



Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG  
Programa de Pós-Graduação em Química



WELTON ROSA

**BIOPROSPECÇÃO DA ESPÉCIE *Miconia willdenowii* VISANDO A OBTENÇÃO DE  
SUBSTÂNCIAS COM POTENCIAL ANTICHAGÁSICO**

Alfenas/MG  
2015

**WELTON ROSA**

**BIOPROSPECÇÃO DA ESPÉCIE *Miconia willdenowii* VISANDO A OBTENÇÃO DE  
SUBSTÂNCIAS COM POTENCIAL ANTICHAGÁSICO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marisi Gomes Soares

**Alfenas/MG  
2015**

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

Rosa, Welton.

Bioprospecção da espécie *Miconia willdenowii* visando a obtenção de substâncias com potencial antichagásico.

/ Welton Rosa. -- Alfenas/MG, 2015.

90 f.

Orientadora: Marisi Gomes Soares.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2015.

Bibliografia.

1. Doença de Chagas. 2. Melastomataceae. 3. Bioprospecção.  
4. Tripanossomicidas. 5. Mata Atlântica. I. Soares, Marisi Gomes.  
II. Título.

CDD-547.8

Welton Rosa

**“Bioprospecção da espécie *Miconia willdenowii* visando a obtenção de substâncias com potencial antichagásico”**

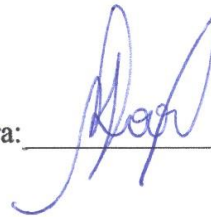
A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química- Orgânica.

Aprovado em: 31/07/2015

Profa. Dra. Marisi Gomes Soares

Instituição: Universidade Federal de Alfenas –  
UNIFAL-MG

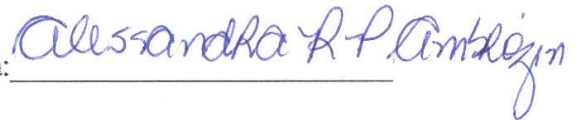
Assinatura: \_\_\_\_\_



Profa. Dra. Alessandra Regina Pepe Ambrozini

Instituição: Universidade Federal de Alfenas –  
UNIFAL-MG

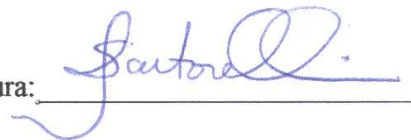
Assinatura: \_\_\_\_\_



Profa. Dra. Patrícia Sartorelli

Instituição: UNIFESP

Assinatura: \_\_\_\_\_



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por toda a força e graça concedida durante todo esse período de muito trabalho e estudo, minha saúde e de todos os meus familiares, enfim, todas as condições por Ele concedidas para que pudesse concluir mais esta etapa com muita paz, felicidade e gratidão.

Aos meus pais, pela confiança e respeito sempre, aos quais dedico mais esta conquista. Sem eles não seria possível, já que seus apoios, tanto financeiro quanto emocional, foram primordiais na conclusão de mais uma etapa. Obrigado sempre por estarem comigo. Amo vocês!

A todos os meus familiares, pelo apoio e admiração, em especial às queridas primas Geisiane e Gisele, pelo carinho e amor sempre.

À minha orientadora, professora Dra. Marisi Gomes Soares, pela atenção, orientação, carinho, amizade, enfim, pelos momentos de muito trabalho árduo e também distrações, os ensinamentos e conselhos. Obrigado por tudo!

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Química, em especial à professora Dra. Daniela Aparecida Chagas de Paula pelos ensinamentos e paciência, a Dra. Daniele Ferreira Dias, pela amizade, ensinamentos e conselhos.

Ao professor Dr. Ivo Santana Caldas, do Departamento de Patologia e Parasitologia da UNIFAL-MG, pela colaboração no trabalho e tantos ensinamentos compartilhados com muita paciência e prontidão.

Aos amigos e colegas do LFQM e agregados, pelos conhecimentos e momentos compartilhados, em especial à Isadora (Bacury), Laís (Tosca), Jaque (Mestrinha), Thiago (cabeça), Carla (Carlinha), Paloma, Nathália (LabiQ), João, Luiza e Victor. Sem vocês não teria sido tão divertido os momentos de lazer.

Em especial a amiga e companheira Bruna Lidiane (inicialmente Sapinha e agora Magrela da minha vida) pela força no desenvolvimento deste trabalho e todos os momentos dentro e fora de LFQM.

Finalmente, agradeço a todos que estiveram comigo em algum momento desse ciclo que se encerra: pelos momentos e/ou ensinamentos, o meu muito obrigado!

## RESUMO

Neste trabalho, foram preparados inicialmente dez diferentes extratos brutos etanólicos de diferentes espécies vegetais da região da mata atlântica mineira das proximidades do município de Alfenas-MG. Após a padronização do teste antichagásico *in vitro* contra as formas epimastigotas da cepa Y, e utilizando-se o método colorimétrico com solução de resazurina, todos os extratos foram submetidos ao bioensaio, o que permitiu a determinação do extrato de maior potencial anti-epimastigota como sendo da *Miconia willdenowii*, da família Melastomataceae. Tal extrato, foi posteriormente submetido a particionamento por extração líquido-líquido com hexano, acetato de etila e uma mistura etanol:água (1:3), o que permitiu separar compostos em grupos por diferença de polaridade. As 3 frações obtidas foram novamente submetidas ao teste biológico, para determinação do grupo de compostos de maior atividade. A fração acetato foi assim determinada como a de maior potencial contra as formas epimastigotas dos parasitas da doença de Chagas, sendo esta submetida ao fracionamento por cromatografia em coluna, obtendo-se assim ao final, um total de 12 subfrações. Estas foram na sequência submetidas também ao teste *in vitro*, determinando-se as de maior potencial contra os epimastigotas. No geral, três destas subfrações apresentaram maior atividade antichagásica (A2, A3 e A4), as quais foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) por conseguinte, a partir das quais puderam ser isoladas dois derivados de hidroquinonas, já relatadas para outras espécies de *Miconia*: miconidina e primina. As duas substâncias tiveram suas estruturas identificadas por espectroscopia de RMN e também espectrometria de massas, e confirmadas com dados da literatura. A quantificação das duas substâncias isoladas foi feita para cada amostra de *M. willdenowii* (extrato bruto, fração acetato e subfrações), o que permitiu deduzir que a presença de tais compostos, nestas amostras, é a principal responsável pela atividade tripanocida apresentada pelas mesmas. O bioensaio anti-*T. cruzi* realizado também para os compostos isolados permitiu observar o alto potencial tripanocida frente a forma epimastigota do parasita, apresentando valores de CE<sub>50</sub> inferiores até mesmo que a droga padrão de referência, o benznidazol. O teste de citotoxicidade *in vitro* com fibroblastos derivados de pele humana normal também com a miconidina e primina, isoladas de *M. willdenowii*, demonstrou que estas só apresentavam efeito adverso a partir de 50 µg/mL (dentre as concentrações testadas), valor este superior ao CE<sub>50</sub> apresentado pelas mesmas, sugerindo o alto potencial efetivo de utilização destes compostos na terapia da doença de Chagas.

**Palavras-chave:** Doença de Chagas. *Miconia willdenowii*. Miconidina. Primina. Atividade Tripanocida. Epimastigota.

## ABSTRACT

In this work, ten different ethanol crude extracts were prepared from different plant species of rainforest nearby the city of Alfenas-MG. After standardization of *in vitro* antichagasic test against *T. cruzi* (Y strain) epimastigote form, and using colorimetric method with resazurin solution, all extracts had the activity evaluated and the most active was *Miconia willdenowii* extract, from the Melastomataceae family. This extract was subsequently subjected to partitioning by liquid-liquid extraction using hexane, ethyl acetate and ethanol:water (1:3) mixture, allowing the separation of compounds in groups by difference in polarity. The 3 fractions obtained were submitted to bioguided assay in order to determine the most active. The ethyl acetate fraction displaying the higher potential against epimastigote form of Chagas' disease parasites was extensively purified under CC conditions. In the end, this process provided a total of 12 subfractions. All subfractions were subjected to bioguided assay, determining those with the greatest potential against epimastigote. Overall, three subfractions showed antichagasic activity (A2, A3 and A4), which were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC), and two hydroquinones derivatives previously reported for other species *Miconia*: miconidin and primin, could be isolated. Both compounds had their structures identified by NMR spectroscopy, mass spectrometry and confirmed by database comparison in the literature. The quantification of these two compounds was made for each sample of *M. willdenowii* (crude extract, acetate fraction and subfractions), which allowed deducing that their presence or absence is related to trypanocidal activity. The anti-*T. cruzi* bioassay, when performed to the isolated compounds, allowed observing higher trypanocidal potential than the reference drug (benznidazole). The *in vitro* cytotoxicity assay for miconidin and primin, using normal human skin-derived fibroblasts, showed that they only present cytotoxicity over 50 µg/mL, in which is higher than the EC<sub>50</sub> presented by these compounds in the trypanocidal assay, suggesting high potential for effective use of these compounds as therapeutical alternative for Chagas' disease after further studies.

**Key-words:** Chagas' disease. *Miconia willdenowii*. Miconidin. Primin. Trypanocidal Activity. Epimastigote.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Mapa representativo da sobreposição geográfica das doenças negligenciadas. ....	19
<b>Figura 2 -</b>	Esquema representativo do ciclo de vida do parasita <i>T. cruzi</i> da doença de Chagas. ....	21
<b>Figura 3 -</b>	Representação da estrutura do benznidazol utilizado na terapia contra a doença de Chagas. ....	22
<b>Figura 4 -</b>	Estrutura química da morfina. ....	24
<b>Figura 5 -</b>	Estrutura química de alguns alcalóides opióides.....	25
<b>Figura 6 -</b>	Salicilatos importantes no desenvolvimento de fármacos entre 1800-1900. ....	26
<b>Figura 7 -</b>	Estrutura química do taxol. ....	26
<b>Figura 8 -</b>	Esquema representativo das tecnologias utilizadas na identificação de compostos naturais. ....	29
<b>Figura 9 -</b>	Representação da reação de redução da resazurina à resofurina.....	35
<b>Figura 10 -</b>	Foto esquemática de Câmara de Neubauer em detalhe. ....	35
<b>Figura 11 -</b>	Esquema representativo do particionamento do extrato bruto de maior atividade tripanocida. ....	37
<b>Figura 12 -</b>	Esquema de reação de redução do reagente MTS no teste de citotoxicidade. ....	42
<b>Figura 13 -</b>	Foto do teste comparativo da mudança de coloração da resazurina nos diferentes parâmetros analisados. ....	44
<b>Figura 14 -</b>	Fluxograma representativo das etapas do processo de cromatografia em coluna da fração acetato do extrato das folhas da espécie <i>Miconia willdenowii</i> . ....	49
<b>Figura 15 -</b>	Perfis cromatográficos obtidos para cada uma das amostras: A) extrato bruto; B) fração acetato; C) subfração A2; D) subfração A3; E) subfração A4. ....	52
<b>Figura 16 -</b>	Perfil cromatográfico obtido por HPLC-UV-DAD em 279 nm mostrando a presença dos compostos X e Y em cada amostra de <i>M. willdenowii</i> . ....	53

<b>Figura 17</b> -	Curva de absorção no UV para o composto X ( $t_{R1} \approx 22,82$ min). .....	54
<b>Figura 18</b> -	Curva de absorção no UV para o composto Y ( $t_{R2} \approx 25,87$ min). .....	55
<b>Figura 19</b> -	Cromatogramas bidimensionais obtido para o isolamento dos picos X e Y em $t_{R1} \approx 32,50$ min e $t_{R2} \approx 34,70$ min, respectivamente. ....	56
<b>Figura 20</b> -	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância X, a 300 MHz em $\text{CDCl}_3$ . ....	58
<b>Figura 21</b> -	Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (0,6 a 2,8 ppm) da substância X. ..	58
<b>Figura 22</b> -	Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (3,7 a 6,7 ppm) da substância X. ..	59
<b>Figura 23</b> -	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância X, a 75 MHz em $\text{CDCl}_3$ . ....	60
<b>Figura 24</b> -	Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY da substância X, a 300 MHz em $\text{CDCl}_3$ . ....	62
<b>Figura 25</b> -	Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HSQC da substância X, a 300 MHz em $\text{CDCl}_3$ . ....	63
<b>Figura 26</b> -	Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC da substância X, a 300 MHz em $\text{CDCl}_3$ . ....	64
<b>Figura 27</b> -	Expansão I do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC da substância X, a 300 MHz em $\text{CDCl}_3$ . ....	64
<b>Figura 28</b> -	Expansão II do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC da substância X, a 300 MHz em $\text{CDCl}_3$ . ....	65
<b>Figura 29</b> -	Expansão III do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC da substância X, a 300 MHz em $\text{CDCl}_3$ . ....	65
<b>Figura 30</b> -	Algumas correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC obtidas para a substância X. ....	66
<b>Figura 31</b> -	Estrutura química da substância X, identificada como miconidina. ....	68
<b>Figura 32</b> -	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância Y, a 300 MHz em $\text{CDCl}_3$ . ....	70
<b>Figura 33</b> -	Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (0,80 a 2,50 ppm) da substância Y, obtido a 300 MHz em $\text{CDCl}_3$ . ....	70
<b>Figura 34</b> -	Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (3,60 a 6,60 ppm) obtido a 300 MHz em $\text{CDCl}_3$ para Y. ....	71
<b>Figura 35</b> -	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância Y, a 75 MHz em $\text{CDCl}_3$ . ....	72
<b>Figura 36</b> -	Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY da substância Y, a 300 MHz em $\text{CDCl}_3$ . ....	73

<b>Figura 37</b> -	Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HSQC da substância Y, a 300 MHz em $\text{CDCl}_3$ . .....	74
<b>Figura 38</b> -	Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC da substância Y, a 300 MHz em $\text{CDCl}_3$ . .....	76
<b>Figura 39</b> -	Algumas correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC obtidas para a substância Y. ....	77
<b>Figura 40</b> -	Estrutura química da substância Y, identificada como primina. ....	77
<b>Figura 41</b> -	Perfil cromatográfico obtido nos modos positivo [TIC (+)] e negativo [TIC (-)] para a subfração A3, por LC-MS. ....	78
<b>Figura 42</b> -	Espectro de massas obtidos no modo positivo para a miconidina. ....	79
<b>Figura 43</b> -	Espectro de massas obtido no modo positivo para a primina. ....	79
<b>Figura 44</b> -	Curva analítica: área versus concentração da miconidina. ....	80
<b>Figura 45</b> -	Curva analítica: área versus concentração da primina. ....	80
<b>Figura 46</b> -	Viabilidade celular das substâncias isoladas obtidas e do benznidazol, em quatro concentrações diferentes. ....	84

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Família e espécies vegetais coletadas para o estudo fitoquímico. ....	33
<b>Tabela 2 -</b>	Extratos brutos com as respectivas massas obtidas. ....	43
<b>Tabela 3 -</b>	Valores de CE <sub>50</sub> obtidos do teste tripanocida para cada extrato bruto. ....	45
<b>Tabela 4 -</b>	Valores de CE <sub>50</sub> obtidos do teste tripanocida para cada fração obtida do extrato da <i>Miconia willdenowii</i> . ....	47
<b>Tabela 5 -</b>	Valores de CE <sub>50</sub> obtidos no bioensaio para cada uma das subfrações da coluna. ....	51
<b>Tabela 6 -</b>	Dados do espectro de RMN de <sup>1</sup> H de X, obtidos a 300 MHz em CDCl <sub>3</sub> . ....	60
<b>Tabela 7 -</b>	Dados do espectro de RMN de <sup>13</sup> C, obtido em CDCl <sub>3</sub> a 75 MHz, para o composto isolado X. ....	61
<b>Tabela 8 -</b>	Correlações de <sup>1</sup> H x <sup>1</sup> H COSY da substância X, a 300 MHz em CDCl <sub>3</sub> . ....	62
<b>Tabela 9 -</b>	Correlações de <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C HSQC da substância X, a 300 MHz em CDCl <sub>3</sub> . ....	63
<b>Tabela 10 -</b>	Correlações de <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C HMBC da substância X, a 300 MHz em CDCl <sub>3</sub> . ....	67
<b>Tabela 11 -</b>	Dados do espectro de RMN de <sup>1</sup> H de Y. ....	71
<b>Tabela 12 -</b>	Dados do espectro de RMN de <sup>13</sup> C obtido a 75 MHz em CDCl <sub>3</sub> para Y. ....	72
<b>Tabela 13 -</b>	Correlações de <sup>1</sup> H x <sup>1</sup> H COSY da substância Y, a 300 MHz em CDCl <sub>3</sub> . ....	74
<b>Tabela 14 -</b>	Correlações de <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C HSQC da substância Y, a 300 MHz em CDCl <sub>3</sub> . ....	75
<b>Tabela 15 -</b>	Correlações de <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C HMBC da substância Y, a 300 MHz em CDCl <sub>3</sub> . ....	76
<b>Tabela 16 -</b>	Concentração das substâncias isoladas, em cada amostra da <i>Miconia willdenowii</i> . ....	81
<b>Tabela 17 -</b>	Valores de CE <sub>50</sub> obtidos no bioensaio para cada uma das substâncias isoladas. ....	82

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNDi -	<i>Drugs for Neglected Diseases initiative</i>
iOWH -	<i>initiative One World Health</i>
WHO/TDR -	<i>World Health Organization/ Special Programme for Research &amp; Training in Tropical Diseases Research</i>
CLAE -	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
RMN -	Ressonância Magnética Nuclear
EM -	Espectrometria de Massas
FDA -	<i>Food and Drug Administration</i>
AAS -	Ácido Acetil Salicílico
NCI -	<i>National Cancer Institute</i>
HPLC -	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
MS -	<i>Mass Spectrometry</i>
UV -	Ultravioleta
DAD -	Detector de Arranjo de Diodos
IR -	<i>InfraRed</i>
DCCC -	<i>Droplet Counter Current Chromatography</i>
RLCC -	<i>Rotation Locular Counter-Current Chromatography</i>
HSCCC -	<i>High-Speed Counter-Current Chromatography</i>
LIT -	<i>Liver Infusion Triptose</i>
PBS -	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
µg/mL -	microgramas por mililitros
µL -	microlitros
epi/mL -	Epimastigotas por mililitros
DMSO -	Dimetil sulfóxido
nm -	Nanômetros
CE <sub>50</sub> -	Concentração de 50% de Eficiência
cm -	Centímetros
Å -	Ângstrom
CCD -	Cromatografia em Camada Delgada
ACN -	Acetonitrila

RMN de $^1\text{H}$ -	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de $^{13}\text{C}$ -	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
MHz -	MegaHertz
COSY -	<i>Homonuclear Correlation Spectroscopy</i>
HSQC -	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy</i>
HMBC -	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
$\text{CDCl}_3$ -	Clorofórmio deuterado
ESI -	<i>Electrospray Ionization</i>
tQUAD -	Triplo Quadrupolo
X -	Substância 1 isolada
Y -	Substância 2 isolada
$\lambda_{\text{MÁX}}$ -	Comprimento de onda de máxima absorção
$R^2$ -	Coefficiente de correlação
% (m/m) -	Porcentagem em massa

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
2.1	AS DOENÇAS NEGLIGENCIADAS .....	17
2.2	A DOENÇA DE CHAGAS .....	19
2.3	FITOQUÍMICA .....	23
2.4	A INFLUÊNCIA DOS PRODUTOS NATURAIS NO DESENVOLVIMENTO DOS FÁRMACOS .....	24
2.5	BIOPROSPECÇÃO .....	27
2.6	AS TECNOLOGIAS MODERNAS NA FITOQUÍMICA .....	27
2.7	O USO DE TÉCNICAS HIFENADAS NA IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DE SUBSTÂNCIAS DE ORIGEM VEGETAL .....	28
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	31
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	32
4.1	OBJETIVO GERAL .....	32
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	33
5.1	COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL .....	33
5.2	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS .....	34
5.3	CULTURA DOS EPIMASTIGOTAS .....	34
5.4	PADRONIZAÇÃO DO USO DA RESAZURINA NO TESTE TRIPANOCIDA .....	34
5.5	TESTE TRIPANOCIDA <i>in vitro</i> .....	36
5.6	PARTICIONAMENTO DO EXTRATO DE MAIOR ATIVIDADE TRIPANOCIDA .....	36

5.7	SEPARAÇÃO DE GRUPOS DE COMPOSTOS POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA .....	37
5.8	ANÁLISE POR HPLC .....	38
<b>5.8.1</b>	<b>Preparo de amostras para análise em HPLC .....</b>	<b>38</b>
<b>5.8.2</b>	<b>Obtenção do perfil cromatográfico por LC-DAD .....</b>	<b>38</b>
<b>5.8.3</b>	<b>Isolamento dos compostos X e Y por LC-DAD .....</b>	<b>39</b>
5.9	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL COMPOSTOS X E Y ISOLADOS POR ESPECTROSCOPIA DE RMN .....	39
5.10	OBTENÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DA AMOSTRA A3 POR LC-MS E DOS ESPECTROS DE MASSA DE X E Y .....	40
5.11	QUANTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS X E Y NAS AMOSTRAS POR LC-DAD .....	40
5.12	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA <i>in vitro</i> DOS COMPOSTOS ISOLADOS .....	41
<b>5.12.1</b>	<b>Linhagem celular e condições de cultivo .....</b>	<b>41</b>
<b>5.12.2</b>	<b>Esquema de tratamento .....</b>	<b>41</b>
<b>5.12.3</b>	<b>Ensaio de viabilidade celular .....</b>	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
6.1	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS .....	43
6.2	PADRONIZAÇÃO DO USO DA RESAZURINA NO TESTE TRIPANOCIDA .....	43
6.3	TESTE TRIPANOCIDA <i>in vitro</i> DOS EXTRATOS BRUTOS .....	44
6.4	PARTICIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO DA ESPÉCIE <i>Miconia willdenowii</i> .....	46
6.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA DAS FRAÇÕES DO EXTRATO BRUTO DA ESPÉCIE <i>Miconia willdenowii</i> .....	47
6.6	FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO ACETATO POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA .....	48
6.7	TESTE TRIPANOCIDA <i>in vitro</i> DAS SUBFRAÇÕES DE A1 A A12 DA FRAÇÃO ACETATO .....	50

6.8	ANÁLISE DAS AMOSTRAS ATIVAS NO TESTE TRIPANOCIDA POR LC-DAD .....	51
6.9	ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS X E Y POR LC-DAD .....	55
6.10	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS X E Y POR ESPECTROSCOPIA DE RMN .....	57
6.10.1	<b>Identificação do composto X por espectroscopia de RMN .....</b>	<b>57</b>
6.10.2	<b>Identificação do composto Y por espectroscopia de RMN .....</b>	<b>68</b>
6.11	CONFIRMAÇÃO DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS .....	78
6.12	QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS NAS AMOSTRAS DA <i>Miconia willdenowii</i> .....	80
6.13	TESTE TRIPANOCIDA <i>in vitro</i> DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS .....	82
6.14	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE COM OS COMPOSTOS ISOLADOS .....	83
7	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>85</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>87</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas são comumente caracterizadas como doenças infectocontagiosas que assolam regiões de miséria e pobreza, principalmente nos países subdesenvolvidos. Dentre as diversas doenças negligenciadas destacam-se as geohelmintoses, a tripanossomíase africana (doença do sono), as parasitoses intestinais, a doença de Chagas, a esquistossomose, a tracoma, a malária, a tuberculose, a hanseníase, a filariose, a febre reumática, as leishmanioses, a oncocercose, entre outras, sendo estas causadas por diversos tipos de organismos, compreendendo vírus, fungos, bactérias, protozoários, etc (SANTOS; MEIRELLES, 2013).

Em diversos países da América Latina, principalmente no Brasil, uma das doenças que mais afeta a população é a doença de Chagas, causada pelo protozoário da espécie *Trypanosoma cruzi*, transmitida principalmente pela picada do barbeiro *Triatoma infestans*. A terapia da doença de Chagas tem utilizado os medicamentos benznidazol e nifurtimox com baixa eficácia ou com limitações, pelo fato de sua eficiência se apresentar somente em certos estágios da doença, além dos efeitos colaterais em grande parte dos indivíduos tratados. Os investimentos em pesquisas na busca por novos candidatos a fármacos no tratamento das doenças negligenciadas, em especial da doença de Chagas, apesar de insuficientes ainda ganham espaço nos institutos de pesquisas, bem como nas Universidades (PITA; PASCUTTI, 2011).

Uma área que tem se apresentada promissora na busca por novos tratamentos, não só da doença de Chagas como de diversas outras doenças negligenciadas, é a Fitoquímica, que faz o estudo da composição de materiais vegetais, na tentativa de isolamento, caracterização e testes de compostos com atividade potencial contra essas doenças (SILVA; CARVALHO, 2004). Tal ramo da Química tem se aplicado tanto nesses esforços, devido à grande diversidade da flora brasileira, o que tem permitido a progressão da bioprospecção aliado ao estudo de Produtos Naturais (SANTOS, 2013).

O estudo fitoquímico de extratos e materiais vegetais é feito por técnicas de separação como cromatografia em camada delgada, cromatografia em coluna, partição líquido-líquido, e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acopladas aos métodos de identificação e análise orgânica, espectroscópicos e espectrométricos, como espectroscopia de ressonância magnética nuclear, no infravermelho, no ultravioleta e espectrometria de massas. Em sua maior parte, o estudo fitoquímico tem utilizado técnicas analíticas hifenadas, onde se tem a junção de métodos de separação com algum método espectroscópico/espectrométrico que forneça

informações sobre a identidade dos compostos separados. A hifenação destas técnicas tem permitido o desenvolvimento de pesquisas em menor tempo, com demanda cada vez menor de quantidades de amostras, vantagens cruciais no desenvolvimento de pesquisas com produtos naturais (RODRIGUES et al., 2006).

A falta de estudos químicos acerca da grande biodisponibilidade vegetal regional e ainda a ausência de tratamentos eficazes para as doenças negligenciadas, com destaque para a doença de Chagas, despertam o interesse do desenvolvimento de trabalhos na área que possam colaborar para o progresso da Química Medicinal voltada para a assistência da comunidade.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção são descritos os principais assuntos tratados neste trabalho.

### 2.1 AS DOENÇAS NEGLIGENCIADAS

Diversos tipos de doenças acometem a população mundial desde o passado. Dentre os milhares tipos de enfermidades registradas, estão as doenças infecciosas que são causadas por algum tipo de micro-organismo patogênico como vírus, bactérias, fungos, protozoários, entre outros, que invadem as células do hospedeiro para sua reprodução. Algumas dessas doenças têm chamado a atenção de estudiosos e líderes políticos para o fato da maioria delas se concentrar principalmente nas regiões mais pobres e vulneráveis do planeta, evidenciando atualmente, graves problemas de saúde pública, o que representa um grande desafio do século XXI em razão de seu aspecto socioeconômico (GUIDO; ANDRICUPOLO; OLIVA, 2010).

Muitas dessas doenças parasitárias infecciosas já foram consideradas “doenças tropicais”, referenciando a maior ocorrência destas enfermidades em áreas do planeta com condições climáticas quentes e úmidas (CAMARGO, 2008). Tal conceito advém também de uma visão colonialista do determinismo geográfico da causalidade destas doenças, uma vez que elas ocorriam na maioria das colônias do século XIX que se situava nos trópicos do planeta (MOREL, 2006).

Apesar do termo “doenças tropicais” sugerir com precisão a área geográfica de ocorrência de grande número de doenças parasitárias, ainda assim tal nomenclatura não é a ideal. Para isso, outra categorização das doenças parasitárias infecciosas foi melhor designada, sendo então utilizado o termo “doenças negligenciadas”. A semântica da palavra “negligenciada” sugere a ideia de esquecimento e abandono (FERREIRA, 1999). Neste sentido, pode-se definir como doenças negligenciadas, as doenças parasitárias infecciosas que afetam a população de áreas assoladas pela pobreza e miséria, caídas ao esquecimento de investimentos políticos, econômicos e sociais contra essas patologias, por falta de recursos, trazendo essas regiões à manutenção dessa vulnerabilidade (OLIVEIRA; MACHADO; FREITAS, 2014).

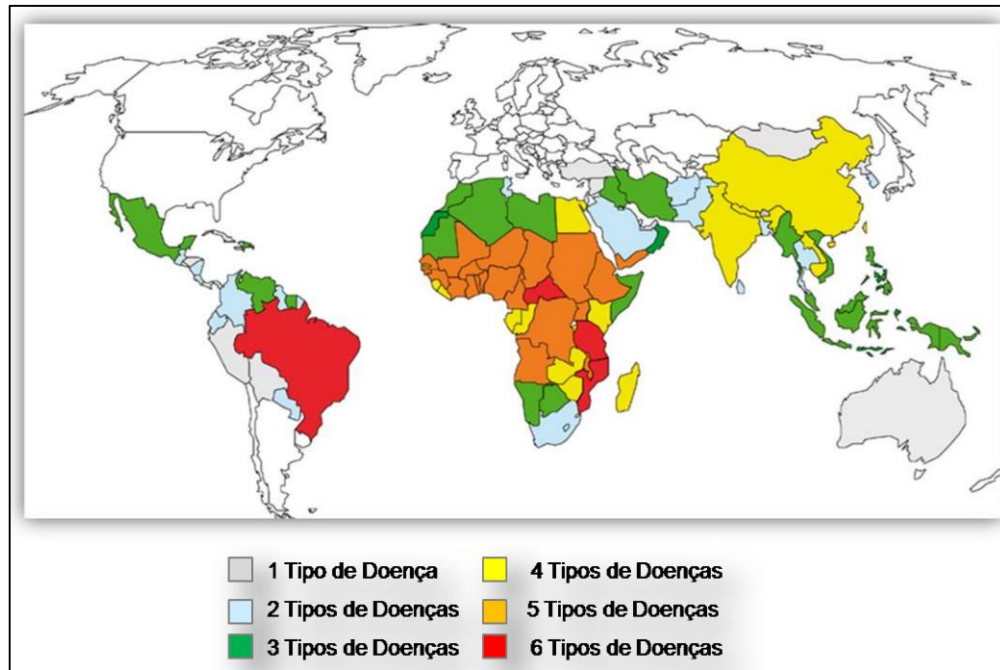
Pelo fato de tais enfermidades ocorrerem principalmente em países em desenvolvimento, o investimento em avanços terapêuticos (fármacos, métodos diagnósticos e

vacinas) torna-se limitado, embora ainda o haja, até mesmo por parte de países já desenvolvidos. Tais esforços, ainda assim não têm sido suficientes pelo baixo interesse das indústrias farmacêuticas, que justificam o reduzido potencial lucrativo de retorno para a indústria, uma vez que a população atingida é de baixa renda, o que não geraria tantos lucros (BRASIL, 2008).

Estima-se que cerca de 15 milhões de pessoas no mundo morrem a cada ano, vítimas de doenças negligenciadas (OLIVEIRA; MACHADO; FREITAS, 2014). A ocorrência destas doenças nos países em desenvolvimento não é somente representada em óbitos, mas também em doentes crônicos dentre jovens e adultos de todas as idades, causando deformidade e incapacidade à população, agravando a saúde pública do país afetado, além de causar a perpetuação da pobreza e da miséria da região (OLIVEIRA et al., 2013).

Existem diversos tipos de doenças negligenciadas, nomeadas de acordo com as várias regiões do planeta em que ocorrem, dentre as quais se destacam geohelmintoses, tripanossomíase africana (doença do sono), parasitoses intestinais, doenças de Chagas, esquistossomose, tracoma, malária, tuberculose, hanseníase, filariose, febre reumática, as leishmanioses e oncocercose (SANTOS; MEIRELLES, 2013). Faz-se importante ressaltar aqui que a AIDS não é considerada uma doença negligenciada, pois apesar de apresentar maior ocorrência em países em desenvolvimento, existe ainda grande investimento para Pesquisas e Desenvolvimento de medicamentos e vacinas, além também de sua grande incidência em países desenvolvidos (BRASIL, 2010).

Os países subdesenvolvidos acometidos pelos diversos tipos de doenças negligenciadas podem apresentar coendemicidade numa mesma região (figura 1), em que os indivíduos da população podem ainda ser infectados por múltiplos parasitas (PITA; PASCUTTI, 2011).



**Figura 1** - Mapa representativo da sobreposição geográfica das doenças negligenciadas.  
 Fonte: PITA; PASCUTTI (2011, p.310).

Com o intuito de colaborar com iniciativas globais científicas para criação, apoio, integração e coordenação de esforços na tentativa de diminuição dos impactos das doenças negligenciadas, vários órgãos e institutos foram criados como a Iniciativa de Fármacos para Doenças Negligenciadas (DNDi – *Drugs for Neglected Diseases initiative*), Instituto de Saúde do Primeiro Mundo (iOWH – *initiative One World Health*) e a Organização Mundial da Saúde através de seu Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (WHO/TDR – *World Health Organization/ Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases Research*) (PITA; PASCUTTI, 2011).

Na América Latina, e mais especificamente no Brasil, estima-se que oito das doenças negligenciadas listadas anteriormente acometem a população da região, sendo as principais a esquistossomose, a oncocercose, as leishmanioses e a doença de Chagas, estas duas últimas as de maior incidência no país até a década de 1970 (CAMARGO, 2008).

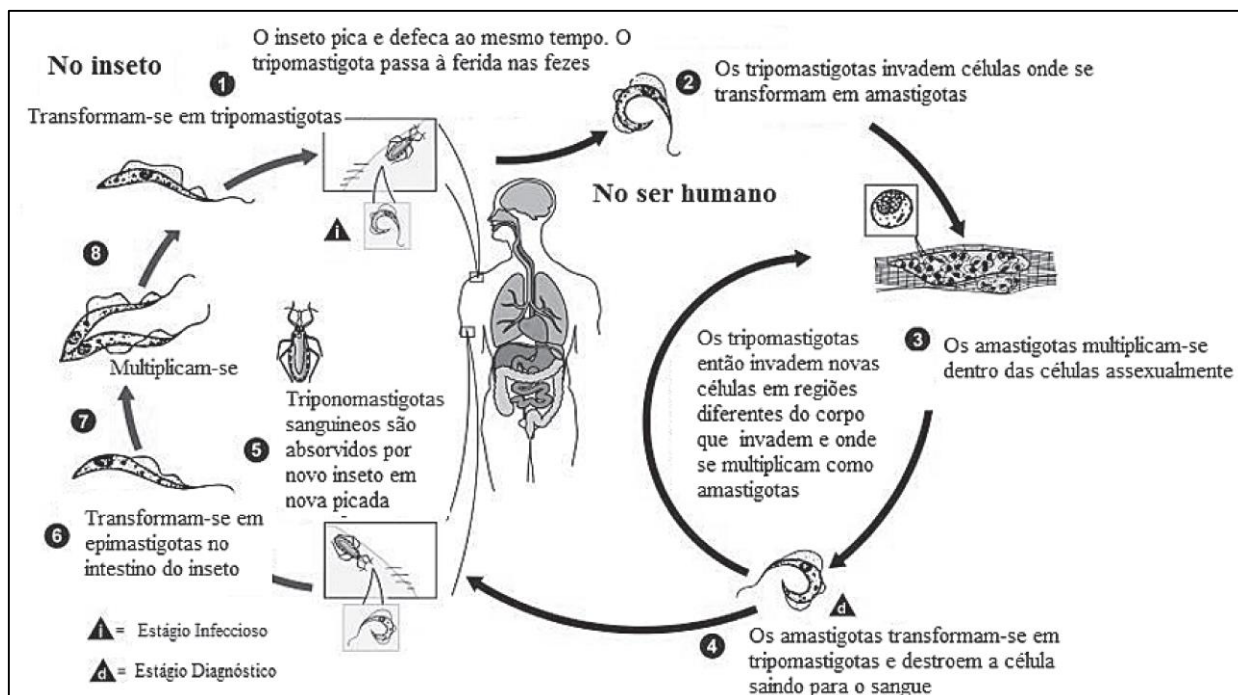
## 2.2 A DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas, também conhecida por tripanossomíase americana, por ser caracterizada como exclusiva do continente americano, foi descoberta e descrita primeiramente

pelo médico sanitarista Carlos Chagas no ano de 1909 (SOBRINHO et al., 2009). O agente etiológico da doença descoberto por Chagas é o protozoário da espécie *Trypanosoma cruzi*, subgênero *Schizotrypanum*, gênero *Trypanosoma*, família Trypanosomatidae e ordem Kinetoplastida (PITA; PASCUTTI, 2011).

A forma de contágio da doença, considerada principal até a década de 70, era pela picada do inseto hematófago da espécie *Triatoma infestans*, além de outras espécies de insetos da família Reduviidae. Após o repasto, o barbeiro deposita as fezes contendo os parasitas que entram na corrente sanguínea onde se desenvolverão e se reproduzirão (CUNHA et al., 2011).

O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* envolve três estágios morfológicos distintos (figura 2) que incluem a passagem pelo vertebrado (mamíferos em geral) e o invertebrado (barbeiro). Após o repasto sanguíneo, o barbeiro deposita suas fezes contendo as formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas do protozoário, próximo ao orifício usado para sucção, por onde os parasitas podem se adentrar no organismo hospedeiro. As formas tripomastigotas, flageladas, circulam pela corrente sanguínea e atingem as células e tecidos, transformando-se na forma amastigota em seu interior. Essa forma, não flagelada, é a responsável pela multiplicação dos parasitas no hospedeiro vertebrado, causando a proliferação dos mesmos, em que após alguns ciclos de replicação se diferenciam novamente na forma tripomastigota que causa ruptura das células e atinge novamente a corrente sanguínea. Devido à sua motilidade pela presença do flagelo, os tripomastigotas podem atingir outras células e tecidos. Quando um barbeiro triatomídeo não infectado, suga o sangue de um mamífero infectado, ele adquire os parasitas na forma tripomastigota que se transformam na forma epimastigota (também flagelada) no interior do tubo digestivo do organismo invertebrado, havendo também ali a replicação dos mesmos, que após isso, serão em seguida diferenciados na forma tripomastigota metacíclica, que poderão infectar outros vertebrados caso venham a ser picados pelo barbeiro (CUNHA et al., 2011).



**Figura 2** - Esquema representativo do ciclo de vida do parasita *T. cruzi* da doença de Chagas.

Fonte: CUNHA et al. (2011, p. 108).

Outras formas de contágio também são listadas na literatura como ingestão de alimentos contaminados com parasitas pela deposição de fezes do triatomídeo, transmissão congênita em que mulheres infectadas passam para seus bebês durante a gestação ou no parto, por transfusão sanguínea, transplante de órgãos ou ainda outros modos menos convencionais como a troca de fluidos com sangramento no ato sexual, a utilização de materiais contaminados no uso de drogas injetáveis ou acidentes em laboratórios (PITA; PASCUTTI, 2011).

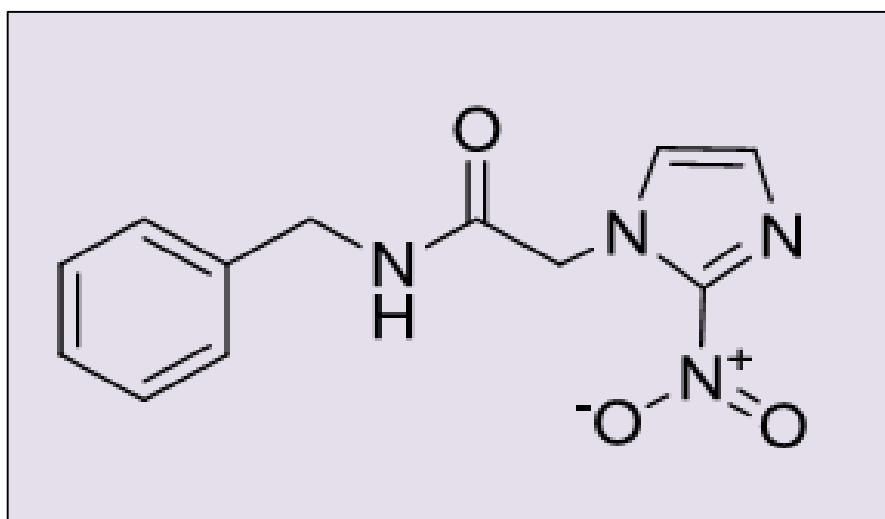
Uma análise minuciosa dos dados epidemiológicos juntamente com os recentes casos de contaminação, permite inferir que a doença de Chagas não é mais uma doença endêmica, confinada a áreas rurais e transmitida exclusivamente por insetos (PITA; PASCUTTI, 2011). No Brasil, tal fato pode ser explicado pela erradicação quase completa da transmissão vetorial da doença, com a eliminação dos insetos vetores da espécie *Triatoma infestans*. Contudo, vale a pena ressaltar que outros insetos da família Reduviidae também são vetores da doença de Chagas e por isso existem áreas no Brasil de ocorrência da doença transmitida ainda pela picada do barbeiro (SOBRINHO et al., 2009).

A doença se manifesta sob dois estágios em que inicialmente, a forma aguda faz com que o infectado apresente um quadro febril passageiro e inespecífico, com a multiplicação rápida dos parasitas que pode durar de uma a duas semanas. Por conseguinte, no outro estágio da doença, a forma crônica, diversos tecidos do organismo infectado podem ser tomados pela

presença dos parasitas causando aos poucos a debilitação de órgãos como o coração, intestino, etc (PITA; PASCUTTI, 2011).

Estudos demonstram que aproximadamente 8,5 milhões de pessoas na América Central e do Sul estão infectadas com a doença de Chagas e 25 milhões estão expostas ao risco de infecção. No Brasil, a doença de Chagas representa a quarta causa de morte dentre as doenças parasitárias, sendo cerca de 3 milhões de pessoas infectadas, maioria com mais de 45 anos (MUGUANDE et al., 2011)

Atualmente, o principal medicamento utilizado no tratamento da doença de Chagas no Brasil é o benznidazol (ou benzonidazol) (figura 3). Contudo, este tem-se apresentado eficiente somente na fase inicial da doença, assim como variações em sua eficácia no tratamento da parasitose de diferentes cepas têm sido observadas, bem como efeitos colaterais diversos podem ocorrer (PITA; PASCUTTI, 2011).



**Figura 3** - Representação da estrutura do benznidazol utilizado na terapia contra a doença de Chagas.

Fonte: PITA; PASCUTTI, (2011).

Considerando-se assim a ausência de medicamentos eficazes no tratamento da doença de Chagas, que apresentem ação contra os parasitas em ambas as suas fases e com baixa toxicidade, faz-se de suma importância a busca por novos candidatos a fármacos na terapia da doença, o que sugere assim o desenvolvimento de atividades nas áreas da Química como a síntese orgânica aplicada à Química Medicinal, bem como de Produtos Naturais, enfatizando-se a Fitoquímica.

## 2.3 FITOQUÍMICA

A fitoquímica é uma parte da ciência que tem por objetivo estudar os componentes químicos, como os princípios ativos, odores, pigmentos, dentre outras moléculas das plantas. A importância destes estudos atinge desde a área médica e farmacêutica, à agricultura, bem como outras áreas, seja por meio de pesquisas de novas substâncias a serem utilizadas em medicamentos ou defensivos agrícolas, seja para a área da taxonomia, por meio dos caracteres químicos para diferenciar as espécies, bem como para a Química, através de estudos dos metabólitos que originam diferentes substâncias presentes nos vegetais (SILVA; CARVALHO, 2004).

Considerando o rápido desenvolvimento das diferentes áreas da ciência ao longo do século XX, tais como química, biologia, farmacologia e medicina, além do advento de diferentes técnicas de separação e análise, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM), tornou-se possível o estudo dos metabólitos oriundos de espécies vegetais, bem como a sua detecção e a caracterização mesmo em baixas concentrações (SUMNER; MENDES; DIXON, 2003).

O Brasil encontra-se numa posição de destaque, pois possui aproximadamente 22% da flora mundial sendo, portanto, uma das maiores biodiversidades do planeta (MOREIRA et al, 2006). Além disso, relata-se que a maioria dos compostos com atividade biológica frente a diferentes doenças é tida como sendo de produtos naturais, o que reafirma a grande importância dos estudos na área (NEWMAN; CRAGG, 2012).

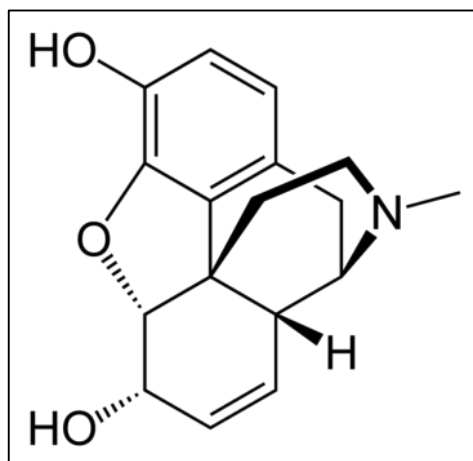
A busca pelo alívio ou pela cura das doenças através do uso de ervas e folhas talvez tenha sido a primeira forma de exploração dos produtos naturais pelo homem. As civilizações Egípcia, Greco-Romana e Chinesa foram as pioneiras no uso de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

O Brasil, com a sua enorme biodiversidade não abdicou de sua vocação para os produtos naturais e, os remédios indígenas tiveram sua importância reconhecida quando os primeiros médicos portugueses aqui chegaram (PINTO et al., 2002).

## 2.4 A INFLUÊNCIA DOS PRODUTOS NATURAIS NO DESENVOLVIMENTO DOS FÁRMACOS

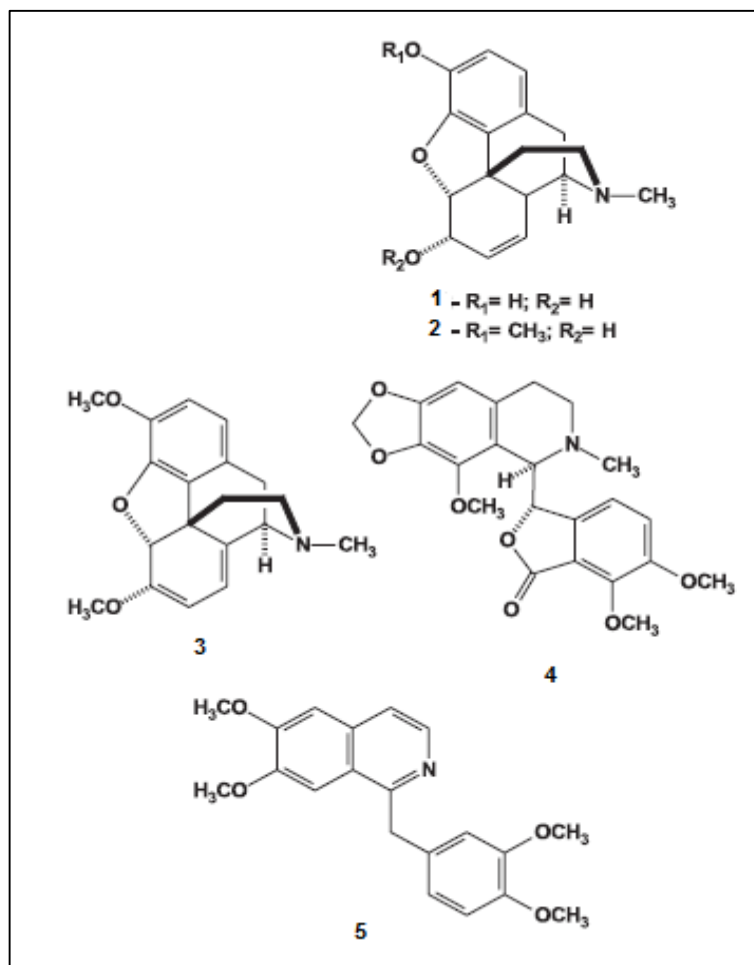
Os produtos naturais sempre exerceram grande influência nos fármacos e somente no período 2001 à 2010 o *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou 16 novos fármacos derivados de plantas (KINGHORN et al., 2011).

A partir do século XVIII, a literatura descreve a utilização de princípios ativos de plantas. Um marco do desenvolvimento da fitoquímica foi a descoberta da morfina (figura 4), obtida da *Papaver somniferum*, que apresenta propriedades soporíferas e analgésicas. (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006)



**Figura 4** - Estrutura química da morfina.  
Fonte: DO AUTOR.

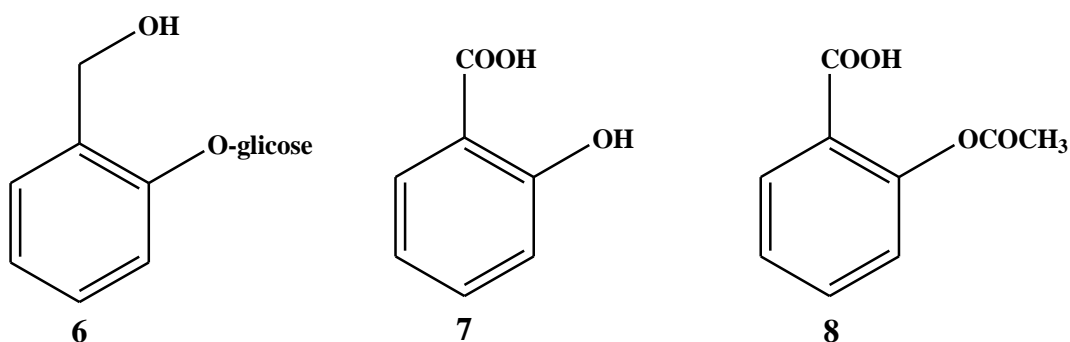
A descoberta de substâncias alucinógenas é um exemplo marcante do impacto que os produtos naturais causaram na humanidade e que certamente influenciou o comportamento do homem moderno. Preparado dos bulbos de *Papaver somniferum*, o ópio é conhecido por suas propriedades soporíferas e analgésicas e há relatos do uso dessa planta desde a época dos Sumérios (4000 A.C.). Apenas em 1803 iniciaram os primeiros estudos sobre a constituição química do ópio e em 1806, na França, Armand Séquin isolou o seu constituinte majoritário, a morfina (**1**, analgésico) e a partir daí, o interesse por substâncias naturais em sua forma pura foi estabelecido. Também foram isolados do ópio alcalóides com propriedades interessantes como a codeína (**2**, antitussígeno), a tebaína (**3**, antagonista da morfina), a narcotina (**4**, antitussígeno e espasmolítico) e a papaverina (**5**, espasmolítico) (figura 5) (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).



**Figura 5** - Estrutura química de alguns alcalóides opióides.  
 Fonte: VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, (2006).

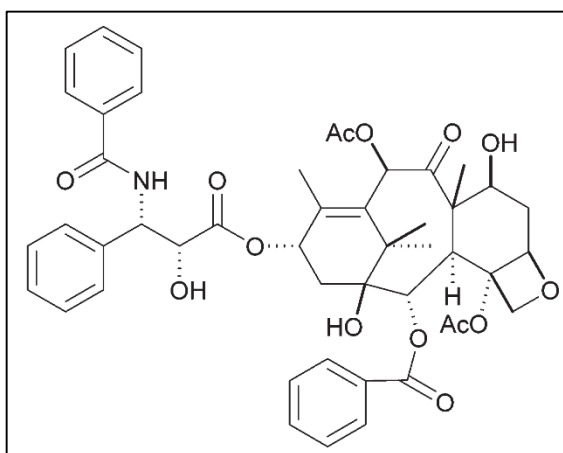
Provavelmente o fato mais importante que diz respeito ao desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais tenha sido a descoberta dos salicilatos extraídos de *Salix alba*. Em 1763, foram comprovadas as propriedades analgésicas e antipiréticas do extrato da planta, mas, somente em 1828, no Instituto de Farmacologia de Munique, Johann A. Buchner isolou uma pequena quantidade da salicilina (6) (figura 6). Na busca por melhorias, muitos outros cientistas empenharam-se em estudar o extrato natural e a salicilina até que, em 1860 o ácido salicílico (7) (figura 6) e seu sal sódico a partir do fenol foram sintetizados por Hermann Kolbe e seus alunos. Em 1874, foi criada a primeira grande fábrica destinada à produção de salicilatos (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Em busca da cura para a artrite que seu pai possuía, Felix Hofmann, descobriu o ácido acetil-salicílico (8, AAS, figura 6) que manteve a propriedade analgésica desejada sem causar os efeitos colaterais que o salicilato de sódio causava. Em 1897, o AAS foi lançado pela Bayer com o nome de Aspirina® e é até hoje alvo de pesquisas sobre sua aplicação terapêutica como analgésico, antiplaquetário e anti-inflamatório (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).



**Figura 6** - Salicilatos importantes no desenvolvimento de fármacos entre 1800-1900.  
Fonte: VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, (2006).

Na década de 60, uma descoberta muito importante foi a obtenção do diterpeno Taxol (figura 7), isolado de *Taxus brevifolia*. Neste estudo, pesquisadores do *National Cancer Institute* (NCI) dos EUA selecionaram diversas espécies vegetais com o objetivo de reconhecer substâncias com atividades citotóxicas e, entre os extratos estudados, o oriundo da casca de “Yewtree” (*T. brevifolia*) foi um dos mais proeminentes para o desenvolvimento de fármacos com ação antitumoral (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).



**Figura 7** - Estrutura química do taxol.  
Fonte: WILDING et al., (2015).

Desta forma, a fitoquímica é um ramo de pesquisa de extrema importância para o Brasil, considerando sua enorme riqueza vegetal ainda sem estudo e as possibilidades de desenvolvimento de novos medicamentos. A exploração científica, desses recursos biológicos naturais, permite não só a descoberta de novas substâncias com potenciais medicinais, mas também o desenvolvimento da bioprospecção com a propagação de práticas comerciais e lucrativas, de produtos naturais, de modo sustentável.

## 2.5 BIOPROSPECÇÃO

Como definição, bioprospecção é o método ou forma de localizar, avaliar e explorar sistemática e legalmente a biodiversidade existente em determinado local. Seu objetivo principal é a busca de recursos genéticos e bioquímicos para fins comerciais (SANTOS, 2013).

A retirada dos recursos naturais brasileiros já ocorre desde o descobrimento do país e, devidos a vários fatores, dentre eles a grande extensão territorial, a falta de fiscalização, a escassez de recursos naturais no restante do mundo e a falta de conscientização estão contribuindo para o comércio ilegal da biodiversidade, ou seja, a biopirataria (SANTOS, 2013).

O desenvolvimento tecnológico e o aumento demográfico havidos nas últimas décadas causaram um desequilíbrio em muitos ecossistemas o que gerou muitos danos para a humanidade (SANTOS, 2013).

As indústrias químicas e farmacêuticas em uma busca crescente por novos produtos aumentaram o interesse na biodiversidade existente nas áreas silvestres pouco ou ainda não exploradas como no caso da floresta Amazônica, o que vem chamando a atenção para o nosso país (SANTOS, 2013).

A exploração de recursos naturais é sempre prejudicial ao meio ambiente, mas a bioprospecção visa o uso desses recursos com as cautelas necessárias para que os danos sejam os menores possíveis (SANTOS, 2013).

## 2.6 AS TECNOLOGIAS MODERNAS NA FITOQUÍMICA

O desenvolvimento de diferentes modalidades de cromatografia (1906) e a introdução dos métodos espectroscópicos modificou gradualmente os objetivos e a filosofia dos trabalhos de isolamento e de determinação estrutural de produtos naturais. A chegada dessas técnicas possibilitou a redução das quantidades de material necessário para a análise e diminuiu o tempo para a determinação estrutural (PINTO et al., 2002).

Existem muitos obstáculos na busca de novos candidatos a fármacos derivados de plantas o que inclui os complexos extratos que são formados por inúmeros constituintes que, para serem isolados e identificados, necessitam do uso de ferramentas analíticas como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), ressonância magnética nuclear (RMN),

espectrometria de massas (MS), ultravioleta (UV), além das técnicas hífenadas, entre outras (BOLZANI et al, 2012).

Um tipo de cromatografia muito utilizada no estudo de composições químicas complexas de origem vegetal é a cromatografia em contracorrente que consiste na separação baseada na partição líquido-líquido, sem o uso de adsorvente. A técnica utiliza duas fases líquidas imiscíveis, sendo uma a fase móvel e outra, a fase estacionária (MARSTON; HOSTETTMANN, 1994).

Esta técnica é amplamente utilizada na separação de produtos naturais, pois evita problemas como a adsorção irreversível das amostras e a degradação de seus constituintes devido à ausência de suporte sólido. A técnica apresenta também outras vantagens como permitir a injeção de grande quantidade de amostra sem necessidade de pré-purificações, recuperação total da amostra ao final das análises e um baixo consumo de solventes (MARSTON; HOSTETTMANN, 1994).

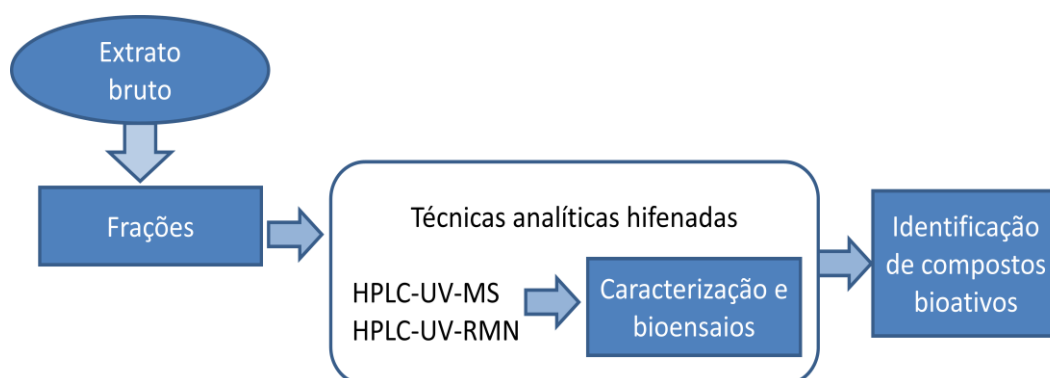
Podemos citar algumas técnicas de cromatografia em contracorrente como a cromatografia contracorrente de gotas (“DCCC: *droplet counter current chromatography*”), a cromatografia contracorrente de rotação locular (“RLCC: *rotation locular counter-current chromatography*”) e a cromatografia contracorrente de alta velocidade (“HSCCC: *high-speed counter-current chromatography*”) (MARSTON; HOSTETTMANN, 1994).

Uma técnica muito utilizada no isolamento de produtos naturais de alta polaridade é a cromatografia contracorrente de alta velocidade. Ela apresenta várias vantagens em relação às outras técnicas, como a diminuição do tempo de análise sem perda de resolução e a utilização de menores quantidades de solventes (MARSTON; HOSTETTMANN, 1994).

## 2.7 O USO DE TÉCNICAS HIFENADAS NA IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DE SUBSTÂNCIAS DE ORIGEM VEGETAL

O extrato vegetal bruto constitui uma matriz bem complexa contendo centenas ou milhares de metabólitos. A grande infinidade de compostos presentes em extratos torna difícil a determinação do perfil metabólico dos mesmos. Uma eficiente detecção e rápida caracterização têm papel fundamental na pesquisa de produtos naturais biologicamente ativos (RODRIGUES et al., 2006).

A triagem química através das técnicas hífenadas permite a caracterização de muitas matrizes complexas de produtos naturais advindos de plantas. A grande sensibilidade e seletividade das técnicas hífenadas desenvolvidas atualmente facilitaram de tal modo a fitoquímica permitindo o estudo de extratos brutos, por exemplo, dispensando o isolamento de substâncias (figura 8), o que muitas vezes demanda laboriosa dedicação (RODRIGUES et al., 2006).



**Figura 8** - Esquema representativo das tecnologias utilizadas na identificação de compostos naturais.

Fonte: DO AUTOR.

O termo “técnicas hífenadas” refere-se à junção de duas ou mais técnicas com o objetivo de obter uma ferramenta analítica mais eficiente e rápida que as técnicas convencionais. A análise de amostras à base de plantas demanda basicamente a separação de compostos e identificação estrutural dos mesmos sendo, portanto, a cromatografia e a espectroscopia as técnicas analíticas mais utilizadas no ramo (RODRIGUES et al., 2006).

A ortogonalidade entre as técnicas hífenadas é o ponto chave no estudo de extratos e frações, devendo assim gerar informações distintas sobre os compostos na amostra. Exemplos tradicionais de técnicas que gerem informações estruturais de moléculas são as técnicas espectrométricas [espectrofotometria de UV-Vis (DAD) ou espectrometria de massas (MS e MS-MS)] ou espectroscópicas como a ressonância magnética nuclear (RMN) e a espectroscopia no Infravermelho (IR), que muitas das vezes funcionam como detectores. A hífenação de um método eficiente de separação com detector espectrométrico ou espectroscópico constitui a principal ferramenta utilizada no estudo de plantas medicinais, onde a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida ocupam posições de destaque entre os métodos de separação. Faz-se importante a escolha do detector para cada tipo de amostra analisada, que poderá fornecer informações sobre uma substância mesmo que em níveis traços (RODRIGUES et al., 2006).

Para compostos que apresentam grupos cromóforos, o detector de arranjo de diodos (DAD) é geralmente empregado; caso contrário, a detecção pode ser feita pelo detector de espectrometria de massas, pelo grande número de informações geradas. No estudo de plantas medicinais, torna-se necessário o uso de técnicas complementares para a identificação dos componentes ativos, como o caso da combinação entre LC-NMR (cromatografia líquida com detector de ressonância magnética nuclear), LC-DAD (cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos) e LC-MS-MS (cromatografia líquida com detector seletivo de massas tandem), graças à complexidade do problema. Devido aos avanços da tecnologia, os pesquisadores podem contar com ferramentas poderosas na busca de novos compostos bioativos (RODRIGUES et al., 2006).

### 3 JUSTIFICATIVA

A flora brasileira apresenta, em geral, uma grande diversidade de espécies em toda sua extensão. Muitas dessas variedades ainda não apresentam estudos fitoquímicos quanto à sua composição, despertando grande interesse dos estudos na área.

A maioria das doenças negligenciadas ainda não apresenta um tratamento eficaz. Com relação a doença de Chagas, os medicamentos utilizados na terapia atualmente apresentam certas limitações quanto ao estágio da doença, bem como as reações adversas entre os pacientes, o que representa ainda a certa ineficiência dos mesmos.

Nesse sentido, considerando-se a grande disponibilidade de espécies vegetais da mata atlântica mineira nas proximidades do município de Alfenas-MG, a carência de substâncias eficazes no tratamento da doença de Chagas, o grande número de casos da doença na região de Alfenas-MG, além da ausência de estudos fitoquímicos de muitas espécies vegetais da região, esse trabalho foi proposto a fim de avaliar o potencial antichagásico de extratos, frações e substâncias isoladas de algumas espécies vegetais, visando o uso sustentável dos mesmos como possíveis candidatos na terapia da doença.

## 4 OBJETIVOS

Dentre os objetivos deste trabalho, destacam-se:

### 4.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo desse trabalho foi realizar o estudo fitoquímico guiado por ensaios biológicos *in vitro*, ou seja, bioprospecção de espécies vegetais inéditas da região de mata Atlântica sul-mineira para tratamento da doença de Chagas, a fim de se obter substâncias e frações ativas frente a tais ensaios. As avaliações que permearam estes estudos foram atividades antichagásicas com parasitas na forma epimastigota.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar a coleta de materiais vegetais de diferentes espécies, compreendendo as partes aéreas remanescentes da Mata Atlântica mineira e preparar os extratos brutos;
- b) Submeter os extratos brutos e frações à avaliação da atividade biológica *in vitro*, frente a *Trypanosoma cruzi*;
- c) Realizar o estudo fitoquímico biomonitorado, visando o isolamento seguido da caracterização estrutural das substâncias ativas frente ao teste tripanocida com parasitas na forma epimastigota da cepa Y;
- d) Submeter as substâncias isoladas ao teste tripanocida bem como ao teste de citotoxicidade, visando a avaliação do potencial antichagásico efetivo destas.

## 5 METODOLOGIA

A seguir, são descritos os métodos aplicados na obtenção dos resultados obtidos bem como detalhes de reagentes, solventes, equipamentos e aparelhagem utilizados.

### 5.1 COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL

Foram coletados dez diferentes materiais vegetais dentre as partes aéreas (folhas e galhos) de diferentes espécies de plantas da mata atlântica mineira (tabela 1 a seguir), localizadas nas zonas rurais próximas do município de Alfenas-MG. As espécies foram selecionadas tendo-se em vista a ausência de estudos fitoquímicos das mesmas, bem como a disponibilidade geográfica, levantamento este feito anteriormente por um projeto do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG. Os materiais vegetais foram identificados pelo professor Dr. Marcelo Pollo, do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alfenas. As exsiccatas foram depositadas no herbário do Instituto de Química da Universidade Federal de Alfenas.

**Tabela 1** - Família e espécies vegetais coletadas para o estudo fitoquímico.

<b>Família</b>	<b>Espécie</b>
Fabaceae	<i>Acacia polyphylla</i>
Sapindaceae	<i>Allophylus racemosus</i>
Salicaceae	<i>Casearia arborea</i>
Salicaceae	<i>Casearia sylvestris</i>
Annonaceae	<i>Duguetia lanceolata</i>
Rutaceae	<i>Metrodorea stipularis</i>
Melastomataceae	<i>Miconia willdenowii</i>
Monimiaceae	<i>Mollinedia widgrenii</i>
Meliaceae	<i>Trichilia emarginata</i>

Fonte: DO AUTOR.

Após a coleta, o material vegetal foi mantido em estufa por 72 horas a 50 °C para secagem. Em seguida, cada uma das espécimes foi triturada em moinho de facas.

## 5.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

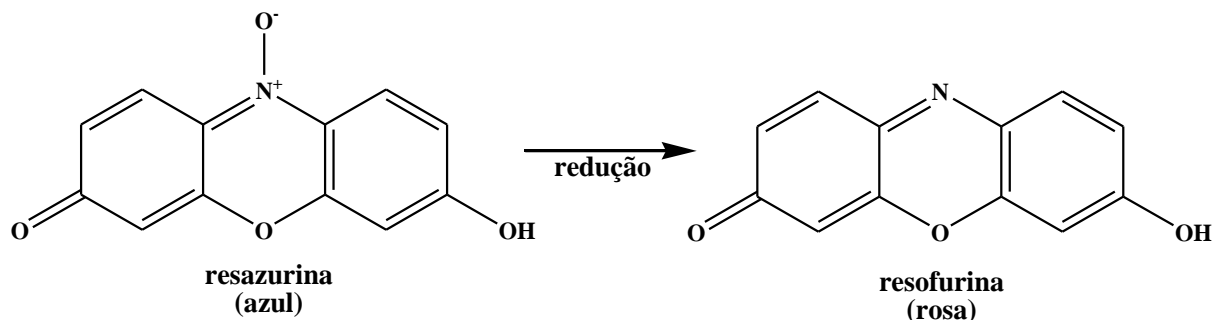
Os extratos foram obtidos por maceração, do material vegetal seco e triturado, com etanol por 72 horas. A extração foi feita por cinco vezes, trocando-se o solvente, sendo este posteriormente evaporado em rota-evaporador, permitindo a obtenção dos extratos secos e livres de solvente.

## 5.3 CULTURA DOS EPIMASTIGOTAS

Para o teste *in vitro* foram utilizados parasitas da *T. cruzi* em sua forma epimastigota da cepa Y. O cultivo dos protozoários foi feito em estufa BOD a 28°C, adicionando-se o meio de cultura LIT (*Liver Infusion Triptose*) a cada 24 h, para crescimento exponencial dos parasitas e então submetidos a um repique semanal, para se evitar a superpopulação da solução de cultura. A cultura dos parasitas bem como toda a parte experimental acerca do teste biológico foi feita com a colaboração do professor Dr. Ivo Santana Caldas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Alfenas.

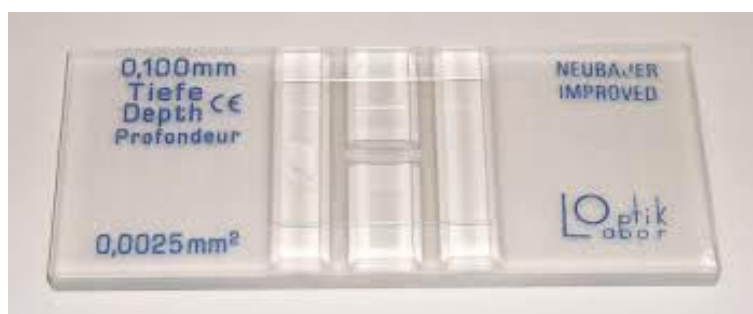
## 5.4 PADRONIZAÇÃO DO USO DA RESAZURINA NO TESTE TRIPANOCIDA

A resazurina é um composto colorido encontrado no reagente comercial Alamar Blue que muda de cor devido a atividade celular, e que é utilizada em diversos bioensaios *in vitro* realizados atualmente, como por exemplo, na determinação de viabilidade celular, quantificação/proliferação de organismos vivos, função mitocondrial, citotoxicidade, toxicologia, entre outros (RÓLON et al., 2006). Tal mudança de coloração se deve ao fato do reagente ser metabolizado pelas células no meio. A resazurina, de cor azul e não fluorescente (em sua forma oxidada), é reduzida a resofurina, de cor rosa e fluorescente, e não precipita após ser reduzida; porém o mecanismo pelo qual este processo ocorre ainda não está muito bem esclarecido, o qual pode ocorrer por reações enzimáticas ou químicas de células viáveis (O'BRIEN et al., 2000) (figura 9).



**Figura 9** - Representação da reação de redução da resazurina à resofurina.  
Fonte: DO AUTOR.

A padronização do bioensaio *in vitro* com uso da resazurina foi feito com diferentes volumes de solução do reagente Alamar Blue em PBS (*Phosphate Buffered Saline*), utilizando-se parasitas *Trypanosoma cruzi* da cepa Y na forma epimastigota. A solução de resazurina foi preparada numa concentração de 250 µg/mL em PBS em pH 7. Assim, essa solução de resazurina foi adicionada em volumes variados (10 µL, 20 µL, 40 µL e 50 µL) à placa de cultura (de 96 poços) contendo 200 µL de epimastigotas em duas concentrações (1.10<sup>6</sup> epi/mL e 2.10<sup>6</sup> epi/mL), a fim de se encontrar um melhor volume de solução de resazurina e melhor quantidade de epimastigotas que resultaria numa “maior mudança de intensidade de coloração” para leitura da absorbância no Leitor de Elisa. O controle da concentração dos micro-organismos nas soluções foi feito, fazendo-se inicialmente a contagem dos parasitas de uma “solução mãe” em Câmara de Neubauer (figura 10) com o auxílio de microscópio óptico Olympus CX40 com zoom de 100 vezes.



**Figura 10** - Foto esquemática de Câmara de Neubauer em detalhe.  
Fonte: DO AUTOR.

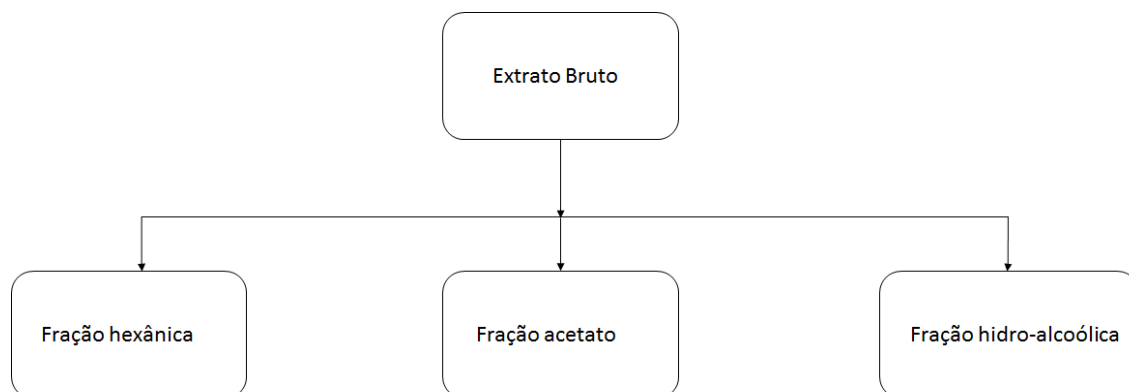
### 5.5 TESTE TRIPANOCIDA *in vitro*

Os extratos de todas as espécies de plantas selecionadas para o estudo foram submetidos ao teste de triagem tripanocida *in vitro*, a fim de se descobrir o extrato da espécie mais ativo. Após isso, as frações e subfrações do extrato bruto mais ativo frente ao teste tripanocida também foram submetidas ao mesmo. Ao final, as substâncias isoladas a partir desses materiais também foram submetidas ao teste. Para isso, partindo-se de uma solução estoque dos extratos brutos (e depois também das frações, sub-frações e compostos isolados) de 100 mg/mL em DMSO (dimetil sulfóxido) foram feitas diversas diluições das mesmas, utilizando-se o meio de cultura LIT fresco. Fazendo-se uso de uma placa de cultura de 96 poços, cada uma das soluções preparadas foi adicionada, em triplicata, aos poços em sua respectiva concentração, juntamente com a solução de epimastigotas na melhor concentração encontrada com os resultados de padronização do uso de resazurina, sendo o volume final em cada poço de 200  $\mu$ L. Após um período de incubação de 72 h dos parasitas com os extratos (e frações e subfrações, posteriormente), a solução de resazurina no melhor volume encontrado na otimização do uso de tal reagente foi adicionada e após 24 h [condições tais de incubação baseadas em Diniz (2013)] a leitura da absorbância das soluções foi feita em um Leitor de Elisa Zenyth 200rt nos comprimentos de onda 570 e 600 nm. Os cálculos da atividade tripanocida bem como a construção da curva Atividade tripanocida *versus* Concentração para cada extrato, fração e subfração, para o cálculo do CE<sub>50</sub>, foram feitos baseados nos trabalhos de Rolón e colaboradores (2006). A concentração final de DMSO utilizada no teste foi menor que 1 %, garantindo a não mortandade dos parasitas pela presença de tal solvente.

### 5.6 PARTICIONAMENTO DO EXTRATO DE MAIOR ATIVIDADE TRIPANOCIDA

O extrato bruto da *Miconia willdenowii*, a espécie que apresentou resultados de maior atividade tripanocida, obtidos com o teste descrito na seção anterior, foi submetido ao particionamento por extração líquido-líquido. Para isso, o extrato foi ressuspenso com uma mistura de solventes etanol:água (1:2). Utilizando-se um funil de extração, foi adicionado hexano à suspensão hidro-alcoólica do extrato, o que permitiu isolar substâncias de menor polaridade na fase hexânica. Após separação das fases, foi adicionado à fração hidro-alcoólica,

acetato de etila, afim de se separar compostos de polaridade intermediária. A extração com cada um dos solventes (hexano e acetato de etila) foi feita três vezes para que se pudesse aumentar o rendimento da extração, o que permitiu obter três frações do extrato: fração hexânica, fração acetato e fração hidro-alcoólica (figura 11). Cada uma dessas frações foi submetida ao teste tripanocida *in vitro* descrito anteriormente, após terem todo solvente retirado por rota-  
evaporação e liofilização.



**Figura 11** - Esquema representativo do particionamento do extrato bruto de maior atividade tripanocida. Fonte: DO AUTOR.

## 5.7 SEPARAÇÃO DE GRUPOS DE COMPOSTOS POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA

A fração acetato de etila, obtida como descrito anteriormente, submetida ao teste descrito na seção 5.5 anterior, e que apresentou maior atividade anti-epimastigota dos parasitas *Trypanosoma cruzi*, foi submetida à separação por cromatografia em coluna, utilizando-se uma coluna de vidro de 5,8 cm de diâmetro interno, empacotada com 539 g de Sílica Gel de poros de 60Å de partículas de 0,063-0,2 mm/70-230 mesh ASTM da Aldrich Chemistry, com uma altura de sílica de aproximadamente 30 cm. Foram coletadas no total 77 frações de 150 mL cada, aproximadamente, utilizando-se os solventes hexano, acetato de etila e metanol, bem como das misturas hexano:acetato de etila e acetato de etila:metanol em gradientes variados e polaridades crescentes. Após análise por cromatografia em camada delgada (CCD) reveladas sob luz UV de 254 e 365 nm, foi possível a junção entre elas, obtendo-se um total de 12 subfrações identificadas de A1 a A12. Cada uma destas 12 subfrações foi submetida então ao teste tripanocida, após terem o solvente eliminado por rota-  
evaporação.

## 5.8 ANÁLISE POR HPLC

Todos os solventes utilizados para análises em cromatógrafo líquido foram grau HPLC (e água Milli-Q). Os equipamentos utilizados foram ambos da Shimadzu. Para análise qualitativa, isolamento e quantificação dos compostos (primina e miconidina) foi utilizado num equipamento modulado da Shimadzu Prominence de duas bombas de fase móvel LC-20AD e desgaseificador DGU-20A 3R, auto-injetor SIL-20A HT, forno para coluna CTO-20A, detector UV-Vis com arranjo de diodos (SPD-M20A, DAD) e comunicador CBM-20<sup>a</sup>. Já para obtenção dos dados de espectrometria de massas foi utilizado um cromatógrafo modulado da Shimadzu Prominence de duas bombas de fase móvel LC-20AD e desgaseificador DGU-20A 3R, auto-injetor SIL-20A HT, forno para coluna CTO-20A, e comunicador CBM-20<sup>a</sup> acoplado a um espectrômetro de massas Shimadzu LCMS- 8030 com ionizador por eletrospray (ESI) e analisador triplo quadrupolo (tQUAD), fazendo-se análises de m/z na faixa de 100 a 1000, com escaneamento total de íons (modo *full scan*).

### 5.8.1 Preparo de amostras para análise em HPLC

O extrato bruto, a fração e as subfrações da coluna mais ativos, frente ao teste tripanocida, foram submetidos a análise por HPLC para obtenção do perfil cromatográfico dos mesmos. Para isso, pesou-se 1 mg de cada uma das amostras (extrato bruto, fração e subfrações), diluindo-as numa mistura de solventes ACN:H<sub>2</sub>O (1:1), sendo posteriormente filtradas em microfiltros com membrana de poros de 0,45 µm e 13 mm de diâmetro, para eliminação de quaisquer resquícios sólidos, sendo a concentração final de todas as soluções de 2 mg/mL.

### 5.8.2 Obtenção do perfil cromatográfico por LC-DAD

As análises por LC-DAD do extrato bruto, fração e subfrações ativas ao teste tripanocida foram realizadas utilizando-se coluna analítica de fase reversa (C18) Shimpack CLC-ODS com

4,6 mm de diâmetro interno e 250 mm de comprimento e partículas de 5  $\mu\text{m}$ . As fases móveis utilizadas foram solução aquosa de ácido acético 0,1 % (V/V) e acetonitrila, utilizando-se um gradiente entre elas num fluxo total de fase móvel de 1 mL/min, variando-se de 5 a 100 % de ACN em 30 min e mantendo-se 100% de ACN por mais 3 min. O volume de amostras utilizadas nas análises foi de 20  $\mu\text{L}$ .

### 5.8.3 Isolamento dos compostos X e Y por LC-DAD

Os compostos X e Y designados como descrito na análise da seção anterior, foram isolados por LC-DAD utilizando-se coluna semi-preparativa de fase reversa (C18) Shimpack PREP-ODS com 20 mm de diâmetro interno e 250 mm de comprimento e partículas de 15  $\mu\text{m}$ . As fases móveis utilizadas foram solução aquosa de ácido acético 0,1 % (V/V) e acetonitrila, utilizando-se um gradiente entre elas num fluxo total de fase móvel de 9 mL/min, variando-se inicialmente a concentração de ACN de 10 a 30 % em 10 min e mantendo-se a 30% de ACN por mais 10 min. Na sequência, a concentração de ACN variou de 30 a 100 % em 10 min e mantida isocrática por mais 10 min.

As amostras foram preparadas utilizando-se soluções de aproximadamente 50 mg/mL, filtradas em microfiltros com membrana de poros de 0,45  $\mu\text{m}$  e 13 mm de diâmetro, para eliminação de quaisquer resquícios sólidos. Foram feitas injeções de 100  $\mu\text{L}$  dessas soluções das amostras A2 e A3.

## 5.9 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL COMPOSTOS X E Y ISOLADOS POR ESPECTROSCOPIA DE RMN

Após terem sido isoladas, ambas as substâncias X e Y tiveram os espectros de RMN obtidos para caracterização. Para isso foram obtidos os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  a 300 MHz e  $^{13}\text{C}$ , bem como outros tipos de espectros de RMN de correlação como COSY, HSQC e HMBC. Para isso, aproximadamente 10 mg de cada amostra foram diluídos em  $\text{CDCl}_3$ . Os espectros foram obtidos num equipamento Bruker AC-300 operando em 300 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 75 MHz ( $^{13}\text{C}$ ).

## 5.10 OBTENÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DA AMOSTRA A3 POR LC-MS E DOS ESPECTROS DE MASSA DE X E Y

A amostra A3 preparada para análise em LC-DAD (seção 5.8.1) foi também conduzida à análise por LC-MS, a fim de se obter o perfil cromatográfico dela e conhecer as características de ionização das substâncias nela presentes. Para isso, utilizou-se coluna ultra-analítica de fase reversa Poroshell 120 EC-C18 da Agilent, com 3 mm de diâmetro interno e 100 mm de comprimento e partículas de 2,7  $\mu\text{m}$ . As fases móveis utilizadas foram solução aquosa de ácido fórmico 0,1 % (V/V) e acetonitrila, utilizando-se um gradiente entre elas, variando-se de 5 a 100 % de ACN em 28 min e mantendo-se 100% de ACN por mais 2 min, num fluxo total de fase móvel de 0,3 mL/min e um volume de injeção de amostras de 3  $\mu\text{L}$ .

Os espectros de massas das substâncias X e Y também foram obtidos utilizando-se o mesmo equipamento LC-MS, porém fazendo-se injeção de 3  $\mu\text{L}$  das soluções a 1 mg/mL de cada uma das substâncias isoladas, para que se pudesse conhecer a massa molecular de cada uma das substâncias, ajudando na confirmação das estruturas dos compostos.

## 5.11 QUANTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS X E Y NAS AMOSTRAS POR LC-DAD

Para quantificação dos compostos X e Y no extrato bruto, fração acetato e subfrações A2, A3 e A4 da *Miconia willdenowii*, ativos frente ao teste tripanocida, foi preparada uma solução inicial pesando-se aproximadamente 1 mg de cada uma destas amostras (tabela 16), fazendo-se o mesmo com os compostos isolados, diluindo-os posteriormente em 500  $\mu\text{L}$ , filtrando-se ao final em microfiltros com membrana PTFE, poros de 0,45  $\mu\text{m}$  e 13 mm de diâmetro.

Para construção da curva analítica dos padrões tidos como os compostos X e Y isolados, sucessivas diluições a partir da solução de aproximadamente 2 mg/mL dos mesmos foram feitas. Todas estas soluções preparadas (amostras e padrões diluídos) foram submetidas a análise por LC-DAD, no mesmo equipamento especificado na seção 5.8.2, utilizando-se coluna analítica de fase reversa (C18) Shim-pack CLC-ODS com 4,6 mm de diâmetro interno e 250 mm de comprimento e partículas de 5  $\mu\text{m}$ . As fases móveis utilizadas foram solução aquosa de

ácido acético 0,1 % (V/V) e acetonitrila (ACN), utilizando-se um gradiente entre elas num fluxo total de fase móvel de 1 mL/min, variando-se de 5 a 100 % de ACN em 30 min e mantendo-se 100% de ACN por mais 3 min. O volume de injeção das amostras utilizadas nas análises para quantificação foi de 10 µL.

## 5.12 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA *in vitro* DOS COMPOSTOS ISOLADOS

Afim de se avaliar o potencial antichagásico efetivo das substâncias isoladas, foi realizado o teste de citotoxicidade com ambas as substâncias isoladas, primina e miconidina com a colaboração da professora Dra. Marisa Ionta do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Alfenas.

### 5.12.1 Linhagem celular e condições de cultivo

A linhagem celular utilizada nos testes de citotoxicidade foi a CCD-1059Sk (fibroblastos derivados de pele humana normal), a qual foi adquirida no banco de células do Rio de Janeiro-BCRJ. As culturas foram mantidas em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma*, CA, EUA) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Vitrocell, Campinas, Brasil) e acondicionadas em estufa a 37°C com atmosfera controlada (95 % de ar e 5 % de CO<sub>2</sub>).

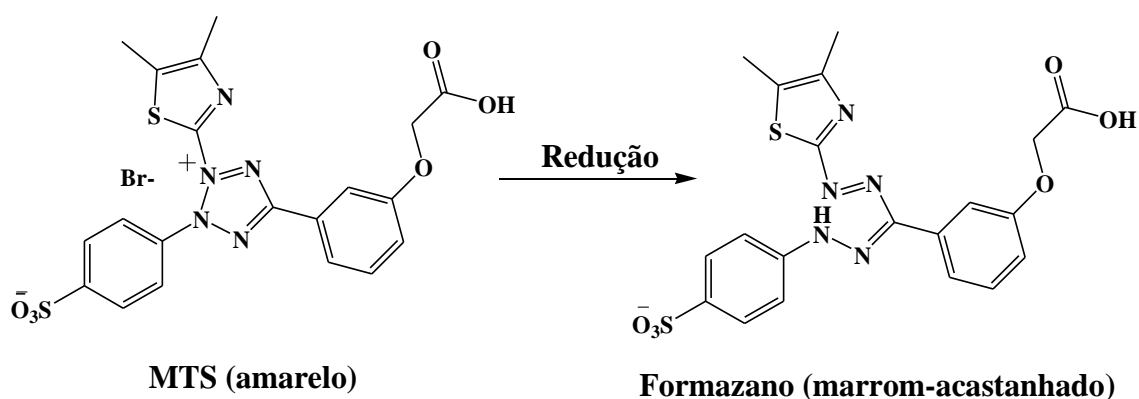
### 5.12.2 Esquema de tratamento

Os compostos e o padrão (benznidazol) foram solubilizados em DMSO para a obtenção da solução-estoque (100 mg mL<sup>-1</sup>) e diluições foram feitas imediatamente antes do uso. As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 2×10<sup>4</sup> células/poço. Após aderência (24h), as células foram tratadas por 48 h com os diferentes compostos nas

concentrações de 5, 10, 25, 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A concentração final de DMSO não ultrapassou 1 % (v/v).

### 5.12.3 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico (MTS) utilizando o Kit CellTiter 96TM da Promega®. Esse ensaio baseia-se na conversão do sal brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil-2H-tetrazólio)] (MTS) (amarelo) em formazano (marrom-acastanhado), via enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria das células viáveis (figura 12).



**Figura 12** - Esquema de reação de redução do reagente MTS no teste de citotoxicidade.  
Fonte: DO AUTOR.

A quantidade produzida de formazano, um composto solúvel em meio de cultura que absorve luz a 490 nm, é diretamente proporcional ao número de células vivas (CORY et al., 1991). A viabilidade foi determinada comparando-se os valores de absorbância entre amostras tratadas com os valores de absorbância obtidos nas amostras controles (sem os compostos). Os experimentos foram realizados em triplicata, os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, calculados pela equação 2.

$$\% \text{ Viabilidade celular} = (\text{Abs}_{\text{amostra}} \times 100) / \text{Abs}_{\text{controle}} \quad (\text{equação 2})$$

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir são descritos os resultados obtidos neste trabalho. Inicialmente, o estudo foi feito com dez extratos de diferentes materiais vegetais; a partir dos resultados do teste tripanocida, decidiu-se trabalhar com o extrato de maior potencial.

### 6.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Foram obtidos dez diferentes extratos brutos etanólicos, que estão relacionados na tabela 2, com as respectivas massas obtidas a partir de diferentes massas dos materiais vegetais:

**Tabela 2** - Extratos brutos com as respectivas massas obtidas.

<b>Extrato</b>	<b>Parte vegetal</b>	<b>Massa (g)</b>
<i>Acácia polyphylla</i>	folhas	11,64
<i>Allophylus racemosus</i>	folhas	27,60
<i>Allophylus racemosus</i>	galhos	4,00
<i>Casearia sylvestris</i>	folhas	16,30
<i>Casearia arborea</i>	galhos	7,24
<i>Duguetia lanceolata</i>	folhas	39,10
<i>Metrodorea stipularis</i>	folhas	207,30
<i>Miconia willdenowii</i>	folhas	140,30
<i>Mollinedia widgrenii</i>	folhas	9,40
<i>Trichilia emarginata</i>	folhas	234,20

Fonte: DO AUTOR.

### 6.2 PADRONIZAÇÃO DO USO DA RESAZURINA NO TESTE TRIPANOCIDA

O teste para padronização no uso da resazurina foi realizado variando-se a concentração de epimastigotas no bioensaio, bem como o volume da solução de resazurina (seção 5.4). O

teste foi baseado na melhor mudança de coloração da solução após 24 h de incubação da resazurina com os parasitas, tendo-se como base a coloração inicial da solução.

Utilizando-se o método de comparação visual da mudança de coloração das soluções de resazurina em diferentes volumes (10, 20, 40 e 50  $\mu\text{L}$ ) nas diferentes concentrações de parasitas ( $1.10^6$  e  $2.10^6$  epi/mL), após 24 h de incubação, foi feita a observação, da mudança de coloração das soluções, tomando-se como base a cor da resazurina sem ser reduzida (ausência de parasitas). Esta padronização, feita em duplicata, mostrou que dentre os parâmetros comparados, o que gerava melhor mudança de coloração da resazurina foi o volume de 20  $\mu\text{L}$  do reagente com uma concentração de parasitas de  $2.10^6$  epi/mL, como mostra a figura 13.



**Figura 13** - Foto do teste comparativo da mudança de coloração da resazurina nos diferentes parâmetros analisados.

Fonte: DO AUTOR.

### 6.3 TESTE TRIPANOCIDA *in vitro* DOS EXTRATOS BRUTOS

O bioensaio com parasitas *Trypanosoma cruzi* da cepa Y na forma epimastigota foi realizado de forma a se determinar o extrato bruto (tabela 2) de maior atividade tripanocida. Deste modo, a partir de uma solução estoque de cada um dos extratos a 100 mg/mL em DMSO, foram realizadas diluições sequenciais dos mesmos em meio de cultura LIT nas concentrações 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625 e 7,813  $\mu\text{g/mL}$ . Tais soluções foram incubadas com os parasitas na concentração padronizada na seção 6.2 ( $2.10^6$  epi/mL) por 72 h, onde cada poço possuía volume final de 200  $\mu\text{L}$ , e então 20  $\mu\text{L}$  da solução de resazurina foi adicionada, incubando-se novamente as placas por mais 24 h. Após isso, foi realizada a leitura de cada uma das soluções em dois diferentes comprimentos de onda (570 e 600 nm), e utilizando-se a

equação 2, foi possível o cálculo da % de inibição de cada extrato (DINIZ, 2013). Os controles positivos foram tidos como os poços contendo parasitas e a solução de resazurina (sem extrato) e os controles negativos os poços com resazurina e LIT (sem parasitas). Um controle com parasitas e DMSO na concentração de 500 µg/mL em LIT também foi testada afim de se avaliar a toxicidade do solvente frente aos micro-organismos. Foi constatado que não há nenhuma influência do DMSO na mortandade dos epimastigotas. Todos os testes foram realizados em triplicatas.

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left[ \frac{A_{570} - (A_{600} \times R_0)_{\text{Tratado}}}{A_{570} - (A_{600} \times R_0)_{\text{Controle+}}} \right] \times 100 \quad (\text{equação 2})$$

onde  $R_0 = (A_{570\text{Controle-}} / A_{600\text{Controle-}})$

Em seguida, os valores de CE<sub>50</sub> (que representa a concentração com eficiência de inibição de 50% dos parasitas) para cada extrato bruto foram obtidos a partir das curvas % de inibição *versus* concentração, construídas com o auxílio do software GraphPad Prism®. Os valores de CE<sub>50</sub> são exibidos na tabela 3, onde se pode observar que o extrato bruto de maior atividade tripanocida é o das folhas da espécie *Miconia willdenowii*.

**Tabela 3** - Valores de CE<sub>50</sub> obtidos do teste tripanocida para cada extrato bruto.

Extrato	Parte vegetal	*CE <sub>50</sub> (µg/mL)
<i>Acácia polyphylla</i>	folhas	15,70
<i>Allophylus racemosus</i>	folhas	>100,00
<i>Allophylus racemosus</i>	galhos	>100,00
<i>Casearia arborea</i>	galhos	>100,00
<i>Casearia sylvestris</i>	folhas	11,00
<i>Duguetia lanceolata</i>	folhas	>100,00
<i>Metrodorea stipularis</i>	folhas	>100,00
<i>Miconia willdenowii</i>	folhas	1,139.10 <sup>-2</sup>
<i>Mollinedia widgrenii</i>	folhas	0,2084
<i>Trichilia emarginata</i>	folhas	7,622
Benznidazol (padrão)	-	6,047.10 <sup>-2</sup>

\*Valores de CE<sub>50</sub> apresentados como a média das triplicatas.

Fonte: DO AUTOR.

O medicamento benznidazol, utilizado no tratamento da doença de Chagas, foi incluso como padrão no teste tripanocida, para que se pudesse avaliar a eficiência da atividade biológica anti-epimastigota dos extratos brutos em comparação com tal medicamento. O resultado do

bioensaio permitiu obtenção do valor de  $CE_{50}$  para o padrão (tabela 3), que possibilitou a inferência sobre o maior potencial tripanocida do extrato das folhas da espécie *Miconia willdenowii* em relação ao próprio medicamento, mostrando a perspectiva de uma possível aplicação do extrato, bem como de seus componentes isolados no tratamento da doença.

Tomando-se ainda como base os valores de  $CE_{50}$  apresentados na tabela 3, é possível observar que 5 dos 10 extratos avaliados no teste apresentaram potencial anti-epimastigota considerável. Isso permite inferir acerca do potencial terapêutico apresentado pelos extratos brutos obtidos das espécies escolhidas para o estudo, demonstrando que a biodiversidade vegetal da região apresenta grandes perspectivas na descoberta de possíveis candidatos a fármacos não só para a doença de Chagas, como também para diversos outros tipos de doenças, a partir desses materiais vegetais.

#### 6.4 PARTICIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO DA ESPÉCIE *Miconia willdenowii*

O extrato bruto etanólico de maior potencial anti-epimastigota, avaliado como descrito na seção 6.3 anterior, foi submetido ao particionamento por extração líquido-líquido, sendo inicialmente ressuspenso numa mistura EtOH:H<sub>2</sub>O (250:500 mL) e então particionado com 400 mL de hexano (três vezes) e posteriormente com 400 mL de acetato de etila (três vezes), sendo o procedimento realizado três vezes com cada solvente, para que se obtivesse um maior rendimento na extração. Tal metodologia permitiu separar os constituintes do extrato da espécie *Miconia willdenowii* em três frações, que compreendem grupos de compostos com polaridades distintas sendo a fração hexânica a fração com constituintes de menor polaridade, a fração acetato de polaridade intermediária e a fração hidro-alcoólica com componentes de maior polaridade. Tomou-se como base o particionamento do extrato bruto com somente estes três solventes para que se pudesse evitar uma maior distribuição de um mesmo componente do extrato bruto em diferentes frações, levando-se em consideração o coeficiente de partição de um componente em dois diferentes solventes, uma vez que tal componente pode se distribuir entre as fases, mesmo que em quantidades imensamente diferentes, entre elas, ocasionando diminuição da concentração do mesmo entre as frações. Após o particionamento, todas as frações tiveram os solventes evaporados em rota-evaporador e foram posteriormente submetidas à liofilização num aparelho Liofilizador LJJ04 Científica, para a retirada completa de água e/ou qualquer resquício de solvente, por sublimação, das amostras congeladas. Isso

permitiria então, o manuseio das frações livres de quaisquer solventes, evitando-se a degradação ou conversão de compostos das mesmas, pela presença de solventes, principalmente de água. Para isso, após eliminação dos solventes por rota-*evaporação*, as frações foram congeladas a -50°C e levadas ao *liofilizador*, e submetidas a baixas pressões, até completa eliminação dos resíduos de solvente.

#### 6.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA DAS FRAÇÕES DO EXTRATO BRUTO DA ESPÉCIE *Miconia willdenowii*

Cada uma das três frações obtidas do extrato da espécie *Miconia willdenowii* foi submetida ao bioensaio com epimastigotas para avaliação comparativa da atividade tripanocida. Os resultados foram comparados com o do medicamento benznidazol, também incluso no teste, a partir dos valores de CE<sub>50</sub>, que são exibidos na tabela 4 a seguir:

**Tabela 4** - Valores de CE<sub>50</sub> obtidos do teste tripanocida para cada fração obtida do extrato da *Miconia willdenowii*.

Fração	*CE <sub>50</sub> (µg/mL)
Hexano	57,24
Acetato de etila	28,36
Água-etanol	>100,00
Benznidazol	24,57

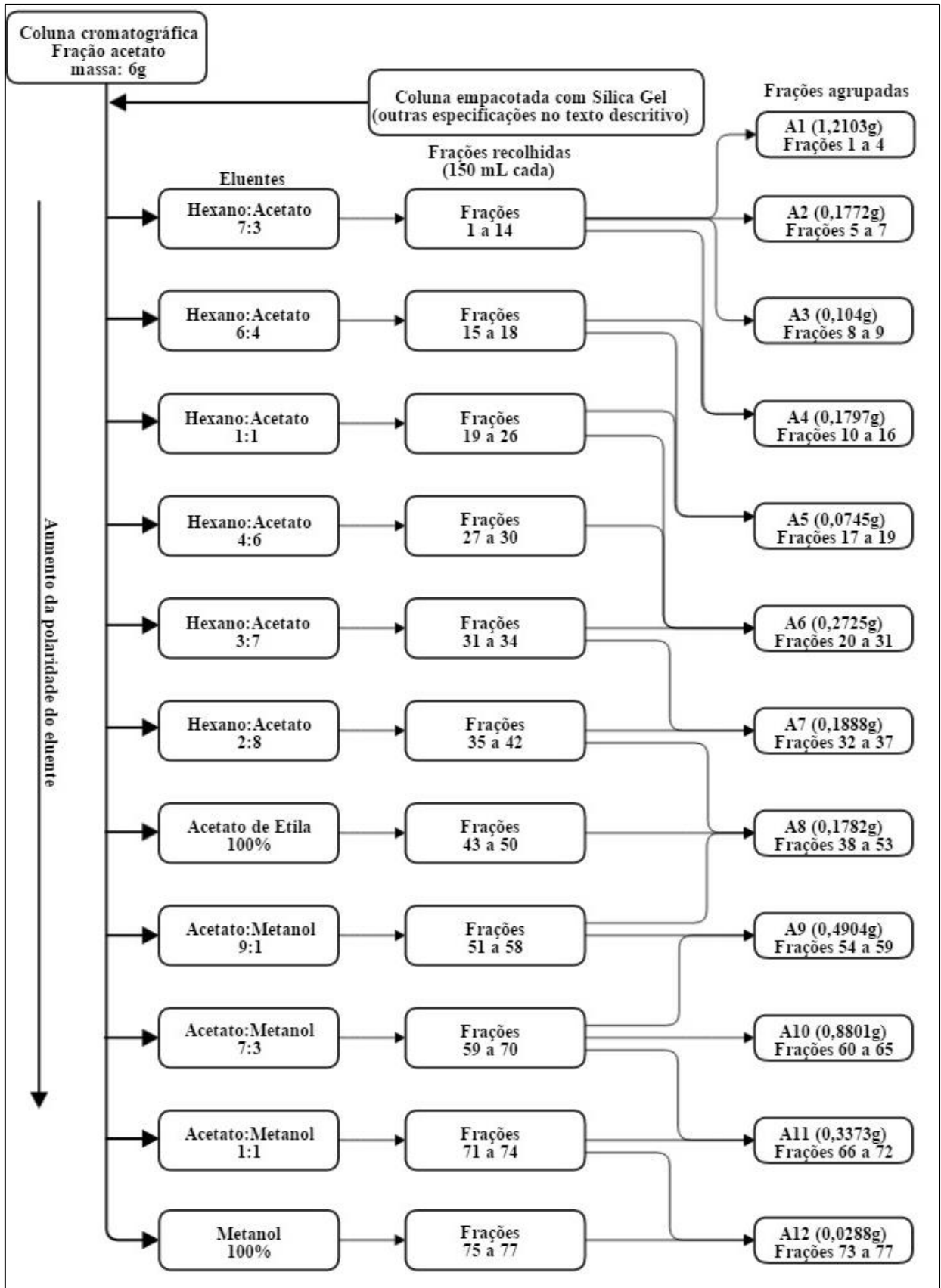
\*Valores de CE<sub>50</sub> apresentados como a média das triplicatas.

Fonte: DO AUTOR.

De acordo com os valores de CE<sub>50</sub> apresentados na tabela 4 anterior, é possível perceber que a fração acetato, que apresenta componentes do extrato bruto das folhas da espécie *Miconia willdenowii* de polaridade intermediária foi a mais ativa, apresentando menor valor de CE<sub>50</sub>, sendo este o mais próximo também do valor para o padrão benznidazol. É possível perceber também uma discrepância do valor de CE<sub>50</sub> do padrão nas tabelas 3 e 4. Isso ocorre devido ao fato de serem de experimentos distintos, podendo então ocorrer variações em seus valores. Ainda assim, é possível identificar o alto potencial tripanocida frente aos parasitas na forma epimastigota da fração acetato, por conter esta, um valor de CE<sub>50</sub> próximo do padrão. Seguiu-se deste modo, o trabalho com tal fração.

## 6.6 FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO ACETATO POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA

Uma massa de 6 g da fração acetato foi submetida ao fracionamento por cromatografia em coluna, obtendo-se ao final um total de 77 subfrações, com 150 mL cada. Os eluentes utilizados foram variados, iniciando-se com uma mistura dos solventes hexano:acetato de etila (7:3) seguindo-se a variação do gradiente entre eles, no sentido do aumento da polaridade do eluente, passando então para as misturas hexano:acetato de etila (6:4), (1:1), (4:6), (3:7), (2:8) e então a eluição com 100% de acetato de etila, mudando-se sequencialmente para a mistura de solventes acetato de etila:metanol nas proporções (9:1), (7:3), (1:1), também no sentido do aumento da polaridade do eluente, até eluição final com metanol 100%. Na figura 14, tem-se o esquema de fracionamento obtido com a cromatografia em coluna, com detalhe das frações obtidas após completa evaporação dos solventes em rota-evaporador e posteriormente sob vácuo.



**Figura 14** - Fluxograma representativo das etapas do processo de cromatografia em coluna da fração acetato do extrato das folhas da espécie *Miconia willdenowii*.

Fonte: DO AUTOR.

## 6.7 TESTE TRIPANOCIDA *in vitro* DAS SUBFRAÇÕES DE A1 A A12 DA FRAÇÃO ACETATO

As subfrações obtidas por cromatografia em coluna (seção 6.6), foram também submetidas ao teste tripanocida com epimastigotas, a fim de se relacionar aquelas com maior potencial frente ao bioensaio e que, possivelmente conteriam os compostos ativos responsáveis pela mortalidade dos parasitas no teste *in vitro*. Deste modo, seguindo-se a metodologia descrita para o teste na seção 5.5, os resultados foram obtidos com valores de  $CE_{50}$  para cada subfração (tabela 5). Os valores nela apresentados mostram que as subfrações que apresentaram maior atividade anti-epimastigota foram A3, A4 e A2, respectivamente. Além disso, foi possível perceber que a subfração A3 é a que possui valor de  $CE_{50}$  mais próximo do valor do padrão, permitindo inferir sobre a grande perspectiva de atividade tripanocida da mesma. Outra observação possível a partir dos valores de  $CE_{50}$  da tabela 5 é que as frações com componentes de maior polaridade (A9, A10, A11 e A12, em específico) não apresentam potencial anti-epimastigota. Isso permite inferir que o(s) composto(s) responsável(veis) pela atividade tripanocida deve(m) provavelmente possuir uma estrutura que lhe confira(m) características não muito polares, dependendo do sítio ativo em que atinge(m) no parasita.

**Tabela 5** - Valores de CE<sub>50</sub> obtidos no bioensaio para cada uma das subfrações da coluna.

Subfrações	*CE <sub>50</sub> (µg/mL)
A1	49,32
A2	18,14
A3	15,18
A4	16,93
A5	>100
A6	39,83
A7	79,75
A8	81,54
A9	>100
A10	>100
A11	>100
A12	>100
Benznidazol (padrão)	15,83

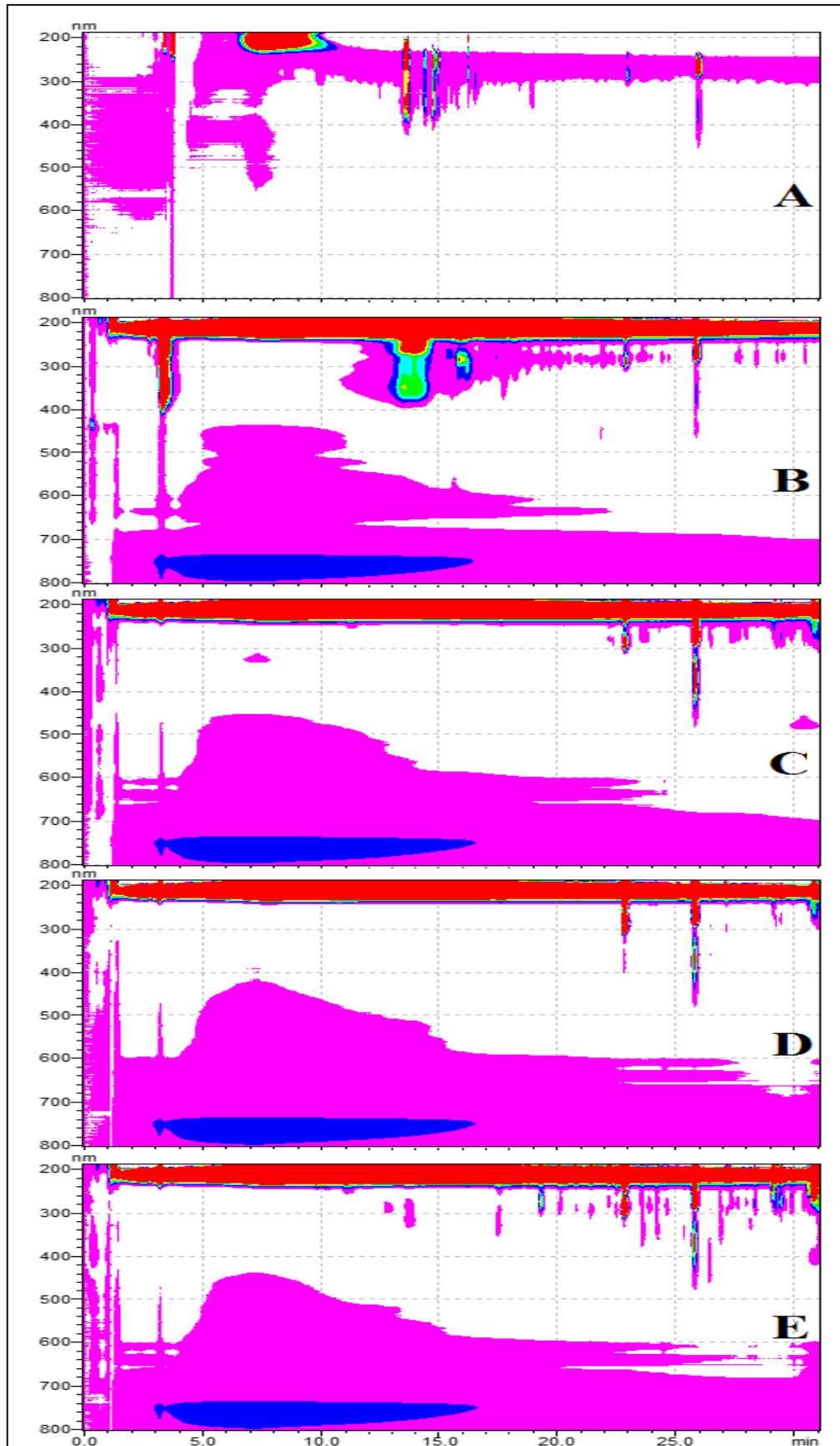
\*Valores de CE<sub>50</sub> apresentados como a média das triplicatas.

Fonte: DO AUTOR.

## 6.8 ANÁLISE DAS AMOSTRAS ATIVAS NO TESTE TRIPANOCIDA POR LC-DAD

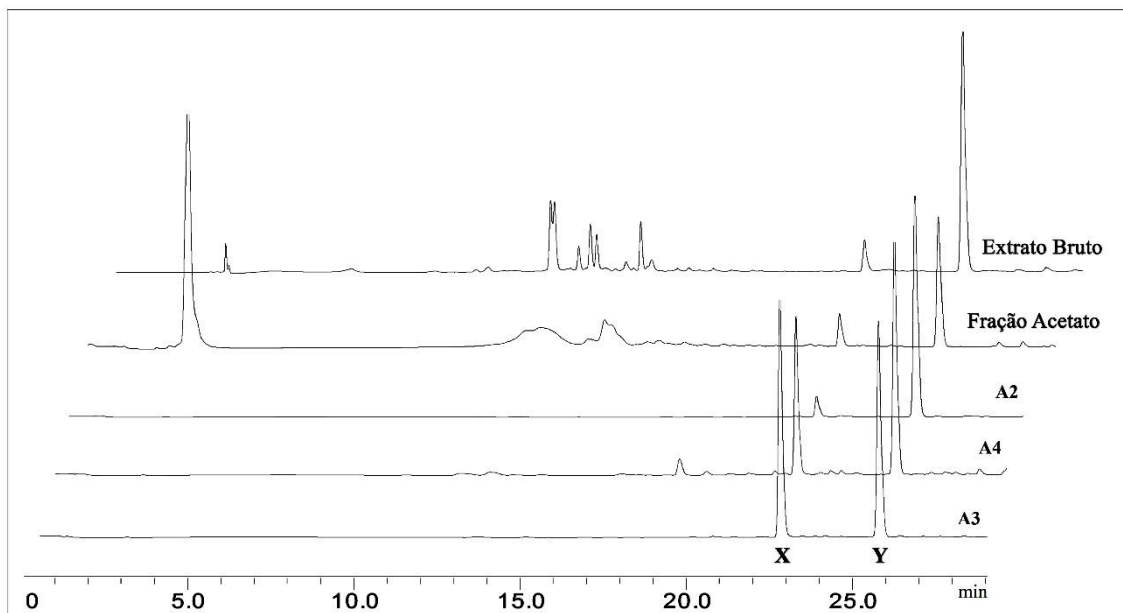
O extrato bruto da *Miconia willdenowii*, a fração acetato deste e subfrações da coluna A2, A3 e A4 (mais ativos frente ao teste tripanocida) foram submetidos à análise por LC-DAD onde foi possível se obter o perfil cromatográfico de tais amostras (figura 15).

Os cromatogramas bidimensionais obtidos por LC-DAD apresentam gráficos que relacionam o comprimento de onda [ou a faixa de comprimentos de onda (em nm) ] em que são detectados cada um dos compostos eluídos na corrida cromatográfica em função dos seus tempos de retenção (em min). As diferentes cores apresentadas indicam a diferença de intensidade de detecção das substâncias eluídas. Sendo assim, é possível observar na figura 15 que apesar de apresentarem perfis cromatográficos distintos, os cromatogramas de todas as amostras analisadas (extrato bruto, fração acetato e subfrações A2, A3 e A4 da *Miconia willdenowii*) apresentaram dois picos em comum com os mesmos tempos de retenção ( $t_{R1} \approx 22,80$  min e  $t_{R2} \approx 25,90$  min).



**Figura 15** - Perfis cromatográficos obtidos para cada uma das amostras: A) extrato bruto; B) fração acetato; C) subfração A2; D) subfração A3; E) subfração A4.  
Fonte: DO AUTOR.

Para uma análise mais detalhada, determinou-se um comprimento de onda (279 nm) em que ambos os picos pudessem ser visualizados num cromatograma unidimensional comum (figura 16). Desta forma, foi possível confirmar a presença dos dois picos típicos em  $t_{R1} \approx 22,80$  min e  $t_{R2} \approx 25,90$  min no cromatograma das amostras analisadas.



**Figura 16** - Perfil cromatográfico obtido por HPLC-UV-DAD em 279 nm mostrando a presença dos compostos X e Y em cada amostra de *M. willdenowii*.

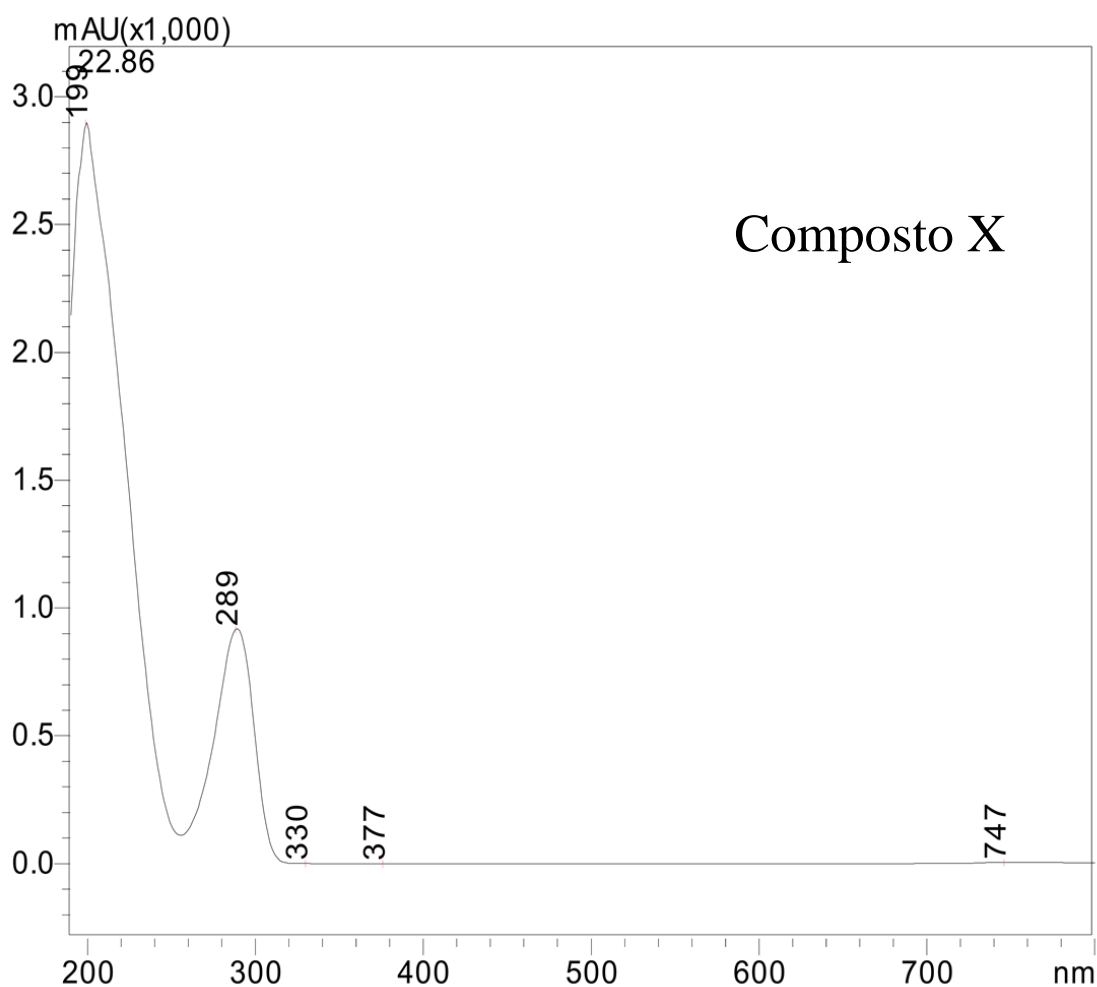
Fonte: DO AUTOR.

Pode-se observar que os cromatogramas exibidos nas figuras 15 e 16 apresentam uma pequena quantidade de picos (compostos ou grupos de compostos), apesar da grande complexidade, em geral, de amostras de produtos naturais. Faz-se importante ressaltar que a utilização do detector de arranjo de diodos permite detectar somente substâncias que absorvam radiações UV, ou seja, somente aquelas que apresentem grupos cromóforos em suas estruturas são detectadas. Deste modo, pode-se entender que somente as substâncias com grupos cromóforos foram detectadas em cada uma das amostras analisadas por LC-DAD, neste trabalho.

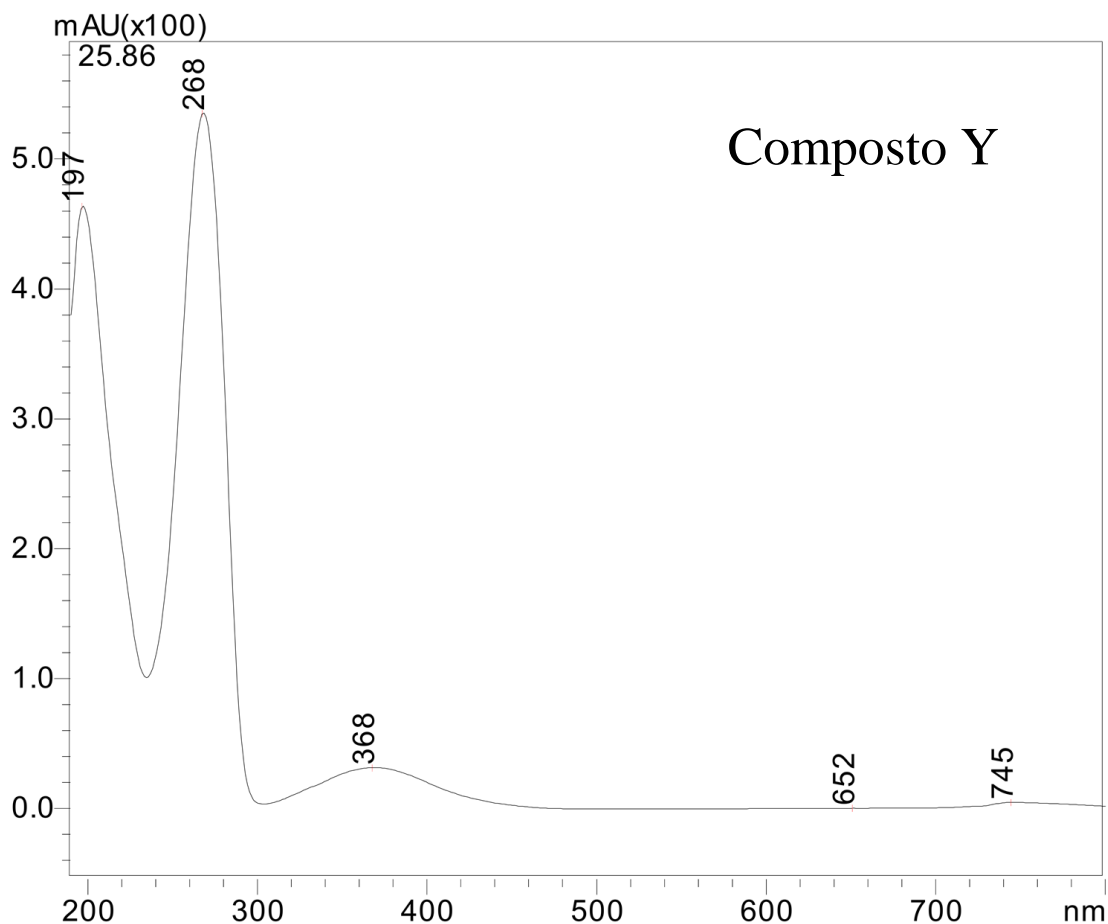
As análises das amostras por LC-DAD permitiram obter ainda o espectro de absorção no UV para os dois picos peculiares [aqui nomeados como X ( $t_{R1} \approx 22,80$  min) e Y ( $t_{R2} \approx 25,90$  min)] em cada um dos cromatogramas, onde foi possível observar que tais picos apresentavam a mesma curva de absorção no UV (figuras 17 e 18) nas diferentes amostras, sugerindo a presença de ambas as substâncias (X e Y) em todas as amostras analisadas. Isso é possível de se afirmar pelo fato das frações e subfrações advirem de uma mesma amostra em comum (extrato bruto da *Miconia willdenowii*). Caso as frações fossem advindas de extratos de espécies

diferentes ou ainda de partições obtidas com solventes distintos, isso não poderia ser afirmado confiavelmente. Além disso, as figuras 17 e 18 permitem destacar o comprimento de onda de máxima absorção característico de cada substância, sendo  $\lambda_{MÁX} = 289$  nm para o composto X e  $\lambda_{MÁX} = 268$  e  $368$  nm para o Y.

A presença das mesmas substâncias X e Y em todas as amostras analisadas em LC-DAD e o alto potencial tripanocida apresentado por estas (tabelas 3, 4 e 5), permitiu inferir ainda, que possivelmente os dois compostos fossem os principais responsáveis pela atividade tripanocida.



**Figura 17** - Curva de absorção no UV para o composto X ( $t_{R1} \approx 22,82$  min).  
Fonte: DO AUTOR.



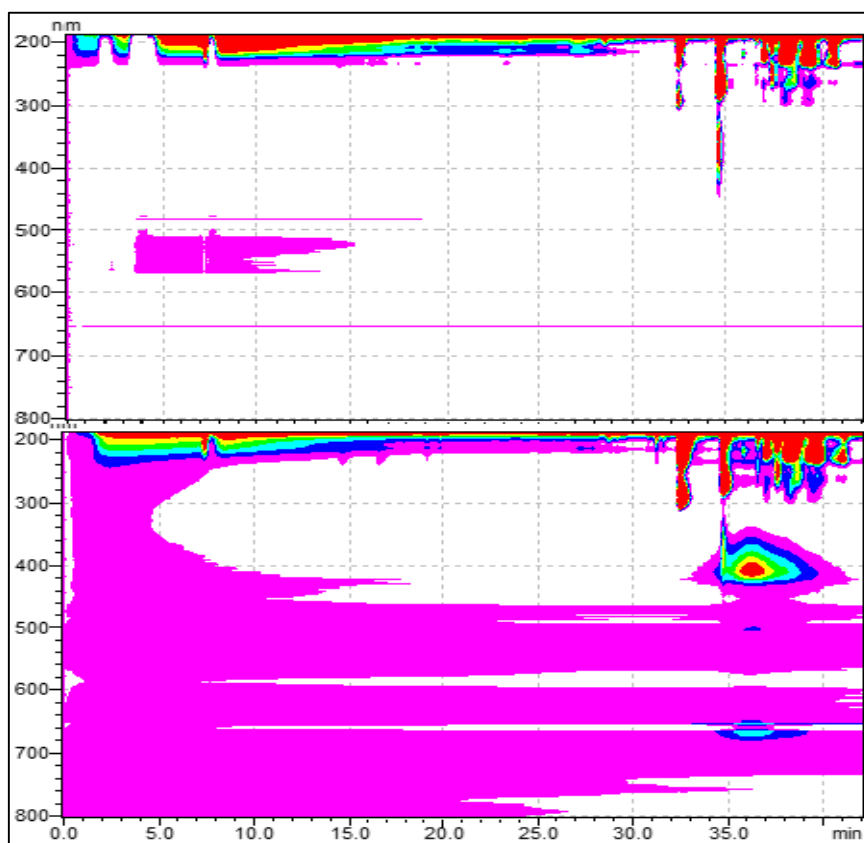
**Figura 18** - Curva de absorção no UV para o composto Y ( $t_{R2} \approx 25,87$  min).  
Fonte: DO AUTOR.

## 6.9 ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS X E Y POR LC-DAD

Os compostos X e Y designados como os picos de  $t_{R1} \approx 22,80$  min e  $t_{R2} \approx 25,90$  min, respectivamente, descritos na análise da seção 6.8, puderam ser isolados a partir das subfrações A2 e A3, que apresentavam quantidades proporcionalmente diferentes desses picos. Apesar de se utilizar coluna com a mesma fase estacionária e as mesmas fases móveis do método analítico (seção 6.8), o isolamento dos picos foi realizado utilizando-se uma programação diferente de gradientes de fases móveis, uma vez que a coluna semi-preparativa utilizada no isolamento possuía dimensões bastante distintas da anterior, além do fluxo muito maior de fase móvel. Obviamente, o perfil cromatográfico apresentado na corrida semi-preparativa apresentou-se diferente da analítica.

Os cromatogramas bidimensionais exibidos na figura 19 representam a separação dos componentes nas amostras A2 e A3 das quais puderam ser obtidos os componentes X e Y

isolados. É possível se observar o perfil cromatográfico obtido com tal análise, onde os tempos de retenção dos picos X e Y foram, respectivamente, em  $t_{R1} \approx 32,50$  min e  $t_{R2} \approx 34,70$  min, nestas condições. Além disso, a intensidade dos picos no cromatograma bidimensional também permite inferir sobre a diferença das quantidades dos mesmos em cada uma das amostras das quais foram isolados.



**Figura 19** - Cromatogramas bidimensionais obtido para o isolamento dos picos X e Y em  $t_{R1} \approx 32,50$  min e  $t_{R2} \approx 34,70$  min, respectivamente.  
Fonte: DO AUTOR.

Para se garantir a identidade das substâncias nos picos X e Y isolados de cada uma das amostras (A2 e A3), comparou-se o tempo de retenção dos mesmos em cada amostra bem como a curva de absorção no UV de cada um deles. Pelo fato das curvas se apresentarem com o mesmo perfil de absorção em toda extensão dos picos para cada substância, é possível inferir sobre a pureza dos compostos ali separados (considerando-se as substâncias detectáveis por DAD).

Após ter o solvente completamente eliminado, o composto X foi obtido com aproximadamente 13 mg, na forma de um sólido branco. Já o composto Y foi obtido sob forma de um sólido amarelo com aproximadamente 14 mg, após diversas injeções das amostras no

LC-DAD. A pouca quantidade dos materiais isolados obtidos, impossibilitou a realização do experimento para determinação da faixa de fusão dos compostos isolados, bem como a obtenção dos espectros no Infravermelho (IV).

## 6.10 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS X E Y POR ESPECTROSCOPIA DE RMN

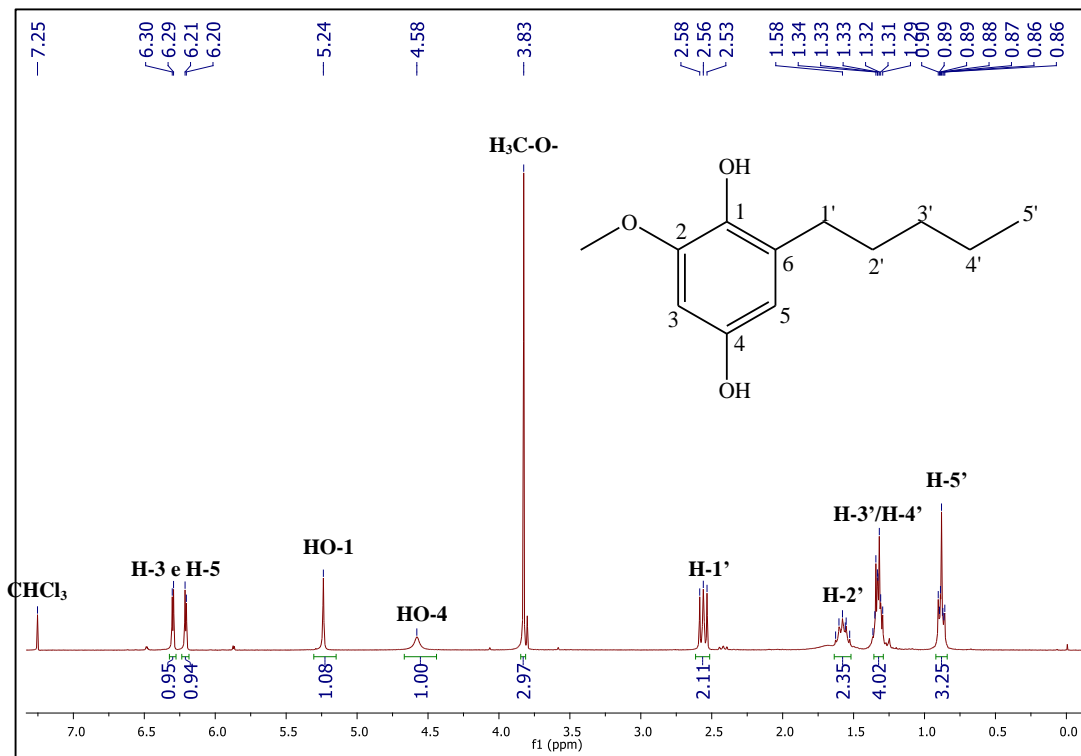
A identificação dos compostos isolados foi feita a partir dos dados de espectroscopia de RMN, comparados com dados da literatura, em adição com dados de espectrometria de massas.

### 6.10.1 Identificação do composto X por espectroscopia de RMN

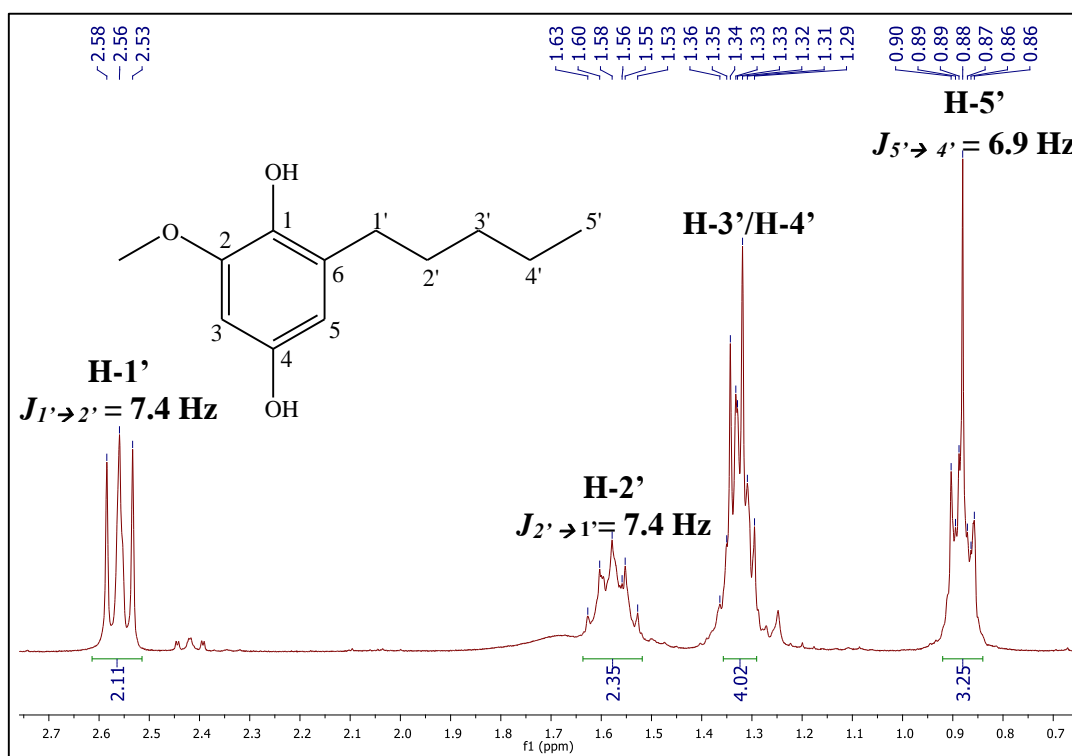
Para a elucidação estrutural do composto X, foram obtidos os espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e ainda os espectros de RMN bidimensionais de correlação (COSY, HSBC e HMBC).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (figura 20) permitiu observar 9 sinais consideráveis para os hidrogênios do composto X. O último sinal (em 7,26 ppm) é referente ao solvente residual ( $\text{CHCl}_3$ ) e sua integral apresentou um valor desprezível em relação aos demais. Pela figura 20, é possível perceber a presença de somente dois sinais, com deslocamento químico próximos, relativos a hidrogênios aromáticos na substância X (6,21 e 6,30 ppm), indicando que a substância possui um anel aromático tetra-substituído. Na expansão dos três primeiros sinais, no sentido do campo alto para campo baixo (figura 21), pode-se observar um tripleto (um pouco distorcido) de 3 hidrogênios em 0,88 ppm com constante de acoplamento  $J = 6,9$  Hz, um multiplete referente a 4 hidrogênios com deslocamento em 1,33 ppm, um quintuplete para 2 hidrogênios em 1,58 ppm ( $J = 7,4$  Hz) e um tripleto de 2 hidrogênios ( $J = 7,4$  Hz) em 2,56 ppm. Pôde-se inferir que os dois últimos sinais descritos, com constantes de acoplamento iguais ( $J = 7,4$  Hz), são referentes a hidrogênios ligados a carbonos adjacentes, comparando-se também os valores de deslocamento deles, que são relativamente próximos. Já o sinal de deslocamento mais baixo (3H, 0,88 ppm,  $J = 6,9$  Hz) foi suposto ser de uma metila ligada a dois metilenos consecutivos (multiplete, 4H, 1,33 ppm). Estes, por sua vez, estariam hipoteticamente ligados a um metileno (2H,  $J = 7,4$  Hz, 1,58 ppm) que como já descrito, estaria ligado a outro metileno

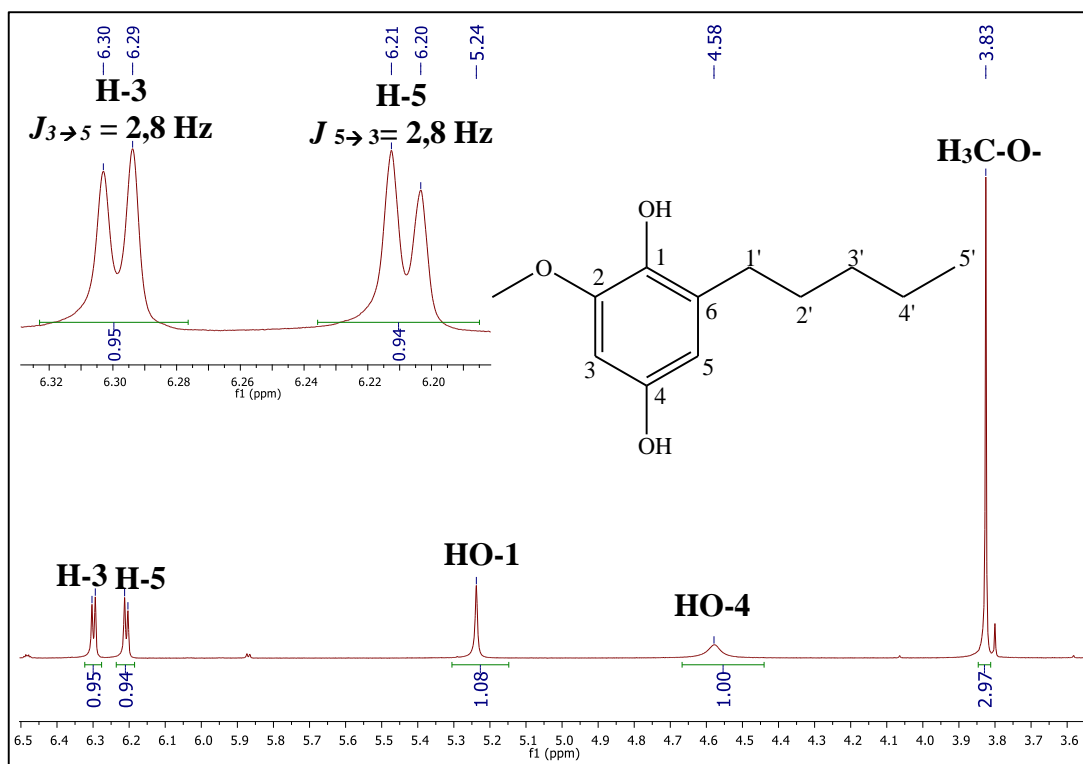
(2H,  $J = 7,4$  Hz, 2,56 ppm). Estes dados sugeriram até então a presença de uma cadeia carbônica linear com cinco carbonos ligada a um anel aromático pelo carbono contendo o hidrogênio de 2,56 ppm (deslocamento químico este característico) na estrutura do composto X.



**Figura 20** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância X, a 300 MHz em  $\text{CDCl}_3$ .  
Fonte: DO AUTOR.



**Figura 21** - Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (0,6 a 2,8 ppm) da substância X.  
Fonte: DO AUTOR.



**Figura 22** - Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (3,7 a 6,7 ppm) da substância X.  
Fonte: DO AUTOR.

Na expansão da região de 3,7 a 6,7 ppm (figura 22), pode-se observar um singlete de 3 hidrogênios em 3,83 ppm, indicando a presença de uma metila ligada a um carbono desblindado por um átomo eletronegativo (oxigênio, nitrogênio ou halogênio, exceto flúor). Contudo, os únicos átomos eletronegativos possíveis de estarem ligados à metila é o oxigênio ou nitrogênio, uma vez que caso fosse um sinal de hidrogênio ligado a átomo de halogênio tratar-se-ia de um haleto de hidrogênio. Além disso, sabe-se que sinais de hidrogênios ligados a nitrogênio possuem deslocamentos entre 2,2 e 2,9 ppm, aproximadamente, o que elimina a hipótese de ligação do substituinte com este átomo, permitindo concluir que o sinal em 3,83 ppm seja de uma metila ligada a um átomo de oxigênio. Ainda na figura 22, é possível se observar dois singletos, um pouco alargados, referentes a 1 hidrogênio cada, em 4,58 e 5,24 ppm, típicos de hidrogênios hidroxílicos.

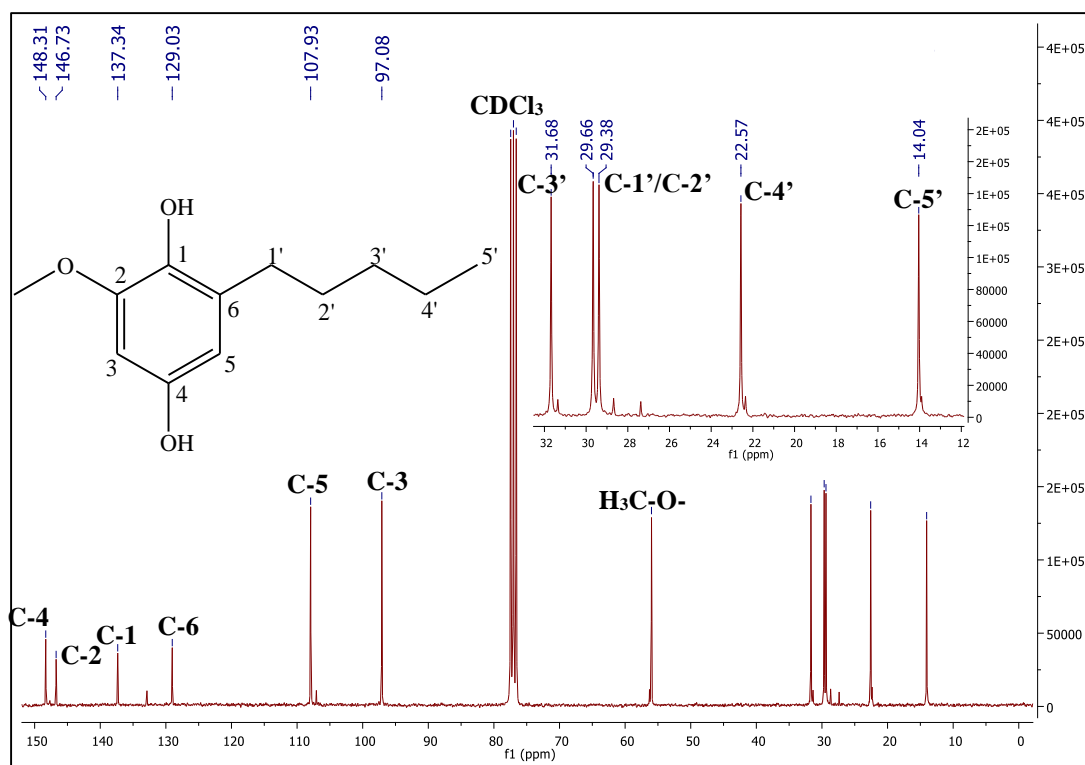
Já na região de hidrogênios aromáticos (6,5 a 8,0 ppm) é possível se identificar a presença de dois sinais referentes a 1 hidrogênio cada, dupletos, ambos com  $J = 2,8$  Hz. Isso permite concluir que o composto X possui dois hidrogênios aromáticos. O valor da constante de acoplamento entre eles ( $J_{META} = 2,8$  Hz) permite inferir ainda que estes hidrogênios estão acoplados em meta, no anel aromático. A tabela 6 resume os dados obtidos com o espectro de

RMN de  $^1\text{H}$  do composto X, onde se pode concluir que sua estrutura possui um total de 18 hidrogênios.

**Tabela 6** - Dados do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de X, obtidos a 300 MHz em  $\text{CDCl}_3$ .

$\delta(\text{ppm})$	multiplicidade; $J$ (Hz)	Integração	Atribuição
0,88	triplete; 6,9	3	H-5'
1,33	multiplete; -	4	H-4'/H-3'
1,58	quintuplete; 7,4	2	H-2'
2,56	triplete; 7,4	2	H-1'
3,83	singleto	3	$\text{H}_3\text{C-O-}$
4,58	singleto	1	HO-4
5,24	singleto	1	HO-1
6,21	duplete; 2,8	1	H-5
6,30	duplete; 2,8	1	H-3

Fonte: DO AUTOR.



**Figura 23** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância X, a 75 MHz em  $\text{CDCl}_3$ .

Fonte: DO AUTOR.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentado na figura 23, permite observar a presença de 5 carbonos da cadeia alifática (descrita anteriormente através do espectro de  $^1\text{H}$ ) com os respectivos deslocamentos químicos: 14,04; 22,57; 29,38; 29,66 e 31,68 ppm. Já o sinal em

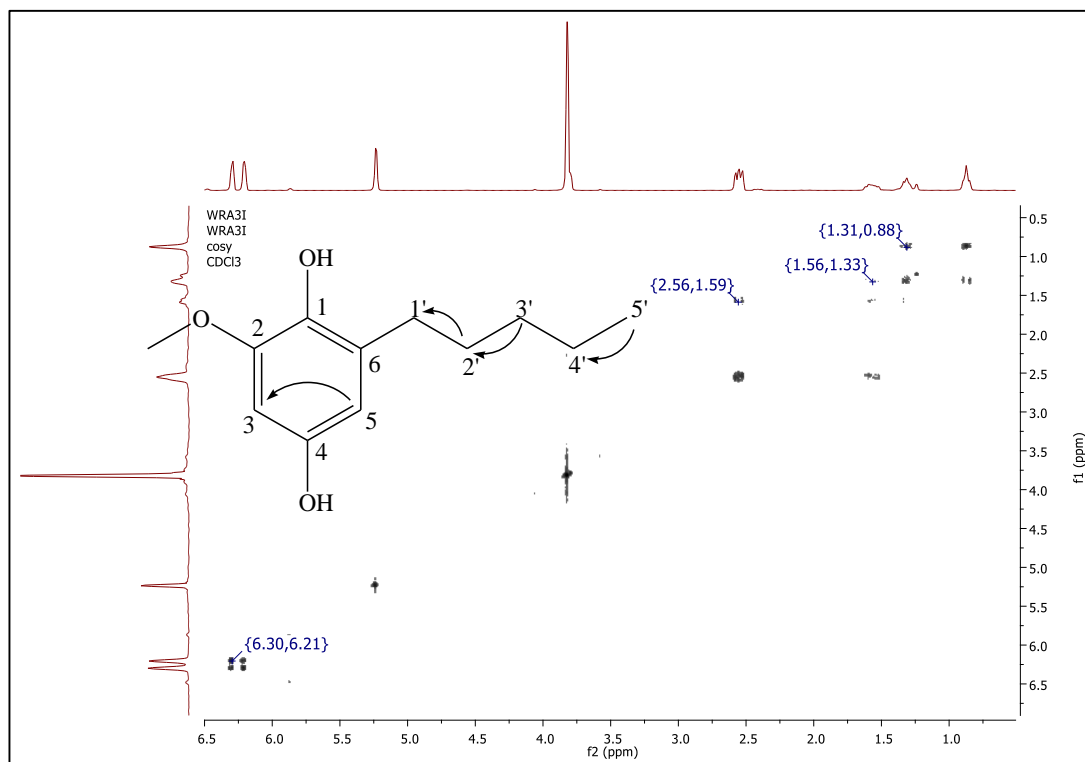
55,98 ppm pode ser atribuído ao carbono metílico ligado ao átomo de oxigênio. Já na região dos aromáticos, puderam ser observados o total de 6 carbonos (97,03; 107,93; 129,03; 137,34; 146,73 e 148,31 ppm), confirmando a presença do anel aromático na substância X, permitindo inferir ainda que a estrutura possui um total de 12 carbonos. Os dados da figura 23 foram reunidos na tabela 7, com as respectivas atribuições dos sinais.

**Tabela 7** - Dados do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , obtido em  $\text{CDCl}_3$  a 75 MHz, para o composto isolado X.

$\delta$ (ppm)	$^{13}\text{C}$
14,04	C-5'
22,57	C-4'
29,38	C-2'
29,66	C-1'
31,68	C-3'
55,98	$\text{H}_3\text{C-O-}$
97,03	C-3
107,93	C-5
129,03	C-6
137,34	C-1
146,73	C-2
148,31	C-4

Fonte: DO AUTOR.

Através do espectro de correlação  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY da substância X (figura 24), foi possível relacionar a proximidade de alguns hidrogênios e confirmar a ligação de alguns carbonos e hidrogênios, já propostas a partir dos espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  unidimensionais. A tabela 8, reúne de modo simples os dados obtidos pelo espectro de RMN  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY da figura 24, e permite confirmar a ordem dos carbonos a que estão ligados os hidrogênios na cadeia alifática linear, já descrita. É possível perceber que a correlação entre H-4' e H-3' não aparece no espectro  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY, uma vez que estes apresentaram um mesmo sinal no espectro de  $^1\text{H}$ , como multipletto em 1,33 ppm com integração para 4 hidrogênios. Além disso, pôde-se observar ainda o sinal de correlação entre os dois hidrogênios aromáticos em meta, como descrito previamente, confirmando suas posições no anel bem como acoplamento entre eles.



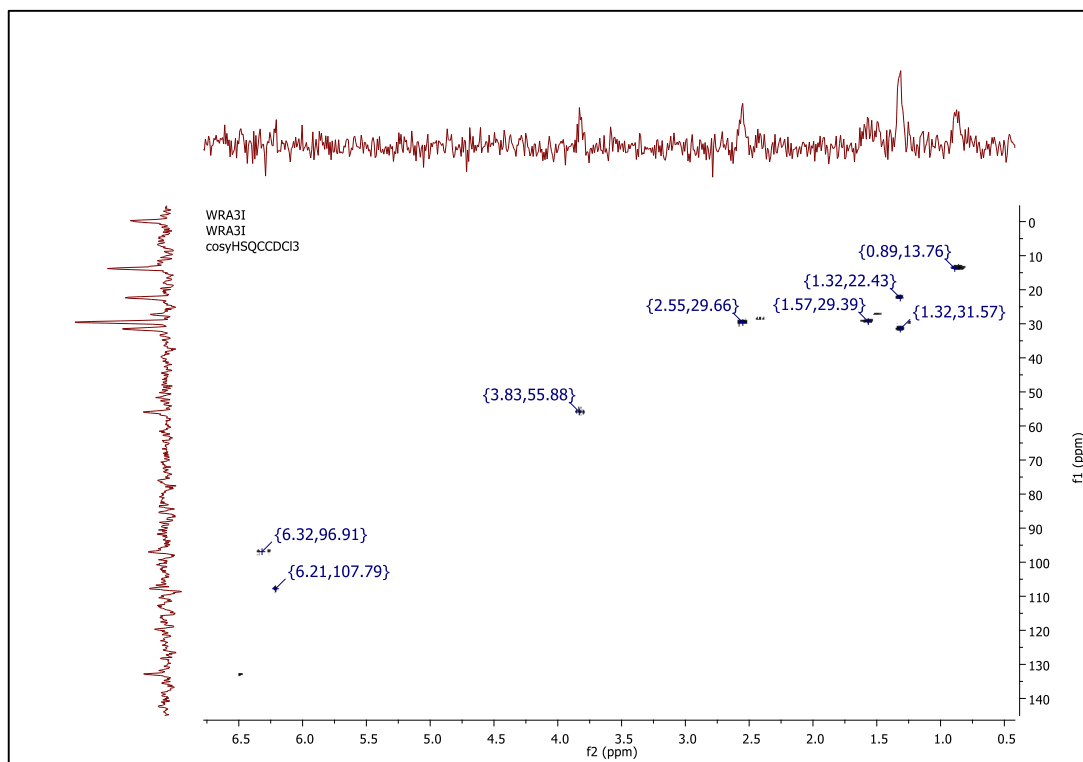
**Figura 24** - Espectro de correlação  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY da substância X, a 300 MHz em  $\text{CDCl}_3$ .  
Fonte: DO AUTOR.

**Tabela 8** - Correlações de  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY da substância X, a 300 MHz em  $\text{CDCl}_3$ .

$^1\text{H}$	$\delta$ (ppm)	multiplicidade; $J$ (Hz)	$^1\text{H}$	$\delta$ (ppm)	multiplicidade; $J$ (Hz)
5'	0,88	triplete; 6,9	4'	1,33	multiplete; -
3'	1,33	multiplete; -	2'	1,58	quintuplete; 7,4
2'	1,58	quintuplete; 7,4	1'	2,56	triplete; 7,4
5	6,21	duplete; 2,8	3	6,30	duplete; 2,8

Fonte: DO AUTOR.

Através do espectro de correlação  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HSQC (figura 25), é possível se confirmar algumas atribuições feitas para carbonos e hidrogênios. Oito sinais referentes a hidrogênios ligados a carbonos foram observados e os dados foram agrupados na tabela 9.



**Figura 25** - Espectro de correlação  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HSQC da substância X, a 300 MHz em  $\text{CDCl}_3$ .  
Fonte: DO AUTOR.

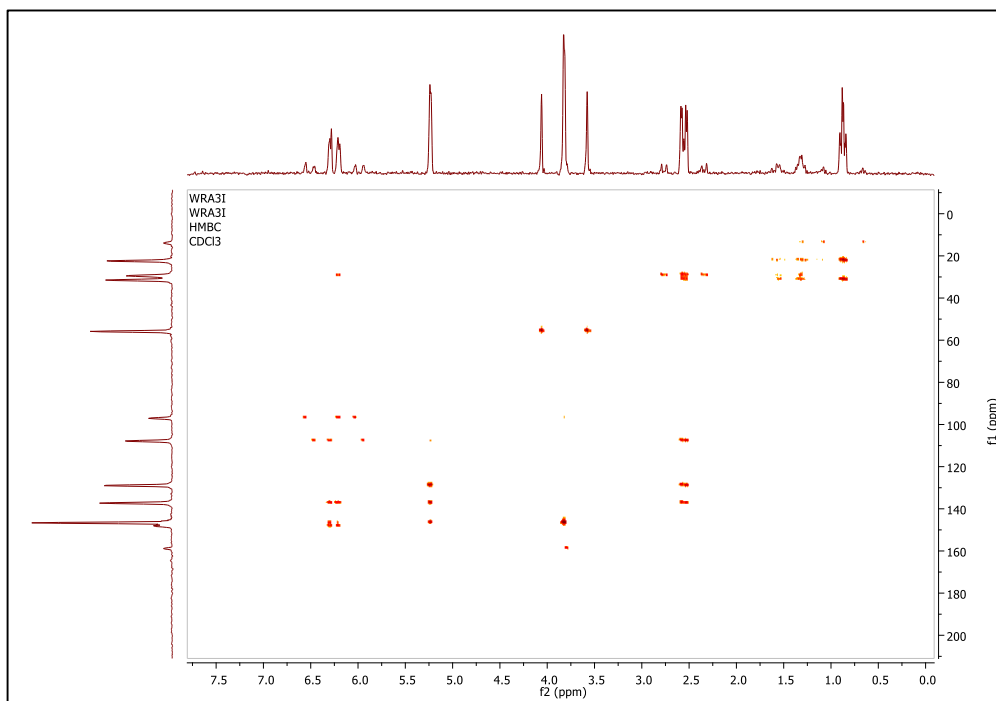
**Tabela 9** - Correlações de  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HSQC da substância X, a 300 MHz em  $\text{CDCl}_3$ .

$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$^1\text{H}$	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$^{13}\text{C}$
0,88	H-5'	14,04	C-5'
1,33	H-4'	22,57	C-4'
1,33	H-3'	31,68	C-3'
1,58	H-2'	29,39	C-2'
2,56	H-1'	29,66	C-1'
3,83	$\text{H}_3\text{C-O-}$	55,98	$\text{H}_3\text{C-O-}$
6,21	H-5	107,93	C-5
6,30	H-3	97,08	C-3

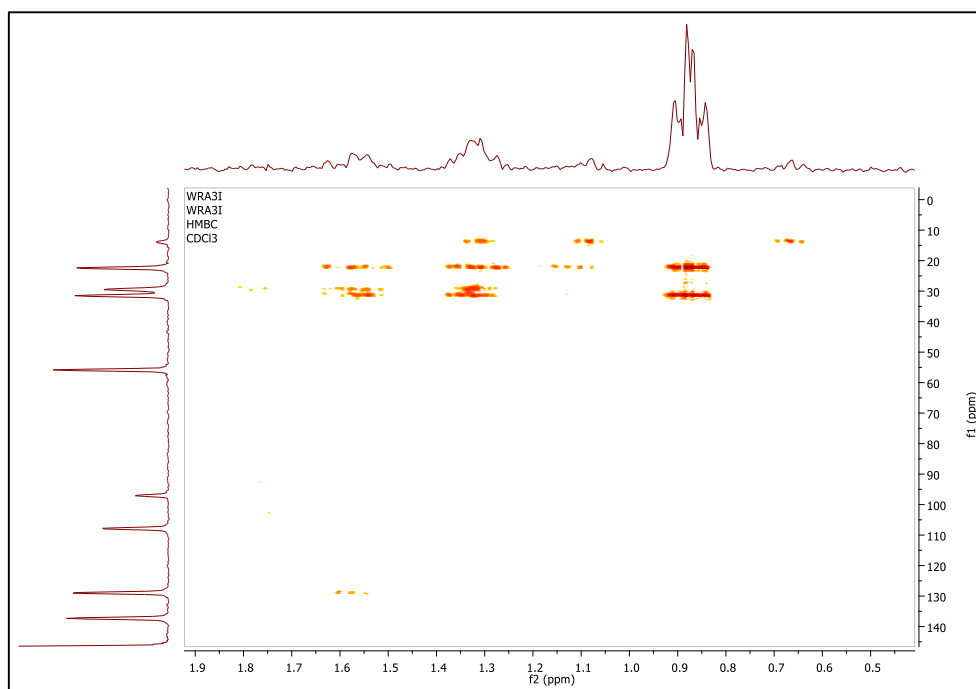
Fonte: DO AUTOR.

Pelos dados de correlação de  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HSQC da substância X, apresentados na tabela 9 é possível se confirmar o deslocamento químico dos carbonos alifáticos já descritos a partir do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , permitindo inferir na estrutura da cadeia carbônica linear proposta. Além disso, foi possível afirmar a partir destes dados que a estrutura possui dois carbonos aromáticos ligados a um hidrogênio cada, possuíam deslocamentos químicos de 97,08 e 107,93 ppm que podem ser seguramente atribuídos, a partir dos dados de correlação de  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HMBC (figura 26).

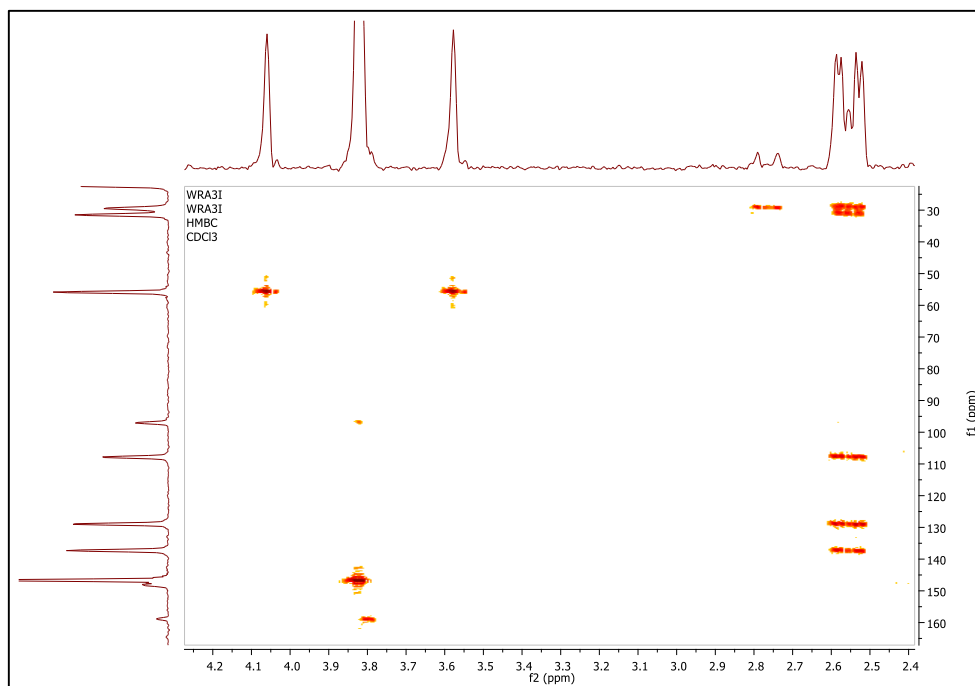
Outra inferência possível a partir dos dados da tabela 9, é que os carbonos aromáticos C-1, C-2, C-4 e C-6 não apresentaram correlação entre  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HSQC, indicando que estes não possuíam hidrogênios ligados diretamente a eles.



**Figura 26** - Espectro de correlação  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HMBC da substância X, a 300 MHz em  $\text{CDCl}_3$ .  
Fonte: DO AUTOR.

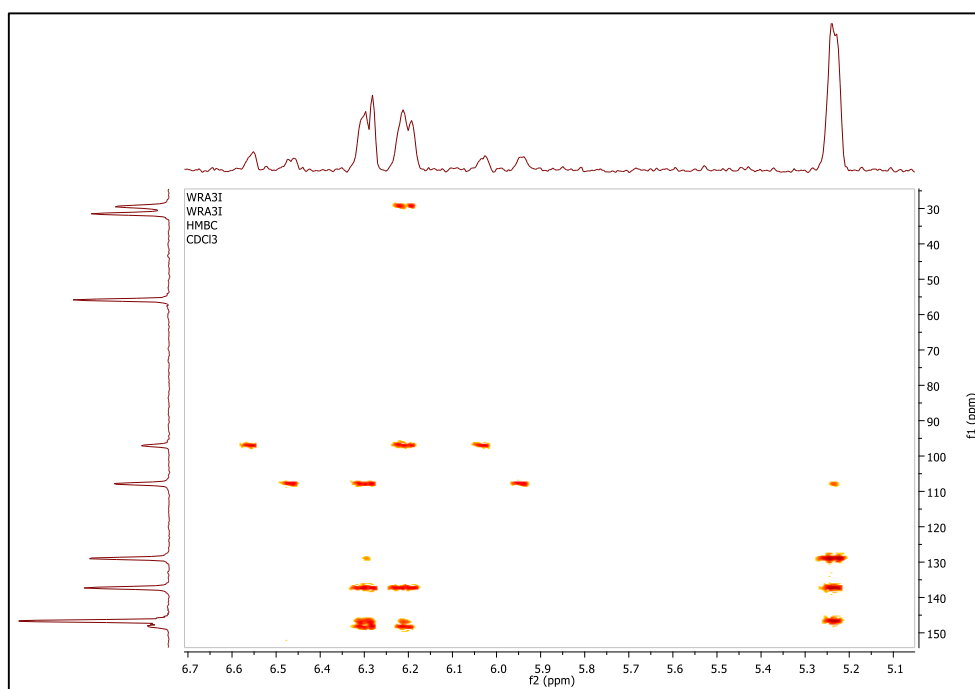


**Figura 27** - Expansão I do espectro de correlação  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HMBC da substância X, a 300 MHz em  $\text{CDCl}_3$ .  
Fonte: DO AUTOR.



**Figura 28** - Expansão II do espectro de correlação  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HMBC da substância X, a 300 MHz em  $\text{CDCl}_3$ .

Fonte: DO AUTOR.



**Figura 29** - Expansão III do espectro de correlação  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HMBC da substância X, a 300 MHz em  $\text{CDCl}_3$ .

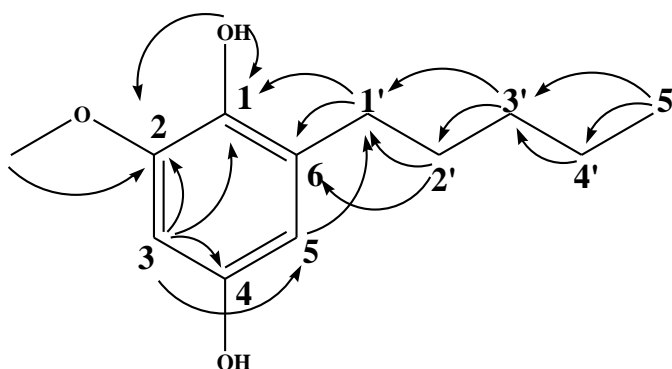
Fonte: DO AUTOR.

A partir das expansões I, II e III do espectro de correlação  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HMBC da substância X (figuras 27, 28 e 29, respectivamente) pôde-se agrupar os dados de correlação de  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HMBC na tabela 10, onde são atribuídos cada sinal. A correlação de  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HMBC permite

identificar o acoplamento heteronuclear, entre  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  neste caso, a no mínimo duas ligações de distância, permitindo visualizar o(s) carbono(s) vizinho(s) ao qual um hidrogênio esteja ligado. Os dados da tabela 10 permitiram confirmar a presença da metila terminal da cadeia carbônica linear proposta pelas correlações  $\text{H-5}'/\text{C-4}'$  e  $\text{H-5}'/\text{C-3}'$ . Já a presença de dois metilenos ( $-\text{CH}_2-$ ) ligados em série, pôde ser confirmada pelo sinal de  $\text{H-3}'/\text{C-4}'$ , pois embora  $\text{H-4}'$  e  $\text{H-3}'$  tenham apresentado um único sinal (multiplete, 1,33 ppm, 4H), eles podem ser diferenciados no carbono com tal correlação. Já as correlações que comprovam a ligação de n-pentil ao carbono C-6 aromático são  $\text{H-2}'$  (1,58 ppm)/C-6 (129,03 ppm), as correlações de  $\text{H-1}'$  (2,56 ppm) com os carbonos C-6 (129,03 ppm), C-5 (107,93 ppm) e C-1 (137,34 ppm), além da correlação entre  $\text{H-5}$  (6,21 ppm) e C-1' (29,66 ppm) [esta última permitiu também confirmar o valor de deslocamento menor de  $\text{H-5}$  (6,21 ppm) em relação ao  $\text{H-3}$  (6,30 ppm)].

A confirmação da ligação do grupo  $\text{H}_3\text{C-O-}$  ao carbono C-2 aromático pode ser feita a partir da correlação em HMQC dos hidrogênios metoxílicos (3,83 ppm) com C-2 em 146,73 ppm, posição esta do carbono também confirmada através de suas correlações HMQC com os hidrogênios em HO-1 (5,24 ppm), H-3 (6,30 ppm) e também a longa distância por H-5 (6,21 ppm). As correlações heteronucleares obtidas pela figura 26 podem ser ilustradas na figura 30.

Vale a pena ressaltar que o espectro de correlação  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HMBC da substância X (figura 26) não apresentou correlação do HO-4 (4,58 ppm) com qualquer carbono, embora ele tenha sido identificado no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . Isso pode ter ocorrido devido a troca do hidrogênio estar ocorrendo numa taxa elevada (devido a sua acidez relativa, por se tratar de um fenol) com o solvente, impedindo a detecção do sinal do mesmo (PAVIA et al., 2013).



**Figura 30** - Algumas correlações  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HMBC obtidas para a substância X.

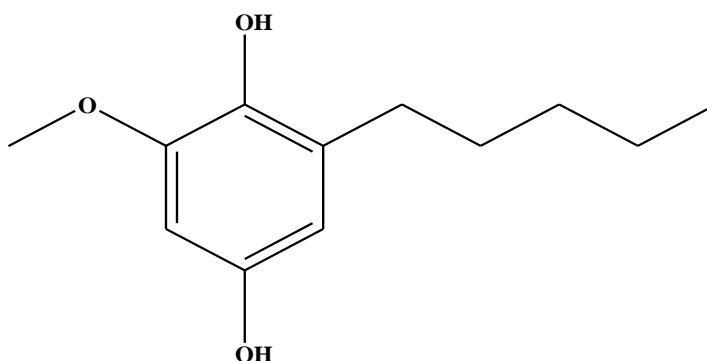
Fonte: DO AUTOR.

**Tabela 10** - Correlações de  $^1\text{H}$  x  $^{13}\text{C}$  HMBC da substância X, a 300 MHz em  $\text{CDCl}_3$ .

$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$^1\text{H}$	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$^{13}\text{C}$
0,88	H-5'	22,57	C-4'
		31,68	C-3'
1,33	H-4' ou H-3'	14,04	C-5'
		22,57	C-4'
		29,38	C-2'
		29,66	C-1'
		31,68	C-3'
1,58	H-2'	22,57	C-4'
		29,66	C-1'
		31,68	C-3'
		129,03	C-6
2,56	H-1'	29,38	C-2'
		31,68	C-3'
		107,93	C-5
		129,03	C-6
		137,34	C-1
3,83	H <sub>3</sub> C-O-	146,73	C-2
5,24	HO-1	107,93	C-5
		129,03	C-6
		137,34	C-1
		146,73	C-2
6,21	H-5	29,66	C-1'
		97,03	C-3
		137,34	C-1
		146,73	C-2
		148,31	C-4
6,30	H-3	107,93	C-5
		137,34	C-1
		146,73	C-2
		148,31	C-4

Fonte: DO AUTOR.

Utilizando-se todos os dados de RMN de forma complementar, apresentados nesta seção 6.10.1, dentre eles os espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , além das correlações  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HSQC,  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HMBC, foi possível identificar assim a estrutura da substância X (figura 31), sendo determinada como a 2-metoxi-4-hidroxi-6-n-pentilfenol ou 2-metoxi-6-n-pentilhidroquinona, conhecida também como miconidina, sendo sua estrutura confirmado a partir de dados de RMN da literatura (PAULSEN; CHRISTENSEN; ANDERSEN, 2006).



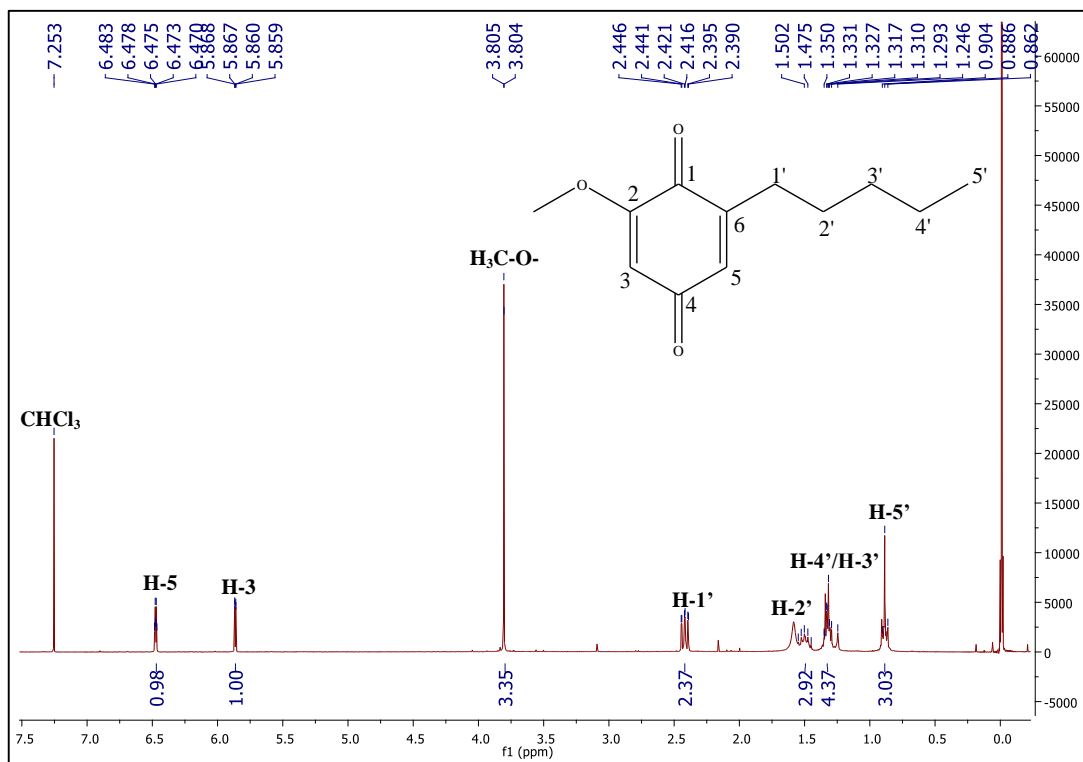
**Figura 31** - Estrutura química da substância X, identificada como miconidina.  
Fonte: DO AUTOR.

A miconidina pode ser isolada principalmente da espécie *Primula obconica* e tem sido descrita também presente em algumas espécies do gênero *Miconia* (HORPER; MARNER, 1996). Esta substância tem sido alvo de muitos estudos, a maioria alergênicos, por ser um precursor biossintético da primina (que possui tal efeito já descrito) (PAULSEN; CHRISTENSEN; ANDERSEN, 2006).

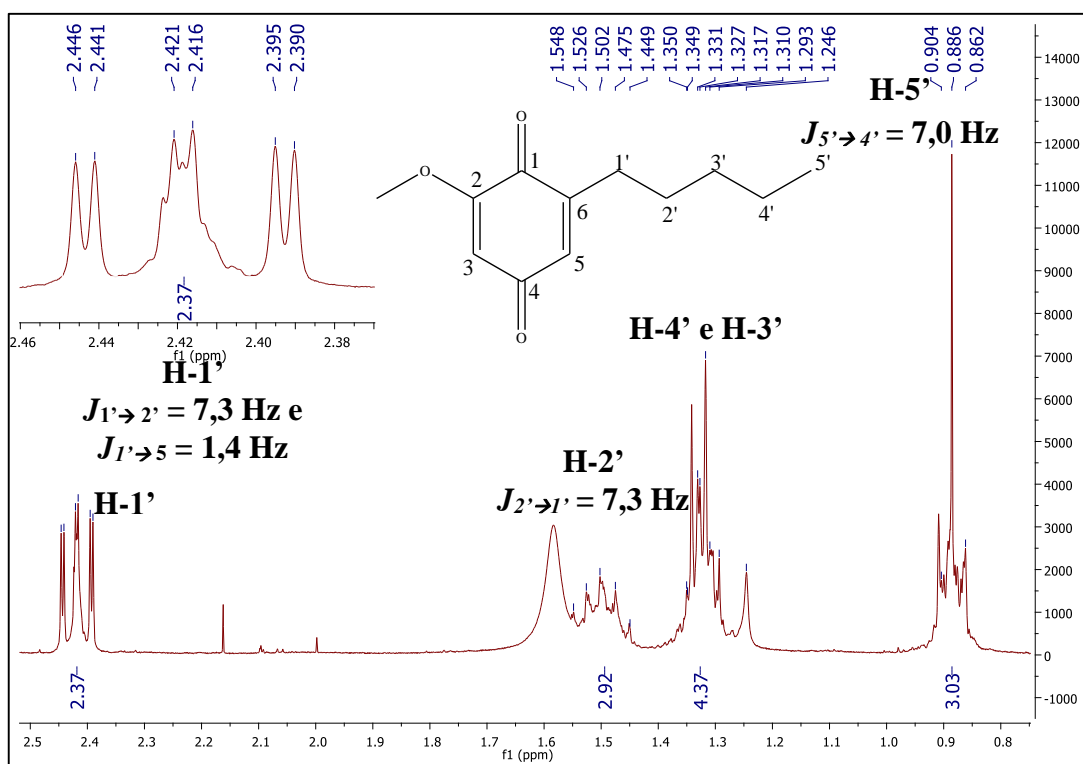
### 6.10.2 Identificação do composto Y por espectroscopia de RMN

Assim como feito para o composto X, a elucidação estrutural do composto Y foi feita a partir dos dados de espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e ainda os espectros de RMN bidimensionais de correlação (COSY, HSBC e HMBC). Comparando-se inicialmente os dados de espectroscopia de RMN dos compostos X e Y, pôde-se observar muitos sinais com deslocamentos químicos próximos. Isso propôs uma certa similaridade dos dois compostos isolados. A partir do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto Y (figura 32), pôde-se observar inicialmente a presença de um sinal bastante intenso e característico, referente a 1H em 7,25

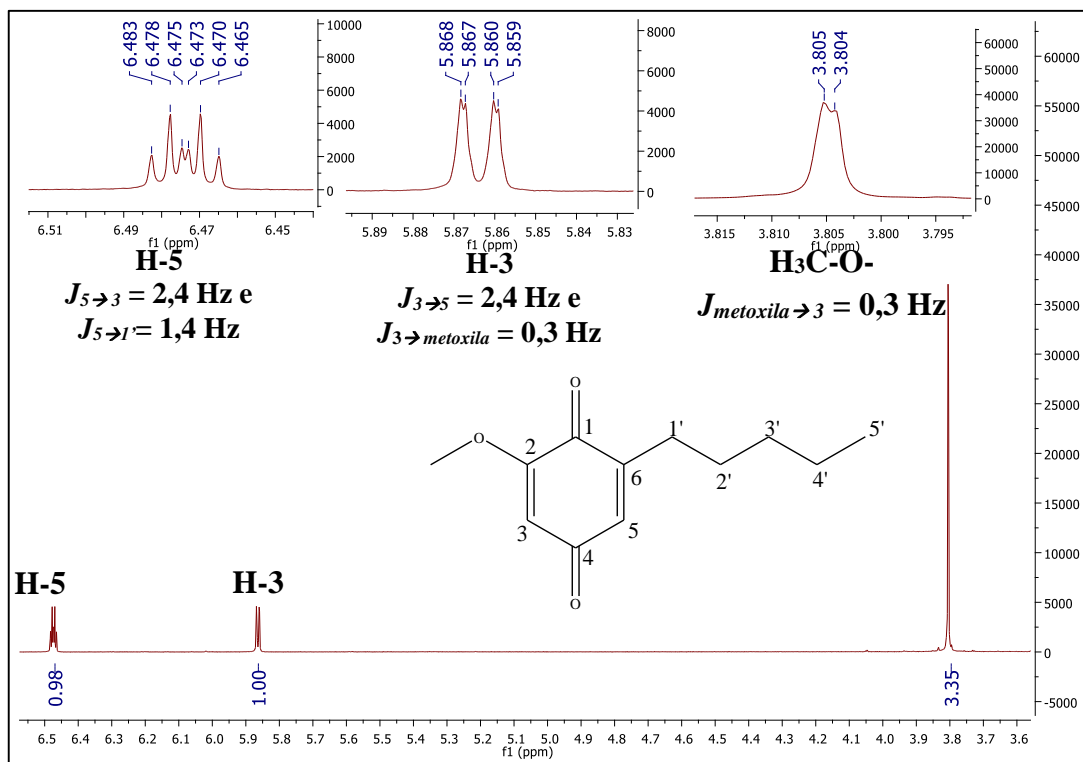
ppm, que pode ser atribuído ao solvente  $\text{CHCl}_3$ . Além disso, pôde-se atribuir um total de 6 sinais de hidrogênios referentes ao composto Y, apesar da presença de alguns outros sinais não característicos, indicando a impureza da amostra analisada. Ainda assim, é possível se identificar que o composto Y possui também dois sinais de hidrogênios do anel insaturado (assim como em X), com deslocamentos químicos em 5,86 e 6,47 ppm, indicando a presença de um anel insaturado tetra-substituído (figura 34), onde as insaturações estão em *orto* às carbonilas. Na expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (figura 33), pode-se observar um tripleto pouco distorcido em 0,89 ppm para 3 hidrogênios, com constante de acoplamento  $J = 6$  Hz, um multipeto referente a 4 hidrogênios com deslocamento em 1,32 ppm, um quintupeto para 2 hidrogênios em 1,50 ppm ( $J = 8$  Hz) e um triplo dupeto de 2 hidrogênios em 2,42 ppm com constantes de acoplamento  $J = 1,4$  Hz e  $J = 7,3$  Hz. Isso pode ser explicado pelo acoplamento do hidrogênio H-1' com H-2' ( $J = 7,3$  Hz) e também com o hidrogênio do anel H-5 ( $J = 1,4$  Hz). A expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da figura 34 permite observar ainda um sinal referente a metoxila em 3,80 ppm como um dupeto (3H,  $J = 0,3$  Hz) e também os dois sinais de hidrogênios do anel: um em 5,86 ppm (1H) como duplo dupeto ( $J' = 2,4$  Hz e  $J'' = 0,3$  Hz) e outro como um duplo tripleto (1H) em 6,47 ppm com constantes de acoplamento  $J' = 2,4$  Hz e 1,4 Hz. Isso permite inferir que o hidrogênio do anel de maior deslocamento (6,47 ppm) é H-5 por apresentar acoplamento tanto com H-1' ( $J = 1,4$  Hz) (descrito anteriormente) quanto com H-3 ( $J = 2,4$  Hz). Fato interessante observado foi o desdobramento do sinal referente aos hidrogênios metoxílicos, indicando acoplamento com o hidrogênio H-3 do anel, pelo valor da constante ( $J = 0,3$  Hz) (figura 34). Os valores das constantes de acoplamento para H-5, permitem deduzir ainda que o acoplamento com H-3 ocorre em meta no anel ( $J = 2,4$  Hz) e também com os hidrogênios H-1' da cadeia linear alifática ( $J = 1,4$  Hz), o que justifica o desdobramento destes sinais. Ao comparar-se os dados do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias X e Y, percebe-se que eles apresentam todos os sinais com deslocamentos muito próximos, embora a substância Y não tenha apresentado sinais de hidrogênios hidroxílicos. Os dados do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância Y estão reunidos na tabela 11, onde pôde-se concluir finalmente que a estrutura do composto Y isolado possui no total 16 hidrogênios.



**Figura 32** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância Y, a 300 MHz em  $\text{CDCl}_3$ .  
Fonte: DO AUTOR.



**Figura 33** - Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (0,80 a 2,50 ppm) da substância Y, obtido a 300 MHz em  $\text{CDCl}_3$ .  
Fonte: DO AUTOR.



**Figura 34** - Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (3,60 a 6,60 ppm) obtido a 300 MHz em  $\text{CDCl}_3$  para Y.

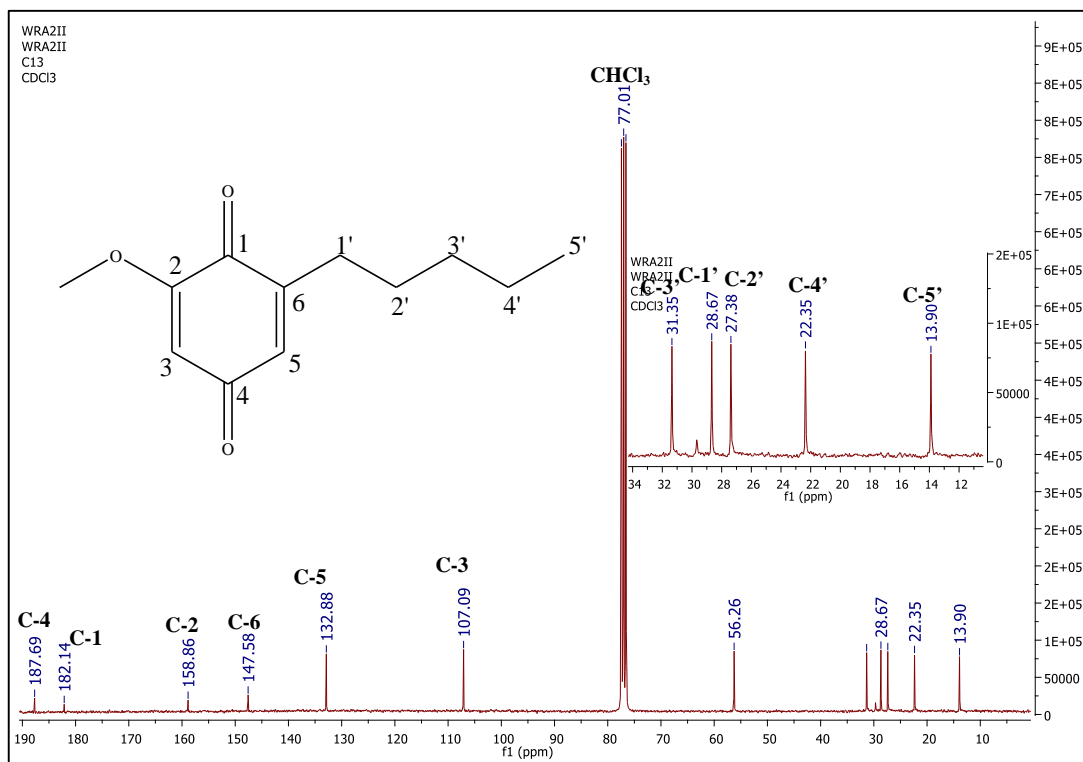
Fonte: DO AUTOR.

**Tabela 11** - Dados do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de Y.

$\delta(\text{ppm})$	multiplicidade; $J$ (Hz)	Integração	Atribuição
0,89	triplete; 7,0	3	H-5'
1,32	multiplete; -	4	H-4'/H-3'
1,50	quintuplete; 7,3	2	H-2'
2,42	triplo duplete; 7,3 e 1,4	2	H-1'
3,80	duplete; 0,3	3	H <sub>3</sub> C-O-
5,85	duplete; 2,4 e 0,3	1	H-3
6,47	duplo triplete; 2,4 e 1,4	1	H-5

Fonte: DO AUTOR.

Já o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (figura 35) permitiu observar um total de 12 sinais de carbono, dentre eles 6 do anel insaturado (107,09; 132,88; 147,58; 158,86; 182,14 e 187,69 ppm), 5 de carbonos de cadeia alifática (13,90; 22,35; 27,38; 28,67 e 31,35 ppm) e também o carbono metoxílico (56,26 ppm). A tabela 12 resume os dados obtidos pelo espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ .

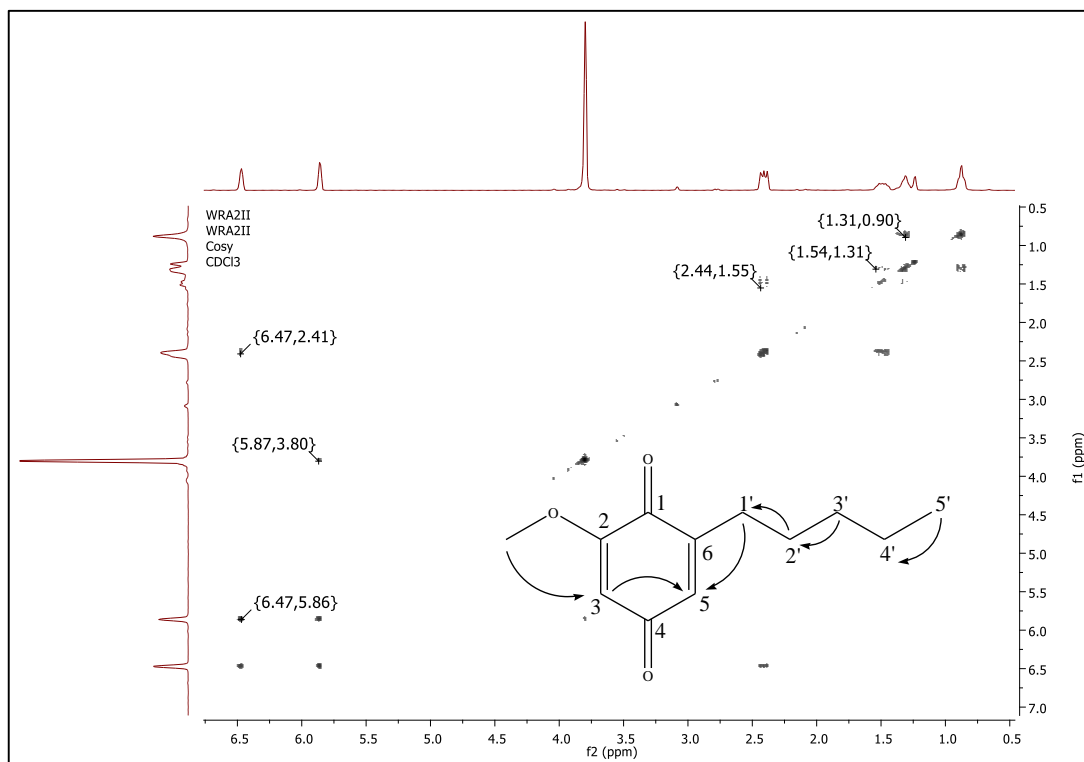


**Figura 35** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância Y, a 75 MHz em  $\text{CDCl}_3$ .  
Fonte: DO AUTOR.

**Tabela 12** - Dados do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido a 75 MHz em  $\text{CDCl}_3$  para Y.

$\delta$ (ppm)	$^{13}\text{C}$
13,90	C-5'
22,35	C-4'
27,38	C-2'
28,67	C-1'
31,35	C-3'
56,26	H <sub>3</sub> C-O-
107,09	C-3
132,88	C-5
147,58	C-6
158,86	C-2
182,14	C-1
187,69	C-4

Fonte: DO AUTOR.



**Figura 36** - Espectro de correlação  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY da substância Y, a 300 MHz em  $\text{CDCl}_3$ .  
Fonte: DO AUTOR.

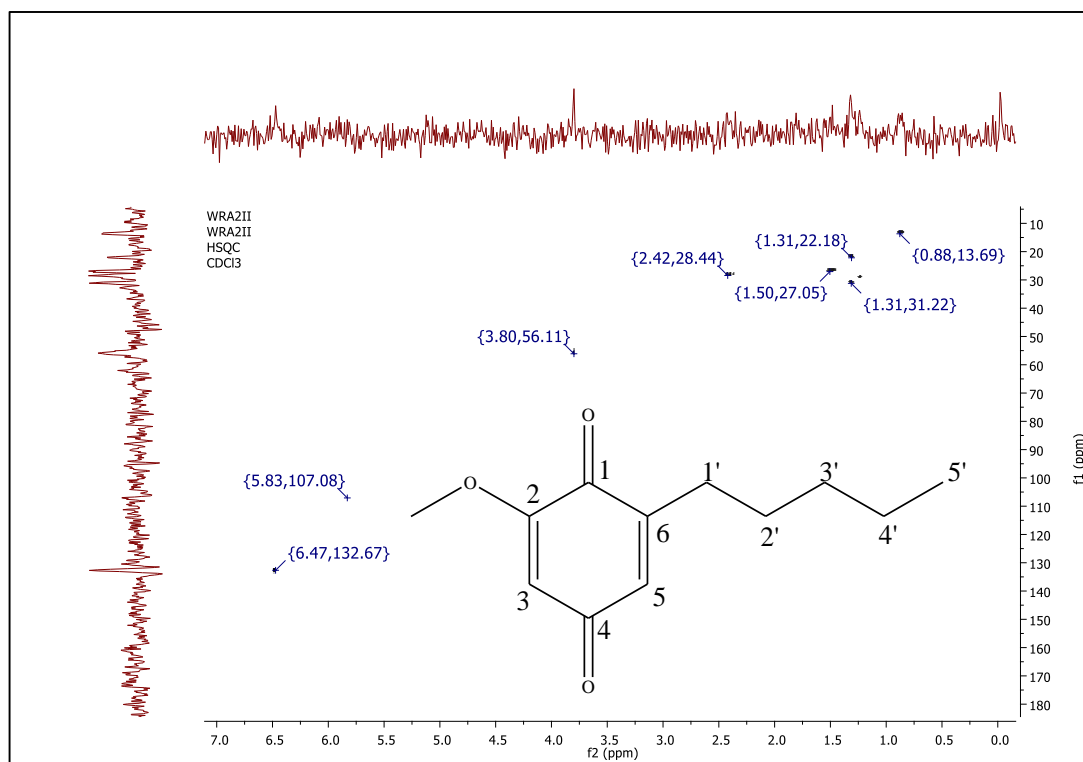
Através do espectro de correlação  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY da substância Y (figura 36), foi possível relacionar a proximidade de alguns hidrogênios e confirmar a ligação de alguns carbonos e hidrogênios, já propostas a partir dos espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  unidimensionais. A tabela 13, reúne de modo simples os dados obtidos pelo espectro de correlações de RMN  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY da figura 36, e permite confirmar a ordem dos carbonos a que estão ligados os hidrogênios na cadeia alifática linear, já descrita. É possível perceber que a correlação entre H-4' e H-3' não aparece no espectro  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY, uma vez que estes apresentaram um mesmo sinal no espectro de  $^1\text{H}$ , como multipletos em 1,32 ppm com integração para 4 hidrogênios. Além disso, pôde-se observar também duas correlações atípicas: os hidrogênios metoxílicos (3,80 ppm) com H-3 (5,87 ppm) e o H-5 (6,47 ppm) com H-1' (2,41 ppm). Estas duas correlações não eram esperadas, porém indicam que a posição espacial em que se encontram esses átomos permitem o acoplamento entre eles. Embora a técnica COSY permita visualizar sinais de correlação entre hidrogênios acoplados a curtas distâncias, como hidrogênios geminais e/ou vicinais, os acoplamentos de hidrogênios a longas distâncias (dificilmente mensuráveis no espectro 1D) podem ser eventualmente visíveis (KAISER, 2000).

A correlação entre os dois hidrogênios do anel em meta pôde também ser confirmada, como descrito previamente, confirmando a posição destes no anel, bem como o acoplamento entre eles.

**Tabela 13** - Correlações de  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY da substância Y, a 300 MHz em  $\text{CDCl}_3$ .

$^1\text{H}$	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	acoplamento; $J$ (Hz)	$^1\text{H}$	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	acoplamento; $J$ (Hz)
H-5'	0,90	triplete; 7,0	H-4'	1,31	multiplete; -
H-3'	1,31	multiplete; -	H-2'	1,54	quintuplete; 7,3
H-2'	1,55	quintuplete; 7,3	H-1'	2,44	triplo duplete; 7,3
H-1'	2,41	triplo duplete; 1,4	H-5	6,47	duplo triplete; 1,4
H <sub>3</sub> C-O-	3,80	duplete; 0,3	H-3	5,87	duplo duplete; 0,3
H-3	5,86	duplo duplete; 2,4	H-5	6,47	duplo triplete; 2,4

Fonte: DO AUTOR.

**Figura 37** - Espectro de correlação  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HSQC da substância Y, a 300 MHz em  $\text{CDCl}_3$ .

Fonte: DO AUTOR.

Através do espectro de correlação  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HSQC (figura 37), é possível se confirmar as atribuições feitas para 8 carbonos e seus respectivos hidrogênios. Os dados foram reunidos na tabela 14 onde é possível se confirmar o deslocamento químico dos carbonos alifáticos já descritos a partir do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , permitindo confirmar a estrutura da cadeia carbônica linear proposta. Além disso, foi possível reafirmar, a partir destes dados, que a estrutura possui dois carbonos do anel ligados a um hidrogênio cada, com deslocamentos químicos de 107,08 e 132,67 ppm que podem ser seguramente atribuídos, a partir dos dados de

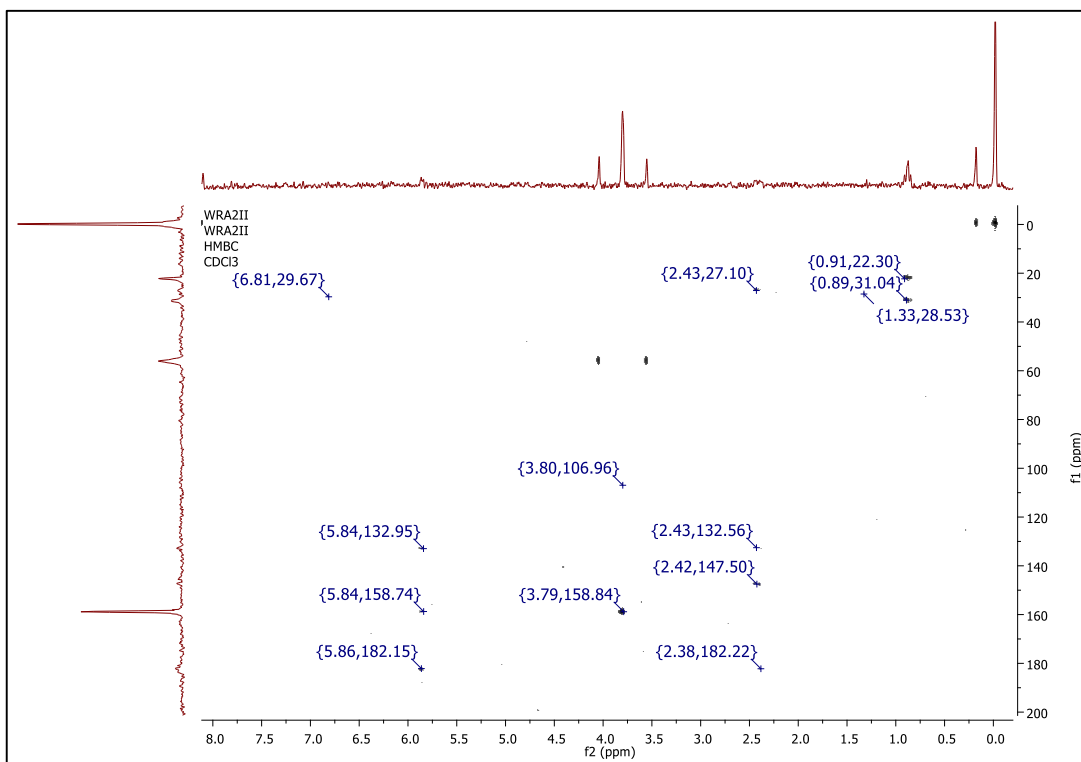
correlação de  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HMBC (figura 38). Além disso, pode-se confirmar a atribuição dos carbonos C-5 (107,08 ppm) e C-3 (132,67 ppm) ligados aos hidrogênios H-5 (5,83 ppm) e H-3 (6,47 ppm), respectivamente. Outra inferência possível a partir dos dados da tabela 12, é que os carbonos do anel C-1, C-2, C-4 e C-6 não apresentaram correlação  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HSQC, indicando que estes não possuíam hidrogênios ligados diretamente a eles.

**Tabela 14** - Correlações de  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HSQC da substância Y, a 300 MHz em  $\text{CDCl}_3$ .

$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$^1\text{H}$	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$^{13}\text{C}$
0,88	H-5'	13,69	C-5'
1,31	H-4'	22,18	C-4'
1,31	H-3'	31,22	C-3'
1,50	H-2'	27,05	C-2'
2,42	H-1'	28,44	C-1'
3,80	H <sub>3</sub> C-O-	55,11	H <sub>3</sub> C-O-
5,83	H-5	107,08	C-5
6,47	H-3	132,67	C-3

Fonte: DO AUTOR.

Já o espectro da figura 38 mostra as correlações  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HMBC onde os dados foram agrupados na tabela 15 e alguns deles foram exemplificados na figura 39, onde se pode confirmar a presença da metila terminal da cadeia carbônica linear proposta pelas correlações H-5'/C-4' e H-5'/C-3'. A correlação H-3'/C-1' confirma a presença dos dois metilenos ligados à metila, já que os sinais de H-4' e H-3' se apresentam como único sinal (multiplete) para 4H (1,32 ppm) no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . A correlação H-1'/C-2' confirma a estrutura da cadeia linear proposta (*n*-pentil). Já as correlações H-1'/C-5, H-1'/C-6 e H-1'/C-1 indicam a ligação do *n*-pentil ao carbono C-6 (147,50 ppm). Os hidrogênios metoxílicos foram confirmados quanto à sua posição pelas correlações apresentadas com os carbonos C-2 (o qual a metoxila se encontra ligada) e C-3 [que possui um dos hidrogênios do anel (5,86 ppm)]. Muitas outras correlações esperadas para a molécula proposta não puderam ser vistas no espectro de correlação de  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HMBC. A baixa concentração do composto Y utilizada na obtenção desses dados talvez seja um dos fatores dessas correlações não serem observadas.

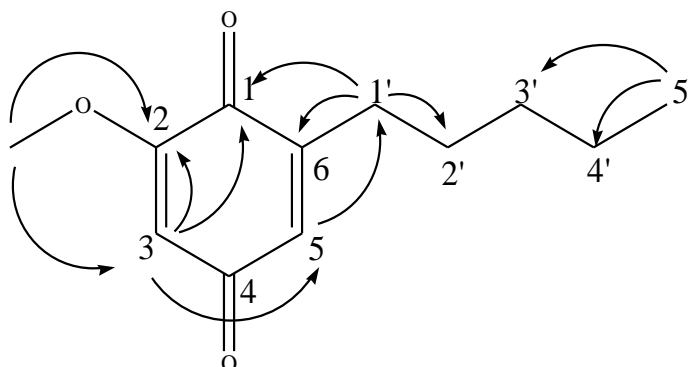


**Figura 38** - Espectro de correlação  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HMBC da substância Y, a 300 MHz em  $\text{CDCl}_3$ .  
Fonte: DO AUTOR.

**Tabela 15** - Correlações de  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HMBC da substância Y, a 300 MHz em  $\text{CDCl}_3$ .

$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$^1\text{H}$	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$^{13}\text{C}$
0,90	H-5'	22,30	C-4'
		31,04	C-3'
1,33	H-3'	28,53	C-1'
2,43	H-1'	27,10	C-2'
		132,56	C-5
		147,50	C-6
		182,22	C-1
3,80	H <sub>3</sub> C-O-	106,96	C-3
		158,84	C-2
		182,15	C-1
5,84	H-3	132,95	C-5
		158,74	C-2
		182,15	C-1
6,81	H-5	29,67	C-1'

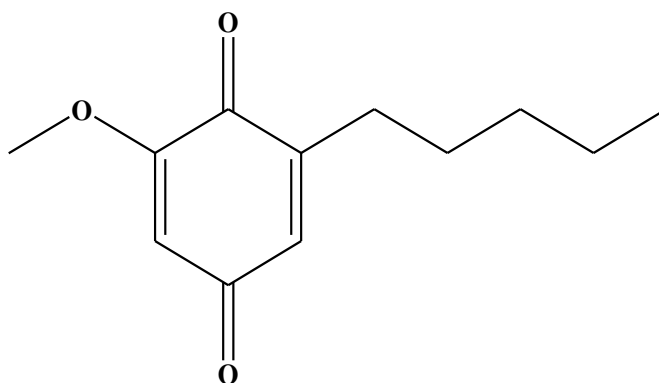
Fonte: DO AUTOR.



**Figura 39** - Algumas correlações  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HMBC obtidas para a substância Y.

Fonte: DO AUTOR.

A partir dos dados de espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC e HMBC da molécula proposta, além de comparação com os dados obtidos na literatura (TASDEMIR et al, 2006), pôde-se concluir que o composto Y se tratava da 2-metoxi-6-*n*-pentil-1,4-benzoquinona, também conhecida como primina (figura 40). O acoplamento entre os hidrogênios do anel H-3 e H-5 com os hidrogênios metoxílicos H<sub>3</sub>C-O-2 e hidrogênios H-1', respectivamente, não haviam sido reportados na literatura ainda para tal composto, sendo um observação inédita deste trabalho.



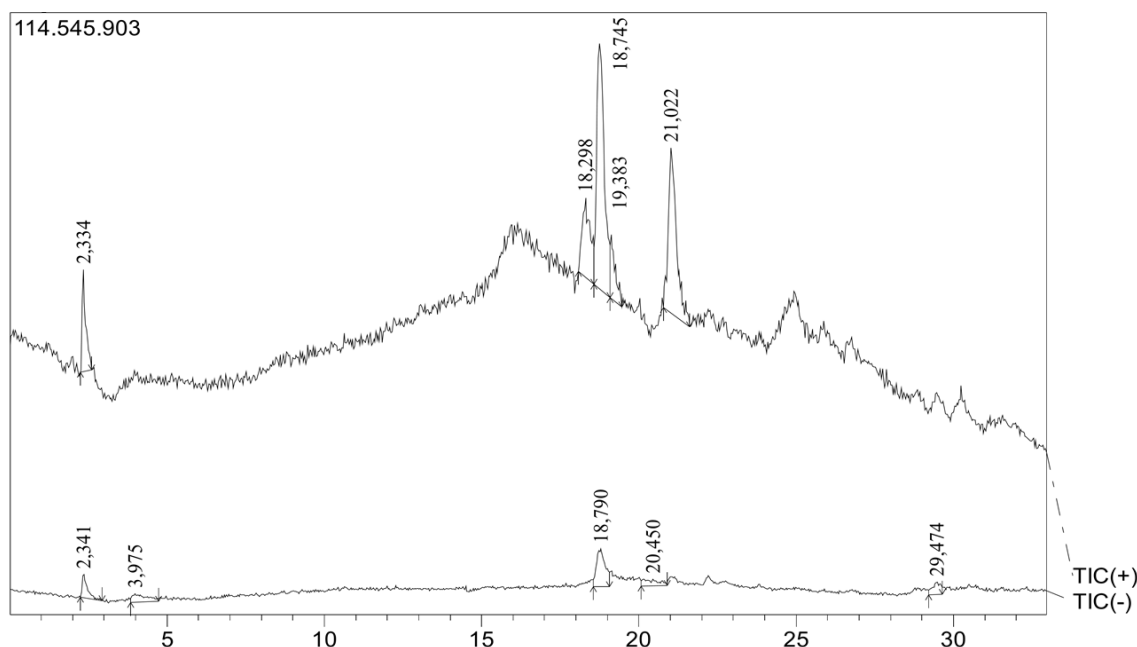
**Figura 40** - Estrutura química da substância Y, identificada como primina.

Fonte: DO AUTOR.

A primina é considerada o principal constituinte alergênico da espécie *Primula obconia* podendo ser obtida também de algumas espécies do gênero *Miconia* (HORPER; MARNER, 1996). Muitos estudos acerca da atividade terapêutica dessa substância e seus análogos têm sido reportados na literatura, como atividade antitumoral (BRONDANI et al., 2007), antituberculótica e antiprotozoária, assim como atividade anti-*T. cruzi*, que será descrita na seção 6.13 (TASDEMIR et al, 2006).

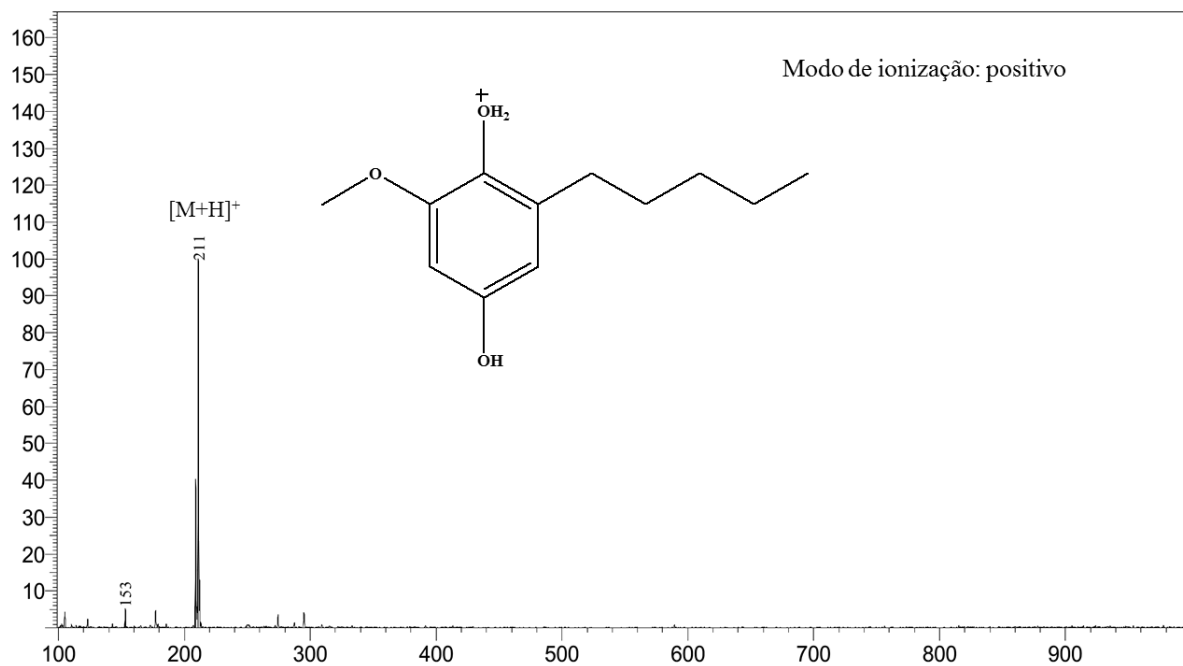
## 6.11 CONFIRMAÇÃO DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Inicialmente o perfil cromatográfico da subfração A3 foi obtido por LC-MS (figura 41). Nele é possível se observar que uma quantidade relativamente baixa de compostos presentes na amostra que são detectadas pelo espectrômetro de massas com ionizador por spray de elétrons. Outra observação possível é a de que as substâncias ali presentes são mais ionizadas no modo positivo, uma vez que este apresentou o cromatograma com picos de maior intensidade que no modo negativo. Com isso, o espectro de massas para a miconidina foi obtido no modo positivo (figura 42), onde se pôde observar o pico de maior intensidade (100) em  $m/z$  211, indicando ser do íon pseudo-molecular  $[M+H]^+$ , podendo-se confirmar assim a massa da molécula de miconidina como sendo de 210 Da. Do mesmo modo, o espectro de massas no modo positivo da primina (identificada por RMN na seção 6.10.2) foi obtido (figura 43), onde a partir do pico de maior intensidade (100) com  $m/z$  209 do espectro no modo positivo, pôde-se identificar o íon pseudo-molecular  $[M+H]^+$ . Deste modo, confirmou-se assim a massa da molécula de primina como sendo 208 Da.

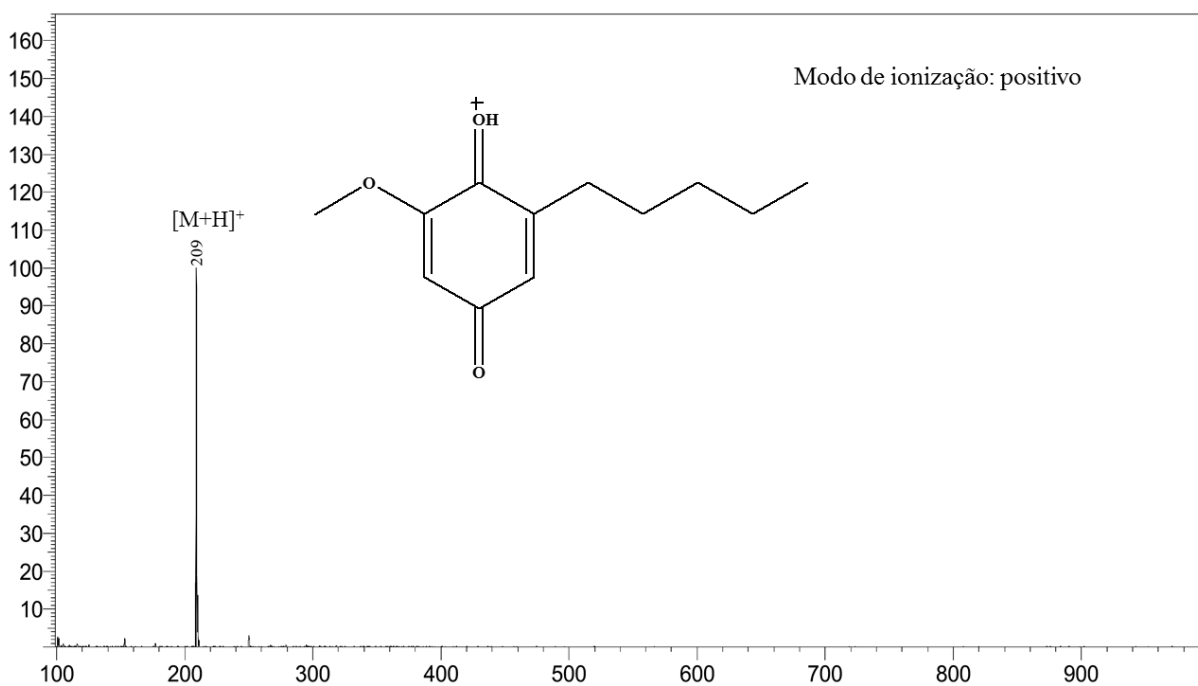


**Figura 41** - Perfil cromatográfico obtido nos modos positivo [TIC (+)] e negativo [TIC (-)] para a subfração A3, por LC-MS.

Fonte: DO AUTOR.



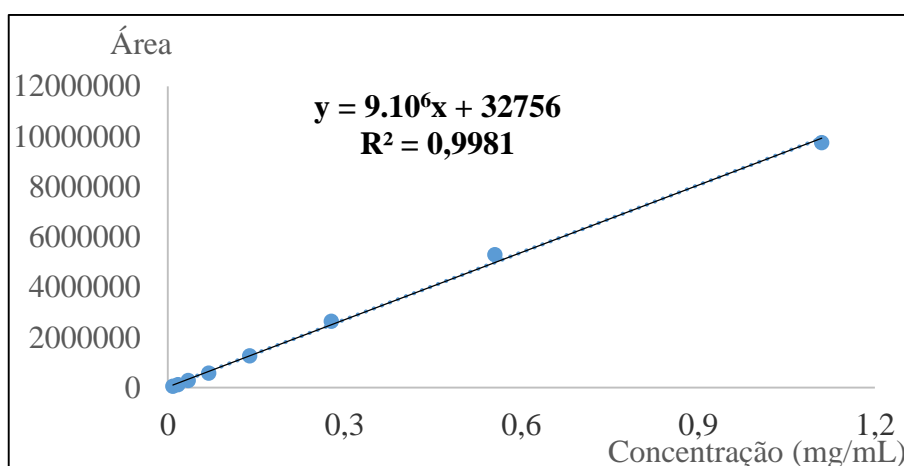
**Figura 42** - Espectro de massas obtidos no modo positivo para a miconidina.  
Fonte: DO AUTOR.



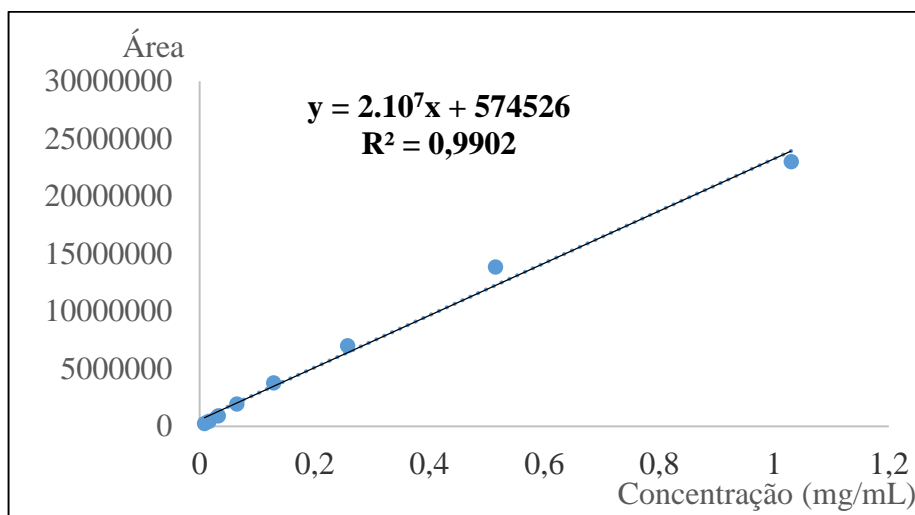
**Figura 43** - Espectro de massas obtido no modo positivo para a primina.  
Fonte: DO AUTOR.

## 6.12 QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS NAS AMOSTRAS DA *Miconia willdenowii*

As duas substâncias isoladas, miconidina e primina, puderam ser quantificadas em cada uma das amostras da *Miconia willdenowii* (extrato bruto, fração acetato e subfrações A2, A3 e A4, obtidos como descrito nas seções anteriores). Para isso, curvas padrão das duas substâncias puras (figuras 44 e 45), que correlacionam área do pico *versus* concentração, foram construídas a partir de cada uma das soluções preparadas em diferentes concentrações. A área dos picos em cada cromatograma foi obtida considerando-se o comprimento de onda de máxima absorção de cada substância, sendo  $\lambda_{MÁX} = 289$  nm para a miconidina e  $\lambda_{MÁX} = 268$  nm para a primina (de acordo com as figuras 17 e 18).



**Figura 44** - Curva analítica: área versus concentração da miconidina.  
Fonte: DO AUTOR.



**Figura 45** - Curva analítica: área versus concentração da primina.  
Fonte: DO AUTOR.

Pode-se observar a relação diretamente proporcional entre as áreas dos picos e as respectivas concentrações de cada uma das soluções. O valor do coeficiente de correlação ( $R^2$ ) das curvas, mostra a grande linearidade das curvas.

A partir das curvas, foram obtidas as equações das retas (figuras 44 e 45) que relacionam área (y) e concentração (x) das duas substâncias. As equações das curvas para o cálculo de cada uma das substâncias nas amostras foram tidas desconsiderando-se o valor do coeficiente linear, considerando-se assim a natureza delas sendo do tipo  $y = ax$ , fazendo-se  $b = 0$ . Conhecendo-se assim a área dos picos da miconidina e da primina em cada uma das amostras da *Miconia willdenowii*, ativas frente ao teste tripanocida, foi possível se calcular a concentração destas substâncias em % (m/m), considerando-se as massas iniciais, de cada amostra, utilizadas no preparo das soluções.

**Tabela 16** - Concentração das substâncias isoladas, em cada amostra da *Miconia willdenowii*.

<b>Amostra</b>	<b>%(m/m) Miconidina</b>	<b>% (m/m) Primina</b>
Extrato Bruto	0,26	0,006
Fração Acetato	0,37	0,47
Subfração A2	0,16	1,11
Subfração A3	14,54	5,5
Subfração A4	6,32	3,65

Fonte: DO AUTOR.

Os valores de % (m/m) das substâncias isoladas (tabela 16) permitem reconhecer, como esperado, que o fracionamento sequencial a partir do extrato bruto causa o enriquecimento dos compostos identificados, nas frações e mais ainda nas subfrações, uma vez que se elimina grande quantidade de compostos presentes na amostra inicial. É possível inferir também que o potencial anti-epimastigota apresentado pelas subfrações (de acordo com a tabela 5) pode estar diretamente relacionado com a presença das duas substâncias em cada subfração, onde é possível se perceber que A3 (mais ativa) possui maior quantidade de miconidina e primina que A4 (atividade intermediária), que por sua vez possui mais desses compostos que a subfração A2 (a menos ativa, dentre as três).

### 6.13 TESTE TRIPANOCIDA *in vitro* DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

Para se descobrir a existência ou não da relação entre a atividade tripanocida das amostras da *Miconia willdenowii* e a presença da miconidina e primina, caracterizadas na espécie vegetal neste trabalho, foi realizado o teste *in vitro* com a forma epimastigota (seção 5.5) com as soluções das substâncias isoladas, como mostra a tabela 17. Os dados nela relacionados, permitem observar que ambas as substâncias isoladas da *M. willdenowii* apresentaram maior atividade tripanocida contra a forma epimastigota que o próprio padrão utilizado, o benznidazol, que é a droga de referência utilizada atualmente na terapia da doença. Além disso, observou-se que a miconidina apresentou maior atividade que a primina.

**Tabela 17** - Valores de CE<sub>50</sub> obtidos no bioensaio para cada uma das substâncias isoladas.

<b>Amostra</b>	<b>*CE<sub>50</sub> (µg/mL)</b>
Miconidina	3,26
Primina	17,00
Benznidazol (padrão)	48,48

\*Valores de CE<sub>50</sub> apresentados como a média das triplicatas.

Fonte: DO AUTOR.

Sabe-se que as membranas dos epimastigotas são constituídas principalmente de bicamadas lipídicas onde se encontram inseridas algumas proteínas. Nelas estão presentes também algumas moléculas poliméricas formadas por 60% de carboidratos neutros, 12,6% de lipídeos, 9,5% de proteínas e os 17,9% restantes são de lipopeptídeofosfoglicanos (LEDEKREMER et al., 1977). Sabendo-se que os carboidratos neutros possuem alguns grupos hidroxilas em suas estruturas, o que lhes conferem um caráter mais polar, pode-se deduzir que a miconidina (mais polar) se apresenta mais ativa que a primina, por apresentar possivelmente maior interação com a membrana destes parasitas, causando ruptura dos mesmos ou ainda permitindo a passagem de maior quantidade do composto, pela membrana, para o interior do micro-organismo, embora os mecanismos de ação das substâncias nos parasitas ainda sejam desconhecidos.

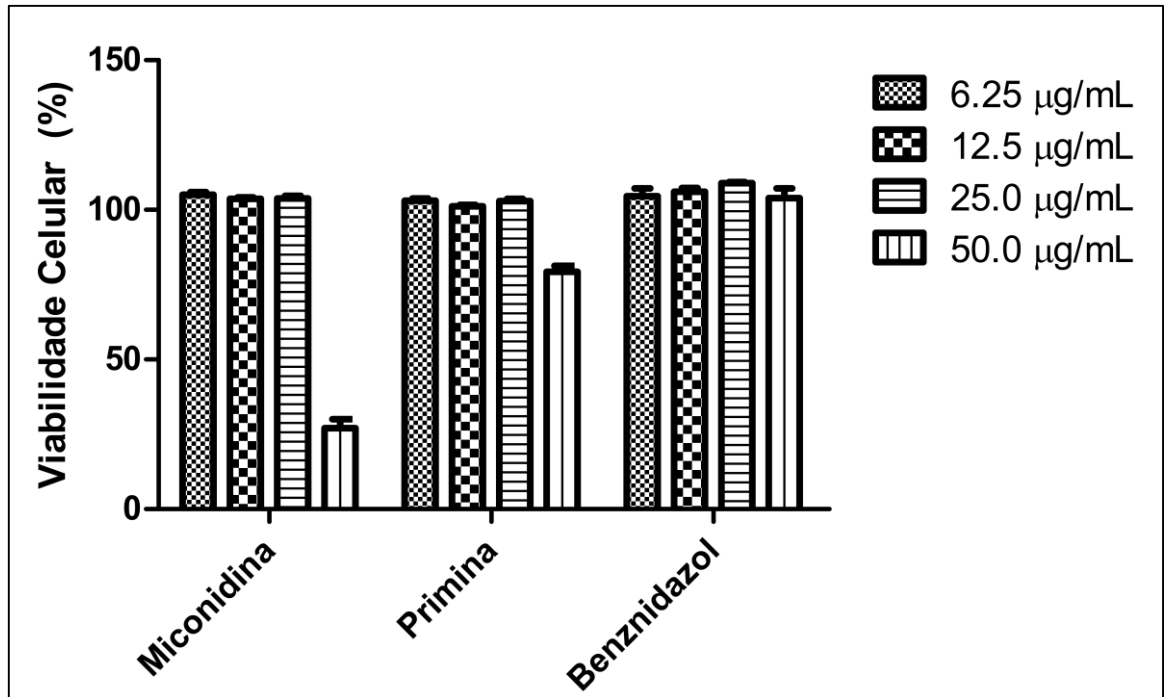
Apesar da primina apresentar menor potencial anti-epimastigota que a miconidina, ela ainda apresentou resultado satisfatório, com valor de CE<sub>50</sub> inferior que o próprio padrão, demonstrando o grande potencial da substância frente aos parasitas na forma epimastigota. Contudo, Tasdemir e colaboradores (2006), em seu trabalho com testes tripanocidas *in vitro*

com as formas tripomastigotas do *T. cruzi*, também conduzidos para a substância primina, relatam o potencial moderado apresentado por esta (10 vezes menor) quando comparado com o padrão benznidazol. Essa disparidade deve ser entendida considerando-se as diferentes formas de parasitas utilizados em cada um dos testes, bem como a metodologia utilizada nos mesmos. Apesar disso, vale a pena considerar o potencial antichagásico apresentado pelas moléculas do composto neste trabalho, na busca de modificações estruturais da mesma a fim de se alcançar resultados mais promissores.

Já em relação à miconidina, nenhum estudo acerca da atividade anti-*T. cruzi* foi encontrado na literatura, o que indica os resultados auspiciosos obtidos neste trabalho acerca da substância.

#### 6.14 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE COM OS COMPOSTOS ISOLADOS

O teste de citotoxicidade foi realizado com as duas substâncias isoladas (miconidina e primina) juntamente com o padrão benznidazol. Nele foram incluídos teste com DMSO que demonstrou que tal solvente não afetava a viabilidade das células testadas. Os resultados do teste são mostrados na figura 46, onde é possível se constatar que para ambas as substâncias isoladas de *M. willdenowii*, miconidina e primina, o efeito citotóxico só é observado a partir da concentração de 50 µg/mL, dentre as concentrações testadas. Já o padrão benznidazol, não apresentou citotoxicidade em nenhuma das concentrações analisadas. Considerando-se que as substâncias miconidina e primina se apresentaram eficientes no teste tripanocida em concentrações menores (3,26 e 17,00 µg/mL, respectivamente) que em relação ao efeito citotóxico observado, faz-se importante aqui enfatizar a grande expectativa de utilização destes compostos, ou ainda de algum derivado dos mesmos, na terapia da doença de Chagas, a partir de estudos posteriores.



**Figura 46** - Viabilidade celular das substâncias isoladas obtidas e do benznidazol, em quatro concentrações diferentes.

Fonte: DO AUTOR.

## 7 CONCLUSÃO

Em suma, o trabalho realizado permitiu o isolamento de compostos com grande potencial tripanocida *in vitro* nas formas epimastigotas de *T. cruzi*, a partir de uma estratégia por biomonitoramento de extrato bruto de plantas.

As espécies vegetais estudadas foram escolhidas tomando-se sua disponibilidade regional e ausência de estudos da maioria delas. A espécie vegetal com extrato bruto mais ativo, frente ao teste tripanocida *in vitro* utilizado neste trabalho, foi a *Miconia willdenowii*. Tal espécie não apresentava qualquer estudo fitoquímico descrito na literatura até o presente trabalho. Além disso, embora as outras espécies vegetais tenham apresentado menor potencial tripanocida, pôde-se observar que metade das espécies estudadas ainda apresentou atividade considerável frente aos parasitas *T. cruzi* na forma epimastigota, o que permite inferir que a grande riqueza vegetal regional, nos entornos do município de Alfenas, e em Minas Gerais como um todo, representa uma grande disponibilidade de diferentes compostos com grandes perspectivas de utilização na terapia não somente da doença de Chagas, mas também de diversas outras doenças negligenciadas.

As técnicas hífenadas utilizadas como HPLC-UV-DAD, assim como HPLC-MS, se mostraram como ferramentas fundamentais na separação e isolamento dos compostos, no estudo fitoquímico realizado. Além disso, a técnica de espectroscopia de RMN, permitiu ainda se conhecer melhor sobre as estruturas das moléculas obtidas, bem como observar sinais atípicos para a primina, advindos de acoplamentos ainda não descritos na literatura.

A quantificação dos compostos nas subfrações permitiu inferir sobre a relação entre a atividade tripanocida apresentada por elas com a quantidade de miconidina e primina, juntas, nestas amostras, deduzindo-se que a atividade anti-*T. cruzi* das amostras de *Miconia willdenowii* esteja associada principalmente à presença destas duas substâncias.

O alto potencial tripanocida frente a forma epimastigota de *T. cruzi* apresentado pelas duas substâncias isoladas, sendo mais eficientes ainda que a droga padrão de referência (benznidazol), e a citotoxicidade apresentada somente em concentrações superiores (dentre as testadas) permitem concluir que a miconidina e a primina possuem grande possibilidade de utilização no tratamento da doença de Chagas, fato este podendo ser confirmado com estudos posteriores. O maior potencial anti-epimastigota da miconidina comparado com o da primina, permitiu deduzir também sobre a diferença de interação destes compostos com os epimastigotas, abrindo questões para estudos sobre os mecanismos de ação (e de outras

moléculas similares) contra os protozoários desta espécie. Além disso, a modificação estrutural a partir destas moléculas com potencial já conhecido é um outro ponto crucial que pode tomar base neste trabalho na busca por novos medicamentos para a doença de Chagas, bem como outras diversas endemias.

## REFERÊNCIAS

- BRASIL. Academia Brasileira de Ciências. Ciência e Tecnologia para o Desenvolvimento Nacional. Estudos estratégicos. **Doenças Negligenciadas**. 2010. Disponível em <<http://www.abc.org.br/IMG/pdf/doc-199.pdf>>. Acesso em: 05 dez. 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. **Agenda nacional de prioridades de pesquisa em saúde**. 2008. Disponível em <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/AGENDA\\_PORTUGUES\\_MONTADO.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/AGENDA_PORTUGUES_MONTADO.pdf)>. Acesso em: 12 dez. 2014.
- BOLZANI, V. S. et al. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, p. 1837-1846, 2012.
- BRONDANI, D. J. et al. Synthesis and antitumour activity of the primim (2-methoxy-6-*n*-pentyl-1,4-benzoquinone) and analogues. **Medicinal Chemistry**. v. 3, p. 369-372, 2007.
- CAMARGO, E. P. Doenças tropicais. **Rev. Estudos Avançados**. v. 22, n. 64, p. 95-110, 2008.
- CHIARADA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**. v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.
- CORY, A. H. et al. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan for cell growth assays in culture. **Cancer Commun**. v. 3, n. 7, p. 207-212, 1991.
- CUNHA, L. C. et al. A própolis no combate a tripanossomatídeos de importância médica: uma perspectiva terapêutica para doença de Chagas e leishmaniose. **Revista de Patologia Tropical**. V. 40, n. 2, p. 105-124, 2011.
- DINIZ, L. F. **Avaliação do efeito do tratamento com benzimidazol em combinação com derivados azólicos na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi***. 2013. 107p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Departamento de Biologia, UFOP, Ouro Preto, 2013.
- FERREIRA, A. B. H. **Aurélio século XXI: o dicionário da Língua Portuguesa**. 3. ed. rev. e ampl. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1999.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICUPOLO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Rev. Estudos Avançados**. v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010.

HORPER, W.; MARNER, F. Biosynthesis of primim and miconidin and its derivatives. **Phytochemistry**. v. 41, n. 2, p. 451-456, 1996.

KAISER, C. R. RMN 2D: detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. **Química Nova**. v. 23, n. 2, p. 231-236, 2000.

KINGHORN, A. D. et al. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. **J. Nat. Prod.** v.74, n.6, p. 1539-1555, 2011.

LEDEKREMER, R. M. et al. Lipopeptidophosfoglycan from *Trypanosoma cruzi*. **Eur. J. Biochem.** v. 74, p. 263-267, 1977.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; Counter-current chromatography as a preparative tool - applications and perspectives. **Journal of Chromatography A**, v. 658, p. 315-341, 1994.

MOREIRA A. C. et al. Pharmaceutical patents on plant derived materials in Brazil: policy, law and statistics. **World Patent Information**. v. 28, p. 34-42, 2006.

MOREL, C. M. Inovação em saúde e doenças negligenciadas. **Cad. Saúde Pública**, v. 22, n. 8, p. 1522-1523, 2006.

MUGUANDE, O. F. et al. Avaliação da qualidade do Sistema de Vigilância Epidemiológica de doença de Chagas aguda em Minas Gerais. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 20, n. 3, p. 317-325, 2011.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural product as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod.**, v. 75, p. 311-335, 2012.

O'BRIEN, J. et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, p. 5421-5426, 2000.

OLIVEIRA, J. S.; MACHADO, K. C.; FREITAS, R. M. Produtos naturais aplicados a doenças negligenciadas: prospecção tecnológica. **Rev. Geintec.**, v. 4, n. 2, p. 729-734, 2014.

OLIVEIRA, F. R. A. M. et al. Prospecção tecnológica do acetato de carvacrolila e aplicações no setor industrial farmacêutico: ênfase em doenças negligenciadas. **Rev. Geintec.**, v. 3, n. 3, p. 103-110, 2013.

PAULSEN, E.; CHRISTENSEN, L. P.; ANDERSEN, K. E. Miconidin and miconidin methyl ether from *Primula obconia* Hance: new allergens in an old sensitizer. **Contact Dermatitis**. v. 55, p. 203-209, 2006.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à espectroscopia**. 4ª edição. Editora Cengage Learning. São Paulo, 2013.

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

PITA, S. S. R.; PASCUTTI, P. G. Alvos terapêuticos na Doença de Chagas: a Tripanotoma Redutase como foco. **Ver. Virtual Química**. v. 3, n. 4, p.307-324, 2011.

RODRIGUES, M. V. N. et al. O emprego de técnicas hífenadas no estudo de plantas medicinais. **MultiCiência** : Revista interdisciplinar dos centros e núcleos da Unicamp, Campinas, n. 7, 2006.

RÓLON, M. et al. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**., v. 99, p. 103-107, 2006.

SANTOS, A. S. R. Biodiversidade, bioprospecção, conhecimento tradicional e o futuro da vida. **Revista de Informação e Tecnologia**. Disponível em <<http://www.ccuec.unicamp.br/revista/infotec/artigos/silveira.html>> Acesso em 25/08/2013.

SANTOS, T. T.; MEIRELLES, R. M. S. A abordagem das doenças negligenciadas na educação em saúde: análise das atas dos ENPECs entre 2009 e 2011. In: ENCONTRO NACIONAL DE PESQUISA EM EDUCAÇÃO EM CIÊNCIAS, 9, 2013, Águas de Lindóia, SP. **Atas...** Águas de Lindóia: ENPEC, 2013. p. 1-8.

SILVA M. C.; CARVALHO J. C. T. Plantas medicinais, fitoterápicos, anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. **Tecmedd**. Ribeirão Preto, SP, p.480, 2004.

SOBRINHO, J. L.S. et al., Doença de Chagas: 100 anos de descoberta. **Rev. Bras. Farm.** v. 90, n. 4, p. 283-289, 2009.

SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, v. 62, p. 817-836, 2003.

TASDEMIR, D. et al., Antituberculotic and antiprotozoal activities of primin, a natural benzoquinone: *in vitro* and *in vivo* studies. **Chemistry & Biodiversity**. v. 3, p. 1230-1237, 2006.

VIEGAS JR., C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WILDING, B. et al. An investigation of nitrile transforming enzymes in the chemo-enzymatic synthesis of the taxol sidechain. **Org. Biomol. Chem.** v. 13, p. 7803-7812, 2015.