

Obtenção de derivados semissintéticos de artepelin C e bacarina oriundos da própolis verde e avaliação de suas atividades biológicas

Débora Munhoz Rodrigues

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Débora Munhoz Rodrigues

Obtenção de derivados semissintéticos de artepelin C e baccarina oriundos da própolis verde e avaliação de suas atividades biológicas

Ribeirão Preto
2022

Débora Munhoz Rodrigues

Obtenção de derivados semissintéticos de artepelin C e bacarina oriundos da própolis verde e avaliação de suas atividades biológicas.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/ USP para obtenção do título de **Doutor** em Ciências.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

Co-orientadora: Profa. Dra. Vanessa Leiria Campo

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 08/04/2022. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2022

Rodrigues, D. M.	Obtenção de derivados semissintéticos de artepeilin C e bacarina oriundos da própolis verde e avaliação de suas atividades biológicas		Doutorado FCFRPUSP 2022
---------------------	--	--	-------------------------------

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

Rodrigues, Débora Munhoz

Obtenção de derivados semissintéticos de artepelin C e bacarina oriundos da própolis verde e avaliação de suas atividades biológicas.
Ribeirão Preto, 2022.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Bastos, Jairo Kenupp.

- | | |
|-------------------------|--------------------------------------|
| 1. Propolis verde | 2. Derivados prenilados |
| 3. Efeitos antitumorais | 4. Semissíntese de produtos naturais |

FOLHA DE APROVAÇÃO

Débora Munhoz Rodrigues

Obtenção de derivados semissintéticos de artepelin C e bacarina oriundos da própolis verde e avaliação de suas atividades biológicas.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Aos Meus Amados Pais

Ailton Rodrigues e Rosa Munhoz, que me apoiam incondicionalmente na minha escolha profissional, que é fazer pesquisa. Pais exemplos de simplicidade e felicidade, que sempre me incentivam pela busca do conhecimento e da evolução como pessoa. Quero agradecer as palavras e os conselhos sábios de ambos, que me ensinam diariamente a olhar o lado lindo e belo da vida e de ser humano.

Ao Meu Irmão

Renan Munhoz, grande conselheiro que amplia a minha visão para as possibilidades, sempre sensato, lucido e prático. Obrigada meu irmão por me completar e, apesar da distância, sempre se fazer presente.

Agradecimentos Especiais

Ao Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

Por me orientar como aluna de doutorado e compartilhar conhecimentos para que eu pudesse aprender tanto profissionalmente, na química de produtos naturais, quanto pessoalmente, na filosofia de vida e experiência de mundo. Agradecer imensamente pela paciência, pelo apoio e confiança nessa trajetória desafiadora.

À Profa. Dr.a Vanessa Leiria Campo

Pela coorientação e participação ativa nos experimentos de síntese orgânica, tornando o desenvolvimento desse projeto possível. Obrigada pelas conversas, experiências e conhecimentos compartilhados, além é claro, do apoio e confiança durante esses anos.

Agradecimentos

- ❖ Aos técnicos de Laboratório de Farmacognosia, Mario Ogasawara e Maria Angelica Chellegatti que sempre ajudam os pós-graduandos em nosso dia-a-dia de laboratório com muito carinho e dedicação;
- ❖ Aos amigos de laboratório pela convivência, colaborações e aprendizado diário, obrigada amigos: Fernando, Gabriel, Aline, Jennyfer, Victor, Adriany, Valdeline, João, Luciana, Yasmine e Beatriz;
- ❖ À amiga Gisele Bulhões Portapilla pela colaboração e ensinamentos nos ensaios antimutagênicos realizados no laboratório de Parasitologia do Prof. Dr. Sergio de Albuquerque.
- ❖ Ao amigo Guilherme Martins Silva pelas análises *in silico* realizadas em colaboração com o laboratório de Química Medicinal do Prof. Dr. Carlos Henrique Tomich De Paula Da Silva.
- ❖ À colaboradora Andressa Duarte pela colaboração nos ensaios de clonogenicidade realizados na FMRP no departamento de Patologia e Medicina Forense.
- ❖ Ao técnico Vinicius Palaretti do departamento de química da FFCLRP-USP pelas análises de RMN;
- ❖ Ao técnico Jose Carlos Tomaz e Luiz Fernando Da Silva do departamento de química da FCFRP-USP pelas análises de espectrometria de massas;
- ❖ A Faculdade de Ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto e à Universidade de São Paulo pela infraestrutura usufruída;
- ❖ Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, aos funcionários e professores da unidade pela colaboração;
- ❖ À FAPESP, pelo apoio financeiro ao projeto temático #2017/04138-8;
- ❖ Aos funcionários e ao Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, por toda infraestrutura na realização do curso de Doutorado;
- ❖ O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Nunca considere o estudo como um dever, mas como uma oportunidade para penetrar no maravilhoso mundo do saber”

Albert Einstein

RESUMO

Rodrigues, D. M. **Obtenção de derivados semissintéticos de artepelin C e bacarina oriundos da própolis verde e avaliação de suas atividades biológicas.** 2022. 130f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Baccharis dracunculifolia, planta nativa brasileira conhecida popularmente como “alecrim do campo”, é a principal fonte botânica para a produção de própolis verde, a qual possui composição química complexa, rica em derivados prenilados do ácido-*p*-cumárico, como a drupanina, o artepillin C e a bacarina. Importantes atividades biológicas têm sido atribuídas a estes derivados, despertando, portanto, tanto o interesse nacional quanto internacional. Assim, com objetivo de aumentar as possibilidades no desenvolvimento de novos fármacos de origem natural, propôs-se a obtenção de derivados semissintéticos da drupanina, artepelin C e da bacarina, visando potencializar as atividades biológicas relatadas para estes compostos, com destaque para as seguintes atividades: antiproliferativa, inibidora da enzima AKR1C3, antimicrobiana e antiparasitária. Os compostos fenólicos prenilados da própolis verde foram obtidos a partir de extratos hidroalcoólicos, utilizando-se cromatografia em coluna aberta (CLV) e cromatografia de contracorrente de alta velocidade (HSCCC). Posteriormente, foram obtidos derivados semissintéticos multivalentes da drupanina, artepelin C e bacarina, assim como derivados amídicos, via acoplamento com cinco aminoácidos diferentes. Foram obtidos ao todo vinte e oito estruturas químicas derivadas dos produtos naturais, as quais foram purificadas e elucidadas por análises de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , bem como de Espectrometria de Massas (ESI-MS). Os testes antitumorais indicaram que os compostos derivados de aminoácidos (**4**, **14**, **16**, **17**, **18**, **24** e **26**) foram considerados os derivados mais promissores com atividade antiproliferativa contra a linhagem tumoral de mama hormônio dependente MCF-7. O derivado da drupanina **18** forneceu a melhor concentração inibitória em linhagens de carcinoma ($\text{IC}_{50} = 9,6 \pm 3,2 \mu\text{M}$) e índice de seletividade de 5,5 nos ensaios com MCF-7, indicando baixa toxicidade e alta seletividade. Além disso, as simulações de *docking* revelaram que o composto **18** apresentou interações de *docking* coerentes, bem como fortes interações dentro do sítio ativo da AKR1C3.

Palavras-chave: Própolis verde, Derivados prenilados, Efeitos antitumorais e Semissíntese de produtos naturais.

ABSTRACT

Rodrigues, D. M. **Development and biological evaluation of artepillin C and baccharin semisynthetic derivatives from Brazilian green propolis.** 2022. 130f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Baccharis dracunculifolia, a Brazilian native plant popularly known as “alecrim do campo”, is the primary botanical source in green propolis production, which has a complex chemical composition rich in prenylated *p*-coumaric acid derivatives, such as drupanin, artepillin C, and baccharin. Twenty-eight chemical structures derived from natural products were obtained, purified and elucidated by Nuclear Magnetic Resonance analyses (¹H e ¹³C NMR) as well as Mass Spectrometry (ESI-MS). Important biological activities have been attributed to these derivatives, arousing national and international interest. It was obtained semisynthetic derivatives of drupanin, artepillin C, and baccharin, aiming to potentiate the biological activities reported for these compounds, mainly antiproliferative, AKR1C3 enzyme inhibitor, antimicrobial and antiparasitic. Prenylated phenolic compounds of green propolis were obtained from propolis hydroalcoholic extract using open-column chromatography and high-speed countercurrent chromatography (HSCCC), as well as high-performance preparative liquid chromatography (HPLC-DAD). Subsequently, multivalent semisynthetic derivatives of artepillin C, baccharin, and amide derivatives were synthesized via coupling with five different amino acids. The antiproliferative assays showed that the amino acid derivatives (**4**, **14**, **16**, **17**, **18**, **24**, and **26**) were the most promising compounds against the hormone-dependent breast tumor cell lines, MCF-7. The drupanin derivative **18** was the most active compound with the best half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀= 9.6 ± 3.2 μM) and selectivity index (5.5) against MCF-7 cells, indicating low toxicity and high selectivity. Furthermore, docking simulations revealed that compound **18** showed coherent docking interactions and strong interactions within the active site of AKR1C3.

Keywords: Green propolis, Prenylated derivatives, Antitumor activities, Semisynthesis from natural products.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Gráfico de pizza com a distribuição da incidência e da mortalidade dos 10 tipos de cânceres mais comuns no mundo todo em 2018, A) homens e B) mulheres. Fonte: Bray, et.al., 2018..... 3
- Figura 2.** Foto, A: Alecrim do Campo (*Baccharis dracunculifolia*), B: Apis Mellifera na coleta de resina, C: Faixas de Própolis verde na colmeia. 4
- Figura 3.** Substâncias aromáticas preniladas presentes na própolis verde. A) artepelin C, B) drupanina, C) bacarina. 5
- Figura 4.** Rota biossintética da formação dos compostos aromáticos prenilados que consiste do acoplamento da via do chiquimato com a do isoprenóide. A via do isoprenóide consiste em duas vias, a via mevalonato (MVA) e a via metil eritritol fosfato (MEP). IPP: isopentenil pirofosfato; DMAPP: dimetilalil pirofosfato. Fonte: Yazaki, et. al., 2009..... 6
- Figura 5.** (A) Geração de regioisômeros 1,4- e 1,5-dissubstituídos usando reações de alta temperatura, (B) Representação da reação química de clique. Fonte: Aragão-Leoneti, et. al., 2010. 10
- Figura 6.** Relação isostérica entre trans-amida e 1,4-dissubstituído 1,2,3-triazol. Fonte:Tautz, et. al. 2019. 11
- Figura 7.** Classificação dos aminoácidos. A) aminoácidos não carregados com cadeias polares; B) aminoácidos não carregados com cadeias apolares; C) aminoácidos com cadeias carregadas. Fonte: Brasilescola..... 12
- Figura 8.** Cromatogramas dos extratos hidroalcoólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE – DAD). A: própolis verde; B: folhas de *Baccharis dracunculifolia*. Eluição: drupanina - 27,3 min; artepelin C - 53,9 min; bacarina - 57,7 min. 51
- Figura 9.** Cromatogramas das frações reunidas (R11, R12 e R14) por cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC) das folhas de *B. dracunculifolia*. Eluição: drupanina - 27,3 min; artepelin C – 54,0 min; bacarina – 57,6 min. 53
- Figura 10.** Cromatogramas das frações reunidas (R2-R11) por cromatografia líquida a vácuo (CLV) da própolis verde. Eluição: drupanina – 26,9 min; artepelin C - 53,9 min; bacarina – 57,7 min. 56
- Figura 11.** Cromatogramas das frações reunidas (R4 – R7) por cromatografia líquida a vácuo (CLV) do extrato das folhas de *B. dracunculifolia*. Eluição: artepelin C - 53,9 min; bacarina – 57,7 min. 57

- Figura 12.** Cromatogramas das substâncias isoladas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE – DAD). A: drupanina – 26.4 min; B: artepelin C– 54.1 min; C: bacarina – 57,8 min. 58
- Figura 13.** Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H dos produtos naturais, drupanina (A), artepelin C (B) e bacarina (C), (CD_3OD , 300 MHz). 59
- Figura 14.** Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H do dímero triazólico protegido do artepelin C 1, em 300 MHz, CDCl_3 64
- Figura 16.** Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H do dímero triazólico protegido da bacarina 5, em 300 MHz, CDCl_3 65
- Figura 17.** Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H do dímero triazólico desprotegido do artepelin C 2, em 300 MHz, MeOD_4 67
- Figura 18.** Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H do acoplamento do artepelin C com a fenilalanina 7, em 300 MHz, CDCl_3 70
- Figura 19.** Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H do acoplamento da drupanina com o triptofano 15, em 300 MHz, CDCl_3 71
- Figura 20.** Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H do acoplamento da bacarina com a serina 24, em 300 MHz, CDCl_3 71
- Figura 21.** Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H do acoplamento do artepelin C com a fenilalanina desprotegida 10, em 300 MHz, CDCl_3 73
- Figura 22.** Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H do acoplamento do artepelin C com a lisina desprotegida 13, em 500 MHz, MeOD_4 75
- Figura 23.** Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H do acoplamento da drupanina com a lisina desprotegida 23, em 500 MHz, MeOD_4 75
- Figura 24.** Curva ROC gerada, com $\text{AUC} = 0,701$, para conjunto de dados de 26 compostos e valores de similaridade correspondentes (modelo RDKit 2D *fingerprint*) e atividades binárias experimentais. 83
- Figura 25.** Resultados obtidos usando o protocolo de *docking* ‘com’ restrições, desenvolvido no Glide. Em (a), *redocking* do ligante nativo FLF no sítio da AKR13C (1S2C.pdb), onde a pose cristalográfica original é representada em rosa e a melhor pose de *docking* obtida em salmão. Em (b), a pose de *docking* da bacarina (em azul claro) obtida ‘com’ restrição. Ambas as imagens foram preparadas usando o software Pymol. 86
- Figura 26.** Resultados obtidos usando o protocolo de *docking* ‘sem’ restrições, desenvolvido em Glide. Em (a), *redocking* do ligante nativo FLF dentro de AKR13C

(1S2C.pdb), onde a pose cristalográfica original é representada em rosa e a melhor pose de *docking* obtida em amarelo. Em (b), a pose de *docking* da bacarina (em azul claro) obtida 'sem' restrição. Ambas as imagens foram preparadas usando o software Pymol. 87

Figura 27. (a, c) Representação 3D das poses de *docking* dos compostos 18 e 26, respectivamente, e as interações correspondentes na enzima AKR1C3 (1S2C.pdb); as ligações de hidrogênio são mostradas em amarelo, enquanto *pi-pi* são mostradas em azul. As figuras foram preparadas usando o software Pymol (SCHRÖDINGER LLC., 2010). (b, d) Diagrama de interação 2D dos compostos 18 e 26, respectivamente, ligações de hidrogênio (em rosa) e interações *pi-pi* (em verde). As figuras foram preparadas usando o software Maestro (SCHRÖDINGER, 2020). 88

Figura 28. Curvas ROC e respectivos valores de AUC obtidos para os alvos AKR1C3 (0,720 em azul), BET (0,560 em laranja), GRP78 (0,464 em verde), MDM2 (0,530 em vermelho) e mTOR (0,304 em roxo), a partir dos resultados de pontuação de *docking* e atividades binárias dos derivados sintetizados. 90

Figura 29. Validação *redocking* de cada protocolo de *docking* empregado no *Glide* para as seguintes estruturas/alvos enzimáticos e respectivos ligantes nativos: (a) BET (6P05.pdb), (b) GRP78 (3LDP.pdb), (c) MDM2 (4ERE.pdb), e (d) mTOR (4JT6.pdb). Os respectivos valores RMSD são mostrados em cada figura. A pose original (cristalográfica) dos ligantes nativos é mostrada em rosa, enquanto as cores amarelo-laranja representam suas poses mais bem pontuadas. As figuras foram preparadas usando o software Maestro. 91

Lista de Tabela

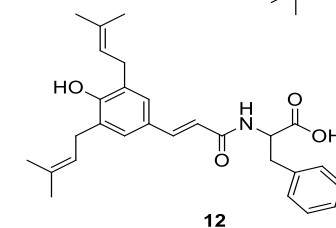
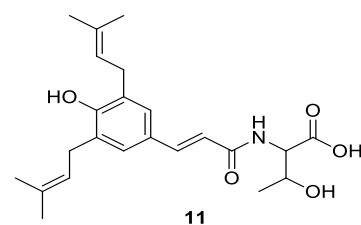
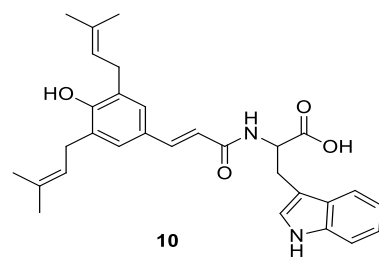
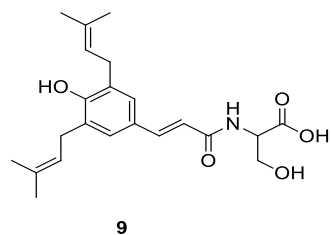
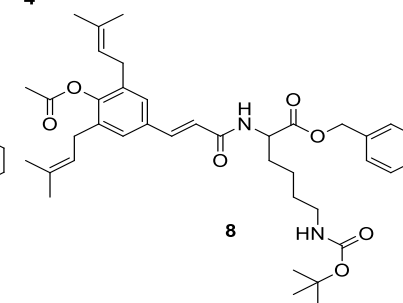
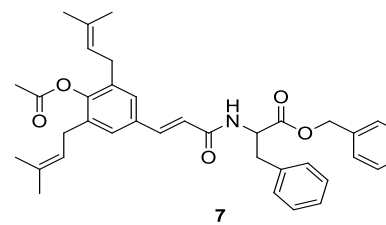
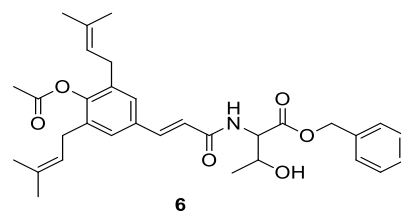
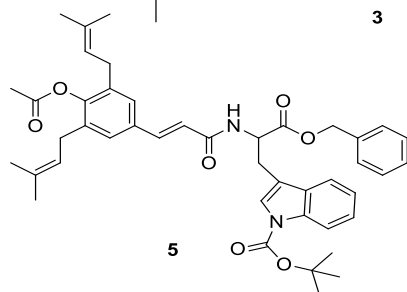
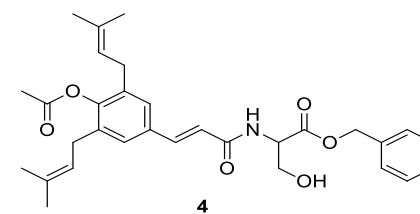
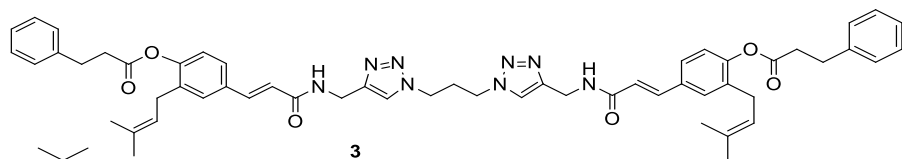
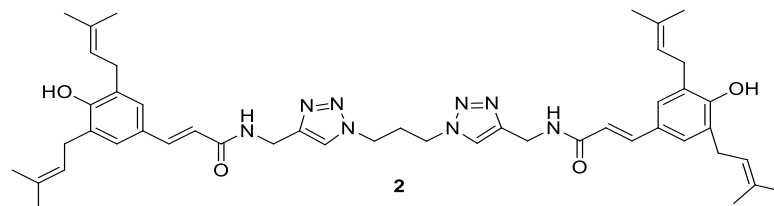
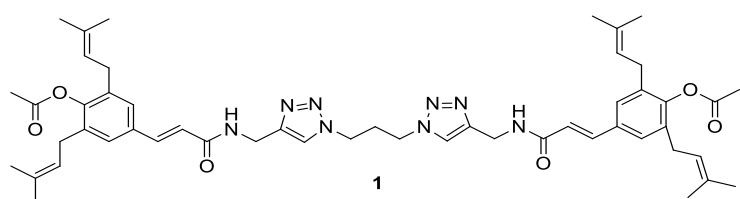
Tabela 1. Eluição por gradiente da HSCCC	16
Tabela 2. Eluição por gradiente da CLV (cromatografia líquida à vácuo)....	17
Tabela 3. Parâmetros utilizados na eluição por gradiente no CLAE-UV preparativo.	18
Tabela 4. Parâmetros utilizados na eluição por gradiente no CLAE-DAD analítico.....	18
Tabela 5. Frações obtidas por cromatografia contracorrente de alta velocidade do extrato das folhas de <i>Baccharis dracunculifolia</i>	52
Tabela 6. Frações obtidas por cromatografia líquida a vácuo do extrato de própolis verde.....	54
Tabela 7. Frações obtidas por cromatografia líquida a vácuo do extrato das folhas de <i>B. dracunculifolia</i>	56
Tabela 8. Concentração inibitória de 50% em linhagens de carcinoma (IC ₅₀), concentração citotóxica de 50% em linhagens não-tumorais (CC ₅₀) e índice de seletividade (SI) determinados pelo tratamento das linhagens de carcinoma e normais com os derivados do artepelin C, drupanina e bacarina.	78
Tabela 9. Concentração inibitória de 50% em linhagens de carcinoma (IC ₅₀), concentração citotóxica de 50% em linhagens não-tumorais (CC ₅₀) e índice de seletividade (SI) determinados pelo tratamento das linhagens de carcinoma e normais com os derivados do artepelin C, drupanina e bacarina.	79
Tabela 10. Inibição das formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> e citotoxicidade sobre as células de mamíferos LLC-MK2 dos precursores e derivados sintetizados.....	80
Tabela 11. Avaliação antimicrobiana dos precursores e dos derivados sintetizados.	81
Tabela 12. Divisão/seleção de compostos do conjunto de dados de 26 derivados sintetizados e aqueles mais similares à bacarina, de acordo com o modelo de RDKit 2D <i>fingerprint</i> desenvolvido, usando a nota de corte de 52%.	84
Tabela 13. Dados de predição de alvo obtidos a partir do site PPB para os sete compostos selecionados, considerando valores de atividade (IC ₅₀ em µM dos ensaios com MCF-7) e similaridade ⁴ com a bacarina.	85

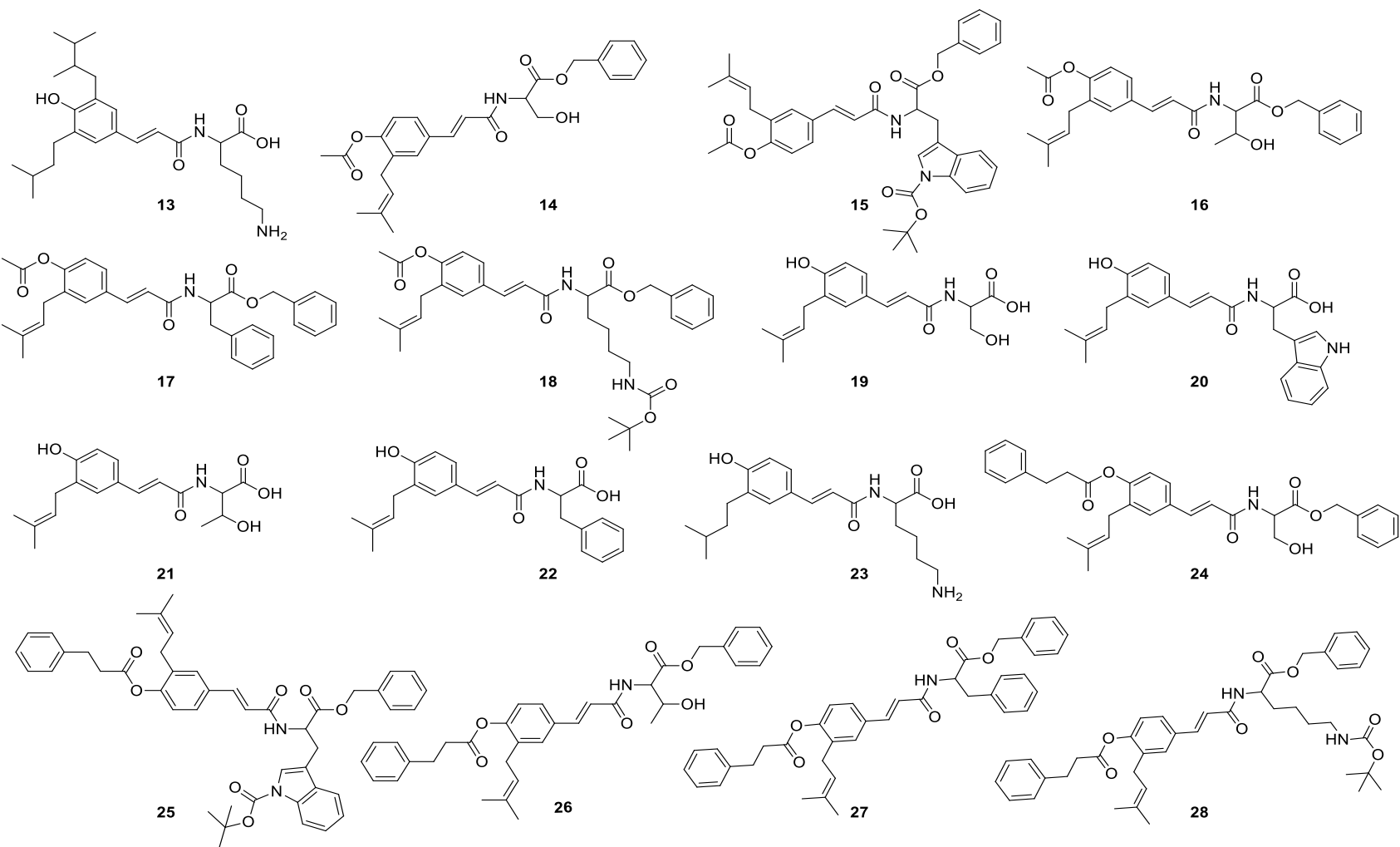
Tabela 14. Valores de pontuação-score de *docking* obtidos para os derivados, usando o software Glide e os respectivos protocolos de *docking* aplicados aos 5 alvos diferentes. 89

Lista de Esquemas

- Esquema 1.** Retrossíntese dos dímeros triazólicos 1-3 utilizando como material de partida propargil-artepelin C 31 / propargil-bacarina 32 e di-azido propano 33. 60
- Esquema 2.** (A) Síntese dos derivados propargil-artepelin C 31 e propargil-bacarina 32. (B) Síntese do derivado di-azido propano 33; 61
- Esquema 3.** Mecanismo da reação de acoplamento envolvendo a utilização do reagente PyBOP/HOBt. 62
- Esquema 4.** Reação de “click chemistry” para obtenção dos dímeros triazólico protegidos de artepelin C 1 e bacarina 3. 62
- Esquema 5.** Mecanismo da reação de “Click Chemistry” catalisada por Cu(I)-CuAAC, utilizando o sistema catalítico CuSO₄/ ascorbato de sódio. 63
- Esquema 6.** Reação de hidrólise básica dos dímeros triazólicos do artepelin C 2 e da drupanina 4. 66
- Esquema 7:** Reação de O-benzilação e desproteção do grupo *N*-Fmoc dos cinco aminoácidos selecionados. 68
- Esquema 8:** Síntese dos derivados de aminoácidos do artepelin C 4-8, drupanina 14-18 e bacarina 24-28 por reações de acoplamento. 69
- Esquema 9:** Desproteção dos derivados de aminoácidos do artepelin C 9-12, 39 e da drupanina 19-22, 40 por reações de hidrólise promovida por base. 72
- Esquema 10.** Desproteção do derivado do aminoácido lisina com artepelin C 13 e drupanina 23 por reação em meio ácido. 74

Derivados sintetizados





SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Figuras.....	iii
Lista de Tabela.....	vii
Lista de Esquemas	viii
Derivados sintetizados.....	ix
1.0. Introdução	1
1.1. Produtos Naturais e Derivados	1
1.2. Cânceres de próstata e de mama.....	2
1.3. Própolis verde	3
1.3.1. Atividade antimicrobiana e antiparasitária	6
1.3.2. Atividade antitumoral.....	7
1.4. Estratégias de Semissíntese	8
1.4.1. Formação de Dímeros Triazólicos.....	8
1.4.2. Acoplamento com Aminoácidos	11
2.0. Objetivos	14
2.1. Objetivo geral	14
2.1.1. Objetivos Específicos.....	14
3.0. Material e Métodos	15
Isolamento dos Produtos Naturais	15
3.1. Isolamento da drupanina, artepelin C e bacarina.....	15
3.1.1. Obtenção do extrato hidroalcoólico da própolis verde e das folhas da <i>Baccharis dracunculifolia</i>	15
3.1.2. Fracionamento do extrato hidroalcoólico por cromatografia contracorrente de alta velocidade	15
3.1.3. Fracionamento do extrato hidroalcoólico por cromatografia líquida a vácuo.....	16
3.1.4. Isolamento e análise das substâncias por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	17
Semissíntese dos Derivados de Produtos Naturais	19
3.2. Semissíntese dos derivados de artepelin C, bacarina e drupanina.....	19
3.2.1. Aparelhagem analítica	19
3.2.2. Compostos sintetizados	19
3.2.2.1. Acetilação do artepelin C e da drupanina	19
3.2.2.2. Síntese dos derivados triazólicos do artepelin C e da bacarina	20

3.2.2.3. Síntese dos derivados amídicos do artepelin C, drupanina e da bacarina.....	24
Avaliação Biológica dos Derivados de Produtos Naturais.....	42
3.3. Avaliação biológica dos derivados de drupanina, artepelin C e bacarina....	42
3.3.1. Ensaio antitumorais.....	42
3.3.1.1. Linhagens de células tumorais e normais	42
3.3.1.2. Avaliação antitumoral <i>in vitro</i> dos derivados semissintéticos	42
3.3.2. Ensaio antiparasitários	43
3.3.2.1. Cultura de <i>Trypanosoma cruzi</i>	43
3.3.2.2. Avaliação tripanocida <i>in vitro</i> dos derivados semissintéticos	44
3.3.2.3. Avaliação da citotoxicidade em LLC-MK ₂ dos derivados semissintéticos.....	44
3.3.3. Ensaio antimicrobianos	45
Estudos <i>in silico</i> dos Derivados de Produtos Naturais	47
3.4. Análises <i>in silico</i> dos derivados de drupanina, artepelin C e bacarina	47
3.4.1. Predição de alvos.....	47
3.4.2. Modelo de similaridade por 2D <i>fingerprint</i>	47
3.4.3. Estudo de <i>docking</i> – desenvolvimento e validação	47
3.4.4. Estudos de <i>docking</i> com outros alvos enzimáticos	49
4. Resultados e Discussão	51
Isolamento dos Produtos Naturais	51
4.1. Isolamento do artepelin C, drupanin e bacarina.....	51
4.1.1. Obtenção do extrato hidroalcoólico da própolis verde e de <i>Baccharis dracunculifolia</i>	51
4.1.2. Fracionamento do extrato hidroalcoólico por cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC)	51
4.1.3. Fracionamento do extrato hidroalcoólico por cromatografia líquida a vácuo (CLV).....	53
4.1.4. Isolamento e análise das substâncias por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	57
Semissíntese dos Derivados de Produtos Naturais	60
4.2. Semissíntese dos derivados de artepelin C, drupanina e bacarina.....	60
4.2.1. Obtenção dos dímeros triazólicos do artepelin C, drupanina e bacarina.....	60
4.2.2. Obtenção dos derivados de aminoácidos do artepelin C, drupanina e bacarina.....	67
Avaliação Biológica dos Derivados de Produtos Naturais.....	76
4.3. Avaliação biológica dos derivados de artepelin C, drupanina e bacarina....	76

4.3.1.	Avaliação da atividade antitumoral.....	76
4.3.2.	Avaliação da atividade antiparasitária	80
4.3.3.	Avaliação da atividade antimicrobiana	81
	Estudos <i>in silico</i> dos Derivados de Produtos Naturais	82
4.4.	Análises <i>in silico</i> dos derivados de artepelin C, drupanina e bacarina	82
4.4.1.	Estudos de <i>docking</i> com a enzima AKR1C3	85
4.4.2.	Estudos de <i>docking</i> com outros alvos enzimáticos	89
5.0.	Considerações Finais.....	92
6.0.	Referências	94
7.0.	Apêndices	103
7.1.	Espectros de RMN de ¹ H e ¹³ C dos derivados semissintéticos	103

1.0. Introdução

1.1. Produtos Naturais e Derivados

Os produtos naturais e seus metabolitos secundários possuem uma forte tradição na química medicinal e na descoberta de novas drogas, uma vez que são considerados fontes valiosas tanto pela singularidade das moléculas, conferindo geometrias únicas, quanto pelos diversos mecanismos de ação que exercem (RODRIGUES et al., 2016).

A diversidade química dos metabolitos secundários produzido pelos micro-organismos, animais e plantas é surpreendente, com o benefício de centenas de milhões de anos de evolução, sob estresses bióticos e abióticos, otimizados para fins biológicos específicos. Sendo assim, a exploração destes produtos naturais com farmacóforos biologicamente ativos são ponto de partida validados biologicamente para o desenvolvimento de novos medicamentos (LI; LOU, 2018; WRIGHT, 2019).

Nos últimos 20 anos, cerca de um terço dos medicamentos aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) são baseados em produtos naturais ou derivados destes, especialmente como agentes antineoplásicos e antimicrobianos. Alguns exemplos de fármacos descobertos a partir de produtos naturais eficazes no tratamento de doenças e que estão disponíveis em hospitais e clínicas são, os anticânceres como Taxol (*Taxus brevifolia*) e Vinblastina (*Catharanthus roseus*), e os antimaláricos como o quinino (*Cinchona* spp.) e Artemisinina (*Artemisia annua*) (THOMFORD et al., 2018).

Destes medicamentos aprovados pelo FDA a grande maioria é derivada de produtos naturais, com *core* estrutural semelhante, sendo apenas uma pequena parte propriamente de produtos naturais ou misturas botânicas. Os derivados dos produtos naturais são produzidos frequentemente por semissíntese, sendo o produto natural produzido por micro-organismos ou extraído de plantas, o qual posteriormente será quimicamente modificado para melhorar as propriedades terapêuticas (EHRENWORTH; PERALTA-YAHYA, 2017).

Com este objetivo, diversos processos químicos baseiam-se na otimização desses derivados para aumentar a eficácia, diminuir a toxicidade e melhorar as propriedades farmacocinéticas do produto natural original. Recentes estratégias biológicas e químicas têm oferecido oportunidades únicas na construção de diversas

bibliotecas de derivado de produtos naturais para descoberta de novos medicamentos. Assim, há uma necessidade significativa de obter maior diversificação estrutural seja isolando os recursos naturais ou gerando-os em manipulações químicas ou genéticas (DECORTE, 2016; LI; LOU, 2018).

1.2. Cânceres de próstata e de mama

O câncer é uma doença crônica caracterizada pelo desenvolvimento de células anormais que se espalham e destroem os tecidos normais do corpo. É uma doença de alto risco e é a segunda principal causa de morte em todo o mundo. Segundo as estatísticas dos Estados Unidos, em 2018, os novos casos de câncer foram de cerca de 1,73 milhão, com mais de 609.000 mortes (MBESE; KHWAZA; ADERIBIGBE, 2019).

Uma análise dos dados clínicos de 45 países mostrou que nos homens, o câncer de próstata tem a segunda maior incidência, e que nas mulheres, o câncer de mama ocupa o primeiro lugar em mortalidade e incidência, compreendendo 13,5% e 24,2% de todos os cânceres, respectivamente (ZIMTA et al., 2019).

No mundo todo, estima-se que o câncer de mama representa 1 em cada 4 casos de cânceres entre as mulheres, e que seja a principal causa de morte em mais de 100 países. Já o câncer de próstata, apesar de ser classificado como o segundo câncer mais frequente, possui menor índice de mortalidade quando comparado ao câncer de mama, sendo a quinta causa principal de morte por câncer em homens, Figura 1 (BRAY et al., 2018).

Neste contexto, estudos recentes indicam promissoras terapias anticâncer com compostos naturais. Os produtos naturais isolados de plantas medicinais têm sido utilizados como tratamento de diversas doenças ao longo dos anos, e se destacam pela singularidade tanto das moléculas quanto dos mecanismos de ação, tornando-os importantes na descoberta de novos e potenciais agentes terapêuticos (DUTTA et al., 2019).

Além disso, crescentes ameaças de cânceres resistentes a medicamentos indicam que há uma necessidade urgente de melhoria ou desenvolvimento de agentes anticânceres mais eficazes (MBESE; KHWAZA; ADERIBIGBE, 2019). Assim, a busca por compostos químicos oriundo de produtos naturais ou derivados destes, constitui-se como uma fonte significativa para a descoberta de novos fármacos, uma vez que

fornecem moléculas singulares na terapêutica contra diversas doenças humanas (HE et al., 2019).

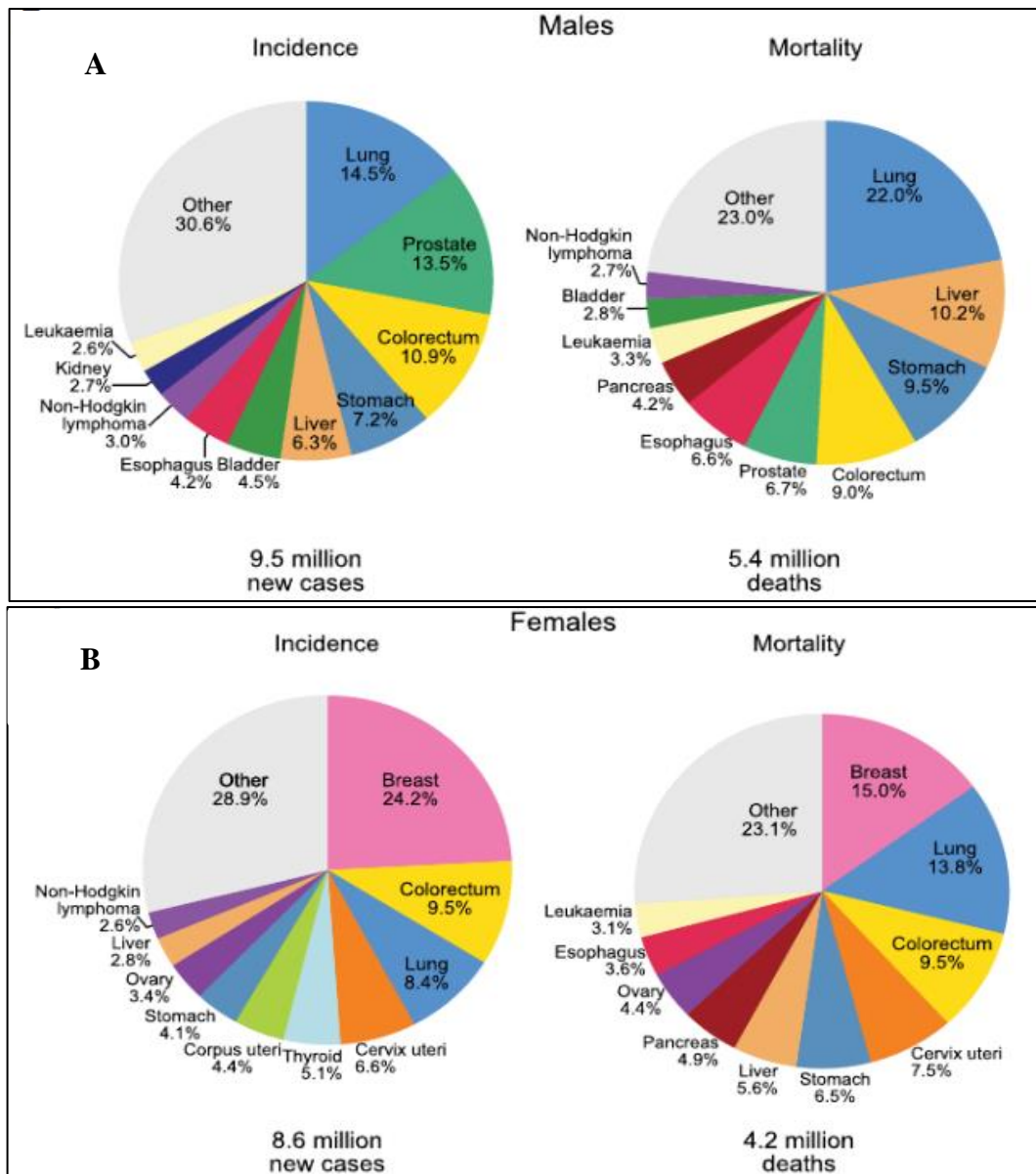


Figura 1. Gráfico de pizza com a distribuição da incidência e da mortalidade dos 10 tipos de cânceres mais comuns no mundo todo em 2018, A) homens e B) mulheres. Fonte: Bray, et.al., 2018.

1.3. Própolis verde

A própolis é um produto natural produzido pelas abelhas a partir de material vegetal de diversas plantas. Esse material vegetal composto por fragmentos vegetativos (brotos e folhas jovens) e exsudatos de plantas é transportado à colmeia e transformado,

a partir de ações enzimáticas das abelhas, no material resinoso denominado própolis (do grego "pro"- em favor de e "polis"- cidade), (SALATINO et al., 2005).

Na colmeia a própolis possui várias funções, desde o preenchimento de frestas, para manutenção da temperatura, até a mumificação de insetos e de outros invasores, para proteção da colmeia contra micro-organismos (BROWN, 1989; SIMONE-FINSTROM; SPIVAK, 2010). A própolis é composta majoritariamente de resina, compreendendo 50% de todo material, assim como, de 30% de ceras, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de compostos orgânicos (SEPÚLVEDA et al., 2019).

É possível encontrar em território brasileiro diversos tipos de própolis, as quais variam principalmente de tonalidades marrom escuro, esverdeado e marrom avermelhado. Essa diversidade nas tonalidades de própolis brasileiras se deve ao processo de produção da própolis, que depende principalmente da fonte botânica, ou seja, da flora de cada região (PARK et al., 2004; SEPÚLVEDA et al., 2019).

A própolis brasileira denominada de “própolis verde” é produzida pela abelha nativa brasileira (*Apis Mellifera*) majoritariamente a partir da resina esverdeada da espécie botânica *Baccharis dracunculifolia*, popularmente conhecida como alecrim-do-campo, arbusto amplamente distribuído no cerrado brasileiro, especialmente nos estados de São Paulo e Minas Gerais, Figura 2, (RODRIGUES et al., 2019).

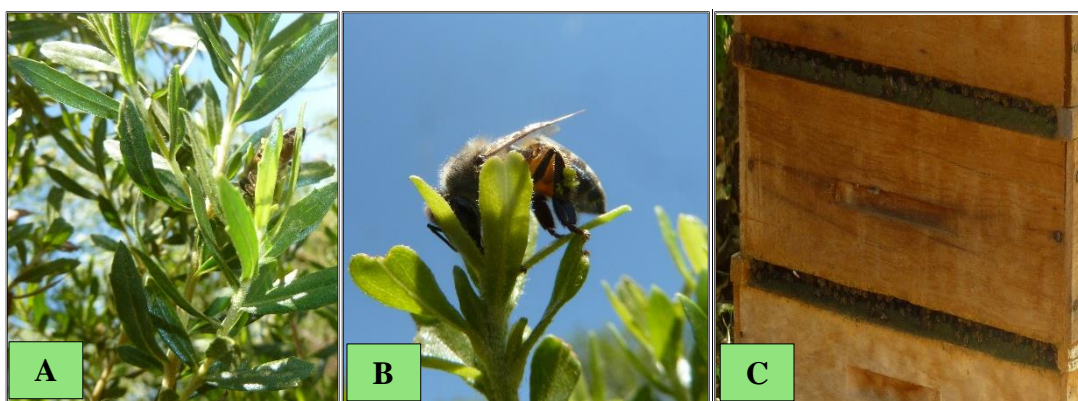


Figura 2. Foto, **A:** Alecrim do Campo (*Baccharis dracunculifolia*), **B:** *Apis Mellifera* na coleta de resina, **C:** Faixas de Própolis verde na colmeia.

A própolis verde tem atraído o interesse internacional, principalmente o interesse do mercado asiático e europeu, por ser rica em derivados prenilados do ácido cinâmico, tais como, o artepelin C (ácido 3,5-diprenil-4- hidroxicinâmico), drupanina (ácido 3-prenil-

4- hidroxicinâmico e a bacarina (ácido 3-prenil-4-diidrocinaoiloxi-cinâmico), Figura 3, (SAWAYA; BARBOSA DA SILVA CUNHA; MARCUCCI, 2011).

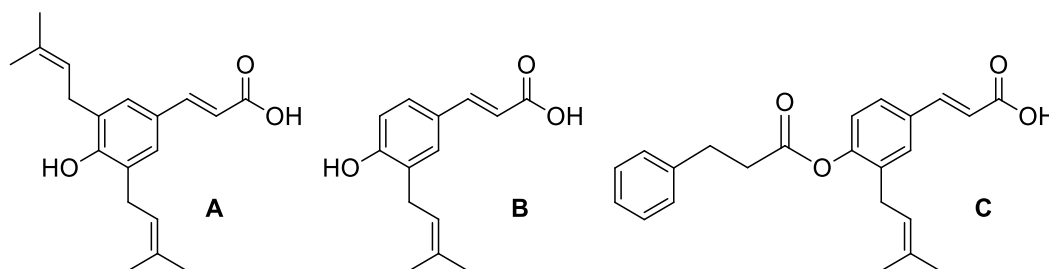


Figura 3. Substâncias aromáticas preniladas presentes na própolis verde. A) artepelin C, B) drupanina, C) bacarina.

Estes compostos aromáticos, contendo resíduos de isoprenos, são resultantes da junção de duas importantes rotas biossintéticas no metabolismo secundário de plantas, tais como a rota do chiquimato e do mevalonato. Os ácidos cinâmicos, por exemplo, são os precursores de um vasto número de compostos aromáticos, classificados como fenilpropanoides, originados a partir da perda da molécula de amônia do aminoácido fenilalanina, da rota biossintética do ácido chiquímico. Já a formação dos resíduos de isoprenos, unidades compostas de cinco átomos de carbono, consistem da via do mevalonato, formado pela condensação de uma unidade de acetoacetil-CoA com uma molécula de acetil-CoA, Figura 4, (DE; BALTAS; BEDOS-BELVAL, 2011; YAZAKI; SASAKI; TSURUMARU, 2009).

A presença majoritária de compostos prenilados na própolis verde quando comparada a própolis europeia, predominantemente composta por flavonoides, conferem à esta própolis brasileira características químicas peculiares, e que vêm demonstrando ao longo das pesquisas inúmeras atividades biológicas, sendo algumas delas, atividade antioxidante (COSTA et al., 2019), anti-inflamatória (DE FIGUEIREDO-RINHEL et al., 2018), antibacteriana (PEREIRA et al., 2016), imunomodulatória (BACHIEGA et al., 2013), antiparasitária (GRESSLER et al., 2012) e antimutagênica (ROBERTO et al., 2016).

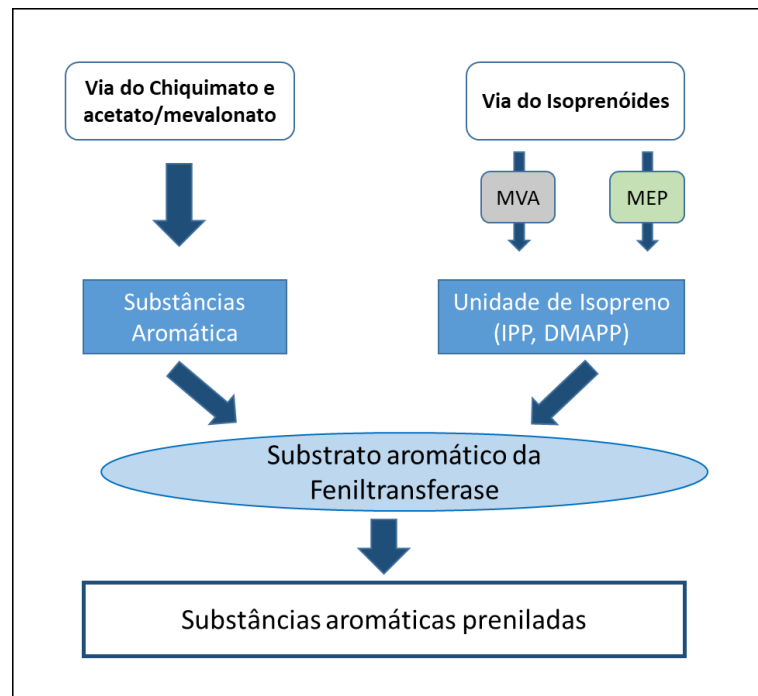


Figura 4. Rota biossintética da formação dos compostos aromáticos prenilados que consiste do acoplamento da via do chiquimato com a do isoprenóide. A via do isoprenóide consiste em duas vias, a via mevalonato (MVA) e a via metil eritritol fosfato (MEP). IPP: isopentenil pirofosfato; DMAPP: dimetilalil pirofosfato. Fonte: Yazaki, et. al., 2009.

1.3.1. Atividade antimicrobiana e antiparasitária

A própolis apresenta amplo espectro de ação frente as bactérias. Estudos relatam que as ações sinérgicas dos inúmeros componentes da própolis são responsáveis pelos efeitos bactericidas e bacteriostáticos observados. Os componentes da própolis, especialmente os derivados cinâmicos, podem agir de diversas maneiras para a morte bacteriana, tanto alterando a permeabilidade da membrana celular quanto a divisão e o funcionamento enzimático da bactéria (POBIEGA; GNIEWOSZ; KRAŚNIEWSKA, 2017).

A alta atividade antibacteriana expressa pela própolis verde pode ser atribuída à sua diferente composição química e à sua alta concentração de flavonoides e ácidos aromáticos (MACHADO et al., 2016). No entanto, estudos demonstram atividade bacteriana especialmente contra as bactérias gram-positivas, tais como, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* (SEIBERT et al., 2019). Em geral, as bactérias gram-positivas são mais suscetíveis aos extratos de própolis do que as bactérias gram-negativas. Há hipóteses de que os ácidos

fenólicos não consigam penetrar a membrana externa das bactérias gram-negativas, não atingindo, assim, o alvo desejado (TIVERON et al., 2016).

A ação do extrato de própolis verde, rico nos compostos bioativos derivados do ácido cinâmico, também demonstrou ação frente as formas epimastigotas e amastigotas de *Trypanosoma cruzi*, sendo as formas amastigotas intracelulares, mais suscetíveis ao extrato do que as epimastigotas (SALOMÃO et al., 2011). Relatos de atividades antiparasitárias também foram observadas frente as formas promastigotas *in vitro* de *Leishmania braziliensis* (PONTIN et al., 2008) e frente ao parasita *Trypanosoma evansi* (GRESSLER et al., 2012).

1.3.2. Atividade antitumoral

Diversos ensaios antitumorais, tanto *in vitro* como *in vivo*, com o extrato da própolis verde e com suas substâncias majoritárias já foram descritos na literatura (DE OLIVEIRA et al., 2014; SEPÚLVEDA et al., 2020). Os potenciais anticânceres da própolis são inúmeros e estes podem ser resumidos nos seguintes mecanismos possíveis: 1) supressão de células do câncer por meio do seu efeito imunomodulador. 2) diminuição da população de células-tronco cancerosas; 3) bloqueio específico na via de sinalização de oncogenes; 4) ação no efeito antiangiogênico; 5) modulação do microambiente tumoral e 6) como um tratamento adjunto ou complementar nas terapias anticâncer convencionais (CHAN; CHEUNG; SZE, 2013).

Um dos primeiros estudos acerca dos efeitos antiproliferativos dos compostos aromáticos prenilados da própolis verde, frente a células humanas tumorais de pulmão, sangue, mama e próstata, sugeriram que a ação citotóxica desses compostos prenilados frente às células tumorais não estariam ligados somente a expressão da proteína p53 na indução da apoptose, ao contrário da maioria dos medicamentos anticâncer que induzem efeitos genotóxicos e a expressão da p53 em células tumorais e que levam a morte celular apoptótica (MISHIMA et al., 2005).

Sugestões de mecanismos alternativos à expressão da p53 levou a descoberta posterior de que estes compostos prenilados da própolis verde estariam também ligados à inibição da enzima AKR1C3, uma aldo-ceto redutase diretamente envolvida na biossíntese de testosterona e estrógeno e que se encontra superexpressa em tumores de próstata e mama hormônio dependentes (ENDO et al., 2012).

Estudos com o silenciamento do gene da AKR1C3 resultaram em uma inibição da progressão tumoral em células de câncer de mama e próstata, indicando que esta enzima participa do desenvolvimento tumoral, sendo considerada um importante alvo terapêutico no tratamento de cânceres de mama e próstata (ENDO et al., 2014). No entanto, apesar de inúmeros compostos terem surgido, a elevada similaridade da AKR1C3 com outras isoformas da AKR1C leva à dificuldade no desenvolvimento de inibidores seletivos à AKR1C3 (PIPPIONE et al., 2017).

Inibidores sintéticos da enzima AKR1C3 reportados recentemente na literatura têm demonstrado efeitos inibitórios não seletivos, inibindo também outras isoformas presentes no corpo humano, tais como, AKR1C1, AKR1C2 e AKR1C4, as quais desempenham papéis distintos no metabolismo dos hormônios esteroidais e ácidos biliares, o que pode causar sérios efeitos adversos (ZANG et al., 2015).

Ao contrário do descrito acima, os produtos naturais prenilados da própolis verde têm demonstrado alta seletividade inibitória para AKR1C3 em relação às demais isoformas, sendo estes também mais potentes, o que representa uma vantagem promissora para o desenvolvimento de novos inibidores citotóxicos frente às células tumorais, em especial o câncer de mama e de próstata (ENDO et al., 2014).

Neste contexto, propõe-se aumentar a variabilidade estrutural dos compostos ativos prenilados da própolis verde, visando atividades biológicas mais pronunciadas em comparação aos seus precursores naturais. Para tal, duas estratégias de síntese foram propostas, sendo a primeira, formação de dímeros triazólicos, e a segunda o acoplamento com diferentes aminoácidos. Estratégias que visam o desenvolvimento de inibidores mais potentes contra o câncer de mama e próstata, e o aumento das atividades biológicas antiparasitárias e antimicrobianas descritas.

1.4. Estratégias de Semissíntese

1.4.1. Formação de Dímeros Triazólicos

Enquanto os monômeros são encontrados em todas as fontes naturais, suas contrapartes diméricas formadas pelo acoplamento via ligações éster, éter, C-C, C-N e N-N são mais difíceis de serem encontradas (SAEED et al., 2018).

Alguns exemplos particulares de produtos naturais diméricos com propriedades promissoras são relatados na natureza. Um estudo de 2016 relatou pela primeira vez um isolado diéster do ácido hidróxi- β -truxínico (dímero do ácido cinâmico) a partir de planta

Eucommia ulmoides, que inibe o crescimento de células tronco tumorais (HUNKE et al., 2018). Outro exemplo é a classe de compostos fúngicos sorbicilinoídes (SIB; GULDER, 2017), como o tricodimerol e sorbicilina, que induzem a apoptose em linhagens de HL-60 (leucemia humana) (YAO et al., 2015), o bisorbicilinol com ação antialérgica e as sorbicilactonas A e B com atividades antivirais e neuroprotetoras (SUGAYA et al., 2019).

Estudos com compostos diméricos relatam que estes não apenas mantêm a atividade mostrada por seu monômero, como também podem aumentá-la, uma vez que possivelmente interagem com dois locais de ligação diferentes em um receptor ou em dois monômeros separados em uma proteína dimérica (PERTINO et al., 2013).

A síntese de derivados dímeros do ácido cinâmico, substância precursora dos composto prenilados da própolis verde, demonstraram efeitos antineoplásicos pronunciados contra o câncer de mama (linhagem MCF7 e MDA-MB-231) quando comparado aos seus respectivos monômeros (HUNKE et al., 2018). Além desse estudo, outros derivados triméricos e tetraméricos do ácido cinâmico e cafeico, também demonstraram, em comparação ao monômero, atividade antitumoral elevada frente a células de câncer de mama MCF-7 (DE; BALTAS; BEDOS-BELVAL, 2011).

Neste contexto, a estratégia da química moderna denominada de “click chemistry” se destaca na criação de blocos de construção unidos através de links de heteroátomos, com notável modularidade e diversidade. Este conceito de “click chemistry”, introduzido por Sharpless e colaboradores, foi atribuído às reações que seguiam os critérios, como: simples execução, altos rendimentos, seletividade e fácil remoção de subprodutos. (KOLB; FINN; SHARPLESS, 2001; MOSES; MOORHOUSE, 2007).

Uma reação que atende aos critérios de “click chemistry” é a reação de cicloadição 1,3-dipolar catalisada pelo Cu (I). Reações que necessitam a previa construção de dois blocos, o azido e o alcino terminal, gerando seletivamente o produto 1,2,3-triazólico. Os grupos azido e alcino além de serem inertes e estáveis na maioria das condições biológicas e orgânicas também têm a vantagem de serem facilmente introduzidos em moléculas orgânicas (BOCK; HIEMSTRA; VAN MAARSEVEEN, 2006).

Interessante notar que o uso de sais de Cu(I) como catalisadores para reações de cicloadição 1,3-dipolar gera apenas o isômero 1,4-triazólico, ao contrário da clássica reação pericíclica descrita durante um período de 40 anos, a qual origina 1,2,3 triazóis

como uma mistura de 1,4 e 1,5 regioisômeros substituídos (Figura 5), (ARAGÃO-LEONETI et al., 2010)

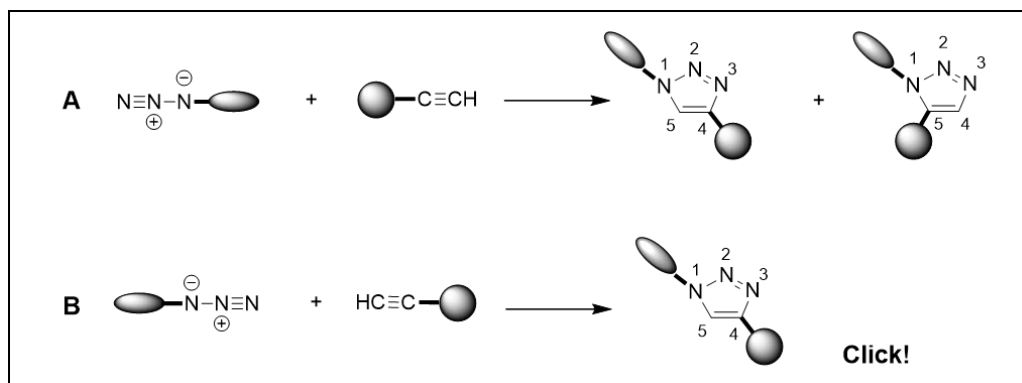


Figura 5: (A) Geração de regioisômeros 1,4- e 1,5-dissubstituídos usando reações de alta temperatura, (B) Representação da reação química de clique. Fonte: Aragão-Leoneti, et. al., 2010.

A inserção do heterocíclo de nitrogênio, como o anel 1,2,3-triazol, confere as moléculas propriedades físico-químicas desejáveis no desenvolvimento de fármacos. O anel 1,2,3-triazol desempenha papéis na bioatividade das moléculas, participando tanto como elemento farmacofórico básico, na formação de ligações de hidrogênio ou interações moleculares, assim como grupo de conexão, ligando moléculas conjugadas (JIANG et al., 2019).

Outra vantagem do anel triazol é o fato deste ser considerado um biosisotero não-clássico do grupo amida, uma vez que a unidade triazol mantém os grupos da posição 1,4-dissubstituídos (R^1 e R^2 , Figura 6) a uma distância de 5 Å o que mimetiza a distância de 3.9 Å da ligação amida (KENRY; LIU, 2019; TAUTZ et al., 2019). Isto confere às moléculas maior estabilidade, uma vez que ao contrário do grupo amida, o anel triazol não é clivado por hidrólise química ou enzimática, oxidado ou reduzido, sendo relativamente resistente à degradação metabólica e proteica (ARAGÃO-LEONETI et al., 2010; JIANG et al., 2019).

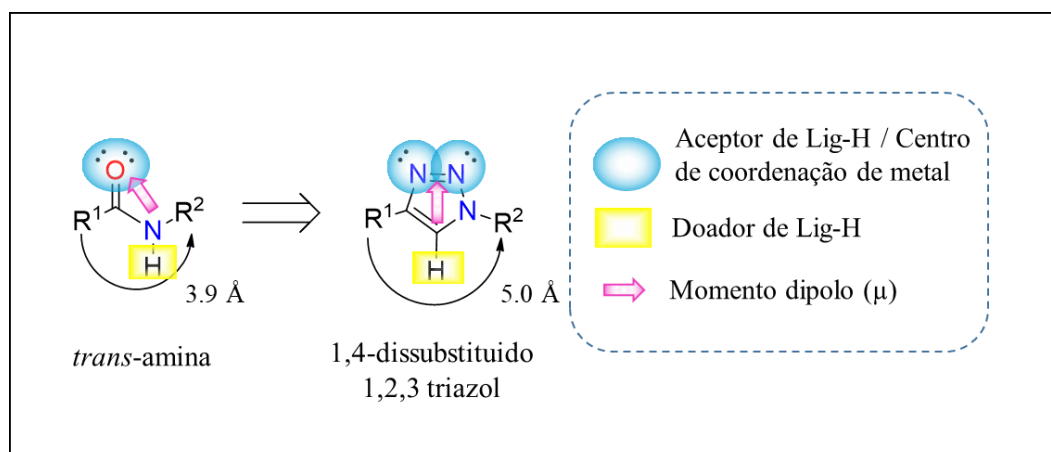


Figura 6. Relação isostérica entre *trans*-amida e 1,4-dissubstituído 1,2,3-triazol. Fonte: Tautz, et. al. 2019.

1.4.2. Acoplamento com Aminoácidos

Os aminoácidos são moléculas orgânicas com variabilidade estrutural singular, apresentando tanto cadeias laterais polares, apolares quanto carregadas (Figura 7), as quais constituem fatores decisivos para interações intra e intermoleculares (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2004; WAHEED; OBAID; AL-HAMDANI, 2019).

As moléculas de aminoácidos além de serem importantes em diversos processos metabólicos no corpo humano, participando na formação de enzimas, hormônios e em processos genéticos (AKRAM et al., 2011), também constituem estruturas interessantes para a síntese orgânica, uma vez que são moléculas de baixo custo, fácil acesso, simples de trabalharem e que possibilitam aumentar a complexidade de moléculas em poucas etapas de reações (DE CASTRO et al., 2020).

Produtos naturais e substâncias sintetizadas que já apresentavam propriedades biológicas importantes podem ser acopladas a diversos aminoácidos, na tentativa de alterar a biodisponibilidade dos precursores, assim como, torna-los mais seletivos e específicos (VILIPIC et al., 2015). A síntese de derivados de aminoácidos é possibilitada por meio da associação com as porções doadores de elétrons (NH₂, COO e S₂) das estruturas dos aminoácidos (WAHEED; OBAID; AL-HAMDANI, 2019).

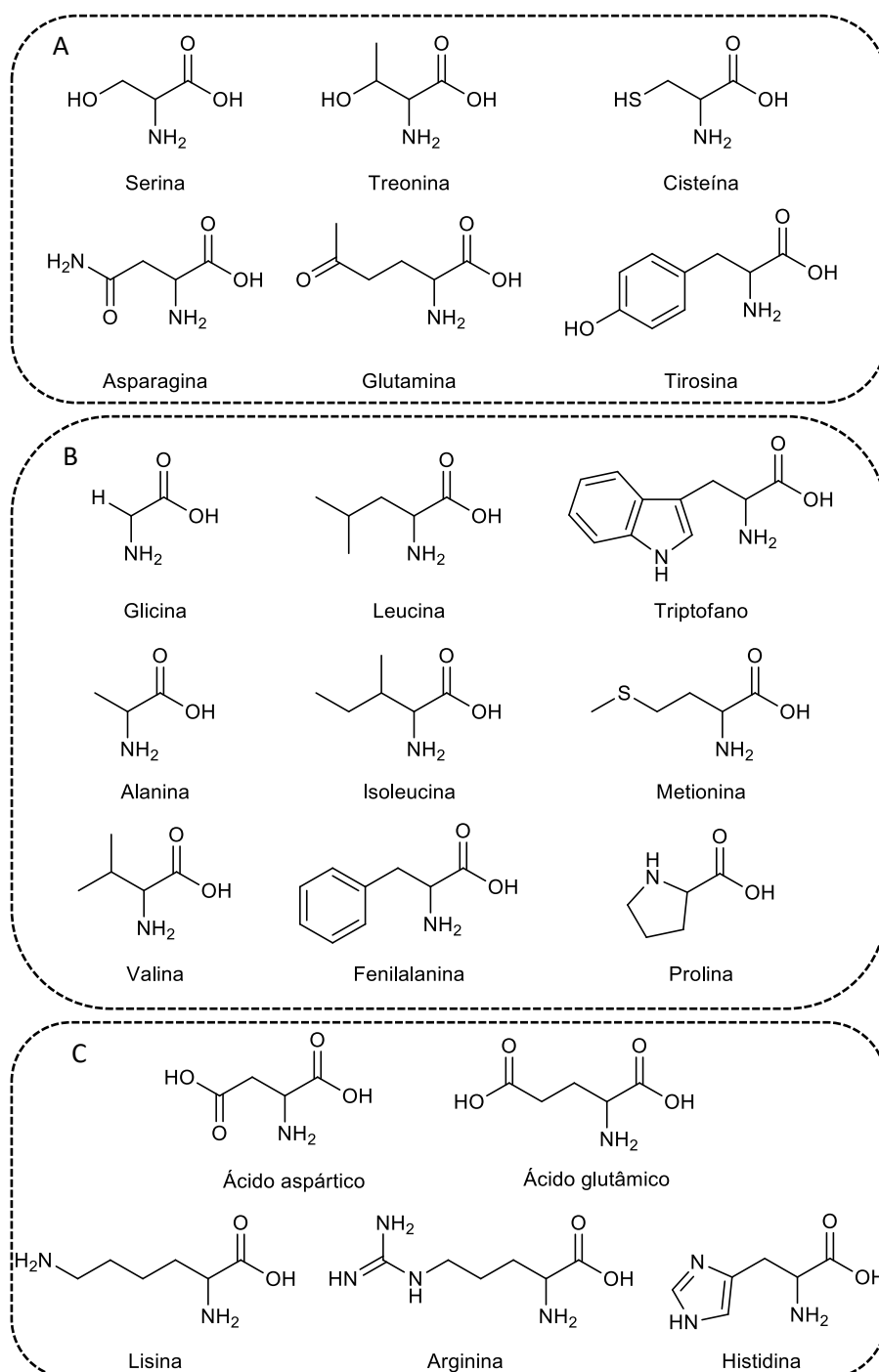


Figura 7. Estruturas química dos 20 aminoácidos. Fonte: Brasilescola

Promissoras atividades têm sido atribuídas aos derivados de aminoácidos, tais como, atividades antibacterianas, antifúngicas e antitumorais (WAHEED; OBAID; AL-HAMDANI, 2019). Como exemplo, estão os derivados de aminoácidos que demonstraram favoráveis atividade comparados aos compostos de origem, tais como, associação da quinoxalina com tirosina e metionina exibindo atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (SHINTRE et al., 2017), de naftoquinona associadas à glicina e asparagina com atividades antitumorais contra

câncer de mama (RIVERA-ÁVALOS et al., 2019) e associação de fulerenos com a arginina e lisina que demonstraram atividades antivirais contra influenza (KHALIKOV et al., 2016).

Interessante observar que na natureza há metabolitos secundários acoplados à aminoácidos. A hidroquinona, nakijiquinonas A, B, C e D, que possuem o resíduo de glicina, valina, serina e treonina, respectivamente, ligados ao anel quinona, foram isoladas de esponjas marinhas e possuem notáveis atividades antifúngica contra fungos *Candida albicans* e *Aspergillus niger* e citotóxicas contra células de leucemia linfoblástica aguda murina e células de carcinoma epidermóide humano (VILIPIC et al., 2015).

Portanto, o acoplamento de produtos naturais a aminoácidos é uma alternativa para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de novos fármacos. Baseado nisso e no exposto, a segunda estratégia de síntese proposta neste trabalho foi a formação de derivados de cinco aminoácidos (serina, treonina, triptofano, fenilalanina, lisina) dos produtos naturais da própolis verde (artepelin C, bacarina e drupanina).

2.0. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Desenvolvimento de derivados semissintéticos a partir dos compostos da própolis verde, artepelin C, drupanina e bacarina, visando obter inibidores mais potentes contra os cânceres de mama e próstata, e mais ativos frente à outras atividades biológicas.

2.1.1. Objetivos Específicos

- Obter os extratos hidroalcoólico da própolis verde e da *B. dracunculifolia* para o fracionamento e obtenção dos compostos de interesse por cromatografia líquida a vácuo (CLV) e por cromatografia de contracorrente de alta velocidade (HSCCC – *High Speed counter current Chromatography*);
- Isolar e purificar os compostos fenólicos prenilados da própolis verde, tais como, artepelin C, drupanina e bacarina por cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (CLAE-UV-VIS) e comparar com os respectivos padrões autênticos das substâncias desejadas, utilizando para tal a cromatografia líquida de alta eficiência analítica (CLAE -DAD);
- Sintetizar derivados multivalentes de artepelin C **1-2**, bacarina **3** utilizando reações de ciclo-adição 1,3-dipolar (“click chemistry”), bem como derivados amídicos a partir de reações de acoplamento dos aminoácidos comerciais com os produtos naturais, artepelin C **4-13**, drupanin **14-23** e bacarina **24-28** (Estruturas acima, pg. vi);
- Avaliar o potencial antitumoral, antiparasitário e antimicrobiano dos derivados sintetizados;
- Realizar estudos *in silico* dos derivados semissintéticos, empregando-se simulações de *docking* com a enzima AKR1C3 (aldo-ceto redutase 1C3);

3.0. Material e Métodos

Isolamento dos Produtos Naturais

3.1. Isolamento da drupanina, artepelin C e bacarina

3.1.1. Obtenção do extrato hidroalcoólico da própolis verde e das folhas da *Baccharis dracunculifolia*

Primeiramente, as folhas de *Baccharis dracunculifolia* foram devidamente identificadas pelo Prof. Dr. Milton Groppo Junior do Departamento de Biologia da FFCLRP – USP, Ribeirão Preto, sendo as exsiccatas da espécie depositadas no herbário desse departamento (SPFR 06143).

Posteriormente, as folhas da *B. dracunculifolia* e a própolis verde, 1 kg de cada amostra, foram congeladas, pulverizadas em moinho de facas e submetidas à maceração em solução hidroalcoólica 7:3, a cada três dias, por três vezes consecutivas. A solução hidroalcoólica obtida foi devidamente filtrada, concentrada em rotaevaporador e, em seguida, liofilizada com a finalidade de se obter o extrato hidroalcoólico bruto. Os extratos obtidos foram posteriormente submetidos tanto à cromatografia líquida a vácuo quanto à cromatografia contracorrente de alta velocidade.

3.1.2. Fracionamento do extrato hidroalcoólico por cromatografia contracorrente de alta velocidade

O fracionamento do extrato das folhas de *B. dracunculifolia* foi realizado por Cromatografia de Contracorrente de alta Velocidade (HSCCC) utilizando-se, a princípio, as condições estabelecidas pelo nosso grupo de pesquisa (DA SILVA, 2011; MOTTA, 2014).

A cromatografia contracorrente de alta velocidade foi realizada em equipamento com duas bobinas, cada uma contendo duas colunas em politetrafluoretileno-PTFE (Bobina 1: coluna A: 208 mL, d.i. 3,2 mm e coluna B: 29 mL, d.i. 1,0 mm; Bobina 2: coluna C: 102 mL, d.i. 2,0 mm e coluna D: 105 mL, d.i. 2,0 mm), modelo Quatro CCCTM MK 5 & MK 6 (AECS Quik Prep™ Ltd., Reino Unido). As separações foram realizadas utilizando-se as colunas C e D, conectadas entre si no sentido cauda-cabeça (modo de eluição normal). Desse modo, a fase inferior/aquosa foi considerada como fase estacionária e a fase superior/orgânica como fase móvel. O sistema de solvente utilizado

foi bombeado por bomba de fluxo contínuo (SSI series II CLAE Pump). A alça do injetor de 10 mL foi utilizada para introdução da amostra no sistema cromatográfico. A velocidade de rotação utilizada foi de 850 rpm e a temperatura foi ajustada em 35 °C (com variação máxima até 40 °C).

Os sistemas de solventes selecionados para a separação do extrato das folhas da *B. dracunculifolia* foram pré-definidos pelo nosso grupo de pesquisa, sendo a fase estacionária (inferior/aquosa) preparada na proporção 9:1 de metanol/água, e a fase móvel (superior/orgânica) nas proporções definidas na tabela 4 de hexano/acetato de etila. Em seguida, a amostra, 2 g solubilizada em 8 ml de mistura 1:1 das fases superior e inferior do sistema de solventes, foi injetada na alça de injeção. Foram coletados volumes em tubos de ensaio com o aparelho em rotação e 10 volumes com rotação desligada (“wash off”). As frações coletadas foram concentradas a vácuo, em evaporador rotatório, monitoradas de acordo com a semelhança cromatográfica em CCD e reunidas em subfrações sendo, posteriormente, analisadas por CLAE-DAD analítica (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).

Tabela 1. Eluição por gradiente da HSCCC

Fase Móvel (Hexano/ Acetato de Etila)	Frações
95/05	1-9
90/10	10-15
85/15	16-57
80/20	58-69
75/25	70-81
70/30	82-87
Metanol	88-93

3.1.3. Fracionamento do extrato hidroalcoólico por cromatografia líquida a vácuo

Os extratos secos da própolis verde e das folhas da *B. dracunculifolia* foram fracionados por cromatografia líquida a vácuo (CLV). Esta técnica de separação permitiu o fracionamento de grandes quantidades de extrato bruto e a obtenção de quantidades satisfatórias de substâncias isoladas.

Para o fracionamento utilizou-se uma coluna de vidro com placa porosa e com diâmetro de 13,5 cm. O preenchimento da coluna com sílica gel 60 H com tamanho de partícula menor que 45 μm foi realizado até atingir a altura entre 6 à 7 cm. Posteriormente com a aplicação do vácuo a altura da sílica atingiu 5 cm (PEDERSEN; ROSENBOHM, 2001). O extrato seco, cerca de 100 g, foi pulverizado com igual massa de sílica e, posteriormente, adicionado à coluna de sílica previamente empacotada, a qual foi submetida a vácuo para compactação. Foram obtidas frações com 1 litro de fase móvel, variando conforme as proporções descritas na Tabela 5, as quais foram concentradas em rotaevaporador e monitoradas quanto à presença das substâncias desejadas. Os perfis semelhantes por CCD foram reunidos em subfrações, pesadas e analisadas por CLAE-DAD nas condições detalhadas na tabela 7, seção 4.1.4.

Tabela 2. Eluição por gradiente da CLV (cromatografia líquida à vácuo)

Fase Móvel (Hexano/ Acetado de Etila)	Frações
95/05	1-32
90/10	33-101
85/15	102-150
75/25	151-161
65/35	162-171
55/45	172-181
45/55	182-191
35/65	192-201
Metanol	202-207

3.1.4. Isolamento e análise das substâncias por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As subfrações oriundas da CLV e da HSCCC foram solubilizadas em 1 mL de metanol (grau HPLC) na concentração de 160 mg/mL e purificadas em sistema preparativo CLAE-UV da marca Shimadzu à vazão de 8 mL/min e detecção em 275 nm. O cromatógrafo preparativo utilizado foi o do modelo: CBM-20A – controlador, LC-6A – bomba, com detector UV-VIS SPD-20, e software LC solution version 1.25. Utilizou-se a coluna preparativa C8 Shimadzu Shim-pack prep.- ODS (15 μm , 20 \times 250 mm). A fase móvel foi por gradiente de metanol e água acidificada com ácido fórmico, Tabela 6.

Tabela 3. Parâmetros utilizados na eluição por gradiente no CLAE-UV preparativo.

Time (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0-5	20	80
7-10	15	85
12-18	10	90
20-22	05	95
24	20	80

Bomba A: 99% de água, 1% de ácido fórmico metanol

Bomba B: metanol

Vazão: 8 mL/min; Detecção: UV 275 nm

Posteriormente as substâncias isoladas foram analisadas por CLAE analítico, objetivando a comparação com os padrões autênticos do artepelin C e da bacarina. O equipamento utilizado foi da marca Waters acoplado ao detector de arranjo de diodos modelo 2998 e sistema controlador computadorizado com software Empower. A coluna cromatográfica utilizada foi Ascentis C₁₈ (Sigma-Aldrich) 25 cm x 4,6 mm com diâmetro de partícula 5 µm e diâmetro de poro 100Å, protegida por pré-coluna de fase reversa com 2 cm x 4 mm, com mesmo tamanho de partículas e diâmetro do poro da coluna (Tabela 7), (DE SOUSA, 2007).

Tabela 4. Parâmetros utilizados na eluição por gradiente no CLAE-DAD analítico.

Time (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0-5	75	25
10	65	35
15	62	38
20	60	40
45	55	45
50	30	70
55	20	80
60	0	100

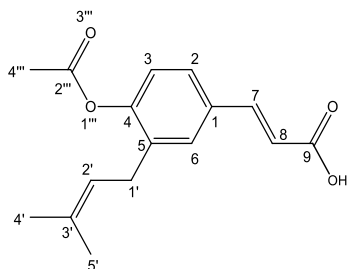
Bomba A: 94,6% de água, 0,4% de ácido fórmico, 5% de metanol

Bomba B: acetonitrila

Vazão: 1 mL/min, Detecção: UV 275 nm

monitorada por CCD (Hex/AcOEt 3:7 v/v). Os solventes foram removidos por pressão reduzida e a mistura foi purificada em coluna clássica cromatográfica com eluição por gradiente (SiO₂, Hex/AcOEt 7:3, 1:1 a 3:7 v/v). O produto acetilado **29** foi isolado como sólido branco com rendimento de 90%. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ_H: 7,75 (d, 1H, *J* 15,9 Hz, H7), 7,28 (s, 2H, H6 e H2), 6,39 (d, 1H, *J* 15,9 Hz, H8), 5,24 (t, 2H, *J* 7,2 Hz, H2' e H2''), 3,22 (d, 4H, *J* 7,2 Hz, H1' e H1''), 2,35 (s, 3H, H4'''), 1,79 (s, 6H, H4' e H4'') e 1,71 (s, 6H, H5' e H5'').

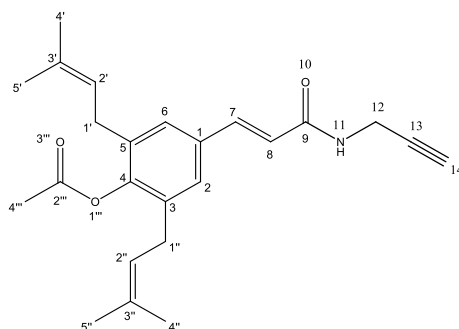
Drupanina acetilada **30**



A drupanina (300 mg, 1.291 mmol) foram adicionados piridina (12 mL) e anidrido acético (12 mL), sendo a mistura reacional agitada à temperatura ambiente por 12 h e monitorada por CCD (Hex/AcOEt 3:7 v/v). Os solventes foram removidos por pressão reduzida e a mistura foi purificada em coluna clássica cromatográfica com eluição por gradiente (SiO₂, Hex/AcOEt 7:3, 1:1 a 3:7 v/v). O produto acetilado **30** foi isolado como sólido branco com rendimento de 73%. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ_H: 7,74 (d, 1H, *J* 15,9 Hz, H7), 7,41 (s, 2H, H6 e H2), 7,07 (d, 1H, *J* 7,9 Hz, H5), 6,39 (d, 1H, *J* 15,9 Hz, H8), 5,21 (t, 1H, *J* 7,2 Hz, H2'), 3,25 (d, 2H, *J* 7,2 Hz, H1'), 2,32 (s, 3H, H4'''), 1,76 (s, 3H, H4') e 1,71 (s, 3H, H5').

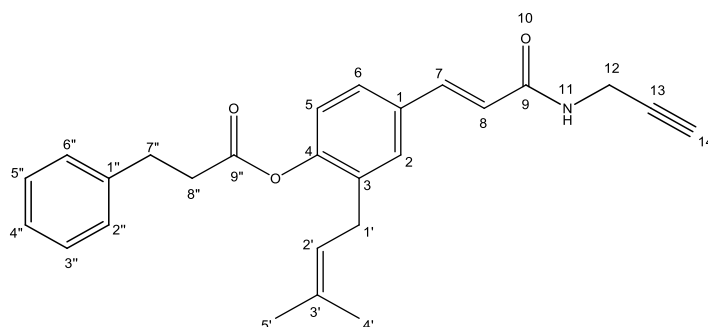
3.2.2.2. Síntese dos derivados triazólicos do artepelin C e da bacarina

Propargil-artepelin C **31**



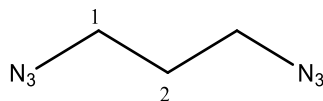
O artepelin C acetilado **29** (70 mg, 0,205 mmol, 1 Eq) foi pesado e solubilizado em DMF. A solução foi tratada com DIPEA (72 μ L, 2 Eq) e posteriormente foi adicionado propargilamina (22,6 mg, 0.410 mmol, 2 Eq), juntamente com os reagentes de acoplamento PyBOP (1 Eq, 0,205 mmol, 107 mg) e HOBt (1Eq, 0.205 mmol, 28 mg), (MARTINS-TEIXEIRA et al., 2013). A reação foi mantida sob agitação por 16h e monitorada por CCD (Hex/AcOEt 1:1 v/v). Após evaporação a vácuo do solvente DMF, realizou-se a separação em coluna clássica cromatográfica com eluição por gradiente (SiO₂, Hex/AcOEt 7:3 a 1:1 v/v). O produto propargil-artepelin C **31** foi isolado como óleo ambar com rendimento de 72%. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ _H: 7,58 (d, 1H, *J* 15,6 Hz, H7), 7,20 (s, 2H, H6 e H2), 6,30 (d, 1H, *J* 15,6 Hz, H8), 5,86 (t, 1H, *J* 5,1 Hz, H11), 5,20 (t, 2H, *J* 7,2 Hz, H2' e H2''), 4,18 (dd, 2H, *J* 2,5 Hz e *J* 5,2 Hz, H12), 3,18 (d, 4H, *J* 7,2 Hz, H1' e H1''), 2,31 (s, 3H, H4'''), 2,26 (t, 1H, *J* 2,5 Hz, H14), 1,75 (s, 6H, H4' e H4'') e 1,68 (s, 6H, H5' e H5'').

Propargil-bacarina **32**



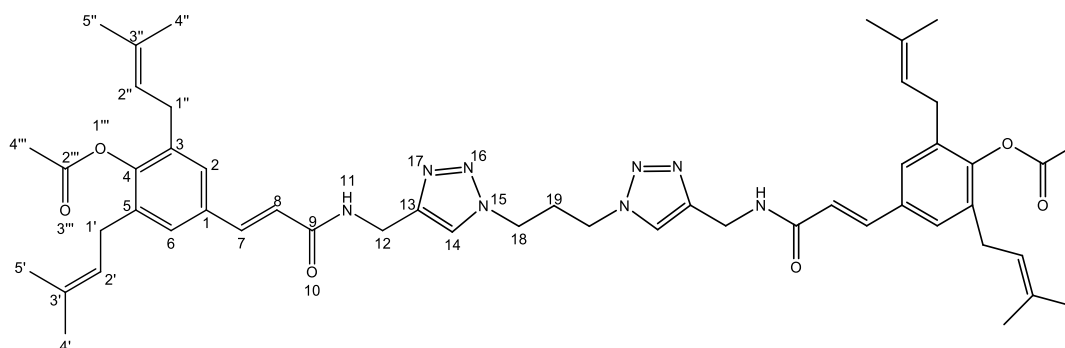
A bacarina **30** (70 mg, 0,192 mmol, 1 Eq) foi pesada e solubilizado em DMF. A solução foi tratada com DIPEA (67 μ L, 2 Eq) e posteriormente foi adicionado propargilamina (22 mg, 0.384 mmol, 2 Eq), juntamente com os reagentes de acoplamento PyBOP (1 Eq, 0,192 mmol, 100 mg) e HOBt (1Eq, 0.192 mmol, 26 mg), (MARTINS-TEIXEIRA et al., 2013). A reação foi mantida sob agitação por 16 h e monitorada por CCD (Hex/AcOEt 1:1 v/v). Após evaporação a vácuo do solvente DMF, realizou-se a separação em coluna clássica cromatográfica com eluição por gradiente (SiO₂, Hex/AcOEt 7:3 a 1:1 v/v). O produto propargil-bacarina **32** foi isolado como óleo ambar com rendimento de 71%. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ _H: 7,23 (d, 1H, *J* 15,1 Hz, H7), 6,92 (m, 7H, H2''-H6'', H6 e H2), 6,59 (d, 1H, *J* 8,6 Hz, H5), 5,98 (d, 1H, *J* 15,1 Hz, H8), 5,70 (t, 1H, *J* 4,9 Hz, H11), 4,88 (t, 1H, *J* 6,9 Hz, H2'), 3,92 (dd, 2H, *J* 2,5 Hz e *J* 5,1 Hz, H12), 2,88 (m, 4H, H1' e H7''), 2,69 (t, 2H, *J* 7,4 Hz, H8''), 2,06 (t, 1H, *J* 2,4 Hz, H14), 1,56 (s, 3H, H4') e 1,48 (s, 3H, H5').

Di-azido propano **33**



Em um balão de fundo redondo foram adicionados 420 μL de dicloropropano (4,46 mmol, 1Eq) o qual foi solubilizado com uma mínima quantidade de solvente DMF. Posteriormente, adicionaram-se 5 Eq de azida de sódio (22,3 mmol) deixando a reação em temperatura ambiente sob agitação por 72 h, (ARSLAN et al., 2018). O produto di-azido propano **33** foi isolado como óleo translúcido com rendimento de 80%. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ_{H} : 3,42 (t, 4H, J 6,02 Hz, H1), 1,85 (q, 2H, J 6,13 Hz, H2), IR 2,125 cm^{-1} (azido), 1,225 cm^{-1} (C-N).

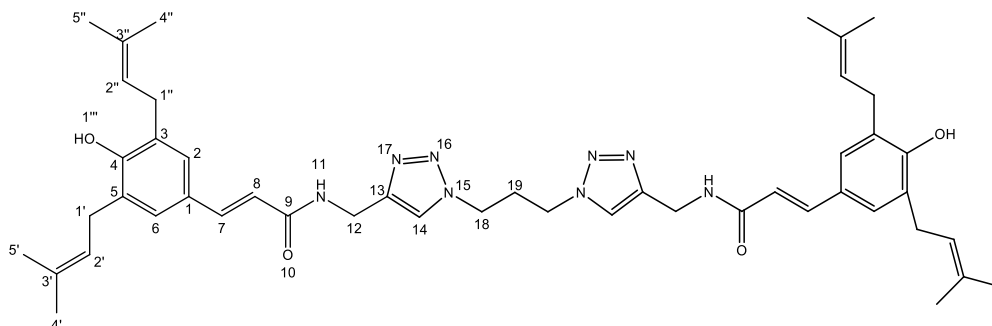
Dímero triazólico protegido do artepelin C **1**



O propargil-artepelin C **31** (30 mg, 0,079 mmol, 1 Eq), 1° bloco de construção, e o di-azido propano **33** (20 mg, 0,158 mmol, 2 Eq), 2° bloco de construção, foram solubilizados em DMF e tratados com ascorbato de sódio (31 mg, 0,158 mmol, 1 Eq) e solução 10% CuSO_4 (0,1 Eq), sendo a mistura agitada à temperatura ambiente por cerca de 4 h, (CAMPO et al., 2015). A reação foi monitorada por CCD (tolueno/ AcOEt , 8:2 v/v), o solvente removido por pressão reduzida e a mistura foi purificada em coluna clássica cromatográfica por gradiente de eluição (SiO_2 , Hex/ AcOEt 1:1 e DCM/ MeOH 9:1). O dímero triazólico de artepelin C **1** foi isolado como um sólido amarelado com rendimento de 97%. Para purificação, o produto final foi injetado em HPLC-UV preparativo com eluição por gradiente $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, (C_{18} , Phenomenex, 4 μm , 250 \times 10 mm, fluxo de 4.6 mL/min), tabela 3. RMN ^1H **1** (CDCl_3 , 300 MHz) δ_{H} : 7,59 (s, 2H, H14), 7,52 (d, 2H, J 15,2 Hz, H7), 7,18 (s, 4H, H6 e H2), 7,01 (t, 2H, J 5,4 Hz, H11), 6,43 (d, 2H, J 15,2 Hz, H8), 5,23 (m, 4H, H2' e H2''), 4,66 (d, 4H, J 5,4 Hz, H12), 4,39 (t, 4H, J 6,2 Hz, H18), 3,27 (d,

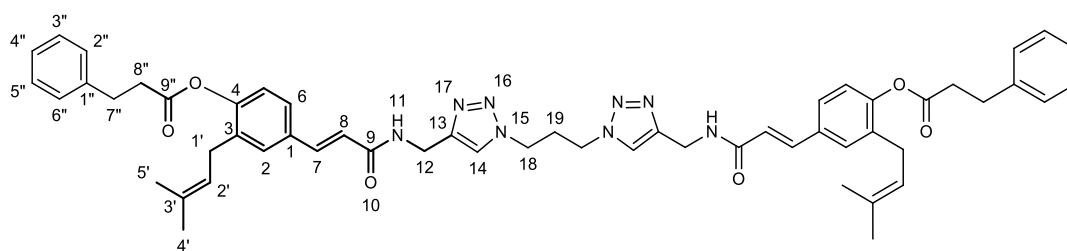
8H, J 6,9 Hz, H1' e H1''), 2,63 (m, 2H, H19), 2,44 (s, 6H, H4'''), 1,89 (s, 12H, H4' e H4'') e 1,83 (s, 12H, H5' e H5''), tabela 1A. ESI-MS: calcd. para $C_{51}H_{65}N_8O_6^+[M+H]^+$: 885,4982; encontrado $C_{51}H_{65}N_8O_6^+[M+H]^+$: 885,5019.

Dímero triazólico desprotegido do artepelin C 2



O dímero triazólicos do artepelin C 1 (32 mg, 0,036 mmol, 1 Eq) foi solubilizado em MeOH e misturado em 5 Eq de solução 10% KOH. A reação foi agitada sob refluxo à 70 °C por cerca de 4 h e monitorada por CCD (DCM/MeOH 9:1 v/v). Após resfriamento e extração com eter etílico a mistura foi neutralizada com HCl (aq) 1M, sendo a fase aquosa extraída, concentrada a vácuo e analisada por RMN 1H e ^{13}C , e ESI-MS, (YASHIRO et al., 2015). O dímero triazólico desprotegido do artepelin C 2 foi isolado como um sólido amarelado com rendimento de 62%. Para purificação, o produto final foi injetado em HPLC-UV preparativo com eluição por gradiente MeOH/H $_2$ O, (C $_{18}$, Phenomenex, 4 μ m, 250 \times 10 mm, fluxo de 4.6 mL/min), tabela 3. RMN 1H 2 (MeOD $_4$, 300 MHz) δ_H : 7,87 (s, 2H, H14), 7,44 (d, 2H, J 15,7 Hz, H7), 7,12 (s, 4H, H6 e H2), 6,40 (d, 2H, J 15,7 Hz, H8), 5,31 (m, 4H, H2' e H2''), 4,54 (s, 4H, H12), 4,44 (t, 4H, J 6,7 Hz, H18), 3,31 (m, 8H, H1' e H1''), 2,53 (m, 2H, H19), 1,73 (dl, 24H, H4', H4'', H5' e H5''), tabela 2A. ESI-MS: calcd. para $C_{47}H_{61}N_8O_4^+[M+H]^+$: 801,4771; encontrado $C_{47}H_{61}N_8O_4^+[M+H]^+$: 801,4801.

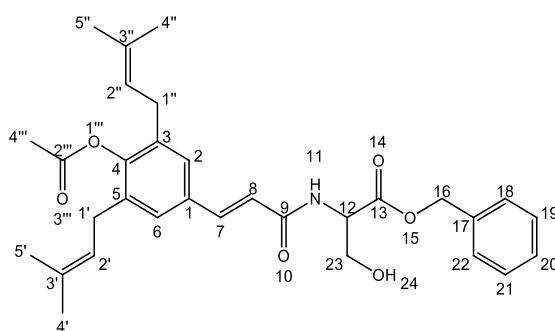
Dímero triazólico da bacarina 3



O propargil-bacarina C **32** (25 mg, 0,062 mmol, 1 Eq), 1° bloco de construção, e o di-azido propano **33** (16 mg, 0,124 mmol, 2 Eq), 2° bloco de construção, foram solubilizados em DMF e tratados com ascorbato de sódio (24 mg, 0,124 mmol, 1 Eq) e solução 10% CuSO₄ (0,1 Eq), sendo a mistura agitada à temperatura ambiente por cerca de 4 h, (CAMPO et al., 2015). A reação foi monitorada por CCD (tolueno/AcOEt, 8:2 v/v), o solvente removido por pressão reduzida e a mistura purificada em coluna clássica cromatográfica por gradiente de eluição (SiO₂, Hex/AcOEt 1:1 e DCM/MeOH 9:1). O dímero triazólico protegido da bacarina **3** foi isolado como um sólido branco com rendimento de 63%. Para purificação, o produto final foi injetado em HPLC-UV preparativo com eluição por gradiente MeOH/H₂O, (C₁₈, Phenomenex, 4 μm, 250×10 mm, fluxo de 4.6 mL/min), tabela 3. RMN ¹H **3** (CDCl₃, 300 MHz) δ_H: 7,21 (d, 4H, H14 e H7), 6,93 (m, 14H, H2"-H6", H6 e H2), 6,74 (t, 2H, *J* 5,6 Hz, H11), 6,56 (d, 2H, H5), 6,10 (d, 2H, *J* 15,2 Hz, H8), 4,86 (t, 2H, *J* 6,9 Hz, H2'), 4,33 (d, 4H, *J* 5,6 Hz, H12), 4,06 (t, 4H, *J* 6,2 Hz, H18), 2,86 (m, 8H, H1' e H7"), 2,69 (m, 4H, H8"), 2,30 (m, 2H, H19), 1,54 (s, 6H, H4') e 1,47 (s, 6H, H5'), tabela 3A. ESI-MS: calcd. para C₅₅H₆₁N₈O₆⁺[M+H]⁺: 929,4669; encontrado C₅₅H₆₁N₈O₆⁺[M+H]⁺: 929,4708.

3.2.2.3. Síntese dos derivados amídicos do artepelin C, drupanina e da bacarina

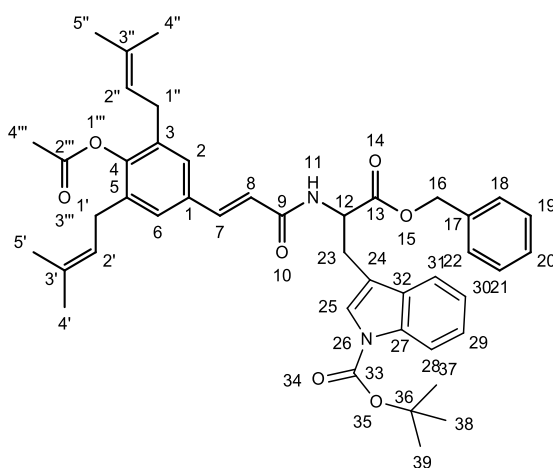
(*E*)-*N*-(3,5-Diprenil-4-acetoxi cinamoil)-*L*-serina benzil ester **4**



O artepelin C acetilado **29** (40 mg, 0,117 mmol, 1 Eq) foi solubilizado em DMF e a solução foi tratada com 41 μL DIPEA (0,234 mmol, 2 Eq) e, posteriormente, foram adicionados 46 mg do aminoácido NH₂SerOBn **34** (0,234 mmol, 2 Eq), juntamente com os reagentes de acoplamento PyBOP (1 Eq, 60,9 mg, 0,117 mmol) e HOBt (1Eq, 15,8 mg, 0,117 mmol), (RODRIGUES et al., 2021). A reação foi deixada em agitação por 16 h, sendo monitorada por CCD (Hex/AcOEt 1:1 v/v). Após rotaevaporação do solvente DMF realizou-se a separação em coluna clássica cromatográfica com eluição por

gradiente (SiO₂, Tolueno/AcOEt 8:2 v/v). O derivado protegido da serina com o artepelin C **4** foi isolado como um sólido branco com rendimento de 88%. RMN ¹H **4** (CDCl₃, 300 MHz) δ_H: 7,58 (d, 1H, *J* 15,6 Hz, H7), 7,34 (s, 5H, H18-H22), 7,21 (s, 2H, H6 e H2), 6,73 (d, 1H, *J* 7,3 Hz, H11), 6,41 (d, 1H, *J* 15,6 Hz, H8), 5,20 (m, 4H, H16, H2' e H2''), 4,85 (dt, 1H, *J* 3,5 Hz e *J* 7,2 Hz, H12), 4,01 (qd, 2H, *J* 3,5 Hz e *J* 11,2 Hz, H23), 3,18 (d, 4H, *J* 7,2 Hz, H1' e H1''), 2,31 (s, 3H, H4'''), 1,76 (s, 6H, H4' e H4'') e 1,69 (s, 6H, H5' e H5''), tabela 4A. ESI-MS: calcd. para C₃₁H₃₈NO₆⁺[M+H]⁺: 520,2654; encontrado C₃₁H₃₈NO₆⁺[M+H]⁺: 520,2690.

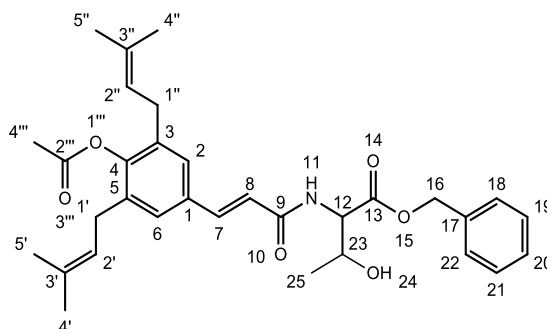
(*E*)-*N*-(3,5-Diprenil-4-acetoxi cinamoil)-(*N'*-Boc-*L*-triptofano) benzil ester **5**



O artepelin C acetilado **29** (50 mg, 0.146 mmol, 1 Eq) foi solubilizado em DMF e a solução foi tratada com 51 µL DIPEA (0,292 mmol, 2 Eq) e, posteriormente, foram adicionados 115 mg do aminoácido NH₂Trp(N-Boc)OBn **35** (0,292 mmol, 2 Eq), juntamente com os reagentes de acoplamento PyBOP (1 Eq, 76 mg, 0,146 mmol) e HOBt (1Eq, 20 mg, 0,146 mmol), (RODRIGUES et al., 2021). A reação foi deixada em agitação por 16 h, sendo monitorada por CCD (Hex/AcOEt 1:1 v/v). Após rotaevaporação do solvente DMF realizou-se a separação em coluna clássica cromatográfica com eluição por gradiente (SiO₂, Hex/AcOEt 1:1 v/v). O derivado protegido do triptofano com o artepelin C **5** foi isolado como um sólido branco com rendimento de 71%. RMN ¹H **5** (CDCl₃, 300 MHz) δ_H: 8,03 (d, 1H, *J* 7,9 Hz, H28), 7,48 (d, 1H, *J* 15,6 Hz, H7), 7,41 (d, 1H, *J* 7,7 Hz, H31), 7,19 (m, 10H, H18-H22, H25, H29-H30, H6 e H2), 6,22 (d, 1H, *J* 15,6 Hz, H8), 6,21 (d, 1H, *J* 7,6 Hz, H11), 5,08 (m, 5H, H2', H2'', H12 e H16), 3,25 (qd, 2H, *J* 5,6 Hz, H23), 3,10 (d, 4H, *J* 7,2 Hz, H1' e H1''), 2,23 (s, 3H, H4'''), 1,67 (s, 6H, H4' e H4''), 1,60 (s, 6H, H5' and H5''), 1,55 (s, 9H, H37-

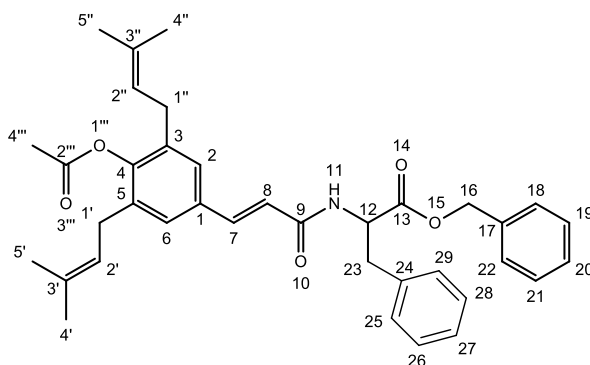
H39), tabela 5A. ESI-MS: m/z calcd. para $C_{44}H_{51}N_2O_7^+[M+H]^+$: 719,3652; encontrado $C_{44}H_{51}N_2O_7^+[M+H]^+$: 719,3691.

(E)-N-(3,5-Diprenil-4-acetoxi cinamoil)-L-treonina benzil ester 6



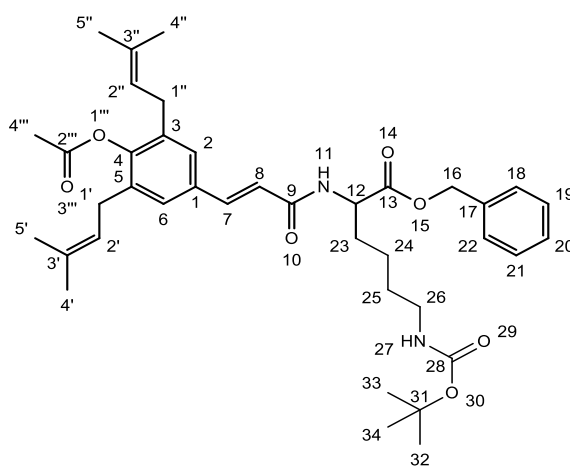
O artepelin C acetilado **29** (70 mg, 0.205 mmol, 1 Eq) foi solubilizado em DMF e a solução foi tratada com 74 μ L DIPEA (0,410 mmol, 2 Eq) e, posteriormente, foram adicionados 86 mg do aminoácido NH_2 ThrOBn **36** (0,410 mmol, 2 Eq), juntamente com os reagentes de acoplamento PyBOP (1 Eq, 107 mg, 0,205 mmol) e HOBt (1Eq, 28 mg, 0,205 mmol), (RODRIGUES et al., 2021). A reação foi deixada em agitação por 16 h, sendo monitorada por CCD (Hex/AcOEt 3:7 v/v). Após rotaevaporação do solvente DMF realizou-se a separação em coluna clássica cromatográfica com eluição por gradiente (SiO_2 , Hex/AcOE 3:7 v/v). O derivado protegido da treonina com o artepelin C **6** foi isolado como um sólido branco com rendimento de 60%. RMN 1H **6** ($CDCl_3$, 300 MHz) δ_H : 7,59 (d, 1H, J 15,6 Hz, H7), 7,33 (s, 5H, H18-H22), 7,21 (s, 2H, H6 e H2), 6,61 (d, 1H, J 8,9 Hz, H11), 6,44 (d, 1H, J 15,6 Hz, H8), 5,19 (m, 4H, H2', H2'' e H16), 4,80 (dd, 1H, J 2,3 Hz, J 8,9 Hz, H12), 4,41 (m, 1H, H23), 3,18 (d, 4H, J 7,2 Hz, H1' e H1''), 2,31 (s, 3H, H4'''), 1,73 (s, 6H, H4' e H4''), 1,68 (s, 6H, H5' e H5'') e 1,21 (d, 3H, J 6,4 Hz, H25), tabela 6A. ESI-MS: m/z calcd. para $C_{32}H_{40}NO_6^+[M+H]^+$: 534,2811; encontrado $C_{32}H_{40}NO_6^+[M+H]^+$: 534,2853.

(E)-N-(3,5-Diprenil-4-acetoxi cinamoil)-L-fenilalanina benzil ester 7



O artepelin C acetilado **29** (46 mg, 0.134 mmol, 1 Eq) foi solubilizado em DMF e a solução foi tratada com 48 μ L DIPEA (0,267 mmol, 2 Eq) e, posteriormente, foram adicionados 68 mg do aminoácido NH₂PheOBn **37** (0,267 mmol, 2 Eq), juntamente com os reagentes de acoplamento PyBOP (1 Eq, 70 mg, 0,134 mmol) e HOBt (1Eq, 18 mg, 0,134 mmol), (RODRIGUES et al., 2021). A reação foi deixada em agitação por 16 h, sendo monitorada por CCD (Hex/AcOEt 1:1 v/v). Após rotaevaporação do solvente DMF realizou-se a separação em coluna clássica cromatográfica com eluição por gradiente (SiO₂, Hex/AcOEt 1:1). O derivado protegido da fenilalanina com o artepelin C **7** foi isolado como um sólido branco com rendimento de 85%. RMN ¹H **7** (CDCl₃, 300 MHz) δ _H: 7,56 (d, 1H, *J* 15,6 Hz, H7), 7,35 (m, 5H, H18-H22), 7,22 (m, 5H, H25-H29), 7,01 (m, 2H, H6 e H2), 6,30 (d, 1H, *J* 15,6 Hz, H8), 6,10 (d, 1H, *J* 7,7 Hz, H11), 5,21 (m, 4H, H2', H2'' e H16), 5,08 (m, 1H, H12), 3,21 (m, 6H, H23, H1' e H1''), 2,34 (s, 3H, H4'''), 1,74 (s, 6H, H4' e H4''), 1,68 (s, 6H, H5' e H5''), tabela 7A. ESI-MS: *m/z* calcd. para C₃₇H₄₂NO₅⁺[M+H]⁺: 580,3018; encontrado C₃₇H₄₂NO₅⁺[M+H]⁺: 580,3057.

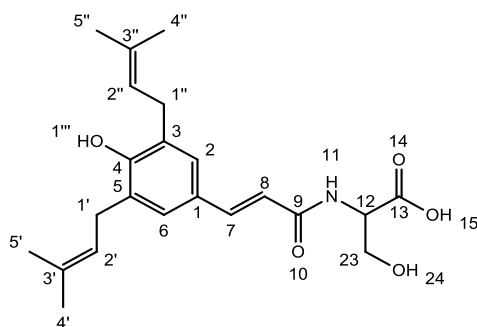
(E)-N-(3,5-Diprenil-4-acetoxi cinamoil)-(Ne-Boc-L-lisina) benzil ester 8



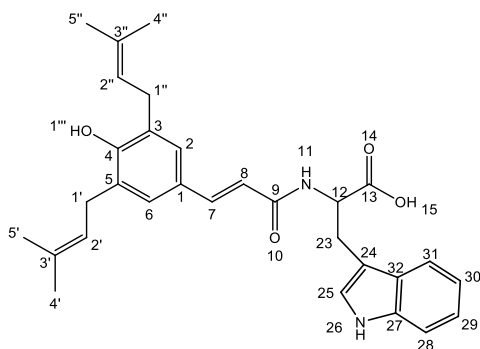
O artepelin C acetilado **29** (43 mg, 0.126 mmol, 1 Eq) foi solubilizado em DMF e a solução foi tratada com 44 μ L DIPEA (0,250 mmol, 2 Eq) e, posteriormente, foram adicionados 84 mg do aminoácido NH₂Tys(N-Boc)OBn **38** (0,250 mmol, 2 Eq), juntamente com os reagentes de acoplamento PyBOP (1 Eq, 66 mg, 0,126 mmol) e HOBt (1Eq, 17 mg, 0,126 mmol), (RODRIGUES et al., 2021). A reação foi deixada em agitação por 16 h, sendo monitorada por CCD (Tolueno/AcOEt 8:2 v/v). Após rotaevaporação do solvente DMF realizou-se a separação em coluna clássica cromatográfica com eluição por gradiente (SiO₂, Tolueno/AcOEt 8:2 v/v). O derivado protegido da lisina com o artepelin C **8** foi isolado como um sólido branco com rendimento de 84%. RMN ¹H **8**

(CDCl₃, 300 MHz) δ_{H} : 7,56 (d, 1H, *J* 15,6 Hz, H7), 7,34 (m, 5H, H18-H22), 7,20 (m, 2H, H6 e H2), 6,38 (m, 2H, *J* 15,6 Hz, H8 e H11), 5,20 (m, 4H, H2', H2'' e H16), 4,76 (dd, 1H, *J* 7,3 Hz e *J* 12,3 Hz, H12), 4,58 (sl, 1H, H27), 3,18 (d, 4H, *J* 7,2 Hz, H1' e H1''), 3,05 (dl, 2H, *J* 5,9 Hz, H26), 2,31 (s, 3H, H4'''), 1,92 (m, 2H, H23), 1,74 (s, 6H, H4' e H4''), 1,68 (s, 6H, H5' e H5''), 1,42 (s, 9H, H32-H34), 1,26 (m, 4H, H24 e H25), tabela 8A. ESI-MS: *m/z* calcd. para C₃₉H₅₃N₂O₇⁺[M+H]⁺: 661,3808; encontrado C₃₉H₅₃N₂O₇⁺[M+H]⁺: 661,3848.

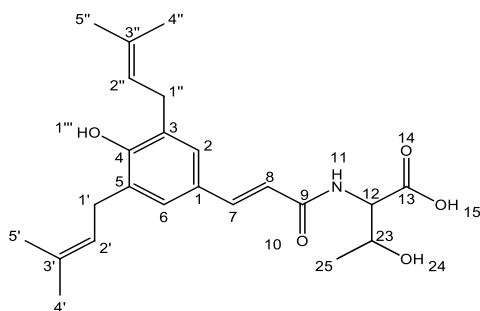
(E)-N-(3,5-Diprenil-4-hidroxi cinamoil)-L-serina 9



O derivado de artepelin C **4** (47 mg, 0,090 mmol, 1 Eq) foi solubilizado em MeOH e misturado com 5 Eq de solução 10% KOH. A reação foi deixada em agitação sob refluxo à 70 °C por cerca de 4 h e monitorada por CCD (DCM/MeOH 9:1 v/v). Após resfriamento e extração com éter etílico, a mistura foi neutralizada com HCl (aq) 1M, sendo a camada orgânica extraída com éter etílico, concentrada a vácuo e analisada por RMN ¹H e ¹³C, e ESI-MS, (RODRIGUES et al., 2021). O derivado desprotegido da serina com o artepelin C **9** foi isolado como um sólido branco com rendimento de 94%. RMN ¹H **9** (CDCl₃, 300 MHz) δ_{H} : 7,49 (d, 1H, *J* 15,5 Hz, H7), 7,30 (d, 1H, H11), 7,06 (s, 2H, H6 e H2), 6,38 (d, 1H, *J* 15,5 Hz, H8), 5,21 (t, *J* 6,6 Hz, 2H, H2' e H2''), 4,72 (m, 1H, H12), 4,08 (d, 1H, *J* 8,9 Hz, H23a), 3,90 (d, 1H, *J* 9,1 Hz, H23b), 3,22 (d, 4H, *J* 6,8 Hz, H1' e H1''), 1,70 (m, 12H, H4', H4'', H5' e H5''), tabela 9A. ESI-MS: *m/z* calcd. para C₂₂H₃₀NO₅⁺[M+H]⁺: 388,2079; encontrado C₂₂H₃₀NO₅⁺[M+H]⁺: 388,2117.

(E)-N-(3,5-Diprenil-4-hidroxi cinamoil)-L-triptofano 10

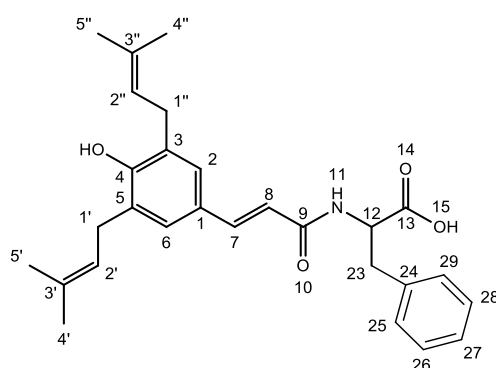
O derivado de artepelin C **5** (99 mg, 0,138 mmol, 1 Eq) foi solubilizado em MeOH e misturado com 5 Eq de solução 10% KOH. A reação foi deixada em agitação sob refluxo à 70 °C por cerca de 4 h e monitorada por CCD (DCM/MeOH 9:1 v/v). Após resfriamento e extração com éter etílico, a mistura foi neutralizada com HCl (aq) 1M, sendo a camada orgânica extraída com éter etílico, concentrada a vácuo e analisada por RMN ^1H e ^{13}C , e ESI-MS, (RODRIGUES et al., 2021). O derivado desprotegido do triptofano com o artepelin C **10** foi isolado como um sólido branco com rendimento de 49%. Para purificação, o produto final foi injetado em HPLC-UV preparativo com eluição por gradiente MeOH/H₂O, tabela 3, (C₁₈, Phenomenex, 4 μm , 250×10 mm, fluxo de 4.6 mL/min). RMN ^1H **10** (CDCl₃, 300 MHz) δ_{H} : 7,50 (d, 1H, *J* 7,8 Hz, H-28), 7,43 (d, 1H, *J* 15,6 Hz, H7), 7,23 (d, 1H, *J* 7,9 Hz, H-31), 7,04 (m, 5H, H25, H29-H30, H6 e H2), 6,19 (d, 1H, *J* 7,5 Hz, H11), 6,06 (d, 1H, *J* 15,5 Hz, H8), 5,19 (t, 2H, *J* 7,1 Hz, H-2' e H2''), 4,98 (dd, 1H, *J* 5,3 Hz, *J* 12,6 Hz, H12), 3,32 (m, 2H, H23), 3,22 (d, 4H, *J* 6,9 Hz, H-1' e H1''), 1,68 (dl, 12H, H4', H4'', H5' e H5''), tabela 10A. ESI-MS: calcd. para C₃₀H₃₅N₂O₄⁺[M+H]⁺: 487,2552; encontrado C₃₀H₃₅N₂O₄⁺[M+H]⁺: 487,2591

(E)-N-(3,5-Diprenil-4-hidroxi cinamoil)-L-treonina 11

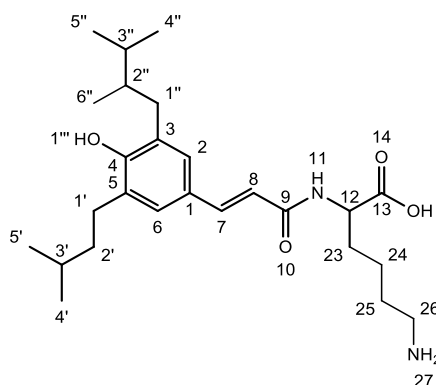
O derivado de artepelin C **6** (54 mg, 0,101 mmol, 1 Eq) foi solubilizado em MeOH e misturado com 5 Eq de solução 10% KOH. A reação foi deixada em agitação sob refluxo à 70 °C por cerca de 4 h e monitorada por CCD (DCM/MeOH 9:1 v/v). Após resfriamento

e extração com éter etílico a mistura foi neutralizada com HCl (aq) 1M, sendo a camada orgânica extraída com éter etílico, concentrada a vácuo e analisada por RMN ^1H e ^{13}C , e ESI-MS, (RODRIGUES et al., 2021). O derivado desprotegido da treonina com o artepelin C **11** foi isolado como um sólido branco com rendimento de 97%. RMN ^1H **11** (CDCl_3 , 300 MHz) δ_{H} : 7,46 (d, 1H, J 15,5 Hz, H7), 7,03 (m, 3H, H6, H2 e H11), 6,34 (d, 1H, J 15,5 Hz, H8), 5,17 (dl, 2H, J 6,8 Hz, H2' e H2''), 4,63 (dl, 1H, J 8,3 Hz, H12), 4,41 (dl, 1H, J 4,9 Hz, H23), 3,18 (d, 4H, J 6,9 Hz, H1' e H1''), 1,65 (dl, 12H, H4', H4'', H5' e H5'') e 1,15 (d, 3H, J 6,0 Hz, H25), tabela 11A. ESI-MS: calcd. para $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{NO}_5^+[\text{M}+\text{H}]^+$: 402,2236; encontrado $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{NO}_5^+[\text{M}+\text{H}]^+$: 402,2274.

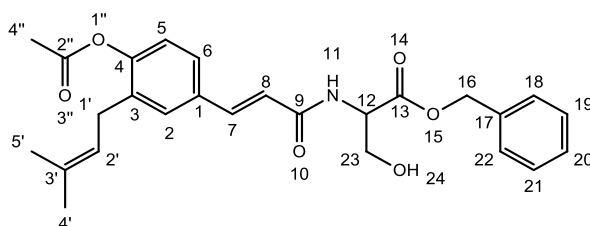
(*E*)-*N*-(3,5-Diprenil-4-hidroxi cinamoil)-*L*-fenilalanina **12**



O derivado de artepelin C **7** (66 mg, 0,114 mmol, 1 Eq) foi solubilizado em MeOH e misturado com 5 Eq de solução 10% KOH. A reação foi deixada em agitação sob refluxo à 70 °C por cerca de 4 h e monitorada por CCD (DCM/MeOH 9:1 v/v). Após resfriamento e extração com éter etílico, a mistura foi neutralizada com HCl (aq) 1M, sendo a camada orgânica extraída com éter etílico, concentrada a vácuo e analisada por RMN ^1H e ^{13}C , e ESI-MS, (RODRIGUES et al., 2021). O derivado desprotegido da fenilalanina com o artepelin C **12** foi isolado como um sólido branco com rendimento de 92%. RMN ^1H **12** (CDCl_3 , 300 MHz) δ_{H} : 7,18 (d, 1H, J 15,1 Hz, H7), 6,87 (m, 5H, H25-H29), 6,78 (s, 2H, H2 e H6), 5,91 (d, 1H, J 15,0 Hz, H8), 5,87 (d, 1H, J 6,7 Hz, H11), 5,00 (m, 2H, H2' e H2''), 4,72 (dd, 1H, J 5,6 Hz, J 12,3 Hz, H12), 3,09 (d, 4H, J 7,0 Hz, H1' e H1''), 2,99 (dd, 2H, J 5,8 Hz, J 13,6 Hz, H23), 1,59 (dl, 12H, H4', H4'', H5' e H5''), tabela 12A. ESI-MS: m/z calcd. para $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{NO}_4^+[\text{M}+\text{H}]^+$: 448,2443; encontrado $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{NO}_4^+[\text{M}+\text{H}]^+$: 448,2482.

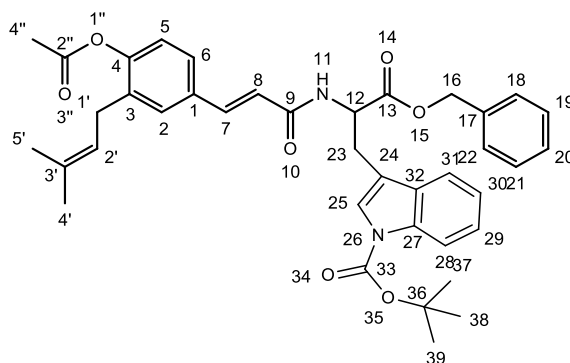
(E)-N-(3-(2-metilisopentil)-5-isopentil-4-hidroxi cinamoil)-L-lisina 13

O derivado de artepelin C **8** (108 mg, 0,164 mmol, 1 Eq) foi solubilizado em MeOH e misturado com 5 Eq de solução 10% KOH. A reação foi deixada em agitação sob refluxo à 70 °C por cerca de 4 h e monitorada por CCD (DCM/MeOH 9:1 v/v). Após resfriamento e extração com éter etílico, a mistura foi neutralizada com HCl (aq) 1M, sendo a camada orgânica extraída com éter etílico e concentrada a vácuo (YASHIRO et al., 2015). O produto obtido (65 mg, 0,123 mmol, 1 Eq) foi posteriormente deixado em agitação com 1:1 TFA/ DCM (365 mg, 3.2 mmol) por cerca de 1 hora, sendo a reação constantemente monitorada por CCD (DCM/MeOH 8:2 v/v). Posteriormente a mistura foi neutralizada com KOH (aq) 1M, sendo a camada orgânica extraída com DCM e concentrada a vácuo (LAVRADO et al., 2011). O derivado desprotegido do acoplamento da lisina com o artepelin C **13** foi isolado como um sólido amarelado com rendimento de 53%. Para purificação, o produto final foi injetado em HPLC-UV preparativo com eluição por gradiente MeOH/H₂O, tabela 3, (C₁₈, Phenomenex, 4 μm, 250×10 mm, fluxo de 4.6 mL/min). RMN ¹H **13** (MeOD₄, 500 MHz) δ_H: 7,41 (d, 1H, *J* 15,6 Hz, H7), 7,16 (m, 2H, H6-H2), 6,54 (d, 1H, *J* 15,6 Hz, H8), 2,92 (t, 2H, *J* 7,4 Hz, H26), 2,79 (t, 2H, *J* 6,6 Hz, H1'), 2,60 (m, 2H, H1''), 1,77 (m, 9H, H23, H3'-H3'', H2'-H2'' e H25), 1,47 (m, 2H, H24), 1,29 (m, 15H, H4'-H4'', H5'-H5'' e H6''), tabela 13A. ESI-MS: *m/z* calcd. para C₂₆H₄₃N₂O₄⁺[M+H]⁺: 447,3178; encontrado C₂₆H₄₃N₂O₄⁺[M+H]⁺: 447,2876.

(E)-N-(3-Prenil-4-acetoxi cinamoil)-L-serina benzil ester 14

A drupanina acetilada **30** (50 mg, 0.182 mmol, 1 Eq) foi solubilizada em DMF e a solução foi tratada com 64 μ L DIPEA (0,364 mmol, 2 Eq) e, posteriormente, foram adicionados 73 mg do aminoácido NH_2SerOBn **34** (0,364 mmol, 2 Eq), juntamente com os reagentes de acoplamento PyBOP (1 Eq, 95 mg, 0,182 mmol) e HOBt (1Eq, 25 mg, 0,182 mmol), (RODRIGUES et al., 2021). A reação foi deixada em agitação por 16 h, sendo monitorada por CCD (Hex/AcOEt 1:1 v/v). Após rotaevaporação do solvente DMF realizou-se a separação em coluna clássica cromatográfica com eluição por gradiente (SiO_2 , Tolueno/AcOEt 8:2 v/v). O derivado protegido da serina com a drupanina **14** foi isolado como um sólido branco com rendimento de 97%. RMN ^1H **14** (CDCl_3 , 300 MHz) δ_{H} : 7,58 (d, 1H, J 15,6 Hz, H7), 7,33 (s, 7H, H18-H22, H6 and H2), 6,99 (d, 1H, J 7,9 Hz, H5), 6,86 (d, 1H, J 7,3 Hz, H11), 6,41 (d, 1H, J 16,2 Hz, H8), 5,21 (m, 3H, H16 and H2'), 4,85 (dt, 1H, J 3,5 Hz e J 7,2 Hz, H12), 4,00 (dd, 2H, J 3,5 Hz e J 11,2 Hz, H23), 3,21 (d, 2H, J 7,2 Hz, H1'), 2,31 (s, 3H, H4''), 1,76 (s, 3H, H4'), 1,69 (s, 3H, H5'), tabela 14A. ESI-MS: m/z calcd. para $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{NNaO}_6^+[\text{M}+\text{Na}]^+$: 474,1887; encontrado $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{NNaO}_6^+[\text{M}+\text{Na}]^+$: 474,1807.

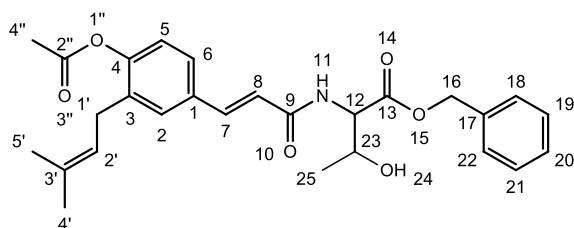
(*E*)-*N*-(3-Prenil-4-acetoxi cinamoil)-(*N'*-Boc-*L*-triptofano) benzil ester **15**



A drupanina acetilada **30** (40 mg, 0.146 mmol, 1 Eq) foi solubilizada em DMF e a solução foi tratada com 51 μ L DIPEA (0,292 mmol, 2 Eq) e, posteriormente, foram adicionados 115 mg do aminoácido $\text{NH}_2\text{Trp(N-Boc)OBn}$ **35** (0,292 mmol, 2 Eq), juntamente com os reagentes de acoplamento PyBOP (1 Eq, 76 mg, 0,146 mmol) e HOBt (1Eq, 20 mg, 0,146 mmol), (RODRIGUES et al., 2021). A reação foi deixada em agitação por 16 h, sendo monitorada por CCD (Hex/AcOEt 1:1 v/v). Após rotaevaporação do solvente DMF realizou-se a separação em coluna clássica cromatográfica com eluição por gradiente (SiO_2 , Hex/AcOE 1:1 v/v). O derivado protegido do triptofano acoplado com a drupanina **15** foi isolado como um sólido branco com rendimento de 61%. RMN ^1H **15** (CDCl_3 , 300 MHz) δ_{H} : 8,11 (d, 1H, J 8,1 Hz, H28), 7,59 (d, 1H, J 15,6 Hz, H7), 7,50

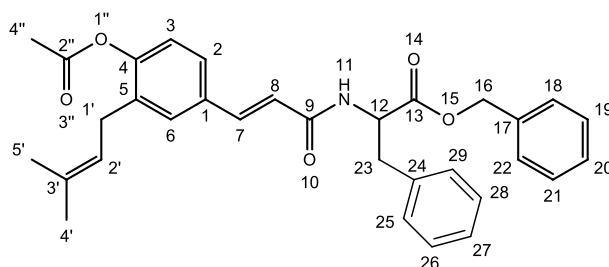
(d, 1H, J 7,7 Hz, H31), 7,26 (m, 10H, H18-H22, H25, H29-H30, H6 e H2), 7,02 (d, 1H, J 8,9 Hz, H5), 6,32 (d, 1H, J 15,6 Hz, H8), 6,30 (d, 1H, J 7,6 Hz, H11), 5,15 (m, 4H, H2', H12 e H16), 3,33 (d, 2H, J 5,5 Hz H23), 3,23 (d, 2H, J 7,2 Hz, H1'), 2,31 (s, 3H, H4''), 1,75 (s, 3H, H4'), 1,70 (s, 3H, H5'), 1,63 (s, 9H, H37-H39), tabela 15A. ESI-MS: m/z calcd. para $C_{39}H_{42}N_2NaO_7^+[M+Na]^+$: 673,2889; encontrado $C_{39}H_{42}N_2NaO_7^+[M+Na]^+$: 673,2665.

(E)-N-(3-Prenil-4-acetoxi cinamoil)-L-treonina benzil ester 16



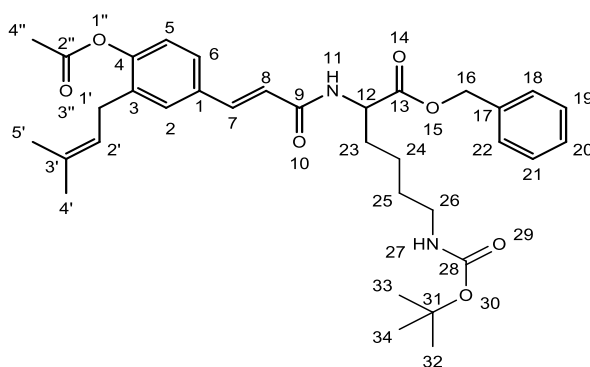
A drupanina acetilada **30** (50 mg, 0.182 mmol, 1 Eq) foi solubilizada em DMF e a solução foi tratada com 64 μ L DIPEA (0,364 mmol, 2 Eq) e, posteriormente, foram adicionados 76 mg do aminoácido $NH_2ThrOBn$ **36** (0,364 mmol, 2 Eq), juntamente com os reagentes de acoplamento PyBOP (1 Eq, 95 mg, 0,182 mmol) e HOBt (1Eq, 25 mg, 0,182 mmol), (RODRIGUES et al., 2021). A reação foi deixada em agitação por 16 h, sendo monitorada por CCD (Hex/AcOEt 1:1 v/v). Após rotaevaporação do solvente DMF realizou-se a separação em coluna clássica cromatográfica com eluição por gradiente (SiO_2 , Hex/AcOEt 1:1 a 7:3). O derivado protegido da treonina acoplada com a drupanina **16** foi isolado como um sólido branco com rendimento de 93%. RMN 1H **16** ($CDCl_3$, 300 MHz) δ_H : 7,60 (d, 1H, J 15,6 Hz, H7), 7,32 (s, 7H, H18-H22, H6 e H2), 7,00 (d, 1H, J 8,1 Hz, H5), 6,69 (d, 1H, J 8,9 Hz, H11), 6,45 (d, 1H, J 15,6 Hz, H8), 5,19 (m, 3H, H2' e H16), 4,80 (dd, 1H, J 2,4 Hz, J 8,9 Hz, H12), 4,41 (qd, 1H, J 2,3 Hz, J 6,2 Hz, H23), 3,22 (d, 2H, J 7,2 Hz, H1'), 2,30 (s, 3H, H4''), 1,73 (s, 3H, H4'), 1,69 (s, 3H, H5') e 1,23 (d, 3H, J 6,4 Hz, H25), tabela 16A. ESI-MS: m/z calcd. para $C_{27}H_{31}NNaO_6^+[M+Na]^+$: 488,2049; encontrado $C_{27}H_{31}NNaO_6^+[M+Na]^+$: 488,1972.

(E)-N-(3-Prenil-4-acetoxi cinamoil)-L-fenilalanina benzil ester 17



A drupanina acetilada **30** (50 mg, 0.182 mmol, 1 Eq) foi solubilizada em DMF e a solução foi tratada com 64 μ L DIPEA (0,364 mmol, 2 Eq) e, posteriormente, foram adicionados 93 mg do aminoácido NH₂PheOBn **37** (0,364 mmol, 2 Eq), juntamente com os reagentes de acoplamento PyBOP (1 Eq, 95 mg, 0,182 mmol) e HOBt (1Eq, 25 mg, 0,182 mmol), (RODRIGUES et al., 2021). A reação foi deixada em agitação por 16 h, sendo monitorada por CCD (Hex/AcOEt 1:1 v/v). Após rotaevaporação do solvente DMF realizou-se a separação em coluna clássica cromatográfica com eluição por gradiente (SiO₂, Tolueno/AcOEt 8:2 v/v). O derivado protegido da fenilalanina acoplada com a drupanina **17** foi isolado como um sólido branco com rendimento de 81%. RMN ¹H **17** (CDCl₃, 300 MHz) δ_H : 7,59 (d, 1H, *J* 15,6 Hz, H7), 7,35 (m, 12H, H18-H22, H25-H29, H6 e H2), 7,03 (d, 1H, *J* 8,9 Hz, H5), 6,32 (d, 1H, *J* 15,6 Hz, H8), 6,10 (d, 1H, *J* 7,78 Hz, H11), 5,20 (m, 3H, H2'e H16), 5,09 (m, 1H, H12), 3,22 (m, 4H, H23 e H1'), 2,32 (s, 3H, H4''), 1,76 (s, 3H, H4'), 1,71 (s, 3H, H5'), tabela 17A. ESI-MS: *m/z* calcd. para C₃₂H₃₃NNaO₅⁺[M+Na]⁺: 534,2256; encontrado C₃₂H₃₃NNaO₅⁺[M+Na]⁺: 534,2150.

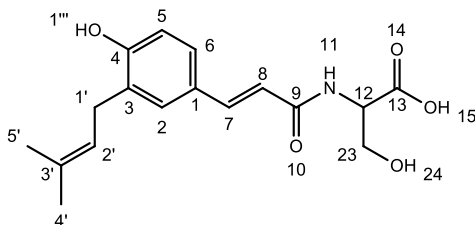
(*E*)-*N*-(3-Prenil-4-acetoxi cinamoil)-(Ne-Boc-*L*-lisina) benzil ester **18**



A drupanina acetilada **30** (50 mg, 0.182 mmol, 1 Eq) foi solubilizado em DMF e a solução foi tratada com 64 μ L DIPEA (0,364 mmol, 2 Eq) e, posteriormente, foram adicionados 122 mg do aminoácido NH₂Trp(N-Boc)OBn **38** (0,364 mmol, 2 Eq), juntamente com os reagentes de acoplamento PyBOP (1 Eq, 95 mg, 0,182 mmol) e HOBt (1Eq, 25 mg, 0,182 mmol), (RODRIGUES et al., 2021). A reação foi deixada em agitação por 16 h, sendo monitorada por CCD (Hex/AcOEt 1:1 v/v). Após rotaevaporação do solvente DMF realizou-se a separação em coluna clássica cromatográfica com eluição por gradiente (SiO₂, Tolueno/AcOEt 8:2 v/v). O derivado protegido da lisina acoplada com a drupanina **18** foi isolado como um sólido branco com rendimento de 73%. RMN ¹H **18** (CDCl₃, 300 MHz) δ_H : 7,59 (d, 1H, *J* 15,6 Hz, H7), 7,34 (m, 7H, H18-H22, H6 e H2), 7,01 (m, 1H, *J* 8,9 Hz, H5), 6,66 (d, 1H, *J* 7,5 Hz, H11), 6,44 (d, 1H, *J* 15,6 Hz, H8), 5,18 (m,

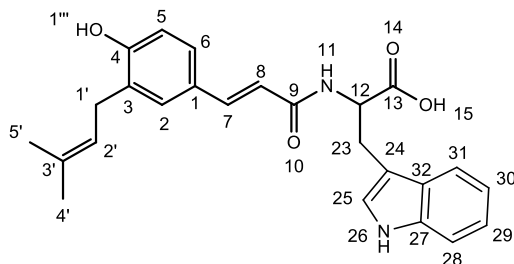
3H, H2' e H16), 4,75 (dd, 1H, J 7,3 Hz e J 12,2 Hz, H12), 4,68 (t, 1H, J 5,8 Hz, H27), 3,23 (d, 2H, J 7,2 Hz, H1'), 3,05 (dl, 2H, J 5,8 Hz, H26), 2,30 (s, 3H, H4''), 1,92 (m, 2H, H23), 1,75 (s, 3H, H4'), 1,70 (s, 3H, H5'), 1,42 (s, 9H, H32-H34), 1,31 (m, 4H, H24 e H25), tabela 18A. ESI-MS: m/z calcd. para $C_{34}H_{44}N_2NaO_7^+[M+Na]^+$: 615,3046; encontrado $C_{34}H_{44}N_2NaO_7^+[M+Na]^+$: 615,2889.

(*E*)-*N*-(4-Hidroxi-3-prenil cinamoil)-*L*-serina **19**



O derivado da drupanina **14** (41 mg, 0,091 mmol, 1 Eq) foi solubilizado em MeOH e misturado com 5 Eq de solução 10% KOH. A reação foi deixada em agitação sob refluxo à 70 °C por cerca de 4 h e monitorada por CCD (DCM/MeOH 9:1 v/v). Após resfriamento e extração com éter etílico, a mistura foi neutralizada com HCl (aq) 1M, sendo a camada orgânica extraída com éter etílico, concentrada a vácuo e analisada por RMN 1H e ^{13}C , e ESI-MS, (RODRIGUES et al., 2021). O derivado desprotegido da serina acoplada com a drupanina **19** foi isolado como um sólido branco com rendimento de 79%. RMN 1H **19** ($CDCl_3$, 300 MHz) δ_H : 7,42 (d, 1H, J 15,7 Hz, H7), 7,22 (m, 3H, H11, H6 e H2), 6,72 (d, 1H, J 8,2 Hz, H5), 6,50 (d, 1H, J 15,7 Hz, H8), 5,28 (m, 1H, H2'), 4,59 (t, 1H, J 4,4 Hz, H12), 3,92 (dd, 1H, J 4,9 Hz, J 11,2 Hz, H23a), 3,84 (dd, 1H, J 4,0 Hz, J 11,2 Hz, H23b), 3,24 (d, 2H, J 7,3 Hz, H1'), 1,71 (s, 3H, H4'), 1,68 (s, 3H, H5'), tabela 19A. ESI-MS: m/z calcd. para $C_{17}H_{22}NO_5^+[M+H]^+$: 320,1453; encontrado $C_{17}H_{22}NO_5^+[M+H]^+$: 320,1488.

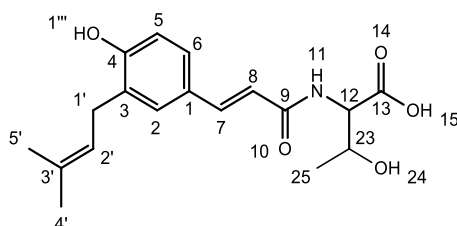
(*E*)-*N*-(4-Hidroxi-3-prenil cinamoil)-*L*-triptofano **20**



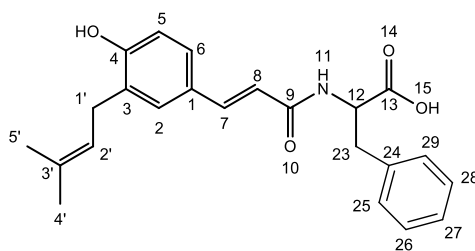
O derivado da drupanina **15** (40 mg, 0,062 mmol, 1 Eq) foi solubilizado em MeOH e misturado com 5 Eq de solução 10% KOH. A reação foi deixada em agitação sob refluxo à 70 °C por cerca de 4 h e monitorada por CCD (DCM/MeOH 9:1 v/v). Após resfriamento

e extração com éter etílico, a mistura foi neutralizada com HCl (aq) 1M, sendo a camada orgânica extraída com éter etílico, concentrada a vácuo e analisada por RMN ^1H e ^{13}C , e ESI-MS, (RODRIGUES et al., 2021). O derivado desprotegido do triptofano acoplada com a drupanina **20** foi isolado como um sólido branco com rendimento de 96%. RMN ^1H **20** (CDCl_3 , 300 MHz) δ_{H} : 7,63 (d, 1H, J 7,9 Hz, H28), 7,53 (d, 1H, J 15,5 Hz, H7), 7,39 (d, 1H, J 8,1 Hz, H31), 7,22 (m, 3H, H25, H29-H30), 7,14 (m, 2H, H6 e H2), 6,77 (d, 1H, J 8,0 Hz, H5), 6,13 (d, 1H, J 15,6 Hz, H8), 5,08 (d, 1H, J 7,0 Hz, H11), 5,29 (t, 1H, J 7,1 Hz, H2'), 5,00 (dd, 1H, J 5,8 Hz, J 12,5 Hz, H12), 3,46 (d, 2H, J 5,7 Hz, H23), 3,33 (d, 2H, J 7,4 Hz, H1'), 1,78 (dl, 6H, H4' e H5'), tabela 20A. ESI-MS: m/z calcd. para $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{NaO}_4^+[\text{M}+\text{Na}]^+$: 441,1790; encontrado $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{NaO}_4^+[\text{M}+\text{Na}]^+$: 441,1711.

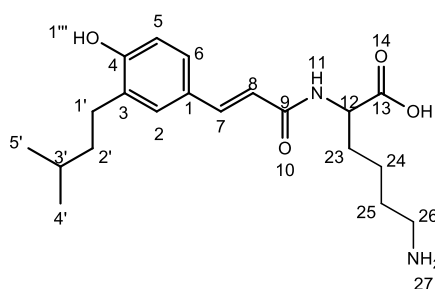
(*E*)-*N*-(4-Hidroxi-3-prenil cinamoil)-*L*-treonina **21**



O derivado da drupanina **16** (50 mg, 0,108 mmol, 1 Eq) foi solubilizado em MeOH e misturado com 5 Eq de solução 10% KOH. A reação foi deixada em agitação sob refluxo à 70 °C por cerca de 4 h e monitorada por CCD (DCM/MeOH 9:1 v/v). Após resfriamento e extração com éter etílico, a mistura foi neutralizada com HCl (aq) 1M, sendo a camada orgânica extraída com éter etílico, concentrada a vácuo e analisada por RMN ^1H e ^{13}C , e ESI-MS, (RODRIGUES et al., 2021). O derivado desprotegido da treonina acoplada com a drupanina **21** foi isolado como um sólido branco com rendimento de 67%. RMN ^1H **21** (CDCl_3 , 300 MHz) δ_{H} : 7,49 (d, 1H, J 15,7 Hz, H7), 7,30 (m, 3H, H11, H6 e H2), 6,78 (d, 1H, J 8,2 Hz, H5), 6,61 (d, 1H, J 15,7 Hz, H8), 5,34 (m, 1H, H2'), 4,59 (d, 1H, J 3,05 Hz, H12), 4,38 (m, 1H, H23), 3,33 (m, 2H, H1'), 1,77 (m, 3H, H4'), 1,74 (s, 3H, H5'), 1,21 (d, 3H, J 6,4 Hz, H25), tabela 21A. ESI-MS: m/z calcd. para $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{NNaO}_5^+[\text{M}+\text{Na}]^+$: 356,1474; encontrado $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{NNaO}_5^+[\text{M}+\text{Na}]^+$: 356,1435.

(E)-N-(4-Hidroxi-3-prenil cinamoil)-L-fenilalanina 22

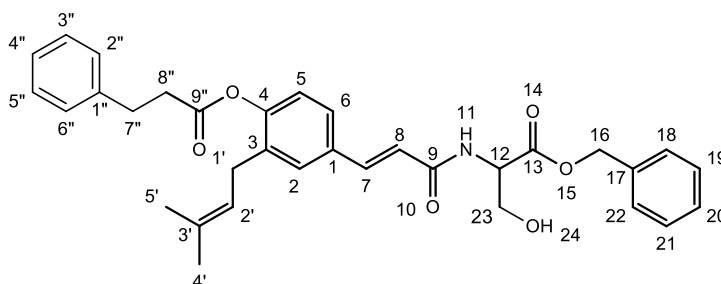
O derivado da drupanina **17** (39 mg, 0,078 mmol, 1 Eq) foi solubilizado em MeOH e misturado com 5 Eq de solução 10% KOH. A reação foi deixada em agitação sob refluxo à 70 °C por cerca de 4 h e monitorada por CCD (DCM/MeOH 9:1 v/v). Após resfriamento e extração com éter etílico, a mistura foi neutralizada com HCl (aq) 1M, sendo a camada orgânica extraída com éter etílico, concentrada a vácuo e analisada por RMN ^1H e ^{13}C , e ESI-MS, (RODRIGUES et al., 2021). O derivado desprotegido da fenilalanina acoplada com a drupanina **22** foi isolado como um sólido branco com rendimento de 87%. RMN ^1H **22** (MeOD₄, 300 MHz) δ_{H} : 7,33 (d, 1H, J 15,7 Hz, H7), 7,14 (m, 7H, H25-H29, H2 e H6), 6,69 (s, 1H, H5), 6,37 (d, 1H, J 15,7 Hz, H8), 5,25 (m, 1H, J 7,4 Hz, H2'), 3,22 (d, 1H, J 7,1 Hz, H1'), 3,18 e 2,97 (m, 2H, H23), 1,68 (s, 3H, H4') e 6,65 (s, 3H, H5'), tabela 22A. ESI-MS: m/z calcd. para C₂₃H₂₆NO₄⁺[M+H]⁺: 380,1817; encontrado C₂₃H₂₆NO₄⁺[M+H]⁺: 380,1853.

(E)-N-(3-isopentil-4-hidroxi cinamoil)-L-lisina 23

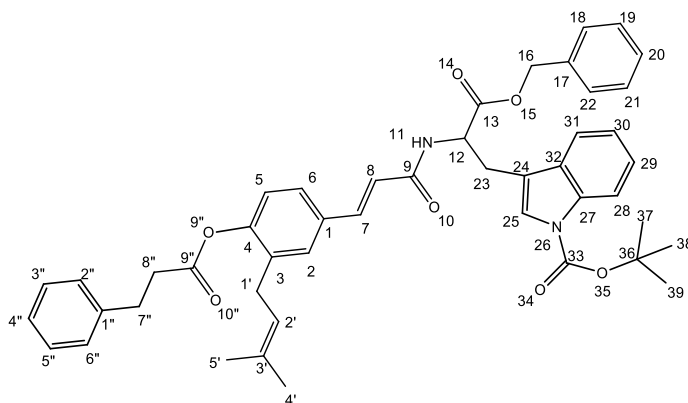
O derivado da drupanina **18** (50 mg, 0,084 mmol, 1 Eq) foi solubilizado em MeOH e misturado com 5 Eq de solução 10% KOH. A reação foi deixada em agitação sob refluxo à 70 °C por cerca de 4 h e monitorada por CCD (DCM/MeOH 9:1 v/v). Após resfriamento e extração com éter etílico, a mistura foi neutralizada com HCl (aq) 1M, sendo a camada orgânica extraída com éter etílico e concentrada a vácuo (YASHIRO et al., 2015). O produto obtido (37 mg, 0,080 mmol, 1 Eq) foi posteriormente deixado em agitação com 1:1 TFA/ DCM (237 mg, 2.1 mmol) por cerca de 1 hora, sendo a reação constantemente monitorada por CCD (DCM/MeOH 8:2 v/v). Posteriormente a mistura foi neutralizada

com KOH (aq) 1M, sendo a camada orgânica extraída com DCM e concentrada a vácuo (LAVRADO et al., 2011). O derivado desprotegido do acoplamento da lisina com a drupanina **23** foi isolado como um sólido amarelado com rendimento de 47%. Para purificação, o produto final foi injetado em HPLC-UV preparativo com eluição por gradiente MeOH/H₂O, tabela 3, (C₁₈, Phenomenex, 4 μm, 250×10 mm, fluxo de 4.6 mL/min). RMN ¹H **23** (MeOD₄, 400 MHz) δ_H: 7,43 (d, 1H, *J* 15,7 Hz, H7), 7,30 (d, 2H, *J* 10,6 Hz, H6-H2), 6,71 (d, 1H, *J* 8,3 Hz, H5), 6,55 (d, 1H, *J* 15,7 Hz, H8), 2,93 (t, 2H, *J* 7,2 Hz, H26), 2,80 (t, 2H, *J* 6,6 Hz, H1'), 1,93 (m, 1H, H23a), 1,72 (m, 3H, H23b' e H25), 1,48 (m, 2H, H24), 1,32 (s, 6H, H4' e H5'), tabela 23A. ESI-MS: *m/z* calcd. para C₂₀H₃₁N₂O₄⁺[M+H]⁺: 363.2239; encontrado C₂₀H₃₁N₂O₄⁺[M+H]⁺: 361,2085.

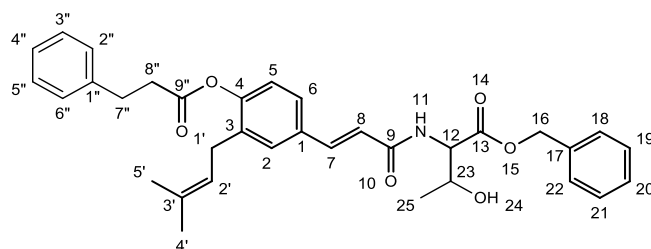
(*E*)-*N*-(3-Prenil-4-dihidrocinamoiloxi cinamoil)-*L*-serina benzil ester **24**



A bacarina (46 mg, 0.126 mmol, 1 Eq) foi solubilizada em DMF, e posteriormente tratada com 44 μL DIPEA (0,252 mmol, 2 Eq), 49 mg do aminoácido NH₂SerOBn **34** (0,252 mmol, 2 Eq), juntamente com os reagentes de acoplamento PyBOP (1 Eq, 66 mg, 0,126 mmol) e HOBT (1Eq, 17 mg, 0,126 mmol), (RODRIGUES et al., 2021). A reação foi deixada em agitação por 16 h, sendo monitorada por CCD (Hex/AcOEt 1:1 v/v). Após rotaevaporação do solvente DMF realizou-se a separação em coluna clássica cromatográfica com eluição por gradiente (SiO₂, Tolueno/AcOEt 8:2 a 1:1 v/v). O derivado protegido da serina acoplada com a bacarina **24** foi isolado como um sólido branco com rendimento de 53%. RMN ¹H **24** (CDCl₃, 300 MHz) δ_H: 7,22 (d, 1H, *J* 15,1 Hz, H7), 6,92 (m, 12H, H18-H22, H2''-H6'', H6 e H2), 6,57 (d, 1H, *J* 8,6 Hz, H5), 6,47 (d, 1H, *J* 7,2 Hz, H11), 6,09 (d, 1H, *J* 15,2 Hz, H8), 4,93 (s, 2H, H16), 4,87 (m, 1H, H2'), 4,57 (dt, 1H, *J* 3,3 Hz e *J* 6,9 Hz, H12), 3,76 (qd, 2H, *J* 3,4 Hz e *J* 10,9 Hz, H23), 2,88 (m, 4H, H1' and H7''), 2,68 (t, 2H, *J* 7,2 Hz, H8''), 1,55 (s, 3H, H4') e 1,48 (s, 3H, H5'), tabela 24A. ESI-MS: *m/z* calcd. para C₃₃H₃₆NO₆⁺[M+H]⁺: 542.2498; encontrado C₃₃H₃₆NO₆⁺[M+H]⁺: 542.2537.

(E)-N-(3-Prenil-4-dihidrocinamoiloxi cinamoil)-(N'-Boc-L-triptofano) benzil ester 25

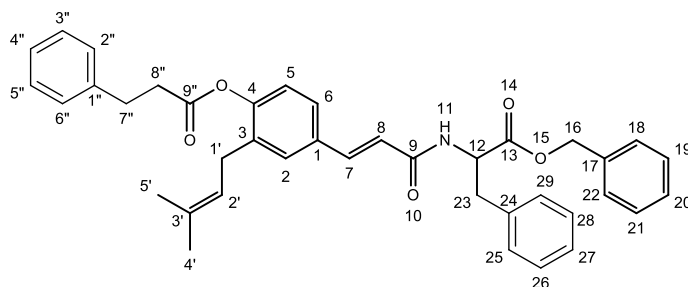
A bacarina (24 mg, 0,067 mmol, 1 Eq) foi solubilizada em DMF, tratada com 23 μ L DIPEA (0,133 mmol, 2 Eq), 53 mg do aminoácido $\text{NH}_2\text{Trp}(\text{N-Boc})\text{OBn}$ **35** (0,133 mmol, 2 Eq), juntamente com os reagentes de acoplamento PyBOP (1 Eq, 0,067 mmol, 35 mg) e HOBt (1Eq, 0,067 mmol, 9 mg) (RODRIGUES et al., 2021). A reação foi deixada em agitação por 16 h, sendo monitorada por CCD (Hex/AcOEt 1:1 v/v). Após concentração a vácuo do DMF, realizou-se a separação em coluna clássica cromatográfica com eluição por gradiente (SiO_2 , Tolueno/AcOEt 8:2 v/v). O derivado protegido do triptofano acoplada com a bacarina **25** foi isolado como um sólido branco com rendimento de 68%. RMN ^1H **25** (CDCl_3 , 300 MHz) δ_{H} : 7,73 (d, 1H, J 7,6 Hz, H28), 7,22 (d, 1H, J 15,1 Hz, H7), 7,13 (d, 1H, J 7,5 Hz, H31), 6,90 (m, 15H, H18-H22, H25, H29-H30, H2''-H6'', H6 e H2), 5,98 (d, 1H, J 15,1 Hz, H8), 5,93 (d, 1H, J 7,5 Hz, H11), 4,77 (m, 4H, H2', H16 e H12), 3,10 (d, 2H, J 5,3 Hz, H23), 2,88 (m, 4H, H-1' e H-7''), 2,69 (t, 2H, J 7,3 Hz, H-8''), 1,56 (s, 6H, H-4') e 1,48 (s, 6H, H-5'), 1,46 (s, 9H, H-37-39), tabela 25A. ESI-MS: calcd. para $\text{C}_{46}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_7^+[\text{M}+\text{H}]^+$: 741,3495; encontrado $\text{C}_{46}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_7^+[\text{M}+\text{H}]^+$: 741,3534.

(E)-N-(3-Prenil-4-dihidrocinamoiloxi cinamoil)-L-treonina benzil ester 26

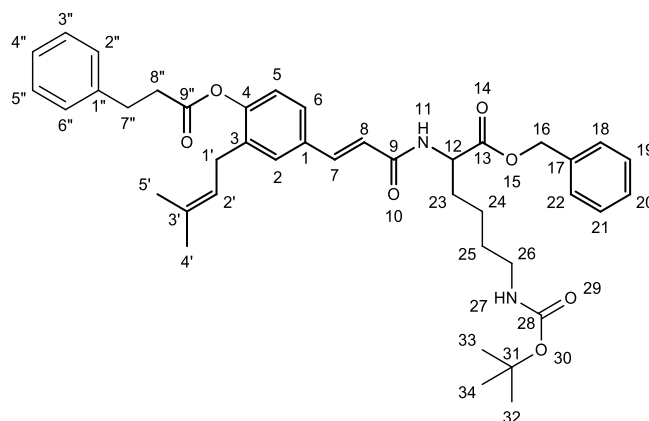
A bacarina (58 mg, 0,160 mmol, 1 Eq) foi solubilizada em DMF e a solução foi tratada com 57 μ L DIPEA (0,320 mmol, 2 Eq) e 67 mg do aminoácido NH_2ThrOBn **36** (0,320 mmol, 2 Eq), juntamente com os reagentes de acoplamento PyBOP (1 Eq, 83 mg, 0,160 mmol) e HOBt (1Eq, 22 mg, 0,160 mmol), (RODRIGUES et al., 2021). A reação foi

deixada em agitação por 16 h, sendo monitorada por CCD (Tolueno/AcOEt 8:2 v/v). Após rotaevaporação do solvente DMF realizou-se a separação em coluna clássica cromatográfica com eluição por gradiente (SiO₂, Tolueno/AcOEt 8:2 a 1:1 v/v). O derivado protegido da treonina acoplada com a bacarina **26** foi isolado como um sólido branco com rendimento de 68%. RMN ¹H **26** (CDCl₃, 300 MHz) δ_H: 7,34 (d, 1H, *J* 15,1 Hz, H7), 7,02 (m, 12H, H18-H22, H2''-H6'', H6 e H2), 6,68 (d, 1H, *J* 8,6 Hz, H5), 6,49 (d, 1H, *J* 8,6 Hz, H11), 6,23 (d, 1H, *J* 15,1 Hz, H8), 4,98 (m, 3H, H16 e H 2'), 4,63 (dd, 1H, *J* 2,3 Hz - *J* 8,6 Hz, H12), 4,25 (m, 1H, H23), 2,95 (m, 4H, H1'e H7''), 2,79 (t, 2H, *J* 7,3 Hz, H8''), 1,66 (s, 3H, H4'), 1,59 (s, 3H, H5') e 1,18 (d, 3H, *J* 6,2 Hz, H25), tabela 26A. ESI-MS: *m/z* calcd. para C₃₄H₃₈NO₆⁺[M+H]⁺: 556.2654; encontrado C₃₄H₃₈NO₆⁺[M+H]⁺: 556.2692.

(*E*)-*N*-(3-Prenil-4-dihidrocinamoiloxi cinamoil)-*L*-fenilalanina benzil ester **27**



A bacarina (49 mg, 0.135 mmol, 1 Eq) foi solubilizada em DMF e a solução foi tratada com 47 µL DIPEA (0,270 mmol, 2 Eq) e 69 mg do aminoácido NH₂PheOBn **37** (0,270 mmol, 2 Eq), juntamente com os reagentes de acoplamento PyBOP (1 Eq, 70 mg, 0,135 mmol) e HOBt (1Eq, 18 mg, 0,135 mmol), (RODRIGUES et al., 2021). A reação foi deixada em agitação por 16 h, sendo monitorada por CCD (Hex/AcOEt 1:1 v/v). Após rotaevaporação do solvente DMF realizou-se a separação em coluna clássica cromatográfica com eluição por gradiente (SiO₂, Tolueno/AcOEt 8:2 v/v). O derivado protegido da fenilalanina acoplada com a bacarina **27** foi isolado como um sólido branco com rendimento de 74%. RMN ¹H **27** (CDCl₃, 300 MHz) δ_H: 7,21 (d, 1H, *J* 15,1 Hz, H7), 6,91 (m, 15H, H18-H22, H2''-H6'' e H25-H29), 6,65 (m, 2H, H6 e H2), 6,58 (d, 1H, *J* 8,6 Hz, H5), 5,98 (d, 1H, *J* 15,1 Hz, H8), 5,85 (d, 1H, *J* 7,5 Hz, H11), 4,84 (m, 4H, H16, H2' e H12), 2,89 (m, 6H, H23, H1' e H7''), 2,69 (t, 2H, *J* 7,2 Hz, H8''), 1,56 (s, 3H, H4'), 1,48 (s, 3H, H5'), tabela 27A. ESI-MS: *m/z* calcd. para C₃₉H₄₀NO₅⁺[M+H]⁺: 602.2862; encontrado C₃₉H₄₀NO₅⁺[M+H]⁺: 602.2901.

(E)-N-(3-Prenil-4-dihidrocinaoiloxi cinamoil)-(Ne-Boc-L-lyisina) benzil ester 28

A bacarina (23 mg, 0.063 mmol, 1 Eq) foi solubilizada em DMF e a solução foi tratada com 22 μ L DIPEA (0,125 mmol, 2 Eq) e 42 mg do aminoácido $\text{NH}_2\text{Lys}(\text{N-Boc})\text{OBn}$ **38** (0,125 mmol, 2 Eq), juntamente com os reagentes de acoplamento PyBOP (1 Eq, 33 mg, 0,063 mmol) e HOBt (1Eq, 9 mg, 0,063 mmol), (RODRIGUES et al., 2021). A reação foi deixada em agitação por 16 h, sendo monitorada por CCD (Hex/AcOEt 1:1 v/v). Após rotaevaporação do solvente DMF realizou-se a separação em coluna clássica cromatográfica com eluição por gradiente (SiO_2 , Tolueno/AcOEt 8:2 a 1:1 v/v). O derivado protegido da lisina acoplada com a bacarina **28** foi isolado como um sólido branco com rendimento de 77%. RMN ^1H **28** (CDCl_3 , 300 MHz) δ_{H} : 7,22 (d, 1H, J 15,1 Hz, H7), 6,94 (m, 12H, H18-H22, H2''-H2'', H6 e H2), 6,59 (d, 1H, J 8,6 Hz, H5), 6,15 (d, 1H, J 7,2 Hz, H11), 6,08 (d, 1H, J 15,1 Hz, H8), 4,91 (m, 3H, H16 e H2'), 4,49 (dd, 1H, J 6,9 Hz e J 11,8 Hz, H12), 4,33 (sl, 1H, H27), 2,88 (m, 3H, H1', H7' e H26), 2,69 (t, 2H, J 7,3 Hz, H8''), 1,72 (m, 2H, H23), 1,57 (s, 3H, H4'), 1,49 (s, 3H, H5'), 1,26 (s, 9H, H32-H34), 1,14 (m, 4H, H24-H25), tabela 28A. ESI-MS: m/z calcd. para $\text{C}_{41}\text{H}_{51}\text{N}_2\text{O}_7^+[\text{M}+\text{H}]^+$: 683.3652; encontrado $\text{C}_{41}\text{H}_{51}\text{N}_2\text{O}_7^+[\text{M}+\text{H}]^+$: 683.3742.

Avaliação Biológica dos Derivados de Produtos Naturais

3.3. Avaliação biológica dos derivados de drupanina, artepelin C e bacarina

3.3.1. Ensaios antitumorais

3.3.1.1. Linhagens de células tumorais e normais

Seis linhagens celulares de próstata e de mama foram utilizadas para a realização dos ensaios biológicos, sendo: duas linhagens de carcinoma de próstata humano (hormônios independentes: DU-145 - metastática para o cérebro, PC-3 - metastática para o osso), duas linhagens de carcinoma de mama humano (MCF-7 – não metastática com receptor de estrógeno; MB-MDA-231 – metastática sem receptor de estrógeno), e duas linhagens não tumorais de controle, sendo, uma a epitelial de mama (MCF-10A) e outra a epitelial de próstata (PNT-2).

Inicialmente, todas as linhagens armazenadas em freezer a -80 °C foram descongeladas e mantidas em meio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e penicilina/estreptomicina (1% v/v), em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂. O crescimento celular foi monitorado diariamente sob microscopia (FLoid™ Cell Imaging Station) por período suficiente para obter 75-80% de confluência. Nesta etapa, as células foram coletadas após ação da enzima tripsina (TrypLE™ Express), centrifugadas, ressuspensas em meio de cultura e transferidas para um novo frasco de cultura.

3.3.1.2. Avaliação antitumoral *in vitro* dos derivados semissintéticos

Uma vez obtido a concentração ideal de crescimento de cada linhagem celular, a próxima etapa foi avaliar o efeito citotóxico dos derivados semissintéticos da própolis verde frente as linhagens selecionadas pelo método colorimétrico clássico de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio), (DA SILVA et al., 2020). A redução do substrato solúvel MTT, de coloração amarela, pelas enzimas desidrogenases mitocondriais levam a formação do produto insolúvel formazan, de coloração arroxeada, que pode ser facilmente dissolvido por solvente DMSO. Nesse momento, é possível

quantificar o dano celular induzido pelo agente a partir da relação linear entre a concentração de células no meio e a absorção do produto formado em 570 nm.

As linhagens tumorais e não tumorais foram incubadas na concentração de 5×10^3 células/poço (MCF-7 e 10A, MB-MDA-231 e DU-145) e 5×10^4 células/poço (PC-3, PNT-2) em 100 μ L de meio de cultura em placas de 96 poços por um período de 24h para aderência das células nas placas. Posteriormente o sobrenadante foi removido e os compostos de interesse, solubilizados em meio com 0,5% (v/v) de DMSO, foram adicionados em duplicata numa variação de oito concentrações (200 μ M à 1.56 μ M), utilizando-se como composto de referências a cisplatina. As células ficaram incubadas com as substâncias por 72 h. Então, o sobrenadante foi removido dos poços para adição do MTT (50 μ L na concentração de 2 mg/mL de PBS) seguido de incubação por 3 h. Após essa etapa, o sobrenadante foi removido e o agente solubilizante foi adicionado (50 μ L de DMSO). As leituras de absorbância foram realizadas em 570 nm no equipamento Biotek Synergy HT e os resultados foram utilizados para determinar a concentração citotóxica para 50 % das células (CC_{50}) no programa GraphPad Prism v. 5. Todos os ensaios biológicos foram realizados em duplicata experimentais obtidas em dias alternados.

3.3.2. Ensaios antiparasitários

3.3.2.1. Cultura de *Trypanosoma cruzi*

A atividade tripanocida dos derivados semissintéticos das substâncias da própolis verde foi determinada nas formas intracelulares amastigotas de uma linhagem modificada geneticamente de *Trypanosoma cruzi* chamada de Tulahuen *LacZ* (BUCKNER et al., 1996). Esta linhagem, modificada para a expressão da enzima β -galactosidase (oriunda da bactéria *Escherichia coli*), facilita a determinação de parasitas viáveis no meio reacional através da reação colorimétrica com substrato CPRG (vermelho de cloro-fenol β -D galactopirano). Esta enzima converte o CPRG, de coloração amarelada, em dois produtos de coloração avermelhada, D-galactose e o vermelho de clorofenol. Dessa forma, a atividade anti *T. cruzi in vitro* foi determinada a partir da relação linear entre a concentração de parasitas no meio e a absorção dos produtos formados em 570 nm.

Como célula hospedeira das formas amastigotas, utilizou-se uma linhagem epitelial renal LLC-MK₂ (isolada de macaco Rhesus), que foi cultivada em meio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute), suplementado com 10% de soro fetal bovino

(FBS) e penicilina/estreptomicina (1% v/v) e mantida em estufa a 37 °C e com atmosfera de 5% de CO₂.

3.3.2.2. Avaliação tripanocida *in vitro* dos derivados semissintéticos

Inicialmente, as células hospedeiras LLC-MK₂ foram plaqueadas na concentração de 5x10⁴ células/poço (placas de 96 poços de fundo chato) e infectadas com as formas tripomastigotas da cepa Tulahuen *LacZ*, na concentração de 5x10⁵ parasitas/mL. Após incubação por 48h em estufa a 37 °C e com atmosfera de 5% de CO₂, o sobrenadante foi removido por meio de sucessivas lavagens com tampão fosfato-salino (PBS) para remoção dos parasitas extracelulares que não infectaram células. Posteriormente os derivados semissintéticos foram adicionados em duplicata de oito concentrações diferentes (200 µM à 1.56 µM) e incubados por 72 h, assim como o composto de referência, o benzonidazol. Após este período, a viabilidade das formas amastigotas foram avaliadas a partir da adição do substrato CPRG a 400 µM em 0,3% Triton X-100 (pH 7,4), sendo as placas novamente incubadas por 4 h em estufa a 37 °C. As leituras de absorbância foram realizadas em 570 nm no equipamento Biotek Synergy HT e os resultados foram utilizados para determinar a concentração inibitória para 50% das formas amastigotas (IC₅₀, do inglês *inhibitory concentration*) no programa GraphPad Prism v. 5. Todos os ensaios biológicos foram realizados em duplicata experimentais obtidas em dias alternados.

3.3.2.3. Avaliação da citotoxicidade em LLC-MK₂ dos derivados semissintéticos

As células hospedeiras LLC-MK₂ foram plaqueadas na concentração de cerca de 5x10⁴ células/poço (placas de 96 poços de fundo chato) e após 48 h o sobrenadante foi removido por meio de sucessivas lavagens com Tampão fosfato-salino (PBS). Os derivados semissintéticos foram adicionados em oito concentrações diferentes (200 µM à 1.56 µM) e incubados por 72 h a 37 °C, assim como o composto de referência, o benzonidazol.

Posteriormente o sobrenadante foi removido e os efeitos da citotoxicidade foram avaliados a partir da adição de MTT (50 µL na concentração de 2 mg/mL de PBS) e incubação por 3 h. Os cristais de formazan formados foram dissolvidos em DMSO (50 µL/poço) e as leituras de absorbância foram realizadas em 570 nm no equipamento Biotek Synergy HT. Os resultados foram utilizados para determinar a concentração

citotóxica para 50 % das células (CC₅₀) no programa GraphPad Prism v. 5. Todos os ensaios biológicos foram realizados em duplicata experimentais obtidas em dias alternados.

3.3.3. Ensaios antimicrobianos

Para a realização da Concentração Inibitória Mínima (CIM), as amostras foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e posteriormente acrescentou-se caldo Mueller Hinton (MH). A concentração final de DMSO não foi superior a 5% e a solução nesta porcentagem foi utilizada como controle negativo. Com o auxílio de uma alça de inoculação esterilizada, as bactérias foram transferidas para um tubo contendo 3 mL de solução salina (estéril) até obter turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, que corresponde a aproximadamente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Em seguida, foi retirado 500 µL desta turvação para outro tubo contendo 4,5 mL de solução salina e depois 2 mL deste tubo foram transferidos para um terceiro tubo contendo 10 mL de caldo MH. Em uma microplaca esterilizada de 96 orifícios foram depositados 50 µL de caldo MH, 50 µL de solução estoque e posteriormente acrescentaram-se 30 µL do caldo MH e 20 µL suspensão bacteriana, a fim de se obter uma concentração de 0,049 a 100 µg/mL, em diluição seriada permitindo determinar a concentração necessária para inibir o crescimento bacteriano a ser avaliado. Nos demais orifícios foi feito o controle da cultura, pelo qual deve apresentar crescimento bacteriano devido à ausência do agente antimicrobiano, controle de esterilidade do caldo, controle esterilidade das amostras e controle do DMSO. A estreptomicina foi o controle positivo para a linhagem Gram-negativa e a penicilina foi o controle positivo para a linhagem Gram-positiva. As placas foram incubadas em condições aeróbicas a 37 °C por 24 h. Após o período de incubação foram adicionados 30 µL de resazurina (Sigma) em cada poço 30 µL de resazurina (Sigma) na concentração de 0,02% preparado em solução aquosa. As placas foram incubadas novamente por 30 min, sendo então observada a alteração da cor azul (ausência de crescimento bacteriano) e a cor rosa (presença de crescimento bacteriano).

Para a obtenção da Concentração Bactericida Mínima (CBM) antes da adição da resazurina na CIM, foi retirada uma alíquota (10 µL) de cada poço da microplaca e transferidos para uma nova placa de Petri contendo meio de cultura Agar Mueller Hinton. A incubação dessas placas foi realizada em condições aeróbicas a 37 °C por 24 h.

Após o período de incubação, o resultado foi avaliado pela ausência ou crescimento de colônias de cada alíquota inoculada. Após o período de incubação, as

culturas foram inspecionadas visualmente e os resultados foram interpretados da seguinte maneira: Quando os resultados da CIM e CBM são iguais indica que as amostras avaliadas apresentaram efeito bactericida, enquanto que o valor da CBM obtido for acima da CBM, indica que as amostras avaliadas apresentaram efeito bacteriostático.

Estudos *in silico* dos Derivados de Produtos Naturais

3.4. Análises *in silico* dos derivados de drupanina, artepelin C e bacarina

3.4.1. Predição de alvos

Para realizar a predição de alvos para os derivados, usou-se o “PPB Poly-Pharmacology Browser” (<http://gdbtools.unibe.ch:8080/PPB/index.html>), que realiza a identificação e classificação de alvos usando uma abordagem baseada em ligante. A pesquisa por similaridade de ligantes é realizada considerando diferentes “*fingerprints*” independentes e/ou combinados. Para tal, considera-se mais de 1.463 proteínas-alvo, cada uma representada por no mínimo 20 moléculas bioativas conforme relatado no banco de dados ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>). Como “input” utilizou-se as notações SMILES dos compostos, e para cada um, foram obtidas: a classificação (ranqueamento) de alvos preditos, o número de moléculas/ligantes encontrados e os “*fingerprints*” mais relevantes e bem pontuados.

3.4.2. Modelo de similaridade por 2D *fingerprint*

Os 26 compostos selecionados foram inseridos no KNIME (BERTHOLD et al., 2008; KNIME AG, 2021) e divididos em dois subconjuntos, um contendo apenas o composto de referência (bacarina) e outro contendo os demais 25 compostos. Foram então gerados os “*fingerprints*” 2D como descritores para ambos os subconjuntos, usando o nó implementado RDKit (RDKit: OPEN-SOURCE CHEMINFORMATICS, 2021). Estes foram posteriormente confrontados para o cálculo de valores de similaridade de Tanimoto (variando de 0,00 a 1,00) e classificados sequencialmente.

3.4.3. Estudo de *docking* – desenvolvimento e validação

A estrutura da proteína AKR1C3 (PDB ID 1S2C) (LOVERING et al., 2004) foi obtida do “RCSB Protein Data Bank” (<https://www.rcsb.org/>), sendo previamente preparada usando o software “Protein Preparation Wizard” (MADHAVI SASTRY et al., 2013; SCHRÖDINGER LLC., 2010). O pré-processamento foi feito pelas seguintes funções: adição de hidrogênio, remoção de moléculas de água e manutenção apenas do

monômero A (excluindo-se o monômero B), exclusão de outros ligantes, cofatores e metais.

Os ligantes utilizados nas simulações de *docking* foram previamente preparados desenhando suas estruturas no software *ChemDraw* (PERKINELMER INFORMATICS INC., 2021) e copiando-os no formato SMILES. Na sequência, as moléculas foram importadas no *Ligprep* (SCHRÖDINGER, 2018) e processadas considerando-se o campo de força *MMFFs*, com atribuição de cargas parciais aos átomos, bem como dos possíveis estados de ionização (gerados com o módulo *Epik*, em $\text{pH} = 7,0 \pm 1,0$), sendo, por fim, as moléculas exportadas no formato *mol2*.

As simulações de *docking* foram conduzidas no software *Glide* (HALGREN et al., 2004) por meio de dois diferentes protocolos, desenvolvidos e validados com base tanto no composto de referência (bacarina) quanto nos procedimentos de *redocking*.

O primeiro protocolo foi desenvolvido incluindo-se restrições para bacarina, conforme previamente reportado na literatura (ENDO et al., 2012). Essas restrições foram aplicadas considerando que estudos de mutagênese direcionada demonstraram que os resíduos não conservados Ser118, Met120 e Phe311 em AKR1C3 realizam interações importantes com a bacarina. Desta forma, a fim de minimizar o número de restrições aplicadas, apenas uma restrição de ligação de hidrogênio em OH de Ser118 foi usada. Construiu-se um "grid" (grade ou caixa que limita o espaço do sítio no receptor) usando parâmetros padrões, exceto pelo estabelecimento das coordenadas tridimensionais definidos no espaço pelo "centróide": $x = 26,05$, $y = -27,78$ e $z = 61,15$. O "grid" compreende duas caixas: externa e interna, com arestas de comprimentos de 20 \AA^3 e $10 \times 10 \times 16 \text{ \AA}$, respectivamente. As simulações de *docking* foram realizadas usando a função de pontuação *Standard Precision (SP)* do *Glide*, considerando as cargas parciais definidas para os ligantes e desativando a minimização pós-*docking*.

O segundo protocolo foi desenvolvido usando exatamente os mesmos parâmetros gerais descritos acima, exceto pela não inclusão da restrição mencionada.

Ambos os protocolos de *docking* ('com' e 'sem' restrições) foram validados por *redocking* usando os parâmetros supramencionados bem como a estrutura da proteína AKR1C3 (PDB ID 1S2C) previamente preparada. Vale ressaltar que, antes das simulações de *redocking*, foi feita uma preparação simples do ligante nativo (FLF, ácido 2-[[3-(trifluorometil)fenil]amino] benzóico), considerando-o em formato 3D (*mol2*), ajustando ordens de ligação, adicionando átomos de hidrogênio, bem como calculando cargas atômicas parciais.

Além disso, os resultados foram programados para gerar 10 poses de *docking* para cada molécula e, em alguns casos, menos poses foram geradas (de acordo com o corte de energia pré-estabelecido no *Glide*). As poses obtidas para cada molécula foram inspecionadas visualmente e, assim, separadas em “*clusters*” (conjuntos/famílias) de poses aparentemente melhores sobrepostas representando poses mais homogêneas e significativas. Dentre a família com poses mais significativas, aquela com o melhor valor de pontuação *score* foi selecionada como a pose representativa. Quando os resultados das poses foram muito dispersos ao acaso (baixa homogeneidade entre elas), a pose com melhor pontuação fora então selecionada como a representativa para tal molécula.

3.4.4. Estudos de *docking* com outros alvos enzimáticos

Simulações de *docking* com outros alvos enzimáticos também foram realizadas utilizando-se do software *Glide*. Para tal, realizou-se a pré-preparação das proteínas e dos ligantes correspondentes, conforme descrito no tópico 3.4.3.. As seguintes estruturas 3D das proteínas e respectivos IDs do PDB foram usadas para cada alvo: BET (6P05.pdb) (LI et al., 2020), GRP78 (3LDP.pdb) (MACIAS et al., 2011), MDM2 (4ERE.pdb) (REW et al., 2012) e mTOR (4JT6.pdb) (YANG et al., 2013). Na etapa de geração dos respectivos “*grids*” para cada receptor, ao invés de usar coordenadas espaciais 'centróides', usamos os correspondentes ligantes nativos como referência (centralizado dentro da grade), com os tamanhos padrão para as caixas externas e internas (arestas de comprimentos de 20 Å³ e 10 Å³, respectivamente). As simulações de *docking* foram realizadas usando a função de pontuação *Standard Precision (SP)* implementada no *Glide*.

Foram construídas curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) usando o nó padrão “*ROC curve*” implementado no KNIME JavaScript Views, e fornecido pela KNIME AG, Zurique, Suíça. As curvas ROC podem ser analisadas com vista a validação de uma determinada metodologia/modelo (por exemplo, protocolo de *docking*) e sua respectiva classificação/discriminação correta entre compostos ativos e inativos. Os compostos são classificados em relação às proporções verdadeiro/falso, positivo/negativo e são representados em termos de sensibilidade e especificidade. Assim, para a construção das curvas ROC, a sensibilidade (eixo y) é correlacionada em função de 1-especificidade (eixo x), onde a sensibilidade é definida pela razão de verdadeiros positivos, e 1-especificidade pela razão de falsos positivos classificados pelo modelo. As curvas ROC construídas foram avaliadas pelos respectivos valores de AUC (*Area Under the Curve*),

onde valores próximos a 1,0 indicam idealidade e melhor desempenho, enquanto o valor 0,5 indica classificação aleatória pelo modelo (NICHOLLS, 2008; TRIBALLEAU et al., 2005).

4. Resultados e Discussão

Isolamento dos Produtos Naturais

4.1. Isolamento do artepelin C, drupanina e bacarina

4.1.1. Obtenção do extrato hidroalcoólico da própolis verde e de *Baccharis dracunculifolia*

A partir da extração hidroalcoólica de um quilograma de própolis verde e das folhas de *Baccharis dracunculifolia* foi possível obter, separadamente, aproximadamente 300 g de extrato seco. Cada extrato bruto foi analisado por CLAE-DAD (cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos), sendo os perfis cromatográficos analisados para constatação da presença das substâncias desejadas, artepelin C, drupanina e bacarina (Figura 8).

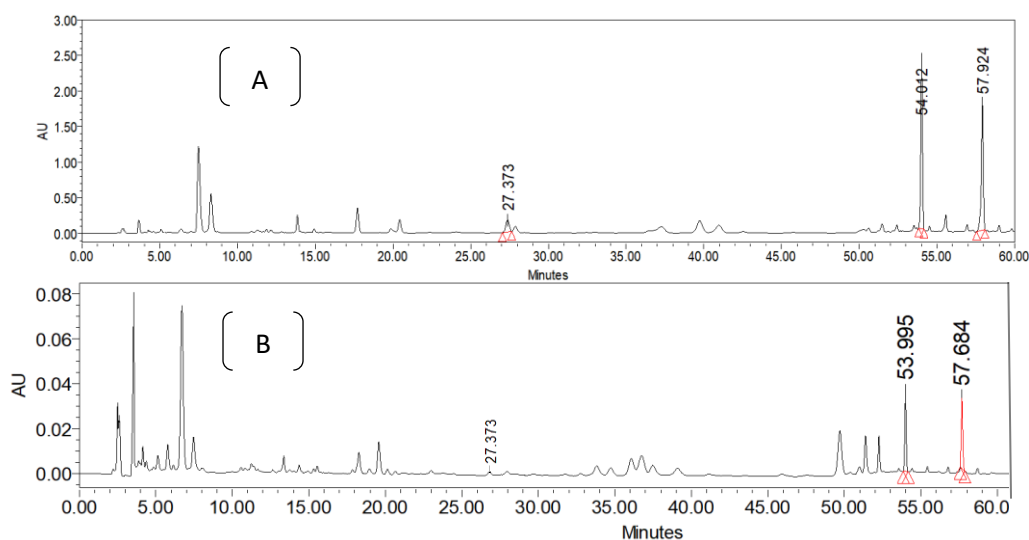


Figura 8. Cromatogramas dos extratos hidroalcoólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE – DAD). A: própolis verde; B: folhas de *Baccharis dracunculifolia*. Eluição: drupanina - 27,3 min; artepelin C - 53,9 min; bacarina - 57,7 min.

4.1.2. Fracionamento do extrato hidroalcoólico por cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC)

O fracionamento de 2 g de extrato bruto das folhas da *Baccharis dracunculifolia*, realizado por cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC), permitiu a obtenção de 87 frações, as quais foram reunidas em 15 subfrações conforme

semelhança no perfil cromatográfico em cromatografia de camada delgada (CCD), Tabela 1 (DA SILVA, 2011; MOTTA, 2014).

Todas as subfrações foram, posteriormente, analisadas em CLAE-DAD e comparadas com os padrões autênticos das substâncias, artepelin C, drupanina e bacarina, para confirmação das respectivas identidades.

A partir dos cromatogramas das reuniões (R11, R12 e R14), Figura 9, pode-se observar o tempo de retenção das substâncias desejadas, além do perfil cromatográfico de algumas das reuniões mais relevantes obtida por HSCCC. Foi possível observar que o fracionamento por HSCCC concentrou em apenas duas reuniões, R11 e R12, toda a bacarina disponível no extrato bruto das folhas da *B. dracunculifolia*, sendo que a reunião 12 (R12) concentrou 100% do artepelin C disponível neste extrato bruto. Quanto a drupanina, observa-se a presença desta substância somente na reunião 14 (R14), concentrando também 100% de toda a drupanina disponível no extrato bruto das folhas da *B. dracunculifolia*.

Tabela 5. Frações obtidas por cromatografia contracorrente de alta velocidade do extrato das folhas de *Baccharis dracunculifolia*.

Reuniões (HSCCC)	Frações	Quantidade (g)
1	4-5	0.092
2	6-7	0.005
3	8-9	0.009
4	10-13	0.014
5	14-17	0.021
6	18-21	0.001
7	22-30	0.002
8	31-36	1.007
9	37-40	0.002
10	41-45	0.005
11	47-50	0.019
12	51-56	0.041
13	57-61	0.092
14	62-68	0.038
15	69-87	0.053

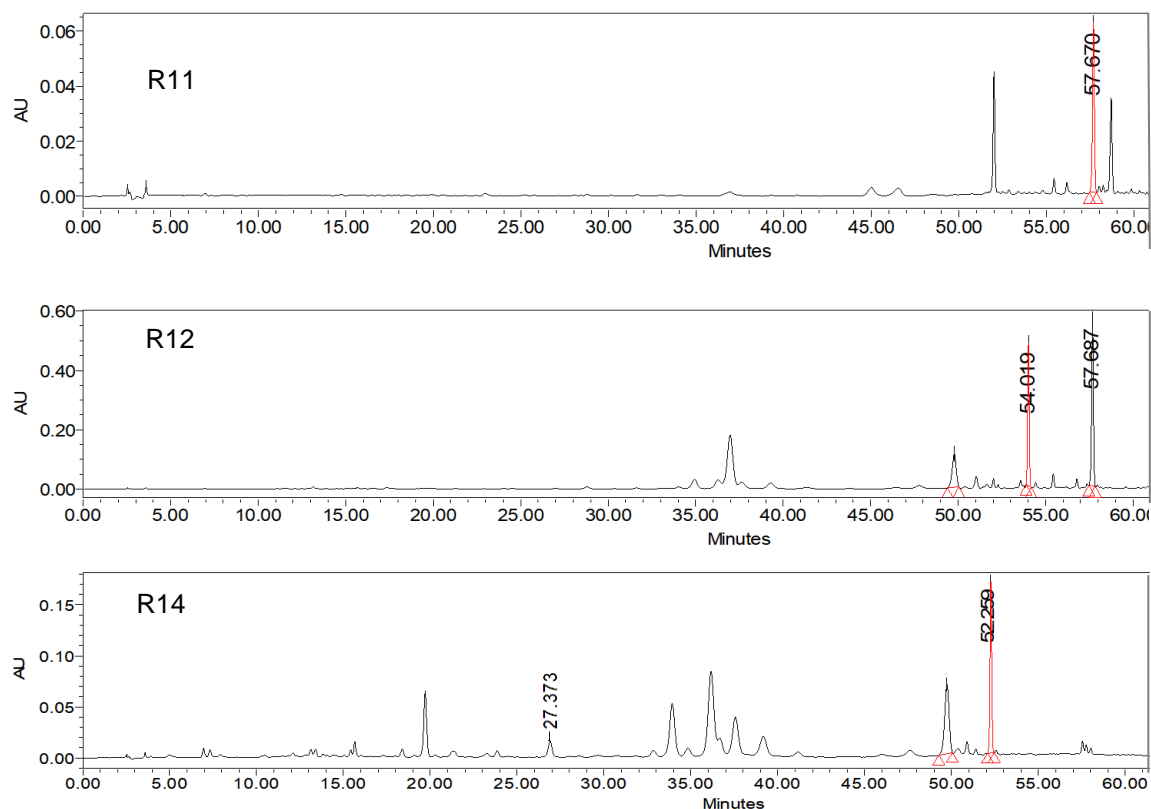


Figura 9. Cromatogramas das frações reunidas (R11, R12 e R14) por cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC) das folhas de *B. dracunculifolia*. Eluição: drupanina - 27,3 min; artepelin C – 54,0 min; bacarina – 57,6 min.

4.1.3. Fracionamento do extrato hidroalcoólico por cromatografia líquida a vácuo (CLV)

O fracionamento de 100 g de extrato bruto da própolis verde por cromatografia líquida a vácuo (CLV) forneceu 207 frações, as quais após análises por CCD foram reunidas em 21 subfrações, conforme a semelhança entre os perfis cromatográficos, Tabela 2, (PEDERSEN; ROSENBOHM, 2001). As 21 subfrações reunidas foram analisadas por CLAE-DAD e as frações com quantidades significativas de drupanina, bacarina e artepelin C foram selecionadas para o isolamento por CLAE preparativo.

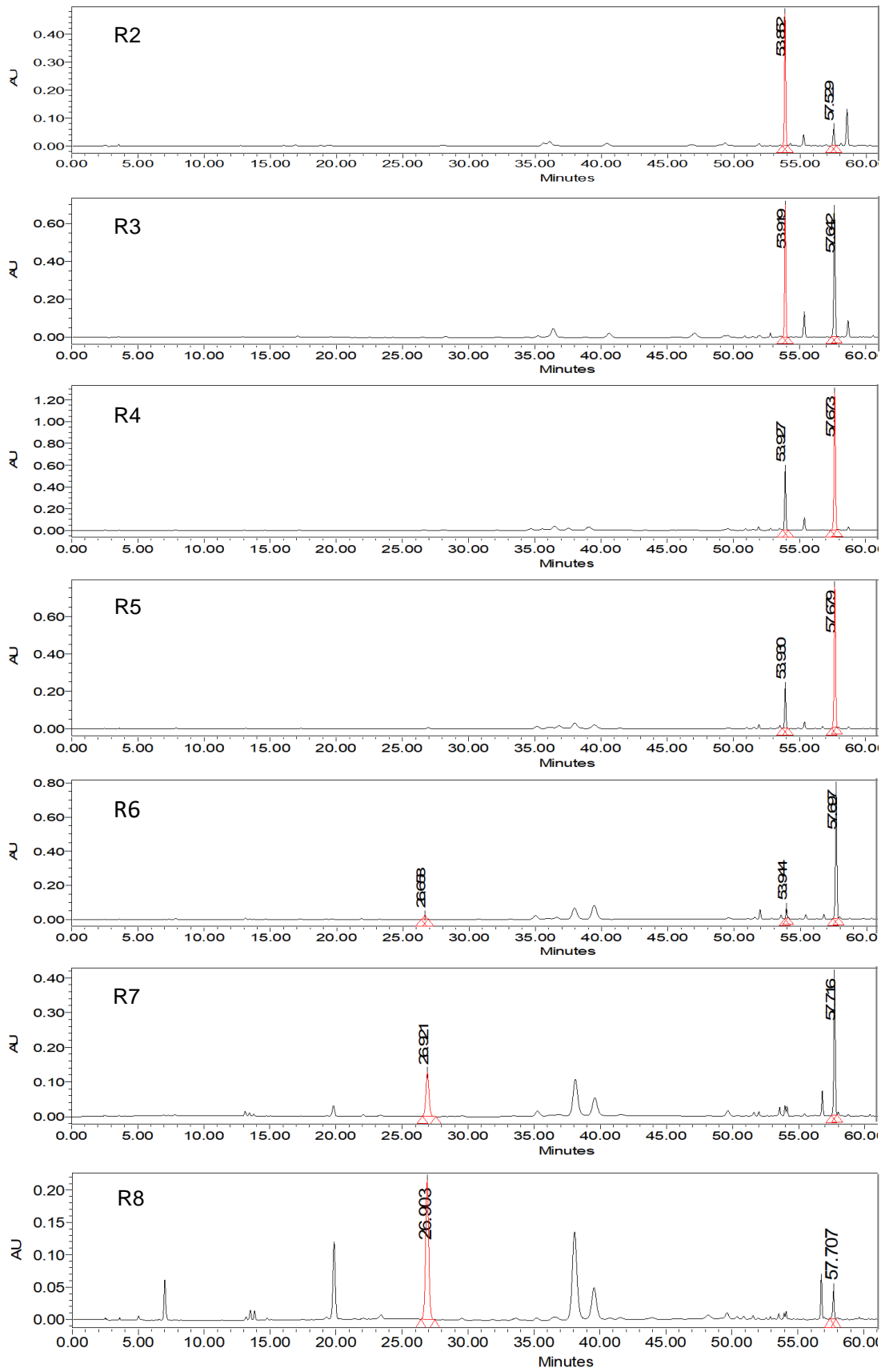
Os cromatogramas das reuniões mais relevantes estão na figura 10, com destaque especial para as substâncias desejadas, as quais estão marcadas quanto ao tempo de retenção. Além da visualização quanto ao perfil cromatográfico de cada reunião obtida, pode-se concluir que as frações reuniões ricas em artepelin C foram as R2 a R6, bacarina as R2 a R8 e em drupanina as R6 a R12.

O extrato bruto das folhas de *B. dracunculifolia* (100 g) também foi fracionado, originando 40 frações, as quais após análise por CCD foram reunidas em 7 subfrações

(Tabela 3). Percebendo-se a partir do fracionamento da própolis verde que os compostos de interesse eluíam com 9:1 Hex/AcOEt até a 40^a fração, a força da eluição no fracionamento do extrato das folhas de *B. dracunculifolia* não foi aumentada, o que acarretou em um menor número de frações. Os cromatogramas das reuniões mais relevantes, com quantidades significativas de drupanina, bacarina e artepelin C, estão na figura 11.

Tabela 6. Frações obtidas por cromatografia líquida a vácuo do extrato de própolis verde

Reuniões (CLV)	Frações	Quantidade (g)
1	1	4.7
2	2-3	12.1
3	4-8	7.9
4	9-12	2.1
5	13-26	3.9
6	27-32	0.9
7	33-40	3.7
8	41-58	4.5
9	59-65	0.9
10	66-75	1.1
11	76-85	1.4
12	86-90	0.5
13	91-96	0.6
14	97-107	2.3
15	108-121	3.1
16	122-150	3.0
17	151-161	2.5
18	162-168	3.5
19	169-176	3.5
20	177-181	2.1
21	182-207	5.3



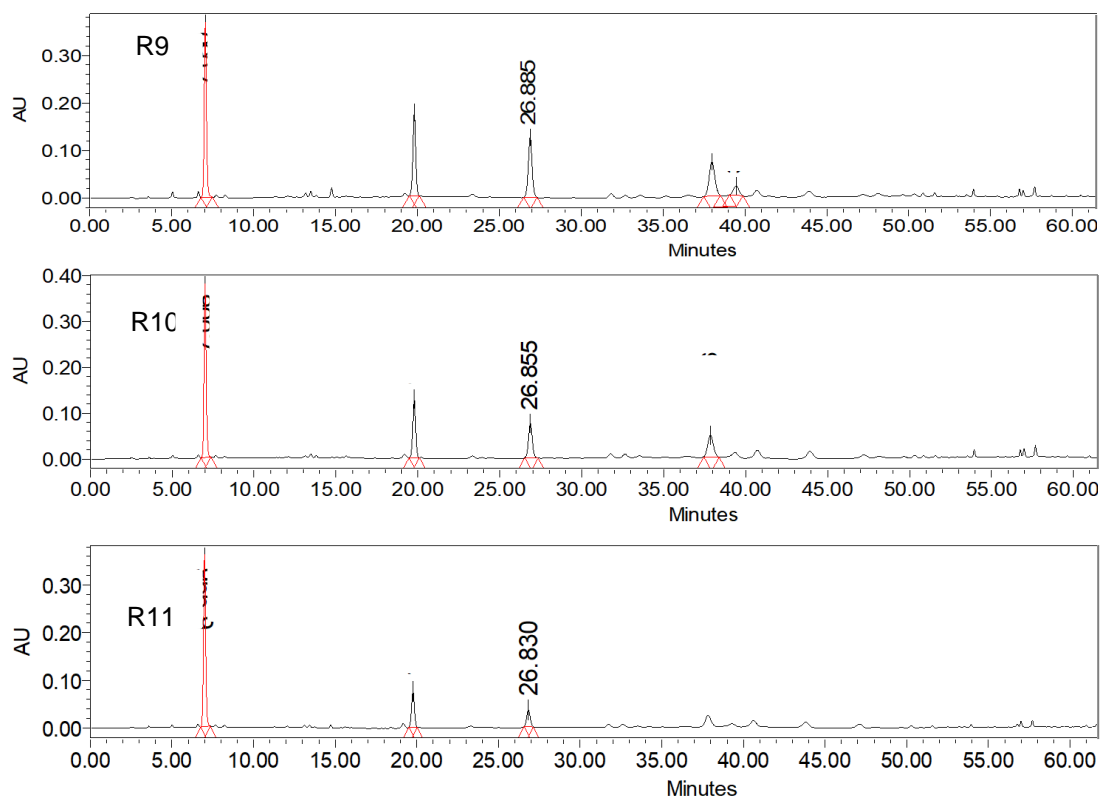


Figura 10. Cromatogramas das frações reunidas (R2-R11) por cromatografia líquida a vácuo (CLV) da própolis verde. Eluição: drupanina – 26,9 min; artepelin C - 53,9 min; bacarina – 57,7 min.

Tabela 7. Frações obtidas por cromatografia líquida a vácuo do extrato das folhas de *B. dracunculifolia*

Reuniões (CLV)	Frações	Quantidade (g)
1	1	0.9
2	2-3	0.7
3	4-8	1.1
4	9-12	0.8
5	13-26	1.8
6	27-32	0.6
7	33-40	0.9

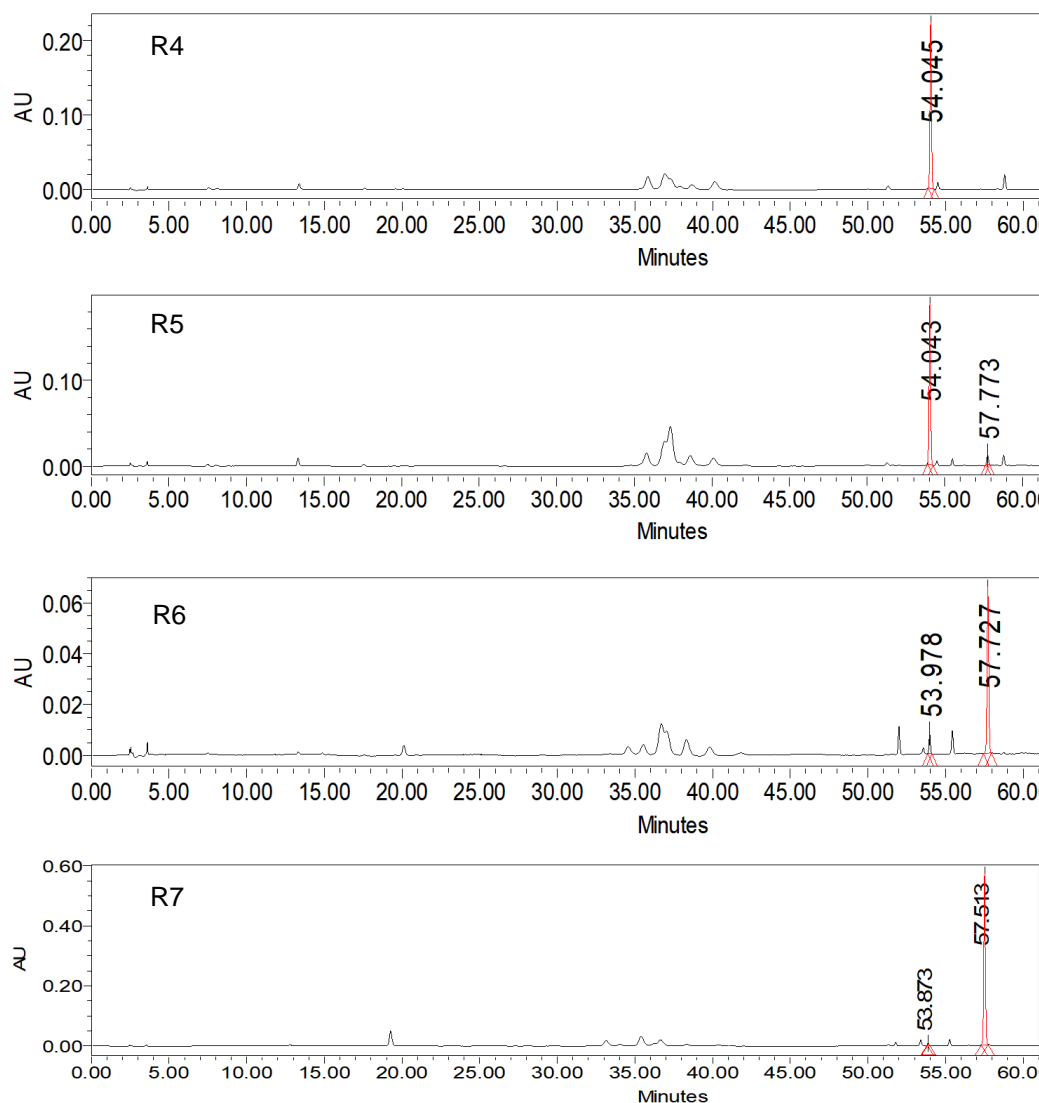


Figura 11. Cromatogramas das frações reunidas (R4 – R7) por cromatografia líquida a vácuo (CLV) do extrato das folhas de *B. dracunculifolia*. Eluição: artepelin C - 53,9 min; bacarina – 57,7 min.

4.1.4. Isolamento e análise das substâncias por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Todas as subfrações ricas nos compostos de interesse (drupanina, artepelin C e bacarina) foram purificadas por CLAE preparativo conforme parâmetros descritos no item 4.1.4, (DE SOUSA, 2007). Realizaram-se aproximadamente 220 injeções fornecendo 0,41g de drupanina, 1,68 g de artepelin C e 0,67 g de bacarina.

Posteriormente, as substâncias foram analisadas por CLAE – DAD analítico, comparados com padrões autênticos quanto ao tempo de retenção e perfil de absorção, sendo a pureza relativa calculada em 275 nm de 97%, 97% e 98% para a drupanina,

artepelin C e bacarina, respectivamente (Figura 12). Para confirmação das estruturas utilizou-se também a análise por RMN de ^1H em 300 MHz (Figura 13).

Os espectros de RMN de ^1H dos produtos naturais isolados da própolis verde, drupanina, artepelin C e bacarina (Figura 13), confirmam sinais típicos dos produtos naturais prenilados do ácido *p*-cumárico, como os dupletos com deslocamento em 6,4 e 7,5 ppm, referente aos sinais dos hidrogênios da ligação dupla, H8 e H7, respectivamente, os quais acoplam em *trans* com $J=15.1$ Hz. Outros sinais característicos são os sinais dos hidrogênios das prenilas, H2' e H2'', que aparecem como um tripleto em δ 5,2, dos hidrogênios H1' e H1'', como duplete em 3,3 ppm, e os hidrogênios das prenilas H4', H4'', H5' e H5'', que aparecem como simpletos em 1,9 ppm e 1,8 ppm.

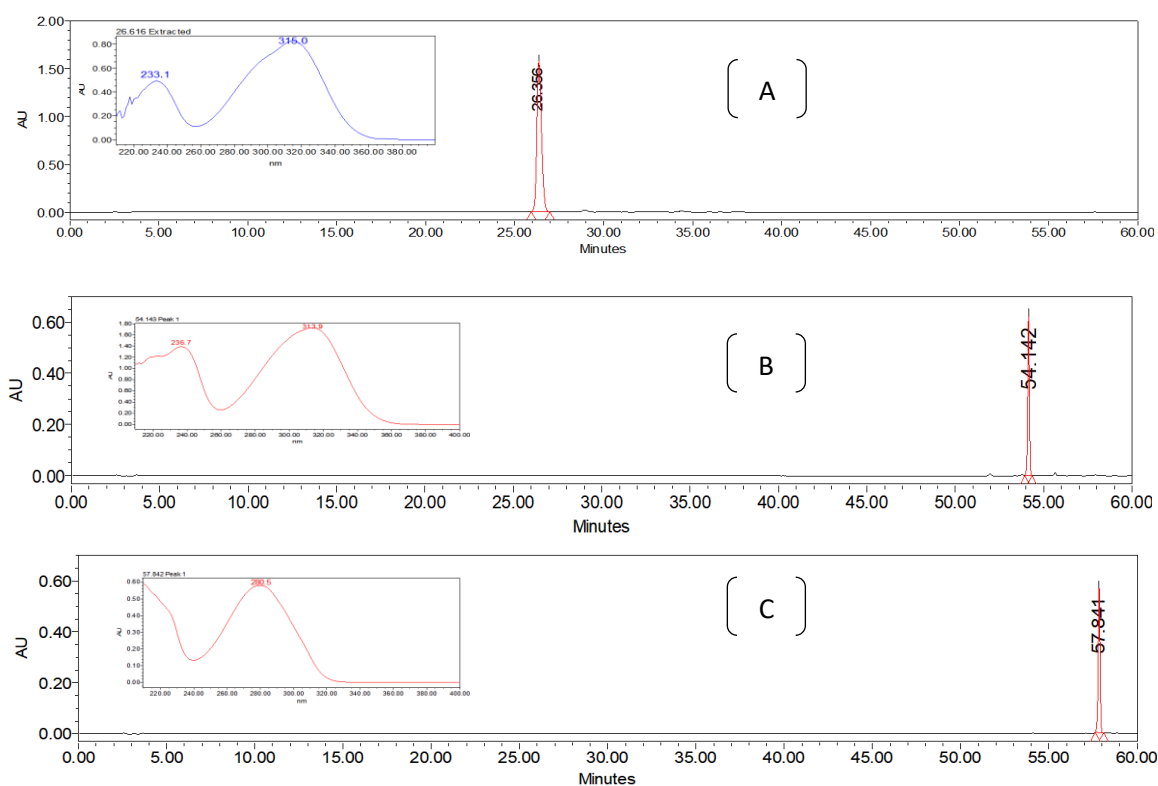


Figura 12. Cromatogramas das substâncias isoladas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE – DAD). A: drupanina – 26.4 min; B: artepelin C – 54.1 min; C: bacarina – 57,8 min.

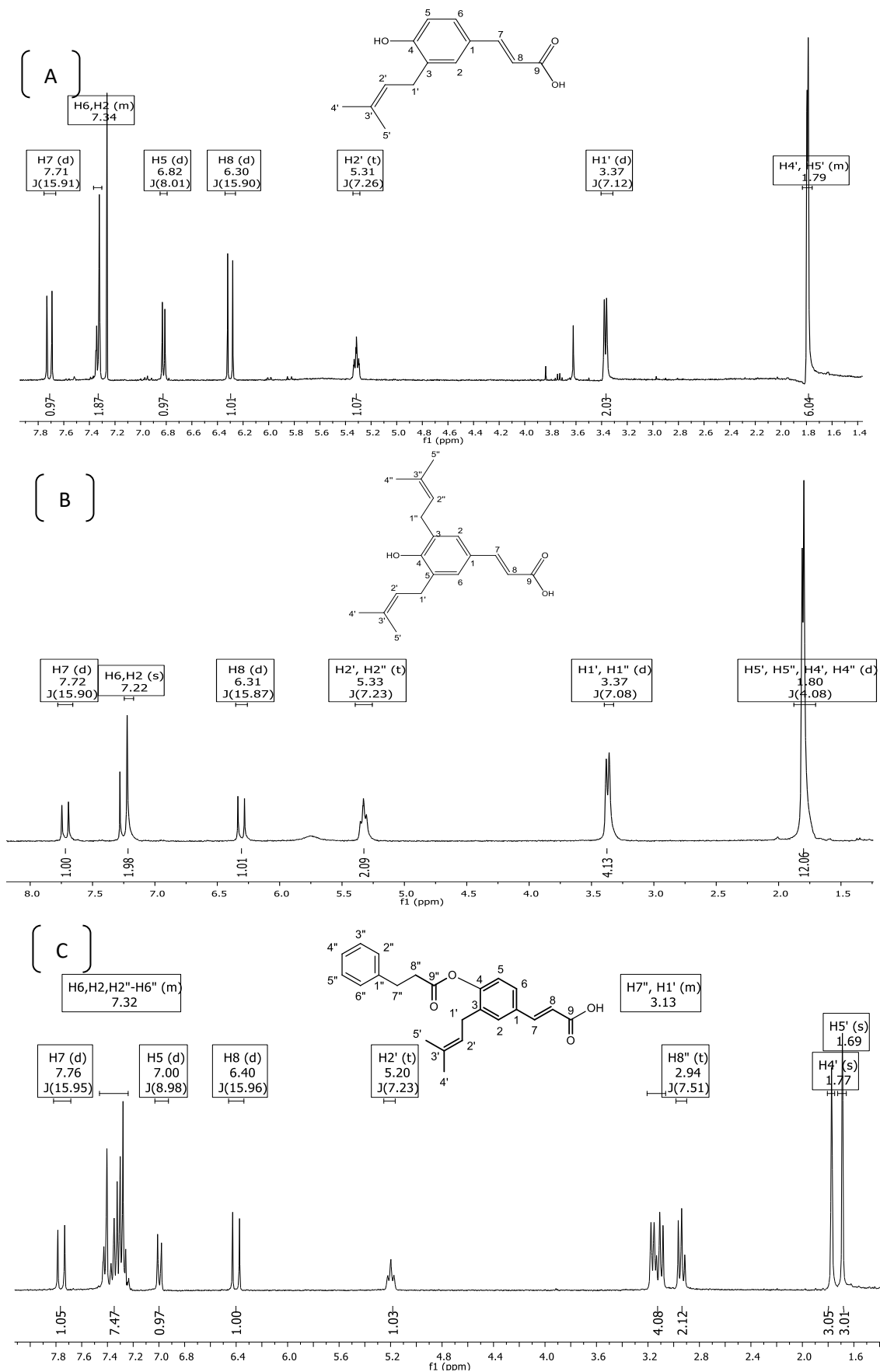


Figura 13: Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H dos produtos naturais, drupanina (A), artepelin C (B) e bacarina (C), (CD $_3$ OD, 300 MHz).

Semissíntese dos Derivados de Produtos Naturais

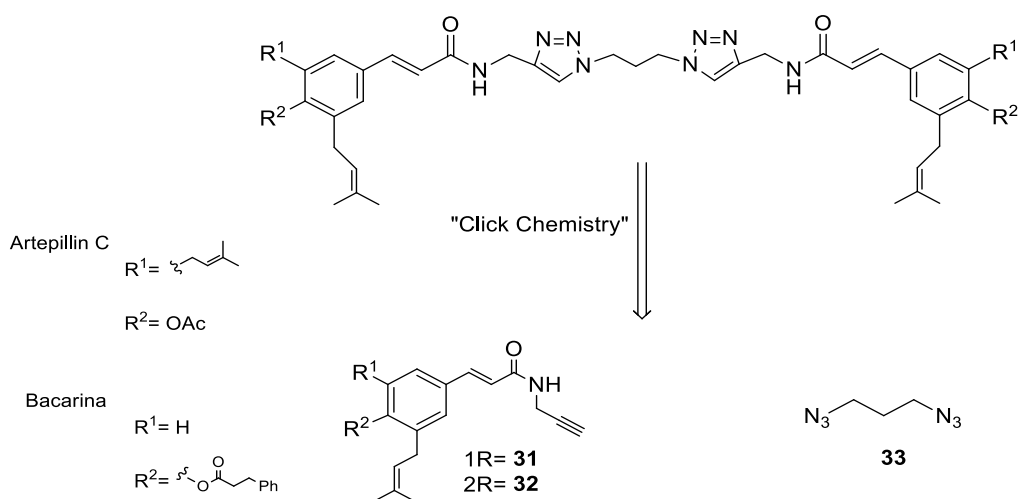
4.2. Semissíntese dos derivados de artepelin C, drupanina e bacarina

A semissíntese dos derivados de artepelin C, drupanin e bacarina foi dividida em duas séries, sendo a primeira representada pela síntese dos dímeros triazólicos **1-3** (Esquema 1 e 8), e a segunda pelos derivados de aminoácidos de artepelin C **4-13**, drupanina **14-23** e de bacarina **24-28** (Esquema 7, 8 e 9).

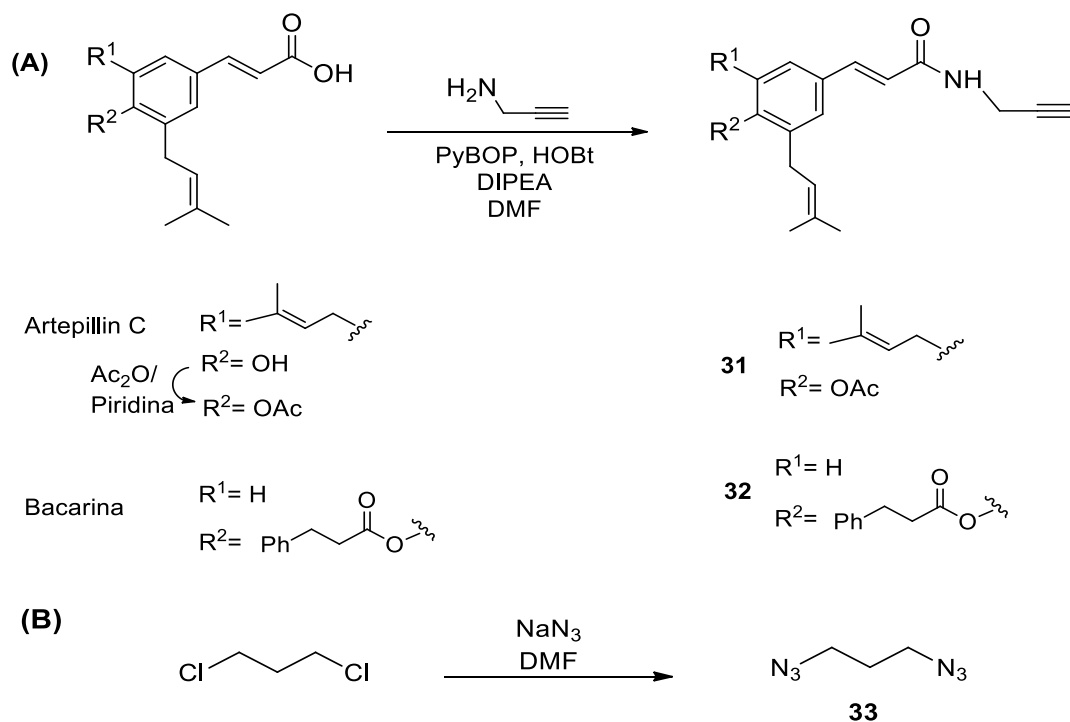
4.2.1. Obtenção dos dímeros triazólicos do artepelin C, drupanina e bacarina

Primeiramente, procedeu-se a acetilação da hidroxila fenólica do artepelin C e da drupanina com o objetivo de proteção do grupo ativo e maior estabilidade da molécula. As reações, realizadas na presença de piridina/ Ac_2O , forneceram os produtos acetilados do artepelin C **29** e da drupanina **30** com rendimentos de 90% e 73%, respectivamente.

A síntese dos dímeros triazólicos **1-3** (Esquema 1) por reação de “click chemistry” envolveu a preparação prévia dos blocos de construção propargil-artepelin C **31** / propargil-bacarina **32** e di-azido propano **33** funcionalizados com grupos alcino e azido, respectivamente (Esquema 2).

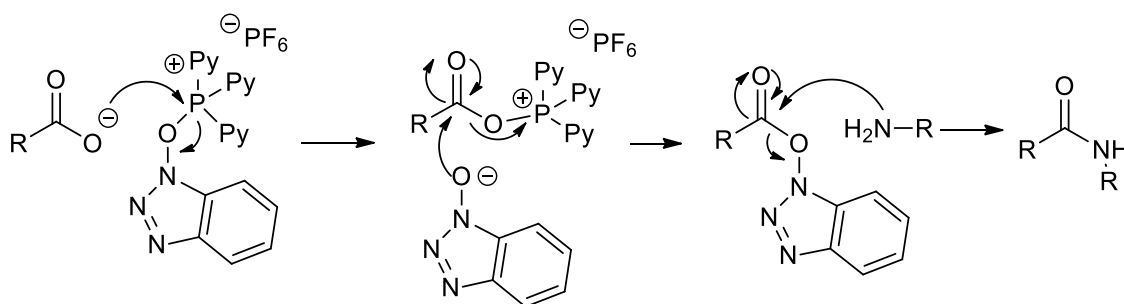


Esquema 1. Retrossíntese dos dímeros triazólicos **1-3** utilizando como material de partida propargil-artepelin C **31** / propargil-bacarina **32** e di-azido propano **33**.



Esquema 2. (A) Síntese dos derivados propargil-artepeillin C **31** e propargil-bacarina **32**. (B) Síntese do derivado di-azido propano **33**;

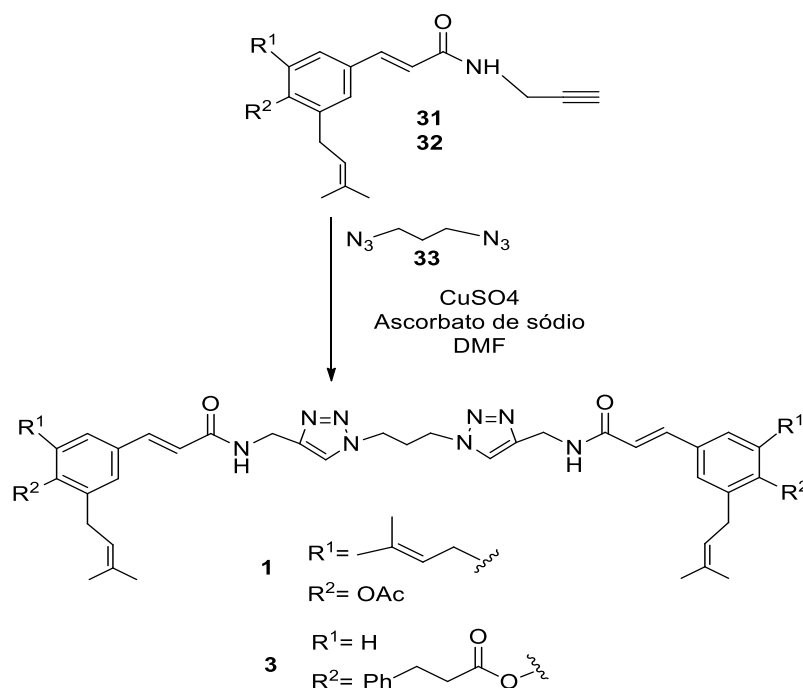
A síntese dos compostos propargil-artepeillin C **31** (72%) e propargil-bacarina **32** (34%) foi realizada a partir da reação de acoplamento do artepillin C e da drupanina acetilados e da bacarina com propargilamina comercial, na presença da base DIPEA (N,N-diisopropiletilamina), e dos reagentes de acoplamento PyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tripirrolidinofosfônio) e HOBT (1-hidroxi-benzotriazol), em DMF (Esquema 2A). O mecanismo de reação de acoplamento entre o grupo ácido carboxílico dos produtos naturais com a amina terminal da propargilamina envolve, inicialmente, a abstração do próton do ácido carboxílico pela base DIPEA, deixando o oxigênio negativamente carregado para o ataque ao íon fosfônio da molécula de PyBOP. Posteriormente, ocorre a liberação da porção hidroxi-benzotriazol, seguido pelo ataque nucleofílico ao carbono carbonílico pelo grupo hidroxi-benzotriazol liberado, deslocando, assim, a porção oxitripirrolidinofosfônio. O éster formado contém o grupo abandonador necessário ao ataque nucleofílico do grupo amino terminal da propargilamina, conforme detalhado no Esquema 3, (MARTINS-TEIXEIRA et al., 2013).



Esquema 3. Mecanismo da reação de acoplamento envolvendo a utilização do reagente PyBOP/HOBt.

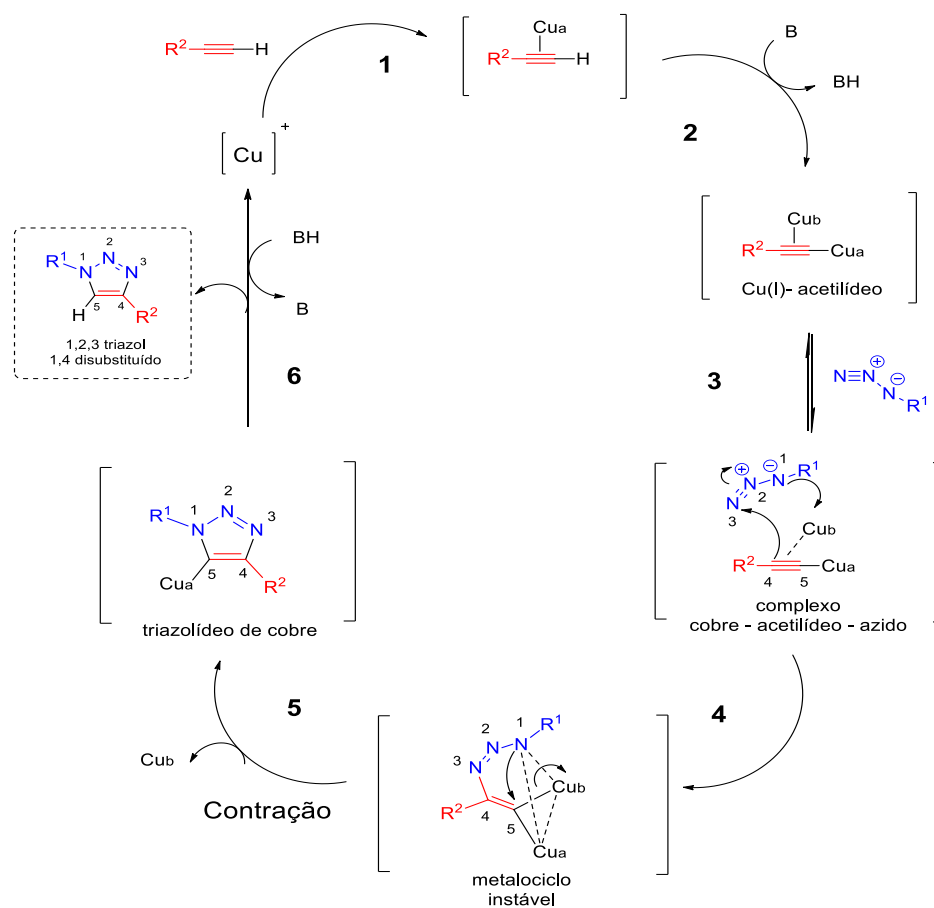
O derivado di-azido propano **33** (80%), por sua vez, foi obtido em atmosfera inerte pelo tratamento do reagente dicloropropano com azida de sódio em DMF anidro (Esquema 2B), por um período de 72 h à temperatura ambiente, considerando a volatilidade do produto final em altas temperaturas (ARSLAN et al., 2018).

Após obtenção dos precursores de alcino (**31** e **32**) e azido (**33**) citados, foi realizada a reação de ciclo-adição 1,3-dipolar (“click chemistry”) catalisada por Cu(I)-CuAAC, utilizando o sistema catalítico CuSO₄/ascorbato de sódio em DMF, (MARCHIORI et al., 2015), Esquema 4.



Esquema 4. Reação de “click chemistry” para obtenção dos dímeros triazólico protegidos de artemilina **1** e bacarina **3**.

O mecanismo da reação proposto envolve seis etapas e sugere a participação de dois átomos de cobre (BOCK; HIEMSTRA; VAN MAARSEVEEN, 2006). Na primeira etapa há a complexação do Cu(I) com a ligação π do alcino terminal e a formação da estrutura Cu(I)- acetilídeo; a segunda etapa envolve a participação do segundo átomo de Cu(I) e a complexação deste na espécie anteriormente formada de Cu(I)- acetilídeo. Posteriormente, na terceira etapa, ocorre a aproximação do grupo azido originando o complexo cobre-acetilídeo-azido, com dois átomos de cobre. Na quarta etapa ocorre a formação de um metalociclo decorrente do ataque nucleofílico do carbono C-4 do alcino ao nitrogênio terminal N-3 do grupo azido. Este metalociclo posiciona o azido de forma que o par de elétrons não compartilhado do nitrogênio N-1 se associe ao orbital π^* (antiligante) do carbono C-5, promovendo contração do ciclo, liberando um Cu e formando uma espécie triazolídeo de cobre mais estável (quinta etapa). Por fim, a protonação da espécie de triazolídeo de cobre, seguida de dissociação, leva ao produto 1,2,3-triazol 1,4-disubstituído e a regeneração do catalisador (sexta etapa) (Esquema 5).



Esquema 5. Mecanismo da reação de "Click Chemistry" catalisada por Cu(I)-CuAAC, utilizando o sistema catalítico CuSO₄/ascorbato de sódio.

Seguindo o protocolo descrito por Campo et al., 2015 a reação inicial de “*click chemistry*” foi realizada em micro-ondas por 15 – 20 min à 100 °C, sendo, no entanto, observada a degradação dos precursores (produtos naturais). Dessa forma, procedeu-se a reação à temperatura ambiente, sendo observado em CCD (tolueno/AcOEt, 8:2 v/v) consumo dos materiais de partida após cerca de 4 h. Após purificação por cromatografia clássica (AcOEt /Hex, 5:5 v/v), os dímeros triazólicos de artepelin C **1** e bacarina **3** foram obtidos com rendimentos de 97% e 62%, respectivamente, sendo suas estruturas devidamente confirmadas por análises de RMN ^1H e ^{13}C , e ESI-MS.

De acordo com o espectro de RMN ^1H do dímero triazólico de artepelin C **1** (Figura 14, Tabela 1A- Apêndice), é possível observar os sinais dos hidrogênios da ligação dupla, H8 e H7, os quais acoplam em *trans* com $J=15.1$ Hz e com deslocamento em 6,4 e 7,5 ppm, respectivamente. Outros sinais referentes à estrutura do artepelin C também foram observados, tais como, o simpleto em δ 7,2 referente aos hidrogênios H6 e H2 dos anéis aromáticos, o multipletto em δ 5,2 referente aos hidrogênios H2' e H2'', o dupletto em 3,3 ppm dos hidrogênios H1' e H1'' ($J=6.9$ Hz) e os simpletos das prenilas em 1,9 ppm e 1,8 ppm (H4', H4'', H5' e H5''), sendo que todos estes sinais estão com integrais duplicadas conforme previsto para a estrutura desse dímero. O sinal referente ao CH triazólico (H14) é observado como um simpleto em 7,6 ppm.

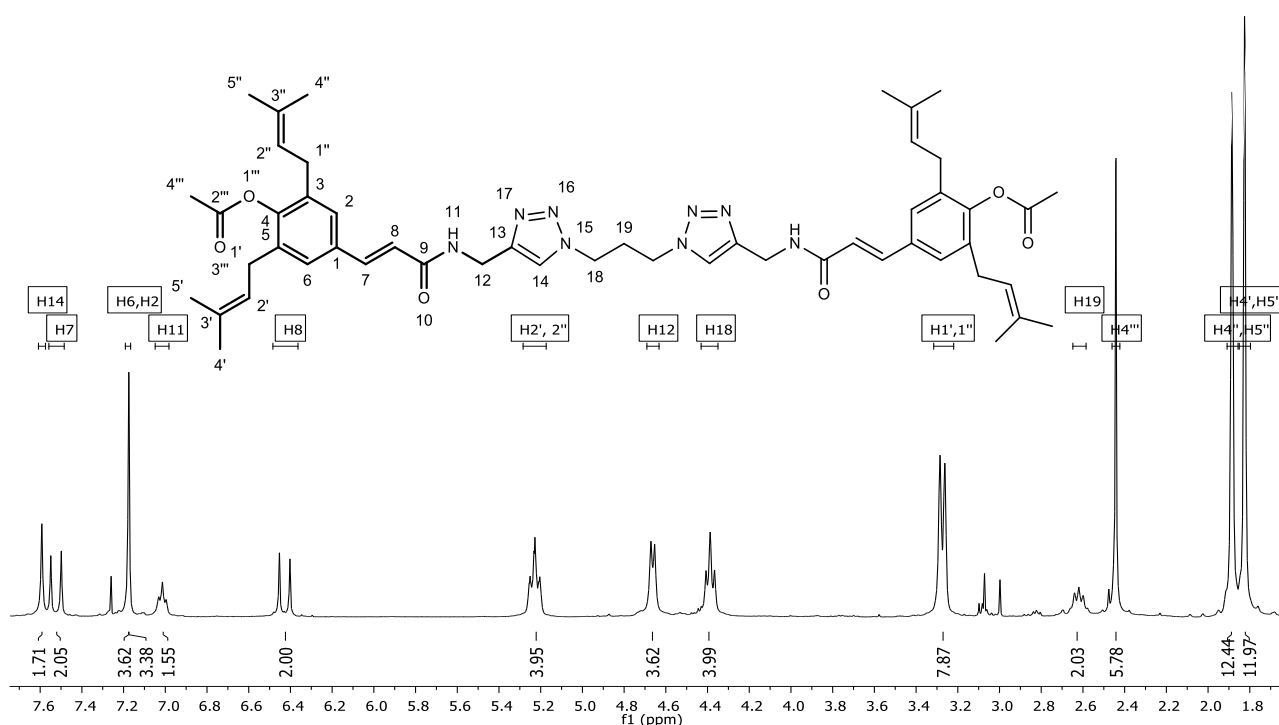


Figura 14. Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H do dímero triazólico protegido do artepelin C **1**, em 300 MHz, CDCl_3 .

A partir do espectro de RMN ^1H do dímero triazólico de bacarina **3** (Figura 15, Tabela 3A- Apêndice) observa-se o sinal do hidrogênio da ligação dupla, H8 em δ 6,1, o qual acopla em *trans* ($J=15.1$ Hz) com o H7. O duplete do H7 em 7,21 ppm se sobrepõe ao simpleto do H14. Os sinais típicos da estrutura da bacarina aparecem em 6,9 ppm como um multiplete, referente aos hidrogênios H2''-H6'' do segundo anel aromático, em 6,6 ppm, simpleto do hidrogênio H5, o qual indica a ausência da prenila quando comparado ao artepelin C, e em 2,7 e 2,9 ppm dos hidrogênios H8'' e H7'' dos metilenos da bacarina. Alguns sinais que confirmam a reação de "click chemistry" podem ser observados em 7,21 ppm, simpleto do CH triazólico (H14), em 4,06 ppm, tripleto do H18, e em 2,30 ppm referente ao multiplete do H19.

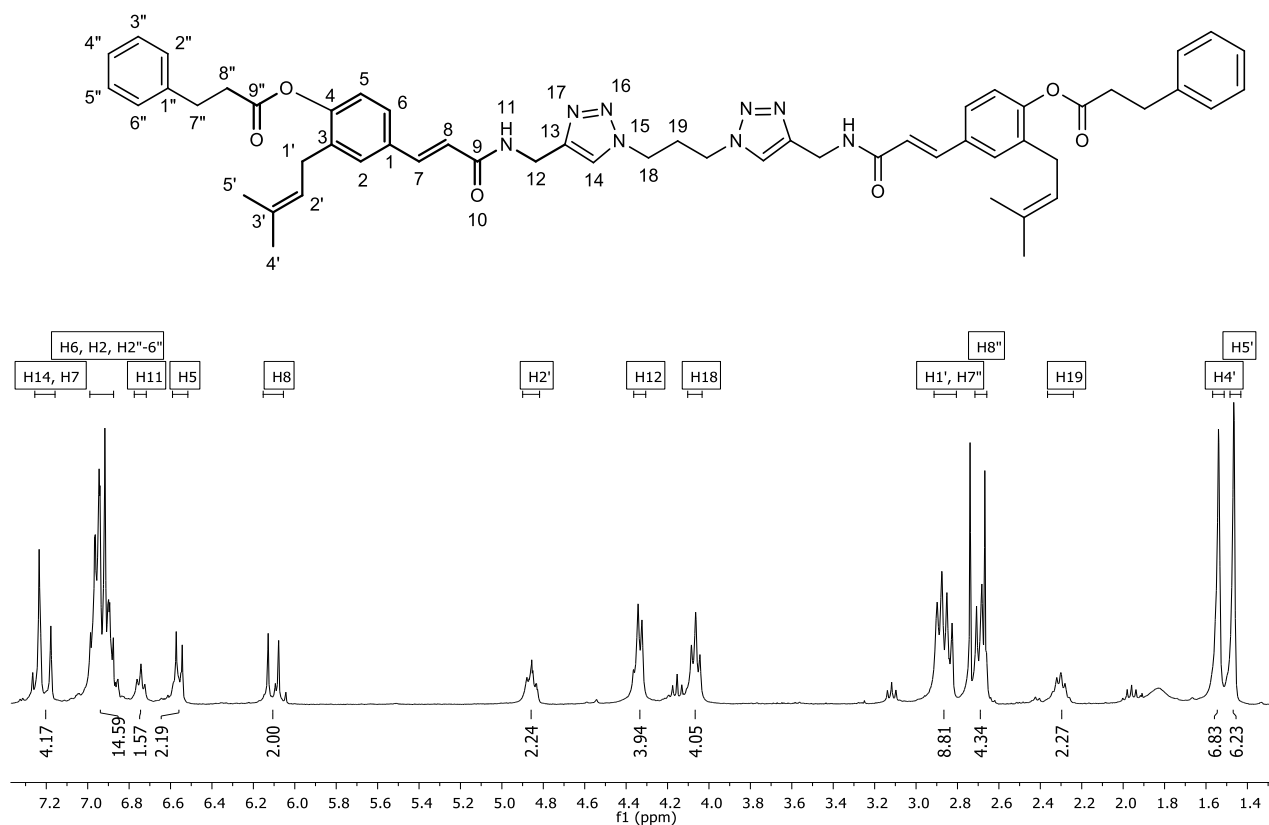
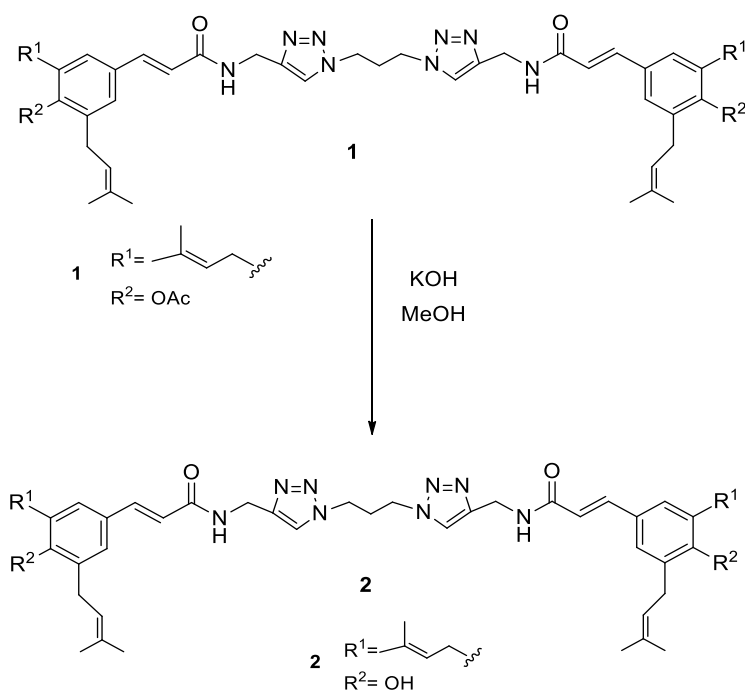


Figura 15. Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H do dímero triazólico protegido da bacarina **5**, em 300 MHz, CDCl_3 .

Como, a princípio, a hidroxila fenólica do artepelin C foi acetilada, posteriormente, o dímero triazólico foi submetido à reação de desproteção por hidrólise básica (KOH 10%) para retirada do grupo acetil (Esquema 6). O dímero desprotegido,

do artepelin C **2** foi confirmado por análises de RMN ^1H e ^{13}C , e ESI-MS (Tabela 2A-Apêndice).

A partir do RMN ^1H do dímero desprotegido do artepelin C **2** é possível observar a ausência do simpleto em δ 4,4 referente aos hidrogênios H4'' do acetil, assim como, outros sinais característicos do triazol e do artepelin C, como o simpleto em 7,6 ppm do H14 e o tripleto em 5,3 ppm do H2' e H2'', comprovando que a estrutura dimérica e as prenilas permaneceram inalteradas após a hidrólise básica (Figura 16).



Esquema 6. Reação de hidrólise básica dos dímeros triazólicos do artepelin C **2** e da drupanina **4**.

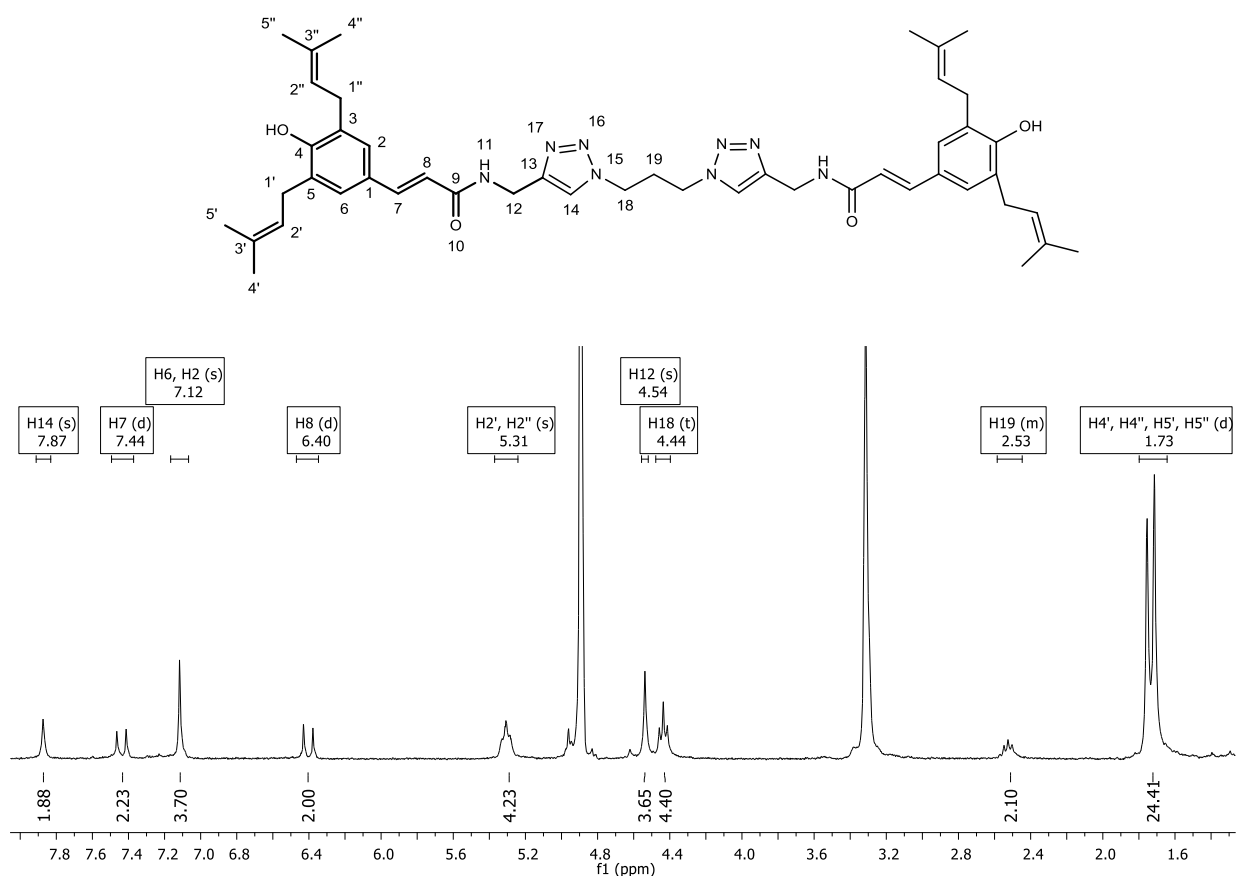
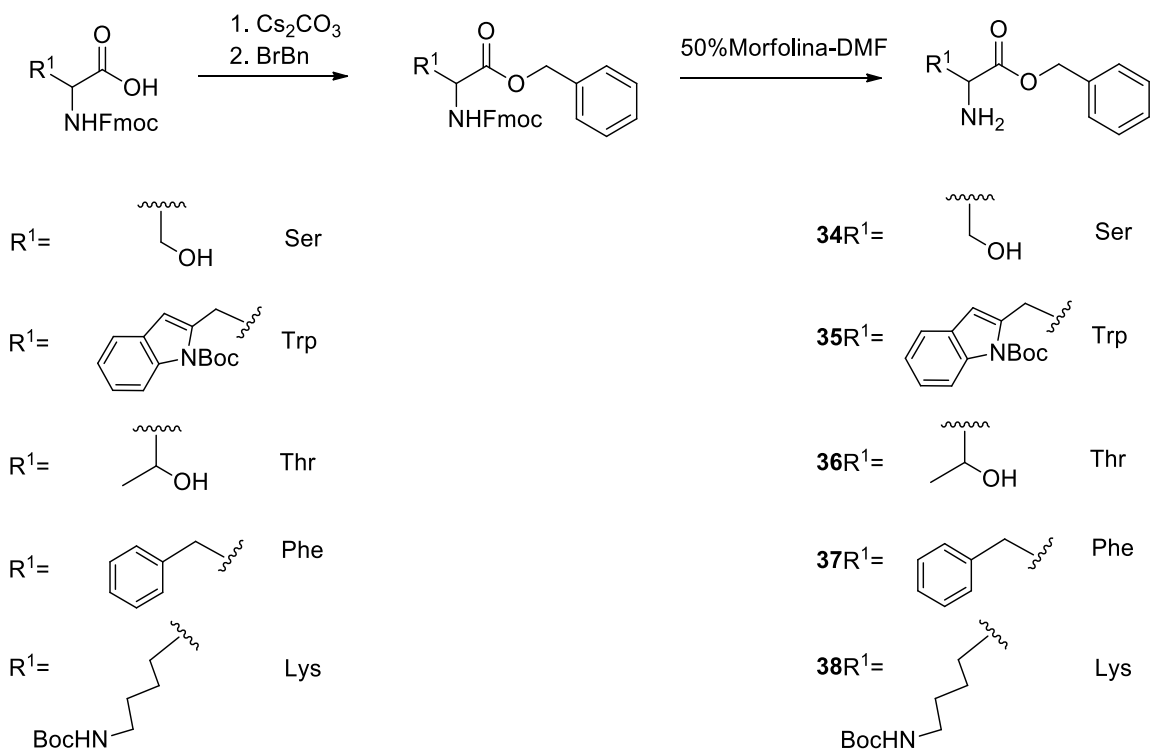


Figura 16. Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H do dímero triazólico desprotegido do artemelin C 2, em 300 MHz, MeOD_4 .

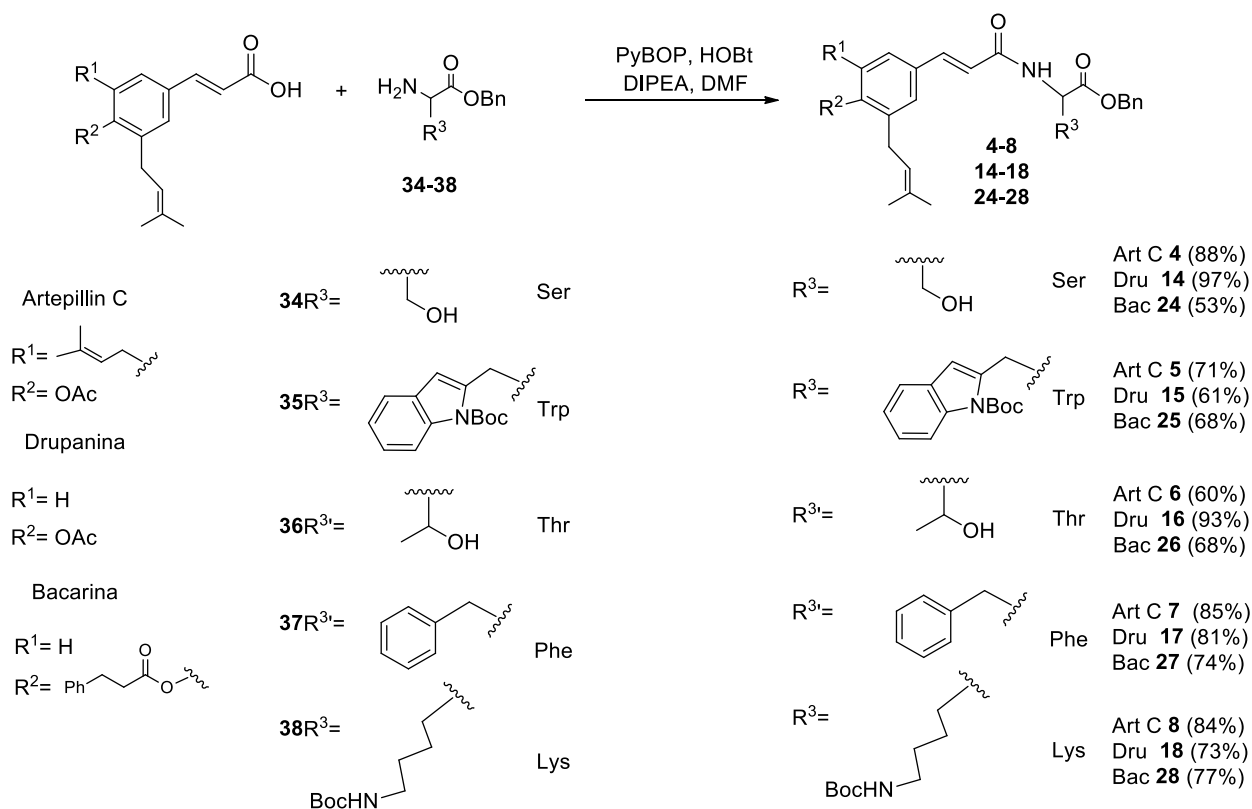
4.2.2. Obtenção dos derivados de aminoácidos do artemelin C, drupanina e bacarina

Cinco aminoácidos comerciais foram selecionados para o acoplamento com o artemelin C, drupanina e bacarina, a saber: *L*-FmocSerOH, *L*-FmocTrp(N-Boc)OH, *L*-FmocThrOH, *L*-FmocPheOH e *L*-FmocLys(N-Boc)OH. A síntese dos derivados de aminoácidos do artemelin C, drupanina e bacarina envolveu a preparação prévia dos aminoácidos *L*-NH₂SerOBn **34**, *L*-NH₂Trp(N-Boc)OBn **35**, *L*-NH₂ThrOBn **36**, *L*-NH₂PheOBn **37** e *L*-NH₂Lys(N-Boc)OBn **38** por reações subsequentes de *O*-benzilação com brometo de benzila e desproteção do grupo *N*-Fmoc com morfolina (50% em DMF), a partir dos correspondentes aminoácidos comerciais contendo grupo protetor *N*-Fmoc e carboxila livre, Esquema 7, (FIELDS, 1994; NGUYEN et al., 1985).



Esquema 7: Reação de O-benzilação e desproteção do grupo *N*-Fmoc dos cinco aminoácidos selecionados.

A seguir, foram realizadas as reações de acoplamento entre artemelin C, drupanina e bacarina com os aminoácidos **34-38**, utilizando os reagentes de acoplamento PyBOP, HOBt e DIPEA, em DMF, fornecendo os derivados de aminoácidos do artemelin C **4-13**, drupanina **14-23** e bacarina **24-28** com rendimentos entre 40% e 97% após purificação cromatográfica por cromatografia clássica, Esquema 8 (MARTINS-TEIXEIRA et al., 2013). As estruturas dos produtos obtidos foram devidamente confirmadas por análises de RMN ¹H e ¹³C, e ESI-MS, conforme detalhado no item 3.2.2. e nos apêndices (Tabela 4A e 28A- Apêndice). Ao longo do texto alguns espectros de RMN ¹H foram discutidos, selecionando-os pela diferença entre as cadeias laterais e o precursor natural.



Esquema 8: Síntese dos derivados de aminoácidos do artepelin C **4-8**, drupanina **14-18** e bacarina **24-28** por reações de acoplamento.

No espectro de RMN ^1H do derivado **7**, acoplamento do artepelin C com a fenilalanina (Figura 17, Tabela 7A- Apêndice), os sinais característicos do artepelin C podem ser observados com o simpleto em δ 7,0, referente aos hidrogênios H6 e H2 do anel aromático, o duplete em 3,2 dos hidrogênios H1' e H1'' ($J=7.2$ Hz), os simpletos das prenilas em 1,7 ppm e 1,6 ppm (H4', H4'', H5' e H5'') e o duplete em 7,6 e 6,3 ppm, referentes aos hidrogênios da ligação dupla, H7 e H8, do acoplamento em *trans* com $J=15.1$ Hz, respectivamente. Os sinais do aminoácido protegido da fenilalanina também foram observados a partir do multiplete em 7.2 ppm dos hidrogênios H25-29, multiplete em 7.4 ppm, referente aos hidrogênios H18-H22, e o multiplete em 5,2 ppm (H16), do metileno do grupo benzil o qual se sobrepõe aos sinais dos H2' e H2'' e integram para quatro hidrogênios.

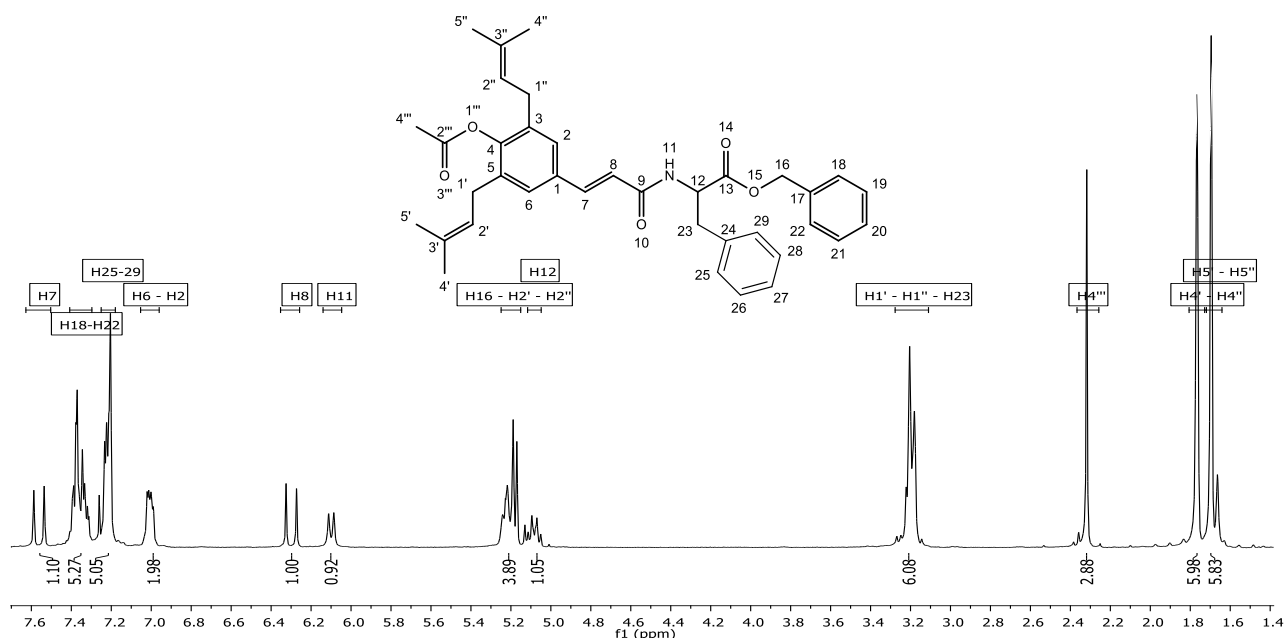


Figura 17. Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H do acoplamento do artemelin C com a fenilalanina **7**, em 300 MHz, CDCl_3 .

A partir do espectro de RMN ^1H do derivado **15**, acoplamento da drupanina com o triptofano, (Figura 18, Tabela 15A- Apêndice), é possível observar sinais característicos tanto da estrutura da drupanina, duplete em δ 7,0 (H5 do anel aromático) e os simpletos das prenilas em 1,8 ppm (H4') e 1,7 ppm (H5'), quanto da estrutura do aminoácido triptofano protegido, duplete em δ 8,1 e δ 7,5 (H28 e H31 do anel indol) e o simpleto integrando para nove hidrogênios das metilas do grupo Boc (H37, H38 e H39) em 1,6 ppm.

Observando-se o espectro de RMN ^1H do derivado **24**, resultante do acoplamento de bacarina com o aminoácido serina (Figura 19, Tabela 24A- Apêndice), confirma-se os sinais característicos da molécula da bacarina, tais como, o duplete em 6,1 ppm e 7,2 ppm referentes aos hidrogênios H8 e H7, respectivamente, os quais acoplam em *trans* com $J=15,2$ Hz, o duplete em δ 6,6 do H5, o tripleto dos metilenos em δ 2,9 e δ 2,7 do H7'' e H8'', respectivamente, e o simpleto das metilas da prenila em δ 1,6 (H4') e δ 1,5 (H5'). Já alguns sinais característicos do aminoácido protegido da serina são representados pelo multiplete em 6,9 ppm (H18-H22) e simpleto em 4,9 ppm (H16), referente ao metileno do grupo benzil, e um duplo-duplo-duplete referente ao grupo CH_2 (H23) em 3,8 ppm.

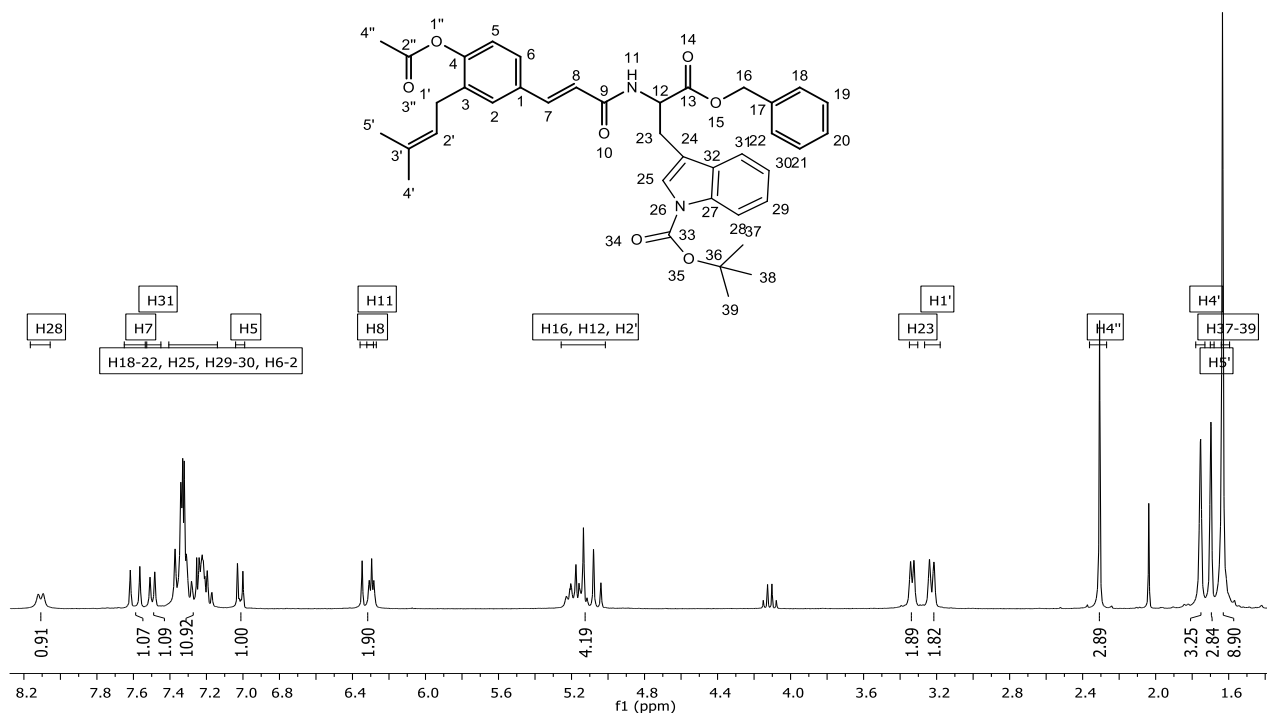


Figura 18: Estrutura numerada e espectro de RMN de ¹H do acoplamento da drupanina com o triptofano **15**, em 300 MHz, CDCl₃.

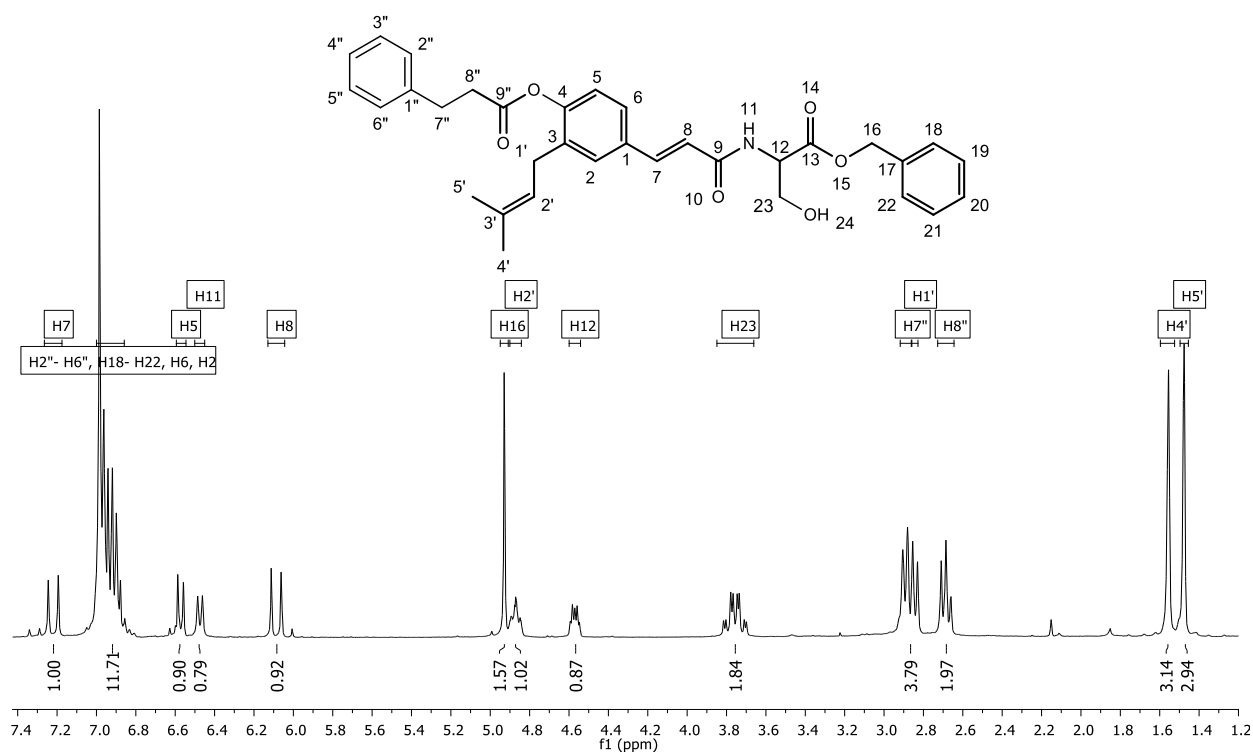
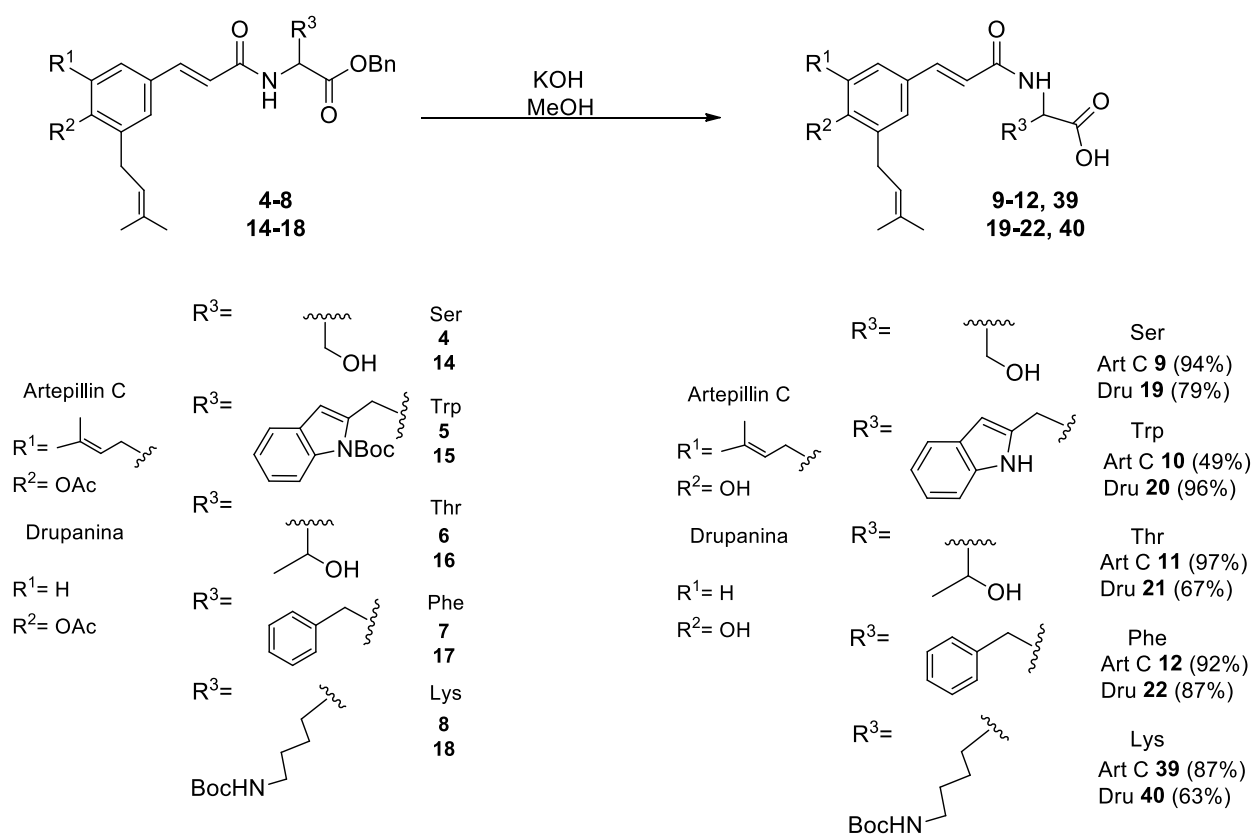


Figura 19: Estrutura numerada e espectro de RMN de ¹H do acoplamento da bacarina com a serina **24**, em 300 MHz, CDCl₃.

Posteriormente, os derivados do artepelin C **4-8** e da drupanina **14-18** foram submetidos às reações de desproteção por hidrólise básica (KOH 10%) para retirada do grupo acetil, benzil e do grupo protetor Boc (terc-butóxicarbonílico). Após hidrólise promovida por base a solução foi neutralizada com HCl 1M, sendo os derivados de aminoácidos do artepelin **9-12, 39** e da drupanina **19-22, 40** obtidos com rendimentos entre 63% e 97% (Esquema 9), (YASHIRO et al., 2015). Os produtos das reações foram devidamente confirmados por análises de RMN ^1H e ^{13}C , e ESI-MS.



Esquema 9: Desproteção dos derivados de aminoácidos do artepelin C **9-12, 39** e da drupanina **19-22, 40** por reações de hidrólise promovida por base.

Análise por RMN de ^1H da desproteção do derivado de artepelin C com a fenilalanina **12** (Figura 20, Tabela 12A- Apêndice) confirma o produto desejado. Observa-se que o sinal referente aos hidrogênios do metileno do grupo protetor benzil (H16) em 5,2 ppm está ausente (Figura 17), o que permite a melhor visualização dos hidrogênios H2' e H2'' da prenila, os quais estavam se sobrepondo. Além disso, observou-se a ausência dos hidrogênios do anel aromático do benzil (H18-H22) em 7.4 ppm e dos

hidrogênios da metila do grupo acetila em 2.3 ppm (H4'''), como foi observado no derivado protegido representado na Figura 17.

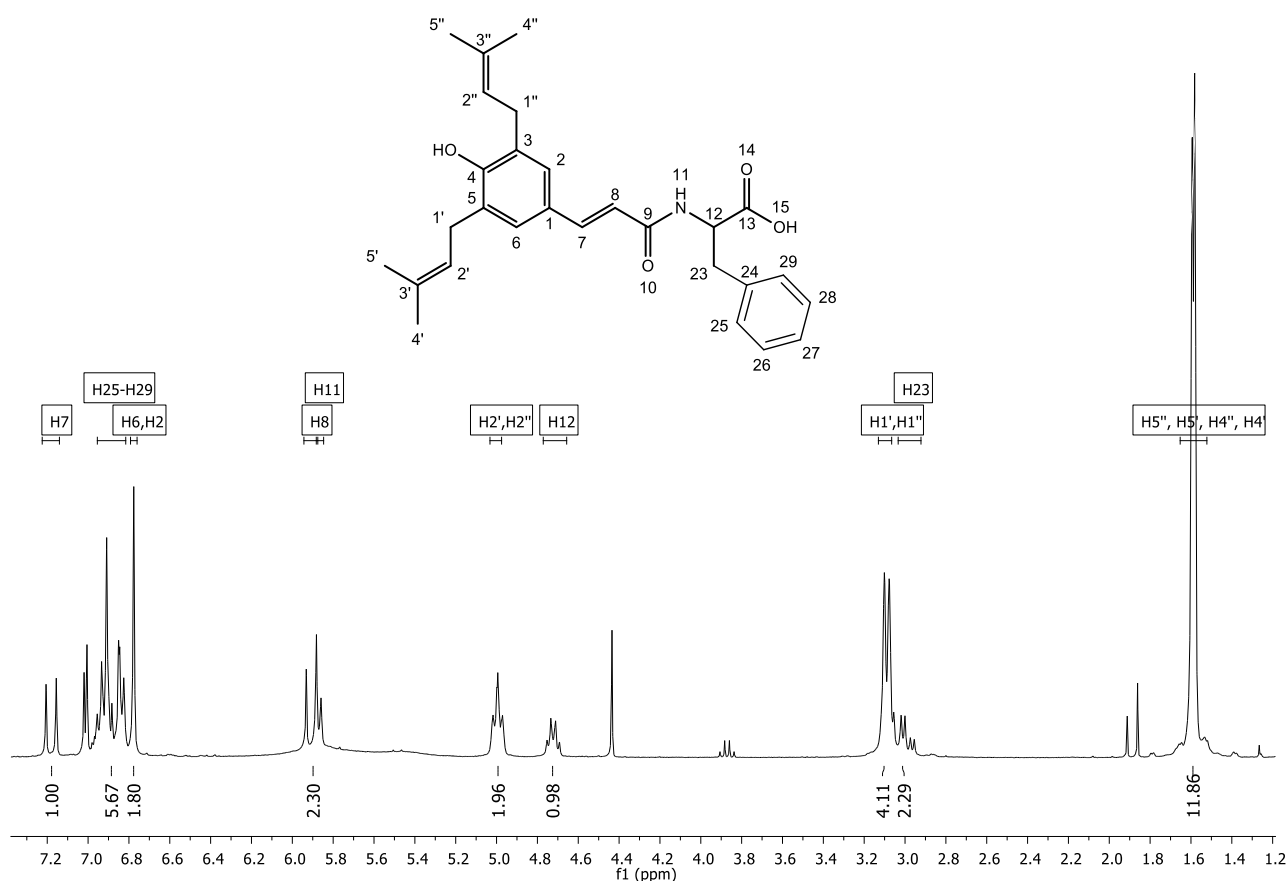
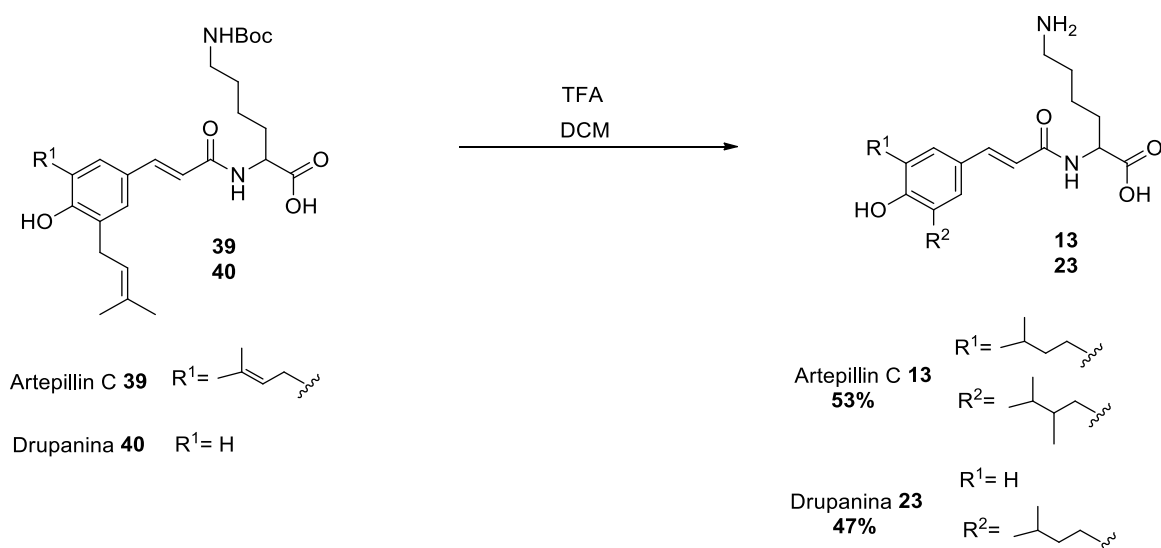


Figura 20: Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H do acoplamento do artemelin C com a fenilalanina desprotegida **10**, em 300 MHz, CDCl_3 .

Observou-se que apesar dos derivados dos aminoácidos lisina e triptofano possuírem o mesmo grupo protetor Boc, somente o derivado do triptofano foi hidrolisado por base, uma vez que o nitrogênio do carbamato do triptofano está envolvido na ressonância do anel indol, facilitando, assim, a hidrólise do éster e a formação da amina aromática. Dessa forma, os derivados do acoplamento da lisina com o artemelin C **39** e da drupanina **40**, foram submetidas à reação com TFA 50% em DMF para retirada do grupo protetor Boc e formação da amina terminal alifática (LAVRADO et al., 2011). Após reação, neutralizou-se a solução ácida com KOH 2M, sendo a fase orgânica extraída com CH_2Cl_2 para a obtenção dos derivados do artemelin C **13** e da drupanina **23** desprotegidos da lisina (Esquema 10).



Esquema 10. Desproteção do derivado do aminoácido lisina com artepelin C **13** e drupanina **23** por reação em meio ácido.

As análises de RMN 1H , Figuras 21 e 22, confirmam a ausência do sinal do grupo protetor Boc (simpleto em 1,6 ppm integrando para nove hidrogênios) para os dois derivados da lisina **13** e **23**, após a reação com TFA/DCM. No entanto, ao contrário da reação de hidrólise promovida por base, a reação com TFA originou muitas impurezas, e apesar, dos produtos isolados por HPLC-DAD preparativo serem os majoritários nos cromatogramas, acredita-se que estes possam ser produtos indesejados da reação, uma vez que os sinais observados no espectro de RMN 1H demonstram a ausência da dupla ligação nos dois derivados e a presença de uma metila no derivado **13**. Os espectros dos dois derivados da lisina **13** e **23** são bem semelhantes, podendo-se observar em ambos o sinal tripleto em 2,8 dos hidrogênios H1'. Este sinal é de extrema importância, uma vez que se a estrutura estivesse com a ligação dupla na prenila, conforme ambos os precursores, este sinal apareceria como um duplete em 3,2 ppm. Além disso, no derivado **13**, o qual possui duas prenilas, aparece com os sinais dos hidrogênios H1' bem distintos, sendo um deles um tripleto, conforme mencionado acima, e o outro um multiplete, o que indica diferenças entre as duas prenilas. Além disso, observou-se pela integral em 1,3 ppm a presença de uma metila, o que foi confirmado por análise de RMN ^{13}C e ESI-MS.

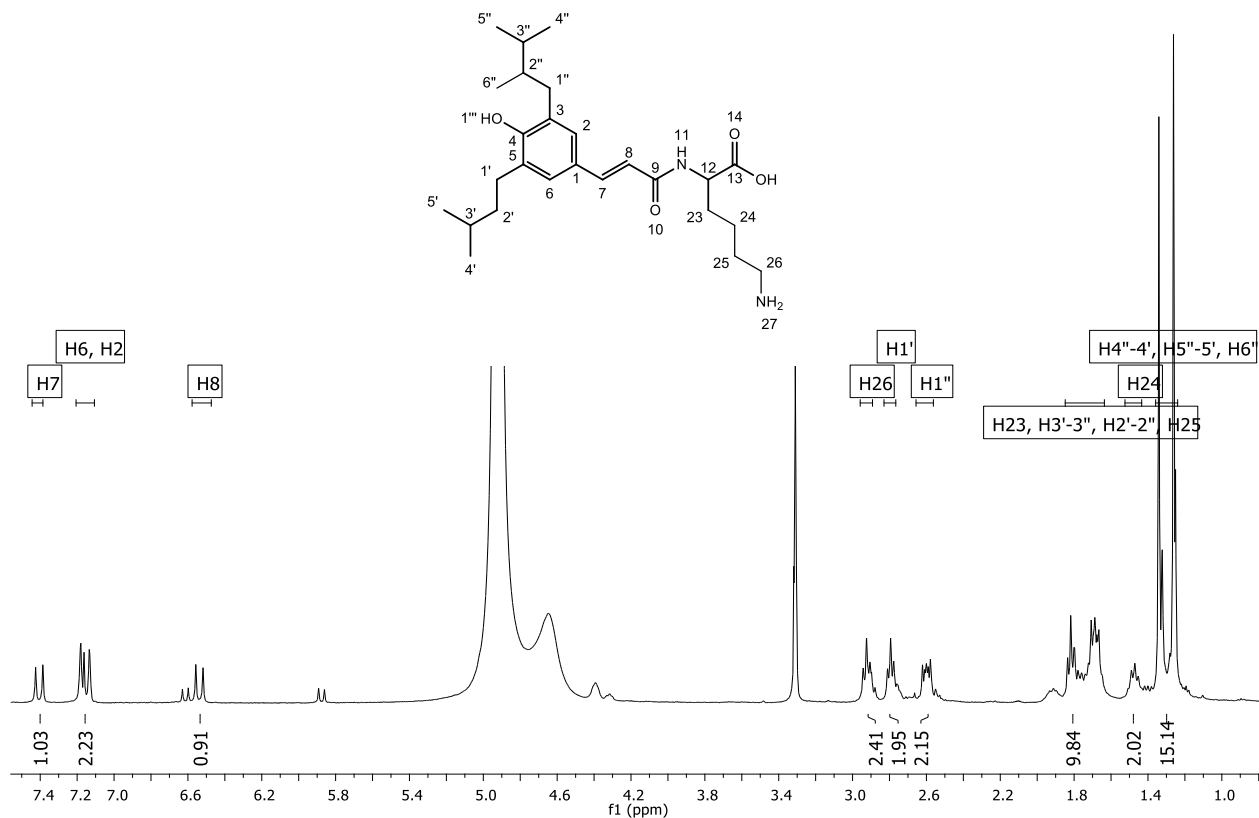


Figura 21: Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H do acoplamento do artepelin C com a lisina desprotegida **13**, em 500 MHz, MeOD₄.

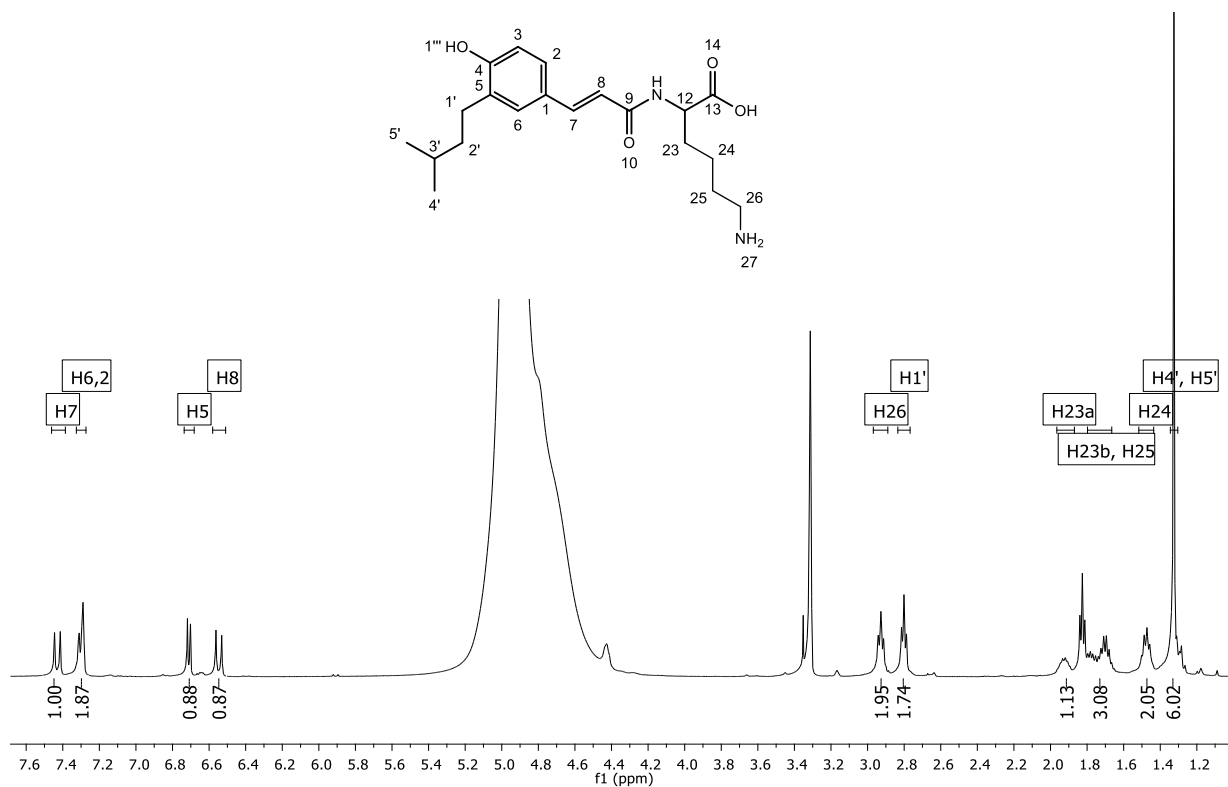


Figura 22: Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H do acoplamento da drupanina com a lisina desprotegida **23**, em 500 MHz, MeOD₄.

Avaliação Biológica dos Derivados de Produtos Naturais

4.3. Avaliação biológica dos derivados de artepelin C, drupanina e bacarina

4.3.1. Avaliação da atividade antitumoral

Todos os derivados e os três precursores naturais foram avaliados frente as linhagens de câncer de mama, MDA-MB-231 (sem receptor para estrógeno) e MCF-7 (com receptor de estrógeno), e de câncer de próstata hormônio independentes, PC-3 e DU-145, usando como comparação as linhagens normais de mama, MCF-10A, e de próstata, PNT-2. A cisplatina, droga quimioterápica usada no tratamento do câncer, foi utilizado como o controle positivo nos ensaios *in vitro*.

Baseado nos ensaios citotóxicos frente as quatro linhagens de câncer de mama e de próstata, observa-se que os derivados sintetizados demonstraram, no geral, uma atividade mais promissora frente a linhagem de câncer de mama hormônio dependente, MCF-7. Além disso, nota-se que dentre os derivados testados frente as células MCF-7, dez deles apresentaram melhores atividades antitumorais quando comparados aos seus precursores naturais artepelin C, drupanina e bacarina.

Comparando-se as duas séries sintetizadas, os derivados de aminoácidos (**4-28**) demonstraram ser mais capazes de inibir as linhagens tumorais testadas do que os dímeros triazólico sintetizados (**1-3**). Observou-se que a maioria dos dímeros não apresentaram citotoxicidade frente às linhagens não tumorais e também não tiveram inibição significativa frente as quatro linhagens de carcinoma, apresentando na maioria, valores de IC₅₀ superiores à 200 µM.

Sete derivados dos produtos naturais (**4, 14, 16, 17, 18, 24 e 26**) destacaram-se frente aos demais derivados, com valores de concentração inibitória de 50% em linhagens de carcinoma (IC₅₀) variando entre 9,6 a 46,5 µM, o que demonstra excelente atividade antitumoral frente as linhagens testadas de câncer de mama quando comparado aos seus precursores naturais, Tabela 8. O derivado da drupanina **18**, apresentou a melhor atividade antiproliferativa com um valor de IC₅₀ de 9,6 ± 3,2 µM frente a linhagem de mama hormônio dependente MCF-7. Os compostos **4** e **24**, derivados do artepelin C e da bacarina, também apresentaram bons valores de

citotoxicidade frente as células MCF-7, com valores de IC₅₀ de 15,4 ± 0,5 µM e 18,4 ± 1,2 µM, respectivamente.

Para cada derivado, além do cálculo de IC₅₀, o índice de seletividade (SI) também foi calculado a partir da divisão entre a concentração citotóxica de 50% em linhagens não tumorais (CC₅₀) de mama (MCF-10A) e de próstata (PNT-2) e os valores de IC₅₀ das linhagens de câncer de mama e de próstata, respectivamente. O Cálculo do SI sugere que os compostos com valores acima de dois são mais seletivos frente as linhagens de carcinoma, com menor toxicidade frente as células não tumorais e maior potencial para posterior desenvolvimento de fármacos (DESAI; DESAI; SHINGADE, 2019). Assim, o derivado **18** além de apresentar o menor valor de IC₅₀ (9,6 ± 3,2 µM) também obteve o maior valor de SI (SI=5,5), confirmando a excelente atividade frente as células MCF-7.

Todos os demais derivados com ótimos valores de IC₅₀ (**4**, **14**, **16**, **17**, **24** e **26**) também tiveram valores de SI acima de dois, confirmando o potencial antitumoral frente as células MCF-7. O segundo maior valor de SI (SI=4,8) foi do composto **17**, derivado da drupanina, o qual apresentou IC₅₀ de 35,4 ± 0,1.

Além disso, a partir dos resultados *in vitro* observa-se que a sequência mais promissora, com melhores valores de IC₅₀ e SI, pertence aos derivados do produto natural drupanina. Por outro lado, outros derivados como os compostos **4** e **26**, derivados do artepelin C e bacarina, respectivamente, também demonstraram uma excelente atividade antiproliferativa.

Todos os trinta derivados obtidos também foram testados frente as linhagens de carcinoma de próstata, e, apesar dos bons valores de IC₅₀ observados, variando entre 25,4 a 38,3 µM, os valores de SI da maioria dos compostos não ultrapassaram o valor de dois, demonstrando citotoxicidade tanto frente as linhagens não tumorais quanto tumorais, Tabela 9.

Importante reforçar que os resultados *in vitro* mostraram atividade antiproliferativa principalmente frente às linhagens hormônio-dependentes com receptores de estrogênio, o que pode sugerir uma possível ação seletiva desses derivados, os quais podem estar atuando na via de produção de hormônios esteroides, conforme reportado na literatura para os precursores naturais artepelin C, drupanina e bacarina (ENDO et al., 2012).

Tabela 8. Concentração inibitória de 50% em linhagens de carcinoma (IC₅₀), concentração citotóxica de 50% em linhagens não tumorais (CC₅₀) e índice de seletividade (SI) determinados pelo tratamento das linhagens de carcinoma e normais com os derivados do artepelin C, drupanina e bacarina.

Substâncias	Linhagens de carcinoma de mama				Linhagem não tumorais de mama
	MCF-7		MDA-MB231		MCF-10A
	IC ₅₀	SI	IC ₅₀	SI	CC ₅₀
<i>artepelin C</i>	162,30 ± 34,9	>1,23	172,65 ± 10,1	>1,16	>200
<i>bacarina</i>	127,60 ± 48,8	0,97	136,90 ± 12,7	0,91	124,65 ± 15,8
<i>drupanina</i>	>200	nd	>200	nd	>200
1	>200	nd	187,40 ± 0,1	>1,07	>200
2	>200	nd	>200	nd	>200
3	>200	nd	>200	nd	>200
4	18,37 ± 1,2	3,23	41,01 ± 4,3	1,45	59,35 ± 1,5
5	104,05 ± 14,9	>1,92	146,20 ± 29,1	>1,37	>200
6	87,07 ± 30,0	1,99	102,65 ± 2,6	1,69	173,40 ± 20,4
7	>200	nd	135,75 ± 1,2	>1,37	>200
8	>200	nd	167,40 ± 28,3	>1,19	>200
9	>200	nd	>200	nd	>200
10	78,38 ± 0,4	2,00	126,15 ± 5,4	1,24	156,70 ± 8,8
11	>200	nd	180,00 ± 3,4	nd	>200
12	>200	nd	>200	nd	>200
13	>200	nd	>200	nd	>200
14	38,68 ± 20,5	3,47	91,92 ± 8,2	1,46	134,40 ± 24,7
15	>200	nd	>200	nd	>200
16	26,31 ± 6,9	2,67	59,11 ± 27,5	1,19	70,39 ± 30,9
17	35,36 ± 0,1	4,84	129,60 ± 11,9	1,32	171,35 ± 21,8
18	9,58 ± 3,2	5,45	80,62 ± 22,6	0,65	52,24 ± 15,6
19	>200	nd	>200	nd	>200
20	>200	nd	175,65 ± 27,6	>1,42	>200
21	>200	nd	>200	nd	>200
22	>200	nd	>200	nd	>200
23	>200	nd	>200	nd	>200
24	46,53 ± 16,5	2,42	60,53 ± 0,6	1,86	112,55 ± 3,6
25	>200	nd	>200	nd	>200
26	15,36 ± 0,5	2,96	47,11 ± 4,7	0,96	45,39 ± 2,4
27	>200	nd	160,05 ± 13,6	1,13	180,30 ± 3,9
28	>200	nd	153,15 ± 22,6	nd	>200
Cisplatina	85,91 ± 6,8	-	6,26 ± 0,7	-	35,20 ± 2,8

*As linhas celulares indicadas foram tratadas com concentrações crescentes (1,56-200 µM) de cada composto por 72 h. A viabilidade celular foi determinada usando o ensaio MTT, sendo o controle positivo a cisplatina. nd: valores não determinados. SI: CC₅₀/IC₅₀. Os valores são expressos como a média ± desvio padrão de experimentos duplicados em dias alternados; MCF-7 e MDA-MB231: adenocarcinoma de mama; MCF-10A: epitelial de mama (linha celular não tumoral).

Tabela 9. Concentração inibitória de 50% em linhagens de carcinoma (IC₅₀), concentração citotóxica de 50% em linhagens não tumorais (CC₅₀) e índice de seletividade (SI) determinados pelo tratamento das linhagens de carcinoma e normais com os derivados do artepelin C, drupanina e bacarina.

Substâncias	Linhagens de carcinoma de próstata				Linhagem não tumorais de próstata
	PC-3		DU-145		PNT-2
	IC ₅₀	SI	IC ₅₀	SI	CC ₅₀
<i>artepelin C</i>	178,90 ± 11,0	1,05	178,95 ± 11,8	1,05	187,55 ± 11,7
<i>bacarina</i>	112,90 ± 1,3	>1,77	125,30 ± 2,4	>1,60	>200
<i>drupanina</i>	>200	nd	>200	nd	>200
1	>200	nd	>200	nd	>200
2	>200	nd	>200	nd	>200
3	>200	nd	>200	nd	>200
4	58,22 ± 10,9	1,15	35,83 ± 5,8	1,87	67,14 ± 10,9
5	>200	nd	138,95 ± 1,1	>1,44	>200
6	>200	nd	>200	nd	>200
7	>200	nd	>200	nd	>200
8	>200	nd	>200	nd	>200
9	>200	nd	>200	nd	>200
10	104,02 ± 6,3	1,28	129,30 ± 18,1	1,03	132,75 ± 11,5
11	>200	nd	>200	nd	>200
12	>200	nd	197,55 ± 4,7	>1,01	>200
13	>200	nd	>200	nd	>200
14	67,22 ± 3,0	1,61	81,09 ± 31,6	1,34	108,35 ± 10,7
15	>200	nd	>200	nd	>200
16	25,39 ± 7,8	3,53	51,32 ± 27,4	1,74	89,53 ± 17,9
17	111,85 ± 1,9	1,29	109,58 ± 25,3	1,31	144,00 ± 2,3
18	33,97 ± 12,7	1,07	47,32 ± 11,3	0,77	36,29 ± 0,7
19	>200	nd	>200	nd	>200
20	>200	nd	>200	nd	>200
21	>200	nd	>200	nd	>200
22	>200	nd	>200	nd	>200
23	>200	nd	>200	nd	>200
24	51,96 ± 14,2	1,36	40,25 ± 11,6	1,76	70,87 ± 15,6
25	>200	nd	184,80 ± 0,0	>1,08	>200
26	38,33 ± 1,6	1,00	41,92 ± 2,2	0,92	38,63 ± 3,2
27	>200	nd	195,00 ± 4,7	>1,03	>200
28	>200	nd	159,30 ± 6,1	>1,26	>200
Cisplatina	28,46 ± 4,8	1,10	4,64 ± 0,4	-	30,58 ± 1,8

*As linhas celulares indicadas foram tratadas com concentrações crescentes (1,56-200 µM) de cada composto por 72 h. A viabilidade celular foi determinada usando o ensaio MTT, sendo o controle positivo a cisplatina. nd: valores não determinados. SI: CC₅₀/IC₅₀. Os valores são expressos como a média ± desvio padrão de experimentos duplicados em dias alternados; PC-3 e DU-145: adenocarcinoma de próstata; PNT-2: epitelial de próstata (linha celular não tumoral).

4.3.2. Avaliação da atividade antiparasitária

Alguns dos derivados semissintéticos do artepelin C, bacarina e da drupanina obtidos em maior quantidade foram testadas frente ao *Trypanosona cruzi* na forma amastigota intracelular, juntamente com a avaliação citotóxica na célula hospedeira de mamífero LLC-MK2.

Os resultados indicaram que a maioria dos compostos não apresentou inibição significativa frente às formas amastigotas de *T. cruzi*. Os compostos **4** e **6**, derivado do acoplamento entre artepelin C com os aminoácidos serina e treonina, respectivamente, foram os únicos que tiveram índices de seletividade (SI) acima de dois, no entanto, a literatura recomenda SI acima de dez para ensaios com *T. cruzi* (CHATELAIN, 2015), indicando que os derivados testados não tiveram citotoxicidade elevada frente às formas amastigotas testadas, tabela 10.

Tabela 10: Inibição das formas amastigotas de *T. cruzi* e citotoxicidade sobre as células de mamíferos LLC-MK2 dos precursores e derivados sintetizados.

Substâncias	CC ₅₀ (µM)	IC ₅₀ (µM)	SI
artepelin C	172.6	>200	ND
bacarina	>200	>200	ND
drupanina	>200	>200	ND
2	>200	>200	ND
4	104.0	29.07	3.6
5	>200	>200	ND
6	>200	73.98	>2.7
7	>200	>200	ND
8	>200	>200	ND
9	>200	>200	ND
10	90.44	145.3	0.62
11	>200	>200	ND
12	89.78	169.7	0.53
14	>200	>200	ND
15	>200	>200	ND
16	>200	>200	ND
17	>200	>200	ND
18	>200	>200	ND
19	>200	>200	ND
21	>200	>200	ND
22	>200	>200	ND
24	126.2	112.8	1.12
25	>200	>200	ND
26	113.3	82.91	1.37
27	>200	>200	ND
28	>200	>200	ND
BZ	>200	6.5	>30.8

IC₅₀ - concentração inibitória de 50% das formas amastigotas (cepa Tulahuen); CC₅₀ - concentração citotóxica de 50% das células de mamíferos LLC-MK2; SI, índice de seletividade representado pela razão de CC₅₀ pelo IC₅₀; BZ: Benznidazol; ND: não determinado.

4.3.3. Avaliação da atividade antimicrobiana

Todos os derivados sintetizados foram avaliados quanto à atividade de inibição do crescimento bacteriano tanto de bactéria gram-negativa (*Escherichia coli*) quanto gram-positiva (*Staphylococcus aureus*). Os resultados indicaram não haver inibição significativa frente às duas bactérias testadas dos derivados sintetizados.

Tabela 11. Avaliação antimicrobiana dos precursores e dos derivados sintetizados.

Substâncias	IC ₅₀ (µM)	
	<i>S. aureus</i> CIM/CBM	<i>E. Coli</i> CIM/CBM
artepelin C	>100	>100
bacarina	>100	>100
drupanina	>100	>100
1	>100	>100
2	100/>100	>100
3	>100	>100
4	>100	>100
5	>100	>100
6	>100	>100
7	>100	>100
8	>100	>100
9	>100	>100
10	>100	>100
11	>100	>100
12	100/100	>100
13	>100	>100
14	>100	>100
15	>100	>100
16	>100	>100
17	>100	>100
18	>100	>100
19	>100	>100
20	>100	>100
21	>100	>100
22	>100	>100
23	>100	>100
24	>100	>100
25	>100	>100
26	>100	>100
27	>100	>100
28	>100	>100
Penicilina	0,1844/2,95	-
Estreptomicina	-	2,95/>5,9

* Os micro-organismos foram tratados com concentrações crescentes (0,049-100 µg/ml) de cada composto por 24 h. Os controles positivos foram usados nas concentrações crescentes (0,0115-5,9 µg/ml), sendo a penicilina usada para *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300) e a estreptomicina para *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Estudos *in silico* dos Derivados de Produtos Naturais

4.4. Análises *in silico* dos derivados de artepelin C, drupanina e bacarina

Os estudos *in silico* foram conduzidos com o objetivo de elucidar o mecanismo de ação mais provável pelo qual os compostos sintetizados poderiam estar apresentando suas atividades inibitórias nos ensaios com as linhagens celulares de câncer de mama. Mais especificamente, nosso principal objetivo *in silico* foi investigar a afinidade de ligação e as interações dos derivados por meio de investigações de *docking* na tentativa de racionalizar as relações estrutura-atividade.

Desta forma, foi considerado um conjunto de 26 compostos (tabela 8) e os respectivos valores de IC₅₀ medidos em células tumorais de mama MCF-7. Desse conjunto, vale destacar que três deles (artepelin C, drupanina e bacarina) são compostos de referência; além disso, quando mencionado, classificou-se os 26 compostos de acordo com as atividades binárias (1 para ativo ou 0 para inativo), considerando o limiar de IC₅₀ ≤ 200 μM, assim, do total, o conjunto foi classificado em 12 compostos ativos e 14 inativos. Vale enfatizar que, para a análise computacional, selecionou-se apenas os compostos derivados do acoplamento com os aminoácidos (**4-12**, **14-22** e **24-28**), uma vez que os dímeros triazólico (**1-3**), além de não apresentarem atividade antitumoral nos estudos *in vitro*, estruturalmente eram bem distintos dos demais compostos.

Deve-se notar que é reportado na literatura a existência de uma afinidade considerável da bacarina pelo alvo AKR1C3 (ENDO et al., 2012). Assim, assumiu-se essa hipótese, ou seja, que os compostos, provavelmente, atuariam pela inibição desse alvo, visto que há similaridade estrutural compartilhada. Assim, realizou-se uma análise preliminar de predição de alvos (*'target fishing'*) para alguns dos compostos selecionados do conjunto usado no estudo *in silico*.

Primeiramente, foi construído um modelo de similaridade (RDKit 2D *fingerprint*) para classificar os 26 compostos, diferenciando aqueles que eram razoavelmente semelhantes à bacarina. Os valores de similaridade obtidos variaram de 0,38 a 0,67. Para estabelecer uma nota de corte confiável para distinção dos compostos, utilizaram-se esses valores de similaridade juntamente com as atividades binárias de cada composto para gerar uma curva ROC, assim verificando se esse modelo de similaridade

seria capaz de discriminar ativos/inativos de forma razoável. O valor de AUC desta curva ROC foi igual a 0,701 e forneceu uma nota de corte ideal de 0,52, ou seja, indicando que 52% de similaridade deveria discriminar apropriadamente os compostos de acordo com este modelo utilizado (Figura 23). Desta forma, os compostos mais similares à bacarina foram divididos como mostrado na tabela 12.

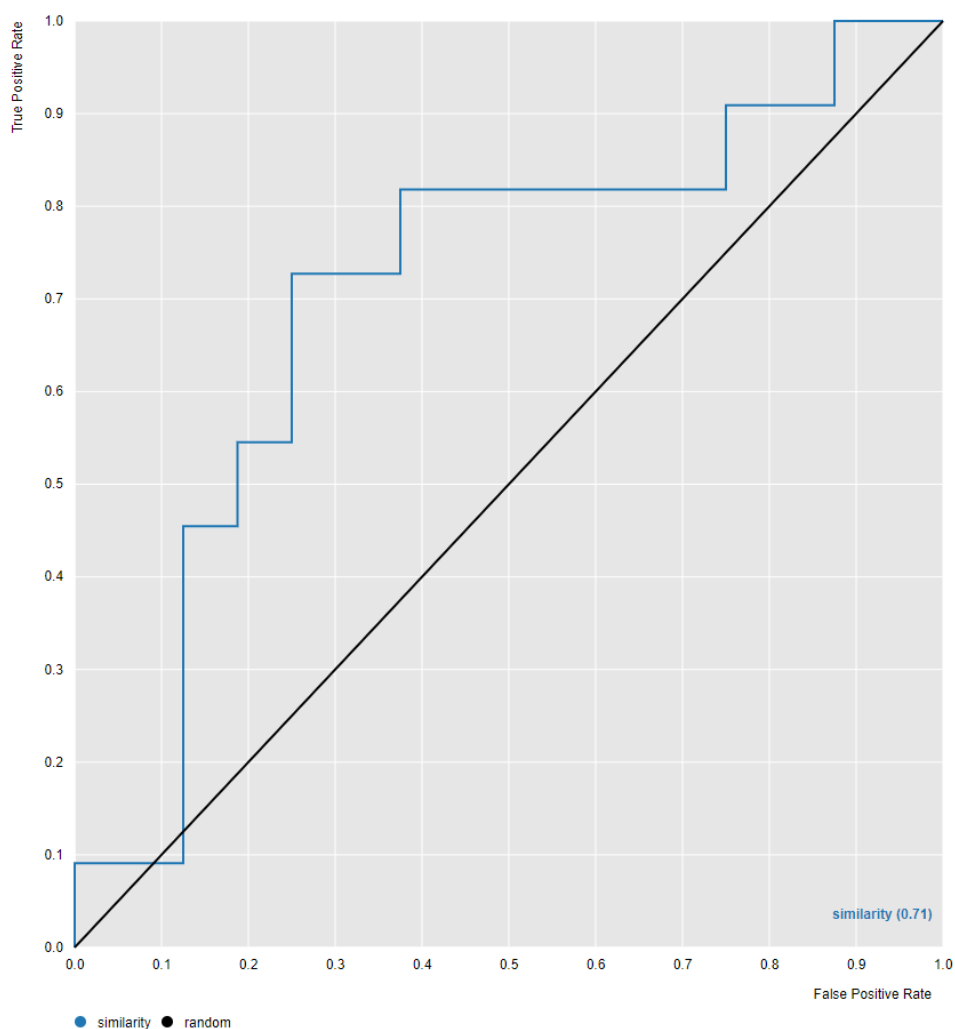


Figura 23. Curva ROC gerada, com AUC = 0,701, para conjunto de dados de 26 compostos e valores de similaridade correspondentes (modelo RDKit 2D *fingerprint*) e atividades binárias experimentais.

Tabela 12. Divisão/seleção de compostos do conjunto de dados de 26 derivados sintetizados e aqueles mais similares à bacarina, de acordo com o modelo de RDKit 2D *fingerprint* desenvolvido, usando a nota de corte de 52%.

Derivados	Similaridade	Atividade Binária ^(a)
art.	0,61	1
6	0,54	1
8	0,51	0
7	0,58	0
bac	1,00	1
24	0,67	1
25	0,43	0
27	0,62	0
28	0,59	0
26	0,62	1
dru	0,63	0
12	0,52	0
11	0,45	0
9	0,49	0
10	0,43	1
14	0,59	1
18	0,52	1
16	0,55	1
17	0,59	1
15	0,41	0
19	0,50	0
21	0,46	0
20	0,43	0
22	0,53	0
4	0,58	1
5	0,41	1

(a) atividades binárias (1 ativo, 0 inativo) para valores experimentais de IC₅₀ de linhagens tumorais de mama MCF-7, considerando o limite de IC₅₀ ≤ 200 μM.

* 16 compostos em verde (valores de similaridade ≥ 52%) foram selecionados para o protocolo de *docking* utilizando-se restrições.

art: artepelin, bac: bacarina, dru: drupanina.

Em seguida, realizou-se a predição de alvos usando o webserver PPB (<http://gdbtools.unibe.ch:8080/PPB/index.html>) para alguns dos compostos mais representativos do conjunto de dados, em vista de suas atividades em MCF-7, bem como suas similaridades com a bacarina, tabela 13. Deste modo, foi observado que a bacarina apresentou uma predição preferencial para o alvo AKR1C3 (classificado em 1^o posição), juntamente com uma classificação razoável (35^o posição) para MCF-7. Esta preferência de predição de alvos parece ter sido mantida para os derivados de forma coerente, de acordo com as suas atividades e similaridade com a bacarina. Por exemplo, o composto **24**, o mais similar e ativo, foi classificado na 14^a posição para AKR1C3 e na 6^a posição para MCF-7, enquanto que o composto **20**, o mais dissimilar e inativo, não apresentou classificação disponível para ambos os alvos. Vale notar que nenhum outro alvo

relacionado ao MCF-7/câncer foi predito e classificado como preferencial em contraste à enzima AKR1C3. Portanto, esta análise preliminar de predição de alvo, além dos dados relatados na literatura, nos permitiu realizar investigações iniciais de *docking* com a suposição de que nossos compostos provavelmente devem estar atuando na inibição da enzima AKR1C3.

Tabela 13: Dados de predição de alvo obtidos a partir do site PPB para os sete compostos selecionados, considerando valores de atividade (IC₅₀ em µM dos ensaios com MCF-7) e similaridade⁴ com a bacarina.

Derivados	IC ₅₀ (µM) MCF-7	AKR13C (CHEMBL4681 ¹)			MCF7 (CHEMBL387 ¹)			Comentários
		Posição no Ranking	#molecula ²	Principal descriptor <i>/fingerprint</i> ³	Posição no Ranking	#molecula ²	Principal descriptor <i>/fingerprint</i> ³	
bac	127,02	1	29	Molécula idêntica ao do banco de dados	35	1	MQN (0,232)	Bacarina
24	46,53	14	20	1 box (p-value entre 0,01 to 0)	6	3	ECfp4 (0,684)	mais similar ⁴ e ativo
27	>200	28	19	1 box (p-value entre 0,01 to 0)	94	1	SMLfp (0,849)	mais similar ⁴ e inativo
5	104,05	na	na	na	30	1	MQN (1,0)	mais diferente ⁴ e ativo
20	>200	na	na	na	na	na	na	Mais diferente ⁴ e inativo
18	9,58	31	1	ECfp4 (0,648)	12	1	Ffp3 (0,73)	mais ativo
art	162,30	1	1	Molécula idêntica ao do banco de dados	na	na	na	mais inativo

¹ IDs dos alvos correspondentes no banco de dados ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>).

² Número de moléculas encontradas/usadas como referência no banco de dados ChEMBL para aplicar a abordagem baseada em ligante e classificar os respectivos alvos

³ Diferentes *fingerprints* independentes e/ou combinados que apresentaram os valores de pontuação mais relevantes para cada predição de destino. Mais detalhes no site: <http://gdbtools.unibe.ch:8080/PPB/basics.html>.

⁴ Similaridades com a bacarina conforme modelo RDKit 2D *fingerprint* desenvolvido.

art: artepelin, bac: bacarina.

4.4.1. Estudos de *docking* com a enzima AKR1C3

As simulações de *docking* foram conduzidas com vista a obtenção das melhores poses e modos de ligação para o conjunto de compostos/derivados frente a enzima AKR1C3. Desta forma, propôs-se o uso de dois diferentes protocolos de *docking* (com e sem restrições – conforme detalhado no tópico 3.4.3.). É importante enfatizar que o protocolo de *docking* ‘com’ restrições foi desenvolvido com base na literatura (ENDO et al., 2012). Isso foi permitido após notar que os estudos de mutagênese dirigida sugeriram que os resíduos não conservados Ser118, Met120 e Phe311 em AKR1C3 eram importantes para determinar a potência inibitória, bem como a seletividade da bacarina.

Considerou-se, ademais, que parte dos derivados aqui avaliados consistem em análogos da bacarina, que compartilham alta (ou baixa) similaridade estrutural com este composto de referência.

Assim, utilizou-se o modelo de similaridade mencionado anteriormente (RDKit 2D *fingerprint*) para diferenciar compostos que são razoavelmente similares à bacarina e, assim, permitir ou não o uso do protocolo de *docking* 'com' restrições. Ressalta-se que tal classificação independe de suas atividades binárias. Desta forma, usou-se o protocolo de *docking* com restrição para os 16 compostos (tabela 12) mais similares à bacarina, e os demais foram *dockados* usando o protocolo sem restrição.

Ambos os protocolos de *docking* foram desenvolvidos usando o software *Glide* e ambos foram submetidos ao procedimento de *redocking*, ou seja, para validar a capacidade de cada um reproduzir a pose cristalográfica (em termos de conformação + orientação) do ligante nativo dentro do sítio de ligação da proteína. Os resultados estão apresentados nas Figuras 24 e 25, onde pode-se observar uma convergência adequada das poses obtidas por meio dos dois protocolos. Mais especificamente, as poses mais bem classificadas obtidas usando o protocolo 'com' e 'sem' restrições exibiram valores de RMSD de 0,63 e 0,56 Å, respectivamente, em acordo com o que se espera de um procedimento geral de validação por *redocking* (COLE et al., 2005; HEVENER et al., 2009).

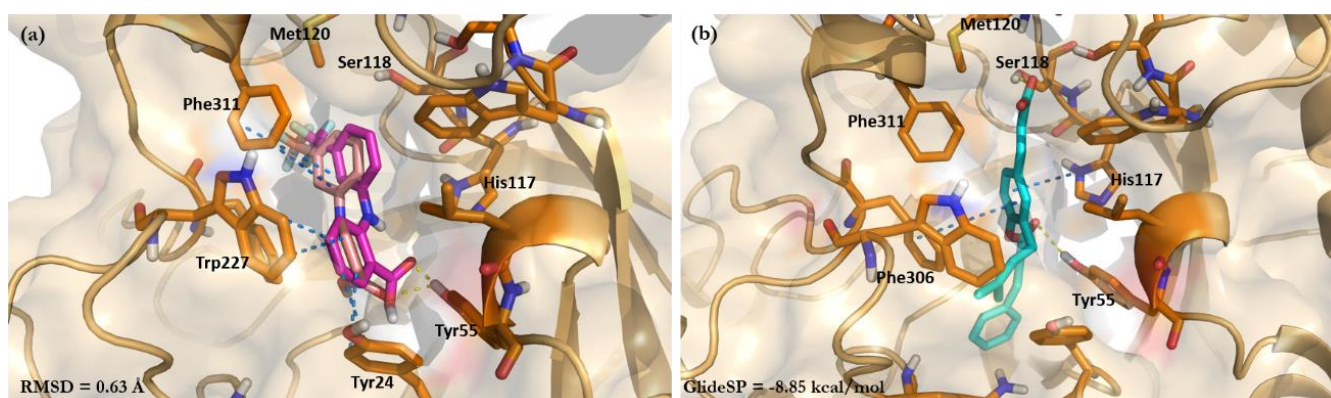


Figura 24. Resultados obtidos usando o protocolo de *docking* 'com' restrições, desenvolvido no *Glide*. Em (a), *redocking* do ligante nativo FLF no sítio da AKR13C (1S2C.pdb), onde a pose cristalográfica original é representada em rosa e a melhor pose de *docking* obtida em salmão. Em (b), a pose de *docking* da bacarina (em azul claro) obtida 'com' restrição. Ambas as imagens foram preparadas usando o software *Pymol*.

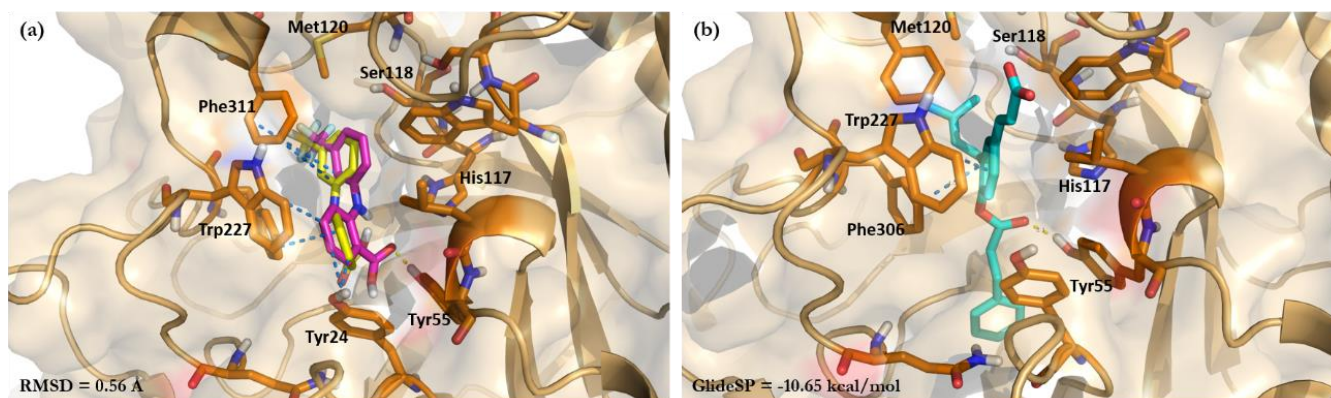


Figura 25. Resultados obtidos usando o protocolo de *docking* ‘sem’ restrições, desenvolvido em Glide. Em (a), *redocking* do ligante nativo FLF dentro de AKR13C (1S2C.pdb), onde a pose cristalográfica original é representada em rosa e a melhor pose de *docking* obtida em amarelo. Em (b), a pose de *docking* da bacarina (em azul claro) obtida ‘sem’ restrição. Ambas as imagens foram preparadas usando o software Pymol.

A fim de fornecer uma distinção visual entre os dois protocolos de *docking*, pode-se visualizar a partir das figuras 24 e 25 as poses de docking da bacarina e as respectivas interações com resíduos de aminoácidos importantes no sítio ativo da AKR13C. Foi possível notar que a melhor pose obtida para a bacarina com o protocolo de *docking* ‘sem’ restrição apresenta-se invertida - apenas estabelecendo interações de ligação de hidrogênio com Tyr55, além de empilhamento *pi-pi* com Trp227 -, não concordando com os estudos de mutagênese dirigida descritos na literatura (ENDO et al., 2012). Por outro lado, a pose de *docking* da bacarina obtida por meio do protocolo ‘com’ restrição, conforme a literatura, demonstra o estabelecimento de possíveis interações mais fortes - ligação de hidrogênio com Ser118 e Tyr55 e empilhamento *pi-pi* com Phe306 e His117. Além disso, os correspondentes valores de *score Glide SP* são apresentados e corroboram tais interações.

As poses de *docking* dos compostos mais ativos do conjunto de dados, compostos **26** e **18** (Figura 26), apresentaram valores de *score* compatíveis bem como interações fortes e coerentes dentro do sítio ativo da AKR13C, igualmente aos observados para a bacarina. O composto **18** apresentou duas interações de ligação de hidrogênio, uma via aceitação do OH de Tyr 55 por um grupo éster carbonílico, e outra via OH da Ser118 com o carbamato C=O; além de três interações de empilhamento *pi-pi*, uma com Trp227 e outra de seu anel aromático terminal estabilizado por duas interações com Phe306 e Trp24. Além disso, o composto **26**, que é um composto maior, foi capaz de se acomodar aparentemente bem no sítio, apresentando três interações de ligações de hidrogênio

com Ser118, Tyr55 e Gln222, e três interações de empilhamento *pi-pi* com His117, Phe311 e Trp86.

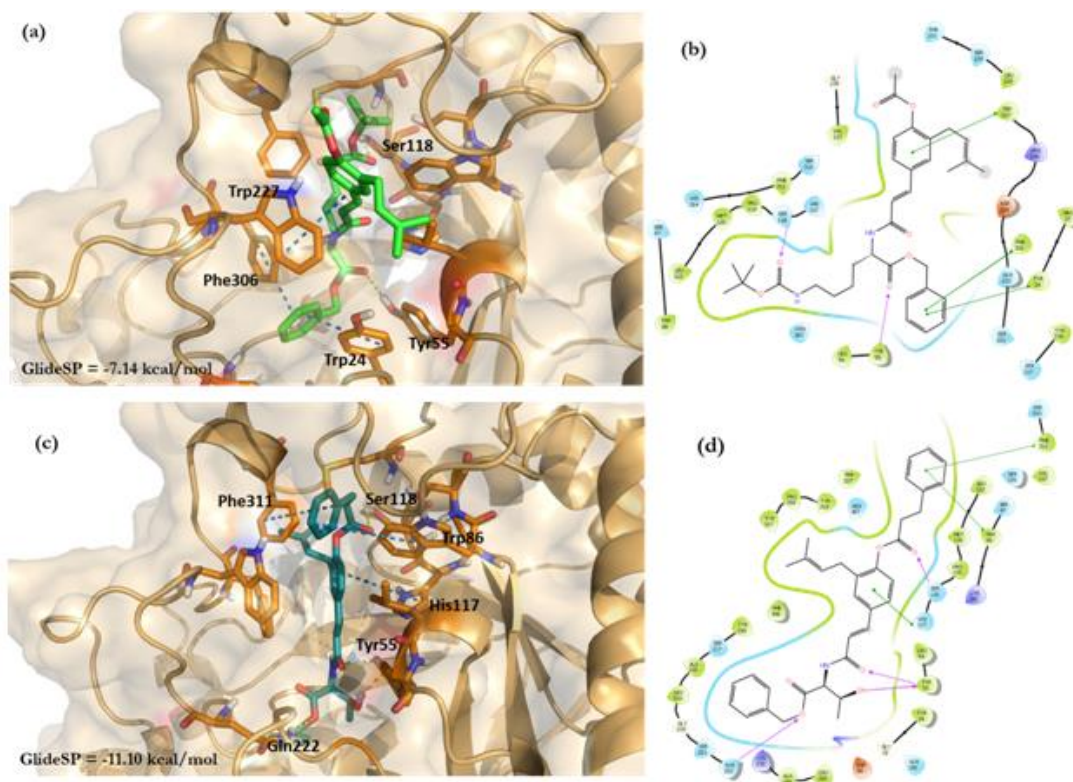


Figura 26. (a, c) Representação 3D das poses de *docking* dos compostos **18** e **26**, respectivamente, e as interações correspondentes na enzima AKR1C3 (1S2C.pdb); as ligações de hidrogênio são mostradas em amarelo, enquanto *pi-pi* são mostradas em azul. As figuras foram preparadas usando o software Pymol (SCHRÖDINGER LLC., 2010). (b, d) Diagrama de interação 2D dos compostos **18** e **26**, respectivamente, ligações de hidrogênio (em rosa) e interações *pi-pi* (em verde). As figuras foram preparadas usando o software Maestro (SCHRÖDINGER, 2020).

Em adição, considerando as poses obtidas para todos os compostos da série em estudo, bem como os respectivos valores de pontuação-*score* *GlideSP* (tabela 14), construiu-se uma curva ROC considerando as atividades binárias dos compostos (a partir das medições experimentais), que proporcionou um valor de AUC de 0,720 (Figura 27). Isso indica, adicionalmente, que há uma distinção/classificação razoável das atividades dos compostos em relação à sua afinidade de ligação com o sítio ativo da enzima AKR1C3.

Tabela 14. Valores de pontuação-score de *docking* obtidos para os derivados, usando o software Glide e os respectivos protocolos de *docking* aplicados aos 5 alvos diferentes.

Derivados	IC ₅₀ (µM) MCF-7	Atividades Binárias	Pontuação de <i>docking</i> - Glide SP (kcal/mol)				
			AKR1C3	BET	GRP78	MDM2	mTOR
art	162,30	1	-7,355	-7,122	-7,200	-4,353	-5,741
6	87,07	1	2,558	-8,22	-10,161	-7,306	-8,579
8	>200	0	-6,936	-9,156	-11,487	-5,555	-7,486
7	>200	0	12,811	-5,646	-11,194	-7,631	-8,56
bac	127,02	1	-8,847	-8,867	-9,081	-7,048	-7,467
24	46,53	1	-5,463	-8,336	-8,511	-4,531	-6,967
25	>200	0	-10,062	-11,135	-11,221	-6,321	-8,807
27	>200	0	6,366	-8,529	-9,585	-6,509	-8,738
28	>200	0	16,545	-8,15	-9,118	-8,969	-8,217
26	15,36	1	-11,108	-9,35	-10,135	-5,529	-7,37
dru	>200	0	-7,09	-7,117	-6,613	-5,681	-8,357
12	>200	0	-3,34	-7,966	-8,817	-5,762	-8,238
11	>200	0	-7,961	-7,807	-9,655	-6,317	-6,906
9	>200	0	-8,289	-6,28	-9,227	-6,324	-7,46
10	78,38	1	-11,393	-6,169	-7,429	-5,547	-7,662
14	38,68	1	-7,391	-7,644	-10,697	-6,235	-8,015
18	9,58	1	-7,142	-9,377	-8,523	-6,697	-9,216
16	26,31	1	-11,445	-6,56	-8,807	-7,372	-8,389
17	35,36	1	-9,893	-8,767	-11,140	-7,329	-8,857
15	>200	0	-10,953	-5,55	-9,923	-6,854	-9,749
19	>200	0	-8,173	-7,668	-8,049	-5,8	-8,646
21	>200	0	-8,228	-8,056	-8,183	-5,794	-9,308
20	>200	0	-8,637	-8,441	-8,896	-6,475	-10,745
22	>200	0	-4,936	-9,07	-4,774	-6,26	-9,837
4	18,37	1	-9,205	-8,538	-9,712	-7,317	-8,288
5	104,05	1	-11,617	-7,239	-7,525	-8,135	-7,582

art: artepelin, bac: bacarina, dru: drupanina.

4.4.2. Estudos de *docking* com outros alvos enzimáticos

Além do estudo de *docking* realizado para a AKR1C3, outros alvos enzimáticos também foram avaliados frente aos 26 derivados sintetizados, a partir da avaliação da habilidade de ancoramento (do inglês '*dockability*') destes compostos frente à outras enzimas consideradas alvos terapêuticos relevantes em células tumorais de câncer de mama. Desta forma, comparamos o estudo prévio de *docking* usando a AKR1C3 (e protocolos mistos) com estudos de *docking* usando outros 4 alvos conhecidos e potencialmente relacionados ao câncer de mama.

Foram selecionados, portanto, importantes alvos enzimáticos relacionado a terapia contra o câncer de mama para estes estudos adicionais de *docking*: BET ("*Bromodomain and ExtraTerminal*", envolvida na transcrição de oncogenes (LI et al., 2020)), GRP78 ("78-KDa glucose-regulated protein", proteína transmembrana considerada um marcador molecular para o câncer de mama (TSENG; ZHANG; LEE, 2019)), MDM2 ("Murine double minute 2 protein", oncoproteínas multifuncionais que promovem a invasão e metástase no câncer de mama (LU et al., 2016)) e a mTOR

(“Mammalian target of rapamycin”, envolvida no controle transcricional e translacional do câncer de mama (CARRAWAY; HIDALGO, 2004).).

A capacidade dos 26 compostos de se ancorar (‘docar’) com sucesso em tais alvos foi avaliada reunindo as correspondentes poses e pontuações *GlideSP*, e assim plotando-os também em curvas ROC; de modo análogo ao procedimento executado para a AKR1C3. Vale mencionar que cada protocolo de *docking* empregado usando o software *Glide* foi previamente validado com sucesso via *redocking*, conforme mostrado na figura 28.

A comparação entre o desempenho dos protocolos de *docking* com os diferentes alvos enzimáticos foi feita em termos dos valores de AUC de cada curva ROC obtida. A partir da figura 27 podemos observar os valores de AUC obtidos para os 4 alvos enzimáticos selecionados, enfatizando-se que os valores de AUC foram menores do que os observados para AKR1C3, possivelmente indicando uma maior afinidade dos derivados sintetizados frente a enzima AKR1C3.

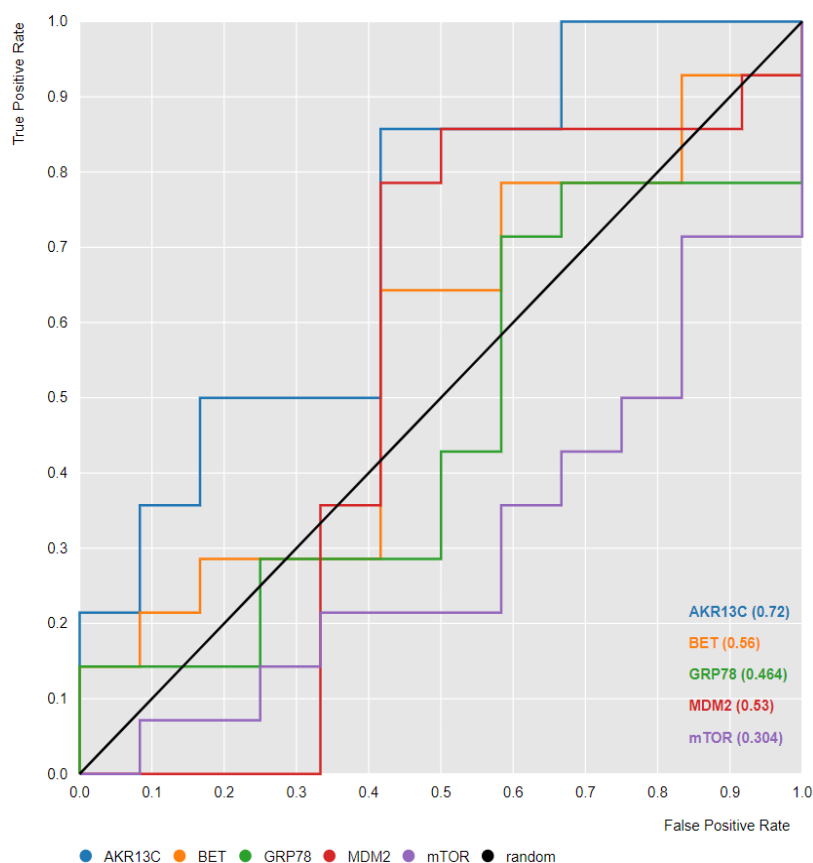


Figura 27. Curvas ROC e respectivos valores de AUC obtidos para os alvos AKR1C3 (0,720 em azul), BET (0,560 em laranja), GRP78 (0,464 em verde), MDM2 (0,530 em vermelho) e mTOR (0,304 em roxo), a partir dos resultados de pontuação de *docking* e atividades binárias dos derivados sintetizados.

Sabe-se, todavia, que demais alvos enzimáticos poderiam ser os responsáveis pela inibição observada nos estudos *in vitro* frente à MCF-7 e que há a necessidade de se realizar ensaios enzimáticos específicos com a AKR1C3 para comprovar este modo de ação sugerida. Além disso, existem outros aspectos relacionados ao tamanho (por exemplo, volume, forma e/ou conformação) dos ligantes nativos para cada sítio ativo do respectivo alvo - bem como a especificidade dos aminoácidos que os constituem, os quais podem exercer papéis importantes quando em comparação com as características químicas dos ligantes. De qualquer forma, neste estudo, foi executado estas simulações adicionais de *docking* com outros 4 alvos enzimáticos que poderiam eventualmente indicar uma maior afinidade frente aos derivados sintetizados. Como este não foi o caso, estes resultados devem indicar que, de fato, o sítio ativo considerado da AKR1C3 acomoda os 26 compostos derivados de bacarina de modo mais favorável.

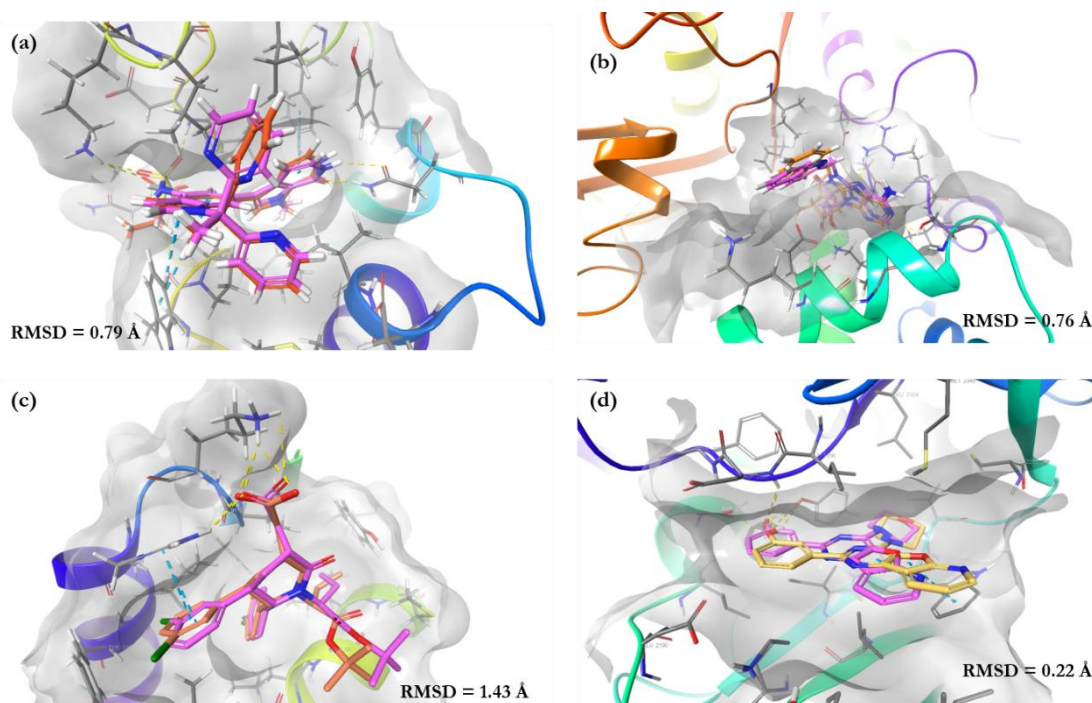


Figura 28. Validação *redocking* de cada protocolo de *docking* empregado no *Glide* para as seguintes estruturas/alvos enzimáticos e respectivos ligantes nativos: (a) BET (6P05.pdb), (b) GRP78 (3LDP.pdb), (c) MDM2 (4ERE.pdb), e (d) mTOR (4JT6.pdb). Os respectivos valores RMSD são mostrados em cada figura. A pose original (cristalográfica) dos ligantes nativos é mostrada em rosa, enquanto as cores amarelo-laranja representam suas poses mais bem pontuadas. As figuras foram preparadas usando o software Maestro.

5.0. Considerações Finais

A partir do extrato bruto da própolis verde e das folhas da *B. dracunculifolia* foi possível o isolamento de quantidades satisfatórias das substâncias desejadas e majoritárias, artepelin C, drupanina e bacarina.

Dois métodos cromatográficos foram utilizados para o isolamento das substâncias naturais, a CLV e o HSCCC. Ambos demonstraram ser eficientes para o isolamento das três substâncias desejadas presentes no extrato bruto. No entanto, a técnica CLV foi considerada mais adequada para os objetivos semissintéticos deste projeto, uma vez que apesar de ser um método de separação mais lento, permite o fracionamento de quantidades superiores de extrato bruto e, portanto, a obtenção de quantidades superiores de produtos naturais quando comparada à HSCCC.

Uma vez isolados os produtos naturais, artepelin C, drupanina e bacarina, iniciaram-se as semissínteses dos dímeros triazólicos e dos derivados dos aminoácidos (serina, triptofano, treonina, fenilalanina e lisina). Os dímeros triazólicos foram obtidos com rendimentos entre 62% e 97% e as reações de acoplamento com os aminoácidos listados forneceram rendimento entre 40% e 97%.

No total, foram obtidos 28 derivados do artepelin C, drupanina e bacarina, sendo uma série de substâncias protegidas com os grupos benzil, acetil e Boc e outra série de substâncias desprotegidas. Todos os compostos sintetizados foram avaliados quanto à atividade antiproliferativa, frente às linhagens de tumores de mama e de próstata, bem como as atividades antimicrobiana e antiparasitária.

No geral, as melhores atividades biológicas obtidas foram frente à linhagem de tumor de mama hormônio dependente MCF-7. Sete derivados (**4**, **14**, **16**, **17**, **18**, **24** e **26**) exibiram bons valores de IC₅₀, os quais variaram de 9,6 a 46,5 µM, e valores de SI acima de dois, entre 2,4 à 5,5, indicando baixa toxicidade e alta seletividade frente as linhagens de câncer de mama.

Os resultados *in vitro* demonstraram que o derivado da drupanina **18** forneceu a melhor concentração inibitória de 50% em linhagens de carcinoma ($IC_{50} = 9,6 \pm 3,2 \mu M$) e índice de seletividade de 5,5 nos ensaios com MCF-7.

Além disso, as simulações de *docking* revelaram que o composto **18** apresentou interações de *docking* coerentes, bem como fortes interações dentro do sítio ativo da AKR1C3, o qual pode ser um dos mecanismos prováveis pelo efeito citotóxico observado *in vitro* frente a linhagem de tumores de mama MCF-7. Portanto, no geral, este estudo fornece uma base para o desenvolvimento de novos derivados de produtos naturais como agentes anticâncer.

6.0. Referências

AKRAM, M.; ASIF, H. M.; UZAIR, M.; AKHTAR, Naveed; MADNI, Asadullah; ALI SHAH, S. M.; HASAN, Zahoor Ul; ULLAH, Asmat. Amino acids: A review article. **Journal of Medicinal Plants Research**, [S. l.], v. 5, n. 17, p. 3997–4000, 2011.

ARAGÃO-LEONETI, Valquiria; CAMPO, Vanessa L.; GOMES, Adriane S.; FIELD, Robert A.; CARVALHO, Ivone. Application of copper(I)-catalysed azide/alkyne cycloaddition (CuAAC) “click chemistry” in carbohydrate drug and neoglycopolymer synthesis. **Tetrahedron**, [S. l.], v. 66, n. 49, p. 9475–9492, 2010. DOI: 10.1016/j.tet.2010.10.001.

ARSLAN, Mustafa; BICAK, Tugrul Cem; PULIDO, Bruno A.; NUNES, Suzana P.; YAGCI, Yusuf. Post modification of acetylene functional poly(oxindole biphenylene) by photoinduced CuAAC. **European Polymer Journal**, [S. l.], v. 100, n. November 2017, p. 298–307, 2018. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2018.02.009.

BACHIEGA, T. F.; DE SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; SFORCIN, J. M. Immunomodulatory/anti-inflammatory effects of *Baccharis dracunculifolia* leaves. **Natural Product Research**, [S. l.], v. 27, n. 18, p. 1646–1650, 2013. DOI: 10.1080/14786419.2012.742078.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. Food chemistry. *In*: **Food Chemistry**. [s.l.: s.n.]. p. 8–91. DOI: 10.1007/978-3-540-69934-7.

BERTHOLD, Michael R. et al. KNIME: The Konstanz Information Miner. *In*: **Studies in Classification, Data Analysis, and Knowledge Organization**. [s.l.: s.n.]. p. 319–326. DOI: 10.1007/978-3-540-78246-9_38.

BOCK, Victoria D.; HIEMSTRA, Henk; VAN MAARSEVEEN, Jan H. Cu I-catalyzed alkyne-azide “click” cycloadditions from a mechanistic and synthetic perspective. **European Journal of Organic Chemistry**, [S. l.], n. 1, p. 51–68, 2006. DOI: 10.1002/ejoc.200500483.

BRAY, Freddie; FERLAY, Jacques; SOERJOMATARAM, Isabelle; SIEGEL, Rebecca L.; TORRE, Lindsey A.; JEMAL, Ahmedin. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S. l.], v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018. DOI: 10.3322/caac.21492.

BROWN, Ron. Hive products: Pollen, propolis and royal jelly. **Bee World**, [S. l.], v. 70, n. 3, p. 109–117, 1989. DOI: 10.1080/0005772X.1989.11099000.

BUCKNER, Frederick S.; VERLINDE, Christophe L. M. J.; LA FLAMME, Anne C.; VAN VOORHIS, Wesley C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing β -galactosidase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 40, n. 11, p. 2592–2597, 1996. DOI: 10.1128/aac.40.11.2592.

CAMPO, Vanessa L. et al. Click chemistry oligomerisation of azido-alkyne-functionalised galactose accesses triazole-linked linear oligomers and macrocycles that inhibit *Trypanosoma cruzi* macrophage invasion. **Tetrahedron**, [S. l.], v. 71, n. 39, p. 7344–7353, 2015. DOI: 10.1016/j.tet.2015.04.085.

CHAN, Godfrey Chi Fung; CHEUNG, Ka Wai; SZE, Daniel Man Yuen. The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, [S. l.], v. 44, n. 3, p. 262–273, 2013. DOI: 10.1007/s12016-012-8322-2.

CHATELAIN, Eric. Chagas disease drug discovery: Toward a new era. **Journal of Biomolecular Screening**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 22–35, 2015. DOI: 10.1177/1087057114550585.

COLE, Jason C.; MURRAY, Christopher W.; NISSINK, J. Willem M.; TAYLOR, Richard D.; TAYLOR, Robin. Comparing protein-ligand docking programs is difficult. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, [S. l.], v. 60, n. 3, p. 325–332, 2005. DOI: 10.1002/prot.20497.

COSTA, Philippe et al. Role of the antioxidant properties in the gastroprotective and gastric healing activity promoted by Brazilian green propolis and the healing efficacy of Artepillin C. **Inflammopharmacology**, [S. l.], v. 28, n. 4, p. 1009–1025, 2019. DOI: 10.1007/s10787-019-00649-7. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10787-019-00649-7>.

DA SILVA, Camila Fontes Neves et al. Anticancer and antitrypanosomal activities of trinuclear ruthenium compounds with orthometalated phenazine ligands. **Dalton Transactions**, [S. l.], v. 49, n. 45, p. 16440–16452, 2020. DOI: 10.1039/d0dt01035a.

DA SILVA, Mauro Nogueira. **Obtenção de extrato padronizado de *Copaifera langsdorfii* por spray drying**. Universidade de São Paulo, , 2011.

DE CASTRO, Pedro P.; SIQUEIRA, Raoni P.; CONFORTE, Luiza; FRANCO, Chris H. J.; BRESSAN, Gustavo C.; AMARANTE, Giovanni W. Cytotoxic activity of synthetic chiral amino acid derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S. l.], v. 31, n. 1, p. 193–200, 2020. DOI: 10.21577/0103-5053.20190157.

DE FIGUEIREDO-RINHEL, Andréa Silva Garcia; DE ANDRADE, Micássio Fernandes; LANDI-LIBRANDI, Ana Paula; AZZOLINI, Ana Elisa Caleiro Seixas; KABEYA, Luciana Mariko; BASTOS, Jairo Kenupp; LUCISANO-VALIM, Yara Maria. Incorporation of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) leaf extract into phosphatidylcholine-cholesterol liposomes improves its anti-inflammatory effect in vivo. **Natural Product Research**, [S. l.], v. 6419, p. 1–5, 2018. DOI: 10.1080/14786419.2018.1448809. Disponível em: <http://doi.org/10.1080/14786419.2018.1448809>.

DE OLIVEIRA, Pollyanna Francielli; DE SOUZA LIMA, Ildercílio Mota; MUNARI, Carla Carolina; BASTOS, Jairo Kenupp; DA SILVA FILHO, Ademar Alves; TAVARES, Denise Crispim. Comparative evaluation of antiproliferative effects of Brazilian green propolis, its main source *Baccharis dracunculifolia*, and their major constituents artepillin C and baccharin. **Planta Medica**, [S. l.], v. 80, n. 6, p. 490–492, 2014. DOI: 10.1055/s-0034-1368298.

DE, P.; BALTAS, M.; BEDOS-BELVAL, F. Cinnamic Acid Derivatives as Anticancer Agents-A Review. **Current Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 18, n. 11, p. 1672–1703, 2011. DOI: 10.2174/092986711795471347.

DE SOUSA, João P. B. . **Influência da sazonalidade no perfil químico dos óleos essenciais e das substâncias fixas de *Baccharis dracunculifolia* cultivada, utilizando-se cromatografia em fases gasosas e líquida**. Universidade de São Paulo, , 2007.

DECORTE, Bart L. Underexplored Opportunities for Natural Products in Drug Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 59, n. 20, p. 9295–9304, 2016. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00473.

DESAI, Sulaksha; DESAI, Vidya; SHINGADE, Sunil. In-vitro Anti-cancer assay and apoptotic cell pathway of newly synthesized benzoxazole-N-heterocyclic hybrids as potent tyrosine kinase inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, [S. l.], v. 94, p. 103382, 2019. DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.103382. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103382>.

DUTTA, Sayanta; MAHALANOBISH, Sushweta; SAHA, Sukanya; GHOSH, Shatadal; SIL,

Parames C. Natural products: An upcoming therapeutic approach to cancer. **Food and Chemical Toxicology**, [S. l.], v. 128, n. April, p. 240–255, 2019. DOI: 10.1016/j.fct.2019.04.012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.012>.

EHRENWORTH, Amy M.; PERALTA-YAHYA, Pamela. Accelerating the semisynthesis of alkaloid-based drugs through metabolic engineering. **Nature Chemical Biology**, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 249–258, 2017. DOI: 10.1038/nchembio.2308.

ENDO, Satoshi et al. Selective inhibition of human type-5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3) by baccharin, a component of Brazilian propolis. **Journal of Natural Products**, [S. l.], v. 75, n. 4, p. 716–721, 2012. a. DOI: 10.1021/np201002x.

ENDO, Satoshi et al. Selective Inhibition of Human Type-5 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase (AKR1C3) by Baccharin, a Component of Brazilian Propolis. **Journal of Natural Products**, [S. l.], v. 75, n. 4, p. 716–721, 2012. b. DOI: <https://doi.org/10.1021/np201002x>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np201002x>.

ENDO, Satoshi et al. Synthesis of non-prenyl analogues of baccharin as selective and potent inhibitors for aldo-keto reductase 1C3. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 22, n. 19, p. 5220–5233, 2014. DOI: 10.1016/j.bmc.2014.08.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2014.08.007>.

FIELDS, Gregg B. Methods for Removing the Finoc Group. *In: Peptide Synthesis Protocols*. New Jersey: Humana Press, 1994. v. 35p. 17–28. DOI: 10.1385/0-89603-273-6:17. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1385/0-89603-273-6:17>.

GRESSLER, Lucas T. et al. Susceptibility of *Trypanosoma evansi* to propolis extract in vitro and in experimentally infected rats. **Research in Veterinary Science**, [S. l.], v. 93, n. 3, p. 1314–1317, 2012. DOI: 10.1016/j.rvsc.2012.02.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.02.007>.

HALGREN, Thomas A.; MURPHY, Robert B.; FRIESNER, Richard A.; BEARD, Hege S.; FRYE, Leah L.; POLLARD, W. Thomas; BANKS, Jay L. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 47, n. 7, p. 1750–1759, 2004. DOI: 10.1021/jm030644s.

HE, Min et al. The NCI library of traditional Chinese medicinal plant extracts – Preliminary assessment of the NCI-60 activity and chemical profiling of selected species. **Fitoterapia**, [S. l.], v. 137, n. June, p. 104285, 2019. DOI: 10.1016/j.fitote.2019.104285. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104285>.

HEVENER, Kirk E.; ZHAO, Wei; BALL, David M.; BABAUGLU, Kerim; QI, Jianjun; WHITE, Stephen W.; LEE, Richard E. Validation of molecular docking programs for virtual screening against dihydropteroate synthase. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [S. l.], 2009. DOI: 10.1021/ci800293n.

HUNKE, Megan; MARTINEZ, Wuilian; KASHYAP, Akshay; BOKOSKIE, Treyvon; PATTABIRAMAN, Mahesh; CHANDRA, Surabhi. Antineoplastic actions of cinnamic acids and their dimers in breast cancer cells: A comparative study. **Anticancer Research**, [S. l.], v. 38, n. 8, p. 4469–4474, 2018. DOI: 10.21873/anticancer.12749.

JIANG, Xiangyi; HAO, Xia; JING, Lanlan; WU, Gaochan; KANG, Dongwei; LIU, Xinyong; ZHAN, Peng. Recent applications of click chemistry in drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, [S. l.], v. 14, n. 8, p. 779–789, 2019. DOI: 10.1080/17460441.2019.1614910. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1614910>.

KENRY; LIU, Bin. Bio-orthogonal Click Chemistry for In Vivo Bioimaging. **Trends in Chemistry**, [S. l.], v. 1, n. 8, p. 763–778, 2019. DOI: 10.1016/j.trechm.2019.08.003.

KHALIKOV, Sh. Kh.; SHARIPOVA, D.; ZAFAROV, S. Z.; UMARKHON, M.; JALALIFAR, M. Synthesis of α -amino acid derivatives of fullerene C60 with antiviral properties. **International Journal of Modern Chemistry**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1–18, 2016. Disponível em: <http://www.modernscientificpress.com/Journals/downloadFile.aspx?H86Z5Noa2iKDNvH/0wRKWscIO0K9z1h/I+3HBIje8iy3H+lvS4Rw6kamerW2woD4>.

KNIME AG. **KNIME Analytics Platform 4.3.1** Zurich, Switzerland, 2021.

KOLB, Hartmuth C.; FINN, M. G.; SHARPLESS, K. Barry. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. **Angewandte Chemie - International Edition**, [S. l.], v. 40, n. 11, p. 2004–2021, 2001. DOI: 10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5.

LAVRADO, João et al. Incorporation of basic side chains into cryptolepine scaffold: Structure-antimalarial activity relationships and mechanistic studies. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 54, n. 3, p. 734–750, 2011. DOI: 10.1021/jm101383f.

LI, Gang; LOU, Hong Xiang. Strategies to diversify natural products for drug discovery. **Medicinal Research Reviews**, [S. l.], v. 38, n. 4, p. 1255–1294, 2018. DOI: 10.1002/med.21474.

LI, Yangfeng et al. Novel Pyrrolopyridone Bromodomain and Extra-Terminal Motif (BET) Inhibitors Effective in Endocrine-Resistant ER+ Breast Cancer with Acquired Resistance to Fulvestrant and Palbociclib. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 63, n. 13, p. 7186–7210, 2020. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.0c00456.

LOVERING, Andrew L.; RIDE, Jon P.; BUNCE, Christopher M.; DESMOND, Julian C.; CUMMINGS, Stephen M.; WHITE, Scott A. Crystal Structures of Prostaglandin D2 11-Ketoreductase (AKR1C3) in Complex with the Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Flufenamic Acid and Indomethacin. **Cancer Research**, [S. l.], v. 64, n. 5, p. 1802–1810, 2004. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-03-2847.

MACHADO, Christiane Schneider et al. Comparative Study of Chemical Composition and Biological Activity of Yellow, Green, Brown, and Red Brazilian Propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [S. l.], v. 2016, n. type 12, 2016. DOI: 10.1155/2016/6057650.

MACIAS, Alba T. et al. Adenosine-derived inhibitors of 78 kDa glucose regulated protein (Grp78) ATPase: Insights into isoform selectivity. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], 2011. DOI: 10.1021/jm101625x.

MADHAVI SASTRY, G.; ADZHIGIREY, Matvey; DAY, Tyler; ANNABHIMOJU, Ramakrishna; SHERMAN, Woody. Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, [S. l.], v. 27, n. 3, p. 221–234, 2013. DOI: 10.1007/s10822-013-9644-8.

MARCHIORI, Marcelo Fiori; PIRES SOUTO, Dênio Emanuel; OLIVEIRA BORTOT, Leandro; FRANCISCO PEREIRA, João; KUBOTA, Lauro Tatsuo; CUMMINGS, Richard D.; DIAS-BARUFFI, Marcelo; CARVALHO, Ivone; CAMPO, Vanessa Leiria. Synthetic 1,2,3-triazole-linked glycoconjugates bind with high affinity to human galectin-3. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 23, n. 13, p. 3414–3425, 2015. DOI: 10.1016/j.bmc.2015.04.044. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2015.04.044>.

MARTINS-TEIXEIRA, Maristela B.; CAMPO, Vanessa L.; BIONDO, Monica; SESTI-COSTA,

Renata; CARNEIRO, Zumira A.; SILVA, João S.; CARVALHO, Ivone. α -Selective glycosylation affords mucin-related GalNAc amino acids and diketopiperazines active on *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 21, n. 7, p. 1978–1987, 2013. DOI: 10.1016/j.bmc.2013.01.027. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2013.01.027>.

MBESE, Zintle; KHWAZA, Vuyolwethu; ADERIBIGBE, Blessing Atim. Curcumin and Its Derivatives as Potential Therapeutic Agents in Prostate, Colon and Breast Cancers. **Molecules**, [S. l.], v. 24, n. 23, p. 4386, 2019. DOI: 10.3390/molecules24234386.

MISHIMA, Satoshi; ONO, Yosuke; ARAKI, Yoko; AKAO, Yukihiro; NOZAWA, Yoshinori. Two related cinnamic acid derivatives from Brazilian honey bee propolis, baccharin and drupanin, induce growth inhibition in allografted sarcoma S-180 in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, [S. l.], v. 28, n. 6, p. 1025–1030, 2005. DOI: 10.1248/bpb.28.1025.

MOSES, John E.; MOORHOUSE, Adam D. The growing applications of click chemistry. **Chemical Society Reviews**, [S. l.], v. 36, n. 8, p. 1249–1262, 2007. DOI: 10.1039/b613014n.

MOTTA, Erick Vicente da Silva. **Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-UV-DAD para quantificação e análise sazonal de derivados galoilquínicos nas folhas de *Copaifera langsdorffii*** Universidade de São Paulo, , 2014.

NGUYEN, Dung Le; SEYER, René; HEITZ, Annie; CASTRO, Bertrand. Renin substrates. Part 1. Liquid-phase synthesis of the equine sequence with benzotriazoloxyltris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP). **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, [S. l.], p. 1025–1031, 1985. DOI: 10.1039/p19850001025.

NICHOLLS, Anthony. What do we know and when do we know it? **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, [S. l.], v. 22, n. 3–4, p. 239–255, 2008. DOI: 10.1007/s10822-008-9170-2.

PARK, Yong K.; PAREDES-GUZMAN, Julio F.; AGUIAR, Claudio L.; ALENCAR, Severino M.; FUJIWARA, Fred Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of agricultural and food chemistry**, [S. l.], v. 52, n. 5, p. 1100–3, 2004. DOI: 10.1021/jf021060m. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf021060m>.

PEDERSEN, D. S.; ROSENBOHM, C. Dry column vacuum chromatography. **Synthesis**, [S. l.], n. 16, p. 2431–2434, 2001. DOI: 10.1055/s-2001-18722.

PEREIRA, Cristiane A.; COSTA, Anna Carolina B. Pereira; LIPORONI, Priscila Christiane S.; REGO, Marcos A.; JORGE, Antonio Olavo C. Antibacterial activity of *Baccharis dracunculifolia* in planktonic cultures and biofilms of *Streptococcus mutans*. **Journal of Infection and Public Health**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 324–330, 2016. DOI: 10.1016/j.jiph.2015.10.012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2015.10.012>.

PERKINELMER INFORMATICS INC. **Chemdraw Professional 18.2.0.48**, 2021.

PERTINO, Mariano Walter; THEODULOZ, Cristina; BASTÍAS, Marco; SCHMEDA-HIRSCHMANN, Guillermo. Dimeric labdane diterpenes: Synthesis and antiproliferative effects. **Molecules**, [S. l.], v. 18, n. 5, p. 5936–5953, 2013. DOI: 10.3390/molecules18055936.

PIPPIONE, Agnese C. et al. European Journal of Medicinal Chemistry Hydroxytriazole derivatives as potent and selective aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3) inhibitors discovered by bioisosteric scaffold hopping approach. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 139, p. 936–946, 2017. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.08.046. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.08.046>.

POBIEGA, Katarzyna; GNIEWOSZ, Małgorzata; KRAŚNIEWSKA, Karolina. Antimicrobial and antiviral properties of different types of propolis. **Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych**, [S. l.], n. 589, p. 69–79, 2017. DOI: 10.22630/zppnr.2017.589.22.

PONTIN, Karina; DA SILVA FILHO, Ademar A.; SANTOS, Fransérgio Francisco; SILVA, Márcio Luís Andrade E.; CUNHA, Wilson Roberto; NANAYAKKARA, N. P. Dhammik.; BASTOS, Jairo Kenupp; DE ALBUQUERQUE, Sérgio. In vitro and in vivo antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. **Parasitology Research**, [S. l.], v. 103, n. 3, p. 487–492, 2008. DOI: 10.1007/s00436-008-0970-z.

RDKIT: OPEN-SOURCE CHEMINFORMATICS. <http://www.rdkit.org>, 2021.

REW, Yosup et al. Structure-Based Design of Novel Inhibitors of the MDM2–p53 Interaction. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 55, n. 11, p. 4936–4954, 2012. DOI: 10.1021/jm300354j.

RIVERA-ÁVALOS, Ernesto; DE LOERA, Denisse; ARAUJO-HUITRADO, Jorge Gustavo; ESCALANTE-GARCÍA, Ismailia Leilani; MUÑOZ-SÁNCHEZ, Miguel Antonio; HERNÁNDEZ, Hiram; LÓPEZ, Jesús Adrián; LÓPEZ, Lluvia. Synthesis of amino acid-naphthoquinones and in vitro studies on cervical and breast cell lines. **Molecules**, [S. l.], v. 24, n. 23, p. 1–14, 2019. DOI: 10.3390/molecules24234285.

ROBERTO, Matheus Mantuanelli; MATSUMOTO, Sílvia Tamie; JAMAL, Cláudia Masrouah; MALASPINA, Osmar; MARIN-MORALES, Maria Aparecida. Evaluation of the genotoxicity/mutagenicity and antigenotoxicity/antimutagenicity induced by propolis and *Baccharis dracunculifolia*, by in vitro study with HTC cells. **Toxicology in Vitro**, [S. l.], v. 33, p. 9–15, 2016. DOI: 10.1016/j.tiv.2016.02.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2016.02.005>.

RODRIGUES, Débora Munhoz; DE SOUZA, Marcelo Claro; ARRUDA, Caroline; PEREIRA, Rodrigo Augusto Santinelo; BASTOS, Jairo Kenupp. The Role of *Baccharis dracunculifolia* and its Chemical Profile on Green Propolis Production by *Apis mellifera*. **Journal of Chemical Ecology**, [S. l.], v. 46, n. 2, p. 150–162, 2019. DOI: 10.1007/s10886-019-01141-w.

RODRIGUES, Débora Munhoz; PORTAPILLA, Gisele Bulhões; SILVA, Guilherme Martins; DUARTE, Andressa; ROTTA, Cristiana Gonçalves; DA SILVA, Carlos Henrique Tomich de Paula; DE ALBUQUERQUE, Sérgio; BASTOS, Jairo Kenupp; CAMPO, Vanessa Leiria. Synthesis, antitumor activity and in silico analyses of amino acid derivatives of artemisinin, drupanin and baccharin from green propolis. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 47, n. July, 2021. DOI: 10.1016/j.bmc.2021.116372.

RODRIGUES, Tiago; REKER, Daniel; SCHNEIDER, Petra; SCHNEIDER, Gisbert. Counting on natural products for drug design. **Nature Chemistry**, [S. l.], v. 8, n. 6, p. 531–541, 2016. DOI: 10.1038/nchem.2479.

SAEED, Aasim et al. Synthesis of new triterpenic monomers and dimers as potential antiproliferative agents and their molecular docking studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 143, p. 948–957, 2018. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.10.079.

SALATINO, Antonio; TEIXEIRA, Érica Weinstein; NEGRI, Giuseppina; MESSAGE, Dejair. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 33–38, 2005. DOI: 10.1093/ecam/neh060.

SALOMÃO, Kelly; DE SOUZA, Eniuce M.; HENRIQUES-PONS, Andrea; BARBOSA, Helene S.; DE CASTRO, Solange L. Brazilian green propolis: Effects in vitro and in vivo on *Trypanosoma cruzi*. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [S. l.], v. 2011, 2011. DOI:

10.1093/ecam/nep014.

SAWAYA, Alexandra C. H. F.; BARBOSA DA SILVA CUNHA, Ildenize; MARCUCCI, Maria C. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. **Chemistry Central Journal**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 1–10, 2011. DOI: 10.1186/1752-153X-5-27.

SCHRÖDINGER. **LigPrep - Suite 2015-2**, 2018.

SCHRÖDINGER. **Maestro Schrödinger Suite 2020-1** Schrödinger, , 2020.

SCHRÖDINGER LLC. **The Pymol Molecular Graphics System 1.3**, 2010. Disponível em: <http://www.pymol.org>.

SEIBERT, Janaína Brandão et al. Development of propolis nanoemulsion with antioxidant and antimicrobial activity for use as a potential natural preservative. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 287, n. October 2018, p. 61–67, 2019. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.02.078.

SEPÚLVEDA, César; NÚÑEZ, Olinda; TORRES, Alejandra; GUZMÁN, Luis; WEHINGER, Sergio. Antitumor Activity of Propolis: Recent Advances in Cellular Perspectives, Animal Models and Possible Applications. **Food Reviews International**, [S. l.], v. 36, n. 5, p. 429–455, 2019. DOI: 10.1080/87559129.2019.1649692. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1649692>.

SEPÚLVEDA, César; NÚÑEZ, Olinda; TORRES, Alejandra; GUZMÁN, Luis; WEHINGER, Sergio. Antitumor Activity of Propolis: Recent Advances in Cellular Perspectives, Animal Models and Possible Applications. **Food Reviews International**, [S. l.], v. 36, n. 5, p. 429–455, 2020. DOI: 10.1080/87559129.2019.1649692. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1649692>.

SHINTRE, Suhas A.; RAMJUGERNATH, Deresh; ISLAM, Md Shahidul; MOPURI, Ramgopal; MOCKTAR, Chunderika; KOORBANALLY, Neil A. Synthesis, in vitro antimicrobial, antioxidant, and antidiabetic activities of thiazolidine–quinoxaline derivatives with amino acid side chains. **Medicinal Chemistry Research**, [S. l.], v. 26, n. 9, p. 2141–2151, 2017. DOI: 10.1007/s00044-017-1922-x. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00044-017-1922-x>.

SIB, Anna; GULDER, Tobias A. M. Stereoselective Total Synthesis of Bisorbicillinoid Natural Products by Enzymatic Oxidative Dearomatization/Dimerization. **Angewandte Chemie**, [S. l.], v. 129, n. 42, p. 13068–13071, 2017. DOI: 10.1002/ange.201705976.

SIMONE-FINSTROM, M.; SPIVAK, M. Review article Propolis and bee health : the natural history and significance of resin use by honey bees. **Apidologie**, [S. l.], v. 41, n. 3, p. 295–311, 2010. DOI: 10.1051/apido/2010016.

SUGAYA, Kouichi; TERAJIMA, Takehito; TAKAHASHI, Aika; ONOSE, Jun ichi; ABE, Naoki. Bisorbicillinol inhibits Lyn tyrosine kinase for allergic response on RBL-2H3 cells. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 29, n. 6, p. 832–835, 2019. DOI: 10.1016/j.bmcl.2019.01.019.

TAUTZ, Markus; TORRAS, Juan; GRIJALVO, Santiago; ERITJA, Ramón; SALDÍAS, César; ALEMÁN, Carlos; DÍAZ, David Díaz. Expanding the limits of amide-triazole isosteric substitution in bisamide-based physical gels. **RSC Advances**, [S. l.], v. 9, n. 36, p. 20841–20851, 2019. DOI: 10.1039/c9ra03316e.

THOMFORD, Nicholas Ekow; SENTHEBANE, Dimakatso Alice; ROWE, Arielle; MUNRO, Daniella; SEELE, Palesa; MAROYI, Alfred; DZOBO, Kevin. Natural products for drug discovery in the 21st century: Innovations for novel drug discovery. **International Journal of Molecular**

Sciences, [S. l.], v. 19, n. 6, 2018. DOI: 10.3390/ijms19061578.

TIVERON, Ana Paula; ROSALEN, Pedro Luiz; FRANCHIN, Marcelo; LACERDA, Risia Cristina Coelho; BUENO-SILVA, Bruno; BENSO, Bruna; DENNY, Carina; IKEGAKI, Masaharu; DE ALENCAR, Severino Matias. Chemical characterization and antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of South Brazilian organic propolis. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 11, n. 11, p. 1–18, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0165588. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0165588>.

TRIBALLEAU, Nicolas; ACHER, Francine; BRABET, Isabelle; PIN, Jean-Philippe; BERTRAND, Hugues-Olivier. Virtual Screening Workflow Development Guided by the “Receiver Operating Characteristic” Curve Approach. Application to High-Throughput Docking on Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 4. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 48, n. 7, p. 2534–2547, 2005. DOI: 10.1021/jm049092j.

VILIPIĆ, Jovana; NOVAKOVIĆ, Irena; STANOJKOVIĆ, Tatjana; MATIĆ, Ivana; ŠEGAN, Dejan; KLJAJIĆ, Zoran; SLADIĆ, Dušan. Synthesis and biological activity of amino acid derivatives of avarone and its model compound. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 23, n. 21, p. 6930–6942, 2015. DOI: 10.1016/j.bmc.2015.09.044.

WAHEED, Enass J.; OBAID, Shatha MH; AL-HAMDANI, Abbas Ali Salih. Biological Activities of Amino Acid Derivatives and their Complexes a Review. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, [S. l.], v. 10, n. October, p. 1624–1641, 2019.

WRIGHT, Gerard D. Unlocking the potential of natural products in drug discovery. **Microbial Biotechnology**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 55–57, 2019. DOI: 10.1111/1751-7915.13351.

YANG, Haijuan; RUDGE, Derek G.; KOOS, Joseph D.; VAIDIALINGAM, Bhamini; YANG, Hyo J.; PAVLETICH, Nikola P. MTOR kinase structure, mechanism and regulation. **Nature**, [S. l.], 2013. DOI: 10.1038/nature12122.

YAO, Yao; LI, Juan; JIANG, Cheng Shuai; ZHAO, Xun Xia; MIAO, Zhen Hua; LIU, He Tao; ZHENG, Ping; YAO, Wan Xia; LI, Wei Qi. Trichodimerol and sorbicillin induced apoptosis of HL-60 cells is mediated by reactive oxygen species. **Pharmazie**, [S. l.], v. 70, n. 6, p. 394–398, 2015. DOI: 10.1691/ph.2015.4868.

YASHIRO, Kazuki; HANAYA, Kengo; SHOJI, Mitsuru; SUGAI, Takeshi. New synthesis of artemillin C, a prenylated phenol, utilizing lipase-catalyzed regioselective deacetylation as the key step. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, [S. l.], v. 79, n. 12, p. 1926–1930, 2015. DOI: 10.1080/09168451.2015.1058704. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/09168451.2015.1058704>.

YAZAKI, Kazufumi; SASAKI, Kanako; TSURUMARU, Yusuke. Prenylation of aromatic compounds, a key diversification of plant secondary metabolites. **Phytochemistry**, [S. l.], v. 70, n. 15–16, p. 1739–1745, 2009. DOI: 10.1016/j.phytochem.2009.08.023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.08.023>.

ZANG, Tianzhu; VERMA, Kshitij; CHEN, Mo; JIN, Yi; TRIPPIER, Paul C.; PENNING, Trevor M. Screening baccharin analogs as selective inhibitors against type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3). **Chemico-Biological Interactions**, [S. l.], v. 234, p. 339–348, 2015. DOI: 10.1016/j.cbi.2014.12.015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2014.12.015>.

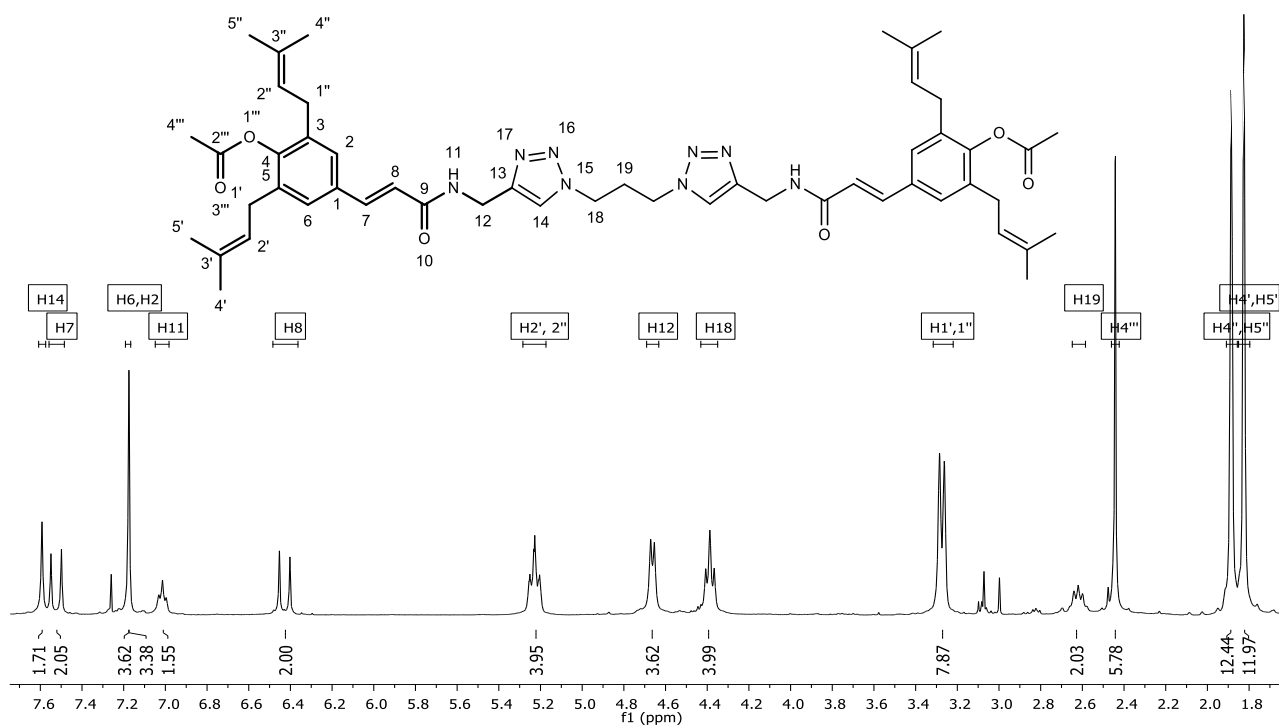
ZIMTA, Alina-andreea; SCHITCU, Vlad; GURZAU, Eugen; STAVARU, Crina; MANDA, Gina; SZEDLACSEK, Stefan; BERINDAN-NEAGOE, Ioana. Biological and molecular modifications induced by cadmium and arsenic during breast and prostate cancer development. **Environmental Research**, [S. l.], v. 178, n. August, p. 108700, 2019. DOI:

10.1016/j.envres.2019.108700. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108700>.

7.0. Apêndices

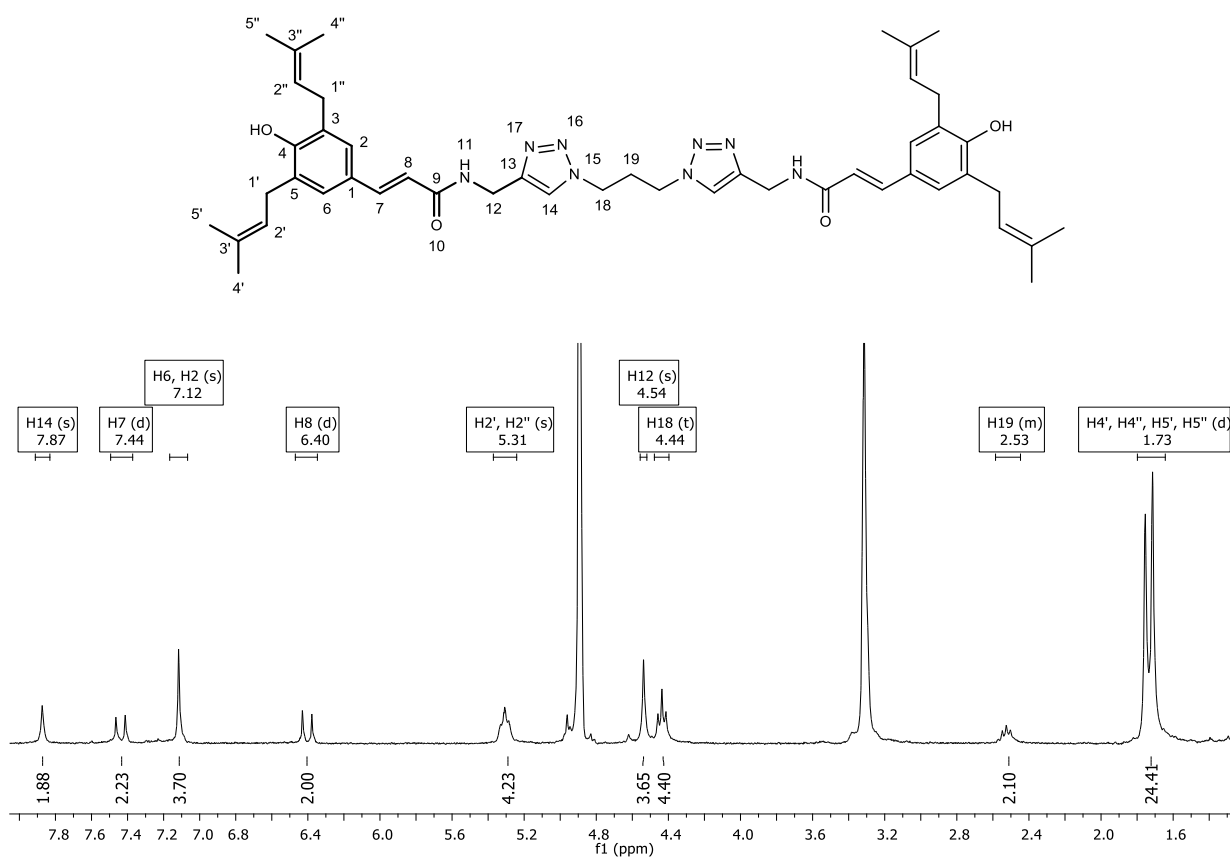
7.1. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos derivados semissintéticos

Tabela 1A. Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do dímero triazólico protegido do artepelin C 1, em 300 MHz, CDCl_3 .



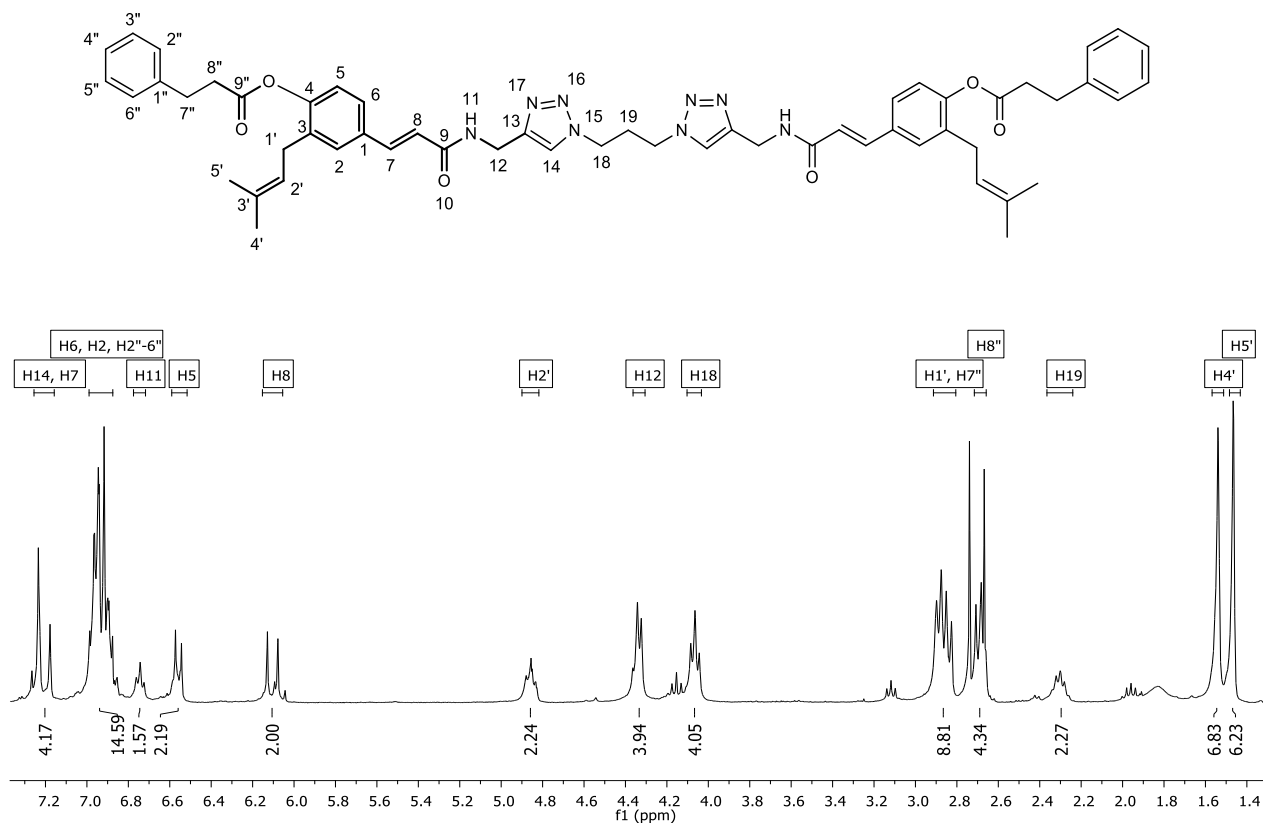
Hidrogênio	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	Multiplicida	Integral	$\delta^{13}\text{C}$
H-14	7,59	-	s	2	123,2
H-7	7,52	15,2	d	2	141,0
H-6,2	7,18	-	s	4	127,3
H-11	7,01	5,4	t	2	-
H-8	6,43	15,2	d	2	120,3
H-2',2''	5,23	-	m	4	121,3
H-12	4,66	5,4	d	4	35,1
H-18	4,39	6,2	t	4	47,1
H-1',1''	3,27	6,9	d	8	29,0
H-19	2,63	-	m	2	30,3
H-4'''	2,44	-	s	6	20,6
H-4',4''	1,89	-	s	12	25,8
H-5',5''	1,83	-	s	12	17,9

Tabela 2A. Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do dímero triazólico desprotegido do artepelin C 2, em 300 MHz, MeOD_4 .



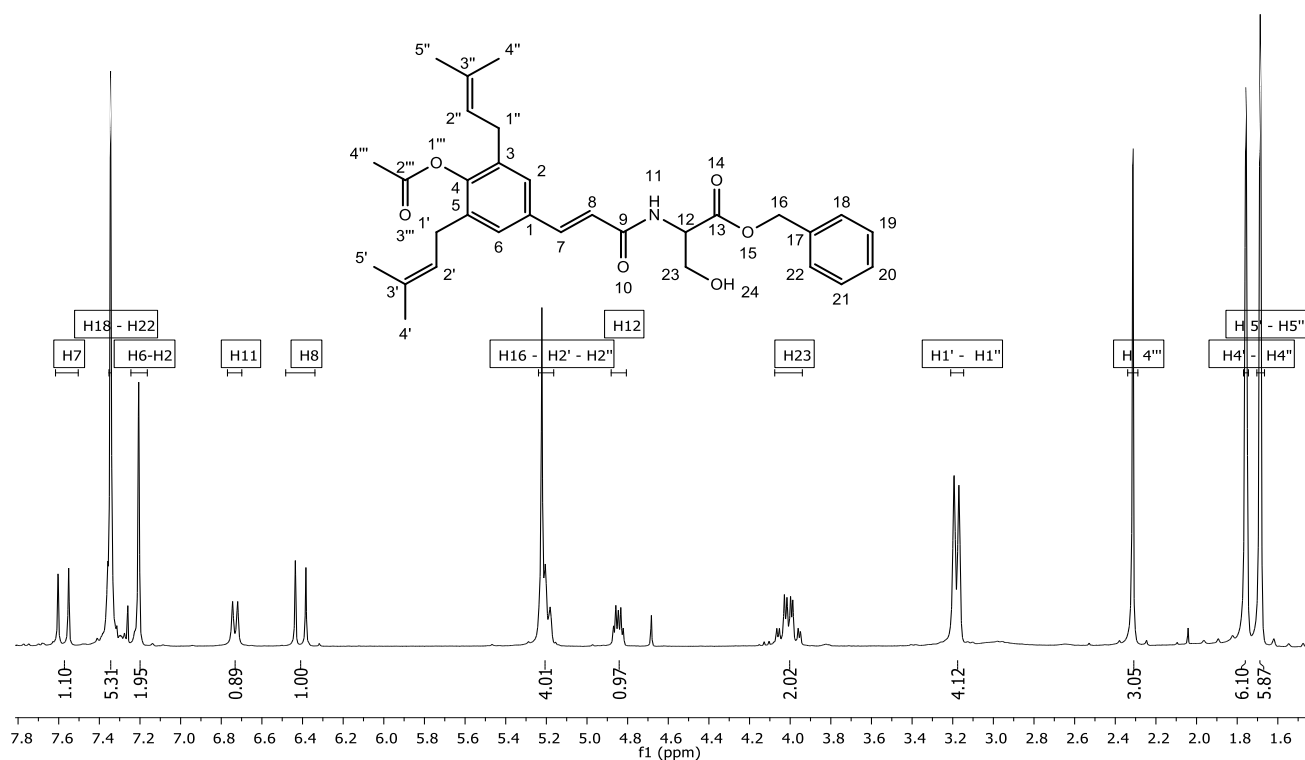
Hidrogênio	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	Multiplicida	Integral	$\delta^{13}\text{C}$
H-14	7,87	-	s	2	124,6
H-7	7,44	15,7	d	2	143,0
H-6,2	7,12	-	s	4	128,1
H-8	6,40	15,7	d	2	117,8
H-2',2''	5,31	-	m	4	123,3
H-12	4,54	-	s	4	35,8
H-18	4,44	6,7	t	4	48,4
H-1',1''	3,31	-	-	-	29,5
H19	2,53	-	m	2	31,5
H-4',4''	1,73	-	dl	24	25,9
H-5',5''	1,73	-	dl	24	17,9

Tabela 3A. Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do dímero triazólico da bacarina **3**, em 300 MHz, CDCl_3 .



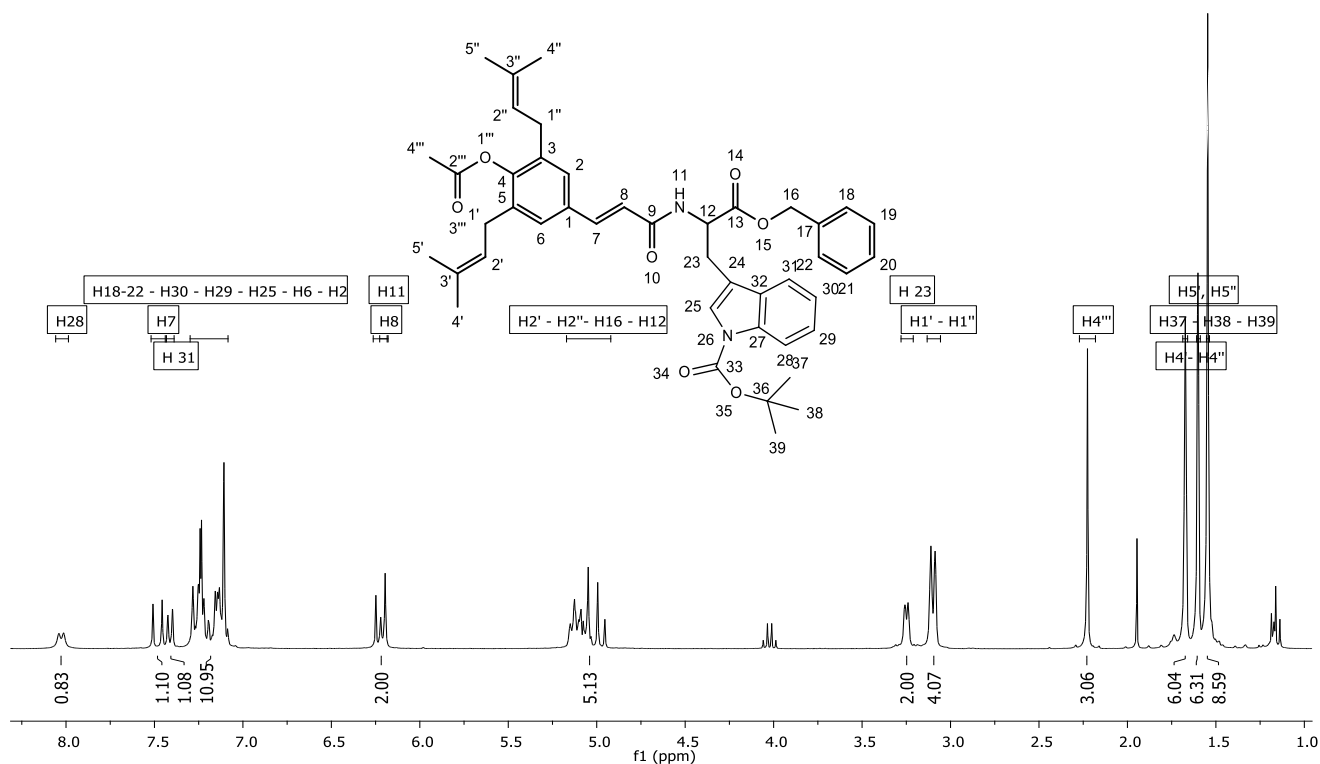
Hidrogênio	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	Multiplicidade	Integral	$\delta^{13}\text{C}$
H-14	7,21	-	d	4	123,2
H-7	7,21	-	d	4	140,1
H-6,2	6,93	-	m	14	126,6
H-6''- 2''	6,93	-	m	14	126,3, 128,5,
H-11	6,74	5,6	t	2	-
H-5	6,56	8,7	d	2	122,8
H-8	6,10	15,2	d	2	120,5
H-2'	4,86	6,9	t	2	121,2
H-12	4,33	5,6	d	4	35,2
H-18	4,06	6,2	t	4	47,2
H-1'	2,86	-	m	8	28,7
H-7''	2,86	-	m	8	31,0
H-8''	2,69	-	m	4	35,9
H19	2,30	-	m	2	30,3
H-4'	1,54	-	s	6	25,8
H-5'	1,47	-	s	6	18,0

Tabela 4A. Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado protegido do artepelin C com a serina **4**, em 300 MHz, CDCl_3 .



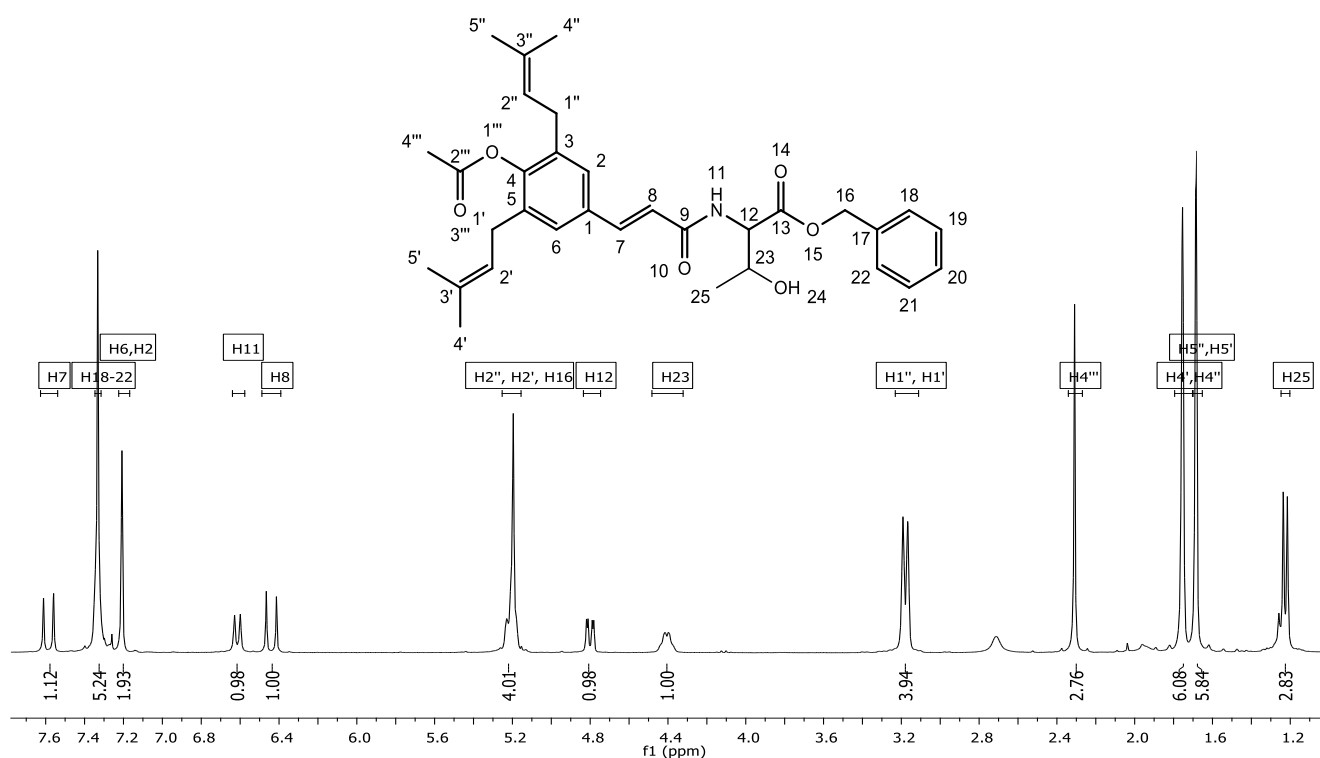
Hidrogênio	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	Multiplicida	Integral	$\delta^{13}\text{C}$
H-7	7,58	15,6	d	1	141,9
H-18,22	7,34	-	s	5	128,3, 128,8,
H-6,2	7,21	-	s	2	127,4
H-11	6,73	7,3	d	1	-
H-8	6,41	15,6	d	1	119,6
H-16	5,20	-	m	4	67,7
H-2',2''	5,20	-	m	4	121,3
H-12	4,85	3,5, 7,2	dt	1	55,2
H-23	4,01	3,5, 11,2	qd	2	63,7
H-1',1''	3,18	7,2	d	4	29,0
H-4'''	2,31	-	s	3	20,6
H-4',4''	1,76	-	s	6	25,8
H-5',5''	1,69	-	s	6	18,0

Tabela 5A. Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado protegido do artepelin C com o triptofano **5**, em 300 MHz, CDCl_3 .



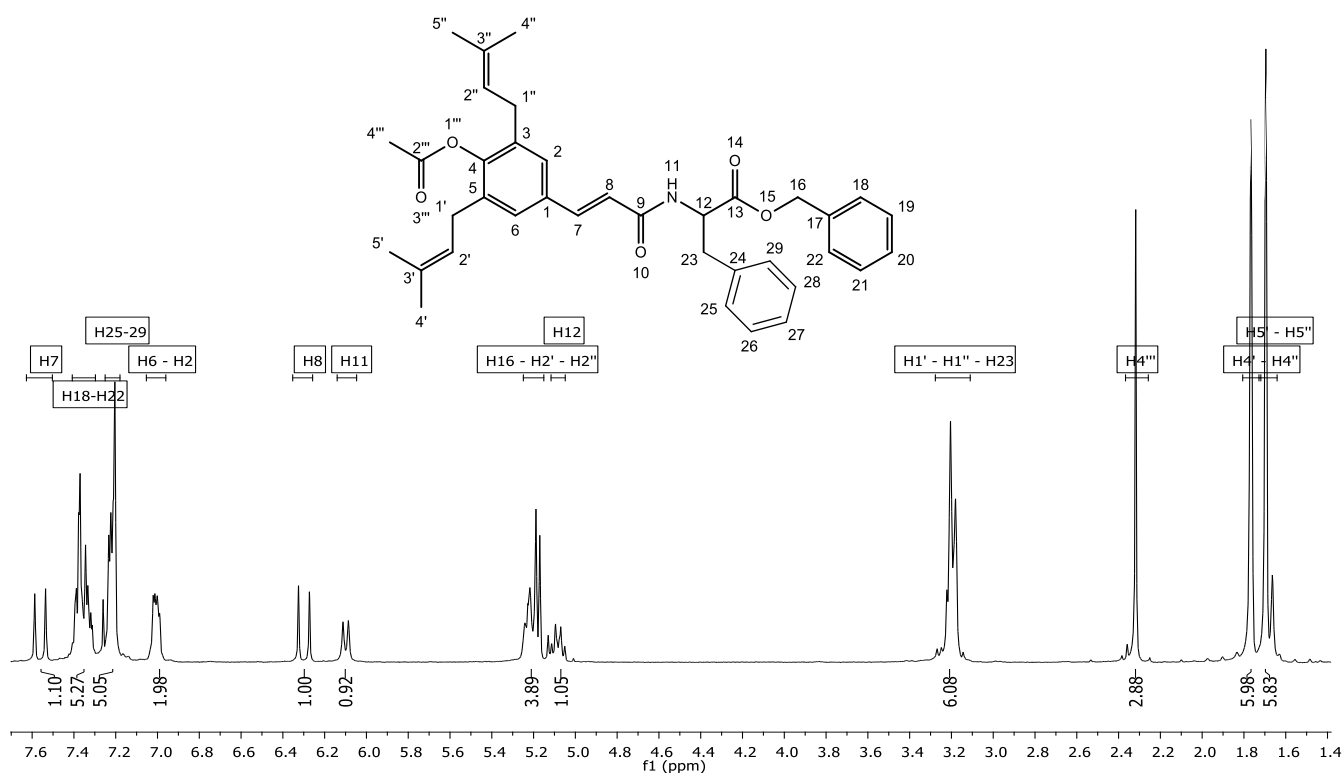
Hidrogênio	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	Multiplicida	Integral	$\delta^{13}\text{C}$
H-28	8,03	7,9	d	1	115,4
H-7	7,48	15,6	d	1	141,7
H-31	7,41	7,7	d	1	119,2
H-18-22	7,19	-	m	10	128,4, 128,8,
H-25, 29-30	7,19	-	m	10	124,7, 124,4,
H-6-2	7,19	-	m	10	127,4
H-8	6,22	15,6	d	1	119,8
H-11	6,21	7,6	d	1	-
H-2', 2''	5,08	-	m	5	121,3
H-12, 16	5,08	-	m	5	53,0, 67,6
H-23	3,25	5,6	d	2	27,8
H-1', 1''	3,10	7,2	d	4	28,9
H-4'''	2,23	-	s	3	20,6
H-4', 4''	1,67	-	s	6	25,9
H-5', 5''	1,60	-	s	6	18
H-37-39	1,55	-	s	9	28,3

Tabela 6A. Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado protegido do artepelin C com a treonina **6**, em 300 MHz, CDCl_3 .



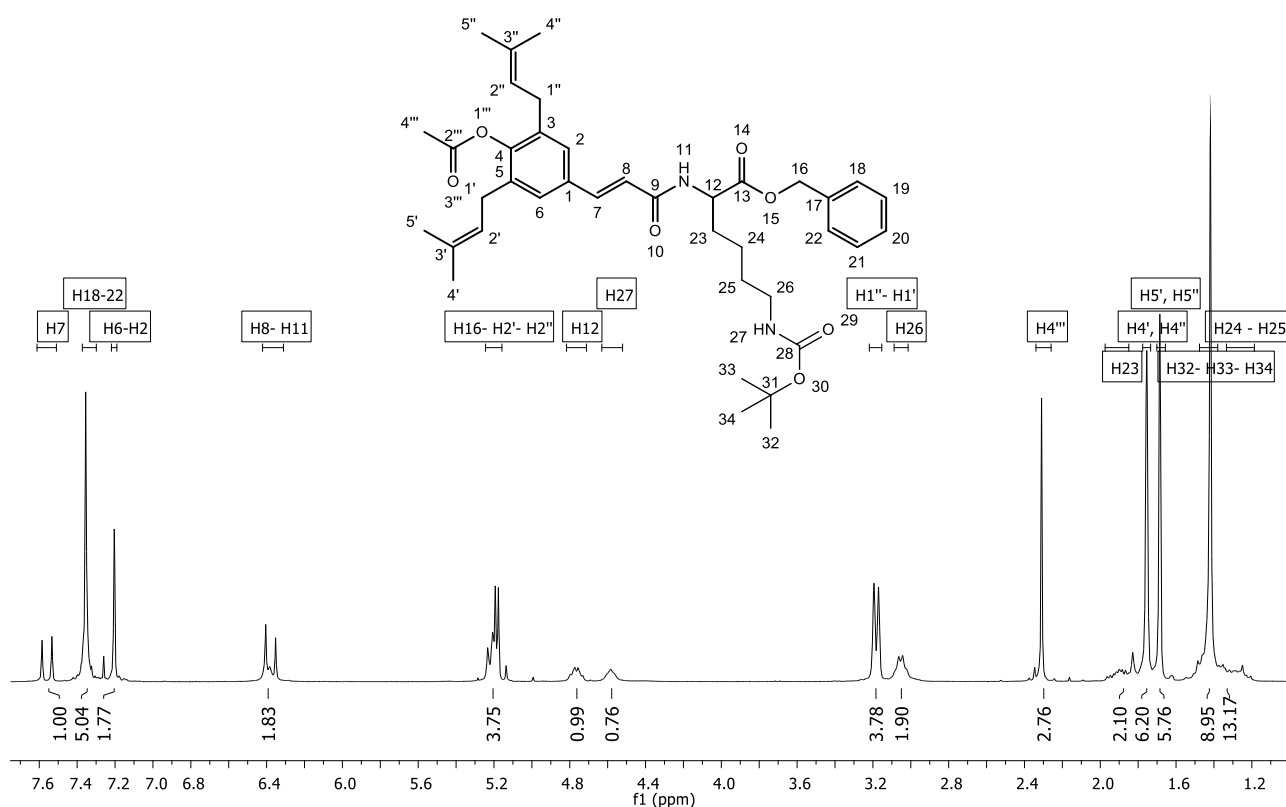
Hidrogênio	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	Multiplicida	Integral	$\delta^{13}\text{C}$
H-7	7,59	15,6	d	1	141,9
H-18,22	7,33	-	s	5	128,4, 128,8,
H-6,2	7,21	-	s	2	127,4
H-11	6,61	8,9	d	1	-
H-8	6,44	15,6	d	1	119,7
H-16	5,19	-	m	4	67,6
H-2',2''	5,19	-	m	4	121,3
H-12	4,80	2,3, 8,9	dd	1	57,5
H-23	4,41	-	m	1	68,5
H-1',1''	3,18	7,2	d	4	28,9
H-4'''	2,31	-	s	3	20,7
H-4',4''	1,73	-	s	6	25,9
H-5',5''	1,68	-	s	6	18,0
H-25	1,21	6,4	d	3	20,2

Tabela 7A. Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado protegido do artepelin C com a fenilalanina **7**, em 300 MHz, MeOD_4 .



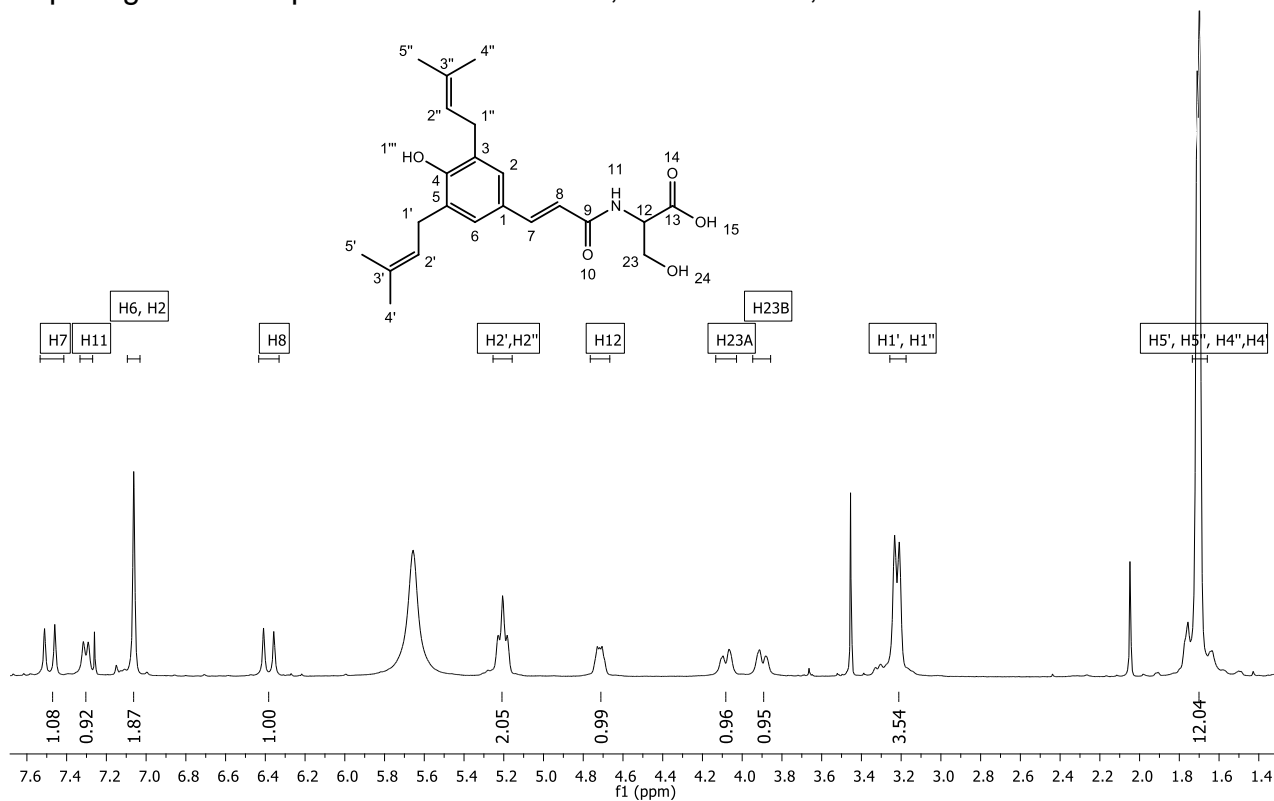
Hidrogênio	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	Multiplicidade	Integral	$\delta^{13}\text{C}$
H-7	7,56	15,6	d	1	141,5
H-18,22	7,35	-	m	5	128,6, 128,7,
H-25,29	7,22	-	m	5	127,1, 127,3,
H-6,2	7,01	-	m	2	129,5
H-8	6,30	15,6	d	1	119,8
H-11	6,10	7,7	d	1	-
H-16	5,21	-	m	4	67,4
H-2',2''	5,21	-	m	4	121,3
H-12	5,08	-	m	1	53,4
H-23	3,21	-	m	6	38,0
H-1',1''	3,21	-	m	6	28,9
H-4'''	2,34	-	s	3	20,6
H-4',4''	1,74	-	s	6	25,8
H-5',5''	1,68	-	s	6	17,9

Tabela 8A. Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado protegido do artepelin C com a lisina **8**, em 300 MHz, CDCl_3 .



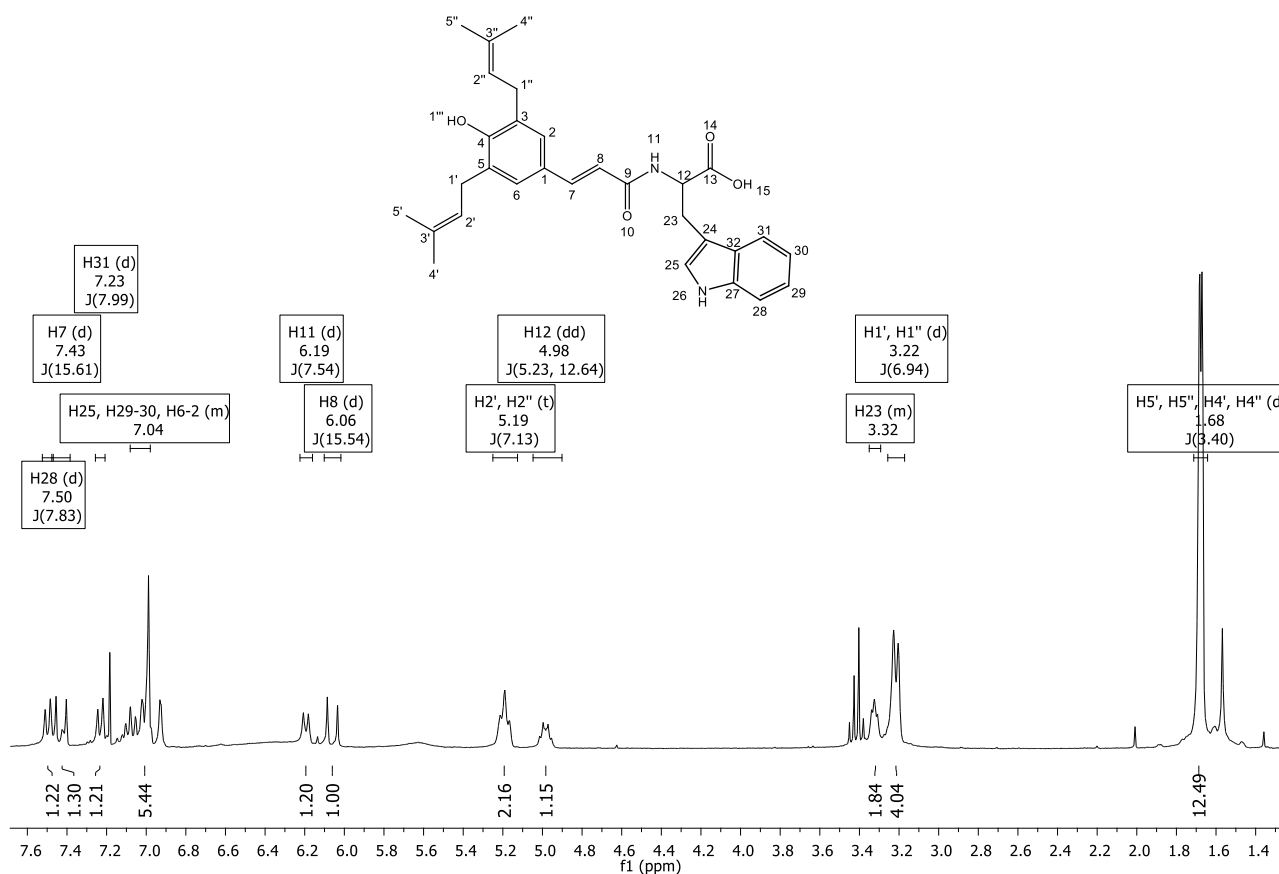
Hidrogênio	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	Multiplicida	Integral	$\delta^{13}\text{C}$
H-7	7,56	15,6	d	1	141,5
H-18-22	7,34	-	m	5	128,5, 128,8,
H-6,2	7,20	-	s	2	127,3
H-8	6,38	15,6	m	2	120,0
H-11	6,38	-	m	2	-
H-16	5,20	-	m	4	67,3
H-2', 2''	5,20	-	m	4	121,4
H-12	4,76	7,3, 12,3	dd	1	52,4
H-27	4,58	-	sl	1	-
H-1', 1''	3,18	7,2	d	4	29,0
H-26	3,05	5,9	dl	2	40,1
H-4'''	2,31	-	s	3	20,6
H-23	1,92	-	m	2	32,3
H-4', 4''	1,74	-	s	6	25,8
H-5', 5''	1,68	-	s	6	18,0
H-32-34	1,42	-	s	9	28,6
H-24,25	1,26	-	m	4	22,4, 29,8

Tabela 9A. Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado desprotegido do artepelin C com a serina **9**, em 300 MHz, CDCl_3 .



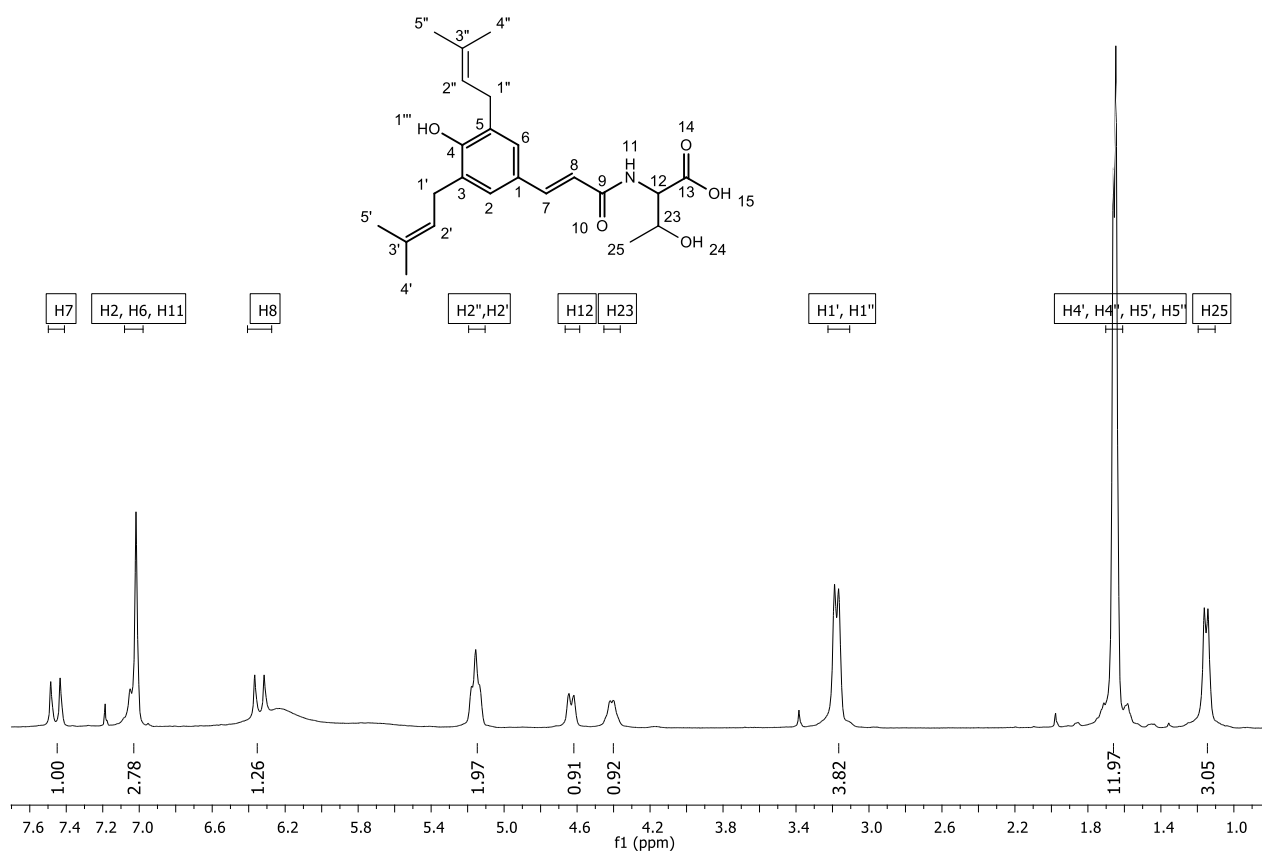
Hidrogênio	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	Multiplicida	Integral	$\delta^{13}\text{C}$
H-7	7,49	15,5	d	1	143,1
H-11	7,30	7,3	d	1	-
H-6,2	7,06	-	s	2	128,1
H-8	6,38	15,5	d	1	116,4
H-2',2''	5,21	6,6	t	2	121,6
H-12	4,72	-	m	1	55,0
H-23A	4,08	8,9	d	1	62,7
H-23B	3,90	9,1	d	1	62,7
H-1',1''	3,22	6,8	d	4	29,5
H-4',4''	1,70	-	m	12	25,7
H-5',5''	1,70	-	m	12	17,8

Tabela 10A: Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado desprotegido do artepelin C com o triptofano **10**, em 300 MHz, CDCl_3 .



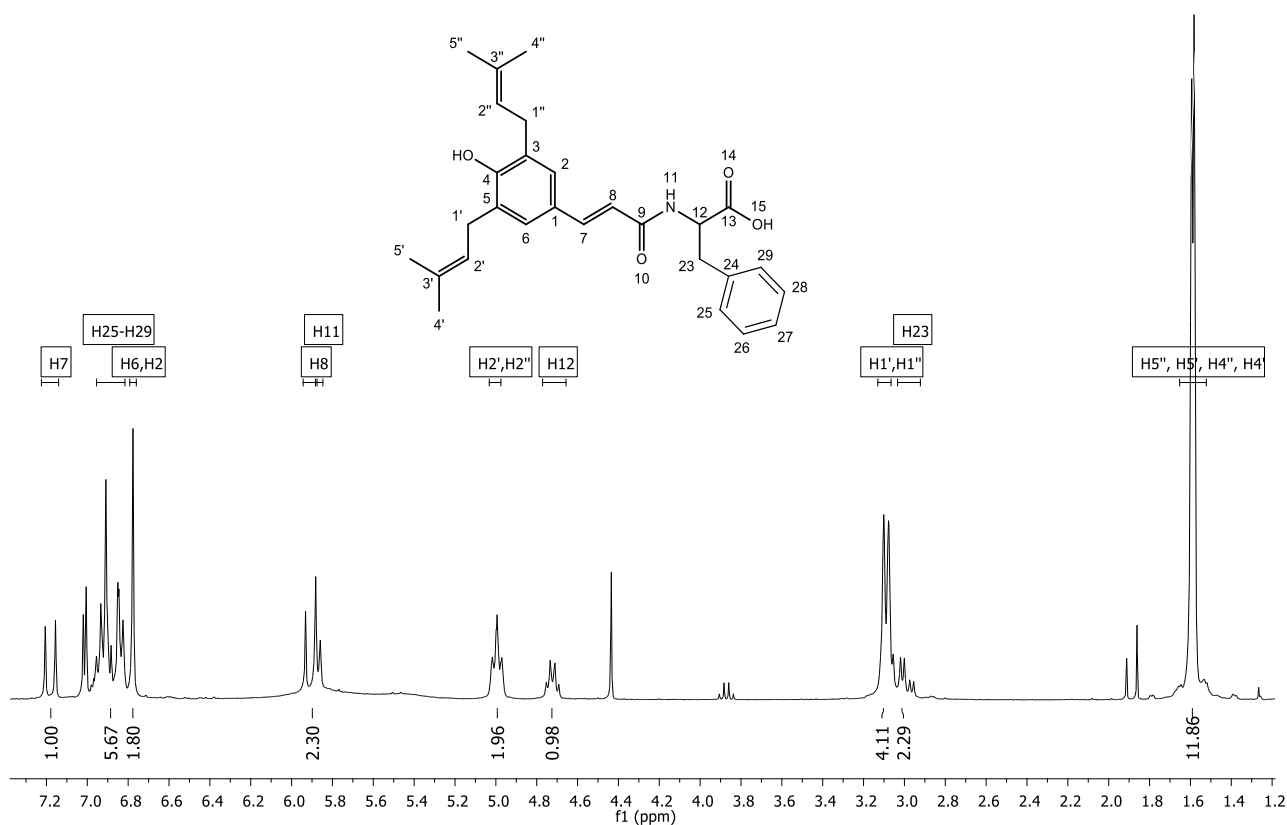
Hidrogênio	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	Multiplicida	Integral	$\delta^{13}\text{C}$
H-28	7,50	7,8	d	1	118,6
H-7	7,43	15,6	d	1	142,7
H-31	7,23	7,9	d	1	111,3
H-25, H29-30	7,04	-	m	5	123,4, 122,2,
H-6,2	7,04	-	m	5	127,9
H-11	6,19	7,5	d	1	-
H-8	6,06	15,5	d	1	116,7
H-2',2''	5,19	7,1	t	2	121,5
H-12	4,98	5,3, 12,6	dd	1	53,7
H-23	3,32	-	m	2	28,2
H-1',1''	3,22	6,9	d	4	29,5
H-4',4''	1,68	-	dl	12	25,8
H-5',5''	1,68	-	dl	12	17,9

Tabela 11A. Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado desprotegido do artepelin C com a treonina **11**, em 300 MHz, CDCl_3 .



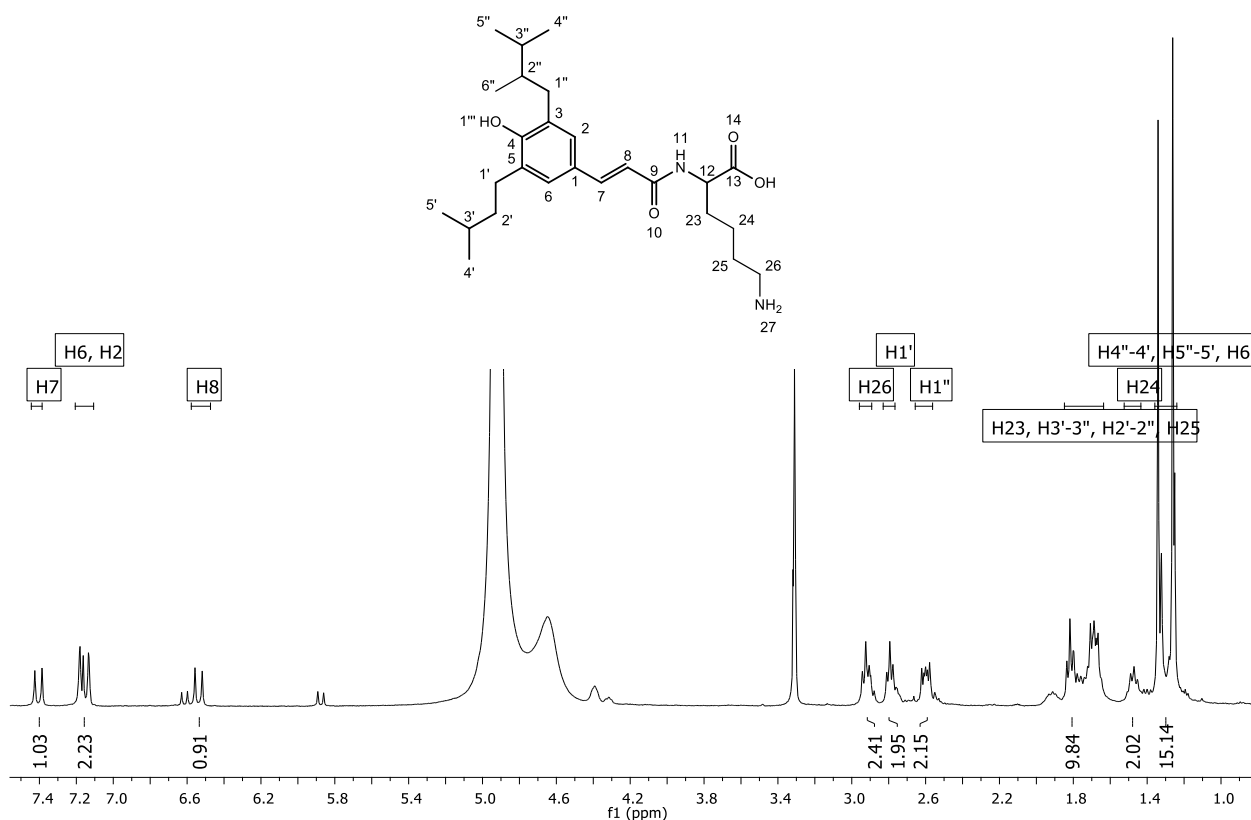
Hidrogênio	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	Multiplicida	Integral	$\delta^{13}\text{C}$
H-7	7,46	15,5	d	1	143,5
H-6,2	7,03	-	m	3	128,0
H-11	7,03	-	m	3	-
H-8	6,34	15,5	d	1	116,8
H-2',2''	5,17	6,8	dl	2	122,0
H-12	4,63	8,3	dl	1	58,3
H-23	4,41	4,9	dl	1	68,2
H-1',1''	3,18	6,9	d	4	30,0
H-4',4''	1,65	-	dl	12	26,2
H-5',5''	1,65	-	dl	12	18,3
H-25	1,15	6,0	d	3	19,8

Tabela 12A. Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado desprotegido do artepelin C com a fenilalanina **12**, em 300 MHz, CDCl_3 .



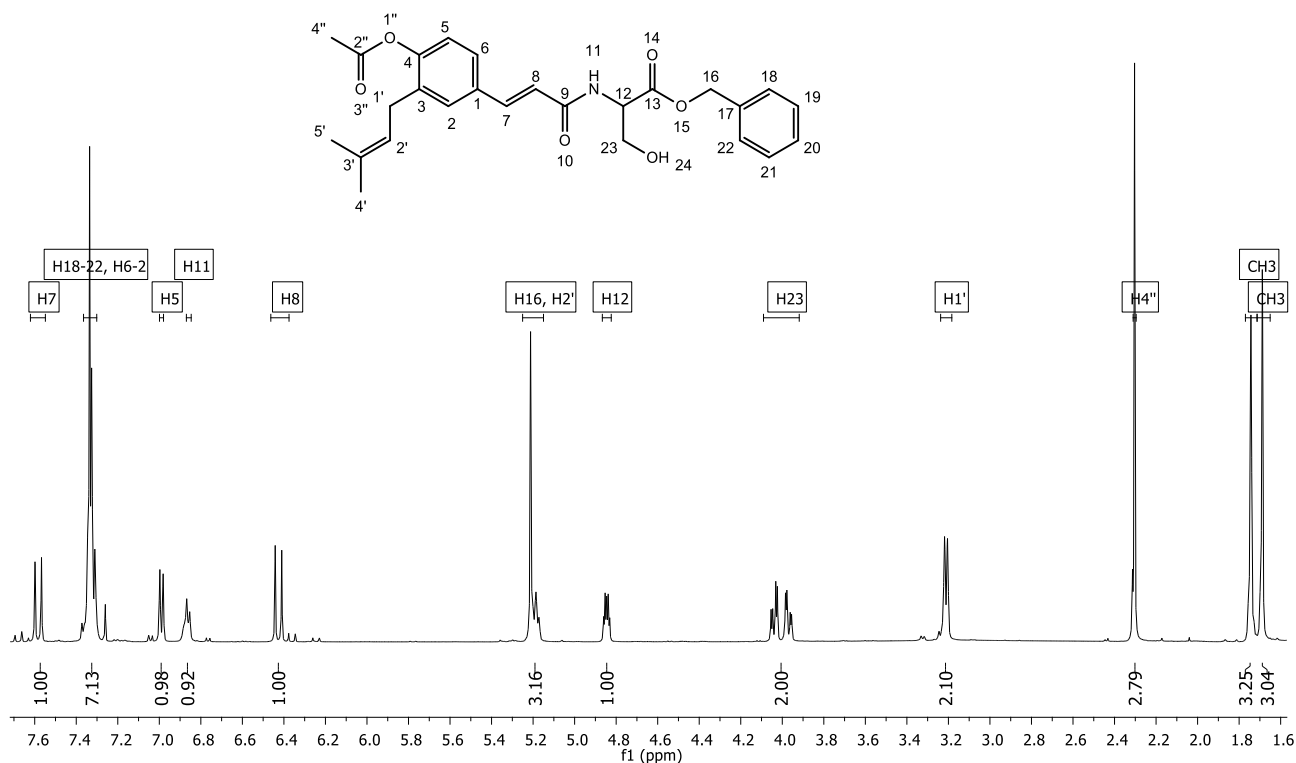
Hidrogênio	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	Multiplicidade	Integral	$\delta^{13}\text{C}$
H-7	7,18	15,1	d	1	143,1
H-25,29	6,87	-	m	5	127,8, 128,0,
H-6,2	6,78	-	s	2	129,6
H-8	5,91	15,0	d	1	116,5
H-11	5,87	6,7	d	1	-
H-2',2''	5,00	8,3	m	2	121,6
H-12	4,72	5,6, 12,3	dd	1	53,8
H-1',1''	3,09	7,0	d	4	29,6
H-23A,B	2,99, 3,08	-	m	2	37,4
H-4',4''	1,59	-	dl	12	25,9
H-5',5''	1,59	-	dl	12	18,0

Tabela 13A. Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado desprotegido do artepelin C com a lisina **13**, em 500 MHz, MeOD₄.



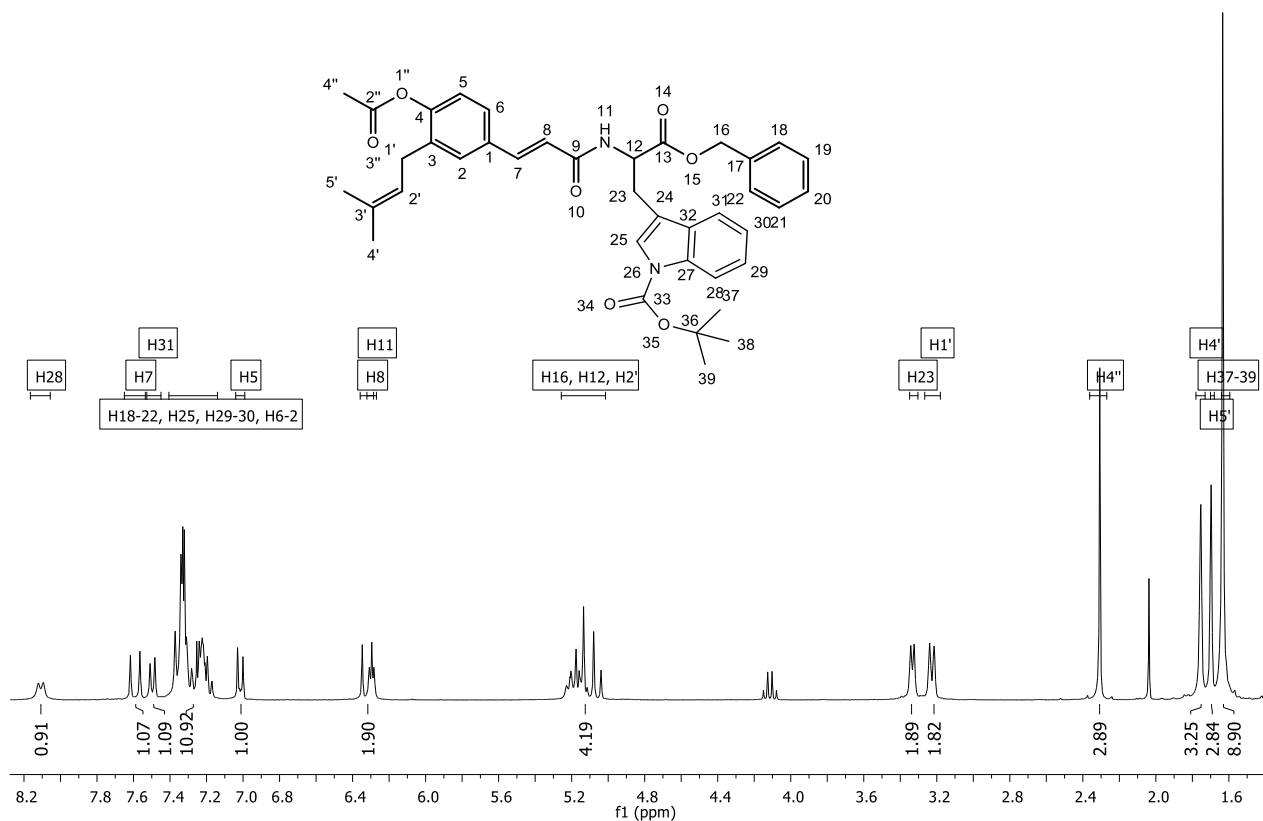
Hidrogênio	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	Multiplicida	Integral	$\delta^{13}\text{C}$
H-7	7,41	15,6	d	1	142,3
H-6,2	7,16	-	m	2	128,1, 128,6
H-8	6,54	15,6	d	1	118,7
H-12	3,33	-	-	-	49,0
H26	2,92	7,4	t	2	40,4
H-1'	2,79	6,6	t	2	23,3
H-1''	2,60	-	m	2	26,4
H23	1,77	-	m	9	33,3
H-3',3''	1,77	-	m	9	33,5
H-2',2''	1,77	-	m	9	44,9
H25	1,77	-	m	9	27,9
H24	1,47	-	m	2	23,4
H-4',4''	1,29	-	m	15	28,9
H-5',5''	1,29	-	m	15	27,1
H6''	1,29	-	m	15	27,0

Tabela 14A. Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado protegido da drupanina com a serina **14**, em 300 MHz, CDCl_3 .



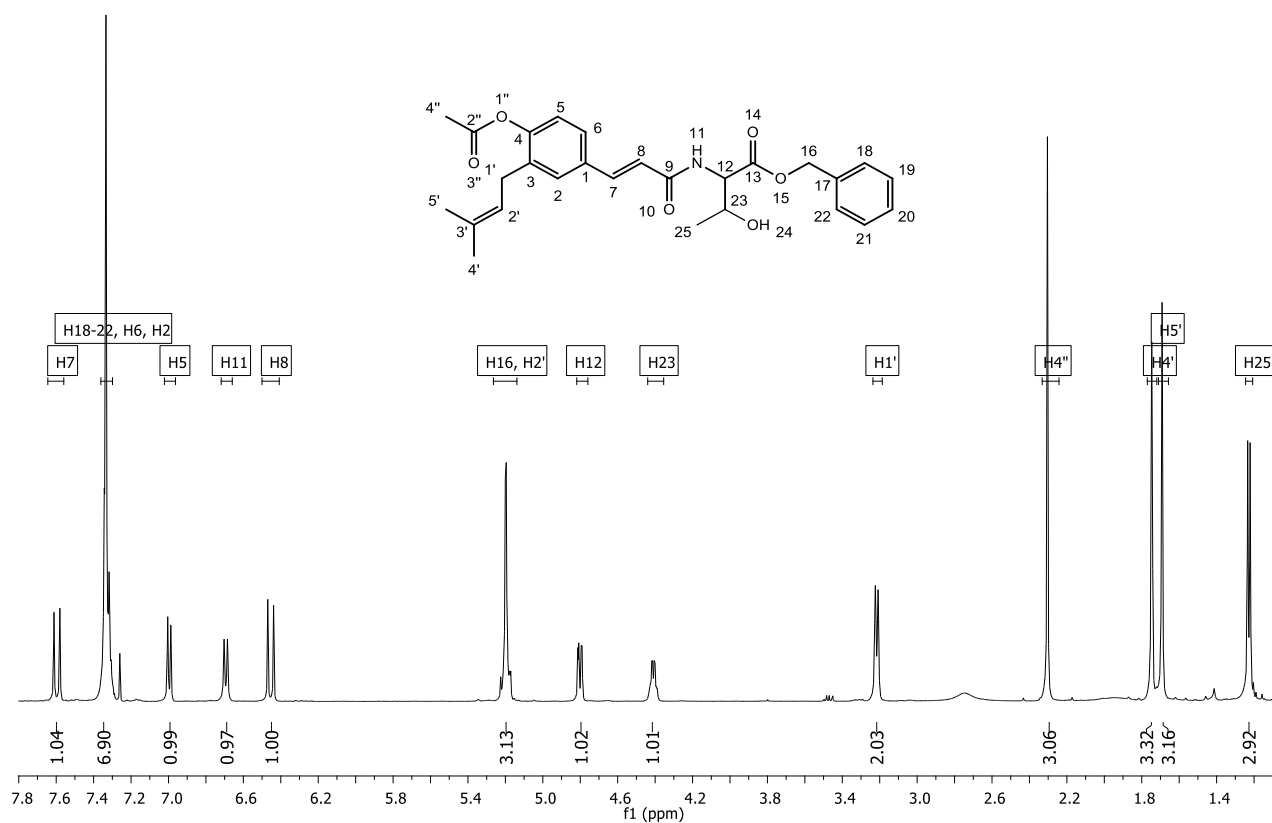
Hidrogênio	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	Multiplicida	Integral	$\delta^{13}\text{C}$
H-7	7,58	15,6	d	1	141,8
H-18,22	7,33	-	m	7	128,6, 128,9,
H-6,2	7,33	-	m	7	126,8, 130,4
H-5	6,99	7,9	d	1	123,1
H-11	6,86	7,3	d	1	-
H-8	6,41	16,2	d	1	120,2
H-16	5,21	-	m	3	68,0
H-2'	5,21	-	m	3	121,4
H-12	4,85	3,5, 7,2	dt	1	55,5
H-23	4,00	3,5, 11,2	dd	2	63,8
H-1'	3,21	7,2	d	2	29,1
H-4''	2,31	-	s	3	21,2
H-4'	1,76	-	s	3	26,1
H-5'	1,69	-	s	3	18,2

Tabela 15A. Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado protegido da drupanina com o triptofano **15**, em 300 MHz, CDCl_3 .



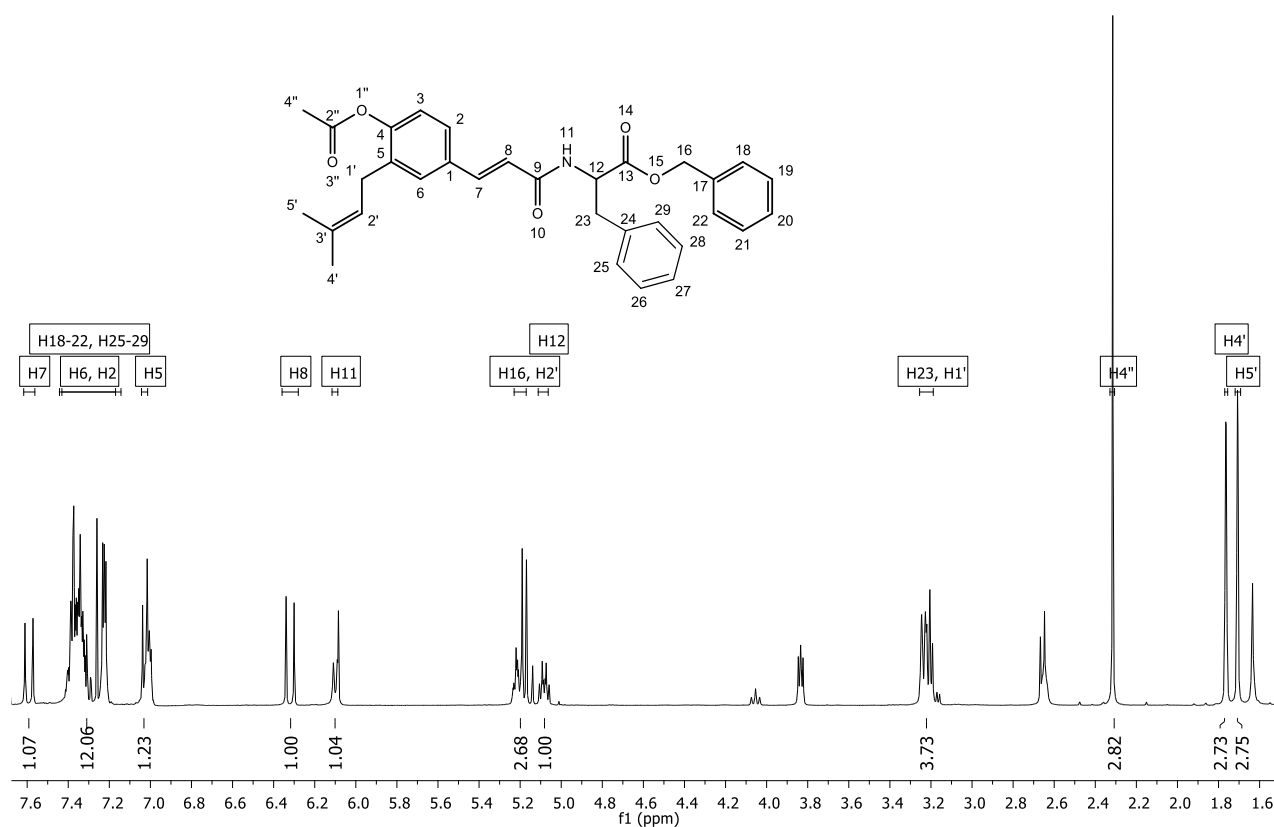
Hidrogênio	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	Multiplicidade	Integral	$\delta^{13}\text{C}$
H-28	8,11	8,10	d	1	115,3
H-7	7,59	15,6	d	1	141,2
H-31	7,50	7,7	d	1	119,0
H-18-22	7,26	-	m	10	128,5, 128,7,
H-25, 29-30	7,26	-	m	10	124,6, 126,5,
H-6-2	7,26	-	m	10	127,4
H-5	7,02	8,9	d	1	122,7
H-8	6,32	15,6	d	1	119,9
H-11	6,30	7,6	d	1	-
H-2'	5,15	-	m	4	121,0
H-12,16	5,15	-	m	4	52,9, 67,5
H-23	3,33	5,5	d	2	27,7
H-1'	3,23	7,2	d	2	28,7
H-4''	2,31	-	s	3	20,9
H-4'	1,75	-	s	3	25,8
H-5'	1,70	-	s	3	17,9
H-37-39	1,63	-	s	9	28,2

Tabela 16A. Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado protegido da drupanina com a treonina **16**, em 300 MHz, CDCl_3 .



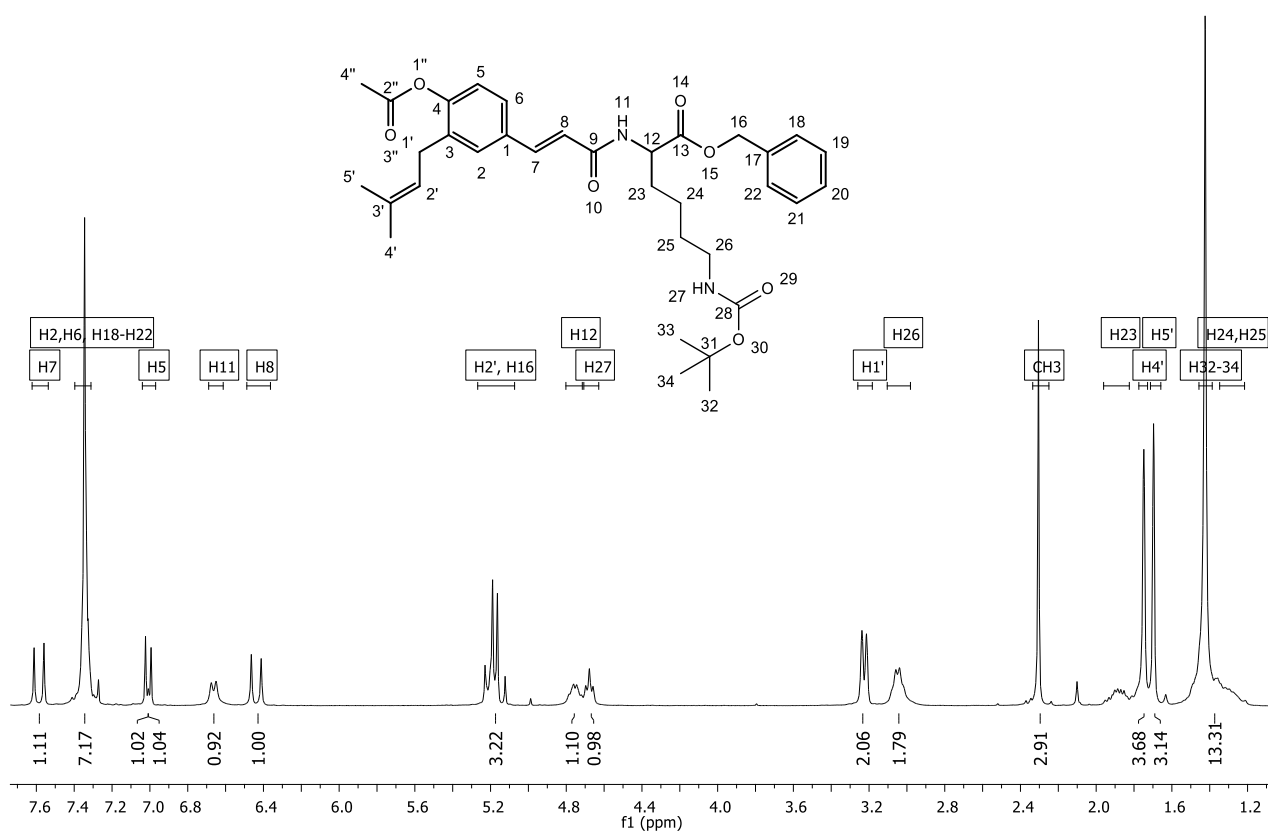
Hidrogênio	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	Multiplicida	Integral	$\delta^{13}\text{C}$
H-7	7,60	15,6	d	1	141,4
H-18,22	7,32	-	m	7	128,9, 129,1,
H-6,2	7,32	-	m	7	126,9, 128,6
H-5	7,00	8,1	d	1	122,9
H-11	6,69	8,9	d	1	-
H-8	6,45	15,6	d	1	120,0
H-16	5,19	-	m	3	67,5
H-2'	5,19	-	m	3	121,2
H-12	4,80	2,4, 8,9	dd	1	57,7
H-23	4,41	2,3, 6,2	qd	1	68,4
H-1'	3,22	7,2	d	2	28,8
H-4''	2,30	-	s	3	20,9
H-4'	1,73	-	s	3	25,8
H-5'	1,69	-	s	3	17,9
H-25	1,23	6,4	d	3	20,2

Tabela 17A. Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado protegido da drupanina com a fenilalanina **17**, em 300 MHz, CDCl_3 .



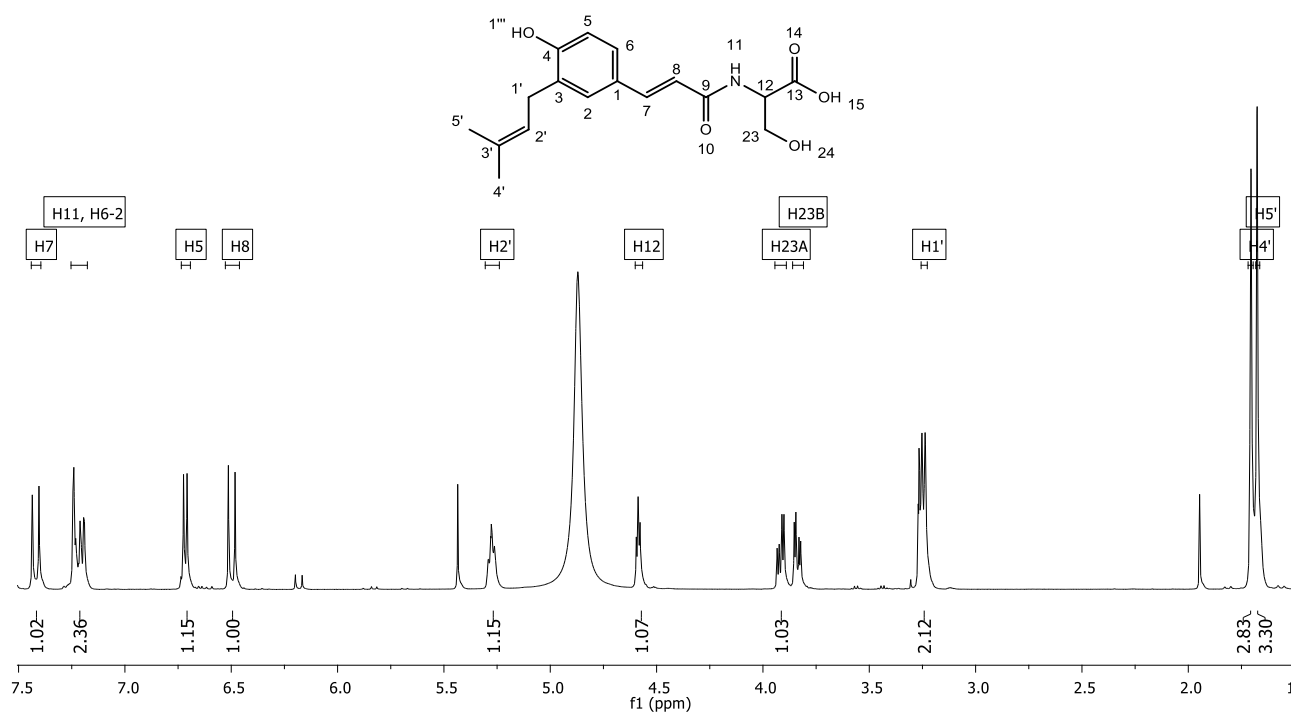
Hidrogênio	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	Multiplicida	Integral	$\delta^{13}\text{C}$
H-7	7,59	15,6	d	1	141,2
H-18,22	7,35	-	m	12	128,7, 129,4
H-25,29	7,35	-	m	12	128,7, 128,6,
H-6,2	7,35	-	m	12	126,5,127,1
H5	7,03	8,9	d	1	122,8
H-8	6,32	15,6	d	1	119,9
H-11	6,10	7,8	d	1	-
H-16	5,20	-	m	3	67,4
H-2'	5,20	-	m	3	121,0
H-12	5,09	-	m	1	53,1
H-23	3,22	-	m	4	37,9
H-1'	3,22	-	m	4	28,7
H-4''	2,32	-	s	3	20,9
H-4'	1,76	-	s	3	25,8
H-5'	1,71	-	s	3	17,9

Tabela 18A. Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado protegido da drupanina com a lisina **18**, em 300 MHz, CDCl_3 .



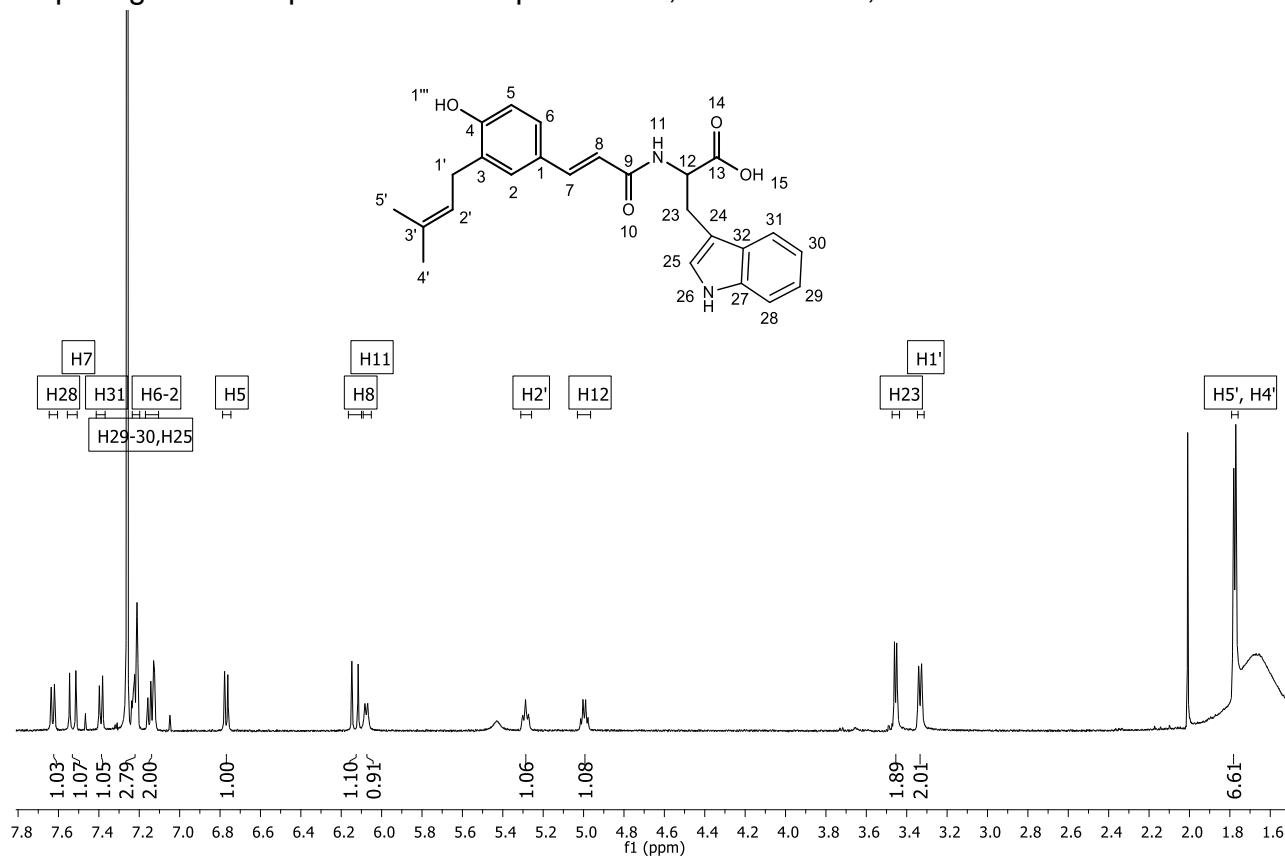
Hidrogênio	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	Multiplicida	Integral	$\delta^{13}\text{C}$
H-7	7,59	15,6	d	1	140,9
H-18-22	7,34	-	m	7	128,9 –
H-6,2	7,34	-	m	7	126,7,128,7
H-5	7,01	8,9	d	1	122,8
H-11	6,66	7,5	d	1	-
H-8	6,44	15,6	d	1	120,3
H-16	5,18	-	m	3	67,2
H-2'	5,18	-	m	3	121,2
H-12	4,75	7,3, 12,2	dd	1	52,4
H-27	4,68	5,8	t	1	-
H-1'	3,23	7,2	d	2	28,8
H26	3,05	5,8	d	2	40,0
H-4''	2,30	-	s	3	20,8
H23	1,90	-	m	2	32,0
H-4'	1,75	-	s	3	25,7
H-5'	1,70	-	s	3	17,9
H32-34	1,42	-	s	9	28,5
H24,25	1,31	-	m	4	22,4, 29,7

Tabela 19A. Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado desprotegido da drupanina com a serina **19**, em 300 MHz, CDCl_3 .



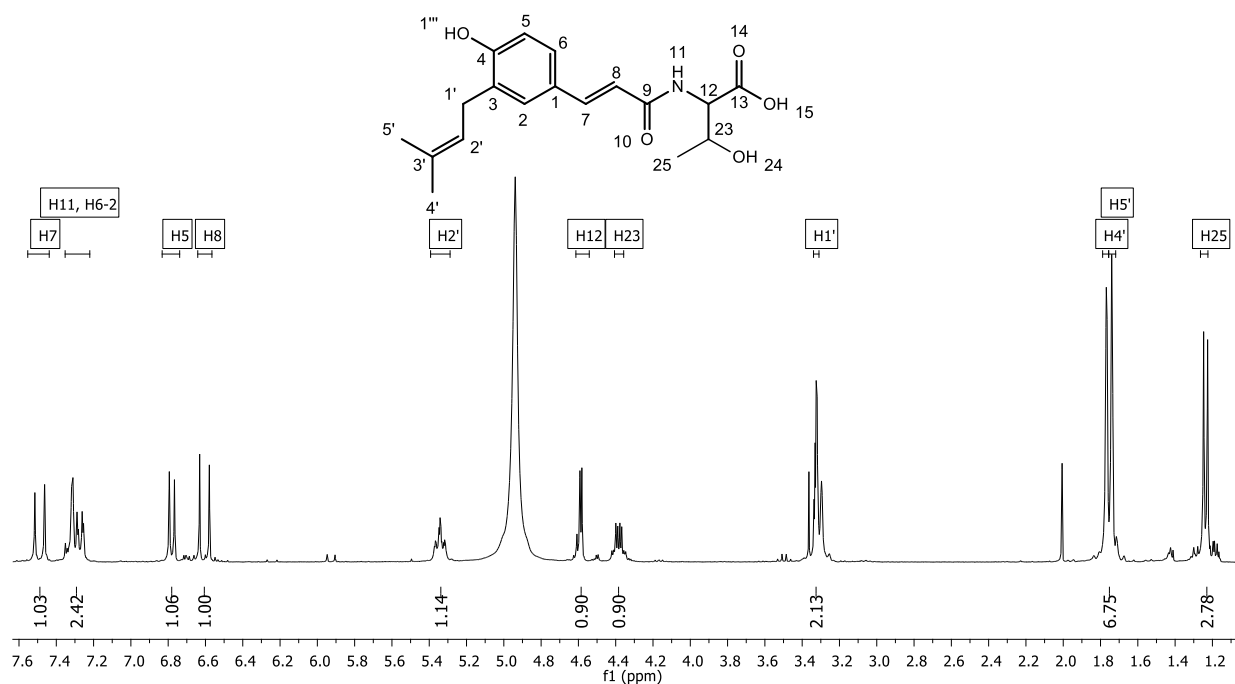
Hidrogênio	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	Multiplicidade	Integral	$\delta^{13}\text{C}$
H-7	7,42	15,7	d	1	142,9
H-11	7,22	-	m	3	-
H-6,2	7,22	-	m	3	128,3,130,3
H-5	6,72	8,2	d	1	116,1
H-8	6,50	15,7	d	1	117,7
H-2'	5,28	-	m	1	123,5
H-12	4,59	4,4	t	1	56,3
H-23A, B	3,92, 3,84	4,9, 11,2	dd	1	63,1
H-1'	3,24	7,3	d	2	29,1
H-4'	1,71	-	s	3	25,9
H-5'	1,68	-	s	3	17,8

Tabela 20A. Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado desprotegido da drupanina com o triptofano **20**, em 300 MHz, CDCl_3 .



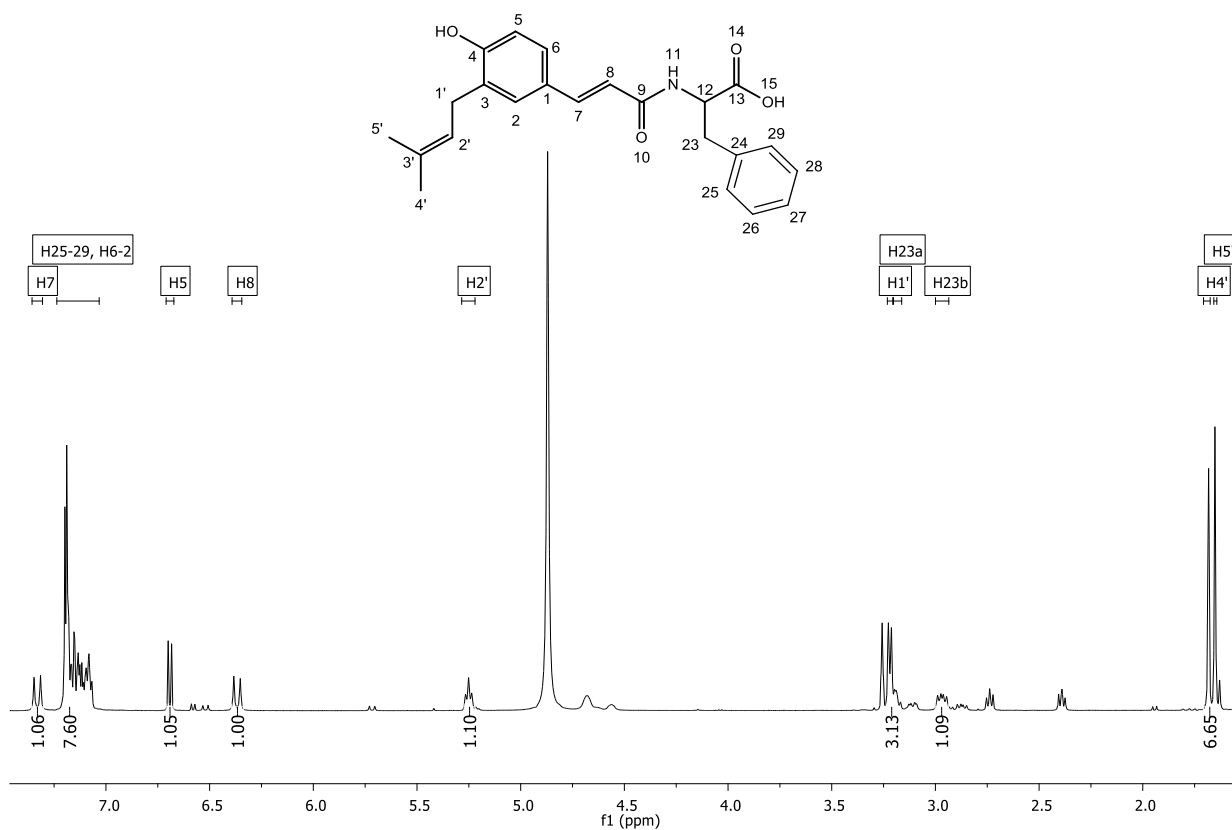
Hidrogênio	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	Multiplicida	Integral	$\delta^{13}\text{C}$
H-28	7,63	7,9	d	1	119,6
H-7	7,53	15,5	d	1	142,5
H-31	7,39	8,1	d	1	112,1
H-25, 29, 30	7,22	-	m	3	129,0-115,0
H-6,2	7,14	-	m	2	124,2-123,1
H-5	6,77	8,0	d	1	115,9
H-8	6,13	15,6	d	1	117,5
H11	6,08	7,0	d	1	-
H-2'	5,29	7,1	t	1	123,2
H-12	5,00	5,8, 12,5	dd	1	49,7
H-23	3,46	5,7	d	2	28,5
H-1'	3,33	7,4	d	2	28,9
H-4'	1,78	-	dl	6	25,8
H-5'	1,78	-	dl	6	17,6

Tabela 21A. Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado desprotegido da drupanina com a treonina **21**, em 300 MHz, CDCl_3 .



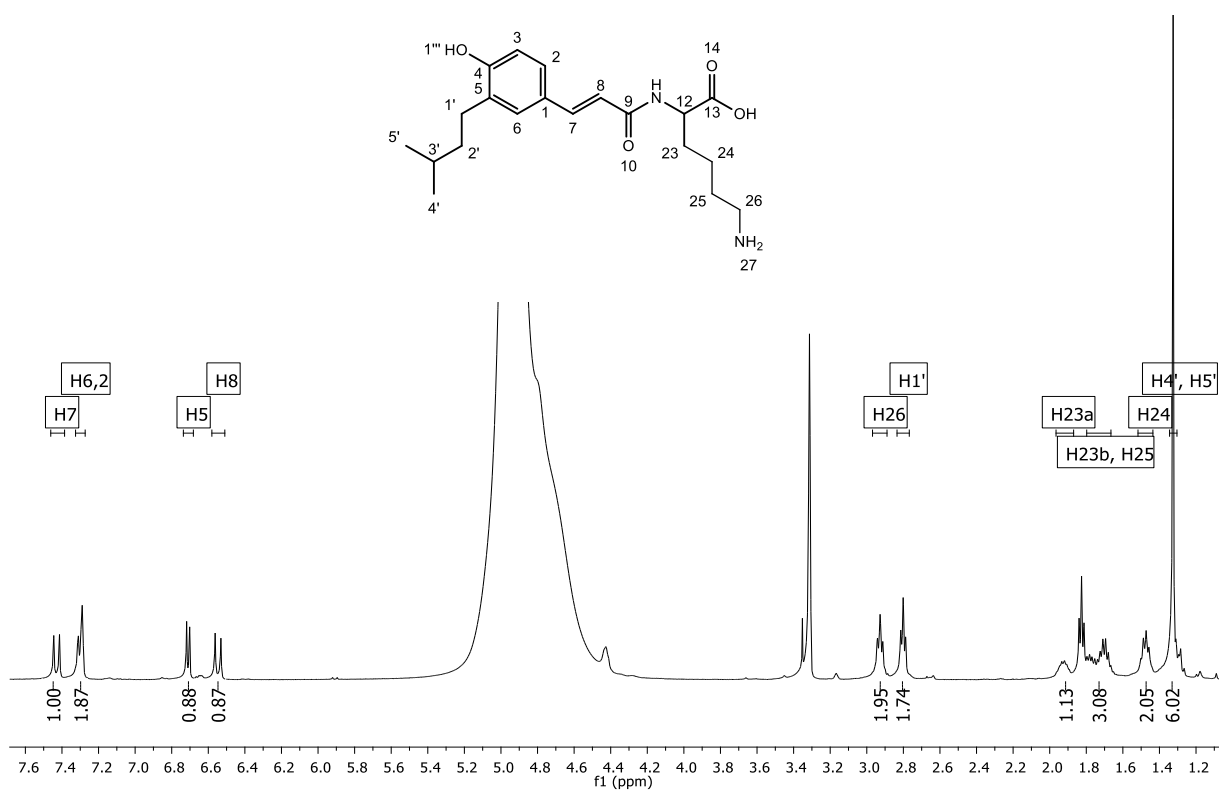
Hidrogênio	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	Multiplicida	Integral	$\delta^{13}\text{C}$
H-7	7,49	15,7	d	1	143,1
H-6,2	7,30	-	m	3	130,4, 128,4
H-11	7,30	-	m	3	-
H-5	6,78	8,2	d	1	116,1
H-8	6,61	15,7	d	1	117,6
H-2'	5,34	-	m	1	123,5
H-12	4,59	3,1	d	1	59,3
H-23	4,38	-	m	1	68,7
H-1'	3,33	-	m	2	29,1
H-4'	1,77	-	s	3	26,0
H-5'	1,74	-	s	3	17,9
H-25	1,21	6,4	d	3	20,5

Tabela 22A. Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado desprotegido da drupanina com a fenilalanina **22**, em 300 MHz, MeOD_4 .



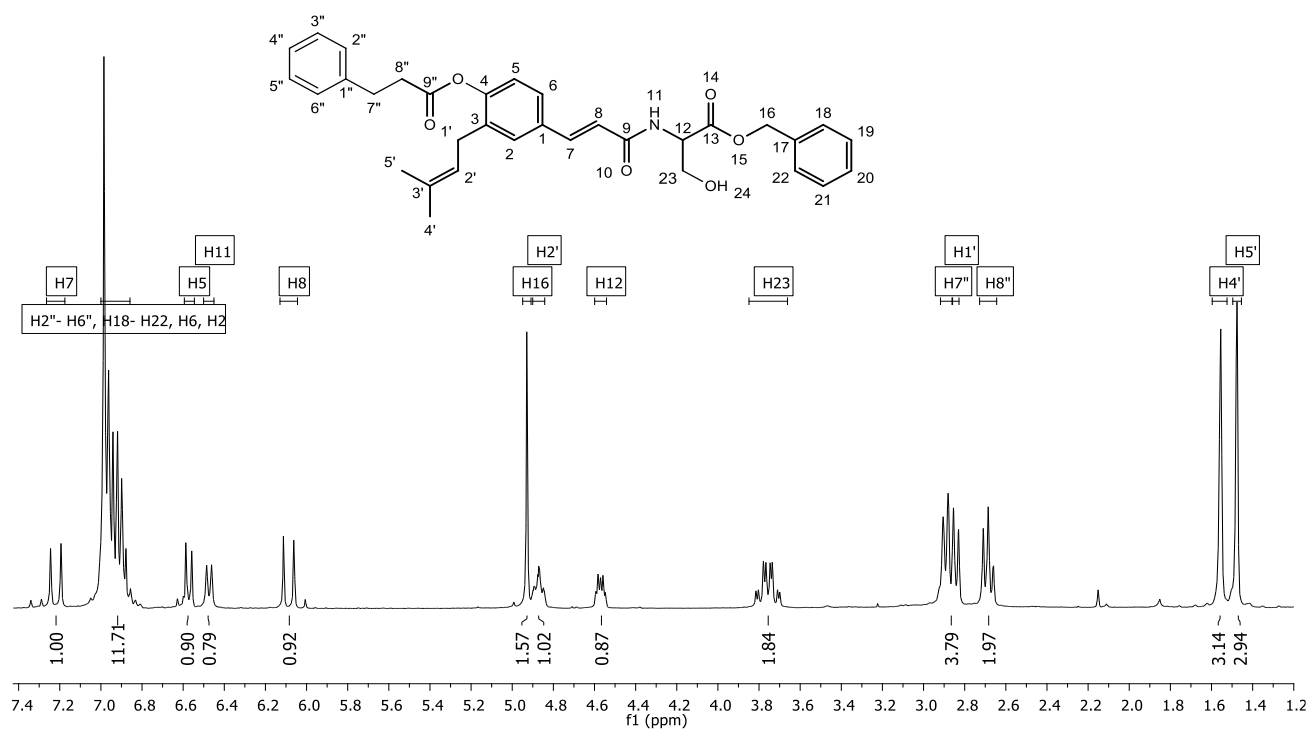
Hidrogênio	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	Multiplicida	Integral	$\delta^{13}\text{C}$
H-7	7,33	15,7	d	1	142,7
H-25,29	7,14	-	m	7	128,1, 129,1,
H6.2	7,14	-	m	7	127,5,130,2
H-5	6,69	-	s	1	116,1
H-8	6,37	15,7	d	1	117,8
H-2'	5,25	7,4	t	1	123,5
H-12	4,8	-	m	-	55,6
H-1'	3,22	7,1	d	2	32,7
H-23A,B	3,18, 2,97	-	m	2	38,8
H-4'	1,68	-	s	3	29,1
H-5'	1,65	-	s	3	17,8

Tabela 23A. Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado desprotegido da drupanina com a lisina **23**, em 400 MHz, MeOD_4 .



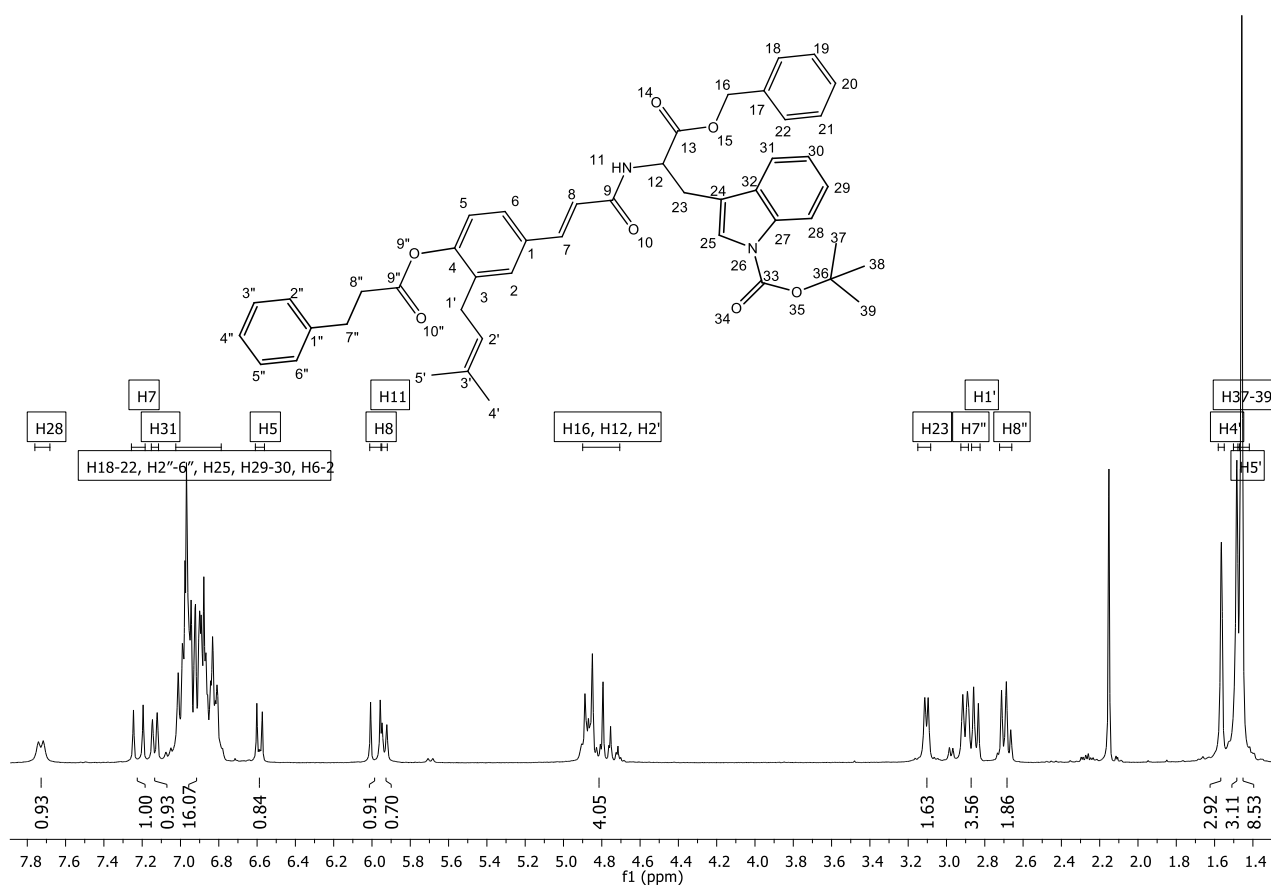
Hidrogênio	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	Multiplicida	Integral	$\delta^{13}\text{C}$
H-7	7,43	15,7	d	1	139,8
H-6,2	7,30	10,6	d	2	126,2,131,1
H-5	6,71	8,3	d	1	121,3
H-8	6,55	15,7	d	1	117,6
H26	2,93	7,2	t	2	39,2
H-1'	2,80	6,6	t	2	22,1
H23	1,78	-	m	7	32,3
H-3'	1,78	-	m	7	32,1
H-2'	1,78	-	m	7	-
H25	1,78	-	m	7	26,4
H24	1,48	-	m	2	22,4
H-4', 5'	1,32	-	s	6	25,8

Tabela 24A. Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado da bacarina com a serina **24**, em 300 MHz, CDCl_3 .



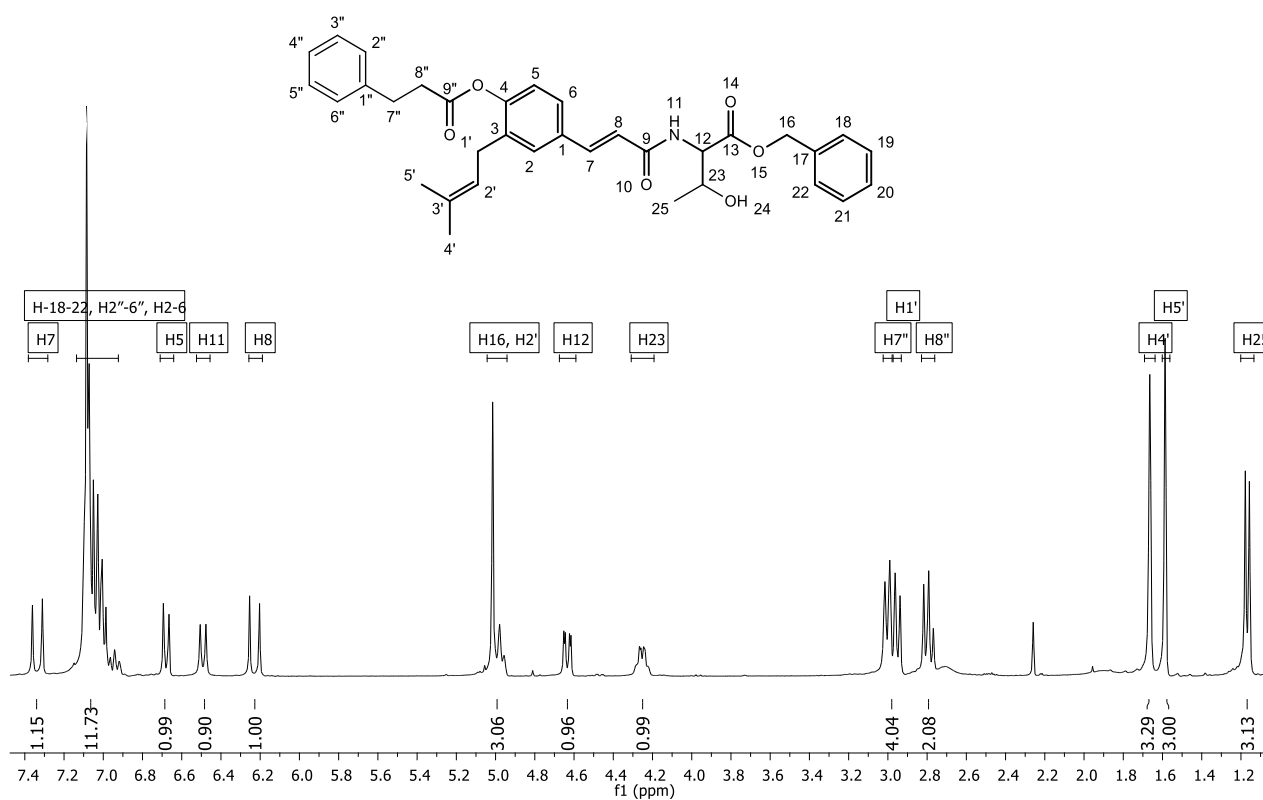
Hidrogênio	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	Multiplicidade	Integral	$\delta^{13}\text{C}$
H-7	7,22	15,1	d	1	141,6
H-18-22, 2''-	6,92	-	m	12	128,3-128,8
H-6,2	6,92	-	m	12	126,6, 126,8
H-5	6,57	8,6	d	1	122,8
H-11	6,47	7,2	d	1	-
H-8	6,09	15,2	d	1	119,9
H-16	4,93	-	s	2	67,7
H-2'	4,87	-	m	1	121,2
H-12	4,57	3,3, 6,9	dt	1	55,2
H-23	3,76	3,4, 10,9	qd	2	63,6
H-1'	2,88	-	m	4	28,6
H-7''	2,88	-	m	4	31,0
H-8''	2,68	4,1, 10,9	t	2	35,9
H-4'	1,55	-	s	3	25,9
H-5'	1,48	-	s	3	18,0

Tabela 25A. Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado da baccarina com o triptofano **25**, em 300 MHz, CDCl_3 .



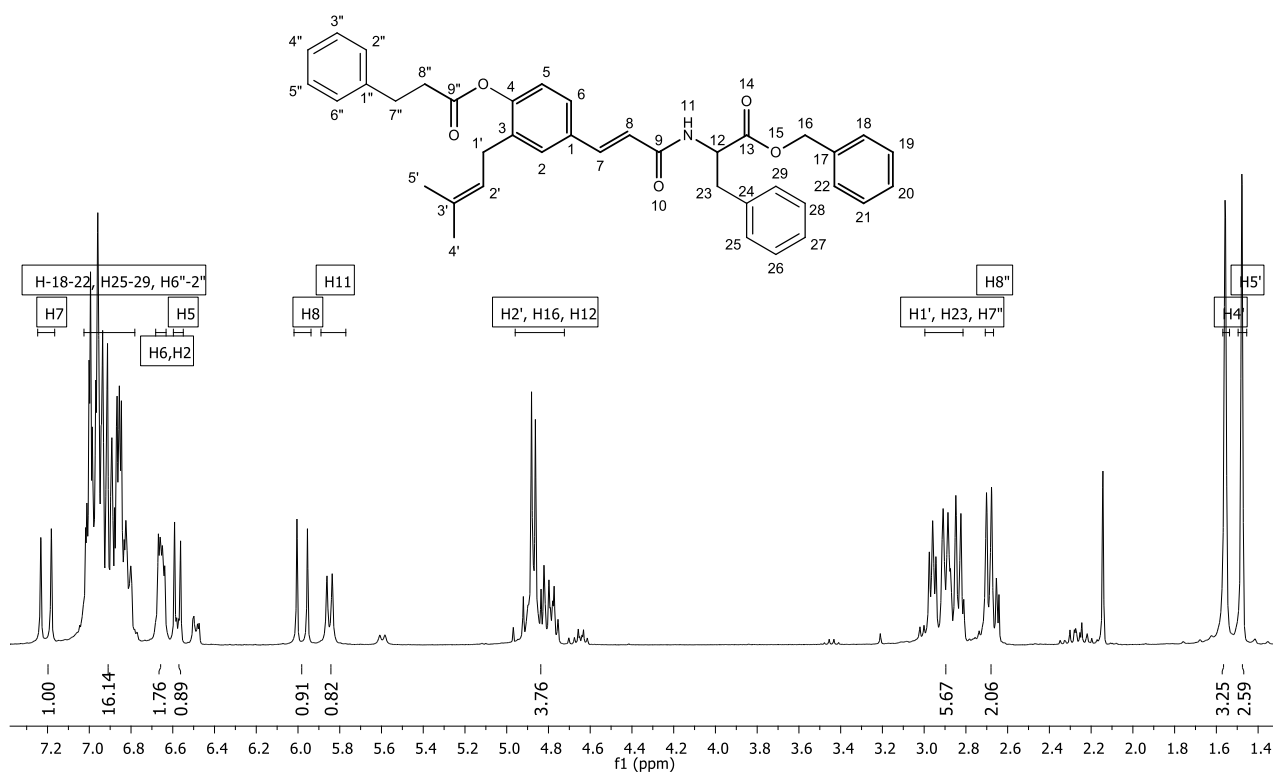
Hidrogênio	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	Multiplicida	Integral	$\delta^{13}\text{C}$
H-28	7,73	7,6	d	1	115,3
H-7	7,22	15,1	d	1	141,2
H-31	7,13	7,5	d	1	119,0
H-18-22, 2''-	6,90	-	m	15	129,6-128,7
H-25, 29-30	6,90	-	m	15	124,7, 124,4,
H-6,2	6,90	-	m	15	129,6, 128,1
H-5	6,59	8,6	d	1	122,7
H-8	5,98	15,1	d	1	119,9
H-11	5,93	7,5	d	1	-
H-2'	4,77	-	m	4	121,2
H-12,16	4,77	-	m	4	52,9, 67,5
H-23	3,10	5,3	d	2	27,7
H-1'	2,88	-	m	4	28,5
H-7''	2,88	-	m	4	30,9
H-8''	2,69	7,3	t	2	35,8
H-5'	1,56	-	s	3	25,7
H-4'	1,48	-	s	3	17,9
H-37-39	1,46	-	s	9	28,2

Tabela 26A. Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado da bacarina com a treonina **26**, em 300 MHz, CDCl_3 .



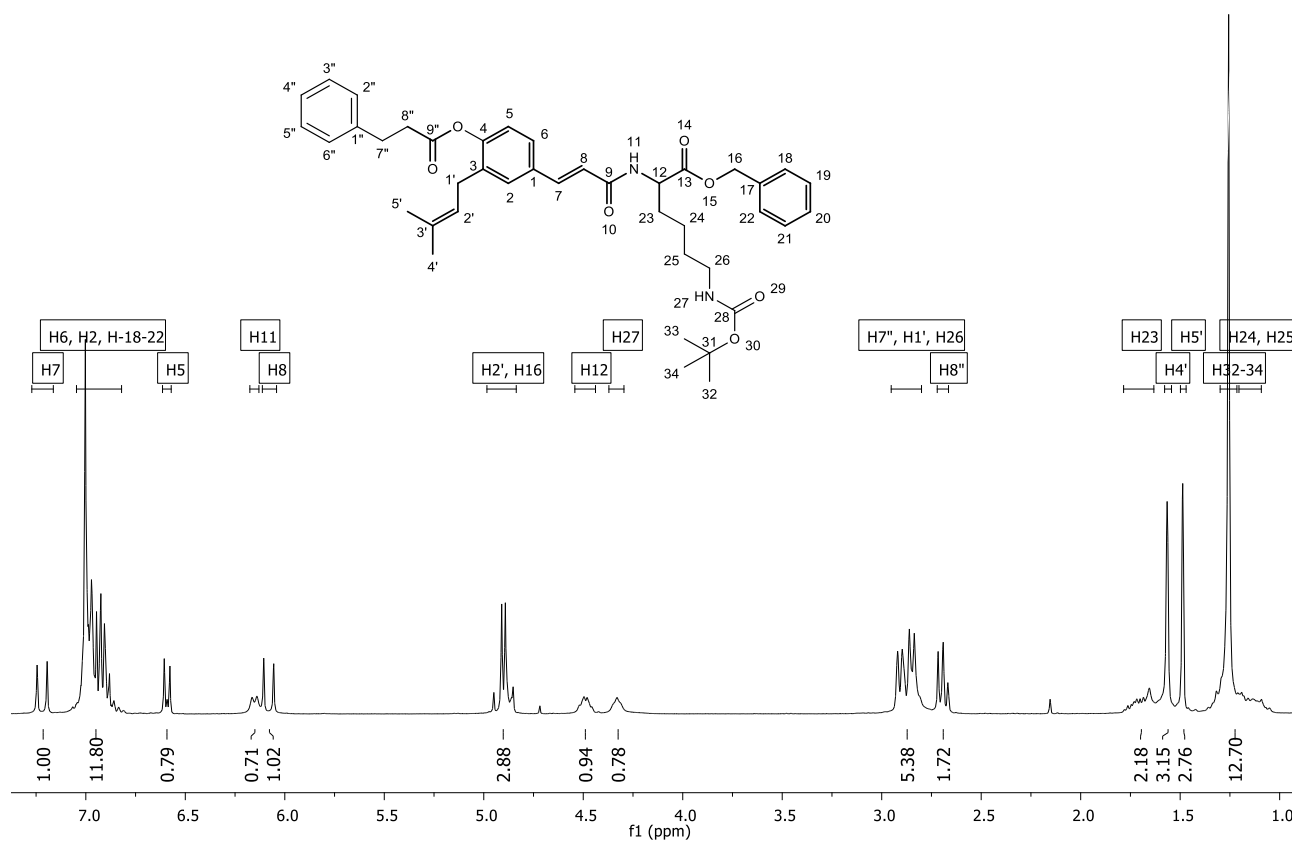
Hidrogênio	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	Multiplicida	Integral	$\delta^{13}\text{C}$
H-7	7,34	15,1	d	1	141,5
H-18-22, 2''-	7,02	-	m	12	128,3-129,9
H-6,2	7,02	-	m	12	126,5, 126,6
H-5	6,68	8,6	d	1	122,7
H-11	6,49	8,6	d	1	-
H-8	6,23	15,1	d	1	120,0
H-16	4,98	-	m	3	67,5
H-2'	4,98	-	m	3	121,2
H-12	4,63	2,3, 8,6	dd	1	57,7
H-23	4,25	-	m	1	68,4
H-1'	2,95	-	m	4	28,7
H-7''	2,95	-	m	4	31,0
H-8''	2,79	7,3	t	2	35,9
H-4'	1,66	-	s	3	25,8
H-5'	1,59	-	s	3	18,0
H-25	1,18	6,2	d	3	20,2

Tabela 27A. Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado da bacarina com a fenilalanina **27**, em 300 MHz, CDCl_3 .



Hidrogênio	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	Multiplicida	Integral	$\delta^{13}\text{C}$
H-7	7,21	15,1	d	1	141,2
H-18,22; 2 $''$ -	6,91	-	m	15	128,7-129,1
H-25,29	6,91	-	m	15	127,8-128,0
H-6,2	6,65	-	m	2	125,8, 125,9
H-5	6,58	8,6	d	1	122,1
H-8	5,98	15,1	d	1	120,0
H-11	5,85	7,5	d	1	-
H-16	4,84	-	m	4	67,5
H-2'	4,84	-	m	4	120,4
H-12	4,84	-	m	4	53,5
H-23	2,89	-	m	6	38,0
H-1'	2,89	-	m	6	28,6
H-7 $''$	2,89	-	m	6	31,0
H-8 $''$	2,69	7,2	t	2	35,9
H-4'	1,56	-	s	3	25,8
H-5'	1,48	-	s	3	18,0

Tabela 28A. Estrutura numerada e espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado da baccarina com a lisina **28**, em 300 MHz, CDCl_3 .



Hidrogênio	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	Multiplicida	Integral	$\delta^{13}\text{C}$
H-7	7,22	15,1	d	1	141,1
H-18-22, H-	6,94	-	m	12	126,6-129,8
H-6,2	6,94	-	m	12	126,4, 128,6
H-5	6,59	8,6	d	1	122,8
H-11	6,15	7,2	d	1	-
H-8	6,08	15,1	d	1	120,2
H-16,2'	4,91	-	m	3	67,3, 121,2
H-12	4,49	6,9, 11,8	dd	1	52,4
H-27	4,33	-	sl	1	-
H-7''	2,88	-	m	3	31,0
H26	2,88	-	m	3	40,1
H-1'	2,88	-	m	3	28,6
H-8''	2,69	7,3	t	2	35,9
H23	1,72	-	m	2	32,2
H-4'	1,57	-	s	3	25,8
H-5'	1,49	-	s	3	18,0
H32-34	1,26	-	s	9	28,5
H24,25	1,14	-	m	4	22,4, 29,7

