Universidade Estadual Paulista - UNESP
"Júlio de Mesquita Filho"
Instituto de Química de Araraquara
Departamento de Química Orgânica

Estudo químico de *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae), síntese e potencial farmacológico de alcalóides guanidínicos e análogos

Luis Octávio Regasini
Doutorando

Profa. Dra. Vanderlan da Silva Bolzani
Orientadora

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química – Campus de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, como requisito para a obtenção do título de Doutor, no curso de pós-graduação em Química, área de concentração Química Orgânica

Araraquara – SP
2008

DADOS CURRICULARES

Dados pessoais
Nome: Luis Octávio Regasini
Filiação: Shirlei Regasini
Nascimento: 30 de julho de 1979
Nacionalidade: brasileiro
Estado civil: solteiro

Endereço Profissional

NuBBE – Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Rua Francisco Degni, SN, Bairro Quitandinha, Araraquara-SP, Cep 14800-900
Telefones: 16-33016600 (ramais 6793 ou 6785)

regasini@iq.unesp.br

#Formação Acadêmica

(1) Graduação em Farmácia-Bioquímica pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP – Araraquara (1998-2002) – Modalidade Fármacos e Medicamentos;

(2) Doutorado Direto em andamento pelo Instituto de Química - UNESP, Araraquara: "Estudo químico de *Pterogyne nitens*, síntese e avaliação farmacológica e toxicológica de alcalóides guanidínicos e análogos antitumorais potenciais".

#Bolsas concedidas

(1) Bolsista de Iniciação Científica – FAPESP (2000 -2002)

Título do projeto: Estudo químico biomonitorado de *Piper arboreum* (Piperaceae), isolamento e modificações estruturais em amidas antifúngicas

(2) Bolsista de Doutorado Direto – FAPESP (2003 – 2007)

Título do projeto: Estudo fitoquímico de *Pterogyne nitens* (Leguminosae), síntese e avaliação farmacológicas de alcalóides guanidínicos naturais e análogos antitumorais

(3) Atividade docente

Ano 2005 -Disciplina de Química Orgânica, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química – UNESP – Araraquara

Ano 2007 -Disciplina de Química Farmacêutica, Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara

 # Prêmios

(1) Menção Honrosa no XIII Congresso de Iniciação científica da UNESP
"Potencial antifúngico de extratos, amidas isoladas e modificadas de *Piper arboreum* e *P. tuberculatum*"
(2) Menção Honrosa no 3rd Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry
"Synthesis and Preliminary SAR Studies of Cytotoxic Prenylguanidines from *Pterogyne nitens*"
(3) Apresentação oral na 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química "Potencial anti-chagásico de cromenos naturais e análogos semi-sintéticos de *Piper aduncum* e *P. gaudichaudianum* (Piperaceae)"
(4) Apresentação oral na 30ª Reunião Annual da Sociedade Brasileira de Química
"Alcalóides guanidino-terpênicos de *Pterogyne nitens*: isolamento, síntese e atividade antitumoral"

 # Artigos completos publicados em periódicos

"Composition and antifungal activity of essential oil from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*"
Química Nova, Volume 29, Número 3, 2006.
"Flavonols from *Pterogyne nitens* and their evaluation as myeloperoxidase inhibitors"
Phytochemistry (**no prelo**)
"Natural chromenes and derivatives as potential trypanocidal agents"
Biological and Pharmaceutical Bulletin (**no prelo**)

 # Artigos submetidos para publicação

"Further cytotoxic guanidine alkaloids from *Pterogyne nitens*"
Journal of Natural Products

"Myelperoxidase inhibitory and antioxidant activities of flavones from *Pterogyne nitens*"
Life Sciences

"Radical scavenging activity of *Pterogyne nitens*"
Fitoterapia

"Potential trypanocidal activity of amides from Piper tuberculatum and their derivatives"

Biological and Pharmaceutical Bulletin

#Últimos resumos publicados em anais de congressos

(1) ***30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química***

(a) APRESENTAÇÃO ORAL - Alcalóides guanidino-terpênicos de *Pterogyne nitens*: isolamento, síntese e atividade antitumoral
(b) Novo flavonol obtido de *Pterogyne nitens* (Fabaceae) com ação inibitória sobre mieloperoxidase
(c) Avaliação eletroquímica de flavonóides obtidos de *Pterogyne nitens* (Fabaceae) empregando voltametria cíclica
(d) Potencial anti-chagásico de amidas isoladas e análogos semi-sintéticos de *Piper tuberculatum* (Piperaceae)

(2) ***The 48th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy***

(a) Further cytotoxic guandine alkaloids from *Pterogyne nitens* (Fabaceae)
(b) Myeloperoxidase inhibitory flavonoids from fruits and leaves of *Pterogyne nitens* (Fabaceae)

(3) ***Primeiro Simpósio Paulista de Farmacognosia***

(a) Avaliação do efeito de *Pterogyne nitens* em ratos diabéticos sobre parâmetros fisiológicos
(b) Atividade sequestradora de radicais livres de extratos obtidos de *Pterogyne* nitens (Fabaceae)
(c) Atividade antioxidante e antifúngica de extratos obtidos de *Alchornea glandulosa*
(d) Rastreamento de genotoxicidade do extrato acetato de etila de *Pterogyne nitens*, utilizando o ensaio de micronúcleo em *Trandescantia pallida*

(4) ***6th INTERNATIONAL CONGRESS OF PHARMACEUTICAL SCIENCES (CIFARP-2007)***

(a) Antimicrobial activity of *Pterogyne nitens* towards opportunistic fungus
(b) Interaction of potential antimalarial guanidine alkaloids from *Pterogyne nitens* (Leguminosae) with heme using spectrophotometry
(c) Potential antifungal agents: amides and their derivatives from *Piper tuberculatum* (Piperaceae)
(d) Trypanocidal activity of extracts from five *Piper species* (Piperaceae)
(e) Myeloperoxidase inhibition by isolated *Pterogyne nitens* secondary metabolites

(5) ***54ª Jornada Farmacêutica da UNESP*** - Atividade imunológica do extrato etanólico de *Pterogyne nitens* em cultura de macrófagos peritoneais

(6) ***"First Brazilian Conference on Natural Products (BCNP)"***

(a) Synthesis and SAR studies of antifungal analogues of galegine
(b) Potential antimalarial and antioxidant activities of gallic acid and their semi-synthetic esters
(c) Two new flavonols from the leaves of *Arrabidaea brachipoda* (Bignoniaceae)
(d) Study of interaction of potential antimalarial guanidine alkaloids and flavonoids from *Pterogyne nitens* (Leguminosae) with heme using spectrophotometry

(e) Myeloperoxidase inhibitory flavonoids from fruits and leaves of *Pterogyne nitens* (Fabaceae)

(7) ***International Symposium on Drug Discovery and IX National Meeting of Medicinal Chemistry Professors*** – Síntese e atividade antitumoral de uma geranilguanidina *N*-benzoilada planejada à partir da nitensidian A, um alcalóide isolado de *Pterogyne nitens*"

(8) ***29ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química***
(a) Novo alcalóide guanidínico isolado dos frutos de *Pterogyne nitens* (Leguminosae)
(b) Atividade antiinflamatória e constituinte químicos das folhas de *Pterogyne nitens* (Leguminosae)
(c) APRESENTAÇÃO ORAL Potencial anti-chagásico de cromenos naturais e análogos semi-sintéticos de *Piper aduncum* e *P. gaudichaudianum* (Piperaceae)

(9) ***Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins (SIMCRO)*** Busca de substâncias antioxidantes em *Pterogyne nitens* (Leguminosae) empregando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica

(10) ***International Conference on Biodiversity and Natural Products (IUPAC – 2006)*** "Current developments on Drug Discovery from Brazilian Biodiversity: the experience of the Biota-Fapesp Program"

(11) ***28ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química***
(a) Constituintes químicos antiproliferativos e antioxidantes dos caules e folhas de *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae)
(b) Relação estrutura-atividade antioxidante via CLAE-DEQ dos metabólitos prenilados de *Piper crassinervium* (Piperaceae)
(c) Flavonóis glicosilados de *Pterogyne nitens* (Leguminosae)

“Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar
a vida com paixão, perder
com classe e vencer com ousadia,
pois o triunfo pertence a quem se atreve...
A vida é muita para ser
insignificante.”

Charles Chaplin

Dedico esta tese ...

Romaria
Elis Regina
Composição: Renato Teixeira

É de sonho e de pó
O destino de um só
Feito eu perdido
Em pensamentos
Sobre o meu cavalo...

É de laço e de nó
De jibeira o jiló
Dessa vida
Cumprida a só..

Sou caipira, pirapora, Nossa
Senhora de Aparecida
Ilumina a mina escura e funda
O trem da minha vida...

O meu pai foi peão
Minha mãe solidão
Meus irmãos
Perderam-se na vida
À custa de aventuras...

Descasei, joguei
Investi, desisti
Se há sorte
Eu não sei, nunca vi...

Sou caipira, Pirapora, Nossa
Senhora de Aparecida
Ilumina a mina escura e funda
O trem da minha vida...

Me disseram, porém
Que eu viesse aqui
Prá pedir de
Romaria e prece
Paz nos desaventos...
Como eu não sei rezar
Só queria mostrar
Meu olhar, meu olhar

À minha história e à minha mãe
pelas lutas que a vida nos trouxe ...
"Das máquinas de costura aos
alcalóides guanidínicos de
***Pterogyne nitens*"**

Tocando em Frente
Almir Sater
Composição: Almir Sater e Renato Teixeira

Ando devagar porque já tive pressa
E levo esse sorriso porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei
Ou nada sei

Conhecer as manhas e as manhãs,
O sabor das massas e das maçãs,
É preciso amor pra poder pulsar,
É preciso paz pra poder sorrir,
É preciso a chuva para florir

Penso que cumprir a vida seja simplesmente
Compreender a marcha e ir tocando em frente
Como um velho boiadeiro levando a boiada
Eu vou tocando dias pela longa estrada eu vou
Estrada eu sou

Conhecer as manhas e as manhãs,
O sabor das massas e das maçãs,
É preciso amor pra poder pulsar,
É preciso paz pra poder sorrir,
É preciso a chuva para florir

Todo mundo ama um dia todo mundo chora,
Um dia a gente chega, no outro vai embora
Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz
E ser feliz

Conhecer as manhas e as manhãs
O sabor das massas e das maçãs
É preciso amor pra poder pulsar,
É preciso paz pra poder sorrir,
É preciso a chuva para florir

Ando devagar porque já tive pressa
E levo esse sorriso porque já chorei demais
Cada um de nós compõe a sua história,
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz
E ser feliz

À minha história e aos meus amigos Caio e Adriana por saberem metaforizar a letra de Renato Teixeira e Almir Sater e pela lealdade, amor, carinho e compreensão

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado o prazer de conhecer a vida ...

À minha mãe por me ensinar a como dar valor a essa vida, por seu carinho, compreensão e por termos ido a luta e ter chegado à universidade ...

À minha orientadora e "mãe científica" Vanderlan pela paciência, por acreditar no meu potencial e por sua lucidez científica e uma maneira muito ousada de enxergar a Química de Produtos Naturais e principalmente pelos desafios sugeridos durante todos esses anos ...

Ao meu co-orientador e mestre Eliezer, o qual instigou minha paixão pela Química Farmacêutica e mesmo que distante, sua ousadia e agressividade intelectual me contagiam ...

À Profa. Dulce (Dudu) como o seu nome mesmo diz , por sua doçura, discussões e por me incentivar nessa longa caminhada ...

Ao meu amigo e professor Ian, pelas discussões filosóficas e pelo apoio e por todas as cervejas...

À Profa. Maysa Furlan pelo convívio durante cinco anos de minha iniciação científica e pelos primeiros ensinamentos ...

À Profa. Fatima (DQ-UFSCAR) pelos seus ensinamentos de Química Orgânica e Biossíntese ...

À profa. Lúcia Xavier pelos seus ensinamentos de RMN e pelo incentivo durante esses anos ...

À minha amiga Adriana por me ensinar o caminho da amizade, por estar presente na minha vida, na minha história, sem você esse lugar vai ficar um pouco chato demais...

Às minhas amigas Vaninha, Mariana e Inara pelo companheirismo e carinho ...

Aos meus amigos Fernanda, Amanda, Marcos, Nina, Fernando e Breno por se fazerem presentes em moments tão difíceis ...

Aos meus amigos Profa. Hosana e João Oiano pelo incentivo ...

Aos companheiros do NuBBE: Aline, Camila, Néia, Ioanis, Wanessa, Douglas, Guilherme, Andreinha, João Marcos, Sílvia, Lidiane, Débora, André, Karin, Marcos Marçal, Otávio, Luciana, Japinha, Renata, Magela, Cristiano, Patrícia Pauletti (desculpas se esqueci alguém o NuBBE está crescendo cada vez mais ...)

Em especial, à minha aluna de IC Daniara, pela qual aprendi mais do que ensinei, obrigado pelas constantes motivações ...

Ao meu aluno de IC Mike, por me ajudar muito no final do trabalho experimental e pela sua amizade...

Aos ensinamentos da vida e da alegria, Alberto, Nivaldo (papai NOE) e Helinha ...

Aos funcionários do IQ ...

À Fapesp pelas bolsas concedidas ...

Aos professor João Aristeu por despertar meu nacionalismo ...

Ao professor Sandro por mostrar o caminho da ciência e por me informar a frase de Virgílio "Eles podem, porque pensam que podem"...

A Profa. Márcia por me ensinar ética ...

A Profa. Ana Dóris pelas discussões e risadas ...

Às profas. Marcia Nasser, Angelinha e Adelia pela ajuda durante minha iniciação como docente...

Aos colaboradores do presente trabalho: Letícia Veras Costa-Lotufo, Christiane Pienna, Olga Mascarenhas, Vellosa, Maria J. Giannini, Susana Zacchino ...

ABSTRACT

The phytochemical study of the stems, leaves, fruits and flowers of *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae) furnished five new compounds: nitensidine D (**42**), nitensidine E (**43**), nitensoside A (**45**), nitensoside B (**47**), pterogynoside (**51**), and 19 known compounds, pterogynine (**1**), pterogynidine (**2**), pedalin (**7**), sorbifolin (**44**), pedalitin (**46**), kaempferol (**48**), afzelin (**49**), kaempferitrin (**50**), quercetin (**52**), isoquercitrin (**53**), rutin (**54**), quercetin 3-*O*-sophoroside (**55**), taxifolin (**61**), astilbin (**62**), ourateacatechin (**63**) and caffeic (**56**), ferulic (**57**), sinapic (**58**), chlorogenic (**59**) and gallic (**60**) acids. All flavonols and flavones were evaluated for their myeloperoxidase (MPO) inhibitory activity. In general, flavonoids that posses the ring B with a cathecol pattern are shown to display a major inhibitory effect on MPO than 4'-hydroxyl-flavonoids. The flavonoids, **46**, **52**, **53**, **54**, and **55** were active, and exhibited IC_{50} values of 3,75, 1,22, 3,75, 3,60 and 3,72 nM, respectively. Additionally, the radical scavengers of the flavones and flavonols was evaluated towards ABTS and DPPH. The guanidine alkaloids from *P. nitens* were selected as prototype compounds for antitumor and antifungal analogue design, and a series of 24 synthetic compounds (mono and disubstituted guanidines with isoprenyl, geranyl or farnesyl groups, and bioisosters) have been prepared using synthetic protocols previously described with minor modifications. The guanidine derivatives and their analogues were evaluated towards four cancer cell lines and nine human pathogenic fungi strains. The qualitative structure-activity relationship studies were concentrated on two regions of the molecular structures of the alkaloids: at the guanidine nucleus and at the prenyl side chain. Preliminary observations on the synthetic guanidine structural features, and their biological activity could be inferred, such as guanidine derivatives containing the farnesyl or genanyl groups were the most potent than isoprenylguanidines. Also, the biosisosteric replacement of the guanidine nucleus by thiourea or urea functions decreased the fungitoxic and antiproliferative activities. Guanidine derivatives **83** and **84** significantly inhibited *in vitro* growth of tumor cells [MDA-MB-435 (breast), HL-60 (leukaemia), SF-295 (glyoblastoma), HCT-8 (colon)] and fungi strains. (*Candida albicans, C. tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus, A. flavus*, *A. niger*; *Microsporum gypseum*, *Tricophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*).

RESUMO

O estudo fitoquímico dos caules, folhas, frutos e flores de *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae) forneceu cinco substâncias inéditas: nitensidina D (**42**), nitensidina E (**43**), nitensosídeo A (**45**), nitensosídeo B (**47**), pteroginosídeo (**51**) e 19 substâncias conhecidas, pteroginina (**1**), pteroginidina (**2**), pedalina (**7**), sorbifolina (**44**), pedalitina (**46**), kaempferol (**48**), afzelina (**49**), kaempferitrina (**50**), quercetina (**52**), isoquercitrina (**53**), rutina (**54**), quercetina 3-*O*-soforosídeo (**55**), taxifolina (**61**), astilbina (**62**), ourateacatequina (**63**) e os ácidos cafeico (**56**), ferúlico (**57**), sinápico (**58**), clorogênico (**59**) e gálico (**60**) . Todos os flavonóis e flavonas foram submetidos ao ensaio bioquímico com mieloperoxidase (MPO). De maneira geral, os flavonóides com padrão catecólico no anel B mostraram maior efeito inibitório sobre a MPO que os 4'-hidroxi-flavonóides. Os flavonóides mais ativos, **46**, **52**, **53**, **54**, e **55** exibiram valores de CI_{50} de 3,75, 1,22, 3,75, 3,60 e 3,72 nM, respectivamente. Adicionalmente, a capacidade seqüestradora de radicais dos flavonóis e flavonas foi avaliada sobre os radicais ABTS e DPPH. Os alcalóides guanidínicos de *P. nitens* foram selecionados como modelos para o planejamento e síntese de análogos antitumorais e antifúngicos. Uma série de 24 substâncias sintéticas, incluindo guanidinas mono e dissubstituídas, e seus bioisósteros foi preparada empregando-se protocolos descritos na literatura com pequenas modificações. Os derivados guanidínicos sintéticos e seus análogos foram avaliados em quatro linhagens de células tumorais e nove cepas fúngicas. Os estudos de relação estrutura-atividade qualitativa foram concentrados sobre duas regiões das estruturas moleculares dos alcalóides: o núcleo guanidínico e a cadeia prenílica lateral. Observações preliminares sobre algumas características estruturais das guanidinas sintéticas e suas atividades biológicas puderam ser inferidos, tais como: derivados guanidínicos contendo os grupos geranila ou farnesila mostraram ser mais potentes que as isoprenilguanidinas e a troca bioisostérica do núcleo guanidínico por uréia ou tiouréia diminuíram a fungitoxicidade e o efeito antiproliferativo. Os derivados guanidínicos **83** e **84** mostraram maior atividade inibitórias sobre o crescimento de células tumorais [MDA-MB-435 (mama), HL-60 (leucemia), SF-295 (glioblastoma), HCT-8 (cólon)] e das cepas fúngicas *in vitro* de células tumorais e cepas fúngicas (*Candida albicans, C. tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus, A. flavus*, *A. niger*; *Microsporum gypseum*, *Tricophyton rubrum*; *T. mentagrophytes*).

SUMÁRIO

Capítulo 1. Considerações preliminares e Objetivos 01

Capitulo 2. Estudo químico de *Pterogyne nitens* 03

1. Introdução..... 03
1.1. *Pterogyne nitens* Tulasne (Fabaceae – Caesalpinioideae)..... 03
1.2. Derivados guanidínicos obtidos de vegetais superiores..... 05
1.2.1. Alcalóides guanidínicos de Fabaceae..... 05
1.2.2. Alcalóides guanidínicos de Euphorbiaceae..... 07
1.2.3. Alcalóides guanidínicos de Bignoniaceae..... 09
1.2.4. Alcalóides guanidínicos de Asteraceae e Ranunculaceae..... 10
1.2.5. Ciclopeptídeos com resíduos de arginina obtidos de Amaranthaceae e Caryophyllaceae..... 10
1.2.6. Biogênese de alcalóides guanidínicos..... 12
2. Substâncias isoladas..... 15
3. Extração e isolamento..... 17
3.1. Coleta e identificação do material botânico..... 17
3.2. Preparo dos extratos e frações..... 17
3.3. Isolamento dos metabólitos e secundários..... 18
3.3.1. Constituintes químicos das folhas..... 19
3.3.2. Constituintes químicos dos frutos..... 21
3.3.3. Constituintes químicos das flores..... 23
3.3.4. Constituintes químicos dos caules..... 26
3.3.5. Observações gerais..... 26
4. Determinação estrutural..... 28
4.1. Alcalóides guanidínicos..... 28
4.1.1. Pteroginina (**1**) e pteroginidina (**2**)..... 28
4.1.2. Nitensidina D (**42**) e nitensidina E (**43**)..... 29
4.2. Flavonas..... 34
4.2.1. Sorbifolina (**44**) e nitensosídeo A (**45**)..... 34
4.2.2. Pedalitina (**46**), pedalina (**7**) e nitensosídeo B (**47**)..... 37
4.3. Flavonóis..... 40
4.3.1. Kaempferol e seus ramnosídeos (**48** – **51**)..... 40
4.3.2. Quercetina e seus glicosídeos (**52** – **55**)..... 44
4.4. Ácidos fenólicos (**56** – **60**)..... 48
4.5. Diidroflavonóis (**61** – **62**) e ourateacatequina (**63**)..... 50

Capitulo 3. Síntese de derivados guanidínicos e análogos

1. Introdução..... 53
2. Substâncias sintetizadas..... 62
3. Planejamento e síntese 64
3.1 Planejamento da síntese e dos estudos preliminares de relação 64

estrutura – atividade qualitativa.....
3.2. Procedimentos experimentas..... 69
3.2.1. Preparo da *bis*-Boc-*S*-metilisotiouréia **67**..... 69
3.2.2. Preparo das isotiouréias **68** – **70**..... 69
3.2.3. Preparo da diuretanas **71** – **73**..... 70
3.2.4. Preparo da *tri*-Boc-ganidina **78**..... 70
3.2.5. Preparo das triuretanas **79** – **81**..... 70
3.2.6. Obtenção dos metanossulfonatos de prenilguanidinas **71** – **73**, **79** – **81** e **94**..... 71
3.2.7. Preparo da *N*-acilguanidina **87**..... 71
3.2.8. Preparo dos análogos oxigenado **90** e sulfurado **91**..... 72
3.2.9. Preparo das diuretanas **92** e **93**..... 72
4. Dados físicos e espectroscópicos das substâncias sintetizadas..... 73

Capitulo 4. Potencial famacológico das substâncias isoladas e sintetizadas 84

1. Atividades antitumoral e hemolítica..... 84
1.1. Câncer e agentes antineoplásicos..... 84
1.2. Procedimento experimental..... 84
1.3. Resultados e discussões..... 86
2. Atividade antifúngica..... 89
2.1. Importância das micoses e agentes antifúngicos..... 89
2.2. Procedimento experimental..... 89
2.2.1. Microrganismos e condições de cultivo (A)..... 89
2.2.2. Teste antifúngico (A)..... 90
2.2.3. Microrganismos e condições de cultivo (B)..... 90
2.2.4. Teste antifúngico (B)..... 91
2.3. Resultados e discussões..... 91
3. Atividades anttioxidante e inibitória frente à mieloperoxidase..... 94
3.1. Mieloperoxidase e inflamação..... 94
3.2. Radicais livres e antioxidantes..... 95
3.3. Procedimentos experimentais..... 95
3.4. Resultados e discussões..... 96

Capítulo 5. Considerações finais 99

Capítulo 6. Materiais e Métodos 101

6.1. Métodos cromatográficos..... 101
6.1.1. Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA)..... 101
6.1.2. Cromatografia em coluna (CC-FN e CC-FR)..... 102
6.1.3. Cromatografia em coluna de permeação em gel (CPG)..... 102
6.1.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)..... 102
6.2. Métodos espectroscópicos e espectrométricos..... 103
6.3. Atividade óptica e intervalo de fusão..... 103
6.4. Reagentes e solventes..... 104

Capítulo 7. Referências 105

Capítulo 8. Espectros de RMN 115

Capítulo 9. Espectros de massas 202

Capítulo 10. Espectros no IV e UV 216

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 01	Biogênese de derivados guanidínicos de plantas.....	**14**
Esquema 02	Estruturas moleculares das substâncias isoladas de *Pterogyne nitens* descritas neste tabalho.....	**16**
Esquema 03	Preparação dos extratos e frações.....	**17**
Esquema 04	Fracionamento cromatográfico de AcOEt-FOL.....	**19**
Esquema 05	Fracionamento cromatográfico de Bu-FOL.....	**20**
Esquema 06	Fracionamento cromatográfico de AcOEt-FRU.....	**22**
Esquema 07	Fracionamento cromatográfico de Bu-FRU.....	**23**
Esquema 08	Fracionamento cromatográfico de AcOEt-FLO.....	**24**
Esquema 09	Fracionamento cromatográfico de BuOH-FLO.....	**25**
Esquema 10	Fracionamento cromatográfico de HA-FLO.....	**25**
Esquema 11	Planejamento geral para a síntese de derivados guanidínicos.....	**54**
Esquema 12	Reagentes guanilantes mais empregados em rotas de preparação de derivados guanidínicos.....	**55**
Esquema 13	Conversão de tioréias em isotiouréias e transformações destas em guanidinas.....	**56**
Esquema 14	Conversão de tiouréias monossubstituídas em guanidinas dissubstítuidas segundo protocolo desenvolvido por Mills.....	**57**
Esquema 15	Conversão de tiouréias monossubstituídas em guanidinas segundo protocolo desenvolvido por Ramadas.....	**57**
Esquema 16	Conversão de tiouréias em guanidinas monossubstituídas segundo protocolo desenvolvido por Qian.....	**58**
Esquema 17	Conversão de tiouréias em guanidinas segundo protocolo desenvolvido por Srinivasan.....	**58**
Esquema 18	Conversão de *N*-aciltiouréias em *N*-acilguanidinas segundo protocolo desenvolvido por Cunha.....	**58**
Esquema 19	Conversão de isotiouréias em guanidinas segundo protocolo desenvolvido por Kim.....	**59**
Esquema 20	Obtenção de guanidinas à partir de álcoois segundo protocolo desenvolvido por kozikowshi.....	**59**
Esquema 21	Reação de guanidinilação na presença de hidreto de sódio.....	**60**
Esquema 22	Reação de guanidinilação realizada por álcoois sob condições de Mitsunobu.....	**60**
Esquema 23	Reação de guanidinilação em meio bifásico na presença de catalisador de trânsferencia de fase.....	
Esquema 24	Estruturas moleculares das substâncias sintetizadas descritas neste trabalho.....	**63**
Esquema 25	Planejamento para os estudos de relação estrutura-atividade qualitativos de derivados guanidínicos bioativos.....	**64**
Esquema 26	Planejamento sintético para a obtenção de derivados guanidínicos *N*-monossubstituídos (**74** – **76**).....	**65**
Esquema 27	Planejamento sintético para a obtenção de derivados guanidínicos *N,N'*-dissubstituídos (**82** – **84**).....	**66**

Esquema 28	Planejamento da síntese da *N*-acilguanidina (**87**).....	**67**
Esquema 29	Preparo dos bioisósteros geraníllicos *N*,*N*'-dissubstituídos (**90** – **91**).....	**67**
Esquema 30	Planejamento da rota sintética para a obtenção da guanidina *N*,*N*'-dissubstituída assimetricamente **94** e intermediário **92**.....	**68**

LISTA DE TABELAS

Tabela 01.	Estimativa dos rendimentos dos processos de extração e partição líquido-líquido.....	**18**
Tabela 02.	Estimativa dos rendimentos dos processos de isolamentos das substâncias presentes nas folhas, frutos, caules e flores de *Pterogyne nitens*.....	**27**
Tabela 03.	Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C dos alcalóides **1** e **2** (11,7T; DMSO-d_6).....	**29**
Tabela 04.	Dados de RMN uni e bidimensionais do alcalóide **42** (11,7T; DMSO-d_6).....	**31**
Tabela 05.	Dados de RMN uni e bidimensionais do alcalóide **43** (11,7T; DMSO-d_6).....	**33**
Tabela 06.	Dados de RMN das flavonas **44** e **45** (11,7T; DMSO-d_6).....	**36**
Tabela 07.	Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C das flavonas **7** e **46** (11,7T; DMSO-d_6).....	**38**
Tabela 08.	Dados de RMN uni e bidimensionais da flavona **47** (11,7T; DMSO-d_6).....	**40**
Tabela 09.	Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C dos flavonóis **48** – **50** (11,7T; DMSO-d_6)..	**42**
Tabela 10.	Dados de RMN uni e bidimensionais do flavonol **51** (11.7T; CD_3OD)..	**44**
Tabela 11.	Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C dos flavonóis **52** e **53** (11,7T; DMSO-d_6)..	**46**
Tabela 12.	Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C dos flavonóis **54** e **55** (11,7T; DMSO-d_6)..	**47**
Tabela 13.	Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C dos fenilpropanóides **56** – **58** (11,7T; DMSO-d_6).....	**49**
Tabela 14.	Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C dos ácidos fenólicos **52** e **53** (11,7T; DMSO-d_6)	**50**
Tabela 15.	Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C das substâncias fenólicas **61** – **63** (11,7T)	**52**
Tabela 16.	Atividade antitumoral de derivados guanidínicos naturais, derivados guanidínicos sintéticos e seus análogos.....	**88**
Tabela 17.	Atividade antifúngica de algumas substâncias isoladas de *Pterogyne nitens*.....	**92**
Tabela 18.	Atividade antifúngica de derivados guanidínicos e análogos.....	**93**
Tabela 19.	Atividade antioxidante e inibitória frente à mieloperoxidase (MPO) de flavonóides isolados de *Pterogyne nitens*.....	**97**

LISTA DE FIGURAS

Figura 001	Espectro de RMN de ^{1}H da substância **1** (DMSO-d_6, 11,7 T)....	**115**
Figura 002	Espectro de RMN de ^{13}C da substância **1** (DMSO-d_6, 11,7 T)..	**115**
Figura 003	Espectro de RMN de ^{1}H da substância **2** (DMSO-d_6, 11,7 T)....	**116**
Figura 004	Espectro de RMN de ^{13}C da substância **2** (DMSO-d_6, 11,7 T)..	**116**
Figura 005	Espectro de RMN de ^{1}H da substância **42** (DMSO-d_6, 11,7 T)..	**117**
Figura 006	Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da substância **42** (DMSO-d_6, 11,7 T).....	**117**
Figura 007	Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da substância **42** (DMSO-d_6, 11,7 T).....	**118**
Figura 008	Espectro de RMN de ^{13}C da substância **42** (DMSO-d_6, 11,7 T)	**118**
Figura 009	Mapa de contornos *g*HMQC da substância **42** (DMSO-d_6, 11,7 T).....	**119**
Figura 010	Ampliação do mapa de contornos *g*HMQC da substância **42** (DMSO-d_6, 11,7 T).....	**119**
Figura 011	Ampliação do mapa de contornos *g*HMQC da substância **42** (DMSO-d_6, 11,7 T).....	**120**
Figura 012	Mapa de contornos *g*HMBC da substância **42** (DMSO-d_6, 11,7 T).....	**120**
Figura 013	Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **42** (DMSO-d_6, 11,7 T).....	**121**
Figura 014	Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **42** (DMSO-d_6, 11,7 T).....	**121**
Figura 015	Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **42** (DMSO-d_6, 11,7 T).....	**122**
Figura 016	Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **42** (DMSO-d_6, 11,7 T).....	**122**
Figura 017	Espectro de NOESY 1D da substância **42** (DMSO-d_6, 11,7 T)..	**123**
Figura 018	Mapa de contornos $^{1}Hx^{1}H$ *g*COSY da substância **42** (DMSO-d_6, 11,7 T).....	**123**
Figura 019	Espectro de RMN de ^{1}H da substância **43** (DMSO-d_6, 11,7 T)..	**124**
Figura 020	Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da substância **43** (DMSO-d_6, 11,7 T).....	**124**
Figura 021	Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da substância **43** (DMSO-d_6, 11,7 T).....	**125**
Figura 022	Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da substância **43** (DMSO-d_6, 11,7 T).....	**125**
Figura 023	Espectro de RMN de ^{13}C da substância **43** (DMSO-d_6, 11,7 T)	**126**
Figura 024	Espectro de RMN de ^{13}C da substância **43** (DMSO-d_6, 11,7 T)	**126**
Figura 025	Ampliação do mapa de contornos *g*HMQC da substância **43** (DMSO-d_6, 11,7 T).....	**127**
Figura 026	Ampliação do mapa de contornos *g*HMQC da substância **43** (DMSO-d_6, 11,7 T).....	**127**
Figura 027	Mapa de contornos *g*HMBC da substância **43** (DMSO-d_6, 11,7 T).....	**128**
Figura 028	Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **43** (DMSO-d_6, 11,7 T).....	**128**
Figura 029	Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **43** (DMSO-d_6, 11,7 T).....	**129**
Figura 030	Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **43**	**129**

(DMSO-d_6, 11,7 T).....
Figura 031 Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **43** (DMSO-d_6, 11,7 T)..... **130**
Figura 032 Mapa de contornos *g*HMBC (^{15}Nx^{1}H) da substância **43** (DMSO-d_6, 11,7 T)..... **130**
Figura 033 Mapa de contornos 1Hx1H *g*COSY da substância **43** (DMSO-d_6, 11,7 T)..... **131**
Figura 034 Ampliação do mapa de contornos 1Hx1H *g*COSY da substância **43** (DMSO-d_6, 11,7 T)..... **131**
Figura 035 Ampliação do mapa de contornos 1Hx1H *g*COSY da substância **43** (DMSO-d_6, 11,7 T)..... **132**
Figura 036 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **44** (DMSO-d_6, 11,7 T).. **132**
Figura 037 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **44** (DMSO-d_6, 11,7 T) **133**
Figura 038 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T). **133**
Figura 039 Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)..... **134**
Figura 040 Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)..... **134**
Figura 041 Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)..... **135**
Figura 042 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T) **135**
Figura 043 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T) **136**
Figura 044 Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)..... **136**
Figura 045 Espectro de DEPT 135^{o} da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T).. **137**
Figura 046 Mapa de contornos *g*HMQC da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)..... **137**
Figura 047 Mapa de contornos *g*HMQC da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)..... **138**
Figura 048 Mapa de contornos *g*HMQC da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)..... **138**
Figura 049 Ampliação do mapa de contornos *g*HMQC da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)..... **139**
Figura 050 Mapa de contornos *g*HMBC da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)..... **139**
Figura 051 Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)..... **140**
Figura 052 Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)..... **140**
Figura 053 Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)..... **141**
Figura 054 Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)..... **141**
Figura 055 Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)..... **142**
Figura 056 Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)..... **142**
Figura 057 Espectro de NOESY 1D da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T).. **143**
Figura 058 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **46** (DMSO-d_6, 11,7 T).. **143**
Figura 059 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **46** (DMSO-d_6, 11,7 T) **144**
Figura 060 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **7** (DMSO-d_6, 11,7 T).... **144**
Figura 061 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **7** (DMSO-d_6, 11,7 T).. **145**

Figura 062 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T). **145**
Figura 063 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T). **146**
Figura 064 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T) **146**
Figura 065 Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T)..... **147**
Figura 066 Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T)..... **147**
Figura 067 Espectro de DEPT 135^{o} da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T),, **148**
Figura 068 Mapa de contornos *g*HMQC da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T)..... **148**
Figura 069 Ampliação do mapa de contornos *g*HMQC da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T)..... **149**
Figura 070 Ampliação do mapa de contornos *g*HMQC da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T) **149**
Figura 071 Ampliação do mapa de contornos *g*HMQC da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T) **150**
Figura 072 Mapa de contornos *g*HMBC da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T) **150**
Figura 073 Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T) **151**
Figura 074 Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T) **151**
Figura 075 Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T) **152**
Figura 076 Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T) **152**
Figura 077 Mapa de contornos $^{1}Hx^{1}H$ *g*COSY da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T) **153**
Figura 078 Ampliação do mapa de contornos $^{1}Hx^{1}H$ *g*COSY da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T) **153**
Figura 079 Ampliação do mapa de contornos $^{1}Hx^{1}H$ *g*COSY da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T)..... **154**
Figura 080 Espectro de NOESY 1D da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T).. **154**
Figura 081 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **48** (DMSO-d_6, 11,7 T).. **155**
Figura 082 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **48** (DMSO-d_6, 11,7 T) **155**
Figura 083 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **49** (DMSO-d_6, 11,7 T).. **156**
Figura 084 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **49** (DMSO-d_6, 11,7 T) **156**
Figura 085 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **50** (DMSO-d_6, 11,7 T).. **157**
Figura 086 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **50** (DMSO-d_6, 11,7 T) **157**
Figura 087 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **51** (CD_3OD, 11,7 T)..... **158**
Figura 088 Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da substância **51** (CD_3OD, 11,7 T)..... **158**

Figura 089 Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da substância **51** (CD_3OD, 11,7 T)..... **159**
Figura 090 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **51** (CD_3OD, 11,7 T) **159**
Figura 091 Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **51** (CD_3OD, 11,7 T)..... **160**
Figura 092 Mapa de contornos *g*HMQC da substância **51** (CD_3OD, 11,7 T)..... **160**
Figura 093 Ampliação do mapa de contornos *g*HMQC da substância **51** (CD_3OD, 11,7 T)..... **161**
Figura 094 Ampliação do mapa de contornos *g*HMQC da substância **51** (CD_3OD, 11,7 T)..... **161**
Figura 095 Mapa de contornos *g*HMBC da substância **51** (CD_3OD, 11,7 T)..... **162**
Figura 096 Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **51** (CD_3OD, 11,7 T)..... **162**
Figura 097 Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **51** (CD_3OD, 11,7 T)..... **163**
Figura 098 Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **51** (CD_3OD, 11,7 T)..... **163**
Figura 099 Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **51** (CD_3OD, 11,7 T)..... **164**
Figura 100 Mapa de contornos $^{1}Hx^{1}H$ *g*COSY da substância **51** (CD_3OD, 11,7 T)..... **164**
Figura 101 Ampliação do mapa de contornos $^{1}Hx^{1}H$ *g*COSY da substância **51** (CD_3OD, 11,7 T)..... **165**
Figura 102 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **52** (DMSO-d_6, 11,7 T).. **165**
Figura 103 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **52** (DMSO-d_6, 11,7 T) **166**
Figura 104 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **53** (DMSO-d_6, 11,7 T).. **166**
Figura 105 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **53** (DMSO-d_6, 11,7 T) **167**
Figura 106 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **54** (DMSO-d_6, 11,7 T).. **167**
Figura 107 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **54** (DMSO-d_6, 11,7 T) **168**
Figura 108 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **55** (DMSO-d_6, 11,7 T).. **168**
Figura 109 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **55** (DMSO-d_6, 11,7 T) **169**
Figura 110 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **56** (DMSO-d_6, 11,7 T).. **169**
Figura 111 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **56** (DMSO-d_6, 11,7 T) **170**
Figura 112 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **57** (DMSO-d_6, 11,7 T).. **170**
Figura 113 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **57** (DMSO-d_6, 11,7 T) **171**
Figura 114 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **58** (DMSO-d_6, 11,7 T).. **171**
Figura 115 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **58** (DMSO-d_6, 11,7 T) **172**
Figura 116 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **59** (DMSO-d_6, 11,7 T). **172**
Figura 117 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **59** (DMSO-d_6, 11,7 T) **173**
Figura 118 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **60** (DMSO-d_6, 11,7 T). **173**
Figura 119 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **60** (DMSO-d_6, 11,7 T) **174**
Figura 120 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **61** (CD_3OD, 11,7 T)..... **174**
Figura 121 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **61** (CD_3OD, 11,7 T).... **175**
Figura 122 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **62** (DMSO-d_6, 11,7 T).. **175**
Figura 123 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **62** (DMSO-d_6, 11,7 T) **176**
Figura 124 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **63** (CD_3OD, 11,7 T)..... **176**
Figura 125 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **63** (CD_3OD, 11,7 T).... **177**
Figura 126 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **67** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **177**
Figura 127 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **67** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **178**
Figura 128 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **68** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **178**

Figura 129 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **68** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **179**
Figura 130 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **69** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **179**
Figura 131 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **69** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **180**
Figura 132 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **70** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **180**
Figura 133 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **70** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **181**
Figura 134 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **71** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **181**
Figura 135 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **71** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **182**
Figura 136 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **72** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **182**
Figura 137 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **72** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **183**
Figura 138 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **73** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **183**
Figura 139 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **73** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **184**
Figura 140 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **74** (DMSO-d_6, 11,7 T).. **184**
Figura 141 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **74** (DMSO-d_6, 11,7 T) **185**
Figura 142 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **75** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **185**
Figura 143 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **75** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **186**
Figura 144 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **76** (DMSO-d_6, 11,7 T).. **186**
Figura 145 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **76** (DMSO-d_6, 11,7 T) **187**
Figura 146 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **78** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **187**
Figura 147 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **78** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **188**
Figura 148 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **79** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **188**
Figura 149 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **79** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **189**
Figura 150 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **80** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **189**
Figura 151 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **80** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **190**
Figura 152 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **81** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **190**
Figura 153 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **81** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **191**
Figura 154 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **82** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **191**
Figura 155 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **82** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **192**
Figura 156 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **83** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **192**
Figura 157 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **83** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **193**
Figura 158 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **84** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **193**
Figura 159 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **84** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **194**
Figura 160 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **86** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **194**
Figura 161 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **86** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **195**
Figura 162 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **87** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **195**
Figura 163 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **87** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **196**
Figura 164 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **90** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **196**
Figura 165 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **90** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **197**
Figura 166 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **91** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **197**
Figura 167 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **91** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **198**
Figura 168 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **92** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **198**
Figura 169 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **92** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **199**
Figura 170 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **93** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **199**
Figura 171 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **93** ($CDCl_3$, 11,7 T)..... **200**
Figura 172 Espectro de RMN de ^{1}H da substância **94** (DMSO-d_6, 11,7 T).. **200**
Figura 173 Espectro de RMN de ^{13}C da substância **94** (DMSO-d_6, 11,7 T) **201**
Figura 174 Espectro de massas de alta resolução da substância **42** (modo positivo)..... **202**
Figura 175 Espectro de massas de alta resolução da substância **43** (modo positivo)..... **202**
Figura 176 Espectro de massas de alta resolução da substância **45** (modo negativo)..... **203**
Figura 177 Espectro de massas de alta resolução da substância **47** (modo **203**

negativo).....
Figura 178 Espectro de massas de alta resolução da substância **51** (modo negativo)..... **204**
Figura 179 Espectro de massas de baixa resolução da substância **67** (modo positivo)..... **204**
Figura 180 Espectro de massas de baixa resolução da substância **68** (modo positivo)..... **205**
Figura 181 Espectro de massas de baixa resolução da substância **69** (modo positivo)..... **205**
Figura 182 Espectro de massas de baixa resolução da substância **70** (modo positivo)..... **206**
Figura 183 Espectro de massas de baixa resolução da substância **71** (modo positivo)..... **206**
Figura 184 Espectro de massas de baixa resolução da substância **72** (modo positivo)..... **207**
Figura 185 Espectro de massas de baixa resolução da substância **73** (modo positivo)..... **207**
Figura 186 Espectro de massas de baixa resolução da substância **74** (modo positivo)..... **208**
Figura 187 Espectro de massas de baixa resolução da substância **75** (modo positivo)..... **208**
Figura 188 Espectro de massas de baixa resolução da substância **76** (modo positivo)..... **209**
Figura 189 Espectro de massas de baixa resolução da substância **78** (modo positivo)..... **209**
Figura 190 Espectro de massas de baixa resolução da substância **79** (modo positivo)..... **210**
Figura 191 Espectro de massas de baixa resolução da substância **81** (modo positivo)..... **210**
Figura 192 Espectro de massas de baixa resolução da substância **82** (modo positivo)..... **211**
Figura 193 Espectro de massas de baixa resolução da substância **87** (modo positivo)..... **211**
Figura 194 Espectro de massas de baixa resolução da substância **84** (modo positivo)..... **212**
Figura 195 Espectro de massas de baixa resolução da substância **86** (modo positivo)..... **212**
Figura 196 Espectro de massas de baixa resolução da substância **87** (modo positivo)..... **213**
Figura 197 Espectro de massas de baixa resolução da substância **90** (modo positivo)..... **213**
Figura 198 Espectro de massas de baixa resolução da substância **91** (modo positivo)..... **214**
Figura 199 Espectro de massas de baixa resolução da substância **92** (modo positivo)..... **214**
Figura 200 Espectro de massas de baixa resolução da substância **93** (modo positivo)..... **215**
Figura 201 Espectro de massas de baixa resolução da substância **94** (modo positivo)..... **215**
Figura 202 Espectro no IV da substância **42**..... **216**
Figura 203 Espectro no IV da substância **43**..... **216**
Figura 204 Espectro no IV da substância **45**..... **217**
Figura 205 Espectro no IV da substância **47**..... **217**

Figura 206 Espectro no IV da substância **51**..... **218**
Figura 207 Espectro no IV da substância **67**..... **218**
Figura 208 Espectro no IV da substância **68**..... **219**
Figura 209 Espectro no IV da substância **69**..... **219**
Figura 210 Espectro no IV da substância **70**..... **220**
Figura 211 Espectro no IV da substância **71**..... **220**
Figura 212 Espectro no IV da substância **72**..... **221**
Figura 213 Espectro no IV da substância **73**..... **221**
Figura 214 Espectro no IV da substância **74**..... **222**
Figura 215 Espectro no IV da substância **75**..... **222**
Figura 216 Espectro no IV da substância **76**..... **223**
Figura 217 Espectro no IV da substância **78**..... **223**
Figura 218 Espectro no IV da substância **79**..... **224**
Figura 219 Espectro no IV da substância **80**..... **224**
Figura 220 Espectro no IV da substância **81**..... **225**
Figura 221 Espectro no IV da substância **82**..... **225**
Figura 222 Espectro no IV da substância **83**..... **226**
Figura 223 Espectro no IV da substância **84**..... **226**
Figura 224 Espectro no IV da substância **86**..... **227**
Figura 225 Espectro no IV da substância **87**..... **227**
Figura 226 Espectro no IV da substância **90**..... **228**
Figura 227 Espectro no IV da substância **91**..... **228**
Figura 228 Espectro no IV da substância **93**..... **229**
Figura 229 Espectro no IV da substância **93**..... **229**
Figura 230 Espectro no UV da substância **42**..... **230**
Figura 231 Espectro no UV da substância **43**..... **230**
Figura 232 Espectro no UV da substância **45**..... **131**
Figura 233 Espectro no UV da substância **47**..... **231**
Figura 234 Espectro no UV da substância **51**..... **232**

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ν	frequência de absorção máxima
δ_H	deslocamento químico de hidrogênio
δ_C	deslocamento químico de carbono
δ_N	deslocamento químico de nitrogênio
Δδ	variação de deslocamento químico
$[\alpha]_D$	rotação óptica
λ	comprimento de onda de máxima absorção
AcOEt	acetato de etila
Boc	*t*-butoxicarbonila
Boc_2O	dicarbonato de t-butoxicarbonila
CC-FN	cromatografia em coluna de fase normal
CC-FR	cromatografia em coluna de fase reversa
CCDA	cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	cromatografia em camada delgada preparativa
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CPG	Ccromatografia de permeação em gel
d	dubleto
dd	duplo dubleto
dl	dubleto largo
dt	duplo tripleto
DCM	diclorometano
DEPT	Diostortionless Enhancement by Polarization Transfer (ganho se distorções por transferência de polarização)
DMF	*N*,*N*-dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
EM	espectro de massas
EtOH	etanol
***g*COSY**	Gradient Correlated Spectroscopy (Espectroscopia de correlação com gradiente)
Hex	hexano
***g*HMBC**	Gradient Heteronuclear Multiple Bond Coherence (Inverse detected ^{1}H-^{13}C long range correlation experiment: Experimento de correlação ^{1}H-^{13}C à longa distância por detecção inversa e gradiente de campo)
***g*HMQC**	Gradient Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (Inverse detected ^{1}H-^{13}C long range correlation experiment: Experimento de correlação ^{1}H-^{13}C à longa distância por detecção inversa e gradiente de campo)
IV	Infravermelho
J	constante de acoplamento
MeOH	metanol
m	multipleto
m.	massa
m/z	relação massa/carga
ODS	octadecilsilano
P.A.	para análise
REA	relação estrutura-atividade
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	singleto
sl	singleto largo
t	tripleto
t.a.	temperatura ambiente
THF	tetraidrofurano
UV	ultravioleta

CAPÍTULO 1

Considerações preliminares e Objetivos (pág 01)

A natureza, exemplificada na diversidade fantástica dos metabólitos secundários produzido por plantas, microrganismos, insetos, vertebrados entre outros, se constitui até hoje, em modelos valiosos para a síntese total e/ou modificações estruturais objetivando-se protótipos de fármacos. Nesse contexto, os produtos naturais bioativos com estruturas moleculares simples, capazes de serem facilmente sintetizados e modelados são considerados matéria-prima valiosa para o planejamento de fármacos. Compartilhando-se dessa realidade, acredita-se que os biomas brasileiros continuam sendo fontes inesgotáveis de produtos naturais bioativas com estruturas inéditas, seja de interesse acadêmico e/ou de aplicação comercial. O Brasil com cerca de 30 % das espécies floríferas do planeta é um verdadeiro celeiro de produtos úteis, levando-se em consideração que os vegetais já contribuíram para a produção de aproximadamente duas dezenas de fármacos e que apenas 15-17 % de todas as espécies de angiospermas têm algum registro sobre o seu efeito farmacológico comprovado.[1]

No Estado de São Paulo, a Mata Atlântica e o Cerrado são os biomas remanescentes mais representativos e, mesmo estando bastante devastados, possuem uma enorme variedade de vegetais, muitos com um valor etnofarmacológico incalculável e apenas para uma parcela irrelevante realizou-se algum estudo químico ou farmacológico. Desta forma, a exploração racional da flora paulista, em especial de espécies que acumulam substâncias bioativas já caracterizadas torna-se importante e estratégico na busca de modelos estruturais para o avanço da Química Medicinal.[2]

Criado oficialmente em março de 1999, o programa BIOTA-FAPESP (O Instituto Virtual da Biodiversidade) objetiva inventariar e caracterizar a biodiversidade do Estado de São Paulo, definindo os mecanismos para sua conservação, seu potencial econômico e sua utilização sustentável. Dentro desse programa, encontra-se o projeto “Conservação e uso sustentável da diversidade vegetal do Cerrado e Mata Atlântica: diversidade química e prospecção de fármacos potenciais FASE II”, cujo objetivo central é a formação de um banco de extratos e substâncias com atividade antioxidante, antitumoral, antifúngica e antimalárica de vegetais superiores e microrganismos endofíticos, bem sendo dirigido pelo NuBBE (Núcleo de Biensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais).

O presente trabalho inserido e desenvolvido no contexto do programa BIOTA-FAPESP teve como objetivos:

- ✓ Isolar os constituintes químicos de *Pterogyne nitens*, identificando ou elucidando suas estruturas moleculares;
- ✓ Sintetizar derivados guanidínicos *N*-monossubstituídos e *N,N'*-dissubstituídos por unidades terpênicas (isoprenila, geranila e farnesila) e análogos;
- ✓ Avaliar o potencial farmacológico das substâncias isoladas e sintetizadas, buscando a descoberta de agentes antioxidantes, antitumorais, antifúngicos e inibidores de mieloperoxidase.

CAPÍTULO 2

Estudo químico de
Pterogyne nitens (pág 03)

1. Introdução

1.1. Pterogyne nitens Tulasne (Fabaceae-Caesalpinioideae)

Fabaceae é a maior família de angiospermas, sendo composta por cerca de 18.000 espécies e 650 gêneros distribuídos em três subfamílias, as quais foram divididas com base nas suas características vegetativas:

Mimosoideae – exibem folhas bipinadas e com glândulas e flores actinomórficas. A única exceção são as espécies do gênero *Inga*, as quais apresentam folhas pinadas.

Papilionoideae – possuem folhas imparipinadas e flores zigomórficas.

Caesalpinioideae – apresentam folhas paripinadas e sem glândulas e flores variáveis. Esta subfamília é constituída por cerca de 180 gêneros e 2.500 a 3.000 espécies, principalmente, árvores e arbustos, tropicais e subtropicais, com distribuição cosmopolita. A maioria dos seus gêneros deste táxon encontra-se na África, América do Sul e Sudeste da Ásia. A subfamília está bem representada no Brasil por diversos gêneros de interesse medicinal, tais como: *Bauhinia*, *Hymenea*, *Copaifera*, *Dimorphandra*, etc.[3]

Pterogyne nitens Tulasne (Fabaceae – Caesalpinioideae) é uma espécie arbórea nativa do Cerrado, sendo popularmente conhecida como “amendoim do campo”, “amendoim-bravo”, “bálsamo”, “yvi-raró”, “cocal”, “tipa” etc. Essa espécie ocorre desde o Ceará até o Paraná, bem como em outros países latino-americanos tais como Argentina, Bolívia e Paraguai. Esta leguminosa é a única do gênero, está incluída na lista de espécies brasileiras em extinção, sendo portanto, recomendada para a conservação genética no Estado de São Paulo.[4]

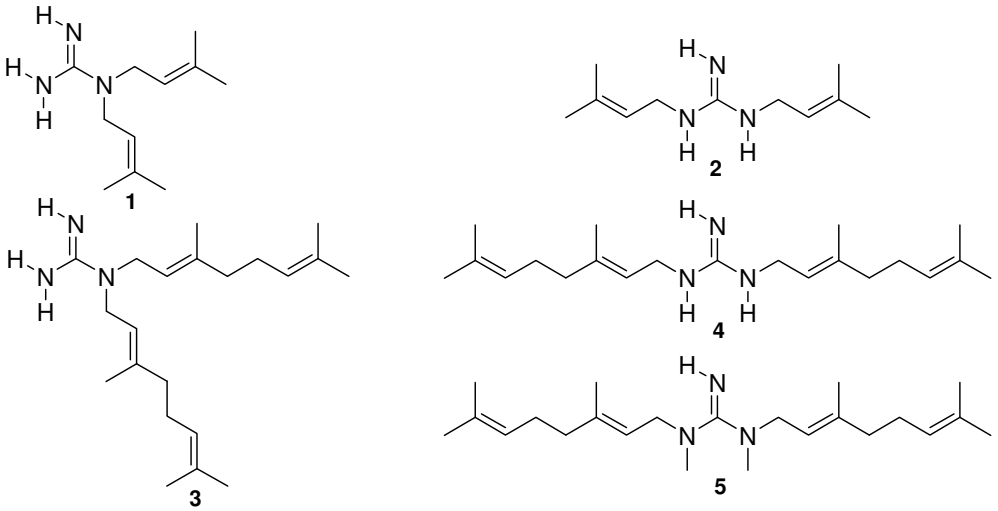
A espécie é perenifólia, semicaducifólia, heliófita, comumente atinge de dez a quinze metros de altura, apresentando flores geralmente bissexuais, porém mais comumente masculinas e com sistema reprodutivo de planta alógama e, suas sâmaras apresentam sementes com dispersão anemocórica.[5]

Segundo Lorenzi[6], a madeira do “amendoim-bravo” é moderadamente densa e apresenta relativa resistência física, sendo amplamente empregada na construção civil. Segundo Carvalho[2], esta espécie possui valor ornamental muito grande, devido à beleza e odor de suas flores. Com folhagem brilhante e frutificação que varia de tons à medida que amadurecem, são recomendadas para arborização de vias urbanas e rodovias e na

reposição de mata ciliar em locais com inundações periódicas. O lenho de *P. nitens* apresenta uma seiva rósea e o extrato aquoso do seu "pó-de-serra" tem coloração roxa, sendo muito utilizado na tinturaria, o que justifica o uso e um de seus nomes populares, "tipa-colorado".[4]

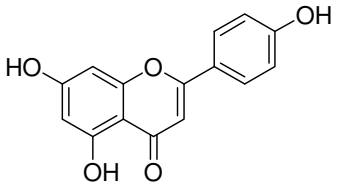
Contudo, existem poucos relatos das aplicações medicinais e da constituição química de *P. nitens*. Segundo os estudos etnofarmacológicos de Crivos e colaboradores em comunidades guaranis do nordeste da Argentina, as cascas do caule possuem ação anti-helmíntica contra o "tacho", nome popular de *Ascaris lumbricoides*.[7]

O primeiro estudo químico de *P. nitens* data no ano de 1969 realizado por Corral e colaboradores. Estes descreveram a presença de um alcalóide guanidínico *N,N*-dissubstituído de estrutura pouco comum, nomeado de pteroginina (**1**).[8] Dois anos depois, estes pesquisadores argentinos descrevem o isolamento de outro alcalóide *N,N'*-dissubstituído isolado dos caules, nomeado de pteroginidina (**2**).[9] Objetivando a confirmação estrutural e diferenciação dos dois isômeros constitucionais, Corral e colaboradores realizaram a primeira síntese total desses alcalóides e seus derivados hidrogenados na forma de picratos, cloridratos e percloratos.[10]

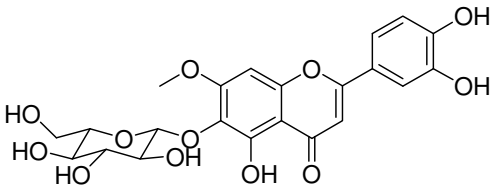


Bolzani e colaboradores[11] realizaram o estudo químico das folhas monitorado por bioensaios com linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, o qual permitiu a descrição de mais três alcalóides guanidínicos, substituídos por grupos geranílicos e metílicos, comumente denominados de nitensidinas A (**4**), B (**3**) e C (**5**). Este trabalho relatou pela primeira vez a substituição do núcleo guanidínico por subunidades monoterpênicas, bem como descreveu o potencial antitumoral dessas substâncias sobre

linhagens celulares de ovário de *hamster*. Adicionalmente, Bolzani descreveu o isolamento de duas flavonas apigenina (**6**) e pedalina (**7**), as quais não apresentaram citotoxicidade pronunciada.



6



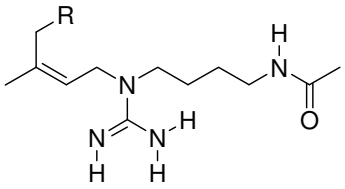
7

1.2. Derivados guanidínicos obtidos de vegetais superiores

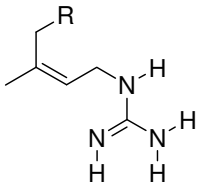
Até o início dos anos oitenta do século passado acreditava-se que somente espécies pertencentes às famílias Euphorbiaceae (*Alchornea* spp) e Leguminosae eram capazes de acumular alcalóides guanidínicos como os apresentados por *P. nitens*, porém com novos estudos químicos, tal subclasse de alcalóides foi encontrada em outras famílias. Esse fato impossibilitou o emprego desses alcalóides como potenciais marcadores quimiotaxonômicos destes táxons. Um dos exemplos desse fato é a descrição de galegina e seus derivados como agentes tóxicos de *Schoenus asperocarpus*, *S. rigens* (Cyperaceae)[12] e *Crassula argentea* (Crassulaceae)[13]. Tendo em vista que os alcalóides guanidínicos são pouco comuns no Reino Vegetal, vale destacar as principais famílias que os acumulam e suas potencialidades farmacológicas.

1.2.1. Alcalóides guanidínicos de Fabaceae

As espécies pertencentes ao gênero *Galega* são conhecidas por seus empregos na agricultura e por suas propriedades medicinais (hipoglicemiante, antimicrobiana e antitrombótica).[14,15] Duas guanidinas hemiterpenoídicas, esfaerofisina ou esmirnovina (**8**) e 4-hidroxiesfaerofisina (**9**) foram isolados de *Galega orientalis*.[16] Outros dois alcalóides foram isolados de *Galega officinalis*, galegina (**10**) e 4-hidroxigalegina (**11**), os quais mostraram-se potentes hipoglicemiantes orais, porém com maior toxicidade que **8** e **9**.[17]

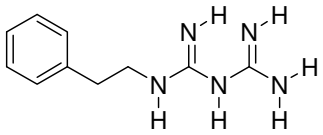


R= H (**8**)
R= OH (**9**)

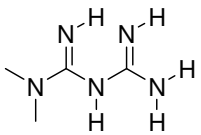


R= H (**10**)
R= OH (**11**)

A importância de galegina e seus análogos não se restringe somente ao seu papel de princípio anti-diabético de *Galega officinalis*, estes serviram como substâncias líderes para o desenvolvimento de potentes hipoglicemiantes orais da classe das alquilbiguanidas amplamente empregados pela terapêutica como fenformina (**12**) e metformina (**13**).[18]

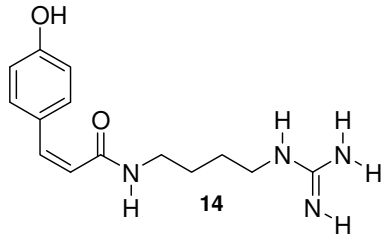


12



13

Albizzia julibrissin é uma planta utilizada pela medicina oriental devido suas propriedades sobre o sistema nervoso central (SNC), fato confirmado por recentes ensaios farmacológicos, que apontam os flavonóis glicosilados quercitrina e isoquercitrina como responsáveis por essa ação sedativa. Outro constituinte de elevado interesse biológico é a *cis-p*-cumaroilagmatina (**14**) obtida do extrato aquoso, com propridade biológica interessante. Esta substância é responsável por movimentos násticos (abertura e fechamento das folhas) associados às mudanças de temperatura e intensidade de luz.[19,20]

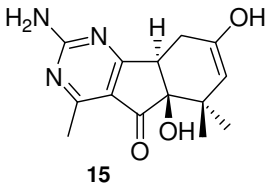


14

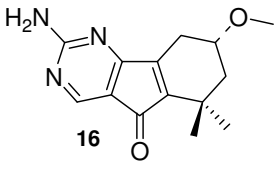
A diversidade estrutural dos alcalóides provenientes das fabáceas não se restringe às estruturas guanidínicas com cadeia carbônica aberta, também são encontradas subunidades guanidínicas intercaladas em ciclos.

Millettia laurentii possui indicação etnobiológica como inseticida, piscicida a antiparasitária (principalmente frente às infestações intestinais). A partir das cascas dos

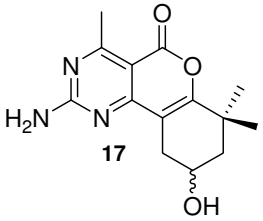
caules obtiveram-se dois alcalóides tipo 2-aminopirimidínicos, 5a,9a-diidro-5a-hidroximilaurina (**15**) e miletonina (**17**).[21] Dados da literatura revelaram que a millaurina A (**16**) obtida de *M. laurentii* é o derivado guanidínico isolado mais recente.[22]



15

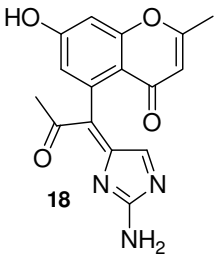


16



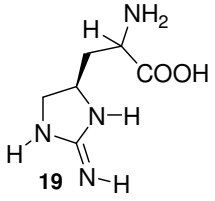
17

Cassia siamea é uma das três árvores mais comuns na Índia e suas flores apresentaram uma cromona acoplada a uma subunidade guanidínica, denominada cassiadinina (**18**).[23]

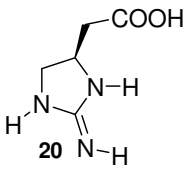


18

Dois derivados 2-amino-2-imidazolidínicos (**19** e **20**) com caráter anfotérico foram isolados das sementes de *Lonchocarpus sericeus*, uma leguminosa do leste da Índia muito empregada como inseticida, piscicida e no tratamento de infecções dermatológicas.[24]



19



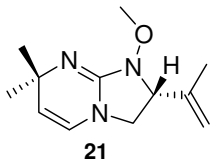
20

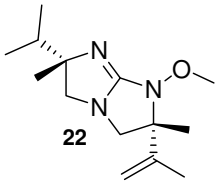
1.2.2. Alcalóides guanidínicos de Euphorbiaceae

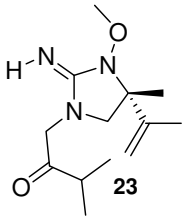
Dentre as euforbiáceas, o gênero *Alchornea* é o que mais acumula metabólitos guanidínicos, apresentando estruturas abertas e cíclicas, substituídas por unidades terpenoídicas altamente rearranjadas.

Os decoctos de *A. floribunda* são tradicionalmente utilizados por tribos africanas para inúmeras finalidades medicinais, dentre elas: combate às afecções intestinais,

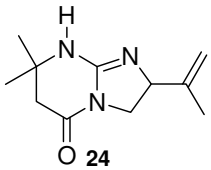
estimulantes sexuais e anestésicas. Estudos revelaram que tais ações podem estar correlacionadas às propriedades simpatomiméticas do alcalóide iombina. Dessa espécie foi isolada uma série de guanidinas isopentenílicas, denominadas de “alcorneínas”: alcorneína (**21**), isoalcorneína (**22**) e alcorneínona (**23**).[25]

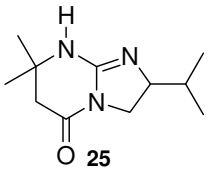

21

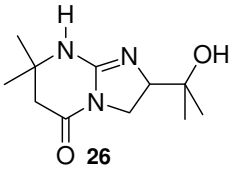

22

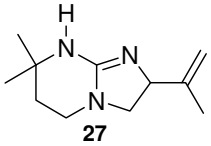

23

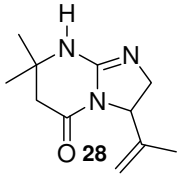
A. javanensis é também uma espécie com valor etnofarmacológico menos evidente que os de *A. floribunda*. Desta espécie, foram obtidos outros alcalóides guanidínicos pouco comuns (**24** – **29**) com unidades isoprenílicas rearranjadas.[26]

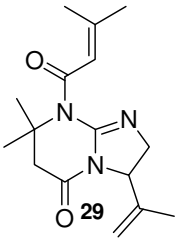

24


25

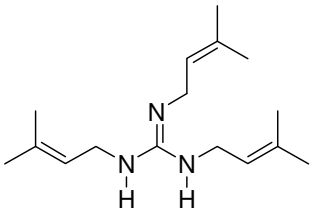

26


27

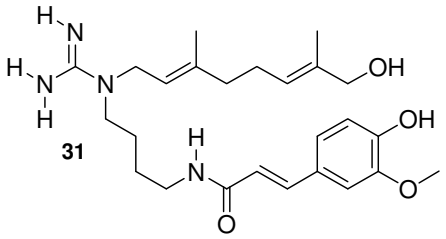

28


29

Recentemente estudos químicos com *A. glandulosa* e *A. cordifolia*, levaram ao isolamento de um alcalóide guanidínico *N*,*N’*,*N’’*-trissubstituído (**30**), com atividades antiproliferativa e antifúngica moderadas.[27,28]


30

Estudos objetivando o isolamento de alcalóides a partir de euforbiáceas da Nova Caledônia, conduziram ao isolamento da fontaineína (**31**) obtida de *Fontainea pancheri*, com estrutura similar as nitensidinas..[29]

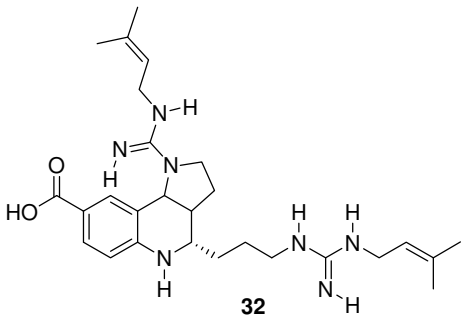


31

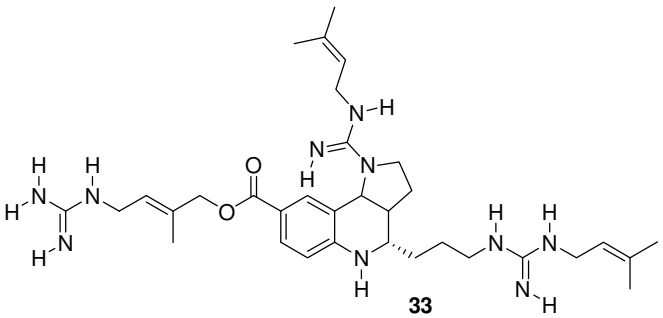
De maneira menos abundante, os derivados guanidínicos podem ser encontrados em outras famílias de angiospermas, tais como: Bignoniaceae, Asteraceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Ranunculaceae e Verbenaceae.

1.2.3. Alcalóides guanidínicos de Bignoniaceae

Macerados das partes aéreas de *Martinella iquitosensis* são utilizados por índios colombianos no combate de processos inflamatórios e infecciosos, principalmente conjuntivite. O potencial antimicrobiano e antiinflamatório foi comprovado a partir do isolamento de dois alcalóides, ácido martinélico (**32**) e martinelina (**33**). Esses apresentam amplo espectro de ação antibacteriano, bem como atuaram como antagonistas de receptores de bradicinina, um peptídeo envolvido na inflamação aguda.[30] Devido ao potencial farmacológico estes alcalóides foram objetos de estudos de síntese recentes.[31]



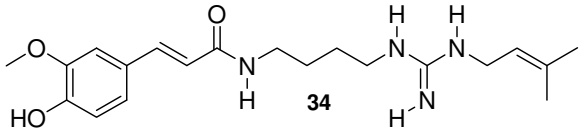
32



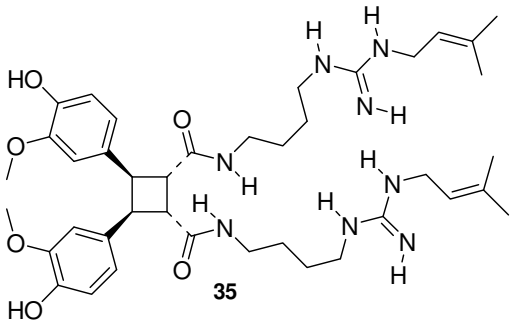
33

1.2.4. **Alcalóides guanidínicos de Asteraceae e Ranunculaceae**

Dois agentes hipotensores, caracasanamida (**34**) e caracasanadiamida (**35**) foram isolados do extrato aquoso das folhas de *Verbesina caracasana*, sendo este último um derivado truxínico obtido por meio de fotodimerização radicalar de duas unidades do isômero *Z* de **34**. Altas doses desses alcalóides promovem bradicardia e hipotensão arterial por meio da diminuição da resistência periférica. Além desses efeitos farmacológicos, não apresentam reações adversas, frequentemente encontradas em fármacos anti-hipertensivos empregados na terapêutica de doenças cardiovasculares, sendo considerados protótipos promissores.[32-36]

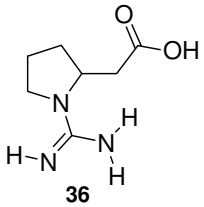


34



35

Cimicifuga racemosa é uma planta medicinal empregada na preparação de inúmeros fitoterápicos encontrados em todo mundo. Cimipronidina (**36**), um derivado anfotérico foi isolado de suas raízes.[37]

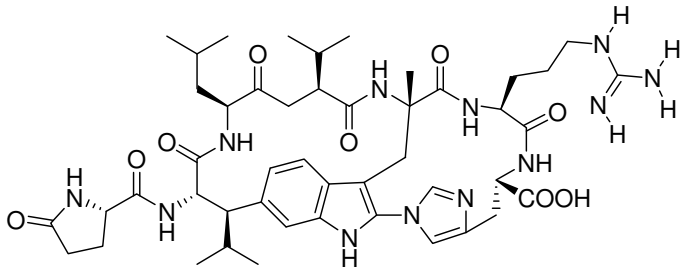


36

1.2.5. **Ciclopeptídeos com resíduos de arginina obtidos de Amaranthaceae e Caryophyllaceae**

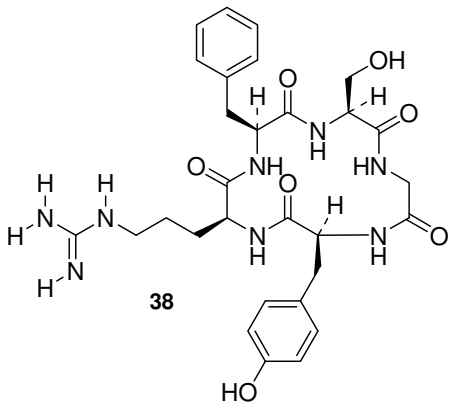
Celosia argentea (Amaranthaceae) é uma das plantas com ação antibacteriana mais empregadas por comunidades tradicionais da Malásia. Os extratos de suas sementes apresentou potente atividade antimitótica, a qual está correlacionada com a presença de biciclopeptídeos comumente denominados de “celogentinas” (**37**). As

celogentinas são os únicos peptídeos cíclicos de origem vegetal que apresentam uma ligação não-peptídica entre os aminoácidos triptofano e histidina, sendo esta uma característica estrutural que pode estar correlacionada à sua capacidade de inibir a polimerização de tubulina, impedindo a formação dos microtúbulos durante a metáfase.[38]



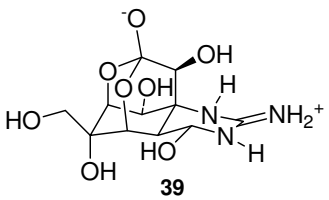
37

Inúmeras cariofiláceas acumulam peptídeos, dentre esses, destacam-se alguns ciclopeptídeos bioativos de *Vaccaria segetalis*. As "segetalinas" (**38**) isoladas das sementes apresentaram atividade estrogênica comparável às isoflavonas da soja.[39]



38

Apesar da ocorrência restrita e escassa dos alcalóides guanidínicos provenientes de plantas superiores, existem outras formas de vida que também os acumulam, sendo estes metabólitos produzidos por microrganismos, invertebrados, vertebrados, algas etc. Um dos exemplos de maior relevância química e biológica é a tetrodoxina (**39**), uma neurotoxina guanidínica e não-peptídica produzida por peixes da ordem Tetraodontiformes (ex. baiacú), a qual se liga fortemente aos canais de sódio neuronal.[40-42]



39

1.2.6. Biogênese de alcalóides guanidínicos

Três diferentes conceitos são encontrados na literatura para o termo “alcalóide”:

1. Por definição da IUPAC:

“Alcalóides são substâncias nitrogenadas e básicas (principalmente heterocíclicas), de ocorrência no Reino Plantae (mas também de origem animal). Peptídeos, proteínas, nucleotídeos, ácido nucléicos, aminoaçúcares e antibióticos não são considerados alcalóides. Por extensão, algumas substâncias neutras biogeneticamente relacionadas aos alcalóides básicos são consideradas alcalóides”;[44]

2. Pelo conceito de Haugner:

“Alcalóides são substâncias relativamente tóxicas, as quais agem sobre o SNC. Eles possuem características básicas, contendo um *N*-heterociclo e são sintetizadas por plantas a partir de aminoácidos. Em muitos casos são de distribuição restrita em um determinado táxon do Reino Plantae”;[43]

3. Três categorias na classificação de G. A. Cordell:

Alcalóides verdadeiros: são substâncias tóxicas apresentando um amplo espectro de atividades farmacológicas; são invariavelmente básicas, contém nitrogênio em anel heterocíclico; são derivadas de aminoácidos; são limitadas quanto a distribuição taxonômica, apresentando-se normalmente na forma de sais ou *N*-óxidos (Ex. morfina, alcalóides da Vinca, etc.);

Protoalcalóides ou aminas biológicas: são aminas simples, cujo átomo de nitrogênio não se encontra em um heterociclo. São derivados de aminoácidos e possuem propriedades básicas (Ex. mescalina, dopamina, etc.);

Pseudoalcalóides: são substâncias básicas, mas não derivadas de aminoácidos. (Ex. alcalóides de Solanaceae, metilxantinas, etc.).[45]

Dentre os conceitos encontrados para o termo “alcalóide”, a definição segundo a IUPAC melhor caracteriza os derivados guanidínicos como alcalóides, uma vez que não torna relevante a necessidade do átomo de nitrogênio básico formar um *N*-heterociclo.

Embora ainda válida e largamente empregada, a definição proposta por Haugner não pode ser aplicada aos alcalóides guanidínicos, uma vez que os mesmos são

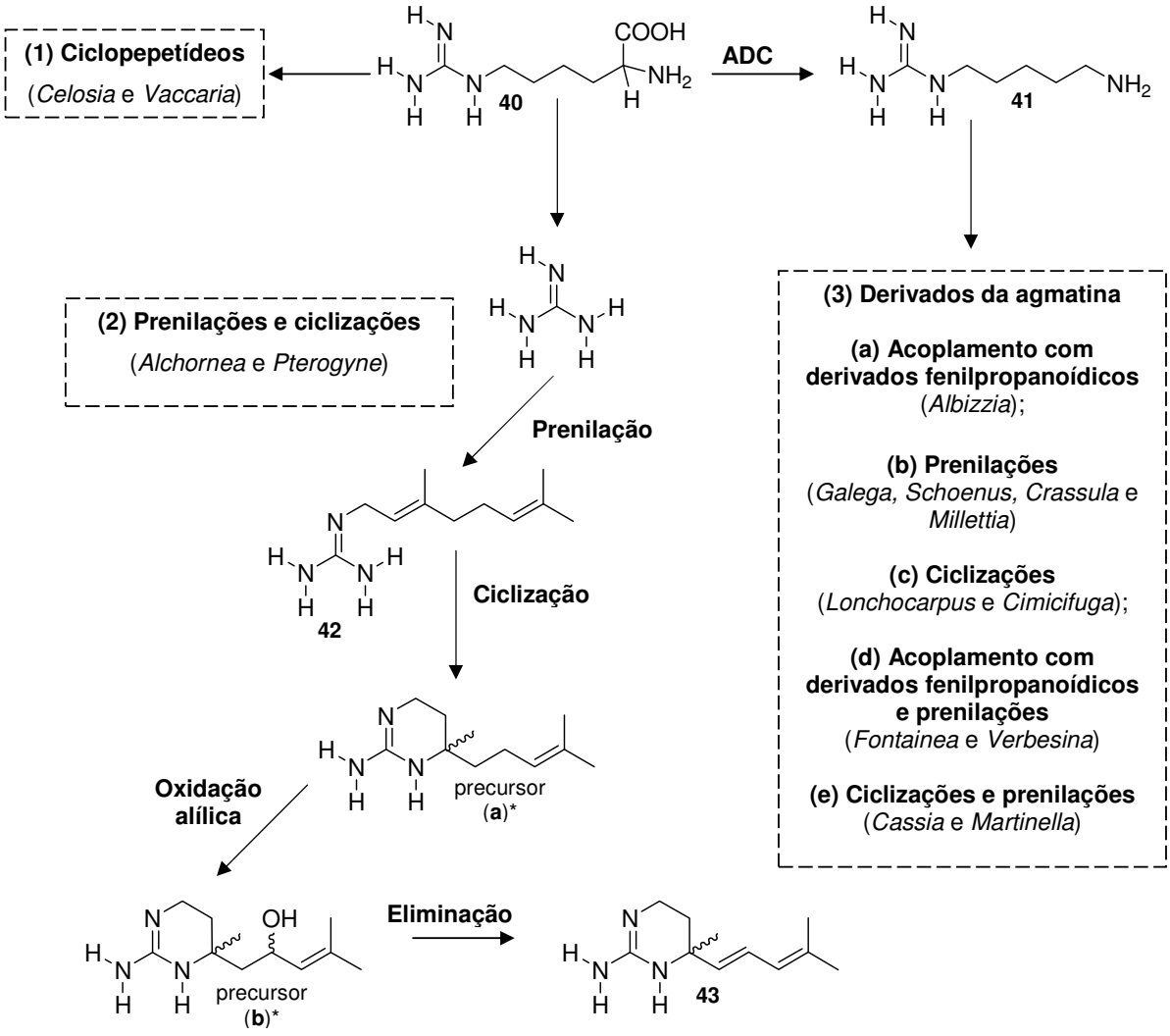
produzidos por plantas, e por outras formas de vida. Um outro aspecto problemático na definição de Haugner é a atribuição obrigatória de ação sobre o SNC. Poucos trabalhos descrevem ação biológica sobre o SNC de derivados guanidínicos, um destes poucos exemplos é a tetrodotoxina.[40-42] Contudo pesquisadores, como Peter G. Waterman[46], questionam a validade do conceito de atividade biológica como quesito fundamental para a classificação dos alcalóides, ou mesmo para a classificação taxonômica em geral.

A proposta biossintética ilustrada no esquema 1 permite a divisão dos derivados guanidínicos de origem vegetal em três grandes grupos. O primeiro grupo refere-se à incorporação dos resíduos de arginina em peptídeos cíclicos, enquanto o segundo está relacionado aos metabólitos derivados do acoplamento de uma unidade guanidínica com substiuintes terpênicos abertos ou rearranjados em ciclos, típicos do gênero *Alchornea* e *P. nitens*. Enquanto, o terceiro refere-se aos alcalóides guanidínicos derivados de agmatina (**41**), um produto de descarboxilação do aminoácido arginina (**40**), reação catalisada pela enzima arginina descarboxilase (ADC).[47]

Pesquisas na literatura apontaram poucos estudos biossintéticos envolvendo derivados guanidínicos em plantas. A proposta para a produção inicial destes alcalóides envolve o aminoácido arginina como doador do núcleo guanidínico.[48-49] No caso dos alcalóides guanidino-terpênicos de *P. nitens*, sugere-se que estes sejam produzidos pelo acoplamento de uma unidade de guanidina com unidades prenílicas (isopentenílicas ou geranílicas). A literatura aponta que reações de prenilação (geralmente *C*- e *O*-prenilações) são realizadas por preniltransferases tendo como substratos; pirofosfato de isopentenila e de geranila (GPP), por reações de substituição nucleofílica.[50]

O presente trabalho descreve duas novas guanidinas (**42** e **43**), sendo **43** um *N*-heterociclo (2-amino-tetraidropirimidínico), provavelmente produto de uma reação envolvendo o rearranjo de uma unidade monoterpênica. Fato que corrobora a classificação dos derivados guanidínicos de *P. nitens* como "alcalóides verdadeiros", segundo a proposta de Cordell.

A proposta de biossíntese para o alcalóide guanidínico **43** envolve o ataque nucleofílico do nitrogênio N-3 sobre o carbono C-3', com subsequente captura de um hidrogênio do núcleo guanidínico por esta olefina, levando a formação de um anel de seis membros. No segundo momento o precursor **a**, pode sofrer uma oxidação, culminando na formação de um álcool alílico (precursor **b**). Finalmente, sugere-se que este álcool hipotético sofra uma reação de desidratação levando a um dieno conjugado.

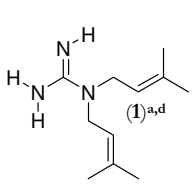


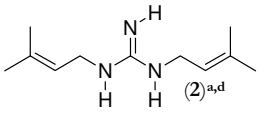
*Precursores **a** e **b** são estruturas hipotéticas

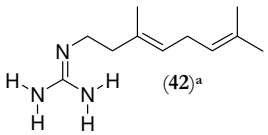
Esquema 1. Biogênese de derivados guanidínicos de plantas

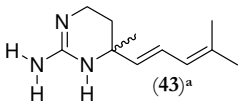
2. Substâncias isoladas

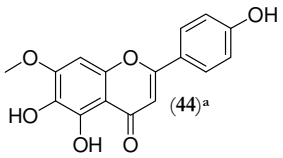
O estudo químico de *Pterogyne nitens* culminou no isolamento de 25 substâncias.

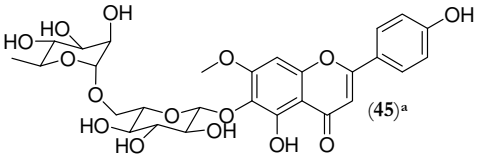

(**1**)[a,d]

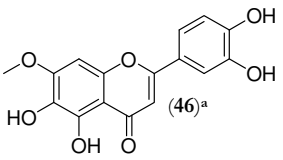

(**2**)[a,d]

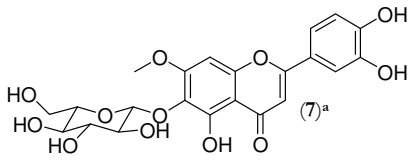

(**42**)[a]

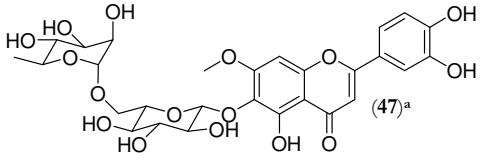

(**43**)[a]

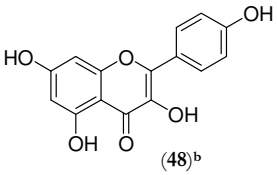

(**44**)[a]

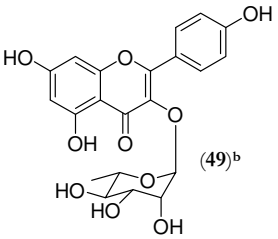

(**45**)[a]

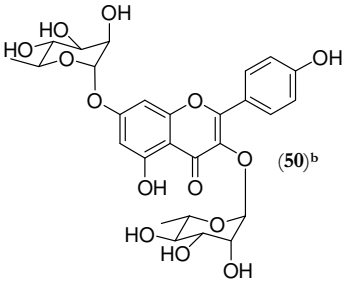

(**46**)[a]

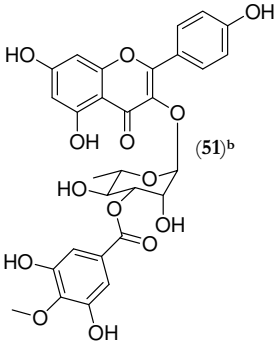

(**7**)[a]

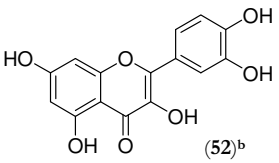

(**47**)[a]

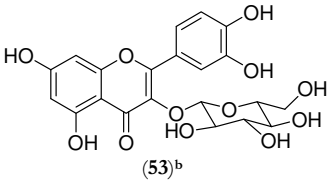

(**48**)[b]

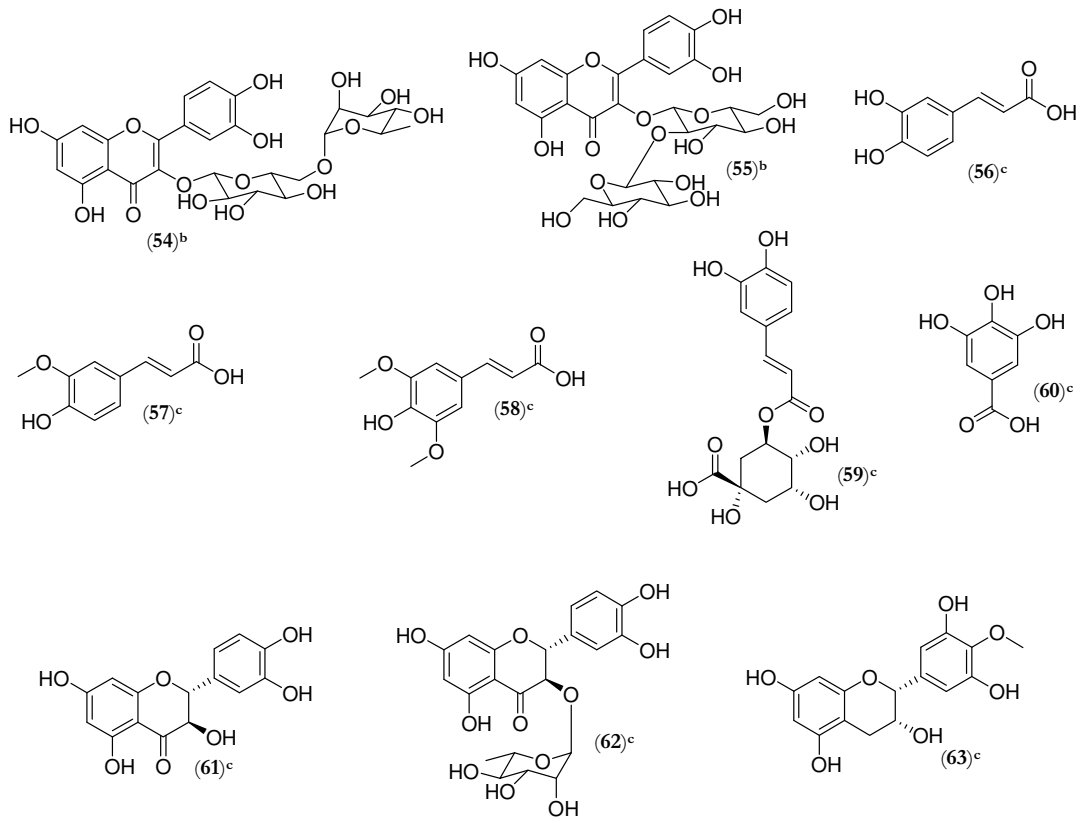

(**49**)[b]


(**50**)[b]


(**51**)[b]


(**52**)[b]


(**53**)[b]



(a) Presentes nas folhas

(b) Presentes nos frutos

(c) Presentes nas flores

(d) Presentes nos caules em quantidades apreciáveis

Esquema 2. Estruturas moleculares das substâncias isoladas de *Pterogyne nitens* descritas neste trabalho

As 25 substâncias isoladas pertencem a três classes de metabólitos especiais: flavonóides, alcalóides guanidínicos e derivados fenólicos. Dentre essas somente as substâncias **1**, **2** e **46** foram obtidas anteriormente de *P. nitens*.[8,9,11] As substâncias **42**, **43**, **45**, **47** e **51** são inéditas na literatura.

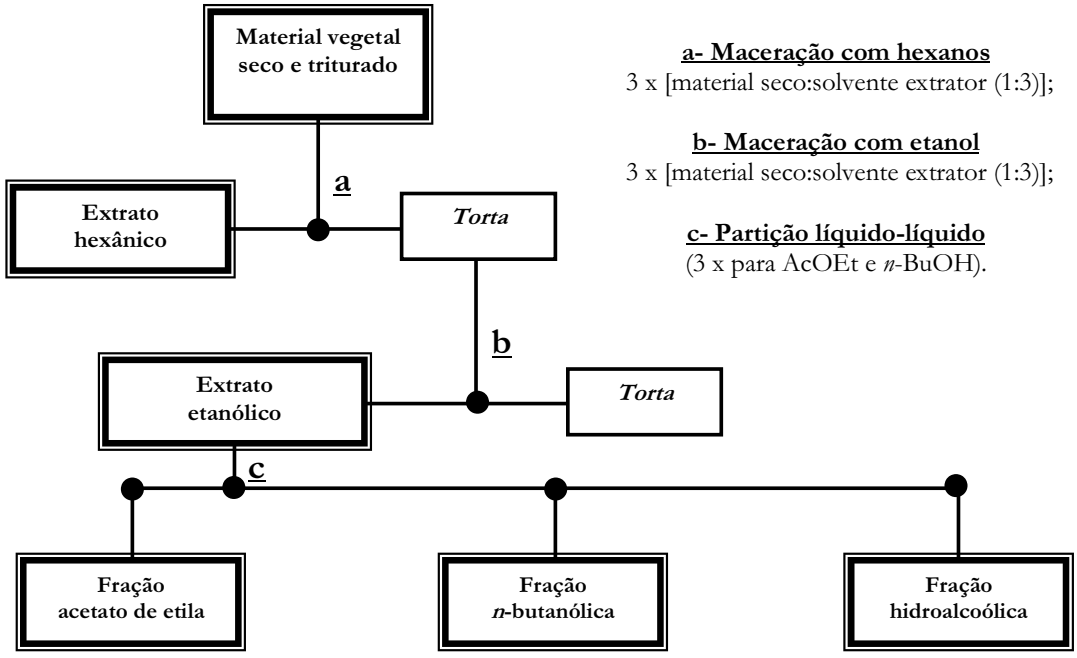
3. Extração e Isolamento

3.1. Coleta e identificação do material botânico

O material vegetal foi coletado no Instituto Botânico, São Paulo – SP, Brasil, entre os meses de abril e maio de 2003, pela Dra. Maria Cláudia Marx Young e identificado como sendo *Pterogyne nitens* Tulasne (Fabaceae – Caesalpinioideae) pela Dra. Inês Cordeiro do mesmo instituto. Uma exsicata (SP204319) encontra-se depositada no herbário "Maria Eneida P. Kaufmann" do Instituto Botânico, São Paulo – SP, Brasil.

3.2. Preparo dos extratos e frações

O material botânico foi seco à temperatura ambiente e foi submetido à moagem empregando moinho de facas. O pó obtido foi levado à maceração empregando hexanos e com posterior maceração em etanol. O extrato etanólico foi dissolvido em mistura metanol:água (7:3) e seguido de partição líquido-líquido empregando-se acetato de etila e posteriormente *n*-butanol, obtendo-se três frações 9esquema 3).



Esquema 3. Preparação dos extratos e frações.

Tabela 1. Estimativa dos rendimentos dos processos de extração e partição líquido-líquido

Partes do vegetal	Massa do material seco (Kg)	Tipo de extrato ou fração	Código	Massa dos extratos ou frações obtidos (g) (rendimento, %)[a,b]
Caules	2,8			
		hexânico	HEX-CAU	40 **(1,4)**
		etanólico	EtOH-CAU	83 **(2,9)**
		acetato de etila	AcOEt-CAU	19 **(23)**
		n-butanólica	BuOH-CAU	40 **(48)**
		hidroalcoólica	HA-CAU	22 **(27)**
Flores	1,3			
		hexânico	HEX-FLO	13 **(1,0)**
		etanólico	EtOH-FLO	43 **(1,8)**
		acetato de etila	AcOEt-FLO	12 **(28)**
		n-butanólica	BuOH-FLO	25 **(58)**
		hidroalcoólica	HA-FLO	5 **(11)**
Folhas	2,5			
		hexânico	HEX-FOL	38 **(1,5)**
		etanólico	EtOH-FOL	106 **(4,3)**
		acetato de etila	AcOEt-FOL	35 **(33)**
		n-butanólica	BuOH-FOL	40 **(38)**
		hidroalcoólica	HA-FOL	30 **(28)**
Frutos	1,2			
		hexânico	HEX-FRU	6 **(0,5)**
		etanólico	EtOH- FRU	24 **(2,0)**
		acetato de etila	AcOEt- FRU	5 **(21)**
		n-butanólica	BuOH- FRU	15 **(63)**
		hidroalcoólica	HA- FRU	3 **(13)**

a- Os extratos hexânicos e etanólicos tiveram seus rendimentos calculados em função do material botânico seco e moído;
b- As frações acetato de etila, *n*-butanólica e hidroalcoólica tiveram seus rendimentos calculados em função do extrato etanólico de origem.

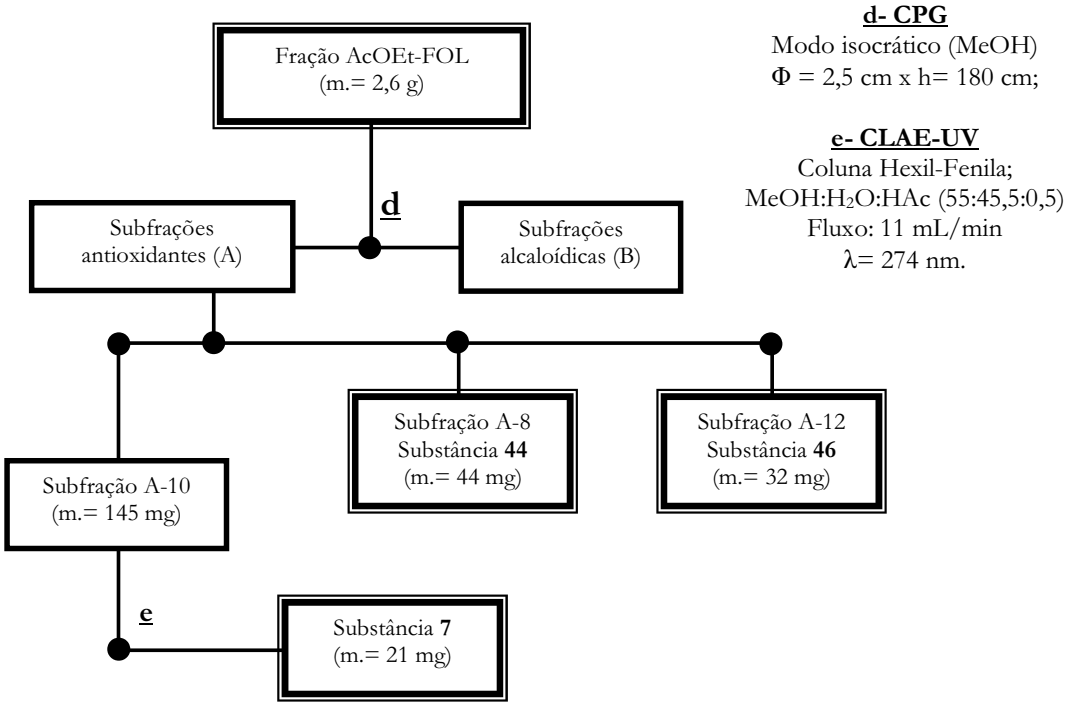
3.3. Isolamento dos metabólitos secundários

No primeiro momento, o estudo químico de *P. nitens* objetivou o isolamento de alcalóides guanidínicos e substâncias antioxidantes. Com esta finalidade, todo o fracionamento cromatográfico foi guiado por sucessivas análises por CCDA reveladas

com os reagentes de Sakaguchi (seletivo para derivados guanidínicos), de Dragendorff, de β-caroteno e anisaldeído. As frações obtidas segundo o item anterior que apresentaram resultado positivo para essas análises foram prioritariamente selecionadas para a continuidade do trabalho fitoquímico.

3.3.1. Constituintes químicos das folhas

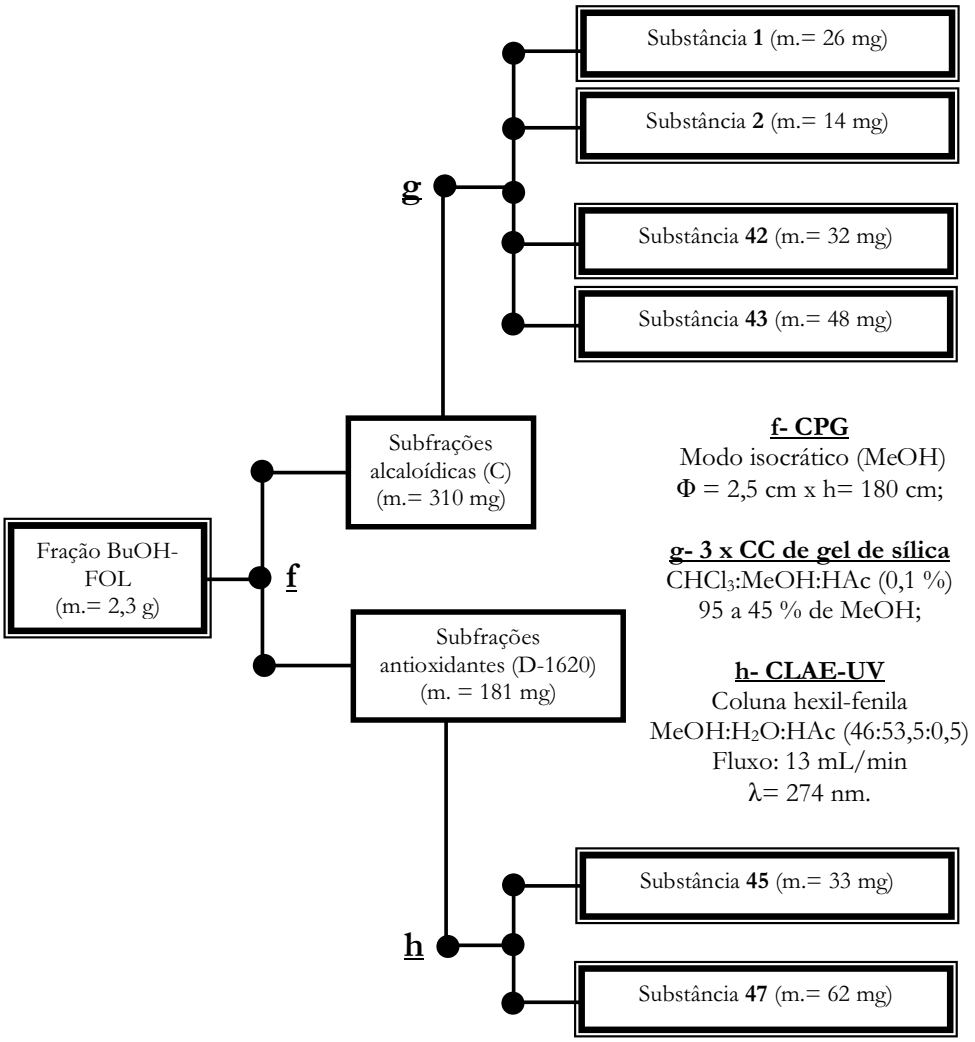
O estudo químico das frações AcOEt-FOL e BuOH-FOL culminou no isolamento de nove substâncias. Primeiramente, essas duas frações foram separadamente submetidas à cromatografia de permeação em gel (Sephadex®, LH-20), permitindo a obtenção de dois tipos de subfrações, as primeiras referem-se àquelas com alcalóides guanidínicos e as outras com substâncias antioxidantes (subfrações antioxidantes).



Esquema 4. Fracionamento cromatográfico de AcOEt-FOL.

A purificação da fração AcOEt-FOL empregando CPG rendeu 12 subfrações, as quais foram reunidas com base nos seus comportamentos em CCDA [$CHCl_3$:MeOH (85:15)] e CLAE-DAD [Coluna hexil-fenila; MeOH:H_2O (5 à 100 % de MeOH); 230 < λ < 400 nm; 1mL/min). Os espectros de absorção na região do ultravioleta obtidos por CLAE-

DAD das substâncias presentes nas subfrações antioxidantes, exibiram duas bandas de absorção intensa em torno de 270 e 350 nm, sugerindo que as mesmas pertencem à classe dos flavonóides.[51] Por outro lado, as subfrações alcaloídicas (B) foram caracterizadas como sendo derivados guanidínicos, devido ao teste positivo com o Reagente de Sakaguchi. As subfrações antioxidantes A-8 e A-12 forneceram as substâncias **44** e **46**, respectivamente. A subfração A- 10 foi purificada por CLAE-UV, obtendo-se a substância **7**.



Esquema 5. Fracionamento cromatográfico de BuOH-FOL.

A purificação da fração BuOH-FOL empregando CPG rendeu 25 subfrações, as quais foram reunidas com base nos seus comportamentos em CCDA [$CHCl_3$:MeOH

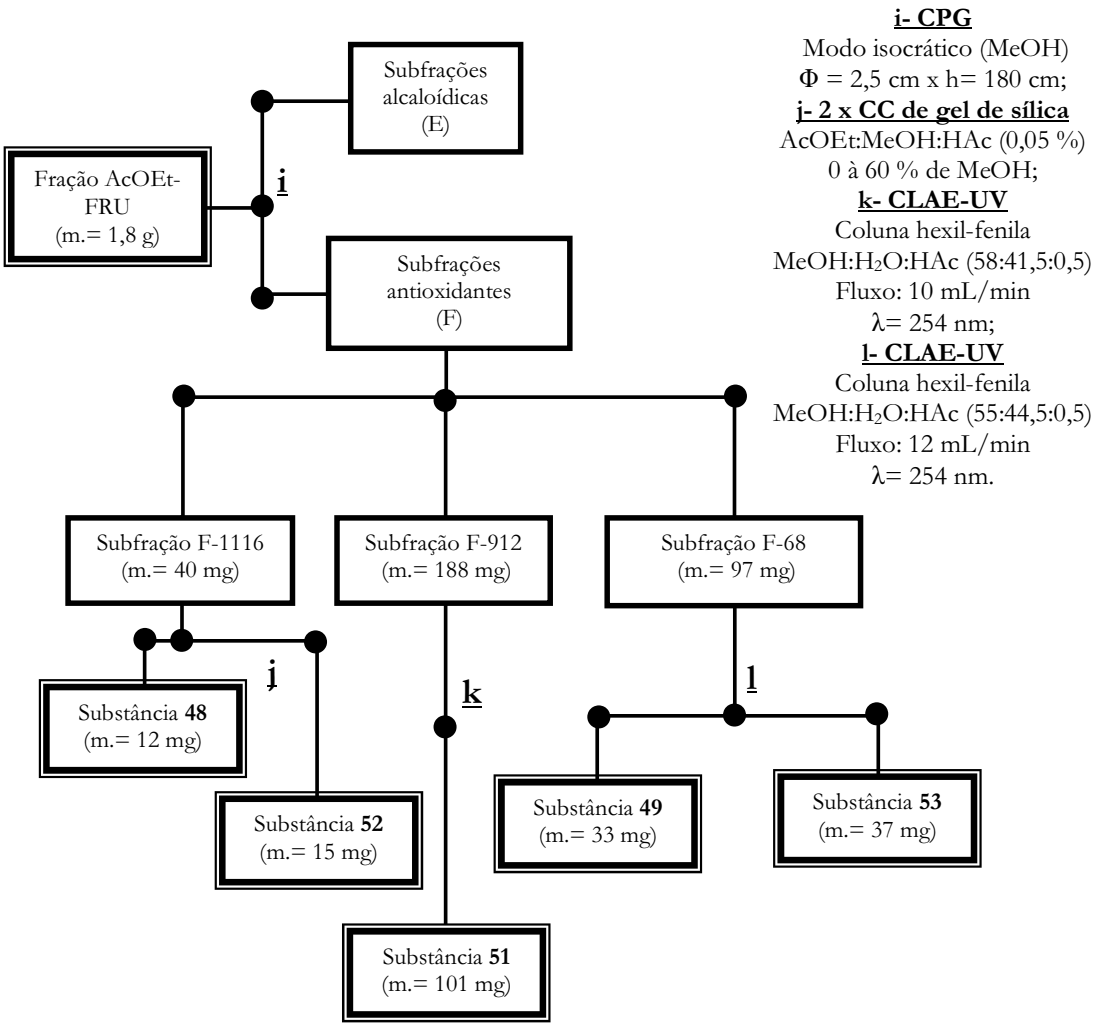
(85:15)] e CLAE-DAD [Coluna hexil-fenila; MeOH:H_2O (5 à 100 % de MeOH); 230 < λ < 400 nm; 1mL/min). Todas as subfrações alcaloídicas C-1 - C-10 obtidas por purificação através de CPG apresentaram o mesmo perfil químico em CCDA e foram reunidas em uma única subfração, denominada de subfrações alcaloídica (C). A subfração C foi submetida a sucessivas etapas de purificação utilizando cromatografia em coluna de gel de sílica, culminando no isolamento das substâncias **1**, **2**, **42** e **43**. Os espectros de absorção na região do ultravioleta obtidos por CLAE-DAD das substâncias presentes nas subfrações antioxidantes D-11 - D-25 exibiram comportamento semelhante àquele apresentado pelas substâncias antioxidantes presentes na fração AcOEt-FOL. As subfrações D-16 - D-20 foram reunidas e renomeadas de subfração D-1620 purificadas por CLAE-UV, fornecendo as substâncias **45** e **47**.

3.3.2. Constituintes químicos dos frutos

O estudo químico das frações AcOEt-FRU e BuOH-FRU culminou no isolamento de oito substâncias (**48**-**55**). Tendo em vista, o procedimento experimental adotado com sucesso para as frações AcOEt-FOL e BuOH-FOL, o qual permitiu uma separação entre flavonóides e alcalóides guanidínicos, adotou-se um fracionamento cromatográfico similar àquele, seguido de purificações empregando CLAE-UV e cromatografia em coluna de gel de sílica.

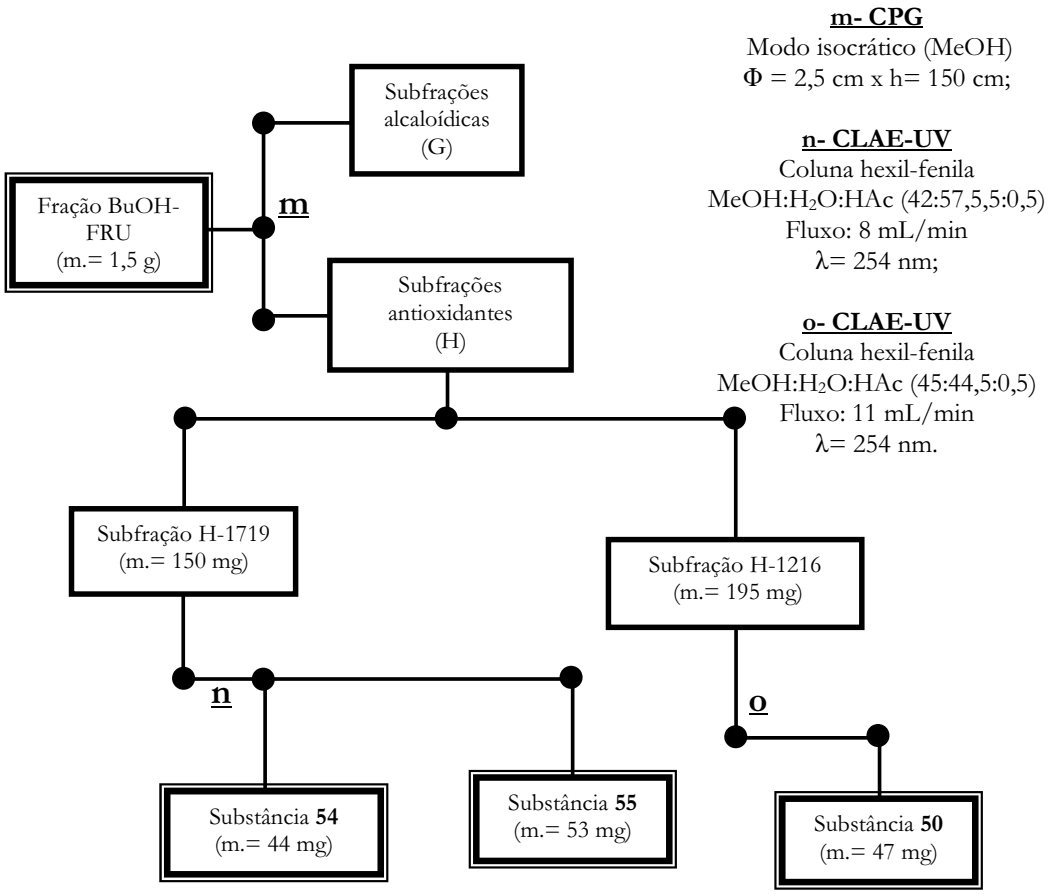
A purificação da fração AcOEt-FRU por meio de CPG, forneceu 18 subfrações, as quais foram reunidas de acordo com os perfis químicos apresentados nas análises por CCDA [$CHCl_3$:MeOH (85:15) e CLAE-DAD [Coluna hexil-fenila; MeOH:H_2O (5 à 100 % de MeOH); 230 < λ < 400 nm; 1mL/min). As substâncias presentes nas subfrações que apresentaram propriedade antioxidante apresentaram espectros de absorção na região do ultravioleta diferente das substâncias obtidas das frações AcOEt-FOL e BuOH-FOL. A feição dos espectros no UV destas substâncias, sugeriram pertencerem à classe dos flavonóides, devido à presença de duas bandas com intensa absorção em 285 e 330 nm.[51] As subfrações F-11 - F-16 nomeadas de subfração F-1116 foram reunidas e submetidas à purificações sucessivas via cromatografia em coluna de gel de sílica, fornecendo as substâncias **48** e **52**. As subfrações F-9 - F-12 foram reunidas e renomeadas de subfração F-912. Esta foi submetida à purificação empregando CLAE-UV,

fornecendo a substância **51**. As subfrações F-6 à F-8 foram reunidas (subfração F-68) e então purificadas por CLAE-UV levando ao isolamento das substâncias **49** e **53**.



Esquema 6. Fracionamento cromatográfico de AcOEt-FRU.

Inicialmente, a fração BuOH-FRU foi purificada por meio de cromatografia de permeação em gel, fornecendo 21 subfrações (H-1 à H-21). As subfrações que apresentaram resultado positivo com o revelador de β-caroteno (subfrações antioxidantes) foram analisadas e reunidas empregando CLAE-DAD [Coluna hexil-fenila; MeOH:H_2O (5 à 100 % de MeOH); 230 < λ < 400 nm; 1mL/min). Os espectros de absorção na região do ultravioleta das substâncias presentes nestas subfrações exibiram absorções típicas de flavonóides.[49]



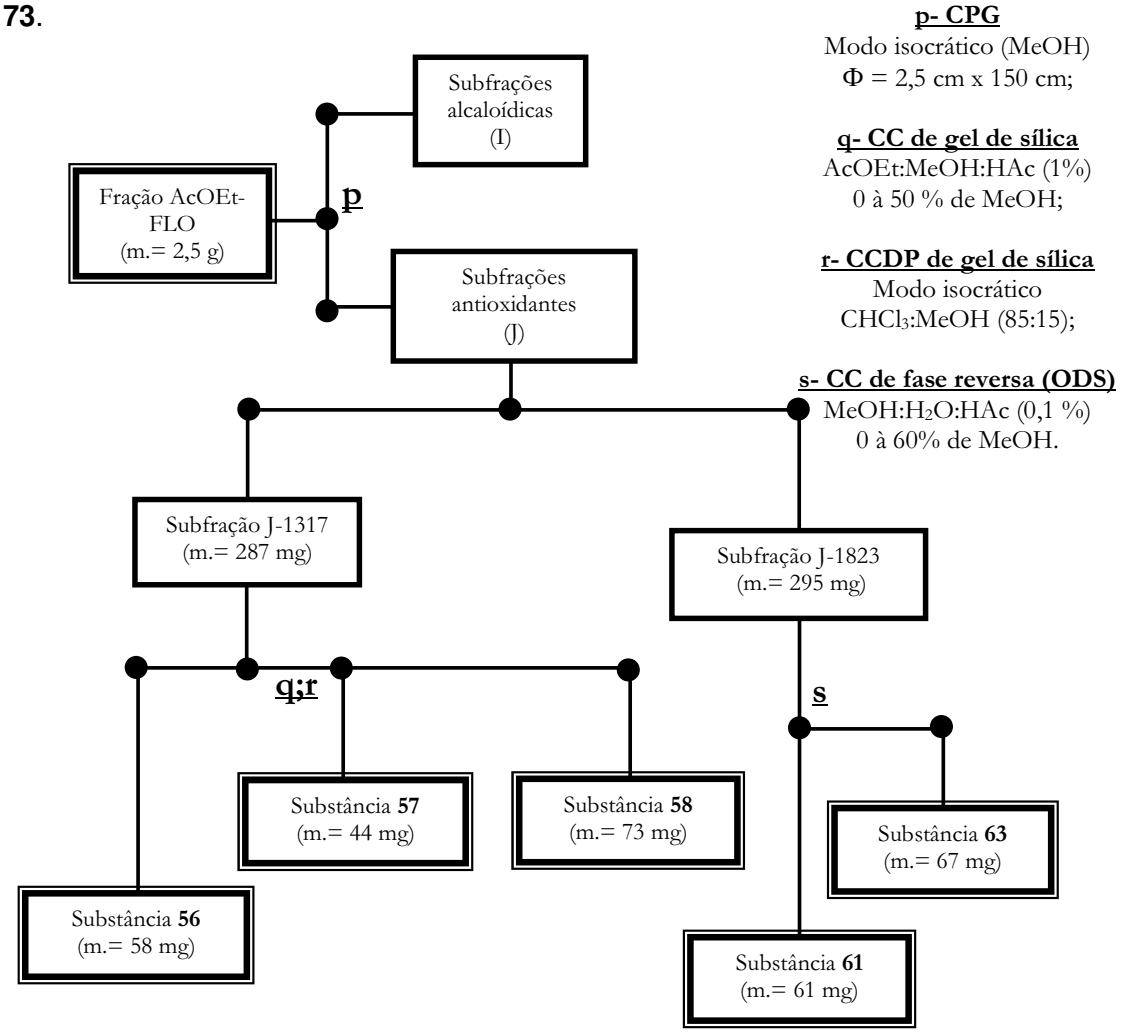
Esquema 7. Fracionamento cromatográfico de BuOH-FRU.

A análise por CLAE-DAD demonstrou que as subfrações H-12 - H-19 aparentemente, apresentou uma menor quantidade de substâncias. Dessa maneira, optou-se por reuni-las em duas subfrações antioxidantes H-12 - H-16 (subfração H-1216) e H-17 - H-19 (H-1719). Diante da elevada polaridade apresentada pelas substâncias presentes nas subfrações, optou-se por fracioná-las empregando CLAE-UV, fornecendo as substâncias **50**, **54** e **55**.

3.3.3. Constituintes químicos das flores

O estudo químico das frações AcOEt-FLO, BuOH-FLO e HA-FLO resultou no isolamento de oito substâncias (**56**-**63**). A fração AcOEt-FLO foi sujeita à cromatografia CPG, obtendo-se 25 subfrações. As subfrações antioxidantes foram analisadas e reunidas empregando-se CLAE-DAD [Coluna hexila-fenila; MeOH:H_2O (5 à 100 % de MeOH); 230 < λ < 400 nm; 1mL/min) e CCDA [$CHCl_3$:MeOH (4:1)]. Ao contrário do

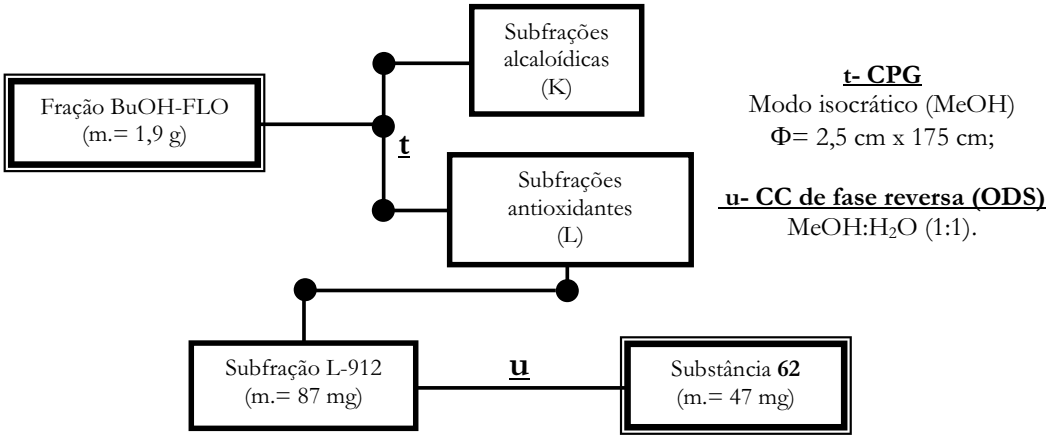
observado para as subfrações obtidas do estudo químico de folhas e frutos, os espectros de absorção no ultravioleta das subfrações com atividade antioxidante demonstraram a presença de substâncias diferentes das flavonas e dos flavonóis. As subfrações J-13 - J-17 apresentaram o mesmo perfil químico segundo estas análises, sendo reunidas e renomeada de subfração J-1317. Esta subfração foi submetida a cromatografia em coluna de gel de sílica, obtendo-se as substâncias **56** – **58**, objetivando-se um elevado grau de pureza das substâncias **56**-**58**, as mesmas foram repurificadas por CCDP [$CHCl_3$:MeOH (85:15)]. As subfrações J-18 - J-23 foram reunidas (J-1823) e em seguida submetida à cromatografia em coluna de fase reversa, resultando no isolamento das substâncias **61** e **73**.



Esquema 8. Fracionamento cromatográfico de AcOEt-FLO

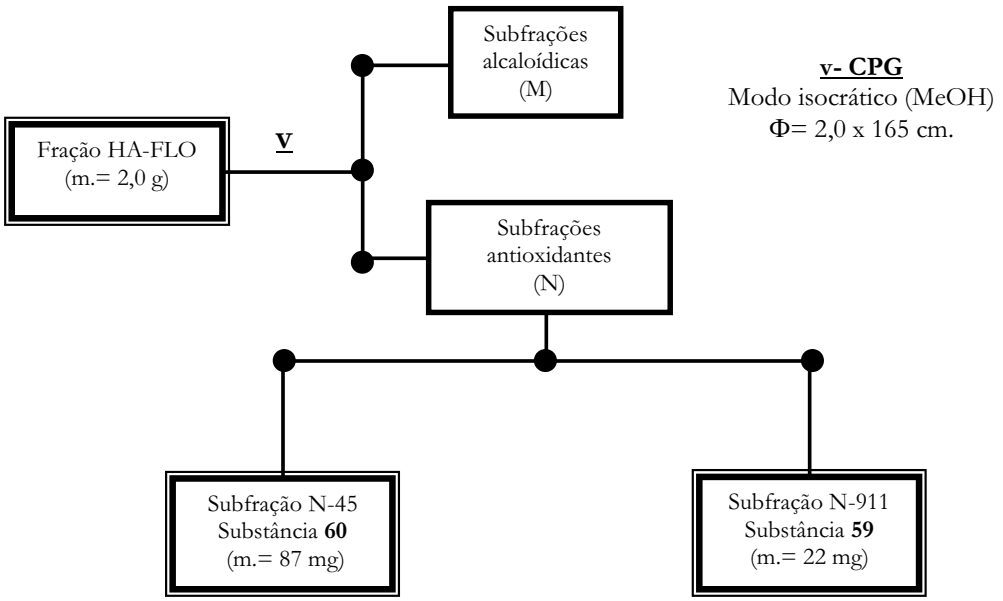
A fração BuOH-FLO foi submetida à CPG fornecendo 22 subfrações, as quais foram submetidas às mesmas condições de análise adotadas para as subfrações de

AcOEt-FLO. As subfrações L-9 - L-12 (subfração L-912) foi submetida à cromatografia em coluna de fase reversa, eluída em MeOH:H_2O (1:1), obtendo-se a substância **62**.



Esquema 9. Fracionamento cromatográfico de BuOH-FLO

A fração HA-FLO foi inicialmente submetida à CPG obtendo-se 13 subfrações. Das subfrações N-4 e N-5 (subfração N-45) foi identificada a substância **60**. As subfrações N-9 - N-11 foram reunidas (N-911), resultando no isolamento da substância **59**.



Esquema 10. Fracionamento cromatográfico de HA-FLO

3.3.4. Constituintes químicos dos caules

Após a partição líquido-líquido realizada com uma pequena alíquota do extrato EtOH-CAU (200 mg), as três frações obtidas (AcOEt-CAU, BuOH-CAU e HA-CAU) foram submetidas às mesmas análises que as frações e subfrações já descritas. Interessantemente, estas frações apresentaram uma concentração apreciável de alcalóides guanidínicos. Assim o extrato EtOH-CAU (83 g) foi submetido à cromatografia em coluna de gel de sílica (Φ= 8,0 cm x 45 cm) com eluição isocrática em $CHCl_3$:MeOH (4:1) fornecendo os alcalóides guanidínicos **1** (1520 mg) e **2** (758 mg).

3.3.5. Observações gerais

Os resultados da tabela 2 sugerem que uma parcela considerável dos constituintes químicos presentes nos extratos etanólicos de *P. nitens* foram isolados. Atenta-se para um acúmulo maior de flavonas que flavonóis pelas folhas de *P. nitens*, contrapondo o perfil químico apresentado pelos frutos, dos quais foram isolados, predominantemente substâncias da classe dos flavonóis. Diferentemente do comportamento químico destes dois órgãos vegetais, as flores acumularam derivados fenilpropanoídicos e diidroflavonóis.

Contudo, notou-se uma distribuição ampla dos alcalóides guanidínicos em todas as partes vegetais estudadas, contando com algumas variações quantitativas. Esse fato pode ser confirmado pela comparação entre os processos de isolamento dos alcalóides **1** e **2** presentes nas folhas e nos caules. No primeiro caso, foram necessárias seis etapas para o isolamento desses derivados guanidínicos, com rendimentos estimados de 0,018 e 0,009 % para as substâncias **1** e **2**, respectivamente. Já no segundo caso, a obtenção de **1** e **2** foi realizada em apenas duas etapas, com rendimentos três vezes maiores (0,054 e 0,027). Salienta-se que os alcalóides guanidínicos **42** e **43** apenas não foram identificados nas flores.

As análises por meio de CCDA e CLAE-UV apontaram também a presença de isoquercitrina (**53**) e quercetina 3-*O*-soforosídeo (**55**) nas folhas e flores. Observou-se também a presença de pedalitina (**46**) nos frutos e flores.

Sugere-se que estudos de “desreplicação”, envolvendo técnicas hifenadas como CLAE-EM, CLAE-DAD, CG-DIC e CG-EM sejam realizados com a finalidade de uma compreensão maio ampla do metaboloma de *P. nitens*, objetivando principalmente a descrição das substâncias de baixa polaridade, as quais se encontram nos extratos hexânicos não estudados neste trabalho.

Tabela 2. Estimativa dos rendimentos dos processos de isolamento das substâncias presentes nas folhas, frutos, caules e flores de *Pterogyne nitens*

órgão vegetal	substância	nº de etapas[a]	massa obtida (mg)	rendimento (%)[b]	rendimento (%)[c]	rendimento (%)[d]
Folhas						
	1	6	26	0,018	0,42	1,13
	2	6	14	0,009	0,23	0,61
	7	4	21	0,011	0,26	0,89
	42	6	32	0,022	0,51	1,39
	43	6	48	0,033	0,77	2,08
	44	3	44	0,023	0,60	1,70
	45	4	33	0,023	0,53	1,43
	46	3	32	0,017	0,40	1,23
	47	4	62	0,042	1,00	2,69
Frutos						
	48	5	12	0,003	0,16	0,67
	49	4	33	0,008	0,38	1,84
	50	4	47	0,039	1,96	3,10
	51	4	101	0,025	1,18	5,63
	52	5	15	0,003	0,17	0,78
	53	4	37	0,009	0,43	1,84
	54	4	44	0,036	1,83	2,90
	55	4	53	0,043	2,21	3,49
Flores						
	56	5	58	0,044	0,74	2,32
	57	5	44	0,033	0,56	1,76
	58	5	73	0,055	0,93	2,92
	59	3	22	0,004	0,13	1,10
	60	3	87	0,017	0,51	4,36
	61	4	61	0,046	0,78	2,44
	62	4	47	0,047	1,43	2,47
	63	4	67	0,046	0,78	2,68
Caules						
	1	2	1520	0,054	1,83	-
	2	2	758	0,027	0,91	-

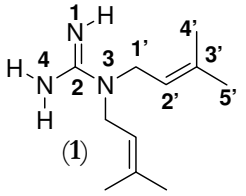
a- Número de etapas contabilizadas desde a maceração com etanol ao isolamento
b- Calculado em função do material botânico seco e moído;
c- Calculado em função do extrato etanólico de origem;
d- Calculado em função da fração originária da partição líquido-líquido.

4. Determinação estrutural

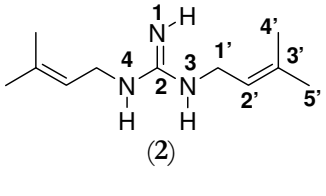
Para facilitar a discussão sobre a determinação estrutural das substâncias isoladas neste trabalho, estas foram separadas por classe de metabólitos secundários, independente da sua origem (folhas, caules, flores ou frutos). As substâncias com estruturas moleculares já relatadas na literatura foram identificadas utilizando-se as análises dos espectros de RMN de ^{1}H e RMN de ^{13}C, bem como por comparação com dados da literatura. As substâncias que apresentam estruturas moleculares ainda não descritas foram elucidadas por meio de técnicas espectroscópicas: RMN uni e bidimensionais, UV, IV e espectrometria de massas de alta resolução.

4.1. Alcalóides guanidínicos

4.1.1. Pteroginina (1) e pteroginidina (2)



(1)



(2)

Os alcalóides **1** e **2** foram obtidos como óleos levemente amarelados. A análise dos dados de RMN de ^{13}C da substância **1** indicou tratar-se de uma substância da classe dos alcalóides guanidino-terpênicos. Entre outras características se destacam a presença do sinal de carbono guanidínico (C-2) em δ_C 155,7 e o conjunto de cinco sinais que estão relacionados à subunidade isopentenílica (δ_C 17,8, 25,2, 39,0, 119,2 e 135,8).

A análise do espectro de RMN de ^{1}H confirmou a substituição do núcleo guanidínico por unidades hemiterpenoídicas. Fato que pode ser evidenciado pelos singletos em δ_H 1,62 e 1,68, atribuídos aos hidrogênios metílicos H-4' e H-5', respectivamente, bem como os sinais em δ_H 3,72 (d) e δ_H 5,16 (t), os quais apresentam-se relacionados aos hidrogênios metilênicos H-1' e metínico H-2', respectivamente.

Dessa forma, pode-se inferir que tal estrutura trata-se de um derivado guanidínico, porém deve-se atentar para o padrão de substituição isoprenílico no núcleo guanidínico merece uma análise mais detalhada. Para isso observou-se a multiplicidade apresentada para o sinal em δ_H 3,72 (J= 6,5 Hz), atribuído aos hidrogênios H-1', o qual se

apresenta como um dubleto, devido ao acoplamento com H-2'. Consequentemente, não se observou a presença de um hidrogênio azometínico com a conectividade H-3/N-3/C-1'/H-1', deduzindo-se que o alcalóide em questão apresentou o padrão *N,N*-dissubstituído, indicando que o alcalóide **1** é a pteroginina.[8]

A análise dos dados de RMN de ^{13}C da substância **2** indicou tratar-se de mais uma prenilguanidina. Fato constatado pela observação do sinal referente ao carbono guanidínico em δ_C 156,9 e cinco sinais que compõem a subunidade isopentenílica (δ_C 17,7, 25,1, 38,7, 119,0 e 136,0).

A análise do espectro de RMN de ^1H demonstrou para o sinal em δ_H 3,70 (J= 6,5 Hz), atribuído ao hidrogênio H-1', uma multiplicidade diferente daquele apresentado pelos hidrogênios H-1' presentes em **1**. No caso anterior observou-se um dubleto, já neste caso, um tripleto aparente, isso deve-se ao acoplamento do hidrogênio H-1' com o hidrogênio azometínico do núcleo guanidínico e H-2'. Esse dado tornou-se mais relevante, pois também se observou o tripleto em δ_H 7,72, o qual pode ser atribuído aos hidrogênios azometínicos H-3 e H-4. Assim sendo, a substância **2** apresentou um hidrogênio azometínico com a conectividade H-3/N-3/C-1'/H-1' e consequentemente inferiu-se que a presente prenilguanidina apresentou o padrão *N,N'* de substituição isoprenílica. Fundamentado nestas análises, conclui-se que a substância **2** pode ser identificada como a pteroginidina, um isômero constitucional do alcalóide **1**.[9]

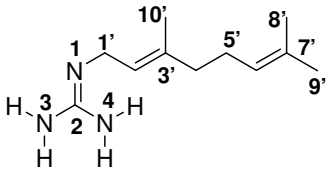
Tabela 3. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C dos alcalóides **1** e **2** (11,7 T; DMSO-d_6)

	pteroginina (**1**)		pteroginidina (**2**)	
Posição	**δ_C**	**δ_H; mult.; *J* (Hz)**	**δ_C**	**δ_H; mult.; *J* (Hz)**
1	-	7,44; sl*	-	7,20; sl
2	155,7	-	156,9	-
3	-	7,64; sl*	-	7,72; t; 6,5
4	-	7,64; sl*	-	7,72; t; 6,5
1'	39,0	3,72; d; 6,5	38,7	3,70; t; 6,5
2'	119,2	5,16; t; 6,5	119,0	5,16; t; 6,5
3'	135,8	-	136,0	-
4'	17,8	1,62; s	17,7	1,63; s
5'	25,2	1,68; s	25,1	1,69; s

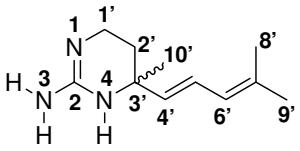
** valores intercambiáveis*

4.1.2. Nitensidina D (42) e nitensidina E (43)

As substâncias **42** e **43** caracterizam-se como óleos incolores.



(42)



(43)

A análise dos dados de RMN de ^{13}C da substância **42** indicou tratar-se de uma substância da classe dos alcalóides guanidino-prenilados. Entre outras feições destaca-se a presença do sinal de carbono guanidínico em δ_C 157,6 e o conjunto de dez sinais que estão relacionados à subunidade geranílica, sendo três carbonos metílicos (δ_C 16,0, 17,5 e 25,4), três carbonos metilênicos (δ_C 25,9, 38,5 e 38,9), dois carbonos metínicos sp^2 (δ_C 119,6 e 123,8) e dois carbonos quaternários (δ_C 130,9 e 138,3). Os sinais em δ_C 119,6; 123,8, 130,9 e 138,3, foram atribuídos aos carbonos C-2', C-6', C-7' e C-3', respectivamente, que estão relacionados aos carbonos das insaturações presentes na subunidade monoterpênica.

Os dados de RMN de ^1H mostraram a presença de dois tripletos em δ_H 5,07 (*J*= 7,0 Hz) e δ_H 5,17 (*J*= 6,0 Hz), os quais foram atribuídos aos hidrogênios metínicos H-6' e H-2', respectivamente. O dubleto em δ_H 3,63 (*J*= 6,0 Hz) foi atribuído aos hidrogênios metilênicos H-1', bem como para o conjunto de três singletos em δ_H 1,55, 1,61 e 1,63, os quais foram relacionados aos nove hidrogênios presentes nos grupos metílicos C-8', C-10' e C-9', respectivamente. A conectividade entre o núcleo guanidínico e a cadeia geranílica pode ser confirmada pelo mapa de contornos *g*HMBC, o qual exibiu a correlação entre o dubleto em δ_H 3,63 (H-2'') e o sinal em δ_C 157,6, atribuído ao carbono guanidínico. O experimento de NOESY 1D foi utilizado para elucidar a configuração da ligação dupla entre os carbonos C-2' e C-3'. O sinal em δ_H 5,17 (H-2') quando irradiado aumentou a intensidade do sinal em δ_H 1,97 (H-5'), sugerindo que os hidrogênios H-2' e H-5' apresentam, entre si, uma relação *sin* e, consequentemente inferiu-se que a insaturação apresenta configuração *E*. O sinal atribuído aos hidrogênios H-1' de **42** mostrou a mesma multiplicidade observada para o hidrogênio H-1'da substância **1**, ou seja um dubleto, sugerindo que **42** não possui um hidrogênio azometínico. Aqui, também caberia a proposição que a substância **42** poderia ser um derivado guanidínico *N,N*-digeranilado (nitensidina B, **3**) ou até mesmo *N,N,N',N'*-tetrageranilado. Esta hipótese foi descartada pela análise do espectro de massas de alta resolução. Este apresentou o íon *quasi*-

molecular *m/z* 196,1808 $[M+H]^+$ (valor teórico 196,1807), confirmando a presença de uma única unidade geranílica e a fórmula molecular $C_{11}H_{21}N_3$. Assim, concluiu-se que a geranilação não ocorreu nas posições N-3 e N-4 (derivados di e tetrageranilados), mas no nitrogênio sp^2 (N-1).

O espectro de absorção na região do infravermelho exibiu bandas em 1662 e 3188 cm^{-1}, as quais estão relacionados aos estiramentos de grupos C=N e N-H, respectivamente, corroborando a natureza guanidínica de **42**. O espectro de absorção na região do ultravioleta apresentou uma banda com absorção máxima em 260 nm (ε = 18), relacionada às transições eletrônicas n → π*, promovidas pela deslocalização de elétrons do núcleo guanidínico. A substância **42** foi nomeada de nitensidina D, uma geranilguanidina *N*-monossubstituída inédita na literatura.

Tabela 4. Dados de RMN uni e bidimensionais do alcalóide **42** (11,7 T; DMSO-d_6)

Posição	δ_C	δ_H**; mult.;** ***J*** **(Hz)**	***g*HMBC**
1	-	9,20; sl*	-
2	157,6	-	H-2'
3	-	8,85; sl*	-
4	-	8,85; sl*	-
1'	38,5	3,63; d; 6,0	H-10'
2'	119,6	5,17; t; 6,0	H-2', H-10' e H-4'
3'	138,3	-	H-2', H-10', H-5' e H-4'
4'	38,9	1,97; m	H-3' e H-5'
5'	25,9	2,03; m	-
6'	123,8	5,07; t; 6,0	H-8', H-9', H-5' e H-4'
7'	130,9	-	H-8', H-9' e H-5'
8'	17,5	1,55; s	H-6'eH-9'
9'	25,4	1,63; s	H-6', H-8' e H-4'
10'	16,0	1,61; s	H-3' e H-4'

** valores intercambiáveis*

Os dados de RMN de ^{13}C permitiram identificar a substância **43** como sendo um alcalóide guanidino-terpênico, devido à presença do sinal em δ_C 154,1 e de dez sinais referentes a uma unidade monoterpênica, com feições diferente daquelas apresentadas na substância **42**.

O espectro de RMN de ^1H apresentou sinais referentes a dois pares de hidrogênios metilênicos δ_H 1,62 (m), 1,79 (ddd, *J*= 3,5, 3,5 e 13,5 Hz), 2,92 (ddd, *J*= 3,5, 3,5 e 11,0 Hz) e 3,15 (m). O mapa de contornos *g*HMQC confirmou a presença destes,

pelo qual observou-se: a correlação entre os sinais em δ_H 1,62 (H-2a') e 1,79 (H-2b') e δ_C 31,9 (C-2') e, a correlação entre os sinais 2,92 (H-1a') e 3,15 (H-1b') com o sinal em δ_C 35,1 (C-1'). O mapa de contornos ^{1}Hx^{1}H *g*COSY indicou a correlação entre o multipleto com absorção em δ_H 1,62 com os sinais em δ_H 2,92 (ddd) e 3,15 (m), sugerindo que estes dois grupos metilênicos estejam em posição vicinal. Os valores das constantes de acoplamento desses sinais indicaram que esses grupos metilênicos façam parte de um ciclo. Sendo que a constante de acoplamento igual a 3,5 Hz sugere acoplamento do tipo equatorial-equatorial e axial-equatorial, enquanto que as constantes de acoplamento de maior magnitude, 11,0 Hz e 13,5 Hz, foram atribuídas aos acoplamentos do tipo axial-axial e geminal, respectivamente.

A análise do espectro de RMN de ^{1}H apresentou o conjunto de sinais em 5,52 (d, *J*= 15,0 Hz), 5,81 (d, *J*= 10,5 Hz) e 6,20 (dd, *J*= 10,5 e 15,0 Hz), os quais foram atribuídos aos três hidrogênios olefínicos H-4', H-6' e H-5', respectivamente e os singletos em δ_H 1,69 (H-8') e 1,73 (H-9') foram relacionados aos dois grupos metílicos vinílicos. O mapa de contornos ^{1}Hx^{1}H *g*COSY indicou a correlação entre o duplo dubleto em δ_H 6,20 (H-5') e os dubletos em δ_H 5,52 (H-4') e 5,81 (H-6'), sugerindo a presença de um dieno. O espectro de RMN de ^{13}C exibiu quatro sinais em δ_C 123,9 (C-6'), 125,2 (C-5'), 135,0 (C-7') e 135,4 (C-4'), confirmando a presença de insaturações na estrutura molecular de **43**. O mapa de contornos *g*HMQC apresentou três correlações que permitiram confirmar a presença do dieno proposto, sendo as correlações entre os sinais em δ_C 135,4, 125,2 e 123,9 e os sinais em δ_H 5,52, 6,20 e 5,81, respectivamente. Contudo o sinal em δ_C 135,0 não apresentou correlação com sinais de núcleos de hidrogênio, sugerindo que este sinal pode ser atribuído a um carbono quaternário. Este fato foi confirmado, pelo mapa de contorno *g*HMBC, o qual exibiu correlações entre os singletos com absorções em δ_H 1,69 e 1,73 e o sinal em δ_C 135,0. O valor da constante de acoplamento de 15,0 Hz observada para o dubleto com absorção em δ_H 5,52, sugeriu uma configuração *E* para a ligação dupla situada entre os carbonos C-4' e C-5'.

O mapa de contorno ^{1}Hx^{15}N *g*HMBC deduziu parte da conectividade do núcleo guanidínico com a unidade terpênica. O nitrogênio com ressonância em torno de δ_N 100,0 (N-4) mostrou correlação com os sinais em δ_H 5,52 e 1,26, atribuídos aos hidrogênios H-4' e H-10', respectivamente. A conectividade entre a unidade cíclica e a cadeia dienílica lateral presentes na estrutura molecular de **43** foram deduzidas pelo mapa de contorno *g*HMBC. Este experimento demonstrou correlações entre o sinal em δ_H 5,52 (H-4') e os

sinais em δ_C 27,6 (C-10'), 31,9 (C-2') e 52,4 (C-3'), bem como as correlações entre os sinais em δ_H 6,20 (H-5') e δ_C 52,4 (C-3').

O espectro de absorção na região do infravermelho do alcalóide **43** exibiu três bandas com absorção em 2970, 2925 e 2866 cm^{-1}, referentes aos estiramentos das ligações C-H alifáticas. Identificou-se a presença dos grupos C=N e N-H na estrutura molecular de **43**, pela presença de bandas com absorção em 1666 e 3215 cm^{-1}, respectivamente. Os alcalóides **42** e **43** apresentaram caráter higroscópico elevado, o que foi observado pelas bandas intensas e largas em 3384 e 3411 cm^{-1} nos seus espectros no infravermelho, de cada amostra, sugerindo-se que a água seja um interferente destas análises espectroscópicas.

Tabela 5. Dados de RMN uni e bidimensionais do alcalóide **43** (11,7 T; DMSO-d_6)

Posição	**δ_C**	**δ_H; mult.; *J* (Hz)**	***g*HMBC**
1	-	-	-
2	154,1	-	-
3	-	7,98; sl*	-
4	-	8,50; sl*	-
1'	35,1	2,92; ddd; 11,0, 3,5 e 3,5 3,15; m	-
2'	31,9	1,62; m 1,79; ddd; 13,5, 3,5 e 3,5	H-4' e H-10'
3'	52,4	-	H-4', H-5' e H-10'
4'	135,4	5,52; d; 15,0	H-10'
5'	125,0	6,20;dd; 10,5 e 15,0	-
6'	123,9	5,81; d; 10,5	H-4', H-5', H-8' e H-9'
7'	135,0	-	H-5', H-8' e H-9'
8'	18,0	1,69; s	H-6' e H-9'
9'	25,5	1,73; s	H-6' e H-8'
10'	27,6	1,26; s	H-4'

** valores intercambiáveis*

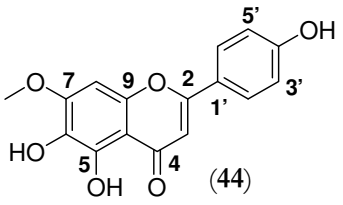
O espectro de massas de alta resolução para o alcalóide **43** apresentou o íon *quasi*-molecular *m*/*z* 194,1652 $[M+H]^+$ (valor teórico 194,1651), confirmando a fórmula molecular $C_{11}H_{19}N_3$. A análise conjunta dos espectros de massas e RMN de ^{13}C sugerem um índice de deficiência de hidrogênios igual a quatro para **43**. Esse dado é mais um forte indício que o alcalóide **43** é um derivado cíclico de **42**, o qual por sua vez apresenta um índice de deficiência de hidrogênios igual a três. O espectro no UV de **43** apresentou uma absorção intensa em 250 nm, relacionada à presença de um grupo guanidina, assim como observado para a substância **43**.

Diante dos dados espectroscópicos expostos, a substância **43** foi nomeada de nitensidina E, e identificada como uma cicloguanidina inédita na literatura com esqueleto carbônico 2-amino-tetraidropirimidínico com rotação óptica especifica de +140^o (25^{o}C, MeOH, 1 m/mL).

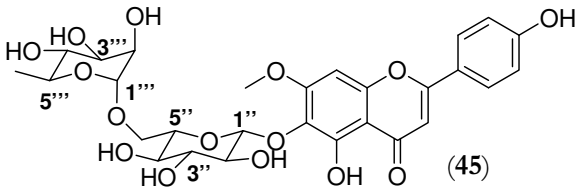
4.2. Flavonas

4.2.1. Sorbifolina (44) e nitensosídeo A (45)

As substâncias **44** e **45** foram obtidas como pós amorfos de coloração amarela.



(44)



(45)

A análise dos espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C permitiu caracterizar a substância **44** como pertencente à classe dos flavonóides. O espectro de RMN de ^{13}C apresentou 14 sinais, destacando-se os sinais em δ_C 164,3, 102,8 e 182,5 atribuídos a C-2, C-3 e C-4, respectivamente, evidenciando a subclasse das flavonas. Destaque para os sinais de maior intensidade em δ_C 128,8 e 116,4, os quais estão correlacionados aos pares de carbonos C-2'/C-6' e C-3'/C-5', respectivamente.

O espectro de RMN de ^{1}H apresentou um par de dubletos em δ_H 7,89 (J= 8,5 Hz) e 6,90 (J= 8,5 Hz) e dois singletos em δ_H 6,70 e 6,85, correspondentes aos hidrogênios H-2'/H-6', H-3'/H-5', H-3 e H-8, respectivamente. Essas observações permitiram concluir que a flavona **44** apresenta um anel A pentassubstituído e o anel B 1',4'-dissubstituído. O singleto largo em δ_H 12,5 foi atribuído ao hidrogênio do grupo fenólico em C-5, o qual está envolvido em uma ligação de hidrogênio intramolecular com o oxigênio carbonílico em C-4. O singleto em δ_H 3,87 e o sinal em δ_H 56,7 foram correlacionados à um grupo metoxila. Esses dados mostraram-se compatíveis com àqueles encontrados na literatura, permitindo identificar a flavona **44** como sendo sorbifolina.[52]

A substância **45** apresentou duas bandas de absorção no espectro na região do ultravioleta, que permitiram caracterizá-la como um flavonóide. A banda com absorção

máxima em 274 nm (banda II, log ε= 4,41) foi relacionada ao anel A, enquanto a banda em 338 nm (banda I, log ε= 4,72) ao anel B em ressonância com anel C, deduziu-se que **45** é um derivado flavônico.

O espectro de absorção na região do infravermelho de **45** apresentou uma banda intensa e larga em 3427 cm^{-1}, a qual está relacionada aos estiramentos de grupos O-H. As bandas em 1606 e 1502 cm^{-1} evidenciaram a presença de anéis aromáticos. A presença de uma carbonila conjugada e a natureza glicosídica de **45** foram deduzidas pela presença das bandas em 1656 e 1060 cm^{-1}, respectivamente.

Os espectros de RMN da flavona **45** apresentaram-se muito similares àqueles observados para a flavona **44**, exceto pela presença sinais pertencentes a duas unidade de açúcar 66,6 < δ_C < 76,4, consequentemente deduziu-se que **45** é o diglicosídeo de **44**.

O espectro de RMN de ^1H apresentou um par de dubletos em δ_H 4,92 e 4,45, que foram atribuídos aos hidrogênios anoméricos de duas unidades monossacarídicas H-1'' e H-1''', respectivamente. Para o primeiro dubleto observou-se uma constante de acoplamento de 7,0 Hz, sugerindo para esta hexose, uma configuração β, enquanto para o segundo uma constante de acoplamento de 1,5 Hz, indicando uma configuração α para a segunda unidade de hexose. Adicionalmente, o dubleto com absorção em δ_H 1,04 (*J*= 6,0 Hz), conduz à conclusão de que uma dessas unidades monossacarídicas seja uma ramnose. Fato este confirmado pela presença do sinal em δ_C 17,7 Hz, o qual foi atribuído ao carbono C-6''' deste açúcar. As correlações observadas no mapa de contornos *g*HMQC entre os dubletos em δ_H 4,92 e 4,45 atribuídos aos hidrogênios anoméricos e os sinais em δ_C 102,4 e 100,6, permitindo atribuir esses dois últimos sinais aos carbonos C-1'' e C-1''', respectivamente. O mapa de contornos *g*HMBC de **45** exibiu uma correlação entre o sinal em δ_C 128,1 (C-6) e o hidrogênio anomérico em δ_H 4,92 (*J*= 7,0 Hz), atribuído à uma unidade de β-glicose, corroborando a ocorrência de *O*-glicosilação na posição 6.

Ao carbono metilênico C-6'' foi atribuído o sinal com absorção em δ_C 66,6. O incremento no valor de deslocamento químico para este (geralmente apresenta-se em torno de 60,5-62,0 ppm), sugere que o carbono C-6'' está envolvido com uma ligação interglicosídica do tipo 6''→ 1'''. O mapa de contorno *g*HMBC confirmou esta proposição, uma vez que o mesmo exibiu a correlação entre os sinais em δ_H 4,45 (H-1''') e 3,70 (H-6''b) e os sinais em δ_C 66,6 (C-6'') e 100,6 (C-1'''), respectivamente.

O experimento de NOESY 1D realizado com irradiação no sinal com absorção em δ_H 3,90 (hidrogênios metílicos de um grupo metoxila) provocou um ganho de

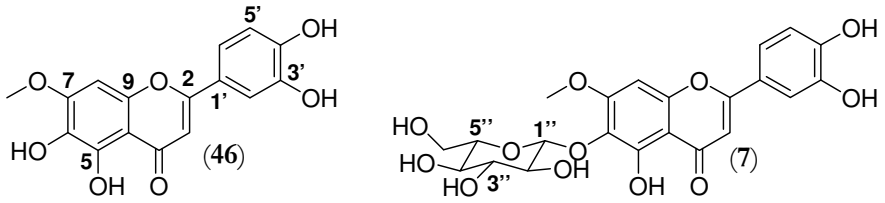
intensidade no singleto em δ_H 6,87, atribuído ao hidrogênio H-8, sugerindo que o grupo metoxílico esteja situado na posição 7. Este fato pode ser confirmado pelo mapa de contorno de *g*HMBC exibiu a correlação entre o sinal em δ_H 3,90 e o sinal em δ_H 158,7 (C-6), o que corrobora a proposição que a estrutura molecular de **45** seja uma 7-metoxiflavona. O espectro de massas de alta resolução para a flavona **45** apresentou o íon *quasi*-molecular *m*/*z* 607,1657 $[M-H]^-$ (valor teórico 607,1657), confirmando a fórmula molecular $C_{28}H_{32}O_{15}$. Os dados obtidos para **45** são compatíveis com a sorbifolina 6-*O*-rutinosídeo, uma 7-metoxiflavona não descrita na literatura e com rotação óptica especifica de +23° (25 °C, 1 mg/mL, MeOH).

Tabela 6. Dados de RMN das flavonas **44** e **45** (11,7 T; DMSO-d_6)

Posição	sorbifolina (**44**)		nitensosídeo A (**45**)		
	δ_C	δ_H; mult.; *J* (Hz)	δ_C	δ_H; mult.; *J* (Hz)	*g*HMBC
2	164,3	-	164,0	-	H-3, H-2' e H-6'
3	102,8	6,70; s	102,7	6,81; s	-
4	182,5	-	182,2	-	H-3
5	146,4	-	151,7	-	5-OH
6	130,2	-	128,1	-	H-8, H-1'' e 5-OH
7	154,7	-	158,7	-	H-8 e 7-OMe,
8	91,5	6,85; s	91,5	6,87; s	-
9	150,1	-	152,8	-	H-8
10	105,3	-	104,9	-	H-3, H-8 e 5-OH
1'	121,7	-	121,2	-	H-3, H-3' e H-5',
2' e 6'	128,8	7,89; d; 8,5	128,5	7,96; d; 8,5	H-6'
3' e 5'	116,4	6,90; d; 8,5	115,9	6,94; d; 8,5	H-5'
4'	161,4		161,2	-	H-2' e H-6'
1''	-	-	102,4	4,92; d; 7,0	H-2''
2''	-	-	74,0	3,24; m	H-3''
3''	-	-	75,7	3,21; m	H-2''
4''	-	-	70,0	3,10; m	H-3''
5''	-	-	76,4	3,12; m	-
6''	-	-	66,6	3,70; dd; 1,5 e 11,0 3,40; m	H-1'''
1'''	-	-	100,6	4,45; d; 1,5	H-6a'' e H-6b''
2'''	-	-	70,3	3,42; m	-
3'''	-	-	70,6	3,30; m	H-1'''
4'''	-	-	71,8	3,10; m	H-6'''
5'''	-	-	68,1	3,26; m	H-6'''
6'''	-	-	17,7	1,04; d; 6,0	H-4''' e H-5'''
7-OCH_3	56,7	3,87; s	56,4	3,90; s	-
5-OH	-	12,5; sl	-	13,0;sl	-

4.2.2. **Pedalitina (46), pedalina (7) e nitensosídeo B (47)**

As substâncias **7** e **46** foram isoladas como pós amorfos de coloração amarela.



A análise dos espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C permite caracterizar as substâncias **7** e **46** como pertencente à classe dos flavonóides.

Os espectros de RMN de ^{13}C de **46** e **7** apresentaram os sinais em δ_C 163,9/164,2, 102,5/102,6 e 182,0/182,0 atribuídos aos carbonos C-2, C-3 e C-4, respectivamente, permitindo inferir que tais substâncias pertencem à subclasse das flavonas.

De uma maneira geral, os espectros de RMN de ^{13}C das flavonas **7** e **46** apresentaram-se muito similares. Basicamente a diferença notada refere-se aos sinais apresentados pela substância **46**, os quais absorveram entre δ_C 60,9 e 77,2, típicos de carbonos carbinólicos constituintes de uma unidade monossacarídica. Logo, deduziu-se que o flavonóide **46** é um glicosídeo de **7**.

Nos espectros de RMN de ^{1}H das flavonas **46** e **7** observou-se a presença de um par de singletos em δ_H 6,68/6,70 e 6,85/6,85, os quais podem ser atribuídos aos hidrogênios H-3 (anel C) e H-8 (anel A), respectivamente. Destacam-se ainda, os sinais em δ_H 3,92 e 3,89, os quais foram caracterizados como um grupo metoxílico aromáticos presentes em **46** e **7**, respectivamente.

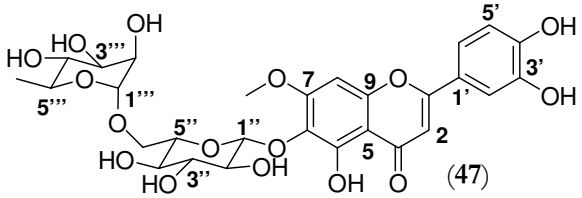
O espectro de RMN de ^{1}H da substância **7** apresentou um dubleto em δ_H 5,02, o qual foi atribuído ao hidrogênio anomérico H-1''. Este dubleto apresenta constante de acoplamento de 7,5 Hz, indicando configuração β para esta unidade monossacarídica. Paralelamente, o espectro de RMN de ^{13}C revelou o sinal em δ_C 60,9, o qual foi atribuído ao carbono metilênico C-6'' da unidade de glicose. Assim sendo, pode-se sugerir que as substância **7** e **46**, tratam-se de duas flavonas comumente denominadas de pedalitina e pedalina, sendo que esta última foi descrita anteriormente para *P. nitens*.[11,52]

Tabela 7. Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C das flavonas **7** e **46** (11,7 T; DMSO-d_6)

Posição	pedalitina (**46**)		pedalina (**7**)	
	δ_C	δ_H; mult.; *J* (Hz)	δ_C	δ_H; mult.; *J* (Hz)
2	163,9	-	164,2	-
3	102,5	6,68; s	102,6	6,70; s
4	182,0	-	182,0	-
5	no*	-	152,5	-
6	129,9	-	128,1	-
7	154,3	-	158,5	-
8	91,0	6,85; s	91,5	6,85; s
9	149,6	-	151,6	-
10	105,0	-	104,8	-
1'	121,7	-	121,4	-
2'	113,4	7,44; d; 1,5	113,4	7,42; d; 1,5
3'	145,7	-	145,7	-
4'	149,6	-	149,8	-
5'	115,9	6,90; d; 8,5	115,9	6,88; d; 8,0
6'	118,8	7,43; dd; 1,5 e 8,5	119,0	7,41; dd; 1,5 e 8,0
1''	-	-	102,0	5,02; d; 7,5
2''	-	-	76,5	3,21; m
3''	-	-	77,2	3,06; m
4''	-	-	69,9	3,13; m
5''	-	-	74,1	3,22; m
6''	-	-	60,9	3,36; m; 3,57; dd; 2,0 e 11,5
7-OCH_3	56,2	3,92; s	56,5	3,89; s
5-OH	-	12,6; sl	-	13,0; sl

** no = não observado*

A substância **47** foi obtida como um pó amorfo de coloração amarela intensa.



(47)

O espectro de absorção na região do ultravioleta de **47** exibiu uma banda com absorção máxima em 270 nm (log ε= 4,43, banda II) foi relacionada ao anel A, enquanto a banda em 349 nm (log ε= 4,93, banda I) referiu-se ao anel B conjugado com anel C, logo inferindo-se que **47** é uma flavona. A banda I da flavona **47** apresenta valor maior que àquele observado para a banda I da flavona **47**, ou seja, observa-se um efeito

batocrômico, sugerindo um padrão de substituição do anel B de **47**, diferente daquele revelado para **45**. Este efeito batocrômico pode estar relacionado à presença de mais um grupo oxigenado em **47**.

O espectro na região do infravermelho da substância **47** apresentou uma banda intensa e larga em 3427 cm^{-1}, a qual está relacionada aos estiramentos (O-H). As bandas em 1606, 1502 e 1450 cm^{-1} evidenciam a presença de anéis aromáticos. As bandas com absorção em 1656 e 1060 cm-1 podem estar correlacionadas a presença de uma função orgânica carbonilada e de açúcares.

Os espectros de RMN unidimensionais da flavona **47** apresentaram-se muito similar àqueles observados para a flavona **7**, exceto pela presença sinais pertencentes a mais uma unidade monossacarídica, consequentemente deduziu-se que **47** comporta-se como um diglicosídeo de **45**.

O espectro de RMN de ^1H apresentou um dubleto em δ_H 4,89, o qual foi atribuído ao hidrogênio anomérico H-1'', cuja constante de acoplamento com o valor de 7,0 Hz, indicou para esta hexose, uma configuração β. O singleto largo em δ_H 4,43 foi relacionado ao hidrogênio anomérico H-1''' de uma unidade de α-hexose. Adicionalmente, o dubleto com absorção em δ_H 1,01 (J= 6,5 Hz), conduz à conclusão de que uma dessas unidades monossacarídicas seja uma ramnose, sendo este sinal atribuído ao hidrogênio H-6'''. Fato este confirmado pela presença do sinal em δ_C 17,7 Hz, o qual foi atribuído ao carbono C-6''' deste açúcar.

As correlações observadas no mapa de contornos *g*HMQC entre os dubletos em δ_H 4,89 e 4,43 atribuídos aos hidrogênios anoméricos e os sinais em δ_C 102,4 e 100,5, permitem atribuir esses dois últimos sinais aos carbonos C-1'' e C-1''', respectivamente.

As conectividades entre os açúcares e a aglicona, a ligação interglicosídica e a posição de metoxilação foram determinados através dos mesmos experimentos de RMN uni e bidimensionais empregados para determinar esses dados condizentes com a substância **45**.

O espectro de massas de alta resolução para a flavona **47** apresentou o íon *quasi*-molecular *m*/*z* 623,1604 $[M-H]^-$ (valor teórico 623,1606), confirmando a fórmula molecular $C_{28}H_{32}O_{16}$.

Assim, a substância **47** foi elucidada como sendo pedalitina 3-*O*-rutinosídeo, uma 7-metoxiflavona inédita na literatura com rotação óptica especifica de +40° (25 °C, 1 mg/mL, MeOH).

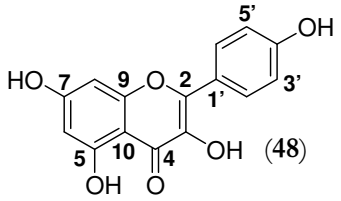
Tabela 8. Dados de RMN uni e bidimensionais da flavona **47** (11,7 T; DMSO-d_6)

Posição	δ_C	δ_H; mult.; *J* (Hz)	*g*HMBC
2	164,1	-	H-3, H-2' e H-6'
3	102,7	6,67; s	-
4	182,1	-	H-3
5	152,8	-	-
6	128,0	-	H-8 e H-1''
7	158,7	-	H-8 e 7-OMe
8	91,4	6,79; s	-
9	151,7	-	H-8
10	104,8	-	H-3 e H-8
1'	121,5	-	H-3, H-2', H-5' e H-6'
2'	113,5	7,43; d; 2,0	H-6'
3'	145,7	-	H-2' e H-5''
4'	149,7	-	H-2' e H-6'
5'	115,9	6,88; d; 8,5	-
6'	119,0	7,42; dd; 2,0 e 8,5	H-2' e H-5'
1''	102,4	4,89; d; 7,0	H-2''
2''	74,0	3,22; m	H-3''
3''	75,7	3,19; m	H-2''
4''	70,0	3,08; m	H-3'' e H-4''
5''	76,4	3,10; m	-
6''	66,5	3,39; m; 3,68; dl; 11,0	H-1'''
1'''	100,5	4,43; s	H-6''a
2'''	70,3	3,40; m	H-3'''
3'''	70,5	3,26; m	H-1'''
4'''	71,8	3,08; m	H-6'''
5'''	68,1	3,24; m	H-6'''
6'''	17,7	1,01; d; 6,5	H-4''' e H-5'''
7-OCH_3	56,4	3,88; s	-
5-OH	-	13,0;sl	-

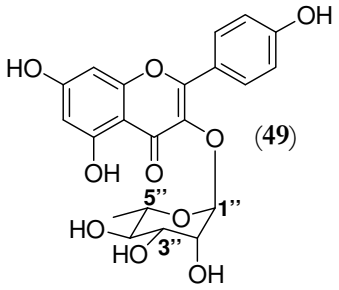
4.3. Flavonóis

4.3.1. Kaempferol e seus ramnosídeos (48 - 51)

A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C permite caracterizar a substância **48**-**51** como pertencentes à classe dos flavonóides, os quais foram isolados como pós amorfos de coloração amarela.



(48)

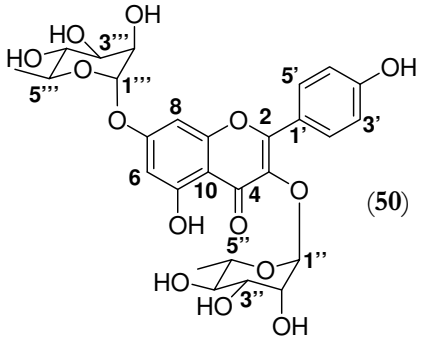


(49)

O espectro de RMN de ^{13}C da substância **48** apresentou 13 sinais, destacando-se os sinais em δ_C 146,8, 135,6 e 175,8 atribuídos aos carbonos C-2, C-3 e C-4, respectivamente. Estes três evidenciam o anel C de um flavonol. Os sinais de maior amplitude em δ_C 129,4 e 115,8, foram atribuídos aos pares de carbonos C-2'/C-6' e C-3'/C-5', respectivamente.

O espectro de RMN de ^1H de **48** apresentou sinais de hidrogênios aromáticos típicos de um flavonol cujos anéis A e B apresentam-se tetra e dissubstituído, respectivamente. Esta observação foi deduzida pela presença de quatro dubletos com absorções em δ_H 6,18 (*J*= 2,0 Hz), 6,43 (*J*= 2,0 Hz), 8,03 (*J*= 9,0 Hz) e 6,92 (*J*= 9,0 Hz), relacionados aos hidrogênios H-6, H-8, H-2'/H-6' e H-3'/H-5', respectivamente. O singleto em δ_H 12,4 foi atribuído ao hidrogênio de uma hidroxila (5-OH) envolvido em uma ligação de hidrogênio intramolecular com o oxigênio carbonílico na posição 4. Assim sendo, conclui-se que a substância **48** pode ser caracterizada como sendo o kaempferol.[51,53]

Os espectros de RMN unidimensionais apontam para as substâncias **49** e **50** um comportamento de ramnosídeos de kaempferol. Além das feições de um derivado de kaempferol, o espectro de RMN de ^1H referente à substância **49** apresentou um dubleto com absorção em δ_H 5,27, o qual foi atribuído ao hidrogênio anomérico H-1''. O valor da constante de acoplamento de 2,0 Hz calculada para este sinal, sugere a presença de uma α-hexose. A presença de um dubleto em δ_H 0,77 (*J*= 5,5 Hz) e do sinal atribuído a um carbono metílico em δ_C 17,5, sugerem que esta hexose seja referente a uma ramnose.



(50)

A análise dos espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C do flavonol **50** demonstrou a presença de sinais duplicados referentes a uma unidade de α-ramnose, sugerindo que este se apresenta como um dirramnosídeo de **48**. Assim as substâncias **48** e **49** foram identificadas como sendo afzelina e kaempferitrina, respectivamente.[51,53]

Tabela 9. Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C dos flavonóis **48** - **50** (11,7 T; DMSO-d_6)

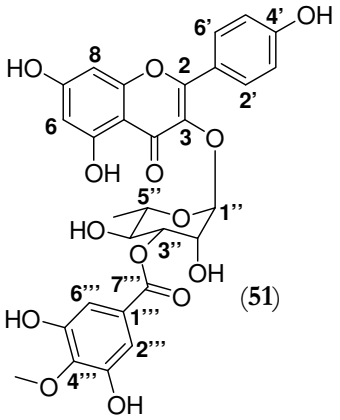
	kaempferol (**48**)		afzelina (**49**)		kaempferitrina (**50**)	
Posição	δ_C	δ_H; mult.; *J* (Hz)	δ_C	δ_H; mult.; *J* (Hz)	δ_C	δ_H; mult.; *J* (Hz)
2	146,8	-	157,3	-	157,5	-
3	135,6	-	134,3	-	134,1	-
4	175,8	-	177,8	-	177,4	-
5	160,6	-	161,3	-	161,5	-
6	98,1	6,18; d; 2,0	98,8	6,19; d; 2,0	99,7	6,33; sl
7	163,9	-	164,3	-	166,9	-
8	93,4	6,43; d; 2,0	93,8	6,40; d; 2,0	93,0	6,63; sl
9	156,1	-	156,6	-	156,1	-
10	103,0	-	104,2	-	106,3	-
1'	121,6	-	120,6	-	118,4	-
2' e 6'	129,4	8,03; d; 9,0	130,7	7,73; d; 9,0	130,5	7,73; d; 8,5
3' e 5'	115,4	6,92; d; 9,0	115,5	6,90; d; 9,0	116,1	6,81; d; 8,5
4'	159,1	-	160,0	-	163,0	-
1''	-	-	101,8	5,27; d; 2,0	101,7	5,29; sl
2''	-	-	70,4	3,47; m	70,1	3,95;sl
3''	-	-	70,1	3,96; m	69,8	3,50; dd; 3,0 e 9,0
4''	-	-	71,2	no	71,2	3,14; t; 9,0
5''	-	-	70,7	3,09; m	70,6	3,22; m
6''	-	-	17,5	0,77; d; 5,5	17,9	0,81; d; 6,0
1'''	-	-	-	-	98,7	5,49; sl
2'''	-	-	-	-	70,3	3,82; sl
3'''	-	-	-	-	70,0	3,62; dd; 3,5 e 9,0
4'''	-	-	-	-	71,7	3,29; t; 9,0
5'''	-	-	-	-	70,4	3,42; m
6'''	-	-	-	-	17,5	1,11; d; 6,0
5-OH						

** não observado*

Os espectros de RMN uni e bidimensionais da substância **51** apresenta-se muito semelhantes àqueles apresentados pelos flavonóis (**48**-**50**).

O mapa de contornos de *g*HMBC mostrou a correlação entre o dubleto em δ_H 5,38, atribuído ao hidrogênio anomérico H-1'' e o sinal em 136,0 (C-3), sugerindo que a de ramnosilação ocorre na posição C-3. Esse dado somado a feição dos espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C apresentado pela substância **51** permite inferir que a mesma seja um derivado da afzelina (**49**). Além dos sinais compatíveis com uma unidade de **49**, observou-se a presença de cinco sinais no espectro de RMN de ^{13}C (δ_C 167,7, 151,5, 141,2, 126,8 e

110,5) e de um singleto em δ_H 7,06, os quais foram correlacionados à presença de uma unidade de galoíla.



(**51**)

Contudo, salienta-se para o valor do deslocamento químico atribuído ao hidrogênio H-3'', o qual mostrou um incremento ($\Delta\delta$= 1,15) em relação ao valor encontrado para o sinal relacionado ao hidrogênio H-3'' da afzelina. O flavonol **51** apresentou um valor de δ_H 5,11 (dd, *J*= 3,2 e 9,8 Hz), enquanto para a afzelina δ_H 3,96, sugerindo a presença de um substituinte sobre o carbono C-3'', o qual teria capacidade eletroatratora e consequente desblindagem do núcleo desse hidrogênio. O mapa de contornos *g*HMBC evidenciou a correlação entre o sinal em δ_H 5,11 (H-3'') e δ_C 167,7, o qual foi atribuído ao carbono C-7''' (substituinte galoíla), sugerindo que a posição de acilação ocorre na posiçao C-3''. Este experimento bidimensional também mostrou a correlação entre o singleto em δ_H 3,77 e δ_H 141,2, atribuído ao carbono quaternário C-4''', levando-se a dedução de que a *O*-metilação ocorre na posição 4''' (substituinte galoíla).

O espectro de absorção na região do ultravioleta de **47** exibiu uma banda com absorção máxima em 265 nm (log ε = 4,29, banda II) foi relacionada ao anel A, enquanto a banda em 352 nm (log ε = 4,53, banda I) refere-se ao anel B conjugado com anel C, logo confirmando-se que **47** é um flavonol.[51] O espectro de absorção na região do infravermelho do flavonol **51** exibiu três bandas com absorção em 3448, 1704 e 1625 cm^{-1}, referentes aos estiramentos das ligações de substituintes hidroxílicos (O-H), éster conjugado (C=O) e cetona conjugada (C=O), respectivamente. A análise do espectro de massas de alta resolução apresentou o íon *quasi*-molecular *m*/*z* 598,1296 $[M-H]^-$ (valor teórico 598,1292), confirmando a fórmula molecular $C_{29}H_{26}O_{14}$. Assim, a substância **51** (pteroginosídeo) foi identificada como kaempferol-3-*O*-(3''-*O*-4'''-metilgalato-α-

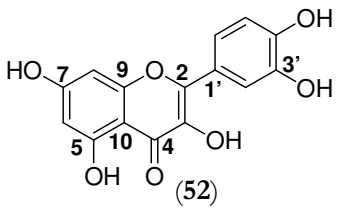
ramnosídeo), um flavonol inédito com com rotação óptica especifica de -131° (25 °C, 1 mg/mL, MeOH).

Tabela 10. Dados de RMN uni e bidimensionais do flavonol **51** (11,7 T; CD_3OD)

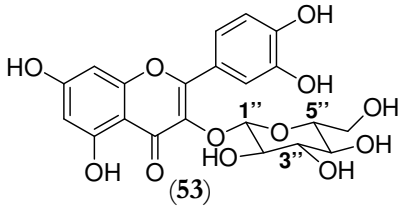
Posição	δ_C	δ_H; mult.; *J* (Hz)	*g*HMBC
2	159,2	-	H-2'e H-6'
3	136,0	-	H-1''
4	179,5	-	-
5	163,1	-	H-6
6	99,9	6,10; d; 2,0	H-8
7	165,9	-	H-6 e H-8
8	94,8	6,29; d; 2,0	H-6
9	158,5	-	H-8
10	105,9	-	H-6 e H-8
1'	122,6	-	H-2'e H-6'
2' e 6'	131,9	7,74; d; 9,0	H-3'e H-5'
3' e 5'	116,6	6,87; d; 9,0	H-2'e H-6'
4'	161,5	-	H-2', H-3', H-6'e H-6'
1''	103,2	5,38; d; 1,5	H-3''
2''	69,8	4,38; dd; 1,5 e 3,2	-
3''	75,5	5,11; dd; 3,2 e 9,8	H-1'', H-2'' e H-4''
4''	70,6	3,58; t; 9,5	H-6''
5''	72,3	3,37; dd; 6,5 e 9,5	H-3'' e H-6''
6''	17,7	0,89; d; 6,5	H-4''
1'''	126,8	-	H-2''' e H-6'''
2''' e 6'''	110,5	7,06; s	-
3''' e 5'''	151,5	-	H-2''' e H-6'''
4'''	141,2	-	H-2''', H-6''' e 4'''-OMe
7'''	167,7	-	H-3'' e H-2'''
4'''-OMe	60,7	3,77; s	-

4.3.2. Quercetina e seus glicosídeos (<u>52</u> - <u>55</u>)

As substâncias **52**-**55** foram isoladas como pós amorfos de coloração amarela.



(52)



(53)

A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C das substâncias **52**-**55** conduziu à conclusão que estas são pertencentes à classe dos flavonóides. A substância **52**

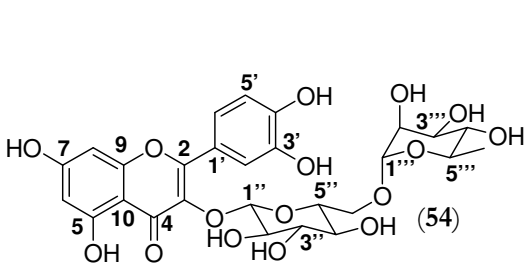
apresentou sinais com absorções em δ_C 146,8, 135,7 e 175,8, os quais foram relacionados aos carbonos C-2, C-3 e C-4, respectivamente, sugerindo que **52** apresenta um anel C típico de um flavonol. Os flavonóides **53**-**55** apresentaram três sinais nessa faixa de absorção, sugerindo que os mesmos sejam também da subclasse dos flavonóis. O espectro de RMN de ^{1}H da substância **52** apresentou um par de dubletos em δ_H 6,17 (*J*= 2,0 Hz) e 6,39 (*J*= 2,0 Hz), os quais foram atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8, respectivamente. Aos hidrogênios H-2', H-5' e H-6' foram atribuídos os sinais em δ_H 7,66 (d, *J*= 2,0 Hz), 6,87 (d, *J*= 8,5 Hz) e 7,52 (dd, *J*= 2,0 e 8,5 Hz), respectivamente. Esse conjunto de informações sugerem que o flavonol **52** com um anel A 5,7,9,10-tetrassubstituído e anel B 1',3',4'-trissubstituído. Deduz-se dessa maneira, que a estrutura molecular de **52** refere-se à quercetina.[51,53]

Os espectros de RMN unidimensionais apresentados pelas substâncias **53**-**55** sugerem que estas são derivados glicosídicos de quercetina.

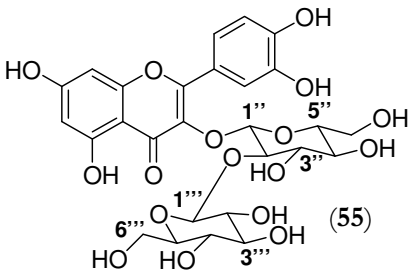
O flavonol **53** apresentou um dubleto em δ_H 5,43 com constante de acoplamento de 7,5 Hz, inferindo a presença de uma unidade de α-hexose, sendo este sinal atribuído ao hidrogênio anomérico H-1''. Salienta-se para os sinais referentes aos hidrogênios metilênicos e diastereotópicos H-6'', aos quais correlacionou-se os sinais em δ_H 3,34 (m) e 3,57 (dl, *J*= 11,0 Hz).

O espectro de RMN de ^{13}C revelou um conjunto de cinco sinais δ_C 61,0 (C-6'') 70,0 (C-4''), 74,2 (C-2''), 76,6 (C-3''), 77,5 (C-5'') e 101,1 (C-1''), os quais confirmaram a presença de uma unidade monossacarídica. Conclui-se dessa maneira que as substâncias **52** e **53** podem ser identificadas como sendo quercetina e isoquercitrina, respectivamente.[51,53]

Diferentemente da substância **53**, os flavonóis **54** e **55** apresentaram espectros de RMN de ^{13}C com um número maior de sinais com absorção entre 60 < δ_H < 80, sugerindo a presença de mais uma unidade glicosídica.



(54)



(55)

O espectro de RMN de ^{1}H do flavonol **54** apresentou sinais referentes a dois hidrogênios anoméricos sendo estes os dubletos em δ_H 5,33 (H-1'') e 4,37 (H-1'''), os quais demonstraram constantes de acoplamento de 7,0 e 1,0 Hz, indicando a presença de uma β- e α-hexoses, respectivamente. A observação dos dubletos em 0,98 (J= 6,5 Hz), o qual foi atribuído aos hidrogênios metílicos H-6''' e o sinal com absorção em δ_C 17,6 (C-6''') confirmou a presença de uma unidade de ramnose.

Tabela 11. Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C dos flavonóis **52** e **53** (11,7 T; DMSO-d_6)

Posição	quercetina (**52**)		isoquercitrina (**53**)	
	δ_C	δ_H; mult.; J (Hz)	δ_C	δ_H; mult.; J (Hz)
2	146,8	-	156,2	-
3	135,7	-	133,4	-
4	175,8	-	177,4	-
5	160,7	-	161,3	-
6	98,1	6,17; d; 2,0	99,0	6,17; s
7	163,8	-	165,0	-
8	93,3	6,39; d; 2,0	93,7	6,37; s
9	156,1	-	156,5	-
10	103,0	-	103,8	-
1'	121,9	-	121,2	-
2'	115,6	7,66; d; 2,0	116,2	7,55; d; 2,5
3'	145,0	-	144,9	-
4'	147,6	-	148,6	-
5'	115,6	6,87; d; 8,5	115,3	6,83; d; 8,5
6'	119,9	7,52; dd; 2,0 e 8,5	121,7	7,56; dd; 2,5 e 8,5
1''	-	-	101,1	5,43; d; 7,5
2''	-	-	74,2	3,24; m
3''	-	-	76,6	3,01; m
4''	-	-	70,0	3,01; m
5''	-	-	77,5	3,24; m
6''	-	-	61,0	3,34; m 3,57; dl; 11,0
5-OH				

O espectro de RMN de ^{13}C da substância **54** exibiu um sinal em 66,9, o qual foi relacionado ao carbono C-6''. Ao comparar-se o valor de deslocamento químico apresentado pelos carbonos C-6'' das substâncias **53** e **54**, observa-se um nítido incremento ($\Delta\delta$ = 5,9) para o segundo, sugerindo que o mesmo esteja envolvido em uma ligação interglicosídica do tipo 6''→ 1'''. Assim, conclui-se que o flavonol **54** pode ser identificado como sendo rutina.[51,53]

Os espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C obtidos para a substância **55** apresentaram-se muito semelhantes àqueles obtidos para a substância **54**.

A análise do espectro de RMN de ^{1}H ndicou a presença de dois dubletos com absorções em δ_H 5,66 e 4,58, os quais foram atribuídos aos hidrogênios anoméricos H-1'' e H-1'''. Diferente das constantes de acoplamento apresentadas pelos hidrogênios anoméricos do flavonol **54**, as constantes de acoplamento observadas para os presentes sinais demonstraram constantes de acoplamento de 7,5 Hz, conduzindo à proposição da presença de duas unidades de β-hexose.

Tabela 12. Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C dos flavonóis **54** e **55** (11,7 T; DMSO-d_6)

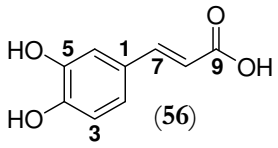
Posição	rutina (**54**)		quercetina 3-*O*-soforosídeo (**55**)	
	δ_C	δ_H; mult.; *J* (Hz)	δ_C	δ_H; mult.; *J* (Hz)
2	156,3	-	155,4	-
3	133,2	-	132,9	-
4	177,3	-	177,3	-
5	161,1	-	161,2	-
6	98,6	6,18; d; 2,0	98,5	6,16; d; 2,0
7	164,0	-	164,0	-
8	93,5	6,37; d; 2,0	93,3	6,37; d; 2,0
9	156,5	-	156,2	-
10	103,9	-	103,8	-
1'	121,1	-	121,0	-
2'	116,2	7,52; d; 2,5	116,0	7,53; d; 2,0
3'	144,7	-	144,7	-
4'	148,3	-	148,4	-
5'	115,1	6,83; d; 8,0	115,3	6,84; d; 8,5
6'	121,5	7,53; dd; 2,5 e 8,0	121,7	7,58; dd; 2,5 e 8,5
1''	101,1	5,33; d; 7,0	97,9	5,66; d; 7,5
2''	74,0	3,22; m	82,6	3,47; m
3''	76,4	3,19; m	77,4	3,45; m
4''	69,9	3,07; m	69,5	3,10; m
5''	75,8	3,12; m	76,4	3,15; m
6''	66,9	3,28; m; 3,69; dl; 10,5	60,6	3,22; m 3,50; m
1'''	100,6	4,37; d; 1,0	104,1	4,58 d; 7,5
2'''	70,3	3,38; m	74,3	3,03; m
3'''	70,5	3,25; m	76,7	3,08; m
4'''	71,8	3,09; m	69,5	3,10; m
5'''	68,1	3,22; m	76,4	3,15; m
6'''	17,6	0,98; d; 6,5	60,6	3,22; m 3,50; m
5-OH	-	-	12,6	-

** no = não obserevado*

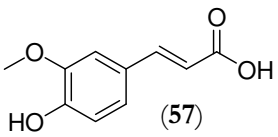
O espectro de RMN de ^{13}C do flavonol **55** apresentou o sinal em δ_C 60,6, o qual foi relacionado aos carbonos C-6'' e C-6'''. Como não foi observado um valor de deslocamento para o carbono C-6'' como àquele observado para o flavonol **54** (δ_c 66,9), propôs-se que este carbono metilênico não esteja envolvido em uma ligação interglicosídica do tipo 6''→ 1'''. Além disso, a presença do sinal com absorção em δ_c 82,6 é um forte indício da presença de uma ligação interglicosídica do tipo 2''→ 1'''. Dessa forma, deduz-se que a estrutura molecular da substância **55** seja coerente com quercetina 3-*O*-soforosídeo.[51,53]

4.4. Ácidos fenólicos (56 - 60)

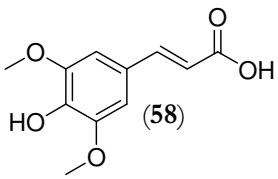
As substâncias **56**-**58** foram obtidas como pós amorfos de coloração levemente amarelada.



(**56**)



(**57**)



(**58**)

A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C permitiu caracterizar as substâncias **56**-**57** como derivados fenilpropanoídicos. O espectro de RMN de ^1H da substância **56** apresentou um par de dubletos em δ_H 7,51 (*J*= 16,0 Hz) e δ_H 6,26 (*J*= 16,0 Hz), os quais foram atribuídos à presença de uma olefina. O valor da constante de acoplamento de 16,0 Hz sugere a configuração *E* para esta ligação dupla. Os sinais em δ_H 7,12 (d, *J*= 2,5 Hz, 1H), δ_H 7,04 (dd, *J*= 2,5 e 8,5 Hz) e δ_H 6,85 (d, *J*= 8,5 Hz), correspondem aos hidrogênios H-2, H-6 e H-5, respectivamente. Tais observações permitiram concluir que o fenilpropanóide **56** apresenta um anel aromático trissubstituído. O espectro de RMN de ^{13}C de **56** apresentou nove sinais, δ_C 114,6, 115,1, 115,7, 121,1, 125,7, 144,5, 145,5, 148,1 e 167,8 corroborando a estrutura fenilpropanoídica de **56**, a qual foi identificada como sendo ácido cafeico.[54] Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **57** apresentaram o mesmo perfil daquele observado para **56**, exceto pela presença do singleto em δ_H 3,90, atribuído a um substituinte metoxílico. Assim, infere-se que a substância **57** pode ser identificada como sendo ácido ferúlico.[55] A substância **58** apresentou espectros de RMN de ^1H e ^{13}C bastante simplificados quando comparados àqueles observados para as substâncias **56** e **57**. O espectro de RMN de ^1H apresentou

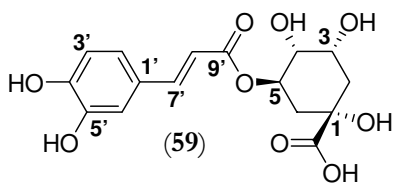
apenas dois singletos δ_H 6,98 e 3,80, os quais foram atribuídos aos hidrogênios metoxílicos 3-OMe e 5-OMe e metínicos H-2 e H-6, respectivamente. Esses dados confirmam a estrutura molecular de **58** como sendo ácido sinápico.[56] Os espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C da substância **59** apresentaram-se similares àqueles pertencentes a substância **56**. Além dos sinais observados para uma unidade de ácido cafeico, observou-se também sinais que foram atribuídos a uma unidade de ácido quínico. O espectro de RMN de ^{13}C apresentou o conjunto de sete sinais δ_C 36,3, 37,1 ,68,1, 70,4, 70,8, 73,5 e 174,8, sendo este último atribuído a um carbono presente no grupo ácido carboxílico (C-7). Dessa forma, conclui-se que a estrutura de **59** corresponde ao ácido 5-*O*-cafeoilquínico, também denominado de ácido clorogênico.[57,58]

Tabela 13. Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C dos fenilpropanóides **56** - **58** (11,7 T; DMSO-d_6)

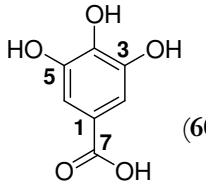
Posição	ácido cafeico (**56**)		ácido ferúlico (**57**)		ácido sinápico (**58**)	
	δ_C	δ_H; mult.; *J* (Hz)	δ_C	δ_H; mult.; *J* (Hz)	δ_C	δ_H; mult.; *J* (Hz)
1	125,7	-	125,7	-	124,5	-
2	114,6	7,12; d; 2,5	111,2	7,35; d; 2,0	106,1	6,98; s
3	145,5	-	147,9	-	148,0	-
4	148,1	-	149,0	-	138,0	-
5	115,7	6,85; d; 8,0	115,6*	6,88; d; 8,5	148,0	-
6	121,1	7,04; dd; 2,5 e 8,0	122,7	7,16; dd; 2,0 e 8,5	106,1	6,98; s
7	144,5	7,51; d; 16,0	144,4	7,58; d; 16,0	144,6	7,49; d; 16,0
8	115,1	6,26; d; 16,0	115,5*	6,44; d; 16,0	116,0	6,40; d; 16,0
9	167,8	-	167,9	-	167,8	-
3-OMe		-	55,6	3,90; s	56,0	3,80; s
5-OMe		-	-	-	56,0	3,80; s

**valores intercambiáveis*

A substância **59** foi obtida como pó amorfo de coloração levemente amarelada e a substância **60** foi obtido como um pó amorfo branco.



(**59**)



(**60**)

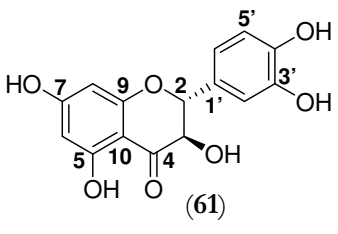
A análise dos espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C permite caracterizar a substância **60** como um ácido fenólico de estrutura molecular relativamente simples. O espectro de RMN de ^{13}C apresentou o conjunto de quatro sinais em δ_C 120,5, 138,0, 108,7 e 145,4, sendo que esses dois últimos apresentaram maior magnitude, sugerindo a presença de um eixo de simetria e, consequentemente revelando um anel aromático tetrassubstituído. O sinal em δ_C 167,4 foi atribuído ao carbono C-7, o qual pode ser caracterizado como carbono pertencente a um grupo carboxila. O espectro de RMN de ^{1}H apresentou um singleto em δ_H 6,90, corroborando com o padrão tetrassubstituído do ácido fenólico. Dessa forma, conclui-se que a substância **60** pode ser identificada como sendo o ácido gálico.[59]

Tabela 14. Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C dos ácidos fenólicos **59** e **60** (11,7 T; DMSO-d_6)

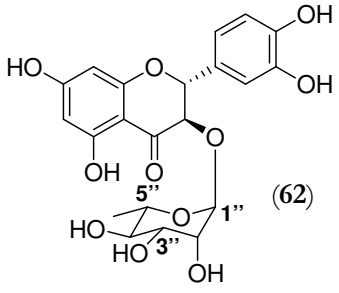
Posição	ácido gálico (**59**)		***Posição***	ácido clorogênico (**60**)	
	δ_C	δ_H; mult.; *J* (Hz)		δ_C	δ_H; mult.; *J* (Hz)
1	120,5	-	**1**	73,5	-
2	108,7	6,91; s	**2**	37,1	1,08; d; 13,0; 1,77; d; 13,0
3	145,4	-	**3**	68,1	3,92; d; 3,5
4	138,0	-	**4**	70,8	3,56; dd; 3,5 e 10,0
5	145,4	-	**5**	70,4	5,06; td; 4,5 e 10,0
6	108,7	6,91; s	**6**	36,3	1,99; m
7	167,4	-	**7**	174,8	-
-	-	-	**1'**	125,6	-
-	-	-	**2'**	114,3	7,02; d; 2,0
-	-	-	**3'**	145,5	-
-	-	-	**4'**	148,3	-
-	-	-	**5'**	115,7	6,75; d; 8,0
-	-	-	**6'**	121,3	6,95; dd; 2,0 e 8,0
-	-	-	**7'**	144,0	7,40; d; 16,0
-	-	-	**8'**	114,7	6,13; d; 16,0
-	-	-	**9'**	165,7	-

4.5. Diidroflavonóis (61-62) e ourateacatequina (63)

As substâncias **61** e **62** foram obtidas como pós amorfos de coloração amarelada, enquanto a substância **63** foi isolada na foram de cristais incolores.



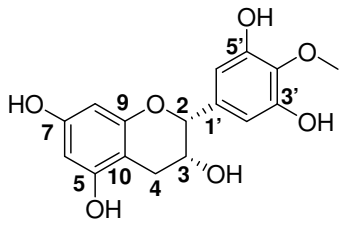
(61)



(62)

Os espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C permitiram inferir que a substância **61** pertence à classe dos flavonóides. Entre outras feições destacam-se o conjunto de sinais com absorções em δ_C 85,0, 73,6 e 198,3, os quais podem ser atribuídos aos hidrogênios C-2, C-3 e C-4, respectivamente, inferindo que **61** pertence à classe dos diidroflavonóis. O par de dubletos em δ_H 5,91 (*J*= 2,0 Hz) e δ_H 5,88 (*J*= 2,0 Hz), sugerem um anel A 5,7,9,10-tetrassubstituído. Os sinais em δ_H 6,96 (d, *J*= 2,0 Hz), δ_H 6,80 (d, *J*= 8,0 Hz) e δ_H 6,84 (dd, *J*= 2,0 e 8,0 Hz), corroboram o padrão 1,3,4-trissubstituído para o anel B do diidroflavonol **61**. Ainda o espectro de RMN de ^{1}H apresentou um par de dubletos com absorções em δ_H 4,90 e δ_H 4,49, os quais foram atribuídos aos hidrogênios H-2 e H-3, respectivamente. A constante de acoplamento de 12,0 Hz apresentada por estes dois dubletos sugerem um acoplamento do tipo axial-axial, conduzindo a proposição de que o anel B e o grupo hidroxila situado na posição 3 mantém uma relação *anti*. Logo, propõe-se que a substância **61** pode ser identificada como sendo taxifolina.[51,53]

De uma maneira geral, os espectros de RMN dos flavonóides **61** e **62** apresentaram-se muito similares. Basicamente a diferença notada refere-se aos sinais apresentados pela substância **62**, os quais absorveram entre δ_C 69,0 e 71,7, típicos de carbonos carbinólicos presentes em uma unidade monossacarídica. Logo, deduziu-se que a flavanona **62** apresenta-se como um glicosídeo de **61**. Salienta-se para o sinal em δ_C 17,8, o qual pode ser atribuído ao carbono metílico C-6'' de uma unidade de ramnose. O espectro de RMN de ^{1}H de **62** apresentou um dubleto com absorção em δ_H 1,05 (*J*= 6,5Hz), confirmando a proposição de que **62** apresenta-se como um ramnosídeo de **61**. Tendo em vista os dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C, sugere-se que a subtância **62** pode ser identificada como sendo astilbina.[60]



(63)

O espectro de RMN de ^{1}H da substância **63** apresentou três sinais característicos de hidrogênios aromáticos: δ_H 6,53 (s). 5,93 (d, *J*= 2,0 Hz) e 5,95 (d, *J*= 2,0 Hz), os quais foram atribuídos aos hidrogênios H-2'/H-6', H-6' e H-8', respectivamente. Os sinais

atribuídos a dois hidrogênios metilênicos em δ_H 2,73 (dd, *J*= 3,0 e 17,0) e 2,86 (dd, *J*= 5,0 e 17,0) ligados ao carbono C-4, onde em geral existe uma carbonila em outros flavonóides, foi indicativo de que **63** poderia ser uma catequina. Os sinais em δ_H 4,78 (sl) e 4,19 (m) foram relacionados aos hidrogênios H-2 e H-3, respectivamente, indicando um anel C sem a presença de uma insaturação situada entre os carbonos C-2 e C-3.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C evidenciou a presença de sinais relativos a carbonos aromáticos entre δ_H 96,5 e 157,9. A constatação de um sinal de carbono em δ_H 29,1 confirmou que a substância **63** pertence à classe das catequinas. Logo, sugere-se que a substância **63** pode ser caracterizada como sendo ourateacatequina.[51,53]

Tabela 15. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C das substâncias fenólicas **61** - **63** (11,7 T)

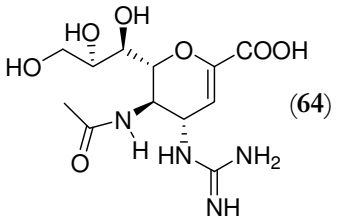
Posição	taxifolina (**61**) (CD_3OD)		astilbina (**62**) (DMSO-d_6)		ourateacatequina (**63**) (CD_3OD)	
	δ_C	δ_H; mult.; *J* (Hz)	δ_C	δ_H; mult.; *J* (Hz)	δ_C	δ_H; mult.; *J* (Hz)
2	85,0	4,90; d; 12,0	81,6	5,24; d; 10,0	79,7	4,78; sl
3	73,6	4,49; d; 12,0	75,7	4,65; d; 10,0	67,4	4,19; m
4	198,3	-	194,5	-	29,1	2,73; dd; 3,0 e 17,0; 2,86; dd; 5,0 e 17,0
5	165,2	-	163,5	-	157,7	-
6	97,3	5,91; d; 2,0	96,1	5,90; d; 2,0	96,5	5,93; s
7	168,6	-	167,2	-	157,9	-
8	96,2	5,88; d; 2,0	95,1	5,88; d; 2,0	95,9	5,95; s
9	164,4	-	162,2	-	157,1	-
10	101,8	-	101,0	-	100,1	-
1'	129,8	-	127,0	-	136,5	-
2'	115,9	6,96; d; 2,0	114,8	6,89; s	107,2	6,53; s
3'	146,2	-	145,2	-	151,3	-
4'	147,0	-	145,9	-	136,0	-
5'	116,1	6,80; d; 8,0	115,4	6,74; s	151,3	-
6'	120,9	6,84; dd; 2,0 e 8,0	119,0	6,74; s	107,2	6,53; s
1''	-	-	100,1	4,04; d; 1,0	-	-
2''	-	-	70,4	3,42; dd; 1,5 e 9,5	-	-
3''	-	-	70,1	3,34; m	-	-
4''	-	-	71,7	3,13; m	-	-
5''	-	-	69,0	3,88; dd; 6,5 e 9,5	-	-
6''	-	-	17,8	1,05; d; 6,5	-	-
4'-OMe 5-OH	-	-	-	-	60,7	3,80; s-

CAPÍTULO 3

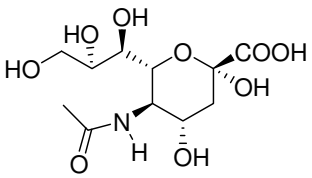
Síntese de derivados guanidínicos e análogos (pág 53)

1. Introdução

O grupo funcional guanidina vem apresentando importante função no comportamento de diversas substâncias farmacologicamente ativas, consagrando-se como um valioso bióforo para um amplo espectro de atividades biológicas. Aos derivados guanidínicos têm sido atribuídas às propriedades de: bloqueadores neuronais de canais de cálcio e sódio, inibidores da liberação de glutamato no SNC, agentes anti-convulsivantes, bloqueadores adrenérgicos, agentes anti-isquêmicos, agentes cardiotônicos, agonistas e antagonistas de receptores de histamina (H_2 e H_3), agentes antiinflamatórios, agentes hipoglicemiantes, agentes anti-hipertensivos, agentes antimicorbianos [antivirais (inibidores de protease HIV-1) e antibacterianos] e também agentes antineoplásicos.[40-42, 61,62] Um dos exemplos é o zanamivir (**64**), um moderno fármaco com atividade antiviral sobre Influenza A e B. Com a incorporação da função guanidina na posição 4 da estrutura desse análogo de ácido siálico (**65**), o zanamivir interage mais fortemente que o ligante natural (**65**) com os resíduos de glutamato ou aspartato constituintes sítio catalítico da neuraminidase, comportando-se como um inibidor potente.[63]



(**64**)

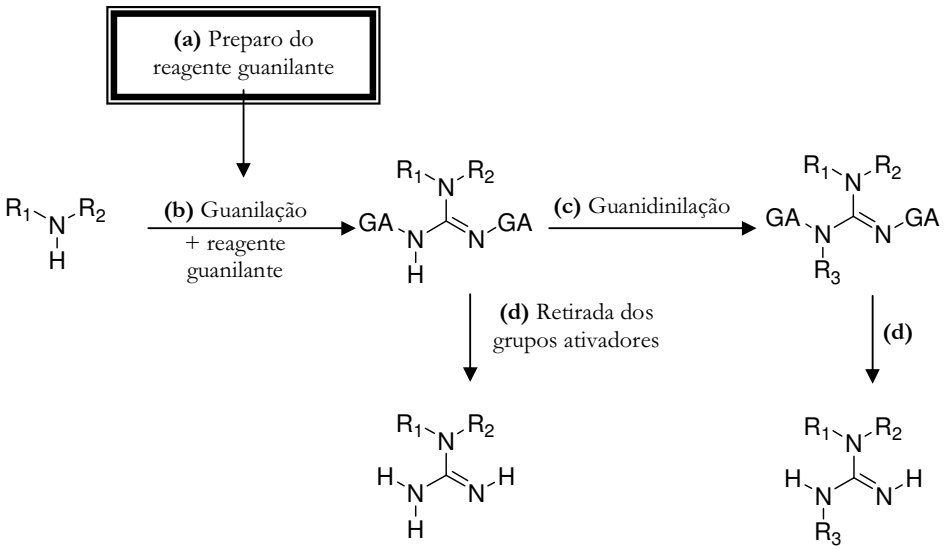


(**65**)

A importância da função guanidínica na otimização de protótipos de interesse farmacológico está relacionada a três características fisico-químicas conferidas pela incorporação dessa função orgânica em estruturas moleculares: alta basicidade (pKa do cátion guanidínio = 13,5), polaridade e hidrossolubilidade. Além disso, o número de substituintes (guanidinas mono, di, tri, tetra e pentassubstituídas), bem como o tipo de substituinte (alquílico ou arílico) conduzem à variáveis estados de oxidação e consequente versatilidade para interações fármaco-bioreceptor, principalmente as ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas. Apesar, do ponto de vista farmacológico a função guanidínica ser um grupo estratégico para modificações

estruturais, estas propriedades físico-químicas conferem grandes dificuldades práticas para procedimentos químicos gerais, principalmente cromatográficos.[64]

Diante do elevado potencial farmacológico atribuído aos derivados guanidínicos e dos desafios químicos experimentais, vem se observando um considerável aumento de estudos de Síntese Orgânica direcionados à produção de guanidinas.

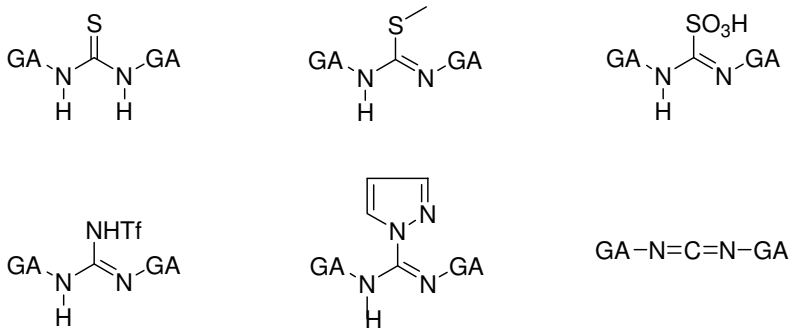


Esquema 11. Planejamento geral para a síntese de derivados guanidínicos[65]

Basicamente, as reações presentes em rotas sintéticas para a preparação de derivados guanidínicos envolve quatro etapas (esquema 11):[66]

(a) A primeira etapa objetiva a preparação do reagente guanilante (vide item b), ou seja utiliza-se de material de partida de baixo custo econômico (ex. tiouréias, sais de guanidina) e a reação desses com grupos ativadores (GA) sob catálise básica. Os grupos ativadores mais utilizados são *t*-Boc (*t*-butoxicarbonila), Fmoc (9-fluorenilmetoxilcarbonila) e Cbz (benziloxicarbonila) (esquema 12). A necessidade de grupos ativadores reside em dois fatos: (1º) na etapa de guanilação (item b), os grupos ativadores promovem um aumento da eletrofilicidade do carbono sp^2, aumentando a reatividade desse frente aos nucleófilos (amina ou amidina), ou seja, nesta etapa propõe-se a ocorrência de uma reação de substituição nucleofílica sob o carbono sp^2. (2º) na etapa de guanidinilação (item c), sugere-se que esta reação apresente um mecanismo de reação de *N*-alquilação (substituição nucleofílica no carbono sp^3), ou seja a reação de um nitrogênio nucleofílico (substrato guanidínico ativado) com um haleto de alquila. Dessa forma, os substratos

provenientes das reações de guanilação que não apresentarem grupos ativadores, levarão a *N*-alquilações sucessivas, culminando na obtenção de produtos mono, di, tri, tetra e até mesmo pentassubstituídos. Apesar dos progressos recentes na síntese de guanidinas, um reagente guanilante completamente satisfatório ainda não foi desenvolvido, pois a maioria dos reagentes guanilantes descritos na literatura são limitados quanto à reatividade das aminas e tiouréias de partida.[65]



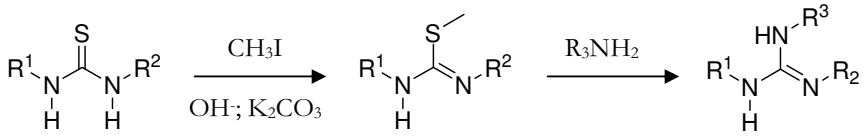
Esquema 12. Reagentes guanilantes mais empregados em rotas de preparação de derivados guanidínicos (GA= grupo ativante = Boc, Cbz ou Fmoc)[65]

(b) Reações de guanilação: são aquelas que buscam a conversão do grupo amina (ou amidina) em guanidina, havendo a obrigatoriedade do(s) átomo(s) de nitrogênio(s) amínico ou amidínico ser um ou dois, dos três nitrogênios guanidínicos. Essas reações ocorrem entre uma amina primária, amina secundária ou amidina e um reagente guanilante. São reações influenciadas pela natureza do grupo ligado à amina, ou seja, aminas primárias são mais reativas que aminas secundárias e-ou cíclicas e amidinas, devido ao impedimento estérico provocado pelo volume dos grupos ativadores presentes nos reagentes guanilantes bem como aminas ligadas à grupos eletroatratores levam a rendimentos pouco apreciáveis. Para substratos guanilantes sulfurados observa-se a necessidade de um catalisador com caráter tiofílico, o qual atua na dessulfurização do reagente guanilante, dentre estes aceptores de elétrons, pode-se citar: sais de mercúrio (reagente de Mukaiama), de cobre e de bismuto. A fim de aumentar o rendimento de reações de guanilação, novos trabalhos vêm desenvolvendo espécies amidínicas mais nucleofílicas e melhores grupos abandonadores nos substratos guanilantes.[65,67-76]

(c) Reações de guanidinilação: são reações que envolvem o núcleo guanidínico proveniente de uma reação de guanilação e uma espécie eletrofílica (geralmente um haleto de alquila e álcoois transformados por protocolos de Mitsunobu). Estas reações são empregadas para aumentar o número de substituintes sobre o núcleo guanidínico e tendo seus rendimentos que variam de acordo com a acidez dos grupos –(C=O)-N-H.[65]

(d) A última etapa da rota sintética para guanidinas envolve a retirada dos grupos ativadores dos substratos guanidínicos já com as substituições desejadas. Estas reações ocorrem em meio fortemente ácido (ácidos trifluoracético, clorídrico e metanossulfônico, etc). A dificuldade dessa etapa vem sendo apresentada principalmente por guanidinas com substituintes olefínicos, os quais podem sofrer reações de adição nucleofílica em meio ácido, resultando na obtenção de subprodutos.[65]

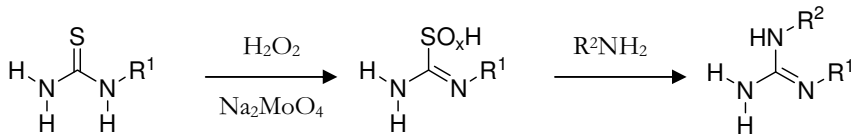
A maioria dos protocolos de reações de guanilação envolve a reação de uma amina com reagentes guanilantes sulfurados, principalmente derivados tioureídicos e isotioureídicos. Um dos métodos mais comuns na síntese de guanidinas é a reação de *S*-metil-isotiouréias com aminas (esquema 13).**[65]**



Esquema 13. Conversão de tiouréias em isotiouréias e transformações destas em guanidinas (R^1=R^2= Boc; R^3 = grupo alquila ou arila)[65]

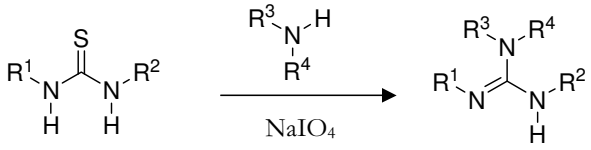
Um outro método eficiente de obtenção de guanidinas a partir de tiouréias e aminas envolve a ativação do enxofre da tiouréia através de *S*-oxidação, seguido pela substituição do enxofre ativado por aminas. Estas reações apresentam maiores rendimentos do que aquelas envolvendo ânions alquilmercaptanas a partir de *S*-alquil-isotiouréias nos processos tradicionais de síntese de guanidinas.

A rota sintética desenvolvida por Mills**[77]** (esquema 14) para a conversão de tiouréias monossubstituídas em guanidinas de dissubstituídas, envolve a oxidação com peróxido de hidrogênio e sais de molibdênio e posterior reação de tiouréia ativada com aminas com elevada nucleofilia.



Esquema 14. Conversão de tiouréias monossubstituídas em guanidinas dissubstituídas segundo protocolo desenvolvido por Mills[77] (R^1= R^2 = grupo alquila ou arila, x =2 ou 3)

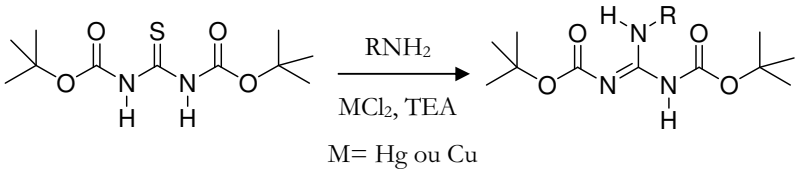
Ramadas e colaboradores[78] (esquema 15) demonstraram que fortes agentes oxidantes como hipoclorito ou metaperiodato de sódio podem também ser utilizados na preparação de guanidinas tetrassubstituídas com rendimentos apreciáveis, à partir da reação de aminas com alta nucleofilia e tiouréias dissubstituídas.



Esquema 15. Conversão de tiouréias monossubstituídas em guanidinas segundo protocolo desenvolvido por Ramadas[78] (R^1 = R^2 = Boc; R^3 = R^4 = grupo alquila ou arila)

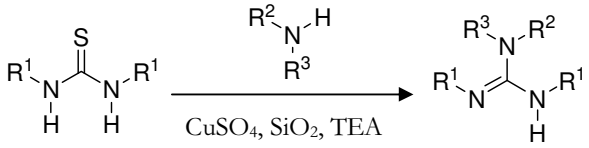
Entretanto os processos oxidativos são pouco eficientes para substratos tendo grupos aminas com baixa nucleofilia. Acredita-se que a reatividade desses reagentes seja aumentada com uso de *N*-aciltiouréias associada aos tiófilos inorgânicos supracitados. O mecanismo dessa reação é pouco compreendido, não tendo sido evidenciada identidade do intermediário formado nessas reações. Acredita-se que *in situ* é gerado um intermediário do tipo carbodiimida, sendo a espécie reativa, a qual sofrerá guanilação por substâncias nitrogenadas.

Qian e Kin[79] (esquema 16) descrevem a obtenção de carbamatos usando como substrato *t*-butoxicarboniltiouréias e cloreto de mercúrio ou de cobre como tiófilos. A retirada dos grupos ativadores foi realizada na presença de ácido trifluoracético, culminando na obtenção das guanidinas planejadas.



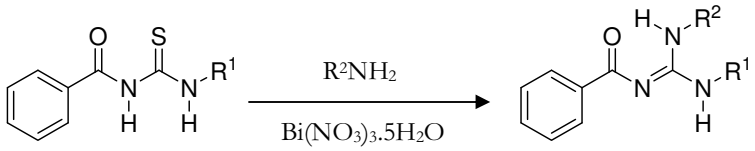
Esquema 16. Conversão de tiouréias em guanidinas monossubstituídas segundo protocolo desenvolvido por Qian[79] (R = grupo alquila ou arila)

Srinivasan e Ramadas[80] (esquema 17) reportaram a preparação de guanidinas tetrassubstituídas pela reação de tiouréias dissubstituídas com aminas secundárias, na presença de sulfato de cobre e gel de sílica.



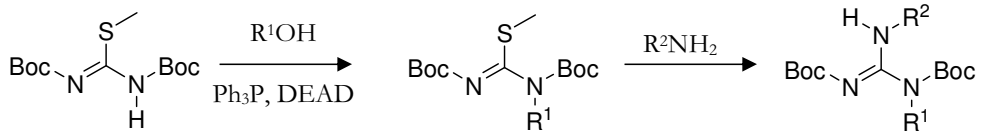
Esquema 17. Conversão de tiouréias em guanidinas segundo protocolo desenvolvido por Srinivasan[80] ($R^1 = R^2 = R^3$ = grupo alquila ou arila)

Devido aos problemas ambientais apresentados por metais pesados comumente empregados na síntese de guanidina como tiófilos, novas metodologias relacionadas à "Química Verde" têm sido investigadas. Segundo relatos de pesquisadores brasileiros[81,82], os rendimentos das *N*-acilguanidinas sintetizadas pelo uso dos sais de bismuto são comparáveis àquelas obtidas pelo emprego de sais de mercúrio, comprovando a viabilidade de aplicações sintéticas desse novo agente tiofílico e com significante redução de potenciais riscos ao meio ambiente (esquema 18).



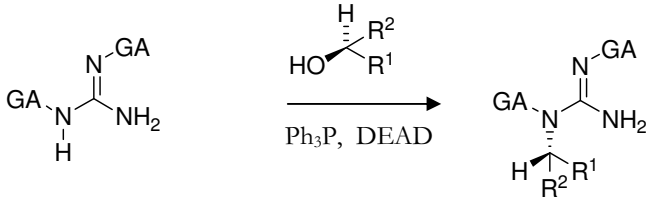
Esquema 18. Conversão de *N*-aciltiouréias em *N*-acilguanidinas segundo protocolo desenvolvido por Cunha[81,82] ($R^1 = R^2$= grupo alquila ou arila)

Como mostrado acima, os métodos comumente empregados na preparação de guanidinas utilizam aminas como reagentes. Apesar de muitos desses métodos proporcionarem rendimentos apreciáveis, sua utilidade é limitada devido à disponibilidade de aminas de partida e do elevado custo econômico. Um método sintético para a preparação de guanidinas assimetricamente dissubstituídas foi desenvolvido por Kim e colaboradores[83] (esquema 19) e empregou inicialmente a reação entre uma reagente guanilante e álcoois primários e secundários, sob condições de Mitsunobu, constituindo-se como uma alternativa para o uso de aminas. Após esta etapa, o núcleo isotioureídico foi novamente substituído por uma reação com uma amina.



Esquema 19. Conversão de isotiouréias em guanidinas segundo protocolo desenvolvido por Kim[83] (R^1 = R^2 = grupo alquila ou arila)

Kozikowski e Dodd[84] (esquema 20) demonstraram que a reação de álcoois quirais, alílicos e benzílicos com di-*t*-butoxicarbonilguanidina e dibenziloxicarbonilguanidinas fornecendo guanidinas monossubstituídas com configuração absoluta invertida.

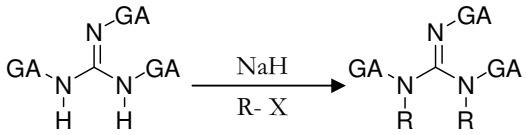


Esquema 20. Obtenção de guanidinas à partir de álcoois segundo protocolo desenvolvido por Kozikowski[84] (GA = Boc ou Cbz; R^1 = R^2 = grupo alquila ou arila)

Em contraste aos inúmeros protocolos para reações de guanilação, apenas três metodologias são encontradas para as reações de guanidinilação:

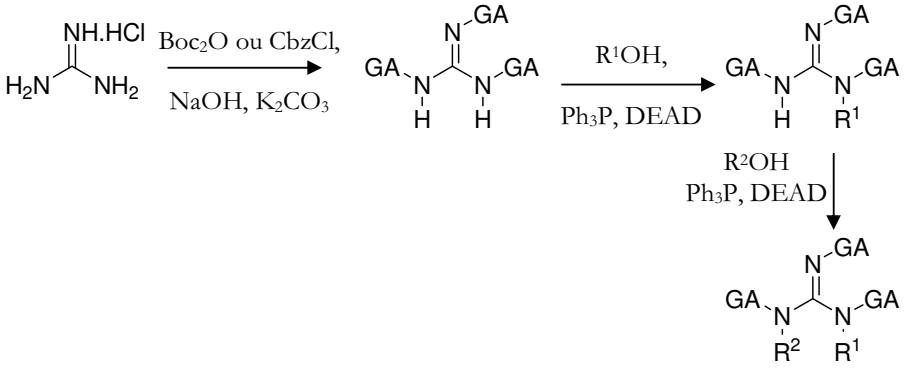
(1) A mais antiga de todas envolve a desprotonação de guanidinas ativadas hidreto de sódio, seguida de uma reação de com um haleto de alquila, gerando

guanidinas polissubstituídas. São reações com rendimentos que variam em função do grupo abandonador presente nos haletos de alquila, tendo rendimentos satisfatórios somente para iodetos e brometos de cadeia alifática pequena (ex. iodeto de metila), ou haletos com grupos abandonadores que contam com a assistência nucleofílica de grupos vizinhos (ex. brometo de alila). Substratos como iodeto de isopropila e brometo de *n*-butila levam à rendimentos inferiores a 50 %. Identifica-se como ponto mais problemático de tal metodologia, o emprego de bases inorgânicas extremamente fortes, as quais podem reagir com grupos sensíveis a altos pHs (ex. ésteres) (esquema 21).[85]



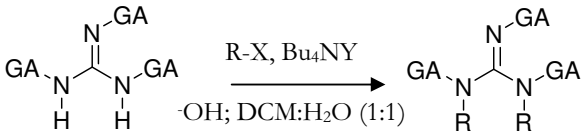
Esquema 21. Reação de guanidinilação na presença de hidreto de sódio[85] (GA = Boc ou Cbz; R = grupo alquila ou arila, X = I, Cl ou Br)

(2) O segundo método envolve a reação de guanidinas ativadas com álcoois primários ou secundários, sob condições de Mitsunobu. Este método aplica-se à uma variedade de álcoois, entretanto requer quantidades estequiométricas elevadas desses álcoois, e consequente elevado custo econômico para a sua realização. Além disso, a retirada dos produtos de meios reacionais condicionados segundo Mitsunobu são exaustivos. Goodman[86] preparou uma série de guanidinas dissubstituídas, via condensação de álcoois primários ou secundários com tri-*t*-butoxicarbonilguanidinas ou tri-benziloxicarbonilguanidinas sob condições reacionais de Mitsunobu (esquema 22).



Esquema 22. Reação de guanidinilação realizada com alcoóis sob condições de Mitsunobu[86] (GA = Boc ou Cbz; R^1 = R^2 = grupo alquila ou arila)

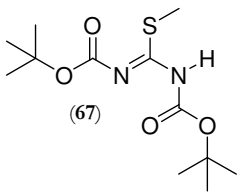
(3) A metodologia mais recente e empregada neste trabalho, envolve a reação de um haleto de alquila com guanidinas ativadas, em um meio reacional bifásico formado por uma fase aquosa básica e outra formada por uma fase orgânica. Para o trânsito correto dos reagentes por esse meio reacional bifásico, há necessidade um catalisador de transferência de fase (ex. iodeto, brometo ou cloreto de tetrabutilamônio) (esquema 23).[65]



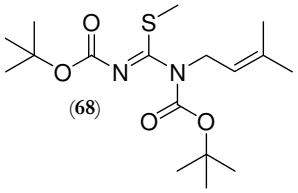
Esquema 23. Reação de guanidinilação em meio bifásico na presença de catalisador de transferência de fase[65] (GA = Boc ou Cbz; R = grupo alquila ou arila; X = Y = I, Cl ou Br)

2. Substâncias sintetizadas

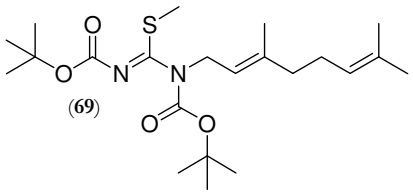
O trabalho sintético resultou na obtenção de **24** substâncias.



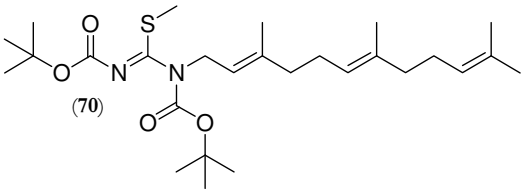
(**67**)



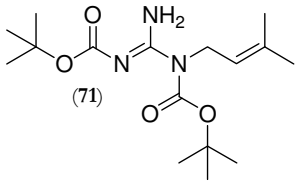
(**68**)



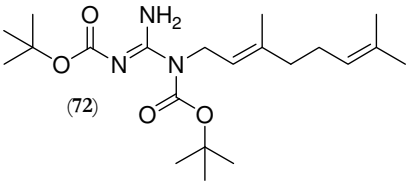
(**69**)



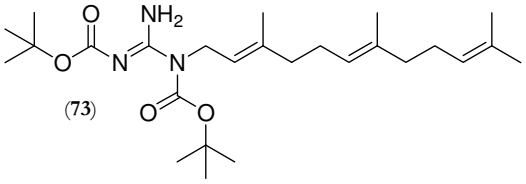
(**70**)



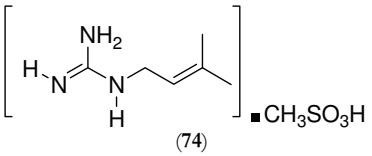
(**71**)



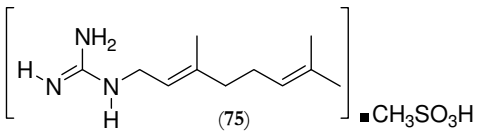
(**72**)



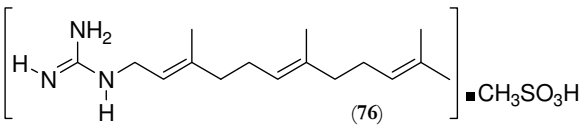
(**73**)



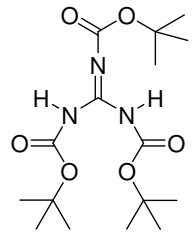
(**74**)



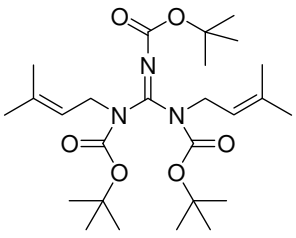
(**75**)



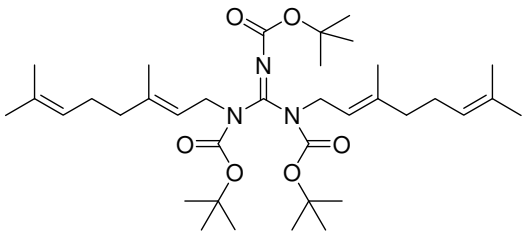
(**76**)



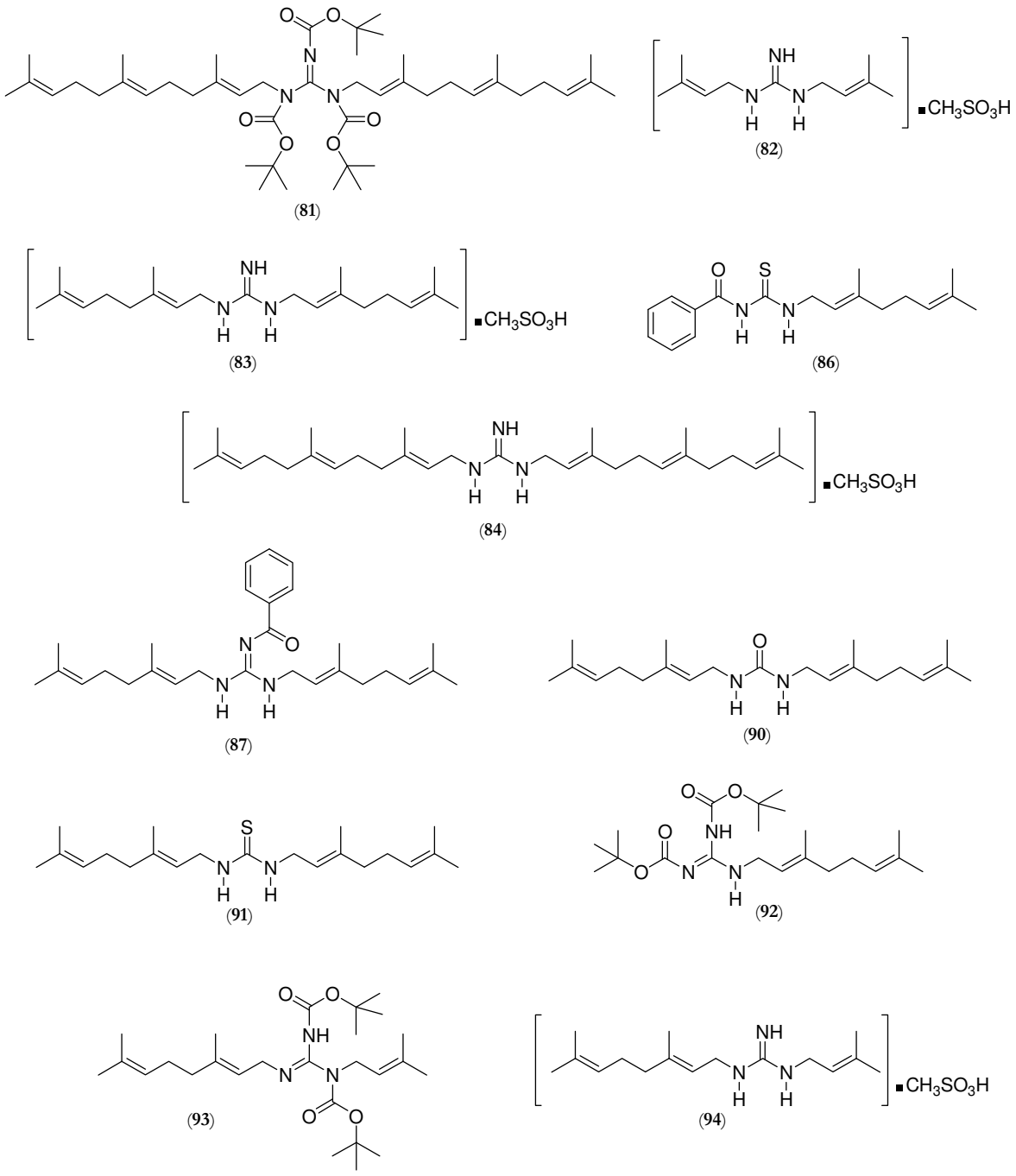
(**78**)



(**79**)



(**80**)



Esquema 24. Estruturas moleculares das substâncias sintetizadas descritas neste trabalho

Dentre as substâncias sintetizadas foram obtidos 7 derivados prenilguanidínicos, sendo três *N*-monossubstituídos (**74**-**76**), três *N*,*N*'-dissubstituídos simetricamente (**82**-**84**) e um *N*,*N*'-dissubstituído assimetricamente (**94**). Adicionalmente foram preparados um derivado *N*-acilguanidínico (**87**), um ureídico (**90**) e um tioureídico (**91**).

3. Planejamento e síntese

3.1. Planejamento da síntese e dos estudos preliminares de relação estrutura-atividade qualitativa

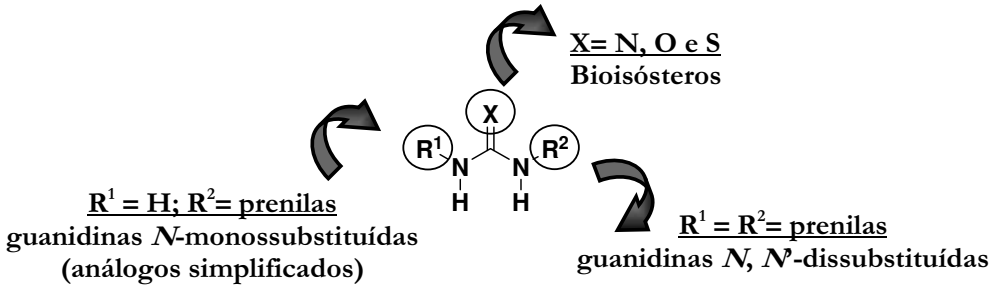
Os alcalóides guanidínicos obtidos de *P. nitens* (Capítulo 2) apresentaram atividade antitumoral e antifúngica (Capítulo 4). Os dados de bioatividade e a relativa simplicidade estrutural foram forças motrizes para o investimento na síntese de alguns derivados guanidínicos naturais e análogos. A obtenção dos derivados guanidínicos foi direcionada de modo a propiciar estudos preliminares de REA qualitativa (esquema 25). Os alcalóides guanidínicos bioativos foram utilizados como protótipos e as etapas de planejamento envolveram: (1) – Síntese de derivados *N*-monossubstituídos (análogos estruturalmente simplificados); (2) – Síntese de derivados *N*,*N*'-dissubstituídos; (3) – Síntese de bioisósteros potenciais e análogos benzoilados.

Primeiramente buscou-se o entendimento da importância dos substituintes prenílicos para a bioatividade dos alcalóides. Para esta finalidade, preparou-se análogos *N*-mono e *N*,*N*'-dissubstituídos com cadeias laterais:

(a) hemiterpenoídicas - 5 átomos de carbono ou 1 unidade isoprênica = isoprenila);

(b) monoterpenoídicas - 10 átomos de carbono ou 2 unidades isopoprênicas = geranila);

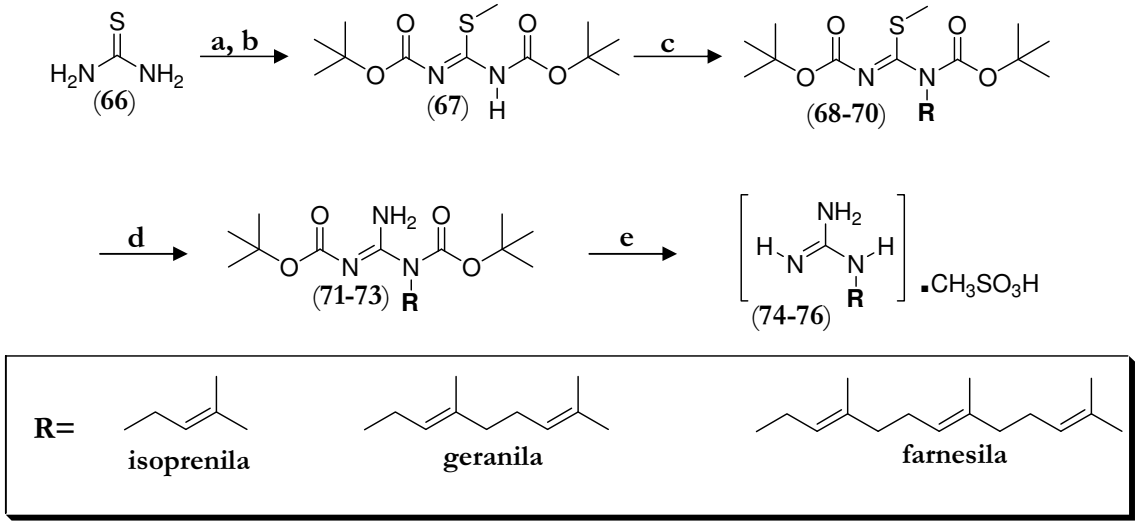
(c) sesquiterpenoídicas – 15 átomos de carbono ou 3 unidades isoprênicas = farnesila).



Esquema 25. Planejamento para os estudos de relação estrutura-atividade qualitativos de derivados guanidínicos bioativos (prenilas= isoprenila, geranila e farnesila)

No segundo momento, foram preparados análogos com potencial comportamento bioisostérico, ou seja, manteve-se duas unidades geranílicas, substituindo o núcleo guanidínico por núcleos ureídicos (análogo oxigenado) e tioureídicos (análogo sulfurado).

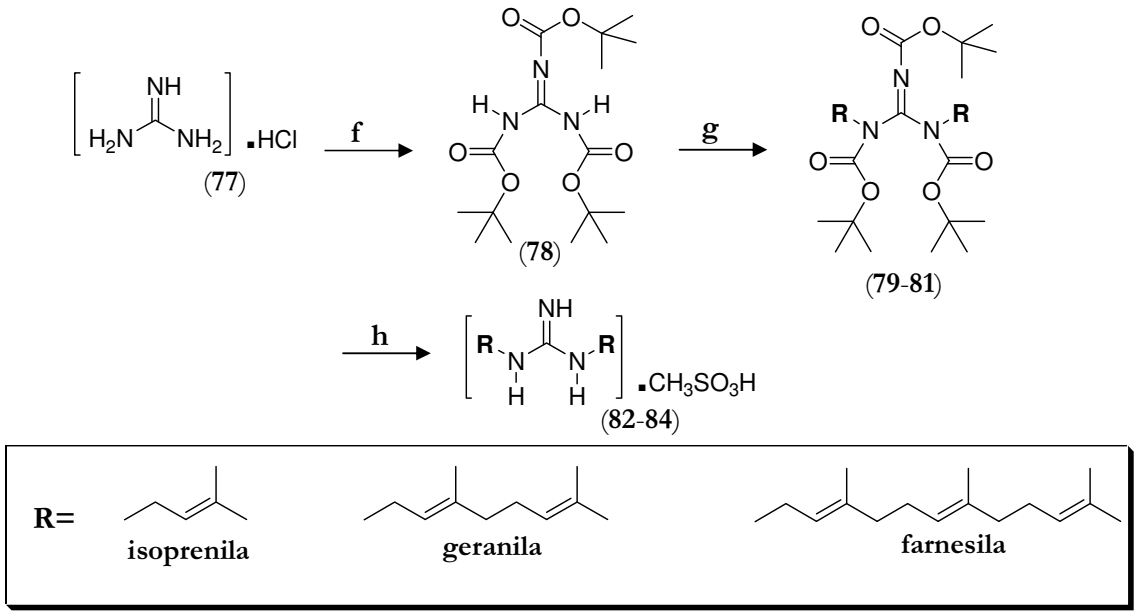
A análise retrossintética apontou para a síntese dos análogos *N*-mono e *N*,*N*'-dissubstituídos, dois materiais de partida de baixo custo econômico, tiouréia e cloridrato, respectivamente. Assim sendo, as rotas sintéticas descritas no presente trabalho foram constituídas de reações descritas na literatura.



Esquema 26. Planejamento sintético para a obtenção de derivados guanidínicos *N*-monossubstituídos **74**-**76** [**a**= CH_3I, DMSO; t.a.; **b**= Boc_2O, KOH, K_2CO_3, DMSO, 50 ^oC; **c**= brometos de prenila, KOH, Bu_4NI, H_2O:DCM (1:1), ta; **d**= NH_4OH, EtOH:H_2O (1:1), t.a.; **e**= CH_3SO_3H; *p*-dioxano, 120 –150^oC][35,36,65,86] .

A rota sintética empregada para a obtenção de guanidinas *N*-monossubstituídas (esquema 26) foi iniciada através da *S*-metilação da tiouréia na presença de iodeto de metila. Após esta etapa foi adicionado dicarbonato de di-*t*-butila em meio altamente básico, formando o reagente guanilante **67**. A segunda etapa consistiu de reações *N*-prenilação realizadas na presença de pHs elevados e catalisador de transferência de fase (iodeto de tetrabutilamônio), bem como os brometos de prenila (ispentenila, geranila e farnesila). A etapa seguinte (reação de guanilação) constou de uma transformação do grupo tioéter (SMe) em amino (NH_2), realizada na presença de hidróxido de amônio e etanol como solvente, obtendo-se diuretanas, ou seja nesta etapa o núcleo guanidínico

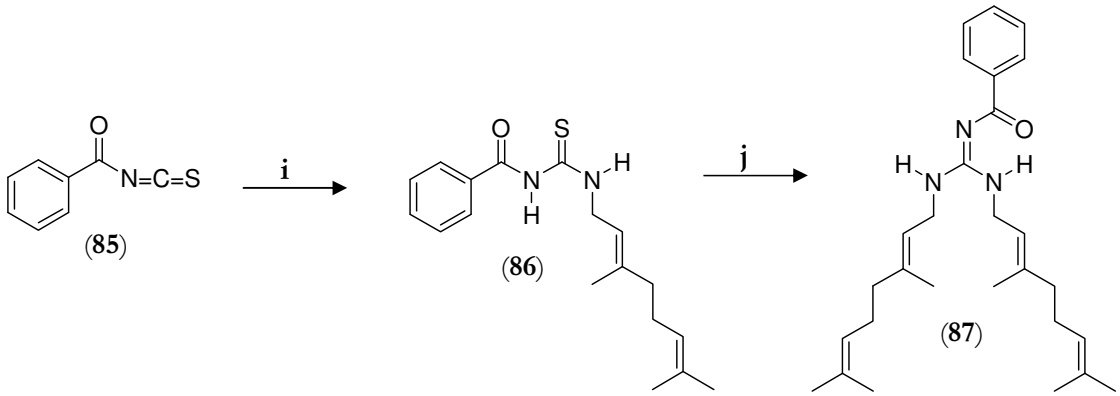
planejado foi construído. A última etapa desta rota buscou a retirada dos grupos ativadores (Boc). Atendendo à esta finalidade, as diuretanas obtidas foram submetidas à pHs baixos (ácido metanossulfônico), resultando na obtenção de metanossulfonatos de prenilguanidinas *N*-monossubstituídas. Salienta-se para a obtenção da substância **74**, a qual apresntou-se como metanossulfonato de galegina, ou seja, trata-se de um sal de um derivado guanidínico natural, comumente isolado de plantas do gênero *Galega*, *Verbesina*, *Crassula* e *Schoenus*.



Esquema 27. Planejamento sintético para a obtenção de derivados guanidínicos *N,N'*-dissubstituídos (**82**-**84**) [**f**= Boc_2O, KOH, K_2CO_3, DMSO, 70 °C; **g**= brometos de prenila, KOH, Bu_4NI, H_2O:DCM (1:1), t.a.; **h**= CH_3SO_3H; *p*-dioxano, 120 –150°C] [35,36,65,86].

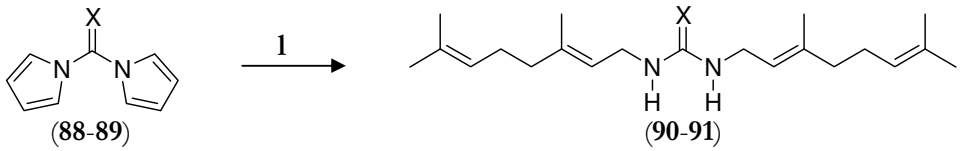
A rota sintética adotada para a preparação de guanidinas *N*, *N'*-dissubstituídas (esquema 27) foi iniciada com a reação do cloridrato de guanidina e dicarbonato de di-*t*-butila. Após a etapa de ativação do núcleo guanidínico, o intermediário **78** foi submetido à *N*-prenilações como descrito no item nterior. Para finalizar o preparo das guanidinas *N,N'*-dissubstituídas simetricamente (**82**-**84**), os grupos ativadores foram removidos em meio fortemente ácido. Esta rota sintética adotada foi de grande valia, uma vez que obteve os metanossulfonatos de pteroginidina (**82**) e de nitensidina A (**83**), os quais se comportam

como sais de dois derivados guanidínicos (**2** e **4**) obtidos de *Pterogyne nitens* e *Alchornea* spp.



Esquema 28. Planejamento da síntese da *N*-acilguanidina **87** [**i**= geranilamina, DCM, 0°C →t.a.; **j**= geranilamina, TEA, $Bi(NO_3)_3.5H_2O$, DMF, 70°C][81,82,87].

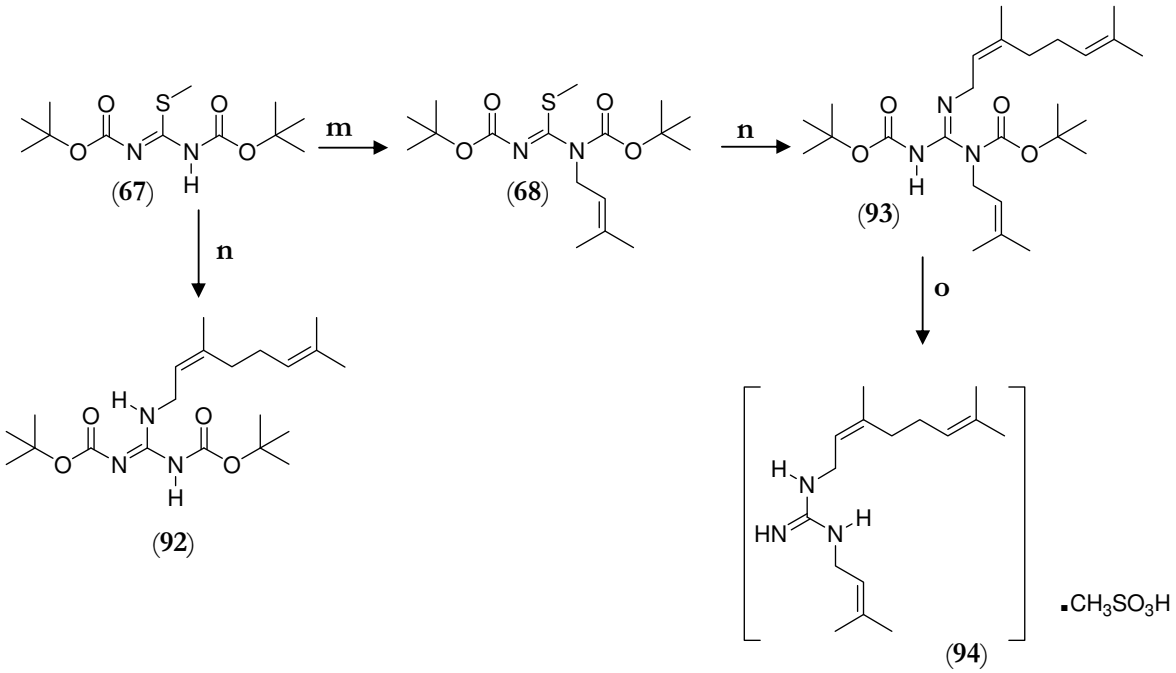
Após a obtenção dos análogos *N*-mono e *N,N'*-dissubstituídos foi prepada uma *N*-acilguanidina (esquema 28), a qual comporta-se como um derivado benzoilado de nitensidina A (**4**). Assim, iniciou-se a síntese de **87** à partir do isotiocianato de benzoíla (**85**) e geranilamina, levando à formação de uma *N*-aciltiouréia (**86**), a qual comporta-se como um reagente guanilante. A segunda etapa consistiu da reação desta *N*-benzoiltiouréia com geranilamina, nitrato de bismuto pentaidratado como agente tiófilo e trietilamina como base.



Esquema 29. Preparo dos bioisósteros geranílicos *N,N'*-dissubstituídos (**90**-**91**) [**l**= geranilamina, DCM, 0°C → ta; X= oxigênio ou enxofre][88].

A síntese dos análogos oxigenado **90** e sulfurado **91** (esquema 29) foi realizada em apenas uma etapa, através da reação dos diimidazóis **88** e **89** com geranilamina, respectivamente. Destaca-se a obtenção dessa uréia e tiouréia, pois as mesmas podem comportar-se como bioisósteros potenciais.

O investimento na síntese dos derivados geranilados foi baseado nos dados de atividade biológica discutidos no capítulo 4, esses dados revelaram maior bioatividade de guanidinas farnesiladas e geraniladas. Apenas geranilamina é um reagente comercialmente disponível, enquanto o preparo de farnesilamina via síntese de Gabriel incrementaria mais duas etapas na rota de obtenção de uréias e *N*-acilguanidinas farnesiladas. Contudo, apenas a obtenção de **87**, **90** e **91** atendeu aos estudos de REA planejados, uma vez que segundo dados presentes no capítulo 4, os análogos sulfurado, oxigenado e benzoilado apresentaram menor atividade biológica.



Esquema 30. Planejamento da rota sintética para a obtenção da guanidina *N,N'*-dissubstituída assimetricamente **94** e intermediário **92** [**m**= brometos de isopentenila, KOH, Bu_4NI, H_2O:DCM (1:1), t.a.; **o**= geranilamina, TEA, THF, 0°C→ t.a.; **p**= CH_3SO_3H; *p*-dioxano, 120 –150°C] [35,36].

A rota sintética adotada para obtenção da guanidina *N,N'*-dissubstituída assimetricamente **94** foi baseada em reações de *N*-prenilação seguida de uma reação de guanilação e posteriormente retirada dos grupos ativadores Boc na presença de ácido metanossulfônico.

A obtenção do intermediário **92** é de grande importância, uma vez que esta mostra a versatilidade das isotiouréias frente às reações com eletrófilos e nucleófilos. No

presente caso, propõe-se que a **67** apresentou-se como um eletrófilo, já no caso descrito para a obtenção de derivados guanidínicos *N*-mono e *N,N'*-dissubstituídos (esquemas 26 e 27), propõe-se que as isotiouréias **68**-**70** comportam-se como nucleófilos frente aos haletos de prenila.

3.2. Procedimentos experimentais

Para a obtenção dos derivados guanidínicos e seus análogos, foram adotadas metodologias já descritas na literatura com pequenas modificações.

3.2.1. Preparo da *bis*-Boc-*S*-metilisotiouréia 67

Em um balão fechado e equipado com agitador magnético, foram dissolvidos 67,5 mmol de tiouréia (**66**) em 20 mL de DMSO e 4,0 mL de iodeto de metila, à 4°C. Esta solução foi mantida por 24 horas. Adaptou-se um condensador ao balão e a seguir foi adicionado 43,8 mmol de hidróxido de potássio finamente pulverizado e diluído em 4,38 mmol de carbonato de potássio. Esta suspensão foi agitada durante 1 hora à temperatura ambiente. Adicionou-se 0,2 mol de dicarbonato de di-*t*-butila (Boc_2O) e a mistura heterogênea foi mantida à uma temperatura de 50 °C, sendo agitada durante 5 dias. O produto bruto foi suspenso em 5,0 L de água destilada, formando um precipitado branco, o qual foi filtrado em papel e seco sob vácuo. O material amorfo foi submetido a sucessivas recristalizações em acetona:diclorometano (1:1).[86]

3.2.2. Preparo das isotiouréias 68 - 70

Em um balão fechado e equipado com agitador magnético, foram adicionados 3,0 mmol de *bis*-Boc-*S*-metilisotiouréia (**67**), 8,50 mmol de KOH e 0,6 mmol de iodeto de tetrabutilamônio a 60,0 mL de DCM:H_2O (1:1). A mistura binária foi agitada por 30 minutos sob atmosfera inerte. Para cada reação de prenilação foi adicionada 3,1 mmol dos respectivos brometos, (de isoprenila, geranila e farnesila). A evolução das reações foi acompanhada por meio de CCDA, até desaparecimento aparente do reagente limitante. O

tempo de reação para as reações de *N*-prenilação variaram de 4 a 7 horas, de acordo com o substituinte terpênico. Após 24 horas, diluiu-se o meio reacional em água, e esse foi submetido à partição líquido-líquido, empregando DCM como fase orgânica. A fase diclorometânica foi seca em Na_2SO_4, filtrada e novamente seca em evaporador rotatório. As isotiouréias preniladas **68**-**70** foram purificadas por meio de cromatografia em coluna de fase normal, empregando eluição isocrática em Hex:AcOEt (9:1).[35,36]

3.2.3. Preparo da diuretanas 71 - 73

Em um balão fechado e equipado com agitação magnética, foram adicionados 5,0 mmol de cada isotiouréia prenilada (**68**-**70**) em 50,0 mL de EtOH. Adicionou-se 100,0 mL de uma solução aquosa 25% de NH_4OH. A reação de guanilação foi acompanhada por CCDA até total conversão das isotiouréias em diuretanas. O tempo de reação para obtenção dos produtos desejados variaram de 4 (para *N*-isoprenilações) a 16 horas (para *N*-farnesilações). Os respectivos produtos brutos foram purificados por meio de cromatografia em coluna de fase normal, empregando Hex:AcOEt (85:15) como fase móvel.[35,36]

3.2.4. Preparo da *tri*-Boc-guanidina 78

Em balão fechado e equipado com agitador magnético, foram adicionados 50,0 mmol de cloridrato de guanidina (**77**), 50,0 mmol de KOH e 50,0 mmol de Na_2CO_3 (finamente pulverizados) à 10,0 mL de DMSO. Esta suspensão foi mantida sob agitação durante 20 minutos. Adicionou-se 300,0 mmol de Boc_2O em cinco alíquotas durante 5 horas. Adaptou-se um condensador e a suspensão foi agitada por uma semana sob temperatura de 70 ^oC. O produto bruto foi suspenso em 5,0 L de água, formando um precipitado branco que foi filtrado, lavado com água e seco sobre vácuo. O pó branco obtido foi recristalizado em acetonitrila.[86]

3.2.5. Preparo das triuretanas 79 - 81

Em balão tritubulado e equipado com agitador magnético, foram adicionados 3,0 mmol de *tri*-Boc-guanidina, 9,0 mmol de KOH e 1,0 mmol de iodeto de tetrabutilamônio à 70,0 mL de DCM:H_2O (1:1). A mistura binária foi agitada por 30 minutos sob atmosfera de gás nitrogênio. Para cada reação de prenilação foi adicionada 6,5 mmol dos respectivos brometos, (de isoprenila, geranila e farnesila). A evolução das reações foi acompanhada por meio de CCDA, até conversão total do reagente limitante. Após 24 horas, diluiu-se o meio reacional em água, e esse foi submetido à partição líquido-líquido, empregando DCM como fase orgânica. A fase diclorometânica foi seca em Na_2SO_4, filtrada e novamente seca em evaporador rotatório. As triuretanas preniladas (**79**-**81**) foram purificadas por meio de cromatografia em coluna de fase normal, empregando eluição isocrática em Hex: AcOEt (85:15).[35,36]

3.2.6. Obtenção dos metanossulfonatos de prenilguanidinas 71-73, 79-81 e 94

Em um balão fechado e equipado com agitação magnética, foram adicionados 1,0 mmol das diuretanas (**71**-**73**) ou das três triuretanas (**79**-**81** e **94**) em 5,0 mL de *p*-dioxano anidro, sob banho de gelo. Adicionou-se 1,0 mmol de ácido metanossulfônico (sob gotejamento *via* seringa) e logo, o meio reacional foi levado à refluxo (120 - 160 ^oC). A reação de desproteção foi acompanhada por CCDA até total conversão das uretanas em metanossulfonatos de prenilguanidinas (**74**-**76, 82**-**84 e 94**). Os tempos de reação variaram de 5 a 8 horas. Os respectivos produtos brutos foram purificados por meio de cromatografia em coluna de fase normal, empregando misturas de $CHCl_3$:MeOH (0 à 30 % de MeOH) como fase móvel.[35,36]

3.2.7. Preparo da *N*-acilguanidina 87

Em um balão fechado e equipado com agitação magnética, foram dissolvidos 3,0 mmol de isotiocianato de benzoíla em 5,0 mL de DCM e então foram adicionados 1,1 mL de geranilamina. A conversão de 85 em *N*-aciltiouréia (**86**) foi acompanhada durante 30 minutos. Após esse tempo, o meio reacional foi seco em evaporador rotatório e então adicionado 5,0 mL de hexano, havendo a formação de cristais aciculares brancos.[87]

Em um balão adaptado a um sistema de refluxo, contendo 1,0 mmol da *N*-aciltiouréia (**86**) foi dissolvida em 8,0 mL de DMF anidro, foram adicionados, 2,0 mmol de geranilamina e 4,0 mmol de Et_3N. Posteriormente, sob agitação vigorosa e à temperatura de 0°C foram adicionados 1,5 mmol de $Bi(NO_3)_3.5H_2O$. O progresso da reação foi acompanhado por CCDA. Quando toda tiouréia foi consumida, 50,0 mL de DCM foi adicionado ao produto bruto, que foi filtrado à vácuo, sob celite. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida e o resíduo dissolvido em 60,0 mL de DCM e, submetido à partição líquido-líquido em água, logo então seco em Na_2SO_4. O material obtido foi purificado por cromatografia em coluna de fase normal, utilizando Hex:AcOEt (4:1) como fase móvel.[81,82]

3.2.8. Preparo dos análogos oxigenado 90 e sulfurado 91

Em um equipado com um agitador magnético foram dissolvidos separadamente 1,0 mmol dos diimidazóis **88** e **89** em 15,0 mL de DCM anidro e então foram adicionados 2,2 mmol de geranilamina. A formação da uréia **90** e da tiouréia **91** foram acompanhadas por CCDA durante 2 horas. Após esse período, o solvente reacional foi evaporado e então o produto bruto foi submetido à cromatografia em coluna de fase normal eluída por misturas de Hex:AcOEt (70 à 50 % de Hex).[88]

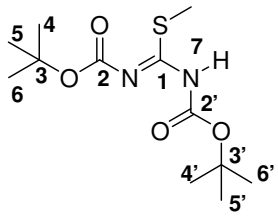
3.2.9. Preparo das diuretanas 92 e 93

Em um balão equipado com agitador magnético e condensador foram dissolvidos 1,2 mmol das isotiouréias **67** ou **68** foram adicionados 10,0 mL de THF anidro e 1,5 mmol de geranilamina e 3,6 mmol de trietilamina. A conversão das isotiouréias **67** e **68** em diuretanas **92** e **93** foi acompanhada por CCDA, sendo a reação finalizada após 15 horas. O meio reacional foi seco em evaporador rotatório e o prduto brutoi foi purificado por meio de cromatografia em coluna de fase normal, utilizando Hex:AcOEt (4:1) como fase móvel. [35,36].

4. Rendimentos e dados físicos e espectroscópicos das substâncias sintetizadas

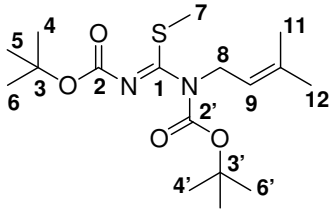
Os derivados guanidínicos sintéticos e seus análogos tiveram suas estruturas moleculares identificadas empregando métodos espectroscópicos de RMN de ^{1}H e de ^{13}C, infravermelho e espectrometria de massas de baixa resolução.

Bis-Boc-*S*-metilisotiouréia (**67**)



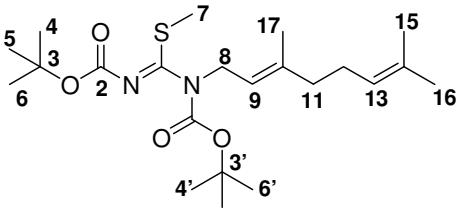
Rendimento: 96%. Sólido branco. **Intervalo de fusão:** 120-122 °C. **IV [KBr; ν (cm^{-1})]:** 1718 (C=O) e 1618 (C=N). **EM** ($C_{12}H_{22}N_2O_4S$): *m/z* 313 $[M+Na]^+$. **RMN de ^{1}H (11,7 T, $CDCl_3$) δ_H (mult; *J* em Hz):** 1,43 (s; H-4, H-5, H-6, H-4', H-5' e H-6'), 2,28 (s; H-7), 11,5 (sl; NH). **RMN de ^{13}C (11,7 T, $CDCl_3$) δ_C:** 170,6 (C-1), 146,1 (C-2 e C-2'), 84,1 (C-3 e C-3'), 26,4 e 27,4 (C-4, C-5, C-6, C-4', C-5' e C-6'), 13,6 (C-7).

N,*N'*-*bis*(*t*-butoxicarbonil)-*N*-isoprenil-*S*-metilisotiouréia (**68**)



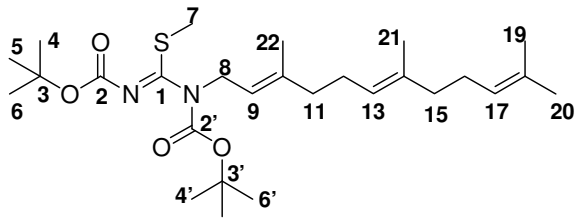
Rendimento: 85%. Óleo incolor. **IV [KBr; ν (cm^{-1})]:** 1741 (C=O) e 1654 (C=N). **EM** ($C_{17}H_{30}N_2O_4S$): *m/z* 358 $[M+H]^+$. **RMN de ^{1}H (11,7 T, $CDCl_3$) δ_H (mult; *J* em Hz):** 1,40 e 1,43 (s; H-4, H-5, H-6, H-4', H-5' e H-6'), 2,29 (s; H-7), 4,00 (d; 7,0; H-8), 5,19 (t; 7,0; H-9), 1,60 (s; H-11), 1,65 (s; H-12). **RMN de ^{13}C (11,7 T, $CDCl_3$) δ_C:** 151,7, 157,8 e 163,0 (C-1, C-2 e C-2'), 81,5 e 82,0 (C-3 e C-3'), 27,9 (C-4, C-5, C-6, C-4', C-5' e C-6'), 15,4 (C-7), 46,6 (C-8), 119,5 (C-9), 135,4 (C-10), 17,8 (C-11), 25,5 (C-12).

N,*N*'-*bis*(*t*-butoxicarbonil)-*N*-geranil-*S*-metilisotiouréia (**69**)



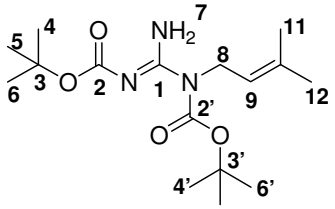
Rendimento: 92%. Óleo incolor. **IV [KBr; ν (cm^{-1})]:** 1720 (C=O) e 1618 (C=N). **EM** ($C_{22}H_{38}N_2O_4S$): *m*/*z* 467 $[M+H]^+$. **RMN de ^{1}H (11,7 T, $CDCl_3$) δ_H (mult; *J* em Hz):** 1,40 e 1,43 (s; H-4, H-5, H-6, H-4', H-5' e H-6'), 2,29 (s; H-7), 4,08 (d; 7,0; H-8), 5,20 (t; 7,0; H-9), 1,95 (m; H-11), 2,01 (m; H-12), 5,00 (t; 7,0; H-13), 1,52 (s; H-15); 1,59 (s; H-16), 1,60 (s; H-17). **RMN de ^{13}C (11,7 T, $CDCl_3$) δ_C:** 151,6, 157,7 e 162,9 (C-1, C-2 e C-2'), 81,3 e 81,8 (C-3 e C-3'), 27,7 e 27,8 (C-4, C-5, C-6, C-4', C-5' e C-6'), 15,3 (C-7), 46,5 (C-8), 119,3 (C-9), 139,1 (C-10), 39,3 (C-11), 26,1 (C-12), 123,7 (C-13), 131,2 (C-14) 17,4 (C-15), 25,4 (C-16), 16,1 (C-17).

N,*N*'-*bis*(*t*-butoxicarbonil)-*N*-farnesil-*S*-metilisotiouréia (**70**)



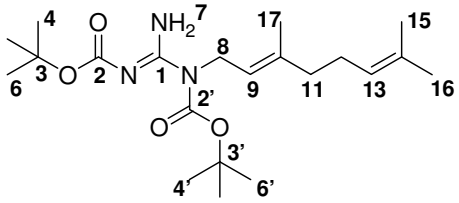
Rendimento: 89%. Óleo incolor. **IV [KBr; ν (cm^{-1})]:** 1720 (C=O) e 1623 (C=N). **EM** ($C_{27}H_{46}N_2O_4S$): *m*/*z* 495 $[M+H]^+$. **RMN de ^{1}H (11,7 T, $CDCl_3$) δ_H (mult; *J* em Hz):** 1,40 e 1,43 (s; H-4, H-5, H-6, H-4', H-5' e H-6'), 2,29 (s; H-7), 4,07 (d; 6,5; H-8), 5,02 e 5,21 (t; H-9, H-13 e H-17), 1,88 – 2,03 (m; H-11, H-12, H-15 e H-16), 1,52 e 1,60 (s; H-19, H-20, H-21 e H-22). **RMN de ^{13}C (11,7 T, $CDCl_3$) δ_C:** 151,8, 157,9 e 163,1 (C-1, C-2 e C-2'), 81,0 e 81,5 (C-3 e C-3'), 27,8 e 27,9 (C-4, C-5, C-6, C-4', C-5' e C-6'), 15,4, 15,9, 16,3 e 17,6 (C-7, C-19, C-21 e C-22), 46,6 (C-8), 119,4, 123,8 e 124,3 (C-9, C-13 e C-17), 131,1, 135,1 e 139,4 (C-10, C-14 e C-18), 39,3 e 39,5 (C-11 e C-15), 25,6, 26,3 e 26,7 (C-12, C-16 e C-20).

N,*N'*-*bis*(*t*-butoxicarbonil)-*N*-isoprenil-guanidina (**71**)



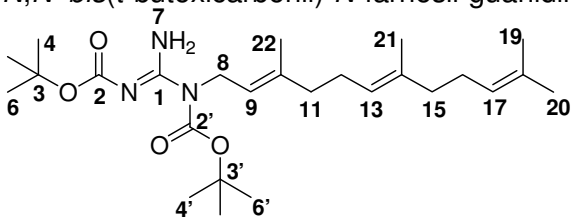
Rendimento: 97%. Óleo incolor. **IV [KBr; ν (cm^{-1})]:** 1714(C=O), 1610 (C=N) e 3386 (N-H). **EM** ($C_{16}H_{29}N_3O_4$): *m*/*z* 328 $[M+H]^+$, *m*/*z* 272 $[M+H\text{-}terc\text{-butila}]^+$. **RMN de ^{1}H (11,7 T, $CDCl_3$) δ_H (mult; *J* em Hz):** 1,41 e 1,43 (s; H-4, H-5, H-6, H-4', H-5' e H-6'), 9,20 (sl; H-7), 4,45 (d; 6,5; H-8), 5,07 (t; 7,0; H-9), 1,63 (s; H-11), 1,64 (s; H-12). **RMN de ^{13}C (11,7 T, $CDCl_3$) δ_C:** 155,1, 160,5 e 163,7 (C-1, C-2 e C-2'), 78,5 e 83,4 (C-3 e C-3'), 28,0 (C-4, C-5, C-6, C-4', C-5' e C-6'), 43,1 (C-8), 120,7 (C-9), 134,5 (C-10), 18,1 (C-11), 25,6 (C-12).

N,*N'*-*bis*(*t*-butoxicarbonil)-*N*-geranil-guanidina (**72**)



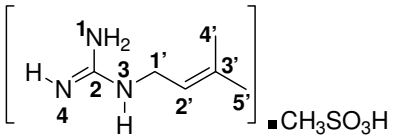
Rendimento: 91%. Óleo incolor. **IV [KBr; ν (cm^{-1})]:** 1714 (C=O), 1610 (C=N) e 3386 (N-H). **EM** ($C_{21}H_{37}N_3O_4$): *m*/*z* 396 $[M+H]^+$. **RMN de ^{1}H (11,7 T, $CDCl_3$) δ_H (mult; *J* em Hz):** 1,41 e 1,42 (s; H-4, H-5, H-6, H-4', H-5' e H-6'), 9,20 (s; H-7), 4,47 (d; 6,5; H-8), 5,05 (t; 6,5; H-9), 1,93 (m; H-11), 2,00 (m; H-12), 5,01 (t; 8,0; H-13), 1,52 (s; H-15); 1,60 (s; H-16 e H-17). **RMN de ^{13}C (11,7 T, $CDCl_3$) δ_C:** 155,2, 160,6 e 163,8 (C-1, C-2 e C-2'), 78,5 e 83,4 (C-3 e C-3'), 28,0 e 28,3 (C-4, C-5, C-6, C-4', C-5' e C-6'), 43,1 (C-8), 120,7 (C-9), 137,8 (C-10), 39,5 (C-11), 26,4 (C-12), 124,0 (C-13), 131,5 (C-14) 17,6 (C-15), 25,6 (C-16), 16,4 (C-17).

N,*N'*-*bis*(*t*-butoxicarbonil)-*N*-farnesil-guanidina (**73**)



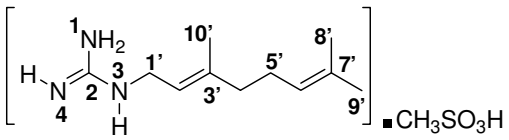
Rendimento: 93%. Óleo incolor. **IV [KBr; ν (cm^{-1})]:** 1712 (C=O), 1612 (C=N) e 3386 (N-H). **EM** ($C_{26}H_{45}N_3O_4$): *m/z* 464 $[M+H]^+$, *m/z* 486 $[M+Na]^+$. **RMN de ^{1}H (11,7 T, $CDCl_3$) δ_H (mult; *J* em Hz):** 1,47 e 1,48 (s; H-4, H-5, H-6, H-4', H-5' e H-6'), 4,53 (d; 6,0; H-8), 5,09 (m; H-9, H-13 e H-17), 1,95 – 2,06 (m; H-11, H-12, H-15 e H-16), 1,58, 1,66 e 1,70 (s; H-19, H-20, H-21 e H-22). **RMN de ^{13}C (11,7 T, $CDCl_3$) δ_C:** 155,1, 161,0 e 163,0 (C-1, C-2 e C-2'), 79,0 e 83,4 (C-3 e C-3'), 28,0 e 28,2 (C-4, C-5, C-6, C-4', C-5' e C-6'), 15,9, 16,4 e 17,6 (C-7, C-19, C-21 e C-22), 43,0 (C-8), 120,6, 123,9 e 124,3 (C-9, C-13 e C-17), 131,1, 135,1 e 137,9 (C-10, C-14 e C-18), 39,5 e 39,6 (C-11 e C-15), 25,6, 26,4 e 26,7 (C-12, C-16 e C-20).

Metanossulfonato de *N*-isoprenil-guanidina (**74**)
(metanossulfonato de galegina)



Rendimento: 88 %. Óleo amarelo. **IV [KBr; ν (cm^{-1})]:** 1660 (C=N) e 3180 (N-H). **EM** $(C_6H_{14}N_3)^+$: *m/z* 128 [*N*-isoprenil-guanidínio]$^+$. **RMN de ^{1}H (11,7 T, DMSO-d_6) δ_H (mult; *J* em Hz):** 7,57 (tl; H-3), 3,67 (t; 5,5; H-1'), 5,18 (t; 5,5; H-2'), 1,61 (s; H-4'), 1,63 (s, H-5'), 2,47 (s, metanossulfonato). **RMN de ^{13}C (11,7 T, DMSO-d_6) δ_C:** 156,9 (C-2), 39,0 (C-1'), 119,1 (C-2'), 136,3 (C-3'), 17,9 (C-4'), 25,4 (C-5'), 39,7 (metanossulfonato).

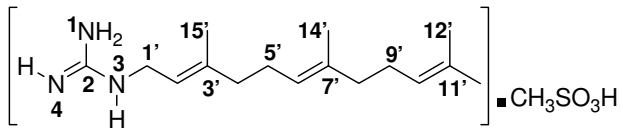
metanossulfonato de *N*-geranil-guanidina (**75**)



Rendimento: 82 %. Óleo amarelo. **IV [KBr; ν (cm^{-1})]:** 1660 (C=N) e 3176 (N-H). **EM** $(C_{11}H_{22}N_3)^+$: *m/z* 196 [*N*-geranil-guanidínio]$^+$. **RMN de ^{1}H (11,7 T, DMSO-d_6) δ_H (mult; *J* em Hz):** 7,60 (tl; H-3), 3,76 (t; 6,0; H-1'), 5,20 (t; 5,5; H-2'), 2,10 (m; H-4' e H-5'), 5,00 (t; 5,0; H-6'), 1,59 e 1,58 (s; H-8', H-9' e H-10') e 2,77 (s, metanossulfonato). **RMN de ^{13}C (11,7 T, DMSO-d_6) δ_C:** 157,5 (C-2), 39,5 (C-1'), 118,4 (C-2'), 141,6 (C-3'), 39,3 (C-4'), 26,2

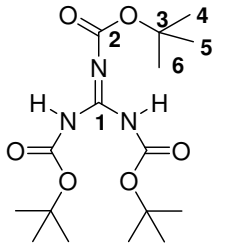
(C-5'), 123,5 (C-6'), 132,0 (C-7'), 17,6 (C-8'), 25,6 (C-9'), 16,3 (C-10') e 39,7 (metanossulfonato).

Metanossulfonato de *N*-farnesil-guanidina (**76**)



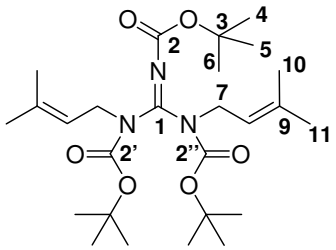
Rendimento: 62 %. Óleo amarelo. **IV [KBr; ν (cm^{-1})]:** 1654 (C=N). **EM** ($C_{16}H_{30}N_3$)$^+$: *m*/*z* 264 [*N*-farnesil-guanidínio]$^+$. **RMN de ^{1}H (11,7 T, DMSO-d_6) δ_H (mult; *J* em Hz):** 7,50 (tl; 6,0 H-3), 3,71 (t; 6,0; H-1'), 5,08 e 5,20 (t; 5,5; H-2', H-6' e H-10'), 1,92 – 2,07 (m; H-4', H-5', H-8' e H-9'), 1,56, 1,57, 1,64 (s; H-12', H-13', H-14' e H-15'), 2,37 (s, metanossulfonato). **RMN de ^{13}C (11,7 T, DMSO-d_6) δ_C:** 156,6 (C-2), 38,7, 38,8 e 39,1 (C-1', C-4' e C-8'), 118,6, 123,5 e 124,0 (C-2', C-6' e C-13'), 15,7, 16,0 e 17,4 (C-12', C-14' e C-15'), 39,6 (metanossulfonato).

Tri-Boc-guanidina (**78**)



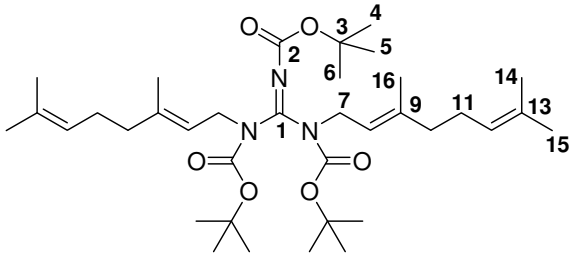
Rendimento: 95%. Sólido branco. **Intervalo de fusão:** 140-143 °C. **IV [KBr; ν (cm^{-1})]:** 1782, 1718 (C=O) e 1641 (C=N). **EM** ($C_{16}H_{29}N_3O_6$): *m*/*z* 360 [M+H]$^+$. **RMN de ^{1}H (11,7 T, $CDCl_3$) δ_H (mult; *J* em Hz):** 1,42 (s; H-4, H-5 e H-6), 10,8 (sl; NH). **RMN de ^{13}C (11,7 T, $CDCl_3$) δ_C:** 27,9 (C-4, C-5 e C-6).

N,*N*',*N*''-*tri*(*t*-butoxicarbonil)-*N*-isoprenil-guanidina (**79**)



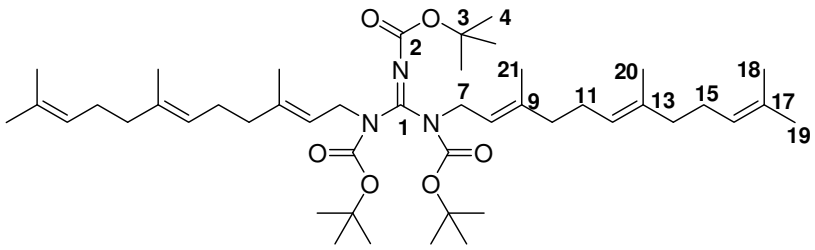
Rendimento: 94 %. Óleo incolor. **IV [KBr; ν (cm^{-1})]:** 1726 (C=O) e 1645 (C=N). **EM** ($C_{26}H_{45}N_3O_6$): *m/z* 496 $[M+H]^+$, *m/z* 518 $[M+Na]^+$. **RMN de ^{1}H (11,7 T, $CDCl_3$) δ_H (mult; *J* em Hz):** 1,38, 1,40 e 1,41 (s; H-4, H-5, H-6, H-4', H-5', H-6', H-4'', H-5'' e H-6''), 4,06 (d; 7,0; H-7), 5,19 (t; 7,0; H-8), 1,56 (s; H-10 e 1,61 (s, H-11). **RMN de ^{13}C (11,7 T, $CDCl_3$) δ_C:** 149,0, 151,9 e 158,1 (C-1, C-2, C-2' e C-2''), 80,6 e 81,9 (C-3, C-3' e C-3''), 28,0 (C-4, C-5, C-6, C-4', C-5', C-6' e C-4'', C-5'' e C-6''), 46,1 (C-7), 119,7 (C-8), 134,7 (C-9), 17,7 (C-10), 25,5 (C-11).

N,*N*',*N*''-*tri*(*t*-butoxicarbonil)-*N*-geranil-guanidina (**80**)



Rendimento: 90 %. Óleo incolor. **IV [KBr; ν (cm^{-1})]:** 1728 (C=O) e 1643 (C=N). **RMN de ^{1}H (11,7 T, $CDCl_3$) δ_H (mult; *J* em Hz):** 1,42 e 1,45 (s; H-4, H-5, H-6, H-4', H-5', H-6', H-4'', H-5'' e H-6''), 4,11 (d; 6,5; H-7), 5,26 (t; 6,5; H-8), 1,94-2,10 (m; H-10 e H-11), 5,04 (t; 6,5; H-12), 1,55 (s; H-14), 1,61 (s; H-16) e 1,63 (s; H-15). **RMN de ^{13}C (11,7 T, $CDCl_3$) δ_C:** 149,3, 158,2 e 152,0 (C-1, C-2, C-2' e C-2''), 80,7 e 82,0 (C-3, C-3' e C-3''), 28,1 (C-4, C-5, C-6, C-4', C-5', C-6', C-4'', C-5'' e C-6''), 46,2 (C-7), 119,7 (C-8), 138,3 (C-9), 39,6 (C-10), 25,5 e 26,5 (C-11 e C-15), 16,2 e 17,5 (C-14 e C-16).

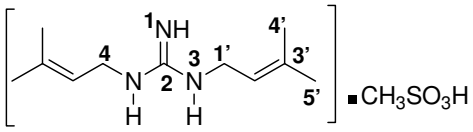
N,*N*',*N*''-*tri*(*t*-butoxicarbonil)-*N*-farnesil-guanidina (**81**)



Rendimento: 71 %. Óleo incolor; **IV [KBr; ν (cm^{-1})]:** 1728 (C=O) e 1645 (C=N). **EM** ($C_{46}H_{77}N_3O_6$): *m/z* 768 $[M+H]^+$, *m/z* 790 $[M+Na]^+$. **RMN de ^{1}H (11,7 T, $CDCl_3$) δ_H (mult; *J* em Hz):** 1,39 e 1,42 (s; H-4, H-5, H-6, H-4', H-5', H-6', H-4'', H-5'' e H-6''), 4,09 (d; 6,5; H-7), 5,0 -5,25 (t; 6,5; H-8, H-12 e H-16), 1,80-2,00 (m; H-10, H-11, H-14 e H-15), 1,51, 1,52,

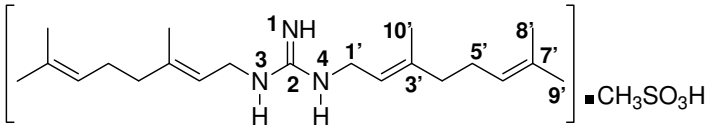
1,58 e 1,60 (s; H-18, H-9, H-20 e H-21). **RMN de ^{13}C (11,7 T, $CDCl_3$) δ_C:** 149,2, 152,0 e 158,2 (C-1, C-2, C-2' e C-2''), 80,7 e 82,0 (C-3, C-3' e C-3''), 28,1 (C-4, C-5, C-6, C-4', C-5', C-6', C-4'', C-5'' e C-6''), 46,2 (C-7), 119,6, 123,9 e 124,3 (C-8, C-12 e C-16), 131,1, 135,1 e 138,5 (C-9, C-13 e C-17), 39,6 (C-10 e C-14), 25,5 e 26,5 (C-11 e C-15), 15,9, 16,2 e 17,5 (C-14 e C-16).

Metanossulfonato de *N,N'*-diisoprenil-guanidina (**82**)
metanossulfonato de pteroginidina



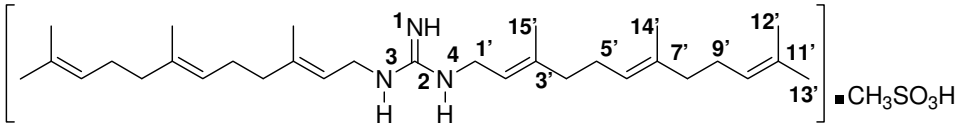
Rendimento: 92 %. Óleo amarelo. **IV [KBr; ν (cm^{-1})]:** 1633 (C=N). **EM** $(C_{11}H_{22}N_3)^+$: *m/z* 196 [*N,N'*-diisoprenil-guanidínio]$^+$. **RMN de ^{1}H (11,7 T, $CDCl_3$) δ_H (mult; *J* em Hz):** 6,75 (sl; H-3 e H-4), 3,80 (t; 5,5; H-1'), 5,21 (t; 5,5; H-2'), 1,69 (s, H-4'), 1,73 (s; H-5'), 2,74 (s, metanossulfonato). **RMN de ^{13}C (11,7 T, DMSO-d_6) δ_C:** 156,3 (C-2), 39,7 (C-1'), 118,6 (C-2'), 137,8 (C-3'), 17,5 (C-4'), 25,5 (C-5'), 39,3 (metanossulfonato).

Metanossulfonato de *N,N'*-digeranil-guanidina (**83**)
metanossulfonato de nitensidina A



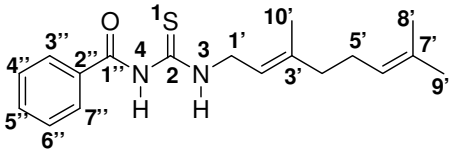
Rendimento: 68 %. Óleo amarelo; **IV [KBr; ν (cm^{-1})]:** 1639 (C=N). **EM** $(C_{21}H_{37}N_3)^+$: *m/z* 332 [*N,N'*-digeranil-guanidínio]$^+$. **RMN de ^{1}H (11,7 T, DMSO-d_6) δ_H (mult; *J* em Hz):** 6,80 (sl; H-3 e H-4), 3,80 (t; 6,5; H-1'), 5,19 (t; 6,5; H-2'), 2,00 – 2,05 (m; H-4' e H-5'), 5,00 (t; 5,0; H-6'), 1,59 e 1,58 (s; H-8', H-9' e H-10') e 2,77 (s, metanossulfonato). **RMN de ^{13}C (11,7 T, DMSO-d_6) δ_C:** 157,5 (C-2), 39,5 (C-1'), 118,4 (C-2'), 141,6 (C-3'), 39,3 (C-4'), 26,2 (C-5'), 123,5 (C-6'), 132,0 (C-7'), 17,6 (C-8'), 25,6 (C-9'), 16,3 (C-10') e 39,7 (metanossulfonato).

Metanossulfonato de *N*,*N*'-difarnesil-guanidina (**84**)



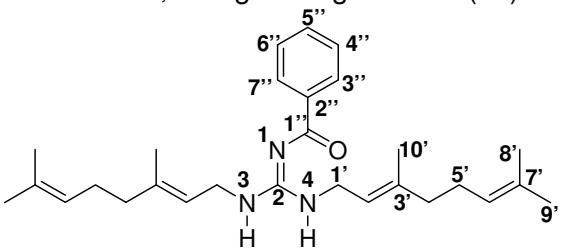
Rendimento: 70 %. Óleo marrom. **IV [KBr; ν (cm^{-1})]:** 1660 (C=N). **EM** ($C_{31}H_{53}N_3$)$^+$: *m*/*z* 468 [*N*,*N*'-difarnesil-guanidínio]$^+$. 6,80 (sl; H-3 e H-4), 3,52 (t; 7,5; H-1'), 5,10 – 5,19 (t; H-2', H-6'e H-10'), 1,80 – 1,98 (m; H-4', H-5', H-8' e H-9'), 1,51, 1,52, 1,60 e 1,64 (s; H-12', H-13', H-14' e H-15') e 2,66 (s, metanossulfonato). **RMN de ^{13}C (11,7 T, DMSO-d_6) δ_C:** 39,5 e 39,1 (C-1', C-4' e C-8'), 115,8, 123,3 e 124,1 (C-2', C-6'e C-10'), 131,1, 135,4 e 143,7 (c-3', C-6' e C-11'), 25,5, 26,3 e 26,6 (C-5', C-9'e C-13'), 15,8, 16,3 e 17,5 (C-12', C-14'e C-15') e 37,3 (metanossulfonato).

N-benzoil-*N*'-geranil-tiouréia (**86**)



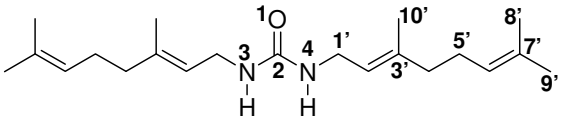
Rendimento: 97 %. Cristais brancos. **Intervalo de fusão:** 66-68 ^{o}C. **IV [KBr; ν (cm^{-1})]:** 1664 (C=O), 1550, 1502, 1446 (C=C aromáticos) e 3257 (N-H) (C=N). **EM** ($C_{24}H_{37}N_2OS$): *m*/*z* 339 [M+H-benzoíla]$^+$. **RMN de ^{1}H (11,7 T, $CDCl_3$) δ_H (mult; *J* em Hz):** 4,21 (dd; 1,5 e 6,6; H-1'), 5,29 (dt; 1,5 e 6,5; H-2'), 1,99 (m; H-4'), 2,04 (m; H-5'), 5,00 (tt; 1,0 e 7,0, H-6'), 1,54 (s; H-8'), 1,62 (s; H-9'), 1,66 (s; H-10') 7,75 (dd; 2,0 e 8,0; H-3'' e H-7''), 7,43 (m; H-4'' e H-6'') e 7,54 (m; H-5'). **RMN de ^{13}C (11,7 T, $CDCl_3$) δ_C:** 179,3 (C-2), 43,9 (C-1'), 117,7 (C-2'), 141,6 (C-3'), 39,4 (C-4'), 26,2 (C-5'), 123,6 (C-6'), 131,8 (C-7'), 17,5 (C-8'), 25,6 (C-9'),16,5 (C-10'), 166,7 (C-1''), 131,8 (C-2''), 127,3 (C-3'' e C-7''), 129,0 (C-4'' e C-6'') e 133,0 (C-5'').

N-benzoil-*N'*,*N''*-digeranil-guanidina (**87**)



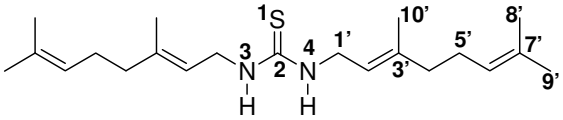
Rendimento: 82 %. Cristais brancos. **Intervalo de fusão:** 73-75 °C. **IV [KBr; ν (cm^{-1})]:** 1687 (C=O), 1542, 1473 (C=C aromáticos) e 3251, 3319 (N-H). **EM** ($C_{28}H_{41}N_3O$): *m*/*z* 436 $[M+H]^+$, *m*/*z* 452 $[M+Na]^+$. **RMN de ^{1}H (11,7 T, $CDCl_3$) δ_H (mult; *J* em Hz):** 3,89 (t; 5,0; H-1'), 5,22 (dt; 1,5 e 5,0; H-2'), 1,94 (m; H-4'), 2,01 (m; H-5'), 5,00 (tt; 1,0 e 7,0, H-6'), 1,52 (s; H-8'), 1,60 (s; H-9'), 1,62 (s; H-10'), 7,95 (dd; 1,0 e 7,5; H-3'' e H-7''), 7,38 (t; 7,5; H-4'' e H-6'') e 7,80 (m; H-5'). **RMN de ^{13}C (11,7 T, $CDCl_3$) δ_C:** 154,5 (C-2), 37,6 (C-1'), 119,9 (C-2'), 139,5 (C-3'), 39,4 (C-4'), 26,3 (C-5'), 123,8 (C-6'), 131,6 (C-7'), 17,6 (C-8'), 25,6 (C-9'),16,2 (C-10'), 168,2 (C-1''), 132,5 (C-2''), 127,9 (C-3'' e C-7''), 128,5 (C-4'' e C-6'') e 132,9 (C-5'').

N,*N'*-digeranil-uréia (**90**)



Rendimento: 91 %. Pó amorfo branco. **Intervalo de fusão:** 67-68 °C. **IV [KBr; ν (cm^{-1})]:** 1622 (C=O), 3342 (N-H). **EM** ($C_{21}H_{36}N_2O$): *m*/*z* 333 $[M+H]^+$,): *m*/*z* 355 $[M+Na]^+$. **RMN de ^{1}H (11,7 T, $CDCl_3$) δ_H (mult; *J* em Hz):** 3,65 (t; 6,0; H-1'), 5,17 (t; 6,0; H-2'), 1,89 (m; H-4'), 1,96 (m; H-5'), 4,97 (t; 6,0, H-6'), 1,50 (s; H-8'), 1,58 (s; H-9'), 1,56 (s; H-10') e 4,52 (sl; NH). **RMN de ^{13}C (11,7 T, $CDCl_3$) δ_C:** 158,5 (C-2), 38,4 (C-1'), 121,0 (C-2'), 139,0 (C-3'), 39,4 (C-4'), 26,4 (C-5'), 123,8 (C-6'), 134,6 (C-7'), 17,5 (C-8'), 25,5 (C-9') e 16,1 (C-10').

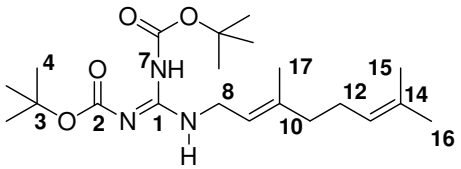
N,*N'*-digeranil-tiouréia (**91**)



Rendimento: 91 %. Óleo amarelo **IV [KBr; ν (cm^{-1})]:** 1546 (C=S). **EM** ($C_{21}H_{36}N_2S$): *m*/*z* 349 $[M+H]^+$,): *m*/*z* 371 $[M+Na]^+$. **RMN de ^{1}H (11,7 T, $CDCl_3$) δ_H (mult; *J* em Hz):** 3,93 (sl; H-1'), 5,17 (t; 7,0; H-2'), 1,96 (m; H-4'), 2,01 (m; H-5'), 4,99 (t; 7,0, H-6'), 1,52 (s; H-8'),

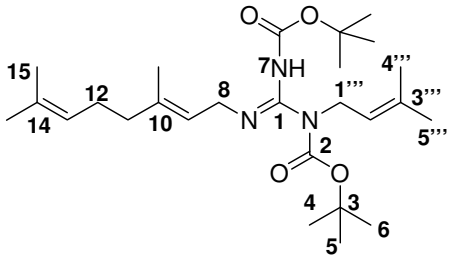
1,61 (s; H-9' e H-10') e 5,93 (sl; NH). **RMN de ^{13}C (11,7 T, $CDCl_3$) δ_C:** 181,2 (C-2), 42,3 (C-1'), 118,8 (C-2'), 140,7 (C-3'), 39,2 (C-4'), 26,1 (C-5'), 123,4 (C-6'), 131,6 (C-7'), 17,4 (C-8'), 25,4 (C-9') e 16,2 (C-10').

N,*N*'-*bis*(*t*-butoxicarbonil)-*N*''-geranil-guanidina (**92**)



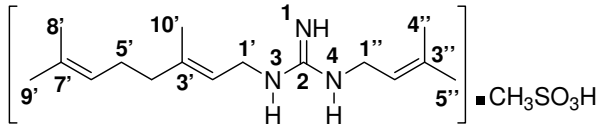
Rendimento: 92 %. Pó amorfo branco. **Intervalo de fusão:** 77-78 °C. **IV [KBr; ν (cm^{-1})]:** 1728 (C=O) e 1645 (C=N). **EM** ($C_{21}H_{37}N_3O_4$): *m*/*z* 396 $[M+H]^+$. **RMN de ^{1}H (11,7 T, $CDCl_3$) δ_H (mult; *J* em Hz):** 1,34 e 1,44 (s; H-4, H-5, H-6, H-4', H-5' e H-6'), 8,00 (t; 6,0; H-7), 3,87 (d; 6,5; H-8), 5,08 (t; 6,0; H-9), 1,88 (m; H-11), 1,93 (m; H-12), 4,91 (t; 6,5; H-13), 1,51 e 1,52 (s; H-15, H-16 e H-17). **RMN de ^{13}C (11,7 T, $CDCl_3$) δ_C:** 153,0, 155,7 e 163,4 (C-1, C-2 e C-2'), 78,9 e 82,7 (C-3 e C-3'), 27,9 e 28,2 (C-4, C-5, C-6, C-4', C-5' e C-6'), 38,9 e 39,3 (C-8 e C-11), 119,1 (C-9), 140,2 (C-10), 25,5 e 26,1 (C-16 e C-12), 123,6 (C-13), 131,5 (C-14) 17,5 (C-15), 16,2 (C-17).

N,*N*'-*bis*(*t*-butoxicarbonil)-*N*-isoprenil-*N*''-geranil-guanidina (**93**)



Rendimento: 96 %. Óleo incolor; **IV [KBr; ν (cm^{-1})]:** 1716 (C=O) e 1614 (C=N). **EM** ($C_{26}H_{45}N_3O_4$): *m*/*z* 464 $[M+H]^+$. **RMN de ^{1}H (11,7 T, $CDCl_3$) δ_H (mult; *J* em Hz):** 1,40 e 1,41 (s; H-4, H-5, H-6, H-4', H-5' e H-6'), 3,76 e 4,18 (d; 7,0; H-8 e H-1'''), 5,01 e 5,14 (t; H-9, H-11 e H-2'''), 2,03 (m; H-11), 1,96 (m, H-12) e 1,53, 1,58, 1,60, 1,61 e 1,63 (s; H-15, H-16, H-17, H-4''' e H-5'''). **RMN de ^{13}C (11,7 T, $CDCl_3$) δ_C:** 78,8 e 81,8 (C-3 e C-3'), 28,1 (C-4, C-5, C-6, C-4', C-5' e C-6'), 41,5 e 45,3 (C-8 e C-1''), 118,7, 119,7 e 123,5 (C-9, C-13 e C-2''), 131,7, 135,5 e 140,6 (C-10, C-14 e C-3''), 39,3 (C-11), 25,5, 25,6 e 26,2 (C-12, C-16 e C-5'''), 16,2, 17,5 e 17,7 (C-15, C-17 e C-4''').

Metanossulfonato de *N*-isoprenil-*N'*-geranil-guanidina (**94**)



Rendimento: 88 %. Óleo amarelo; **IV [KBr; ν (cm^{-1})]:** 1633 (C=N) e 3178 (N-H). **EM** $(C_{16}H_{30}N_3)^+$: *m*/*z* 264 [*N*-isoprenil-*N'*-geranil-guanidínio]$^+$. **RMN de ^{1}H (11,7 T, DMSO-*d*$_6$) δ_H (mult; *J* em Hz):** 7,15 (sl; H-3 e H-4), 3,30 e 3,70 (d; H-1' e H-1''), 5,05 e 5,15 (t; H-2' e H-6' e H-2''), 1,93 (m; H-4'), 2,10 (m; H-5'), 1,57, 1,64 e 1,71 (s; H-8', H-9', H-4'' e H-5''). **RMN de ^{13}C (11,7 T, DMSO-*d*$_6$) δ_C:** 38,8, 38,9, 39,0, 39,5 (C-1', C-4', C-1'' e metanossulfonato), 118,8, 119,2, 123,7 (C-2', C-6'e C-2''), 130,9, 135,7 e 139,1 (C-3', C-7'e C-3''), 25,2, 25,3 e 25,8 (C-5', C-9' e C-5''), 16,0, 17,4, 17,7 (C-8', C-10'e C-4'').

CAPÍTULO 4

Potencial farmacológico das substâncias isoladas e sintetizadas (pág 84)

As substâncias isoladas ou sintetizadas no presente trabalho tiveram se potencial farmacológico avaliado por ensaios químicos (atividade antioxidante), bioquímicos (ação inibitória frente à mieloperoxidase) e/ou biológicos (atividades antitumoral, hemolítica e antifúngica).

1. Atividades antitumoral e hemolítica

1.1. Câncer e agentes antineoplásicos

Atualmente, o câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade mundial. Estima-se que no ano de 2006, mais de 126 mil pessoas no Brasil e cerca de 6 milhões de pessoas em todo mundo morrem decorrência dessa patologia. O tratamento quimioterápico antineoplásico é caracterizado pelo seu elevado custo econômico e realizado com inúmeras classes de fármacos (agentes alquilantes, antimitóticos, antimetabólitos análogos de nucleosídeos e de metotrexato, etc.), porém nenhuma delas apresenta-se capaz de erradicar as células tumorais sem afetar tecidos normais. Este baixo índice terapêutico somado à multi-fármaco resistência apresentada por tumores de diversas origens histológicas, conduz à necessidade premente de novos agentes antitumorais.[89,90] Nesse contexto, Cragg e colaboradores têm reportado a importância dos produtos naturais para o desenvolvimento de 57 % dos fármacos antineoplásicos. Essa porcentagem é constituída basicamente por três categorias: **(a)** o agente antineoplásico é o próprio metabólito secundário; **(b)** derivados semi-sintético; **(c)** fármacos sintéticos com o grupo farmacofórico desenhado à partir de um produto natural.[91]

1.2. Procedimento experimental

Os ensaios antitumorais e de hemólise foram desenvolvidos no Laboratório Oncologia Experimental, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, sob supervisão da Profa. Dra. Letícia Veras Costa-Lotufo.

As linhagens tumorigênicas humanas utilizadas no ensaios de atividade antitumoral foram SF 295 (glioblastoma), MDA-MB435 (mama), HCT-8 (cólon) e HL-60 (leucemia) foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (USA).

As células foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10,0 % de soro fetal bovino e 1,0 % de antimicrobiano, sendo mantidas em estufa a 37 ^{o}C e atmosfera contendo 5,0 % de CO_2.

A análise de citotoxicidade pelo método do MTT consiste em uma análise colorimétrica, pela qual ocorre a conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazana, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas.

Para os ensaios com as substâncias foram plaqueadas em quatro placas com 96 cavidades, uma para cada linhagem de célula testada. As células foram plaqueadas nas seguintes concentrações: SF 295 e MDA-MB435 – 1,0 x 10^5 células/mL e HCT-8 e HL-60 – 7,0 x 10^4 células / mL.

Foram plaqueadas 100 μL de cada uma destas soluções celulares por poço, sendo então adicionados as amostras e doxorrubicina em concentrações variáveis de 0,19 a 25,0 μg/mL. As placas permaneceram incubadas por 72,0 horas nas mesmas condições ambientais descritas acima.

Ao término deste período, as placas foram centrifugadas e o sobrenadante foi removido. Em seguida, foram adicionados 200 μL da solução de MTT, e as placas foram novamente incubadas por 3,0 horas.

Após a dissolução do precipitado com DMSO, as placas foram levadas a um espectrofotômetro de placas, tendo a leitura de absorbância em 590 nm.

Os experimentos foram estatisticamente validados, segundo suas médias, segundo o programa GraphPad Prism, empregando esse para a determinação das CI_{50} (concentração inibitória capaz de diminuir em 50 % a viabilidade celular).[92]

O ensaio de hemólise foi realizado em microplacas de 96 poços segundo método descrito por Moreira[93] com pequenas modificações. Previamente, cada poço recebeu uma alíquota de 100 μL de cloreto de cálcio (10 mM em salina 0,85 %), seguida da adição de 100 μL de uma suspensão de eritrócitos de ratos em salina 0,85). Os derivados guanidínicos foram dissolvidos em DMSO e colocados em contato com essa suspensão celular. Triton X -100 à 0,5 % dissolvido em salina 0,85 % foi empregado como controle positivo. Após um tempo de incubação de 60 minutos á temperatura ambiente, essas suspensão foi centrifugada, e o sobrenadante contendo a hemoglobina liberada foi submetido à análise espectrofotométrica operando no comprimento de onda de 540 nm.

1.3. Resultados e discussões

O potencial antitumoral dos derivados guanidínicos naturais e sintéticos foi avaliado frente a quatro linhagens tumorigênicas humanas e comparadas com o controle positivo (doxorrubicina).

Inicialmente, os derivados guanidínicos naturais, sintéticos e seus análogos, bem como os intermediários das diversas rotas sintéticas foram ensaiados em uma concentração única de 25 μg/mL. As substâncias capazes de inibir em 90 % o crescimento das células tumorais foram diluídas seriadamente com intuito de determinar a concentração capaz de inibir em 50 % do crescimento das células tumorais (CI_{50}).Todos os intermediários de síntese mostraram uma porcentagem de inibição inferior à 90 %, ou seja exibiram $CI_{50} > 25$ μg/mL.

Os derivados guanidínicos isolados de *Pterogyne nitens* apresentaram atividade citotóxica fraca quando comparados ao controle positivo. Dentre esses, destaca-se a atividade da nitensidina E (**43**), a qual apresentou uma CI_{50} de 18,6 μM frente à linhagem de mama MDA-MB-435, valor correspondente à uma potência moderada, comportando-se cerca de 20 vezes menos ativa que a doxorrubicina (CI_{50} = 0,86 μM). A guanidina **42**, um derivado geranilado mostrou-se como a segunda substância mais ativa na série dos derivados de origem natural, exibindo uma CI_{50} de 57,4 μM frente às células tumorais de mama. Com esses dados de citotoxicidade iniciais foram observadas algumas características estruturais relacionadas ao comportamento antiproliferativo de derivados guanidínicos. Ao comparar-se as substâncias **1** e **2** (derivados isoprenilados) com as substâncias **42** e **43** (derivados geranilados), estes últimos apresentam maior bioatividade, sugerindo a importância do substituinte terpênico para a ação antitumoral. Além disso, o alcalóide **43** mostrou-se significantemente mais ativo que **42**, inferindo a importância da restrição conformacional (ciclização e da formação de um dieno conjugado) para uma maior citotoxicidade.

Em um segundo momento, os derivados guanidínicos sintéticos foram testados, visando a descoberta de agentes antitumorais mais potentes que os derivados guanidínicos naturais, bem como estabelecer dados preliminares e qualitativos de relação estrutura-atividade antitumoral.

De maneira geral, a tabela 16 indica uma maior atividade antitumoral dos derivados guanidínicos *N*,*N*'-dissubstituídos (**82**-**84** e **94**) em relação aos *N*-monossubtituídos (**74**-**76**), corroborando a importância do número de unidades

isoprênicas para a bioatividade. A comparação dos valores de CI_{50} apresentados para a doxorrubicina e os derivados guanidínicos *N*-monossubstituídos, sugere-se para esses últimos uma atividade moderada.

Dentre as guanidinas *N*,*N'*-dissubstituídas, observa-se uma maior atividade para o derivado farnesilado (**84**), seguido do geranilado (**83**), assimétrico (**94**) e por último os derivado isoprenilado (**82**), os quais apresentam 6, 4, 3 e 2 unidades isoprênicas, respectivamente. Esses dados concretizam a proposição de que o tipo de substituinte isoprenílico influencia na atividade antitumoral de derivados guanidino-terpênicos, ou seja quanto maior o número de unidades isoprênicas substituintes do núcleo guanidínico maior a bioatividade. Nesse contexto, destaca-se a ação da guanidina **84** sobre linhagens de mama, a qual apresentou uma CI_{50} igual àquela apresentada pela doxorrubicina, sendo portanto, o derivado com maior atividade e consequentemente, sendo um valioso "hit" para futuras otimizações.

A comparação dos valores de CI_{50} exibidos pelos derivados **83** e **87**, sugerem que a incorporação de uma benzoíla no núcleo guanidínico, promove um pequeno decréscimo sobre a citotoxicidade. A uréia **90** e tiouréia **91** mostraram valores de CI_{50} inferiores àqueles observados para o seu análogo guanidínico **83**, comportando-se como bioisósteros clássicos. A ação citotóxica superior de **90** em relação à tiouréia **91** e inferior à guanidina **83**, sugere que o núcleo central dos derivados guanidínicos também influenciam na bioatividade, ou seja propõe-se a seguinte ordem de potência citotóxica C=N > C=O > C=S.

Vale salientar, a importância da obtenção de derivados sintéticos para este trabalho, uma vez que o derivado farnesílico **84**, mostrou-se como um agente antitumoral otimizado à partir de seus protótipos isolados de *Pterogyne nitens* (**1** e **2**). Esse fato pode ser confirmado pelo comportamento dos derivados sintéticos **83** e **84**, os quais apresentaram ação antitumoral cerca de 50 a 100 vezes maior que os alcalóides guanidínicos **1** e **2**.

Um outro dado relevante é a baixa seletividade dos derivados guanidínicos e seus análogos frente às linhagens celulares de diversas origens histológicas. Assim, observa-se uma maior atividade sobre células tumorais de mama e uma menor ação sobre células tumorais de crescimento lento pertencentes ao SNC (glioblastoma), bem como os derivados guanidínicos e seus análogos apresentaram-se citotóxicos tanto para células de tumores sólidos quanto para células leucêmicas.

Tabela 16. Atividade antitumoral e hemolítica de derivados guanidínicos naturais, derivados guanidínicos sintéticos e seus análogos [valores expressados em CI_{50} (μM)]

Substâncias	***Linhagens celulares***				
	tumorais				*normais*
	MDA-MB-435 (mama)	**HL-60** (leucemia)	**SF-295** (glioblastoma)	**HCT-8** (cólon)	**eritrócitos de rato**
1	75,8	89,2	> 130	> 130	> 500
2	39,0	> 130	> 130	101	> 500
42	57,4	94,3	128	92,3	> 500
43	18,6	47,8	72,9	25,5	> 500
74	84,0	44,6	87,5	72,6	> 500
75	41,2	36,1	43,8	26,1	> 500
76	32,3	32,9	46,8	27,0	> 500
82	15,2	30,5	43,3	32,5	> 500
83	1,84	1,65	3,90	4,05	50,6
84	**0,86**	0,79	2,24	1,82	55,5
87	3,21	6,48	8,34	8,94	> 500
90	2,44	5,57	15,9	5,72	> 500
91	5,83	8,44	13,3	9,05	> 500
94	14,5	20,3	20,3	10,9	309
doxorubicina	**0.86**	**0,04**	**0,42**	**0,07**	**-**

Após a avaliação da ação antitumoral, os derivados guanídinicos foram ensaiados no teste de indução de hemólise.

Os derivados guanidínicos **83**, **84** e **94** que demonstraram maior atividade antitumoral, também apresentaram ação hemolítica sobre 50 % dos eritrócitos nas concentrações de 50,6, 55,5 e 309 μM, respectivamente. Esses dados podem sugerir que a ação citotóxica apresentada pelos derivados guanidínicos podem estar relacionadas à lise da membrana eritrocitária ou a outros mecanismos que provoquem mudanças na estabilidade dessa estrutura celular. Apesar de ter sido observado um efeito hemolítico propiciado pelos derivados gunaidínicos com maior atividade antitumoral, este ocorre em concentrações maiores que àquelas necessárias para o efeito citotóxico, havendo um pequeno índice de seletividade entre as células tumorais testadas e os eritrócitos.

O caráter anfifílico dos derivados guanidínicos pode ser a característica estrutural responsável pela ação hemolítica dos derivados guanidínicos, ou seja estes apresentam um núcleo carregado positivamente (polar) ligado à uma cadeia alifática longa (apolar). Esse arranjo assemelha-se aos agentes tensoativos, os quais podem intercalar-se na membrana plasmática, provocando o seu rompimento.

2. Atividade antifúngica

2.1. Importância das micoses e agentes antifúngicos

A relevância clínica das micoses tem aumentado gradativamente devido ao aumento concomitante de pacientes imunocomprometidos nos últimos anos, incluindo pacientes portadores de HIV, pacientes transplantados e com câncer.[94,95] Atualmente, a ameaça de duas novas doenças micóticas tem ganhado importância mundial, a aspergilose como componente da Síndrome Respiratória Aguda e Severa (SARS) e a inclusão de fungos como *Coccidioides immitis* como uma potente arma biológica do bioterrorismo.[96,97]

As dificuldades de um tratamento adequado para as infecções fúngicas estão basicamente relacionadas à semelhança metabólica entre fungos e células humanas, os quais se apresentam como organismos eucarióticos. Além disso, o longo tratamento com antifúngicos poliênicos (anfotericina B) conduz a inúmeros efeitos tóxicos. Enquanto, os fármacos da classe dos azóis apresentam espectros de ação limitados e mostram-se facilmente inativados pelos fungos, gerando inúmeros processos de resistência fúngica.[98,99] Por estas razões, existe uma grande necessidade pela descoberta de novos agentes antifúngicos ou pela otimização dos fármacos já existentes.

2.2. Procedimento experimental

Os ensaios antifúngicos envolvendo as substâncias isoladas de *Pterogyne nitens* foram desenvolvidos no Laboratório de Micologia Clínica, Departamento de Análise Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara, sob a supervisão da Profa. Dra. Maria José Giannini.

2.2.1. Microrganismos e condições de cultivo (A)

Os fungos utilizados neste trabalho incluem *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Cryptococcus neoformans* ATCC 90012. As cepas são originárias do Laboratório de Micologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP – Araraquara, sendo cultivadas em agar Sabouraud-dextrose à temperatura ambiente.[100]

2.2.2. Teste antifúngico (A)

Os ensaios antifúngicos foram desenvolvidos segundo o método de microdiluição em caldo, segundo descrito no documento M27-A2 do Instituto de Padrões Laboratoriais Clínicos. O meio de cultura utilizado foi RPMI 1640 com L-glutamina, ácido morfolinopropanosulfônico (MPOS), suplementado com 2% de glicose.

As substâncias isoladas de *Pterogyne nitens* foram dissolvidas em DMSO e logo dissolvidas no meio de cultura RPMI, alcançando uma concentração inicial de 250 μg/mL. A suspensão de células fúngicas foi preparada em salina 0,85 % com densidade óptica de 0,5 (McFarland) e então diluída na razão de 1:100 em RPMI tendo uma densidade fúngica equivalente à 1 x 10^5 unidades formadoras de colônia/mL. Esta suspensão foi inoculada sobre as microplacas com as substâncias, sendo este inoculo diluído até à concentração de 0,48 μg/mL. As microplacas foram incubadas sob agitação constante à uma temperatura de 37°C, durante 24 horas para *Candida albicans*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* e 48 horas para *Cryptococcus neoformans*. Os controles positivos empregados nos ensaios de fungitoxicidade foi anfotericina B e fluconazol. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a concentração capaz de inibir em 100 % o crescimento fúngico, sendo este analisado por espectrofotometria.[100]

Os derivados guanidínicos sintéticos e seus análogos tiveram seu potencial antifúngico avaliado na Facultad de Ciéncias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario – Argentina, sob responsabilidade da Profa. Dra. Susana Zacchino.

2.2.3. Microrganismos e condições de cultivo (B)

Os microrganismos utilizados na avaliação antifúngica dos derivados guanidínicos sintéticos e seus análogos foram adquiridos da “American Type Culture Collection (ATCC)” ou foram obtidos de isolados clínicos do Centro de Referencia Micológica, Facultad de Ciéncias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosário (CEREMIC). Sendo utilizados os fungos: *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida tropicalis* (C131), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9163), *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32264), *Microsporum gypseum* (C115), *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 9972), *Trichophyton rubrum* (C113), *Aspergillus fumigatus* (ATCC 26934),

Aspergillus flavus (ATCC 9170) e *Aspergillus niger* (ATCC 9029). O inóculo foi preparado de acordo com o método proposto pelo Comitê Nacional de Padrões de Laboratórios Clínicos e ajustados para 1 x 10^4 esporos ou células formadoras de colônia/ mL.[101]

2.2.4. Teste antifúngico (B)

A atividade antifúngica dos derivados guanidínicos e seus análogos foi determinada pelo método de diluição em caldo em microplacas de 96 poços, segundo o método do Comitê Nacional de Padrões de Laboratórios Clínicos, segundo os documentos M-27-A2 para leveduras e M-38-A para os fungos filamentosos.[101]

Foram plaqueadas 100 μL das suspensões fúngicas por poço, sendo então adicionados as amostras e os controles positivos (anfotericina B e fluconazol) em concentrações variáveis de 250 μg/mL a 3,10 μg/mL. As placas permaneceram incubadas à 28 ^oC para os fungos dermatófitos e à 35-37 ^oC para as leveduras e fungos, durante 72 horas.

De maneira semelhante à metodologia empregada no Laboratório de Micologia Clínica (FCF-UNESP-Araraquara), as concentrações inibitórias mínimas foram determinadas após o período de incubação.

2.3. Resultados e Discussões

Dando início aos estudos de avaliação do potencial antifúngico das substâncias descritas neste trabalho, os flavonóides pedalina (**7**), sorbifolina (**44**), pedalitina (**46**), nitensosídeo B (**47**), isoquercitrina (**53**) e quercetina 3-*O*-soforosídeo (**55**) e os alcalóides guanidínicos, pteroginina (**1**) e pteroginidina (**2**) foram testados sobre quatro fungos oportunistas, *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*.

Os dados de CIM (concentração inibitória mínima capaz de inibir em 100 % o crescimento fúngico) revelaram uma ação antifúngica superior das flavonas quando comparadas aos flavonóis e alcalóides guanidínicos. Apesar do número pequeno de substâncias ensaiadas, podem ser propostos alguns fatores estruturais que conferem ação antifúngica dessas substâncias.

A comparação dos valores de CIM apresentada pelas 7-metoxiflavonas, sugere a importância do número de hidroxilas livres para a ação antifúngica. A flavona **46** apresentou os menores valores de CIM, seguida de **44**, **7** e **47**, as quais apresentam 4, 3,

2 e 2 hidroxilas fenólicas livres. Esses dados conduzem à observação preliminar que a substituição da hidroxila na posição 6 por unidades sacarídicas provoca um decréscimo na atividade fungitóxica das flavonas.

Ao se comparar as duas substâncias com maior bioatividade (**44** e **46**) notou-se uma maior ação apresentada pela substância **46**, a qual exibe um padrão catecólico sobre o anel B, podendo ser mais uma característica estrutural que provoca incremento na fungitoxicidade. Outra observação preliminar refere-se à importância do número de unidades de açúcar, ou seja, os flavonóides diglicosilados (**47** e **55**) mostram-se menos ativos que quando comparados aos seus análogos monoglicosildados (**7** e **53**).o número de unidades de açúcares.

De maneira ampla, as flavonas mostraram ação fungitóxica forte, destacando-se a ação de **46**, o qual apresentou uma CIM de 0,9 μg/mL frente a *Cryptococcus neoformans*. Por outro lado, os flavonóis e alcalóides guanidínicos apresentaram-se como fracos agentes antifúngicos. As substâncias isoladas de *P. nitens* mostraram baixa inibição sobre o crescimento de *Candida albicans* e maior fungitoxicidade frente à *Cryptococcus neoformans*.

Tabela 17. Atividade antifúngica de algumas substâncias isoladas de *Pterogyne nitens*. [valores expressados em CIM (μg/mL)]

Substâncias	***cepas fúngicas***			
	Candida albicans	***Candida krusei***	***Candida parapsilosis***	***Cryptococcus neoformans***
1	250	62,5	250	31,2
2	250	62,5	250	31,2
7	250	**31,2**	125	**7,8**
44	125	**31,2**	125	**3,9**
46	250	**15,6**	**15,6**	**0,9**
47	250	62,5	125	**7,8**
53	250	62,5	250	**15,6**
55	250	250	250	62,5
fluconazol	**2,00**	**64,0**	**8,00**	**4,00**
anfotecina B	**2,00**	**2,00**	**1,00**	**0,06**

Paralelamente aos dados iniciais de atividade antifúngica de substâncias obtidas de *P. nitens*, parte dos derivados guanidínicos sintéticos foram testados frente a um painel de nove cepas fúngicas: *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*,

Cryptococcus neoformans, *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes*.

Inicialmente, os derivados guanidínicos sintéticos e seus análogos, bem como os intermediários das diversas rotas sintéticas foram ensaiados em uma concentração única de 250 μg/mL. As substâncias capazes de inibir em 100 % o crescimento fúngico foram diluídas seriadamente com intuito de determinar a concentração inibitória mínima capaz de inibir em 100 % a proliferação fúngica (CIM). Todos os intermediários de síntese mostraram uma porcentagem de inibição inferior à 100 %, ou seja exibiram CIM > 250 μg/mL.

Tabela 18. Atividade antifúngica de derivados guanidínicos sintéticos e seus análogos [valores expressados em CIM (μg/mL)]

Substâncias	*Cepas fúngicas*									
	Ca	**Ct**	**Sc**	**Cn**	**Afu**	**Afl**	**An**	**Mg**	**Tr**	**Tm**
74	250	250	250	< 250	< 250	< 250	125	125	125	125
75	125	125	62,5	< 250	125	250	62,5	125	**7,8**	62,5
76	125	125	31,2	< 250	62,5	250	62,5	62,5	15,6	62,5
82	250	250	250	> 250	250	250	250	> 250	62,5	125
83	**< 3,10**	**< 3,10**	**< 3,10**	< 250	31,2	125	**3,10**	nd*	nd*	nd*
84	**< 3,10**	**< 3,10**	**< 3,10**	< 250	**7,80**	62,5	15,6	31,2	**< 3,10**	**< 3,10**
87	> 250	> 250	> 250	> 250	**< 3,10**	**< 3,10**	**< 3,10**	250	250	250
90	> 250	> 250	> 250	> 250	125	125	125	62,5	nd*	nd*
91	31,2	31,2	31,2	< 250	62,5	125	125	250	**15,8**	62,5
94	62,5	62,5	< 250	< 250	< 250	< 250	62,5	nd*	nd*	nd*
anfotericina B	**0,75**	nd*	**0,63**	**0,40**	**3,00**	**3,00**	**0,90**	**6,25**	**25,0**	**6,25**
fluconazol	**8,00**	nd*	**6,00**	**2,00**	**20,0**	**30,0**	**12,5**	**6,25**	**15,0**	**12,5**

*** nd = *não determinado*

Ca = *Candida albicans*; **Ct** = *Candida tropicalis*; **Sc** = *Saccharomyces cerevisiae*; **Cn** = *Cryptococcus neoformans*; **Afu** = *Aspergillus fumigatus*; **Afl** = *Aspergillus flavus*; **An** = *Aspergillus niger*; **Mg** = *Microsporum gypseum*; **Tr** = *Tricophyton rubrum*; **Tm** = *Trycophyton mentagrophytes*

De maneira semelhante ao comportamento antitumoral apresentado pelas guanidinas e seus análogos, observou-se uma maior ação antifúngica dos derivados guanidínicos *N*,*N*'-dissubstituídos (**82**-**84**) quando comparados aos derivados *N*-monossubstituídos (**74**-**76**). Dentre os derivados *N*,*N*'-dissubstituídos testados, os derivado geranilado (**83**) e farnesilado (**84**) apresentaram maior fungitoxicidade que o derivado isoprenilado (**82**), sugerindo a importância do número de substituintes isopentenílicos para a bioatividade.

Salienta-se para a atividade antifúngica da *N*-acilguanidina **87**, a qual mostrou concentrações inibitórias mínimas superiores àquelas exibidas pelos derivados guanidínicos *N,N'*-dissubstituídos, exceto para os fungos do gênero *Aspergillus*, para os quais mostrou-se maior fungitoxicidade atingindo concentrações inibitórias mínimas inferiores a 3,10 μg/mL. Esses dados revelam a importância da incorporação de uma unidade benzoíla para a fungitoxicidade seletiva sobre *Aspergillus* spp.

As substâncias **90** e **91** comportaram-se como bioisósteros antifúngicos dos derivados guanidínicos. Os dados da tabela 18 revelam uma menor bioatividade apresentada pela uréia **90** quando comparada à tiouréia **91**, e essa por sua vez mostrou-se menos ativa que os derivados guanidínicos *N,N'*-dissubstituídos. Dessa forma, nota-se uma importância do núcleo central polar diferente daquele apresentado para a ação antitumoral. No caso da inibição do crescimento de células tumorais propôs-se a seguinte ordem de bioatividade C=N > C=O > C= S, enquanto para a atividade antifúngica, sugere-se a ordem C=N > C=S > C= O.

Os dados preliminares contidos na tabela 18 indicam uma atividade antifúngica promissora dos derivados guanidínicos e seus análogos. Neste contexto destaca-se a ação das guanidinas **83** e **84**, as quais apresentaram CIM < 3,10 μg/mL, um valor inferior à CIM exibida pelo fluconazol (CIM 8,00 e 6,00 μg/mL) frente a *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente. Outro derivado guanidínico com ação antifúngica potente é a *N*-acilguanidina **87**, a qual apresentou CIM similares ou inferiores aos controles positivos (fluconazol e anfotericina B) frente a espécies de *Aspergillus*.

Salienta-se para outros valores de CIM em negrito na tabela 18, os quais apontam uma ação antifúngica similar ou superior apresentada por derivados guanidínicos e seus análogos quando comparados a um ou aos dois fármacos antifúngicos utilizados como controles positivos (fluconazol e anfotericina B).

3. Atividades antioxidante e inibitória frente à mieloperoxidase

3.1. Mieloperoxidase e inflamação

O conhecimento acumulado nos últimos anos sobre os processos inflamatórios permite um grande entendimento do mecanismo de inúmeros mediadores celulares.

Neste contexto, algumas enzimas tais como prostaglandina endoperóxido sintase (PGHS), óxido nítrico sintase (NOS) e mieloperoxidase (MPO) têm sido amplamente reconhecidas como valiosos alvos terapêuticos para a ação de agentes antiinflamatórios.[102-104]

Mieloperoxidase é uma heme-enzima abundante em polimorfonucleares (PMNs), sendo considerada uma macromolécula-chave na resposta imunológica inespecífica frente a vários agentes invasores, principalmente bactérias. Ela converte peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e gás cloro (Cl_2) em água e ácido hipocloroso (HOCl), o qual por sua vez atua como um agente antimicrobiano potente. Contudo, o excesso da atividade de MPO e subsequente produção demasiada de HOCl, culmina em um intenso estresse oxidativo para os PMNs. A literatura correlaciona essa injúria oxidativa promovida por MPO e HOCl com inúmeros processos inflamatórios, tais como: artrite reumatóide, fibrose cística, doença inflamatória intestinal (IBD), injúria pulmonar neonatal, etc. Dessa forma, a busca por inibidores de MPO à partir de fontes naturais torna-se de grande valia na descoberta de agentes antiinflamatórios, bem como no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.[105-108]

3.2. Radicais livres e antioxidantes

Radicais livres desempenham papel fundamental no metabolismo celular. No entanto, quando em excesso, podem gerar estresse oxidativo, levando à intensas alterações em macromoléculas (lipídeos, ácido nucléicos, proteínas, etc.) e consequentemente dando início a inúmeros processos patológicos como câncer, aterosclerose, diabetes, envelhecimento precoce, e outras doenças degenerativas crônicas.[109] Nesse contexto, a literatura reporta inúmeras substâncias de origem natural capazes de sequestrar radicais livres (substâncias antioxidantes), tais como: ácido fenólicos, flavonóides, quinonas, cumarinas, lignanas, estilbenos, terpenóides (incluindo carotenóides).[110-111]

3.3. Procedimentos experimentais

Os ensaios envolvendo a inibição de mieloperoxidase e sequestro dos radicais livres foram desenvolvidos no Laboratório de Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Tecnologia do Instituto de Química, UNESP-Araraquara, sob supervisão da Profa. Dra.

Olga Mascarenhas. O ensaio de inibição sobre mieoloperoxidase (MPO) foi realizado em uma cubeta para espectrofotômetro, onde foram adicionados tampão fosfato de sódio (50 mM, pH = 7,4), guaiacol (70 mM), as substâncias dissolvidas em etanol e MPO (8 nM). A reação enzimática foi iniciada com a adição de peróxido de hidrogênio (0,3 mM) e logo realizou-se a primeira leitura da absorbância em 470 nm, sendo repetido esse processo a cada 5 segundos durante um minuto, determinando-se a velocidade inicial (v_o). Para isso, vo foi calculada por meio da plotagem de um gráfico produto formado *versus* tempo de reação ($v_o = \Delta A/ \Delta t$) foi comparada frente a diferentes concentrações das substâncias testadas por meio da construção de gráficos que correlacionam concentração *versus* resposta. Esse ensaio tem como princípio a oxidação do guaiacol na presença de peróxido de hidrogênio.[112]

O ensaio espectrofotométrico para a determinação da atividade seqüestradora do radical DPPH foi realizado em tubos, nos quais as amostras foram dissolvidas em em EtOH em diversas concentrações, sendo adicionada uma solução de DPPH (60 μM). O volume final do meio reacional foi completado até 1,0 mL com etanol absoluto. Após permanecer sob abrigo de luz durante 15 minutos, o meio reacional teve sua absortividade lida em um comprimento de onda de 531 nm.[113]

O ensaio de sequestro do radical catiônico ABTS foi conduzido de modo a produzi-lo *in situ*. Para isso, inicialmente realizou-se a reação entre uma solução aquosa na concentração de 7 mM do ácido sulfônico ABTS [2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) e uma solução aquosa de persulfato de potássio (140 mM), produzindo uma solução-estoque de $ABTS^{\bullet+}$.Essa solução foi diluída em tampão fosfato de potássio (10 mM) em uma razão de 1:44), produzindo a solução de trabalho.

Dando início ao ensaio antioxidante, 500 μL da solução de trabalho foi diluída em 500 μL de tampão fosfato de potássio (10 mM), obtendo-se uma concentração aproximada de 55 μM de $ABTS^{\bullet+}$, sendo adicionado as amostras-testes em diversas concentrações e então, o meio reacional foi mantido ao abrigo da luz por 30 minutos. Após esse tempo o meio reacional teve sua absortividade determinada por espectrofotômetro operando em um comprimento de onda de 734 nm.[114]

3.4. Resultados e discussões

Os flavonóides isolados de *Pterogyne nitens* tiveram seu potencial antioxidante avaliado sobre os radicais livres ABTS e DPPH. Adicionalmente, foi testada a inibição

sobre destas substâncias frente à mieloperoxidase (MPO) e comparados à quercetina (controle positivo).[115]

Os flavonóis que possuem grupo catecólico no anel B (**52**-**54**) apresentaram CI_{50} (concentração capaz de reduzir a atividade enzimática em 50%) inferiores que àquelas mostrados pelos flavonóis que apresentam um anel B monoidroxilado (**48**-**51**), sugerindo a importância do número de hidroxilas fenólicas para ação frente à MPO. A comparação dos valores de CI_{50} entre o flavonol **52** e os seus glicosídeos **53** e **54** sugerem que as glicosilações na posição 3 reduzem a atividade inibitória sobre MPO.

Essas observações também são coerentes com o comportamento de inibição enzimática apresentado pelas flavonas. As flavonas com padrão catecólico no anel B e/ou aquelas com a hidroxila livre na posição 6 mostraram-se mais ativas que as flavonas com anel B monoidroxilado e/ou glicosiladas na posição 6. Outro fator estrutural observado para a ação inibitória frente à MPO desses flavonóides foi o números de unidades de glicose e/ou ramnose. Dessa forma, observou-se uma atividade inibitória frente à MPO menor de flavonóides diglicosilados (**45**, **47, 50**, **54** e **55**) quando comparados aos seus respectivos precursores monoglicosilados (**7**, **49, 51 e 53**).

Tabela 19. Atividades antioxidante e inibitória frente à mieloperoxidase (MPO) de flavonóides isolados de *Pterogyne nitens*.

Flavonóides	**inibição de MPO** (nM)	**Atividade antioxidante**	
		ABTS (µM)	**DPPH** (µM)
7	15,8	4,07	8,19
44	19,2	5,67	13,5
45	25,9	15,3	14,7
46	3,75	**1,36**	5,22
47	19,2	5,02	11,0
48	8,30	18,0	17,8
49	13,9	17,0	> 80,0
50	15,8	18,5	55,8
51	10,3	8,10	> 80,0
52*	1,22	4,12	2,60
53	3,75	4,37	**2,77**
54	3,60	4,85	**3,15**
55	3,72	4,88	5,72
Trolox®	**-**	**0,63**	**4,72**

** controle positivo para o ensaios de inibilçao de MPO*

Os dados contidos na tabela 19 mostram uma relação entre os flavonóides com ação inibitória potente frente à MPO e sua capacidade sequestradora de radicais livres, ou seja, as substâncias mais ativas no ensaio de inibição de MPO foram aquelas com maior ação antioxidante. Sugere-se como proposição que justifique esta relação, os fatores estruturais que conferem capacidade antioxidante são os mesmos responsáveis pela ação inibitória frente à MPO. A literatura descreve que substâncias catecólicas são excelentes sequestradoras de radicais livres, bem como glicosilações, metilações ou acilações sobre as hidroxilas fenólicas reduzem drasticamente o seu potencial antioxidante.[111]

Dessa forma, a tabela 19 evidencia a atividade antioxidante potente do flavonóide **46**, o qual exibe CI_{50} (concentração capaz de seqüestrar 50 % dos radicais livres) de 1,36 μM frente ao radical ABTS. Os flavonóis **52** – **54** mostraram atividade antioxidante superior ao Trolox (controle positivo), exibindo CI_{50} de 2,77 e 3,15 μM frente ao radical DPPH.

Os flavonóis e flavonas apresentaram significativa inibição de mieloperoxidase e simultânea ação sequestradora de radicais livres, os quais podem agir como entidades antiinflamatórias potenciais.

CAPÍTULO 5

Considerações finais (pág 99)

O estudo químico dos caules, folhas, frutos e flores de *Pterogyne nitens* conduziu ao isolamento e identificação de 26 metabólitos especiais, sendo cinco substâncias inéditas na literatura: nitensidinas D e E (**42** e **43**), nitensosídeos A e B (**45** e **47**) e pteroginosídeo (**51**), bem como 19 substâncias conhecidas, pteroginina (**1**), pteroginidina (**2**), pedalina (**7**), sorbifolina (**44**), pedalitina (**46**), kaempferol (**48**), afzelina (**49**), kaempferitrina (**50**), quercetina (**52**), isoquercitrina (**53**), rutina (**54**), quercetina 3-*O*-soforosídeo (**55**), taxifolina (**61**), astilbina (**62**), ourateacatequina (**63**) e os ácidos cafeico (**56**), ferúlico (**57**), sinápico (**58**), clorogênico (**59**) e gálico (**60**).

Dentre as substâncias isoladas por diversas técnicas cromatográficas, incluem-se alcalóides guanidínicos, flavonóides e ácidos fenólicos, evidenciando a diversidade de metabólitos produzidos por espécies de Fabaceae. Nesse contexto, destaca-se a obtenção dos nitensosídeos A e B (**45** e **47**), os quais apresentam *O*-glicosilações na posição 6, uma substituição pouco comum em vegetais superiores. Enquanto, as nitensidinas D e E (**42** e **43**) apresentam-se como novos derivados guanidínicos, sendo que esta última apresenta um esqueleto carbônico 2-amino-tetraidropirimidínico inédito para substâncias de origem natural e o isolamento da guanidina **43** corrobora a proposta biossintética para o *N*-heterociclo **44**.

Contudo, o presente trabalho contribuiu para a descrição dos constituintes majoritários de alta polaridade presentes em *P. nitens*, a qual se apresenta como a única espécie do gênero.

Paralelamente ao trabalho fitoquímico, foram sintetizados 24 derivados guanidínicos sintéticos e análogos por meio de rotas sintéticas simples com rendimentos apreciáveis e tendo como materiais de partida tiouréia (**66**) e cloridrato de guanidina (**77**), reagentes comerciais de custo econômico relativamente baixo. Nesse contexto, salienta-se para a obtenção dos derivados guanidínicos **74**, **82** e **83**, os quais se comportam como os metanossulfonatos de galegina (**10**), pteroginidina (**2**) e nitensidina A (**4**), sendo estas duas últimas substâncias presentes no metaboloma de *P. nitens*.

Após a realização das etapas de isolamento, síntese e identificação das substâncias, estas foram enviadas para diversos colaboradores inseridos no projeto de bioprospecção do NuBBE e financiado pelo programa BIOTA-FAPESP, obtendo-se dados valiosos de atividade biológica.

Dentre esses resultados destacou-se:

(1) As atividades inibitórias dos flavonóis **46**, **52**, **53** e **54** frente à mieloperoxidase (MPO), os quais apresentaram valores de CI_{50} de 3,75, 1,22, 3,75, 3,60 e 3,72 nM. Esses dados sugerem o potencial antiinflamatório dessas substâncias, as quais podem atuar sobre uma enzima pouco explorada em terapêutica, tendo sua importância como modelos para o desenvolvimento de novos agentes antiinflamatórios com mecanismo de ação inédito;

(2) A atividade antitumoral do derivado guanidínico sintético **84** sobre células de mama (MD-MBA-435), o qual apresentou similar CI_{50} àquele apresentado pelo controle positivo (doxorrubicina);

(3) A ação hemolítica dos derivados guanidínicos **83** e **84** sugere a capacidade do rompimento da membrana plasmática como um possível mecanismo de ação, ou até mesmo outros sítios de atividade que estejam correlacionados à instabilidade de elementos da membrana plasmática;

(4) A atividade antifúngica dos derivados guanidínicos sintéticos **83** e **84** os quais apresentaram CIM inferiores ao fluconazol (controle positivo) frente aos fungos *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *Saccharomyces cerevisiae*;

(5) A fungitoxicidade seletiva apresentada pela *N*-acilguanidina **87** frente aos fungos do gênero *Aspergillus*.

Contudo, os dados de potencial biológico obtidos pelos laboratórios colaboradores do NuBBE são preliminares, porém sugeriram importantes dados de relação estrutura-atividade, os quais podem dirigir maiores investimentos químicos e farmacológicos.

As informações contidas nesse trabalho demonstram a importância da multidisciplinaridade necessária para a busca de entidades farmacologicamente úteis, bem como é apenas mais um exemplo da reflexão sobre os fantásticos produtos da biodiversidade brasileira e as prementes racionalizações dirigidas pela Química Medicinal.

CAPÍTULO 6

Materiais e Métodos(pág 101)

6.1. Métodos cromatográficos

Grande parte desse trabalho baseou-se na utilização de técnicas cromatográficas como cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), cromatografia em coluna de fase normal (CC-FN) e reversa (CC-FR), cromatografia de permeação em gel (CPG) e cromatografia líquida de alta eficiência com detector no ultravioleta (CLAE-UV).

6.1.1. Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA)

Esta técnica foi empregada na análise comparativa das frações e substâncias obtidas no decorrer do fracionamento cromatográfico do extrato dos frutos de *P. nitens*, bem como no monitoramento das reações.

As cromatoplacas foram preparadas aplicando-se uma suspensão de sílica gel 60 PF_{254}, com indicador de fluorescência em água destilada, na proporção de 1:2 (m.:v) sobre placas de vidro, obtendo-se 25 mm de espessura de adsorvente através da utilização de espalhador Quickfitt®. Após a preparação das cromatoplacas, estas foram ativadas em estufa por 30 minutos.

Revelação das cromatoplacas: cada cromatoplaca foi revelada por meio de um ou mais dos métodos físicos e químicos descritos abaixo:

(A) Inspeção em luz ultravioleta: as cromatoplacas foram expostas a luz ultravioleta, nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm.

(B) Solução de anisaldeído: aproximadamente 5,0 mL de solução de anisaldeído (0,5 mL de anisaldeído + 10,0 mL de ácido sulfúrico concentrado + 85,0 mL de MeOH) foi preparada com a adição dos reagentes em banho de gelo. Tal solução foi acondicionada em vidro âmbar e armazenada à 8 ^{o}C.

Para a revelação de cromatoplacas, borrifaram-se pequenas alíquotas e então, estas foram colocadas em estufas à 120 ^{o}C.

(C) Revelador de Dragendorff (revelação de substâncias nitrogenadas gerais)

Solução A: foi preparada por simples solubilização do sal em meio aquoso ácido (0,85 g de subnitrato de bismuto + 10,0 mL de HOAc + 40,0 mL de água destilada);

Solução B: 8,0 g de iodeto de bismuto dissolvido em 20,0 mL de água.

Para a preparação do revelador de Dragendorff, tomou-se do estoque, 5,0 mL da solução A e misturou-se à 20,0 mL da solução B.

(D) Revelador de Sakaguchi (revelação de substâncias guanidínicas)

Solução A: preparou-se 0,1 N de α-naftol em acetona;

Solução B: constituída de uma mistura de 0,2 mL de bromo dissolvido em 10,0 mL de uma solução 0,5 N de hidróxido de sódio.

Para a revelação das cromatoplacas borrifou-se solução A seguida da solução B. As manchas que apresentaram coloração rósea no fundo roxo, indicaram a presença de substâncias guanidínicas.

(E) Revelador de β-caroteno (revelação de substâncias antioxidantes)

O revelador de β-caroteno foi preparado como uma solução 0,02 % de β-caroteno em diclorometano. As cromatoplacas foram borrifadas e expostas à luz solar até o desaparecimento do revelador. Os pontos que mantiveram coloração amarela mostraram a presença de substâncias antioxidantes.

Os métodos descritos nos itens abaixo foram empregados com o intuito de purificação e isolamento dos metabólitos secundários de *P. nitens*, bem como dos derivados guanidínicos e seus análogos sintéticos.

6.1.2. Cromatografia em coluna (CC-FN e CC-FR)

Empregou-se como suporte cromatográfico sílica derivatizada com cadeia de dezoito átomos de carbono, comumente denominada ODS (para CC-FR) e gel de sílica (0,035-0,070 μm) da marca ACROS. (para CC-FN). A fase estacionária foi suspensa no eluente e em seguida transferida para uma coluna de vidro, na qual, o fluxo da fase móvel foi mantido até total acomodação do suporte cromatográfico.

6.1.3. Cromatografia em coluna de permeação em gel (CPG)

Buscou-se por meio dessa técnica a separação de substâncias através dos seus diferentes pesos moleculares, empregando LH-20 (Sephadex®, Pharmacia Biotech) como suporte cromatográfico. Tal suporte foi mantido na fase eluente por 48 horas antes do início da aplicação da amostra, visando que o gel atinja sua porosidade máxima.

6.1.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os laboratórios do NuBBE dispõem dos seguintes equipamentos para a realização de CLAE, os quais foram empregados no presente trabalho:

(A) Cromatógrafo preparativo binário Waters LC 4000 System, Detector UV/Vis com registrador e integrador Waters 746.

(B) Cromatógrafo preparativo binário Varian Star Dynamax modelo SD-1, com detector UV/vis Varian Modelo 320.

(C) Cromatógrafo analítico sistema ternário Varian Pro Star modelo 240, com auto-injetor Varian Pro Star Modelo 410, detector UV-Diodo Array modelo 330.

As colunas cromatográficas empregadas pelas técnicas de CLAE foram coluna preparativa: coluna analítica Phenomenex (série LUNA) hexil-fenila com tamanho de partícula de 5 μm, 250 x 4,60 mm e coluna preparativa Phenomenex (série LUNA) hexil-fenila com tamanho de partícula de 10 μm, 250 x 21,2 mm.

6.2. Métodos espectroscópicos e espectrométricos

Para a identificação e elucidação estrutural das substâncias isoladas e-ou obtidas por síntese, foram empregadas técnicas de ressonância magnética nuclear uni e bidimensionais, infravermelho, ultravioleta e espectrometria de massas de baixa e alta resolução.

As análises de RMN foram realizadas em espectrômetro Varian INOVA-500 (11,7 T), operando a 500 MHz para o núcleo de hidrogênio e a 126 MHz operando para o núcleo de carbono. As amostras foram solubilizadas nos solventes deuterados $CDCl_3$, CD_3OD e DMSO-d_6 da marcas Aldrich e Merck.

Os espectros de massas de baixa e alta resolução foram obtidos em espectrômetro Modelo ultrOTOF$_Q$ – ESI-TOF Mass Spectrometer (Bruker).

Os espectros de absorção no IV foram obtidos em espectrômetro Perkin-Elmer – FTIR Série 1600, utilizando-se pastilhas de brometo de potássio.

Os espectros de absorção no UV foram registrados em espectrômetro PERKIN ELMER UV-Vis - Lambda 14 P.

6.3. Atividade óptica e intervalo de fusão

Os valores de rotação óptica específica foram obtidos em polarímetro Polamat A (Carl Zein Jena), em temperatura ambiente de 25 ^oC.

Os intervalos de fusão das substâncias sintetizadas foram determinados em aparelho manual da marca MQAPF.

6.4. Reagentes e solventes

Os reagentes empregados na obtenção dos derivados guanidínicos e seus análogos foram da marca Aldrich e Acros. Os solventes empregados na purificação e isolamento das substâncias naturais e sintéticas foram de grau PA e CLAE das marcas Synth e JT Baker.

CAPÍTULO 7

Referências (pág 105)

1 SOEJARTO, D. D. Biodiversity prospecting and benefit-sharing: perspectives from the field. **J. Ethnopharmacol.**, v. 51, p. 1-15, 1996.

2 Bolzani, V. S. et al. Search for antifungal and anticancer compounds from native plant species of Cerrado and Atlantic Forest. **Ann**. **Acad. Bras. Cienc.**, v. 71, n. 2, p. 181-187.

3 RIBEIRO, J. E. L. **Flora da Reserva Ducke:** guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: DFID Inpa, 1999.

4 CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileira:** recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**.** Piracicaba: Colombo: Embrapa, 1994.

5 BUKART, A. **Las leguminosas argentinas**. Buenos Aires: Aemé-Agency, 1952.

6 LORENZI, H. **Árvores brasileiras:** manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1998.

7 CRIVOS, M. et al. Pathways as signatures in landscape: towards an ethnography of mobility among the *Mbya-Guaraní* (Northeastern Argentina). **J. Ethnobiol. Ethnomed**., v. 2, p. 1-12, 2007.

8 CORRAL, R. A.; ORAZI, O. O.; PETRUCCELLI, M. F. A new guanidine alkaloid. **Experientia**, v. 25, p. 1020-1021, 1969.

9 CORRAL, R. A.; ORAZI, O. O.; PETRUCCELLI, M. F. Guanidine alkaloids of *Pterogyne nitens*. **J. Chem. Soc., Chem. Commun.**, v. 556, p. 178-183, 1971.

10 CORRAL, R. A.; ORAZI, O. O.; PETRUCCELLI, M. F. Guanidine alkaloids of *Pterogyne nitens*. **J. Chem. Soc., Chem. Commun.**, v. 561, p. 38-42, 1973.

11 BOLZANI, V. S.; GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I. Bioactive guanidine alkaloids from *Pterogyne nitens*. **J. Nat. Prod.**, v. 58, p.1683-1688, 1995.

12 HUXTABLE, C. R. et al. Identification of galegine, ans isoprenyl guanidine, as the toxic principle of *Schoenus asperocarpus* (poison sedge). **Austr. Vet. J.**, v. 70, p. 169-171, 1993.

13 WANG, F. et al. 3-Methyl-2-butenylisoguanidine as active hypoglycemic component in *Crassula argentea* and its preparation. **Arch. Pharm. Res.**, v. 472, p. 587-592, 2001.

14 HEESING, A. et al. The structure of sphaerophysine. **Chem. Ber.**, v. 103, p. 534-538, 1970.

15 GRESHAM, A. C.; BOOTH, K. Poisoning of sheep by goat's rue. **Vet. Record**, v. 129, p. 197-198, 1991.

16 BENN, M. H. et al. Isolation and characterization of two guanidines from *Galega orientalis* Lam. Cv. Gale (Fodder Galega). **J. Agric. Food Chem.**, v. 44, p. 2779-2781, 1996.

17 ATASANOV, A. T.; SPASOV, V. Inhibiting and disaggregating effect of gel-filtered *Galega officinalis* L. herbal extract on platelet aggregation. **J. Ethopharmacol**., v. 69, p. 235-240, 2000.

18 BAILEY, C. J.; DAY, C. Metformin: its botanical background. **Pract. Diab. Int.**, v. 21, n. 3, p. 115-116, 2004.

19 UEDA, M.; TASHIRO, C.; YAMAMURA, S. *Cis-p*-coumaroylagmatine, the genuine leaf-opening substance of a nyctinastic, *Albizzia julibrissin* Durazz. **Tetrahedron Lett.**, v. 38, n. 18, p. 3253-3256, 1997.

20 UEDA, M. et al. A leaf-closing substance of *Albizzia julibrissin* Durazz. **Tetrahedron**, v. 56, p. 8101-8105, 2000.

21 KAMNAING, P. et al. Milletonine, a guanidine alkaloid from *Millettia laurentii*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 6, p. 1561-1562, 1994.

22 NGAMBA, D. et al. Millaurina A, a new guanidine alkaloid from seeds of *Millettia laurentii*. **Fitoterapia**, v. 78, n. 3, p. 276-277, 2007.

23 BISWAS, K. M.; MALLIK, H. Cassiadinine, a chromone alkaloid and (+)-6-hydroxy-millein, a dihydroisocoumarin from *Cassia siamea*. **Phytochemistry**, v. 254, n. 7, p. 1727-1730, 1996.

24 FELLOWS, L. E.; HIDER, R. C.; BELL. E. A. 3-[2-amino-2-imidazolin-4(5)-yl]alanine (enduracididine) and 2-[2-amino-2-imidazolin-4(5)-yl]acetic acid in seeds of *Lonchocarpus sericeus.* **Phytochemistry**, v. 16, p. 1957-1958, 1977.

25 KHUONG, F. et al. Alchornéine, isoalchornéine et alchornéinone, produits isolés di l' *Alchornea floribunda* Muell. Arg. **Tetrahedron**, v. 28, n. 2, p. 5207-5220, 1972.

26 HART, N. K. et al. Hexahydroimidazo-pyrimidines, a new class of alkaloids from *Alchornea javanensis*. **J. Chem. Soc. Chem. Commun**., v. 28, p.1484-1485, 1969.

27 URREA-BULLA, A. et al. Biological activity of phenolic compounds from *Alchornea glandulosa*. **Fitoterapia**, v. 75, p. 392-394, 2004.

28 MAVAR-MANGA, H. et al. *N1*,*N2*,*N3*-Trisisopentenenyl guanidine and *N1*,*N2*-Diisopentenyl guanidine, two cytotoxic alkaloids from *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Müll, Arg. (Euphorbiaceae) root barks. **Nat. Prod. Commun**., v. 1, n. 12, p. 1097-1100, 2006.

29. LONTSI, D. et al. Fontaineine, a new alkaloid from *Fontainea pancheri*. **J. Nat. Prod.**, v. 61, p. 953-954, 1998.

30 WHITERUP, K. M. et al. Martinelline and martinnelic acid, novel G-protein linked receptor antagonists from the tropical plant *Martinella iquitosensis* (Bignoniaceae). **J. Am. Chem. Soc.**, v. 117, p. 6682-6685, 1995.

31 SNIDER, B. B.; O'HARE, S. M. Synthesis of the hindered *N*,*N*,*N'*-trisubstituted guanidine moiety of martinelline and martinellic acid. **Tetrahedron Lett.**, v. 42, p. 2455-2458, 2001.

32 DELLE MONACHE, G. et al. Further hypotensive metabolites from *Verbesina caracasana*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 9, p. 3249-3254, 1999.

33 DELLE MONACHE, G. et al. Caracasandiamide, a truxinic hypotensive agent from *Verbesina caracasana*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 6, n. 3, p. 233-238, 1996.

34 DELLE MONACHE, G. et al. Novel Hypotensive agents from *Verbesina caracasana*. Synthesis and Pharmacology of caracasanamide. **J. Med. Chem.**, v. 36, p. 2956-2963, 1993.

35 CARMIGNANI, M. et al. Novel hypotensive agents from *Verbesina caracasana*. Synthesis and Pharmacology of (3,4-dimethoxycinnamoyl)-N1-agmatine and synthetic analogues. **J. Med. Chem.**, v. 44, p. 2950-2958, 2001.

36 CARMIGNANI, M. et al. Novel hypotensive agents from *Verbesina caracasana*. Synthesis and Pharmacology of caracasandiamide. **J. Med. Chem.**, v. 42, p. 3116-3125, 1999.

37 FABRICANT, D. S. et al. Cimipronidine, a cyclic guanidine alkaloid from *Cimicifuga racemosa*. **J. Nat. Prod**., v. 68, p. 1266-1270, 2005.

38 SUZUKI, H. et al. Celogentin K, a new cyclic peptide from the seeds of *Celosia argentea* and X-ray structure of moroidin. **Tetrahedron**, v. 60, p. 2489-2495, 2004.

39 YUN, Y. S. et al. Cyclic peptides from higher plants. Segetalin G and H, structures and estrogen-like activity of cyclic pentapeptides from *Vaccaria segetalis*. **J. Nat. Prod.**, v. 60, p. 216-218, 1997.

40 BERLINCK, R. G. S. Natural guanidine derivatives. **Nat. Prod. Rep.**, v. 13, p. 310-409, 1996.

41 BERLINCK, R. G. S. Natural guanidine derivatives. **Nat. Prod. Rep.**, v. 16, p. 339-365, 1999.

42 BERLINCK, R. G. S. Natural guanidine derivatives. **Nat. Prod. Rep.**, v. 19, p. 617-651, 2002.

43 ROTERMANN, J. Glossary of class names of organic compounds and reactive intermediates based on structure. **Pure Appl. Chem.**, v. 67, p. 1313-1315, 1995.

44 ROBERTS, M. F. **Alkaloids.** biochemistry, ecology and medicinal applications. New York: Plenum, 1998.

45 CORDELL, G. A. **Introduction to alkaloids:** a biogenetic approach. New York: John-Wiley & Sons, 1981.

46 WATERMAN, P. G. **The alkaloids**. New York: Academic Press, 1998.

47 GRASER, G.; HARTMANN, T. Biosynthesis of spermidine, a direct precursor of pyrrolizidine alkaloids in root cultures of *Senecio vulgaris* L. **Planta**, v. 211, p. 239-245, 2000.

48 STEINIGER, J.; GERHATD, R. Biosynthesis of dimethylallylguanidine from guanidinoacetic acid. **Biochem. Physiol. Pflanzen**, v. 166, n. 3, p. 275-279, 1974.

49 REUTER, G. Biochemistry and physiology of galegine in *Galega officinallis*. III. Arginine as precursor of galegine in *G. officinalis*. **Arch. Pharm.**, v. 296, n. 8, p. 516-522, 1963.

50 LOPES, A. A. et al. Biosynthetic origins of the isoprene units of gaudichaudianic acid in *Piper gaudichaudianum* (Piperaceae). **Phytochemistry**, v. 68, n. 15, p. 2053-2058, 2007.

51 AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of flavonoids**. New York: Elsevier Science, 1989.

52 CHWAN-FWU, L. et al. Bioactive flavonoids from *Ruellia tuberosa*. **J. Chin. Med.**, v. 17, n. 3, p. 103-109, 2006.

53 HARBORNE, J. B. **Flavonoids:** advances in research since 1992. London: Chapman & Hall, 1994.

54 NOLDIN, V. F. et al. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivado no Brasil. **Quím. Nova**, v. 26, n. 3, p. 331-334, 2002.

55 YOUNG, H. S. et al. Phytochemical study on *Catalpa ovata*. **Arch. Pharm. Res.**, v. 15, p. 322-327, 1992.

56 DUAN, L. et al. Sinapic acid derivatives from the seeds of *Raphanus nussatirus* L. **J. Asian Nat. Prod. Res.**, v. 9, p. 557-561, 2007.

57 CHEMINAT, A. et al. Caffeoyl conjugates from *Echinacea* species: structures and biological activity. **Phytochemistry**, v. 27, p. 2787-2784, 1988.

58 CORTHOUT, J. et al. Antiviral caffeoyl esters from *Spondias mombin*. **Phytochemistry**, v. 31, p. 1979-1981, 1992.

59 MA, X. et al. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for separation of methyl gallate from *Acer truncatum* Bunge. **J. Chromat. A**., v. 1076, p. 212-215, 2005.

60. MOULARI, B. et al. Isolation and *in vitro* antibacterial activity of astilbin, the bioactive flavanone from the leaves of Harungana madagascariensis Lam. ex Poir. (Hypericaceae). **J. Ethnopharmacol.,** v. 106, n. 2, p.272-278, 2006.

61 MORI, A. **Guanidine:** historical, biological, biochemical and clinical aspects of the naturally guanidine compounds. New York: Plenum Press, 1985.

62 MORI, A. **Guanidines 2:** further explorations of the biological and clinical significance of guanidine compounds. New York:. Plenum Press, 1987.

63 STASCHKE, K. A. et al. Molecular basis for the resistance of Influenza virus to guanidine-Neu5Ac2en. **Virology**, v. 214, p. 642-646, 1996.

64 GREENHILL, J. L. **Progress in medicinal chemistry**. New York: Elsevier Science, 1998.

65 POWELL, D.; RAMSDEN, P. D.; BATEY, R. A. Phase-transfer-catalyzed alkylation of guanidines by alkyl halides under biphasic conditions: a conversion protocol for the synthesis of highly functionalized guanidines. **J. Org. Chem**., v. 68, p. 2300-2309, 2003.

66 JONES, J. H. The terminology of guanidine formation. **J. Peptide Sci.**, v. 8, p. 285-287, 2002.

67 WU, Y-Q. et al. Direct synthesis of guanidines using di(imidazole-1-yl)methanimine. **J. Org. Chem.**, v. 67, p. 7553-7556, 2002.

68 KEARNEY, P. C.; FERNANDEZ, M.; FLYGARE, J. A. Solid-phase synthesis of disubstituted guanidines. **Tetrahedron Lett.**, v. 39, p. 2663-2666, 1998.

69 ELLIOTT, A. J. et al. An improved synthesis of 7-substituted pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidines. **J. Org. Chem.**, v. 62, p. 8071-8075, 1997.

70 GHOSH, A. K.; WIM, G. J.; FAN, E. Solid-phase synthesis of *N*-acyl-*N*'-alkyl/aryl disubstituted guanidines. **J. Org. Chem.**, v. 66, p. 2161-2164, 2001.

71 ISOBE, T. et al. Modified guanidines as potential chiral superbases.1. Preparation of 1,3-disubstituted 2-iminoimidazolidines and the related guanidines through chloroamidine derivatives. **J. Org. Chem.**, v. 65, p. 7770-7773, 2000.

72 ISOBE, T. et al. Modified guanidines as potential chiral superbases.2. Preparation of 1,3-unsubstituted and 1-substituted 2-iminoimidazolidine derivatives and a related guanidine by the 2-chloro-1,3-dimethylimidazolidinium chloride-induced cyclization of thioureas. **J. Org. Chem.**, v. 65, p. 7774-7778, 2000.

73 ISOBE, T. et al. Modified guanidines as potential chiral superbases.3. Preparation of 1,4,6-triazabicyclooctene systems and 1,4-disubstituted 2-iminoimidazolidines by the 2-chloro-1,3-dimethylimidazolidinium chloride-induced cyclization of guanidines with a hydroxyethyl substituent. **J. Org. Chem.**, v. 65, p. 7779-7785, 2000.

74 KATRITZKY, A. R. et al. Di(benzotriazol-1-yl)methanimidine: a new reagent for thes synthesis of tri- and tetrasubstituted guanidines. **J. Org. Chem.**, v. 65, p. 8080-8082, 2000.

75 GUISADO, O.; MARTINEZ, S.; PASTOR, J. A novel, facile methodology for the synthesis of *N*, *N'*-bis(*tert*-butoxycarbonyl)-protected guanidines using polymer-supported carbodiimide. **Tetrahedron Lett.**, v. 43, p. 7105-7109, 2002.

76 MARYANOFF, C. A. et al. A convenient synthesis of guanidines from thioureas. **J. Org. Chem.**, v. 51, p. 1882-1884, 1986.

77 MILL, J. E. et al. A convenient synthesis of guanidines from thioureas. **J. Org. Chem.**, v. 51, n. 10, p. 1882-1884, 1986.

78 RAMADAS, K.; SRINIVASAN, N. An expedient synthesis of substituted guanidines. **Tetrahedron Lett.**, v. 36, n. 16, p. 2841-2844, 1995.

79 QIAN, L. et al. Improved method for the preparation of guanidines. **Tetrahedron Lett.**, v. 34, n. 48, p. 7677-7680, 1993.

80 SRINIVASAN, N. et al. An expedient synthesis of substituted guanidines. **Tetrahedron Lett.**, v. 36, n. 16, p. 2841-2844, 1995.

81 CUNHA, S. et al. The first synthesis of pyridinium *N*-benzoylguanidines by bismuth- and mercury-promoted guanylation of *N*-iminopyridinium ylide with thioureas. **Tetrahedron**, v. 61, p. 10536-10540, 2005.

82 CUNHA, S. et al. Study of *N*-benzoyl-activation in the $HgCl_2$-promoted guanylation reaction of thioureas. Synthesis and structural analysis of *N*-benzoyl-guanidines. **Tetrahedron**, v. 57, p. 1671-1675, 2001.

83 KIM, H.; MATHEW, F.; OGBU, C. A convenient synthesis of disubstituted guanidines via Mitsunobu protocol. **Synlett**, n. 2, p. 193-194, 1999.

84 KOZIKOWSKI, A. P. et al. Conversion of alcohols to protected guanidines using the Mistsunobu protocol. **Tetrahedron Lett.,** v. 35, n. 7, p. 977-980, 1994.

85 VAIDYANATHAN, G. et al. A new route to guanidines from bromoalkanes. **J. Org. Chem.**, v. 62, n. 14, p. 4867-4869, 1997.

86 GOODMAN, M. et al. Triurethane-protected guanidines and triflyldiurethane-protected guanidines; new reagents for guanidynilation reactions. **J. Org. Chem**., v. 63, p. 8432-8439, 1998.

87 MANIMALA, J. C.; ANSLYN, E. V. A highly efficient method for the synthesis of guanidium derivatives. **Tetrahedron Lett.**, v. 43, p. 565-567, 2002.

88 VENKATACHALAM, T. K. et al. Inhibition of mast cell leukotriene release by thiourea derivatives. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 13, p. 485-488, 2003.

89 DA SILVA, T. H. A. et al. Agentes antitumorais inibidores da angiogênes – modelos farmacofóricos para inibidores de integrina αvβ3. **Rev. Bras. Ciências Farm.**, v. 43, n. 1, p. 1-17, 2007.

90 ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celulares específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quím. Nova**, v. 23, n. 1, p. 118-129, 2005.

91 CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products as sources of new drugs over the last years. **J. Nat. Prod.**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

92 MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for celular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assys. **J. Immunol. Methods**, v. 16, p. 55-63, 1983.

93 MOREIRA, D. R. M. et al. Synthesis and antitumour evaluation of peptidyl-like derivatives containing the 1,benzodioxole system. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 42, p. 351-357, 2007.

94 CLARCK, T. A. et al. Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 15, p. 569-574, 2002.

95 HAGE, C. A. et al. Mucosal and invasive fungal infections in HIV/AIDS. **Eur. J. Med. Res.**, v. 7, p. 236-241, 2002.

96 WANG, H. et al. Fatal aspergillosis in as patient with SAR who was treated with corticosteroids. **N. Engl. Med.**, v. 349, p. 507-521, 2003.

97 DIXON, D. M. et al. *Coccidioides immitis* as select agent of bioterrorism. **J. Appl. Microbiol.**, v. 91, p. 602-605, 2001.

98 WAKABAYASHI, H. et al. Inhibition of hyphal growth of azole-resistant strains of *Candida albicans* by triazole antifungal agents in the presence of lactoferrin-related compounds. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, p. 1587-1591, 1998.

99 HELMERHORST, E. J. et al. Amphotericin B- and fluconazole-resistant *Candida* spp., *Aspergillus fumigatus* and other newly emerging pathogenic fungi are susceptible to basic antifungal peptides. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 43, p. 702-704, 1999.

100 SCORZONI, L. et al. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida* spp and *Cryptococcus* spp. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n. 1, p. 25-34, 2007.

101 MUSCHIETTI, L. et al. *In vitro* antifungal assay of traditional Argentine medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 102, p. 233-238, 2005.

102 BARNES, P. J. et al. Inflammatory mediators of asthma: an update. **Pharmacol. Rev.**, v. 50, p. 515-596, 2001.

103 DI ROSA, M. et al. Interaction between nitric oxide and cyclooxygenase pathways. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 54, n. 4, p. 229-238, 1996.

104 SAUTEBIN, L. A. et al. Modulation by nitric oxide of prostaglandins biosynthesis in the rat. **Br. J. Pharmacol**., v. 114, p. 323-352, 1995.

105 WINTERBOURN, C. C. et al. Myeloperoxidase. **Curr. Opin. Hematol**., v. 7, p. 53-58, 2000.

106 EDWARDS, S. W.; HALLET, M. B. Seeing the wood for the trees: the forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis. **Immunol. Today**, v. 18, p. 320-324, 1997.

107 DHANESSHWAR, S. S. et al. Synthesis, kinetic studies and pharmacological evaluation of mutual azo prodrug of 5-aminosalicylic acid for colon-specific drug delivery in inflammatory bowel disease. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 42, n. 6, p. 885-890, 2007.

109 SOARES, D. G. et al. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células de levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Rev. Bras. Ciênc. Farm**., v. 41, n. 1, p. 95-100, 2005.

110 CAI, Y. et al. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with cancer. **Life Sci.**, v. 74, p. 21-27, 2004.

111 CAI, Y. et al. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. **Life Sci.**, v. 78, p. 2872-2888, 2006.

112 CAPEILLÈRE-BLANDIN, C. Oxidation of guaiacol by myeloperoxidase: a two-electron-oxidized guaiacol transient species as a mediator of NADPH oxidation. B**iochem. J.**, v. 336, p. 395-404, 1998.

113 DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Evaluation of the antioxidant activity using the β-carotene/linoleic acid system and DPPH scavenging method. **Ciência Tecnol. Ali.**, v. 26, p. 446-452, 2006.

114 PELLEGRINI, N. et al. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2´-azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. **Methods Enzymol.**, v. 299, p. 379-389, 1999.

115 KATO, Y. et al. Inhibition of myeloperoxidase-catalyzed tyrosylation by phenolic antioxidants *in vitro*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 67, p. 1136-1139, 2003.

CAPÍTULO 8

Espectros de RMN (pág 115)

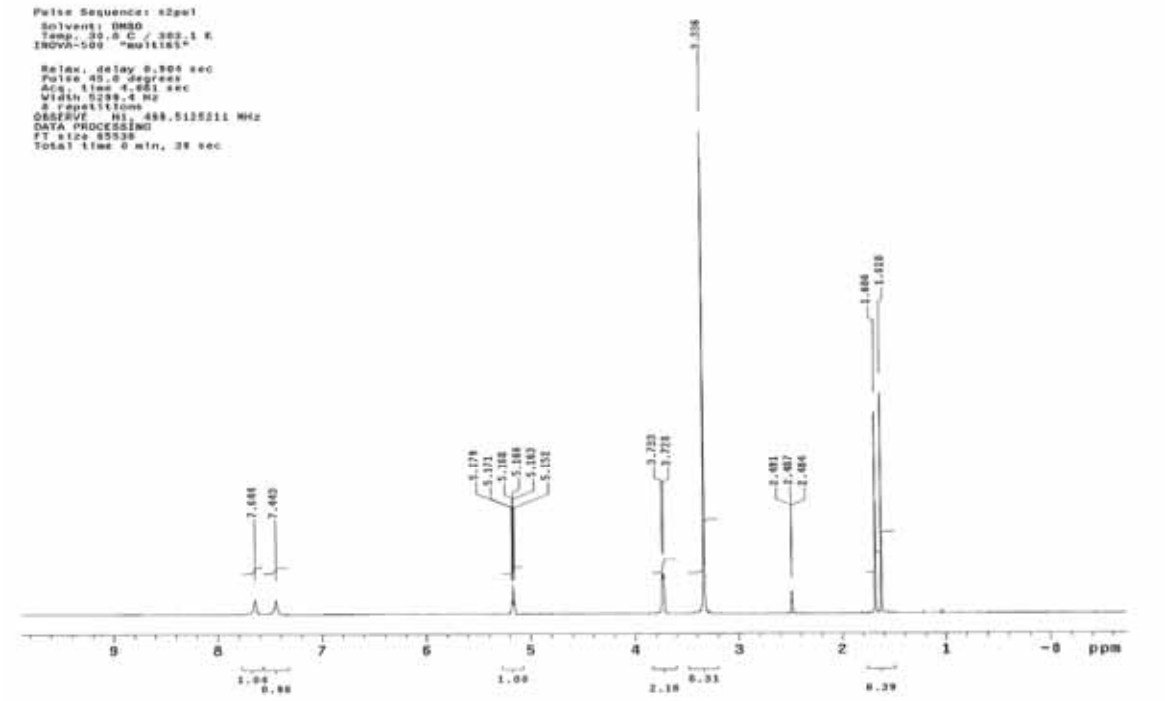


Figura 001. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **1** (DMSO-d_6, 11,7 T)

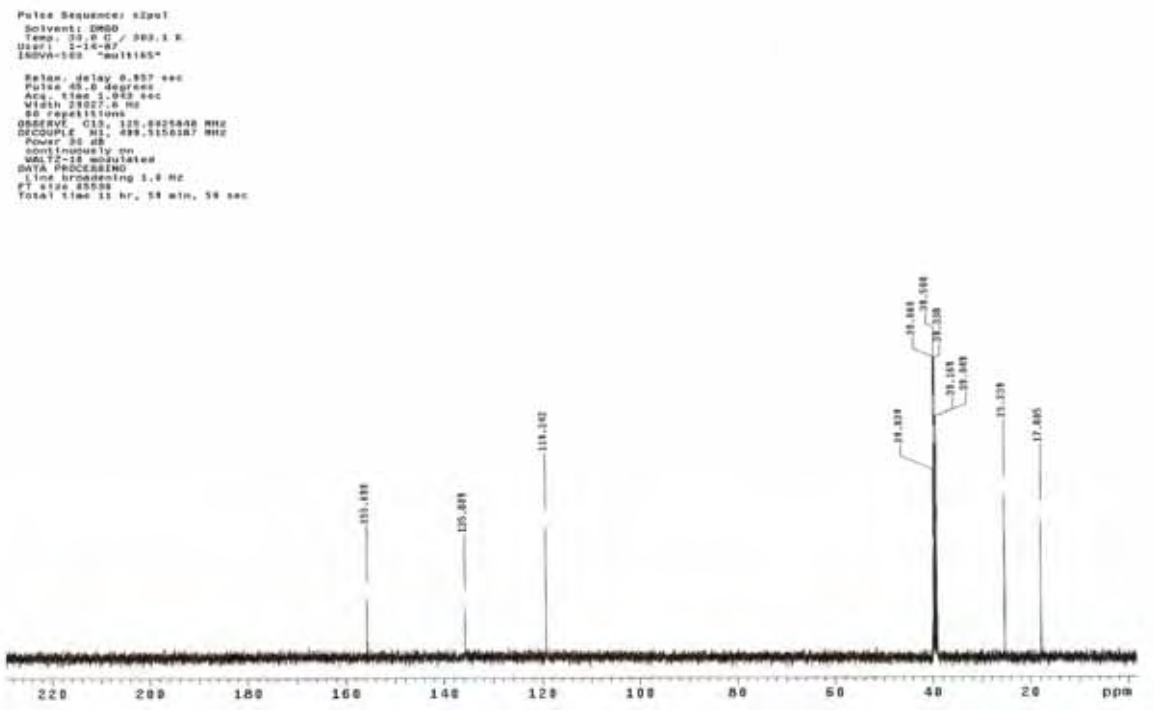


Figura 002. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **1** (DMSO-d_6, 11,7 T)

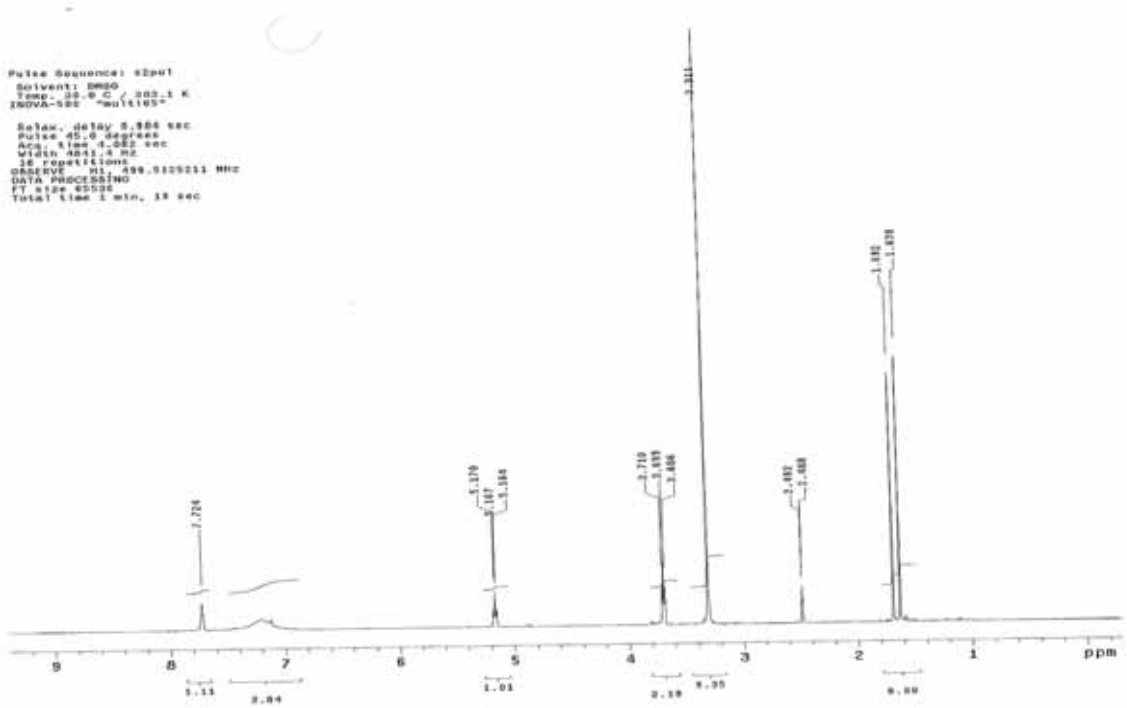


Figura 003. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **2** (DMSO-d_6, 11,7 T)

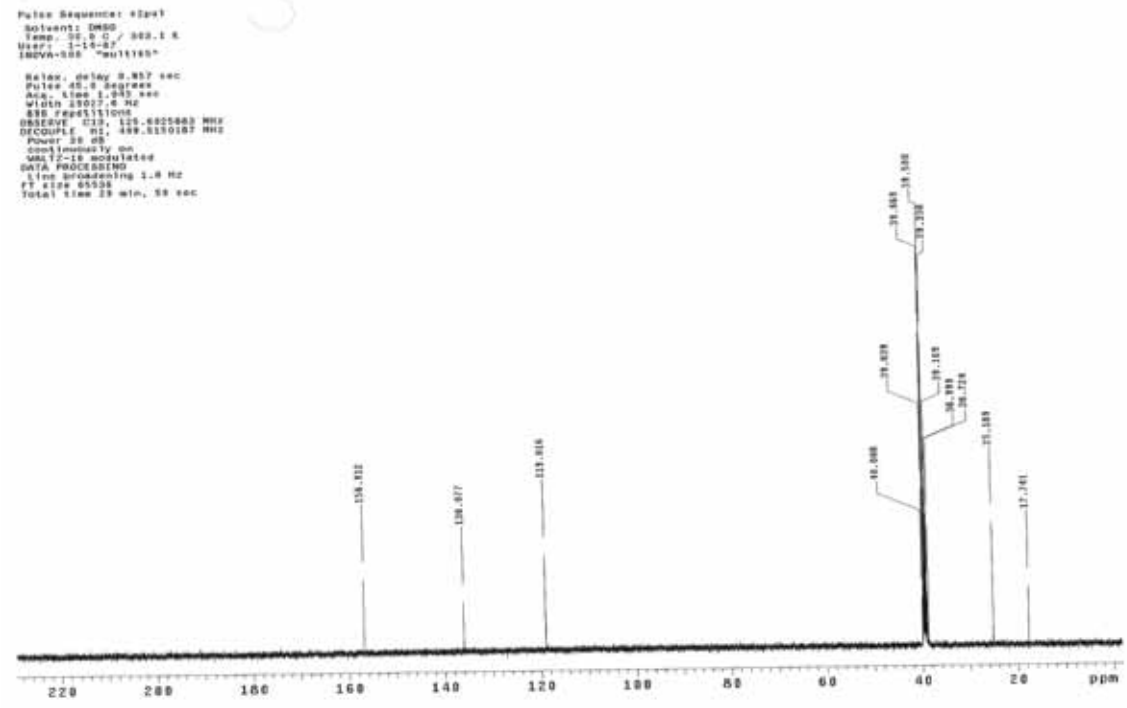


Figura 004. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **2** (DMSO-d_6, 11,7 T)

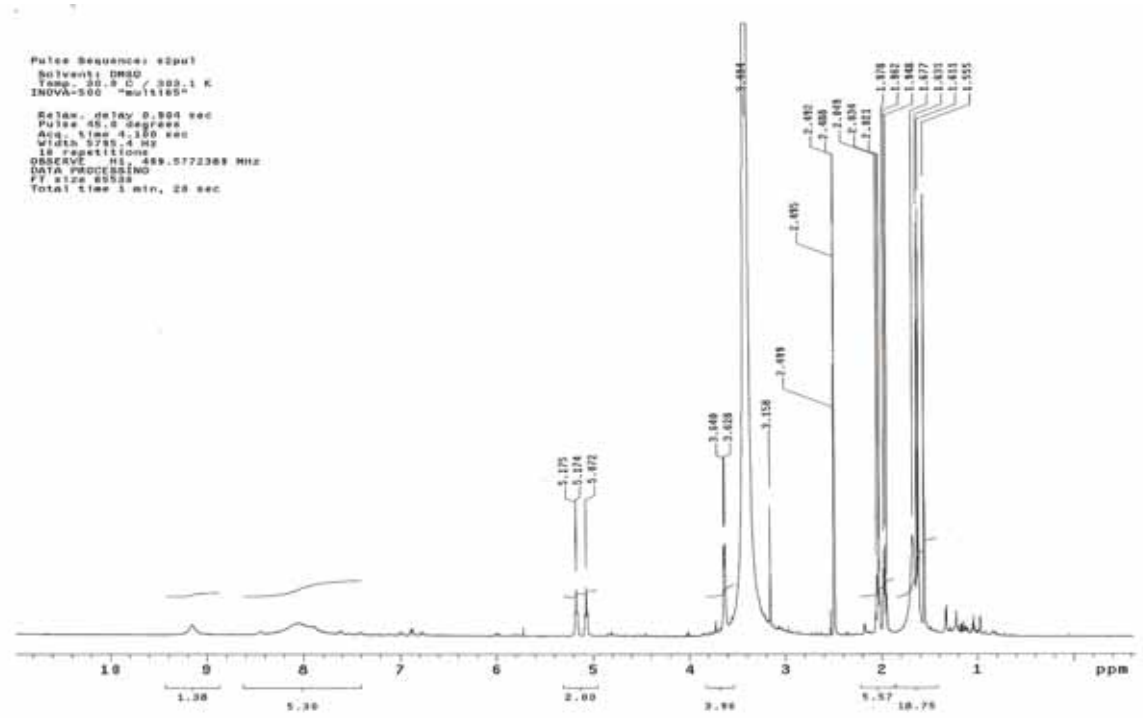


Figura 005. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **42** (DMSO-d_6, 11,7 T)

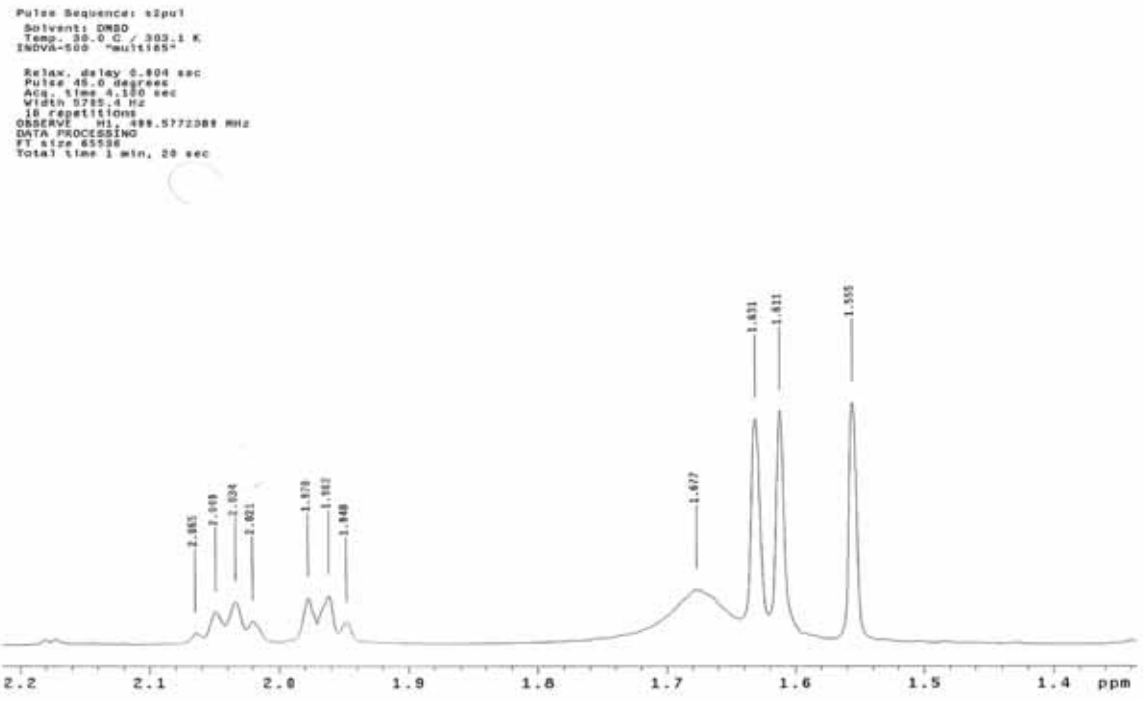


Figura 006. Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da substância **42** (DMSO-d_6, 11,7 T)

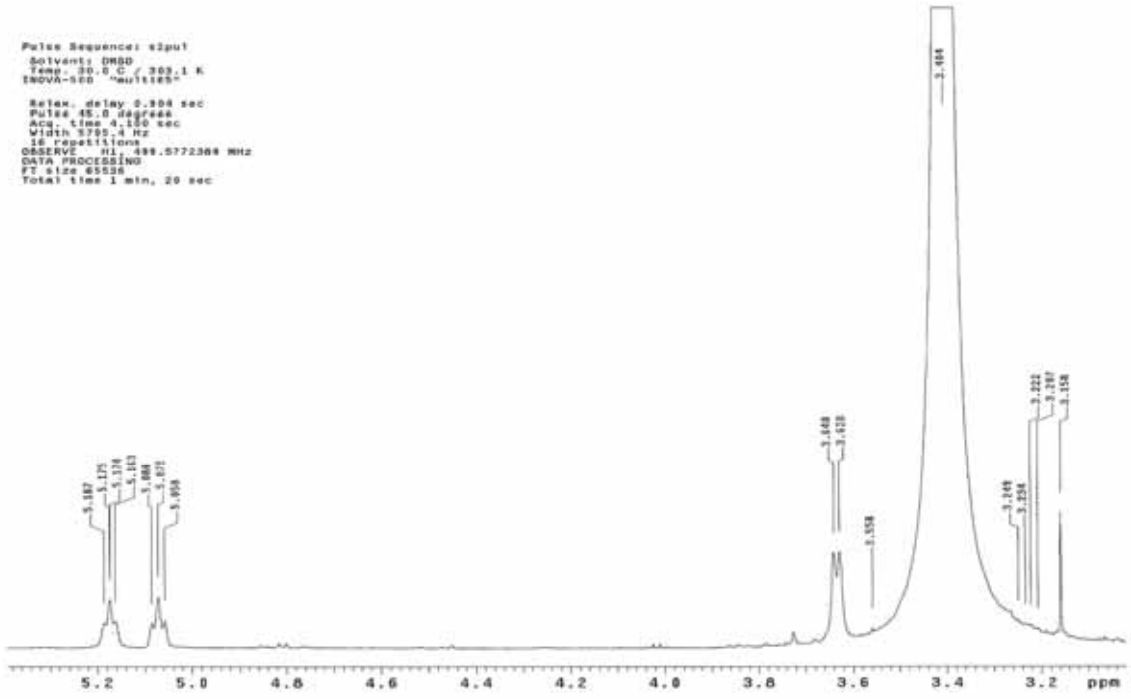


Figura 007. Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da substância **42** (DMSO-d_6, 11,7 T)

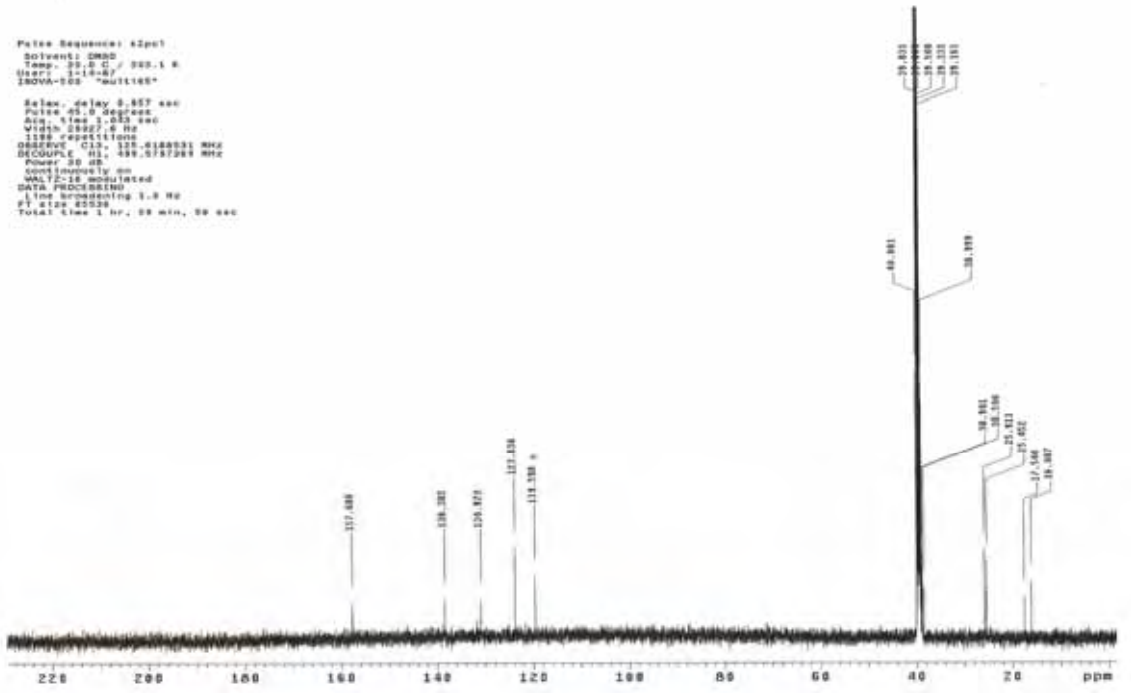


Figura 008. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **42** (DMSO-d_6, 11,7 T)

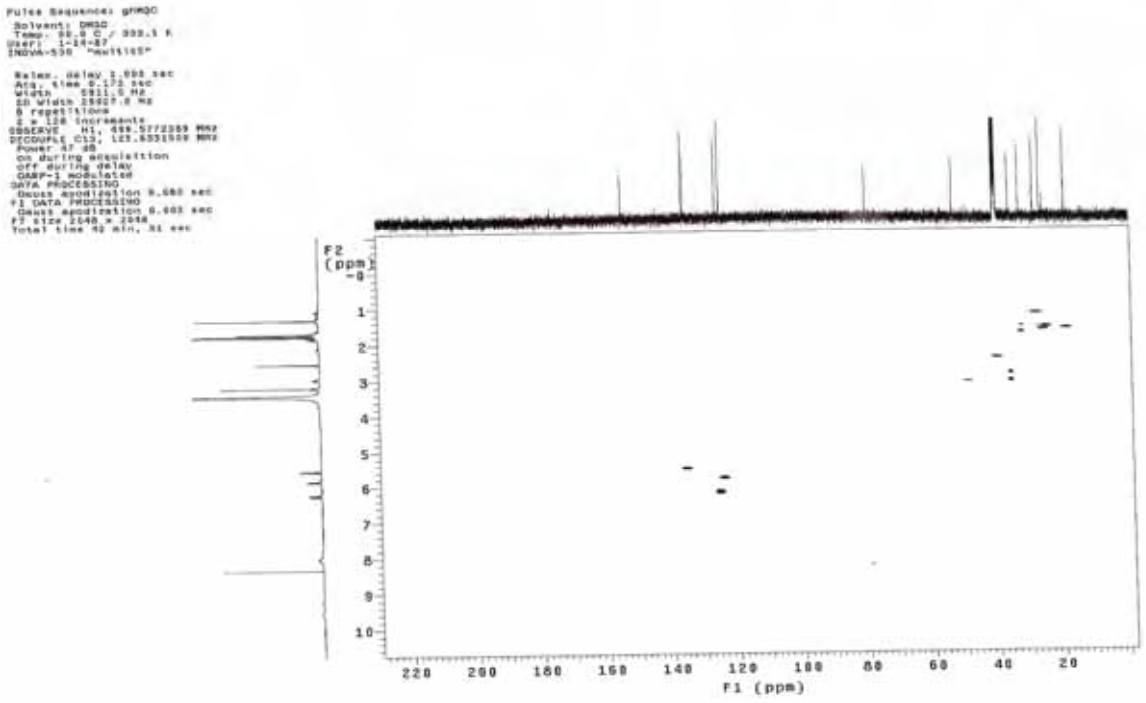


Figura 009. Mapa de contornos *g*HMQC da substância **42** (DMSO-d_6, 11,7 T)

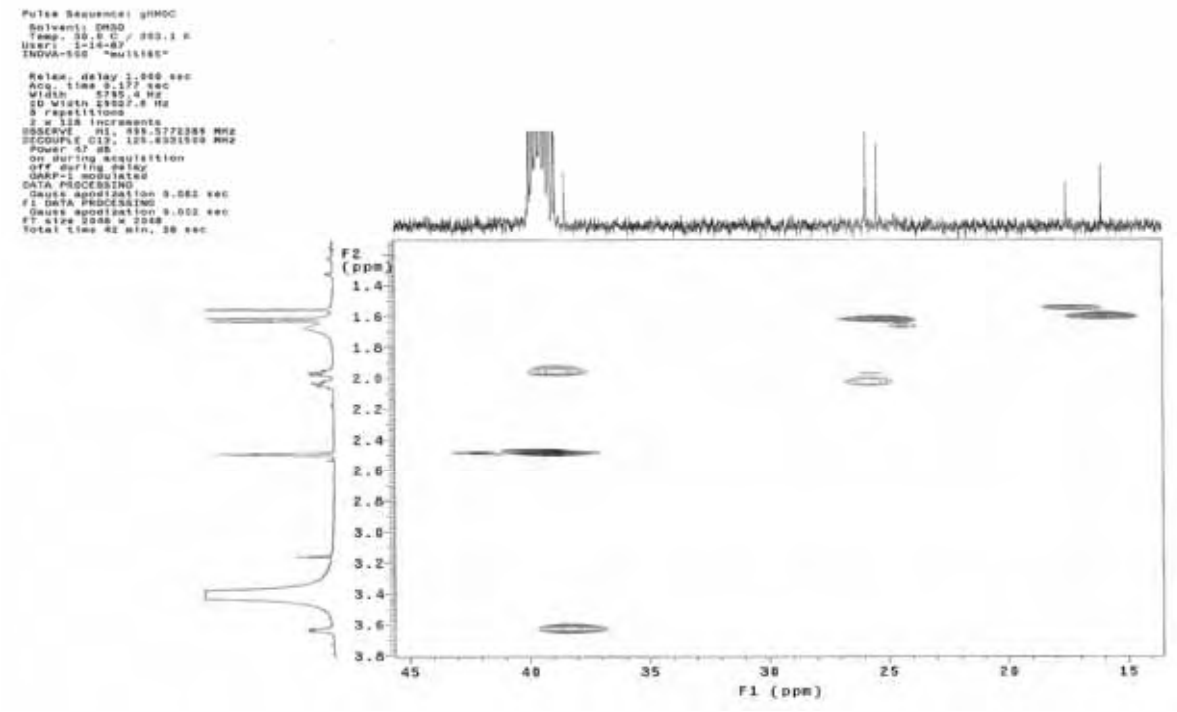


Figura 010. Ampliação do mapa de contornos *g*HMQC da substância **42** (DMSO-d_6, 11,7 T)

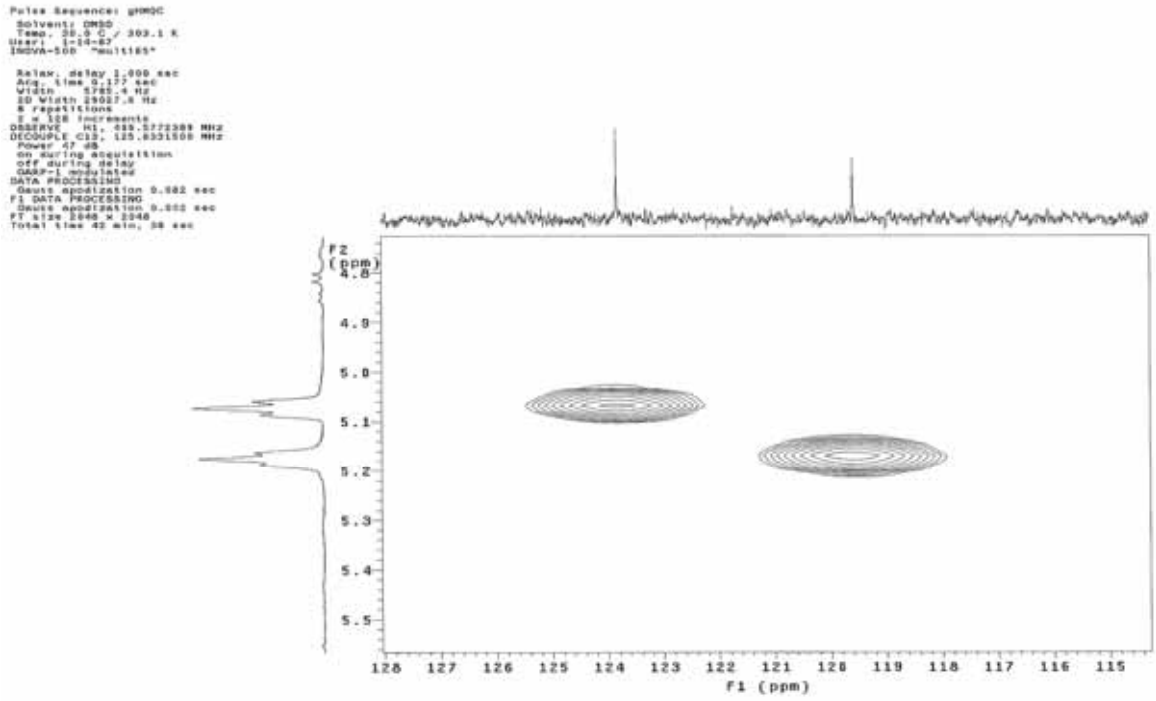


Figura 011. Ampliação do mapa de contornos *g*HMQC da substância **42** (DMSO-d_6, 11,7 T)

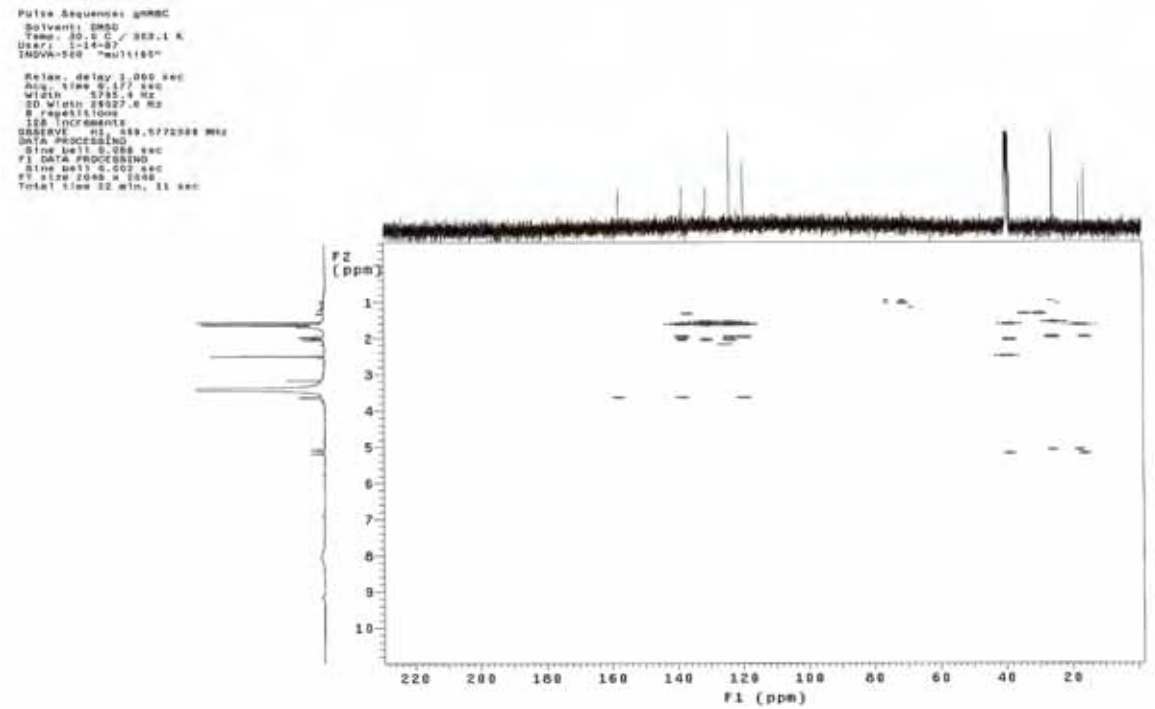


Figura 012. Mapa de contornos *g*HMBC da substância **42** (DMSO-d_6, 11,7 T)

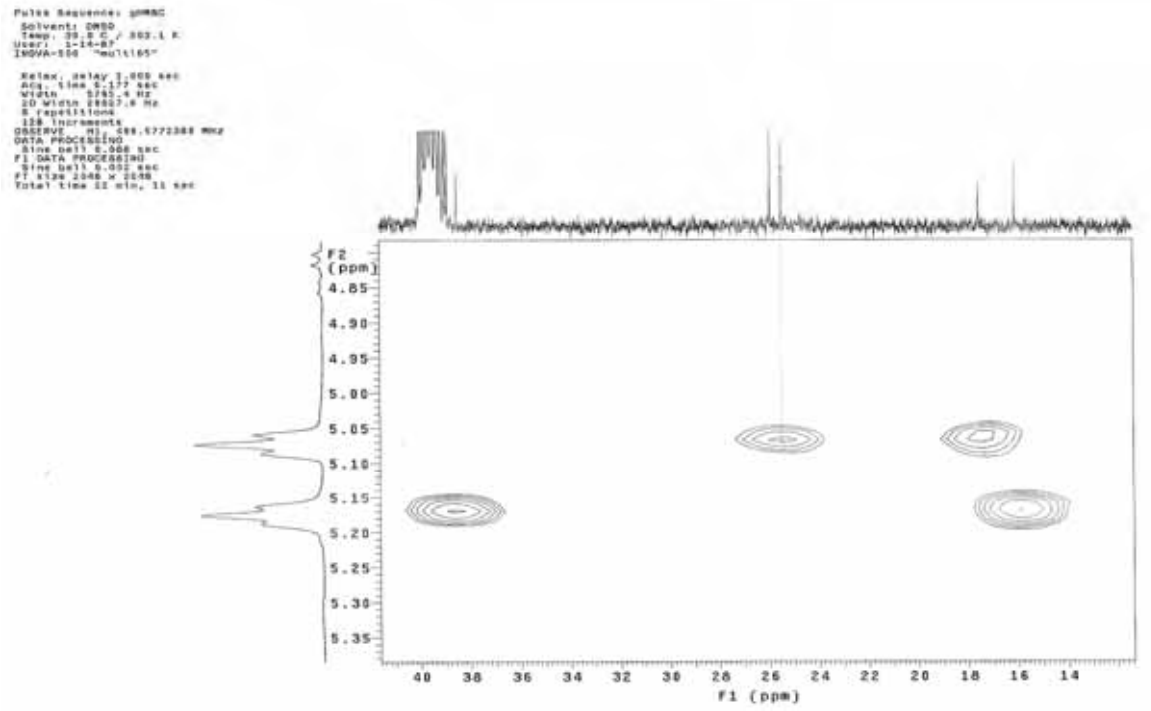


Figura 013. Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **42** (DMSO-d_6, 11,7 T)

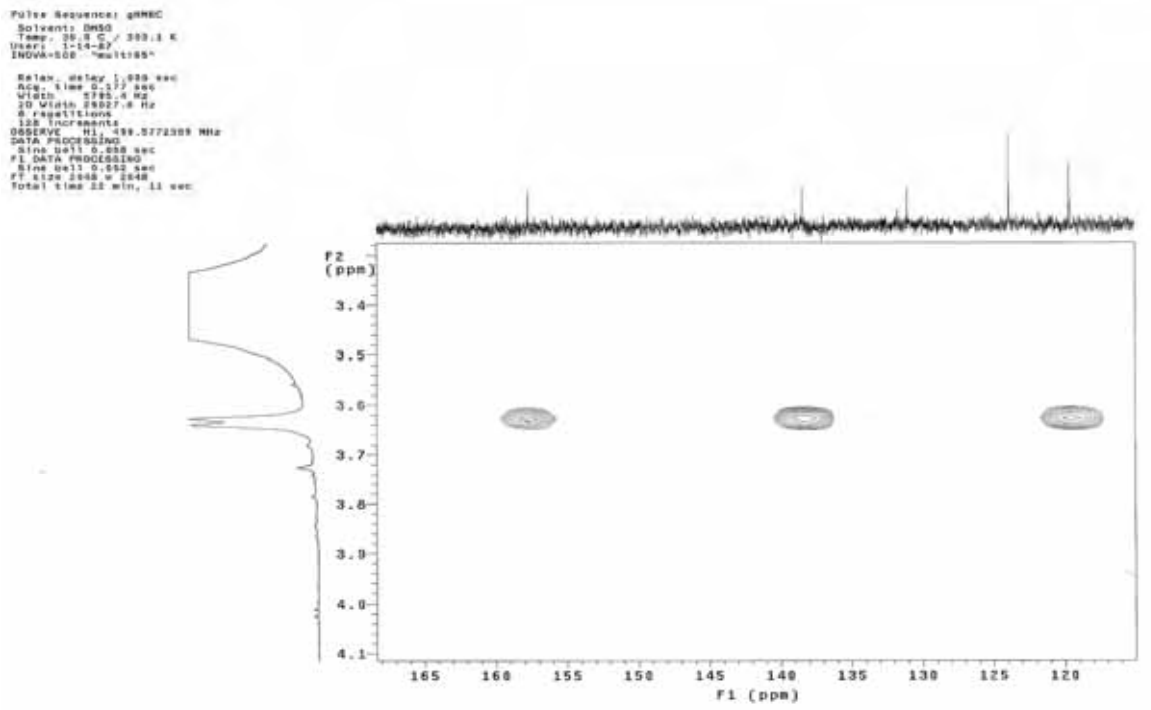


Figura 014. Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **42** (DMSO-d_6, 11,7 T)

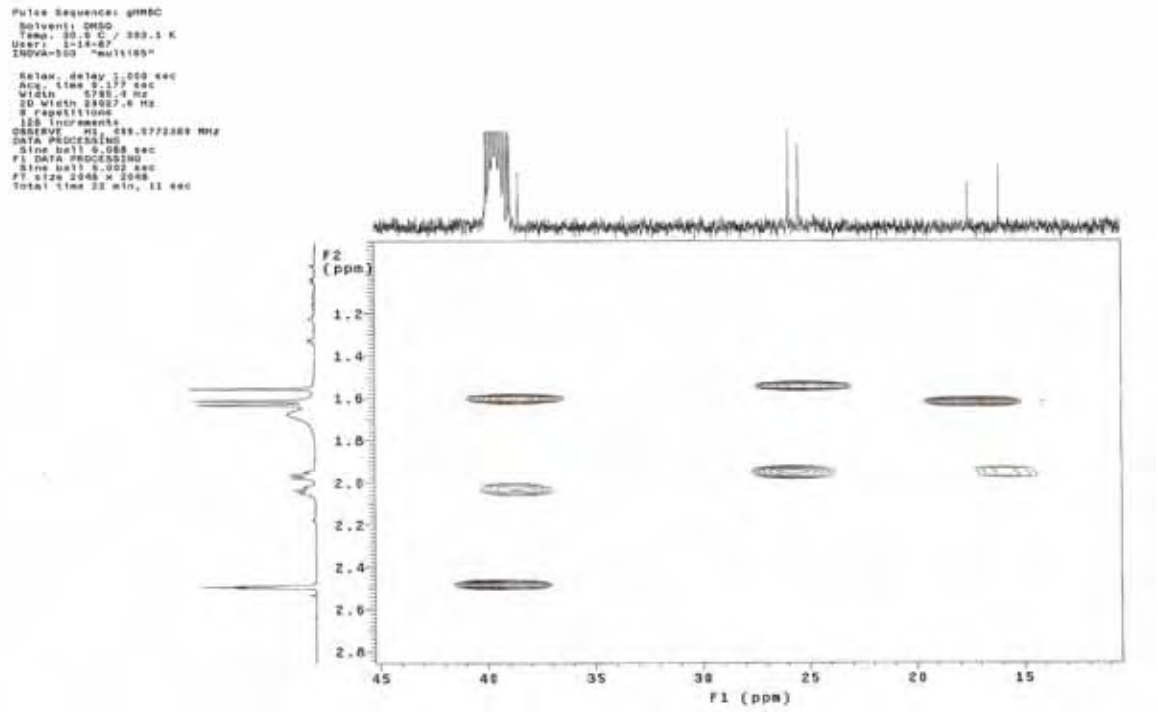


Figura 015. Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **42** (DMSO-d_6, 11,7 T)

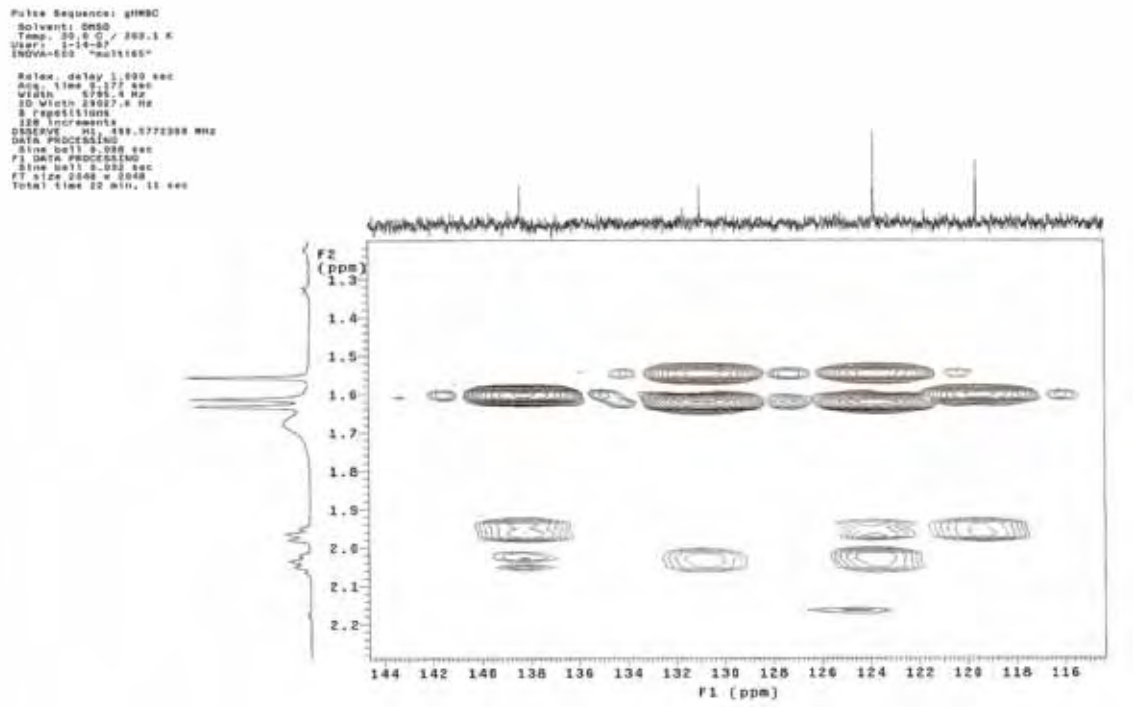


Figura 016. Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **42** (DMSO-d_6, 11,7 T)

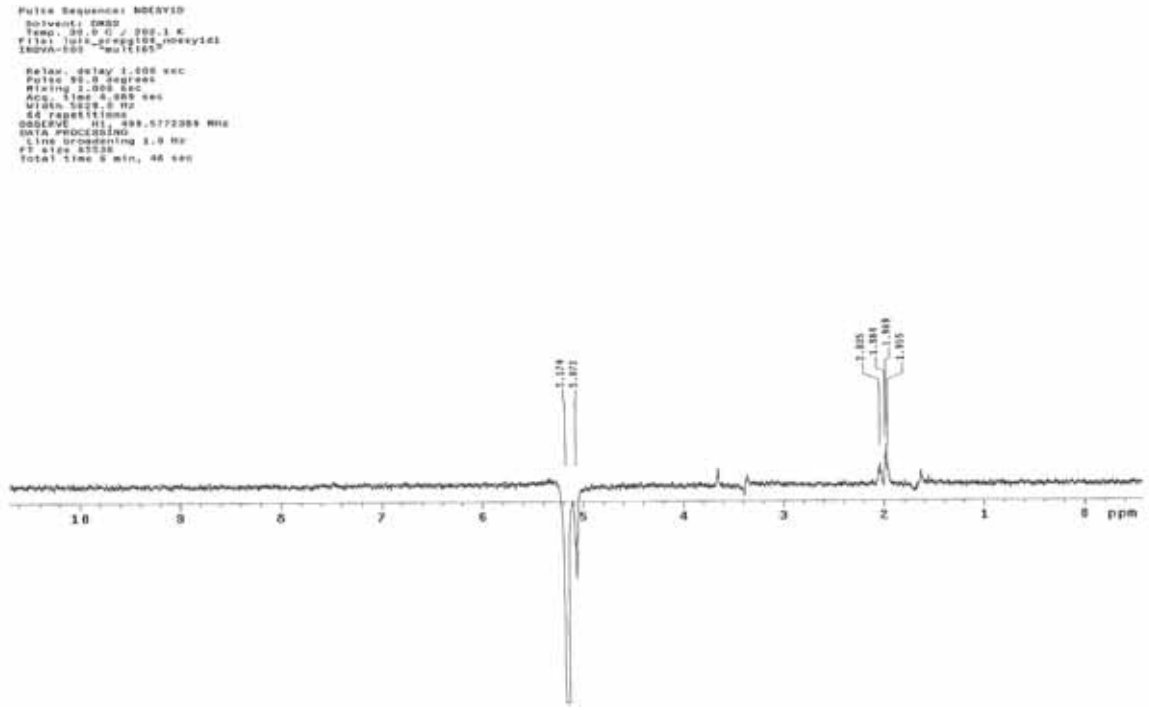


Figura 017. Espectro de NOESY 1D da substância **42** (DMSO-d_6, 11,7 T)

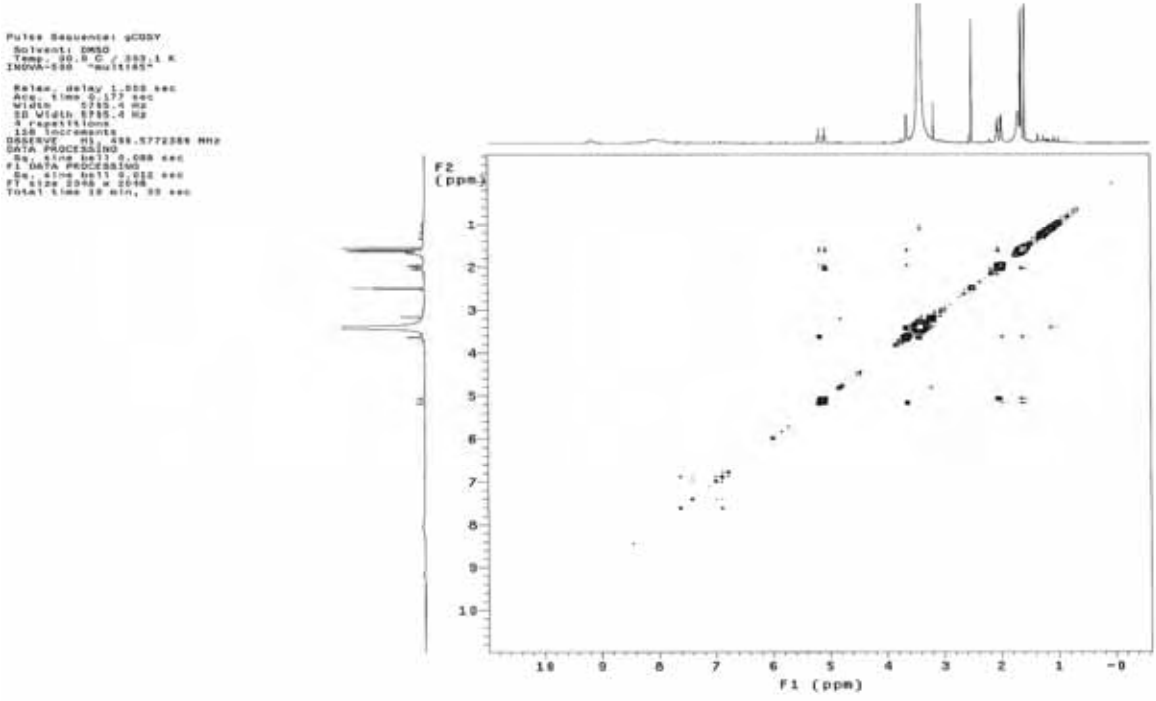


Figura 018. Mapa de contornos ^{1}Hx^{1}H *g*COSY da substância **42** (DMSO-d_6, 11,7 T)

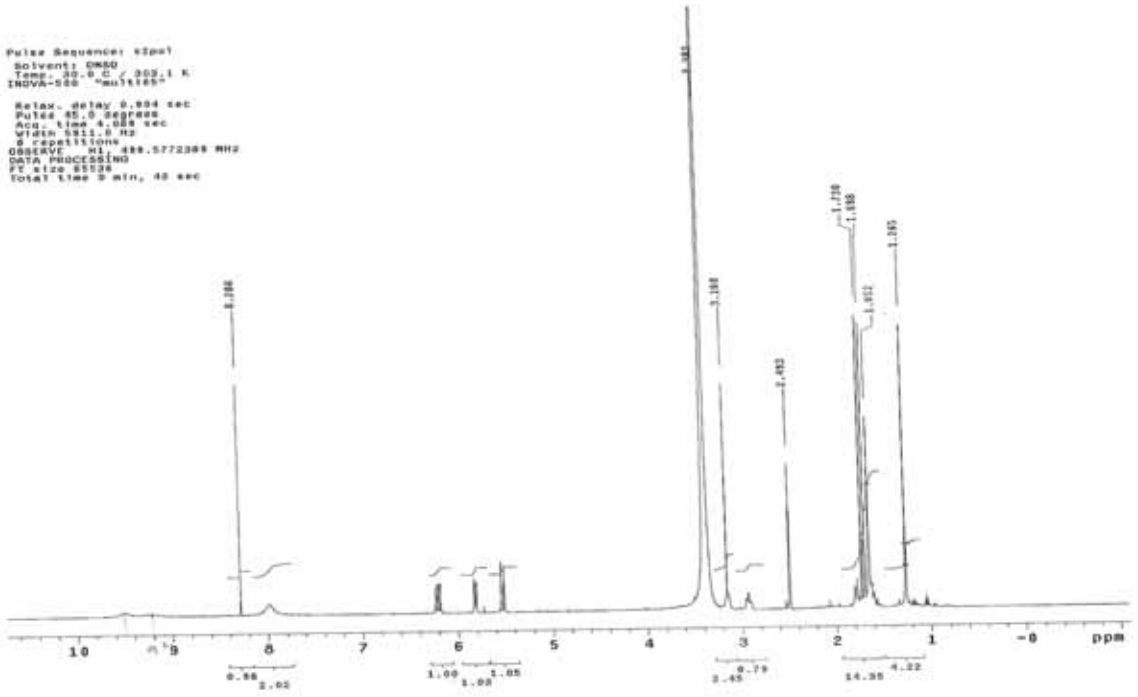


Figura 019. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **43** (DMSO-d_6, 11,7 T)

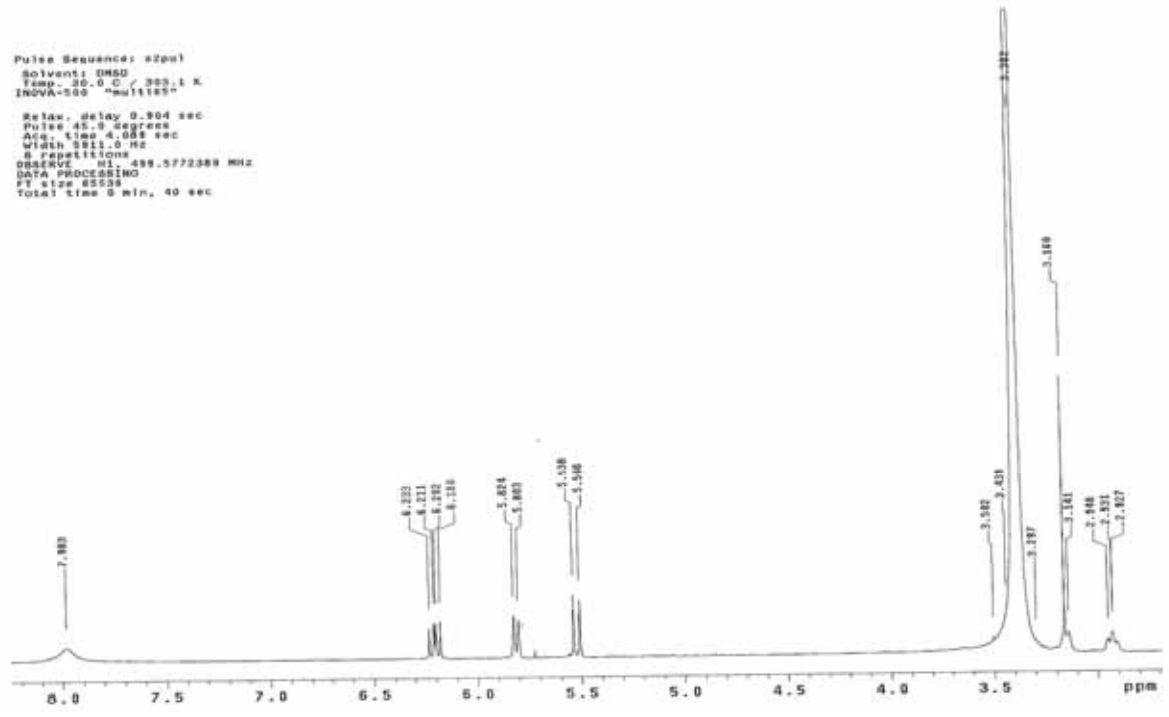


Figura 020. Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da substância **43** (DMSO-d_6, 11,7 T)

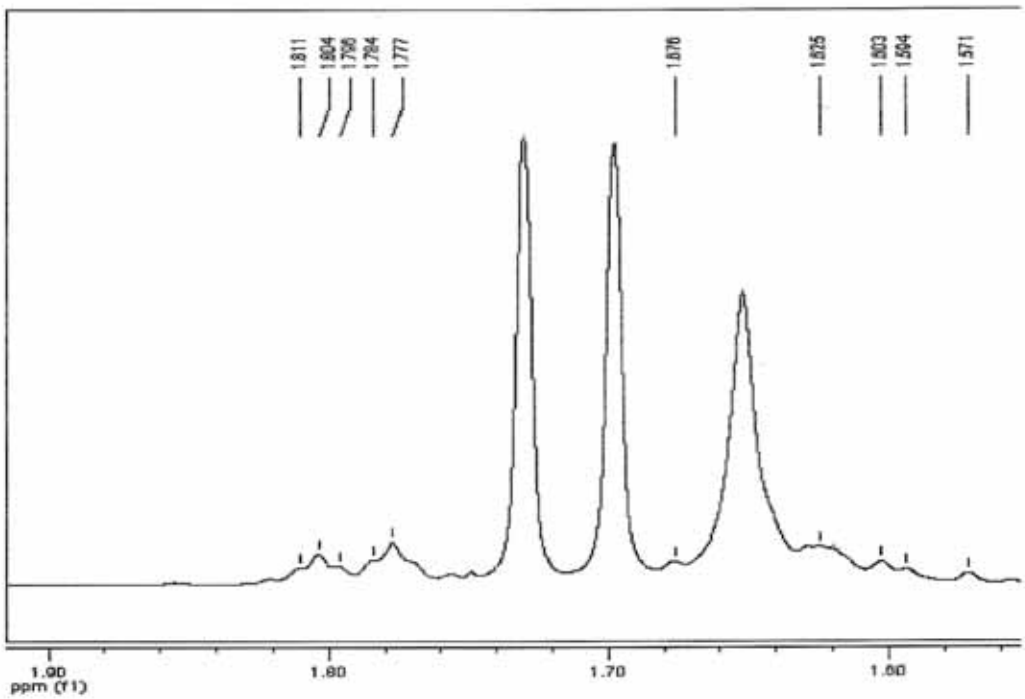


Figura 021. Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da substância **43** (DMSO-d_6, 11,7 T)

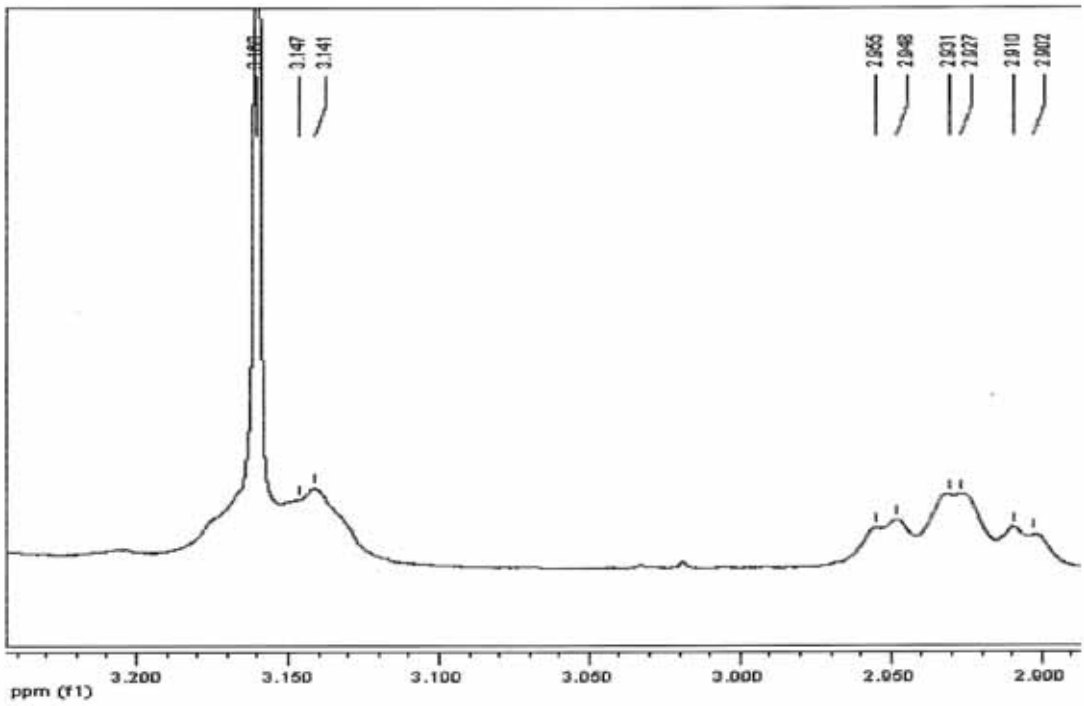


Figura 022. Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da substância **43** (DMSO-d_6, 11,7 T)

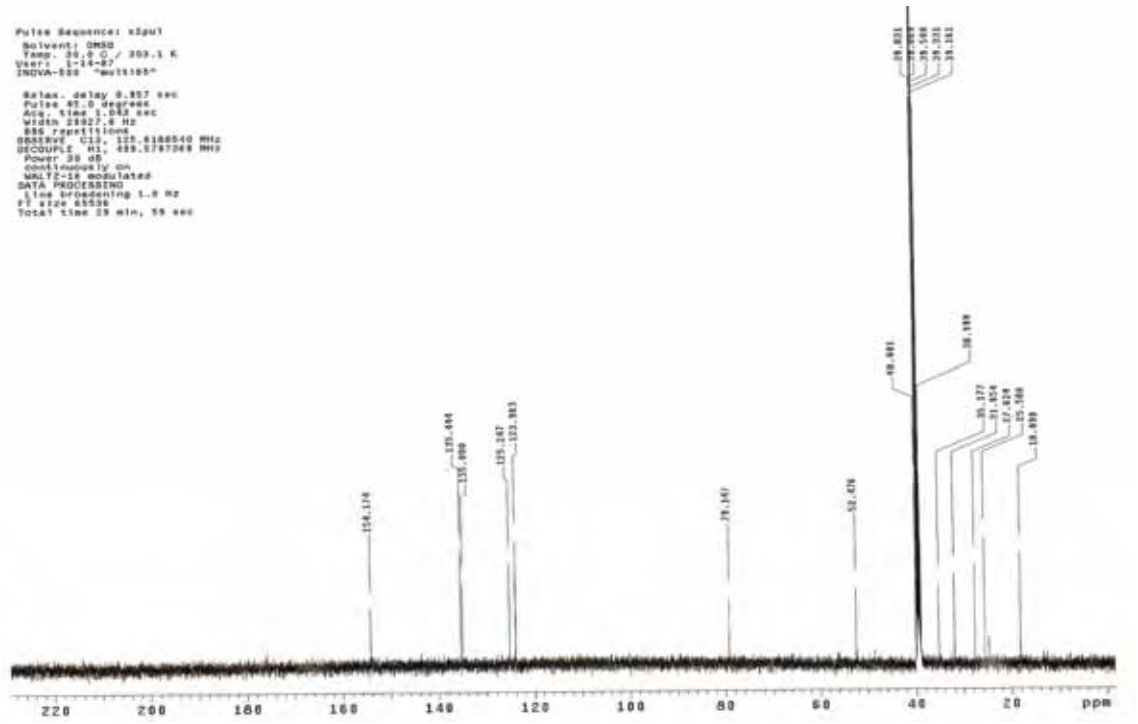


Figura 023. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **43** (DMSO-d_6, 11,7 T)

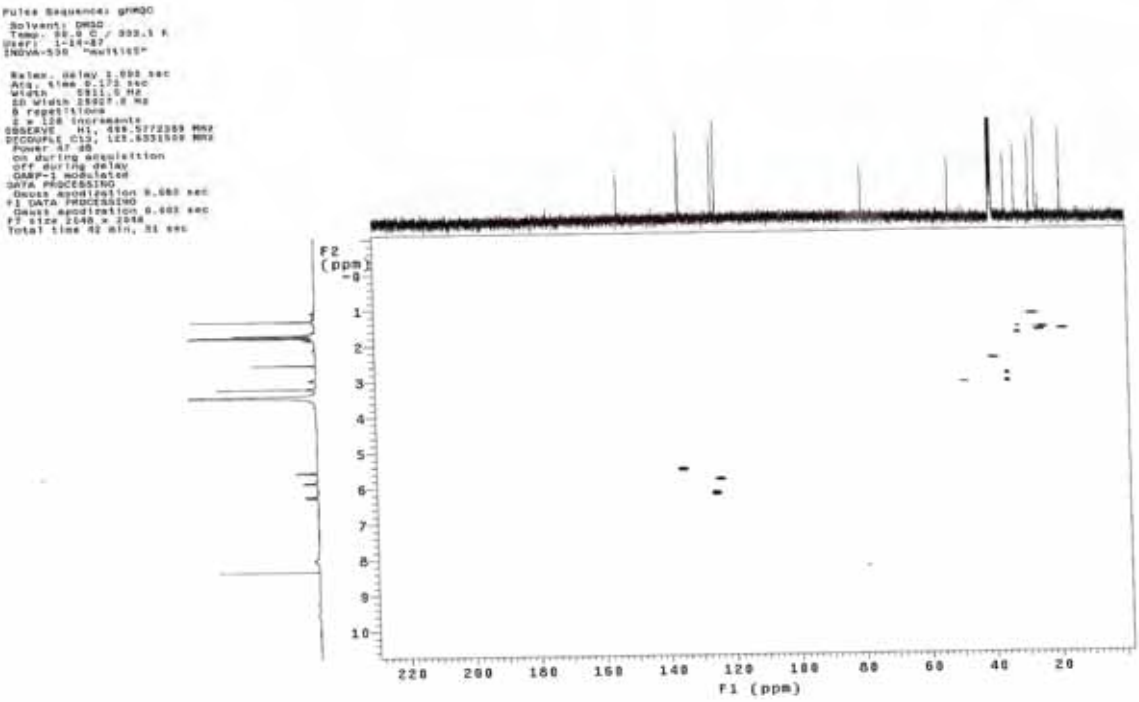


Figura 024. Mapa de contornos *g*HMQC da substância **43** (DMSO-d_6, 11,7 T)

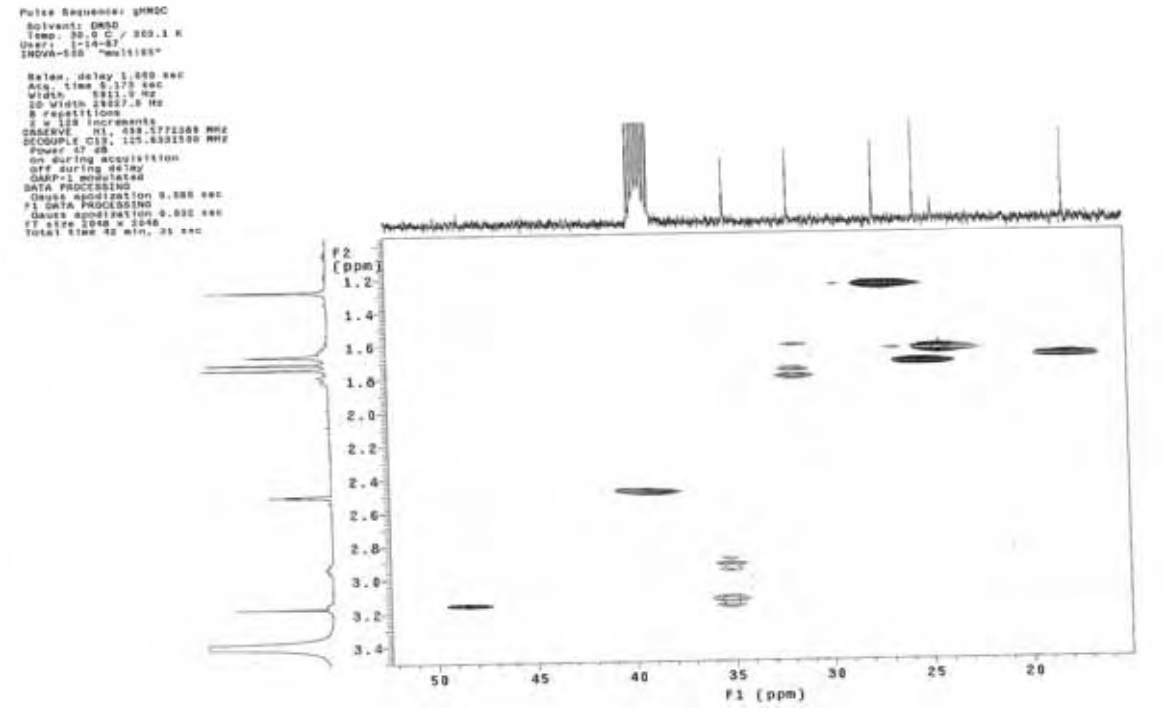


Figura 025. Ampliação do mapa de contornos *g*HMQC da substância **43** (DMSO-d_6, 11,7 T)

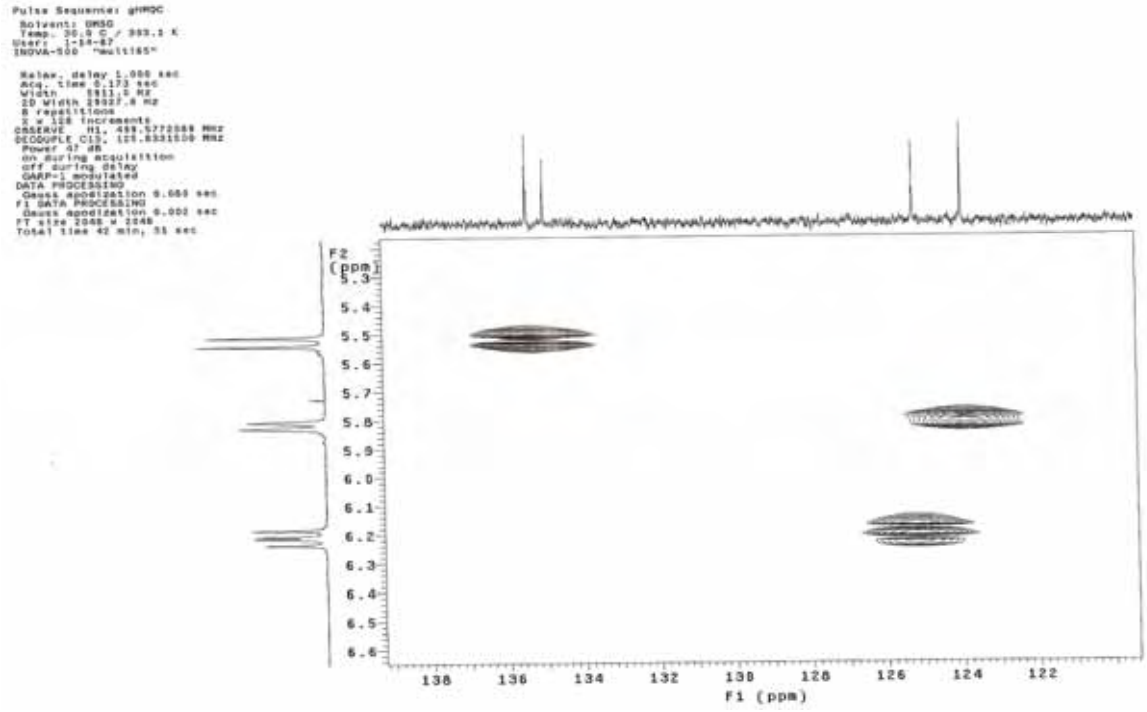


Figura 026. Ampliação do mapa de contornos *g*HMQC da substância **43** (DMSO-d_6, 11,7 T)

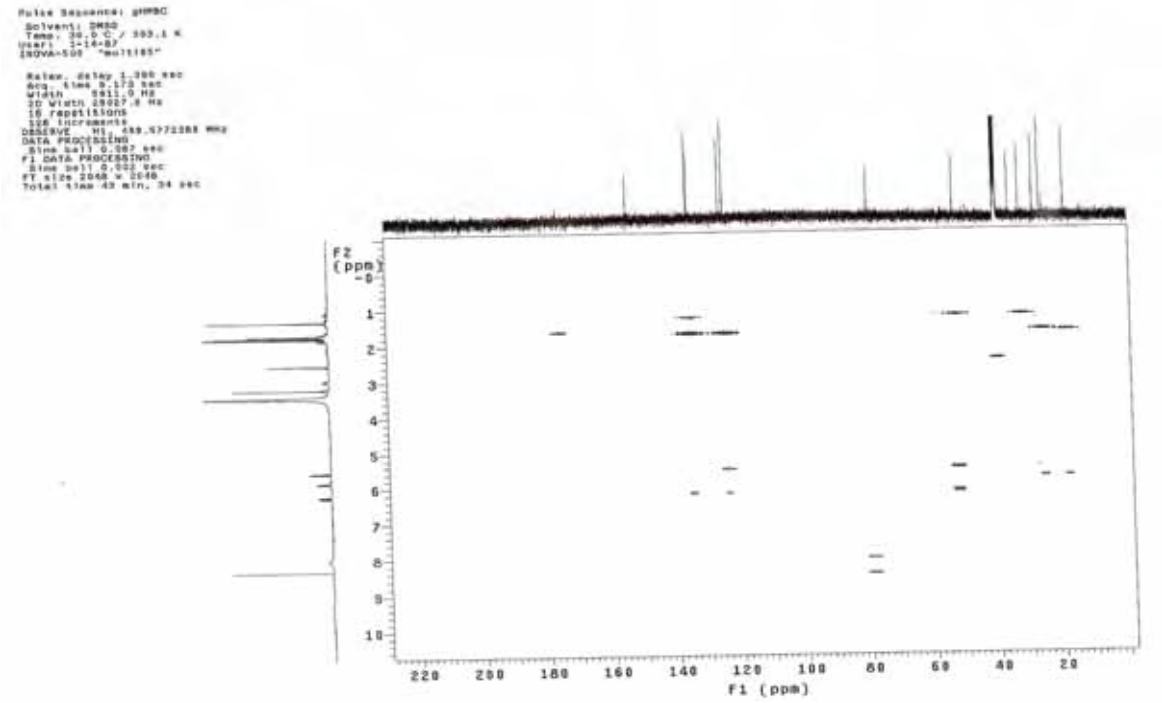


Figura 027. Mapa de contornos *g*HMBC da substância **43** (DMSO-d_6, 11,7 T)

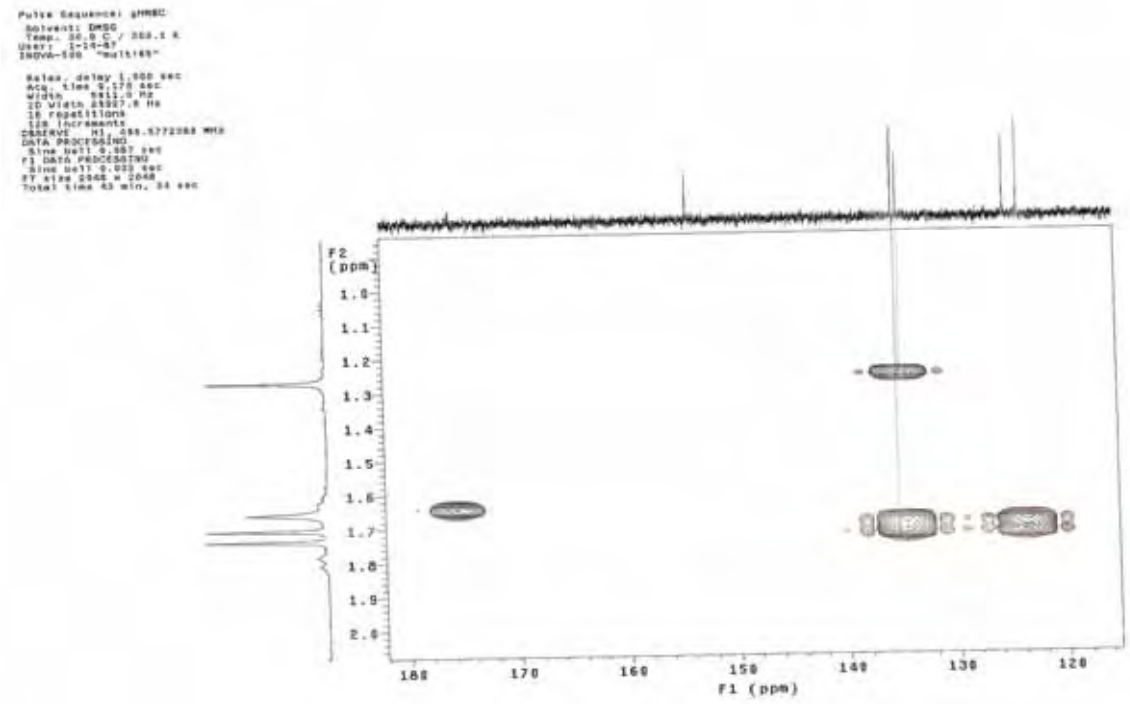


Figura 028. Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **43** (DMSO-d_6, 11,7 T)

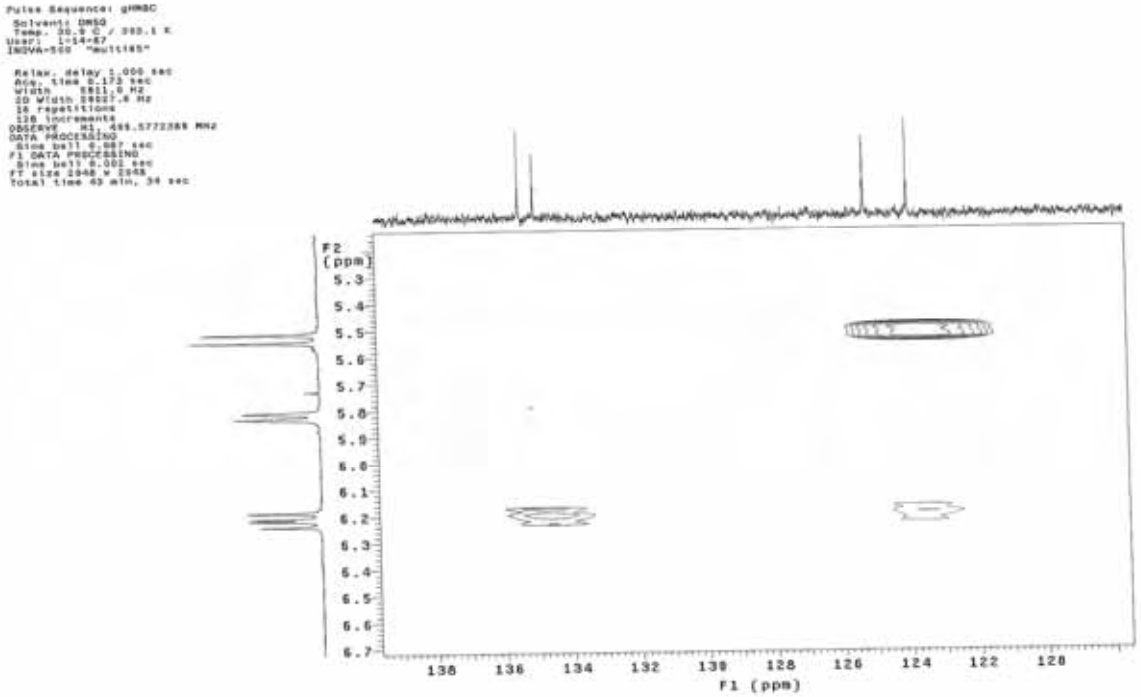


Figura 029. Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **43** (DMSO-d_6, 11,7 T)

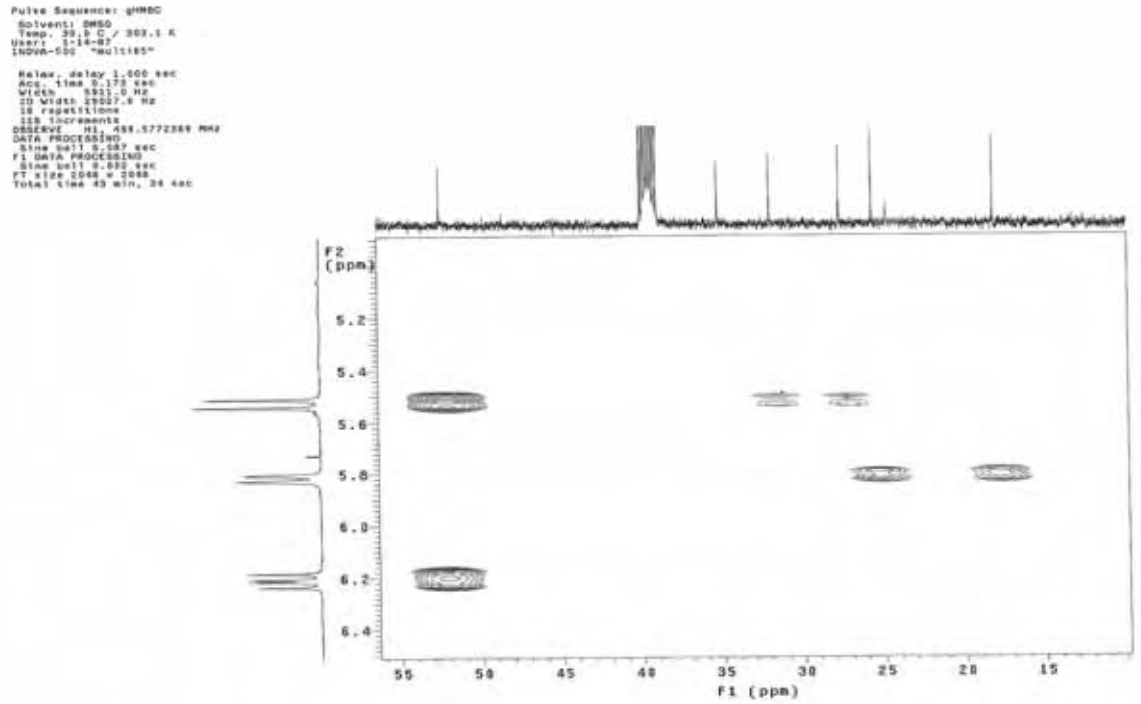


Figura 030. Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **43** (DMSO-d_6, 11,7 T)

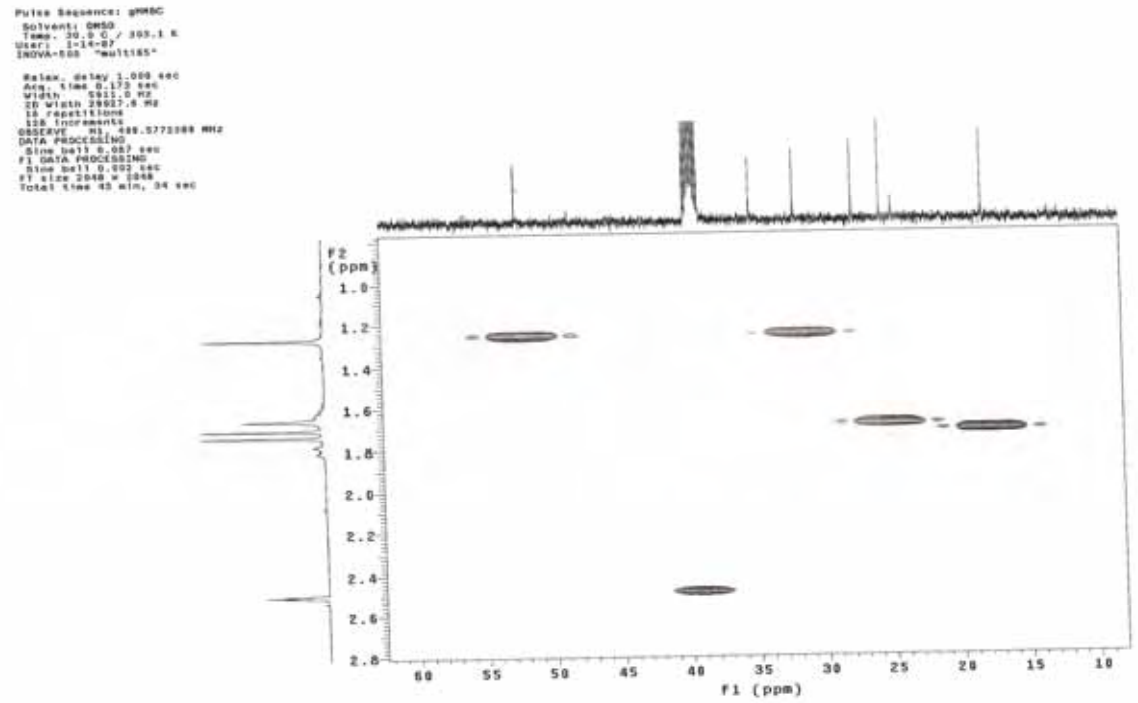


Figura 031. Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **43**(DMSO-d_6, 11,7 T)

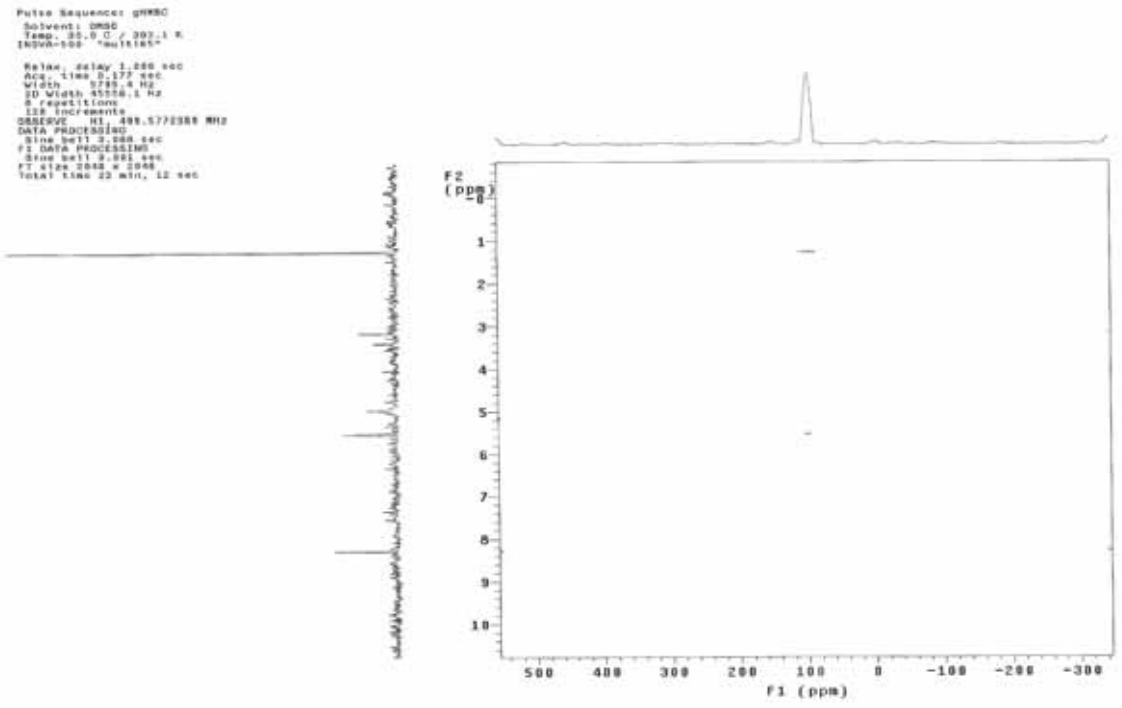


Figura 032. Mapa de contornos *g*HMBC (^{15}Nx^{1}H) da substância **43** (DMSO-d_6, 11,7 T)

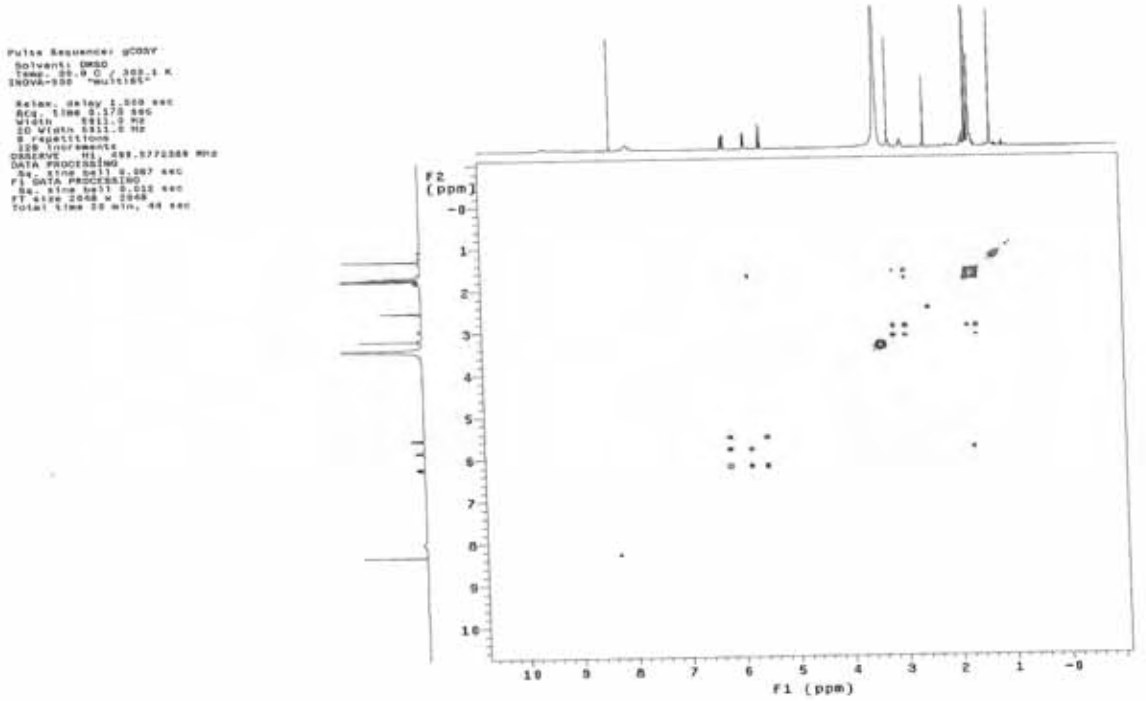


Figura 033. Mapa de contornos 1Hx1H *g*COSY da substância **43** (DMSO-d_6, 11,7 T)

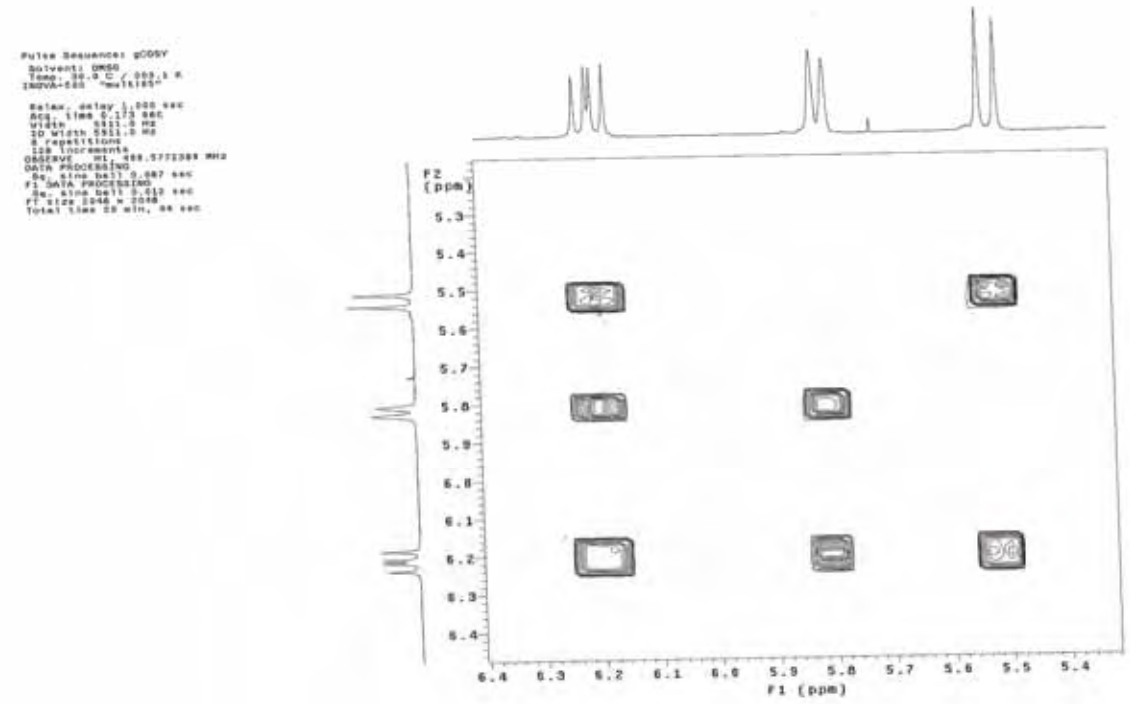


Figura 034. Ampliação do mapa de contornos 1Hx1H *g*COSY da substância **43** (DMSO-d_6, 11,7 T)

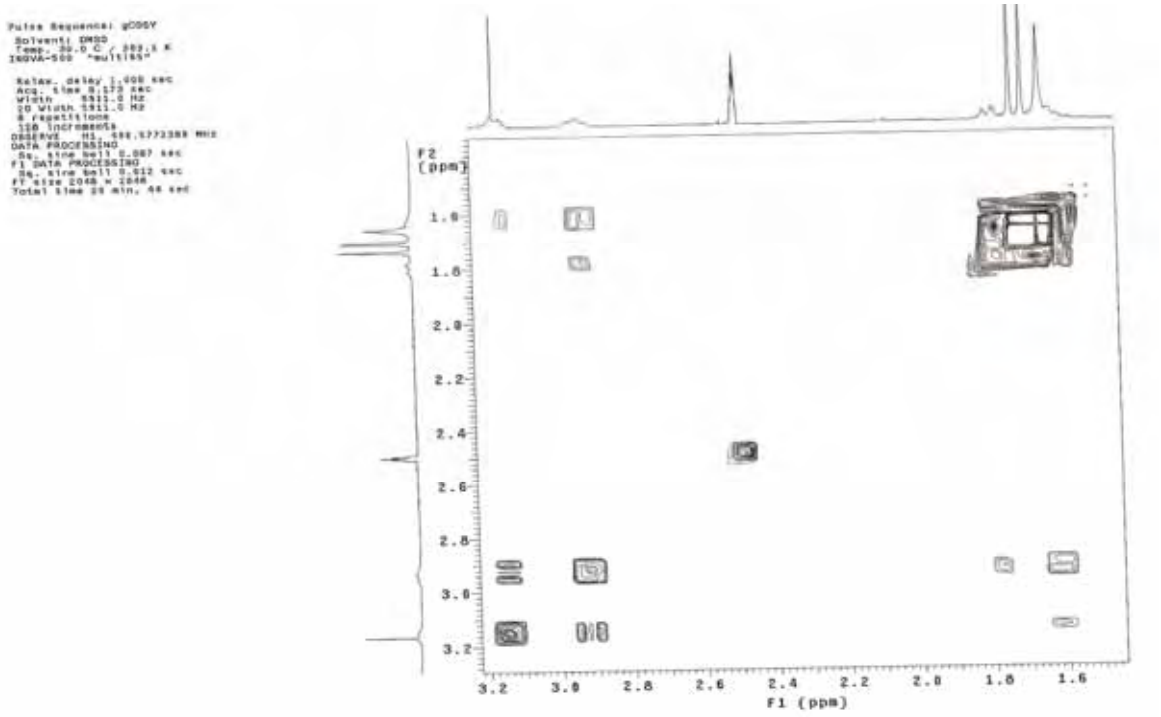


Figura 035. Ampliação do mapa de contornos 1Hx1H *g*COSY da substância **43** (DMSO-d_6, 11,7 T)

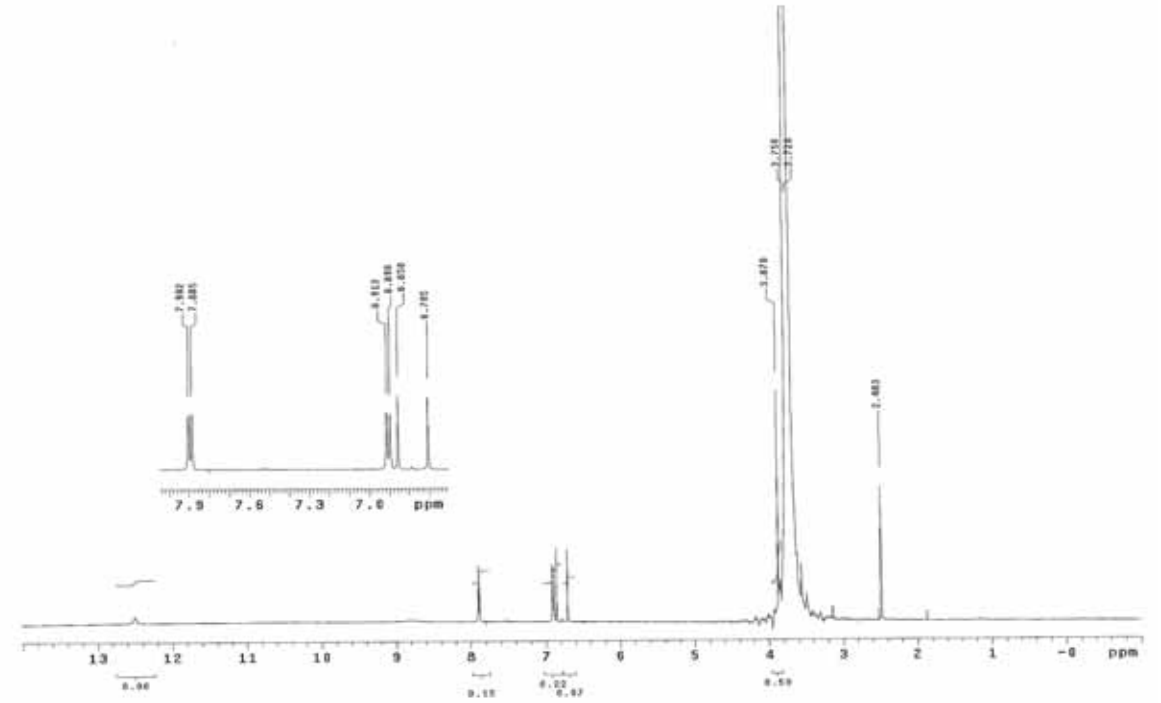


Figura 036. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **44** (DMSO-d_6, 11,7 T)

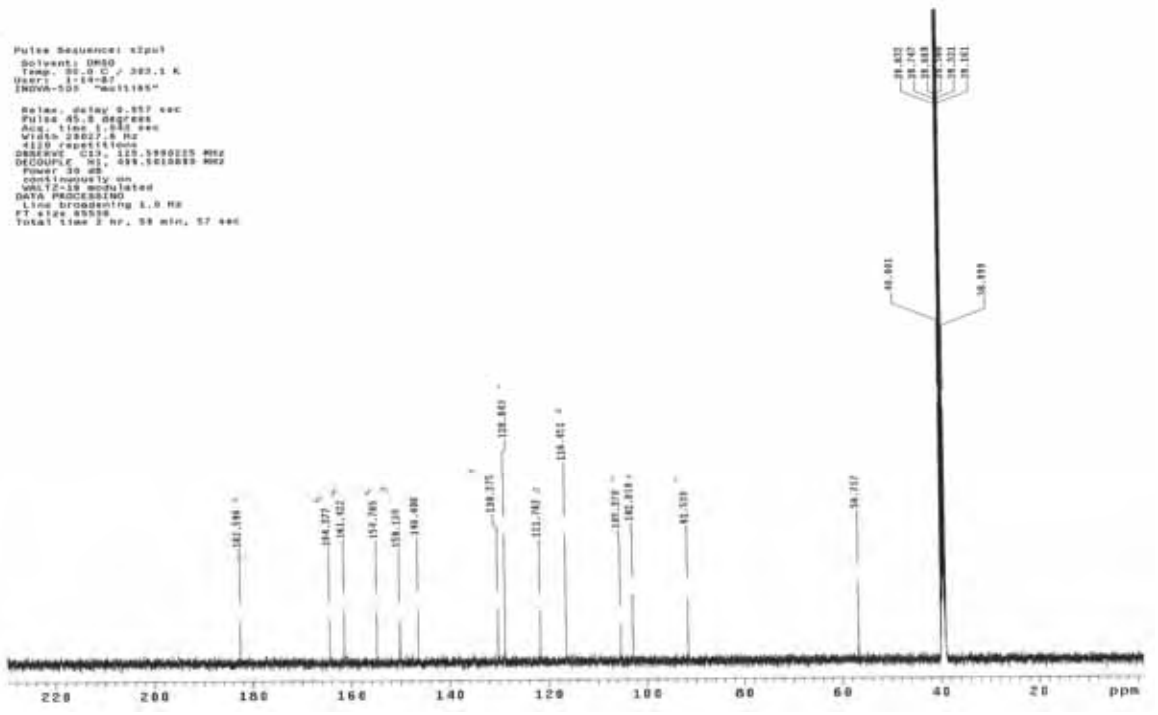


Figura 037. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **44** (DMSO-d_6, 11,7 T)

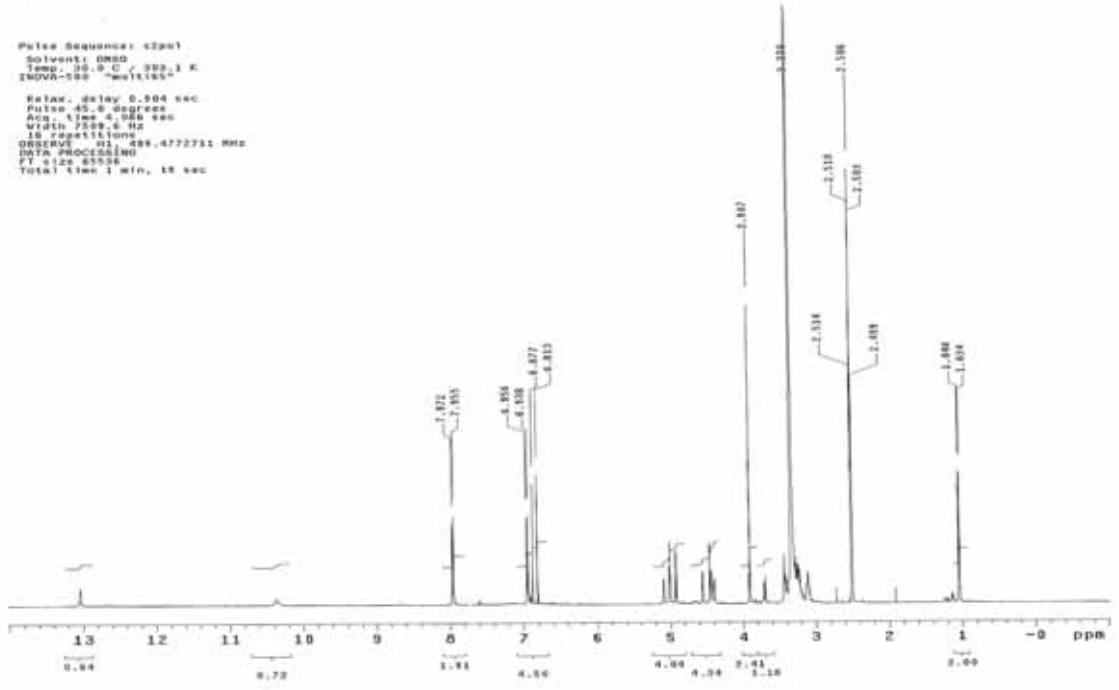


Figura 038. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)

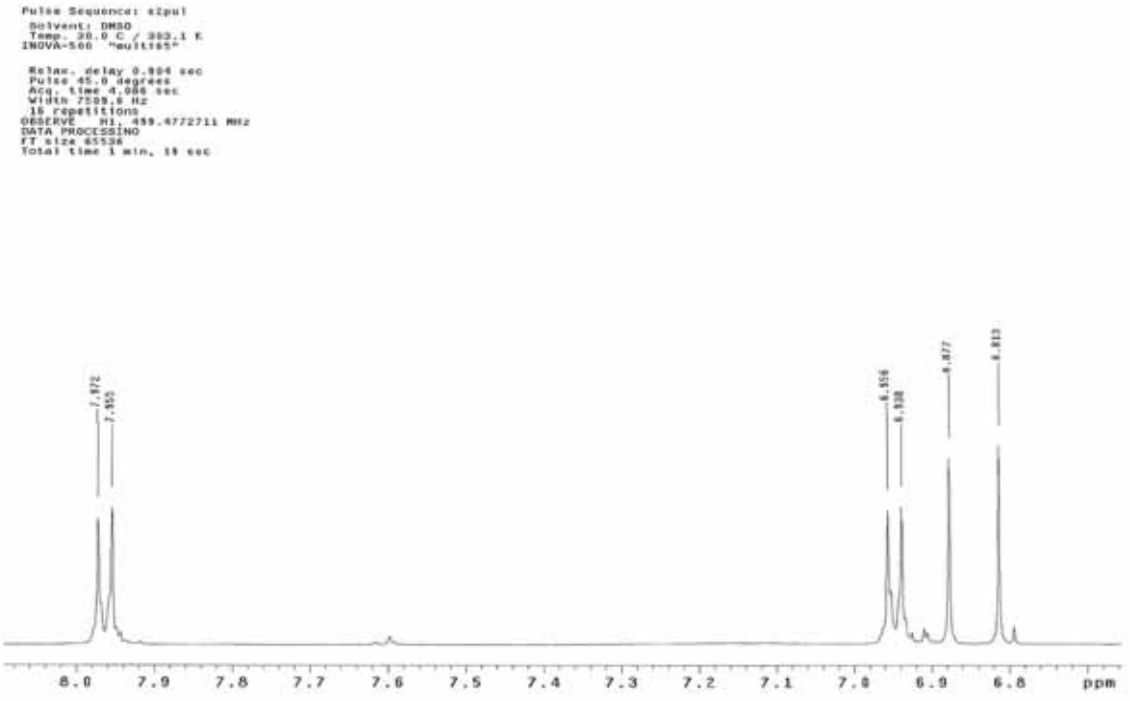


Figura 039. Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)

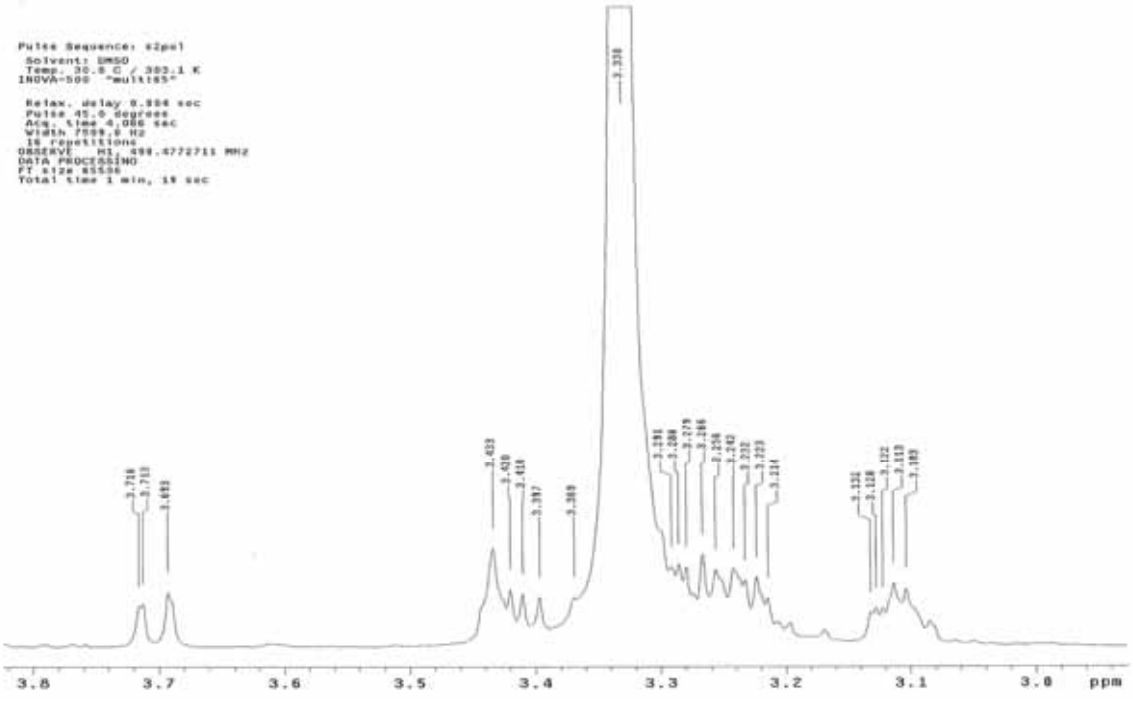


Figura 040. Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)

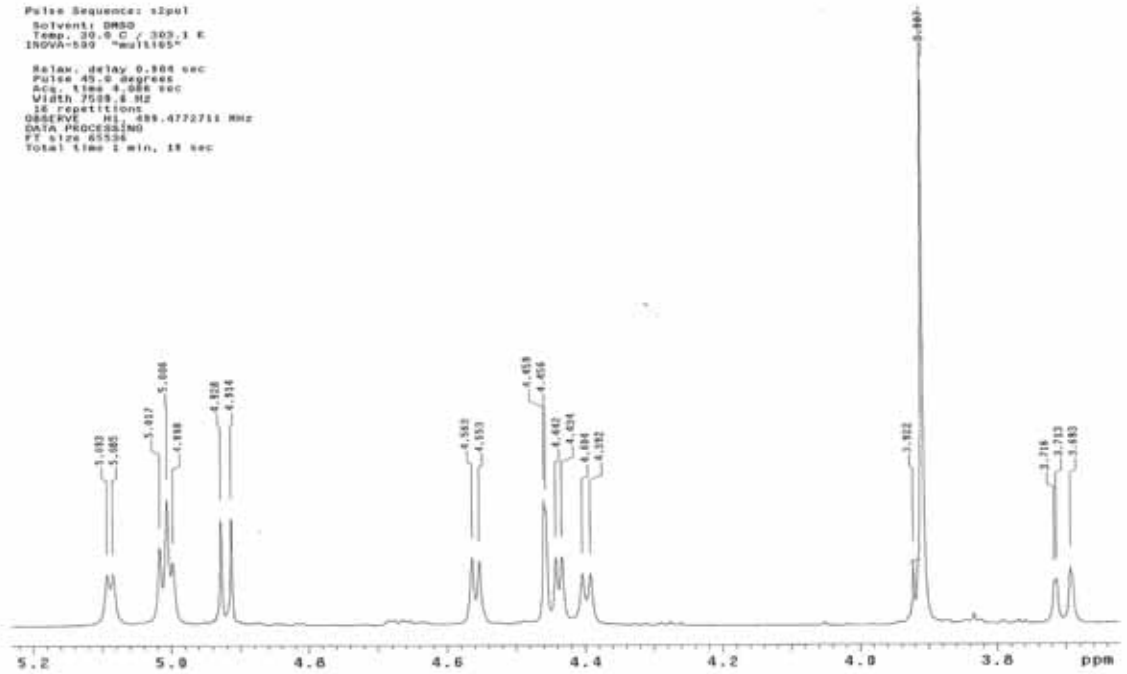


Figura 041. Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)

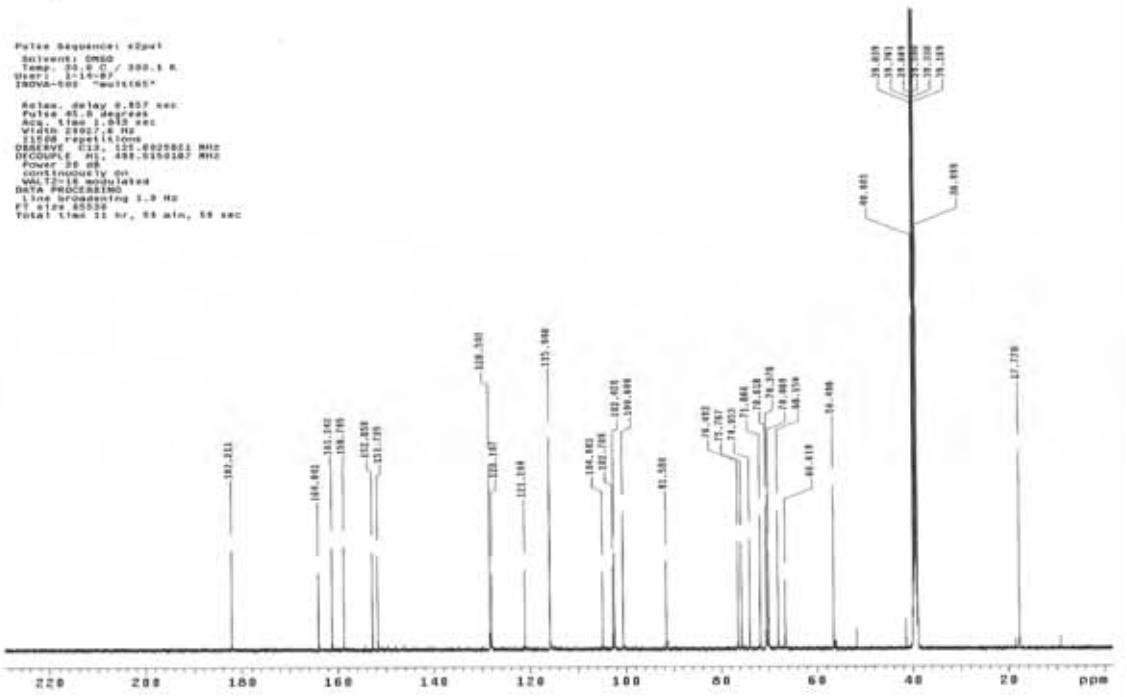


Figura 042. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)

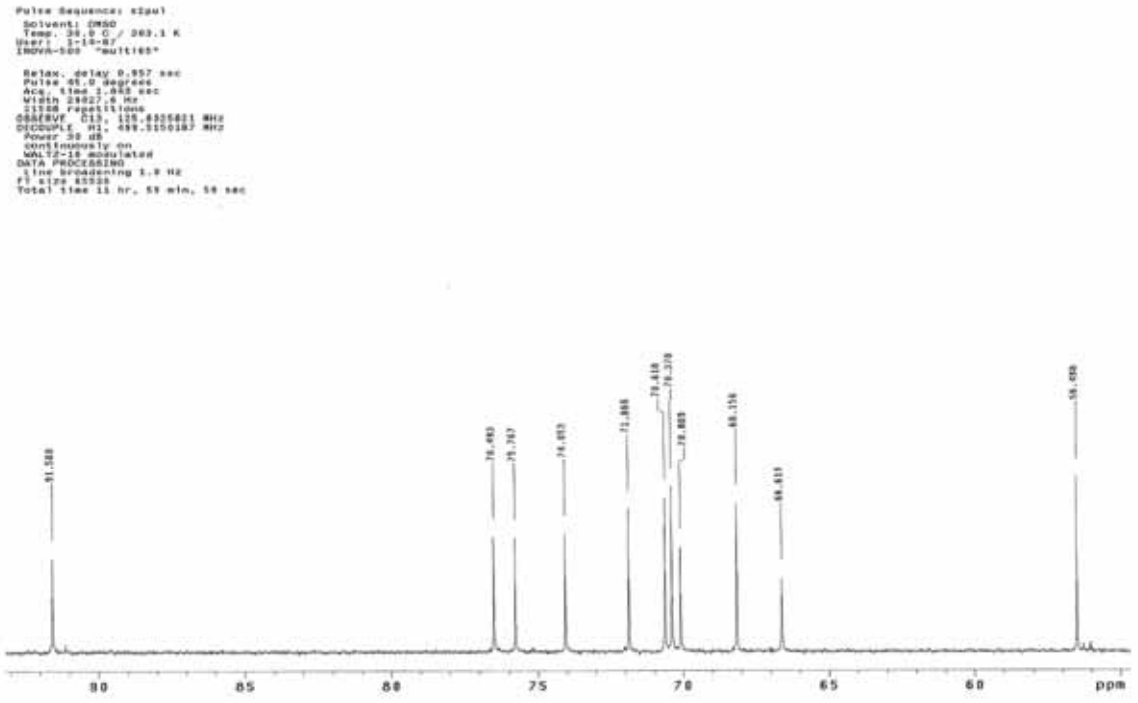


Figura 043. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)

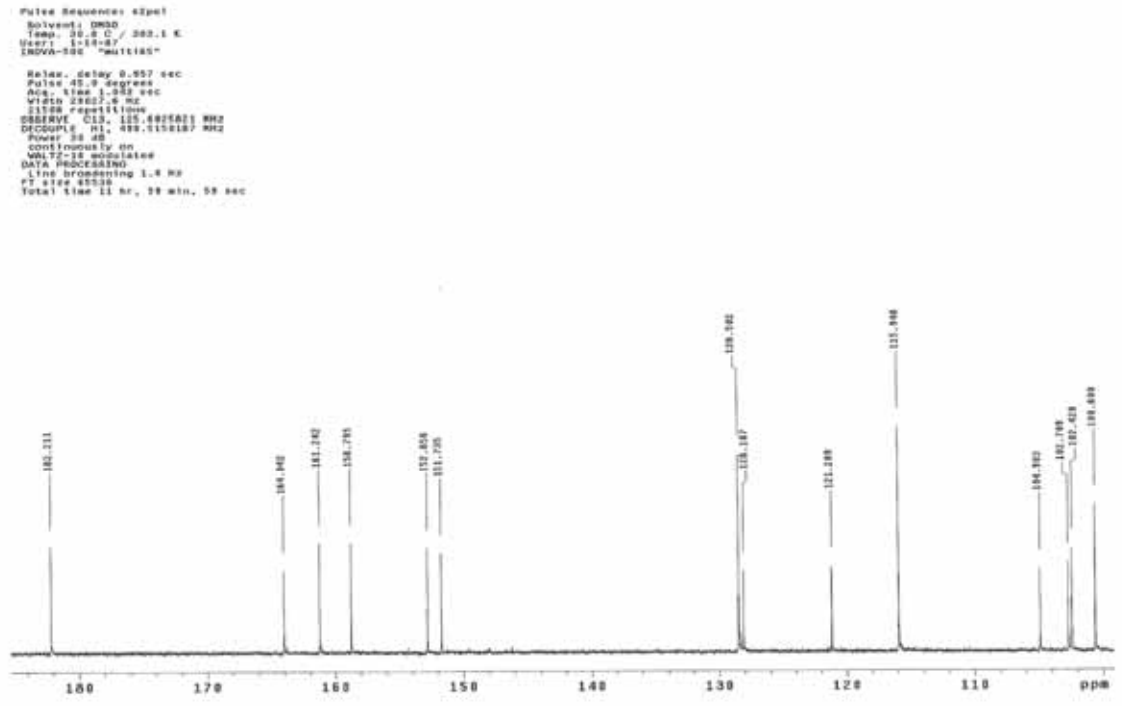


Figura 044. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)

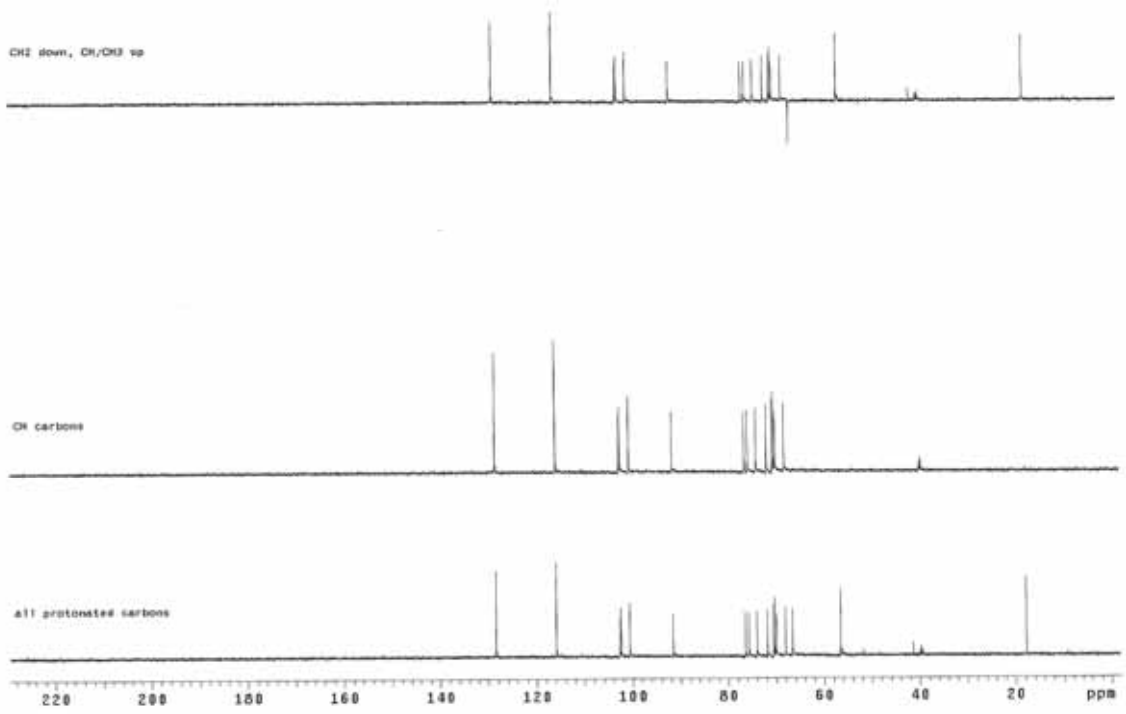


Figura 045. Espectro de DEPT 135° da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)

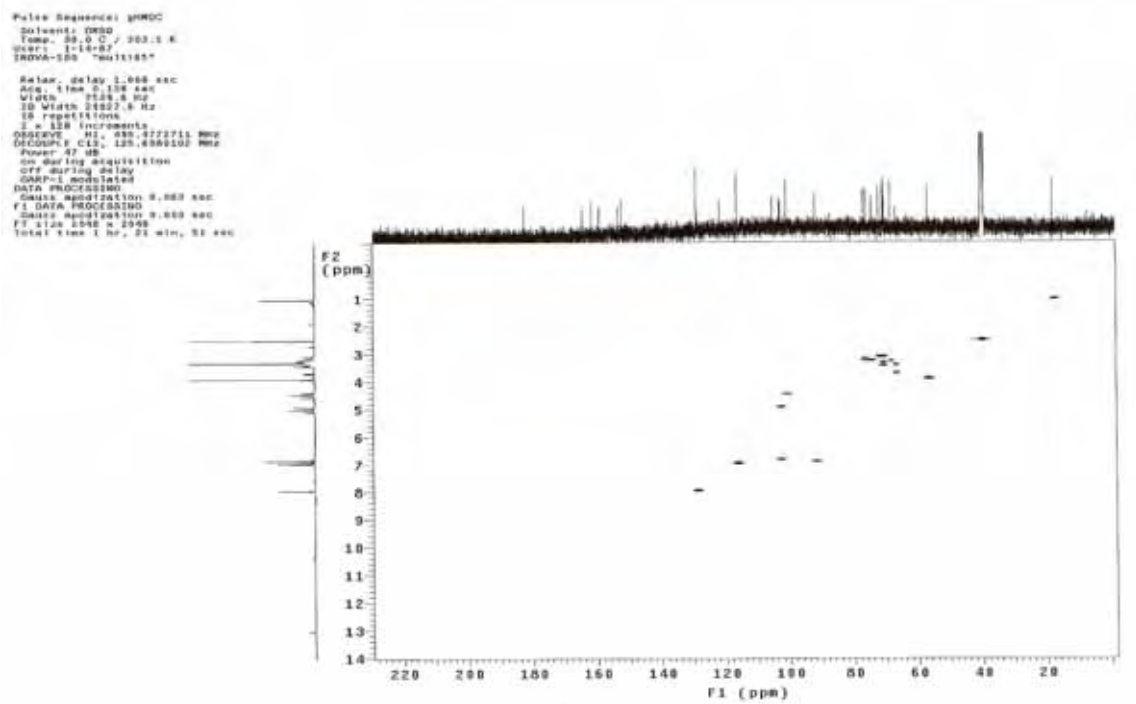


Figura 046. Mapa de contornos *g*HMQC da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)

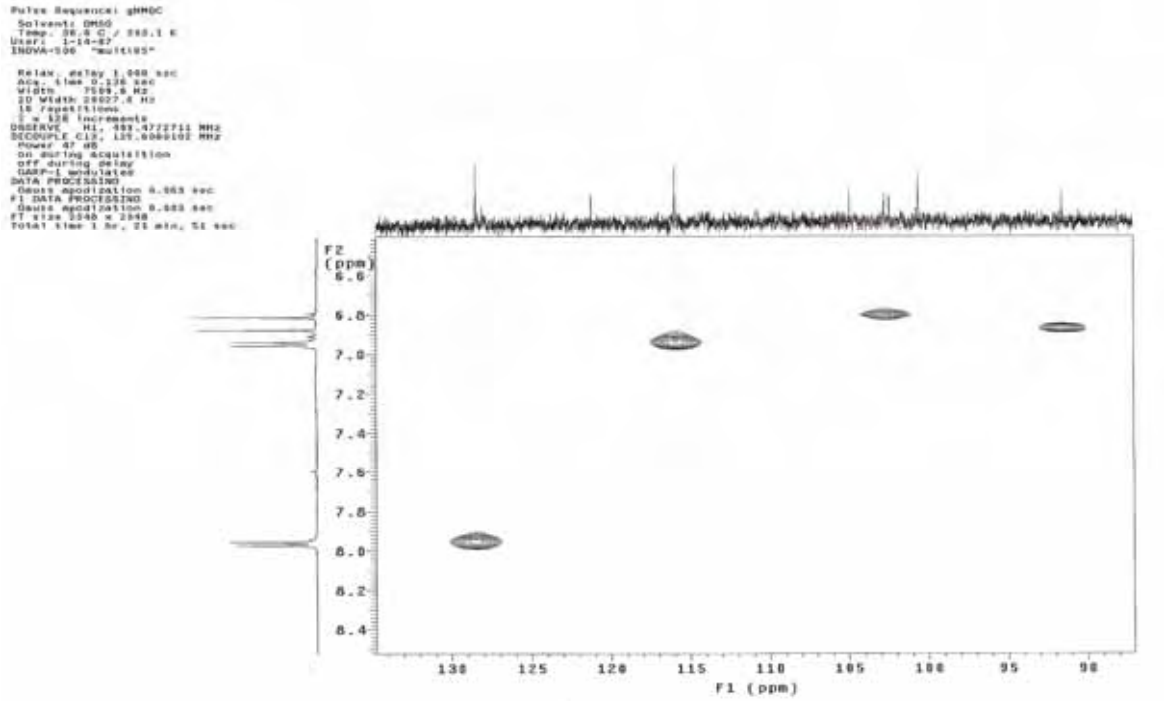


Figura 047. Ampliação do mapa de contornos *g*HMQC da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)

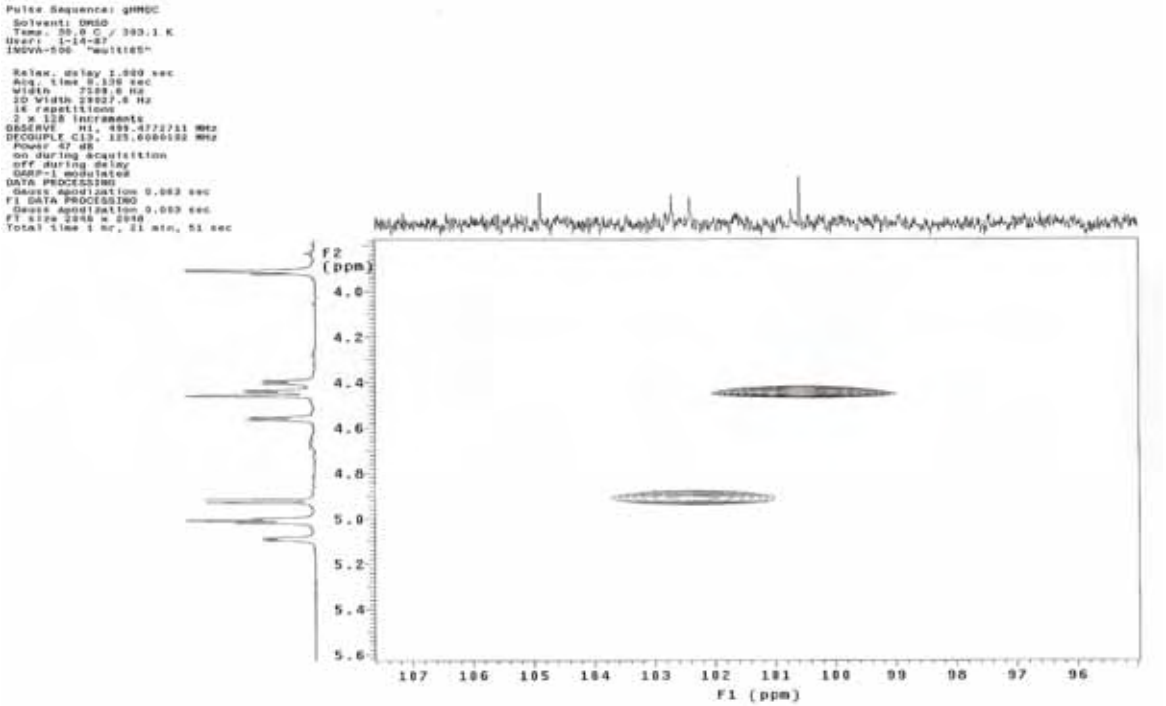


Figura 048. Ampliação do mapa de contornos *g*HMQC da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)

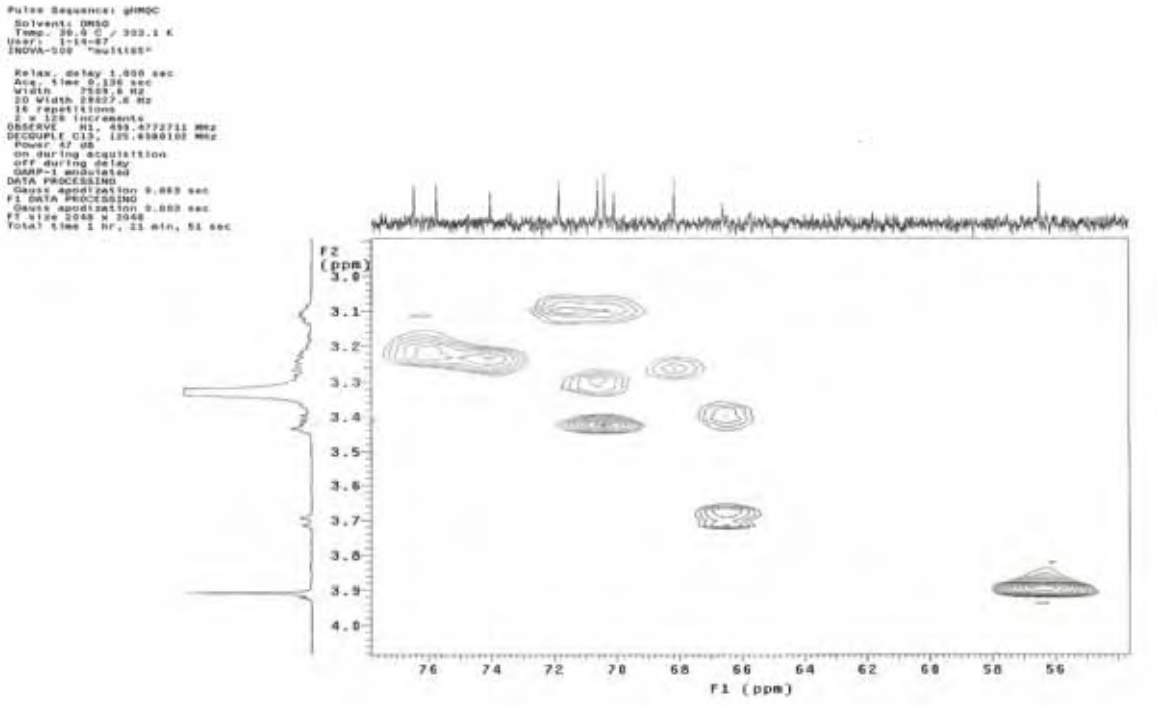


Figura 049. Ampliação do mapa de contornos *g*HMQC da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)

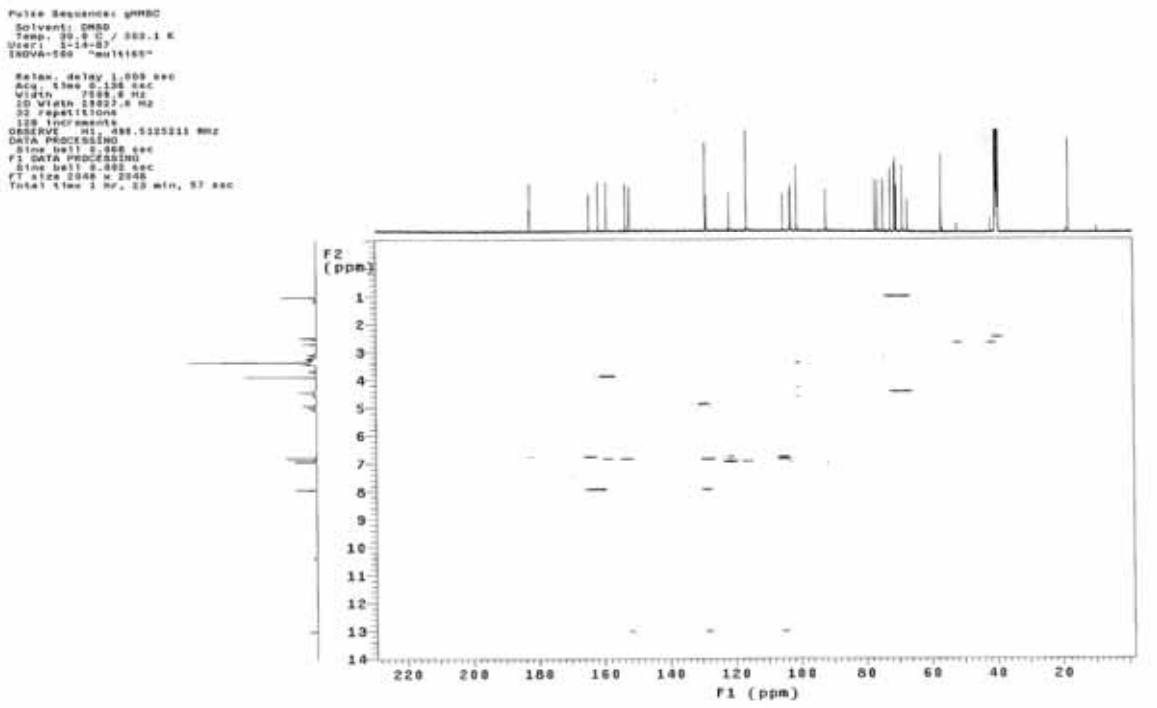


Figura 050. Mapa de contornos *g*HMBC da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)

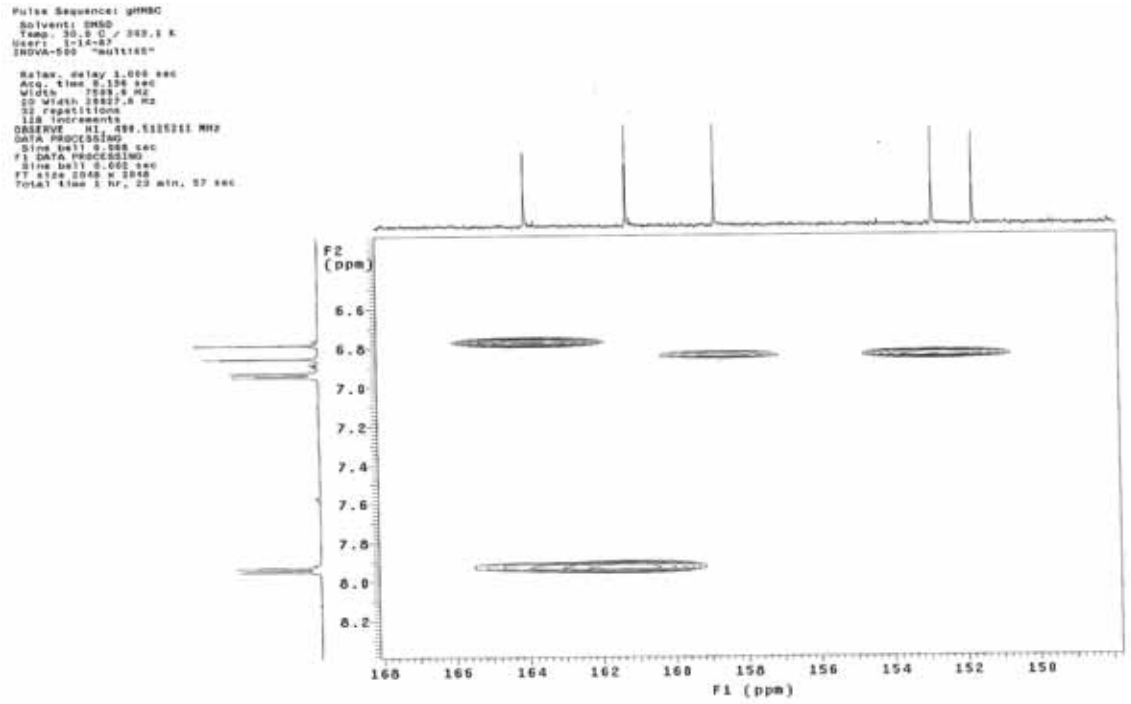


Figura 051. Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)

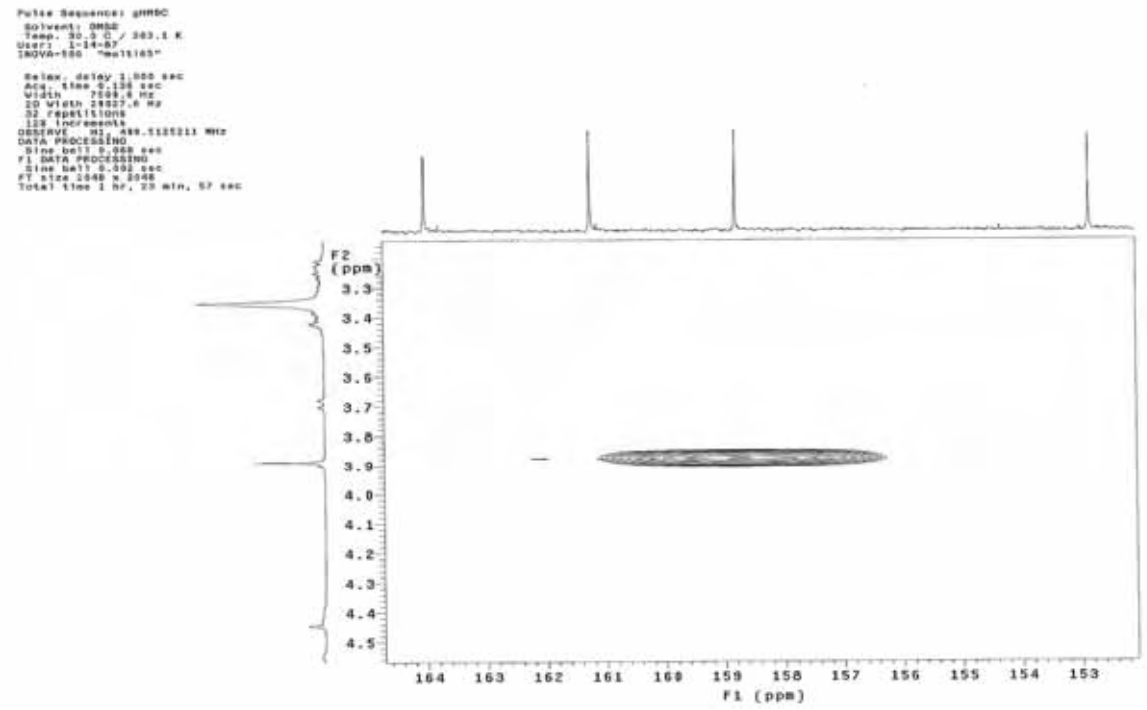


Figura 052. Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)

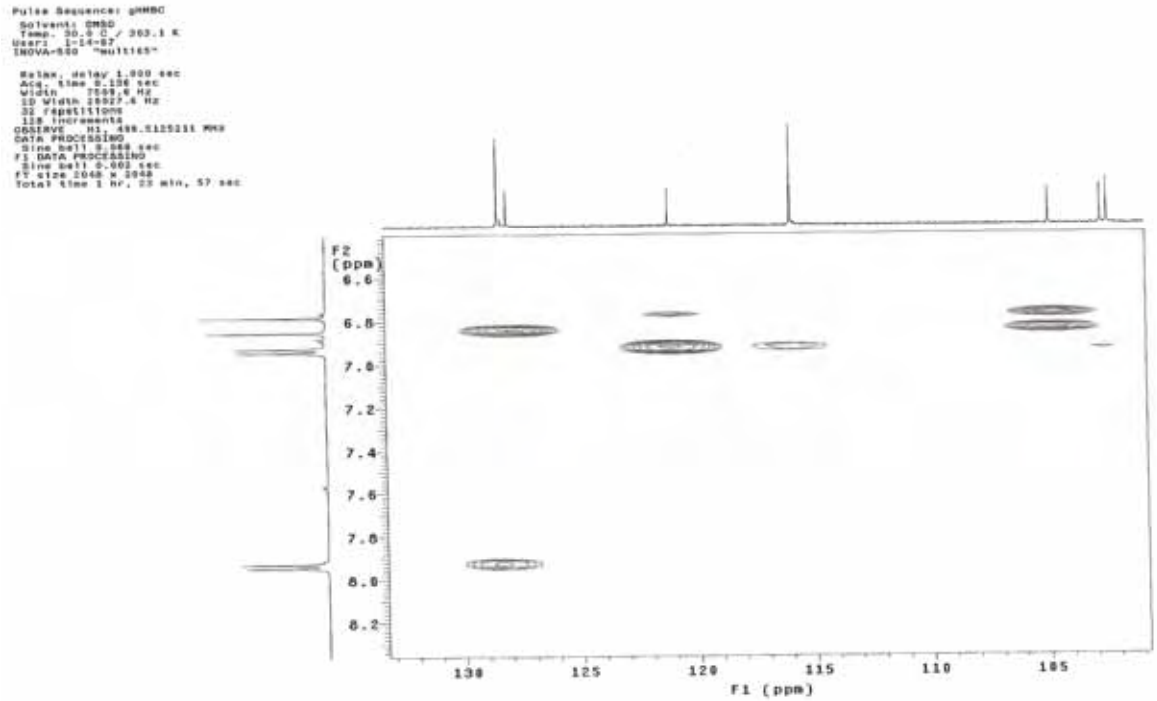


Figura 053. Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)

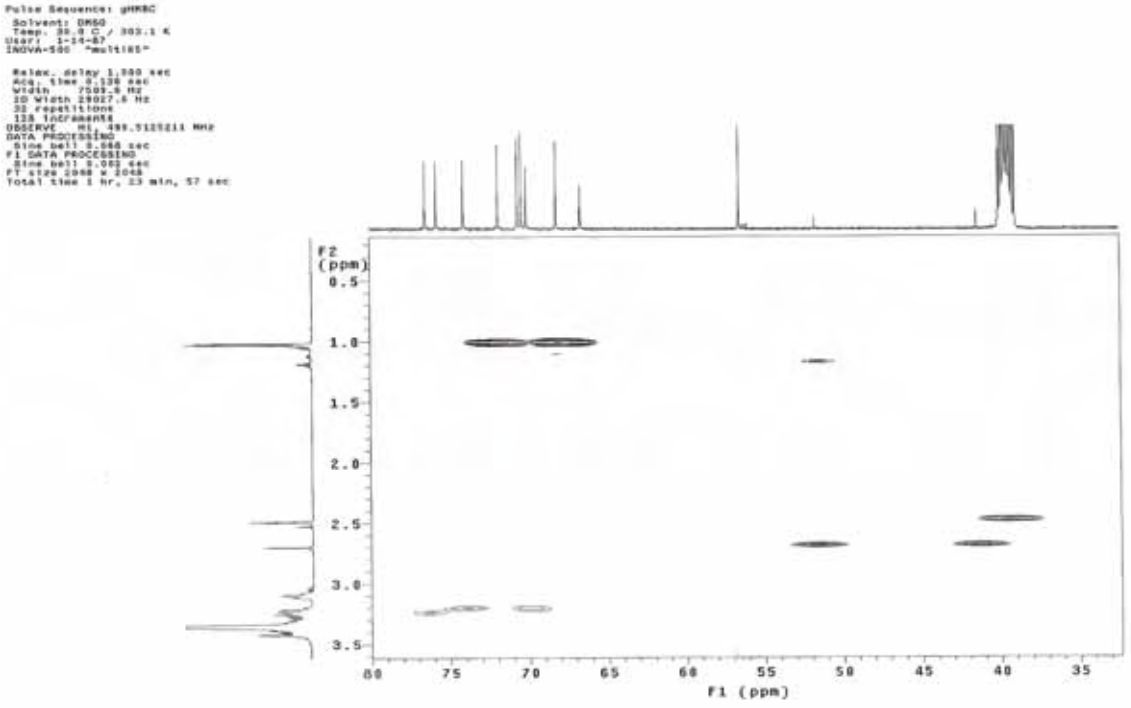


Figura 054. Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)

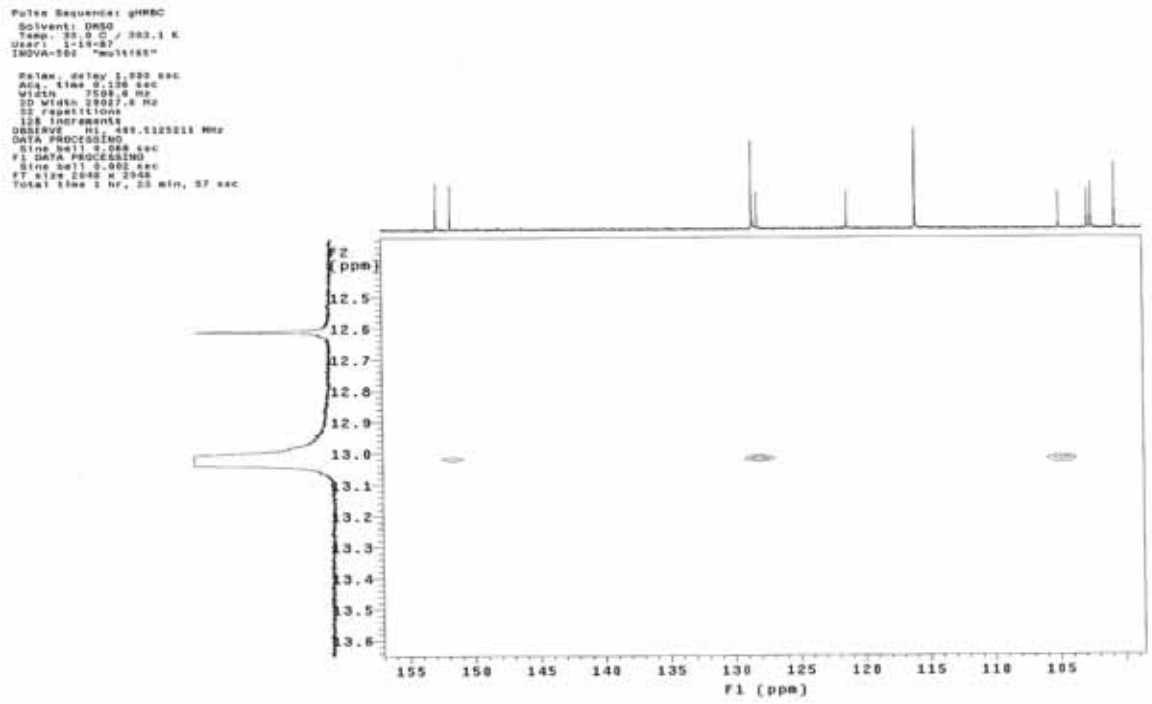


Figura 055. Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)

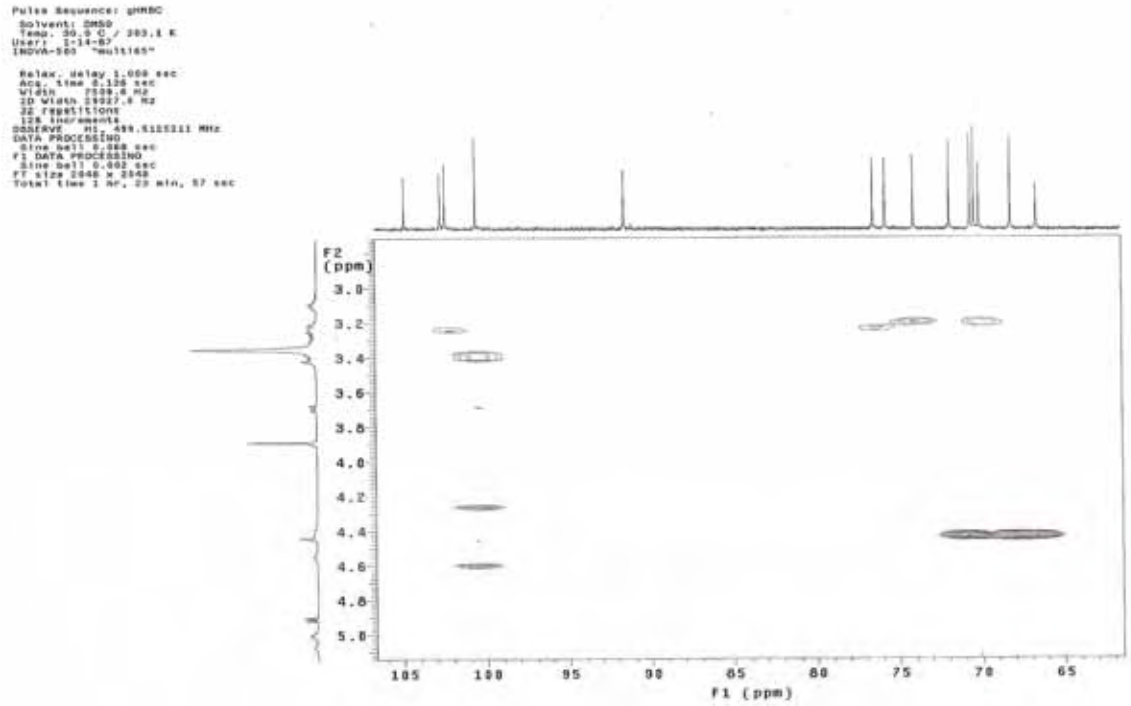


Figura 056. Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)

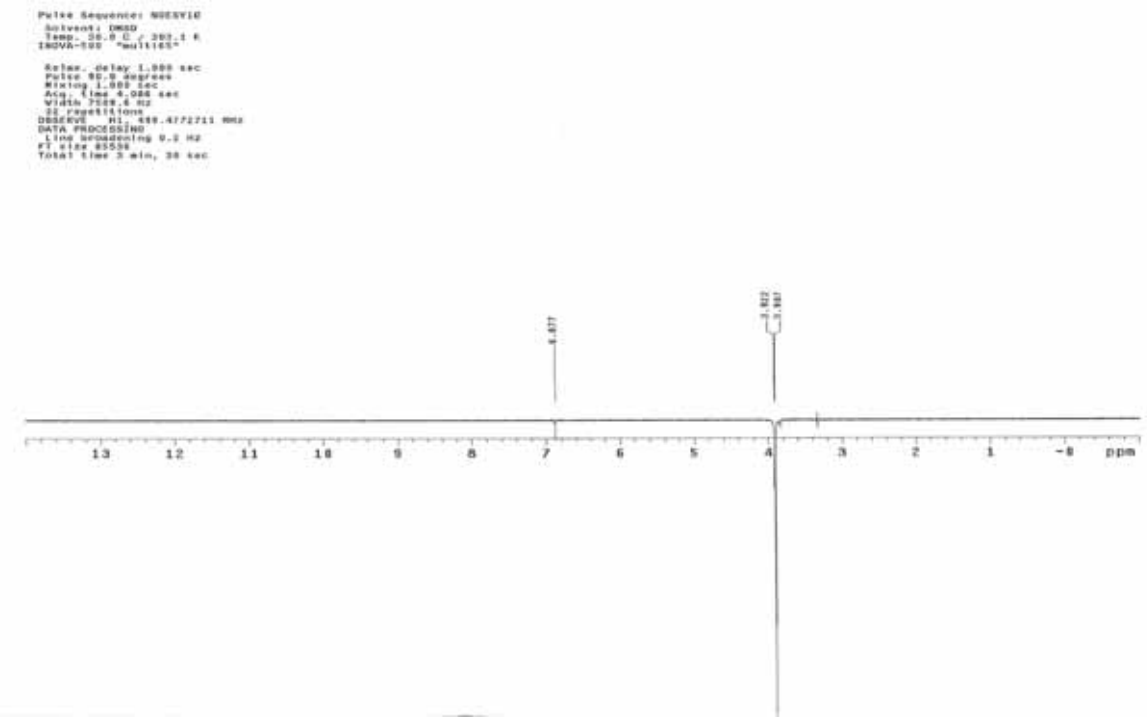


Figura 057. Espectro de NOESY 1D da substância **45** (DMSO-d_6, 11,7 T)

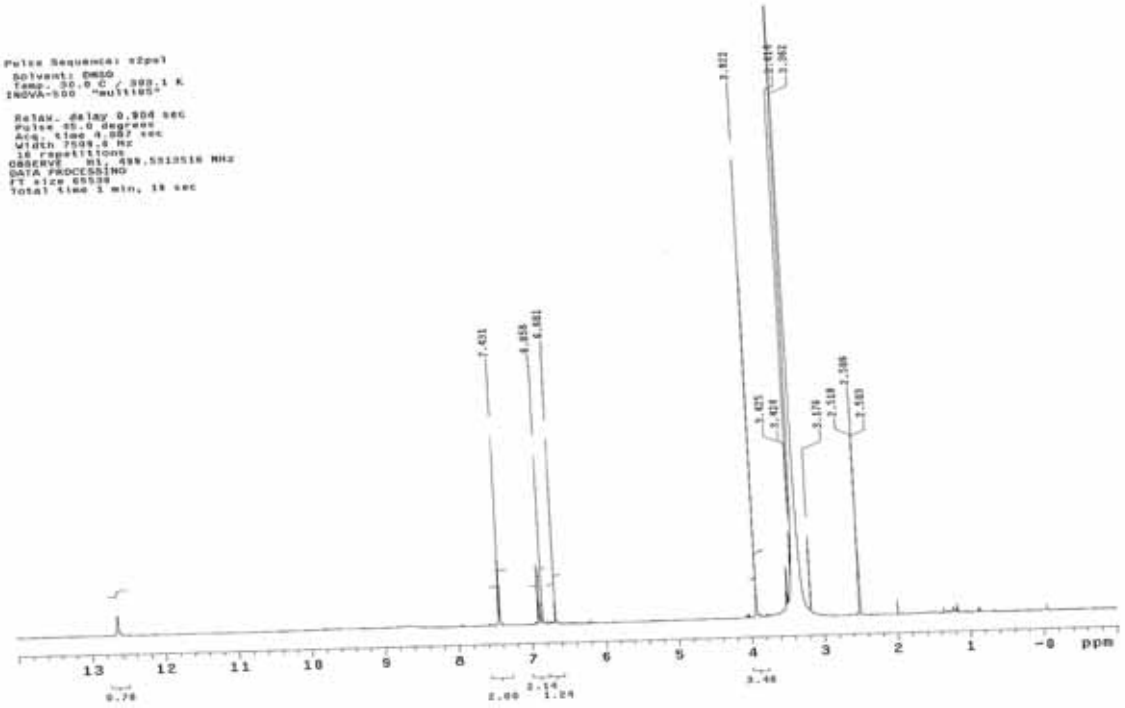


Figura 058. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **46** (DMSO-d_6, 11,7 T)

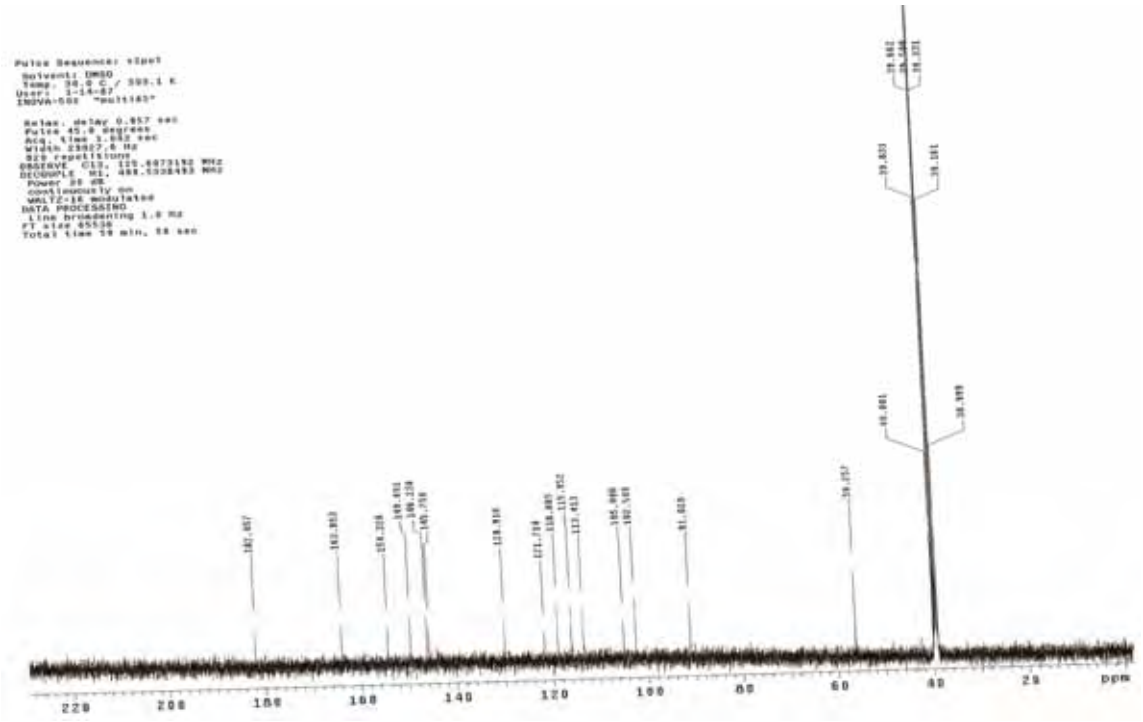


Figura 059. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **46** (DMSO-d_6, 11,7 T)

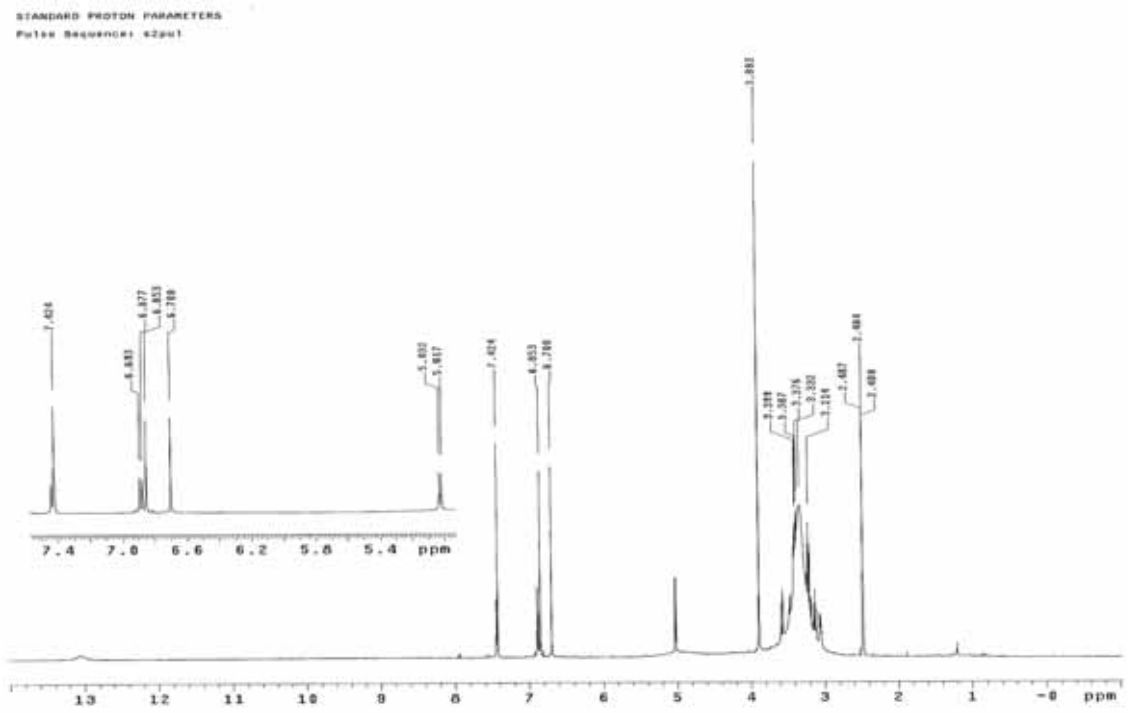


Figura 060. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **7** (DMSO-d_6, 11,7 T)

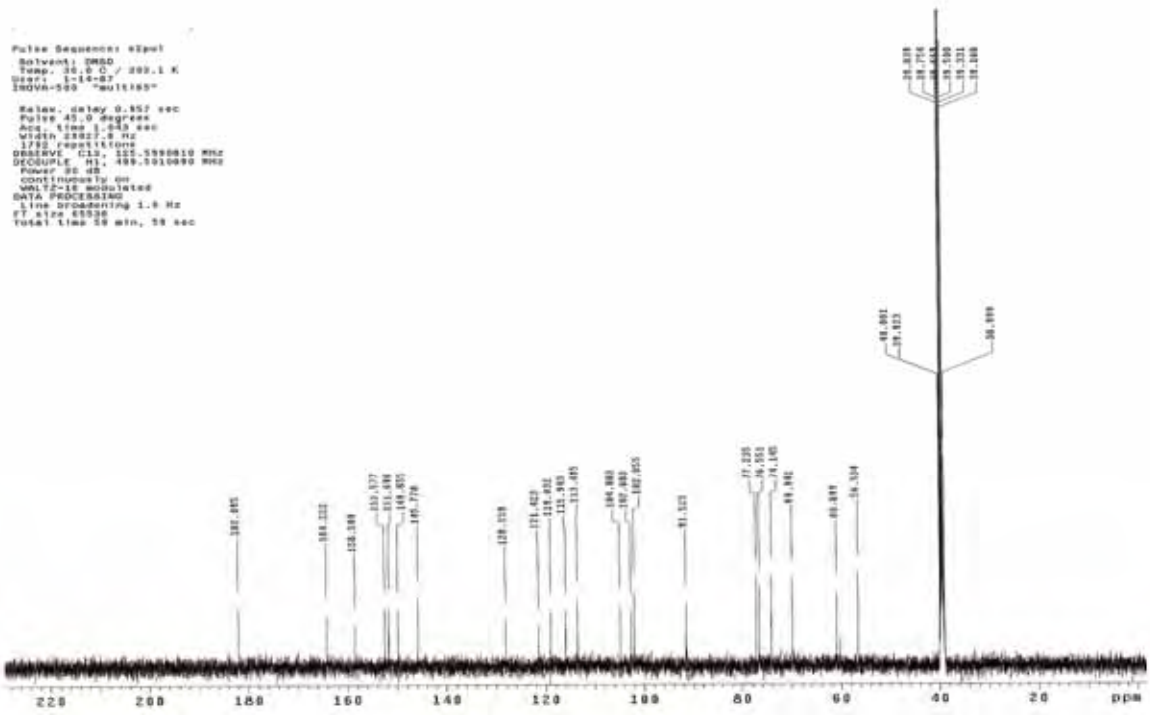


Figura 061. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **7** (DMSO-d_6, 11,7 T)

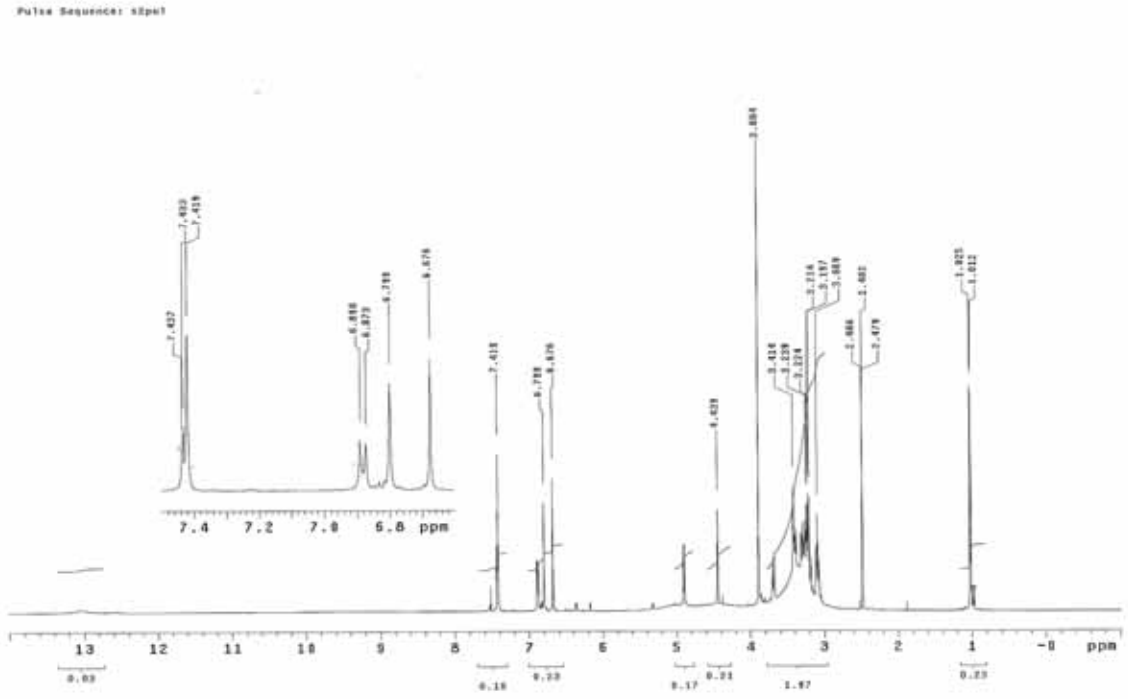


Figura 062. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T)

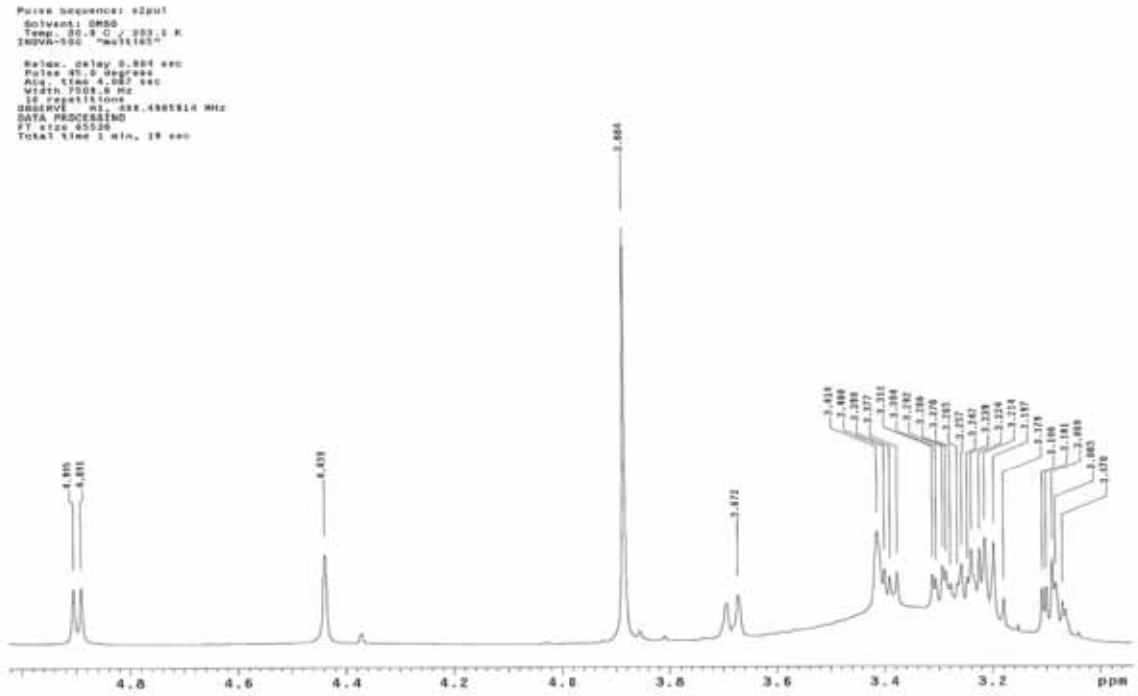


Figura 063. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T)

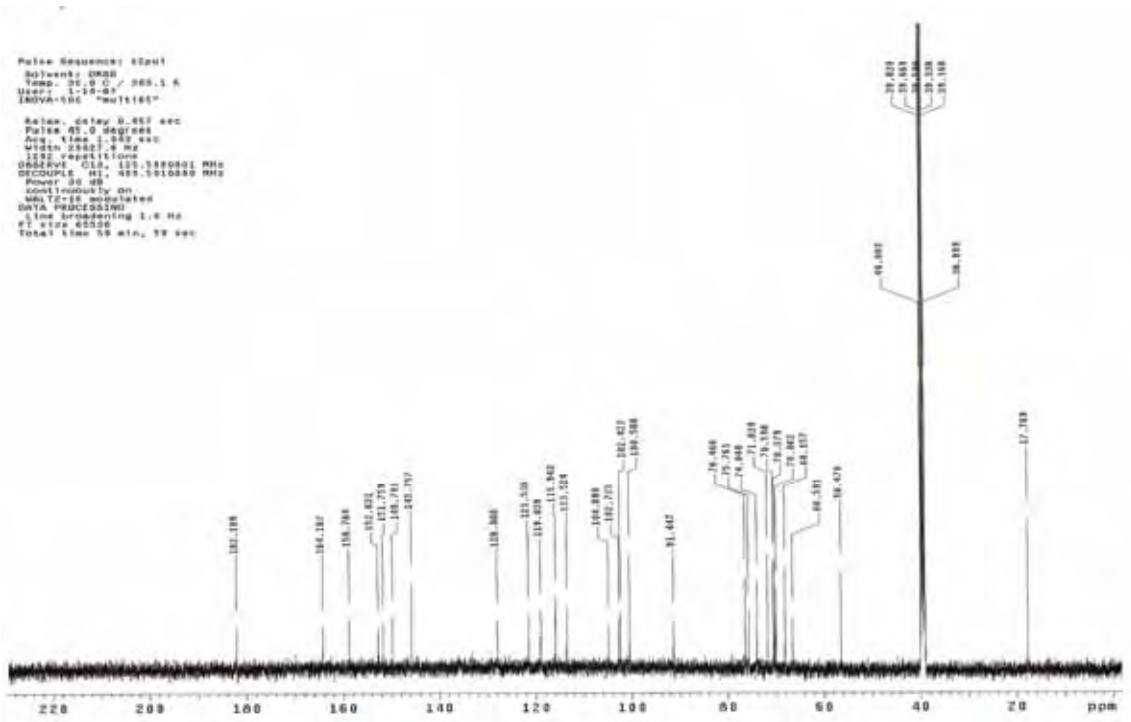


Figura 064. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T)

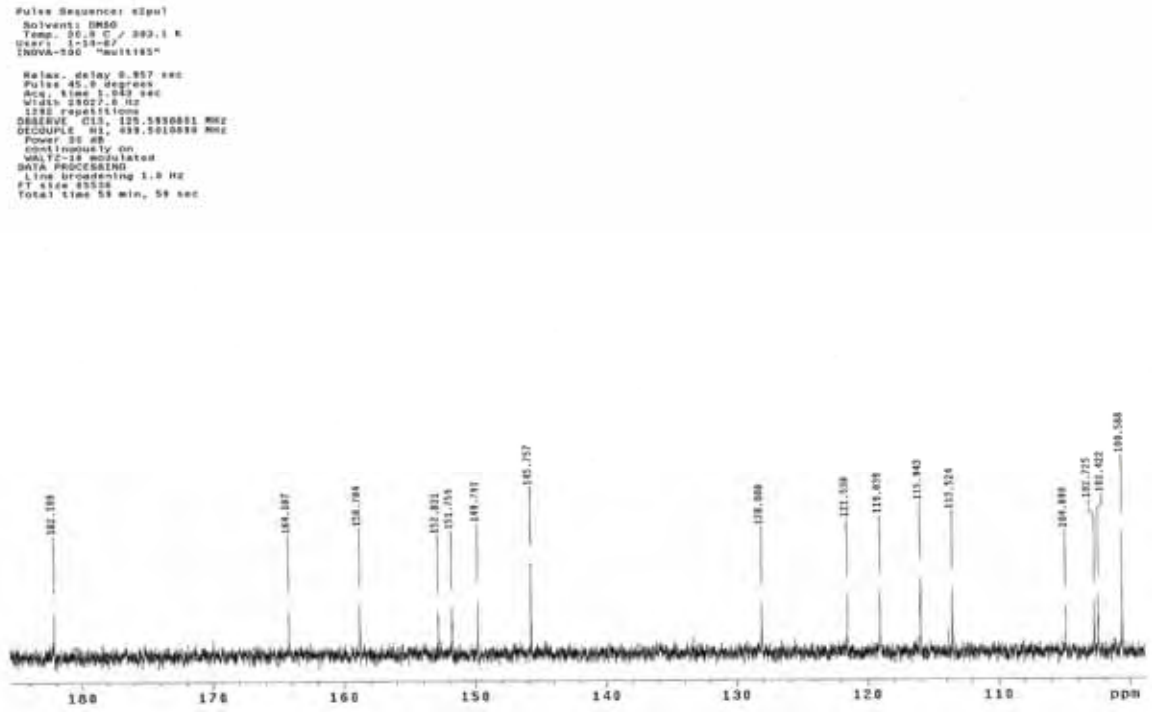


Figura 065. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T)

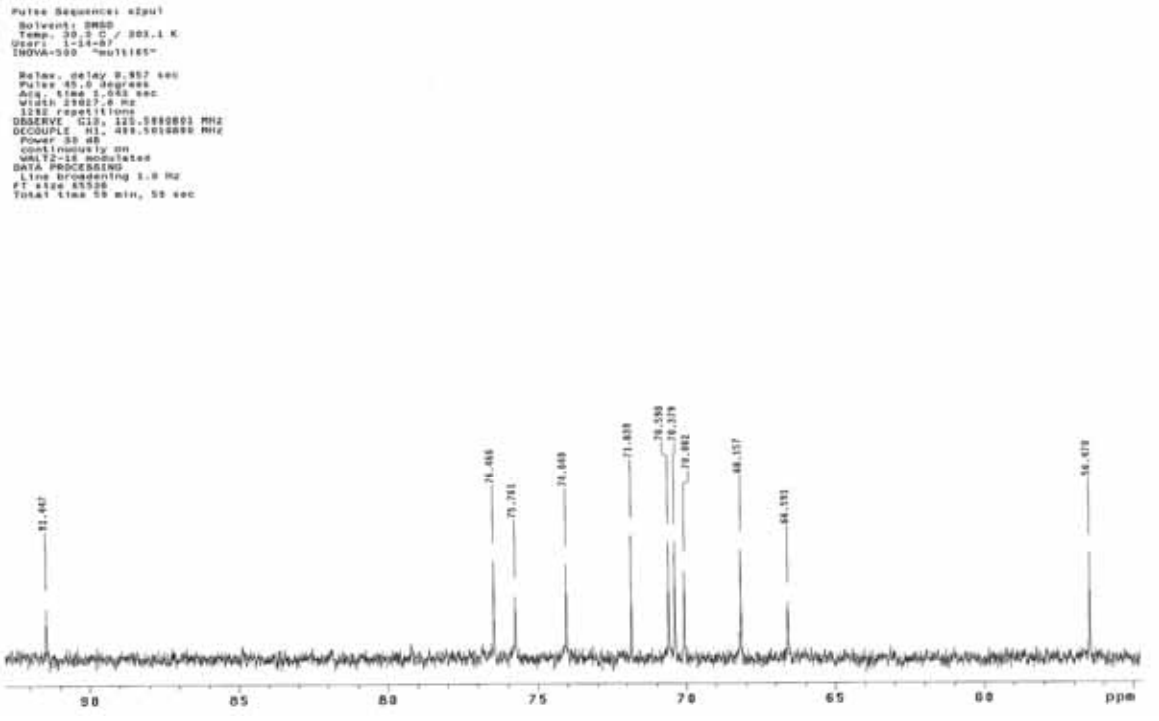


Figura 066. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T)

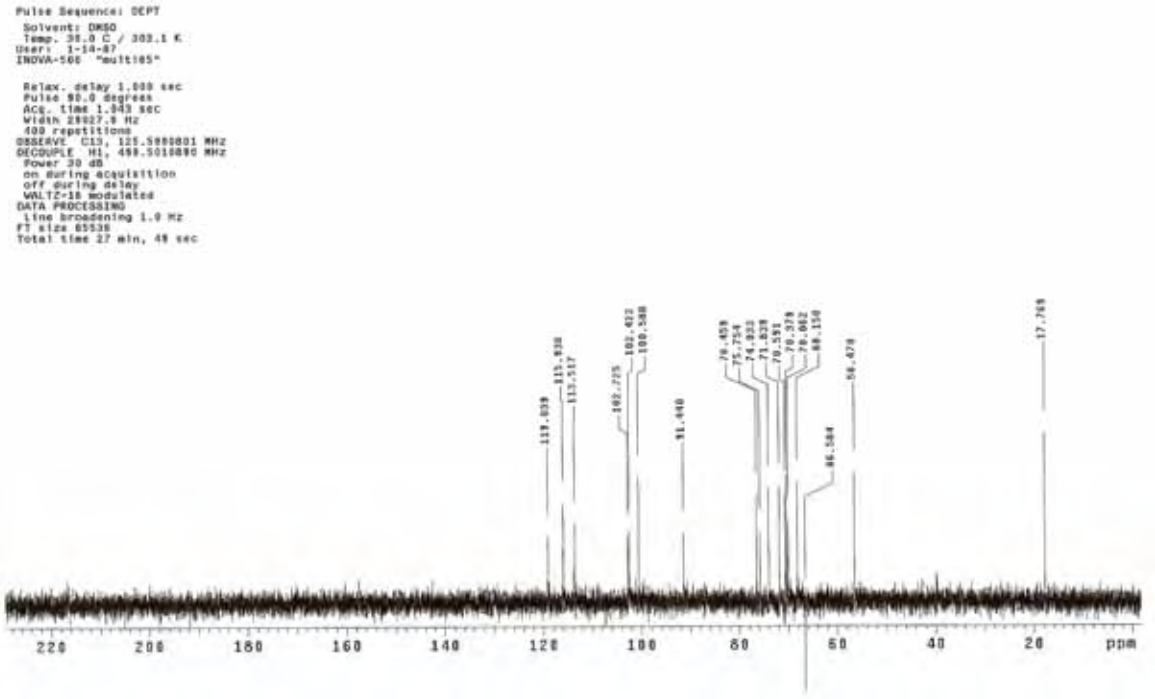


Figura 067. Espectro de DEPT 135° da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T)

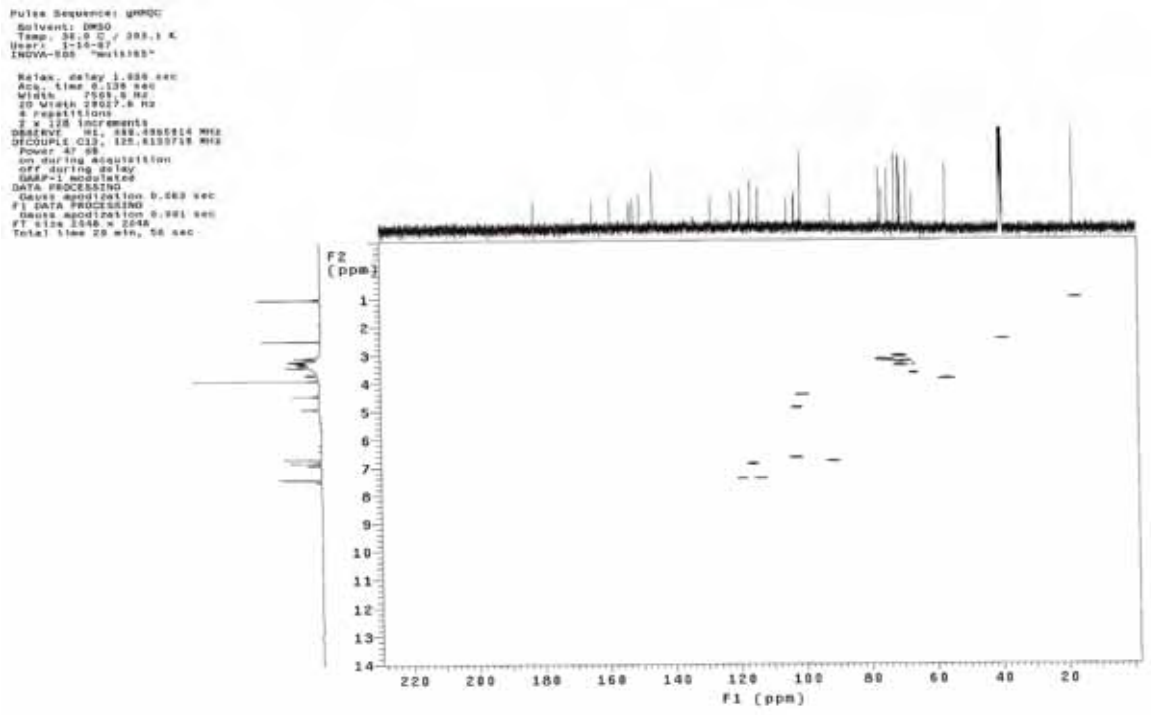


Figura 068. Mapa de contornos *g*HMQC da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T)

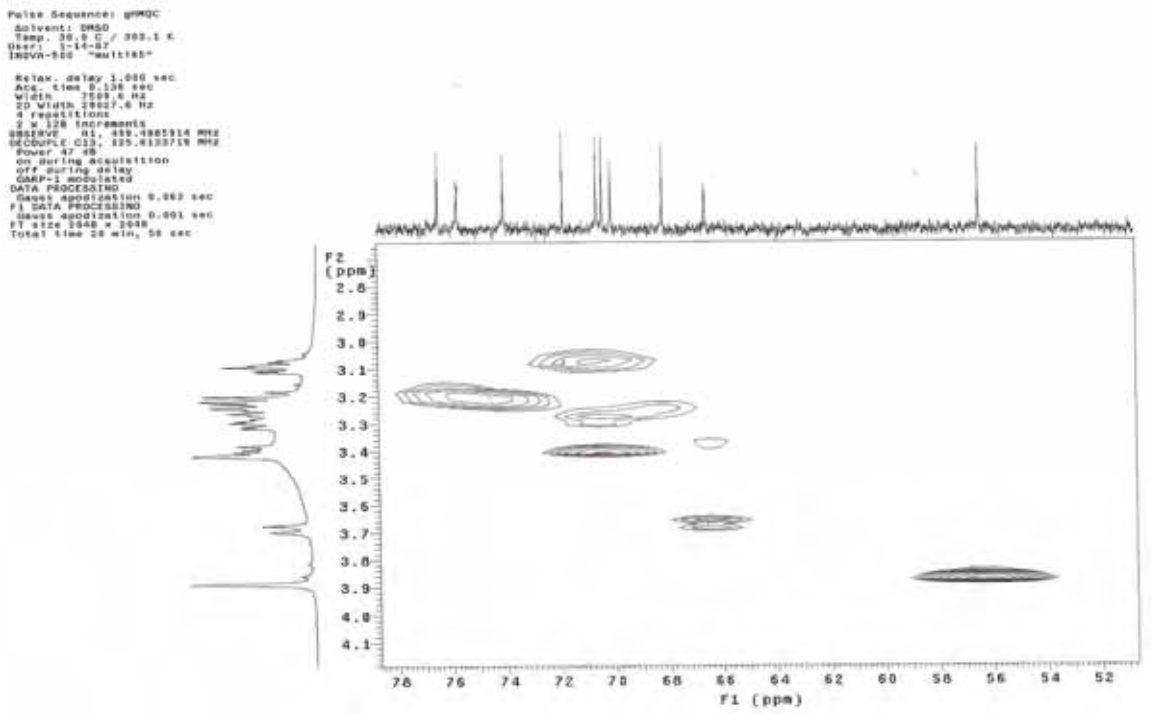


Figura 069. Ampliação do mapa de contornos *g*HMQC da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T)

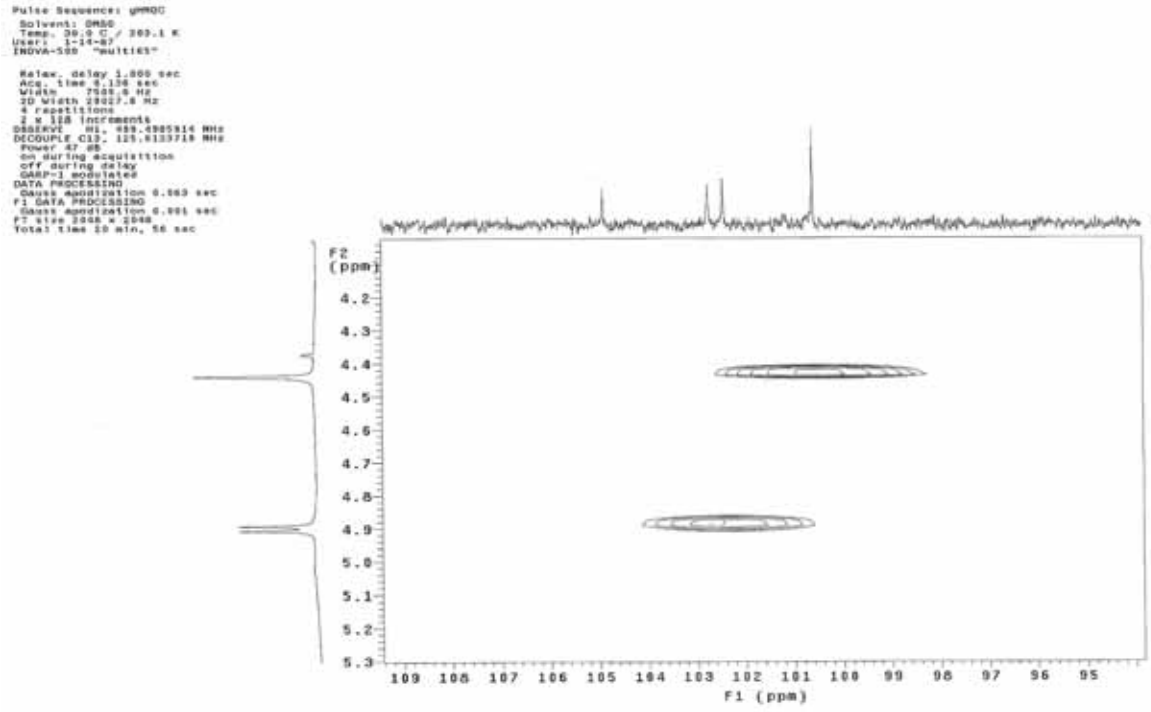


Figura 070. Ampliação do mapa de contornos *g*HMQC da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T)

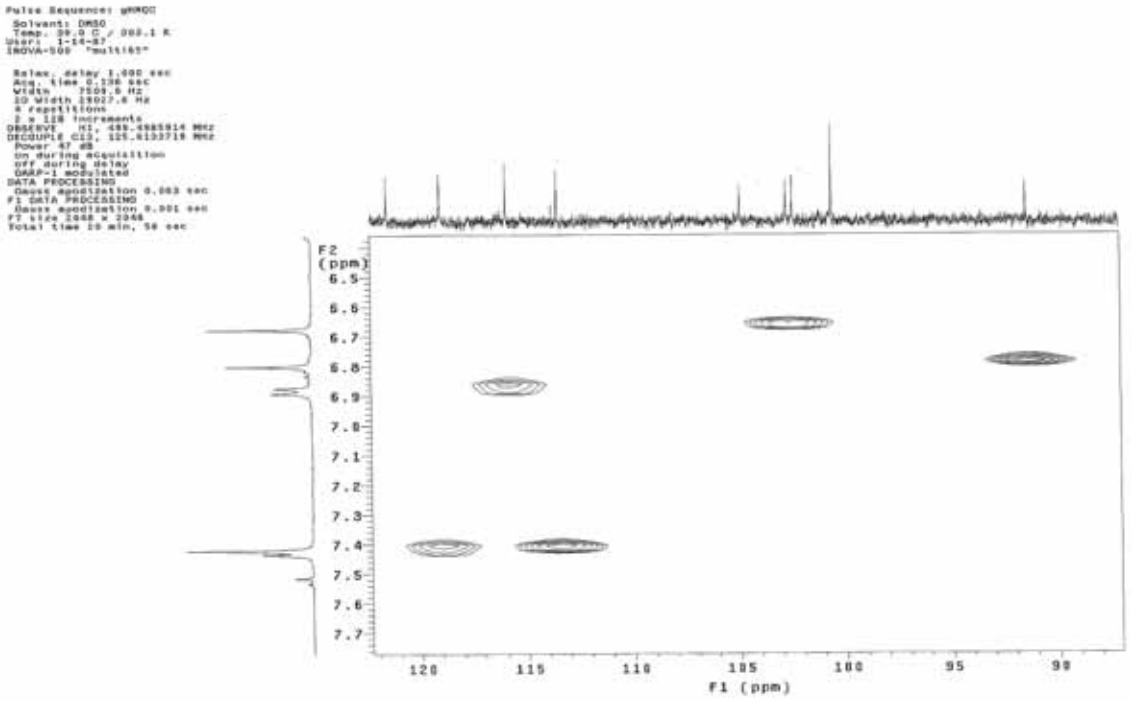


Figura 071. Ampliação do mapa de contornos *g*HMQC da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T)

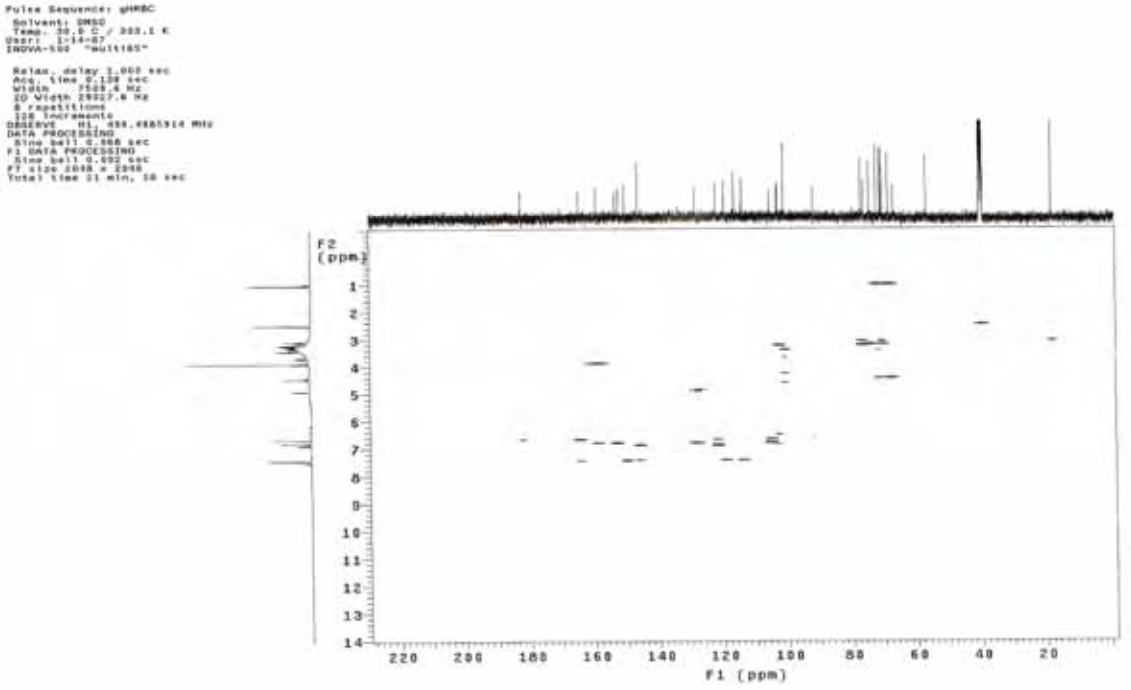


Figura 072. Mapa de contornos *g*HMBC da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T)

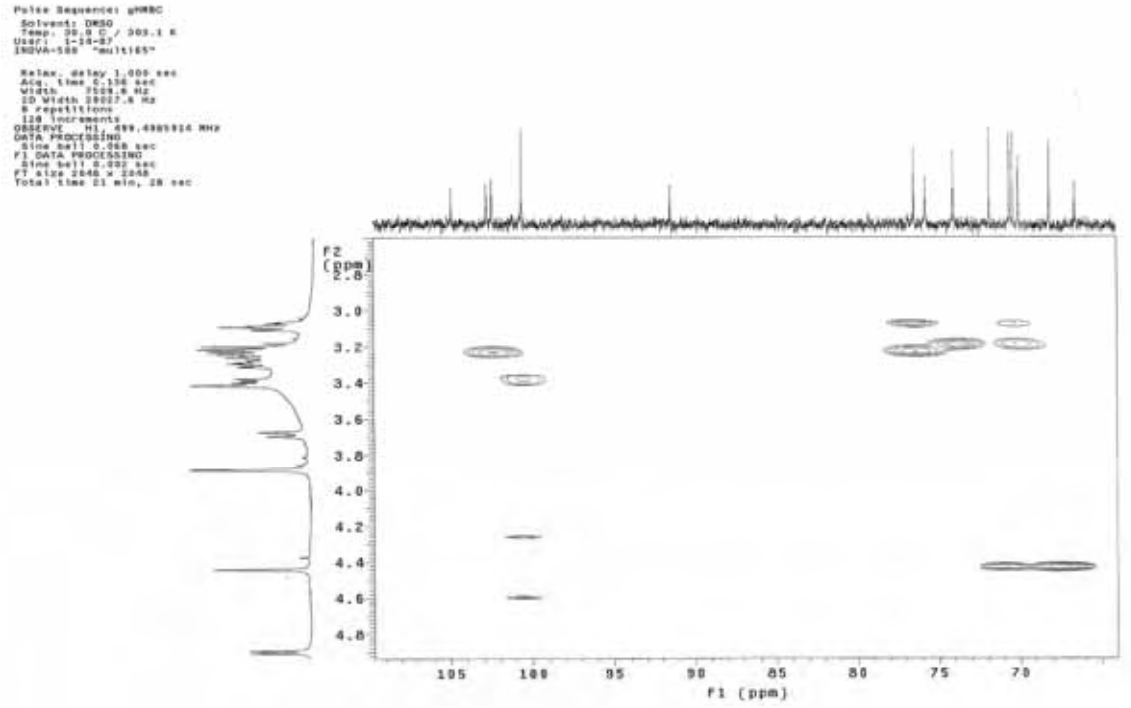


Figura 073. Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T)

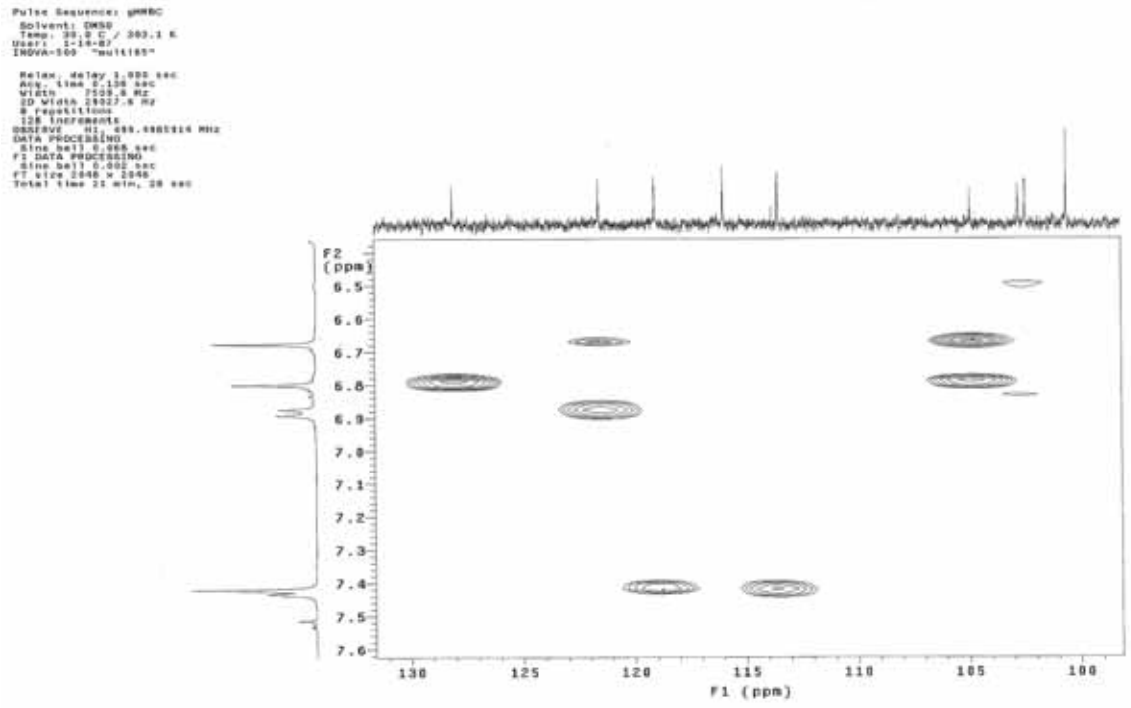


Figura 074. Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T)

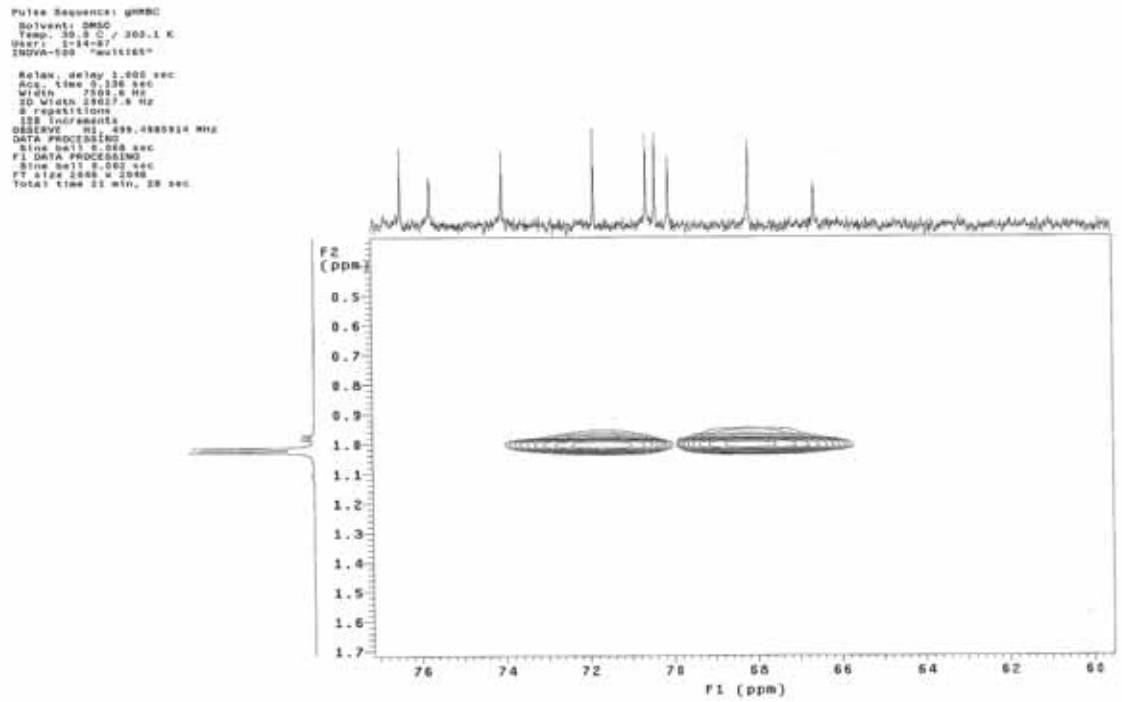


Figura 075. Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T)

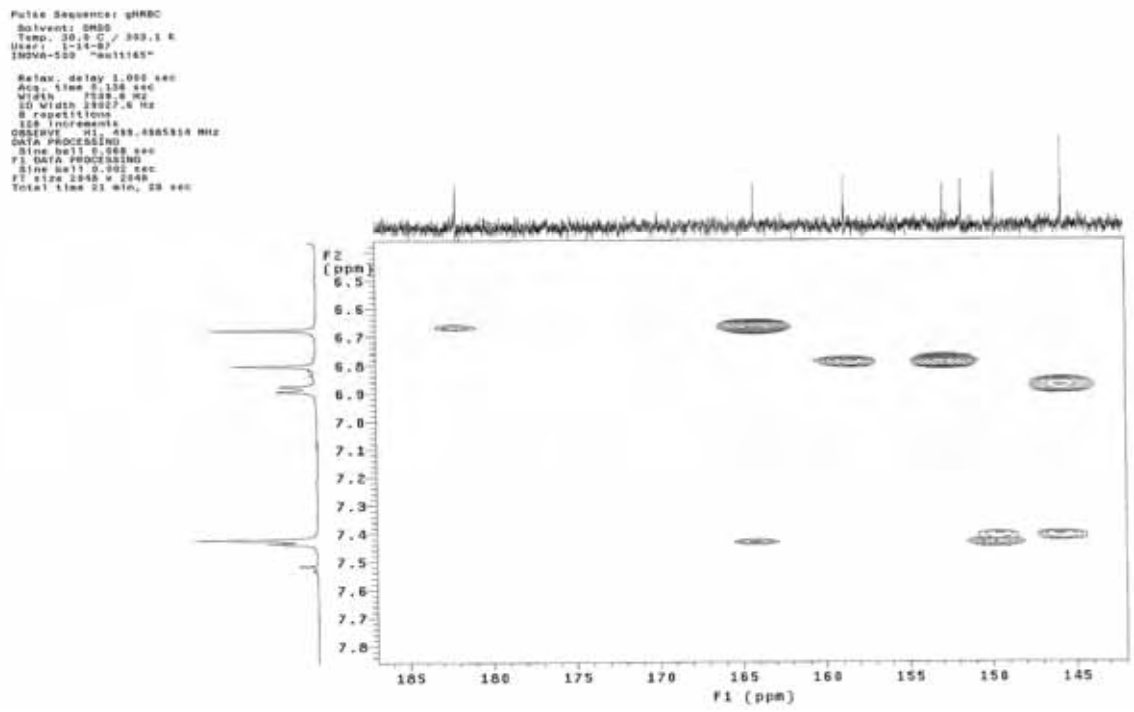


Figura 076. Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T)

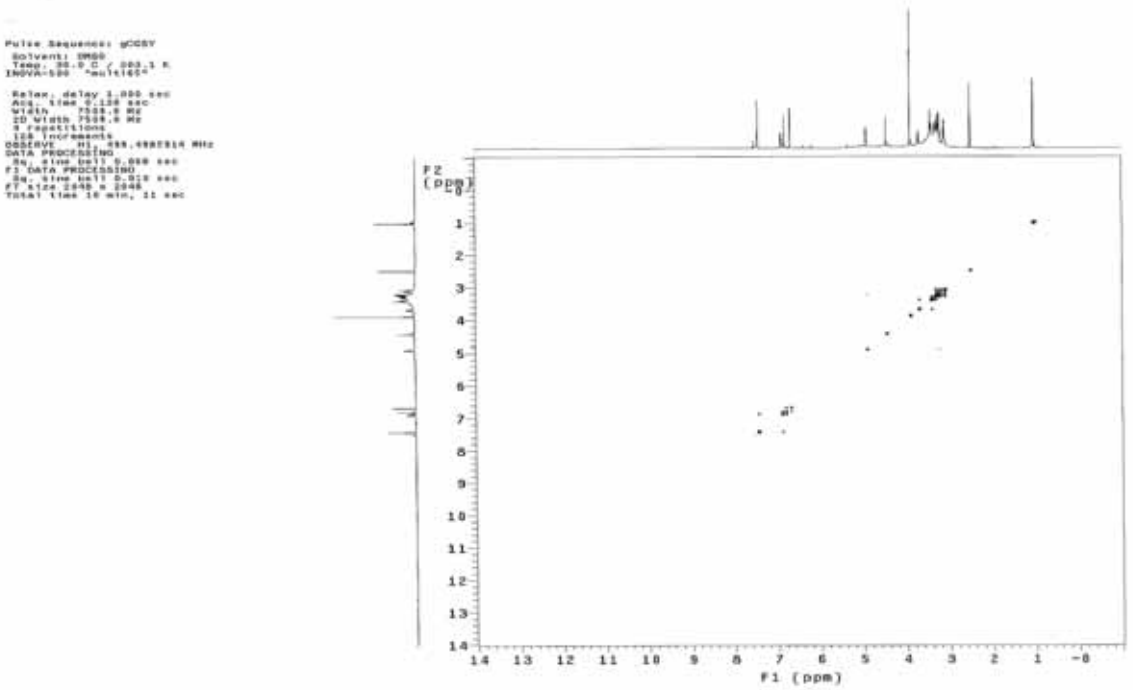


Figura 077. Mapa de contornos ^{1}Hx^{1}H *g*COSY da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T)

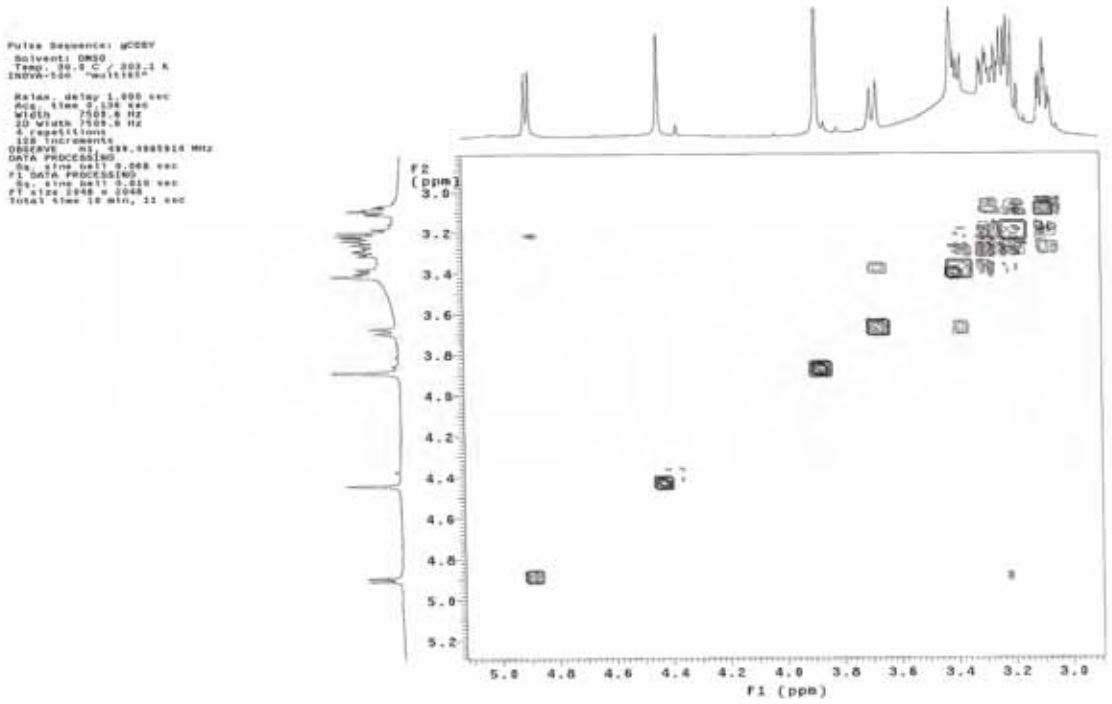


Figura 078. Ampliação do mapa de contornos ^{1}Hx^{1}H *g*COSY da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T)

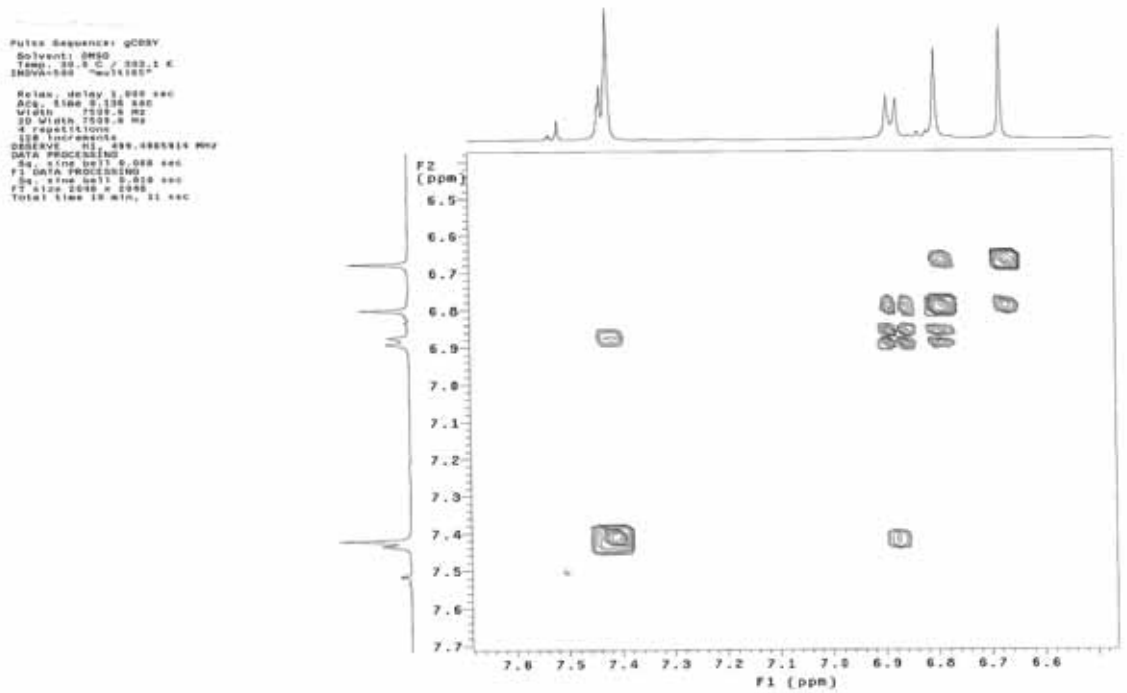


Figura 079. Ampliação do mapa de contornos ^{1}Hx^{1}H *g*COSY da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T)

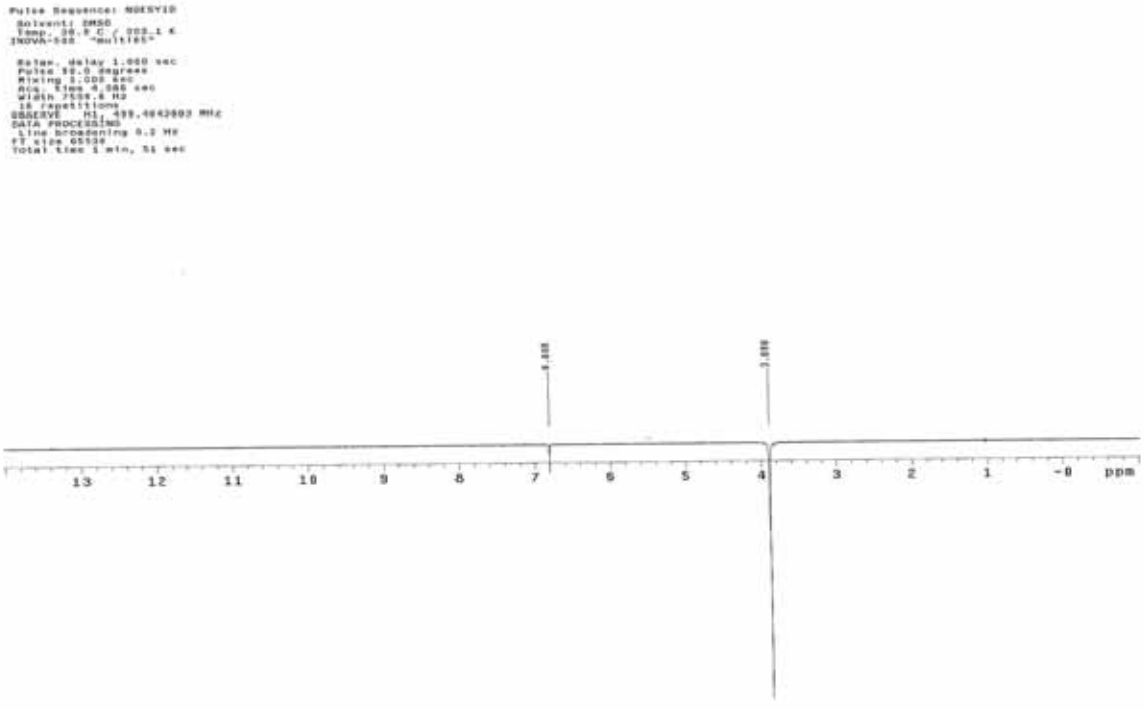


Figura 080. Espectro de NOESY 1D da substância **47** (DMSO-d_6, 11,7 T)

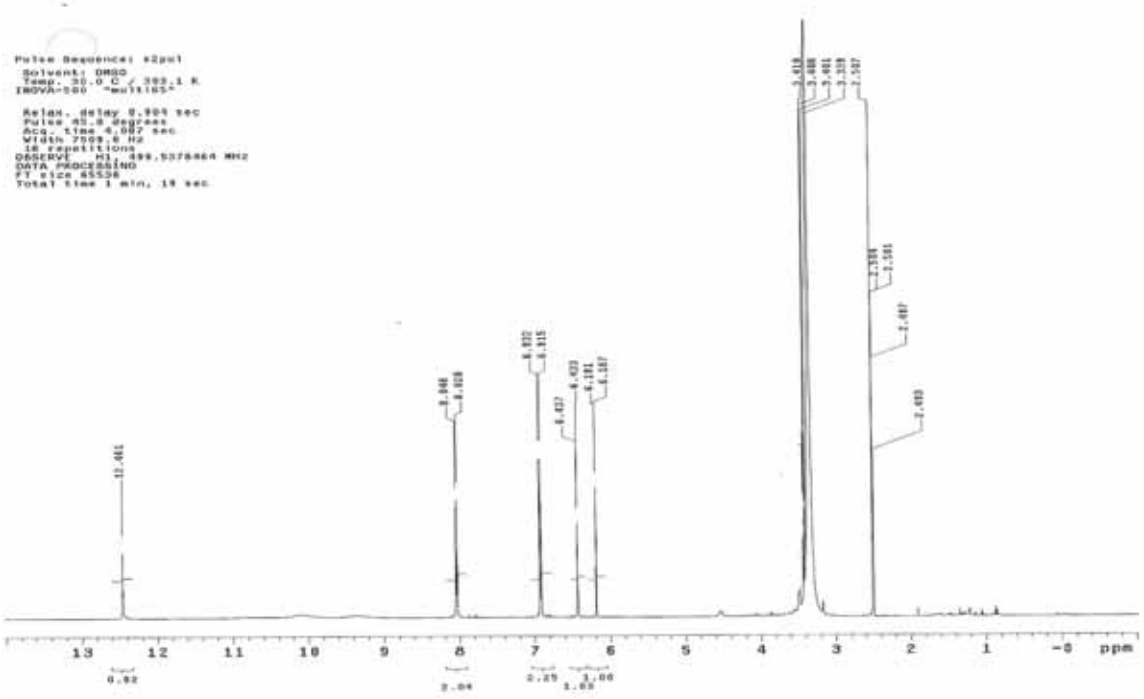


Figura 081. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **48** (DMSO-d_6, 11,7 T)

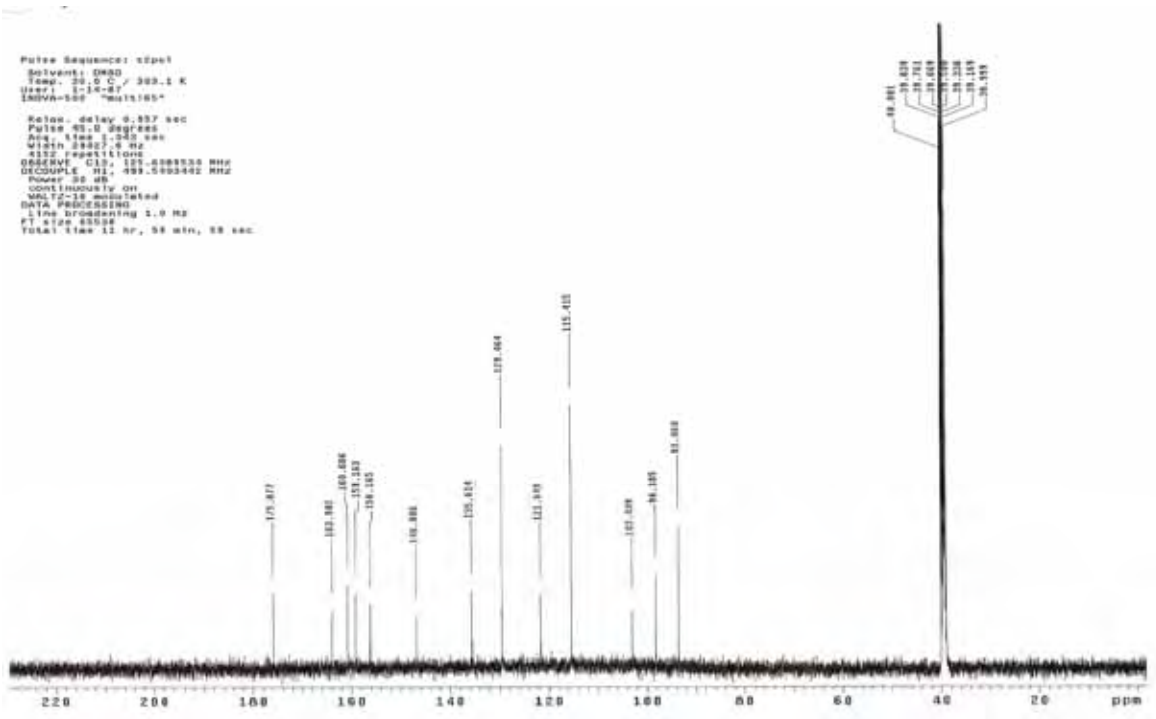


Figura 082. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **48** (DMSO-d_6, 11,7 T)

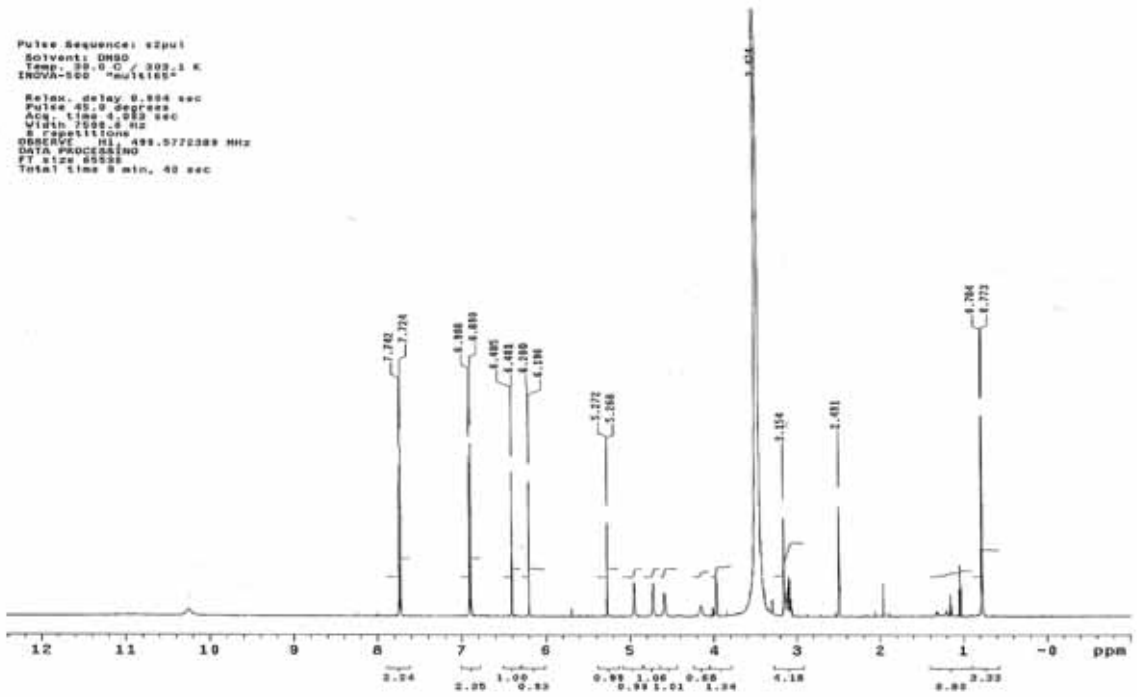


Figura 083. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **49** (DMSO-d_6, 11,7 T)

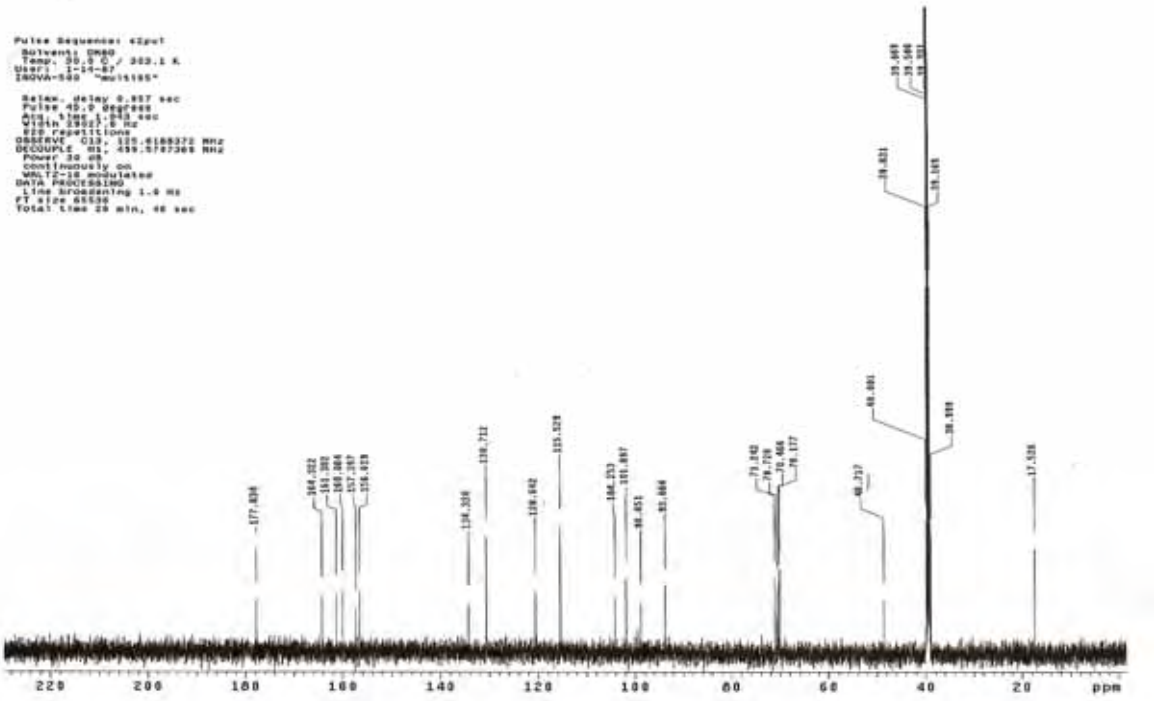


Figura 084. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **49** (DMSO-d_6, 11,7 T)

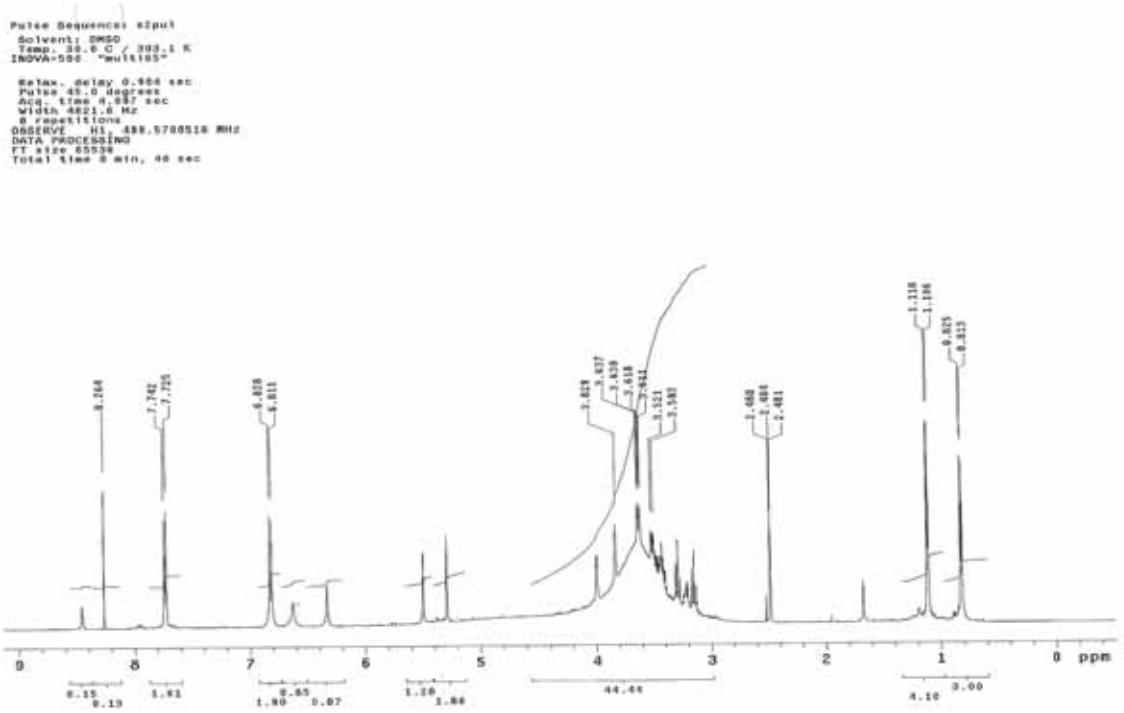


Figura 085. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **50** (DMSO-d_6, 11,7 T)

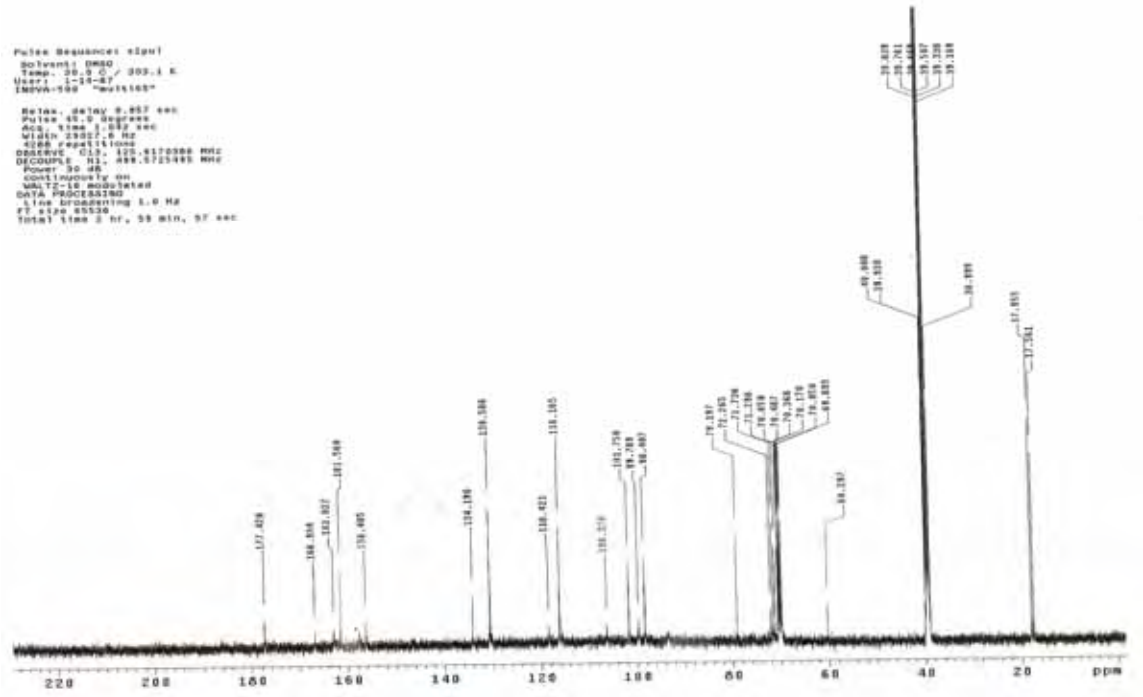


Figura 086. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **50** (DMSO-d_6, 11,7 T)

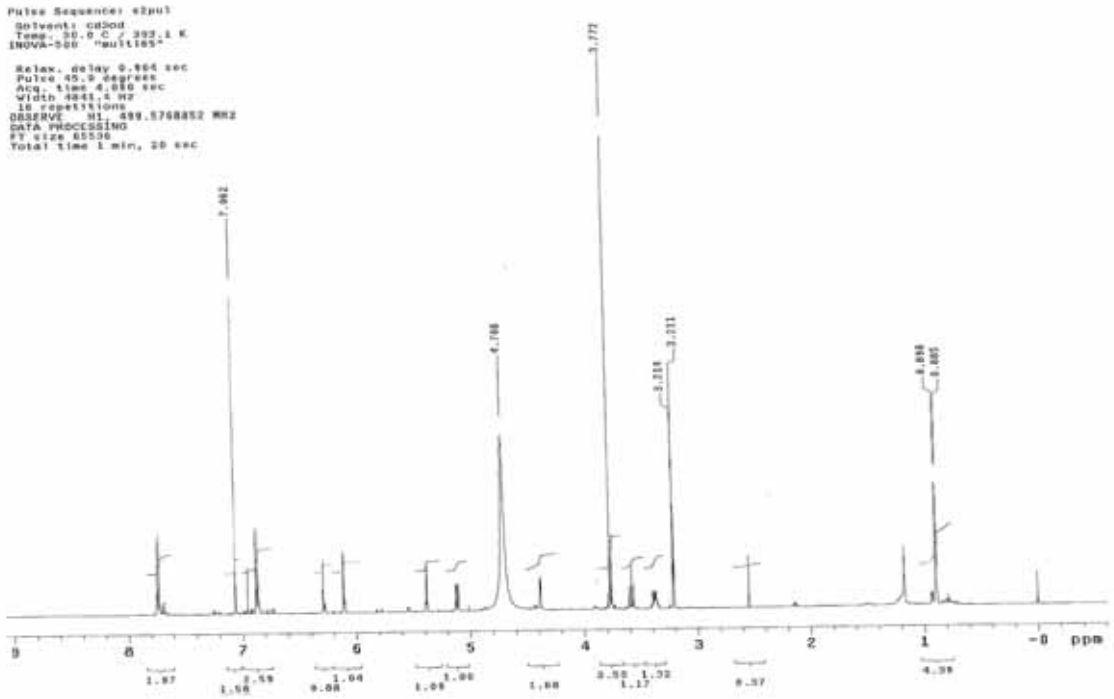


Figura 087. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **51** (CD_3OD, 11,7 T)

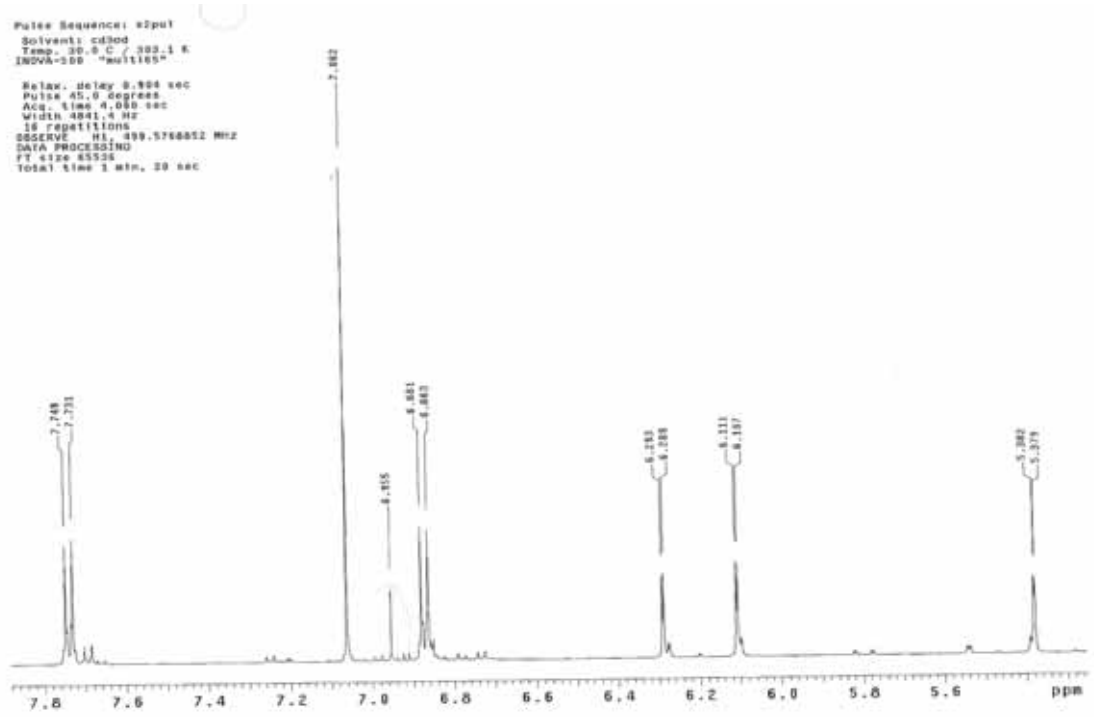


Figura 088. Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da substância **51** (CD_3OD, 11,7 T)

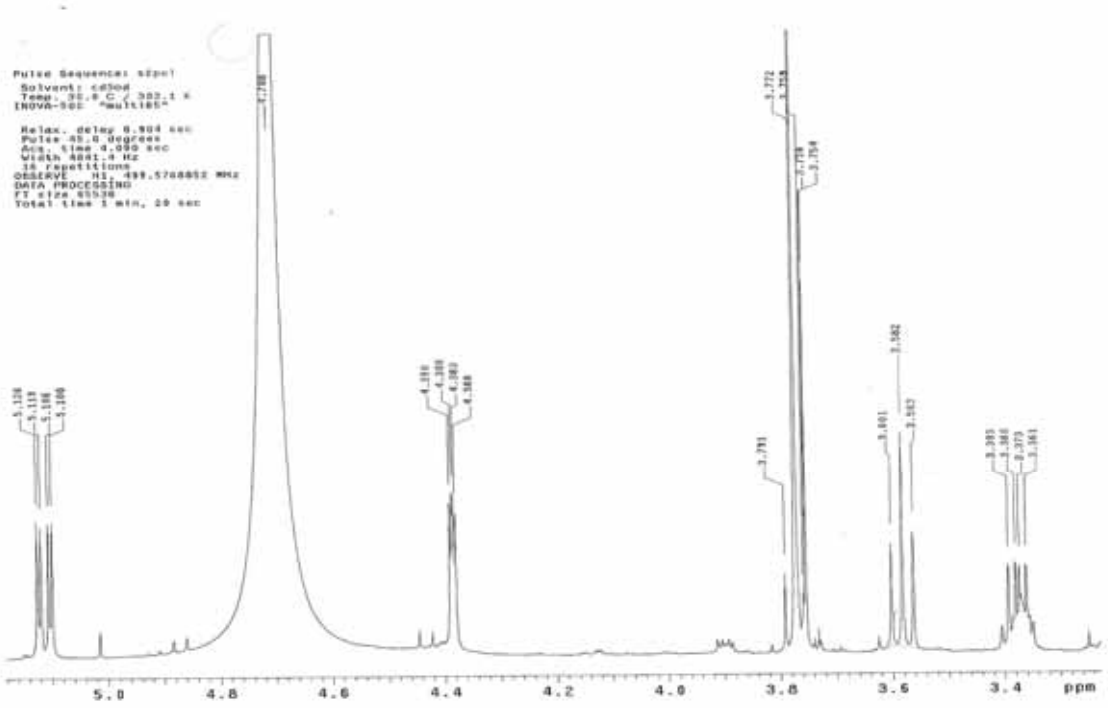


Figura 089. Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da substância **51** (CD_3OD, 11,7 T)

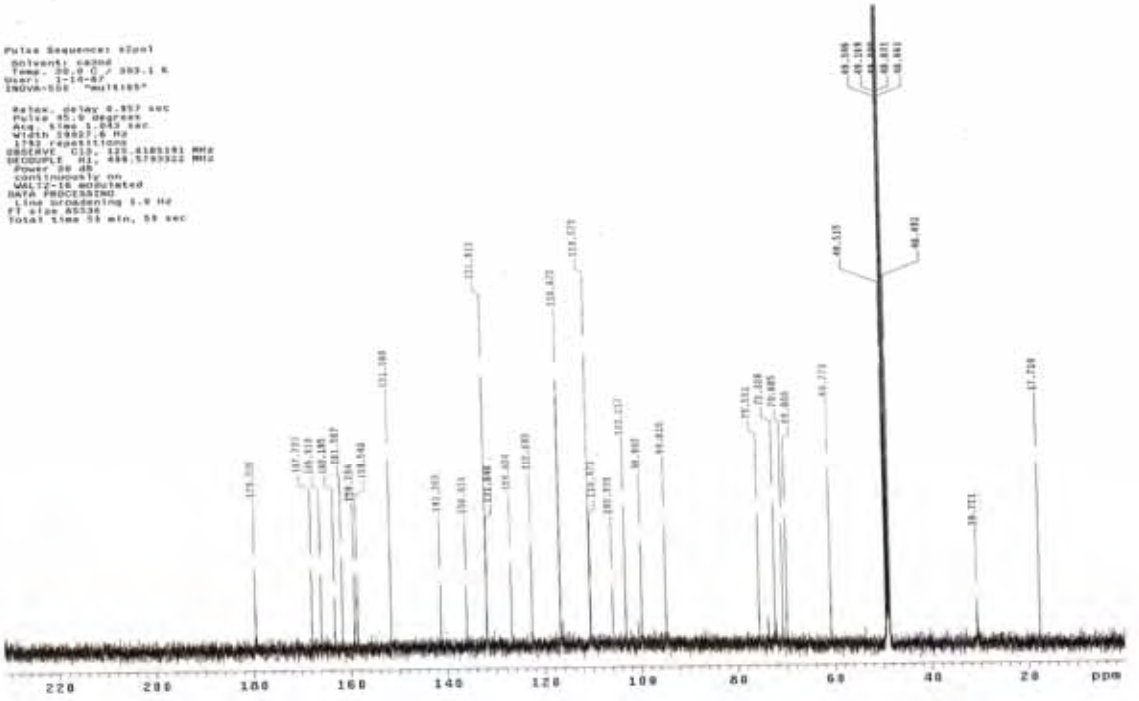


Figura 090. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **51** (CD_3OD, 11,7 T)

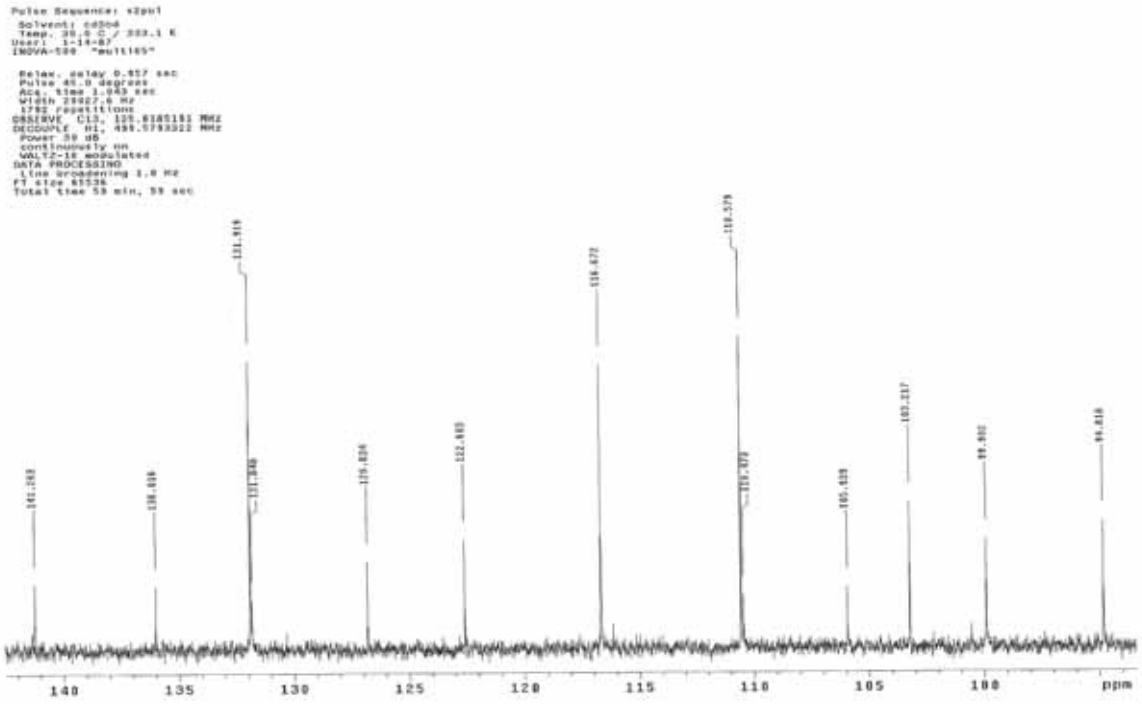


Figura 091. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **51** (CD_3OD, 11,7 T)

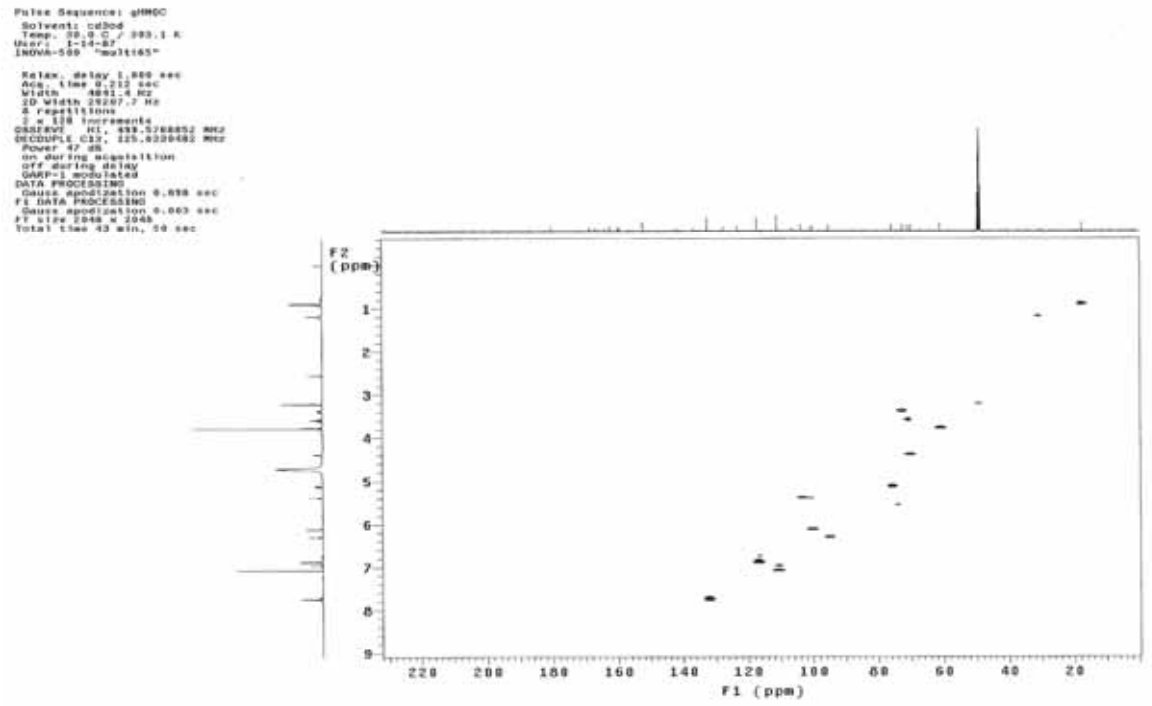


Figura 092. Mapa de contornos *g*HMQC da substância **51** (CD_3OD, 11,7 T)

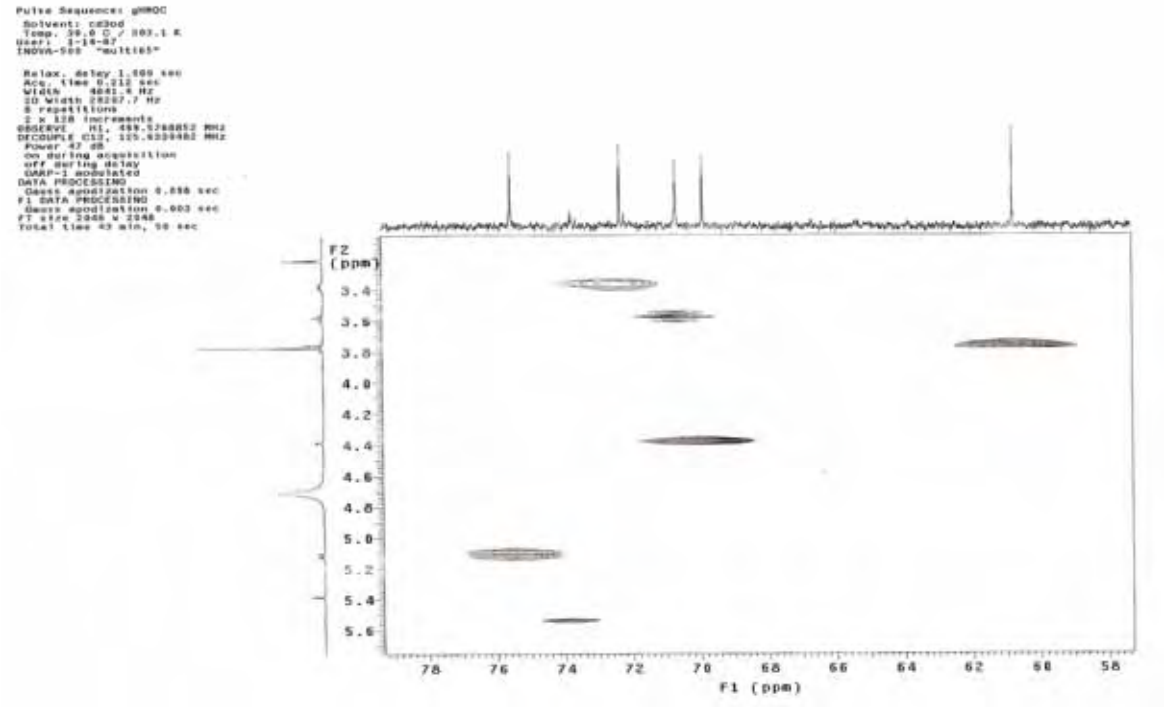


Figura 093. Ampliação do mapa de contornos *g*HMQC da substância **51** (CD_3OD, 11,7 T)

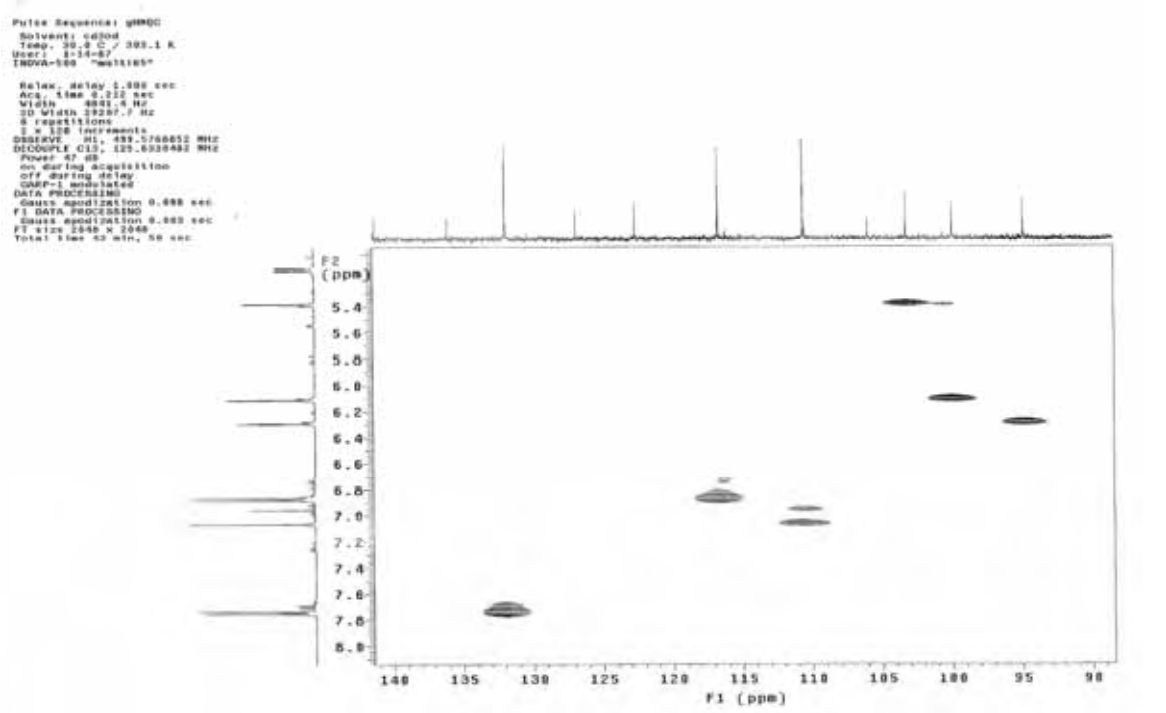


Figura 094. Ampliação do mapa de contornos *g*HMQC da substância **51** (CD_3OD, 11,7 T)

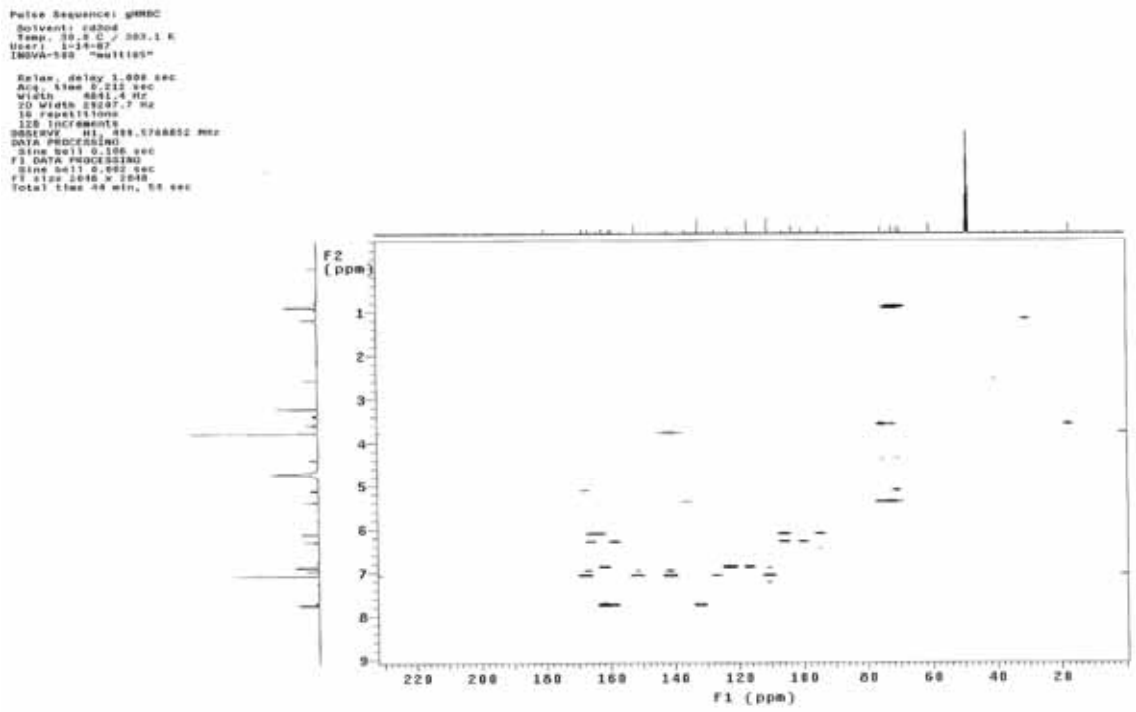


Figura 095. Mapa de contornos *g*HMBC da substância **51** (CD_3OD, 11,7 T)

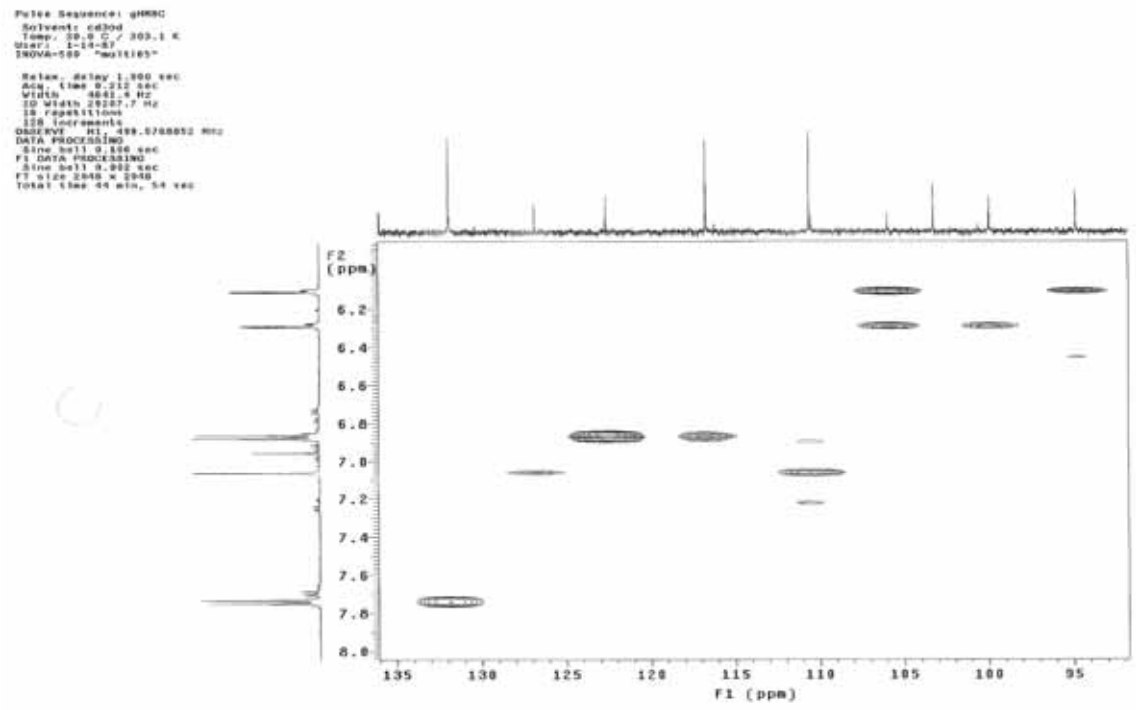


Figura 096. Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **51** (CD_3OD, 11,7 T)

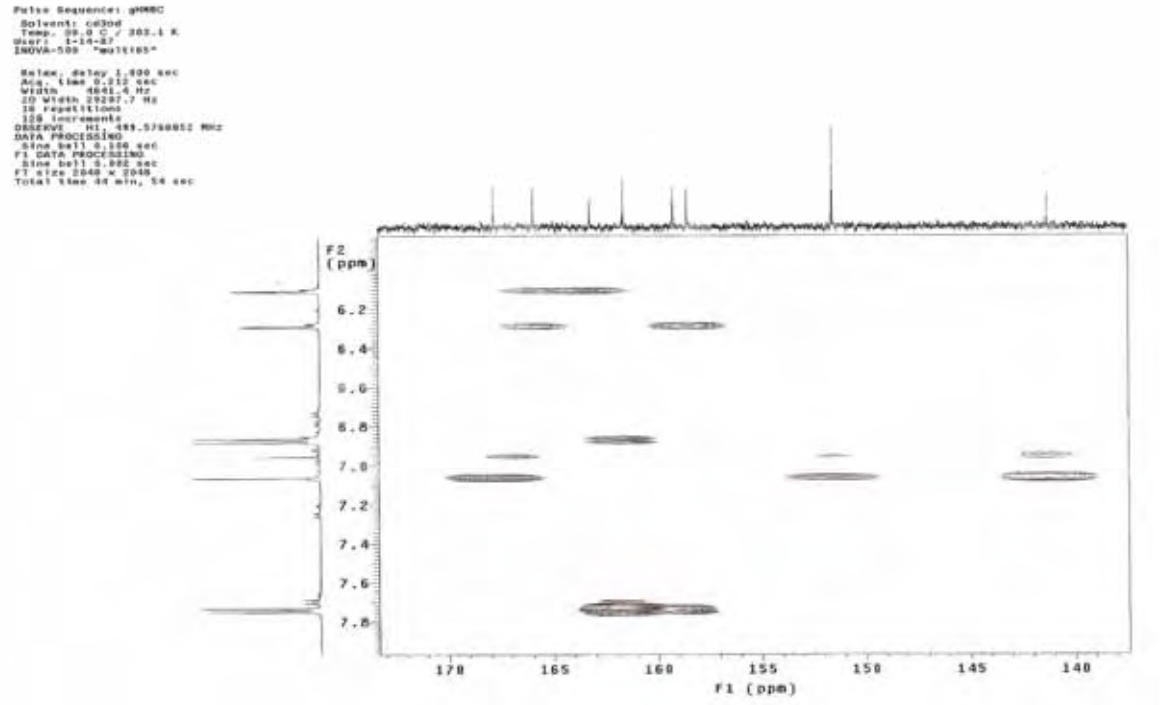


Figura 097. Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **51** (CD_3OD, 11,7 T)

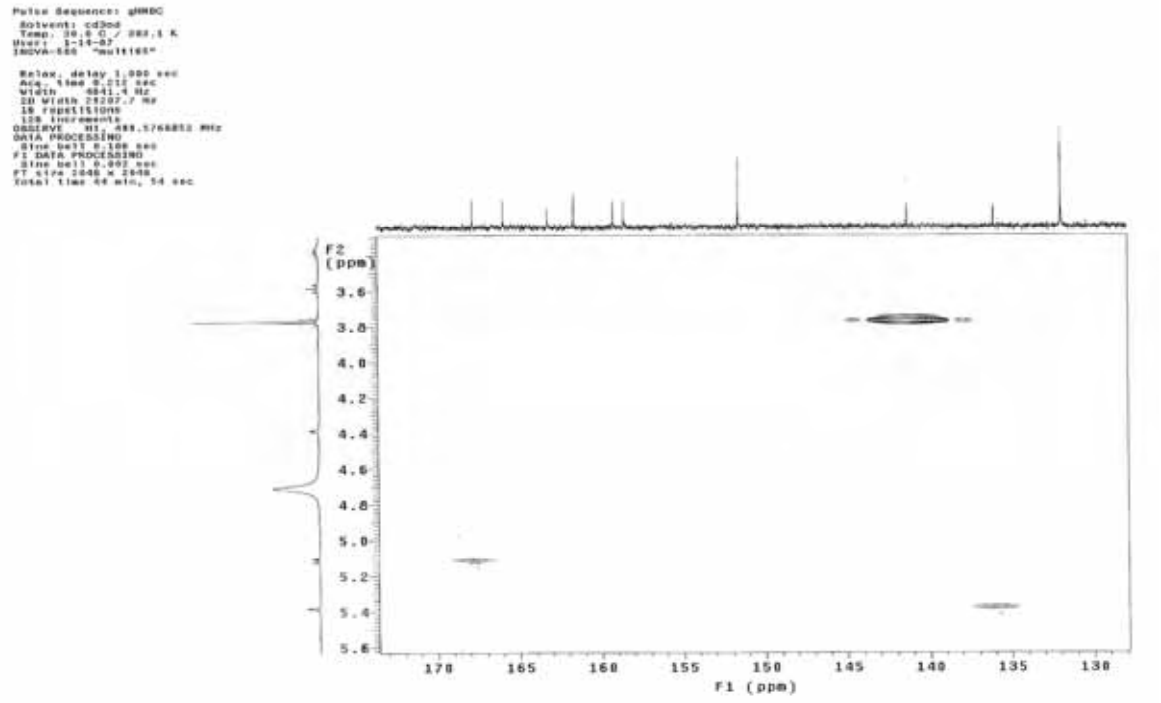


Figura 098. Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **51** (CD_3OD, 11,7 T)

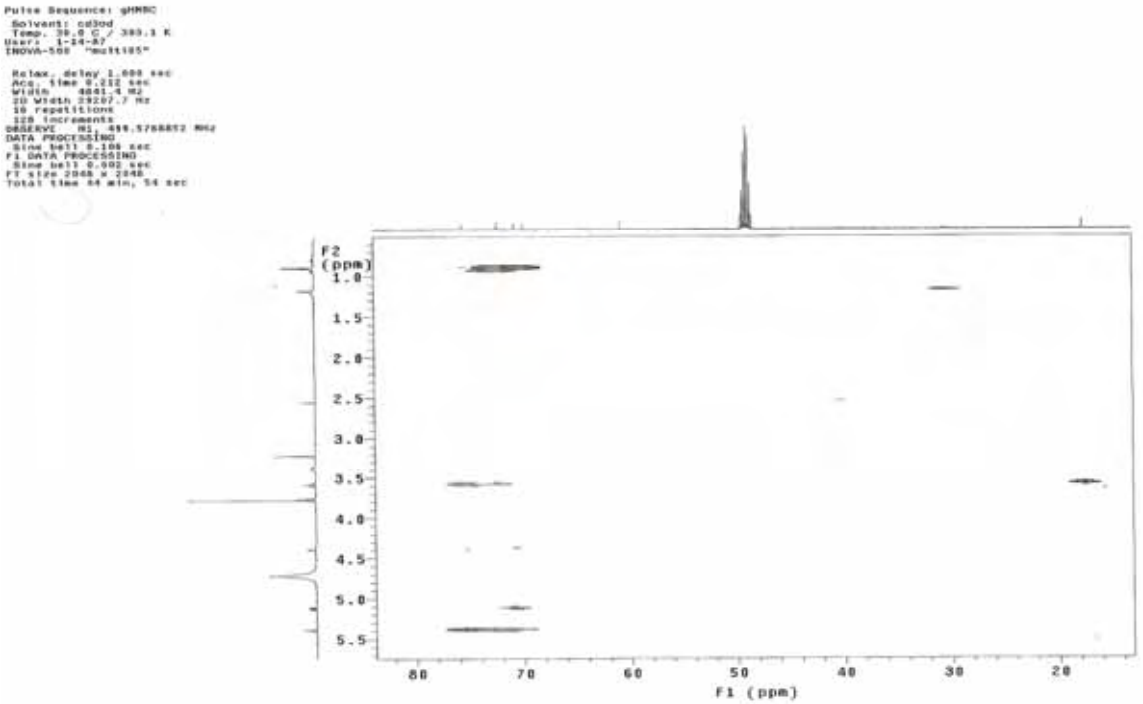


Figura 099. Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC da substância **51** (CD_3OD, 11,7 T)

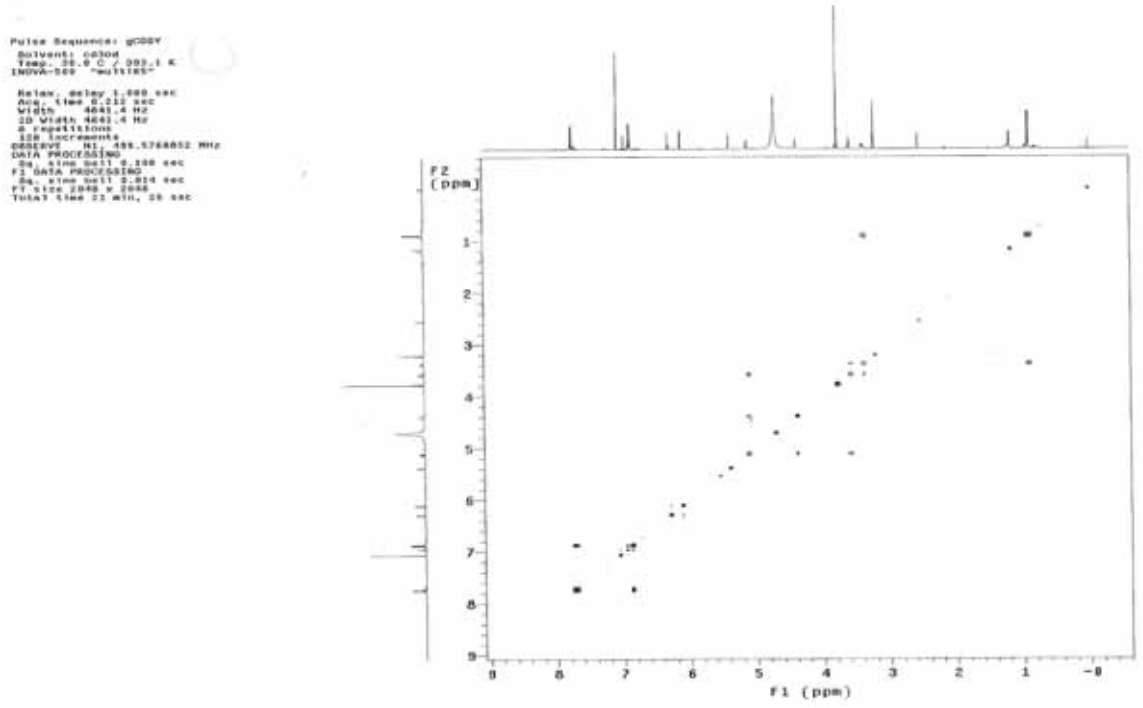


Figura 100. Mapa de contornos $^{1}Hx^{1}H$ *g*COSY da substância **51** (CD_3OD, 11,7 T)

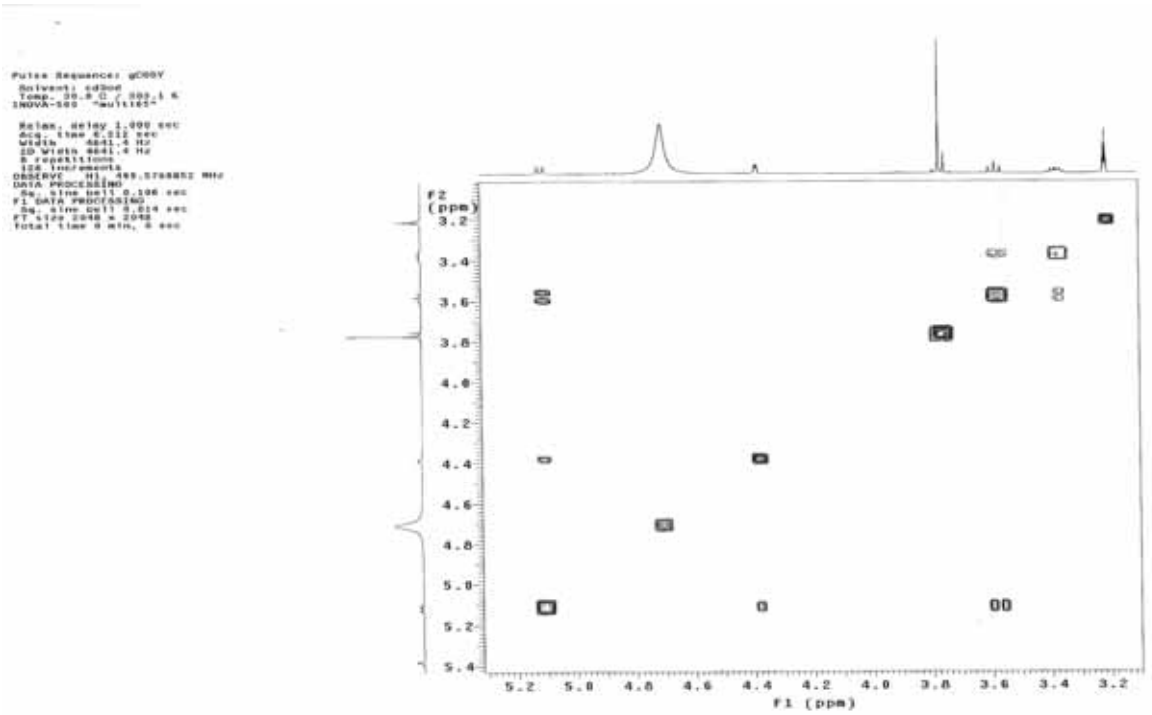


Figura 101. Ampliação do mapa de contornos ^{1}Hx^{1}H *g*COSY da substância **51** (CD_3OD, 11,7 T)

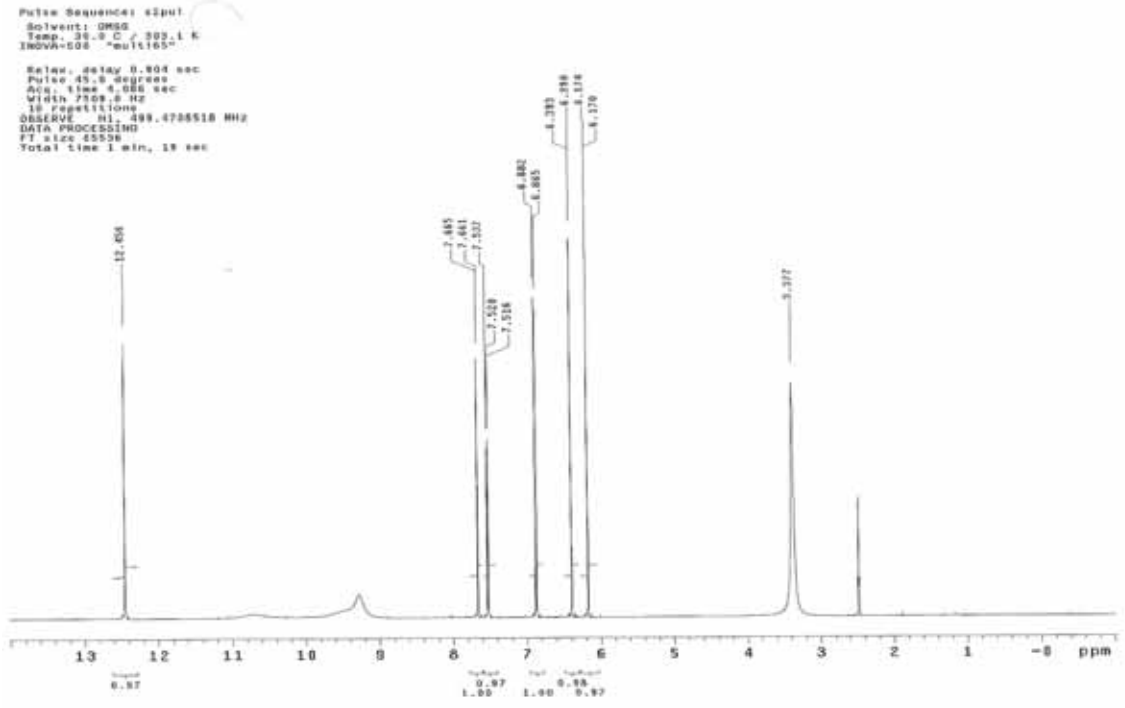


Figura 102. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **52** (DMSO-d_6, 11,7 T)

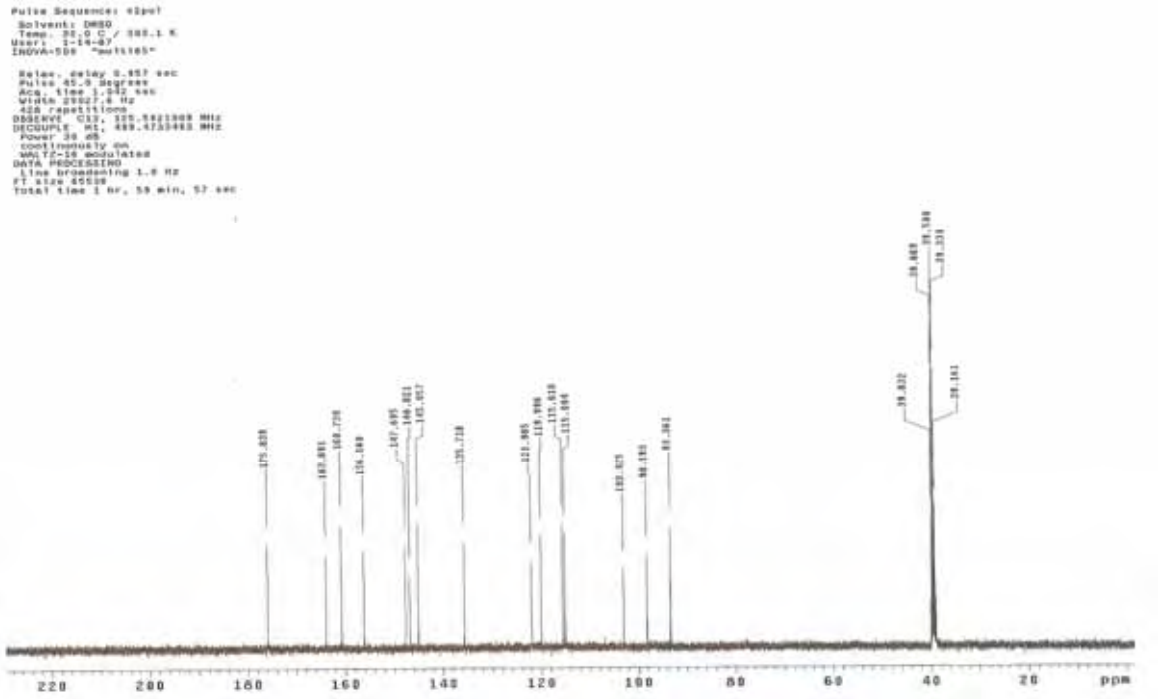


Figura 103. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **52** (DMSO-d_6, 11,7 T)

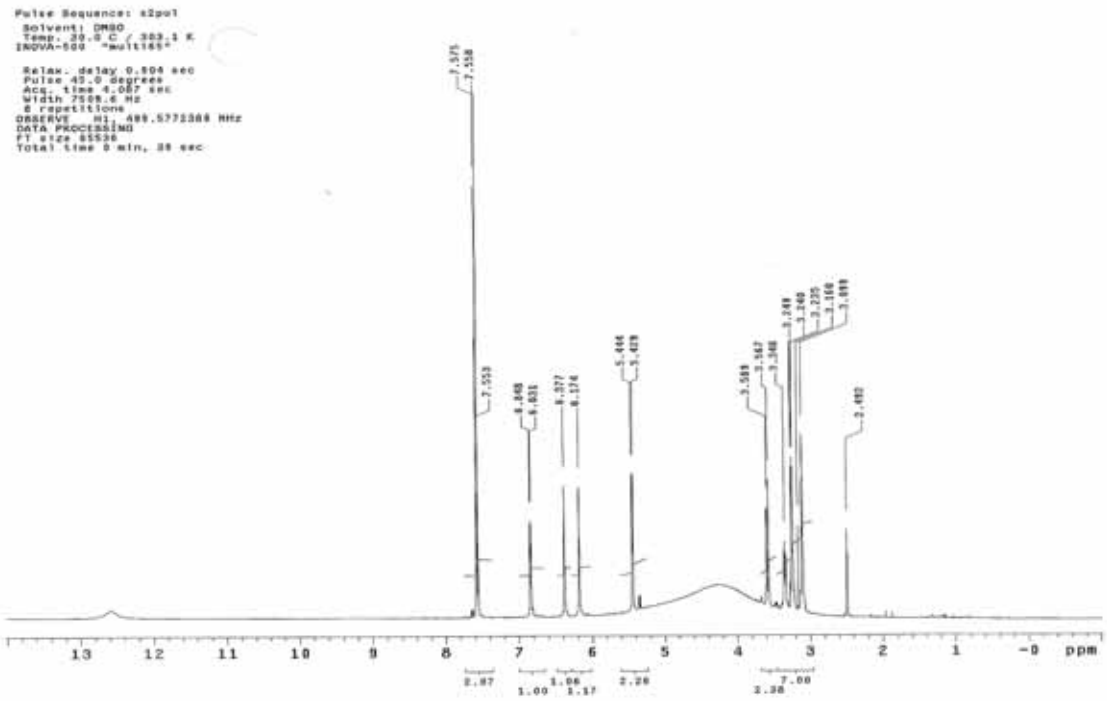


Figura 104. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **53** (DMSO-d_6, 11,7 T)

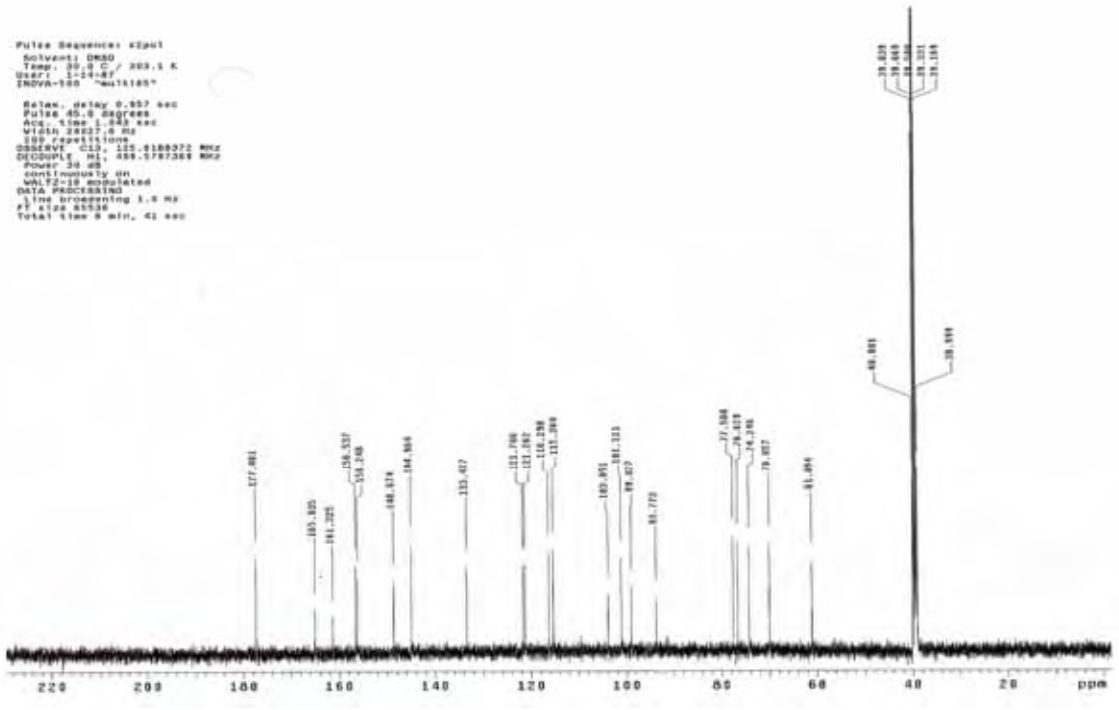


Figura 105. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **53** (DMSO-d_6, 11,7 T)

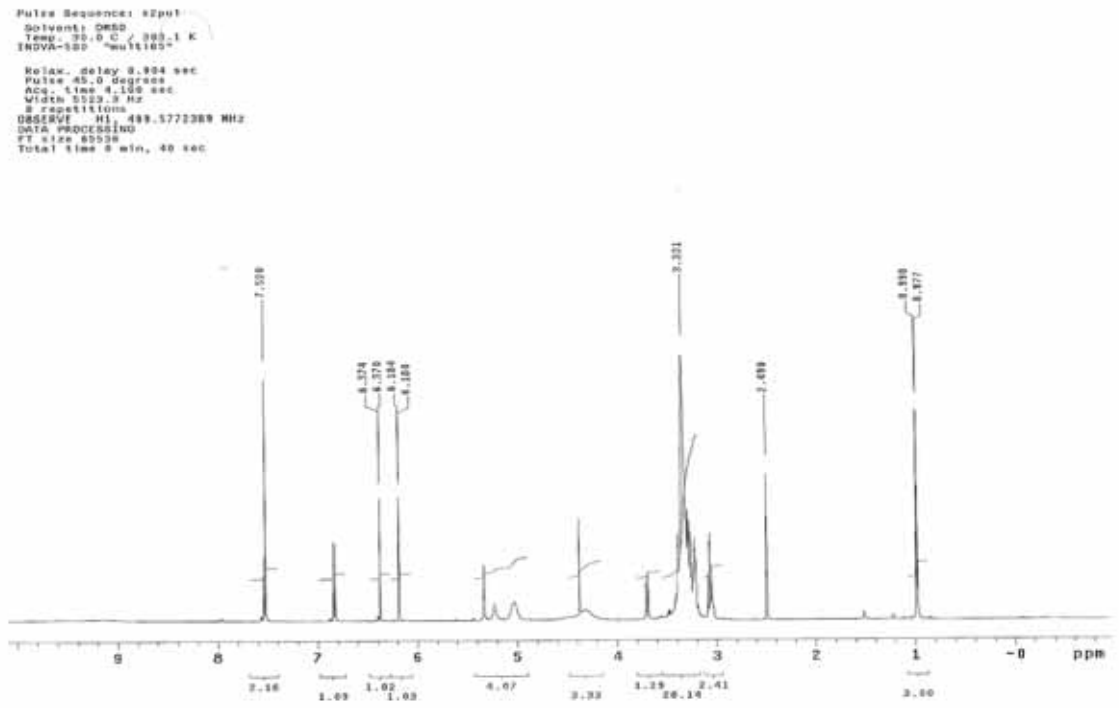


Figura 106. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **54** (DMSO-d_6, 11,7 T)

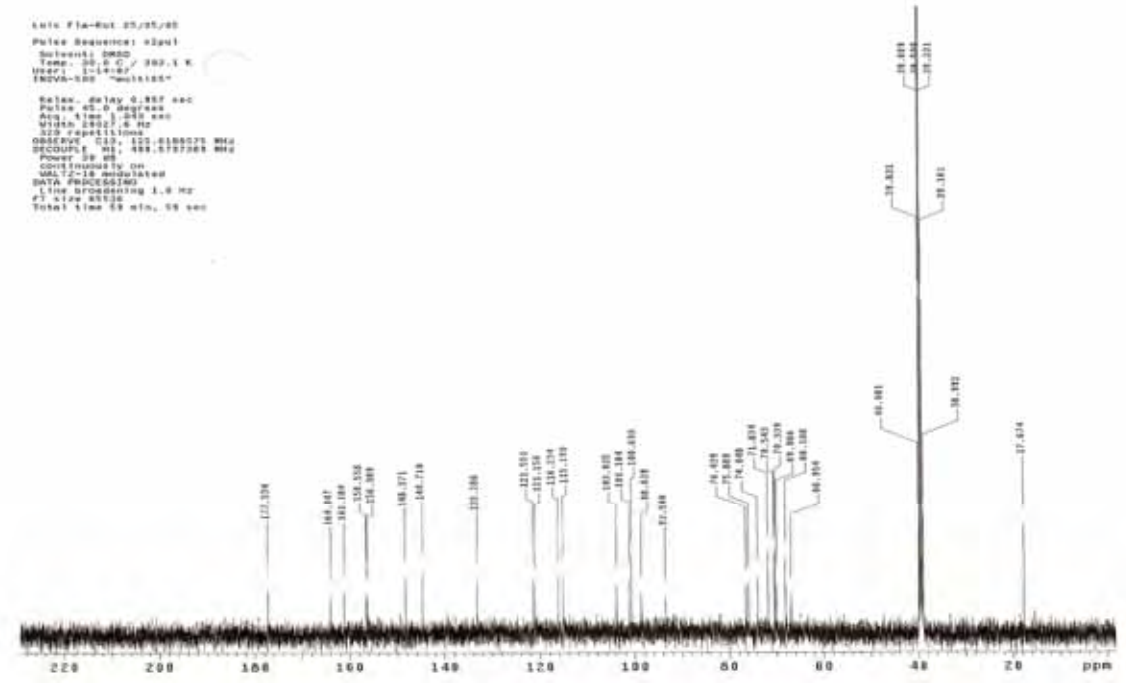


Figura 107. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **54** (DMSO-d_6, 11,7 T)

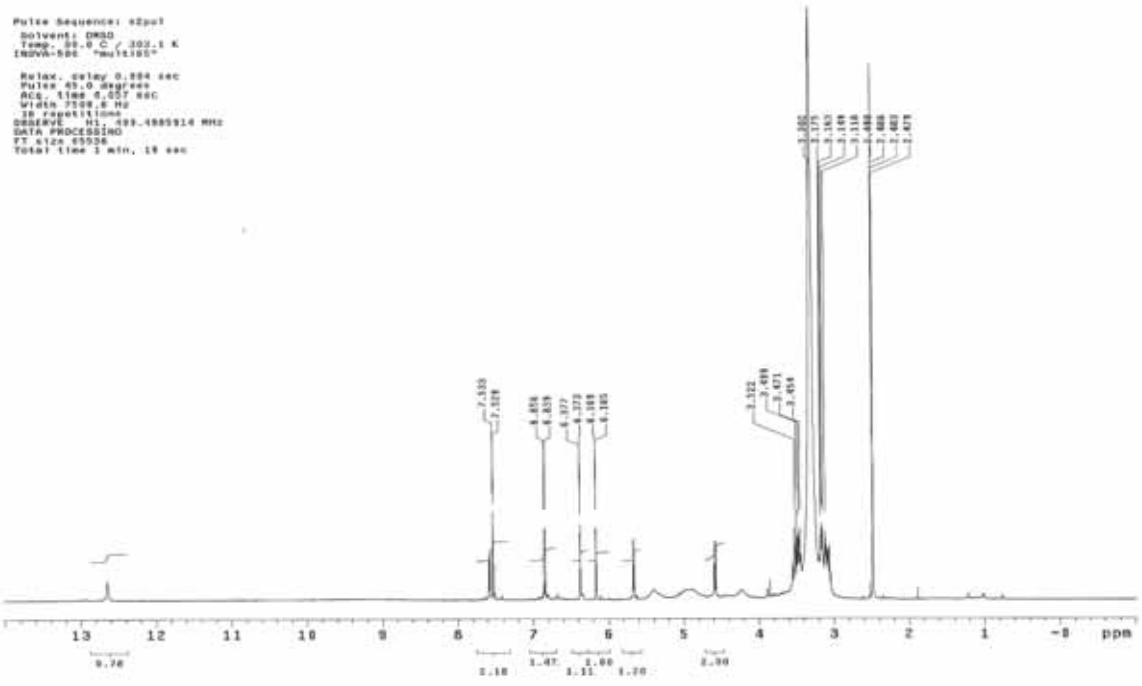


Figura 108. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **55** (DMSO-d_6, 11,7 T)

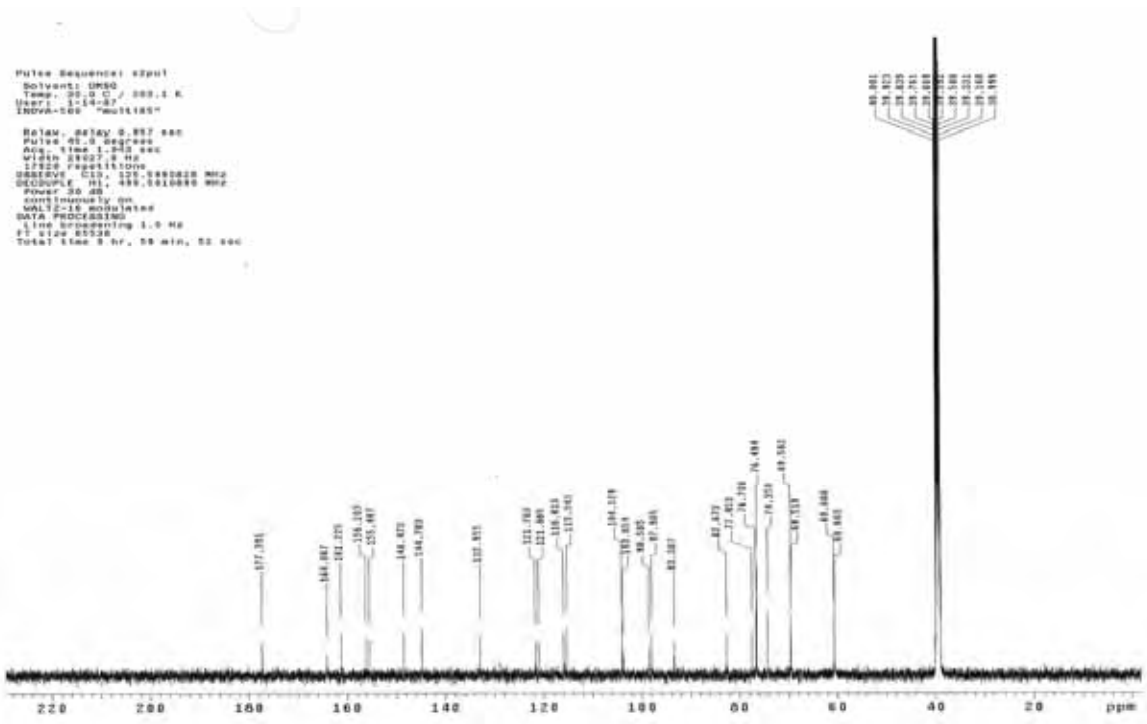


Figura 109. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **55** (DMSO-d_6, 11,7 T)

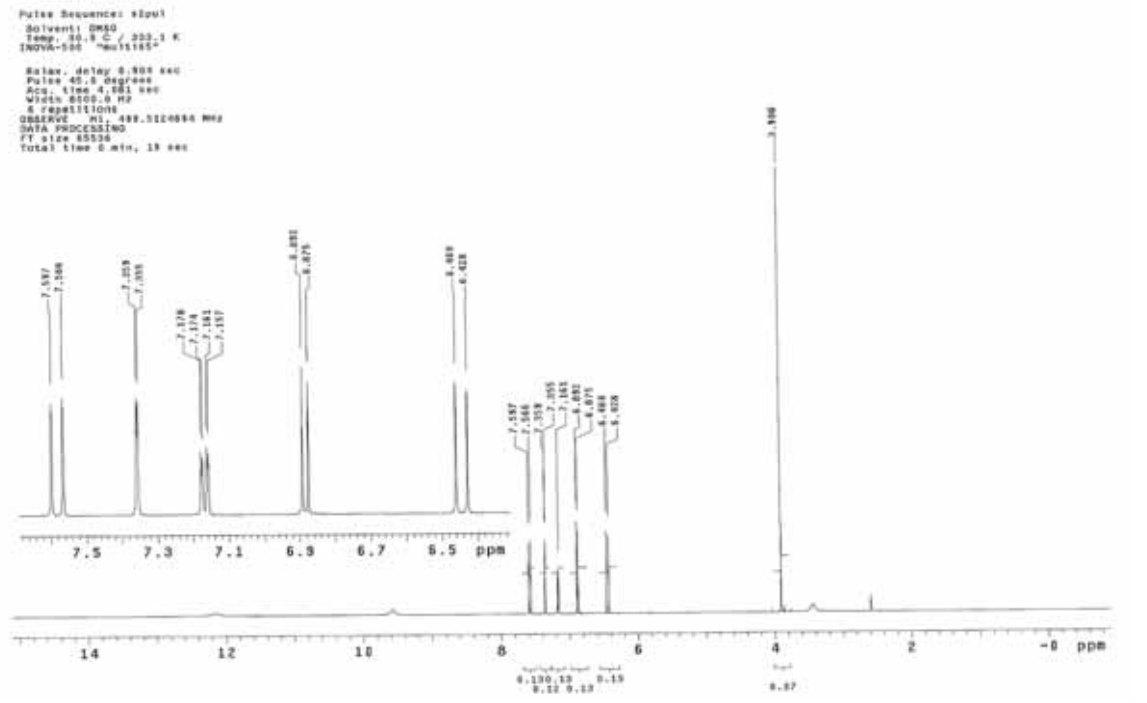


Figura 110. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **56** (DMSO-d_6, 11,7 T)

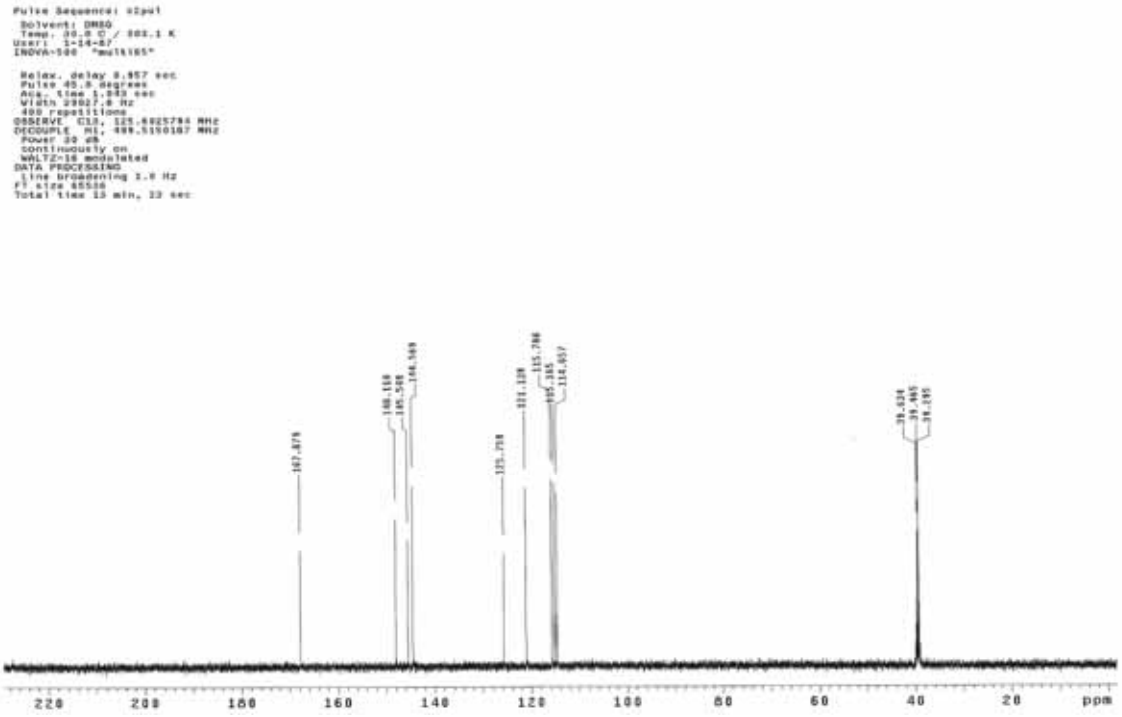


Figura 111. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **56** (DMSO-d_6, 11,7 T)

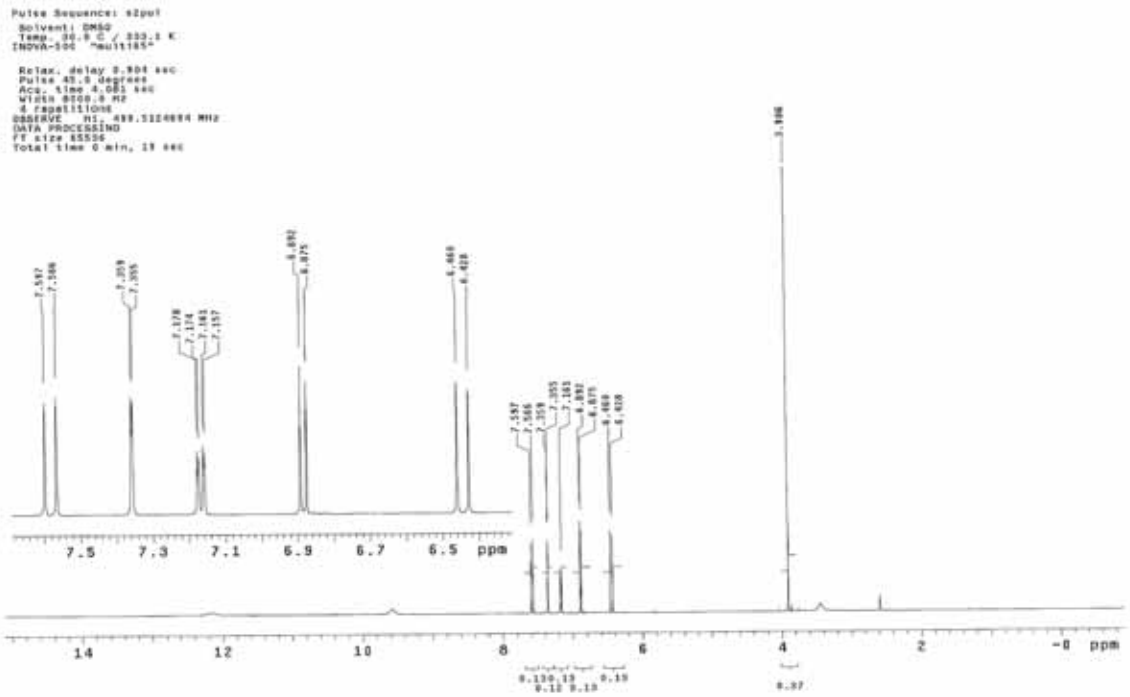


Figura 112. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **57** (DMSO-d_6, 11,7 T)

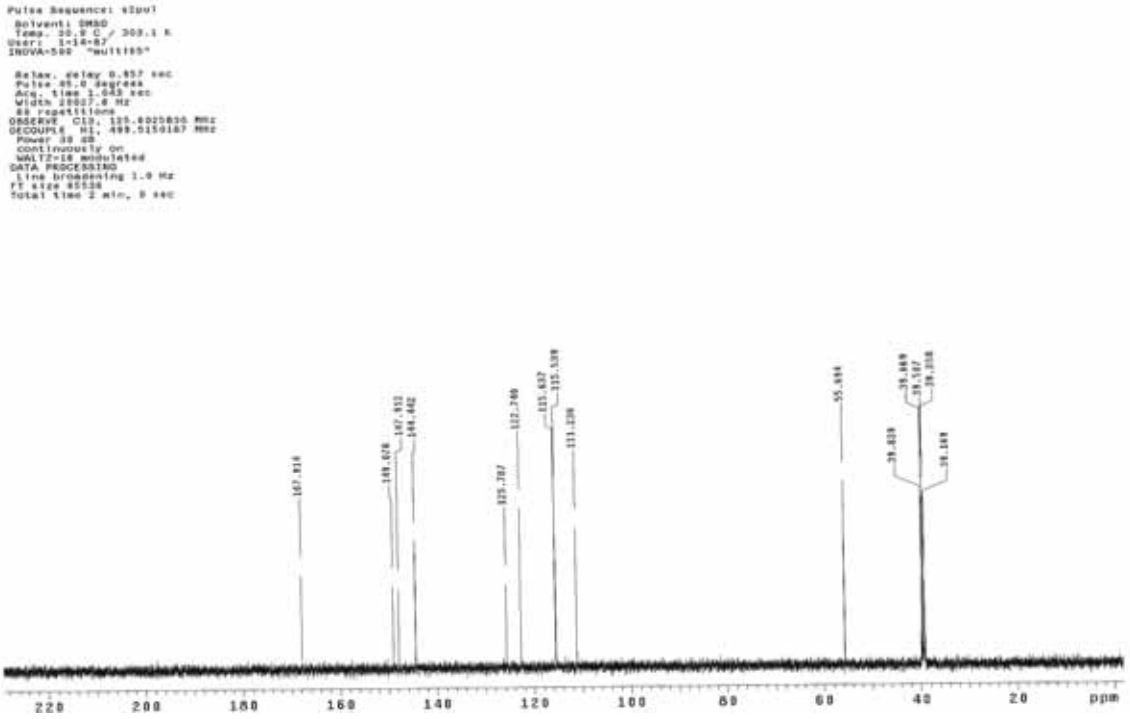


Figura 113. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **57** (DMSO-d_6, 11,7 T)

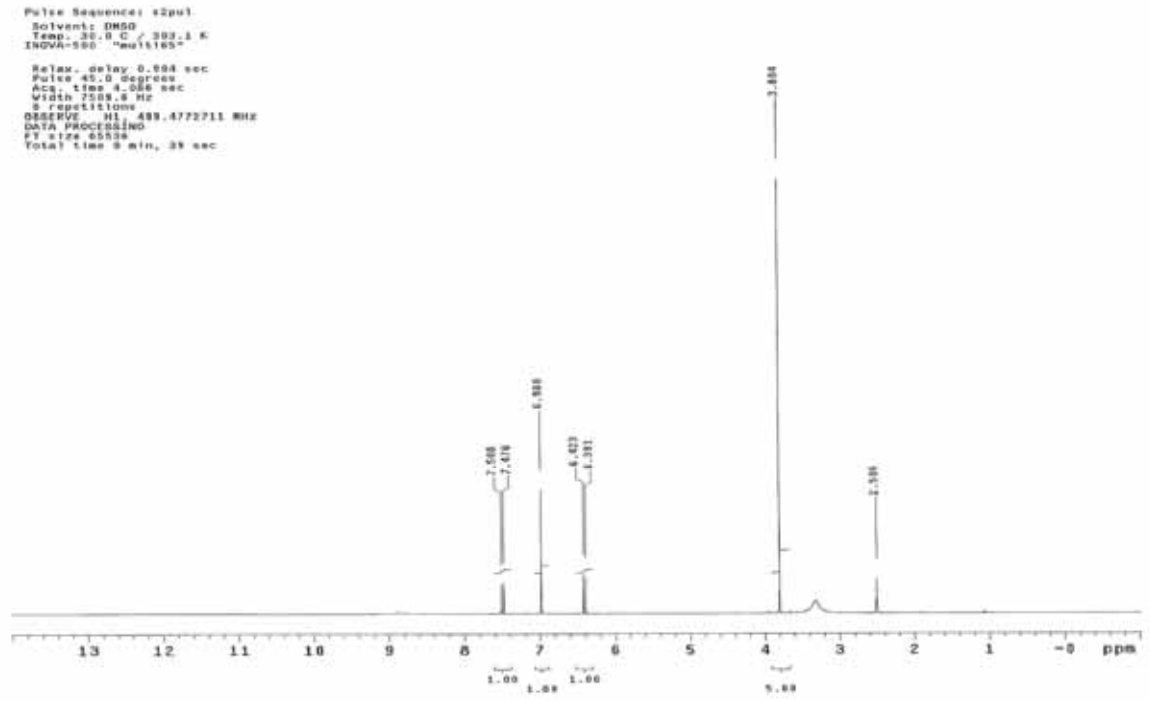


Figura 114. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **58** (DMSO-d_6, 11,7 T)

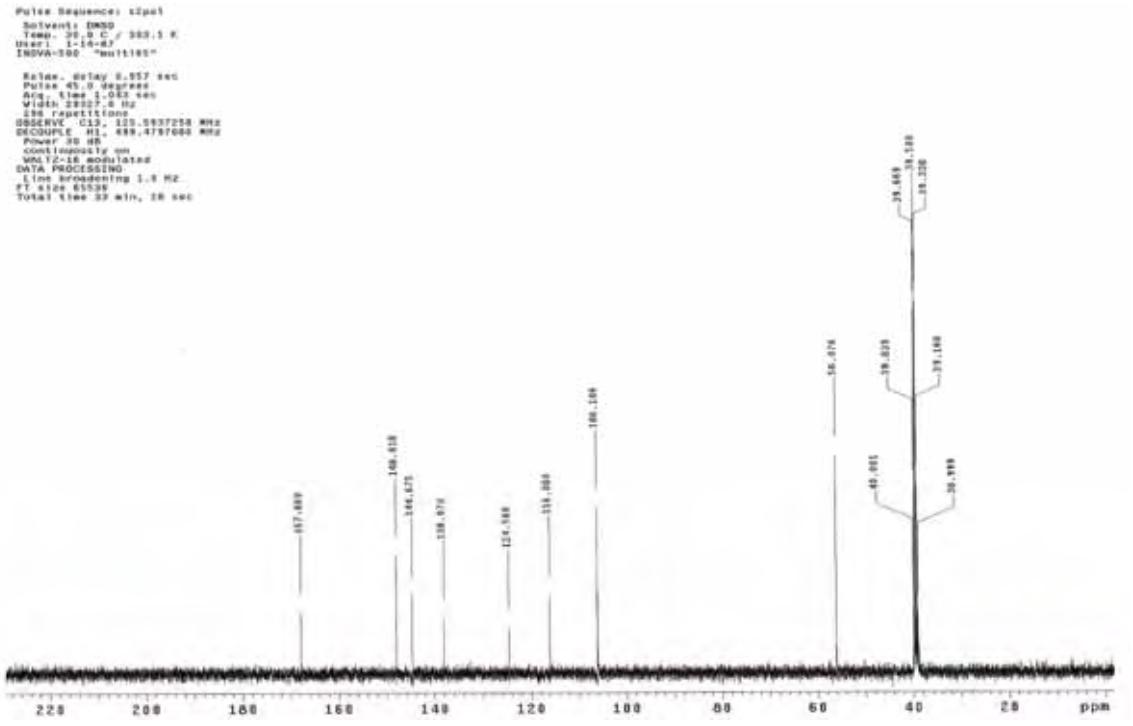


Figura 115. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **58** (DMSO-d_6, 11,7 T)

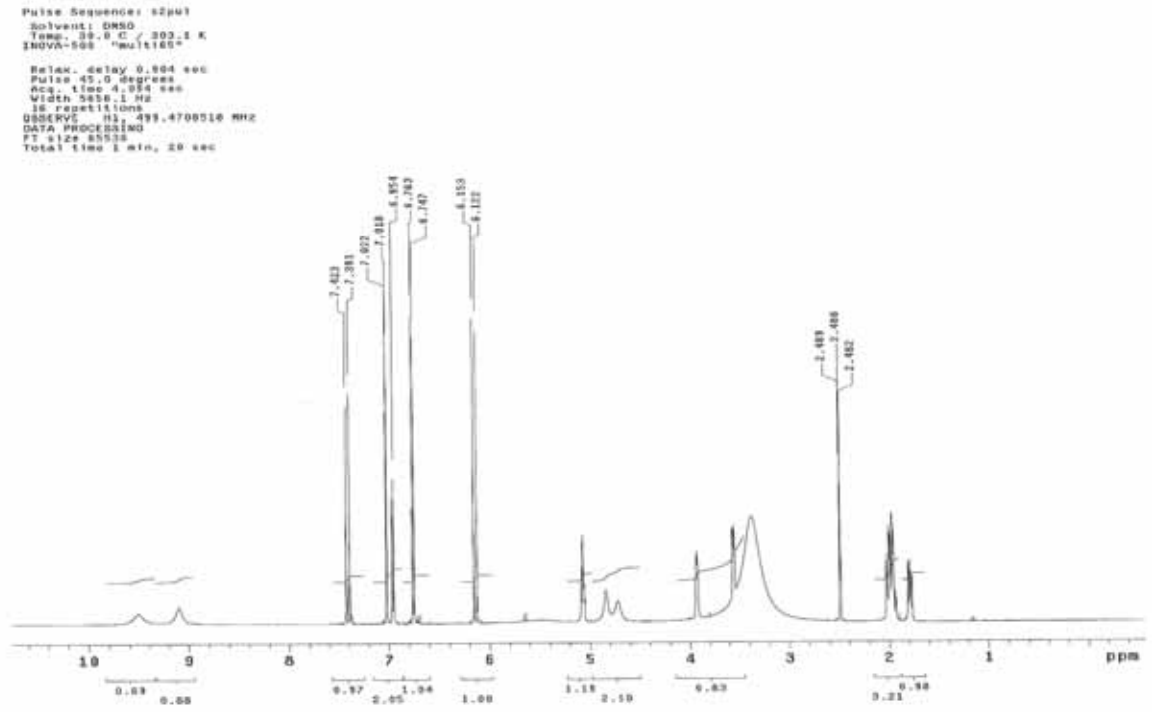


Figura 116. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **59** (DMSO-d_6, 11,7 T)

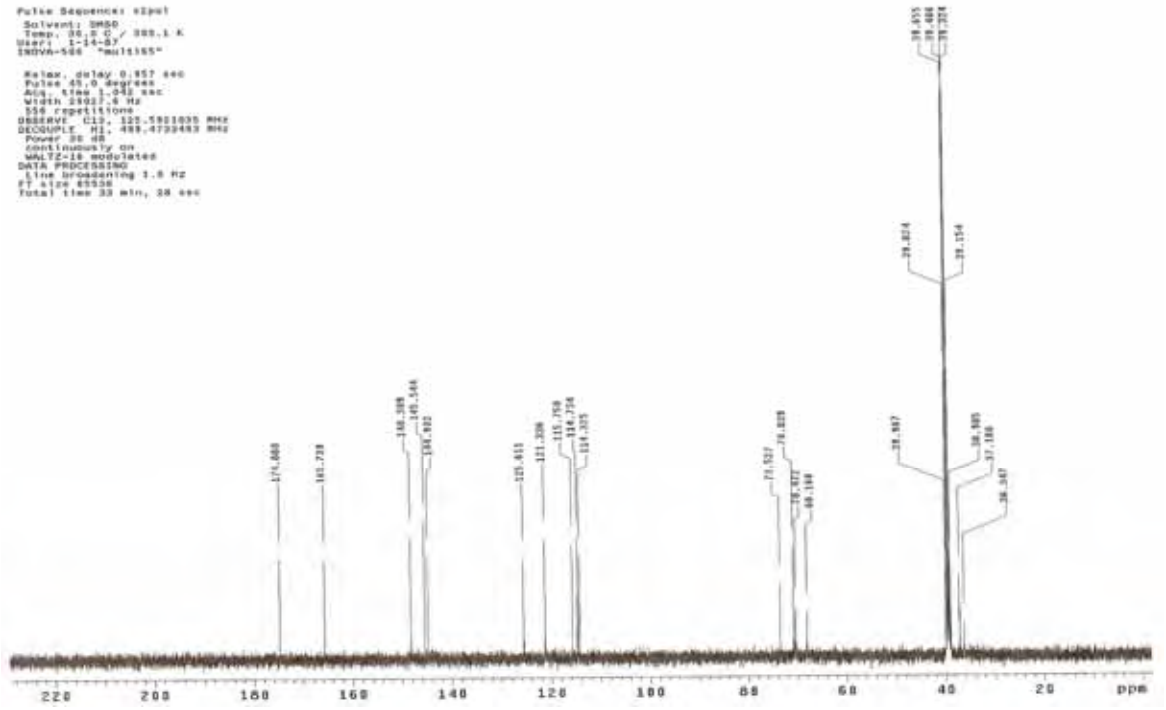


Figura 117. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **59** (DMSO-d_6, 11,7 T)

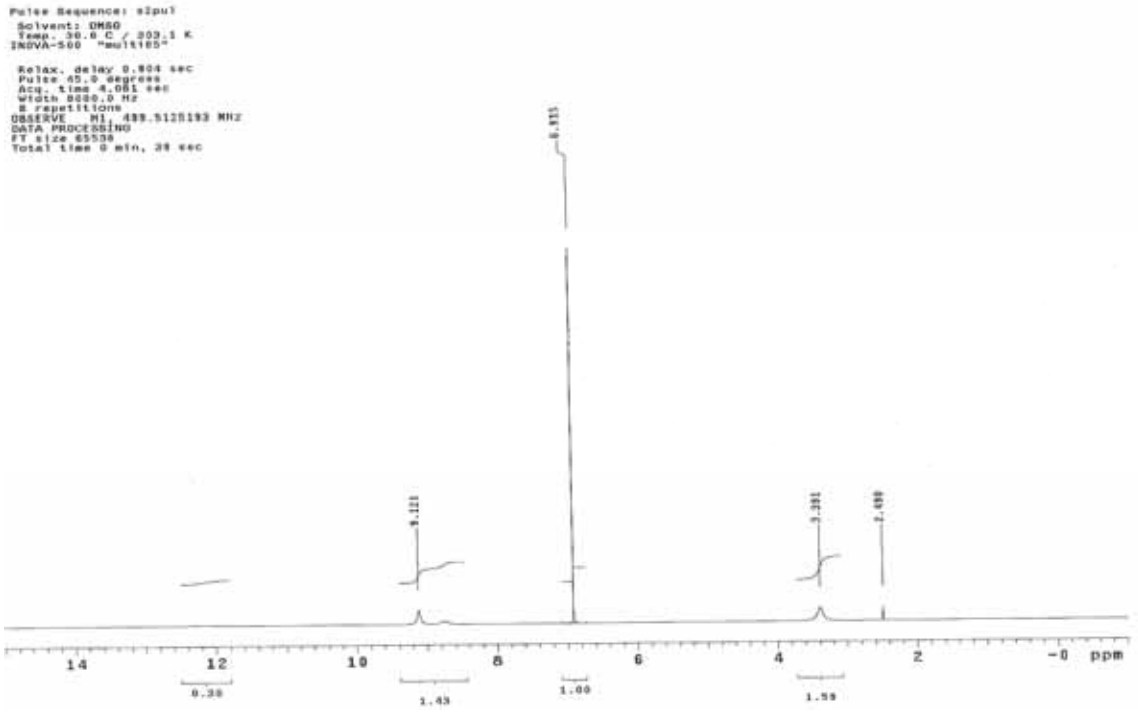


Figura 118. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **60** (DMSO-d_6, 11,7 T)

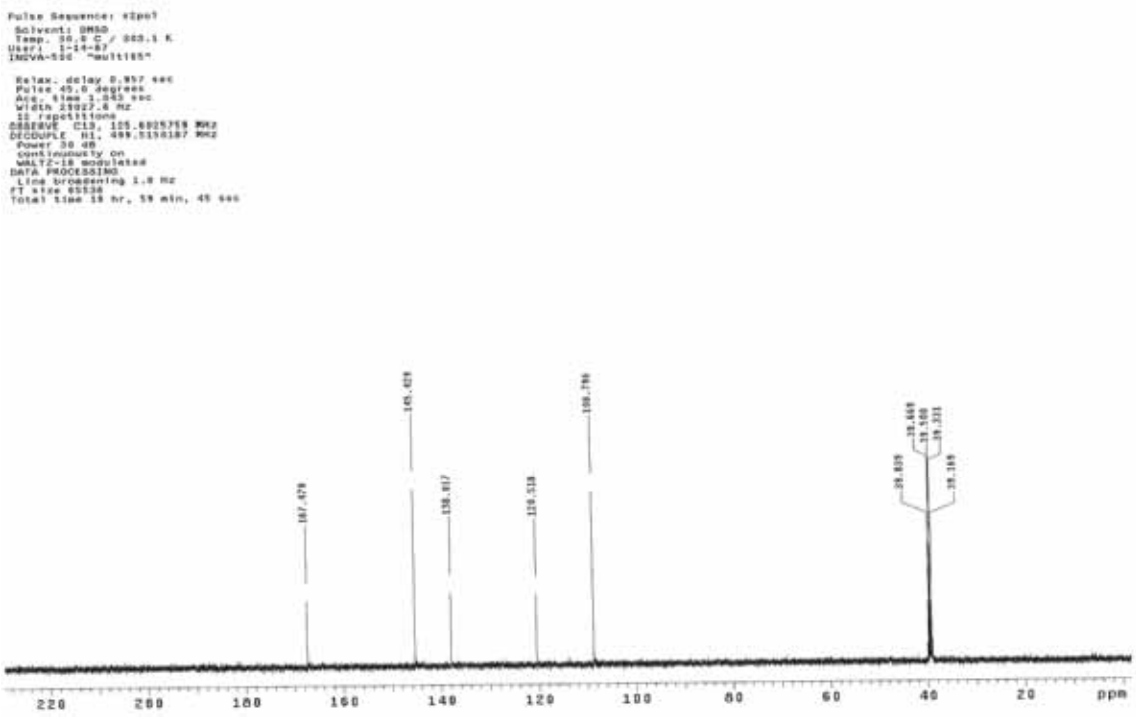


Figura 119. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **60** (DMSO-d_6, 11,7 T)

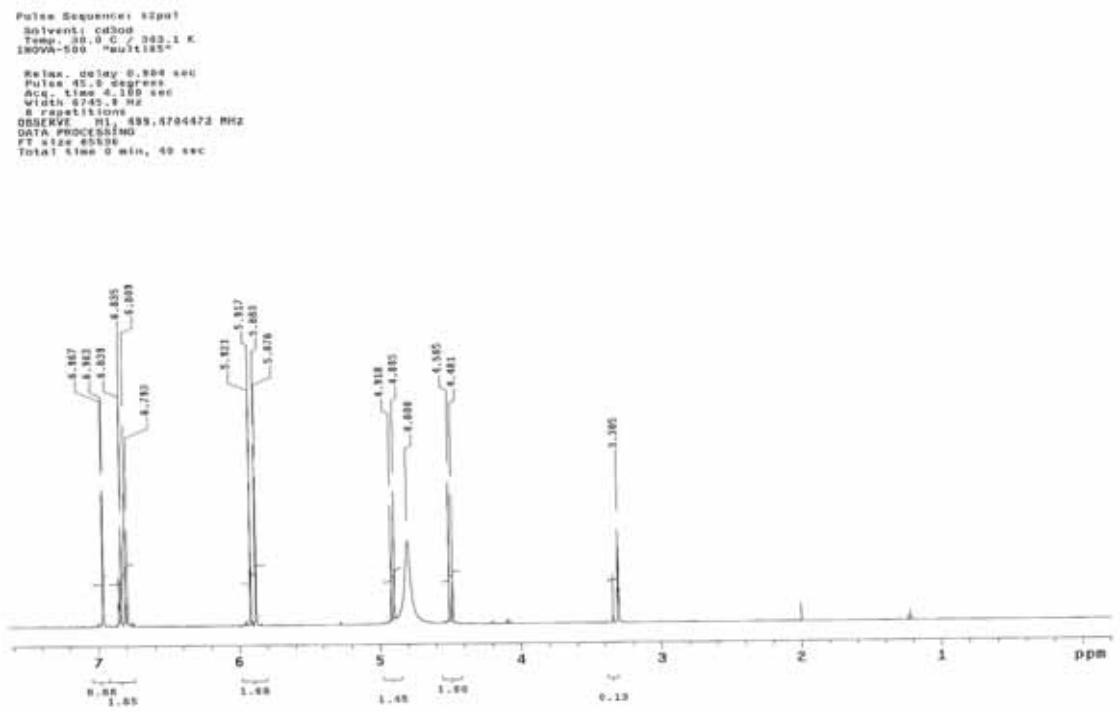


Figura 120. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **61** (CD_3OD, 11,7 T)

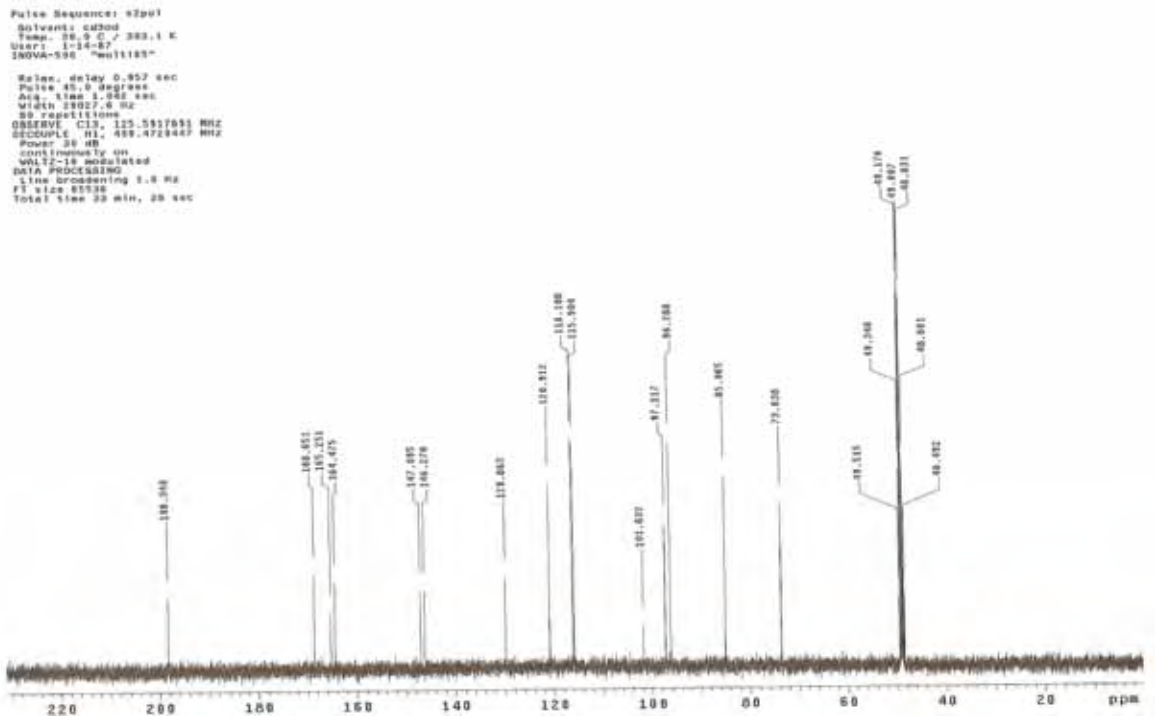


Figura 121. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **61** (CD_3OD, 11,7 T)

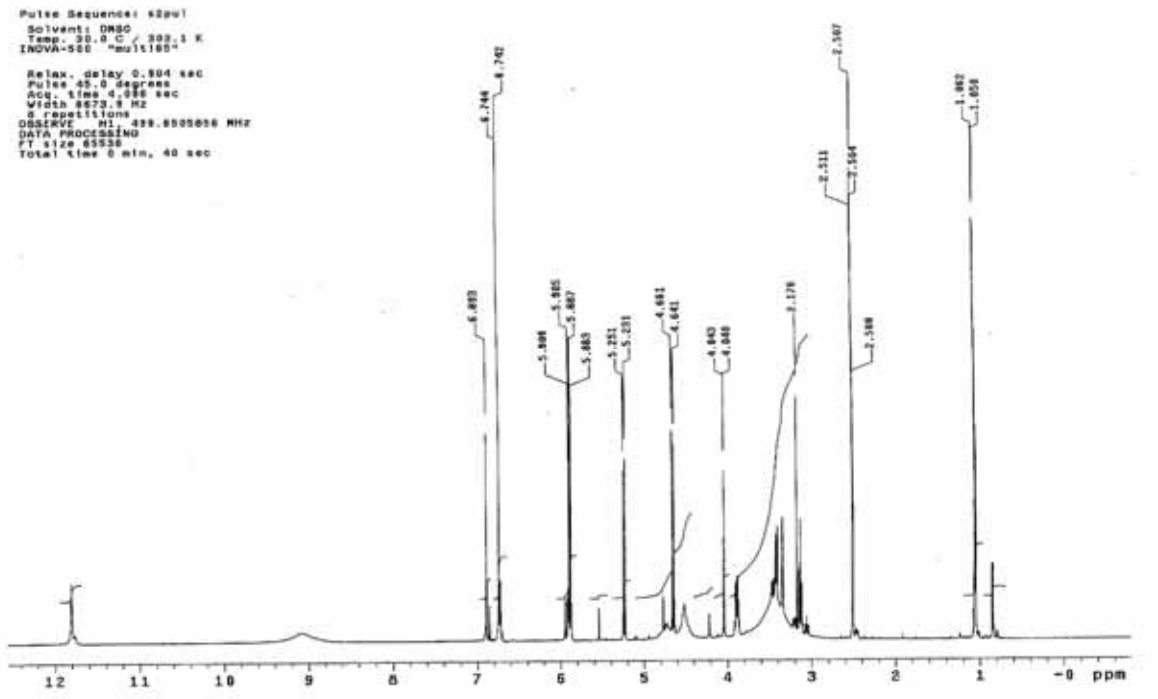


Figura 122. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **62** (DMSO-d_6, 11,7 T)

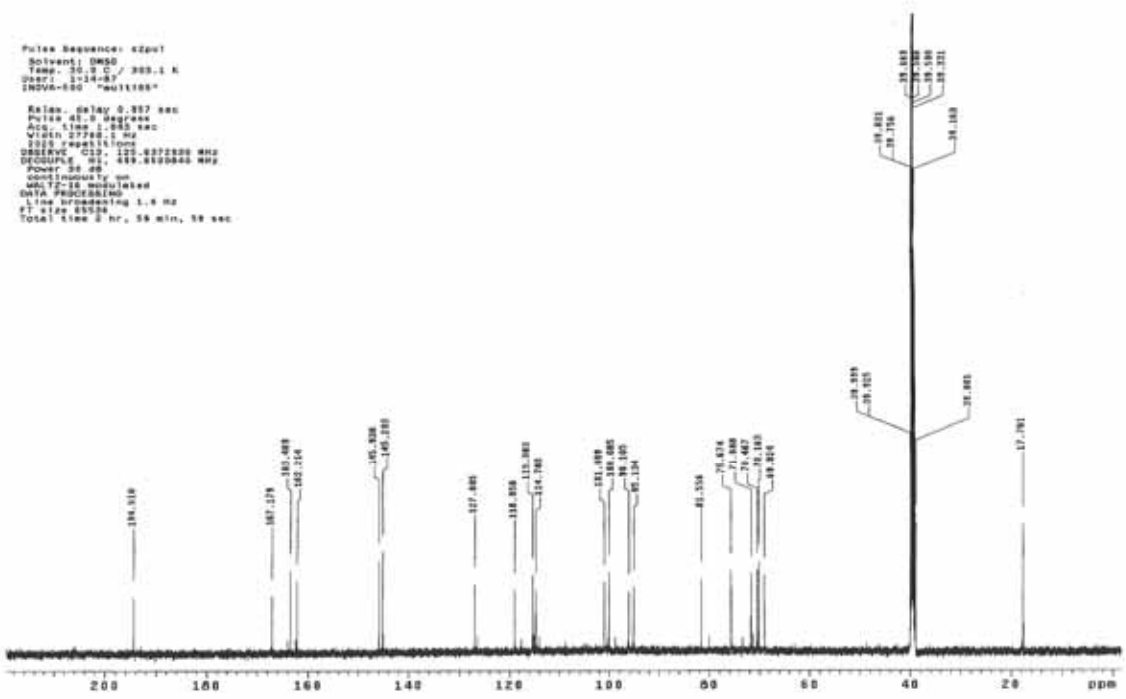


Figura 123. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **62** (DMSO-d_6, 11,7 T)

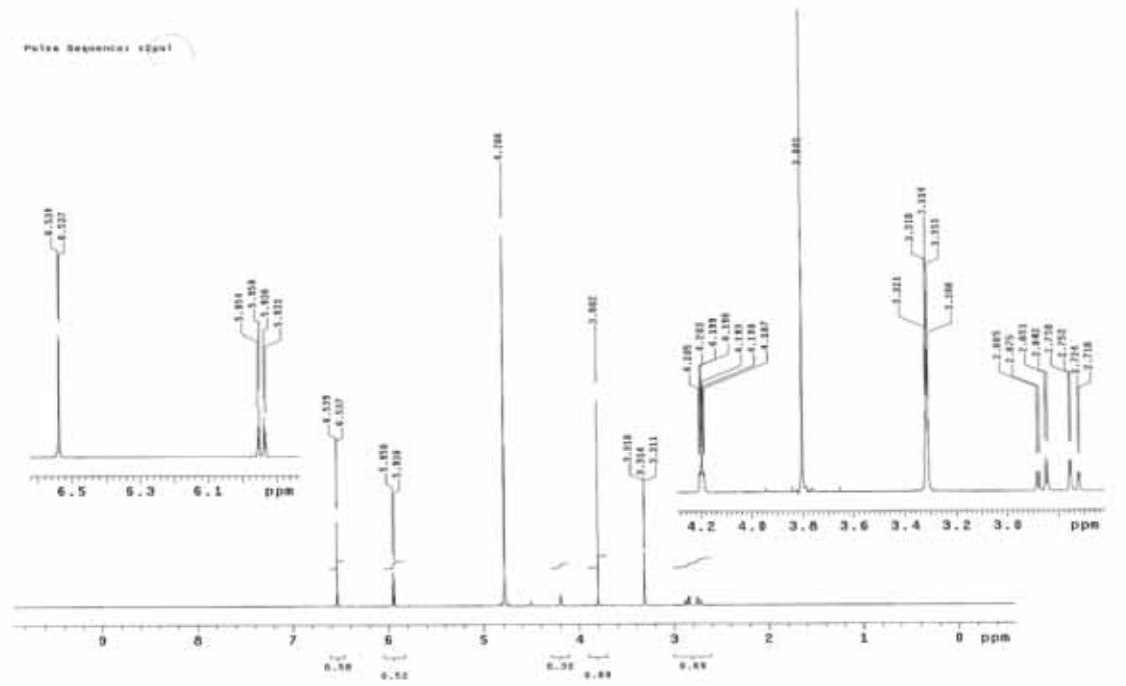


Figura 124. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **63** (CD_3OD, 11,7 T)

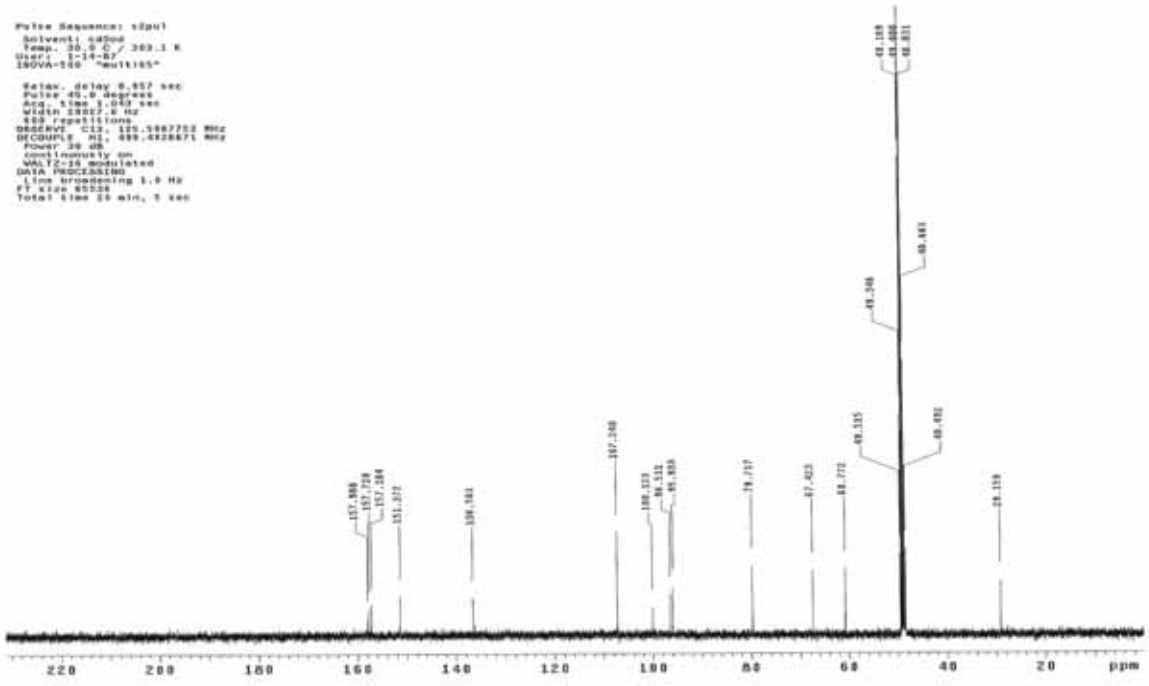


Figura 125. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **63** (CD_3OD, 11,7 T)

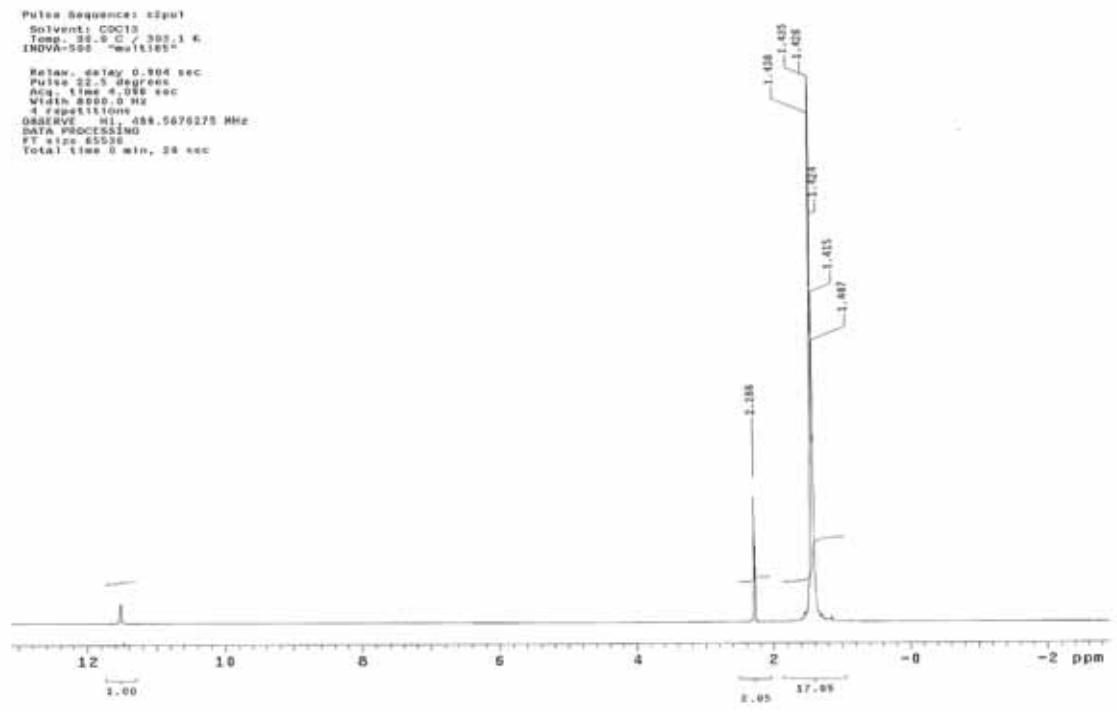


Figura 126. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **67** ($CDCl_3$, 11,7 T)

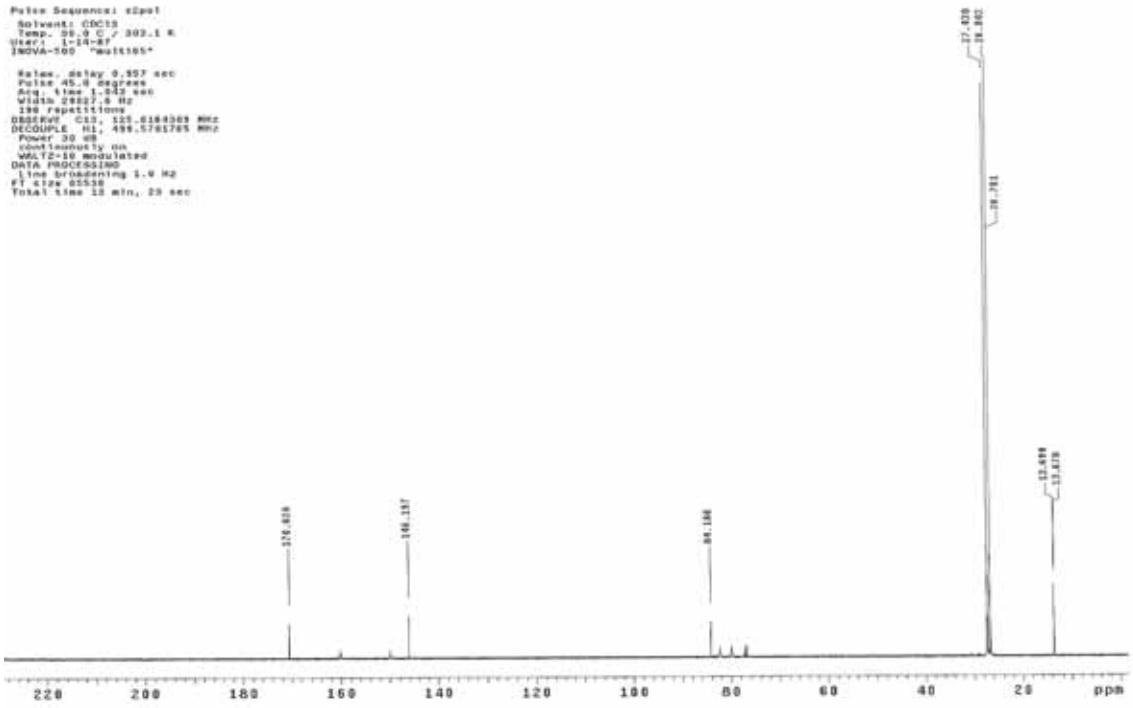


Figura 127. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **67** ($CDCl_3$, 11,7 T)

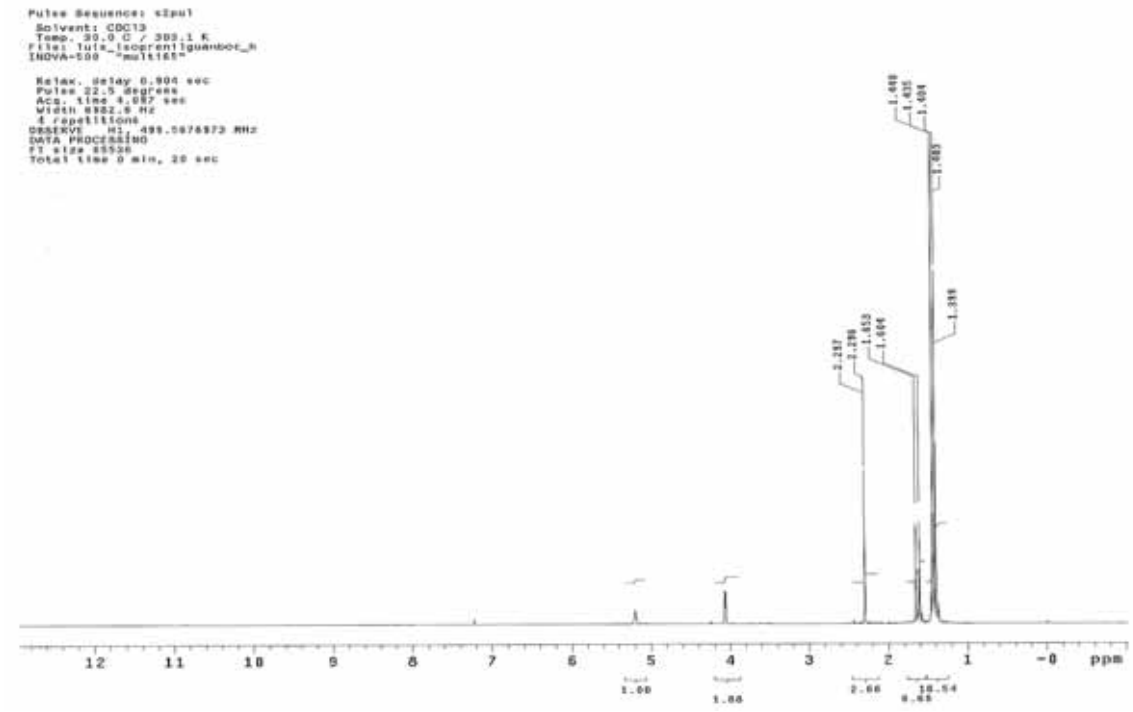


Figura 128. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **68** ($CDCl_3$, 11,7 T)

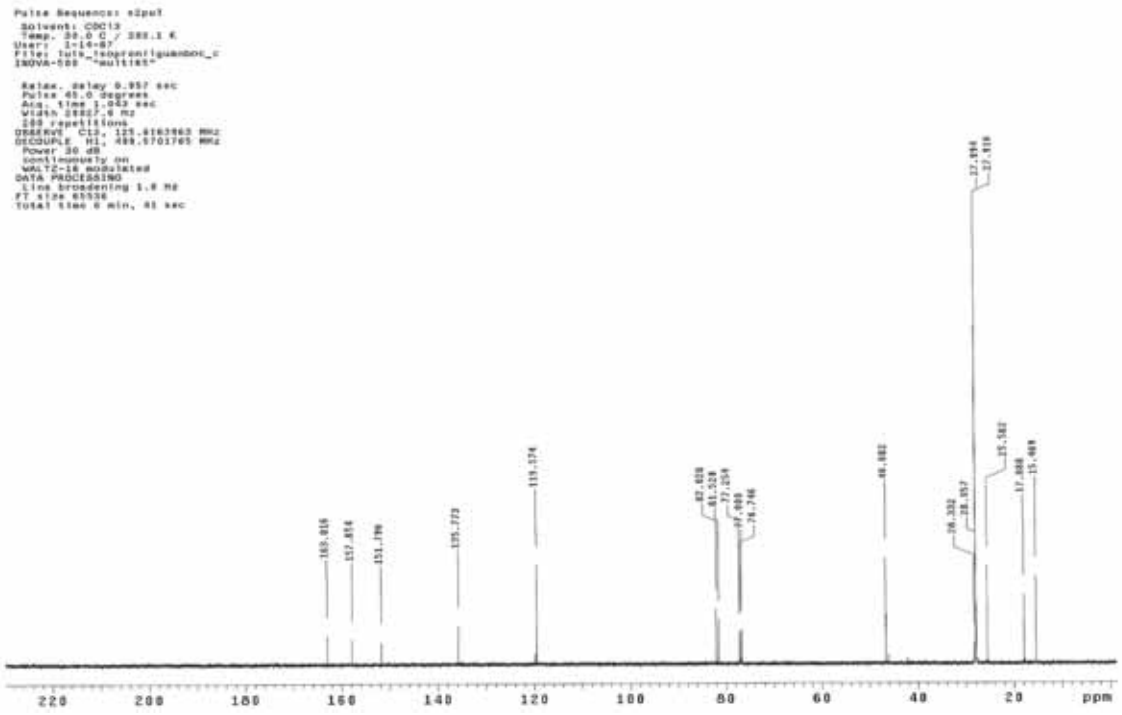


Figura 129. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **68** ($CDCl_3$, 11,7 T)

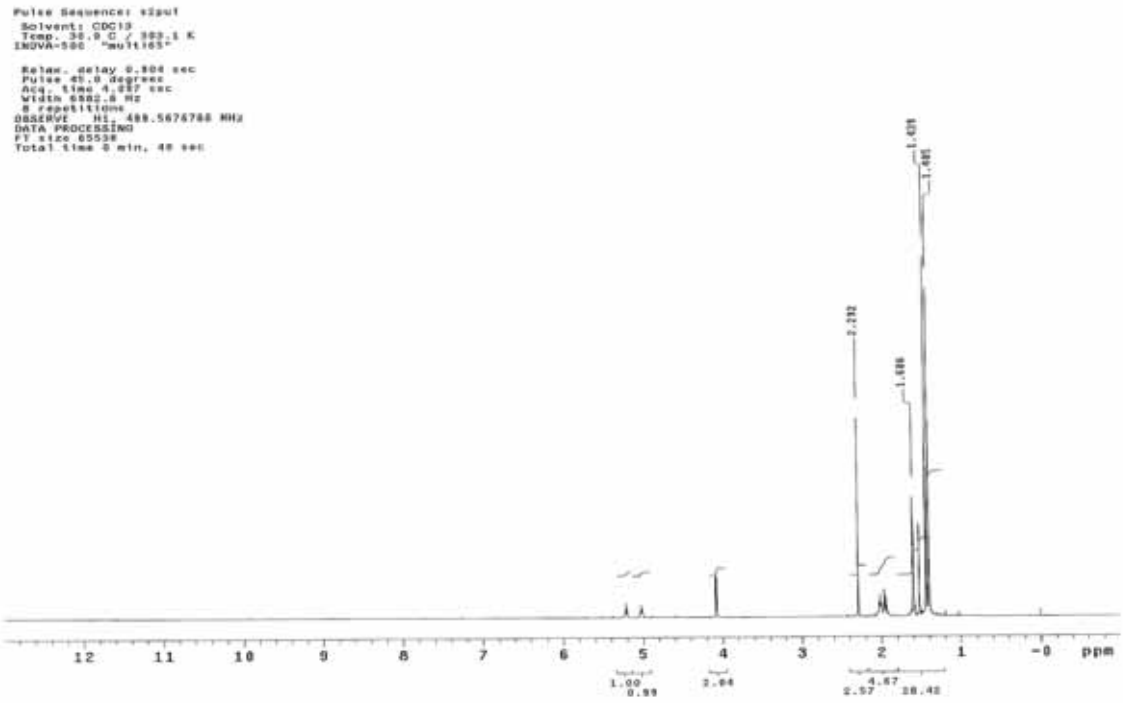


Figura 130. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **69** ($CDCl_3$, 11,7 T)

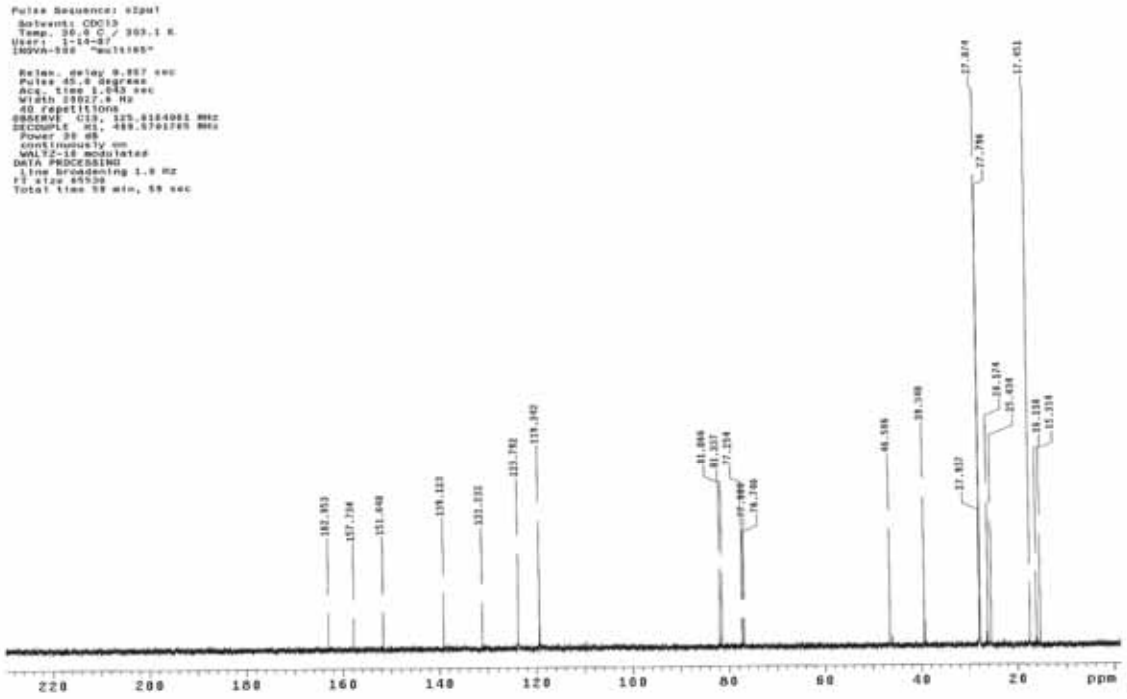


Figura 131. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **69** ($CDCl_3$, 11,7 T)

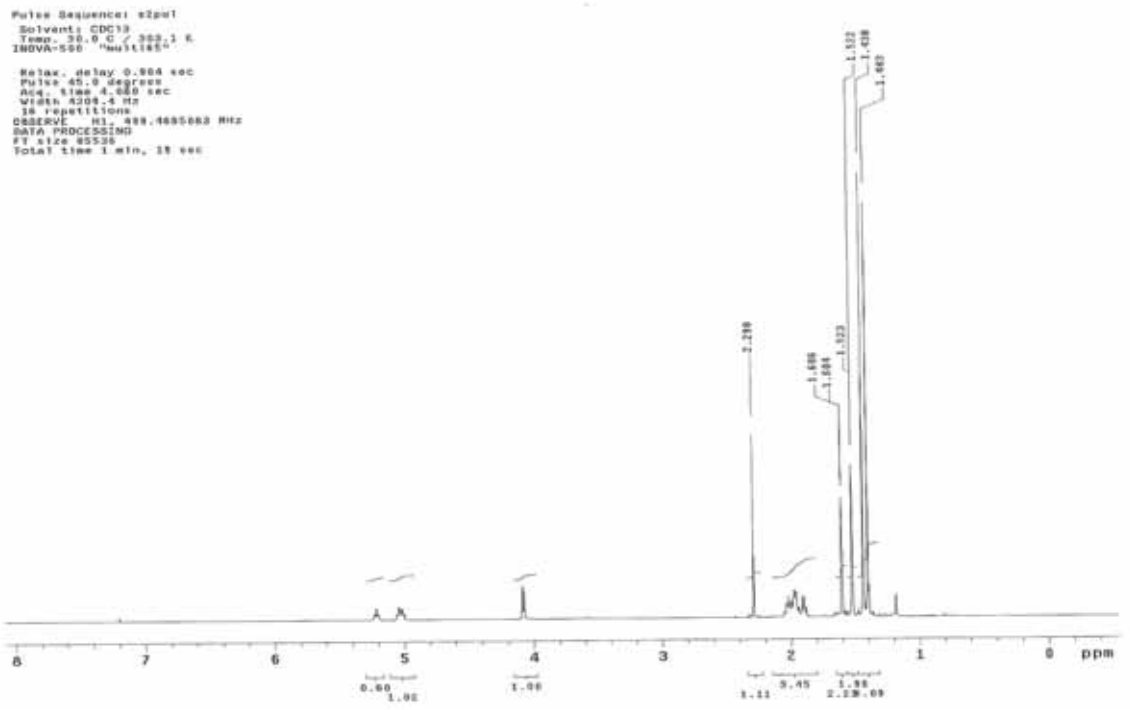


Figura 132. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **70** ($CDCl_3$, 11,7 T)

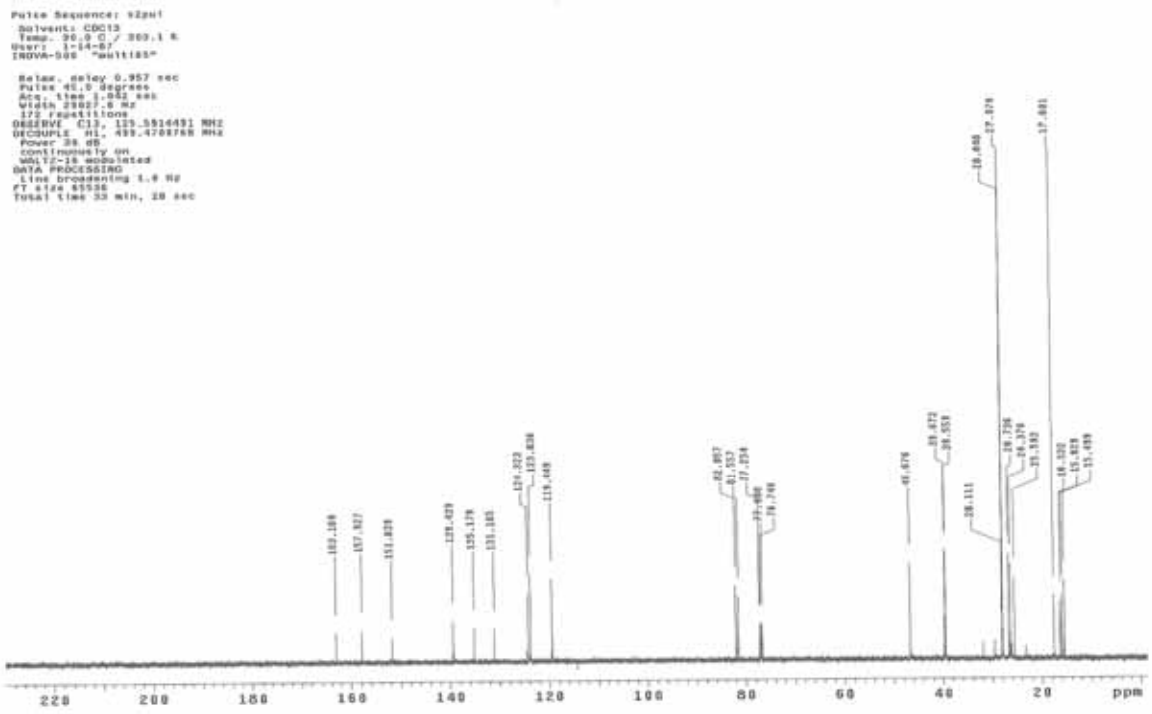


Figura 133. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **70** ($CDCl_3$, 11,7 T)

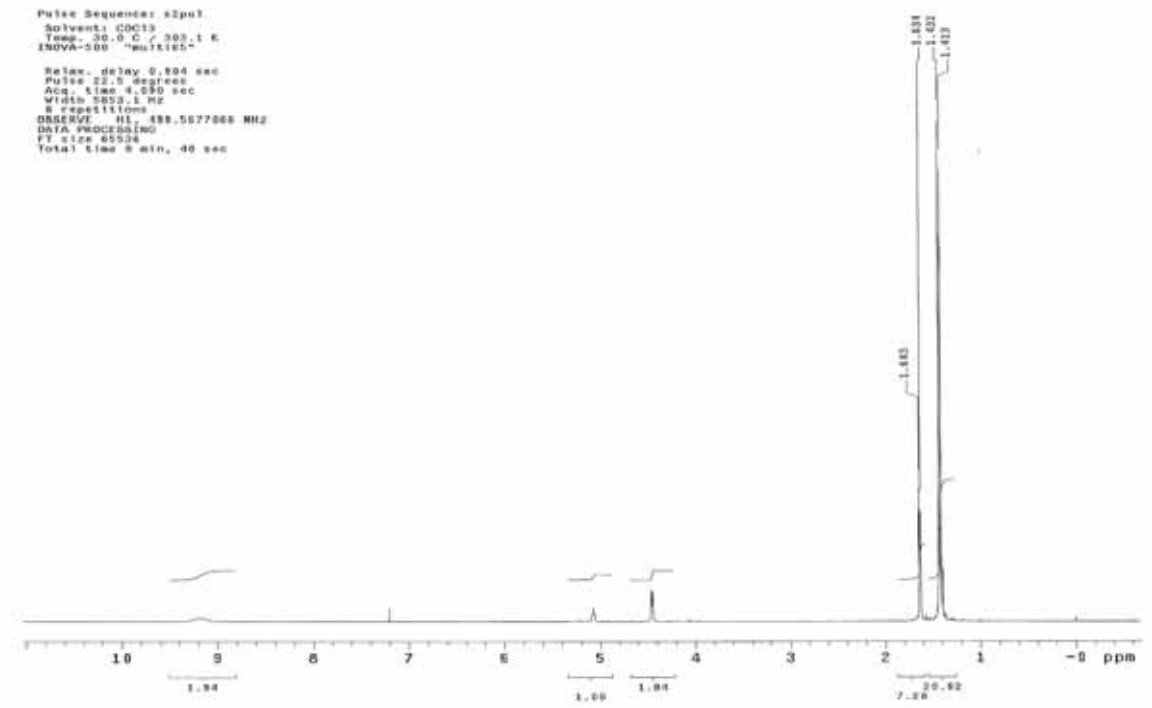


Figura 134. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **71** ($CDCl_3$, 11,7 T)

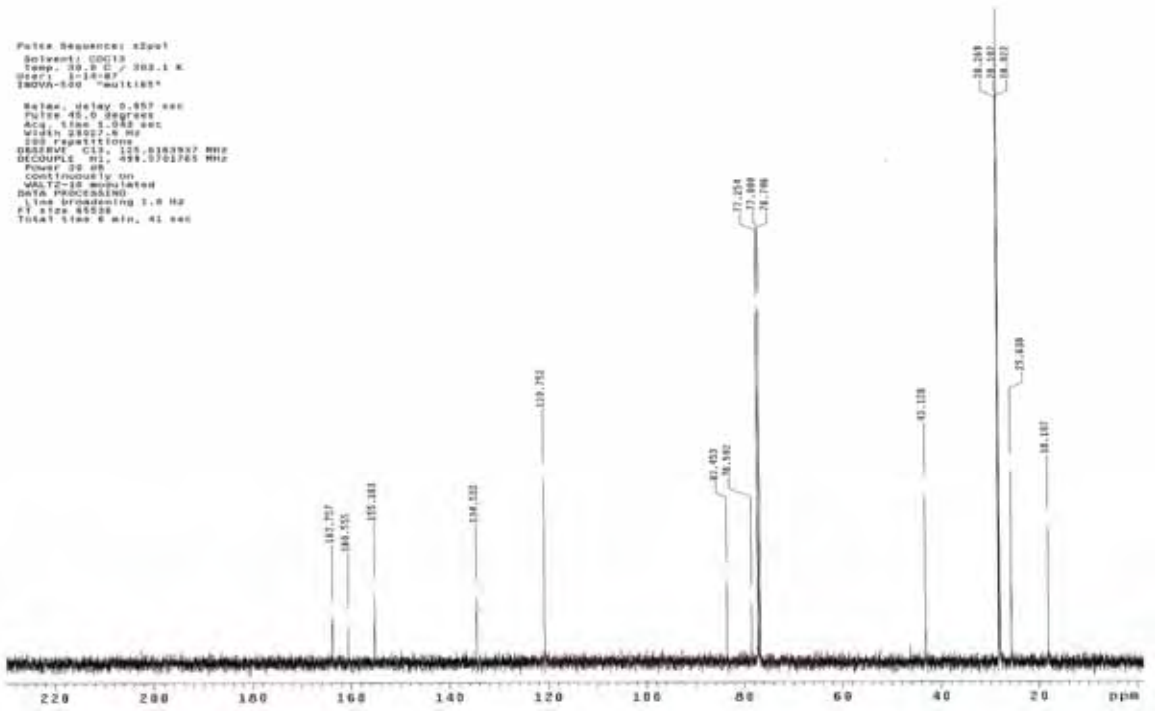


Figura 135. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **71** ($CDCl_3$, 11,7 T)

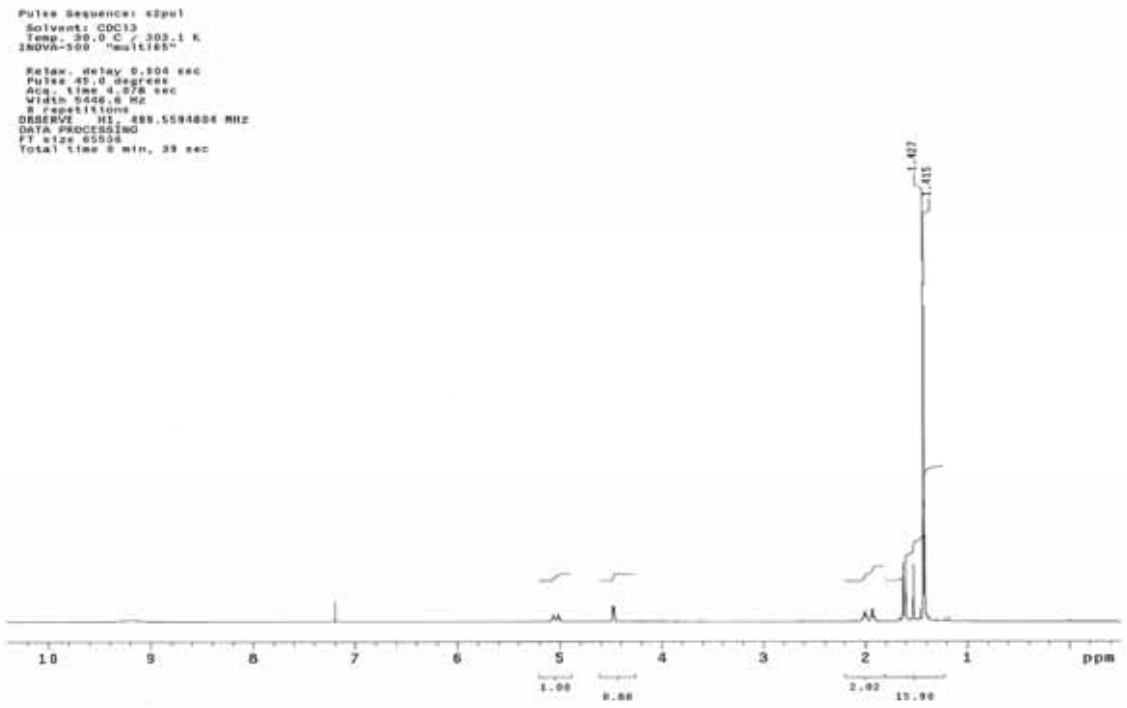


Figura 136. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **72** ($CDCl_3$, 11,7 T)

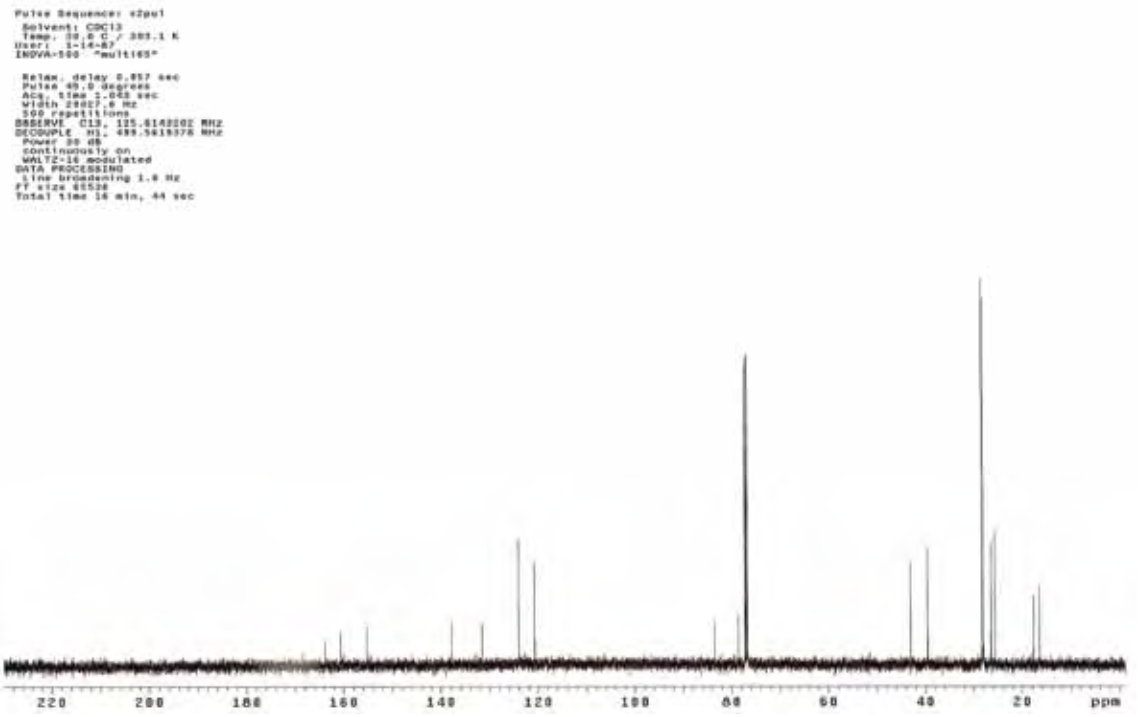


Figura 137. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **72** ($CDCl_3$, 11,7 T)

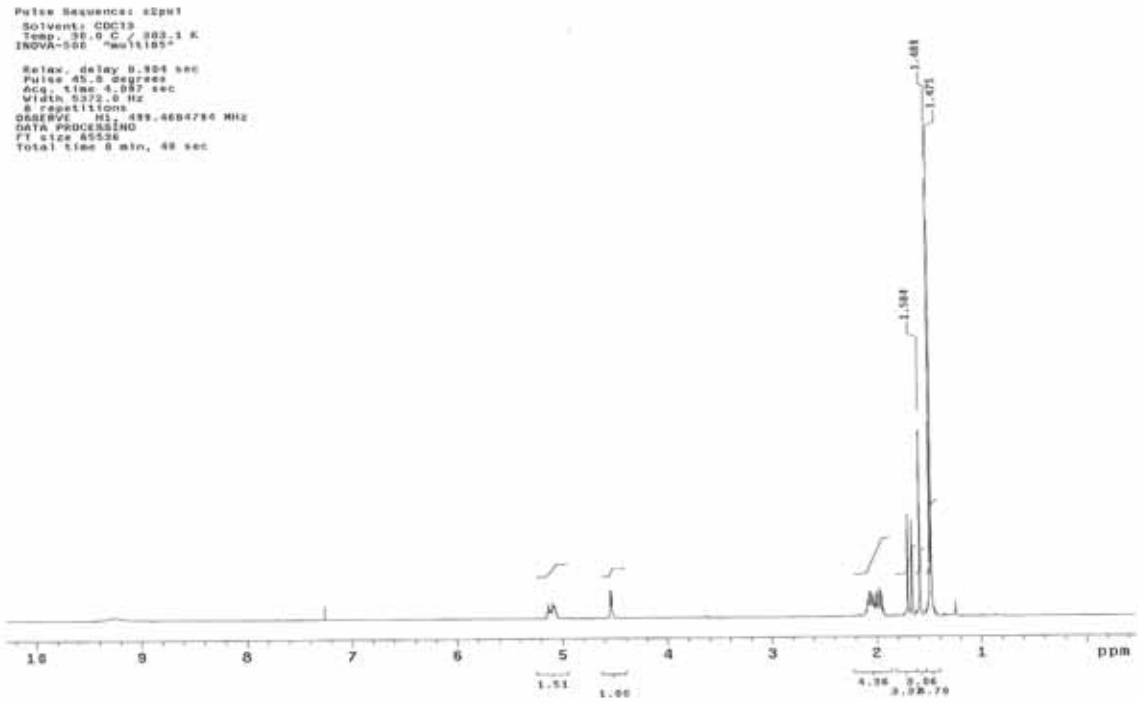


Figura 138. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **73** ($CDCl_3$, 11,7 T)

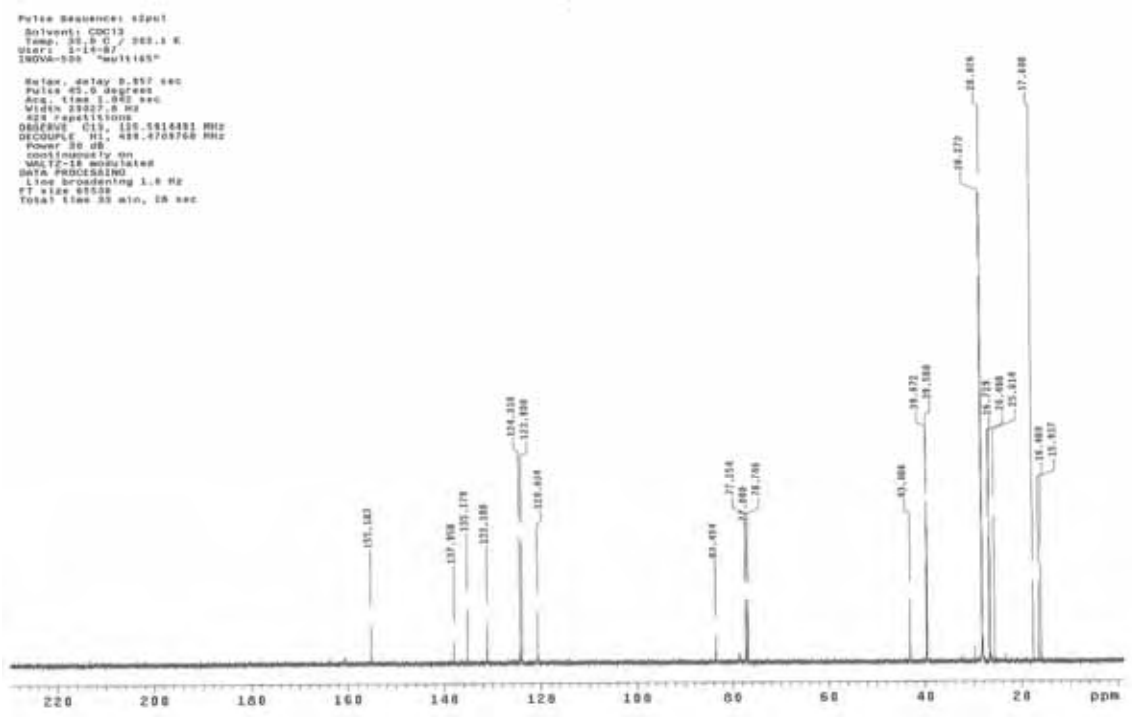


Figura 139. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **73** ($CDCl_3$, 11,7 T)

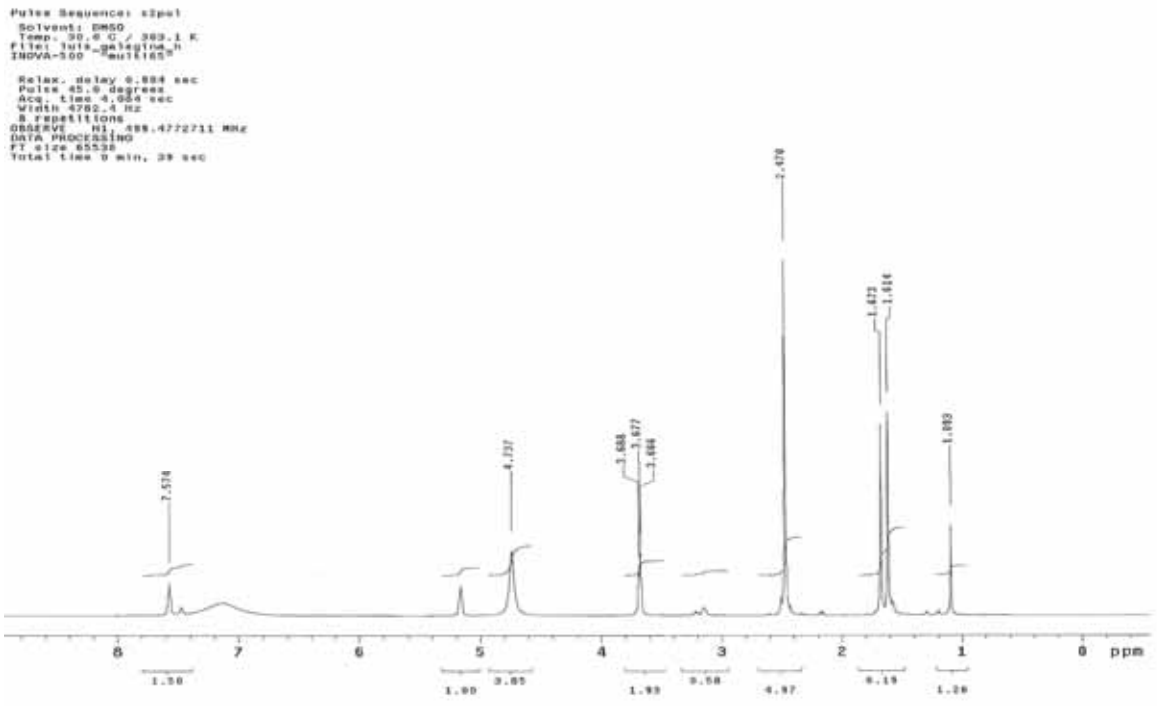


Figura 140. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **74** (DMSO-d_6, 11,7 T)

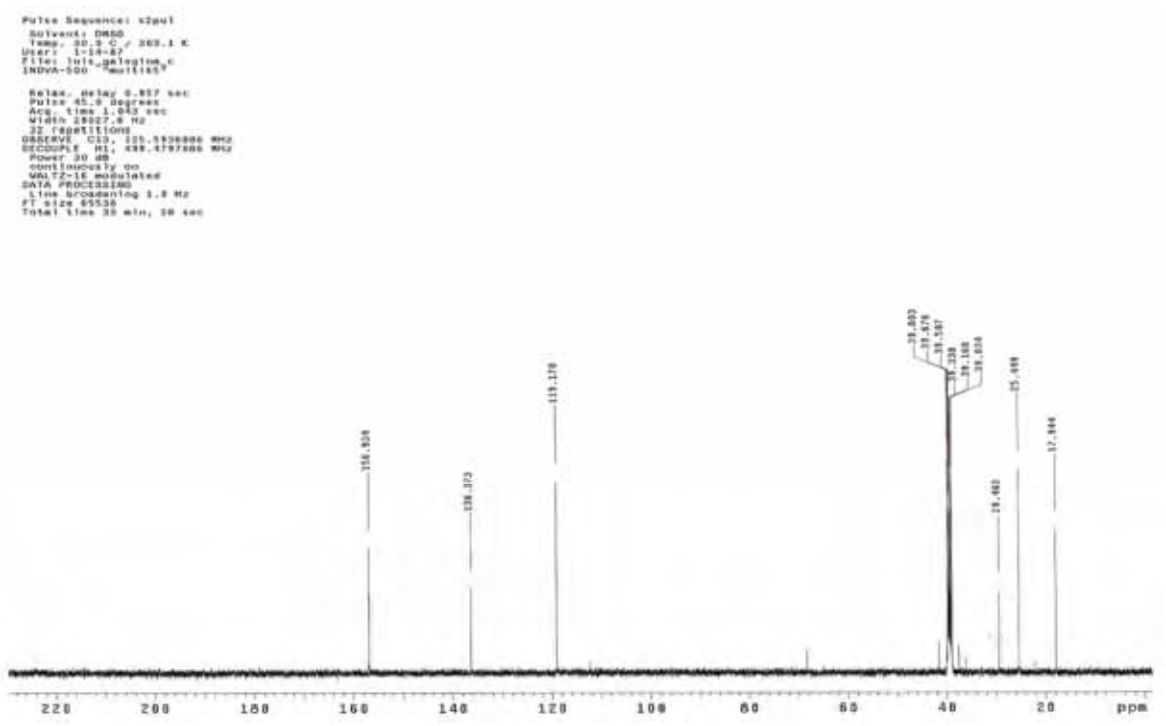


Figura 141. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **74** (DMSO-d_6, 11,7 T)

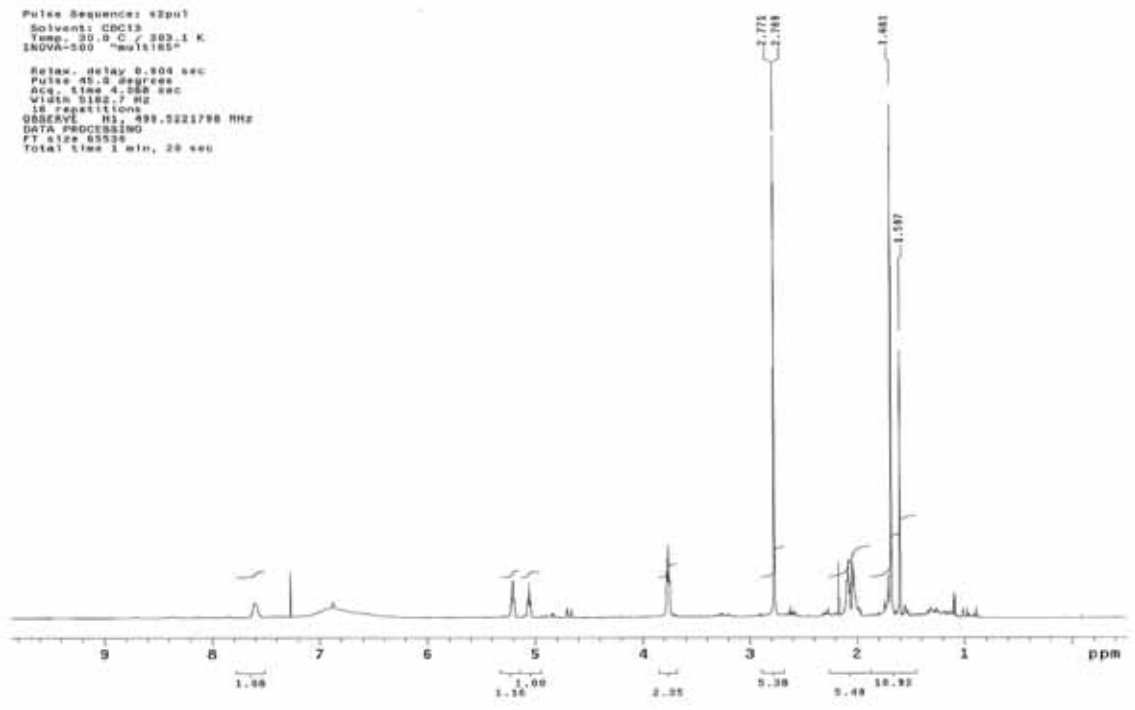


Figura 142. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **75** ($CDCl_3$, 11,7 T)

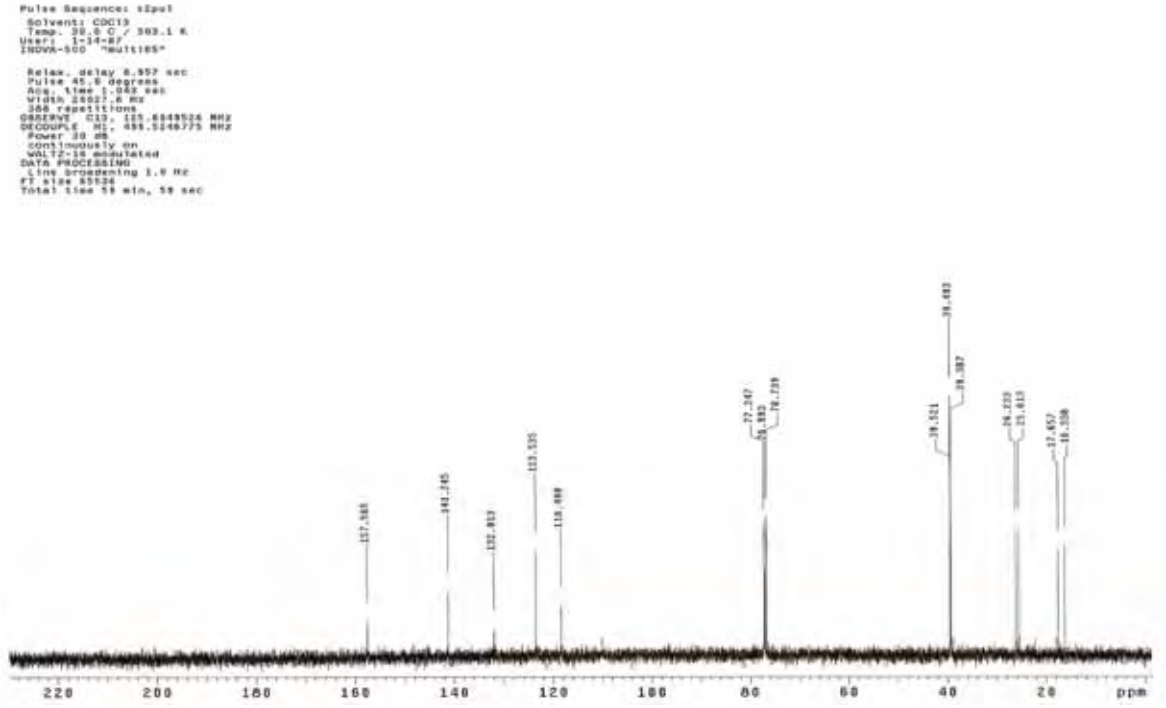


Figura 143. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **75** ($CDCl_3$, 11,7 T)

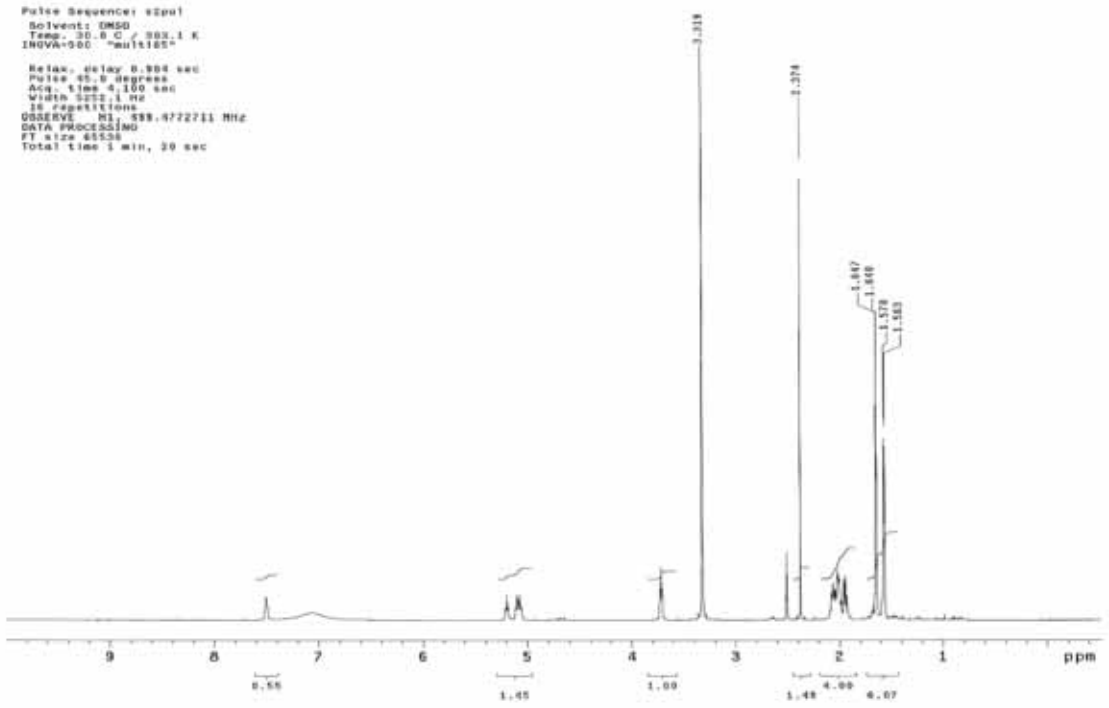


Figura 144. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **76** (DMSO-d_6, 11,7 T)

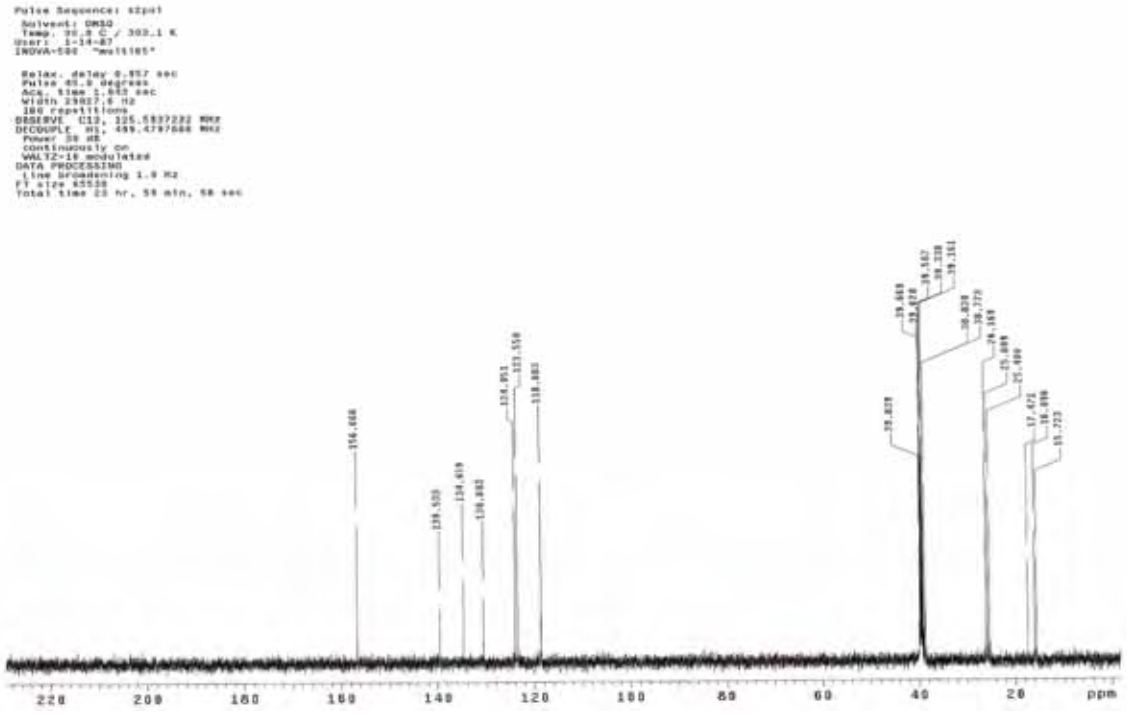


Figura 145. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **76** (DMSO-d_6, 11,7 T)

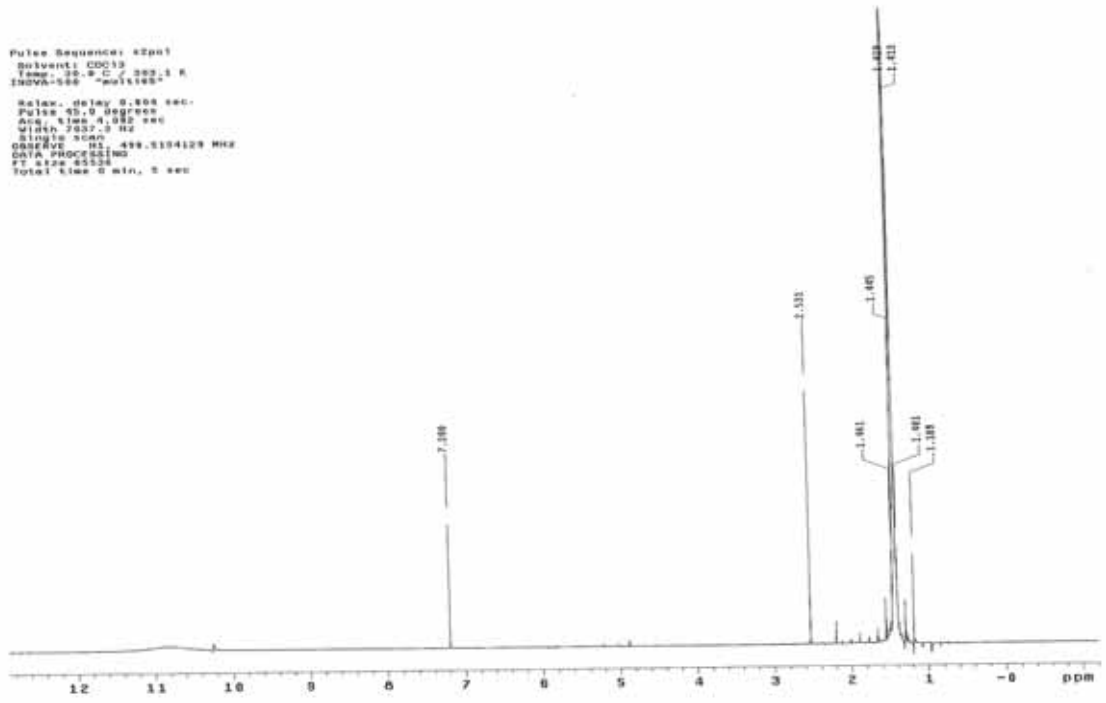


Figura 146. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **78** ($CDCl_3$, 11,7 T)

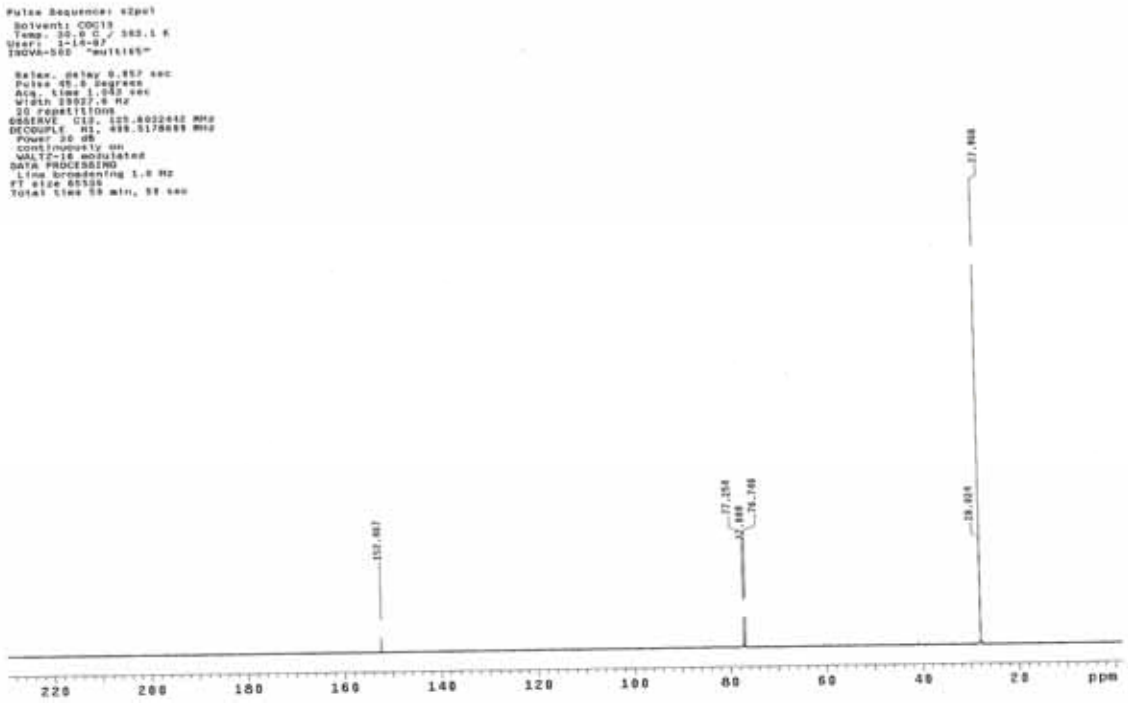


Figura 147. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **78** ($CDCl_3$, 11,7 T)

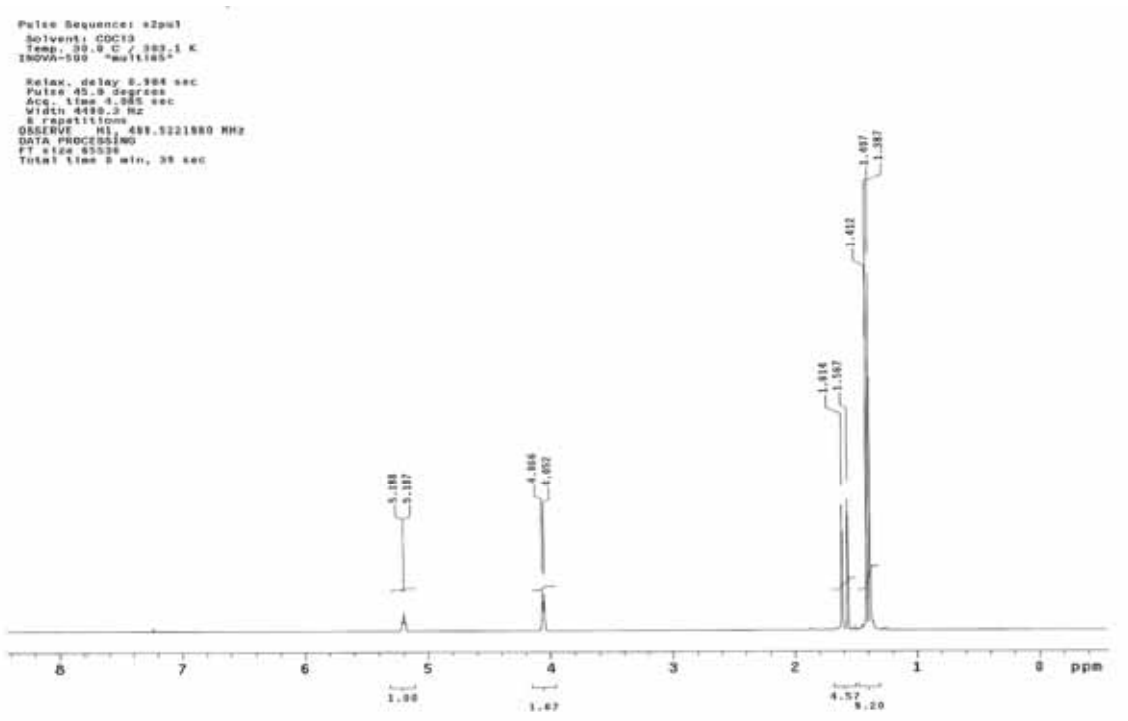


Figura 148. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **79** ($CDCl_3$, 11,7 T)

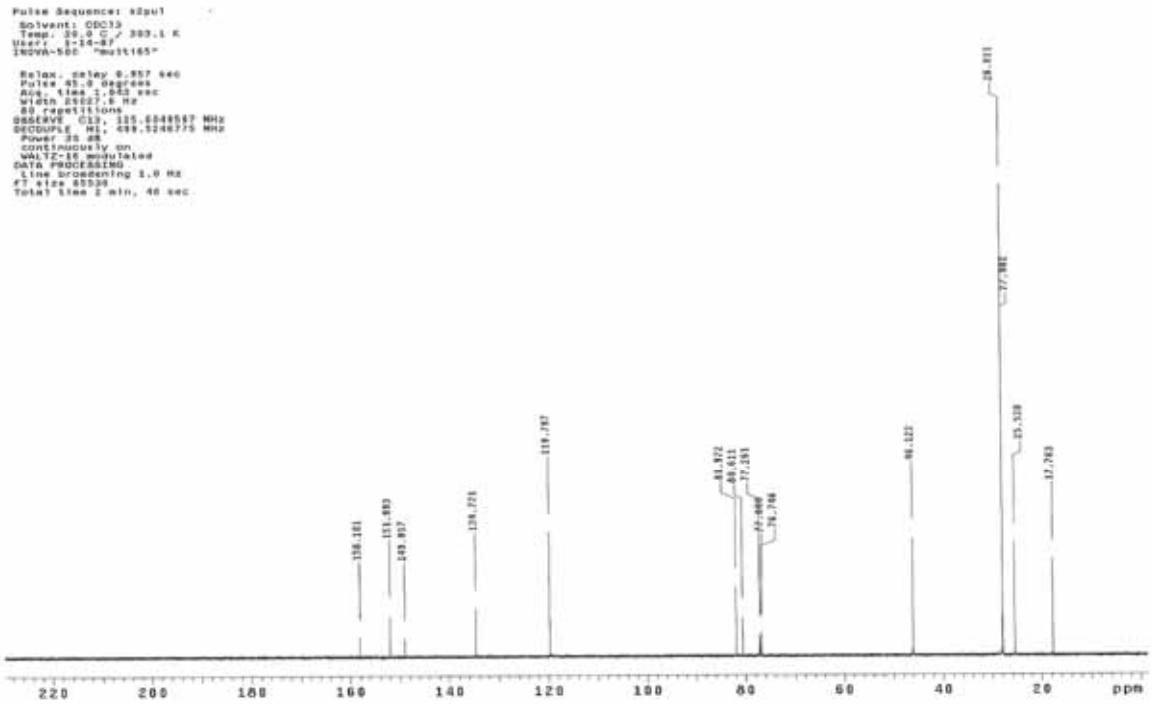


Figura 149. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **79** ($CDCl_3$, 11,7 T)

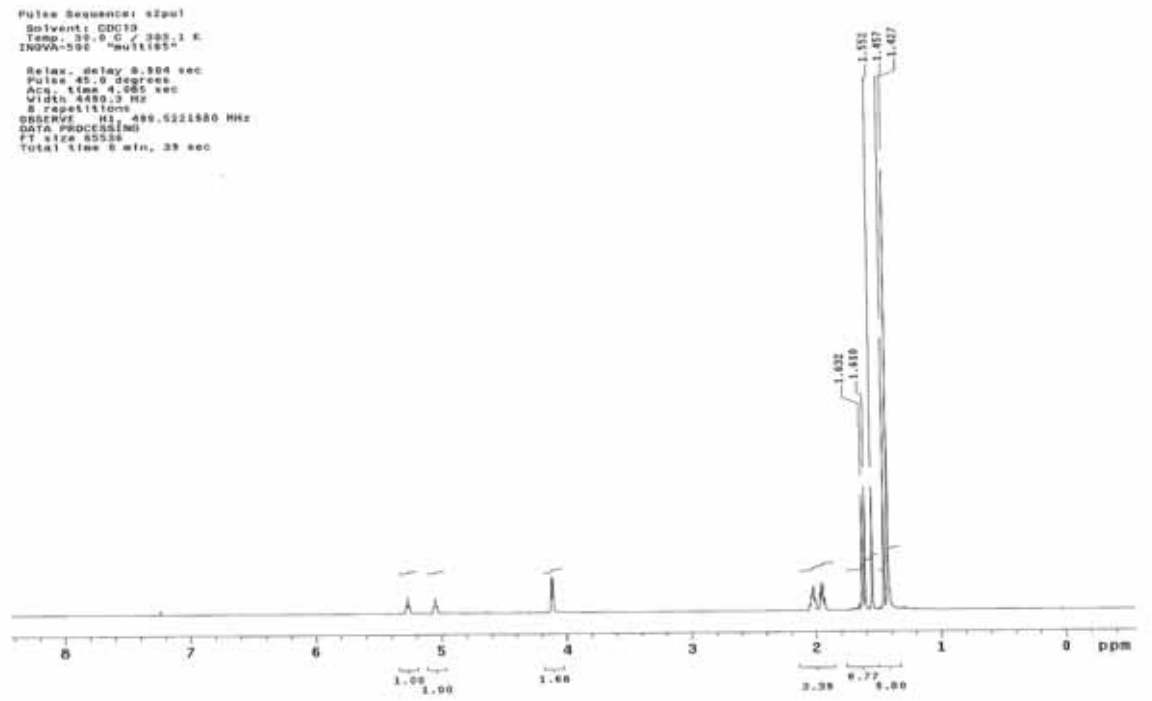


Figura 150. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **80** ($CDCl_3$, 11,7 T)

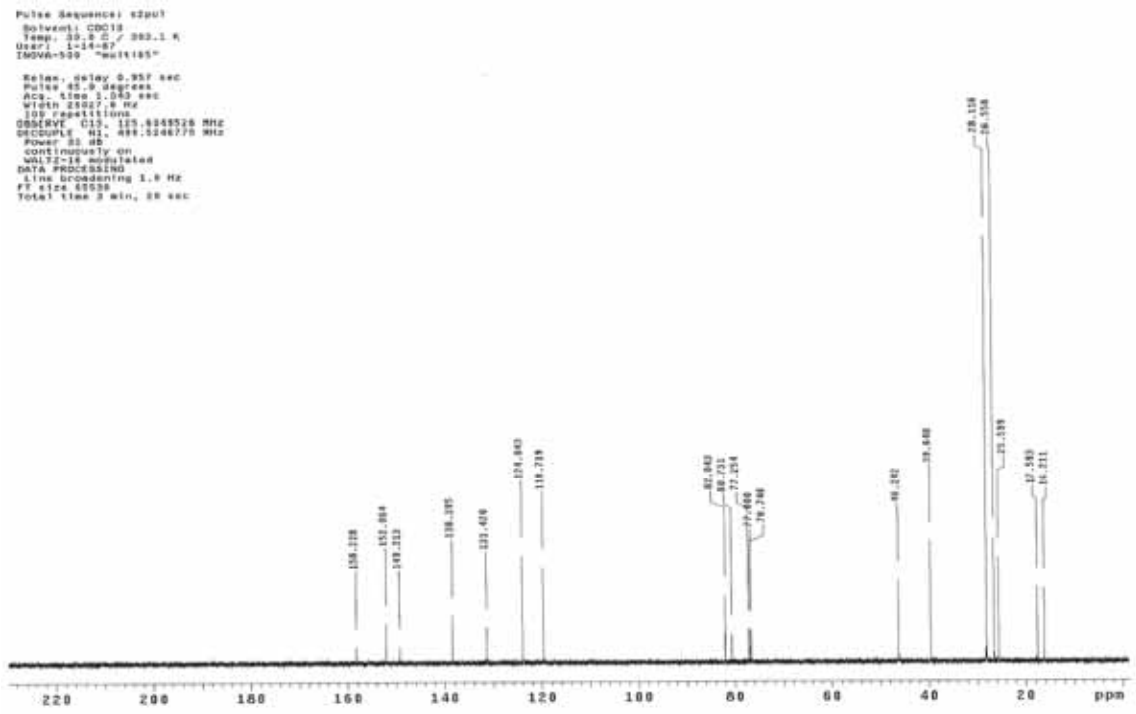


Figura 151. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **80** ($CDCl_3$, 11,7 T)

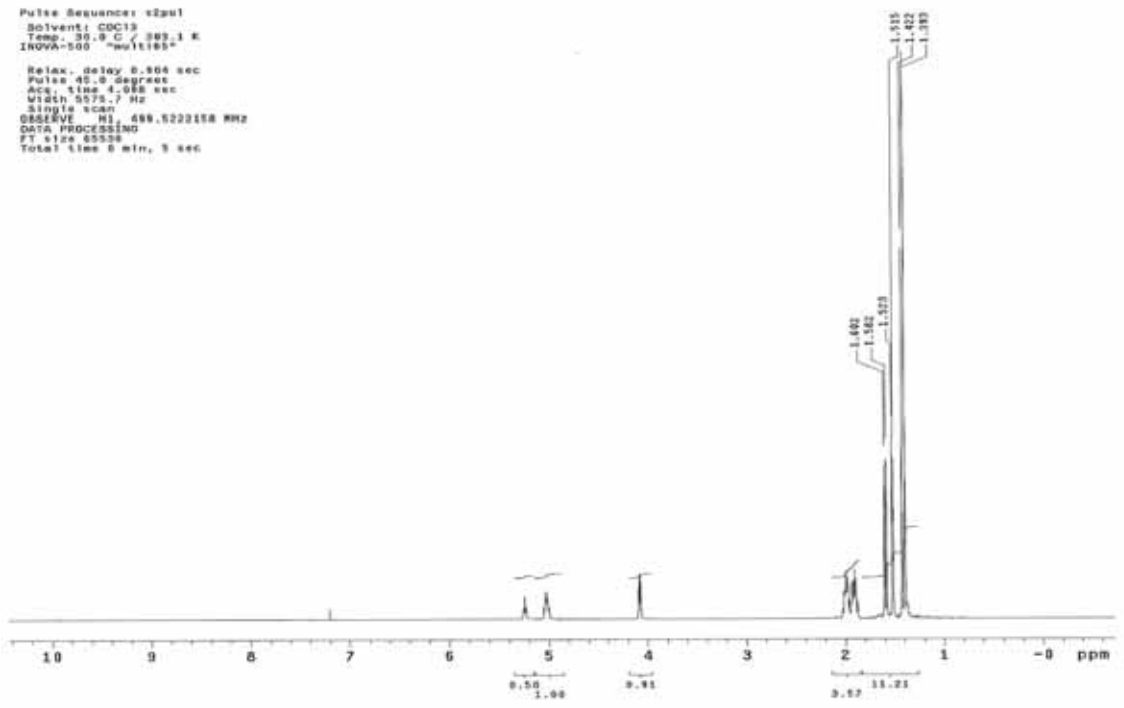


Figura 152. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **81** ($CDCl_3$, 11,7 T)

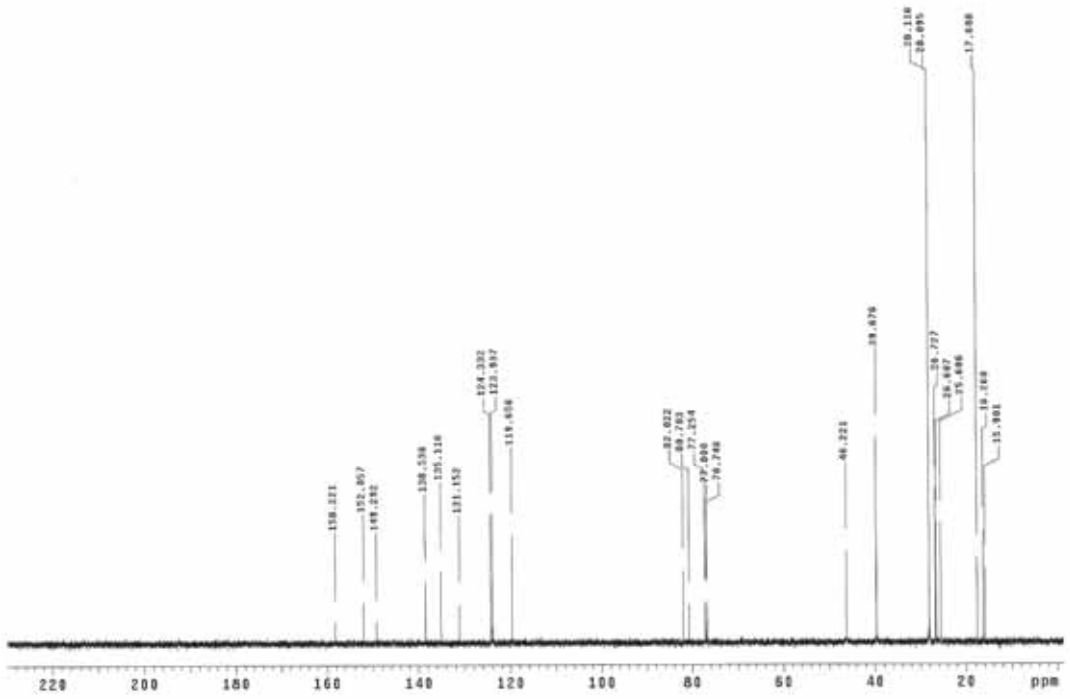


Figura 153. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **81** ($CDCl_3$, 11,7 T)

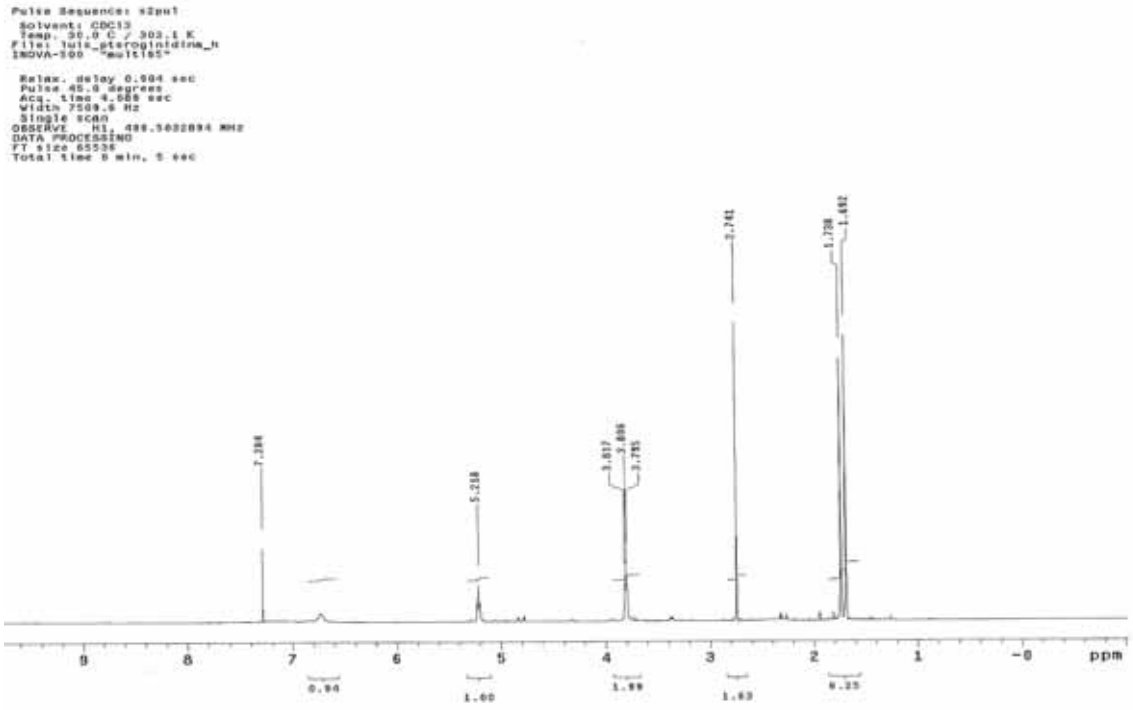


Figura 154. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **82** ($CDCl_3$, 11,7 T)

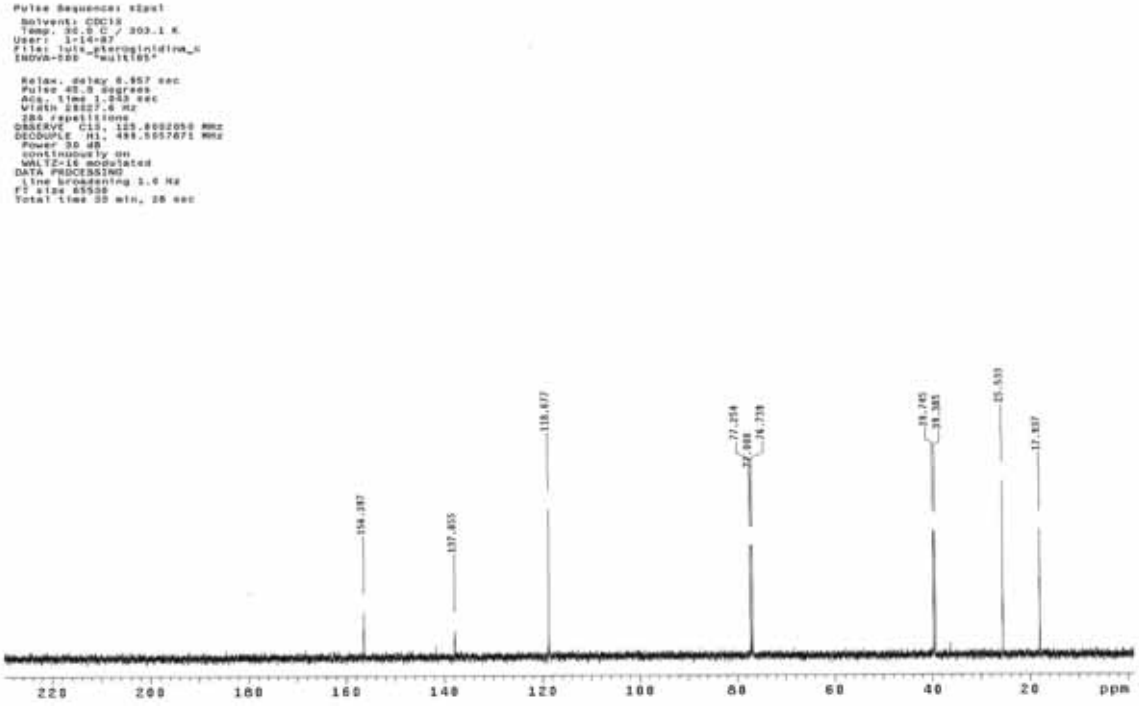


Figura 155. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **82** ($CDCl_3$, 11,7 T)

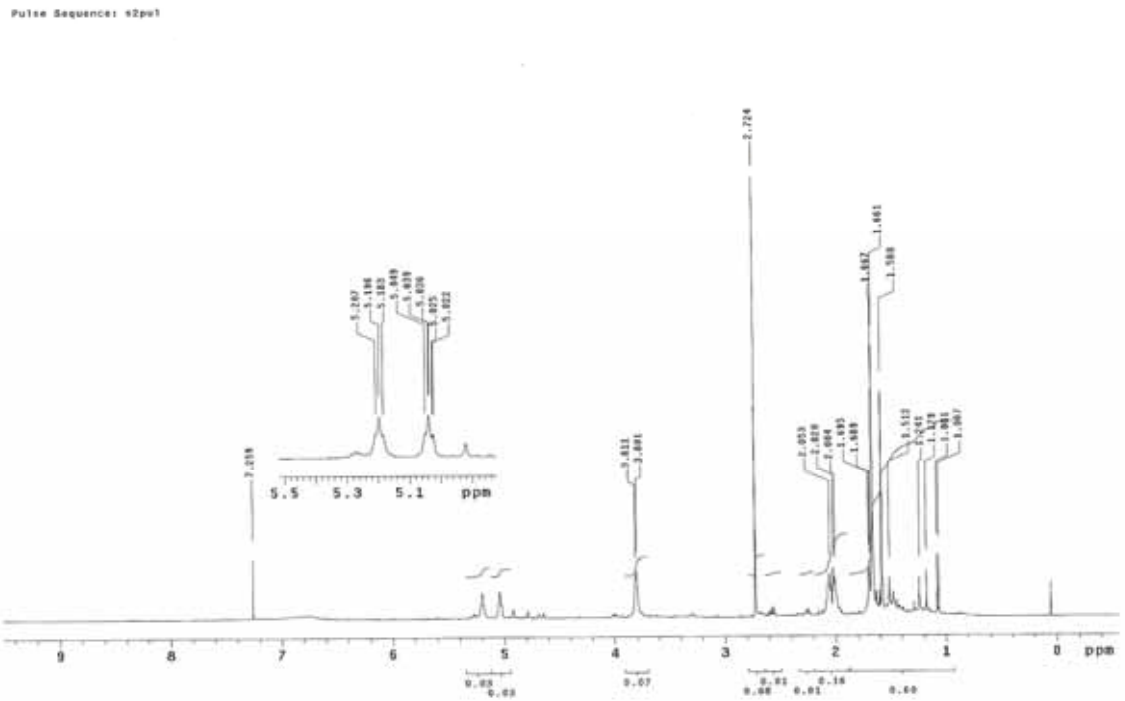


Figura 156. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **83** ($CDCl_3$, 11,7 T)

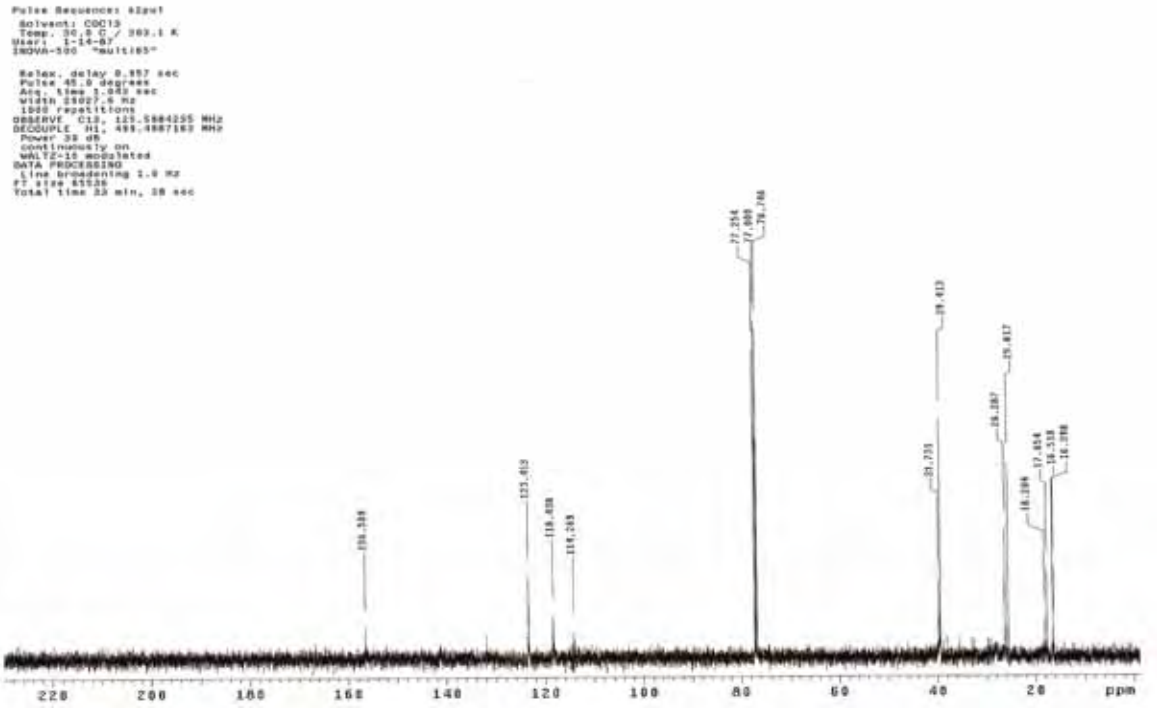


Figura 157. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **83** ($CDCl_3$, 11,7 T)

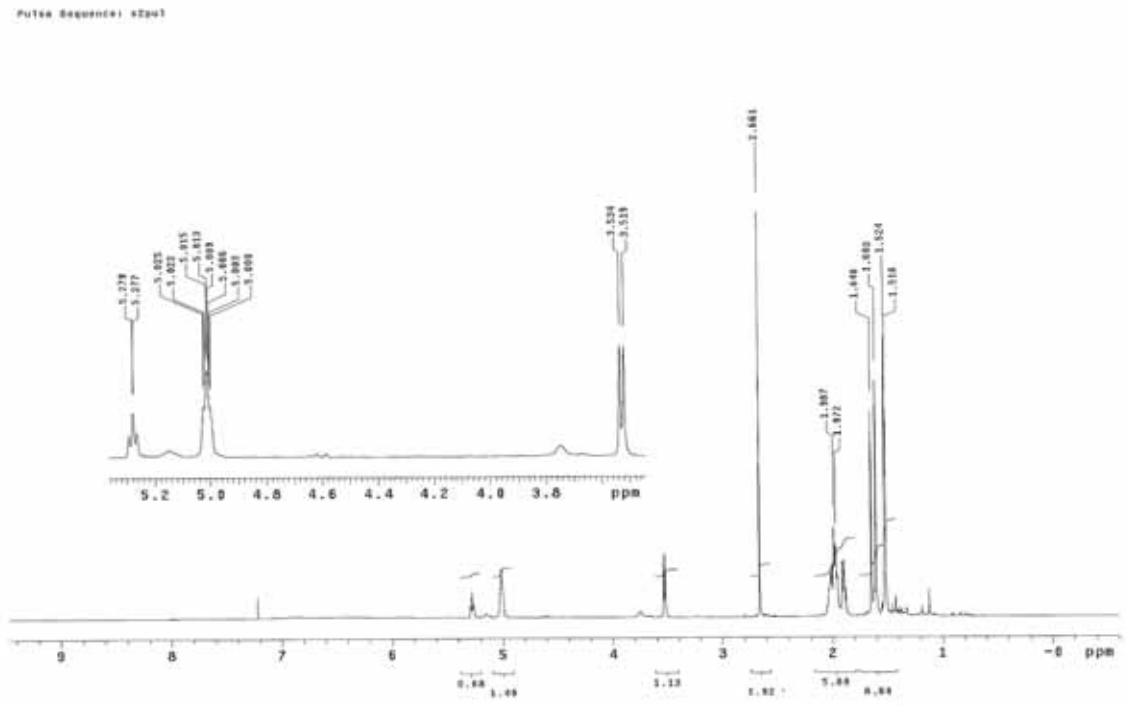


Figura 158. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **84** ($CDCl_3$, 11,7 T)

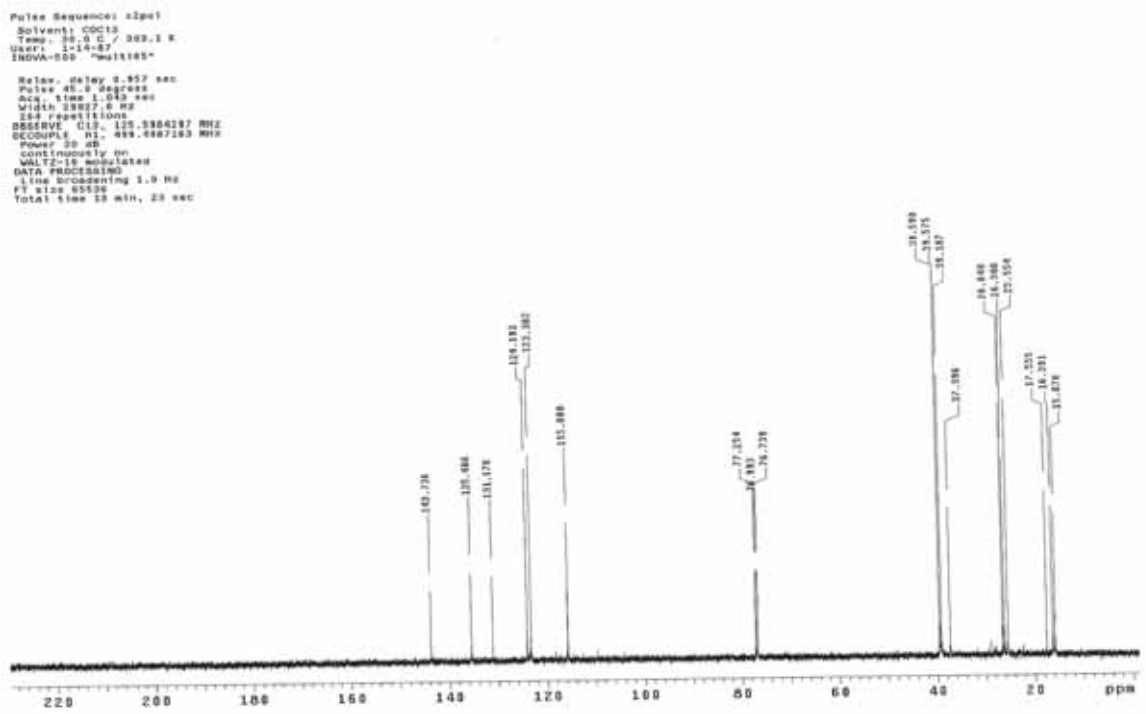


Figura 159. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **84** ($CDCl_3$, 11,7 T)

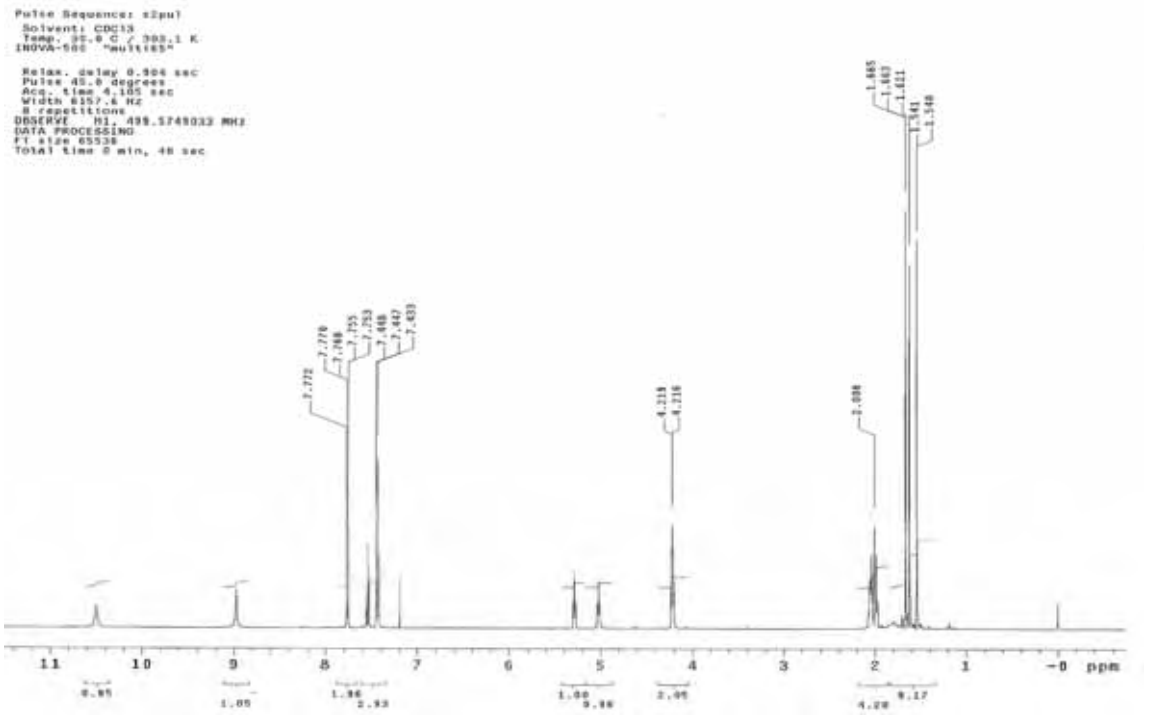


Figura 160. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **86** ($CDCl_3$, 11,7 T)

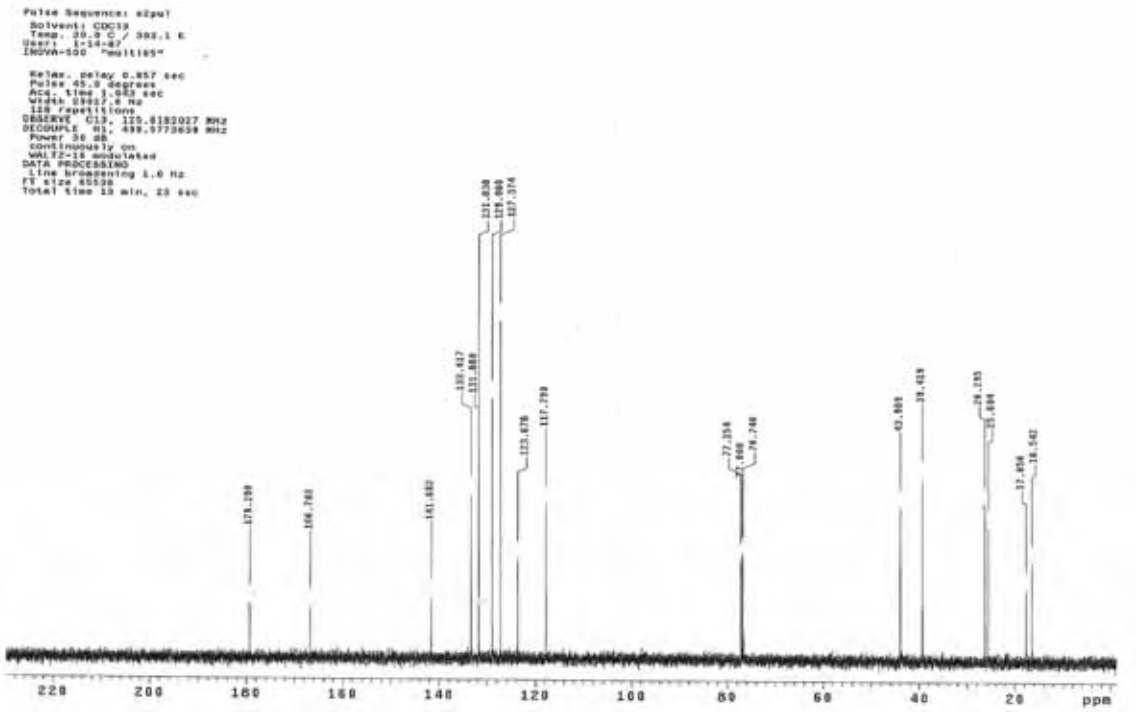


Figura 161. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **86** ($CDCl_3$, 11,7 T)

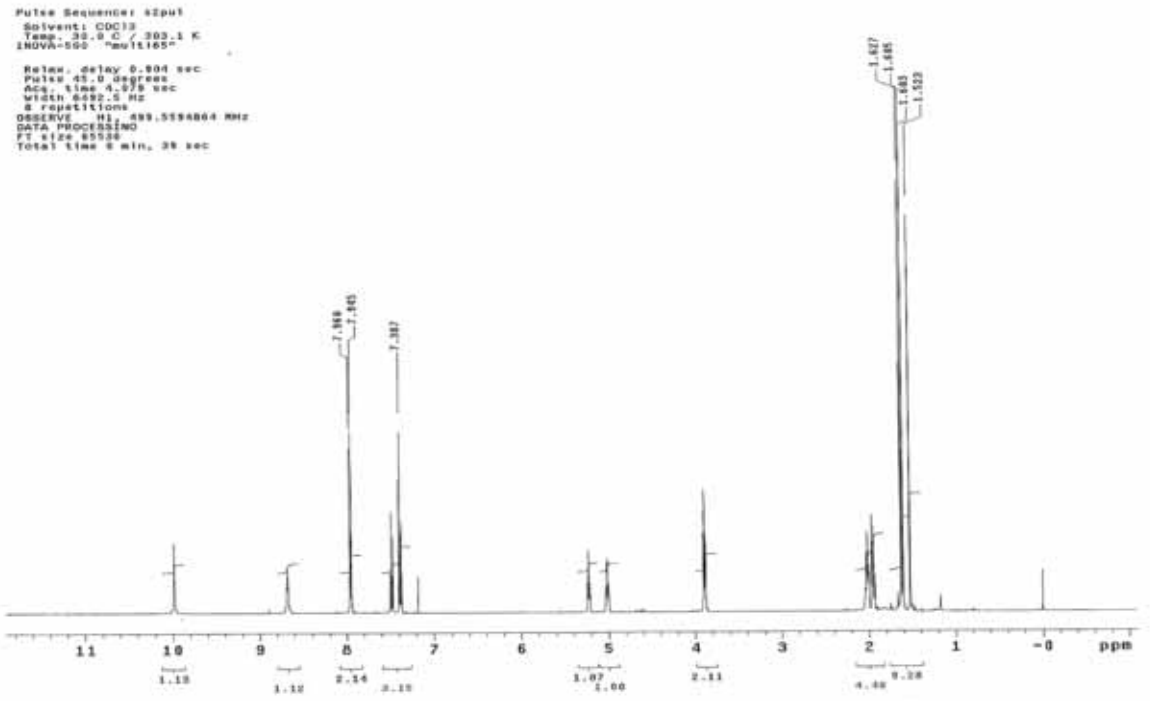


Figura 162. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **87** ($CDCl_3$, 11,7 T)

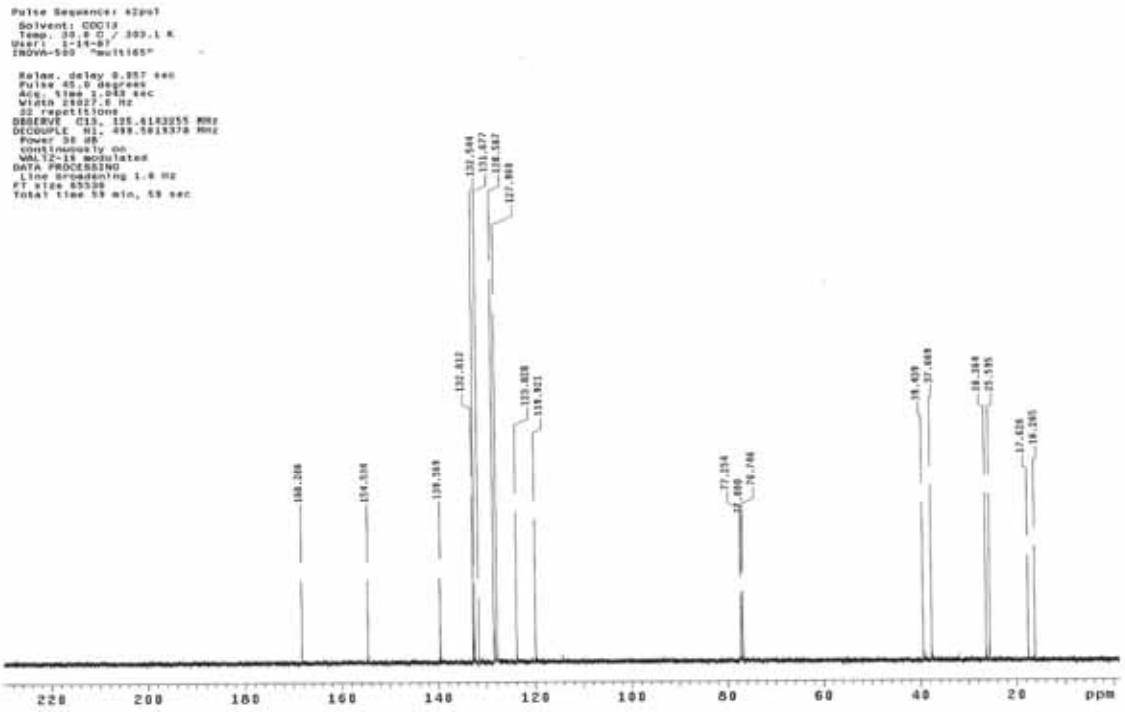


Figura 163. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **87** ($CDCl_3$, 11,7 T)

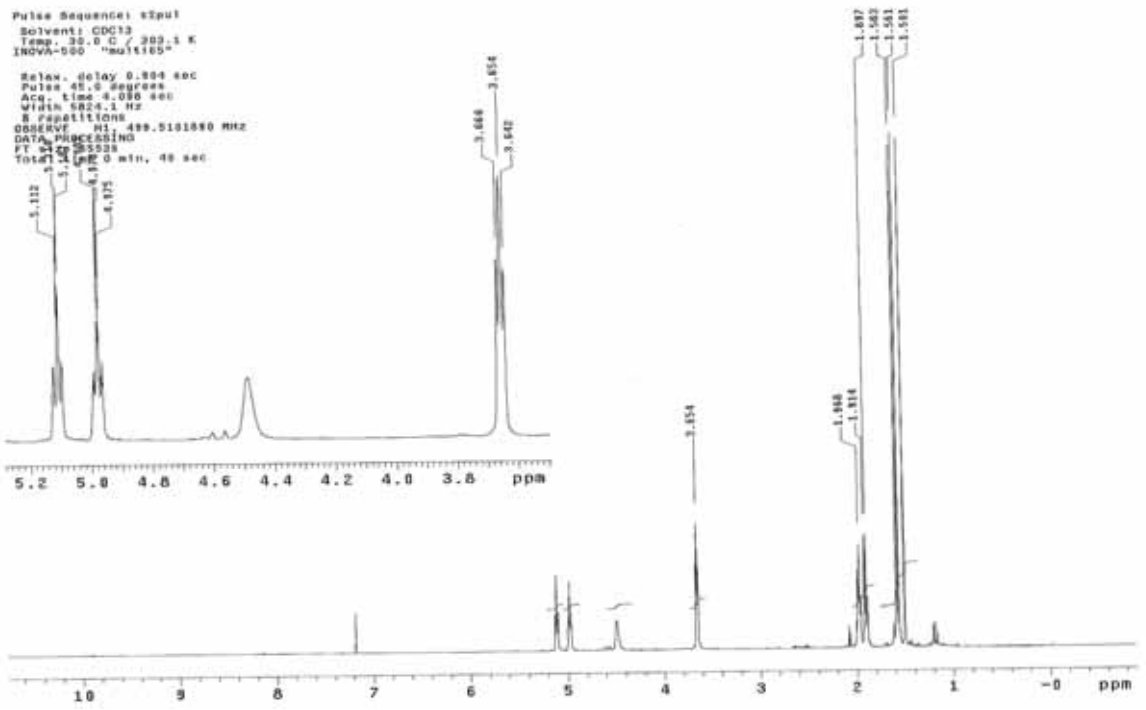


Figura 164. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **90** ($CDCl_3$, 11,7 T)

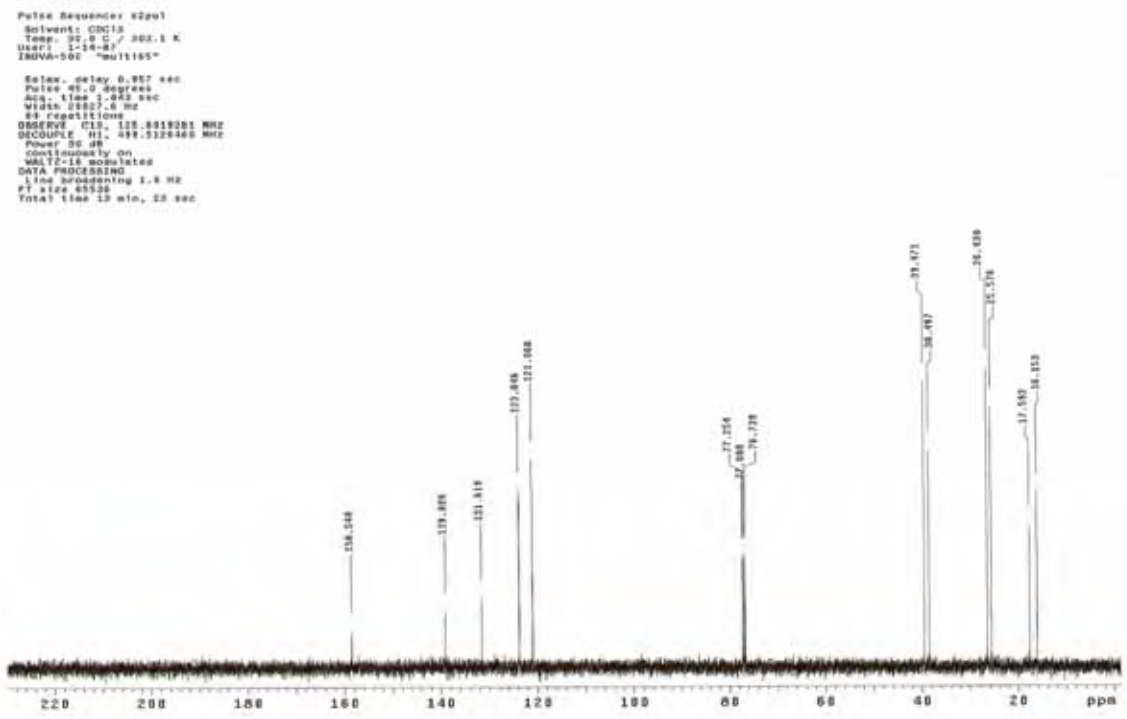


Figura 165. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **90** ($CDCl_3$, 11,7 T)

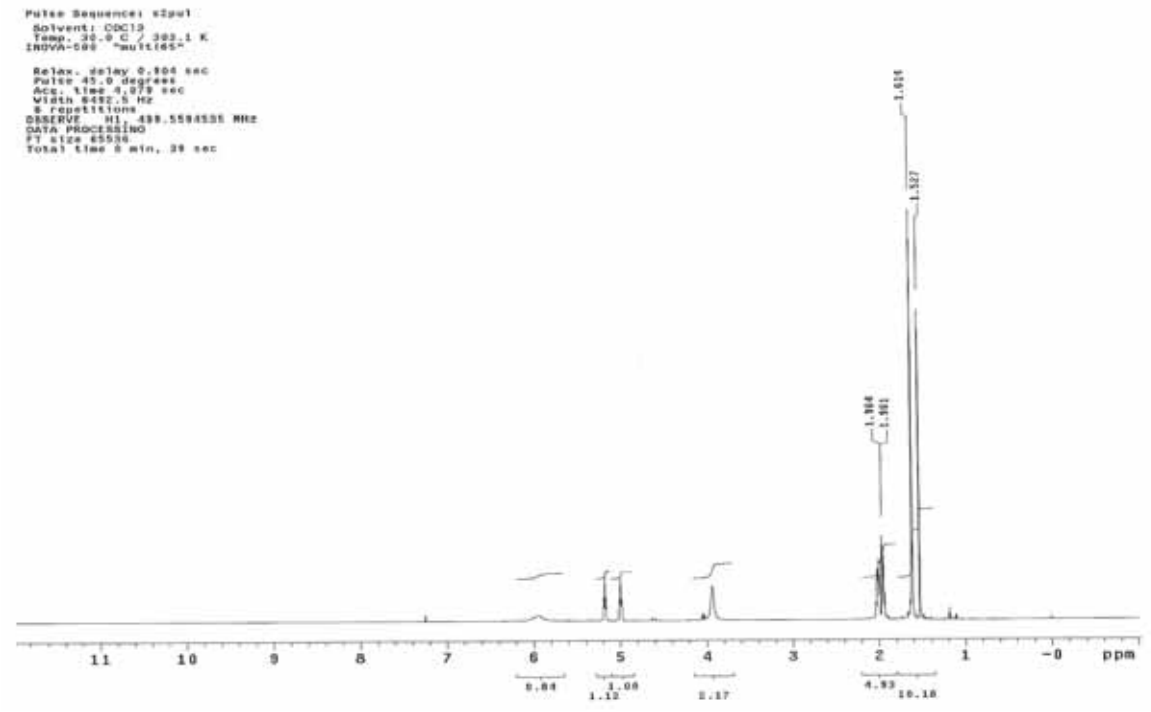


Figura 166. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **91** ($CDCl_3$, 11,7 T)

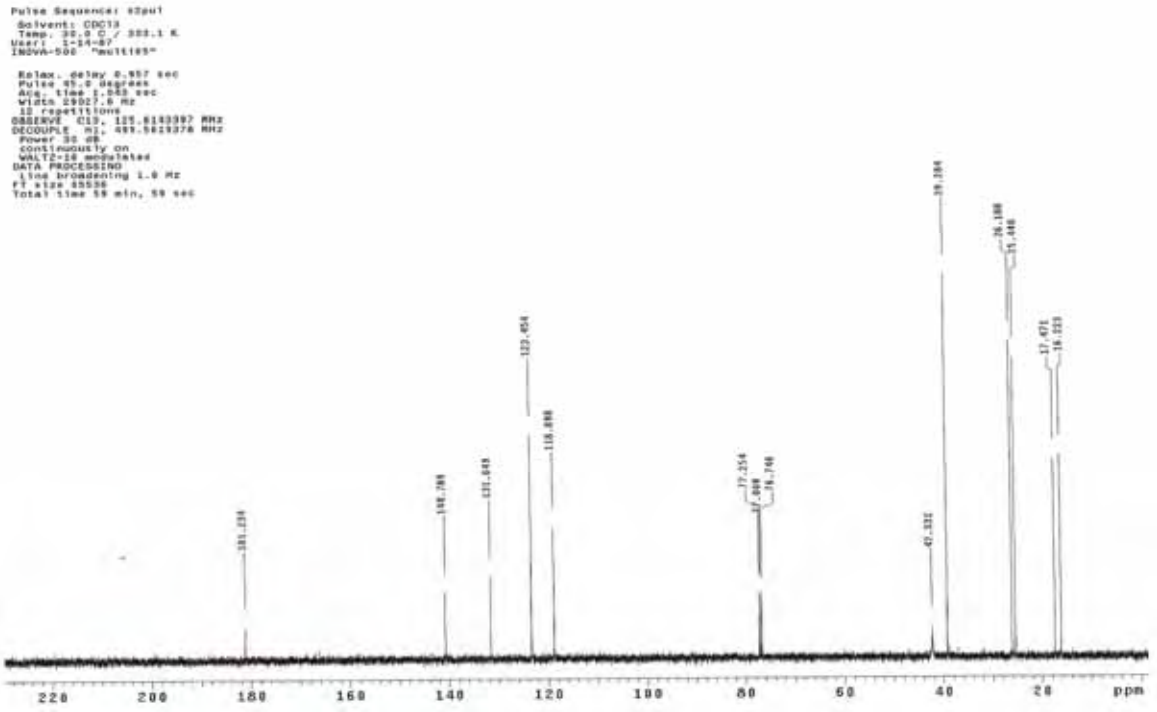


Figura 167. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **91** ($CDCl_3$, 11,7 T)

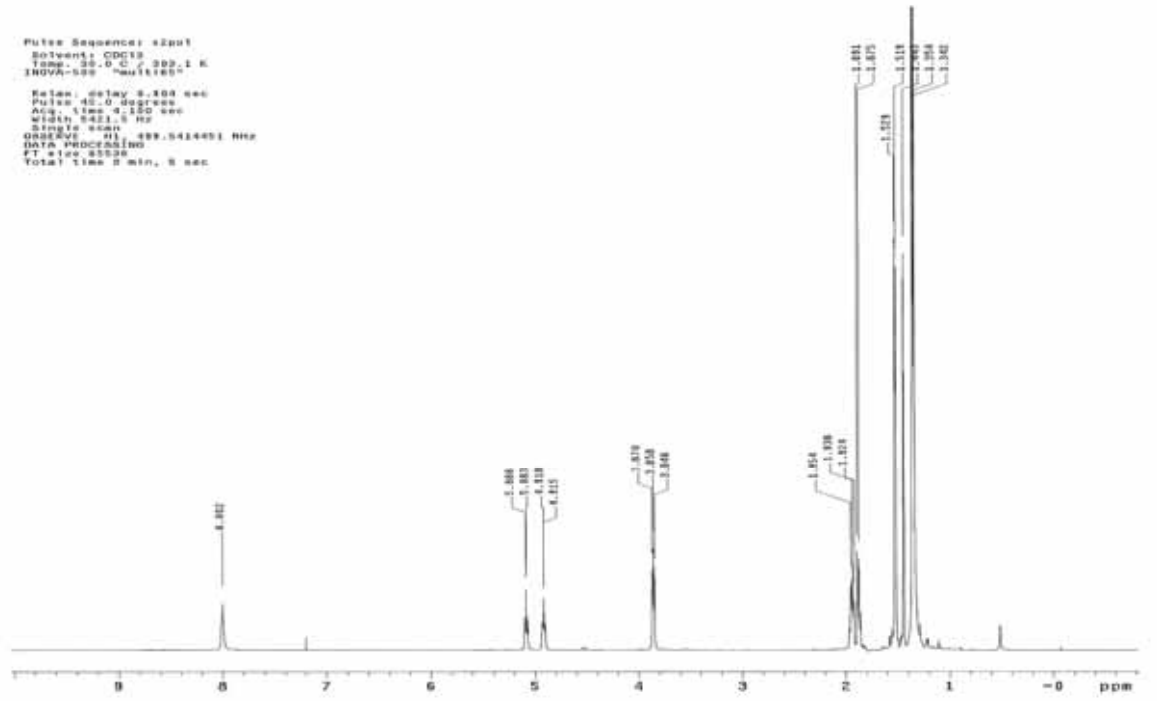


Figura 168. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **92** ($CDCl_3$, 11,7 T)

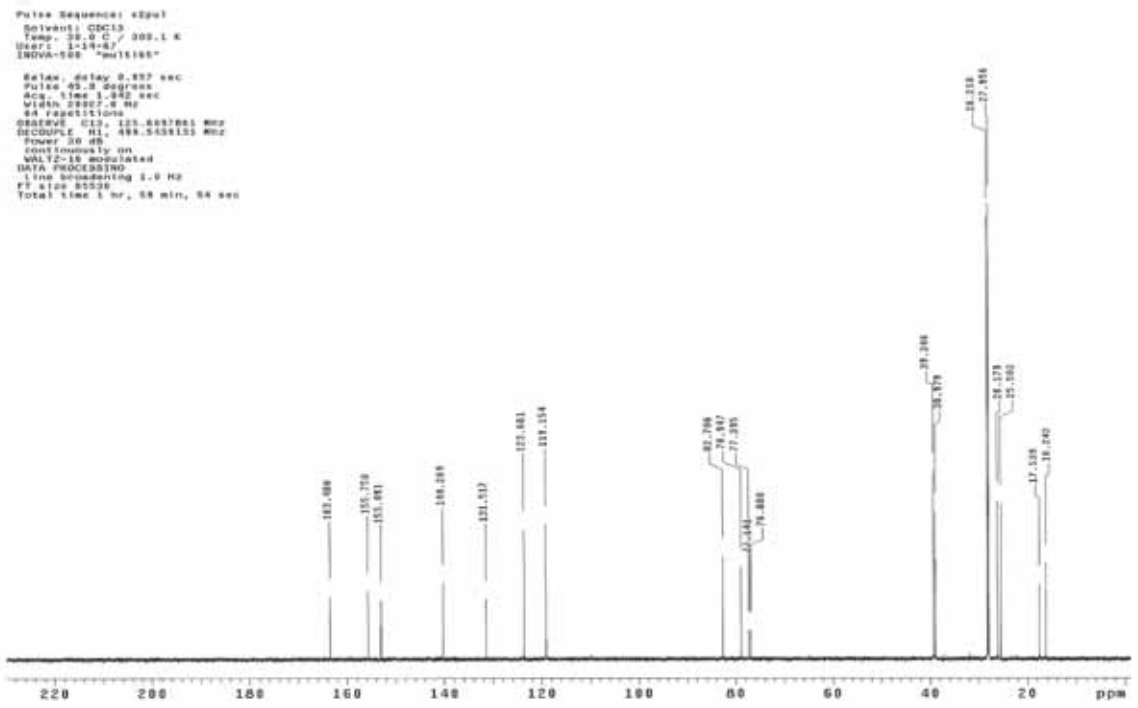


Figura 169. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **92** ($CDCl_3$, 11,7 T)

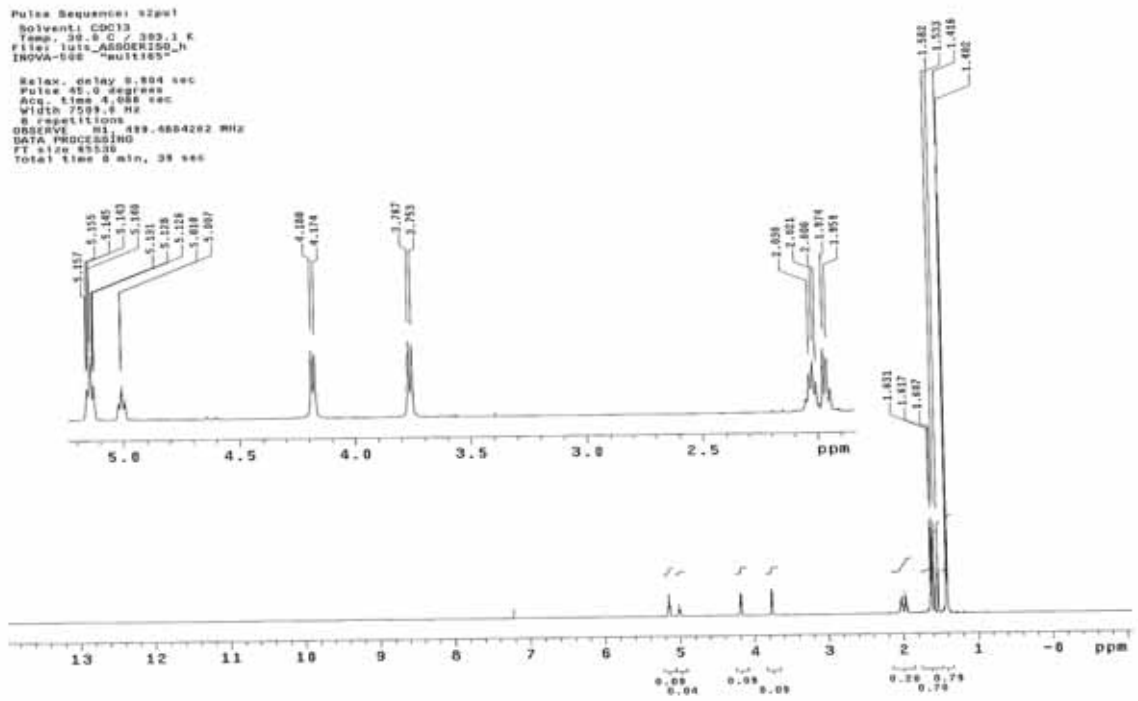


Figura 170. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **93** ($CDCl_3$, 11,7 T)

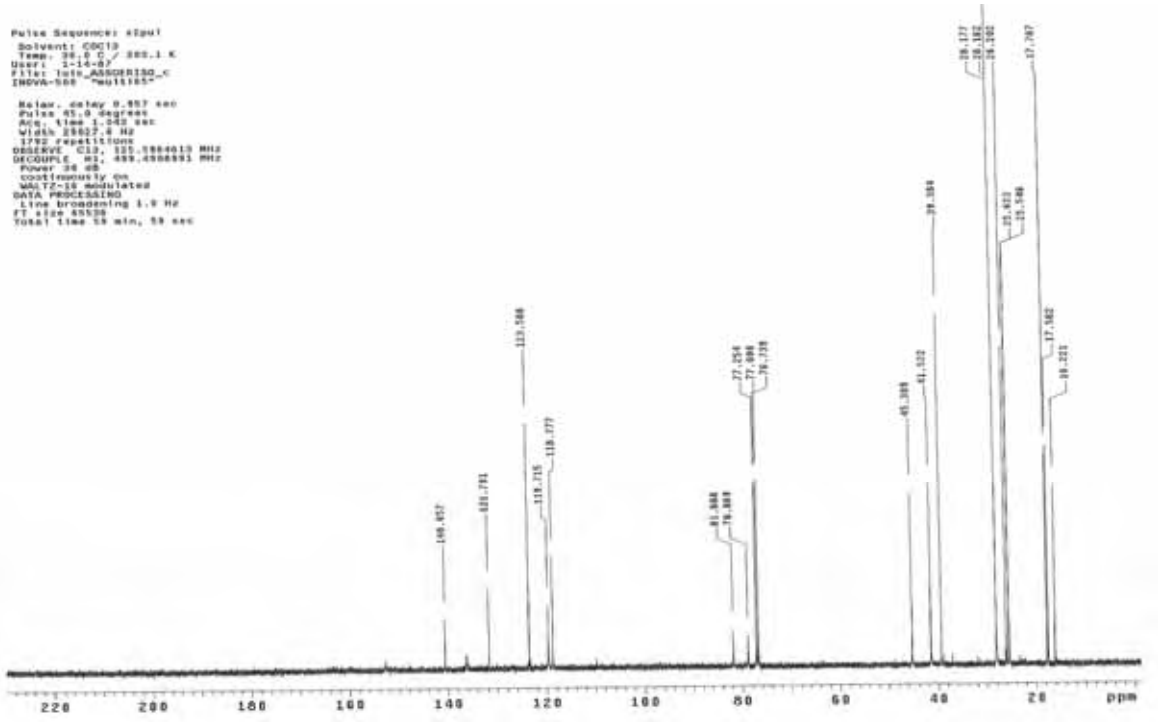


Figura 171. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **93** ($CDCl_3$, 11,7 T)

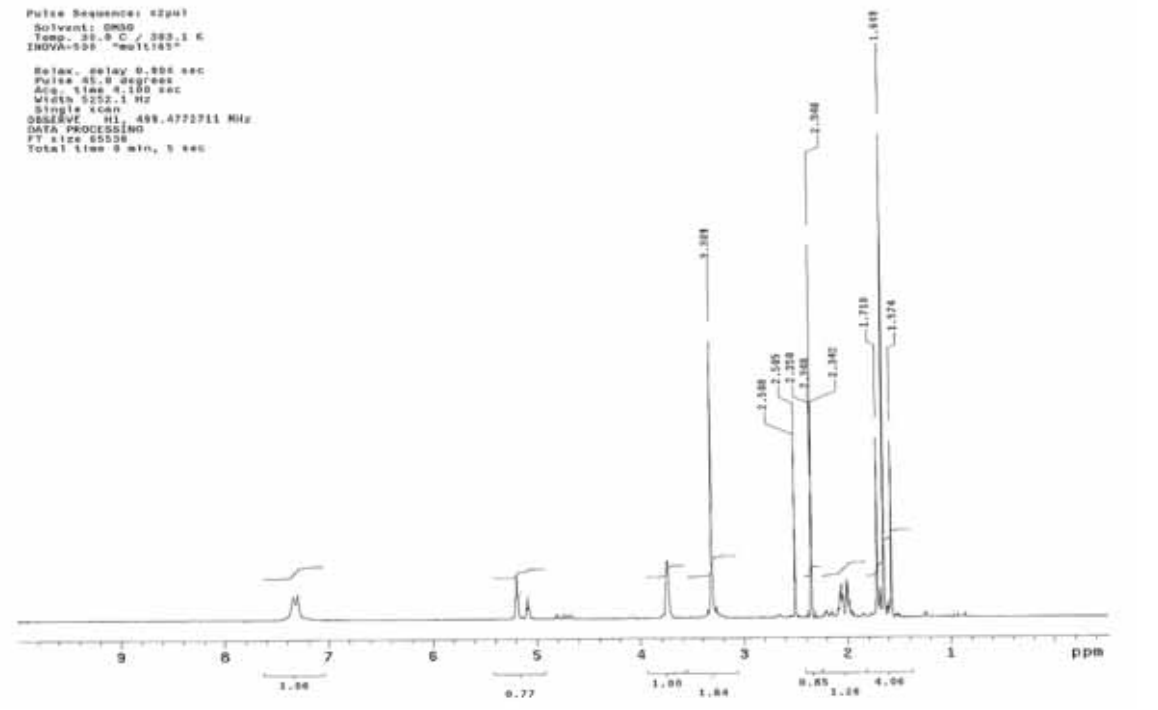


Figura 172. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **94** (DMSO-d_6, 11,7 T)

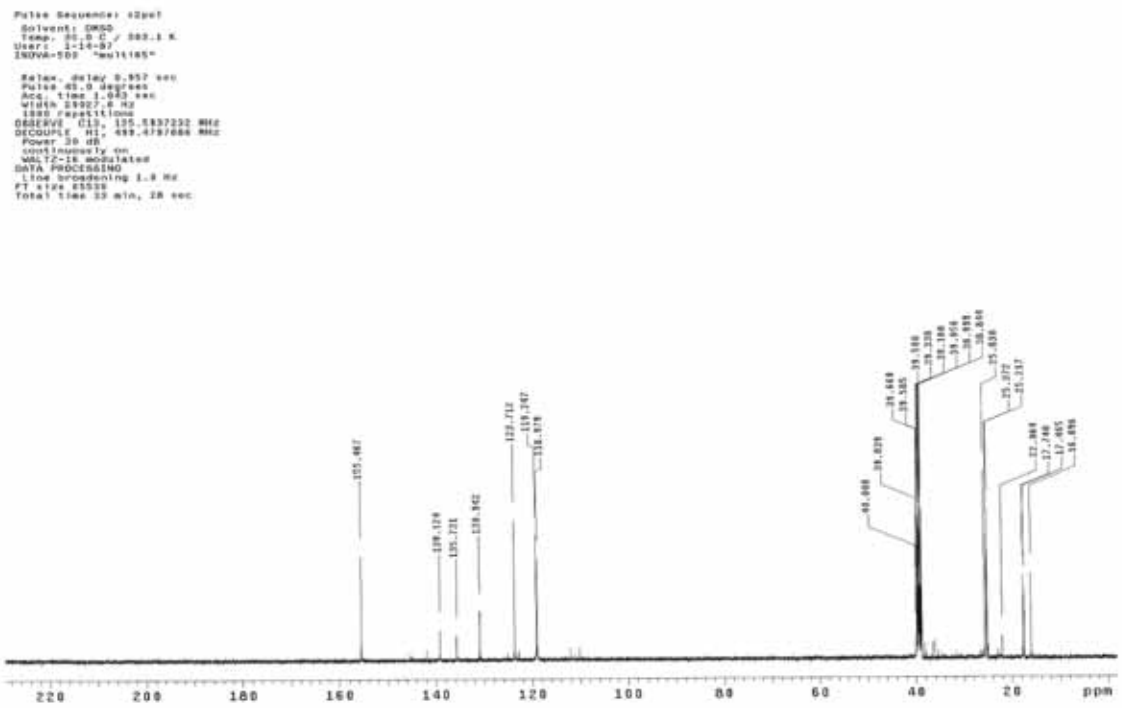


Figura 173. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **94** (DMSO-d_6, 11,7 T)

CAPÍTULO 9

Espectros de massas (pág 202)

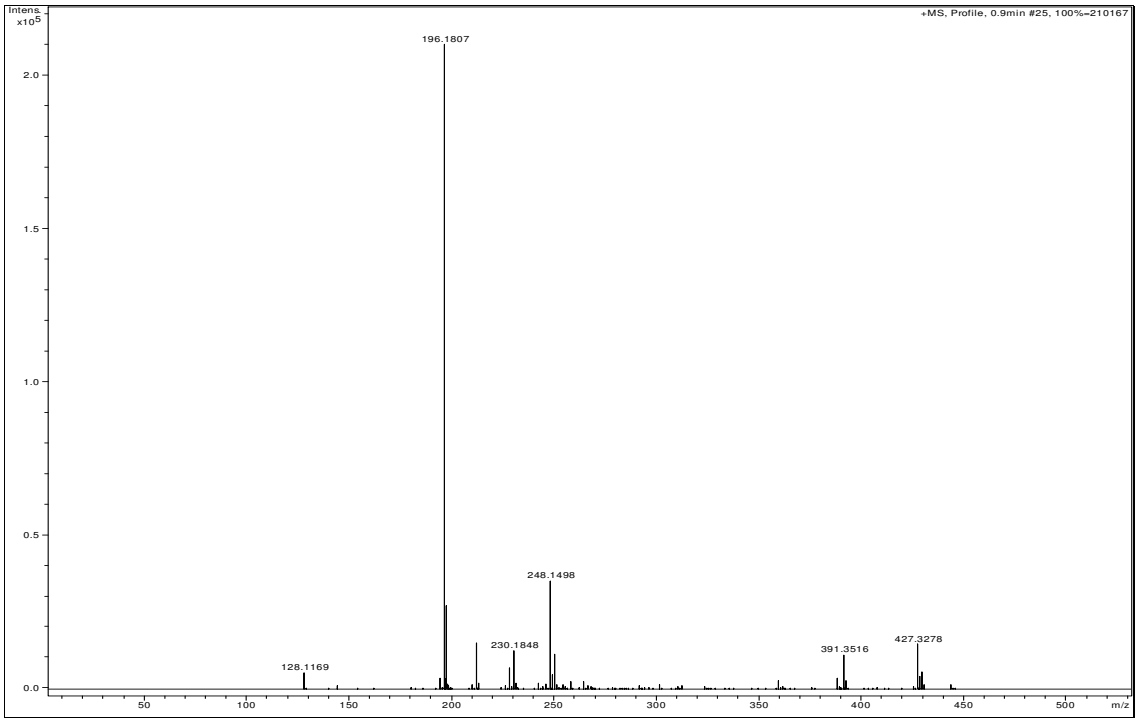


Figura 174. Espectro de massas de alta resolução da substância **42** (modo positivo)

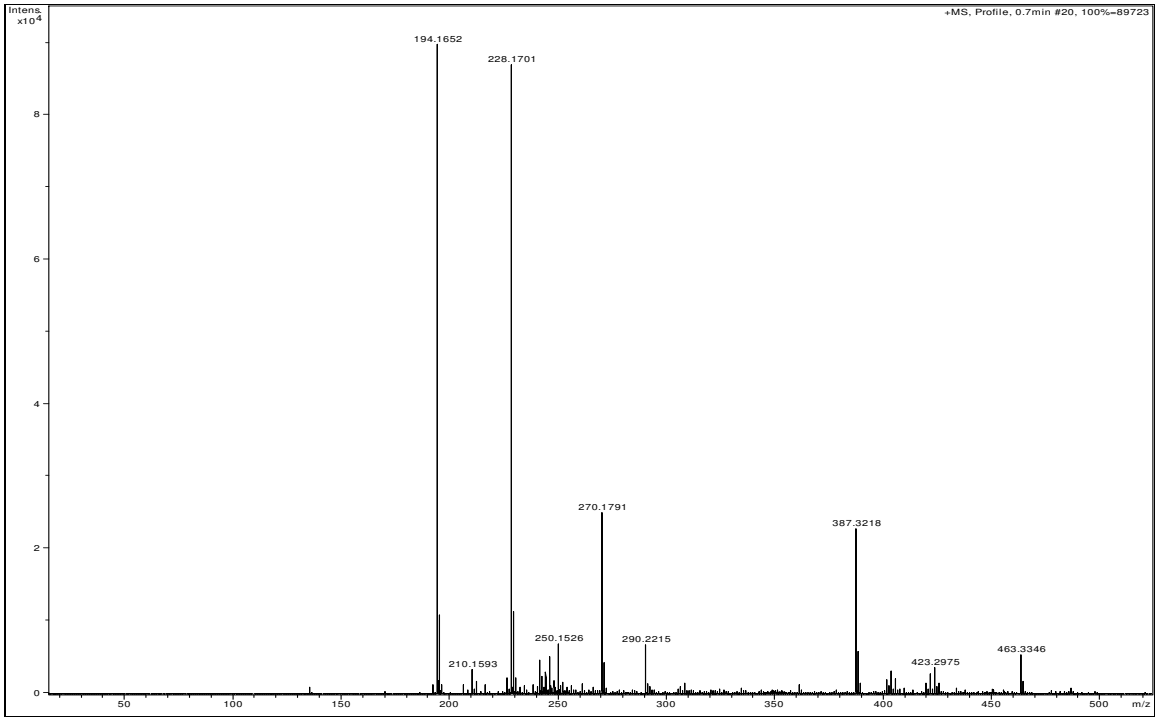


Figura 175. Espectro de massas de alta resolução da substância **43** (modo positivo)

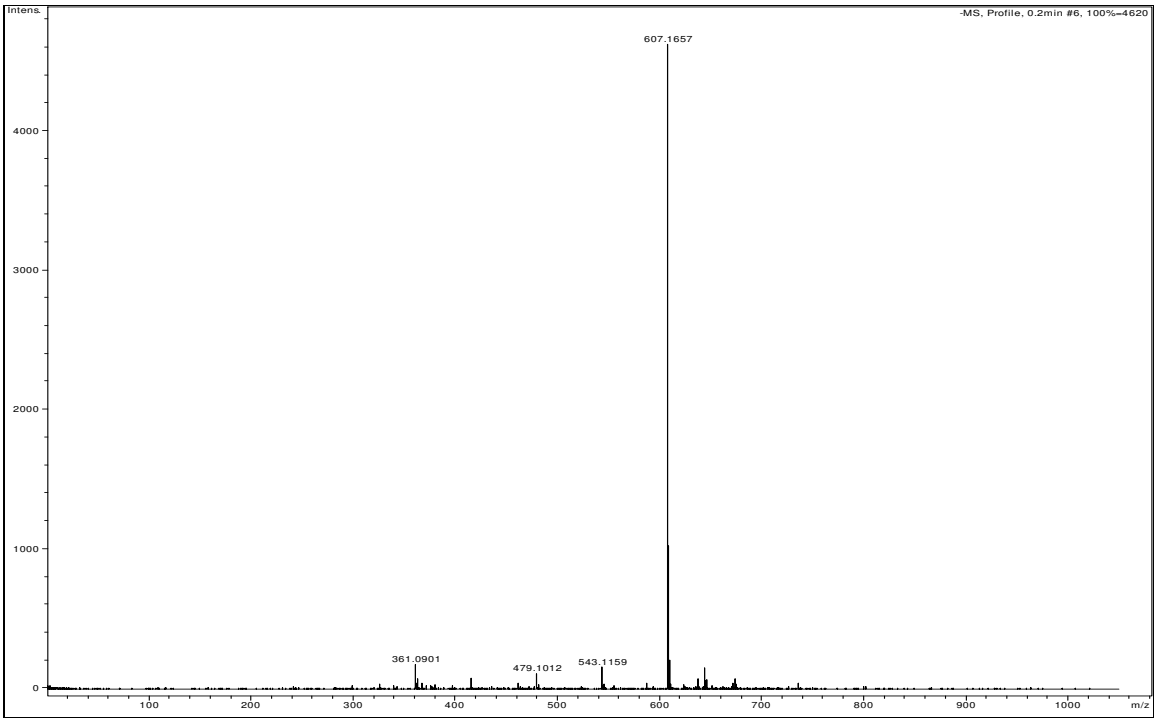


Figura 176. Espectro de massas de alta resolução da substância **45** (modo negativo)

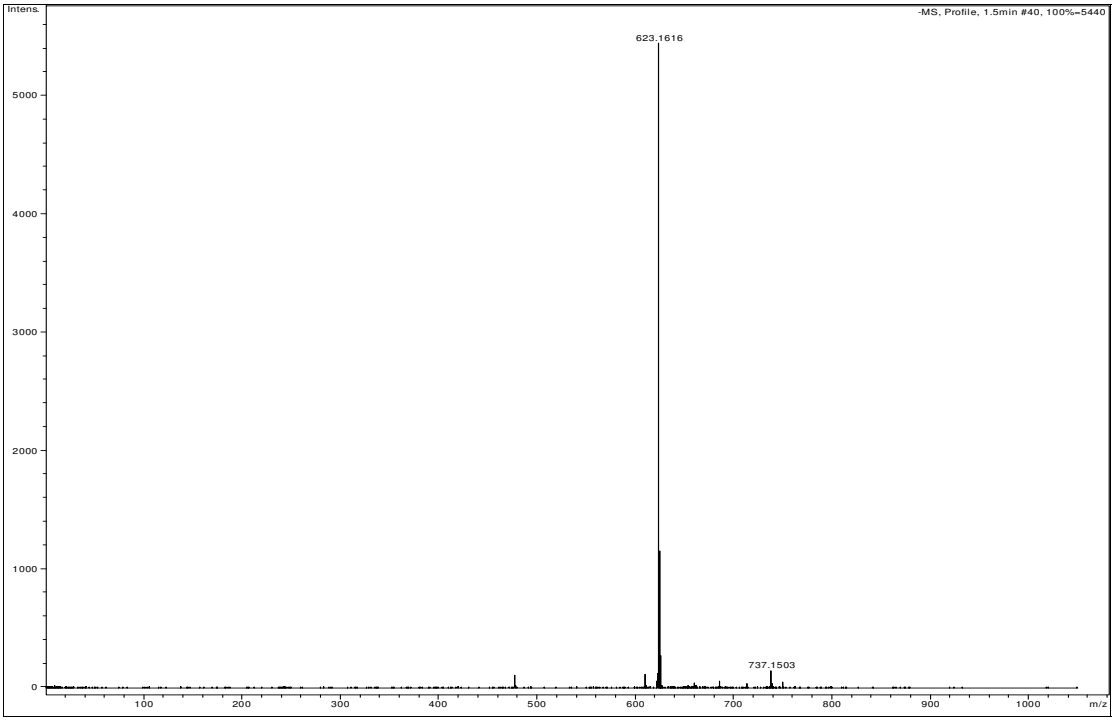


Figura 177. Espectro de massas de alta resolução da substância **47** (modo negativo)

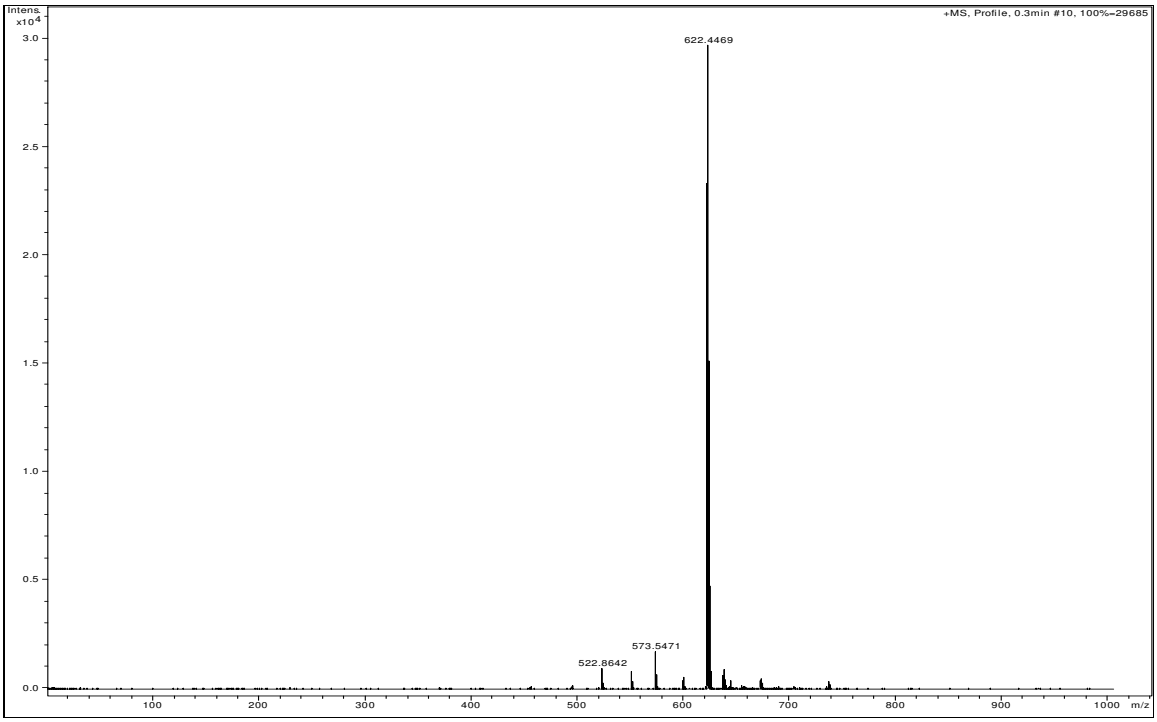


Figura 178. Espectro de massas de alta resolução da substância **51** (modo negativo)

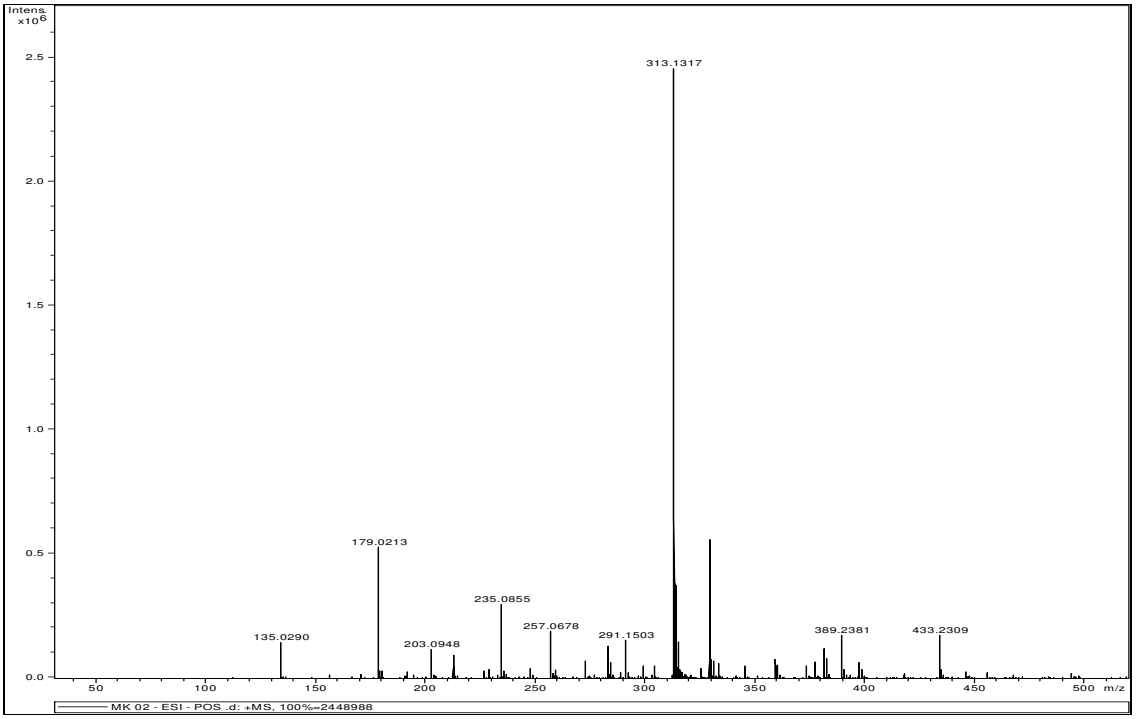


Figura 179. Espectro de massas de baixa resolução da substância **67** (modo positivo)

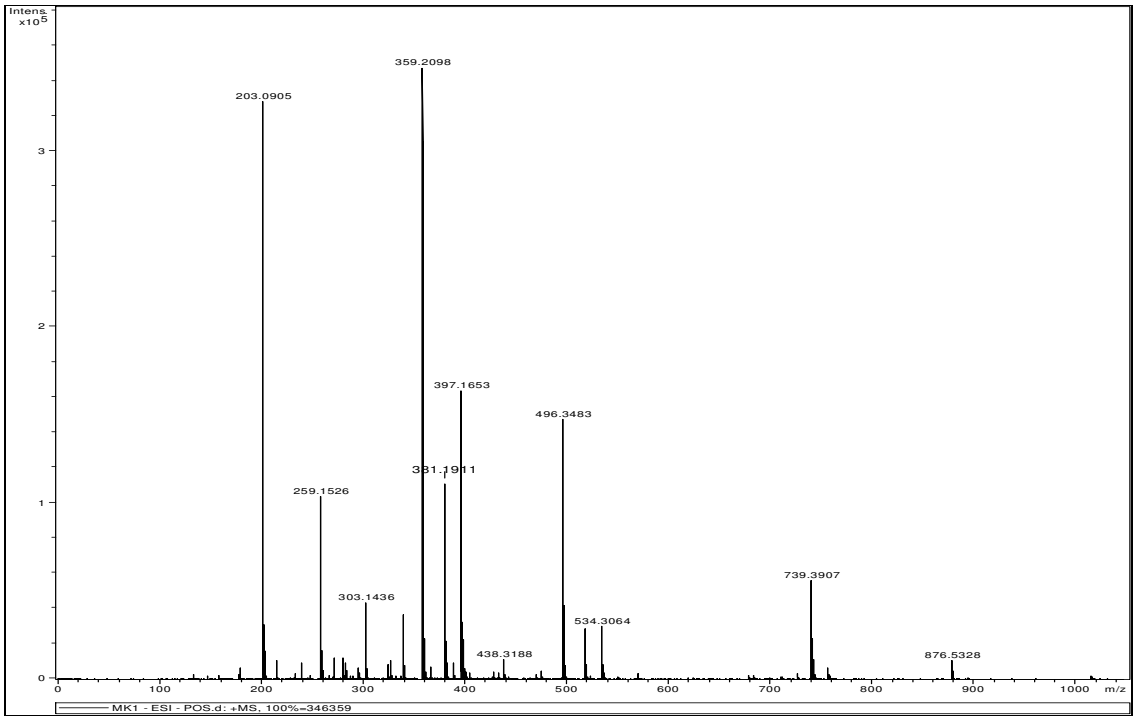


Figura 180. Espectro de massas de baixa resolução da substância **68** (modo positivo)

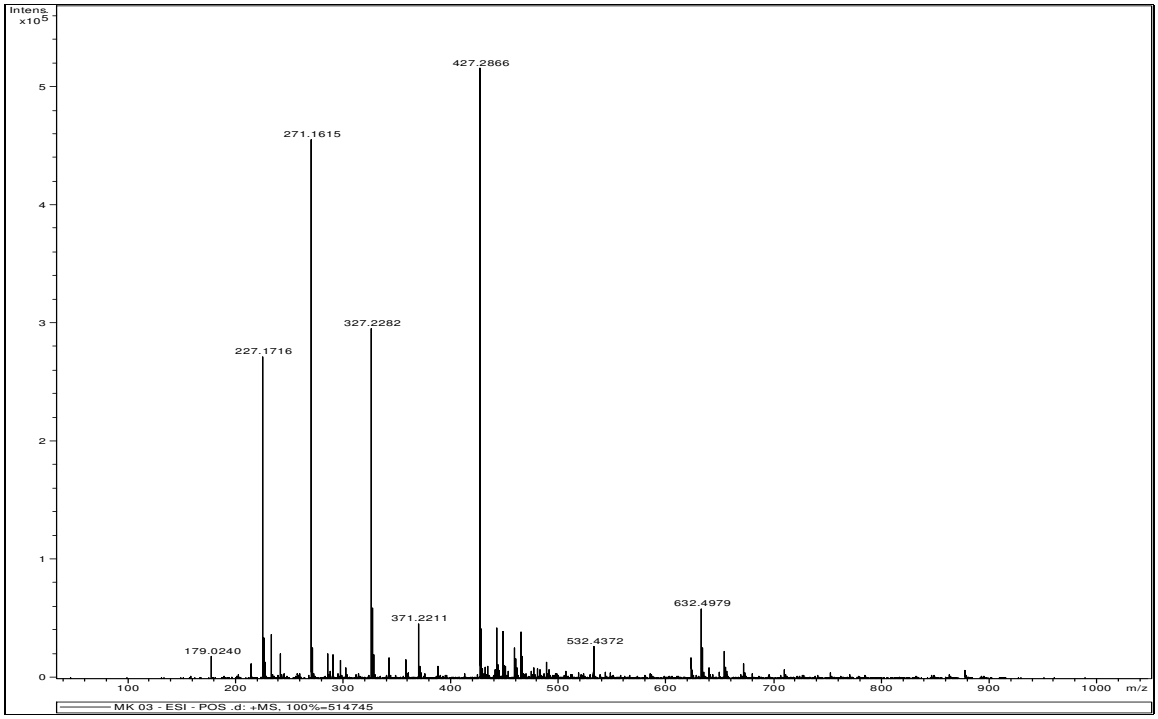


Figura 181. Espectro de massas de baixa resolução da substância **69** (modo positivo)

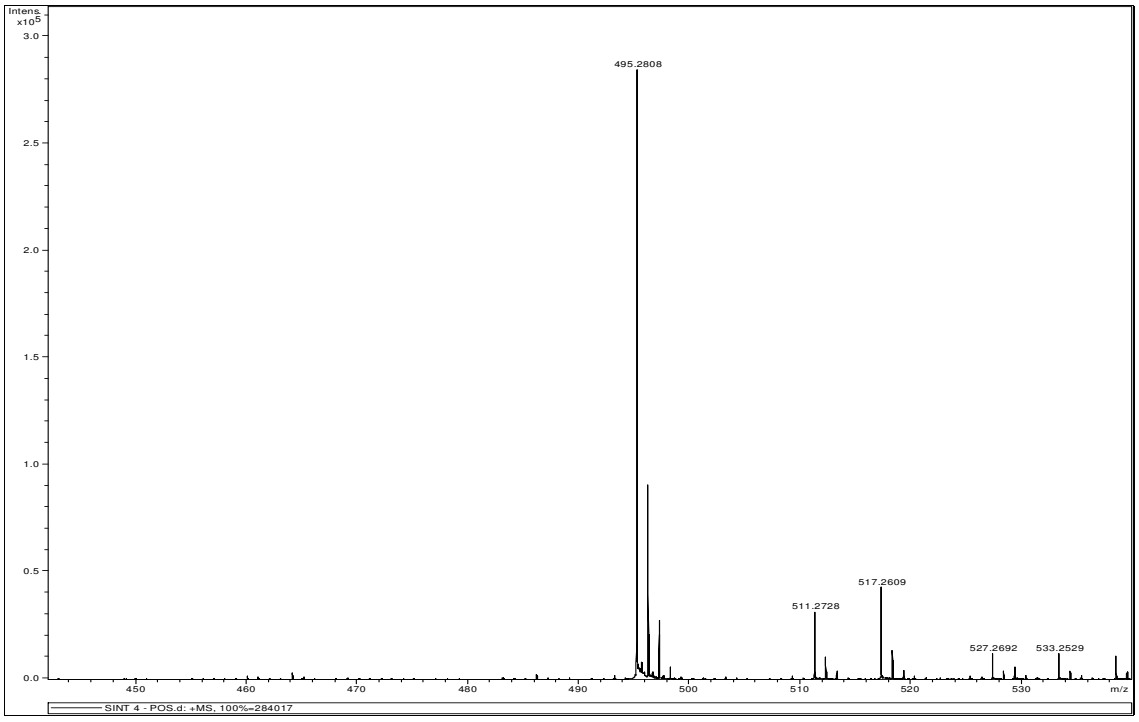


Figura 182. Espectro de massas de baixa resolução da substância **70** (modo positivo)

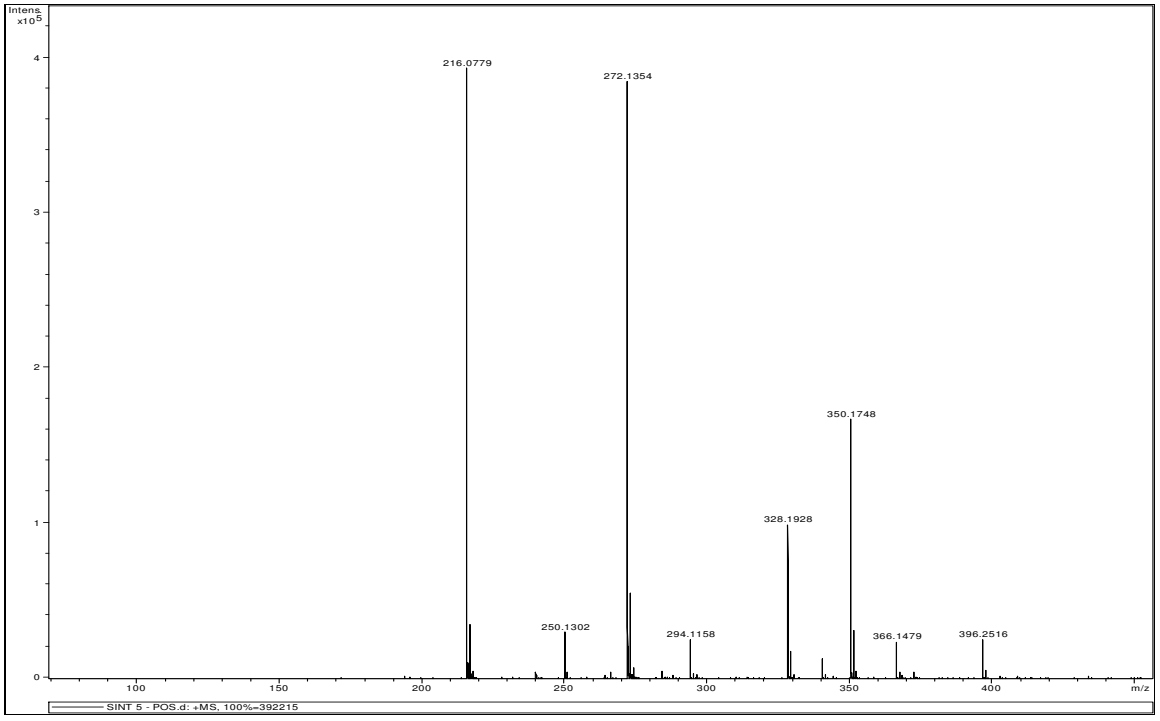


Figura 183. Espectro de massas de baixa resolução da substância **71** (modo positivo)

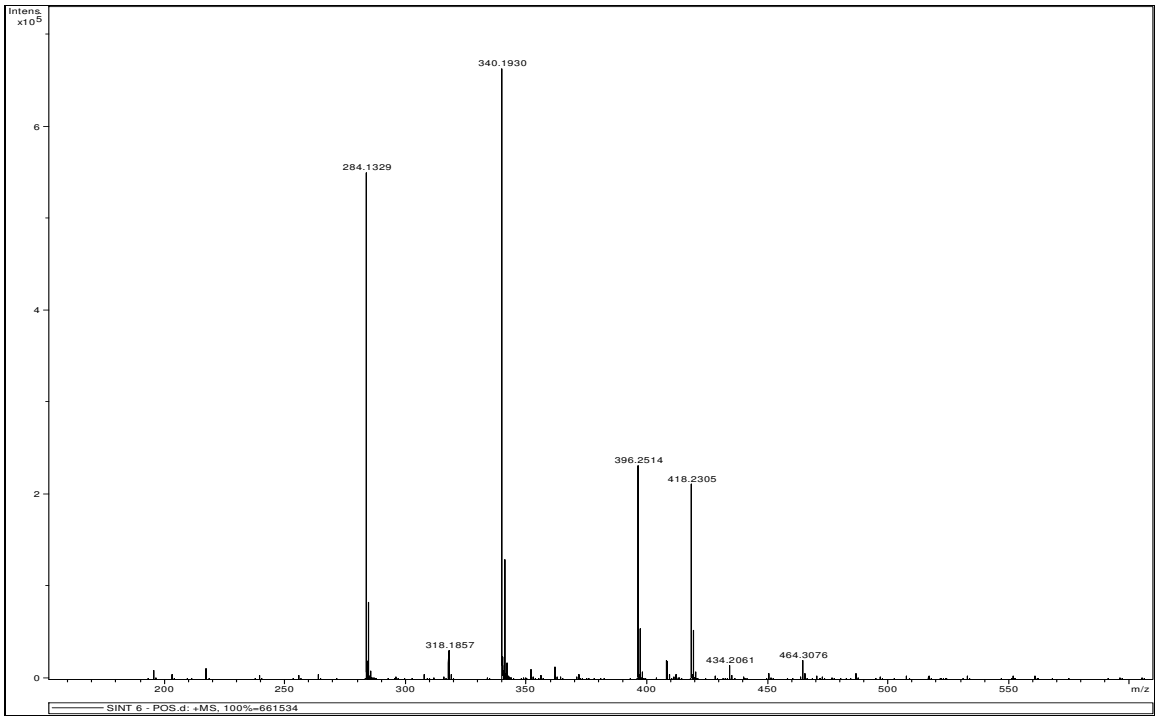


Figura 184. Espectro de massas de baixa resolução da substância **72** (modo positivo)

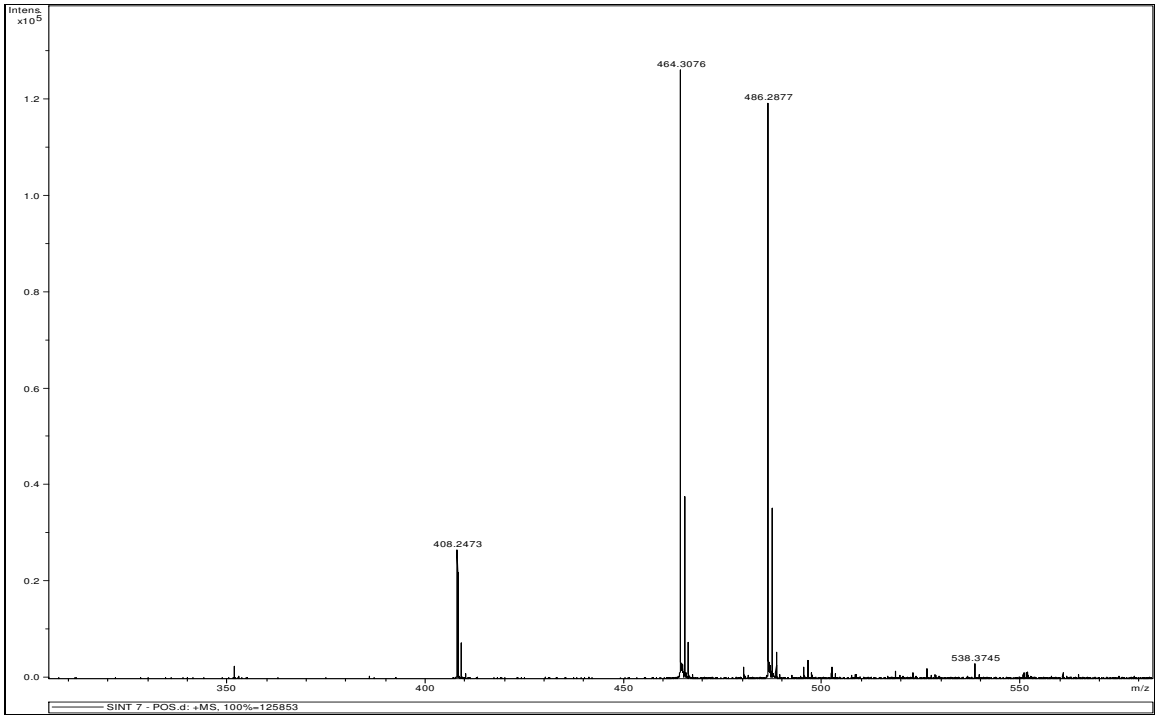


Figura 185. Espectro de massas de baixa resolução da substância **73** (modo positivo)

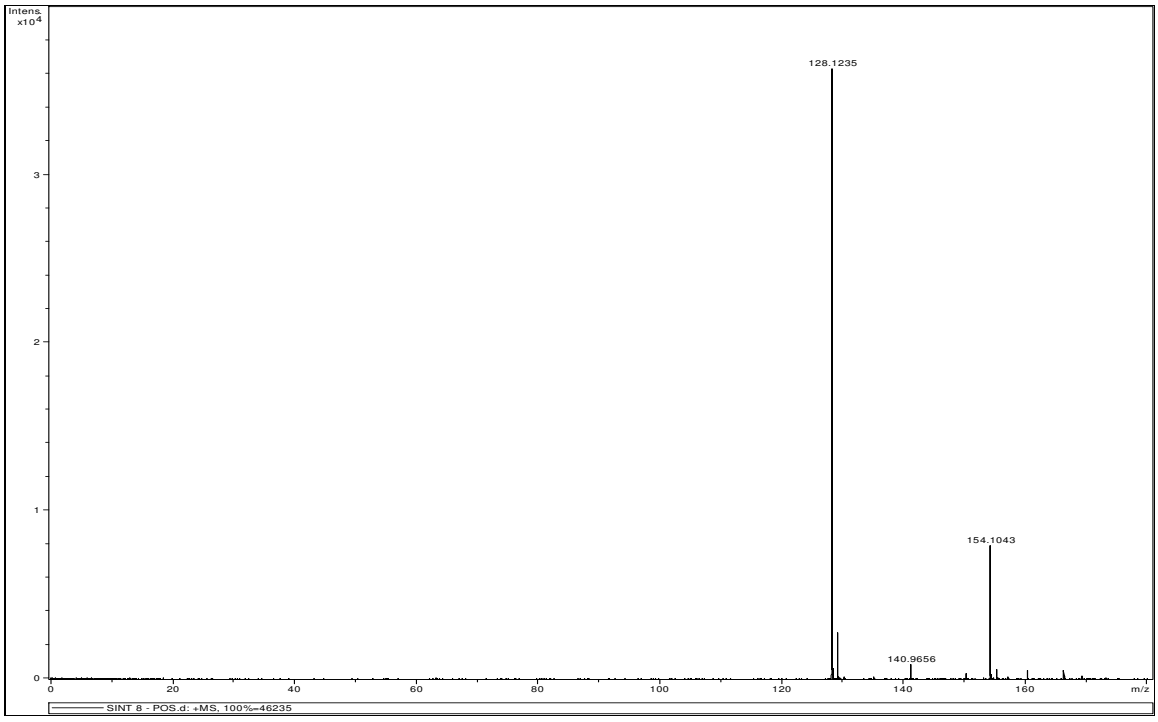


Figura 186. Espectro de massas de baixa resolução da substância **74** (modo positivo)

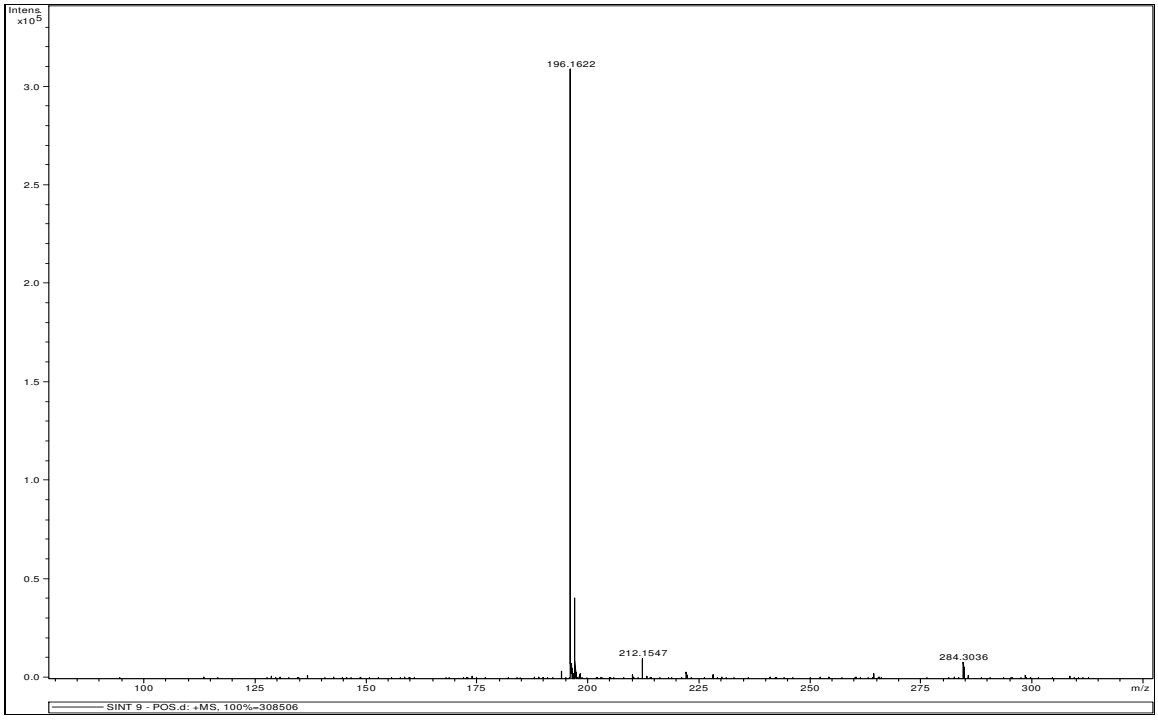


Figura 187. Espectro de massas de baixa resolução da substância **75** (modo positivo)

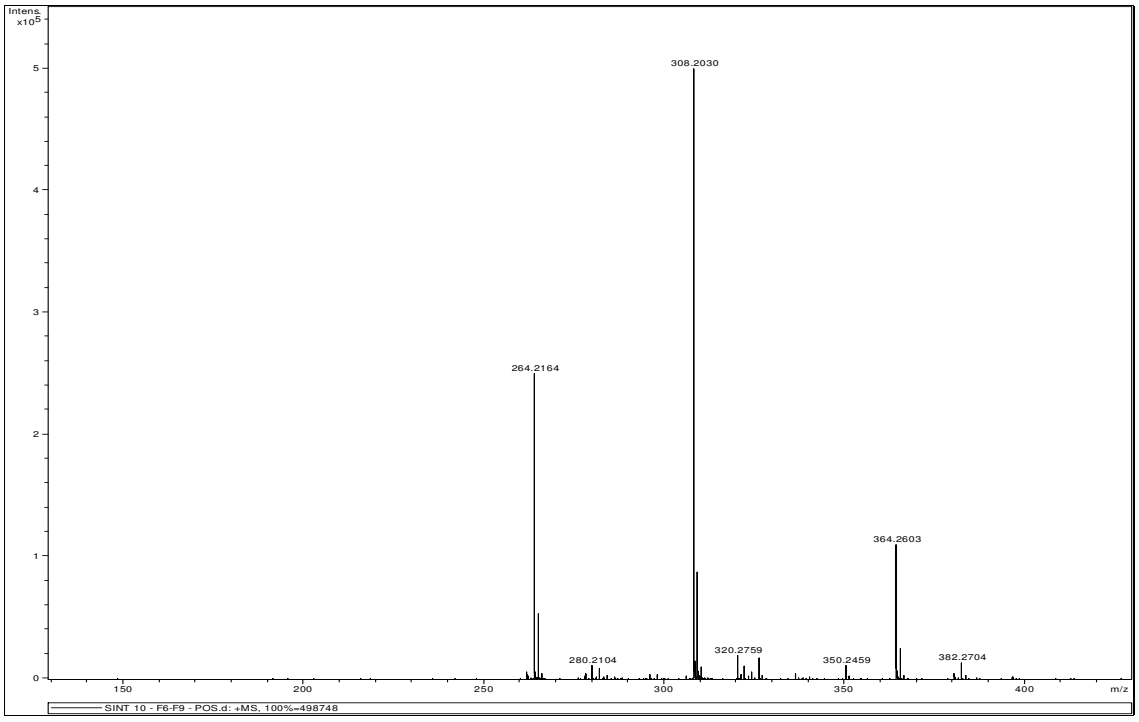


Figura 188. Espectro de massas de baixa resolução da substância **76** (modo positivo)

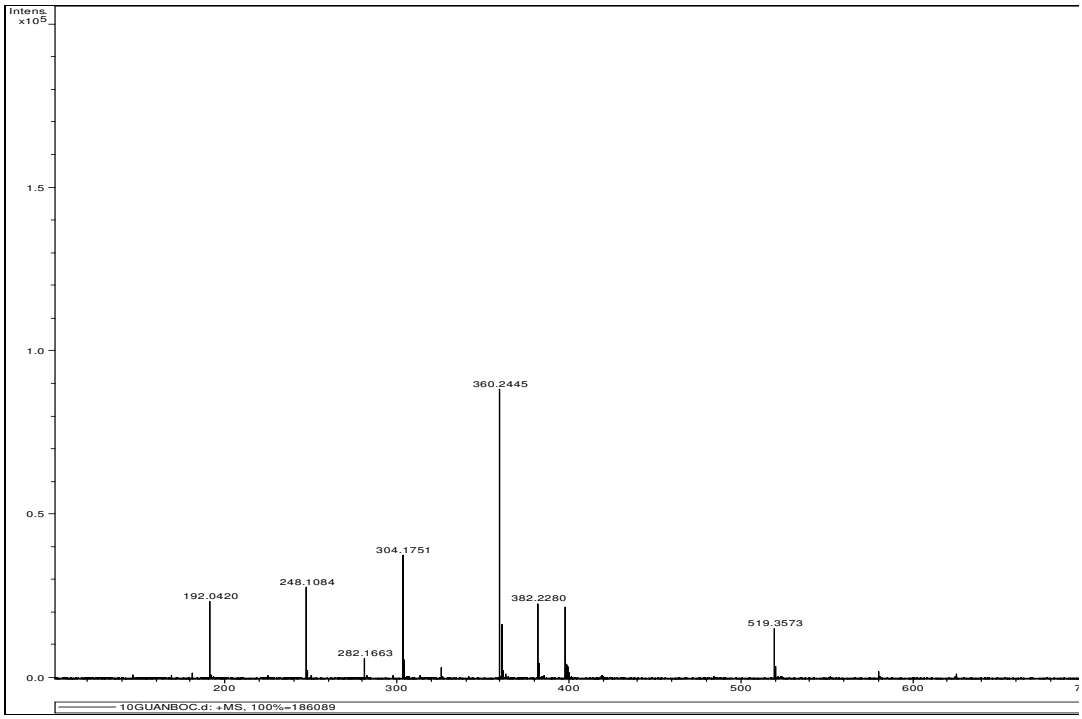


Figura 189. Espectro de massas de baixa resolução da substância **78** (modo positivo)

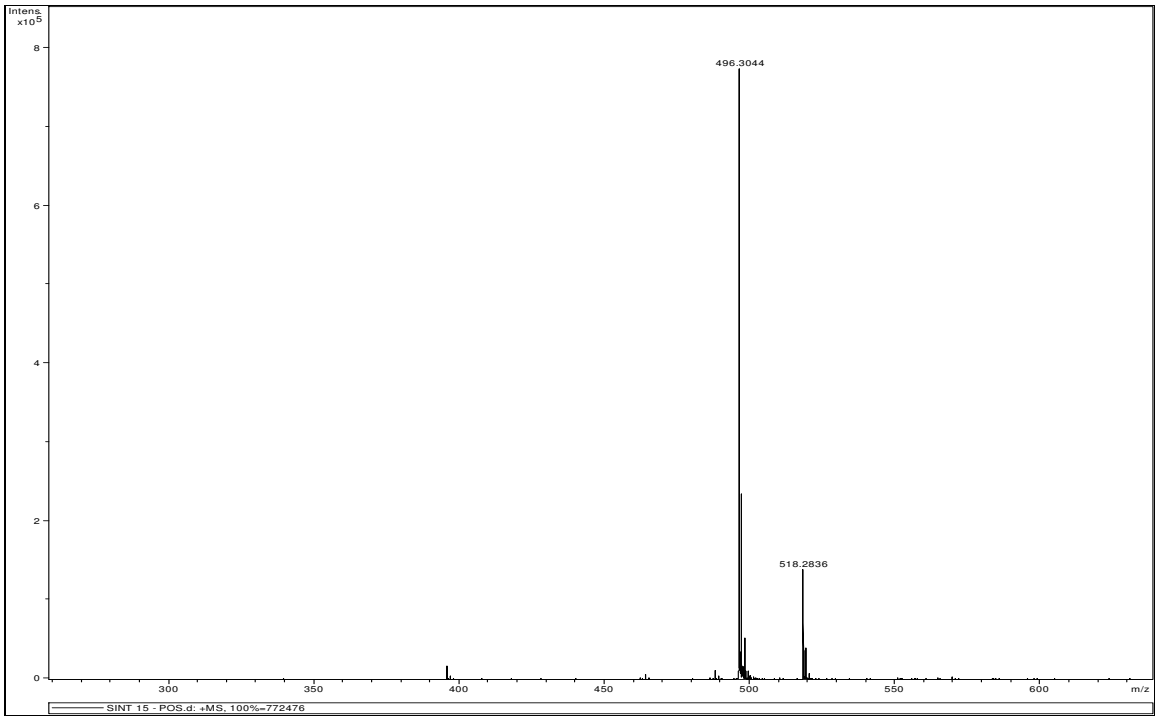


Figura 190. Espectro de massas de baixa resolução da substância **79** (modo positivo)

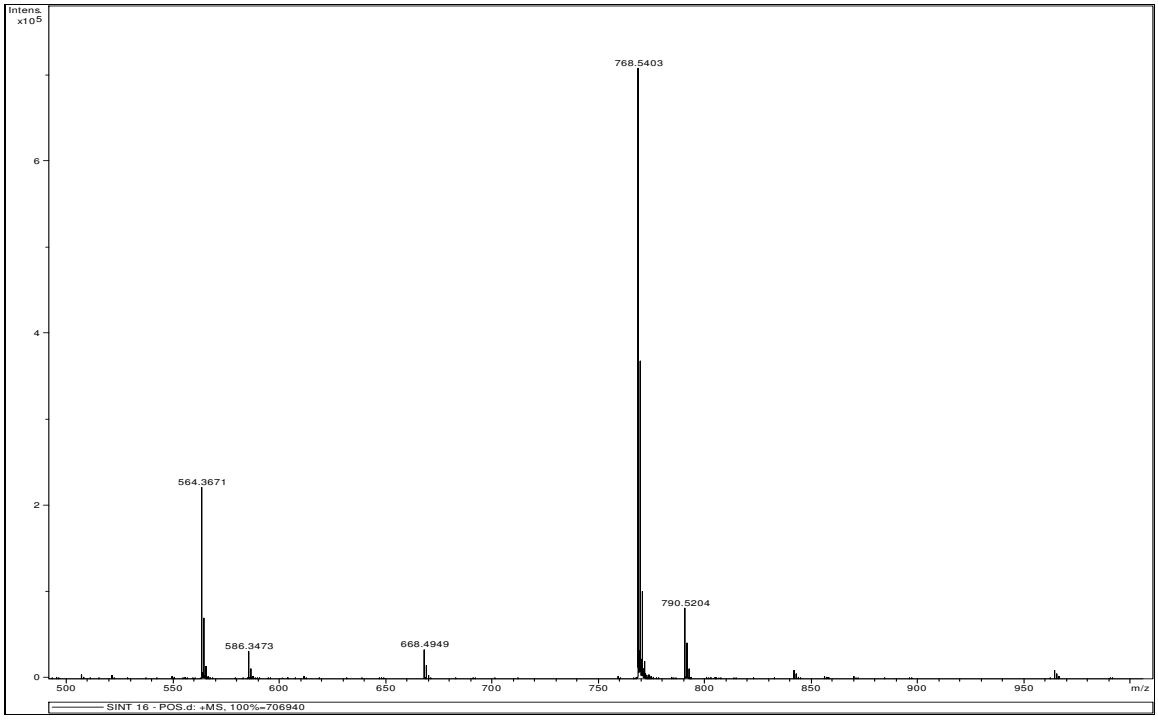


Figura 191. Espectro de massas de baixa resolução da substância **81** (modo positivo)

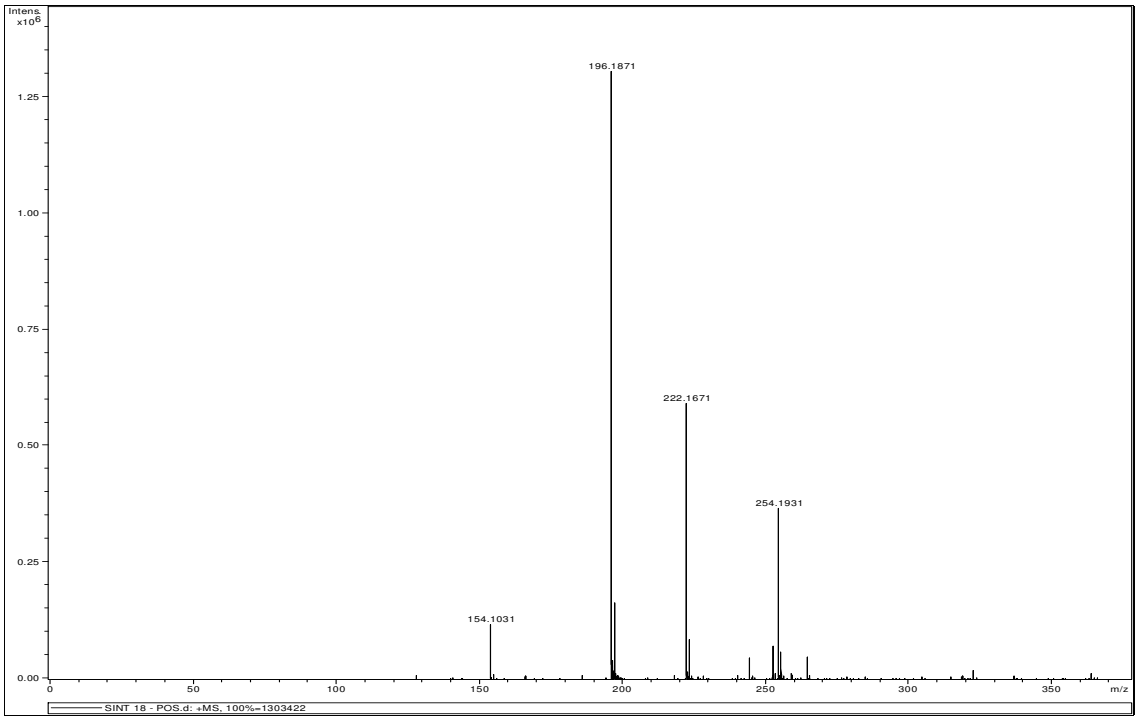


Figura 192. Espectro de massas de baixa resolução da substância **82** (modo positivo)

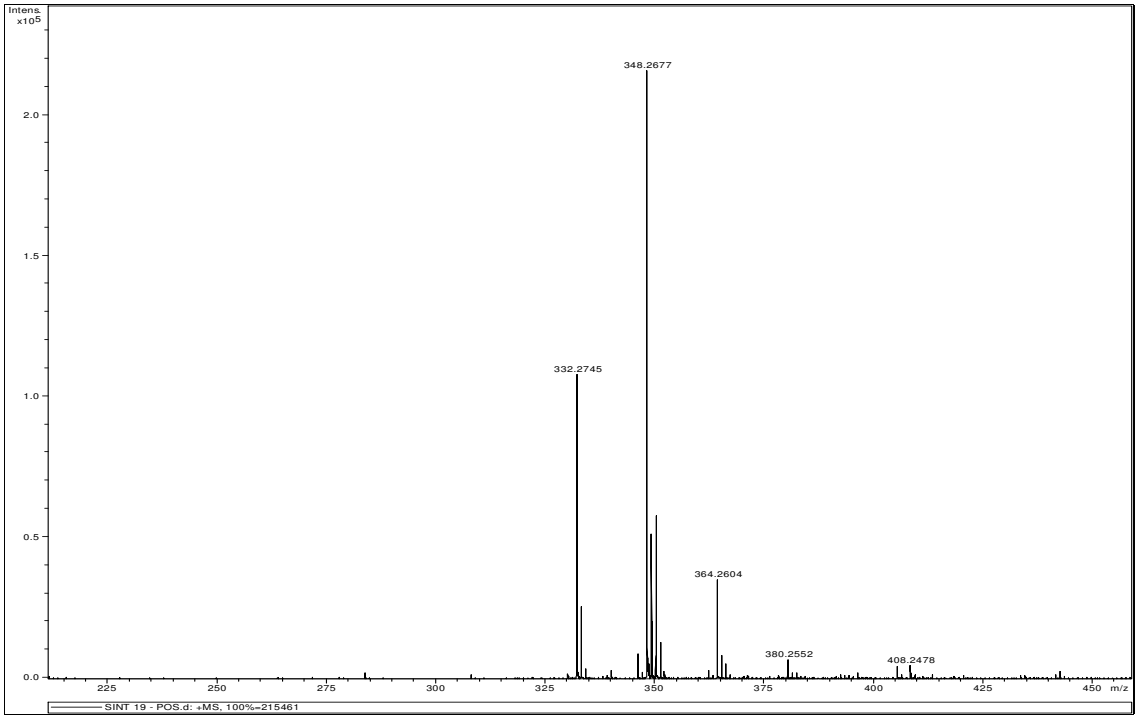


Figura 193. Espectro de massas de baixa resolução da substância **83** (modo positivo)

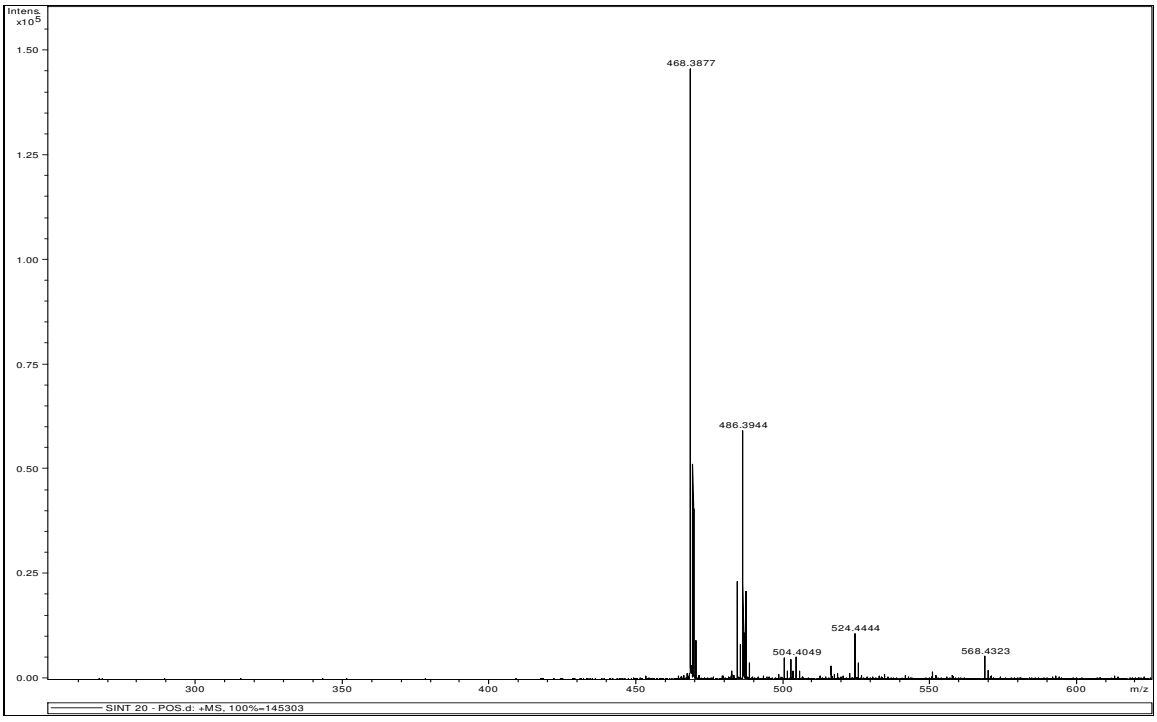


Figura 194. Espectro de massas de baixa resolução da substância **84** (modo positivo)

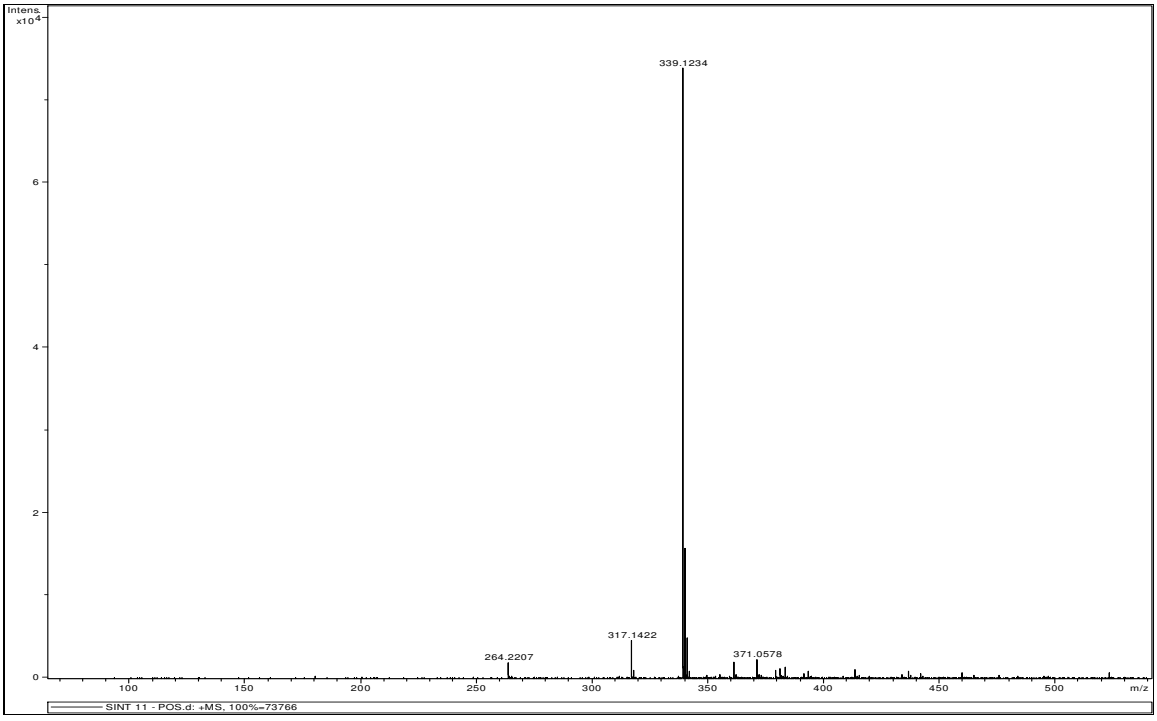


Figura 195. Espectro de massas de baixa resolução da substância **86** (modo positivo)

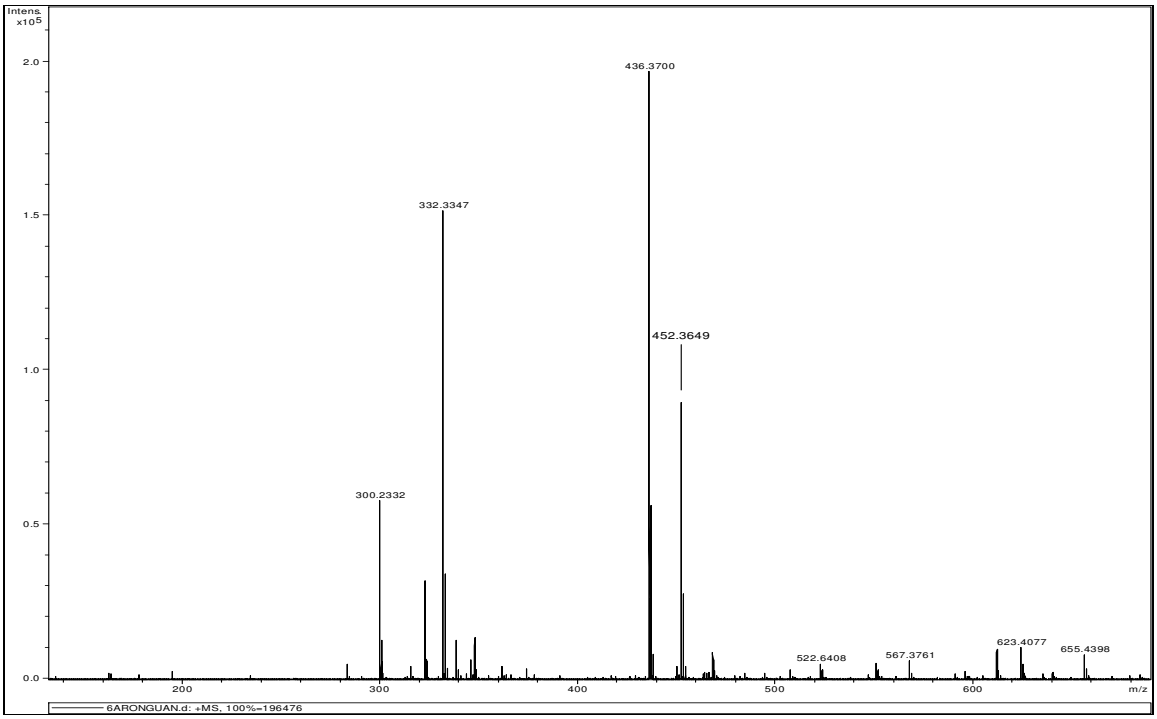


Figura 196. Espectro de massas de baixa resolução da substância **87** (modo positivo)

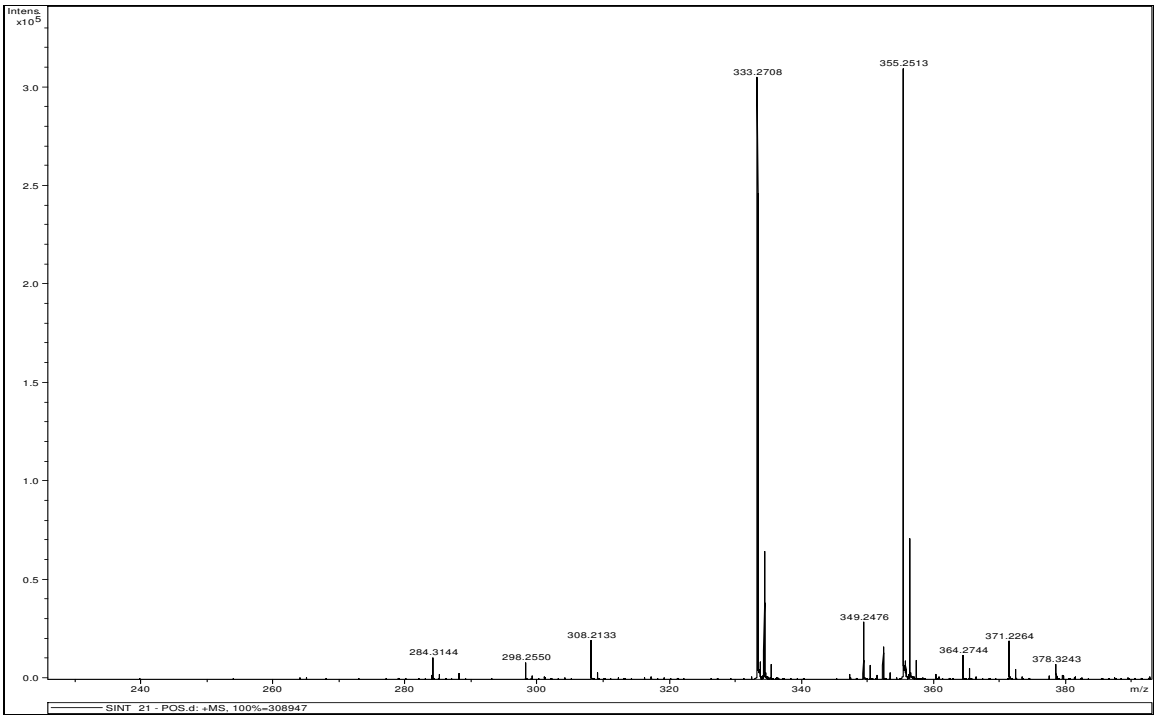


Figura 197. Espectro de massas de baixa resolução da substância **90** (modo positivo)

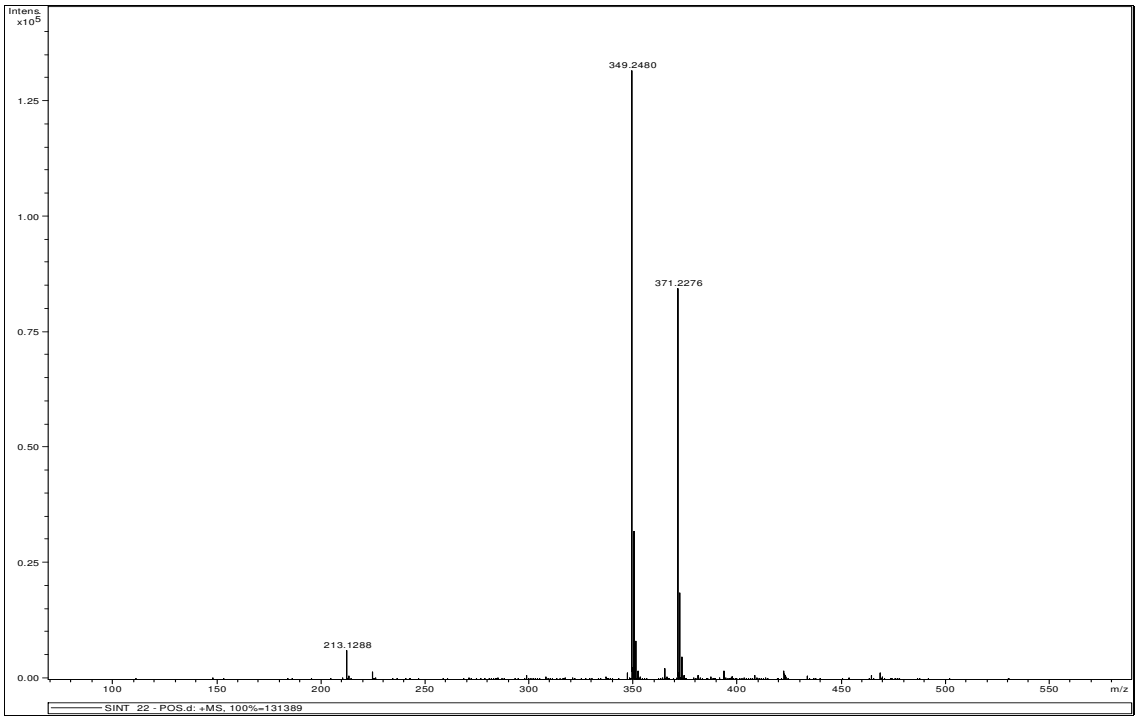


Figura 198. Espectro de massas de baixa resolução da substância **91** (modo positivo)

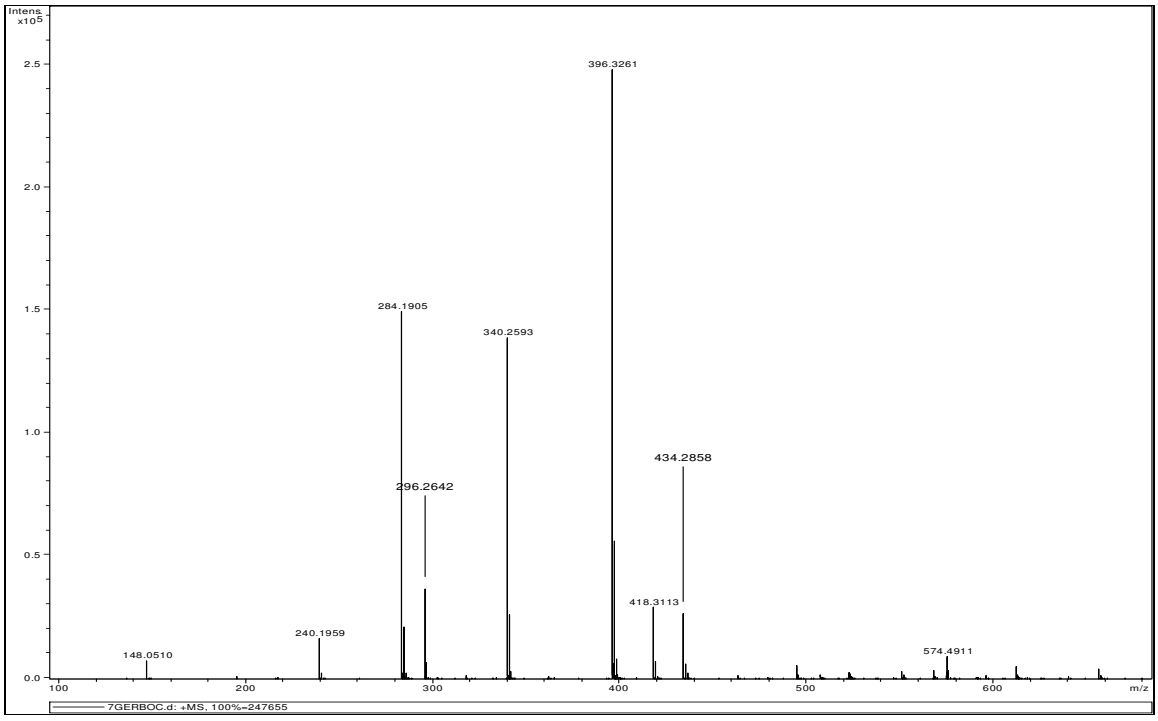


Figura 199. Espectro de massas de baixa resolução da substância **92** (modo positivo)

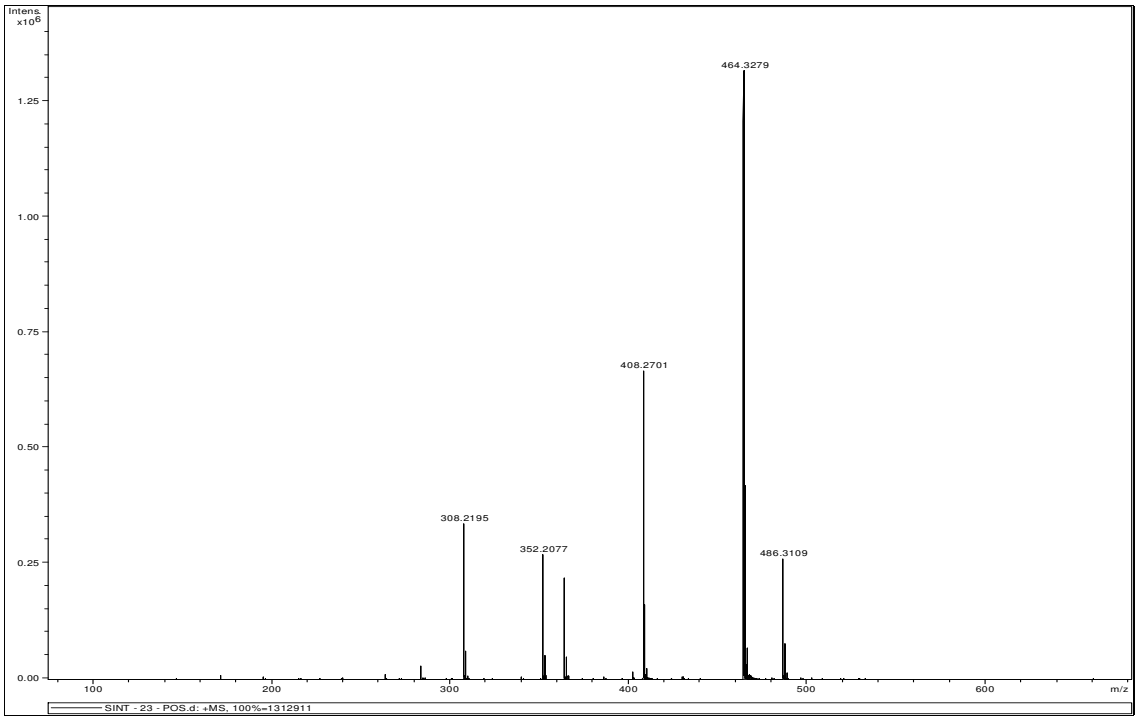


Figura 200. Espectro de massas de baixa resolução da substância **93** (modo positivo)

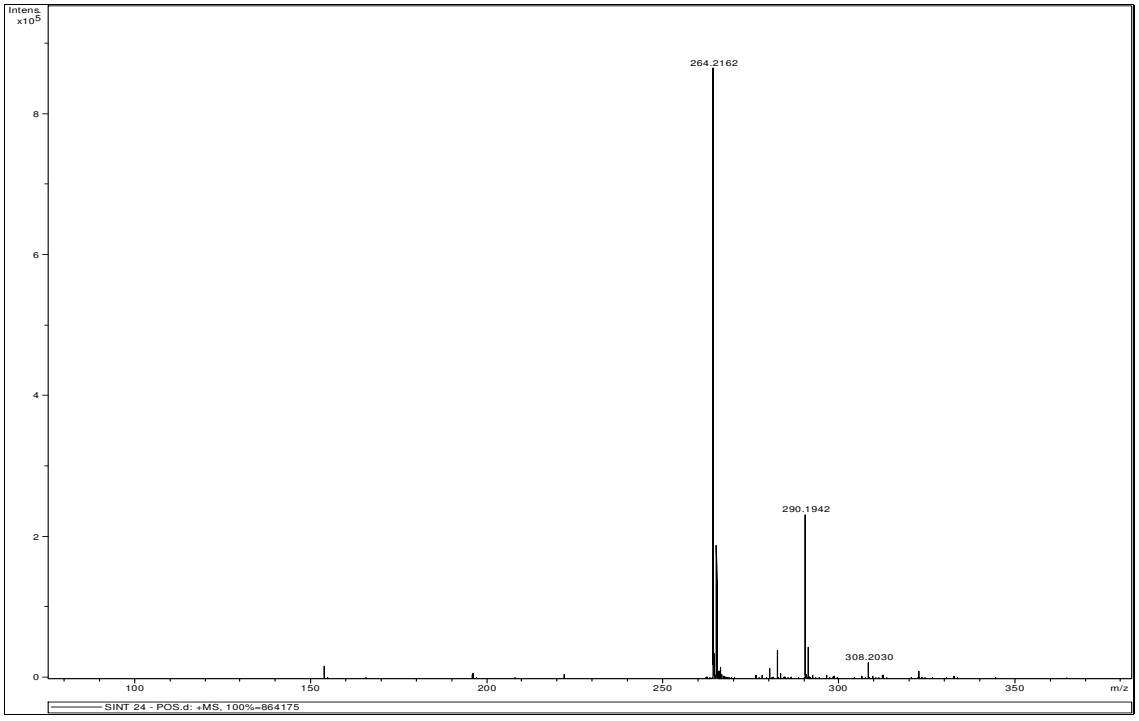


Figura 201. Espectro de massas de baixa resolução da substância **94** (modo positivo)

CAPÍTULO 10

Espectros no IV e UV (pág 216)

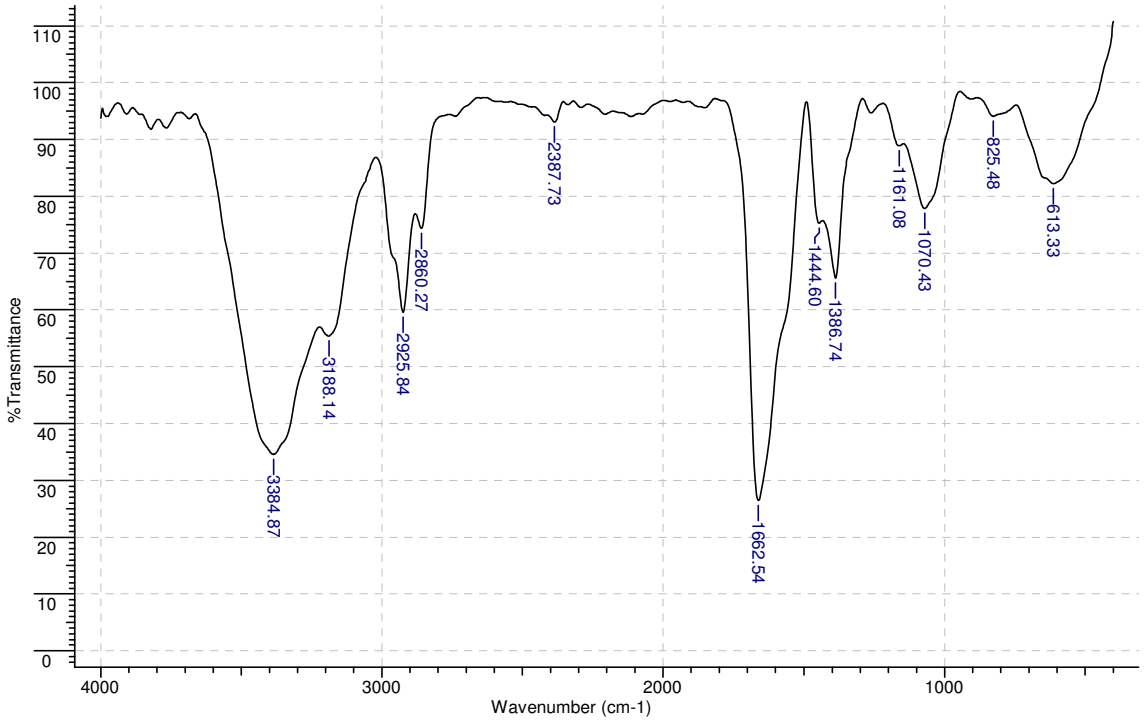


Figura 202. Espectro no IV da substância **42**

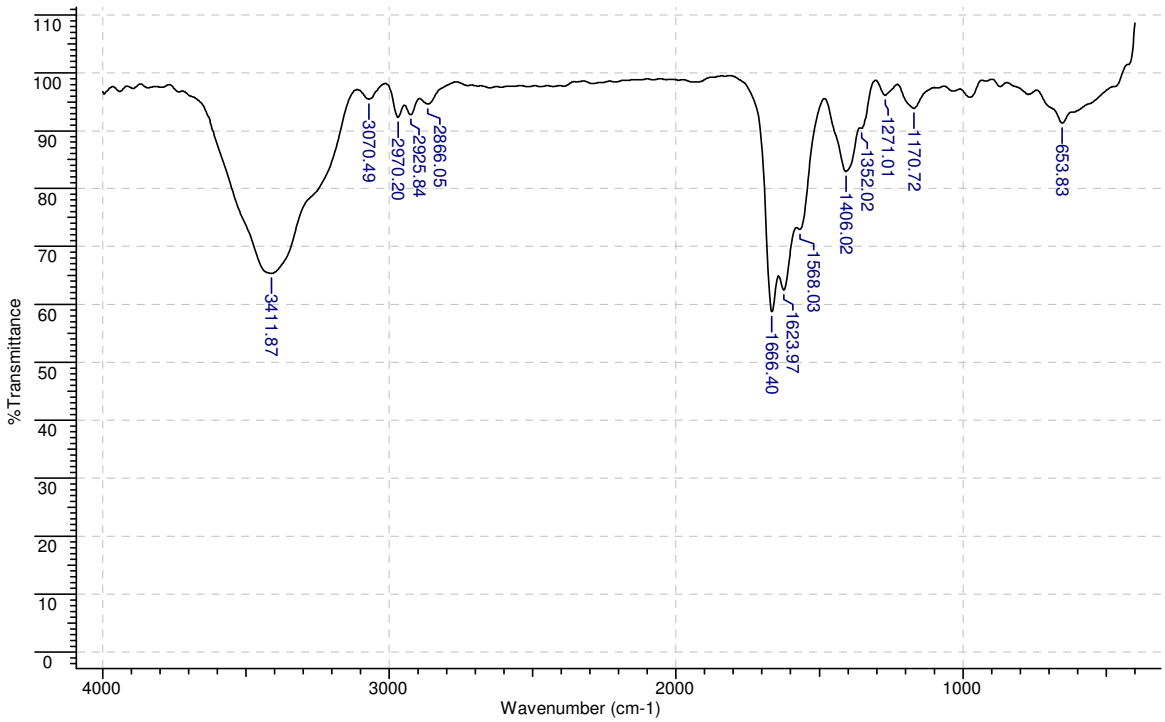


Figura 203. Espectro no IV da substância **43**

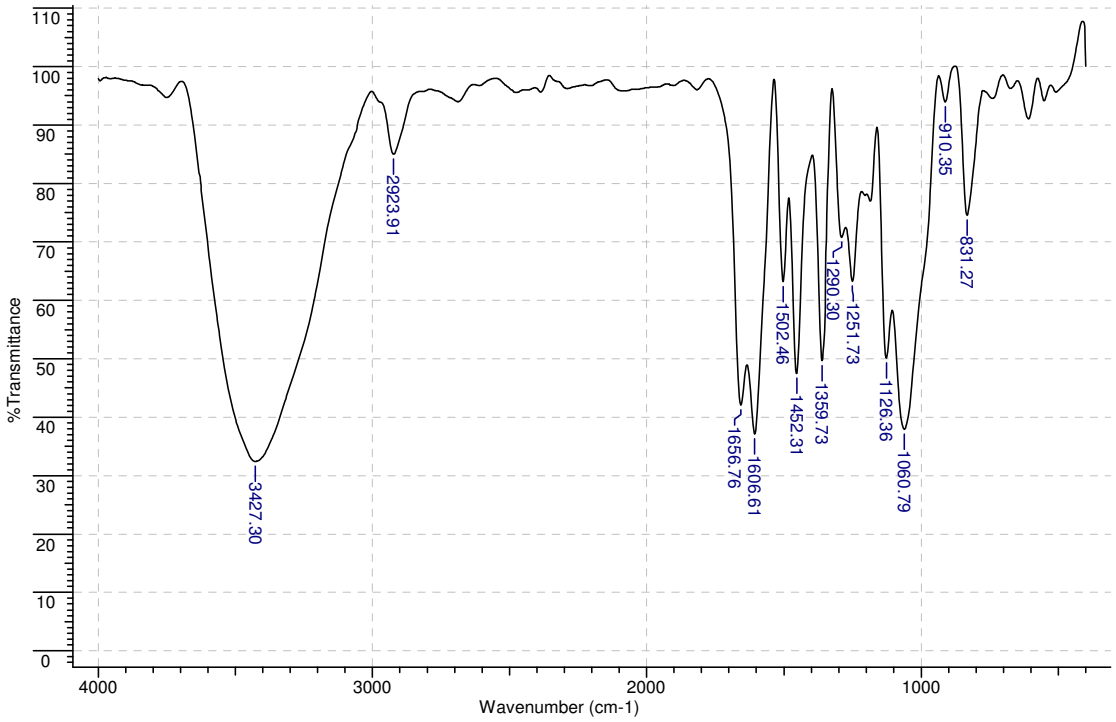


Figura 204. Espectro no IV da substância **45**

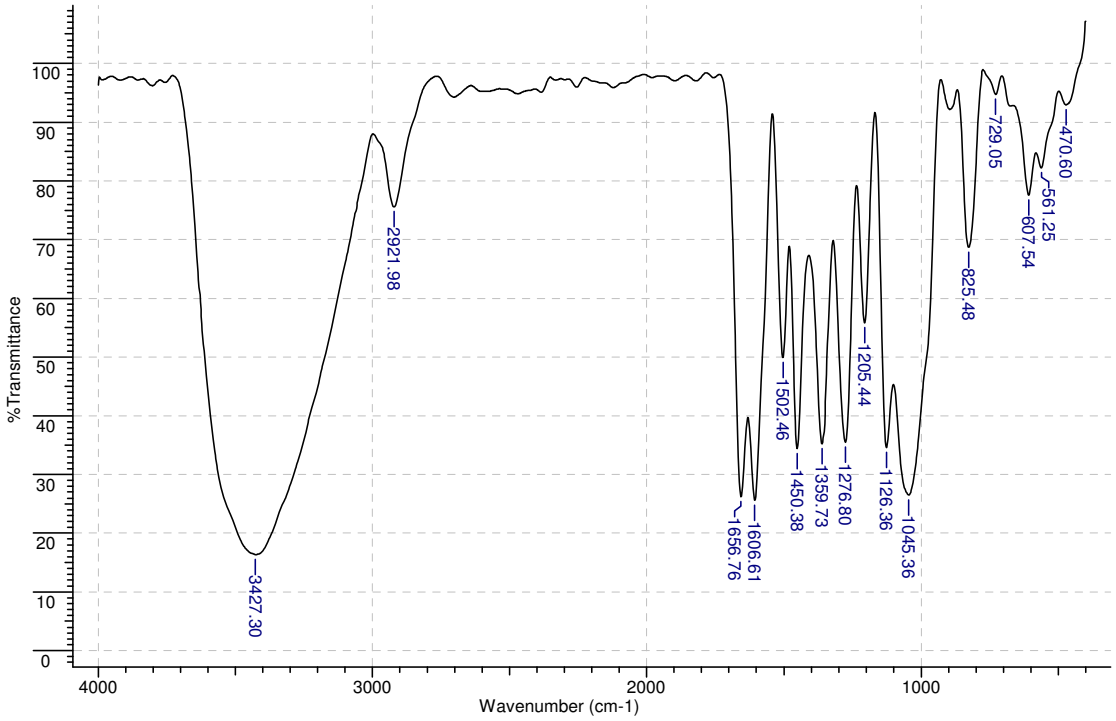


Figura 205. Espectro no IV da substância **47**

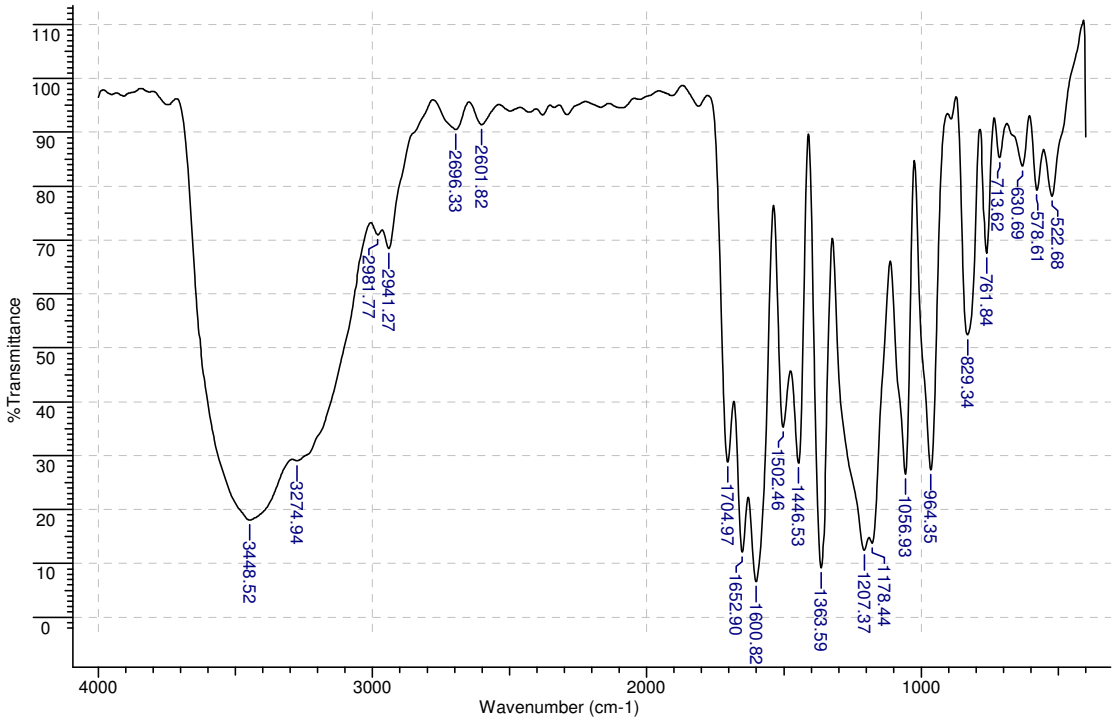


Figura 206. Espectro no IV da substância **51**

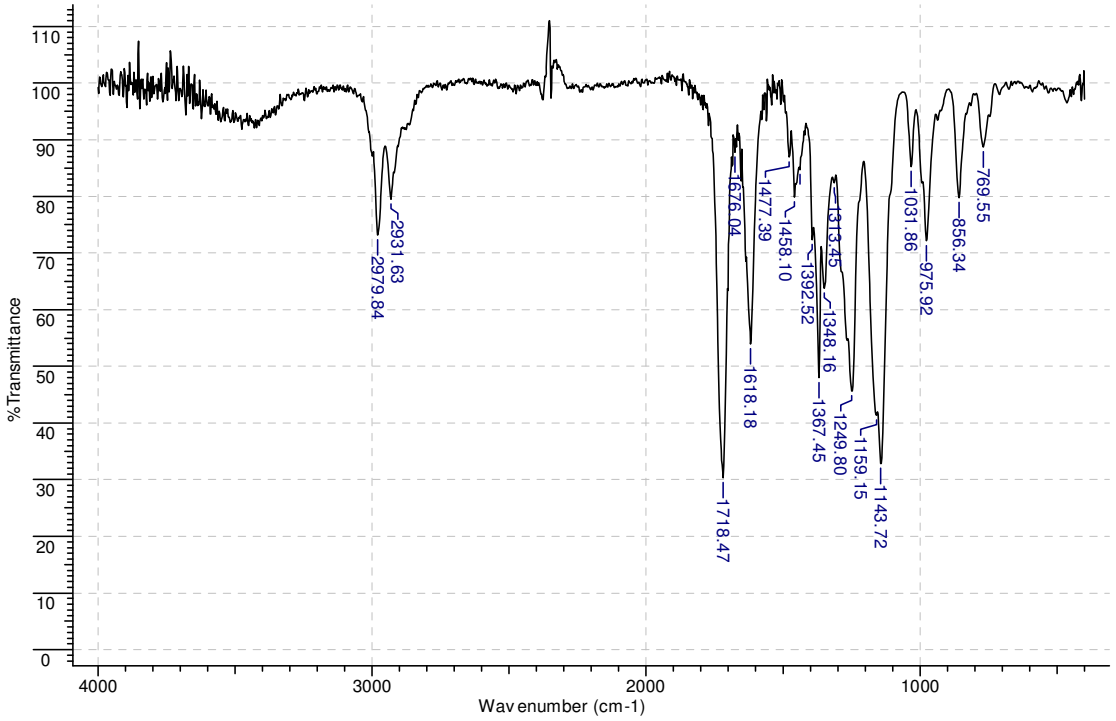


Figura 207. Espectro no IV da substância **67**

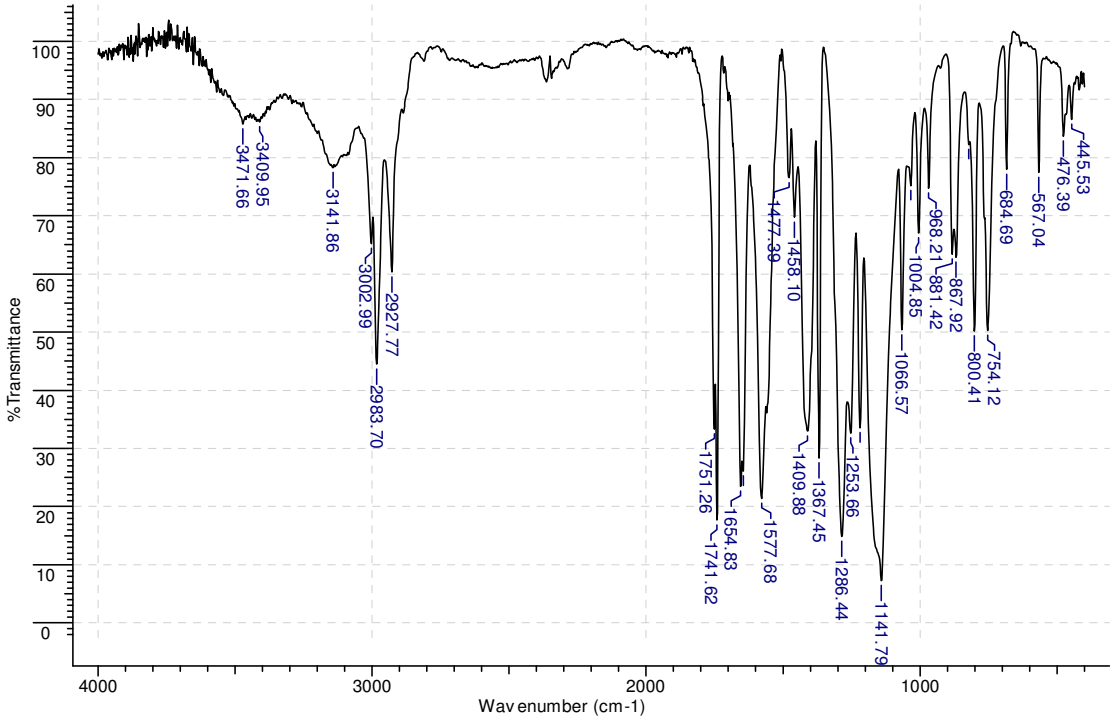


Figura 208. Espectro no IV da substância **68**

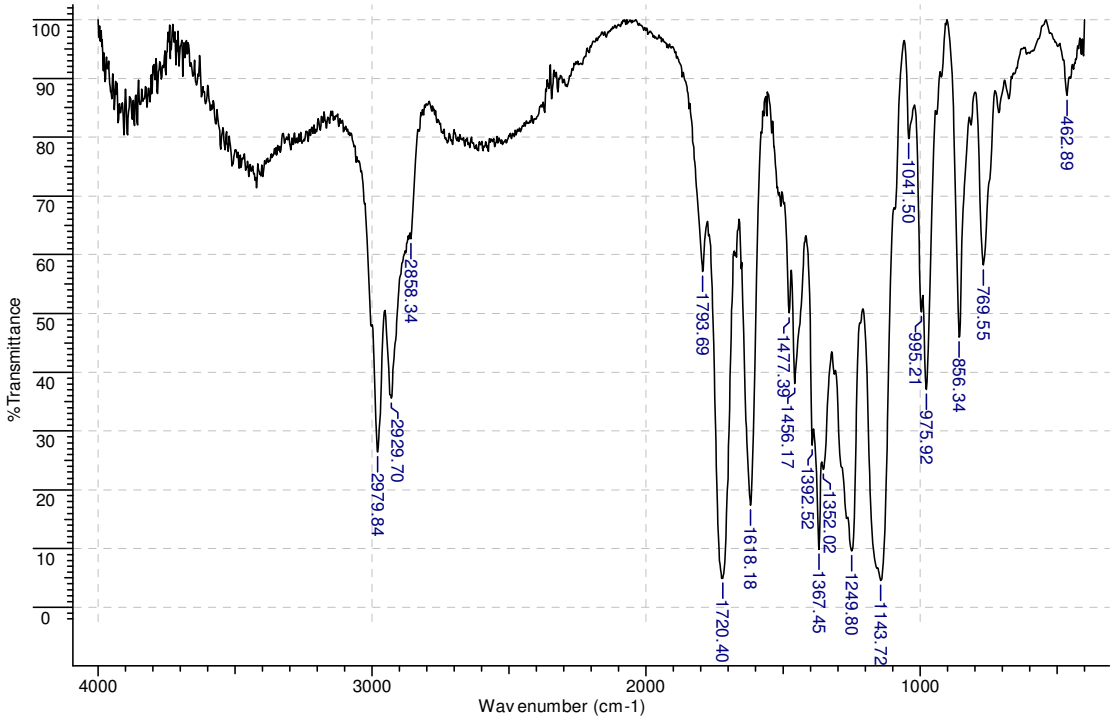


Figura 209. Espectro no IV da substância **69**

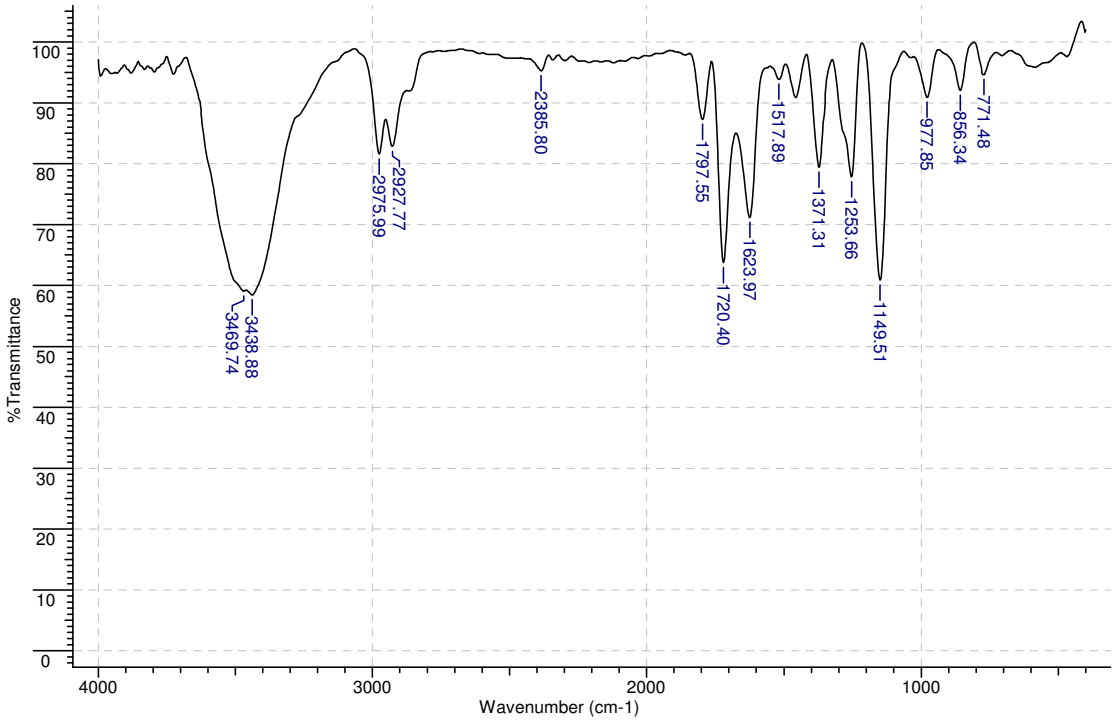


Figura 210. Espectro no IV da substância **70**

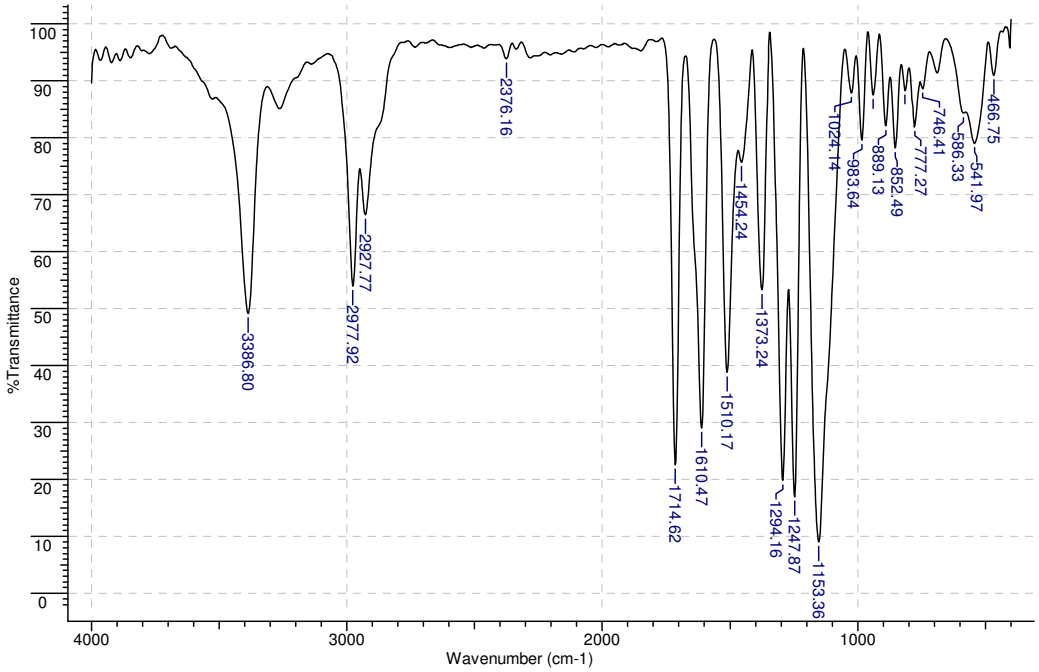


Figura 211. Espectro no IV da substância **71**

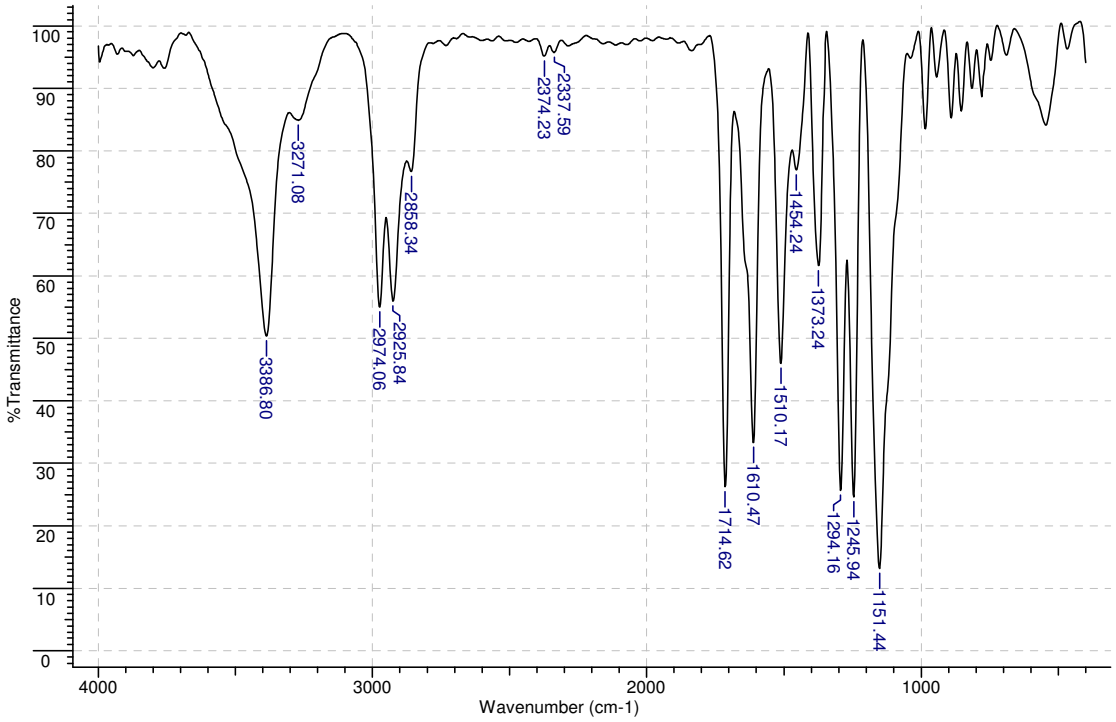


Figura 212. Espectro no IV da substância **72**

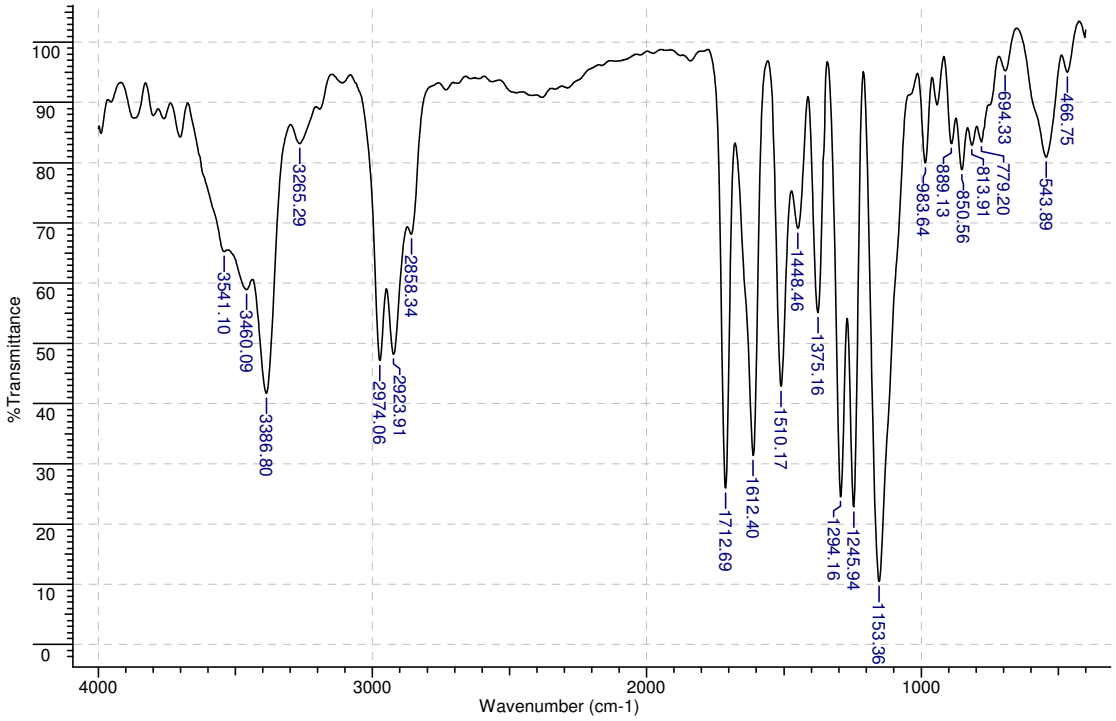


Figura 213. Espectro no IV da substância **73**

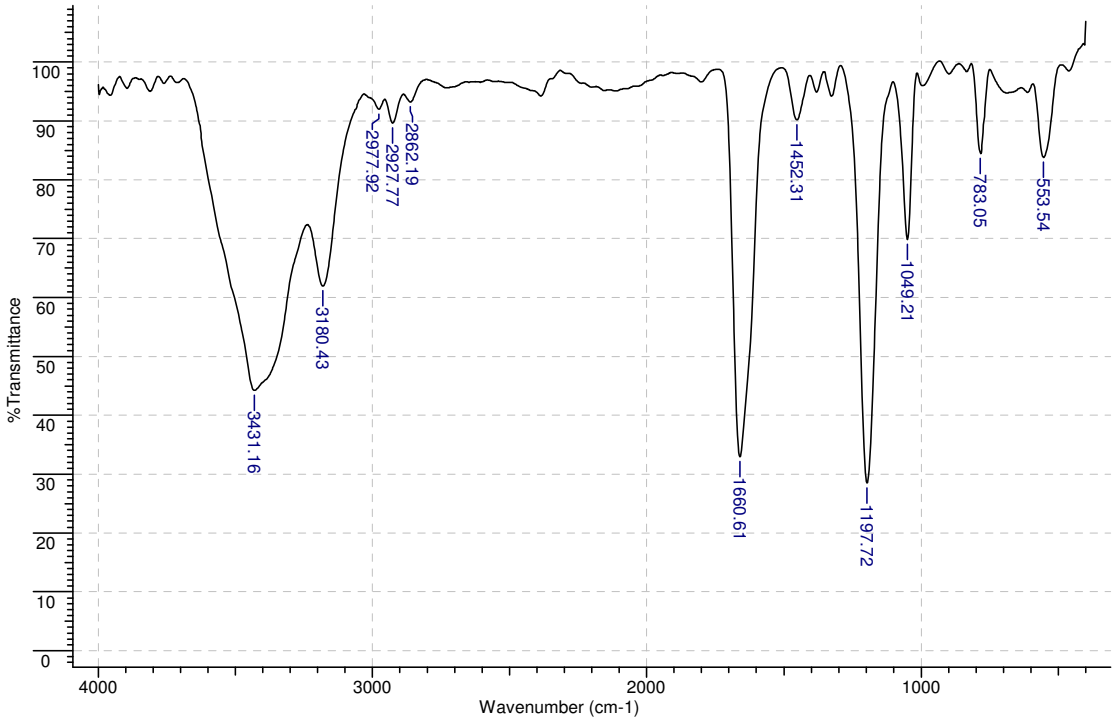


Figura 214. Espectro no IV da substância **74**

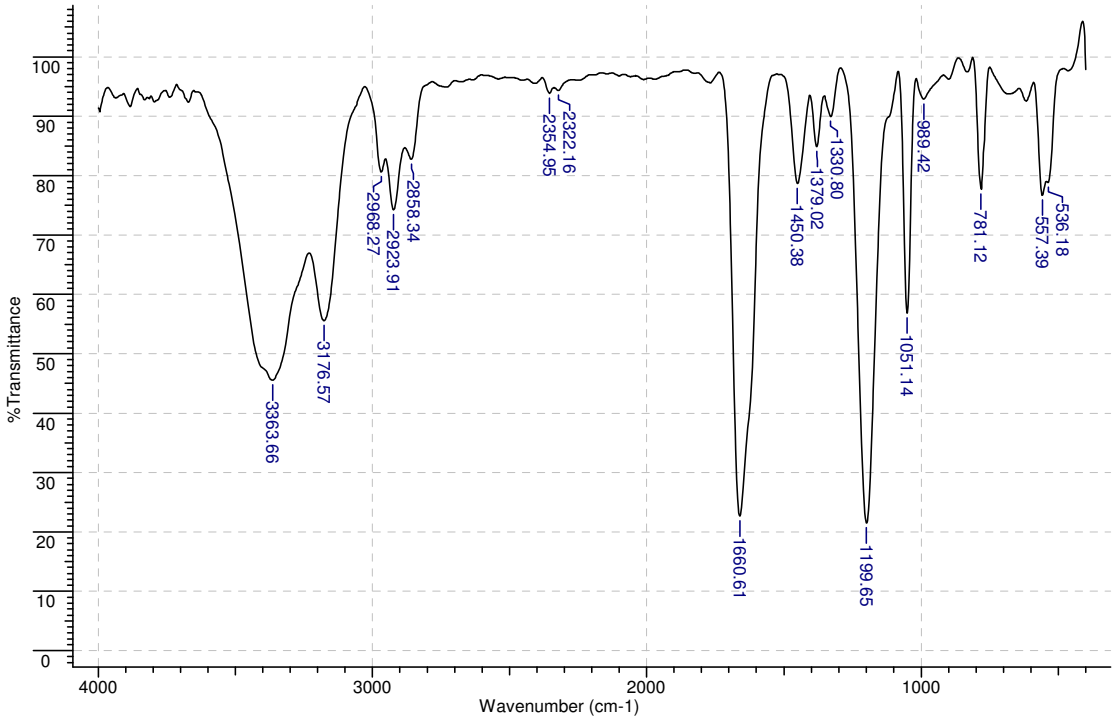


Figura 215. Espectro no IV da substância **75**

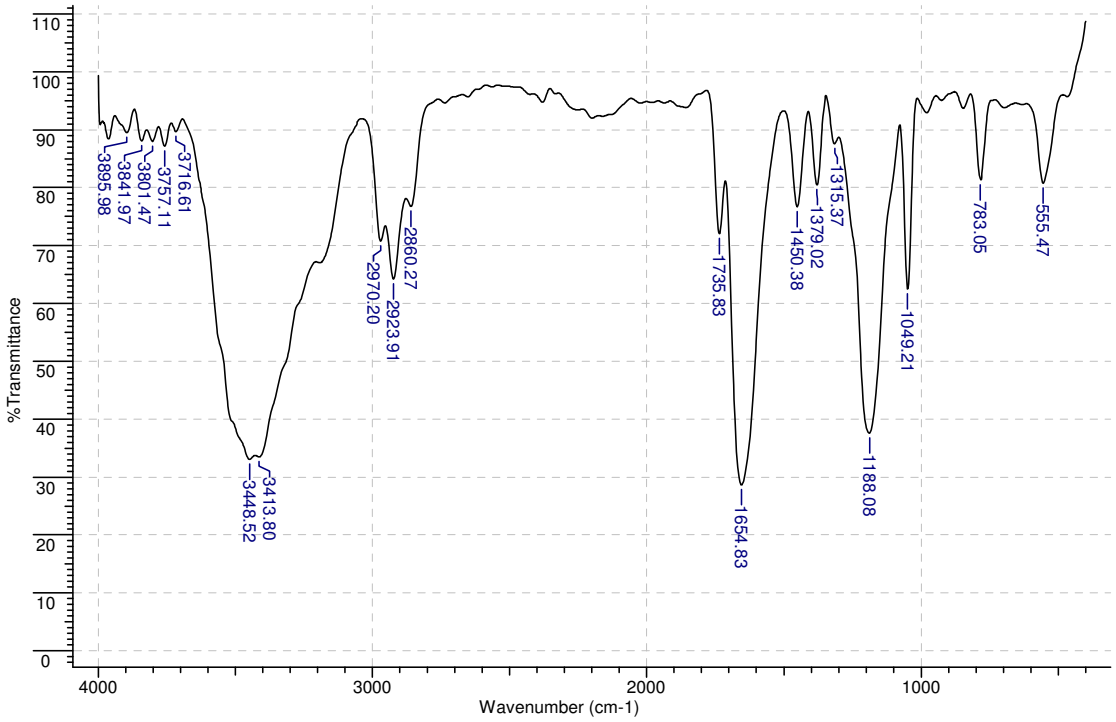


Figura 216. Espectro no IV da substância **76**

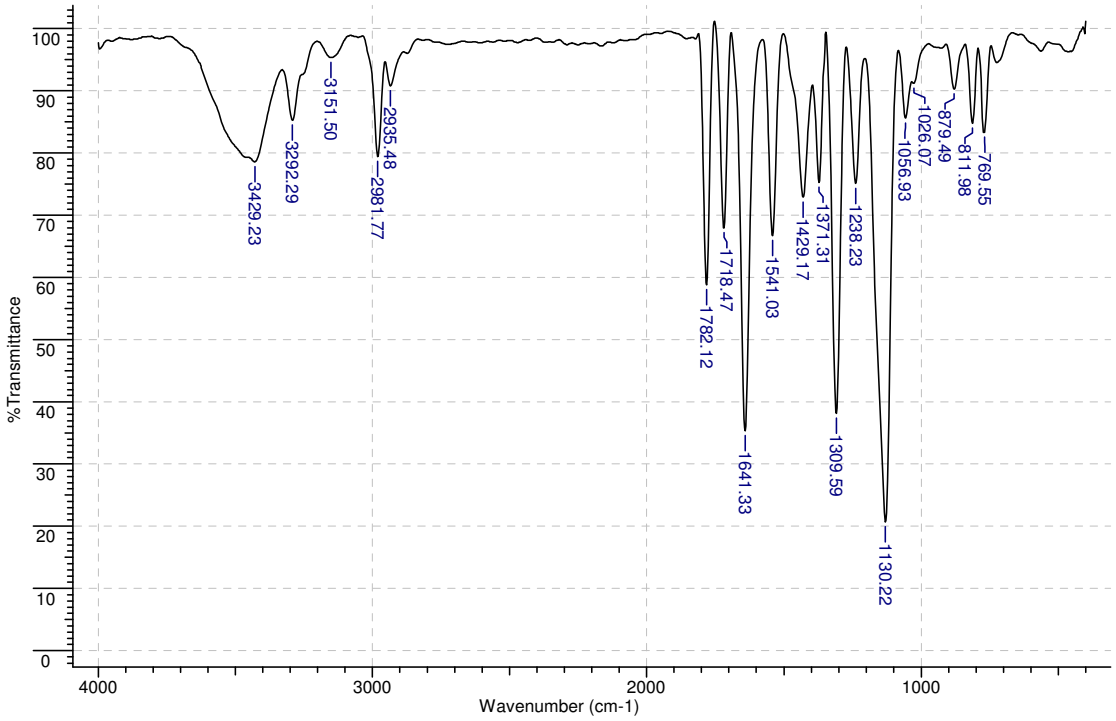


Figura 217. Espectro no IV da substância **78**

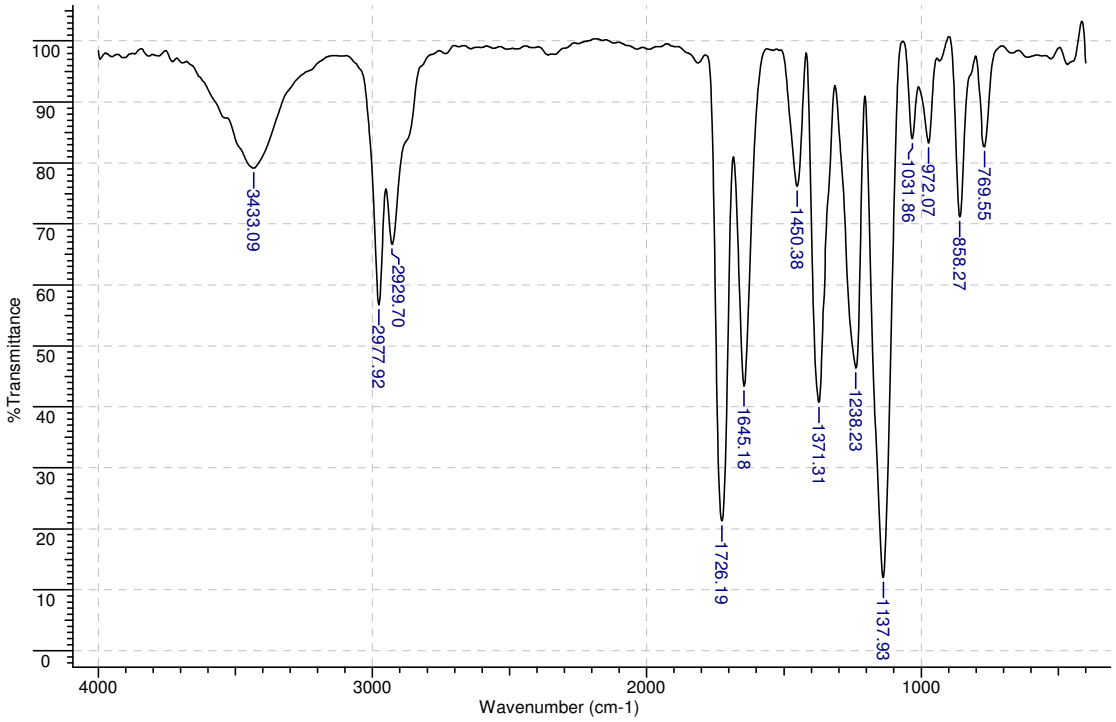


Figura 218. Espectro no IV da substância **79**

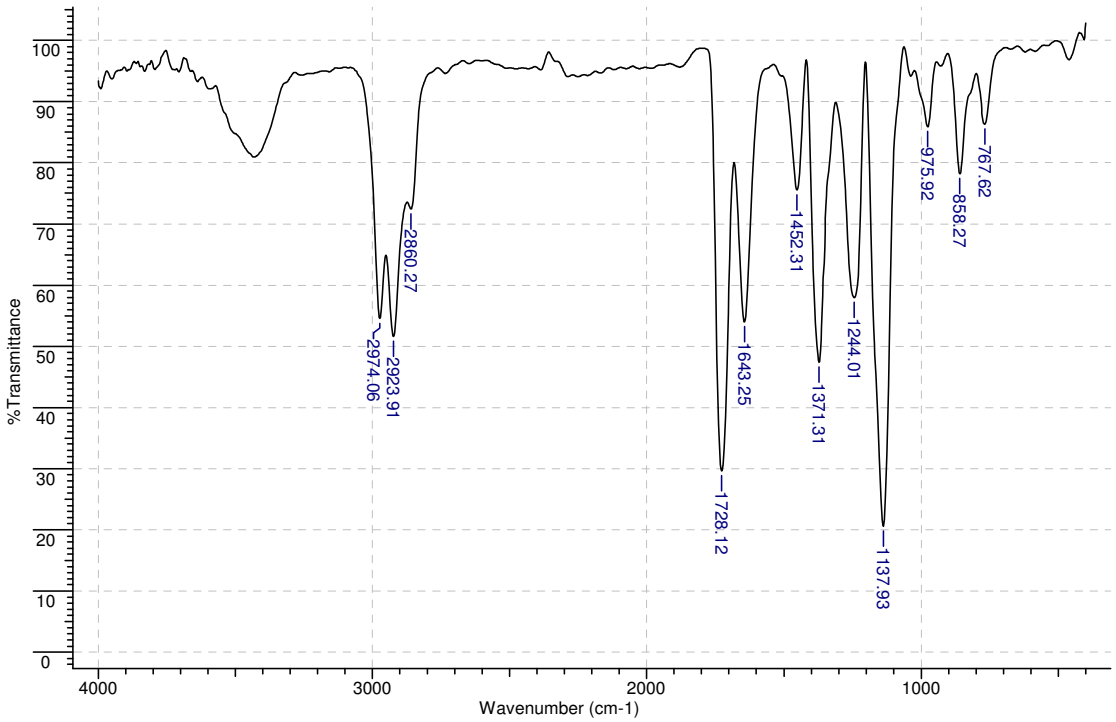


Figura 219. Espectro no IV da substância **80**

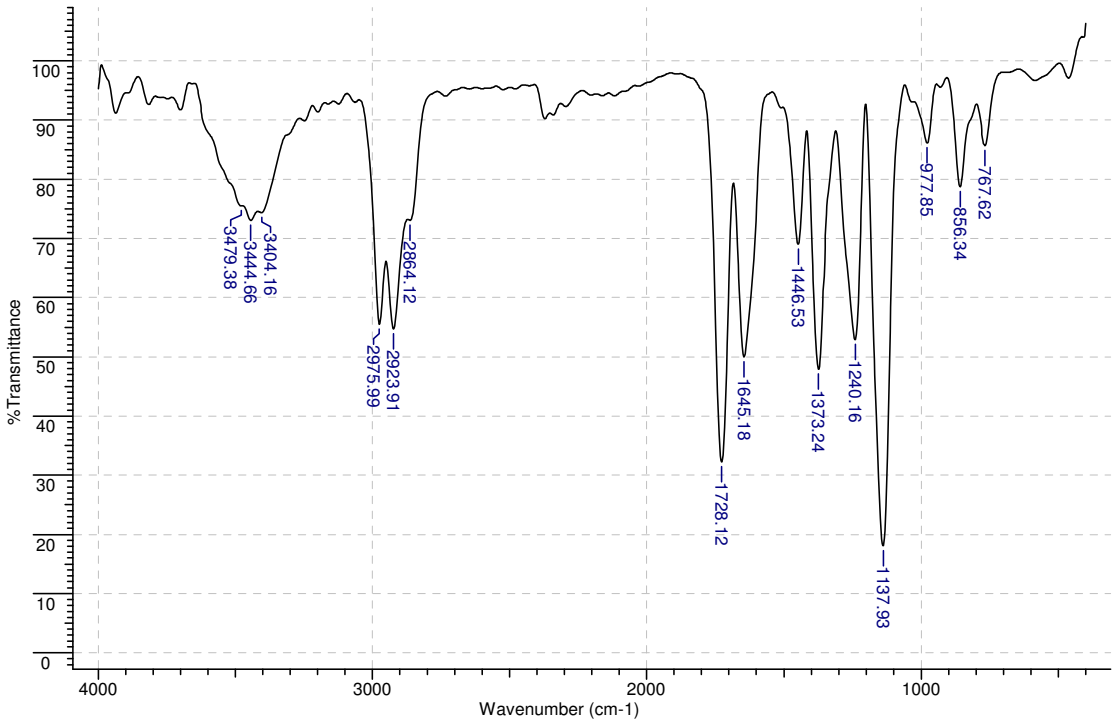


Figura 220. Espectro no IV da substância **81**

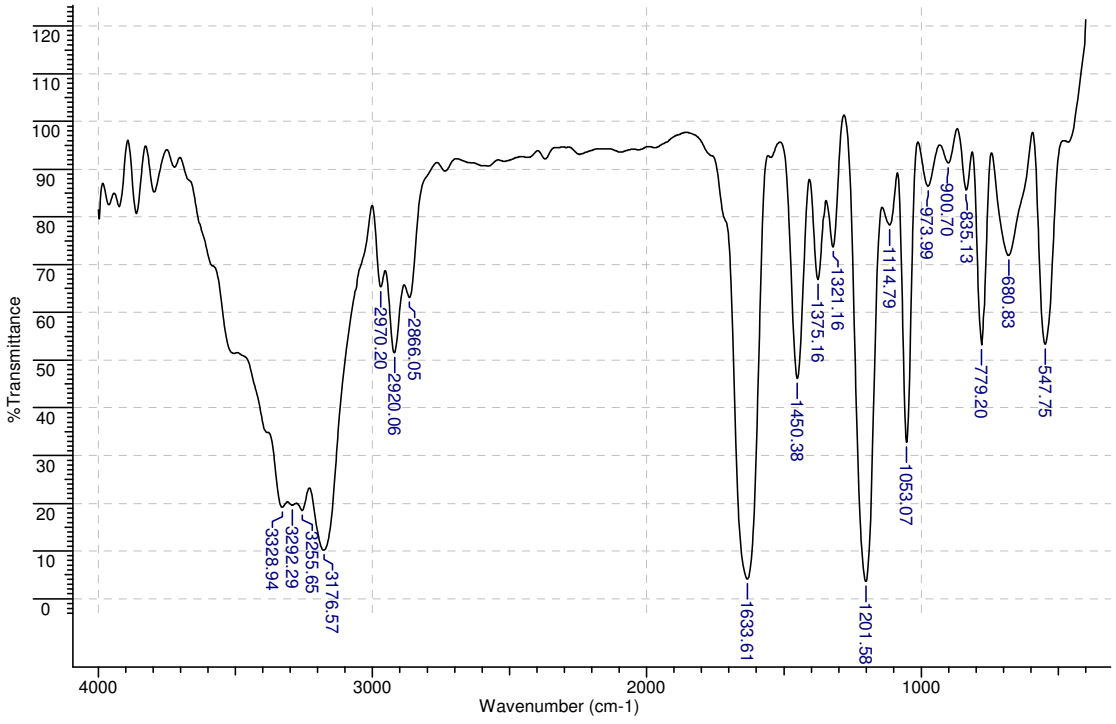


Figura 221. Espectro no IV da substância **82**

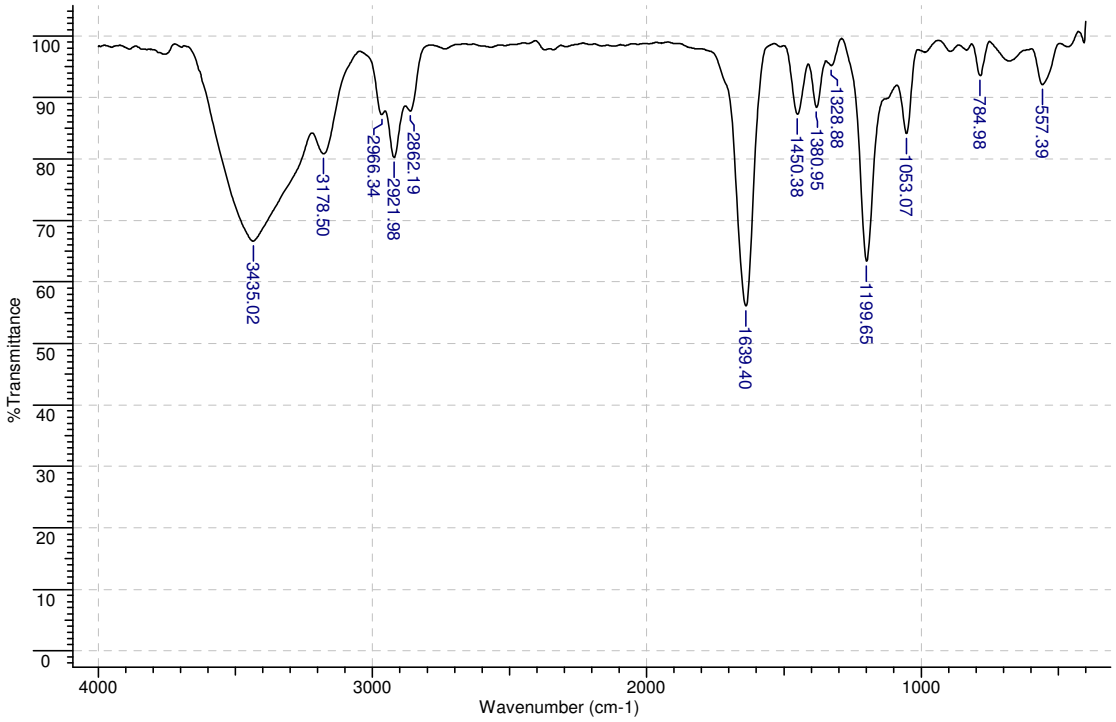


Figura 222. Espectro no IV da substância **83**

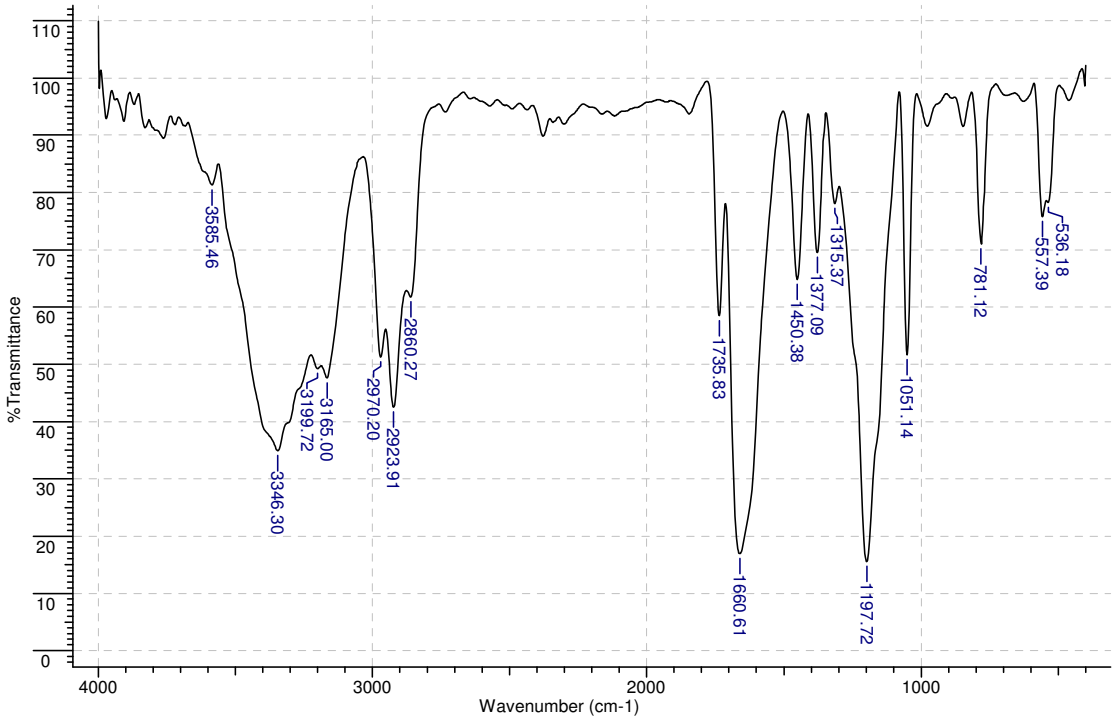


Figura 223. Espectro no IV da substância **84**

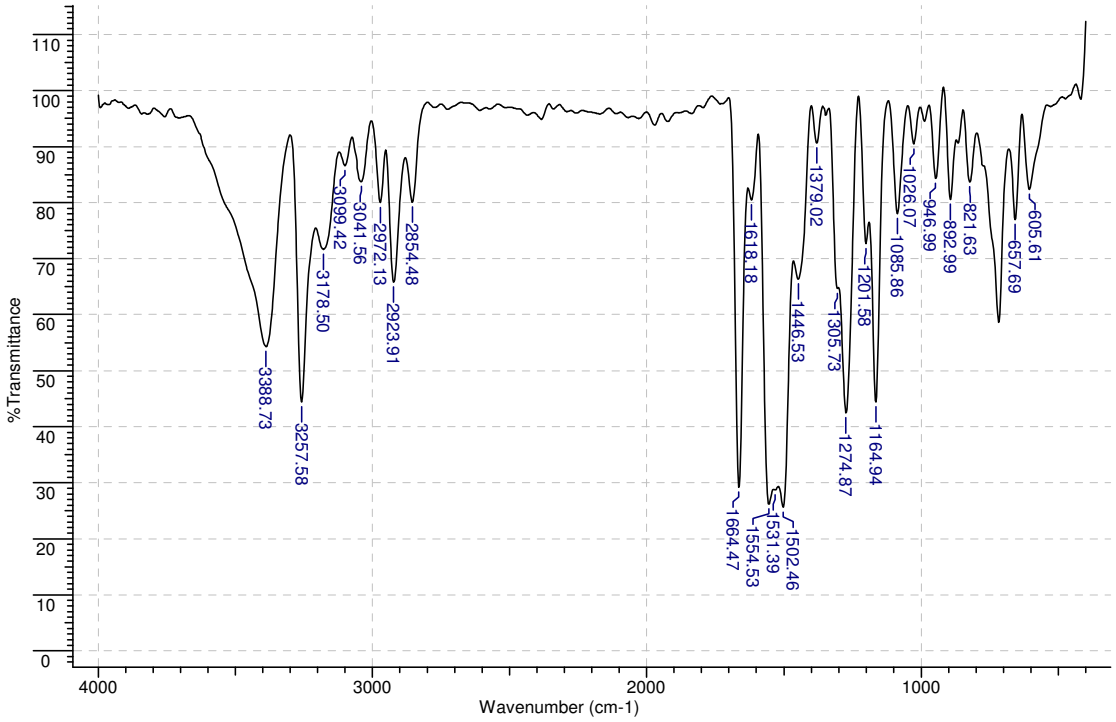


Figura 224. Espectro no IV da substância **86**

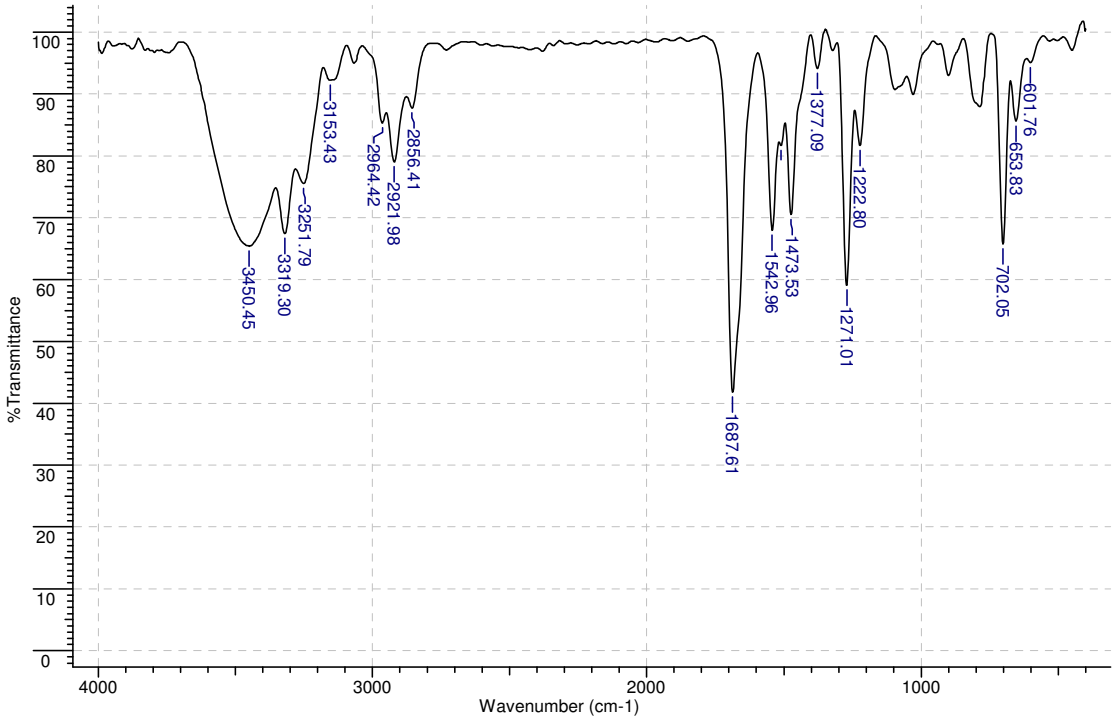


Figura 225. Espectro no IV da substância **87**

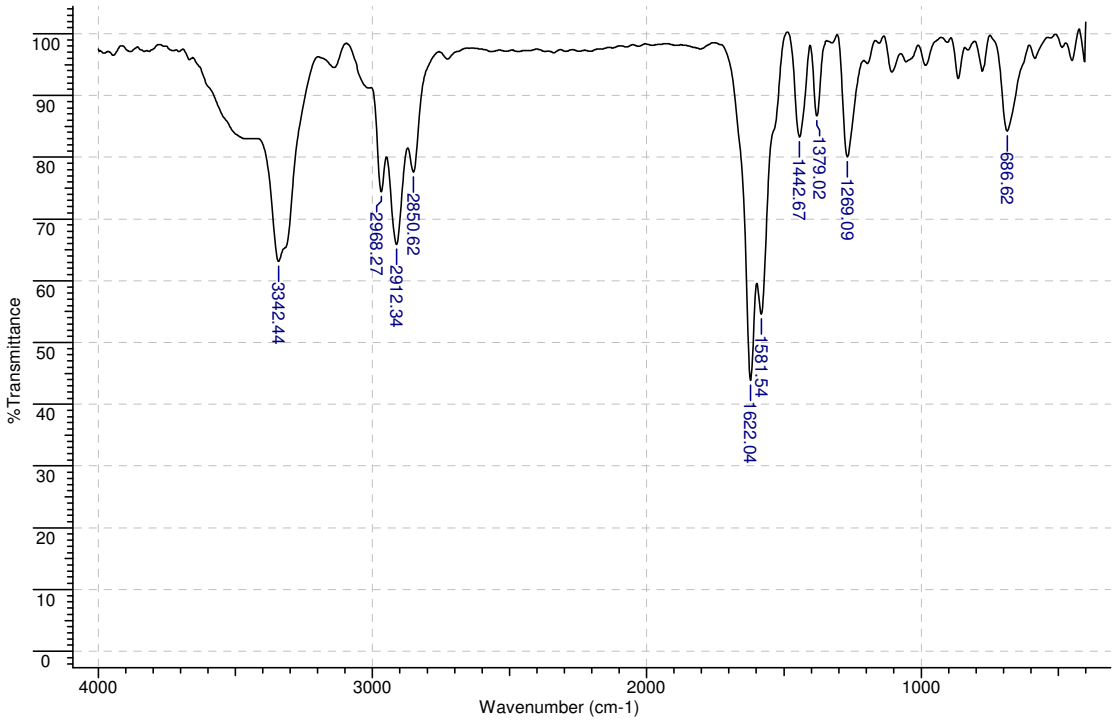


Figura 226. Espectro no IV da substância **90**

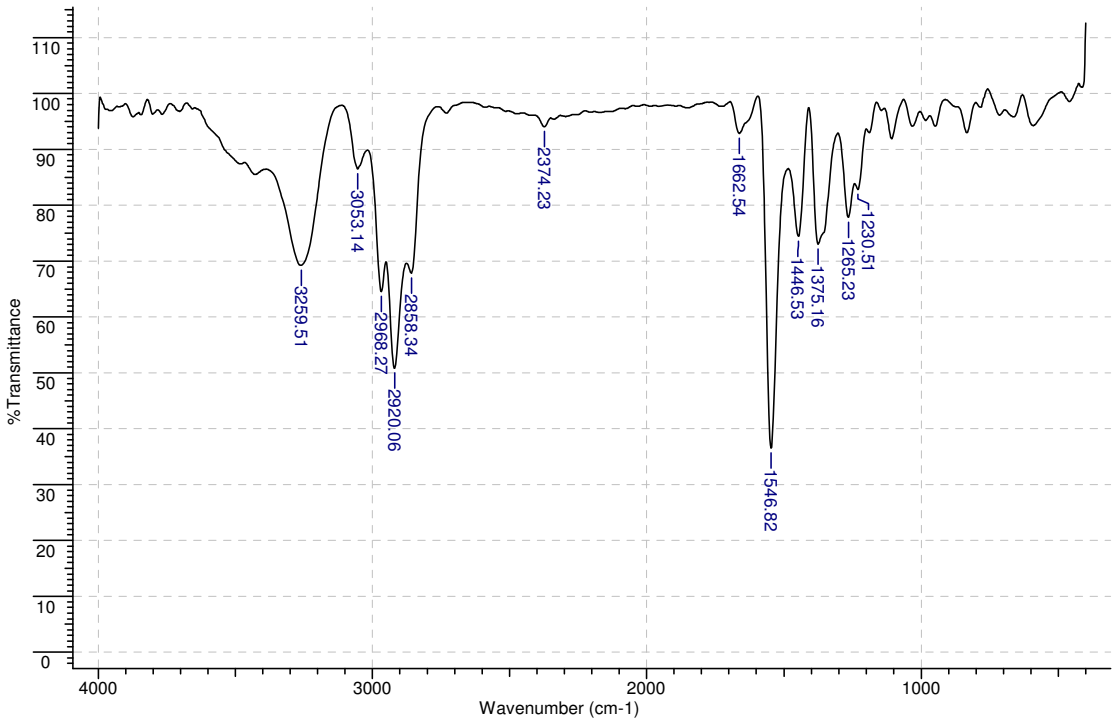


Figura 227. Espectro no IV da substância **91**

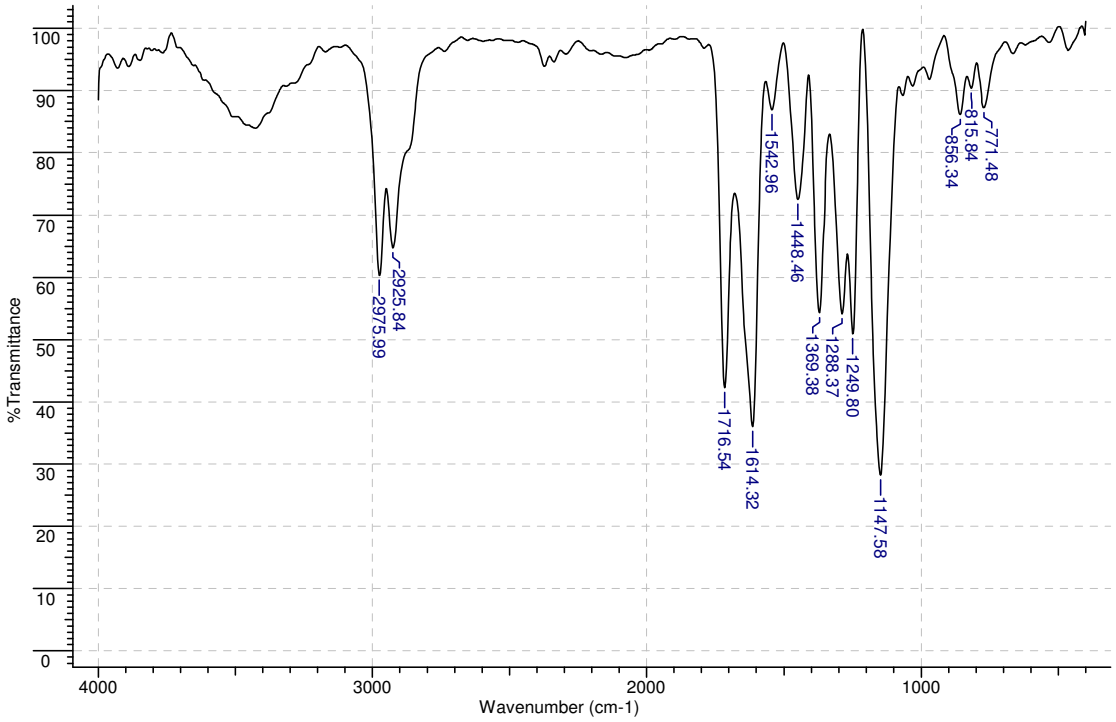


Figura 228. Espectro no IV da substância **93**

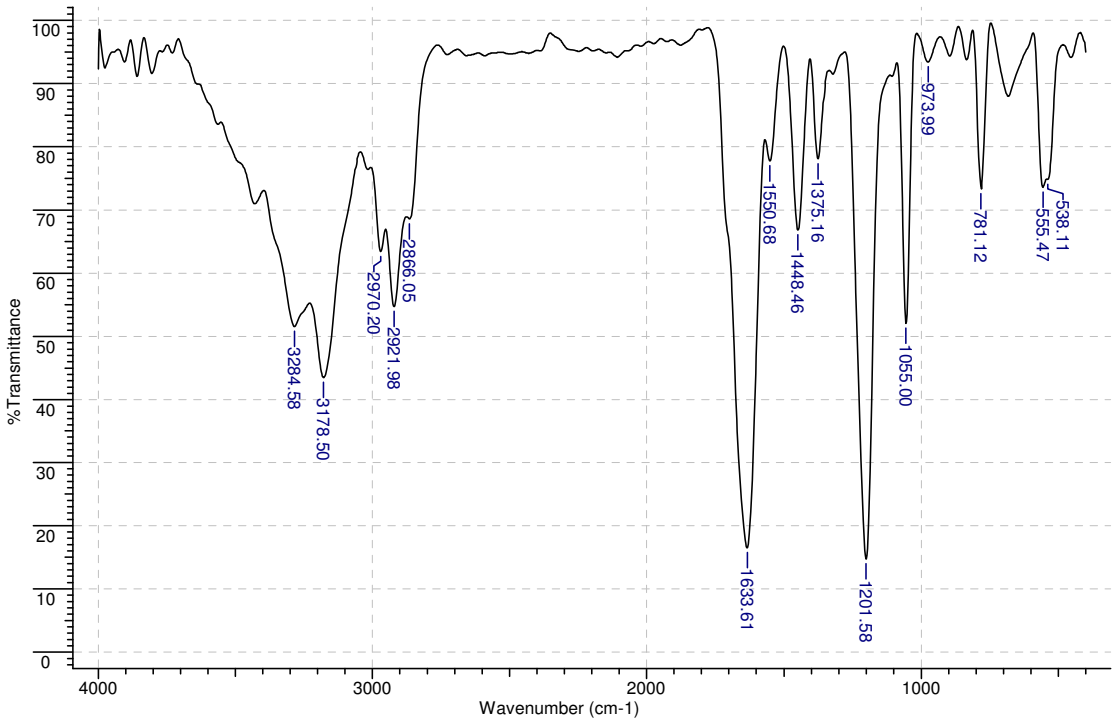


Figura 229. Espectro no IV da substância **93**

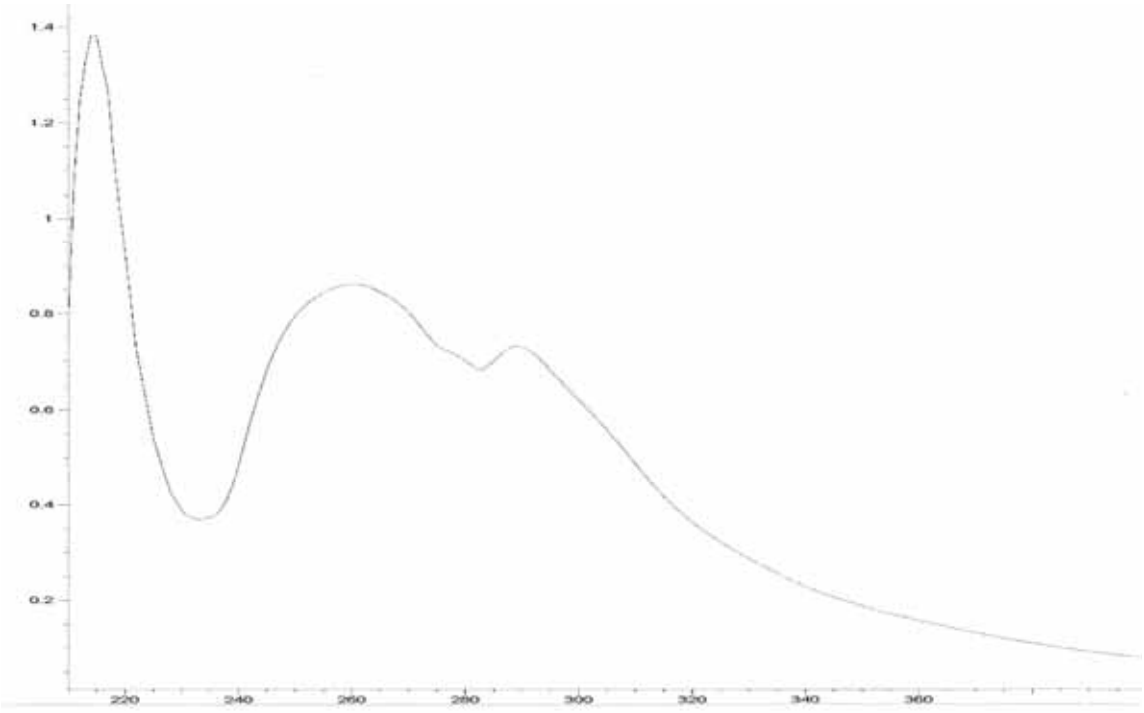


Figura 230. Espectro no UV da substância **42**

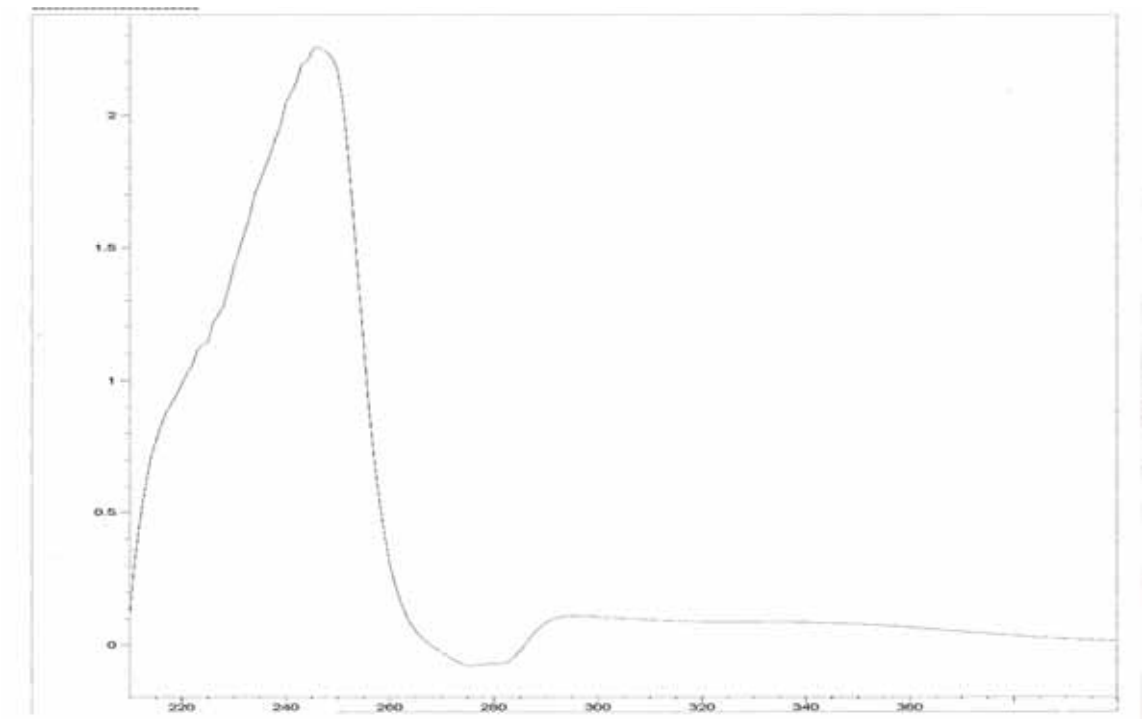


Figura 231. Espectro no UV da substância **43**

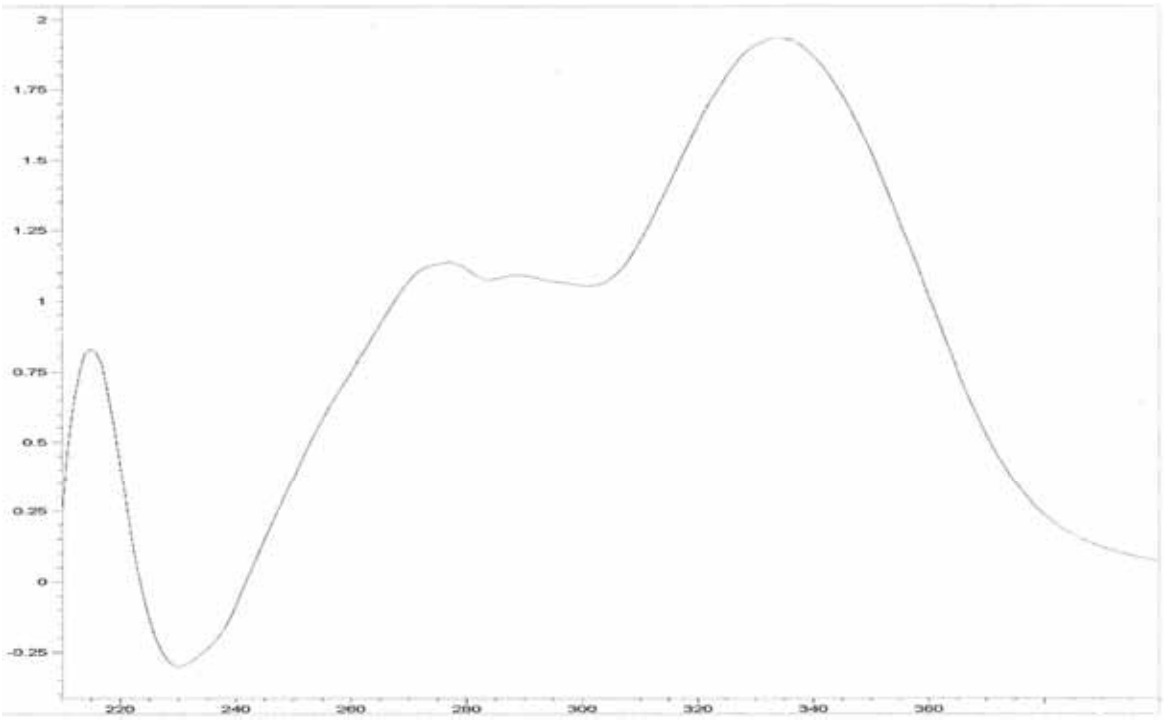


Figura 232. Espectro no UV da substância **45**

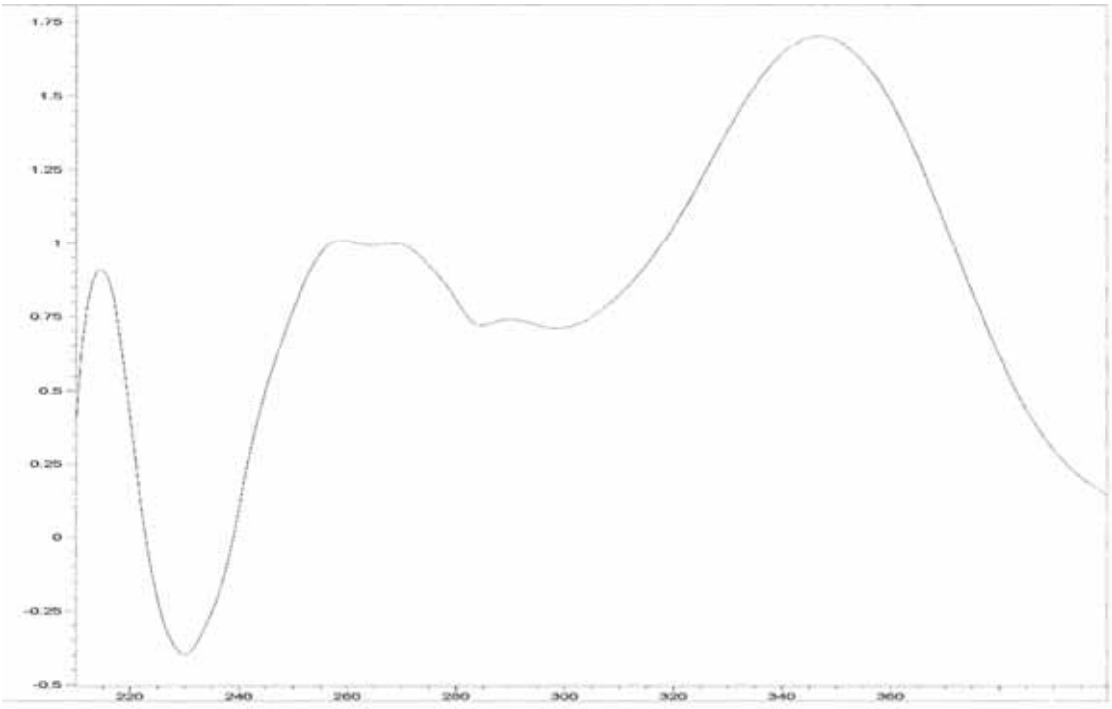


Figura 233. Espectro no UV da substância **47**

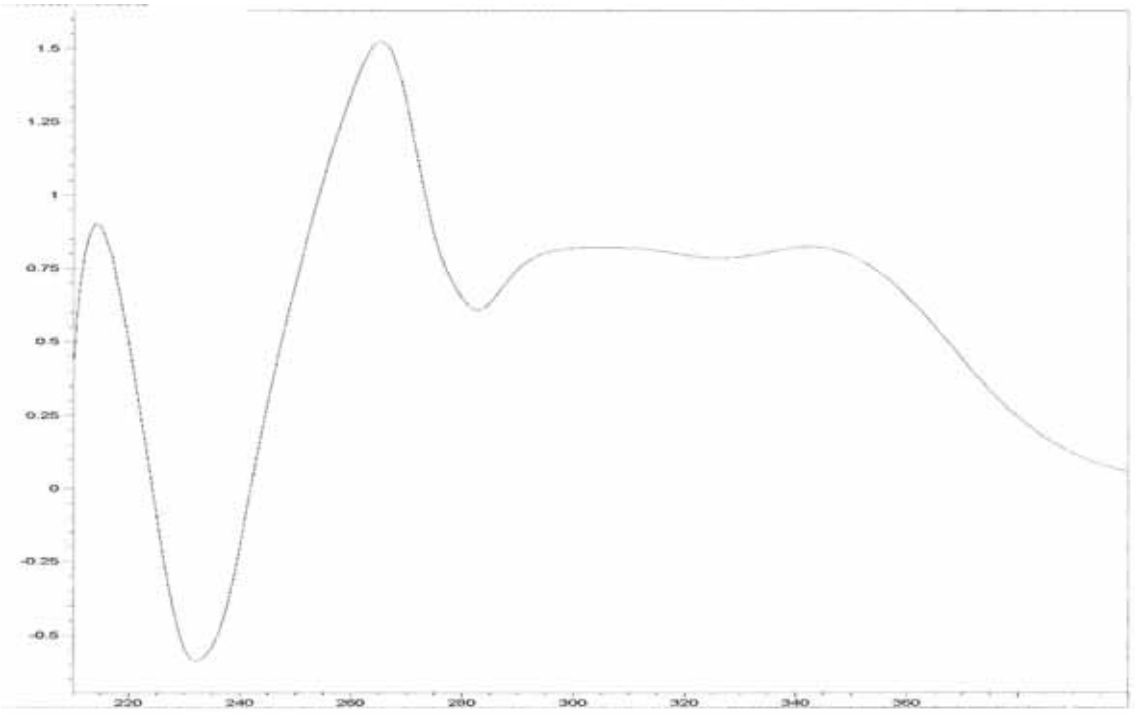


Figura 234. Espectro no UV da substância **51**