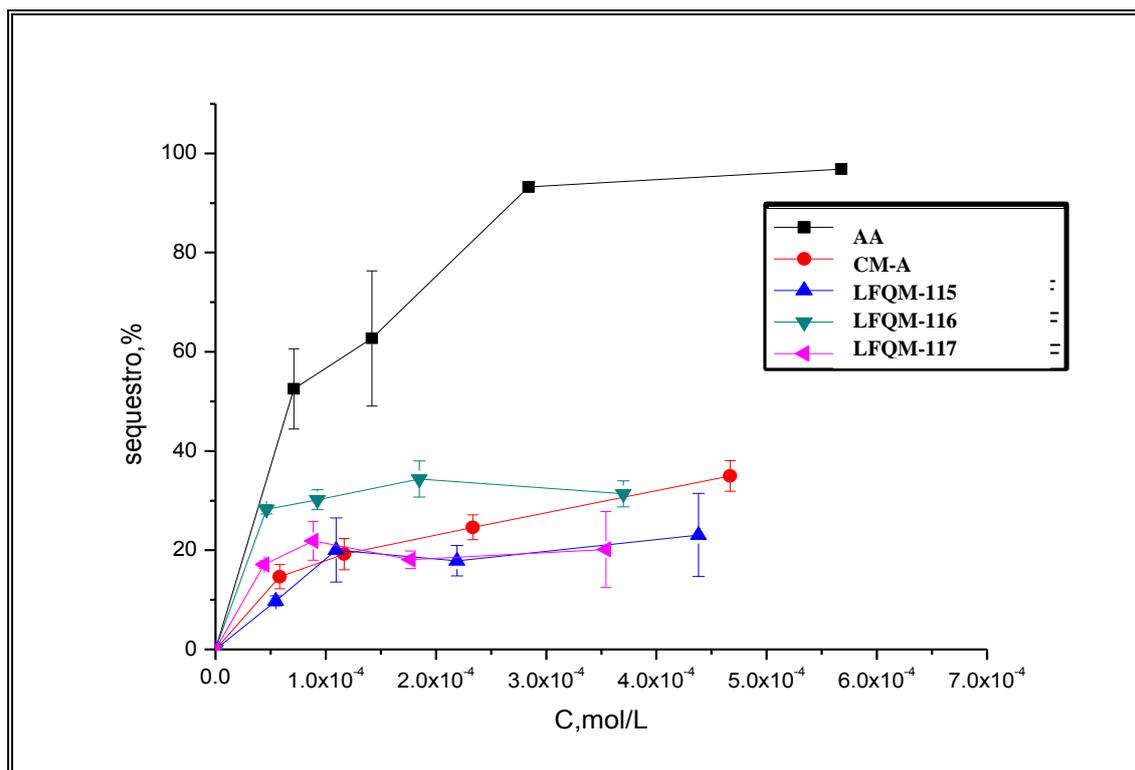


Figura 87 - Efeito antioxidante dos derivados de 2,4-dihidroxibenzofenona (CM-A).

Tabela 09 - Atividade antioxidante dos derivados de 2,4-dihidroxibenzofenona (CM-A)

CONCENTRAÇÃO Mol/L	CM-A % SEQUESTRO	LFQM-115 % SEQUESTRO	LFQM-116 % SEQUESTRO	LFQM-117 % SEQUESTRO	ACIDO ASCORBICO % SEQUESTRO
1,0	17	17	30	22	57
2,0	22	17	32	17	72
3,0	27	18	30	17	93
4,0	30	20	--	--	95

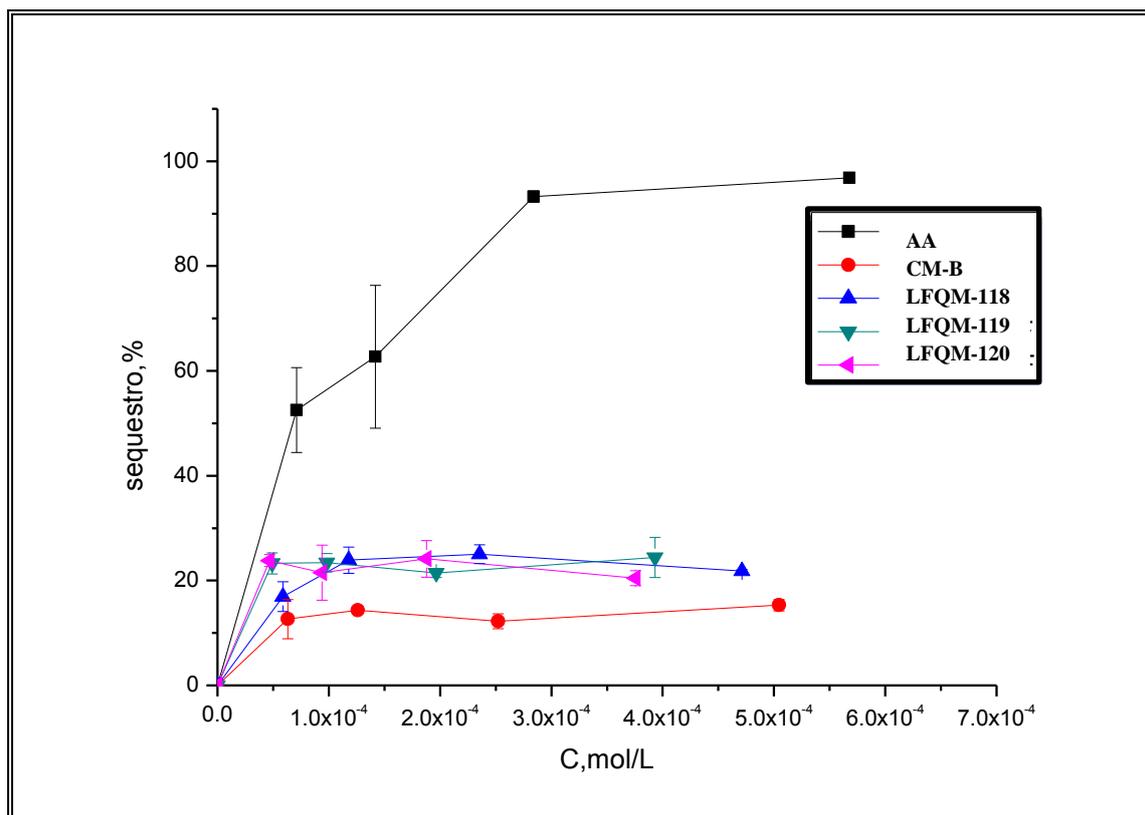


Figura 88 - Efeito antioxidante dos derivados de 4-hidroxibenzofenona (CM-B).

Tabela 10 - Atividade antioxidante dos derivados de 4-hidroxibenzofenona (CM-B)

CONCENTRAÇÃO Mol/L	CM-B % SEQUESTRO	LFQM-118 % SEQUESTRO	LFQM-119 % SEQUESTRO	LFQM-120 % SEQUESTRO	ACIDO ASCORBICO % SEQUESTRO
1,0	12	22	22	22	57
2,0	12	22	20	22	72
3,0	12	22	20	22	93
4,0	12	22	20	--	95

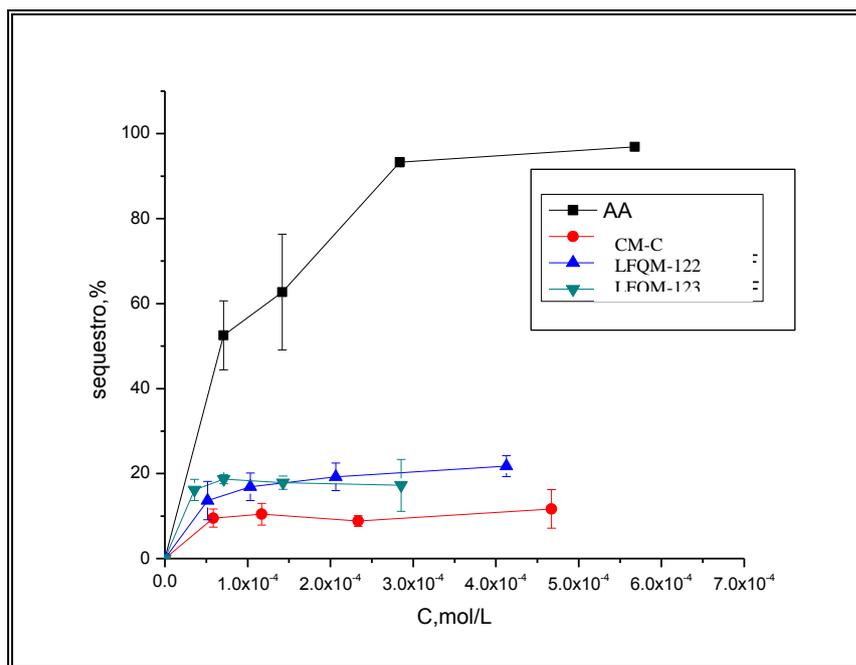


Figura 89 - Efeito antioxidante dos derivados de 4,4'-diidroxibenzofenona (CM-C).

Tabela 11 - Atividade antioxidante dos derivados de 4,4'-diidroxibenzofenona (CM-C)

CONCENTRAÇÃO Mol/L	CM-C % SEQUESTRO	LFQM-121 % SEQUESTRO	LFQM-122 % SEQUESTRO	LFQM-123 % SEQUESTRO	ACIDO ASCORBICO % SEQUESTRO
1,0	10	NR	17	17	57
2,0	7	NR	20	18	72
3,0	7	NR	22	--	93
4,0	7	NR	--	--	95

6.2.2 Inibitória de xantina oxidase

A 2,4-diidroxibenzofenona apresentou inibição de XO de 7,48% e $IC_{50} = 481 \mu\text{M}$ numa concentração de $38,9 \mu\text{M}$. Numa concentração de $77,8 \mu\text{M}$ esse composto apresentou inibição de 16,29% e IC_{50} de 400. O alopurinol, utilizado como padrão apresentou inibição de 39,67% com IC_{50} de $5,67 \mu\text{M}$ numa concentração de $3,73 \mu\text{M}$. Numa concentração de $7,47 \mu\text{M}$ apresenta inibição de 49,51% e IC_{50} de $7,62 \mu\text{M}$.

Os demais derivados não foram testados devido dificuldade de solubilidade.

Tabela 12 - Resultados de inibição de XO por 2,4-diidroxibenzofenona, [xantina] = 26 μ M, 30 °C.

CM-A (μ M)	Inibição (%)	IC ₅₀ (μ M)
0	0	
38,9	7,48	481
77,8	16,29	400
156	24,41	483
311	41,93	431
		449 \pm 41a

^aMédia \pm desvio padrão

Tabela 13 - Resultados de inibição de XO por alopurinol,[xantina]=26 μ M, 30 °C.

[alopurinol] (μ M)	Inibição (%)	IC ₅₀ (μ M)
0	0	
3,73	39,67	5,67
7,47	49,51	7,62
	67,67	7,12
		6,80 \pm 1,01a

^aMédia \pm desvio padrão

6.2.3 Avaliação do efeito antibacteriano

6.2.3.1 Ação sobre a parede celular

A parede celular constitui-se em uma região de extrema importância à célula bacteriana por conferir a estabilidade osmótica, mantendo a integridade celular, além de conferir às células as diferentes morfologias, tais como cocos, bacilos, espirilos.

As bactérias Gram-negativas e Gram-positivas reagem diferentemente à coloração de Gram devido às diferenças estruturais em suas paredes celulares que afetam a retenção ou liberação do complexo cristal violeta-iodo (CV-I) ou também denominado iodopararosanilina. As bactérias Gram-negativas contêm uma camada externa de lipopolissacarídeos como parte de sua parede celular, conferindo-lhe um caráter mais lipofílico quando comparada à região externa da parede celular de bactérias Gram-positivas. Quando aplicada a células Gram-positivas e Gram-negativas, a violeta genciana e o iodo penetram facilmente nas células e, em seu interior, formam o complexo CV-I. Esse complexo é maior que a molécula de violeta genciana que penetrou na célula, e devido ao seu tamanho não pode ser removido da camada intacta de peptidoglicano das células Gram positivas e que fora desidrata na presença de

álcool. Consequentemente as células Gram-positivas retêm a cor do corante cristal violeta. Nas células Gram-negativas, a lavagem com álcool solubiliza a camada externa de lipopolissacarídeos e os complexos CV-I são removidos através dos poros da camada de peptideoglicano (TORTORA et al., 2005).

Bactérias Gram-positivas podem ser coradas como Gram-negativas ao sofrerem modificações estruturais em sua parede celular. Os antibióticos que agem sobre a síntese da parede celular atuam produzindo parede com defeitos estruturais. As bactérias Gram-positivas quando expostas a antibióticos que atuam por esse mecanismo de ação sofrem lesões em suas paredes celulares e, consequentemente, passam a não responder da maneira esperada à coloração diferencial de Gram por não reterem o complexo CV-I no interior de suas células. Nos ensaios de avaliação da atividade antibacteriana, as células das bactérias expostas às concentrações ativas dos compostos e as células do mesmo microrganismo presentes nos poços utilizados como controle do crescimento foram submetidas ao teste de coloração diferencial de Gram. Todos os esfregaços apresentaram coloração violeta, demonstrando que os derivados que apresentaram ação não danificaram a parede celular em pontos que alterassem a estrutura conformacional da mesma, evidenciando que a atividade antibacteriana não deve ocorrer por este mecanismo de ação.

De acordo com os testes realizados os derivados CM-A, CM-B, CM-C, LFQM-115, LFQM-116, LFQM-117, LFQM-118, LFQM-119, LFQM-120, LFQM-121, LFQM-122, LFQM-123 quando avaliados nos microrganismos *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. typhimurii* e utilizando Clorafenicol com fármaco padrão, não apresentaram atividade bacteriostática.

6.2.4 Avaliação do efeito antifúngico

Os resultados mostrados no Quadro 5 mostram os valores de IC₅₀ de seis substâncias sintetizadas (LFQM-115, LFQM-117, LFQM-118, LFQM-119 LFQM-120 e LFQM-121) e dos compostos de partida CM-A, CM-B e CM-C frente às formas fungicas. De todos os derivados avaliados, alguns mostraram atividade fungistática contra as formas avaliadas quando comparado aos compostos de partida, CM-A, CM-B e CM-C. No entanto, alguns são inferiores ao padrão de referência e já outros apresentaram resultados melhores que Fluconazol padrão utilizado apresenta IC₅₀ 64µg/mL.

Os derivados sintetizados exibiram ação contra os fungos *C. glabrata*, *C. Tropicalis*, *C. Krusei*, *C. parapsilosis*, *C. albicans* e *C. albicans*. Para *C. glabrata* os derivados LFQM-122,

LFQM-116 e LFQM-119 apresentaram IC_{50} de 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, enquanto que o antifúngico fluconazol, utilizado como padrão apresentou IC_{50} 64 $\mu\text{g/mL}$. Estes resultados evidenciaram que o composto LFQM-122, 1,28 vezes mais ativo que o fármaco de referência. Para *C. Tropicalis* os derivados LFQM-122 e LFQM-123 apresentaram IC_{50} de 31,2 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$, sendo bem menos potentes que o padrão fluconazol (IC_{50} 1 $\mu\text{g/mL}$). Para *C. Krusei*, os derivados LFQM-122, LFQM-118 e LFQM-123 apresentaram IC_{50} = 31,2 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O derivado LFQM-122 demonstrou efeito antifúngico 16,4 vezes maior o padrão Fluconazol (IC_{50} 64 $\mu\text{g/mL}$). Para *C. parapsilosis* os derivados LFQM-122 e LFQM-123 apresentaram IC_{50} de 1,95 $\mu\text{g/mL}$ para ambos, , ou seja, 8,2 vezes mais ativos que o antifúngico Fluconazol (IC_{50} 16 $\mu\text{g/mL}$). Para *C. albicans* os derivados LFQM-122, LFQM-123 e LFQM-116 apresentaram IC_{50} = 7,8 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que o Fluconazol apresentou IC_{50} = 2 $\mu\text{g/mL}$. Para *C. Albicans*, os derivados LFQM-118, LFQM-122 e LFQM-123 mostraram-se equipotentes (IC_{50} = 50 $\mu\text{g/mL}$), sendo, portanto menos ativos que o Fluconazol (IC_{50} = 2 $\mu\text{g/mL}$).

Na avaliação da atividade antifúngica, o derivado LFQM-122 apresentou atividade fungistática contra *C. Glabrata*, enquanto que os derivados LFQM-118, LFQM-122 e LFQM-123 apresentaram atividade fungistática contra *C. Krusei* LFQM-122 e LFQM-123 apresentaram atividade fungistática contra *C. parapsilosis*.

Tabela 14 - Atividade antifúngica dos derivados LFQM

Microrganismos	μM	<i>C.glabrata</i> ATCC 90030	<i>C.tropicalis</i> ATCC 15105	<i>C.krusei</i> ATCC 6258	<i>C.parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C.albicans</i> ATCC 10231	<i>C.albicans</i> ATCC 64548
Derivados							
CM-A	IC ₅₀	0,233	--	--	--	--	--
	IC ₁₀₀	--	--	--	--	--	--
CM-B	IC ₅₀	0,252	0,252	0,505	0,505	0,505	0,505
	IC ₁₀₀	--	--	--	--	--	--
CM-C	IC ₅₀	0,467	0,233	0,233	--	0,467	0,467
	IC ₁₀₀	--	--	--	--	--	--
LFQM-115	IC ₅₀	--	--	--	--	--	--
	IC ₁₀₀	--	--	--	--	--	--
LFQM-116	IC ₅₀	0,370	--	--	--	0,370	--
	IC ₁₀₀	--	--	--	--	--	--
LFQM-117	IC ₅₀	--	--	--	--	--	--
	IC ₁₀₀	--	--	--	--	--	--
LFQM-118	IC ₅₀	--	--	0,238	--	0,471	0,238
	IC ₁₀₀	--	--	--	--	--	--
LFQM-119	IC ₅₀	0,393	0,393	--	--	--	--
	IC ₁₀₀	--	--	--	--	--	--
LFQM-120	IC ₅₀	--	--	--	--	--	--
	IC ₁₀₀	--	--	--	--	--	--
LFQM-121	IC ₅₀	--	0,206	0,413	--	0,128	0,128
	IC ₁₀₀	--	--	--	--	--	--
LFQM-122	IC ₅₀	0,153	0,095	0,011	0,005	0,023	0,153
	IC ₁₀₀	--	--	--	--	--	--
LFQM-123	IC ₅₀	0,285	0,285	0,142	0,005	0,142	0,142
	IC ₁₀₀				0,142		
Fluconazol IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	IC ₅₀	0,209	0,003	0,209	0,052	0,006	0,006

*-IC₅₀: inibição de **50%** do crescimento (ação "stática"- bacteriostática ou fungistática):

IC₁₀₀: inibição de **100%** (ação "cida"- bactericida ou fungicida) do crescimento

-- sem ação

6.2.5 Avaliação do efeito antiparasitário

6.2.5.1 Atividade leishmanicida contra as formas promastigotas

Os resultados apresentados no Quadro 5 mostram os valores de IC₅₀ de seis substâncias sintetizadas (LFQM-115, LFQM-117, LFQM-118, LFQM-119 LFQM-120 e LFQM-121) e dos compostos de partida CM-A, CM-B e CM-C frente à forma promastigotas

de *L.(L.) amazonensis*. Todos os derivados mostraram atividade leishmanicida contra a forma promastigota de *L. (L.) amazonensis*, quando comparados aos compostos de partida, CM-A, CM-B e CM-C, porém menos potentes que a Anfotericina-B ($IC_{50} = 4,70 \mu\text{g/ mL}$), utilizada como padrão. O derivado LFQM-115 ($IC_{50} = 4,90\mu\text{g/ mL}$)apresentou a melhor atividade contra a forma promastigota, sendo de 1,03 a 4,34 vezes mais potente que os demais derivados, LFQM-118 ($IC_{50} = 5,05 \mu\text{g/ mL}$), LFQM-117 ($IC_{50} = 7,05 \mu\text{g/ mL}$), LFQM-120 ($IC_{50} = 7,82 \mu\text{g/ mL}$), LFQM-119 ($IC_{50} = 8,56 \mu\text{g/ mL}$) e LFQM-121 ($IC_{50} = 21,3 \mu\text{g/ mL}$).

Tabela 15 - Atividade anti-leishmania dos derivados LFQM

SUBSTÂNCIAS	CONCENTRAÇÃO % INIBIÇÃO					IC ₅₀ μg/ mL
	40μg/ mL	20μg/ mL	10μg/ mL	5μg/ mL	1μg/ mL	
LFQM-115	94,23	88,61	69,76	48,98	34,44	0,021
LFQM-116	--	--	--	--	--	--
LFQM-117	97,96	89,48	63,88	41,46	19,75	0,025
LFQM-118	96,61	85,53	65,37	50,06	35,67	0,023
LFQM-119	95,82	85,47	59,66	27,98	13,65	0,033
LFQM-120	96,48	88,96	61,53	30,98	18,00	0,029
LFQM-121	56,34	47,51	33,27	30,32	20,45	0,088
LFQM-122	--	--	--	--	--	--
LFQM-123	--	--	--	--	--	--
CM-A	75,85	61,35	--	--	--	--
CM-B	37,20	15,58	--	--	--	--
CM-C	3,87	--	--	--	--	--
ANFOTERICINA-B	--	96,07	69,45	48,67	38,28	0,005

-- não realizado

7 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi relatada a síntese, a caracterização e a avaliação biológica dos compostos benzofenônicos LFQM-115, LFQM-116, LFQM-117, LFQM-118, LFQM-119, LFQM-120, LFQM-121, LFQM-122 e LFQM-123.

Com o intuito de verificar o potencial destes intermediários em alvos biológicos de interesse, alguns dos derivados foram testados para avaliar o potencial antioxidante, inibitório de xantina oxidase e antimicrobiano.

Para a atividade antioxidante, os resultados não foram significativos, uma vez que após as modificações os derivados tornaram-se lipofílicos perdendo hidroxilas fenólicas que são consideradas importantes no sequestro de radicais livres (SCOTTI et al., 2007).

Quanto ao teste para avaliar a inibição de XO, detectou que os derivados por serem mais lipofílicos não foram testados devido dificuldade de solubilidade em DMSO.

Para a atividade antimicrobiana, os resultados parecem indicar que a inserção de substituintes que aumentam a lipofilicidade das moléculas, potencializou a ação contra *Leishmania* e para alguns fungos que foram testados, porém sem ação antibacteriana. Acredita-se que para as bactérias o mecanismo de ação desses derivados não esteja relacionado com receptores de parede celular.

Já para os fungos e *Leishmanias* que são organismos eucariotos, os derivados testados apresentaram resultados promissores e acredita-se que o seu mecanismo de ação está relacionado com inibição da biossíntese de ergosterol, que é o componente da membrana citoplasmática desses microrganismos (TORTORA et al., 2005).

O conjunto de resultados obtidos da avaliação biológica apontam para a pertinência do planejamento das modificações estruturais sobre o composto protótipo, que levou a derivados mais potentes, seletivos e pouco tóxicos para diferentes tipos de microrganismos patogênicos. Além disso, estas substâncias representam um novo padrão estrutural possível de ser explorado para o planejamento de novos candidatos a fármacos.

8 PERSPECTIVAS

- ❖ Aprofundar o estudo dos mecanismos da ação no nível molecular;
- ❖ Explicar através de modelagem molecular (“docking”) prováveis interações com alvos receptores;
- ❖ Sintetizar novos análogos baseados em estudos de planejamento racional de fármacos.

REFERÊNCIAS

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

BAKANA, P. et al. Structure and Chemotherapeutical Activity of a Polyisoprenylated Benzophenone from the Stem Bark of *Garcinia Huillensis*. **Jornal of Ethnopharmacology**, v.21, p. 75-84, 1987.

BAKER, K. S. et al. Genome-wide expression profiling reveals genes associated with amphotericin B and fluconazole resistance in experimentally induced antifungal resistant isolates of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. V.54, p.376-385, 2004.

BAILEY, P. S.; **Ozonation in Organic Chemistry**. New York: Biology, v. 64, p. 99-104, 2001.

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

BEERHUES, L. Benzophenone synthase from cultured cells of *Centaureum erythraea*. **FEBS Letters**, 383, p. 264-266, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2. ed. Brasília, 2007.

BURK, A.; SMYTH, E.; FITZGERALD, G.A. Analgesic antipyretic agents; pharmacotherapy of gout. In: BRUNTON,L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. (Ed.). **The pharmacological basis of therapeutics**, 11. ed. New York : McGraw-Hill, 2006. p 706-710.

CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. 500 p.

CASTRO, G. T.; BLANCO, S. E.; FERRETTI, F. H. Inhibition of Xanthine–Oxidase by 2,4–Dihydroxy–Benzophenone and 2,3,4–Trihydroxy–Benzophenone. Internet Electron. **Journal of Molecular Design**, v.3. p. 684-703, 2004.

CATÃO, R. M. R. et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato etanólico de *Punica granatum linn* (romã) sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38, p. 111-114, 2006.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p. 99-105, 1998.

CIOCHINA, R.; GROSSMAN, R. B. Polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols. **Chemical Reviews**, v.106, p. 3963-3986, 2006.

CONSTANTINO, L.; RASTELLI, G.; ALBASINI, A. A rational approach to the design of flavones as xanthine oxidase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.31, p. 693-699, 1996.

COOK, N.; FREEMAN, S., **Journal of Dermatology**, V.42, p.257, 2001.

COS, P. et al. Structure–activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. **Jornal of Natural Products**, v.61, p. 71-76, 1998.

COTELLE, N. et al. Antioxidant properties of hidroxy-flavones. **Free Radical Biology Medicine**, v.20, p. 35-43, 1996.

COX, J. P.; KECHAGIAS, D.; KELLY, O. A monohydrate pseudopolymorph of 3,4-dihydroxybenzophenone and the role in the crystal assembly of benzophenones. **Acta Crystallographica**, v.64, p. 206, 2008.

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

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

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

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

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

DORIGUETTO, A. C. et al. Natural polyprenylated benzophenones inhibiting cysteine and serine protease. **Chemistry Biodiversity**, v.4, p. 488, 2007.

EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of *Candida* sp infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **The Lancet Infectious Diseases**, v.3, p. 685-702, 2003.

FULLER, R.W. et al. Vismiaphenones D-G, new prenylated benzophenones from *Vismia cayennensis*. **Jornal of Natural Products**, v.62, p. 67-69, 1999a.

FUNASA. **Manual de controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2000 p. 62.

GENARO, O; REIS A.B. **Leishmaniose tegumentar americana**. In: NEVES, D. P. Parasitologia humana. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

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

GONZÁLEZ, U. et al. **Interventions for old world cutaneous leishmaniasis**. Local: JohnWiley & Sons, 2008.

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

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

HEPBURN, N. C. Cutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 25, n. 5, p. 363-370, 2000.

HILLE, R.; SPRECHER, H.; J. On the mechanism of action of xanthine oxidase. Evidence in support of an oxo transfer mechanism in the molybdenum-containing hydroxylases. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 262, p. 10914, 1987.

HOTEZ, P. J. et al. Combating tropical infectious diseases: report of the disease control priorities in developing countries project. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 6, p. 871-8, 2004.

ITO, C. et al. Polyprenylated benzophenones from *Garcinia assigu* and their potential cancer chemopreventive activities. **Journal of natural products**, v. 66. p. 206-209, 2003.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. **Microbiologia médica**, 2. ed. São Paulo: Premier, 1998.

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

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

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico microbiológico**, 5. ed. Medsi: Rio de Janeiro, 2001.

KOOLMAN, J.; ROEHM K. H. **Color Atlas of Biochemistry**. 2. ed. New York: Thieme Stuttgart, 2000.

KOWALSKY, R.J., FALEN, S., **Radiopharmaceuticals in Nuclear Pharmacy and Nuclear Medicine**, Washington: APhA publications, 2004.

KUHN, F.E. et al. in: **Transition Metals for Organic Synthesis**. Germany: Weinheim, Germany. vol. 2, p.427, 2004.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeasts: a taxonomic study**. 4. ed. New York: Elsevier, 1998.

LACAZ, C. S. **Tratado de micologia médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LEE, D.G.; CHEN, T. *in*: **Comprehensive Organic Synthesis**, 1 ed. Oxford, vol. 7, p. 541–591, 1991.

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

LIN, C.C., HUANG, P.C. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Acathopanax senticosus*. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 489-494, 2000.

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

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

MANUAL DE VIGILÂNCIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA. 6 ed. Brasília: MS. 2006.

MARVEL, C.S.; SPERRY, W.M. Coll. **Organic Syntheses**, vol. 1, p. 95, 1941.

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

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

NAGAO, A.; SEKI, M.; KOBAYASHI, H. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 63, p. 1787-1790, 1999.

NAKAI, K. et al. **Free radical production requires both inducible nitric oxide synthase and xanthine oxidase in LPS- treated skin**. USA . Proc. Natl. Acad Sci. v.103, p. 4616-4621, 2006.

NALDONI, F. et al. Antimicrobial activity of benzophenones and extracts from the fruits of *Garcinia brasiliensis*. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, p. 403-407, 2009.

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

PASSOS, M.G.V.M.; Santos, V. L. 1. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato etanólico de *Punica granatum linn* (romã) sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v.38, p. 111-114, 2006.

PELLISSARI, D.M. et al. **Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil**. Brasília, Epidemiol. v. 20, p. 107-110, 2011.

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

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 3 ed, Rio de Janeiro: Koogan, 1997.

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

ROMÁN-LUQUE-ORTEGA, J., REUTHER, P., RIVAS, L., DARDONVILLE, C. New benzophenone-derived bisphosphonium salts as leishmanicidal leads targeting mitochondria through inhibition of respiratory complex II. **Journal of Medicinal Chemistry**, v 53, p. 1788-1798, 2010.

RUBIO, O. C. et al Polyisoprenylated benzophenone from Cuban propolis. **Journal of Natural Products**, v.62, p. 1013-1015, 1999.

SANG, S. et al. Chemical studies on antioxidant mechanism of garcinol: Analysis of radical reaction products of garcinol with peroxy radicals and their antitumor activities. **Tetrahedron**, v.58, p. 10095-10102, 2002.

SATO, Y. et al. Application of *in vitro* mutagenesis to identify the gene responsible for cold agglutination phenotype of *Streptococcus mutans*. **Microbiology Immunology**, v.48, p. 449-456, 2004.

SANTOS, M. H. dos. et al. 7-Epiclusianone, the new tetraprenylated benzophenone and other chemical constituents from the fruits of *Rheedia gardneriana*. **Química Nova**, v.22, p. 654-66, 1999.

SCOTTI, L. et al. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 2, p. 153-166, 2007.

SCHAECHTER, M. et al. **Microbiologia: Mecanismos das Doenças Infecciosas**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2002.

SCHWARTZ, E.; HATZ, C. ; BLUM, J. New world cutaneous leishmaniasis in travelers. **The Lancet Infectious Diseases Dis.**, v. 6, p. 342-349, 2006.

SEO, E. K. et al. New bioactive aromatic compounds from *Vismia guianensis*. **Phytochemistry**, v.55, p. 35-42, 2000.

SHAHIDI, F. **Natural antioxidants: chemistry health effects and applications**. Champaign: AOCS Press, 414 p,1997.

SHENS, S.et al. In vitro growth, acidogenicity and cariogenicity of predominant human root caries flora. **Journal of Dental**, v. 32, p. 662-673, 2004.

SHEU, S. Y., TSAI, H. J., CHIANG, H. C. Benzophenones as xanthine oxidase inhibitors. **Anticancer Res.** v.19, p. 1131-1136, 1999. *Apud*: CASTRO, G. T.; BLANCO, S. E.; FERRETTI, F. H. Inhibition of Xanthine-Oxidase by 2,4-Dihydroxy-Benzophenone and 2,3,4-Trihydroxy-Benzophenone. Internet Electron. **Journal of Molecular Design**, v.3, p.684-703, 2004.

SILVA, E.S. et al. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.3, p. 285-291, 2001.

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

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

SWEETMAN, S. C.; MARTINDALE: **The Complete Drug Reference**. London: Pharmaceutical Press. Electronic version, 2007.

TERKELTAUB, R. et al. **Gout. In: Schumacher HR**, 10 ed. Atlanta: Arthritis Foundation, v.209, p.18, 1993.

TORTORA, G. J.;FUNKE, B.R; CASE, C.L. **Microbiologia**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TOWNES, A. S.; OSTEOARTHRITIS ,IN; BARKER, J. R.; BURTON, P. D.; ZIEVE, P. D. **Principles in Ambulatory Medicine**. 5 ed. p. 960–973, 1999.

TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

URBACH, F. The historical aspects of sunscreens. *Journal of Photochemistry and*
UZEL, A., SORKUN, K., ÖNCAG, Ö., COGULU, D., GENÇAY, Ö. e SALIH, B. **Microbiological Research**. p.195, 2005.

UZEL, A., SORKUN, K., ÖNCAG, Ö., COGULU, D., GENÇAY, Ö. e SALIH, B. **Microbiological Research**. p.195, 2005

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

VAZ, Z. R. et al. **XII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, Curitiba, Paraná 1998.

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

VOOTURI,S.K., CHEUNG, C.M., RYBAK, M.J., FIRESTINE, S.M. Benzophenones containing tetraamides. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.52, p. 5020–5031, 2009.

WHO (World Health Organization). Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases. (Acessado em novembro 2011).

WORTMAN R. L. **Gout and other disorders of purine metabolism**. In: FAUCI, A. S. et al. *Harrison's principles of internal medicine*. 14 ed. New York: McGraw Hill. v. 21, p. 58–66, 1998.

WRIGHT, J. D.; PINTO, A. B. **Clinical manifestations and treatment of gout.** Prim. Care Update Ob/Gyns. v.10, p.19-23, 2003.

YANG, Z. et al. Design, synthesis, antitumor activity and mode of action of novel oxiranyl and thiiranyl phenol derivatives. Bull. Korean **Chemistry Societat**, v. 30, p. 1463-1469, 2009.

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

ZACCHINO, S.A. et al. The need for new antifungal drugs: screening for antifungal compounds with a selective mode of action with emphasis on the inhibitors of the fungal cell wall. In: RAI, M.; MARES, D. **Plant derived antimycotics: current trends and future prospects.** The Haworth Press, v.1, p. 41, 2003.