UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Síntese e modificação molecular de compostos isolados da
própolis brasileira visando a obtenção de protótipos
antimaláricos

Mauro de Oliveira Junior

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Maria Amélia Barata da Silveira

São Paulo
2004

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

O48s	<p>Oliveira Junior, Mauro de</p> <p>Síntese e modificação molecular de compostos isolados da própolis brasileira visando a obtenção de protótipos antimaláricos / Mauro de Oliveira Junior. -- São Paulo, 2004. 100p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia. Orientador: Silveira, Maria Amélia Barata da</p> <p>1. Fármaco : Planejamento : Química farmacêutica 2. Antimalárico : Farmacodinâmica 3. Própolis : Produtos naturais : Farmacognosia I. T. II. Silveira, Maria Amélia Barata da, orientador.</p> <p>615.19 CDD</p>
------	--

Mauro de Oliveira Junior

Síntese e modificação molecular de compostos isolados da própolis
brasileira visando a obtenção de protótipos antimaláricos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Maria Amélia Barata da Silveira
orientadora/presidente

Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno
1º. examinador

Profa. Dra. Maria Cristina Marcucci Ribeiro
2º. examinador

São Paulo, 14 de dezembro de 2004.

Minha esposa, Roberta

“O tempo é:
muito lento para os que esperam,
muito rápido para os que tem medo,
muito longo para os que lamentam,
muito curto para os que festejam,
mas para os que AMAM, o tempo é a eternidade”

William Shakespeare

Te amo

Meu Pai, Mauro

Um exemplo de obstinação e perseverança, forjou do menino um homem,
sempre vibrando com nossas vitórias. Aqui está mais uma.
Mesmo que muitas vezes não se consiga demonstrar

Te Amo

Minha Mãe, Rosa

Amor, carinho, ternura e dedicação. Seu exemplo de vida
nos mostra o caminho, "não esmorecer, para nunca desmerecer"

Te amo

Meu irmão, Fabiano

Fonte inesgotável de apoio, sem você desde o começo,
nada disso seria possível,

Te amo

DEUS

Força invisível sempre a nos guiar
pelos caminhos tortuosos da vida,
mais uma vez obrigado.

“Não se pode ensinar nada a um homem
você pode apenas ajudá-lo a
encontrar a resposta dentro dele mesmo”
(Galileu Galilei)

Agradecimentos

“Há pessoas que falam
e nem as escutamos,
há pessoas que nos ferem
e nem deixam cicatrizes.
Mas, há pessoas que simplesmente
aparecem em nossa vida
e nos marcam para sempre”

Cecília Meireles

A prof.^a Dra. Maria Amélia Barata da Silveira, por sempre acreditar no trabalho e apoio constante, correções e lições que jamais poderiam ser obtidos de outra fonte, cuja dedicação se estendeu por muitos finais de semana. Obrigado.

Ao prof. Dr. Carlos Alberto Brandt, pelo apoio incondicional no laboratório e aprendizado de Química Orgânica, verdadeiramente um “pai” científico.

A prof.^a Dra. Maria Cristina Marcucci Ribeiro, pelo “pontapé inicial” nesta carreira científica, se assim pode ser chamado, atuando com serenidade e inesgotável dedicação desde à iniciação científica.

A prof.^a Dra. Elizabeth Igne Ferreira, pelos “puxões de orelha” nas disciplinas, fato que gera um inestimável aprendizado que perdurará por toda a vida.

A todos amigos e funcionários, cujos nomes não serão citados, pois a lista seria interminável, além do poema acima, fica um muito obrigado.

SUMÁRIO

Resumo	X
Abstract	XI

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 PRÓPOLIS	1
1.2 MALÁRIA	2
1.3 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	4

Capítulo 2

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 PRÓPOLIS	7
2.1.2 OBTENÇÃO DE PRINCÍPIOS ATIVOS DA PRÓPOLIS BRASILEIRA	9
2.2. MALÁRIA	14
2.2.1 EPIDEMIOLOGIA	15
2.2.2 ETIOLOGIA	17
2.2.2.1 CICLO BIOLÓGICO	18
2.2.2.1.1 NOS VERTEBRADOS	18
2.2.2.1.2 NOS INVERTEBRADOS	19
2.2.3 DIAGNÓSTICO	20
2.2.4 TRATAMENTO	21
2.2.4.1 ESQUIZONTICIDAS TISSULARES	21
2.2.4.2. ESQUIZONTICIDAS HEMÁTICOS	21
2.2.4.3. GAMETOCITOCIDAS	22
2.2.4.4. ESPORONTICIDAS	22

2.3 PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS	23
------------------------------	----

2.3.1 PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS BASEADO EM PRODUTOS NATURAIS	29
--	----

2.4 REAÇÕES COM MICROONDAS	32
----------------------------	----

2.5 REARRANJO DE CLAISEN	37
--------------------------	----

Capítulo 3

3. MATERIAIS E MÉTODOS	39
------------------------	----

3.1 MATERIAIS	39
---------------	----

3.1.1 REAGENTES E SOLVENTES	39
-----------------------------	----

3.1.2 EQUIPAMENTOS	40
--------------------	----

3.2 MÉTODOS	41
-------------	----

Capítulo 4

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
---------------------------	----

4.1 RESULTADOS	54
----------------	----

4.1.2 PROPRIEDADES ESPCTROSCÓPICAS	55
------------------------------------	----

4.1.3 ESPECTROS	58
-----------------	----

4.2 DISCUSSÃO	77
---------------	----

Capítulo 5

5. CONCLUSÕES	85
---------------	----

Capítulo 6

6. PERSPECTIVAS	87
-----------------	----

Capítulo 7

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
-------------------------------	----

Resumo

A própolis, bem como outros produtos da colméia, vêm sendo utilizados em larga escala, por número crescente da população mundial, com base na medicina popular, sendo incorporados até mesmo na alimentação.

A própolis é produzida a partir de resinas encontradas na natureza, nas quais a abelha adiciona a sua saliva e deposita o produto na colméia, com o intuito de tornar o ambiente asséptico.

Devido a grande diversidade de nossa flora, a própolis brasileira tornou-se mundialmente reconhecida por suas propriedades curativas, sendo inúmeros os princípios ativos isolados com atividade biológica comprovada.

Por outro lado, dentre as muitas enfermidades que assolam a humanidade, a malária merece atenção especial, pois além de ser debilitante, esta doença afeta considerável número de pessoas, não só no Brasil, mas em outros países, sendo alarmante o número de óbitos por ela causados.

Fator agravante, a resistência aos fármacos utilizados para combate da malária, torna imprescindível a pesquisa para descoberta de novos compostos ativos contra esta doença, principalmente quando se trata das infecções causadas por *Plasmodium falciparum*, agente que causa a maioria dos casos fatais da doença.

No presente trabalho, visa-se à obtenção sintética de compostos presentes na própolis brasileira, com intuito de obtenção de protótipos antimaláricos que, posteriormente serão submetidos ao processo de modificação molecular.

Abstract

Propolis or bee glue, like others beehive products, are very used in the whole of the countries, based in the popular medicine and incorporated into foods.

Bee glue is produced by natural resins in which bee adds its spit and puts in the beehive with purpose to obtain aseptic environment.

The brazilian bee glue is common knowledge because it is produced from a great diversity of plants and exhibits very interesting curative properties, with many active principles biologically tested.

There are many illness that destroy humanity, and malaria must take special attention, because it is weakening disease and many people in Brazil and another countries, killing people in a large scale.

Resistance is a big problem to combat malaria and research for discovery new pharmacological compounds became essential, mainly against *Plasmodium falciparum* infections, that pills very often.

This work, has a syntetic objective to obtain bee glue compounds, with intention to get anti-malaria prototypes.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

1.1. PRÓPOLIS

Apesar de o uso da própolis ser antigo e o seu consumo ser bem difundido no Brasil e em outros países, trabalhos de pesquisa vêm se desenvolvendo para comprovar os poderes curativos desta resina, existindo inúmeros relatos na literatura nacional e internacional sobre a utilização da própolis (Marcucci, 1995; Banskota *et al.*, 2000; Kimoto *et al.*, 2001).

A própolis apresenta composição resinosa sendo encontrada nas colméias. É produzida pelas abelhas, a partir de diferentes substâncias retiradas das plantas, associadas às suas secreções salivares. É depositada em seus ninhos, com o objetivo de isolá-lo e protegê-lo e, principalmente, de tornar o ambiente asséptico (Greenaway *et al.*, 1990).

Sua composição química é muito complexa, e até 1995 foram descritos cerca de 200 compostos. Entre eles são encontrados, em maior quantidade, os derivados fenólicos como flavonóides, ácidos carboxílicos e seus derivados, além de hidrocarbonetos (Marcucci, 1995). A composição química varia em função da flora disponível na região. Por conseguinte, a própolis brasileira é diferente da de outros países de clima temperado tendo sido reconhecida mundialmente pela excelência de sua qualidade (Marcucci, 1995).

Com o advento da popularização da própolis, esta passou a ser incorporada na alimentação em muitos países, principalmente no Japão, atuando como preventivo de inflamações, infecções, estimulante do sistema imunológico e anti-oxidante, com base principalmente na medicina popular local (Wang *et al.*, 2004).

1.2. MALÁRIA

Dar-se-á, inserido no gênero *Plasmodium*, maior destaque ao *Plasmodium falciparum*, causador da forma mais grave da doença, incluindo entre outros, os sintomas seguintes: insuficiência renal, edema cerebral, encefalopatia e até mesmo a morte (Hirst et al.; 2000).

O controle da malária, no estado de São Paulo, foi satisfatoriamente consolidado à partir da década de 60, graças aos esforços desenvolvidos pelo órgão vertical de controle, hoje Superintendência de Controle de Endêmias (SUCEN). Ao lado deste intenso trabalho, as profundas alterações da paisagem e substituição da mata original por monoculturas e pastagens devem ter interferido e contribuído para êxito das ações empreendidas. Desde então, são desenvolvidas ações de vigilância epidemiológica que visam detectar e tratar, de maneira precoce, as fontes de infecções importadas, procedentes de outras áreas do Brasil onde a malária é endêmica, com o objetivo de impedir a instalação de surtos de transmissão, além de reduzir a morbidade e mortalidade (Wanderley et al.; 1994)

O Brasil, dentre tantas outras dificuldades, enfrentadas pelo povo, já duramente castigado por diversas enfermidades, ainda luta contra malária. Doença infecto-parasitária, é transmitida pela picada da fêmea do mosquito *Anopheles*, que introduz juntamente com sua saliva, o protozoário do gênero *Plasmodium* na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, neste caso, o homem (Alves et al.; 2000).

A doença é característica de áreas tropicais e subtropicais, distribuída principalmente pelo continente africano, asiático e americano, sendo endêmica e mais expressiva no Brasil na região que compreende a Amazônia legal, onde são encontrados inúmeros fatores para tal disposição, como clima, floresta, hidrografia, temperatura e baixo nível sócio-econômico cultural da população (Alves et al., 2000).

Apresenta estimativa anual de 300 a 500 milhões de casos clínicos mundiais, chegando a média de 2 milhões de óbitos, constitui-se em emergência médica, requerendo diagnóstico e tratamento urgentes (W.H.O., 2004) .

1.3. OBJETIVO E JUSTIFICATIVA

O objetivo deste trabalho é estudar, sintetizar e caracterizar os compostos derivados do ácido *p*-hidroxicinâmico, estrutura básica das substâncias fenólicas encontradas na própolis com atividade antiprotozoária (Burdock, 1997), bem como realizar modificações moleculares posteriores, esperando obter agentes potencialmente ativos na malária, especialmente a resistente.

Os compostos já isolados da própolis brasileira são derivados de ácidos fenólicos prenilados (Marcucci, 1995), como o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (em destaque) e seus análogos oriundos de simplificação molecular, consoante a figura 1:

Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico, isolado da própolis brasileira.

ácido ferúlico

ácido cafeico

Figura 1: em destaque o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico e seus derivados mais simples

A simplificação molecular de um modo geral, visa a elucidação do grupo farmacofórico, tornando cada vez mais simples a estrutura a ser pesquisada, sendo mantida, entretanto, a atividade terapêutica. A partir desta unidade simples, poderão ser anexados grupos substituintes, escolhidos de acordo com a finalidade pretendida, aprimorando a atividade farmacológica.

Neste estudo, serão feitas modificações moleculares, utilizando-se análogos alilados, consoante o esquema a seguir apresentado:

Esquema 1: retrosíntese dos compostos planejados.

A base para este trabalho é encontrada em Couto e colaboradores (1999), que demonstraram a importância do *P. falciparum* no estágio intra-entrocitário, onde este utiliza colesterol e seus derivados obtidos do hospedeiro vertebrado, para suas atividades vitais, como respiração mitocondrial, síntese de membranas entre outras. Neste processo metabólico, os isoprenóides são essenciais para o

processo de aproveitamento do colesterol e derivados exógenos, para posterior biossíntese de seus próprios metabólitos.

Com a identificação da importância dos isoprenóides em rotas biossintéticas essenciais à sobrevivência do parasito, estes tomam-se possíveis alvos para serem utilizados como protótipos no planejamento de novos fármacos.

Destarte, estratégia que pode ser empregada é a síntese de derivados dos isoprenóides, que sendo estruturalmente semelhantes entre si, mas diversos quanto as propriedades físico-químicas, podem ser incorporados pelo parasito, em suas macromoléculas, induzindo a produtos defeituosos, podendo ocasionar a síntese letal, ou seja, a morte do mesmo.

Uma modificação possível é a substituição do grupo prenila pelo alila com ciclização posterior. Esta poderá ser obtida mediante a utilização do forno de microondas, possibilitando a realização de rearranjo de Claisen. Com isto espera-se aumento da lipofilicidade e melhor absorção no caso de um futuro protótipo, facilitando a formação de produtos defeituosos num possível mecanismo de ação acima relatado.

Assim, os compostos planejados neste trabalho, bem como seus intermediários, sendo análogos dos compostos prenilados, poderão possivelmente, interagir nesta via metabólica, sob forma de antagonista, impedindo a biossíntese e levando o parasito à morte.

Como não são conhecidos as relações estrutura-atividade para tais derivados quanto a atividade antimalárica, deve-se respeitar os parâmetros de lipofilicidade, bem como cargas eletrônicas localizadas, que podem interferir com a absorção do mesmo.

Estas observações poderão então, fornecer dados para futuros estudos de QSAR ou mesmo de QSAR 3D, caso seja comprovada a atividade antimalárica.

Com isto, justifica-se a importância deste estudo já que o advento da resistência aos fármacos antimaláricos, a descoberta de novos fármacos de combate efetivo, além das medidas de controle efetuadas pelos órgãos competentes, são de extrema importância no atual contexto mundial para controle e erradicação da malária.

CAPÍTULO 2

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. PRÓPOLIS

Baseado no uso popular, de alguns anos para cá, a literatura científica vem relatando estudos referentes ao reconhecimento das propriedades biológicas da própolis, tais como: antimicrobiana (Kedzia, 1986, 1990; Pepeljnjak *et al.*, 1981, 1982), antifúngica (Holdema e Kedzia, 1987; Valdéz *et al.*, 1987), antiprotzoária (Scheller *et al.*, 1977; Torres *et al.*, 1990), antiviral (Debiaggi *et al.*, 1990; Amoros *et al.*, 1992a, 1992b; Serkedjieva *et al.*, 1992).

Além dessas, foi investigada a atividade citotóxica *in vitro*, examinada mediante diferentes métodos de cultura de células HeLa (carcinoma cervical humano) (Ban *et al.*, 1983; Ross, 1990), verificando-se a ação citotóxica da própolis nestas células. Por outro lado, estudos *in vitro* com EEP (extrato etanólico de própolis) revelaram a atividade sobre três formas de desenvolvimento de *T.cruzi* (linhagem Y) na faixa de concentração de 25-100 µg/ml (Higashi *et al.*, 1991).

Outras propriedades biológicas e farmacêuticas da própolis foram relatadas: propriedades anestésicas locais; regeneração de tecido cartilaginoso, de tecido ósseo e da polpa dental, também foi empregada em dentifrícios, preparações para lavagem bucal, tratamento de gengivites, quelite e na pós-extração dentária, apresentando também ação anticáries em ratos (Draganova *et al.*, 1989).

Demonstrou também ser efetiva contra doenças do aparelho digestivo, indicando atividade hepatoprotetora e eficaz como anti-úlceras (Kabanov *et al.*, 1989).

A própolis possui propriedades antiinflamatórias que foram descritas principalmente contra doenças do sistema músculo-articular e outros tipos de inflamações, reumatismos e torções (Draganova *et al.*, 1989; Kabanov *et al.*, 1989).

Foi utilizada na dermatologia, em cicatrização de ferimentos, regeneração de tecidos, tratamento de queimaduras, neurodermites, eczemas, dermatite de

contato, úlceras externas, psoríase, hanseníase, *herpes simplex*, *zoster e genitalis*, pruridos e dermatófitos (Ghisalberti, 1979; Marcucci, 1995).

Alguns relatos da literatura apresentam o sucesso clínico da própolis no tratamento de doenças respiratórias (Lin *et al.*, 1993; Marcucci, 1995; Paulino *et al.*, 2002).

Foi descrito seu uso no tratamento de tumores. São também conhecidas as suas propriedades anti-oxidante, imunomoduladora, anti-sépticas, adstringentes e hipotensivas (Ghisalberti, 1979; Marcucci, 1995).

2.1.2. OBTENÇÃO DE PRINCÍPIOS ATIVOS DA PRÓPOLIS BRASILEIRA

A própolis obtida na colméia apresenta-se sob forma rudimentar, de aparência pétrea, sendo necessários diversos processos para sua extração, entre os quais merece destaque a extração Soxhlet, do qual são obtidos o extrato etanólico para uso comercial ou o extrato metanólico para pesquisas (Marcucci, 1995).

Após obtenção do extrato é realizada cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), constatando a presença de diversas substâncias, que então serão isoladas por cromatografia em coluna de baixa pressão (Lowbar) ou cromatografia líquida semi-preparativa (Kimoto *et al.*, 2001).

Após ser isolada, caracterizada e identificada, procede-se os testes biológicos comprovando sua eficácia *in vivo* ou *in vitro*, sendo agora qualificada sua atividade (Ito *et al.*, 2001). O quadro a seguir, apresenta os princípios ativos já isolados e caracterizados, bem como a atividade biológica identificada:

Quadro 1: Princípios ativos isolados da própolis e correspondente atividade biológica

Composto	Propriedade Biológica	Composto	Propriedade Biológica
<p>Ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenóico</p>	<p>-Citotóxico (Banskota <i>et al.</i>, 1998)</p> <p>- Hepatoprotetor (Banskota <i>et al.</i>, 2001)</p>	<p>Ácido 2,2-dimetil-2H-1-benzopirano-6-carboxílico</p>	<p>-Citotóxico (Banskota <i>et al.</i>, 1998)</p>
<p>Ácido 2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenóico (DPB)</p>	<p>-Citotóxico (Banskota <i>et al.</i>, 1998)</p>	<p>Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (DHCA)</p>	<p>-Citotóxico e Hepatoprotetor (Banskota <i>et al.</i>, 1998, 2001)</p> <p>-Anti leucêmico (Kimoto <i>et al.</i>, 2001)</p> <p>-anti <i>H.pylori</i> (Banskota <i>et al.</i>, 2001)</p> <p>-Quimioterápico (Aga <i>et al.</i>, 1994)</p>

<p>Vanilina (G1)</p>	<p>-Hepatoprotetor (Banskota <i>et al.</i>, 2001)</p>	<p>Ácido 15-acetilisocupressico ou 15-acetóxiisocupressico</p>	<p>-Citotóxico (Banskota <i>et al.</i>; 1998) -Hepatoprotetor (Banskota <i>et al.</i>, 2001)</p>
<p>3-metoxi-4-hidroxicinamaldeído (composto G2 – coniferaldeído)</p>	<p>-Citotóxico (Banskota <i>et al.</i>, 1998) -Hepatoprotetor (Banskota <i>et al.</i>, 2001)</p>	<p>Ácido agático</p>	<p>-Hepatoprotetor (Banskota <i>et al.</i>, 2001)</p>

<p>15-metil-éster do ácido agático</p>	<p>-Citotóxico (Banskota <i>et al.</i>, 1998, 2001)</p> <p>-antibacteriano (Banskota <i>et al.</i>, 2001)</p>	<p>Tremetona</p>	<p>-Citotóxico (Banskota <i>et al.</i>, 1998, 2001)</p> <p>-antibacteriano (Banskota <i>et al.</i>, 2001)</p>
<p>Ácido agatático</p>	<p>-Citotóxico (Banskota <i>et al.</i>, 1998, 2001)</p> <p>-antibacteriano (Banskota <i>et al.</i>, 2001)</p>	<p>Viscidona</p> <p>2-[1-hidroximetil]vinil-5-acetil- hidroxicumarano (I)</p>	<p>-antibacteriano (Banskota <i>et al.</i>, 2001)</p>

<p>Betuletol (flavonol)</p>	<p>-Hepatoprotetor (Banskota <i>et al.</i>, 2001) -Antiinflamatório (Banskota <i>et al.</i>, 2001)</p>	<p>3,5,7-triidroxi-4'-metoxiflavonol (Flavonol)</p>	<p>-Citotóxico, Hepatoprotetor (Banskota <i>et al.</i>, 2001) -Antiinflamatório (Banskota <i>et al.</i>, 2001)</p>
<p>Canferida (flavonol)</p>	<p>-Citotóxico (Banskota <i>et al.</i>, 2001) -Antiinflamatório (Banskota <i>et al.</i>, 2001)</p>	<p>Acetato de coniferila dimérico</p>	<p>-Hepatoprotetor (Banskota <i>et al.</i>, 2001) -antibacteriano (Banskota <i>et al.</i>, 2001)</p>

<p>Ácido metil-4,5-di-O –cafeoilquinico</p>	-Anti-HIV (Ito et al., 2001)	<p>Ácido p-cumárico</p>	-antibacteriano (Banskota et al., 2001)
<p>Benzofurano B</p>	-Citotóxico (Banskota et al., 2001)	<p>Ácido cafeico</p>	-Antiinflamatório (Banskota et al., 2001)
<p>Benzofurano A</p>	-Hepatoprotetor (Banskota et al., 2001) -Citotóxico (Banskota et al., 2001)		

2.2. MALÁRIA

No Brasil, a malária faz parte do cotidiano de grande parte do povo, já debilitado por carências, entre outras, e principalmente, alimentares (Noronha, *et al.*, 2000).

O termo malária é de origem italiana e, literalmente, significa “mal ar”, porque se acreditava que a doença fosse causada pelas emanções dos pantanos (Korolkovas, A. & Burckhalter, J.H., 1982).

Os principais antimaláricos podem ser classificados quimicamente como diaminopirimidínicos, aminoquinolínicos, quinolinometanólicos, sulfonamidicos, fenantrenometanólicos, derivados lactônicos sesquiterpênicos e alguns antibióticos (Casteel, 1996).

O primeiro caso de resistência aos antimaláricos foi relatado em 1945 com a pirimetamina e outros antagonistas do ácido fólico. Disseminou-se, de forma incisiva, por vastas áreas do mundo, assumindo, na atualidade proporções alarmantes. No Brasil, a resistência ao quinino foi relatada pela primeira vez por Couto em 1908 (Boulos, Di Santi, Barata 1986). Segurado e colaboradores (1997) avaliaram a resistência do *P. falciparum* aos fármacos antimaláricos rotineiramente empregados no Brasil e constataram o alto grau de resistência à cloroquina e amodiaquina, indicando aumento da resistência do parasita ao quinino na Amazônia brasileira. Reitera-se, assim, a necessidade de monitorização contínua da sensibilidade a antimaláricos, com o intuito de recomendar esquemas mais eficazes e a busca de novos fármacos para terapêutica da malária por *Plasmódio falciparum*.

2.2.1. EPIDEMIOLOGIA

A malária é doença que atinge áreas tropicais e subtropicais, especialmente o continente africano, asiático e sul americano, com altas morbidade e prevalência. As regiões mundiais de risco encontram-se geograficamente distribuídas como mostra a figura 2 (W.H.O.;2004):

Figura 2: áreas de alto e baixo risco de transmissão da malária

Fonte: www.mosquito-netting.com/malaria.html. Acesso em 15/04/04

Devido a fatores climáticos, sócio-econômicos e principalmente de carência alimentar, financeira e de apoio de organismos internacionais, principalmente no que se refere a administração de medicamentos, a malária atinge níveis altíssimos

na África, concentrando também o maior número de óbitos (W.H.O.;2004), como observado na figura 2.

No Brasil, a área compreendida pela Amazônia e seus estados adjacentes constituem a região de alto risco de transmissão, como demonstrado na figura abaixo, apresentado 500 mil casos clínicos anuais (W.H.O.;2004):

Figura 3: áreas de risco no Brasil

Fonte: www.saude.pr.gov.br/Seminario/Malaria/malaria.htm

Pode-se definir epidemia como sendo o resultado da transmissão simultânea de uma doença a um número não habitual de pacientes, no caso da malária, corresponde à uma exacerbação da sua incidência na região considerada (Rey, 2002).

As epidemias são comuns apenas em zonas de malária instável, onde pequenas modificações em quaisquer dos fatores da transmissão podem alterar o equilíbrio e não são refreadas pela imunidade da população, que pode ser reduzida ou nula (Cimermam & Cimermam, 2001).

Epidemias periódicas, resultantes de modificação cíclicas nas condições e relacionadas com fatores climáticos, aumento das chuvas e dos criadouros, ou chuvas mais precoces que estendem a duração do período de transmissão, ocorrem com certa frequência. Anos epidêmicos, com intervalos quinquenais, ocorriam habitualmente em São Paulo, antes das campanhas de erradicação (Wanderley *et al.*;1994).

2.2.2. ETIOLOGIA

No gênero *Plasmodium*, as espécies que habitualmente parasitam o homem, causando malária são (Rey, 2002; Cimermam & Cimermam, 2001):

Plasmodium falciparum

Quando injetados no sangue humano, todos os esporozoítas evoluem concomitantemente, de acordo com sua espécie, de modo a produzir uma só geração de formas pré-eritrocíticas. Desenvolvem-se rapidamente no fígado e após dois dias medem 4 μm . No fim do quinto dia, o esquizonte maduro já alcança 60 μm e contém 40.000 merozoítas.

As formas eritrocíticas são os trofozoítas que mostram-se como formações pequenas, hialinas e anulares, no interior dos glóbulos vermelhos parasitados.

Responsável pela febre terçã maligna, com ciclos de 36 a 48 hs, pode dar origem à forma letal da malária, causando a maioria dos óbitos.

Plasmodium vivax

Os esquizontes medem 40 μm , estão maduros no oitavo dia e encerram cerca de 10.000 merozoítas.

Na fase eritrocítica, os trofozoítas apresentam-se na forma de um disco arredondado que, em poucas horas, manifestam intensa atividade amebóide. Entre 24 e 36 horas é quando a movimentação do parasito alcança maior intensidade, justificando sua vivacidade que origina o nome da espécie.

Responsável pela febre terçã benigna, com ciclos de 48 hs, consiste na forma com maior taxa de incidência, porém com menor taxa de mortalidade.

Existem outros, como *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*, porém com menor representatividade nos panoramas clínicos atuais.

2.2.2.1. CICLO BIOLÓGICO

2.2.2.1.1 Nos Vertebrados (Cimermam & Cimermam, 2001).

O ciclo no hospedeiro vertebrado inicia-se quando, ao picar o homem, os mosquitos inoculam diretamente na circulação sanguínea, juntamente com a saliva, as formas infectantes acumuladas em suas glândulas salivares, que são os esporozoítas.

Dentro de meia hora, já não se encontram mais no sangue. Os parasitos alcançam o fígado e penetraram no interior dos hepatócitos, onde se desenvolvem e passam a ser denominados esquizontes.

Os esquizontes formados no fígado dão lugar a milhares de elementos-filhos: os merozoítas. Dentro de 6 a 9 dias, de acordo com a espécie, ocorrerá o rompimento do hepatócito, com liberação dos merozoítas.

Uma vez liberados dos hepatócitos, os merozoítas invadem os glóbulos vermelhos. Ao término deste processo são denominados trofozoítas. Os trofozoítas crescem e se multiplicam assexuadamente, quando da replicação do núcleo, passando a constituir esquizontes.

Por sua vez, os esquizontes se multiplicam por um processo denominado esquizogônia, que formará novos merozoítas. Quando do rompimento do eritrócito, ganham novamente a corrente sanguínea, dando origem ao ciclo eritrocítico, que se repete sucessivamente e a intervalos regulares, de acordo com a espécie, originando os tipos terça e quartã.

Depois de algum tempo de evolução da infecção malárica, aparecem no interior das hemácias algumas formas que já não se dividem. São os gametócitos: eles crescem, igualmente no sangue de capilares profundos, porém, mais lentamente que os trofozoítas. Possuem morfologia bem definida e destinam-se a assegurar a continuidade da espécie. Quando os parasitos são retirados da circulação sanguínea do hospedeiro vertebrado pelo repasto sanguíneo da fêmea do mosquito ocorre sua disseminação.

2.2.2.1.2. Nos Invertebrados

Quando a fêmea do anofelino suga o sangue de um paciente portador desses elementos sexuais (gametócitos), todos os componentes são digeridos no estômago do inseto, degenerando também todas as formas evolutivas do parasito, com exceção dos gametócitos.

Existem dois tipos de gametócitos, os masculinos e os femininos, que no interior do estômago do inseto evoluem para gameta feminino e gameta masculino.

Com a união dos gametas, forma-se uma célula-ovo ou zigoto, que cerca de 20 horas depois começa a deslocar-se com movimentos amebóides, razão pela qual é chamada oocineto, dirige-se para o revestimento epitelial da parede intestinal, perfura-a e aloja-se entre o epitélio e a membrana basal ou mesmo no próprio epitélio. Segrega um envoltório protetor transformando-se em oocisto, que cresce consideravelmente. Inicia-se então o processo de multiplicação esporogônica, mediante a qual produzem-se, no interior do oocisto, milhares de elementos-filhos: os esporozoítas.

O oocisto maduro acaba por romper-se e libertar os esporozoítas que invadem a hemolinfa do inseto, e migrando para as glândulas salivares, completa o ciclo evolutivo dos plasmódios.

A figura 4 exemplifica melhor o ciclo biológico dos Plasmódios em geral:

Figura 4: ciclo evolutivo dos plasmódios. Fonte: www.ficharionline.com/biologia/Malaria.php. Acesso em 23/08/04.

2.2.3. DIAGNÓSTICO

A única maneira de estabelecer o diagnóstico em pacientes com suspeita de malária é demonstrar a presença do plasmódio em exames de sangue. Esta pesquisa deve ser feita em todos os pacientes febris, nas áreas endêmicas, e em todos os que procedem de áreas endêmicas. Tal comportamento visa prevenir as formas graves e imprevisíveis de malária, devidas ao *P. falciparum*, que podem instalar-se subitamente e determinar a morte do doente (Rey, 2002).

Recomenda-se preparar uma lâmina com gota espessa e examiná-la cuidadosamente por profissional habilitado, até a identificação da espécie de plasmódio, pois o prognóstico a curto e a longo prazo bem como a escolha dos medicamentos dependem da espécie em questão (Dutra, 2004).

2.2.4. TRATAMENTO

Os fármacos antimaláricos não atuam sobre as mesmas fases evolutivas dos plasmódios, bem como seus efeitos não são os mesmos, permitindo que se reconheçam vários tipos de atividades terapêuticas (Cimermam & Cimermam, 2001).

2.2.4.1. Esquizonticidas tissulares

São fármacos que atuam sobre o ciclo esquizogônico hepático, destruindo os parasitos durante o ciclo pré-eritrocítico. Os medicamentos dotados desta propriedade impedem o aparecimento da fase sanguínea e portanto das manifestações clínicas da malária. Tais medicamentos são chamados etio-profiláticos, quando aplicados na fase pré latente da infecção. Ex: primaquina.

2.2.4.2. Esquizonticidas hemáticos

São fármacos que atuam sobre os parasitos que estão efetuando o ciclo esquizogônico eritrocítico. O paciente apresenta nessa ocasião acessos maláricos e o resultado do tratamento será a cura clínica da doença. Tais medicamentos são chamados supressivos, por suprimirem a sintomatologia. Como em muitos casos a parasitemia prossegue em níveis sub latentes, as recaídas ainda são possíveis nas infecções causadas por *Plasmodium vivax* e *malariae*. Ex: cloroquina.

2.2.4.3. Gametocitocidas

Destroem os macro e microgametas (gametócitos masculino e feminino) do sangue, suprimindo a possibilidade de o paciente vir a infectar outros anofelinos. Do ponto de vista do paciente não há benefício. Em virtude de interromper a cadeia de transmissão do parasito são extremamente importantes para medicina preventiva. Ex.:8-aminoquinolinas.

2.2.4.4. Esporonticidas

Atuam sobre os gametócitos sem destruí-los, impedindo entretanto que possam evoluir no estômago do mosquito. Por impedir a formação de oocistos e esporozoítas, estes medicamentos interessam de perto a medicina preventiva. Ex.: primaquina.

2.3. PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS

Os fármacos podem ser introduzidos na terapêutica por acaso, triagem empírica, extração de princípios ativos de fontes naturais, modificação molecular e planejamento racional (Korolkovas, 1988).

O método de obter novos fármacos por modificação molecular, também chamado manipulação molecular, é um dos processos mais empregados, hoje em dia, apresentando resultados alentadores. Basicamente, consiste em tomar uma substância ativa quimicamente bem determinada como modelo, sintetizar e ensaiar novos compostos que sejam congêneres, homólogos ou análogos estruturais do composto matriz. Este método apresenta diversas vantagens (Korolkovas, 1988):

- 1- Maior probabilidade de os congêneres, homólogos e análogos apresentarem propriedades farmacológicas melhores que o modelo.
- 2- Possibilidade de obter produtos farmacologicamente superiores.
- 3- Probabilidade de a produção dos novos fármacos serem mais econômicas.
- 4- Os dados obtidos podem elucidar a relação estrutura atividade.
- 5- Emprego dos mesmos métodos de ensaios biológicos utilizados para o modelo.

Dentre os propósitos da química farmacêutica estão o isolamento, caracterização, elucidação da estrutura e a síntese de compostos que determinem protótipos para uma possível utilização na terapia (Wermuth, 1996).

Nos dois últimos séculos, muitos produtos naturais foram isolados e purificados, tendo sido determinada sua estrutura química. Muitos manifestaram propriedades terapêuticas úteis. Para se tomar independente das fontes naturais, sujeita aos vários tipos de intempéries, tenta-se obter princípio natural por síntese total, trabalho árduo e nem sempre compensador (Thompson, 2001).

Grupos de medicamentos sintéticos que já pareciam superados, como as sulfas, nos apresentam novos aspectos e com novas possibilidades de aplicação terapêutica. É o caso das sulfas hipoglicemiantes e depois as sulfas de

eliminação lenta, como a sulfametoxipiridazina, cuja campo de aplicação se estende também a quimioterapia da hanseníase. Surgem as sulfonamidas heterocíclicas, inibidoras da anidrase carbônica e utilizadas como diuréticos no combate a hipertensão arterial, frutos de aplicação de conceitos de isosterismo, inibição competitiva e modificações moleculares diversas, que norteiam a pesquisa sobre síntese de novos fármacos orgânicos (Korolkovas, 1999).

A introdução de novas tecnologias, associadas ao uso do computador, permitiu o desenvolvimento e introdução de novos fármacos na terapêutica.

Entretanto, métodos clássicos ainda são empregados, com muito êxito. Nesse sentido, a modificação molecular ainda é a ferramenta mais empregada com objetivo de aprimorar e introduzir novos agentes terapêuticos, consoante com o esquema 2:

Esquema 2: Divisão meramente didática da modificação molecular

Método de obtenção de novos fármacos muito utilizado atualmente, a modificação molecular constitui desenvolvimento natural da química orgânica. Uma substância quimicamente determinada e com ação biológica também conhecida, é eleita como protótipo, a partir da qual, sintetizam e se ensaia novos compostos que sejam congêneres, homólogos ou análogos estruturais do protótipo inicial, com objetivo de elucidar o grupo farmacofórico, e/ou, obter

compostos com propriedades físico-químicas mais próximas às desejadas (Korolkovas, 1988).

A modificação molecular divide-se em processos gerais e processos especiais (vide esquema 2), sendo os processos gerais novamente divididos em simplificação molecular e associação molecular (Korolkovas, 1988).

O processo de simplificação molecular, consiste nas sínteses e ensaios de análogos visando tornar cada vez mais simples a molécula protótipo, comumente de um produto natural de estrutura química muito complexa (Korolkovas, 1988).

Por outro lado, o processo de associação objetiva às sínteses e ensaios de análogos cada vez mais complexos da molécula protótipo, incorporando diversas propriedades ao modelo, destacando-se três tipos principais (Korolkovas, 1988):

- Adição molecular: associação de agentes estruturalmente diferentes por ligações químicas fracas.

- Replicação molecular: união de agentes idênticos por ligação covalente, podendo conter duplicação, triplicação e assim por diante.

- Hibridação molecular : associação de agentes estruturalmente diferentes através de ligação covalente.

Os processos especiais, por sua vez, dividem-se em três grandes grupos, sendo o primeiro que altera, especialmente, propriedades relacionadas com tamanho e flexibilidade das moléculas; já o segundo discorre sobre as alterações de propriedades físico-químicas através da introdução de novos grupos ou substituição de determinados grupos por grupamentos diferentes, e por fim, a latenciação, processo que compreende a ligação do fármaco à uma molécula inativa farmacologicamente, porém, atuante como transportador, visando aumento

de biodisponibilidade, prolongamento de ação, aumento de estabilidade, diminuição de toxicidade e dos efeitos colaterais. (Korolkovas, 1988).

Os processos utilizados nas alterações de tamanho e flexibilidade são: fechamento ou abertura de anel, formação de homólogos; introdução de ligações duplas, introdução de centros opticamente ativos, introdução ou substituição de grupos volumosos (Korolkovas, 1988).

O grupo onde são alteradas as propriedades físico-químicas, encontramos os processos de substituição isostérica, mudança de posição ou orientação de determinados grupos e inibição ou promoção de estados eletrônicos diversos (Korolkovas, 1988).

Grupos isostéricos e bioisostéricos são extensivamente aplicados no planejamento de fármacos, não apenas na modificação molecular de fármacos conhecidos, mas também no planejamento racional de antimetabólitos, que em razão de sua semelhança estrutural com metabólitos celulares normais, podem substituí-lo nos processos biológicos, mas não conseguem executar seu papel normal (Wermuth, 1996) (Thompson, 2001).

O aciclovir, descoberto, em 1977, nos laboratórios Wellcome, EUA, por Gertrude Elion e colaboradores, é um derivado purínico sintético, obtido por simplificação molecular ou abertura de anel (processo especial de modificação molecular) da guanosina. É empregado até hoje, com sucesso, no tratamento do *Herpes sp.* (Chechin Filho & Yunes, 1998).

Considera-se isómero clássico as substituições que seguem a lei do deslocamento do hidreto, os elementos de cada um dos grupos da classificação periódica, compreendendo também os equivalentes anelares.

Por outro lado, o conceito foi estendido e hoje considera-se isómero não clássico os que, substituídos em determinada molécula, formarão um composto com disposição estérica e configuração eletrônica semelhantes à do composto matriz.

Destarte, os antimetabólitos são classificados em clássicos e não clássicos, sendo os primeiros obtidos por isosterismo clássico, substituindo certos átomos ou grupos químicos dos metabólitos essenciais. A utilização na via metabólica destes isósteros determina a morte da célula ou eventualmente do parasito. Os grupos isostéricos utilizados para esta conversão são denominados grupos deceptores (Korolkovas, 1988), conforme esquema abaixo.

Figura 5: conversão metabólitos em antimetabólitos clássicos através de isosterismo com grupos deceptores

O conceito bioisosterismo foi introduzido por Friedman, em 1951. São considerados bioisósteros grupos ou fragmentos estruturais diferentes quimicamente, mas equivalentes biologicamente, substituíveis na molécula de um

fármaco ou protótipo. Os não clássicos são assim denominados porque sua semelhança com os metabólitos é muito remota, como exemplo podemos citar a pirimetamina e cicloguanila, ainda que inibam a diidrofolato desidrogenase sua semelhança estrutural com o ácido fólico, com o qual competem, não é acentuada (Gomes & Reis, 2000), vide esquema a seguir:

PIRIMETAMINA

CICLOGUANILA

ÁCIDO FÓLICO

Figura 6: antimetabólitos não clássicos do ácido fólico

2.3.1. PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS BASEADO EM PRODUTOS NATURAIS

A descoberta de novos fármacos, atribuição da Química Farmacêutica, caracteriza-se por sua complexidade, fruto da multiplicidade de fatores que envolvem o planejamento molecular de novas estruturas capazes de apresentarem os efeitos farmacológicos desejados, com biodisponibilidade adequada ao seu emprego terapêutico, seguro e confortável (Chechin Filho & Yunes, 1998).

Devido a multiplicidade de fatores que, além da biodisponibilidade, incluem a toxicidade e o metabolismo, o processo de planejamento racional de novos fármacos envolve bilhões de dólares e ocupa milhares de pesquisadores, de diferentes áreas, em diversos laboratórios de pesquisa, tanto industriais como acadêmicos. Este processo representou um desafio insuperável durante muito tempo, começando a ser vencido há 30 anos, com a descoberta da cimetidina, primeiro fármaco capaz de prevenir e curar a úlcera péptica. Este fármaco foi planejado para atuar como antagonista seletivo de receptores histaminérgicos do sub-tipo 2 (H-2) e representou, na época de seu lançamento, inovação terapêutica singular (Montanari & Bolzani, 2001).

Frente aos avanços tecnológicos observados em diversas áreas como a biologia estrutural, molecular e a química computacional, por exemplo, o planejamento racional de novos fármacos tornou-se uma realidade (Barreiro, 2002).

Múltiplas disciplinas estão envolvidas com o processo do planejamento racional de fármacos, destacando as tecnologias emergentes, que representaram significativas conquistas científicas do final do século 20, e que influenciarão este processo neste século. Vale destacar a contribuição da química computacional e, mais recentemente, da química combinatória que, acoplada ao contínuo desenvolvimento de computadores cada vez mais eficientes, viabilizou bioensaios robotizados de vastas quimiotecas que, provavelmente, produzirão novos

paradigmas para o processo de descoberta racional de novos fármacos. A conquista do genoma e o desenvolvimento do proteoma, além da nanotecnologia, representam aspectos recentes do avanço tecnológico que, certamente, terão impacto neste processo (Barreiro, 2002).

Por outro lado, inúmeros alcalóides, termo introduzido em 1818 pelo químico alemão Wilhelm Meissner para denominar substâncias naturais básicas, de distintas classes, originaram importantes fármacos, de diversas categorias terapêuticas, pelo emprego, ainda empírico, à época, da estratégia de simplificação molecular do produto natural protótipo (Montanari & Bolzani, 2001).

Um exemplo clássico é a morfina , alcalóide isolado de *Papaver somniferum* (Papaverácea) pelo farmacêutico alemão F. W. A. Setümer, em 1803. Este fármaco foi o precursor dos analgésicos da classe da 4-fenilpiperidinas, representados pela petidina, ilustrando significativamente o sucesso da estratégia de simplificação molecular, sucessiva, de protótipos naturais. A estrutura da petidina caracteriza-se pela presença de um sistema piperidínico similar ao da morfina, em que o carbono C-4, quaternário, encontra-se ligado ao anel benzênico, correspondendo ao grupo farmacofórico clássico dos hipnoanalgésicos opiáceos (Chechin Filho & Yunes, 1998).

A quinina, um dos principais componentes da casca de *Cinchona officinalis*, é outro exemplo clássico. Este alcalóide originou, mais recentemente, por simplificação molecular planejada, os derivados antimaláricos da classe dos hidroximetilquinolínicos ou quinolinometanóis, exemplificados pela mefloquina . O processo de simplificação molecular que originou a mefloquina compreende, basicamente, a modificação do anel rubânico da quinina para o sistema piperidínico. A presença dos substituintes trifluórmethyla nos carbonos 2 e 8 do sistema quinolínico foi ditada por razões metabólicas. A mefloquina veio a suplantir os fármacos mais antigos das classes das 4-aminoquinolinas, exemplificado pela cloroquina (Barreiro, 2002).

O captopril , descoberto em 1977, nos laboratórios Squibb, por Ondetti e colaboradores, é um fármaco anti-hipertensivo, desenvolvido por simplificação molecular consecutiva do nonapeptídeo teprotido . Este último possui a mesma seqüência dos peptídeos isolados por Ferreira e colaboradores, em 1965, do

veneno de jararaca (*Bothrops jararaca*), identificados como inibidores da enzima conversora de angiotensina bovina (ECA). Esta enzima promove a hidrólise de ligações peptídicas envolvendo a prolina. Inibidores da ECA previnem a bioformação da angiotensina II, endo-peptídeo pró-vasoconstritor e, simultaneamente, a degradação da bradicinina, potente agente hipotensor endógeno e representaram, à época, importante inovação terapêutica para o tratamento da hipertensão (Barreiro, 2002).

Com o desenvolvimento de técnicas modernas de espectroscopia, os químicos tem elucidado rapidamente estruturas moleculares complexas de constituintes naturais, até pouco tempo impossíveis de serem identificadas. Neste contexto é importante ressaltar que os produtos naturais além do uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, têm contribuído ao longo dos anos na obtenção de vários fármacos, até hoje, amplamente utilizados na clínica. Cabe ressaltar que foram gastos em um ano nos Estados Unidos, 8 bilhões de dólares, por consumidores que pediram a prescrição de produtos naturais (Montanari & Bolzani, 2001).

Sendo a própolis um produto natural, abundante no Brasil e pouco conhecido do ponto de vista da sua vasta composição, uma vez que nossa flora amplamente diversa, fazem-se necessárias pesquisas que venham a contribuir com a elucidação desta fonte de múltiplos princípios ativos, que apresenta desde antimicrobianos até anti HIV, contornando até o problema representado pela biopirataria, freqüentemente reportada nos veículos de comunicação, além de possibilitar talvez, a inclusão futura de um novo fármaco na terapêutica, fato este raro na história da Química Farmacêutica do Brasil.

2.4. REAÇÕES USANDO MICROONDAS

O forno de microondas doméstico é utensílio prático, seja no preparo dos alimentos ou apenas no aquecimento. Sua utilização na química analítica teve início nos anos 70, na digestão de amostras para análise elementar, extração de diversas substâncias e desorção térmica de vários compostos (Mavandadi & Lidstrom, 2004).

Durante a 2ª Guerra Mundial, cientistas britânicos desenvolveram um dispositivo que gerava microondas, denominado magnetron e que era a parte central do RADAR ("Radio Detection And Ranging"), usado para detectar aeronaves inimigas. Funcionava da seguinte forma: o objeto a ser detectado reflete o sinal emitido (as microondas) e o sistema de RADAR detecta o eco deste sinal. Com isto é possível saber a posição, forma do objeto, velocidade e direção de seu movimento (Loupy, 2004).

Os cientistas que trabalhavam com o magnétron já sabiam que além da emissão de microondas também havia geração de calor, mas foi Spencer que percebeu que se poderia usar radiação eletromagnética para aquecer alimentos. Em 1945, Spencer notou que uma barra de um doce em seu bolso começou a derreter quando ele ficou em frente a um tubo de magnétron que estava ligado, e intrigado por este fato, conduziu alguns experimentos simples, como preparar pipoca espalhando alguns grãos de milho em frente ao tubo. Pouco tempo depois, no ano seguinte, a Raytheon solicitou a primeira patente sobre a utilização de microondas para o aquecimento de alimentos (Mavandadi & Lidstrom, 2004).

Em 1947, a Raytheon apresentou o primeiro forno de microondas chamado "Radarange". Este microondas pesava cerca de 340 Kg e possuía cerca de 1,5 m de altura. O preço era entre US\$ 2.000 e 3.000, sendo vendido para estabelecimentos comerciais. Além disso, este microondas também precisava de refrigeração interna. No final da década de 60 começaram a ser comercializados com sucesso, fornos de microondas domésticos (com as dimensões dos atuais e sem necessidade de refrigeração) com preços de US\$ 500. O forno de

microondas doméstico tomou-se popular em escala mundial nas décadas de 70 e 80. A frequência de operação destes fornos é de 2,45 GHz (Mavandadi & Lidstrom, 2004).

O aquecimento por microondas é totalmente diferenciado em relação ao que ocorre em um forno de cozinha convencional (seja a gás ou elétrico), onde o aquecimento de alimentos ocorre por condução, irradiação e convecção. O aquecimento por microondas é chamado de aquecimento dielétrico (Sanseveriano, 2002).

Existem dois mecanismos principais para a transformação de energia eletromagnética em calor.

O primeiro deles é chamado rotação de dipolo, e relaciona-se com o alinhamento das moléculas (que tem dipolos permanentes ou induzidos) com o campo elétrico aplicado. Quando o campo é removido, as moléculas voltam a um estado desordenado, e a energia que foi absorvida para esta orientação nestes dipolos é dissipada na forma de calor (Sanseveriano, 2002). Uma representação esquemática é mostrada na Figura 7, onde foi utilizada água como exemplo.

Figura 7: representação esquemática do aquecimento por microondas

Fonte: adaptado de Sanseveriano 2002.

O segundo mecanismo é chamado de condução iônica: o calor é gerado através de perdas por fricção, que acontecem através da migração de íons dissolvidos quando sob a ação de um campo eletromagnético. Estas perdas dependem do tamanho, carga, condutividade dos íons dissolvidos e interação destes últimos com o solvente (Loupy, 2004).

Os primeiros relatos de reações orgânicas conduzidas em forno de microondas doméstico surgiram em 1986 em dois trabalhos independentes de Gedye e Guigere . As reações usando microondas foram conduzidas em frasco selado sendo feita comparação com o aquecimento convencional (Esquema 3). Redução drástica no tempo de reação foi observada, embora não tenha havido um controle de pressão (Mavandadi & Lidstrom, 2004; Sanseveriano, 2002).

Esquema 3: primeiras reações utilizando forno de microondas

fonte: adaptado de Mavandadi & Lidstrom, 2004.

Dessarte, as reações efetuadas em forno de microondas doméstico também levaram aos primeiros relatos de acidentes, pois alguns frascos deformaram ou explodiram devido às condições de irradiação. Apesar disso, inúmeros trabalhos se seguiram após estes relatos iniciais, sendo descritos na literatura diversas reações orgânicas conduzidas com sucesso em forno de microondas doméstico sem modificação, e com segurança segundo seus autores (Mavandadi & Lidstrom, 2004; Sanseveriano, 2002).

As principais vantagens da utilização de energia de microondas sobre o aquecimento convencional (manta, bico de Bünsen, placa de aquecimento) em reação química, são: a) as taxas de aquecimento em uma reação onde determinada substância presente absorva bem microondas são muito maiores que no aquecimento convencional; b) o reator ou recipiente da reação pode ser transparente às microondas (como teflon, por exemplo): a energia é absorvida somente pelos reagentes ou solvente; c) a energia é transferida diretamente para a amostra, não havendo contato físico com a fonte de aquecimento; d) a possibilidade de maiores rendimentos, maior seletividade e menor decomposição térmica, vantagens bem documentadas na literatura para várias reações orgânicas em sistemas homogêneos e heterogêneos (Loupy, 2004).

As reações conduzidas por esta metodologia mostraram ainda grande vantagem em termos de rendimento, tempo e menor formação de subprodutos. Em um experimento típico, utiliza-se um gral com pistilo, no qual misturam-se os reagentes líquidos com um catalisador sólido (ou suporte, como sílica gel, alumina, argilas e diversos metais impregnados nestes materiais) ou então misturam-se os reagentes sólidos sobre os quais se irradia com microondas (Mavandadi & Lidstrom, 2004).

O rearranjo de pinacol é uma reação bem conhecida na Química Orgânica, e foi conduzido em ausência de solvente em forno de microondas doméstico usando uma argila (montmorilonita) com íons de Cobre(II) (Esquema 3). O procedimento com aquecimento convencional levou a menor rendimento e um tempo muito maior (15h!), como mostrado na comparação com o uso de microondas doméstico (Sanseveriano, 2002).

Outro exemplo, é uma alquilação aniônica conduzida em alumina, que também apresentou grande vantagem em relação ao aquecimento convencional, já que o éster foi obtido em apenas 2 minutos contra um tempo de 5 horas no processo convencional, também demonstrado no esquema 6 (Sanseveriano, 2002):

Esquema 4: exemplos de reações em microondas

Fonte: adaptado de Sanseveriano 2002.

O chamado “efeito microondas” ou “efeito específico de microondas” tem sido apontado como sendo um efeito não térmico, mas que seria causado pelo uso da radiação eletromagnética, sendo responsável pelas maiores velocidades de reação com aquecimento por microondas quando comparadas com o aquecimento convencional (diferentes energias de ativação). A cinética em forno de microondas caseiro é um estudo difícil, já que não há controle de temperatura. Assim, a diferença de velocidade seria explicada em alguns casos por uma medição inadequada da temperatura e pressão (Mavandadi & Lidstrom, 2004).

Ainda faltam estudos mais criteriosos para investigar estes efeitos de seletividade e velocidade, pois é preciso melhor compreensão sobre o que realmente ocorre nestes casos. No entanto, é inegável que os fatos experimentais demonstram claramente que existem vantagens consideráveis em usar o aquecimento por microondas (Loupy, 2004).

Assim, o uso de microondas é justificado naquelas situações onde isto é permitido, representando método de síntese rápido, limpo, fácil e econômico, pois não requer solventes e tampouco catalisadores especiais.

2.5. REARRANJO DE CLAISEN

O reconhecimento do rearranjo de Claisen representou um grande avanço para química orgânica clássica. Em linhas gerais trata-se de processo endotérmico, onde se promove um deslocamento do próton, gerando diversos estágios de estados de transição, até a conformação mais estável prevalecer, de acordo com os níveis de energia fornecidos (Gozzo *et al.*, 2003).

Esquema 5: níveis de energia (em Watts) e os intermediários do rearranjo de Claisen

Fonte: adaptado de Gozzo *et al.*, 2002.

Nos éteres alílicos, caso dos *o*-alilfenol, aquecendo-se a 200° C, ocorre migração do grupo alil para a posição *orto*, sendo pouco observadas migrações na posição *meta* e *para*, fato este explicado pela distância do último carbono deste grupamento até estas posições, sendo o mecanismo semelhante ao Rearranjo de Cope (rearranjo sigmatrópico [3,3]), acontecendo em um único momento (Svanholm & Parker, 1974).

Esquema 6: mecanismo do rearranjo de Claisen

Existem diversos fatores que interferem nos rearranjos de Claisen, tais como solvente, fontes de aquecimento (manta, bico de Bunsen, placa de aquecimento, etc.), presença de substituintes nas posições *meta* e *para* entre outros (Svanholm & Parker, 1974; Gozzo *et al.*, 2003).

Porém, levando-se em consideração e controlando estes fatores, as condições que propiciam o rearranjo de Claisen, são, sem dúvida, ferramenta importante na Química Orgânica, e como consequência para a química de obtenção de novos fármacos, quando há necessidade de se introduzir certos grupos químicos em posições definidas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1 REAGENTES E SOLVENTES

Acetato de sódio p.a. (MERCK)

Acetato de cálcio (MERCK)

Ácido 4-hidroxibenzoico (ALDRICH)

Ácido acético glacial (MERCK)

Ácido clorídrico (MERCK)

Alcool etílico absoluto p.a. (MERCK)

Alcool metílico absoluto p.a. (MERCK)

p-Bromofenol (SYNTH)

Brometo de sódio (SYNTH)

Clorato de lítio (MERCK)

p-Clorofenol (MERCK)

Cetofórmo p.a. (MERCK)

Clorofórmo deuterado (ISOTEC)

Cromatofóro AL TLC, Sílica gel 60 F254 (MERCK)

Dimetilsulfato deuterado (ISOTEC)

Hexano (SYNTH)

p-Hidroxibenzoato de propila (SYNTH)

Hidróxido de lítio (MERCK)

Hidróxido de sódio p.a. (SYNTH)

Iodo (MERCK)

Sílica gel 60, tamanho de partículas 3-50 µm (MERCK)

Sulfato de sódio anidro (SYNTH)

Todos os solventes comerciais utilizados foram previamente secos e purificados antes do uso, segundo as práticas recomendadas pela literatura (Forn et al., 1980).

CAPÍTULO 3

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1 REAGENTES E SOLVENTES

Acetato de etila p.a. (MERCK)

Acetonitrila (MERCK)

Ácido 4-hidroxicinâmico (ALDRICH)

Ácido acético glacial (MERCK)

Ácido clorídrico (MERCK)

Álcool etílico absoluto p.a. (MERCK)

Álcool metílico absoluto p.a. (MERCK)

p-Bromofenol (SYNTH)

Brometo de alila (SYNTH)

Cloreto de tionila (MERCK)

p-Clorofenol (MERCK)

Clorofórmio p.a. (MERCK)

Clorofórmio deuterado (ISOTEC)

Cromatofolhas AL TLC, Sílica gel 60 F254 (MERCK)

Dimetilsulfóxido deuterado (ISOTEC)

Hexano (SYNTH)

p-Hidroxibenzoato de propila (SYNTH)

Hidróxido de lítio (MERCK)

Hidróxido de sódio p.a. (SYNTH)

Iodo (MERCK)

Sílica gel 60, tamanho de partícula 0,063-0,2000mm (MERCK)

Sulfato de sódio anidro (SYNTH)

Todos os solventes comerciais utilizados foram previamente secos e purificados antes do uso, segundo os padrões estabelecidos pela literatura (Perrin *et al.*; 1980).

3.1.2. EQUIPAMENTOS

Balança analítica Metler AE 163

Cromatógrafo a gás HP 6890

Espectrômetro infravermelho Bömem MB SERIES

Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker DPX-300

Forno de destilação horizontal Büchi GKR-51

Forno de Microondas Eletrolux ME27F

Rotavapor R- 114 Büchi

Estufa para secagem FANEM modelo 515C

Espectrômetro de massas, modelo SHIMADZU qp5050 A.

3.2. MÉTODOS

As tentativas de sínteses seguiram inicialmente dois caminhos, sendo o primeiro a partir do ácido *p*-hidroxicinâmico e o segundo tendo como partida haletos na posição *para*, como o *p*-clorofenol, seguido da reação de Heck. Como rota alternativa, foi utilizado também o *p*-hidrobenzoato de propila, que através da redução levaria a aldeído que por sua vez, através de condensação Knoevenagel levaria ao produto final, como mostra o esquema retro-sintético:

retro-síntese a partir do ácido 4-hidroxicinâmico

retro-síntese a partir do *p*-clorofenol (segundo reação de Heck)

retro-síntese a partir do *p*-hidrobenzoato de propila (segundo reação de Knoevenagel)

3.2.1. PRIMEIRA ROTA SINTÉTICA

1ª etapa

O experimento baseou-se na tentativa direta de C-alquilação do ácido *p*-hidroxicinâmico, como descrita por Uto *et al.*, 2002, substituindo a brometo de prenila por brometo alila.

Em balão de 25 mL com 0,825 g (5 mmol) de ácido *p*-hidroxicinâmico, foram adicionados 0,70 g de brometo de alila (10 mmol) e a mistura reacional foi agitada constantemente, com metanol até completa dissolução. A seguir, foram adicionados 10 mL de uma solução de NaOH a 10% gota à gota, permanecendo sob agitação constante por 24 hs.

Ao término deste período, o produto bruto foi acidificado com uma solução de ácido acético 10% até obter pH ligeiramente ácido, sendo o produto extraído com éter (procedimento de extração realizado 3 vezes) e seco com sulfato de sódio anidro.

O produto foi então rotaevaporado e completamente seco a vácuo, gerando rendimento bruto de 1,25g.

2ª etapa

Foi constatada a presença do regioisômero O-alilado (vide Capítulo 4), procedemos para rearranjo de Claisen, utilizando aquecimento convencional e microondas.

Processo 1: em balão de 10 ml contendo 0,60 g do produto obtido na etapa anterior, inicia-se aquecimento em manta a 180° C durante 3 hs.

Processo 2: transfere-se 0,60 g do produto obtido na primeira reação para tubo de ensaio dentro de um Erlenmeyer de tamanho adequado e utilizando forno de microondas doméstico, ajustou-se a potência para 720 w, sendo irradiado durante 8 min.

3.2.2. SEGUNDA ROTA SINTÉTICA

1ª etapa

A primeira etapa a ser considerada nesta rota sintética é a proteção do grupo funcional carboxílico, permitindo desta forma o prosseguimento das reações na hidroxila:

Procedimento:

Em balão de 50 mL munido de tubo secante, foram adicionados 1,65 g (10 mmol) de ácido *p*-hidroxicinâmico, diluídos em 20 mL de metanol, com agitação constante à temperatura ambiente. Após total dissolução, foi adicionado gota a gota 0,8 mL de cloreto de tionila (10 mmol) através de seringa de vidro com capacidade de 1mL e prosseguiu-se com agitação durante 3 hs.

O produto bruto foi rotaevaporado e completamente seco à vácuo, gerando um rendimento bruto de 1,78 g .

2ª etapa

Esta etapa consiste na preparação do intermediário O-alilado, mediante tratamento do derivado fenólico com hidróxido de sódio e brometo de alila (Uto *et al*, 2002)

Procedimento

Em balão de 50 mL com 1,78 g do composto 1, foram adicionados 1,4 g de brometo de alila (10 mmol) e a mistura reacional foi agitada constantemente, com metanol até completa dissolução. A seguir, foram adicionados 10 mL de uma solução de NaOH a 10% gota à gota, permanecendo sob agitação constante por 24 hs.

Ao término deste período, o produto bruto foi acidificado com solução de ácido acético 10% até obter pH ligeiramente ácido, sendo a fase orgânica extraída com éter (procedimento de extração realizado 3 vezes) e seca com sulfato de sódio anidro.

O produto foi então rotaevaporado e completamente seco à vácuo, gerando rendimento de 1,55g.

3ª etapa

Mediante o Rearranjo de Claisen é possível obter o produto C-alilado,, utilizando forno de microondas doméstico.

Procedimento

Transferem-se 1,55g do composto 2 para um tubo de ensaio dentro de um Erlenmeyer de tamanho adequado e utilizando forno de microondas doméstico, ajustou-se a potência de 900 w irradiados durante 15 minutos.

3.2.3. TERCEIRA ROTA SINTÉTICA

1ª etapa

O derivado O-alilado foi obtido facilmente, através da mesma rota sintética utilizada para o derivado *p*-hidroxicinâmico.

Procedimento

Em balão de 100 mL foram pesados 6,4 g de *p*-clorofenol (50 mmol), 7 g de brometo de alila (50 mmol). Foram adicionados gota à gota 20 mL de solução de NaOH 10%, permanecendo em agitação durante 24 hs.

Ao término deste período, o produto bruto foi acidificado com solução de ácido acético 10% até obter pH ligeiramente ácido, sendo a fase orgânica extraída com éter (procedimento de extração realizado 3 vezes) e seca com sulfato de sódio anidro.

O produto foi então rotaevaporado e completamente seco à vácuo, gerando um rendimento bruto de 7,73g.

2ª etapa

Uma vez obtido o composto O-alilado, segue-se então para a C-alilação através do Rearranjo de Claisen, que de forma semelhante ao derivado cinâmico, o melhor resultado foi obtido com uso de forno de microondas doméstico.

Procedimento

Transferem-se 7,73g do composto 4 para tubo de ensaio dentro de Erlenmeyer de tamanho adequado e utilizando forno de microondas doméstico, ajusta-se a potência de 900 w irradiados durante 15 minutos.

3ª etapa

Uma vez obtido o produto C-alilado procedeu-se de maneira semelhante ao *p*-clorofenol, mostrado anteriormente.

Procedimento

Em balão de 100 mL, foram adicionados cerca de 7,73 g (45,5 mmol) do composto 5, em seguida 6,4 g de brometo de alila (45,5 mmol). Sob agitação constante foram adicionados gota à gota 20 mL de uma solução de NaOH 10%, permanecendo durante 24 hs.

Ao término deste período o produto bruto foi acidificado com solução de ácido acético 10% até obter pH ligeiramente ácido, sendo a fase orgânica extraída com éter (procedimento de extração realizado 3 vezes) e seco com sulfato de sódio anidro.

O produto foi então rotaevaporado e completamente seco à vácuo, gerando um rendimento bruto de 7,15g.

4ª etapa

O produto desejado foi obtido por Rearranjo de Claisen, via microondas, nas mesmas condições utilizadas anteriormente para o produto monoalilado.

Procedimento

Transferem-se 7,15g do composto 6 para tubo de ensaio dentro de Erlenmayer de tamanho adequado e utilizando forno de microondas doméstico, programa-se para potência de 900w sendo irradiados durante 15 min.

3.2.4. QUARTA ROTA SINTÉTICA

1ª etapa

Utilizando o *p*-hidroxibenzoato de propila, procede-se à reação de O-alilação com uso de brometo de alila e hidróxido de lítio. Desta forma não é necessária acidificação, gerando o produto da reação praticamente puro.

Em balão de 150 mL contendo 10,8 g (60 mmol) de *p*-hidroxibenzoato de propila, adicionaram-se 3,042g (72 mmol) de hidróxido de lítio e 100 mL de água. A mistura reacional foi então mantida sob agitação constante até completa solubilização. Com a utilização de banho de gelo, adicionam-se, gota à gota, 6 mL (66 mmol) de brometo de alila, mantendo agitação constante por 24 hs.

Ao término deste período, a fase orgânica é extraída com acetato de etila (precedimento realizado 3 vezes) previamente seca com sulfato de sódio anidro, rotaevaporada e completamente seca à vácuo, gerando 13,3 g de produto bruto.

2ª etapa

Como já realizado em etapas anteriores, esta fase consiste na preparação do intermediário C-alilado, através do Rearranjo de Claisen.

Transferem-se 1,5g do composto O-alilado para tubo de ensaio dentro de Erlenmeyer de tamanho adequado. Procede-se então utilizando forno de microondas doméstico, ajustando-se a potência de 900w irradiados durante 15 minutos.

3.2.5. QUINTA ROTA SINTÉTICA

1ª etapa

Seguindo o planejamento elaborado para o *p*-clofenol, foi realizada a O-alilação.

Em balão de 150 ml foram colocados cerca de 8,65g de *p*-bromofenol (50 mmol), adicionaram-se 2,52 g de hidróxido de lítio (60mmol) e 100 mL de água. A mistura reacional foi então mantida sob agitação constante até completa solubilização. Com a utilização de banho de gelo, adicionou-se gota á gota 7 mL de brometo de aliila (77 mmol), mantendo agitação constante por 24 hs.

Ao término deste período a fase orgânica é extraída com acetato de etila (procedimento realizado 3 vezes) e previamente seca com sulfato de sódio anidro, rotaevaporada e completamente seca à vácuo, gerando um rendimento bruto de 11,25 g.

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. RESULTADOS

Na primeira etapa da primeira rota sintética, a tentativa de C-alilação direta resultou em dois produtos, o planejado e seu regioisômero O-alilado.

A segunda rota sintética apresentou algumas dificuldades, pois o Rearranjo de Claisen gerou, além do produto desejado, um derivado cíclico, que após tentativa de purificação em coluna de gel de sílica, resultou na não separação dos compostos. Esta questão merece ser melhor resolvida.

Paralelamente, pela terceira rota sintética, obtiveram-se os produtos C-alquilados e C-dialquilados purificados através de coluna de gel de sílica e destilação horizontal. Após a comprovação da estrutura e pureza mediante os métodos analíticos convencionais, estes derivados deverão ser avaliados biologicamente.

Já a quarta rota, os derivados O-alilados foram obtidos sem dificuldades, mas as reações de redução que permitiam a preparação de aldeído e posterior condensação ao produto final, apresentaram resultados insatisfatórios.

A quinta rota sintética proposta, pretende que as reações com bromo sejam mais eficazes, uma vez que é descrito na literatura a reação de Heck, onde é previsível a obtenção do produto final de forma direta.

4.1.2. PROPRIEDADES ESPECTROSCÓPICAS

RMN ^1H

O anel aromático dos compostos O-alilados preparados a partir dos derivados fenólicos são caracterizados pela presença de dois duplos dubletos localizados na região entre 6 e 8 ppm. No espectro de RMN ^1H (figura 8) do derivado *p*-clorofenol observamos um dubleto em 6,75ppm com constante de acoplamento de 8,9Hz atribuído ao próton *orto* e um dubleto na região 7,18 ppm com a mesma constante de acoplamento atribuído ao próton *meta*. Além disso, observamos também neste caso o deslocamento do carbono carbinólico na região de 4,44 ppm na forma de um dubleto com constante de acoplamento de 5,3 Hz.

Figura 8: Espectro de RMN ^1H do derivado *p*-clorofenol O-alilado (região entre 4 a 8 ppm).

Os sinais dos prótons olefínicos absorvem de maneira semelhante em todos os outros derivados: duplo dubleto na região de 6,0 ppm e dois dubletos na região entre 5,0 e 5,5 ppm.

Nos derivados C-alilados, obtidos a partir dos O-alilados por rearranjo de Claisen, observamos três sinais na região entre 6,5 e 7,5 ppm; um dubleto em 6,72 ppm (8,1 Hz) atribuído ao próton 6 (*orto*), um dubleto em 7,06 ppm (8,1 Hz) atribuído ao próton 5 e um singlete em 7,08 ppm atribuído ao próton 3 (figura 9). Além disso, os sinais atribuídos aos metilênicos absorvem agora na região de 3,35 ppm. Neste caso, os prótons olefínicos *cis* e *trans* estão sobrepostos na região de 5 ppm.

Figura 9: Espectro de RMN ^1H (300 MHz) do derivado *p*-clorofenol C-alilado (região entre 3 a 8 ppm).

Para os derivados obtidos de O-alilação dos compostos C-alilados, a principal observação é a presença de dois sinais em forma de dubletos na região em 4 ppm e 3 ppm atribuídos aos prótons carbinólicos e metilênicos vizinhos ao anel aromático, respectivamente. Os prótons aromáticos são semelhantes ao derivado C-alilado mostrado anteriormente. Entretanto, nos derivados C-dialilados observamos apenas um sinal atribuído ao próton *meta*.

RMN ^{13}C

Os compostos O-alilados apresentam 4 sinais aromáticos. Por exemplo, no derivado do *p*-bromofenol observamos sinais em 157,5 (C_1), 132,2 ($\text{C}_{3,5}$), 116,6 ($\text{C}_{2,6}$) e 113,0 (C_4) ppm. O carbono carbinólico absorve em 70,0 ppm (figura 10). Os derivados C-dialilados apresentam as mesmas características quanto ao anel aromático ou seja, 4 sinais.

Figura 10: Espectro de RMN ^{13}C (75,5 MHz) do derivado *p*-bromofenol O-alilado

Nos compostos C-alilados fenólicos e éteres (O-alilados) observamos 6 carbonos aromáticos. Dessa maneira, no derivado fenólico *p*-clorofenol C-alilado observamos estes sinais em: 152,6 (C₁), 130,1 (C₃), 129,5 (C₂), 127,8 (C₄), 127,4 (C₅), 116,7 (C₆) ppm. Neste caso o carbono metilênico absorve em 35,0 ppm (figura 11).

Figura 11: Espectro de RMN ¹³C (75,5 MHz) do derivado fenólico *p*-clorofenol C-alilado

4.1.3. ESPECTROS

As etapas de cada rota sintética foram acompanhadas por espectros de RMN ¹H, RMN ¹³C e infravermelho, sendo demonstrados a seguir:

Espectro do composto obtido na primeira etapa da primeira via sintética:

Figura 12: espectro de RMN¹H e as estruturas obtidas na primeira etapa da primeira rota sintética

RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz, δ=PPM):

Isômero A: 4,58 (d, J=5,1 Hz, 2H) HC 10; 5,32 (d, J=10,5 Hz, 1H) HC 12 cis; 5,43 (d, J=17,3 Hz, 1H) HC 12 trans; 5,94-6,16 (m, 1H) HC 11; 6,33 (d, J=15,9 Hz, 1H) HC 8; 6,94 (d, J=8,6 Hz, 2H) HC 2 e 6; 7,50 (d, J=8,6 Hz, 2H) HC 3 e 5; 7,75 (d, J=15,9 Hz, 1H) HC 7.

Isômero B: 3,42 (d, J=6,5 Hz, 2H) HC 10; 5,07-5,22 (m, 2H) HC 12; 5,94-5,16 (m, 1H) HC 11; 6,33 (d, J=15,8 Hz, 1H) HC 8; 6,84 (m, 1H) HC 6; 7,34-7,4 (m, 2H) HC 3 e 5; 7,73 (d, J=15,8 Hz, 1H) HC 7.

Espectros do composto obtido na primeira etapa da segunda via sintética:

Figura 13 : Espectro de RMN¹H e estrutura do composto obtido na primeira da segunda rota sintética

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz, δ=ppm): 3,8 (s,3H)HC10; 6,30 (d,J=16,0 Hz, 1H) HC8; 6,85 (d, J=8,1 Hz, 2H) HC2 e HC6; 7,43 (d, J=8,0 Hz, 2H) HC3 e HC5; 7,64 (d, J=16,0 Hz, 1H) HC7.

Figura 14: espectro de RMN¹³C e estrutura do composto obtido na primeira etapa da segunda rota sintética.

RMN¹³C (CDCl₃, 75 MHz, δ =ppm): 51,7 (C10); 115,4 (C8); 115,9 (C2 e C6); 127,1 (C4); 130,0 (C3 e C5); 144,8 (C7); 157,9 (C1); 169,4 (C9).

Figura 15: espectro de infravermelho e estrutura do composto obtido na primeira etapa da segunda rota sintética

IV (KBr) λ máx. (cm⁻¹)= deformação axial de OH 3401,59 cm⁻¹ ; deformação axial de C-H aromático 3045,52 cm⁻¹ ; deformação axial de metileno 2951,17 cm⁻¹; deformação angular no plano de C-OH 1433,51 cm⁻¹; deformação de anel 1,4 di-substituído 832,18 cm⁻¹.

Figura 17: espectro de RMN^{13}C e estrutura do composto obtido na segunda etapa da segunda via sintética

RMN^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz, δ =ppm): 51,7 (C10); 68,8 (C11); 115,1 (C2 e C6); 116,00 (C8); 117,99 (C13); 129,74 (C3 e C5); 132,74 (C4); 144,70 (C7); 160,42 (C1); 168,0 (C9). (C12)

Figura18: espectro de infravermelho e estrutura do composto obtido na segunda etapa da segunda via sintética

IV (KBr) λ máx. (cm⁻¹)= deformação axial de C-O-C 3380,88 cm⁻¹; deformação axial de C=C 3050 cm⁻¹; deformação axial de -C=C- 2940,67 cm⁻¹; 1718,27 cm⁻¹; deformação axial de C=C cíclico 1602,73; estiramento simétrico de CH₃ 1434,64 cm⁻¹; estiramento de anel 1,4 di-substituído 820,72 cm⁻¹.

Espectros do composto obtido na primeira etapa da terceira via sintética:

Figura 19: espectro de RMN¹H e estrutura do composto obtido na primeira etapa da terceira via sintética

RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz, δ=ppm): 4,44 (d, J= 5,3 Hz, 2H) HC7; 5,26 (d, J=11,2 Hz, 1H) HC9 cis; 5,37 (d, J= 17,3 Hz, 1H) HC9 trans; 5,92-6,06 (m, 1H) HC8; 6,75 (d, J=8,9 Hz, 2H) HC2 e HC6; 7,18 (d, J= 8,9 Hz, 2H) HC3 e HC5.

Figura 20: Espectro de RMN¹³C e estrutura do composto obtido na primeira etapa da terceira via sintética

RMN¹³C (CDCl₃, 75 MHz, δ =ppm): 68,98 (C7); 115,96 (C2 e C6); 117,83 (C9); 127,4 (C4); 129,22 (C3 e C5); 132,81 (C8), 157,06 (C1).

Espectros do composto obtido na segunda etapa da terceira via sintética:

Figura 21: espectro de RMN¹H e estrutura do composto obtido na segunda etapa da terceira via sintética

RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz, δ/ppm): 3,36 (d, J=6,3 Hz, 2H) HC7; 5,5 (sl, 1H) OH; 5,10-5,17 (m, 2H) HC9; 5,89-6,02 (m, 1H) HC8; 6,72 (d, J=8,1 Hz, 1H) HC6; 7,06 (d, J=8,1 Hz, 1H) HC5; 7,08 (s, 1H) HC3.

Figura 22: espectro de RMN^{13}C e estrutura do composto obtido na segunda etapa da terceira via sintética

RMN^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz, δ =ppm): 35,13 (C7); 116,95 (C6); 117,05 (C9); 127,38 (C5); 127,81 (C4); 152,58 (C1); 129,80 (C2); 130,07 (C3); 135,54 (C8).

Figura 23: espectro de infra-vermelho e estrutura do composto obtido na segunda etapa da terceira via sintética

IV (KBr) λ máx. (cm^{-1}) = deformação axial de OH $3432,36 \text{ cm}^{-1}$; deformação axial de $\text{CH}=\text{CH}_2$ $3078,70 \text{ cm}^{-1}$; deformação axial de $-\text{CH}_2-$ $2919,84 \text{ cm}^{-1}$; deformação axial de $\text{C}=\text{C}$ de anel $1600,64 \text{ cm}^{-1}$; deformação axial de anel 1,2,4 tri-substituído $815,92 \text{ cm}^{-1}$.

Espectro do composto obtido na terceira etapa da terceira via sintética:

Figura 24: espectro de RMN ^1H e estrutura do composto obtido na terceira etapa da terceira via sintética

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz, δ =ppm): 3,41 (d, J =6,6 Hz, 2H) HC10; 4,53 (d, J =4,96 Hz, 2H) HC7; 5,09-5,15 (m, 2H) HC12; 5,31 (d, J =10,5 Hz, 1H) HC9 cis; 5,44 (d, J =17,31 Hz, 1H) HC9 trans; 6,00-6,05 (m, 2H) HC8 e HC11; 6,77 (d, J =7,4 Hz, 1H) HC6; 7,12 (d, J =2,64 Hz, 1H) HC5; 7,13 (s, 1H) HC3.

Espectro do composto obtido na quarta etapa da terceira via sintética:

Figura 25: espectro de RMN^1H e estrutura do composto obtido na quarta etapa da terceira via sintética

RMN^1H (CDCl_3 , 300 MHz, δ =ppm): 3,35 (d, J = 6,4 Hz, 4H) HC7 e HC10; 5,02-5,42 (m, 4H) HC12 e HC9; 5,89-6,02 (m, 2H) HC8 e HC11; 6,97 (s, 2H) HC3 e HC5).

Espectro do composto obtido na primeira etapa da quarta rota sintética:

Figura 26: espectro de RMN¹H e estrutura do composto obtido na primeira etapa da quarta rota sintética

RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz, δ =ppm): 0,99(t, J=6,9 Hz, 3H) HC13; 1,74 (sext, J=6,9 Hz, 2H) HC12; 4,23 (t, J=6,8 Hz, 2H) HC11; 4,53 (m, 2H) HC7; 5,27 (d, J=10,4 Hz, 2H) HC9 cis; 5,38 (d, J=17,4 Hz, 2H) HC9 trans; 5,0 (m, 2H) HC8; 6,89 (d, J=7,4 Hz, 2H) HC2 e HC6; 7,97 (d, J=7,4 Hz, 2H) HC3 e HC5.

Espectro do composto obtido na segunda etapa da quarta rota sintética:

Figura 27: espectro de RMN¹H e estrutura do composto obtido na segunda etapa da quarta rota sintética

RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz, δ=ppm): 1,02 (t, J=7,4 Hz, 3H) HC13; 1,78 (sext, J=7,4 Hz, 2H) HC12; 3,43 (d, J=6,4 Hz, 2H) HC7; 4,25 (t, J=6,9 Hz, 2H) HC11; 5,08-5,16 (m, 2H) HC9; 5,91-6,11 (m, 1H) HC8; 6,91 (d, J=16 Hz, 1H) HC6; 7,30 (sl, OH); 7,80-7,98 (m, 2H) HC3 e HC5.

Figura 29: espectro de RMN¹³C e estrutura do composto obtido na primeira etapa da quinta via sintética

RMN¹³C (CDCl₃, 75 MHz, δ =ppm): 68,98 (C7), 112,99 (C4), 116,18 (C2 e C6), 117,84(C9), 132,22 (C3 e C5), 132,88 (C8), 157,69 (C1).

4.2. DISCUSSÃO

Uma das estratégias comumente utilizada na elucidação do grupo farmacofônico (subunidade estrutural essencial à atividade farmacológica) é a simplificação molecular, que pode ser observada "*in natura*" nos compostos presentes na própolis brasileira, fato este possivelmente atribuído a adição de enzimas (saliva) feita pela abelha à resina coletada na natureza.

Portanto, observa-se dentre os compostos isolados da própolis uma semelhança estrutural profunda, onde a grande maioria dos compostos origina-se do ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico.

Segundo Olliaro e Yuthavong (1999) existem diversos alvos para planejamento de protótipos antimaláricos, sendo classificados em três categorias:

- Alvos responsáveis por processos ocorrentes no vacúolo digestivo do *P. falciparum*, como digestão de hemoglobina e mecanismo de defesa do hospedeiro. Em adição, o vacúolo digestivo está ligado com a capacidade em acumular fármacos no seu interior.
- Enzimas envolvidas na biossíntese de ácido nucléico, de fosfolípidos e glicólise.
- Enzimas responsáveis pelos processos de membrana, incluindo transporte de nutrientes para o parasito e transporte de fármacos.

Dentre as enzimas contidas no processo de digestão de hemoglobinas podemos citar a plasmepsina I e II, falcipaina, hemepolimerase e hemedespolimerase.

Existem ainda diversas classes de enzimas que poderiam ser utilizadas como possíveis alvos da quimioterapia antimalárica, como as do metabolismo de folato, síntese de pirimidinas, síntese de RNA/DNA, glicólise, metabolismo de fosfolipídios.

Embora ainda não exista consenso, o mecanismo de ação dos principais fármacos utilizados no combate a malária podem ser citados (Warhurst, 1999):

Cloquina: interações com DNA do parasito, outra hipótese está relacionada com acúmulo do fármaco no vacúolo digestivo.

Amodiaquina: inibe a polimerização de heme.

Primaquina: interferência com função mitocondrial.

Mefloquina: mudanças morfológicas no vacúolo digestivo

Em 1999, Couto e colaboradores relataram um novo alvo possível para planejamento de novos fármacos, relacionados com a absorção de colesterol proveniente do hospedeiro, vital para a produção de organelas do *P. falciparum*.

Macedo e colaboradores, em 2002, comprovaram a real existência de um sítio de ligação, denominado como "isoprenoid chain", ou seja, um sítio isoprenóide existente na coenzima Q, presente em *P. falciparum*, relacionado com absorção do colesterol do hospedeiro.

A semelhança do grupamento cinâmico com isoprenos ou até mesmo isoprenóides, fornece subsídios necessários para acreditar-se em sua incorporação fraudulenta pelo parasito como matéria prima, sendo utilizada na

produção de membranas e outras organelas lipídicas necessárias à vida do parasito.

Após a incorporação da molécula derivada, o parasito iniciaria a produção de organelas defeituosas que certamente o levariam a morte, caracterizando desta forma o conceito de bioisosterismo.

Porém, este processo também depende das propriedades físico-químicas da molécula derivada, necessárias para transpor as diversas barreiras existentes (absorção), objetivo este que pode ser alcançado através da incorporação de substituintes adequados, como a substituição do grupamento prenila por alila, modificando lipofilicidade e cargas eletrônicas localizadas.

Com base nestas premissas, o trabalho sintético caminhou no sentido de buscar derivados do protótipo natural, isolado da própolis, mantendo-se a semelhança estrutural e incorporando propriedades físico-químicas compatíveis com emprego farmacológico.

Destarte, os derivados assim obtidos poderiam ser incorporados no metabolismo do parasito, dando origem a macromoléculas defeituosas, que o levariam ao colapso.

Assim, foram realizadas as etapas a seguir discutidas:

1ª rota sintética

Para realizar as C-alilações diretas (Uto *et al.*; 2002), utilizou-se como material de partida o ácido *p*-hidroxicinâmico, reagindo com brometo de alila e hidróxido de sódio.

Observou-se na primeira etapa baixo rendimento do produto C-alilado em contrapartida com seu regioisômero O-alilado, fato possivelmente atribuído a

atuação do hidróxido de sódio, que possivelmente tenha abstraído o próton mais ácido (fenólico).

Como o produto O-alilado após rearranjo de Claisen, torna-se C-alilado, foram eliminados quaisquer tipos de purificação, postergado para etapa posterior.

O rearranjo de Claisen por aquecimento convencional levou a mistura complexa, que pode ser explicado pela alta variação de temperatura e tempo de aquecimento.

Na utilização de microondas obteve-se como produto principal derivado cíclico, impedindo, desta maneira, o prosseguimento de nova alilação, fato atribuído a presença de meio ácido, uma vez que não se encontrava impedido o grupo carboxílico. Gerando desta forma uma nova rota sintética.

Figura 30: produto obtido por rearranjo de Claisen via microondas

2ª rota sintética

Para proteção da hidroxila do ácido utilizou-se como material de partida o ácido *p*-hidroxicinâmico, reagindo com cloreto de tionila e metanol, sendo esta a primeira etapa obtida sem maiores dificuldades.

Adição do grupamento alila no oxigênio, segunda etapa, tendo como catalisador o hidróxido de sódio, onde observou-se regioseletividade acentuada, praticamente não ocorrendo derivado C-alilado, possivelmente por uma estabilização de cargas efetuada pela proteção da carboxila.

O rearranjo de Claisen em forno de microondas doméstico (3ª etapa) resultou em dois produtos: o esperado e um outro possivelmente ciclizado, que se degradaram na realização de cromatografia líquida em coluna de sílica, fato atribuído pela presença de muitas hidroxilas (SiOH), que de alguma forma reagiram com os produtos obtidos.

Esquema 7: planejamento da 2ª rota sintética

3ª rota

Nesta rota, utilizou-se o *p*-clorofenol como material de partida, reagindo com brometo de alila para obtenção dos produtos O-alilados (etapas 1 e 3); e rearranjos de Claisen (etapas 2 e 4), para obtenção dos produtos C-alilados.

Esquema 8: planejamento da 2ª rota sintética

Esta rota tem como particularidade baixo custo, já que não se utiliza ácido *p*-hidroxicinâmico, que onera o processo.

Por outro lado, a reação para obtenção de aldeído a partir do halogênio, é realizada utilizando-se butil lítio e dimetilformamida, também com custo relativamente elevado, dando origem à pesquisa de novas alternativas.

A etapa que compreende a passagem do aldeído para o grupamento do derivado acrílico foi planejada através da reação de condensação de Knoevenagel (tipo aldólica), mais barata que a condensação de Wittig.

Desta vez, todas etapas funcionaram satisfatoriamente, inclusive o rearranjo de Claisen, mas nenhuma das tentativas funcionou na posição *para*, inclusive com a hidroxila protegida por grupo acetil.

Observando os princípios de bioisosterismo, apesar de constituir um intermediário da rota planejada, este composto pode ser testado biologicamente após purificação.

4ª rota sintética

Como as reações na hidroxila fenólica foram bem estabelecidas, na tentativa de obter êxito nas reações da posição *para*, mudou-se o material de partida para *p*-hidroxibenzoato de propila, visando facilitar a atuação de catalizadores como hidreto de lítio alumínio ou mesmo paládio e acetado de paládio, na reação de redução parcial que levaria ao aldeído. Desta forma, o produto final seria também obtido por condensação de Knoevenagel.

Esquema 9: planejamento da 3ª rota sintética

Esta rota tem como particularidade a substituição do hidróxido de sódio pelo hidróxido de lítio, obtendo desta forma maior regioseletividade e maior rendimento em relação à base anterior, incluindo-se o hidróxido de potássio, que também foi utilizado.

A alilação e o rearranjo de Claisen funcionaram a contento. Com o intuito de economizar tempo e reagentes, antes de dar prosseguimento à outra O-alilação e mais um rearranjo de Claisen, partiu-se direto para as reações na posição *para*, utilizando hidreto de lítio e alumínio para reduzir o grupo propila à aldeído e não a álcool como costumeiro. Entretanto, tal objetivo não foi alcançado, pois a reação conduziu a redução total, mesmo descrito em literatura que a utilização de trietanolamina impediria a redução total.

5ª rota sintética

Como executado anteriormente na rota do *p*-clorofenol, todas etapas de reação na hidroxila foram mantidas, porém, utilizaremos a reação de Heck para adicionar o grupamento cinâmico. Para tanto, a presença de bromo na posição *para* garante um melhor rendimento (Larhed & Hallberg, 1996).

Esquema 10: retrossíntese da quinta rota sintética

A obtenção dos compostos mono e dialilados são excelentes, e uma vez obtido o composto dialilado, encontra-se descrito em literatura a etapa final (Patel et al., 1977), o que consiste uma grande vantagem desta rota, pois utiliza acetato de paládio em quantidades ínfimas, consoante figura abaixo:

Figura 31: Reação de Heck

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSÕES

1- A substituição do grupamento prenila pelo grupamento alila, provavelmente irá modificar as propriedades físico-químicas, alterando absorção e facilitando o acesso da molécula até o parasito, além de possibilitar o rearranjo de Claisen, pois a utilização de alila geraria um regioisômero totalmente equivocado.

Esquema 11: rearranjo de Claisen com prenila

2- As etapas de O-alilação com brometo de alila foram positivas como demonstram os resultados analíticos, sendo reações relativamente rápidas e com alto rendimento, independente do grupo substituinte na posição *p*, porém, a utilização de hidróxido de lítio, na reação com *p*-hidroxibenzoato de propila, mostrou maior rendimento e regiosseletividade.

3- Obtenção dos compostos C-alilados via rearranjo de Claisen utilizando forno de microondas doméstico é um feito inédito, simples, eficiente e rápido, sem perda de rendimento, tanto para mono, quanto para anéis di-substituídos. Não há interferência com possíveis substituintes na posição *p*.

4- A redução com hidreto de lítio e alumínio na quarta rota sintética, levou à redução total, fato inicialmente atribuído a presença de hidroxila livre, mas mesmo após proteção com grupamento acetil, a reação não ocorreu de forma satisfatória.

5-Conclui-se também, que a utilização de forno de microondas doméstico constitui uma nova possibilidade na química orgânica, ampliando horizontes e reduzindo drasticamente o tempo e aumentando a eficiência das reações químicas.

CAPÍTULO 6

6. PERSPECTIVAS

Este estudo representa uma das etapas iniciais para aproveitamento das atividades benéficas de princípios ativos naturais, encontrados na própolis brasileira.

Como não existem ainda estudos de relação estrutura atividade e mecanismo de ação, os dados a serem obtidos poderão auxiliar na elucidação dos mesmos.

Portanto, existe muito ainda a ser feito. O início foi realizado, e o horizonte que se apresenta é muito amplo, mas merece ser desvendado.

CAPÍTULO 7

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- AGA, H.; SHIBUYA, T.; SUGIMOTO, T.; KURIMOTO, M.; NAKAJIMA, S. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, Tokyo, v.58, n.5, p.945-946, 1994.
- ALVES, M.J.C.P.; RANGEL, O.; SOUZA, S.S.A.L. Malária in region of Campinas, São Paulo, 1980 to 1994. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Rio de Janeiro, v.33, n.1, p.153-157, 2000.
- AMOROS, M.; SAUVAGER, F.; GIRRE, L.; CORMIER, M. *In vitro* antiviral activity of propolis. *Apidologie*, Les Ulis, v.23, p.231-240, 1992a.
- AMOROS, M.; SIMÕES, C.M.O.; GIRRE, L.; SAUVAGER, F.; CORMIER, M. Synergistic effect of flavones and flavonols against *Herpes Simplex* virus Type1 in cell culture: comparison with the antiviral activity of propolis. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.55, n.12, p.1732-1740, 1992b.
- BAN, J.; POPOVIC, S.; MAYSINGER, D. Cytostatic effects of propolis *in vitro*. *Acta Pharm. Jugosl.*, Zagreb, v.33, p.245-255, 1983.
- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; STOEV, G.; POPOV, S. Determination of phenolics from propolis by gas chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.607, n.1, p.150-153, 1992a.

*De acordo com a NBR6023/2000, preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI), 2004.

- BANKOVA, V.; DYULGEROV, A.; POPOV, S.; EVSTATIEVA, L.; KULEVA, L.; PUREB, O.; ZAMJANSAN, Z. Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin. *Apidologie*, Les Ulis, v.23, p.79-85, 1992b.
- BANKOVA, V.; KUJUMGIEV, A.; IGNATOVA, A.; DYULGEROV, A.; PUREB, O.; ZAMJANSAN, Z. Antibacterial activity of Bulgaria and Mongolian propolis and poplar buds. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON CHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY OF BIOLOGICALLY ACTIVE NATURAL PRODUCTS, 5, Vama, 1989. *Proceedings*. Vama, 1998. v.2, p.239-243.
- BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I.K.; ISHII, E.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; KADOTA, S. Hepatoprotective and anti-*Helicobacter pylori* activities of constituents from Brazilian propolis. *Phytomedicine*, Jena, v.8, p16-23, 2001.
- BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I.K.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; KADOTA, S. Two novel cytotoxic benzofuran derivatives from Brazilian propolis. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.63, p.1277-1279, 2000.
- BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother. Res.*, Bognor Regis, v.15, p.561-571, 2001.
- BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; PRASAIN, J.K.; MATSUSHIGE, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activity. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.61, p.896-900, 1998.
- BARREIRO, E.J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. *Quim. Nova*, São Paulo, v.25, n.6B, p.1172-1180, 2002.

- BRANDT, C.A.; COMASSETO, J.V.; FERRAZ, H.M.C. Ciclofuncionalização envolvendo reagentes de enxofre, selenio e telúrio. *Quim. Nova*, São Paulo, v.14, p.165-174, 1991.
- COMASSETO, J.V.; BRANDT, C.A. Selenium in organic synthesis: a novel route to 1-phenylselenobutadienes and 1,4-dicarbonyl compounds. *Synthesis*, Stuttgart, n.2, p.146-154, 1987.
- BRUMFITT, W.; HAMILTON-MILLER, J.T.M.; FRANKLIN, I. Antibiotic activity of natural products. 1. Propolis. *Microbios*, Cambridge, v.62, p.19-22, 1990.
- BURDOCK, G.A. Review of biological and toxicity of bee propolis. *Food Chem. Toxicol.*, Amsterdam, v.36, p.347-363, 1997.
- CASTEEL, D.A. *Burger's medicinal chemistry and drug discovery*. 5.ed. New York: John Wiley, 1997. 164p.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Quim. Nova*, São Paulo, v.21, n.1, p.99-105, 1998.
- CIMERMAM, B.; CIMERMAM, S. *Parasitologia humana e seus aspectos gerais*. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2001. 390p.
- CIZMÁRIK, J.; MATEL, I. Examination of the chemical composition of propolis. I. Isolation and identification of the 3,4-dihydroxycinnamic acid (caffeic acid) from propolis. *Experientia*, Basel, v.26, p.713-722, 1970.

- COUTO, A.S.; KIMURA, E.A.; PERES, V.J.; UHRIG, M.L.; KATZIN, A.L. Active isoprenoid pathway in the intra-erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*: presence of dolichols of 11 and 12 isoprene units. *Biochem. J.*, Colchester, v.341, pt.3, p.629-637, 1999.
- DEBIAGGI, M.; TATEO, F.; PAGANI, L.; LUINI, M.; ROMERO, E. Effects of propolis flavonoids on virus infectivity and replication. *Microbiologica*, Pavia, v.13, p.207-213, 1990.
- DEBUYSER, E. *La propolis*. Nantes, 1983. 82p. Tese de Doutorado - Faculte de Pharmacie - Université de Nantes.
- DRAGANOVA, L.; DISHOVSKI, C.H.; DISHOVSKA, Z.; SHKENDEVOV, S.; SAMNALIEV, M. *In vitro* and *in vivo* studies of drugs on the base of propolis for local application. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF APICULTURE APIMONDIA, 32, Rio de Janeiro, 1989. *Proceedings*. Rio de Janeiro, 1989. p.221.
- DUTRA, A.P. *Malária*. Disponível em: www.sucen.sp.gov.br/doencas/malaria/texto-malaria-pro.htm. Acesso em: 19 abr. 2004.
- FRANCO, T.T.; KUREBAYASHI, A.K. Isolamento de princípios ativos da própolis por cromatografia em papel bidimensional e doseamento espectrofotométrico. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, v.46, n.1/2, p.81-86, 1986.
- GARCÍA-VIGUERA, C.; GREENAWAY, W.; WHATLEY, F.R. Composition of propolis from two different Spanish regions. *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.*, Tuebingen, v.47C, n.7/8, p.634-637, 1992.

- GARCÍA-VIGUERA, C.; FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Study of Canadian propolis by GC-MS and HPLC. *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.*, Tuebingen, v.48C, n.9/10, p731-735, 1993.
- GHISALBERTI, E.L. Propolis: a review. *Bee World*, Benson, v.60, p.59-84, 1979.
- GOZZO, F.C.; FERNADES, S.A.; RODRIGUES, D.C.; EBERLIN, M.N.; MARSAIOLE, A.J. Regioselectivity in aromatic Claisen rearrangements.
- GOJMERAC, W.L. *Bees, beekeeping, honey and pollination*. Westport: AVI Publ., 1980. 116p.
- GOMES, M.J.V.M.; REIS, A.M.M. *Ciências farmacêuticas: uma abordagem em farmácia hospitalar*. São Paulo: Atheneu, 2001. 559p.
- GREENAWAY, W.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F.R. The analysis of bud exudate of *Populus x euramericana* and propolis, by gas chromatography-mass spectrometry. *Proc. R. Soc. London, Ser. B.*, London, v.232, p.249-272, 1987.
- GREENAWAY, W.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F.R. The composition and plant origins of propolis: a report of work at Oxford. *Bee World*, Benson, v.71, n.3, p.107-118, 1990.
- HAYASHI, K.; KOMURA, S.; ISAJI, N.; OHISHI, N.; YAGI, K. Isolation of antioxidative compounds from Brazilian propolis: 3,4-dihydroxi-5-prenylcinnamic acid, a novel potent antioxidant. *Chem. Pharm. Bull.*, Tokyo, v.47, p.1521-1524, 1999.

- HIGASHI, K.O.; CASSILHAS, A.P.; MEIRELLES, M.N.L.; CASTRO, S.L. Effect of propolis extract on *Trypanosoma cruzi* - infected cell cultures and experimental animals. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.86, sp.is., suppl.1, r.QT-7, 1991. (XVIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease, VII Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, Caxambu, 1991).
- HIRST, S.L.; STAPLEY, L.A. Parasitology: the dawn of a new millennium. *Parasitol. Today*, Amsterdam, v.16, n.1, p.1-3, 2000.
- HOLDERNA, E.; KEDZIA, B. Investigations upon the combined action of propolis and antimicotic drugs on *Candida albicans*. *Herba Pol.*, Poznan, v.33, n.2, p.145-151, 1987.
- ITO, J.; CHANG, F.R.; WANG, H.K.; PARKER, Y.K.; IKEGAKI, M.; KILGORE, N.; LEE, K.H. Anti-HIV activity of moronic acid derivates and the new melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.64, p.1278-1281, 2001.
- KABANOV, A.N.; SUVOROV, A.M.; LESNYKH, I.U.F.; KONONOV, A.V.; LOPUSHANSKI, V.G. Endoscopic treatment of duodenal ulcers with propolis. *Sov. Med.*, Moskva, v.6, p.92-94, 1989.
- KEDZIA, A. Effect of ethanol extract of propolis (EEP) on anerobic bacteria. *Herba Pol.*, Poznan, v.32, n.1, p.53-58, 1986.
- KEDZIA, A. Sensitivity of anaerobic bacteria to the ethanol extract of propolis. *Phytothérapie*, v.6, p.4-6, 1990.

- KIMOTO, T.; AGA, M.; HINO, K.; MIYATA, S.K.; YAMAMOTO, Y.; MICALLEF, M.J.; HANAYA, T.; ARAI, S.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Apoptosis of human leukemia cells induced by Artepillin C, an active ingredient of Brazilian propolis. *Anticancer Res.*, Attiki, v.21, p.221-228, 2001.
- KIMOTO, T.; KOYA, S.; HINO, K.; YAMAMOTO, Y.; NOMURA, Y.; MICALLEF, M.J.; HANAYA, T.; ARAI, S.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Renal carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice and protection from it by Brazilian propolis and Artepillin C. *Pathol. Int.*, Carlton, v.50, p.679-689, 2000.
- KOROLKOVAS, A. *Essentials of medicinal chemistry*. 2.ed. New York: Wiley Interscience, 1988. 1204p.
- KORTENSKA, V.D.; VELIKOVA, M.P.; YANISHLIEVA, N.V.; TOTZEVA, I.R.; BANKOVA, V.S.; MARCUCCI, M.C. Kinetics of lipid oxidation in the presence of cinnamic acid derivatives. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.*, Weinheim, v.104, p.19-28, 2002.
- KUSUMOTO, T.; MIYAMOTO, T.; HIGUCHI, R.; DOI, S.; SUGIMOTO, H.; YAMADA, H. Isolation and structures of two new compounds from the essential oil of Brazilian propolis. *Chem. Pharm. Bull.*, Tokyo, v.49, p.1207-1209, 2001.
- LARHED, M.; HALLBERG, A. Microwave promoted palladium-catalized coupling reactions. *J. Org. Chem.*, Columbus, v.61, p.9582-9584, 1996.
- LIN, Y.L.; YE, J.Y.; CHEN, Y.X.; ZHANG, J.B. El tratamiento de la faringo-laringitis, mediante emulsión de propóleos, administrada por atomización. *Proc*

- INTERNATIONAL CONGRESS OF APICULTURE APIMONDIA, 33, Beijing, 1993. *Proceedings*. Beijing, 1993. p.138.
- LOUPY, A. Solvent-free Microwave organic synthesis as an efficient procedure for green chemistry. *Actual. Chim.*, Paris, v.272, p.18-26, 2004.
- MACEDO, C.S.; UHRIG, M.L.; KIMURA, E.A.; KATZIN, A.M. Characterization of the isoprenoid chain of coenzyme Q in *Plasmodium falciparum*. *FEMS. Micro letters*. London, v 207, p. 13-20, 2002.
- MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, Les Ulis, v.26, p.83-99, 1995.
- MAVANDADI, F.; LIDSTROM, P. Microwave - assisted chemistry in drug discovery. *Curr. Top. Med. Chem.*, Sharjah, v.4, n.7, p.773-792, 2004.
- MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Quim. Nova*, São Paulo, v.24, n.1, p.105-111, 2001.
- NAGAOKA, T.; BANSKOTA, A.H.; XIONG, Q.; TEZUKA, Y.; SHIGETOSHI, K. Synthesis and antihepatotoxic and antiproliferative activity of di- and tri-O-caffeoylquinic acid derivatives. *J. Trad. Med.*, v.18, p.183-190, 2001.
- NIKOLAEV, A.B. Diffending the bee town, em **A remarkable hive product: propolis**, *Apimondia*, Bucareste, p.10. 1978.

- OLLIARO, P.L.; YUTHAVONG, Y. An overview of chemotherapy targets for antimalarial drug discovery. *Pharmacol. Ther.* New York, v.81,n2, p.91-110, 1999.
- PATEL, B.A.; ZIEGLER, C.B.; CORTESE, N.A.; PLEVYAK, J.E.; ZEBOVITZ, T.C.; TERPKO, M.; HECK, R. F. Palladium-catalyzed vinylic substitution reactions with carboxylic acid derivatives. *J. Org. Chem.*, Columbus, v.42, n.24, p.3903-3907, 1977.
- PAULINO, N.; SCREMIN, F.M.; RAICHASKI, L.B.; MARCUCCI, M.C.; SCREMIN, A.; CALIXTO, J.B. Mechanism involved in the relaxant action of the ethanolic extract of propolis in the Guinea-Pig trachea *in-vitro*. *J. Pharm. Pharmacol.*, Wallingford, v.54, p1-9, 2002.
- PEPELJNJAK, S.; JALSENJAK, I.; MAYSINGER, D. Growth inhibition of *Bacillus subtilis* and composition of various propolis extracts. *Pharmazie*, Eschborn, v.37, n.12, p.884-885, 1982.
- PEPELJNJAK, S.; JALSENJAK, I.; MAYSINGER, D. Influence of microencapsulated propolis extract on *Bacillus subtilis* strain IP-5832. *Acta Pharm. Jugosl.*, Zagreb, v.31, p.27-32, 1981.
- PERRIN, D.D.; ARMAREGO, W.L.F.; PERRIN, D.R. *Purification of laboratory chemicals*. 2.ed. Oxford: Pergamon Press, 1980. 568p.

- REY, L. *Bases da parasitologia médica*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 379p.
- ROSS, P.B. *The effects of propolis fractions on cells in tissue culture*. 1990. 193p. Dissertação de Mestrado - College of Cardiff - University of Wales.
- SANSEVERIANO, M.A. Microondas em síntese orgânica. *Quim. Nova*, São Paulo, v.25, n.4, p.660-667, 2002.
- SHELLER, S.; SZAFLARSKI, J.; TUSTANOWSKI, J.; NOLEWAJKA, E.; STOJKO, A. Biological properties and clinical application of propolis I. *Arzneim. Forsch.*, Aulendorf, v.27, n.4, p.889-890, 1977.
- SCHNEIDEWIND, E.; KALA, H.; LINZER, B.; METZNER, J. Zur kenntnis der inhaltsstoffe von propolis. *Pharmazie*, Eschborn, v.30, p.803-808, 1975.
- SEGURADO, A.A.C.; DUARTE, M.I.S.; BOULOS, M.; OLIVEIRA, M.S.; ARAUJO, E.S.A.; SILVA, M.A.L.G.; PAGLIARI, C.; AMATO, N.V. Hyperreactive malarious splenomegaly: immunohistochemical demonstration of *Plasmodium falciparum* antigen in liver cells. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v.91, n.4, p.429-430, 1997.

- SERKEDJIEVA, J.; MANOLOVA, N.; BANKOVA, V. Anti-influenza virus effect of some propolis constituents and their analogues (esters of substituted cinnamic acids). *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.55, n.3, p.294-297, 1992.
- SVANHOLM, U.; PARKER, V.D. Acid catalyzed *ortho*-claisen rearrangement of allyl aryl ethers in trifluoroacetic-acid. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, Cambridge, v.2, p.169-174, 1974.
- TAZAWA, S.; WARASHINA, T.; NORO, T.; MIYASE, T. Studies on the constituents of Brazilian propolis. *Chem. Pharm. Bull.*, Tokyo, v.46, p.1477-1479, 1998.
- TAZAWA, S.; WARASHINA, T.; NORO, T. Studies on the constituents of Brazilian propolis II. *Chem. Pharm. Bull.*, Tokyo, v.47, p.1388-1392, 1999.
- TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; FERRERES, F.; GARCIA-VIGUEIRA, C.; TOMÁS-LORENTE, F. Flavonoids in honey of different geographical origin. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, Berlin, v.196, p.38-44, 1993a.
- TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; FERRERES, F.; GARCIA-VIGUEIRA, C.; TOMÁS-LORENTE, F. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. *Phytochemistry*, Amsterdam, v.34, p.191-196, 1993b.

- THOMPSON, T.N. Optimization of metabolic stability as a goal of modern drug design. *Med. Res. Rev.*, Hoboken, v.21, n.5, p.412-449, 2001.
- TORRES, D.; HOLLANDS, I.; PALACIOS, E. Efecto de un extracto alcohólico de propóleos sobre el crecimiento de *Giardia lamblia* in vitro. *Rev. Cubana Cienc. Vet.*, v.21, n.1, p.15-19, 1990.
- UTO, Y.; HORI, H.; HIRATA, A.; FUJITA, T.; TAKUBO, S.; NAGASAWA, H. First total synthesis for artemisinic acid established by O,O'-diprenylation of p-halophenols in water. *J. Org. Chem.*, Columbus, v.67, p.2355-2357, 2002.
- VALDÉZ, G.; ROJAS, N.M.; MORALES, C. Ensayo preliminar de la acción antifúngica de extractos de propóleo sobre *Candida albicans*. *Cienc. Tec. Agric., Apic.*, Havana, v.3, p.41-49, 1987.
- WANDERLEY, D.M.V.; SILVA, R.A.; ANDRADE, J.C.R. Aspectos epidemiológicos da malária no Estado de São Paulo, Brasil, 1983 a 1992. *Rev. Saúde Pública*, São Paulo, v.28, n.3, p.192-197, 1994.
- WANG, B.J.; LIEN, Y.H.; YU, Z.R. Supercritical fluid extractive fractionation – study of the antioxidant activities of propolis. *Food Chem.*, Amsterdam, v.86, p.237-243, 2004.
- WARHUST, D.C. Drug resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *Infection*, v.27, suppl.2, S55-8, 1999.

WERMUTH, CG. *The practice of medicinal chemistry*. London, San Diego: Academic Press, 1996. 968p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Malaria: a global crisis. Disponível em: <http://mosquito.who.int/docs/fs>. 1. Acesso em: 7 abr. 2004.

Mauro de Oliveira Junior

— BIBLIOTECA —