



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Avaliação das atividades antibacteriana e antiparasitária de análogos prenilados do artepillin C e estudo de suas reações de fragmentação em fase gasosa por espectrometria de massas sequencial”

Tatiana Manzini Vieira

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2023



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Avaliação das atividades antibacteriana e antiparasitária de análogos prenilados do artepillin C e estudo de suas reações de fragmentação em fase gasosa por espectrometria de massas sequencial”

Tatiana Manzini Vieira

Orientador: Prof. Dr. Antônio Eduardo Miller Crotti

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Vieira, Tatiana Manzini

Avaliação das atividades antibacteriana e antiparasitária de análogos prenilados do artepillin C e estudo de suas reações de fragmentação em fase gasosa por espectrometria de massas sequencial. Ribeirão Preto, 2023.

194 p.: il.; 30cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química Orgânica.

Orientador: Crotti. Antônio Eduardo Miller.

1. Artepillin C. 2. Própolis 3. Atividade antibacteriana. 4. Atividade antiparasitária 5. Química de íons em fase gasosa.

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

Theodore Roosevelt

Dedicatória

Ao meu pai Aloísio e à minha mãe Márcia, por todos os conselhos, apoio, paciência e carinho, que me fizeram ter forças para continuar lutando pelo meu sonho de tornar-me doutora; por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos, tanto nos bons como nos ruins, além de me aconselharem e de me orientarem a sempre seguir o caminho correto; por serem as pessoas em que tento espelhar-me todos os dias; por nunca terem desistido dos meus sonhos; por compartilharem comigo angústias, alegria e, principalmente, amor! A vocês dois todo o meu amor, carinho e saudade – saudade esta que agora me acompanha todos os dias por estarem vivendo em outra cidade;

Ao meu marido, Hebert, que me acompanhou nesses quatro árduos anos, período em que quis desistir em muitos momentos. Ele deu-me forças para continuar a jornada; incentivando-me, tendo paciência e dedicando-me sempre muito amor, carinho e companheirismo. Uma pessoa por quem sempre tive orgulho e admiração pela força de vontade e por jamais desistir; por ter se tornado o melhor marido e pai que nossa filha poderia ter (não é à toa que ela é a cara dele); por lutar tanto por nós, mesmo quando não está bem. Obrigado por ser aquele com quem quero viver o resto dos meus dias. Foi graças a você, que sempre me motivou, que consegui chegar até aqui;

À minha filha Maria Eduarda, que no meio de tantos percalços, veio para fortalecer-me, para lutar pelo melhor que eu poderia oferecer a ela, que sempre me acompanhou “grudadinha”, compartilhando sua alegria diária e fazendo-me ainda mais feliz. A pessoinha mais gostosa e risonha do mundo, que me fez forte e capaz de alcançar meus sonhos. Se eu consegui chegar até aqui, foi graças a ela! Obrigada por acreditar em mim, filha! Você é a razão dessas páginas!

Aos meus amigos e familiares, que mesmo não estando sempre presentes, estiveram ao meu lado, dando-me forças e amor durante esses quatro anos, por mais difíceis que tenham sido, por tudo o que são e, principalmente, por sempre me motivarem.

Agradecimentos

A Deus, por ouvir-me em todas as minhas orações nesses últimos quatro anos, que foram extremamente difíceis e desafiadores para mim, e por manter-me saudável física e emocionalmente para enfrentar os obstáculos que surgiram, especialmente no último ano, por mais difíceis que tenham sido;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antônio Eduardo Miller Crotti, cuja dedicação e paciência durante todos esses anos serviram como pilares de sustentação para o meu crescimento profissional. Agradeço por todos os conhecimentos compartilhados, tanto no âmbito profissional como no pessoal. Seus conselhos e “puxões de orelhas” e, especialmente, seu posicionamento durante o desenvolvimento desse projeto, proporcionaram-me oportunidades para amadurecer e me prepararam para uma oportunidade de emprego em uma empresa renomada. Obrigada, também, por confiar em meu trabalho e na minha capacidade de gerir o laboratório enquanto estava fora do país em seu estágio sabático e, principalmente, por permitir-me continuar exercendo essa função mesmo após seu retorno ao laboratório. GRATIDÃO demais a tudo o que você fez por mim e continua fazendo, Miller! Apesar das minhas falhas como aluna, espero ter atingido as suas expectativas.

À minha grande amiga/irmã, Thaís Oliveira (Jade), presente eterno da USP, que esteve comigo no mesmo barco nesses quatro anos de doutorado, ouvindo minhas frustrações e desabafos, mas sempre acreditando em mim e dando-me forças para não desistir. Obrigado por sempre dividir comigo as tarefas do laboratório, pelas horas e horas juntas no HPLC e por toda nossa vida fora do laboratório. Obrigada por cuidar da Madu sempre que precisei e por ser uma pessoa na qual me inspiro todos os dias, pela sua força de vontade e foco. Obrigada, minha amiga linda e maravilhosa!

À minha irmã do coração, Camila Moura, que mesmo não estando na USP sempre foi ouvido para meus momentos mais tristes. Obrigada por dividir também todas suas tristezas e desafios diários; por aguentar-me quando nem eu me aguentava; por cuidar e fazer bagunça com a Madu, por ser essa pessoa maravilhosa que tenho tanto amor e orgulho e por ser a melhor médica veterinária do mundo inteiro. Obrigada “pirizinha”, por toda amizade, amor e companheirismo nesses anos juntas!

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins e seus alunos, pelo grande empenho na realização dos ensaios antimicrobianos e pela atenção dedicada nos momentos de dúvida;

À Prof. Dra. Lizandra Guidi Magalhães (Universidade de Franca) e aos seus alunos, pelo empenho nos ensaios antiparasitários, pela amizade e parceria;

Ao Dr. Eduardo José Crevelin, pelo empenho em ajudar-me e ensinar-me durante os experimentos de espectrometria de massas, sempre com muita paciência e bom humor, e principalmente; pelas horas gastas arrumando os BOs do HPLC e pelas risadas e conselhos enquanto estávamos congelando fazendo os experimentos. Que tenhamos grandes oportunidades de trabalhar juntos futuramente. Obrigada, por tudo!

À Jaqueline, pelo empenho na aquisição dos dados de alta resolução e MSⁿ, além de toda atenção dada sempre que precisei;

Ao Prof. Dr. Paulo Marcos Donate, por todos os ensinamentos sobre Síntese Orgânica e pela oportunidade de realizar minha iniciação científica com bolsa;

Ao Me. Vinícius Palaretti, pela amizade e, principalmente, prestatividade e cuidado com os experimentos de ressonância magnética nuclear. Obrigado por ser sempre acessível e disposto a ajudar-me sempre que precisei;

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes, que sempre permitiu-me utilizar o HPLC e o GC-MS em todas as vezes que precisei, e por todos os ensinamentos e conselhos durante esses quatro anos;

Ao Prof. Dr. Ricardo Vessecchi, por todo o ensinamento de Química Computacional e pelo empenho e disponibilidade na realização dos cálculos computacionais deste trabalho. Obrigado por toda prestatividade, pelas explicações e pelos grandes conselhos durante meu exame de qualificação.

Aos alunos de iniciação científica e de pós-graduação que passaram pelo Laboratório de Síntese Orgânica, Lívia, Ana Carla, Júlia, Giovane, Felipe, Sara, Jackson, Richard, Rebeca, Murilo e Yan. A vocês agradeço pelos dias que passamos juntos, pelas horas e horas sofridas de calor intermitente dentro do laboratório, por todo o conhecimento compartilhado, pelos nossos deliciosos almoços no sushi, pelas

risadas que tornavam nossos dias menos árduos e, principalmente, pela amizade, que levarei comigo para sempre;

Aos meus grandes amigos Herbert, Wesley e Kimie, que estiveram comigo (mesmo morando a quilômetros de distância) e acompanharam-me em todos os momentos, sempre me aconselhando. Vocês são pessoas maravilhosas, das quais tenho um orgulho gigante. Muito obrigada por toda a amizade!

Aos funcionários do Departamento de Química, pela dedicação em seu trabalho. Meu grande agradecimento, em especial aos técnicos Vinicius Banhos, Celso, Geraldo, ao pessoal da secretaria (Fernando, Lâmia e André), pela prestatividade e eficiência em todos os momentos em que mais precisamos deles, principalmente no laboratório. E um agradecimento especial à Lozane, pela prestatividade, pelos empréstimos de reagentes sempre que precisei e por ser uma pessoa muito especial para o departamento;

A todos os familiares, que de alguma forma estiveram presentes, principalmente pelo incentivo nesse período;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Proc. Fapesp 2019/11700-0), pela concessão da bolsa, sem a qual este trabalho não teria sido possível.

Sumário

Universidade de São Paulo.....	2
Lista de Figuras.....	Erro! Indicador não definido.
Lista de Tabelas.....	15
Lista de Esquemas.....	16
Lista de Anexos.....	17
Lista de Abreviaturas.....	19
1. Introdução.....	21
1.1. Cárie e Doenças Tropicais Negligenciadas.....	22
1.1.1. Cárie.....	22
1.1.2. Esquistossomíase.....	23
1.1.3. Leishmaniose.....	25
1.2. Espectrometria de massas com ionização por eletrospray.....	27
1.2.1. Ionização por eletrospray.....	27
1.2.2. Espectrometria de massas sequencial (MS/MS) e de múltiplos estágios (MS ⁿ).....	29
1.3. Própolis e artepillin C.....	32
1.3.1. Importância comercial da própolis.....	32
1.3.2. Artepillin C.....	34
1.3.2.1. Atividades biológicas.....	34
1.3.2.2. Síntese do artepillin C.....	35
1.3.3. Estudos por ESI-MS/MS do artepillin C.....	36
2. Objetivos.....	38
3. Materiais e Métodos.....	40
3.1. Reagentes, solventes, métodos e equipamentos.....	41
3.2. Síntese do artepillin C e seus derivados.....	42
3.2.1. Síntese do <i>p</i> -cumarato de metila.....	42
3.2.2. Síntese dos fenilpropanoides prenilados 1, 5, 9 and 11.....	43
3.2.3. Síntese dos compostos 3, 7 e 14.....	45
3.2.4. Síntese dos compostos 4, 6, 8, 12 e 15.....	45
3.2.5. Síntese dos compostos 10 e 13.....	46
3.3. Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> contra bactérias cariogênicas.....	47
3.3.1. Micro-organismos utilizados.....	47
3.3.2. Preparo das soluções, meios de cultura e inóculos.....	47
3.3.3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo.....	48

3.4. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM).....	49
3.5. Docking molecular.....	50
3.5.1. Abordagem computacional.....	50
3.5.1.1. Preparações de ligantes e alvos.....	50
3.5.1.2. Protocolo e validação do método de ancoragem.....	50
3.5.1.3. Simulação de Dinâmica Molecular (MD).....	51
3.5.1.4. Avaliação ADME-Tox.....	51
3.6. Ensaio antiparasitários.....	51
3.6.1. <i>Schistosoma mansoni</i> (LE).....	51
3.6.2. <i>Leishmania amazonensis</i>	52
3.7. Estudos das vias de fragmentação dos compostos 1-15 por ESI-MS/MS.....	52
3.7.1. Análises de amostras de própolis por UPLC-MS/MS.....	53
3.7.2. Métodos computacionais.....	54
4. Resultados e Discussão.....	55
4.1. Sobre a síntese dos 1-15.....	56
4.1.2. Síntese e isolamento dos compostos 1, 5, 9 e 11.....	56
4.1.3. Otimização das condições reacionais para obtenção do composto di- <i>C</i> -prenilado (1).....	58
4.2. Elucidação estrutural.....	62
4.2.1. Elucidação estrutural do artepillin C e seus derivados.....	63
4.3. Atividade antibacteriana.....	78
4.4. <i>Docking</i> molecular.....	83
4.4.1. Interações alvo-compostos.....	83
4.4.2. Simulação de Dinâmica Molecular.....	89
4.4.3. Parâmetros farmacocinéticos de ADMET e previsão de semelhança com drogas.....	90
4.4.3.1. Avaliação de semelhança com drogas.....	90
4.4.3.2. Propriedades ADMET-T.....	91
4.4. Atividade antiparasitária.....	92
4.4.1. <i>Schistosoma mansoni</i> (LE).....	92
4.4.2. <i>Leishmania amazonensis</i>	95
4.5. Estudo de fragmentação do artepillin C e seus derivados protonados.....	96
4.5.1. Correlação estrutura-fragmentação dos compostos <i>C</i> - e <i>O</i> -prenilados.....	96
4.5.2. Sítio de protonação.....	103
4.5.3. Formação dos íons de produtos diagnósticos para compostos <i>C</i> -prenilados.....	105
4.5.4. Formação dos íons de produto de compostos <i>O</i> -prenilados.....	110

4.6. Identificação do artepillin C e da plicatina B em amostras comerciais de própolis	112
5. Conclusões	115
6. Referências	117
7. Seção de espectros	130

Resumo

O artepillin C é um dos principais componentes da própolis verdade. Várias atividades biológicas têm sido atribuídas ao artepillin C, com destaque para a atividade antimicrobiana. Neste trabalho, o artepillin C e 14 análogos prenilados e seus derivados foram sintetizados e avaliados quanto às suas atividades antibacteriana frente a bactérias cariogênicas, esquistossomicida e leishmanicida. Além disso, as reações de fragmentação em fase gasosa dos compostos sintetizados foram investigadas por espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray (ESI-MS/MS). Apesar de o uso de micro-ondas ter reduzido a etapa de prenilação do *p*-cumaroato de metila de 24 h para 10 min, não foi possível evitar a formação de três subprodutos prenilados, que também haviam sido formados nas condições da literatura. Nenhum dos 15 compostos sintetizados apresentou atividades esquistossomicida contra vermes adultos de *Schistosoma mansoni* ou leishmanicida contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* promissoras. Por outro lado, os compostos **5** (plicatina B) e **6** (2',3',7,8-tetraidroplicatina B) apresentaram atividade antibacteriana promissora frente a um painel representativo de bactérias cariogênicas, com valores de concentração inibitória mínima (CIM) entre 32,2 e 62,5 µg/mL. Dados obtidos por docking molecular demonstraram que os compostos **5** e **6** possuem parâmetros físico-químicos, biodisponibilidade e farmacocinética que atendem a todos os critérios para serem considerados como promissores. Os estudos por espectrometria de massas mostraram que compostos *C*-prenilados podem ser diferenciados de *O*-prenilados pelas perdas de C₄H₈ e C₅H₈, respectivamente. Além disso, a utilização de varredura por monitoramento de reações múltiplas (MRM) utilizando as transições 301→259, 301→245 e 301→203 para o artepillin C (**5**) e 247→205, 247→191, e 247→159 para a plicatina B (**6**) possibilitou a identificação desses compostos em uma amostra comercial de própolis utilizando cromatografia de ultraperformance acoplada à espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray (UPLC-ESI-MS/MS).

Palavras-chave: artepillin C, atividade antibacteriana, atividade antiparasitária, cárie, espectrometria de massas

Abstract

Artepillin C is one of the main components of true propolis. Several biological activities have been attributed to artepillin C, and the antimicrobial activity has been highlighted. In this work, artepillin C and 14 prenylated analogues and their derivatives were synthesized and evaluated for their antibacterial, schistosomicidal and leishmanicidal activities. Furthermore, the gas phase fragmentation reactions of the synthesized compounds were investigated by sequential electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS/MS). Although the use of microwave irradiation reduced the time of prenylation step of methyl *p*-coumaroate from 24 h to 10 min, it was not possible to avoid the formation of three prenylated by-products, which had also been formed under conditions in the literature. None of the 15 compounds synthesized showed promising schistosomal against adult *Schistosoma mansoni* worms or leishmanicidal activity against *Leishmania amazonensis* promastigote forms. On the other hand, compounds **5** (plicatin B) and **6** (2',3',7',8'-dihydroplicatin B) showed promising antibacterial activity against a representative panel of cariogenic bacteria, with minimum inhibitory concentration (MIC) values between 32.2 and 62.5 µg/mL. Data obtained by molecular docking demonstrated that compounds **5** and **6** meet all the physicochemical, pharmacokinetic, and bioavailability criteria to be considered as promising. Mass spectrometry studies showed that *C*-prenylated compounds can be differentiated from *O*-prenylated compounds by the losses of C₄H₈ and C₅H₈, respectively. Moreover, the use of multiple reaction monitoring (MRM) scan mode based on the transitions 301→259, 301→245 and 301→203 for artepillin C (**5**) and 247→205, 247→191, and 247→159 for plicatin B (**6**) allowed for the identification of these compounds in a commercial sample of green propolis using ultra-performance chromatography coupled with sequential mass spectrometry with ionization by electrospray (UPLC-ESI-MS/MS).

Keywords: artepillin C, antimicrobial activity, antiparasitic activity, caries, mass spectrometry.

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura química da clorexidina (I).....	23
Figura 2. Ciclo de vida da esquistossomíase adaptado [31].	24
Figura 3. Estruturas químicas dos quimioterápicos (R)-Praziquantel (II) e Oxamniquina (III) utilizados no tratamento da esquistossomíase.....	25
Figura 4. (1) Forma flagelada ou promastigota; e (2) Forma aflagelada ou amastigota de Leishmania [43].	25
Figura 5. Ciclo de vida de Leishmania adaptado [43].	26
Figura 6. Estruturas químicas dos quimioterápicos Lomidina (III), Miltefosine (IV), úrea estibamina (V), paromomicina (VI), antimoniato de meglumina (VII) e anfotericina B (VIII) utilizados no tratamento da leishmaniose [48-50].	27
Figura 7. Esquema geral de uma fonte de ionização por eletrospray em um espectrômetro de massas com analisador do tipo quadrupolo (QqQ) operando no modo varredura de íons produtos (do inglês product ion scan mode), elaborado com base na referência [57].	28
Figura 8. Espectrometria de massas sequencial (ESI-MS/MS). Fonte: Próprio autor.	30
Figura 9. Etapas da elucidação das vias de fragmentação em fase gasosa utilizando espectrometria de massas e dados termoquímicos estimados por Química Computacional. Fonte: a autora.	31
Figura 10. Estruturas químicas dos metabolitos da própolis éster fenilético (X) do ácido cafeico, ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (artepillin C, XI), bacarina (XII) e drupamina (XIII) [72, 74].	33
Figura 11. (A) Baccharis dracunculifolia DC e (B) própolis verde [79].	33
Figura 12. Estrutura química dos análogos do artepillin C (XI) sintetizados por Uto e colaboradores [88].	34
Figura 13. Estrutura química dos compostos identificados e quantificados da própolis verde por Gardana e colaboradores por HPLC-ESI-MS/MS [84].	37
Figura 14. Estrutura química dos produtos de metabolismo do artepillin C [103].	37
Figura 15. Esquema do preparo da amostra e do inóculo para o teste da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) [112].	49
Figura 16. Reação de redução da resazurina à resorufina.	49
Figura 17. Numeração do esqueleto básico do éster metílico do Artepillin C (1) e de seus derivados.	63
Figura 18. Estrutura dos compostos 1-15.	81
Figura 19. Estrutura otimizada dos compostos 5 e 6, que foram os mais ativos nos ensaios antimicrobianos.	84
Figura 20. Diagramas 3D e 2D da interação entre, (A): o composto 5 e S. mitis; (B): o composto 6 com S. mitis; (C): o ligante nativo (GOL) e S. mitis.	87
Figura 21. Diagramas 3D e 2D da interação entre, (D): o composto 5 e S. sanguinis; (E): o composto 6 e S. sanguinis; (F): o ligante nativo (FMN) e S. sanguinis.	88
Figura 22. Diagramas 3D da melhor pose encontrada por docking molecular (verde) e dinâmica molecular (amarelo) dos compostos 6 e 5 com sítios ativos de ligação para 3LE0 (a) e 4N82 (b).	89
Figura 23. Energia potencial (U) em função do tempo para dois complexos; (c): 3LE0-Composto 6, e (d): 4N82-Composto 5.	89
Figura 24. Gráficos da redução da viabilidade de vermes adultos de Schistosoma mansoni após incubação com os compostos 10 e 11. Dados expressos como média \pm desvio padrão.	95
Figura 25. Gráficos da intensidade relativa (%) dos principais íons produtos dos compostos 1, 3, 5, 6, 9, 11 e 12 protonados em função energia de colisão (E_{lab} , em eV).	98
Figura 26. Espectros de íons produtos dos compostos 1, 3, 5, 6, 9, 11 e 12 protonados (QqQ, Ar como gás de colisão, $E_{lab} = 15$ eV).	99
Figura 27. Correlações estrutura-fragmentação para o artepillin C e seus derivados protonados. As correlações acima foram suportadas por experimentos de MS ³ e MS ⁴ (Figuras A63-A67).	100
Figura 28. Afinidade protônica (PA, em kcal/mol) para os compostos 1, 3, 5, 6, 9, 11 e 12. Os valores de PA foram calculados em nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p).	105
Figura 29. Cromatograma obtido no modo “full scan” do extrato de própolis comercial da empresa Apis Vida e cromatogramas obtidos no modo MRM em transições específicas para o artepillin C (a) e plicatina B (b).	114

Lista de Tabelas

Tabela 1. Cepas das culturas de bactérias Gram-positivas utilizadas nos ensaios antibacterianos.....	47
Tabela 2. Informações relacionadas aos alvos estudados.....	50
Tabela 3. Características e rendimentos dos compostos 1-15	58
Tabela 4. Conversão do p-cumaroato de metila nos compostos 1, 5, 9 e 11 em diferentes solventes após 24 h de reação.*.....	60
Tabela 5. Conversão do p-cumaroato de metila nos compostos 1, 5, 9 e 11 em diferentes solventes em condições da literatura* e com irradiação de micro-ondas (100 W) após 24 h e 30 min de reação, respectivamente.....	60
Tabela 6. Taxas de conversão do p-cumaroato de metila nos compostos 1, 5, 9 e 11 em tolueno em diferentes tempos de reação e em reator de micro-ondas em diferentes potências.....	61
Tabela 7. Comparação da seletividade obtida para as reações de prenilação do p-cumaroato de metila nas condições da literatura e com irradiação por micro-ondas.....	62
Tabela 8. Dados de RMN de ¹ H (400 MHz) e de ¹³ C (100 MHz) dos composto 1 e 3 e comparação com os da literatura para o artepillin C (300 MHz e 75 MHz, respectivamente), ambos em CDCl ₃ [101].....	67
Tabela 9. Dados de RMN de ¹ H (400 MHz) e de ¹³ C (100 MHz) dos compostos 2 e 4 comparação com os dados do artepillin C (300 MHz e 75 MHz, respectivamente), ambos em CDCl ₃ [101].....	68
Tabela 10. Dados de RMN de ¹ H (400 MHz) e de ¹³ C (100 MHz) dos composto triprenilados 9 e 10 e comparação com o os dados do artepillin C (300 MHz e 75 MHz, respectivamente), ambos em CDCl ₃	73
Tabela 11. Dados de RMN de ¹ H (400 MHz) e de ¹³ C (100 MHz) dos compostos O-prenilado (11), 13, 14 e comparação com o da literatura (300 MHz e 75 MHz, respectivamente), ambos em CDCl ₃ [129].....	76
Tabela 12. Dados de RMN de ¹ H (400 MHz) e de ¹³ C (100 MHz) dos compostos 12, 15 e comparação com o da literatura (300 MHz e 75 MHz, respectivamente), ambos em CDCl ₃ [129].....	77
Tabela 13. Valores da concentração inibitória mínima (CIM, em preto) e concentração bactericida mínima (CBM, em cinza) dos compostos 1-14 frente ao painel representativo de bactérias cariogênicas avaliadas, em µg/mL e mM (entre parênteses).....	82
Tabela 14. Resultados de encaixe dos compostos 5 e 6 com os alvos de <i>S. mitis</i> (PDB ID: 3LE0) e <i>S. sanguinis</i> (PDB ID: 4N82).....	85
Tabela 15. Propriedades físico-químicas e previsões de semelhança com drogas dos compostos 5 e 6	90
Tabela 16. Propriedades farmacocinéticas de ADMET dos compostos 5 e 6	91
Tabela 17. Porcentagem de mortalidade (média ± DP) dos vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> (LE) após incubação com as amostras na concentração de 50 µg/mL (triagem).....	93
Tabela 18. Redução da viabilidade de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> após incubação com as amostras.....	94
Tabela 19. Triagem contra formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> após 24 h de incubação.....	96
Tabela 20. Íons produtos dos compostos 1, 3, 5, 6, 9, 11 e 12 em energia de colisão (E_{lab}) de 15 eV. As intensidades relativas (%) estão demonstradas entre parênteses. Abaixo das razões m/z (em itálico), estão demonstrados os dados dos experimentos de troca por deutério.....	101
Tabela 21. Íons produtos mais significativos (intensidade relativa maior que 5 %) dos compostos 1, 3, 5, 6 e 9-12 na energia de colisão $E_{lab}=15$ eV.....	102
Tabela 22. Transições iônicas e condições do equipamento utilizadas nos experimentos de MRM para identificar os compostos 3 (artepillin C) e 5 (plicatina B) em extratos de amostras comerciais de própolis.....	113

Lista de Esquemas

Esquema 1. Metodologias descritas na literatura para síntese do artepillin C [99-101].	36
Esquema 2. Preparação do p-cumarato de metila.	42
Esquema 3. Síntese dos derivados do artepillin C [107].	44
Esquema 4. Reação de hidrólise dos compostos 1, 5 e 11 segundo Uto e colaboradores [108].	45
Esquema 5. Reação de hidrogenação catalítica dos compostos 2, 4, 6, 8, 12 e 15 [109].	46
Esquema 6. Reação de redução dos ésteres 9 e 11 para obtenção dos álcoois 10 e 13 correspondentes[110].	46
Esquema 7. Proposta para o mecanismo de formação do éster metílico do artepillin C (1).	56
Esquema 8. Proposta para o mecanismo de formação dos compostos 9 e 11 .	57
Esquema 9. Formas de ressonância de uma carbonila α,β -insaturada representando a desblindagem da posição β .	64
Esquema 10. Representação do efeito de hiperconjugação para explicar a desblindagem dos hidrogênios H1'.	65
Esquema 11. Efeito de desblindagem de H7 devido à hiperconjugação.	Erro! Indicador não definido.
Esquema 12. Formas de ressonância do composto 1 devido à ligação dupla entre C7 e C8 e mudança conformacional do composto 2 devido à ligação simples entre C7 e C8.	80
Esquema 13. Representação das características estruturais dos compostos 1-15 e de suas respectivas atividades.	83
Esquema 14. Formação dos íons produtos D, E e P3 a partir dos compostos protonados 1, 3 e 5 . Os valores das Entalpias e energia de Gibbs encontram-se abaixo das estruturas, em kcal/mol.	106
Esquema 15. Formação dos íons produtos C, P2, P4, P12 e P13 para os compostos protonados 1-5 . Os valores das Entalpias e energia de Gibbs encontram-se abaixo das estruturas, em kcal/mol.	108
Esquema 16. Formação dos íons produtos C, P2, P14, G, P15, P17 e P18 a partir dos compostos 6 e 12 . Os valores das Entalpias e energia de Gibbs encontram-se abaixo das estruturas, em kcal/mol.	109
Esquema 17. Formação do íon de produto C, F, P6, B e P7 a partir dos compostos 9-11 e 13 . Os valores das Entalpias e energia de Gibbs encontram-se abaixo das estruturas, em kcal/mol.	111
Esquema 18. Formação do íon produto E e P1 para o composto 9 . Os valores das Entalpias e energia de Gibbs encontram-se abaixo das estruturas, em kcal/mol.	112

Lista de Anexos

Figura A 1. Espectro de massas do composto 1 (ESI-Q-TOF, N ₂ , E _{lab} = 15 eV).....	132
Figura A 2. Espectro de absorção no infravermelho do composto 1 (em pastilha de KBr).....	132
Figura A 3. Espectro de RMN de ¹ H do composto 1 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	133
Figura A 4. Espectro de DEPT 135 do composto 1 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	134
Figura A 5. Espectro de RMN de ¹³ C do composto 1 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	135
Figura A 6. Espectro de RMN de ¹ H do composto 2 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	136
Figura A 7. Espectro de DEPT 135 do composto 2 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	137
Figura A 8. Espectro de RMN de ¹³ C do composto 2 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	138
Figura A 9. Espectro de massas do composto 3 (ESI-Q-TOF, N ₂ , E _{lab} = 15 eV).....	139
Figura A 10. Espectro de absorção no infravermelho do composto 3 (em pastilha de KBr).....	139
Figura A 11. Espectro de RMN de ¹ H do composto 3 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	140
Figura A 12. Espectro de DEPT 135 do composto 3 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	141
Figura A 13. Espectro de RMN de ¹³ C do composto 3 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	142
Figura A 14. Espectro de absorção no infravermelho do composto 4 (em pastilha de KBr).....	143
Figura A 15. Espectro de RMN de ¹ H do composto 4 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	144
Figura A 16. Espectro de DEPT 135 do composto 4 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	145
Figura A 17. Espectro de RMN de ¹³ C do composto 4 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	146
Figura A 18. Espectro de massas do composto 5 (ESI-Q-TOF, N ₂ , E _{lab} = 15 eV).....	147
Figura A 19. Espectro de absorção no infravermelho do composto 5 (em pastilha de KBr).....	147
Figura A 20. Espectro de RMN de ¹ H do composto 5 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	148
Figura A 21. Espectro de DEPT 135 do composto 5 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	149
Figura A 22. Espectro de RMN de ¹³ C do composto 5 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	150
Figura A 23. Espectro de massas do composto 6 (ESI-Q-TOF, N ₂ , E _{lab} = 15 eV).....	151
Figura A 24. Espectro de RMN de ¹ H do composto 6 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	152
Figura A 25. Espectro de DEPT 135 do composto 6 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	153
Figura A 26. Espectro de RMN de ¹³ C do composto 6 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	154
Figura A 27. Espectro de absorção no infravermelho do composto 7 (em pastilha de KBr).....	155
Figura A 28. Espectro de RMN de ¹ H do composto 7 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	156
Figura A 29. Espectro de DEPT 135 do composto 7 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	157
Figura A 30. Espectro de RMN de ¹³ C do composto 7 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	158
Figura A 31. Espectro de absorção no infravermelho do composto 8 (em pastilha de KBr).....	159
Figura A 32. Espectro de RMN de ¹ H do composto 8 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	160
Figura A 33. Espectro de DEPT 135 do composto 8 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	161
Figura A 34. Espectro de RMN de ¹³ C do composto 8 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	162
Figura A 35. Espectro de massas do composto 9 (ESI-Q-TOF, N ₂ , E _{lab} = 15 eV).....	163
Figura A 36. Espectro de absorção no infravermelho do composto 9 (em pastilha de KBr).....	163
Figura A 37. Espectro de RMN de ¹ H do composto 9 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	164
Figura A 38. Espectro de DEPT 135 do composto 9 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	165
Figura A 39. Espectro de RMN de ¹³ C do composto 9 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	166
Figura A 40. Espectro de absorção no infravermelho do composto 10 (em pastilha de KBr).....	167
Figura A 41. Espectro de RMN de ¹ H do composto 10 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	168
Figura A 42. Espectro de DEPT 135 do composto 10 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	169
Figura A 43. Espectro de RMN de ¹³ C do composto 10 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	170
Figura A 44. Espectro de massas do composto 11 (ESI-Q-TOF, N ₂ , E _{lab} = 15 eV).....	171
Figura A 45. Espectro de absorção no infravermelho do composto 11 (em pastilha de KBr).....	171
Figura A 46. Espectro de RMN de ¹ H do composto 11 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	172
Figura A 47. Espectro de DEPT 135 do composto 11 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	173
Figura A 48. Espectro de RMN de ¹³ C do composto 11 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	174
Figura A 49. Espectro de massas do composto 12 (ESI-Q-TOF, N ₂ , E _{lab} = 15 eV).....	175
Figura A 50. Espectro de absorção no infravermelho do composto 12 (em pastilha de KBr).....	175

Figura A 51. Espectro de RMN de ^1H do composto 12 (CDCl_3 , 400 MHz).....	176
Figura A 52. Espectro de DEPT 135 do composto 12 (CDCl_3 , 400 MHz).....	177
Figura A 53. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 12 (CDCl_3 , 100 MHz).....	178
Figura A 54. Espectro de absorção no infravermelho do composto 13 (em pastilha de KBr).....	179
Figura A 55. Espectro de RMN de ^1H do composto 13 (CDCl_3 , 400 MHz).....	180
Figura A 56. Espectro de DEPT 135 do composto 13 (CDCl_3 , 400 MHz).....	181
Figura A 57. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 13 (CDCl_3 , 100 MHz).....	182
Figura A 58. Espectro de absorção no infravermelho do composto 14 (em pastilha de KBr).....	183
Figura A 59. Espectro de RMN de ^1H do composto 14 (CDCl_3 , 400 MHz).....	184
Figura A 60. Espectro de DEPT 135 do composto 14 (CDCl_3 , 400 MHz).....	185
Figura A 61. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 14 (CDCl_3 , 100 MHz).....	186
Figura A 62. Espectro de absorção no infravermelho do composto 15 (em pastilha de KBr).....	187
Figura A 63. Espectro de RMN de ^1H do composto 15 (CDCl_3 , 400 MHz).....	188
Figura A 64. Espectro de DEPT 135 do composto 15 (CDCl_3 , 400 MHz).....	189
Figura A 65. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 15 (CDCl_3 , 100 MHz).....	190
Figura A 66. Espectro de ESI-IT- MS^n do composto 1 protonado (m/z 315).....	191
Figura A 67. Espectro de ESI-IT- MS^n do composto 3 protonado (m/z 301).....	191
Figura A 68. Espectro de ESI-IT- MS^n do composto 5 (m/z 247).....	192
Figura A 69. Espectro de ESI-IT- MS^n do composto 6 (m/z 251).	192
Figura A 70. Espectro de ESI-IT- MS^n do composto 11 (m/z 247).....	193
Figura A 71. Espectro de ESI-IT- MS^n do composto 12 (m/z 251).....	193
Figura A 72. Espectros de massas compostos 1, 3, 5-6, 9 e 11-12 (ESI-MS/MS-Q-TOF, N_2 , $E_{\text{lab}} = 15$ eV).	194

Lista de Abreviaturas

AcOEt	Acetato de etila
ACN	Acetonitrila
CBM	<i>Concentração bactericida mínima</i>
CCC	Cromatografia em coluna clássica
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CEM	<i>Chain ejection model</i> , modelo de ejeção do íon
CID	<i>Collision induced dissociation</i> , dissociação induzida por colisão
CIM	<i>Concentração inibitória mínima</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CRM	<i>Charge residual model</i> , modelo da carga residual
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo duplo dupleto
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
E_{lab}	Energia de colisão (eV)
EI-MS	Espectrometria de massa com ionização por elétrons (do inglês <i>Electron ionization</i>)
ESI	Eletrospray (do inglês <i>electrospray ionization</i>)
ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização por eletrospray (do inglês <i>electrospray ionization mass spectrometry</i>)
ESI-MS/MS	Espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray (do inglês <i>electrospray ionization tandem mass spectrometry</i>)
ESI-MSⁿ	Espectrometria de massas de múltiplos estágios com ionização por eletrospray (do inglês <i>electrospray ionization multiple stage mass spectrometry</i>)
ESI-TOF	Ionização por eletrospray acoplada a analisador do tipo tempo de voo
EtOH	Etanol
GA	Acidez em fase gasosa (do inglês <i>gas-phase acidity</i>)
GB	Basicidade em fase gasosa (do inglês <i>gas-phase basicity</i>)
GC-FID	Cromatografia gasosa com detector por ionização de chama (do inglês <i>gas chromatography flame ionization detection</i>)
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada com espectrômetro de massas (do inglês <i>gas chromatography coupled with mass spectrometry</i>)
GNPS	Rede Molecular Social Global de Produtos Naturais (do inglês <i>Global Natural Products Social</i>)
Hex	Hexano
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanossulfônico

HMPA	ácido 4-hidroxi metilfenoxiacético
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>high-performance liquid chromatography</i>)
HPLC-ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização por eletrospray acoplada à cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry</i>)
HPLC-ESI-MS/MS	Espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray acoplada à cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry</i>)
IT	<i>Ion trap</i>
IV	Radiação infravermelha
LC	<i>Cromatografia líquida</i> (do inglês <i>Liquid Chromatography</i>)
m	Multiplete
MALDI	Ionização por dessorção a laser assistida por matriz (do inglês <i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i>)
MeOH	Metanol
MSⁿ	Espectrometria de massas sequencial (do inglês <i>sequential mass spectrometry</i>)
MW	Micro-ondas (do inglês <i>MicroWave</i>)
PA	Afinidade protônica (do inglês <i>Proton Affinity</i>)
QqQ	Tripla quadrupolo
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RMN	Ressonância magnética nuclear
s	Simpleto
t	Triplete
THF	Tetraidrofurano
TSB	Caldo triptono soja (do inglês <i>tryptic soy broth</i>)
UFC	Unidades formadoras de colônia
UV/vis	Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta/visível
δ	Deslocamento químico (ppm)
ΔG	Varição da energia de Gibbs
ΔH	Varição da entalpia

1. Introdução

1.1. Cárie e Doenças Tropicais Negligenciadas

1.1.1. Cárie

A saúde bucal é um parâmetro importante para a qualidade de vida do ser humano. No entanto, 3,5 bilhões de pessoas no mundo são acometidas doenças bucais, tais como a cárie e o câncer bucal. Essas doenças estão associadas a diferentes fatores, tais como má higiene bucal, alto consumo de açúcar e tabagismo, além de fatores sociodemográficos [1]. No Brasil, de acordo com dados do Instituto Nacional do Câncer, o câncer bucal causou aproximadamente 6192 mortes em 2020, sendo 4767 de homens e 1425 de mulheres [2]. Apesar de a cárie ser uma doença que pode ser diagnosticada precocemente, dados da literatura mostraram que apenas 44% da população brasileira têm procurado assistência odontológica, sendo que na maioria dos casos esta procura deve-se à perda de todos os dentes [3, 4]. Além disso, 43,4% das crianças brasileiras de 0-5 anos e 38,4% das crianças com 12 anos já possuem cárie, enquanto 11% das pessoas com 18 anos ou mais já perderam todos os dentes, mesmo com a fluoretação da água [3-5].

A cárie é uma doença infecciosa e transmissível que acomete 69% da população brasileira e 75% da população mundial [6, 7]. Esta doença é caracterizada pela desintegração progressiva e molecular da estrutural dental resultante do acúmulo de bactérias acidogênicas e acidúricas residentes na cavidade bucal [8, 9]. Na presença de glicoproteínas salivares e de matrizes ricas em polissacarídeos, algumas destas bactérias podem formar colônias que se aderem firmemente às superfícies bucais, formando uma camada chamada de biofilme [10], cujo acúmulo é considerado um fator crítico para o desenvolvimento da cárie [11]. Dentre as bactérias presentes na microbiota bucal, *Streptococcus mutans*, é uma das principais formadoras de colônias. No entanto, recentes estudos baseados no RNA e DNA da microbiota de lesões cariosas revelaram que, além do *S. mutans*, os múltiplos microrganismos da microbiota bucal agem coletivamente, provavelmente de maneira sinérgica, causando a cárie [12]. Após a adesão desses microrganismos, são produzidas substâncias que favorecem a adesão e o acúmulo de outros microrganismos, formando uma matriz extracelular resistente. Este mecanismo de adesão é conhecido como co-agregação [13, 14].

Devido aos riscos que as bactérias cariogênicas oferecem aos seus hospedeiros, o acúmulo do biofilme dental deve ser evitado. A maneira mais eficaz para se evitar esse acúmulo e, assim, prevenir a cárie e outras doenças periodontais é através da higienização bucal, especialmente por métodos mecânicos (escovação e uso do fio dental). Entretanto, em muitos casos, a remoção mecânica do biofilme é feita de maneira inadequada, principalmente em locais de difícil contato, tais como áreas entre os dentes, sub-gengivais e fissuras. Por essa razão, métodos químicos são utilizados como adjuvantes na higienização bucal e no controle do biofilme [15, 16]. Dentre estes métodos, merecem

destaque os enxaguatórios bucais com ação antibacteriana, que promovem a redução da adesividade das bactérias à superfície dental e inibem o crescimento e a proliferação microbiana [17]. A clorexidina (I, **Figura 1**), considerada como o agente anti-cariogênico mais efetivo na redução da placa bacteriana [17-20], é o agente antimicrobiano mais comumente utilizado em enxaguatórios bucais [16, 17, 20]. Quimicamente, a clorexidina é uma *bis*-guanidina de natureza catiônica, geralmente comercializada na forma de sal gluconato na concentração de 0,12% [16, 21], que é eficaz contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, leveduras, dermatófitos e alguns vírus lipofílicos [21-23].

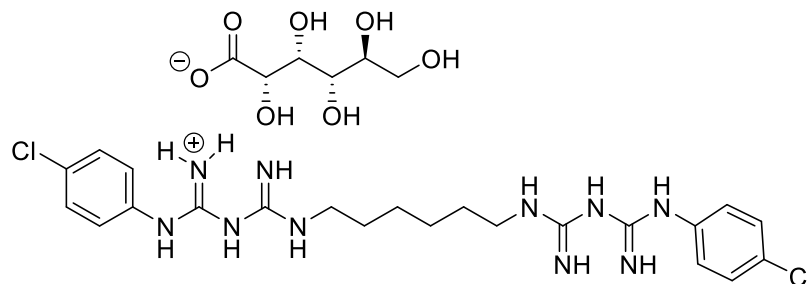


Figura 1. Estrutura química da clorexidina (I).

Apesar de sua eficácia, a clorexidina tem demonstrado efeitos adversos, principalmente na sua utilização diária, tais como manchas nos dentes e na língua, perda do paladar, sensação de queimação na mucosa oral e distúrbios da flora oral e intestinal [16, 17, 19], além do surgimento de cepas bacterianas resistentes [17, 19].

1.1.2. Esquistossomíase

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) constituem um grupo de doenças transmissíveis que acometem prevalentemente países tropicais e subtropicais, como África, Ásia e Américas, afetando principalmente populações em extrema pobreza. As DTNs refletem uma situação de fragilidade social, o que acaba impactando na saúde pública e inibindo o desenvolvimento socioeconômico [24, 25]. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), são conhecidas 17 DTNs, que afetam a vida de 1 bilhão de pessoas. A transmissão dessas doenças está relacionada à falta de saneamento básico, péssimas condições de moradias e presença de vetores [25]. O Brasil tem a maior população afetada pelas DTNs, dentre as quais dengue, doenças de Chagas, leishmaniose, malária, esquistossomíase, hanseníase e tuberculose são consideradas prioritárias para prevenção e controle devido à gravidade e às suas consequências socioeconômicas, principalmente nas regiões Norte e Nordeste [26].

A esquistossomíase é uma doença infecciosa parasitária aguda e crônica causada por vermes trematódeos do gênero *Schistosoma* [27, 28]. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 779 milhões de

As pessoas estão em risco de infecção por esquistossomíase em todo o mundo, e mais de 251,4 milhões de pessoas precisaram de tratamento preventivo em 2021 [29, 30]. Por ser uma doença endêmica em muitos países, a esquistossomíase representa um sério problema para a saúde pública, estando intimamente relacionada a uma variedade de mudanças ambientais e atividades de humanos e animais, tais como fatores de risco biológicos, naturais e socioeconômicos [29].

O principal hospedeiro do parasita é o homem, em cujas fezes e urina os pares de vermes adultos de *Schistosoma* são excretados na forma de ovos [31, 32]. Quando esses ovos entram em contato com a água, rompem-se e permitem a saída da forma larvária ciliada, denominada miracídio. A transmissão da esquistossomíase ocorre quando o indivíduo suscetível entra em contato com águas superficiais onde existem caramujos, hospedeiros intermediários, onde os ovos passam à forma larvária, liberando cercárias. As cercárias ficam dispersas principalmente em águas não tratadas, como lagos, e infectam o homem pela pele (**Figura 2**) [32]. A infecção causa danos ao tecido intestinal devido ao grande número de ovos liberados pelos vermes e, se não tratada, pode levar a efeitos de saúde irreversíveis [31].

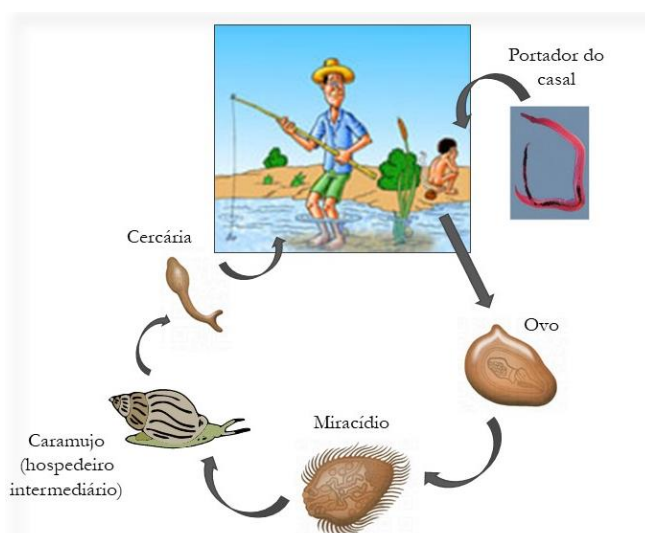


Figura 2. Ciclo de vida da esquistossomíase adaptado [31].

Em 2016, cerca de 206,5 milhões de pessoas necessitaram de tratamento preventivo contra a esquistossomíase [27, 28, 30, 33-36]. No entanto, em 2021, devido a pandemia da COVID-19, apenas 29,9% das pessoas que necessitavam do tratamento receberam o medicamento. Para o tratamento da esquistossomíase, a principal estratégia adotada baseia-se na utilização de drogas anti-helmínticas, sendo o praziquantel (PZQ, **II**) a droga escolhida pela OMS (**Figura 3**, p. 27) [30]. A utilização do PZQ (**II**) como quimioterápico baseia-se em sua eficácia contra todas as espécies de esquistossomos, em sua segurança e em seu baixo custo [37], sendo o (R)-praziquantel o enantiômero responsável pela atividade anti-helmíntica [37]. Contudo, o uso do PZQ apresenta algumas limitações, tais como sua baixa solubilidade

O ciclo biológico da leishmaniose inicia-se com a infecção do vetor, que ocorre quando as fêmeas da espécie, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania*. No trato digestivo anterior ocorre o rompimento dos macrófagos liberando essas formas, que se reproduzem e diferenciam-se rapidamente em formas flageladas denominadas de promastigotas, que também se reproduzem por processos sucessivos de divisão binária [43]. O ciclo do parasito no inseto se completa em torno de 72 h. Após este período, as fêmeas infectantes, ao realizarem um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, liberam as formas promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva do inseto. Na epiderme do hospedeiro, estas formas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário (**Figura 5**). No interior dos macrófagos, no vacúolo parasitóforo, diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se intensamente até o rompimento dos mesmos, ocorrendo a liberação destas formas que serão fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo, ocorrendo então a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea [43].

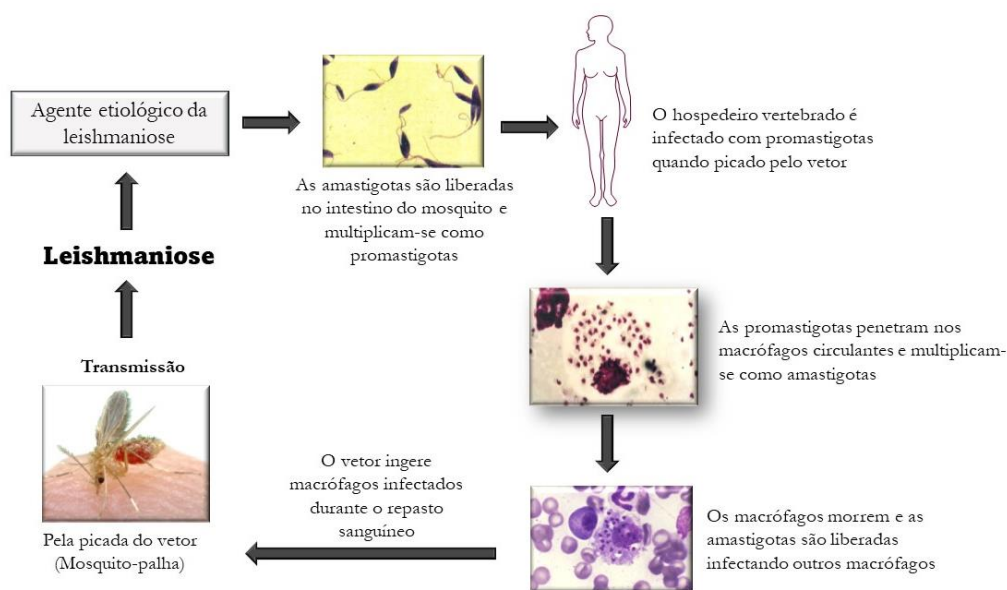


Figura 5. Ciclo de vida de *Leishmania* adaptado [43].

Para o tratamento da leishmaniose, várias drogas são descritas na literatura. Durante décadas, foram utilizados antimoniais pentavalentes (por exemplo, antimoniato de meglumina (**VIII**) e uréia estibamina (**VI**) (**Figura 6**, p. 29), para o tratamento da leishmaniose, independentemente das espécies de *Leishmania* [44-46]. A anfotericina B (**IX**) e o isotionato de pentamidina (Lomidina, **IV**) também são usados, principalmente na falha do tratamento com antimonial pentavalente. Entretanto, a anfotericina B (**IX**) não é sugerida em pacientes com doença cardíaca, doença

hepática e nefropatia [47]. Além disso, o tratamento com esses fármacos apresentou várias limitações, tais como toxicidade elevada e desenvolvimento de cepas resistentes entre certos subtipos [44, 47]. Por outro lado, as opções terapêuticas atuais para o tratamento da leishmaniose (miltefonise (V) e paromomicina (VII) (Figura 6) também apresentam sérias limitações, como o custo alto, a impossibilidade de administração oral, alta toxicidade, baixa eficácia, efeitos colaterais e resistência parasitária às drogas [44-47].

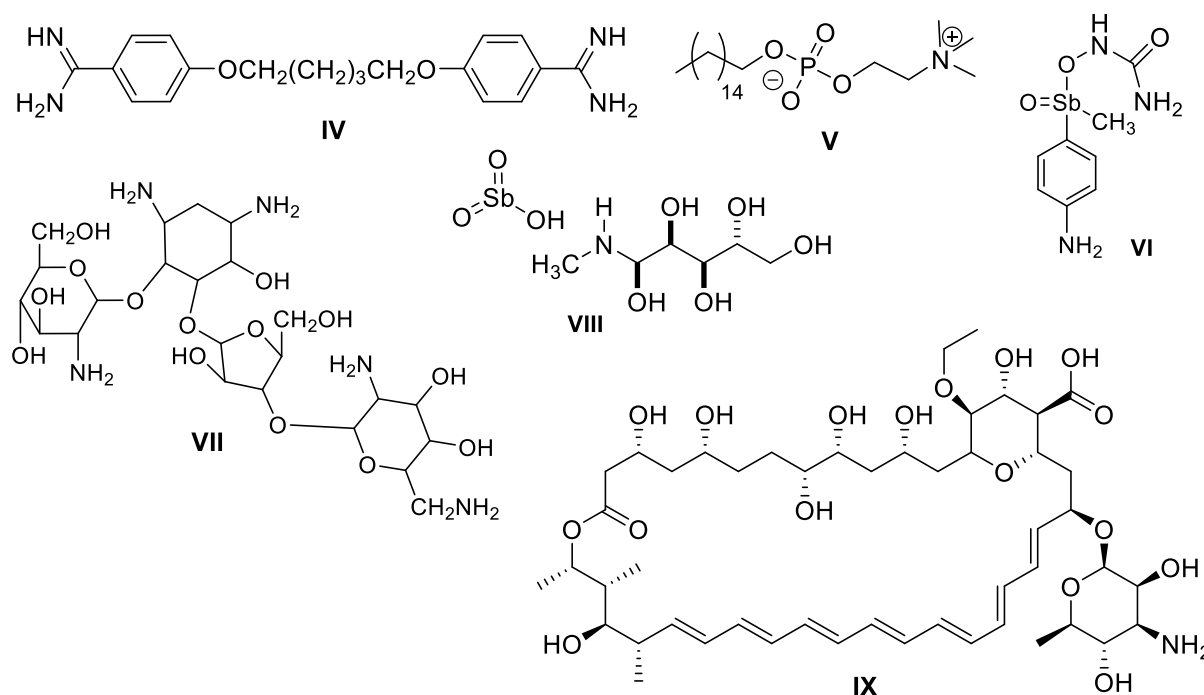


Figura 6. Estruturas químicas dos quimioterápicos Lomidina (III), Miltefosine (IV), úrea estibamina (V), paromomicina (VI), antimoniato de meglumina (VII) e anfotericina B (VIII) utilizados no tratamento da leishmaniose [48-50].

1.2. Espectrometria de massas com ionização por eletrospray

1.2.1. Ionização por eletrospray

Atualmente, a espectrometria de massas é uma técnica poderosa e multidisciplinar no campo analítico e bioanalítico. No entanto, até a década de 80, os métodos de ionização a pressão atmosférica (API) eram limitados às análises de compostos orgânicos voláteis (ou volatilizáveis), de baixo peso molecular e/ou termicamente estáveis. Essas limitações da técnica impossibilitavam a análise de moléculas com elevada massa molecular, como por exemplo, biomoléculas e polímeros [51-53]. Foi apenas no começo dos anos 90, com John Fenn e o desenvolvimento da ionização por eletrospray (ESI), que os métodos de ionização à pressão atmosférica (API) tiveram seus primeiros avanços. O desenvolvimento desses métodos de ionização que possibilitou uma maior aplicabilidade da espectrometria de massas [51-53].

Na ionização por eletrospray (ESI, do inglês *electrospray ionization*) os analitos são ionizados em solução e transferidos para fase gasosa de maneira isolada, na forma de moléculas protonadas ou cationizadas (modo positivo) ou como moléculas desprotonadas (modo negativo). Em ESI, as amostras são dissolvidas em um solvente orgânico polar e introduzidas em um capilar metálico submetido a uma alta voltagem (1-4 kV). A ionização propriamente dita (isto é, a geração de íons) ocorre no interior deste capilar por meio de reações ácido-base [54]. Devido à alta voltagem, as espécies carregadas migram para a interface metal-solução, formando uma dupla camada elétrica [55]. Na ponta do capilar, devido ao fluxo coaxial de um gás nebulizante (geralmente N₂), é formada uma superfície cônica chamada de cone de Taylor [54, 56], onde as gotas com carga de mesmo sinal aproximam-se devido à evaporação do solvente promovida por um gás secante e começam a repelir-se. Inicialmente, essas forças de repulsão coulômbicas entre as cargas de mesmo sinal são contrabalanceadas pela tensão superficial do líquido. Entretanto, quando o limite de Rayleigh é atingido, ocorre a explosão da gota - fenômeno conhecido como “explosão coulômbica”. Com a ação de um gás secante, o solvente contido nas gotículas é evaporado até que a repulsão entre as cargas nas gotículas torne-se cada vez maior, ocasionando assim novas explosões coulômbicas, até que íons individuais sejam formados e direcionados para o analisador de massas (**Figura 7**) [52, 53, 56].

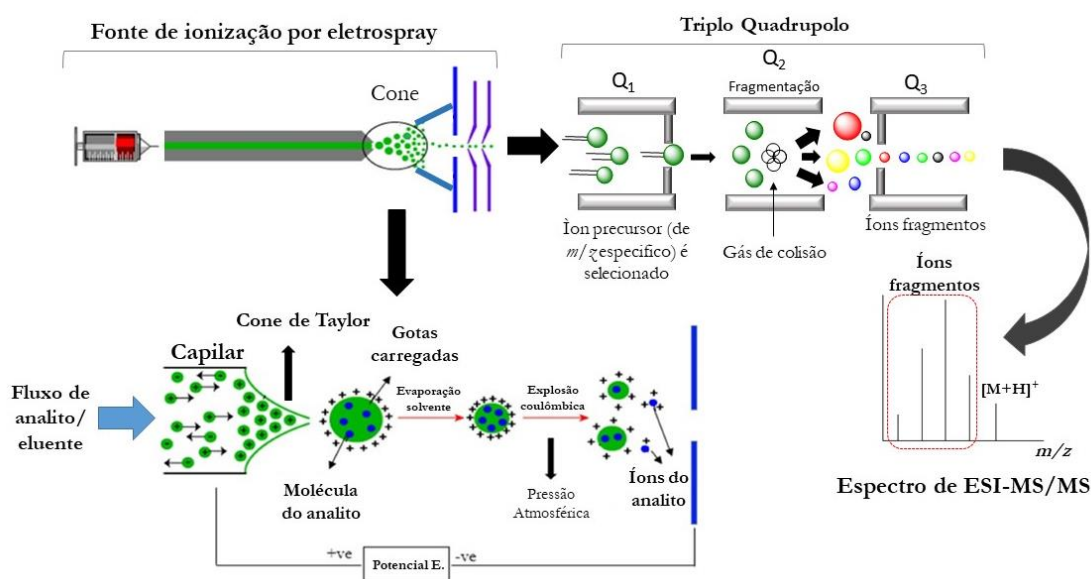


Figura 7. Esquema geral de uma fonte de ionização por eletrospray em um espectrômetro de massas com analisador do tipo quadrupolo (QqQ) operando no modo varredura de íons produtos (do inglês *product ion scan mode*), elaborado com base na referência [57].

1.2.2. Espectrometria de massas sequencial (MS/MS) e de múltiplos estágios (MSⁿ)

Durante décadas, a ionização por elétrons trouxe informações estruturais de compostos orgânicos através de dos vários íons fragmentos formados a partir do íon molecular, muitas vezes às custas da abundância relativa deste íon. Com o advento dos métodos de ionização considerados “brandos” (do inglês *soft ionization*), espectros de massas com íons fragmentos de baixa intensidade ou sem nenhum fragmento puderam ser gerados [58]. O desenvolvimento de novas técnicas para armazenar, manipular, ativar, fragmentar e reanalisar íons em fase gasosa por meio de espectrometria de massas foi impulsionado pelo desejo de entender a energia, a reatividade e os caminhos de fragmentação detalhados dos íons e a forte necessidade de técnicas para obter informações estruturais de espectros de massas obtidos por métodos de ionização “brandos”.

A ionização por eletrospray (ESI) produz íons simples e/ou multiplamente carregados (no caso de compostos polifuncionalizados), que conservam um baixo conteúdo de energia interna. Como consequência, espectros de massas obtidos por ESI-MS apresentam poucos ou nenhum íon fragmento, o que, em princípio, acaba limitando a utilização da técnica como ferramenta de elucidação estrutural. Por essa razão, quando se deseja obter informações sobre a estrutura do analito, utiliza-se a espectrometria de massas sequencial (MS/MS, do inglês *tandem mass spectrometry*), na qual íons precursores de m/z selecionados são submetidos a um segundo estágio de análise por espectrometria de massas [58].

A técnica ESI-MS/MS compreende dois estágios de MS. No primeiro estágio (MS1), íons de m/z específica, chamados de “íon precursores”, são selecionados no primeiro estágio de MS e ativados para fragmentar-se, produzindo íons de m/z menor, chamados de “íons fragmentos” (ou íons produtos), que são então analisados em um segundo estágio de MS (MS2) (**Figura 8**). Dentre os métodos de ativação mais comuns, destaca-se a dissociação induzida por colisão (CID, do inglês *collision-induced dissociation*). Este método consiste em promover a colisão do íon precursor com moléculas de um gás inerte (Ar, He ou N₂) através de uma célula de colisão em condições energéticas controladas [59, 60].

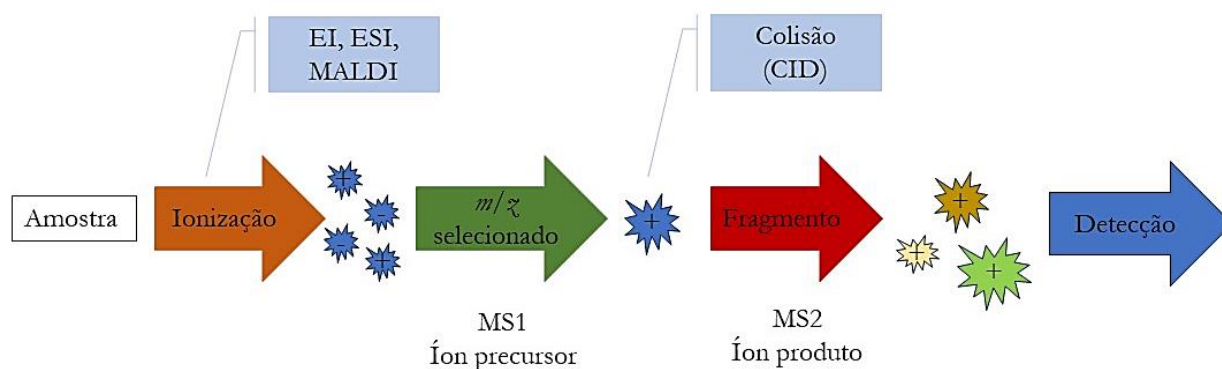


Figura 8. Espectrometria de massas sequencial (ESI-MS/MS). Fonte: Próprio autor.

Experimentos de espectrometria de massas sequencial podem ser realizados no espaço (do inglês *in-space tandem mass spectrometry*) ou no tempo (do inglês *in-time tandem mass spectrometry*). No primeiro caso, utiliza-se espectrômetros híbridos, tais como os do tipo triplo quadrupolo (QqQ) e quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF), de forma que os dois estágios de MS ocorrem em analisadores distintos; no segundo, os dois estágios de MS ocorrem em um mesmo analisador, como em espectrômetros equipados com analisadores do tipo captor de íons (do inglês *ion trap*) [61]. No caso de analisadores que realizam experimentos de espectrometria de massas sequencial no tempo, é possível realizar vários estágios de MS, de modo que íons fragmentos são selecionados, tornando-se íons precursores, que são então ativados para fragmentação. Este processo pode ser repetido n vezes e é conhecido como espectrometria de massas de múltiplos estágios (MS^n , do inglês *sequential mass spectrometry*), que é considerada uma poderosa ferramenta na elucidação de vias de fragmentação e em estudos de determinação estrutural.

Ao longo das duas últimas décadas, a técnica de ESI-MS/MS tem se tornado extremamente importante para a identificação de compostos já conhecidos sem a necessidade de isolamento (desreplicação) presentes em misturas complexas, como extratos de plantas, micro-organismos e produtos de metabolismo [56]. Parte deste papel relevante deve-se ao seu acoplamento com a cromatografia líquida, que não apenas permite a separação prévia dos compostos antes das análises por ESI-MS/MS como também fornece tempos de retenção e espectros de absorção para serem comparados com os de padrões autênticos analisados nas mesmas condições [67,68].

Um dos maiores desafios para a utilização de dados de ESI-MS/MS na elucidação estrutural de compostos orgânicos naturais e sintéticos tem sido a falta de uma biblioteca espectral comercial confiável como as que foram elaboradas a partir de dados de EI-MS. Nos últimos anos, ferramentas de *molecular networking*, como o GNPS (do inglês *Global Natural Products Social*) têm se mostrado extremamente úteis para nortear a identificação de compostos orgânicos

[62]. No entanto, a correta interpretação dos resultados fornecidos por essas ferramentas depende, em alguma extensão, do conhecimento acerca das vias de fragmentação em fase gasosa do composto ou de seus análogos e homólogos [62].

Na elucidação estruturas das vias de fragmentação a partir de dados de ESI-MS/MS, é possível obter importantes relações estrutura-fragmentação utilizando uma série de compostos que apresentem o mesmo núcleo estrutural e possuam pequenas diferenças estruturais, como por exemplo, a posição de um substituinte ou insaturação) [63]. Essas relações estrutura-fragmentação permitem distinguir íons e processos de fragmentação que são “comuns” à série analisada daqueles que são “diagnósticos”, cuja formação está associada a características estruturais específicas. Além disso, as relações estrutura-fragmentação podem ser utilizadas em combinação com dados de experimentos com troca de deutério, de MS^n e de massas acuradas para a elucidação das vias de fragmentação e proposição das estruturas dos íons produtos formados. Finalmente, dados termoquímicos [entalpias, energias de Gibbs, afinidade protônica (PA), basicidade em fase gasosa (GB) e acidez em fase gasosa (GA)], estimados por Química Quântica Computacional, podem ser empregados não apenas para sustentar as estruturas dos íons propostos, mas também para um melhor entendimento de suas intensidades nos espectros de íons produtos em função dos valores de entalpia, entropia e estados de transição (Figura 9) [63].

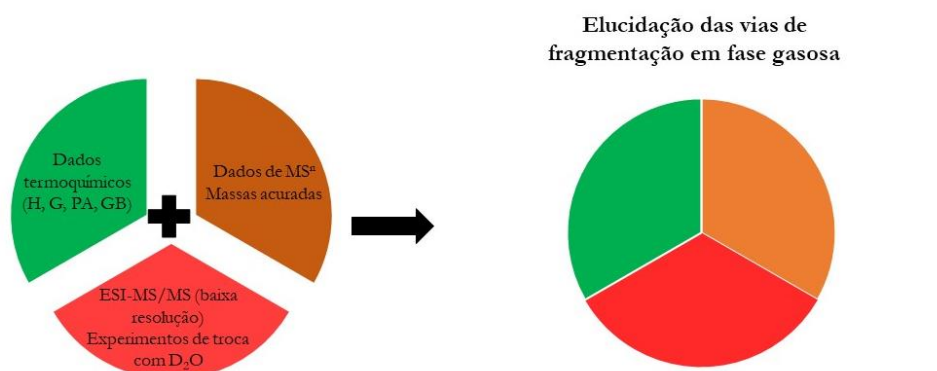


Figura 9. Etapas da elucidação das vias de fragmentação em fase gasosa utilizando espectrometria de massas e dados termoquímicos estimados por Química Computacional. Fonte: a autora.

Uma das etapas mais importantes de estudos envolvendo compostos bioativos é identificação dos produtos de metabolismo, tanto *in vivo* como *in vitro*. Na última década, a espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray (ESI-MS/MS) em hifenação com a cromatografia líquida (LC, do inglês *Liquid Chromatography*) vem se tornando uma das ferramentas mais utilizadas em estudos de metabolismo [64]. Em LC-ESI-MS/MS, inicialmente, os metabólitos (analitos) são previamente separados no sistema cromatográfico e, na sequência, introduzidos na fonte de

ionização, onde são convertidos em moléculas protonadas, desprotonadas e/ou cationizadas [65]. Íons de m/z específica (os íons precursores), gerados na fonte de ionização, são então selecionados no primeiro estágio de MS, sendo em seguida ativados para fragmentação, frequentemente por meio da colisão com um gás inerte (Ar e N₂, entre outros). Os íons produtos formados após a ativação são então analisados no segundo estágio de MS [66]. A identificação de um metabólito por LC-ESI-MS/MS é, então, feita com base na comparação de seu tempo de retenção, de seu espectro de absorção no ultravioleta-visível (UV-vis) e de seus dados de MS/MS com os de padrões autênticos [66]. No entanto, na maioria dos casos, a disponibilidade de padrões ainda é indispensável, uma vez que existem poucas bibliotecas espectrais comerciais baseadas em dados de ESI-MS/MS [67, 68].

1.3. Própolis e artepillin C

1.3.1. Importância comercial da própolis

Misturas complexas, de origem vegetal, extraídas de colmeias resinosas coletadas por abelhas são chamadas de própolis [69-71]. A própolis tem sido utilizada na medicina popular durante muitos anos em diversas regiões do mundo no tratamento de diversas doenças [72]. Quimicamente, a própolis é constituída por compostos fenólicos, como flavonoides e fenilpropanoides, terpenoides, hidrocarbonetos e outros compostos orgânicos. No entanto, a composição da própolis está relacionada a vários fatores, como por exemplo, as fontes vegetais, a origem geográfica e a época do ano em que é produzida [72, 73]. Além disso, a própolis pode apresentar diferentes cores dependendo da constituição química, variando do verde (devido a clorofila) a diversas tonalidades de marrom, vermelho e até amarelo [73].

A “própolis verde” (**B, figura 11**) é produzida por abelhas (*Apis mellifera*) a partir de resinas proveniente das folhas de *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) (**A, figura 11**), popularmente conhecida no Brasil como “alecrim-do-campo”. Dentre os principais metabólitos da própolis encontram-se flavonoides e derivados do ácido cinâmico, com destaque para o éster fenético (**X**) do ácido cafeico, ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (artepillin C, **XI**), bacarina (**XII**) e drupamina (**XIII**) (**Figura 10**) [72, 74]. Na literatura, várias atividades biológicas tem sido reportadas para a própolis verde, tais como antibacteriana [75], antioxidante [76], antiparasitária [77] e anticâncer [78]. Além disso, os extratos etanólicos da própolis verde são amplamente utilizados em várias regiões do mundo como alimento ou suplemento alimentar, medicamentos e produtos de higiene, dependendo do país [76].

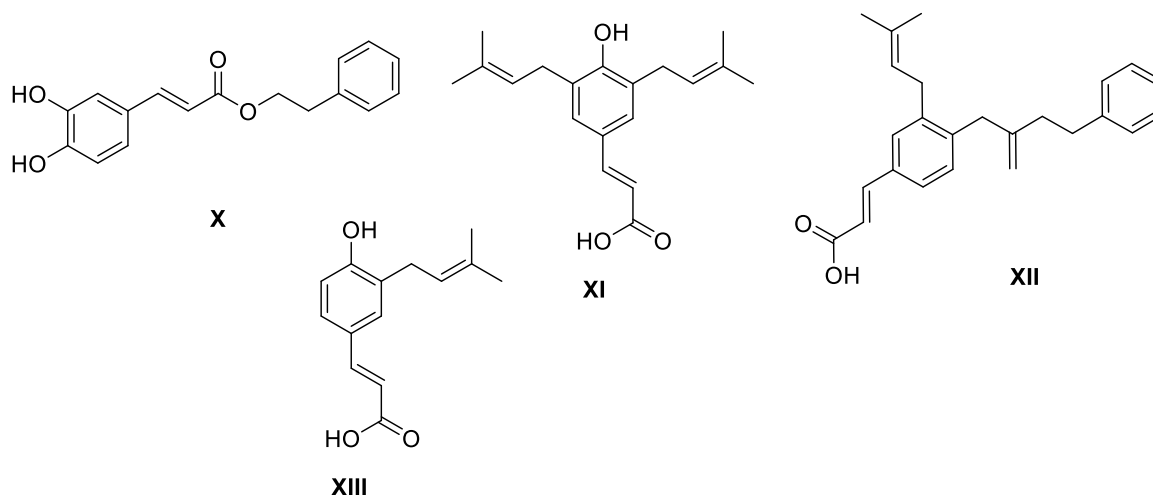


Figura 10. Estruturas químicas dos metabolitos da própolis éster fenílico (**X**) do ácido cafeico, ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (artepillin C, **XI**), bacarina (**XII**) e drupamina (**XIII**) [72, 74].



Figura 11. (A) *Baccharis dracunculifolia* DC e (B) própolis verde [79].

Conforme mencionado anteriormente (p. 32), a composição química das própolis pode variar de acordo com os diferentes tipos de plantas coletadas pelas abelhas. No entanto, o artepillin C é um dos principais ácido fenólicos encontrado na própolis verde [69, 71, 72, 80, 81]. Além disso, estudos demonstram que o artepillin C é encontrado também nas partes aéreas do arbusto perene *Baccharis grisebachii*, na qual é utilizado na Província de San Juan, na Argentina, para tratar úlceras gástricas, queimaduras e feridas na pele [71, 82, 83]. Por esse motivo, o artepillin C tem sido utilizado como indicador de qualidade da própolis brasileira e como marcador fitoquímico para controle de qualidade na exportação da própolis verde [84]. Este composto foi previamente isolado da *Flourensia heterolepis* [71] e de várias espécies de *Baccharis* [85], *Relbania* [71], sendo um dos principais ácidos fenólicos encontrados nas própolis brasileiras.

1.3.2. Artepillin C

1.3.2.1. Atividades biológicas

O artepillin C (ácido 3-[4-hidroxi-3,5-*bis*-(3-metil-2-butenil)-fenil]-2-(*E*)-propenóico ou ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) (XI) consiste de um ácido *p*-hidroxicinâmico substituído por grupos prenils, que conferem uma maior hidrofobicidade e asseguram sua afinidade por ambientes lipofílicos (1, **Figura 12**, p. 36) [71, 86, 87]. As características estruturais do artepillin C contribuem para sua função como agente antioxidante, principalmente para proteção das membranas celulares, uma vez que o grupo hidroxila do anel aromático está disponível para o processo redox com o radical livre via transferência de um próton (H⁺) em uma etapa [87].

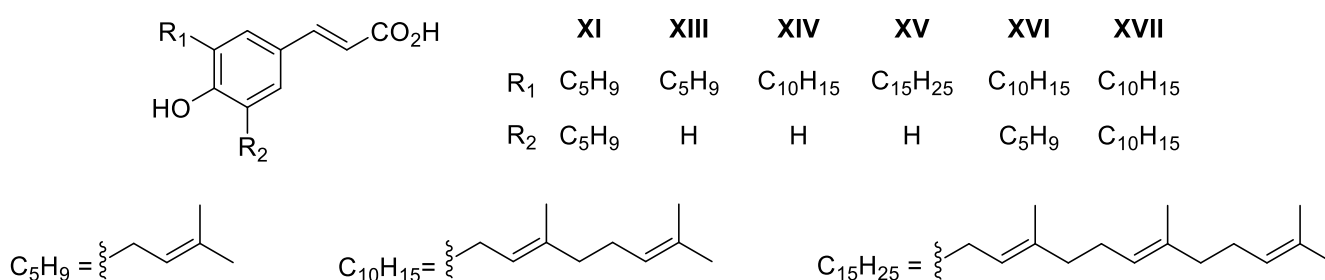


Figura 12. Estrutura química dos análogos do artepillin C (XI) sintetizados por Uto e colaboradores [88].

O artepillin C possui uma ampla variedade de atividades biológicas reportadas na literatura, com destaque para as atividades antitumoral [89], anticâncer [90], antioxidante [87], anti-inflamatória [91], antifúngica [71, 82] e antimicrobiana [71, 92]. Além disso, o artepillin C é descrito na literatura o principal composto bioativo responsável pelo efeito antibacteriano da própolis verde [93, 94]. O artepillin C demonstrou uma atividade promissora (valores de concentração inibitória mínima, ou CIM, relativamente baixos) contra diversas bactérias patogênicas, tais como *Bacillus cereus* (CIM= 15,6 µg/mL) [64], *Bacillus subtilis* (CIM= 31,3 µg/mL), *Enterobacter aerogenes* (CIM= 31,3 µg/mL), *Mycobacterium smegmatis* (CIM= 31,3 µg/mL), *Corynebacterium equi* (CIM= 31,3 µg/mL), *Staphylococcus aureus* (CIM= 62,5 µg/mL) [93-95], *Streptococcus faecalis* (CIM= 11,0 mg/mL) [95] e *Porphyromonas gingivalis* [96]. Entretanto, apesar do seu potencial antibacteriano promissor, seu mecanismo de ação ainda é desconhecido [71]. O artepillin C também foi mais efetivo que os controles fluconazol e/ou anfotericina B em ensaios antifúngicos *in vitro*, apresentando atividade inibitória frente a *Candida albicans* (CIM= 32,1 µg/mL) e *Candida tropicalis* (CIM= 8 µg/mL) [97], entre outros fungos [71, 82, 97].

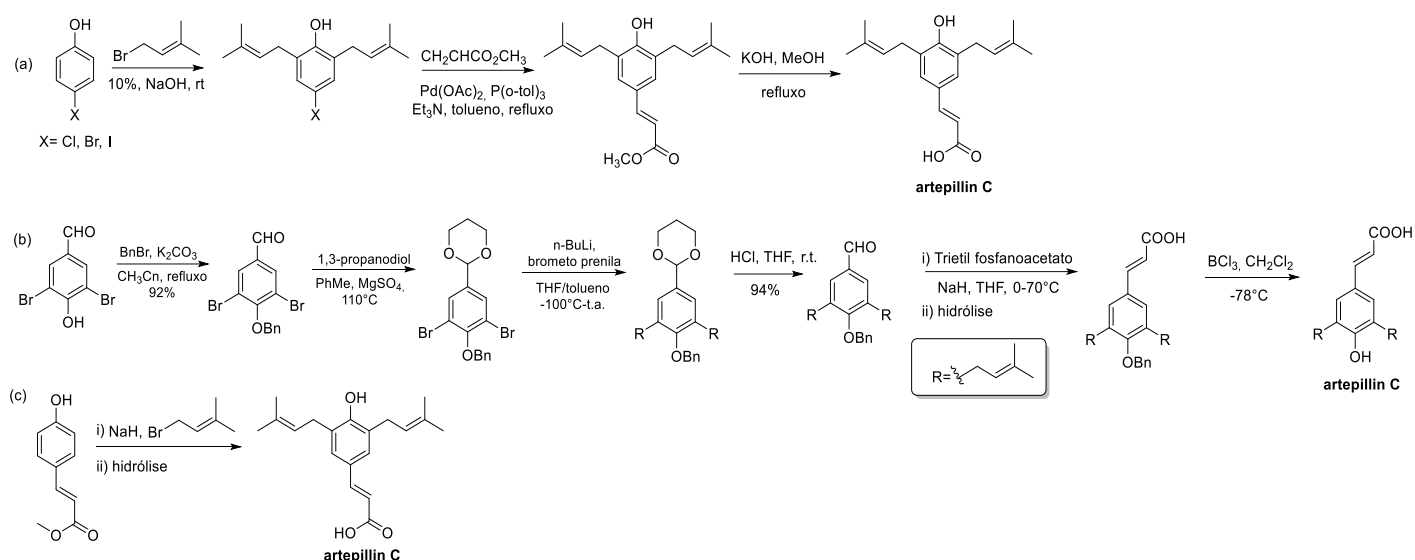
O artepillin C demonstrou também uma atividade antiparasitária contra a formas amastigotas de *L. amazonensis*, (IC₅₀ = 3,49 µM). No entanto, tanto a atividade antimicrobiana do artepillin C contra as bactérias cariogênicas e a

atividade antiparasitária contra formas promastigotas de *L. amazonensis* e *Schistosoma mansoni* ainda não foram reportados na literatura.

1.3.2.2. Síntese do artemisinina C

Várias metodologias têm sido desenvolvidas para o processo de extração e purificação do artemisinina C. Por exemplo, Lee e colaboradores isolaram o artemisinina C por meio da extração com dióxido de carbono supercrítico, obtendo-se 95% em peso [98]. Por outro lado, há poucas metodologias para a síntese total do artemisinina C [99, 100]. Até o momento, apenas três metodologias descritas para a obtenção do artemisinina C via síntese orgânica foram reportadas na literatura. Uto e colaboradores reportaram a síntese do artemisinina C por meio da *ortho*-diprenilação do *p*-iodofenol em água, seguida pelo acoplamento de Mizoroki-Heck com acrilato de metila e posterior hidrólise do éster (**Esquema 1a**) [100]. Essa metodologia tem como vantagem a fácil separação dos compostos prenilados formados na primeira etapa reacional. Entretanto, na segunda etapa reacional utiliza-se reagentes caros, o que torna a metodologia pouco economicamente inviável e pouco atrativa. Por sua vez, Zhao e colaboradores sintetizaram o artemisinina C através de uma reação de prenilação mediada por CuCN em duas etapas contínuas (**Esquema 1b**) [101]. De acordo com os autores, a introdução do segundo grupo prenil foi facilitada pelo estabilizador organometálico HMPA, com um rendimento global de 41% do produto desejado. Nessa metodologia, os autores obtiveram também o intermediário mono-prenilado, que levou à formação da drupanina (**Figura 10, XIII**) com rendimento satisfatório (35%)[101].

Já Patra e colaboradores obtiveram o artemisinina C através da reação entre o ácido *p*-cumárico previamente preparado pelos autores (através de uma *para*-olefinação) e brometo de prenila (**Esquema 1c**) [99]. Apesar do baixo rendimento (23%), essa metodologia mostrou-se a mais simples e barata que as descritas anteriormente.



Esquema 1. Metodologias descritas na literatura para síntese do artemillin C [99-101].

1.3.3. Estudos por ESI-MS/MS do artemillin C

A técnica LC-ESI-MS tem sido utilizada na identificação dos compostos presentes na própolis verde, dentre eles o artemillin C (**XI**). Gardana e colaboradores identificaram e quantificaram vários constituintes químicos da fração polifenólica da própolis brasileira por LC-ESI-MS/MS (**Figura 13**) [84]. A identificação e quantificação de vários constituintes químicos foi feita com base na comparação de dados cromatográficos, dados de UV e de ESI-MS/MS com os de substâncias padrões previamente isoladas [84].

Posteriormente, Corrêa e colaboradores investigaram a composição química dos resíduos e do extrato da própolis bruta por espectrometria de massas com ionização por eletrospray no modo negativo (ESI-MS). Com base na comparação entre os espectros obtidos pela análise e padrões descritos na literatura, os autores perceberam que substâncias bioativas como o artemillin C estavam presentes tanto no extrato bruto como também nos resíduos [102]. Mais recentemente, Carrão e colaboradores utilizaram a técnica LC-ESI-IT-MS/MS para identificação de dois metabólitos *in vitro* do artemillin C após seu metabolismo em microsomas hepáticos de ratos e humanos (**Figura 14**). A identificação e diferenciação de dois metabólitos isômeros de m/z 315 foi feita a partir dados de ESI-MS/MS, em combinação com dados cromatográficos. A posição das hidroxilas foi deduzida a partir da eliminação de formaldeído (30 unidades de massa), típica de álcoois primários [103].

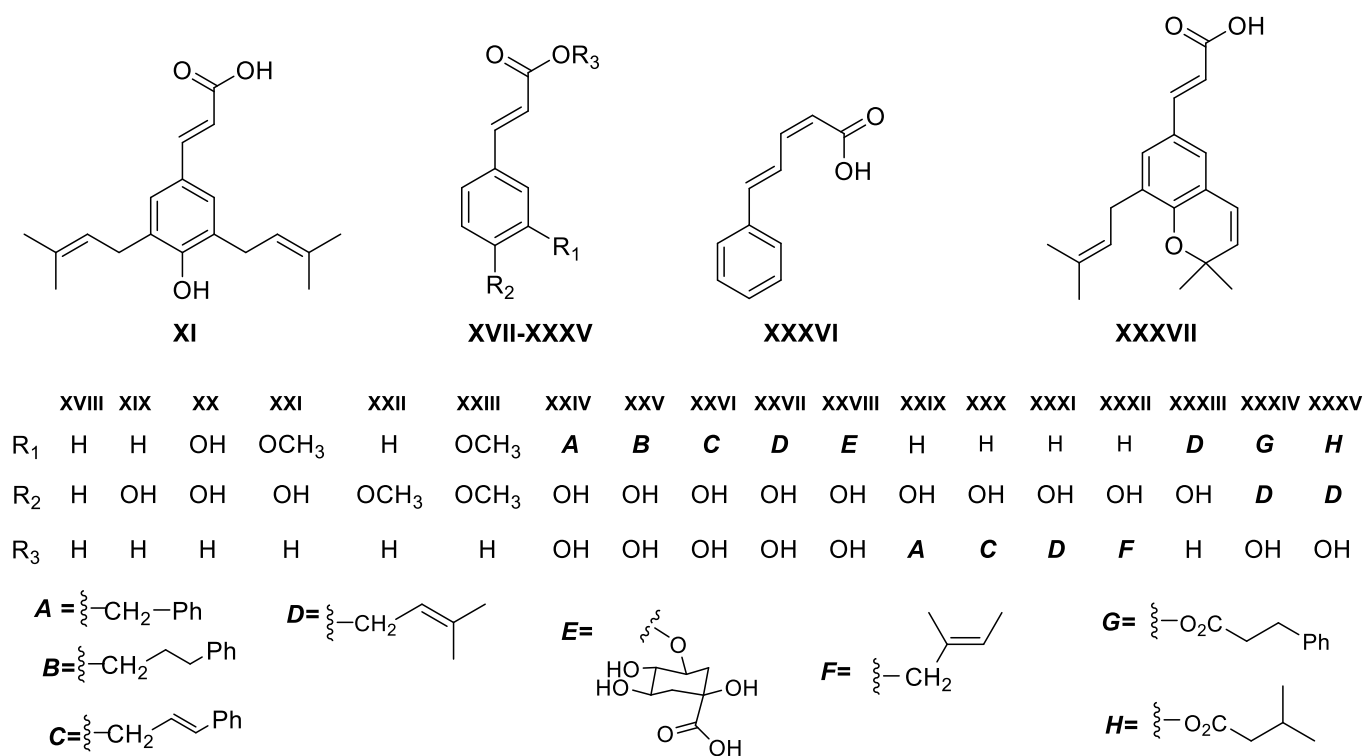


Figura 13. Estrutura química dos compostos identificados e quantificados da própolis verde por Gardana e colaboradores por HPLC-ESI-MS/MS [84].

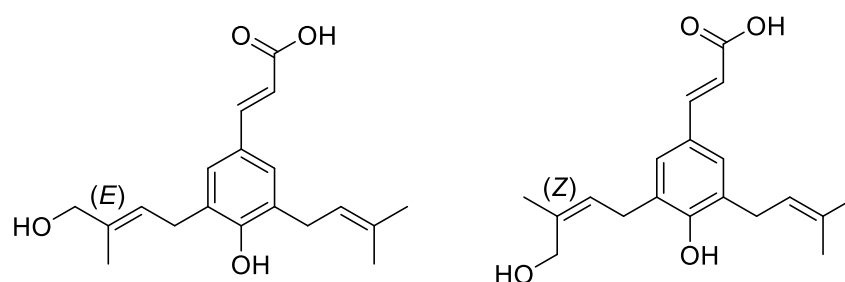


Figura 14. Estrutura química dos produtos de metabolismo do artemillin C [103].

2. Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram:

- Sintetizar o artepillin C e alguns análogos prenilados;
- Obter derivados do artepillin C e de seus análogos por meio de reações de hidrogenação catalítica e redução com LiAlH_4 ;
 - Identificar os compostos sintetizados com base em dados de ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C , espectroscopia de absorção no ultravioleta e de espectrometria de massas;
 - Avaliar a atividade antibacteriana do artepillin C e de seus análogos prenilados e derivados frente a um painel representativo de bactérias cariogênicas;
 - Avaliar a atividade esquistossomicida *in vitro* do artepillin C e de seus análogos prenilados e derivados contra vermes adultos de *Schistosoma mansoni*;
 - Avaliar a atividade leishmanicida *in vitro* do artepillin C e de seus análogos prenilados e derivados frente a formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*;
 - Investigar as interações entre os compostos que apresentarem atividade antibacteriana e antiparasitária mais promissoras e possíveis receptores através de *docking* molecular;
 - Investigar as vias de fragmentação do artepillin C e de seus análogos prenilados e derivados em fase gasosa utilizando combinação de espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray (ESI-MS/MS) com espectrometria de massas de estágios múltiplos (MS^n), dados de massas acuradas e dados termoquímicos, estimados por Química Quântica Computacional.

3. Materiais e Métodos

3.1. Reagentes, solventes, métodos e equipamentos

Os reagentes utilizados neste trabalho tiveram sua pureza verificada por cromatografia gasosa ou por ressonância magnética nuclear e, quando necessário, foram purificados conforme a literatura [104]. Para a dissolução dos reagentes e produtos e/ou como solventes de reação foram utilizados acetato de etila, acetonitrila, acetona, hexano, THF, DMF, éter etílico, metanol, tolueno e etanol que foram previamente tratados por meio de destilação e posteriormente submetidos ao processo de refluxo na presença de sódio metálico ou hidreto de sódio para secagem.

As análises por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foram realizadas em folhas de alumínio Merck KGaA recobertas por uma camada de sílica gel GF₂₅₄. Para visualização das manchas foi utilizada revelação com irradiação de luz ultravioleta em 254 nm e 365 nm, emitida por lâmpada UV da marca Osram, e por revelação química com vanilina sulfúrica (aquecimento da cromatoplaça em chapa de aquecimento após ter sido mergulhada na solução de vanilina sulfúrica). As separações por cromatografia em coluna clássica (CCC) foram realizadas em tubo de vidro de dimensões 70 cm x 1,8 cm equipado com torneira na parte inferior e recheado com sílica gel (tamanho de poro de 60Å, 230-400 mesh), marca Sigma-Aldrich, aproximadamente na proporção de 100 g de sílica/g de amostra. As amostras foram concentradas em rotaevaporador marca Buchi modelo R-215.

As análises por cromatografia gasosa com detector por ionização de chama (GC-FID) foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu modelo 2010, equipado com injetor automático AOC20i+s. Utilizou-se nessas análises uma coluna Restek Rtx-5®, de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme, composto por 5% de difenilpolisiloxano e 95% de dimetilpolisiloxano. Como gás de arraste foi utilizado nitrogênio (99,999%) a uma velocidade linear de 36,8 cm/s. A temperatura da coluna foi mantida a 80 °C por 2 min, sendo programada para aumentar até 290 °C a 30 °C/min e então mantida a 290 °C por 10 min. As análises foram realizadas a partir de 1 mg do composto, que foi dissolvido em 1 mL de acetato de etila e adicionado a um vial de 2 mL.

As análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu modelo GCMS2010 Plus, equipado com injetor automático AOC-20i, coluna de sílica fundida marca Restek, modelo Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm), composta por 5% de fenilpolisiloxano e 95% de metilpolisiloxano. As condições para análise no GC-MS foram as mesmas do GC-FID descritas anteriormente. A fonte de ionização por elétrons (EI-MS) operou a 70 eV e analisador do tipo quadrupolar. Hélio (99,999% de pureza) foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 1 mL/min. As amostras (1 mg) foram solubilizadas em acetato de etila e analisadas no modo

split na razão de 1:20. A identificação dos compostos foi feita por comparação de seus respectivos espectros de massas com os da biblioteca Wiley 7.0 disponível no equipamento.

As reações de hidrogenação catalítica foram realizadas em reator de aço inox de alta pressão (pressão máxima de 200-400 psi) no volume de 100 mL da marca Famabras.

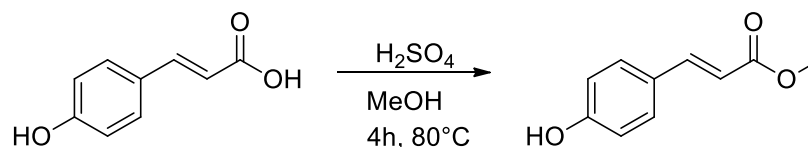
Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em espectrômetro Perkin-Elmer modelo Spectrum Two (Perkin-Elmer). As amostras sólidas foram maceradas com KBr e fundidas sob pressão até a formação de pastilhas. As amostras oleosas foram solubilizadas em diclorometano e analisadas na forma de filme sobre pastilha de KBr.

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em espectrômetros Bruker DRX-400, operando em frequência de 400 MHz para ^1H e em 100 MHz para ^{13}C , respectivamente. Clorofórmio deuterado [CDCl_3 , 99,9% de átomos de D, Aldrich – EUA] foi utilizado como solvente. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em parte por milhão (ppm) em relação ao sinal residual do solvente. A multiplicidade dos sinais foi deduzida conforme a quantidade de sinais obtidos nos espectros. A constante de acoplamento (J ; em Hz) foi calculada a partir da comparação dos picos do mesmo sinal e o número de hidrogênios foi deduzido a partir da integral relativa (ver **Anexos**).

3.2. Síntese do artepillin C e seus derivados

3.2.1. Síntese do *p*-cumarato de metila

Para a obtenção do esqueleto básico do artepillin C, foi inicialmente preparado o *p*-cumarato de metila por meio da esterificação do ácido *p*-cumárico (marca Sigma-Aldrich) com metanol utilizando ácido sulfúrico concentrado como catalisador, conforme metodologia previamente descrita na literatura [105, 106]. A reação foi conduzida sob agitação e refluxo (80 °C) durante 4 h (**Esquema 2**).



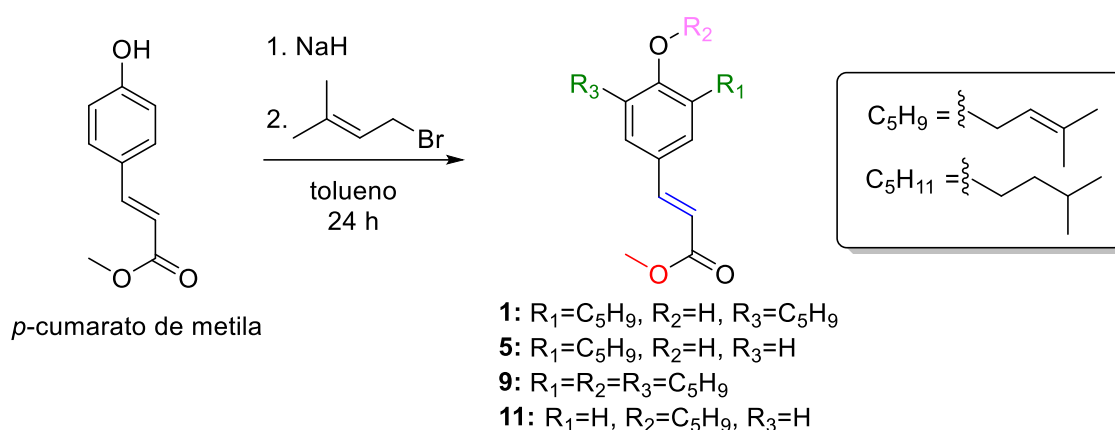
Esquema 2. Preparação do *p*-cumarato de metila.

O monitoramento do progresso da reação foi realizado através de CCDC, utilizando-se como eluente uma solução de Hex:AcOEt 1:1 (v/v). Após o término da reação, o meio reacional foi concentrado em rotaevaporador,

solubilizado em 10 mL de acetato de etila e lavado com água (3 x 15 mL). Em seguida, a fase orgânica foi lavada com uma solução saturada de NaHCO₃ (2 x 15 mL) para neutralização do ácido sulfúrico e 15 mL de solução saturada de NaCl. A fração orgânica foi então seca com MgSO₄ e filtrada. Em seguida, o solvente foi removido por evaporação à pressão reduzida em rotaevaporador, obtendo-se um produto na forma de sólido branco com rendimento de 90 %.

3.2.2. Síntese dos fenilpropanoides prenilados 1, 5, 9 and 11

O éster metílico do artepillin C (**1**, **esquema 3**, p. 46)) foi sintetizado por meio de uma reação de prenilação do *p*-cumarato de metila com brometo de prenila de acordo com a metodologia previamente descrita na literatura [107]. Nesse procedimento, em um balão de duas bocas de 25 mL, foram adicionados 0,5 mmol (89 mg) do *p*-cumarato de metila. O balão foi então purgado com argônio e, na sequência, foram adicionados 15 mL de tolueno previamente tratado. A mistura reacional foi resfriada a 0° C e, em seguida, foram adicionados 1,5 mmol (282 mg) de NaH em porções por 15 min. Após 15 min, foram adicionados, gota a gota, 1,5 mmol (153 µL) de brometo de prenila. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética por 24 h à temperatura ambiente. O monitoramento do progresso da reação foi realizado através de CCDC utilizando-se como eluente uma solução de Hex:AcOEt 8:2 (v/v). Após o término da reação, o tolueno foi removido à pressão reduzida em rotaevaporador e a mistura reacional acidificada com uma solução de HCl 1 mol/L (15 mL). Em seguida, a solução acidificada foi submetida à extração com acetato de etila (3 x 15 mL). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaCl (15 mL) e então seca com MgSO₄ e filtrada. O solvente foi removido por evaporação à pressão reduzida em rotaevaporador obtendo-se um líquido amarelado de aspecto viscoso. O líquido obtido foi dissolvido em acetato de etila grau HPLC e analisado por GC-MS. Após a análise do cromatograma obtido, verificou-se que se tratava de uma mistura de 4 produtos (**1**, **5**, **9** e **11**, **esquema 3**). Os rendimentos de cada produto estão listados na **Tabela 4** (p. 60), na seção **Resultados e discussões**.



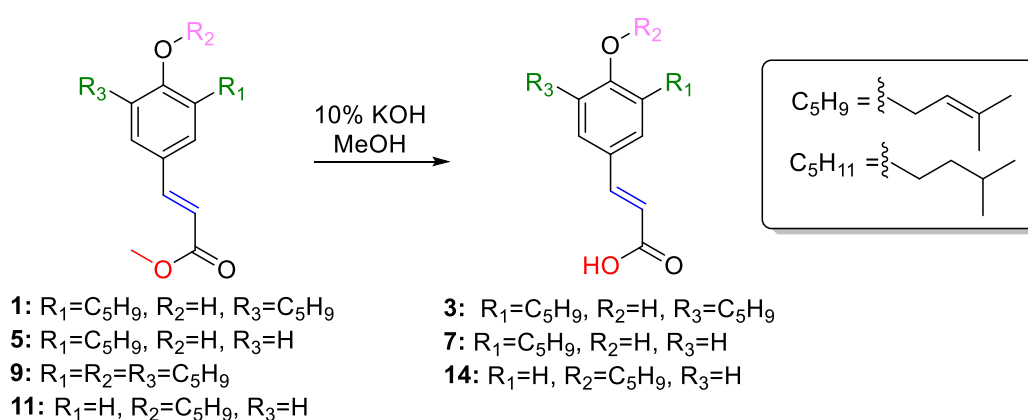
Esquema 3. Síntese dos derivados do artepillin C [107].

Para a separação e purificação desses 4 compostos foram necessárias duas etapas cromatográficas: cromatografia em coluna com sílica seguida por cromatografia líquida de alta eficiência. Primeiramente, empregou-se a cromatografia em coluna “flash” utilizando tubo de vidro de dimensões 2,5 x 105 cm, contendo sílica gel “flash” (tamanho do poro 60 Å, 230-400 mesh) na proporção de 100g/g de amostra. Foi utilizado *n*-hexano como fase móvel até a eluição do composto **9**. Em seguida, utilizou-se Hex:AcOEt 98:2 (v/v) até a eluição dos compostos **1** e **11**, após o qual empregou-se Hex:AcOEt 8:2 (v/v) como fase móvel para eluição do composto **5**. As frações contendo os compostos **5** e **9**, foram coletadas, agrupadas e concentradas em rotaevaporador, obtendo-se os compostos **5** e **9**. As frações que continham os compostos **1** e **11** também passaram pelo mesmo processo, para em seguida, serem novamente fracionadas por HPLC.

Devido ao fato de os compostos **1** e **11** coeluírem em cromatografia em coluna, utilizou-se cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *high-performance liquid chromatography*- HPLC) para o isolamento desses compostos das frações coletadas da CCC. Como eluente, utilizou-se uma mistura de acetonitrila (ACN) e água no seguinte gradiente de concentração: de 0 a 5 min: gradiente de ACN: H₂O 30:70 a ACN:H₂O 95:5; de 5 a 35 min: ACN:H₂O 95:5; de 35 a 40 min: gradiente de ACN:H₂O 5:95 a ACN:H₂O 30:70. Após remoção do solvente, foram obtidos os compostos **1** e **11**. Os rendimentos, assim como as características dos compostos **1**, **5**, **9** e **11** foram incluídos na **Tabela 4** (Seção Resultados e Discussão, **item 4.1**, p. 60), respectivamente. Todos os compostos foram identificados com base nas análises de ESI-MS (ou EI-MS), IV e RMN de ¹H e ¹³C (ver seção Resultados e Discussão, **item 4.3**).

3.2.3. Síntese dos compostos 3, 7 e 14

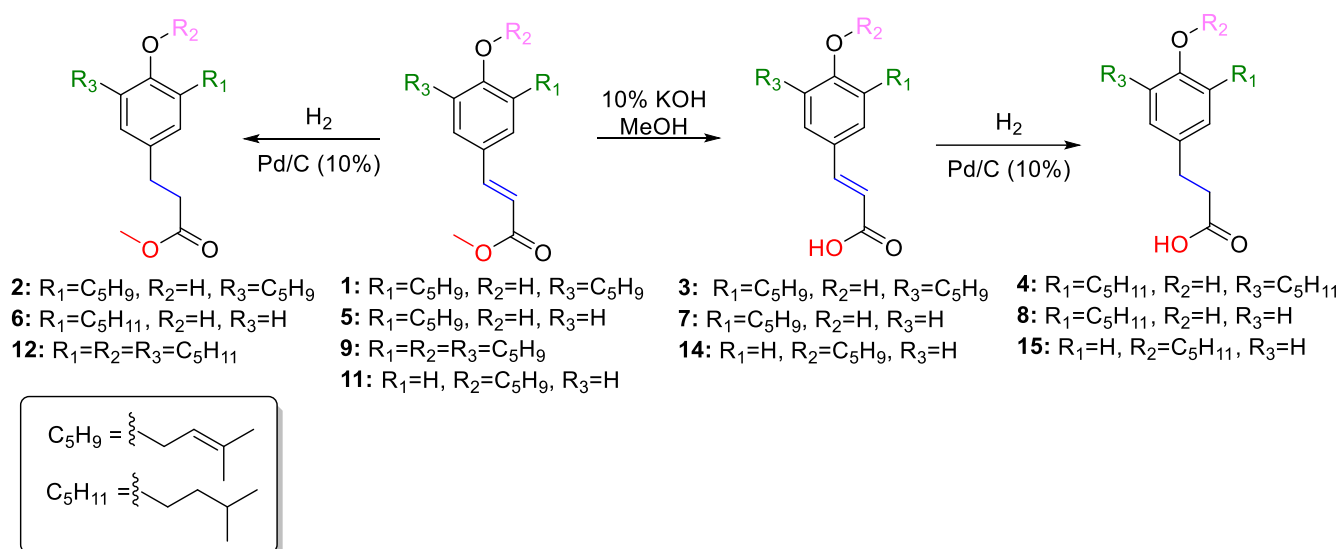
Os compostos **3**, **7** e **14** foram obtidos a partir de reações de hidrólise de acordo com a metodologia descrita por Uto e colaboradores [108]. Neste procedimento, uma solução de KOH (15 mL de uma solução aquosa a 10%) foi adicionada a uma solução contendo os compostos **1**, **5** e **11** em MeOH (15 mL). A mistura foi aquecida sob refluxo durante 1 h, arrefecida a 0-5 °C e acidificada com HCl 1 mol/L. O MeOH foi evaporado sob pressão reduzida e o resíduo aquoso foi extraído com AcOEt. Os extratos foram lavados com NH₄Cl saturado e salmoura, secos com MgSO₄ e evaporados sob pressão reduzida. Os sólidos brancos resultantes foram secos sob vácuo, para produzir os compostos **3**, **7** e **14** (rendimento de 100%) (**Esquema 4**). Todos os compostos foram identificados com base nas análises de ESI-MS, IV e RMN de ¹H e ¹³C (ver seção Resultados e Discussão, **item 4.2**).



Esquema 4. Reação de hidrólise dos compostos **1**, **5** e **11** segundo Uto e colaboradores [108].

3.2.4. Síntese dos compostos 4, 6, 8, 12 e 15

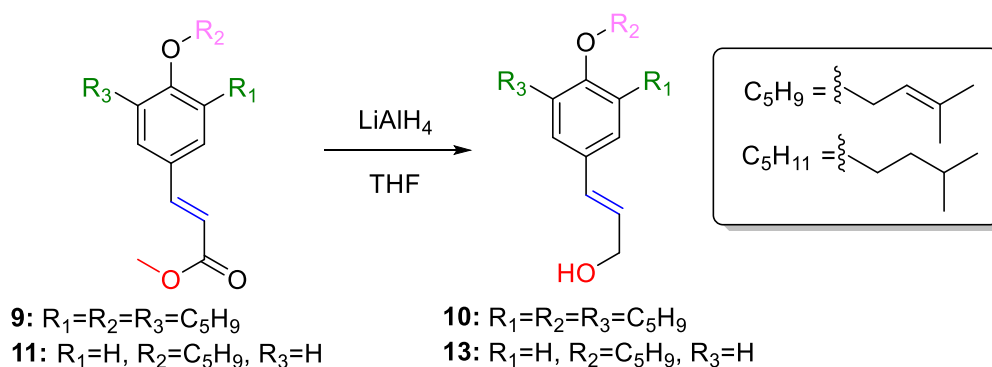
Os compostos **2**, **4**, **6**, **8**, **12** e **15** foram obtidos por hidrogenação catalítica dos compostos **1**, **3**, **5**, **7**, **9** e **14**, respectivamente, segundo metodologia descrita na literatura com algumas modificações [109]. Neste procedimento, os compostos foram dissolvidos em acetato de etila grau HPLC juntamente com o catalisador e transferidos para um reator de alta pressão sob agitação, atmosfera de H₂ e pressão de 400 psi à temperatura ambiente por 1-2 h (**Esquema 5**). Após secagem sob vácuo, os compostos **2**, **4**, **6**, **8**, **12** e **15** foram obtidos com rendimento de 100%. Todos os compostos foram identificados com base nas análises de ESI-MS (ou EI-MS), IV e RMN de ¹H e ¹³C (ver seção Resultados e Discussão, **item 4.3**).



Esquema 5. Reação de hidrogenação catalítica dos compostos **2**, **4**, **6**, **8**, **12** e **15** [109].

3.2.5. Síntese dos compostos **10** e **13**

Os compostos **10** e **13** foram sintetizados de acordo com a metodologia de Kantee e colaboradores [110] com algumas modificações. Neste procedimento, $LiAlH_4$ (0,68 mmol) foi adicionado rapidamente a uma solução dos compostos **9** e **11** (0,34 mmol) em THF (5,5 mL) a $0\text{ }^\circ\text{C}$. A mistura de reação então permaneceu sob agitação sob atmosfera de N_2 a $0\text{ }^\circ\text{C}$ por 1 h. Após esse período, a mistura foi mantida em agitação à temperatura ambiente por mais 9-10 h. Em seguida, água e HCl concentrado foram adicionados à mistura reaciona. Após extração com AcOEt (3 x 10 mL), as fases orgânicas combinadas foram lavadas com solução saturada de NaCl, secas sobre $MgSO_4$ e concentradas em vácuo. O resíduo bruto foi purificado por cromatografia em coluna com eluição isocrática com hexano:acetato de etila 9,8:0,2 (v/v), fornecendo, após secagem sob vácuo, os álcoois correspondentes **10** e **13** (Esquema 6).



Esquema 6. Reação de redução dos ésteres **9** e **11** para obtenção dos álcoois **10** e **13** correspondentes [110].

3.3. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* contra bactérias cariogênicas

Os ensaios para avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* do artemillin C e seus derivados foram realizados no Laboratório de Ensaios Antimicrobianos (LEA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU-MG), sob a supervisão do Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins.

3.3.1. Micro-organismos utilizados

As bactérias Gram-positivas utilizadas nos ensaios antimicrobianos, assim como seus morfotipos e condições de crescimento e encubação, estão listadas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Cepas das culturas de bactérias Gram-positivas utilizadas nos ensaios antibacterianos.

Micro-organismos	Padrão ATCC	Morfotipo
<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 25175	Coco
<i>Streptococcus mitis</i>	ATCC 49456	Coco
<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC 25975	Coco
<i>Streptococcus sanguinis</i>	ATCC 10556	Coco
<i>Streptococcus sobrinus</i>	ATCC 33478	Coco
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 4082	Coco
<i>Lactobacillus paracasei</i>	ATCC 11578	Bacilo

3.3.2. Preparo das soluções, meios de cultura e inóculos

Para o preparo dos inóculos, cepas de cada micro-organismo, armazenadas a -20 °C, foram suspensas em caldo TSB (meio de cultura líquido). Em seguida, os micro-organismos foram repicados em meio de cultura ágar sangue (Difco®) e incubados em estufa a 37 °C em atmosfera apropriada durante 24 h. Após a confirmação, as culturas de 24 h dos micro-organismos indicadores (desenvolvidos em ágar sangue) foram transferidas com o auxílio de uma alça de platina esterilizada para tubos contendo 5 mL de solução salina 0,9 %. Todas as amostras bacterianas preparadas foram padronizadas por comparação com o tubo da escala de 0,5 de McFarland [111]. Após essa comparação, as amostras foram diluídas em solução salina esterilizada (1 mL de suspensão em 9 mL de solução salina), obtendo-se inóculos de $1,5 \times 10^7$ UFC/mL. Em seguida, os inóculos foram diluídos em caldo triptona soja (2 mL de suspensão em 10 mL de caldo), obtendo-se assim inóculos de $2,5 \times 10^6$ UFC/mL e uma concentração final no poço de inóculo de 5×10^5 UFC/mL, conforme metodologia reportada na literatura pelo CLSI [111].

Para o preparo das soluções dos compostos **1-15**, 5 mg de cada composto foram solubilizados em 250 μL em DMSO (Sigma®) com auxílio de um banho de ultrassom. Após completa solubilização, foram adicionados 1000 μL de caldo triptona soja. A solução aquosa de digluconato de clorexidina, da Sigma® (0,1 mg/mL), utilizada como controle positivo, foi diluída em TSB, obtendo-se uma concentração final de 0,02 mg/mL. As atividades foram avaliadas para concentrações finais da clorexidina (nos poços das microplacas) na faixa de 0,115 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 59,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3.3.3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo

Para a determinação da concentração inibitória mínima, adicionou-se a microplacas esterilizadas de 96 orifícios o caldo TSB, a solução da amostra (artepillin C e seus derivados) e a suspensão padronizada dos micro-organismos, totalizando 100 μL , (**Figura 15**, p. 51). As amostras foram avaliadas nas concentrações de 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 0,98 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Estas concentrações foram obtidas através do método de microdiluição em microplaca, sendo que o valor da concentração inibitória mínima (CIM) correspondeu à solução de menor concentração em que ocorreu a inibição do crescimento microbiano, detectado após a adição de resazurina (Sigma®). Esta técnica foi realizada utilizando a metodologia padronizada na literatura pelo CLSI com modificações [111].

Para os controles negativos, foram realizados os seguintes testes: controle de esterilidade do caldo TSB (100 μL de TSB), controle das culturas - inóculos (que devem apresentar crescimento microbiano devido à ausência de agentes antimicrobianos) (80 μL caldo triptona soja + 20 μL do inóculo) e controle de esterilidade do sistema solvente utilizado na solubilização das amostras (99 μL de caldo triptona soja e 1 μL de DMSO), que devem apresentar ausência de crescimento. Além destes, foi também realizado o controle do DMSO (mistura de 1 a 5 μL de DMSO, de 75 a 79 μL de caldo TSB e 20 μL de inóculo em 5 orifícios), que deve apresentar crescimento bacteriano, indicando a ausência de interferência do DMSO no crescimento dos micro-organismos.

Como controle positivo frente aos micro-organismos indicadores utilizou-se clorexidina (Sigma®) a 0,02 mg/mL. Conforme mencionado anteriormente, as atividades foram avaliadas para concentrações finais da clorexidina (nos poços das microplacas) na faixa de 0,115 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 59,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As microplacas foram seladas com filme plástico e incubadas a 37 °C por 24 h, respeitando-se as exigências de atmosfera de cada bactéria testada.

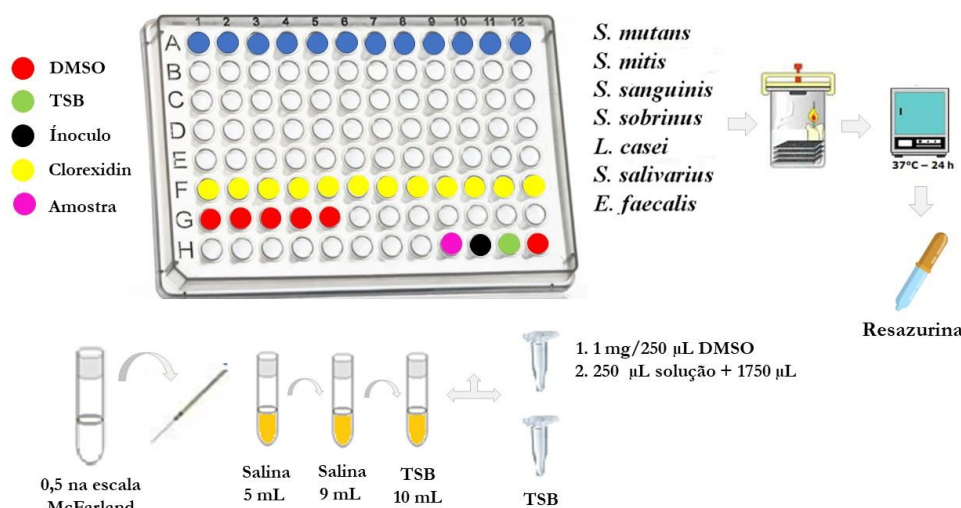


Figura 15. Esquema do preparo da amostra e do inóculo para o teste da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) [112].

Posteriormente, foram adicionados em cada orifício 30 µL de solução aquosa de resazurina a 0,02% como revelador do crescimento microbiano [113]. A resazurina apresenta-se na forma oxidada, com coloração azul, podendo reduzir-se a resorufina (coloração rosa) na presença da enzima bacteriana desidrogenase ativa (**Figura 16**, p. 51) [114]. Dessa forma, a atividade antimicrobiana nos poços das microplacas foi avaliada de acordo com sua coloração, sendo então observada a manutenção da cor azul (sem crescimento bacteriano) ou alteração para a cor rosa (crescimento bacteriano).

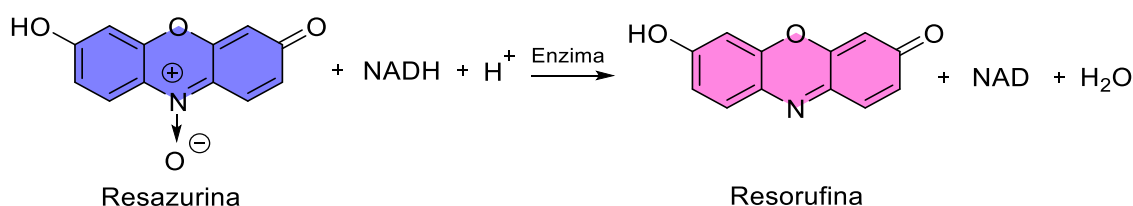


Figura 16. Reação de redução da resazurina à resorufina.

3.4. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

Para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM) dos compostos **1-15**, uma alíquota de 10 µL de cada amostra foi removida de cada poço antes de adicionar resazurina (Sigma). A alíquota foi semeada em ágar Schaedler (DIFCO) suplementado com hemina (5 mg mL⁻¹, Sigma), menadiona (1 mg/mL Sigma) e 5% de sangue de cavalo desfibrinado. As placas de ágar foram incubadas a 36 °C por 24 h em condições gasosas apropriadas. Os ensaios

de CBM foram realizados em triplicata. Após a incubação, a CBM foi definido como a concentração de amostra com menor concentração da amostrada capaz de matar a população bacteriana inicial, onde nenhum crescimento bacteriano visível foi observado[115].

3.5. Docking molecular

3.5.1. Abordagem computacional

3.5.1.1. Preparações de ligantes e alvos

Os compostos **5** e **6**, que apresentaram os resultados nos ensaios antibacterianos mais promissores (ver seção **Resultados e Discussão**), foram submetidos a estudos por “docking” molecular. Os estudos foram realizados pelo grupo do prof. Rhida Ben Said, do College of Science and Arts da Qassim University, Tunísia. Para a realização desses estudos, as estruturas 3D dos compostos foram otimizadas usando o método semi-empírico AM1 [116] implementado no software Hyperchem 8.0.8 (Versão 8.0.8, Hypercube, EUA, <http://www.hiper.com>). As estruturas otimizadas foram convertidas para o formato *.mdb para usar como entrada MOE-docking.

As estruturas cristalinas de *S. mitis* (PDB ID: 3LE0) [117] e *S. sanguinis* (PDB ID: 4N82) [118] foram selecionadas como alvos antibacterianos, baixados do Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>). Algumas informações relacionadas às estruturas-alvo foram fornecidas na **Tabela 2**.

Tabela 2. Informações relacionadas aos alvos estudados.

Alvos PDB	Métodos	Osganismo	Corrente	Comprimento da sequência	Resolução (Å)	Ligantes-nativos
3LE0	Difração raio X	<i>Streptococcus mitis</i>	A	153	1.91	GOL
4N82	Difração raio X	<i>Streptococcus sanguinis</i>	A, B, C, D, E, F	178	1.88	FMN

3.5.1.2. Protocolo e validação do método de ancoragem

Estudos de “docking” molecular foram realizados para identificar as interações de ligação dos compostos mais ativos dentro do resíduo do sítio de ligação dos alvos usando o software MOE [4]. As etapas do protocolo de “docking” foram as mesmas descritas na literatura [5,6] usando os seguintes parâmetros padrão: Placement: Triangle Matcher; Responsing 1: London dG. A função de pontuação London dG.

Para validar o método, o reencaixe de todos os ligantes nativos aos seus alvos foi realizado usando “Dock Option” implementado no software MOE [4]. Os valores de RSMD dos complexos obtidos (*Targets-Crystallized ligands*) foram menores de 2,50 Å [7], indicando que o método de encaixe foi preciso e bem-sucedido.

3.5.1.3. Simulação de Dinâmica Molecular (MD)

Com o objetivo de estudar a estabilidade de dois complexos formados, as simulações MD foram realizadas usando as opções "Compute/Simulations/Dynamics" incluídas no software MOE 2014.0901 [119]. Como parâmetros padrão foram utilizados o algoritmo Nose–Poincaré–Andersen (NPA), com o objetivo de pesquisar as interações de diferentes resíduos em cada sistema, e o campo de força MMFF94x, usado para a etapa de minimização de energia desses complexos. O protocolo MD foi estabelecido para 1500 ps (um período de equilíbrio de 100 ps seguido por um período de produção de 1400 ps, a uma temperatura constante de 310 K). Finalmente, os gráficos das variações das energias potenciais U (kcal/mol) em função do tempo t (ps) foram feitos usando o software OriginPro 9.1.

3.5.1.4. Avaliação ADME-Tox

As regras de semelhança de drogas, nomeadamente: Lipinski, Veber e Ghose, foram verificadas calculando os diferentes parâmetros físico-químicos (TPSA, nROT, MW, LogP, número de aceptadores de ligações de hidrogênio (nHA) e número de doadores de ligações de hidrogênio (nHD) usando o SwissADME server (<http://www.swissadme.ch/>). Além disso, o servidor pkCSM (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/prediction>) [120] foi utilizado para análise de perfis ADMET, calculando os seguintes parâmetros: absorção (Caco-2: adenocarcinoma do cólon, HIA: absorção intestinal humana), distribuição (SNC: Permeabilidade do Sistema Nervoso Central, BBB: permeabilidade da barreira hematoencefálica), metabolismo (inibidor do CYP1A2, inibidor do CYP2C19, inibidor do CYP2D6), excreção (substrato OCT2 renal: transportador de cátions orgânicos 2, depuração total) e toxicidade (hERG: human ether-à-go-go-related gene, hepatotoxicity).

3.6. Ensaios antiparasitários

3.6.1. *Schistosoma mansoni* (LE)

Para a avaliação *in vitro* da atividade esquistossomicida dos compostos **1-15**, após a perfusão das veias porta e mesentéricas, vermes adultos de *Schistosoma mansoni* linhagem Luiz Evangelista (LE) foram transferidos para uma placa de cultura de 24 poços (2 casais de vermes por poço) contendo 2 mL de meio RPMI 1640 (Inlab, Campinas, São Paulo) tamponado com HEPES 20 µM, pH 7,5 e suplementado com penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) (Gibco) e 10% de soro bovino fetal (Gibco), sendo então incubados em atmosfera umidificante a 37°C na presença de 5% de CO₂ por 24 h. Para cada amostra usou-se N amostral de 8 vermes (4 casais). Após o período de incubação as

amostras foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO)(Sigma-Aldrich) e aplicadas na concentração de 50 μM , em caráter de triagem. Como controles usou-se Praziquantel (PZQ) (Sigma-Aldrich) previamente solubilizado em DMSO e adicionado na concentração 1,6 μM (controle positivo) e meio RPMI 1640 suplementado contendo 0,1% de DMSO (controle negativo).

Os casais de vermes adultos foram incubados nas mesmas condições descritas anteriormente e avaliados a cada 24 h durante 72 h por análise visual utilizando um microscópio invertido (Microscópio Primo Vert, Carl Zeiss) (4 – 10x). As alterações fenotípicas observadas foram classificadas em uma escala de viabilidade fenotípica (0-3) sendo: 3 para vermes normais, fixados na placa com bons movimentos; 2 para vermes com movimentos lentos; 1 para vermes com movimento severamente reduzido, com ou sem alterações no tegumento e o valor 0 para vermes mortos ou com ausência de movimentos após dois minutos de análises.

3.6.2. *Leishmania amazonensis*

Para a realização dos ensaios anti-*Leishmania in vitro* com os compostos **1-15**, cerca de 1×10^6 formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, na fase estacionária de crescimento dos parasitas, foram cultivadas em placas de 96 poços com meio RPMI 1640 (Gibco). Em seguida, as amostras dos compostos **1-15** e de anfotericina B, previamente dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth), nas concentrações de 50 μM e 1,56 μM , respectivamente, foram adicionadas às culturas. As culturas foram incubadas a 25°C em estufa BOD (Quimis) por 24 h e a viabilidade das formas promastigotas foi determinada pela inibição do crescimento do parasito a partir da contagem, em câmara de Neubauer (Glass), do número total de formas promastigotas vivas, levando-se em consideração a motilidade flagelar.

Como controle negativo foi utilizado meio RPMI 1640 contendo 0,1 % de DMSO e como controle positivo utilizou-se parasitos cultivados com anfotericina B na concentração descrita anteriormente. Os resultados foram expressos como a média da porcentagem da inibição da motilidade em relação ao controle negativo (0,1% DMSO). Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata.

3.7. Estudos das vias de fragmentação dos compostos 1-15 por ESI-MS/MS

As análises por espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray (ESI-MS/MS) dos compostos **1-15** foram inicialmente feitas em espectrômetro de massas Acquity H-Class triplo quadrupolo (QqQ) Xevo TQS (Waters, Milford, MS, USA) equipado com uma fonte de ionização Z-spray, operando no modo positivo. Soluções-estoque das amostras na concentração de 1,0 mg/mL em metanol foram preparadas e diluídas em MeOH:H₂O (80:20

v/v) com 0,1% de ácido fórmico e infundidas diretamente na fonte de ionização na concentração de 10 µg/mL a um fluxo de 0,1 mL/min. No caso dos experimentos com troca por deutério, as soluções-estoque dos compostos **1-6** e **9**, **11** e **12** foram dissolvidas em MeOH:D₂O (1:1 v/v). As voltagens do capilar e do cone foram otimizadas para 3,2 kV e 40 V, respectivamente. Foi utilizado N₂ (99,999%) como gás de dessolvatação, a uma temperatura de 250 °C. A temperatura da fonte de ionização foi de 150 °C.

As análises por espectrometria de massas de múltiplos estágios (ESI-MSⁿ) foram realizadas em espectrômetro de massas AmaZon Speed (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) equipado com analisador do tipo *ion trap* (IT) e fonte de ESI, operando em modo positivo. N₂ (99,999%) foi utilizado tanto para nebulização (6 psi) como para a secagem (8 mL/min, 220 °C). A voltagem utilizada no capilar e no endplate foram de 3,5 kV e 500 V, respectivamente. A faixa de m/z utilizada nos experimentos foi de m/z 50 a 500.

Os dados de massas acuradas foram obtidos em equipamento híbrido Q-TOF Bruker micrOTOF™-QII, equipado com fonte de ionização por eletrospray (ESI-MS). As amostras dos compostos **1-6** e **9**, **11** e **12** foram solubilizados em MeOH:H₂O (9:1 v/v + 0,1% de ácido fórmico) e infundidos diretamente na fonte de ionização. Foi empregada voltagem no capilar de 3,0 kV, temperatura da fonte 180°C e uma faixa varredura de m/z 50-500. Como gás de colisão foi utilizado N₂ (99,999%) em energias de 10 a 40 eV. Trifluoroacetato de sódio foi utilizado como padrão para calibração do equipamento.

3.7.1. Análises de amostras de própolis por UPLC-MS/MS

As análises por cromatografia líquida de ultraperformance acoplada à espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray (UPLC-ESI-MS/MS) nos modos de varredura completa (*full-scan*) e monitoramento de reações múltiplas (MRM) foram realizadas em um sistema cromatográfico Waters modelo Acquity UPLC H-Class acoplado a espectrômetro Xevo TQ-S tandem quadrupolo equipado com fonte de ionização por eletrospray operando no modo positivo. Os experimentos de MRM foram realizados com uma amostras do extrato de própolis (5 µL) adquiridos da Apis Flora Ltda (Ribeirão Preto, SP, Brasil, lote 0790310). A amostra foi obtida por extração com etanol:água 7:3 (v/v) sob sonicação, sendo na sequência filtrada e analisada em uma coluna Ascentis Express C18 (100 × 4,6 mm, 2,7 µm) marca Supelco, na concentração de 5 µg/mL). Utilizou-se eluição isocrática com MeOH:H₂O contendo 0,1% de ácido fórmico. O espectro de MS de varredura completa foi registrado entre m/z 100 e 600, com energia de colisão definida em 15 eV. As varreduras de íons precursores foram registradas entre m/z 100 e 350, e a energia de colisão foi definida

como 20 eV para o íon de produção m/z x. Para selecionar uma transição adequada para a detecção de MRM do artepillin C (3) e plicatina B (5), três pares de transições íon precursor \rightarrow íon produto foram usadas para cada composto. O tempo de espera estabelecido para cada transição foi de 0,146 s, e o atraso entre varreduras foi definido no modo automático. Os dados de massa foram processados com o software MassLynx V4.1.

3.7.2. Métodos computacionais

Os cálculos computacionais utilizados para a obtenção dos dados termoquímicos descritos neste trabalho foram realizados pelo professor Dr. Ricardo Vessecchi, do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo. A análise conformacional e a otimização de geometria foram obtidos empregando o modelo B3LYP e sistema de base 6-31 + G(d, p)[121] em software Gaussian 09 [122]. A análise das frequências vibracionais demonstrou que todos os compostos estudados estão no mínimo em suas respectivas superfícies de energia potencial.

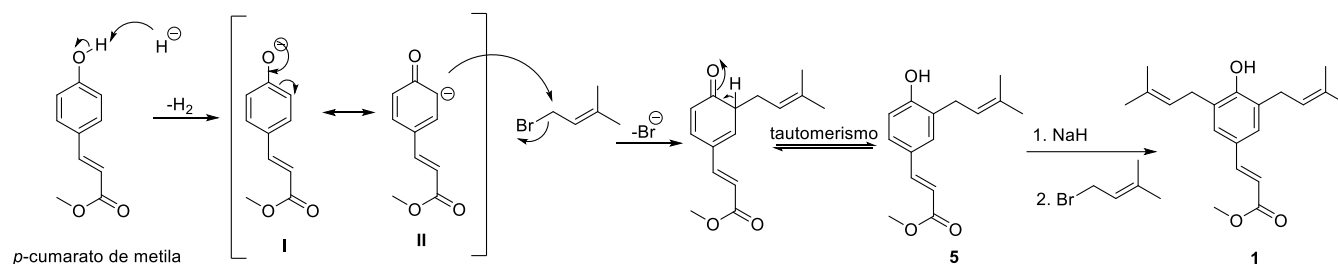
Os valores de afinidade protonica (PA) foram obtidos a partir de variações nas entalpias de uma reação de protonação $M + H^+ \rightarrow MH^+$, conforme descrito em estudos anteriores sobre produtos naturais e compostos orgânicos sintéticos que utilizaram a espectrometria de massas [93]. A entalpia experimental e a energia de Gibbs para prótons foram consideradas como sendo 1,48 e $-6,28$ kcal/mol [94]. Para estudar as vias de fragmentação, as estruturas iônicas mais estáveis foram propostas e as rotas de fragmentação foram sugeridas comparando as energias de Gibbs e as entalpias calculadas a 298,15 K. As energias de Gibbs foram usadas com cautela durante este trabalho, pois não foi possível alcançar as condições de equilíbrio durante os experimentos de CID [95–97].

4. Resultados e Discussão

4.1. Sobre a síntese dos 1-15

4.1.2. Síntese e isolamento dos compostos 1, 5, 9 e 11

Conforme mencionado anteriormente (p.45), o artepillin C (**3**) foi obtido de acordo com a metodologia descrita na literatura por Patra e colaboradores, que consiste na prenilação do *p*-cumarato de metila e posterior hidrólise do *p*-cumarato de metila di-*C*-prenilado (**1**) [107]. Utilizou-se NaH para promover a desprotonação da hidroxila fenólica e, assim, gerar o ânion fenolato. A formação do produto **1** desejado envolve o ataque nucleofílico dos carbonos *ortho* do ânion fenolato ao carbono eletrofílico do brometo de prenila, com consequente expulsão do íon brometo por um mecanismo S_N2. Em seguida, ocorre rearomatização do anel por meio de tautomerização, com consequente formação do composto mono-prenilado **5** (plicatina B), conforme representado no **Esquema 7**. O composto **1** é formado pela prenilação de **5**. Para assegurar que ocorra a segunda prenilação, resultando na formação de **1**, emprega-se excesso da base (3 eq) e de brometo de prenila (3 eq), conforme descrito anteriormente (p. 45).

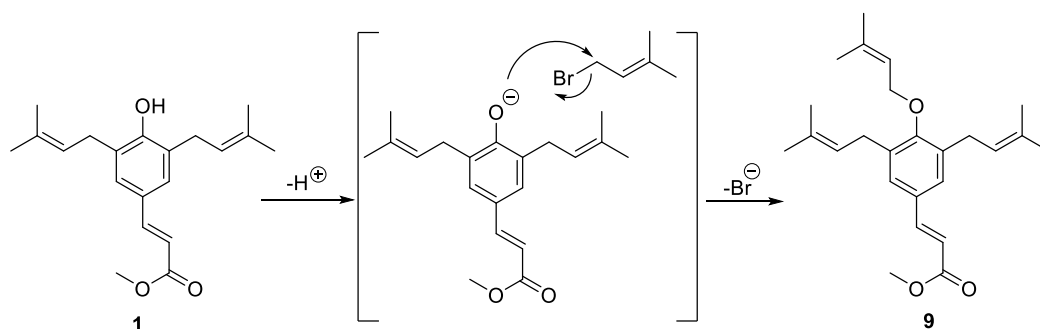
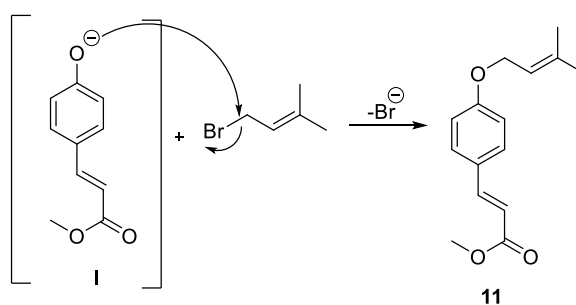


Esquema 7. Proposta para o mecanismo de formação do éster metílico do artepillin C (**1**).

Considerando-se que o íon fenolato é um nucleófilo ambidentado, a prenilação pode ocorrer também no oxigênio, resultando nos produtos **9** e **11** (**Esquema 8**). De fato, nas condições reportadas na literatura, a reação levou a uma mistura dos compostos prenilados (**1**, **5**, **9** e **11**), com predominância do composto *O*-prenilado (**11**) e com baixa seletividade para o composto di-*C*-prenilado **1** (**Esquema 3**), a partir do qual o artepillin C (**3**) foi posteriormente obtido por hidrólise básica.

Apesar de a formação dos compostos prenilados **9** e **11** ser possível, merece ser destacado que a formação dos compostos prenilados **5**, **9** e **11** não foi reportada por Patra e colaboradores [107]. Além disso, a dificuldade de isolamento do composto **1** da mistura **1+5+9+11**, que também não foi reportada pelos autores, acabou tornando-se, inesperadamente, o maior desafio deste trabalho. Devido à dificuldade de se separar os compostos **1** e **11** por métodos cromatográficos, vários esforços foram direcionados à separação dos compostos **1** (di-*C*-prenilado) e **11** (*O*-prenilado) por métodos não-cromatográficos. Dentre as várias tentativas de isolamento de **1**, merecem ser destacadas a

recristalização e a extração com solventes quimicamente ativos. A recristalização foi considerada com base no fato de que **1** e **9** são óleos, enquanto **5** e **11** são sólidos. Já a extração com solventes quimicamente ativos foi realizada devido à presença de hidroxila fenólica ionizável nas estruturas de **1** e **5**. No entanto, diante de inúmeras tentativas frustradas, optou-se por realizar um estudo sistemático para tentar otimizar as condições reacionais visando aumentar a seletividade para o composto **1**.

Formação composto tri-prenilado (**9**)Formação composto O-prenilado (**11**)Esquema 8. Proposta para o mecanismo de formação dos compostos **9** e **11**.

Na **tabela 3** encontram-se reunidos o aspecto físico e os rendimentos dos compostos dos compostos **1**, **5**, **9** e **11** e de seus derivados **2-4**, **6-8**, **10-15**.

Tabela 3. Características e rendimentos dos compostos 1-15.

Composto	Nome	Característica	Rendimento (%)
1	(<i>E</i>)-3-4-hidroxi-3,5-bis(3-metilbut-2-en-1-il)fenil)acrilato de metila	Óleo amarelo	32
2	3-(4-hidroxi-3,5-diisopentilfenil)propanoato de metila	Óleo amarelo claro	100
3	ácido (<i>E</i>)-3-(4-hidroxi-3,5-bis(3-metilbut-2-en-1-il)fenil)acrílico (artepillin C)	Sólido branco	100
4	ácido 3-(4-hidroxi-3,5-diisopentilfenil)propanoico	Sólido branco	100
5	(<i>E</i>)-3-(4-hidroxi-3-(3-metilbut-2-en-1-il)fenil)acrilato de metila (plicatina B)	Sólido branco	18
6	3-(4-hidroxi-3-isopentilfenil)propanoato de metila	Óleo amarelo claro	100
7	ácido (<i>E</i>)-3-(4-hidroxi-3-(3-metilbut-2-en-1-il)fenil)acrílico (drupanina)	Sólido branco	100
8	ácido 3-(4-hidroxi-3-isopentilfenil)propanoico	Óleo transparente	100
9	(<i>E</i>)-3-(3,5-bis(3-metilbut-2-en-1-il)-4-((3-metilbut-2-en-1-il)oxi)fenil)acrilato de metila	Óleo amarelo	15
10	(<i>E</i>)-3-(3,5-bis(3-metilbut-2-en-1-il)-4-((3-metilbut-2-en-1-il)oxi)fenil)prop-2-en-1-ol	Óleo amarelo	65
11	Metil (<i>E</i>)-3-(4-((3-metilbut-2-en-1-il)oxi)fenil)acrilato	Sólido branco	35
12	Metil 3-(4-(isopentiloxi)fenil)propanoato	Sólido branco	100
13	(<i>E</i>)-3-(4-((3-metilbut-2-en-1-il)oxi)fenil)prop-2-en-1-ol	Sólido amarelo	89
14	ácido (<i>E</i>)-3-(4-((3-metilbut-2-en-1-il)oxi)fenil)acrílico	Sólido branco	100
15	ácido 3-(4-(isopentiloxi)fenil)propanoico	Sólido branco	100

4.1.3. Otimização das condições reacionais para obtenção do composto di-*C*-prenilado (1)

Devido aos obstáculos encontrados para o isolamento do composto di-*C*-prenilado (1) descritos anteriormente (p. 57), optou-se por realizar um estudo mais detalhado da reação de prenilação do *p*-cumaroato de metila com o intuito de “otimizar” as condições reacionais e, assim, aumentar a seletividade para a formação do produto di-*C*-prenilado (1) desejado ou, pelo menos, evitar a formação do composto *O*-prenilado (11). Dessa forma, foram inicialmente efetuadas pequenas modificações no procedimento de síntese, tais como a introdução de refluxo na etapa de geração do fenolato e o aumento do tempo reacional. Essas modificações levaram a um aumento na conversão do material de partida, porém sem alterações significativas na seletividade da reação.

Em seguida, foram testadas diferentes condições experimentais, tais como solvente, tempo de reação e irradiação por micro-ondas. As reações foram monitoradas por cromatografia gasosa (GC-FID, do inglês *Gas Chromatography Flame Ionization Detection*) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS, do inglês *Gas Chromatography Mass Spectrometry*). A identificação dos compostos 1, 5, 9 e 11 foi feita com base na comparação dos tempos de retenção dos picos do cromatograma de GC-FID obtidos da mistura reacional com os dos padrões dos compostos 1, 5, 9 e 11 cujos isolamento e identificação foram descritos anteriormente. Sendo assim, inicialmente, foram

testados diversos solventes além do tolueno, variando-se o tempo reacional de 24 a 48 h nas condições empregadas na literatura. Solventes considerados mais “verdes” como acetonitrila, etanol e água também foram testados. Alíquotas dos meios reacionais foram retiradas e analisadas inicialmente a cada 1 h e depois em 20, 24 e 48 h. Na **Tabela 4** (p. 59) encontram-se os dados obtidos da reação de prenilação do *p*-cumaroato de metila em diferentes solventes após 24 h. Os resultados obtidos em 48 h não foram incluídos na tabela porque não houve mudanças significativas na composição do meio reacional após 24 h.

Conforme pode ser observado na **Tabela 4** (p. 62), as maiores conversões (isto é, a porcentagem de *p*-cumaroato de metila que foi consumido) foram obtidas em tolueno, éter, THF, DMF, acetonitrila e acetona. No entanto, com exceção do tolueno, nesses solventes foi observada uma seletividade para a formação do produto de *O*-alquilação **11**, que foi o único produto formado na maioria dos casos. O melhor solvente para esta reação foi, de fato, o tolueno, conforme descrito por Patra e colaboradores [99].

Na literatura, é bem estabelecido que a *C*-alquilação de fenóis é favorecida em solventes polares próticos como o metanol e a água devido à formação de ligação de hidrogênio entre esses solventes e o oxigênio do ânion fenolato. Devido à solvatação do oxigênio, sua nucleofilicidade em relação aos átomos de carbono diminui, tornando assim as posições *orto* e *para* do anel mais suscetíveis à prenilação [123]. No entanto, dentre os solventes próticos testados, apenas a água resultou em uma seletividade para a *C*-prenilação, com preferência para a formação do composto mono-*C*-prenilado **5**, porém a taxa de conversão foi muito baixa. No caso do metanol e do fluoroetanol, o produto de *O*-prenilação **11** foi majoritário.

Tanto a baixa seletividade para a formação do produto desejado **1** em tolueno como a baixa conversão e a baixa seletividade para a *C*-alquilação obtidas nos testes realizados com água, metanol e trifluoroetanol foram resultados inesperados e que não estavam em concordância com os dados da literatura [123]. Diante desses resultados, optou-se por avaliar o efeito da irradiação por micro-ondas (MW, do inglês *MicroWave*) sobre a seletividade da reação. Inicialmente, a reação foi conduzida em diferentes solventes, com o tempo reacional fixado em 30 min e a potência do reator de micro-ondas ajustada em 100 W, conforme mostrado na **Tabela 5** (p. 62).

Tabela 4. Conversão do *p*-cumaroato de metila nos compostos **1**, **5**, **9** e **11** em diferentes solventes após 24 h de reação.*

Solvente	C/%	S/% (5)	S/% (1)	S/% (9)	S/% (11)
Tolueno	100	11,8	23,9	30,2	34,1
Hexano	99,5	13,1	28,1	32,7	26,0
Éter	100	-	-	-	100
THF	100	-	-	-	100
DMF	100	-	4,6	-	95,4
Acetonitrila	100	-	-	-	100
Acetona	100	-	-	-	100
Metanol	94,8	5,8	-	-	94,2
Trifluoroetanol	64,5	-	36,3	-	63,7
Água	48	52,3	20,4	-	27,3

*C: conversão; S: seletividade

Tabela 5. Conversão do *p*-cumaroato de metila nos compostos **1**, **5**, **9** e **11** em diferentes solventes em condições da literatura* e com irradiação de micro-ondas (100 W) após 24 h e 30 min de reação, respectivamente.

Solvente	% Conversão		% Seletividade							
			5		1		9		11	
	Lit.	MW	Lit.	MW	Lit.	MW	Lit.	MW	Lit.	MW
Tolueno	100	100	11,8	—	23,9	33,9	30,2	49,7	34,1	16,4
Hexano	99,5	100	13,1	24,2	28,1	20,2	32,7	—	26,1	55,6
Éter	100	**	—	**	—	**	—	**	100	**
THF	100	100	—	—	—	—	—	—	100	100
DMF	100	100	—	—	4,6	—	—	—	95,4	100
Acetonitrila	100	100	—	—	—	—	—	—	100	100
Acetona	100	**	—	**	—	**	—	**	100	*
Metanol	94,8	45,8	5,8	15,0	—	—	—	—	94,2	85,0
Etanol	**	25,2	**	—	**	—	**	—	*	100
Trifluoroetanol	64,5	**	—	*	36,3	**	—	**	63,7	**
Água	48,0	1,9	52,3	—	20,4	—	—	—	27,3	100

* Condições descritas na literatura por Patra e colaboradores (tolueno como solvente e sem aquecimento) ** Não testado.

Os resultados obtidos dos experimentos realizados em reator de micro-ondas revelaram que em água e em metanol a conversão do *p*-cumaroato de metila foi ainda menor que a obtida para a reação conduzida nas condições da literatura [99]. Na maioria dos solventes polares apróticos testados, o produto *O*-prenilado **11** foi majoritário ou foi o único produto formado. No caso do hexano, foi possível observar um decréscimo na seletividade para a formação do produto di-*C*-prenilado **1** desejado, que foi acompanhada por um aumento da formação do composto *O*-prenilado **11**. Por outro lado, os dados mostraram que quando a reação é conduzida em tolueno e irradiação por micro-ondas, a seletividade para o produto **1** aumenta e a formação de **11** diminui em relação aos experimentos realizados nas condições da literatura.

Diante dos resultados promissores obtidos para a reação conduzida em micro-ondas, foram realizados outros experimentos para otimizar a potência do reator de micro-ondas e o tempo da reação em tolueno. Os resultados desses experimentos de otimização encontram-se reunidos na **Tabela 6**.

Tabela 6. Taxas de conversão do *p*-cumaroato de metila nos compostos **1**, **5**, **9** e **11** em tolueno em diferentes tempos de reação e em reator de micro-ondas em diferentes potências.

Produto	100 W			150 W			200 W		
	10	20	30	10	20	30	10	20	30
5	28,9	—	—	—	—	—	—	—	—
1	45,9	27,9	33,9	31,5	26,2	25,4	33,2	33,2	29,3
9	-	60,1	49,7	54,5	59,6	62,7	58,8	48,1	58,0
11	25,2	12,0	16,4	14,0	14,2	11,9	8,0	14,6	12,7

* Na potência de 50 W o material de partida (*p*-cumaroato de metila) não foi consumido.

Foram testadas as potências de 50, 100, 150 e 200 W e os tempos reacionais de 5 a 30 min. Os resultados referentes à reação em 5 min nas diferentes potências e na potência de 50 W nos diferentes tempos reacionais não foram incluídos na tabela porque não houve consumo do material de partida. Nas demais potências e tempos reacionais a conversão foi de 100%. A melhor seletividade tanto para a *C*-prenilação como para a formação do produto di-*C*-prenilado **1** foi obtida na potência de 100 W e no tempo reacional de 10 min. Conforme pode ser observado na **Tabela**

7, o uso da irradiação por micro-ondas resultou não apenas em uma redução considerável no tempo de reação (de 24 h para 10 min) para o consumo total do material de partida, como também resultou em uma seletividade quase duas vezes maior para o produto di-*C*-prenilado **1** desejado. Além disso, a seletividade para a formação do composto *O*-prenilado **11**, que dificulta o processo de isolamento do composto **1** da mistura reacional, foi três vezes menor.

Tabela 7. Comparação da seletividade obtida para as reações de prenilação do *p*-cumaroato de metila nas condições da literatura e com irradiação por micro-ondas.

	Tempo	C/%	S/% (5)	S/% (1)	S/% (9)	S/% (11)
Literatura	24 h	100	11,8	23,9	30,2	34,1
No reator de MW	10 min	100	28,9	45,9	—	12,7

Entretanto, apesar do uso da irradiação por micro-ondas aumentar a seletividade para a formação do composto di-*C*-prenilado (**1**) e diminuir a formação do composto *O*-prenilado (**11**), a quantidade formada de **11**, ainda que menor, continuou sendo um obstáculo para o processo de isolamento do composto **1** da mistura reacional, que teve que ser realizado através de duas etapas - cromatografia em coluna seguida da cromatografia líquida (HPLC) para a separação e purificação desses compostos.

4.2. Elucidação estrutural

A elucidação estrutural dos compostos **1**, **3**, **5** e **11** foi feita a partir dos dados de espectrometria de massas, espectroscopia de absorção no IV e espectroscopia de RMN de ^1H e de ^{13}C , bem como pela comparação de seus dados de RMN com os disponíveis na literatura. Todos os espectros de IV, RMN de ^1H e de ^{13}C e de massas encontram-se nos **Anexos**. Os demais compostos foram identificados por comparação de seus dados de IV, RMN de ^1H e de ^{13}C e de espectrometria de massas com os dos compostos **1,3**, **5** e **11**.

O Artepillin C tem como esqueleto básico o ácido *p*-cumárico, um fenilpropanoide formado a partir da via do ácido chiquímico [124]. Por essa razão, adotou-se neste trabalho o padrão de numeração do esqueleto deste fenilpropanoide, conforme mostrado da **Figura 17**. Para diferenciar os grupos prenila ligados a carbono e a oxigênio, adotou-se números seguidos por (') ou dois (") apóstrofes, respectivamente.

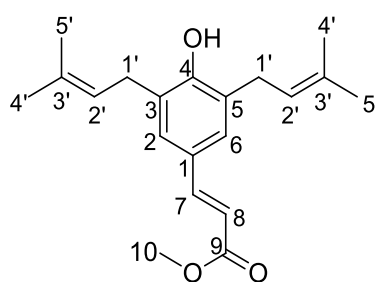


Figura 17. Numeração do esqueleto básico do éster metílico do Artepillin C (**1**) e de seus derivados.

Na metodologia adotada neste trabalho, foram inicialmente analisados os espectros de massas (ESI-MS ou EI-MS, este último em casos em que o composto fragmenta-se na fonte) e, em seguida, os espectros de absorção na região do IV. Após a identificação dos grupos funcionais presentes na estrutura desses compostos e da massa molecular do composto (e, eventualmente, de sua fórmula molecular), foram analisados os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram inicialmente analisados os espectros de RMN de ^{13}C e de DEPT 135. A combinação dos dados destes espectros permitiu identificar quais carbonos são metílicos, metilênicos, metínicos e quais não estão ligados a átomos de hidrogênio. Em seguida, foi feita uma análise do espectro de RMN de ^1H dos compostos para identificar os deslocamentos químicos, as integrais e as multiplicidades de cada sinal no espectro. Todos os espectros encontram-se na seção **Anexos** deste trabalho. Por fim, esses dados foram comparados com os da literatura para o mesmo composto ou, eventualmente, com os dados do composto do qual foi obtido.

4.2.1. Elucidação estrutural dos compostos 1-4

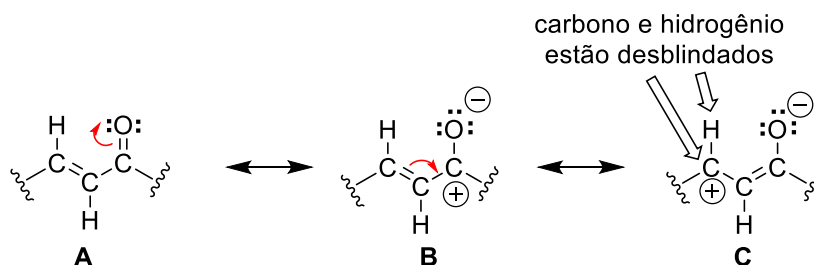
No espectro de massas obtido por (+)-ESI-MS em equipamento Q-TOF para o composto di-C-prenilado (**1**), foi possível observar os picos de m/z 315,1941 e 337,1768, que são compatíveis com íons de fórmulas $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{O}_3^+$ (erro de 4,4 ppm) e $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_3\text{Na}^+$ (erro de -1,8) e correspondem às moléculas protonadas e sodiadas de um composto de fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_3$ (**Figura A1**, p. 132). Esta fórmula indica um IDH de 8, que é compatível com a presença de um anel aromático e quatro outras insaturações.

No espectro de absorção da região do infravermelho do composto **1** (**Figura A2**, p. 132), foi possível observar uma banda de absorção larga e de média intensidade, centrada em 3428 cm^{-1} , que pôde ser atribuída ao estiramento da ligação O-H de hidroxila fenólica. Foi também observada uma banda de absorção intensa em 1718 cm^{-1} , característica de estiramentos de ligações C=O de sistemas α , β -insaturados. Por sua vez, as bandas de absorção entre 1450 e 1550 cm^{-1} são indicativas do estiramento de ligações C=C de anéis aromáticos. Além disso, na região entre 3000 e 2850 cm^{-1}

¹ é possível observar bandas de absorção intensas indicativas do estiramento de ligações C-H de carbonos com hibridização sp³ (2985 cm⁻¹) e sp² (3055 cm⁻¹) (**Figura A2**, p. 132).

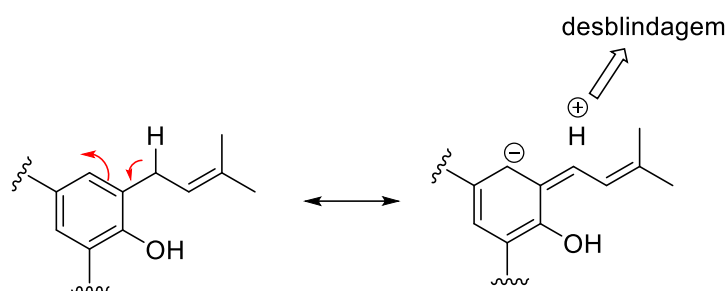
No espectro de RMN de ¹³C do composto **1** (**Figura A5**, p.135) foi possível observar a presença de apenas doze sinais. Este número de sinais é menor que o número de carbonos na estrutura do composto **1** devido à presença de simetria molecular. A maioria dos sinais deste espectro estão na região dos carbonos com hibridização sp² (aromáticos ou olefínicos, entre δ_c 100 e 160), quatro na região de carbonos com hibridização sp³ (carbonos saturados, entre δ_c 18 a 51) e um na região de carbonos carbonílicos (δ_c 168,0 - C9), corroborando com a estrutura esperada para o composto di-*C*-prenilado (**1**).

No espectro de RMN de ¹H do composto **1** (**Figura A3**, p. 133), alguns dos sinais encontram-se na região entre δ_H 6,0 e 7,9, que é característica de hidrogênios ligados a carbonos olefínicos ou aromáticos. Os sinais em δ_H 6,28 (1H, *d*, *J*=16,0 Hz) e δ_H 7,60 (1H, *d*, *J*=16,0 Hz) foram atribuídos aos hidrogênios olefínicos H8 e H7, respectivamente. A grande diferença entre os deslocamentos químicos destes hidrogênios pode ser atribuída ao efeito mesomérico elétron-retirador da carbonila, que torna a posição β de sistemas carbonílicos α,β-insaturados mais desblindada que a posição α. Isto pode ser melhor visualizado através das formas de ressonância representadas no **Esquema 9**. O valor da constante de acoplamento entre H7 e H8 é característico da configuração *E* (*trans*) da ligação dupla entre C7 e C8.



Esquema 9. Formas de ressonância de uma carbonila α,β-insaturada representando a desblindagem da posição β.

Os sinais na região entre δ_H 1,7 e 1,8, são característicos de hidrogênios ligados a carbonos com hibridização sp³ adjacentes a sistemas insaturados. Os sinais em δ_H 1,76 (6H, *s*) e δ_H 1,79 (6H, *s*) foram atribuídos aos hidrogênios metílicos H4' e H5' presentes nos dois grupos prenilas, respectivamente. O sinal em δ_H 3,35 (4H, *d*, *J* = 7,2 Hz) foi atribuído aos hidrogênios metilênicos H1' da posição alílica do grupo prenila. O maior deslocamento desses hidrogênios em relação dos hidrogênios metílicos nos grupos prenilas pode ser atribuído à hiperconjugação com o anel aromático (**Esquema 10**).



Esquema 10. Representação do efeito de hiperconjugação para explicar a desblindagem dos hidrogênios H1'.

A comparação dos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C do composto (**1**) com os da literatura (**Tabela 8**, p.70) para o artepillin C permitiu identificá-lo como sendo o éster metílico do artepillin C.

O composto **3** foi obtido por hidrólise de **1**, enquanto os compostos **2** e **4** são produtos de hidrogenação catalítica de **1** e **3**, respectivamente. No espectro de massas (ESI-TOF) do composto **3** (**Figura A9**, p. 139), por exemplo, os picos de m/z 301,1791 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) e m/z 323,1606 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), de fórmulas $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{O}_3^+$ (erro de 2,3 ppm) e $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{NaO}^{+3}$ (erro de -3,7 ppm) e são 14 unidades de massa menores que os correspondentes no espectro de **1** ($\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{O}_3^+$ e $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_3\text{Na}^+$, respectivamente), confirmando a hidrólise do éster **1** e a consequente formação do ácido carboxílico **3** (artepillin C).

A análise dos espectros de absorção na região do IV de **3** e **4** permitiu observar algumas mudanças em relação ao espectro de **1**. Por exemplo, no espectro de IV de **3** (**Figura A10**, p. 139), a banda de absorção característica do estiramento da ligação C=O foi observada em 1680 cm^{-1} (ácido carboxílico α,β -insaturado), enquanto a banda correspondente no espectro de IV de **1** (**Figura A2**, p. 132) foi observada em 1718 cm^{-1} (éster α,β -insaturado). Da mesma forma, a absorção referente ao estiramento das ligação C=O do derivado hidrogenado **4** (**Figura A14**, p. 143) ocorre em 1713 cm^{-1} . O fato de as absorções referentes às ligações C=O α,β -insaturadas de **1** e **3** ocorrerem em números de onda maiores que os das ligações C=O não-conjugadas de **2** e **4** pode ser atribuído o maior comprimento da ligação C=O de **1** e **3**, que se deve à contribuição da forma de ressonância **C** do **esquema 9** (p. 64), que não existe para **2** e **4**.

Como principal diferença entre os sinais dos espectros de RMN do composto **3** (**Figuras A11, A12 e A13**, p. 140, 141 e 142) em relação aos do composto **1**, merece ser ressaltada a ausência dos sinais de C10 em δ_c 51,5 e de H10 em δ_H 3,78 (3 H, s). Esses dados, em comparação com a literatura, permitiram identificar o composto **3** como sendo o artepillin C.

Com relação aos derivados hidrogenados **2** e **4**, as principais diferenças com relação aos espectros de RMN de ^1H de **1** e **3** são a ausência dos sinais dos hidrogênios olefínicos referentes a H7 (δ_{H} 7,60 e 7,76, respectivamente), H8 (δ_{H} 6,28 e 6,35, respectivamente) e H2' (δ_{H} 5,30 e 5,37, respectivamente). Devido à hidrogenação de **1** e **3**, C7 (δ_{C} 145,4 e 147,6), C8 (δ_{C} 115,1 e 114,2), C2' (δ_{C} 121,5 e 121,4) e C3' (δ_{C} 134,9 e 135,4) tornaram-se saturados e sp^3 -hidridizados, sendo substituídos no espectro de **2** (**Figura A6**, p. 136) e **4** (**Figura A8**, p. 138) pelos sinais em δ_{C} 30,3 e 30,4 (C7), 34,8 e 34,5 (C8), 30,4 e 28,4 (C2') e 22,7 e 22,8 (C3'), respectivamente. Além disso, os carbonos C2' e C3, que são metínicos e não hidrogenados na estrutura de **1** e **3**, tornam-se metilênico e metínico, respectivamente, nas estruturas de **2** e **4**. Consequentemente, tanto o deslocamento químico como a multiplicidade desses sinais são alterados. Por exemplo, com a presença de um hidrogênio em C3 de **2** e **4**, os hidrogênios das metílicas vinílicas H4' e H5' tornam-se dupletos com deslocamento de δ_{H} 0,95-1,7. Por sua vez, os sinais H7 e H8 de **2** e **4** aparecem em δ_{H} 3,31 e 2,86 e δ_{C} 2,83 e 2,62, respectivamente. Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C dos compostos **1**, **2**, **3** e **4** encontram-se reunidos nas tabelas 8 (p. 67) e 9 (p. 68).

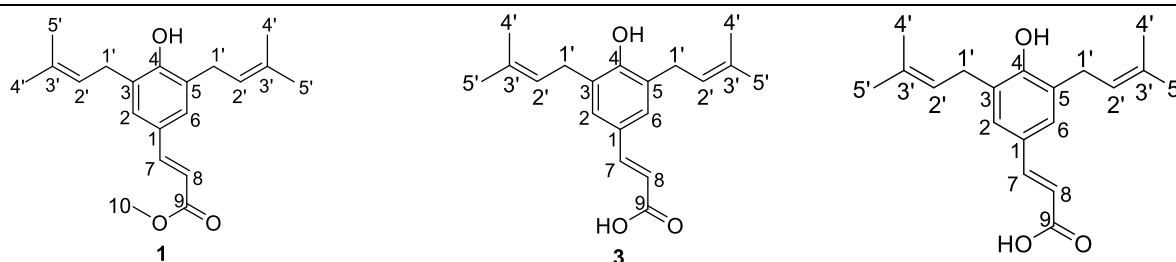
4.2.2. Elucidação estrutural dos compostos 5-8

O composto **5** foi obtido como um “produto indesejado” da prenilação do *p*-cumaroato de metila. No espectro de massas (ESI-TOF) deste composto (**Figura A18**, p. 147), os picos de m/z 247,1327 ($\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{O}_3^+$, erro de -0,8) e m/z 269,1143 ($\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{NaO}_3^+$, erro de -1,9) sugerem um composto de fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_3$. Considerando-se que o *p*-cumaroato de metila tem 10 átomos de carbono em sua estrutura e IDH = 6, esta fórmula molecular e o IDH = 7 sugere que o composto **5** foi formado por mono-prenilação do *p*-cumaroato de metila.

No espectro de absorção no IV do composto **5** (**Figura A19**, p. 147), a presença de uma banda de absorção larga de média intensidade, centrada em 3395 cm^{-1} , e da banda de absorção intensa em 1721 cm^{-1} , que são características dos estiramentos de ligações O-H e C=O, respectivamente, sugere a presença de um grupamento éster α,β -insaturado. A presença do éster metílico α,β -insaturado pôde ser confirmada pelos sinais em δ_{C} 167,9 (C9) e 51,5 (C10) no espectro de RMN de ^{13}C (**Figura A22**, p. 150) e DEPT (**Figura A21**, p. x149) e dos sinais em δ_{H} 7,60 (1H, *d*, $J_{7,8}=16,0$) e δ_{H} 6,27 (1 H, *d*, $J_{8,7}=16,0$) no espectro de RMN de ^1H (**Figura A20**, p. 148). A presença dos sinais em δ_{H} 7,29 (1H, *d*, $J_{2,6}=2,3$, H2), 7,03 (1H, *d*, $J_{5,6}=8,4$, H5) e 7,20 (1H, *dd*, $J_{6,5}=8,4$ e $J_{6,2}=2,3$, H6) sugere a presença de um grupo prenila na posição orto à hidroxila (C3). A posição da prenilação foi estabelecida com base na multiplicidade e nos valores de J: o sinal de H2 aparece como um duplete centrado em δ_{H} 7,29, que acopla com H6 com $^4J_{\text{meta}} = 2,3\text{ Hz}$. Por sua vez, H6 aparece

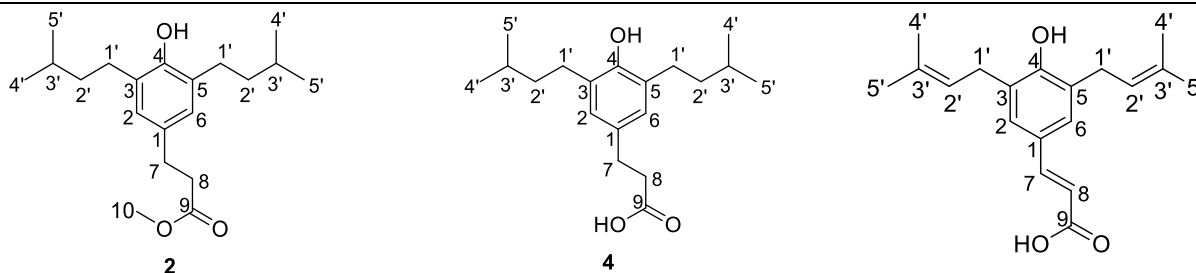
como um duplo duplete devido ao acoplamento com H2 (*meta*, $J=2,3$ Hz) e com H5 (*orto*, $J=8,4$ Hz). Por fim, o sinal de H5 aparece como um duplete ($J=8,4$ Hz) devido ao acoplamento com H6. A comparação destes dados com os da literatura (**Tabela 10**, p. 69) [99, 101] permitiu identificar o composto **5** como sendo a plicatina B, cuja ocorrência em extratos de própolis brasileira já foi previamente reportada na literatura [125].

Tabela 8. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) dos composto **1** e **3** e comparação com os da literatura para o artepillin C (300 MHz e 75 MHz, respectivamente), ambos em CDCl_3 [101].



	Composto 1		Composto 3		Artepillin C Literatura [1]	
	^{13}C (ppm)*	^1H (δ , ppm; J , Hz)	^{13}C (ppm)*	^1H (δ , ppm; J , Hz)	^{13}C (ppm)	^1H (δ , ppm; J , Hz)
1	127,8 (C)	—	127,8 (C)	—	127,8 (C)	—
2=6	128,1 (CH)	7,16 (1H, s)	128,2 (CH)	7,31 (1H, s)	128,6 (CH)	7,29 (1H, s)
3=5	126,8 (C)	—	126,6 (C)	—	126,3 (C)	—
4	155,1 (C)	—	155,6 (C)	—	155,6 (C)	—
7	145,4 (CH)	7,60(1H, d , $J_{7,8}=16,0$)	147,6 (CH)	7,76 (1H, d , $J_{7,8}=16,0$)	147,3 (CH)	7,72 (1H, d , $J=15,9$)
8	115,1 (CH)	6,28 (1H, d , $J_{8,7}=16,0$)	114,2 (CH)	6,35 (1 H, d , $J_{8,7}=16,0$)	114,1 (CH)	6,31 (1H, d , $J=15,9$)
9	168,0 (C)	—	172,1 (C)	—	172,5 (C)	—
10	51,5 (CH)	3,78 (3H, s)	—	—	—	—
1'	29,5 (CH ₂)	3,34 (4H, d , $J_{1',2'}=7,2$)	29,6 (CH ₂)	3,41 (4 H, d)	29,5 (CH ₂)	3,38 (4H, d , $J_{1',2'}=7,3$)
2'	121,5 (CH)	5,30 (2H, m)	121,4 (CH)	5,37 (2 H, m)	121,5 (CH)	5,34 (2H, m)
3'	134,9 (C)	—	135,4 (C)	—	135,2 (C)	—
4'	25,8 (CH ₃)	1,78 (6H, s)	26,0 (CH ₃)	1,85 (6 H, s)	25,8 (CH ₃)	1,82 (6H, s)
5'	18,0 (CH ₃)	1,76 (6H, s)	18,0 (CH ₃)	1,83 (6 H, s)	17,9 (CH ₃)	1,80 (6H, s)

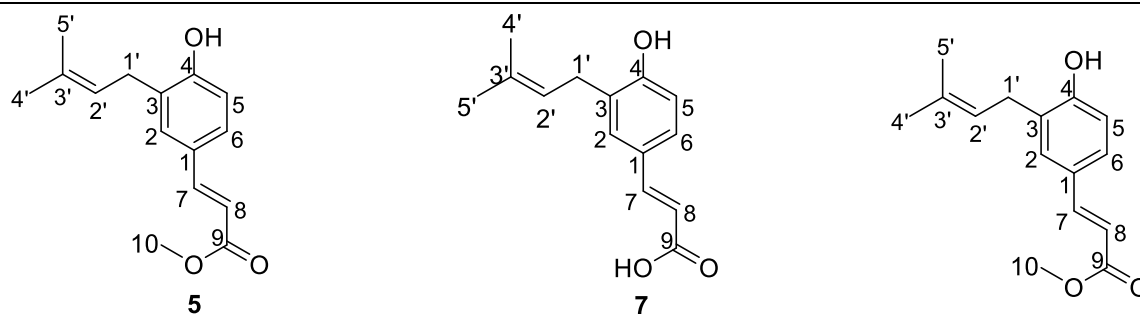
Tabela 9. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) dos compostos **2** e **4** comparação com os dados do artepillin C (300 MHz e 75 MHz, respectivamente), ambos em CDCl_3 [101].



	Composto 2		Composto 4		Artepillin C Literatura [1]	
	^{13}C (ppm)*	^1H (δ , ppm; J , Hz)	^{13}C (ppm)*	^1H (δ , ppm; J , Hz)	^{13}C (ppm)	^1H (δ , ppm; J , Hz)
1	132,2 (C)	—	132,2 (C)	—	127,8 (CH)	—
2=6	128,5 (CH)	6,79 (1H, s)	128,6 (CH)	6,81 (1H, s)	128,6 (CH)	7,29 (1H, s)
3=5	127,5 (C)	—	127,5 (C)	—	126,3 (C)	—
4	149,8 (C)	—	150,1 (C)	—	155,6 (C)	—
7	30,3 (CH)	3,31 (2H, t, $J_{7,8}=7,5$)	30,4 (CH)	2,86 (2H, t, $J_{7,8}=7,5$)	147,3 (CH)	7,72 (1H, d, $J=15,9$)
8	34,8 (CH)	2,83 (2H, t, $J_{7,8}=7,5$)	34,5 (CH)	2,62 (2H, t, $J_{8,7}=7,5$)	114,1 (CH)	6,31 (1H, d, $J=15,9$)
9	174,8 (C)	—	177,5 (C)	—	172,5 (C)	—
10	51,7 (CH ₃)	3,67 (3H, s)	—	—	—	—
1'	36,7 (CH ₂)	2,58 (4H, m)	39,3 (CH ₂)	2,50 (4H, m)	29,5 (CH)	3,38 (4H, d, $J_{1',2'}=7,3$)
2'	30,2 (CH ₂)	1,76 (4H, m)	28,43 (CH ₂)	1,48 (4H, m)	121,5 (CH)	5,34 (2H, m)
3'	28,2 (CH)	1,76 (4H, m)	28,36 (CH)	1,65 (4H, m)	135,2 (C)	—
4'	22,7 (CH ₃)	0,95 (6H, m)	22,8 (CH ₃)	0,95 (6H, d, $J=7,1$)	25,8 (CH ₃)	1,82 (6H, s)
5'	22,7 (CH ₃)	1,28 (6H, m)	22,8 (CH ₃)	0,95 (6H, d, $J=7,1$)	17,9 (CH ₃)	1,80 (6H, s)

* Multiplicidades atribuídas com base em sequência de pulsos DEPT 135.

Tabela 10. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) dos compostos **5** e **7** comparação com os dados da plicatina B (300 MHz e 75 MHz, respectivamente), ambos em CDCl_3 [126].



	Composto 5		Composto 7		Plicatina B Literatura [126]	
	^{13}C (ppm)*	^1H (δ , ppm; J , Hz)	^{13}C (ppm)*	^1H (δ , ppm; J , Hz)	^{13}C (ppm)	^1H (δ , ppm; J , Hz)
1	127,4 (C)	—	127,8 (C)	—	127,9 (C)	—
2	129,4 (CH)	7,29 (1H, d , $J_{2,6}=2,3$)	130,7 (CH)	7,33 (1H, d , $J_{2,6}=2,0$)	130,2 (CH)	7,28 (1H, d , $J_{2,6}=2,0$)
3	127,2 (C)	—	128,4 (C)	—	127,9 (C)	—
4	156,5 (C)	—	157,1 (C)	—	156,6 (C)	—
5	117,8 (CH)	7,03 (1H, d , $J_{5,6}=8,4$)	114,4 (CH)	6,82 (1H, d , $J_{5,6}=8,0$)	116,2 (CH)	6,82 (1H, d , $J_{5,6}=8,9$)
6	126,4 (CH)	7,20 (1H, dd , $J_{6,5}=8,4$ e $J_{6,2}=2,3$)	127,3 (CH)	7,33 (1H, dd , $J_{6,5}=8,0$ e $J_{6,2}=2,0$)	127,1 (CH)	7,28 (1H, dd , $J_{6,5}=8,3$ e $J_{6,2}=2,0$)
7	144,5 (CH)	7,60 (1H, d , $J_{7,8}=16,0$)	147,1 (CH)	7,71 (1H, d , $J_{7,8}=15,8$)	145,2 (CH)	7,64 (1H, d , $J=16,0$)
8	115,0 (CH)	6,27 (1 H, d , $J_{8,7}=16,0$)	116,4 (CH)	6,30 (1 H, d , $J_{8,7}=15,8$)	114,6 (CH)	6,29 (1H, d , $J=16,0$)
9	167,9 (C)	—	177,4(C)	—	168,2 (C)	—
10	51,5 (CH_3)	3,78 (3H, s)	—	—	51,7 (CH_3)	3,80 (3H, s)
1'	28,9 (CH_2)	3,30 (2 H, d , $J_{1',2'}=7,3$)	29,7 (CH_2)	3,36 (2 H, d , $J=7,0$)	29,4 (CH_2)	3,36 (2 H, d , $J = 7,0$)
2'	122,3 (CH)	5,28 (1H, m)	121,1 (CH)	5,33 (1 H, m)	121,3 (CH)	5,31 (1H, m)
3'	132,7 (C)	—	131,4 (C)	—	135,0 (C)	—
4'	25,8 (CH_3)	1,75 (3H, s)	25,9 (CH_3)	1,79 (3 H, s)	25,7 (CH_3)	1,78 (3H, s)
5'	17,9 (CH_3)	1,71 (3H, s)	18,0 (CH_3)	1,78 (3 H, s)	17,8 (CH_3)	1,77 (3H, s)

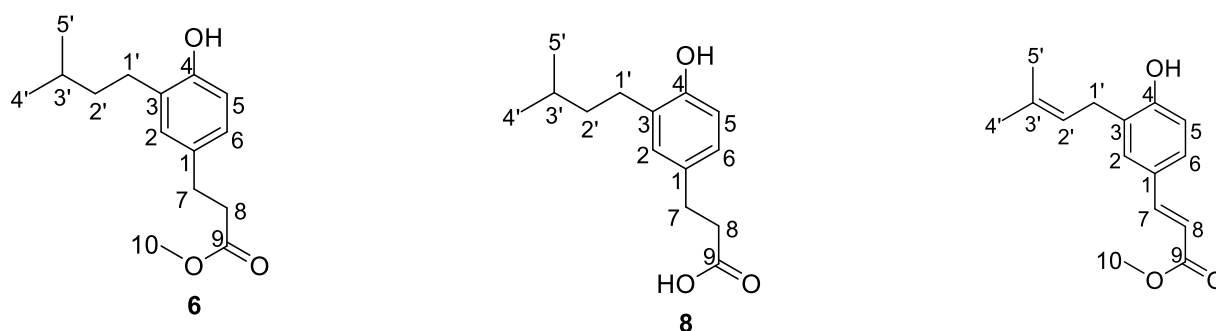
* Multiplicidades atribuídas com base em sequência de pulsos DEPT 135.

O composto **7** foi obtido a partir de **5** por hidrólise, sendo, portanto, o ácido carboxílico correspondente de **7**. A presença da carboxila pôde ser inferida pela banda de absorção intensa em 1685 cm^{-1} no espectro de absorção no IV (**Figura A27**, p. 155), que é característica do estiramento de ligações $\text{C}=\text{O}$ de ácidos carboxílicos α,β -insaturados. Isto pôde ser confirmado pela ausência dos sinais do carbono oximetílico em δ_{C} 51,5 (C10) e δ_{H} 3,78 (3H, s, H10) nos espectros de RMN de ^1H (**Figura A28**, p. 156) e ^{13}C (**Figura A30**, p. 158). A comparação dos dados do composto **7**

com os da literatura permitiu identificá-lo como sendo a drupanina A, um composto fenólico prenilado cuja ocorrência é frequentemente reportada em extratos de própolis [127, 128].

Os compostos **6** e **8** são os derivados hidrogenados da plicatina B (**5**) e da drupanina (**7**). No espectro de absorção no IV do composto **8** (**Figura A31**, p. 159), as bandas de absorção referentes ao estiramento da ligação C=O de ácido carboxílico, em 1716 cm^{-1} , aparece em número de onda maior que as bandas correspondentes nos espectros de IV dos compostos **5** e **7**, o que corrobora a hidrogenação da ligação dupla entre C7 e C8 desse composto. A presença de uma ligação simples entre C7 e C8 nas estruturas de **6** e **8** pôde ser confirmada pelos dados dos espectros de RMN de ^1H (**Figuras A24** e **A32**, p. 152 e 160) e de ^{13}C (**Figuras A26** e **A34**, p. 154 e 162), nos quais os sinais dos hidrogênios olefínicos H7 e H8 não foram observados. Merece ser também ressaltada a presença de sinais em δ_{H} 2,85-2,86 (H7) e 2,57-2,58 (H8), com intensidade para dois hidrogênios, e em δ_{C} 30,0-30,3 (C7) e 36,0-36,2 (C8), estes últimos referentes a carbonos metilênicos. Assim como ocorreu para os compostos **2** e **4**, que são os derivados hidrogenados de **1** e **3**, os sinais referentes à porção prenilica de **6** e **8** são mais complexos que os de **5** e **7**, conforme pode ser observado na **Tabela 11** (p. 71), onde os dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **6** e **8** são comparados com os da plicatina B (**5**).

Tabela 11. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) dos compostos **6** e **8** comparação com os dados da plicatina B [126] (300 MHz e 75 MHz, respectivamente), ambos em CDCl_3



Composto 6		Composto 8		Plicatina B Literatura [2]		
^{13}C (ppm)*	^1H (δ , ppm; J , Hz)	^{13}C (ppm)*	^1H (δ , ppm; J , Hz)	^{13}C (ppm)	^1H (δ , ppm; J , Hz)	
1	132,1 (C)	—	—	127,9 (C)	—	
2	129,8 (CH)	6,93 (1H, d , $J_{2,6}=2,1$)	130,2 (CH)	6,95 (1H, d , $J_{2,6}=4,0$)	130,2 (CH)	7,28 (1H, d , $J_{2,6}=2,0$)
3	129,2 (C)	—	129,2 (C)	—	127,9 (C)	—
4	152,3 (C)	—	152,2 (C)	—	156,6 (C)	—
5	130,3 (C)	6,68 (1H, d , $J_{5,6}=8,1$)	115,4 (CH)	6,68 (1H, d , $J_{5,6}=8,0$)	116,2 (CH)	6,82 (1H, d , $J_{5,6}=8,9$)
6	128,2 (CH)	6,85 (1H, dd , $J_{6,5}=8,1$ e $J_{6,2}=2,1$)	126,7 (CH)	6,89 (1H, dd , $J_{6,5}=8,0$ e $J_{6,2}=2,0$)	127,1 (CH)	7,28 (1H, dd , $J_{6,5}=8,3$ e $J_{6,2}=2,0$)
7	30,3 (CH ₂)	2,85 (2H, $J_{7,8}=8,1$)	30,0 (CH ₂)	2,86 (2H, t , $J_{7,8} = 7,5$)	145,2 (CH)	7,64 (1H, d , $J=16,0$)
8	36,2 (CH ₂)	2,58 (2H, t , $J_{8,7}=8,1$)	36,0 (CH ₂)	2,57 (2H, m)	114,6 (CH)	6,29 (1H, d , $J=16,0$)
9	173,9 (C)	—	178,5 (C)	—	168,2 (C)	—
10	51,7 (CH ₃)	3,67 (3H, s)	—	—	51,7 (CH ₃)	3,80 (3H, s)
1'	39,0 (CH ₂)	2,58 (4H, t , $J_{1',2'}=8,1$)	39,1 (CH ₂)	2,64 (2H, t , $J= 8,1$)	29,4 (CH ₂)	3,36 (2 H, d , $J = 7,0$)
2'	28,0 (CH ₂)	1,47 (2H, m)	28,2 (CH ₂)	1,48 (2H, m)	121,3 (CH)	5,31 (1H, m)
3'	27,9 (CH)	1,60 (1 H, m)	28,0 (CH)	1,61 (1H, m)	135,0 (C)	—
4'	22,6 (CH ₃)	0,94 (3 H, d , $J_{4',3'}=6,5$)	22,8 (CH ₃)	0,94 (3H, d)	25,7 (CH ₃)	0,95 (6H, s)
5'	22,6 (CH ₃)	0,94 (3 H, d , $J_{5',3'}=6,5$)	22,8 (CH ₃)	0,94 (3H, d)	17,8 (CH ₃)	0,95 (6H, s)

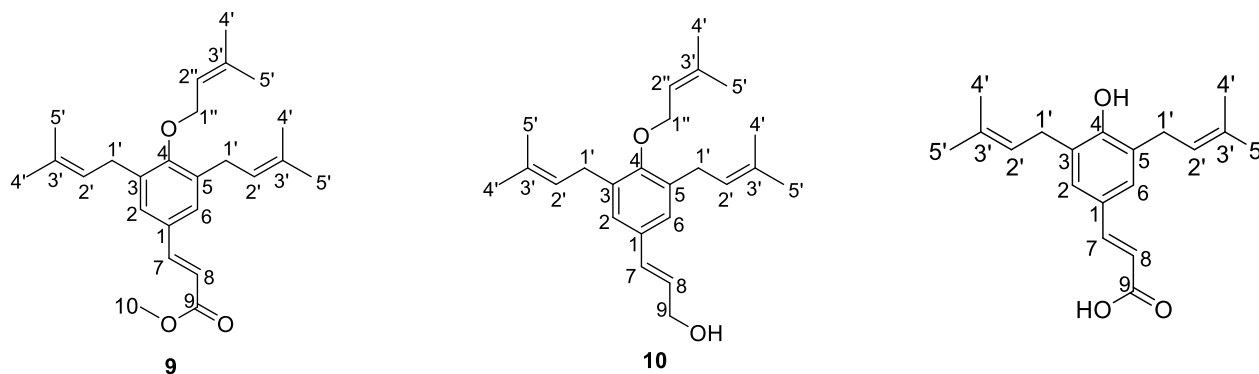
4.2.3. Elucidação estrutural dos compostos 9 e 10

No espectro de massas (ESI-TOF) do composto **9** (Figura A35, p. 163), o íon de m/z 383,2572, de fórmula $C_{25}H_{35}O_3^+$ (erro de -2,3 ppm), indicou a presença de três grupos prenila na estrutura. A absorção na região do infravermelho do composto **9** (Figura A36, p. 163), a banda de absorção larga entre 3420 e 3430 cm^{-1} , característica do estiramento da ligação O-H de hidroxila fenólica presente nos compostos **1** e **5**, não foi observada. A ausência dessa banda pode indicar que um dos grupos prenila encontra-se ligado ao oxigênio em C4.

A comparação entre os espectros de RMN de 1H do composto **9** (Figura A37, p. 167) e do artepillin C (tabela 12, p. 73) revelou que os mesmos são muito similares. No entanto, os sinais referentes às metilas da porção prenilica (H4' e H5') do composto **9** aparecem com intensidades para 9 hidrogênios. Foi também observada a presença de um sinal em δ_H 4,32, com intensidade para 2 hidrogênios, que é característico de hidrogênios ligados a carbonos oximetilênicos. Essas diferenças, somada à presença de um sinal no espectro de RMN de ^{13}C (Figura A39, p. 166) em δ_C 70,6, que aparece como um metileno no espectro de DEPT 135 (Figura A38, p. 165), confirmaram que o composto **9** trata-se do (*E*)-3-(3,5-*bis*(3-metilbut-2-en-1-il)-4-((3-metilbut-2-en-1-il)oxi)fenil)acrilato de metila, que possui uma prenila ligada ao oxigênio de C4, tendo sido possivelmente formado a partir do composto **1** por meio de *O*-prenilação.

O composto **10** foi obtido por redução do composto **9** com $LiAlH_4$. No espectro de absorção na região do IV (Figura A40, p. 167), pôde-se verificar a presença da banda de absorção larga e de média intensidade entre 3500 e 3300 cm^{-1} presente nos compostos **1** e **5**, que foi atribuída ao estiramento da ligações O-H. No entanto, não foi observada a banda de absorção referente ao estiramento de ligações C=O. A comparação dos dados do espectro de RMN de 1H (Figura A41, p. 168) e de ^{13}C (Figura A43, p. 170), deste composto com os do composto **9** (Tabela 12, p. 73) permitiu verificar que os sinais referentes a C10 e H10 não estão presentes. Além disso, o sinal da carbonila do éster (C9) em δ_C 167,8 também não foi observado no espectro de RMN de ^{13}C do composto **10**. Por outro lado, foram observados sinais em δ_H 4,28 e δ_C 64,1, que sugerem que a redução do éster a álcool primário foi bem sucedida. Estes dados em conjunto permitiram identificar o composto **9** como sendo o (*E*)-3-(3,5-*bis*(3-metilbut-2-en-1-il)-4-((3-metilbut-2-en-1-il)oxi)fenil)prop-2-en-1-ol.

Tabela 10. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) dos composto triprenilados **9** e **10** e comparação com o os dados do artepillin C (300 MHz e 75 MHz, respectivamente), ambos em CDCl_3 .



	Composto 9		Composto 10		Artepillin C Literatura [1]	
	^{13}C (ppm)*	^1H (δ , ppm; J , Hz)	^{13}C (ppm)	^1H (δ , ppm; J , Hz)	^{13}C (ppm)	^1H (δ , ppm; J , Hz)
1	127,8 (C)	—	127,5 (C)	—	127,90 (C)	—
2	128,1 (CH)	7,19 (2H, s)	127,7 (CH)	6,79 (2H, d , $J_{2,6}=8,2$)	130,2 (CH)	7,28 (1H, d , $J_{2,6}=2,4$)
3	135,7 (C)	—	132,5 (C)	—	127,9 (CH)	—
4	157,4 (C)	—	156,6 (C)	—	156,8 (C)	—
5	145,2 (CH)	—	132,5 (C)	—	116,2 (C)	6,82 (1H, d , $J_{5,6}=8,4$)
6	116,4 (CH)	7,19 (2H, s)	127,7 (CH)	6,79 (2H, d , $J_{2,6}=8,2$)	127,1 (CH)	7,27 (1H, dd , $J_{6,5}=8,3$ e $J_{6,2}=2,0$)
7	167,8 (C)	7,60 (1H, d , $J_{7,8}=16,0$)	131,5 (CH)	6,52 (1H, m)	145,4 (CH)	7,64 (1H, d , $J=15,8$)
8	51,7 (CH_3)	6,30 (1H, d , $J_{8,7}=16,0$)	129,0 (CH)	6,22 (1H, m)	114,8 (CH)	6,30 (1H, d , $J=15,9$)
9	28,5 (CH)	—	64,1 (CH)	4,28 (2 H, m)	168,4 (C)	—
10	122,7 (CH)	3,80 (3H, s)	—	—	51,8 (CH)	3,80 (3H, s)
1'	130,3 (C)	3,38 (4 H, d)	28,6 (CH)	3,31 (4H, d , $J_{1',2'}=7,2$)	29,4 (CH)	3,36 (2 H, d)
2'	25,8 (CH)	5,28 (2H, m)	122,5 (CH)	5,49 (1H, m)	121,3 (CH)	5,32 (1H, m)
3'	18,0 (CH_3)	—	130,7 (C)	—	135,2 (C)	—
4'	137,9 (C)	1,78 (9 H, s)	18,3 (CH)	1,74 (9 H, d)	26,0 (CH)	1,78 (6H, s)
5'	120,5 (CH)	1,72 (9 H, s)	25,8 (CH)	1,71 (9 H, d)	18,0 (CH)	1,76 (6H, s)
1''	137,9 (C)	4,32 (2 H, d)	65,3 (CH)	4,52 (2 H, t , $J_{1'',2''}=6,3$)	—	—
2''	120,5 (CH)	5,57 (1H, m)	120,2 (CH)	5,30 (1 H, m)	—	—
3''	—	—	138,4 (C)	—	—	—

4.2.4. Elucidação estrutural dos compostos 11-15

Para o composto **11**, no espectro de massas obtido por (+)-ESI-MS em equipamento Q-TOF, foi possível observar um pico de m/z 247,1326 e m/z 269,1144 que é compatível com um íon de fórmula $C_{15}H_{19}O_3^+$ (erro de -1,2 ppm) e $C_{15}H_{19}NaO_3^+$ (erro de -2,2 ppm) (**Figura A44**, p. 171). Esta fórmula indicou um IDH de 5, que é compatível com a presença de um anel aromático e duas insaturações, sugerindo também que apenas um grupo prenil foi ligado à estrutura do *p*-cumaroato de metila (material de partida), devendo, portanto, tratar-se de um isômero do composto **5**.

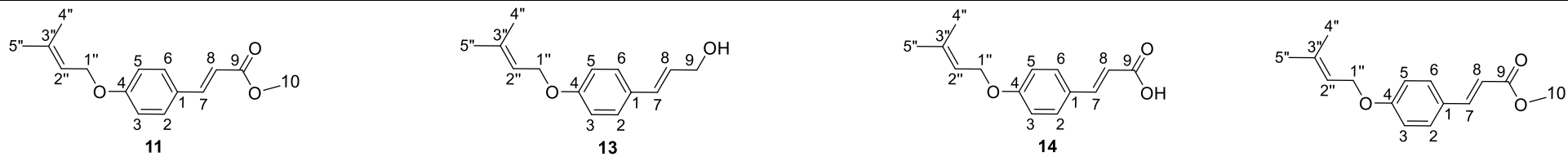
No espectro de absorção da região do infravermelho do composto **11** (**Figura A45**, p. 171), observou-se uma banda de absorção intensa em 1724 cm^{-1} , característica de estiramentos de ligações C=O de ésteres α , β -insaturados, além das bandas de absorção múltiplas e finas na região entre 1450 e 1550 cm^{-1} , que são indicativas do estiramento de ligações C=C de anéis aromáticos. (**Figura A45**, p. 171).

No espectro de RMN de ^1H do composto **1** (**Figura A46**, p. 172), além dos sinais referentes a H7 e H8 em δ_{H} 7,65 (1H, *d*, $J_{7,8}=16,0$) e 6,30 (1H, *d*, $J_{8,7}=16,0$), foram observados apenas dois sinais na região dos aromáticos – em δ_{H} 7,46 e 6,91 – que aparecem como dupletos com intensidade para dois hidrogênios cada. O valor da constante de acoplamento entre esses hidrogênios (8,7 Hz) sugere que ambos estão em orto, evidenciando que a prenilação não ocorre em nenhum dos carbonos do anel aromático. Estes dados, combinados com o fato de que o íon fenolato é um nucleófilo ambidentado, levou-nos a propor que o composto **11** é resultado de *O*-prenilação. Esta hipótese foi suportada pelo deslocamento químico de H1' (δ_{H} 4,54) (**Figura A46**, p. 172) e C1' (δ_{C} 65,4) (**Figura A48**, p. 174), que estão mais desprotegidos que os sinais correspondentes no espectro do isômero *C*-prenilado **5** (plicatina B) – em δ_{H} 3,30 e δ_{C} 28,9 – devido ao efeito indutivo elétron-retirador do oxigênio. A comparação desses dados com os da literatura [129] (**Tabela 13**, p. 76) indicaram que o composto **11** trata-se do *O*-prenil-*p*-cumarato de metila.

O composto **14** foi obtido a partir de **11** por hidrólise, sendo, portanto, o ácido carboxílico correspondente de **11**. A presença da carboxila pôde ser inferida pela banda de absorção intensa em 1684 cm^{-1} no espectro de absorção no IV (**Figura A58**, p. 183), que é característica do estiramento de ligações C=O de ácidos carboxílicos α , β -insaturados. Isto pôde ser confirmado pelos dados dos espectros de RMN de ^1H (**Figura A59**, p. 184) e ^{13}C (**Figura A61**, p. 186) através da ausência dos sinais do carbono oximetílico em δ_{C} 51,8 (CH₃, C10) e δ_{H} 3,80 (3H, *s*, H10). A comparação dos dados do composto **14** com os da literatura [130] permitiu identificá-lo como sendo o ácido (*E*)-3-(4-((3-metilbut-2-en-1-il)oxi)fenil)acrílico, um composto *O*-prenilado cuja ocorrência em extratos de própolis, ao contrário da do artemillin C (**3**), da plicatina (**5**) e da drupanina (**7**), não foi reportada previamente.

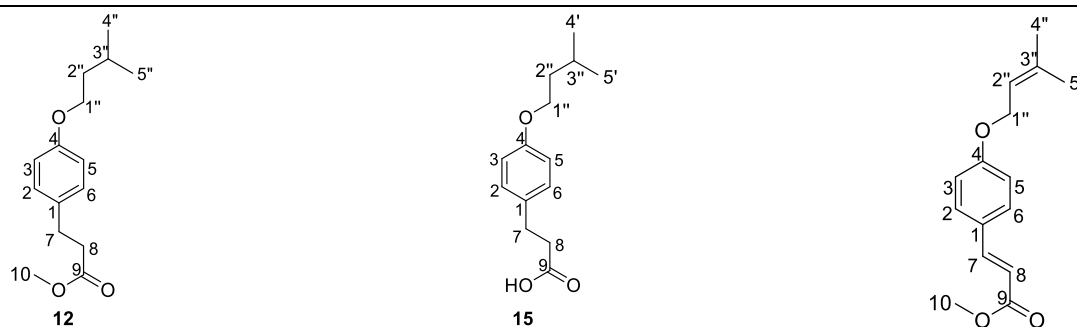
Os compostos **12** e **15** são os derivados hidrogenados dos compostos **11** e **14**, respectivamente. Nos espectros de absorção no IV desses compostos (**Figuras A50 e A62**, p.175 e **187**), as bandas de absorção referentes ao estiramento da ligação C=O de éster (1738 cm^{-1}) e de ácido carboxílico (1716 cm^{-1}) dos compostos **11** e **14**, respectivamente, aparecem em números de onda maiores que as bandas correspondentes nos espectros de IV dos compostos **11** e **14**, o que corrobora a hidrogenação da ligação dupla entre C7 e C8 desses compostos. A presença de uma ligação simples entre C7 e C8 nas estruturas de **12** e **15** pôde ser confirmada pelos dados dos espectros de RMN de ^1H (**Figuras A51 e 63**, p. **176 e 188**) e de ^{13}C (**Figuras A53 e A65**, p. **178 e 190**), nos quais os sinais dos hidrogênios olefínicos H7 e H8 não foram observados. Merece ser também ressaltada a presença de sinais em δ_{H} 3,31 (H7) e 3,02 (H8), com intensidade para dois hidrogênios, e em δ_{C} 66,6 (C7) e 38,1 (C8), estes últimos referentes a carbonos metilênicos. Por sua vez, os sinais referentes à porção “prenílica” de **12** e **15** são mais complexos que os de **11** e **14**, conforme pode ser observado na **Tabela 12** (p. 77).

No caso do composto **13**, que foi obtido por redução do éster **11** com LiAlH_4 , a banda de absorção referente ao estiramento da ligação C=O não foi observada no espectro de absorção no IV de **13** (**Anexo A54**, p. 179). Por outro lado, foi observada uma banda de absorção de média intensidade centrada em 3428 cm^{-1} , que foi atribuída ao estiramento da ligação O-H. Comparando-se os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C do composto **13** (**Figura A55**, p. 180) com os do composto **11**, foi possível verificar a ausência dos sinais em δ_{H} 3,80 (3H, s) e δ_{C} 168,1 (C=O, C9) nos espectros de ^{13}C do composto **13** (**Figura A57**, p. 182). No espectro de ^1H do composto **13** (**Figura A55**, p. 180) e de ^{13}C do composto **13** (**Figura A57**, p. 182), é possível observar um sinal em δ_{H} 4,29 (2H, dd, $J_{9,8}=5,9$ e $J_{\text{gem}}=1,3$) e 64,4 (CH₂) referente ao H9 e C9, indicando que o éster presente no composto **11** também sofreu redução com LiAlH_4 formando o álcool primário presente na estrutura do composto **13**.

Tabela 11. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) dos compostos *O*-prenilado (**11**), **13**, **14** e comparação com o da literatura (300 MHz e 75 MHz, respectivamente), ambos em CDCl_3 [129].


	Composto 11		Composto 13		Composto 14		<i>O</i> -prenilado Literatura [129]	
	^{13}C (ppm)	^1H (δ , ppm; J , Hz)	^{13}C (ppm)	^1H (δ , ppm; J , Hz)	^{13}C (ppm)	^1H (δ , ppm; J , Hz)	^{13}C (ppm)	^1H (δ , ppm; J , Hz)
1	119,5 (C)	—	127,7 (C)	—	126,8 (C)	—	126,9 (C)	—
2	127,2 (CH)	7,46 (2H, d , $J_{2,3}=8,7$)	129,4 (CH)	7,31 (2H, dd , $J_{2,3}=8,7$ e $J_{2,6}=1,9$)	130,1 (CH)	7,50 (1H, d , $J=8,7$)	129,7 (CH)	7,41 (1H, d , $J_{2,3}=8,5$)
3	115,1 (CH)	6,91 (2H, d , $J_{3,2}=8,7$)	119,6 (CH)	6,87 (2H, d , $J_{5,6}$ e $3,2=8,7$)	114,4 (CH)	6,92 (1H, d , $J=8,8$)	114,8 (CH)	6,84 (2H, d , $J_{5,6}=8,5$)
4	160,9 (C)	—	158,6 (C)	—	161,2 (C)	—	160,7 (C)	—
5	115,1 (CH)	6,91 (2H, d , $J_{3,2}=8,7$)	119,6 (CH)	6,87 (2H, d , $J_{5,6}$ e $3,2=8,7$)	114,4 (CH)	6,92 (1H, d , $J=8,8$)	114,8 (CH)	6,84 (2H, d , $J_{5,6}=8,5$)
6	127,2 (CH)	7,46 (2H, d , $J_{2,3}=8,7$)	129,4 (CH)	7,31 (2H, dd , $J_{2,3}=8,7$ e $J_{2,6}=1,9$)	130,1 (CH)	7,50 (1H, d , $J=8,7$)	129,7 (CH)	7,41 (1H, d , $J_{6,5}=8,5$)
7	138,8 (CH)	7,65 (1H, d , $J_{7,8}=16,0$)	131,2 (CH)	6,55 (1H, d , $J_{7,8}=15,8$)	146,8 (CH)	7,74 (1H, d , $J=15,9$)	144,6 (CH)	7,60 (1H, d , $J=15,9$)
8	115,3 (CH)	6,30 (1H, d , $J_{8,7}=16,0$)	126,2 (CH)	6,24 (1 H, dd , $J_{8,7}=15,8$ e $J_{8,9}=5,9$)	115,3 (CH)	6,32 (1H, d , $J=15,9$)	115,4 (CH)	6,24 (1H, d , $J=15,9$)
9	167,9 (C)	—	64,4 (CH)	4,29 (2H, dd , $J_{9,8}=5,9$ e $J_{\text{gem}}=1,3$)	174,1 (C)	—	167,8 (C)	—
10	51,8 (CH_3)	3,80 (3H, s)	—	—	—	—	51,5 (CH)	3,73 (3H, s)
4'	26,1 (CH_3)	1,80 (6 H, s)	25,9 (CH)	1,79 (3 H, s)	26,0 (CH)	1,78 (3 H, s)	39,5 (CH)	1,74 (3 H, s)
5'	18,2 (CH_3)	1,75 (6 H, s)	18,5 (CH)	1,74 (3 H, s)	18,3 (CH)	1,78 (3 H, s)	14,2 (CH)	1,69 (3 H, s)
1''	65,4 (CH)	4,50 (2 H, d , $J_{1',2''}=6,7$)	64,1 (CH)	4,51 (2 H, d , $J_{1',2''}=6,7$)	65,1 (CH)	4,55 (2H, d , $J_{1',2''}=6,8$)	64,9 (CH)	4,49 (2H, d , $J_{1',2''}=6,6$)
2''	119,3 (CH)	5,48 (1 H, m)	114,8 (CH)	5,49 (1 H, m)	119,6 (CH)	5,48 (1H, m)	119,2 (CH)	5,42 (1H, m , $J_{1',2''}=6,6$)
3''	138,8 (C)	—	138,5 (C)	—	138,0 (C)	—	138,6 (C)	—

Tabela 12. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) dos compostos **12**, **15** e comparação com o da literatura (300 MHz e 75 MHz, respectivamente), ambos em CDCl_3 [129].



	Composto 12		Composto 15		O-prenilado Literatura [129]	
	^{13}C (ppm)*	^1H (δ , ppm; J , Hz)	^{13}C (ppm)	^1H (δ , ppm; J , Hz)	^{13}C (ppm)	^1H (δ , ppm; J , Hz)
1	132,5 (C)	—	132,3 (C)	—	126,9 (C)	—
2=6	129,2 (CH)	7,53 (2H, d , $J=8,4$)	129,4 (CH)	7,11 (1H, d , $J=8,5$)	129,7 (CH)	7,41 (1H, d , $J_{2,3}=8,5$)
3=5	114,7 (CH)	7,24 (2H, d , $J=8,4$)	114,9 (CH)	6,83 (1H, d , $J=8,5$)	114,8 (CH)	6,84 (2H, d , $J_{5,6}=8,5$)
4	157,7 (C)	—	157,9 (C)	—	160,7 (C)	—
7	66,6 (CH ₂)	3,31 (2H, t , $J=8,1$)	29,9 (CH ₂)	2,65 (2H, t , $J=15,5$)	144,6 (CH)	7,60 (1H, d , $J=15,9$)
8	38,1 (CH ₂)	3,02 (2H, t , $J=8,1$)	36,0 (CH ₂)	2,89 (2H, t , $J=15,5$)	115,4 (CH)	6,24 (1H, d , $J=15,9$)
9	173,7 (C)	—	172,8 (C)	—	167,8 (C)	—
10	51,6 (CH ₃)	4,08 (3H, s)	—	—	51,5 (CH ₃)	3,73 (3H, s)
1''	36,1 (CH ₂)	4,38 (2H, t , $J_{1',2'}=6,7$)	66,7 (CH ₂)	3,96 (2H, t , $J=13,3$)	64,9 (CH ₂)	4,49 (2H, d , $J_{1',2'}=6,6$)
2''	30,2 (CH ₂)	2,09 (2H, q)	38,2 (CH)	1,66 (2H, q , $J=6,7$)	119,2 (CH)	5,42 (1H, m , $J_{1',2'}=6,6$)
3''	25,1 (CH)	2,55 (1H, m)	25,2 (CH ₂)	1,84 (1H, m)	138,6 (C)	—
4'	22,6 (CH ₃)	1,38 (3H, s)	22,7 (CH)	0,96 (3H, s)	39,5 (CH ₃)	1,74 (3 H, s)
5'	22,6 (CH ₃)	1,38 (3H, s)	22,7 (CH ₃)	0,94 (3H, s)	14,2 (CH ₃)	1,69 (3 H, s)

4.3. Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana do artepillin C (**3**) e dos compostos **1-2** e **4-15** frente ao painel de bactérias cariogênicas selecionadas foi avaliada segundo o método da microdiluição em microplacas. A atividade desses compostos foi analisada a partir dos valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). A CIM foi considerada como sendo a menor concentração do composto capaz de inibir em 100% o valor o crescimento bacteriano em relação aos controles negativos, em função da alteração da cor do meio ao qual foi adicionado o agente colorimétrico: azul, sem crescimento e rosa; com crescimento. Por sua vez, a CBM foi considerada como sendo a menor concentração capaz de impedir o crescimento bacteriano visível.

A atividade antibacteriana foi classificada conforme critérios previamente reportados na literatura [109, 131-134] e comparada à atividade da clorexidina, que foi utilizada como controle positivo. De acordo com esses critérios, valores de CIM menores que 100 µg/mL, entre 101 e 500 µg/mL, entre 501 e 1500 µg/mL e entre 1501 e 2000 µg/mL correspondem a atividades muito forte, forte, moderada e fraca, respectivamente, enquanto valores de CIM superiores a 2000 µg/mL denotam inatividade [131-133]. Com base nestes critérios, os compostos **5** e **6** apresentaram atividade muito forte ou forte contra todas as bactérias testadas (**Tabela 13**). No entanto,, os menores valores de CIM e CBM foram obtidos para a plicatina B (**5**), que apresentou atividade muito forte contra *Streptococcus mutans*, *S. mitis* e *S. sobrinus* (CIM e CBM= 31,2 µg/mL). Este composto também apresentou forte atividade contra *S. salivarius* e *S. sanguinis* (CIM = 62,5 µg/mL e CBM = 62,5 para o *S. sanguinis* e 250 µg/mL para o *S. salivarius*). A forte atividade do composto **5** contra *S. mutans* é um resultado promissor, uma vez que este microrganismo é um dos principais agentes causadores da cárie dentária [135]. Os compostos **6**, **7** (drupamina) e **3** (artepilin C) também apresentaram atividade muito forte e/ou forte contra *Streptococcus mutans* e *S. mitis* (CIM e CBM entre 31,2 e 250 µg/mL). No entanto, os compostos **1**, **9**, **10** e **14** não apresentaram atividade contra nenhuma das bactérias cariogênicas testadas.

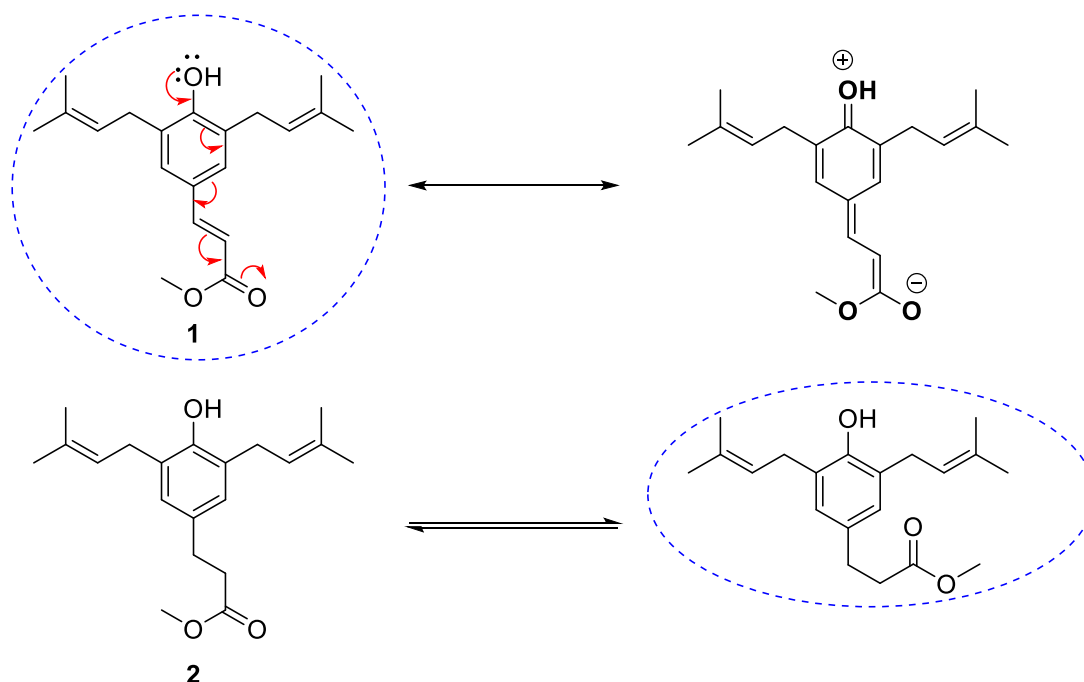
Dados da literatura sobre a atividade antimicrobiana da artepilin C (**3**) e da drupamina (**7**) associaram o aumento da atividade a um número crescente de grupos prenila ligados à estrutura [136, 137]. Estudos recentes sobre a atividade antimicrobiana do artepillin C (**3**) e do ácido *p*-cumárico contra bactérias da cavidade bucal mostraram que o artepillin C (**3**) inibiu o crescimento de diferentes cepas de bacterianas cariogênicas, como *Streptococcus mutans*, *S. mitis*, *S. sobrinus*, *S. sanguinis*, *S. salivarius* e *Lactobacillus casei* em concentrações variando de 200 a 400 µg/mL, enquanto o ácido *p*-cumárico foi inativo nas mesmas concentrações, sugerindo assim o papel dos substituintes prenila na atividade [138]. Neste trabalho, a comparação entre os valores de CIM e CBM dos compostos **1** (di-*C*-prenilado), **9** (triprenilado) e **11**

(*O*-prenilado) mostra que o composto **9** (triprenilado) é o mais ativo contra as bactérias cariogênicas selecionadas, corroborando assim com a hipótese de que a atividade antimicrobiana aumenta com o número de grupos prenilas ligados à estrutura. No entanto, o fato de o composto **5** (mono-*C*-prenilado) ser mais ativo que o composto **9** (triprenilado) sugere que outros fatores além do número de grupos prenila estão associados à atividade antibacteriana, conforme discutido a seguir.

Comparando-se as atividades dos compostos *C*-prenilados **5**, **6** e **7** com a de seus isômeros *O*-prenilados **11**, **12** e **14**, observou-se que os compostos **5**, **6** e **7** foram mais ativos (menores valores de CIM e CBM) contra as bactérias cariogênicas selecionadas, indicando que a hidroxila fenólica desempenha importante papel na atividade antibacteriana. Por outro lado, a comparação entre as atividades antibacterianas dos ésteres **1**, **2**, **11** e **12** com a dos ácidos carboxílicos **3**, **4**, **14** e **15** correspondentes revelou que, de maneira geral, os compostos que apresentam uma carboxila em C9 são mais ativos que aqueles que possuem um grupamento éster em C9. Entretanto, a comparação entre as atividades dos ésteres **5** e **6** com a dos ácidos carboxílicos **7** e **8** correspondentes revelou que, no caso de compostos monoprenilados, a presença de um grupamento éster aumenta a atividade. Estes dados aparentemente contraditórios podem estar relacionados à lipofilicidade destes compostos, que não pode ser vista como sendo o resultado de um único aspecto estrutural, como o número de substituintes prenila). Por exemplo: além da carboxila, os ácidos carboxílicos **3** e **4** também possuem hidroxila fenólica livre capaz de realizar ligações de hidrogênio com sítios do receptores enzimáticos, sendo assim mais hidrossolúveis que os ésteres **1** e **2** correspondentes. Por outro lado, os compostos **3** e **4** também apresentam em suas estruturas dois grupos prenila ligados a C3 e C5 que conferem a lipofilicidade necessária para permeação na membrana celular. No caso dos compostos **7** e **8**, que possuem apenas um substituinte prenila, é possível que a carboxila em C9 diminua a lipofilicidade destes compostos. Por outro lado, os compostos **5** e **6**, que possuem um grupamento éster em C9, são mais lipofílicos que **7** e **8** e, conseqüentemente, são mais ativos.

A comparação entre os valores de CIM e CBM dos compostos diprenilados **1** e **2** (éster em C9) e **3** e **4** (carboxila em C9), dos compostos monoprenilados **5** e **6** (éster em C9) e **7** e **8** (carboxila em C9) e *O*-prenilados **11** e **12** (éster em C9) e **14** e **15** (carboxila em C9) permitiu fazer algumas inferências sobre o efeito da ligação dupla entre C7 e C8 sobre a atividade antibacteriana. Estruturalmente, a presença dessa ligação dupla não apenas restringe o número de conformações da cadeia C7-C8-C9 como também estende o sistema conjugado desde a carbonila até o anel aromático, com participação do par de elétrons do oxigênio em C4. Dessa forma, a ressonância aumenta a densidade

eletrônica do oxigênio da carbonila em C9 e diminui a densidade eletrônica do anel benzênico em relação aos compostos que apresentam uma ligação simples entre C7 e C8 (**esquema 12**).



Esquema 11. Formas de ressonância do composto **1** devido à ligação dupla entre C7 e C8 e mudança conformacional do composto **2** devido à ligação simples entre C7 e C8.

Os resultados deste trabalho indicaram que, para os compostos diprenilados **2** e **4**, a ausência da ligação dupla entre C7 e C8 aumentou a atividade antibacteriana em relação a **1** e **3**. Por outro lado, para os derivados monoprenilados, a presença da ligação dupla aumentou a atividade antibacteriana tanto para o composto **5** (éster em C9) como para **7** (carboxila em C9) em relação a **6** e **8**. No caso dos compostos *O*-prenilados, a ausência da ligação dupla entre C7 e C8 contribuiu para o aumento a atividade do éster **12** em relação a **11** e para a diminuição da atividade do ácido carboxílico **15** em relação a **14**. Uma possível explicação para esses dados aparentemente contraditórios seria a mudança no “formato” e no tamanho molecular de cada um desses compostos em função da mobilidade conformacional da cadeia C7-C8-C9 em função da presença ou ausência da ligação dupla. No caso de compostos diprenilados, que são consideravelmente maiores¹ que os derivados mono e *O*-prenilados, é possível que a liberdade conformacional resultante da ligação simples entre C7 e C8 possa facilitar o “encaixe” nos sítios enzimáticos do receptor e a permeação pela membrana celular. Para os compostos compostos monoprenilados **5** e **7**, que são

¹ Infelizmente, o derivado hidrogenado do composto **9** não foi obtido neste trabalho.

“menores”, a presença da ligação dupla confere maior “linearidade”, facilitando a permeação pela membrana enzimática e, possivelmente, o encaixe no receptor enzimático. No caso dos compostos *O*-prenilados, os resultados indicaram que o efeito da ligação dupla entre C7 e C8 depende da natureza do grupo carbonilado em C9, aumentando a atividade para o ácido carboxílico **14** em relação a **15** e diminuindo a atividade do éster **11** em relação ao composto **12**.

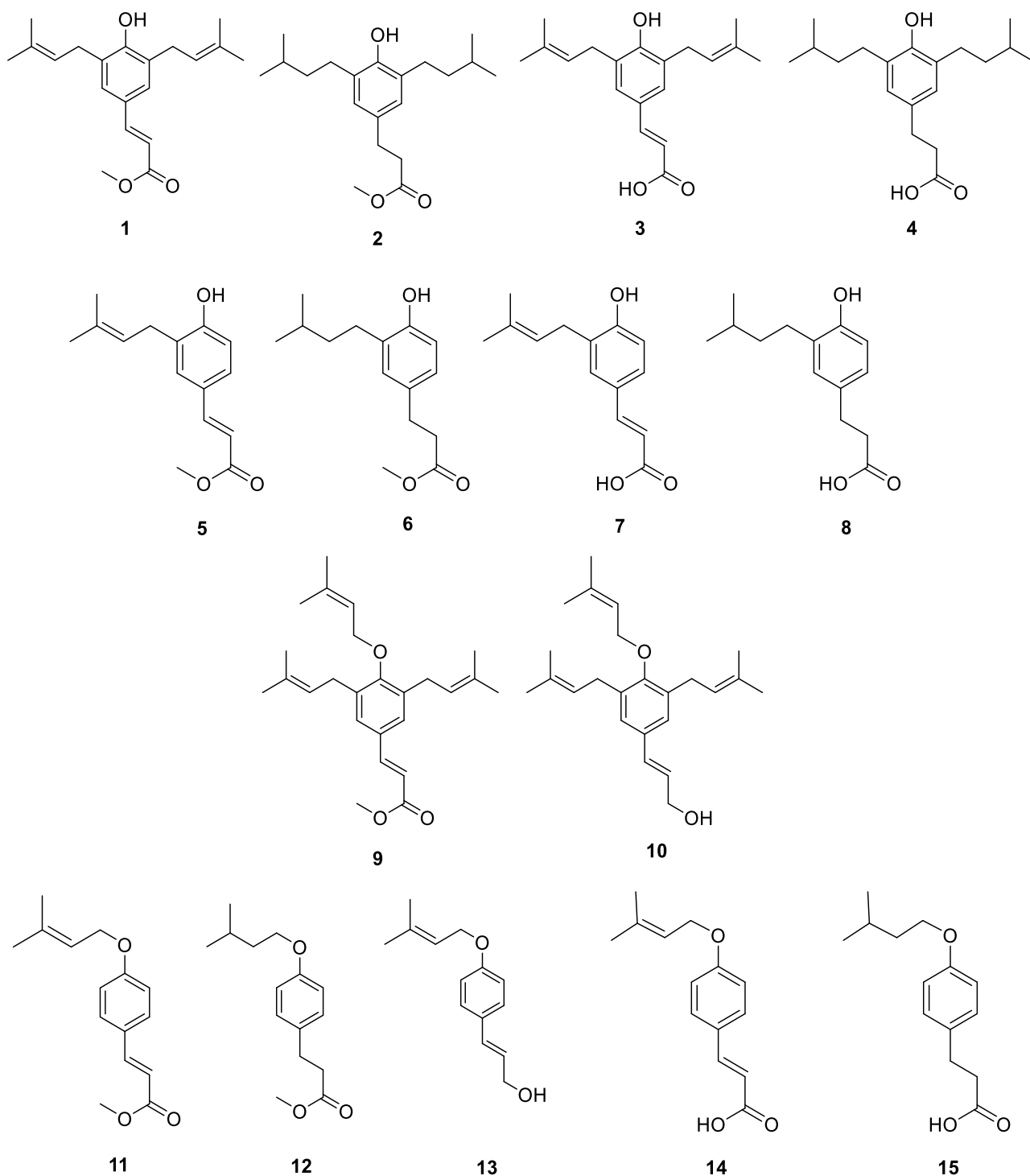
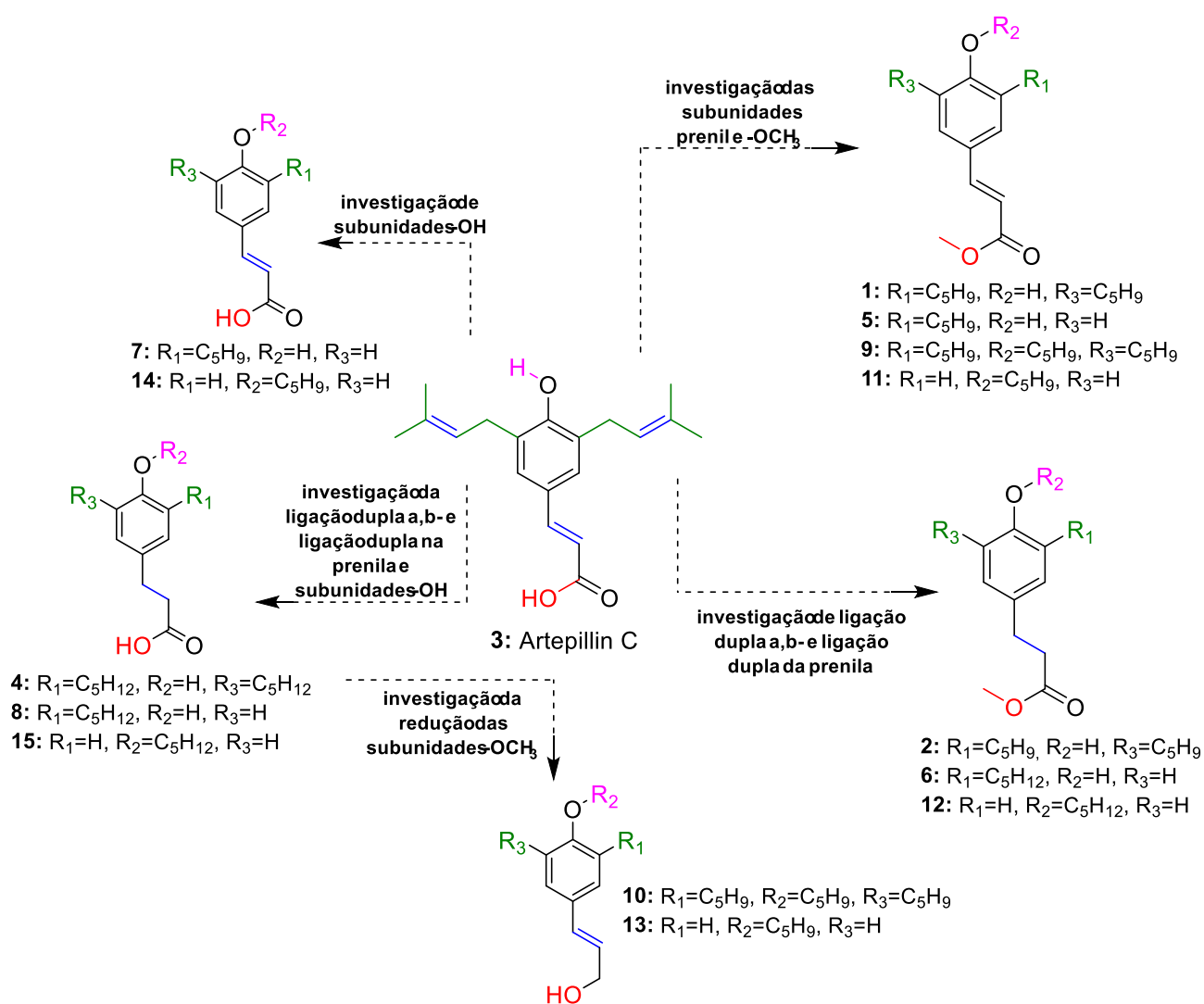


Figura 18. Estrutura dos compostos 1-15.

Tabela 13. Valores da concentração inibitória mínima (CIM, em preto) e concentração bactericida mínima (CBM, em cinza) dos compostos **1-14** frente ao painel representativo de bactérias cariogênicas avaliadas, em µg/mL e mM (entre parênteses).

Compostos	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus sobrinus</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
1	>2000 (>6,36)	>2000 (>6,36)	>2000 (>6,36)	>2000 (>6,36)	>2000 (>6,36)	>2000 (>6,36)	>2000 (>6,36)
	>2000 (>6,36)	>2000 (>6,36)	>2000 (>6,36)	>2000 (>6,36)	>2000 (>6,36)	>2000 (>6,36)	>2000 (>6,36)
2	>2000 (>6,24)	>2000 (>6,24)	>2000 (>6,24)	>2000 (>6,24)	>2000 (>6,24)	>2000 (>6,24)	>2000 (>6,24)
	>2000 (>6,24)	>2000 (>6,24)	>2000 (>6,24)	>2000 (>6,24)	>2000 (>6,24)	>2000 (>6,24)	>2000 (>6,24)
3	>2000 (>6,66)	500 (1,66)	1000 (3,33)	500 (1,66)	125 (0,41)	500 (1,66)	500 (1,66)
	>2000 (>6,66)	1000 (3,33)	2000 (6,66)	2000 (6,66)	1000 (3,33)	1000 (3,33)	2000 (6,66)
4	1000 (3,26)	500 (1,63)	500 (1,63)	250 (0,82)	62,5 (0,20)	500 (1,63)	500 (1,63)
	2000 (6,53)	1000 (3,26)	500 (1,63)	500 (1,63)	125 (0,41)	1000 (3,26)	500 (1,63)
5	500 (2,03)	500 (2,03)	62,5 (0,25)	31,25 (0,13)	31,25 (0,13)	62,5 (0,25)	31,25 (0,13)
	500 (2,03)	1000 (4,06)	250 (1,01)	31,25 (0,13)	31,25 (0,13)	62,5 (0,25)	125 (0,51)
6	125 (0,50)	62,5 (0,25)	62,5 (0,25)	62,5 (0,25)	31,25 (0,12)	125 (0,50)	62,5 (0,25)
	125 (0,50)	250 (1,0)	62,5 (0,25)	62,5 (0,25)	31,25 (0,12)	125 (0,50)	62,5 (0,25)
7	1000 (3,09)	500 (1,55)	250 (0,77)	125 (0,39)	250 (0,77)	250 (0,77)	125 (0,39)
	1000 (3,09)	500 (1,55)	500 (1,55)	125 (0,39)	250 (0,77)	250 (0,77)	250 (0,77)
8	>2000 (8,46)	>2000 (8,46)	>2000 (8,46)	>2000 (8,46)	250 (1,06)	1000 (4,23)	>2000 (8,46)
	>2000 (8,46)	>2000 (8,46)	>2000 (8,46)	>2000 (8,46)	1000 (4,23)	1000 (4,23)	>2000 (8,46)
9	>2000 (>5,23)	>2000 (>5,23)	2000 (5,23)	2000 (5,23)	500 (1,31)	1000 (2,61)	>2000 (5,23)
	>2000 (>5,23)	>2000 (>5,23)	>2000 (>5,23)	>2000 (>5,23)	1000 (2,61)	2000 (5,23)	>2000 (5,23)
10	>2000 (>5,64)	>2000 (>5,64)	>2000 (>5,64)	>2000 (>5,64)	>2000 (>5,64)	>2000 (>5,64)	>2000 (>5,64)
	>2000 (>5,64)	>2000 (>5,64)	>2000 (>5,64)	>2000 (>5,64)	>2000 (>5,64)	>2000 (>5,64)	>2000 (>5,64)
11	>2000 (8,12)	>2000 (8,12)	>2000 (8,12)	>2000 (8,12)	1000 (4,06)	>2000 (8,12)	>2000 (8,12)
	>2000 (>8,12)	>2000 (>8,12)	>2000 (>8,12)	>2000 (>8,12)	2000 (8,12)	>2000 (>8,12)	>2000 (>8,12)
12	>2000 (8,0)	>2000 (8,0)	1000 (4,0)	1000 (4,0)	500 (2,0)	1000 (4,0)	2000 (8,0)
	>2000 (8,0)	>2000 (8,0)	2000 (8,0)	1000 (4,0)	1000 (4,0)	1000 (4,0)	2000 (8,0)
13	2000 (9,16)	2000 (9,16)	62,5 (0,29)	2000 (9,16)	500 (2,29)	1000 (4,58)	1000 (4,58)
	>2000 (>9,1)	>2000 (>9,1)	125 (0,57)	2000 (9,16)	1000 (4,58)	2000 (9,16)	2000 (9,16)
14	500 (2,15)	1000 (4,31)	1000 (4,31)	1000 (4,31)	500 (2,15)	500 (2,15)	1000 (4,31)
	>2000 (>8,61)	2000 (8,61)	2000 (8,61)	1000 (4,31)	500 (2,15)	500 (2,15)	2000 (8,61)
15	2000 (8,46)	2000 (8,46)	2000 (8,46)	2000 (8,46)	1000 (4,23)	2000 (8,46)	2000 (8,46)
	>2000 (>8,46)	>2000 (>8,46)	2000 (8,46)	2000 (8,46)	1000 (4,23)	2000 (8,46)	2000 (8,46)
Clorexidina	3,688 µg/mL	1,844 µg/mL	0,922 µg/mL	1,844 µg/mL	3,688 µg/mL	3,688 µg/mL	0,922 µg/mL
	3,688 µg/mL	1,844 µg/mL	0,922 µg/mL	1,844 µg/mL	3,688 µg/mL	3,688 µg/mL	0,922 µg/mL



Esquema 12. Representação das características estruturais dos compostos 1-15 e de suas respectivas atividades.

4.4. Docking molecular

4.4.1. Interações alvo-compostos

O *docking* molecular é uma técnica amplamente utilizada na identificação de alvos farmacológicos via triagem virtual de diferentes compostos disponíveis para uma proteína específica. A técnica baseia-se na identificação de diferentes conformações de ligantes no sítio ativo da proteína e no ranqueamento dessas conformações de acordo com a afinidade de ligação. Além disso, é possível obter dados termodinâmicos de interações proteína-ligante para a identificação adequada do ligante contra a proteína alvo [139].

Neste trabalho, foram utilizados como compostos-alvos nos estudos de *docking* os compostos 5 e 6, que foram os mais ativos contra bactérias cariogênicas nos ensaios *in vitro*. Inicialmente, as estruturas 3D desses compostos foram

otimizadas usando o método semi-empírico AM1 [116] implementado no software Hyperchem 8.0.8 (Versão 8.0.8, Hypercube, EUA, <http://www.hiper.com>). As estruturas otimizadas encontram-se na Figura 17 (p.84).

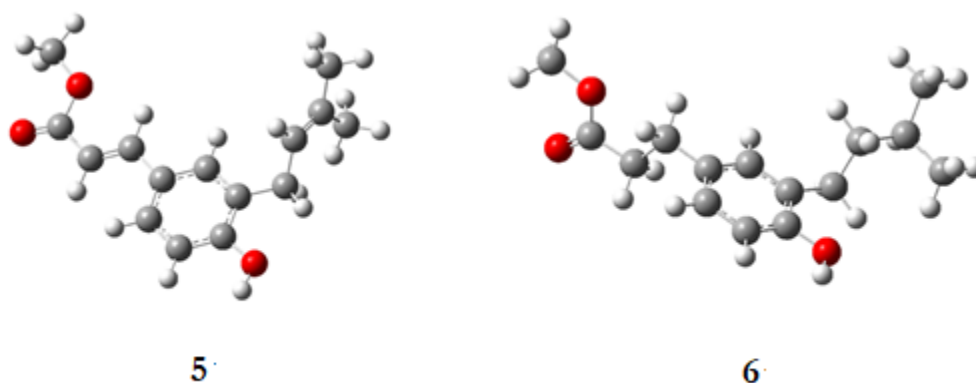


Figura 19. Estrutura otimizada dos compostos **5** e **6**, que foram os mais ativos nos ensaios antimicrobianos.

O *docking* molecular foi utilizado para prever o modo de ligação dos ligantes dos compostos **5** e **6** com as estruturas cristalinas das enzimas das bactérias, *S. mitis* e *S. sanguinis*. Com esse estudo, foi possível demonstrar a hipótese estrutural de como o ligante inibe o alvo, que neste trabalho são as bactérias bucais [140]. Para a validação do protocolo realizado no *docking* molecular, o *re-docking* usando o valor de RMSD (*Root Mean Square deviation*) precisou ser avaliado. Para que o *docking* molecular seja considerado válido, os valores de RMSD devem permanecer na faixa de 0 a 2Å [141].

Os resultados da simulação de encaixe para os compostos **5** e **6** com ambos os cristais de raios X dos alvos estudados foram listados na **Tabela 14**. A visualização de todas as interações possíveis entre os compostos e os resíduos do sítio ativo do receptor foi gerada pelo pacote BIOVIA DS visualize (Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, 2020).

Os valores de energia do “score” de ligação indicaram que os compostos **5** e **6** são inibidores mais potentes de *S. mitis* (PDB ID: 3LE0) em comparação com o ligante nativo (GOL), onde os valores de energia de pontuação foram baixos (de -4,228 e -4,476 Kcal/mol), respectivamente (**Tabela 14**). Por outro lado, os resultados mostraram que o composto **6** é um aglutinante alvo de *S. mitis* (PDB ID: 3LE0) mais forte que o composto **5**, que forma um complexo com alta estabilidade, o que foi confirmado pela energia de pontuação negativa: -4,476 Kcal/ mol.

Tabela 14. Resultados de encaixe dos compostos 5 e 6 com os alvos de *S. mitis* (PDB ID: 3LE0) e *S. sanguinis* (PDB ID: 4N82).

<i>S. mitis</i> (PDB ID: 3LE0)								
Compostos	S-Score (kcal/mol)	RMSD (Å)	Ligações entre átomos de compostos e resíduos do sítio ativo					
			Átomo do composto	Átomos receptores envolvidos	Resíduos do receptor envolvido	Categoria	Tipo de interação	Distância (Å)
5	-4.228	2.997	O	HH11	ARG120(A)	Ligação de H	Ligação de H convencional	2.28
			H	NE2	HIS85(A)	Ligação de H	Ligação de H convencional	1.98
			/	NH2	ARG112(A)	Eletrostático	Pi-Cátion	4.01
			C	/	TYR62(A)	Hidrofóbico	Pi-Pi forma-T	5.02
			C	/	VAL117(A)	Hidrofóbico	Alquil	4.91
			H	NE2	HIS85(A)	Ligação de H	Ligação de H convencional	2.23
6	-4.476	2.932	H	OD1	ASP114(A)	Ligação de H	Ligação C-H	2.87
			H	OD2	ASP77(A)	Ligação de H	Ligação C-H	2.90
			H	OD1	ASP114(A)	Ligação de H	Ligação C-H	2.95
			/	NH2	ARG112(A)	Eletrostático	Pi-Cátion	3.88
			C	/	VAL117(A)	Hidrofóbico	Alquil	5.38
Ligante nativo (GOL)	-3.655	2.149	O1	HH11	ARG120(A)	Ligação de H	Ligação de H convencional	2.30
			O3	HH11	ARG112(A)	Ligação de H	Ligação de H convencional	2.21
			H12	NE2	HIS85(A)	Ligação de H	Ligação C-H	2.73
<i>S. sanguinis</i> (PDB ID: 4N82)								
5	-6.156	2.071	O	H	ASN104(A)	Ligação de H	Ligação de H convencional	2.37
			O	HA3	GLY103(A)	Ligação de H	Ligação C-H	2.93
			/	O	THR63(A)	Outros	Pi-par de elétrons desemparelhados	2.94
			/	/	PHE107(A)	Hidrofóbico	Pi-Pi empilhado	3.51
			C	/	MET132(A)	Hidrofóbico	Alquil	5.00
			C	/	PRO62(A)	Hidrofóbico	Alquil	4.90
			C	/	TYR64(A)	Hidrofóbico	Alquil	4.67
6	-5.575	1.283	O	H	ASN104(A)	Ligação de H	Ligação de H convencional	2.77
			H	O	LEU65(A)	Ligação de H	Ligação C-H	2.85
			/	O	TYR63(A)	Outros	Pi-par de elétrons desemparelhados	2.95
			/	/	PHE107(A)	Hidrofóbico	Pi-Pi empilhado	3.54
			C	/	PRO62(A)	Hidrofóbico	Alquil	5.02
			O1P	H	LEU11(A)	Ligação de H	Ligação de H convencional	2.15
			O3P	H	SER12(A)	Ligação de H	Ligação de H convencional	2.29
			O3P	HG	SER12(A)	Ligação de H	Ligação de H convencional	1.62
			O3P	H	GLY13(A)	Ligação de H	Ligação de H convencional	2.02
			O3P	H	ASN14(A)	Ligação de H	Ligação de H convencional	1.78
			O2P	H	THR15(A)	Ligação de H	Ligação de H convencional	2.27
			O2P	HG1	THR15(A)	Ligação de H	Ligação de H convencional	1.73
			O1P	HH	TYR64(A)	Ligação de H	Ligação de H convencional	1.78
Ligante nativo (FMN)	-6.671	1.034	HO3	OH	TYR64(A)	Ligação de H	Ligação de H convencional	2.90
			HO4	O	SER102(A)	Ligação de H	Ligação de H convencional	2.86
			/	/	PHE107(A)	Hidrofóbico	Pi-Pi empilhado	5.92
			/	/	PHE107(A)	Hidrofóbico	Pi-Pi empilhado	4.39
			/	/	PHE107(A)	Hidrofóbico	Pi-Pi empilhado	3.45
			C7M	/	LEU65(A)	Hidrofóbico	Alquil	4.05
			C7M	/	PHE107(A)	Hidrofóbico	Pi-alquil	3.93
			C8M	/	PHE107(A)	Hidrofóbico	Pi-alquil	4.29

Os resultados obtidos mostraram que o composto **5** tem uma alta afinidade com o bolso de *S. mitis* (PDB ID: 3LE0), o que pôde ser confirmado pelo estabelecimento de quatro ligações de hidrogênio fortes [142, 143] com o resíduo do sítio ativo de *S. mitis*: um tipo de ligação H convencional: H/ HIS85(A)-NE2/comprimento da ligação = 2,23Å. Três outras ligações H de carbono: H/ ASP114(A)-OD1/ comprimento da ligação = 2,87Å, H/ ASP77(A)-OD2/comprimento da ligação = 2,90Å e H/ ASP114(A)-OD1/comprimento da ligação = 2,95Å. Uma interação eletrostática apareceu com ARG112(A). Além disso, este composto formou uma interação hidrofóbica com o sítio ativo da enzima (**Tabela 14 e Figura 20 (B)**). A este respeito, vários estudos [144, 145] revelaram que os resíduos: ARG112(A) e HIS85(A) desempenham um papel importante na inibição do alvo *S. mitis* (PDB ID: 3LE0).

No caso do alvo *S. sanguinis* (PDB ID: 4N82), vale destacar que o complexo formado pelo composto **5** forneceu um alto valor de energia de pontuação negativa -6,156 kcal/mol em comparação com o do composto **6**. Além disso, o valor de pontuação do composto **5** é muito próximo do ligante nativo FMN (-6,156 kcal/mol) vs. -6,671 kcal/mol. A conformação encaixada deste composto com o alvo de *S. sanguinis* (PDB ID: 4N82) é mostrada na **Figura 21-D**. Nela, é possível observar a formação de duas ligações H de carbono fortes: O/ASN104(A)-H/comprimento da ligação = 2,37Å e O/GLY103(A)-HA3/comprimento da ligação = 2,93Å (**Tabela 14 e Figura 21 -D**), além da formação de uma interação Pi-Lone Pair (com TYR63(A)) e quatro interações hidrofóbicas com resíduos: PHE107(A), MET132(A), PRO62(A) e TYR64(A). Trabalhos recentes [118, 145] relataram que todos esses resíduos têm um efeito importante na estabilidade do complexo formado.

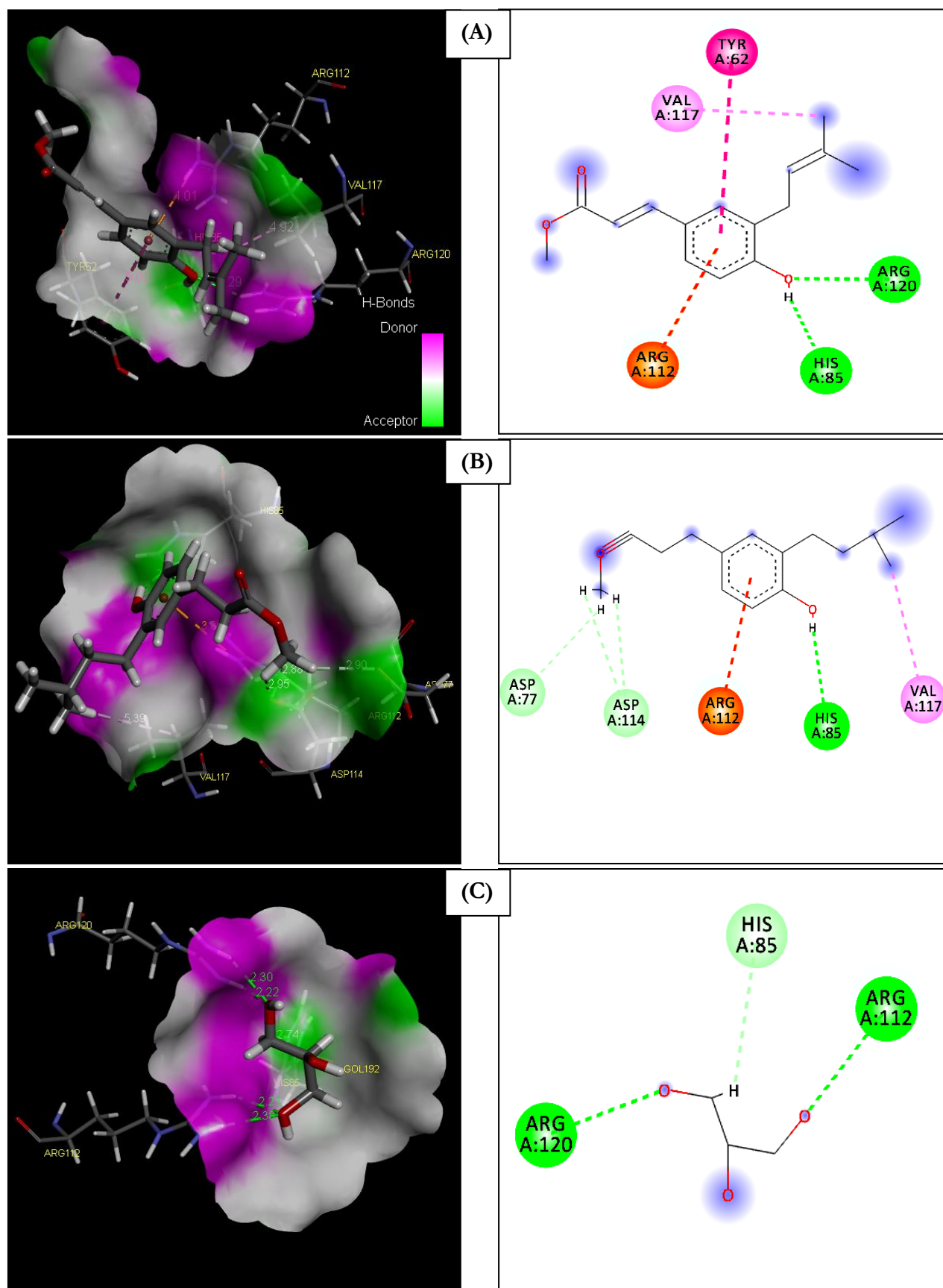
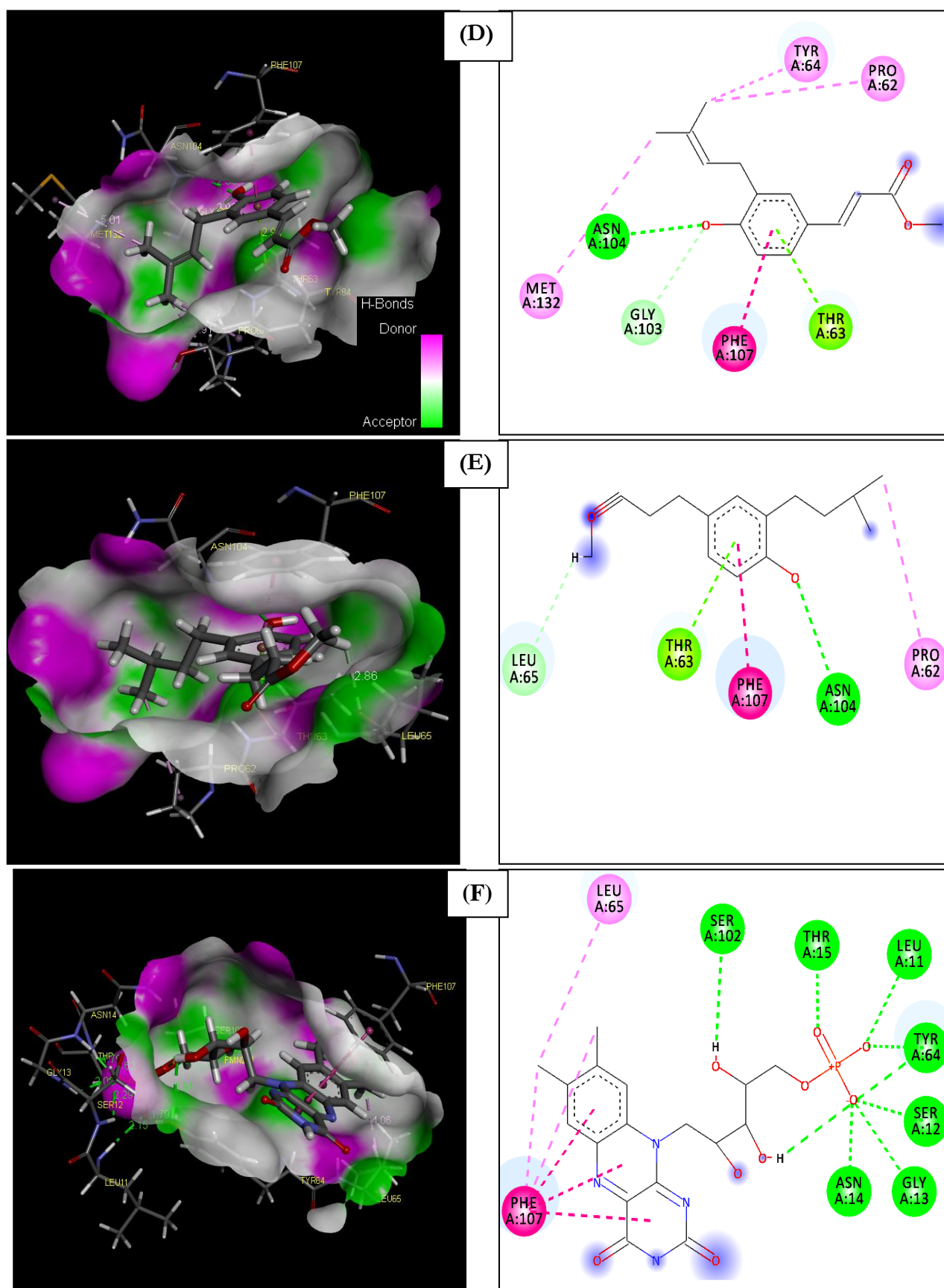


Figura 20. Diagramas 3D e 2D da interação entre, (A): o composto **5** e *S. mitis*; (B): o composto **6** com *S. mitis*; (C): o ligante nativo (GOL) e *S. mitis*.



4.4.2. Simulação de Dinâmica Molecular

Simulações de dinâmica molecular (MD) foram realizadas para investigar a estabilidade dos melhores complexos obtidos nos cálculos de *docking* molecular como 3LE0-5 (a) e 4N82-4(b). A **Figura 22** mostra os diagramas 3D das interações da melhor pose encontrada por *docking* molecular (verde) e dinâmica molecular (amarelo) dos compostos **5** e **6** com sítios ativos de ligação para 3LE0-5 (a) e 4N82 (b), respectivamente. Além disso, as curvas de variação da energia potencial (U) em função do tempo para esses complexos são dadas na **Figura 23**.

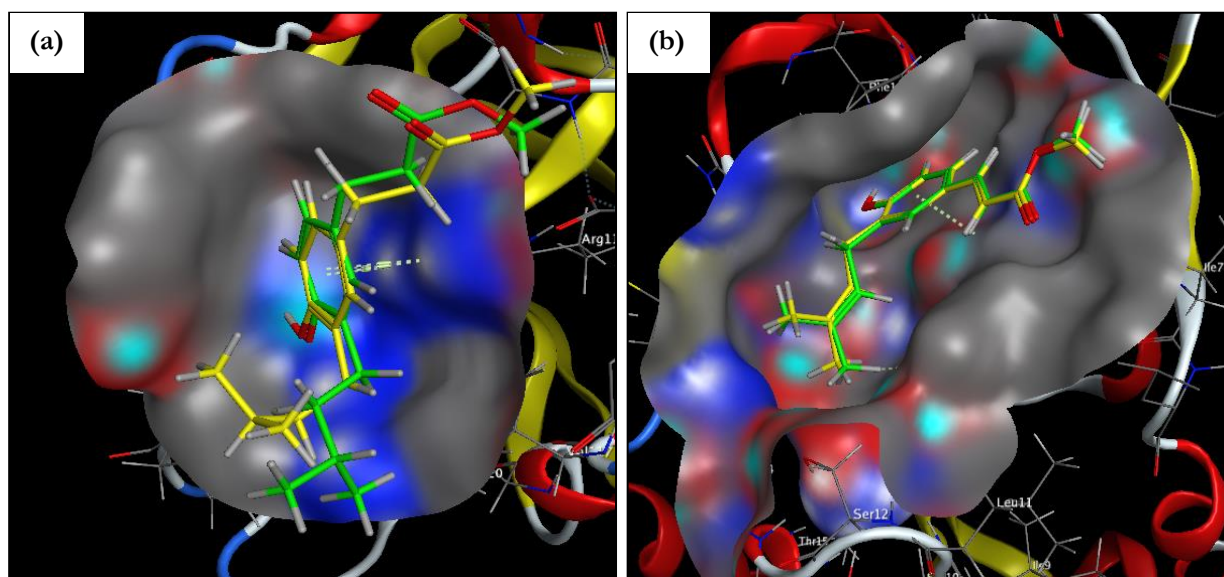


Figura 22. Diagramas 3D da melhor pose encontrada por *docking* molecular (verde) e dinâmica molecular (amarelo) dos compostos **6** e **5** com sítios ativos de ligação para 3LE0 (a) e 4N82 (b).

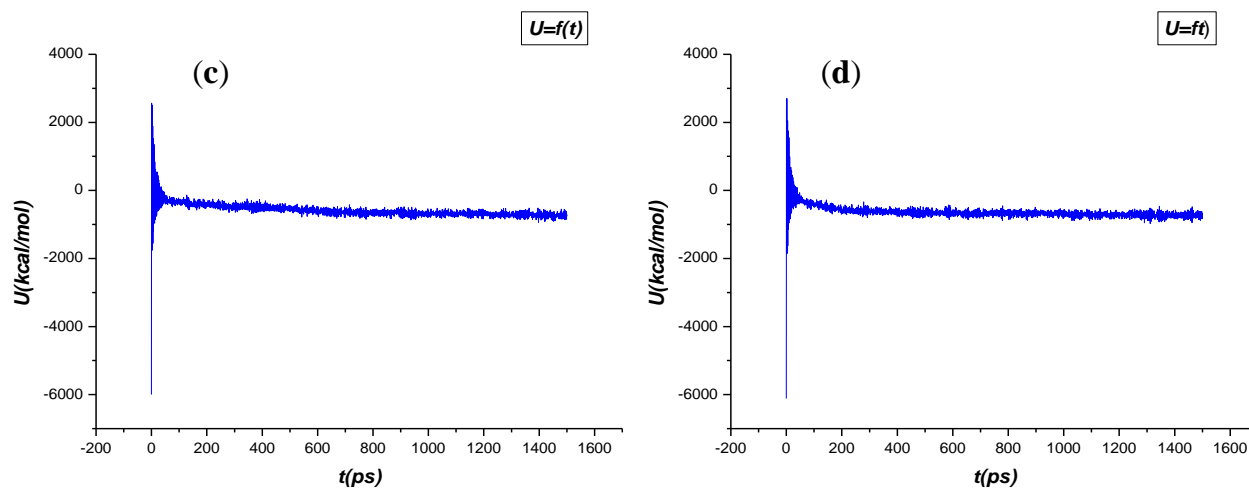


Figura 23. Energia potencial (U) em função do tempo para dois complexos; (c): 3LE0-Composto **6**, e (d): 4N82-Composto **5**.

Conforme mostrado na **Figura 23**, inicialmente foi observada uma flutuação em ambas as curvas durante os primeiros 100 ps (picosegundos), justificada pela variação da energia potencial dos dois complexos investigados: 3LE0-Composto **6** e (d): 4N82-Composto **5**. A pequena variação na energia potencial foi observada entre 100 e 800 ps na curva (c), e entre 100 e 400 ps na curva (d). Finalmente, a partir do último intervalo entre 800 e 1500 ps no caso do complexo 3LE0-Composto **6** e entre 400 e 1500 ps para o complexo 4N82-Composto **5**, os complexos mantêm sua estabilidade (**Figura 23-c e d**).

Vale ressaltar que todos os complexos estudados apresentam maior estabilidade confirmada por simulações de MD, pois mantiveram os tipos de interações entre os compostos **5** e **6** com os resíduos do sítio ativo dos alvos 4N82 e 3LE0 semelhantes, em comparação com o estudo de *docking* molecular, o que também foi confirmado pela estabilidade da energia potencial em função do tempo utilizada em vários trabalhos recentes [146, 147].

4.4.3. Parâmetros farmacocinéticos de ADMET e previsão de semelhança com drogas

4.4.3.1. Avaliação de semelhança com drogas

A partir da estrutura otimizada, as diferentes propriedades farmacocinéticas de ADMET como físico-químicas, biodisponibilidade e farmacocinética com base em Lipinski, Veber e Egan dos compostos **5** e **6** foram calculadas para verificar as regras de similaridade com drogas usando o servidor online SwissADME (**Tabela 15**).

Tabela 15. Propriedades físico-químicas e previsões de semelhança com drogas dos compostos **5** e **6**.

Compostos	Propriedades físico-químicas						Semelhança com drogas		
	TPSA (Å ²) (0~140)	n-ROT (0~11)	MM (g/mol) (100~500)	MLog P WLogP (0~5)	n-HA (0~12)	n-HD (0~7)	Lipinski	Veber	Egan
5	39,42	2	225,25	1,49 2,40	3	0	aceita	aceita	aceita
6	30,19	1	223,27	2,33 3,01	2	0	aceita	aceita	aceita

TPSA: Área de superfície polar topológica, **n-ROT:** Número de rotativos, **MW:** Peso molecular, **Log P:** Logaritmo do coeficiente de partição do composto entre *n*-octanol e água, **n-HA:** Número de aceitadores de ligações de hidrogênio, **n-HD:** Número de doadores de pontes de hidrogênio.

De acordo com a literatura, essa metodologia é baseada na regra dos cinco de Lipinski, que estabelece que para que uma molécula seja um bom fármaco, deve apresentar valores para 4 parâmetros múltiplos de 5: $\log P \geq 5$ (relacionado a lipossolubilidade e a capacidade de atravessar membranas plasmáticas), massa molecular ≤ 500 (quanto

maior a massa molecular, maior o volume da substância, e mais difícil é a passagem da molécula para o meio intracelular), aceptores de ligação de hidrogênio ≤ 10 e doadores de ligação de hidrogênio ≤ 5 [148, 149]. Já a regra de Veber afirma que um composto deve apresentar ligações rotacionais ≤ 10 e a área de superfície polar $\leq 140 \text{ \AA}^2$ [150], enquanto que a regra de Egan afirma que $\text{Log Po} \leq 5,8$. Conforme observado na **Tabela 15**, ambos os compostos têm o número de doadores de ligação de hidrogênio < 5 (n-HD: (0~7)) e aceitadores de ligação de hidrogênio < 10 (n-HA: (0~10)). Além disso, os compostos **5** e **6** possuem os valores de massa molecular no intervalo 100~500 g/mol e MLogP, WLogP < 5 . Os valores de nROTB são < 11 , o que denota a flexibilidade desses compostos. Já os valores de TPSA obtidos também são menores que 140 Å. Esses resultados mostram que os compostos **5** e **6** satisfazem aos critérios de similaridade com drogas sem qualquer violação das regras de Lipinski, Veber e Egan. Esses dados sugerem que os compostos **5** e **6** não apresentarão problemas com biodisponibilidade oral e parâmetros farmacocinéticos.

4.4.3.2. Propriedades ADMET-T

As propriedades farmacocinéticas de ADMET levam em consideração parâmetros como absorção, distribuição, metabolismo e excreção, que são ferramentas úteis na fase inicial do processo de descoberta de medicamentos. Dessa maneira, a absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade dos compostos **5** e **6** foram calculados usando o servidor online pkCSM. Esses resultados encontram-se agrupados na **Tabela 16**.

Tabela 16. Propriedades farmacocinéticas de ADMET dos compostos **5** e **6**.

ADMET	Parâmetros	Compostos	
		5	6
Permeabilidade de aparente	Caco2 (10^{-6}cm/s)	1,178x10 ⁻⁶	1,417x10 ⁻⁶
	HIA (%)	99,207	97,682
Distribuição	CNS (log PS)	-1,800	-1,692
	BBB (log BB)	0,311	0,030
	Inibidor CYP1A2	Sim	Sim
Metabolismo	Inibidor CYP2C19	Não	Não
	Inibidor CYP2D6	Não	Não
	Substrato CYP2D6	Não	Não
	Substrato CYP3A4	Não	Não
Excreção	Substrato renal OCT2	Não	Não
	Folga total (log mL/min/kg)	0,744	0,780
Toxicidade	Inibidores I e II hERG	Não	Não
	Hepatotoxicidade	Não	Não

Caco-2: Adenocarcinoma do cólon, **HIA:** Absorção intestinal humana, **SNC:** Permeabilidade do sistema nervoso central, **BBB:** Permeabilidade da barreira hematoencefálica, Substrato **OCT2** renal: Transportador de cátions orgânicos 2, **hERG:** Gene humano relacionado ao éter-à-go-go.

De acordo com a análise da **Tabela 16**, os compostos **5** e **6** apresentam valores de Caco-2 superiores a -5,15 (> -5,15 cm/s), o que confirma que esses compostos apresentam boa permeabilidade. Além disso, ambos os compostos têm valores de HIA superiores a 30%, o que significa que os candidatos administrados por via oral são absorvidos do sistema gastrointestinal para a corrente sanguínea do corpo humano. Os valores de logPS, que estão entre: $-3 < \logPS < -2$, indicam que compostos **5** e **6** não são capazes de penetrar no SNC. Além disso, os valores de logBB dos compostos **5** e **6** são: 0,311 e 0,030, respectivamente, indicando que o derivado **5** facilmente atravessa a barreira hematoencefálica e o derivado **6** é mal distribuído no cérebro (**Tabela 16**).

Os dados obtidos também mostraram que os compostos **5** e **6** são inibidores de CYP1A2, porém não são inibidores de CYP2C19 e CYP2D6. Além disso, esses compostos não são substratos de CYP2D6 e CYP3A4 nem tampouco candidatos a um substrato renal OCT2. Esses compostos não são inibidores de hERG I nem de hERG II e têm uma excreção baixa do clearance (< 5 mL/min/kg) (**Tabela 16**). No entanto, todos esses compostos não apresentaram risco de hepatotoxicidade.

4.4. Atividade antiparasitária

4.4.1. *Schistosoma mansoni* (LE)

A atividade esquistossomicida do artepillin C (**3**) e de seus derivados (**1,2 e 4-15**) frente aos vermes adultos de *S. mansoni* foi avaliada após os vermes serem cultivados em placas de 96 poços com meio RPMI 1640. Primeiramente, a atividade foi avaliada a partir da porcentagem de mortalidade e, em seguida, da redução da viabilidade dos vermes adultos. Todos os compostos foram avaliados na concentração de 50 μ M.

Os dados dos ensaios para se avaliar o efeito dos compostos **1-15** sobre a mortalidade de vermes adultos de *S. mansoni* estão reunidos na **Tabela 17** (p. 95). Esses dados mostraram que apenas os compostos **9, 10 e 11** foram capazes de provocar a morte dos vermes adultos de *S. mansoni*, com taxas de mortalidade de 33,3% para **9** e **11** e de 66,67% para o composto **10** (**Tabela 17**). Ao final de 72 h de incubação, a porcentagem de mortalidade promovida pelo composto **11** manteve-se a mesma de 24 h, enquanto que os vermes incubados com o composto **9** recuperaram sua viabilidade após 72 h, apresentando somente 4,16% de mortalidade. Esta queda na taxa de mortalidade deveu-se possivelmente à metabolização e excreção do composto **9** pelo parasita, que conseguiu recuperar sua homeostase. Para

a amostra **10**, notou-se também uma ligeira recuperação dos vermes após 72 h, uma vez que a porcentagem de redução da viabilidade caiu para 58,33%. Além destes, o composto **13**, que não havia apresentado atividade em 24 h, reduziu em 12,5% a viabilidade dos vermes adultos após 72 h. Contudo, essa porcentagem foi muito abaixo da preconizada ($\geq 55\%$) para dar seguimento aos ensaios de LC₅₀. Apesar do composto **11** também estar abaixo do valor preconizado para ensaios em menores concentrações, decidiu-se realizar os mesmos para comprovação desta atividade, que se manteve estável durante os períodos analisados na triagem.

Tabela 17. Porcentagem de mortalidade (média \pm DP) dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (LE) após incubação com as amostras na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ (triagem).

	% mortalidade	
	24 horas	72 horas
Controle Negativo^a	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Controle Positivo^b	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00
1	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
2	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
3	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
4	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
5	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
6	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
7	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
8	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
9	33,30 \pm 0,00	4,16 \pm 4,16
10	66,67 \pm 0,00	58,33 \pm 5,45
11	33,30 \pm 0,00	33,30 \pm 0,00
12	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
13	0,00 \pm 0,00	12,50 \pm 6,09
14	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
15	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00

^aMeio de cultura RPMI 1640 + 0,1% DMSO. ^bPZQ (Sigma-Aldrich) aplicado na concentração de 1,6 μM .
Dados expressos em média \pm desvio padrão.

Nos ensaios com os compostos **10** e **11** em menores concentrações (de 50 a 3,1 μM), que foram realizados para o cálculo dos valores de IC₅₀, observou-se que o composto **11** causou redução na viabilidade de apenas em 50 μM , porém uma redução de apenas 6,25 % após 24 h, valor ainda menor do que o obtido durante a triagem (**Tabela 18**). Foi possível notar ainda que após 48 h tal redução foi nula e, ao final de 72 h, os vermes novamente apresentaram uma ligeira diminuição em sua viabilidade. Por sua vez, o composto **10**, após 2 h e na maior concentração (50 μM), promoveu a redução em 27,08%, aumentando para 31,25 % em 48 h e, como observado na triagem inicial, diminuindo

para 16,67% ao final de 72 h de incubação. Em 24 h, as concentrações de 25 μM e 12,5 μM causaram uma pequena redução (2,08%) na viabilidade dos vermes adultos de *S. mansoni*, a qual foi zerada nos períodos seguintes de incubação. Os valores de IC_{50} , foram calculados e, para ambas as amostras, mantiveram-se acima de 50 μM , com valores de 69,13 μM para **11** e 52,75 μM em 72h (Tabela 18, Figura 24).

Tabela 18. Redução da viabilidade de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* após incubação com as amostras.

Amostras	Concentrações (μM)														
	24 horas					48 horas					72 horas				
	50	25	12,5	6,25	3,12	50	25	12,5	6,25	3,12	50	25	12,5	6,25	3,12
Controle negativo ¹	0,00 \pm 0,00														
Controle positivo ²	100,00 \pm 0,00														
11	6,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,25	0,00	0,00	0,00	0,00
	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
	3,35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,35	0,00	0,00	0,00	0,00
	27,08	2,08	2,08	0,00	0,00	31,25	0,00	0,00	0,00	0,00	16,67	0,00	0,00	0,00	0,00
10	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
	8,17	2,08	2,08	0,00	0,00	8,31	0,00	0,00	0,00	0,00	4,30	0,00	0,00	0,00	0,00

¹Meio de cultura RPMI 1640 + 0,1% DMSO. ²PZQ (Sigma-Aldrich) aplicado na concentração de 1,6 μM . Dados expressos em (%) média \pm desvio padrão.

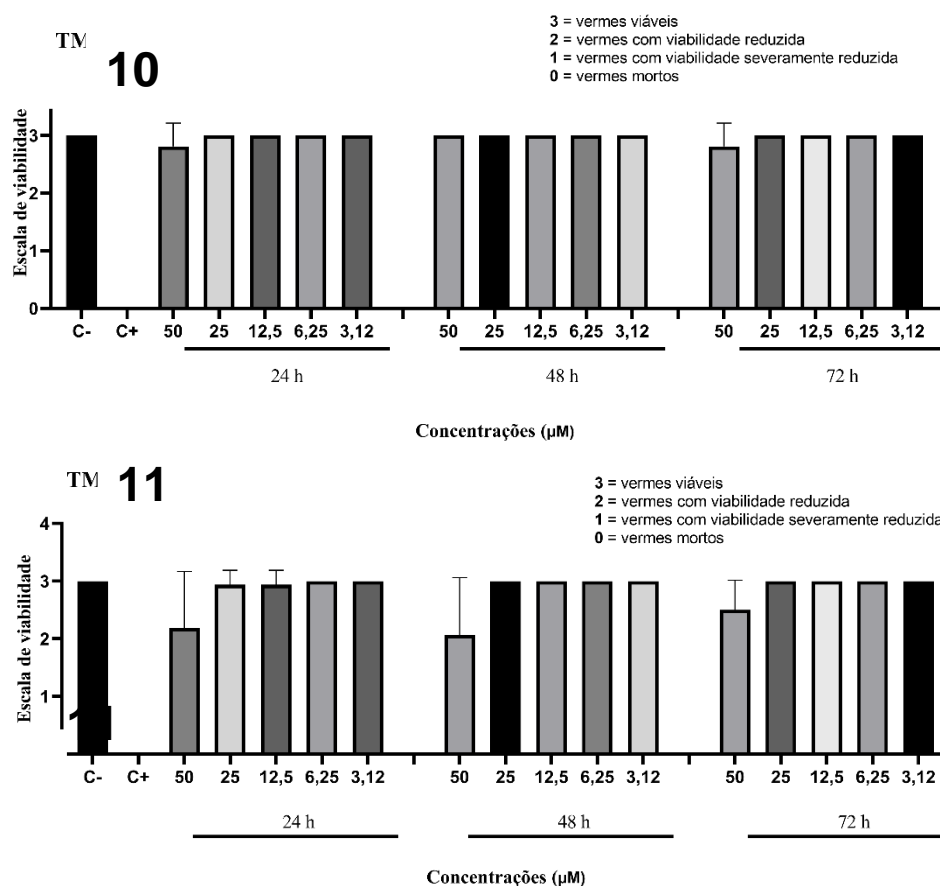


Figura 24. Gráficos da redução da viabilidade de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* após incubação com os compostos 10 e 11. Dados expressos como média \pm desvio padrão.

4.4.2. *Leishmania amazonensis*

A atividade antiparasitária do artepillin C (**3**) e de seus derivados (**1-15**) frente as formas promastigotas da *Leishmania amazonensis* foi determinada através da inibição do crescimento do parasito, estimada a partir da contagem do número total de promastigotas vivas, levando-se em consideração a motilidade flagelar. Os resultados obtidos mostraram que os compostos, **6**, **10** e **11** foram os que causaram uma maior redução na viabilidade dos vermes adultos de *L. (L.) amazonensis* (50,81% para **6**, 54,44% para **10** e 40,04% para **11**) na concentração de 50 µM.

No caso do composto di-C-prenilado (**1**), foi possível observar uma porcentagem de inibição maior (35,91%) do que do artepillin C (**3**), que se mostrou inativo. Um outro ponto a ser destacado é que o composto **6**, que contém as ligações simples entre C2' e C3' e C7 e C8, promoveu uma inibição maior que do seu precursor, plicatina B (**5**), que apresenta uma ligação dupla entre C7 e C8. No caso de **10** e **13**, que contém um álcool primário em sua estrutura, esses compostos mostraram-se mais ativos contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* do que seus precursores sintéticos **9** e **11**. A maior atividade desses compostos, principalmente o composto **9**, indica que o número de grupos

prenilas presente nas estruturas dos derivados do artepillin C (3), influencia na atividade leishmanicida desses compostos. No entanto, nenhum dos compostos analisados mostraram uma atividade leishmanicida promissora (Tabela 19).

Tabela 19. Triagem contra formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* após 24 h de incubação.

Amostras	% de inibição da motilidade flagelar \pm D.P.
1	35,91 \pm 12,74
2	0,00 \pm 12,07
3	0,00 \pm 10,41
4	0,00 \pm 12,91
5	28,28 \pm 14,42
6	50,81 \pm 18,05
7	0,00 \pm 9,53
9	22,40 \pm 15,66
10	54,44 \pm 18,76
11	40,04 \pm 10,97
12	30,41 \pm 7,96
13	35,41 \pm 15,57
14	0,00 \pm 11,35
15	0,00 \pm 9,62
Anfotericina B	100,00 \pm 0,00

*Realizados 2 experimentos independentes no período de 24 horas de incubação na concentração de 50 μ M de cada substância em análise. Dados expressos em média \pm desvio padrão.

4.5. Estudo de fragmentação do artepillin C e seus derivados protonados

4.5.1. Correlação estrutura-fragmentação dos compostos C- e O-prenilados

Uma etapa importante da elucidação das vias de fragmentação em fase gasosa de compostos que compartilham o mesmo núcleo estrutural é a comparação de seus espectros de íons produtos obtidos em uma mesma energia de colisão (E_{lab}), na qual se espera que haja uma redução na relação intensidade do íon precursor para menos de 50% sem promover extensa fragmentação [151, 152]. Esta estratégia tem como objetivo minimizar efeitos experimentais sobre o perfil do espectro de íons produtos, e assim, fazer com que as diferenças entre os espectros de compostos estruturalmente semelhantes possam ser associadas às diferenças estruturais existentes entre eles. A importância dessa estratégia para a obtenção de correlações estrutura-fragmentação e para a elucidação das vias de

fragmentações de compostos que possuem o mesmo núcleo estrutural, tais como curcuminoides monocetonicos e benzofuranos, foram demonstrados por nosso grupo de pesquisa em estudos anteriores [151, 153].

Com base nos gráficos de intensidade relativa (RI, %) em função da energia de colisão (E_{lab} , em eV), determinou-se que o valor de E_{lab} mais adequado para se comparar os espectros de íons produtos dos compostos **1, 3, 5, 6, 9, 11 e 12** foi de 15 eV (**Figura 25, p. 102**). Com relação aos compostos **2, 4, 7, 8, 10, 13, 14 e 15**, os picos correspondentes às molécula protonadas não foram observados nos respectivos espectros de massas (ESI-MS) devido à fragmentação na fonte, que não pôde ser evitada mesmo após alterações feitas em parâmetros experimentais, tais como a voltagem do capilar e o potencial do cone extrator, que não impediram de que as moléculas protonadas desses compostos se fragmentasse na fonte de ionização.

Os íons produtos dos compostos **1, 3, 5, 6 e 9-12** em energia de colisão (E_{lab}) de 15 eV e as intensidades relativas (%) encontram-se na **Tabela 20**. As massas dos compostos obtidos por (+)-ESI-MS em equipamento Q-TOF, assim como o erro (ppm) em relação a massa teórica estão descritas na **Tabela 21**.

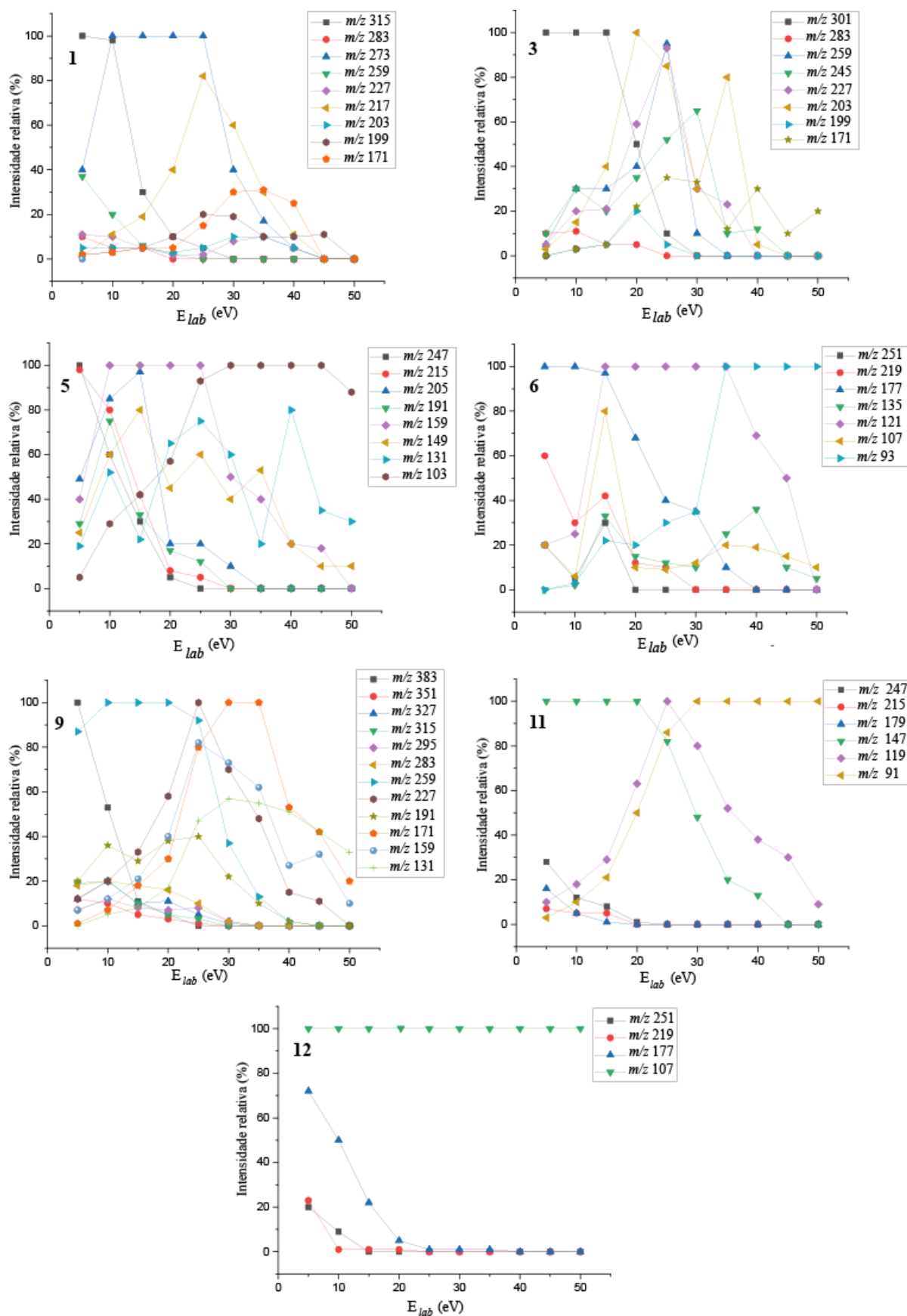


Figura 25. Gráficos da intensidade relativa (%) dos principais íons produzidos dos compostos 1, 3, 5, 6, 9, 11 e 12 protonados em função energia de colisão (E_{lab} , em eV).

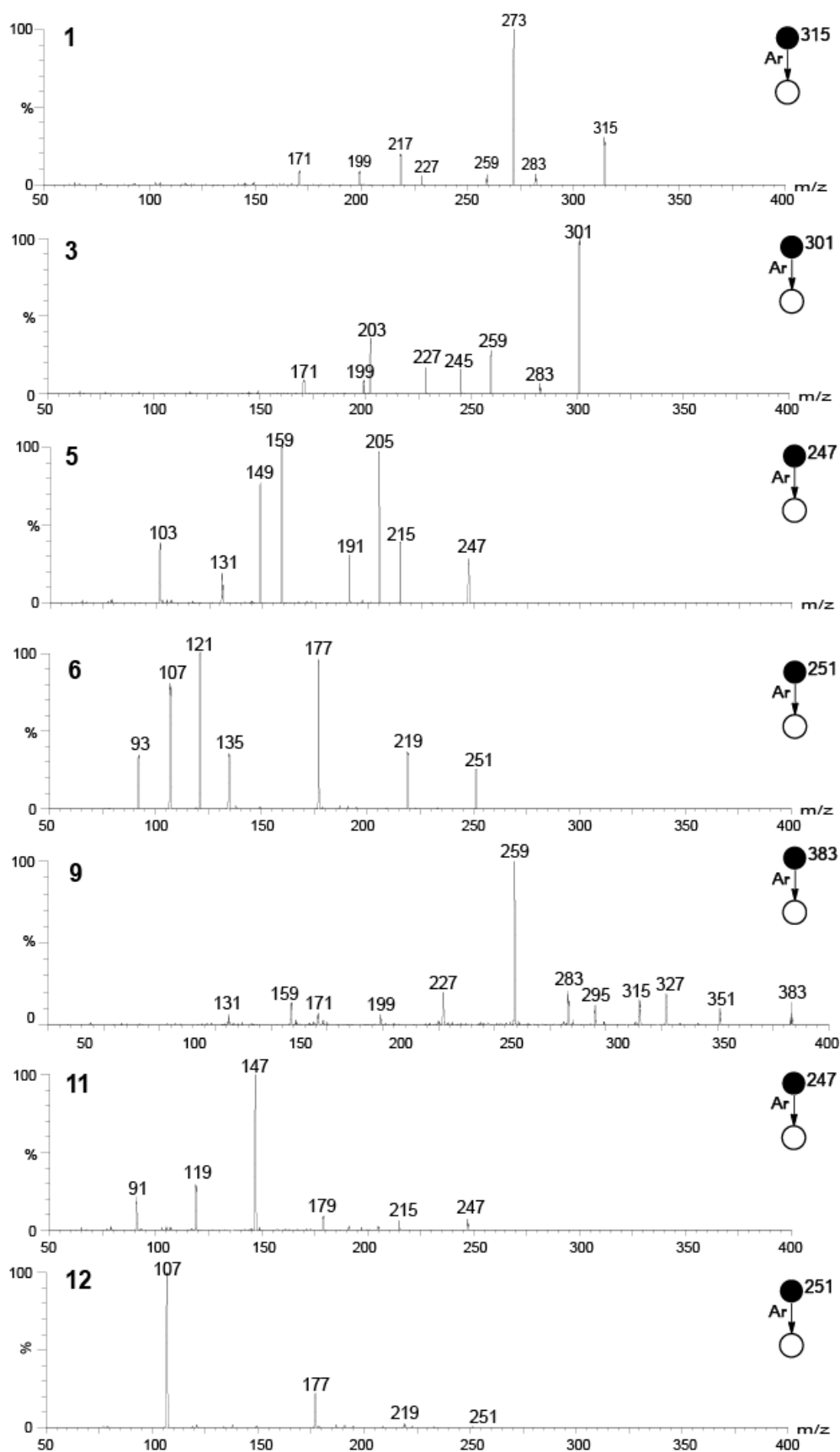


Figura 26. Espectros de íons produzidos dos compostos 1, 3, 5, 6, 9, 11 e 12 protonados (QqQ, Ar como gás de colisão, $E_{lab} = 15$ eV).

Tabela 20. Íons produtos dos compostos **1, 3, 5, 6, 9, 11 e 12** em energia de colisão (E_{lab}) de 15 eV. As intensidades relativas (%) estão demonstradas entre parênteses. Abaixo das razões m/z (em itálico), estão demonstrados os dados dos experimentos de troca por deutério.

Intensidade relativa (%) estão em parênteses.

Atribuição	1	3	5	6	9	11	12
A ($[M+H]^+$)	315 (30) <i>(316)</i>	301 (100) <i>(302)</i>	247 (30) <i>(248)</i>	251 (30) <i>(252)</i>	383 (11) <i>(384)</i>	247 (8) <i>(248)</i>	251 (5) <i>(252)</i>
C (A-CH ₃ OH)	283 (5) <i>(284)</i>	—	215 (42) <i>(215)</i>	219 (42) <i>(220)</i>	351 (5) <i>(351)</i>	215 (5) <i>(215)</i>	219 (5) <i>(219)</i>
B (A-H ₂ O)	—	283 (5) <i>(284)</i>	—	—	—	—	—
G (A-C ₃ H ₅ O ₂)	—	—	—	177 (97) <i>(177)</i>	—	—	177 (22) <i>(177)</i>
D (A-C ₂ H ₂ O)	273 (100) <i>(274)</i>	259 (30) <i>(260)</i>	205 (97) <i>(206)</i>	—	—	—	—
E (A-C ₄ H ₈)	259 (6) <i>(260)</i>	245 (20) <i>(246)</i>	191 (33) <i>(192)</i>	—	327 (10) <i>(328)</i>	—	—
P1 (E-CH ₃ OH)	227 (5) <i>(228)</i>	—	159 (100) <i>(159)</i>	—	295 (8) <i>(296)</i>	—	—
P2 (E-C ₄ H ₈)	227 (5) <i>(228)</i>	—	159 (100) <i>(159)</i>	135 (33) <i>(135)</i>	—	—	—
F (A-C ₃ H ₈)	—	—	—	—	315 (10) <i>(316)</i>	179 (6) <i>(180)</i>	107 (100) <i>(107)</i>
P3 (D-C ₄ H ₈ ; E-C ₂ H ₂ O)	217 (19) <i>(218)</i>	203 (40) <i>(204)</i>	149 (80) <i>(150)</i>	—	—	—	—
P4 (E-H ₂ O)	—	227 (21) <i>(227)</i>	—	—	—	—	—
P5 (F-CH ₃ OH)	—	—	—	—	283 (18) <i>(283)</i>	147 (100) <i>(147)</i>	—
P6 (F-C ₄ H ₈)	—	—	—	—	259 (100) <i>(260)</i>	—	—
P7 (P6-HOCH ₃ ; P5-C ₄ H ₈)	—	—	—	—	227 (33) <i>(227)</i>	—	—
P8 (P7-CO)	—	—	—	—	199 (10) <i>(199)</i>	—	—
P9 (P8-CO)	—	—	—	—	171 (18) <i>(171)</i>	—	—
P10 (P7-C ₅ H ₈)	—	—	—	—	159 (21) <i>(159)</i>	—	—
P11 (P10-CO)	—	—	—	—	131 (8) <i>(131)</i>	—	—
P12 (P1-CO)	199 (5) <i>(199)</i>	199 (5) <i>(199)</i>	131 (22) <i>(131)</i>	—	—	—	—
P13 (P12-CO)	171 (5) <i>(171)</i>	171 (5) <i>(171)</i>	103 (42) <i>(103)</i>	—	—	—	—
P14 (G-C ₄ H ₈)	—	—	—	121 (100) <i>(121)</i>	—	—	—
P15 (P2-CO)	—	—	—	107 (80) <i>(107)</i>	—	—	—
P16 (P5-CO)	—	—	—	—	—	119 (29) <i>(119)</i>	—
P17 (G-C ₃ H ₈)	—	—	—	—	—	—	107 (100) <i>(107)</i>
P18 (P14-CO)	—	—	—	93 (22) <i>(93)</i>	—	—	—
P19 (P16-CO)	—	—	—	—	—	91 (21) <i>(91)</i>	—

Tabela 21. Íons produtos mais significativos (intensidade relativa maior que 5 %) dos compostos **1**, **3**, **5**, **6** e **9-12** na energia de colisão $E_{\text{lab}}=15$ eV.

Composto	m/z Observado	m/z Teórico	Erro (ppm)	Fórmula do íon	Atribuição
1	315,1941	315,1955	-4,4	$C_{20}H_{26}O_3^+$	A ($[M+H]^+$)
	283,1680	283,1693	-4,5	$C_{19}H_{23}O_2^+$	C (A - CH_3OH)
	273,1861	273,1850	+4,0	$C_{18}H_{25}O_2^+$	D (A - C_2H_2O)
	259,1321	259,1329	-3,0	$C_{16}H_{19}O_3^+$	E (A - C_4H_8)
	227,1059	227,1067	-3,5	$C_{15}H_{15}O_2^+$	P1 (E - CH_3OH)/ P2 (E - C_4H_8)
	217,1227	217,1224	+5,9	$C_{14}H_{17}O_2^+$	P3 (D - C_4H_8 ; E - C_2H_2O)
	199,1118	199,1076	-4,0	$C_{14}H_{15}O^+$	P15 (P1 -CO)
	171,0445	171,1169	-2,3	$C_{13}H_{15}^+$	P16 (P15 -CO)
3	301,1793	301,1798	-1,7	$C_{19}H_{25}O_3^+$	A ($[M+H]^+$)
	283,1699	283,1693	+2,1	$C_{19}H_{23}O_2^+$	B (A - H_2O)
	259,1698	259,1693	+1,9	$C_{17}H_{23}O_2^+$	D (A - C_2H_2O)
	245,1170	245,1172	-0,8	$C_{15}H_{17}O_3^+$	E (A - C_4H_8)
	227,1062	227,1067	-3,9	$C_{15}H_{15}O_2^+$	P4 (E - H_2O)
	203,1075	203,1067	+2,2	$C_{13}H_{15}O_2^+$	P3 (D - C_4H_8 ; E - C_2H_2O)
	199,1109	199,1117	-4,0	$C_{14}H_{15}O^+$	P15 (P1 -CO)
	171,1159	171,1168	-5,3	$C_{13}H_{15}^+$	P16 (P15 -CO)
5	247,1322	247,1329	-2,8	$C_{15}H_{19}O_3^+$	A ($[M+H]^+$)
	215,1066	215,1067	-0,5	$C_{14}H_{15}O_2^+$	C (A - CH_3OH)
	205,1216	205,1223	-3,4	$C_{13}H_{17}O_2^+$	D (A - C_2H_2O)
	191,0705	191,0703	+1,0	$C_{11}H_{11}O_3^+$	E (A - C_4H_8)
	159,0440	159,0441	-0,6	$C_{10}H_7O_2^+$	P1 (E - CH_3OH)/ P2 (E - C_4H_8)
	149,0589	149,0597	-5,4	$C_9H_9O_2^+$	P3 (D - C_4H_8 ; E - C_2H_2O)
	131,0489	131,0491	-1,5	$C_9H_7O^+$	P15 (P1 -CO)
	103,0557	103,0542	-4,9	$C_8H_7^+$	P16 (P15 -CO)
6	251,1644	251,1642	-0,8	$C_{15}H_{23}O_3^+$	A ($[M+H]^+$)
	219,1374	219,1380	+2,7	$C_{14}H_{19}O_2^+$	C (A - CH_3OH)
	177,1267	177,1274	+4,0	$C_{12}H_{17}O^+$	G (A - $C_5H_5O_2$)
	135,0808	135,0804	+3,0	$C_9H_{11}O^+$	P2 (E - C_4H_8)
	121,0649	121,0648	-0,8	$C_8H_9O^+$	P17 (G - C_4H_8)

	107,0861	107,0856	+0,8	C ₈ H ₁₁ ⁺	P18 (P2-CO)
	93,0693	93,0699	+6,4	C ₇ H ₉ ⁺	P23 (P17-CO)
9	383,2590	383,2581	+2,3	C ₂₅ H ₃₅ O ₃ ⁺	A ([M+H]⁺)
	351,2313	351,2319	-1,7	C ₂₄ H ₃₁ O ₂ ⁺	C (A-CH₃OH)
	327,1949	327,1955	-1,8	C ₂₁ H ₂₇ O ₃ ⁺	E (A-C₄H₈)
	315,1959	315,1955	+1,3	C ₂₀ H ₂₇ O ₃ ⁺	F (A-C₅H₈)
	295,1687	295,1693	-2,0	C ₂₀ H ₂₃ O ₂ ⁺	P1 (E-CH₃OH)
	283,2001	283,1993	+2,8	C ₁₉ H ₂₃ O ₂ ⁺	P5 (F-CH₃OH)
	259,1335	259,1329	+2,3	C ₁₆ H ₁₉ O ₃ ⁺	P6 (F-C₄H₈)
	227,1059	227,1067	-3,5	C ₁₅ H ₁₅ O ₂ ⁺	P7 (P6-HOCH₃; P5-C₄H₈)
	199,1123	199,1118	+2,5	C ₁₄ H ₁₅ O ⁺	P8 (P7-CO)
	171,1174	171,1169	+2,9	C ₁₃ H ₁₅ ⁺	P9 (P8-CO)
	159,0448	159,0441	+4,4	C ₁₀ H ₇ O ₂ ⁺	P10 (P7-C₅H₈)
	131,0497	131,0492	+3,8	C ₉ H ₇ O ⁺	P11 (P10-CO)
11	247,1326	247,1329	-1,2	C ₁₅ H ₁₉ O ₃ ⁺	A ([M+H]⁺)
	215,1074	215,1067	+3,25	C ₁₄ H ₁₅ O ₂ ⁺	C (A-CH₃OH)
	179,0702	179,0703	-0,56	C ₁₀ H ₁₁ O ₃ ⁺	F (A-C₅H₈)
	147,0433	147,0441	-5,44	C ₉ H ₇ O ₂ ⁺	P6 (F-CH₃OH)
	119,0482	119,0492	-8,40	C ₈ H ₇ O ⁺	P19 (P6-CO)
	91,0548	91,0543	-5,5	C ₇ H ₇ ⁺	P24 (P19-CO)
12	251,1650	251,1642	+3,2	C ₁₅ H ₂₃ O ₃ ⁺	A ([M+H]⁺)
	219,1386	219,1380	+2,7	C ₁₄ H ₁₉ O ₂ ⁺	C (A-CH₃OH)
	177,1282	177,1274	+4,5	C ₁₂ H ₁₇ O ⁺	G (A-C₅H₅O₂)
	107,0496	107,0492	+3,7	C ₇ H ₇ O ⁺	F (A-C₅H₈) ou P21 (G-C₅H₈)

4.5.2. Sítio de protonação

A primeira etapa de estudos de reações de fragmentação de moléculas protonadas em fase gasosa é a determinação do sítio de protonação. Em moléculas polifuncionalizadas, é possível determinar o sítio mais suscetível à protonação através de parâmetros termodinâmicos como a afinidade protônica (PA) e a basicidade em fase gasosa (BG). No entanto, apesar de extremamente importantes, esses parâmetros devem ser utilizados com cautela por pelo

menos três razões. A primeira delas é que o íon formado pela protonação no sítio mais básico não é o único formado [154]. Na verdade, todas as espécies protonadas podem coexistir em diferentes populações e a fragmentação pode ser iniciada a partir de uma população de íons menos abundante, nos quais o próton está ligado a um sítio estrutural que não é o mais básico. A segunda, conhecida como “hipótese do próton móvel” [155], é que em condições de dissociação induzida por colisão (CID), o próton pode migrar do sítio estrutural mais básico para outros menos básicos, alterando assim a população de íons e desencadeando processos de fragmentação. Por fim, a fragmentação pode iniciar-se a partir da espécie protonada no sítio mais básico, de modo que a energia translacional transferida ao íon precursor através da ativação colisional pode ser convertida em energia interna, fazendo com que a fragmentação seja então iniciada [156].

Recentemente, Vieira e colaboradores investigaram as vias de fragmentação de uma série de curcuminoides monocetonos protonados utilizando espectrometria de massas sequencial. Os autores demonstraram que apesar de o oxigênio da carbonila ser o sítio mais suscetível à protonação, a protonação pode também ocorrer no carbono α à carbonila [153].

Na **figura 29** encontram-se os valores das afinidades protônicas (PA), estimados por Química Computacional, de diferentes sítios das estruturas dos compostos **1-12**. Estes dados indicaram que o oxigênio carbonílico é o mais suscetível à protonação para o artepillin C (**3**) e seus derivados. Com base nesses dados, considerou-se neste trabalho que a fragmentação foi iniciada a partir da espécie formada por protonação no oxigênio carbonílico.

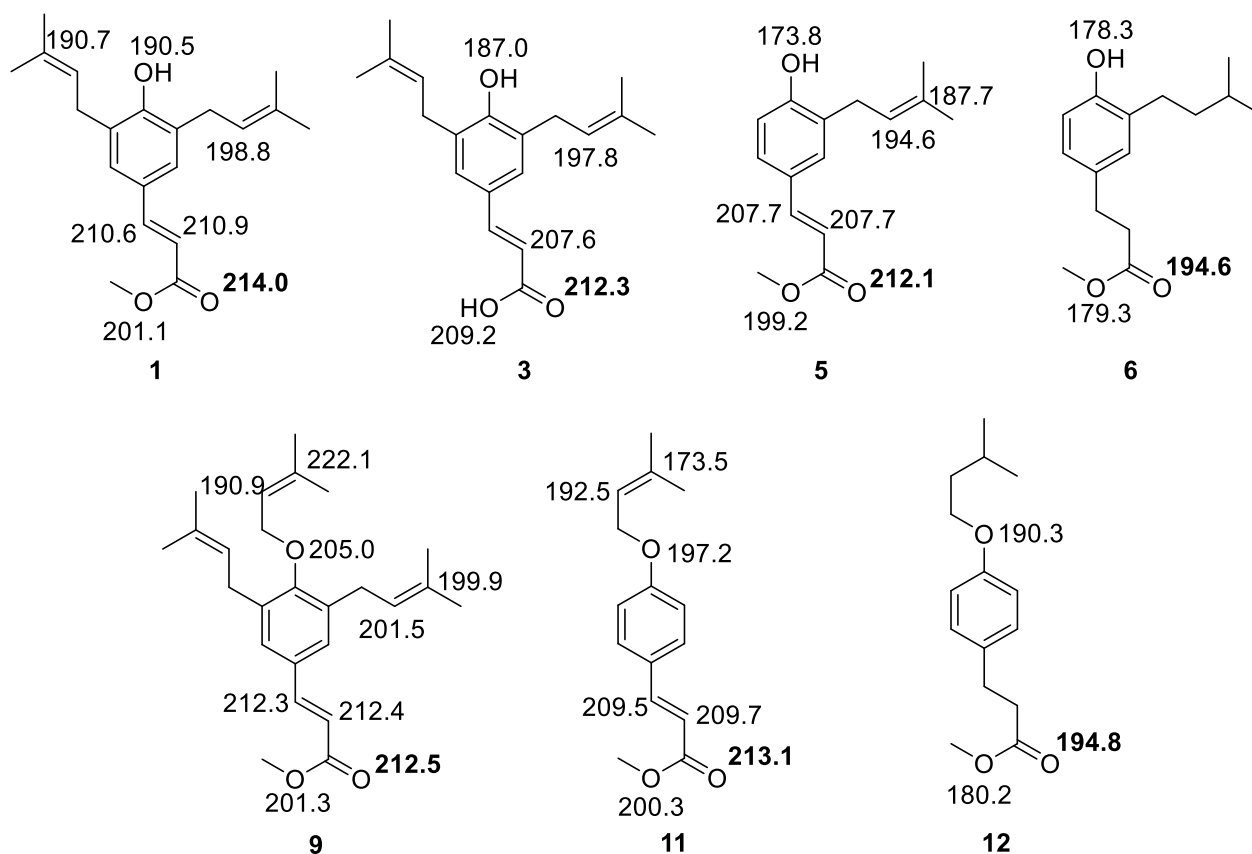
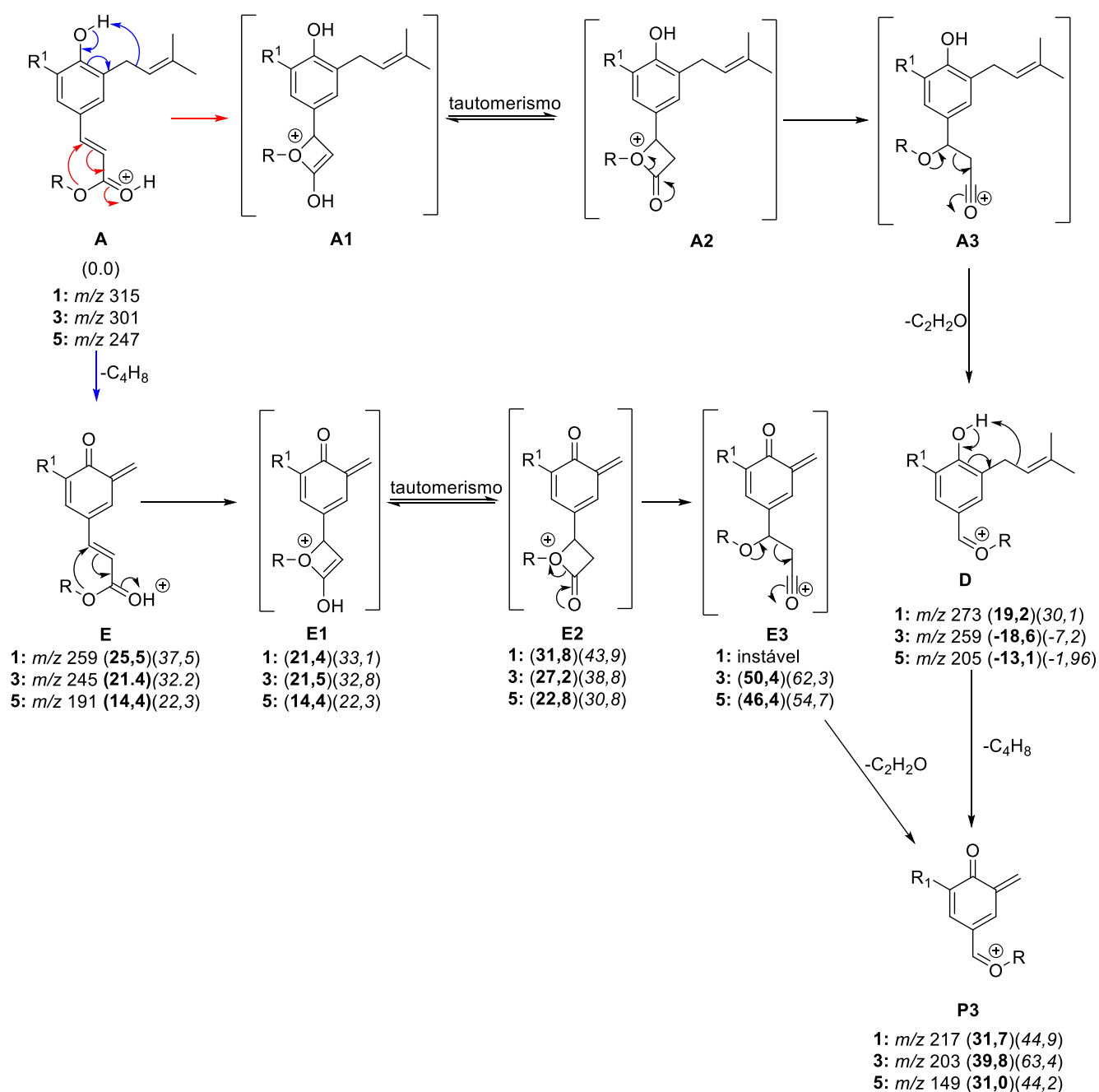


Figura 28. Afinidade protônica (PA, em kcal/mol) para os compostos **1**, **3**, **5**, **6**, **9**, **11** e **12**. Os valores de PA foram calculados em nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p).

4.5.3. Formação dos íons de produtos diagnósticos para compostos C-prenilados

O íon produto **D** ($A-C_2H_2O$) é o mais intenso no espectro dos compostos **1** e **3** e um dos mais intensos no espectro do composto **5** (Figura 26, Tabela 20). A formação de **D** diretamente do íon precursor (molécula protonada) dos compostos **1**, **3** e **5** é precedida por um rearranjo que envolve o ataque nucleofílico do oxigênio éster à posição β -carbonila e a consequente formação do íon intermediário **A1**, que é a espécie menos estável em equilíbrio com seu tautômero **A2** (Esquema 14, p. 106). A abertura do anel de quatro membros leva à formação do íon acílio **A3**, do qual ocorre a eliminação do ceteno por via fragmentação de Grob-Wharton (Esquema 14, p. 106). Os valores de ΔH estimados para a formação de **D** e **E** indicaram que a formação de **D** (que compete com a formação de **E**), a partir de **A** (ΔH variando de -18,6 a 19,2 kcal/mol) é energeticamente mais favorecida que a formação de **E** a partir de **A**. Consequentemente, a maioria dos íons precursores (**A**) é convertida em **D**, fazendo com que a intensidade de **D** seja maior que a de **E** nos espectros de íons produtos de **1**, **3** e **5** (Esquema 14, p. 106).



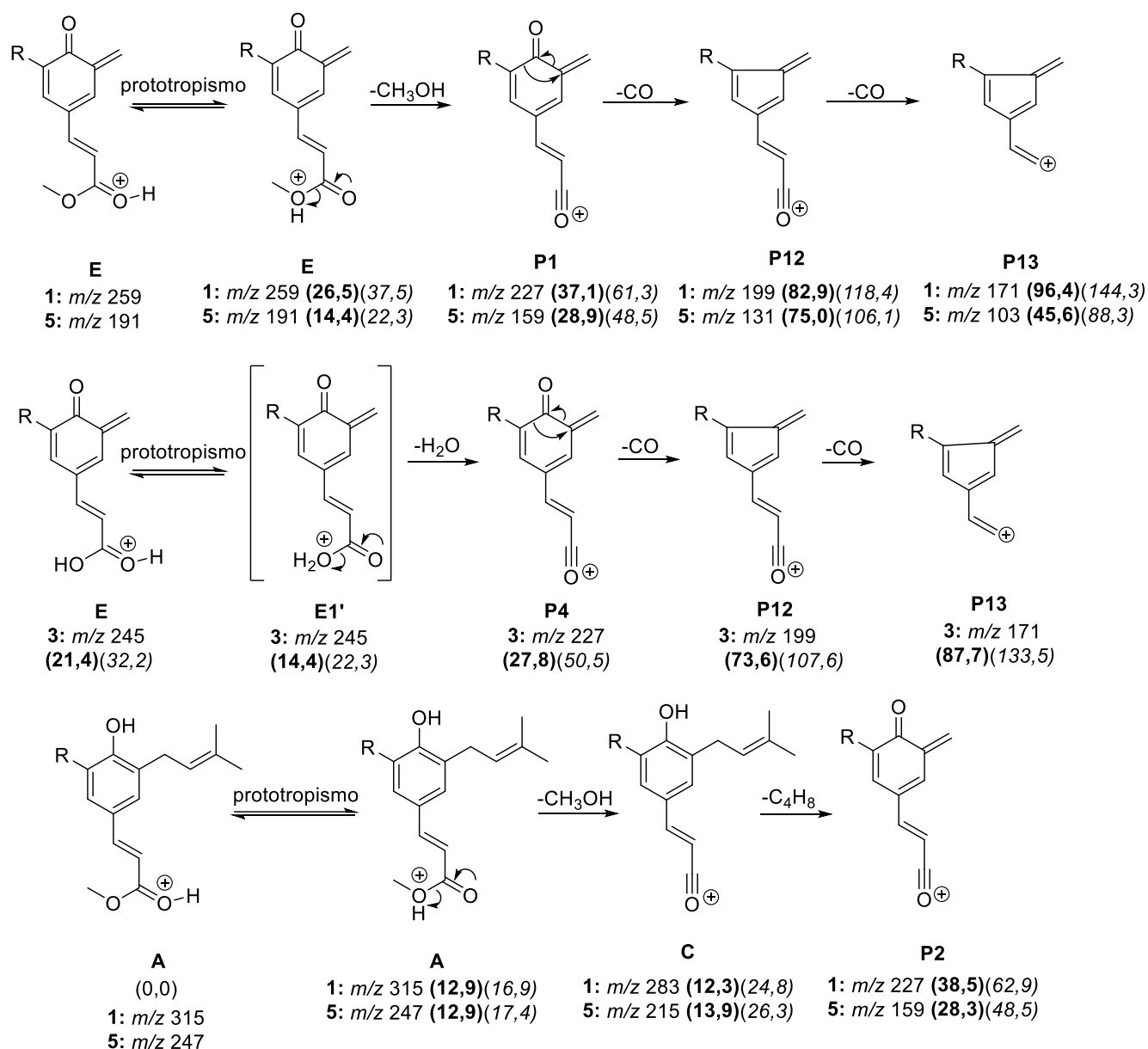
Esquema 13. Formação dos íons produtos **D**, **E** e **P3** a partir dos compostos protonados **1**, **3** e **5**. Os valores das Entalpias e energia de Gibbs encontram-se abaixo das estruturas, em kcal/mol.

Os íons produtos **E** (**A**-C₄H₈) e **P3** (**D**-C₄H₈) são diagnósticos para os compostos C-prenilados **1**, **3** e **5**. A formação destes íons ocorre com a participação do hidrogênio da hidroxila fenólica (**Esquema 14**, p. 106), o que pôde ser confirmado pelas perdas de 57 u (C₄H₇D) nos experimentos com troca de deutério (**Tabela 20**, p. 101). Os valores de ΔH estimados para a formação de **P3** indicaram que a formação de **E1** (que leva a formação de **P3**) a partir de **E** (ΔH variando de 14,4 a 21,5 kcal/mol, **Esquema 14**, p. 106) é energeticamente mais favorecida para o composto **5** do

que para os compostos **1** e **3**. Essa diferença nos valores de ΔH explica a diferença nas intensidades do íon **P3** para os três compostos, que no caso do composto **5** é 4 vezes maior que a do composto **1**. Além disso, embora eliminações de C_4H_8 também possam ocorrer a partir de íons produtos formados durante a fragmentação de compostos *O*-prenilados, a formação de **E** e **P3** pode ocorrer apenas para os compostos *C*-prenilados.

A eliminação adicional de HOR ($R = CH_3$ para **1** e **5**; $R = H$ para **3**) de **E** ocorre por meio de mecanismos semelhantes (**Esquema 14**) e leva à formação dos íons acílios **P1** (**E**- CH_3OH) e **P4** (**E**- H_2O). No entanto, os cálculos revelaram que a formação do íon acílio **P1** é mais favorecida para o composto **5** ($\Delta H = 28,9$ kcal/mol) do que para o composto **1** ($\Delta H = 37,1$ kcal/mol). Isso provavelmente se deve ao fato de que o composto **1**, que contém um grupo prenil em sua estrutura, acaba estabilizando a estrutura de **P1** em relação ao composto **5**, que já perdeu o único grupo prenil presente em sua estrutura. Devido à maior estabilidade do íon produto **P1** proveniente de **1**, um número menor de íons **E** são convertido em **P1**, fazendo com que um número maior de íons **E** cheguem intactos ao analisador. Isto pode explicar, pelo menos em princípio, a razão pela qual o pico do íon fragmento **P1** é mais intenso no espectro de íons produtos do composto **5** (pico base) (**Tabela 21**). A formação desses íons pode ser útil para identificar o grupo funcional em *C9* (um éster metílico para **1** e **5** e um ácido carboxílico para **3**). Eliminações adicionais de CO por meio da contração do anel e clivagem heterolítica única podem produzir **P15** e **P16**, respectivamente (**Esquema 14**). Para os compostos **1** e **5**, a eliminação de CH_3OH para produzir **C** compete com a formação de **D** e **E**.

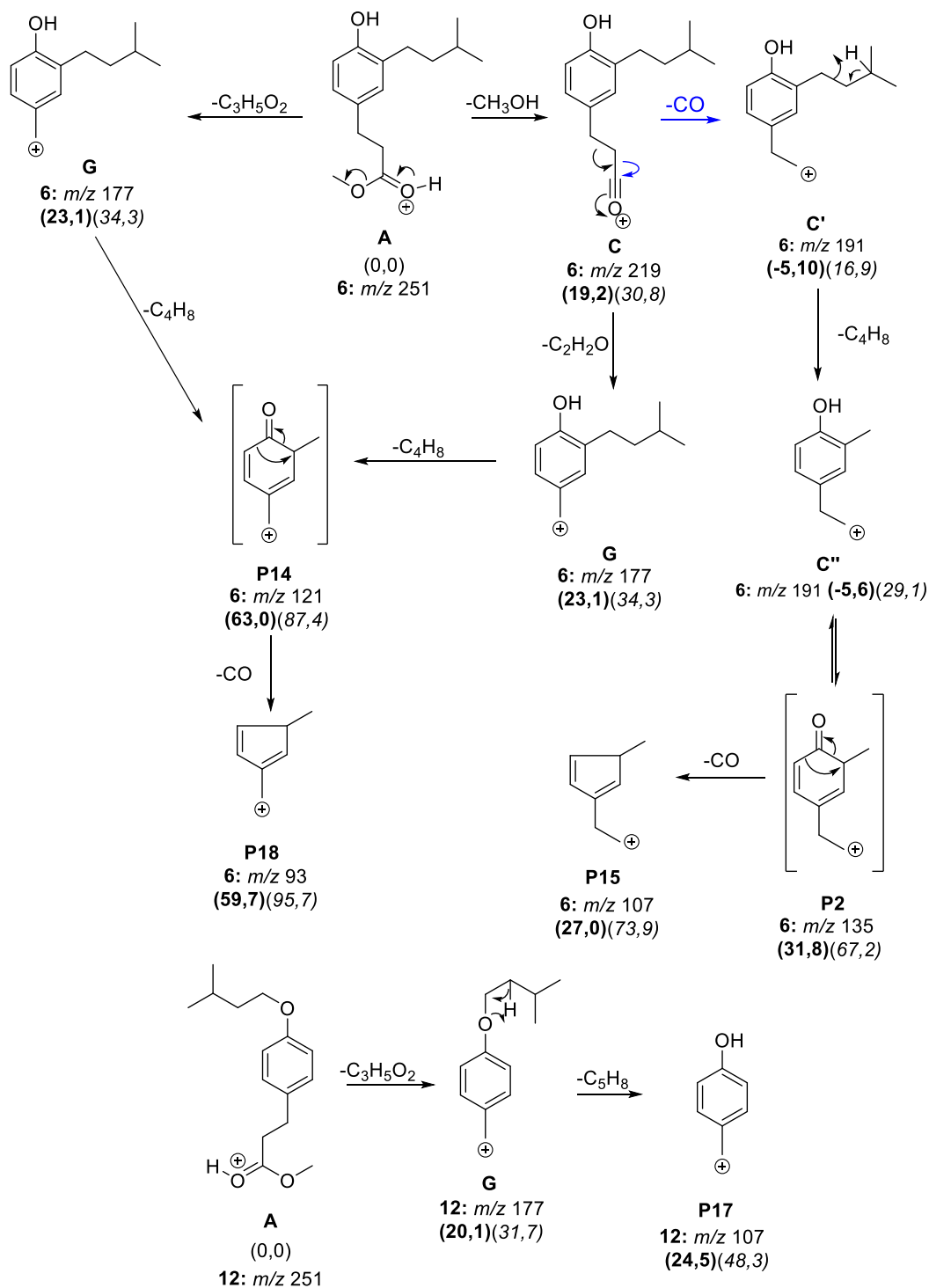
Para o composto **3**, a formação de **P4** (**E**- H_2O) a partir de **E** (**Esquema 14**) pode ocorrer através da eliminação de uma molécula de água energeticamente favorecida ($\Delta H = 27,8$ kcal/mol) após o prototropismo (troca rápida) entre oxigênio da carbonila do éster (sítio mais básico) e o oxigênio do éster (sítio menos básico). Assim como foi descrito para os compostos **1** e **5**, as eliminações adicionais de CO por meio da contração do anel e clivagem heterolítica única podem produzir **P12** e **P13** requerem valores de ΔH relativamente altos ($\Delta H = 73,6$ kcal/mol para **P12** e $\Delta H = 87,7$ kcal/mol para **P13**), o que explica a baixa intensidade desses dois íons no espectro de íons produtos do composto **3**.



Esquema 14. Formação dos íons produtos **C**, **P2**, **P4**, **P12** e **P13** para os compostos protonados 1-5. Os valores das **Entalpias** e **energia de Gibbs** encontram-se abaixo das estruturas, em kcal/mol.

Para o composto **6**, que apresenta uma ligação simples entre C7 e C8, a eliminação de acetato de metila ($C_3H_5O_2$) a partir do íon precursor **A** e a consequente formação de **G** compete com a formação de **C**. Entretanto, o pico correspondente a **G** é mais intenso que **C** no espectro de íons produtos de **A** obtidos em $E_{lab} = 15$ eV. Essa diferença entre as intensidades de **G** e **C** pode ser interpretada de acordo com a estabilização do íon formado. Apesar do valor de ΔH estimado para a formação de **C** seja energeticamente mais favorecida ($\Delta H = 19,2$ kcal/mol) do que para **G** ($\Delta H = 23,1$ kcal/mol), o íon **G** é estabilizado por ressonância, o que consequentemente favorece a sua formação. Além disso, o íon produto **G** é formado também a partir de **C**, o que contribui para a maior intensidade de **G** quando

comparada com **C**. Outras eliminações de C_4H_8 e CO de **C** (m/z 219) e **G** (m/z 177) produzem **P2** (m/z 135), **P14** (m/z 121), **P15** (m/z 107) e **P18** (m/z 93), conforme mostrado no **Esquema 16**. No caso do composto **12**, a formação de **G** é seguida pela eliminação de C_5H_8 e resulta no íon produto benzílico estabilizado por ressonância **P17** (**Esquema 16**), que é o pico base no espectro de íons produtos do composto **6** (**Tabela 21**).

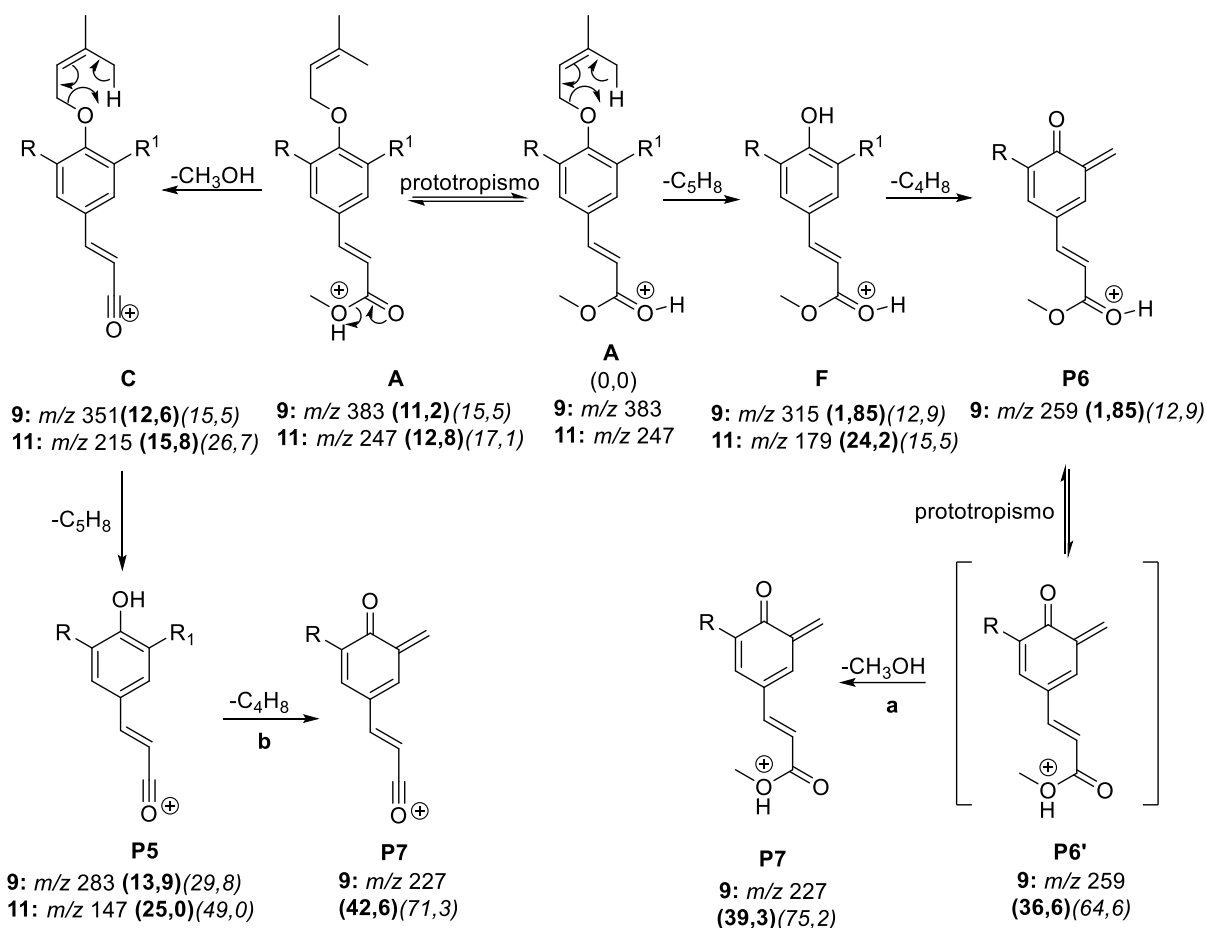


Esquema 15. Formação dos íons produtos **C**, **P2**, **P14**, **G**, **P15**, **P17** e **P18** a partir dos compostos **6** e **12**. Os valores das **Entalpias** e **energia de Gibbs** encontram-se abaixo das estruturas, em kcal/mol.

4.5.4. Formação dos íons de produto de compostos *O*-prenilados

Os compostos **9**, **11** e **12** são derivados *O*-prenilados (ou seja, exibem um grupo prenila ligado ao oxigênio). Para esses compostos, a eliminação de C_5H_8 a partir do íon precursor por meio de um rearranjo de hidrogênio remoto para produzir **F** e de alguns íons produtos (por exemplo, **G**) é diagnóstica para compostos *O*-prenilados (**Esquema 16**). Para o composto **11**, a formação do íon produto **P5**, o íon mais intenso no espectro de íons produtos, ocorre através da eliminação do metanol de **F** ($\Delta H = 25,0$ kcal/mol). A formação de **P5** para o composto **11** é energeticamente menos favorecida que para o composto **9** ($\Delta H = 13,9$ kcal/mol), o que explica a maior intensidade deste íon produto no espectro de **9** em comparação com o de **11**. Essa diferença nas intensidades do íon produto **P5** para os compostos **9** e **11**, pode estar relacionado a presença de mais de um grupo prenil na estrutura do composto **9**, que acaba estabilizando o íon produto **C** que leva a formação de **P5**. Além disso, para os compostos **9** e **11**, a formação do íon diagnóstico **C** ocorre através da eliminação do metanol diretamente da molécula protonada (**A**). A perda de metanol, neste caso, é diagnóstica da presença do grupo éster nos compostos **9** e **11**, conforme discutido para os compostos **1**, **5** e **6** (**esquema 14**, p. 106). No entanto, apesar da formação de **C** ser energeticamente favorecida (ΔH entre 12,5 e 15,8 kcal/mol) para os dois compostos, a intensidade de **C** é baixa quando comparada com outros íons produtos. A baixa intensidade do íon **C** para os dois compostos pode estar relacionada ao fato de que a sua formação compete com a formação **F**.

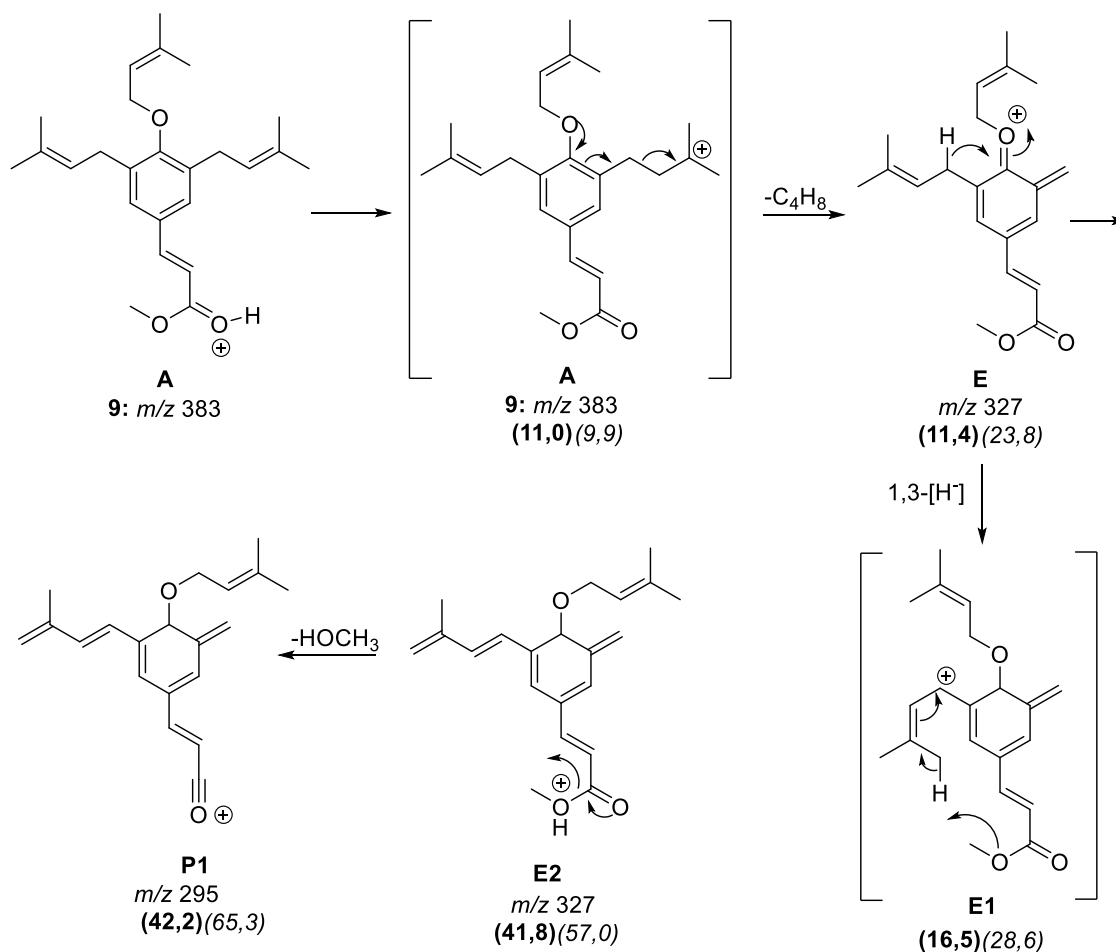
O íon produto **F** também foi observado como o mais intenso no espectro de íon de produto do composto **12**. A alta intensidade relativa de **F** pode estar relacionada não apenas à sua alta estabilidade devido à deslocalização de carga, mas também ao fato de que sua formação pode ocorrer por meio de duas vias de fragmentação. Além do íon **P5**, o íon produto **P6** também pode ser formado a partir de **F** através da perda de C_4H_8 . Este íon é diagnóstico do composto **9**, que possuem um grupo *O*-prenil e dois grupos *C*-prenil em suas estruturas. Para o composto **9**, o íon produto **P6** é o mais intenso no espectro de íons produto (m/z 259, $\Delta H = 25,6$ kcal/mol). A maior intensidade de **P6** para o composto **9** pode estar relacionada ao fato de que a formação de **P7** a partir de **P6** é energeticamente desfavorecida ($\Delta H = 36,6$ kcal/mol), fazendo com que um número maior de íons **P7** cheguem intactos ao analisador de massas. Além disso, a formação de **P7** para o composto **9** pode ocorrer por duas vias (**a** e **b**), sendo a primeira (**a**) por meio da eliminação de metanol a partir de **P6** e a segunda (**b**) via eliminação de C_4H_8 a partir de **P5** (**Esquema 17**, p. 116). No entanto, a formação de **P7** a partir de **P5** é energeticamente desfavorecida ($\Delta H = 42,2$ kcal/mol e $\Delta G = 71,3$ kcal/mol), como pode ser observado no **Esquema 17** (p. 111).



Esquema 16. Formação do íon de produto **C**, **F**, **P6**, **B** e **P7** a partir dos compostos **9-11** e **13**. Os valores das **Entalpias** e energia de Gibbs encontram-se abaixo das estruturas, em kcal/mol.

O íon produto **E** também foi observado nos espectros dos compostos **1**, **3**, **5** e **9**, que apresentam pelo menos um grupo *C*-prenila na posição *orto* à hidroxila fenólica. A formação deste íon ocorre pela eliminação de Grob-Wharton de C_4H_8 diretamente da molécula protonada **A** e é precedida pelo prototropismo representado no **Esquema 17**. No caso do composto **9**, que possui o grupo éster, foi observado o íon diagnóstico **P1**, que é formado a partir do **E** pela eliminação do metanol. Entretanto, a formação de **E2** (que leva a formação de **P1**) é energeticamente desfavorecida

($\Delta H = 48,1$ kcal/mol e $\Delta G = 54,0$ kcal/mol) (**Esquema 18**). Como consequência, a intensidade do íon produto **P1** para o composto **9** é baixa.



Esquema 17. Formação do íon produto **E** e **P1** para o composto **9**. Os valores das **Entalpias** e energia de Gibbs encontram-se abaixo das estruturas, em kcal/mol.

4.6. Identificação do artepillin C e da plicatina B em amostras comerciais de própolis

Os dados obtidos do estudo de fragmentação realizado neste trabalho foram utilizados para a identificação do artepillin C (**3**) e a plicatina B (**5**) em extratos de amostras comerciais de própolis utilizando UPLC-ESI-MS/MS. Para tanto, foi desenvolvida uma metodologia de MRM baseada em transições específicas para esses compostos. Os detalhes desta metodologia encontram-se reunidos na **Tabela 22** (p. 113).

No cromatograma adquirido em modo varredura completa (*full scan*) do extrato de própolis, mostrado na **Figura 28** (p. 113), foi possível observar mais de 20 picos com tempos de retenção entre 2 e 12 min. No entanto, a utilização do método MRM permitiu identificar e detectar, de forma seletiva, o artepillin C (**3**) e a plicatina B (**5**), cujos tempos de retenção foram de 8,08 e 7,95. Os resultados dos experimentos de MRM mostraram que os dados do

presente trabalho podem ser úteis para a desreplicação do artepillin C e da plicatina B em extratos de própolis utilizando UPLC-ESI-MS/MS e para o controle de qualidade de amostras de própolis.

Tabela 22. Transições iônicas e condições do equipamento utilizadas nos experimentos de MRM para identificar os compostos **3** (artepillin C) e **5** (plicatina B) em extratos de amostras comerciais de própolis.

Composto	Íon		VC (V)	EC (eV)	TR (min)
	Precursor (m/z)	Íon produto (m/z)			
3	301	259	40	20	8,08
		245	40	35	
		203	40	35	
5	247	205	40	20	7,95
		191	40	30	
		159	40	35	

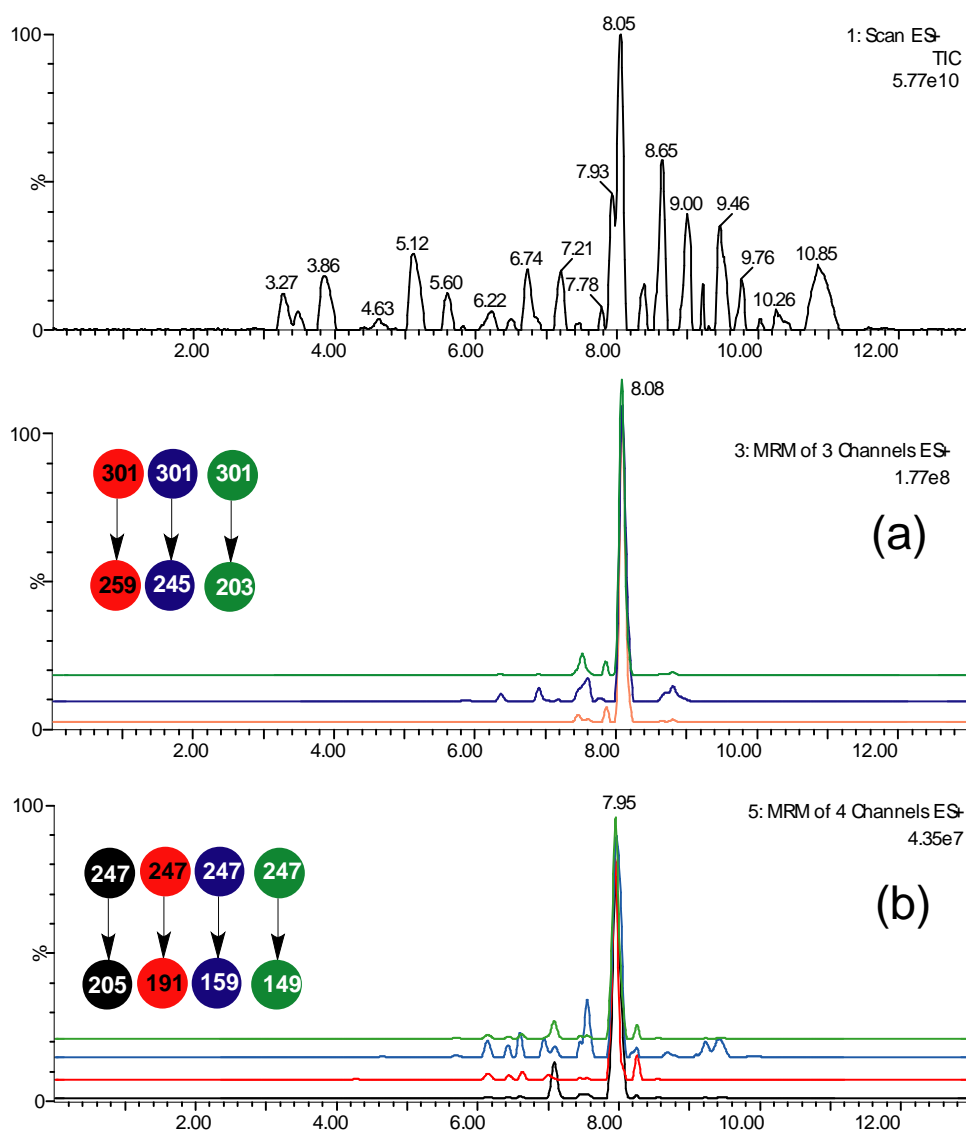


Figura 29. Cromatograma obtido no modo “full scan” do extrato de própolis comercial da empresa Apis Vida e cromatogramas obtidos no modo MRM em transições específicas para o artepillin C (a) e plicatina B (b).

5. Conclusões

A síntese do artepillin C através da prenilação do *p*-cumaroato de metila seguida de hidrólise mostrou-se bastante simples, não exigindo reagentes caros ou de difícil acesso. Neste trabalho, graças à utilização de irradiação por micro-ondas, conseguiu-se reduzir o tempo reacional de 24 h para 10 min em tolueno. No entanto, verificou-se a formação de pelo menos outros três produtos prenilados nesta reação, sendo que o isolamento do produto desejado (**1**) do subproduto *O*-prenilado (**11**) exigiu duas etapas cromatográficas. Devido a este fato, apesar da redução no tempo reacional, a obtenção do artepillin C através desta metodologia sintética, nas condições utilizadas neste trabalho, mostrou-se pouco atrativa.

Os compostos prenilados obtidos como subprodutos – mono-*C*-prenilado (**5**), *O*-prenilado (**11**) e triprenilado (**9**) - foram isolados e submetidos a modificações estruturais. No total, 15 compostos foram sintetizados e identificados com base em seus dados de IV, RMN de ^1H e ^{13}C e espectrometria de massas. Nenhum desses compostos apresentou atividade esquistossomicida ou leishmanicida *in vitro* promissora. Por outro lado, os compostos **5** e **6** apresentaram atividade antibacteriana promissora contra bactérias cariogênicas, com destaque para *Streptococcus mitis*, *S. sanguinis* e *S. mitis*. Estudos de *docking* molecular mostraram que esses compostos atendem a todas as exigências para serem considerados como potenciais fármacos contra essas bactérias.

Com base em dados de alta resolução, MSⁿ e dados termoquímicos, foi possível elucidar as vias de fragmentação de **7** dentre os compostos sintetizados, sendo que os outros 8 fragmentaram-se na fonte de ionização. Os estudos por espectrometria de massas sequencial revelaram que compostos *O*-prenilados e *C*-prenilados podem ser distinguidos entre si através das perdas de C₅H₈ e C₄H₈, respectivamente. Além disso, com base nos dados deste trabalho, foi possível identificar o artepillin C (**3**) e a plicatina B (**5**) em três amostras comerciais de própolis por UPLC-ESI-MS/MS utilizando um método MRM, o que abre caminho para o uso desta técnica para o controle de qualidade de amostras comerciais de própolis.

Em resumo, os resultados deste trabalho contribuirão para um melhor entendimento da atividade antibacteriana do artepillin C, principal composto da própolis verde, e permitirão a rápida identificação deste composto em amostras de própolis utilizando LC-ESI-MS/MS.

6.Referências

- [1] Mutluay, M.; Mutluay, A. T. Caries prevalence, oral health practices/behaviours and dental anxiety levels amongst dental hygiene students: a cross-sectional study. *Int. J. Dent. Hygiene* **2022**, *20*, 262–272.
- [2] INCA. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Câncer da boca. <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/boca>. Acesso em 25/04/23.
- [3] Bagramian, R. A.; Garcia-Godoy, F.; Volpe, A. R. The global increase in dental caries: a pending public health crisis. *Am. J. Dent.* **2009**, *21*, 3-8.
- [4] IBGE, C. d. T. e. R. Pesquisa nacional de saúde: 2013: acesso e utilização dos serviços de saúde, acidentes e violências: Brasil, grandes regiões e unidades da federação. <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv94074.pdf>. Acesso em 14/04/23.
- [5] Saude, M. d. Pesquisa Nacional de saúde bucal https://egestorab.saude.gov.br/image/?file=20221216_I_mod2resultadospreliminaresBrasiliamonsitecompressed_288277690346345359.pdf. 13 june.
- [6] George, S. A. The prevalence of impacted third molars in their associated pathologies in adult patients with age group 25-60. *J. Pharm. Sci. Res.* **2015**, *7*, 871–872.
- [7] Ozdemir, D. Dental caries: the most common disease worldwide and preventive strategies. *Int. J. Biol.* **2013**, *5*, 55–61.
- [8] Chandki, R. B. R. B., P. Biofilms: a microbial home. *J. Indian Soc. Periodontol.* **2011**, *15*, 111–114.
- [9] Veale, A. A., M.; Johnson, S.; Nash, M.; Patterson, L.; George, T. The early childhood oral health program: a qualitative study of the perceptions of child and family health nurses in south western sydney, Australia. *BMC Oral Health.* **2016**, *16*, 2-10.
- [10] Tahour, K. K., F.B.; Fdhila, B.; Elabed, K.; Slama, H.; Mahdouani, R. B.; Backhrouf, K.; Chaieb, A. Anti-bacterial and anti-biofilm activity of probiotic bacteria against oral pathogens. *Microb. Pathog.* **2016**, *97*, 213–220.
- [11] Pleszczyńska, J. W., M.; Bachanek, A.; Szczodrak, T. Enzymes in therapy of biofilm-related oral diseases. *Biotechnol Appl Biochem.* **2017**, *64*, 337–346.
- [12] Gomes, M. P. Dental caries paradigm: etiology and preventive and minimally invasive restorers treatments. *Rev. Rede cuid. saúde* **2022**, *16*, 83-99.
- [13] Arweiler, L. N. N. B. The oral microbiota. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2016**, *902*, 45–60.
- [14] Yan, X. J., Z.; Dingyu, Y.; Yi, D. Progress in study of oral biofilm dispersal-inducing agents. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* **2014**, *32*, 625–630.
- [15] Marín, M. J. F., E.; González, I.; O'Connor, A.; Diz, P.; Álvarez, M.; Herrera, D.; Sanz, M. Comparison of the detection of periodontal pathogens in bacteraemia after tooth brushing by culture and molecular techniques. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.* **2016**, *21*, e276-284.
- [16] Walsh, D. O.-N., T.; Moore, J.M. Chlorhexidine treatment for the prevention of dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2015**, *4*, CD008457.

- [17] Deglovic, J.; Majtanova, N.; Majtan, J. Antibacterial and antibiofilm effect of honey in the prevention of dental caries: a recent perspective. *Foods* **2022**, *11*, 2670.
- [18] Ferreira, G. L. S. B., L. M. D.; Ribeiro, I. L. A.; Morais Júnior, R. C. D.; Castro, R. D. Susceptibility of cariogenic microorganisms to phytoconstituents. *Braz. J. Biol.* **2018**, *78*, 691–696.
- [19] Choo, L. B. D., A.; Messer, D. M. Oral hygiene measures and promotion: review and considerations. *Aust. Dent. J.* **2001**, *46*, 166–173.
- [20] Balasubramanian, A. R.; Vasudeman, S.; Shanmugam, K.; Lévesque, C. M.; Solomon, A. P.; Neelakantan, P. Combinatorial effects of trans-cinnamaldehyde with fluoride and chlorhexidine on *Streptococcus mutans*. *J. Appl. Microbiol.* **2020**, *130*, 382–393.
- [21] Rabe, P. T., S.; Kinnby, B.; Svensäter, G.; Davies, J. R. Effect of fluoride and chlorhexidine digluconate mouthrinses on plaque biofilms. *Open Dent. J.* **2015**, *9*, 106–111.
- [22] Jones, C. G. Chlorhexidine: is it still the gold standard?. *Periodontol.* **1997**, *15*, 55–62.
- [23] Ximenes, M. C., M.; Astorga, F.; Arnold, R.; Pimenta, L. A.; Viera, R. S. Antimicrobial activity of ozone and NaF-chlorhexidine on early childhood caries. *Braz. Oral Res.* **2017**, *31*,
- [24] Conceição, J. R.; Lopes, P. G.; Ferreira, E. I.; Epiphany, S.; Giarolla, J. Neglected tropical diseases and systemic racism especially in Brazil: from socio-economic aspects to the development of new drugs. *Acta Tropica* **2022**, *235*, 106654.
- [25] Melo, G. B. T.; Angulo-Tuesta, A.; Silva, E. N.; Santos, T. S.; Uchimura, L. Y. T.; Obara, M. T. Evolution of research funding for neglected tropical diseases in Brazil, 2004–2020. *PLOS Negl. Trop. Dis.* **2023**, *17*, 0011134.
- [26] Fuzaro, A. F. S.; Ponciano, C. S.; Barros, J. C.; Grazul, R. M.; Almeida, M. V.; Ávila, E. P. Natural products and synthetic derivatives as promising candidates against neglected tropical diseases. *Orbital: Electron. J. Chem.* **2022**, *14*, 247–266.
- [27] Brandão, E.; Romero, S.; da Silva, M. A. L.; Santos, F. L. N. Neglected tropical diseases in Brazilian children and adolescents: Data analysis from 2009 to 2013. *Infect. Dis. Poverty.* **2017**, *6*, 1–10.
- [28] Casavechia, M. T. G. d. M., G. de A.N.; Fernandes, A.C.B.D.S.; de Castro, K.R.; Pedroso, R.B.; Santos, T.D.S.; Teixeira, J.J.V Systematic review and meta-analysis on *Schistosoma mansoni* infection prevalence, and associated risk factors in Brazil. *Parasitology.* **2018**, *145*, 1000–1014.
- [29] Xue, Q.; Deng, Y.; Liu, Y.; Wang, Y.; Hu, W.; Huang, Y.; Yang, K. A retrospective analysis of schistosomiasis related literature from 2011–2020: focusing on the next decade *Acta Tropica* **2023**, *238*, 106750.
- [30] WHO. *Schistosomiasis*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis#:~:text=Schistosomiasis%20is%20an%20acute%20and%20chronic%20parasitic%20disease%20caused%20by,will%20reduce%20and%20prevent%20morbidity>. Acesso em 14/09/2022.

- [31] Normas, S. A.; Técnicos, M. Dengue, esquistossomose, hanseníase, malária, tracoma e tuberculose. In: Cardenos de atenção básica Brasília : Ministério da Saúde: Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica, **2008**.
- [32] Nur, W.; Trisilowati; Suryanto, A.; Kusumawinahyu, W. M. Schistosomiasis model with treatment, habitat modification and biological control. *Math. Biosci. Eng.* **2022**, *19*, 13799–13828.
- [33] Zhang, C. Y.; Yuan, W. G.; He, P.; Lei, J. H.; Wang, C. X. Liver fibrosis and hepatic stellate cells: etiology, pathological hallmarks and therapeutic targets. *World J. Gastroenterol.* **2016**, *22*, 10512–10522.
- [34] Nascimento, G. L. P., H. M.; Domingues, A. L. C.; de A. Ximenes, R. A.; Itria, A.; Cruz, L. N., de Oliveira, M. R. F. The cost of a disease targeted for elimination in Brazil: the case of *schistosomiasis mansoni*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2019**, *114*, e180347.
- [35] Martins-Melo, F. R.; Carneiro, M.; Ramos, A. N. J.; Heukelbach, J.; Ribeiro, A. L. P.; Werneck, G. L. The burden of neglected tropical diseases in Brazil, 1990-2016: a subnational analysis from the global burden of disease study 2016. *PLoS Negl Trop Dis* **2018**, *12*, e0006559.
- [36] Fundação Oswaldo, C. Esquistossomose e outras doenças parasitárias. **2014**,
- [37] Aboagye, I. F.; Addison, Y. A. A. Praziquantel efficacy, urinary and intestinal schistosomiasis reinfection – a systematic review. *Pathog Glob Health* **2022**,
- [38] Paiva, T. V., L.; Melo, P.; Nele, M.; Pinto, J.C. In situ incorporation of praziquantel in polymer microparticles through suspension polymerization for treatment of schistosomiasis. *Macromol. React. Eng* **2018**, *1800064*, 1–12.
- [39] Chuah, C. G., G.N.; Latif, B.; Heo, C.C.; Leow, C.Y Schistosomiasis in Malaysia: a review. *Acta Trop.* **2019**, *190*, 137–143.
- [40] Siqueira, L. d. P.; Fontes, D. A. F.; Aguilera, C. S. B.; Timóteo, T. R. R.; Ângelos, M. A.; Silva, L. C. P. B. B.; de Melo, C. G.; Rolim, L. A.; da Silva, R. M. F.; Neto, P. J. R. Schistosomiasis: drugs used and treatment strategies. *Acta Tropica* **2017**, *176*, 179-187.
- [41] Cioli, D.; Pica-Mattocchia, L.; Basso, A.; Guidi, A. Schistosomiasis control: praziquantel forever? *Mol. Biochem. Parasitol.* **2014**, *195*, 23-29.
- [42] Yadava, P.; Azam, M.; Ramesh, V.; Singh, R. Unusual observations in Leishmaniasis - an overview. *Pathogens* **2023**, *12*, 297.
- [43] Técnicos, S. A. N. e. M. Manual de vigilância e controle da Leishmaniose visceral. In: Epidemiológica, S. d. V. e. S. D. d. V. Brasília - DF: **2006**.
- [44] Glans, H.; Dotevall, L.; Söbirk, S. K.; Färnert, A.; Bradley, M. Cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis in Sweden from 1996–2016: a retrospective study of clinical characteristics, treatments and outcomes. *BMC Infect. Dis.* **2018**, *18*, 1996-2016.
- [45] Rath, S. T., L. A.; Imbrunito, T. R.; Tomazela, D. M.; de Jesús, M. N.; Marzal, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da Leishmaniose: estado da arte. *Quim. Nova* **2003**, *26*, 550-555.

- [46] Sangenito, L. S.; Santos, S.; Avila-levy, C. M. Leishmaniasis and Chagas disease -neglected tropical diseases : treatment leishmaniasis and Chagas disease – neglected tropical diseases : treatment updates. *Curr Top Med Chem* **2019**, *19*, 174-177.
- [47] Severino, P.; Santana, W.; Lisboa, E. S.; Santos, V. L. S.; Lima, E. T. S.; Cardoso, J. C.; Albuquerque-Junior, R. L. C.; Naveros, B. C.; Santini, A.; Souto, E. B.; Jain, S. Cutaneous/Mucocutaneous Leishmaniasis treatment for wound healing: classical versus new treatment approaches. *Microbiol. Res.* **2022**, *13*, 836–852.
- [48] Afrin, F.; Khan, I.; Hemeg, H. A. Leishmania-host interactions—an epigenetic paradigm. *Front Immunol* **2019**, *10*, 1-9.
- [49] FIOCRUZ, F. *Leishmaniose, a doença endêmica que ainda cresce no Brasil*. <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/noticias/1558-leishmaniose-a-doenca-endemica-que-ainda-cresce-no-brasil>. Acesso em 15/05/2023.
- [50] Sundar, S.; Chakravarty, J.; Meena, L. P. Leishmaniasis: treatment, drug resistance and emerging therapies. *Expert Opin Orphan Drugs* **2019**, *7*, 1-10.
- [51] Hu, B.; Yao, Z. P. Electrospray ionization mass spectrometry with wooden tips: a review. *Anal. Chim. Acta* **2022**, *1209*, 339136.
- [52] McLafferty, F. W.; Turecek, F. *Interpretation of Mass Spectra*, 4^o ed. Sausalito, **1993**.
- [53] McLafferty, F. W. Mass spectrometry across sciences *PNAS* **2008**, *105*, 18088-18089.
- [54] Fenn, C. M.; Mann, J. B.; Meng, M.; Wong, C. K.; Whitehouse, S. F. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules *Science* **1989**, *246*, 64-71.
- [55] Henderson, W.; McIndoe, J. S. *Mass Spectrometry of Inorganic, Coordination and Organometallic Compounds*, England: John Wiley & Sons, Ltd, **2005**.
- [56] Dias, H. J.; Melo, N. I.; Crotti, A. E. M. Electrospray ionization tandem mass spectrometry as a tool for the structural elucidation and dereplication of natural products: an overview. *Sect. Title Org. Anal. Chem.* **2012**, 595-618.
- [57] Dias, H. J.; Melo, N. I.; Crotti, A. E. M. Electrospray ionization tandem mass spectrometry as a tool for the structural elucidation and dereplication of natural products: an overview. In: *Applications of Tandem Mass Spectrometry*, Rijeka, Croatia: InTech: Open Access Publisher, **2011**.
- [58] Gross, J. H. *Mass spectrometry*. **2017**,
- [59] Kind, O.; Fiehn, T. Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. *Bioanal. Rev.* **2010**, *2*, 23-60.
- [60] Cooks, G. Special feature: historical. Collision-induced dissociation: readings and commentary. *J. Mass Spectrom.* **1995**, *30*, 1215–1221.
- [61] Watson, O. D.; Sparkman, J. T. *Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications and strategies for data interpretation*, 4th ed. Chichester, England: 2007.

- [62] Gaudêncio, S. P.; Bayram, E.; Bilela, L. L.; Cueto, M.; Díaz-Marrero, A. R.; Haznedaroglu, B. Z.; Jimenez, C.; Mandalakis, M.; Pereira, F.; Reyes, F.; Tasdemir, D. Advanced methods for natural products discovery: bioactivity screening, dereplication, metabolomics profiling, genomic sequencing, databases and informatic tools, and structure elucidation. *Mar. Drugs* **2023**, *21*, 308.
- [63] Demarque, D. P. C.; Crotti, A. E. M.; Vessechi, R.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 432–455.
- [64] Patel, K. N.; Patel, J.; Patel, M. P.; Rajput, G.; Patel, H. A. Introduction to hyphenated techniques and their applications in pharmacy. *Pharm Methods* **2010**, *1*, 2-13.
- [65] Crotti, A. E. M. C., C.A.; Gobbo-Neto, L.; Santos, M.D.; Gates, P.J.; Lopes, N.P. LC-hyphenated techniques: uses in the structural elucidation of low and high molecular weight compounds. In: *Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry*, Kerala, India: **2006**.
- [66] Dias, H. J. M., N.I.; Crotti, A.E.M. *Electrospray ionization tandem mass spectrometry as a tool for the structural elucidation and dereplication of natural products: an overview. In: tandem mass spectrometry: applications and principles*, **2012**.
- [67] Herrera-Lopez, S. H., M.D.; García-Calvo, E.; Fernández-Alba, A.R.; Ulaszewska, M.M. Simultaneous screening of targeted and nontargeted contaminants using an LC-QTOF-MS system and automated MS/MS library searching. *J. Mass Spectrom.* **2014**, *49*, 878–893.
- [68] Oberacher, B. W., H.; Bernd, G. Evaluation of the sensitivity of the “wiley registry of tandem mass spectral data, MS for ID” with MS/MS data of the “NIST/NIH/EPA mass spectral library”. *J. Mass Spectrom.* **2013**, *48*, 487–496.
- [69] Abad, M. J.; Bermejo, P. Baccharis (Compositae): a review update. *Arkivoc* **2012**, *2007*, 76-76.
- [70] Costa, P.; Almeida, M. O.; Lemos, M.; Arruda, C.; Casoti, R.; Somensi, L. B.; Boeing, T.; Mariott, M. S.; Fonseca, R. C. M. V. A. F.; Stein, B. D. P.; Souza, P.; dos Santos, A. C.; Bastos, J. K.; da Silva, L. M.; de Andrade, S. F. Artepillin C, drupanin, aromadendrin-4'-O-methyl-ether and kaempferide from Brazilian green propolis promote gastroprotective action by diversified mode of action. *J. Ethnopharmacol* **2018**, *226*, 82-89.
- [71] Estrada, G. O. D.; da Silva, J. F. M.; Antunes, O. A. Artepillin C: a review. *Lett Drug Des Discov.* **2008**, *5*, 88-92.
- [72] Hirata, Y.; Motoyama, M.; Kimura, S.; Takashima, M.; Ikawa, T.; Oh-hashii, K.; Kamatari, Y. O. Artepillin C, a major component of Brazilian green propolis, inhibits endoplasmic reticulum stress and protein aggregation. *Eur. J. Pharmacol.* **2021**, *912*, 174572.
- [73] Ribeiro, V. P.; Ccapatinta, G. V. C.; Aldana-Mejía, J. A.; Berretta, A. A.; Moraes, L. A. B.; Bastos, J. K. Chemical characterization of Brazilian propolis using automated direct thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. *J Sci Food Agric* **2022**, *102*, 4345–4354.

- [74] Beserra, F. P.; Gushiken, L. F. S.; Hussni, M. F.; Ribeiro, V. P.; Bonamin, F.; Jackson, C. J.; Pellizzon, C. H.; Bastos, J. K. Artepillin C as an outstanding phenolic compound of Brazilian green propolis for disease treatment: a review on pharmacological aspects. *Phytother Res* **2021**, *35*, 2274–2286.
- [75] Assis, M. A. S.; Ramos, L. P.; Hasna, A. A.; Queiroz, T. S.; Pereira, T. C.; Lima, P. M. N.; Berretta, A. A.; Marcucci, M. C.; Carvalho, C. A. T.; Oliveira, L. D. Antimicrobial and antibiofilm effect of brazilian green propolis aqueous extract against dental anaerobic bacteria. *Molecules* **2022**, *27*, 8128.
- [76] Berretta, A. A.; Zamarrenho, L. G.; Correa, J. A.; Lima, J. A.; Borini, G. B.; Ambrósio, S. R.; Barud, H. S.; Bastos, J. K.; Jong, D. Development and characterization of new green propolis extract formulations as promising candidates to substitute for green propolis hydroalcoholic extract. *Molecules* **2023**, *28*, 3510.
- [77] Paula, L. A. L.; Santos, M. F. C.; Pagotti, M. C.; Veneziani, R. C. S.; Bastos, J. K.; Caffrey, C. R.; Ambrósio, S. R.; Magalhães, L. G. Brazilian green propolis reduces worm burden and hepatic granuloma formation in a *Schistosoma mansoni* experimental murine model. *Parasitol. Res.* **2022**, *121*,
- [78] Altabbal, S.; Athamnah, K.; Rahma, A.; Wali, A. F.; Eid, A. H.; Iratni, R.; Dhaheri, Y. A. Propolis: a detailed insight of its anticancer molecular mechanisms. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 450.
- [79] França, M. *Própolis verde mineira conquista mercado internacional*
- [80] Bankova, V.; Boudourova-Krasteva, G.; Sforcin, J. M.; Frete, X.; Kujumgiev, A.; Maimoni-Rodella, R.; Popov, S. Phytochemical evidence for the plant origin of brazilian propolis from São Paulo state. *Z. Naturforsch., C, J. Biosci.* **2015**, *54*, 401-405.
- [81] Monroy, Y. M.; Rodrigues, R. A. F.; Rodrigues, M. V. N.; Cabral, F. A. Fractionation of ethanolic and hydroalcoholic extracts of green propolis using supercritical carbon dioxide as an anti-solvent to obtain artepillin rich-extract. *J. Supercrit. Fluids.* **2018**, *138*, 167-173.
- [82] Feresin, G. E.; Tapia, A.; Gimenez, A.; Ravelo, A. G.; Zacchino, S.; Sortino, M.; Schmeda-Hirschman, G. J. Turning medicinal plants into drugs. *Ethnopharmacol.* **2003**, *89*, 73-80.
- [83] Ghisalberti, E. L.; Jefferies, P. R.; Lanteri, R.; Matisons, J. Constituents of propolis. *Experientia* **1978**, *34*, 157-158.
- [84] Gardana, C.; Scaglianti, M.; Pietta, P.; Simonetti, P. Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *45*, 390-399.
- [85] Bohlmann, F.; Kramp, W.; Grenz, M.; Robinson, H.; King, R. M. Diterpenes from *Baccharis* species. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 1907-1913.
- [86] Barth, O. M.; de Freitas, A. S.; Matsuda, A. H.; Almeida-Muradian, L. B. d. Botanical origin and artepillin-C content of brazilian propolis samples. *Grana* **2013**, *52*, 129-135.

- [87] Pazin, W. M.; Ruiz, G. C. M.; Santos, M. J.; Aoki, P. H. B.; Ito, A. S.; Constantino, C. J. L. The protective effect of Artepillin C against lipid oxidation on model membranes. *J. Mol. Liq.* **2021**, *324*, 115089.
- [88] Uto, Y.; Ae, S.; Koyama, D.; Sakakibara, M.; Otomo, N.; Otsuki, M.; Hideko, K.; Kenneth, L.; Hori, H. Artepillin C isoprenomics: design and synthesis of artepillin C isoprene analogues as lipid peroxidation inhibitor having low mitochondrial toxicity. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5721-5728.
- [89] Rodrigues, D. M.; Portapilla, G. B.; Silva, G. M.; Duarte, A.; Rotta, C. G.; Silva, C. H. T. P.; Albuquerque, S.; Bastos, J. K.; Campo, V. L. Synthesis, antitumor activity and in silico analyses of amino acid derivatives of artepillin C, drupanin and baccharin from green propolis. *Bioorg. Med. Chem.* **2021**, *47*, 116372.
- [90] Ota, A.; Kawai, M.; Kudo, Y.; Segawa, J.; Hoshi, M.; Kawano, S.; Yoshino, Y.; Ichihara, K.; Shiota, M.; Fujimoto, N.; Matsunaga, T.; Endo, S.; Ikara, A. Artepillin C overcomes apalutamide resistance through blocking androgen signaling in prostate cancer cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **2023**, *735*, 109519.
- [91] Martins, N. S.; Fraga-Silva, T. F. C.; Correa, G. F.; Boko, M. M. M.; Ramalho, L. N. Z.; Rodrigues, D. M.; Hori, J. I.; Costa, D. L.; Bastos, J. K.; Bonato, V. L. D. Artepillin C reduces allergic airway inflammation by induction of monocytic myeloid-derived suppressor cells. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1763.
- [92] Sova, M. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. *Mini Rev Med Chem* **2012**, *12*, 749-767.
- [93] Aga, H.; Shibuya, T.; Sugimoto, T.; Kurimoto, M.; Nakajima, S. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1994**, *58*, 945-946.
- [94] Veiga, R. S.; De Mendonça, S.; Mendes, P. B.; Paulino, N.; Mimica, M. J.; Lagareiro Netto, A. A.; Lira, I. S.; López, B. G. C.; Negrão, V.; Marcucci, M. C. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. *J. Appl. Microbiol.* **2017**, *122*, 911-920.
- [95] Seibert, J. B.; Bautista-Silva, J. P.; Amparo, T. R.; Petit, A.; Pervier, P.; dos Santos Almeida, J. C.; Azevedo, M. C.; Silveira, B. M.; Brandão, G. C.; de Souza, G. H. B.; de Medeiros Teixeira, L. F.; dos Santos, O. D. H. Development of propolis nanoemulsion with antioxidant and antimicrobial activity for use as a potential natural preservative. *Food Chemistry* **2019**, *287*, 61-67.
- [96] Yoshimasu, Y.; Ikeda, T.; Sakai, N.; Yagi, A.; Hirayama, S.; Morinaga, Y.; Furukawa, S.; Nakao, R. Rapid bactericidal action of propolis against *Porphyromonas gingivalis*. *J. Dent. Res.* **2018**, *97*, 928-936.
- [97] Pereira, C. A.; da Costa, A. C. B. P.; Machado, A. K. S.; Júnior, M. B.; Zöllner, M. S. A. C.; Junqueira, J. C.; Jorge, A. O. C. Enzymatic activity, sensitivity to antifungal drugs and *Baccharis dracunculifolia* essential oil by *Candida* strains isolated from the oral cavities of breastfeeding infants and in their mothers' mouths and nipples. *Mycopathologia* **2011**, *171*, 103-109.

- [98] Lee, Y. N.; Chen, C. R.; Yang, H. L.; Lin, C. C.; Chang, C. M. J. Isolation and purification of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (artepillin C) in brazilian propolis by supercritical fluid extractions. *Sep Purif Technol.* **2007**, *54*, 130-138.
- [99] Patra, T.; Bag, S.; Kancherla, R.; Mondal, A.; Dey, A.; Pimparkar, S.; Agasti, S.; Modak, A.; Maiti, D. Palladium-catalyzed directed para C-H functionalization of phenols. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2016**, *55*, 7751-7755.
- [100] Uto, Y.; Hirata, A.; Fujita, T.; Takubo, S.; Nagasawa, H.; Hori, H. First total synthesis of artemillin C established by o,o'-diprenylation of p-halophenols in water. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2355-2357.
- [101] Zhao, X. Z.; Wang, L.; Li, X. Y.; Zhang, Q. Q.; Li, W.; Lin, A. J.; Xu, J. Y.; Wu, X. M.; Xie, W. J. A practical synthetic route to artemillin C and drupanin. *Asian J. Org. Chem.* **2021**, *10*, 1691-1694.
- [102] Corrêa, W. R.; López, B. G. C.; Prado, S. C.; Cunha, I. B. S.; Sawaya, A. C. H. F.; Salvador, M. J. ESI-MS fingerprinting of residues of green propolis, and evaluation of their antioxidant and antimicrobial activities. *J. Apic. Res.* **2016**, *8839*, 1-7.
- [103] Carrão, D. B.; de Albuquerque, N. C. P.; Marquez, L. M. M.; Crotti, A. E. M.; Pilon, A. C.; Bolzani, V. S.; Berreta, A. A.; Oliveira, A. R. M. *In vitro* metabolism of artemillin C by rat and human liver microsomes. *Planta Med.* **2017**, *83*, 737-745.
- [104] Hawbecker, B. L.; Kurtz, D. W.; Putnam, T. D.; Ahlers, P. A.; Gerber, G. D. The aldol condensation: a simple teaching model of organic laboratory. *J. Chem. Educ.* **1978**, *55*, 4-5.
- [105] Dias, H. J. Síntese e estudos sobre a fragmentação de compostos benzofurânicos empregando espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray. - Universidade de São Paulo **2018**.
- [106] Dias, H. J. Síntese e estudos sobre a fragmentação de compostos benzofurânicos empregando espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray. - Universidade de São Paulo **2018**.
- [107] Patra, T.; Bag, S.; Kancherla, R.; Mondal, A.; Dey, A.; Pimparkar, S.; Agasti, S.; Modak, A.; Debabrata Maiti, D. Palladium-catalyzed directed para C-H functionalization of phenols. *Angew. Chem. Int.* **2016**, *55*, 7751-7755.
- [108] Uto, Y.; Hirata, A.; Fujita, T.; Takubo, S.; Nagasawa, H.; Hori, H. First total synthesis of artemillin C established by o,o'-diprenylation of p-halophenols in water. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2355-2357.
- [109] Vieira, T. M. Avaliação da atividade antimicrobiana de curcuminoides e estudo de suas reações de fragmentação em fase gasosa por espectrometria de massas sequencial -Universidade de São Paulo, 2019.
- [110] Kantee, K.; Rukachaisirikul, V.; Tadpetch, K. Synthesis of tetrahydropyranyl diarylheptanoids from *Dioscorea villosa*. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 3505-3509.

- [111] CLSI *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically - Tenth Edition*, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.
- [112] Gibbons, S. Anti-staphylococcal plant natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 263-267.
- [113] Palomino, J. C.; Martin, A.; Camacho, M.; Guerra, H.; Swings, J.; Portaels, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 2720–2722.
- [114] Brouwer, H. Testing for chemical toxicity using bacteria. *J. Chem. Educ.* **1991**, *68*,
- [115] Duarte, E. A.; Santiago, M. B.; Silva, N. B. S.; Martins, C. H. G.; Gatto, C. C. Crystal design, spectroscopic analyses and antibacterial study of new carbazate ligands and their Cu(II) complexes. *Inorganica Chim. Acta* **2023**, *549*, 121421.
- [116] Stewart, J. J. P. Optimization of parameters for semi-empirical methods V: modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *J. Mol. Model.* **2007**, *13*, 1173-1213.
- [117] Feil, S. C.; Lawrence, S.; Mulhern, T. D.; Holien, J. K.; Hotze, E. M.; Farrand, S.; Tweten, R. K.; Parker, M. W. Structure of the lectin regulatory domain of the cholesterol-dependent cytolysin lectinolysin reveals the basis for its lewis antigen specificity. *Structure* **2012**, *20*, 248-258.
- [118] Makhlynets, O.; Boal, A. K.; Rhodes, D. V.; Kitten, T.; Rosenzweig, A. C.; Stubbe, J. *Streptococcus sanguinis* class Ib ribonucleotide reductase: high activity with both iron and manganese cofactors and structural insights. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 6259-6272.
- [119] Inc, C. C. G. *Molecular operating Environment (MOE), 2013.08*, Montreal, QC, Canada, H3A2R77: **2014**.
- [120] D.E., P.; Blundell, T. L.; Ascher, D. B. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 4066-4072.
- [121] Becke, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5652.
- [122] Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; al., e. Gaussian 09 *Gaussian, Inc* **2009**,
- [123] Kornblum, N.; Berrigan, P. J.; le Noble, W. J. Chemical effects arising from selective solvation: selective solvation as a factor in the alkylation of ambident anions. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1257–1258.
- [124] Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach* Third Edition. University of Nottingham, UK: 2009.
- [125] Tazawa, S.; Warashina, T. N., T Studies on the constituents of Brazilian propolis. II. *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*, 1388-1392.
- [126] Bates, R. W.; Gabel, C. J.; Ji, J.; Rama-Devi, T. Synthesis of phenolic natural products using palladium catalyzed coupling reactions *Tetrahedron* **1995**, *30*, 8199-8212.
- [127] Costa, P.; Almeida, M. O.; Lemos, M.; C., A.; Casoti, R.; Somensi, L. B.; Boeing, T.; Mariott, M.; Silva, R. C. M. V. A. F.; Stein, B. D. P.; Souza, P. S.; Santos, A. C. S.; Bastos, J. K.; Silva, L. M.; Andrade, S. F. Artepillin C, drupanin, aromadendrin-4'-O-methyl-ether and kaempferide from

- Brazilian green propolis promote gastroprotective action by diversified mode of action. *J. Ethnopharmacol.* **2018**, *226*, 82-89.
- [128] Nakashima, K. I.; Murakami, T.; Tanabe, H.; Inoue, M. Drupanin is a naturally occurring retinoid X receptor agonist from Brazilian green propolis. *Planta Med.* **2014**, *80*, 80-PG87.
- [129] De, P.; Yoya, G. K.; Constant, P.; Bedos-Belval, F.; Duran, H.; Saffon, N.; Daffé, M.; Baltas, M. Design, synthesis, and biological evaluation of new cinnamic derivatives as antituberculosis agents. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1449–1461.
- [130] De, P.; Baltas, M.; Bedos-Belval, F. Cinnamic acid derivatives as anticancer agents- a review. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 1672-1703.
- [131] Saleem, M.; Nazir, M.; Ali, M. S.; Hussain, H.; Lee, Y. S.; Riaz, N.; Jabbar, A. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 238–254.
- [132] Rios, J. L.; Recio, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *100*, 80–84.
- [133] Oliveira, T. A. S.; Santiago, M. B.; Santos, V. H. P.; Silva, E. O.; Martins, C. H. G.; Crotti, A. E. M. Antibacterial activity of essential oils against oral pathogens. *Chem. Biodiversity* **2022**, *19*, e202200097.
- [134] Aligiannis, N.; Kalpoutzakis, E.; Mitaku, S.; Chinou, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4168–4170.
- [135] Arweiler, L. B.; Netuschil, L. The oral microbiota. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2016**, *902*, 45-60.
- [136] Aga, H.; Shibuya, T.; Sugimoto, T.; Kurimoto, M.; Nakajima, S. Isolation and identification of antimicrobial compounds in brazilian propolis. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1994**, *58*, 945-946.
- [137] Veiga, R. S.; Mendonça, S. D.; Mendes, P. B.; Paulino, N.; Mimica, M. J.; Lagareiro Netto, A. A.; Lira, I. S.; López, B. G. C.; Negrão, V.; Marcucci, M. C. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. *J. Appl. Microbiol.* **2017**, *122*, 911-920.
- [138] Shahinozzama, M.; Basak, B.; Emran, R.; Rozario, P.; Obanda, D. N. Artepillin C: a comprehensive review of its chemistry, bioavailability, and pharmacological properties. *Fitoterapia* **2020**, *147*, 104775.
- [139] Jabeen, Y.; Ansari, N.; Rasheed, H.; Rasheed, M. A.; Awais, M.; Ibrahim, M.; Kanwal, A.; Zahid, M. A.; Jamil, F. Let's Dock: a smart platform for Molecular Docking. *Pak. J. Zool.* **2022**, *54*, 1501-2001.
- [140] Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785-2791.
- [141] Thomsen, R.; Christensen, M. H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3315-3321.

- [142] Wade, R. C.; Goodford, P. J. The role of hydrogen-bonds in drug binding. *Prog. Clin. Biol. Res.* **1989**, *289*, 433-444.
- [143] Imberty, A.; Hardman, K. D.; Carver, J. P.; Perez, S. Molecular modelling of protein-carbohydrate interactions. Docking of monosaccharides in the binding site of concanavalin A. *Glycobiology* **1991**, *1*, 631-642.
- [144] Velarde, J. J.; Piai, A.; Lichtenstein, I. J.; Lynskey, N. N.; Chou, J. J.; Wessels, M. R. Structure of the *Streptococcus pyogenes* NAD⁺ glycohydrolase translocation domain and its essential role in toxin binding to oropharyngeal keratinocytes. *J. Bacteriol.* **2022**, *204*, e00366-00321.
- [145] Fernandes, L. D. P.; Silva, J. M.; Martins, D. O.; Santiago, M. B.; Martins, C. H.; Jardim, A. C.; Oliveira, C. G. Fragmentation study, dual anti-bactericidal and anti-viral effects and molecular docking of cobalt (III) complexes. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8355.
- [146] Roy, N.; Ghosh, B.; Roy, D.; Bhaumik, B.; Roy, M. N. Exploring the inclusion complex of a drug (umbelliferone) with α -cyclodextrin optimized by molecular docking and increasing bioavailability with minimizing the doses in human body. *ACS omega* **2020**, *5*, 30243-30251.
- [147] Djebaili, R.; Kenouche, S.; Daoud, I.; Melkemi, N.; Belkadi, A.; Mesli, F. Investigation of [3H] diazepam derivatives as allosteric modulators of GABAA receptor $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ subtypes: combination of molecular docking/dynamic simulations, pharmacokinetics/drug-likeness prediction, and QSAR analysis. *Struct. Chem.* **2023**, *34*, 791–823.
- [148] Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development setting. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3-26.
- [149] Lipinski, C. A. Lead-anddrug-likecompounds:the rule-of-fiveevolution. *Drug discovery today. Technologies* **2004**, *1*, 337-341.
- [150] Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H.-Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2615–2623.
- [151] Dias, H. J.; Vieira, T. M.; Crevelin, E. J.; Donate, P. M.; Vesseccchi, R.; Crotti, A. E. M. Fragmentation of 2-arylbzofuran derivatives by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2017**, *52*, 809-816.
- [152] Antônio, E. M. C.; Bronze-Uhle, E. S.; Nascimento, P. G. B. D.; Donate, P. M.; Galembeck, S. E.; Vesseccchi, R.; Lopes, N. P. Gas-phase fragmentation of γ -lactone derivatives by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* **2009**, *44*, 1733-1741.
- [153] Vieira, T. M.; Orenha, R. P.; Crevelin, E. J.; Furtado, S. S. P.; Vesseccchi, R.; Parreira, R. L. T.; Crotti, A. E. M. Electrospray ionization tandem mass spectrometry of monoketone curcuminoids. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **2020**, *34*, e8699.

- [154] Li, J.; Pan, Y.; Chen, B. The ion–neutral complex-mediated fragmentation reaction in electrospray ionization tandem mass spectrometric analysis of N-phenyl-3-(phenylthio)propanamides. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **2022**, *36*,
- [155] Boyd, R.; Somogyi, A. The mobile proton hypothesis in fragmentation of protonated peptides: a perspective. *J Am Soc Mass Spectrom.* **2010**, *21*, 1275-1278.
- [156] Sleno, L.; Volmer, D. A. Ion activation methods for tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* **2004**, *39*, 1091-1112.

7. Seção de espectros

ANEXOS

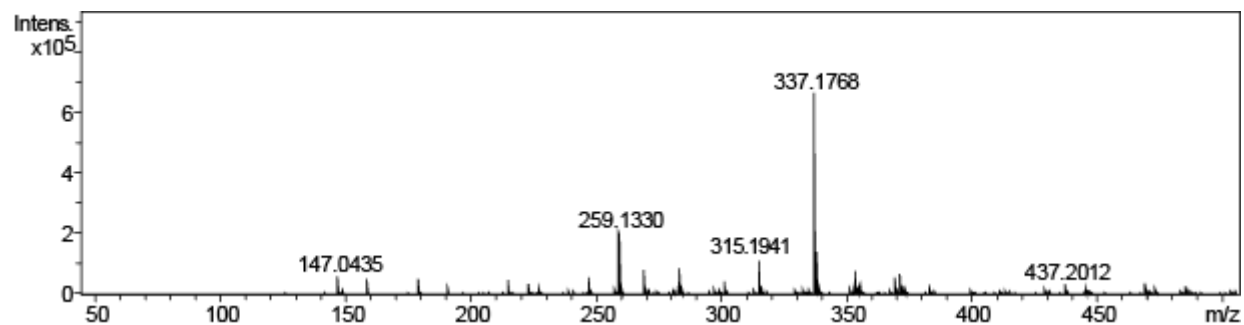


Figura A 1. Espectro de massas do composto 1 (ESI-Q-TOF, N₂, E_{lab} = 15 eV).

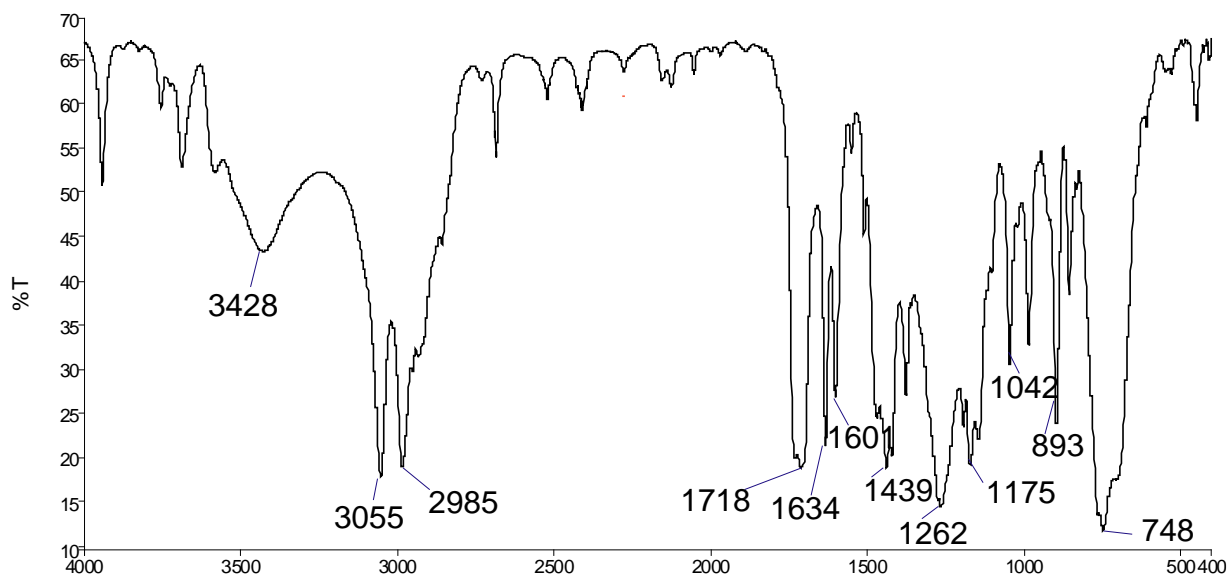


Figura A 2. Espectro de absorção no infravermelho do composto 1 (em pastilha de KBr).

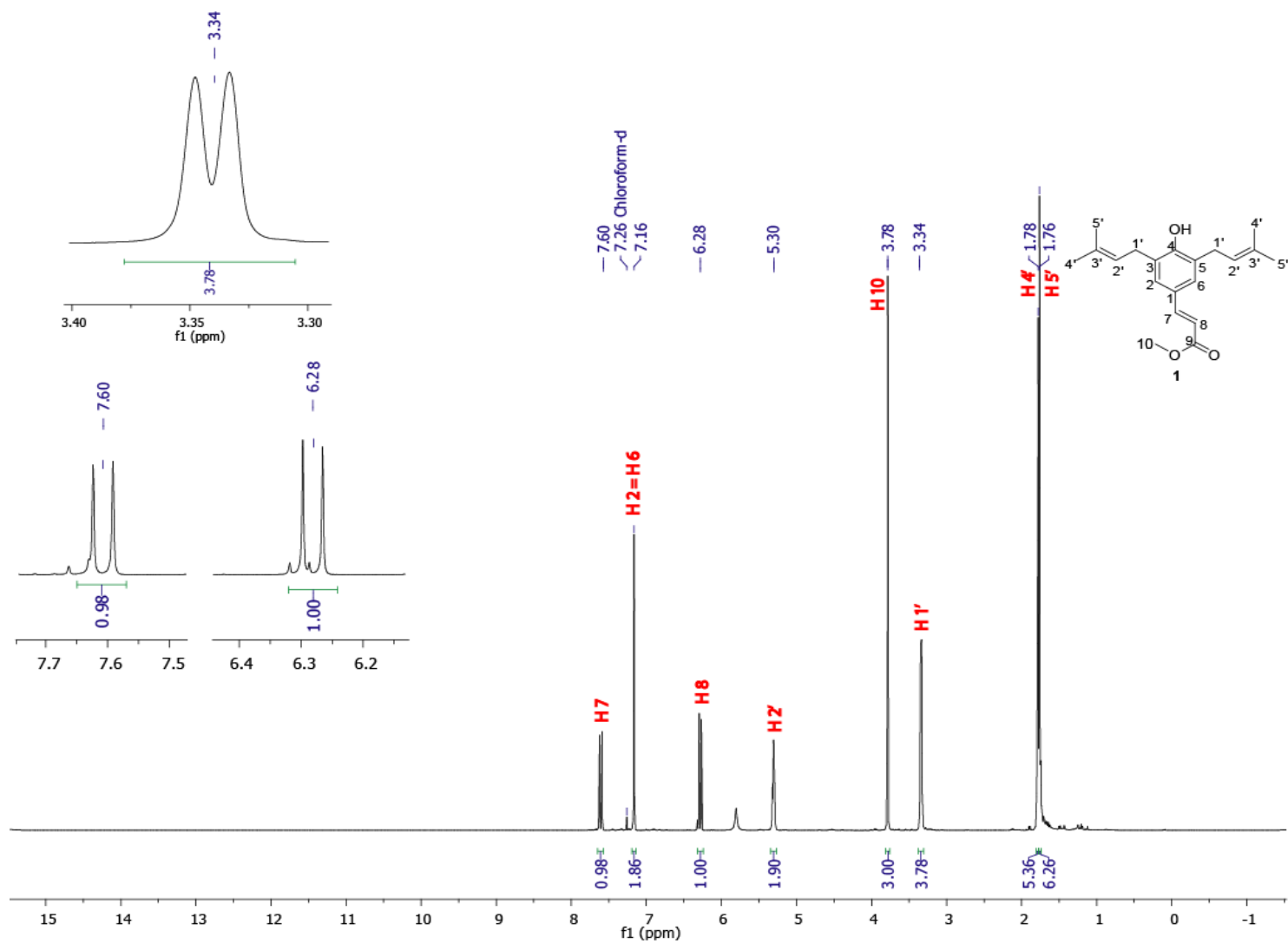


Figura A 3. Espectro de RMN de ^1H do composto 1 (CDCl_3 , 400 MHz).

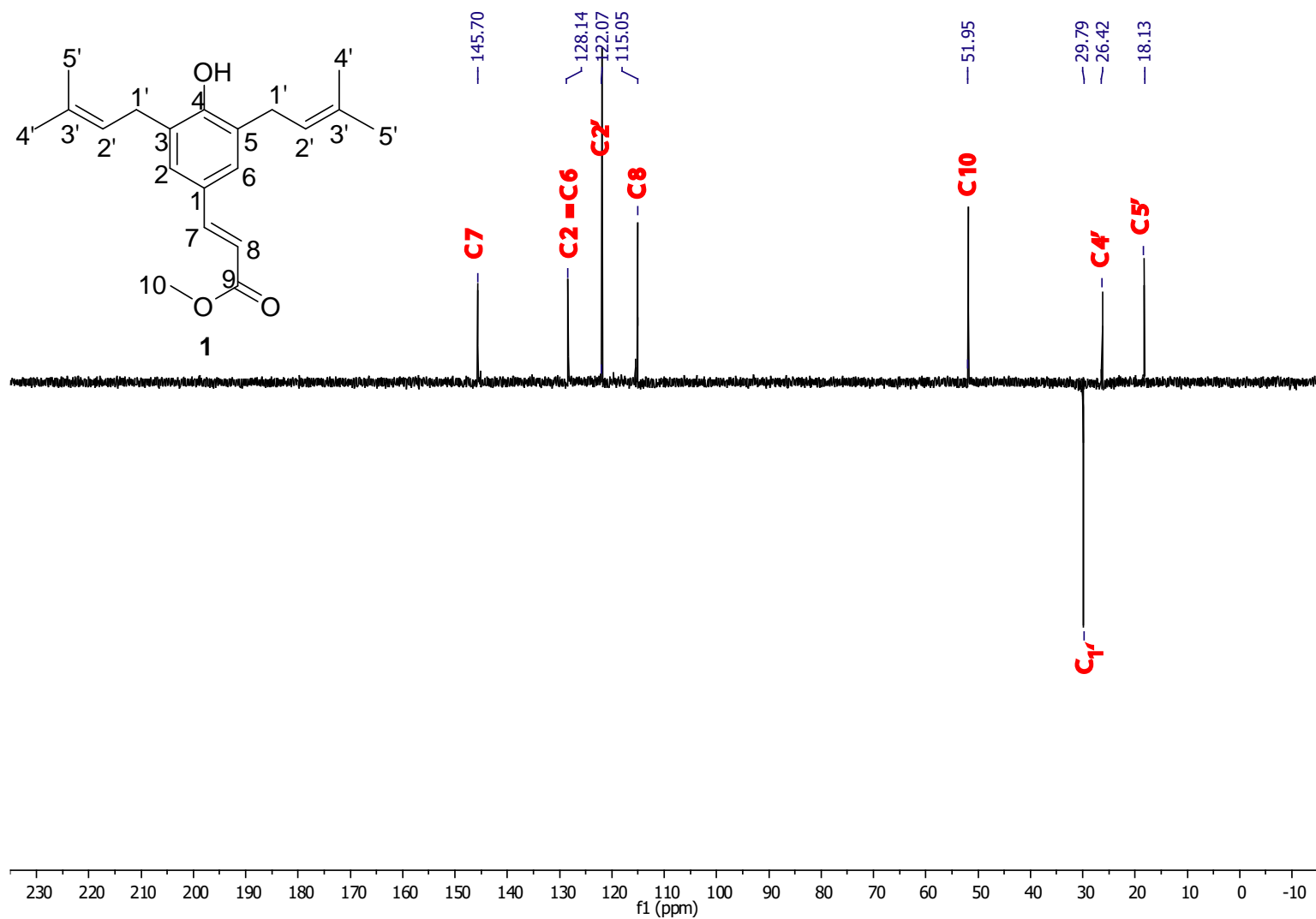


Figura A 4. Espectro de DEPT 135 do composto **1** (CDCl₃, 400 MHz).

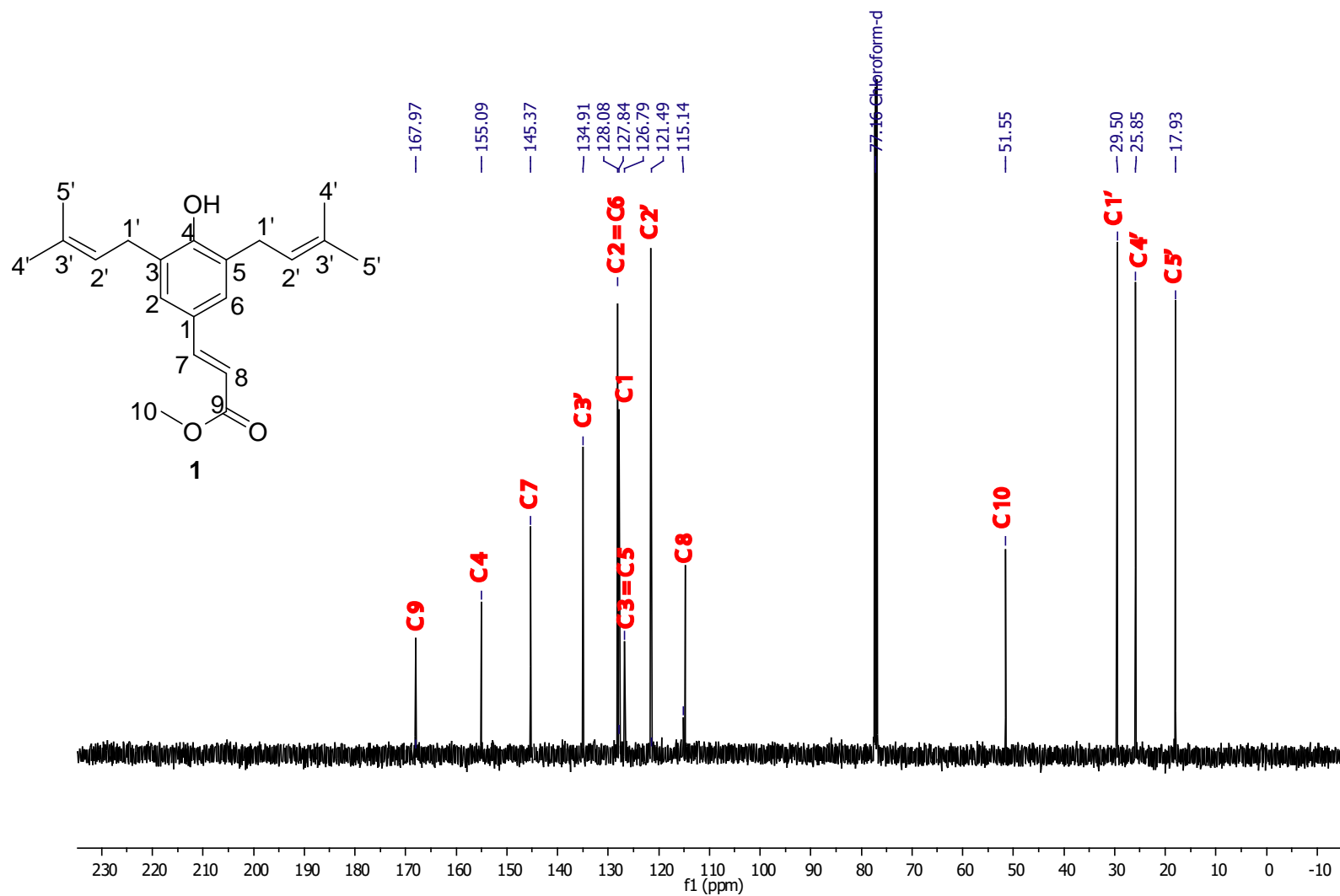


Figura A 5. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 1 (CDCl_3 , 100 MHz).

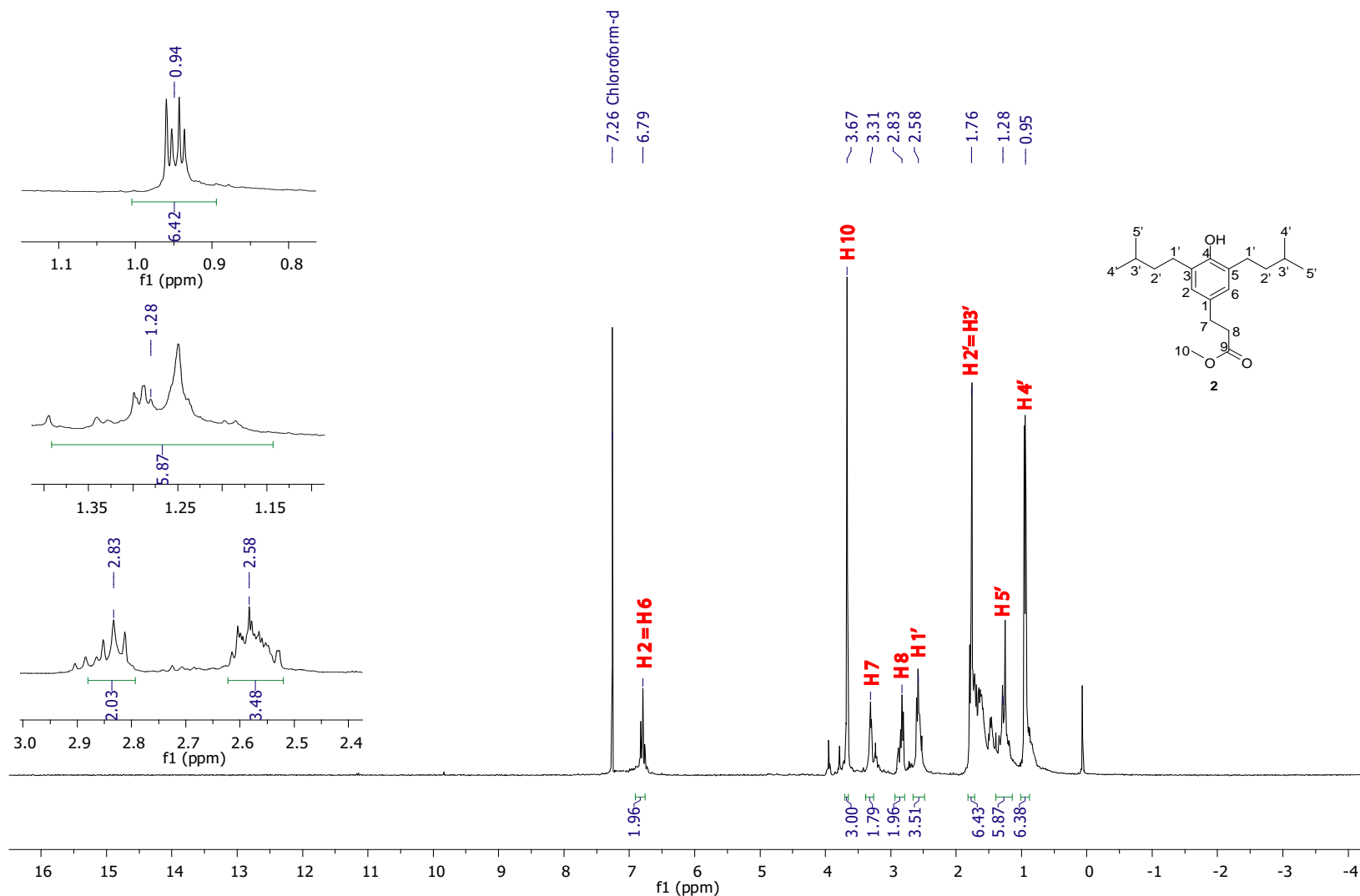


Figura A 6. Espectro de RMN de ^1H do composto 2 (CDCl_3 , 400 MHz).

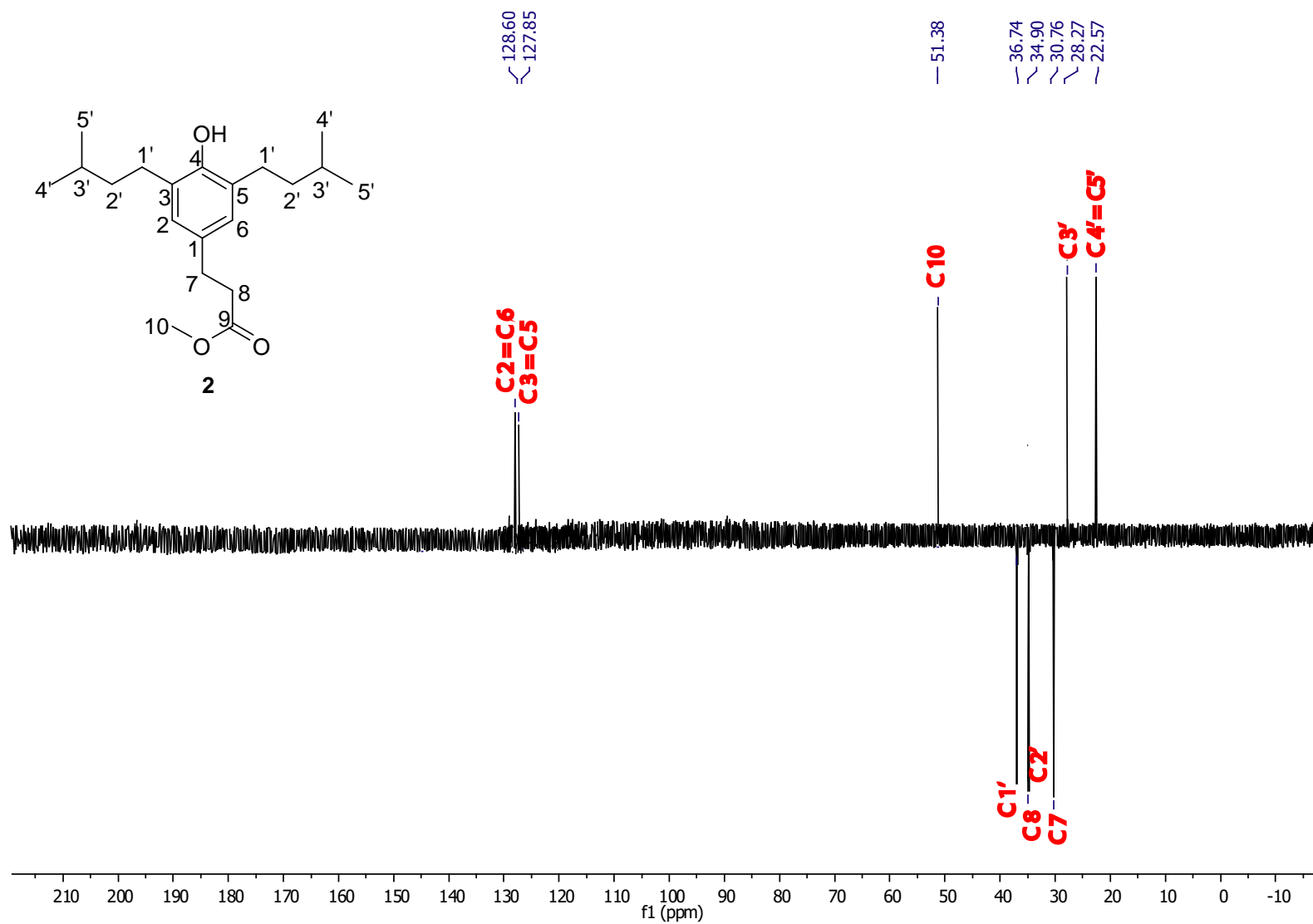


Figura A 7. Espectro de DEPT 135 do composto 2 (CDCl₃, 400 MHz).

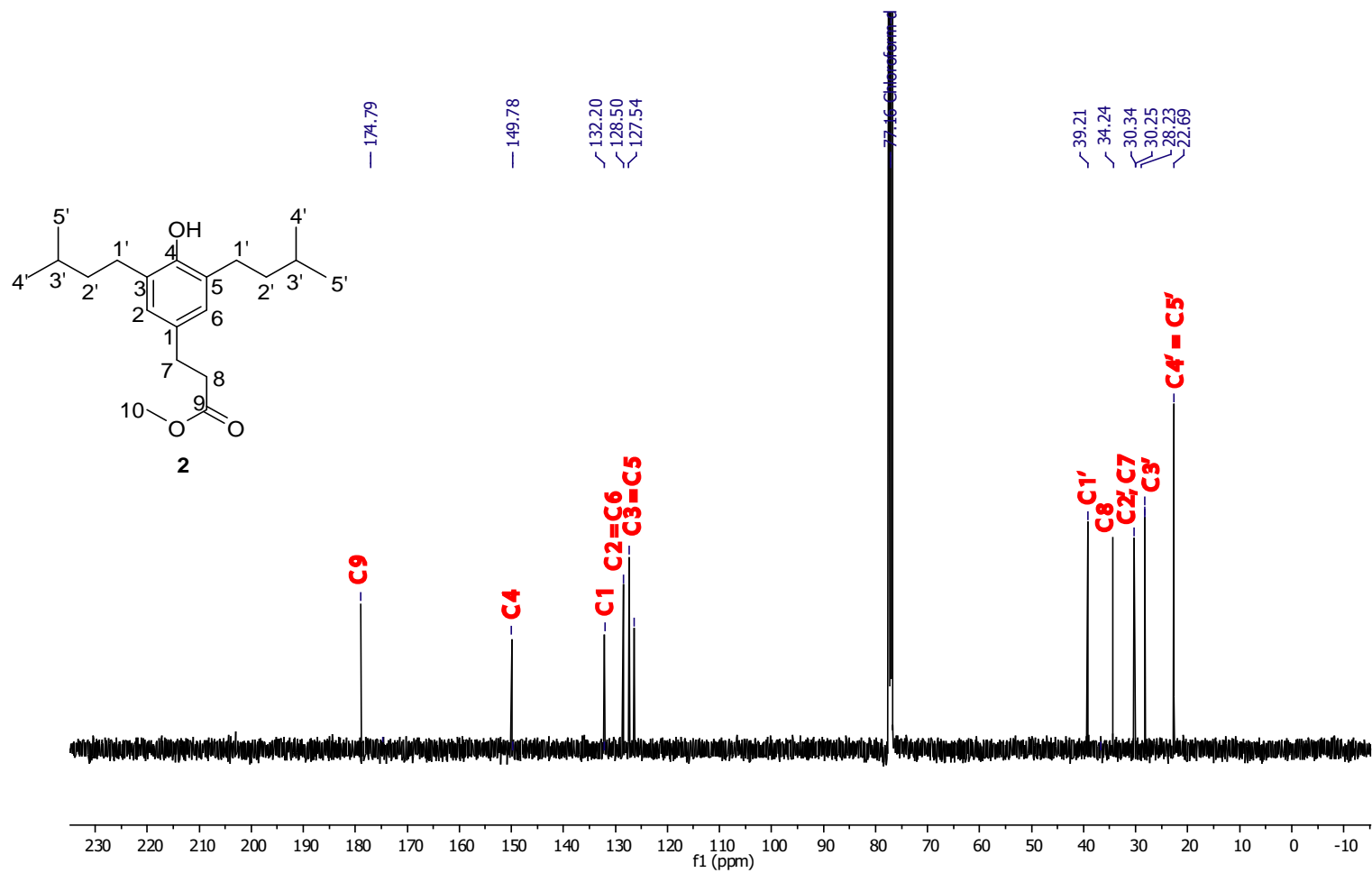


Figura A 8. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 2 (CDCl_3 , 100 MHz).

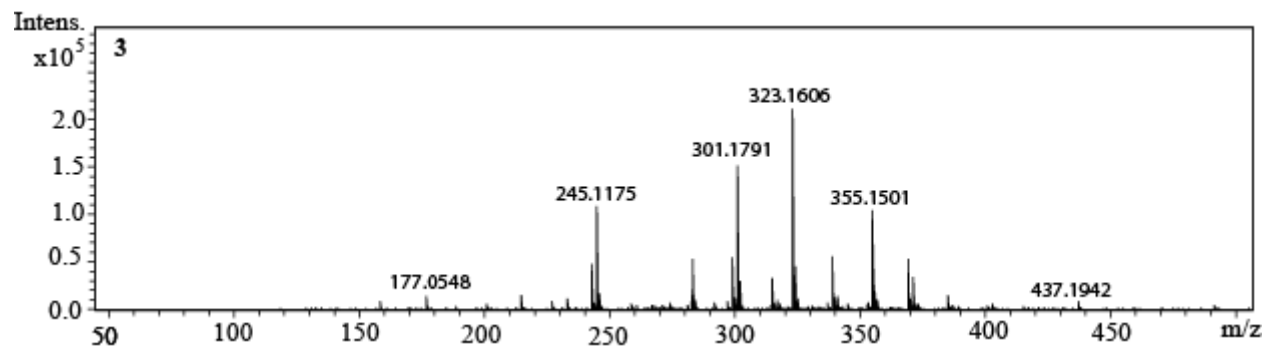


Figura A 9. Espectro de massas do composto 3 (ESI-Q-TOF, N₂, E_{lab} = 15 eV).

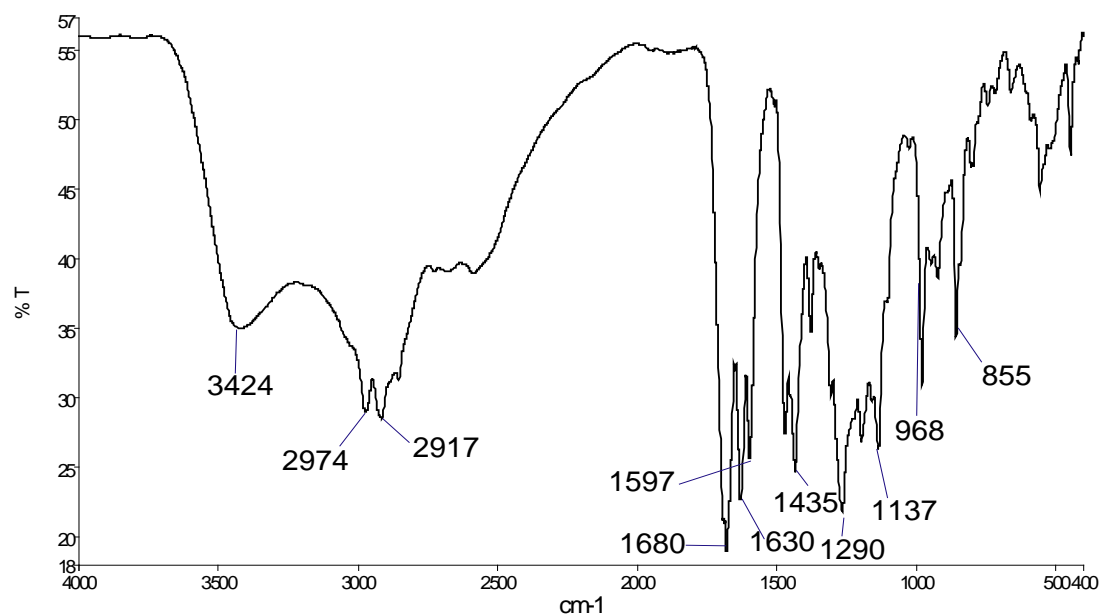


Figura A 10. Espectro de absorção no infravermelho do composto 3 (em pastilha de KBr).

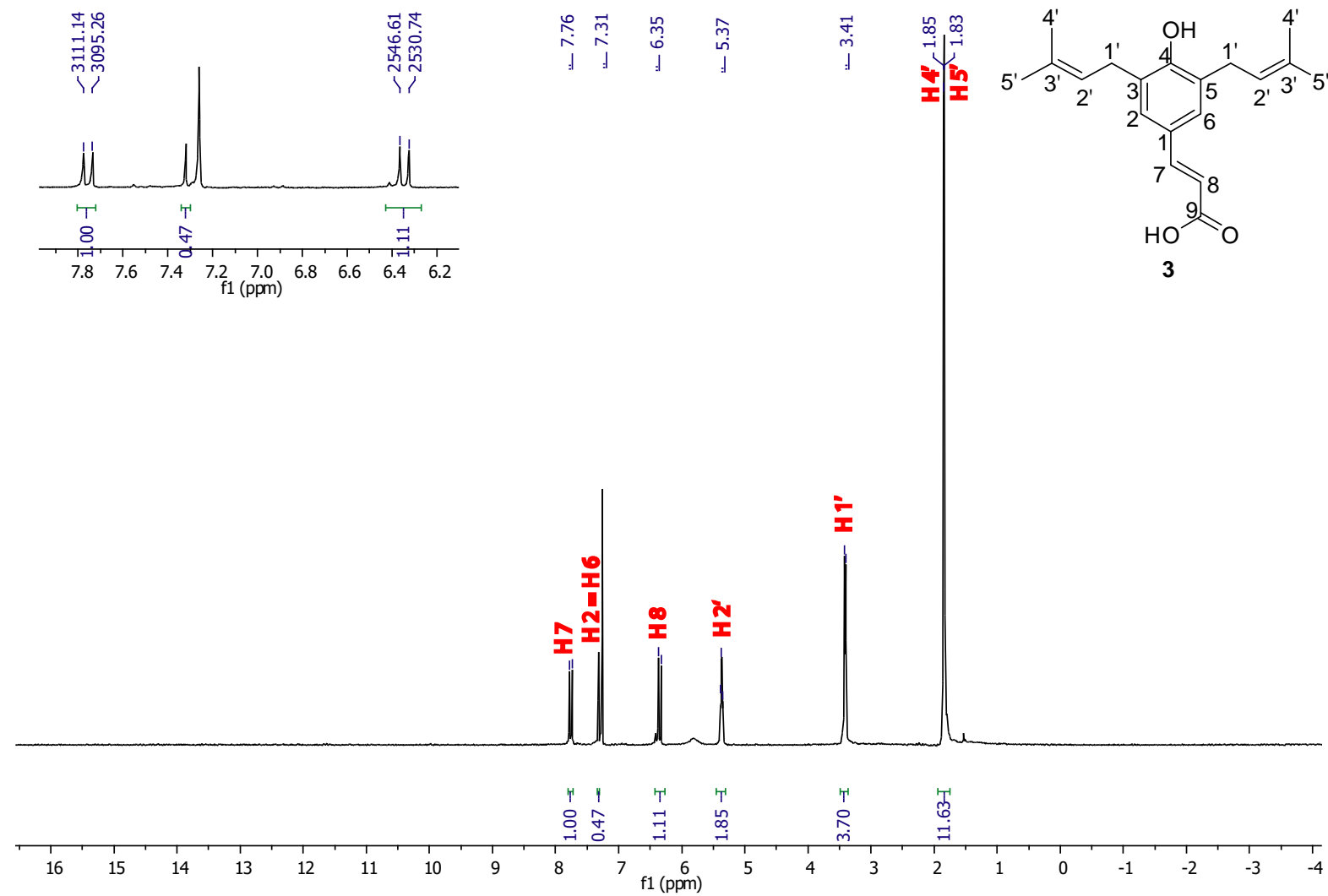


Figura A 11. Espectro de RMN de ^1H do composto **3** (CDCl_3 , 400 MHz).

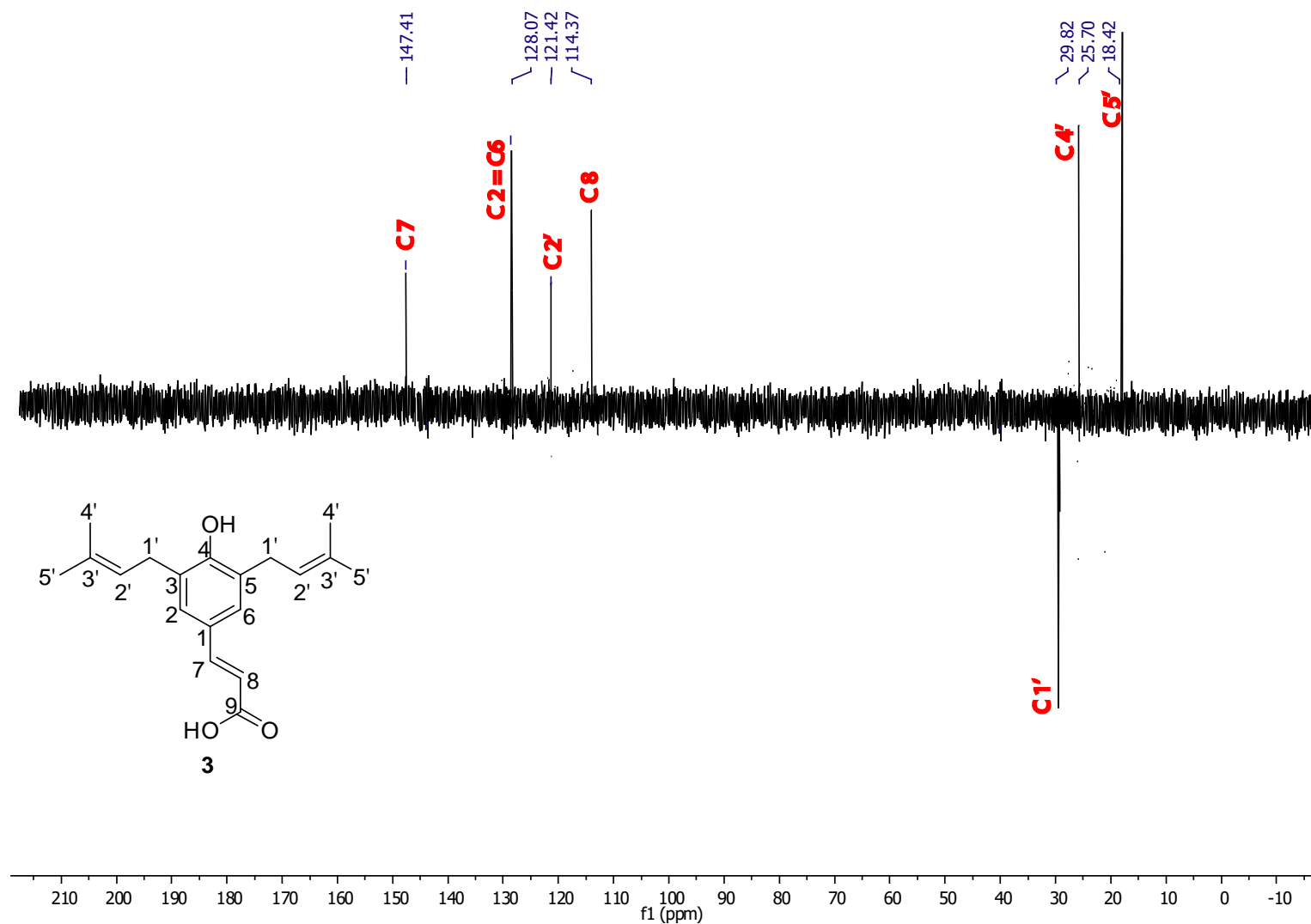


Figura A 12. Espectro de DEPT 135 do composto 3 (CDCl₃, 400 MHz).

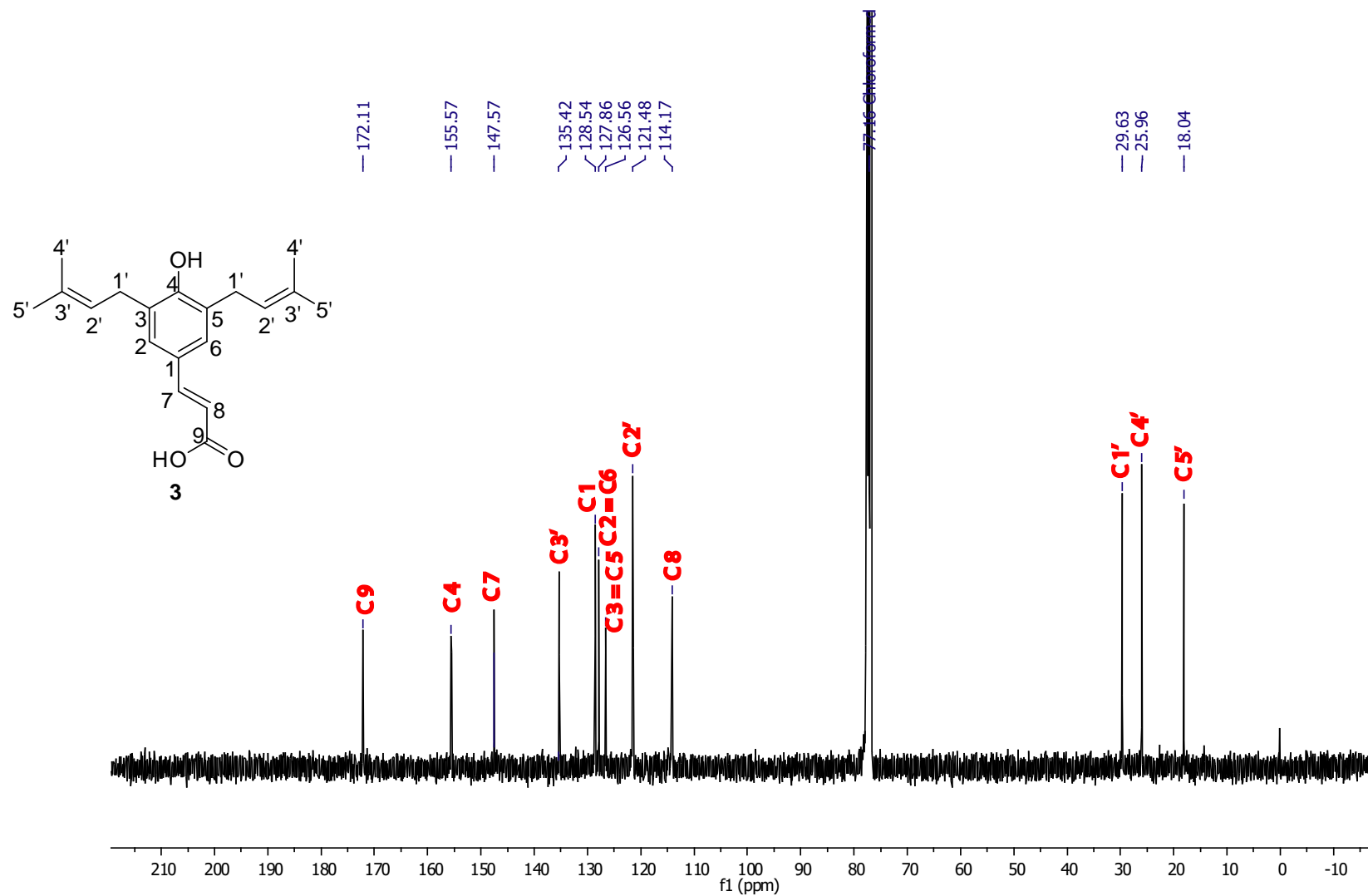


Figura A 13. Espectro de RMN de ¹³C do composto 3 (CDCl₃, 100 MHz).

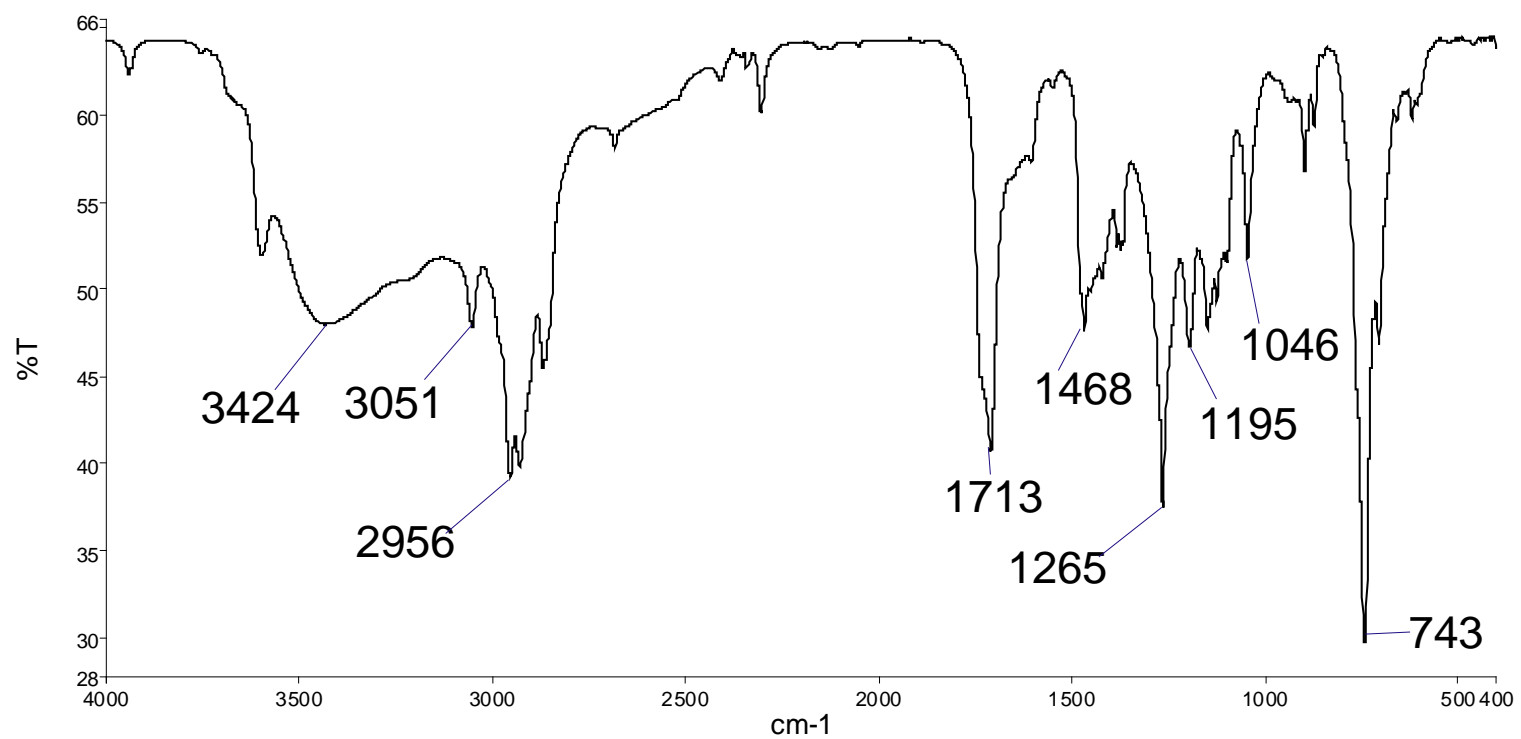


Figura A 14. Espectro de absorção no infravermelho do composto 4 (em pastilha de KBr).

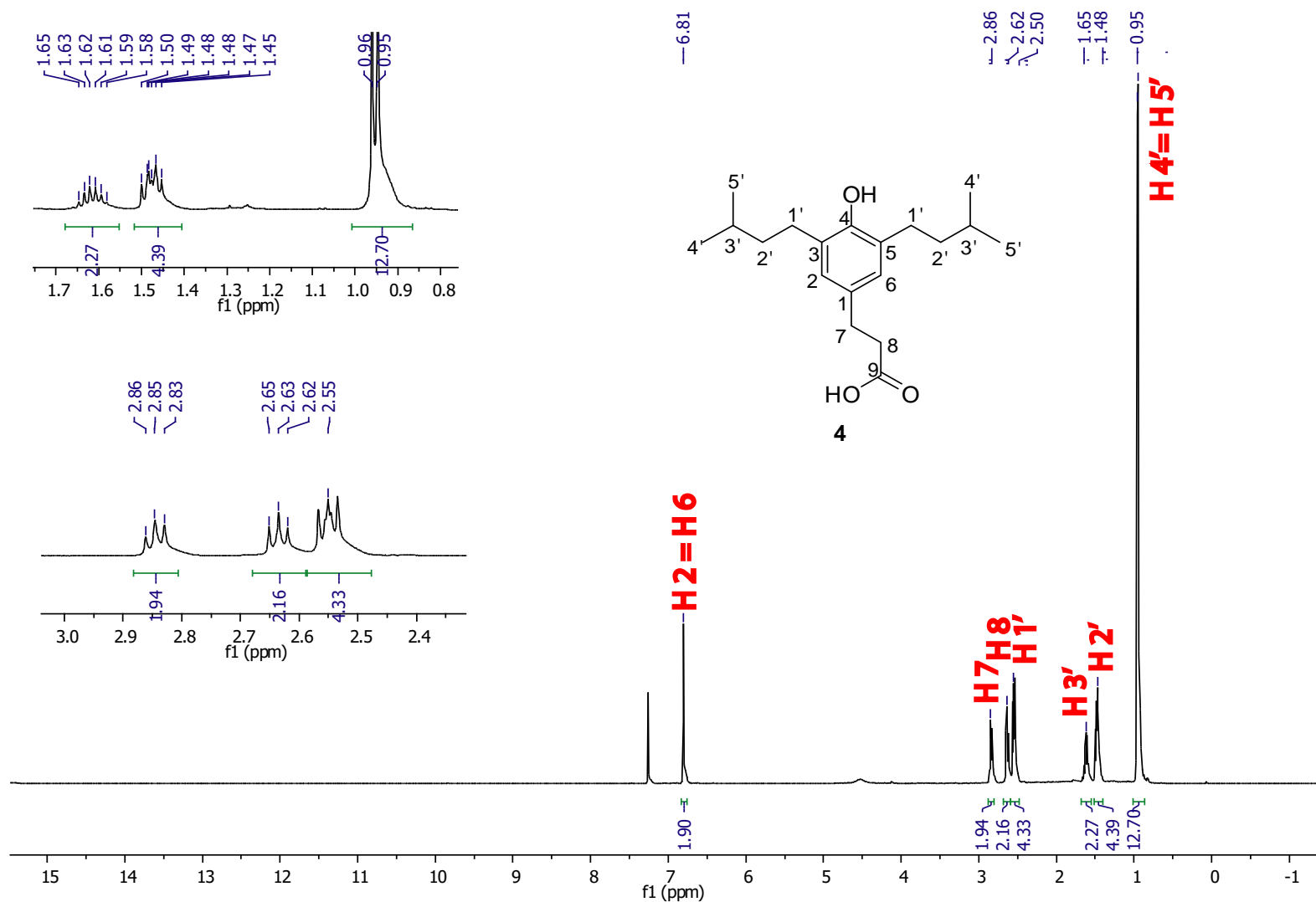


Figura A 15. Espectro de RMN de ^1H do composto **4** (CDCl_3 , 400 MHz).

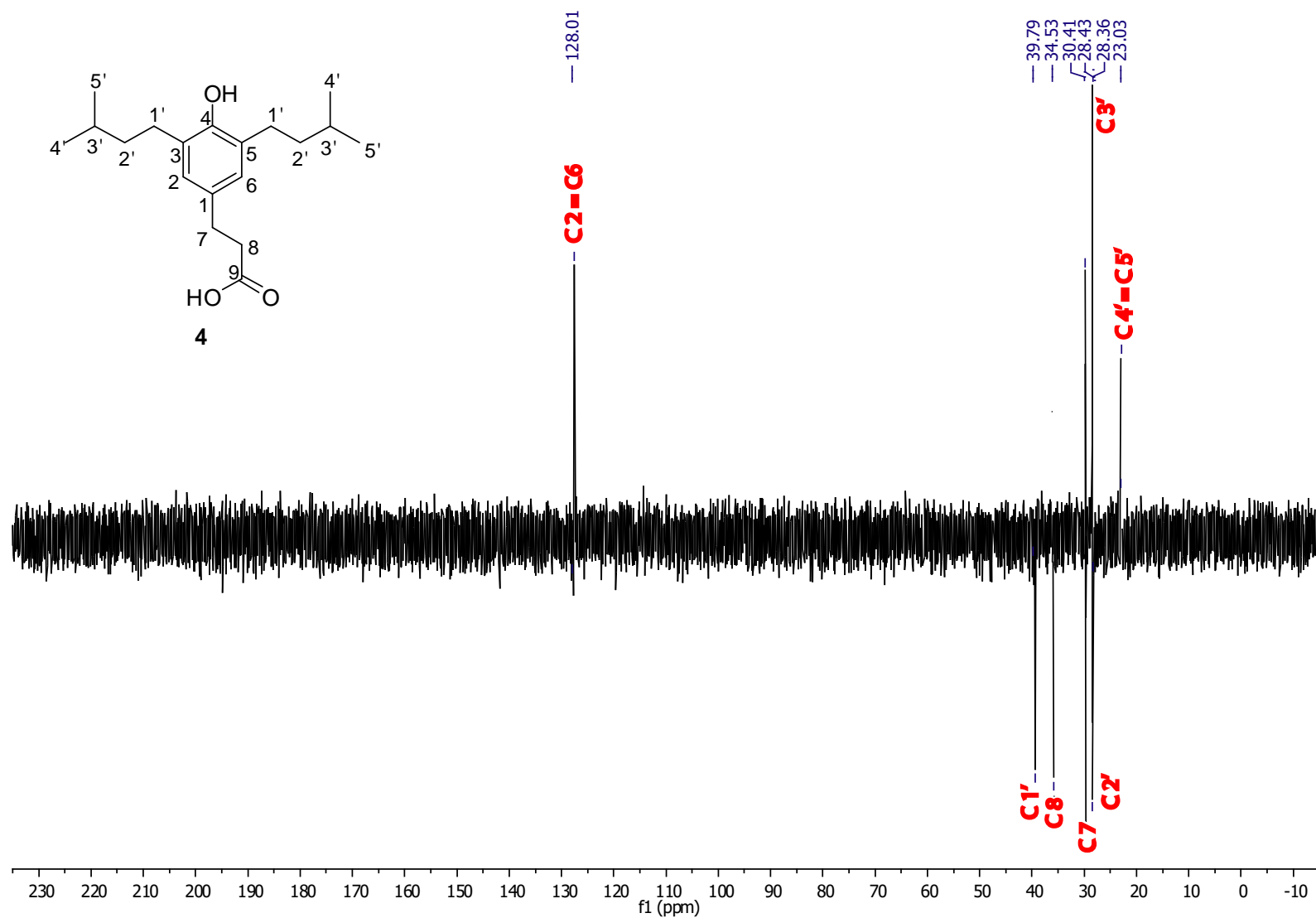


Figura A 16. Espectro de DEPT 135 do composto 4 (CDCl₃, 400 MHz).

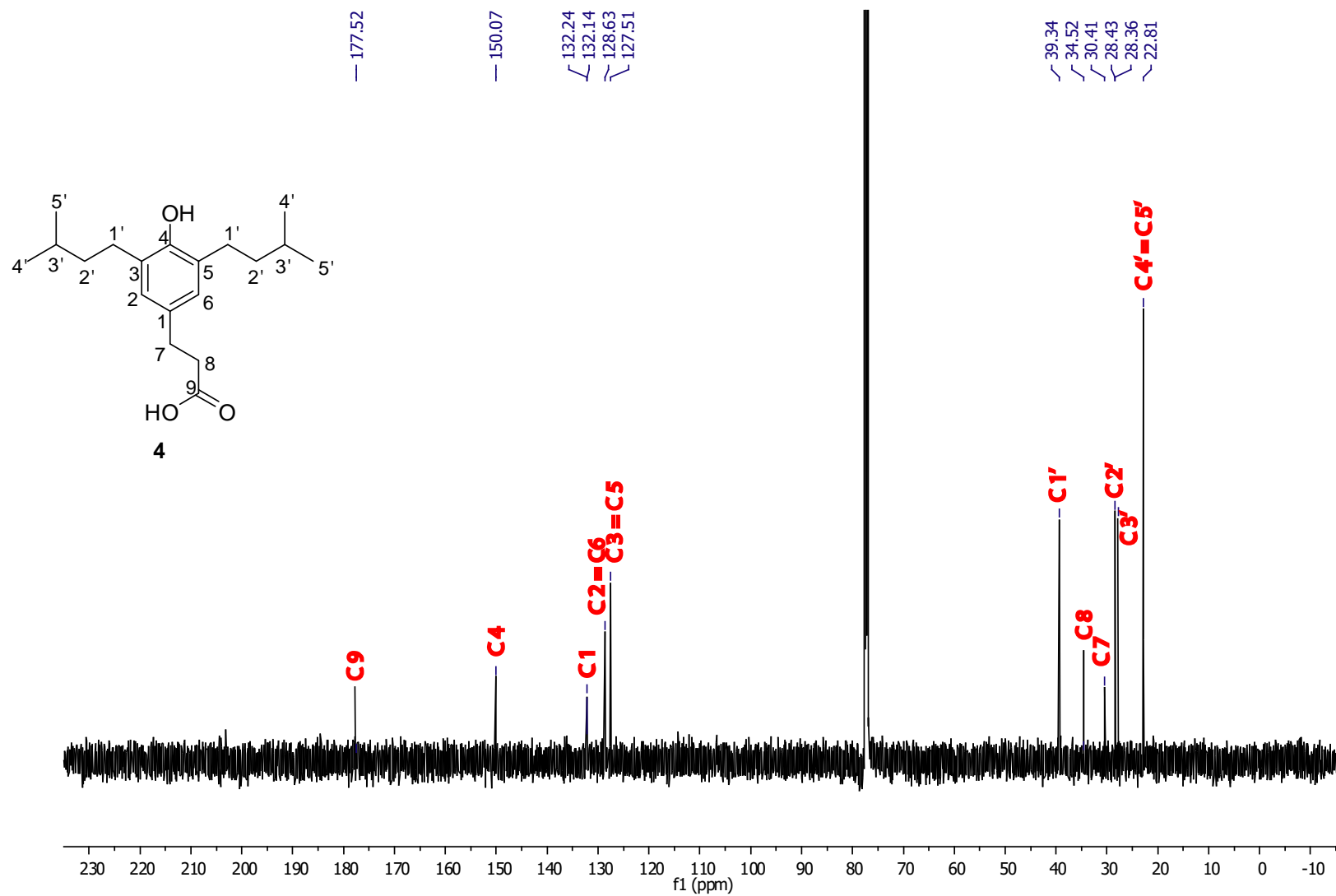


Figura A 17. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 4 (CDCl_3 , 100 MHz).

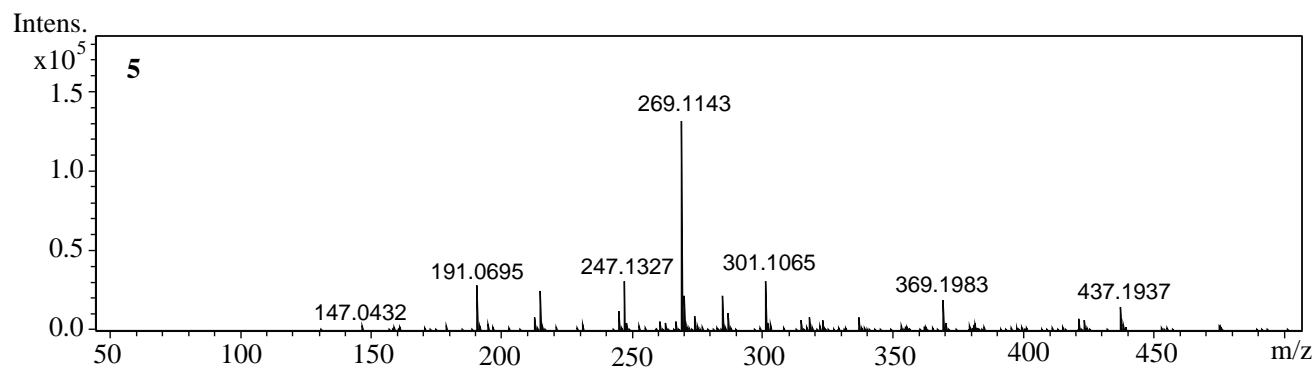


Figura A 18. Espectro de massas do composto 5 (ESI-Q-TOF, N₂, E_{lab} = 15 eV).

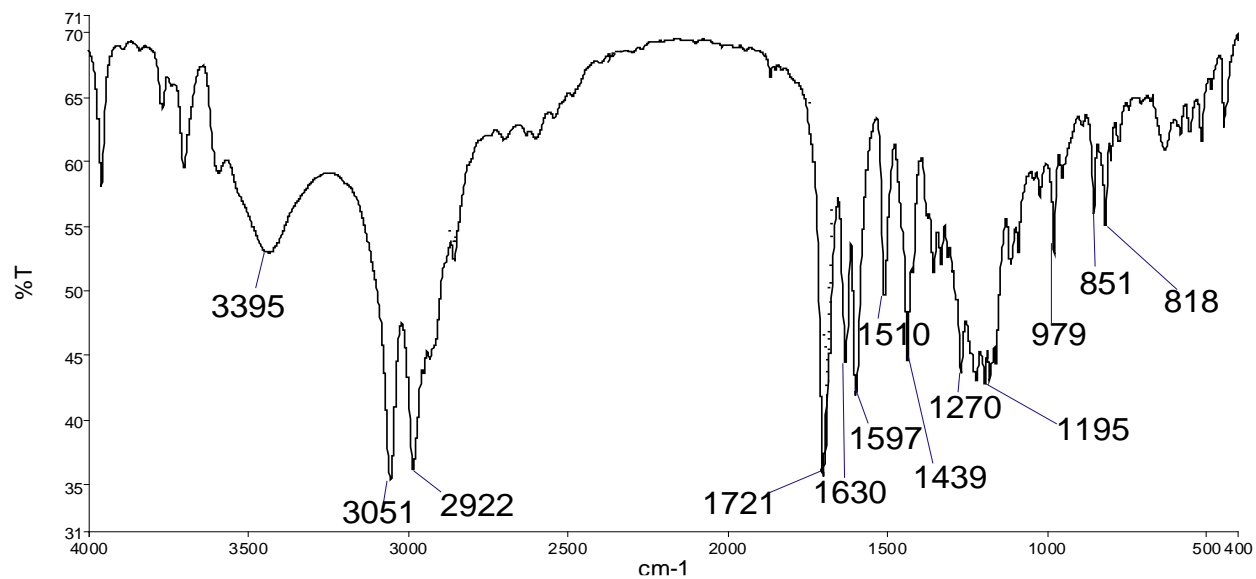


Figura A 19. Espectro de absorção no infravermelho do composto 5 (em pastilha de KBr).

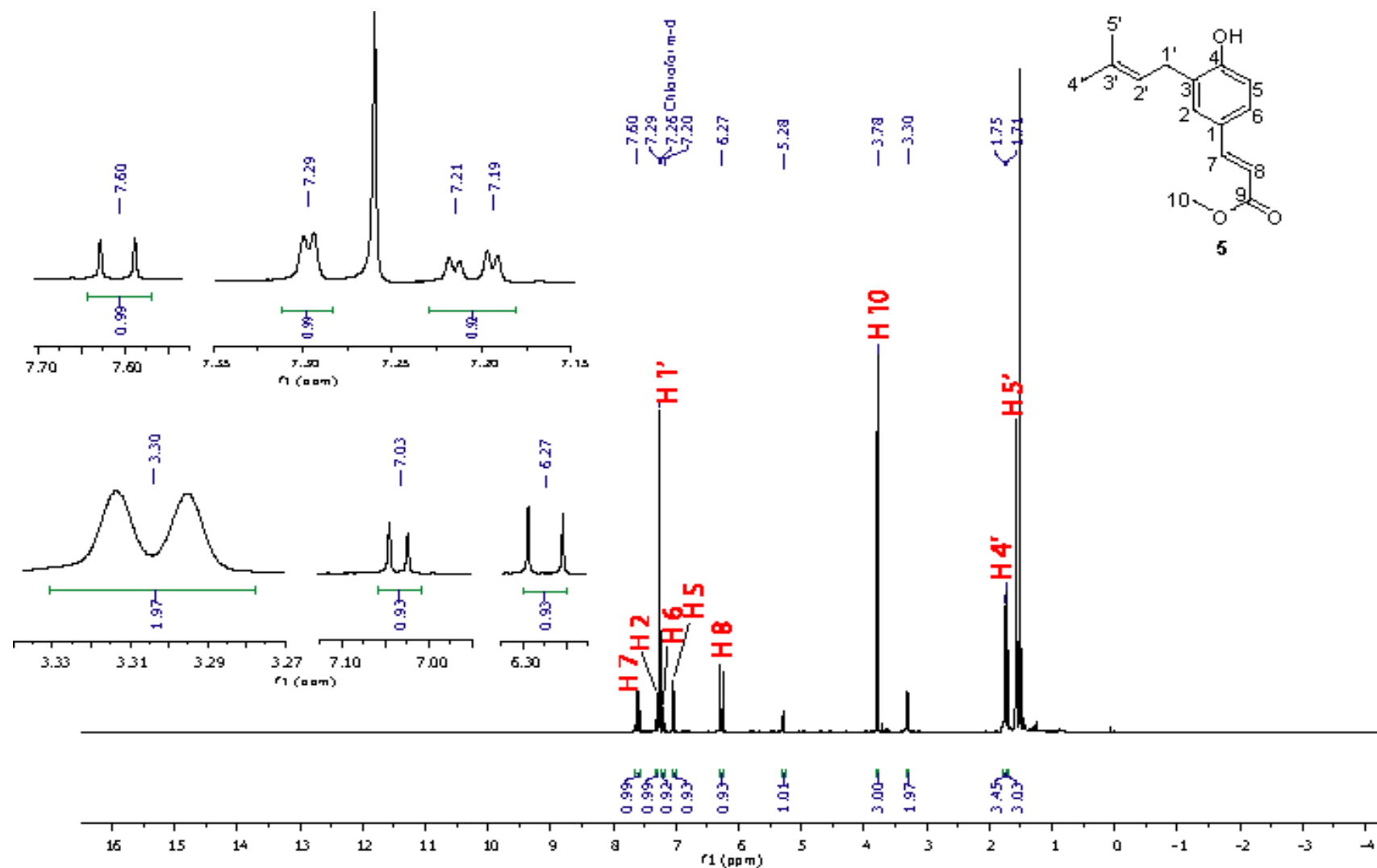


Figura A 20. Espectro de RMN de ^1H do composto **5** (CDCl_3 , 400 MHz).

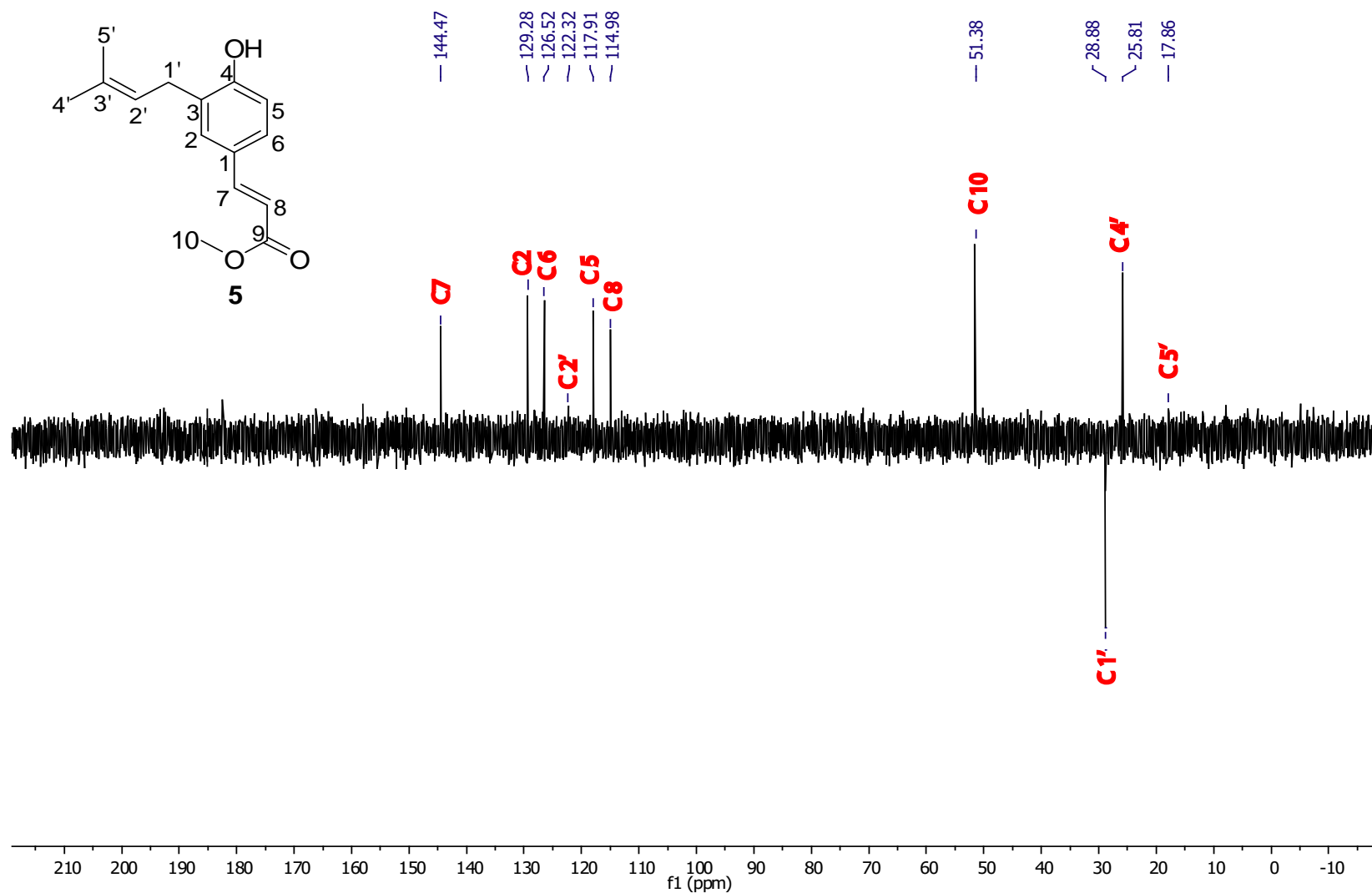


Figura A 21. Espectro de DEPT 135 do composto 5 (CDCl₃, 400 MHz).

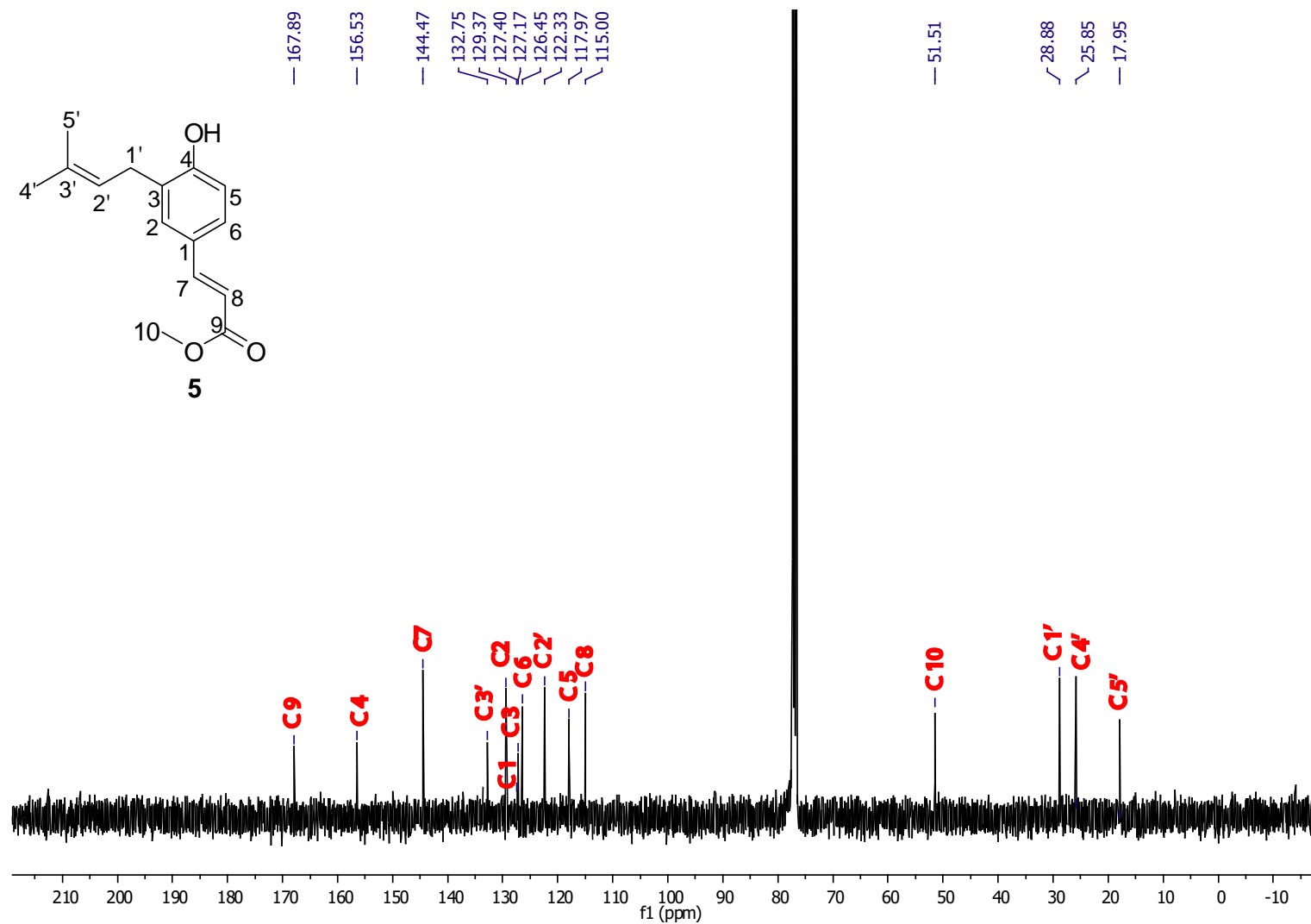


Figura A 22. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 5(CDCl_3 , 100 MHz).

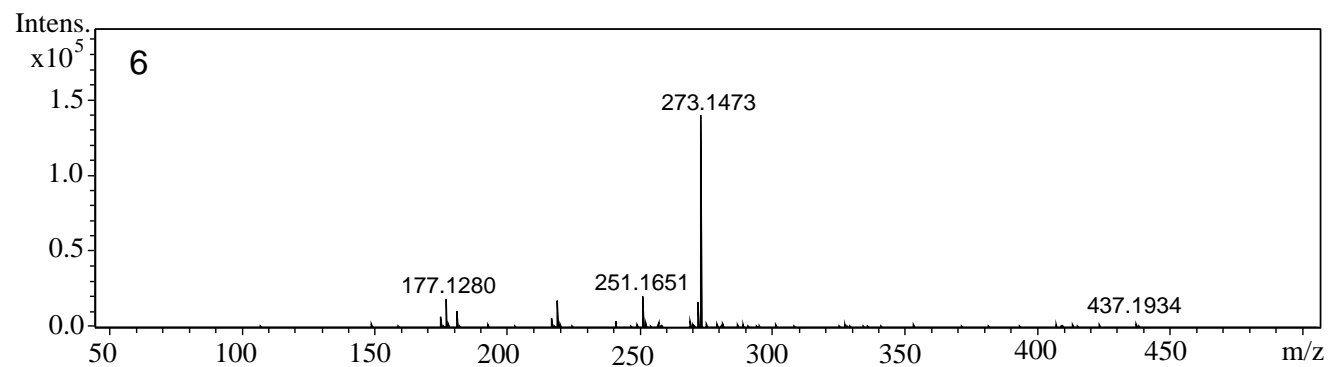


Figura A 23. Espectro de massas do composto **6** (ESI-Q-TOF, N₂, E_{lab} = 15 eV).

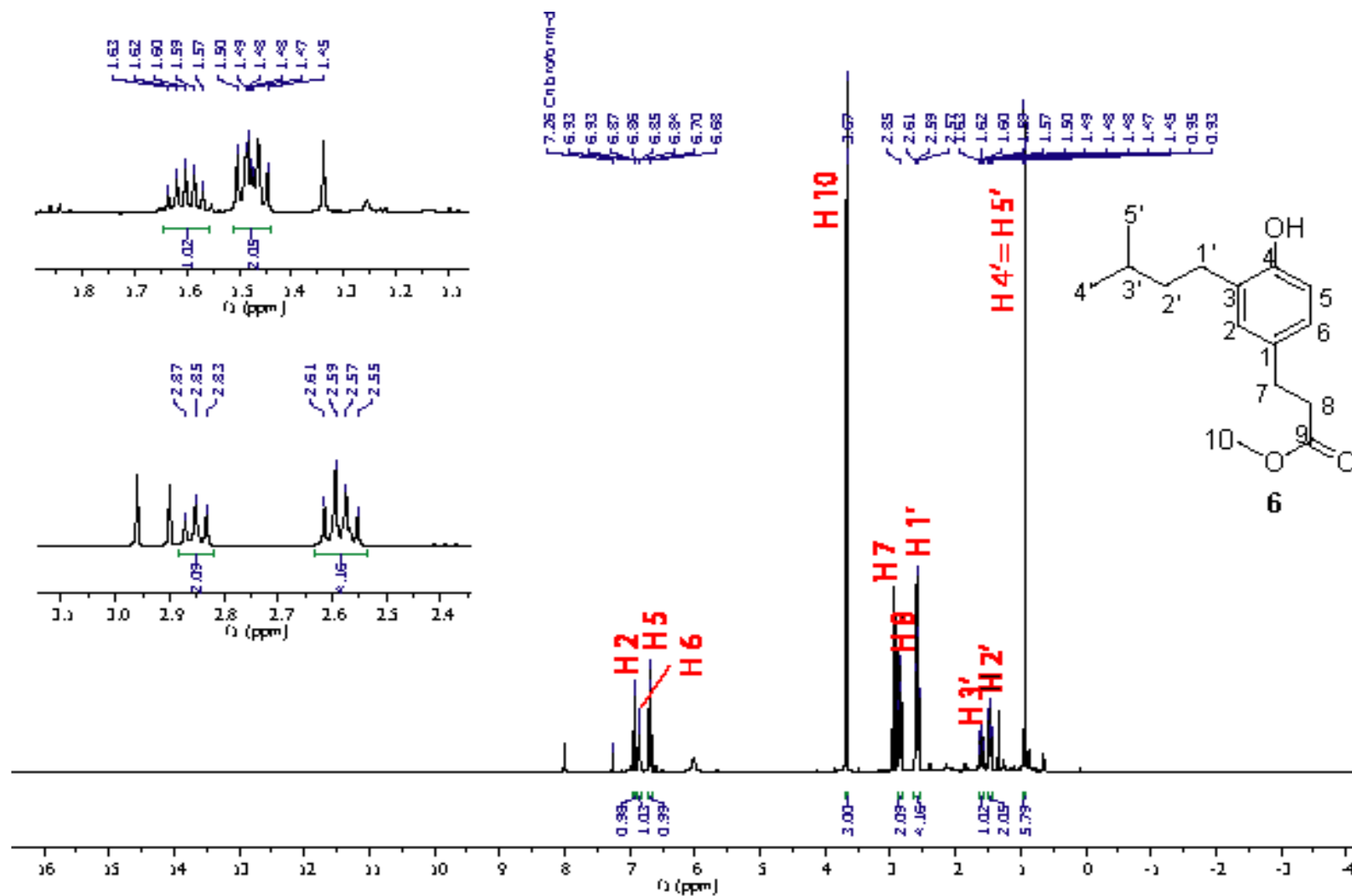


Figura A 24. Espectro de RMN de ^1H do composto **6** (CDCl_3 , 400 MHz).

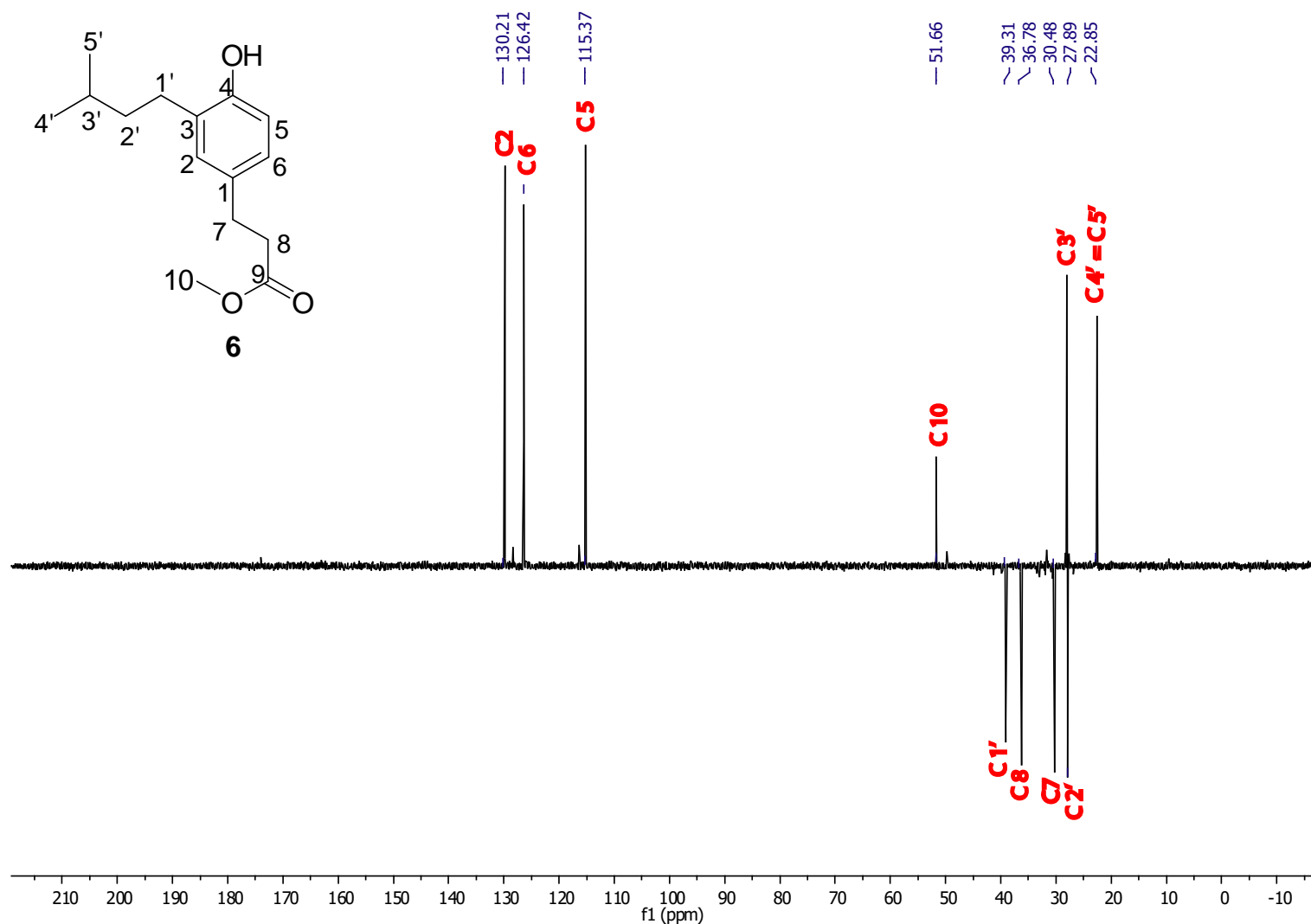


Figura A 25. Espectro de DEPT 135 do composto 6 (CDCl₃, 400 MHz).

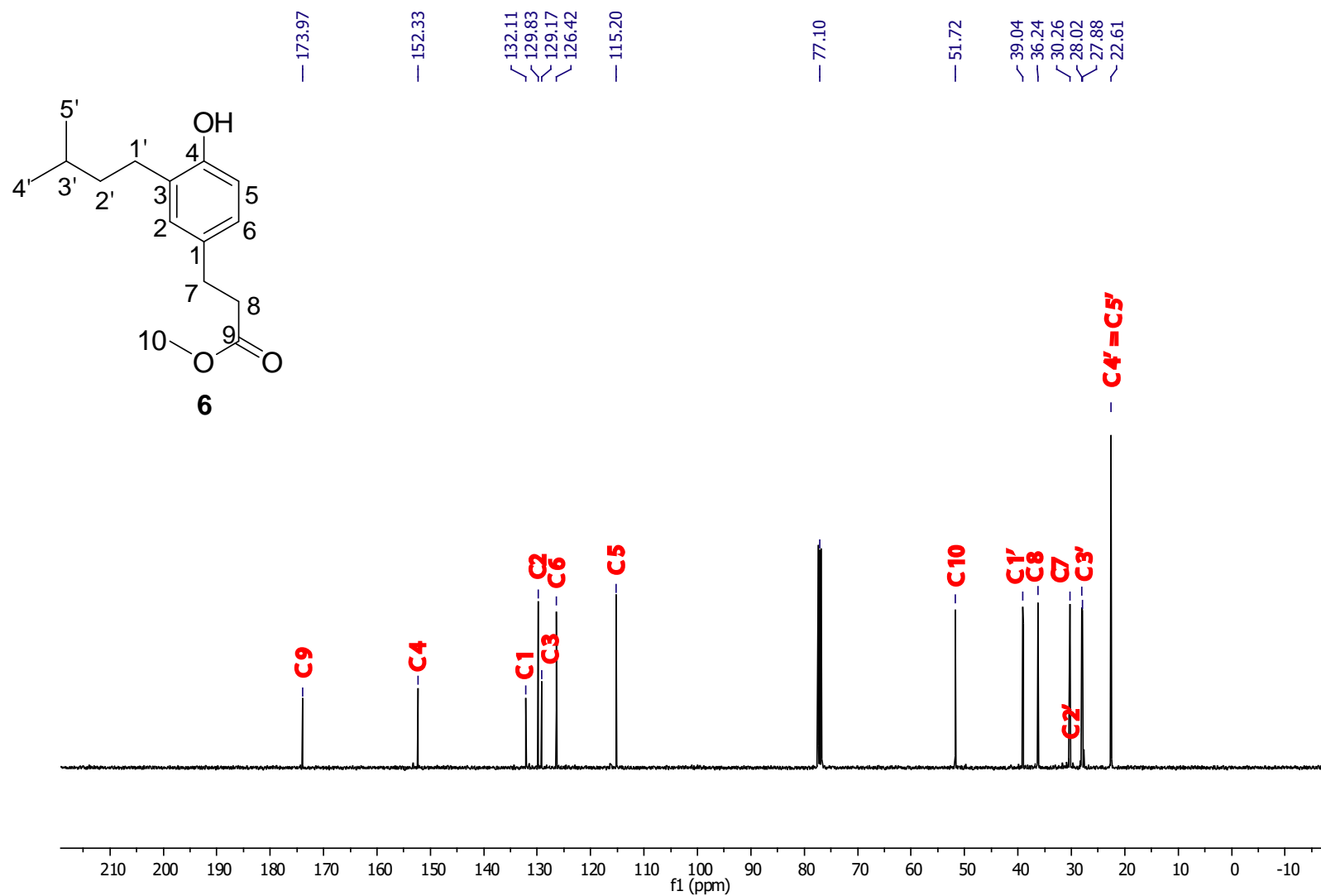


Figura A 26. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 6 (CDCl_3 , 100 MHz).

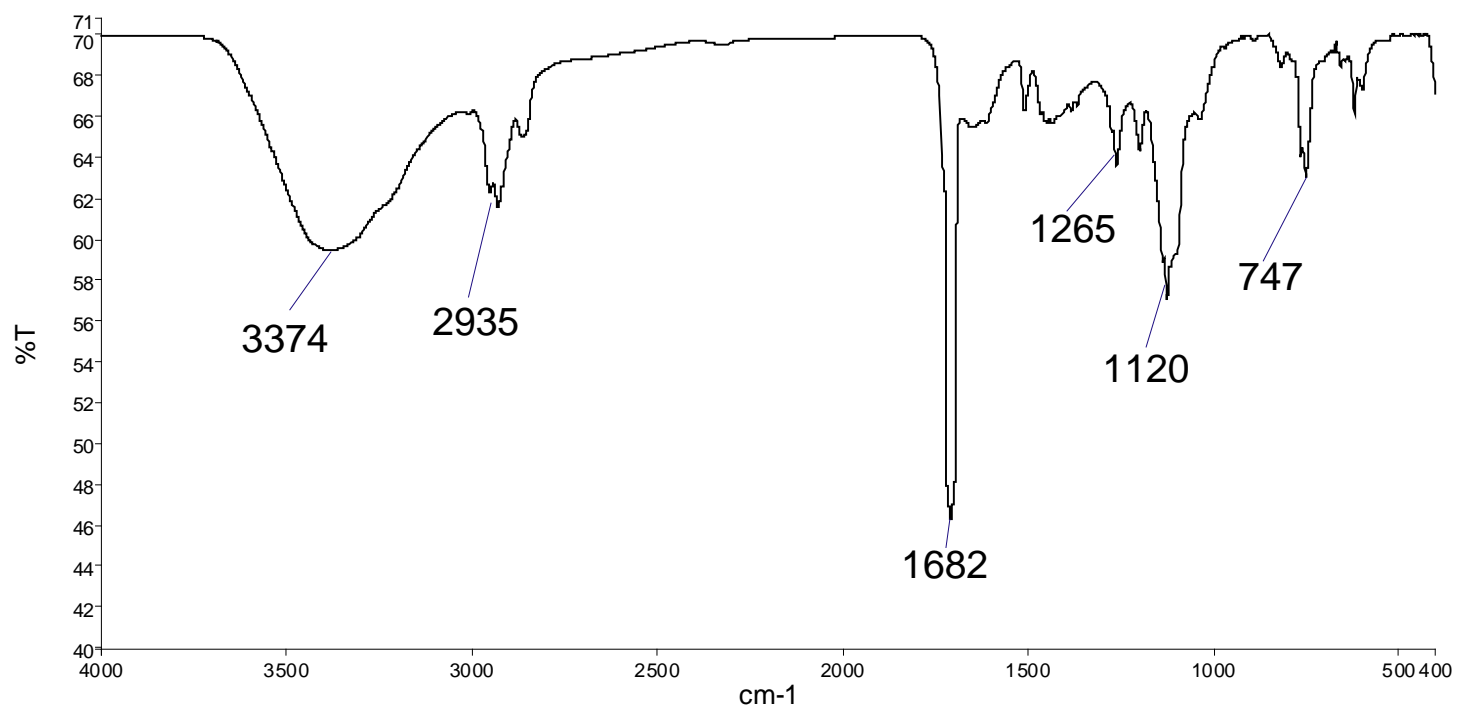


Figura A 27. Espectro de absorção no infravermelho do composto 7 (em pastilha de KBr).

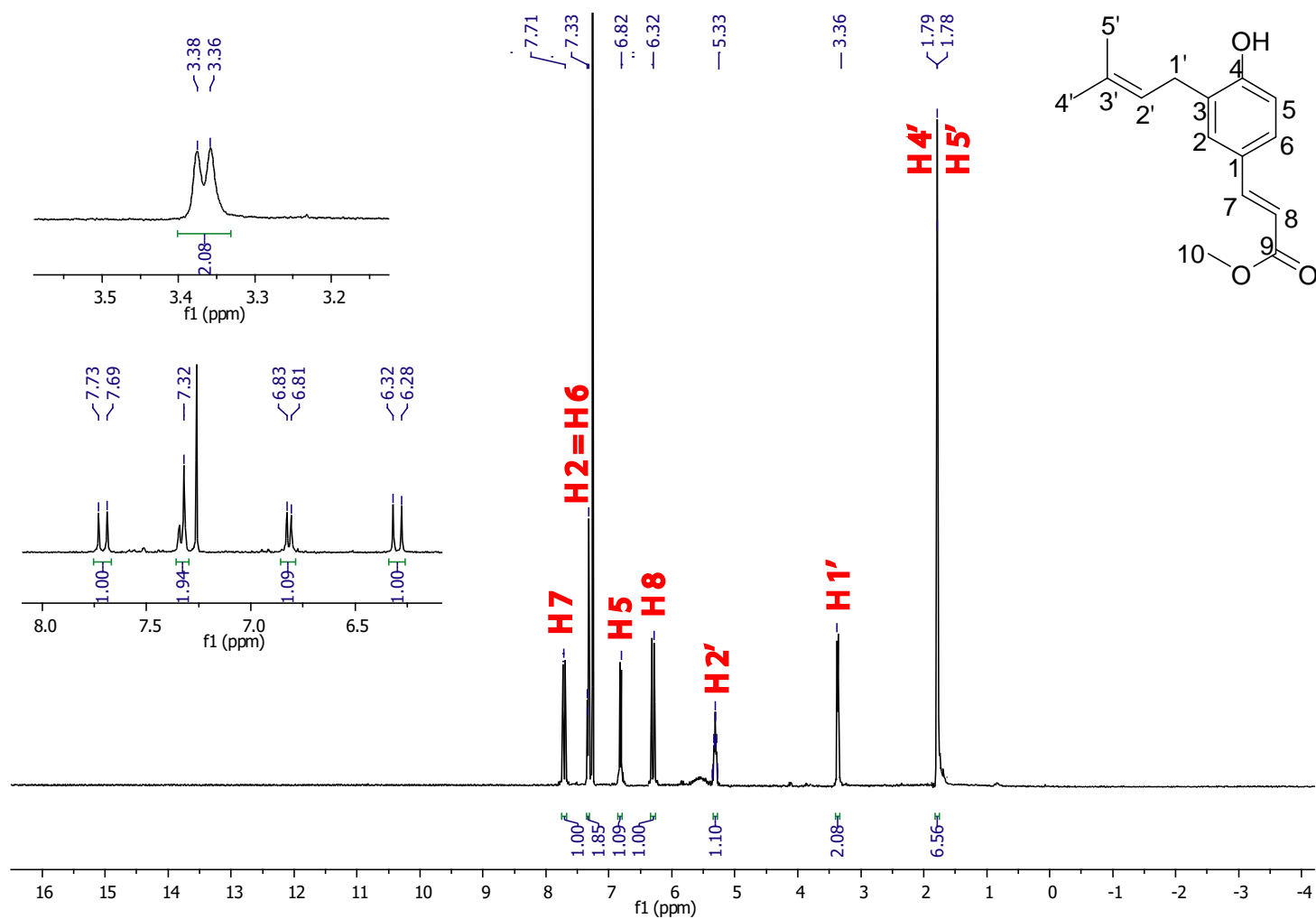


Figura A 28. Espectro de RMN de ^1H do composto 7 (CDCl_3 , 400 MHz).

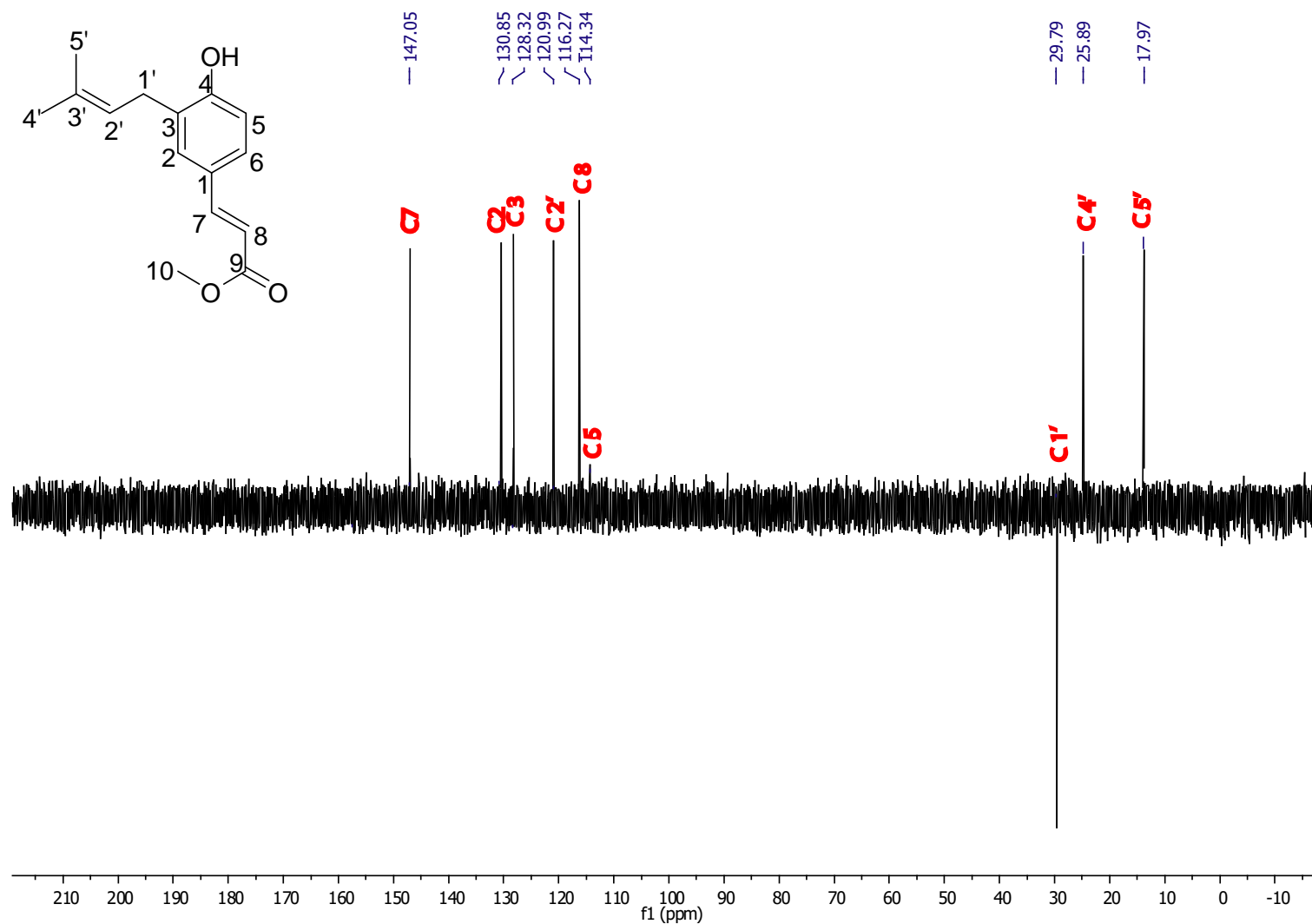


Figura A 29. Espectro de DEPT 135 do composto 7 (CDCl₃, 400 MHz).

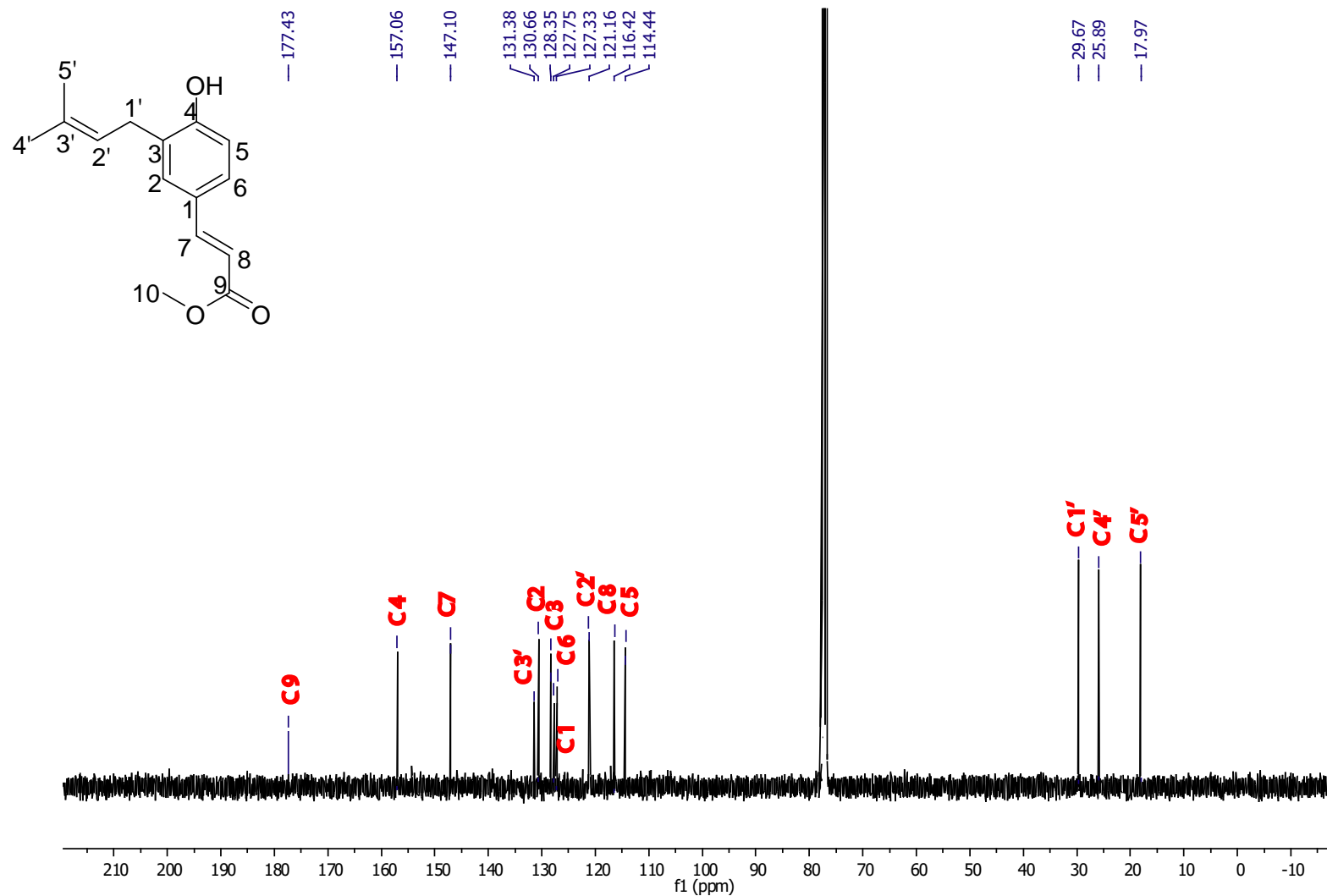


Figura A 30. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 7 (CDCl_3 , 100 MHz).

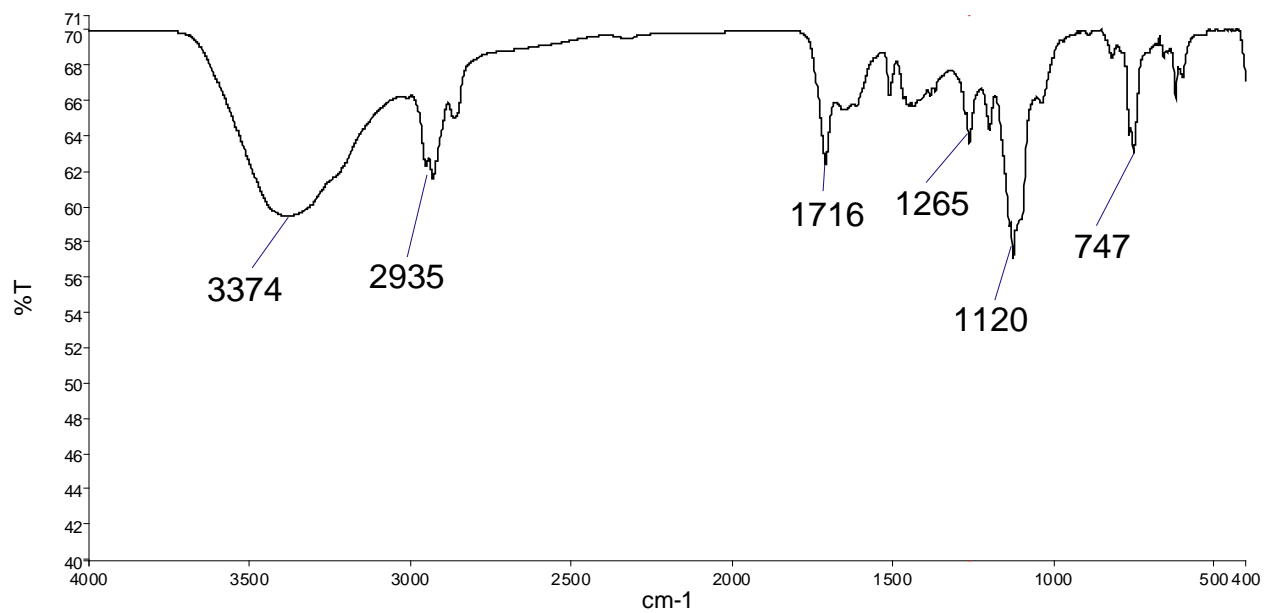


Figura A 31. Espectro de absorção no infravermelho do composto **8** (em pastilha de KBr).

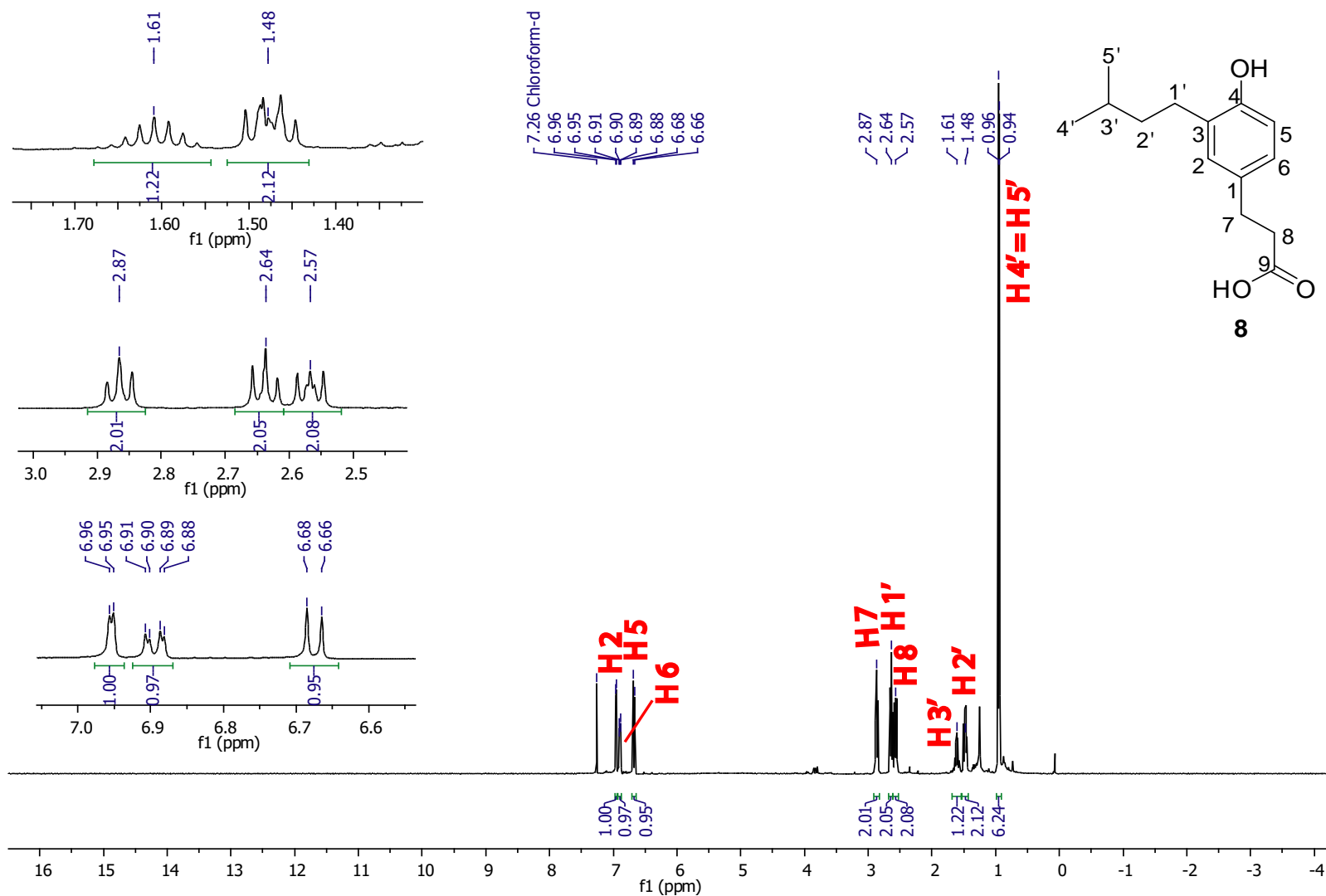


Figura A 32. Espectro de RMN de ^1H do composto **8** (CDCl_3 , 400 MHz).

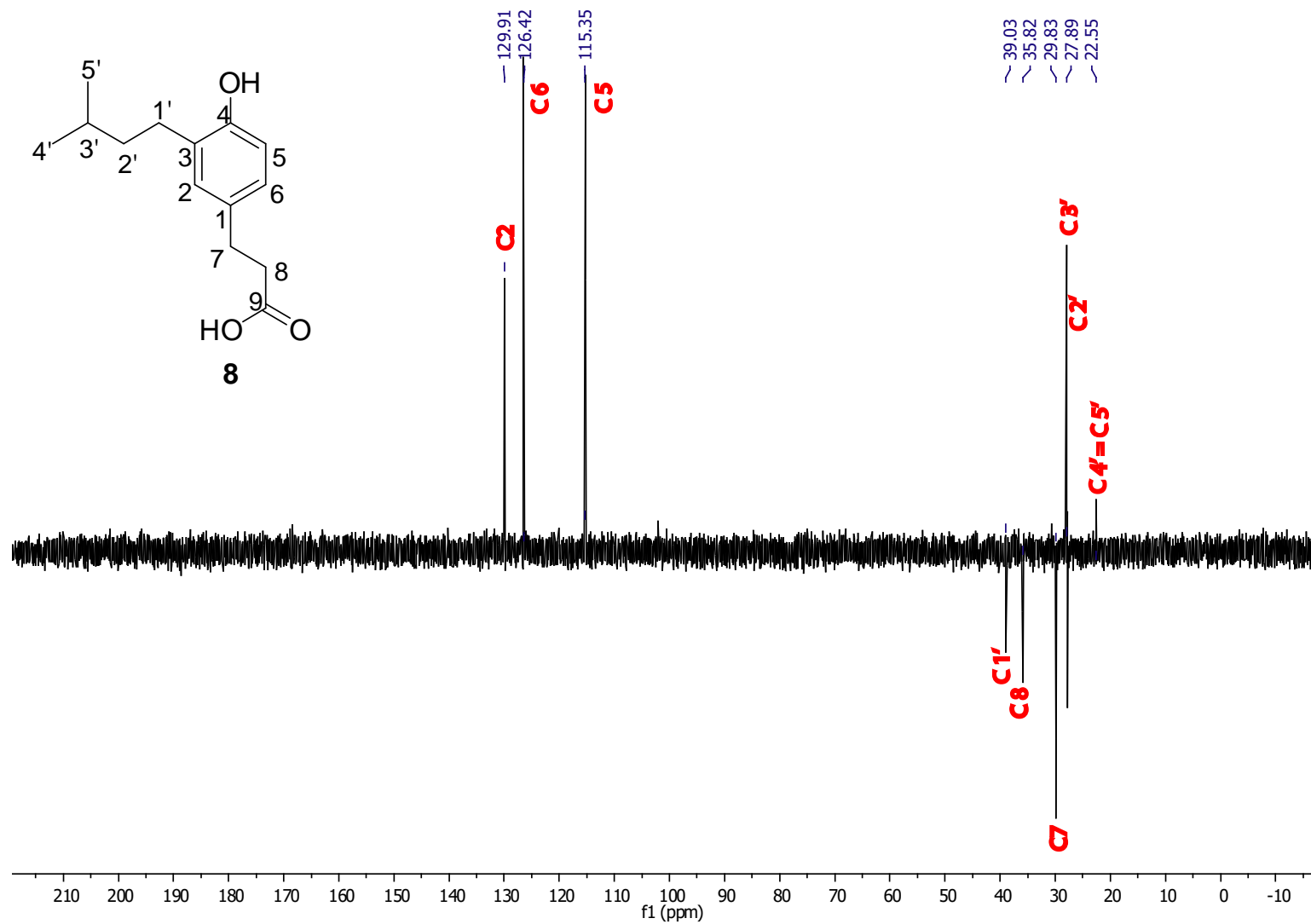


Figura A 33. Espectro de DEPT 135 do composto **8** (CDCl₃, 400 MHz).

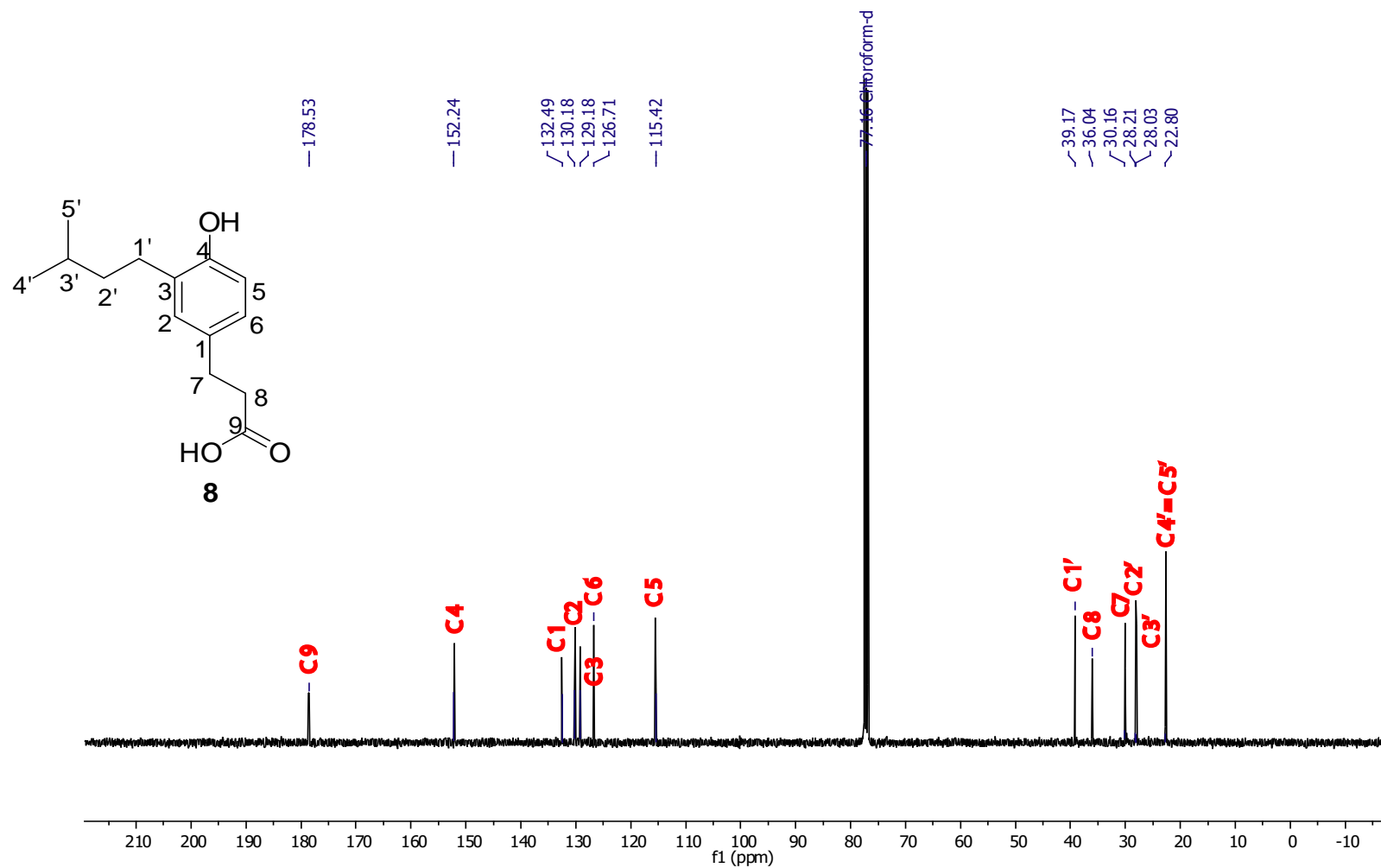


Figura A 34. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8 (CDCl_3 , 100 MHz).

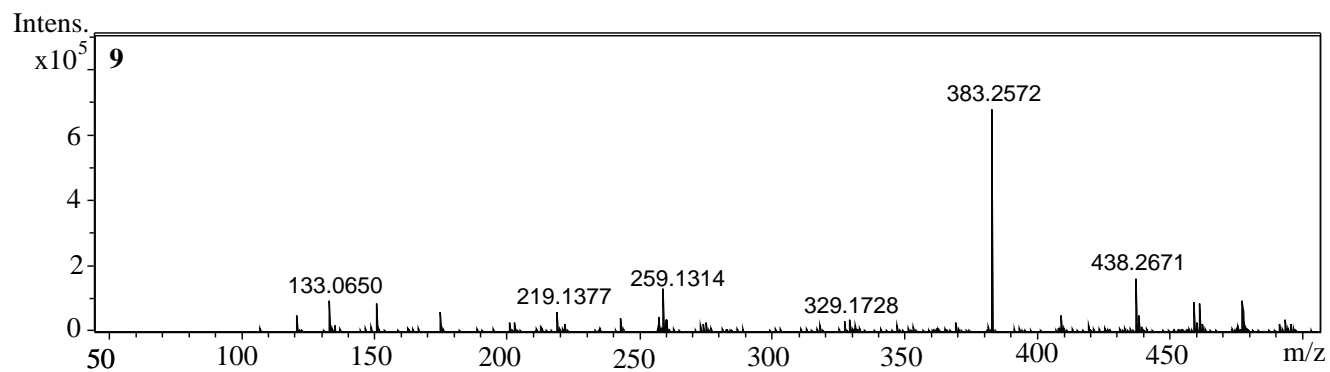


Figura A 35. Espectro de massas do composto **9** (ESI-Q-TOF, N_2 , $E_{lab} = 15$ eV).

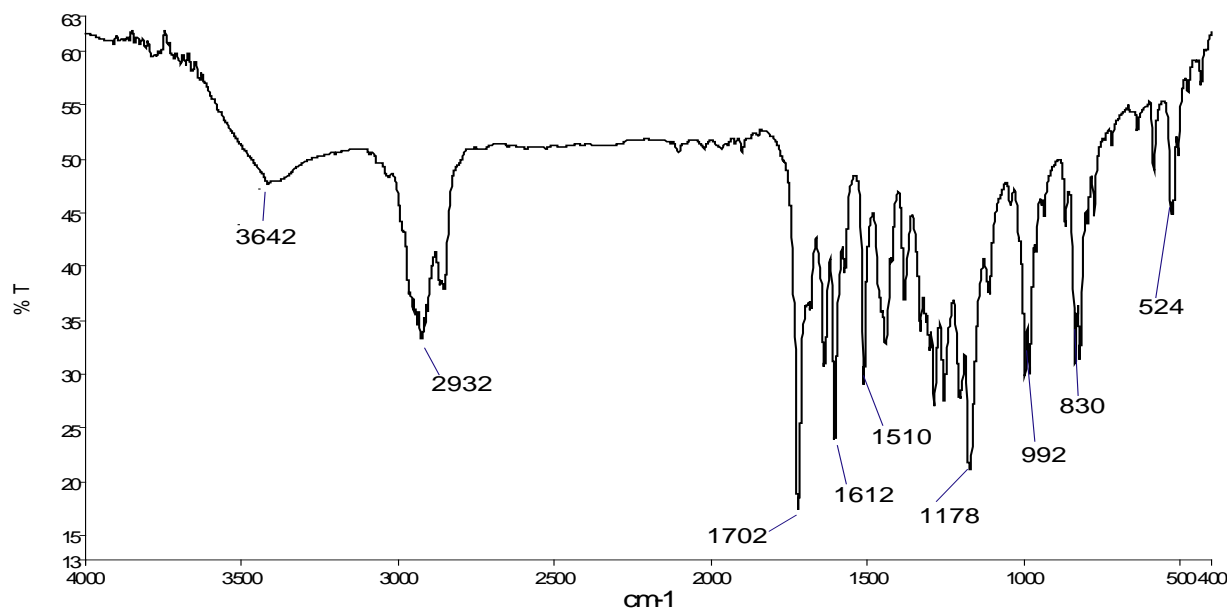


Figura A 36. Espectro de absorção no infravermelho do composto **9** (em pastilha de KBr).

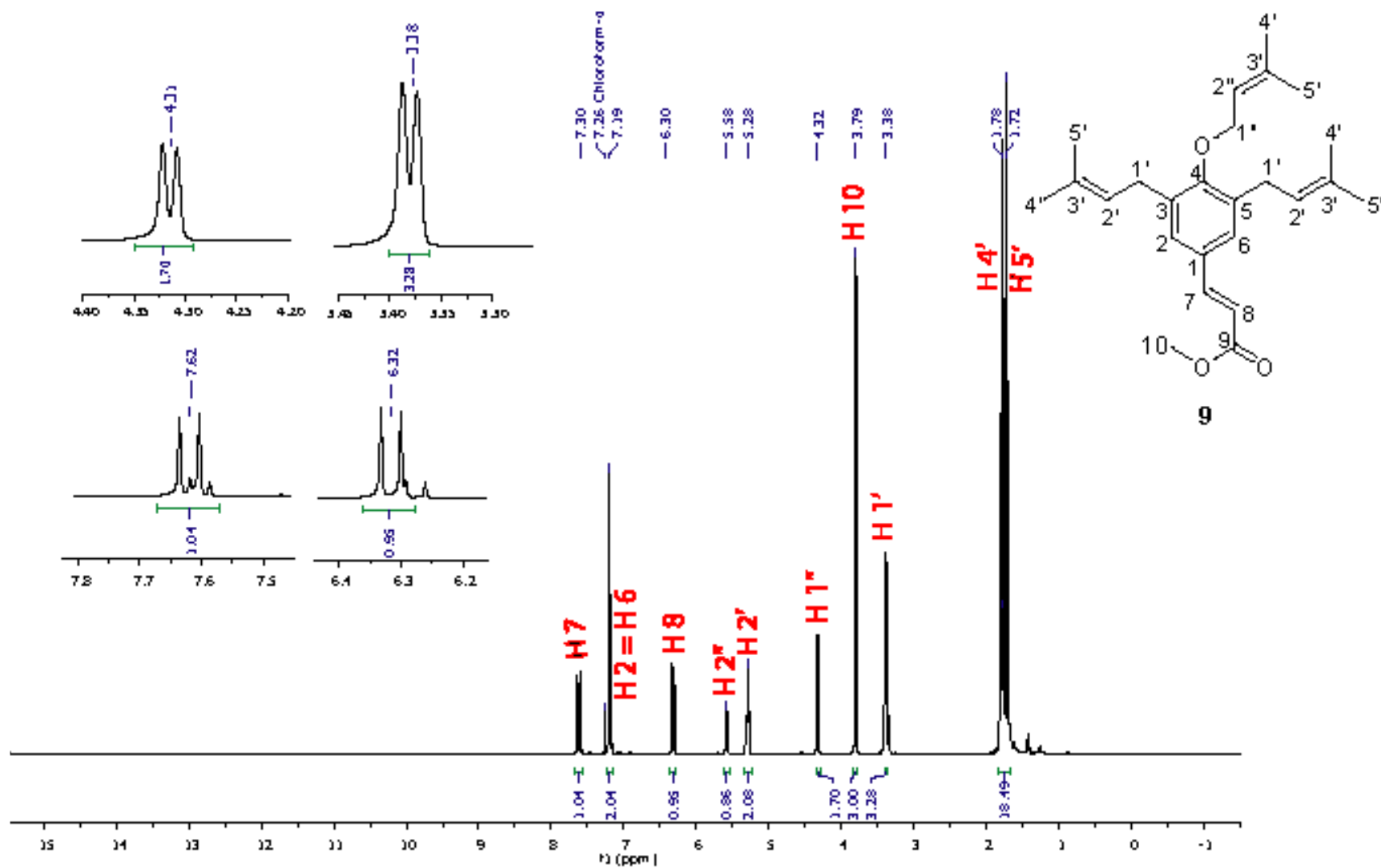


Figura A 37. Espectro de RMN de ^1H do composto **9** (CDCl_3 , 400 MHz).

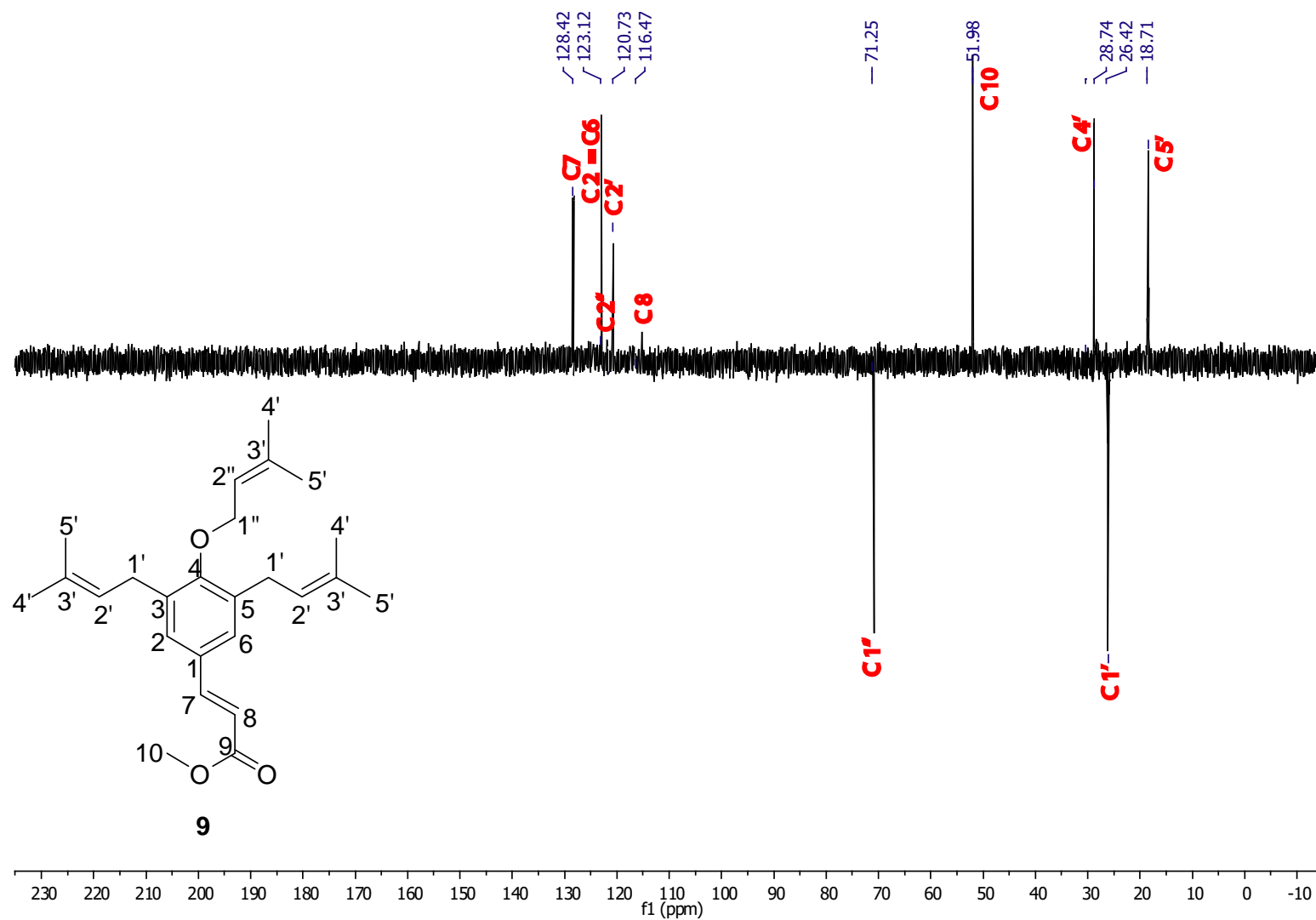
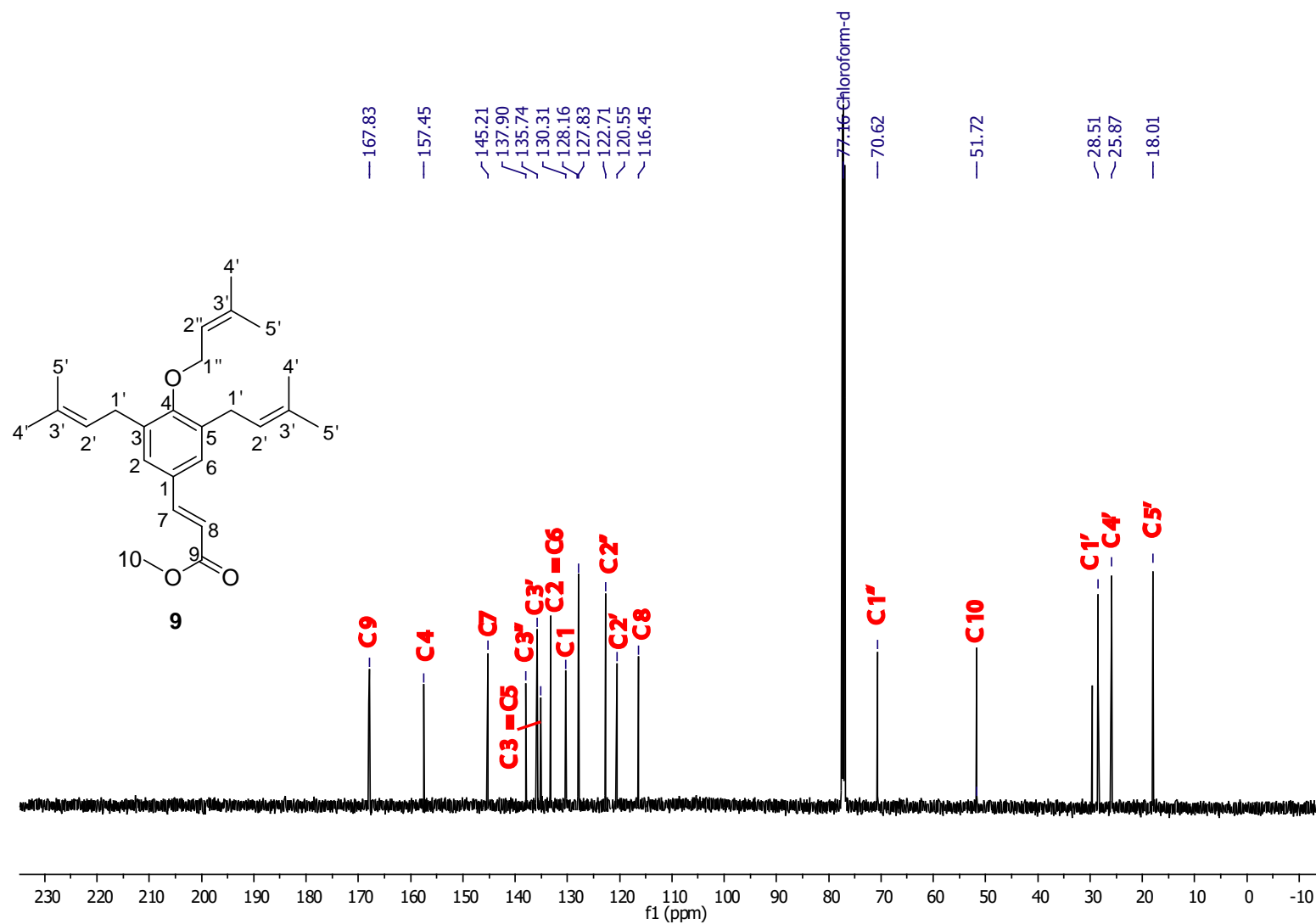


Figura A 38. Espectro de DEPT 135 do composto **9** (CDCl₃, 400 MHz).

Figura A 39. Espectro de RMN de ¹³C do composto 9 (CDCl₃, 100 MHz).

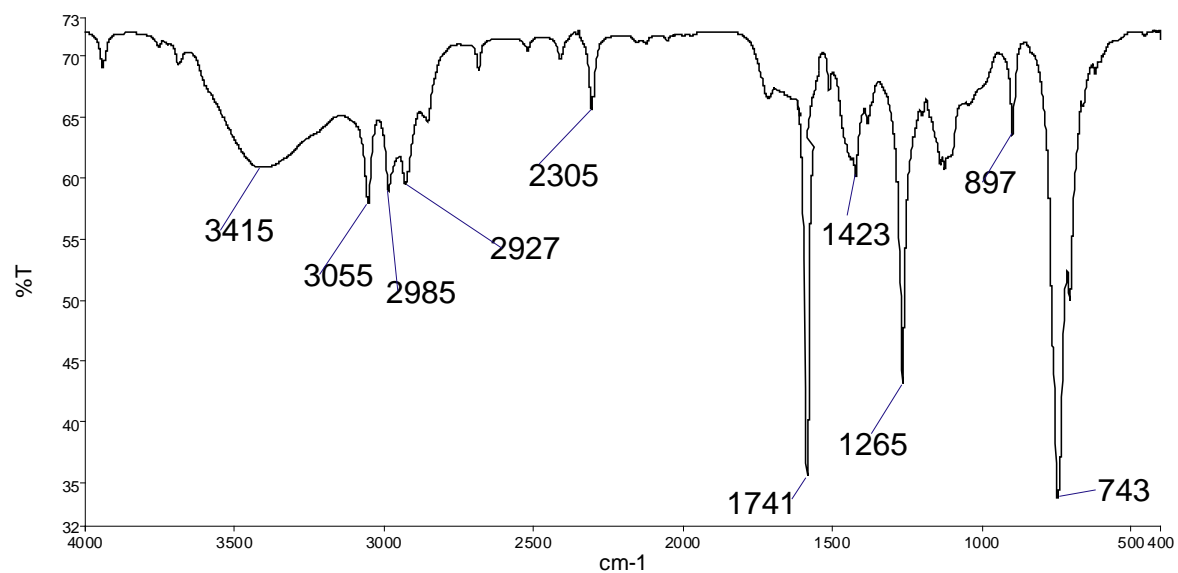


Figura A 40. Espectro de absorção no infravermelho do composto **10** (em pastilha de KBr).

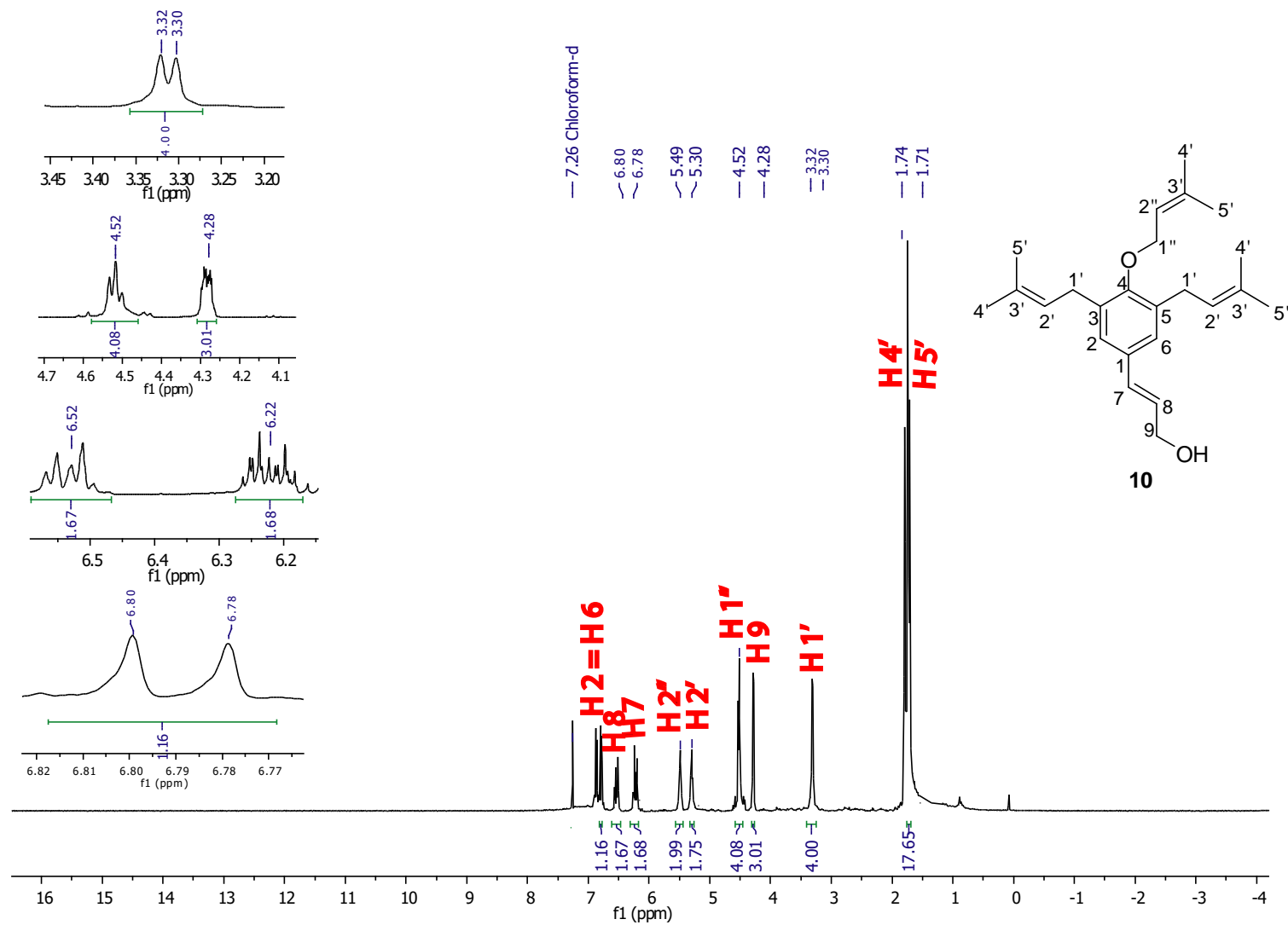


Figura A 41. Espectro de RMN de ^1H do composto **10** (CDCl_3 , 400 MHz).

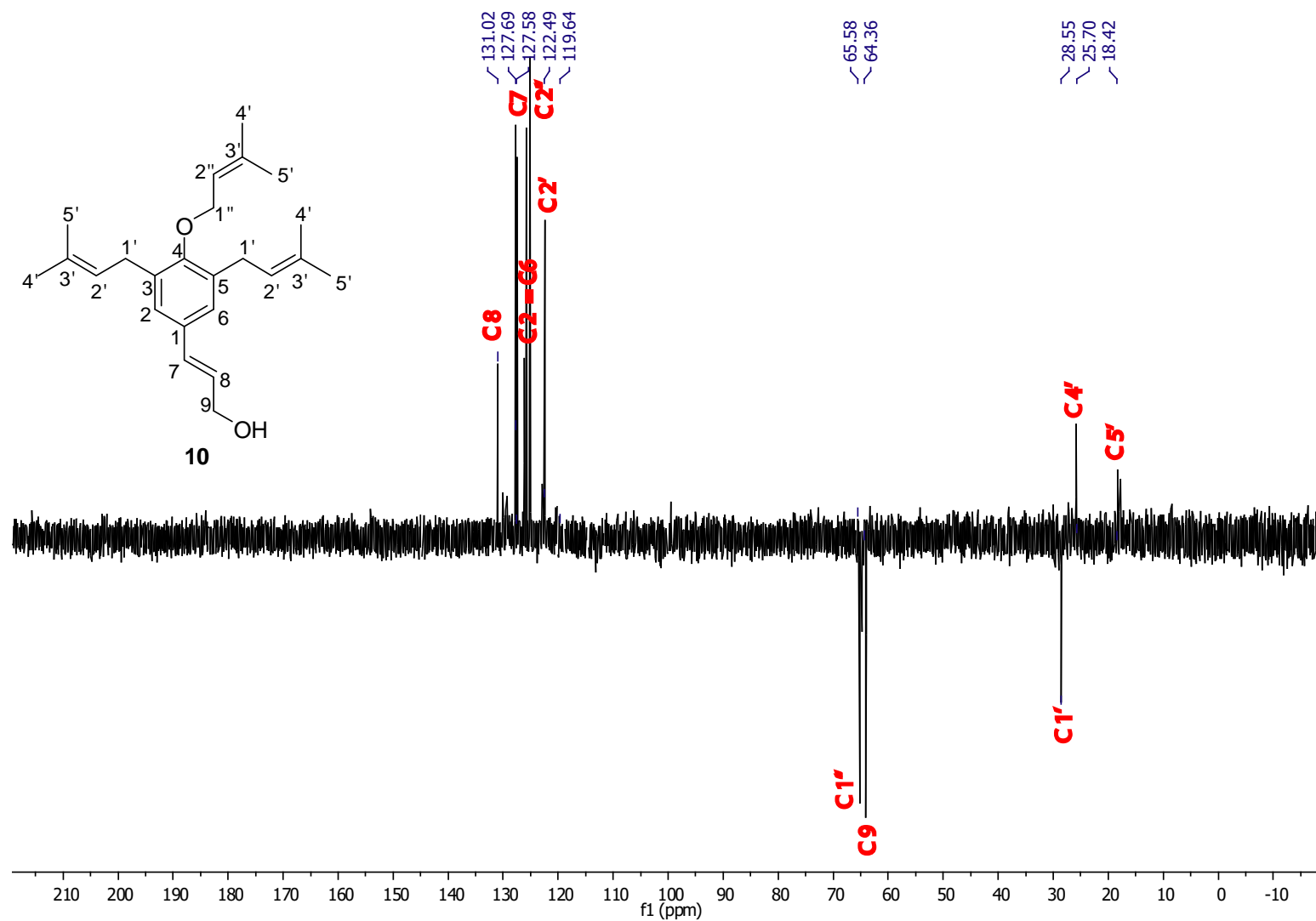


Figura A 42. Espectro de DEPT 135 do composto **10** (CDCl₃, 400 MHz).

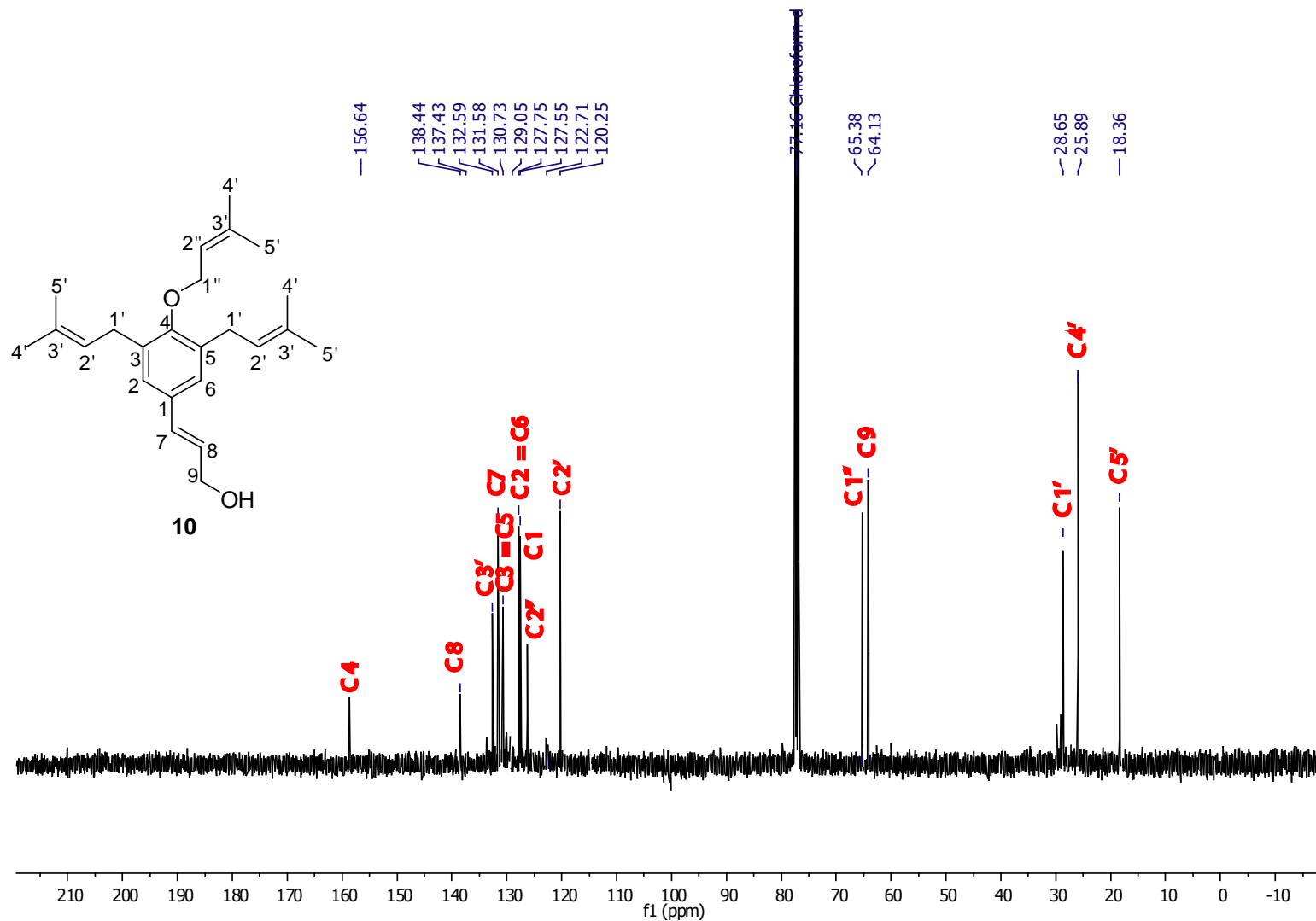


Figura A 43. Espectro de RMN de ¹³C do composto **10** (CDCl₃, 100 MHz).

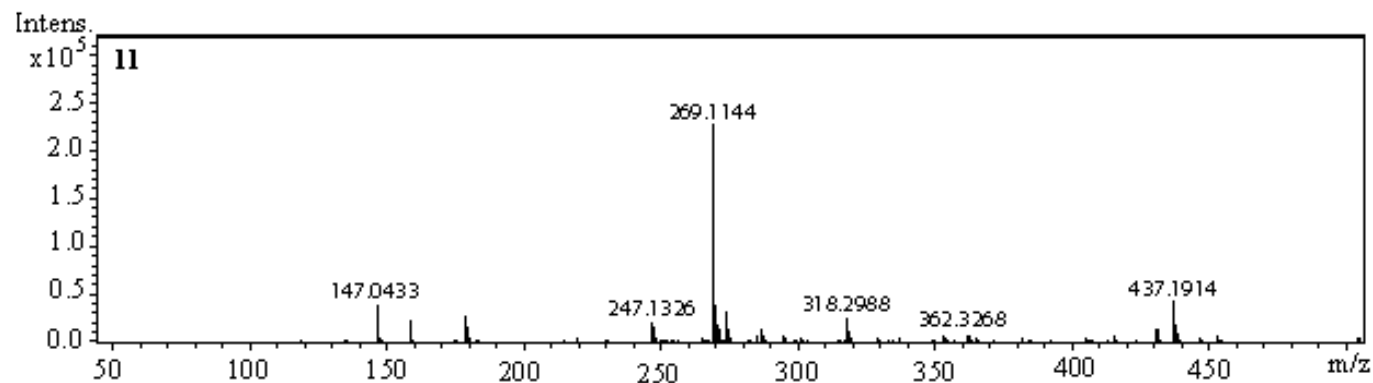


Figura A 44. Espectro de massas do composto **11** (ESI-Q-TOF, N₂, E_{lab} = 15 eV).

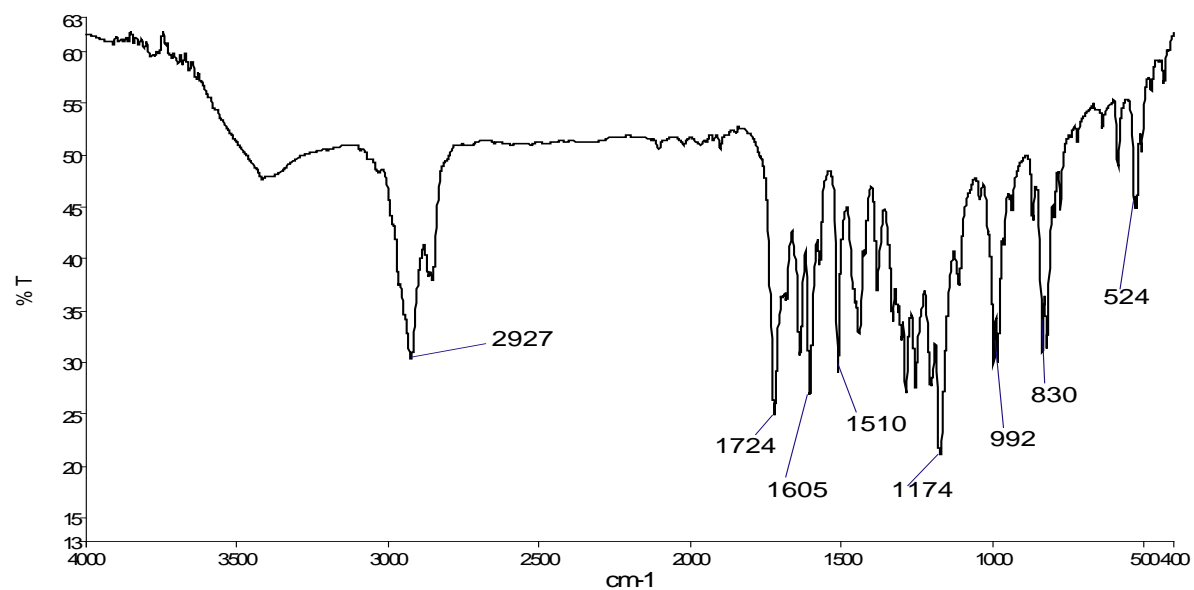


Figura A 45. Espectro de absorção no infravermelho do composto **11** (em pastilha de KBr).

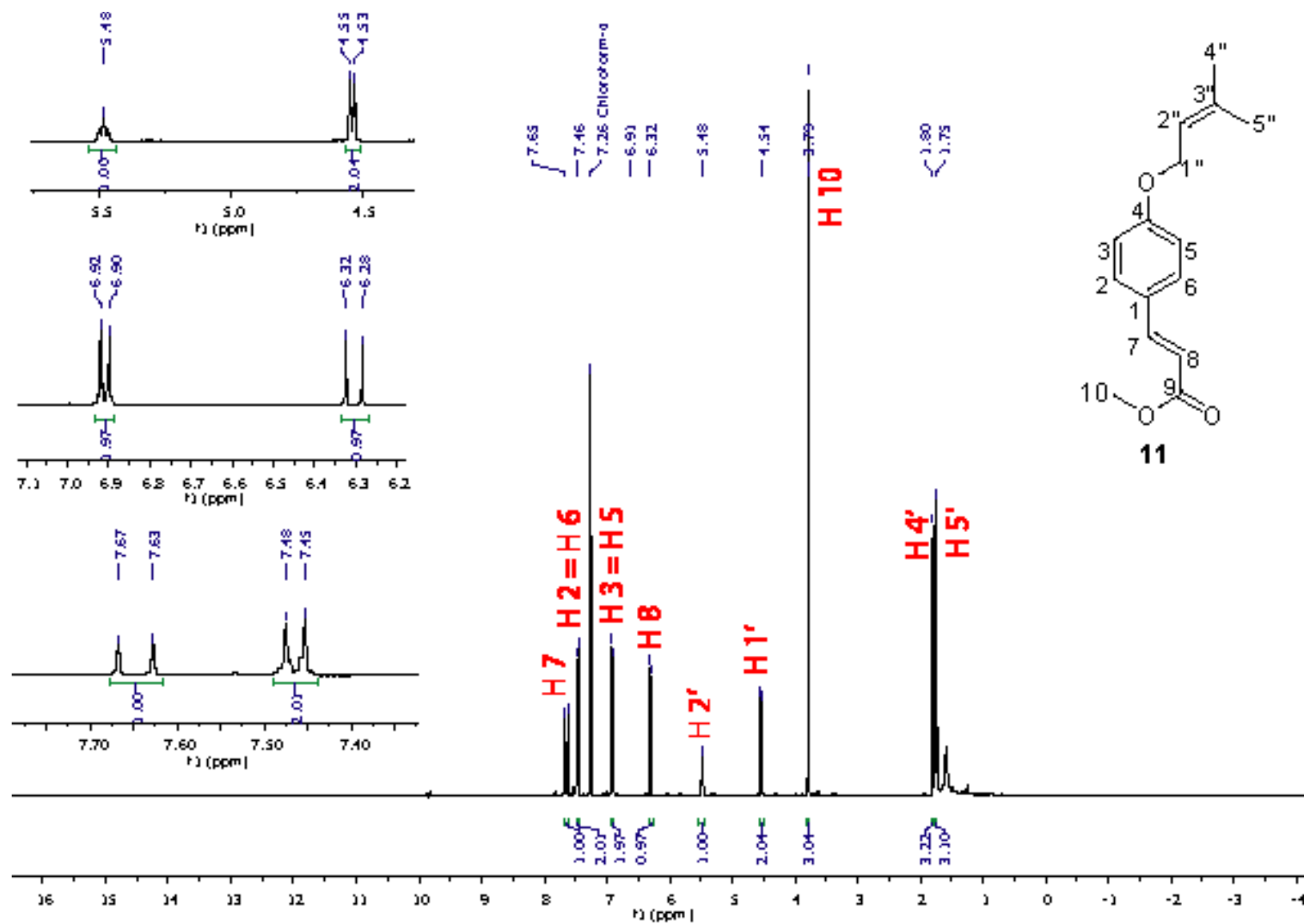


Figura A 46. Espectro de RMN de ^1H do composto 11 (CDCl_3 , 400 MHz).

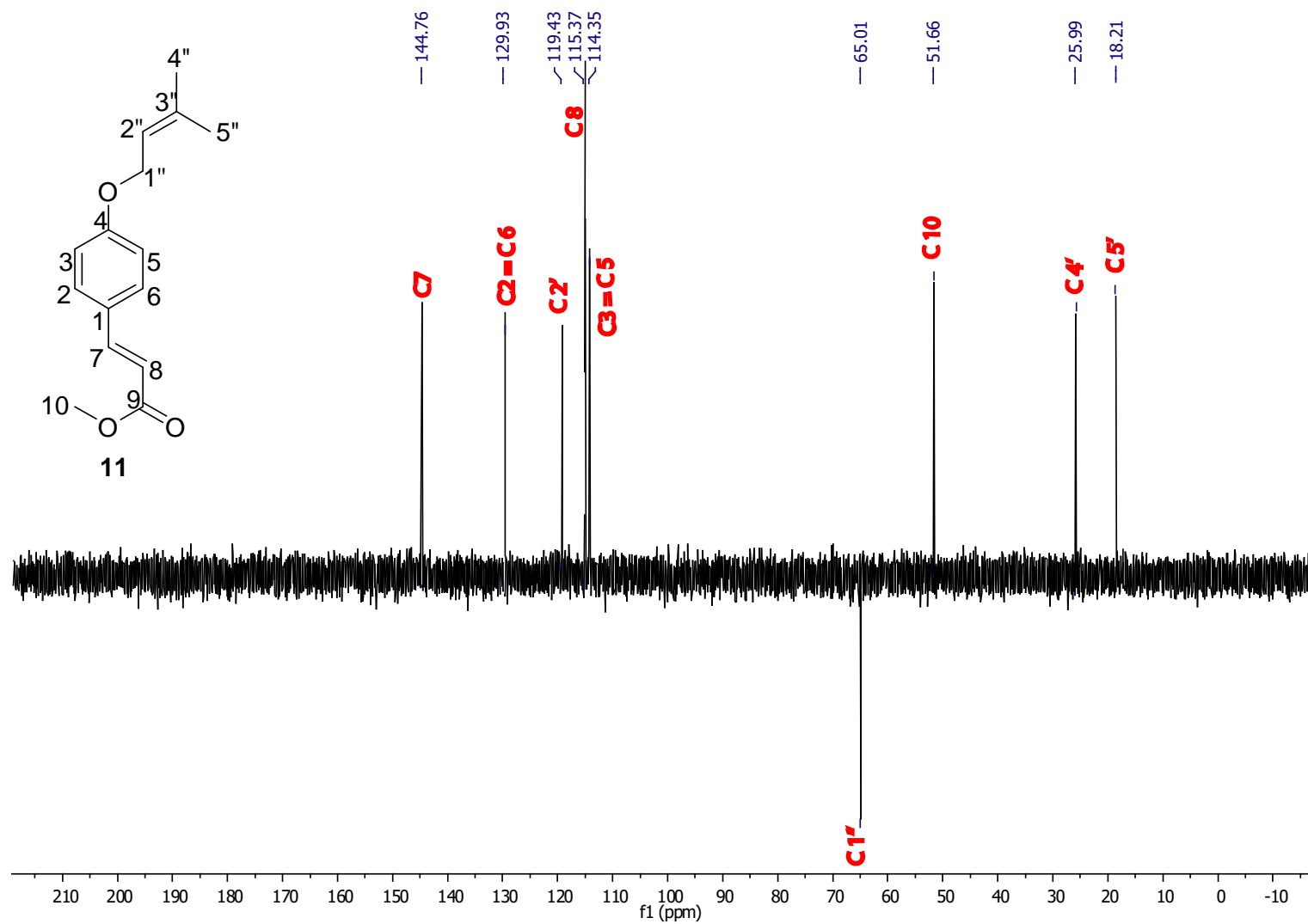


Figura A 47. Espectro de DEPT 135 do composto **11** (CDCl₃, 400 MHz).

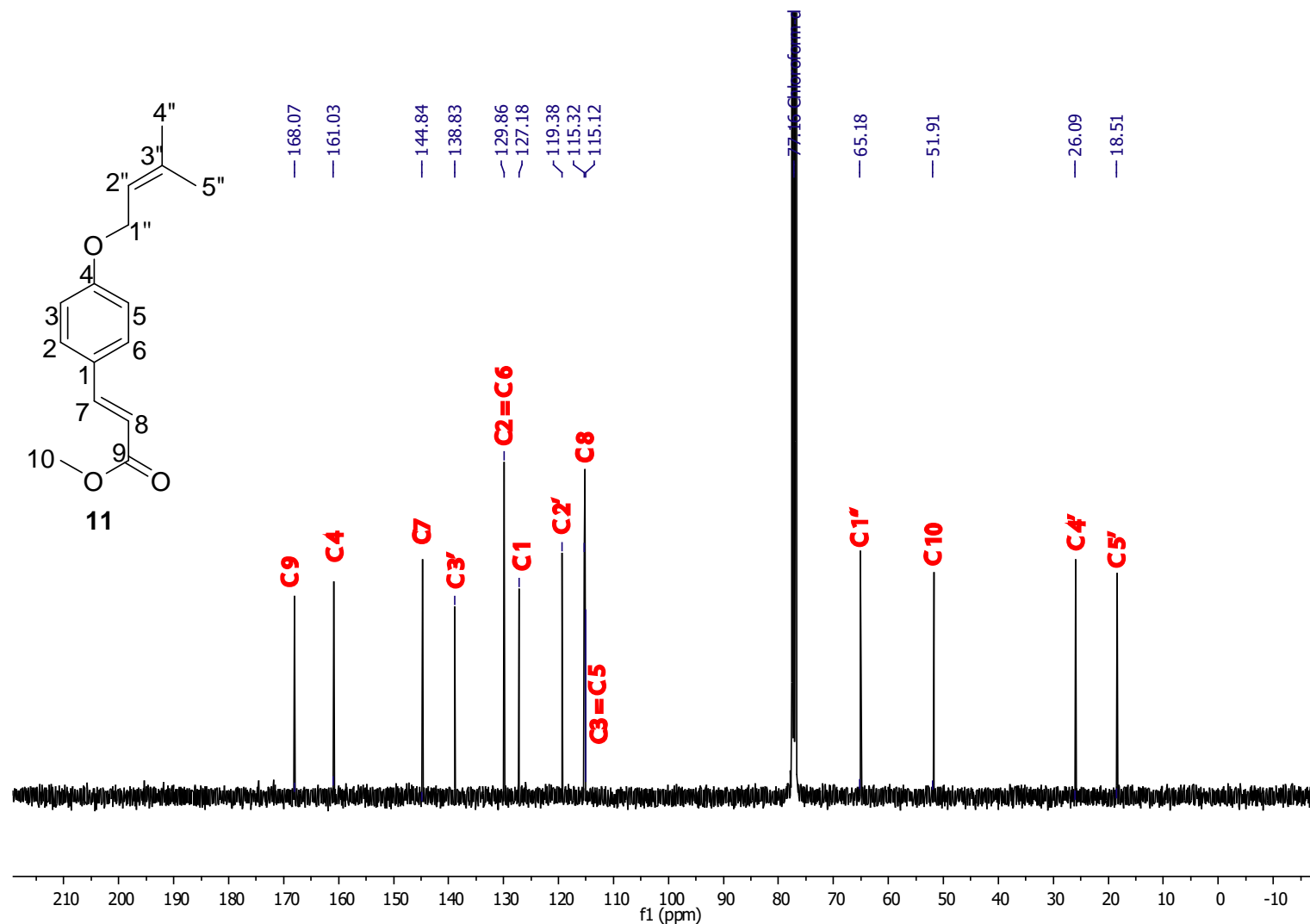


Figura A 48. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **11** (CDCl_3 , 100 MHz).

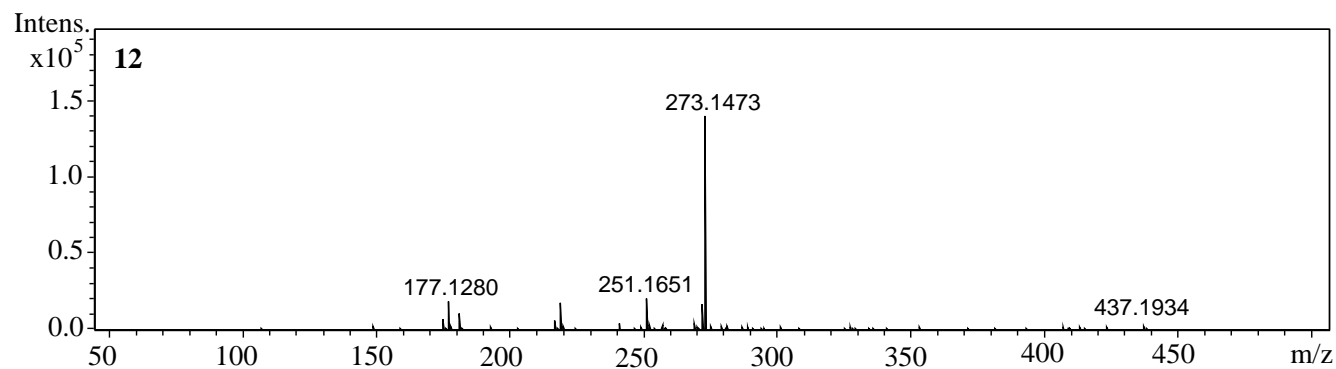


Figura A 49. Espectro de massas do composto **12** (ESI-Q-TOF, N₂, E_{lab} = 15 eV).

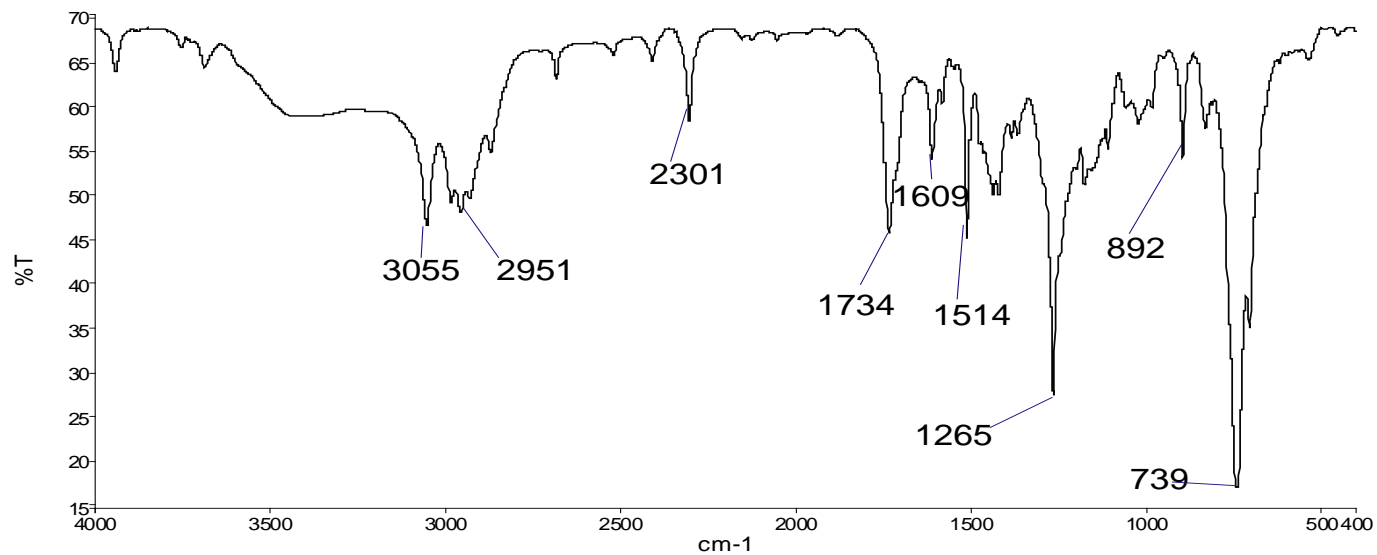


Figura A 50. Espectro de absorção no infravermelho do composto **12** (em pastilha de KBr).

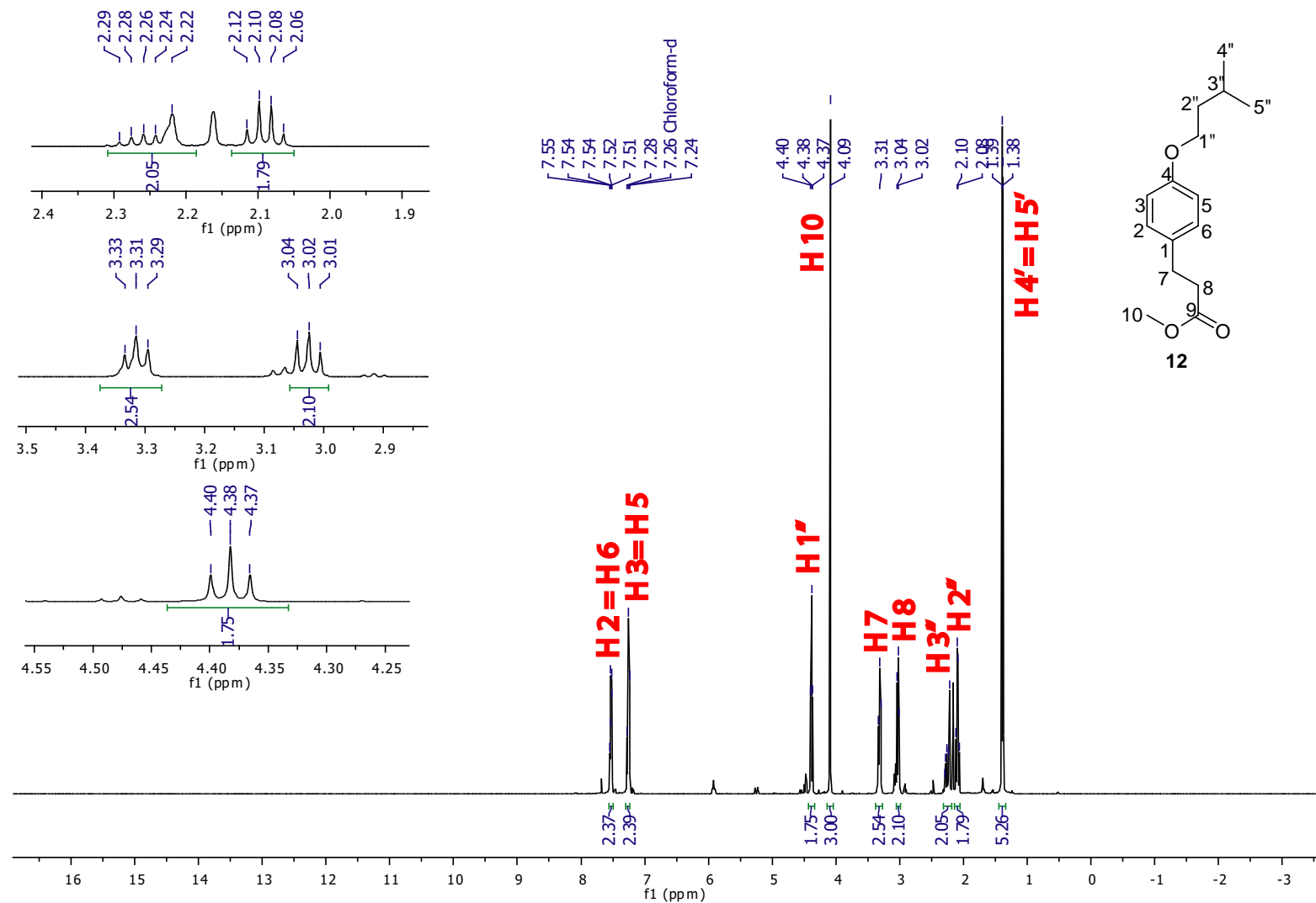


Figura A 51. Espectro de RMN de ^1H do composto **12** (CDCl_3 , 400 MHz).

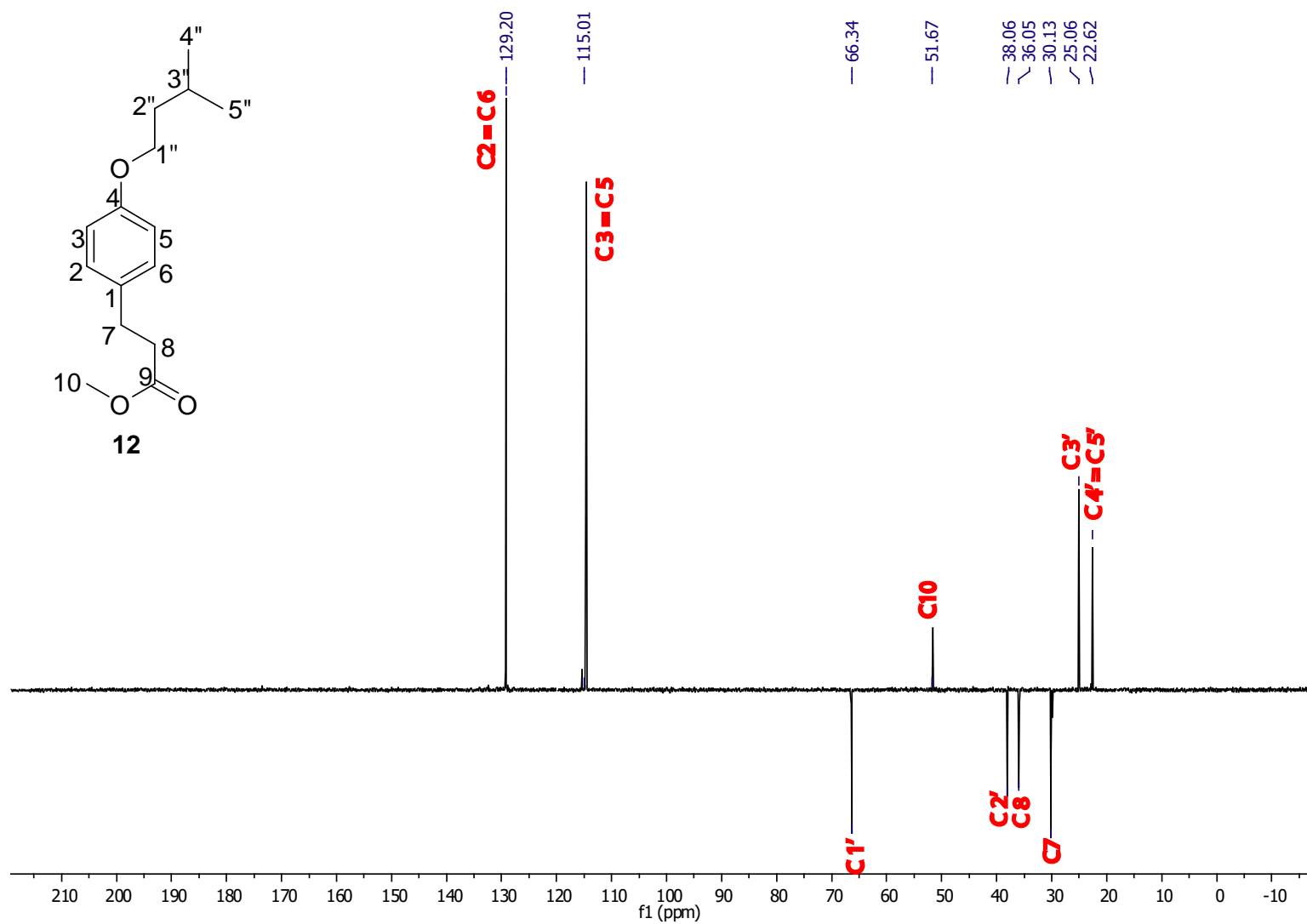


Figura A 52. Espectro de DEPT 135 do composto 12 (CDCl₃, 400 MHz).

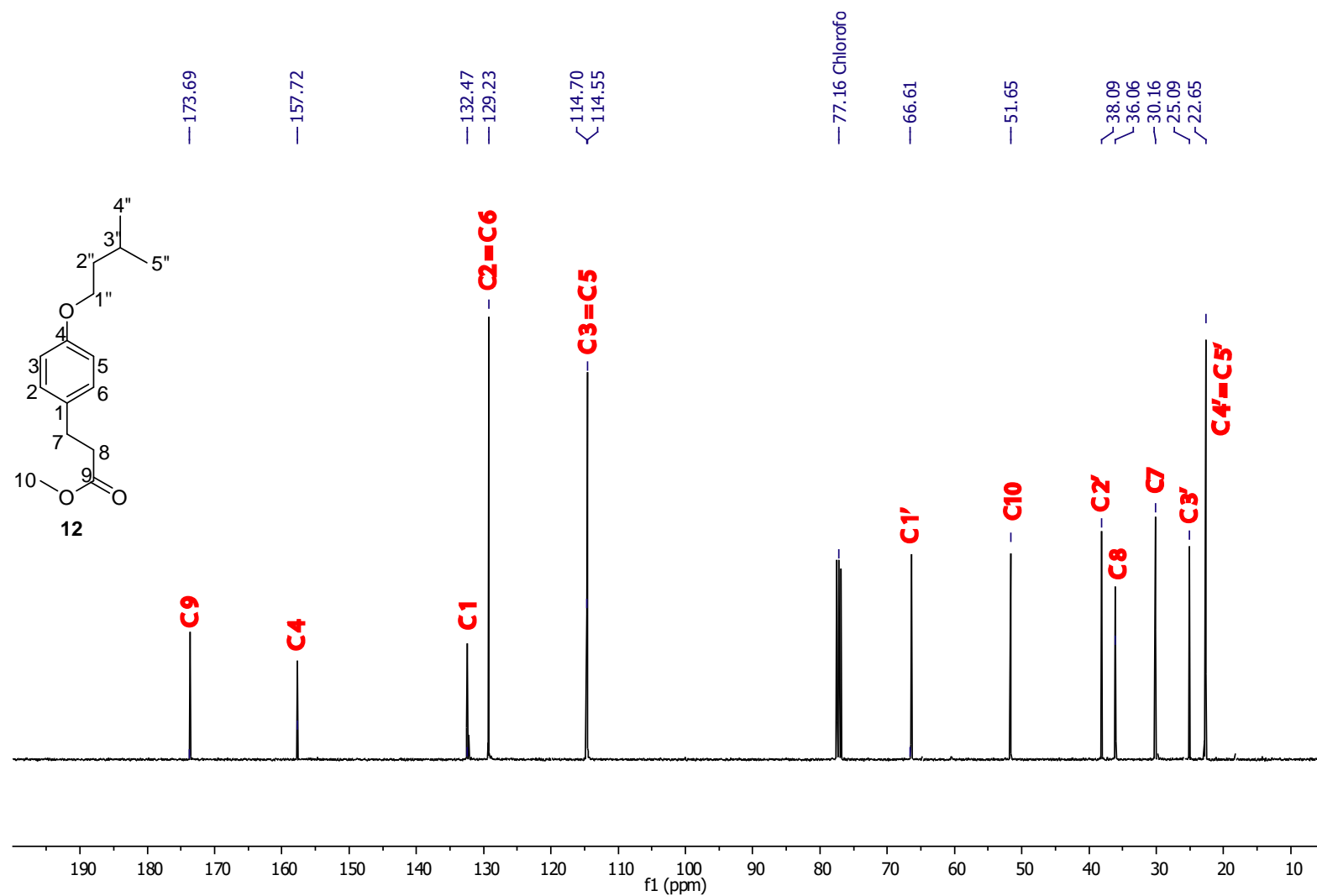


Figura A 53. Espectro de RMN de ¹³C do composto **12** (CDCl₃, 100 MHz).

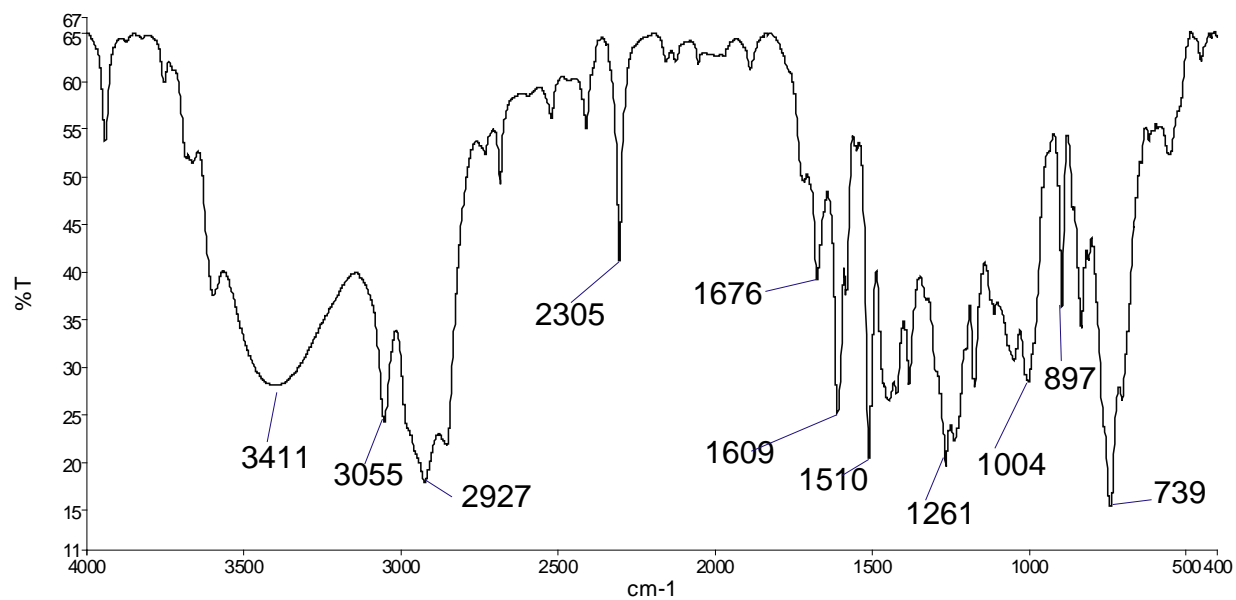


Figura A 54. Espectro de absorção no infravermelho do composto **13** (em pastilha de KBr).

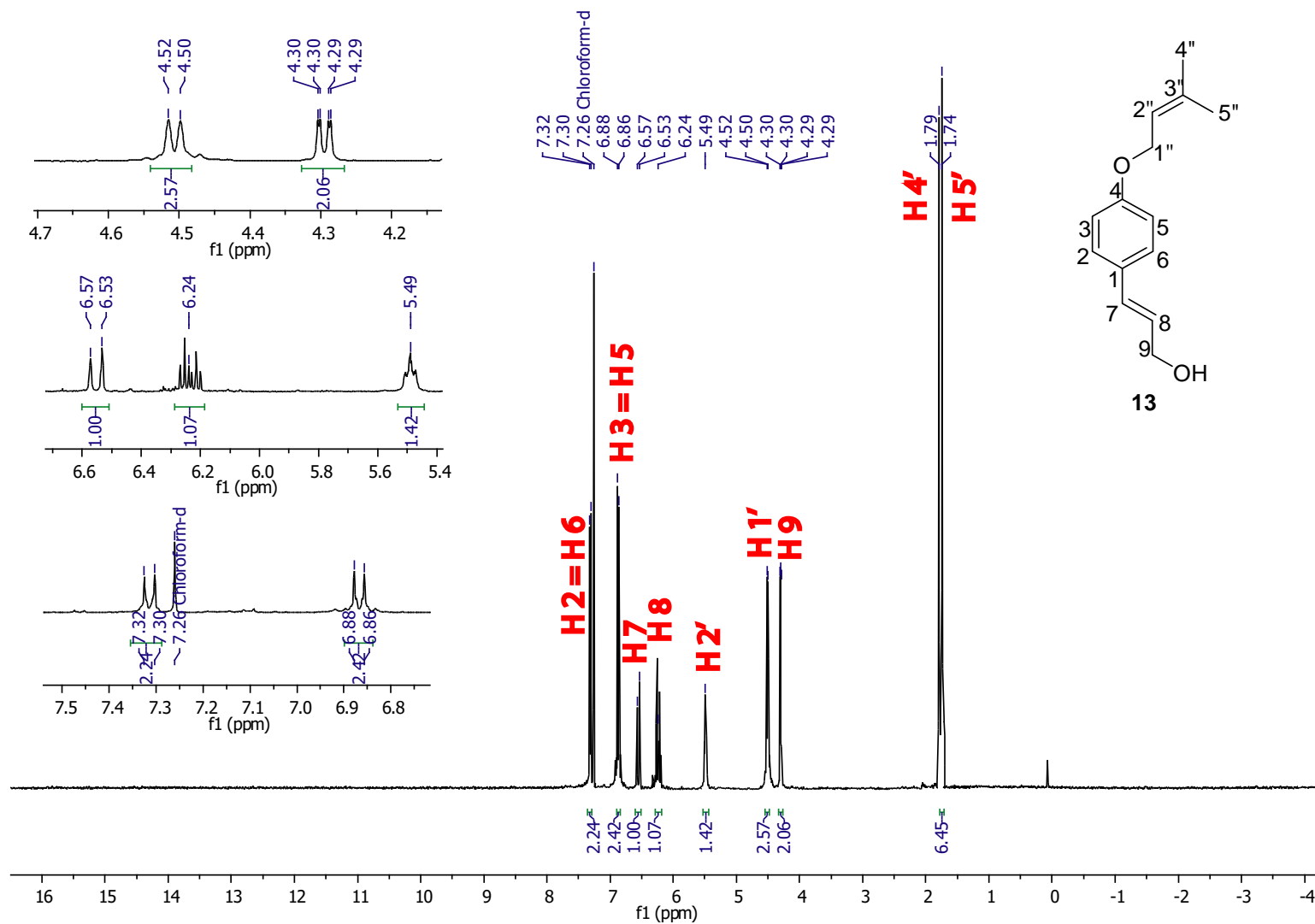


Figura A 55. Espectro de RMN de ^1H do composto **13** (CDCl_3 , 400 MHz).

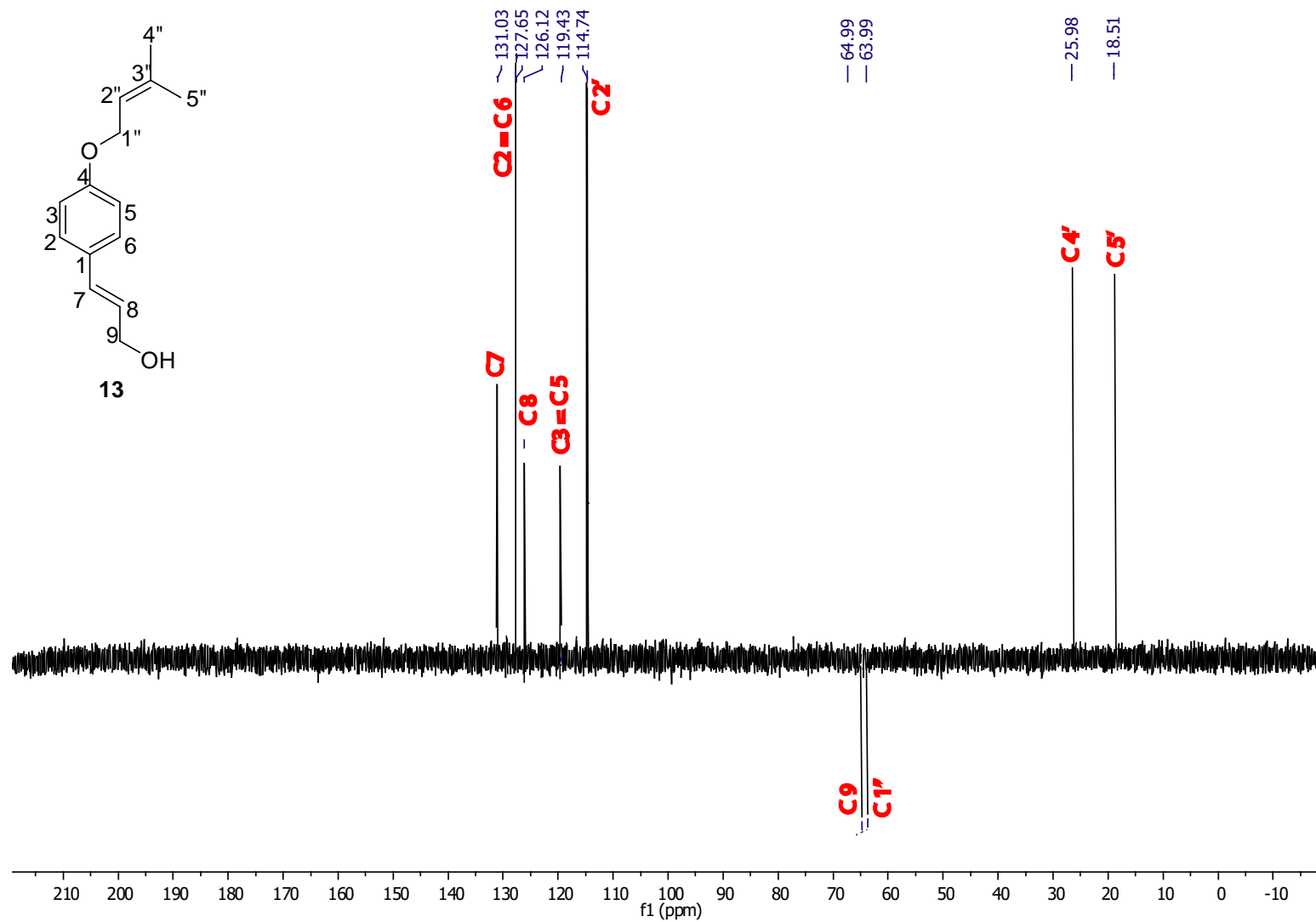


Figura A 56. Espectro de DEPT 135 do composto 13 (CDCl₃, 400 MHz).

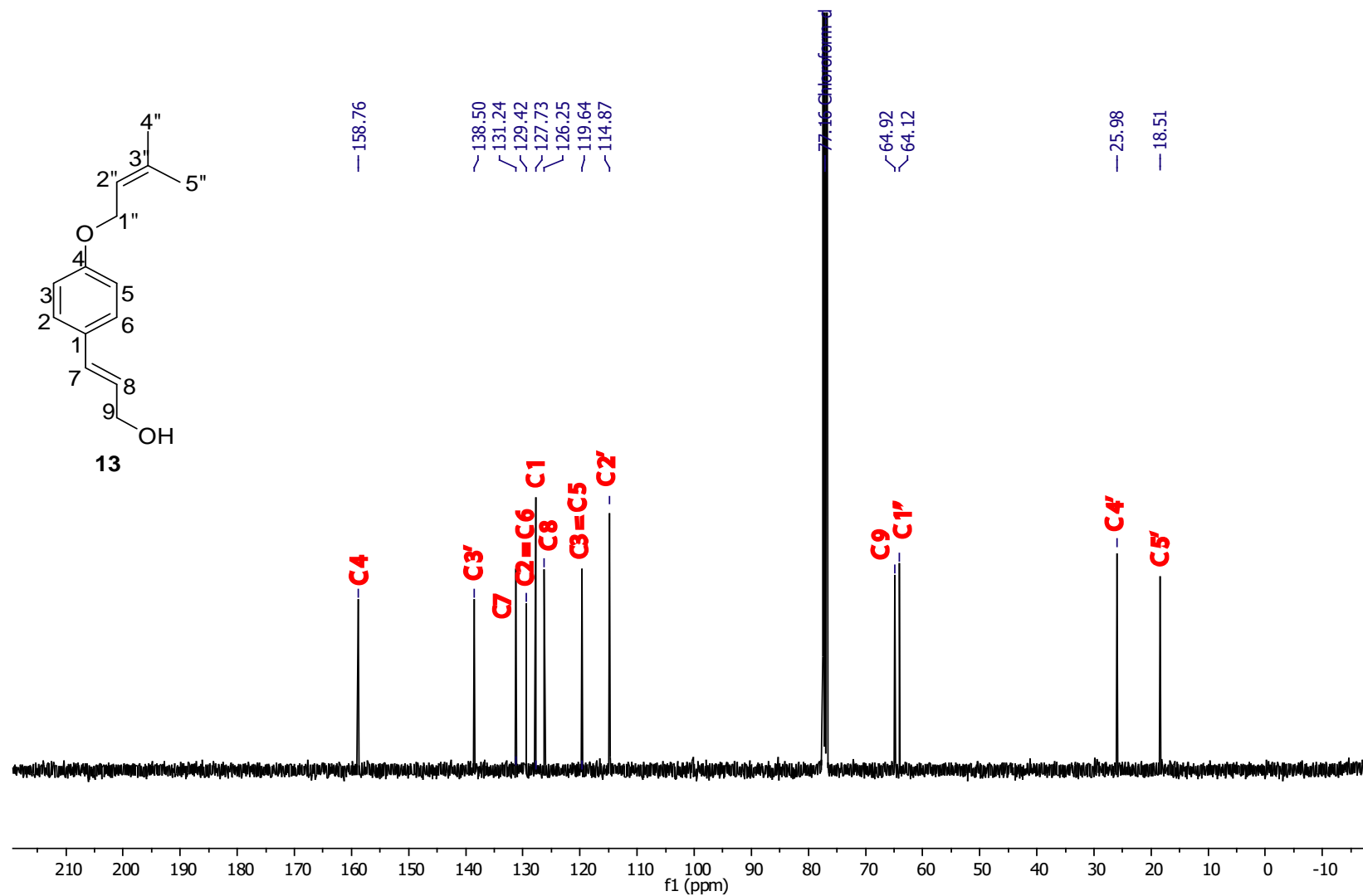


Figura A 57. Espectro de RMN de ¹³C do composto **13** (CDCl₃, 100 MHz).

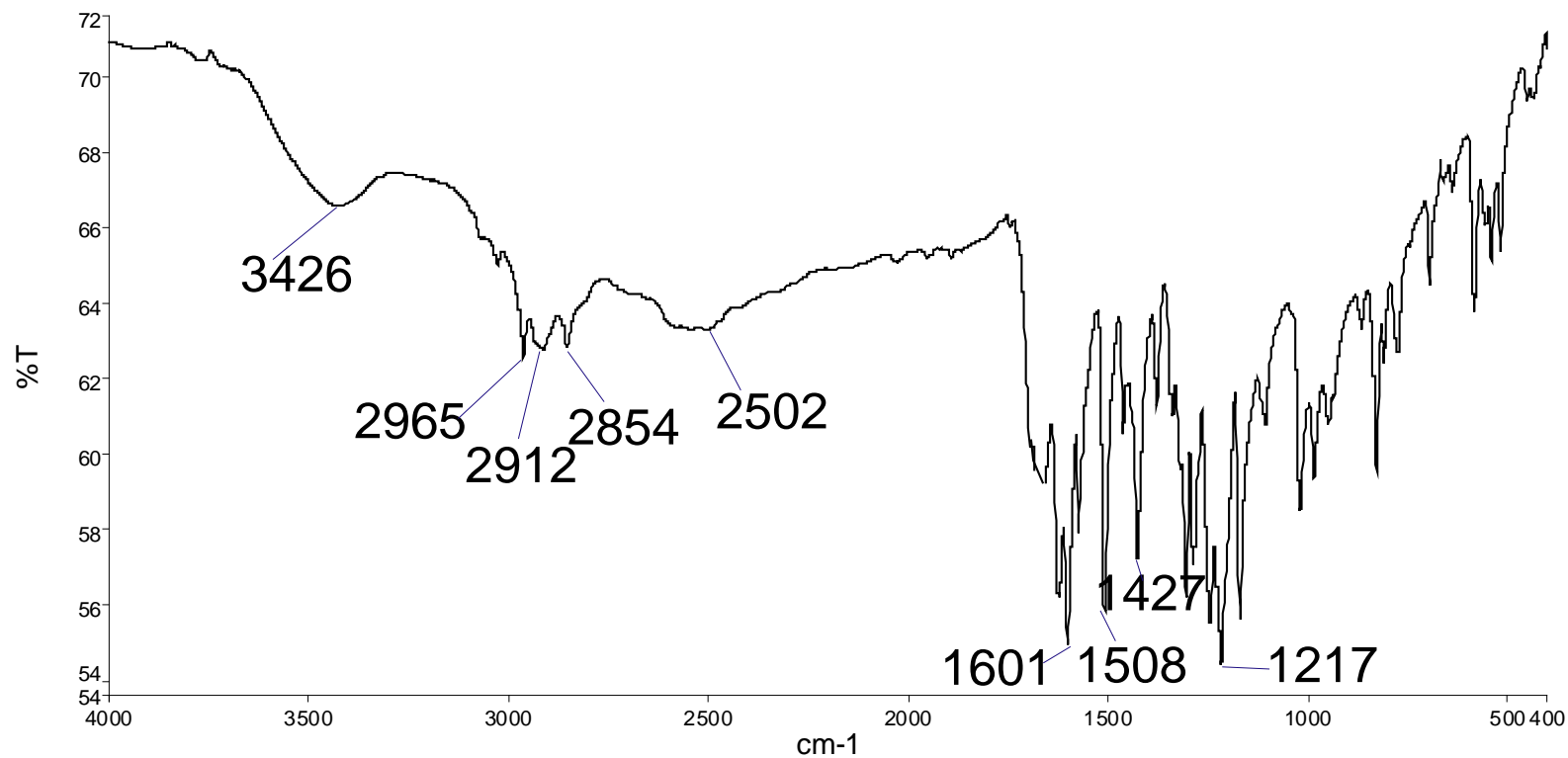


Figura A 58. Espectro de absorção no infravermelho do composto 14 (em pastilha de KBr).

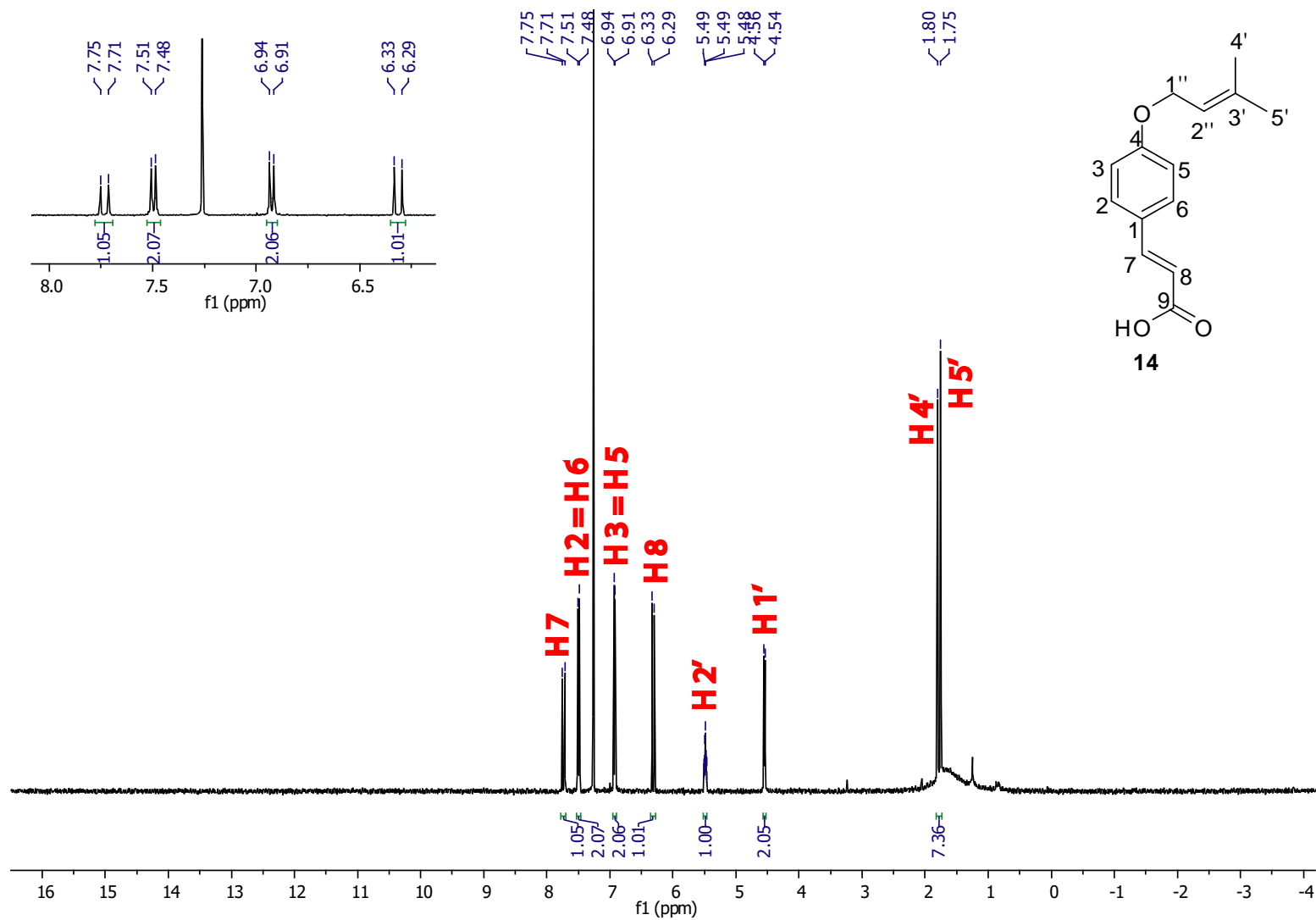


Figura A 59. Espectro de RMN de ^1H do composto **14** (CDCl_3 , 400 MHz).

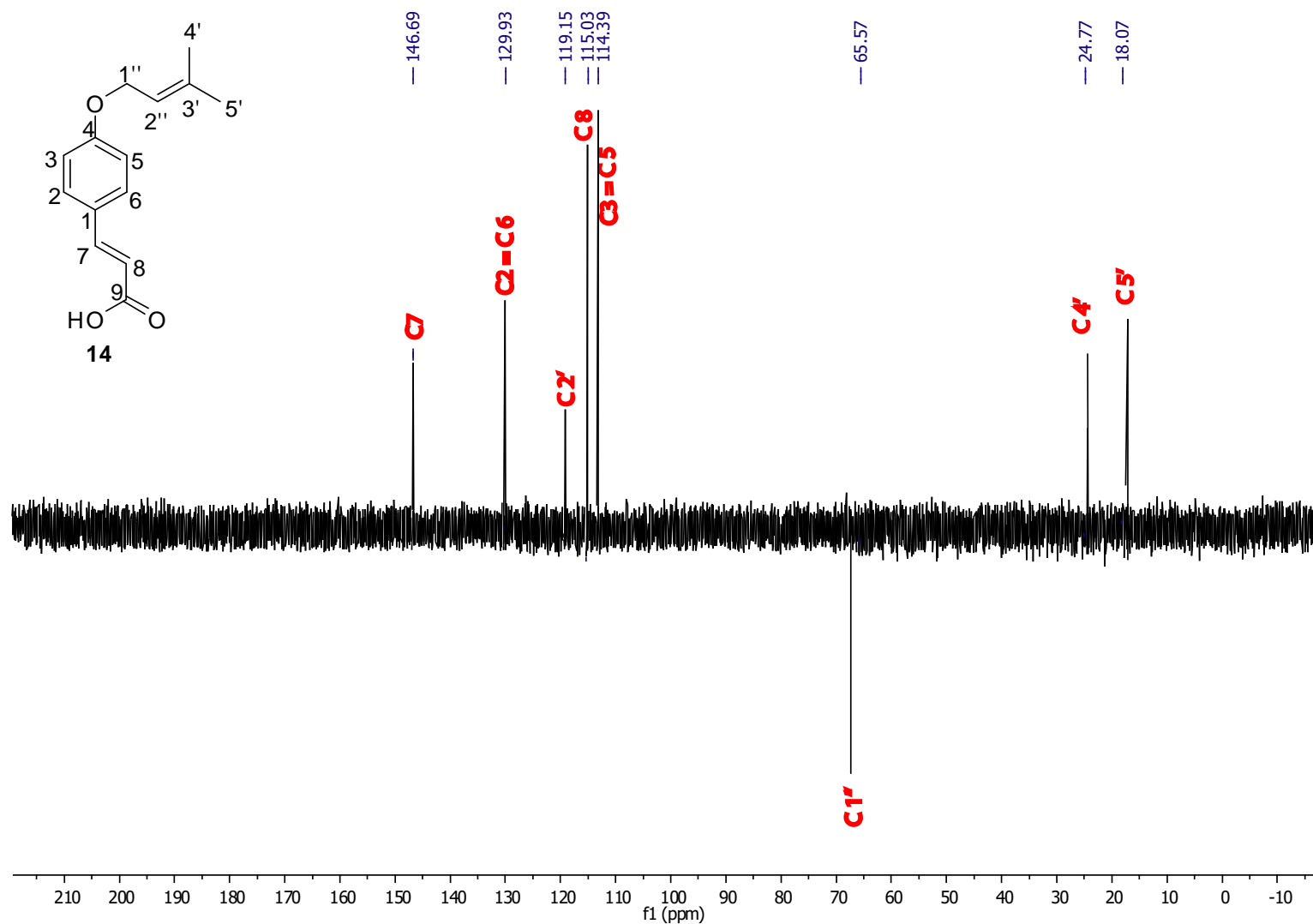


Figura A 60. Espectro de DEPT 135 do composto 14 (CDCl₃, 400 MHz).

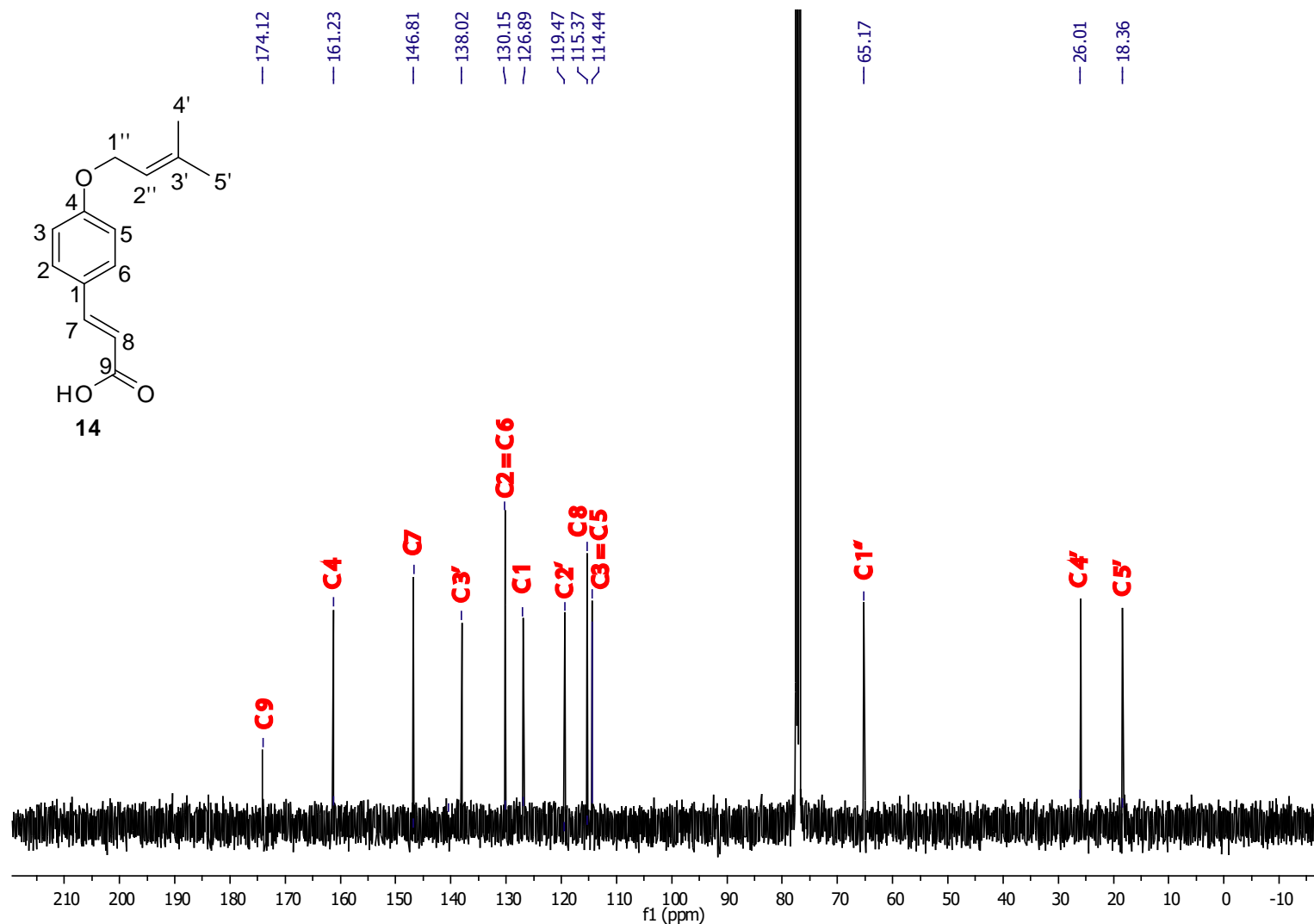


Figura A 61. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **14** (CDCl_3 , 100 MHz).

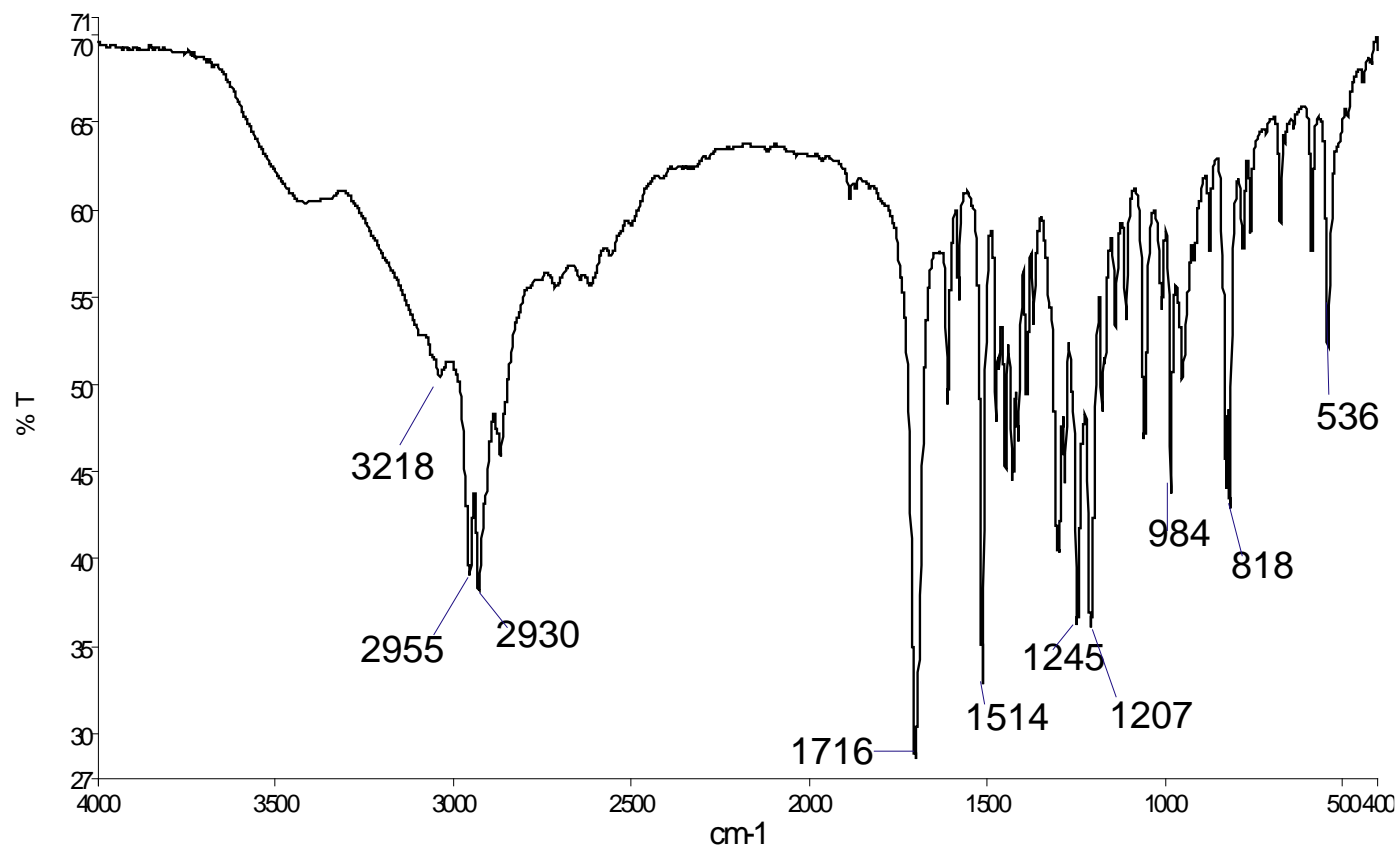


Figura A 62. Espectro de absorção no infravermelho do composto 15 (em pastilha de KBr).

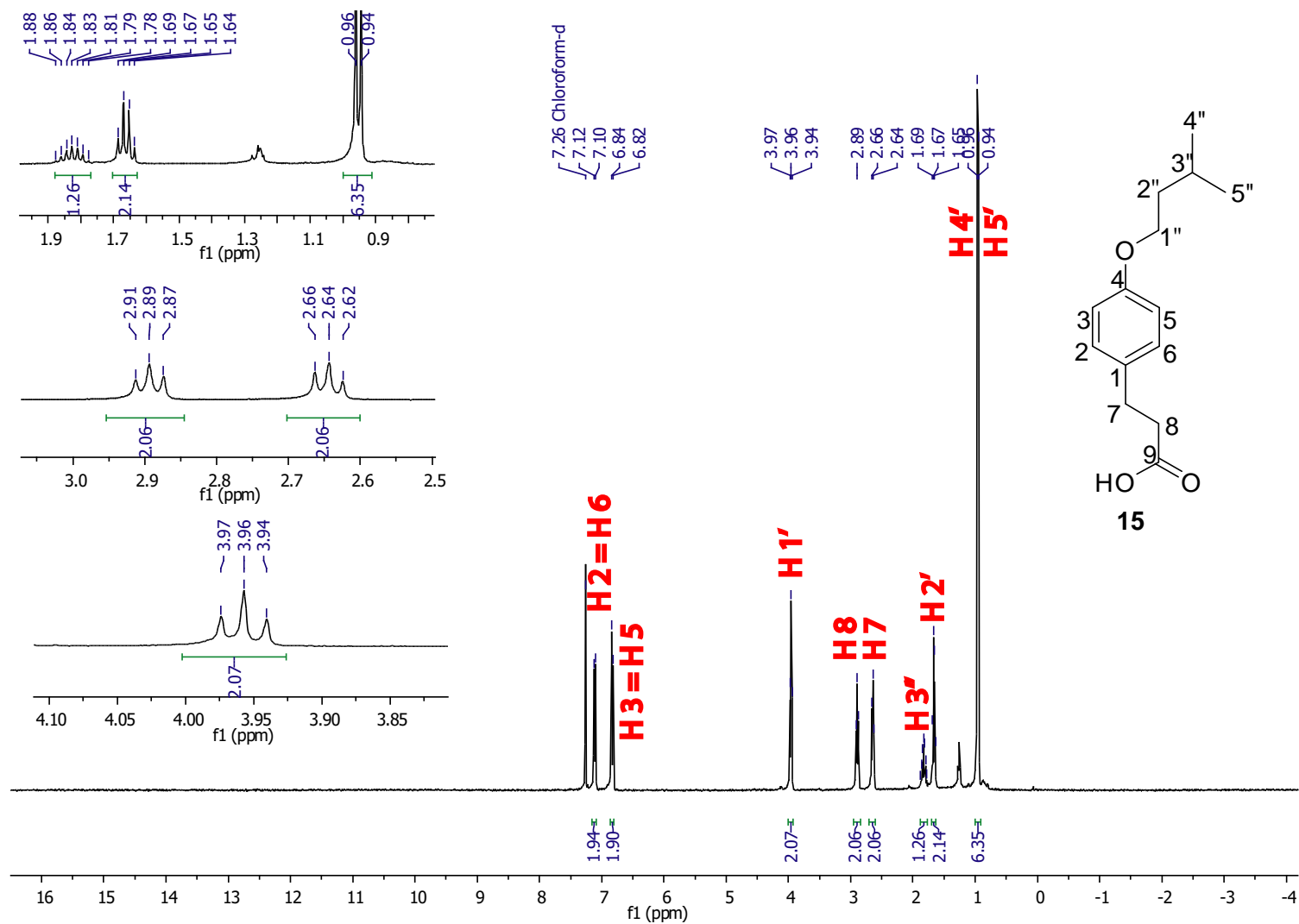


Figura A 63. Espectro de RMN de ^1H do composto **15** (CDCl_3 , 400 MHz).

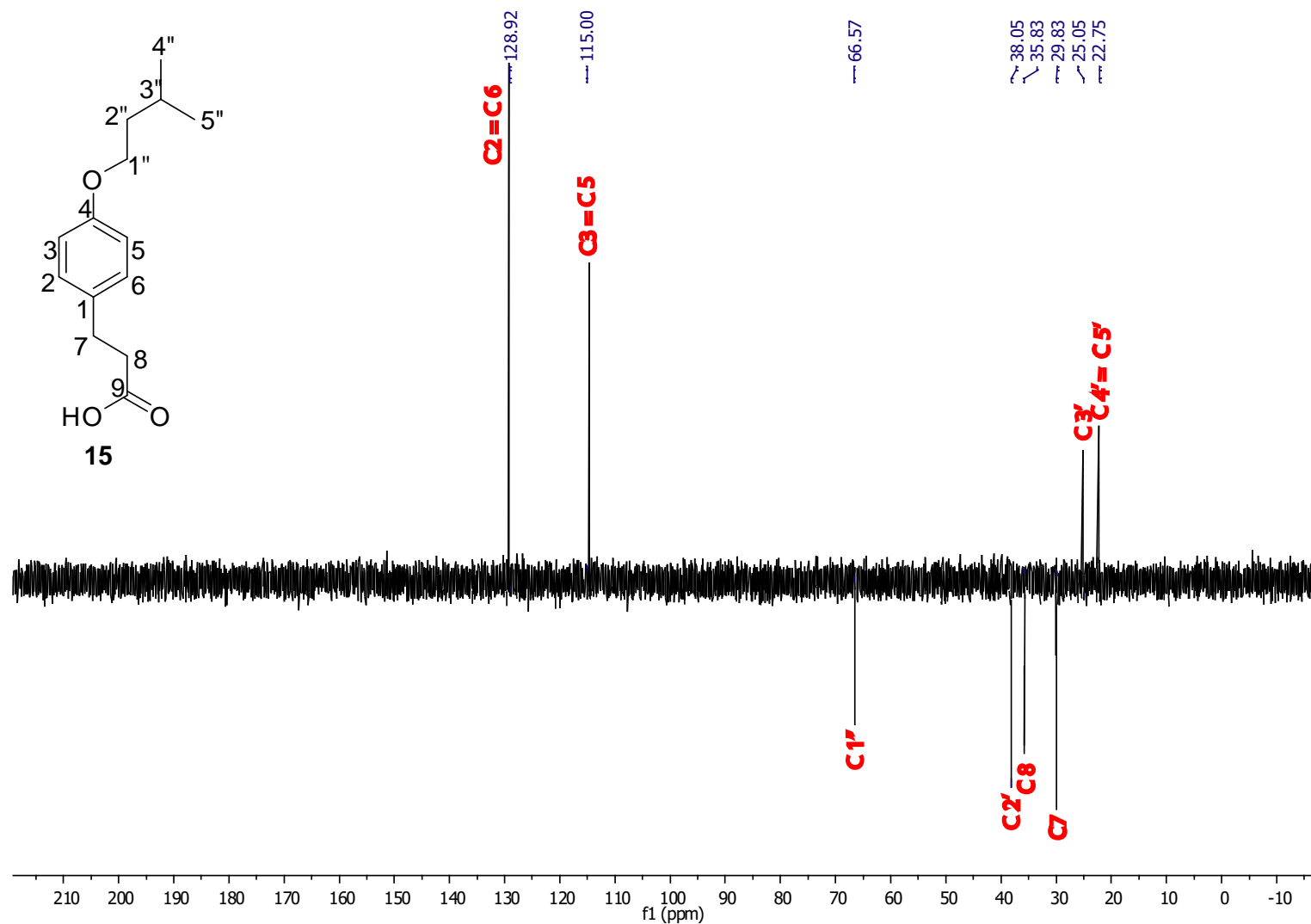


Figura A 64. Espectro de DEPT 135 do composto **15** (CDCl₃, 400 MHz).

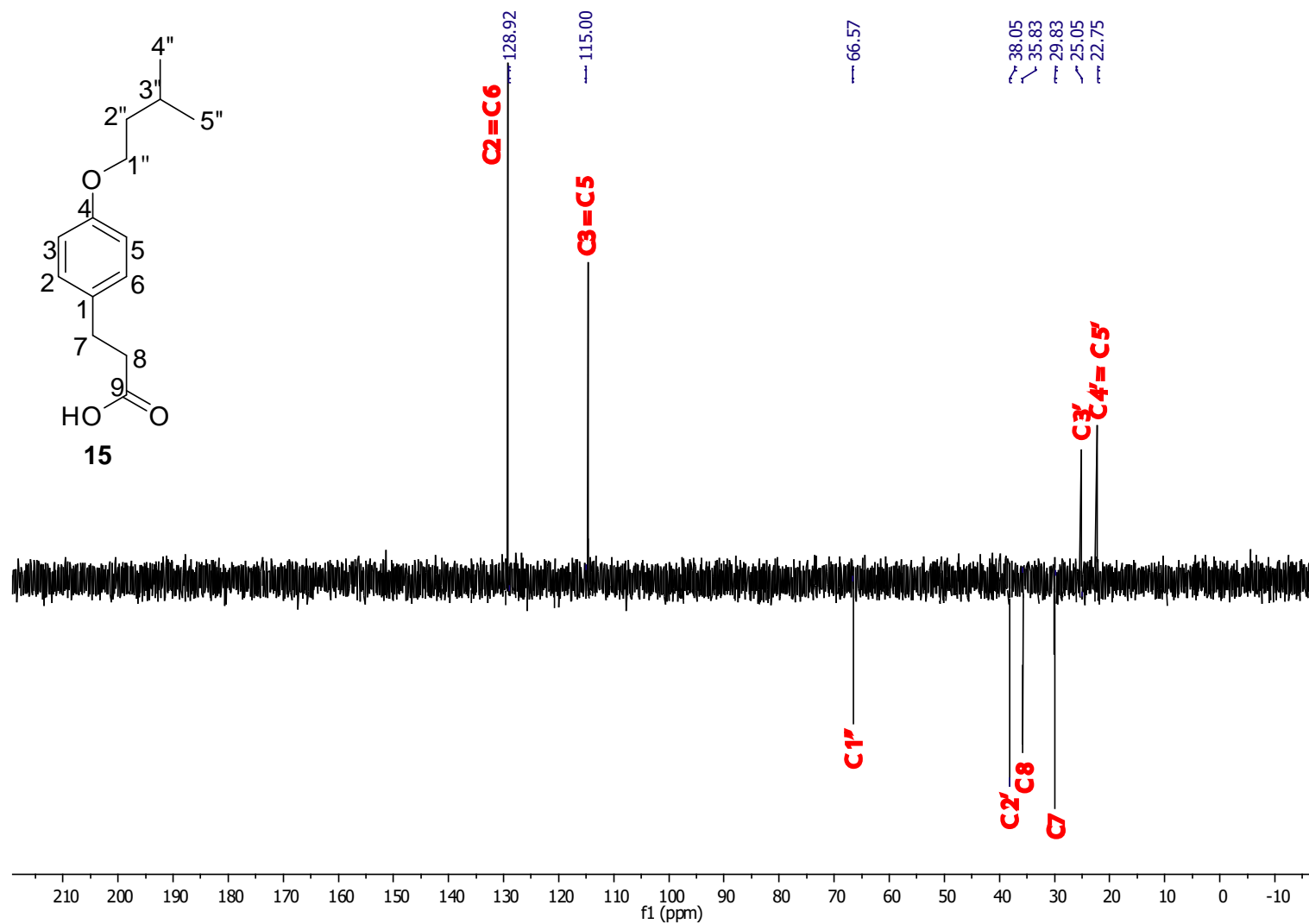


Figura A 65. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **15** (CDCl_3 , 100 MHz).

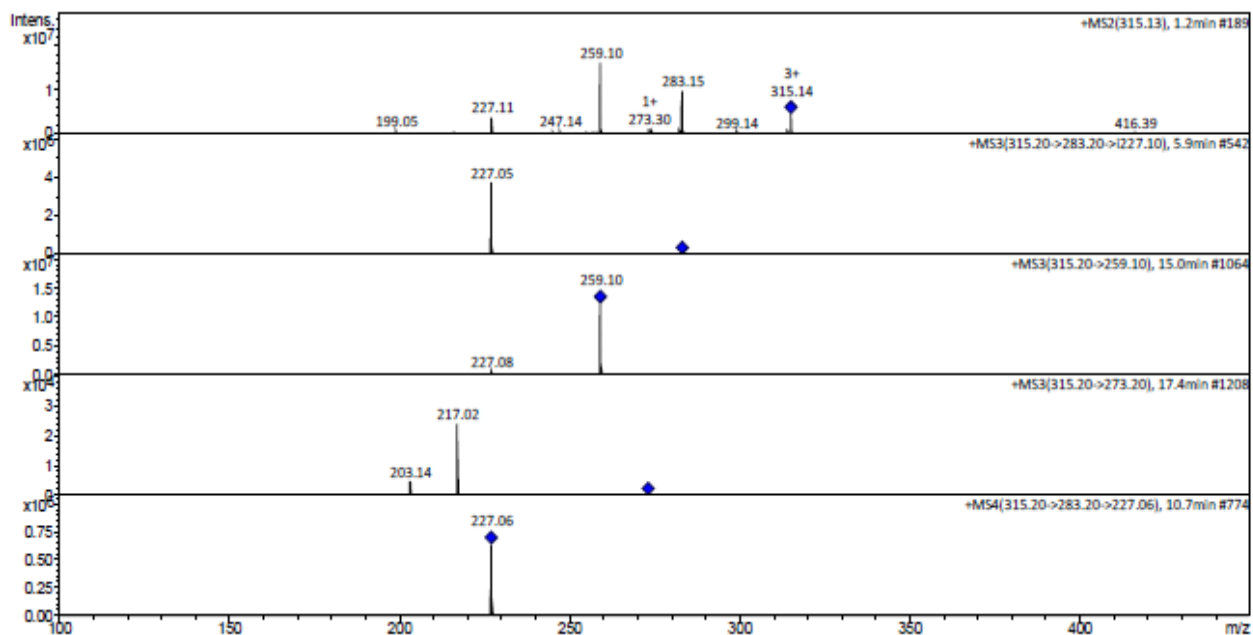


Figura A 66. Espectro de ESI-IT-MSⁿ do composto 1 protonado (m/z 315).

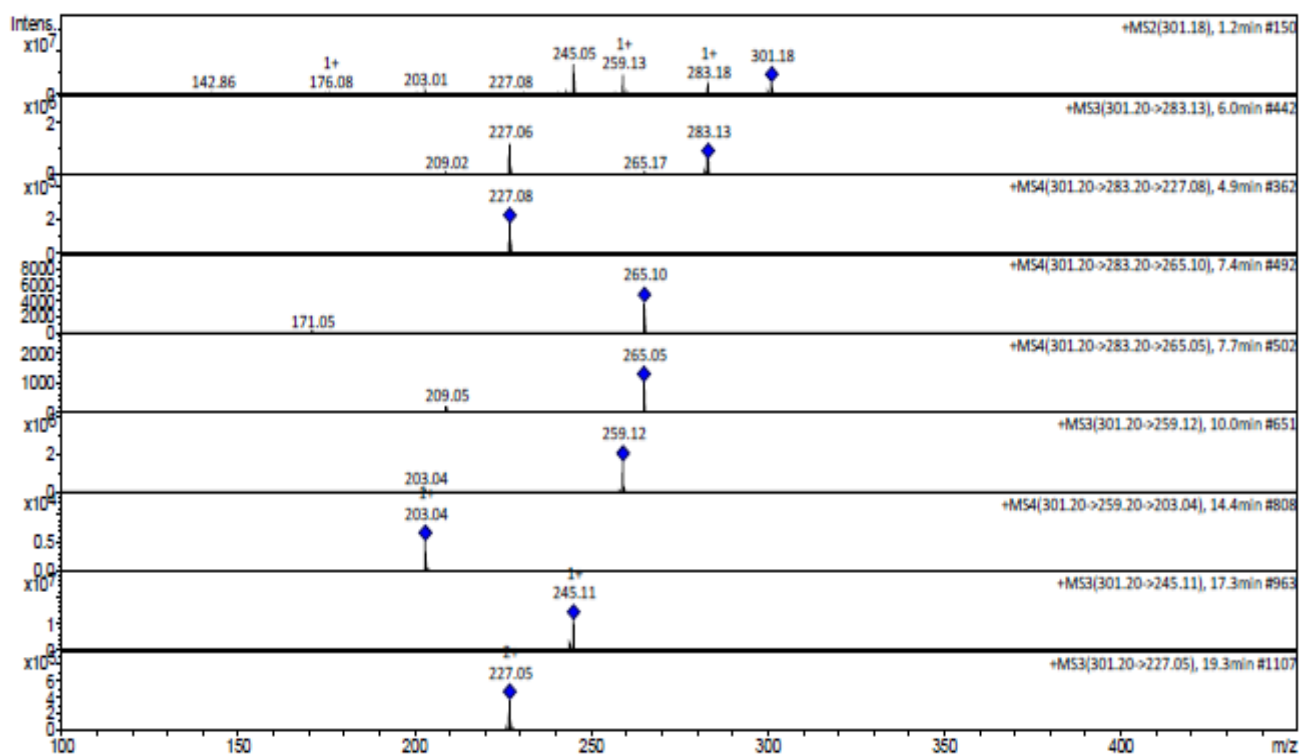


Figura A 67. Espectro de ESI-IT-MSⁿ do composto 3 protonado (m/z 301).

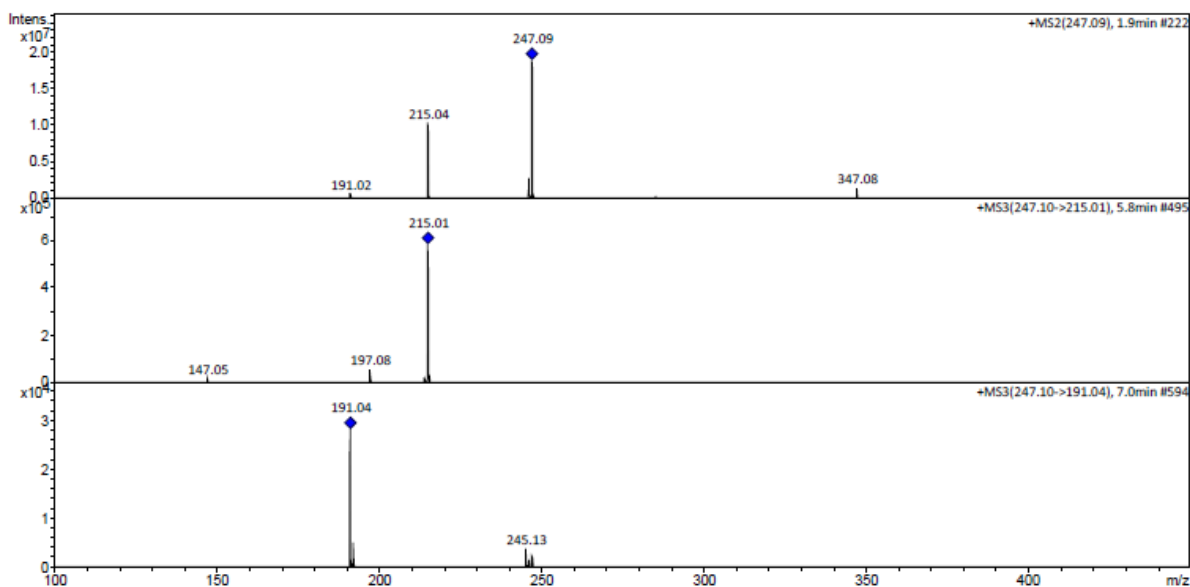


Figura A 68. Espectro de ESI-IT-MSⁿ do composto 5 (m/z 247)

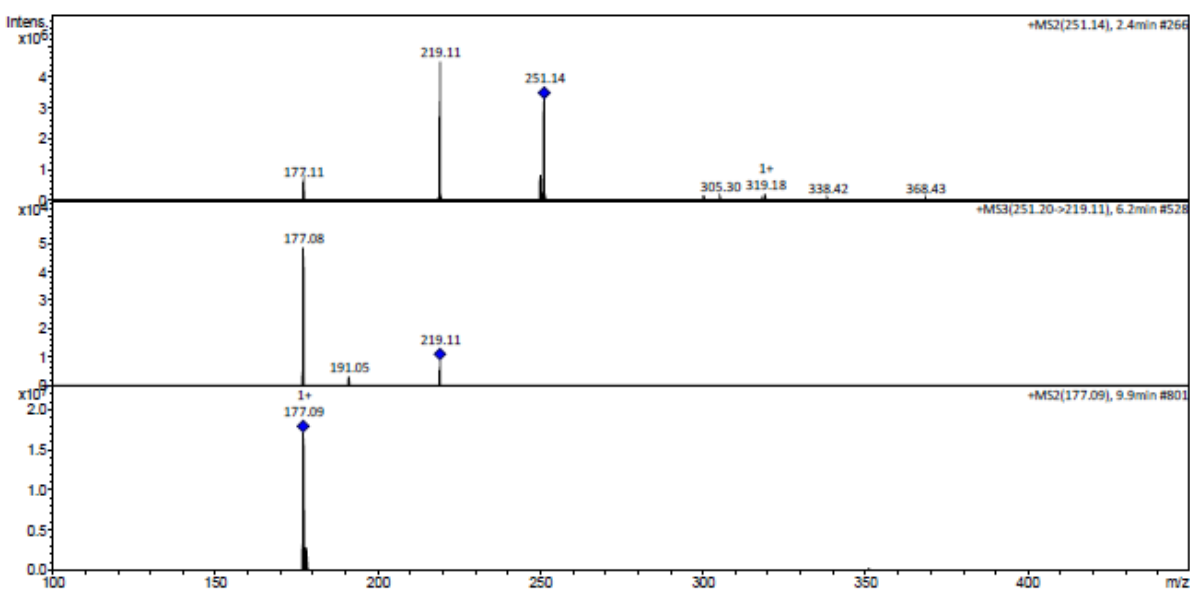


Figura A 69. Espectro de ESI-IT-MSⁿ do composto 6 (m/z 251).

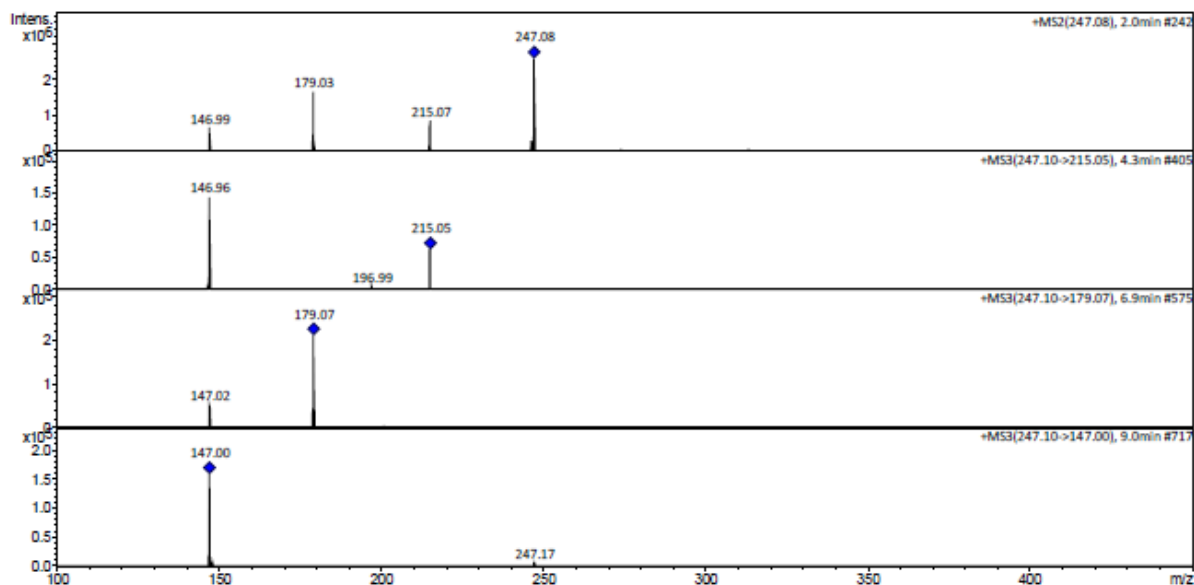


Figura A 70. Espectro de ESI-IT-MSⁿ do composto **11** (m/z 247).

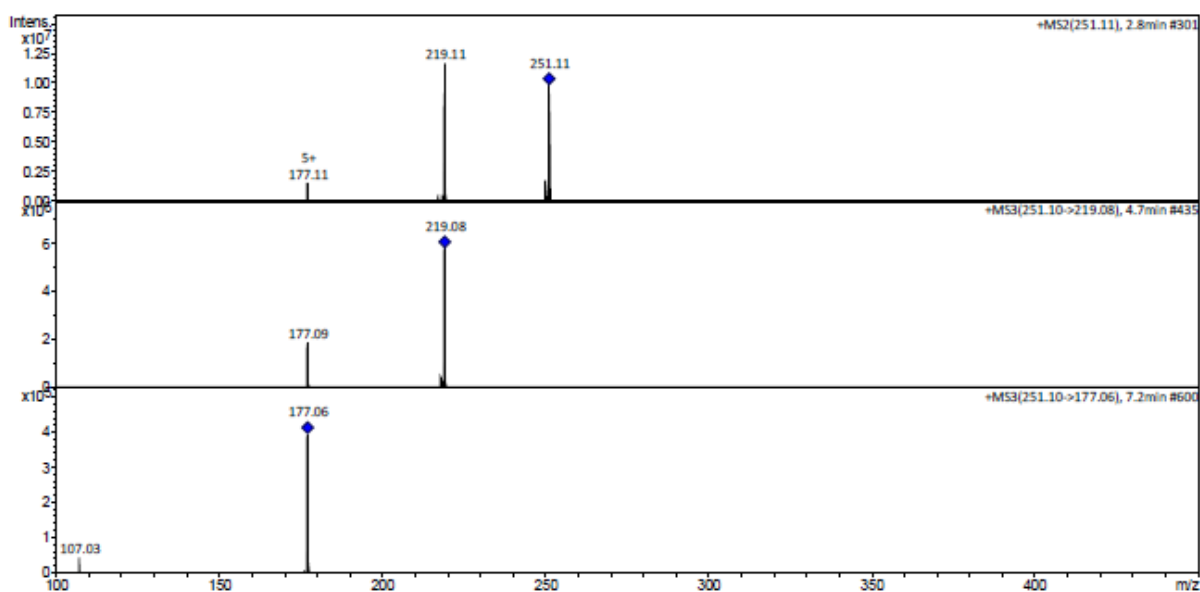


Figura A 71. Espectro de ESI-IT-MSⁿ do composto **12** (m/z 251).

$E_{\text{lab}} = 15 \text{ eV}$.

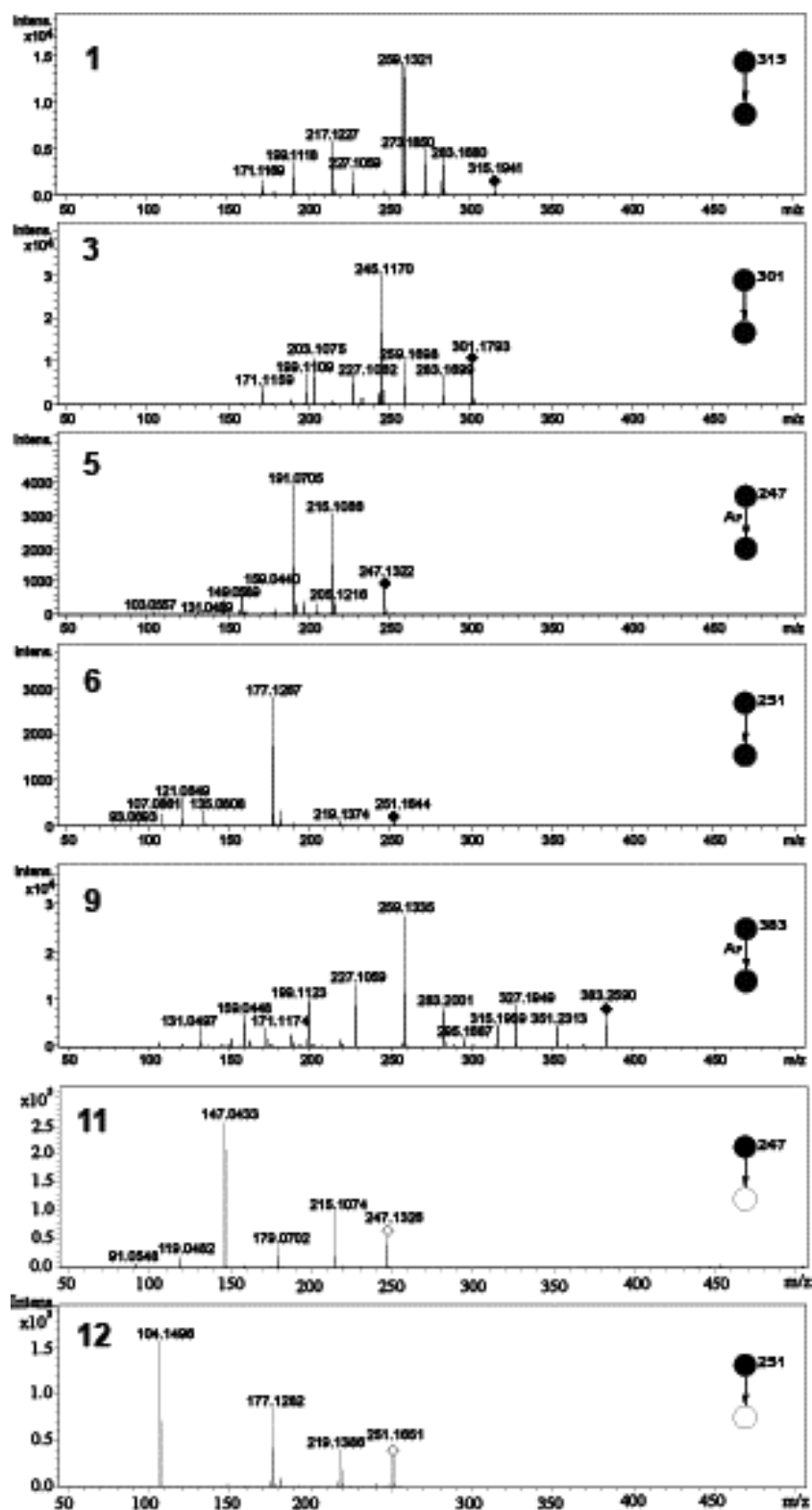


Figura A 72. Espectros de massas compostos 1, 3, 5-6, 9 e 11-12 (ESI-MS/MS-Q-TOF, N_2 , $E_{lab} = 15$ eV).