



Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG



KRIS SIMONE TRANCHES DIAS

**SEMISSÍNTESE E ESTUDO DA RELAÇÃO ESTRUTURA – ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE NOVOS DERIVADOS DA GUTTIFERONA-A**

MESTRADO EM QUÍMICA

Alfenas -MG

2011

KRIS SIMONE TRANCHES DIAS

**SEMISSÍNTESE E ESTUDO DA RELAÇÃO ESTRUTURA – ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE NOVOS DERIVADOS DA GUTTIFERONA-A**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal de Alfenas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química Orgânica. Orientador: Prof. Dr. Claudio Viegas Jr. Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos.

Alfenas-MG

2011

Dias, Kris Simone Tranches.

Semissíntese e estudo da relação estrutura-atividade antimicrobiana de novos derivados da Guttiferona-A / Kris Simone Tranches Dias . - 2011.

119 f. -

Orientador: Cláudio Viegas Júnior.

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

Bibliografia.

1. Garcinia - química. 2. Benzofenonas – isolamento & purificação.
3. Testes de Sensibilidade Antimicrobiana. I. Viegas Júnior, Cláudio.
II. Título.

CDD: 547

KRIS SIMONE TRANCHES DIAS

**SEMISSÍNTESE E ESTUDO DA RELAÇÃO ESTRUTURA – ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE NOVOS DERIVADOS DA GUTTIFERONA-A**

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

Aprovada em: 08/08/2011

Prof. Dr. Claudio Viegas Jr.

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Instituição: Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Marcos José Marques

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Alfenas-MG

2011

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, por tudo o que me é concedido neste mundo, pela oportunidade do aprendizado e trabalho, maiores privilégios que podemos ter e desenvolver e por colocar pessoas especiais no meu caminho.

Ao **Prof. Dr. Cláudio Viegas Jr.** pela grande oportunidade concedida, sendo mais que um orientador, um **Amigo e Mestre**, me dando apoio e orientação todo tempo, os quais foram imprescindíveis para a realização deste trabalho e minha formação.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos** pela co-orientação e ajudas constantes.

A **Prof^a. Amanda LATERCIA Tranches Dias** pela colaboração nos ensaios antimicrobianos

Aos pesquisadores e funcionários do **Laboratório de Microbiologia e Imunologia da UNIFAL-MG** pelo auxílio e infraestrutura disponibilizada.

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

A aluna de iniciação científica **Jéssica Lopes D'Dego** pelo auxílio no desenvolvimento dos experimentos, muito obrigada por toda sua ajuda.

Aos **meus pais**, pelo amor, apoio e por fazer dos meus sonhos o sonho de vocês. Muito obrigada!

A **Amanda**, minha irmã, grande incentivadora e colaboradora desse trabalho, pelo amor e companheirismo que nos une. Ao meu cunhado Marcos pelo carinho e pela amizade.

Ao **Saulo** pelo amor, carinho e por compreender os meus momentos de ausência.

A todos os amigos do **Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal** pela amizade e ajudas constantes. Em especial, Jaqueline, Danielle, Cláudia Mara, Maria Cecília, Vanessa e Bianca. Durante esse tempo vocês foram muito mais que colegas de trabalho, se tornaram amigas, confidentes e parceiras. Vocês tornaram essa jornada muito mais prazerosa. Muito obrigado a todos vocês.

A **Universidade Federal de Alfenas e ao Programa de Pós- Graduação em Química** pela oportunidade oferecida;

RESUMO

As infecções causadas por bactérias e fungos são muito comuns e a resistência adquirida aos antibióticos disponíveis tem se tornado frequente, mostrando a necessidade de constantes pesquisas e investimentos em novos fármacos antimicrobianos eficazes. Dentre as alternativas de prospecção de novos fármacos, os produtos naturais se destacam como fontes de substâncias ativas, novos modelos moleculares e matérias-primas com padrões moleculares singulares e inovadores. Como parte de um projeto de bioprospecção e planejamento de novas substâncias bioativas, o gênero *Rhedia* foi eleito como fonte de benzofenonas polipreniladas a serem utilizadas como substratos para obtenção de novos derivados com perfil antibacteriano otimizado e estudos de relação estrutura-atividade (REA). O objetivo deste trabalho foi sintetizar novos derivados da guttiferona-A (LFQM-78), uma benzofenona natural, realizando modificações das características de hidro/lipofilicidade através da inserção de grupos substituintes nas hidroxilas fenólicas visando à otimização do perfil de atividade antimicrobiana desta substância. Os derivados sintetizados foram avaliados quanto a sua ação contra um amplo espectro de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. As espécies microbianas mais sensíveis a os compostos testados foram as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Bacillus cereus* (ATCC 11778), sendo que alguns dos compostos foram mais ativos do que o cloranfenicol, antibiótico utilizado como referência. Os resultados obtidos evidenciaram que a variação da lipofilicidade da molécula é um ponto importante para a modulação da atividade, e que as modificações estruturais realizadas na guttiferona-A, levaram a derivados mais potentes, seletivos e pouco tóxicos contra diferentes tipos de microrganismos patogênicos.

Palavras-chave: Garcinia. Benzofenona. Testes de Sensibilidade Antimicrobiana.

ABSTRACT

Infections caused by bacteria and fungi are very common and acquired resistance to available antibiotics has become common, showing the need for constant research and investments in new effective antimicrobial drugs. Among the alternatives to the prospection for new drugs, natural products stand out as sources of active ingredients, new molecular models and raw materials with innovative molecular patterns. As part of a project aiming the bioprospection and the design of new bioactive substances, the genus *Rheedia* was elected as a source of poliprenylated benzophenones to be used as starting materials for new semi-synthetic derivatives with optimized antibacterial profile and structure-activity relationship studies (SAR). The central objective was to synthesize new derivatives of guttiferone-A (LFQM-78), a natural benzophenone, carrying out modifications of their hydro/lipophilic properties by the insertion of substituents on the phenolic hydroxyl groups to optimize the profile of antimicrobial activity of this compound. Semi-synthetic derivatives were evaluated for their effects against a broad spectrum of Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungi. The most sensitive microbial species to the target compounds were Gram-positive (ATCC 6538) and *Bacillus cereus* (ATCC 11778), and some of the derivatives were more active than chloramphenicol, used as standard. Our results were indicative that a variation in lipophilicity of the molecules was an important requisite for antimicrobial activity modulation, and that the structural modifications made on guttiferone-A led to more potent and selective derivatives, with lower toxicity for different types of pathogens.

Keywords: *Garcinia*. Benzophenone. Antimicrobial Sensitivity Tests.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01	Representação esquemática da parede celular de bactérias Gram-negativas.....	20
FIGURA 02	Representação esquemática da parede celular de bactérias Gram-positivas.....	20
FIGURA 03	Exemplos de antifúngicos padrões utilizados em esquemas terapêuticos no tratamento de infecções fúngicas: anfotericina-B (1) e fluconazol (2).....	25
FIGURA 04	Representação esquemática da parede celular fúngica.....	29
FIGURA 05	Frutos de <i>Rheedia brasiliensis</i>	33
FIGURA 06	Sistema difenilmetanona.....	34
FIGURA 07	Em negrito, o anel biciclo [3.3.1] noneno.....	34
FIGURA 08	Exemplos de benzofenonas polipreniladas.....	34
FIGURA 09	Condensação da benzoil-coA com 3-malonil-coA resultando na formação da florobenzofenona.....	35
FIGURA 10	Guttiferonas A (3), B (7), C (4), D (5), E (6), F (8), G (9), H (10), I (11), J (12), K (13) e L (14), M (15), N (16), O (17), P (18).....	37
FIGURA 11	Esquema de isolamento das benzofenonas guttiferona-A e 7-epiclusianona a partir do extrato acetato de etila de sementes de <i>R. brasiliensis</i>	42
FIGURA 12	Estrutura química, fórmula molecular e massa molar da benzofenona natural guttiferona-A (LFQM-78).....	42
FIGURA 13	Estrutura química, fórmula molecular e massa molar do derivado 14-terc-butoxicarbonil-guttiferona-A (LFQM-79).....	43
FIGURA 14	Estrutura química, fórmula molecular e massa molar do derivado 13,14-di-acetil-guttiferona- A (LFQM-80).....	44
FIGURA 15	Estrutura química, fórmula molecular e massa molar do derivado 13,14-di-metanosulfonil guttiferona- A (LFQM-81).....	45
FIGURA 16	Estrutura química, fórmula molecular e massa molar do derivado 13,14-di-(4-clorobenzoil) guttiferona-A (LFQM-82).....	46
FIGURA 17	Estrutura química, fórmula molecular e massa molar do derivado 13,14-di-(p-toluenosulfonil)- guttiferona- A (LFQM-113).....	47
FIGURA 18	Estrutura química, fórmula molecular e massa molar do derivado 13,14-di-benzoil guttiferona- A (LFQM-114).....	48
FIGURA 19	Placa de 96 poços utilizadas na metodologia de microdiluição para a avaliação da sensibilidade antibacteriana e antifúngica.....	52
FIGURA 20	Diluição seriada das substâncias para avaliação da ação antibacteriana e antifúngica por microdiluição	53
FIGURA 21	Esquema da microplaca utilizadas no teste de avaliação antimicrobiana dos compostos em estudo.....	54

FIGURA 22	A atividade proteolítica acompanhada na presença de um substrato fluorogênico (peptidil-MCA), o qual mediante clivagem pela enzima em estudo libera o peptídeo e MCA livre resultando na emissão de fluorescência.....	56
FIGURA 23	Ilustração dos frutos de <i>R. brasiliensis</i> : A- frutos inteiros; B- frutos cortados transversalmente; C- sementes com e sem casca	58
FIGURA 24	Ilustração dos extratos de <i>R. brasiliensis</i> : A- maceração das sementes de <i>R. brasiliensis</i> com acetato de etila ; B- extrato acetato de etila das sementes de <i>R. brasiliensis</i>	58
FIGURA 25	Espectro de massa do extrato acetato de etila das sementes de <i>R. brasiliensis</i> . Em destaque sinal <i>m/z</i> referente ao composto LFQM-78.....	59
FIGURA 26	Cromatografia em camada delgada (CCD): 1- extrato bruto acetato de etila de sementes de <i>R. brasiliensis</i> ; 2- Fração contendo 7-epiclusianona e garcineafenona; 3- Fração contendo guttiferona-A; 4- Padrão de 7-epiclusianona; 5- Padrão de guttiferona-A; 6- Padrão de fukugetina	60
FIGURA 27	Benzofenonas preniladas, 7-epiclusianona e guttiferona-A isoladas dos frutos de <i>R. brasiliensis</i>	61
FIGURA 28	Espectro no IV (KBr, cm^{-1}) do composto LFQM-78	62
FIGURA 29	Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto LFQM-78	63
FIGURA 30	Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) ampliado de 5,3 a 4,9 ppm do composto LFQM-78	63
FIGURA 31	Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) ampliado de 7,2 a 6,5 ppm do composto LFQM-78	64
FIGURA 32	Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) ampliado de 2,8 a 1,3 ppm do composto LFQM-78	64
FIGURA 33	Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto LFQM-78	65
FIGURA 34	Reação de obtenção do derivado LFQM-79.....	67
FIGURA 35	Espectro no IV (KBr, cm^{-1}) do derivado LFQM-79	68
FIGURA 36	Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do derivado LFQM-79	69
FIGURA 37	Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) ampliado de 1,0 a 1,2 ppm – em destaque deslocamento em 1.11 ppm referente aos 9H da metila do grupo substituinte	69
FIGURA 38	Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do derivado LFQM-79.....	71
FIGURA 39	Espectro de massa do derivado LFQM-79.....	71
FIGURA 40	Íon molecular do derivado LFQM-79.....	72
FIGURA 41	Reação de obtenção do derivado LFQM-80.....	72
FIGURA 42	Espectro no IV (KBr, cm^{-1}) do derivado LFQM-80	73
FIGURA 43	Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do derivado LFQM-80	74

FIGURA 44	Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do derivado LFQM-80 ampliado de 2,5 a 2,05 ppm – em destaque deslocamento em 2.22 ppm referente aos 6H das metilas dos grupos substituintes	74
FIGURA 45	Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do derivado LFQM-80	75
FIGURA 46	Espectro de massas do derivado LFQM-80.....	77
FIGURA 47	Íon molecular do derivado LFQM-80.....	77
FIGURA 48	Reação de obtenção do derivado LFQM-81	78
FIGURA 49	Espectro no IV (KBr , cm^{-1}) do derivado LFQM-81	78
FIGURA 50	Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do LFQM-81	79
FIGURA 51	Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do derivado LFQM-81 ampliado de 3,24 a 3,15 ppm	80
FIGURA 52	Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do derivado LFQM-81	80
FIGURA 53	Espectro de massa do derivado LFQM-81.....	82
FIGURA 54	Íon molecular do derivado LFQM-81.....	82
FIGURA 56	Reação de obtenção do derivado LFQM-82.....	83
FIGURA 57	Espectro no IV (KBr , cm^{-1}) do derivado LFQM-82	84
FIGURA 58	Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do derivado LFQM-82	85
FIGURA 59	Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do derivado LFQM-82 ampliado de 8,0 a 7,3 ppm	85
FIGURA 60	Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do derivado LFQM-82	87
FIGURA 61	Espectro de massas do derivado LFQM-82.....	87
FIGURA 62	Íon molecular do derivado LFQM-82.....	88
FIGURA 63	Reação de obtenção do derivado LFQM-113.....	88
FIGURA 64	Espectro no IV (KBr , cm^{-1}) do derivado LFQM-113	89
FIGURA 65	Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do derivado LFQM-113	90
FIGURA 66	Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do derivado LFQM-113 ampliado em 6,9-7,9 ppm	90
FIGURA 67	Espectro RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do derivado LFQM-113	92
FIGURA 68	Espectro de massa do derivado LFQM-113.....	92
FIGURA 69	Íon molecular do derivado LFQM-113.....	93

FIGURA 70	Reação de obtenção do derivado LFQM-114.....	93
FIGURA 71	Espectro no IV (KBr, cm^{-1}) do derivado LFQM-114	94
FIGURA 72	Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do derivado LFQM-114	95
FIGURA 73	Espectro RMN de ^1H ampliado 8,2- 7,3 ppm do derivado LFQM-114	95
FIGURA 74	Espectro RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do derivado LFQM-114	97
FIGURA 75	Espectro de massas do derivado LFQM-114	97
FIGURA 80	Íon molecular do derivado LFQM-114.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Diluições sequenciais dos derivados para a avaliação de seus potenciais antibacterianos e antifúngicos.....	51
Tabela 02	Fracionamento do extrato bruto acetato de etila por CC.....	61
Tabela 03	Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C de LFQM-78 (¹ H- 400 MHz; ¹³ C- 100 MHz, CDCl ₃ , δ em ppm, J=Hz, M= multiplicidade.....	66
Tabela 04	Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C de LFQM-79 (¹ H- 400 MHz; ¹³ C- 100 MHz, CDCl ₃ , δ em ppm, J=Hz, M= multiplicidade.....	70
Tabela 05	Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C de LFQM-80 (¹ H- 400 MHz; ¹³ C- 100 MHz, CDCl ₃ , δ em ppm, J=Hz, M= multiplicidade.....	76
Tabela 06	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C do composto LFQM-81 (400 e 100 MHz, CDCl ₃).....	81
Tabela 07	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C do composto LFQM-82 (400 e 100 MHz, CDCl ₃).....	86
Tabela 08	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C do composto LFQM-113 (400 e 100 MHz, CDCl ₃).....	91
Tabela 09	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C do composto LFQM-114 (400 e 100 MHz, CDCl ₃).....	96
Tabela 10	Concentração citotóxica da benzofenona natural LFQM-78 e seus derivados semissintéticos.....	102
Tabela 11	Efeito inibitório dos compostos naturais e semissintéticos em cisteína protease (papaína) e serino protease (tripsina).....	104

LISTA DE QUADROS

Quadro 01	Classificação dos principais fármacos antibióticos de acordo com o seu mecanismo de ação	28
Quadro 02	Classificação dos principais fármacos antifúngicos de acordo com o seu mecanismo de ação.....	31
Quadro 03	Avaliação da atividade antibacteriana da benzofenona natural LFQM-78 e seus derivados semissintéticos. CIM ₅₀ e CIM ₁₀₀ expressa em µmol/L.....	99
Quadro 04	Avaliação da atividade antifúngica da benzofenona natural LFQM-78 e seus derivados semissintéticos. CIM ₅₀ e CIM ₁₀₀ expressa em µmol/L.....	100
Quadro 05	Estrutura, nomenclatura e valores de QLog P octanol/água do composto natural LFQM-78 e seus derivados semissintéticos.....	101

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

ATCC- American Type Culture Collection

Boc- *Terc*-butoxicarbonila

Boc₂O- Anidrido de di-*terc*-butoxicarbonila

CC- Cromatografia em coluna

CCD- Cromatografia em camada delgada

CDCl₃- Clorofórmio deuterado

CC₅₀- Concentração Citotóxica para 50% das células

CG-EM- Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas

CIM₅₀- Concentração inibitória mínima 50%

CIM₁₀₀- Concentração inibitória mínima 100%

d- Duplete

dd- Duplo-duplete

4-DMAP- 4-*N,N*-Dimetilaminopiridina

DMSO- Dimetilsulfóxido

DTT - Ditioneitol

E-64 - *Trans*-Epoxisuccinil-L-Leucilamida(4-guanidino)-butano

Et₃N- Trietilamina

Hz- Hertz

IV- Infravermelho

J- Constante de acoplamento

LFQM - Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal

m- Multiplete

MCA - 7-amino 4-metilcumarina

MHz- Megahertz

m/z- Razão massa/carga elétrica do fragmento

MsCl- Cloreto de mesila

PPM- Parte por milhão

REA – Relação estrutura atividade

RPMI– Meio de cultura

RMN ¹H- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN ¹³C- Ressonância magnética nuclear de carbono

s- Simpleto

t- Tripleto

TsCl- Cloreto de tosila

TLCK- Tosila-L-lisina clorometil cetona

TMS- Tetrametilsilano

TRIS - Tri(hidroxi metil)aminometano

δ - Deslocamento químico (em ppm para RMN)/deformação angular (IV)

λ – Comprimento de onda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	BACTÉRIAS.....	19
1.1.1	Bactérias Gram- positivas.....	21
1.1.2	Bactérias Gram -negativas	22
1.2	LEVEDURAS.....	23
1.3	DERMATÓFITOS.....	25
1.4	CLASSIFICAÇÃO DOS AGENTES ANTIMICROBIANOS QUANTO AO MECANISMO DE AÇÃO.....	26
1.5	CLASSIFICAÇÃO DOS AGENTES ANTIFÚNGICOS QUANTO AO MECANISMO DE AÇÃO.....	29
1.6	FAMÍLIA GUTTIFERAE.....	31
1.6.1	O gênero <i>Rheedia</i>	32
1.6.1.1	<i>Rheedia brasiliensis</i>	33
1.7	BENZOFENONAS.....	33
1.8	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS GUTTIFERONAS.....	35
2	JUSTIFICATIVA	38
3	OBJETIVOS	39
4	METODOLOGIA	40
4.1	GENERALIDADES.....	40
4.2	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	41
4.2.1	Fracionamento do extrato e isolamento da guttiferona-A.....	41
4.3	MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS DA GUTTIFERONA-A.....	43
4.3.1	Derivado 14- <i>terc</i> -butoxicarbonil-guttiferona-A (LFQM-79).....	43
4.3.2	Derivado 13,14-di-acetil-guttiferona-A (LFQM-80).....	44
4.3.3	Derivado 13,14-di-metanosulfonil-guttiferona-A (LFQM-81).....	44
4.3.4	Derivado 13,14-di-(4-clorobenzoil)-guttiferona- A (LFQM-82).....	45
4.3.5	Derivado 13,14-di-(p-toluenosulfonil)-guttiferona-A (LFQM-113).....	46
4.3.6	Derivado 13,14-di-benzoil-guttiferona-A (LFQM-114).....	47
4.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	48
4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	48
4.5.1	Microrganismos.....	49
4.5.2	Preparo dos inóculos bacterianos.....	49
4.5.3	Preparo dos inóculos de fungos leveduriformes.....	50

4.5.4	Preparo do inóculo de fungos filamentosos.....	50
4.5.5	Preparo das diluições do LFQM-78 e seus derivados semissintéticos.....	50
4.5.6	Avaliação da sensibilidade bacteriana e fúngica por microdiluição em caldo.....	51
4.5.7	Avaliação da sensibilidade bacteriana.....	52
4.5.8	Avaliação da sensibilidade fúngica.....	53
4.5.9	Leitura e interpretação dos resultados.....	54
4.6	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	54
4.7	INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO- INIBIÇÃO DE PROTEASES.....	55
4.7.1	Determinação do tempo necessário para a inibição enzimática.....	56
4.7.2	Determinação da inibição de 50% da atividade enzimática (IC ₅₀).....	56
4.8	INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO - INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE PAREDE CELULAR.....	57
5	RESULTADOS EXPERIMENTAIS	58
5.1	PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO.....	58
5.1.1	Cromatografia líquida de alto desempenho acoplada a espectrometria de massas (LC-MS).....	59
5.1.2	Isolamento e purificação dos extratos brutos.....	60
5.2	CARACTERIZAÇÃO DA GUTTIFERONA-A (LFQM-78).....	61
5.3	PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS.....	67
5.3.1	Preparo e caracterização do derivado 14- <i>terc</i> -butoxicarbonil-guttiferona- A (LFQM-79).....	67
5.3.2	Reação de obtenção do derivado 13,14-di-acetil-guttiferona-A (LFQM-80).....	72
5.3.3	Preparo e caracterização do derivado 13,14-di-metanosulfonil-guttiferona-A (LFQM-81).....	77
5.3.4	Preparo e caracterização do derivado 13,14-di-(4-clorobenzoil)-guttiferona-A (LFQM-82).....	82
5.3.5	Preparo e caracterização do derivado 13,14-di-(<i>p</i> - toluenosulfonil)-guttiferona (LFQM-113)....	87
5.3.6	Preparo e caracterização do derivado 13, 14-di-benzoil-guttiferona (LFQM-114).....	92
5.4	RELAÇÃO ESTRUTURA - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	97
5.5	CITOTOXICIDADE.....	102
5.6	INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTIMICROBIANA.....	103
5.6.1	Ação sobre síntese da parede celular.....	103
5.6.2	Ação sobre enzimas proteolíticas utilizando como modelo as enzimas Papaína e Tripsina.....	104
6	CONCLUSÃO	106
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

1 INTRODUÇÃO

Até a primeira metade do século XX, as alternativas terapêuticas eram escassas e muitos dos casos de infecções bacterianas eram responsáveis pelas altas taxas de mortalidade. A descoberta dos antibióticos revolucionou a história da medicina, de modo que, atualmente, existe um grande arsenal disponível desses fármacos antimicrobianos. Em contrapartida, devido à grande expansão desta terapia, o uso irracional de antibióticos associado às más condições de higiene e saneamento, o aumento de pacientes imunocomprometidos e a demora no diagnóstico das infecções bacterianas levaram à seleção de microrganismos resistentes (GUIMARÃES et al., 2010). Durante as duas últimas décadas, o problema da resistência aumentou consideravelmente o custo do tratamento das infecções e fez com que a taxa de mortalidade devido a doenças infecciosas voltasse a crescer, tornando-se um dos principais problemas de saúde pública (TENOVER, 2006).

Devido a esses problemas é evidente a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias para o controle das infecções microbianas, seja pelo incentivo do uso racional dos antibióticos, como pela descoberta de moléculas mais eficazes, a fim de substituir os antibióticos convencionais. Os produtos naturais extraídos de plantas exercem um papel importante no processo de descoberta de fármacos, sejam como modelos estruturais para a síntese de moléculas novas ou pelas suas propriedades farmacológicas. O valor dos produtos naturais está claramente reconhecido e os desafios são identificar novos compostos bioativos, elucidar seus mecanismos de ação e propor o uso terapêutico (PINTO et al., 2002).

O presente trabalho tem como proposta contribuir com o maior conhecimento da atividade antimicrobiana da guttiferona-A, uma benzofenona poliprenilada natural, e seus derivados semissintéticos, especialmente no que se refere à modificação das características de hidro/lipofilicidade através da inserção de grupos substituintes nas hidroxilas fenólicas e no estudo da relação estrutura-atividade, visando à otimização do perfil de atividade biológica. Com este trabalho, objetiva-se a obtenção de novas moléculas, mais ativas contra microrganismos em que a guttiferona-A já apresentou atividade, bem como em outros microrganismos em que a molécula natural não mostrou atividade significativa.

1.1 BACTÉRIAS

As bactérias são organismos simples 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 nenhuma membrana nuclear e por essa razão são chamadas de procarioto (TORTORA et al., 2005).

A parede celular de uma célula bacteriana é responsável pela sua forma da célula e de acordo com a constituição e organização estrutural da parede, as bactérias podem ser divididas em dois grandes grupos: Gram-negativas e Gram-positivas. 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 (FIGURA 01) 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. Já a parede celular das bactérias Gram-negativas (FIGURA 02), consiste de uma ou poucas mais camadas de peptidoglicano e uma membrana externa formada por lipoproteínas, lipopolissacarídeos e fosfolipídeos. 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 (SILVA et al., 1999).

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 (SCHAECHTER et al., 2002))

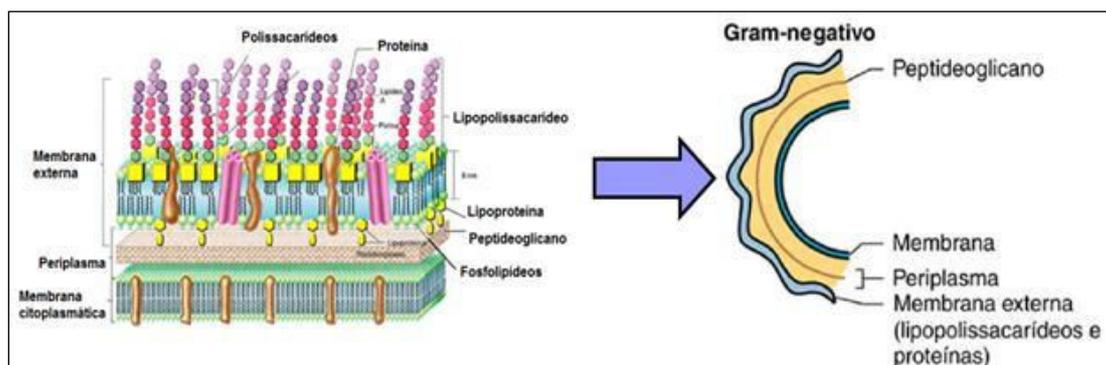


Figura 01 - Representação esquemática da parede celular de bactéria Gram-negativa (TORTORA et.al., 2005)

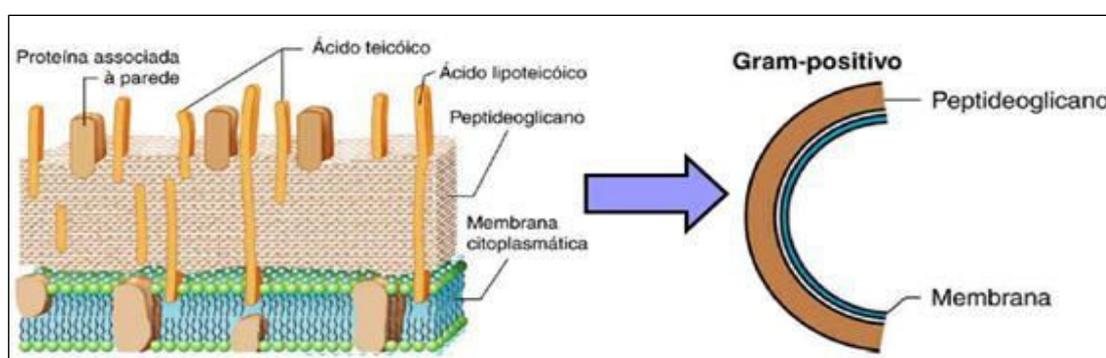


Figura 02 - Representação esquemática da parede celular de bactéria Gram-positiva (TORTORA et al., 2005)

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. O espaço periplasmático é composto por uma ou poucas camadas de peptidoglicano e um gel composto por várias substâncias, no qual podem ser encontradas algumas enzimas, como as beta-lactamases, capazes de inativar antibióticos beta-lactâmicos, tornando a célula resistente a esses agentes (RYAN, 1996).

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 patogênicas ou patogênicas oportunistas (TRABULSI et al., 1999).

1.1.1 Bactérias Gram-positivas

As bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* são patógenos humanos e de outros mamíferos. Dentre as diversas espécies o *Staphylococcus aureus* são cocos Gram-positivos aeróbios ou anaeróbios facultativos, coagulase-positiva crescendo melhor em anaerobiose e que ocorrem tipicamente em agrupamento como 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 (RYAN et al, 1996). 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 et al., 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 do microrganismo em desenvolver resistência rapidamente aos antibióticos convencionais, como as penicilinas, contribui para o aumento de sua patogenicidade (CATÃO et al., 2006).

O *Staphylococcus epidermidis* faz parte da flora normal da pele e da mucosa de seres humanos e animais superiores. O *S. epidermidis* é uma espécie bem menos virulenta do que *S. aureus*. Não apresentam a produção de coagulase e algumas cepas apresentam a produção muito tímida de certas enzimas proteolíticas. Todavia, isto não significa que *S. epidermidis* não possa ser patogênico (JAWETZ et al., 1998). Esta espécie tem muitos fatores de adesão e forma muito biofilme, sendo perigosa para pacientes que fazem uso de material invasivo de plástico (cateter, 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).

A maioria dos membros do gênero *Bacillus* são 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). O *Bacillus cereus* é uma bactéria mesófila aeróbia, em forma de bastonete espiralado e formador de esporos termorresistentes, amplamente distribuída no meio ambiente, tanto em sua forma de esporos como em células vegetativas. Este microrganismo contamina facilmente alimentos, tais como grãos, cereais, vegetais e condimentos, produtos cárneos e lácteos, que passam a ser importantes veículos de infecção de doenças de origem alimentar.

1.1.2 Bactérias Gram-negativas

Dentre as diversas espécies a *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, sendo um dos microrganismos mais prolíficos no trato intestinal humano. Normalmente é inofensiva, mas pode gerar algumas linhagens patogênicas que possuem fimbrias 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. Essas linhagens são classificadas pelas suas propriedades de virulência, e cada grupo provoca diarreia através de um mecanismo diferente (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 (MIMS et al., 1999).

As espécies do gênero *Proteus* são regularmente encontradas no intestino do homem. Causam infecções principalmente no trato urinário, sendo uma das primeiras causas de infecções comunitárias e a segunda causa de infecções hospitalares. Esses microrganismos hidrolisam a uréia formando amônia, tornado assim a urina dos pacientes com infecção crônica muito alcalina (TRABULSI et al., 1999).

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. (KONEMAN et al., 2001).

1.2 LEVEDURAS

As leveduras são fungos unicelulares, não-filamentosos, caracteristicamente esféricos ou ovais. Amplamente encontradas na natureza, são capazes de crescimento anaeróbico facultativo, podendo utilizar oxigênio ou um componente orgânico como acceptor final de elétrons. Esse é um atributo valioso porque permite uma grande capacidade de adaptação, garantindo a sobrevivência destes fungos em vários ambientes (KONEMAN et al., 2001).

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 (SCHAECHTER et al., 2002).

As candidíases podem ser superficiais ou profundas, com localização cutânea, mucosa, muco-cutânea, visceral ou sistêmica. Na candidíase muco-cutânea os tecidos da mucosa oral e vaginal são os mais atingidos. A candidíase cutânea envolve as áreas da pele das mãos, virilhas e axilas. Já 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 aquelas correlacionadas com a AIDS ou outras imunodeficiências (LACAZ, 2002).

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. Entretanto, somente 3 ou 4 espécies são responsáveis pela ocorrência de mais de 90% das micoses humanas (KURTZMAN et al.; 1998). A maioria destas espécies pode ser isolada da microbiota normal da pele, trato gastrointestinal, trato geniturinário, respiratório e do ambiente tais como do ar e de superfícies inanimadas (EGGIMANN, 2003).

As diversas espécies de *Candida* apresentam variado grau de suscetibilidade aos agentes antifúngicos. Por exemplo, *C. lusitaniae* é menos sensível à anfotericina B (1) e *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* são menos sensíveis ao fluconazol (2) que outras espécies de *Candida* (YANG et al., 2005). Atualmente a anfotericina-B (1), um polieno poliidroxiado, e o fluconazol (2), um composto azólico (FIGURA 03), são os dois fármacos mais comumente utilizados no tratamento de infecções por *Candida* (BAKER et al., 2004). Ambos os antifúngicos estão associados a altos custos e a alta diversidade de efeitos colaterais e, em alguns casos, estão associados a casos de resistência.

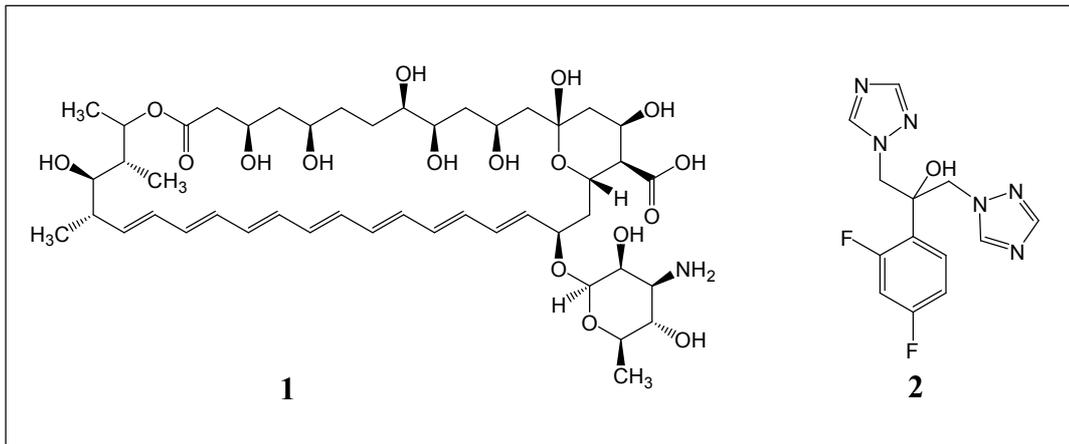


Figura 03 - Exemplos de antifúngicos padrões utilizados em esquemas terapêuticos no tratamento de infecções fúngicas- anfotericina B (1) e fluconazol (2)

O uso indiscriminado e inadequado de antifúngicos e inibidores celulares tem levado ao isolamento de linhagens resistentes de *C. albicans*, levando à 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 (CASALI et al., 2003).

1.3 DERMATÓFITOS

A expressão dermatófito é utilizada para designar grupos de fungos multicelulares e filamentosos que em vida parasitária vivem à custa de queratina da pele, unhas e pelos. Entre os dermatófitos estão os gêneros *Trichophyton* e *Microsporum* (WEITZMAN et. al. 1995). As infecções por dermatófitos, denominadas dermatofitoses, incluem organismos fúngicos que colonizam a camada epidérmica queratinizada e estabelecem uma reação inflamatória associada no hospedeiro. Essas infecções são geralmente cutâneas e restritas à derme, pois em indivíduos sadios esses fungos não conseguem penetrar em tecidos e órgãos. As principais patologias causadas pelos dermatófitos também são conhecidas como tíneas (TORTORA et al., 2005).

O *Microsporum gypseum* é um fungo de espécie geofílica, que se encontra no solo de jardins, e quando acomete seres humanos provoca lesões inflamatórias e impetiginosas. O *Trichophyton rubrum* é o agente etiológico da *Tinea pedis*, ou pé de atleta, que acomete principalmente os pés e as mãos. Espécie antropofílica de distribuição mundial é responsável por cerca de 40% do número de casos totais de dermatofitoses. Este fungo pode infectar os pelos e a pele (SCHAECHTER et al., 2002). O *Trichophyton tonsurans* é um fungo antropofílico de distribuição mundial, mas considerado endêmico nos Estados Unidos, Canadá, México e nordeste da América do Sul. A *Tinea capitis* de ponto negro epidérmico é a causa das infecções nos países acima citados. Este fungo foi isolado, também, de casos de *Tinea corporis*, *Tinea pedis* e, ocasionalmente, onicomicose (FISHER et al., 2001).

1.4 CLASSIFICAÇÕES DOS AGENTES ANTIBACTERIANOS QUANTO AO MECANISMO DE AÇÃO

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:

- Inibidores da síntese de parede celular bacteriana

A parede celular bacteriana de Gram-positivos contém peptidoglicanos e ácido teicóico e as bactérias podem estar rodeadas por proteínas ou envelope de polissacarídeos. Bactérias Gram-negativas contém na parede celular peptidoglicanos, lipopolissacarídeos, lipoproteínas, fosfolipídeos e proteínas. 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 et al., 1997).

- 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 sua molécula de grupamentos básicos 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).

- 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 ou interconversão. Para iniciar a síntese de DNA é necessária a ativação prévia de uma enzima para desenrolar a dupla fita de DNA. Esta enzima é a DNA-girase ou topoisomerase II, que pode interferir na replicação e transcrição do DNA (SCHAECHTER et al., 2002).

- 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 onde inibe a formação do peptídeo por ligação à enzima peptidiltransferase nessa subunidade (TAVARES, 1999)

- 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 (MIMS et al., 1999).

Quadro 01- Classificação dos principais fármacos antibióticos de acordo com o seu 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
Cefalosporinas (β -lactâmicos)		Cefalexina, cefalotina, cefepime, cefotaxima, cefoxitina, ceftazidima, ceftriaxona
Carbapenems (β -lactâmicos)		Imipenem, meropenem
Glicopeptídeos		Vancomicina
Aminoglicosídeos	Afetam a síntese de proteína Bacteriana	Amikacina, canamicina, estreptomicina, gentamicina, neomicina, tobramicina
Lincosamidas		Clindamicina
Fenólicos		Cloranfenicol
Macrolídeos		Clarithromicina, eritromicina, azitromicina
Tetraciclínicas		Tetraciclínicas
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/trimetopim, sulfacetamida

1.5 CLASSIFICAÇÃO DOS AGENTES ANTIFÚNGICOS QUANTO AO MECANISMO DE AÇÃO

Os antifúngicos existentes no mercado atualmente possuem limitações terapêuticas, principalmente quando se levam em consideração os 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 04), 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 (ZACCHINO et al., 2003). 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. (LACAZ, 2002).

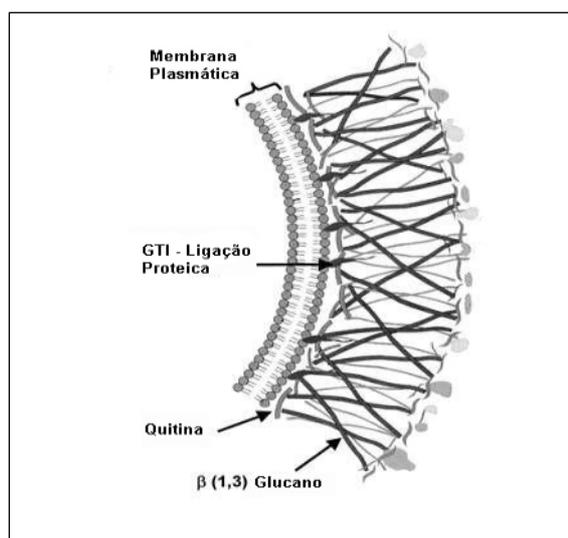


Figura 04 - Representação da estrutura da parede celular fúngica (TORTORA et al., 2005)

Os agentes antifúngicos podem ser classificados em duas categorias: 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 têm-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).

Já o mecanismo de ação de azóis, baseia-se na inibição da esterol 14- α -demetilase, 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 (RANG e DALE, 1993).

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 (SCHAECHTER et al., 2002).

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	

1.6 FAMÍLIA GUTTIFERAE

A família Guttiferae, também conhecida como Clusiaceae, pertence à classe das angiospermas e é caracterizada pela presença significativa de látex na maioria de suas espécies. Esta família possui 49 gêneros, como *Vismia* (NGUEMEVING et al., 2006) *Garcinia* (DEACHATHAI et al., 2006), *Clusi* (DIAS et al., 2006), *Cratoxylum* (BOONSRI et al., 2006), *Harungana* (TIH et al., 2006), *Mesua* (UAWONGGUL et al., 2006), *Kielmeyera* (ZAGOTO et al., 2006) e mais de 1000 espécies distribuídas em 6 subfamílias, todas com representantes no Brasil (JOLY, 1993).

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

Esta família é fonte de uma ampla variedade de metabólitos biologicamente ativos incluindo antraquinonas, flavonoides, xantonas (BARNES et al., 2001) e benzofenonas (OLIVEIRA et al., 1999). Em virtude desta grande quimiodiversidade, espécies desta família têm sido descritas por um amplo espectro de propriedades farmacológicas como antidepressiva (ZAGOTO et al., 2006), antiobesidade, citotóxica, (KIM et al., 2004)

antimalárica (LIKHITWITAYA et al., 1998), antivirais (MAGADULA et al., 2010) antiproliferativa (MOONGKARNDI et al., 2004), anti-inflamatória (YOU et al., 2008), antioxidante e antimicrobiana (MACKEEN et al., 2000).

1.6.1 O Gênero *Rheedia*

O gênero *Rheedia*, também denominado como *Garcinia*, é constituído por diversas espécies, como *G. cowa*, *G. gardneriana* e *G. mangostan*, que têm demonstrado uma considerável diversidade de atividades e constituintes químicos (RAO et al., 2003). Estudos de bioprospecção em espécies deste gênero evidenciaram atividades antioxidante e antimutagênica de *G. pedunculata* (JAYAPRAKASHA et al., 2006), atividade antileucêmica *in vitro* do extrato aquoso de *G. mangostana* e atividade leishmanicida (PEREIRA et al., 2010) e antimicrobiana (NALDONI et al. 2009) do extrato de *G. brasiliensis*. Além destas, *G. cambogia* vem sendo utilizada no tratamento de obesidade (HAYAMIZU et al., 2003).

Dos frutos de *G. cowa*, Panthong e colaboradores (2006) isolaram as xantonas A-E, descritas como responsáveis por atividade antibacteriana. As guttiferonas, isoladas de diferentes gêneros e espécies da família Guttiferae, demonstraram efeitos citopáticos contra o HIV *in vitro* (GUSTAFSON et al.1992). Em um estudo conduzido por Guo (2006) o ácido gambóico, isolado da resina extraída de *G. hanburyi*, apresentou atividade antineoplásica. *G. kola* é outra espécie utilizada na medicina tradicional, apresentando uma complexa mistura de biflavonóides, benzofenonas preniladas e xantonas (IWU et al. 2002). Estudos químicos dos frutos de *G. gardneriana* demonstraram a presença de alguns constituintes com considerável poder antioxidante, como biflavonóides, xantonas, benzofenonas poli-isopreniladas, triterpenos e cumarinas (SANTOS et al. 1999).

1.6.1.1 *Rheedia brasiliensis*

A espécie *Rheedia brasiliensis* (Mart) Planch e Triana, ou *Garcinia brasiliensis* Mart, nativa da Amazônia, do Paraguai e norte da Argentina, é cultivada em todo o território brasileiro, onde é conhecida popularmente como bacuri, bacupari, porocó e bacuripari, e na Bolívia, como guapomo (MORTON, 1987). O bacuparizeiro é uma árvore em forma de pirâmide rica em um látex amarelo, com folhas em formato de lança, flores abundantes e polígamas. Os frutos são comestíveis, ovais, com a casca elástica (pericarpo) e amarela que pode ser facilmente removida; a polpa é branca, suave, saborosa e possui 2 a 3 sementes (FIGURA 05) (MORTON, 1987). Como descrito por Villagómez Rojas (1990), as sementes apresentam forma elipsoidal, com coloração externa castanha e com linhas claras, longitudinalmente, bem visíveis, semelhantes a nervuras. Internamente, são de coloração branco-amarelada e exsudam látex amarelo. Cerca de 8 a 9% do peso das sementes é referente ao óleo que é utilizado em cataplasmas para o tratamento de feridas e panarício (espécie de furúnculo) (CORRÊA, 1984). A infusão da polpa possui ação narcótica semelhante à nicotina e os frutos são ainda utilizados no tratamento de tumores, inflamações do trato urinário, artrite e como analgésico (MARTINS et al., 2008).



Figura 05 - Frutos de *Rheedia brasiliensis*

1.7 BENZOFENONAS

As benzofenonas são compostos fenólicos de origem natural e de distribuição restrita, ocorrendo principalmente nas famílias Guttiferae e Gentianaceae. A família Guttiferae se

destaca como fonte de benzofenonas geralmente substituídas por isoprenóides ou geranóides, que podem estar ciclizados ou não (CIOCHINA et al., 2006).

As benzofenonas podem ser agrupadas de acordo com a estrutura do seu núcleo e classificadas como: simples e polipreniladas (BEERHUES, 1996). Pela presença desse anel biciclo [3.3.1] noneno (FIGURA 07), as benzofenonas polipreniladas são também classificadas como acilfloroglucinóis poliprenilados policíclicos do tipo B. Como exemplos, podem-se citar a guttiferona-A (3), o garcinol (4), a 7-epiclusianona (5) e a garcinafenona (6) (CIOCHINA et al., 2006). (FIGURA 08)

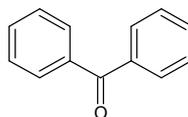


Figura 06 - Sistema difenilmetanona

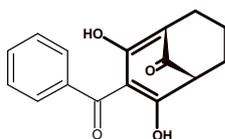


Figura 07 - Em negrito, o sistema biciclo [3.3.1]noneno

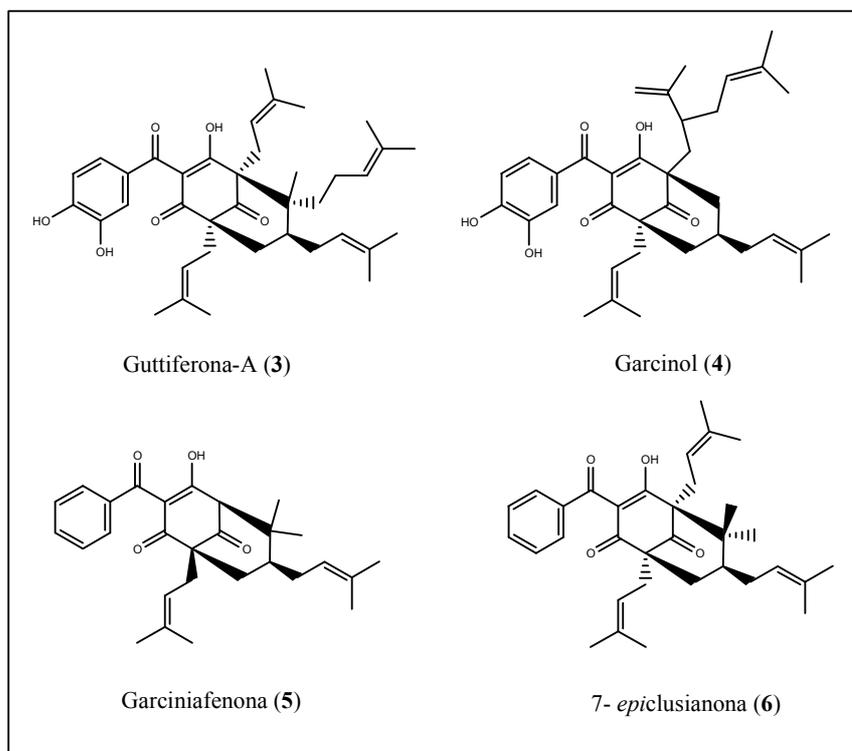


Figura 08 - Exemplos de benzofenonas polipreniladas naturais.

A 7-epiclusianona (6), primeiramente isolada dos frutos de *R. gardneriana* (SANTOS et al., 1999) apresentou atividade *in vitro* contra tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (ALVES et al., 1999), em baixas concentrações, é vasodilatadora e, em altas concentrações, vasoconstritora (CRUZ et al., 2006). Estudo realizado por Neves e colaboradores (NEVES et al., 2007) evidenciou, também, propriedades anti-anafiláticas. Esta benzofenona poliprenilada foi também testada quanto à sua atividade antidiabética, mas não apresentou ação significativa (OLIVEIRA et al., 2005). A garciniafenona (5), cujo isolamento e elucidação estrutural foram descritos por Derogis e colaboradores (2008) é muito semelhante à 7-epiclusianona, diferindo apenas na ausência de um grupamento prenila. A guttiferona-A (3) foi primeiramente isolada de *Symphonia globulifera* e descrita com atividade anti-HIV (GUSTAFSON et al. 1992) e teve sua estrutura elucidada por difração de raios-X em 2007 (MARTINS et al 2007).

As benzofenonas são descritas biossinteticamente como precursores imediatos de xantonas (CIOCHINA et al., 2006). Klingauf e colaboradores (2005) afirmaram que a biossíntese de benzofenonas envolve a condensação entre a benzoil-CoA e a malonil-CoA, mas também pode envolver a condensação de malonil-CoA com acil-CoA como descrito por Ciochina (2006). Ambos os mecanismos resultam na formação de uma florobenzofenona (FIGURA 09).

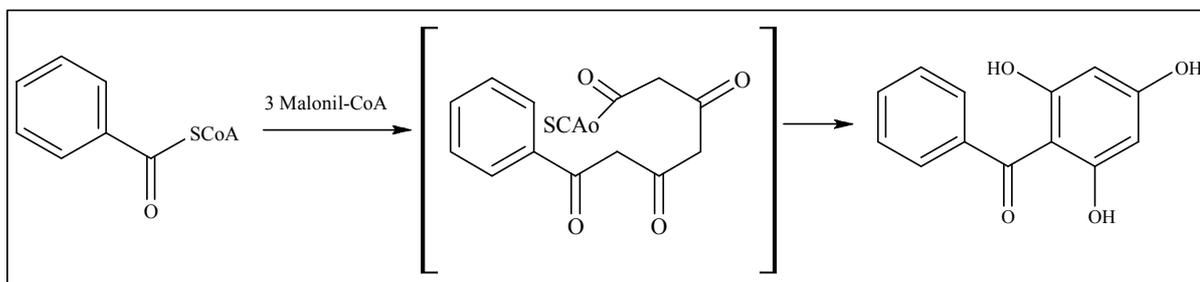


Figura 09 - Condensação da benzoil-coA com 3-malonil-coA resultando na formação da florobenzofenona

1.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS GUTTIFERONAS

As guttiferonas são benzofenonas polipreniladas hidroxiladas, com várias citações na literatura por seu amplo espectro de atividades biológicas e sua ocorrência comum na família Clusiaceae. Há relatos de 15 tipos de guttiferonas: A (3), B (7), C (4), D (5), E (6), F (8), G

(9), H (10), I (11), J (12), K (13) e L (14), M (15), N (16), O (17), P (18), (Figura 10) sendo que alguns desses compostos são relatados como antimicrobianos. Guttiferona A (3), isolada pela primeira vez na espécie *Symphonia globulifera* (GUSTAFSON et al.1992), apresenta atividades como plasmodicida (PEREIRA et al., 2010), antibacteriana (NALDONI et al., 2009), anti-HIV (GUSTAFSON et al.1992), tripanocida (MARTINS et al., 2008) e leishmanicida (ROUX et al., 2000). Guttiferona B (7), C (4) e D (5) isolada de *Symphonia globulifera* e guttiferona E (6) isolada de *G. pyrifer*a apresentaram atividade anti-HIV (GUSTAFSON et al., 1992). A guttiferona F (8) isolada de *G. pyrifer*a apresentou atividade leishmanicida e antibacteriana. Guttiferona I (11), isolada de *G. smeathmannii*, apresentou atividade antibacteriana com CIM= 1,22-0,61 µg/mL (FULLER et al., 1992). Não existem relatos de atividade antimicrobiana das guttiferonas: G (9), H (10), K (13), L (14), M (15), N (16), O (17) e P (18).

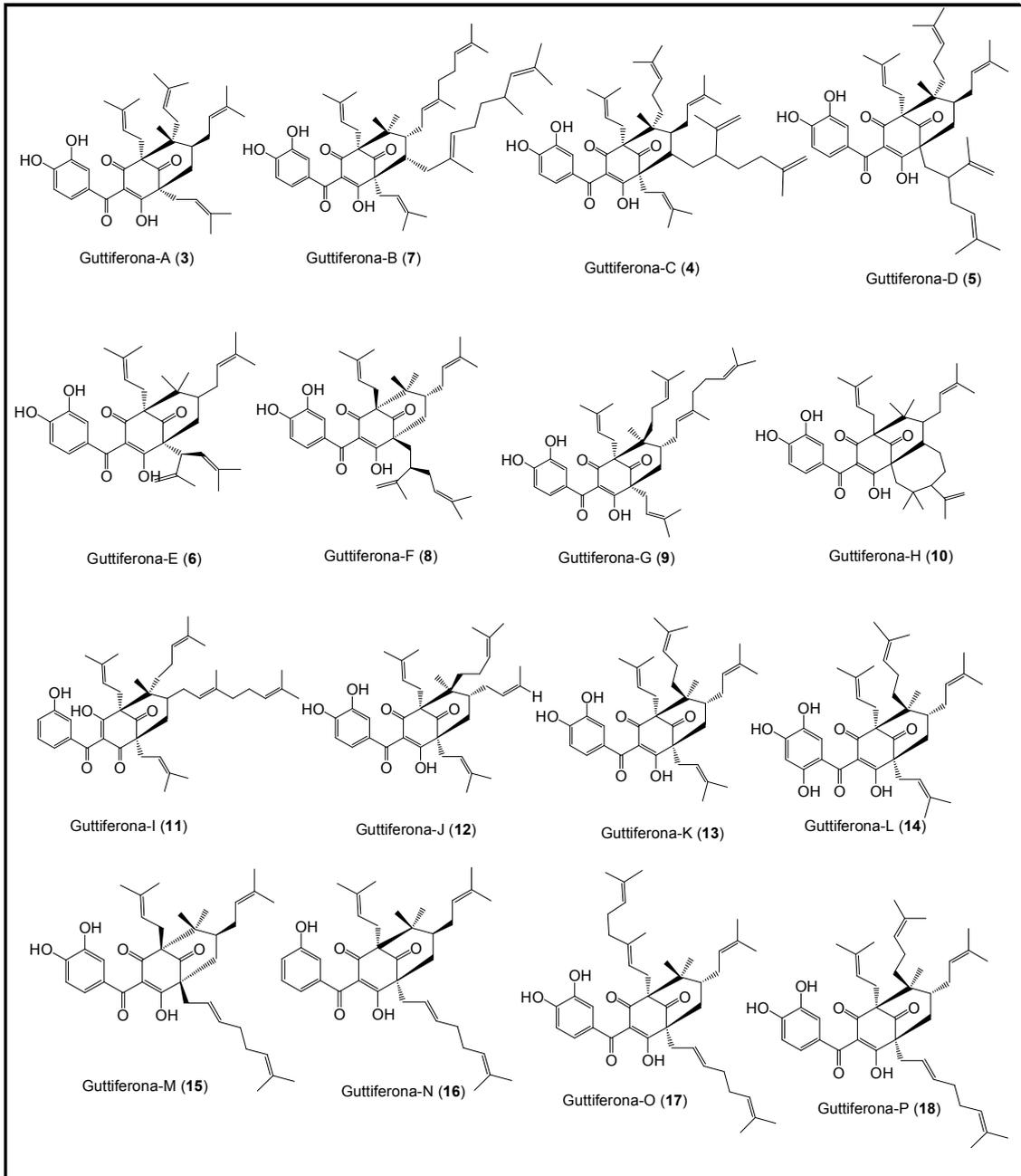


Figura 10 - Guttiferonas A (3), B(7), C(4), D(5), E (6), F (8), G (9), H (10), I (11), J (12), K(13) e L (14), M (15), N (16), O (17), P (18)

2 JUSTIFICATIVA

As infecções causadas por bactérias e fungos são muito comuns e a resistência adquirida pelos microrganismos aos antibióticos atualmente disponíveis tem se tornado muito frequente, mostrando a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias para o controle das infecções microbianas. A descoberta de moléculas mais eficazes, a intensificação na busca por antibióticos sintéticos alternativos e/ou fármacos de fontes naturais mais eficazes, a fim de substituir os antibióticos convencionais são estratégias que podem ser adotadas para minimizar o surgimento da resistência.

Grande parte dos medicamentos encontrados no mercado é derivada direta ou indiretamente de vegetais, microrganismos, organismos marinhos, vertebrados e invertebrados terrestres. De acordo com Newman (2003), dos medicamentos disponibilizados no mercado entre 1981 e 2002, 28% possuem princípios ativos isolados de produtos naturais ou semissintéticos, ao passo que 24% são sintéticos com grupos farmacofóricos baseados em estruturas de produtos naturais. Portanto, mais da metade dos novos medicamentos lançados no referido período são derivados de produtos naturais, mostrando que essa fonte é muito importante nos estudos de desenvolvimento de novos medicamentos. As plantas representam as maiores fontes de substâncias biologicamente ativas que podem ser usadas na terapêutica, devido à grande diversidade estrutural de metabólitos produzidos e representam a fonte mais antiga de tratamento de inúmeras enfermidades no ser humano.

Portanto, considerando que a guttiferona-A já teve sua eficácia comprovada na inibição do crescimento de algumas bactérias Gram-positivas e tendo em vista a magnitude das infecções causadas por fungos e bactérias, face aos problemas relacionados com os tratamentos existentes atualmente, nesse trabalho foi proposto a síntese e avaliação de novas substâncias potencialmente bioativas derivadas daquele produto natural, abundante e de fácil isolamento.

3 OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo o isolamento da guttiferona-A, a partir do extrato acetato de etila das sementes de *Rheedia brasiliensis*, utilizada como material de partida para a obtenção de derivados semissintéticos, modificados nos grupos hidroxílicos fenólicos e com propriedades lipofílicas modificadas em relação ao produto original. Os derivados foram analisados e comparados quanto relação estrutura-atividade antimicrobiana.

4 METODOLOGIA

4.1 GENERALIDADES

Os procedimentos de cromatografia em coluna (CC) foram realizados com gel de sílica 60 (70- 230 Mesh (0,063–0,200 nm) ou 230–400 Mesh (0, 200–0,360 nm), ASTM, da marca Merck®, empacotados em colunas de vidro. As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram feitas em placas de gel de sílica 60 G Merck®, com espessura de 0,25 mm (analítica) indicador de fluorescência F 254. Para visualização das placas cromatográficas foram utilizados vapor de iodo sublimado, solução etanólica de FeCl₃ a 1% (m/v) ou luz ultravioleta ($\lambda = 254$ ou 365 nm). Os solventes utilizados nas reações e em cromatografia foram de grau P.A, tratados adicionalmente quando necessário (PERRIM, 1988).

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro Shimadzu modelo Prestig-21, no Laboratório Interdisciplinar de Química (LABIQ) do Instituto de Ciências Exatas da UNIFAL-MG, em pastilhas de KBr e as absorções expressas em números de ondas (cm⁻¹). Os espectros de massas foram obtidos em cromatógrafo em fase gasosa acoplado a espectrometria de massas (CG-EM) Shimadzu, modelo QP5050A, no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os espectros de ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C foram obtidos no Laboratório Multiusuário de Análise por RMN (LAMAR) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), em espectrômetros Varian modelo MR 400 (400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C). As amostras foram solubilizadas em CDCl₃, utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno e os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

Os ensaios enzimáticos foram realizados no Laboratório de Bioquímica da UNIFAL-MG, em um espectrofluorímetro Varian modelo Cary Eclipse, utilizando 7-amino-4-metilcumarina (MCA) para calibração do equipamento. Os ensaios microbiológicos e de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da UNIFAL-MG e as leituras dos resultados foram feitas em leitor automático de microplacas (Zenith – modelo 200 rt).

4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Os frutos de *Rheedia brasiliensis* foram coletados no campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e separados em cascas e sementes. Foi realizada a limpeza necessária do material, retirando-se as sementes estragadas e contaminadas. Uma vez limpas e secas, foram colocadas em local arejado e ao abrigo da luz. O extrato foi preparado pelo processo de maceração com acetato de etila, após obtenção do extrato o solvente foi evaporado por rota evaporador e obteve-se o extrato acetato de etila de sementes de *R. brasiliensis*.

4.2.1 Fracionamento do extrato e isolamento da guttiferona-A

O isolamento da guttiferona-A (FIGURA 11) foi realizado a cada 50 g do extrato acetato de etila das sementes de *Rheedia brasiliensis*, por CC, segundo adaptação da metodologia descrita por SANTOS et al., 1999. A eluição das substâncias iniciou-se com hexano e a polaridade foi aumentada gradativamente com adição de acetato de etila. As frações foram coletadas em volumes de 250 mL e analisadas por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 95:5; reveladores: solução etanólica de FeCl₃ vapor de iodo sublimado e sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm). As frações foram agrupadas por comparação por CCD. Em seguida, foram tratadas com hexano e, após algum tempo de repouso, foi observada a decantação de um sólido amarelo (4g de guttiferona-A, com rendimento de 8%).

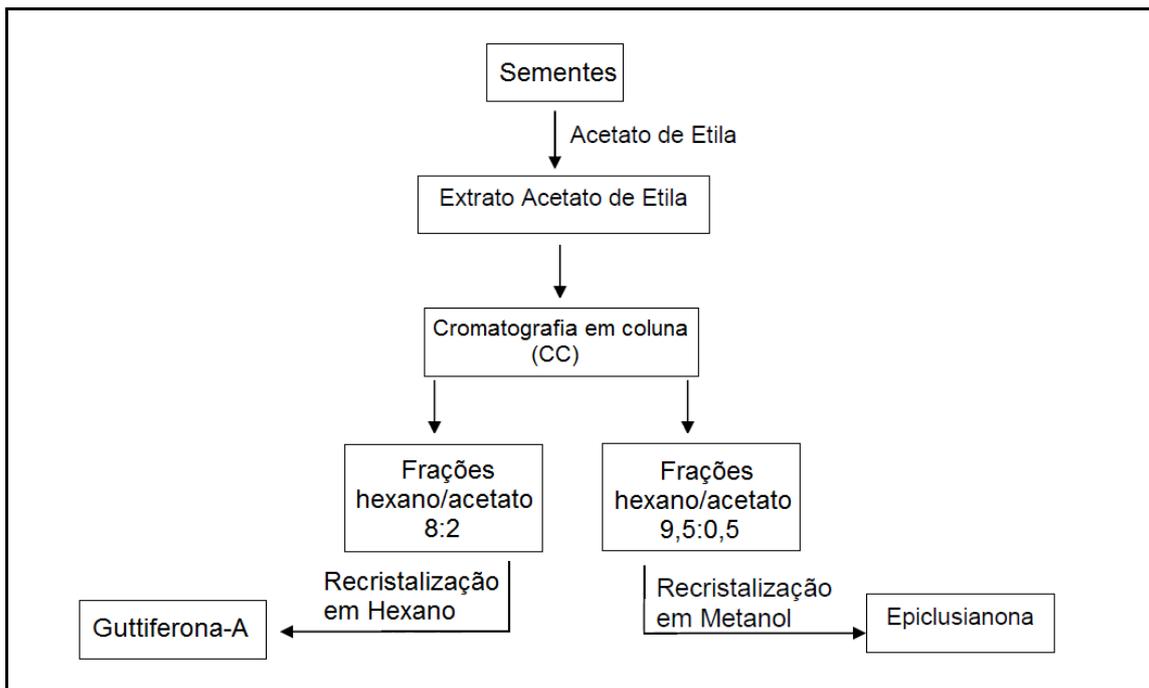


Figura 11 - Esquema de isolamento das benzofenonas guttiferona-A e 7-epiclusianona a partir do extrato acetato de etila de sementes de *R. brasiliensis*

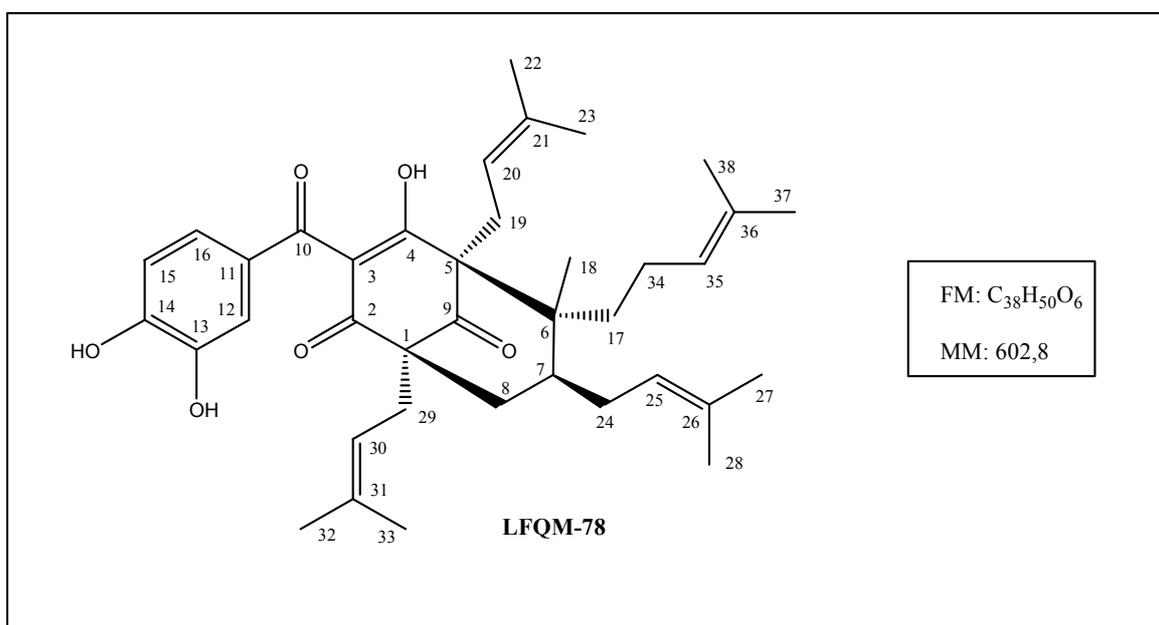


Figura 12 - Estrutura química, fórmula molecular e massa molar da guttiferona-A (LFQM-78)

4.3 MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS NA GUTTIFERONA-A

4.3.1 Derivado 14-*terc*-butoxicarbonil-guttiferona-A (LFQM-79)

Em balão monotubulado foram colocados 100 mg (0,17 mmol) de LFQM-78, solubilizados em 5 mL de CH₂Cl₂, seguido da adição de 61 mg (0,34 mmol) de anidrido de di-*terc*-butoxicarbonila (Boc₂O) e quantidades catalíticas de 4-DMAP. O sistema foi mantido sob agitação constante em temperatura ambiente por 12 horas e monitorado por CCD (hexano/acetato de etila 7:1), ao final da reação, foram adicionados 20 mL de água destilada e o material reacional foi extraído com acetato de etila (3 x 20 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas em sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por coluna cromatográfica resultando em 95 mg de LFQM-79, com rendimento de 81%.

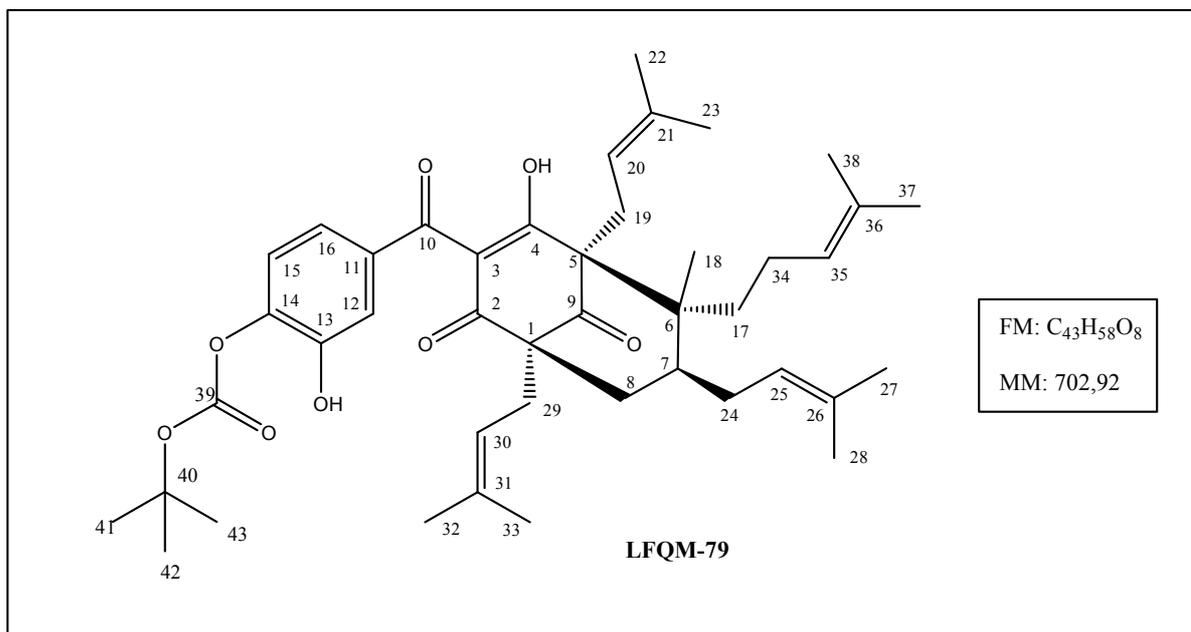


Figura 13 - Estrutura química, fórmula molecular e massa molar do derivado 14-*terc*butoxicarbonil-guttiferona- A (LFQM-79)

4.3.2 Derivado 13,14-di-acetil-guttiferona-A (LFQM-80)

Em um balão monotubulado foram adicionados 100 mg (0,17 mmol) de LFQM-78 solubilizados em 5 mL de CH₂Cl₂ seguido da adição de 1mL (10,2 mmol) de anidrido acético e quantidades catalíticas de 4-DMAP. O sistema foi mantido sob agitação constante em temperatura ambiente por 4 horas e monitorado por CCD (hexano/acetato de etila 7:2), ao final da reação, foi adicionado 20 mL de água destilada e o material reacional foi extraído com acetato de etila (3 x 20 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas em sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por coluna cromatográfica, resultando em 100 mg de LFQM-80, com rendimento de 87%.

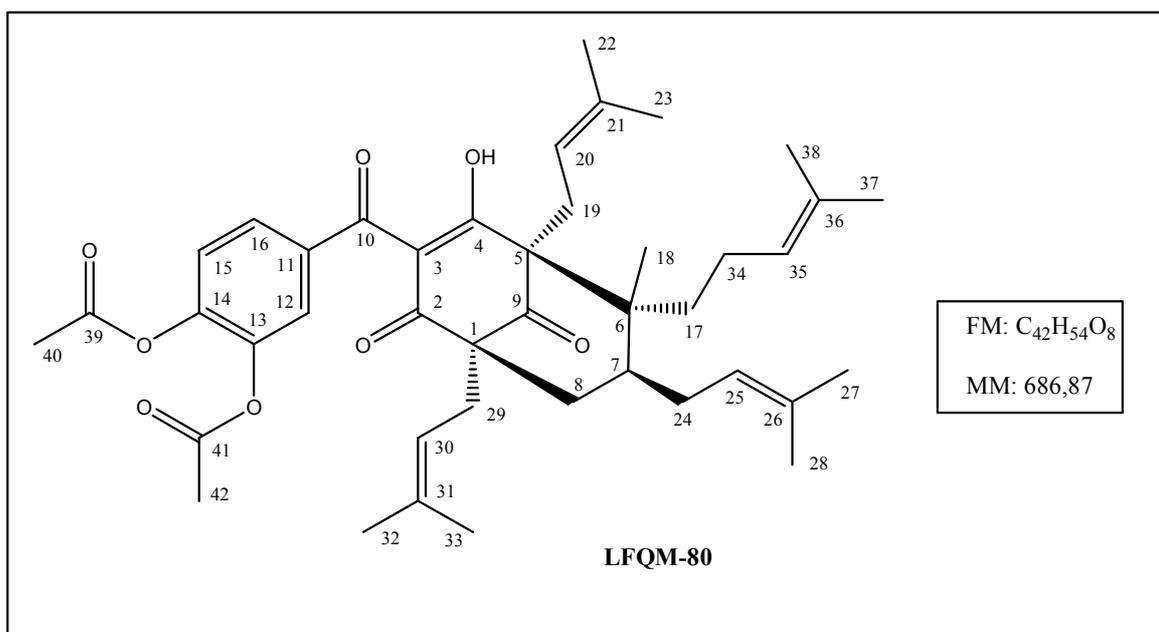


Figura 14 - Estrutura química, fórmula molecular e massa molar do derivado 13,14-diacetil-guttiferona-A (LFQM-80)

4.3.3 Derivado 13,14-di-metanosulfonyl-guttiferona-A (LFQM-81)

Em um balão monotulado sob atmosfera de N₂ colocou-se 100 mg (0,17mmol) de LFQM-78 dissolvido em 5 mL de CH₂Cl₂ seco. O sistema foi resfriado a -5° C, seguido da adição de 0,14 mL (1,02 mmol) de Et₃N e 0,08 mL (1,02 mmol) de MsCl recentemente

destilado. O sistema reacional foi mantido à temperatura ambiente por 8 horas. Quando a análise por CCD (hexano/acetato 7:3) indicou conversão completa do material de partida, a mistura reacional foi extraída com CH₂Cl₂ e os extratos orgânicos combinados foram lavados com NaHCO₃, secos com MgSO₄ anidro e filtrados. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna, resultando em 88 mg de LFQM-81, com rendimento de 70%.

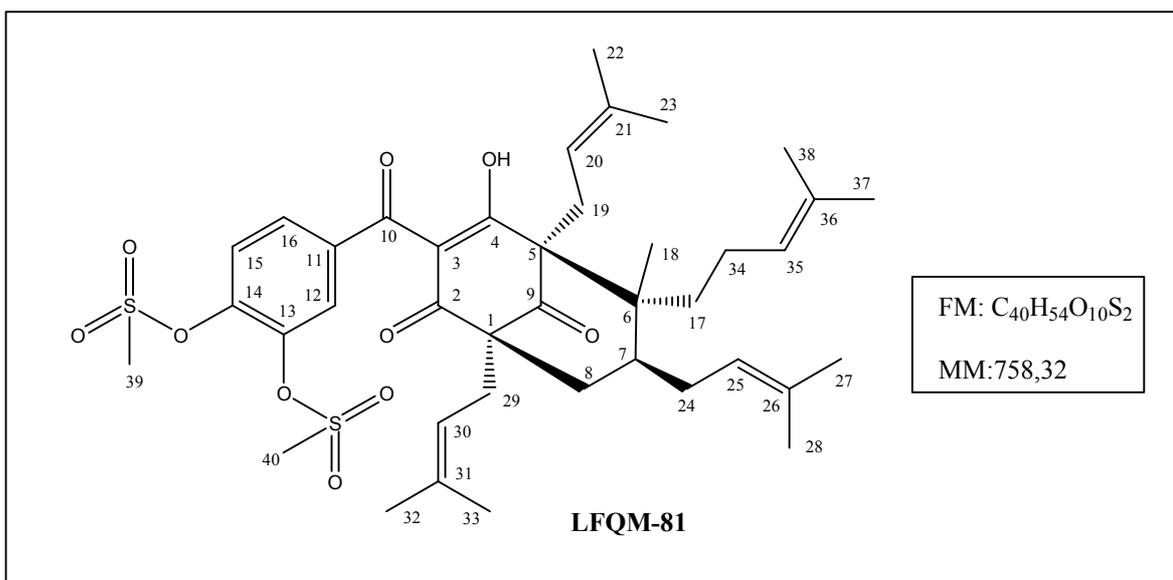


Figura 15 - Estrutura química, fórmula molecular e massa molar do derivado 13,14-di-metanosulfonil-guttiferona-A (LFQM-81)

4.3.4 Derivado 13,14-di-(4-clorobenzoil)-guttiferona- A (LFQM-82)

Em um balão monotubulado foram dissolvidos 100 mg (0,17 mmol) de LFQM-78 em 5 mL de acetona, seguido da adição 33,3 mg (0,32 mmol) de K₂CO₃ e 0,02 mL (0,32 mmol) de C₇H₄Cl₂O. O sistema reacional foi mantido em atmosfera de N₂ por 4 horas e a reação foi monitorada por CCD (hexano/acetato 9,5:0,5). Ao final, o material reacional foi neutralizado com solução saturada de NaHCO₃ e extraído com acetato de etila (3 x 10 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas em sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O produto bruto foi submetido à purificação por cromatografia em coluna, resultando em 87 mg de LFQM-82, com rendimento de 60%.

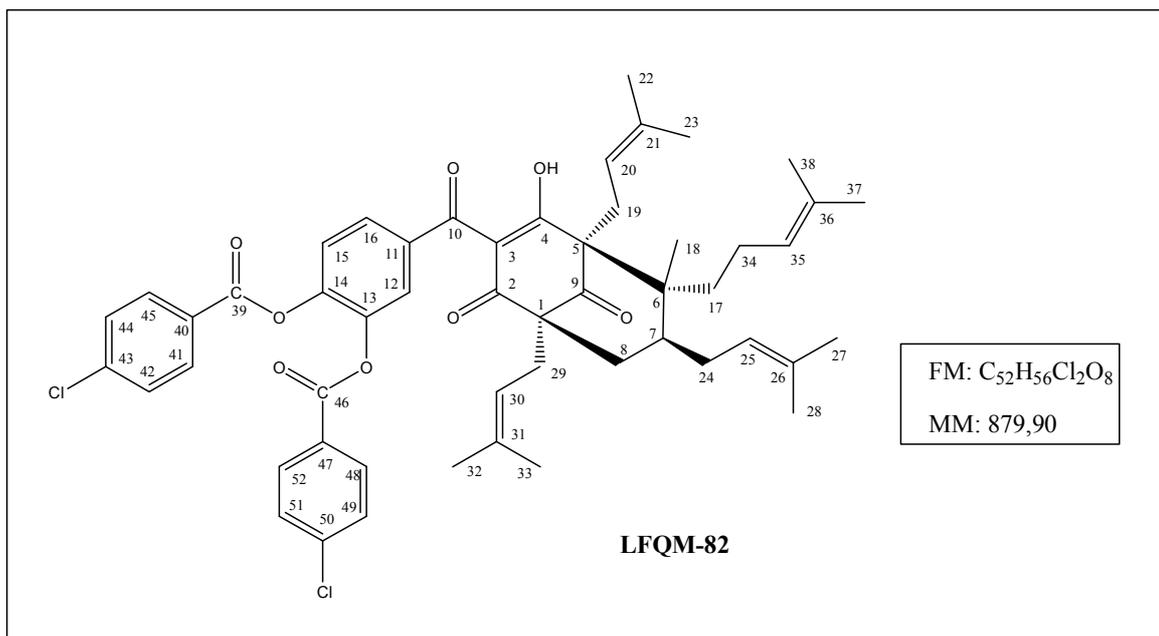


Figura16 - Estrutura química, fórmula molecular e massa molar do derivado 13,14-(4-clorobenzoil)-guttiferona- A (LFQM-82)

4.3.5 Derivado 13,14-di-(p-toluenosulfonyl)-guttiferona-A (LFQM-113)

Em um balão sob atmosfera de N₂ colocou-se 100 mg (0,17 mmol) de guttiferona-A e 48 mg (0,51 mmol) de TsCl dissolvidos em 5 mL de CHCl₂ seco. O sistema foi resfriado a -5° C, seguido da adição de 0,07mL (0,51 mmol) de Et₃N recentemente destilada. Quando a análise por CCD (hexano/acetato 7:3) indicou conversão completa do material de partida, a mistura reacional foi extraída com CH₂Cl₂ e os extratos orgânicos combinados foram lavados com NaHCO₃, secos com MgSO₄ anidro e filtrados. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna, resultando em 80,6 mg de LFQM-113, com rendimento de 55%.

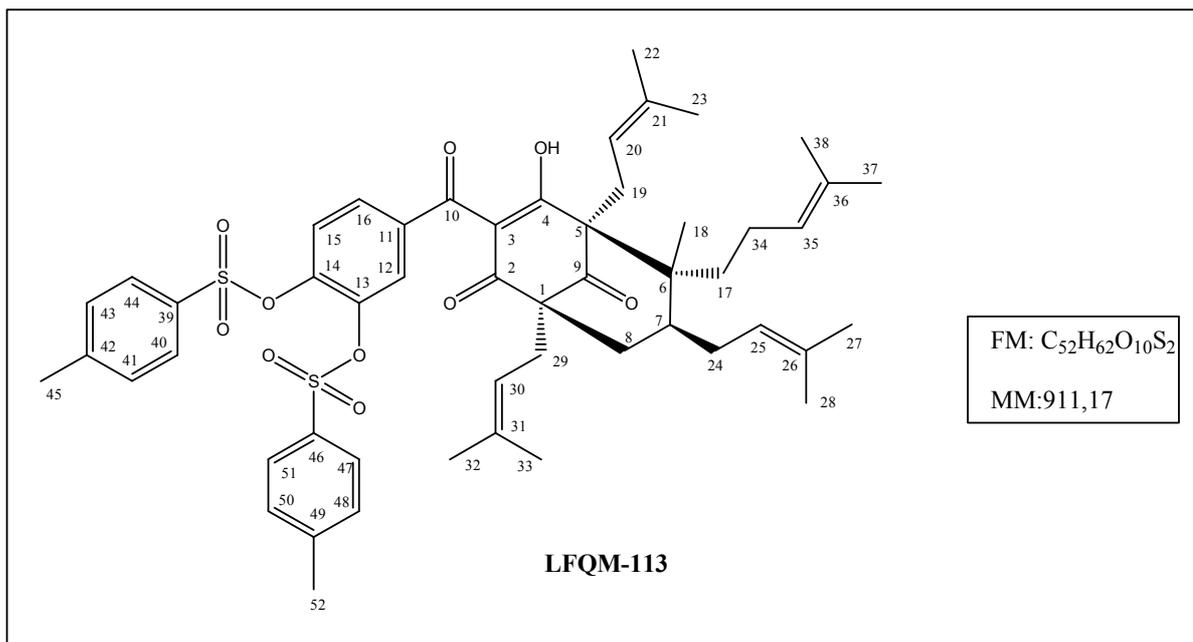


Figura 17 - Estrutura química, fórmula molecular e massa molar do derivado (LFQM-113)

4.3.6 Derivado 13,14-di-benzoil-guttiferona-A (LFQM-114)

Em um balão monotubulado foram dissolvidos 100 mg (0,17 mmol) de LFQM-78 em 5 mL de acetona, seguido da adição 33,3 mg (0,32 mmol) de K₂CO₃ e 0,04 mL (0,32 mmol) de cloreto de benzoíla. O sistema reacional foi mantido em atmosfera de N₂ por 12 horas e a reação foi monitorada por CCD. Ao final, o material reacional foi neutralizado com solução saturada de NaHCO₃ e extraído com acetato de etila (3 x 10 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas em sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O produto bruto foi submetido à purificação por cromatografia em coluna, resultando em 68 mg de LFQM-114, com rendimento de 51%.

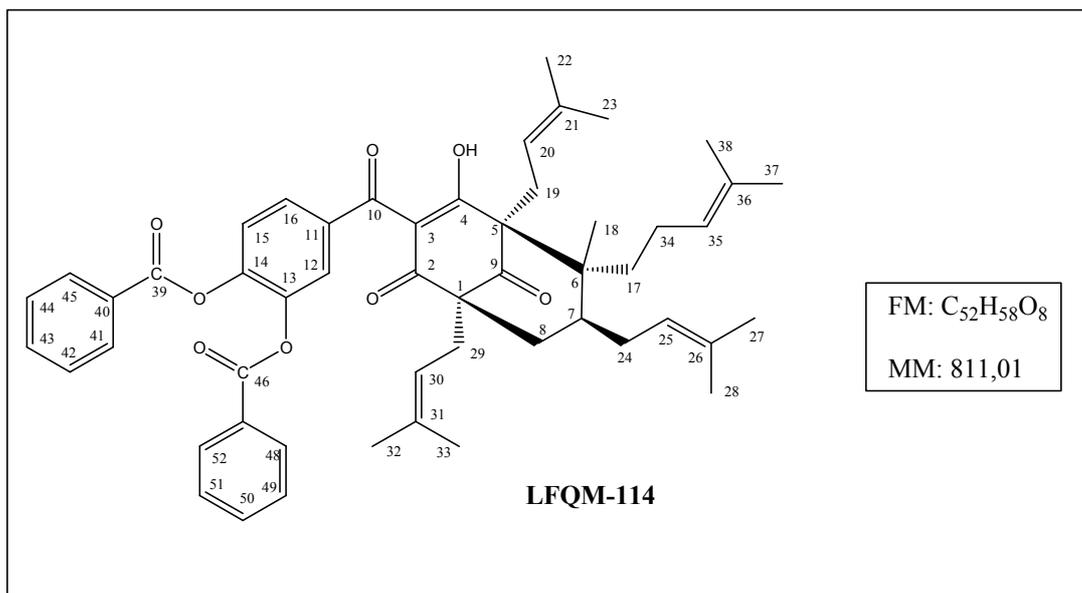


Figura 18 - Estrutura química, fórmula molecular e massa molar do derivado 13,14-dibenzoilguttiferona- A (LFQM-114)

4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises foram realizadas utilizando o *software* Prism 5.0 (GraphPad,2007). As análises estatísticas para as atividades antibacterianas e antifúngicas foram realizadas através do teste de ANOVA one way e Kruskal-Wallis. Os resultados foram mostrados em número de vezes de aumento ou diminuição de atividade analisada e a significância estatística expressa através do valor de *p* com intervalo de confiança de 95%.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A benzofenona natural LFQM-78 e seus derivados semissintéticos foram avaliados quanto a atividade antimicrobiana através do ensaio de microdiluição em caldo.

4.5.1 Microrganismos

As amostras microbianas de bactérias, leveduras e dermatófitos 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) e as amostras de dermatófitos foram gentilmente cedidas pelo Instituto Adolfo Lutz São Paulo (IAL). *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538); *Bacillus cereus* (ATCC 11778); *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228). *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027); *Proteus mirabilis* (ATC 25933), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Candida albicans* (ATCC 09548); *Candida glabrata* (ATCC 90030); *Candida krusei* (ATCC 6258); *Candida parapsilosis* (ATCC 69548); *Candida tropicalis* (ATCC 750); *Cryptococcus neoformans* (HNR 41)

4.5.2 Preparo dos inóculos bacterianos

Para o preparo do inóculo as bactérias foram ativadas com caldo BHI e incubadas a 35°C por 18 horas. Para o isolamento das colônias jovens, uma alíquota de cada cultura ativada foi transferida para meio com Agar Muller Hinton, pelo menos duas vezes para assegurar pureza e viabilidade das culturas jovens e incubada a 35°C por aproximadamente 24 horas. Após o período de incubação foram selecionadas 3 a 4 colônias transferindo-as para um tubo estéril contendo 5 mL de solução de NaCl a 0,9% (m/v). A turvação da suspensão celular foi comparada com a turvação 0,5 da escala de MacFarland e ajustada em câmara de Neubauer à uma concentração aproximada de $1,5 \times 10^8$ células/mL. Os inóculos bacterianos foram diluídos 1:100 em meio caldo Mueller Hinton para se obter a concentração de trabalho de $1,5 \times 10^6$ células/mL.

4.5.3 Preparo dos inóculos de fungos leveduriformes

Para o preparo do inóculo foram utilizadas linhagens de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. neoformans*. Os fungos leveduriformes foram semeados em meio Agar Sabouraud Dextrosado inclinados, pelo menos duas vezes para assegurar pureza e viabilidade das culturas jovens e incubados a 37°C por 48 horas. Após incubação transferiram-se 4 a 5 colônias de levedura com alça estéril para um tubo estéril contendo salina. A suspensão foi ajustada com a escala de 0,5 de MacFarland, e ajustada por contagem celular em câmara de Neubauer correspondendo a uma concentração aproximada de $5,0 \times 10^6$ células/mL. Os inóculos foram diluídos 1:10 em meio caldo RPMI 1640, obtendo-se a concentração de trabalho de $5,0 \times 10^5$ célula/mL.

4.5.4 Preparo do inóculo de fungos filamentosos

Os inóculos dos fungos filamentosos foram preparados com *Trichophyton tonsurans* e *Microsporum gypseum*. Os fungos filamentosos foram semeados em meio Agar Sabouraud dextrose, a 30°C por 7 dias. Após, 1 mL de solução salina 0,85% foi vertido sobre as colônias fúngicas. Com auxílio de uma alça de platina o micélio foi homogeneizado à solução salina e após 5 minutos para a decantação das partículas pesadas; o sobrenadante foi transferido para um tubo estéril, o qual foi vedado e homogeneizado em agitador tipo “vortex” durante 15 segundos. A turbidez da solução final foi comparada com a escala 0,5 de MacFarland e ajustada a uma concentração aproximada de $5,0 \times 10^6$ células/mL. Esta solução foi diluída 1:5 em meio RPMI resultando em concentração de trabalho de $1,0 \times 10^6$ células/mL.

4.5.5 Preparo das diluições do LFQM-78 e seus derivados semissintéticos

Preparou-se uma solução estoque inicial, na concentração de 5 mg/mL, de cada substância a ser avaliada. As substâncias foram diluídas em DMSO e homogeneizadas em “vórtex” até dissolução completa. Em seguida, as substâncias foram novamente diluídas em

meio Mueller Hinton 2x. para bactérias; caldo RPMI 1640, com L-glutamina e vermelho de fenol, sem bicarbonato e tamponado com MOPS 0,165 mol/L e 2% de glicose para leveduras e caldo RPMI 1640, com L-glutamina e vermelho de fenol, sem bicarbonato e tamponado com MOPS 0,165 mol/L para fungos filamentosos a uma concentração máxima de 100 µg/mL e DMSO < 2%.

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

Concentração (µg/mL) Anfotericina B	Concentração (µg/mL) Cloranfenicol	Concentração (µg/mL) LFQM-78 e derivados
8	250	100
4	125	62,5
2	62,5	31,2
1	31,2	15,6
0,5	15,6	7,8
0,25	7,8	3,9
0,12	3,9	1,95
0,06	1,95	0,48
0,03	0,97	0,24
	0,48	0,06

4.5.6 Avaliação da sensibilidade bacteriana e fúngica por microdiluição em caldo

O método utilizado para a avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos foi o teste de microdiluição em caldo. Foi adotada, com algumas modificações, a metodologia proposta pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para teste de microdiluição em caldo para bactérias (CLSI, 2003), para leveduras (CLSI, 2008) e fungos filamentosos (CLSI, 2002).

Para a realização desta metodologia foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato que são compostas por colunas numeradas de 1 a 12 e fileiras de A a H (FIGURA 19).

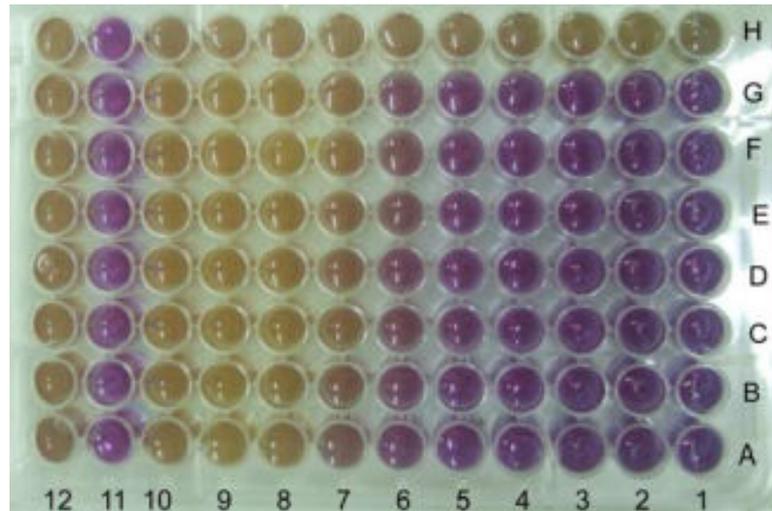


Figura 19 - Placa de 96 poços utilizadas na metodologia de microdiluição para a avaliação da sensibilidade bacteriana e fúngica

O antifúngico anfotericina B (em concentrações entre 8 e 0.015 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e o antibiótico cloranfenicol (em concentrações entre 250 e 0,487 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram utilizados como controles positivos nas avaliações das atividades antifúngica e antibacteriana, respectivamente. Como controle negativo, de ausência de atividade antimicrobiana, foi utilizado o DMSO nas mesmas concentrações utilizadas no preparo das diluições das substâncias e diluído no meio de cultura em concentração menor que 2%.

No teste de avaliação da sensibilidade antibacteriana foi utilizado o meio de cultura caldo Mueller Hinton 2x concentrado e para os fungos, o meio de cultura caldo RPMI 1640 2x concentrado.

4.5.7 Avaliação da sensibilidade bacteriana

Em ambiente asséptico, foram distribuídos 100 μL do meio de cultura Agar Mueller Hinton em todos os poços de uma microplaca de 96-poços de fundo chato. Em seguida, foram distribuídos 100 μL das diluições das substâncias nas filas de A a G e colunas de 2 a 11 com auxílio de pipetador multicanal. Na fila H, foram acrescentados 100 μL das diluições do antimicrobiano cloranfenicol (em $\mu\text{g}/\text{mL}$: 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6; 7,8; 3,9; 1,95; 0,975; 0,487).

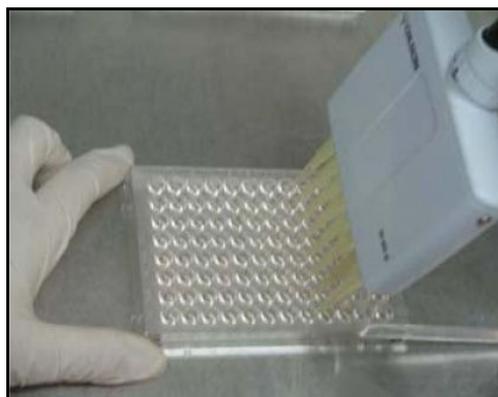


Figura 20 - Diluição seriada das substâncias para avaliação da ação antibacteriana e antifúngica por microdiluição.

Logo após, 100 μL da suspensão bacteriana foram distribuídos em todos os poços, das filas de A a F e H e nas colunas de 2 a 12. Na coluna 1, foram acrescentados mais 100 μL de meio de cultura; esta coluna contém apenas meio de cultura e é considerada o branco do teste, ou seja, é destinada para o controle de esterilidade do meio. A última coluna, apenas com meio e microrganismo foi destinada para controle de crescimento microbiano. As placas foram tampadas, seladas com filme PVC e incubadas em estufa a 37° C°.

4.5.8 Avaliação da sensibilidade fúngica

Foram distribuídos 100 μL do meio de cultura Agar RPMI 1640 em todos os 96 poços da microplaca. Em seguida, foram distribuídos 100 μL das diluições das substâncias nas colunas de 2 a 11 e filas de A a F com auxílio de pipetador multicanal. Na fila G, foram acrescentados 100 μL das diluições do antifúngico anfotericina (em $\mu\text{g}/\text{mL}$: 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,12; 0,06; 0,03; 0,015). Na fila H foram acrescentados 100 μL das diluições do antifúngico fluconazol (em $\mu\text{g}/\text{mL}$ 64, 32, 16,8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125)

Após, 100 μL da suspensão bacteriana foram distribuídos em todos os poços, das filas de A a E e G-H e nas colunas de 2 a 12. Na coluna 1, foram acrescentados mais 100 μL de meio de cultura; esta coluna contém apenas meio de cultura e é considerada o branco do teste, ou seja, é destinada para o controle de esterilidade do meio. A última coluna, com meio e microrganismo, foi o controle de crescimento microbiano. As placas foram seladas com filme PVC, tampadas e incubadas em estufa a 37° para leveduras e 30°C para fungos filamentosos.

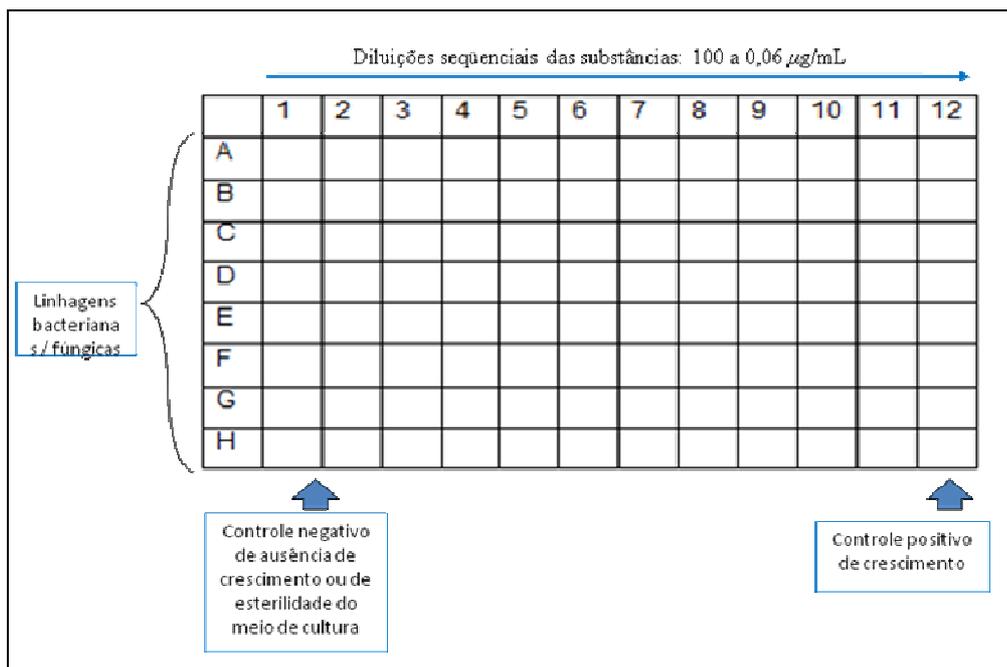


Figura 21 - Esquema de microplaca utilizada no teste de avaliação antimicrobiana dos compostos em estudo

4.5.9 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.

4.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Para a avaliação da citotoxicidade dos derivados foi utilizado o ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) A suspensão celular de monócitos normais na concentração de $2,4 \times 10^6$ células/mL foi distribuída em uma placa de 96 poços, 90 µL por poço, e incubadas a 37 °C em incubadora a 5% de CO₂, juntamente com mais 10 µL da

amostra teste em diferentes concentrações. Neste estudo foram utilizadas as concentrações 100; 62,5; 31,2; 15,6; 7,8; 3,9; 1,95; 0,48; 0,24; 0,06 $\mu\text{g/mL}$ dos compostos testados e a placa foi incubada por 48 horas. Após o período de incubação as células dos poços controle e do teste foram observadas microscopicamente. Após adicionou-se 10 μL do corante MTT (5 mg/mL) e as células foram novamente incubadas por mais 4 horas. Em seguida, o meio foi retirado cuidadosamente e adicionaram-se 100 μL de DMSO para solubilização dos cristais de formazana. As placas foram agitadas durante 5 minutos e a absorvância correspondente a cada amostra foi medida no leitor espectrofotométrico de microplacas a 560 nm. A absorvância obtida das células controle, não-tratadas, foi considerada como 100% de viabilidade celular (MOSMANN, 1983). Os dados foram avaliados utilizando regressão linear para se obter os valores de CC_{50} (concentração citotóxica para 50% das células).

4.7 INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO - INIBIÇÃO DE PROTEASES

Os ensaios com papaína foram realizados em tampão fosfato de sódio 50 mmol.L^{-1} (pH 6,8) contendo 1,0 mmol.L^{-1} de EDTA. Papaína foi previamente ativada com DTT 10 mmol.L^{-1} por 10 minutos enquanto que, os ensaios com tripsina foram realizados em tampão Tris-HCl 50 mmol.L^{-1} (pH 8,0) contendo CaCl_2 10 mmol.L^{-1} , ambos à 25°C. E-64 foi utilizado como inibidor clássico de cisteíno-proteases e TLCK foi utilizado como inibidor clássico de serino-proteases.

Os derivados semissintéticos (1mg) foram dissolvidos em 1 mL de dimetilformamida (DMF) e o substrato fluorescente Z-Phe-Arg-MCA (1 mg) foi dissolvido em 1 mL de uma solução água/DMF 1:1. A concentração final foi ajustada conforme a necessidade de cada ensaio.

A atividade proteolítica foi monitorada por meio da hidrólise do substrato peptídico fluorogênico Z-Phe-Arg-MCA, através da liberação de MCA em comprimentos de onda de excitação de 380 nm e emissão de 460 nm (em $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$). Os ensaios foram realizados em espectrofluorímetro (Varian modelo Cary Eclipse) previamente calibrado com soluções padrão de MCA.

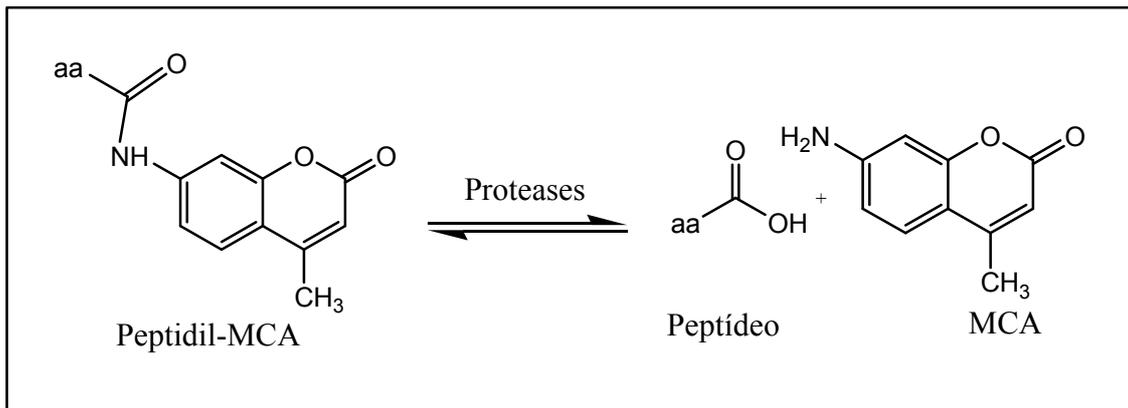


Figura 22 - A atividade proteolítica pode ser acompanhada na presença de um substrato fluorogênico (peptidil-MCA), o qual mediante clivagem pela enzima em estudo libera o peptídeo e MCA livre resultando na emissão de fluorescência.

4.7.1 Determinação do tempo necessário para a inibição enzimática

Para a determinação do tempo de inibição, as enzimas foram incubadas no tampão de ensaio respectivo a cada enzima em uma concentração final de 25 nmol.L^{-1} contendo os compostos semissintéticos em uma concentração fixa de $50 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$. A contagem do tempo se iniciou no momento em que a enzima entrou em contato com o inibidor. Uma alíquota de $50 \text{ }\mu\text{L}$ desse pré-incubado foi então diluída no tampão em cubeta (volume final de 1 mL) e a dosagem da atividade enzimática foi iniciada pela adição de substrato Z-Phe-Arg-MCA ($10 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$). As leituras foram realizadas em 10, 25, 35 e 45 minutos e os resultados foram expressos como porcentagem da atividade enzimática (atividade residual) em função do tempo.

4.7.2 Determinação da inibição de 50% da atividade enzimática (IC_{50})

Para a determinação da IC_{50} , papaína e tripsina foram solubilizadas no tampão de ensaio respectivo a cada enzima (concentração final - 2.5 nmol.L^{-1}) e a solução estoque dos derivados semissintéticos (inibidores) foram adicionadas a este incubado resultando em

concentrações finais de 1, 5, 10, 20 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Fixou-se o tempo de contato de inibidores e enzima, de acordo com o tempo necessário para inibição obtido no item acima.

4.8 INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO - INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE PAREDE CELULAR

O princípio do método de coloração diferencial de Gram é baseado na diferença estrutural da parede celular bacteriana. As bactérias Gram-positivas possuem estrutura que permite a retenção do corante violeta genciana durante um tratamento com lugol (iodo), enquanto que a parede celular das bactérias Gram-negativas não o faz. Antibióticos que agem contra a parede celular bacteriana causam danos ou perdas nessa camada destruindo a rigidez da parede celular.

O teste de coloração de Gram foi realizado com o intuito de verificar se as substâncias testadas haviam provocado alteração estrutural na parede celular das bactérias Gram-positivas testadas. Colocou-se sobre uma lâmina de microscópio uma pequena quantidade da solução contendo as amostras de bactérias Gram-positivas presente no poço da microplaca no qual a substância teste apresentou atividade. Deixou-se o material secar e, em seguida, fixou-se com calor. Depois foi gotejado corante violeta genciana sobre a lâmina, esperou-se durante um minuto. Imediatamente depois, a lâmina foi enxaguada com água para remover o excesso de corante. Em seguida, aplicou-se lugol, cobrindo toda a amostra por 30 segundos, novamente a lâmina foi submetida a um enxágue para eliminar o excesso de fixador. O passo seguinte consistiu em despejar algumas gotas de álcool para remover a violeta genciana das bactérias e a observação do descoloramento ou não do esfregaço.

5 RESULTADOS EXPERIMENTAIS

5.1 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO

Os extratos foram preparados a partir de 3,8 Kg de sementes frescas de *R. brasiliensis* (FIGURA 23) sem casca que foram trituradas e submetidas a extração a frio em acetato de etila. A cada 3 dias de maceração, a mistura era filtrada e concentrada por evaporação à pressão reduzida a 45°C e o solvente extrator retornava aos frascos contendo as sementes trituradas. O processo foi repetido até que todo material fosse extraído resultando em 252,6 g do extrato bruto (FIGURA 24).

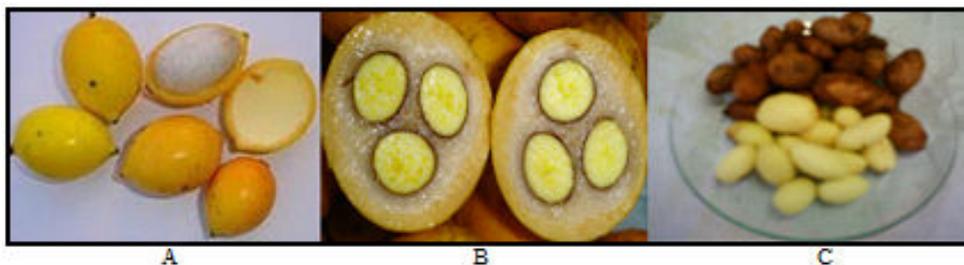


Figura 23 - Ilustração dos frutos de *Rheedia brasiliensis*: A- frutos inteiros; B- frutos cortados transversalmente; C- sementes com e sem casca.



Figura 24 - Ilustração dos extratos de *Rheedia brasiliensis*: A- maceração das sementes de *R. brasiliensis* com acetato de etila ; B- extrato acetato de etila das sementes de *R. brasiliensis*

5.1.1 Cromatografia líquida de alto desempenho acoplada a espectrometria de massas (LC-MS)

Após estabelecimento das melhores condições de separação cromatográfica, o extrato acetato de etila das sementes de *R. brasiliensis* foi submetido à análise por LC-MS para a confirmação da presença da guttiferona-A. O sistema foi montado com um divisor de fluxo na saída da coluna, permitindo desviar um volume de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ de efluente para o espectrômetro de massas. O sinal m/z 601,8 sugere a presença da benzofenona poliprenilada guttiferona-A (**LFQM-78**) (FIGURA 25).

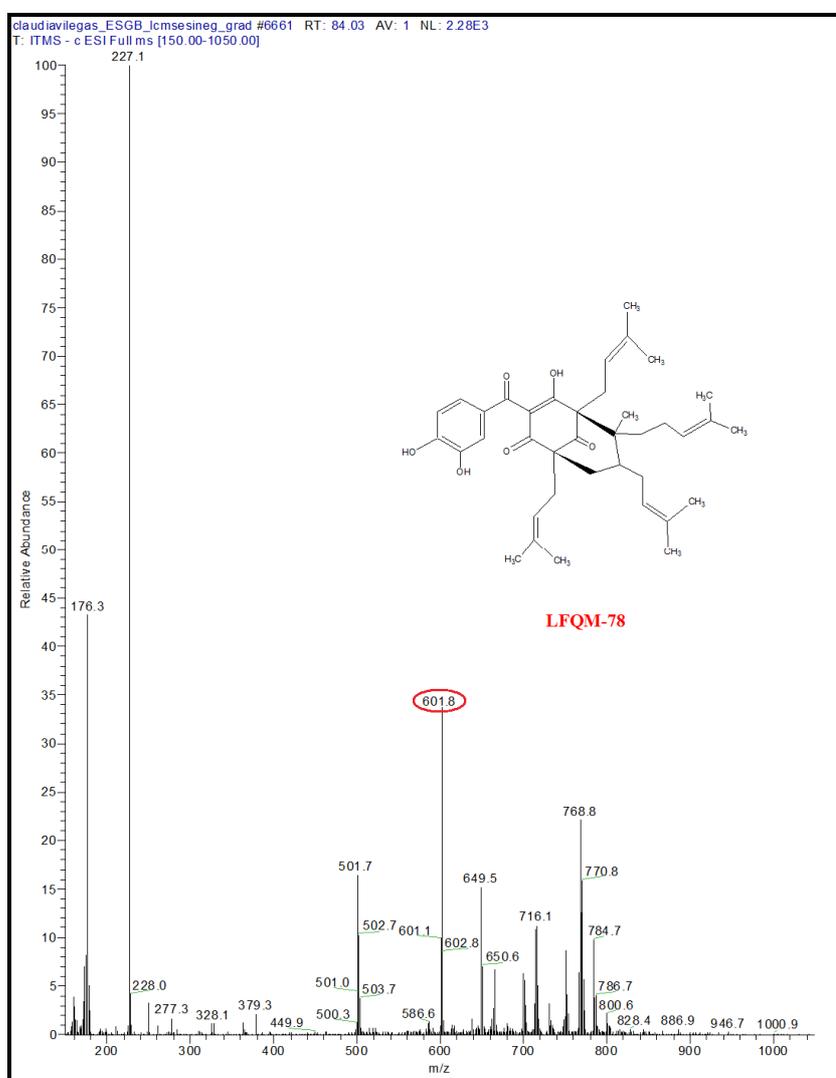


Figura 25 - Espectro de massa do extrato acetato de etila das sementes de *R. brasiliensis*. Em destaque sinal m/z 601,8 indicando a presença do composto **LFQM-78**

5.1.2 Isolamento e purificação dos extratos brutos

O fracionamento do extrato bruto acetato de etila foi realizado por CC utilizando-se 50 g do mesmo, em uma coluna de vidro 45 cm x 6 cm e 250 g de gel de sílica 60. A eluição do extrato foi iniciada com hexano e a polaridade foi aumentada gradativamente com adição de acetato de etila. As frações foram coletas em volumes de 250 mL, obtendo-se ao todo 84 frações que posteriormente foram reunidas por comparação por CCD. (FIGURA 26).

A guttiferona-A foi obtida nas frações 26 a 82 (TABELA 02). As frações agrupadas foram tratadas com hexano e após algum tempo de repouso foi observado a decantação de um sólido amarelo. Com o descarte do sobrenadante obteve-se a benzofenona natural poliprenilada pura, a guttiferona-A. As frações reunidas contendo 7-epiclusianona foram recristalizada em metanol e as frações contendo guttiferona-A foram recristalizadas em hexano, fornecendo as benzofenonas puras 7-epiclusianona e guttiferona-A (FIGURA 27). Os compostos foram identificados por CCD comparativa.

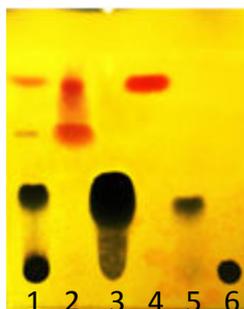


Figura 26 - Cromatografia em camada delgada (CCD): 1- extrato bruto acetato de etila de sementes de *R. brasiliensis*; 2- Fração contendo 7-epiclusianona e garciniafenona; 3- Fração contendo guttiferona- A; 4- Padrão de 7-epiclusianona; 5- Padrão de guttiferona-A; 6- Padrão de fukugentina

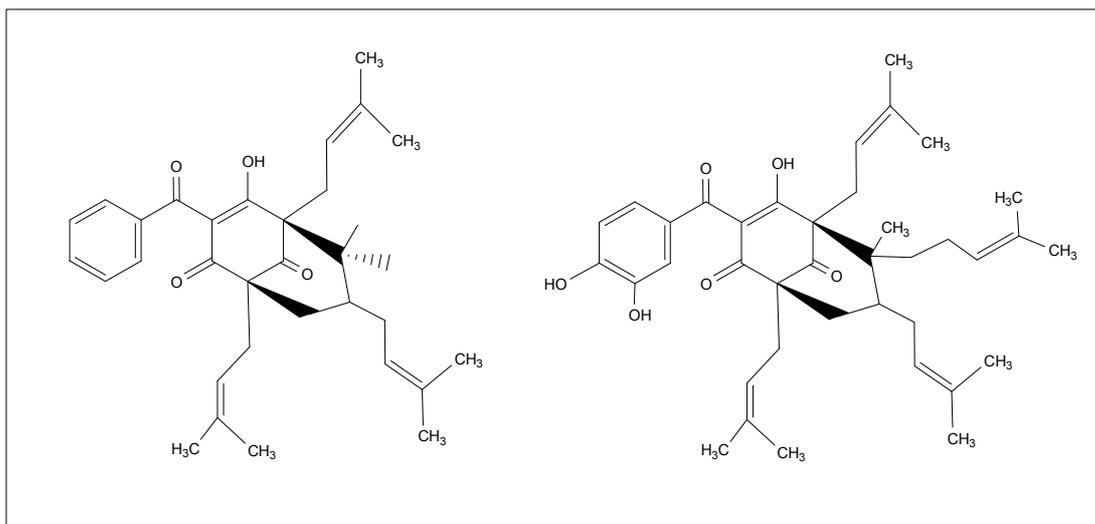


Figura 27 - Benzofenonas preniladas, 7-epiclusianona e guttiferona-A, isoladas dos frutos de *R.brasiliensis*

Tabela 02- Fracionamento do extrato bruto acetato de etila por CC

Eluente	Frações	Identificação
Hexano 100%	1-4	_____
Hexano/AcOEt (9,5:0,5)	5-15	7-epiclusianona
Hexano/AcOEt (9,5:0,5)	16-21	7-epiclusianona+ garciniofenona
Hexano/AcOEt (9,5:0,5)	22- 25	7-epiclusianona+ garciniofenona + guttiferona-A
Hexano/AcOEt (8:2)	26-82	guttiferona-A
Hexano/AcOEt (8:2)	83-84	Mistura

5.2 CARACTERIZAÇÃO DA GUTTIFERONA-A (LFQM-78)

A substância isolada apresentou-se como um sólido amarelo com faixa de fusão de 120-123 °C. O espectro de absorção na região do IV (FIGURA 28) apresenta bandas intensas em 2999,31 e 2858,51 cm^{-1} característico de deformação axial C-H e em 1429 cm^{-1} referentes à deformação angular de C-H e banda em 3267 cm^{-1} típica de deformação axial da ligação OH de fenol. Também foram identificadas bandas de deformação axial de C=C de anel aromático

em 1610 cm^{-1} , de deformação axial assimétrica de C-O em 1197 cm^{-1} , além de banda em 1730 cm^{-1} de C=O.

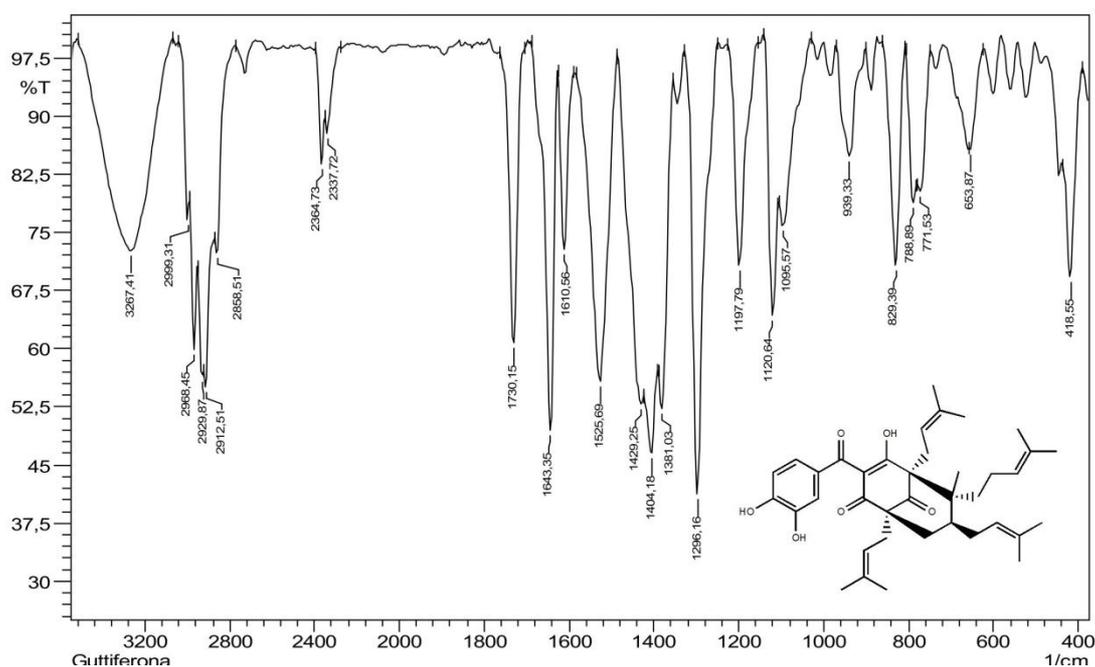


Figura 28 - Espectro no IV (KBr, cm^{-1}) da Guttiferona A (LFQM-78)

No espectro de RMN de ^1H (FIGURA 29) é possível observar quatro sinais característicos de prótons vinílicos na região de δ 5,24; 5,15; 5,04 e 4,92 (FIGURA 30) os quais foram correlacionados com os hidrogênios H-30, H-35, H-25 e H-20 respectivamente. Além disso, mostra a evidência do anel aromático 1,3,4 trissubstituído com deslocamentos em δ 6,60 d ($J=8,5\text{ Hz}$); 6,99 dd ($J=8,5; 2,0\text{ Hz}$); 7,05 d ($J=8,5\text{ Hz}$) atribuídos aos hidrogênios H-15, H-16 e H-12 respectivamente (FIGURA 31). É possível observar também, oito sinais entre 1,79 e 1,53 ppm, atribuídos as metilas ligadas aos carbonos vinílicos referentes aos hidrogênios H-22, H-23, H-27, H-28, H-32, H-33, H-37 e H-38. Os sinais na região entre 1,76 e 2,74 ppm foram relacionados aos hidrogênios alílicos dos quatro grupos isopentilas, H-19, H-34, H-24 e H-29. (FIGURA 32) Quando se analisa o espectro de RMN de C^{13} (FIGURA 33) observam-se dois sinais em 206,77 e 195,23 ppm típicos de carbono carbonílico atribuído ao C-10 e C-2. Além desses, três sinais em 193,48; 114,93 ppm referentes aos carbonos C-4, C-3. Outros sinais no espectro de carbono que confirmam essa estrutura são os 50,44; 39,02; 61,87 encontrados em sistemas biciclo do tipo [3,3,1] nonano referentes aos carbonos C-6, C-7, C-1 respectivamente. Outros sinais que merecem destaque são aqueles típicos de carbonos aromáticos δ 132,0; 115,50; 142,78; 148,66; 113,86 e 126,98 ppm atribuídos aos

carbonos C-11, C-12, C-13, C-14, C-15 e C-16. Os sinais em δ 117,87; 123,01; 118,90; 122,66 ppm justificam a presença de quatro grupos isoprenilas os quais foram atribuídos ao carbono C-20, C-25, C-30, C-35.

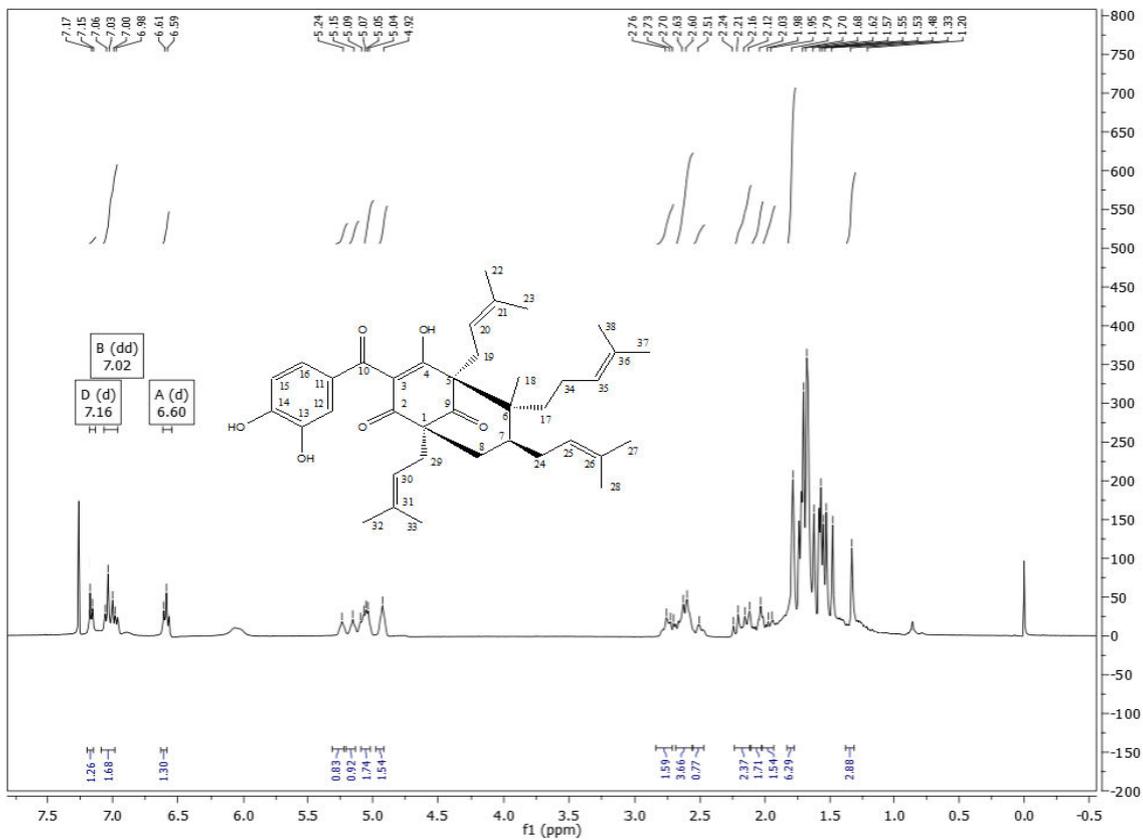


Figura 29 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto LFQM-78

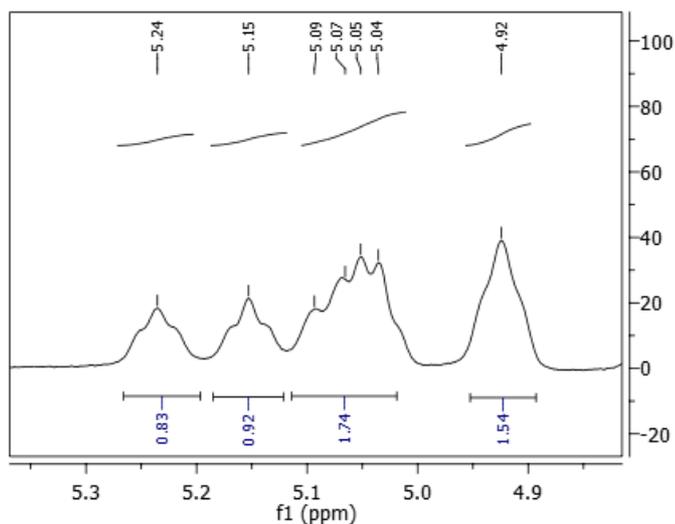


Figura 30 - Espectro de RMN H^1 (400 MHz, CDCl_3) ampliado de 5,3 a 4,9 ppm do composto LFQM-78

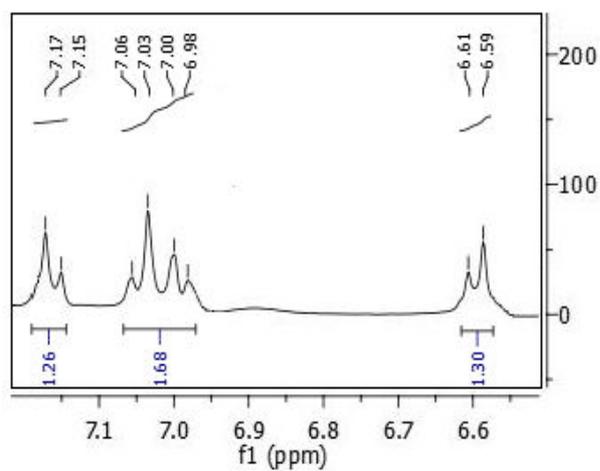


Figura 31 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) ampliado de 7,2 a 6,5 ppm do composto LFQM-78

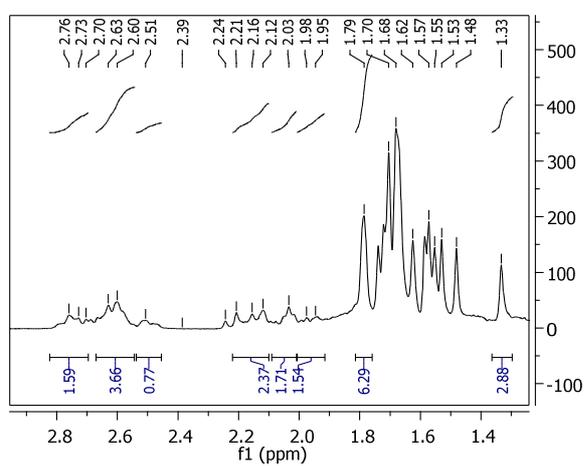


Figura 32 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) ampliado de 2,8 a 1,3 ppm do composto LFQM-78

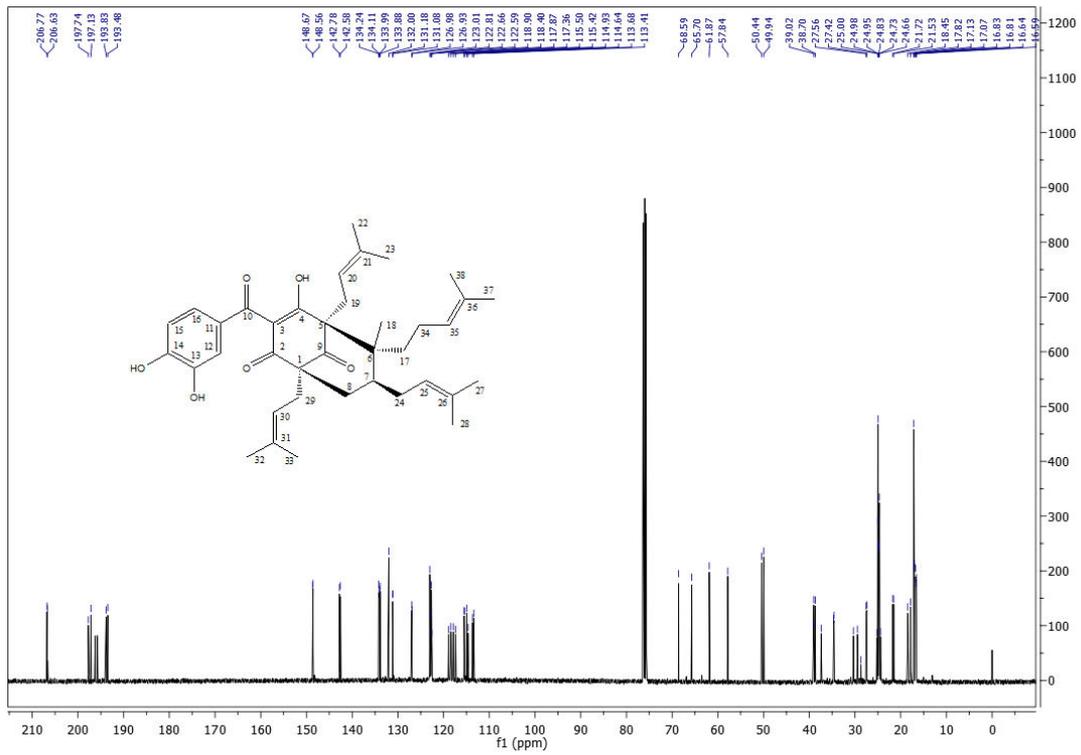


Figura 33 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto LFQM-78

Tabela 03- Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C de LFQM-78 (^1H - 400 MHz; ^{13}C - 100 MHz, CDCl_3 , δ em ppm, J =Hz, M= multiplicidade)

Posição	δ ^1H	M*	J (Hz)	δ ^{13}C	Posição	δ ^1H	M	J	δ ^{13}C
1	-	-	-	61,87	20	5,24	m	-	117,87
2	-	-	-	196,23	21	-	-	-	134,24
3	-	-	-	114,93	22	1,70	s	-	24,73
4	-	-	-	193,83	23	1,48	s	-	17,82
5	-	-	-	68,58	24	2,74	m	-	30,34
6	-	-	-	50,44	25	5,04	m	-	123,01
7	2,51	m	-	39,02	26	-	-	-	133,99
8	2,16	m	-	37,40	27	1,57	s	-	24,83
9	-	-	-	206,77	28	1,79	s	-	16,83
10	-	-	-	197,74	29	2,61	m	-	27,56
11	-	-	-	132,00	30	5,15	m	-	118,90
12	7,05	d	8,5	115,50	31	-	-	-	134,11
13	-	-	-	142,78	32	1,53	s	-	24,97
14	-	-	-	148,66	33	1,55	s	-	18,45
15	6,60	d	2,1	113,68	34	2,03	m	-	24,41
16	6,99	dd	8,5; 2,1	126,98	35	4,92	m	-	122,66
17	1,96	m	-	34,68	36	-	-	-	133,88
18	1,33	s	-	17,13	37	1,68	s	-	24,66
19	2,61	m	-	21,72	38	1,79	s	-	16,64

5.3 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS

5.3.1 Preparo e caracterização do derivado 14-*tert*-butoxicarbonil-guttiferona- A (LFQM-79)

O derivado foi obtido pela reação entre LFQM-78 por reação com BocO_2 e 4-DMAP (FIGURA 34). A reação resultou em um óleo amarelo intenso que, após a purificação em coluna, resultou apresentando em 95 mg de LFQM-79, com rendimento de 81%.

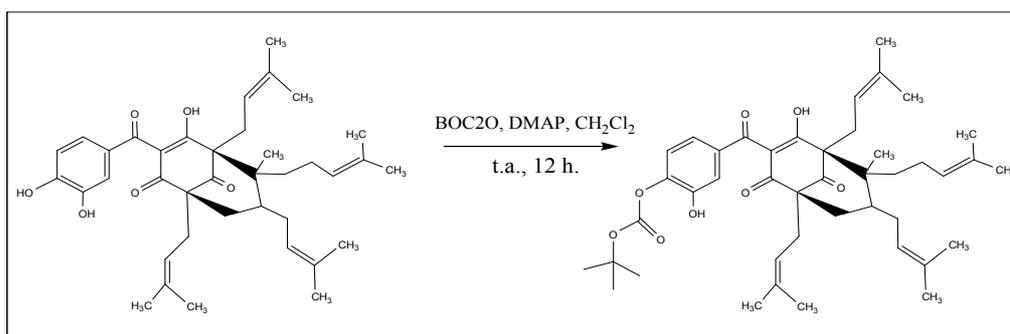


Figura 34 - Reação de obtenção do derivado LFQM-79

No espectro no IV foi identificada uma banda de absorção em 3446 cm^{-1} , referente às vibrações de deformação axial do grupo OH, indicando que não ocorreu a reação em ambas as hidroxilas. Foram também observadas bandas em 2981 e 2931 cm^{-1} referentes à deformação axial assimétrica de C–H, em $1371,39\text{ cm}^{-1}$ banda de absorção intensa referente à deformação angular no plano de CH_3 e em $1805,37\text{ cm}^{-1}$, uma banda intensa de estiramento C=O de éster.

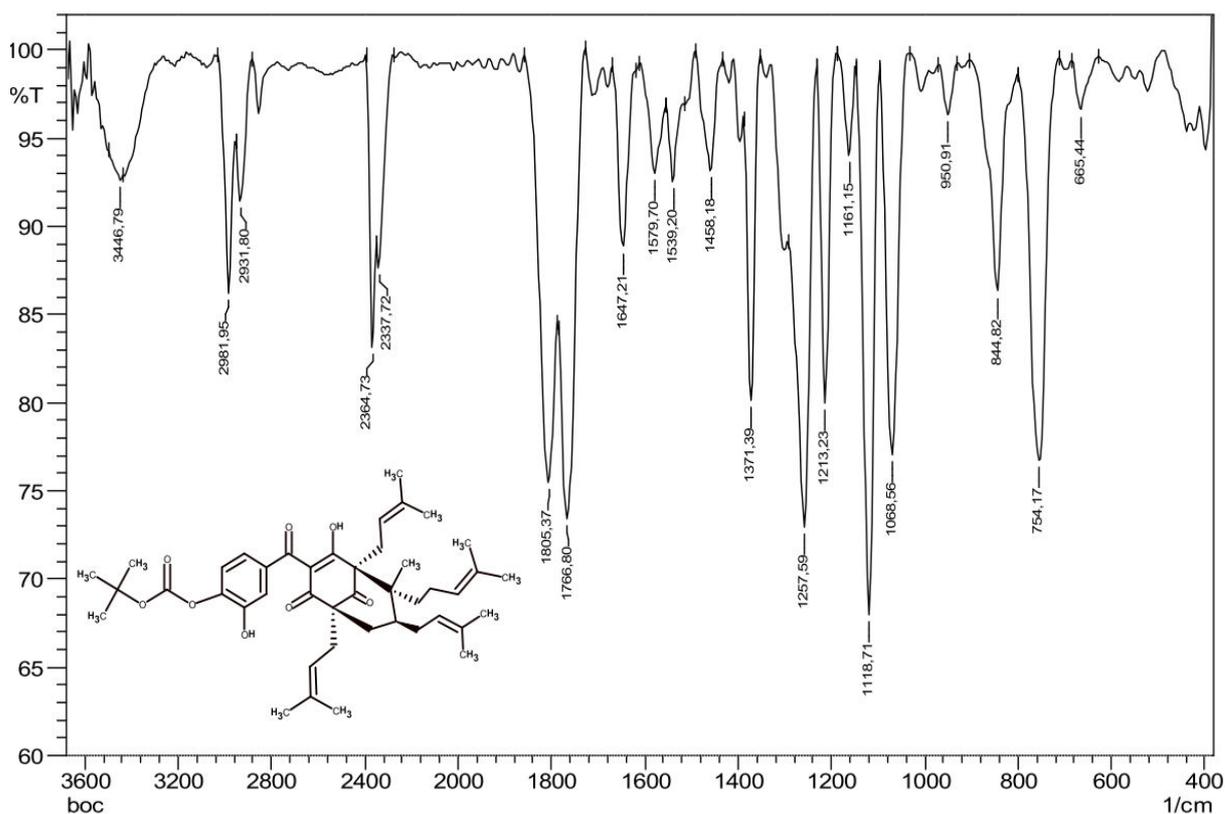


Figura 35 - Espectro no IV (KBr, cm^{-1}) do derivado LFQM-79

Pela análise do espectro de RMN de ^1H do derivado LFQM-79 (FIGURA 36) foi observado, além de outros, um sinal em 1,11 ppm (9H) (FIGURA 37) que foi atribuído aos H-41, H-42 e H-43 referente as metilas do grupo substituinte BOC, sugerindo portanto a modificação. No espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 38) foram observados sinais em 26,58 e 83,13 ppm referentes a metila e ao carbono carbonílico do grupo substituinte, respectivamente. Vale ressaltar que não foi observado este mesmo sinal no espectro de RMN de ^1H do produto de partida, LFQM-78.

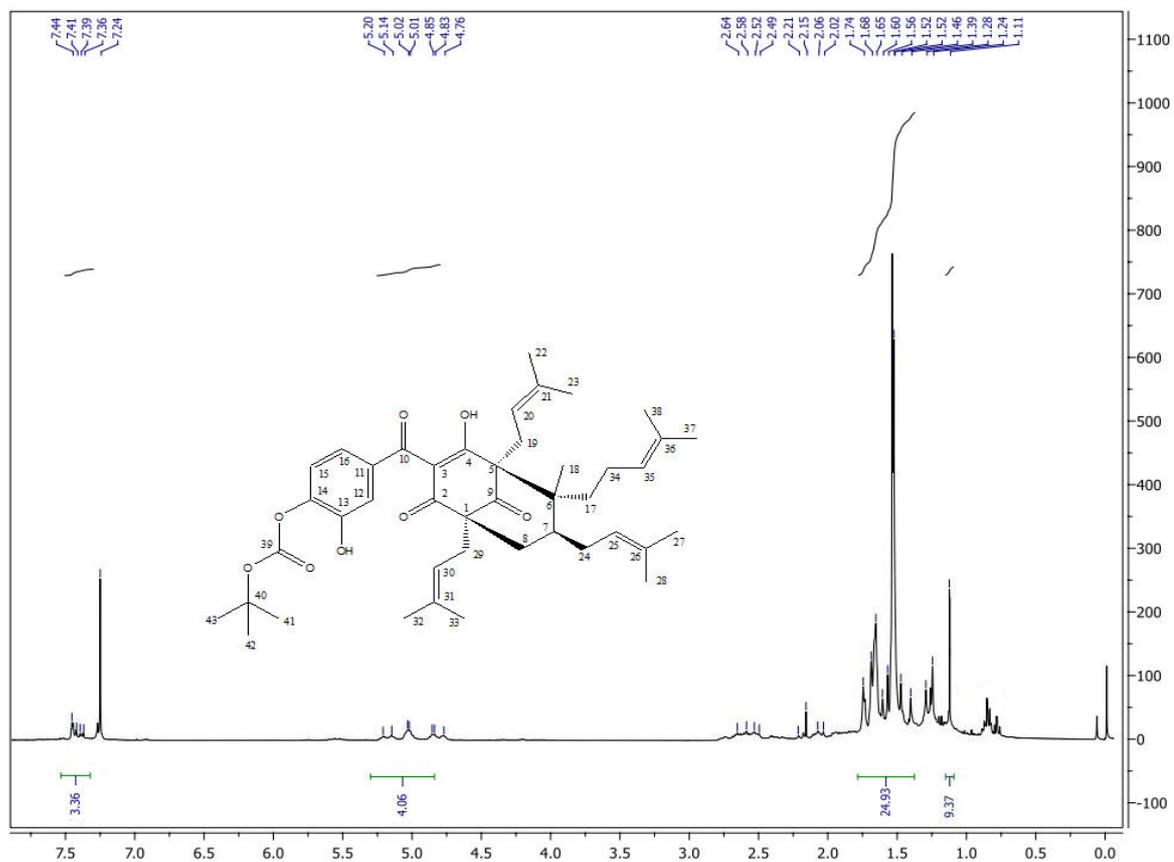


Figura 36: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do derivado LFQM-79

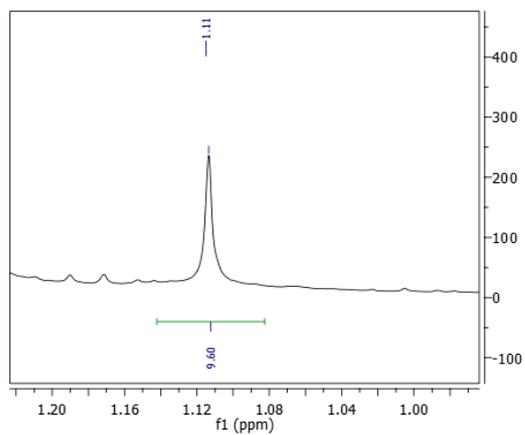


Figura 37 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) ampliado de 1,0 a 1,2 ppm –em destaque deslocamento em 1.11 ppm referente aos 9H da metila do grupo substituinte

Tabela 04- Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C de LFQM-79 (^1H - 400 MHz; ^{13}C - 100 MHz, CDCl_3 , δ em ppm, J =Hz, M= multiplicidade

Posição	δ ^1H (ppm)	M	J	δ ^{13}C (ppm)	Posição	δ ^1H (ppm)	M	J	δ ^{13}C (ppm)
1	-	-	-	62,07	22	1,68	m	-	24,71
2	-	-	-	193,46	23	1,46	-	-	17,80
3	-	-	-	115,93	24	2,64	s	-	30,18
4	-	-	-	192,63	25	5,14	s	-	123,11
5	-	-	-	68,58	26	-	m	-	133,82
6	-	-	-	50,64	27	1,60	m	-	24,81
7	2,49	m	-	38,97	28	1,68	-	-	16,85
8	2,15	m	-	37,60	29	1,74	s	-	28,68
9	-	-	-	206,78	30	5,02	s	-	117,93
10	-	-	-	196,81	31	-	m	-	133,89
11	-	-	-	131,93	32	1,52	m	-	24,99
12	7,44	d	8,2	114,92	33	1,56	-	-	18,55
13	-	-	-	144,98	34	2,06	s	-	24,61
14	-	-	-	149,37	35	4,85	s	-	122,73
15	7,36	d	1,9	113,76	36	-	m	-	133,77
16	7,41	dd	8,2; 1,9	126,75	37	1,65	m	-	24,65
17	2,02	m	-	34,82	38	1,74	-	-	16,56
18	1,24	s	-	17,13	39	-	-	-	140,76
19	2,57	m	-	21,72	40	-	-	-	83,18
20	5,20	-	-	119,05	41	1,11	s	-	26,58
21	-	-	-	133,99	42	1,11	s	-	26,58
					43	1,11	s	-	26,58

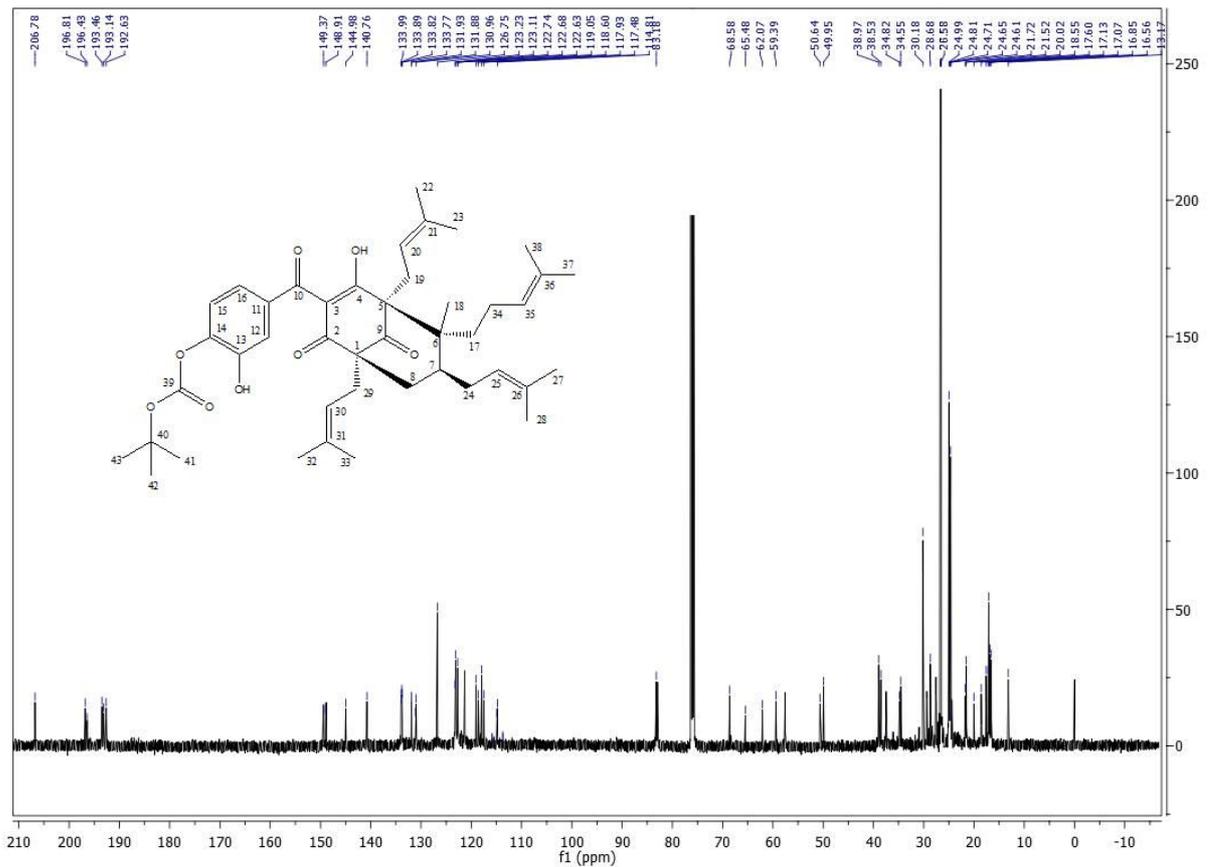


Figura 38 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do derivado LFQM-79

O espectro de massas do derivado LFQM-79 está apresentado na Figura 39, onde foi identificado o sinal do íon molecular m/z 702 (FIGURA 40).

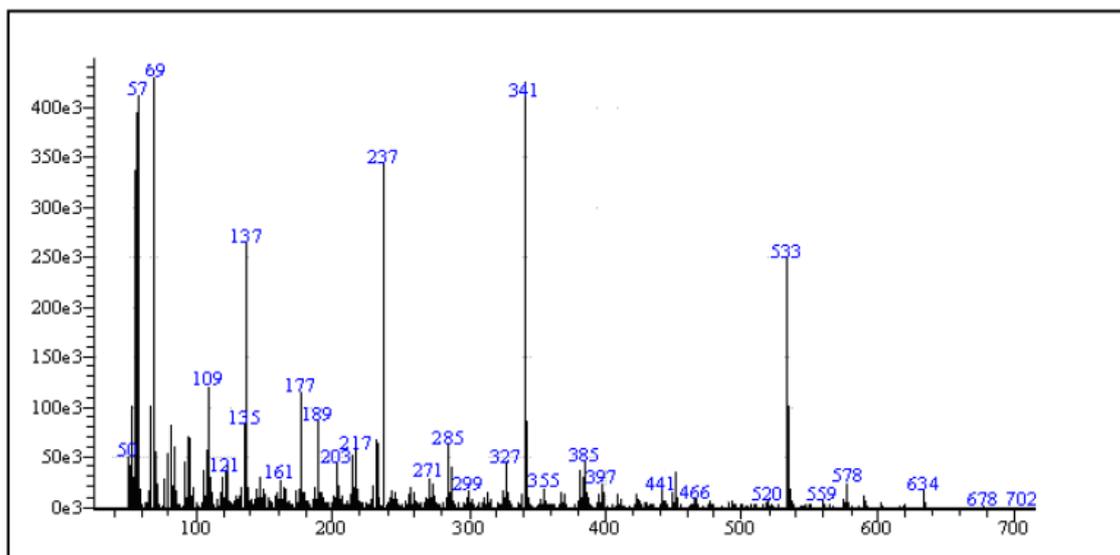


Figura 39 - Espectro de massas do derivado LFQM-79

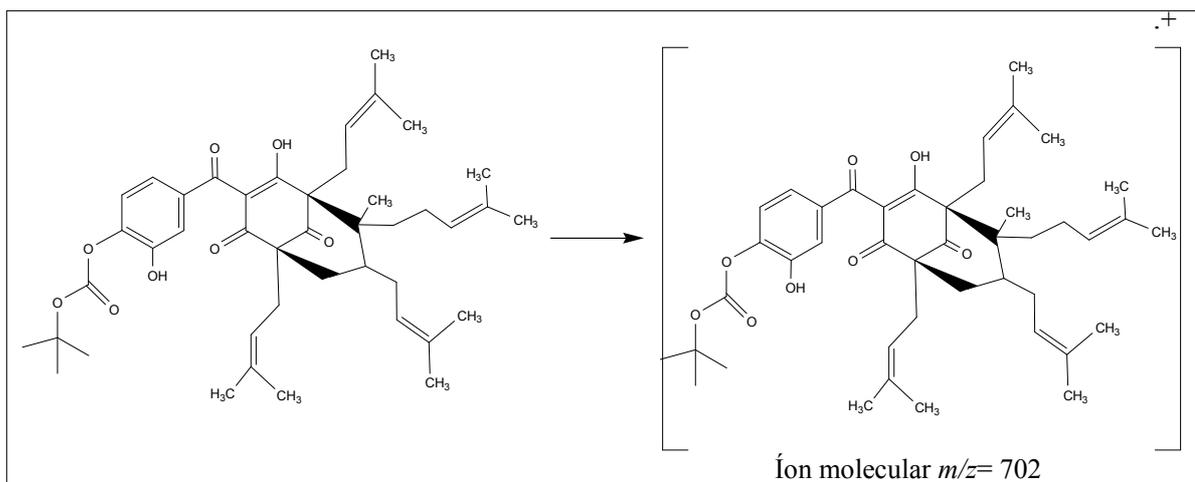


Figura 40 - Íon molecular m/z 702 do derivado LFQM-79

5.3.2 Reação de obtenção do derivado 13,14-di-acetil-guttiferona-A (LFQM-80)

O derivado foi obtido pela reação de acetilação, a partir de LFQM-78, por reação com anidrido acético e 4-DMAP (FIGURA 41). A reação resultou em um óleo avermelhado que, após purificação em coluna, resultou em 100 mg de LFQM-80, com rendimento de 87% .

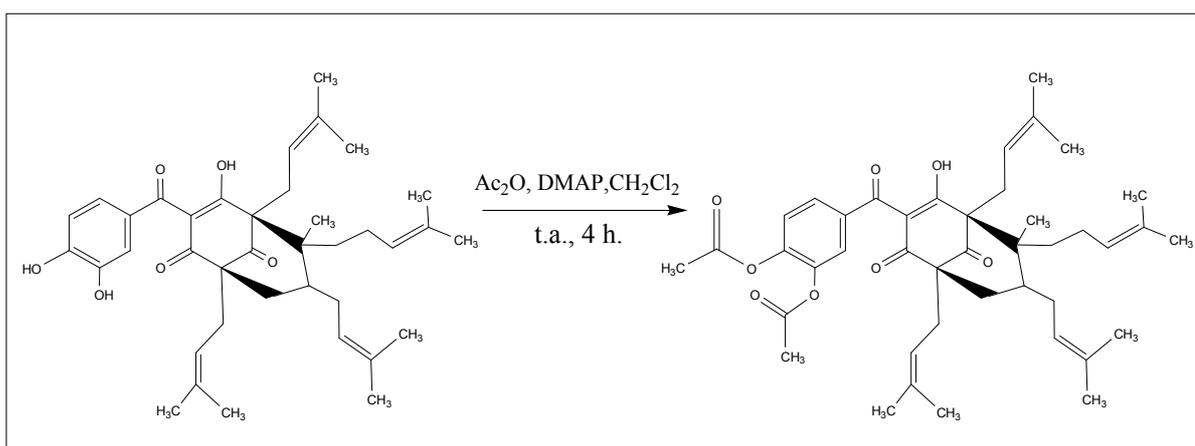


Figura 41 - Reação de obtenção do derivado LFQM-80

No espectro no IV (FIGURA 42) do derivado acetilado não se observou banda de estiramento de deformação axial de OH em 3650 à 3590 cm^{-1} , sugerindo a modificação da hidroxila. O aparecimento de uma banda de absorção em $1778,37\text{ cm}^{-1}$, típica de estiramento

de C=O de éster, sugere a formação do produto. Também foram identificadas bandas de deformação axial assimétrica de C-H em 2916,37 cm^{-1} , de deformação axial de C=C de aromático em 1668,43 cm^{-1} , deformação axial assimétrica de C-O em 1203,58 cm^{-1} , além de várias bandas de deformação axial de C-C de anel aromático em 1575,84 cm^{-1} .

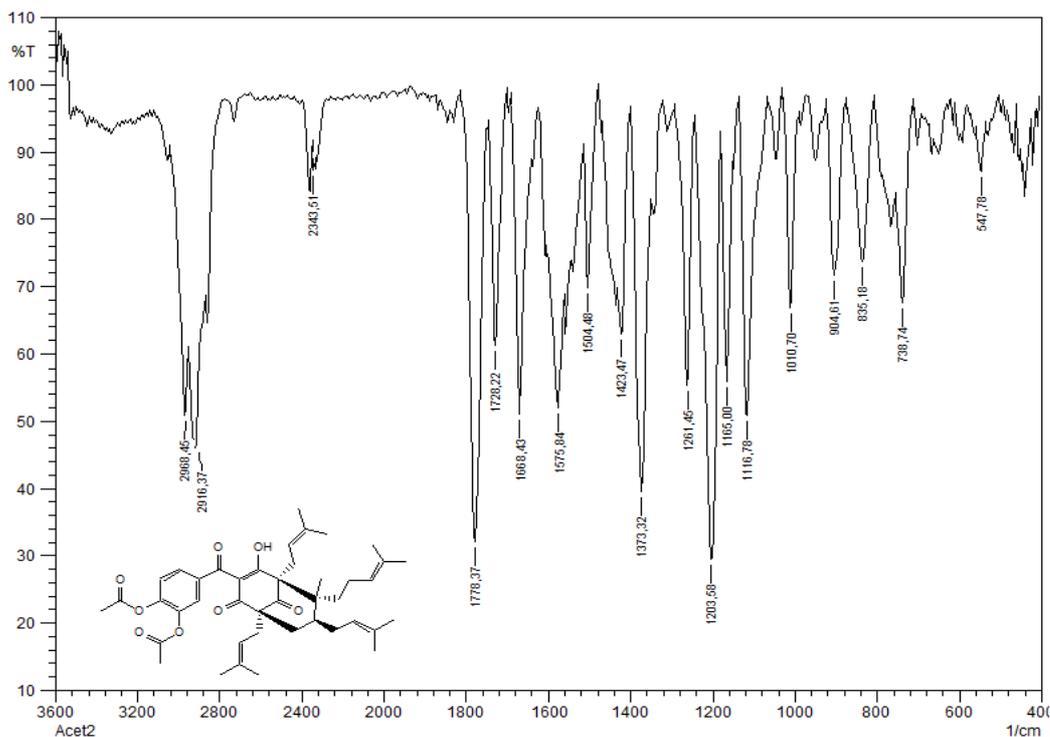


Figura 42 - Espectro no IV (KBr, cm^{-1}) do derivado LFQM-80

No espectro de RMN de ^1H do composto acetilado (FIGURA 43) foi observado além de outros sinais um singlete em 2,22 ppm, que foi atribuído aos hidrogênios das metilas dos grupos acetilas substituídos no anel aromático (H-40 e H-42), sugerindo portanto a modificação nas hidroxilas fenólicas.

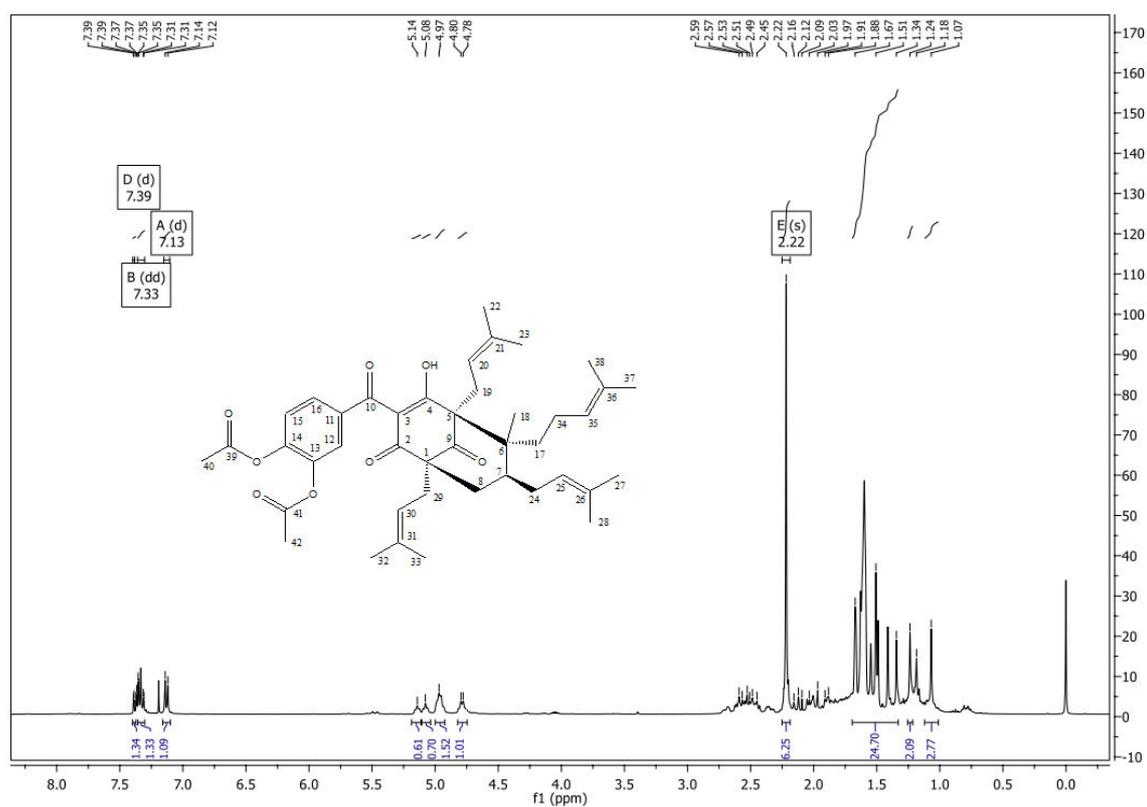


Figura 43 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do derivado LFQM-79

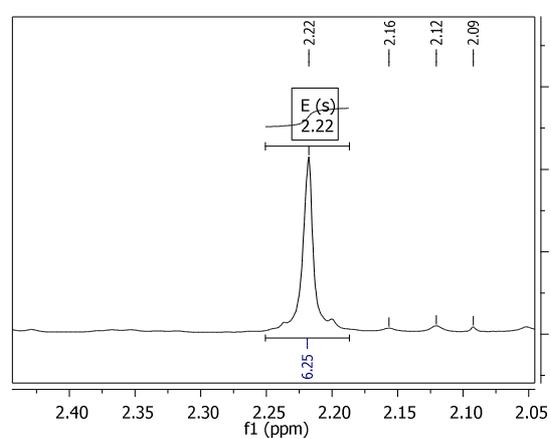


Figura 44 - Espectro de RMN H^1 (400 MHz, CDCl_3) do derivado LFQM-80 ampliado de δ 2,5 a 2,05 –em destaque deslocamento em δ 2,22 referente aos 6H das metilas dos grupos substituintes

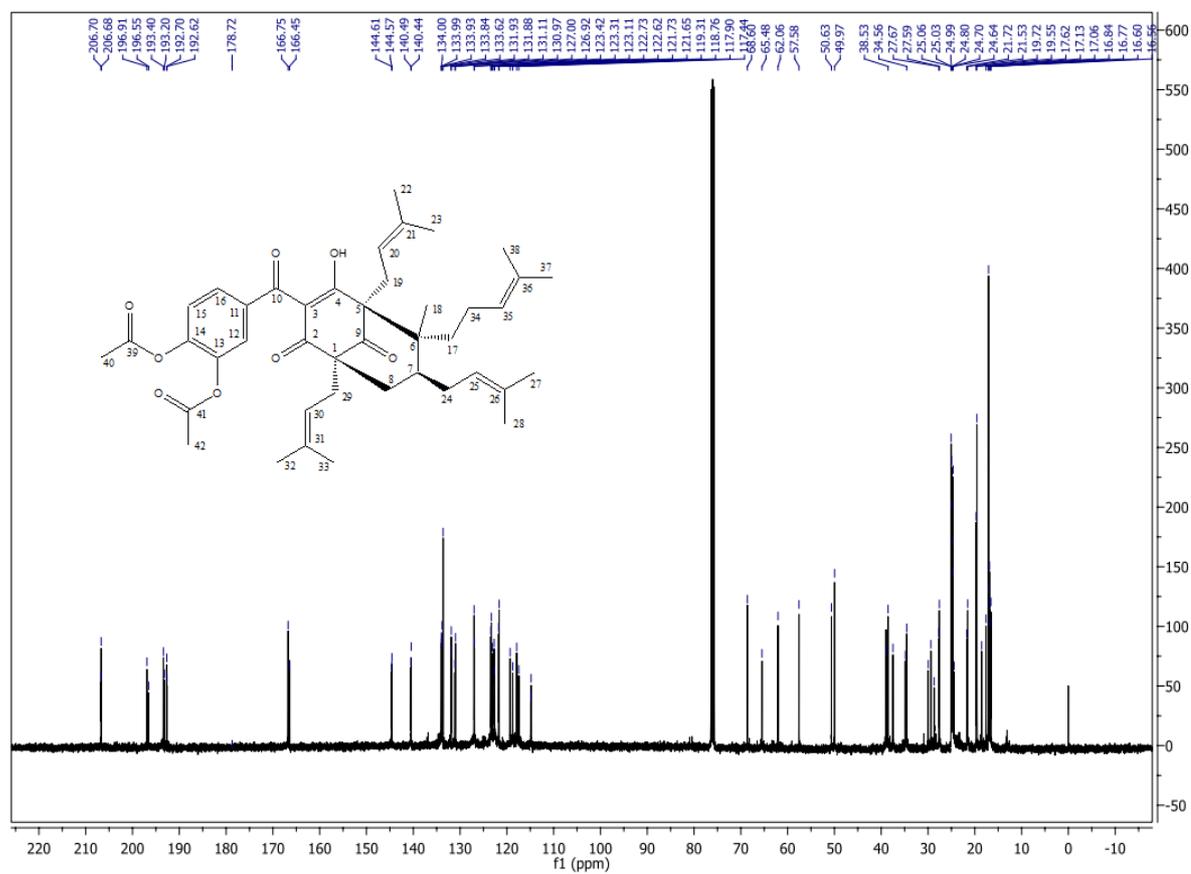


Figura 45 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do derivado LFQM-80

Tabela 05- Dados de RMN ¹H e RMN ¹³C de LFQM-80 (¹H- 400 MHz; ¹³C- 100 MHz, CDCl₃, δ em ppm, *J*=Hz, M= multipicidade)

Posição	δ ¹ H (ppm)	M	<i>J</i>	δ ¹³ C (ppm)	Posição	δ ¹ H (ppm)	M	<i>J</i>	δ ¹³ C (ppm)
1	-	-	-	62,06	22	1,59	m	-	24,98
2	-	-	-	193,40	23	1,24	-	-	17,62
3	-	-	-	114,91	24	2,59	s	-	29,98
4	-	-	-	192,70	25	4,97	s	-	123,42
5	-	-	-	68,60	26	-	m	-	133,93
6	-	-	-	50,63	27	1,48	m	-	25,02
7	2,45	m	-	38,93	28	1,67	-	-	16,84
8	2,12	m	-	37,49	29	2,48	S	-	27,57
9	-	-	-	205,70	30	5,08	s	-	119,31
10	-	-	-	196,91	31	-	m	-	133,99
11	-	-	-	133,62	32	1,34	m	-	25,05
12	7,39	d	8,1	115,82	33	1,41	-	-	18,54
13	-	-	-	140,49	34	2,03	s	-	24,65
14	-	-	-	144,61	35	4,79	s	-	122,73
15	7,13	d	1,9	113,93	36	-	m	-	133,84
16	7,33	dd	8,1; 1,9	127,00	37	1,50	m	-	24,80
17	1,96	m	-	34,82	38	1,67	-	-	16,50
18	1,07	s	-	17,13	39	-	-	-	166,45
19	2,52	m	-	21,72	40	2,22	s	-	19,55
20	5,24	-	-	117,90	41	-	-	-	166,75
21	-	-	-	134,00	42	2,22	s	-	19,72

No espectro de massas (FIGURA 46) foi identificado o sinal do íon molecular do composto apresenta-se em *m/z* 686 (FIGURA 47).

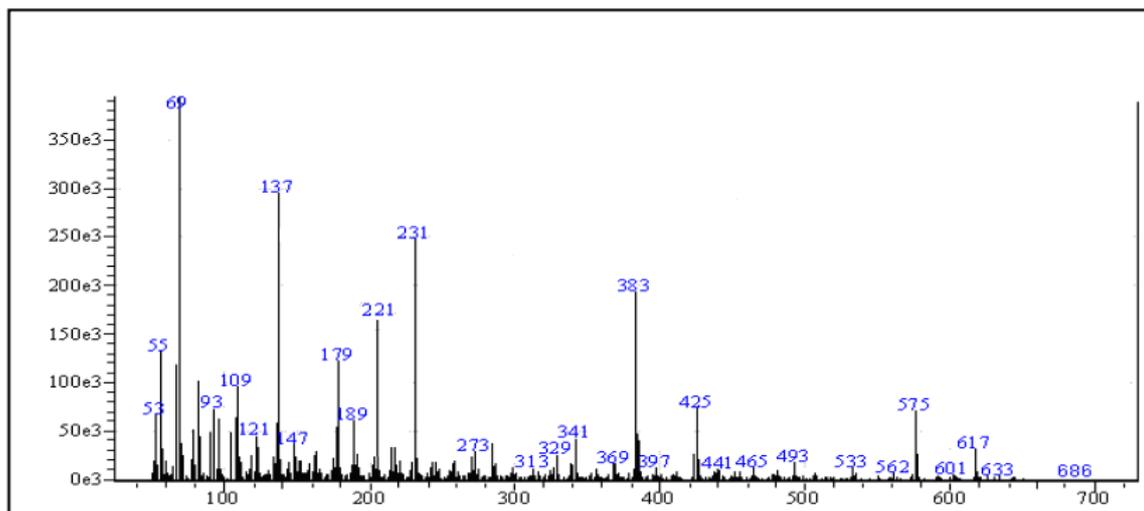


Figura 46 - Espectro de massa do derivado LFQM-80

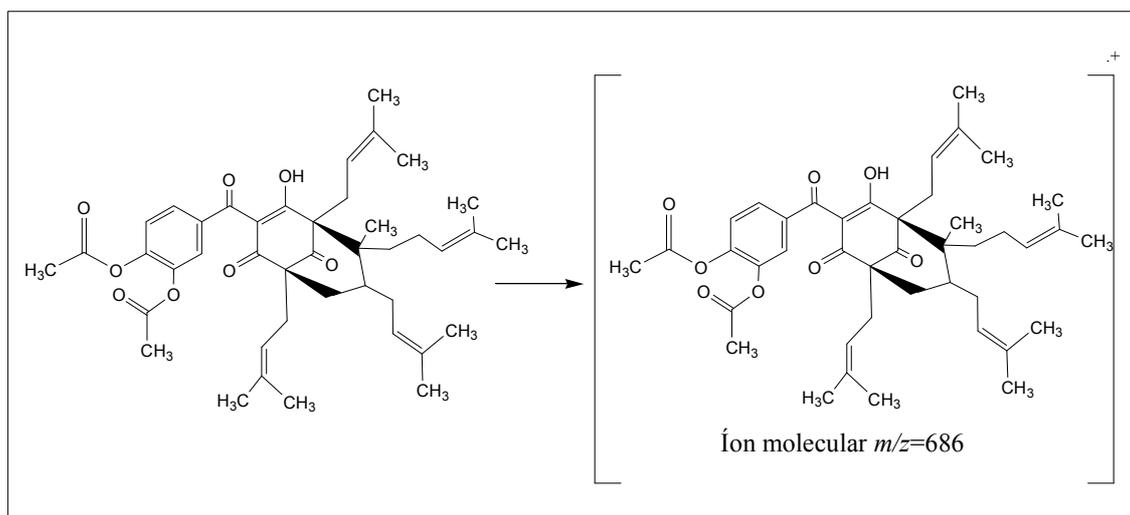


Figura 47 - Íon molecular do derivado LFQM-80

5.3.3 Preparo e caracterização do derivado 13,14-di-metanosulfonil-guttiferona-A (LFQM-81)

O derivado foi obtido por reação do LFQM-78 com MsCl e Et_3N . O produto (FIGURA 48). A reação resultou em um óleo amarelado que, após purificação em coluna, resultou em 88 mg de LFQM-81 com de rendimento de 70%.

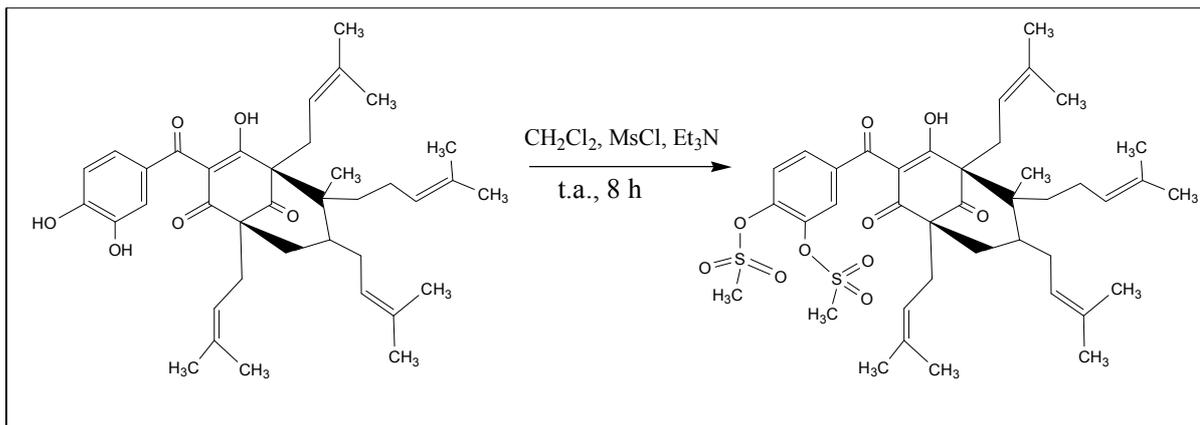


Figura 48 - Reação de obtenção do derivado LFQM-81

A análise do espectro no IV (FIGURA 49) do derivado LFQM-81 revelou bandas em 1373,32 e 1371,74 cm^{-1} atribuídas a deformação assimétrica do grupo $\text{S}(=\text{O})_2$, banda em 1180 cm^{-1} referente a deformação simétrica de grupo $\text{S}(=\text{O})_2$ e bandas em 1103,28 e 738,74 cm^{-1} atribuídas à deformação axial do sistema S-O-C. A ausência da banda referente ao grupo -OH sugeriu a substituição em dois grupos hidroxila do substrato.

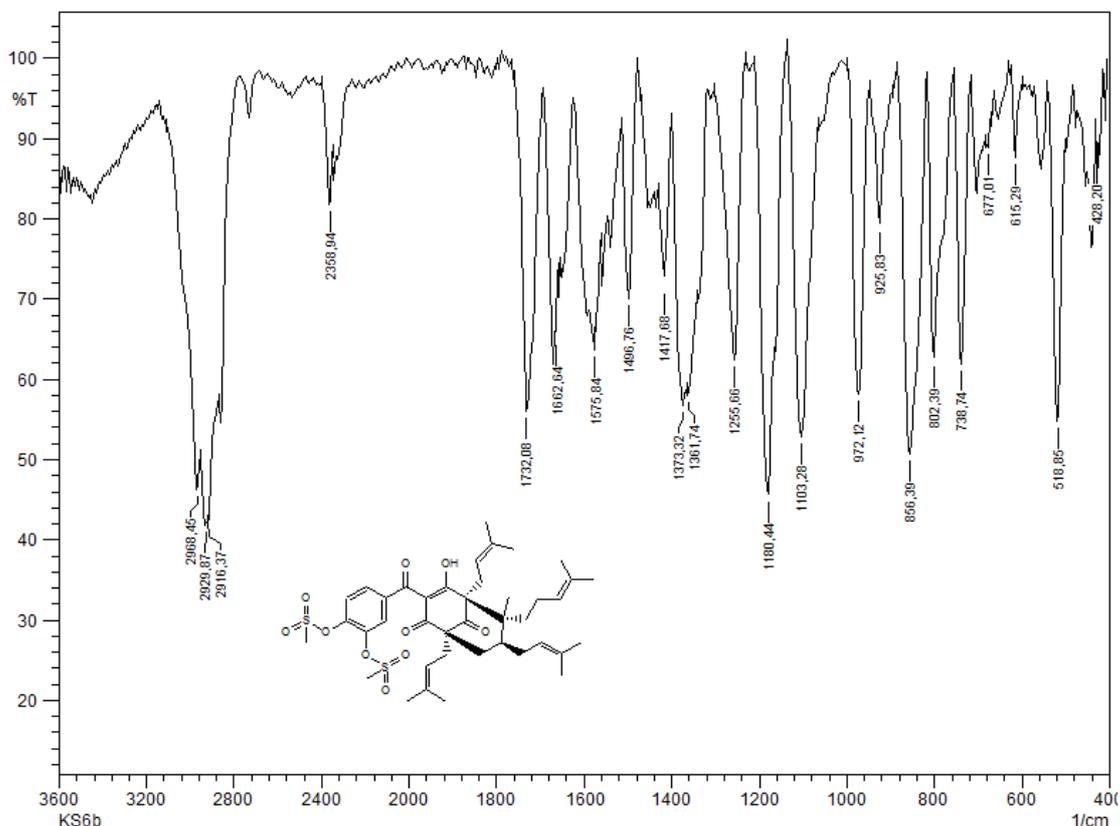


Figura 49- Espectro no IV (KBr, cm^{-1}) do derivado LFQM-81

A análise do espectro de RMN de ^1H do derivado LFQM-81 (FIGURA 50) evidenciou, além de outros, dois simpletos em 3,22 e 3,24 ppm, ausentes no espectro de RMN de ^1H do material de partida, que foram atribuídos aos hidrogênios H-39 e H-40 referente aos grupos metila do grupo metanosulfonil, confirmando portanto a modificação estrutural desejada. No espectro de ^{13}C foi observado em 32,66 ppm referente ao carbono metílico do grupo substituinte.

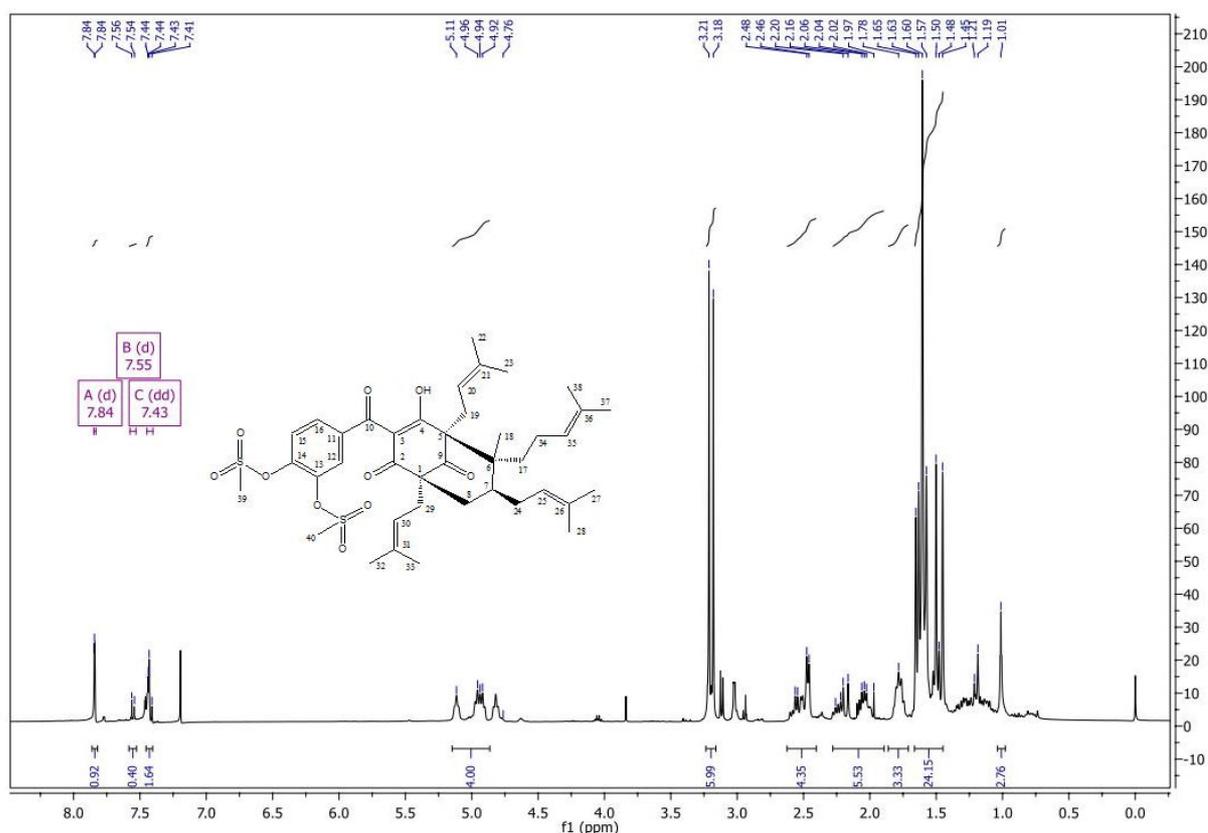


Figura 50- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do derivado LFQM-81

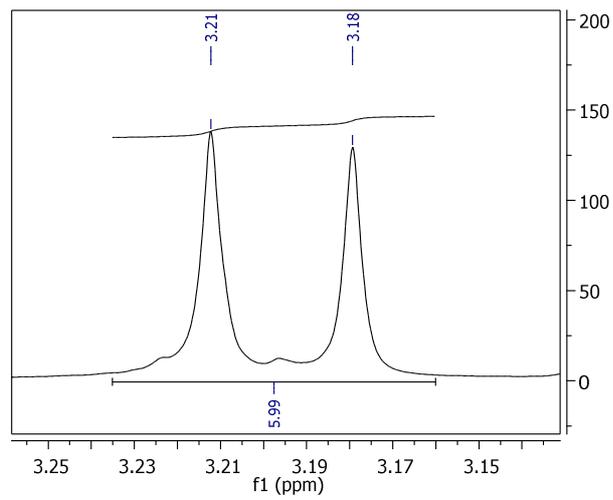


Figura 51- Espectro de RMN de ^1H do derivado LFQM-81 ampliado de 3,24-3,15 ppm

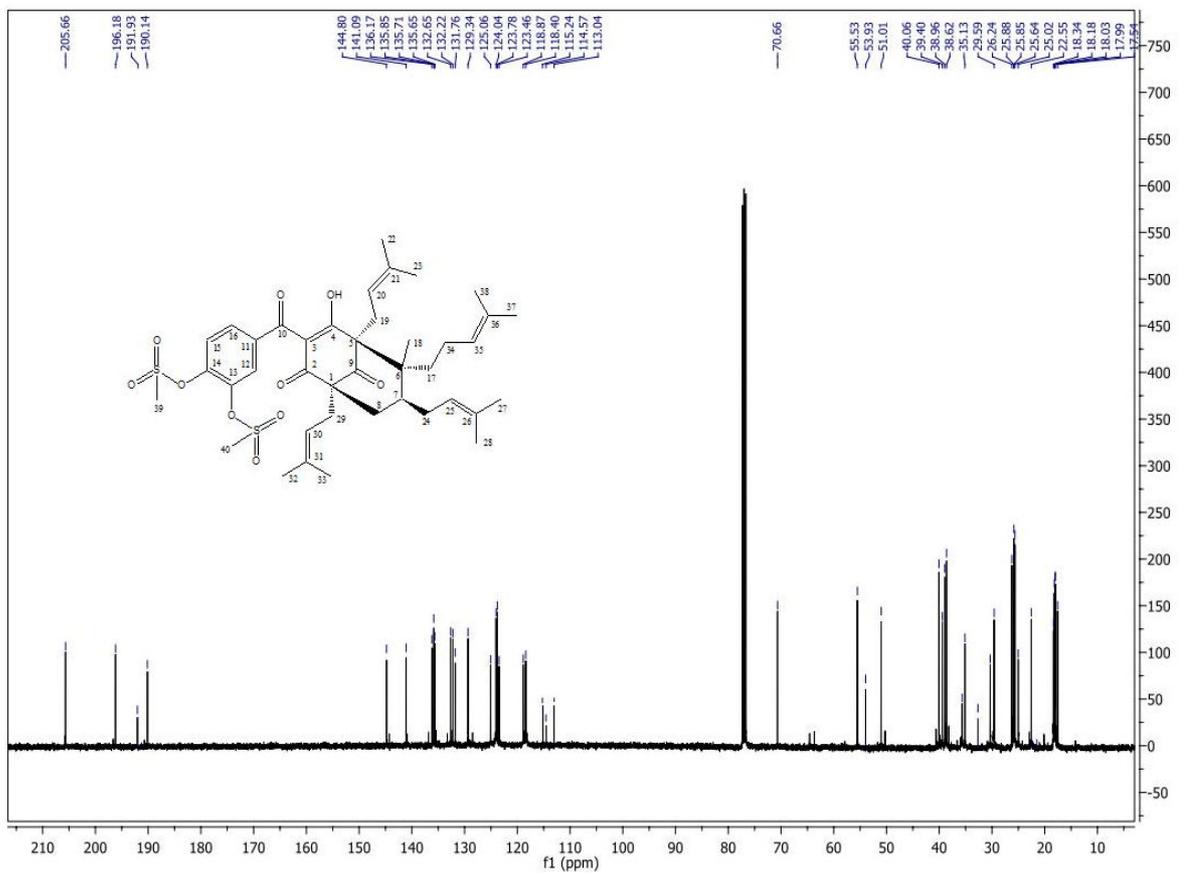


Figura 52- Espectro RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do derivado LFQM-81

Tabela 06- Dados de RMN ¹H e RMN ¹³C de LFQM-81 (¹H- 400 MHz, ¹³C- 100 MHz, CDCl₃, δ em ppm, J=Hz, M= multiplicidade

Posição	δ ¹ H (ppm)	M	J	δ ¹³ C (ppm)	Posição	δ ¹ H (ppm)	M	J	δ ¹³ C (ppm)
1	-	-	-	55,53	21	-	m	-	136,17
2	-	-	-	191,93	22	1,63	-	-	26,88
3	-	-	-	114,57	23	1,45	s	-	18,18
4	-	-	-	190,14	24	2,55	s	-	30,33
5	-	-	-	70,66	25	4,94	m	-	124,04
6	-	-	-	51,01	26	-	m	-	135,85
7	2,20	m	-	40,06	27	1,60	-	-	26,88
8	2,16	m	-	38,96	28	1,65	s	-	17,54
9	-	-	-	205,66	29	2,26	s	-	29,59
10	-	-	-	196,18	30	4,96	m	-	118,87
11	-	-	-	132,65	31	-	m	-	137,71
12	7,84	d	8,3	115,24	32	1,48	-	-	26,24
13	-	-	-	141,09	33	1,57	s	-	18,34
14	-	-	-	144,80	34	2,04	s	-	25,64
15	7,44	d	2,0	113,04	35	4,92	m	-	123,46
16	7,46	dd	8,3; 2,0	129,0	36	-	m	-	135,64
17	1,78	m	-	35,13	37	1,60	-	-	25,82
18	1,01	s	-	18,03	38	1,65	m	-	17,99
19	2,46	m	-	21,51	39	3,18	s	-	32,63
20	5,11	-	-	118,40	40	3,21	s	-	32,63

No espectro de massas (Figura 53), foi identificado o sinal do íon molecular do composto em *m/z* 757 (Figura 54).

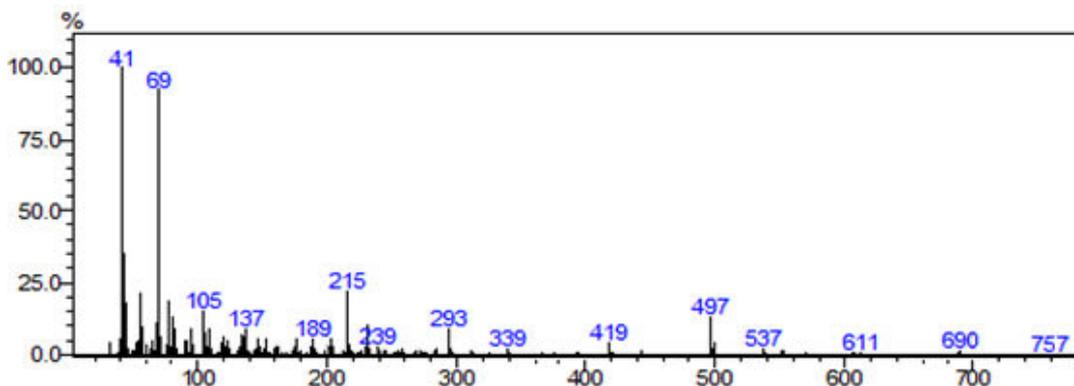


Figura 53- Espectro de massa do derivado LFQM-81

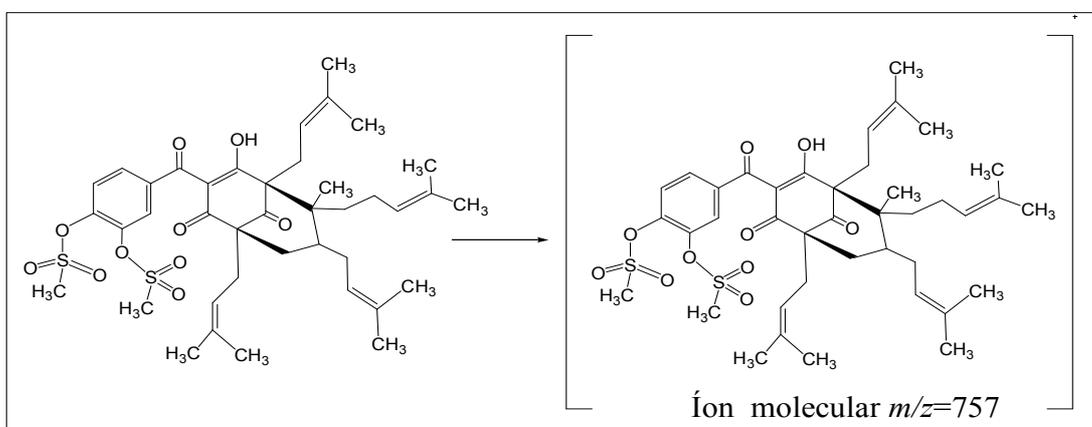


Figura 54- Íon molecular do derivado LFQM-81

5.3.4 Preparo e caracterização do derivado 13,14-di-(4-clorobenzoil)-guttiferona-A (LFQM-82)

O derivado foi obtido pela reação de benzoilação, no qual se fez reagir LFQM-78, $C_7H_4Cl_2O$ e Et_3N em CH_2Cl_2 . O produto obtido resultou de um óleo amarelo e após a purificação apresentou um rendimento de 60% (87 mg).

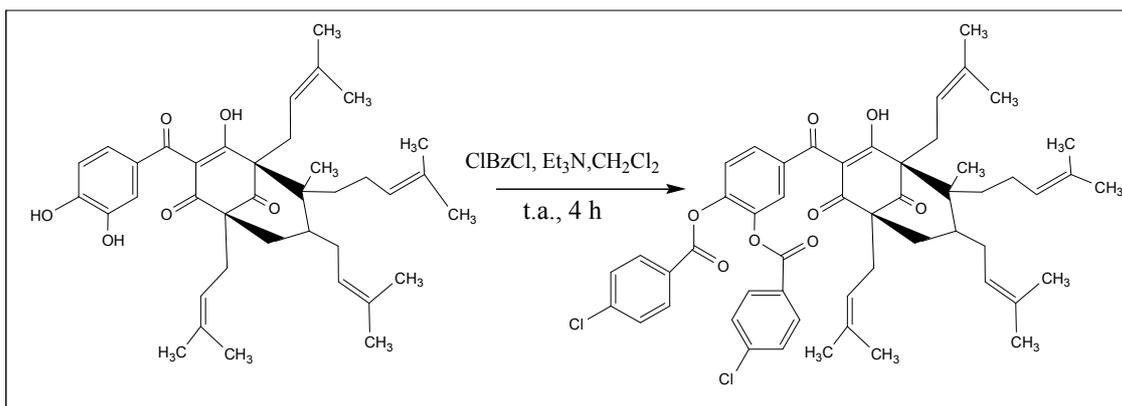


Figura 55- Reação de obtenção do derivado LFQM-82

No espectro no infravermelho (FIGURA 56) não foram observadas bandas referentes às vibrações de deformação axial do grupo OH, indicando que ocorreu a modificação nas hidroxilas fenólicas. Foram observadas bandas em 1749 cm^{-1} e 1253 cm^{-1} referentes às deformações axiais de C=O e C-O de éster respectivamente.

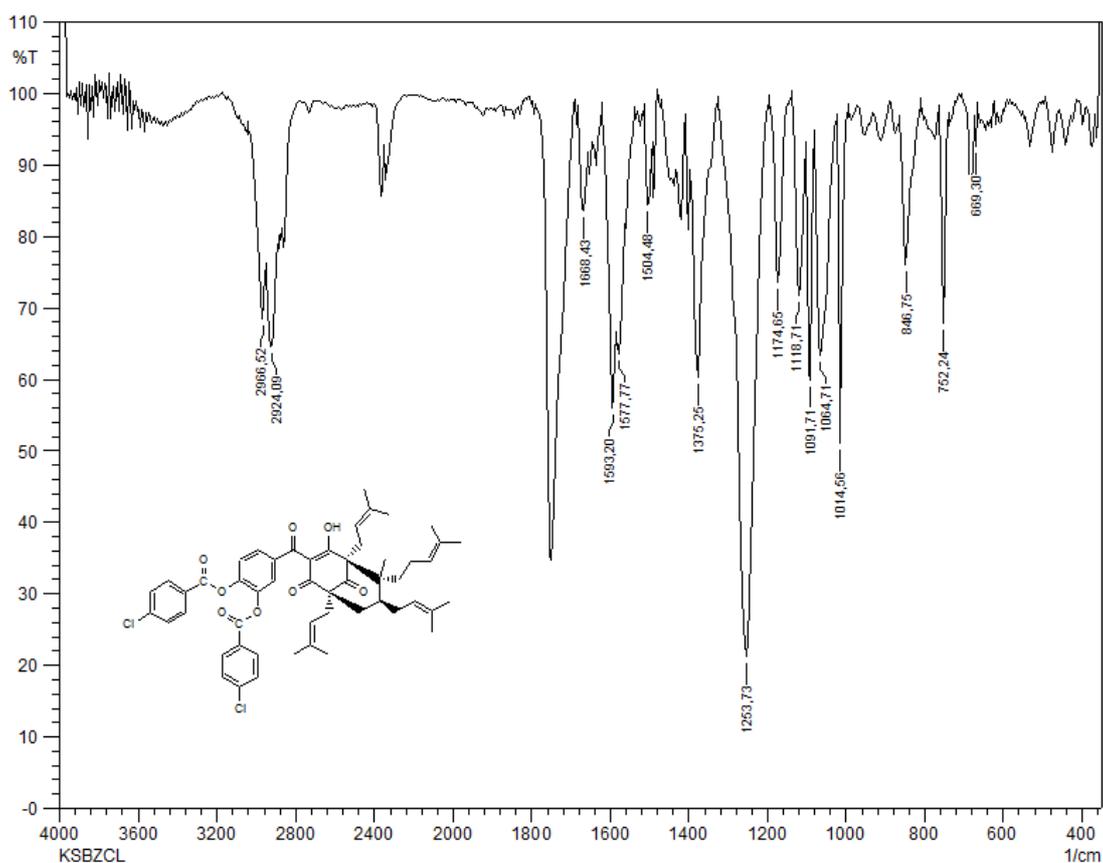


Figura 56- Espectro no IV (KBr, cm^{-1}) do derivado LFQM-82

Pela análise do espectro de RMN de ^1H do derivado (FIGURA 57) foi observado, além dos outros sinais já observados no composto de partida LFQM-78, sinais característicos de sistemas aromáticos 1,4 disubstituído, um duplete em 7,99 ppm ($J=8,5$ Hz) que foi atribuídos aos hidrogênios aromáticos (H-41, H-45, H-48 e H-52), duplete em 7,39 ppm ($J= 9,3$ Hz) referente aos hidrogênios (H- 42, H-44, H-49 e H-51) (FIGURA 61) confirmando portanto a modificação nas duas hidroxilas fenólicas. No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 59) foi observado um sinal em 163,91 ppm referentes aos carbono carbonílicos, e sinais entre 128,47 ppm e 133,77 ppm referentes aos carbonos aromáticos do sistema aromático 1,4 disubstituído do grupamento ClBz. Vale ressaltar que não foram observados estes sinais no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do material de partida.

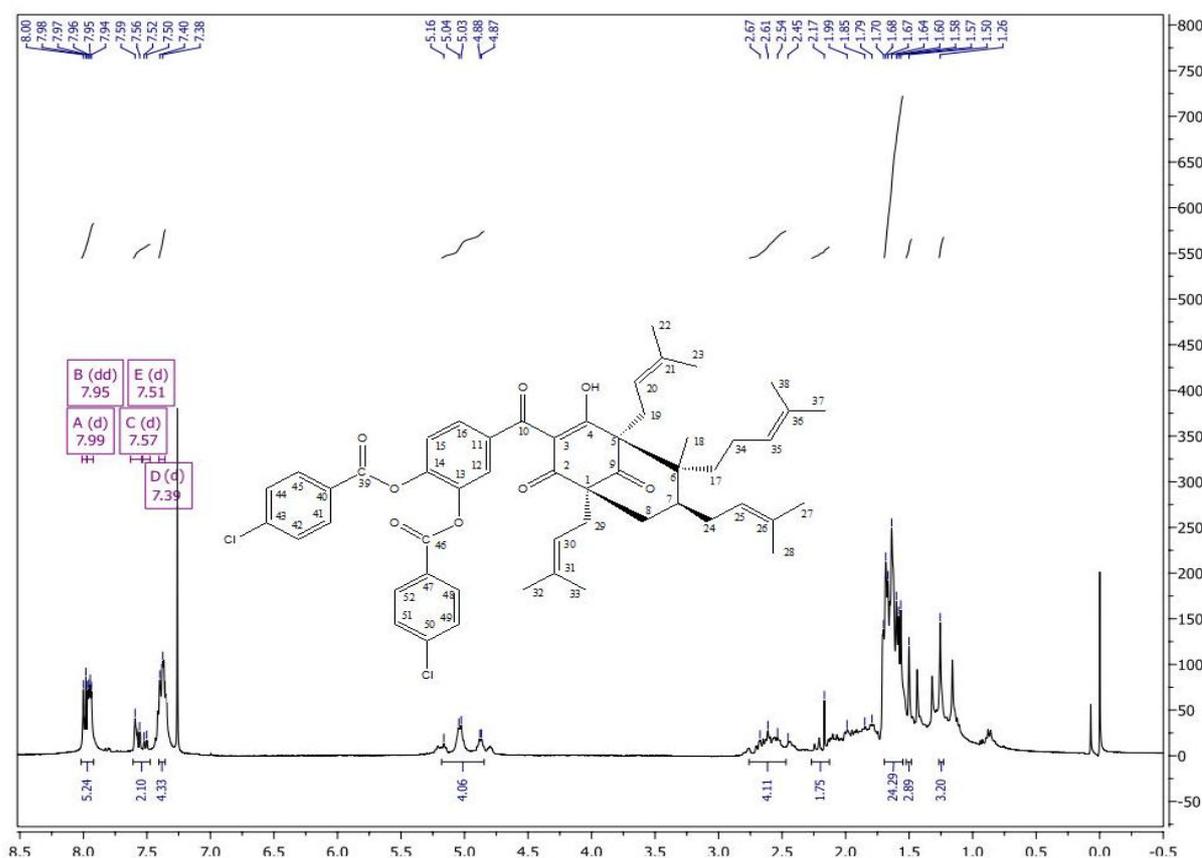


Figura 57 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do LFQM-82

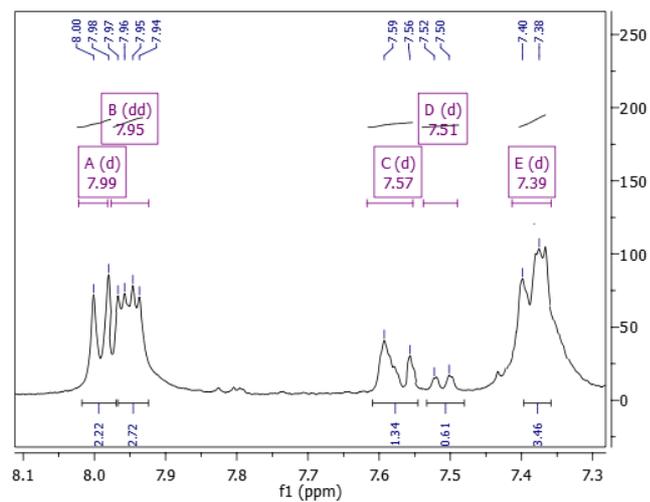


Figura 58- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) ampliado de δ 8,0 a 7,3 ppm do LFQM-82

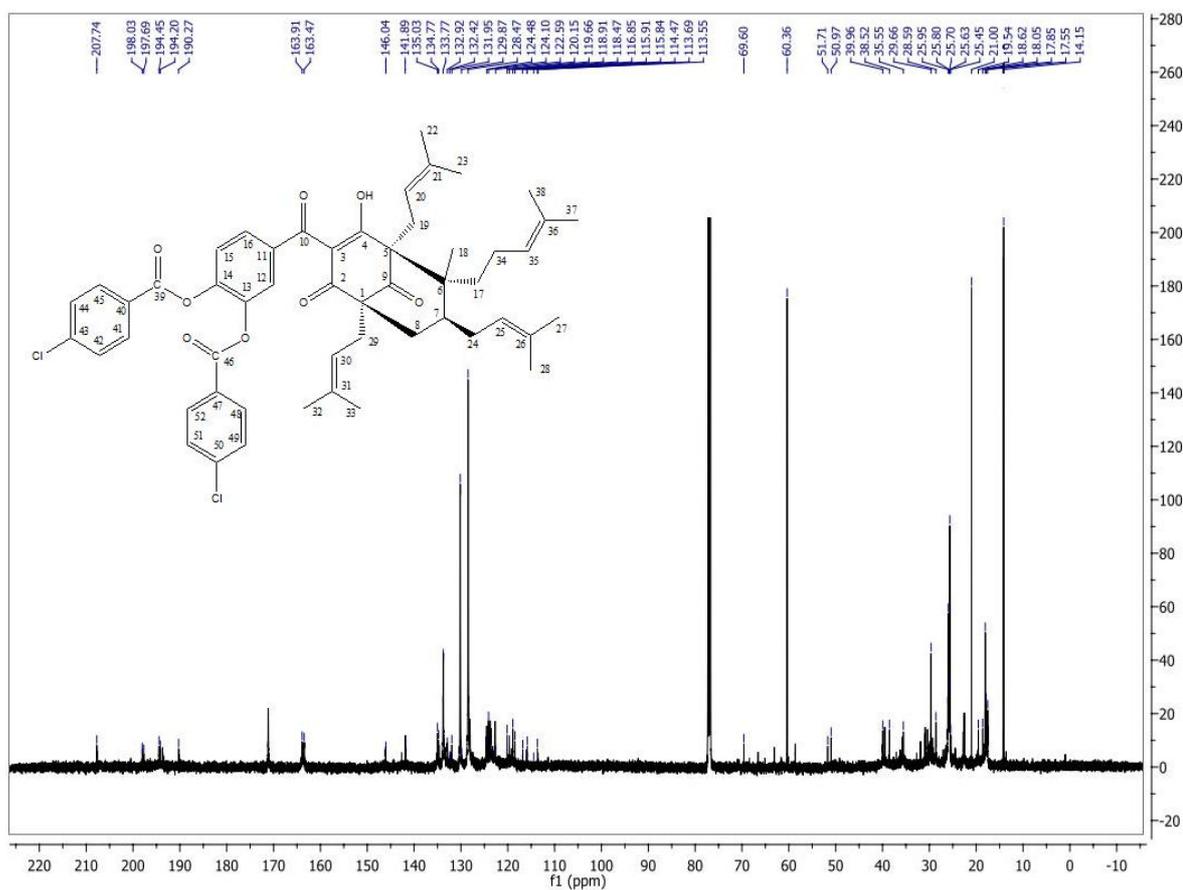


Figura 59- Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do derivado LFQM-82

Tabela 07- Dados de RMN ¹H e RMN ¹³C de LFQM-82 (¹H- 400 MHz; ¹³C- 100 MHz, CDCl₃, δ em ppm, *J*=Hz, M= multiplicidade

Posição	δ ¹ H (ppm)	M	<i>J</i>	δ ¹³ C (ppm)	Posição	δ ¹ H (ppm)	M	<i>J</i>	δ ¹³ C (ppm)
1	-	-	-	60,36	27	1,64	s	-	25,80
2	-	-	-	195,45	28	1,68	s	-	17,85
3	-	-	-	115,91	29	2,54	m	-	28,59
4	-	-	-	190,27	30	5,03	m	-	118,47
5	-	-	-	69,60	31	-	-	-	134,77
6	-	-	-	51,71	32	1,58	s	-	25,95
7	2,45	m	-	39,96	33	1,60	s	-	19,54
8	2,17	m	-	38,52	34	1,99	m	-	25,45
9	-	-	-	207,74	35	4,88	m	-	199,66
10	-	-	-	198,03	36	-	-	-	132,42
11	-	-	-	131,94	37	1,64	s	-	25,63
12	7,57	d	8,4	116,85	38	1,70	s	-	17,55
13	-	-	-	141,89	39	-	-	-	163,91
14	-	-	-	145,04	40	-	-	-	124,48
15	7,51	d	3,7	113,69	41	7,99	d	8,5	129,87
16	7,95	dd	8,4; 3,7	122,29	42	7,39	d	9,3	128,47
17	1,85	m	-	35,55	43	-	-	-	133,77
18	1,26	s	-	18,05	44	7,39	d	9,3	128,47
19	2,61	m	-	21,00	45	7,99	d	8,5	129,87
20	5,16	m	-	118,91	46	-	-	-	163,91
21	-	-	-	135,03	47	-	-	-	124,10
22	1,67	s	-	25,70	48	7,99	d	8,5	129,87
23	1,57	s	-	18,61	49	7,39	d	9,3	128,47
24	2,67	m	-	29,66	50	-	-	-	133,77
25	5,04	m	-	120,15	51	7,39	d	9,3	128,47
26	-	-	-	132,92	52	7,99	d	8,5	129,87

O espectro de massas do derivado LFQM-82 está apresentado na Figura 60, onde foi identificado o sinal do íon molecular *m/z* 878 (FIGURA 61)

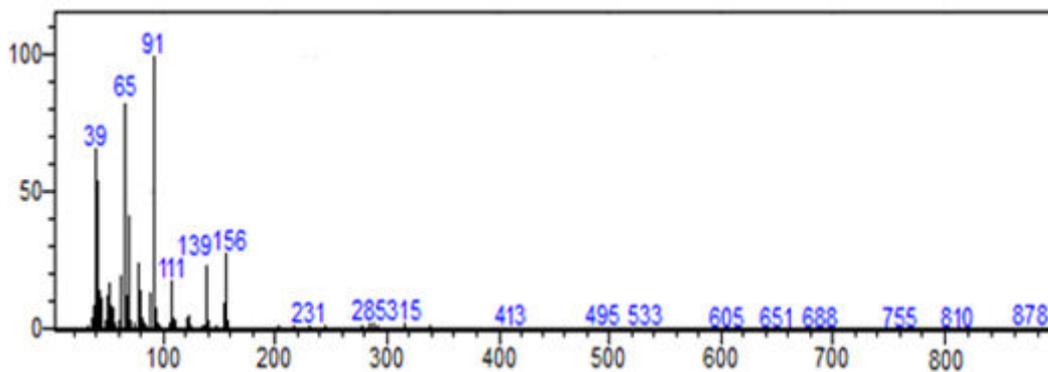


Figura 60 - Espectro de massas do derivado LFQM-82

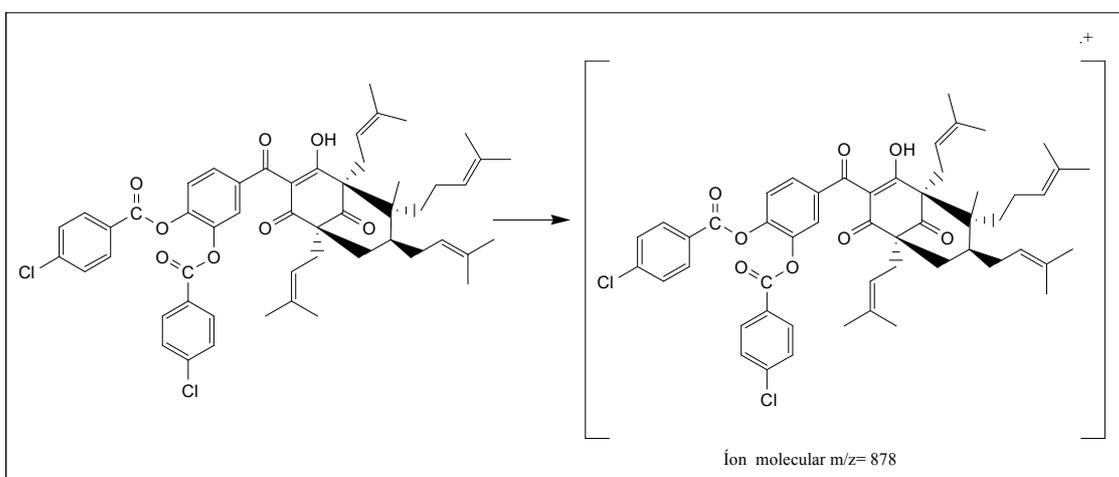


Figura 61- Íon molecular do derivado LFQM-82

5.3.5 Preparo e caracterização do derivado 13,14-di-(p-toluenosulfonil)-guttiferona-A (LFQM-113)

O derivado foi obtido pela reação de LFQM-78 com TsCl e Et₃N. A reação resultou em um óleo amarelo claro que, após purificação em coluna, resultou em 80,6 mg de LFQM-113, com rendimento de 55%.

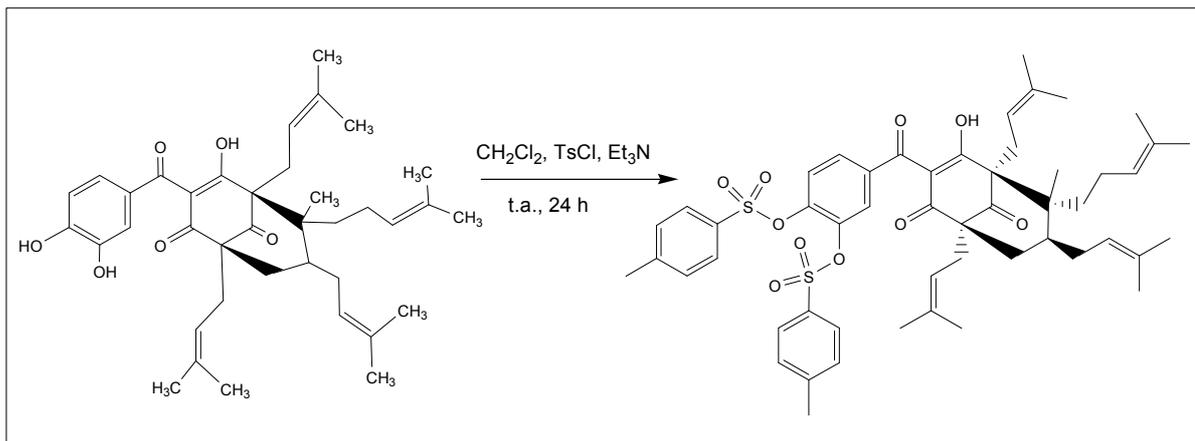


Figura 62- Reação de obtenção do derivado LFQM-113

A análise do espectro no IV (FIGURA 63) do derivado tosilado revelou banda em 1384 cm^{-1} atribuídas a deformação assimétrica do grupo $\text{S}(=\text{O})_2$, banda em $1085,92\text{ cm}^{-1}$ referente a deformação simétrica de grupo $\text{S}(=\text{O})_2$ e bandas em $921,97$ e $748,38\text{ cm}^{-1}$ atribuídas à deformação axial do sistema S-O-C. A ausência da banda referente ao grupo $-\text{OH}$ em 3485 cm^{-1} sugeriu a substituição dos dois grupos hidroxila do substrato.

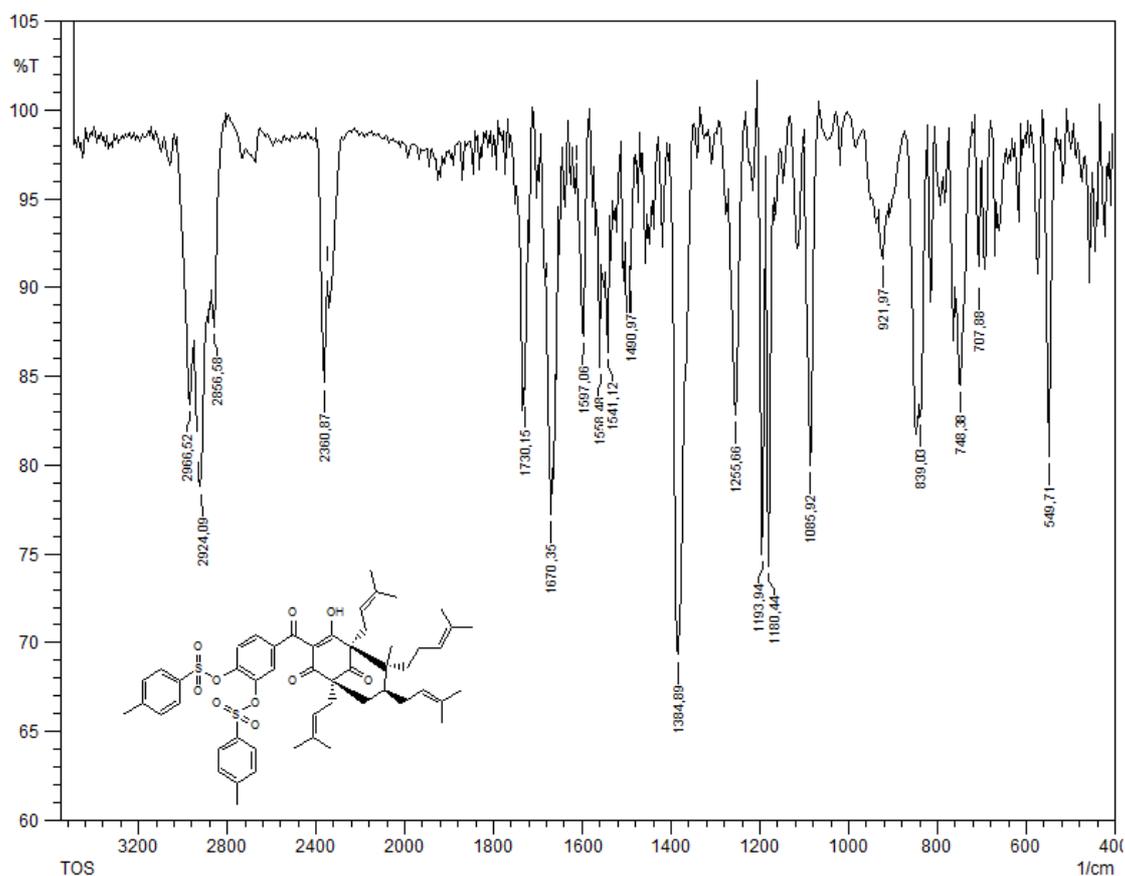


Figura 63- Espectro no IV (KBr) do derivado LFQM-113

Pela análise do espectro de RMN de ^1H (FIGURA 64) do derivado LFQM-113 foi observado, um simpleto em δ 2,45 ppm que foi atribuído aos hidrogênios H-45 e H-52 referente as metilas do grupo tosila, além dos sinais duplete em δ 7,65 ppm atribuídos aos H-40, H-44, H-47, H-51; duplete em 7,29 ppm atribuídos aos hidrogênios aromáticos H-48, H-50, H-41, H-43 dos grupos tosila. No espectro de RMN de ^{13}C foram observados sinais em δ 128,57 (C-40, C-44, C-47 e C-51) e δ 129,84 (C-41, C-43, C-48, C-50), δ 127,87 (C-46); δ 130,42 (C-39); δ 144,05 (C-42); δ 145,77 (C-49) sinais referentes aos carbonos aromáticos.

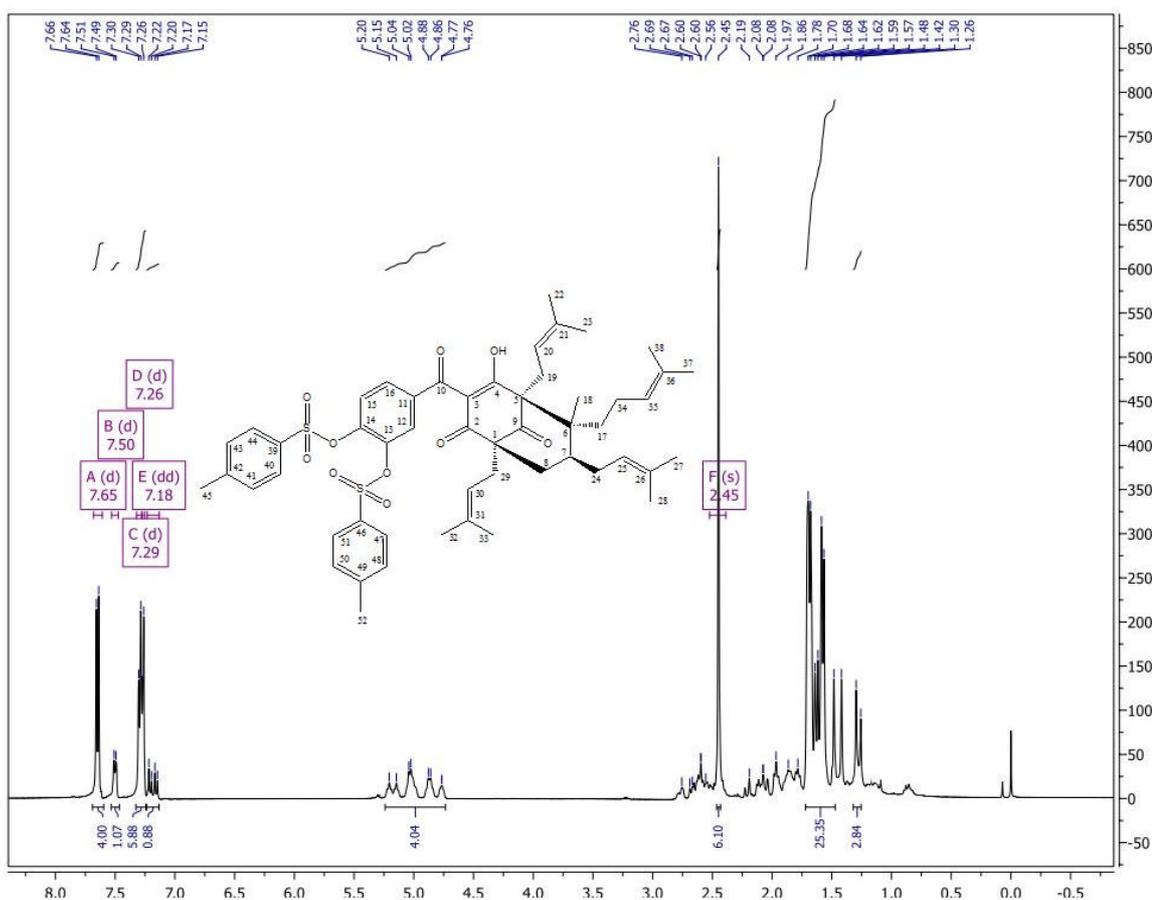


Figura 64- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do derivado LFQM-113

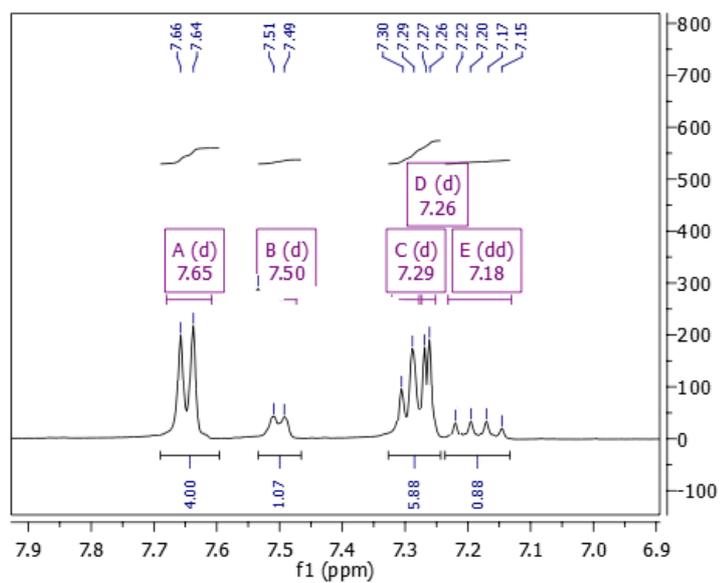


Figura 65- Espectro RMN de ^1H ampliado 6,9-7,9 ppm do derivado LFQM-113

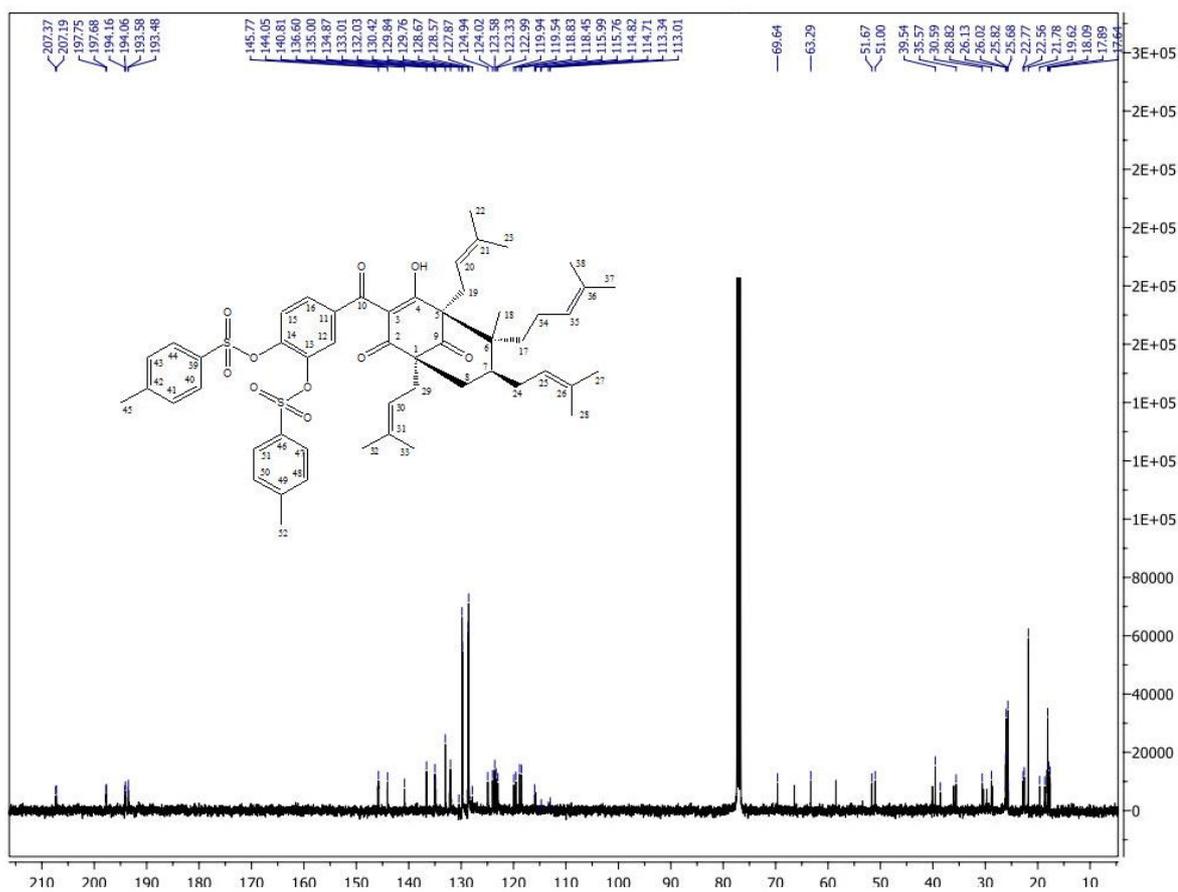


Figura 66- Espectro RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do derivado LFQM-113

Tabela 08: Dados de RMN ¹H e RMN ¹³C de LFQM-113 (¹H- 400 MHz; ¹³C- 100 MHz, CDCl₃, δ em ppm, *J*=Hz, M= multiplicidade

Posição	δ ¹ H (ppm)	M	<i>J</i>	δ ¹³ C (ppm)	Posição	δ ¹ H (ppm)	M	<i>J</i>	δ ¹³ C (ppm)
1	-	-		63,29	27	1,61	m	-	26,02
2	-	-		194,16	28	1,69	-	-	17,89
3	-	-		114,82	29	2,59	s	-	28,82
4	-	-		193,58	30	4,88	s	-	119,94
5	-	-		69,64	31	-	m	-	135,00
6	-	-		51,67	32	1,56	m	-	26,12
7	2,55	m		39,54	33	1,58	-	-	19,62
8	2,19	m		38,56	34	2,07	s	-	25,59
9	-	-		207,37	35	4,77	s	-	122,99
10	-	-		197,75	36	-	m	-	134,87
11	-	-		132,03	37	1,64	m	-	25,68
12	7,50	d	6,5	115,99	38	1,69	-	-	17,64
13	-	-		140,81	39	-	-	-	130,42
14	-	-		144,05	40	7,65	d	8,1	128,57
15	7,26	d	8,6	113,34	41	7,29	d	7,0	129,84
16	7,18	dd	8,6; 6,0	124,94	42	-	-	-	144,05
17	1,96	m		35,57	43	7,29	d	7,0	129,84
18	1,30	s		18,09	44	7,65	d	8,1	128,57
19	2,59	m		22,77	45	2,45	s	-	21,78
20	5,20	-		118,83	46	-	-	-	127,87
21	-	-		136,60	47	7,65	d	8,1	128,57
22	1,67	m	-	25,82	48	7,29	d	7,0	129,84
23	1,48	-	-	18,63	49	-	-	-	145,77
24	2,74	s	-	30,59	50	7,29	d	7,0	129,84
25	5,04	s	-	123,58	51	7,65	d	8,1	128,57
26	-	m	-	133,01	52	2,45	s	-	21,78

No espectro de massas (FIGURA 67), foi identificado o sinal do íon molecular do composto apresenta-se em *m/z* 910. (FIGURA 68)

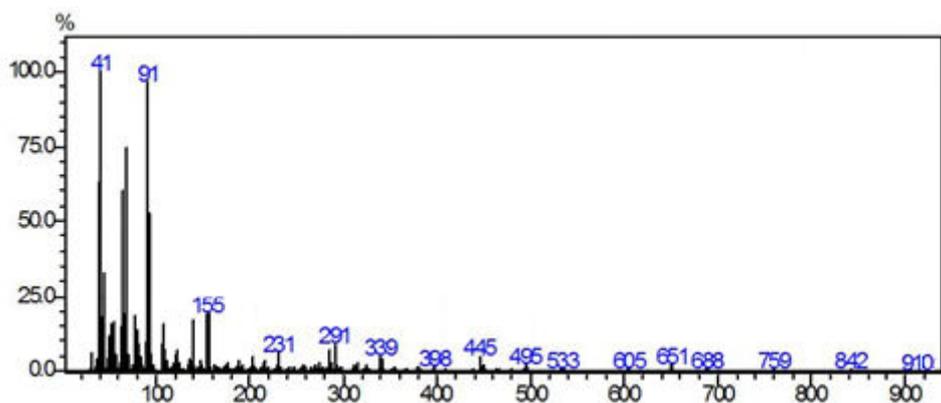


Figura 67- Espectro de massa do derivado LFQM-113

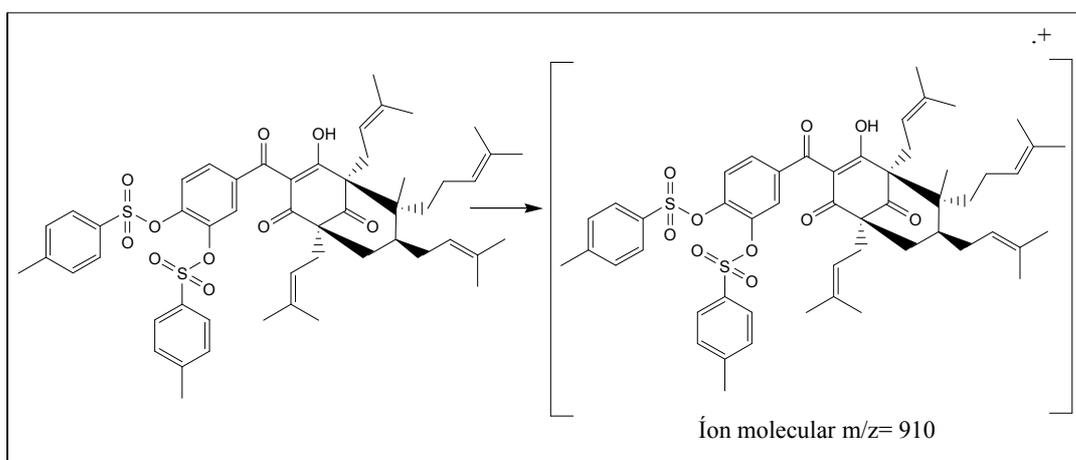


Figura 68- Íon molecular do derivado LFQM-113

5.3.6 Preparo e caracterização do derivado 13, 14-di-benzoil-guttiferona (LFQM-114)

O derivado foi obtido por reação de LFQM-78 com BzCl e K_2CO_3 (FIGURA 69). A reação resultou em um óleo amarelo que, após purificação em coluna, resultou em 68 mg de LFQM-114, com rendimento de 51% .

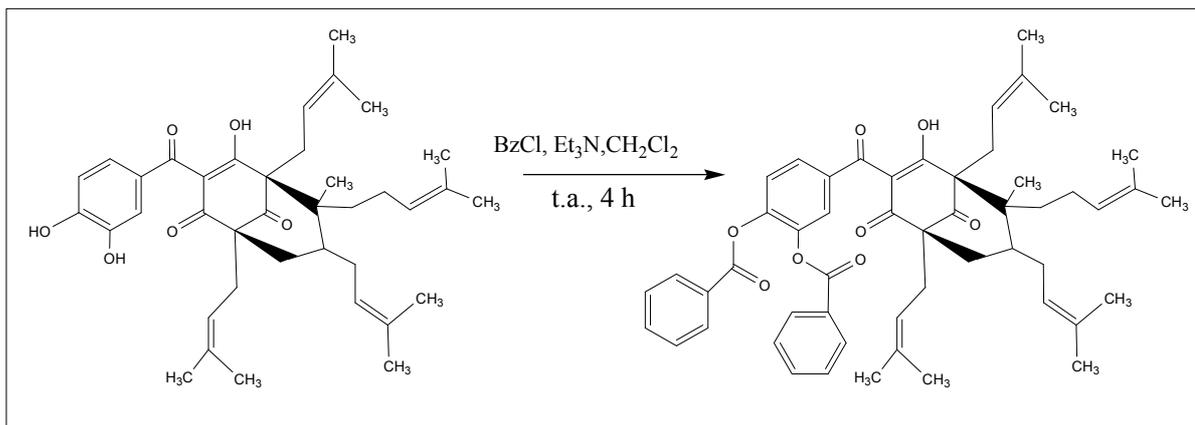


Figura 69- Reação de obtenção do derivado LFQM-114

No espectro de infravermelho (FIGURA 70) não foram observadas bandas referentes às vibrações de deformação axial do grupo OH, indicando que ocorreu modificação nas hidroxilas fenólicas. Foram observadas bandas em 1749 cm^{-1} referente à deformação axial de C=O de éster e em 1246 cm^{-1} referente a deformação axial desse mesmo grupo.

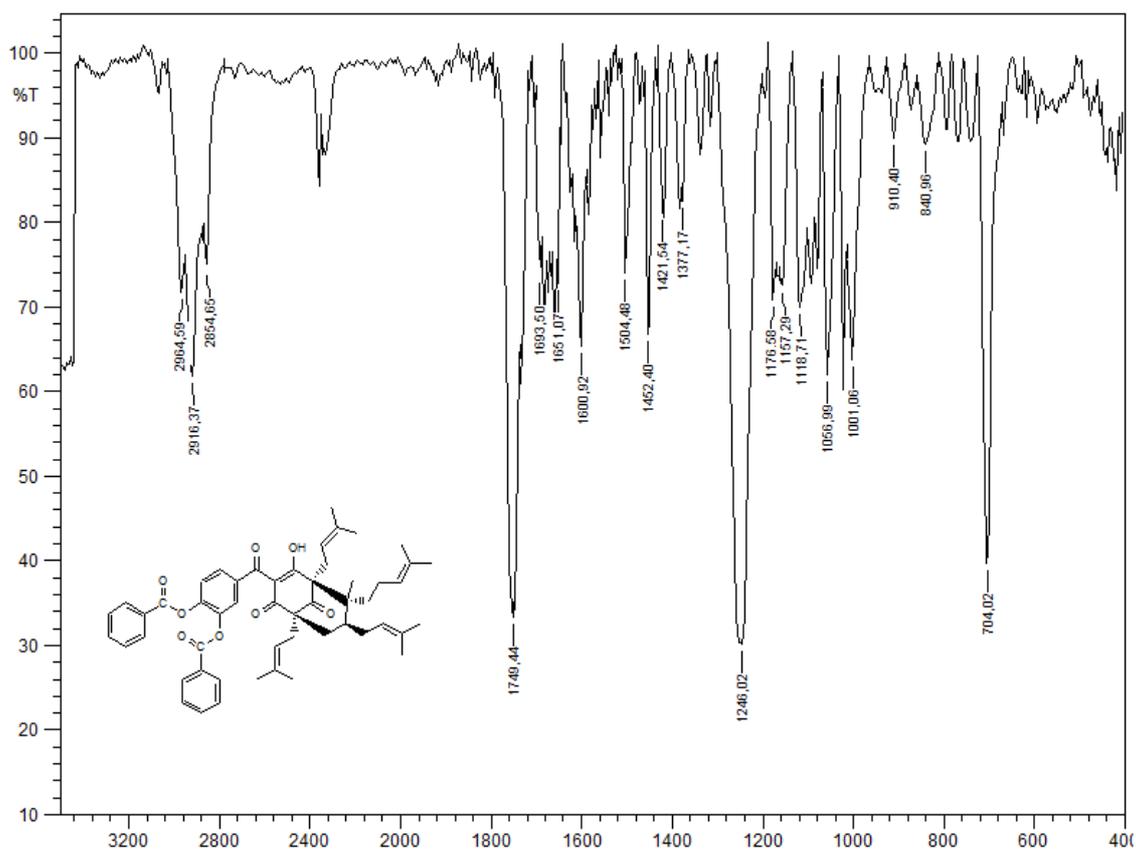


Figura 70- Espectro no IV (KBr, cm^{-1}) do derivado LFQM-114

No espectro de RMN de ^1H do derivado LFQM-114 (FIGURA 71) foram observados, além de outros sinais, um duplete em 8,02 ppm que foi atribuído aos hidrogênios aromáticos H-41, H-45, H-48 e H-52. Dois tripletos em 7,35 ppm referente aos hidrogênios H-42, H-44, H-49 e H-51 e outro em 7,52 ppm, referente aos hidrogênios H-43 e H-50 dos grupos substituintes.

No espectro de RMN de ^{13}C de LFQM-114 (FIGURA 73) foram atribuídos aos carbonos orto à carbonila do grupo benzoíla, os sinais de ressonância em 130,2 ppm (C-41, C-45, C-48 e C-52); os sinais em δ 128,49 (C-42, C-44, C-49 e C-51), e sinais referentes aos carbonos em para observados em 134,22 ppm (C-50 e C-43). Em 167,11 ppm em 161,34 ppm foram observados os sinais de ressonância dos carbonos carbonílicos (C-39 e C-46); e em 127,96 ppm foram observados os sinais de ressonância para os carbonos C-40 e C-47 respectivamente.

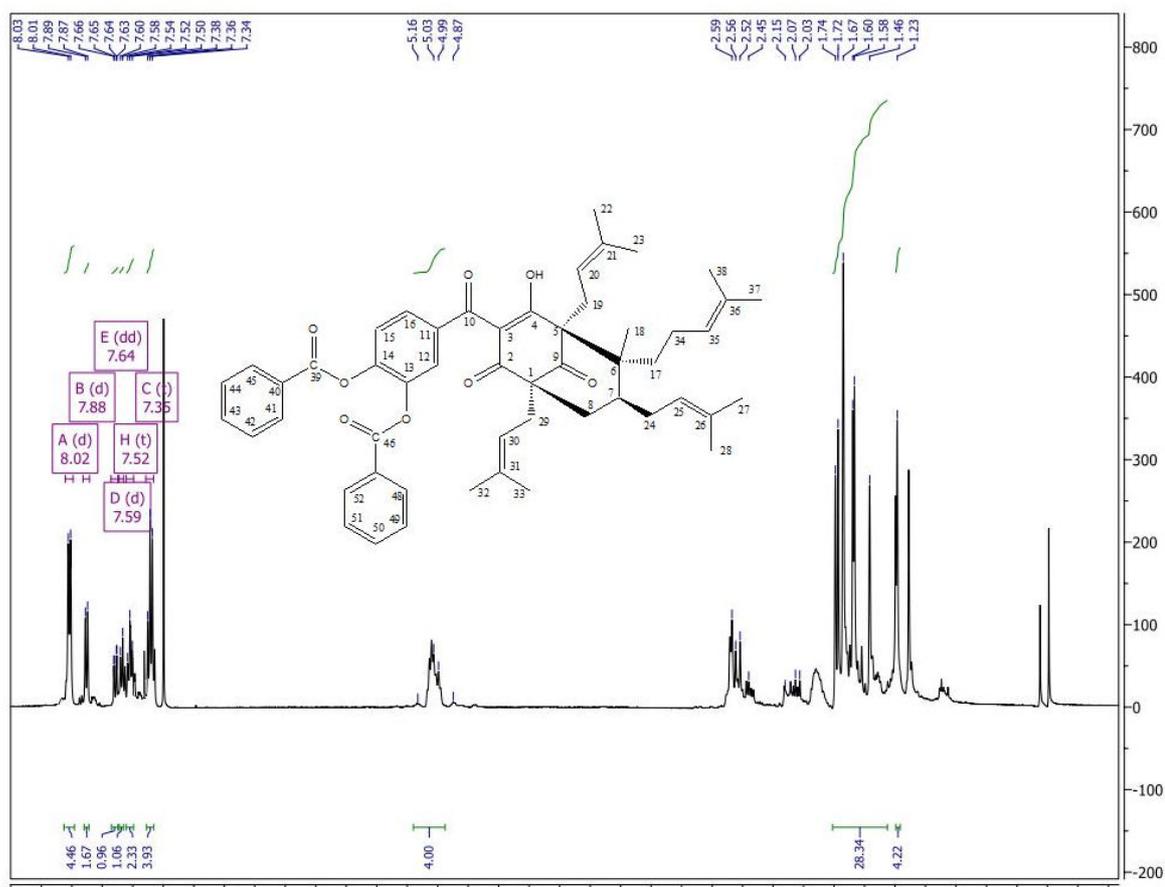


Figura 71- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do derivado LFQM-114

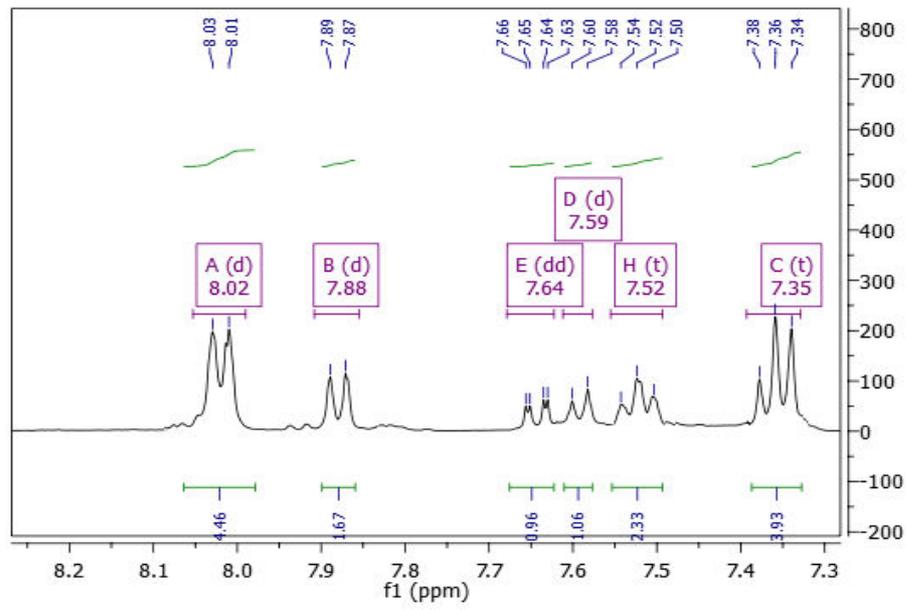


Figura 72- RMN ^1H ampliado de 8,2 a 7,3 ppm do derivado LFQM-114

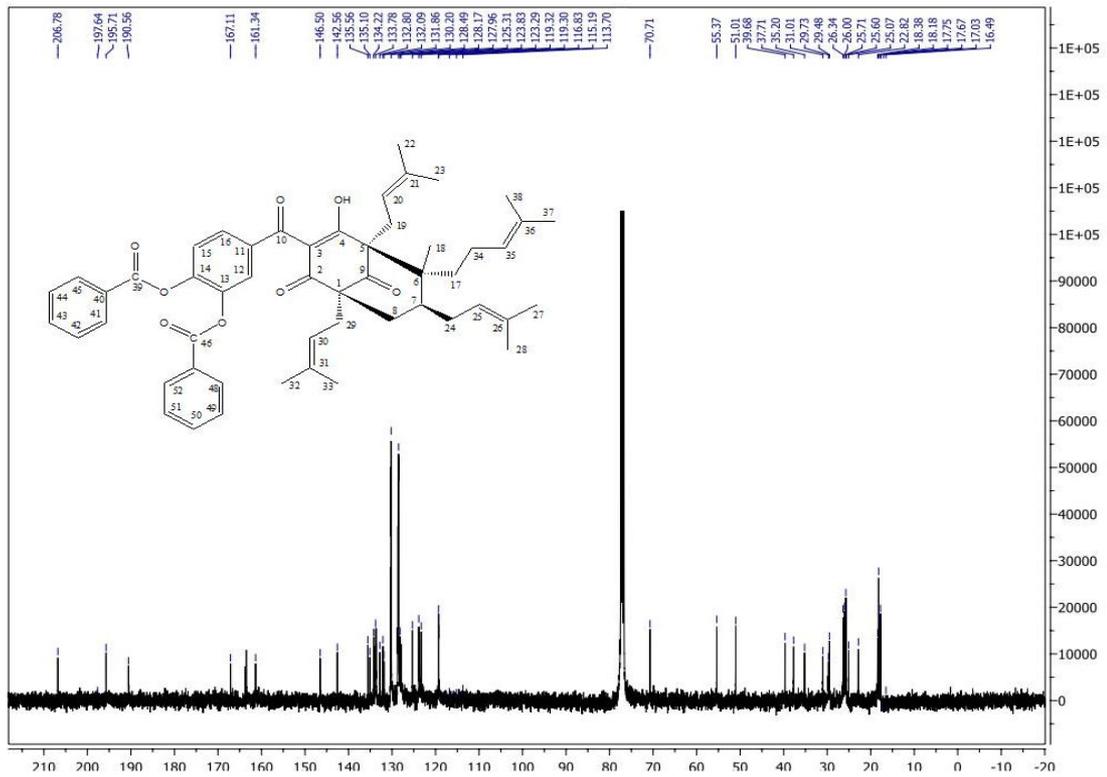


Figura 73- Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do derivado LFQM-114

Tabela 09- Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C de LFQM-114 (^1H - 400 MHz; ^{13}C - 100 MHz, CDCl_3 , δ em ppm, J =Hz, M= multiplicidade

Posição	δ ^1H (ppm)	M	J	δ ^{13}C (ppm)	Posição	δ ^1H (ppm)	m	J	δ ^{13}C (ppm)
1	-			55,37	27	1,67			24,95
2	-			195,71	28	1,74			17,03
3	-			115,19	29	2,52			29,73
4	-			190,56	30	4,99			119,32
5	-			70,71	31	-			135,10
6	-			51,01	32	1,58			24,98
7	2,45			39,68	33	1,60			18,38
8	2,15			37,71	34	2,07			24,66
9	-			206,78	35	4,87			123,29
10	-			197,64	36	-			131,85
11	-			132,00	37	1,67			24,73
12	7,88	d	7,3	116,83	38	1,74			16,49
13	-			142,56	39	-			167,11
14	-			145,50	40	-			127,96
15	7,59	d	2,0	113,70	41	8,02	d	7,9	130,20
16	7,64	dd	7,3; 2,0	125,31	42	7,35	t	7,8	128,49
17	2,03			35,20	43	7,52	t	7,9	134,22
18	1,23			17,75	44	7,35	t	7,8	128,49
19	2,56			22,82	45	8,02	d	7,9	130,20
20	5,16			119,30	46	-	-		161,34
21	-			135,56	47	-	-		127,96
22	1,72			24,83	48	8,02	d	7,9	130,20
23	1,46			18,18	49	7,35	t	7,8	128,49
24	2,59			31,01	50	7,52	t	7,9	134,22
25	5,03			123,83	51	7,35	t	7,8	128,49
26	-			132,09	52	8,02	d	7,9	130,20

No espectro de massas (FIGURA 74), foi identificado o sinal do íon molecular do composto em m/z 810 (FIGURA 75)

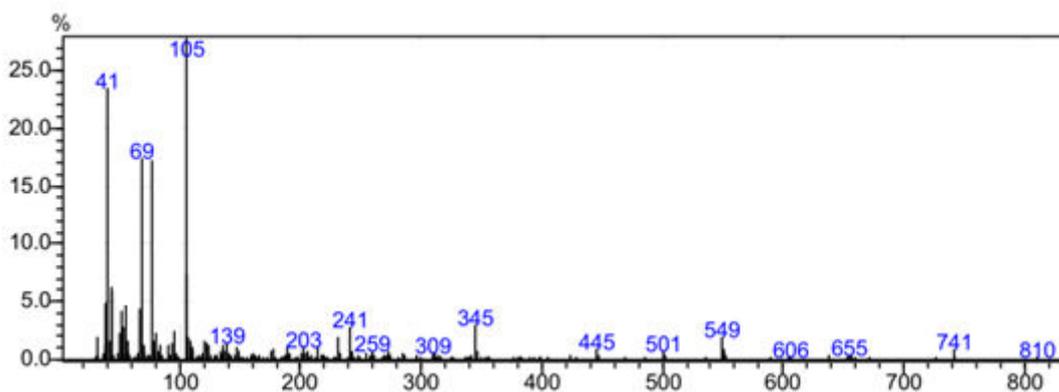


Figura 74- Espectro de massas do derivado LFQM-114

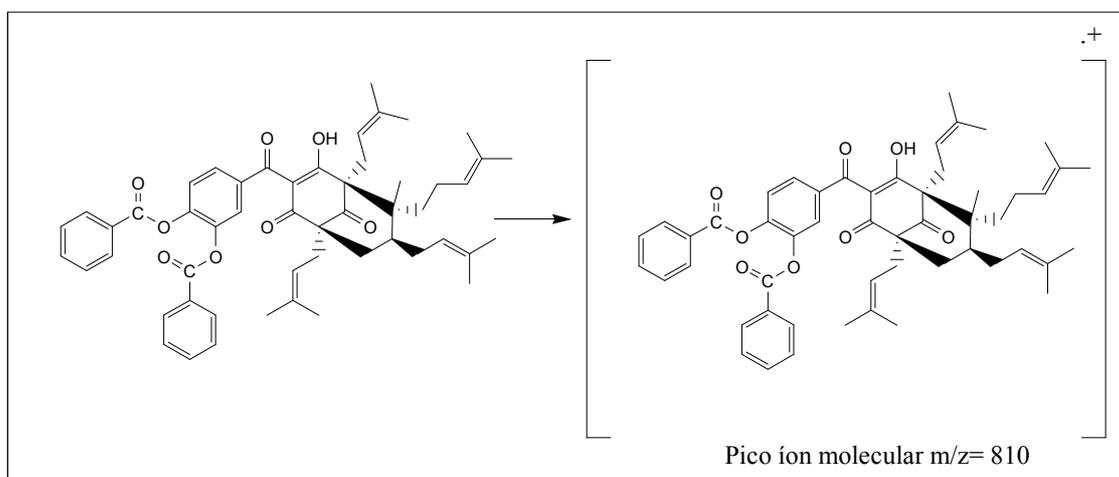


Figura 75- Íon molecular do derivado LFQM-114

5.4 RELAÇÃO ESTRUTURA - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os derivados sintetizados exibiram uma expressiva ação contra as bactérias Gram-positivas *S. aureus*, *S. epidermidis* e *B. cereus*. Para *S. aureus* apresentaram ação as substâncias LFQM-78, 80, 81, 79 e 113, sendo que os compostos LFQM-78, 80, 81 e 113 foram cerca 1,45; 3,31; 3,66 e 4,39 vezes mais ativos que o antibiótico padrão utilizado (cloranfenicol), respectivamente. Os compostos LFQM-80, 81 e 113 foram cerca de 2,5 vezes mais ativos que o protótipo natural LFQM-78 mostrando que as modificações realizadas nesses derivados foram importantes na modulação da atividade. Para *S. epidermidis* apenas o composto LFQM-113 apresentou atividade 3,5 vezes maior que a do cloranfenicol. Para *B. cereus* apenas o composto LFQM-114 não foi ativo, todos os outros derivados foram mais

ativos que o cloranfenicol, sendo que os compostos LFQM-80 e 81 foram 1,25 e 9,13 vezes mais ativos que o protótipo natural LFQM-78. Para as bactérias Gram-negativas os compostos apresentaram um menor espectro de ação, sendo que a maioria dos composto apresentou ação bacteriostática. Os compostos LFQM-79 e 114 apresentaram atividade contra *P. aeruginosa*, já para *S. typhimurium* os compostos LFQM-78, 79 e 82 apresentaram melhor ação fungistática do que o antibiótico comercial utilizado (cloranfenicol). Para *E. coli*, os compostos LFQM-79, 81, 82 e 114 foram ativos apresentando ação bacteriostática. Para *P. mirabis* os compostos LFQM-78 e 82 apresentaram atividade porém menos intensa que o cloranfenicol.

Diferenças na composição da parede celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e a relação com as características lipofílicas auxiliam na explicação da diferença das atividades antibacteriana desses compostos. A parede celular das bactérias Gram-positivas consiste em uma espessa camada de peptidoglicana que consiste de um dissacarídeo repetitivo unidos por polipeptídeos, além de ácidos teicóicos que consiste primariamente em uma porção álcool e um grupamento fosfato. Já a parede celular das bactérias Gram-negativas consiste de uma ou mais camadas de peptidoglicana e uma membrana externa formada por lipoproteínas, lipopolisacarídeos e fosfolipídeos (JAWETZ et al., 1998). Analisando os resultados é possível observar que para as bactérias Gram-positivas os compostos mais ativos foram LFQM- 80, 81 e 113, que apresentam os menores valores de Log p, ou seja, apresentam menores lipofilicidade, 9,06; 5,20; 8,75; respectivamente. Já para as bactérias Gram-negativas os compostos LFQM-79, 82e 114 que foram pouco ativos contra bactérias Gram-positivas apresentaram melhor ação bactericida que os demais compostos. Analisando a lipofilia desses compostos observamos que os mesmos apresentam os maiores valores de Log p, ou seja, apresentam maior lipofilia. Fazendo relação da estrutura com a atividade antibacteriana, pode-se observar que a variação da lipofilicidade da moléculaéum ponto importante para a modulação da atividade e que como relatado na literatura compostos que apresentam uma maior hidroflicidade são mais ativos contra bactérias Gram-positivas, enquanto uma maior lipofilicidade favore as bacterias Gram-negativas (CATÃO et al., 2006). Porém, a correlação entre lipofilicidade e atividade antimicrobiana não exclui a importância de outros fatores estruturais que podem ser responsáveis pela atividade dos compostos estudados.

Para leveduras o protótipo natural LFQM-78 apresentou atividade fungistática, os derivados não foram ativos ou apresentaram redução na atividade, revelando que a hidroxila é um grupo farmacofórico da atividade. Para *C. neoformans* e para os dermatófitos *T.*

mentagrophytes e *M. gypseum* merece destaque os derivados LFQM-79 e LFQM-80 que apresentaram atividade antifúngica melhor que a benzofenona natural LFQM-78, mostrando que a inserção de grupos carbonílicos foi importante para a atividade. Não houve correlação entre log P a atividade antifúngica.

Quadro 03 - Avaliação da atividade antibacteriana da benzofenona natural **LFQM-78** e seus derivados semissintéticos. CIM₅₀ e CIM₁₀₀ expressa em µmol/L.

MO	µmol/L	LFQM 78	LFQM 79	LFQM 80	LFQM 81	LFQM 82	LFQM 113	LFQM 114	Cloranf.
<i>S. aureus</i>	CIM ₅₀	8,293*	1,800*	0,056*	0,051*	0,177*	0,043*	1,541*	6,034*
	CIM ₁₀₀	8,293**	142,300**	3,639**	3,293**	-	2,743**	-	12,060**
<i>S. epidermidis</i>	CIM ₅₀	-	-	-	-	-	2,743*	-	193,420*
	CIM ₁₀₀	-	-	-	-	-	109,7**	-	386,840**
<i>B.cereus</i>	CIM ₅₀	0,064*	1,800*	0,227*	1,647*	0,3545*	0,171*	123,303*	4,820*
	CIM ₁₀₀	2,073**	28,400**	0,227**	1,647**	45,459**	43,899**	-	77,360**
<i>P.aeruginosas</i>	CIM ₅₀	-	56,900*	-	-	-	-	109,700*	48,277*
	CIM ₁₀₀	-	-	-	-	-	-	-	386,841
<i>S. typhimurium</i>	CIM ₅₀	0,065*	0,5548*	-	-	0,044*	109,700*	49,320*	15,071*
	CIM ₁₀₀	-	-	-	-	-	109,700**	-	6,034**
<i>E.coli</i>	CIM ₅₀	-	0,555*	1,818*	0,205*	0,044*	-	0,048*	1,507*
	CIM ₁₀₀	-	-	-	-	-	-	-	12,060
<i>P. mirabis</i>	CIM ₅₀	165,875*	-	-	-	113,649*	-	-	24,130*
	CIM ₁₀₀	-	-	-	-	-	-	-	48,270

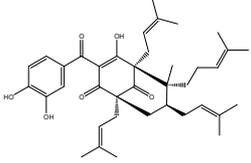
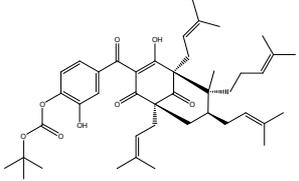
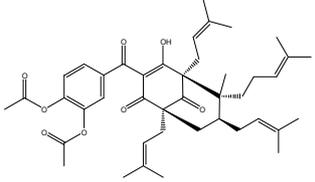
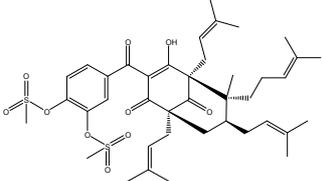
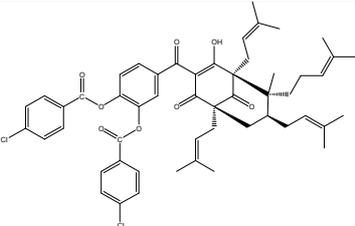
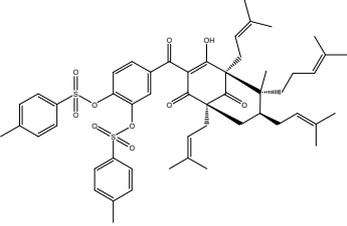
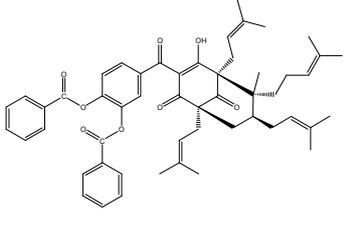
*: diferença estatisticamente significante. $p < 0,05$

Quadro 04 - Avaliação da atividade antifúngica da benzofenona natural LFQM-78 e seus derivados semissintéticos. CIM₅₀e CIM₁₀₀ expressa em µmol/L

MO	µmol/L	LFQM 78	LFQM 79	LFQM 80	LFQM 81	LFQM 82	LFQM 113	LFQM 114	Anfote.
<i>C. albicans</i>	CIM ₅₀	66,350	-	-	-	-	-	-	
	CIM ₁₀₀	-	-	-	-	-	-	-	0,540
<i>C. krusei</i>	CIM ₅₀	-	56,900 *	3,639*	52,700*	-	-	-	-
	CIM ₁₀₀	-	142,300**	-	-	-	-	-	1,080**
<i>C. parapsilosis</i>	CIM ₅₀	33,175*	142,300*	-	-	-	-	-	-
	CIM ₁₀₀	-	-	-	-	-	-	-	0,540
<i>C. grabrata</i>	CIM ₅₀	8,293 *	56,900 *	7,279*	131,700*	-	-	-	-
	CIM ₁₀₀	-	-	-	-	-	-	-	0,540
<i>C. tropicalis</i>	CIM ₅₀	33,175	-	-	-	-	-	-	-
	CIM ₁₀₀	-	-	-	-	-	-	-	1,080
<i>C. neoformans</i>	CIM ₅₀	8,293*	0,555*	0,056*	52,700 *	45,459 *	43,899*	49,320*	-
	CIM ₁₀₀	16,587**	1,818**	3,639**	-	-	-	-	1,080**
<i>T. mentagrophytes</i>	CIM ₅₀	33,175*	0,555 *	3,639*	3,293*	-	-	-	-
	CIM ₁₀₀	33,175**	1,818**	3,639**	-	-	-	-	0,540**
<i>M. gypseum</i>	CIM ₅₀	165,87*	1,818*	7,279*	-	-	-	-	-
	CIM ₁₀₀	-	28,400**	7,279**	-	-	-	-	1,080 **

*: diferença estatisticamente significante. $p < 0,05$

Quadro 05 – Estrutura e valores de QLog P octanol/água do composto natural LFQM-78 e seus derivados semissintéticos.

Código do composto	Estrutura molecular	Valores de QLog P octanol/ água*
LFQM-78		9,24
LFQM-79		10,82
LFQM-80		9,06
LFQM-81		5,20
LFQM-82		11,11
LFQM-113		8,75
LFQM-114		11,85

*Calculado pelo o software Qikprop 3.2

5.5 CITOTOXICIDADE

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de MTT que é um teste usado para avaliar a viabilidade celular, de execução rápida e objetiva, baseado em uma reação colorimétrica. O sal MTT entra na mitocôndria da célula viável e é clivado pela enzima succinato desidrogenase, produzindo cristais formazan, de coloração azul escuro. A quantidade de cristais formada é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Assim, quanto mais escura a coloração ao final da reação, maior é a viabilidade celular. Os valores da Concentração Citotóxica (CC_{50}) das substâncias foram todos maiores que os valores das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) necessárias para inibir o crescimento das bactérias e fungos ensaiados, demonstrando que a benzofenona LFQM-78 e os derivados LFQM-79, LFQM-80, LFQM-81, LFQM-82, LFQM-113 e LFQM-114 são compostos seletivos e pouco tóxicos.

Tabela 10- Concentração Citotóxica (CC_{50}) de LFQM-78 e seus derivados semissintéticos

Substâncias	CC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)
LFQM-78	116,00
LFQM-79	>142,25
LFQM-80	113,55
LFQM-81	>131,87
LFQM-82	>113,85
LFQM-113	>113,33
LFQM-114	>123,39

5.6 INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTIMICROBIANA

5.6.1 Ação sobre síntese da 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 peptidoglicano.

Bactérias Gram-positivas podem se corar 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, conseqüentemente, 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.

5.6.2 Ação sobre enzimas proteolíticas utilizando como modelo as enzimas Papaína e Tripsina

Os resultados (TABELA 11) indicam os valores de CI_{50} em $\mu\text{mol.L}^{-1}$, para o composto LFQM-78 e seus derivados semissintéticos (LFQM-79, LFQM-80, LFQM-81, LFQM-82, LFQM-113 e LFQM-114) referente à inibição de serino e cisteíno proteases. Pode-se verificar que os compostos inibiram as enzimas ensaiadas (tripsina e papaína) com diferentes graus de seletividade.

Os derivados semissintéticos LFQM-80, LFQM-81 e LFQM-113 apresentaram as melhores atividades inibitórias, com valores de CI_{50} para papaína de $7,35 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $6,96 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $3,78 \mu\text{mol.L}^{-1}$ respectivamente. E para tripsina valores de $34,15 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $12,51 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $13,41 \mu\text{mol.L}^{-1}$ respectivamente. Os derivados LFQM-80, LFQM-81 e LFQM-113 foram também os derivados que apresentaram maior atividade antibacteriana nas condições ensaiadas.

Correlacionando a atividade antibacteriana dos compostos com as atividades proteolíticas e considerando que as proteases estão amplamente difundidas em várias bactérias patogênicas, onde desempenham funções essenciais relacionadas com a colonização e evasão das defesas do sistema imune do hospedeiro, a aquisição de nutrientes para crescimento e proliferação ou danos nos tecidos durante a infecção, podemos sugerir que esses compostos possam agir sob proteases dos microrganismos testados. Contudo, estudos adicionais são necessários para comprovar o mecanismo de ação destes compostos.

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

COMPOSTOS	VALORES DE CI_{50} ($\mu\text{mol.L}^{-1} \pm$ Desvio Padrão) ^a	
	Papaína	Tripsina
LFQM-78	2,15±0,23	9,19±1,20
LFQM-79	15,40±1,71	65,39±2,34
LFQM-80	7,35±1,30	34,15±3,23
LFQM-81	6,96±0,23	12,51±1,23
LFQM-82	8,80±0,81	41,01±3,03
LFQM-113	3,78±0,78	13,41±0,98
LFQM-114	13,33±1,20	26,66±3,23
TLCK ^b	-	1,39 ±0,23
E64 ^b	0,64±0,04	-

^aCada valor de CI_{50} representa a média \pm desvio padrão da triplicata determinado pelo software Grafit 5.0.

^b Os compostos TLCK e E64 foram usados como inibidores de referência para as proteases correspondentes que foram ensaiadas.

6 CONCLUSÃO

Foram obtidos 6 novos derivados a partir da modificação estrutural de LFQM-78, benzofenona poliprenilada abundante nas sementes de *R. brasiliensis*, e todas as substâncias foram caracterizadas por IV, RMN de ^1H e ^{13}C e EM. A avaliação da atividade antimicrobiana sobre culturas de bactérias Gram-positivas, negativas, fungos filamentosos e leveduras evidenciou que as mudanças estruturais introduzidas no protótipo natural, resultaram em novos derivados ativos, potentes e com seletividade contra bactérias Gram-positivas, como LFQM-80, LFQM-81 e LFQM-113. Um pouco menos potentes, mas seletivos para Gram-negativos foram LFQM-79, LFQM-82 e LFQM-114. Em relação à atividade contra fungos filamentosos e leveduras, LFQM-79 e LFQM-80 mostraram-se particularmente ativos, sendo mais potentes que o produto natural de partida. Uma análise comparativa dos resultados obtidos indicou que a variação da lipofilicidade da molécula é um parâmetro importante para a modulação da atividade. 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, e valorizam a estratégia de utilização de produtos naturais para estudos de prospecção de novas substâncias bioativas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES T. M., et al. Biological activities of 7-epiclusianone. **Journal Natural Product**, v. 62, p. 369-374, 1999.

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.

BARNES, J.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. St. John's worth (*Hypericum perforatum*): a review of chemistry, pharmacology and chemical properties. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 53, p. 583-600, 2001.

BOECK, P. **Obtenção de moléculas bioativas a partir de substâncias naturais e sintéticas**. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis – SC, 2005

BOONSRI, S. et al. Antibacterial and cytotoxic xanthenes from the roots of *Cratoxylum formosum*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 723-727, 2006.

CAO, S. et al. Guttiferones K and L, antiproliferative compounds of *Rheedia calcicola* from the Madagascar rain forest. **Journal Natural Product**, v. 70, p. 686-688, 2007.

CASALI, A. K. et al. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **FEMS yeast research**, v. 3, p. 405-415, 2003.

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. 1, 1998.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984.

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

DEACHATHAI, S. et al. Phenolic compounds from the flowers of *Garcinia dulcis*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 464-469, 2006.

DELLE, M. F.; et al. Chemical investigation of the genus *Rheedia*. Prenylated xanthenes from *Rheedia gardneriana*. **Journal Natural Products**, v. 46, p. 655-660, 1983.

DEROGIS, P. B. M. C. **Atividade antioxidante das benzofenonas e extrato hexânico do pericarpo dos frutos de *Rheedia brasiliensis***. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêutica) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2008.

DIAS, A. T. C. et al. Aboveground biomass stock of native woodland on a Brazilian sandy coastal plain: estimates based on the dominant tree species. **Forest Ecology and Management**, v. 226, p. 364-367, 2006.

DUARTE, S. et al. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of *mutans streptococci*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, p. 527-531, 2003.

EGGIMANN, P. et al. Epidemiology of *Candida* sp infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, p. 685-702, 2003.

FISHER, F. et al. **Micologia: fundamentos e diagnósticos**. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.

FULLER, R. W. et al. Guttiferone F, the first prenylated benzophenone from *Allanblackia stuhlmannii*. **Journal Natural Product**, v. 62, p. 130-132, 1999.

GUIMARÃES, et al. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta de novos agentes. **Química Nova**, v. 3, p. 667-679, 2010.

GUO, Q. et al. Inhibition of human telomerase reverse transcriptase gene expression by gambogic acid in human hepatoma SMMC-7721 cells. **Life Sciences**, v.78, p. 1238-1245, 2006.

GUSTAFSON, et al. The guttiferones, HIV inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea*. **Tetrahedron**, v. 48, p. 10093–10102, 1992.

HANSEN, M. M.; RIGGS, J. R. A Novel protecting group for hindered phenols. **Tetrahedron Letters**, v. 39, p. 2705-2706, 1998.

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

IWU, M. M. et al. *Garcinia Kola*: a new look at an old adaptogenic agent. **Advances in Phytomedicine**. v. 1, p. 191-199, 2002.

JAYAPRAKASHA, G. K.; et al. Antioxidative and antimutagenic activities of the extracts from the rinds of *Garcinia pedunculata*. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.7, p. 246-250, 2006.

JAWETZ, E. et al. **Microbiologia Médica**. 2. ed. São Paulo: Premier, 1998.

JOLY, A. B. **Botânica – Introdução à taxonomia vegetal**. 6. ed. São Paulo: Editora Nacional, 1993.

KIM, M. S. et al. Anti-adipogenic effects of *Garcinia* extract on the lipid droplet accumulation and the expression of transcription factor. **Biofactors**, v. 22, p. 193-196, 2004.

KLINGAUF, P. et al. Biosynthesis of the hyperforin skeleton in *Hypericum calycinum* cell cultures. **Phytochemistry**, v. 66, p. 139–145, 2005.

KURTZMAN, C. P. et al. **The yeasts: a taxonomic study**. 4. ed. New York: Elsevier, 1998.

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

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

LENTA, B. N. et al. Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds from *Allanblackia monticola* and *Symphonia globulifera*. **Molecules**, v. 12, p. 548-1557, 2007.

LIKHITWITAYAWUID, K.; CHANMAHASASTHIEN, W. Xanthones with antimalarial activity from *Garcinia dulcis*. **Planta Medica**, v. 64, p. 281–282, 1998.

MERZA, J. et al. New cytotoxic guttiferone analogues from *Garcinia virgata* from New Caledonia. **Planta médica**, v. 72, p. 87-89, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **J. Immunology Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (CLSI). **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbio: Norma M7-A6**, 6. ed. 2003.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (CLSI). **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras: Norma M27-A3**, 2. ed. 2008.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (CLSI). **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos: Norma M38-A**. 6. ed. 2002.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981–2002. **Journal Natural Product**, v. 66, p. 1022, 2003.

MAGADULA, J. J. et al. Cytotoxic and anti-HIV activities of some Tanzanian *Garcinia* species. **Journal of Health Research**, v. 12, p. 2-10, 2010.

MARTINS, F. T. et al. Natural Polyprenylated Benzophenones: Keto-Enol Tautomerism and Stereochemistry. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 18, p. 1515-1523, 2007.

MARTINS, F. T. et al. Natural polyprenylated benzophenones inhibiting cysteine and serine proteases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 1230-1239, 2008.

MARTINS, F. T. **Estudo cristalográfico de benzofenonas preniladas extraídas de sementes e frutos de *Rheedia brasiliensis*: estrutura cristalina e relação estrutura-atividade**. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas). Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2008

MACKEEN, M. M.; et al. Anti-inflammatory activity of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L. species used in the Caribbean traditional medicine. **Journal Ethnopharmacology**, v. 71, p. 395-400, 2000.

MOONGKARNDI, P.; et al. Antiproliferation, antioxidation and induction of apoptosis by *Garcinia mangostana* (mangosteen) on SKBR3 human breast cancer cell line. **Journal Ethnopharmacol.**, v. 90, p. 161-166, 2004.

MORTON, J. F. **Fruits of warm climate**. Miami: Julia F. Morton, 1987.

MIMS, C. Microbiologia médica, 2. ed. São Paulo: Manole, 1999.

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

NEVES, J. S. et al. Antianaphylactic properties of 7-epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone isolated from *Garcinia brasiliensis*. **Planta Medica**, v. 73, p. 644-649, 2007.

NGUEMEVING, J. R. et al. Laurentixanones A and B, antimicrobial xanones from *Vismia laurentii*. **Phytochemistry**, v. 13, p. 1341-1346, 2006.

OLIVEIRA, C. M. A. et al. Two polyisoprenylated benzophenones from floral resins of three *Clusia* species. **Phytochemistry**, v. 50, p. 1073-1079, 1999.

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

PANTHONG, K. et al. Tetraoxygenated xanones from the fruits of *Garcinia cowa*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 999-1004, 2006.

PAULA, C. R. et al. Infecção hospitalar fúngica: experiências em hospitais públicos de São Paulo. **Prática hospitalar**, v. 52, p. 63-66, 2007.

PERRIM, D. D.; ARMARENGO W. L. F. **Purification of Laboratory Chemicals**, 3. ed., Pergamon Press, 1988.

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

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

PROTIVA, P. et al. Growth inhibition of colon cancer cells by polyisoprenylated benzophenones is associated with induction of the endoplasmic reticulum response. **Internacional Journal of Cancer**, v. 123, p. 687-694, 2008.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 3. ed, Rio de Janeiro: Guanabara, 1997.

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

ROUX, D. et al. Structure-activity relationship of polyisoprenyl benzophenones from *Garcinia pyrifera* on the tubulin/microtubule system. **Journal Natural Product**, v. 63, p. 1070-1076, 2000.

RYAN, M. P. et al. An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 612-619, 1996.

SANTOS, M. H. dos. et al. Efeito de constituintes químicos extraídos do fruto de *Rheedia gardneriana* (bacupari) sobre bactérias patogênicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 35, p. 297-301, 1999.

SANTOS, M. H. et al. 7-epiclusianone, the new tetraprenylated benzophenone and others chemical constituents from the fruits of *Rheedia gardneriana*. **Química Nova**, v. 22, p. 654-660, 1999.

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.

SCHAECHTER, M. et al. **Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2002.

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.

SILVA, C. H. P. M. **Bacteriologia: um texto ilustrado**. Rio de Janeiro: Eventos, 1999.

SUKSAMRARN, S. et al. Cytotoxic prenylated xanthenes from the young fruit of *Garcinia mangostana*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, p. 301-305, 2006.

TAVARES, W. Manual dos antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos, 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American Journal of Medicine**, v. 119, p. 3-10, 2006.

TORTORA, G. J. et al. **Microbiologia**. 8. ed. São Paulo: Artmed, 2005.

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

TIH, A. E. et al. Minor constituents of *Harungana madagascariensis* stem bark. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 267-269, 2006.

UAWONGGUL, N. et al. Screening of plants acting against *Heterometrus laoticus* scorpion venom activity on fibroblast cell lysis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 201-207, 2006.

UNANGST, P. C.; CONNOR, D. T.; MILLER, S. R. Synthesis of novel 3-alkoxy- and 3-alkylthioindole and -benzofuran-2-carboxamides. **J. Heter. Chem.**, v. 33, n. 6, p. 2025-2030, 1996.

VILLAGÓMEZ R. A. Estudio preliminar de la densidad morfológica, distribución, producción y comercialización del achachairu (*Rheedia* spp.) en Santa Cruz de la Sierra. **Faculdade de Ciências Agrícolas**, v. 10, p. 32-37, 1990.

XU, G. et al. Bioassay and ultraperformance liquid chromatography/mass spectrometry Guided Isolation of Apoptosis-Inducing Benzophenones and Xanthone from the Pericarp of *Garcinia yunnanensis* Hu. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 111-114, 2008.

YANG, Y. L. et al. Distribution and susceptibility to amphotericin B and fluconazole of *Candida spp.* isolated from Taiwan. **Epidemiology and infection**, v. 133, p. 325-330, 2005.

YOU, C. H. et al. *Antrodia camphorate* inhibits proliferation of human breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, 2688-2690, 2008.

WEITZMAN, I. et al. The dermatophytes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, p. 240-259, 1995.

WILLIAMS, R. B. et al. A novel cytotoxic guttiferone analogue from *Garcinia macrophylla* from the Suriname rainforest. **Planta Medica**, v. 69, p. 864–866, 2003.

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. **Plant derived antimycotics: current trends and future prospects**. New York: The Haworth Press, 2003.

ZAGOTO, J. N. et al. Effects of the *Kielmeyera coriacea* extract on energy -metabolism in the rat liver. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 47-54, 2006.