

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

**DALILA JUNQUEIRA ALVARENGA**

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE DERIVADOS DE FENOIS NATURAIS COMO  
AGENTES INIBIDORES DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA**

Alfenas/MG

2017

**DALILA JUNQUEIRA ALVARENGA**

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE DERIVADOS DE FENOIS NATURAIS COMO  
AGENTES INIBIDORES DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas  
Orientador: Prof. Dr. Diogo Teixeira Carvalho  
Co-orientadora: Profa. Dra. Marília Gabriella Alves Goulart Pereira

Alfenas/MG  
2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Alvarenga, Dalila Junqueira

Síntese de derivados de fenóis naturais e avaliação de seu potencial inibitório sobre a enzima conversora de angiotensina / Dalila Junqueira Alvarenga. – Alfenas/MG, 2017.

158 f.

Orientador: Diogo Teixeira Carvalho  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -  
Universidade Federal de Alfenas, 2017.  
Bibliografia.

1. Fenóis. 2. Glicosídeos. 3. Eugenol. I. Carvalho, Diogo Teixeira.  
II. Título.

CDD-615.19

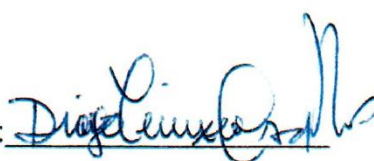
**DALILA JUNQUEIRA ALVARENGA**

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE DERIVADOS DE FENOIS NATURAIS COMO  
AGENTES INIBIDORES DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA**

A banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovado em. 13/07/2017

Prof Dr Diogo Teixeira Carvalho  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof Dr Daniel Henriques Soares Leal  
Instituição: UFES

Assinatura: 

Profa. Dra. Danielle Ferreira Dias  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Dedico esse trabalho à minha família. Especialmente aos meus pais, por sempre me incentivarem e me darem o apoio necessário. E ao meu marido, por estar ao meu lado em todos os momentos e me motivar a nunca desistir.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, prof. Dr. Diogo Teixeira Carvalho, pela oportunidade, amizade e por sempre estar disposto a auxiliar nas dificuldades que surgiram durante o caminho.

Aos meus pais, João Pedro e Simone, por serem exemplos em minha vida e sempre me incentivarem a buscar meus objetivos.

Às minhas irmãs, Talita e Lara, pela amizade e apoio. A minha afilhada Beatriz por ser mais um motivo de alegria em minha vida.

Ao meu marido, Alexandre, pelo amor, companheirismo e compreensão em todos os momentos difíceis.

A todos meus familiares, por serem motivo para que eu nunca desista dos meus sonhos.

A minha co-orientadora, Profa. Dra. Marília Gabriella Alves Goulart Pereira, pelo auxílio durante a realização dos ensaios enzimáticos. Aos funcionários do laboratório de Bioquímica Básica que sempre se mostraram tão solícitos.

As alunas de iniciação científica Laira, Letícia e Luara, pela contribuição e dedicação ao trabalho.

Aos técnicos Kris Simone Tranches Dias, Leandro Marcos Santos, Lellis Henrique Costa e ao professor Rudy Bonfilio, pelo auxílio na realização das análises de espectroscopia e ensaios *in vitro*.

A professora Stefânia Lavorato pela disponibilidade para a realização dos estudos de modelagem molecular.

Aos professores Danielle Ferreira Dias e Thiago Belarmino por contribuírem com seus conhecimentos, aprimorando o trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica (LQFar), André, Antônio, Caroline, Guilherme Tadeu (em memória), Luíz Paulo, Taciane, Tatiane, Thaynan, em especial Camila, Guilherme Brancaglion, Helloana e Thiago dos Santos, por sempre estarem dispostos a ajudar.

À Universidade Federal de Alfenas pelo espaço concedido na realização da pesquisa e aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelos esforços em prol da pesquisa e do crescimento acadêmico da instituição.

A todos os funcionários da Universidade Federal de Alfenas, em especial, Márcia Dantas e Fabiana da Silva, que estão sempre fazendo seu melhor e procurando ajudar os alunos.

A todas as pessoas que fizeram e fazem parte dessa caminhada.

Ao CNPq, FAPEMIG e CAPES pelo financiamento da pesquisa.

E, principalmente, a Deus por ser a razão de tudo e permitir que todos meus objetivos fossem alcançados!

*É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.*

*(Theodore Roosevelt)*

## RESUMO

A hipertensão arterial é uma doença crônica que afeta pessoas em todo o mundo, podendo levar a diversas complicações para o indivíduo e até mesmo a morte. Uma importante classe de medicamentos anti-hipertensivos são os inibidores da enzima conversora da angiotensina (iECA), que além de diminuir os níveis pressóricos pela inibição da formação de um potente agente vasoconstritor (angiotensina II), auxilia em outras patologias, como na insuficiência cardíaca e na nefropatia diabética. Os iECA podem levar a uma série de efeitos adversos que fazem com que a adesão ao tratamento seja prejudicada. Com isso, a busca por novos representantes dessa classe, especialmente de origem natural, é uma importante estratégia para a descoberta de fármacos superiores. Estudos relatam que alguns derivados fenólicos de produtos naturais possuem atividade inibitória frente à ECA, como o eugenol, glicosídeos do eugenol e glicosídeos da vanilina. Diante disso, buscou-se a obtenção de dezoito derivados dessas substâncias a fim de avaliar-se o perfil de atividade em função das modificações realizadas. As substâncias propostas foram obtidas com sucesso a partir de reações clássicas de *O*-metilação, *O*-benzilação, *O*-glicosilação, oxidação e redução. Todos os produtos obtidos foram caracterizados por espectroscopias no infravermelho e de ressonância magnética nuclear. Na sequência, as substâncias foram submetidas à triagem *in vitro*, a concentração fixa de 2,0 mmol.L<sup>-1</sup>. As substâncias mais ativas, capazes de inibir ao menos 60% da atividade da ECA tiveram seu valor de CI<sub>50</sub> determinados, sendo elas **FN01** (CI<sub>50</sub> 1,7 ± 0,3 mmol.L<sup>-1</sup>), **FNG01** (CI<sub>50</sub> 1,0 ± 0,15 mmol.L<sup>-1</sup>), **FN02** (CI<sub>50</sub> 1,3 ± 0,3 mmol.L<sup>-1</sup>), **FNG02** (CI<sub>50</sub> 1,1 ± 0,2 mmol.L<sup>-1</sup>), **FNG03** (CI<sub>50</sub> 1,0 ± 0,2 mmol.L<sup>-1</sup>) e **FNG05** (CI<sub>50</sub> 1,8 ± 0,2 mmol.L<sup>-1</sup>). Esses resultados demonstraram que a presença de substituintes hidrofílicos auxilia na interação das substâncias com o sítio de ligação da ECA, enquanto grupos hidrofóbicos não são bons substituintes na hidroxila fenólica, impactando negativamente o potencial inibitório. Estudos de modelagem molecular estão sendo realizados para avaliação da forma de interação entre cada um desses melhores derivados com a enzima. Desta forma, essas substâncias poderão servir de protótipos para otimização estrutural e futuras investigações como candidatos a agentes iECA.

Palavras-chave: Fenóis naturais. Glicosídeos. Eugenol. Inibidores da ECA.

## ABSTRACT

Hypertension is a chronic disease that affects people all over the world. It can lead to various complications for the patients and even death. An important class of antihypertensive drugs are the angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEI), which in addition to lowering blood pressure levels by inhibiting the formation of a potent vasoconstrictor agent (Angiotensin II), helps in other pathologies such as heart failure and diabetic nephropathy. Despite these facts, the ACE inhibitors adverse effects may cause the adherence to treatment to be impaired. Hence, the search for new representatives of this class, especially of natural origin, is a needed and important strategy for discovering superior drugs. Studies have reported that some phenolic derivatives of natural products have an inhibitory activity against ACE, such as eugenol, eugenol glycosides and vanillin glycosides. Therefore, it was aimed to obtain eighteen derivatives of these substances to assess their activity profiles as a function of the made structural modifications. The proposed substances were successfully obtained from classical reactions of *O*-methylation, *O*-benzylation, *O*-glycosylation, oxidation and reduction. All obtained compounds were characterized by infrared (IR) and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). Subsequently, the substances were subjected to in vitro screening, at the fixed concentration of 2 mmol.L<sup>-1</sup>. The most active substances, capable of inhibiting at least 60% of ACE activity, had their IC<sub>50</sub> values determined, being them **FN01** (IC<sub>50</sub> 1.7 ± 0.3 mmol.L<sup>-1</sup>), **FNG01** (IC<sub>50</sub> 1.0 ± 0.15 mmol.L<sup>-1</sup>), **FN02** (IC<sub>50</sub> 1.3 ± 0.3 mmol.L<sup>-1</sup>), **FNG02** (IC<sub>50</sub> 1.1 ± 0.2 mmol.L<sup>-1</sup>), **FNG03** (IC<sub>50</sub> 1.0 ± 0.2 mmol.L<sup>-1</sup>) and **FNG05** (IC<sub>50</sub> 1.8 ± 0.2 mmol.L<sup>-1</sup>). These results demonstrate that the presence of hydrophilic substituents helps the interaction of the substances with the ACE binding site, whereas hydrophobic groups on the phenolic hydroxyl substituent, negatively impacting the inhibitory potential. Molecular modeling studies are being conducted to evaluate the interaction between each of these best derivatives and ACE. In this way, these substances can serve as prototypes for structural optimization and future investigations as potential ACEI agents.

Keywords: Natural phenols. Glycosides. Eugenol. ACE inhibitors.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do Sistema Renina-angiotensina aldosterona .....	22
Figura 2 - Estrutura química do teprotídeo .....	23
Figura 3 - Primeiros iECA desenvolvidos .....	24
Figura 4 - Interação da angiotensina II, do captopril e do enalapril com a ECA.....	25
Figura 5 - Estrutura química do calceolariosídeo B .....	26
Figura 6 - Estrutura química do glicosídeo de junipediol A .....	27
Figura 7 - Estrutura química do eugenol (a), e de seus glicosídeos (b) e (c).....	27
Figura 8 - Estrutura química da vanilina (a) e dos seus glicosídeos (b), (c) e (d) ...	28
Figura 9 - Estruturas químicas gerais dos análogos propostos .....	29
Figura 10 - Rota sintética seguida para obtenção dos derivados hidroxilados <b>FN02</b> e <b>FN03</b> , metilados <b>FNM02</b> , <b>FNM03</b> e <b>FNM05</b> , benzilados <b>FNB02</b> , <b>FNB03</b> e <b>FNB05</b> e glicosilados <b>FNG02</b> , <b>FNG03</b> e <b>FNG05</b> a partir da vanilina ( <b>FN05</b> ) .....	32
Figura 11 - Rota sintética seguida para obtenção dos derivados: hidroxilado <b>FN04</b> , metilados <b>FNM01</b> e <b>FNM04</b> , benzilados <b>FNB01</b> e <b>FNB04</b> , e glicosilados <b>FNG01</b> e <b>FNG04</b> a partir do eugenol ( <b>FN01</b> ).....	33
Figura 12 - Reação de benzilação.....	33
Figura 13 - Reação de O-metilação .....	35
Figura 14 - Reação de peracetilação da D-glicose .....	37
Figura 15 - Reação de formação do brometo de glicosila .....	38
Figura 16 - Reação de glicosilação .....	39
Figura 17 - Reação de desproteção dos glicosídeos.....	40
Figura 18 - Reação de oxidação com óxido de prata .....	42
Figura 19 - Reação de oxidação com permanganato de potássio .....	43
Figura 20 - Reação de redução com boridreto de sódio .....	46
Figura 21 - Reação de hidroboração/oxidação.....	49
Figura 22 - Modificações propostas para obtenção de candidatos a iECA .....	55
Figura 23 - Mecanismo proposto para a reação de benzilação .....	57
Figura 24 - Mecanismo proposto para a reação de O-metilação .....	59
Figura 25 - Mecanismo proposto para a reação de acetilação da D-glicose.....	61

Figura 26 - Mecanismo proposto para formação do brometo de glicosila.....	62
Figura 27 - Mecanismo proposto para reação de O-glicosilação .....	63
Figura 28 - Mecanismo clássico proposto para reação de desproteção .....	64
Figura 29 - Mecanismo proposto para reação de desproteção.....	65
Figura 30 - Comparação dos métodos de oxidação aplicados ao derivado glicosila <b>FNG05</b> .....	67
Figura 31 - Mecanismo proposto para reação de redução via NaBH <sub>4</sub> .....	69
Figura 32 - Mecanismo proposto para a reação de hidroboração-oxidação .....	71
Figura 33 - Representação da hidrólise do substrato Hip-His-Leu pela ação da ECA.....	73
Figura 34 - Representação da reação proposta entre o dipeptídeo His-Leu e o derivativante <i>orto</i> -ftaldeído .....	73
Figura 35 - Influência das substâncias teste sobre a atividade da ECA a concentração de 2,0 mmol.L <sup>-1</sup> .....	74
Figura 36 - Substâncias testes com atividade inibitória sobre a ECA acima de 60%.....	76
Figura 37 – Comparação dos valores de Cl <sub>50</sub> (mmol.L <sup>-1</sup> ) dos melhores inibidores da ECA.....	77
Figura 38 - Representação da biotransformação de substâncias alílicas a epóxidos e reação deste com bionucleófilos .....	79
Figura 39 - Espectro de absorção na região do IV da substância <b>FNB01</b> .....	87
Figura 40 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>FNB01</b> (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....	88
Figura 41 - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância <b>FNB01</b> (CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz) .....	89
Figura 42 - Subespectro DEPT-135 da substância <b>FNB01</b> (CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz) .....	90
Figura 43 - Espectro de absorção na região do IV da substância <b>FNB05</b> .....	91
Figura 44 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>FNB05</b> (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....	92
Figura 45 - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância <b>FNB05</b> (CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz) .....	93
Figura 46 - Subespectro DEPT-135 da substância <b>FNB05</b> (CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz) .....	94
Figura 47 - Espectro de absorção na região do IV da substância <b>FNM01</b> .....	95
Figura 48 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>FNM01</b> (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) .....	96
Figura 49 - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância <b>FNM01</b> (CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz) .....	97
Figura 50 - Subespectro DEPT-135 da substância <b>FNM01</b> (CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz).....	98
Figura 51 - Espectro de absorção na região do IV da substância <b>FNM05</b> .....	99

Figura 52 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>FNM05</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) .....	100
Figura 53 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>FNM05</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) .....	101
Figura 54 - Subespectro DEPT-135 da substância <b>FNM05</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).....	102
Figura 55 - Espectro de absorção na região do IV da substância <b>FNG01</b> .....	103
Figura 56 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>FNG01</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 200 MHz) .	104
Figura 57 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>FNG01</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 50 MHz) .	105
Figura 58 - Subespectro DEPT-135 da substância <b>FNG01</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 50 MHz)...	106
Figura 59 - Espectro de absorção na região do IV da substância <b>FNG05</b> .....	107
Figura 60 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>FNG05</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz) .	108
Figura 61 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>FNG05</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 75 MHz) .	109
Figura 62 - Subespectro DEPT-135 da substância <b>FNG05</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 75 MHz)...	110
Figura 63 - Espectro de absorção na região do IV da substância <b>FN02</b> .....	111
Figura 64 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>FN02</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz) ....	112
Figura 65 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>FN02</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 75 MHz) ....	113
Figura 66 - Subespectro DEPT-135 da substância <b>FN02</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 75 MHz) .....	114
Figura 67 - Espectro de absorção na região do IV da substância <b>FNM02</b> .....	115
Figura 68 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>FNM02</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz) .	116
Figura 69 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>FNM02</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 75 MHz) ..	117
Figura 70 - Subespectro DEPT-135 da substância <b>FNM02</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 75 MHz) ..	118
Figura 71 - Espectro de absorção na região do IV da substância <b>FNB02</b> .....	119
Figura 72 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>FNB02</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz) .	120
Figura 73 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>FNB02</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 75 MHz) .	121
Figura 74 - Subespectro DEPT-135 da substância <b>FNB02</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 75 MHz) ....	122
Figura 75 - Espectro de absorção na região do IV da substância <b>FNG02</b> .....	123
Figura 76 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>FNG02</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz) .	124
Figura 77 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>FNG02</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 75 MHz) .	125
Figura 78 - Subespectro DEPT-135 da substância <b>FNG02</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 75 MHz)....	126
Figura 79 - Espectro de absorção na região do IV da substância <b>FN03</b> .....	127
Figura 80 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>FN03</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz) ...	128
Figura 81 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>FN03</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 75 MHz) ....	129
Figura 82 - Subespectro DEPT-135 da substância <b>FN03</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 75 MHz) .....	130
Figura 83 - Espectro de absorção na região do IV da substância <b>FNM03</b> .....	131
Figura 84 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>FNM03</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) .....	132

Figura 85 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>FNM03</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) .....	133
Figura 86 - Subespectro DEPT-135 da substância <b>FNM03</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).....	134
Figura 87 - Espectro de absorção na região do IV da substância <b>FNB03</b> .....	135
Figura 88 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>FNB03</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz).136	
Figura 89 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>FNB03</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 75 MHz) ..	137
Figura 90 - Subespectro DEPT-135 da substância <b>FNB03</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 75 MHz)....	138
Figura 91 - Espectro de absorção na região do IV da substância <b>FNG03</b> .....	139
Figura 92 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>FNG03</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz) 140	
Figura 93 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>FNG03</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 75 MHz) .141	
Figura 94 - Subespectro DEPT-135 da substância <b>FNG03</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 75 MHz)....	142
Figura 95 - Espectro de absorção na região do IV da substância <b>FN04</b> .....	143
Figura 96 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>FN04</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) .....	144
Figura 97 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>FN04</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) .....	145
Figura 98 - Subespectro DEPT-135 da substância <b>FN04</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).....	146
Figura 99 - Espectro de absorção na região do IV da substância <b>FNM04</b> .....	147
Figura 100 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>FNM04</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) ....	148
Figura 101 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>FNM04</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) .....	149
Figura 102 - Subespectro DEPT-135 da substância <b>FNM04</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) .....	150
Figura 103 - Espectro de absorção na região do IV da substância <b>FNB04</b> .....	151
Figura 104 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>FNB04</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).....	152
Figura 105 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>FNB04</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).....	153
Figura 106 - Subespectro DEPT-135 da substância <b>FNB04</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) .....	154
Figura 107 - Espectro de absorção na região do IV da substância <b>FNG04</b> .....	155
Figura 108 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>FNG04</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz) .....	156
Figura 109 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>FNG04</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 75 MHz) 157	
Figura 110 - Subespectro DEPT-135 da substância <b>FNG04</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 75 MHz)..	158

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Perfil de atividade das substâncias em teste e seus percentuais de inibição.....	75
---	----

## LISTA DE ABREVIações, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>Ac</b>	- Acetila
<b>AcO</b>	- Acetoxila
<b>AT<sub>1</sub></b>	- Receptor de Angiotensina II tipo 1
<b>AT<sub>2</sub></b>	- Receptor de Angiotensina II tipo 2
<b>ATR</b>	- Refletância total atenuada ( <i>Attenuated Total Reflectance</i> )
<b>CCD</b>	- Cromatografia em camada delgada
<b>CCS</b>	- Cromatografia em coluna de sílica
<b>CI<sub>50</sub></b>	- Concentração capaz de inibir 50% da atividade enzimática
<b>cLogP</b>	- Logaritmo do coeficiente de partição calculado
<b>cLogD</b>	- Logaritmo do coeficiente de distribuição calculado
<b>d</b>	- Duplete
<b>dd</b>	- Duplete duplo
<b>DEPT</b>	- Intensificação sem distorção via transferência de polarização ( <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i> )
<b>DMSO-<i>d</i><sub>6</sub></b>	- Dimetilsulfóxido deuterado
<b>DP</b>	- Desvio padrão
<b>ECA</b>	- Enzima conversora da angiotensina
<b>EM</b>	- Espectrometria de Massas
<b>eq.</b>	- Equivalente
<b>F.F.</b>	- Faixa de fusão
<b>F.M.</b>	- Fórmula molecular
<b>Hz</b>	- Hertz
<b>IC</b>	- Insuficiência Cardíaca
<b>iECA</b>	- Inibidores da enzima conversora de angiotensina
<b>IV</b>	- Infravermelho
<b>J</b>	- Constante de acoplamento escalar
<b>Lit.</b>	- Literatura
<b>m</b>	- Multiplete
<b>mmol</b>	- milimol
<b>MHz</b>	- MegaHertz
<b>M.M.</b>	- Massa molar
<b>p.</b>	- página
<b>ppm</b>	- Partes por milhão
<b>RENAME</b>	- Relação Nacional de Medicamentos Essenciais

<b>RMN</b>	- Ressonância Magnética Nuclear
<b>s</b>	- Simpleto
<b>sl</b>	- Simpleto largo
<b>S<sub>N</sub>1</b>	- Substituição nucleofílica unimolecular
<b>S<sub>N</sub>2</b>	- Substituição nucleofílica bimolecular
<b>SRAA</b>	- Sistema renina-angiotensina aldosterona
<b>t</b>	- Triplete
<b>t.a.</b>	- Temperatura ambiente
<b>TMS</b>	- Tetrametilsilano
<b>v/v</b>	- Volume por volume
<b>δ</b>	- Deslocamento químico
<b>ū</b>	- Número de onda
<b>u</b>	- Estiramento ou deformação axial

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
1.1	HIPERTENSÃO ARTERIAL .....	19
1.2	SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA ALDOSTERONA E O CONTROLE DA PRESSÃO ARTERIAL .....	20
1.3	FÁRMACOS INIBIDORES DA ECA .....	23
1.4	PRODUTOS NATURAIS INIBIDORES DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA .....	25
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	29
<b>3</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	30
3.1	MÉTODOS DE SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL.....	30
<b>3.1.1</b>	<b>Método geral para reações de O-benzilação (adaptado de Wang et al., 2014)</b> .....	33
3.1.1.1	<i>Dados de caracterização dos produtos benzilados FNB01 e FNB05</i> .....	34
<b>3.1.2</b>	<b>Método geral para as reações de O-metilação (adaptado de Coolen et al., 1995)</b> .....	35
3.1.2.1	<i>Dados de caracterização dos produtos metilados FNM01 e FNM05</i> .....	36
<b>3.1.3</b>	<b>Métodos para obtenção dos produtos O-glicosilados</b> .....	37
3.1.3.1	<i>Reação de peracetilação da D-glicose (adaptado de Deng, Gangadharmath e Chang, 2006)</i> .....	37
3.1.3.2	<i>Reação de formação do brometo de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-<math>\alpha</math>-D- glicopiranosila (adaptado de Conchie, Levvy e Marsch, 1957)</i> .....	38
3.1.3.3	<i>Métodos gerais para reação de O-glicosilação e desproteção (adaptado de Hongu; Saito; Tasujihara, 1999; Conchie, Levvy e Marsch, 1957)</i> .....	39
3.2.3.3.1	<i>Dados de caracterização dos produtos glicosilados FNG01 e FNG05</i> .....	40
<b>3.1.4</b>	<b>Métodos gerais para reações de oxidação dos derivados formilados</b> .....	42
3.1.4.1	<i>Via óxido de prata (adaptado de Pearl, 1950)</i> .....	42
3.1.4.2	<i>Via permanganato de potássio (adaptado de Dignum et al., 2003)</i> .....	43
3.1.4.3	<i>Dados de caracterização dos produtos oxidados FN02, FNM02, FNB02 e FNG02</i> .....	43
<b>3.1.5</b>	<b>Método geral para as reações de redução via boridreto de sódio (adaptado de Ward; Rhee, 1989; Mochalov et al., 2016)</b> .....	46

3.1.5.1	<i>Dados de caracterização dos produtos reduzidos FN03, FNM03, FNB03 e FNG03</i> .....	47
3.1.6	<b>Método geral de reação de oxidação via dimetilsulfeto de borana (adaptado de Pepper; Sundaram e Dyson, 1971; Barbosa et al., 2012; Hemelaere, Carreaux e Carboni, 2015).</b> .....	49
3.1.6.1	<i>Dados de caracterização dos produtos oxidados FN04, FNM04, FNB04 e FNG04</i> .....	50
3.2	<b>AVALIAÇÃO <i>in vitro</i> DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ECA</b> .....	52
3.2.1	<b>Ensaio de triagem das substâncias a concentração fixa</b> .....	53
3.2.2	<b>Determinação da Concentração Inibitória de 50% da atividade enzimática (CI<sub>50</sub>)</b> .....	54
3.2.3	<b>Análise estatística</b> .....	54
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	55
4.1	<b>SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS PROPOSTOS</b> .....	56
4.1.1	<b>Síntese dos derivados FNB01 e FNB05</b> .....	56
4.1.2	<b>Síntese dos derivados FNM01 e FNM05</b> .....	59
4.1.3	<b>Síntese dos derivados FNG01 e FNG05</b> .....	60
4.1.4	<b>Síntese dos derivados FN02, FNM02, FNB02 e FNG02</b> .....	66
4.1.5	<b>Síntese dos derivados FN03, FNM03, FNB03 e FNG03</b> .....	68
4.1.6	<b>Síntese dos derivados FN04, FNM04, FNB04 e FNG04</b> .....	70
4.2	<b>AVALIAÇÃO <i>in vitro</i> DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ECA</b> .....	72
5	<b>CONCLUSÕES</b> .....	80
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	81
	<b>APÊNDICE</b> .....	87

## 1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial é uma doença crônica que está presente por todo o mundo. Quando não tratada pode ocasionar acidente vascular cerebral, doença cardíaca coronária, disfunção renal, invalidez e morte (SIMARATANAMONGKOL et al., 2014). Uma das causas para o desenvolvimento da hipertensão arterial é o desequilíbrio do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), que leva a produção descontrolada de um potente vasoconstritor denominado angiotensina II, acarretando no aumento da pressão sanguínea (WANG et al., 2015).

O uso de medicamentos para o tratamento da hipertensão arterial é muito empregado, devido aos benefícios que a terapia medicamentosa pode trazer para a qualidade de vida do paciente. Os inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) correspondem a uma das principais classes utilizadas para essa finalidade. Porém a baixa adesão ao tratamento devido aos efeitos colaterais que estes medicamentos podem causar faz com que a busca por novos inibidores da ECA seja relevante, a fim de se obterem representantes que possuam maior aceitação pelo paciente (MION JR et al., 2006; SIMARATANAMONGKOL et al., 2014).

Alguns produtos oriundos de fontes naturais mostraram atividade inibitória frente a esse alvo. Estudos relataram que fenóis naturais, como o eugenol, o glicosídeo do junipediol A e o calceolariosídeo B desempenham uma considerável atividade inibitória da ECA e, por isso, são substâncias interessantes para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos anti-hipertensivos (CHAUDHARY et al., 2014; LOHITH et al., 2006; SIMARATANAMONGKOL et al., 2014; WANG et al., 2015).

A utilização de produtos de origem natural, e de derivados de semissíntese a partir destes, pode colaborar para a obtenção de novos inibidores de ECA, a fim de buscar candidatos a fármacos que possam ter menos efeitos colaterais que os já comercializados. Dessa forma, foi proposto nesse projeto a preparação de derivados dos fenóis naturais eugenol e vanilina, por modificação em alguns pontos da sua estrutura, e sua avaliação sobre a ECA, por ensaios de inibição enzimática *in vitro*.

## 1.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL

A hipertensão arterial é uma condição patológica na qual o indivíduo possui a pressão arterial em valores iguais ou superiores a 140 por 90 mmHg. Vários motivos podem fazer com que ocorra esse aumento da pressão, sendo o principal a contração dos vasos sanguíneos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2015).

A Organização Mundial da Saúde vem salientando a necessidade de se aumentar os cuidados com a hipertensão arterial, visto que essa doença afeta cerca de um bilhão de pessoas por todo o mundo. Segundo a agência, a hipertensão arterial contribui para 9,4 milhões de mortes por doenças cardiovasculares a cada ano, além de aumentar o risco de desenvolvimento de insuficiência renal e cegueira. Também é considerada a causa mais constante para doenças cardíacas e acidentes vasculares cerebrais. A hipertensão arterial é mais prevalente na África, onde afeta até 46% dos adultos (ONU, 2013).

De acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL, 2013b), 24,3% da população brasileira é vítima de hipertensão arterial, sendo que a maioria é constituída por mulheres com idade superior a 65 anos. Dados da ONU (2016) revelam que os brasileiros portadores de hipertensão têm tendência de desenvolver doenças cardiovasculares, sendo uma doença de prevalência na população adulta, podendo atingir 80% da população em 10 anos. Apesar do número de doentes estarem aumentando, as iniciativas públicas e a disponibilização gratuita de medicamentos vêm fazendo com que a taxa de internações, devido a complicações da hipertensão, diminua.

O cuidado com o indivíduo que possui hipertensão arterial envolve uma equipe multiprofissional com o intuito de manter os níveis de pressão arterial controlados, reduzir riscos de doenças cardiovasculares e melhorar a qualidade de vida. O tratamento pode ser não medicamentoso, o qual envolve medidas como controle da obesidade, da dislipidemia, da ingestão de álcool, do tabagismo, culminando na adoção de hábitos saudáveis. Em alguns casos, faz-se necessário o uso de uma terapia medicamentosa que estará diretamente ligada ao estado de saúde do paciente e suas condições quanto à adoção de um melhor estilo de vida (MALACHIAS et al., 2016).

Diversas classes de fármacos podem ser usadas para o tratamento da hipertensão arterial, de acordo com a necessidade do indivíduo e seu estado de saúde, sendo que muitas vezes se faz necessário a associação de dois ou mais anti-hipertensivos. Analisando-se as indicações e contraindicações de cada medicamento, é possível a seleção do melhor agente anti-hipertensivo dentre os grupos disponíveis (BRASIL, 2013a).

Os fármacos que atuam no sistema renina-angiotensina (SRA) são amplamente utilizados, por este ter um papel relevante na regulação da pressão arterial. A enzima conversora da angiotensina (ECA) é mediadora da biossíntese de um importante agente vasoconstritor, de modo que, com isso, tem-se que a inibição da ECA é uma abordagem terapêutica valiosa para o tratamento da hipertensão arterial (LI et al., 2015).

## 1.2 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA ALDOSTERONA E O CONTROLE DA PRESSÃO ARTERIAL

O primeiro relato sobre a renina data de 1898, quando Tiegerstedt e Bergman descobriram, em extrato de rim, uma substância capaz de aumentar a pressão arterial. Tal descoberta não foi considerada relevante até 1934, ano em que Goldblatt e colaboradores descobriram que a constrição de artérias renais levava a hipertensão persistente em cães. Com isso, diversos grupos de pesquisas aprofundaram os estudos relativos à renina, declarando que esta era uma enzima que atuava sobre um substrato proteico (angiotensinogênio) catalisando a reação de formação do verdadeiro agente pressor (angiotensina). Nos anos 50, foram descobertas duas isoformas da angiotensina, um decapeptídeo denominado angiotensina I, e um octapeptídeo que era mais ativo e denominado angiotensina II, sendo que a formação deste último era catalisada por uma enzima, então denominada enzima conversora de angiotensina (ECA) (JACKSON, 2010).

O início da cascata hormonal do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) se dá com a biossíntese da prorenina nas células justaglomerulares dos rins (FIGURA 1). A prorenina é ativada à renina pela clivagem no aminoácido 43 da sua subunidade *N*-terminal, assim a renina ativa é armazenada nos grânulos das

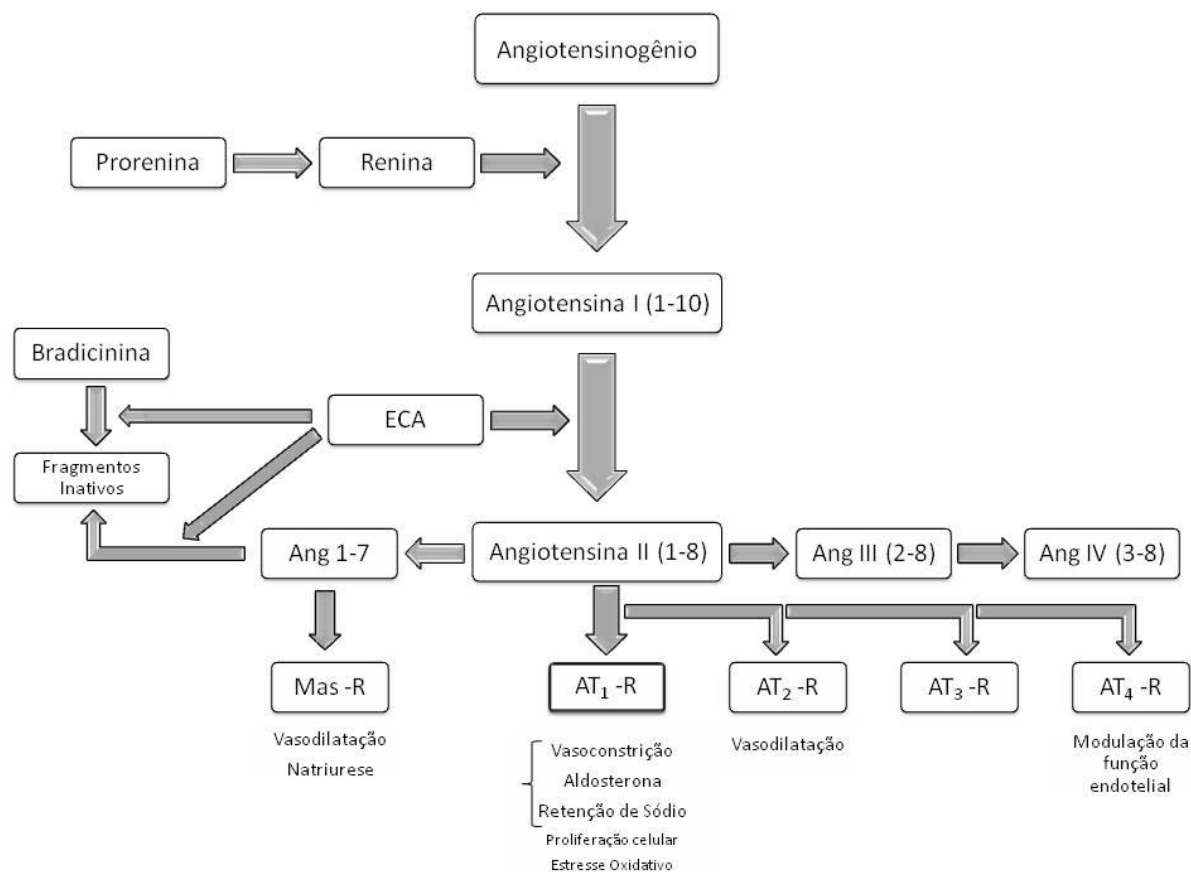
células justaglomerulares. A liberação da renina é regulada principalmente por quatro fatores (BROWN, 2006):

- a) Pela detecção de mudanças na pressão da perfusão renal, feita pelas barorreceptores;
- b) Pela mudança na concentração de NaCl nas células da mácula densa;
- c) Estímulo do nervo simpático pelos receptores adrenérgicos (beta-1);
- d) *Feedback* negativo da ação da angiotensina II nas células justaglomerulares.

O controle da secreção de renina é um fator determinante para a atividade do SRAA. A renina irá regular o passo inicial, a clivagem do angiotensinogênio, proteína de grande peso molecular, em angiotensina I. O angiotensinogênio é principalmente originado do fígado, e seus níveis séricos são geralmente estáveis em condições normais. O produto da hidrólise do angiotensinogênio, a angiotensina I, que é um decapeptídeo inativo, será hidrolisado pela ECA no octapeptídeo ativo, potente vasoconstritor, a angiotensina II. A ECA é uma exopeptidase localizada na membrana plasmática de vários tipos de células, como nas células endoteliais e epiteliais, também existindo em menor concentração no plasma. Ela metaboliza diversos outros peptídeos, incluindo aqueles com função vasodilatadora como a bradicinina, dessa forma a ação da ECA resulta no aumento da vasoconstricção e diminuição da vasodilatação. Embora a angiotensina II seja o principal produto do SRAA, existem outros metabólitos da angiotensina I que desempenham diferentes funções no organismo, como a modulação da função endotelial (ATLAS, 2007).

Os efeitos das angiotensinas são exercidos através de receptores heptaélicoidais acoplados à proteína G, existindo principalmente dois subtipos denominados receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>. O receptor AT<sub>1</sub> possui 359 aminoácidos e o receptor AT<sub>2</sub> possui 363 aminoácidos, sendo pouco homólogos entre si. Os efeitos da angiotensina II estão relacionados à sua interação com o receptor AT<sub>1</sub>, enquanto a função dos receptores AT<sub>2</sub> ainda não está bem definida, estando este ligado a efeitos cardioprotetores. A ligação da angiotensina II ao seu receptor leva à ativação de diversas vias de transdução de sinais, correlacionadas ao tecido na qual se encontra e a resposta esperada (JACKSON, 2010).

Figura 1 - Esquema do Sistema Renina-angiotensina aldosterona



Fonte: adaptado de ATLAS, 2007.

A angiotensina II eleva a pressão sanguínea por vários mecanismos, incluindo vasoconstrição direta, potencialização da atividade do sistema nervoso simpático nos níveis central e periférico, estimulação da síntese de aldosterona e sua liberação, com consequente retenção de sódio e fluidos pelos rins, e estimulação da liberação de vasopressina. Além desses efeitos, a angiotensina II promove diversas outras ações que levam a danos nos vasos sanguíneos, estimula a adesão leucocitária nos vasos lesionados e favorece o estresse oxidativo (ZAMAN; OPARIL; CALHOUN, 2002).

Evidências demonstram que a angiotensina II pode modular as ações da insulina devido a uma via de sinalização a qual compartilham. Isso indica que a ativação do SRAA poderia inibir algumas ações metabólicas da insulina. Além disso, a hiperglicemia e a hiperinsulinemia levariam à ativação do SRAA por aumentarem a expressão de angiotensinogênio, o que conduziria à hipertensão em indivíduos com resistência a insulina. Outro fato relacionado à angiotensina II é sua estimulação da

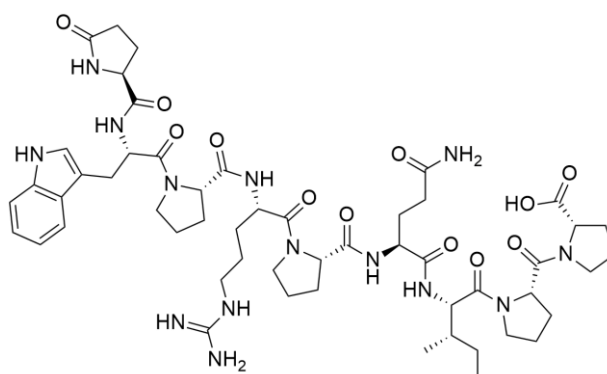
NADPH oxidase, que por ser uma das principais fontes de espécies reativas de oxigênio, levaria ao estresse oxidativo, provocando disfunção endotelial, inflamação, hipertrofia da musculatura lisa e remodelamento vascular (SANJULIANI et al., 2011).

### 1.3 FÁRMACOS INIBIDORES DA ECA

Na década de 60, Ferreira e colaboradores descobriram que o veneno de *Bothrops jararaca* continha fatores que intensificavam as respostas da bradicinina, que é uma substância vasodilatadora. Estes fatores constituíam-se de uma família de peptídeos que inibiam a enzima responsável pela inativação da bradicinina. Mais tarde, descobriu-se que essa enzima era a mesma que catalisava a conversão da angiotensina I à II, denominada de ECA.

A partir dessa descoberta, foram sintetizados análogos desses peptídeos, como o teprotídeo, demonstrado na Figura 2, e os mesmos foram avaliados em pacientes hipertensos, sendo observada uma significativa redução da pressão arterial. Com essas observações foram iniciados estudos para o desenvolvimento dos inibidores da ECA (iECA).

Figura 2 - Estrutura química do teprotídeo.

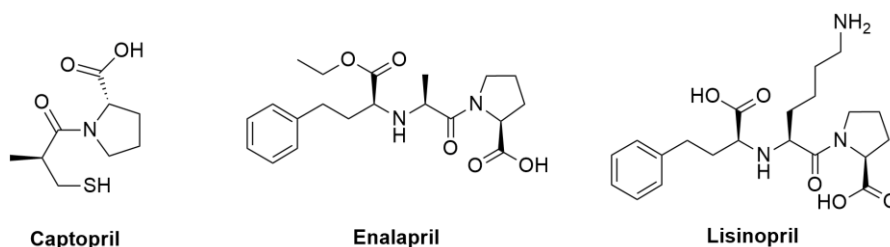


Fonte: Da autora.

O captopril foi o primeiro iECA eficaz por via oral, desenvolvido a partir do planejamento racional empregando dados da análise da ação inibitória dos peptídeos ativos e da forma como a ECA se ligaria a eles. Mediante essas descobertas, diversas outras substâncias foram desenvolvidas a fim de otimizar a ação do captopril e diminuir seus efeitos colaterais, como o enalapril e lisinopril. As

estruturas químicas de alguns destes representantes estão demonstradas na figura 3 (JACKSON, 2010).

Figura 3 - Primeiros iECA desenvolvidos.



Fonte: Da autora.

Os iECA são usados no tratamento de diversas doenças além da hipertensão arterial, como na insuficiência cardíaca (IC), disfunção do ventrículo esquerdo e nefropatia diabética. Diante disso, alguns de seus representantes constam na lista de medicamentos essenciais, RENAME, estando disponíveis no sistema de saúde (BRASIL, 2008).

Na IC, os iECA são usados com diversos objetivos, como o de prevenir quando na forma inicial, abrandar a evolução e auxiliar no tratamento de formas avançadas, reduzindo a mortalidade. Sabe-se que o uso dos iECA podem levar a redução na dilatação das câmaras ventriculares e melhorar o desempenho cardíaco dos pacientes, levando à diminuição do número de internações decorrentes da IC (BARRETTO; RAMIRES, 1998).

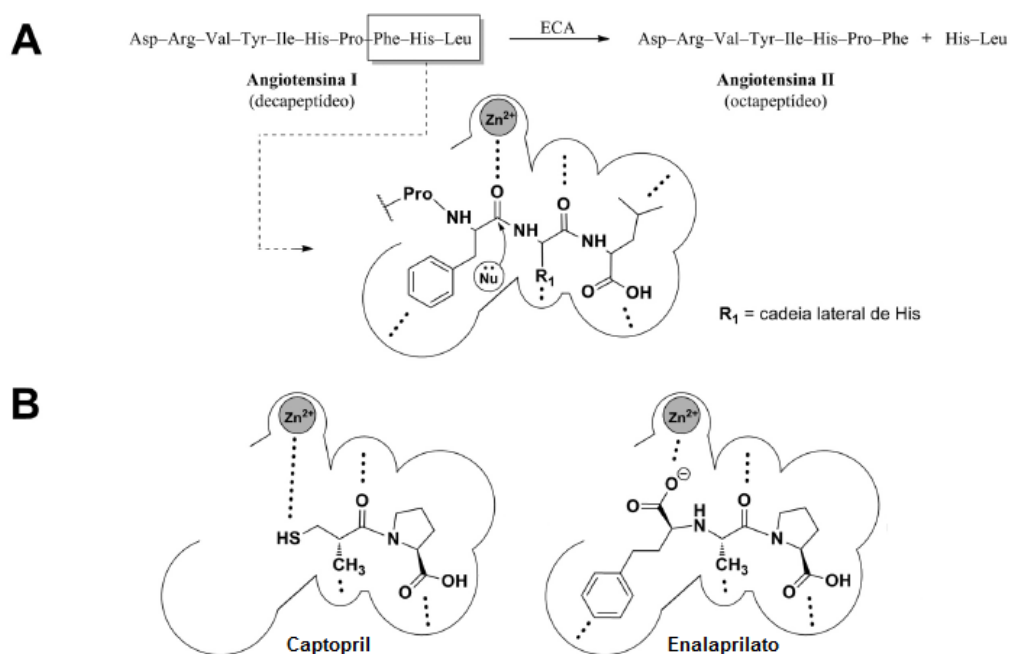
Para a nefropatia diabética, os iECA são usados a fim de gerar uma hipertrofia dos vasos intraglomerulares que levaria a uma redução da resistência pós-renal, diminuindo a proteinúria e hiperlipidemia, além de outros fatores que fazem com que tais fármacos tenham papel renoprotetores (FRANCO, 1998).

Estes fármacos abolem respostas exacerbadas relacionadas à síntese extra de angiotensina II, mas sem alterar os efeitos de moléculas deste peptídeo que já tenham sido formadas, garantindo seu papel fisiológico. Adicionalmente, a ECA possui diversos outros substratos e sua inibição pode ocasionar efeitos secundários, como o aumento dos níveis do vasodilatador bradicinina, o que pode contribuir para os efeitos farmacológicos obtidos (HOFFMAN, 2010).

A interação ao nível molecular com o sítio ativo da ECA pelos inibidores disponíveis comercialmente, como captopril e enalapril, já é bem conhecida. Na

Figura 4 está representada a forma de interação de alguns inibidores com a ECA em comparação à forma de ligação do substrato natural, a angiotensina I. Notam-se interações fundamentais ao reconhecimento enzima-inibidor e enzima-substrato como interações hidrofóbicas, de hidrogênio, atrações eletrostáticas e complexação com o zinco desta metalo-enzima. Pode ser observado um aumento da interação com sítios da enzima no segundo fármaco.

Figura 4 - Interação da angiotensina II, do captopril e do enalapril com a ECA.



Fonte: adaptado de TAVARES et al., 2015.

Notas: **(A)** Reconhecimento molecular da tríade peptídica Phe-His-Leu pela ECA. As regiões de interação entre enzima e substrato são indicadas por linhas tracejadas. **(B)** Interação dos fármacos captopril e enalaprilato (forma ativa do enalapril), respectivamente, com o sítio ativo da ECA.

#### 1.4 PRODUTOS NATURAIS INIBIDORES DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA

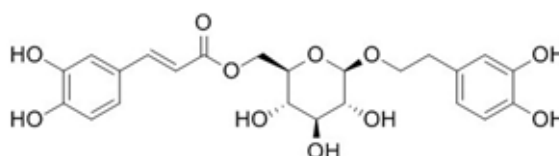
Os fármacos iECA sintéticos, como o captopril, se tornaram amplamente utilizados no tratamento clínico, porém levam a diversos efeitos colaterais indesejáveis, como erupções cutâneas, pruridos e, em casos mais raros, edema angioneurótico. Diante disso, a busca de novos inibidores de ECA, inclusive de

origem natural, que possam causar menos efeitos adversos, se tornou uma questão global (LI et al., 2015).

Vários extratos de plantas já tiveram descrito seu potencial de inibição da ECA, tais como aqueles obtidos de *Glycine max* (Soja), *Cassia tora* (Fedegoso), *Rosa damasceno* (Rosa de damasco), *Curcuma longa* (Açafrão da terra) e *Lactuca sativa* (Alface) (SIMARATANAMONGKOL et al., 2014).

Componentes isolados destes extratos também apresentaram ação inibitória da ECA. Estudos demonstraram uma inibição importante por glicosídeos feniletanólicos, nos quais a presença de grupos hidroxila parece ter influência direta na complexação com o cátion zinco existente na enzima, assim como fazem os grupos funcionais tiol e carboxila do captopril e enalaprilato, respectivamente. Dentre estas substâncias, o glicosídeo conhecido por calceolariosídeo B, encontrado em espécies de *Fraxinus* sp., mostrou valor considerável de  $CI_{50}$  ( $2,15 \pm 0,20 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) em ensaios de inibição da ECA (FIGURA 5). Assim, ele é um composto bioativo potencialmente útil em estudos como anti-hipertensivo e mesmo como modelo para a síntese total de derivados com o mesmo papel (KOSTOVA; IOSSIFOVA, 2002; LI et al., 2015).

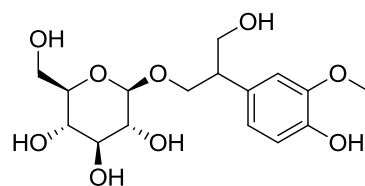
Figura 5 - Estrutura química do calceolariosídeo B.



Fonte: (LI et al, 2015)

O extrato de *Apium graveolens*, uma planta comestível tailandesa, mostrou também ter efeito inibitor sobre a ECA. Isso se deve à presença de um derivado glicosilado do fenol natural junipediol A (FIGURA 6). Esse glicosídeo foi capaz de inibir em cerca de 60% a atividade enzimática quando avaliado na concentração de  $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Dessa forma, esse também é um glicosídeo bioativo com atividade relevante para o estudo de novos iECA e até então não se têm relatos de estudos da atividade de análogos dele ou de relações entre a sua estrutura e a atividade observada como inibidor de tal enzima (SIMARATANAMONGKOL et al., 2014).

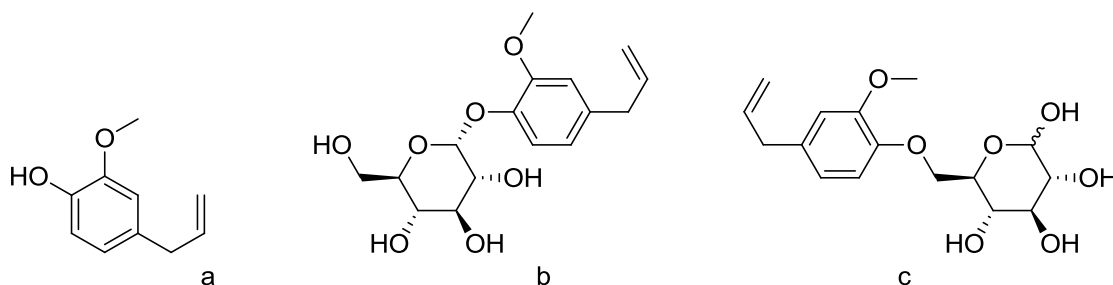
Figura 6 - Estrutura química do glicosídeo de junipediol A.



Fonte: Da autora.

O eugenol, Figura 7 - estrutura a, um alilfenol natural amplamente conhecido e estudado, também mostrou possuir atividade inibidora da ECA, todavia com valores de  $Cl_{50}$  que diferem segundo cada estudo. Chaudhary e colaboradores (2014), em investigações por novos iECA, obtiveram valor de  $Cl_{50}$  de  $0,3 \pm 0,02$   $mmol.L^{-1}$  para o eugenol e provaram que o efeito anti-ECA apresentado pelo óleo essencial de *Ocimum sanctum* L. está diretamente relacionado à concentração de eugenol que esta espécie possui. Outros estudos, como o realizado por Mnafgui e colaboradores (2013) apresentaram um valor de  $Cl_{50}$  de  $0,8 \pm 0,02$   $mmol.L^{-1}$  para o eugenol. Em outro trabalho, pesquisadores avaliaram a atividade sobre a ECA de uma mistura de O-glicosídeos do eugenol, obtidos em um processo de síntese assistida por enzimas, Figura 7 - estruturas b e c, com valores de  $Cl_{50}$  próximos a  $0,5 \pm 0,04$   $mmol.L^{-1}$ , o que comprova a importância de substâncias derivadas do eugenol no estudo de novos agentes anti-hipertensivos (LOHITH et al., 2006).

Figura 7 - Estrutura química do eugenol (a), e de seus glicosídeos (b) e (c).

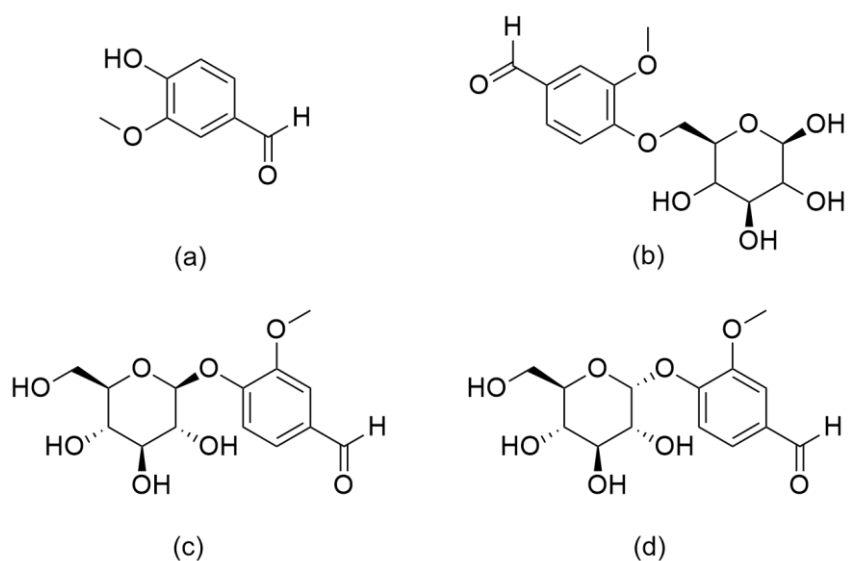


Fonte: Da autora.

A vanilina é o componente principal da baunilha, que é um flavorizante empregado com frequência em diversos produtos. Sua fonte principal é a vagem da orquídea tropical de baunilha, *Vanilla planifolia*, porém está presente em muitas outras espécies vegetais. Estudos mostraram que a vanilina tem atividades diversas,

como antioxidante, antimicrobiana, entre outras (WALTON; MAYER; NARBAD, 2003). Derivados glicosídicos dela foram ainda testados frente à ECA, com intuito de verificar seu potencial inibitório (FIGURA 8). Ainda que na forma de uma mistura dos anômeros  $\alpha$  e  $\beta$ , além do 6-O-glicosídeo, obteve-se valor de  $CI_{50}$  interessante, da ordem de  $1,1 \pm 0,10 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Mesmo sendo superior ao descrito para a mistura de glicosídeos do eugenol, esses resultados demonstram que os grupos presentes na molécula conseguem interagir com a ECA, fazendo com que ocorra a inibição de sua atividade (LOHITH et al., 2006).

Figura 8 - Estrutura química da vanilina (a) e dos seus glicosídeos (b), (c) e (d).



Fonte: Da autora.

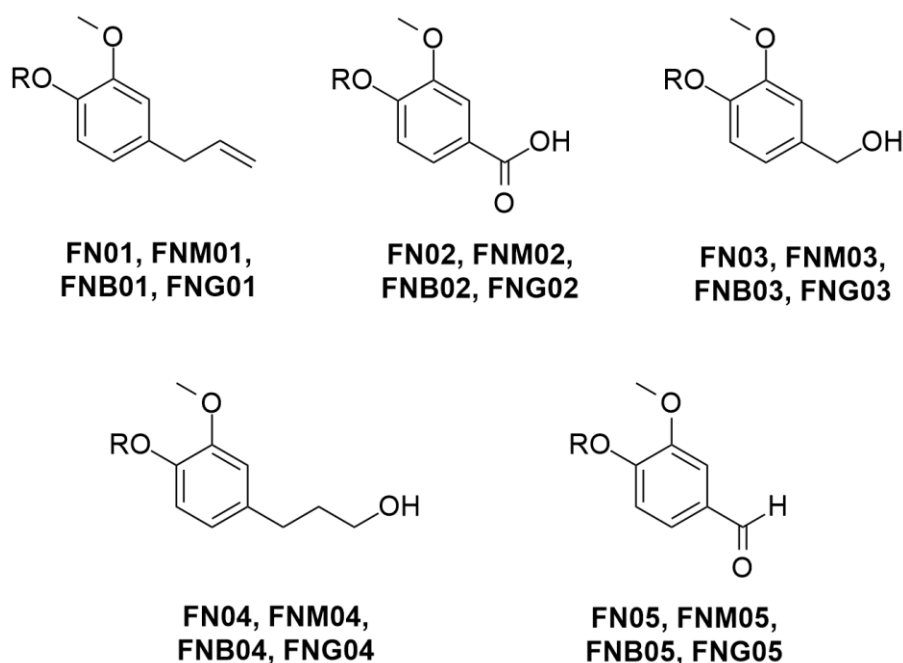
## 2 OBJETIVOS

Com esse trabalho teve-se por objetivo obter novos iECA baseados na estrutura de substâncias naturais bioativas que reconhecidamente inibem essa enzima.

De modo específico, pretendeu-se:

- Sintetizar as dezoito substâncias cujas estruturas gerais estão mostradas adiante e que trazem analogia estrutural com os fenóis naturais de partida, eugenol e vanilina (FIGURA 9);
- Caracterizar os produtos obtidos pelos métodos físico-químicos convencionais;
- Avaliar o comportamento dos produtos obtidos, do eugenol e da vanilina em triagem *in vitro* frente à ECA;
- Determinar os valores de  $CI_{50}$  para os derivados mais ativos na triagem a concentração fixa;
- Estabelecer relações preliminares entre a estrutura química dos análogos e a atividade observada.

Figura 9 - Estruturas químicas gerais dos análogos propostos.



Fonte: Da autora.

Notas: FN: R = H; FNM: R = CH<sub>3</sub>; FNB: R = Bn; FNG: R = 1-O-glicopiranosila.

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

Os procedimentos experimentais associados às etapas de síntese, caracterização físico-química e avaliação da atividade frente à ECA dos derivados propostos são descritos a seguir.

#### 3.1 MÉTODOS DE SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

Os derivados propostos foram sintetizados no Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica (LQFar) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNIFAL-MG. Esses derivados não são inéditos, portanto utilizou-se de metodologias descritas na literatura para sua obtenção e, em alguns casos, foram efetuadas adaptações aos mesmos. O planejamento sintético seguido teve como pontos de partida dois fenóis naturais adquiridos comercialmente, a vanilina (Vetec<sup>®</sup>) e o eugenol (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>).

A evolução das reações de síntese foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando placas de sílica gel em suporte de alumínio com detector de fluorescência (Macherey-Nagel, DC-Fertigfolien ALUGRAM<sup>®</sup> Xtra Sil G/UV254). As purificações por cromatografia em coluna de sílica (CCS) foram realizadas com sílica gel 60, 70-230 mesh (Sorblin). Os eluentes empregados estão descritos em cada procedimento. As reações realizadas sob irradiação de ultrassom foram efetuadas em banho ultrassônico Cristófoli, operando na faixa de 50-60 Hz.

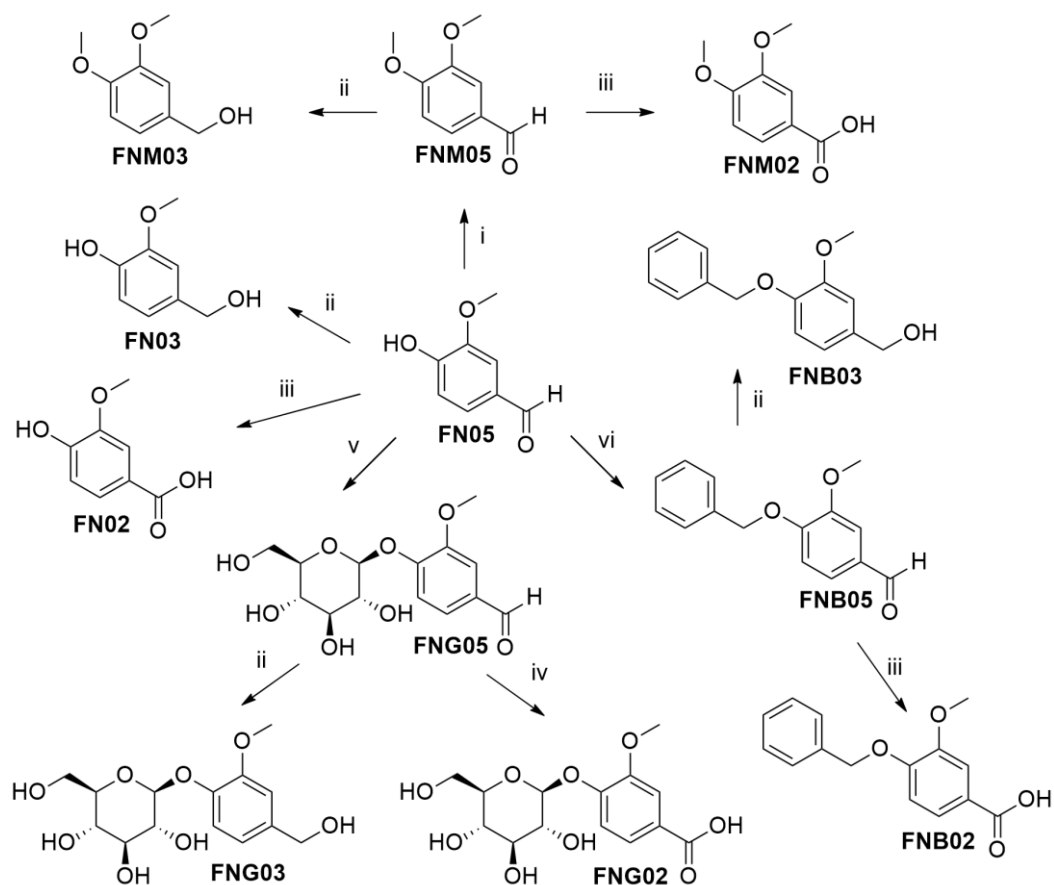
As determinações de faixa de fusão foram realizadas em aparelho Bücher 535 (0-300 °C), calibrado com vanilina P.A. Merck<sup>®</sup> (P.F.: 80–81 °C, LAYEK *et al.*, 2011). Os valores de logP e de logD foram calculados utilizando-se o software ACD/Log P DB, desenvolvido pela Advanced Chemistry Development<sup>®</sup> (versão 6.0; 2002). O poder rotatório das substâncias quirais foi avaliado em polarímetro Quimis<sup>®</sup> (modelo Q760M2).

As análises de espectroscopia na região do infravermelho (IV) foram realizadas no Núcleo de Controle de Qualidade ou no Laboratório de Análise Química de Fármacos, ambos da UNIFAL-MG, e obtidas em espectrômetros Shimadzu-Affinity-1 ou Thermo Scientific Nicolet-iS50, ambos com dispositivo ATR, e os valores foram descritos em número de onda ( $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ , cm<sup>-1</sup>).

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da UNIFAL-MG, obtidas em espectrômetro Bruker AC-300 e na Universidade Federal de Minas Gerais, em espectrômetro *Avance* DPX 200. Os resultados foram processados com o programa MestReNova, desenvolvido pela Mestrelab Research S.L.<sup>®</sup> (versão 6.0.2; 2009). Foi empregado como padrão interno o tetrametilsilano (TMS) e como solventes clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) ou dimetilsulfóxido deuterado ( $\text{DMSO}-d_6$ ). Os valores de deslocamento químico são dados em partes por milhão ( $\delta$ , ppm). A numeração representada nas figuras não condiz com a numeração associada ao seu nome químico, mas foi empregada para se efetuar a atribuição dos sinais de RMN.

Na rota de síntese apresentada na figura 10, ilustram-se as condições reacionais para as sínteses que tiveram como ponto de partida a vanilina.

Figura 10 - Rota sintética para obtenção dos derivados hidroxilados **FN02** e **FN03**, metilados **FNM02**, **FNM03** e **FNM05**, benzilados **FNB02**, **FNB03** e **FNB05** e glicosilados **FNG02**, **FNG03** e **FNG05** a partir da vanilina (**FN05**).

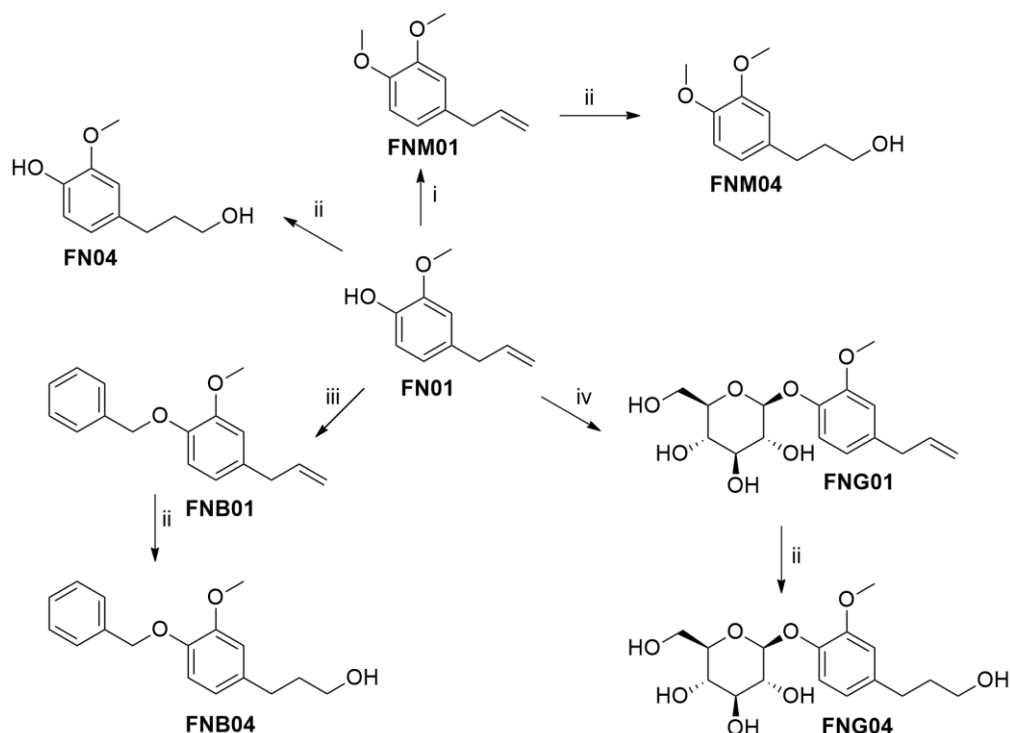


Fonte: Da autora.

Notas: i)  $\text{CH}_3\text{I}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , acetona, t.a.; ii)  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{NaOH}$  aq., etanol,  $0^\circ\text{C}$ –t.a., seguido de  $\text{HCl}$  aq.  $0^\circ\text{C}$ –t.a.; iii)  $\text{Ag}_2\text{O}$ ,  $\text{NaOH}$   $4 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $50^\circ\text{C}$ ; iv)  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $80^\circ\text{C}$ ; v) brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -*D*-glicopiranosila,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , TBAB ( $\text{NBu}_4\text{Br}$ ), diclorometano,  $\text{H}_2\text{O}$ , t.a., seguido de  $\text{KOH}$ , metanol, t.a.; vi)  $\text{BnCl}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , TBAB ( $\text{NBu}_4\text{Br}$ ), diclorometano,  $\text{H}_2\text{O}$ , t.a.

Para as sínteses dos análogos e derivados com origem no eugenol, foram empregadas as condições apresentadas adiante, na figura 11.

Figura 11 - Rota sintética para obtenção dos derivados: hidroxilado **FN04**, metilados **FNM01** e **FNM04**, benzilados **FNB01** e **FNB04**, e glicosilados **FNG01** e **FNG04** a partir do eugenol (**FN01**).

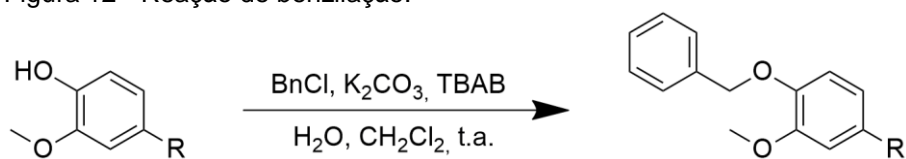


Fonte: Da autora.

Notas: i)  $\text{CH}_3\text{I}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , acetona, t.a.; ii)  $\text{BH}_3 \cdot (\text{CH}_3)_2\text{S}$ , tetraidrofurano,  $0^\circ\text{C}$ –t.a., seguido de  $\text{NaOH}$   $4 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  5% v/v,  $0^\circ\text{C}$ –t.a.; iii)  $\text{BnCl}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , TBAB ( $\text{NBu}_4\text{Br}$ ), diclorometano,  $\text{H}_2\text{O}$ , t.a.; iv) brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-glicopiranosila,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , TBAB ( $\text{NBu}_4\text{Br}$ ), diclorometano,  $\text{H}_2\text{O}$ , t.a., seguido de  $\text{KOH}$ , metanol, t.a.

### 3.1.1 Método geral para reações de *O*-benzilação (adaptado de Wang et al., 2014)

Figura 12 - Reação de benzilação.

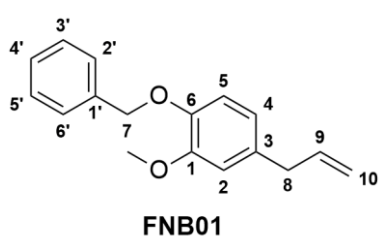


Fonte: Da autora.

Em um balão de fundo redondo de 25,0 mL adicionou-se a substância a ser benzilada, **FN01** ou **FN05**, (1,0 eq.), brometo de benzila (1,2 eq.), carbonato de

potássio (1,5 eq.) e brometo de tetrabutilamônio - TBAB (0,5 eq.). Uma pequena quantidade de água destilada e de diclorometano foi adicionada, suficiente para agitação magnética (cerca de 5,0 mL de cada). Deixou-se a mistura reacional sob agitação magnética à temperatura ambiente, sendo acompanhada por CCD, usando como eluente hexano e acetato de etila (8,0:2,0; v/v). Após o término da reação, foi realizada uma extração líquido-líquido com diclorometano. Em seguida, a fase orgânica foi lavada com solução de NaOH 1,0 mol.L<sup>-1</sup> e com água destilada, para remoção dos resíduos pertencentes a fase aquosa e traços de material de partida. Após essa etapa, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o sal removido por filtração simples. O filtrado, contendo o produto, foi concentrado em evaporador rotatório. A purificação foi realizada por CCS, com hexano e acetato de etila (8,0:2,0; v/v) como eluente.

### 3.1.1.1 Dados de caracterização dos produtos benzilados **FNB01** e **FNB05**



#### **2-metoxi-1-(fenilmetoxi)-4-(2-propen-1-il)-benzeno**

Óleo amarelo claro

**Rendimento:** 75% - 1,23 g (4,9 mmol) a partir de 1,06g (6,5 mmol)

**F.M.:** C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>      **M.M.:** 254,32 g.mol<sup>-1</sup>

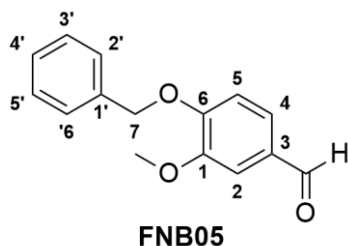
**Rf:** 0,87 (hexano e acetato de etila 7,0:3,0 v/v)

**clogP:** 4,63 ± 0,25

**IV** ( $\bar{\nu}_{\text{máx}}$  cm<sup>-1</sup>): 2933 (C-H), 1637 (C=C), 1589 (C=C ar), 1258 (C-O-C).

**RMN de <sup>1</sup>H** ( $\delta$ ; CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz): 7,48-7,45 (m; 2H; H2' e H6'), 7,40-7,31 (m; 3H; H3', H4' e H5'), 6,85 (d; 1H;  $J_{\text{H5}, \text{H4}} = 8,1$  Hz; H5), 6,77 (d; 1H;  $J_{\text{H2}, \text{H4}} = 2,0$  Hz; H2), 6,69 (dd; 1H; H4), 6,05-5,92 (m; 1H; H9), 5,15 (s; 1H; H7), 5,14-5,07 (m; 2H; H10), 3,90 (s; 3H; C1-OCH<sub>3</sub>), 3,35 (d; 2H;  $J_{\text{H8}, \text{H9}} = 6,63$  Hz; H8).

**RMN de <sup>13</sup>C** ( $\delta$ ; CDCl<sub>3</sub>; 75 MHz): 149,6 (C1), 146,5 (C6), 137,5 (C1'), 137,3 (C9), 133,2 (C3), 128,4 (C3' e C5'), 127,6 (C4'), 127,1 (C2' e C6'), 120,3 (C4), 115,5 (C10), 114,2 (C2), 112,4 (C5), 71,1 (C7), 55,8 (C1-OCH<sub>3</sub>), 39,7 (C8).



### 3-metoxi-4-(fenilmetoxi)-benzaldeído

Sólido amarelo claro

**F.F.:** 57,6-58,3°C (Lit.: 60,0°C; MARTIN, 1989)

**Rendimento:** 60% - 0,230 g (1,0 mmol) a partir de 0,250 g (1,6 mmol).

**F.M.:** C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>      **M.M.:** 242,09 g.mol<sup>-1</sup>

**Rf:** 0,81 (hexano e acetato de etila 6,0:4,0 v/v)

**clogP:** 3,27 ± 0,28

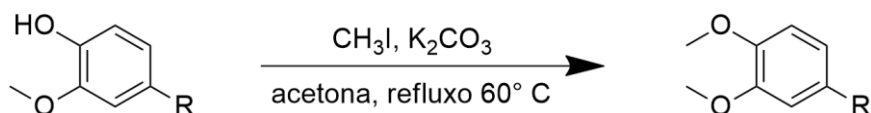
**IV** ( $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ , cm<sup>-1</sup>): 2724 (C-H), 1677 (C=O), 1583 (C=C ar), 1259 (C-O-C).

**RMN de <sup>1</sup>H** ( $\delta$ ; CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz): 9,82 (s; 1H; C3-COH), 7,44-7,31 (m; 7H; H2', H3', H4', H5', H6', H2 e H4), 6,97 (d; 1H;  $J_{H5, H4} = 8,2$  Hz; H5), 5,22 (s; 2H; H7), 3,92 (s; 3H; C6-OCH<sub>3</sub>).

**RMN de <sup>13</sup>C** ( $\delta$ ; CDCl<sub>3</sub>; 75 MHz): 190,8 (C3-COH), 153,5 (C6), 150,0 (C1), 135,9 (C1'), 130,2 (C3), 128,6 (C3' e C5'), 128,1 (C4'), 127,1 (C2' e C6'), 126,5 (C4), 112,3 (C5), 109,3 (C2), 70,8 (C7), 56,0 (C1-OCH<sub>3</sub>).

#### 3.1.2 Método geral para as reações de O-metilação (adaptado de Coolen et al., 1995)

Figura 13 - Reação de O-metilação.

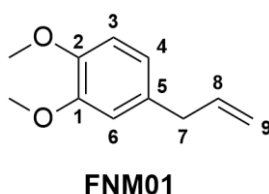


Fonte: Da autora.

Em um balão de fundo redondo de 125,0 mL adicionou-se a substância a ser metilada (1,0 eq.), carbonato de potássio (2,0 eq.) e acetona (60,0 mL). Deixou-se sob agitação magnética à temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse tempo adicionou-se iodometano (três porções de 1,2 eq.), gota a gota, e a mistura reagente foi aquecida sob refluxo a 60°C. A reação foi acompanhada por CCD, usando como eluente hexano e acetato de etila (7,0:3,0; v/v). Ao término da reação, a mistura reagente foi filtrada para separação e descarte do material inorgânico e a acetona foi removida em rotaevaporador. O resíduo obtido foi solubilizado com acetato de etila e

lavado com NaOH 0,5 mol.L<sup>-1</sup> e água destilada. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, o sal removido por filtração simples, e o produto concentrado em evaporador rotatório. Os produtos foram purificados por CCS, usando como eluente hexano e acetato de etila (9,5:0,5; v/v).

### 3.1.2.1 Dados de caracterização dos produtos metilados **FNM01** e **FNM05**



#### **4-allyl-1,2-dimetoxibenzeno**

Líquido amarelo

**Rendimento:** 53% - 1,84 g (10,3 mmol) a partir de 3,18 g (19,4 mmol)

**F.M.:** C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>      **M.M.:** 178,23 g.mol<sup>-1</sup>

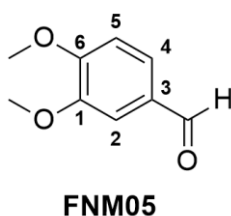
**Rf:** 0,79 (hexano e acetato de etila 8,0:2,0 v/v)

**clogP:** 2,97 ± 0,24

**IV** ( $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ , cm<sup>-1</sup>): 2832 (C-H), 1637 (C=C), 1590 (C=C ar), 1257 (C-O-C).

**RMN de <sup>1</sup>H** ( $\delta$ ; CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz): 6,81-6,70 (m; 3H; H3, H4 e H6), 6,02-5,89 (m; 1H; H8), 5,10-5,04 (m; 2H; H9), 3,86 (s; 3H, C1-OCH<sub>3</sub>), 3,85 (s; 3H, C2-OCH<sub>3</sub>), 3,32 (d; 2H;  $J_{\text{H7, H8}} = 6,7$  Hz; H7).

**RMN de <sup>13</sup>C** ( $\delta$ ; CDCl<sub>3</sub>; 75 MHz): 148,8 (C1), 147,3 (C2), 137,6 (C8), 132,6 (C5), 120,3 (C4), 115,5 (C9), 111,8 (C6), 111,2 (C3), 55,9 (C1-OCH<sub>3</sub>), 55,7 (C2-OCH<sub>3</sub>), 39,7 (C7).



#### **3,4-dimetoxibenzaldeído**

Sólido amarelo claro

**F.F.:** 42,5-43,9°C (Lit.: 43,0°C; SHANKARAN; RAO, 1980)

**Rendimento:** 73% - 1,6 g (9,6 mmol) a partir de 2,0 g (13,1 mmol)

**F.M.:** C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>      **M.M.:** 166,17 g.mol<sup>-1</sup>

**Rf:** 0,67 (hexano e acetato de etila 6,0:4,0 v/v)

**clogP:** 1,61 ± 0,27

**IV** ( $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2837 (C-H), 1670 (C=O), 1509 (C=C ar), 1267 (C-O-C).

**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\delta$ ;  $\text{CDCl}_3$ ; **300 MHz**): 9,82 (s; 1H; C3-COH), 7,42 (dd; 1H; H4), 7,37 (d; 1H;  $J_{\text{H}_2, \text{H}_4} = 1,7$  Hz; H2), 6,94 (d; 1H;  $J_{\text{H}_5, \text{H}_4} = 8,2$  Hz; H5), 3,93 (s; 3H, C6-OCH<sub>3</sub>), 3,91 (s; 3H, C1-OCH<sub>3</sub>).

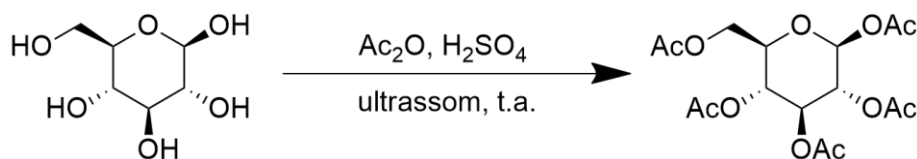
**RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\delta$ ;  $\text{CDCl}_3$ ; **75 MHz**): 190,8 (C3-COH), 154,4 (C6), 149,5 (C1), 130,0 (C3), 126,8 (C4), 110,3 (C5), 108,9 (C2), 56,1 (C6-OCH<sub>3</sub>), 56,0 (C1-OCH<sub>3</sub>).

### 3.1.3 Métodos para obtenção dos produtos O-glicosilados

Para a obtenção dos produtos glicosilados foi necessário primeiro obter-se o agente de glicosilação, brometo de glicosila, para depois realizar-se, efetivamente, a reação de glicosilação.

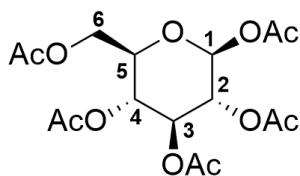
#### 3.1.3.1 Reação de peracetilação da D-glicose (adaptado de Deng, Gangadharmath e Chang, 2006)

Figura 14 - Reação de peracetilação da D-glicose.



Fonte: Da autora.

Em um erlenmeyer de 250,0 mL foram adicionados D-glicose anidra (1,0 eq.) e anidrido acético (7,5 eq.). Em seguida, adicionou-se ácido sulfúrico (30 gotas), mantendo-se a mistura reacional em constante agitação. Submeteu-se a mistura reagente a irradiação ultrassônica por 15 minutos. Após esse tempo, foi adicionada água destilada e gelo à mistura reagente, a fim de precipitar o monossacarídeo peracetilado. Dessa forma, a mistura reacional ficou em repouso, por 24 horas, em refrigerador. Dado este tempo, procedeu-se a separação do produto sólido por filtração a vácuo e lavagem do mesmo com solução de bicarbonato de sódio. A purificação foi feita por recristalização com solução etanólica 96°GL.



GL01

**1,2,3,4,6-penta-O-acetil-β-D-glicopiranosose**

Sólido branco

**F.F.:** 105,0-107,0°C (Lit.: 133,5-134,0°C; DAVIDSON; MEYER, 1954)

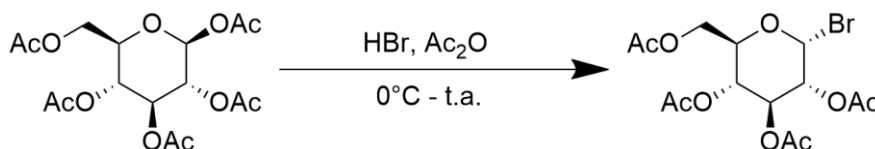
**Rendimento:** 63% - 13,9 g (35,6 mmol) a partir de 10,0 g (56,0 mmol)

**F.M.:** C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>      **M.M.:** 390,34 g.mol<sup>-1</sup>

**Rf:** 0,28 (hexano e acetato de etila 7,0:3,0 v/v)

### 3.1.3.2 Reação de formação do brometo de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-glicopiranosila (adaptado de Conchie, Levvy e Marsch, 1957)

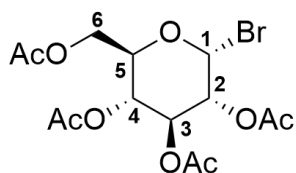
Figura 15 - Reação de formação do brometo de glicosila.



Fonte: Da autora.

Em um balão de fundo redondo de 250,0 mL foi preparada uma solução de bromação pela adição, gota a gota, de ácido bromídrico 48% m/m (12,5 mL) em anidrido acético (50,0 mL), sob agitação magnética e banho de gelo. Em outro balão de fundo redondo de 250,0 mL foi adicionado o monossacarídeo peracetilado (5,0 g) e diclorometano (50,0 mL) para solubilização. Essa solução foi colocada sob agitação magnética em banho de gelo. A solução de bromação foi gotejada lentamente à solução do monossacarídeo, com auxílio de um funil de adição. Ao término da adição, a solução permaneceu em agitação magnética à temperatura ambiente. O acompanhamento da reação foi feito por CCD, usando-se como eluente hexano e acetato de etila (7,0:3,0; v/v). Em seguida, a mistura reacional foi vertida em água e gelo, agitada e extraída com diclorometano. Posteriormente, a fase orgânica foi lavada com uma solução saturada de bicarbonato de sódio, até que o pH da fase aquosa fosse igual ao dessa solução. A fase orgânica foi, então, seca

com sulfato de sódio anidro, o sal removido por filtração simples, o produto concentrado em evaporador rotatório e armazenado adequadamente.



**GL02**

**brometo de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-glicopiranosila**

Sólido branco

**F.F.:** 79,8-81,4°C (Lit.: 88,0-89,0°C; GONZALEZ; APARICIO, 1945)

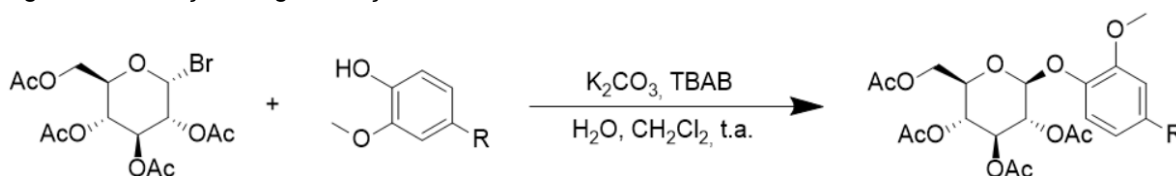
**Rendimento:** 98% - 5,2 g (12,6 mmol) a partir de 5,0 g (12,8 mmol)

**F.M.:** C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>BrO<sub>9</sub>      **M.M.:** 411,20 g.mol<sup>-1</sup>

**Rf:** 0,50 (hexano e acetato de etila 7,0:3,0 v/v)

**3.1.3.3 Métodos gerais para reação de O-glicosilação e desproteção (adaptado de Conchie; Levvy; Marsch, 1957; Hongu; Saito; Tasujihara, 1999)**

Figura 16 - Reação de glicosilação.

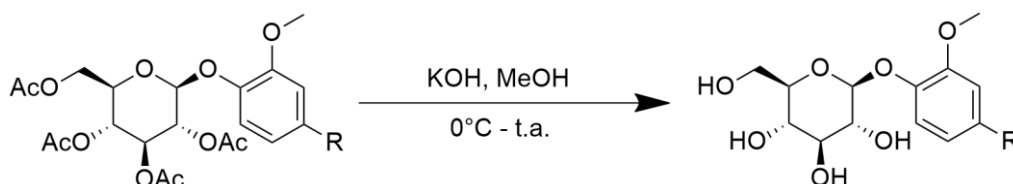


Fonte: Da autora.

Em um balão de fundo redondo de 250,0 mL foi adicionado o fenol a ser glicosilado (1,0 eq.), carbonato de potássio (8,8 eq.), brometo de tetrabutilamônio (0,3 eq.), água destilada (50,0 mL) e diclorometano (50,0 mL). A solução foi colocada em agitação magnética vigorosa à temperatura ambiente. Em seguida solubilizou-se o brometo de glicosila (1,1 eq.) em diclorometano (25,0 mL) e adicionou-se o mesmo gota a gota à mistura reacional presente no balão. A reação foi acompanhada por CCD com hexano e acetato de etila (7,0:3,0; v/v) como eluente. Utilizou-se como revelador da placa de CCD uma solução de ácido sulfúrico/etanol a 15% v/v seguida de aquecimento. Após o término da reação, a fase orgânica foi lavada com uma solução de NaOH 1,0 mol.L<sup>-1</sup>, seguido de água destilada. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, o sal removido por

filtração simples, e o produto concentrado em rotaevaporador. A purificação foi realizada por CCS, usando como eluente hexano e acetato de etila (7,0:3,0; v/v).

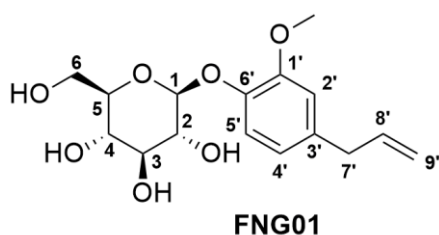
Figura 17 - Reação de desproteção dos glicosídeos.



Fonte: Da autora.

A um balão de 25,0 mL adicionou-se hidróxido de potássio (0,1 eq.) e metanol absoluto (5,0 mL) e deixou-se solubilizar a base sob agitação magnética e banho de água-gelo. Na sequência, adicionou-se o glicosídeo a ser desprotegido (1,0 eq.), solubilizado em metanol absoluto (5,0 mL). Deixou-se sob agitação nas mesmas condições por 20 minutos, acompanhando-se a reação com CCD, usando como eluente hexano e acetato de etila (1,0:1,0; v/v). Utilizou-se solução de ácido sulfúrico/etanol a 15% v/v para revelar a placa de CCD. Ao final da reação, adicionou-se resina ácida Amberlite® IRA-120 ao balão e colocou-se sob agitação e banho de água-gelo até pH entre 6 e 7. Realizou-se filtração simples da mistura, secou-se com sulfato de sódio anidro o filtrado, o sal removido por filtração simples, e o produto concentrado em evaporador rotatório, obtendo-se, ao fim, o produto desacetilado puro.

### 3.2.3.3.1 Dados de caracterização dos produtos glicosilados **FNG01** e **FNG05**



#### **$\beta$ -D-glicopiranosídeo de 2-metoxi-4-(2-propen-1-il)-fenila**

Sólido branco amorfo

**Rendimento:** 79% - 4,1 g (8,2 mmol) a partir de 1,7 g de eugenol (10,3 mmol)

**F.M.:** C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>7</sub>      **M.M.:** 326,34 g.mol<sup>-1</sup>

**Rf:** 0,68 (acetato de etila e metanol 6,5:3,5 v/v)

**clogP:** -0,03 ± 0,35

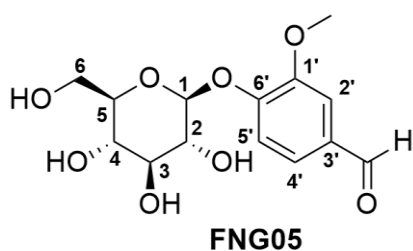
**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub>** -41,0 (c 0,5, CH<sub>3</sub>OH) (Lit. -43,6; KIM *et al.*, 2004).

**IV** ( $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3361 (O-H), 2919 (C-H), 1637 (C=C), 1510 (C=C ar), 1219 (C-O-C).

**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\delta$ ; **DMSO- $d_6$** ; **200 MHz**)\*: 6,99 (d; 1H;  $J_{\text{H}5', \text{H}4'} = 8,0$  Hz; H5'), 6,83-6,75 (m; 1H; H2'), 6,66 (d; 1H; H4'), 6,04-5,84 (m; 1H; H8'), 5,10 (s; 1H; H sacarídico), 5,05-5,00 (m; 2H; H9'), 4,84 (d; 1H;  $J_{\text{H}1, \text{H}2} = 6,5$  Hz; H1), 3,74 (s; 3H; C1'-OCH<sub>3</sub>), 3,69-3,18 (m; 11H; H sacarídicos e H7').

**RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\delta$ ; **DMSO- $d_6$** ; **50 MHz**)\*: 148,9 (C1'), 144,8 (C6'), 138,0 (C8'), 133,4 (C3'), 120,3 (C4'), 115,6 (C5'), 115,4 (C9'), 112,9 (C2'), 100,2 (C1), 77,0 (C3), 76,9 (C5), 73,2 (C2), 69,7 (C4), 60,7 (C6), 55,6 (C1-OCH<sub>3</sub>).

\*Atribuído segundo Vijayakumar; Divakar (2007).



### **$\beta$ -D-glicopiranosídeo de 4-formil-2-metoxifenila**

Sólido branco

**F.F.:** 184,3-186,6°C (Lit.: 185,0-187,0°C; REICHEL; SCHICKLE, 1943)

**Rendimento:** 94% - 4,8 g (9,8 mmol) a partir de 1,6 g (10,5 mmol)

**F.M.:** C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>O<sub>8</sub>      **M.M.:** 314,29 g.mol<sup>-1</sup>

**Rf:** 0,67 (acetato de etila e metanol 6,5:3,5 v/v)

**clogP:** -1,32  $\pm$  0,39

**$[\alpha]_D$**  -57,2 (c 0,5, CH<sub>3</sub>OH)

**IV** ( $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3300 (O-H), 2887 (C-H), 1658 (C=O), 1508 (C=C ar), 1265 (C-O-C).

**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\delta$ ; **DMSO- $d_6$** ; **300 MHz**)\*: 9,86 (s; 1H; COH), 7,53 (dd; 1H; H4'), 7,43 (d, 1H,  $J_{\text{H}2', \text{H}4'} = 1,8$  Hz; H2'), 7,27 (d, 1H,  $J_{\text{H}5', \text{H}4'} = 8,4$  Hz; H5'), 5,35 (d, 1H,  $J_{\text{H}} = 5,1$  Hz; H sacarídico), 5,12 (d, 1H,  $J_{\text{H}} = 4,4$  Hz; H sacarídico), 5,09 (d, 1H,  $J_{\text{H}1, \text{H}2} = 7,6$  Hz; H1), 5,06 (d, 1H,  $J_{\text{H}} = 5,2$  Hz; H sacarídico), 4,56 (d, 1H,  $J_{\text{H}} = 5,6$  Hz; H sacarídico), 3,84 (s; 3H; C1'-OCH<sub>3</sub>), 3,67 (dd, 1H,  $J_{\text{H}} = 10,5$  Hz,  $J_{\text{H}} = 5,2$  Hz, H6a), 3,50-3,46 (m, 2H, H2 e H6b), 3,31-3,18 (m, 3H, H3, H4 e H5).

**RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\delta$ ; **DMSO- $d_6$** ; **75 MHz**)\*: 191,6 (C3'-COH), 151,8 (C6'), 149,3 (C1'), 130,6 (C3'), 125,4 (C4'), 114,6 (C5'), 110,5 (C2'), 99,4 (C1), 77,2 (C4), 76,8 (C3), 73,1 (C2), 69,6 (C5), 60,6 (C6), 55,7 (C1'-OCH<sub>3</sub>).

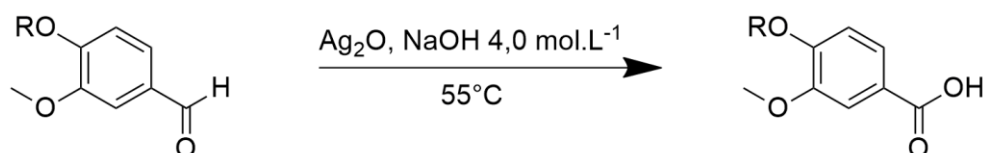
\*Atribuído segundo Schwarz; Hofmann (2009).

### 3.1.4 Métodos gerais para reações de oxidação dos derivados formilados

Dois métodos foram utilizados para a oxidação dos derivados formilados, nos quais são empregados diferentes agentes oxidantes, o óxido de prata e o permanganato de potássio.

#### 3.1.4.1 Via óxido de prata (adaptado de Pearl, 1950)

Figura 18 - Reação de oxidação com óxido de prata.

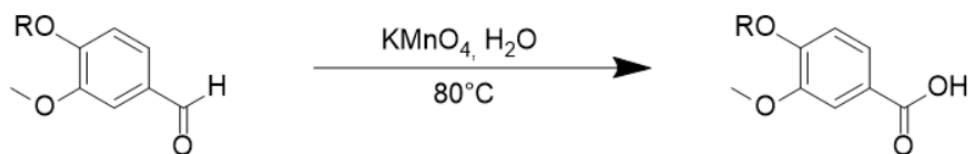


Fonte: Da autora.

Em um balão de fundo redondo de 50,0 mL adicionou-se o derivado a ser oxidado **FN01**, **FNM01** ou **FNB01** (1,0 eq.) e NaOH 4,0 mol.L<sup>-1</sup> (20,2 mL). Deixou-se em agitação magnética até solubilização do aldeído. Em seguida foi adicionado óxido de prata (0,85 eq.) e colocou-se a mistura sob aquecimento a 55°C. A reação foi acompanhada por CCD com hexano e acetato de etila (7,0;3,0; v/v) como eluente. Após o término e resfriamento, a mistura reagente foi filtrada a vácuo para remover os resíduos de prata presentes. O filtrado foi acidificado até pH 2,0, seguindo com a extração do produto da fase aquosa com acetato de etila. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, o sal removido por filtração simples e o produto concentrado em rotaevaporador.

### 3.1.4.2 Via permanganato de potássio (adaptado de Dignum et al., 2003).

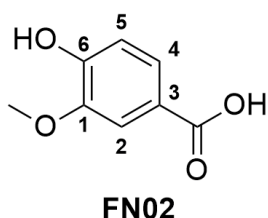
Figura 19 - Reação de oxidação com permanganato de potássio.



Fonte: Da autora.

Em um balão de fundo redondo de 25,0 mL adicionou-se o glicosídeo **FNG01** a ser oxidado (1,0 eq.) e cerca de 3,5 mL de H<sub>2</sub>O destilada. A mistura formada foi colocada sob aquecimento a 80°C. Na sequência, adicionou-se uma solução de KMnO<sub>4</sub> (1,2 eq.) em H<sub>2</sub>O destilada, gota a gota, durante 10 minutos. Após essa adição, deixou-se a mistura reagente sob as mesmas condições por 1 hora. Em seguida, fez-se uma filtração simples e lavou-se o resíduo com água destilada. O resíduo sólido foi descartado e o filtrado foi acidificado até pH 2,0 com HCl concentrado e extraído com acetato de etila. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, o sal removido por filtração simples e o solvente eliminado em rotaevaporador.

### 3.1.4.3 Dados de caracterização dos produtos oxidados **FN02**, **FNM02**, **FNB02** e **FNG02**



#### ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico

Sólido bege

**F.F.:** 206,8-207,8°C (Lit.: 207°C; TSUKERVANIK; SERGEEVA, 1947)

**Rendimento:** 92% - 0,2 g (1,2 mmol) a partir de 0,2 g (1,3 mmol)

**F.M.:** C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>      **M.M.:** 168,15 g.mol<sup>-1</sup>

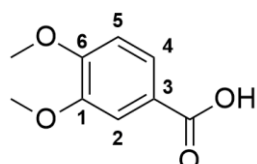
**Rf:** 0,31 (hexano e acetato de etila 6,0:4,0 v/v)

**clogP:** 1,33 ± 0,25      **clogD:** -1,41 (pH 7,4)

**IV** ( $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ , cm<sup>-1</sup>): 3480 (O-H), 2922 (C-H), 1732 (C=O), 1598 (C=C ar), 1207 (C-O-C).

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ; DMSO- $d_6$ ; 300 MHz):** 9,84 (s; 1H; C3-COO-H), 7,46-7,43 (m; 2H; H2 e H4), 6,83 (d; 1H;  $J_{\text{H5, H4}} = 8,6$  Hz; H5), 3,80 (s; 3H; C1-CH $_3$ ).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ; DMSO- $d_6$ ; 75 MHz):** 167,3 (C3-COOH), 151,2 (C6), 147,3 (C1), 123,6 (C4), 121,7 (C3), 115,1 (C2), 112,8 (C5), 55,6 (C1-O-CH $_3$ ).



FNM02

### ácido 3,4-dimetoxibenzoico

Sólido branco

**F.F.:** 176,7-180,9 °C (Lit.: 178,0-180,0°C; ROW et al., 1964)

**Rendimento:** 62%, 0,15 g (0,8 mmol) a partir de 0,216 g (1,3 mmol)

**F.M.:** C $_9$ H $_{10}$ O $_4$       **M.M.:** 182,17 g.mol $^{-1}$

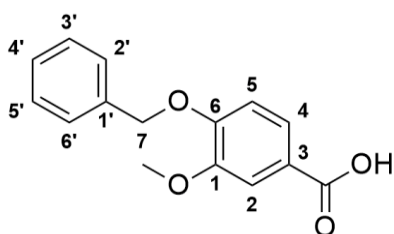
**Rf:** 0,37 (hexano e acetato de etila 6,0:4,0 v/v)

**clogP:** 1,99  $\pm$  0,25    **clogD:** -0,80 (pH 7,4)

**IV ( $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ , cm $^{-1}$ ):** 3480 (O-H), 2938 (C-H), 1669 (C=O), 1514 (C=C ar), 1231 (C-O-C).

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ; DMSO- $d_6$ ; 300 MHz):** 7,56 (dd; 1H; H4), 7,44 (d; 1H;  $J_{\text{H2, H4}} = 2,0$  Hz; H2), 7,03 (d; 1H;  $J_{\text{H5, H4}} = 8,5$  Hz; H5), 3,81 (s; 3H; C1-CH $_3$ ), 3,79 (s; 3H; C6-CH $_3$ ).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ; DMSO- $d_6$ ; 75 MHz):** 167,2 (C3-COOH), 152,6 (C6), 148,3 (C1), 123,2 (C4), 122,9 (C3), 111,9 (C2), 111,0 (C5), 55,6 (C1-OCH $_3$ ), 55,4 (C6-OCH $_3$ ).



FNB02

### ácido 3-metoxi-4-(fenilmetoxi)-benzóico

Sólido branco

**F.F.:** 169,2-171,7°C (Lit.: 171,0-172°C HEY; LOBO, 1954)

**Rendimento:** 46% - 0,44 g (1,8 mmol) a partir de 0,95 g (3,92 mmol)

**F.M.:** C $_{15}$ H $_{14}$ O $_4$       **M.M.:** 258,27 g.mol $^{-1}$

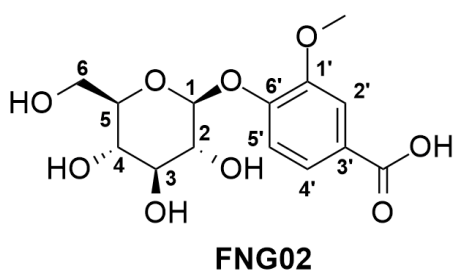
**Rf:** 0,41 (hexano e acetato de etila 6,0:4,0 v/v)

**clogP:** 3,65  $\pm$  0,26    **clogD:** 0,85 (pH 7,4)

**IV ( $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ , cm $^{-1}$ ):** 3006 (O-H), 2831 (C-H), 1670 (C=O), 1583 (C=C ar), 1226 (C-O-C).

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ; DMSO- $d_6$ ; 300 MHz):** 7,55 (d; 1H;  $J_{\text{H}_4, \text{H}_5} = 8,3$  Hz; H4), 7,47 (d; 1H;  $J_{\text{H}_2, \text{H}_4} = 1,6$  Hz; H2), 7,44-7,33 (m; 5H; H2', H3', H4', H5' e H6') 7,13 (d; 1H; H5), 5,15 (s; 2H; H7), 3,80 (s; 3H; C1- $\text{CH}_3$ ).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ; DMSO- $d_6$ ; 75 MHz):** 167,2 (C3- $\text{COOH}$ ), 151,7 (C6), 148,7 (C1), 136,6 (C1'), 128,5 (C3' e C5'), 128,1 (C4'), 128,0 (C2' e C6'), 123,3 (C4), 123,1 (C3), 112,5 (C2), 112,3 (C5), 69,9 (C7), 55,6 (C1-O- $\text{CH}_3$ ).



**$\beta$ -D-glicopiranosídeo de 4-carboxi-2-metoxifenila**

sólido branco

**F.F.:** 199,4-202°C

**Rendimento:** 72% - 0,431 g (0,86 mmol) a partir de 0,6 g (1,2 mmol)

**F.M.:**  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_9$       **M.M.:** 330,29 g.mol $^{-1}$

**Rf:** 0,32 (acetato de etila e metanol 6,5:3,5 v/v)

**clogP:** -0,91  $\pm$  0,36    **clogD:** -3,77(pH 7,4)

**$[\alpha]_D$**  -60,4 (c 0,5,  $\text{CH}_3\text{OH}$ )

**IV ( $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3416 (O-H), 2884 (C-H), 1689 (C=O), 1509 (C=C ar), 1270 (C-O-C).

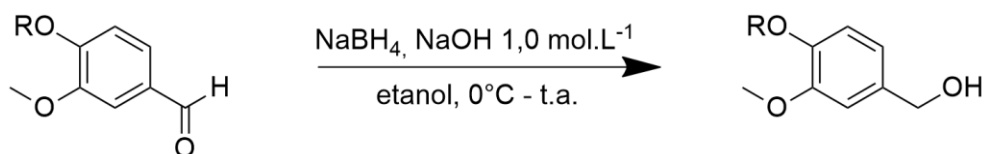
**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ; DMSO- $d_6$ ; 300 MHz)\*:** 7,51 (dd; 1H;  $J_{\text{H}_4', \text{H}_5'} = 8,5$  Hz;  $J_{\text{H}_4', \text{H}_2'} = 1,9$  Hz; H4'), 7,47 (d; 1H; H2'), 7,15 (d; 1H; H5'), 5,31 (sl; 1H; H sacarídico), 5,10 (sl; 1H; H sacarídico), 5,03 (d; 1H;  $J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 7,4$  Hz; H1), 4,55 (sl; 1H; H sacarídico), 3,81 (s; 3H; C1'-O $\text{CH}_3$ ), 3,66 (d; 1H;  $J_{\text{H}} = 11,4$  Hz; H6a), 3,47-3,28 (m; 7H; H sacarídicos).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ; DMSO- $d_6$ ; 75 MHz)\*:** 167,1 (C3'- $\text{COOH}$ ), 150,3 (C6'), 148,5 (C1'), 124,1 (C3'), 122,9 (C4'), 114,3 (C5'), 112,7 (C2'), 99,5 (C1), 77,1 (C5), 76,9 (C3), 73,2 (C2), 69,6 (C4), 60,6 (C6), 55,6 (C1'-O $\text{CH}_3$ ).

\*Atribuído segundo Sakushima; Coskun; Maoka (1995).

### 3.1.5 Método geral para as reações de redução via boridreto de sódio (adaptado de Mochalov et al., 2016; Ward; Rhee, 1989)

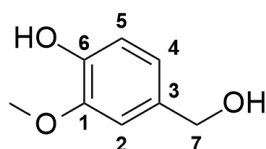
Figura 20 - Reação de redução com boridreto de sódio.



Fonte: Da autora.

Em um balão de fundo redondo de 50,0 mL adicionou-se o derivado a ser reduzido (1,0 eq.) e etanol (2,0 mL). Deixou-se em agitação magnética até solubilização do aldeído, sob banho de gelo. Em seguida, foi adicionado boridreto de sódio (1,0 eq.) solubilizado em NaOH 1,0 mol.L<sup>-1</sup> (1,0 mL), gota a gota, durante 10 minutos. Após esse tempo a reação foi deixada a temperatura ambiente e foi acompanhada por CCD com hexano e acetato de etila (7,0;3,0; v/v) como eluente. Após o término da reação, colocou-se novamente o balão em banho de gelo e adicionou-se HCl 20% (v/v) gota a gota, até pH 2,0. A reação foi deixada sob agitação magnética em banho de gelo por mais 10 minutos. Em seguida, quando houve a formação de um sólido, filtrou-se a vácuo a mistura reacional lavando-se o sólido com água gelada e o produto foi mantido em dessecador. Quando não foi formado o sólido, o solvente da reação foi eliminado em evaporador rotatório, o resíduo foi ressuspendido em água destilada e extraído com diclorometano e, logo após, lavou-se a fase orgânica com uma solução saturada de cloreto de sódio. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, o sal retirado por filtração simples e o produto final obtido após eliminação do solvente em rotaevaporador.

3.1.5.1 Dados de caracterização dos produtos reduzidos **FN03**, **FNM03**, **FNB03** e **FNG03**



**FN03**

**4-hidroxi-3-metoxi-benzenometanol**

Sólido branco

**F.F.:** 114,3-116,0°C (Lit.: 114-115°C; PEARL, 1946)

**Rendimento:** 33% - 0,165 g (1,1 mmol) a partir de 0,500 g (3,3 mmol)

**F.M.:** C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>      **M.M.:** 154,16 g.mol<sup>-1</sup>

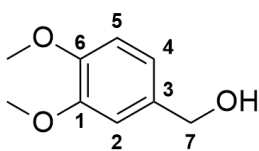
**Rf:** 0,28 (hexano e acetato de etila 6,0:4,0 v/v)

**clogP:** 0,00 ± 0,24

**IV** ( $\bar{\nu}$  máx, cm<sup>-1</sup>): 3438 (O-H), 2943 (C-H), 1510 (C=C ar), 1232 (C-O-C).

**RMN de <sup>1</sup>H** ( $\delta$ ; DMSO-*d*<sub>6</sub>; 300 MHz): 6,86 (s; 1H; H<sub>2</sub>), 6,70-6,69 (m; 2H; H<sub>4</sub> e H<sub>5</sub>), 4,36 (s; 2H; H<sub>7</sub>), 3,73 (s, 3H, C1-OCH<sub>3</sub>).

**RMN de <sup>13</sup>C** ( $\delta$ ; DMSO-*d*<sub>6</sub>; 75 MHz): 147,9 (C<sub>1</sub>), 145,7 (C<sub>6</sub>), 133,8 (C<sub>4</sub>), 119,8 (C<sub>3</sub>), 115,5 (C<sub>5</sub>), 111,6 (C<sub>2</sub>), 63,6 (C<sub>7</sub>), 56,0 (C1-OCH<sub>3</sub>).



**FNM03**

**3,4-dimetoxi-benzenometanol**

Óleo amarelo claro

**Rendimento:** 62% - 1,260 g (7,5 mmol) a partir de 2,0 g (12,0 mmol)

**F.M.:** C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>      **M.M.:** 168,19 g.mol<sup>-1</sup>

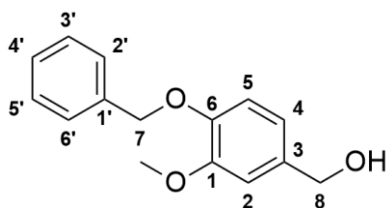
**Rf:** 0,31 (hexano e acetato de etila 6,0:4,0 v/v)

**clogP:** 0,77 ± 0,25

**IV** ( $\bar{\nu}$  máx, cm<sup>-1</sup>): 3480 (O-H), 2937 (C-H), 1513 (C=C ar), 1257 (C-O-C).

**RMN de <sup>1</sup>H** ( $\delta$ ; CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz): 6,83-6,73 (m; 3H; H<sub>2</sub>, H<sub>4</sub> e H<sub>5</sub>), 4,51-4,49 (m; 2H; H<sub>7</sub>), 3,79 (s; 6H; C1-OCH<sub>3</sub> e C6-OCH<sub>3</sub>), 2,69-2,66 (m; 1H; C7-OH).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ;  $\text{CDCl}_3$ ; 75 MHz):** 148,8 (C1), 148,3 (C6), 133,5 (C3), 119,2 (C4), 110,9 (C2), 110,3 (C5), 64,8 (C7), 55,7 (C1-O $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 55,6 (C6-O $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ).



**FNB03**

**2-(4-(benzoxi)-3-metoxifenil)metanol**

Sólido branco

**F.F.:** 72,5-75,3°C (Lit.: 70,0 - 71,0°C ALLAIS; PLA; DUCROT, 2011)

**Rendimento:** 82% - 0,14 g (0,5 mmol) a partir de 0,2 g (0,8 mmol)

**F.M.:**  $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_3$       **M.M.:** 244,29  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

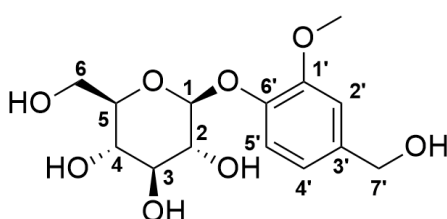
**Rf:** 0,48 (hexano e acetato de etila 6,0:4,0 v/v)

**clogP:** 2,43  $\pm$  0,26

**IV ( $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3390 (O-H), 2931(C-H), 1513 (C=C ar), 1226 (C-O-C).

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ;  $\text{DMSO}-d_6$ ; 300 MHz):** 7,45-7,31 (m; 5H; H2', H3', H4', H5' e H6'), 6,97-6,94 (m; 2H; H2 e H5), 6,79 (dd; 1H;  $J_{\text{H}_4, \text{H}_2} = 1,9$  Hz;  $J_{\text{H}_4, \text{H}_5} = 8,3$  Hz; H4), 5,11 (t; 1H;  $J_{\text{OH}, \text{H}_8} = 5,73$  Hz; C8H $\underline{2}\text{O}\underline{\text{H}}$ ), 5,05 (s; 2H; H7), 4,42 (d; 2H;  $J_{\text{H}_8, \text{OH}} = 5,7$  Hz; H8), 3,76 (s; 3H; C1- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ;  $\text{DMSO}-d_6$ ; 75 MHz):** 149,1 (C1), 148,6 (C6), 137,4 (C1'), 135,6 (C3), 128,4 (C3' e C5'), 127,8 (C4'), 127,8 (C2' e C6'), 118,6 (C4), 113,6 (C2), 110,9 (C5), 70,1 (C7), 62,8 (C8), 55,5 (C1-O- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ).



**FNG03**

**$\beta$ -D-glicopiranosídeo de 4-(hidroximetil)-2-metoxifenila**

sólido branco

**F.F.:** 118,1-119,1°C (Lit.: 119,0-121,0°C EL-GHAZOLY et al., 2003)

**Rendimento:** 93% - 0,153 g (0,5 mmol) a partir de 0,163 g (0,52 mmol)

**F.M.:**  $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_8$       **M.M.:** 316,30  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**Rf:** 0,64 (acetato de etila e metanol 6,5:3,5 v/v)

**clogP:** -2,23  $\pm$  0,35

**$[\alpha]_D$**  -50,4 ( $c$  0,5,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ) (Lit. -47,7; KOIKE et al., 2010)

**IV** ( $\bar{\nu}$  máx,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3542 (O-H livre), 3266 (O-H), 2918 (C-H), 1510 (C=C ar), 1264 (C-O-C).

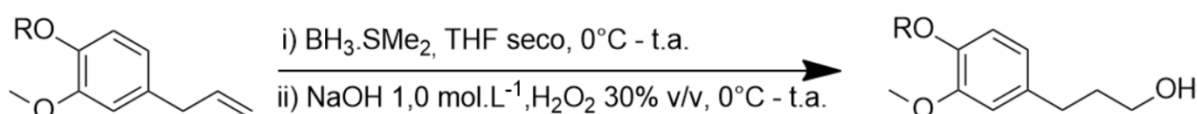
**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ; DMSO- $d_6$ ; 300 MHz)\*:** 7,02 (d; 1H;  $J_{\text{H}5', \text{H}4'} = 8,3$  Hz; H5'), 6,93 (d; 1H;  $J_{\text{H}2', \text{H}4'} = 1,8$  Hz; H2'), 6,79 (dd; 1H; H4'), 5,19 (d; 1H;  $J_{\text{H}} = 4,5$  Hz; H sacarídico), 5,10 (t; 1H;  $J_{\text{H}} = 5,7$  Hz; C7'-OH), 5,05 (d; 1H;  $J_{\text{H}} = 3,7$  Hz; H sacarídico), 4,99 (d; 1H;  $J_{\text{H}} = 4,4$  Hz; H sacarídico), 4,86 (d; 1H;  $J_{\text{H}1, \text{H}2} = 7,2$  Hz; H1), 4,51 (t; 1H;  $J_{\text{H}} = 5,7$  Hz; H sacarídico), 4,41 (d; 2H;  $J_{\text{H}7', \text{OH}} = 5,6$  Hz; H7'), 3,75 (s; 3H; C1'-OCH<sub>3</sub>), 3,66 (dd; 1H;  $J_{\text{H}} = 4,0$  Hz;  $J_{\text{H}} = 11,2$  Hz; H6b), 3,49-3,45 (m; 1H; H6a), 3,30-3,15 (m; 4H; H2, H3, H4 e H5).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ; DMSO- $d_6$ ; 75 MHz)\*:** 148,8 (C1'), 145,3 (C6'), 136,4 (C3'), 118,6 (C4'), 115,3 (C5'), 111,1 (C2'), 100,3 (C1), 77,0 (C3), 76,9 (C5), 73,3 (C2), 69,8 (C4), 62,8 (C7'), 60,7 (C6), 55,6 (C1'-OCH<sub>3</sub>).

\*Atribuído segundo Koike *et al.* (2010).

### 3.1.6 Método geral de reação de oxidação via dimetilsulfeto de borana (adaptado de Barbosa *et al.*, 2012; Hemelaere; Carreaux; Carboni, 2015; Pepper; Sundaram; Dyson, 1971)

Figura 21 - Reação de hidroboração/oxidação.

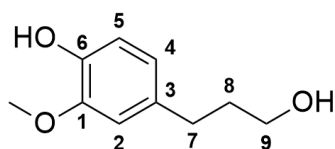


Fonte: Da autora.

Em um balão de fundo redondo de 50,0 mL foi adicionada a substância a ser oxidada (1,0 eq.), vedou-se o balão com septo de borracha e fez-se atmosfera de argônio. Em seguida, adicionou-se tetraidrofurano seco (15,0 mL) com auxílio de seringa. Deixou-se sob agitação magnética em banho de gelo e atmosfera inerte por 10 minutos para adequação da temperatura. Depois, foi adicionado dimetilsulfeto de borana (2,0 eq.) gota a gota via seringa. Após a adição, a mistura reagente ficou por uma hora sob agitação em banho de gelo, seguida da retirada do banho gelo, ficando por mais uma hora à temperatura ambiente. Completadas as duas horas, o balão foi novamente resfriado em banho de gelo, retirou-se a atmosfera de argônio e

procedeu-se com a adição de NaOH 1,0 mol.L<sup>-1</sup> (16,0 mL), gota a gota, tendo cuidado com efervescência, seguida da adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% v/v (20,0 mL), da mesma forma. A mistura reacional permaneceu por mais 30 minutos em banho de gelo, sob agitação, e uma hora a temperatura ambiente. Terminada a reação, procedeu-se com a extração do produto com éter etílico e, logo após, lavou-se a fase orgânica com uma solução saturada de cloreto de sódio. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, o sal retirado por filtração simples, e o produto concentrado em rotaevaporador. A purificação foi realizada por CCS com hexano e acetato de etila (7,0:3,0; v/v) como eluente.

### 3.1.6.1 Dados de caracterização dos produtos oxidados **FN04**, **FNM04**, **FNB04** e **FNG04**



**FN04**

#### **4-(3-hidroxiopropil)-2-metoxifenol**

Óleo amarelo

**Rendimento:** 74% - 0,88 g (4,8 mmol) a partir de 1,06 g (6,5 mmol)

**F.M.:** C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>      **M.M.:** 182,22 g.mol<sup>-1</sup>

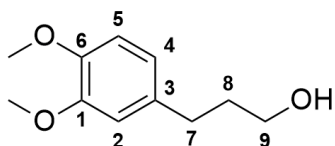
**Rf:** 0,17 (hexano e acetato de etila 7,0:3,0 v/v)

**clogP:** 0,85 ± 0,23

**IV** ( $\bar{\nu}_{\text{máx}}$  cm<sup>-1</sup>): 3374 (O-H), 2934 (C-H), 1513 (C=C ar), 1267 (C-O-C).

**RMN de <sup>1</sup>H** ( $\delta$ ; CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz): 6,81 (d; 1H;  $J_{\text{H5}, \text{H4}} = 7,8$  Hz; H5), 6,69-6,66 (m; 2H; H2 e H4), 5,69 (s; 1H; C6OH), 3,84 (s; 3H; C1-CH<sub>3</sub>); 3,65 (t; 2H;  $J_{\text{H9}, \text{H8}} = 6,4$  Hz; H9), 2,62 (t; 2H;  $J_{\text{H7}, \text{H8}} = 7,7$  Hz; H7), 1,90-1,80 (m; 3H; H8 e C9OH).

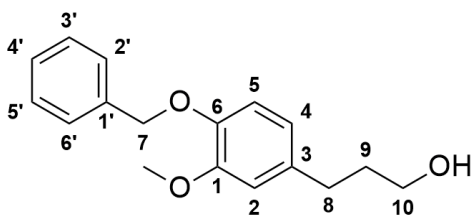
**RMN de <sup>13</sup>C** ( $\delta$ ; CDCl<sub>3</sub>; 75 MHz): 146,4 (C1), 143,6 (C6), 133,7 (C3), 120,8 (C4), 114,3 (C5), 111,0 (C2), 62,2 (C9), 56,8 (C1-O-CH<sub>3</sub>), 34,4 (C8), 31,7 (C7).



FNM04

**3-(3,4-dimetoxifenil)-propan-1-ol**

Óleo amarelo

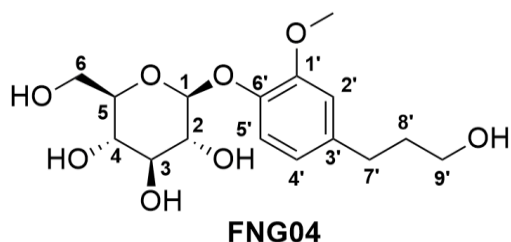
**Rendimento:** 76% - 0,82 g (4,2 mmol) a partir de 1,08 g (5,5 mmol)**F.M.:** C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>      **M.M.:** 196,24 g.mol<sup>-1</sup>**Rf:** 0,15 (hexano e acetato de etila 8,0:2,0 v/v)**clogP:** 1,62 ± 0,24**IV** ( $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ , cm<sup>-1</sup>): 3374 (O-H), 2934 (C-H), 1513 (C=C ar), 1232 (C-O-C).**RMN de <sup>1</sup>H** ( $\delta$ ; CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz): 6,78-6,70 (m; 3H; H<sub>2</sub>, H<sub>4</sub> e H<sub>5</sub>), 3,84 (s; 3H; C1-OCH<sub>3</sub>), 3,83 (s; 3H; C6-OCH<sub>3</sub>), 3,64 (t; 2H;  $J_{\text{H}_9, \text{H}_8} = 6,4$  Hz; H<sub>9</sub>), 2,63 (t; 2H;  $J_{\text{H}_7, \text{H}_8} = 7,7$  Hz; H<sub>7</sub>), 1,90-1,80 (m; 3H; H<sub>8</sub> e C9OH).**RMN de <sup>13</sup>C** ( $\delta$ ; CDCl<sub>3</sub>; 75 MHz): 148,8 (C1), 147,1 (C6), 134,4 (C3), 120,1 (C4), 111,7 (C5), 111,2 (C2), 62,1 (C9), 56,8 (C1-O-CH<sub>3</sub>), 56,7 (C6-O-CH<sub>3</sub>), 34,3 (C8), 31,6 (C7).

FNB04

**3-metoxi-4-fenilmetoxi-benzenopropanol**

Sólido amarelo

**F.F.:** 53,6-55,8°C**Rendimento:** 83% - 0,134 g (0,5 mmol) a partir de 0,153 g (0,6 mmol)**F.M.:** C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>      **M.M.:** 272,34 g.mol<sup>-1</sup>**Rf:** 0,86 (hexano e acetato de etila 8,0:2,0 v/v)**clogP:** 3,27 ± 0,25**IV** ( $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ , cm<sup>-1</sup>): 3552 (O-H), 2835 (C-H), 1511(C=C ar), 1218 (C-O-C).**RMN de <sup>1</sup>H** ( $\delta$ ; CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz): 7,44-7,25 (m; 5H; H<sub>2'</sub>, H<sub>3'</sub>, H<sub>4'</sub>, H<sub>5'</sub> e H<sub>6'</sub>), 6,80 (d; 1H;  $J_{\text{H}_5, \text{H}_4} = 8,1$  Hz; H<sub>5</sub>), 6,74 (d; 1H;  $J_{\text{H}_2, \text{H}_4} = 2,0$  Hz; H<sub>2</sub>), 6,66 (dd; 1H; H<sub>4</sub>), 5,11 (s; 2H; H<sub>7</sub>), 3,87 (s; 3H; C1-OCH<sub>3</sub>), 3,64 (t; 2H;  $J_{\text{H}_{10}, \text{H}_9} = 6,42$  Hz; H<sub>10</sub>), 2,63 (t; 2H;  $J_{\text{H}_8, \text{H}_9} = 7,71$  Hz; H<sub>8</sub>), 1,90-1,81 (m, 2H, H<sub>9</sub>).**RMN de <sup>13</sup>C** ( $\delta$ ; CDCl<sub>3</sub>; 75 MHz): 149,6 (C1), 146,6 (C6), 137,4 (C1'), 135,2 (C3), 128,5 (C3' e C5'), 127,8 (C4'), 127,3 (C2' e C6'), 120,3 (C4), 114,3 (C5), 112,4 (C2), 71,2 (C7), 62,2 (C10), 56,0 (C1-O-CH<sub>3</sub>), 34,3 (C9), 31,7 (C8).



**$\beta$ -D-glicopiranosídeo de 4-(3-hidroxiopropil)-2-metoxifenila**

Sólido bege

**F.F.:** 114,0-117,0°C (Lit.: 117,0-119,0°C MAZUR et al., 2007)

**Rendimento:** 70% - 0,18 g (0,35 mmol) a partir de 0,25 g (0,5 mmol)

**F.M.:** C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>O<sub>8</sub>      **M.M.:** 344,36 g.mol<sup>-1</sup>

**Rf:** 0,65 (acetato de etila e metanol 6,5:3,5 v/v)

**clogP:** -1,38 ± 0,34

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub>** -43,0 (c 0,5, CH<sub>3</sub>OH)

**IV ( $\bar{\nu}$  máx, cm<sup>-1</sup>):** 3364 (O-H), 2904 (C-H), 1513 (C=C ar), 1257 (C-O-C).

**RMN de <sup>1</sup>H ( $\delta$ ; DMSO-d<sub>6</sub>; 300 MHz)\*:** 6,96 (d; 1H;  $J_{H5', H4'} = 8,3$  Hz; H5'), 6,79 (d; 1H;  $J_{H2', H4'} = 1,9$  Hz; H2'), 6,65 (dd; 1H; H4'), 5,15 (d; 1H;  $J_H = 4,5$  Hz; H sacarídico), 5,03 (d; 1H;  $J_H = 3,15$  Hz; H sacarídico), 4,97 (d; 1H;  $J_H = 5,04$  Hz; H sacarídico), 4,82 (d; 1H;  $J_{H1, H2} = 7,32$  Hz; H1), 4,52-4,43 (m; 2H; H sacarídico e C9'OH), 3,73 (s; 3H; C1'-OCH<sub>3</sub>), 3,65 (dd; 1H;  $J_H = 4,59$  Hz;  $J_H = 10,63$  Hz; H6b), 3,44-3,39 (m; 3H; H9' e H6a), 3,28-3,13 (m; 4H; H2, H3, H4 e H5), 2,55-2,49 (m; 2H; H7'), 1,73-1,63 (m; 2H; H8').

**RMN de <sup>13</sup>C ( $\delta$ ; DMSO-d<sub>6</sub>; 75 MHz)\*:** 148,9 (C1'), 144,6 (C6'), 137,0 (C3'), 120,1 (C4'), 115,4 (C5'), 112,9 (C2'), 100,3 (C1), 77,0 (C5), 76,9 (C3), 73,3 (C2), 69,7 (C4), 60,7 (C6), 60,1 (C9'), 55,6 (C1'-OCH<sub>3</sub>), 34,6 (C8'), 31,2 (C7').

\*Atribuído segundo Miyagawa et al. (2014).

### 3.2 AVALIAÇÃO *in vitro* DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ECA

A avaliação da atividade enzimática *in vitro* foi realizada no laboratório de Bioquímica Básica da UNIFAL-MG, sob a orientação da Profa. Dra. Marília Gabriella Alves Goulart Pereira. Foram testadas as dezoito substâncias obtidas sinteticamente, além dos precursores eugenol e vanilina. O método empregado foi baseado no descrito por Friedland e Silverstein (1976), adaptado por Pereira e colaboradores (2010).

Neste estudo, plasma de ratos Wistar foi empregado como fonte da enzima ECA. Os substratos Hip-His-Leu (hipuril-L-histidil-L-leucina) e His-Leu (L-histidil-L-leucina), assim como os demais reagentes utilizados, foram adquiridos comercialmente (Sigma-Aldrich®).

Foram preparadas soluções estoques das substâncias avaliadas na concentração de  $10,0 \text{ mmol.L}^{-1}$  em água ultrapura MilliQ® contendo 5,0% (v/v) de DMSO. Essa solução foi usada para os testes de triagem e, partir dela, foram realizadas diluições a fim de se obterem as concentrações necessárias para a aquisição dos valores de  $\text{CI}_{50}$ . Para a investigação desse parâmetro foram selecionadas as substâncias que foram ativas estatisticamente e que, ainda, inibissem ao menos 60% da atividade enzimática.

### 3.2.1 Ensaios de triagem das substâncias a concentração fixa

A análise foi iniciada pela incubação de  $31,0 \mu\text{L}$  da solução preparada para cada substância em teste com  $30,0 \mu\text{L}$  de plasma e  $94,0 \mu\text{L}$  de tampão borato de sódio a  $0,4 \text{ mol.L}^{-1}$  (pH 8,3), contendo NaCl e sacarose a 0,9% e  $0,32 \text{ mol.L}^{-1}$ , por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Nessa solução, após diluição, a concentração final das substâncias em teste foi de  $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Na sequência, à mistura formada por plasma, substância em teste e tampão foram adicionados  $6,7 \mu\text{L}$  do substrato Hip-His-Leu a  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  e a mistura incubada novamente por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . O controle negativo da reação foi preparado com o mesmo tampão, plasma e substrato, seguido de incubação nas mesmas condições. O controle positivo foi preparado nas mesmas condições, utilizando o captopril a  $10,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$  como inibidor.

A reação enzimática foi finalizada com a adição de  $360,0 \mu\text{L}$  de NaOH  $0,34 \text{ mol.L}^{-1}$ . Após a finalização da reação, adicionou-se  $30,0 \mu\text{L}$  de *orto*-ftaldeído em metanol (100mg/mL), e, após 10 minutos,  $60,0 \mu\text{L}$  de HCl  $3 \text{ mol.L}^{-1}$ .

As misturas resultantes foram homogeneizadas em agitador tipo vortex e os valores de fluorescência obtidos em fluorímetro operando com comprimento de onda para excitação de 365 nm e emissão de 495 nm (Cary Eclipse, Varian®).

A curva padrão para His-Leu (0-80 nmol) foi preparada nas mesmas condições do ensaio.

As medidas foram realizadas em duplicatas e são oriundas de três experimentos independentes. Os resultados obtidos em nmol de His-Leu/min/mL de plasma foram convertidos em porcentagem de atividade enzimática, tomando-se por 100 % de atividade a absorbância obtida com o controle negativo.

### **3.2.2 Determinação da Concentração Inibitória de 50% da atividade enzimática (CI<sub>50</sub>)**

As soluções estoques das amostras selecionadas após a triagem foram diluídas de forma a obterem-se soluções com concentrações no intervalo de 0 a 4 mmol.L<sup>-1</sup>. Estas foram tratadas da mesma forma descrita no procedimento de triagem.

O cálculo do CI<sub>50</sub> foi realizado a partir da equação da reta do gráfico de regressão linear da porcentagem de inibição da ECA pela concentração das substâncias testes.

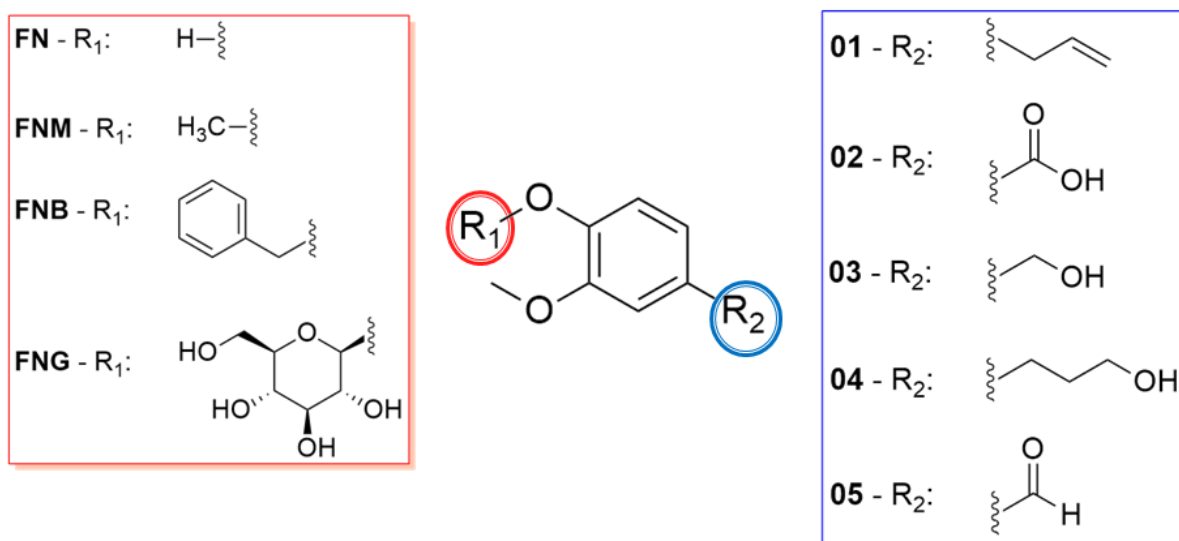
### **3.2.3 Análise estatística**

Os dados quantitativos foram apresentados como a média ± desvio padrão (DP). Diferenças estatísticas foram determinadas de acordo com a análise de variância *one-way* ANOVA, seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Dunnett e de Tukey, tendo como nível de confiança 95% e de significância 0,05.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diante do exposto anteriormente, foi proposta a síntese de uma série de substâncias tendo por base a exploração de duas regiões presentes nos fenóis naturais de partida, eugenol e vanilina: a hidroxila fenólica e o grupo posicionado *para* em relação a ela (FIGURA 22). Desse modo, foram propostas variações referentes ao volume e hidrofobia dos grupos inseridos nestas posições. Esta exploração estrutural poderia apontar os requisitos mais apropriados para uma afinidade adequada entre o inibidor e a ECA.

Figura 22 – Modificações propostas para obtenção de candidatos a iECA.



Fonte: Da autora.

A partir da obtenção e caracterização das substâncias propostas, foram realizados os testes de inibição da ECA *in vitro* com intuito de avaliar a capacidade de inibir a enzima em questão. As substâncias para as quais se encontrou inibição significativa foram avaliadas quanto ao seu valor de CI<sub>50</sub>. Dessa forma, foi possível estabelecer relações iniciais entre os substituintes empregados e a atividade observada.

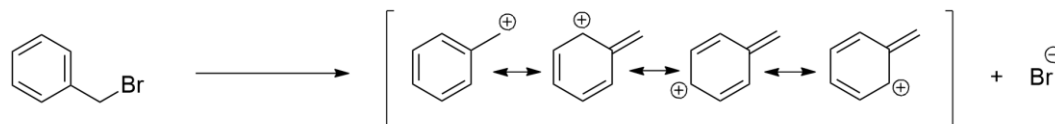
## 4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS PROPOSTOS

### 4.1.1 Síntese dos derivados FNB01 e FNB05

A reação de benzilação do eugenol e da vanilina, para formação do **FNB01** e **FNB05**, respectivamente, foi realizada conforme descrito por Wang e colaboradores (2014). A escolha desse método deve-se à utilização de condições mais brandas para que a reação ocorra, em comparação com outros métodos descritos na literatura, nos quais se empregam bases fortes e altas temperaturas, o que muitas vezes não condiz com a estabilidade das substâncias envolvidas. A reação teve duração média de 2 horas.

O mecanismo proposto para essa reação encontra-se ilustrado na figura 23. Essa reação possivelmente ocorre por um mecanismo de substituição nucleofílica unimolecular ( $S_N1$ ), pelo qual há a formação de um carbocátion benzílico, pela perda de brometo a partir do brometo de benzila. A formação desse carbocátion é possível visto que o mesmo é estabilizado por efeito de ressonância com os elétrons das ligações  $\pi$  do anel aromático. Em seguida, o fenóxido formado da desprotonação do material de partida, em meio básico, faz um ataque nucleofílico ao carbono benzílico do carbocátion. Esse ataque leva à formação do éter respectivo. Os produtos obtidos passam a conter, então, um grupo lipofílico de alto volume, o que poderá influenciar na sua atividade frente à enzima, bem como em suas características farmacocinéticas (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012).

Figura 23 – Mecanismo proposto para a reação de benzilação.

**Etapa 1:****Etapa 2:****Etapa 3:**

Fonte: Da autora.

Ao se observar o espectro de absorção no IV da substância **FNB01** demonstrado na Figura 39 (p. 87), notam-se bandas entre 2830-3061  $\text{cm}^{-1}$  referentes aos estiramentos de ligações C-H. Os estiramentos relativos às absorções dos anéis aromáticos estão representados em 1508-1589  $\text{cm}^{-1}$ . Os grupos éter geram bandas em 1137-1258  $\text{cm}^{-1}$ , relativas ao estiramento C-O.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , Figura 40 (p. 88), da substância **FNB01**, podem ser observados os hidrogênios do anel aromático da molécula precursora nos sinais a  $\delta$  6,85, onde observa-se um duplete equivalente ao H5 que acopla-se com o H4, o qual observa-se como um duplo duplete a  $\delta$  6,69, e o sinal do H2, que também acopla-se com o H4, como um duplete a  $\delta$  6,77. O sinal dos hidrogênios da metoxila estão representados como um simpleto a  $\delta$  3,90. A cadeia alílica está representada nos multipletos entre  $\delta$  5,92 a  $\delta$  6,05 equivalente ao H9, e entre  $\delta$  5,07 a  $\delta$  5,14 referente ao H10, sendo os hidrogênios que possuem dupla ligação, o hidrogênio H8 encontra-se representado no duplete a  $\delta$  3,35. Por fim, confirma-se que a reação foi bem sucedida pela presença do sinal dos hidrogênios do grupo benzílico H7 no simpleto a  $\delta$  5,15 e pelos sinais de hidrogênios aromáticos equivalentes aos H2', H3', H4', H5' e H6' na região entre  $\delta$  7,48 a  $\delta$  7,31.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **FNB01**, Figura 41 (p. 89), notam-se os sinais referentes à cadeia alílica onde em  $\delta$  39,7 está o sinal referente ao C8, e

em  $\delta$  137,5 e em  $\delta$  115,5 os sinais do C9 e do C10, respectivamente. O sinal do carbono da metoxila encontra-se a  $\delta$  55,8. Os carbonos do anel aromático ligados diretamente ao oxigênio estão representados nos sinais em  $\delta$  149,6 e em  $\delta$  146,5, sendo o C1 e o C6, nesta ordem. Os sinais do C2 encontra-se a  $\delta$  114,2, do C3 a  $\delta$  133,2, do C4 a  $\delta$  120,3, C5 a  $\delta$  112,4. O C7 do grupo benzílico adicionado é observado no sinal a  $\delta$  71,1 e os demais sinais do anel aromático desse grupo são notados nos sinais a  $\delta$  137,5 do C1',  $\delta$  128,4 dos carbonos C3' e C5', a  $\delta$  127,6 do C4' e a  $\delta$  127,1 dos carbonos C1' e C6'.

No subespectro de DEPT-135, confirmam-se as atribuições feitas, mostrando três sinais de carbonos metilênicos em fase oposta equivalentes aos carbonos C8, C7 e C10 (FIGURA 42, p. 90).

No caso da substância **FNB05** observa-se em seu espectro no IV, demonstrado na figura 43 (p. 91), as bandas em comum com **FNB01** e, como maior diferencial, a banda em  $1677\text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento da ligação C=O de aldeídos. Como esperado, a banda para OH fenólica está ausente.

Da mesma forma ao observado para a substância **FNB01**, no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **FNB05**, podem ser observados os hidrogênios do anel aromático da molécula precursora e do grupo benzílico adicionado na região de  $\delta$  7,44 a  $\delta$  6,97. O sinal do H7 do grupo benzílico é observado no simpleto a  $\delta$  5,22 e o sinal dos hidrogênios metoxílicos a  $\delta$  3,92. Diferente do anterior nota-se o sinal a  $\delta$  9,82 atribuído ao hidrogênio ligado diretamente à carbonila, característico de grupo aldeído (FIGURA 44, p. 92).

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **FNB05**, Figura 45 (p. 93), o sinal do carbono do grupo aldeído é notado a  $\delta$  190,8. Os sinais referentes aos carbonos aromáticos do precursor e do grupo benzílico adicionado encontram-se na região esperada e semelhante ao mostrado para a substância anterior. O sinal a  $\delta$  70,8 representa o C7 do grupo benzílico adicionado e o sinal do carbono da metoxila encontra-se a  $\delta$  56,0.

#### 4.1.2 Síntese dos derivados FNM01 e FNM05

A reação de *O*-metilação foi empregada para obtenção dos produtos **FNM01** e **FNM05**, tendo o eugenol e a vanilina como precursores. O método empregado foi descrito por Coolen et al. (1995), sendo uma forma clássica para obtenção de derivados metilados. A duração média da reação foi de cinco horas.

Na figura 24 encontra-se demonstrado o mecanismo proposto para a reação, sendo uma substituição nucleofílica bimolecular ( $S_N2$ ). Primeiramente ocorrerá a desprotonação da hidroxila fenólica pela base presente no meio, o carbonato de potássio, auxiliado pelo solvente polar aprótico presente. O fenóxido formado faz um ataque nucleofílico ao iodeto de metila, ocorrendo uma heterólise da ligação entre carbono e iodo, o que libera o iodeto, bom grupo abandonador (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012). Dessa forma, esses fenóis têm bloqueadas suas hidroxilas e diminuída a possibilidade de efetuar ligações de hidrogênio via esta subunidade.

Figura 24 – Mecanismo proposto para a reação de *O*-metilação.

**Etapa 1:**



**Etapa 2:**



Fonte: Da autora.

Observa-se nos espectros de absorção no IV das substâncias **FNM01** e **FNM05** a ausência de bandas relativas ao estiramento de OH fenólica, indicativo de sucesso das reações (FIGURAS 47 - p. 95 e 51 - p. 99, respectivamente). Além disso, podem ser observadas bandas em 1238-1257  $\text{cm}^{-1}$  relativas a estiramentos dos grupos éter C-O.

Pelos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dessas substâncias observa-se que a reação foi bem sucedida pela presença dos sinais relativos aos hidrogênios da metoxila agora inserida. Para a substância **FNM01** observa-se dois sinais a  $\delta$  3,86 e a  $\delta$  3,85 que indicam a presença dos hidrogênios das duas metoxilas ligados a C1 e a C2, respectivamente (FIGURA 48, p. 96). Do mesmo modo, no espectro da substância **FNM05**, notam-se sinais na região de  $\delta$  3,92 equivalentes aos hidrogênios das duas metoxilas presentes, em C1 oriunda do precursor e em C6 formada após a reação (figura 52, p. 100). Os demais sinais dos hidrogênios aromáticos, cadeia alílica no caso de **FNM01** e aldeído para **FNM05** também podem ser observados, como esperado.

Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  observam-se os sinais dos carbonos das metoxilas oriundas da O-metilação em  $\delta$  55,7 para a substância **FNM01**, demonstrado na Figura 49 (p. 97), e a  $\delta$  56,0 para a substância **FNM05**, demonstrado na Figura 53 (p. 101).

#### 4.1.3 Síntese dos derivados FNG01 e FNG05

Para que seja possível realizar as reações de glicosilação, a glicose inicialmente deve passar por reações de acetilação, para que as hidroxilas fiquem protegidas nas reações subsequentes e, em seguida, reação para formar o brometo de glicosila, o qual irá possibilitar a ocorrência das reações de glicosilação.

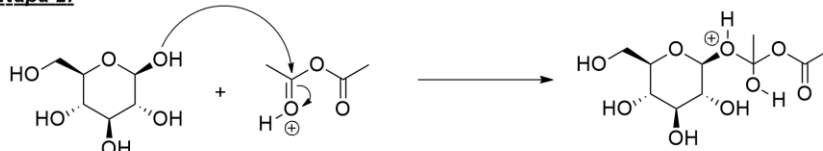
A reação de acetilação da D-glicose foi realizada a partir do que foi descrito por Deng, Gangadharmath e Chang (2006), levando à formação do derivado **GL01**. Nessa reação utiliza-se anidrido acético como reagente acilante, ácido sulfúrico como catalisador e irradiação ultrassônica, o qual leva a menores tempos de reação e não necessidade de aquecimento, em relação ao método tradicional (Conchie; Levvy; Marsch, 1957). O mecanismo proposto para tal reação encontra-se demonstrado na figura 25.

Figura 25 – Mecanismo proposto para a reação de acetilação da D-glicose.

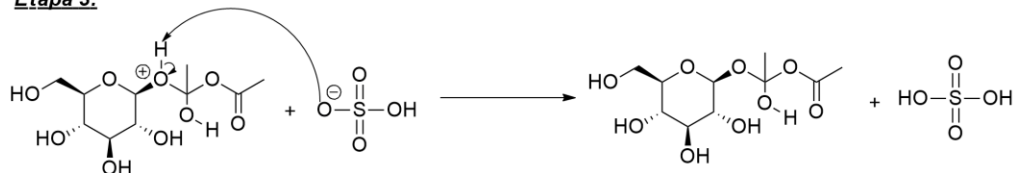
**Etapa 1:**



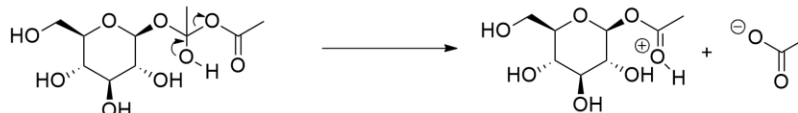
**Etapa 2:**



**Etapa 3:**



**Etapa 4:**



**Etapa 5:**



Fonte: Da autora.

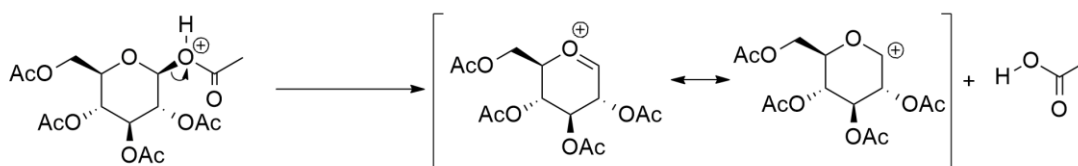
Para a formação do brometo de glicosila foi usado o método descrito por Conchie, Levvy e Marsch (1957), o qual consiste em duas etapas. A primeira etapa consiste na formação de ácido bromídrico anidro a partir de sua solução aquosa, por tratamento com anidrido acético. Em um segundo momento, essa solução foi adicionada lentamente a uma solução do monossacarídeo peracetilado, o que leva ao deslocamento do grupo acetoxila anomérico e substituição estereosseletiva por um átomo de bromo. O produto formado, **GL02**, foi obtido com elevado rendimento, sem necessidade de métodos de purificação adicionais. Na figura 26 está demonstrado o mecanismo proposto para essa reação.

Figura 26– Mecanismo proposto para formação do brometo de glicosila.

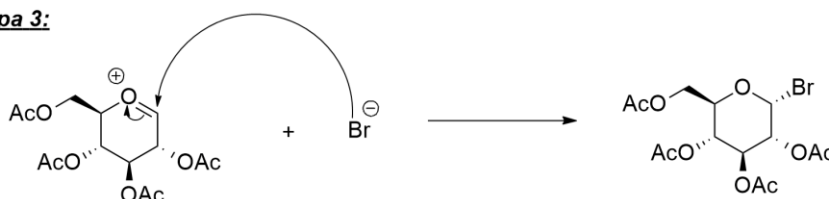
**Etapa 1:**



**Etapa 2:**



**Etapa 3:**



Fonte: Da autora.

O método empregado para a síntese dos glicosídeos a partir de fenóis foi descrito por Hongu, Saito e Tasujihara, (1999). Foram utilizados como precursores o eugenol e a vanilina para obtenção dos derivados **FNG01** e **FNG05**, respectivamente, e estes foram posteriormente usados para obtenção dos demais produtos glicosilados. Após a reação de *O*-glicosilação, os derivados passaram por uma reação de transesterificação para desproteção das hidroxilas do monossacarídeo e obtenção dos produtos finais (**FNG01** e **FNG05**), adaptado do método descrito por Conchie, Levvy e Marsch (1957). A duração média para a reação de *O*-glicosilação foi de 24 horas, com rendimentos dentro do esperado. Já a reação de desproteção teve duração média de 30 minutos e seu rendimento foi quantitativo.

O mecanismo pelo qual ocorre a reação de *O*-glicosilação, demonstrado na figura 27, é via  $S_N2$ . O fenóxido originado da desprotonação do eugenol ou da vanilina faz um ataque nucleofílico ao carbono anomérico do sacarídeo deslocando o átomo de bromo. A reação ocorre com catálise de transferência de fase, o que acelera a reação entre o reagente iônico da fase aquosa e os substratos orgânicos

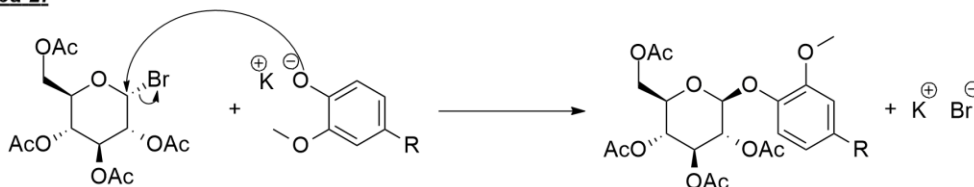
insolúveis em água presente no solvente orgânico, com isso o transferidor de fase, no caso o brometo de tetrabutilamônio, irá transferir os ânions da fase aquosa para a orgânica, na forma de pares iônicos. Na fase orgânica, estes ânions encontraram-se não solvatados (livres) e muito reativos, desempenhando, assim seu papel na reação (LANG; COMASSETO, 1988). A formação do glicosídeo na configuração  $\beta$  deve-se ao fato das reações  $S_N2$  ocorrerem com inversão de configuração, visto que o nucleófilo aproxima-se do carbono eletrofílico pelo lado oposto ao grupo abandonador, interagindo com o orbital antiligante formado pela ligação deste carbono com o bromo e isso faz com que a ligação formada seja oposta, a  $180^\circ$  da ligação rompida (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012).

Figura 27 – Mecanismo proposto para reação de O-glicosilação.

**Etapa 1:**



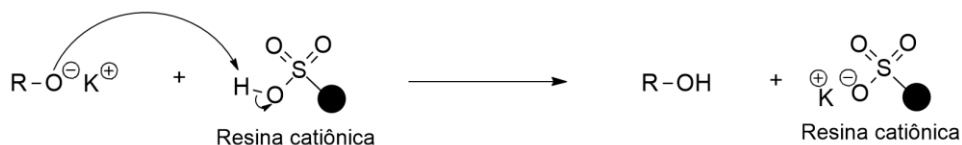
**Etapa 2:**



Fonte: Da autora.

Na figura 28 encontra-se demonstrado o mecanismo clássico de reação para a desproteção dos glicosídeos, a qual, nestas condições, também é denominada de transesterificação. O primeiro passo envolve a formação de metóxido de potássio, em uma reação ácido-base entre o metanol e o hidróxido de potássio. O ânion metóxido, por sua vez, irá desacetilar a subunidade sacarídica dos glicosídeos em um mecanismo de substituição acílica. A adição de resina catiônica ao meio reagente faz com que o intermediário polialcóxi seja finalmente protonado, o que leva aos glicosídeos desejados. (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012).

Figura 28 – Mecanismo clássico proposto para reação de desproteção.

**Etapa 1:****Etapa 2:****Etapa 3:****Etapa 4:**

Fonte: Da autora.

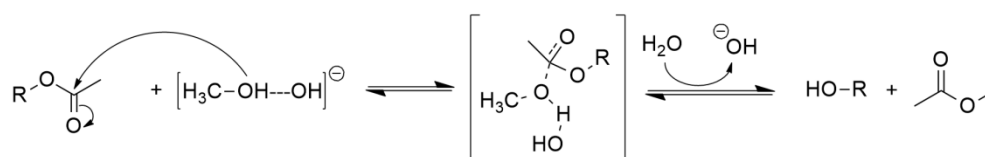
Os estudos realizados por Ren (2015) sugerem um outro mecanismo para a desproteção que envolve a formação de um complexo de ligação de hidrogênio entre a hidroxila do metanol e o ânion  $\text{OH}^-$  da base. Por esse mecanismo alguns fatores, como a presença de água no meio, não influenciaria a reação. Na figura 29 encontra-se demonstrado o mecanismo proposto, observa-se a formação de um estado de transição onde ocorre a quebra da ligação do oxigênio e a acetila, liberando o álcool, água e acetato de metila.

Figura 29 – Mecanismo proposto para reação de desproteção.

**Etapa 1:**



**Etapa 2:**



Fonte: adaptado de REN (2015).

Pela figura 55 (p. 103), na qual encontra-se demonstrado o espectro no IV da substância **FNG01**, notam-se as bandas referentes aos grupos funcionais presentes na estrutura, destacando-se a banda a  $3361 \text{ cm}^{-1}$  relativa aos estiramentos de ligações O-H da subunidade sacarídica.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  dessa substância, mostrada na figura 56 (p. 104), podemos confirmar a glicosilação pelos sinais característicos de açúcares. Os sinais a  $\delta$  5,10 e entre  $\delta$  3,69-3,18 referem-se aos hidrogênios presentes na unidade glicosídica, sendo que estes sinais estão sobrepostos aos hidrogênios H7'. Ressalta-se o sinal do hidrogênio sacarídico H1 a  $\delta$  4,84 que possui uma constante de acoplamento característica de glicosídeos com configuração anomérica  $\beta$  ( $J = 6,5 \text{ Hz}$ ). Além desses sinais, notam-se demais sinais relativos as outras regiões da estrutura.

Na figura 57 (p. 105), encontra-se o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **FNG01**. Destacam-se os sinais da unidade sacarídica, o carbono C1 localiza-se a 100,2 ppm, o C3 a 77,0 ppm, o C5 a 76,9 ppm, o C2 a 73,2 ppm, o C4 a 69,7 ppm e o C6 a 60,7 ppm. Pelo subespectro DEPT-135 (FIGURA 58, p. 106), confirmam as atribuições feitas anteriormente, observando-se os sinais relativos aos carbonos metilênicos em fase oposta.

Para a substância **FNG05** as mesmas inferências podem ser feitas, exceto pela existência do grupo formila na estrutura. No espectro no IV dessa substância, destacam-se as bandas em  $3300 \text{ cm}^{-1}$  relativa ao estiramento de ligações O-H do

açúcar e a banda em  $1658\text{ cm}^{-1}$  relativa ao estiramento da ligação C=O da carbonila do grupo aldeído (FIGURA 59, p. 107).

Na figura 60 (p. 108), encontra-se representado o espectro RMN de  $^1\text{H}$  dessa substância, no qual podem ser evidenciados o sinal característico do hidrogênio de aldeído a  $\delta$  9,86 e os sinais dos hidrogênios sacarídicos na região entre  $\delta$  5,35 a  $\delta$  3,18. Dentre estes sinais, aquele referente a H1, em  $\delta$  5,09, comprova a obtenção do anômero  $\beta$  ( $J= 7,6\text{ Hz}$ ).

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **FNG05**, Figura 61 (p. 109), notam-se todos os sinais esperados, destacando-se os provenientes dos carbonos sacarídicos no intervalo de 99,4-60,6 ppm. A  $\delta$  191,6, o sinal referente ao carbono carbonílico. Tais informações podem ser confirmadas pelo subespectro DEPT-135 (FIGURA 62, p. 110).

#### 4.1.4 Síntese dos derivados FN02, FNM02, FNB02 e FNG02

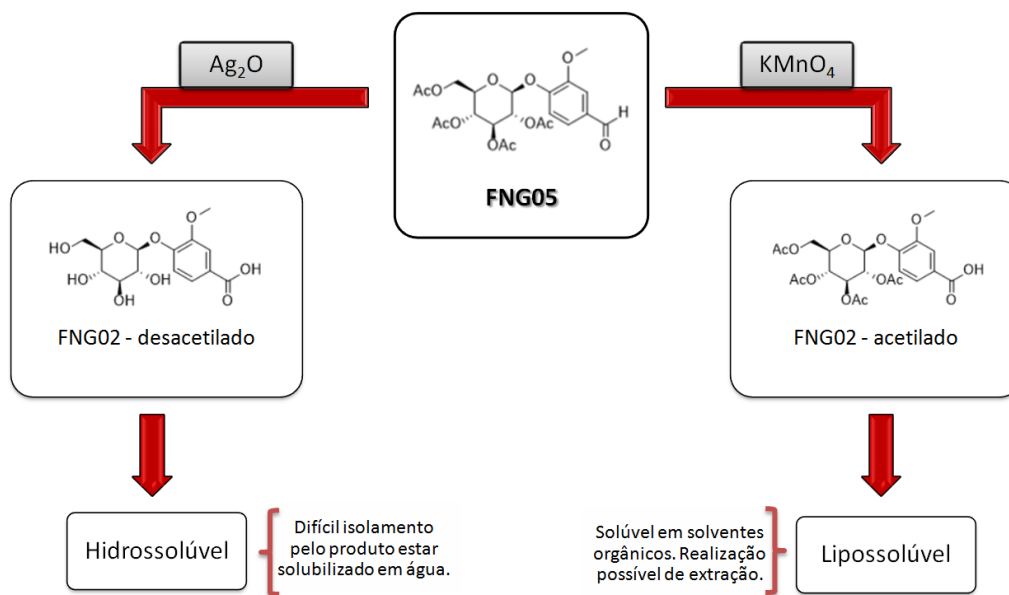
Os derivados da série 02 foram obtidos a partir de reação de oxidação do grupo aldeído presente nas substâncias vanilina (precursora de **FN02**), **FNM05** (precursor de **FNM02**), **FNB05** (precursor de **FNB02**) e **FNG05** (precursor de **FNG02**), a ácido carboxílico.

O método usado na oxidação da vanilina (**FN05**), **FNM05** e **FNB05** foi descrito por Pearl (1950) e se trata do emprego de óxido de prata em meio básico. Essa reação envolve um agente oxidante relativamente brando e seletivo, não afetando outros grupos oxidáveis nas moléculas envolvidas. Possivelmente, a reação ocorre por formação, em meio alcalino, dos hidratos dos aldeídos e subsequente oxidação dos mesmos (JAMES, 2015).

Para a oxidação de **FNG05** foi utilizado outro método, descrito por Dignum et al. (2003), que emprega  $\text{KMnO}_4$  em aquecimento. Por essa metodologia foi possível oxidar o aldeído a ácido de forma eficaz quando o precursor se encontra glicosilado. Isso se deve ao fato de a metodologia via óxido de prata exigir condições alcalinas, o que é incompatível com a manutenção da unidade sacarídica peracetilada ou com o isolamento do produto de alta polaridade obtido (FIGURA 30). O mecanismo exato pelo qual ocorrem as reações não foi encontrado durante as pesquisas bibliográficas realizadas.

Essas oxidações mostraram-se muito eficientes, considerando cada caso particular, levando a rendimentos elevados e produtos puros após reações que duraram cerca de 1,5 hora.

Figura 30 – Comparação dos métodos de oxidação aplicados ao derivado glicosila **FNG05**.



Fonte: Da autora.

Ao se analisar o espectro de absorção no IV das substâncias desse grupo, **FN02**, apresentado na Figura 63 (p. 111), **FNM02**, apresentado na Figura 67 (p. 115), **FNB02**, apresentado na Figura 71 (p. 119) e **FNG02**, apresentado na Figura 75 (p. 123), podem ser destacadas as bandas referentes ao estiramento de ligação O-H do ácido carboxílico que se encontram em cerca de  $3000\text{ cm}^{-1}$  como uma banda larga. A banda de estiramento de ligação de C=O situada a cerca de  $1670\text{ cm}^{-1}$  também é indicativo para a formação do ácido carboxílico.

Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dessas substâncias, encontram-se os sinais esperados para os constituintes das estruturas. Sendo que o sinal do hidrogênio da hidroxila ácida, que comprovaria a ocorrência da reação, não pode ser notado em todos os espectros pelo mesmo sofrer trocas com o deutério no solvente usado na análise (FIGURAS 64 - p. 112, 68 - p. 116, 72 - p. 120, 76 - p. 124). Porém, pode-se obter tal informação nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  dessas substâncias, onde o sinal do carbono carbonílico típico de ácido carboxílico pode ser notado na região de 167,0 ppm (FIGURAS 65 - p. 113, 69 - p. 117, 73 - p. 121, 77 - p. 125). Pelos

subespectros DEPT-135, apresentados nas figuras 66 (p. 114), 70 (p.118), 74 (p. 122) e 78 (p. 126), todas as atribuições feitas no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  podem ser confirmadas, evidencia-se a formação dos produtos esperados pela ausência do sinal de carbono hidrogenado de aldeídos, presentes nos precursores.

#### 4.1.5 Síntese dos derivados FN03, FNM03, FNB03 e FNG03

A reação de redução via boridreto de sódio foi adaptada dos estudos feitos por Ward e Rhee (1989) e Mochalov e colaboradores (2016). Essa reação foi realizada para obtenção dos derivados alcoólicos **FN03** (a partir da vanilina), **FNM03** (a partir de **FNM05**), **FNB03** (a partir de **FNB05**) e **FNG03** (a partir de **FNG05**).

A escolha desse método deve-se a utilização de condições mais brandas para que a reação ocorra, visto que o boridreto de sódio é um agente redutor menos reativo que o hidreto de alumínio e lítio, o qual também é empregado para conversão de aldeídos à álcoois. Isso permite, por exemplo, o uso de mistura bifásica de solventes, como etanol-água ou mesmo solvente orgânico isolado, sem secagem prévia. A duração média para término da reação foi de 30 minutos.

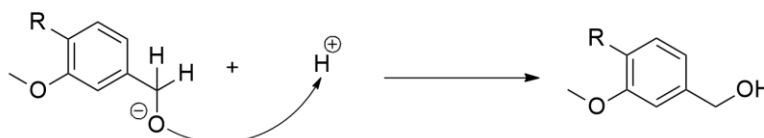
O mecanismo envolvido nesta reação está demonstrado na figura 31. O boridreto de sódio funciona como um doador de hidreto para a carbonila do aldeído. Primeiramente, um hidreto do  $\text{NaBH}_4$  é doado ao carbono carbonílico, gerando um alcóxido. Este, ao ser tratado com o ácido, na segunda etapa, protona-o, conduzindo ao álcool primário esperado. As etapas descritas são repetidas até que todos hidrogênios do boro sejam transferidos às demais moléculas de aldeído (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012).

Figura 31 – Mecanismo proposto para reação de redução via NaBH<sub>4</sub>.

**Etapa 1:**



**Etapa 2:**



Fonte: Da autora.

Demonstrados nas figuras 79 (pág. 127), 83 (pág. 131), 87 (pág. 135) e 91 (pág. 139) estão os espectros no IV das substâncias **FN03**, **FNM03**, **FNB03** e **FNG03**, respectivamente. Entre as bandas presentes equivalentes aos grupos funcionais presentes na estrutura destacam-se as bandas na região de 3400 cm<sup>-1</sup> relativas ao estiramento de ligação O-H. A ausência da banda de estiramento de carbonila de aldeídos também é um indicativo da reação ter ocorrido.

Quanto aos seus espectros de RMN de <sup>1</sup>H, apresentados nas figuras 80 (p. 128), 84 (p. 132), 88 (p. 136) e 92 (p. 140), notam-se em todos os espectros os sinais confirmatório da redução na região de 4,40 ppm que referem-se aos hidrogênios ligados ao carbono do álcool benzílico. Os hidrogênios das hidroxilas alcoólicas são notados nos sinais entre  $\delta$  2,69-2,66 para **FNM03**, em  $\delta$  5,11 para **FNB03**, e em  $\delta$  5,10 para **FNG03**, esse hidrogênio nem sempre é notado devido à troca com o deutério do solvente.

Nos espectros de RMN de <sup>13</sup>C destacam-se os sinais na região de  $\delta$  63,0 relativos ao carbono metilênico do álcool benzílico, que indicam a ocorrência da redução (FIGURAS 81 - p. 129, 85 - p. 133, 89 - p. 137, 93 - p. 141). Pelos subespectros de DEPT-135, confirmam-se as atribuições feitas, especialmente pelo sinal em fase oposta a cerca de  $\delta$  63,0 atribuído ao carbono metilênico oriundo da redução (FIGURAS 82 - p. 130, 86 - p. 134, 90 - p. 138, 94 - p. 142).

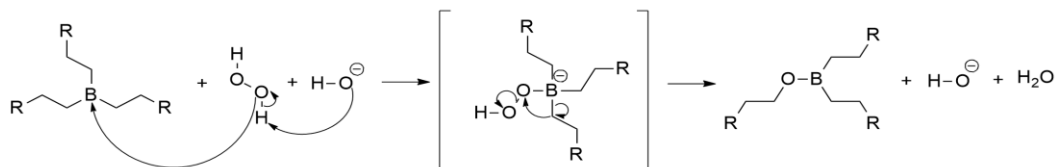
#### 4.1.6 Síntese dos derivados FN04, FNM04, FNB04 e FNG04

A reação de hidroboração-oxidação foi realizada por adaptação dos procedimentos descritos em diferentes trabalhos (BARBOSA et al.,2012, HEMELAERE; CARREAUX; CARBONI, 2015; PEPPER; SUNDARAM; DYSON, 1971). Por meio desta reação foram obtidos os derivados **FN04**, **FNM04**, **FNB04** e **FNG04**. O eugenol foi oxidado diretamente para obtenção do derivado **FN04**. Os compostos **FNM01**, **FNB01** e **FNG01** foram os precursores para a síntese de **FNM04**, **FNB04** e **FNG04**, nesta ordem.

O mecanismo dessa reação, apresentado na figura 32, tem por fundamento a obtenção de um álcool primário a partir de uma hidratação anti-Markovnikov de alceno e utiliza comumente os reagentes denominados boranas. Neste caso, empregou-se o complexo dimetilsulfeto de borana, amplamente utilizado para esse propósito (BARBOSA et al.,2012, HEMELAERE; CARREAUX; CARBONI, 2015; PEPPER; SUNDARAM; DYSON, 1971).

O átomo de boro é importante nesse contexto por possuir um orbital p livre, o qual sofrerá os ataques nucleofílicos envolvidos na reação. Os elétrons da dupla ligação da cadeia alílica do substrato estabelecem ligação com este orbital (Etapa 1). Esse processo ocorre para os três átomos de hidrogênio ligados ao boro, o que resultará em um intermediário trialquílico de boro. Em seguida, o ânion peróxido, formado na etapa em que se adiciona NaOH e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> leva a um rearranjo estrutural (Etapa 2). Na sequência, este produto de rearranjo é levado ao intermediário alcóxido (Etapa 3), o qual vai ao produto final por protonação (Etapa 4). Sabe-se que essa reação ocorre de forma a obter um álcool primário devido ao impedimento estérico do boro que, devido ao seu tamanho, não consegue aproximar-se do carbono mais interno da dupla ligação. Diante disso, ele se ligará ao carbono terminal do alceno, enquanto o hidrogênio se associa ao mais interno (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012).

Figura 32 – Mecanismo proposto para a reação de hidroboração-oxidação.

**Etapa 1:****Etapa 2:**

obs: o mesmo processo ocorre para os demais grupos alquílicos

**Etapa 3:**

obs: o mesmo processo ocorre para os demais oxigênios ligados às cadeias alquílicas

**Etapa 4:**

Fonte: Da autora.

Nos espectros no IV das substâncias desse grupo, **FN04**, **FNM04**, **FNB04** e **FNG04**, apresentados das figuras 95 (p. 143), 99 (p. 147), 103 (p. 151) e 107 (p. 155), respectivamente, podem ser notadas as bandas relativas ao estiramento de ligação O-H na região de  $3360\text{ cm}^{-1}$ .

Pelos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  destas substâncias pode ser destacado o padrão dos sinais relativos à subunidade hidroxipropílica (FIGURAS 96 - p. 144, 100 - p. 148, 104 - p. 152, 108 - p. 156). Como exemplo, observa-se para **FN04** o tripleto a  $\delta$  3,65 (referente ao hidrogênio, destacado em  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ), o tripleto a  $\delta$  2,62 (referente ao carbono benzílico,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ) e o multipletto em  $\delta$  1,90-1,80 (atribuído aos hidrogênios destacados em  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ , possivelmente sobrepostos ao sinal da hidroxila alcoólica). Para a substância **FNG04** alguns desses sinais estão sobrepostos a sinais de hidrogênios sacarídicos.

Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , figuras 97 (p. 145), 101 (p. 149), 105 (p. 153) e 109 (p. 157), observam-se sinais a aproximadamente  $\delta$  31,7, 34,4 e 62,2, relativos

à cadeia propílica, o que pode ser confirmado pela análise do subespectro de DEPT-135, figuras 98 (p. 146), 102 (p. 150), 106 (p. 154) e 110 (p. 158), pelos sinais de carbonos metilênicos em fase oposta.

Todos os demais sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  apresentados estão de acordo com o esperado para as demais regiões das estruturas.

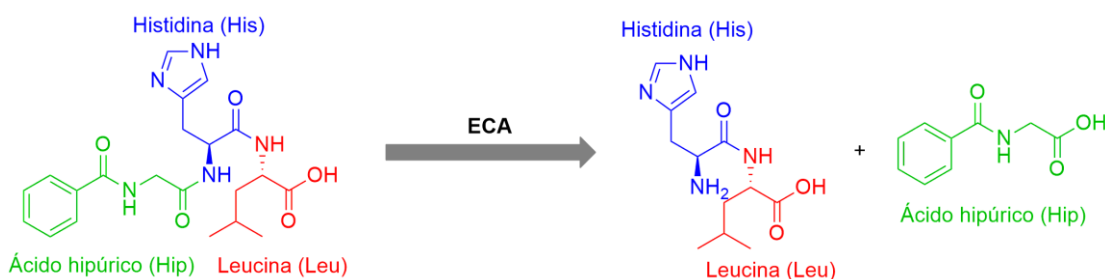
#### 4.2 AVALIAÇÃO *in vitro* DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ECA

Esses ensaios foram baseados na reação de hidrólise do substrato Hip-His-Leu pela ECA ao dipeptídeo His-Leu, no qual sua concentração está correlacionada à atividade enzimática. Ao se inserir uma substância com capacidade de inibir essa enzima, a reação entre enzima-substrato estaria diminuída, levando a uma menor formação do dipeptídeo final.

A hidrólise do tripeptídeo Hip-His-Leu é empregada como fundamento de diferentes metodologias que buscam avaliar a atividade da ECA. Alguns estudos realizam a quantificação do ácido hipúrico liberado após a reação enzimática, em vez do dipeptídeo, sendo empregados como métodos de detecção a espectrofotometria na região do ultravioleta (CHAUDHARY et al., 2013; CHEN; KANG, 2014; LOHITH et al., 2006) ou a cromatografia líquida de alta eficiência (LI et al., 2015; MNAFGUI et al., 2013; SIMARATANAMONGKOL et al., 2014).

Neste trabalho, quantificou-se o dipeptídeo formado, His-Leu, através de técnica fluorimétrica (FRIEDLAND; SILVERSTEIN, 1976; LEITE; SALGADO, 1992; PEREIRA et al., 2010). A escolha por métodos fluorimétricos deve-se à facilidade e à sensibilidade deste comparado a outros que necessitam da extração do ácido hipúrico para a quantificação, sendo que, muitas vezes, substâncias como os lipídeos podem influenciar nesse processo.

Figura 33 – Representação da hidrólise do substrato Hip-His-Leu pela ação da ECA.

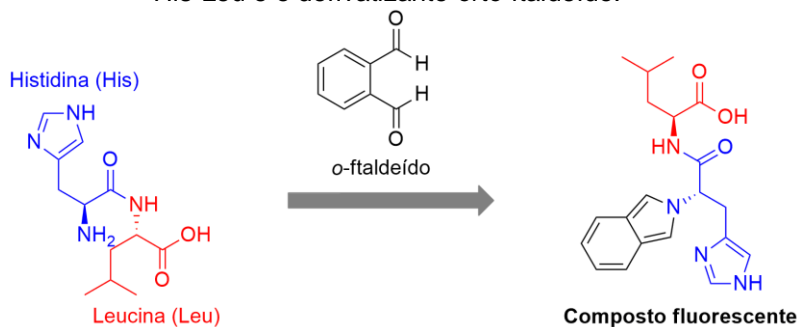


Fonte: Da autora.

O método de quantificação empregado neste trabalho baseia-se na medida fluorimétrica de um produto de derivatização do dipeptídeo His-Leu pelo reagente *orto*-ftaldeído. Esse produto estaria presente em maiores concentrações quando o ensaio fosse realizado normalmente e, ao se adicionar as substâncias testes, tal concentração diminuiria de acordo com a capacidade de inibição da enzima pelas mesmas.

A reação do *orto*ftaldeído com His-Leu é uma opção eficiente, rápida, altamente sensível e que necessita de pequenas quantidades de enzima para detecção da reação (FRIEDLAND; SILVERSTEIN, 1976).

Figura 34 – Representação da reação proposta entre o dipeptídeo His-Leu e o derivatizante *orto*-ftaldeído.

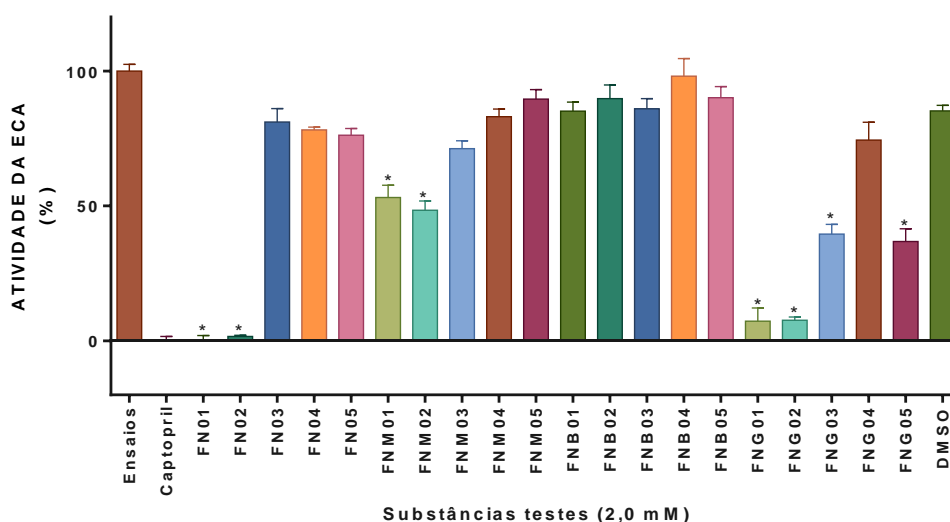


Fonte: Da autora.

Para os ensaios de triagem foi utilizada a concentração de  $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ , tendo por base o valor de  $CI_{50}$  da mistura de glicosídeos da vanilina relatados na literatura ( $1,1 \pm 0,10 \text{ mmol.L}^{-1}$  LOHITH et al., 2006) que, dentre os produtos naturais descritos em nosso trabalho, possuía o valor mais elevado de  $CI_{50}$ . Assim, tentou-se abranger uma concentração maior para que fosse possível avaliar de forma mais efetiva a inibição da enzima.

Na figura 35 pode ser observado o conjunto de resultados obtidos da triagem, expressos como atividade enzimática encontrada após tratamento com cada substância.

Figura 35 – Influência das substâncias teste sobre a atividade da ECA a concentração fixa de 2,0 mmol.L<sup>-1</sup>.



Fonte: Da autora.

Notas: \* Estatisticamente diferente ( $p < 0,05$ ) do grupo controle de acordo com análise de variância ANOVA e pós-teste de Dunnett.

As substâncias que mostraram atividade inibitória sobre a ECA de forma significativa foram a **FN01**, **FN02**, **FNM01**, **FNM02**, **FNG01**, **FNG02**, **FNG03** e **FNG05** (TABELA 1). Destas, as substâncias **FN01**, **FNG01** e **FNG05** já tiveram atividade relatada.

A partir destes resultados algumas inferências podem ser feitas sobre o perfil da atividade observada com as modificações realizadas na estrutura. Na figura 35, observa a atividade da ECA, em porcentagem, na ausência de inibidores, sob a ação do captopril e sob a ação das substâncias em teste. Das substâncias avaliadas, de forma geral, aquelas com grupos hidrofóbicos mais volumosos (**FNB01-05**) não apresentaram atividade inibitória na concentração utilizada. Isso provavelmente ocorreu devido à falta de um sítio de interação hidrofóbica que permita o reconhecimento do grupo benzila pela enzima.

Pode-se observar que as substâncias **FNM01** e **FNM02**, oriundas de O-metilação, levaram a cerca de 50% de inibição da atividade enzimática. Contudo os demais representantes do mesmo grupo não apresentaram diferença estatística. O fato de outros derivados metilados não terem demonstrado atividade pode ser

devido às orientações espaciais assumidas pelas substâncias em seu sítio de ligação na enzima, possivelmente favorecidas por uma combinação adequada com o grupo em posição *para* à hidroxila então metilada.

Assim como para as substâncias metiladas, dois integrantes do grupo dos derivados com hidroxila fenólica livre apresentaram atividade significativa de inibição da ECA, sendo eles o eugenol (**FN01**) e o derivado **FN02**. Como relatado nos estudos dos grupos de Mnafgui (2013) e Chaudhary (2014), o eugenol é ativo como inibidor da ECA, o que se confirmou nos ensaios realizados. A substância **FN02**, que apresenta um grupo carboxílico em posição *para* à hidroxila fenólica, deve ter afinidade aumentada pelo sítio de ligação na enzima mediada por este grupo. Como ocorre com o enalaprilato, e com outros fármacos iECA dicarboxilados, a existência da carboxila na forma ionizada contribui significativamente com o reconhecimento pela enzima, em vista de se envolver em ligação coordenada com o cátion zinco da metalo-enzima.

Tabela 1 - Perfil de atividade das substâncias em teste e seus percentuais de inibição

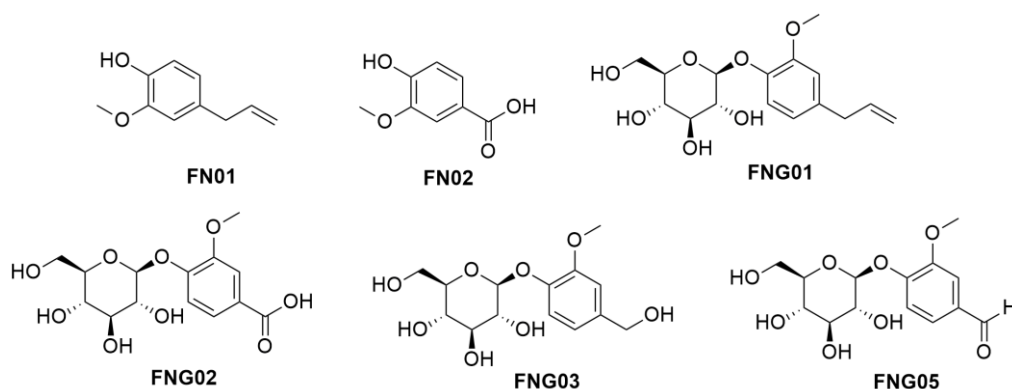
Substância	Atividade	Porcentagem de inibição
FN01	Ativo	100,0%
FN02	Ativo	68,2%
FN03	Inativo	-
FN04	Inativo	-
FN05	Inativo	-
FNM01	Ativo	46,9%
FNM02	Ativo	51,6%
FNM03	Inativo	-
FNM04	Inativo	-
FNM05	Inativo	-
FNB01	Inativo	-
FNB02	Inativo	-
FNB03	Inativo	-
FNB04	Inativo	-
FNB05	Inativo	-
FNG01	Ativo	92,7%
FNG02	Ativo	82,7%
FNG03	Ativo	60,4%
FNG04	Inativo	-
FNG05	Ativo	63,2%

Fonte: Da autora.

De forma geral, as substâncias que apresentaram melhor inibição da ECA foram as que possuem um resíduo glicosídico como substituinte. Tal fato evidencia a importância de grupos polares na estrutura das substâncias que, conforme estudos anteriores podem estar relacionados à coordenação com o zinco presente no sítio ativo da enzima (LI et al., 2015). Dentre elas, somente um representante não apresentou atividade significativa, o **FNG04**. Entretanto, acredita-se que a hidroxila alcoólica da aglicona de **FNG04** esteja em uma posição desfavorável para sua interação com o sítio de ligação da enzima, contrário ao que talvez ocorra com a substância **FNG03** que possui um menor distanciamento entre a hidroxila e o anel aromático.

A partir desta triagem, as substâncias que apresentaram maior atividade inibitória da ECA foram investigadas quanto à sua potência, expressa como o valor de concentração capaz de inibir a atividade da enzima em 50% ( $CI_{50}$ ). Das oito substâncias ativas avaliadas, aquelas que possuíam como substituinte um grupo metila, **FNM01** e **FNM02**, não tiveram seu valor de  $CI_{50}$  determinados, visto que sua capacidade de inibição foi inferior a 60%, valor este usado para definir quais substâncias teriam tal concentração determinada (FIGURA 36).

Figura 36 – Substâncias testes com atividade inibitória sobre a ECA acima de 60%.

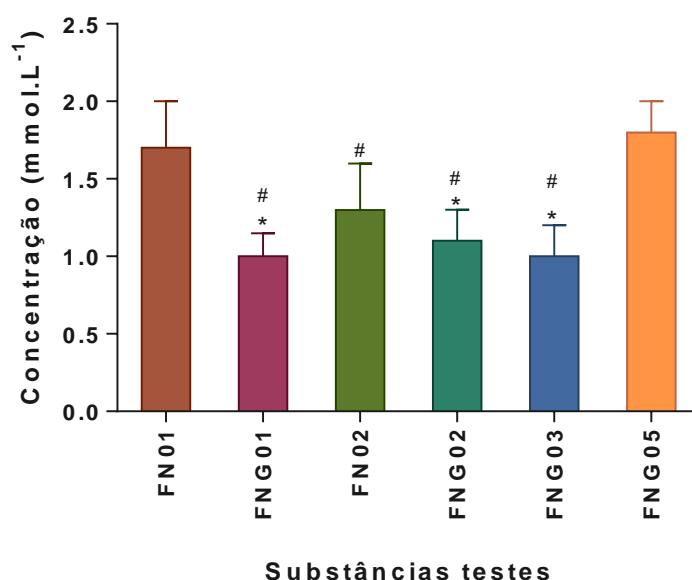


Fonte: Da autora

Para algumas destas substâncias, já existem descritos na literatura seu valor de  $CI_{50}$ . O eugenol, nas condições empregadas neste ensaio, resultou em um valor de  $CI_{50}$  de  $1,7 \pm 0,3 \text{ mmol.L}^{-1}$ , o que difere do obtido pelos estudos de Chaudhary e colaboradores (2014), da ordem de  $CI_{50}$  de  $0,3 \pm 0,02 \text{ mmol.L}^{-1}$ , e de Mnafigui e colaboradores (2013), que relataram  $CI_{50}$  de  $0,8 \pm 0,02 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Essa diferença de valores provavelmente deve-se às metodologias empregadas nos ensaios, visto que

foi utilizada a enzima isolada, enquanto que no nosso caso a mesma estava em uma matriz biológica mais complexa, representada pelos demais constituintes plasmáticos. Um outro motivo pode ser a diferença quanto ao método de detecção utilizado, como a espectrometria na região do ultravioleta e cromatografia líquida de alta eficiência.

Figura 37 – Comparação dos valores de  $CI_{50}$  ( $mmol.L^{-1}$ ) dos melhores inibidores da ECA.



Fonte: Da autora.

Notas: \* Estatisticamente diferente de **FN01**, # Estatisticamente diferente de **FNG05**, ( $p < 0,05$ ) de acordo com análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

Não foram encontrados relatos de investigação de **FNG01** e **FNG05**, isoladamente, como iECA. Todavia, o trabalho de Lohith e colaboradores (2006) destacou estudos frente à ECA com misturas de outros glicosídeos de eugenol ( $CI_{50}$  de  $0,5 \pm 0,04 mmol.L^{-1}$ ) e deste glicosídeo de vanilina associado a outros dois ( $1,1 \pm 0,10 mmol.L^{-1}$ ), substâncias já apresentadas nas figura 6 e 7. Em nosso trabalho, contudo, foi encontrado o valor de  $CI_{50}$  de  $1,0 \pm 0,15 mmol.L^{-1}$  para **FNG01** e de  $1,8 \pm 0,2 mmol.L^{-1}$  para **FNG05**, mas ambas substâncias testadas tratam-se de 1-O- $\beta$ -glicosídeos puros.

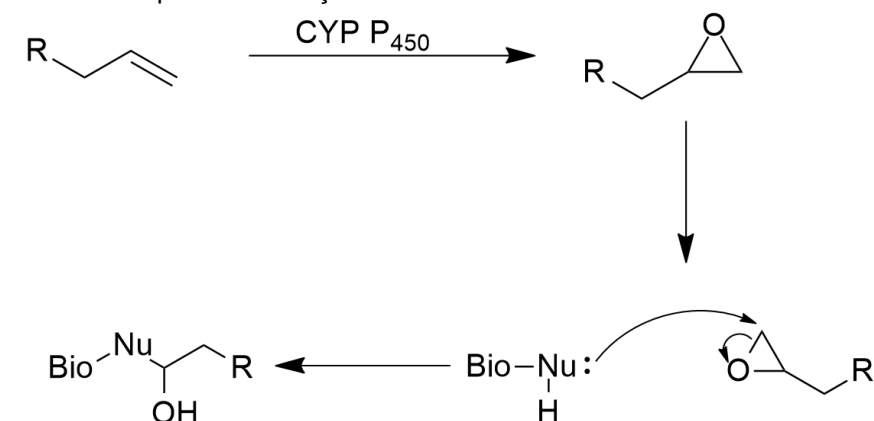
Os valores de  $CI_{50}$  calculados para as substâncias carboxiladas foram de  $1,3 \pm 0,3 mmol.L^{-1}$  (**FN02**) e  $1,1 \pm 0,2 mmol.L^{-1}$  (**FNG02**). Como já aventado, a interação dessas substâncias com a ECA provavelmente é otimizada pela interação do

carboxilato com o zinco do sítio ativo, mas também pode ser resultante da atração eletrostática por um resíduo de aminoácido catiônico da enzima (LIMA, 1999). Semelhante ao encontrado para essa substância, **FNG03** apresentou o  $CI_{50}$  no valor de  $1,0 \pm 0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$ , e a presença do álcool benzílico *para* em relação à unidade sacarídica também deve auxiliar na interação com regiões no sítio de ligação na ECA. Diante do exposto, observa-se que, de forma geral, as substâncias que possuem um resíduo glicosídico em sua estrutura apresentam uma melhor capacidade de inibição da ECA, o que corrobora os estudos de Li e colaboradores (2015) que defendem a influência dessas hidroxilas sacarídicas na quelatação do zinco presente no sítio ativo dessa enzima, sendo uma região importante para ocorrência da ação esperada (LIMA, 1999).

O uso de eugenol por via sistêmica tem sido um desafio, em vista de sua lipofilia acentuada, palatabilidade inadequada e suscetibilidade a reações oxidativas voltadas ao fenol livre. Assim, uma das vantagens dos derivados glicosilados sobre seus análogos equipotentes não-glicosilados pode ser a sua maior solubilidade em água e estabilidade quando comparado aos fenóis (JENG et al., 1994).

O derivado carboxilado **FNG02**, por sua vez, mesmo ligeiramente menos potente que o glicosídeo do eugenol, pode ser mais vantajoso que ele em estudos futuros, pois carece do grupo toxicofórico alila presente em **FN01** e **FNG01**. Este grupo pode ser biotransformado por reações de fase I mediadas por enzimas microsossomais do metabolismo humano a epóxido (FIGURA 38), o qual é um eletrófilo que pode alquilar e tornar não-funcionais biomoléculas essenciais como ácidos nucleicos e enzimas (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012; LUO; QATO; GUENTHNER, 1992).

Figura 38 - Representação da biotransformação de substâncias alílicas a epóxidos e reação deste com bionucleófilos.



Fonte: Da autora.

Ao se considerar aspectos que controlariam a biodisponibilidade dessas substâncias que tiveram seu valor de  $Cl_{50}$  determinados, prevê-se que **FN01** e **FN02** possuem os valores de  $\log P/\log D$  mais compatíveis com o necessário para serem absorvidas, porém, pelos aspectos comentados acima, **FNG02** seria uma opção mais adequada para a continuidade dos estudos, entretanto apresenta  $\log P$  inferior a zero, indicando possuir problemas potenciais para difusão por membranas biológicas, em vista da alta hidrossolubilidade. Isso na verdade não deve ser encarado como limitação, uma vez que há estratégias, como o preparo de pró-fármacos mais lipossolúveis, que poderiam contornar esta questão de solubilidade (CHIN; FERREIRA, 1999).

Finalmente, ressalta-se que estudos de modelagem molecular, especialmente os de docagem entre estes ligantes e a ECA, permitirão avaliar a maneira pela qual ocorrem as interações entre as substâncias inibidoras e o alvo molecular. No momento, estes estudos *in silico* estão em fase final de processamento e os mesmos poderão guiar estudos futuros de otimização estrutural com estes compostos.

## 5 CONCLUSÕES

Nesse trabalho foram sintetizadas com sucesso dezoito substâncias, a partir do eugenol e da vanilina, todas já descritas na literatura. Todos os derivados tiveram sua identidade estrutural confirmada por métodos espectroscópicos usuais de IV, RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

Quando avaliadas como inibidoras da ECA, notou-se que seis delas (**FN01**, **FNG01**, **FN02**, **FNG02**, **FNG03** e **FNG05**) inibiram a atividade desta enzima acima de 60%. Os derivados com substituintes polares na hidroxila fenólica levaram aos melhores resultados de  $\text{CI}_{50}$ , destacando-se os glicosídeos **FNG01**, **FNG02** e **FNG03**.

Corroborando trabalhos já descritos, acredita-se que as hidroxilas da unidade sacarídica cooperem na coordenação com o zinco do sítio ativo e que os grupos polares nas agliconas, como a carboxila de **FNG02** e o álcool de **FNG03**, auxiliem no ancoramento a um sítio catiônico ou a um grupo participante de ligação de hidrogênio. Estas especulações estão sob avaliação em estudos de modelagem molecular.

Diante do exposto, conclui-se que essas substâncias servem de protótipos para otimização estrutural e futuras investigações como candidatos a agentes iECA.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLAIS, F.; PLA, T. J. L.; DUCROT, P. H. An access to chiral  $\beta$ -benzyl-gamma-butyrolactones and its application to the synthesis of enantiopure (+)-secoisolariciresinol, (-)-secoisolariciresinol and (-)-enterolactone. **Synthesis**, v. 9, p. 1456-1464, 2011.
- ATLAS, S. A. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. **Journal of Managed Care Pharmacy**, n. 8, v. 13, supl. b, 2007.
- BARBOSA, J. D. F. et al. Structure–activity relationships of eugenol derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Society of Chemical Industry**, v. 68, p. 1478–1483, 2012.
- BARRETTO, A. C. P.; RAMIRES, J. A. F. Insuficiência Cardíaca. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**: v. 71, n. 4, p. 635-642, 1998.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais - RENAME**. Ministério da Saúde, Brasília: ed. 6, 2008.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO BÁSICA. **Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica: hipertensão arterial sistêmica**. Ministério da Saúde, Brasília: n. 37, p. 128p, 2013a. Disponível em: <<http://dab.saude.gov.br/portaldab/biblioteca.php?conteudo=publicacoes/cab37>>. Acesso em: 28 ago 2015.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portal Saúde. **Hipertensão atinge 24,3% da população adulta**. Brasília: 2013b. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2013/11/hipertensao-atinge-24-3-da-populacao-adulta>>. Acesso em: 28 ago 2015.
- BROWN, M. J. Direct renin inhibition - a new way of targeting the renin system. **Journal of the Renin Angiotensin Aldosterone System**, suplement. 2, p. s7-s11, 2006.
- CHAUDHARY, S. K. et al. Ocimum sanctum L. a potential angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor useful in hypertension. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, Nova Deli: v. 5, n. 1, p. 83–87, 2014.
- CHEN, L.; KANG, Y. *In vitro* inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of red pepper (*Capsicum annuum* L.) including pericarp, placenta, and stalk. **Journal of food biochemistry**: v. 38, p. 300-306, 2014.
- CHIN, M. C.; FERREIRA, E. I. O processo de latenciação no planejamento de fármacos. **Química Nova**, São Paulo: v. 22, p. 75-84, 1999.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. **Organic Chemistry**. USA: Oxford University Press, ed. 2, 2012.

CONCHIE, J.; LEVVY, G. A.; MARSCH, C. A. Methyl and phenyl glycosides of the common sugars. **Advances in Carbohydrate Chemistry**, v. 12, p. 157-179, 1957.

COOLEN, H. K. A. C. et al. Substrate Selective Catalysis by Rhodium Metallohosts. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, p. 11906-11913, 1995.

DAVIDSON, E. A.; MEYER, K. Structural studies on chondroitinsulfuric acid. I. The nature of chondrosine. **Journal of the American Chemical Society**, v. 76, p. 5686-5689, 1954.

DENG, S.; GANGADHARMATH, U.; CHANG, C. T. Sonochemistry: A Powerful Way of Enhancing the Efficiency of Carbohydrate Synthesis. **Journal of Organic Chemistry**, v. 71, p. 5179-5185, 2006.

DIGNUM, M. J. W. et al. Identification of glucosides in green beans of *Vanilla planifolia* Andrews and kinetics of vanilla  $\beta$ -glucosidase. **Food Chemistry**: v. 85, p.199-205, 2003.

EL-GHAZOLY, M. G. et al. Chemical constituents of *Helichrysum conglobatum* growing in Egypt. **Natural Product Sciences**, v. 9, p. 213-219, 2003.

FRANCO, R. J. S. Proteção renal durante o tratamento com inibidores da enzima conversora de angiotensina. **HiperAtivo**: v. 5, n. 2, 1998.

FRIEDLAND, J.; SILVERSTEIN, E. A sensitive fluorimetric assay for angiotensin converting enzyme. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.66, p. 416-424, 1976.

GONZALEZ, F. G.; APARICIO, F. J. L. Derivatives of furan I. **Anales de Fisica y Quimica**, v. 41, p. 846-859, 1945.

HEMELAERE, R.; CARREAUX, F.; CARBONI, B. A Diastereoselective Route to trans-2-Aryl-2,3-dihydrobenzofurans through Sequential Cross-Metathesis/Isomerization/Allylboration Reactions: Synthesis of Bioactive Neolignans. **European Journal of Organic Chemistry**: p. 2470-2481, 2015.

HEY, D. H.; LOBO, L. C. The aporphine series. Part I. developments of the Bischler-Napieralski-Pschorr synthetic method - the synthesis of ( $\pm$ )-isobulbocapnine and ( $\pm$ )-actinodaphnine methyl ether. **Journal of the Chemical Society**, ed. 0, p. 2246-2256, 1954.

HOFFMAN, B. B. Terapia da hipertensão. In: BRUTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. Porto Alegre: AMGH Editora, cap 32, p. 757-778, 2010.

HONGU, M.; SAITO, K.; TSUJIHARA, K. Solid-liquid phase transfer catalyzed novel glycosylation reaction of phenols. **Synthetic Communications**, v. 29, n.16, p. 2775-2781, 1999.

JACKSON, E. K. Renina e angiotensina. In: BRUTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. Porto Alegre: AMGH Editora, cap 30, p. 705-734, 2010.

JAMES. **Demystifying alcohol oxidations**. Master Organic Chemistry, 2015. Disponível em: <<http://www.masterorganicchemistry.com/2015/05/21/demystifying-alcohol-oxidations/>>. Acesso em: 31 jan 2017.

JENG, J. H. et al. Eugenol triggers different pathobiological effects on human oral mucosal fibroblasts. **Journal of Dental Research**, v. 73, p. 1050-1055, 1994.

KIM, M. et al. Phytochemical constituents of *Carpesium macrocephalum* F<sub>R</sub>-et S<sub>AV</sub>. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, n. 10, p. 1029-1033, 2004.

KOIKE, Y. et al. Novel phenolic glycosides, adenophoraside A-E, from Adenophora roots. **Journal of Natural Medicines**: v. 64, p. 245-251, 2010.

KOSTOVA, I. N.; IOSSIFOVA, T. Chemical components of Fraxinus ornus bark-structure and biological activity. **Studies in Natural Products Chemistry**. Elsevier: Atta-ur-Rahman, v. 26, p. 313-350, 2002.

LANG, E. S.; COMASSETO, J. V. Catálise por transferência de fase. **Química Nova**, São Paulo: v. 11, n. 2, p. 238-257, 1988.

LEITE, R.; SALGADO, M. C. O. Increased vascular formation of angiotensin II in one-kidney, one clip hypertension. **Hypertension**: v. 19, n. 6, p. 575-581, 1992.

LI, P. et al. Structure–inhibition relationship of phenylethanoid glycosides on angiotensin-converting enzyme using ultra-performance liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry. **RSC Adv.**, v. 5, n. 64, p. 51701–51707, 2015.

LIMA, D. P. Synthesis of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors: an important class of antihypertensive drugs. **Química Nova**, São Paulo: v. 22, p. 375-381, 1999.

LOHITH, K. et al. Glycosides and amino acyl esters of carbohydrates as potent inhibitors of angiotensin converting enzyme. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 9, p. 1059–1072, 2006.

LUO, G.; QATO, M.K.; GUENTHNER, T.M. Hydrolysis of the 2',3'-allylic epoxides of allylbenzene, estragole, eugenol, and safrole by both microsomal and cytosolic epoxide hydrolases. **Drug metabolism and disposition**, v. 20, p. 440–445, 1992.

MALACHIAS, M. V. B. et al. 7ª Diretriz brasileira de Hipertensão Arterial. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**, n.3, v.107, supl.3, 2016.

MARTIN, P. Der Zugang zum Antitumor-Antibiotikum CC-1065 mittels Hetero-Cope-Umlagerung von Vinyl-N-phenylhydroxamaten. **Helvetica Chimica Acta**, v. 72, p. 1554-1582, 1989.

MAZUR, M. et al. Synthesis of hydroxyphenylpropanoid  $\beta$ -D-glucosides. **Journal of Wood Chemistry and Technology**: v.27, p. 1-8, 2007.

MION JR, D. et al. A importância da medicação anti-hipertensiva na adesão ao tratamento. **Revista Brasileira da Hipertensão**: v. 13, p. 55-58, 2006.

MIYAGAWA, Y. et al. Synthesis and fundamental HSQS NMR data of monolignol  $\beta$ -glycosides, dihydromonolignol  $\beta$ -glycosides, and *p*-hydroxybenzaldehyde derivate  $\beta$ -glycosides for the analysis of phenyl glycoside type lignin-carbohydrate complexes (LCCs). **Holzforschung**, v. 68, ed. 7, p. 747-760, 2014.

MNAFGUI, K. et al. Inhibition of key enzymes related to diabetes and hypertension by Eugenol in vitro and in alloxan-induced diabetic rats. **Archives of Physiology and Biochemistry**: v. 119, ed. 5, p. 225-233, 2013.

MOCHALOV, S. S. et al. Direct synthesis of ethers from aldehydes and ketones. One-Pot reductive etherification of benzaldehydes, alkyl ketones, and benzophenones. **Russian Journal of Organic Chemistry**, n. 4, v. 52, p. 503-512, 2016.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS - ONU. **Hipertensão contribui para 9,4 milhões de mortes anuais por doenças cardiovasculares no mundo, alerta OMS**. 2013. Disponível em: <<http://nacoesunidas.org/hipertensao-contribui-para-94-milhoes-de-mortes-anuais-por-doencas-cardiovasculares-no-mundo-alerta-oms/>>. Acesso em: 28 de agosto de 2015.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS - ONU. **Brasileiros têm tendência a desenvolver doenças cardiovasculares causadas por hipertensão arterial**. 2016. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/brasileiros-tem-tendencia-a-desenvolver-doencas-cardiovasculares-causadas-por-hipertensao-arterial/>>. Acesso em: 13 jul 2016.

PEARL, I. A. Reactions of vanillin and its derived compounds. III The Cannizzaro reaction of vanillin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 71, n. 3, p. 1066-1068, 1946.

PEARL, I. A. Vanillic acid silver oxide method. **Organic Syntheses**: v. 4, p. 972, 1950.

PEPER, J. M.; SUNDARAM, S.; DYSON, G. Lignin and Related Compounds. 111. An Improved Synthesis of 3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-propanol and 3-(4-Hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-1-propanol. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 49, p. 3394-3395, 1971.

PEREIRA, M. G. A. G. et al. Inhibition of the renin-angiotensin system prevents seizures in a rat model of epilepsy. **Clinical science**, v. 119, n. 11, p. 477–482, 2010.

REICHEL, L.; SCHICKLE, R. Chemistry and biochemistry of plant substances. XII. Syntheses of new methoxylated chalcone-flavonone glucosides under physiological conditions. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 76B, p. 1134-1137, 1943.

REN, B. et al. Zemplén transesterification: a name reaction that misled us for 90 years. **Green Chemistry**, n. 17, p. 1390-1394, 2015.

ROW, L. R. et al. New lignans from *Phyllanthus niruri*. **Tetrahedron letters**, ed. 24, v. 5, 1964.

SAKUSHIMA, A.; COSKUN, M.; MAOKA, T. Hydroxybenzoic acids from *Boreava orientalis*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 1, p. 257-261, 1995.

SANJULIANI, A. F. et al. Eixo renina-angiotensina-aldosterona: bases fisiológicas e fisiopatológicas. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**, Rio de Janeiro: ano 10, jul-set, 2011.

SCHWARZ, B.; HOFMANN, T. Identification of novel orosensory active molecules in cured vanilla beans (*Vanilla planifolia*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**: v. 57, p. 3729-3737, 2009.

SHANKARAN, K.; RAO, A. S. A Convenient route for the preparation of Aromatic Aldehydes. **Synthetic Communications Journal**, v. 10, ed. 7, p. 573-579, 1980.

SIMARATANAMONGKOL, A. et al. Identification of a new angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor from Thai edible plants. **Food Chemistry**, v. 165, p. 92–97, 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO. **O que é hipertensão?** Disponível em: <<http://www.sbh.org.br/geral/oque-e-hipertensao.asp>>. Acesso em: 28 ago 2015.

TAVARES, M. T. et al. Interações fármaco-receptor: aplicações de técnicas computacionais em aula prática sobre a evolução dos inibidores da enzima conversora de angiotensina. **Química Nova**, São Paulo: v. X, n. 00, p. 1–8, 2015.

TSUKERVANIK, I. P.; SERGEEA, V. Alkylation of aromatic compounds in the presence of zinc chloride. II. Synthesis of alkylguaiacols. **Zhurnal Obshchei Khimii**, v. 17, p. 1009-1047, 1947.

VIJAYAKUMAR, G. R.; DIVAKAR, S. Amyloglucosidase-catalyzed synthesis of eugenyl and curcuminyl glycosides. **Biotechnology Letters**: v. 29, p. 575-584, 2007.

WALTON, N. J.; MAYER, M. J.; NARBAD, A. Vanillin. Molecules of interest. **Phytochemistry**, v. 63, p. 505-515, 2003.

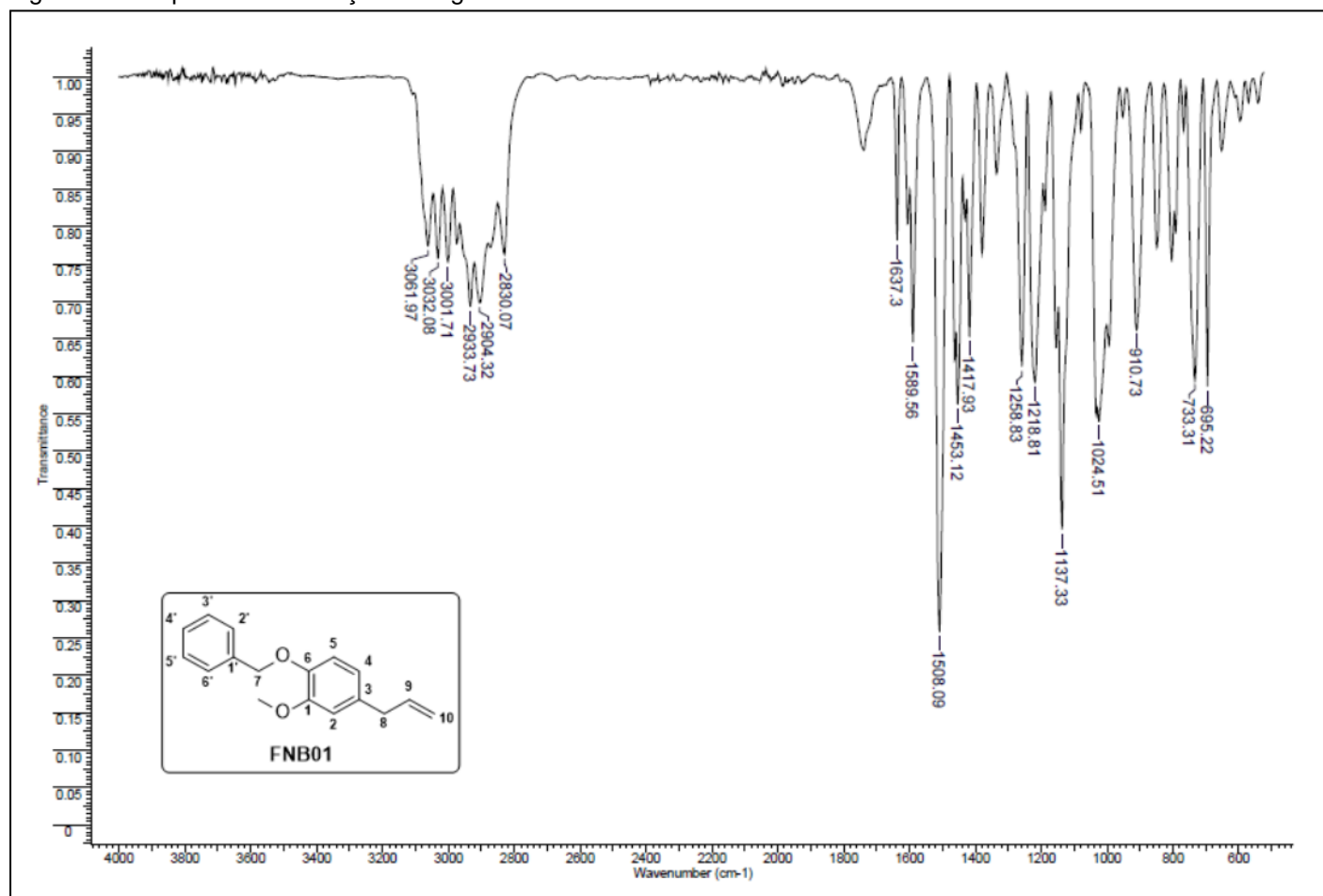
WANG, H. et al. Tetrabutyl ammonium bromide-mediated benzylation of phenols in water under mild condition. **Tetrahedron**, v. 70, p. 2669-2673, 2014.

WANG, W. et al. New Phenolic Compounds from *Coreopsis tinctoria* Nutt. and Their Antioxidant and Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 1, p. 200–207, 2015.

WARD, D. E.; RHEE, C. K. Chemoselective reductions with sodium borohydride. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 67, p. 1206-1211, 1989.

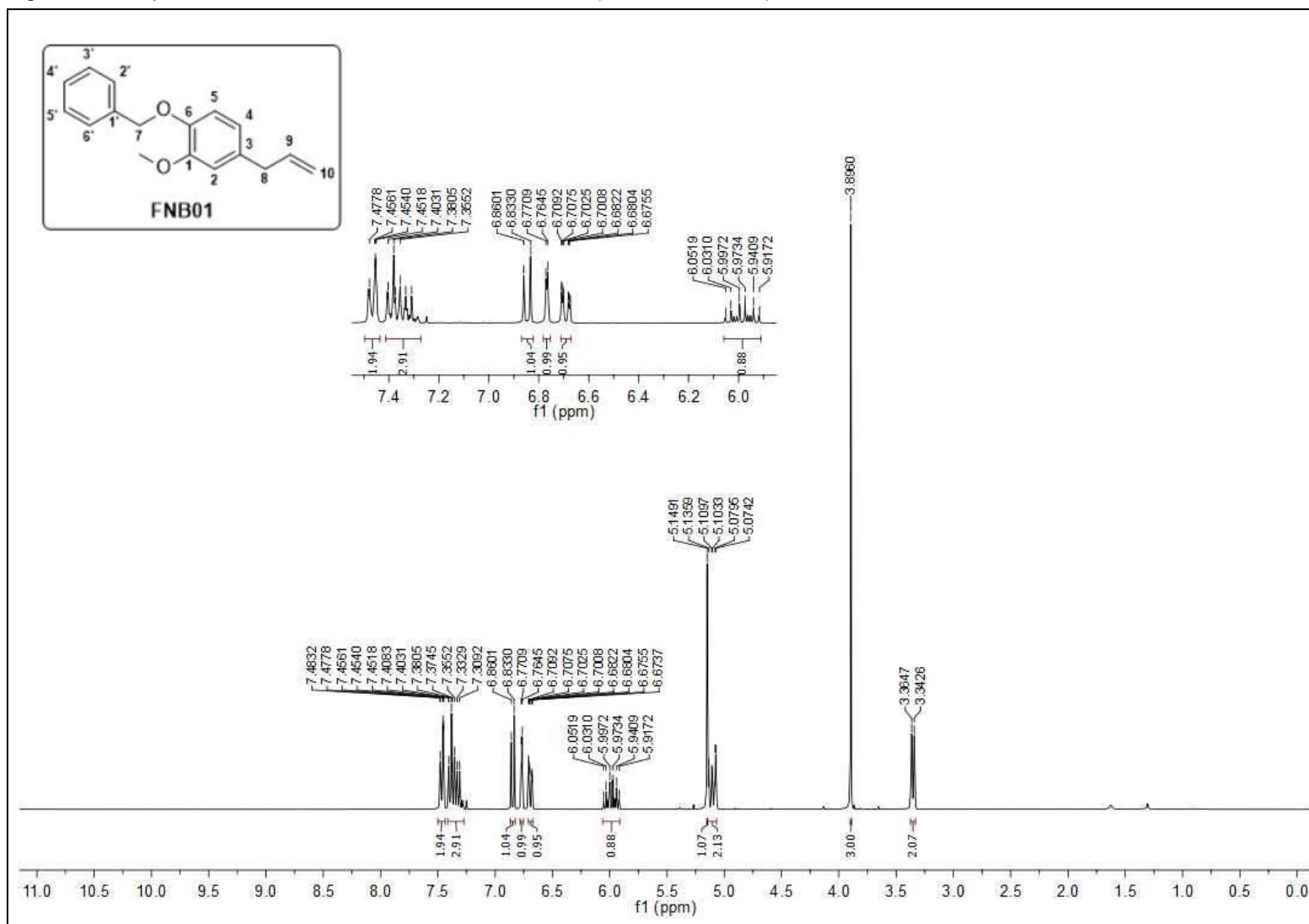
ZAMAN, M. A.; OPARIL, S.; CALHOUN, D. A. Drugs targeting the renin-angiotensin aldosterone system. **Nature Reviews. Drug discovery**, v. 1, p. 621-636, 2002.

## APÊNDICE

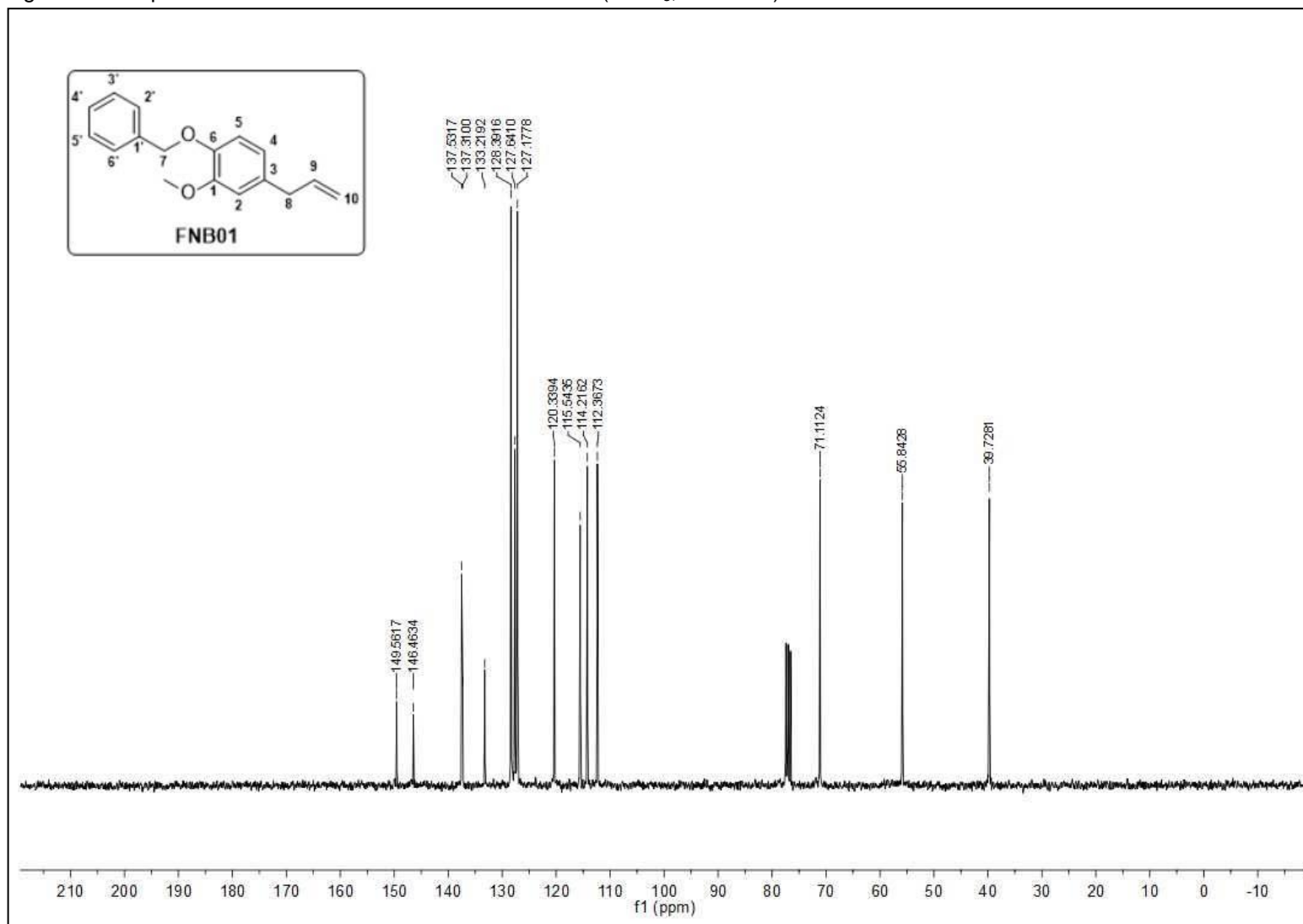
Figura 39 – Espectro de absorção na região do IV da substância **FNB01**.

Fonte: Da autora.

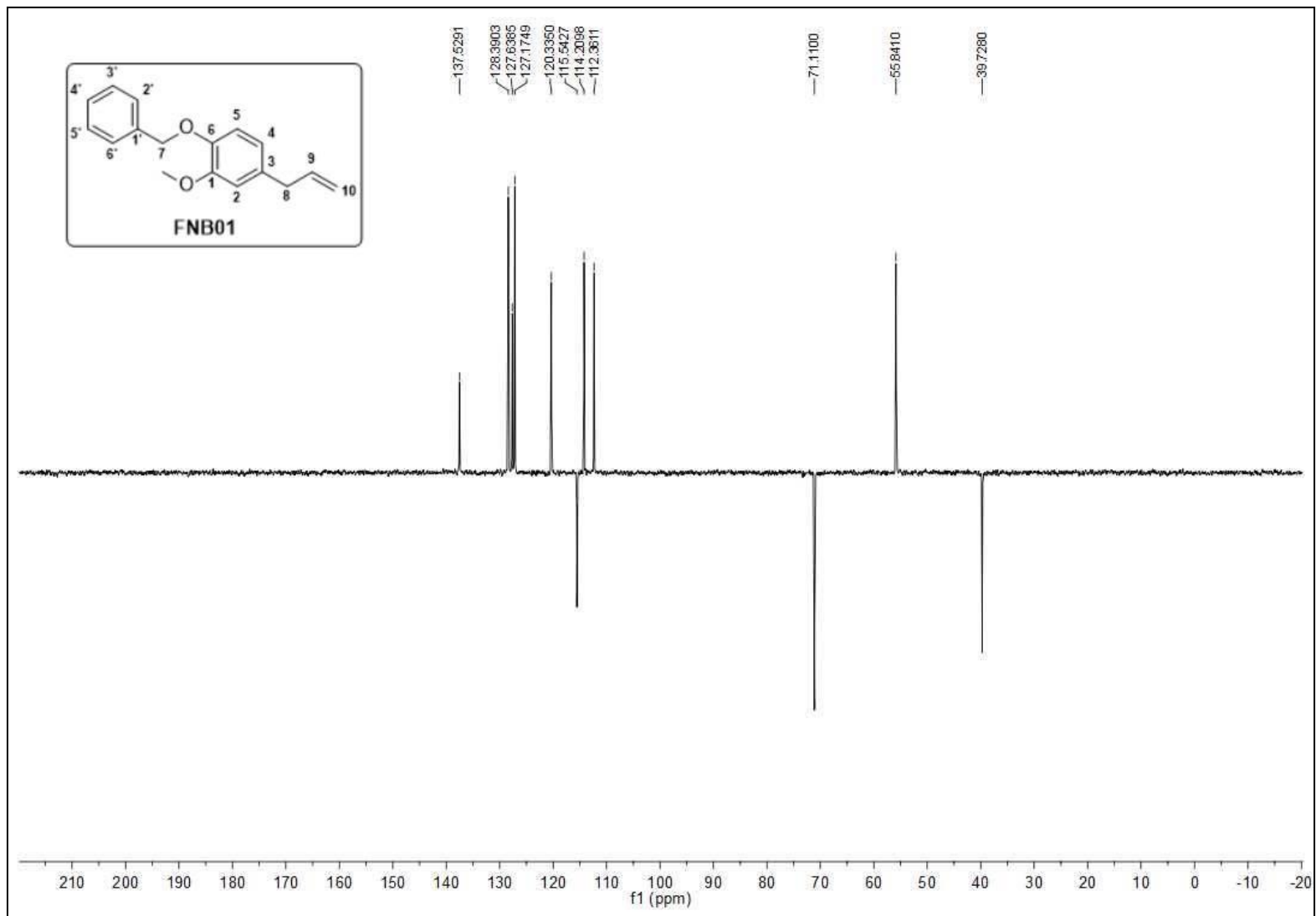
Figura 40 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **FNB01** ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).



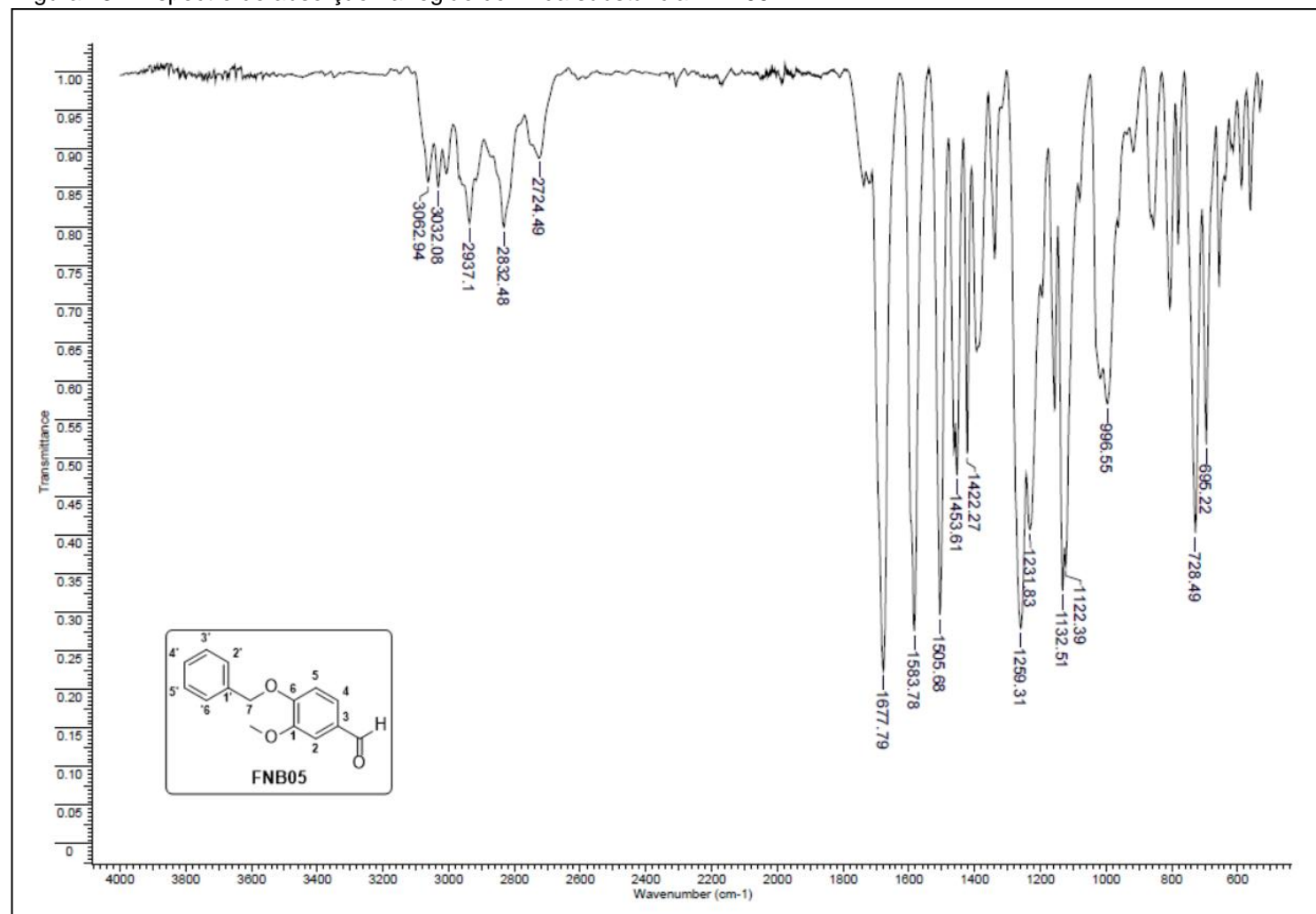
Fonte: Da autora

Figura 41 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **FNB01** ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

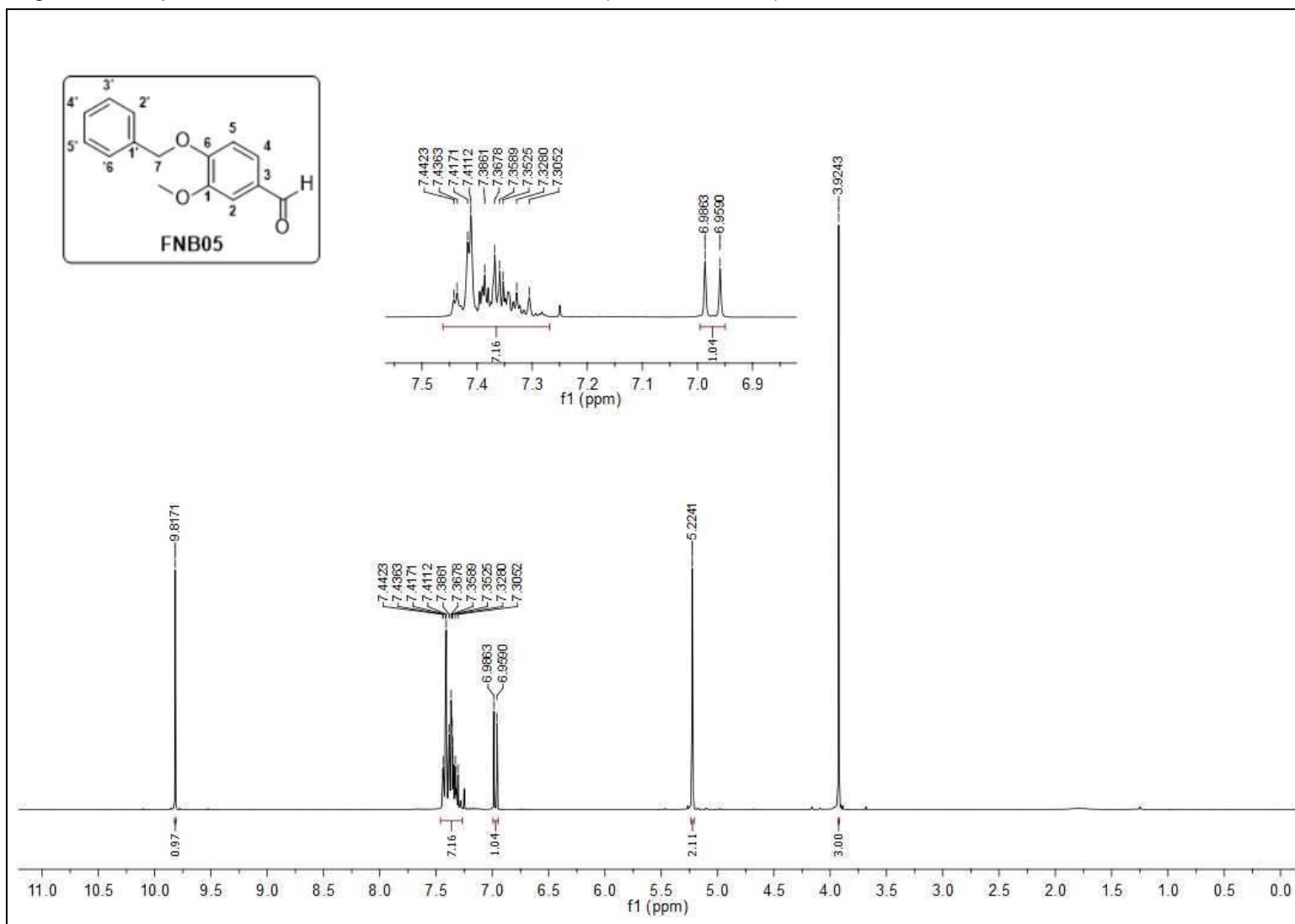
Fonte: Da autora

Figura 42 – Subespectro DEPT-135 da substância **FNB01** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz).

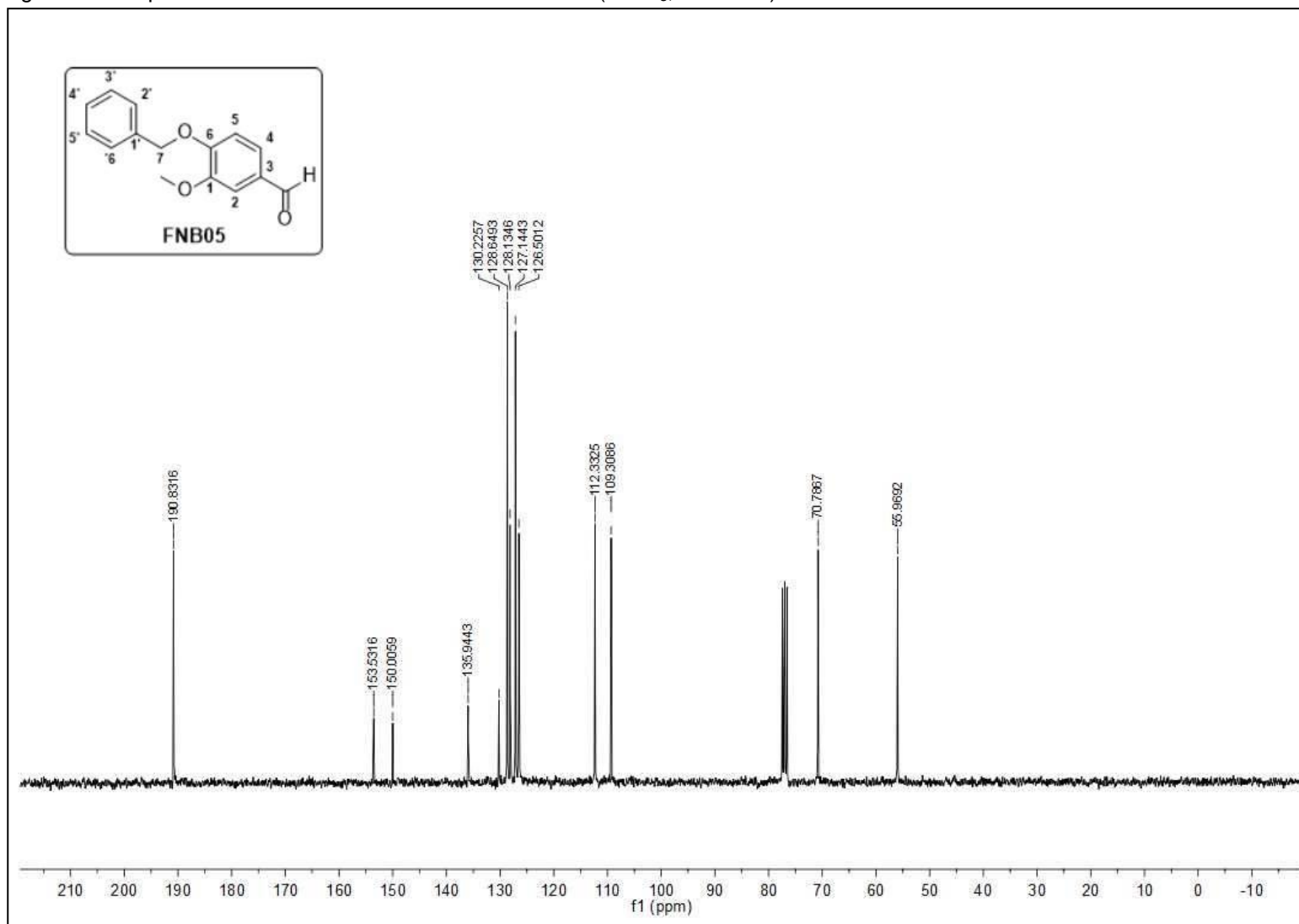
Fonte: Da autora

Figura 43 – Espectro de absorção na região do IV da substância **FNB05**.

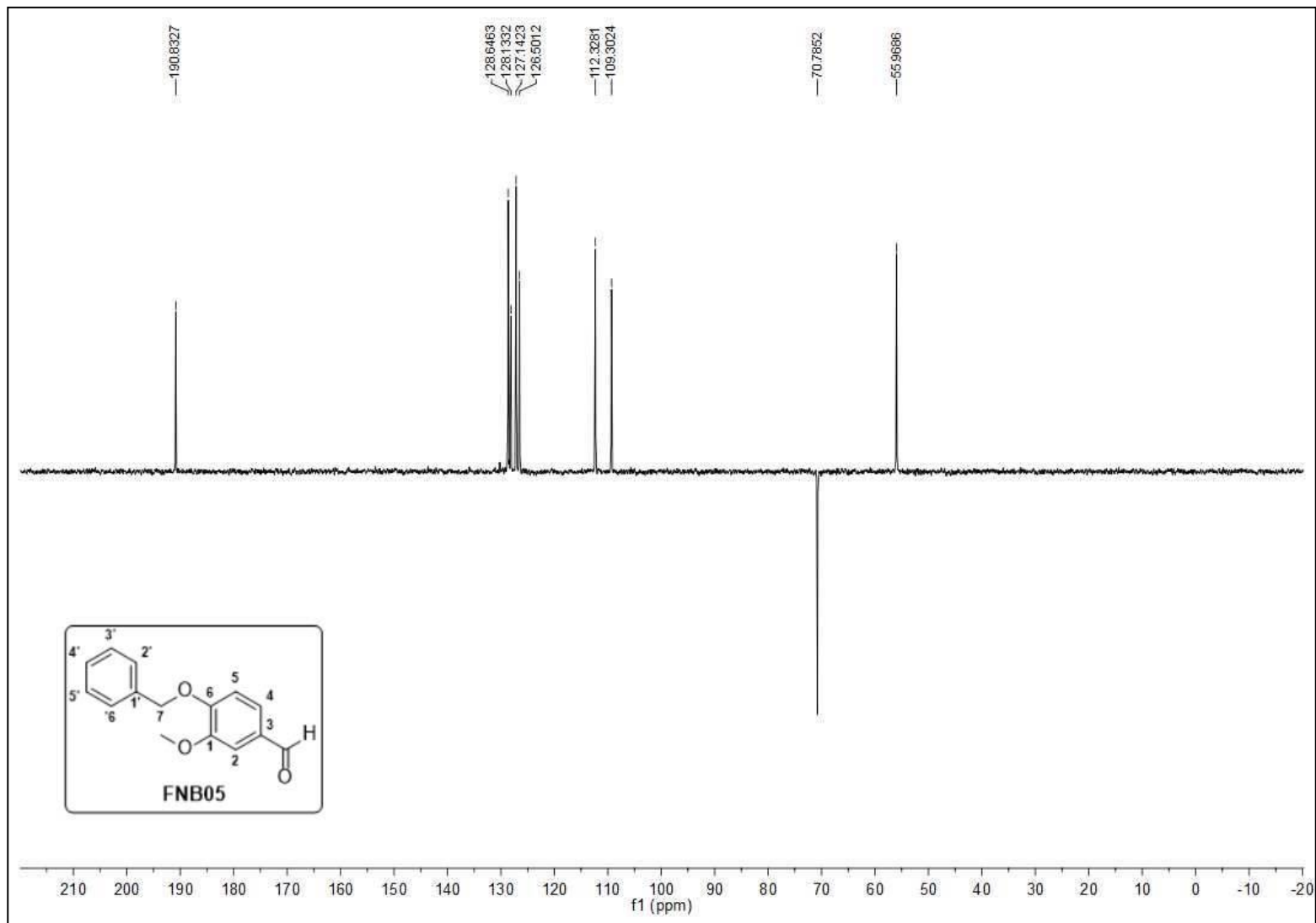
Fonte: Da autora.

Figura 44 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **FNB05** ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

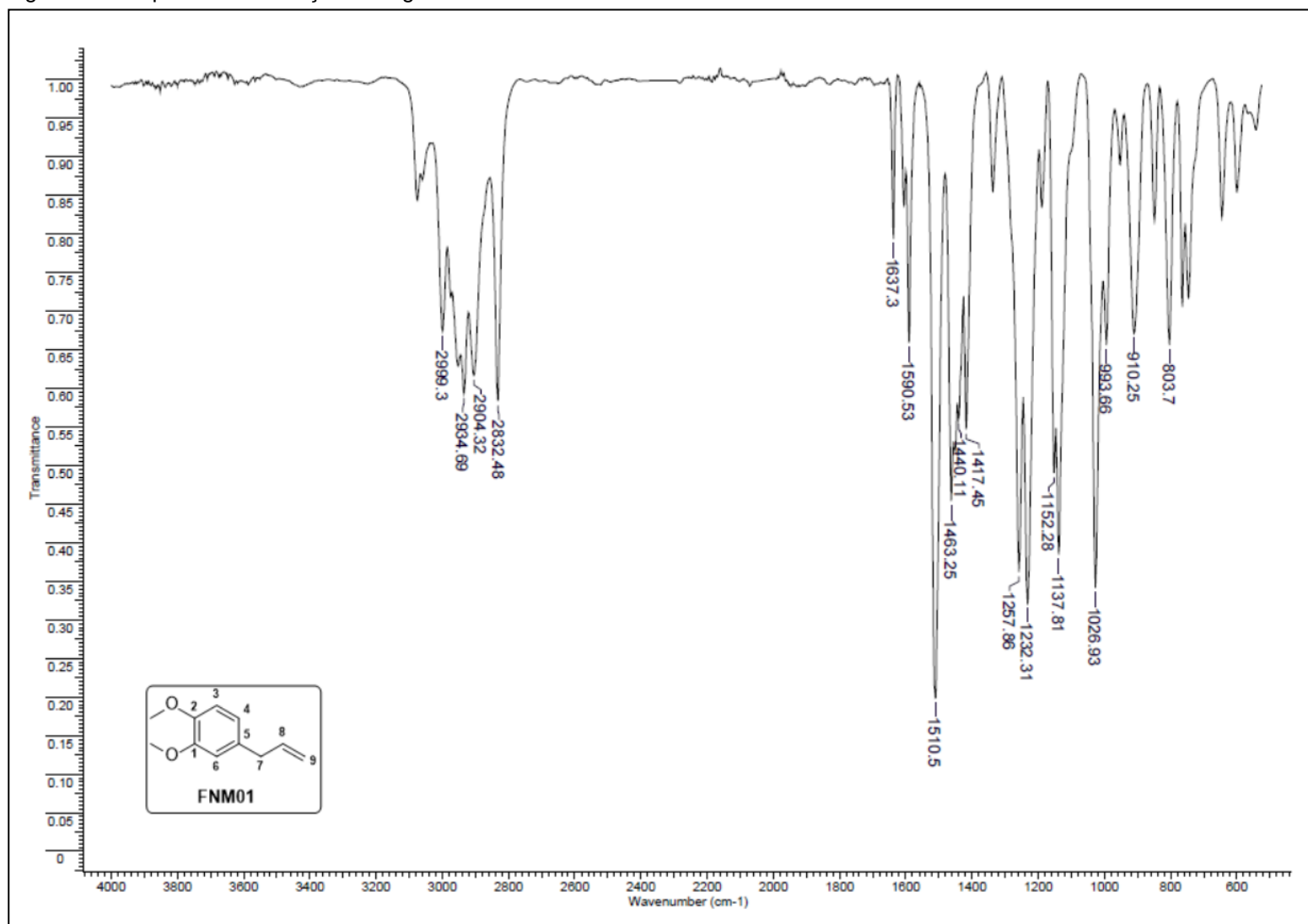
Fonte: Da autora.

Figura 45 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **FNB05** ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

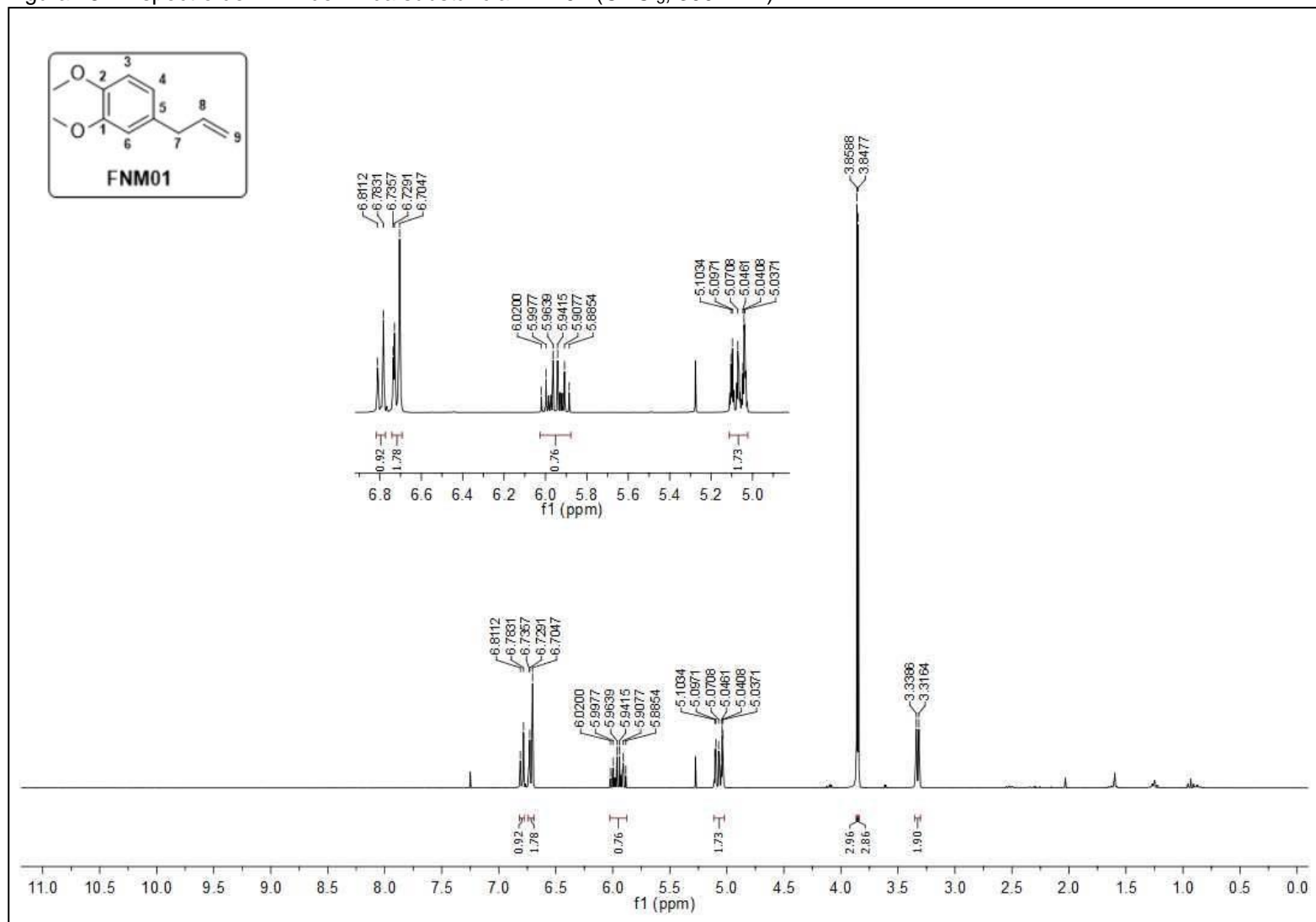
Fonte: Da autora.

Figura 46 – Subespectro DEPT-135 da substância **FNB05** ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).

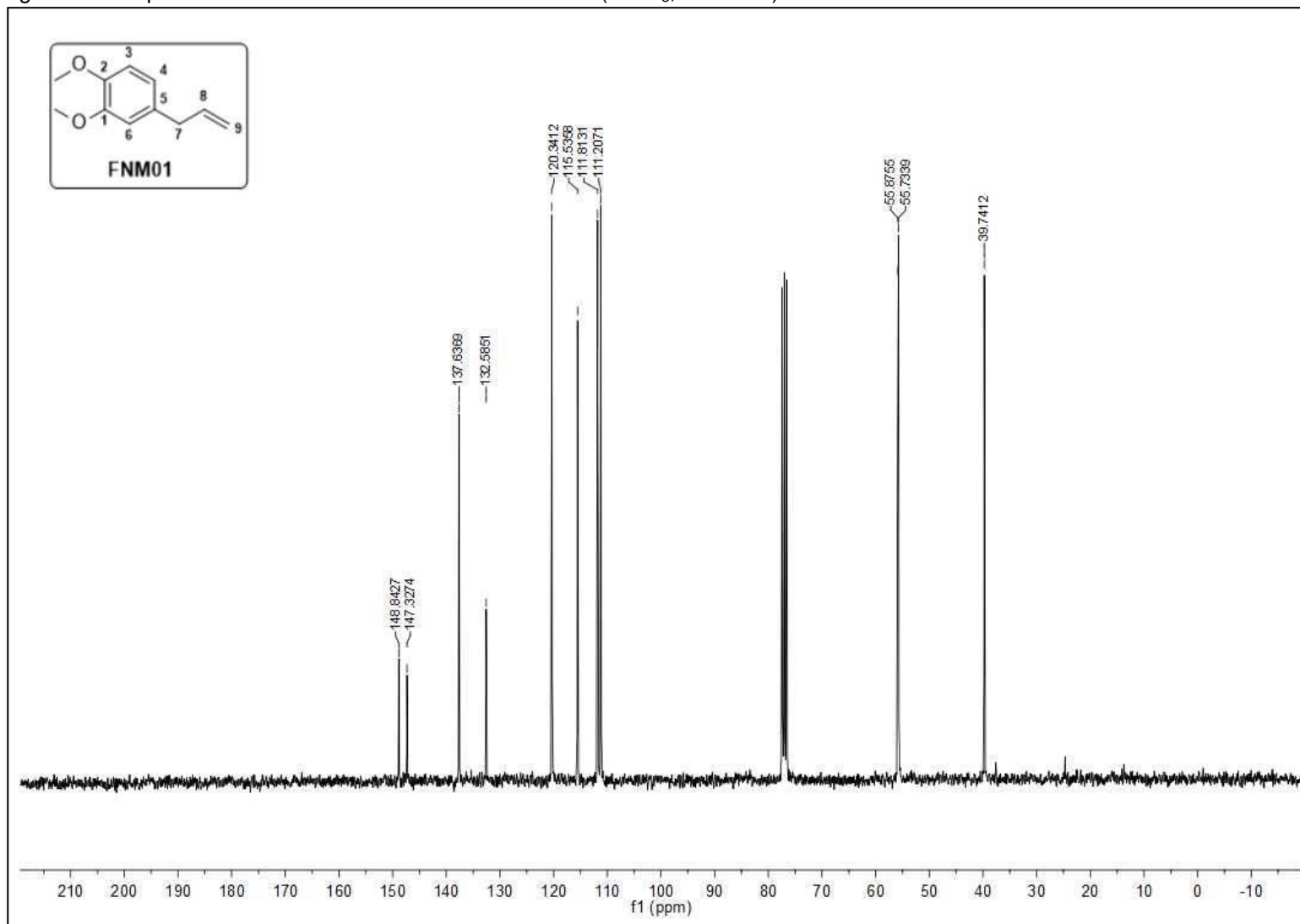
Fonte: Da autora.

Figura 47 – Espectro de absorção na região do IV da substância **FNM01**.

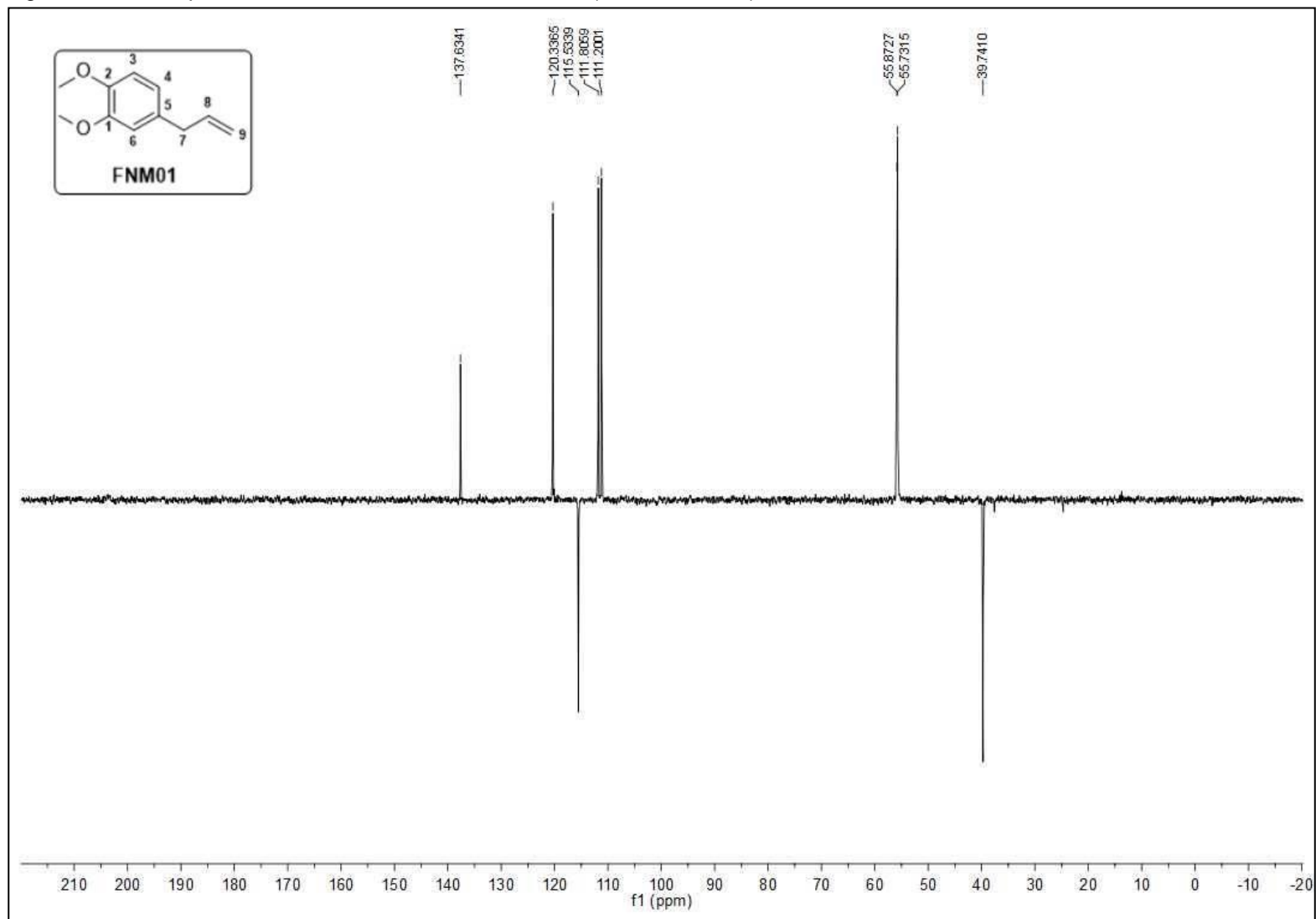
Fonte: Da autora.

Figura 48 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **FNM01** ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

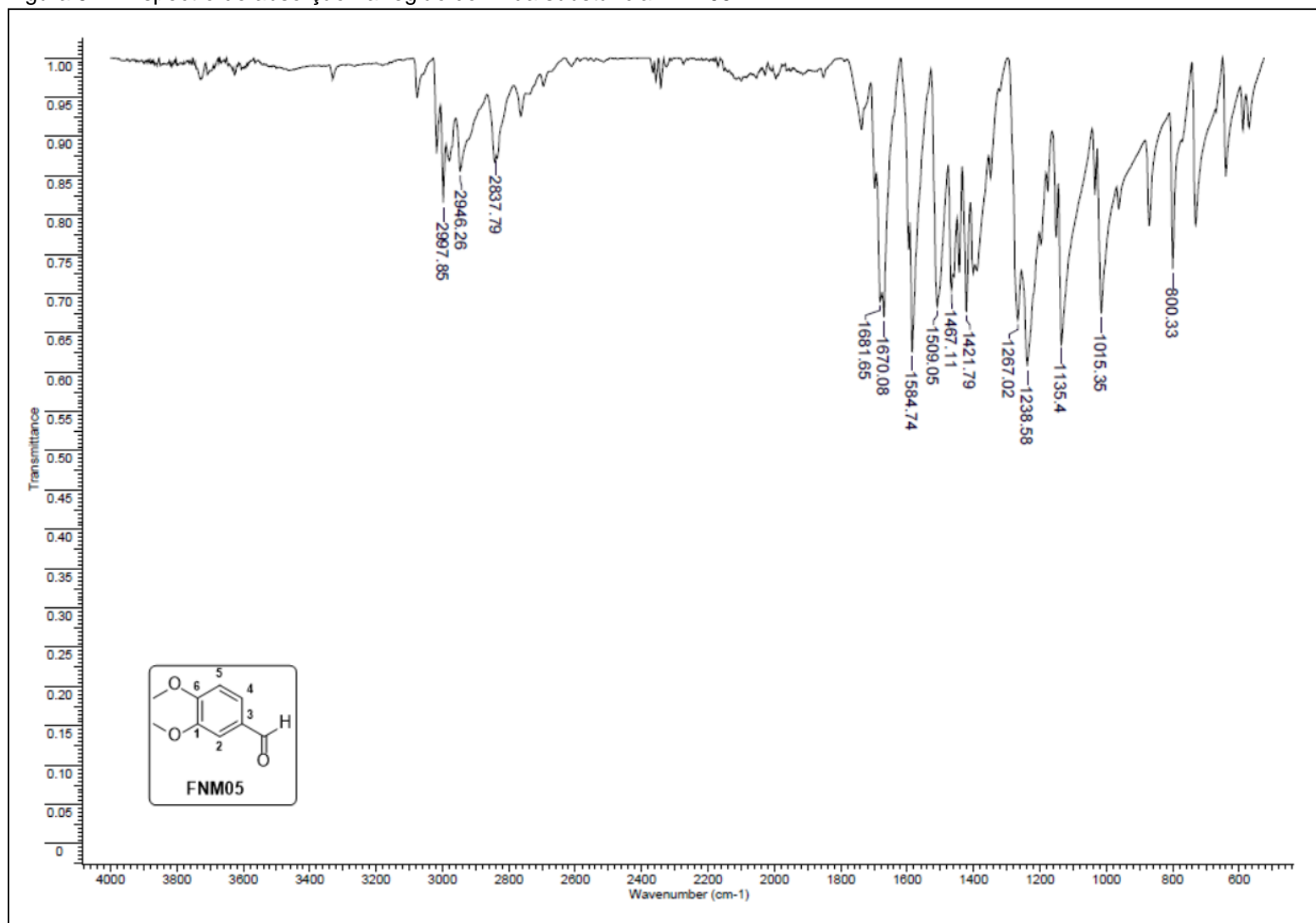
Fonte: Da autora.

Figura 49 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **FNM01** ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

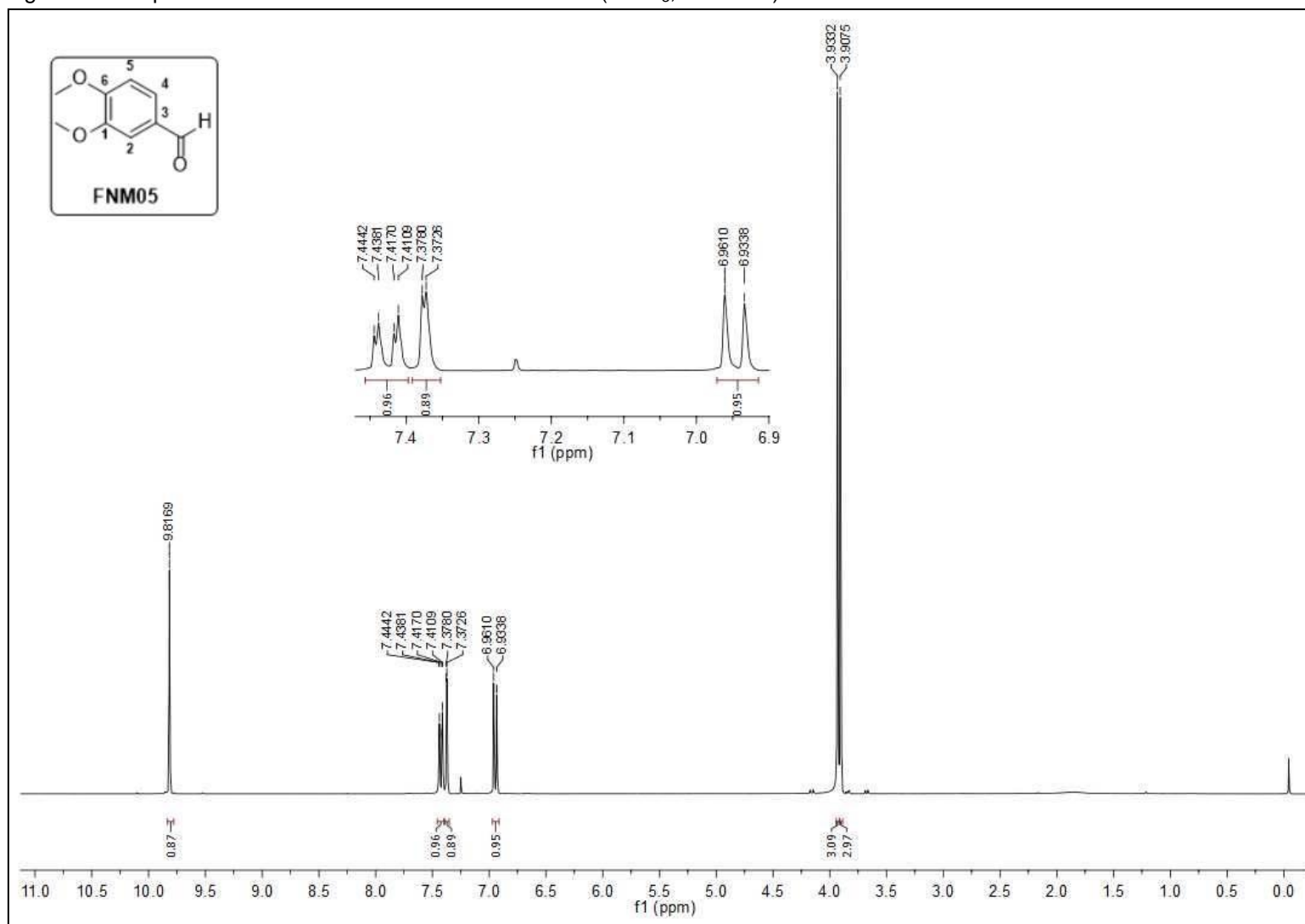
Fonte: Da autora.

Figura 50 – Subespectro DEPT-135 da substância **FNM01** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz).

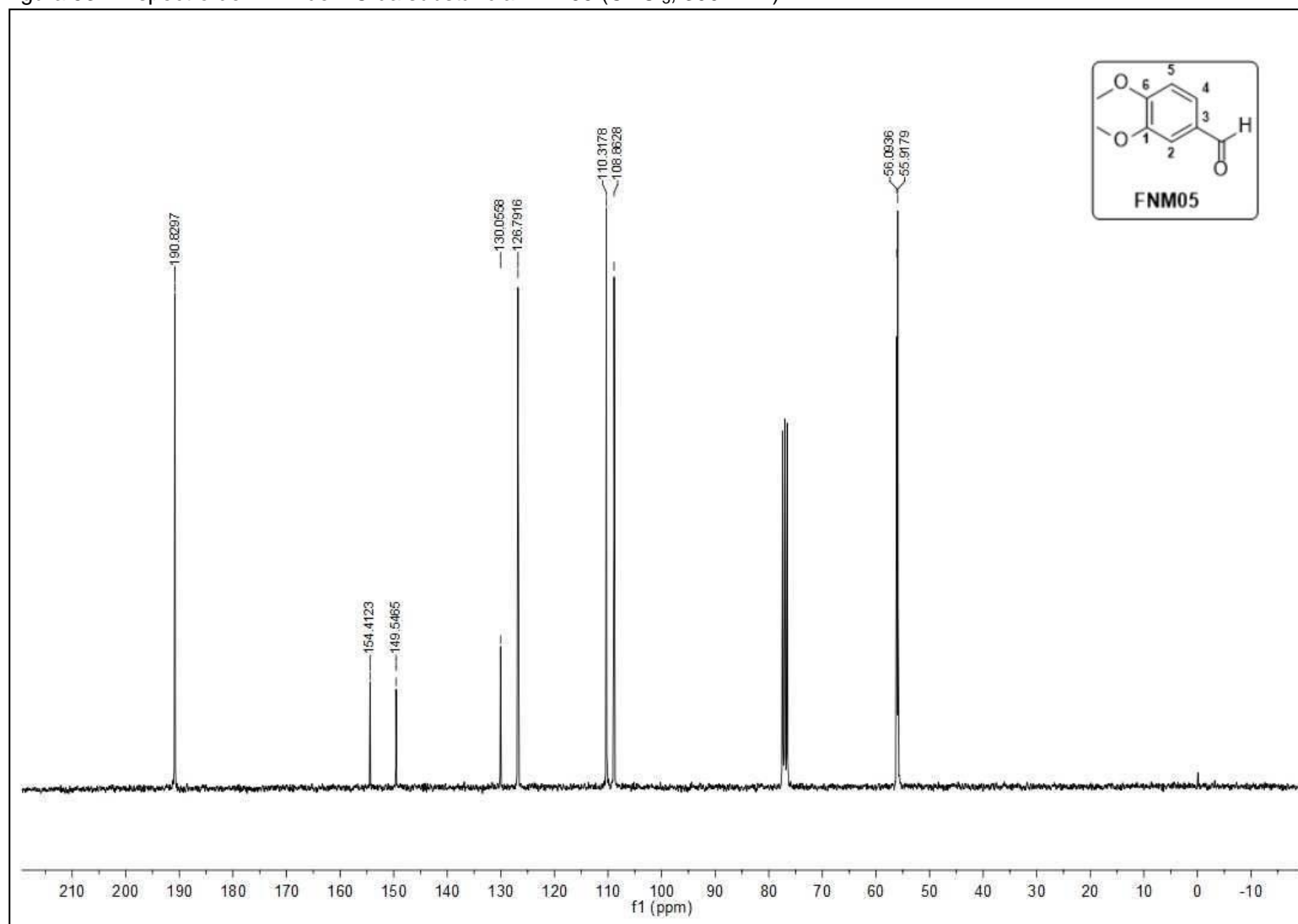
Fonte: Da autora.

Figura 51 – Espectro de absorção na região do IV da substância **FNM05**.

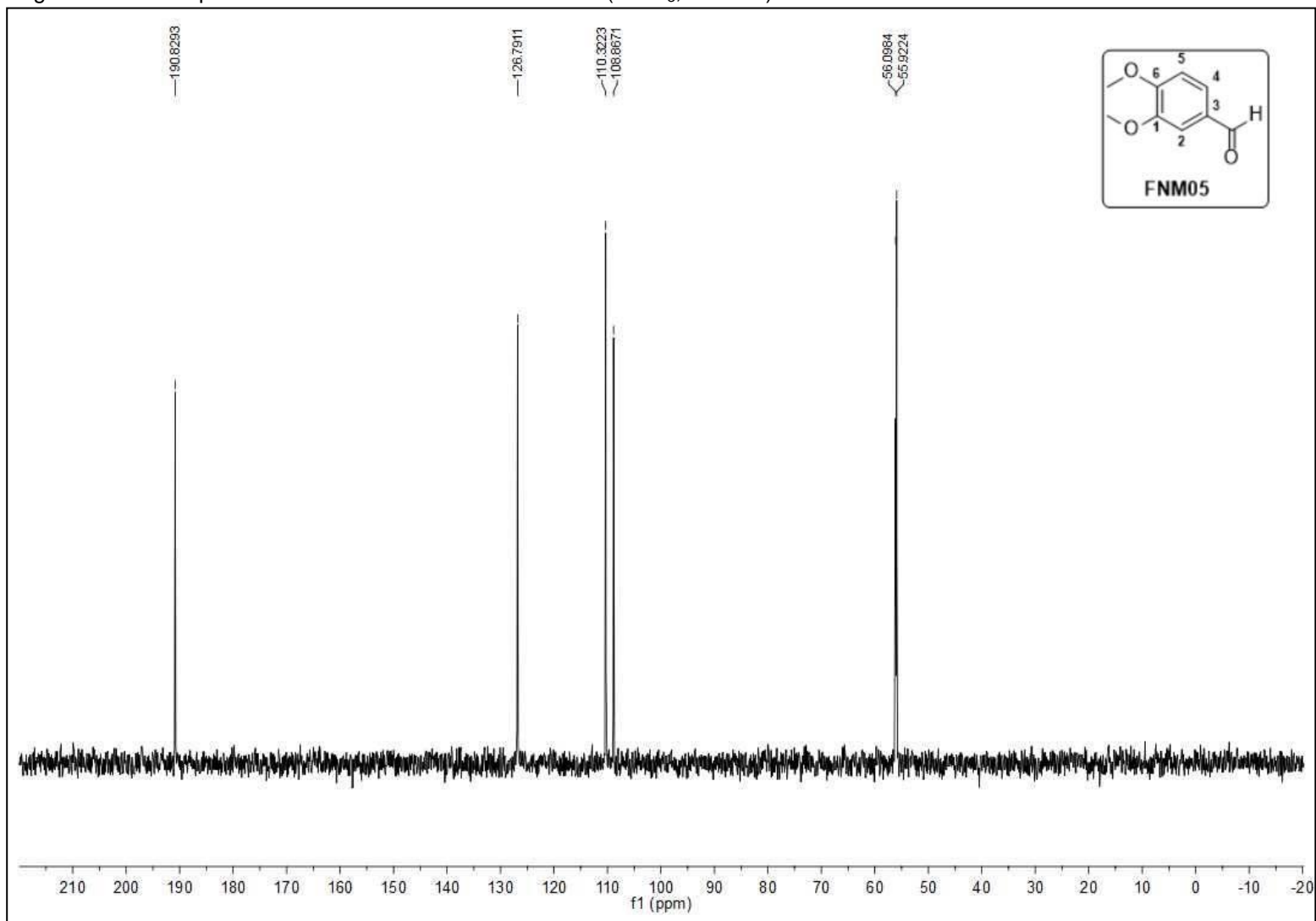
Fonte: Da autora.

Figura 52 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **FNM05** ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

Fonte: Da autora.

Figura 53 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **FNM05** ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

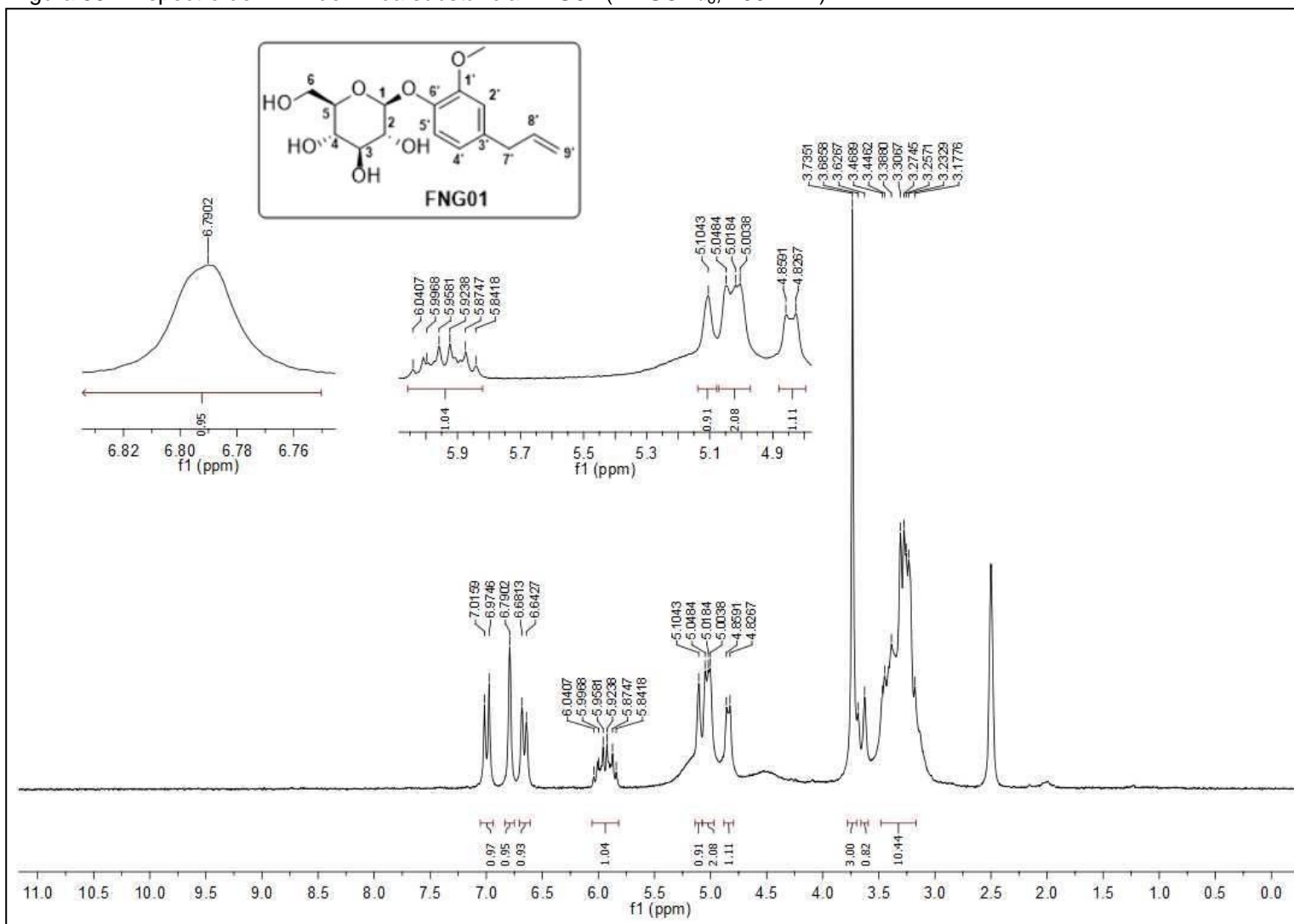
Fonte: Da autora.

Figura 54 – Subespectro DEPT-135 da substância **FNM05** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz).

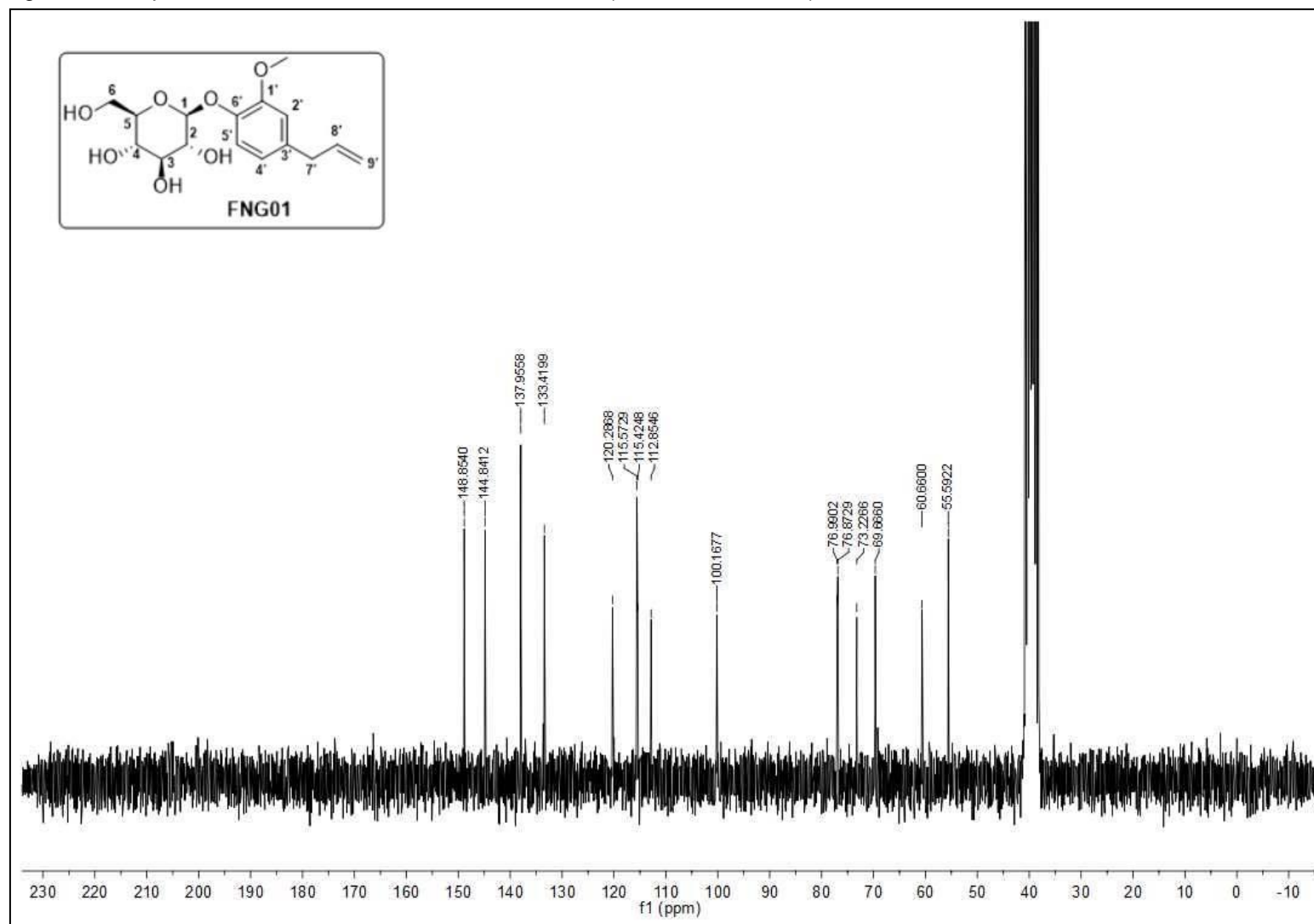
Fonte: Da autora.



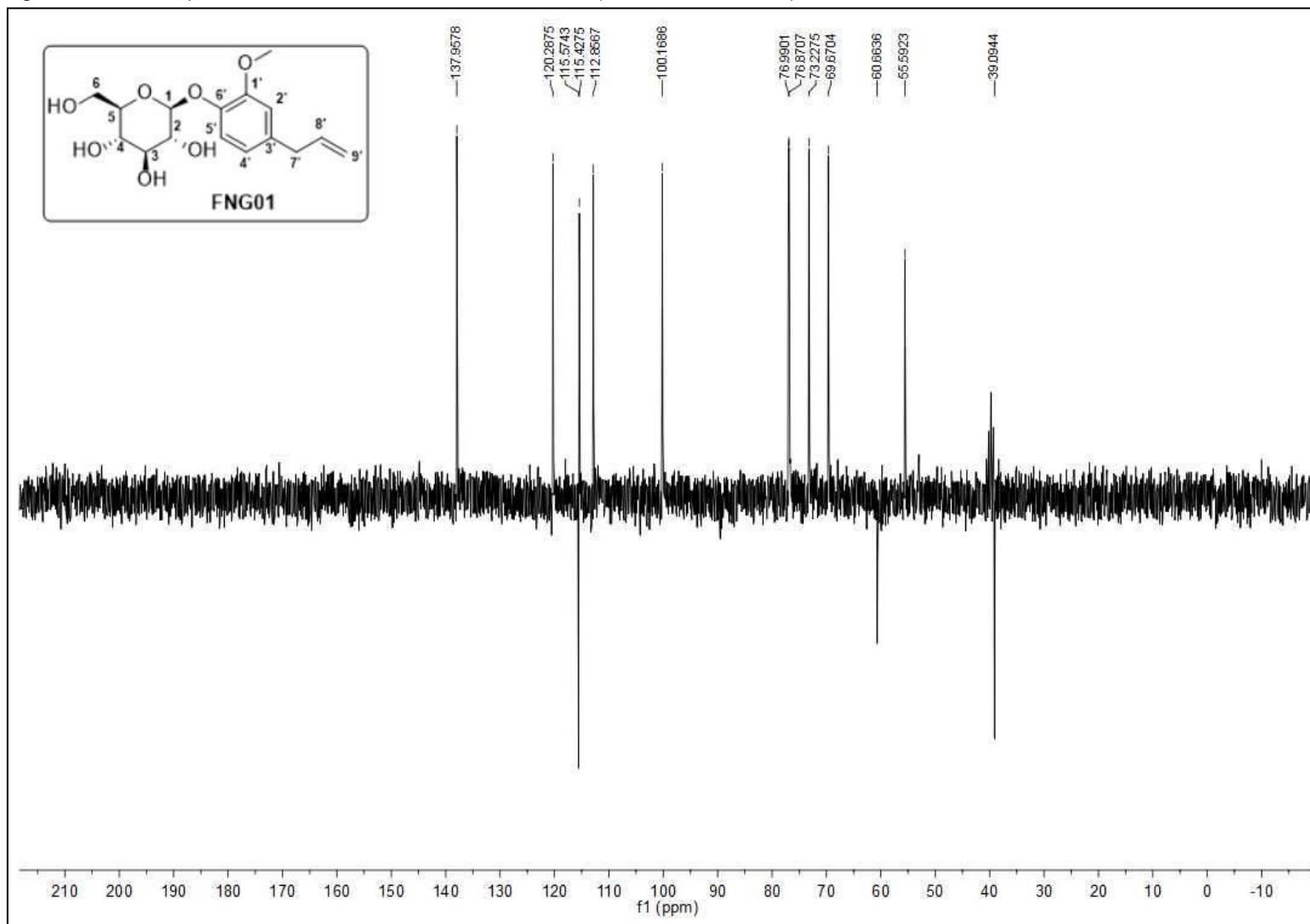
Figura 56 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **FNG01** (DMSO-  $d_6$ , 200 MHz).



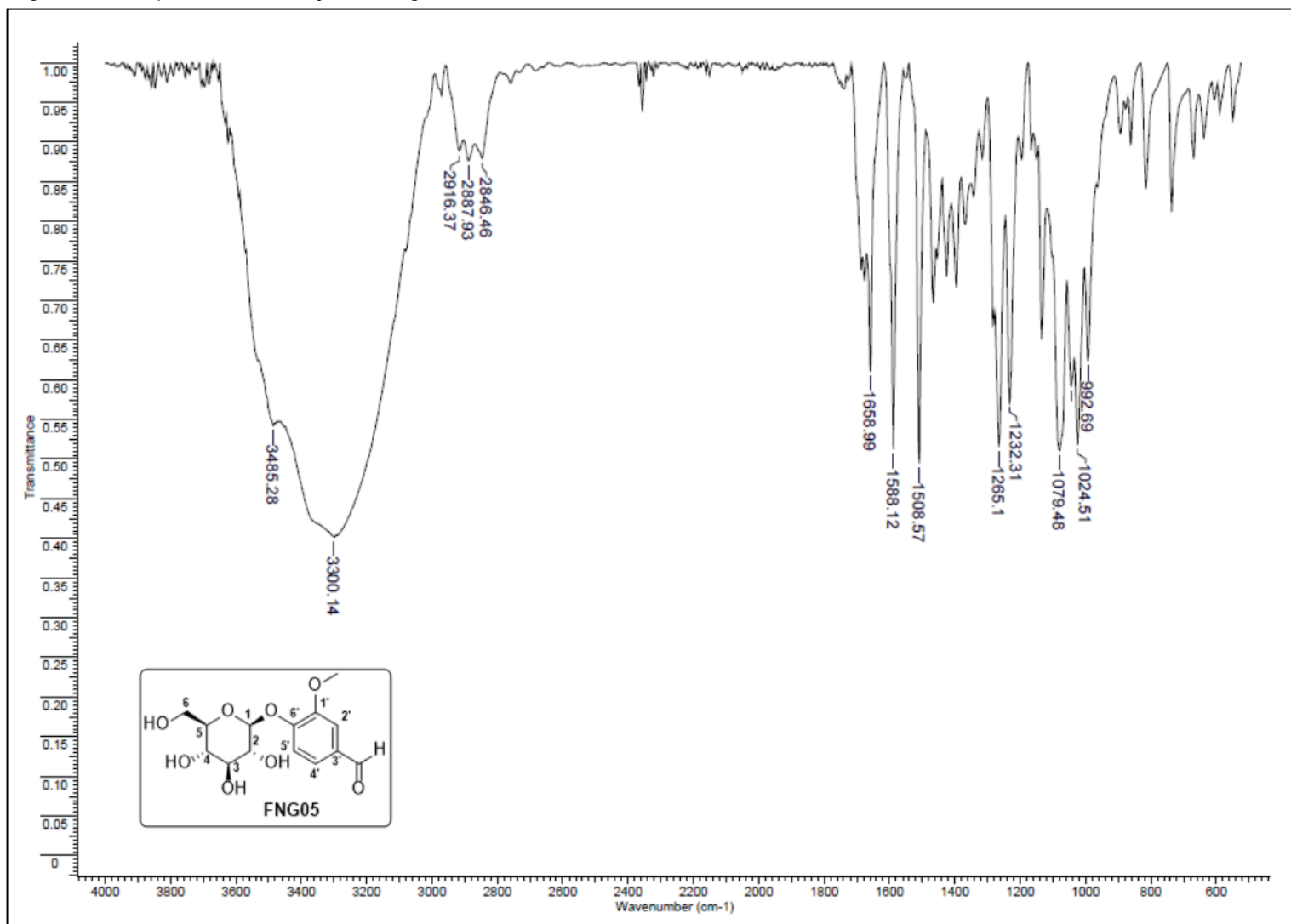
Fonte: Da autora.

Figura 57 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **FNG01** (DMSO-  $d_6$ , 50 MHz).

Fonte: Da autora.

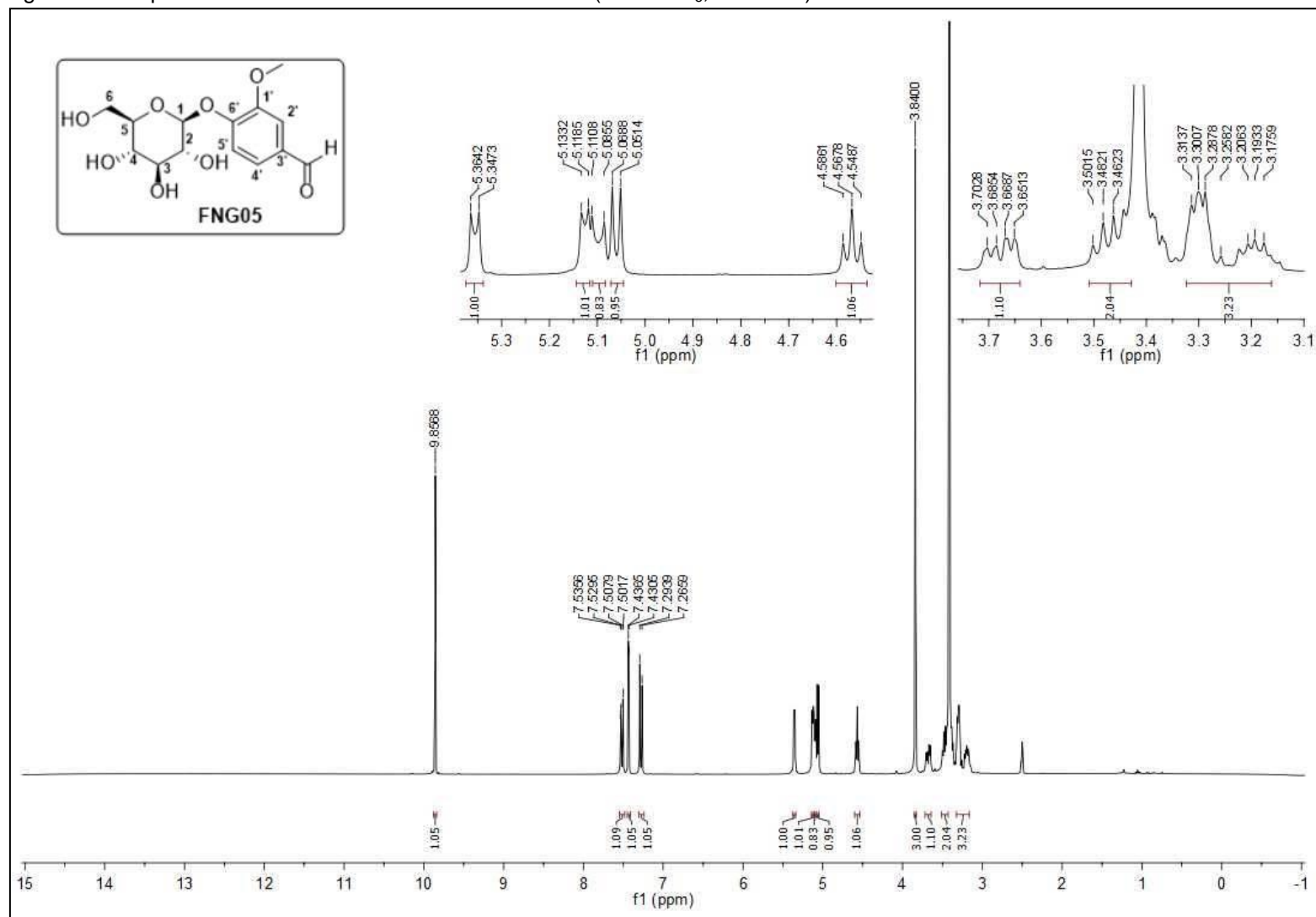
Figura 58 – Subespectro DEPT-135 da substância **FNG01** (DMSO- $d_6$ , 50 MHz).

Fonte: Da autora.

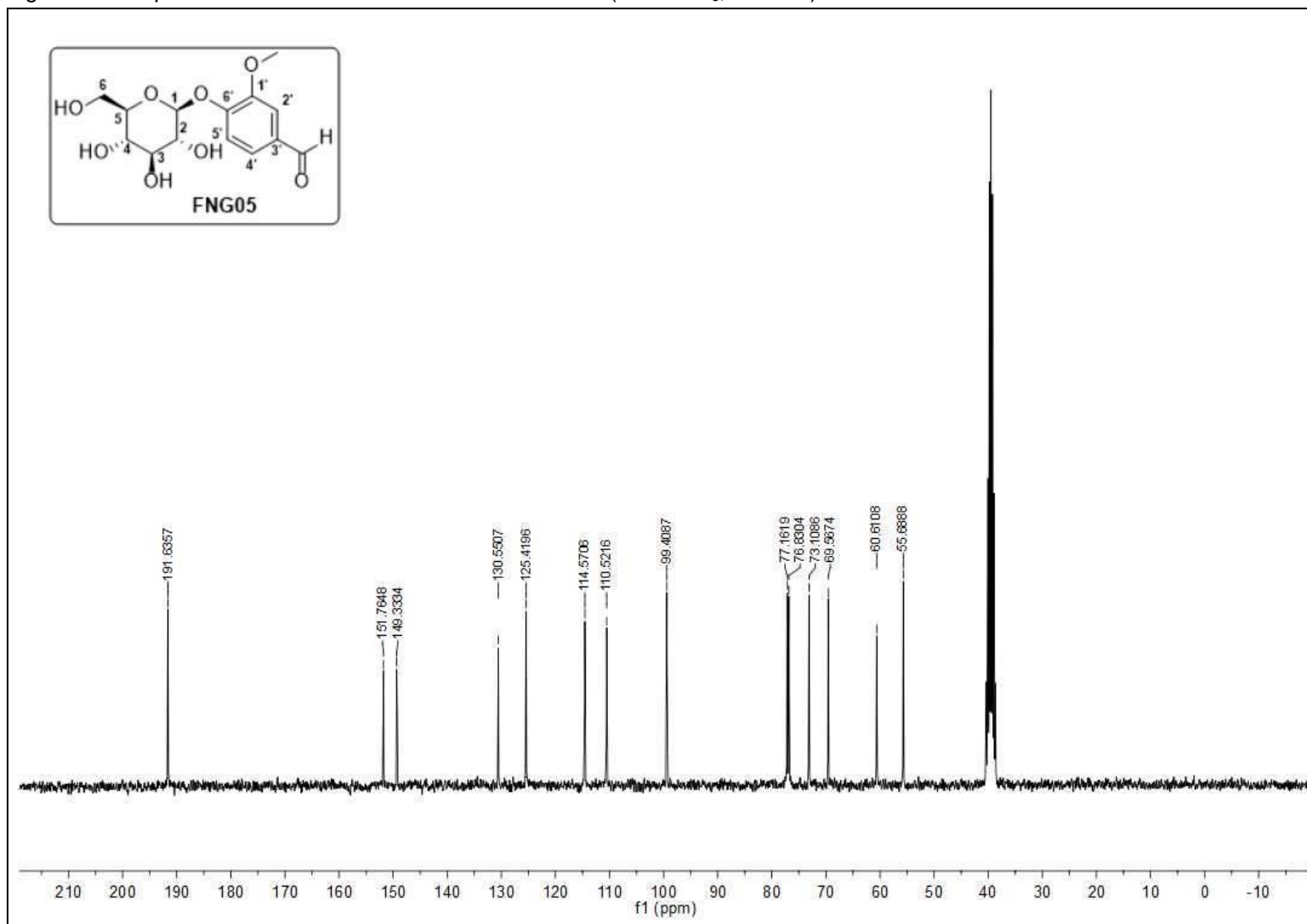
Figura 59 – Espectro de absorção na região do IV da substância **FNG05**.

Fonte: Da autora.

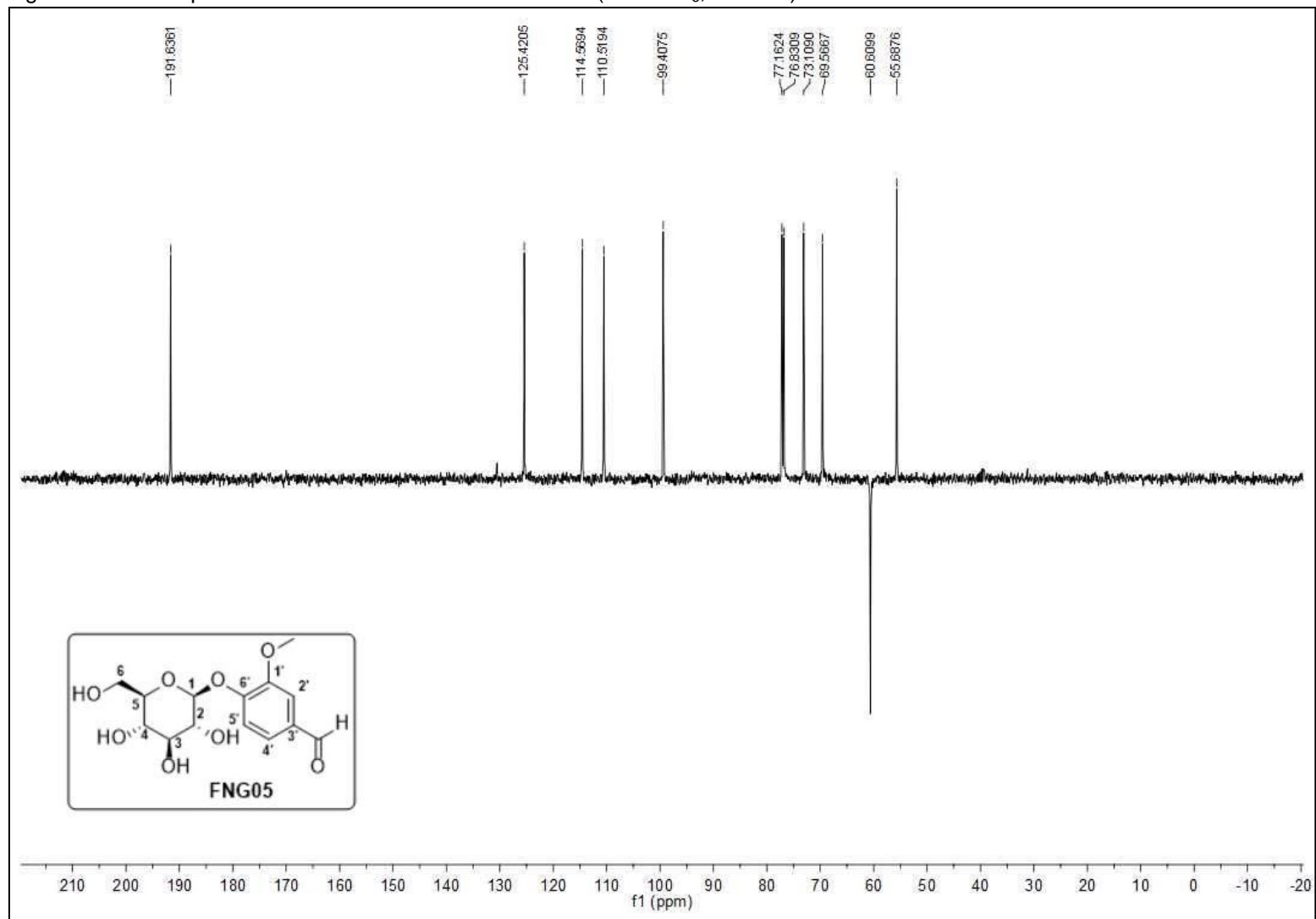
Figura 60 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **FNG05** (DMSO-  $d_6$ , 300 MHz).



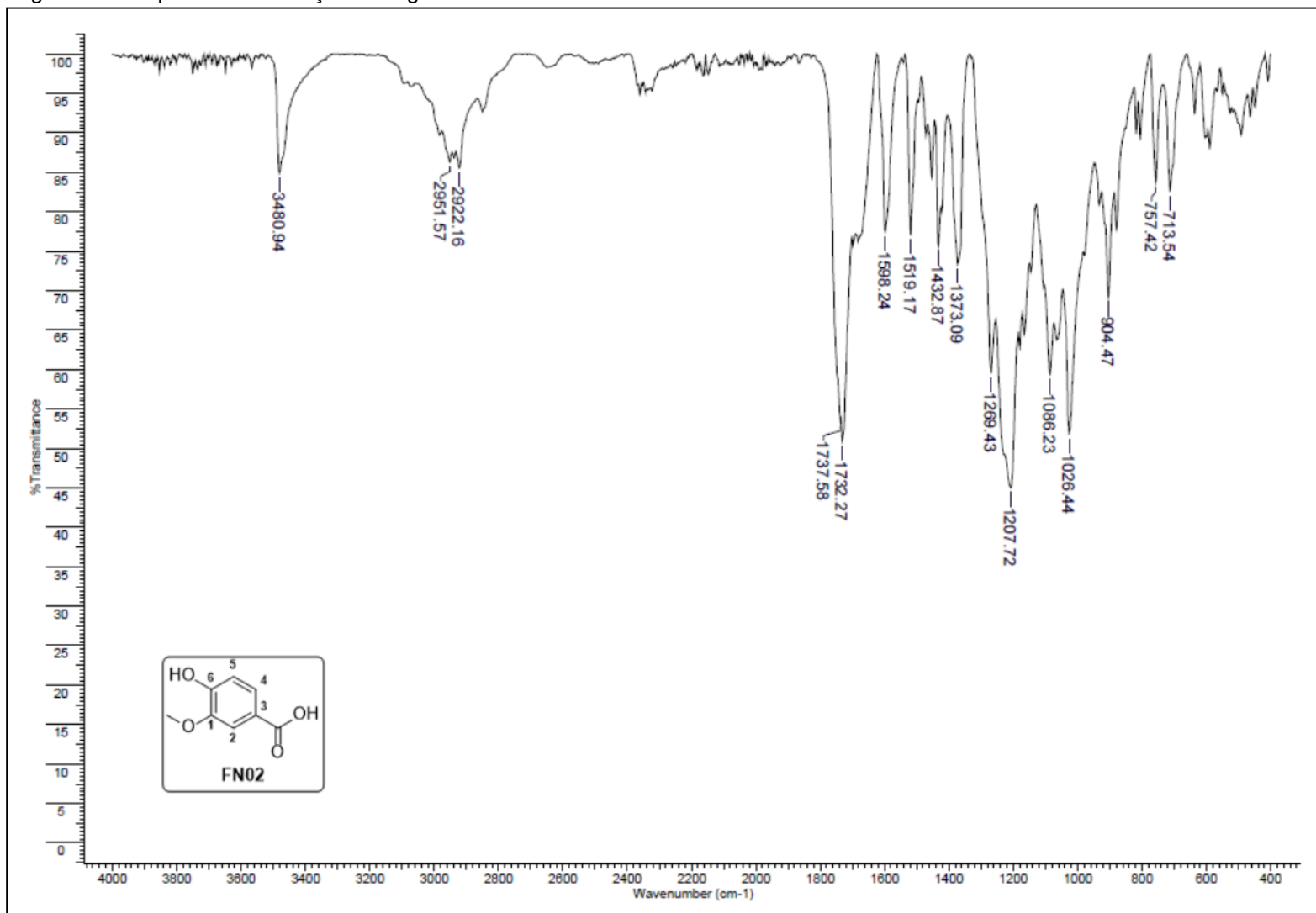
Fonte: Da autora.

Figura 61 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **FNG05** (DMSO-  $d_6$ , 75 MHz).

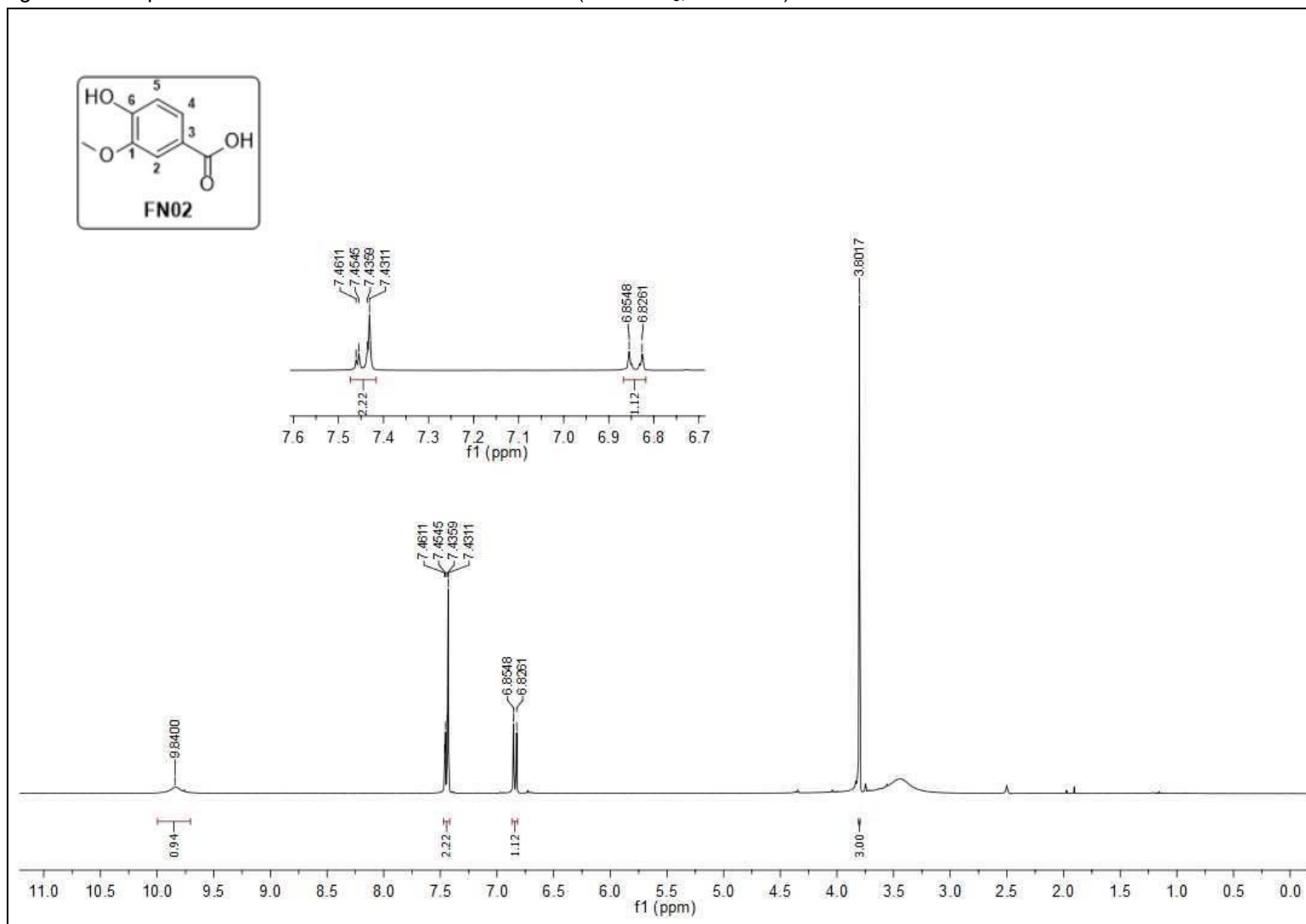
Fonte: Da autora.

Figura 62 – Subespectro DEPT-135 da substância **FNG05** (DMSO- $d_6$ , 75 MHz).

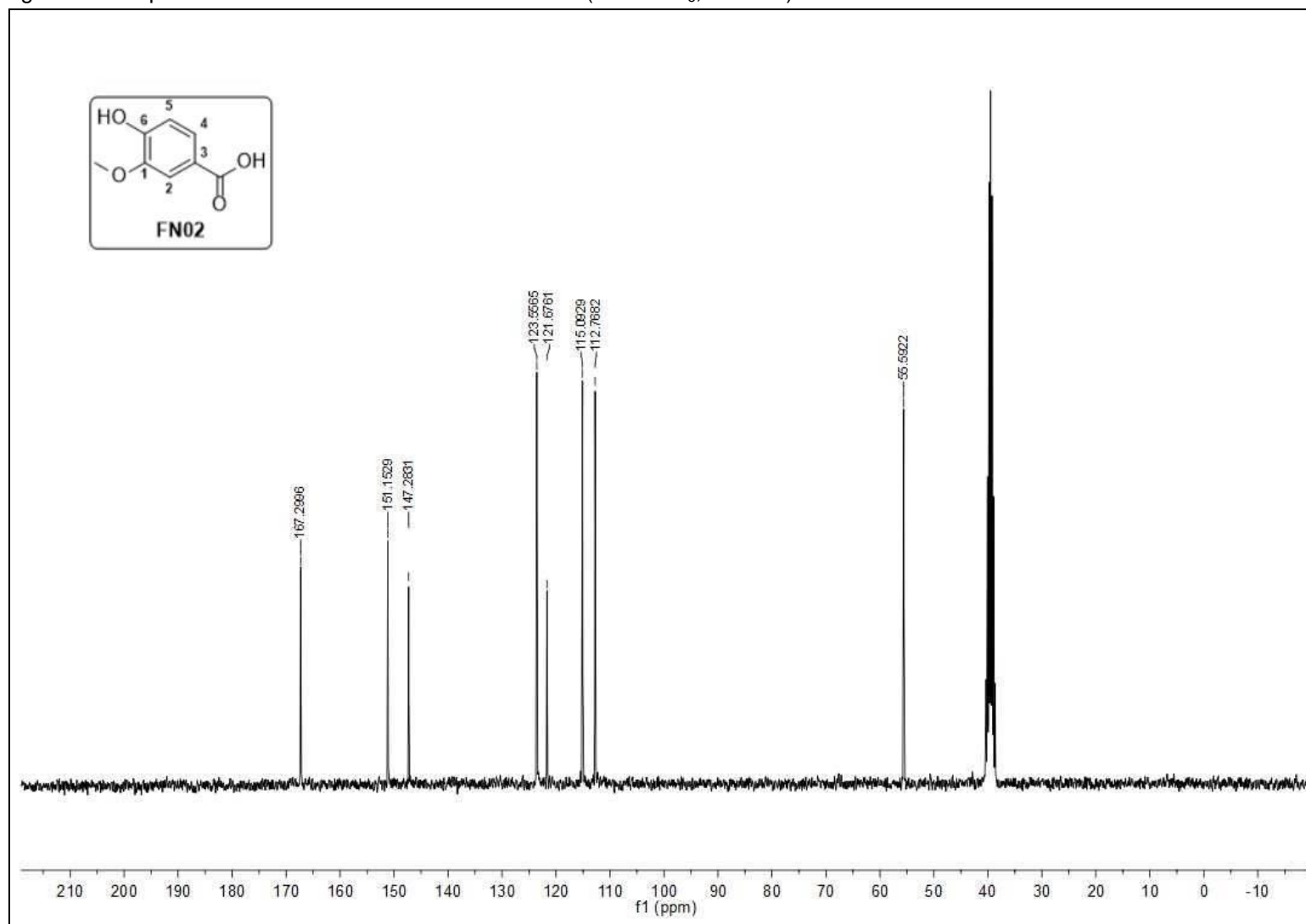
Fonte: Da autora.

Figura 63 – Espectro de absorção na região do IV da substância **FN02**.

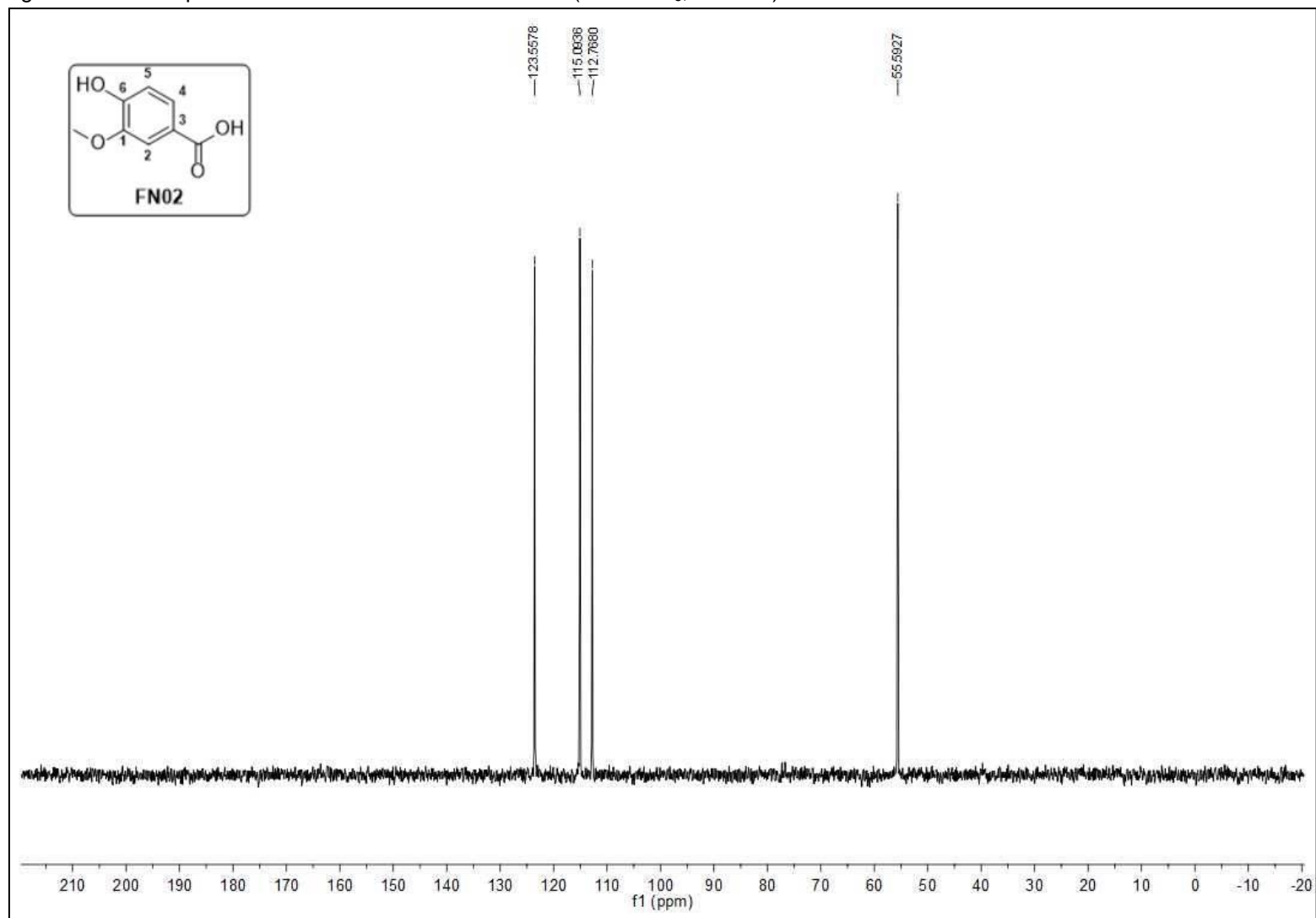
Fonte: Da autora.

Figura 64 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **FN02** (DMSO- $d_6$ , 300 MHz).

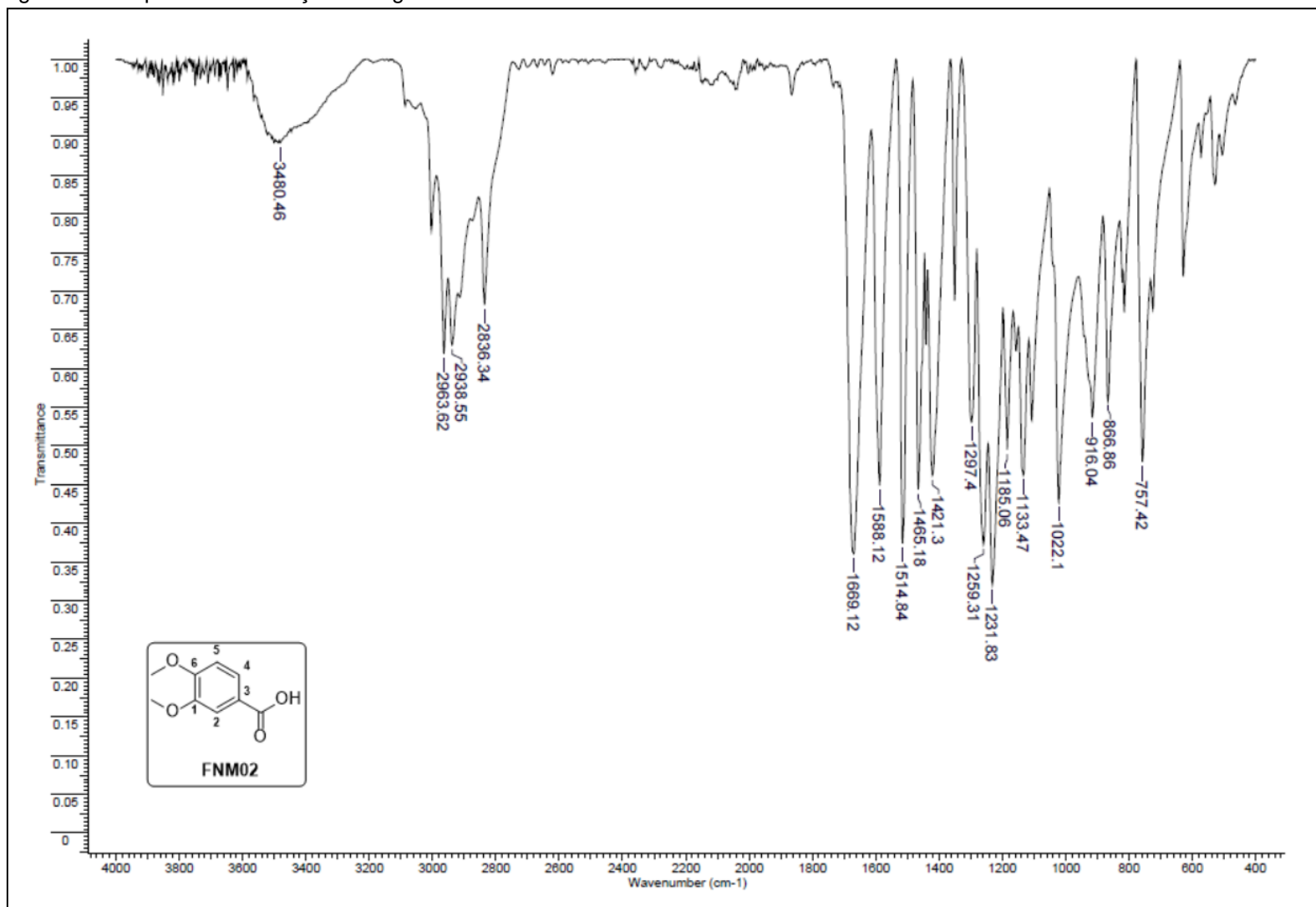
Fonte: Da autora.

Figura 65 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **FN02** (DMSO-  $d_6$ , 75 MHz).

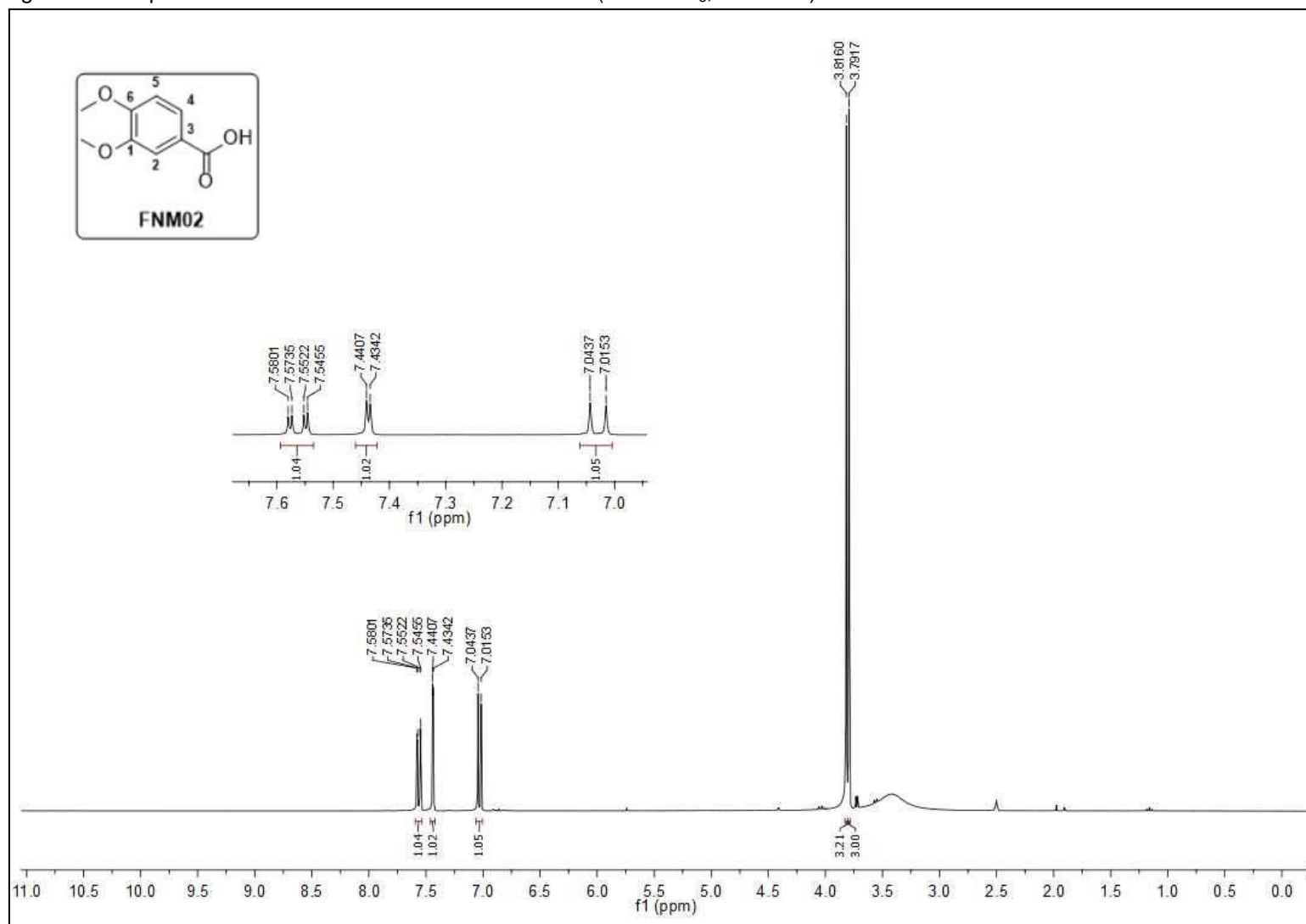
Fonte: Da autora.

Figura 66 – Subespectro DEPT-135 da substância **FN02** (DMSO-  $d_6$ , 75 MHz).

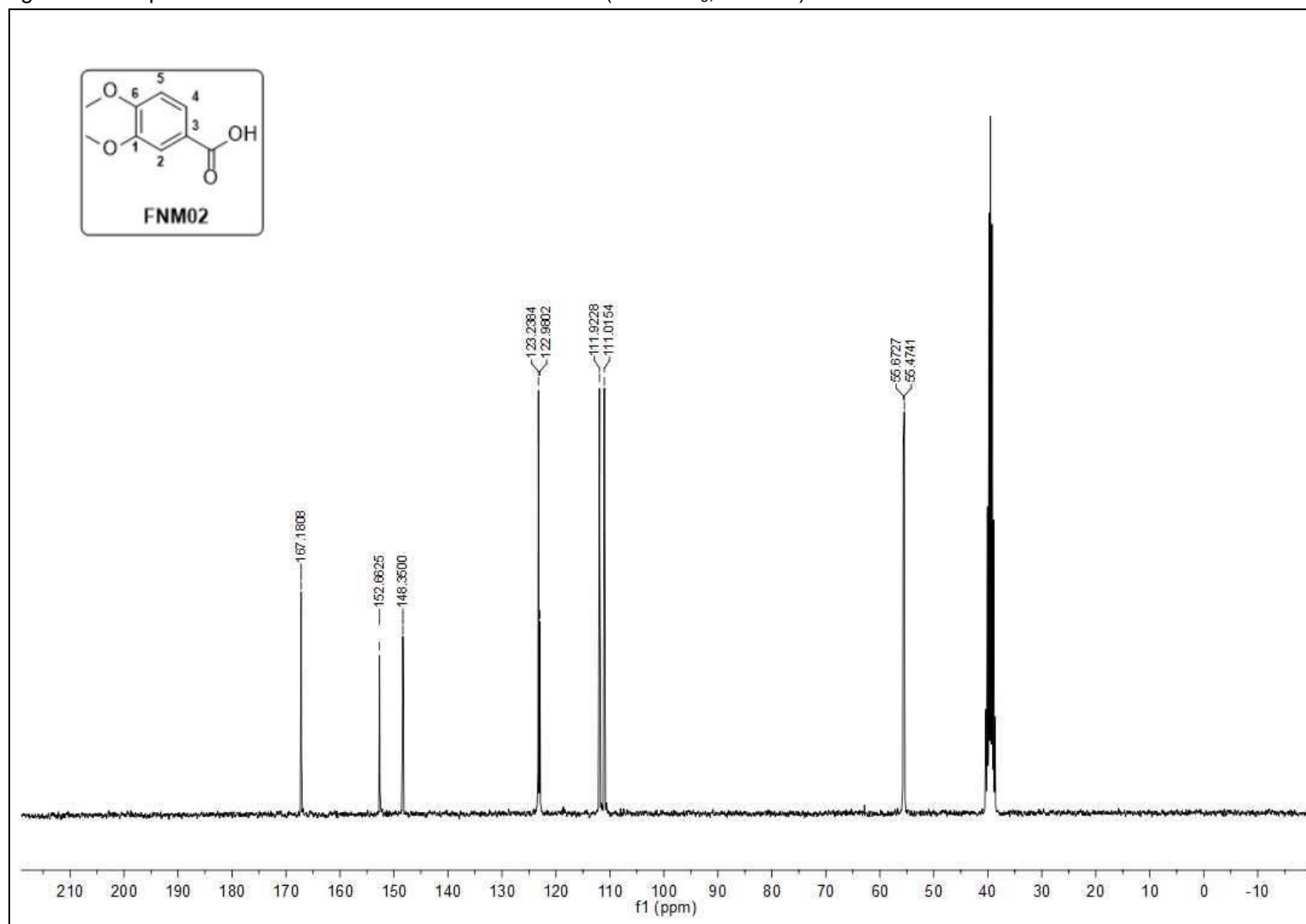
Fonte: Da autora.

Figura 67 – Espectro de absorção na região do IV da substância **FNM02**.

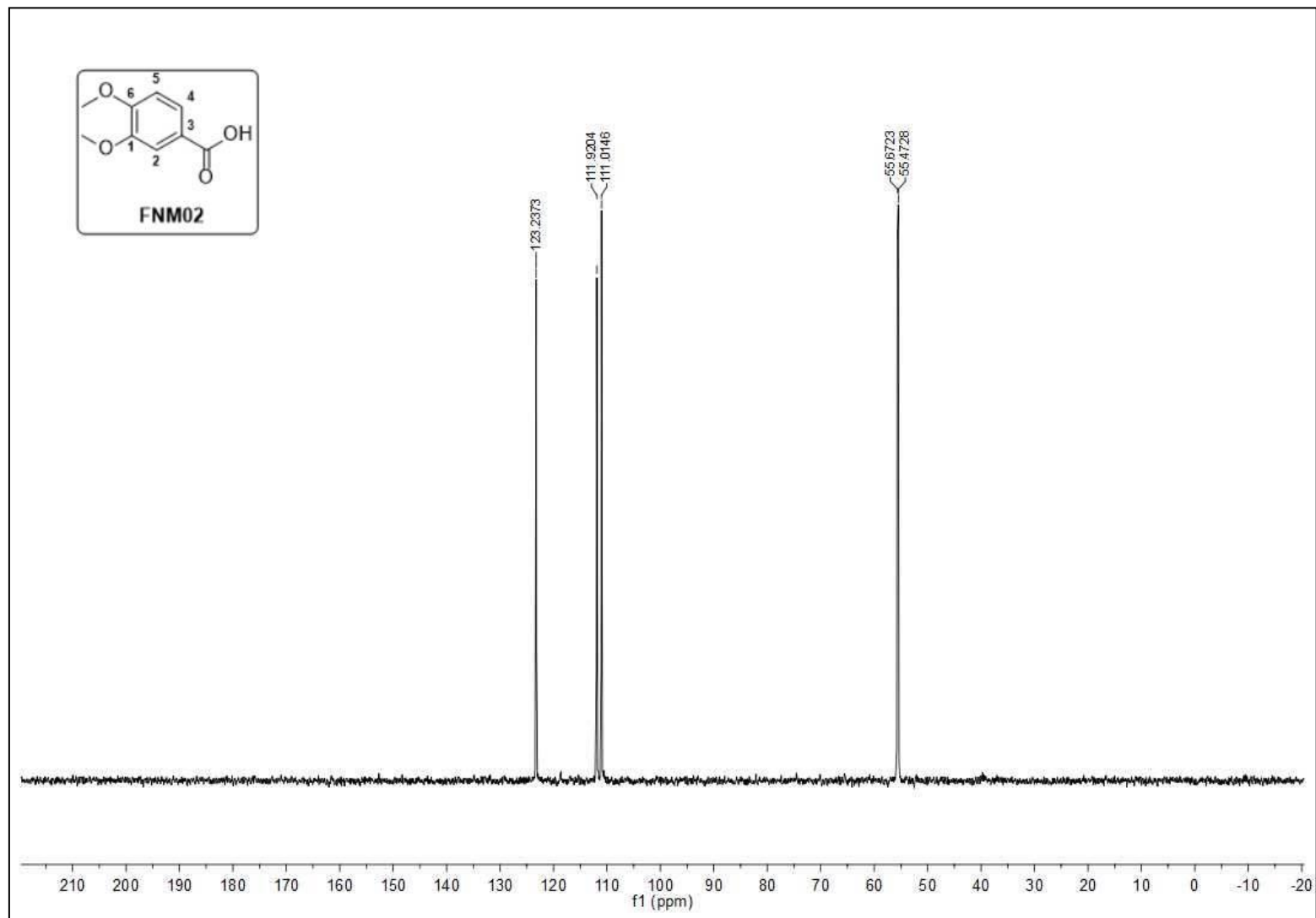
Fonte: Da autora.

Figura 68 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **FNM02** (DMSO-  $d_6$ , 300 MHz).

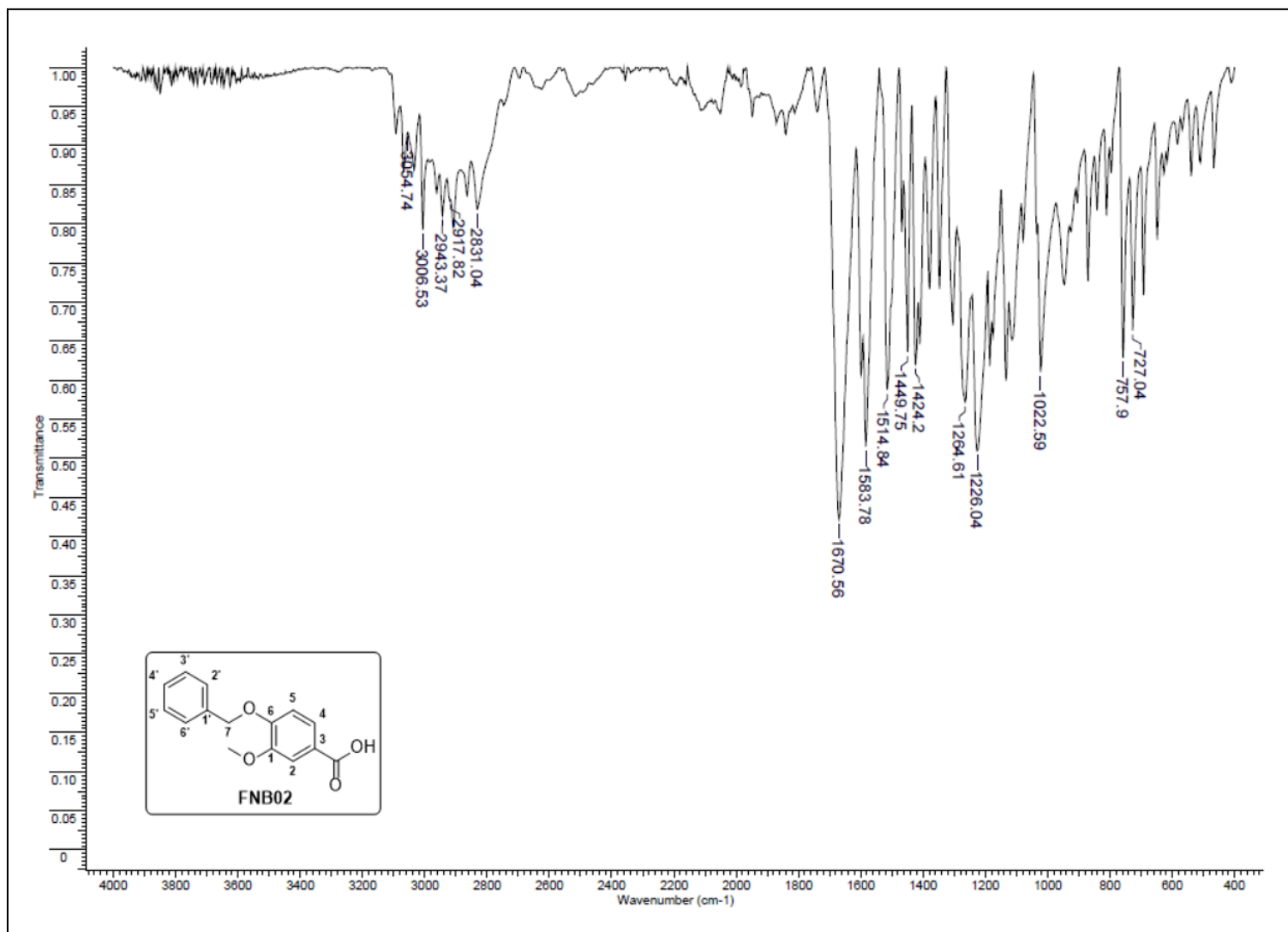
Fonte: Da autora.

Figura 69 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **FNM02** (DMSO- $d_6$ , 75 MHz).

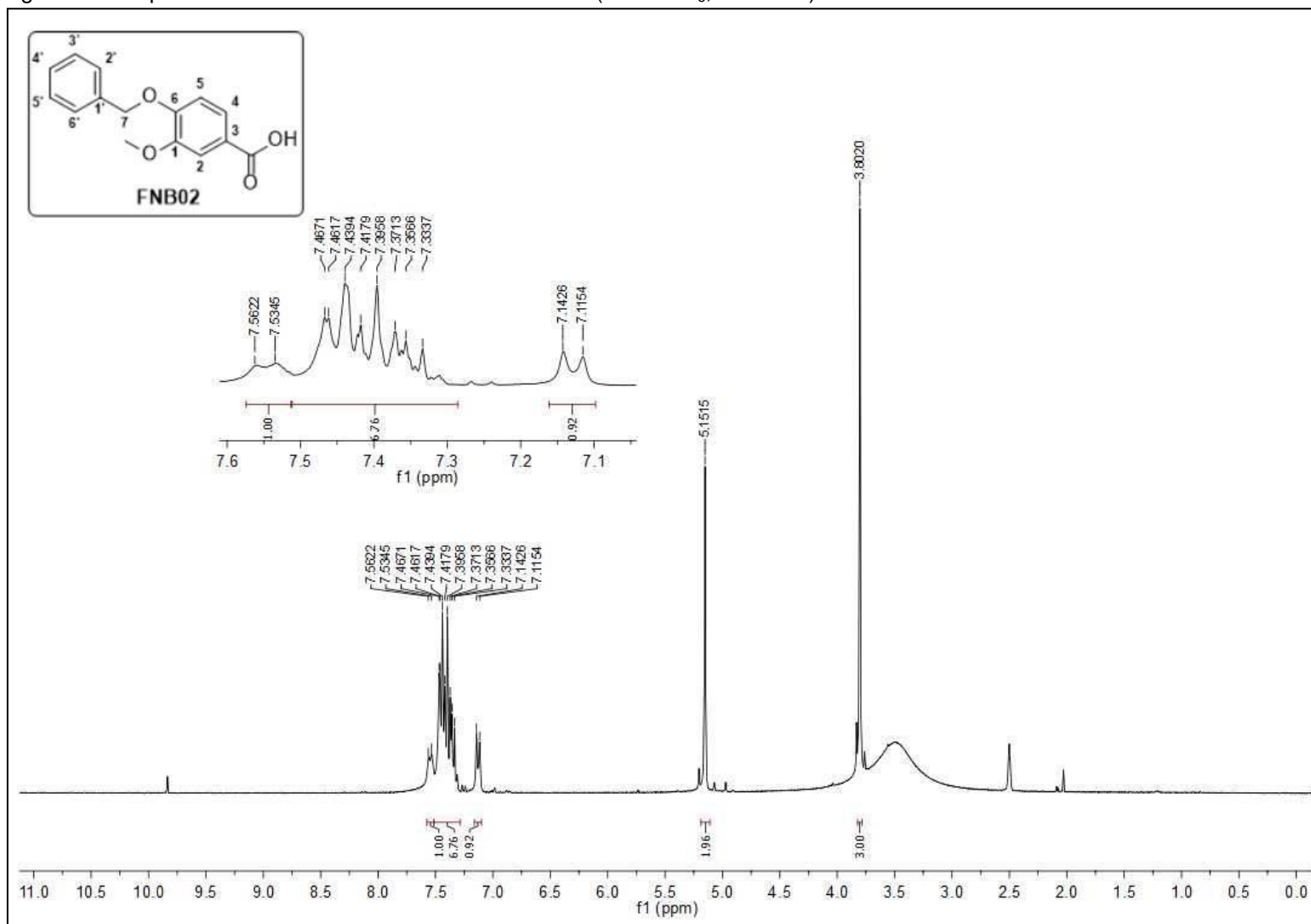
Fonte: Da autora.

Figura 70 – Subespectro DEPT-135 da substância **FNM02** (DMSO-  $d_6$ , 75 MHz).

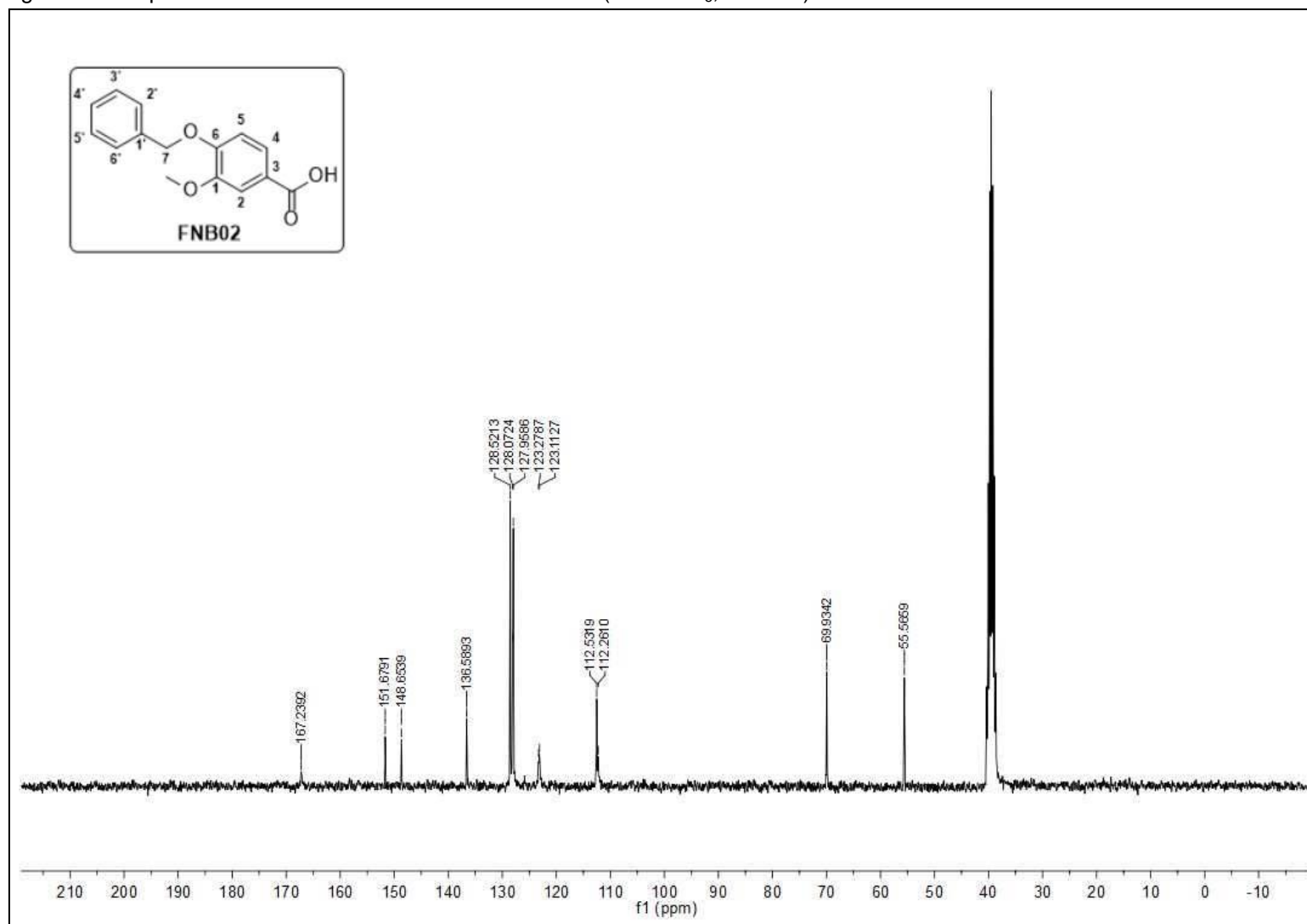
Fonte: Da autora.

Figura 71 – Espectro de absorção na região do IV da substância **FNB02**.

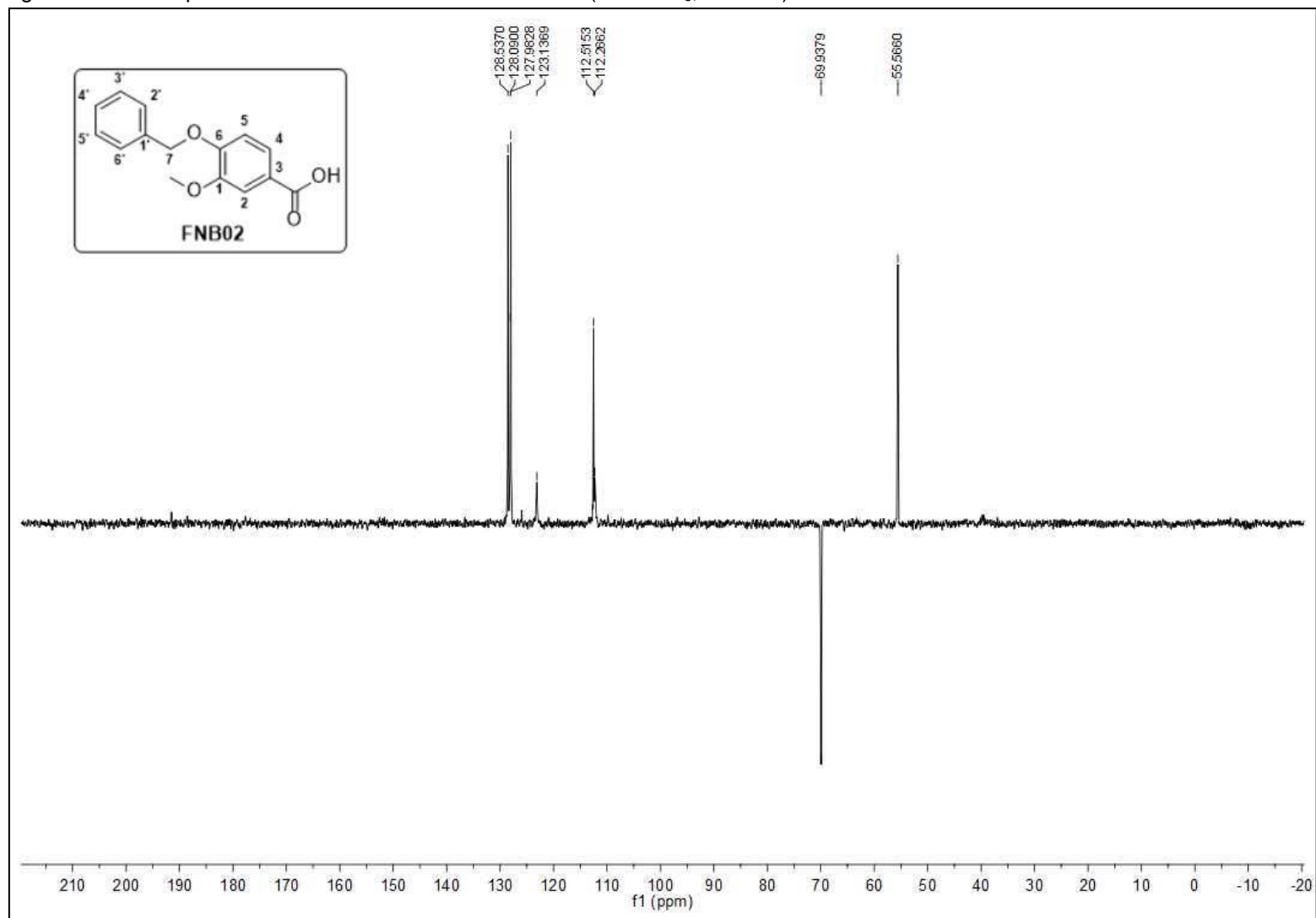
Fonte: Da autora.

Figura 72 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **FNB02** (DMSO-  $d_6$ , 300 MHz).

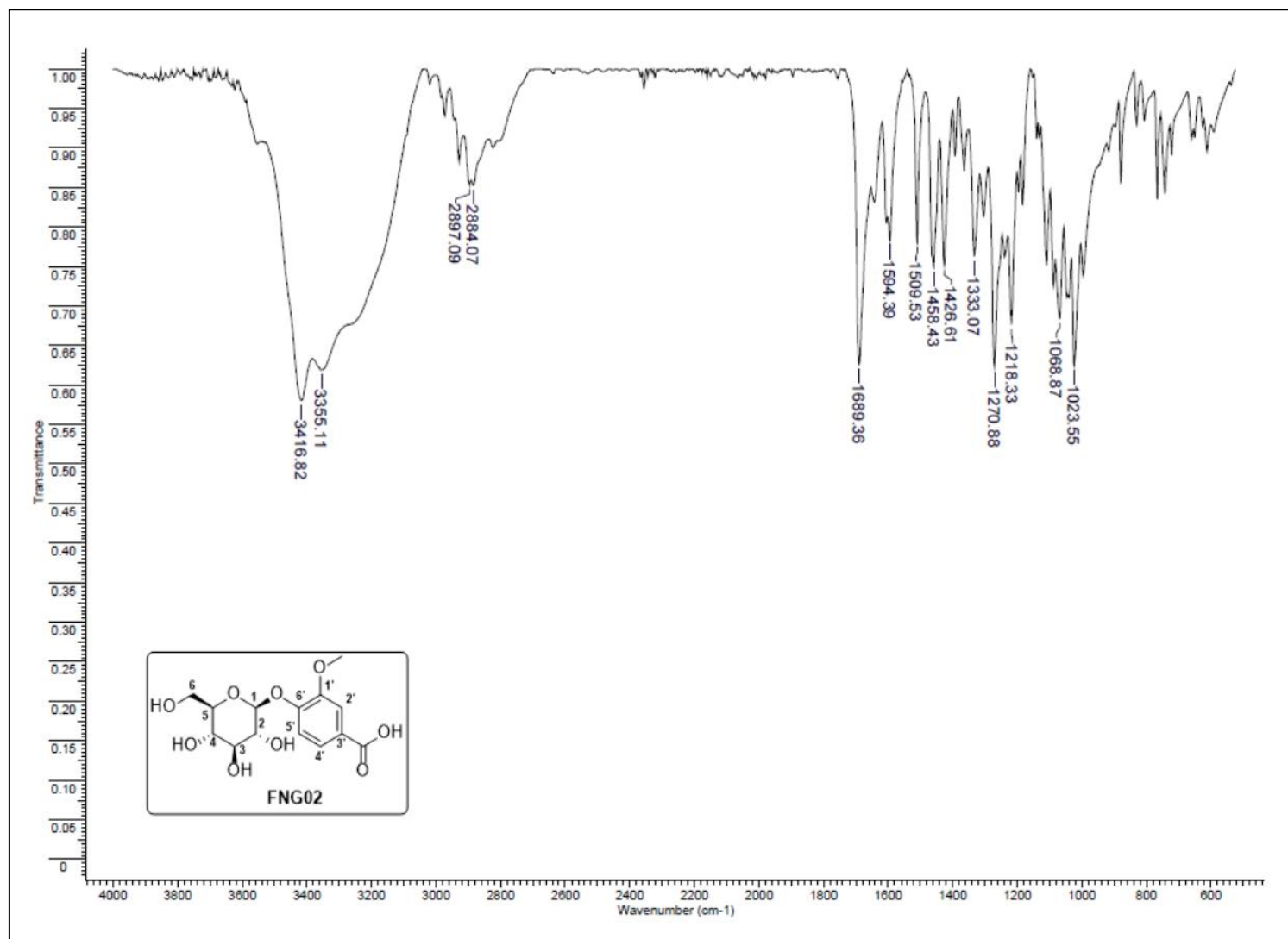
Fonte: Da autora.

Figura 73 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **FNB02** (DMSO-  $d_6$ , 75 MHz).

Fonte: Da autora.

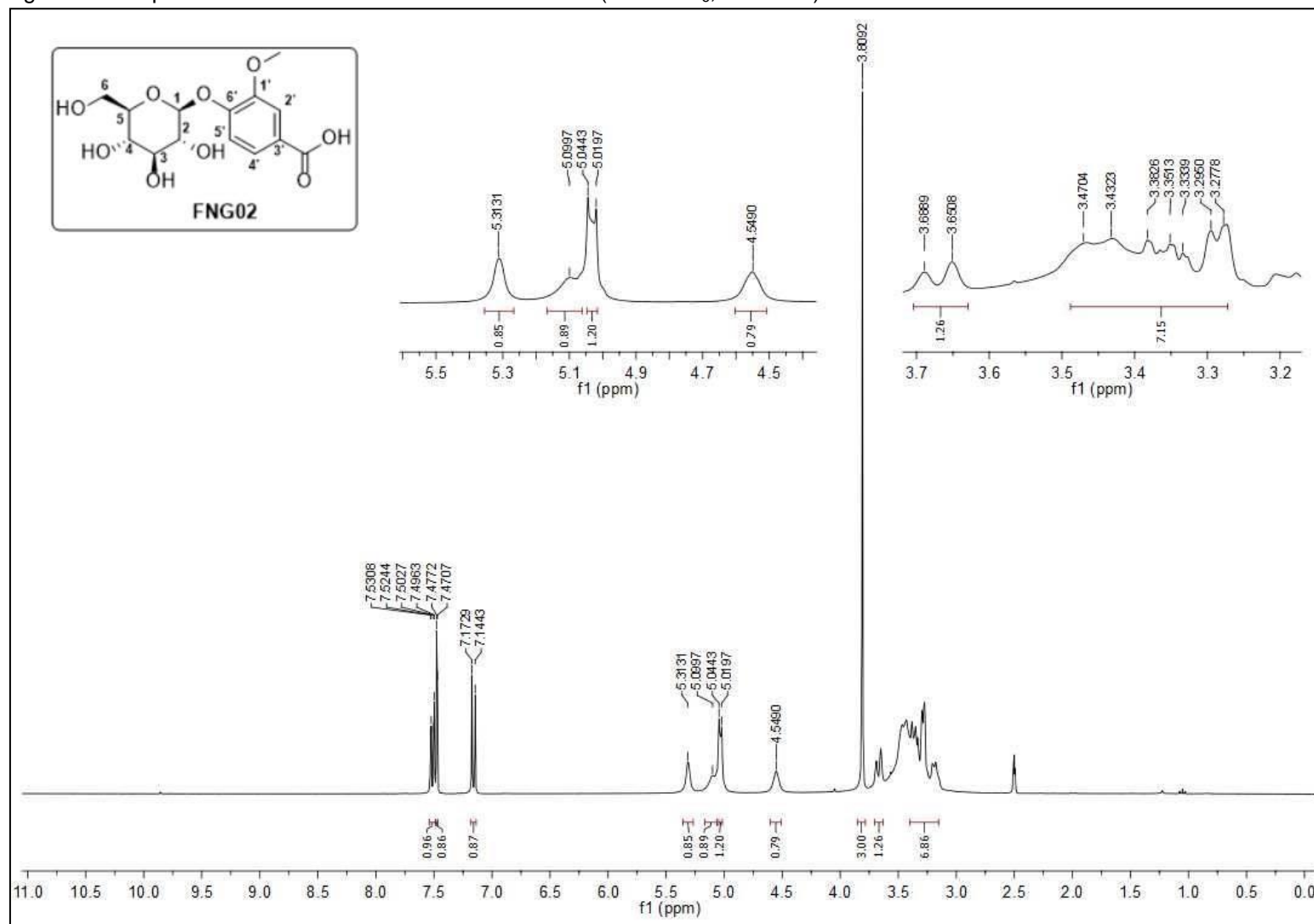
Figura 74 – Subespectro DEPT-135 da substância **FNB02** (DMSO- $d_6$ , 75 MHz).

Fonte: Da autora.

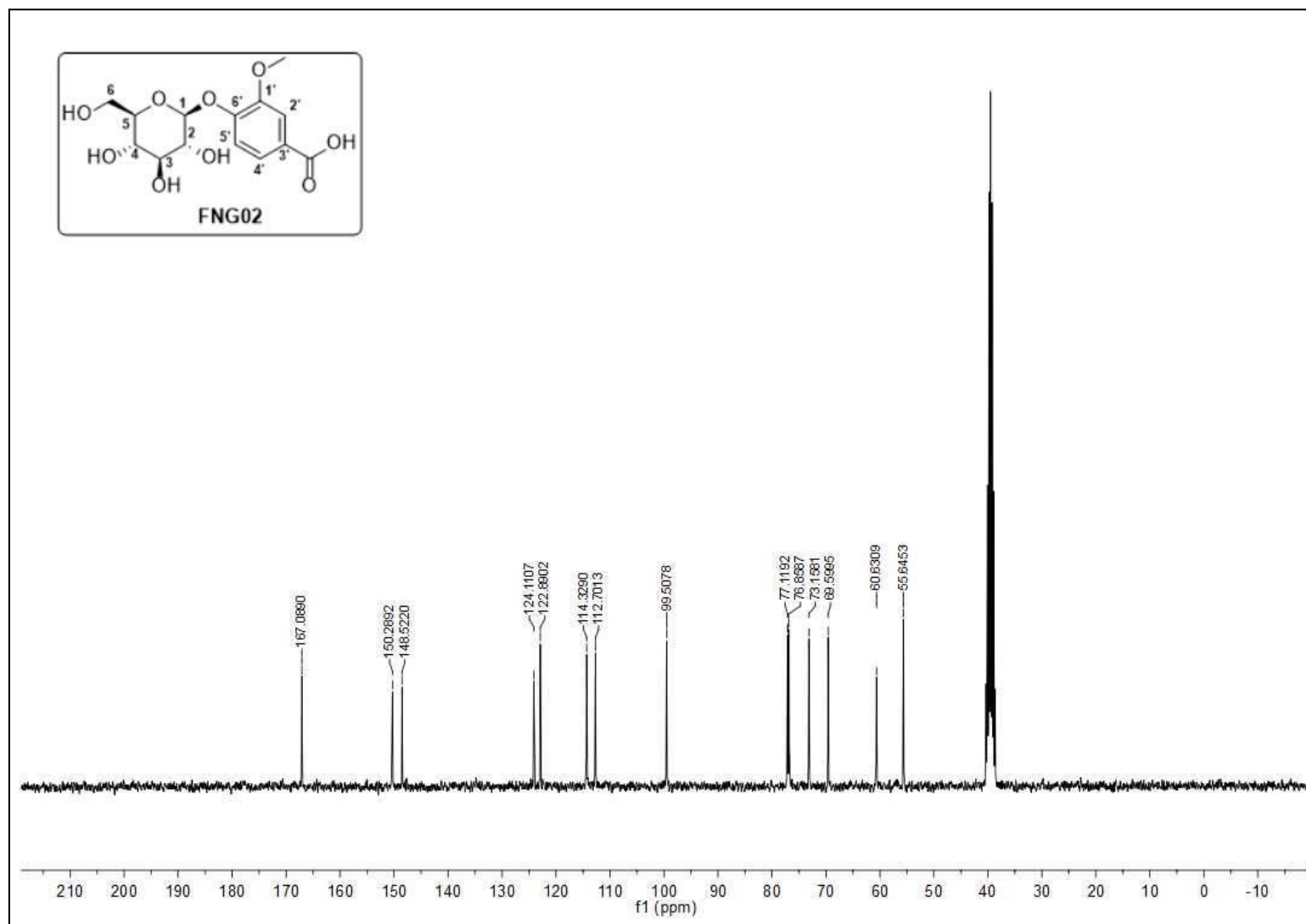
Figura 75 – Espectro de absorção na região do IV da substância **FNG02**.

Fonte: Da autora.

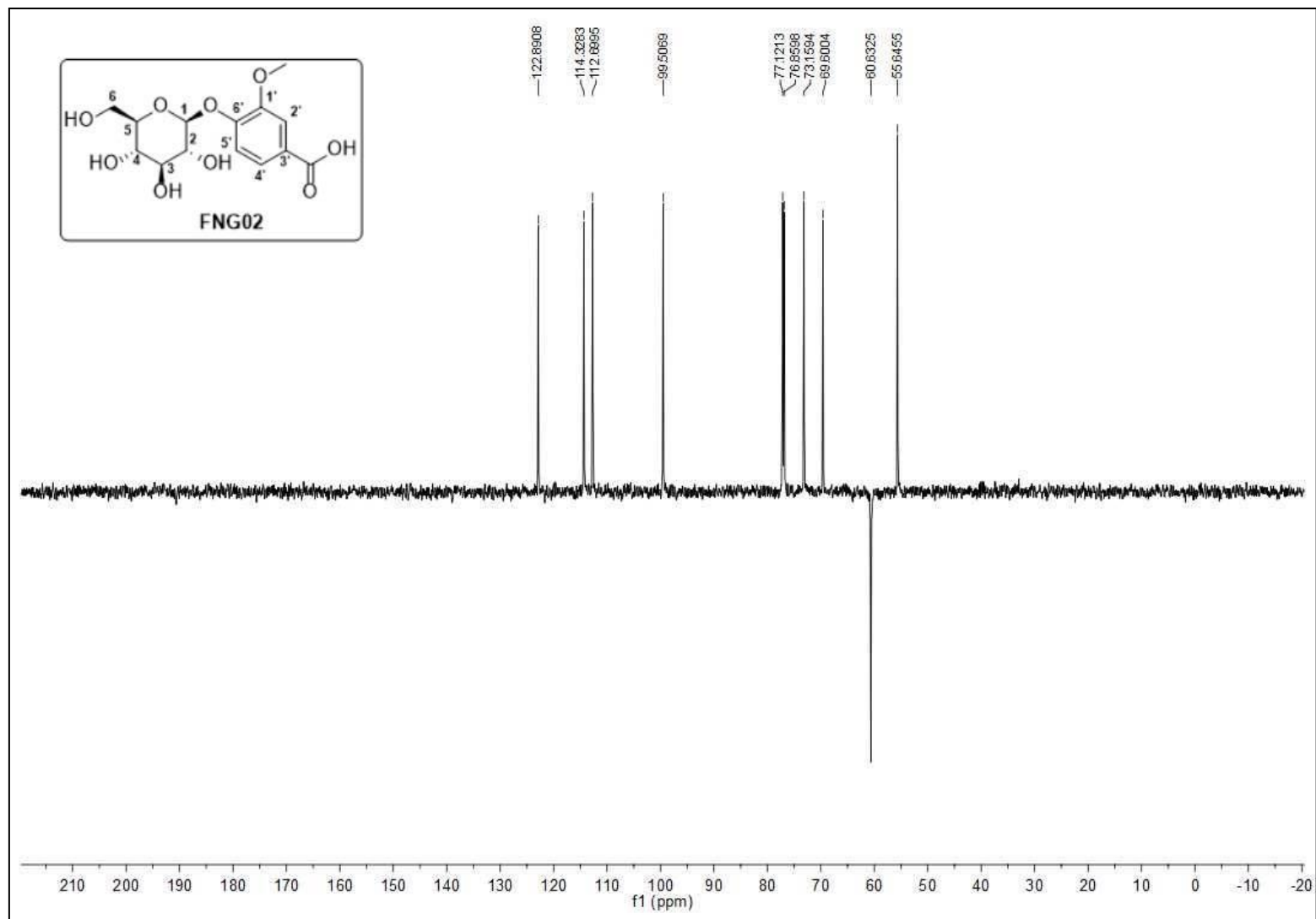
Figura 76 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **FNG02** (DMSO-  $d_6$ , 300 MHz).



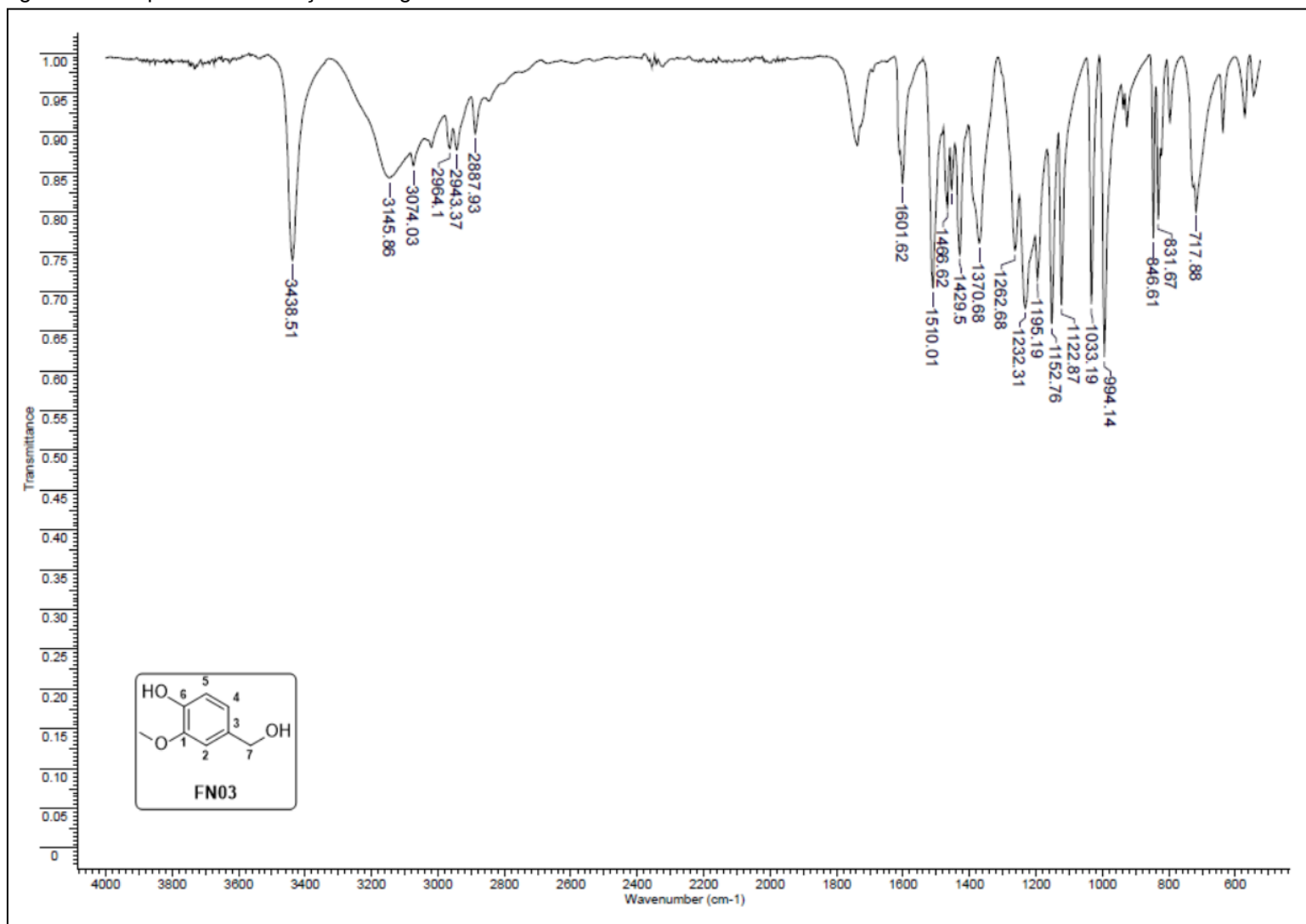
Fonte: Da autora.

Figura 77 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **FNG02** (DMSO-  $d_6$ , 75 MHz).

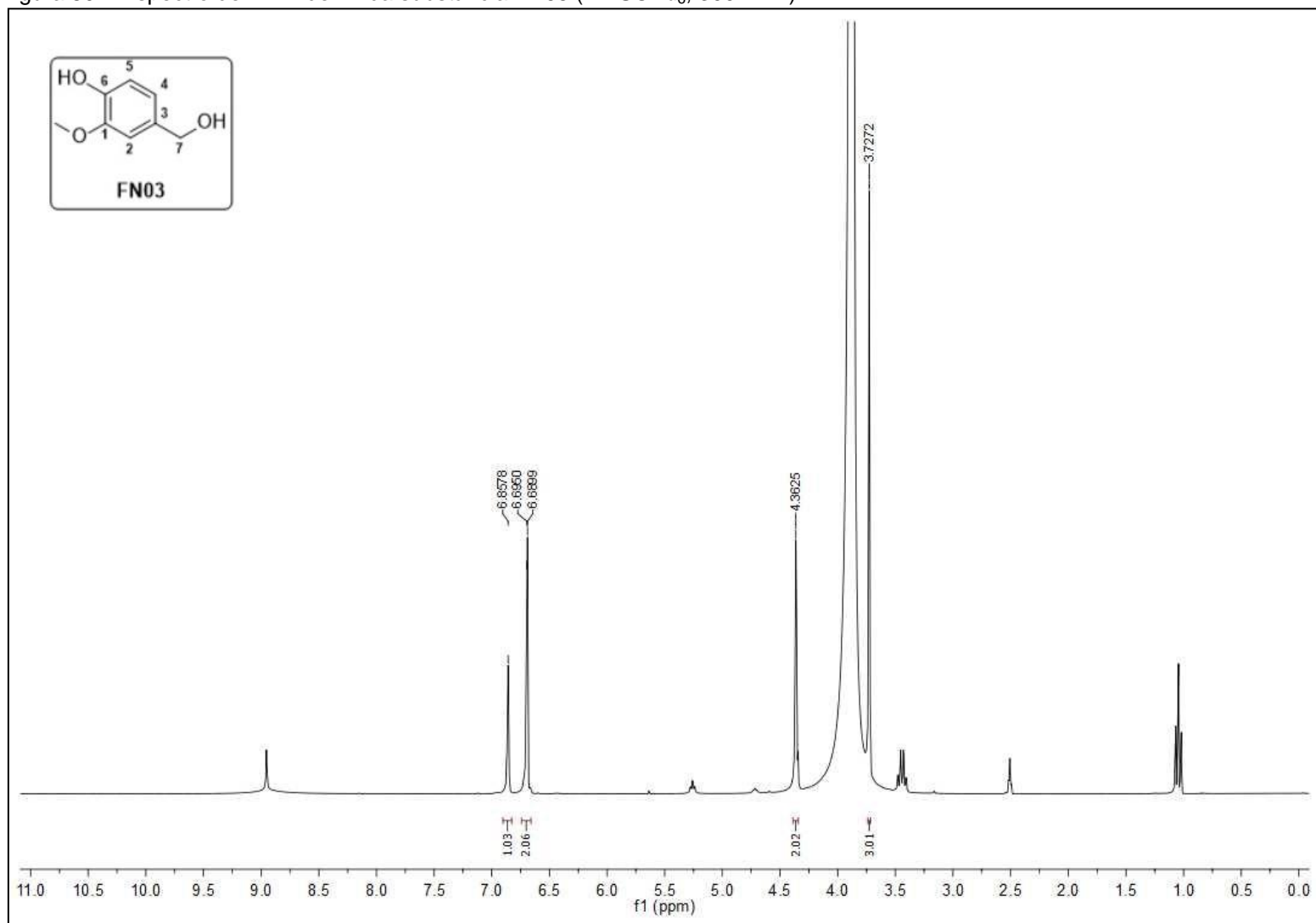
Fonte: Da autora.

Figura 78 – Subespectro DEPT-135 da substância **FNG02** (DMSO- $d_6$ , 75 MHz).

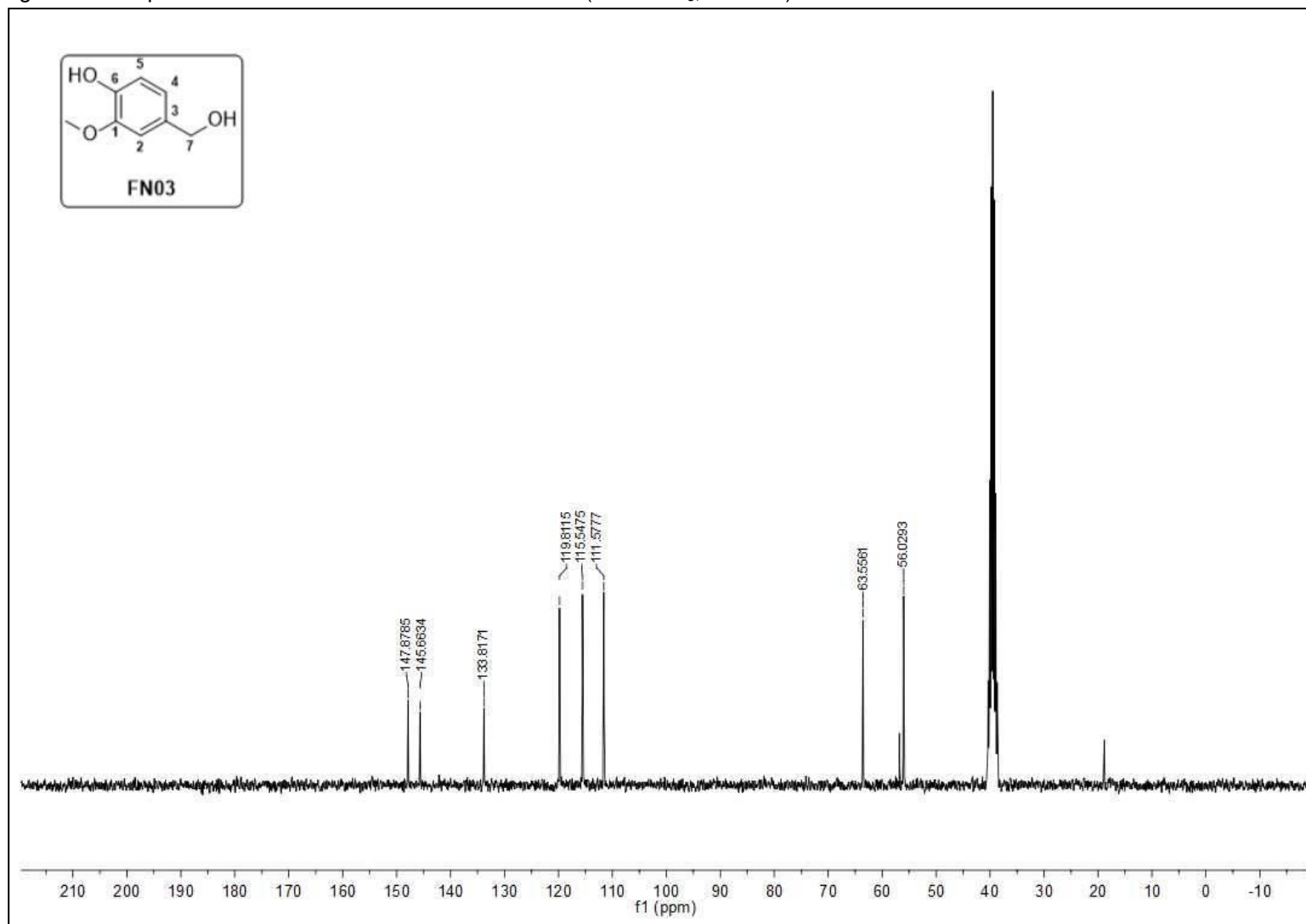
Fonte: Da autora.

Figura 79 – Espectro de absorção na região do IV da substância **FN03**.

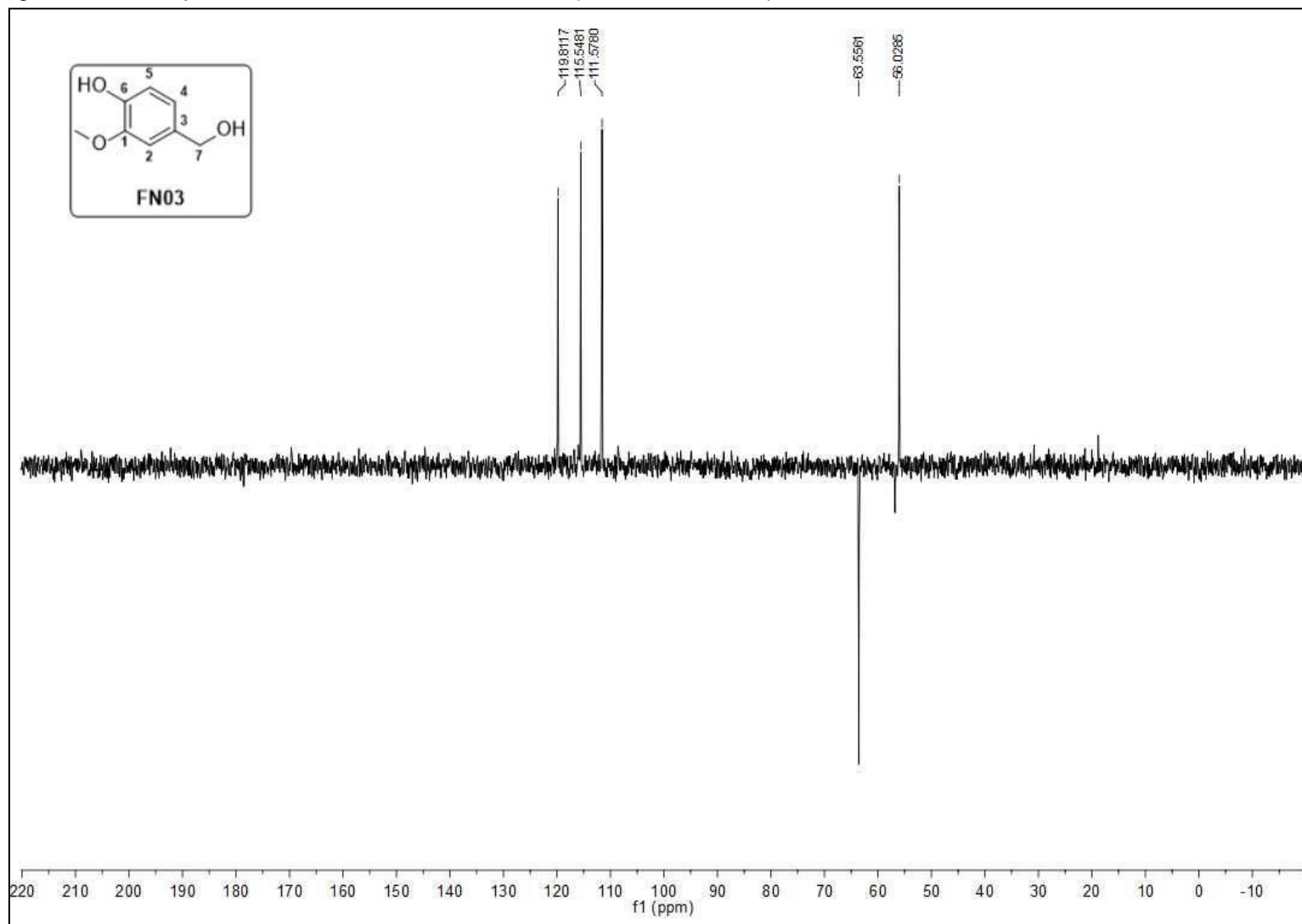
Fonte: Da autora.

Figura 80 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **FN03** (DMSO-  $d_6$ , 300 MHz).

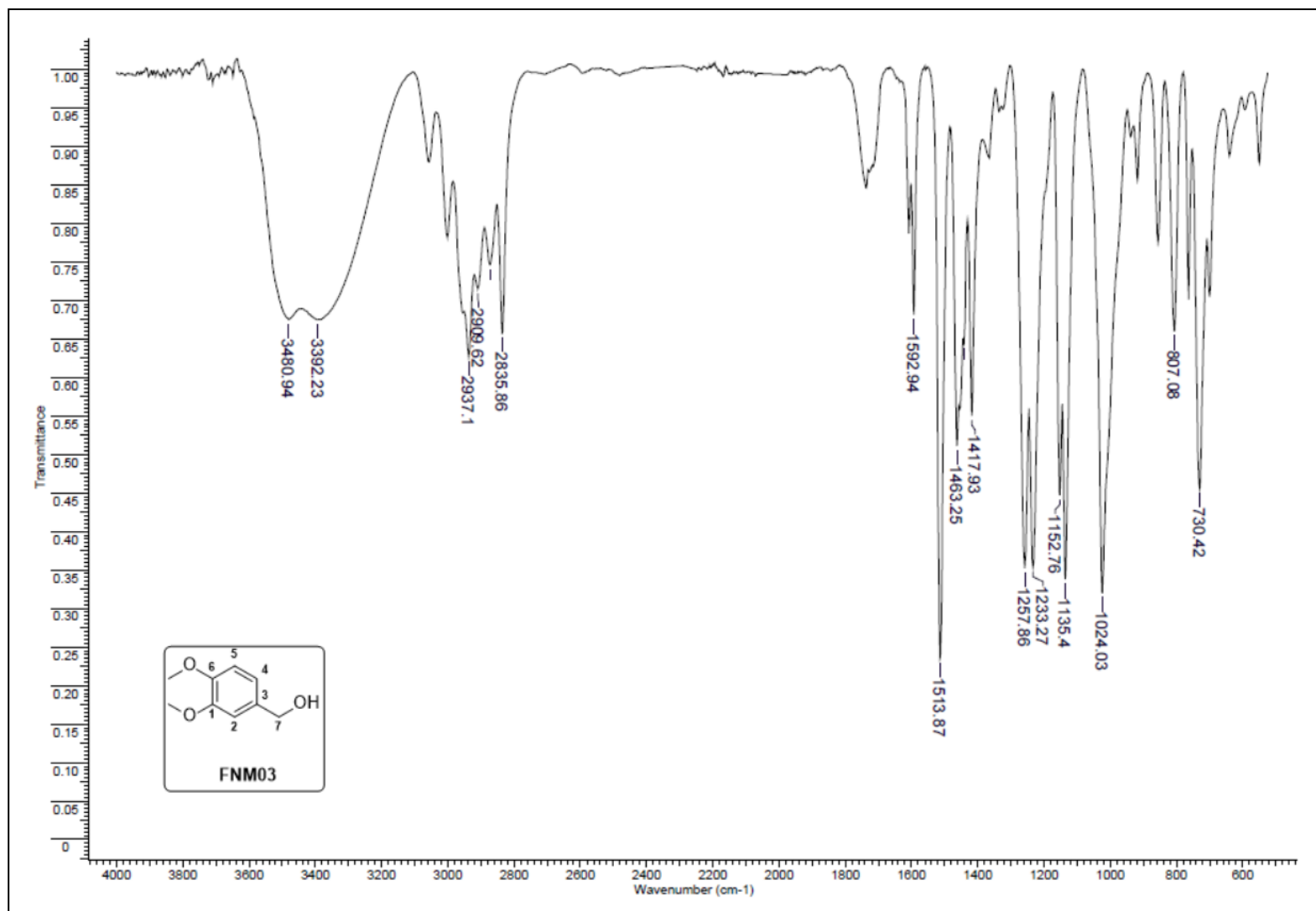
Fonte: Da autora.

Figura 81 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **FN03** (DMSO-  $d_6$ , 75 MHz).

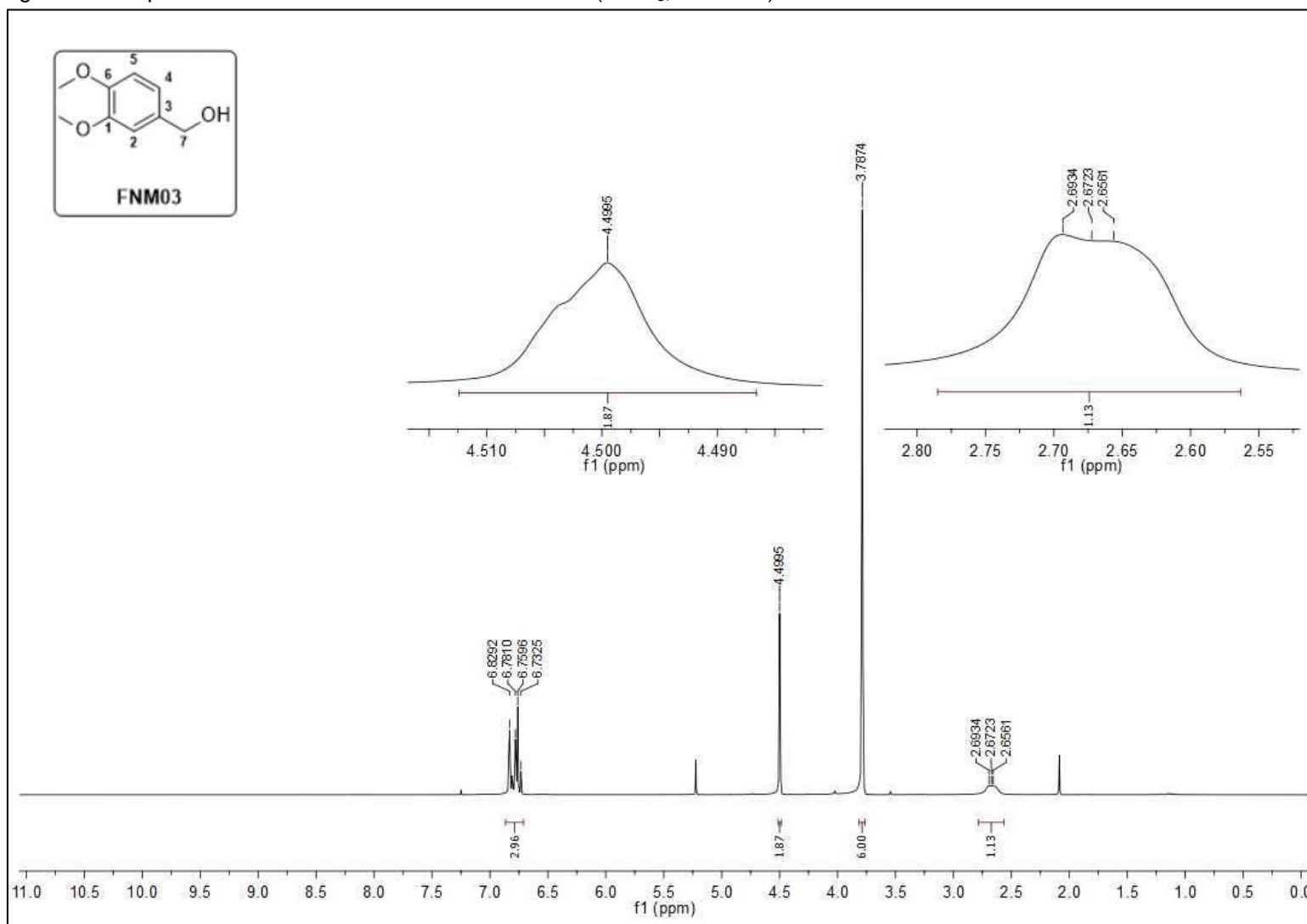
Fonte: Da autora.

Figura 82 – Subespectro DEPT-135 da substância **FN03** (DMSO- $d_6$ , 75 MHz).

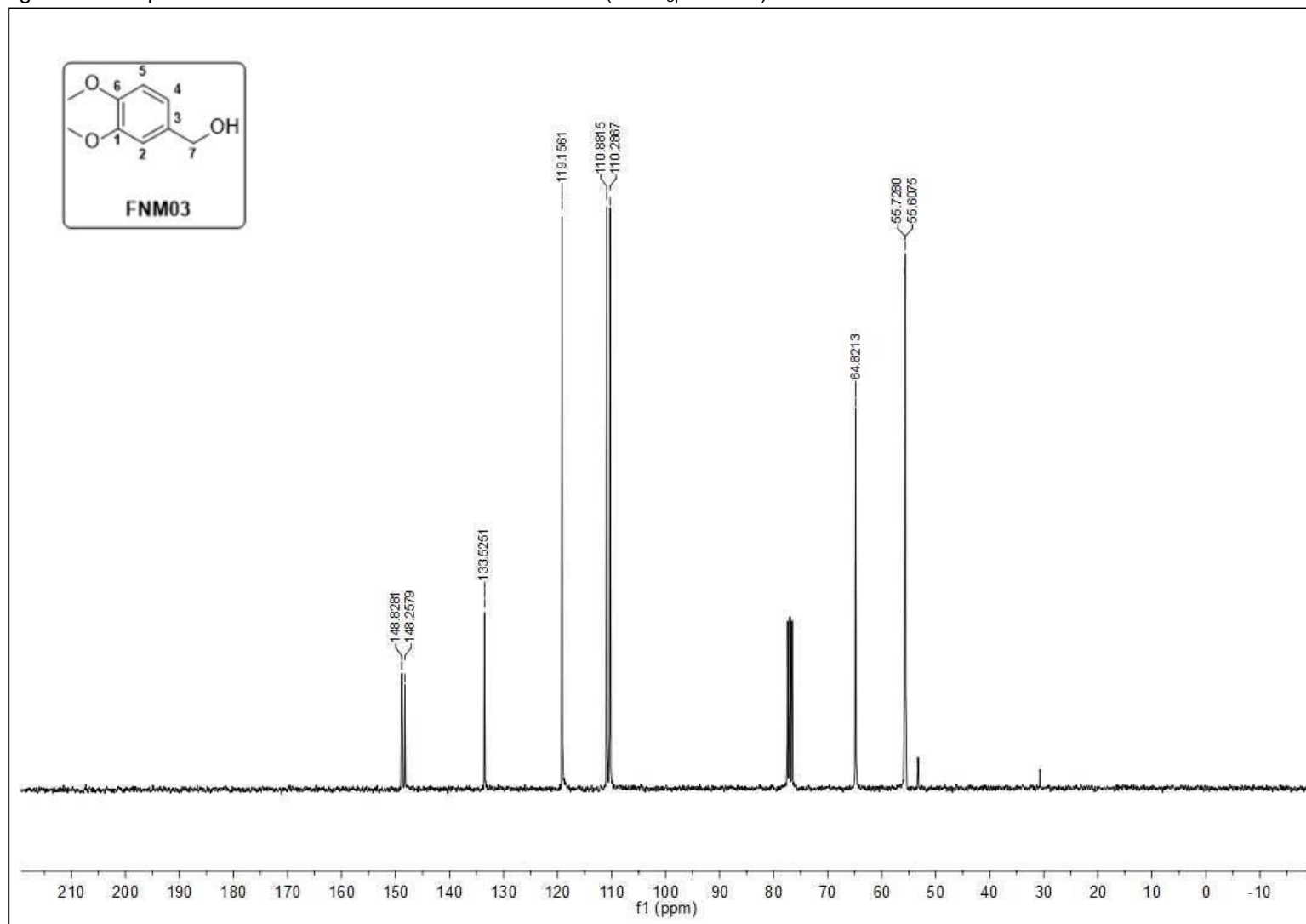
Fonte: Da autora.

Figura 83 – Espectro de absorção na região do IV da substância **FNM03**.

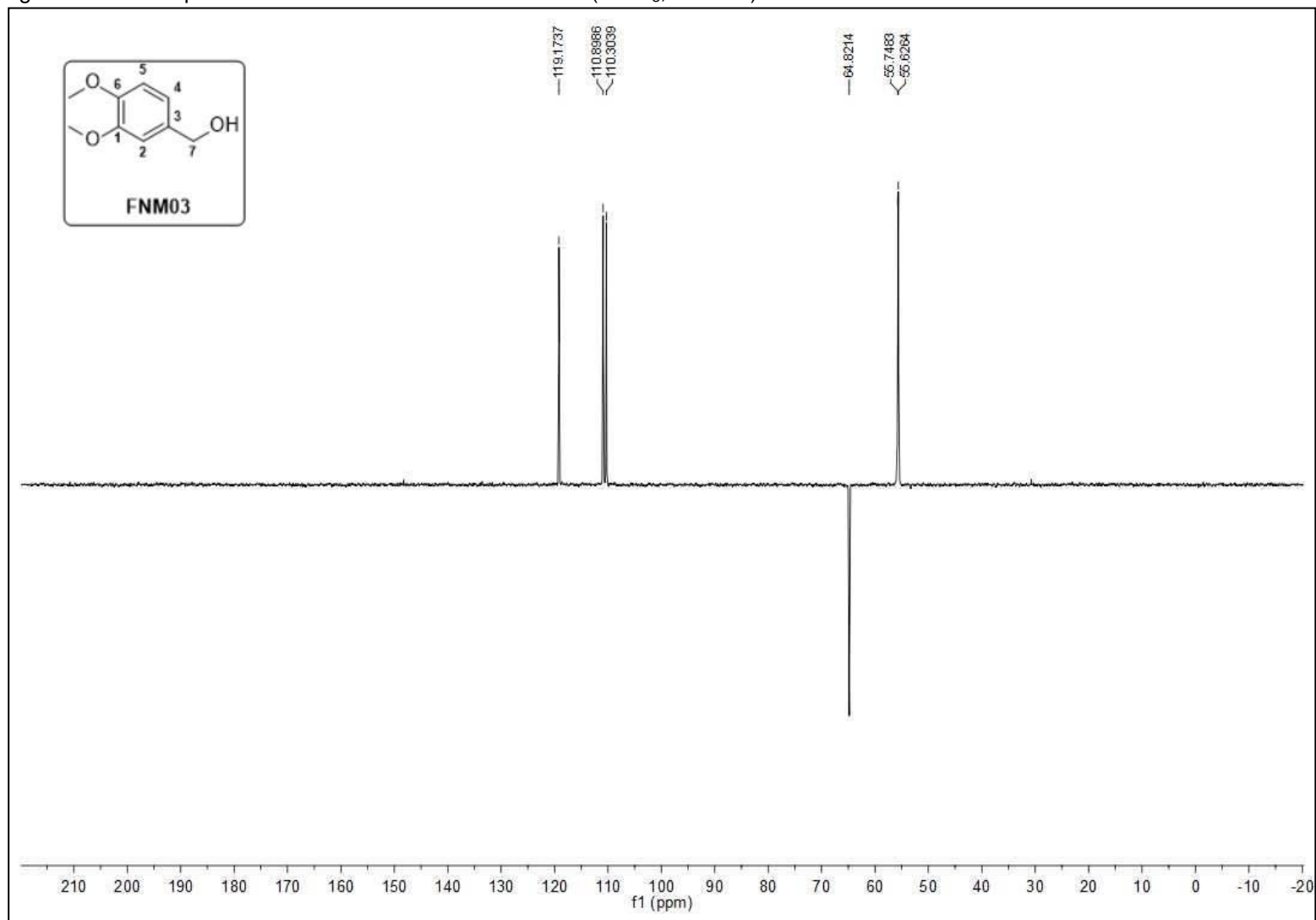
Fonte: Da autora.

Figura 84 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **FNM03** ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

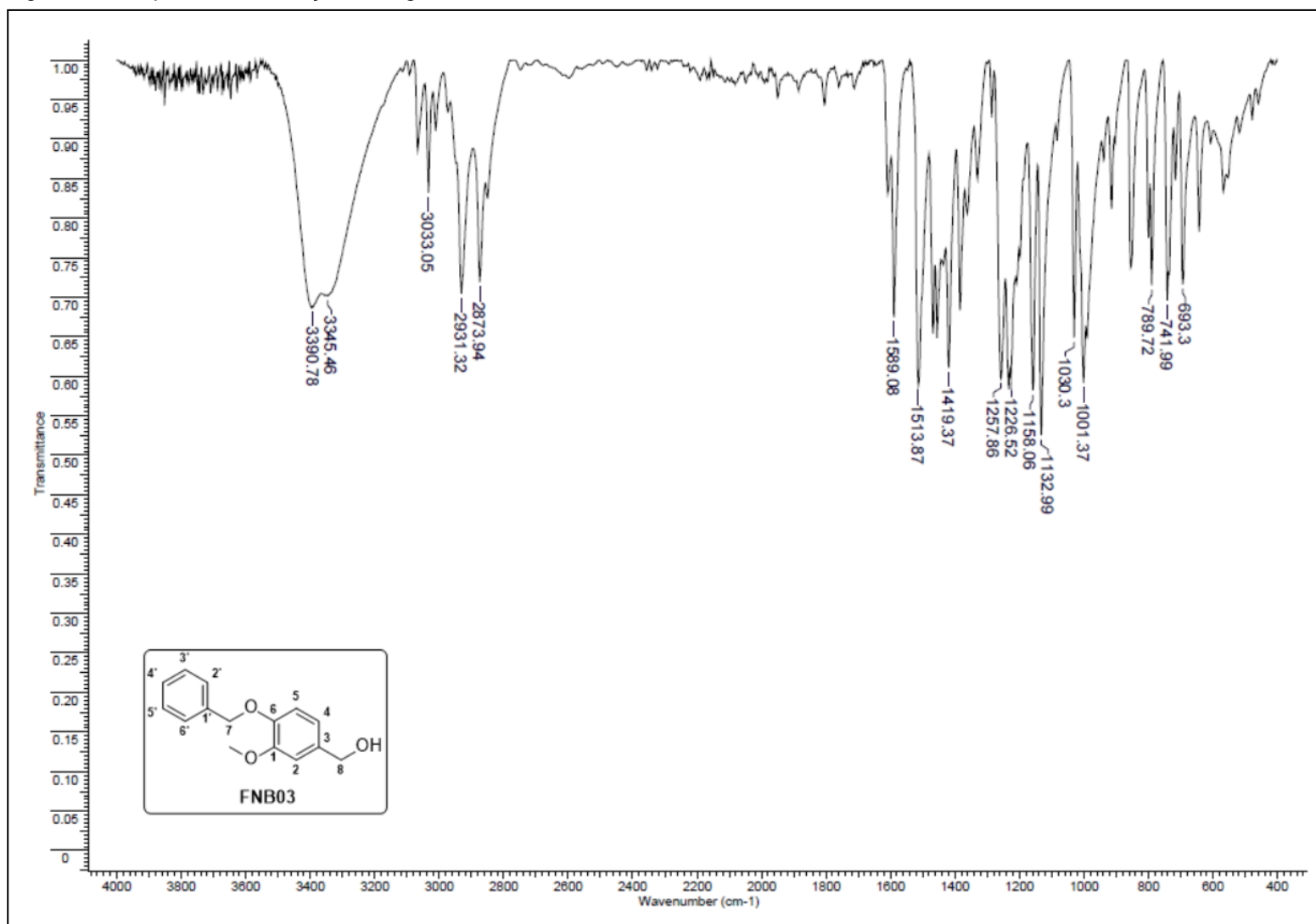
Fonte: Da autora.

Figura 85 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **FNM03** ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).

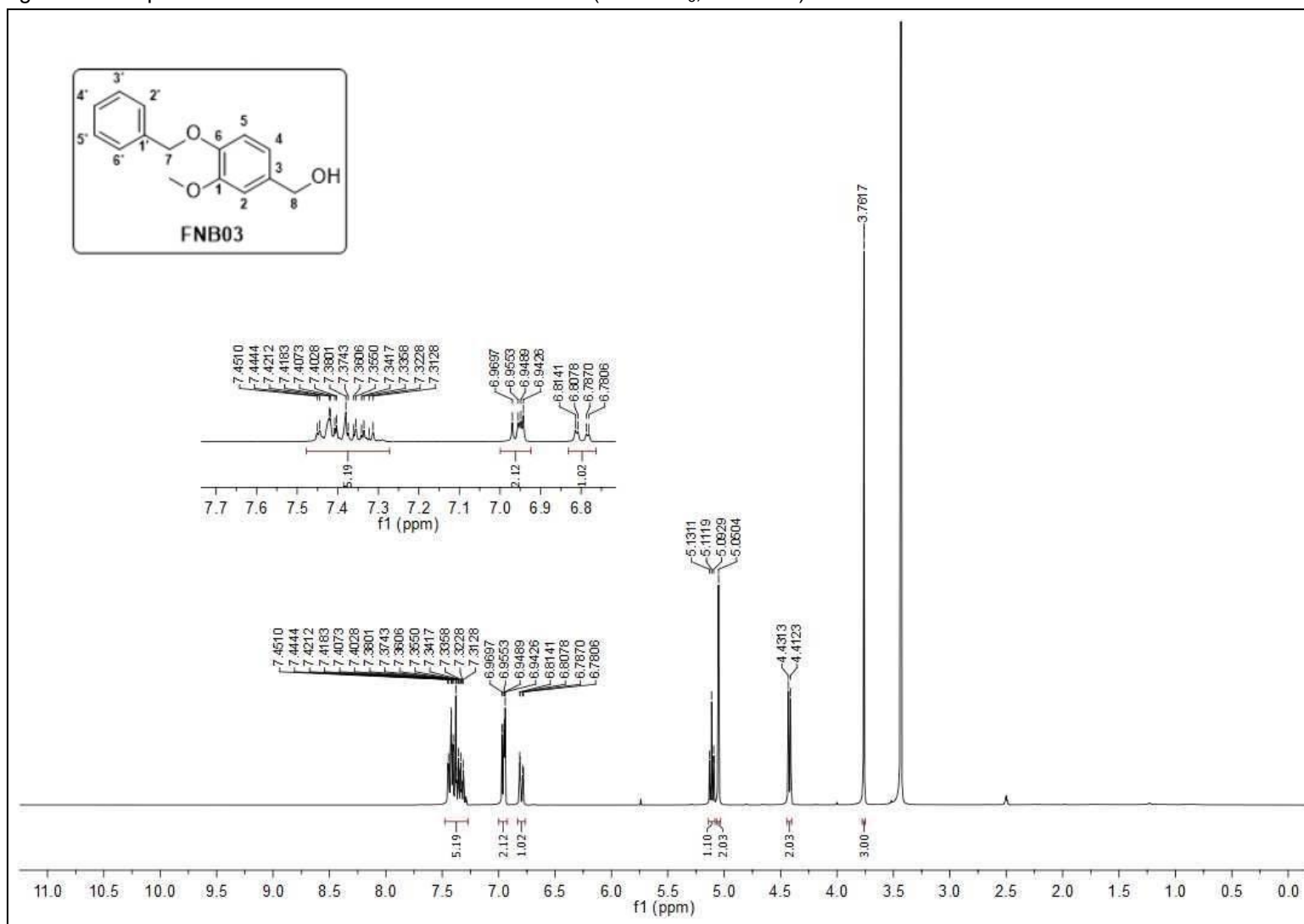
Fonte: Da autora.

Figura 86 – Subespectro DEPT-135 da substância **FNM03** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz).

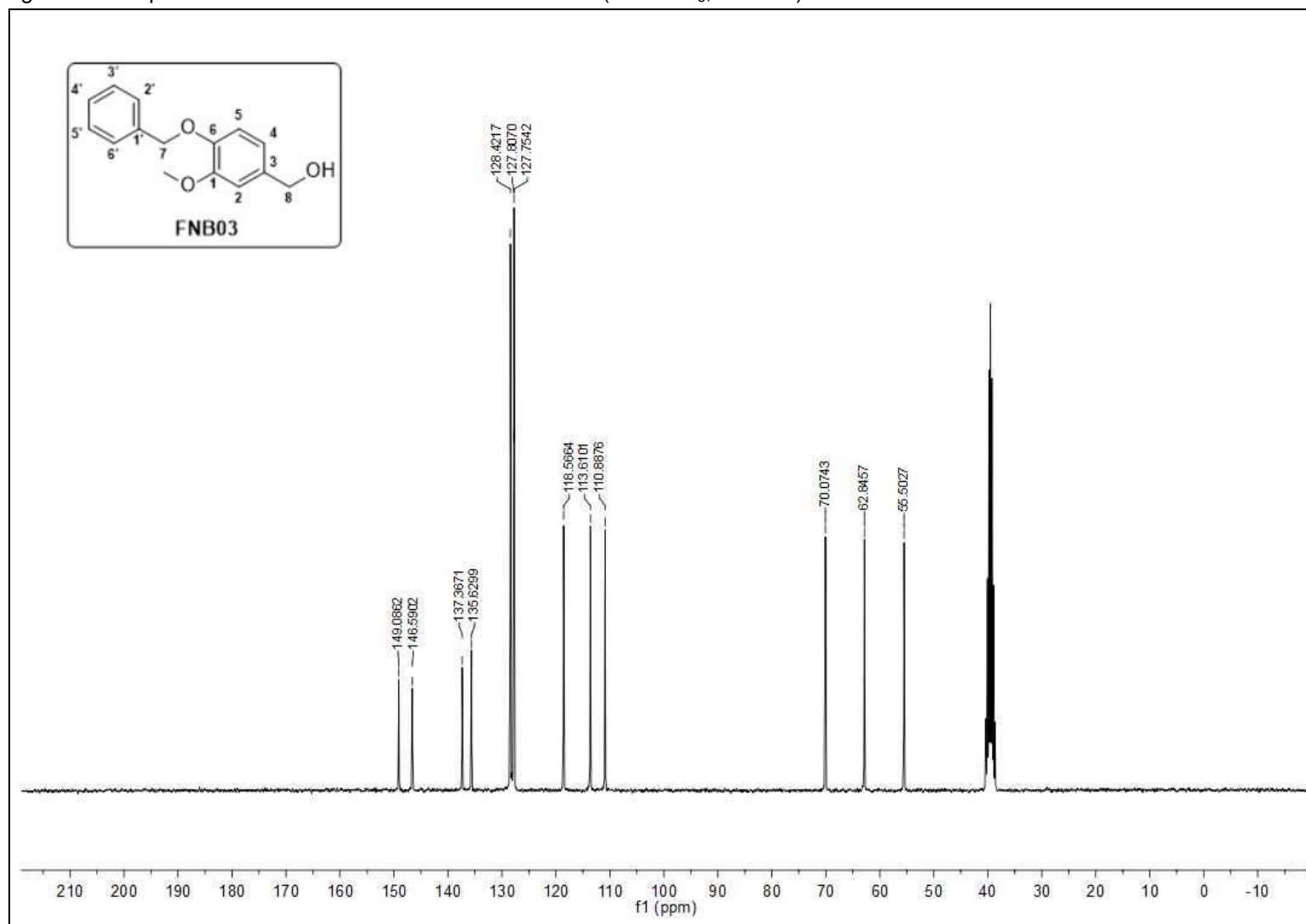
Fonte: Da autora.

Figura 87 – Espectro de absorção na região do IV da substância **FNB03**.

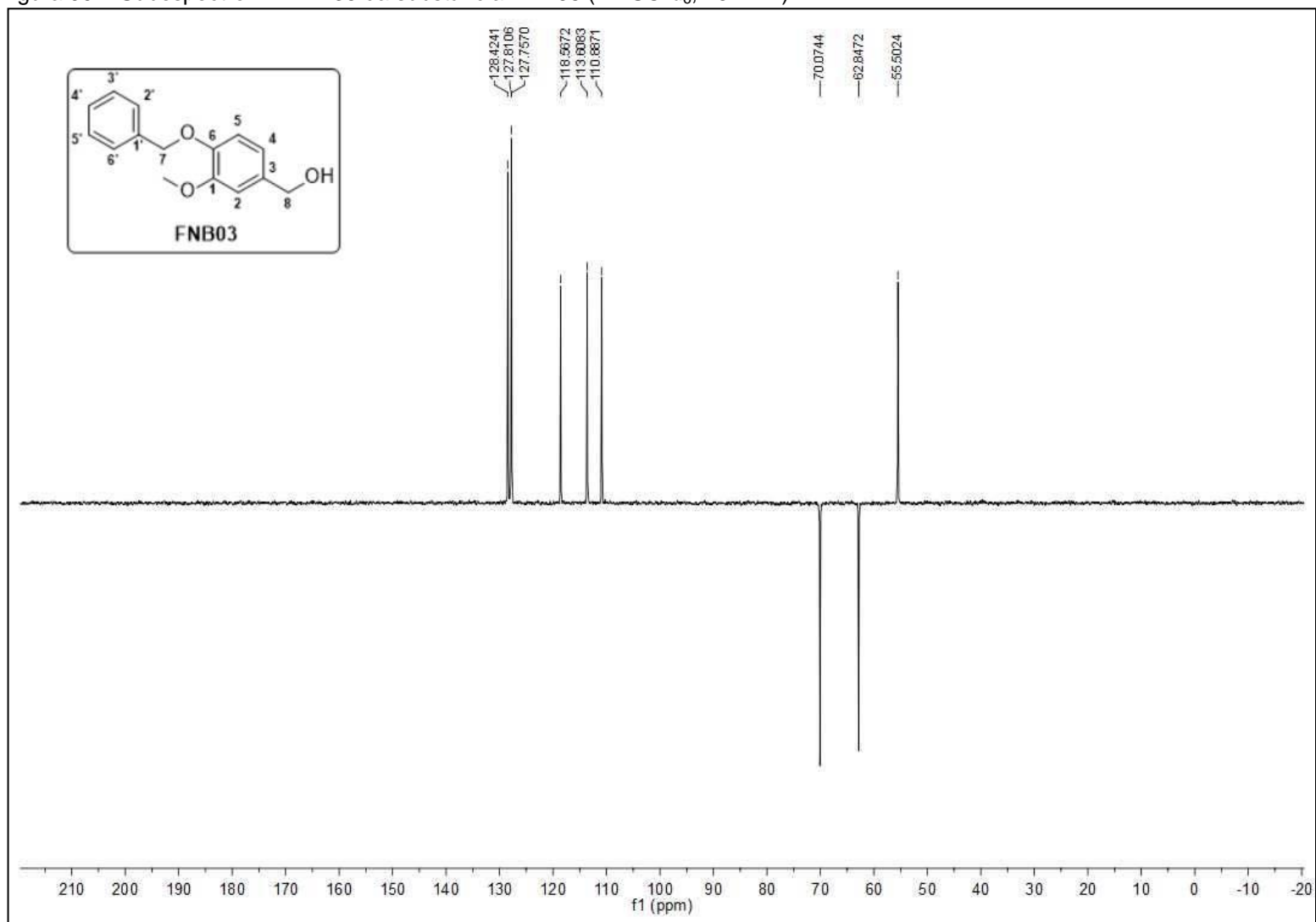
Fonte: Da autora.

Figura 88 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **FNB03** (DMSO- $d_6$ , 300 MHz).

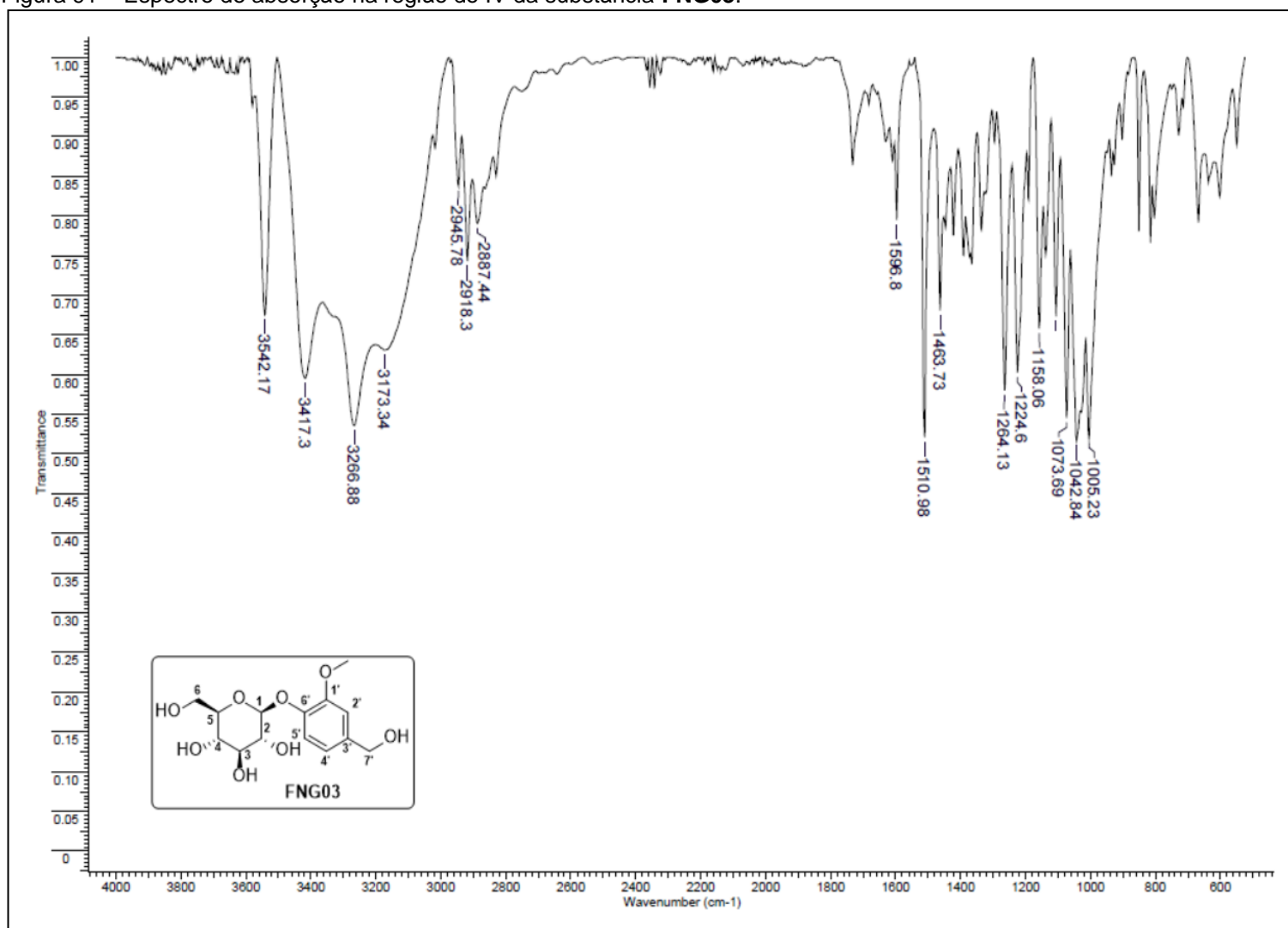
Fonte: Da autora.

Figura 89 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **FNB03** (DMSO- $d_6$ , 75 MHz).

Fonte: Da autora.

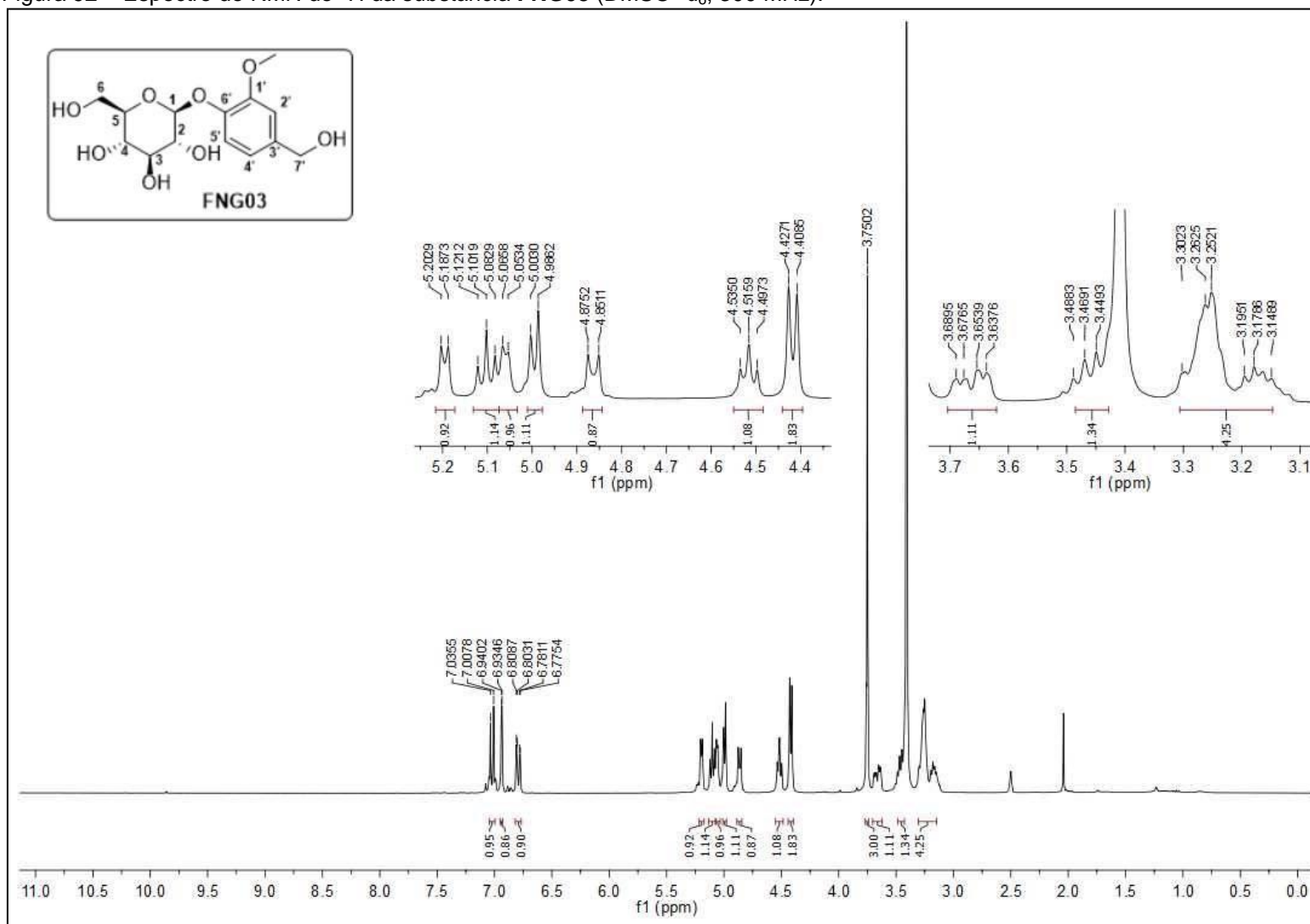
Figura 90 – Subespectro DEPT-135 da substância **FNB03** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75 MHz).

Fonte: Da autora.

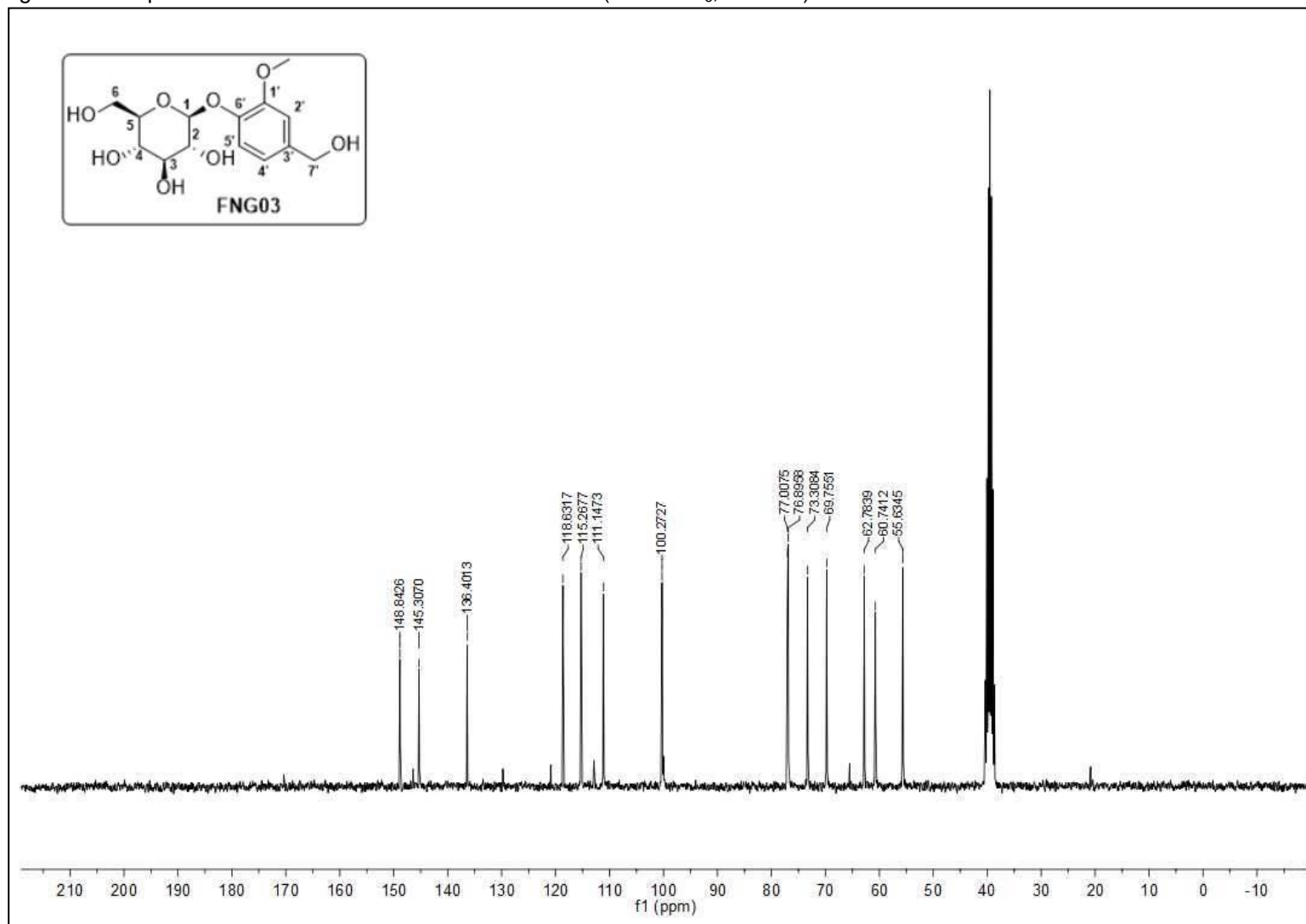
Figura 91 – Espectro de absorção na região do IV da substância **FNG03**.

Fonte: Da autora.

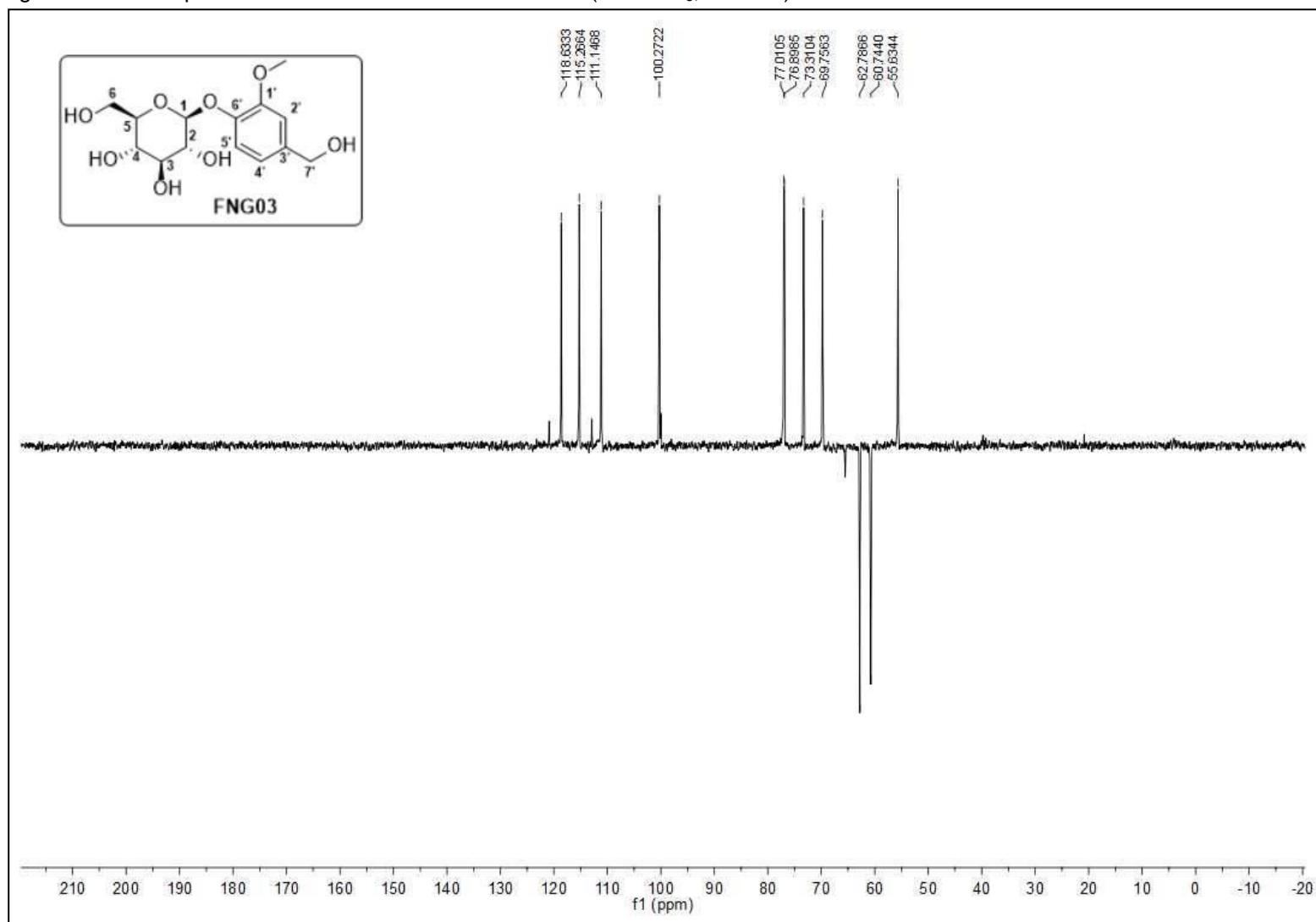
Figura 92 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **FNG03** (DMSO-  $d_6$ , 300 MHz).



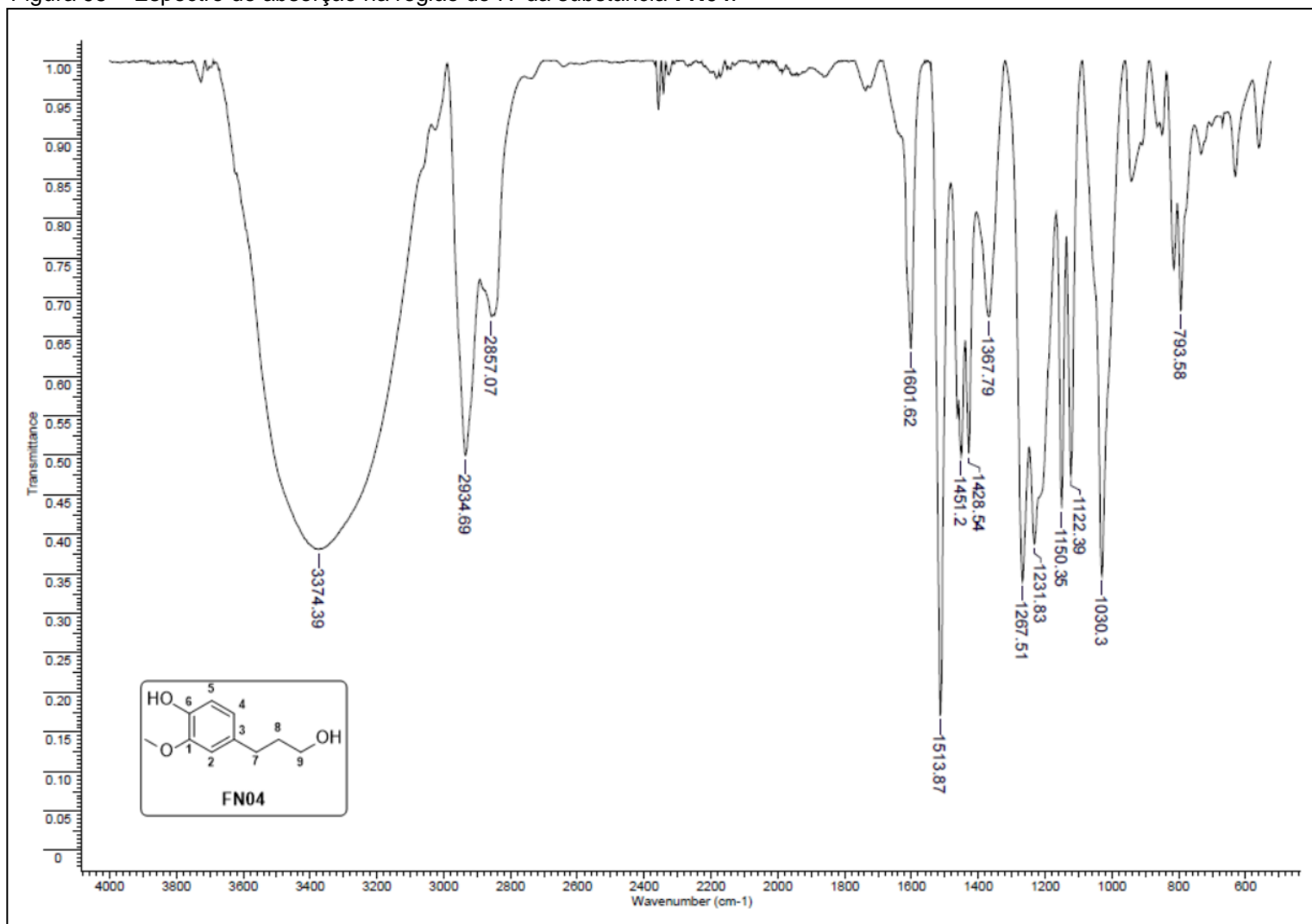
Fonte: Da autora.

Figura 93 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **FNG03** (DMSO-  $d_6$ , 75 MHz).

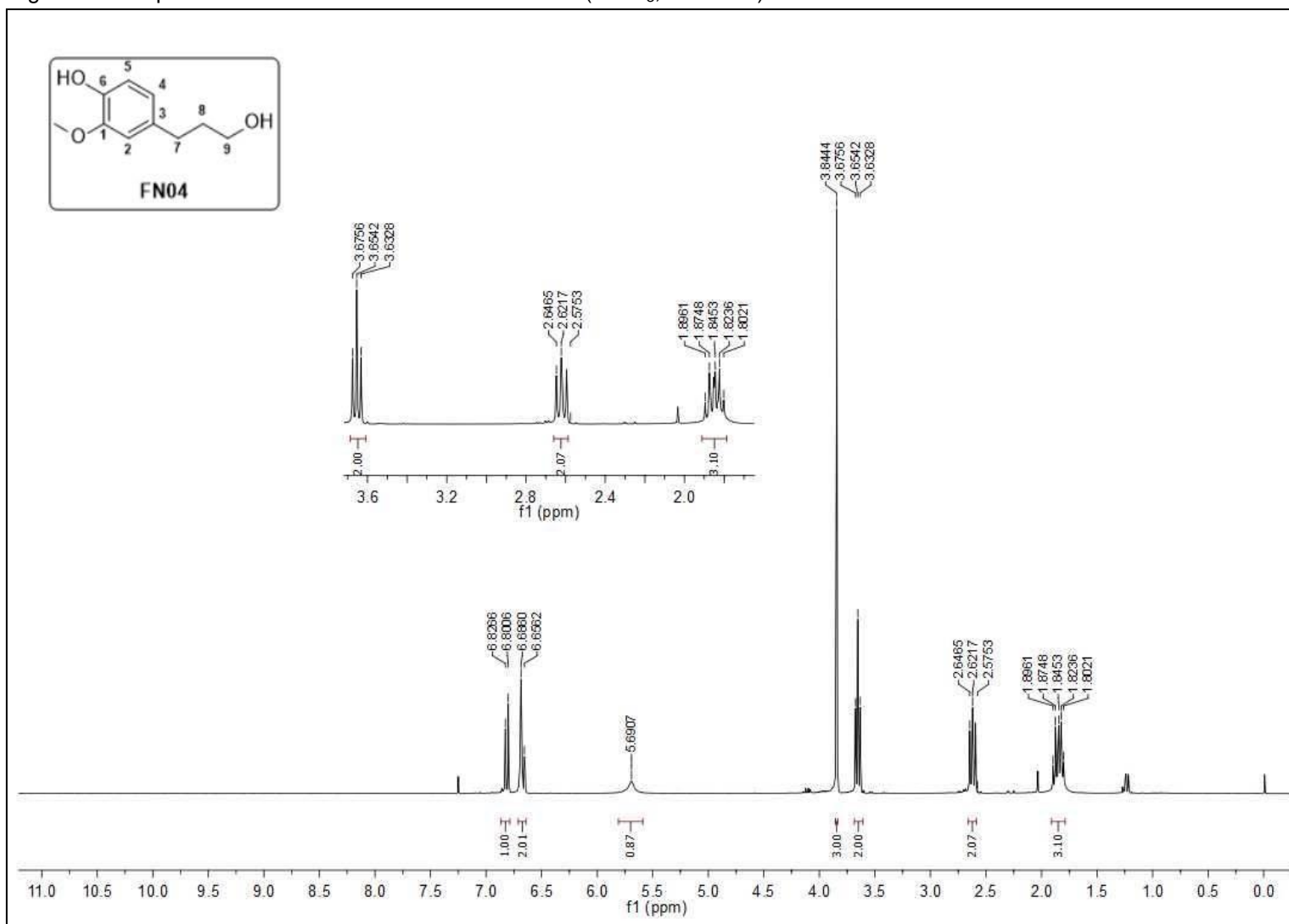
Fonte: Da autora.

Figura 94 – Subespectro DEPT-135 da substância **FNG03** (DMSO- $d_6$ , 75 MHz).

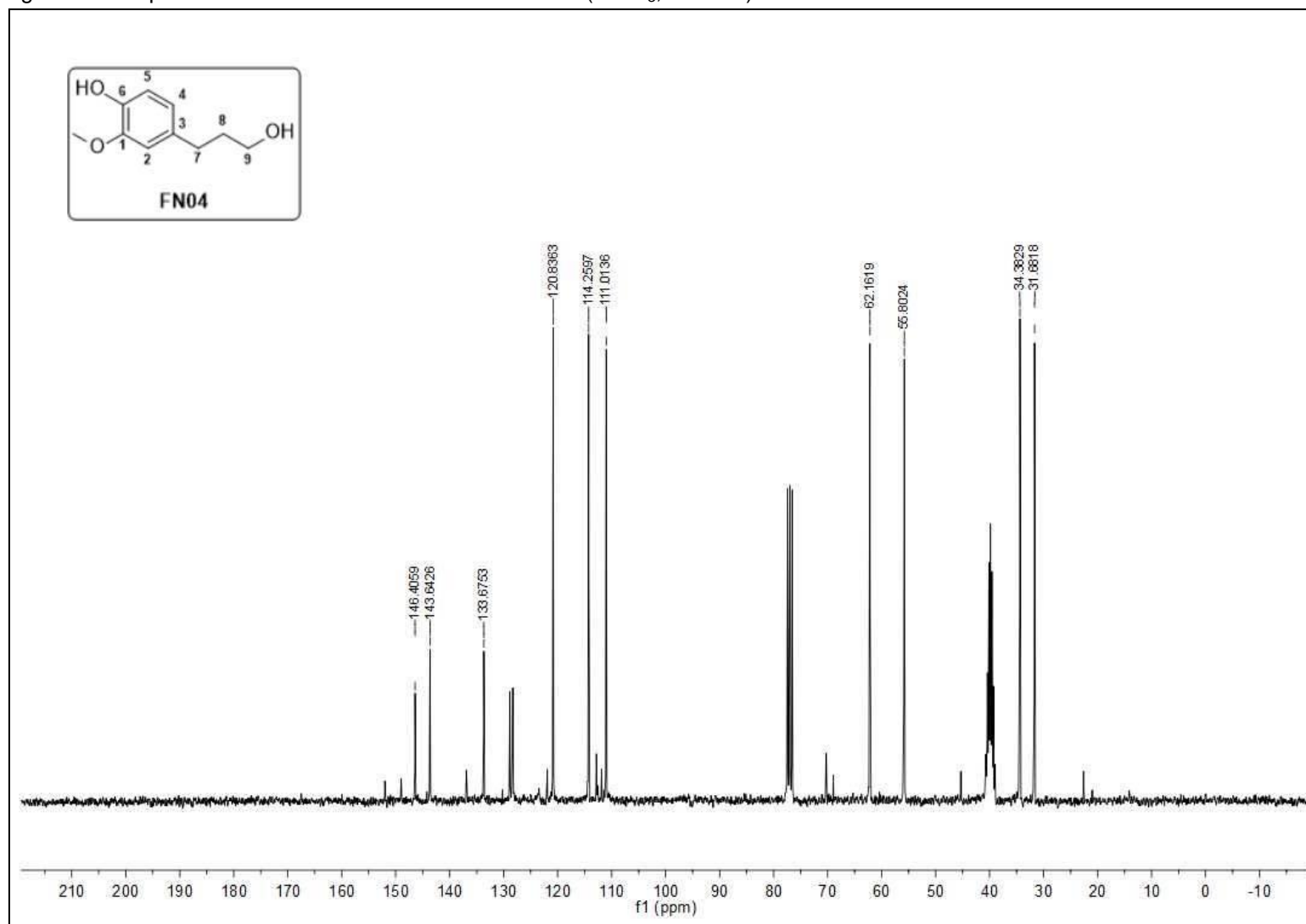
Fonte: Da autora.

Figura 95 – Espectro de absorção na região do IV da substância **FN04**.

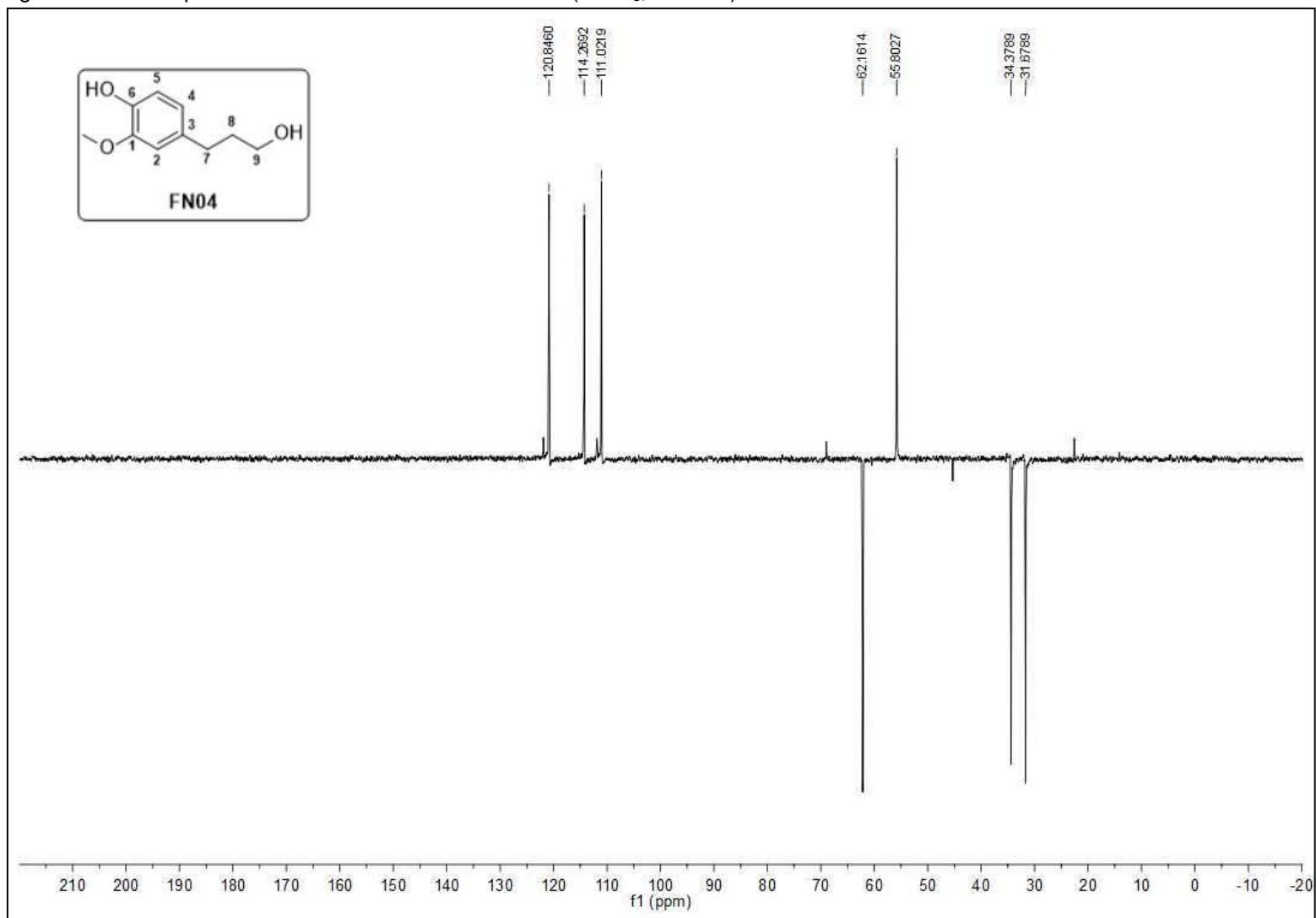
Fonte: Da autora.

Figura 96 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **FN04** ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

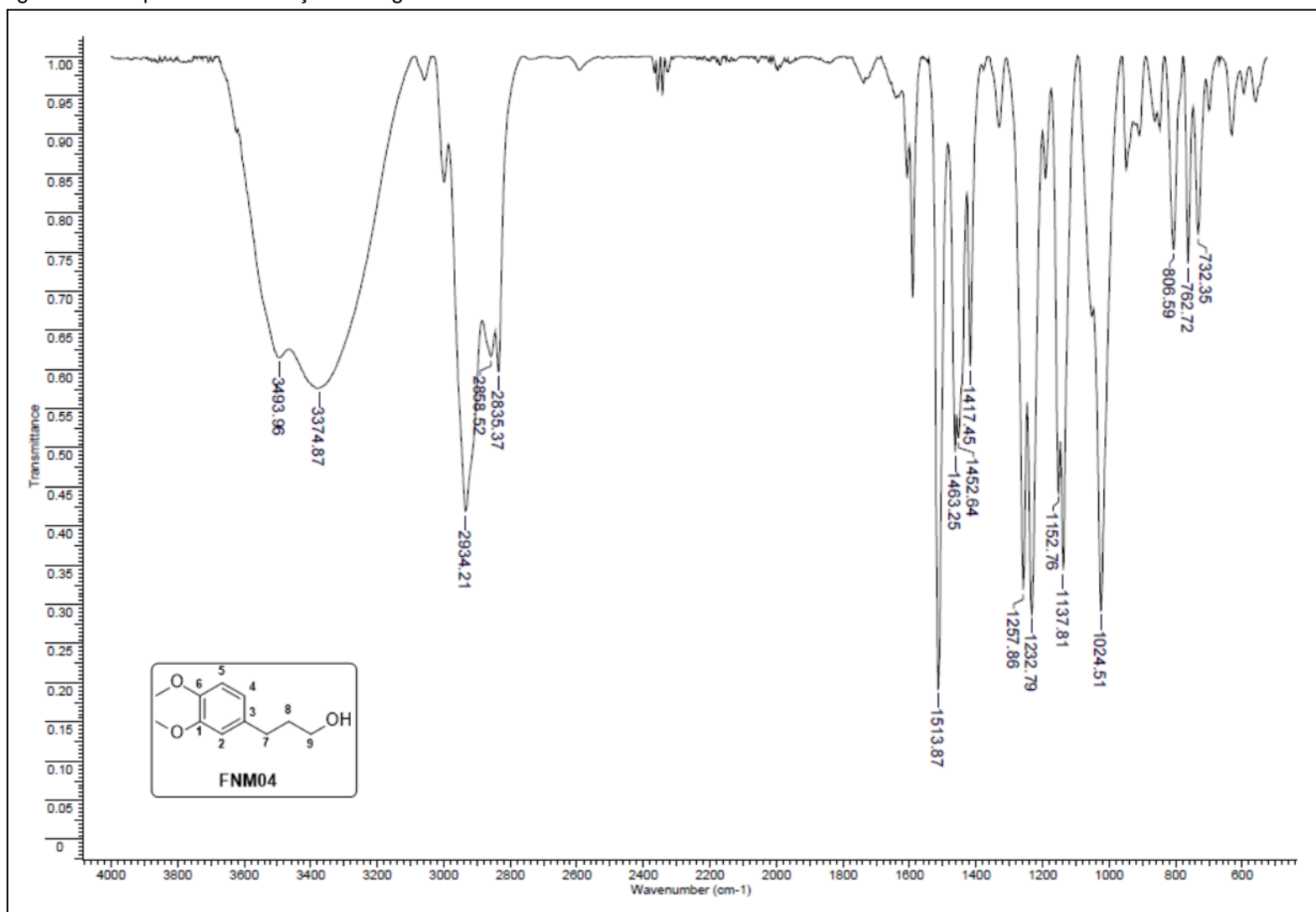
Fonte: Da autora.

Figura 97 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **FN04** ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).

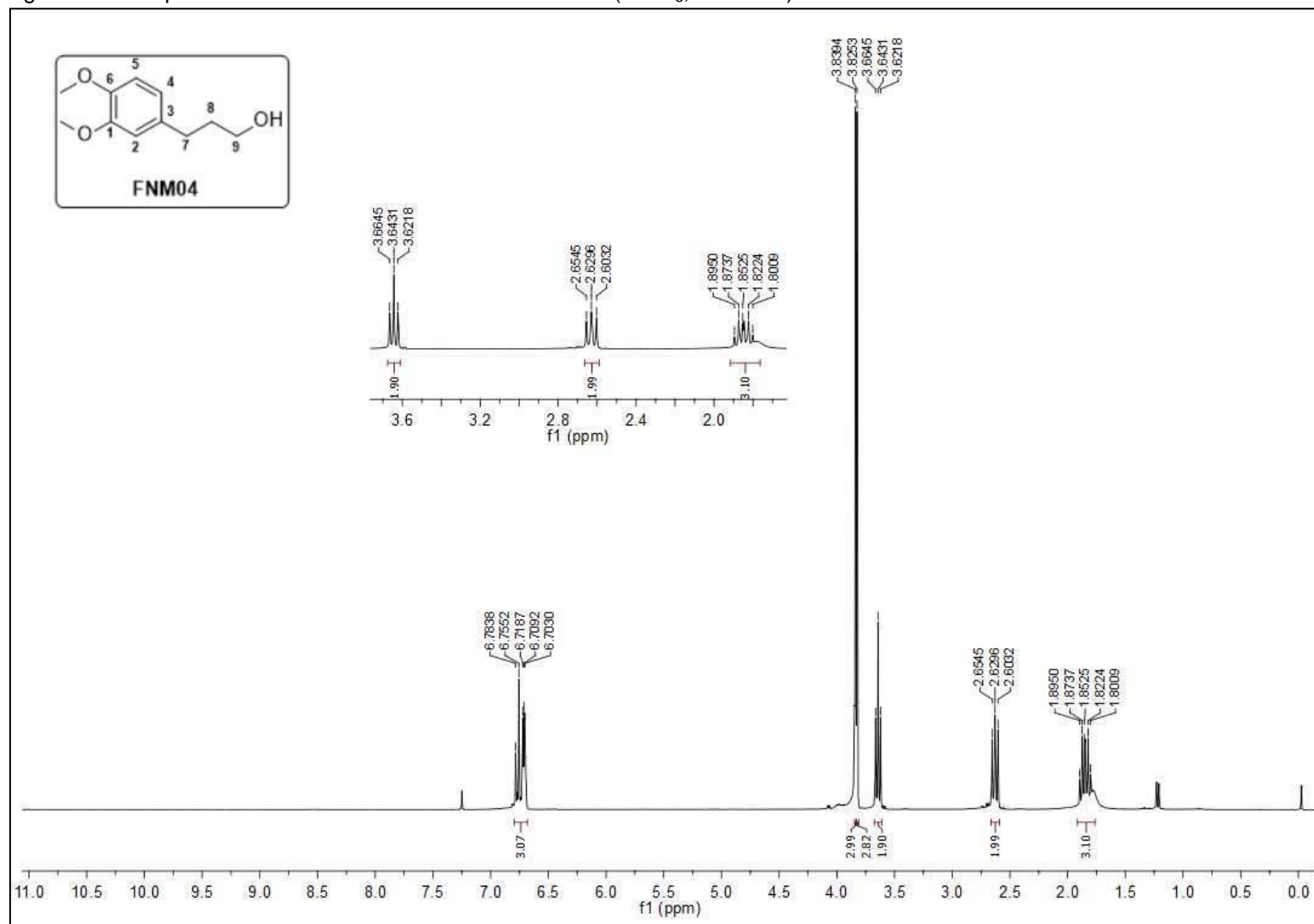
Fonte: Da autora.

Figura 98 – Subespectro DEPT-135 da substância **FN04** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz).

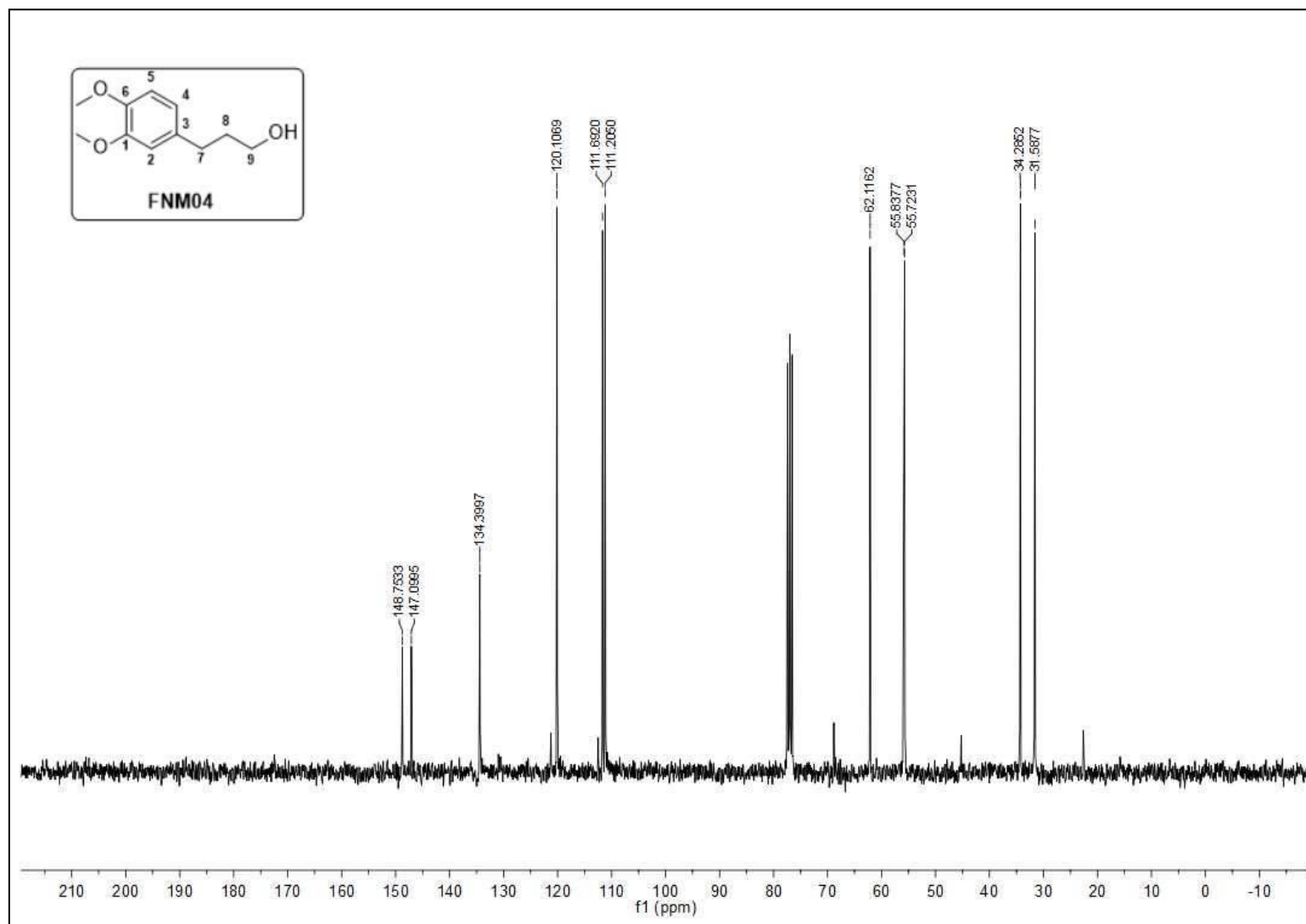
Fonte: Da autora.

Figura 99 – Espectro de absorção na região do IV da substância **FNM04**.

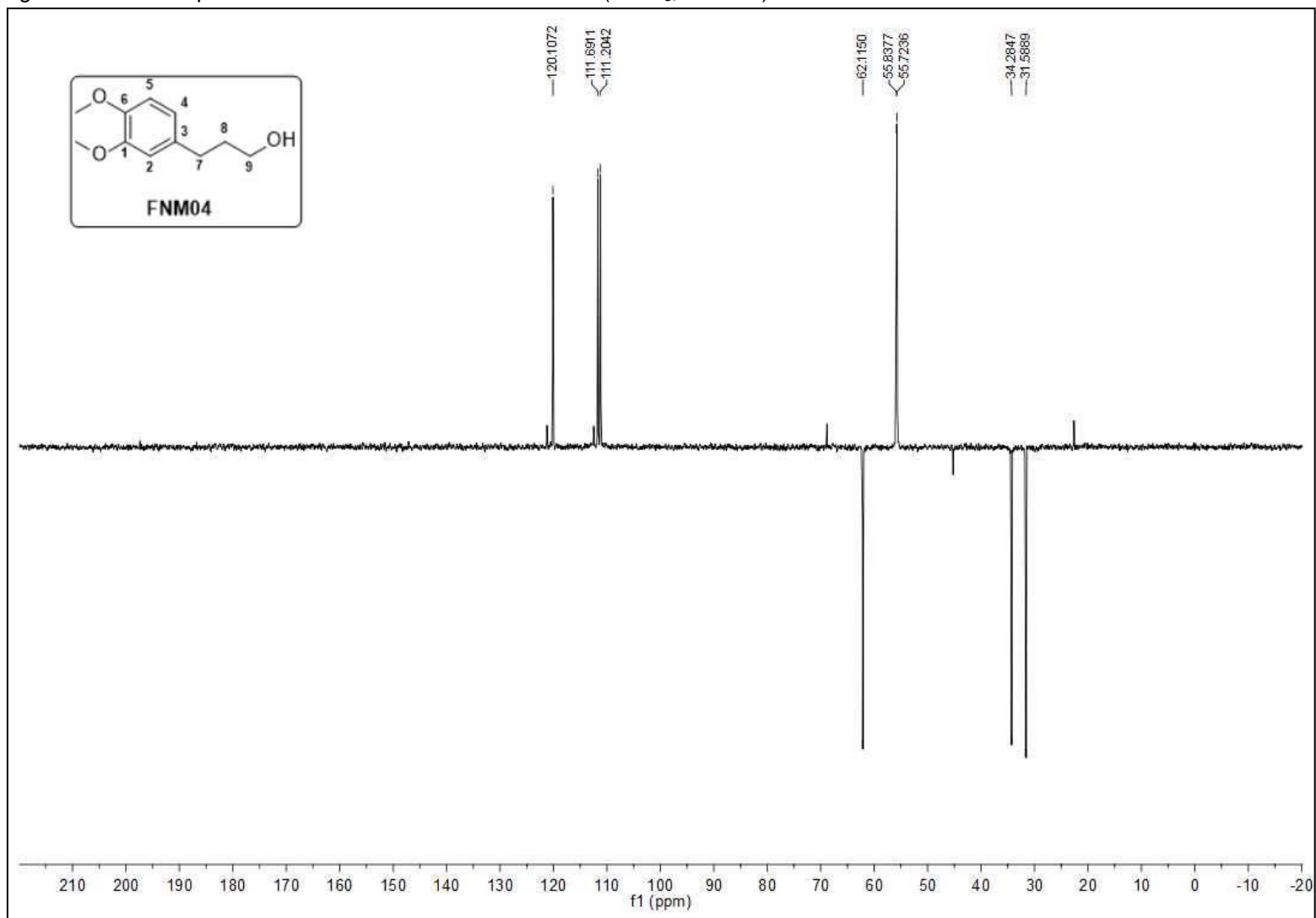
Fonte: Da autora.

Figura 100 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **FNM04** ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

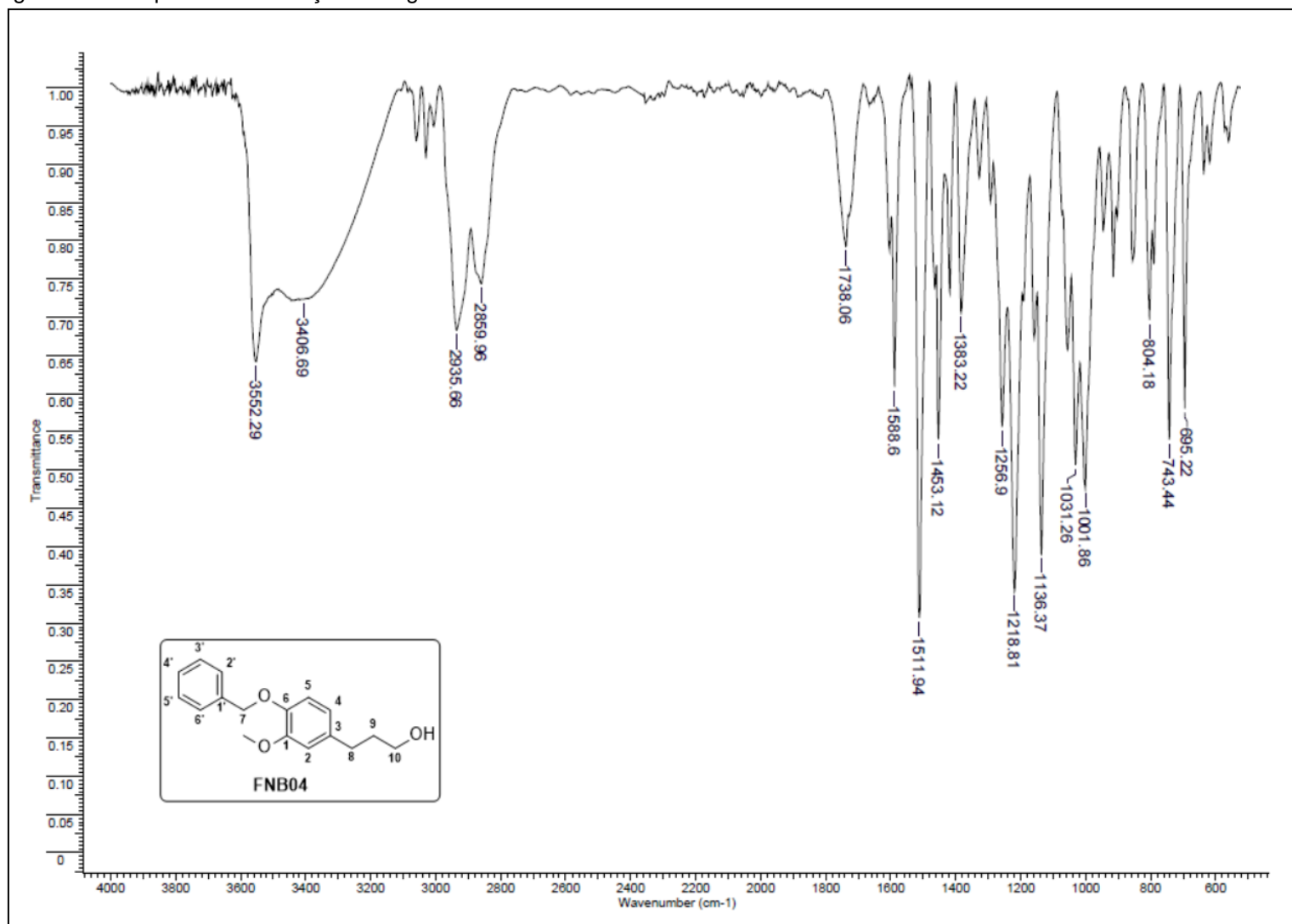
Fonte: Da autora.

Figura 101 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **FNM04** ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).

Fonte: Da autora.

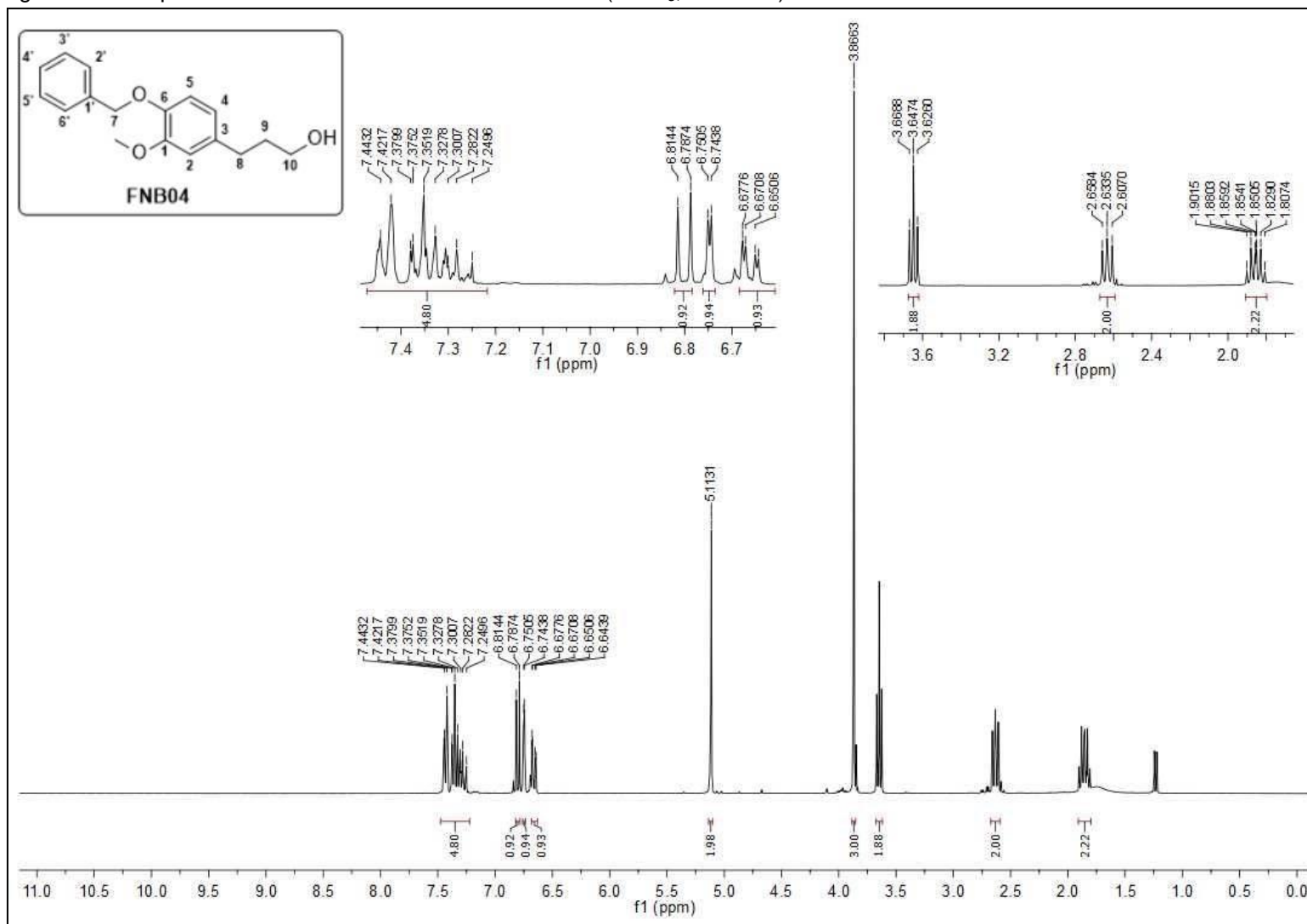
Figura 102 – Subespectro DEPT-135 da substância **FNM04** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz).

Fonte: Da autora.

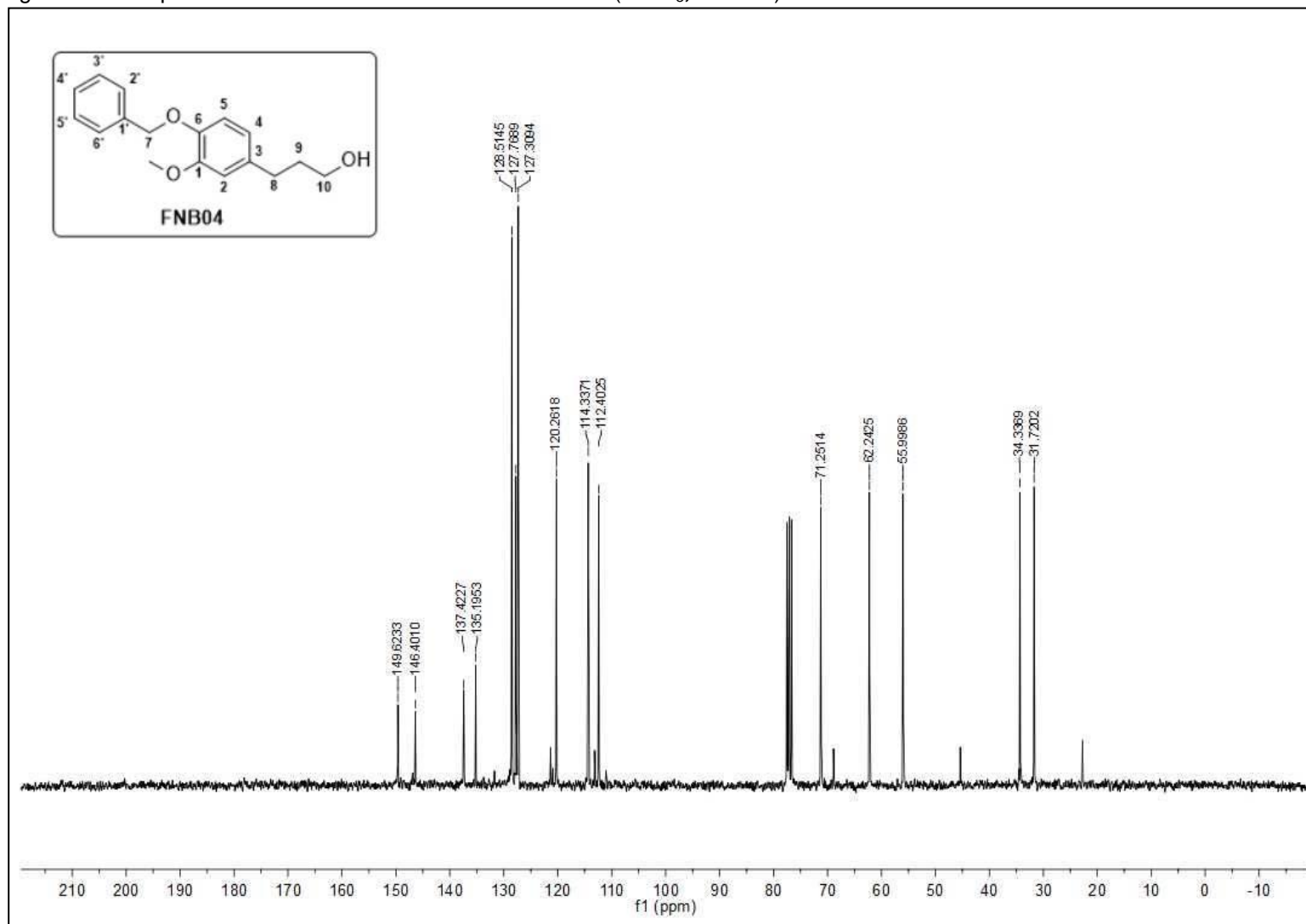
Figura 103 – Espectro de absorção na região do IV da substância **FNB04**.

Fonte: Da autora.

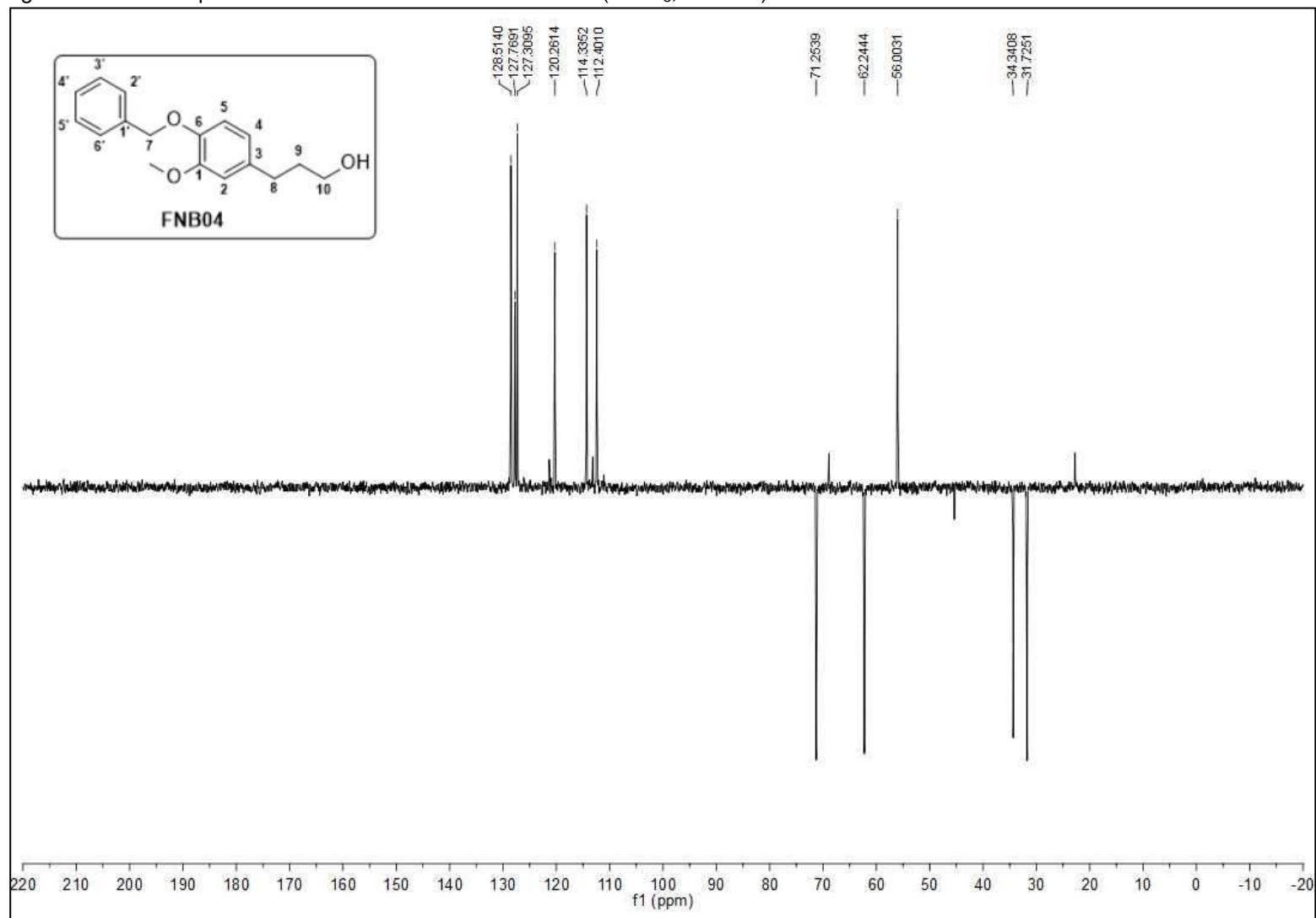
Figura 104 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **FNB04** ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).



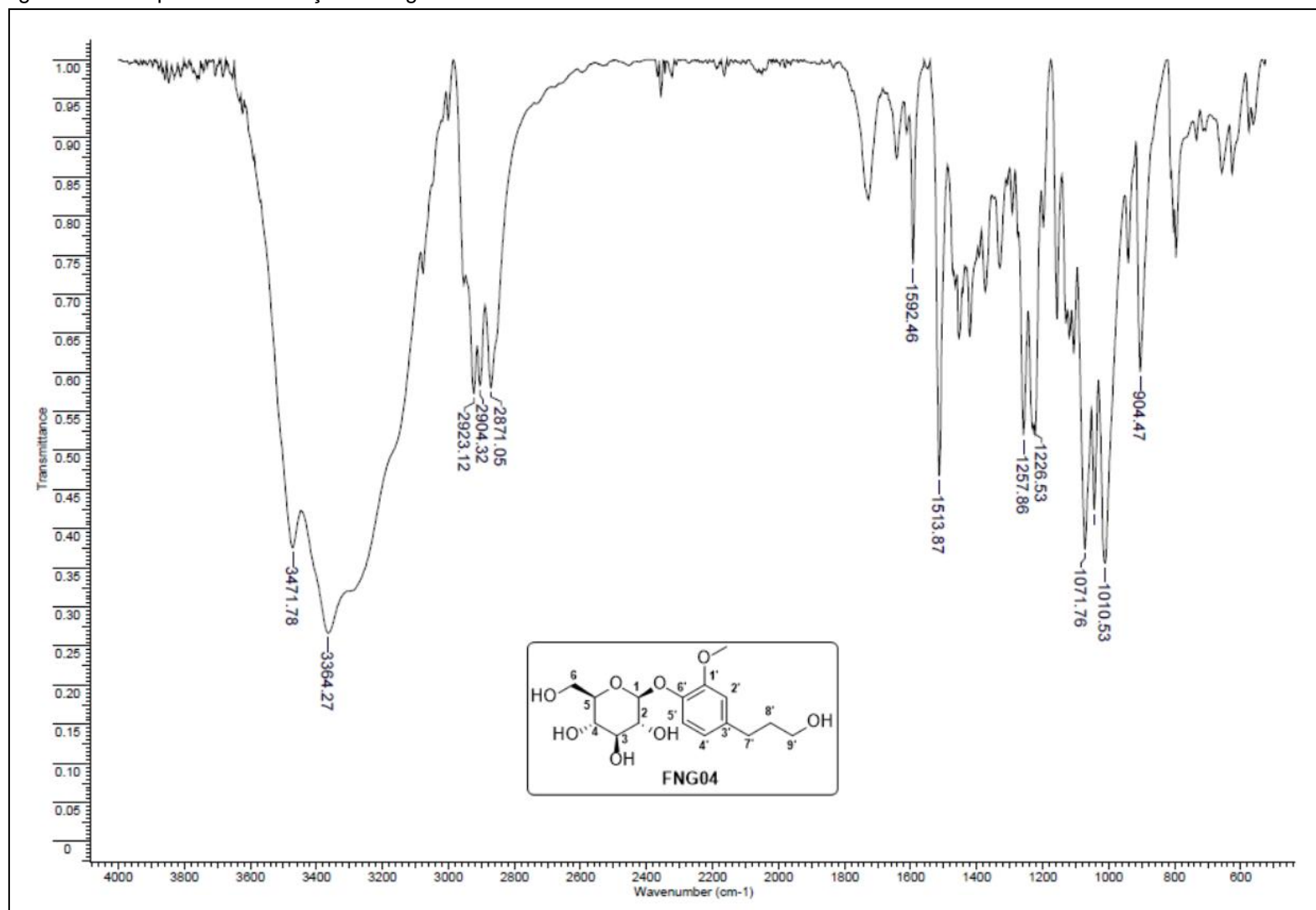
Fonte: Da autora.

Figura 105 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **FNB04** ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).

Fonte: Da autora.

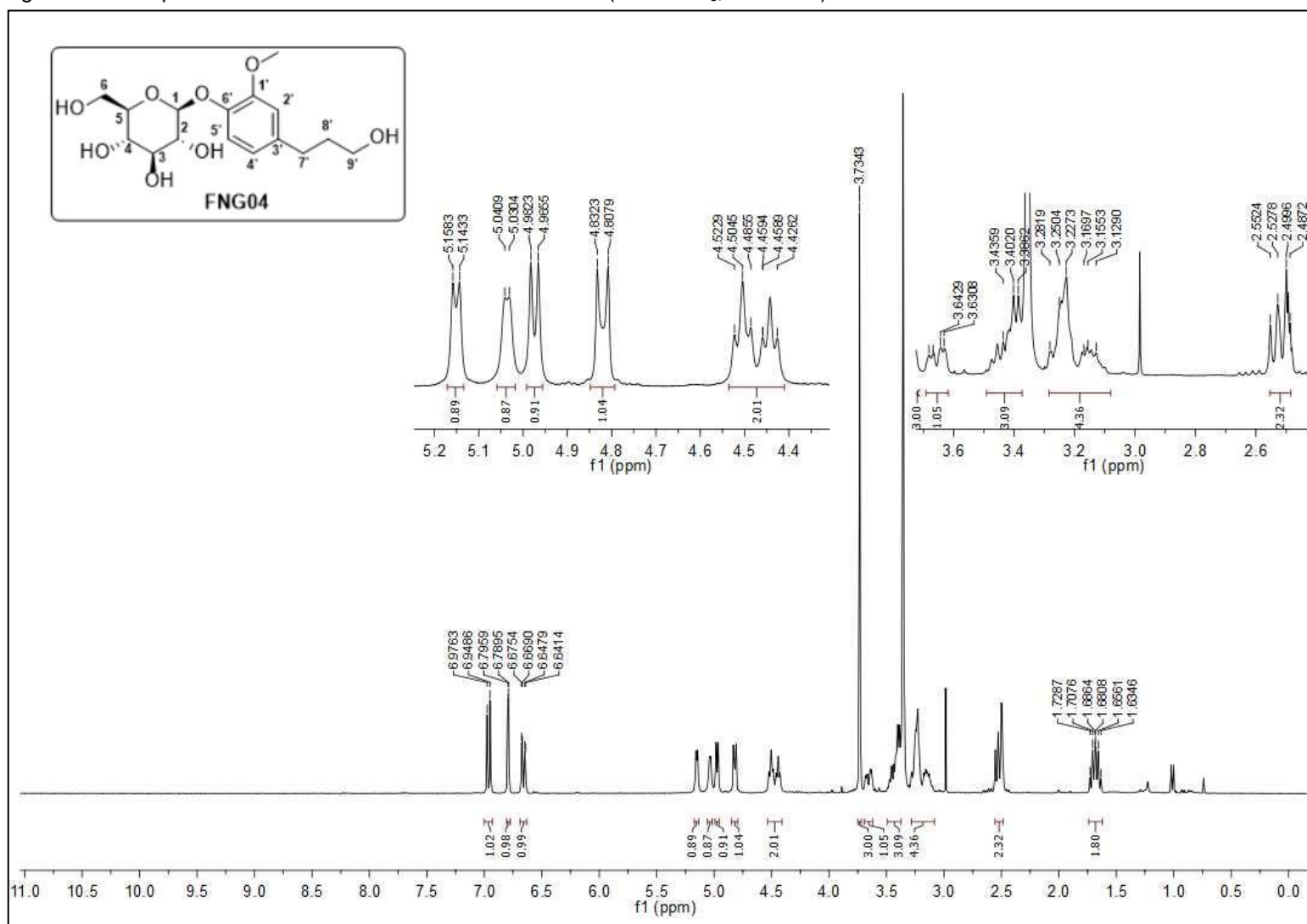
Figura 106 – Subespectro DEPT-135 da substância **FNB04** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz).

Fonte: Da autora.

Figura 107 – Espectro de absorção na região do IV da substância **FNG04**.

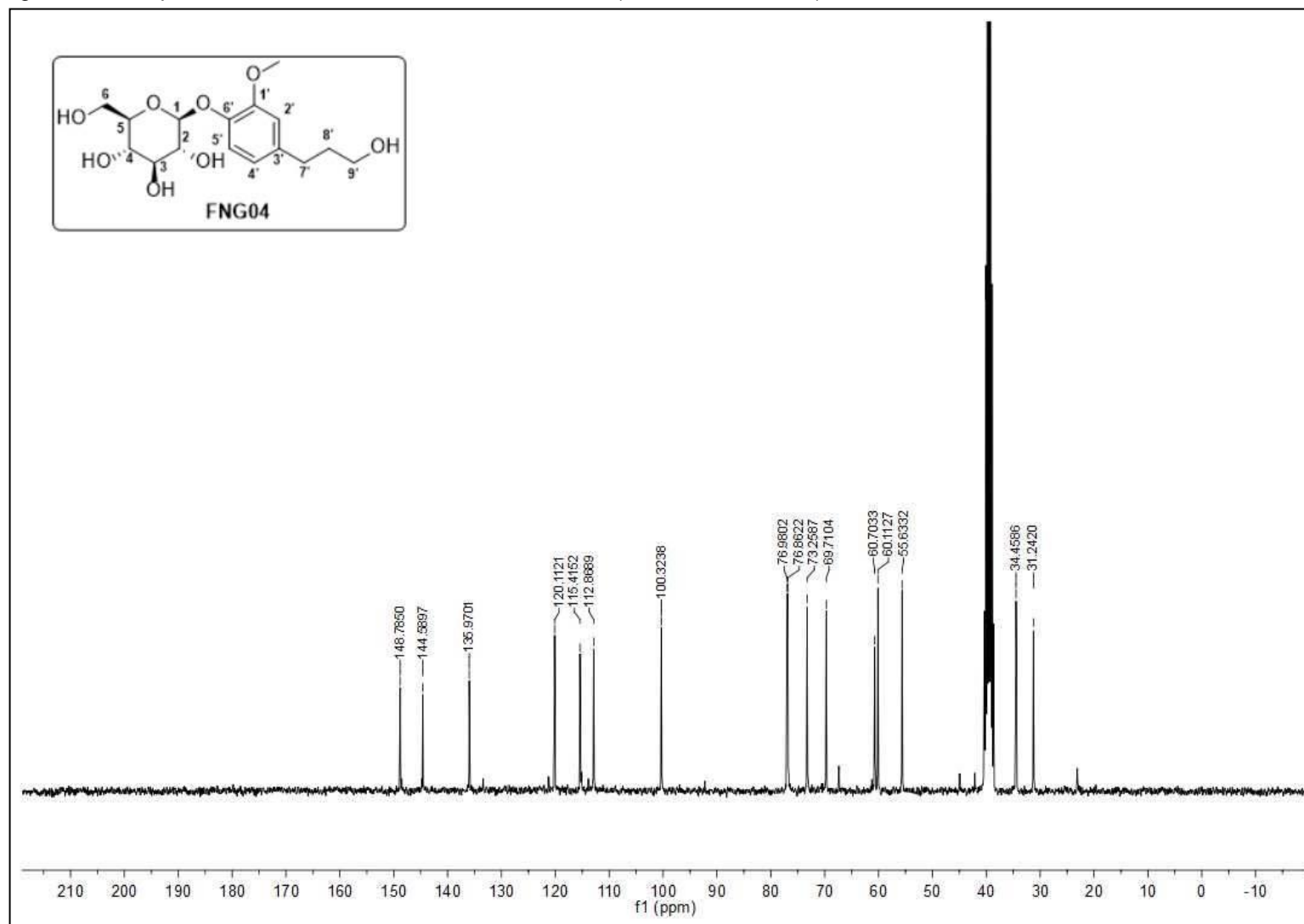
Fonte: Da autora.

Figura 108 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **FNG04** (DMSO-  $d_6$ , 300 MHz).

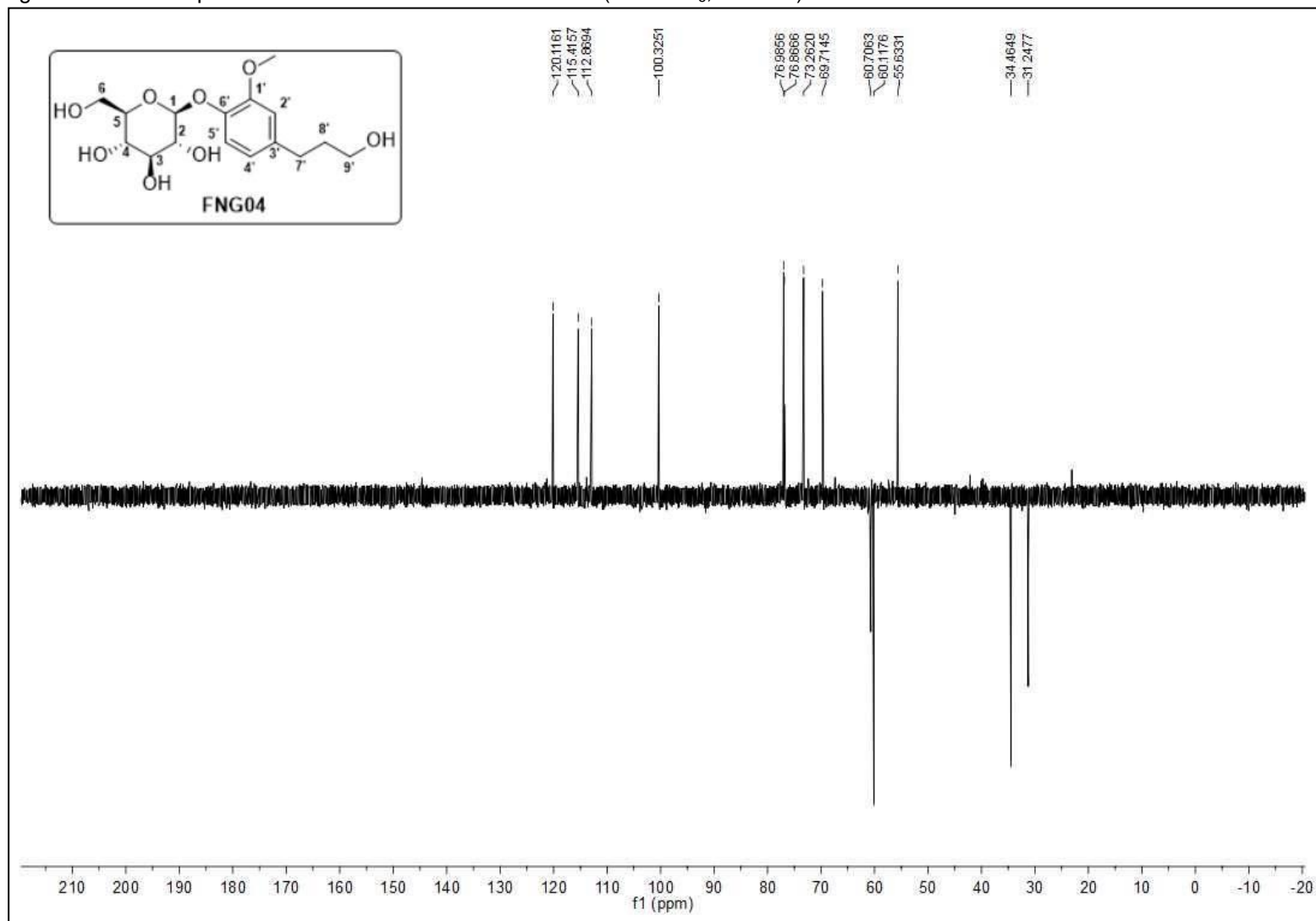


autora.

Fonte: Da

Figura 109 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **FNG04** (DMSO-  $d_6$ , 75 MHz).

Fonte: Da autora.

Figura 110 – Subespectro DEPT-135 da substância **FNG04** (DMSO- $d_6$ , 75 MHz).

Fonte: Da autora.