UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudos preliminares de metabolismo *in vitro* utilizando reações biomiméticas
com metaloporfirinas e toxicidade da licarina A

Juliana Neves de Paula e Souza

Ribeirão Preto, 2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudos preliminares de metabolismo *in vitro* utilizando reações biomiméticas
com metaloporfirinas e toxicidade da licarina A

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia
para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Juliana Neves de Paula e Souza

Orientadora: Dra. Denise Brentan da Silva

Ribeirão Preto, 2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Souza, Juliana Neves de Paula

Estudos preliminares de metabolismo *in vitro* utilizando reações biomiméticas com metaloporfirinas e toxicidade da licarina A. Ribeirão Preto, 2013.

97p.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP. Área de concentração: Toxicologia Experimental

Orientadora: Silva, Denise Brentan

1. licarina A. 2. Leishmaniose. 3. Metabolismo *in vitro*.
4. Metaloporfirinas. 5. Metabólitos. 6. Toxicidade aguda

FOLHA DE APROVAÇÃO

Juliana Neves de Paula e Souza

Estudos preliminares de metabolismo *in vitro* utilizando reações biomiméticas com metaloporfirinas e toxicidade da licarina A

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia
para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Juliana Neves de Paula e Souza

Orientadora: Dra. Denise Brentan da Silva

Aprovado em:

Banca examinadora:

Prof(a). Dr(a): _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a): _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a): _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais e irmãos
pelo apoio incondicional,
assim como aos amigos e pesquisadores
que colaboraram para a efetuação
e conclusão do mesmo

AGRADECIMENTOS

A gratidão é a melhor forma de tentarmos retribuir pelo menos em um pequeno gesto tudo aquilo que nos foi confiado.

Agradeço primeiramente ao grupo de pesquisa NPPNS pela oportunidade e credibilidade, assim como a todos os amigos do grupo que fizeram a rotina de trabalho mais valiosa e menos cansativa.

Agradeço ainda à Lychnoflora pelo apoio no projeto e pela permissão na utilização de alguns equipamentos. Ao Leandro De Santis, Ivanildes Vansconcelos e Daniel Callejon pelo auxílio nos experimentos e pela troca de conhecimentos. Aos técnicos e grandes amigos Izabel Cristina, Jacqueline Nakau e José Carlos Tomaz, pelos momentos inesquecíveis, pelas análises perfeitas e pelo bom humor de sempre.

Ao professor Dr. Ricardo Vessecchi pela imensa disponibilidade. Ao professor Dr. Norberto Peporine pelo respeito e dedicação aos alunos e ao grupo.

Agradeço imensamente e especialmente à minha orientadora Dra. Denise Brentan da Silva, que não mediu esforços para que esse trabalho fosse realizado. Agradeço pela confiança, paciência e, sobretudo pela linda amizade. Iniciar a minha carreira acadêmica sob sua orientação foi uma grande honra e privilégio. Grandes pessoas são sempre ótimos profissionais. A diferença está no gosto do trabalho efetuado, e é isso que te faz excepcional.

Aos grandes amigos Rodrigo, Raquel, Patrícia, Talita, Fillipe, Luciana e Ana que tornaram minha estadia em Ribeirão Preto mais amena, que me acolheram e ampararam nos momentos mais difíceis. Ao Tiago, meu namorado, pelo apoio, amor e paciência, assim como aos meus pais e irmãos que tornaram meus passos mais tranquilos e firmes, que acreditaram na concretização de mais uma etapa da minha vida. Que mandaram mesmo de longe em forma de oração o apoio, o conforto do abraço que nos separa pela longa distância. O amor de vocês me faz superar todo e qualquer obstáculo. A Deus por nunca me abandonar e me permitir a conclusão desse trabalho.

À FCFRP-USP, bem como a FAPESP, CNPq e Capes pelo apoio financeiro.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”
(Cora Coralina)

RESUMO

SOUZA, J.N.P. **Estudos preliminares de metabolismo *in vitro* utilizando reações biomiméticas com metaloporfirinas e toxicidade da licarina A.** 2013. 97f. Dissertação Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Unisversidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

As neolignanas, bem como as lignanas, apresentam diversas atividades biológicas comprovadas, sendo a licarina A uma neolignana diidrobenzofurânica, detentora de atividade leishmanicida. A partir dessa atividade e do interesse na produção de fármacos eficazes no tratamento dessa doença, a licarina A foi selecionada para estudo de metabolismo *in vitro* a partir de reações biomiméticas utilizando [Fe(TPP)Cl] e Mn(Salen) como catalisadores; sob ação de oxidantes (PhIO e *m*CPBA) em quatro solventes de polaridades distintas (AcOEt, MeOH, ACN, DCM), na proporção de 1:30:30 (catalisador:substrato:oxidante). Inicialmente, as reações realizadas foram submetidas às análises por CG-EM comprovando um produto de oxidação majoritário m/z 342, denominado metabólito A. Os solventes de menor polaridade (DCM e AcOEt), bem como o catalisador de Jacobsen, foram mais eficientes na geração desse metabólito. O aumento do tempo reacional bem como o aumento da concentração do oxidante não favoreceu a produção de metabólitos. Posteriormente, as análises dessas reações também foram realizadas por CLUE-DAD-EM/EM e sete metabólitos puderam ser identificados a partir do auxílio do estudo de fragmentação da licarina A bem como a partir de análises de RMN e EM dos metabólitos isolados por CLAE em escala semipreparativa. As análises de RMN dessas frações permitiram a determinação estrutural de um metabólito de m/z 343 $[M+H]^+$ (metabólito 3) constituído de uma epoxidação nos carbonos C-7'/C-8' situados na cadeia lateral da licarina A. Sendo assim, quatro dos sete metabólitos (2, 3, 6 e 7) formados apresentaram m/z 343 $[M+H]^+$ e espectros de massas *tandem* muito semelhantes, correspondendo aos possíveis diastereoisômeros do metabólito epoxidado, visto que a licarina A apresenta dois centros quirais. Outros três metabólitos foram produzidos e exibiram íons de m/z 361 $[M+H]^+$, m/z 315 $[M+H]^+$ e m/z 341 $[M+H]^+$, correspondentes respectivamente a um diol vicinal em C-7'/C-8', um aldeído benzóico e um outro aldeído gerado a partir da oxidação da metila terminal em C-9'. Foi realizado ainda o estudo de metabolismo *in vitro* com microsomas hepáticos de ratos, sendo que esse estudo foi capaz de reproduzir as reações biomiméticas a partir da produção do mesmo metabólito (2) (apresentando mesmo TR e mesmo espectro de UV). Em relação à toxicidade e aos possíveis danos que a licarina A poderia acarretar, um estudo de toxicidade aguda foi realizado sendo esse capaz de auxiliar na classificação da licarina A, sendo a mesma tóxica em doses $> 300\text{mg/kg}$ e $\leq 2000\text{mg/kg}$ (categoria 4). Análises dos parâmetros bioquímicos realizadas foram capazes de determinar possível toxicidade hepática, a partir das alterações enzimáticas (AST, ALT, LDH, ALP) ocorridas. Contudo, análise microscópica de cortes dos tecidos (fígado, coração e rins) não determinaram nenhum comprometimento tecidual que pudesse evidenciar toxicidade.

Palavras-chave: licarina A, leishmaniose, metabolismo *in vitro*, metaloporfirinas, metabólitos, toxicidade aguda

ABSTRACT

SOUZA, J.N.P. **Preliminary *in vitro* metabolism studies using biomimetic reactions and toxicity of metalloporphyrins licarin A.** 2013. 97p. Dissertation (Master) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Unisversidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Neolignans and lignans show several biological activities. Licarin A is a dihydrobenzofuranic neolignan, which exhibits leishmanicidal activity. For this reason, licarina A was selected to carry out the studies of *in vitro* metabolism. So biomimetic reactions were done by the use of [Fe(TPP)Cl] and Mn (Salen) catalysts, different oxidants (PhIO and *m*CPBA), as well solvents with different polarities (EtOAc, MeOH, ACN, and DCM), and the ratio of 1:30:30 (catalyst:substrate:oxidant). Initially, the reactions were analyzed by GC-MS and showed one major oxidation product of m/z 342 (metabolite A). The less polar solvents (DCM and EtOAc) and Jacobsen catalyst (Mn (Salen)) were more efficient for the production of metabolite A. The reaction time and concentration were increased, but they did not represent a higher production of metabolites. Subsequently these reactions were also analyzed by UPLC-DAD-MS/MS and seven metabolites could be identified based on the fragmentation pattern proposed for licarin A, as well as from NMR and MS data of the metabolites isolated by HPLC. A metabolite of m/z 343 $[M+H]^+$ (metabolite 3) was identified by NMR and MS/MS data and it consists of epoxidation in the carbons of C-7'/C-8' from licarin A. Therefore, four of the seven metabolites (2, 3, 6 and 7) exhibited m/z 343 $[M+H]^+$ in the MS spectra and the MS/MS showed high similarity with the epoxidized metabolite (metabolite 3). So these metabolites could be diastereoisomers of the metabolite 3. Three other metabolites were produced and exhibited ions at m/z 361 $[M+H]^+$, m/z 315 $[M+H]^+$ and m/z 341 $[M+H]^+$, corresponding respectively to a vicinal diol in C-7'/C-8', benzylic aldehyde and other aldehyde generated from the oxidation of the terminal methyl at C-9'. The study of *in vitro* metabolism by rat liver microsomes was also carried out, and this study was able to reproduce the biomimetic reactions by production of the same metabolite (2). The acute toxicity and potential damage of licarin A were evaluated and the results indicated toxicity for this compound at doses $>300\text{mg/kg}$ and $\leq 2000\text{mg/kg}$ (category 4). Analysis of biochemical parameters were able to determine possible liver toxicity caused by enzymatic changes (AST, ALT, LDH, ALP). However, microscopic analysis of tissues sections (liver, heart and kidneys) did not show any tissue damage that could indicate toxicity.

Keywords: licarin A, leishmaniasis, *in vitro* metabolism, metalloporphyrins, metabolites, acute toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da licarina A.....	3
Figura 2. Estrutura química do isoeugenol, precursor da licarina A	5
Figura 3. Representação da Fe ^{III} protoporfirina IX.....	8
Figura 4. Metaloporfirinas de primeira (A), segunda (B) e terceira geração (C), respectivamente.	9
Figura 5. Calatisador de Jacobsen utilizado nas reações biomiméticas	10
Figura 6. Formação do Iodosilbenzeno	17
Figura 7. Cromatograma da reação de oxidação JD.1 (ACN, Jacobsen, PhIO) obtido na purificação em CLAE ($\lambda = 280$ nm) e frações coletadas.....	21
Figura 8. Estrutura química dos enantiômeros da licarina A	25
Figura 9. Cromatograma da licarina A sintetizada obtido por CG-EM.....	25
Figura 10. Espectro de massas <i>tandem</i> (Q-TOF) da licarina A sintetizada (IES, 20 eV, modo positivo).....	27
Figura 11. Basicidade em fase gasosa para a licarina A em kcal.mol ⁻¹ obtidos através do modelo computacional B3LYP/6-31+G(d,p)	28
Figura 12. Protonação do anel furano da licarina A e sua estabilização por ressonância.	29
Figura 13. Espectro de massas adquirido com o analisador do tipo <i>Ion trap</i> no modo positivo do íon fragmento <i>m/z</i> 203	29
Figura 14. Proposta para o mecanismo de fragmentação da licarina A protonada.	30
Figura 15. Espectro de massas adquirido com o analisador do tipo <i>Ion trap</i> no modo positivo do íon fragmento <i>m/z</i> 188	31
Figura 16. Cromatograma obtido por CG-EM da reação FB.2 (AcOEt, [Fe(TPP)Cl] e <i>m</i> CPBA) após 24h de reação.	32
Figura 17. Reação JA.1 (DCM, Jacobsen, PhIO) e a diversidade de produtos formados a partir do ensaio biomimético com catalisador de Jacobsen.....	35
Figura 18. Cromatograma da reação JB-2 (catalisador de Jacobsen, acetato de etila e <i>m</i> CPBA) após 24h de reação e representação dos sete metabólitos produzidos a partir dessa reação.....	37
Figura 19. Estrutura química do metabólito 1	38
Figura 20. Proposta de fragmentação do metabólito 1 (<i>m/z</i> 361, [M+H] ⁺) e suas respectivas perdas sucessivas de 18 u (H ₂ O).....	38

Figura 21. Espectro de massas do metabólito 1 (TR 2,14 min), (IES, modo positivo) gerado a partir da reação JB-2 (Jacobsen, acetato de etila e <i>m</i> CPBA).....	39
Figura 22. Espectro de massas <i>tandem</i> do íon de m/z 361 $[M+H]^+$ (metabólito 1) (IES, modo positivo, 10 eV) gerado a partir da reação JB-2 (Jacobsen, acetato de etila e <i>m</i> CPBA)	39
Figura 23. Espectro de massas <i>tandem</i> do íon m/z 343 $[M+H]^+$ (IES, modo positivo, 10 eV) gerado a partir da reação JB-2 (Jacobsen, acetato de etila e <i>m</i> CPBA).....	40
Figura 24. Estrutura química dos metabólitos 2-3 e 6-7.....	40
Figura 25. Espectro de massas <i>tandem</i> do íon m/z 343 $[M+H]^+$ (metabólito 2) (IES, modo positivo, 10 eV) gerado a partir da reação JB-2 (Jacobsen, acetato de etila e <i>m</i> CPBA)	41
Figura 26. Espectro de massas <i>tandem</i> do íon m/z 343 $[M+H]^+$ (metabólito 3) (IES, modo positivo, 10 eV) gerado a partir da reação JB-2 (Jacobsen, acetato de etila e <i>m</i> CPBA)	41
Figura 27. Espectro de massas <i>tandem</i> do íon m/z 343 $[M+H]^+$ (metabólito 6) (IES, modo positivo, 10 eV) gerado a partir da reação JB-2 (Jacobsen, acetato de etila e <i>m</i> CPBA)	42
Figura 28. Espectro de massas <i>tandem</i> do íon m/z 343 $[M+H]^+$ (metabólito 7) (IES, modo positivo, 10 eV) gerado a partir da reação JB-2 (Jacobsen, acetato de etila e <i>m</i> CPBA)	42
Figura 29. Proposta de fragmentação do metabólito 3 (m/z 343 $[M+H]^+$), gerado a partir da epoxidação em C-7'/C-8'.	43
Figura 30. Estrutura química do metabólito 4	44
Figura 31. Espectro de massas do metabólito 4 (TR 3,62 minutos), nos modos de ionização positivo (A) e negativo (B).	44
Figura 32. Espectro de massas <i>tandem</i> do íon m/z 315 $[M+H]^+$ relativo ao metabólito 4 (TQ, IES, modo positivo, 10 eV) gerado a partir da reação JB-2 (Jacobsen, acetato de etila e <i>m</i> CPBA).....	45
Figura 33. Espectro de massas <i>tandem</i> do íon m/z 315 $[M+H]^+$ relativo ao metabólito 4 isolado por CLAE em escala semipreparativa (IES, modo positivo, Q-TOF, 15eV).	45
Figura 34. Estrutura química do metabólito 5	46
Figura 35. Espectros de massas <i>tandem</i> do íon m/z 341 $[M+H]^+$ relativo ao metabólito 5 (TQ, IES, modo positivo, 10 e 15 eV) gerado a partir da reação JB-2 (Jacobsen, acetato de etila e <i>m</i> CPBA).....	46
Figura 36. Espectro de massas <i>tandem</i> do íon m/z 339 $[M-H]^-$ relativo ao metabólito 5 (TQ, IES, modo positivo, 15 eV) gerado a partir da reação JB-2 (Jacobsen, acetato de etila e <i>m</i> CPBA).....	47
Figura 37. Estrutura química do metabólito 3	48

Figura 38. Deslocamentos químicos e correlações observadas nos COSY e HMBC relativos ao metabólito isolado.	48
Figura 39. Espectro de massas do metabólito 3 isolado (IES, modo positivo, Q-TOF)	49
Figura 40. Espectro de RMN de ^1H do metabólito isolado (CDCl_3 , 500 MHz). * Sinal não observado com gotas de D_2O	50
Figura 41. Ampliação do espectro de RMN de ^1H do metabólito isolado (CDCl_3 , 500 MHz).....	50
Figura 42. Mapa de contornos COSY do metabólito isolado (CDCl_3 , 500 MHz)	51
Figura 43. Ampliação do mapa de contornos COSY do metabólito isolado (CDCl_3 , 500 MHz).....	51
Figura 44. Mapa de contornos HMQC do metabólito isolado (CDCl_3 , 500 MHz).....	51
Figura 45. Mapa de contornos HMBC- 8 Hz do metabólito isolado (CDCl_3 , 500 MHz)	52
Figura 46. Ampliação do mapa de contornos HMBC- 8 Hz do metabólito isolado (CDCl_3 , 500 MHz).....	52
Figura 47. Estrutura química do metabólito 4	52
Figura 48 Comparação entre alguns deslocamentos químicos (δ) observados para o metabólito 4 (500 MHz, CDCl_3) e a licarina A (400 MHz, CDCl_3).	53
Figura 49. Correlações observadas no mapa de contornos HMBC (8 Hz) do metabólito 4	54
Figura 50. Espectro de RMN de ^1H do metabólito 4 isolado (CDCl_3 , 500 MHz). * Sinal observado após a adição de D_2O	55
Figura 51. Ampliação do espectro de RMN de ^1H do metabólito 4 isolado (CDCl_3 , 500 MHz).....	55
Figura 52. Mapa de contornos HMQC do metabólito 4 isolado (CDCl_3 , 500 MHz).....	56
Figura 53. Mapa de contornos HMBC- 8 Hz do metabólito 4 isolado (CDCl_3 , 500 MHz).....	56
Figura 54. Ampliação do mapa de contornos HMBC- 8 Hz do metabólito 4 isolado (CDCl_3 , 500 MHz).....	56
Figura 55. Espectro de massas do metabólito 4 isolado (IES, modo positivo, Q-TOF)	57
Figura 56. Cromatograma da licarina A após 24h de exposição nos solventes DCM (diclorometano) e AcOEt (acetato de etila).....	57
Figura 57. Cromatogramas das reações da licarina A (concentração 1mg/mL) com microsomas de ratos após o tempo incubação de 2 horas. As reações analisadas foram submetidas a extração com acetonitrila (A) e acetato de etila (B), com destaque para o metabólito 2 (TR 2,9 e m/z 343 $[\text{M}+\text{H}]^+$).	58

Figura 58. Cromatogramas do controle reacional (sem cofatores) (A) e da reação com microsomas hepáticos de ratos (B) ambos obtidos a partir da extração com AcOEt e tempo de incubação de 2h.	59
Figura 59. Espectro de massas do metabólito 2 (TR 2,97 min) produzido a partir do ensaio com microsomas hepáticos de ratos (ESI, modo positivo, TQ).....	60
Figura 60. Espectro de massas do metabólito 2 (TR 2,97 min) produzido a partir do ensaio com microsomas hepáticos de ratos a partir da extração com AcOEt e tempo de incubação de 2h (ESI, modo negativo, TQ).	60
Figura 61. Espectro de ultravioleta (UV) do metabólito 2 (TR* 2,97 min) produzido pelas reações biomiméticas (A) e a partir do ensaio com microsomas hepáticos de ratos a partir da extração com AcOEt e tempo de incubação de 2h (B).	61
Figura 62. Fluxograma do teste de observação do ensaio de toxicidade aguda oral, segundo o protocolo estabelecido pela OECD 420 (2001).	62
Figura 63. Fluxograma do teste principal do ensaio de toxicidade aguda oral, segundo o protocolo estabelecido pela OECD 420 (2001).	64
Figura 64. Imagens de cortes histológicos dos órgãos (rim, coração e fígado) do animal controle e do animal após gavagem com licarina A, decorrido 14 dias * aumento de 20 x	71
Figura 65. Imagens de cortes histológicos dos órgãos (rim, coração e fígado) do animal controle e do animal após gavagem com licarina A, decorrido 14 dias ** aumento de 40 x	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies, já relatadas na literatura, que possuem a neoligana licarina A.....	4
Tabela 2. Diferentes combinações avaliadas entre os reagentes nas reações de oxidação com metaloporfirinas e o catalisador de Jacobsen	19
Tabela 3. Gradiente de eluição utilizado na purificação dos metabólitos de oxidação da reação JD.1 por CLAE-DAD.....	21
Tabela 4. Quantidade administrada a cada animal no teste de observação	23
Tabela 5. Volume administrado a cada animal no teste de determinação dos parâmetros bioquímicos	24
Tabela 6. Dados de RMN de ^1H (δ) e ^{13}C (δ) da licarina A sintetizada e relatados na literatura.....	26
Tabela 7. Produtos de oxidação (metabólitos) formados a partir do ensaio biomimético com catalisador de Jacobsen (Reação JA.1, cromatograma ilustrado na Figura 17).....	34
Tabela 8. Dados, obtidos por CG-EM, da cinética reacional e o rendimento do principal metabólito formado (m/z 342) na reação JA.1 (Jacobsen, DCM, PhIO)	36
Tabela 9. Resultados das variações da concentração do agente oxidante (PhIO) na produção do principal metabólito de m/z 342 A na reação JA.1 (Jacobsen, DCM, PhIO)	36
Tabela 10. Metabólitos formados a partir da reação JB.2 nos modos de ionização positivo e negativo.....	37
Tabela 11 Dados de RMN de ^1H (δ) e ^{13}C (δ) do metabólito 4 isolado	54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Eficiência dos catalisadores em relação a produção do metabólito A nas reações de oxidação biomiméticas após 24h. A: DCM, B: AcOEt, C: MeOH e D: ACN; J: Jacobsen, F: [Fe(TPP)Cl], 1: PhIO e 2: <i>m</i> CPBA.....	33
Gráfico 2. Variação do peso dos animais (camundongos machos – linhagem: Balb/c) durante o teste principal do ensaio de toxicidade aguda oral por um período de 14 dias	63
Gráfico 3. Perfil lipídico sérico dos animais tratados com licarina A (TRAT), não tratados (NT) e o controle (CONT) que foi administrado apenas o veículo PEG por um período de 24h. PEG: polietilenoglicol 300, , HDL: Lipoproteína de alta densidade – <i>High Density Lipoprotein</i> , LDL: Lipoproteína de baixa densidade – <i>Low Density Lipoprotein</i> , VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade – <i>Very Low Density Lipoprotein</i>	66
Gráfico 4. Níveis de glicose dos animais tratados (TRAT), não tratados (NT) e do controle (CONT) que foi administrado apenas o veículo PEG.	67
Gráfico 5. Perfil renal dos animais tratados (TRAT), não tratados (NT) e do controle (CONT) que foi administrado somente o veículo (PEG) por um período de 24h.....	68
Gráfico 6. Perfil hepático dos animais tratados (TRAT), não tratados (NT) e do controle (CONT) que foi administrado o veículo por um período de 24h. TGO/AST (aspartato amino-transferase), TGP/ALT (alanina amino-transferase), LDH (Lactato Desidrogenase), ALP (Fosfatase Alcalina).	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS UTILIZADOS

[Fe(TPP)]Cl]	Cloreto de tetrafenil-ferroporfirina
$[\alpha]_D^{25}$	Rotação ótica específica
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada ao espectrômetro de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com arranjo de diodo
CLUE-DAD/EM	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas
CONT	Controle
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CYP-450	Citocromo P-450
<i>D</i>	Dubleto
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DC	Dicroísmo Circular
DCM	Diclorometano
<i>Dd</i>	Duplo dubleto
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer</i>
<i>Dq</i>	Duplo Quarteto
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
EM	Espectro de Massas
EM/EM	Espectro de Massas <i>tandem</i>

FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FFCLRP	Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto
GHS	Sistema Harmonizado Globalmente para a Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
HRP	Horseradish peroxidase
IE	Ionização por Elétrons
IES	Ionização por Eletrospray
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LDH	Lactato desidrogenase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
<i>m</i> CPBA	Ácido metacloroperbenzóico
MeOH	Metanol
Mn(Salen)	Catalisador de Jacobsen
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NPPNS	Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais e Sintéticos
NT	Não Tratados
OECD	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PEG	Polietilenoglicol
PhIO	Iodosilbenzeno
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio

Rpm	Rotações por Minuto
<i>S</i>	Singleto
SAC	Serviço de Análises Clínicas
<i>Sl</i>	Singleto largo
TR	Tempo de retenção
TRAT	Tratados
<i>U</i>	Unidade de massa atômica
USP	Universidade de São Paulo
UV	Espectro no Ultravioleta
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
Δ	Deslocamento Químico em partes por milhão

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE GRÁFICOS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS UTILIZADOS	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Lignanas, neolignanas e leishmaniose.....	1
1.2 Um breve estudo da licarina A	3
1.3 Estudos de metabolismo <i>in vitro</i>	6
1.4 Metaloporfirinas sintéticas: modelos químicos do CYP-450.....	7
1.5 Reações biomiméticas com metaloporfirinas	10
2. OBJETIVOS GERAIS.....	12
2.1 Objetivos específicos	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Especificações dos equipamentos em geral.....	13
3.2 Equipamentos utilizados no teste de microsoma hepático.....	14
3.3 Equipamentos utilizados no teste biomimético com metaloporfirinas.....	14
3.4 Equipamento utilizado no isolamento dos metabólitos	15
3.5 Equipamentos utilizados para determinação de rotação ótica e RMN	15
3.6 Equipamento utilizado na observação de cortes histológicos	15
3.7 Solventes e reagentes utilizados	15
3.8 Síntese da licarina A	16
3.9 Reações biomiméticas com metaloporfirinas	17
3.9.1 Síntese do doador de oxigênio iodosilbenzeno	17
3.9.2 Reações de oxidação	17
3.10 Reações com microsomas hepáticos de ratos.....	20
3.11 Isolamento dos produtos de oxidação	20
3.12 Cálculos computacionais do sítio provável para a reação com um eletrófilo (H+).....	22
3.13 Teste de toxicidade aguda oral.....	22

3.14	Análises histológicas dos órgãos (fígado, rim e coração) após 14 dias	24
3.15	Avaliação dos parâmetros bioquímicos no soro de animais tratados por gavagem com licarina A	24
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1	Síntese e identificação estrutural da licarina A	25
4.2	Sistemas de oxidação (reações biomiméticas).....	31
4.2.1	Reações com metaloporfirinas e catalisador de Jacobsen.....	31
4.2.2	Cinética reacional e variação da concentração de oxidante.....	35
4.2.3	Análise por CLUE-DAD-EM/EM	37
4.2.3.1	Identificação do metabólito 1 (TR 2,14 min).....	38
4.2.3.2	Identificação dos metabólitos 2 (tr 2,97 min), 3 (tr 3,62 min), 6 (tr 7,50 min), e 7 (tr 7,95 min).....	40
4.2.3.3	Identificação do metabólito 4 (TR 3,62 min).....	44
4.2.3.4	Identificação dos metabólitos 5 (TR 4,09 min).....	46
4.3	Identificação estrutural dos metabólitos oxidados isolados	48
4.3.1	Identificação estrutural do metabólito 3	48
4.3.2	Identificação estrutural do metabólito 4	52
4.4	Estudo da estabilidade da licarina a após 24h na presença dos solventes	57
4.5	Ensaio com microsomas hepáticos de ratos.....	58
4.6	Estudo de toxicidade aguda oral da licarina A	61
4.7	Determinação dos parâmetros bioquímicos após administração da licarina a em camundongos	64
4.8	Análise histológica dos órgãos (fígado, rim e pulmão) após 14 dias de administração da licarina A	70
5.	CONCLUSÃO.....	72
6.	REFERÊNCIAS	74
ANEXOS	82	
ANEXO A - Caracterização da licarina A.....	82	
ANEXO B - Espectros de massa nos modos de ionização positivo e negativo (IES, 10 eV, TQ) gerados a partir da reação JB-2 (Jacobsen, acetato de etila e <i>m</i> CPBA).....	87	
ANEXO C - Fluxograma dos estudos de toxicidade aguda oral da oecd 420 (2001)	90	
ANEXO D - Espectro de massas da licarina a analisado por <i>ion trap</i> nos modos positivo e negativo de ionização	92	
ANEXO E - Aprovação do comitê de ética para estudos <i>in vivo</i>	97	

1. INTRODUÇÃO

1.1 Lignanas, neolignanas e leishmaniose

O estudo do uso de plantas medicinais no Brasil vem crescendo significativamente, principalmente por apresentarem atividades biológicas comprovadas. Além disso, as plantas medicinais também são utilizadas na busca de substâncias bioativas que possam ser utilizadas como candidatos a fármacos. Em muitos casos as substâncias isoladas são promissoras, porém inviáveis para a realização dos estudos necessários para o desenvolvimento de novos fármacos, devido a sua toxicidade, inviabilidade de isolamento e/ou síntese (McCHESNEY et al., 2007). Um exemplo desta incessante busca é a aplicabilidade de substâncias bioativas no tratamento de doenças negligenciadas, como a leishmaniose, já que a terapêutica nesta área ainda é pobre e necessita de ampliação.

As doenças negligenciadas, ou também chamadas “doenças órfãs” ou “doenças tropicais” (NWAKA & RIDLEY, 2003), como: leishmaniose, doença de Chagas, esquistossomose, filariose linfática, dengue e doença do sono, continuam ainda sendo uma das principais causas de mortalidade e morbidade em todo o mundo. As doenças negligenciadas são assim chamadas por não apresentarem solução e ainda representarem um grande problema à Saúde Pública (CHIRAC & TORREELE, 2006). As doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) fazem parte de um grupo de infecções crônicas incapacitantes que atingem, principalmente, as pessoas mais pobres do mundo (HOTEZ et al., 2007).

A leishmaniose é uma DTN de grande expansão afetando aproximadamente 80 países, sendo que cerca de 1,5 bilhões de pessoas encontram-se em áreas de risco. O número de infectados é de 12 milhões de pessoas, sendo reportados 400.000 novos casos a cada ano (AMATO et al., 2000; DARDARI et al., 2004).

No Brasil, a leishmaniose atinge aproximadamente 19 estados, sendo a região Nordeste a de maior incidência (DARDARI et al., 2004). A leishmaniose apresenta manifestações clínicas variáveis, dependendo da virulência da espécie infectante, susceptibilidade do hospedeiro e co-infecções (DARDARI et al., 2004).

Em relação ao tratamento terapêutico da leishmaniose, o mesmo é ainda precário e consiste na administração de estibogluconato sódico (Pentostan®) e antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime®) que são fármacos de primeira geração. Tem-se ainda, o uso de pentamidina ou anfotericina B, que são de segunda geração (DEMICHELI et al., 2002; SERENO et al., 2000).

Devido à precariedade frente ao tratamento farmacológico da leishmaniose, torna-se necessário o estudo de novos potenciais fármacos para tratamento desta DTN. Neste contexto, uma classe química de grande interesse e importância leishmanicida são as lignanas e neolignanas (BARATA et al., 2000; PEREIRA et al., 2011).

As lignanas constituem-se de um grupo de metabólitos secundários vegetais e estão amplamente distribuídas no reino vegetal. Os lignóides são de grande utilidade para as plantas que as produzem bem como para os homens que as extraem ou sintetizam. Nas plantas, as lignanas acumulam-se em madeira como resposta a ferimento mecânico ou a invasão bacteriana ou fúngica (GOTTLEB & YOSHIDA, 1984). Para o homem, derivados da podofilotoxina, como vincleucoblastina e vincleurocristina, desempenham a função de agentes antitumorais, sendo atualmente produzidos pela Sandoz® (JEWERS et al., 1971).

As lignanas são derivadas da dimerização radicalar do fenilpropano (C₆C₃) (WARD, 1982). Na natureza são encontradas principalmente sob a forma de um único enantiômero, contudo podem também ser encontradas como mistura racêmica (UMEZAWA et al., 1997). Esta classe de metabólitos está presente em altas concentrações em sementes de linhaça e também em outras sementes, bem como em frutas e vegetais. Além disso, bebidas como: café, chá e vinho também contém lignanas estando dessa maneira presentes em concentrações substanciais na dieta humana (MILDER, et al., 2005; THOMPSON, et al., 2006; VALSTA et al., 2003).

As lignanas, bem como as neolignanas, são classes de produtos naturais que apresentam uma grande diversidade em relação às suas atividades biológicas, como exemplo, as atividades: antitumoral (BASTOS et al., 1996; MACRAE & TOWERS, 1984), leishmanicida (BARATA et al., 2000; PEREIRA et al., 2011) e antimalárica (ZHANG et al., 2001). Esses resultados vêm estimulando a pesquisa em relação à atividade e busca de novas lignanas e neolignanas.

Existem diversos estudos a respeito da atividade biológica de diversas espécies ricas em lignanas e neolignanas. Algumas espécies do gênero *Aristolochia*, como exemplo *A. elegans* e *A. grandiflora*, vêm sendo utilizadas em grande escala pela medicina tradicional mexicana, para o tratamento da tosse (DIAZ, 1976). Outra espécie do mesmo gênero amplamente estudada é *A. taliscana* Hook, conhecida popularmente no México como Guaco. Segundo estudos de Abe e colaboradores (2002), essa espécie apresentou em sua composição química neolignanas que estavam relacionadas com a atividade antiprotozoária.

Outro gênero de grande importância é o gênero *Myristica* (Myristicaceae), o qual é representado principalmente pela noz moscada, sendo esta rica em neolignanas e que desde a

Idade Média vem sendo utilizada como carminativa, estimulante, narcótica, emenagoga e abortiva (HALL, 1973). Além disso, as neolignanas presentes na noz moscada apresentaram atividades antioxidante, anti-inflamatória (JIN et al., 2005), hepatoprotetora (MORITA et al., 2003), inibição da proteína tirosina fosfatase (YANG et al., 2006), inibição da enzima acetilcolinesterase (MUKHERJEE et al., 2007), antiperoxidativa e antibacteriana (HATTORI, et al., 1986; MURAKAMI, et al., 2005; HATTORI, et al., 1993).

1.2 Um breve estudo da licarina A

A licarina A (Figura 1) é uma neolignana diidrobenzofurânica, a qual pode ser encontrada em diversas espécies vegetais apresentando inúmeras atividades biológicas relacionadas, sendo que sua atividade neuroprotetora foi comprovada a partir do extrato metanólico da casca de *Machilus thunbergii* (Lauraceae) (MA et al., 2004). O fracionamento desse extrato revelou que a fração diclorometânica foi a detentora de maior atividade, sendo que a neolignana de maior porcentagem de proteção foi a licarina A na concentração de 10 μ M (MA et al., 2004).

Figura 1. Estrutura química da licarina A

Em relação à atividade neuroprotetora dessas neolignanas, foi relatado a necessidade da presença dos grupos metóxi e hidróxi no anel benzênico (MA et al., 2004), mostrando assim uma grande relação entre sua estrutura e correspondente atividade.

Outra fonte rica nessa neolignana concerne-se nas sementes de *Myristica fragrans* Houtt (Myristicaceae), bem conhecida na medicina tradicional chinesa e vem sendo utilizadas para tratamento de estômago bem como de gases intestinais excessivos (CHIN PHARMACOPEIA, 2005), sendo ainda uma das especiarias mais utilizadas na preparação de medicamentos ayurvédicos (VAN & COX, 1994).

Na tabela 1, encontram-se sumariadas algumas espécies que apresentaram em sua composição química a presença da neolignana licarina A.

Tabela 1. Espécies, já relatadas na literatura, que possuem a neolignana licarina A

Espécie	Família	Referência Bibliográfica
<i>Aristolochia pubescens</i>	Aristolochiaceae	NASCIMENTO et al., 2000
<i>Aristolochia taliscana</i>	Aristolochiaceae	LEON-DÍAZ et al., 2013, ABE et al., 2002
<i>Machilus odoratissima</i>	Lauraceae	GIANG et al., 2006
<i>Machilus japonica</i>	Lauraceae	COLOMA et al., 1994
<i>Machilus thunbergii</i>	Lauraceae	MA et al., 2004, MA et al., 2005
<i>Magnolia ovate</i>	Magnoliaceae	BARROS et al., 2009
<i>Myristica fragrans</i>	Myristicaceae	LI & YANG, 2008, LI & YANG, 2011
<i>Nectandra amazonum</i>	Lauraceae	COY et al., 2009
<i>Nectandra glabrescens Benth</i>	Lauraceae	BARBOSA-FILHO et al., 1989 CABRAL, et al., 2010
<i>Ocotea macrophylla</i>	Lauraceae	COY et al., 2009
<i>Pleurothyrium cinereum</i>	Lauraceae	COY et al., 2009

A neolignana em estudo apresenta em sua estrutura dois centros assimétricos ou quirais, o que pode interferir em sua atividade dependendo da estereoespecificidade dessa propriedade biológica. É importante salientar que a maioria dos compostos quirais apresentam comportamentos biológicos, fisiológicos e bioquímicos distintos, podendo dessa maneira exercer diferentes atividades toxicológicas, farmacodinâmicas e farmacocinéticas (FDA, 1992; MIL'ANOVA & HUTTA, 2003; CALDWELL, 1995; YAN et al., 2004).

Estudos *in vitro* recentes relataram que a ($\pm$) licarina A, bem como a (-) licarina A, apresentaram potente atividade tripanossomicida e esquistossomicida (PEREIRA et al., 2011), sendo então promissoras ao desenvolvimento de novos agentes terapêuticos no combate a esquistossomose e doença de Chagas.

A licarina A também apresentou uma potente atividade anti-inflamatória (MURAKAMI et al., 2005), assim como propriedades antimicrobianas (LEÓN-DÍAZ et al., 2010) e antitumoral (PARK et al., 2004).

Em relação ao estudo do metabolismo *in vitro* e *in vivo* dessa neolignana, podemos destacar o trabalho de Li e Yang (2011), em que foram realizados os ensaios de microssomas hepáticos de ratos bem como administração oral em ratos tratados com licarina A, sendo

analisadas fezes e urina. Neste estudo foram identificados nove metabólitos, dos quais cinco eram inéditos. A determinação estrutural dos metabólitos foi realizada a partir de várias técnicas como: espectroscopia de ultravioleta (UV), espectrometria de massas (EM), ressonância magnética nuclear (RMN) e dicroísmo circular (DC). A licarina A apresentou algumas vias preferenciais de metabolismo nos ratos como, por exemplo, oxidação (incluindo a hidroxilação, a hidroformilação e acetilação), desmetilação, com abertura de anel, e desidrogenação. Nesse estudo os metabólitos encontrados nos ensaios de metabolismo *in vitro* foram diferentes dos encontrados no metabolismo *in vivo* (LI & YANG; 2011).

Em relação à absorção intestinal, a mesma foi estudada pela primeira vez a partir da permeabilidade intestinal através do modelo (humano) de monocamada celular Caco-2 (para prever a absorção oral), sendo que neste estudo a licarina A foi obtida a partir das sementes de *Myristica fragrans* (YANG et al., 2010). Além da licarina A, neste trabalho também foram avaliadas outras neolignan benzofurânicas, as quais apresentaram baixa ou moderada permeabilidade, sendo que a licarina A exibiu permeabilidade moderada. A permeabilidade das substâncias está relacionada às diferenças em suas estruturas e consequentemente à sua lipofilicidade (YANG, et al., 2010). Além disso, foi ainda possível constatar que a licarina A apresentou um transporte principalmente através da difusão passiva, sendo absorvida através do epitélio intestinal (YANG, et al., 2010). Os resultados deste estudo são de grande relevância, uma vez que auxiliam no fornecimento de informações importantes nas previsões relativas à absorção oral de neolignanas *in vivo*.

A partir do exposto, a neolignana licarina A foi selecionada como substância alvo do presente estudo, devido principalmente ao seu grande potencial leishmanicida (NÉRIS et al., 2013) o que também foi comprovado pelos grupos de pesquisa do NPPNS e Lychnoflora. A licarina A pode ser isolada a partir de diversas espécies vegetais, como já demonstrado anteriormente, porém o método mais rápido e com maior rendimento com relação a sua obtenção foi a partir da rota sintética utilizando o isoeugenol (Figura 2) (NASCIMENTO et al., 2000), sendo este o método de escolha para a obtenção dessa neolignana utilizada no estudo proposto.

Figura 2. Estrutura química do isoeugenol, precursor da licarina A

1.3 Estudos de metabolismo *in vitro*

O metabolismo em geral é determinado por várias famílias de enzimas hepáticas, denominadas enzimas do citocromo P-450 (CYP-450). O metabolismo de fármacos é um processo catalisado por enzimas capazes de produzir modificações estruturais nos fármacos (WILLIAMS, 1959), sendo dividido em duas fases: fase I, que compreende as reações de oxidação, redução e hidrólise, e a fase II, compreendendo a fase de conjugação que envolve as reações de glicuronidação, metilação, acilação, dentre outras (VANDENBERGHE et al., 2013).

Os fármacos ao serem administrados, em sua grande maioria, sofrem metabolização sendo então eliminados. Uma das principais vias de eliminação para fármacos, principalmente os de baixa polaridade, baseia-se no processo de biotransformação de compostos por oxidação que ocorre principalmente a partir do metabolismo de fase I sob a ação das enzimas do CYP-P450 (MONTELANO, 2005).

Esse metabolismo oxidativo de compostos exógenos ocorre tanto em plantas e animais, bem como em bactérias e fungos, sendo mediado por essa superfamília de enzimas do CYP-450 (MANSUY, 2007), que apresentam em sua estrutura a protoporfirina de ferro IX como o grupo prostético. (Figura 3)

O principal intuito do metabolismo de fase I é promover o aumento da polaridade do fármaco facilitando sua eliminação, principalmente pelos rins (via sistema urinário). Sendo assim, o estudo da biotransformação do possível fármaco, é de grande relevância para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, pois estudos de biotransformação demonstram possíveis interações com outros fármacos além de poder determinar alguns efeitos adversos (BRANDON et al., 2003; ZHOU et al., 2004).

Os estudos do metabolismo de fármacos são primordiais para o conhecimento dos fatores farmacocinéticos relevantes ao uso adequado e principalmente seguro dos fármacos. Dessa maneira, a Organização Mundial da Saúde (OMS), faz uma recomendação sobre a presença obrigatória de estudos de metabolismo de fármacos, tanto na avaliação pré-clínica como clínica de qualquer novo medicamento (WHO, 1966). Assim, o conhecimento do metabolismo é primordial na tomada de decisão estabelecendo o término, ou a continuação dos estudos desse novo fármaco.

Uma questão importante nesses estudos de metabolismo *in vitro* e *in vivo* é extrapolar esses resultados para a prática clínica, porém os estudos *in vitro* são muito importantes já que complementam os estudos *in vivo* e predizem interações antes de triagens clínicas (EKINS et

al., 2000). Estes modelos fornecem informações importantes sobre o mecanismo e possíveis rotas do metabolismo de fármacos.

Alguns modelos *in vitro* vêm sendo utilizados com o intuito de reproduzir as reações de biotransformação que ocorrem em humanos. Dentre os principais modelos biológicos estão: microsomas hepáticos, superssomas, frações citosólicas de fígado e frações S9 de fígado (BRANDON et al., 2003; EKINS et al., 2000). Porém, vários problemas podem ser associados ao uso destas metodologias como a necessidade de uso de animais que são dispendiosos e requerem o seu sacrifício, como também o uso de microsomas isolados que leva a um baixo rendimento na produção dos metabólitos. Por este motivo os usos de sistemas biomiméticos do CYP-450 envolvendo metaloporfirinas ou catalisador de Jacobsen têm recebido grande atenção (LOHMNAN & KARST, 2008).

Esses modelos biomiméticos, apresentam inúmeras vantagens como um aumento no rendimento do produto oxidado, o que possibilita e favorece seu isolamento a um custo aceitável além de minimizar a utilização de quantidades de animais para experiências de metabolismo *in vitro* e *in vivo* (BERNADOU & MEUNIER, 2004).

Logo, as metaloporfirinas sintéticas, como modelo de estudo de metabolismo *in vitro*, têm apresentado boa resposta na geração de metabólitos via metabolismo oxidativo, sendo utilizadas principalmente como um método alternativo para produção desses metabólitos e ainda para fins de comparação e identificação dos possíveis metabólitos formados em sistemas *in vivo*, a partir da formação dos mesmos em sistemas *in vitro* (PALARETTI, et al., 2012).

Esse sistema de metabolismo biomimético *in vitro* vem sendo utilizado principalmente devido a grande complexidade inerente ao estudo de sistemas *in vivo*, o que justifica o uso das metaloporfirinas mimetizando a ação das enzimas do CYP-450 (PALARETTI, et al., 2012).

1.4 Metaloporfirinas sintéticas: modelos químicos do CYP-450

As metaloporfirinas sintéticas, principalmente as (Fe^{III}porfirinas), auxiliam no entendimento do metabolismo a partir dos mecanismos de ação do CYP-450.

A maioria das metaloporfirinas contém centros de ferro e utilizam o oxigênio como oxidante. No presente trabalho, foram utilizadas metaloporfirinas de primeira geração que apresentam uma unidade de Fe^{III} porfirinas, principalmente a Fe^{III} protoporfirina IX (Figura 3), assim como as heme-enzimas do CYP-450.

Figura 3. Representação da Fe^{III} protoporfirina IX

Groves e colaboradores iniciaram em 1979 um dos estudos pioneiros a partir da utilização de metaloporfirinas sintéticas como modelos químicos do CYP-450. Eles utilizaram a metaloporfirina de primeira geração $[\text{Fe}(\text{TPP})\text{Cl}]$ na oxidação de hidrocarbonetos, utilizando iodosilbenzeno (PhIO) como doador de oxigênio e diclorometano como solvente. Nesse trabalho, concluiu-se que esse modelo testado apresentou uma excelente seletividade para um dos produtos formados, dessa maneira confirmando a seletividade do sistema catalítico proposto.

Esse foi um dos trabalhos pioneiros na utilização de metaloporfirinas, contudo, o baixo rendimento reacional obtido por Groves e colaboradores (1979), foi com o passar dos anos amenizado principalmente a partir do desenvolvimento de sistemas catalíticos (metaloporfirinas) mais eficientes.

As metaloporfirinas, como catalisadores de reações de oxidação, foram evoluindo com o passar dos tempos, sendo classificadas por Meunier (1992) em:

- **Primeira geração:** complexos metálicos gerados pela inserção de um íon metálico na porfirina H_2TPP , sem a presença de substituintes nas posições *meso*-arílicas e β -pirrólicas (Figura 4).

- **Segunda geração:** formadas a partir da introdução de substituintes volumosos e/ou eletronegativos nas posições *meso*-aril do anel porfirínico. (Figura 4).

- **Terceira geração:** formadas a partir da introdução de substituintes (grupos retiradores de elétrons) nas posições β -pirrólicas do anel porfirínico. (Figura 4).

Figura 4. Metaloporfirinas de primeira (A), segunda (B) e terceira geração (C), respectivamente.

As metaloporfirinas de primeira geração são menos protegidas quando comparadas as posteriores de segunda e terceira geração. Essa desproteção pode acarretar na oxidação do centro prostético pelo oxidante (PhIO ou *m*CPBA), permitindo uma redução do número de ciclos catalíticos. Sendo assim, estudos prosseguiram no desenvolvimento de metaloporfirinas contendo substituintes de maior volume, determinando uma maior proteção ao ataque do centro prostético, e/ou átomos eletronegativos nas posições *meso*-aril e mais tardiamente nas posições β -pirrólicas do anel porfirínico (REEDJIK & BOWMAN, 1999).

Além das metaloporfirinas, outro catalisador amplamente utilizado nos ensaios biomiméticos de metabolismo são os catalisadores de Jacobsen ($\text{Mn}(\text{Salen})$) (Figura 5). Esses catalisadores não apresentam o centro prostético idêntico ao sistema do CYP-450, como representado anteriormente pelas metaloporfirinas, contudo apresentam uma eficiência catalítica substancialmente relevante, como observado no estudo de Niehues e colaboradores (2012), no qual foram obtidos 11 metabólitos distintos a partir de uma catálise homogênea utilizando *S,S*-Salen como catalisador.

Figura 5. Calatisador de Jacobsen utilizado nas reações biomiméticas

1.5 Reações biomiméticas com metaloporfirinas

As metaloporfirinas sintéticas são análogas ao grupo prostético do CYP-450 e têm sido sintetizadas e estudadas há mais de 30 anos. Estes modelos biomiméticos auxiliam no entendimento do mecanismo da enzima, bem como na reprodução da atividade catalítica destas usando doadores de oxigênio simples, na busca de catalisadores mais seletivos para utilização na “química fina” (GUNTER & TURNER, 1990; MEUNIER, 1992; SHELDON, 1994; GONSALVES & PEREIRA, 1996; MEUNIER et al., 2000; BERNADOU & MEUNIER, 2004). Convém destacar que as metaloporfirinas, bem como o catalisador de Jacobsen, frequentemente são utilizados na tentativa de mimetizar o metabolismo, principalmente o metabolismo de fase I, compreendido por mudanças na forma original da molécula, pela adição de grupos funcionais, oxidação e/ou hidrólise (MAC LEOD, et al., 2008).

Estas reações em sistemas oxidativos envolvendo metaloporfirinas possuem dois componentes básicos: o catalisador porfirínico contendo um metal, geralmente (Fe ou Mn) e um doador de oxigênio. Alguns exemplos de doadores de oxigênio são o hipoclorito de sódio (NaOCl), iodosilbenzeno (PhIO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e perácidos como o ácido *meta*cloroperbenzóico (*m*CPBA) (REEDIJK & BOUWMAN, 1999).

Em relação a esses oxidantes, os mesmos apresentam algumas vantagens e desvantagens na sua utilização. Por exemplo, a utilização de PhIO como oxidante apresenta algumas desvantagens como: esse reagente não está comercialmente disponível sendo então necessária sua síntese e posterior ensaio iodométrico para determinação de sua pureza, que é demorado e bastante variável além de sua toxicidade (GROVES, 2006). Contudo, quando

comparado a outro agente oxidante como, por exemplo, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o mesmo possui um maior poder oxidante.

Em relação à utilização de H_2O_2 , existem desvantagens como a sua limitada atividade catalítica, bem como a possibilidade deste peróxido sofrer uma clivagem homolítica da ligação O-O, desencadeando reações radicalares que na maioria das vezes podem levar a destruição do catalisador, determinando baixos rendimentos do produto de oxidação desejado (metabólito) (GROVES, 2006). Como vantagem temos o seu baixo custo, disponibilidade comercial e principalmente a geração de água como seu único subproduto, sendo assim considerado um oxidante “limpo” (GROVES, 2006).

Vários fármacos têm sido oxidados por sistemas biomiméticos, e estes estudos têm mostrado que apesar das limitações, as metaloporfirinas podem ser capazes de sintetizar metabólitos que também ocorrem *in vivo* (BERNADOU & MEUNIER, 2004). Além disso, estas reações de oxidação catalisadas por metaloporfirinas podem gerar substâncias que não são observadas *in vivo* e que podem apresentar maior potência do que o fármaco. A utilização de metaloporfirinas se faz principalmente para a caracterização inicial dos diferentes metabólitos produzidos a partir de uma substância, sem a utilização de modelos experimentais animais, ou até mesmo o uso de microssomas hepáticos, apresentando como principal vantagem o grande número e diversidade de metabólitos formados, bem como um maior rendimento na produção dos metabólitos, o que facilita o isolamento e caracterização estrutural dos produtos formados.

2. OBJETIVOS GERAIS

O principal objetivo do presente estudo foi avaliar a oxidação da licarina A a partir do uso de metaloporfirina e complexo de Salen (*S,S*-Salen) como catalisadores e comparar os resultados obtidos com os resultados gerados a partir dos ensaios com microsossomas hepáticos de ratos. Além da determinação de sua toxicidade aguda.

2.1 Objetivos específicos

Como objetivos específicos do presente estudo, encontram-se:

- Promover as reações de oxidações biomiméticas a partir do uso de metaloporfirina e catalisador de Jacobsen pela variação das condições reacionais (solvente, catalisador, oxidante) e realizar a identificação estrutural dos principais metabólitos formados;
- Realizar ensaios com microsossomas hepáticos de ratos, a fim de confirmar se esses metabólitos formados são os mesmos observados nas reações biomiméticas com metaloporfirina e catalisador de Jacobsen;
- Determinar a toxicidade aguda dessa substância, seguindo o protocolo da (OECD/OCDE - Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico), além da determinação dos parâmetros bioquímicos;
- Avaliar as possíveis alterações histológicas nos órgãos (coração, fígado e rins) causadas pela administração da licarina A (dose única) após um período de 14 dias;
- Estudar o perfil de fragmentação da licarina A para o auxílio na identificação dos metabólitos oxidados;
- Criar uma biblioteca com os dados de EM/EM de possíveis metabólitos gerados a partir das reações de oxidação *in vitro* da licarina A.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Especificações dos equipamentos em geral

- **CG-EM** (Cromatógrafo Gasoso acoplado ao espectrômetro de massas) - Shimadzu® QP2010, com ionização por elétrons (IE) (70 eV) possuindo injetor automático AOC-20i. A coluna utilizada foi a DB-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm). A temperatura de injeção foi de 250°C, a temperatura do forno de 120°C, com pressão de 80,6 kPa, vazão 1,0 mL/min, hélio como gás carreador e modo de injeção *split*. Foi utilizada a temperatura programada, com o início de aquisição dos dados em 3,0 minutos, sendo que o gradiente de temperatura se iniciou com a manutenção da temperatura do forno em 120 °C durante 4 minutos, elevando-se a uma taxa de 8°C/min até 300°C, a partir da qual a temperatura foi mantida constante por mais 12 minutos.

- **CLUE-DAD-EM/EM** (Cromatógrafo líquido de ultra-eficiência acoplado ao detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas) – Acquity (Waters®) com fonte de ionização por eletrospray (IES) e analisador do tipo triplo quadrupolo. A vazão da fase móvel foi de 0,3 mL/min e com relação ao espectrômetro de massas, foi utilizada a temperatura da fonte de 150°C, temperatura de dessolvatação de 350°C, fluxo do gás de colisão de 0,15 mL/min e voltagem do cone de 25 eV. Argônio foi utilizado como gás de colisão e nitrogênio como gás de nebulização. A coluna utilizada foi ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ (50mm x 2,1mm x 1,7µm, Waters®). Como fase móvel utilizou-se água deionizada e acetonitrila e o gradiente de eluição utilizado corresponde a um aumento na proporção de acetonitrila de 20 a 40% nos 5 primeiros minutos, subindo para 80% em 11 minutos, permanecendo em 100% de solvente orgânico até 13,5 minutos. Finalmente retornando as condições iniciais (20% de solvente orgânico), até 15 minutos, intervalo correspondente ao tempo de corrida. Afim de trabalharmos com uma melhor detecção dos metabólitos, uma vez que estavam presentes em baixas concentrações, foi realizada uma pequena mudança na metodologia analítica de tal maneira que foram injetadas soluções mais concentradas e a partir do tempo de retenção (TR) de 8 minutos o eluato era direcionado ao descarte, não gerando nenhum dado de espectrometria de massas a partir desse tempo, pois logo após este tempo ocorre a eluição da licarina A e alguns reagentes. Isso permitiu a injeção de amostras mais concentradas, consequentemente gerando uma maior concentração dos metabólitos, facilitando sua detecção. Todas as análises do ensaio biomimético de metaloporfirinas e catalisador de

Jacobsen foram realizadas segundo essa metodologia. O detector foi ajustado para monitorar entre 190 a 800 nm durante todo período de análise.

- **Espectrômetro Massas híbrido triplo quadrupolo e tempo de voo** (MicroTOF-Q2 Bruker-Daltonics®), com ionização por eletrospray (IES). Nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização e colisão. A temperatura do gás foi de 180°C; fluxo do gás de 4 L/min, pressão de nebulização 0,4 Barr, voltagem do cone de 500 V e do capilar de 3,5 kV. As amostras foram analisadas através de infusão direta no espectrômetro de massas.

- **Espectrômetro de massas com analisador do tipo *Ion-Trap*** (AmaZon SL IES-ion trap - Bruker®) com ionização por eletrospray (IES). Nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização. A temperatura de secagem utilizada foi de 180°C, fluxo do gás de secagem de 4 L/min, voltagem do capilar de 4,5 kV e amplitude de fragmentação 1,0 V. O gás hélio foi utilizado no *trap* e a infusão dos analitos foi realizada a um fluxo de 10 µL/min.

- **ULTRASSOM:** Ultrasonic-Clean – Ultracleaner 1400 - Unique®

3.2 Equipamentos utilizados no teste de microssoma hepático

- Balança Sartorius AG Germany modelo CP225D (Sartorius®, Santo André, Brasil)
- Homogeneizador (tipo “Potter” modelo MA 181 (Marconi®, Piracicaba, SP, Brasil)
- Centrífuga Hitachi (CF16RXII, Himac®, Tóquio, Japão)
- Ultra Centrífuga Beckman XL-70 (Beckman®, Carlsbad, EUA)
- Espectrofotômetro modelo 8453 da Agilent® (Waldbrook, Alemanha)
- Banho-maria (modelo SL 157, Solab®, Brasil)
- pHmetro modelo A88AS da Quimis® (Diadema, Brasil)
- Vibrax VXR da IKA® (Staufen, Alemanha)
- Agitador modelo AP56 da Phoenix® (Araraquara, Brasil)
- Centrífuga modelo CF16RXII da Himac® (Tóquio, Japão)

3.3 Equipamentos utilizados no teste biomimético com metaloporfirinas

- Balança modelo AY220 da Shimadzu®
- Agitador magnético modelo Q261A21 da Quimis®

3.4 Equipamento utilizado no isolamento dos metabólitos

- CLAE (Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência) Shimadzu[®]. Bombas modelo 6A, detector 20A, controlador CTO20A

3.5 Equipamentos utilizados para determinação de rotação ótica e RMN

- Para determinação do alfa-D da licarina A e do metabólito utilizou-se o polarímetro digital Jasco[®] modelo DIP-370. As medidas foram realizadas em metanol a 25°C.
- Os espectros de RMN de ¹H (300, 400 e 500 MHz) e ¹³C (75, 100 e 125 MHz) foram obtidos nos espectrômetros Bruker-Advance[®] DPX-300, DRX-400 e DRX 500, que estão alocados no departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP) – USP.

3.6 Equipamento utilizado na observação de cortes histológicos

- Microscópio óptico invertido Axiovert[®] 40 CFL com câmera integrada modelo Zeiss[®] (axioCam Icc1). Lentes objetivas (Zeiss[®]) de 10 (LDA-Plan 10x/0,25 Ph 1), 20 (LDA-Plan 20x/0,3 Ph 1), e 40 (LDA-Plan 10x/0,5 Ph 2). As fotos foram geradas e tratadas a partir do software release 4.8.2 (06.2010) da Carl Zeiss Imaging Systems[®].

3.7 Solventes e reagentes utilizados

- Os solventes utilizados no presente trabalho foram diclorometano grau CLAE (J.T.Baker[®]) e P.A. (Synth[®]), acetato de etila grau CLAE (J.T.Baker[®]) e P.A. (Synth[®]); metanol grau CLAE (J.T.Baker[®]) e P.A (Synth[®]); acetonitrila grau CLAE (J.T.Baker[®]) e água deionizada (18mΩ; mili-Q; milipore).
- Para as análises de RMN foram utilizados os seguintes solventes deuterados: CDCl₃ (Sigma-Aldrich[®]) e D₂O (Sigma-Aldrich[®]).
- Para síntese da licarina A foram utilizados isoeugenol (Sigma-Aldrich[®]), etanol (J.T.Baker[®]), água deionizada e cloreto férrico (Synth[®]).
- Nas reações biomiméticas foram utilizadas a metaloporfirina de primeira geração [Fe(TPP)Cl] (Aldrich Chemical Company[®]) e o catalisador de Jacobsen ((S,S)- Cloreto de N,N'-bis(3,5-di-tert-butilsalicidieno)-1,2-cicloexanodiaminomangans (III) (Sigma-Aldrich[®]).

- Nas reações de microsomas hepáticos de ratos foram utilizados NADP (Sigma Aldrich[®]), tampão fosfato pH 7,4, fosfato monossódico monoidratado (Merck[®], Darmstadt, Alemanha), fosfato dissódico diidratado (Merck[®], Darmstadt, Alemanha), glicose-6-fosfato (Sigma Aldrich[®]), glicose-6-fosfato desidrogenase (Sigma Aldrich[®]).
- Para síntese do idosilbenzeno foram utilizados diacetato de iodobenzeno (Sigma-Aldrich[®]), hidróxido de sódio (Synth[®]), água deionizada e clorofórmio (J.T.Baker[®]). Outro reagente utilizado na oxidação da substância foi o *m*CPBA (ácido metacloroperbenzóico) que foi adquirido comercialmente.

3.8 Síntese da licarina A

A licarina A foi sintetizada em parceria com a empresa Lychnoflora Pesquisa e Desenvolvimento em Produtos Naturais LTDA. A pureza cromatográfica da licarina A sintetizada foi de 98% comprovada pela técnica CG-EM. Inicialmente, as sínteses química e enzimática foram avaliadas e estão descritas abaixo.

A síntese enzimática foi realizada da seguinte maneira: uma solução de HRP (Horseradish peroxidase) (Boehringer, 20 mg Lys/4220.3 U) foi adicionada em 25 mL de tampão fosfato (pH 6,0) e 25 mL de MeOH. Essa mistura foi agitada durante a noite a 8°C. Houve então o resfriamento e posterior centrifugação (1200 g, 30 min) a 4°C. A solução de enzima resultante foi diluída 1000 vezes em tampão fosfato 20 mM.

Em uma cubeta de 2 mL, fez-se a adição de 1,5 mL de tampão fosfato 20 mM, 50 µL de guaiacol 20,1 mM, e 50 µL de uma solução de enzima previamente preparada. Após houve a adição de 30 mL de H₂O₂ 12,3 mM, e a alteração da absorbância a 436 nm foi monitorizada durante 2 minutos. O branco de referência foi preparado da mesma maneira, contudo sem a adição de H₂O₂. O cálculo da atividade enzimática foi realizado utilizando-se o coeficiente de absorção molar (6.39 M⁻¹ cm⁻¹) como descrito por Putter (1974).

A síntese enzimática apesar de baixo rendimento reacional e baixa pureza, possui a vantagem de ser uma “reação limpa”, processada por microrganismos, livre de solventes, o que determina diminuição na produção de resíduos tóxicos durante o procedimento.

Já a síntese química da licarina A foi realizada segundo a metodologia proposta por Leopold (1950), a qual consiste no procedimento descrito a seguir.

Em um balão munido de agitação magnética foi adicionado isoeugenol (6 mmol), o qual foi diluído em etanol e água deionizada (9,0 mL e 4,0 mL respectivamente). A essa solução foi adicionada uma solução aquosa de FeCl₃ (7,0 mmol) preparada em água

deionizada (5,5 mL). Logo após a adição total, sob agitação, ocorreu a formação de uma suspensão, devido a formação de sólidos. O balão foi mantido sob refrigeração por 24h (em geladeira) para a precipitação do produto de interesse (licarina A). Posteriormente, a amostra contida no balão foi filtrada a vácuo e os cristais foram lavados com etanol 45% (4,5 mL de etanol PA em 5,5 mL de água destilada).

A síntese química apresentou um rendimento muito superior à síntese enzimática. Dessa maneira, foi escolhida para a produção inicial da licarina A em maior escala.

3.9 Reações biomiméticas com metaloporfirinas

3.9.1 Síntese do doador de oxigênio iodosilbenzeno

Envolveu-se o béquer em papel alumínio, pesou-se 3,2 g de diacetato iodobenzeno em béquer de 250 mL, em seguida, adicionou-se 15,0 mL de NaOH 3,0N e agitou-se vigorosamente por 5 minutos. O resíduo sólido formado foi triturado com bastão de vidro e a mistura reacional foi colocada em repouso por 45 minutos. Após decorrido esse tempo, procedeu-se com a adição de 10 mL de água destilada, sob agitação vigorosa e posterior filtração em funil de buncher (vácuo). Nessa etapa, cuidados devem ser tomados em relação à fotossensibilidade do agente oxidante. A etapa de lavagem com água destilada foi repetida.

O sólido seco foi triturado em 7,5 mL de clorofórmio em béquer. Posteriormente lavado por cerca de três vezes com hidróxido de sódio (NaOH). Após a síntese, o reagente obtido, iodosilbenzeno, foi padronizado por iodometria, segundo a metodologia descrita por Lucas e colaboradores (1955). A figura 6 apresenta a reação de formação do iodosilbenzeno.

Figura 6. Formação do Iodosilbenzeno (GUIMARAES et al., 2004)

3.9.2 Reações de oxidação

Foram inicialmente testados quatro tipos de solventes como meio reacional, sendo eles: metanol (MeOH), acetonitrila (ACN), acetato de etila (AcOEt) e diclorometano (DCM),

todos de grau CLAE adquiridos comercialmente. Como substrato da reação, foi utilizada a licarina A sintetizada quimicamente e como oxidante foram utilizados o iodosilbenzeno (PhIO) e o ácido *meta*cloroperbenzóico (*m*CPBA).

As reações de oxidação foram realizadas em frascos de vidro de 4,5 mL de capacidade. Para cada reação, utilizou-se o PhIO e o *m*CPBA como doadores de oxigênio. Em frascos separados, foram pesados o catalisador e o agente oxidante. Posteriormente, no frasco de 4,5 mL contendo a licarina A, fez-se a adição do catalisador, completou-se o volume para 4 mL e efetuou-se a adição do respectivo doador de oxigênio. O frasco então foi vedado, envolvido em papel de alumínio e a reação se processou por 24 horas sob agitação magnética. Foram ainda realizados os controles (constituem-se da ausência do catalisador, sob as mesmas condições que as reações de oxidação biomiméticas), bem como os brancos reacionais (constituindo-se da ausência do substrato, licarina A, também sob as mesmas condições que as reações de oxidação biomiméticas).

A proporção dos reagentes utilizados nas reações foi de 1:30:30 (NIEHUES et al., 2012) ou seja, 1 μ mol de catalisador ([Fe(TPP)Cl] ou Mn(Salen)), 30 μ mol de oxidante (PhIO ou *m*CPBA) e 30 μ mol de licarina A. Outras proporções foram testadas a fim de aumentar a produção de metabólitos de algumas reações, sendo essas: 1:60:30, 1:90:30. Porém, não foram obtidos rendimentos superiores aos observados anteriormente.

As reações de oxidação realizadas foram codificadas (tabela 2) da seguinte maneira: segundo o catalisador utilizado (J para Jacobsen e F para [Fe(TPP)Cl]), para os solventes utilizou-se as letras de A a D correspondentes a: DCM (A), AcOEt (B), MeOH (C) e ACN (D). Por fim, os doadores de oxigênio foram codificados em 1 (PhIO) e 2 (*m*CPBA). Na tabela 2 a seguir, constam os testes realizados com os respectivos solventes, catalisadores e doadores de oxigênio, bem como os controles reacionais (ausência do catalisador).

As reações foram realizadas como descrito anteriormente e então analisadas inicialmente por CG-EM e posteriormente por CLUE-DAD-EM/EM.

Tabela 2. Diferentes combinações avaliadas entre os reagentes nas reações de oxidação com metaloporfirinas e o catalisador de Jacobsen

Código da reação	Catalisador	Solvente ¹	Oxidante
JA.1	Jacobsen Mn(Salen)	DCM	PhIO
JA.2		DCM	<i>m</i> CPBA
JB.1		AcOEt	PhIO
JB.2		AcOEt	<i>m</i> CPBA
JC.1		MeOH	PhIO
JC.2		MeOH	<i>m</i> CPBA
JD.1		ACN	PhIO
JD.2		ACN	<i>m</i> CPBA
FA.1	[Fe(TPP)Cl]	DCM	PhIO
FA.2		DCM	<i>m</i> CPBA
FB.1		AcOEt	PhIO
FB.2		AcOEt	<i>m</i> CPBA
FC.1		MeOH	PhIO
FC.2		MeOH	<i>m</i> CPBA
FD.1		ACN	PhIO
FD.2		ACN	<i>m</i> CPBA
A.1	Sem catalisador	DCM	PhIO
B.1		AcOEt	PhIO
A.2		DCM	<i>m</i> CPBA
B.2		AcOEt	<i>m</i> CPBA
C.1		MeOH	PhIO
D.1		ACN	PhIO
C.2		MeOH	<i>m</i> CPBA
D.2		ACN	<i>m</i> CPBA

DCM: diclorometano (A), AcOEt: acetato de etila (B), MeOH: metanol (C), ACN: acetonitrila (D); PhIO: iodozilbenzeno (1) e *m*CPBA: ácido *meta*cloroperbenzóico (2). *Todos os solventes utilizados são grau CLAE/ Proporção das reações: 1:30:30 (μmol)

Após essas análises iniciais e geração dos possíveis metabólitos, foram selecionados os melhores solventes, sendo eles: acetato de etila e diclorometano, capazes de levar a

produção de uma maior diversidade de produtos no sistema de catálise homogênea investigado.

3.10 Reações com microsomas hepáticos de ratos

Os ensaios catalíticos efetuados, bem como o isolamento dos microsomas hepáticos de ratos, foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes da FFCLRP-USP e o auxílio da doutoranda Fernanda Lima Moreira.

As reações foram realizadas da seguinte maneira: 25 μ L da amostra (1 mg/mL de licarina A em acetonitrila) foram transferidos para tubos de ensaio e em seguida foram adicionados 575 μ L de solução tampão fosfato para a manutenção do pH durante toda a reação. Logo após, adicionou-se os cofatores reacionais (100 μ L de NADP, 100 μ L de glicose-6-fosfato e 50 μ L da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase). Essa mistura foi mantida em banho-maria a 37°C com agitação por 5 minutos. Após isto, foram retiradas e adicionou-se 150 μ L de um *pool* de microsomas de concentração 2 mg/mL. As amostras retornaram ao banho-maria a 37°C sob agitação, para que ocorresse a ação do sistema catalítico.

Os tempos reacionais foram definidos em 5, 15, 30, 90 e 120 min. As reações foram interrompidas pela adição de acetato de etila (4,0 mL). Os tubos foram então submetidos à agitação por 15 minutos e centrifugados a 2000 g por 7 minutos a uma temperatura de 4°C. Após esses procedimentos, coletou-se 3,0 mL da fase orgânica (superior) e desprezou-se a fase aquosa. Esse volume final foi reduzido, concentrado e após secagem, essas amostras foram ressuspensas e analisadas em CLUE-DAD-EM/EM.

Outra metodologia de extração foi realizada a partir da adição de acetonitrila (ACN), método de precipitação de proteínas, e partição com hexano. Após a incubação com o *pool* de microsomas ao fim do tempo estipulado (120 minutos), a reação foi interrompida pela adição de 500 μ L de ACN (resfriada) seguida de partição com 1 mL de hexano. Foi realizado ainda o ensaio de microsomas hepáticos de ratos a partir de uma solução de concentração 2 mg/mL de licarina A.

3.11 Isolamento dos produtos de oxidação

O isolamento do produto de oxidação da licarina A foi realizado por CLAE-DAD em escala semipreparativa. Para tal fim, foi utilizada uma coluna semipreparativa de C₁₈ (Shim-pack Prep-ODS, 20 mm x 25 cm x 5 μ m, Shimadzu®), fluxo de 9 mL/min, e como fase móvel ACN e H₂O. O gradiente de eluição utilizado nessa separação encontra-se sumariado

na tabela 3. A reação JD.1 (Jacobsen, acetonitrila, iodosilbenzeno) foi a de escolha para esse procedimento.

Tabela 3. Gradiente de eluição utilizado na purificação dos metabólitos de oxidação da reação JD.1 por CLAE-DAD

Tempo (min)	Concentração de ACN
0	20
20	50
35	50
50	80
57	100
66	100
67	20
70	20

As frações purificadas foram recolhidas de acordo com o cromatograma da Figura 7. A licarina A corresponde ao pico cromatográfico 9 e os metabólitos relativos aos picos 4 (TR 26 min), e 6 (TR 33 min) foram submetidos a análises por RMN e EM.

O metabólito relativo ao pico 4 foi caracterizado como sendo um metabólito produzido a partir da formação de um grupo epóxido na ligação dupla carbono-carbono pertencente a cadeia lateral da licarina A. Já o metabólito relativo ao pico 6 foi caracterizado como sendo um aldeído benzóico.

Figura 7. Cromatograma da reação de oxidação JD.1 (ACN, Jacobsen, PhIO) obtido na purificação em CLAE ($\lambda = 280$ nm) e frações coletadas

As frações purificadas correspondentes aos números 1, 2 e 3 foram enviadas para análise em RMN, contudo não foi possível a visualização dos metabólitos de interesse, uma vez que ocorreu degradação dos metabólitos e devido à pequena quantidade isolada os espectros de RMN não apresentaram qualidades suficientes para a elucidação.

As frações correspondentes aos números 10, 11 e 12 e 13 não são relativas aos metabólitos formados, mas sim aos reagentes utilizados no ensaio biomimético com metaloporfirinas e catalisador de Jacobsen.

3.12 Cálculos computacionais do sítio provável para a reação com um eletrófilo (H⁺)

Estudos computacionais foram realizados em combinação com os resultados obtidos por IES-EM/EM com intuito de se propor o sítio de protonação da licarina A. Estes estudos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Ricardo Vessecchi do Departamento de Química da FFCLRP-USP. O modelo computacional utilizado para obter os sítios de protonação da licarina A foi o B3LYP/6-31+G(d,p) (BECKE, 1993; LEE & YANG, 1988) utilizando o programa Gaussian 03. (FRISCH et al., 2004)

A obtenção das grandezas termoquímicas e sítios de reatividade são de extrema valia para auxiliar a compreensão dos estudos de espectrometria de massas. Alguns autores já forneceram um protocolo (VESSECCHI et al., 2008) para os estudos de espectrometria de massas através da química computacional, onde os sítios de protonação são obtidos através da análise dos orbitais de fronteira, cargas atômicas e basicidade em fase gasosa.

3.13 Teste de toxicidade aguda oral

O estudo de toxicidade aguda oral foi realizado segundo as diretrizes do *Guideline 420* (toxicidade aguda) da OECD (ANEXO C).

Para os testes (parâmetros bioquímicos e toxicidade aguda oral) foram utilizados animais jovens, adultos e saudáveis (camundongos machos, linhagem: Balb/c). A escolha pelos machos foi realizada, devido à dificuldade de padronização do ciclo menstrual das fêmeas, tornando o estudo mais reprodutível.

Para a administração (gavagem) das doses (fixas) de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg (OECD, 2001) de uma suspensão de licarina A em polietilenoglicol (PEG) 300 (Synth[®]), os animais foram previamente preparados e pesados, sendo o volume administrado corrigido segundo o peso de cada animal (Tabela 4).

Tabela 4. Quantidade administrada a cada animal no teste de observação

Animal	Dose (mg/Kg)	Peso do animal (g)	Quantidade administrada* (µL)
1	5	31	193,7
2	50	29	181,2
3	300	33	206,2
4	2000	30	187,5

*Houve ainda a administração de 200µL de veículo (PEG) a um quinto animal (32 g), sendo este o animal controle

Optamos por iniciar o teste na concentração de 300 mg/kg, sendo esse animal observado individualmente por um período de 24h, com atenção especial às primeiras 4h.

Durante o tempo de 24h algumas alterações podem ocorrer como: alterações no pelo alterações nos aparelhos respiratório e circulatório, no Sistema Nervoso Central e Sistema Nervoso Autônomo, além de alterações comportamentais (tremores, salivação, diarreia, letargia, sono e coma) que podem dessa maneira sugerir a toxicidade da substância em teste.

O teste de observação realizado possui grande importância uma vez que contribui para a proteção da saúde humana auxiliando na escolha de uma dose inicial apropriada. Assim sendo, a partir da escolha da dose, o estudo principal pode ser conduzido posteriormente. O estudo principal foi realizado, através da utilização de outro grupo de 6 animais (5 teste principal e 1 controle), os quais foram monitorados por um período de 14 dias.

Após decorridos os 14 dias os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e realizadas as análises macroscópica e histopatológica dos órgãos.

Os animais utilizados nos testes de observação e principal, bem como na determinação dos parâmetros bioquímicos foram provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) da Universidade de São Paulo (USP). Esses animais foram escolhidos ao acaso, devidamente marcados para sua posterior identificação e mantidos em suas gaiolas por pelo menos 5 dias antes do início do teste, permitindo dessa maneira a aclimação dos mesmos.

Os animais foram mantidos sob condições padrões (temperatura de 22°C ($\pm 3^\circ\text{C}$), umidade relativa do ar de 50-60%, com iluminação artificial (controle do ciclo claro/escuro), conforme estipulado pelo protocolo. Os mesmos tiveram acesso à ração e água *ad libitum*. Houve ainda o cuidado com o número de animais por gaiola, de modo que não houvesse nenhuma dificuldade ou interferência na observação de cada animal, após o início dos testes.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob protocolo nº 09.1.112.53.4, aprovado em 04/02/2009 (ANEXO E).

3.14 Análises histológicas dos órgãos (fígado, rim e coração) após 14 dias

Os órgãos dos animais foram coletados e lavados com salina e armazenados em etanol 70% até o procedimento de inclusão em parafina. Os cortes foram realizados e corados com a coloração HE (hematoxilina/eosina). As lâminas foram observadas em microscópio óptico com as objetivas de 20 x e 40 x.

3.15 Avaliação dos parâmetros bioquímicos no soro de animais tratados por gavagem com licarina A

Após o ensaio *in vivo* de toxicidade aguda oral, dezoito novos animais machos da linhagem Balb/c foram selecionados. Os grupos foram divididos em três grupos de 6 animais, sendo eles: controle (administração somente do veículo), tratado (administração de licarina A (300 mg/kg em PEG) e não tratado (sem nenhuma administração), como descrito na tabela 5.

Tabela 5. Volume administrado a cada animal no teste de determinação dos parâmetros bioquímicos

VOLUME ADMINISTRADO						
	animal 1	animal 2	animal 3	animal 4	animal 5	animal 6
CONTROLE*	187,50 µL	168,75 µL	175,00 µL	187,50 µL	181,25 µL	187,50 µL
TRATADO**	156,25 µL	187,50 µL	168,75 µL	162,50 µL	162,50 µL	168,75 µL

*CONTROLE: Administração de PEG, **TRATADO: Administração de licarina A em PEG

Os valores de volume de administração foram calculados a partir de um volume máximo de 200 µL para um animal de 32 g, sendo assim, os valores acima representados pela Tabela 5, foram corrigidos segundo o peso de cada animal.

Após administração, os animais foram anestesiados (500 µL de cetamina, 125 µL xilazina para 2mL de água) e eutanasiados no intervalo de 24h, posterior à sua coleta de sangue (colhidas a partir do plexo retro-orbital com o auxílio de uma pipeta Pasteur). O sangue obtido foi separado do soro por centrifugação (4000 rpm por 20 minutos) e enviado ao Setor de Análises Clínicas (SAC) da FCFRP-USP para dosagem de seus parâmetros bioquímicos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese e identificação estrutural da licarina A

Figura 8. Estrutura química dos enantiômeros da licarina A

A licarina A (figura 8) sintetizada apresentou pureza cromatográfica de 98% obtida por CG-EM (figura 9). Além disso, ela foi analisada por RMN de ^1H e ^{13}C (anexo A) para verificação de sua autenticidade estrutural.

Figura 9. Cromatograma da licarina A sintetizada obtido por CG-EM

Os deslocamentos químicos observados para a licarina A (^1H e ^{13}C), bem como as constantes de acoplamento entre os hidrogênios, são compatíveis com os dados descritos na literatura para a licarina A (BARBOSA-FILHO et al., 1998), como demonstrado na tabela 6.

Tabela 6. Dados de RMN de ^1H (δ) e ^{13}C (δ) da licarina A sintetizada e relatados na literatura

H/C	Licarina sintetizada		Licarina A	
	^1H (δ) ^a	^{13}C (δ) ^b	^1H (δ) ^{c, 1}	^{13}C (δ) ^{d, 1}
1	-	132,1	-	132,3
2	6,99 (<i>d</i> , $J = 1,3$ Hz)	108,9	6,99 (<i>d</i> , $J = 0,8$ Hz)	109,1
3	-	146,5	-	146,8
4	-	145,7	-	145,9
5	6,93 (<i>d</i> , $J = 8,1$ Hz)	114,0	6,92 (<i>d</i> , $J = 7,5$ Hz)	114,2
6	6,92 (<i>dd</i> , $J = 1,3$ e $8,1$ Hz)	120,0	6,91 (<i>dd</i> , $J = 0,8$ e $7,5$ Hz)	120,1
7	5,12 (<i>d</i> , $J = 9,5$ Hz)	93,8	5,12 (<i>d</i> , $J = 9,4$ Hz)	93,9
8	3,48 (<i>m</i>)	45,3	3,47 (<i>dq</i> , $J = 6,8$ e $9,4$ Hz)	45,7
9	1,40 (<i>d</i> , $J = 6,8$ Hz)	17,5	1,40 (<i>d</i> , $J = 6,8$ Hz)	17,7
1'	-	132,0	-	132,2
2'	6,79 (<i>sl</i>)	109,1	6,81 (<i>s</i>)	109,5
3'	-	144,2	-	144,3
4'	-	146,6	-	146,7
5'	-	133,2	-	133,4
6'	6,81 (<i>sl</i>)	113,3	6,79 (<i>s</i>)	113,4
7'	6,38 (<i>dd</i> , $J = 1,5$ e $15,7$ Hz)	130,9	6,39 (<i>dd</i> , $J = 1,5$ e $15,7$ Hz)	131,1
8'	6,13 (<i>dq</i> , $J = 6,5$ e $15,7$ Hz)	123,5	6,13 (<i>dq</i> , $J = 6,6$ e $15,7$ Hz)	123,6
9'	1,89 (<i>dd</i> , $J = 1,7$ e $6,6$ Hz)	18,4	1,89 (<i>dd</i> , $J = 1,5$ e $6,6$ Hz)	18,8
OCH ₃ -3	3,90 (<i>s</i>) [*]	55,9 [*]	3,88	56,1
OCH ₃ -3'	3,91 (<i>s</i>) [*]	56,1 [*]	3,61	56,1
OH	5,66 (<i>s</i>)	-	-	-

^a(400 MHz, CDCl₃); ^b(100 MHz, CDCl₃); ^c(300 MHz, CDCl₃); ^d(75 MHz, CDCl₃), ^{*}sinais que podem estar trocados; ¹Barbosa-Filho et al., 1998.

Em relação ao espectro de RMN de ^1H , foi possível observar sinais na região de hidrogênios olefínicos relativos a sete hidrogênios. Os sinais com deslocamentos químicos de δ 6,7 – 7,0 foram atribuídos aos hidrogênios dos anéis aromáticos, sendo que os padrões de acoplamento observados bem como os valores das constantes de acoplamento foram fundamentais na atribuição dos sinais. Assim, os sinais em δ 6,99 (*d*, $J = 1,3$ Hz), 6,93 (*dd*, $J = 1,3$ e $8,1$ Hz), 6,92 (*d*, $J = 8,1$ Hz), 6,79 (*sl*) e 6,81 (*sl*) foram atribuídos a H-2, H-5, H-6, H-2' e H-6'. Essas constantes de acoplamento de $8,1$ e $1,3$ Hz são características de acoplamentos entre hidrogênios em *orto* e *meta*, respectivamente.

Além desses sinais descritos, também foram observados mais dois sinais olefínicos em δ 6,38 (*dd*) e 6,13 (*dq*), os quais apresentaram constantes de acoplamentos de $15,7$ Hz, confirmando a presença da ligação dupla carbono-carbono do tipo *trans*, e $1,5/6,5$ Hz que são característicos de acoplamentos vicinal e alílico entre os hidrogênios da ligação dupla em C-7'/C-8' com a metila em C-9'. Outros dois sinais em δ 3,90 e 3,91 apresentaram-se como singletos e com integração para 3 hidrogênios, sendo correspondentes a duas metoxilas aromáticas.

O espectro de RMN ^{13}C (Anexo A) exibiu 20 sinais, sendo que no espectro de DEPT $^{\circ}$ 135 (Anexo A) foi possível confirmar a ausência de carbonos metilênicos, além de confirmar a presença de sete carbonos quaternários. Os sinais observados em δ 146,5 (C-3), 145,7 (C-4), 144,2 (C-3') e 146,6 (C-4') confirmam as oxigenações em *orto*, pois estes deslocamentos químicos são característicos do padrão de oxigenação do tipo catecol. Além disso, também foram observados dois sinais característicos de metoxilas aromáticas (δ 55,9 e 56,1) e dois relativos a metilas em δ 17,5 (C-9) e 18,4 (C-9').

A rotação ótica específica ($[\alpha]_{\text{D}}^{25}$) da licarina A também foi adquirida, sendo observado um valor de $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ de -5,5 (*c* 0,79, MeOH), o que comprova que a licarina A sintetizada consiste em uma mistura dos enantiômeros (Figura 8), uma vez que a (+)-e a (-)-licarina A apresentaram $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ de +52 (*c* 0,79) e -52 (*c* 0,79 MeOH), respectivamente (LEE et al., 2009). É importante salientar que a mistura de enantiômeros formada não constitui-se de uma mistura racêmica, pois dessa forma teríamos um valor de $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ nulo (igual a zero). Assim sendo, a licarina A sintetizada apresentou um excesso enantiomérico.

Em relação ao espectro EM/EM (figura 10) da licarina A, obtido no espectrômetro de massas QTOF no modo de ionização positivo, com energia de colisão de 20 eV, houve a produção dos seguintes íons fragmentos: 327,15 (36,5%), 297,14 (17,6%), 267,13 (5,5%), 235,11 (4,3%), 203,10 (100%), 188,08 (66,7%), 171,08 (46,2%), 163,07 (47,8%), 151,1 (40,9%) e 137,05 (48,5%).

Figura 10. Espectro de massas *tandem* (Q-TOF) da licarina A sintetizada (IES, 20 eV, modo positivo).

A partir dos íons fragmentos observados no espectro da licarina A protonada $[M+H]^+$, uma proposta de fragmentação foi elaborada (figura 14) corroborada por cálculos de química computacional, onde o objetivo foi o de se obter o provável sítio de protonação da molécula em estudo. Os possíveis sítios de protonação podem ser determinados a partir do estudo e análise dos orbitais de fronteira (para protonação, utiliza-se o HOMO), cargas atômicas e basicidade em fase gasosa. Dentre esses descritores de reatividade, a basicidade em fase gasosa é o mais indicado para estudos de sítio de protonação, pois combina as variações de energia entre a molécula neutra e suas formas protonadas como descrito por Vessecchi e colaboradores (2008). Dessa maneira, a partir do estudo de basicidade foi possível inferir que o oxigênio do anel furano é o sítio mais provável de protonação (maior valor de basicidade), como ilustrado na figura 11.

Figura 11. Basicidade em fase gasosa para a licarina A em kcal.mol^{-1} obtidos através do modelo computacional B3LYP/6-31+G(d,p)

A partir dos resultados fornecidos por este estudo, pode-se definir que no modo de ionização positivo, a protonação ocorrerá preferencialmente no oxigênio do anel furano. Outro possível sítio de protonação é o oxigênio da metoxila em C-3', uma vez que sua basicidade foi a segunda maior e com valor mais próximo do observado para o oxigênio do anel furano. Já a hidroxila fenólica em C-4 apresenta maior caráter ácido quando comparada ao oxigênio do anel furano e assim é menos propensa a protonação.

Sendo assim, após a protonação nesse sítio específico, ocorre a ruptura da ligação C-O do anel furano, facilitando sua abertura (figura 12). Após rompimento dessa ligação, ocorre a formação do íon benzílio, o qual é estabilizado por ressonância a partir do efeito doador de elétrons do grupo $-\text{OH}$ presente na posição *para* do anel benzeno, como demonstrado no esquema a seguir.

Figura 12. Protonação do anel furano da licarina A e sua estabilização por ressonância.

Em relação à fragmentação da licarina A, é possível, inicialmente, visualizar duas perdas neutras de $30u$ (as quais são atribuídas a eliminações de formaldeído – CH_2O), dando origem aos fragmentos de m/z 297 e 267 (Figura 14). O pico base de m/z 203 é advindo da perda neutra de *orto*-metóxfenol, além disso, este íon origina os íons m/z 188 ($-15u$) e 171 ($-32u$) pela perda radicalar de uma metila e pela perda neutra de uma molécula de metanol, respectivamente, como verificado no espectro adquirido com o analisador do tipo *Ion trap* (Figura 13). Além disso, também foi possível observar o fragmento de m/z 188, obtido a partir do pico base m/z 203, que é advindo de uma perda radicalar de uma metila a partir do grupo metoxila ligado ao anel aromático na posição C-3' (Figura 14). Isso porque a ligação O-C ligado ao anel benzênico se torna enfraquecida pela presença do efeito de ressonância determinado pelo anel aromático, o que facilita a saída de $\bullet CH_3$. O fragmento de m/z 171 pode ainda ser proveniente da perda do grupo hidroxila a partir do fragmento de m/z 188, como verificado abaixo na figura 15.

Figura 13. Espectro de massas adquirido com o analisador do tipo *Ion trap* no modo positivo do íon fragmento m/z 203

Figura 14. Proposta para o mecanismo de fragmentação da licarina A protonada.

Figura 15. Espectro de massas adquirido com o analisador do tipo *Ion trap* no modo positivo do íon fragmento m/z 188

O fragmento de m/z 151 origina-se da abertura do anel furano, seguida da formação do íon acílio e eliminação da cadeia lateral, oriundos do íon m/z 327. As análises realizadas com um analisador do tipo *Ion Trap* revelaram que este fragmento forma-se apenas a partir do íon m/z 327 (ANEXO D). O fragmento de m/z 163 é originado pela abertura do anel furano levando a formação de um carbocátion secundário sendo esse estabilizado a partir da formação de uma dupla ligação, levando assim a formação desse fragmento. A migração de um hidrogênio da metila ligada ao anel furano, com posterior abertura desse anel e rompimento da ligação leva a formação do íon fragmento de m/z 137.

4.2 Sistemas de oxidação (reações biomiméticas)

4.2.1 Reações com metaloporfirinas e catalisador de Jacobsen

As reações foram realizadas utilizando como catalisadores uma metaloporfirina de primeira geração e Jacobsen (*S,S*-Salen), com diferentes combinações de solventes (DCM, AcOEt, MeOH e ACN) e agentes oxidantes (PhIO e *m*CPBA). Os dados de CG-EM (Figura 16) revelaram predominantemente a formação de um produto acrescido de 16 u (m/z 342), em relação a licarina A (m/z 326), denominado metabólito A.

Figura 16. Cromatograma obtido por CG-EM da reação FB.2 (AcOEt, [Fe(TPP)Cl] e *m*CPBA) após 24h de reação.

Em relação a eficiência dos catalisadores utilizados nas reações biomiméticas, observou-se que o catalisador de Jacobsen foi muito mais eficiente na produção do metabólito A (Gráfico 1), além dos solventes DCM e AcOEt determinar uma maior efetividade na formação desse metabólito. Sendo assim, solventes de menor polaridade determinaram a eficiência desse catalisador na geração do produto oxidado.

Esses resultados podem ter sido observados devido a pequena estabilidade de metaloporfirinas de primeira geração e a grande probabilidade de ocorrência de oxidação do seu núcleo macrocíclico, o que não ocorre com metaloporfirinas de 2^a geração; essas possuem substituintes eletronegativos nos anéis *meso*-aril, que aumentam sua eletrofilicidade e evitam a destruição autoxidativa do catalisador (BERNADOU & MUNIER, 2009).

Gráfico 1. Eficiência dos catalisadores em relação a produção do metabólito A nas reações de oxidação biomiméticas após 24h. A: DCM, B: AcOEt, C: MeOH e D: ACN; J: Jacobsen, F: [Fe(TPP)Cl], 1: PhIO e 2: *m*CPBA.

Em relação aos solventes polares, a eficiência do catalisador de Jacobsen pode variar dependendo se o solvente utilizado é prótico ou aprótico. O catalisador de Jacobsen na presença de PhIO como doador de oxigênio e MeOH como solvente não foi capaz de produzir o metabólito A. Estudos realizados com a oxidação biomimética da carbamazepina em metanol e etanol, apresentaram um rendimento mais baixo em comparação com o solvente ACN. Isto ocorreu devido a possibilidade do álcool poder atuar como um substrato, competindo assim com a carbamazepina pelas espécies catalíticas e conduzindo à formação de sub-produtos indesejados (LEODA MAC et al., 2007).

Ainda em relação ao catalisador de Jacobsen, é amplamente descrita a sua capacidade em promover a catálise de reações de epoxidação frente a doadores de oxigênio como PhIO e *m*CPBA (NIEHUES et al., 2012; HAVARE & PLATTNER, 2009; BRANDES & JACOBSEN, 1995), agentes oxidantes utilizados em nosso trabalho.

Nas reações (JC.1, FC.1, FC.2) (na presença de MeOH), não houve a formação do metabólito A (m/z 342). Nas reações que foram processadas em metanol, somente a reação JC.2 (Jacobsen, MeOH e *m*CPBA) foi capaz de gerar esse produto de oxidação. O solvente MeOH apresenta grande reatividade, podendo assim atuar como um bom nucleófilo, competindo com a licarina A pelas espécies catalíticas presentes e interferindo na oxidação

pelos respectivos doadores de monooxigênio (PhIO, *m*CPBA). Sendo assim, solventes de menor polaridade (DCM e AcOEt), foram muito mais eficientes na geração do metabólito A, sendo capaz de gerá-lo em todas as condições reacionais em que se utilizou esses solventes, o que não ocorreu com MeOH e ACN.

Um outro ponto que poderia interferir no rendimento da produção desse metabólito, seria a solubilidade do substrato, licarina A, nos solventes utilizados nas reações em testes. Contudo, a partir da execução de testes de solubilidade, observamos que a licarina A (na concentração de 2,5 mg/mL) é solúvel nos quatro solventes de escolha, sendo assim, a solubilidade do substrato em questão não interferiu na produção do metabólito A.

Dentre todas as reações realizadas e analisadas por CG-EM, destaca-se a reação JA.1 (Jacobsen, DCM e PhIO) que apresentou, além do metabólito A (m/z 342) em 25,4 minutos, outros metabólitos como demonstrado na figura 17 abaixo. Esses metabólitos incluem a adição de 16 *u* (um oxigênio), 32 *u* (dois oxigênios) e -2 *u* (formação de uma ligação dupla) em relação a licarina A (Tabela 7). Devido a efetividade dessa condição reacional na produção desses produtos de oxidação, a mesma foi selecionada para o estudo de cinética reacional, bem como da variação de concentração de oxidante por CG-EM.

Tabela 7. Produtos de oxidação (metabólitos) formados a partir do ensaio biomimético com catalisador de Jacobsen (Reação JA.1, cromatograma ilustrado na Figura 17)

Pico	TR	m/z
1	25,15	342
2	25,41 (metabólito A)	342
3	26,18	360
4	26,41	360
5	26,81	360
6	27,05	324

TR: tempo de retenção

Figura 17. Reação JA.1 (DCM, Jacobsen, PhIO) e a diversidade de produtos formados a partir do ensaio biomimético com catalisador de Jacobsen.

4.2.2 Cinética reacional e variação da concentração de oxidante

Os testes de cinética reacional, bem como os testes da variação da concentração de oxidante foram analisados por CG-EM. A reação JA.1 (Jacobsen, DCM, PhIO) foi a reação de escolha para a realização de ambos testes decorrente da sua maior diversidade de produtos de oxidação formados.

A porcentagem relativa do principal metabólito, produto de maior intensidade na reação (m/z 342), diminuiu com o aumento do tempo reacional. Dessa maneira, a reação de 24 horas favorece a formação desse metabólito, uma vez que os produtos de oxidação formados podem estar sofrendo degradações com a utilização de tempos reacionais elevados (Tabela 8).

Em relação a variação da concentração do agente oxidante (PhIO), os resultados encontram-se sumariados na Tabela 9. Os dados obtidos a partir dessas análises demonstraram que um excesso do doador de oxigênio acarreta redução no rendimento do produto oxidado, uma vez que a maioria do substrato foi consumido. Isto sugere a ocorrência de degradação, pois nos cromatogramas não foram observados picos cromatográficos adicionais com espectros de massas condizentes a possíveis metabólitos oxidados, quando comparado com a reação padrão JA.1 de 24 horas.

Portanto, a partir do momento em que se duplicou ou triplicou a concentração do agente oxidante PhIO utilizado, apesar do substrato ser intensamente consumido, não houve aumento da produção dos metabólitos oxidados da licarina A, o que justifica a realização dos nossos estudos em condições mais brandas (proporção de 1:30:30 de catalisador:substrato:oxidante), mas com tempos reacionais tipicamente mais longos (NIEHUES et al., 2012).

Tabela 8. Dados, obtidos por CG-EM, da cinética reacional e o rendimento do principal metabólito formado (m/z 342) na reação JA.1 (Jacobsen, DCM, PhIO)

Tempo reacional	Licarina A (% rel)*	Metabólito de m/z 342 (% rel)*
24h	78,4	2,3
48h	73,2	1,6
72h	74,5	1,3

*Porcentagem relativa de área.

Tabela 9. Resultados das variações da concentração do agente oxidante (PhIO) na produção do principal metabólito de m/z 342 A na reação JA.1 (Jacobsen, DCM, PhIO)

Concentração do Oxidante (μmol)	Licarina A (% rel)*	Metabólito de m/z 342 (% rel)*	Relação produto/substrato
30	58,87	4,02	0,07
60	21,43	13,59	0,63
90	11,50	10,64	0,92

*Porcentagem relativa de área.

As análises em CG-EM revelaram, em todas as reações, majoritariamente a formação de um metabólito de m/z 342 (TR 25,4 min), denominado metabólito A. Entretanto, algumas análises iniciais em CLUE-DAD-EM dessas reações revelaram a formação de outros metabólitos que não foram detectados no CG-EM. Assim, optou-se pela mudança de metodologia analítica (CLUE-DAD-EM/EM) com o intuito de verificar de maneira mais abrangente os produtos de oxidação formados bem como auxiliar no estudo de fragmentação da licarina A e seus produtos de oxidação por IES. A mudança de metodologia analítica permitiu a observação de uma maior diversidade de metabólitos

4.2.3 Análise por CLUE-DAD-EM/EM

A partir da determinação da melhor condição reacional por CG-EM, análises posteriores seguiram por CLUE-DAD-EM/EM com solventes de menor polaridade e com o catalisador de Jacobsen, mais eficazes na geração de metabólitos. Dentre as reações já realizadas, prossegui-se o trabalho com a reação JB-2 (catalisador de Jacobsen, AcOEt e *m*CPBA). Assim sendo, a partir dessa metodologia foi possível verificar a produção de sete metabólitos, que encontram-se sumariados na Tabela 10 e representados no cromatograma na figura 18 abaixo.

Figura 18. Cromatograma da reação JB-2 (catalisador de Jacobsen, acetato de etila e *m*CPBA) após 24h de reação e representação dos sete etabólitos produzidos a partir dessa reação.

Tabela 10. Metabólitos formados a partir da reação JB.2 nos modos de ionização positivo e negativo.

Metabólitos	TR (min)	Modo positivo	Modo negativo
		m/z $[M+H]^+$	m/z $[M-H]^-$
1	2,14	361	359
2	2,97	343	341
3	3,62	343	341
4	3,62	315	313
5	4,09	341	339
6	7,50	343	341
7	7,95	343	341

TR: tempo de retenção

4.2.3.1 Identificação do metabólito 1 (TR 2,14 min)

Figura 19. Estrutura química do metabólito 1

O espectro de massas do metabólito 1 (figura 19) apresentou os íons intensos de m/z 361 e 343 (Figura 21), mas a fragmentação do íon m/z 361 $[M+H]^+$ produziu os íons m/z 343 e 325, o que comprova que o metabólito possui massa molecular de 360. Estes íons são relativos a duas perdas sucessivas de 18 u (H_2O), como pode ser visualizado abaixo pelo espectro de massas adquirido com energia de colisão de 10 eV (Figura 22). Os mecanismos relativos a essas eliminações consecutivas de H_2O foram propostos e encontram-se ilustrados na figura 20.

Figura 20. Proposta de fragmentação do metabólito 1 (m/z 361, $[M+H]^+$) e suas respectivas perdas sucessivas de 18 u (H_2O)

O espectro de massas *tandem* do íon fragmento m/z 343 gerou os íons m/z 325, 219, 163 e 137 (Figura 23). O íon fragmento m/z 137 é similar ao mesmo íon advindo da

fragmentação da licarina A (Figura 14), o que indica que não houve alteração do anel furano, sendo o metabólito resultante de mudanças estruturais provenientes da oxidação da dupla ligação situada na cadeia lateral da licarina A. Após a primeira perda de H_2O , ocorre a formação do íon de m/z 343 que leva a formação do íon de m/z 219 através da eliminação do anel benzênico (não possuidor do substituinte em C-1' relativo a ligação dupla carbono-carbono ligado diretamente ao anel benzofurano). Isto representa um acréscimo de 16 u ao fragmento de m/z 203 da licarina A (Figura 14), confirmando tal modificação nessa parte da estrutura da licarina A.

Portanto, a partir dos dados obtidos para o metabólito 1 foi possível estabelecer que tal composto é formado pela oxidação da licarina A através da produção de um diol vicinal (Figura 19).

Figura 21. Espectro de massas do metabólito 1 (TR 2,14 min), (IES, modo positivo) gerado a partir da reação JB-2 (Jacobsen, acetato de etila e *m*CPBA)

Figura 22. Espectro de massas *tandem* do íon de m/z 361 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (metabólito 1) (IES, modo positivo, 10 eV) gerado a partir da reação JB-2 (Jacobsen, acetato de etila e *m*CPBA)

Figura 23. Espectro de massas *tandem* do íon m/z 343 $[M+H]^+$ (IES, modo positivo, 10 eV) gerado a partir da reação JB-2 (Jacobsen, acetato de etila e *m*CPBA).

4.2.3.2 Identificação dos metabólitos 2 (tr 2,97 min), 3 (tr 3,62 min), 6 (tr 7,50 min), e 7 (tr 7,95 min)

Figura 24. Estrutura química dos metabólitos 2-3 e 6-7

Os espectros de massas (**ANEXO B**) dos metabólitos 2, 3, 6 e 7 no modo de ionização positivo, exibiram íons que comprovaram a adição de 16 *u*, ou seja, a adição de um oxigênio na estrutura da licarina A, originando o metabólito m/z 343 $[M+H]^+$. As análises de EM/EM desses metabólitos foram realizadas e estão ilustradas nas Figuras 25-28.

Figura 25. Espectro de massas *tandem* do íon m/z 343 $[M+H]^+$ (metabólito 2) (IES, modo positivo, 10 eV) gerado a partir da reação JB-2 (Jacobsen, acetato de etila e *m*CPBA)

Figura 26. Espectro de massas *tandem* do íon m/z 343 $[M+H]^+$ (metabólito 3) (IES, modo positivo, 10 eV) gerado a partir da reação JB-2 (Jacobsen, acetato de etila e *m*CPBA)

Figura 27. Espectro de massas *tandem* do íon m/z 343 $[M+H]^+$ (metabólito 6) (IES, modo positivo, 10 eV) gerado a partir da reação JB-2 (Jacobsen, acetato de etila e *m*CPBA)

Figura 28. Espectro de massas *tandem* do íon m/z 343 $[M+H]^+$ (metabólito 7) (IES, modo positivo, 10 eV) gerado a partir da reação JB-2 (Jacobsen, acetato de etila e *m*CPBA)

O metabólito 3 (TR 3,62 min) foi isolado por CLAE em escala semipreparativa e sua estrutura foi determinada por RMN e EM. A descrição dessa determinação estrutural encontra-se no item 4.3.1, e a partir desses dados foi possível estabelecer que tal metabólito é formado pela epoxidação da ligação dupla carbono-carbono entre C-7' e C-8'. Assim, iniciou-se o estudo do perfil de fragmentação (Figura 29) desse metabólito para auxiliar na identificação dos demais metabólitos que poderiam ser isômeros deste já isolado, uma vez que a licarina A usada nos estudos biomiméticos constituía-se de mistura de enantiômeros.

Figura 29. Proposta de fragmentação do metabólito 3 (m/z 343 $[M+H]^+$), gerado a partir da epoxidação em C-7'/C-8'.

O espectro de massas *tandem* do íon m/z 343 $[M+H]^+$, referente ao metabólito 3, produziu os fragmentos de m/z 325, 219, 163 e 137, como representado pela figura 26. O íon fragmento m/z 325 é advindo da perda de 18 u (água), como representado na figura 29. A formação do íon fragmento m/z 219 ocorre a partir da eliminação de fenol. O íon fragmento m/z 137 é similar ao mesmo íon advindo da fragmentação da licarina A (Figura 14).

A partir dos dados fornecidos pelos espectros de EM/EM, pode-se observar que os 4 metabólitos acima citados possuem grande similaridade no perfil de fragmentação em relação ao íon m/z 343 $[M+H]^+$, que incluem a formação dos fragmentos m/z 325, 219, 163 e 137, como observado nos espectros de massas *tandem* representados pelas figuras 25-28. Assim sendo, conclui-se que os metabólitos 2, 3, 6 e 7 constituem-se de diastereoisômeros do metabólito epoxidado e identificado por RMN e EM (metabólito 3).

4.2.3.3 Identificação do metabólito 4 (TR 3,62 MIN)

Figura 30. Estrutura química do metabólito 4

Além do metabólito 3 de m/z 343 $[M+H]^+$ (TR 3,62 min), é possível visualizar a co-eluição de um outro metabólito (4) de m/z 315 $[M+H]^+$ e 313 $[M-H]^-$ observado em modo positivo e negativo (Figura 31), respectivamente, e portanto apresentando o mesmo tempo de retenção. A fragmentação do íon de m/z 343 $[M+H]^+$ (Figura 26), correspondente ao metabólito 3 (TR 3,62 min), não determinou a produção do íon de m/z 315, o qual foi fragmentado e produziu um espectro de massas em *tandem* diferente do observado para o íon m/z 343 (Figura 32). Portanto, esses dados sugeriram a co-eluição de dois metabólitos, o que foi posteriormente confirmado através do isolamento deste metabólito e caracterização por RMN e EM. A determinação estrutural deste metabólito através de dados de RMN e EM encontram-se descritos no item 4.3.2.

Figura 31. Espectro de massas do metabólito 4 (TR 3,62 minutos), nos modos de ionização positivo (A) e negativo (B).

O espectro de massas *tandem* do metabólito 4 exibiu fragmentos de m/z 191, 163 e 137 (Figura 32), os quais são os mesmos obtidos no equipamento com analisador do tipo Q-TOF através da infusão direta do metabólito isolado (Figura 33). A partir desses dados, pode-se concluir que o metabólito 4, correspondente a fração 6 isolada por CLAE em escala semipreparativa, constitui-se da formação de um aldeído benzóico (Figura 30).

Figura 32. Espectro de massas *tandem* do íon m/z 315 $[M+H]^+$ relativo ao metabólito 4 (TQ, IES, modo positivo, 10 eV) gerado a partir da reação JB-2 (Jacobsen, acetato de etila e *m*CPBA)

Figura 33. Espectro de massas *tandem* do íon m/z 315 $[M+H]^+$ relativo ao metabólito 4 isolado por CLAE em escala semipreparativa (IES, modo positivo, Q-TOF, 15eV).

4.2.3.4 Identificação dos metabólitos 5 (TR 4,09 MIN)

Figura 34. Estrutura química do metabólito 5

Os espectros de massas do metabólito 5 (TR 4,09 min) apresentaram íons de m/z 341 $[M+H]^+$ e m/z 339 $[M-H]^-$, obtidos nos modos de ionização positivo e negativo, respectivamente (**ANEXO B**). O espectros de espectros de massas *tandem* podem ser visualizados abaixo (Figuras 35-36).

Figura 35. Espectros de massas *tandem* do íon m/z 341 $[M+H]^+$ relativo ao metabólito 5 (TQ, IES, modo positivo, 10 (A) e 15 eV(B)) gerado a partir da reação JB-2 (Jacobsen, acetato de etila e *m*CPBA)

Figura 36. Espectro de massas *tandem* do íon m/z 339 $[M-H]^-$ relativo ao metabólito 5 (TQ, IES, modo positivo, 15 eV) gerado a partir da reação JB-2 (Jacobsen, acetato de etila e *m*CPBA)

Os dados observados para o metabólito 5 sugerem a formação de um aldeído na metila olefínica em C-9'. Li e Yang (2011) já relataram a formação deste produto de m/z 340 como um dos metabólitos gerados pelo ensaio de microsomas hepáticos de ratos, sendo esse produto constituído de um aldeído gerado a partir da oxidação de uma hidroxila terminal.

É possível ainda observar perdas de 18 u e 15 u (figura 35), no modo de ionização positivo originando os íons fragmentos m/z 323 e 308, sendo que essas eliminações estão de acordo com as descritas por Li e Yang (2011) para o metabólito (m/z 340). A partir dos dados expostos e confirmados pela literatura, pode-se inferir que o metabólito 5 constitui-se de um aldeído terminal gerado pela oxidação de um álcool primário a aldeído.

No modo de ionização negativo (figura 36), é possível visualizar duas perdas sucessivas de 15 u , levando a formação dos íons fragmentos m/z 324 e 309. Essas eliminações ocorrem possivelmente devido a perda radicalar das metilas das metoxilas ligadas aos carbonos 3 e 3', devido ao enfraquecimento da ligação O-C após a protonação, como discorrido por Cardozo e colaboradores (2008).

4.3 Identificação estrutural dos metabólitos oxidados isolados

4.3.1 Identificação estrutural do metabólito 3

Figura 37. Estrutura química do metabólito 3

A reação JD.1 (Jacobsen, ACN, PhIO) foi submetida ao isolamento de seus constituintes por CLAE em escala semipreparativa como descrito em Material e Métodos. O metabólito 3 foi isolado e analisado por RMN ^1H (Figura 40-41), COSY (Figura 42-43), HMQC (Figura 44) e HMBC (Figura 45-46) e EM (Figura 39). O espectro de massas do metabólito 3 exibiu um pico intenso de m/z 343,1522 $[\text{M}+\text{H}]^+$ em modo de ionização positiva, o que é compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{O}_5^+$, apresentando um erro de 5,2 ppm.

É importante destacar que o metabólito isolado apresenta grande instabilidade uma vez que foi possível detectar apenas sinais nos espectros de RMN de seus produtos de degradação, mas que confirmam a proposta para este metabólito oxidado da licarina A.

Este metabólito oxidado foi formado a partir da epoxidação da ligação dupla carbono-carbono entre as posições 7' e 8' da licarina A, como comprovado pela ausência dos sinais em δ 6,38 (*d*) e 6,13 (*dq*) relativos aos hidrogênios dessa ligação dupla (Figura 41).

Além disso, sinais de RMN ^1H e ^{13}C relativos ao anel furano foram observados no espectro, o que confirma a ausência de alteração nesta parte da estrutura da licarina A (Figura 44). Esses sinais foram estabelecidos com base nas correlações observadas nos espectros de COSY, HMQC e HMBC, os quais são relativos aos sinais dos produtos de degradação do metabólito isolado.

Figura 38. Deslocamentos químicos e correlações observadas nos COSY e HMBC relativos ao metabólito isolado.

A elucidação estrutural foi realizada por técnicas bidimensionais devido à formação de uma mistura, inclusive a formação de dióis, o que dificultou a interpretação dos dados de RMN ^1H . Por esta razão, apresentamos na figura 38, os sinais correspondentes a dois anéis furano destes produtos de degradação do metabólito isolado.

Alguns sinais, que confirmam a presença do diol nas posições 7' e 8', também foram observados (Figura 38). Assim, apresentamos os deslocamentos químicos que caracterizam esta parte da estrutura química, porém como alguns sinais apresentaram sobreposição devido à presença de diferentes produtos de degradação nesta amostra, foram ilustrados apenas os dados relativos a um destes produtos.

A epoxidação da licarina A, na ligação dupla carbono-carbono presente na cadeia lateral dessa molécula, leva a formação de um anel de três membros, que tem como característica grande tensão e consequentemente alta instabilidade, sendo propenso a catálise ácida e sucessiva abertura do anel (HAN et al., 2005, YOO et al., 2003).

Apesar de serem observados apenas sinais relativos aos produtos de degradação do metabólito 3, esses dados confirmaram a formação de um epóxido em C-7' e C-8', uma vez que o diol é produzido a partir do epóxido. Além disso, convém destacar que os picos coletados na separação por CLAE em escala semipreparativa foram acompanhados por EM, porém devido ao tempo necessário para a secagem da amostra e análise por RMN, tal metabólito isolado sofreu degradação.

Figura 39. Espectro de massas do metabólito 3 isolado (IES, modo positivo, Q-TOF)

Figura 42. Mapa de contornos COSY do metabólito isolado (CDCl_3 , 500 MHz)

Figura 43. Ampliação do mapa de contornos COSY do metabólito isolado (CDCl_3 , 500 MHz)

Figura 44. Mapa de contornos HMQC do metabólito isolado (CDCl_3 , 500 MHz)

Figura 45. Mapa de contornos HMBC- 8 Hz do metabólito isolado (CDCl_3 , 500 MHz)

Figura 46. Ampliação do mapa de contornos HMBC- 8 Hz do metabólito isolado (CDCl_3 , 500 MHz).

4.3.2 Identificação estrutural do metabólito 4

Figura 47. Estrutura química do metabólito 4

O metabólito 4 foi isolado através de CLAE em escala semipreparativa e o mesmo foi analisado por RMN e EM para a determinação de sua estrutura.

O espectro de RMN ^1H (Figuras 50 e 51) do metabólito 4 apresentou alguns sinais muito semelhantes aos observados para a licarina A, principalmente com relação aos sinais do anel aromático que contém o grupo hidroxila (Tabela 11). Os hidrogênios observados em δ 5,22 (*d*, $J = 9,3$ Hz), 3,53 (*m*) e 1,42 (*d*, $J = 6,8$ Hz) são condizentes aos sinais relativos ao furano, sendo atribuídos aos hidrogênios H-7, H-8 e H-9, respectivamente. Logo, pode-se inferir que não houve alteração nesta porção da estrutura da licarina A para a formação do metabólito 4.

Já os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C do anel aromático benzofurânico sofreram alterações significativas (Figura 48), bem como aqueles relacionados à ligação dupla em C-7' e C-8' da licarina A, uma vez que não foram mais observados esses sinais, juntamente com o H-9', nos espectros de RMN ^1H . Os sinais observados em δ 7,32 e 7,35 apresentaram-se como dubletos e foram atribuídos a H-6' e H-2'. Esses sinais exibem um efeito significativo de desblindagem sob esses hidrogênios, sugerindo a presença de um grupo retirador de elétrons o que provoca tal efeito.

Figura 48 Comparação entre alguns deslocamentos químicos (δ) observados para o metabólito 4 (500 MHz, CDCl_3) e a licarina A (400 MHz, CDCl_3).

Tabela 11 Dados de RMN de ^1H (δ) e ^{13}C (δ) do metabólito 4 isolado.

H/C	Metabólito 4		HMBC (8 Hz)
	^1H (δ) ^a	^{13}C (δ) ^{b,#}	
1	-	131,0	-
2	6,91 (<i>sl</i>)	109,0	C-2', C-5', C-6'
3	-	146,7	-
4	-	146,2	-
5	6,89 (<i>d</i> , $J = 8,4$ Hz)	114,3	C-4
6	6,87 (<i>dl</i> , $J = 8,4$ Hz)	120,1	C-1, C-7 C-2
7	5,22 (<i>d</i> , $J = 9,3$ Hz)	95,0	C-6, C-2, C-9
8	3,53 (<i>m</i>)	44,9	-
9	1,42 (<i>d</i> , $J = 6,8$ Hz)	17,7	-
1'	-	153,1	-
2'	7,35 (<i>d</i> , $J = 1,1$ Hz)	112,0	C-7', C-1', C-4', C-6'
3'	-	145,0	-
4'	-	144,8	-
5'	-	131,4	-
6'	7,32 (<i>d</i> , $J = 1,1$ Hz)	119,8	C-7', C-2', C-1'
7'	9,82 (<i>s</i>)*	190,7	-
OCH ₃ -3	3,87 (<i>s</i>)	56,0	C-3
OCH ₃ -3'	3,92 (<i>s</i>)	56,0	C-3'
OH	5,65 (<i>s</i>)	-	-

^a(500 MHz, CDCl₃); ^b(125 MHz, CDCl₃); #: δ obtidos a partir dos espectros de HMQC e HMBC, *sinal observado mesmo após a adição de gotas de D₂O.

Além desses sinais relatados, também foi observado um singlete em δ 9,82, o qual foi visualizado no espectro mesmo após a adição de gotas de D₂O, e revelou correlação com o carbono em δ 190,7 no espectro de HMQC (Figura 52). Esses dados, juntamente com o peculiar deslocamento químico observado para a carbonila, sugerem a presença de um aldeído conjugado, sendo este ligado diretamente ao anel aromático benzofurano. Tal proposta foi confirmada a partir de importantes correlações observadas no espectro de HMBC (Figuras 53 e 54) como, por exemplo, entre H-2' (δ 7,35) e C-7' (δ 190,7) e H-6' (δ 7,32) com C-7' (δ 190,7) (Figura 49).

Figura 49. Correlações observadas no mapa de contornos HMBC (8 Hz) do metabólito 4

Por fim, o metabólito 4 foi submetido a análise por EM de alta resolução e seu espectro encontra-se ilustrado na Figura 55. O espectro de massas do metabólito 4 exibiu um pico mais intenso de m/z 315,1232 $[M+H]^+$ em modo de ionização positiva, o que é compatível com a fórmula molecular $C_{18}H_{19}O_5^+$, apresentando um erro de 1,6 ppm.

Portanto, a partir da análise de todos os dados observados para o metabólito 4, foi possível confirmar que tal metabólito é formado por uma oxidação e formação de um aldeído benzóico, como visualizado na Figura 47.

Figura 50. Espectro de RMN de 1H do metabólito 4 isolado ($CDCl_3$, 500 MHz). * Sinal observado após a adição de D_2O .

Figura 51. Ampliação do espectro de RMN de 1H do metabólito 4 isolado ($CDCl_3$, 500 MHz).

Figura 52. Mapa de contornos HMQC do metabólito 4 isolado (CDCl_3 , 500 MHz).

Figura 53. Mapa de contornos HMBC- 8 Hz do metabólito 4 isolado (CDCl_3 , 500 MHz)

Figura 54. Ampliação do mapa de contornos HMBC- 8 Hz do metabólito 4 isolado (CDCl_3 , 500 MHz).

Figura 55. Espectro de massas do metabólito 4 isolado (IES, modo positivo, Q-TOF)

4.4 Estudo da estabilidade da licarina a após 24h na presença dos solventes

É de grande importância a determinação da estabilidade do substrato diante das reações de oxidação realizadas, sendo assim a licarina A foi mantida sob agitação em frascos de 4,5 mL, perfazendo um volume final de solvente (AcOEt e DCM) de 4 mL por um período de 24h. Os solventes AcOEt e DCM foram escolhidos devido a sua maior eficiência catalítica, comparados aos solventes de maior polaridade, como demonstrado pelo gráfico 1. Com base nesses resultados, pode-se inferir que a licarina A não apresentou nenhum produto de degradação (Figura 56), permanecendo inalterada ao fim desse tempo reacional (mesmo intervalo de tempo utilizado nas reações biomiméticas com metaloporfirinas e catalisador de Jacobsen).

Figura 56. Cromatograma da licarina A após 24h de exposição nos solventes DCM (diclorometano) e AcOEt (acetato de etila)

4.5 Ensaio com microsossomas hepáticos de ratos

Diversos parâmetros foram avaliados no ensaio de microsossomas hepáticos de ratos. Primeiramente, realizou-se a variação do tempo de incubação da substância teste com o meio microsossomal, sendo analisados os tempos reacionais de 5, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos. O tempo de 120 minutos foi o mais efetivo na geração de metabólitos a partir do substrato, licarina A, como já reportado por Li e Yang (2011).

As concentrações de 1 mg/mL e 2 mg/mL de licarina A (em acetonitrila) foram avaliadas no intervalo de 2 horas de incubação, contudo não houve mudança no resultado, sendo assim optou-se pela utilização da concentração da substância teste de 1 mg/mL. Outro parâmetro avaliado que tem grande representatividade nos resultados obtidos é com relação a metodologia de extração final. Foram realizados os ensaios de extração com acetato de etila (extração líquido-líquido) e ainda o método de precipitação proteica a partir da adição de acetonitrila e posterior extração com hexano. Os mesmos resultados foram obtidos para a produção do metabólito 2 (TR 2,9 min) como pode ser observado na (figura 57). Logo, a extração com acetato de etila foi escolhida devido a minimização com relação a diluição da amostra que ocorre após adição de acetonitrila ao meio reacional e posterior partição com hexano.

Figura 57. Cromatogramas das reações da licarina A (concentração 1mg/mL) com microsossomas de ratos após o tempo incubação de 2 horas. As reações analisadas foram submetidas a extração com acetonitrila (A) e acetato de etila (B), com destaque para o metabólito 2 (TR 2,9 e m/z 343 $[M+H]^+$).

Convém destacar, que o metabólito 2 (TR 2,9 minutos) foi formado apenas na reação com os microsossomas não sendo visualizado a sua produção na amostra controle, a qual é constituída da ausência dos cofatores reacionais (Figura 58). Sendo assim, o metabólito formado constitui-se da ação do sistema de metabolismo *in vitro* em teste (microsossomas hepáticos de ratos).

Figura 58. Cromatogramas do controle reacional (sem cofatores) (A) e da reação com microsossomas hepáticos de ratos (B) ambos obtidos a partir da extração com AcOEt e tempo de incubação de 2h.

Uma outra informação concerne-se no fato de que o metabólito 2 (produto de oxidação) produzido pelo ensaio de metabolismo *in vitro* com microsossomas hepáticos de ratos também foi produzido pelo ensaio biomimético. O metabólito 2 (TR 2,97 min) observado nas reações com microsossomas hepáticos de ratos, apresentou no espectro de massas (Figura 59) no modo positivo os íons m/z 343 $[M+H]^+$, 365 $[M+Na]^+$, 381 $[M+K]^+$ e 325, sendo este último advindo da perda de 18 u (desidratação). Já no modo de ionização negativo, esse metabólito apresentou um íon de m/z 341 $[M-H]^+$, como representado pela (Figura 60) abaixo. Nos ensaios biomiméticos realizados, e já citados, temos a formação de isômeros de um produto epoxidado (metabólito) m/z 343 $[M+H]^+$ que apresenta o mesmo espectro de UV (Figura 61) e TR do metabólito gerado pelo ensaio de microsossomas hepáticos de ratos. Logo,

pode-se inferir que o ensaio de microsomas hepáticos de ratos determinou a produção de um metabólito de m/z 343 $[M+H]^+$, correspondente ao metabólito 2, produzido também pelas reações biomiméticas. Dessa forma, o sistema de oxidação com metaloporfirinas foi capaz de reproduzir o sistema de oxidação com microsomas hepáticos de ratos.

Figura 59. Espectro de massas do metabólito 2 (TR 2,97 min) produzido a partir do ensaio com microsomas hepáticos de ratos (ESI, modo positivo, TQ).

Figura 60. Espectro de massas do metabólito 2 (TR 2,97 min) produzido a partir do ensaio com microsomas hepáticos de ratos a partir da extração com AcOEt e tempo de incubação de 2h (ESI, modo negativo, TQ).

Figura 61. Espectro de ultravioleta (UV) do metabólito 2 (TR* 2,97 min) produzido pelas reações biomiméticas (A) e a partir do ensaio com microsomas hepáticos de ratos a partir da extração com AcOEt e tempo de incubação de 2h (B).

4.6 Estudo de toxicidade aguda oral da licarina A

O estudo de toxicidade aguda oral da licarina A foi realizado segundo metodologias preconizadas pelo protocolo da OECD 420 (*Organization for Economic Cooperation and Development*) (OECD, 2001). Esse protocolo preconiza a avaliação de sinais de toxicidade aguda oral a partir da administração de doses fixas pré-determinadas de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg, sendo dividido em duas etapas, que consistem do estudo de observação e o estudo principal.

O estudo de observação fundamenta-se em um estudo inicial realizado a partir da administração de doses fixas pré-determinadas, segundo o fluxograma apresentado pelo (ANEXO C), sendo o objetivo principal desse estudo a seleção da dose apropriada para a realização do estudo principal. O estudo principal constitui-se da administração da dose estabelecida pelo estudo de observação a um grupo de 5 animais (do mesmo sexo) e acompanhamento dos mesmos por um período de 14 dias. É importante salientar que doses que causem morte no estudo de observação não são repetidas no estudo principal.

No estudo de observação realizado para a determinação da dose, o teste inicial utilizando a dose de 300 mg/kg foi selecionado. O animal sob essa dosagem apresentou algumas evidências de toxicidade tais como: respiração acelerada, movimentação comprometida (letargia), sono, salivação e diarreia. Esse experimento foi novamente repetido e o animal na dose de 300 mg/kg continuou apresentando evidências de toxicidade,

eliminando a possibilidade da toxicidade ser advinda de uma variação biológica do animal e sim proveniente da administração da licarina A (300 mg/kg). Dessa maneira, optamos por trabalhar com essa dose no estudo principal, conforme determinado pelo protocolo e exemplificado pelo fluxograma da figura 62, ilustrado no anexo C. Segundo esse fluxograma, caso o animal sob administração de uma dose de 300 mg/kg morra, é necessário a realização de novo teste em dose menor (50 mg/kg) já determinada pelo protocolo. O mesmo ocorre caso não haja toxicidade evidente na dose de 300 mg/kg, sendo necessária nova gavagem em uma dose de 2000 mg/kg a partir da utilização de um novo animal. Caso seja notado evidências de toxicidade que incluem alterações no pelo e pele, olhos, alterações nos aparelhos respiratório, circulatório, Sistema Nervoso Central (convulsões), e/ou alterações comportamentais, a dose de 300 mg/kg será utilizada para o estudo principal, como ocorreu em nosso estudo, sendo a dose de 300 mg/kg selecionada.

Figura 62. Fluxograma do teste de observação do ensaio de toxicidade aguda oral, segundo o protocolo estabelecido pela OECD 420 (2001).

Sendo assim, o estudo principal foi conduzido a partir da administração de uma solução de licarina A em PEG (300mg/kg) por gavagem a 5 animais (camundongos machos adultos, Balb/C), sendo esses observados por um período de 14 dias.

Após 50 minutos da administração, um dos cinco animais (animal 2) apresentou as seguintes alterações: pelo (o pelo do animal ficou eriçado), alteração respiratória (aumento na

frequência respiratória), aumento dos batimentos cardíacos e alteração comportamental (o animal permaneceu sem movimentação e isolado dos demais presentes na mesma gaiola), além de tremores, letargia e sono. Esse animal foi então eutanasiado, como determinado pelo protocolo, autopsiado e seus órgãos retirados e devidamente armazenados a -80°C .

Os 4 animais restantes foram observados individualmente, após os primeiros minutos e periodicamente durante as 24 horas, com uma atenção especial durante às 4 primeiras horas. Posteriormente, os animais que foram observados também foram pesados no intervalo de 3 em 3 dias por um período de 14 dias. Os pesos desses animais encontram-se ilustrados no gráfico 2. Foi possível observar que esses animais não apresentaram variação significativa de peso.

Gráfico 2. Variação do peso dos animais (camundongos machos – linhagem: Balb/c) durante o teste principal do ensaio de toxicidade aguda oral por um período de 14 dias

A partir desse resultado, em que houve somente uma evidência de toxicidade, a licarina A (300 mg/kg) foi classificada e incluída na categoria 4, segundo o sistema GHS (Sistema Harmonizado Globalmente para a Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos), como representado pela figura 63. Esse sistema classifica as substâncias em categorias, sendo essas substâncias em estudo designadas para uma das cinco categorias apresentadas, no qual a categoria 1 é a mais severa em toxicidade e a categoria 5 a menos severa.

A licarina A é pertencente a categoria 4, a qual é classificada por produzir uma toxicidade aguda oral em uma dose $> 300\text{mg/kg}$ e $\leq 2000\text{ mg/kg}$. O fluxograma abaixo (Figura 63) detalha a interrupção do estudo, seguida da classificação da licarina A em sua respectiva categoria. Como o estudo principal apresentou um animal com evidência de toxicidade (sendo o mesmo eutanasiado), o estudo foi encerrado e a licarina A, incluída na categoria 4 (a partir da administração de uma dose de 300 mg/kg). Caso houvesse um número maior ou igual a 2 mortes, teríamos a classificação em categoria 3, sendo a substância tóxica em uma dose $> 50\text{ mg/kg}$ e $\leq 3000\text{ mg/kg}$. Caso não houvesse nenhum sinal de toxicidade, outros 5 animais necessitariam de nova gavagem em uma dose de 2000 mg/Kg (ANEXO C).

Figura 63. Fluxograma do teste principal do ensaio de toxicidade aguda oral, segundo o protocolo estabelecido pela OECD 420 (2001).

4.7 Determinação dos parâmetros bioquímicos após administração da licarina a em camundongos

A partir da conclusão do ensaio de toxicidade aguda oral, realizou-se o estudo da influência da licarina A na variação dos parâmetros bioquímicos séricos relacionados aos seguintes perfis: renal, lipídico e hepático; após tratamento dos animais com a dose de 300 mg/kg por um período de 24h.

Os animais foram divididos em três grupos: animais controle (CONT) (sob administração do veículo PEG), animais tratados (TRAT) (aqueles que receberam licarina A

em conjunto ao veículo) e animais não tratados (NT) (os quais não foram administrados nem veículo e nem substância teste).

Em relação ao perfil lipídico dos animais, pode-se observar que os animais tratados apresentaram uma redução dos níveis do colesterol LDL (*Low Density Lipoprotein*) (gráfico 3) quando comparados ao controle e aos não tratados. Esse resultado está relacionado à ação da licarina A uma vez que a diminuição do valor de LDL ocorreu apenas quando a neolignana foi administrada. Nos animais controle, ocorreu um ligeiro aumento na concentração deste parâmetro, contudo este resultado pode não ser expressivo e significativo. É importante ressaltar que todos os resultados obtidos não possuem valores de desvio ou outros parâmetros estatísticos calculados, pois as amostras analisadas foram obtidas a partir da formação de um *pool* de 5 animais, devido ao volume necessário para a realização das análises. Em relação aos níveis do colesterol HDL (*High Density Lipoprotein*), foi possível observar que o mesmo manteve-se constante após administração de licarina A (Gráfico 3). Assim, esses resultados sugerem uma possível atividade cardioprotetora da licarina A, estabelecida pela diminuição do colesterol LDL, o qual é extremamente aterogênico (MOTTA, 2003) contribuindo para a diminuição do risco de aterosclerose coronariana.

Além disso, o colesterol VLDL e triglicérides também foram avaliados, uma vez que estes estão intimamente correlacionados. O colesterol VLDL está relacionado a quantidade de triglicérides presentes no sangue. Isso pode ser notado pelos resultados adquiridos em que se observa o mesmo perfil de dosagem para estes dois parâmetros. Nos animais controle e tratado houve um aumento dos índices do colesterol VLDL e triglicérides. Os triglicérides são transportados pelo colesterol VLDL e representam a principal forma de armazenamento de energia para o homem. O excesso de glicose no sangue poderia acelerar a produção de triglicérides, contudo isso não foi visualizado, visto que os animais tratados com licarina A apresentaram uma diminuição do valor de glicemia (Gráfico 4), quando comparados aos grupos não tratados e controle. Por fim, a dosagem de colesterol total representado pela soma de suas frações LDL, HDL e VLDL foi realizada e não permitiu uma conclusão do risco ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (aterosclerose e doença arterial coronariana) devido a semelhança de resultados apresentados pelos animais não tratados e tratados com a licarina A, por isso a importância em se trabalhar com a dosagem de suas frações e não somente o colesterol total.

Gráfico 3. Perfil lipídico sérico dos animais tratados com licarina A (TRAT), não tratados (NT) e o controle (CONT) que foi administrado apenas o veículo PEG por um período de 24h. PEG: polietilenoglicol 300, , HDL: Lipoproteína de alta densidade – *High Density Lipoprotein*, LDL: Lipoproteína de baixa densidade – *Low Density Lipoprotein*, VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade – *Very Low Density Lipoprotein*.

Gráfico 4. Níveis de glicose dos animais tratados (TRAT), não tratados (NT) e do controle (CONT) que foi administrado apenas o veículo PEG.

Em relação a possíveis alterações ou danos renais, os parâmetros bioquímicos creatinina, ácido úrico e ureia foram determinados com o intuito de avaliar tais alterações. A creatinina e ureia são resultantes do metabolismo de proteínas e constituem-se de determinações padrões para avaliação de danos renais, sendo que um aumento de seus níveis sanguíneos está relacionado à dificuldade da eliminação do ativo (MOTTA, 2003).

Os animais controle e tratados (Gráfico 5) exibiram uma diminuição nos valores sanguíneos de creatinina, o que não representa grande alteração e significância clínica. Em relação à ureia, não houve variação significativa em relação ao grupo não tratado (Gráfico 5). Desta maneira, a licarina A (300 mg/kg) e o veículo (PEG) aparentemente não contribuíram para nenhum dano renal. É importante ficar atento aos valores de ureia, visto que os mesmos também podem estar diretamente relacionados a danos hepáticos (DEVLIN, 1998). A redução dos valores relacionados a ureia podem indicar hepatopatia grave, visto que a uréia é sintetizada no fígado a partir do catabolismo de proteínas e então excretada pelos rins.

O ácido úrico avalia, além das funções renais, algumas condições patológicas como, por exemplo, a gota. Foi possível visualizar um pequeno aumento dos níveis de ácido úrico nos animais controle e tratado (Gráfico 5), contudo esses dados não sugerem nenhuma relevância clínica e podem não possuir significância estatística. Níveis relativamente aumentados de ácido úrico podem indicar alguns quadros patológicos, além do comprometimento renal, como também gota, diabetes mellitus e hipertensão arterial.

Gráfico 5. Perfil renal dos animais tratados (TRAT), não tratados (NT) e do controle (CONT) que foi administrado somente o veículo (PEG) por um período de 24h.

Por fim, as determinações dos parâmetros bioquímicos hepáticos como TGO/AST (aspartato amino-transferase), TGP/ALT (alanina amino-transferase), LDH (Lactato Desidrogenase) e ALP (Fosfatase Alcalina) foram realizadas com o intuito de se investigar uma possível hepatotoxicidade (Gráfico 6).

O fígado é responsável por inúmeras funções conhecidas como: metabólicas, secretoras, excretoras, armazenamento, protetoras, circulatórias e coagulação sanguínea (MOTTA, 2003). Assim, uma disfunção hepática pode acarretar consequências ao bom funcionamento do organismo. Essa disfunção pode ser mensurada a partir de diferentes testes, sendo esses capazes de detectarem anormalidades na função hepática, determinando o tipo e local da lesão ocorrida (MOTTA, 2003). Os danos hepáticos severos podem ainda ser visualizados de forma indireta pela redução dos níveis de uréia, devido à deficiência hepática na conversão de amônia (NH_3) como já mencionado anteriormente, e ainda por uma hipoglicemia gerada por uma gliconeogênese e/ou glicogenólise prejudicada. (DEVLIN, 1998)

Foi possível observar uma redução dos níveis glicêmicos dos animais controle e principalmente nos tratados com a licarina A (Gráfico 4). Esses dados podem sugerir um comprometimento hepático inicial, em conjunto com as alterações dos níveis séricos de ALT (alanina amino-transferase) e AST (aspartato amino-transferase) (Gráfico 6). As transaminases (AST e ALT) são enzimas indicadoras de morte celular e que existem em quantidades pequenas no sangue, contudo após uma extensa destruição celular tem seus valores aumentados (MOTTA, 2003). Elas estão presentes, além das células hepáticas, nas cardíacas, musculares e no pulmão (MOTTA, 2003). Sendo assim, o aumento dos níveis séricos de transaminases podem indicar danos musculares, respiratórios e principalmente hepáticos.

Outra enzima investigada como possível causadora de danos hepáticos foi a lactato desidrogenase (LDH). Os valores de LDH encontram-se elevados nos animais controle e tratados com licarina A, além disso ocorreram ainda alterações dos níveis de ALT e AST, o que representa um indício de possíveis alterações do fígado.

Dessa maneira, o tratamento com a licarina A na concentração de 300 mg/kg pode representar danos hepáticos a partir do estudo e análise dos parâmetros bioquímicos (ALT, AST, ALP e LDH). Contudo, estudos com um número maior de indivíduos, a inclusão de outros parâmetros que evidenciam danos hepáticos, e que utilizam outras técnicas, como, por exemplo, análise histológica do fígado devem ser realizados para comprovarem tal toxicidade da licarina A.

Assim sendo, a evidência de toxicidade apresentada no teste de toxicidade aguda oral (14 dias), foi capaz de gerar alterações hepáticas, contudo não foi capaz de comprometer parâmetros lipídicos bem como os renais. Isto poderia ser justificado, por exemplo, pelo uso não contínuo do substrato em estudo no teste em questão, sendo necessários estudos mais prolongados, levando em consideração o tempo e a frequência que os animais ficariam expostos ao fármaco em teste.

Gráfico 6. Perfil hepático dos animais tratados (TRAT), não tratados (NT) e do controle (CONT) que foi administrado o veículo por um período de 24h. TGO/AST (aspartato amino-transferase), TGP/ALT (alanina amino-transferase), LDH (Lactato Desidrogenase), ALP (Fosfatase Alcalina).

4.8 Análise histológica dos órgãos (fígado, rim e pulmão) após 14 dias de administração da licarina A

As análises histológicas das figuras 64 e 65 mostraram que nos órgãos (rim, coração e fígado) a organização tecidual foi preservada, não sendo observadas características de lesão tecidual como necrose, infiltrado leucocitário e fibrose.

Esses resultados sugerem que as alterações enzimáticas hepáticas verificadas no estudo dos parâmetros bioquímicos não foram correlacionados a uma lesão tecidual do fígado. Desta forma, estudos de toxicidade crônica são necessários para avaliar o efeito da licarina A sobre o fígado e sobre os marcadores da função hepática.

Figura 64. Imagens de cortes histológicos dos órgãos (rim, coração e fígado) do animal controle e do animal após gavagem com licarina A, decorrido 14 dias * aumento de 20 x

Figura 65. Imagens de cortes histológicos dos órgãos (rim, coração e fígado) do animal controle e do animal após gavagem com licarina A, decorrido 14 dias ** aumento de 40 x

5. CONCLUSÃO

A licarina A sintetizada constitui-se de uma mistura de enântiômeros (confirmada pelos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C) com excesso enantiomérico e com pureza cromatográfica de 98%.

A partir de análises por CG-EM foi possível a visualização de um metabólito majoritário de m/z 342 denominado metabólito A. Esse metabólito constitui-se da adição de 16 u à licarina A. Foi ainda possível determinar a partir dessas análises que solventes mais apolares (AcOEt e DCM) assim como o catalisador de Jacobsen foram mais eficazes nas reações de oxidação. A cinética reacional bem como a variação da concentração do agente oxidante justificaram a proporção utilizada (1:30:30 - catalisador:oxidante:substrato), bem como o tempo reacional de escolha (24h).

A mudança de metodologia analítica para CLUE-DAD-EM/EM foi determinante para a caracterização estrutural dos metabólitos formados, bem como a visualização de outros produtos formados. Assim, 7 metabólitos foram detectados e estes exibiram íons de m/z 361 $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 341 $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 343 $[\text{M}+\text{H}]^+$ e m/z 315 $[\text{M}+\text{H}]^+$. O metabólito 1, m/z 361 $[\text{M}+\text{H}]^+$, constitui-se de um diol vicinal formado na ligação dupla em C-7'/C-8' da licarina A e apresentou em seu espectro de massas *tandem* duas perdas sucessivas de água (-18u) originando os íons fragmentos m/z 343 e m/z 325, além dos íons fragmentos m/z 219, 163 e 137, que reforçam efetivamente a não alteração do anel furano, sendo o metabólito resultante de mudanças estruturais provenientes da oxidação da dupla ligação situada na cadeia lateral da licarina A. Outros metabólitos denominados (2, 3, 6 e 7) de m/z 343 $[\text{M}+\text{H}]^+$ também apresentaram perda de 18u, além dos íons fragmentos 219, 163 e 137. Esses metabólitos constituem-se de diastereoisômeros do metabólito 3 (correspondente a epoxidação da ligação C-7'/C-8' da licarina A, a qual foi confirmada após a análise por RMN da fração advinda do isolamento por CLAE em escala semipreparativa). O metabólito 4 corresponde a um metabólito de m/z 315 $[\text{M}+\text{H}]^+$, que coeluiu com o metabólito 3 no TR de 3,62 min. Esse metabólito constitui-se de um aldeído benzóico formado no anel aromático benzofurano e foi identificado como a fração 6 do isolamento por CLAE em escala semipreparativa. Por fim, o metabólito 5, foi correspondente a um produto de oxidação m/z 341 $[\text{M}+\text{H}]^+$, pela formação de um aldeído, a partir da oxidação de um álcool terminal.

Dessa forma, a partir do isolamento por CLAE em escala semipreparativa foi possível a determinação estrutural de dois metabólitos, a partir da aplicação das técnicas de RMN e EM, sendo esses correspondentes a fração 4 (epoxidação da dupla ligação da cadeia lateral da

licarina A) e a fração 6 (aldeído). Além, disso foi possível sugerir a formação de outros metabólitos a partir do estudo do perfil de fragmentação desses compostos.

O metabolismo *in vitro* a partir de reações biomiméticas (com metaloporfirinas e catalisador de Jacobsen) foi ainda comparado com o metabolismo *in vitro* a partir da utilização de microsomas hepáticos de ratos. O mesmo metabólito (metabólito 2) foi produzido em ambas reações, o qual foi identificado se tratar de um diastereoisômero do metabólito 3 (epóxido formado nos carbonos C-7'/C-8' da licarina A).

Em relação à toxicidade aguda do substrato, foi possível concluir que a licarina A na dose de 300 mg/kg apresentou evidência de toxicidade, sendo classificada como uma substância pertencente a categoria 4 pelo sistema GHS, apresentando possivelmente hepatotoxicidade nessa dose (em um intervalo de 24h), sugeridos pelas análises dos parâmetros bioquímicos hepáticos, as quais não foram correlacionadas com nenhum tipo de lesão tecidual visto que a análise histopatológica dos órgão (rim, coração e fígado) após um período de 14 dias pós administração da licarina A não determinou alterações patológicas nesses tecidos não sugerindo toxicidade renal, hepática ou cardíaca nesse intervalo de tempo.

6. REFERÊNCIAS

- ABE, F.; NAGAFUJI, S.; YAMAUCHI, T.; OKADE, H.; MAKI, J.; HIGO, H.; AKAHANE, H.; AGUILAR, A.; JIMENEZ-ESTRADA, M.; REYES-CHILPA, R. Evaluation of some Mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in guaco roots of *Aristolochia taliscana*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, vol. 25, p. 1188-1191, 2002.
- AMATO, V.S.; PADILHA, A.R.S; NICODEMO, A.C; DUARTE, M.I.S; VALENTINI, M.; U.I.P., D.E; BOULOS, M.; AMATO, V.N. Use of Itraconazole in the Treatment of mucocutaneous Leishmaniasis: A Pilot Study, **International Journal of Infectious Diseases**, vol. 4, p. 153-157, 2000.
- BARATA, L.E.S.; SANTOS, L.S.; FERRI, P.H.; PHILLIPSON, J.D.; PAINE, A.; CROFT, S.L. Antileishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. **Phytochemistry**, vol. 55, p. 589–595, 2000.
- BARBOSA-FILHO, J.M., YOSHIDA, M., GOTTLIEB, O.R. Lignoids from *Nectandra amazonum* and *N. glabrescens*. **Phytochemistry**, vol.28, p. 1991. 1989.
- BARBOSA-FILHO, M.J; DA-CUNHA, L.V.E; SILVA, S.M. Complete assignment of the ¹H and ¹³C spectra of some lignoids from Lauraceae. **Magnetic Resonance in Chemistry**. vol.36, p. 929-935, 1998.
- BARROS, L.F.L., BARISON, A., SALVADOR, M.J., CABRAL, E.C., EBERLIN, M.N., STEFANELLO, M.E.A. Constituents of the Leaves of *Magnolia ovata*. **Journal of Natural Products**, vol. 72, p. 1529–1532, 2009.
- BASTOS, J.K.; BURANDT, C.L.; NANAYAKKARA, N.P.D.; BRYANT, L.; MCCHESENEY, J.D. Quantification of Aryltetralin lignans in plant parts and among different populations of *Podophyllum peltatum* by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Natural Products**, vol. 59, p. 406–408, 1996.
- BECKE, A. D. A new mixing of hartree-fock and local density-functional theories. **Journal of Chemical Physics**, vol. 98, p. 1372, 1993
- BERNADOU, J; MEUNIER, B. Biomimetic Chemical Catalysts in the Oxidative Activation of Drugs. **Advanced Synthesis & Catalysis**, vol.346, p. 171-184, 2004.
- BRANDES, B.D.; JACOBSEN, E.N. Enantioselective Catalytic Epoxidation of Tetrasubstituted Olefins. **Tetrahedron Letters**, vol. 36, n°. 29, p. 5123-5126, 1995.
- BRANDON, E.F.A.; RAAP, C.D.; MEIJERMAN, I.; BEIJNEN, J.H.; SCHELLENS, J.H. M. An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. **Toxicology and Applied Pharmacology**, vol. 189, p. 233–246, 2003.

- CABRAL, M.M.O., BARBOSA-FILHO, J.M., MAIA, G.L.A., CHAVES, M.C.O, BRAGA, M.V., DE SOUZA, W., SOARES, R.O.A. Neolignans from plants in northeastern Brazil (Lauraceae) with activity against *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, vol. 124, p. 319–324, 2010.
- CALDWELL J. Stereochemical determinants of the nature and consequences of drug metabolism. **Journal of Chromatography A**, vol. 694, p. 39–48, 1995.
- CARDOZO, K.H.M.; VESSECCI, R.; CARVALHO, V.M.; PINTO, E.; GATES, P.J.; COLEPICOLO, P.; GALEMBECK, S.E.; LOPES, N.P. A theoretical and mass spectrometry study of the fragmentation of mycosporine – like amino acids. **International Journal Mass Spectrometry**. vol. 273, p. 11-19, 2008.
- CHIRAC, P.; TORRELE, E. Global framework on essential health R&D. **The Lancet**, vol. 367, n. 9522, p. 1560-1561, 2006.
- COLOMA, G.A., ESCOUBAS, P., MIZUTANI, J., LAJIDE, L. Insect growth inhibitors from *Machilus japonica*. **Phytochemistry**, vol. 35. n° 3, p. 607-610. 1994.
- COY, D.E., CUCA, E.L., SEFKOW, M. COX, LOX and platelet aggregation inhibitory properties of Lauraceae neolignans. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, vol.19, p. 6922–6925, 2009.
- DARDARI, Z.; LEMRANI, M.; BAHLOUL, A.; SEBBAN, A.; HASSAR, M.; KITANE, S.; BERRADA, M.; BOUDOUMA, M. Antileishmanial activity of a new 8-hydroxyquinoline derivative designed 7-[5'-(3'-phenylisoxazolino)methyl]-8-hydroxyquinoline: preliminary study. **IL Farmaco**, vol. 59, p. 195-199, 2004.
- DEMICHELI, C.; FRÉZARD, F.; LECOUEY, M.; GARNIER-SUILLEROT, A. Antimony (V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1570, p. 192-198, 2002.
- DEVLIN, T M. Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas – tradução da 4ª edição americana, Ed. Edgard Blucher Ltda, 1998.
- DÍAZ, J.L. Usos de las plantas medicinales de México. **Monografías científicas III**, 1st ed., IMEPLAM, México, pp. 204, 1976.
- EKINS, S.; RING, B. J.; GRACE, J.; McROBIE-BELLE, D. J.; WRIGHTON, S. A. Present and future in vitro approaches for drug metabolism. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 44, p. 313-324, 2000.

- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA'S policy statement for the development of new stereoisomeric drugs. *Chirality*; vol.4, p. 338–40, 1992.
- FRISCH, M. J., G. et al., Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.
- GIANG, P.M., SON, P.T., MATSUNAMI, K., OTSUKA, H. New Neolignans and Lignans from Vietnamese Medicinal Plant *Machilus odoratissima* NEES. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, vol. 54(3), p. 380-383, 2006
- GONSALVES, A.D.M.R.; PEREIRA, M.M., State of the art in the development of biomimetic oxidation catalysts. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, vol.113, p.209–221, 1996.
- GOTTLIEB, O.T.; YOSHIDA, M., Lignóides: Com Atenção Especial à Química das Neolignanas. **Química Nova**, p. 250-269, 1984.
- GROVES, J.T.; NEMO, T.E.; MYERS, R.S. Hydroxylation and epoxidation catalyzed by iron-porphine complexes. Oxygen transfer from iodosylbenzene. **Journal of American Chemical Society**, v. 101, p. 1032-1033, 1979.
- GROVES, T.J. High-valent iron in chemical and biological oxidations. **Journal of Inorganic Biochemistry**. vol. 100, p. 434–447, 2006.
- GUIMARÃES, C.A., SANTOS, M.C., MORAES, M. Efeitos da β -polinitração na eficiência catalítica de ruteneoporfirinas em reações de oxidação de cicloexano. **Química Nova**, vol.27, p.199-205, 2004.
- GUNTER, M.J.; TURNER, P. Metalloporphyrins as models for the cytochromes P-450. **Chemical Reviews**, vol.108, p.115–160, 1990.
- HALL, R.L. Toxicants occurring naturally in spices and flavours. In: **Food Protection Committee, National Research Council**, editors. Toxicants occurring naturally in foods, 2nd edition. Washington DC: National Academy of Sciences, p. 448–463, 1973.
- HAN, H.J; HONG, J.S; LEE, Y.E; LEE, H.J; KIM, J.H; KWAK, H. Conversion of Epoxides into trans-Diols or trans-Diol Mono-Ethers by Iron(III) Porphyrin Complex 4. **Bulletin of the Korean Chemical Society**. vol. 26, n 9, 2005.
- HATTORI M, YANG XW,MIYASHIRO H, NAMBA T. Inhibitory effects of monomeric and dimeric phenylpropanoids from mace on lipid peroxidation in vivo and in vitro. **Phytotherapy Research**; vol. 7, p. 395–401, 1993.

- HATTORI, M; HADA S; WATAHIKI A; IHARA, H; SHU, Y.Z; KAKIUCHI, N et al. Studies on dental caries prevention by traditional medicines: Antibacterial action of phenolic components from mace against *Streptococcus mutans*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, vol. 3, p. 3885–93, 1986.
- HAVARE, N., PLATTNER, D.A. Selectivity Enhancement for the *Jacobsen – Katsuki* Epoxidation in Fluorinated Solvents. **Helvetica Chimica Acta**, vol. 92, p. 623-628, 2009.
- HOTEZ, P.J.; MOLYNEUX, D.H.; FENWICK, A.; KUMARESAN, J.; SACHS, S.E.; SACHS, J.D.; SAVIOLI, L. Control of neglected tropical diseases. **New England Journal of Medicine**, vol. 357, p. 1018–1027, 2007.
- JEWERS, K., MANCHANDS, A.H., ROSE, H.M., em *Progress in Medicinal Chemistry* (E.P.Ellis e E.B.West, eds.), p.33, Butterworths, London, 1971
- JIN, D.Q; LIM, C.S; WANG, J.K; HA, I.; HAN, J.S. Anti-oxidant and anti-inflammatory activities of macelignan in murine hippocampal cell line and primary culture of rat microglial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol.331, p.1264–1269, 2005.
- LEE, C. T & YANG. Development of the colle-salveti correlation-energy formula into a functional of the electron-density. **Physical Review B**, vol.37, p.785, 1988
- LEE, S.U., SHIM, K.S., RYU, S.Y., MIN, Y.K, KIM, S.H. Machilin A Isolated from *Myristica fragrans* Stimulates Osteoblast Differentiation. **Planta Medica**, vol.75, p. 152-157, 2009
- LEODA MAC, T.C.O.; BARROS, V.P.; FARIA, A.L.; SCHIAVON, M.A.; YOSHIDA.; I.V.P.; QUEIROZ, M.E.C., ASSIS, M.D.; Jacobsen catalyst as a P450 biomimetic model for the oxidation of an antiepileptic drug, **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, vol.273, p. 259–264, 2007
- LEÓN-DÍAZ et al. Antymicobacterial neolignans isolated from *Aristolochia taliscana*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 105 (1), p. 45-51, 2010
- LÉON-DIAZ, R., MECKES-FISCHER, M., VALDOVINOS-MARTÍNEZ, L., CAMPOS, M.G., HERNÁNDEZ-PANDO, R., JIMÉNEZ-ARELLANES, M.A. Antitubercular Activity and the Subacute Toxicity of (-)-Licarin A in BALB/c Mice: A Neolignan Isolated from *Aristolochia taliscana*. **Archives of Medical Research** vol. 44, p. 99-104, 2013.
- LEOPOLD, B. **Acta Chemica Scandinavica**. vol. 4, p. 1523-1537; 1950.

- LI, F., YANG, W.X. Simultaneous Determination of Diastereomers (+)-Licarin A and Isolicarin A from *Myristica fragrans* in Rat Plasma by HPLC and its Application to their Pharmacokinetics. **Planta Medica**, vol. 74, p. 880–884, 2008.
- LI, F.; YANG, W. X. Metabolism of the Lignan Dehydrodiisoeugenol in Rats. **Planta Medica**, vol. 77, p. 1712–1717, 2011.
- LOHMANN, W.; KARST, U. Biomimetic modeling of oxidative drug metabolism: Strategies, advantages and limitations. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, vol. 391, p. 79-96, 2008.
- LUCAS, H. J.; KENNEDY, E. R.; FORMO, M. W.; BAUNGRATEM, H. E. eds.; **Organic Synthesis Collective**, John Willey & Sons: New York., vol.3, p. 483; 1955.
- MA, C.J., KIM, R.S., KIM, J., KIM, Y.C. Meso-dihydroguaiaretic acid and licarin A of *Machilus thunbergii* protect against glutamate-induced toxicity in primary cultures of a rat cortical cells. **British Journal of Pharmacology**, vol.146, p. 752–759, 2005.
- MA, C.J., SUNG, S.H. & KIM, Y.C. Neuroprotective Lignans from the bark of the *Machilus thunbergii*. **Planta Medica**, vol. 70, p. 78-80, 2004.
- MAC LEOD, T.C.O., FARIA, A.L., BARROS, V.P., QUEIROZ, M.E.C., ASSIS, M.D. Primidone oxidation catalyzed by metalloporphyrins and Jacobsen catalyst. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, vol. 296, p. 54-60, 2008.
- MACRAE, W.D.; TOWERS, G.H.N. Biological activities of lignans. **Phytochemistry**, vol. 23, p. 1207–1220, 1984.
- MANSUY, D. A brief history of the contribution of metalloporphyrin models to cytochrome P450 chemistry and oxidation catalysis, **Comptes Rendus Chimie** 10 (4-5): 392-413, 2007.
- McCHESNEY, J.D.; VENKATARAMAN, S.K.; HENRI, J.T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, vol. 68, p. 2015-2022, 2007.
- MEUNIER, B. Metalloporphyrin as versatile catalysts for oxidation reactions and oxidative DNA cleavage. **Chemical Reviews**, vol. 92, p.1411–1456, 1992.
- MEUNIER, B.; ROBERT, A.; PRATVIEL G. Metalloporphyrins in catalytic oxidations and oxidative DNA cleavage. In: KADISH, K. M.; SMITH, K. M.; GUILARD, R. **The Porphyrin Handbook**. New York: New York Academic Press, vol.4, cap. 31, p.119-187, 2000.

- MIL'ANOVA, C; HUTTA, M. Role of biological matrices during the analysis of chiral drugs by liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**; vol. 797, p. 91– 109, 2003.
- MILDER, I. E., ARTS, I. C., PUTTE, B., VENEMA, D. P., & HOLLMAN, P. C. Lignan contents of Dutch plant foods: a database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol. **British Journal of Nutrition**, vol. 93, p. 393–402, 2005.
- MONTELLANO, O.R.P. Cytocrome P-450: Structure, Mechanism e Biochemistry, second ed. Plenum Publishers, New York, 2005.
- MORITA, T.; JINNO, K.; KAWAGISHI, H.; ARIMOTO, Y.; SUGANUMA, H.; INAKUMA, T.; SIGIYAMA, K. Hepatoprotective effect of myristicin from nutmeg (*Myristica fragrans*) on lipopolysaccharide/ β -galactosamine-induced liver injury. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 51, p. 1560-1565, 2003.
- MOTTA, V.T. Bioquímica Clínica para o Laboratório: Princípios e Interpretações. 4ªed. Porto Alegre: Editora Médica Missau; São Paulo: Robe editorial, EDUCS – Caxias do Sul, 2003.
- MUKHERJEE, P.K.; KUMAR, V.; HOUGHTON, P.J. Screening of Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Phytotherapy Research**, vol. 21, p. 1142-1145, 2007.
- MURAKAMI, Y.; SHOJI, M.; HIRATA, A.; TANAKA, S.; YOKOE, I.; FUJISAWA, S. Dehydrodiisoeugenol, an isoeugenol dimer, inhibits lipopolysaccharide-stimulated nuclear factor kappa B activation and cyclooxygenase-2 expression in macrophages. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 434, p. 326-332, 2005.
- NASCIMENTO, I.R., LOPES, L.M.X., DARVIN, L.B., LEWIS, G.N. Stereoselective Synthesis of 8,9-Licarinediols. **Tetrahedron**, vol. 56, p. 9181-9193, 2000.
- NÉRIS, P.L.N., CALDAS, J.P.A, ROGRIGUES, Y,K,S., AMORIM, F.M., Patrícia L.N., LEITE, J.A., MASCARENHAS, S.R., BARBOSA-FILHO, J.M., RODRIGUES, L.C., OLIVEIRA, M.R. Neolignan Licarin A presents effect against *Leishmania (Leishmania) major* associated with immunomodulation *in vitro*. **Experimental Parasitology**. vol.135, p. 307-313, 2013.
- NIEHEUS, M; BARROS, V.P; EMERY, S.F, DIAS-BARUFFI, M; ASSIS, D.M; LOPES, P.N. Biomimetic in vitro oxidation of lapachol: A model to predict and analyse the in vivo phase I metabolism of bioactive compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, vol.54, p.804-812, 2012.
- NWAKA, S.; RIDLEY, R. G.; Virtual drug discovery and development for neglected diseases through public–private partnerships. **Nature Reviews Drug Discovery**, vol.2, p.919-928, 2003.

- OECD. Guideline for testing of chemicals. Acute Oral Toxicity – **Fixed Dose Procedure** n°420, 2001.
- PALARETTI, V.; SANTOS, S.J.; GUEDES, C.F.D.; MORAES, B.A.L.; ASSIS, D.M. Metalloporphyrins as cytochrome P450 models for chlorhexidine metabolite prediction. **Applied Catalysis A: General**, vol. 447–448, p.7–13, 2012.
- PARK, B.Y.; MIN, B.S.; KWON, O.K.; OH, S.R.; AHN, S.K.; Kim, T.J.; KIM, D.Y.; BAE, K.; LEE, H.K. Increase of caspase-3 activity by lignans from *Machilus thunbergii* in HL-60 cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, vol. 27, p. 13051307, 2004.
- PEREIRA, A.C.; MAGALHÃES, L.G.; JANUÁRIO, A.H.; PAULETTI, P.M.; CUNHA, W.R.; BASTOS, J.K.; NANAYAKKARAC, D.N.; SILVA, M.L. Enantiomeric resolution of (±)-licarin A by high-performance liquid-chromatography using a chiral stationary phase. **Journal of Chromatography A**, vol. 1218, p. 7051-7054, 2011.
- PUTTER, J. Methods of Enzymatic Analysis; **Verlag Chemie**, Academic: New York, p. 685–690, 1974.
- REEDIJK, J.; BOUWMAN, E. **Bioinorganic Catalysis**. [S.1]: Marcel Dekker, Incorporated, 1999.
- SERENO, D.; HOLZMULLER, P.; LEMESTRE, J. L. Efficacy of second line drugs on antimonyl- resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. **Acta Tropica**, v. 74, p. 25-31, 2000.
- SHELDON, R.A. Metalloporphyrins in catalytic oxidations, 1ªed. New York: Marcel Deckker, Inc. ch. 1, 1994.
- THE STATE PHARMACOPOEIA COMMISSION OF P. R. CHINA. **CHIN PHARMACOPOEIA** Beijing: Chemical Industry Press; vol.1, p.102–3, 2005.
- THOMPSON, L. U., BOUCHER, B. A., LIU, Z., COTTERCHIO, M., & KREIGER, N. Phytoestrogen content of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans and coumestan. **Nutrition and Cancer**, vol.54, p.184–201, 2006
- UMEZAWA, T.; OKUNISHI, T.; SHIMADA, M. Stereochemical diversity in lignin biosynthesis. **Wood Research**, vol. 84, p. 62–72, 1997.
- VALSTA, L. M., KILKKINEN, A., MAZUR, W., NURMI, T., LAMPI, A. M., OVASKAINEN, M. L., et al., Phyto-oestrogen database of foods and average intake in Finland. **British Journal of Nutrition**, vol. 89, p.31–38., 2003

- VAN, G.C; COX, P.A. Ethnobotany of nutmeg in the spice islands. **Journal Ethnopharmacology**, vol. 42, p. 117–24, 1994.
- VANDENBERGHE, A.; MARKÓ, I.E.; LUCACCIONI, F.; LUTTS, S. Enantioselective hydrolysis of racemic 1-phenylethyl acetate by an enzymatic system from fresh vegetables. **Industrial Crops and Products**, vol.42, p. 280-385, 2013.
- VESSECCHI, R., GALEMBECK, S. E., LOPES N. P., NASCIMENTO, P. G. B. D., CROTTI, A. E. M. Application of computational quantum chemistry to chemical processes involved in mass spectrometry. **Química Nova. Nova**, vol.31, p.840. 2008
- WARD, R.S. The synthesis of lignans and neolignans. **Chemical Society Reviews**, vol. 11, p. 75–125, 1982.
- WHO, Technical Report Series n° 341, Organização Mundial da Saúde, Genebra, 1966.
- WILLIAMS, R.T. Detoxication mechanisms: The metabolism and detoxication of drugs. **Toxics Substances and Other Organic Compounds**, 2a. Ed., J Wiley & Sons Inc.: Nova Iorque, EUA, 1959.
- YAN, K; SONG, H; LO, M. Determination of MK-0767 enantiomers in human plasma by normal phase LC–MS/MS. **Journal of Chromatography B**; vol. 813, p. 95–102, 2004.
- YANG, S.; KYUN, N.M.; JANG, J.P.; KIM, K.A.; KIM, B.Y.; SUNG, N.J.; OH, W.K.; AHN, J.S. Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B by lignans from *Myristica fragrans*. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 680-682, 2006.
- YANG, W.X; HUANG, X; MA, L; WU, Q; XU, W. The Intestinal Permeability of Neolignans from the Seeds of *Myristica fragrans* in the Caco-2 Cell Monolayer Model. **Planta Medica**, vol. 76, p. 1587–1591, 2010.
- YOO, K.S; HAN, H.J; LEE, J.S; RYU, Y.J; KIM, W.S; JIN, W.S; KIM, Y NAM, W. Conversion of olefins into trans-diols or trans-diol mono-ethers by using iron porphyrin(III) complex and H₂O₂. **Inorganic Chemistry Communications**, vol.6, p. 1148–1151, 2003.
- ZHANG, H.J.; TAMEZ, P.A.; HOANG, V.D.; TAN, G.T.; HUNG, N.V.; XUANG, L.T.; HUONG, L.M.; CUONG, N.M.; THAO, D.T.; SOERJANO, D.D.; FONG, H.H.S.; PEZZUTO, J.M. Antimalarial compounds from *Rhaphidophora decursiva*. **Journal of Natural Products**, vol. 66, p. 772–777, 2001.
- ZHOU, S.; KOH, H.L.; GAO, Y.; GONG, Z.Y.; LEE, E.J.D. Hebal bioactivation: the good, the bad and the ugly. **Life Sciences**, vol. 74, p. 935-968, 2004.

ANEXOS

ANEXO A - Caracterização da licarina A

Figura 1. Cromatograma da licarina A sintetizada obtido por CLUE-DAD ($\lambda = 280$ nm)

Figura 2. Espectro de RMN de ^1H da licarina A sintetizada (CDCl_3 , 400 MHz)

Figura 3. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da licarina A sintetizada (CDCl_3 , 400 MHz)

Figura 4. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da licarina A sintetizada (CDCl_3 , 400 MHz)

Figura 5. Espectro de RMN de ^{13}C da licarina A sintetizada (CDCl_3 , 100 MHz)

Figura 6. Espectro de RMN de DEPT^o135 da licarina A sintetizada (CDCl₃, 100 MHz)

Figura 7. Espectro de massas (Q-TOF) da licarina A (IES, modo positivo)

Figura 8. Espectro de massas (Q-TOF) da licarina A (IES, modo negativo)

Figura 9.Espectro de massas *tandem* (Q-TOF) da licarina A sintetizada (IES, 20eV, modo negativo)

ANEXO B – Espectros de massa nos modos de ionização positivo e negativo (IES, 10 eV, TQ) gerados a partir da reação JB-2 (Jacobsen, acetato de etila e *m*CPBA)

Figura 10. Espectro de massas do metabólito 2 m/z 343 $[M+H]^+$ nos modos de ionização positivo e negativo no TR 2,97 min.

Figura 11. Espectro de massas do metabólito 3 m/z 343 $[M+H]^+$ nos modos de ionização positivo e negativo no TR 3,62 min

Figura 12. Espectro de massas do metabólito 4 m/z 343 $[M+H]^+$ nos modos de ionização positivo e negativo no TR 3,62 min

Figura 13. Espectro de massas do metabólito 5 m/z 341 $[M+H]^+$ nos modos de ionização positivo e negativo no TR 4,09 min.

Figura 14. Espectro de massas do metabólito 6 m/z 343 $[M+H]^+$ nos modos de ionização positivo e negativo no TR 7,5 min

Figura 15. Espectro de massas do metabólito 7 m/z 343 $[M+H]^+$ nos modos de ionização positivo e negativo no TR 7,9 min

ANEXO C: Fluxograma dos estudos de toxicidade aguda oral da oecd 420 (2001)

Figura 16. Fluxogramas do estudo de observação

ANEXO C: Fluxograma dos estudos de toxicidade aguda oral da oecd 420 (2001)

Figura 17. Fluxogramas do estudo principal

ANEXO D: Espectro de massas da licarina a analisado por *ion trap* nos modos positivo e negativo de ionização

MODO POSITIVO

Figura 18. Espectro de massas da licarina A no modo de ionização positivo (m/z 327)

Figura 19. Espectro de massas *sequencial* da licarina A (m/z 327)

Figura 20. Espectro de massas sequencial do íon m/z 203 no modo de ionização positivo

Figura 21. Espectro de massas sequencial do íon m/z 267 no modo de ionização positivo

Figura 22. Espectro de massas sequencial do íon m/z 188 no modo de ionização positivo

MODO NEGATIVO

Figura 23. Espectro de massas da licarina A (m/z 325) no modo de ionização negativo

Figura 24. Espectro de massas sequencial do íon m/z 325 no modo de ionização negativo

Figura 25. Espectro de massas sequencial do íon m/z 310 no modo de ionização negativo

Figura 26. Espectro de massas sequencial do íon m/z 295 no modo de ionização negativo

ANEXO E- Aprovação do comitê de ética para estudos *in vivo*

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 09.1.112.53.4), intitulado “Desenvolvimento de Medicamento de Uso Tópico para o Tratamento de Leishmaniose Cutânea Utilizando Modelos Estruturais da Biodiversidade Brasileira”, de autoria de **Leandro de Santis Ferreira** e de **Norberto Honorato Prestes Junior**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 04/02/2009.

This is to certify that the work (Protocol number 09.1.112.53.4), entitled: “Desenvolvimento de Medicamento de Uso Tópico para o Tratamento de Leishmaniose Cutânea Utilizando Modelos Estruturais da Biodiversidade Brasileira”, by **Leandro de Santis Ferreira** and **Norberto Honorato Prestes Junior**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, February 04, 2009.

Ribeirão Preto, 31 de maio de 2011.

Presidente da CEUA
Profa.Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro

SOUZA, J. N. P. Estudos preliminares de metabolismo *in vitro* utilizando reações biomiméticas com metaloporfirinas e toxicidade aguda da licarina A. 2013. 97 f. **Dissertação (Mestrado em Toxicologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.**

ERRATA

Folha **Parágrafo/linha**

Onde se lê

Leia-se

3 Figura 1

16 Parágrafo 4

Após houve adição de 30 mL

Após houve adição de 30 µL

2' 6,81 (s) – 109,5

2' 6,79 (s) – 113,4

26 Tabela 6

6' 6,79 (s) – 113,4

6' 6,81 (s) – 109,5

DCM e AcOEt determinar uma maior efetividade
na formação desse metabólito

DCM e AcOEt foram capazes de produzir o metabólito
majoritário em todas condições reacionais

32 Parágrafo 1

38

Figura 20

43

Figura 29

43 Parágrafo 2

ocorre a partir da eliminação de fenol

65 Parágrafo 1

a partir da formação de um *pool* de 5 animais

72 Parágrafo 1

Uma mistura de enantiômeros (confirmada pelos deslocamentos químicos de ¹H e ¹³C)

ocorre a partir da eliminação de *ortometóxfenol*a partir da formação de um *pool* de 6 animais

Uma mistura de enantiômeros (confirmada pelos estudos de [α]_D²⁵)