

UNIVERSIDADE PRESBITERIANA MACKENZIE

Curso de Farmácia

RELATÓRIO FINAL

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA DE SUBSTÂNCIAS
DE ORIGEM NATURAL E SEMI-SINTÉTICA**

São Paulo

2011

UNIVERSIDADE PRESBITERIANA MACKENZIE

Curso de Farmácia

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA DE SUBSTÂNCIAS
DE ORIGEM NATURAL E SEMI-SINTÉTICA**

LÍDER DE GRUPO:

ROBERTO PARISE FILHO

COLABORADORES:

FÁTIMA MARIA MOTTER MAGRI

ROBERTO RODRIGUES RIBEIRO

PEDRO LUIZ SILVA PINTO

ALUNOS PARTICIPANTES:

CINTIA SATIE MURAYAMA (40625915)

JENNY CHANG (40709620)

PRISCILA CARDOSO FERNANDES DA CUNHA (30724759)

TAMYRES TRINDADE (40738108)

São Paulo

2011

RESUMO

As fontes naturais são recursos importantíssimos para o desenvolvimento de substâncias biologicamente ativas, haja vista a enorme quantidade de fármacos historicamente produzidos a partir destas fontes. A grande maioria das substâncias bioativas relatadas na terapêutica é proveniente do Reino Vegetal, portanto, é de grande interesse, tanto para a academia quanto para as indústrias farmacêuticas, pesquisar grupos de plantas que produzam constituintes ativos, e obter, a partir destes, substâncias com atividade biológica superior. A esquistossomose é uma endemia que afeta milhões de pessoas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Os investimentos por parte da indústria farmacêutica na descoberta de novas moléculas potencialmente ativas contra a doença são precários, fato que desloca a responsabilidade de inovação para a pesquisa acadêmica. Com base nestas informações, o presente trabalho teve como objeto de estudo a substância conhecida como dilapiol, extraída da piperácea *Piper aduncum*. Objetivou-se extrair o óleo essencial de *P. aduncum*, isolar o princípio ativo e avaliar sua atividade esquistossomicida. Além disso, foram propostas modificações moleculares em sua estrutura, buscando encontrar novos análogos com potencial atividade e também pretendendo elucidar a relação entre estrutura química e atividade biológica. Os resultados mostraram que o dilapiol possui atividade esquistossomicida moderada, indicando que pode servir como um protótipo para novas moléculas potencialmente ativas. Após a obtenção e avaliação biológica de alguns análogos naturais, sintéticos e semi-sintéticos do dilapiol foi possível elucidar, de forma simplista, sua REA, indicando que sua estrutura como um todo é importante para atividade biológica, assim como as metoxilas aromáticas e o grupo alil da cadeia lateral. Qualquer simplificação em sua estrutura provoca redução ou perda de atividade.

PALAVRAS-CHAVE: *Piper aduncum*, Dilapiol, Esquistossomose, Esquistossomicidas, Modificação Molecular.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Página
FIGURA 1 – Estruturas químicas dos principais fármacos esquistossomicidas	13
FIGURA 2 – Análogos da oxamniquina, obtidos por modificação molecular.	15
FIGURA 3 – Estruturas de princípios ativos de origem vegetal.	16
FIGURA 4 – Quimioterápicos de origem vegetal.	18
FIGURA 5 – Fármacos obtidos por modificação molecular de princípios ativos vegetais.	19
FIGURA 6 – Estrutura química do safrol	22
FIGURA 7 – Estrutura química do dilapiol	22
FIGURA 8 – Estruturas de várias substâncias de interesse terapêutico que possuem a unidade 1,3-benzodioxólica.	23
FIGURA 9 – Esquema de obtenção dos principais análogos estruturais do dilapiol.	30
FIGURA 10 – Estruturas bidimensional (2D) (esquerda) e tridimensional (3D) (direita) do benzeno (acima) e dilapiol (abaixo) e representação da conformação espacial e da distribuição de cargas eletrônicas.	49
FIGURA 11 – Perfil comparativo do oograma quantitativo obtido pela utilização de dilapiol em diferentes doses.	56
FIGURA 12 – Perfil de redução da carga parasitária pela utilização de dilapiol em diferentes doses.	56
FIGURA 13 – Perfil comparativo do oograma quantitativo obtido pela utilização de análogos do dilapiol.	62
FIGURA 14 – Perfil comparativo do oograma quantitativo obtido pela utilização de análogos do dilapiol.	62
FIGURA 15 – Perfil de redução da carga parasitária pela utilização dos análogos do dilapiol na dose de 400 mg/kg.	63
FIGURA 16 – Elucidação da Relação Estrutura-Atividade do Dilapiol.	64

LISTA DE TABELAS

TABELAS	PÁGINA
TABELA I – Condições reacionais para a redução do safrol.	34
TABELA II – Oograma quantitativo do grupo controle positivo (não tratados).	53
TABELA III – Oograma quantitativo do grupo controle negativo (receberam apenas veículo).	53
TABELA IV – Oograma quantitativo do grupo controle tratado (receberam oxamniquina - 100mg/kg).	53
TABELA V – Oograma quantitativo do grupo dilapiol 50 mg/kg.	54
TABELA VI – Oograma quantitativo do grupo dilapiol 100 mg/kg.	54
TABELA VII – Oograma quantitativo do grupo dilapiol 200 mg/kg.	54
TABELA VIII – Oograma quantitativo do grupo dilapiol 400 mg/kg.	55
TABELA IX – Oograma quantitativo do grupo dilapiol 800 mg/kg.	55
TABELA X – Perfil comparativo do oograma quantitativo referente às diferentes doses empregadas de dilapiol.	55
TABELA VIII – Oograma quantitativo do grupo dilapiol 400 mg/kg.	56
TABELA IX – Oograma quantitativo do grupo dilapiol 800 mg/kg.	56
TABELA X – Perfil comparativo do oograma quantitativo referente às diferentes doses empregadas de dilapiol.	56
TABELA XI – Oograma quantitativo e carga parasitária do grupo Eugenol (1).	58
TABELA XII – Oograma quantitativo e carga parasitária do grupo Metileugenol (2).	58
TABELA XIII – Oograma quantitativo e carga parasitária do grupo Di-idrometileugenol (3).	58
TABELA XIV – Oograma quantitativo e carga parasitária do grupo Isometileugenol (4).	59
TABELA XV – Oograma quantitativo e carga parasitária do grupo Safrol (5).	59
TABELA XVI – Oograma quantitativo e carga parasitária do grupo Di-idrosafrol (6).	59
TABELA XVII – Oograma quantitativo e carga parasitária do grupo Di-idrodilapiol (8).	60
TABELA XVIII – Oograma quantitativo e carga parasitária do grupo Isodilapiol (9).	60
TABELA XIX – Oograma quantitativo e carga parasitária do grupo Pirocatecol (11).	60
TABELA XX – Oograma quantitativo e carga parasitária do grupo Benzodioxol (12).	61
TABELA XXI – Perfil comparativo do oograma quantitativo referente aos análogos do dilapiol.	61
TABELA XXII - Picos obtidos no cromatograma de CG-MS e suas porcentagens para a composição do óleo de eugenol.	83
TABELA XXIII - Picos obtidos no cromatograma de CG-MS e suas porcentagens para a composição do óleo de safrol.	86
TABELA XXIV - Principais picos obtidos no cromatograma de CG-MS e suas porcentagens para a composição do óleo de dilapiol.	89
TABELA XXV - Principais picos obtidos no cromatograma de CG-MS e suas porcentagens para a composição do Metileugenol.	92
TABELA XXVI - Principais picos obtidos no cromatograma de CG-MS e suas porcentagens para a composição do Isometileugenol.	95
TABELA XXVII - Principais picos obtidos no cromatograma de CG-MS e suas porcentagens para a composição do Di-idrosafrol.	98
TABELA XXVIII - Principais picos obtidos no cromatograma de CG-MS e suas porcentagens para a composição do Di-idrodilapiol.	101

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Abreviatura, Sigla ou Símbolo	Significado
°C	Graus Celsius
CCl_4	Tetracloroeto de Carbono
$CDCl_3$	Clorofórmio Deuterado
CG-MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
d	Dupleto
DCM	Diclorometano
H	Hidrogênio
HC/	Ácido Clorídrico
K_2CO_3	Carbonato de Potássio
KOH	Hidróxido de Potássio
m	Multipeto
M.M.	Massa Molar
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
mmol	Milimol
m/z	Razão Massa-Carga
$NaBH_4$	Boroidreto de Sódio
Na_2SO_4	Sulfato de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	Cloreto de Níquel Hexahidratado
P.E.	Ponte de Ebulição
PKNO	Número de Pico
ppm	Parte por Milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Singleto
t	Tripleto
μl	Microlitro
δ	Constante de Acoplamento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3 MATERIAL E MÉTODO	25
3.1 MATERIAL	25
3.1.1 Produtos Farmacêuticos	25
3.1.2 Reagentes e Solventes	25
3.1.3 Vidrarias e materiais	26
3.1.4 Materiais Biológicos	27
3.1.5 Equipamentos	27
3.2 MÉTODO	29
3.2.1 Métodos Extrativos	29
3.2.2 Métodos Sintéticos	29
3.2.3 Métodos Analíticos	37
3.2.4 Métodos Biológicos	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Caracterizações das substâncias de partida	42
4.1.1 Eugenol (1)	42
4.1.2 Safrol (5)	43
4.1.3 Dilapiol (10)	43
4.2 Análogos	44
4.2.1 Metileugenol (2)	44
4.2.2 Di-idrometileugenol (3)	44
4.2.3 Isometileugenol (4)	45
4.2.4 Di-idrosafrol (6)	45
4.2.5 Di-idrodilapiol (8)	46
4.2.6 Isodilapiol (9)	47
4.2.7 Nitrodilapiol (10)	47
4.2.8 Benzodioxol (12)	50
4.3 Métodos Biológicos	51
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	65
5.1 CONCLUSÕES	65
5.2 PERSPECTIVAS	66
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ANEXOS	81
ANEXO A – Cromatogramas de CG-MS e espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do Eugenol	82
ANEXO B – Cromatogramas de CG-MS e espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do Safrol	85
ANEXO C – Cromatogramas de CG-MS e espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do Dilapiol	88
ANEXO D – Cromatogramas de CG-MS e espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do Metileugenol	91
ANEXO E – Cromatogramas de CG-MS e espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do Isometileugenol	94
ANEXO F – Cromatogramas de CG-MS e espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do Di-idrosafrol	97
ANEXO G – Cromatogramas de CG-MS e espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do Di-idrodilapiol	100
ANEXO H - Espectro de RMN de ^1H do Isodilapiol	103
ANEXO I - Espectro de RMN de ^1H Nitrodilapiol	104
ANEXO J - Espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do Pirocatecol	105

1 INTRODUÇÃO

Desde a origem humana, os produtos naturais têm sido utilizados para o tratamento e cura de doenças, sendo encontrados os maiores exemplos desses usos no desenvolvimento das civilizações Egípcia, Greco-Romana e Chinesa. Todo o conhecimento químico adquirido da natureza teve início devido às descobertas realizadas ao longo dos tempos pelos povos primitivos e pelos povos indígenas. A partir do contato com essas diferentes etnias, a população científica pôde dar início ao desenvolvimento de pesquisas com produtos naturais e ao estudo da relação intrínseca que existe entre a estrutura química dos compostos e suas propriedades biológicas (Viegas-Junior, Bolzani, 2006).

Muitas substâncias bioativas já foram e continuam sendo extraídas da natureza, sejam a partir de microrganismos ou de fontes marinhas e/ou de animais, porém, em sua grande maioria, essas substâncias são originadas do reino vegetal. Estima-se que 500.000 espécies vegetais ocupem atualmente o planeta, sendo metade destas, angiospermas, que pelo seu processo evolutivo apresentam micromoléculas distintas e complexas, as quais muitas vezes possuem atividade biológica (Montanari, Bolzani, 2001). Entretanto, muito pouco dessa biodiversidade já foi analisada quanto às suas propriedades medicinais e seus constituintes químicos.

Nas duas últimas décadas o uso de plantas medicinais entrou em ascensão, fazendo com que, cada vez mais, as pessoas buscassem alternativas terapêuticas, como a fitoterapia, para a cura de suas enfermidades. Observando essa tendência e vislumbrando a possibilidade de encontrar novas entidades moleculares patenteáveis, as indústrias farmacêuticas iniciaram grande investimento no estudo da química de produtos naturais.

A família Piperaceae, constituída por grande variedade de espécies, é conhecida por produzir uma gama de compostos bioativos (Yunker, 1972; Parmar *et al.*, 1997), alguns bastante atraentes para serem explorados por modificação molecular. Compreendida em aproximadamente três mil espécies, os gêneros *Piper*, *Peperomia* e *Pothormorphe* destacam-se dos outros, por existirem vários trabalhos publicados relacionados à atividade antitumoral, antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória e até mesmo, inseticida (Lago *et al*, 2004; Silva, Bastos, 2007). Dentre outros, o gênero *Piper*

apresenta grande variedade nos seus constituintes e na sua atividade biológica. É amplamente utilizada na medicina popular e está presente em todas as regiões tropicais do mundo, sendo que, aproximadamente 170 das suas 700 espécies, ocorrem no Brasil (Silva, Bastos, 2007). Estudos realizados por Bernard *et al.*, (1995), envolvendo 16 espécies de *Piper*, demonstraram que a espécie *Piper aduncum* L. (pimenta de macaco), é uma das piperáceas que apresenta substâncias com potencial atividade biológica, entre elas, um alto poder inseticida (Lobato *et al.*, 2007). Adicionalmente, Smith, Kassim (1979) e Gottlieb *et al.*, (1981) comprovaram que o dilapiol aparece como principal constituinte do óleo essencial obtido dessa espécie, variando de 58% a 88,4%.

Poucos estudos acerca da obtenção de análogos e também sobre as possíveis atividades terapêuticas do dilapiol são relatados na literatura (Okunade *et al.*, 1997; Belzile *et al.*, 2000; Majerus *et al.*, 2000). Por ser um produto natural, de extração acessível, de estrutura relativamente simples e com reatividade satisfatória, o dilapiol permite que sua manipulação sintética e sua avaliação biológica sejam planejadas, elaboradas e realizadas facilmente. A utilização deste produto natural como protótipo para a síntese de análogos de atividade pontencialmente superior, é tema bastante atrativo e de grande importância científica, o que justifica plenamente este trabalho.

2 OBJETIVOS

O uso de produtos naturais como matéria-prima para síntese de substâncias bioativas tem despertado grande interesse para as universidades e indústrias farmacêuticas, representando importante ferramenta na obtenção de novos fármacos (Barreiro, Fraga, 1999). Utilizando este preceito, o presente trabalho objetivou:

- a. Extrair e isolar o *dilapiol* de espécies de *Piper aduncum*;
- b. Realizar ensaios de Atividade Biológica (AB) para o ***dilapiol***, verificando sua eficácia esquistossomicida;
- c. Determinar a relação existente entre a Estrutura Química do ***dilapiol*** e sua Atividade Esquistossomicida (Relação Estrutura-Atividade: REA), com o intuito de fornecer dados sobre o grupo farmacofórico e também direcionar a pesquisa para obtenção de novos análogos;
- d. Promover Modificações/Alterações Moleculares na estrutura química do ***dilapiol*** visando à obtenção de análogos com atividade potencialmente superior.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A esquistossomose, mal que aflige o homem há milhares de anos, está entre as doenças parasitárias mais importantes do mundo subdesenvolvido. É doença comportamental, na qual pessoas se expõem à infecção por cercárias, fundamentada pela falta de escolha e disponibilidade de suprimentos de água seguros para propósitos recreativos, domésticos ou profissionais (Hagan *et al.*, 1998). É doença causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*, cujas espécies mais importantes que infestam humanos são *S. mansoni*, *S. mekongi* e *S. japonicum*, *S. haematobium* e *S. Intercalatum* (Fritsche, Smith, 1999). Está associada ao baixo poder aquisitivo e ignorância, além da falta de condições sanitárias e de moradia adequadas (Menezes *et al.*, 1993; Remais *et al.*, 2008). A doença ataca primeiramente o fígado e os sistemas intestinal e urinário, dependendo das espécies envolvidas, e é prevalente em várias regiões tropicais e subtropicais do mundo (James, Colley, 1995; Chitsulo *et al.*, 2000). No Brasil, a esquistossomose mansônica é uma endemia transmitida pelo *Schistosoma mansoni*, um trematódeo que tem como hospedeiros intermediários os caramujos do gênero *Biomphalaria*, tendo como mais importante a espécie *Biomphalaria glabrata*.

Mesmo depois de todo o avanço conseguido no tratamento e prevenção, a esquistossomose ainda amarga números significativos de prevalência e morbidade (Parise-Filho, Silveira, 2001; Parise-Filho *et al.*, 2007). Estima-se que mais de 200 milhões de pessoas estão infectadas, 779 milhões em risco de infecção, 280.000 mortes anualmente e mais de 20 milhões de indivíduos sofrendo com a morbidade (Hotz *et al.* 2007; Sayed *et al.*, 2008; WHO, 2008). As atividades de controle, embora aparentemente bem elaboradas, parecem ser geralmente ineficazes pela multiplicidade de fatores envolvidos e por não oferecerem promessa realista de controle sustentável e definitivo (Ferreira, Coutinho, 1999). No Brasil, após mais de 25 anos de programa de controle de esquistossomose, a quimioterapia tem se mostrado ferramenta muito importante no controle da morbidade e no decréscimo da prevalência e na incidência em áreas endêmicas. No entanto, a médio e longo prazo, saneamento, controle químico do caramujo, suprimentos seguros de água, captação de esgoto e educação sanitária parecem ser as verdadeiras ferramentas quando o objetivo é o controle persistente e definitivo da esquistossomose (Chitsulo *et al.*, 2000; Katz, 1999; Hotz *et al.* 2007).

Acredita-se que a quimioterapia (FIGURA 1) moderna contra esquistossomose tenha começado quando Christopherson (1918) relatou o tratamento bem sucedido da doença com tartarato de antimônio. Compostos antimoniais de vários tipos foram, certamente, os medicamentos disponíveis mais usados até a Segunda Guerra Mundial (Brindley, 1994), quando então a lucantona foi introduzida na prática clínica. Período de progresso intenso começou nos anos 60, com a introdução do niridazol, hicanona, oxamniquina e metrifonato. Este período culminou nos anos 70 com a descoberta do amoscanato, oltipraz e o mais importante, praziquantel.

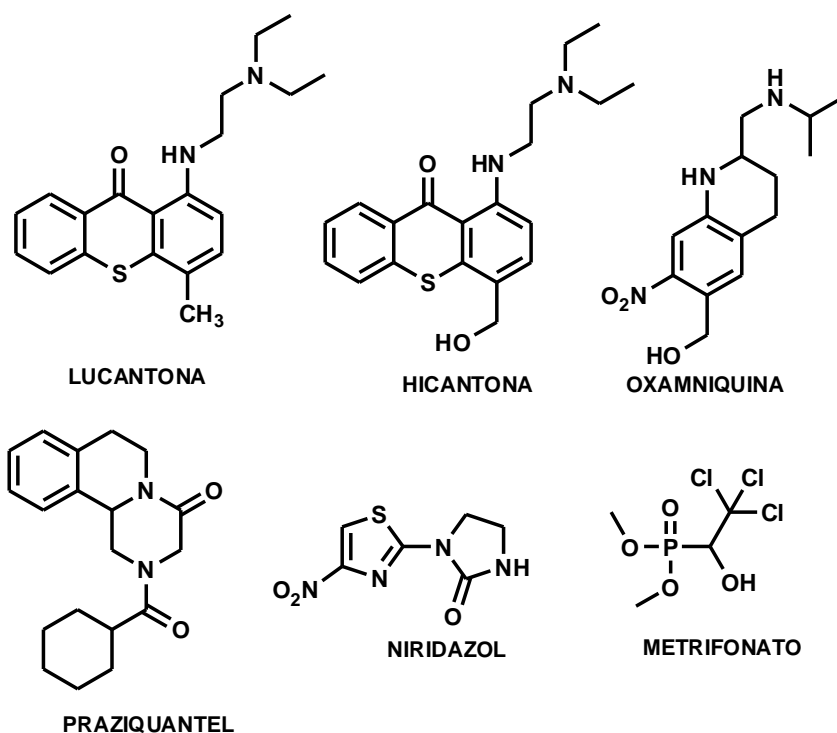


FIGURA 1 – Estruturas químicas dos principais fármacos esquistossomicidas.

Desde então, nenhum outro avanço terapêutico foi alcançado, provavelmente por dois fatores: a disponibilidade de um fármaco relativamente efetivo e seguro; e a falta de investimentos no desenvolvimento de novos fármacos, provavelmente relacionado ao tipo de população afetada (Cioli, 1995; Pink *et al.*, 2005). Outros fármacos reconhecidos por suas propriedades antimaláricas, como as lactonas sesquiterpênicas (ginghaosu, artemeter, artesunato e arteter) têm sido também testados contra esquistossomas *in vitro*, em animais e em pacientes. Estes compostos mostraram boa atividade, especialmente contra esquistossomas imaturos, além de apresentarem efeitos adversos leves (Shuhua, Catto, 1989; Li *et al.*, 1996; Shuhua *et al.*, 1998; Cioli, 1998; Shuhua *et al.*, 2000; Pink *et al.*, 2005). Estudos revelaram também propriedades esquistossomicidas de uma série de

plantas africanas (Sparg *et al.*, 2000). Algumas plantas do cerrado brasileiro também apresentaram atividade, desta vez, moluscicida, contra o caramujo *Biomphalaria glabrata* (Bezerra *et al.*, 2002). A recente identificação de novas substâncias oxadiazólicas como protótipos para obtenção de fármacos esquistossomicidas de amplo espectro pode representar futuro promissor no tratamento da doença (Sayed *et al.*, 2008). Mas, apesar destas perspectivas, a quimioterapia da esquistossomose pode estar agora num ponto crucial. Poucos fármacos estão disponíveis para o tratamento efetivo da esquistossomose. Apenas os fármacos oxamniquina e praziquantel estão em uso e é bem possível que apenas o praziquantel esteja destinado a permanecer no mercado (Abdul-Ghani *et al.*, 2009; Cioli, 1995; Marco, De Verjovski-Almeida, 2009; Parise Filho *et al.*, 2001; Ribeiro-dos-Santos *et al.*, 2006). Contar com apenas um fármaco é, certamente, situação perigosa, especialmente no que diz respeito à resistência. É preocupante que cepas de *S. mansoni*, em algumas áreas, parecem estar mostrando certo grau de resistência ao fármaco mais amplamente empregado, o praziquantel (Fallon, Doenhoff, 1994; Murray-Smith *et al.*, 1996; Doenhoff, 1998; Ismail *et al.*, 1999). Isto não é surpresa, pois em países como o Egito, os fármacos, incluindo o praziquantel, têm sido usado agressivamente por mais de 10 anos (Ismail *et al.*, 1999; Pink *et al.*, 2005). É pertinente notar que mais de 500.000 doses de praziquantel têm sido administradas na China para o tratamento da infecção por *Schistosoma japonicum* desde 1980 (Yue *et al.*, 1990). Se esta noção está correta e a atual terapia continuar, o aumento na incidência de resistência parece inevitável (Doenhoff, 1998). O praziquantel foi o fármaco de escolha para o tratamento de todas as formas de esquistossomose por muito tempo. Atualmente, no Brasil, a oxamniquina é usada no tratamento da esquistossomose mansônica, por ter a mesma eficácia e menor custo em relação ao fármaco de primeira escolha. Apesar de serem medicamentos seguros, já foram relatados, especialmente para a oxamniquina, resistência (Dias *et al.*, 1978; Araújo *et al.*, 1980; Coelho *et al.*, 1997; Coelho *et al.*, 1998; Conceição *et al.*, 2000) e efeitos adversos graves, como crises epiléticas e arritmias cardíacas (Krajden *et al.*, 1983; Carvalho *et al.*, 1985; Stokvis *et al.*, 1987; Guitti *et al.*, 1993; Fowler *et al.*, 1999). Isto se deve, principalmente, à falta de especificidade celular, resultando em toxicidade periférica indesejada. Para tentar solucionar estes problemas, variedades sintéticas que sejam capazes de combater a doença tem sido desenvolvidas. Barberato Filho, em 1996, obteve três novos derivados da oxamniquina, dois mediante fechamento de anel e um por meio da latenciação, derivados estes que exibiram atividade esquistossomicida promissora (FIGURA 2).

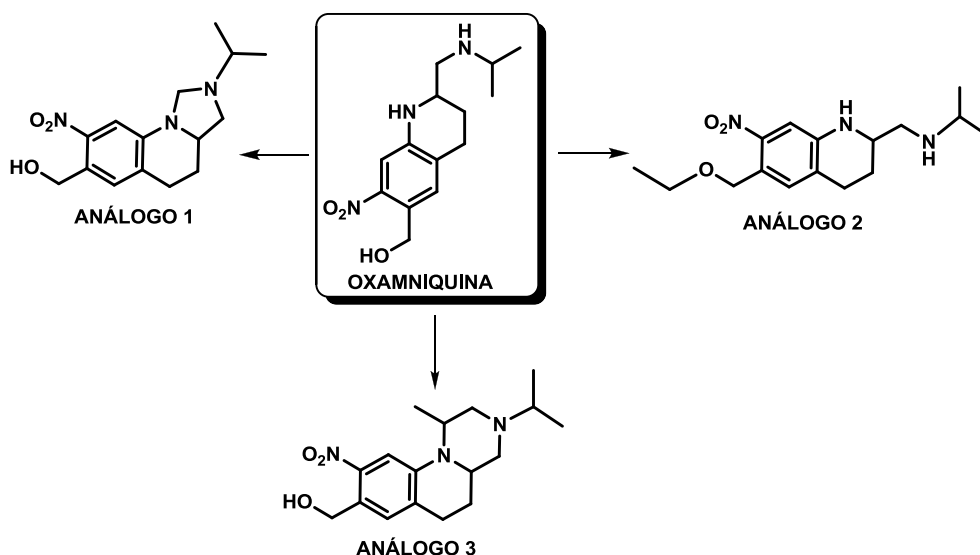


FIGURA 2 – Análogos da oxamniquina, obtidos por modificação molecular.

Pró-fármacos poliméricos, formas capazes de liberar o fármaco efetivamente no sítio alvo, que prolonguem a ação terapêutica ou que atinjam níveis plásmaticos não tóxicos, constituíram-se como as principais pesquisas na obtenção de derivados de oxamniquina no início dos anos 2000 (Soyez *et al.*, 1996; Parise-Filho *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2006; Parise-Filho *et al.*, 2007).

A necessidade de novos fármacos é evidente. As doenças negligenciadas não costumam ser de interesse do setor privado, uma vez que o retorno esperado no desenvolvimento de medicamentos para seu tratamento não costuma justificar financeiramente os investimentos necessários. O custo do desenvolvimento de compostos seguros e efetivos é extremamente alto, chegando-se ao desânimo quanto ao sucesso na introdução de novo esquistossomicida no futuro (Cioli, 1995).

Desde a antiguidade, a humanidade faz uso de diversos recursos para preservar ou restaurar a saúde. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (Barreiro, Fraga, 1999). Naquela época, a maioria dos tratamentos das doenças era realizada com o uso de substâncias, principalmente de origem vegetal e animal. O desconhecimento, tanto da causa das doenças, quanto das maneiras de como substâncias agiam, fez com que alguns estudiosos, entre eles Paracelso (1493-1541), adotassem a “Doutrina da Assinatura”. Segundo esta, Deus indicaria qual era o agente medicinal adequado para o tratamento do órgão afetado ou dos sintomas de uma certa

doença, conferindo-lhe um “sinal” na forma de uma semelhança, ainda que superficial, daquele agente com este órgão ou sintomas. A partir desta doutrina, descobriram-se as propriedades medicinais das folhas e galhos da *Salix alba* (vulgarmente, salgueiro). Visto que a planta originava-se em locais úmidos e seus galhos eram bastante flexíveis, estas características foram relacionadas com o tratamento de resfriados e doenças das articulações. Posteriormente, verificou-se que as propriedades antiinflamatórias, analgésicas e antipiréticas características da *Salix alba* eram devidas ao ácido salicílico, princípio ativo obtido a partir da hidrólise da salicilina, substância orgânica extraída daquela planta (Menegatti *et al.*, 2001, Wermuth, 2003).

Assim como no caso da *Salix alba*, a natureza, de um modo geral, é a responsável pela produção da maioria das substâncias orgânicas conhecidas e pela maior parcela da diversidade química registrada na literatura, além de ter contribuído de forma significativa para o fornecimento de substâncias úteis ao tratamento de doenças que acometem os seres humanos (Viegas-Junior *et al.*, 2006). O avanço da química orgânica, associado ao início do estudo científico em plantas, resultou no isolamento e na consagração de princípios ativos eficazes, e que até hoje, são empregados no tratamento de doenças, a exemplo da morfina, ácido salicílico, cocaína e quinina (Montanari, Bolzani, 2001) (FIGURA 3).

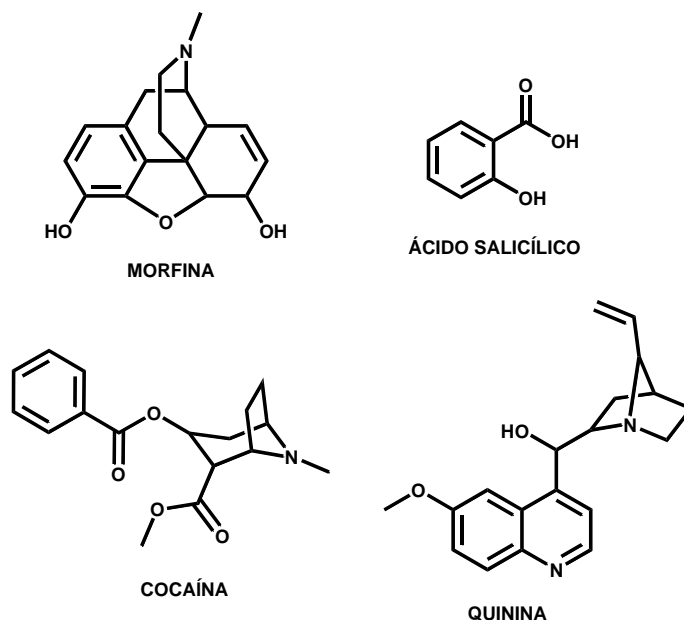


FIGURA 3 – Estruturas de princípios ativos de origem vegetal.

Os produtos naturais obtidos de fontes vegetais predominaram na terapêutica até o século XIX, mas a partir do final do século XX, com o rápido desenvolvimento de técnicas avançadas de produção de compostos orgânicos e também com a elaboração de métodos eficientes de avaliação biológica, houve uma contínua introdução de compostos de origem sintética e semi-sintética. Após um longo período de estagnação nos estudos e também por terem sido aviltados pela ascensão de fármacos de origem sintética, os produtos naturais vêm, atualmente, recuperando espaço e importância na indústria farmacêutica, seja *per-se*, seja como fonte inspiradora de novos padrões moleculares bioativos (Montanari, Bolzani, 2001, Viegas-Junior *et al.*, 2006). A indústria farmacêutica motivada, em parte, pela descoberta recente de quimioterápicos eficazes como vimblastina, vincristina, artemisinina e paclitaxel (FIGURA 4), reativou o interesse pelos fármacos de origem vegetal. Este fato se deve, principalmente, pela busca de substâncias com estruturas moleculares (protótipos) diversificadas, que possuem atividades biológicas específicas e que possam sofrer derivatizações gerando compostos com melhores propriedades e maior eficácia. A principal desvantagem da utilização dos produtos naturais como protótipos é que são, com frequência, moléculas complexas e difíceis de serem sintetizadas e/ou modificadas. Conseqüentemente, a otimização da estrutura ideal pode ser árdua e a produção comercial muito onerosa. Dessarte, a avaliação biológica e utilização de protótipos naturais, estruturalmente simples e funcionalmente reativos, na obtenção de análogos, podem ser métodos bastante promissores para a aquisição de substâncias com atividade distinta ou, até mesmo, potencialmente superior (Wermuth, 2003).

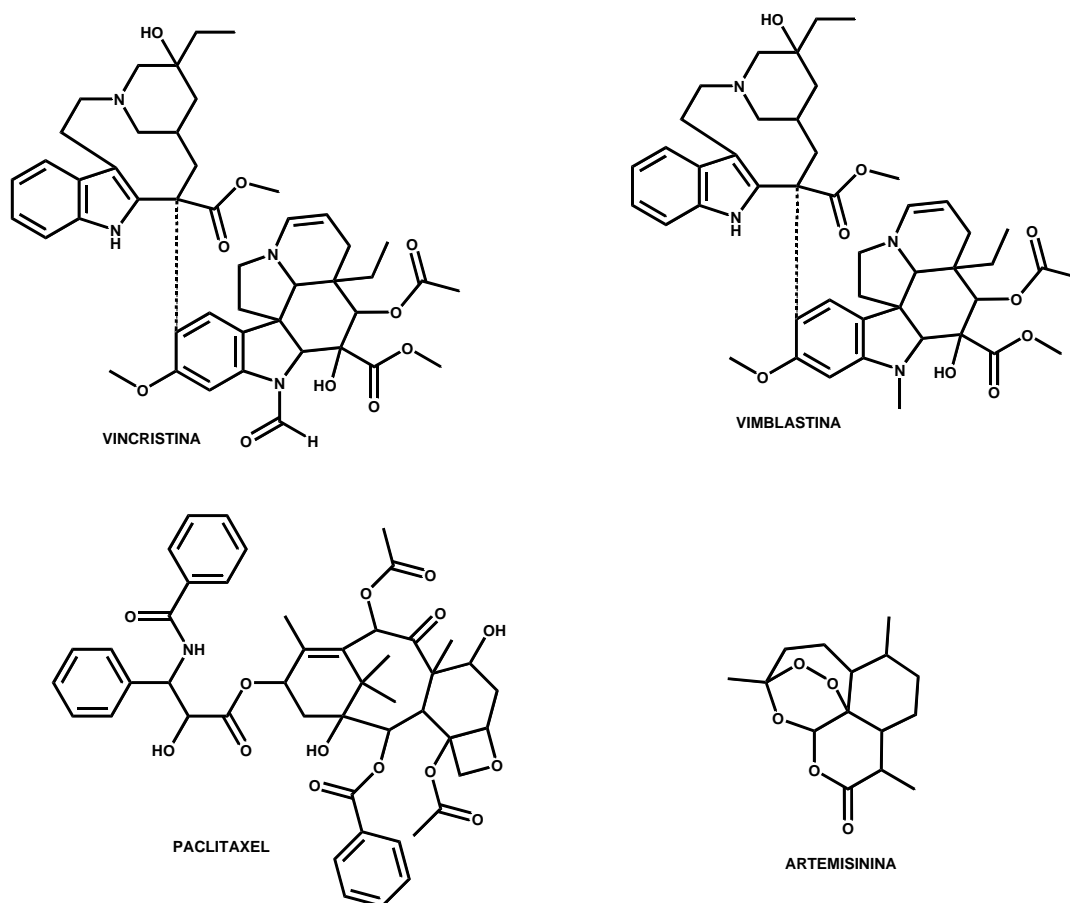


FIGURA 4 – Quimioterápicos de origem vegetal.

Recentemente, vários estudos têm sido realizados abordando o fato de os produtos naturais serem utilizados como fármacos e também como padrões para novas estruturas (Cragg *et al.*, 1997, Cragg, Newman, 2000, Cragg *et al.*, 2000, Li *et al.*, 2004, Kumar *et al.*, 2005). Na FIGURA 5, estão representados exemplos de fármacos que tiveram sua origem em plantas e, que mais tarde, sofreram modificações para obtenção de análogos com propriedades farmacocinéticas/farmacodinâmicas aprimoradas.

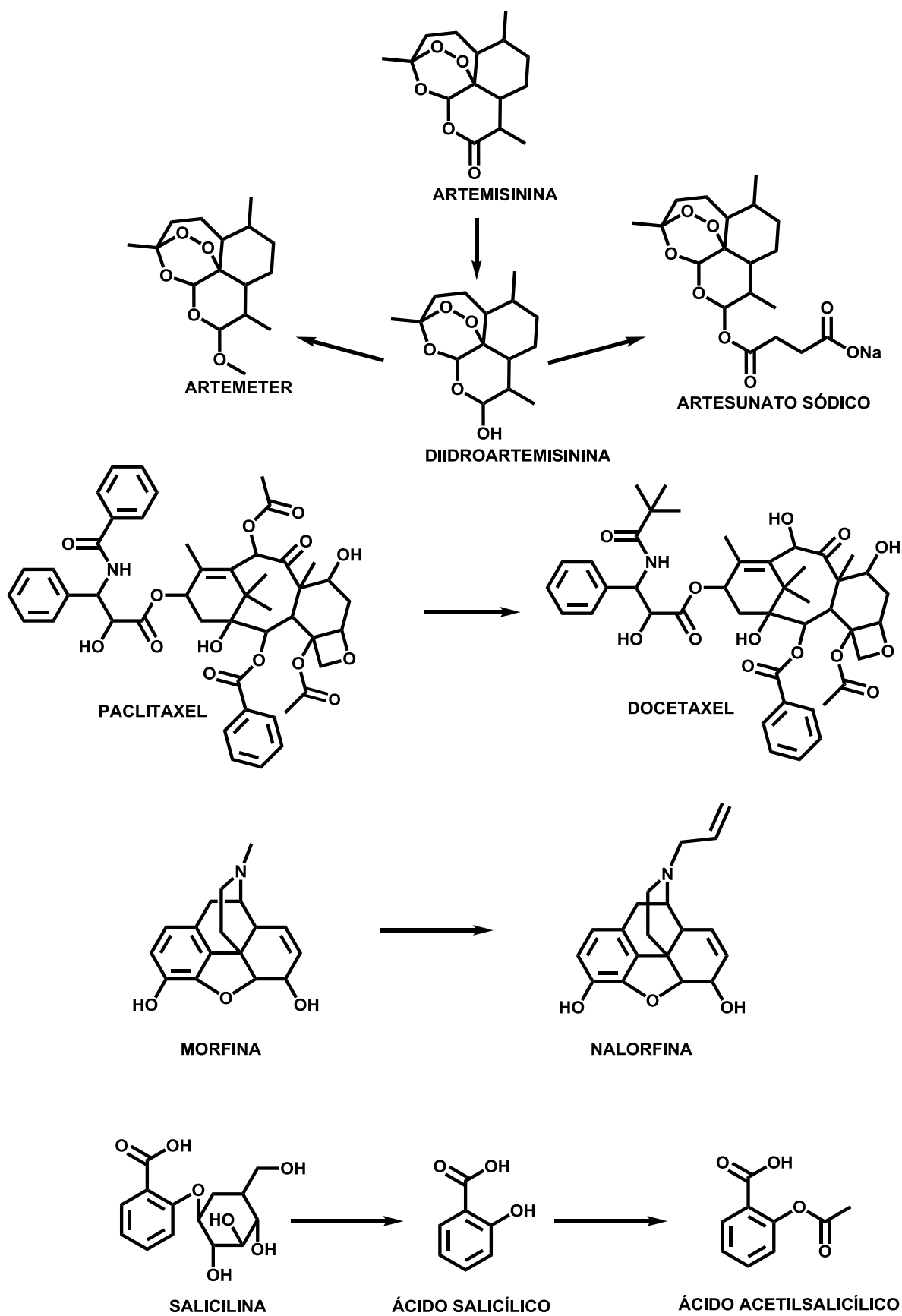


FIGURA 5 – Fármacos obtidos por modificação molecular de princípios ativos vegetais.

A artemisinina (FIGURA 5) é uma lactona sesquiterpênica que apresenta atividade antimalárica e esquistossomicida. Extraída da *Artemisia annua* (Cragg *et al.*, 1997, Cragg, Newman, 2000, Cragg *et al.*, 2000), problemas relacionados à solubilidade ocasionavam transtornos para o tratamento, especialmente, de malária cerebral e até mesmo, o tratamento emergencial. A fim de solucionar estes problemas, foram planejados dois derivados de artemisinina, o artemeter e o artesunato sódico. Com o intuito de viabilizar a obtenção destes derivados, a artemisina foi convertida no análogo funcionalizado, diidroartemisinina. O artemeter, obtido pela metilação da hidroxila da diidroartemisinina, propiciou aumento de lipossolubilidade e melhor penetração no sistema nervoso central. Em contrapartida, o artesunato sódico, sal formado pela esterificação da diidroartemisinina com ácido succínico, seguido da reação com base, permitiu aumento de hidrossolubilidade, fator importante para administração parenteral (Montanari, Bolzani, 2001, Wermuth, 2003, Viegas-Junior *et al.*, 2006).

No final da década de 70, o paclitaxel (FIGURA 5) foi identificado e isolado das cascas de *Taxus brevifolia*. Durante os primeiros estudos sobre sua potencialidade como novo agente antineoplásico, foi questionada a viabilidade de seu futuro emprego face à complexidade de sua estrutura e à relativa escassez da fonte natural, visto que para se extrair 1 kg da substância, 10 toneladas de cascas de *T. brevifolia* eram necessárias (Avery *et al.*, 1992). O interesse pelo fármaco foi intenso a partir dos anos 80, quando vários grupos de pesquisa passaram a tentar viabilizar metodologias sintéticas para sua obtenção em maior escala. Posteriormente, processos semi-sintéticos, a partir da bacatina III (Viegas-Junior *et al.*, 2006), resultaram no fármaco desejado, com maiores rendimentos. Modificações moleculares bem sucedidas no diterpenóide paclitaxel resultaram no composto semi-sintético, docetaxel (FIGURA 5), fármaco duas vezes mais ativo que o primeiro (Kanazawa *et al.*, 1994; Cheng, 1996, Wermuth, 2003).

O ópio, preparado dos bulbos de *Papaver somniferum*, é conhecido há séculos por suas propriedades soporíferas e analgésicas. Armand Séquin isolou o seu constituinte majoritário, a morfina, e Sertürner publicou seus trabalhos sobre o *principium somniferum*, tendo sido os pioneiros na busca pela utilização de substâncias naturais na forma pura (Viegas-Junior *et al.*, 2006). A morfina (FIGURA 5), hipnoanalgésico clássico, teve sua molécula modificada pela introdução de um grupo alil no nitrogênio do anel piperidínico. Com esta modificação, a morfina foi transformada em nalorfina (FIGURA 5), um antagonista dos receptores opióides. Os antagonistas opióides são úteis para reverter o

quadro de depressão respiratória causada pela overdose de morfina (Patrick, 2001, Wermuth, 2003).

O ácido acetilsalicílico (AAS) (FIGURA 5), é o analgésico mais consumido e vendido no mundo. Esta substância pode ser considerada como um fármaco pioneiro sob vários aspectos. Muito embora derive do produto natural salicina (FIGURA 5), foi o primeiro fármaco sintético empregado na terapêutica, tendo sua síntese concluída em 1897, pelo químico alemão Felix Hoffman, do laboratório Bayer. Na época, a síntese de derivados dos salicilatos com melhor tolerabilidade foi incentivada, devido ao desconforto gástrico causado pelo tratamento com salicina (FIGURA 5).

Como mencionado anteriormente e corroborando com os exemplos apresentados, o uso de padrões moleculares como fonte de inspiração para obtenção de novas entidades químicas bioativas, mostra-se como um método bastante promissor e eficaz. A biodiversidade, especialmente do Brasil, é algo fascinante. Segundo Pletsch, Sant'Ana (1995), 16% das 500.000 espécies de plantas, que se estima existirem no mundo, encontram-se na floresta Amazônica. No entanto, a pesquisa de substâncias ativas derivadas de plantas no Brasil ainda é muito insipiente. Até o início da década de 80 foi estimado que menos de 1% das espécies da flora brasileira eram conhecidas quanto aos seus constituintes químicos (Gottlieb *et al.*, 1981). Mesmo considerando ter havido incrementos significativos a partir desse percentual nas últimas duas décadas, há, evidentemente, uma grande lacuna de conhecimento da nossa flora a ser preenchida. Em decorrência disso, desenvolver ensaios, isolar, caracterizar e finalmente sintetizar ou biossintetizar compostos de interesse biológico, especialmente para o tratamento da esquistossomose, torna-se um desafio constante (Shapiro, 1991).

A família de plantas Piperaceae compreende cerca de 10 gêneros e quase 1400 espécies (Yunker, 1972). Algumas destas espécies são empregadas na medicina popular para o tratamento de diversas doenças (Duke, 1985, Parmar *et al.*, 1997). Investigações químicas realizadas nos óleos essenciais deste gênero de planta têm mostrado a presença de monoterpenos, sesquiterpenos (Sengupta, Ray 1987, Green *et al.*, 1999), fenilpropanóides, além de outras substâncias (Maxwell, Rampersad, 1989, Moreira *et al.*, 2001). Tem sido frequente o isolamento e a caracterização química dos fenilpropanóides, classe química representada pelas seguintes substâncias: apiol, miristicina, eugenol, safrol, e dilapiol (Diaz *et al.*, 1986, Bernard *et al.*, 1995, Fazolin *et al.*, 2005).

O grande interesse pelos fenilpropanóides é devido às interessantes propriedades biológicas por ele apresentadas, incluindo atividades psicotrópica, antimicrobiana, antioxidante e citotóxicas (Shulgin, 1966, Masuda *et al.*, 1991, Atsumi *et al.*, 2000, Lago *et al.*, 2004, Lago *et al.*, 2005). Atualmente, a *Piper hispidinervum*, vulgarmente conhecida como pimenta longa, é rica em safrol (FIGURA 6), fenilpropanóide, que é empregado como matéria-prima na manufatura de heliotropina, importante fixador de fragrâncias, e butóxido de piperonila, agente sinérgico de inseticidas naturais (Fazolin *et al.*, 2007). Estudos de Barreiro, Fraga (1999) e, Costa (2000), sobre a reatividade química do safrol e a obtenção de análogos sintéticos, mostraram grande variabilidade sintética e ótimas oportunidades para derivatização do mesmo.

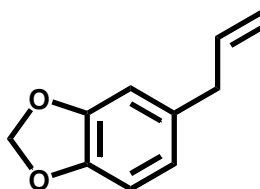


FIGURA 6 – Estrutura química do safrol

A espécie *Piper aduncum* ocorre naturalmente em várias regiões do mundo e tem ampla distribuição no Brasil (Gaia *et al.*, 2004). Conhecida vulgarmente como pimenta-de-macaco, produz óleo essencial com grande potencial de exploração, uma vez que possui comprovada ação sobre fitopatógenos de culturas tradicionais, como fungos (Bastos, 1997), bactérias e moluscos (Orjala *et al.*, 1994), além de ação analgésica e anti-inflamatória com baixos níveis de toxicidade (Okunade *et al.*, 1997; Monteiro *et al.*, 2001). Dentre as diversas piperáceas presentes no mundo, a *Piper aduncum*, é uma excelente produtora de óleo essencial, a qual possui alto teor da substância, dilapiol (FIGURA 7) (Ciccio, Ballesterro, 1997, Maia *et al.*, 1998).

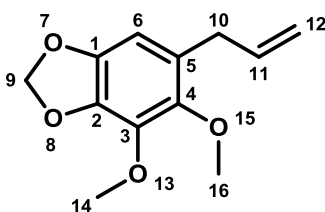


FIGURA 7 – Estrutura química do dilapiol

O dilapiol, estrutura bastante semelhante ao safrol, é uma monolignana cuja estrutura chave é o anel benzênico fundido à unidade 1,2-metilenodioxílica. A presença desta unidade introduz neste alil-benzeno natural uma reatividade química particular. Comparando-se a reatividade de derivados do piperonal à de outros aldeídos relacionados, que possuam, ao invés da função metilenodioxila, éteres catecólicos, pôde-se observar um comportamento químico particularmente distinto (Barreiro, Fraga, 1999).

A unidade metilenodioxila, presente no *dilapiol*, pode ser identificada em diversas substâncias de interesse terapêutico como a podofilotoxina, o etoposídeo, a paroxetina e em diversos outros compostos (FIGURA 8). Uma característica relevante é que, quando presente, a unidade 1,3-benzodioxólica assegura às moléculas bioativas, adequado caráter lipofílico, facilitando seu trânsito na biofase, e ao mesmo tempo caráter acceptor de ligações de hidrogênio, útil na interação com eventuais biorreceptores (Barreiro, Fraga, 1999):

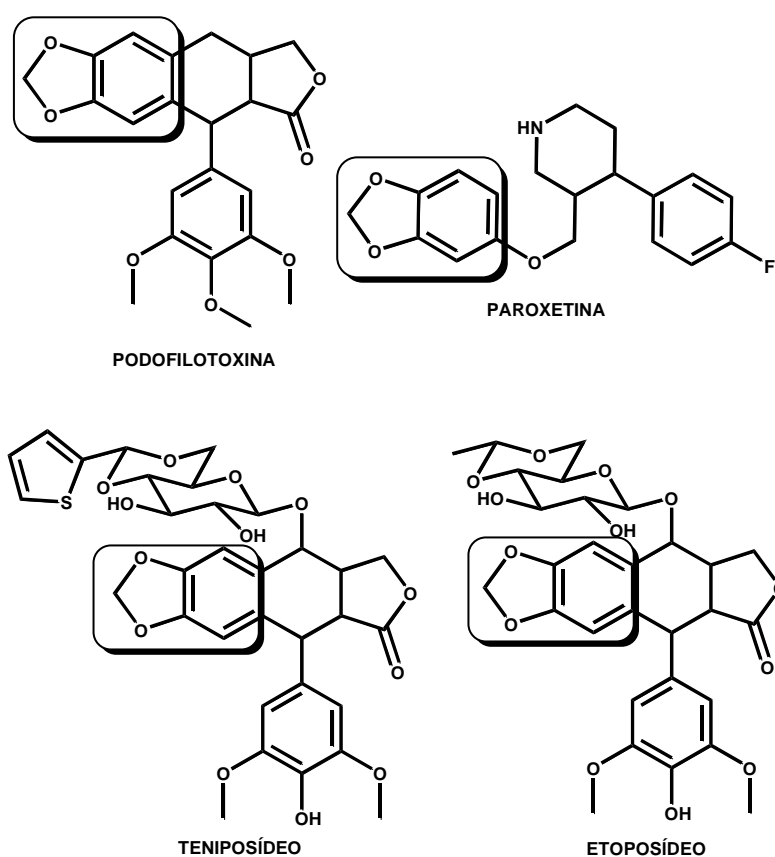


FIGURA 8 – Estruturas de várias substâncias de interesse terapêutico que possuem a unidade 1,3-benzodioxólica.

Poucos estudos acerca da obtenção de análogos e também sobre as possíveis atividades terapêuticas do dilapiol são relatados na literatura (Belzile *et al.*, 2000; Majerus *et al.*, 2000). Por ser um produto natural, de extração acessível, de estrutura relativamente simples e com reatividade satisfatória, o dilapiol permite que sua manipulação sintética e sua avaliação biológica sejam planejadas, elaboradas e realizadas facilmente. A utilização deste produto natural como protótipo para a síntese de análogos de atividade potencialmente superior, é tema bastante atrativo e de grande importância científica, o que justifica plenamente o presente projeto.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 MATERIAL

3.1.1 Produtos Farmacêuticos

- Oxamniquina grau farmacêutico (Pfizer);
- Cremophor® EL (BASF).

3.1.2 Reagentes e Solventes

• *Reagentes*

- Ácido clorídrico (Merck);
- Boroidreto de sódio (Merck);
- Carbonato de Potássio (Merck);
- Cloreto de sódio (Quimex);
- Cloreto de Amônio (Quimex);
- Cloreto de Níquel hexa-hidratado (Merck);
- Hidróxido de amônio (Merck);
- Hidróxido de sódio (Synth);
- Hidróxido de potássio (Merck);
- Iodeto de metila (Merck);
- Óleo de safrol;
- Óleo de eugenol;
- Permanganato de potássio (Quimex);
- Sulfato de Sódio anidro (Merck).

• *Solventes*

- Acetona P.A. (Merck);
- Acetonitrila P.A. (Synth);
- Ácido acético glacial (Quimex);
- Ácido clorídrico (Synth);
- Ácido nítrico (Sigma-Aldrich);
- Ácido sulfúrico (Sigma-Aldrich);

- Álcool etílico absoluto (Synth);
- Álcool metílico P.A. (Merck);
- Anidrido acético P.A. (Synth);
- Butanol P.A. (Merck);
- Clorofórmio P.A. (Merck);
- Diclorometano P.A. (Merck);
- Éter etílico P.A. (Merck);
- Hexano P.A. (Sigma-Aldrich);
- Solução de Ringer;
- Tetraidrofurano (Merck);

3.1.3 Vidrarias e materiais

- Argola com mufa;
- Agulhas e seringas para gavagem;
- Balão de fundo redondo 100 ml;
- Balão de fundo redondo 25 ml;
- Balão de fundo redondo 250 ml;
- Balão de fundo redondo 50 ml;
- Balão Volumétrico 100 mL
- Barra magnética;
- Bastão de vidro;
- Bequer 100 ml;
- Bequer 150 ml;
- Bequer 250 ml;
- Bequer 30 ml;
- Bequer 50 ml;
- Coluna cromatográfica;
- Condensador “*cold finger*”;
- Condensador de refluxo;
- Dessecador plástico;
- Erlenmeyer 125 mL;
- Espátula aço;
- Funil simples;
- Funil de separação 250 mL;

- Garras;
- Mangueira de silicone;
- Pinças
- Pipeta graduada;
- Pipeta pasteur 1 mL;
- Pipetador de borracha três vias;
- Pisseta 500 ml;
- Placa com cavidade 130x100x6mm;
- Placa de Petri
- Proveta 10 ml;
- Proveta 100 ml;
- Proveta 25 ml;
- Suporte universal;
- Termômetro -10 a 360°C;
- Tesoura cirúrgica;
- Trompa de vácuo para água;
- Tubo capilar;
- Tubo secante;
- Vidro de relógio.

3.1.4 Materiais Biológicos

- Camundongos “Swiss”;
- *Schistosoma mansoni*, cepa BH.

3.1.5 Equipamentos

- Agitador Magnético com aquecimento (IKA - CMAG HS4);
- Bomba de alto vácuo (Edwards – Modelo E2M5);
- Câmara Escura com Luz Ultravioleta (254 nm) – Fabricação própria;
- Câmara de gás carbônico (CO₂);
- Estufa de secagem (Quimis – Modelo Q317B);
- Microscópio binocular (Nikon – Modelo E20);
- Kulgerorf (Forninho de destilação);

- Plataforma Ajustável tipo “JACK” (FISATOM – Modelo 453-2).

3.2 MÉTODO

3.2.1 Métodos Extrativos

3.2.1.1 Extração do Dilapiol de *Piper aduncum*

As folhas de *Piper aduncum* foram coletadas em março de 2010 e junho de 2010, no Município de Campos do Jordão, São Paulo, Brasil. A identificação foi realizada no laboratório de Botânica da Universidade Presbiteriana Mackenzie (UPM). A extração e o isolamento do dilapiol foram realizados segundo procedimento elaborado por Lago *et al.*, (2006), no Laboratório de Pesquisa, da Universidade Presbiteriana Mackenzie. O material vegetal coletado foi submetido à extração dos componentes voláteis através de procedimento de hidrodestilação, em aparelho de *Clevenger* modificado. O óleo volátil bruto foi extraído com diclorometano, seco com Na₂SO₄ anidro, filtrado e mantido em freezer (-15 °C), em frasco de vidro âmbar.

3.2.1.1.1 Purificação do Dilapiol

O óleo essencial foi submetido à purificação em coluna cromatográfica para a retirada de outras substâncias contidas na amostra. A coluna cromatográfica foi empacotada, utilizando sílica gel 60 como fase estacionária e hexano:diclorometano (7:3) como sistema eluente. A amostra foi eluída com o mesmo sistema solvente, recolhendo-se 20 frascos. Aqueles que apresentavam apenas dilapiol foram agrupados, misturados e mantidos em freezer, a -15 °C. A amostra pura foi utilizada para todas as reações.

3.2.2 Métodos Sintéticos

De acordo com os objetivos do projeto foram propostos análogos naturais, sintéticos e semi-sintéticos do dilapiol. Na FIGURA 9 está representado o esquema geral de síntese das principais substâncias almeçadas e/ou obtidas neste trabalho. Cabe ressaltar que alguns dos análogos aqui sintetizados não seguiram os objetivos propostos. As alterações relacionadas aos objetivos estão amplamente discutidas em tempo oportuno.

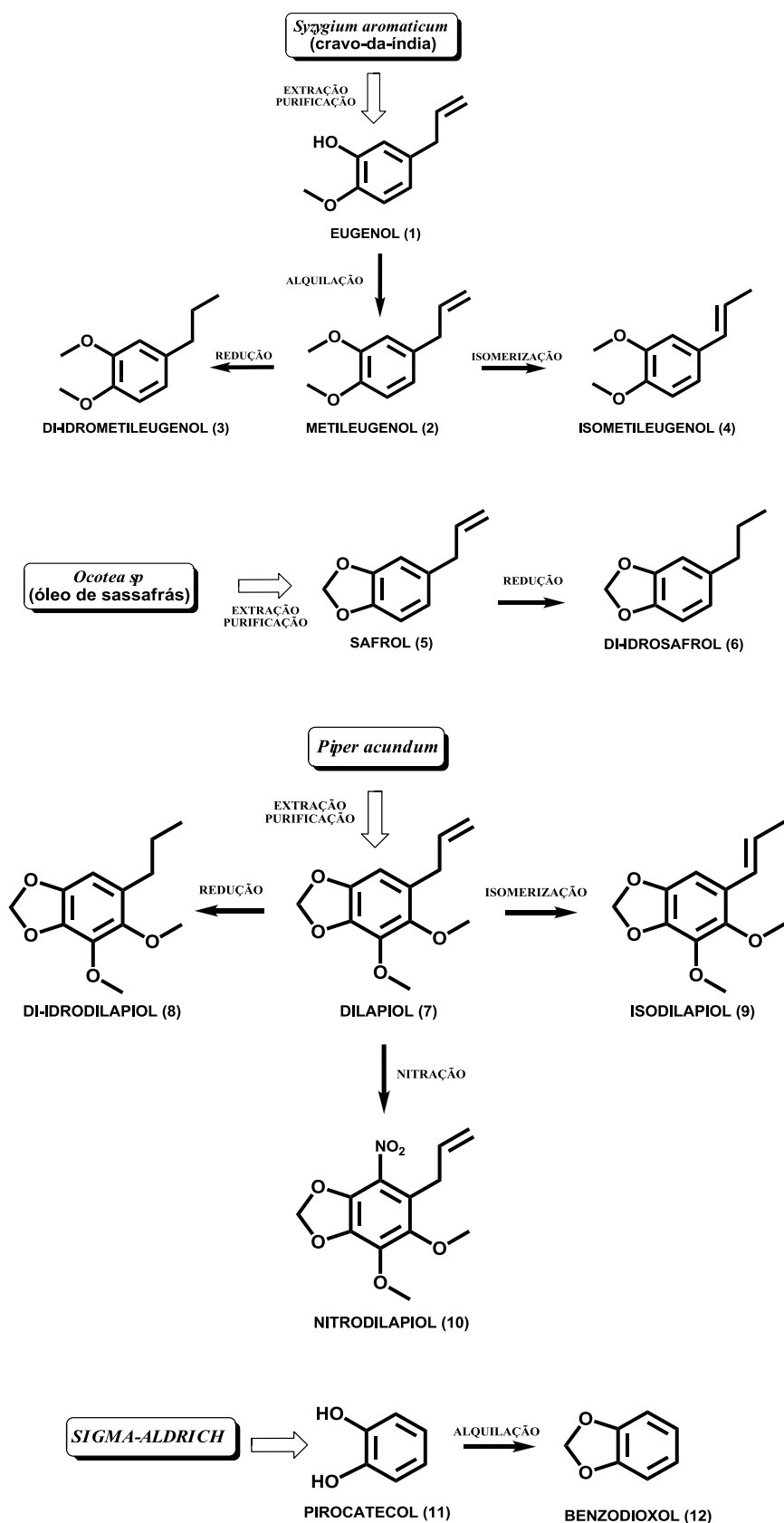
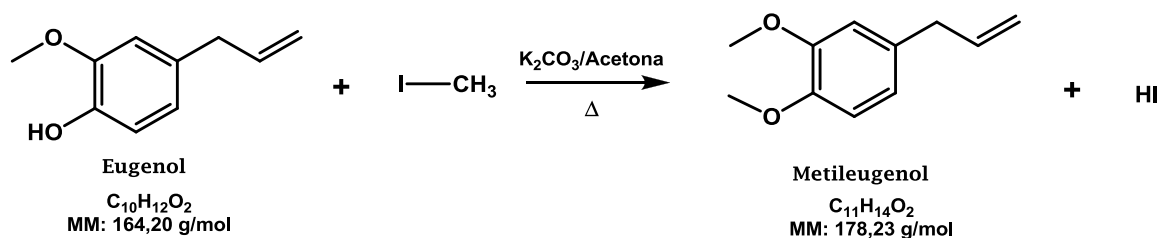


FIGURA 9 – Esquema de obtenção dos principais análogos estruturais do dilapiol.

3.2.2.1 Eugenol (1)

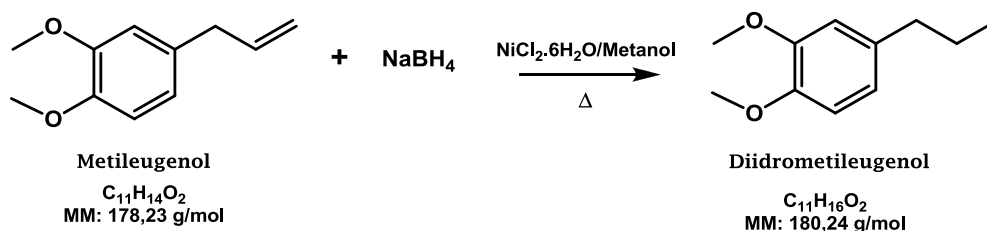
O óleo de eugenol foi gentilmente cedido pelos professores Dr. Carlos Alberto Brandt e Dr. Jorge Massuo Kato, ambos representantes do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Para o projeto foram disponibilizados 200 mL de óleo. Após purificação por destilação, o eugenol foi utilizado para as reações propostas.

3.2.2.1.1 Metilação do Eugenol (Análogo 2 - Metileugenol)



Em balão de fundo redondo de 100 mL, munido de condensador de refluxo e tubo secante, foram dissolvidos 5,0 g de óleo de eugenol (30,5 mmol), 8,4 g de K_2CO_3 (61 mmol) e 2,28 mL (equivalente a 5,2 g ou 36,5 mmol) de Iodeto de Metila, em 75 mL de acetona. A mistura foi deixada em refluxo e sob agitação constante durante 24 horas. Após resfriamento, o produto obtido foi diluído em 20 mL clorofórmio, causando precipitação de sólido branco no fundo do balão. Adicionou-se então 20 mL de água destilada, fazendo com o sólido branco formado se solubilizasse nesta. A solução foi então lavada com 40 mL de solução de NaOH a 5% e 10 mL de solução saturada de NaCl. Após a lavagem, as fases orgânica e aquosa foram separadas em funil de separação de 250 mL e secou-se a orgânica com sulfato de sódio anidro. A solução foi filtrada e o solvente retirado com auxílio de rota-evaporador. O produto final foi analisado por CG-MS e RMN de 1H e ^{13}C .

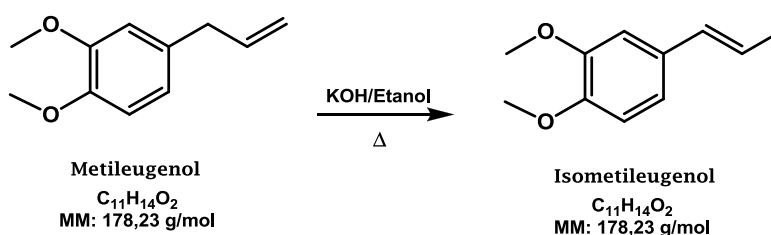
3.2.2.1.2 Redução do Metileugenol (Análogo 3 – Di-idrometileugenol)



Em um balão de fundo redondo de 100 mL, munido de condensador de refluxo e tubo secante foram dissolvidos 0,36 g de eugenol metilado (2 mmol), 0,16 g de NaBH₄ (40 mmol) e 0,24 g de NiCl₂.6H₂O (3 mmol) em 40 mL de metanol (Narisada *et al.*, 1989). A mistura foi deixada em refluxo por 24 horas a 70 °C, em banho de silicone e agitação constante. Após resfriamento, o produto foi filtrado por três vezes e o solvente retirado com auxílio de rota-evaporador. O produto final obtido foi então parcialmente dissolvido em clorofórmio deuterado e filtrado em algodão diretamente para o tubo de RMN, para que fosse enviado para a análise de ¹H e ¹³C. Reservou-se uma segunda parte para análise por CG-MS.

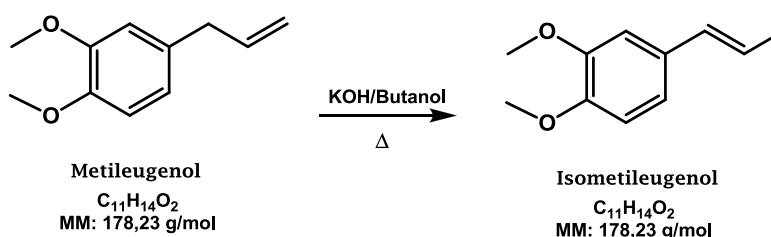
3.2.2.1.3 Isomerização do Metileugenol (Análogo 4 - Isometileugenol)

a) Isomerização com Etanol



Em um balão de fundo redondo de 25 mL, munido de condensador de refluxo e tubo secante, foram dissolvidos 1,78 g do metileugenol (10 mmol) em uma solução a 17% de hidróxido de potássio em etanol, de modo que fossem adicionados 25 mmol de KOH (1,40 g). A reação foi deixada em refluxo por 24 horas, com agitação constante. Após o resfriamento a mistura foi diluída com 30 mL de água destilada e então extraída em funil de separação com 12 mL de éter etílico, por quatro vezes. Secou-se a fase etérea com Na₂SO₄ anidro. Após filtração da fase orgânica, o excesso de éter etílico foi evaporado em rota-evaporador. O produto obtido foi então analisado por CG-MS e RMN de ¹H e ¹³C.

b) Isomerização com Butanol

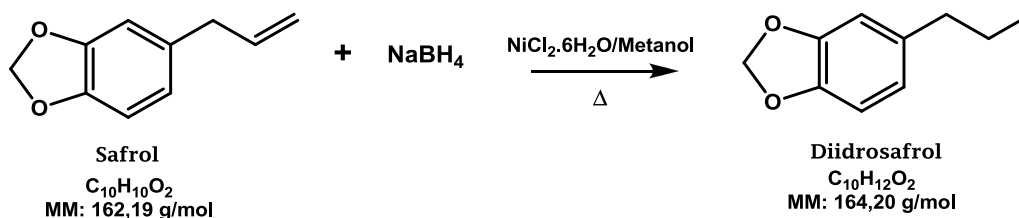


Em um balão de fundo redondo de 25 mL, munido de condensador de refluxo e tubo secante, foram dissolvidos 0,75 g do metileugenol (4,20 mmol) em uma solução feita a partir de (0,84g) de hidróxido de potássio em 5 mL de butanol (Lima *et al.*, 2000). A reação foi deixada em refluxo por 24 horas com agitação constante. Após o resfriamento a mistura foi lavada com 0,6 mL de HCl concentrado e 4 mL de água destilada gelada para neutralização. A fase orgânica foi lavada com três porções de 20 mL de água e as fases foram então separadas em funil de separação. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro, o excesso de butanol evaporado em rota-evaporador e então destilado com pressão reduzida. O produto obtido foi analisado por CG-MS e RMN de ¹H e ¹³C.

3.2.2.2 Safrol (5)

O óleo de safrol foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Jorge Massuo Kato do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Para o projeto foram disponibilizados cerca de 150 mL de óleo. Após purificação por destilação, o safrol foi utilizado para as reações propostas.

3.2.2.2.1 Redução do Safrol (Análogo 6 – Di-idrosafrol)



Em um balão de fundo redondo de 100 mL, munido de condensador de refluxo e tubo secante foram dissolvidos safrol, NaBH₄, NiCl₂.6H₂O (3 mmol) em metanol, segundo TABELA I (Narisada *et al.*, 1989). A mistura foi deixada sob refluxo e em agitação constante por 24 horas. Após resfriamento, o produto foi “exaustivamente” filtrado e o solvente removido em rota-evaporador. O produto final foi encaminhado para realização de RMN de ¹H e ¹³C e CG-MS. Nas reações 2 e 3, o produto final foi ainda extraído com diclorometano.

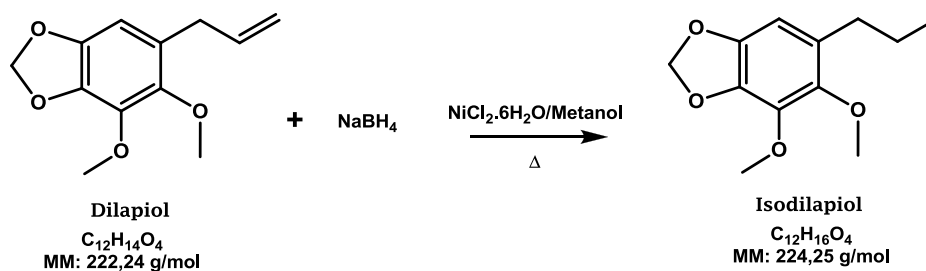
TABELA I – Condições reacionais para a redução do safrol.

SUBSTÂNCIAS	REAÇÃO 1	REAÇÃO 2	REAÇÃO 3
Safrol	2 mmol (0,33 g)	2 mmol (0,33 g)	2 mmol (0,33 g)
NaBH ₄	40 mmol (0,16 g)	40 mmol (0,16 g)	20 mmol (0,08 g)
NiCl ₂ .6H ₂ O	3 mmol (0,24 g)	3 mmol (0,24 g)	1,5 mmol (0,12 g)
Extração com DCM	----	5,0 mL	5,0 mL

3.2.2.3 Dilapiol (7)

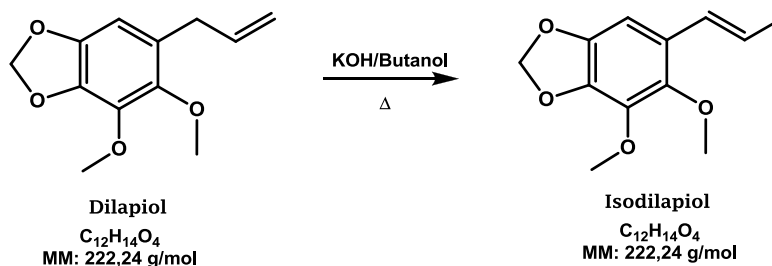
O dilapiol foi extraído das folhas de *Piper aduncum* conforme metodologia descrita por Lago *et al.*, 2006.

3.2.2.3.1 Redução do Dilapiol (Análogo 8 – Di-idrodilapiol)



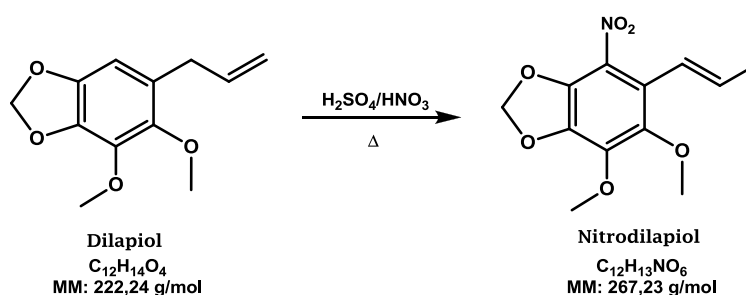
Em um balão de fundo redondo de 100 mL, munido de condensador de refluxo e tubo secante foram dissolvidos 0,44 g de dilapiol (2 mmol), 0,08 g de NaBH₄ (20 mmol) e 0,12 g de NiCl₂.6H₂O (1,5 mmol) em 40 mL de metanol. A mistura foi mantida em agitação constante, sob refluxo por 24 horas. Ao término da reação, a mistura foi filtrada por 5 vezes e o solvente removido em rota-evaporador. O sólido obtido foi lavado com 5 mL de DCM, procedeu-se a filtração da suspensão e a solução filtrada foi submetida ao rota-evaporador para remoção do solvente. O produto final foi encaminhado para análises de RMN de ¹H e ¹³C e CG-MS.

3.2.2.3.2 Isomerização do dilapiol (Análogo 9 - Isodilapiol)



Em um balão de fundo redondo de 25 mL, munido de condensador de refluxo e tubo secante, foram dissolvidos 0,5 g de dilapiol (2,25 mmol) em uma solução 17% de hidróxido de potássio (0,85 g) em n-butanol (5 mL). A reação foi mantida sob refluxo e agitação constante por 24 horas. Ao término da reação, a mistura foi resfriada e neutralizada com 0,15 mL de HCl concentrado e 1,0 mL de água destilada. A mistura foi submetida à extração com três porções de 10 mL de éter etílico e a fase orgânica foi recolhida e lavada com quatro porções de 30 mL de água destilada. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro, o solvente foi removido em rota-evaporador e o excesso de butanol retirado em forno de destilação (Lima *et al.*, 2000). O produto final foi então analisado por RMN de ¹H e ¹³C e CG-MS.

3.2.2.3.3 Nitração do dilapiol (Análogo 10 - Nitrodilapiol)



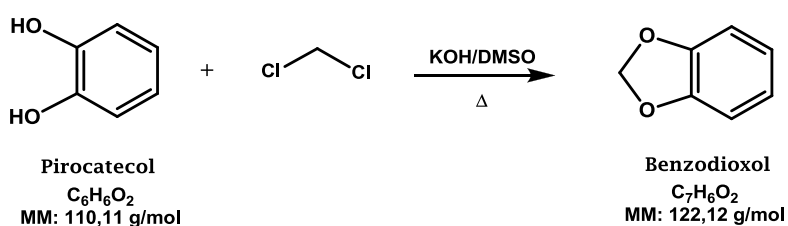
Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 0,2222 g (1 mmol) de dilapiol. O balão foi resfriado em banho de gelo. A este balão foram adicionados 10 mmol de H₂SO₄ concentrado, seguido da adição cuidadosa de 5 mmol de HNO₃ concentrado. A mistura reacional foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 24 h. Água (15 mL) foi adicionada e a mistura resfriada em banho de gelo. Bicarbonato de sódio sólido foi adicionado à mistura até que a fase aquosa alcançasse pH 8. A mistura foi transferida para um funil de separação e a fase aquosa foi extraída com três porções de 15 mL

acetato de etila. A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e o solvente foi removido em rota-evaporador. O produto final foi então analisado por RMN ^1H .

3.2.2.4 Benzodioxol (12)

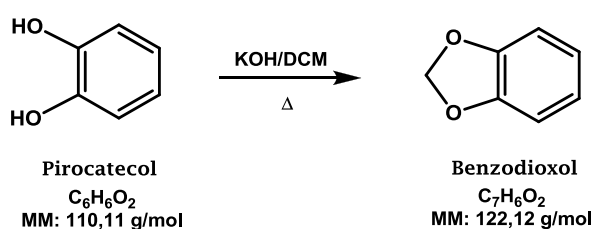
3.2.2.4.1 Proteção do pirocatecol (11) (Análogo 11 – 1,3-benzodioxol)

a) Solubilização em DMSO



Em um balão de fundo redondo de 250 mL foram adicionados 1 mmol de pirocatecol, 1 mmol de diclorometano e 100 mL de DMSO. Após total solubilização do pirocatecol, foram adicionados 2 mmol de KOH. A solução foi mantida sob refluxo, a 140°C por duas horas. A reação foi acompanhada por CCD (Bonthron, Cornforth, 1969; Bashall, Collins, 1975). Para a remoção do DMSO do meio e purificar o produto obtido, foi realizada uma destilação fracionada. O produto foi submetido à análise por RMN ^1H .

b) Solubilização em DCM



Em um balão de fundo redondo de 250 mL foram adicionados 1 mmol de pirocatecol e 20 mmol de hidróxido de potássio em 100 mL de diclorometano. Solubilizou-se primeiramente o pirocatecol em diclorometano e posteriormente adicionou-se o hidróxido de potássio. A solução foi mantida sob refluxo a 140°C por duas horas. A reação foi acompanhada por CCD. Ao término da reação, a mistura foi rotaevaporada e o produto final foi analisado por RMN ^1H .

3.2.3 Métodos Analíticos

3.2.3.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

O acompanhamento das reações foi realizado por CCD, utilizando cromatofolhas de alumínio cobertas com sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck). A revelação das placas foi feita por lâmpada de ultravioleta (UV) e iodo.

3.2.3.2 Cromatografia em coluna (CC)

Foram utilizadas colunas de vidro e sílica gel 60 (Merck) para a separação e purificação dos produtos obtidos.

3.2.3.3 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa (CG-MS)

As análises de cromatografia gasosa e espectrometria de massas foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

3.2.3.4 Ressonância Magnética Nuclear ¹H e ¹³C

As análises espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C foram realizadas utilizando os aparelhos INOVA 300 e BRUKER 300 na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

3.2.4 Métodos Biológicos

3.2.4.1 Atividade Esquistossomicida *in vivo*

Os ensaios de atividade biológica foram realizados no Laboratório de Parasitologia, Setor de Esquistossomose do Instituto Adolfo Lutz por alunos de Iniciação Científica da Universidade Presbiteriana Mackenzie, sob a orientação e colaboração do Prof. Dr. Pedro Luiz Silva Pinto. Todos os procedimentos éticos foram seguidos conforme a determinação

do comitê de ética em pesquisa animal da Universidade Presbiteriana Mackenzie e do Instituto Adolfo Lutz.

Os ensaios de atividade biológica seguiram a sistemática:

3.2.4.1.1 Infecção dos animais

Foram utilizados camundongos “SWISS”, machos pesando entre 37 e 40 gramas, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (IAL-SP). Os animais foram infectados por via subcutânea, cada qual com 50 cercárias de *Schistosoma mansoni*, cepa BH, mantida no Setor de Esquistosomose do IAL-SP. Para confirmação da infecção, as fezes dos roedores foram examinadas, individualmente, através do método direto, para a pesquisa de ovos de *Schistosoma mansoni*, a partir do 45º dia após a inoculação (o 45º dia representa o período em que os ovos maduros são encontrados nas fezes, ponto final do ciclo no hospedeiro definitivo). Somente os animais que apresentaram ovos nas fezes foram utilizados nos experimentos posteriores.

3.2.4.1.2 Administração dos fármacos e esquemas posológicos

Os camundongos infectados e selecionados na fase anterior foram distribuídos em grupos de 5 animais e, a seguir, submetidos aos esquemas posológicos com as substâncias naturais, sintéticas e semi-sintéticas. Solução 15% de Cremophor® em água foi utilizada como veículo de administração. Cada composto foi dissolvido/suspendido na solução do veículo e administrado por via oral, em esquema dose única (0,3 mL), através de sonda gástrica.

A administração das substâncias e a sequência de dose empregada foram planejadas mediante as etapas que se apresentam:

ETAPA I: Verificação da atividade esquistossomicida do dilapiol utilizando-se diferentes doses.

Procedimento: Utilizando o peso médio de cinco animais, foram preparados 10 mL de uma solução contendo 50 mg/kg de DILAPIOL em Cremophor® EL a 15%. O mesmo procedimento foi realizado para as concentrações de 100 mg/kg, 200 mg/kg, 400 mg/kg e 800 mg/kg, totalizando 5 grupos de 5 animais.

Como grupos controle foram planejados os seguintes itens:

Grupo Controle Positivo: 5 animais infectados e não tratados;

Grupo Controle Negativo: 5 animais infectados que receberam somente o veículo (Solução aquosa 15% de Cremophor EL[®]);

Grupo Controle Tratado: 5 animais infectados que receberam oxamniquina (100mg/kg) suspensa em solução aquosa 15 % de Cremophor EL[®];

ETAPA II: *Verificação da atividade esquistossomicida dos análogos naturais, sintéticos e semi-sintéticos do dilapiol.*

Procedimento: Utilizando o peso médio de cinco animais, foram preparados 10 mL de uma solução contendo 400 mg/kg de ANÁLOGO, em Cremophor[®] EL a 15%. O mesmo procedimento foi empregado para todos os análogos naturais, sintéticos e semi-sintéticos do dilapiol, totalizando 10 grupos de 5 animais.

Da mesma forma que na etapa anterior (ETAPA I), como grupos controle foram planejados os seguintes itens:

Grupo Controle Positivo: 5 animais infectados e não tratados;

Grupo Controle Negativo: 5 animais infectados que receberam somente o veículo (Solução aquosa 15% de Cremophor EL[®]);

Grupo Controle Tratado: 5 animais infectados que receberam oxamniquina (100mg/kg) suspensa em solução aquosa 15 % de Cremophor EL[®];

3.2.4.1.3 Avaliação da eficácia das substâncias

Os animais foram sacrificados por asfixia em cuba de gás carbônico (CO₂) após 10 dias de tratamento. O método de perfusão das veias porta e mesentéricas foi empregado para quantificar os vermes adultos. Para cada animal, dois fragmentos delgados do intestino (cerca de 1 cm) foram removidos para verificação do número de ovos e do estágio de desenvolvimento (método do oograma quantitativo) (Pellegrino, Siqueira, 1956; Pellegrino, Faria, 1965).

3.2.4.1.4 Análise Estatística

Os resultados dos experimentos foram expressos como média \pm erro padrão da média e analisados, empregando-se análise de variância (ANOVA), seguido do teste “t” de Student, tomando-se o valor de $p < 0,05$ como nível de significância estatística (Sokal, Rohlf, 1981).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho teve início com a coleta das espécimes de *Piper aduncum* na cidade de Campos do Jordão – SP. Após aventurarem-se por trilhas ecológicas dentro da colônia de férias da Universidade Presbiteriana Mackenzie, os integrantes do grupo, com auxílio da Profa. Dra. Fátima Maria Motter Magri, encontraram o vegetal almejado. As plantas foram coletadas, acondicionadas em embalagem propícia e enviadas para o Laboratório de Ciências Farmacêuticas (CF1) do prédio Amantino Vassão da Universidade Presbiteriana Mackenzie. Neste laboratório foram realizadas as lavagens da planta e posterior extração por arraste a vapor. O trabalho de lavagem e extração contou com a presença de todos os alunos bolsistas e de alguns professores pesquisadores. Ao término da primeira parte das extrações conseguiu-se obter cerca de 3 g de óleo essencial. Este foi enviado à Central Analítica da Universidade de São Paulo a fim de comprovar sua composição. Verificou-se, por CG-MS (Anexo C) que havia a presença de um componente majoritário que, segundo a literatura, poderia ser o dilapiol. Ao realizar RMN ^1H pôde-se corroborar os resultados, comprovando a presença de 88,61% de dilapiol. O óleo essencial foi submetido à purificação por coluna cromatográfica e resultou em 76% de rendimento. Novas extrações foram sendo realizadas a fim de aumentar a quantidade de óleo essencial, anteriormente obtida. Para tanto, uma nova excursão foi organizada a fim de coletar novos espécimes.

Paralelamente aos processos extrativos, iniciaram-se estudos reacionais para o safrol e eugenol, substâncias análogas ao dilapiol. O safrol e eugenol foram doados em quantidade satisfatória pelo Prof. Dr. Jorge Massuo Kato, da Universidade de São Paulo. Ambos óleos essenciais foram purificados por destilação. Os estudos com estas substâncias tiveram como objetivo inicial elaborar metodologias de síntese que pudessem ser aplicadas eficientemente ao dilapiol. O fato de que processos extrativos resultam, geralmente, em pequenas quantidades de óleo essencial, incentivou os pesquisadores a iniciarem os estudos sintéticos por substâncias que estavam prontamente disponíveis e em grande quantidade, situação ainda não observada para o dilapiol. Cabe ressaltar que o objetivo inicial do trabalho não mencionava a utilização de eugenol para obtenção de análogos, porém houve a necessidade de utilizá-lo também como substância padrão para desenvolver e testar as novas metodologias sintéticas.

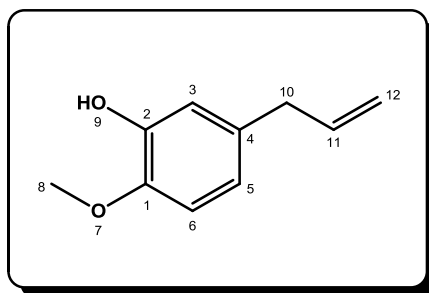
As metodologias sintéticas elaboradas para a obtenção de análogos do safrol e do eugenol foram eficazmente comprovadas e puderam ser suficientemente aplicadas ao dilapiol. Neste sentido, também foram obtidos alguns análogos do dilapiol, fato que posteriormente permitiu a elucidação da relação entre a estrutura química e a atividade esquistossomicida para o composto em questão.

A seguir estão apresentadas as discussões dos resultados obtidos com as sínteses e semi-sínteses de análogos do safrol, eugenol e dilapiol. Torna-se importante salientar que foram feitas análises também para os materiais de partida, simplesmente, como fator de comparação.

4.1 Caracterizações das substâncias de partida

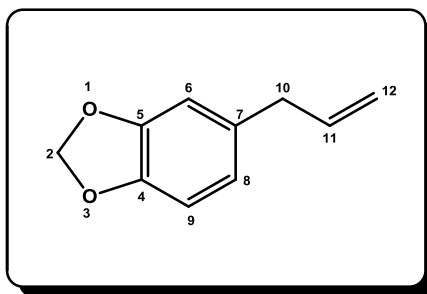
Todas as substâncias de partida foram analisadas por CG-MS e Ressonância Magnética Nuclear ^1H e ^{13}C . Os cromatogramas e espectros estão em anexo e são a seguir discutidos. Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos a fim de servirem como padrão comparativo para os análogos sintetizados.

4.1.1 Eugenol (1)



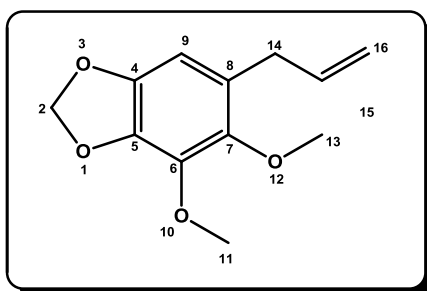
Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , juntamente com os cromatogramas de CG-MS encontram-se no ANEXO A. Para a cromatografia gasosa obtiveram-se dois principais picos, sendo que o maior, o de nº 1, representa 99,91% do total do produto utilizado, mostrando a alta pureza do óleo empregado nas sínteses. Segundo o espectro de RMN ^1H foi possível observar sinais característicos do eugenol, como a metila em 3,83 ppm, os prótons olefínicos em 4,98-5,0 ppm e os prótons aromáticos em 6,70 ppm. O espectro de RMN ^{13}C , revela todos os sinais característicos dos dez carbonos do eugenol.

4.1.2 Safrol (5)



Os cromatogramas de CG-MS e os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto encontram-se no ANEXO B. A partir da CG-MS pode-se verificar que o pico mais intenso é o eugenol e que este representa cerca 99,69% do óleo utilizado. Este resultado também sugere alta pureza para a realização das reações propostas. O espectro de RMN ^1H revela o sinal referente ao próton (H-2) em 5,88 ppm e os prótons olefínicos (H-11 e H-12) em 5,01-5,09 ppm e em 5,84-5,98 ppm, respectivamente. O espectro de RMN ^{13}C revela todos os sinais característicos dos carbonos presentes na molécula do safrol. Cabe ressaltar a presença do carbono C2 em 101,09 ppm, fato que mostra a diferença de deslocamento químico entre este carbono e o carbono metílico do eugenol.

4.1.3 Dilapiol (10)

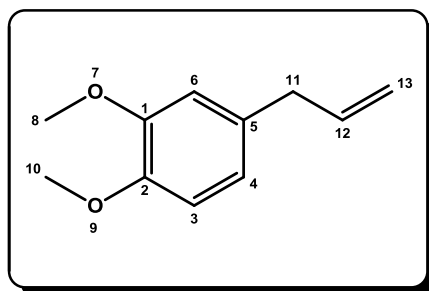


Os cromatogramas de CG-MS e os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto se encontram no ANEXO C. O óleo extraído da *Piper aduncum*, apresentou 88,61% de dilapiol, dado obtido a partir da CG-MS. Este resultado sugere uma alta quantidade de dilapiol no extrato bruto, que embora pudesse ser utilizado diretamente nas sínteses, foi decidido que a purificação do mesmo seria interessante. Para tanto, procedeu-se a purificação por coluna utilizando hexano:diclorometano (7:3) como fase móvel. O dilapiol também foi identificado e caracterizado por ressonância magnética nuclear. O espectro de RMN ^1H mostra sinais bastante semelhantes com aqueles do safrol, porém houve o desaparecimento dos prótons aromáticos e, ao mesmo tempo, surgiram novas metilas em 3,75 ppm e 4,00 ppm. O espectro de RMN ^{13}C revela doze sinais característicos do dilapiol, com especial atenção para os sinais em 60,3 ppm e 60,8 ppm referentes às metilas C13 e C14.

4.2 Análogos

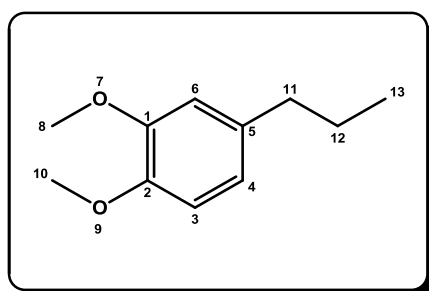
A seguir estão apresentadas as discussões referentes às modificações realizadas nas substâncias de partida.

4.2.1 Metileugenol (2)



Os cromatogramas de CG-MS e os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do metileugenol encontram-se no ANEXO D. A confirmação da obtenção do composto desejado foi possível pelas análises comparativas de seus espectros de RMN de ^1H e ^{13}C com aqueles para o eugenol. Para tanto, verificou-se que o sinal do próton H-9 referente à hidroxila fenólica do eugenol desapareceu. Este fato é corroborado pelo aparecimento de um sinal intenso em 3,85 ppm, sinal inexistente anteriormente. Também pela introdução da metila à molécula, verificou-se no espectro de RMN de ^{13}C a presença de um sinal referente ao carbono desse grupo, em 146,91 ppm, o qual não era observado anteriormente à alquilação. O rendimento da reação foi de 96,81%, fato que ajuda a corroborar a eficiência da reação.

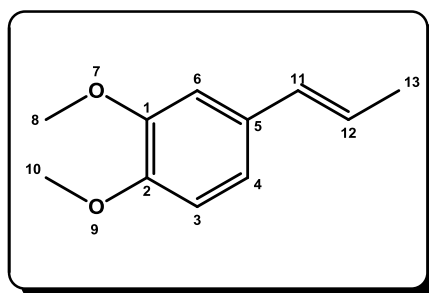
4.2.2 Di-idrometileugenol (3)



Não foi possível realizar os cromatogramas e espectros de ressonância para o di-idrometileugenol, pois ao ser enviado para análise, o tubo de ressonância estava

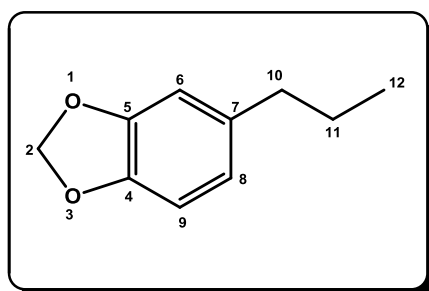
trincado e o produto foi perdido. Em tempo oportuno, outra reação será realizada e novos dados espectroscópicos podem ser adquiridos. Cabe ressaltar que a reação de redução é bastante eficaz e que a hidrogenação catalítica do metileugenol processaria-se sem dificuldades. Este fato pode ser corroborado pela obtenção dos análogos reduzidos 6 (di-idrosafrol) e 8 (di-idrodilapiol).

4.2.3 Isometileugenol (4)



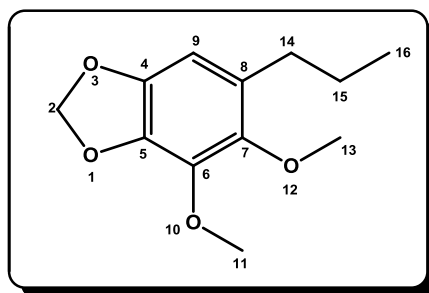
Os cromatogramas de CG-MS e os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do isometileugenol encontram-se no ANEXO E. Observando os espectros de RMN de ^1H , o metileugenol apresenta a dupla ligação do grupo alil entre as posições 12 e 13, representado por multipletos em 5,88-5,94 ppm e 5,02-5,11 ppm, respectivamente. O isometileugenol, confirmando o sucesso da reação, apresentou os sinais da dupla ligação na posição 11, referente a um duplete em 6,29-6,37 ppm, e na posição 12, com multiplete em 6,02-6,14 ppm. Os prótons da posição 13 se tornaram então mais protegidos, fazendo com o sinal se tornasse um duplo-duplete e caindo para 1,84-1,91 ppm. O espectro de RMN de ^{13}C demonstra a obtenção do produto ao verificar-se que o carbono na posição 11 se torna mais desprotegido, tendo seu sinal movido de 55,12 ppm para 130,65 ppm. A síntese obteve 73,66% de rendimento.

4.2.4 Di-idrosafrol (6)



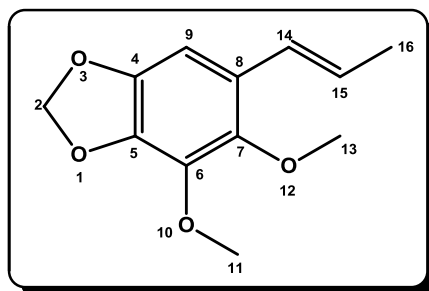
Os cromatogramas de CG-MS e os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do di-idrosafrol encontram-se no ANEXO F. Os sinais dos hidrogênios 10, 11 e 12 referentes ao grupo alil são, respectivamente, duplete em 3,27 ppm, multiplete em 5,84-5,98 ppm, multiplete em 5,01 a 5,09 ppm. Após a redução por NaBH_4 com NiCl_2 , o grupo alil foi convertido em grupo n-propil. Este novo grupo, ao ser analisado pelo RMN ^1H , mostra que um novo padrão de acoplamento foi adquirido. Para o di-idrosafrol, o aparecimento de um triplete entre 0,89-0,94 ppm, um multiplete entre 1,52-1,64 ppm e um triplete entre 2,46-2,51 ppm são resultados indicativos de que o processo de redução foi efetivo. No espectro de RMN de ^{13}C , os sinais dos carbonos 11 e 12 caíram ao ser rompida a dupla, de 115,93 ppm e 138,36 ppm para 24,82 e 13,70 ppm, respectivamente, fato que corroborou os resultados. O rendimento da reação foi de 82,35%, mostrando que a reação de redução foi mais efetiva do que a de isomerização.

4.2.5 Di-idrodilapiol (8)



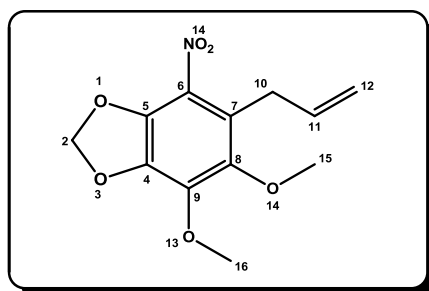
Os cromatogramas de CG-MS e os espectros de RMN ^1H e ^{13}C do di-idrodilapiol encontram-se no ANEXO G. Os sinais dos hidrogênios 14, 15 e 16 referentes ao grupo alil do dilapiol são, respectivamente, duplete em 3,31 ppm, multiplete em 5,88 ppm e duplete em 5,01 ppm. Após a redução por NaBH_4 com NiCl_2 , o grupo alil foi convertido em grupo n-propil. Este novo grupo, ao ser analisado pelo RMN ^1H , mostra novo padrão de sinais, pois para o di-idrodilapiol, o aparecimento de um triplete em 2,49 ppm, um multiplete em 1,54 ppm e um triplete em 0,91 ppm, são resultados indicativos de um processo de redução eficaz. A síntese foi comprovada por RMN ^{13}C , onde o deslocamento químico do sinal emitido pelo carbono 16 diminuiu, de 115,9 ppm para 13,86 ppm, demonstrando que a dupla ligação foi hidrogenada e o carbono tornou-se mais protegido. O rendimento da síntese foi de 86,34%, fato que ajuda a corroborar a eficácia da reação.

4.2.6 Isodilapiol (9)



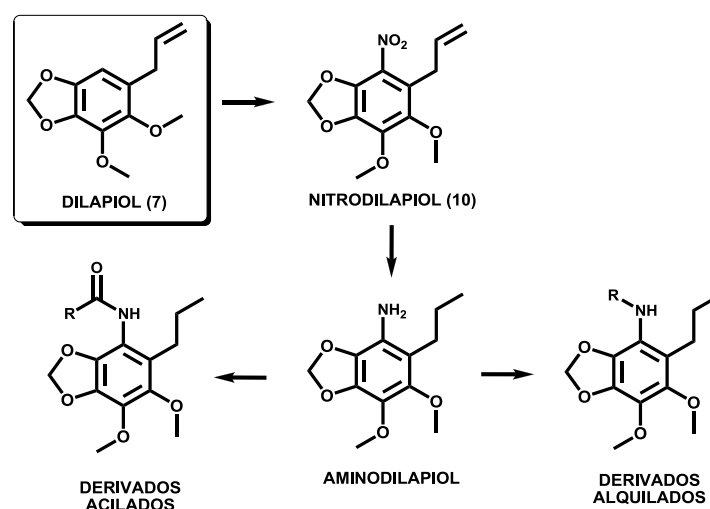
O espectro de RMN ^1H do isodilapiol encontra-se no ANEXO H. Para o dilapiol, os sinais dos hidrogênios 14, 15 e 16, referentes ao grupo alil são, respectivamente, duplete em 3,31 ppm, multiplete em 5,88 ppm e duplete em 5,01 ppm. Após a isomerização com KOH e n-Butanol, o grupo alil foi convertido em grupo propenil, apresentando, agora novo padrão de distribuição de sinais. Para o isodilapiol, o aparecimento de um duplete em 6,96 ppm, um multiplete em 5,91 e um duplete entre 1,86-1,89 ppm, são resultados indicativos de que isomerização se processou. Devido à recente síntese do isodilapiol, após a obtenção do resultado da RMN ^1H , que confirmou o sucesso da reação, não houve tempo para a realização das análises de RMN ^{13}C e CG-MS. Porém, em futuro breve, na continuação do presente trabalho e na elaboração dos artigos científicos que serão afortunadamente publicados, as análises serão realizadas e seus resultados, discutidos. O rendimento bruto da reação foi de 68,9% e após purificação, 45,1%. Estes resultados indicam que as condições reacionais precisam ser otimizadas.

4.2.7 Nitrodilapiol (10)



O espectro de RMN ^1H do nitrodilapiol encontra-se no ANEXO I. A partir do resultado do espectro de RMN ^1H , verificou-se que, embora tenham sido realizadas alternativas sintéticas para a nitração do dilapiol, em nenhum caso, obteve-se a substância desejada. Como pode ser visualizado pelo espectro de hidrogênio, o próton H-

6 ainda aparece como singlete em 3,27 ppm. Esta situação confirma que não houve a formação do análogo nitrado. As reações de nitração aromática, utilizando H_2SO_4 e HNO_3 , são reações clássicas e esperava-se que não haveria a necessidade de alteração de metodologia. Porém, novas alternativas sintéticas estão sendo buscadas a fim de tentar solucionar o problema da reatividade do anel. Este fato comprometeu profundamente os objetivos gerais do projeto visto que através da nitração e posterior redução do grupo nitro, esperaria-se obter uma série de análogos acilados e alquilados, como apresentado a seguir.



Com o intuito de encontrar uma explicação plausível para a não formação do análogo nitrado, optou-se por realizar simulações de propriedades químicas, utilizando química computacional. Os resultados obtidos com essas simulações poderiam ajudar a levantar uma hipótese sobre a baixa reatividade do anel aromático do dilapiol frente à reação de nitração. Sabendo que a reação química entre o dilapiol e o reagente de nitração ($\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$) seria regida pelo mecanismo de substituição eletrofílica aromática, é notório saber que a maior nucleofilicidade do carbono aromático a ser substituído é fator extremamente relevante para o satisfatório processo reacional. Portanto, optou-se por avaliar *duas* propriedades relacionadas ao anel aromático do dilapiol:

a) *Eletrônicas*: quantificar a carga eletrônica existente no átomo de carbono que sofrerá a substituição eletrofílica e comparar o resultado com a carga eletrônica de um carbono presente no benzeno. O benzeno foi escolhido como estrutura padrão por saber-se que as reações de nitração aromática processam-se rápida e satisfatoriamente. Assim, seria possível verificar qual dos dois carbonos, do dilapiol ou do benzeno, teria maior capacidade de ataque ao reagente;

b) *Estéricas*: verificar a vizinhança espacial ao redor do carbono que sofrerá a substituição. O impedimento estérico ao redor do carbono pode ser um fator limitante para a entrada do grupo nitro naquela posição.

Para a realização dos ensaios virtuais, como minimização energética (determinar a conformação mais estável) e obtenção de propriedades eletrônicas e estéricas, utilizou-se o programa Hyperchem[®] 7.0, da Hypercube, sistema que permite a simulação de comportamentos moleculares. Entre os métodos disponíveis para a minimização de energia e cálculo de propriedades, foram escolhidos a mecânica molecular, utilizando o campo de força MM+ e o semi-empírico, utilizando a base AM1 e o algoritmo de Polak-Ribieri. Os resultados obtidos estão esquematicamente representados na Figura 10.

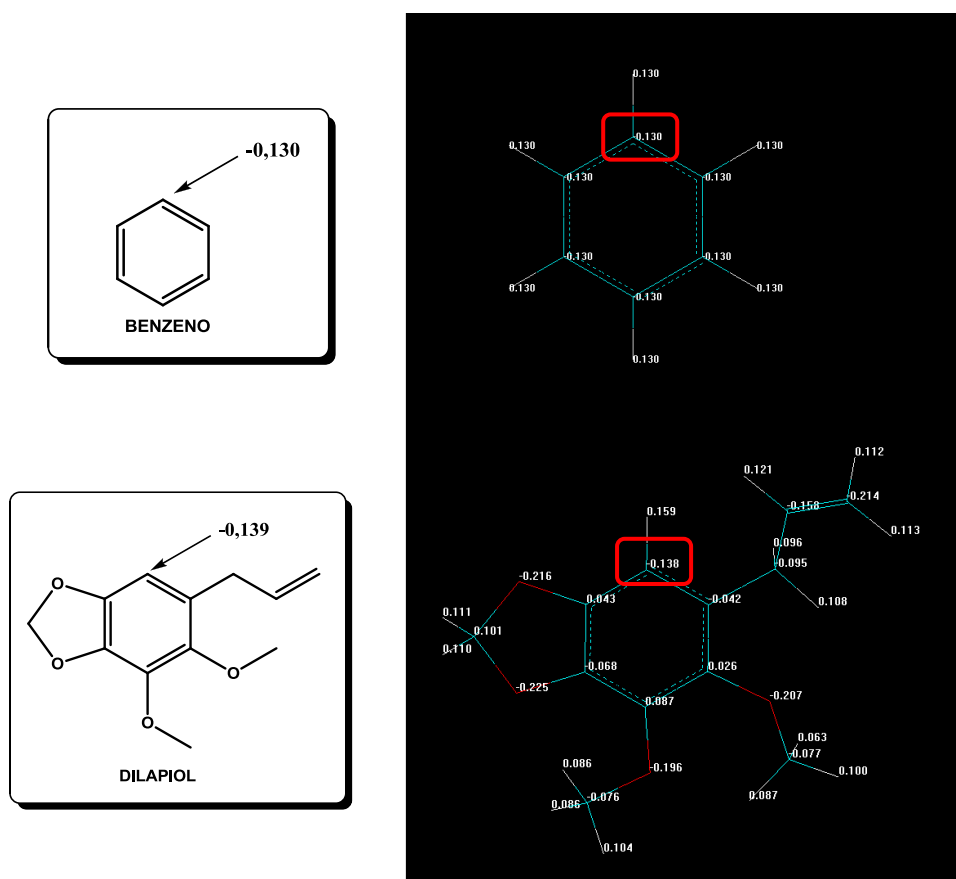
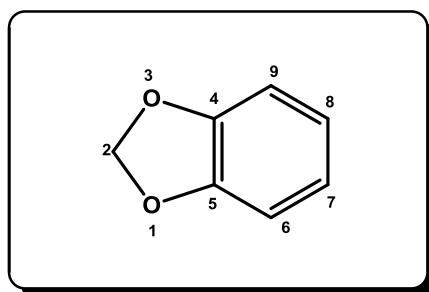


FIGURA 10 – Estruturas bidimensional (2D) (esquerda) e tridimensional (3D) (direita) do benzeno (acima) e dilapiol (abaixo) e representação da conformação espacial e da distribuição de cargas eletrônicas. Em vermelho, estão enaltecidas as cargas dos carbonos estudados.

Os resultados mostraram que a carga eletrônica encontrada no carbono do benzeno e no carbono aromático do dilapiol são muito próximas (Figura 10), cerca de -0,130 eV e -0,139 eV, respectivamente. Esta semelhança indica que o dilapiol poderia se comportar como o benzeno em termos de reatividade e dessa forma, sofrer a reação de nitração. Aliás, o dilapiol poderia ser uma substância ligeiramente mais reativa devido a presença de maior carga negativa no carbono em estudo. Porém, esta situação não foi obtida na prática e outra hipótese aventada para a falha da reação foi de que o carbono aromático do dilapiol é um elemento impedido estericamente. Dessa forma, acredita-se que as dificuldades de ataque por parte do carbono estejam relacionadas à presença de grupos substituintes na posição *orto* em relação àquele elemento.

4.2.8 Benzodioxol (12)



Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C para o benzodioxol estão apresentados no ANEXO K. Ao analisar o espectro de hidrogênio pode-se confirmar a obtenção do benzodioxol pelo aparecimento do singlete em 5,90 ppm. O reagente de partida, pirocatecol (ANEXO J), possui não possui sinal indicativo de grupo metileno, mas ao sofrer a reação com DCM em presença de KOH, os oxigênios sofrem alquilação, fechando o anel dioxolico. O espectro de RMN ^{13}C também auxilia na confirmação do produto formado, haja visto o aparecimento de um sinal em 101,2 ppm. O rendimento bruto da reação foi 32% e após purificação, caiu para 15%. Portanto, novas alternativas sintéticas são necessárias para otimizar o processo de síntese do benzodioxol.

4.3 Métodos Biológicos

Durante a realização das metodologias sintéticas, foram sendo feitos, paralelamente, ensaios de atividade esquistossomicida. Cabe ressaltar que os ensaios esquistossomicidas são extremamente demorados e requerem muitos cuidados de planejamento e execução. São realizados testes para 4 substâncias diferentes ou diferentes doses de uma mesma substância simultaneamente, incluindo os grupos controle positivo, negativo e tratado. Isto faz com que as repetições sejam também demoradas e em alguns casos, exaustivas. Os alunos de iniciação científica tiveram a oportunidade de estagiar no Instituto Adolfo Lutz para aprender com cautela e rigor os ensaios esquistossomicidas. Os ensaios de atividade esquistossomicida para o dilapiol e análogos naturais, sintéticos e semi-sintéticos ficaram sob co-responsabilidade do Prof. Dr. Pedro Luiz Silva Pinto, pesquisador do Instituto Adolfo Lutz.

Utilizando-se a técnica de perfusão de veias mesentéricas, perfusão do sistema porta e do oograma quantitativo foi possível verificar a atividade esquistossomicida das substâncias: dilapiol e análogos naturais, sintéticos e semi-sintéticos. Após 45 dias de infecção, avaliou-se a positividade dos camundongos frente à eliminação de ovos nas fezes. A positividade foi avaliada pelo exame direto de fezes. A presença de apenas um ovo de *Schistosoma mansoni* indica positividade. Os camundongos positivos foram triados e separados dos negativos. Os negativos, por sua vez, foram submetidos a uma segunda avaliação. Aqueles que ainda encontraram-se negativos seriam eliminados do experimento. Neste trabalho, todos os camundongos estavam positivos e não houve nenhuma morte no decorrer dos ensaios.

Após triagem, os camundongos foram separados em 8 grupos para a primeira etapa (ETAPA I) e em 14 grupos para a segunda etapa (ETAPA II). Após 10 dias de tratamento, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e foram verificados dois aspectos: a) a quantidade de vermes recuperados em relação ao controle positivo e; b) o número de ovos nos seus diversos estágios evolutivos.

No oograma quantitativo dois aspectos principais indicam a atividade esquistossomicida: supressão da oviposição e aumento do número de ovos imaturos. O primeiro pode ser consequência da morte de ambos os parasitas ou de todos de um mesmo sexo, ou ainda, consequência da atividade sobre o sistema reprodutor de machos

ou fêmeas. O segundo pode indicar ação direta da substância sobre os ovos, apresentando assim, algum efeito terapêutico.

Quanto à pesquisa de vermes adultos pela técnica de perfusão de veias, pode-se avaliar a ação direta do fármaco sobre o verme ou se o aparelho reprodutor foi afetado. Um número alto de vermes associado a pequeno número de ovos indica ação sobre o aparelho reprodutor. Em contraste, pequeno número de vermes e pequeno número de ovos indica que a viabilidade foi afetada.

A seguir estão apresentados os resultados obtidos ao término do ensaio de atividade esquistossomicida para as substâncias em análise. Na ETAPA I estão apresentados os resultados da atividade esquistossomicida utilizando dilapiol (7) nas doses de 50, 100, 200, 400 e 800 mg/kg. Na ETAPA II estão apresentados os resultados referente à ação esquistossomicida dos análogos naturais, sintéticos e semi-sintéticos do dilapiol, utilizando para a isso a dose fixa de 400 mg/kg.

ETAPA I: Verificação da atividade esquistossomicida do dilapiol utilizando-se diferentes doses.

As TABELAS de II a IX apresentam os resultados do oograma quantitativo e do número de vermes recuperados para os grupos de animais tratados com dilapiol em diferentes doses. A TABELA X mostra um **perfil comparativo** do oograma quantitativo referente às diferentes doses empregadas de dilapiol. A FIGURA 11 apresenta, graficamente, as variações ocorridas nos estágios evolutivos dos ovos de *Schistosoma mansoni* e também na carga parasitária em função das diferentes doses empregadas de dilapiol. A FIGURA 12 apresenta de uma forma mais aprofundada a variação da carga parasitária em função da dose administrada de dilapiol.

TABELA II – Oograma quantitativo do grupo controle positivo (não tratados).

Animal	ESTÁGIO DOS OVOS E NÚMERO DE VERMES								
	1º	2º	3º	4º	5º	IM	MM	CV	Vermes
1	22	14	12	7	45	0	0	0	15
2	13	18	25	16	39	0	0	0	13
3	12	12	32	12	33	0	0	0	14
4	20	14	24	11	52	0	0	0	11
5	18	22	31	9	46	0	0	0	11
Média	17	16	24,8	11	43	0	0	0	12,8
<i>DP</i>	4,36	4,00	7,98	3,39	7,25	0,00	0,00	0,00	1,79

IM: ovos mortos imaturos; **MM:** ovos mortos maduros; **CV:** cascas vazias

DP: desvio padrão

TABELA III – Oograma quantitativo do grupo controle negativo (receberam apenas veículo).

Animal	ESTÁGIO DOS OVOS E NÚMERO DE VERMES								
	1º	2º	3º	4º	5º	IM	MM	CV	Vermes
1	9	21	27	0	12	0	0	0	13
2	10	16	24	19	64	0	0	0	15
3	15	12	22	11	34	0	0	0	14
4	20	8	30	4	41	0	0	0	9
5	14	10	16	6	54	0	0	0	8
Média	13,6	13,4	23,8	8	41	0	0	0	11,8
<i>DP</i>	4,39	5,18	5,31	7,31	19,92	0,00	0,00	0,00	3,11

IM: ovos mortos imaturos; **MM:** ovos mortos maduros; **CV:** cascas vazias

DP: desvio padrão

TABELA IV – Oograma quantitativo do grupo controle tratado (receberam oxamniquina - 100mg/kg).

Animal	ESTÁGIO DOS OVOS E NÚMERO DE VERMES								
	1º	2º	3º	4º	5º	IM	MM	CV	Vermes
1	0	0	0	0	12	2	0	1	0
2	0	0	0	0	2	4	0	0	0
3	0	0	0	0	8	1	1	0	0
4	0	0	0	0	12	7	2	0	0
5	0	0	0	0	17	4	1	0	0
Média	0	0	0	0	10,2	3,6	0,8	0,2	0
<i>DP</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	5,59	2,30	0,84	0,45	0,00

IM: ovos mortos imaturos; **MM:** ovos mortos maduros; **CV:** cascas vazias

DP: desvio padrão

TABELA V – Oograma quantitativo do grupo dilapiol 50 mg/kg.

Animal	ESTÁGIO DOS OVOS E NÚMERO DE VERMES								
	1º	2º	3º	4º	5º	IM	MM	CV	Vermes
1	6	13	14	5	60	1	1	0	13
2	11	18	1	5	50	0	1	0	11
3	16	15	20	7	42	0	0	0	11
4	9	13	17	6	50	0	0	0	7
5	6	11	24	10	46	0	0	0	8
Média	9,6	14	15,2	6,6	49,6	0,2	0,4	0	10
DP	4,16	2,65	8,76	2,07	6,69	0,45	0,55	0,00	2,45

IM: ovos mortos imaturos; **MM:** ovos mortos maduros; **CV:** cascas vazias

DP: desvio padrão

TABELA VI – Oograma quantitativo do grupo dilapiol 100 mg/kg.

Animal	ESTÁGIO DOS OVOS E NÚMERO DE VERMES								
	1º	2º	3º	4º	5º	IM	MM	CV	Vermes
1	8	20	26	0	32	0	0	0	11
2	12	10	28	0	36	4	4	4	13
3	10	18	34	6	52	0	0	2	17
4	14	19	16	8	30	2	0	4	14
5	18	18	10	6	52	0	0	0	12
Média	12,4	17	22,8	4	40,4	6	0,8	2	13,4
DP	3,85	4,00	9,65	3,74	10,81	1,79	1,79	2,00	2,30

IM: ovos mortos imaturos; **MM:** ovos mortos maduros; **CV:** cascas vazias

DP: desvio padrão

TABELA VII – Oograma quantitativo do grupo dilapiol 200 mg/kg.

Animal	ESTÁGIO DOS OVOS E NÚMERO DE VERMES								
	1º	2º	3º	4º	5º	IM	MM	CV	Vermes
1	16	8	16	8	42	2	0	0	10
2	10	6	12	4	24	2	0	0	9
3	8	6	18	24	32	0	0	2	11
4	2	10	16	6	24	0	0	2	21
5	2	10	10	12	44	0	0	0	9
Média	7,6	8	14,4	10,8	33,2	0,8	0	0,8	12
DP	5,90	2,00	3,29	7,95	9,55	1,10	0,00	1,10	5,10

IM: ovos mortos imaturos; **MM:** ovos mortos maduros; **CV:** cascas vazias

DP: desvio padrão

TABELA VIII – Oograma quantitativo do grupo dilapiol 400 mg/kg.

Animal	ESTÁGIO DOS OVOS E NÚMERO DE VERMES								
	1º	2º	3º	4º	5º	IM	MM	CV	Vermes
1	1	4	10	7	31	5	2	0	4
2	2	5	9	8	33	3	2	0	5
3	4	9	11	12	35	4	2	1	3
4	5	5	12	10	26	1	3	0	2
5	0	3	4	2	22	0	1	0	5
Média	2,4	5,2	9,2	7,8	29,4	2,6	2	0,2	3,8
DP	2,07	2,28	3,11	3,77	5,32	2,07	0,71	0,45	1,30

IM: ovos mortos imaturos; **MM:** ovos mortos maduros; **CV:** cascas vazias

DP: desvio padrão

TABELA IX – Oograma quantitativo do grupo dilapiol 800 mg/kg.

Animal	ESTÁGIO DOS OVOS E NÚMERO DE VERMES								
	1º	2º	3º	4º	5º	IM	MM	CV	Vermes
1	1	3	9	8	30	3	2	0	2
2	2	5	7	4	27	4	1	0	3
3	4	6	11	3	26	6	0	0	2
4	3	8	6	7	27	2	0	1	4
5	0	3	6	2	29	1	0	2	1
Média	2	5	7,8	4,8	27,8	3,2	0,6	0,6	2,4
DP	1,58	2,12	2,17	2,59	1,64	1,92	0,89	0,89	1,14

IM: ovos mortos imaturos; **MM:** ovos mortos maduros; **CV:** cascas vazias

DP: desvio padrão

TABELA X – Perfil comparativo do oograma quantitativo referente às diferentes doses empregadas de dilapiol.

MÉDIA/GRUPO	ESTÁGIO DOS OVOS E NÚMERO DE VERMES								
	1º	2º	3º	4º	5º	IM	MM	CV	Vermes
Grupo não tratado	17	16	24,8	11	43	0	0	0	12,8
Grupo veículo	13,6	13,4	23,8	8	41	0	0	0	11,8
Grupo tratado	0	0	0	0	10,2	3,6	0,8	0,2	0
Grupo dilapiol 50mg/kg	9,6	14	15,2	6,6	49,6	0,2	0,4	0	10
Grupo dilapiol 100mg/kg	12,4	17	22,8	4	40,4	6	0,8	2	13,4
Grupo dilapiol 200mg/kg	7,6	8	14,4	10,8	33,2	0,8	0	0,8	12
Grupo dilapiol 400mg/kg	2,4	5,2	9,2	7,8	29,4	2,6	2	0,2	3,8
Grupo dilapiol 800mg/kg	2	5	7,8	4,8	27,8	3,2	0,6	0,6	2,4
Média	8,075	9,825	14,75	6,625	34,325	2,05	0,575	0,475	8,275
DP	6,16	6,15	8,82	3,66	12,19	2,17	0,67	0,68	5,33

IM: ovos mortos imaturos; **MM:** ovos mortos maduros; **CV:** cascas vazias

DP: desvio padrão

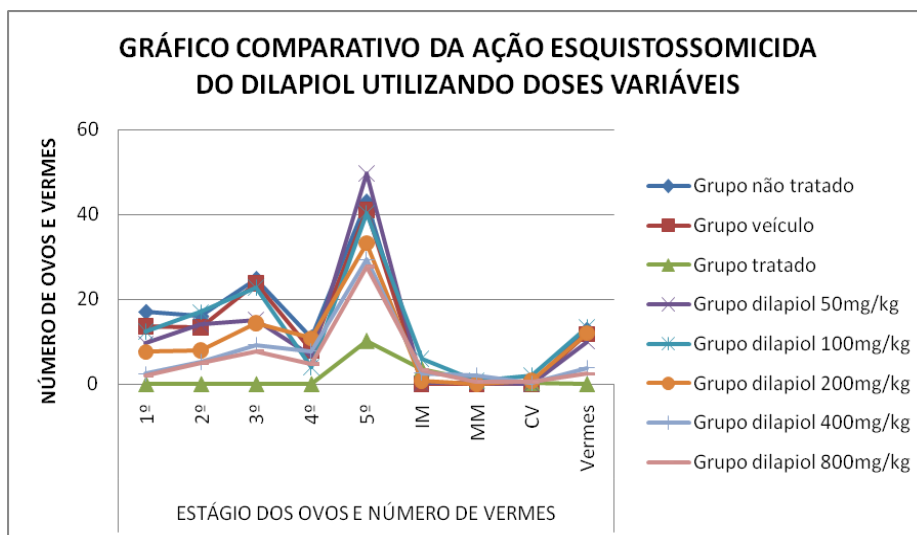


FIGURA 11 – Perfil comparativo do oograma quantitativo obtido pela utilização de dilapiol em diferentes doses.

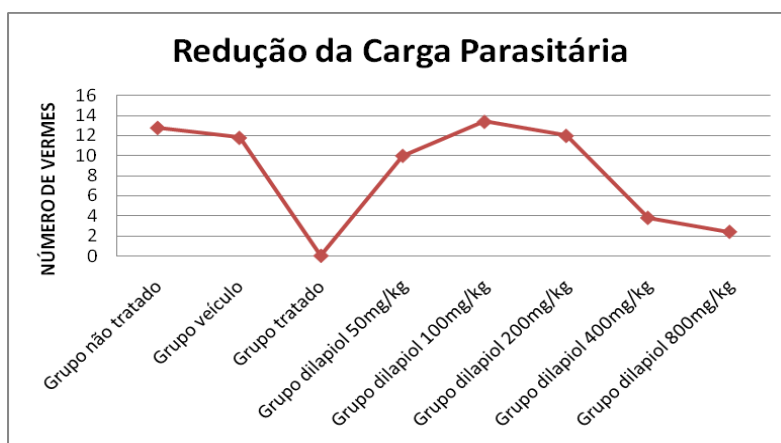


FIGURA 12 – Perfil de redução da carga parasitária pela utilização de dilapiol em diferentes doses.

Os ensaios realizados nesta etapa (ETAPA I) objetivaram avaliar a eficácia esquistossomicida do dilapiol (7). Para tanto, planejou-se também utilizar doses crescentes de dilapiol com vistas a uma possível curva dose-resposta. Como pode ser observado nas FIGURAS 11 e 12, os grupos não tratados e aqueles tratados com veículo não sofreram supressão de oviposição e nem redução de carga parasitária. O grupo tratado com oxamniquina 100 mg/kg sofreu supressão total de oviposição, visto que no oograma apareceram apenas ovos de 5º estágio. A redução do número de ovos dos primeiros estágios indica atividade esquistossomicida. Com relação à carga parasitária, o grupo sofreu redução completa de vermes, indicando um efeito direto sobre os helmintos. Ainda com relação às FIGURAS 11 e 12, observa-se que o dilapiol (7), administrado nas doses de 50, 100, 200, 400 e 800 mg/kg, apresentou ligeira redução na oviposição nos

diferentes estágios, porém não houve redução significativa nos primeiros estágios, o que indica uma atividade parcial. Como pode ser verificada pelas análises dos gráficos, com o aumento da dose, a oviposição parece diminuir proporcionalmente. Porém, esta atividade não parece ser dose dependente, visto que nas doses de 400 e 800 mg/kg não existiu diferença significativa de redução da oviposição. Já com relação à carga parasitária, observa-se um efeito sobre os vermes que também parece ser dependente da dose. Doses maiores reduzem mais o número de vermes, porém ainda não conseguem curar os animais. Estes dados indicam que o dilapiol possa ter sua atividade baseada na ação direta sobre os vermes, visto que houve uma redução da carga parasitária simultaneamente à do número ovos de primeiros estágios.

ETAPA II: Verificação da atividade esquistossomicida dos análogos naturais, sintéticos e semi-sintéticos do dilapiol.

As TABELAS XI a XX apresentam os resultados do oograma quantitativo e do número de vermes recuperados para os grupos de animais tratados com dilapiol (7) 400 mg/kg e os análogos naturais [eugenol(1) e safrol (5)], sintéticos [pirocatecol (11) e benzodioxol (12)] e semi-sintéticos [metileugenol (2), di-idrometileugenol (3), isometileugenol (4), di-idrosafrol (6), di-idrodilapiol (8) e isodilapiol (9)], também administrados na dose de 400 mg/kg. A dose de 400 mg/kg foi escolhida para todos os análogos por ter apresentado satisfatória redução da oviposição e de carga parasitária quando o dilapiol (7) foi ensaiado. Apesar de a dose de 800 mg/kg também ter mostrado redução nos itens analisados, acredita-se que uma dose menor que cause efeitos semelhantes possa ser usada com maior facilidade, tanto no que se refere a aspectos físico-químicos como toxicológicos. A TABELA XXI mostra as médias dos números de ovos obtidos a partir dos diferentes estágios evolutivos, bem como a média dos números de vermes recuperados. Os dados desta tabela permitem comparar diretamente a capacidade de supressão de ovos e também da redução de carga parasitária. As FIGURAS 13 e 14 apresentam, graficamente, as variações dos estágios evolutivos dos ovos de *Schistosoma mansoni* e também na carga parasitária em função dos diferentes análogos do dilapiol. A FIGURA 14 foi elaborada para facilitar a visualização e comparação da eficácia esquistossomicida de cada análogo em comparação com o dilapiol e controles. A FIGURA 15 apresenta, de forma mais simplista, a variação da carga parasitária em função do análogo testado.

TABELA XI – Oograma quantitativo e carga parasitária do grupo Eugenol (1).

Animal	ESTÁGIO DOS OVOS E CARGA PARASITÁRIA								
	1º	2º	3º	4º	5º	IM	MM	CV	Vermes
1	22	14	32	8	62	0	0	0	9
2	13	18	11	10	49	0	0	0	11
3	14	16	22	14	44	0	0	0	17
4	15	13	17	15	55	0	0	0	13
5	22	17	24	9	42	0	0	0	12
Média	17,2	15,6	21,2	11,2	50,4	0	0	0	12,4
DP	4,44	2,07	7,85	3,11	8,20	0,00	0,00	0,00	2,97

IM: ovos mortos imaturos; **MM:** ovos mortos maduros; **CV:** cascas vazias

DP: desvio padrão

TABELA XII – Oograma quantitativo e carga parasitária do grupo Metileugenol (2).

Animal	ESTÁGIO DOS OVOS E CARGA PARASITÁRIA								
	1º	2º	3º	4º	5º	IM	MM	CV	Vermes
1	8	20	26	11	33	0	0	0	9
2	12	10	28	6	31	0	1	0	13
3	10	18	34	8	30	0	0	0	17
4	14	19	16	9	55	0	0	0	14
5	18	18	10	12	49	0	0	0	8
Média	12,4	17	22,8	9,2	39,6	6	0,2	0	12,2
DP	3,85	4,00	9,65	2,39	11,57	0,00	0,45	0,00	3,70

IM: ovos mortos imaturos; **MM:** ovos mortos maduros; **CV:** cascas vazias

DP: desvio padrão

TABELA XIII – Oograma quantitativo e carga parasitária do grupo Di-idrometileugenol (3).

Animal	ESTÁGIO DOS OVOS E CARGA PARASITÁRIA								
	1º	2º	3º	4º	5º	IM	MM	CV	Vermes
1	16	15	25	9	48	0	0	0	20
2	15	21	23	4	35	0	0	0	18
3	22	20	18	24	34	0	0	0	9
4	28	14	19	6	26	0	0	0	21
5	19	12	21	12	52	0	0	0	11
Média	20	16,4	21,2	11	39	0	0	0	15,8
DP	5,24	3,91	2,86	7,87	10,72	0,00	0,00	0,00	5,45

IM: ovos mortos imaturos; **MM:** ovos mortos maduros; **CV:** cascas vazias

DP: desvio padrão

TABELA XIV – Oograma quantitativo e carga parasitária do grupo Isometileugenol (4).

Animal	ESTÁGIO DOS OVOS E CARGA PARASITÁRIA								
	1º	2º	3º	4º	5º	IM	MM	CV	Vermes
1	14	21	19	11	40	0	0	0	11
2	21	14	15	20	51	0	0	0	7
3	20	17	22	17	31	0	0	0	10
4	22	20	32	11	27	0	0	0	14
5	4	27	27	9	52	0	0	0	9
Média	16,2	19,8	23	13,6	40,2	0	0	0	10,2
DP	7,50	4,87	6,67	4,67	11,34	0,00	0,00	0,00	2,59

IM: ovos mortos imaturos; **MM:** ovos mortos maduros; **CV:** cascas vazias

DP: desvio padrão

TABELA XV – Oograma quantitativo e carga parasitária do grupo Safrol (5).

Animal	ESTÁGIO DOS OVOS E CARGA PARASITÁRIA								
	1º	2º	3º	4º	5º	IM	MM	CV	Vermes
1	10	14	17	9	31	1	0	0	10
2	15	12	11	11	35	1	0	0	12
3	8	9	22	10	41	0	0	0	2
4	10	11	13	14	28	0	0	1	9
5	12	17	16	13	33	0	0	2	8
Média	11	12,6	15,8	11,4	33,6	0,4	0	0,6	8,2
DP	2,65	3,05	4,21	2,07	4,88	0,55	0,00	0,89	3,77

IM: ovos mortos imaturos; **MM:** ovos mortos maduros; **CV:** cascas vazias

DP: desvio padrão

TABELA XVI – Oograma quantitativo e carga parasitária do grupo Di-idrosafrol (6).

Animal	ESTÁGIO DOS OVOS E CARGA PARASITÁRIA								
	1º	2º	3º	4º	5º	IM	MM	CV	Vermes
1	9	13	20	13	39	0	1	0	7
2	17	15	18	14	41	0	0	0	9
3	8	10	21	9	32	0	0	0	8
4	12	12	11	9	30	1	0	0	10
5	14	17	14	15	38	0	0	0	12
Média	12	13,4	16,8	12	36	0,2	0,2	0	9,2
DP	3,67	2,70	4,21	2,83	4,74	0,45	0,45	0,00	1,92

IM: ovos mortos imaturos; **MM:** ovos mortos maduros; **CV:** cascas vazias

DP: desvio padrão

TABELA XVII – Oograma quantitativo e carga parasitária do grupo Di-idrodilapiol (8).

Animal	ESTÁGIO DOS OVOS E CARGA PARASITÁRIA								
	1º	2º	3º	4º	5º	IM	MM	CV	Vermes
1	4	7	10	8	35	1	0	1	4
2	2	5	7	5	26	2	1	0	6
3	4	3	11	10	27	2	4	0	4
4	3	9	9	9	24	1	1	0	3
5	1	3	7	10	32	0	0	1	4
Média	2,8	5,4	8,8	8,4	28,8	1,2	1,2	0,4	4,2
DP	1,30	2,61	1,79	2,07	4,55	0,84	1,64	0,55	1,10

IM: ovos mortos imaturos; **MM:** ovos mortos maduros; **CV:** cascas vazias

DP: desvio padrão

TABELA XVIII – Oograma quantitativo e carga parasitária do grupo Isodilapiol (9).

Animal	ESTÁGIO DOS OVOS E CARGA PARASITÁRIA								
	1º	2º	3º	4º	5º	IM	MM	CV	Vermes
1	2	3	10	9	29	1	0	1	4
2	3	6	8	8	32	2	0	0	3
3	5	7	9	11	35	3	0	0	5
4	4	6	7	6	27	3	0	0	4
5	1	4	8	10	30	1	0	0	6
Média	3	5,2	8,4	8,8	30,6	2	0	0,2	4,4
DP	1,58	1,64	1,14	1,92	3,05	1,00	0,00	0,45	1,14

IM: ovos mortos imaturos; **MM:** ovos mortos maduros; **CV:** cascas vazias

DP: desvio padrão

TABELA XIX – Oograma quantitativo e carga parasitária do grupo Pirocatecol (11).

Animal	ESTÁGIO DOS OVOS E CARGA PARASITÁRIA								
	1º	2º	3º	4º	5º	IM	MM	CV	Vermes
1	23	14	26	10	63	0	0	0	19
2	15	19	31	16	55	0	0	0	18
3	16	21	27	6	59	0	0	0	17
4	17	19	26	9	45	0	0	0	13
5	22	13	17	11	31	0	0	0	7
Média	18,6	17,2	25,4	10,4	50,6	0	0	0	14,8
DP	3,65	3,49	5,13	3,65	12,84	0,00	0,00	0,00	4,92

IM: ovos mortos imaturos; **MM:** ovos mortos maduros; **CV:** cascas vazias

DP: desvio padrão

TABELA XX – Oograma quantitativo e carga parasitária do grupo Benzodioxol (12).

Animal	ESTÁGIO DOS OVOS E CARGA PARASITÁRIA								
	1º	2º	3º	4º	5º	IM	MM	CV	Vermes
1	9	13	14	5	50	0	0	0	15
2	6	18	15	7	45	0	0	0	14
3	22	15	20	10	53	0	0	0	11
4	31	14	29	6	49	0	0	0	13
5	16	26	33	3	33	0	0	0	12
Média	16,8	17,2	22,2	6,2	46	0	0	0	13
DP	10,08	5,26	8,47	2,59	7,81	0,00	0,00	0,00	1,58

IM: ovos mortos imaturos; **MM:** ovos mortos maduros; **CV:** cascas vazias

DP: desvio padrão

TABELA XXI – Perfil comparativo do oograma quantitativo referente aos análogos do dilapiol.

MÉDIA/GRUPO	ESTÁGIO DOS OVOS E NÚMERO DE VERMES								
	1º	2º	3º	4º	5º	IM	MM	CV	Vermes
Grupo não tratado	17	16	24,8	11	43	0	0	0	12,8
Grupo veículo	13,6	13,4	23,8	8	41	0	0	0	11,8
Grupo tratado	0	0	0	0	10,2	3,6	0,8	0,2	0
Grupo Dilapiol (7) 400mg/kg	2,4	5,2	9,2	7,8	29,4	2,6	2	0,2	3,8
Grupo Eugenol (1)	17,2	15,6	21,2	11,2	50,4	0	0	0	12,4
Grupo Metileugenol (2)	12,4	17	22,8	9,2	39,6	6	0,2	0	12,2
Grupo Di-idrometileugenol (3)	20	16,4	21,2	11	39	0	0	0	13,6
Grupo Isometileugenol (4)	16,2	19,8	23	13,6	40,2	0	0	0	10,2
Grupo Safrol (5)	11	12,6	15,8	11,4	33,6	0,4	0	0,6	8,2
Grupo Di-idrosafrol (6)	12	13,4	16,8	12	36	0,2	0,2	0	9,2
Grupo Di-idrodilapiol (8)	2,8	5,4	8,8	8,4	28,8	1,2	1,2	0,4	4,2
Grupo Isodilapiol (9)	3	5,2	8,4	8,8	30,6	2	0	0,2	4,4
Grupo Pirocatecol (11)	18,6	17,2	25,4	10,4	50,6	0	0	0	14,8
Grupo Benzodioxol (12)	16,8	17,2	22,2	6,2	46	0	0	0	13
Média	11,643	12,457	17,386	9,2143	37,029	1,1429	0,3143	0,1143	9,32857
DP	6,82	6,01	7,84	3,30	10,43	1,82	0,61	0,19	4,54

IM: ovos mortos imaturos; **MM:** ovos mortos maduros; **CV:** cascas vazias

DP: desvio padrão

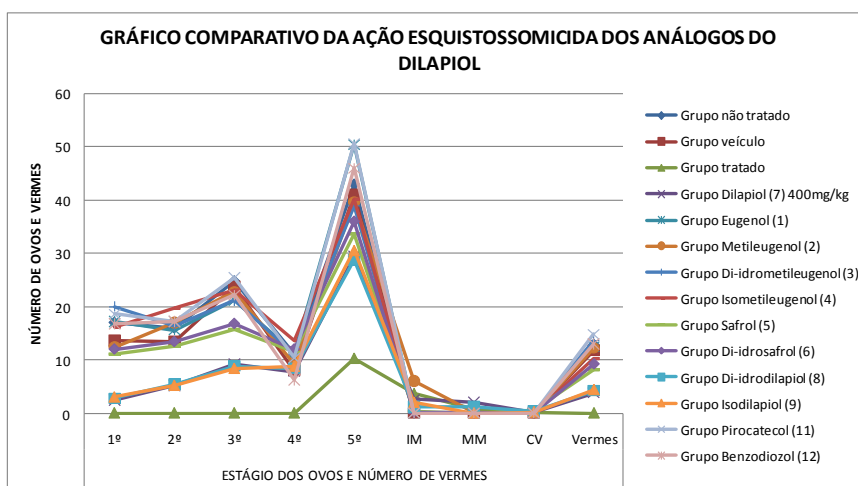


FIGURA 13 – Perfil comparativo do oograma quantitativo obtido pela utilização de análogos do dilapiol.

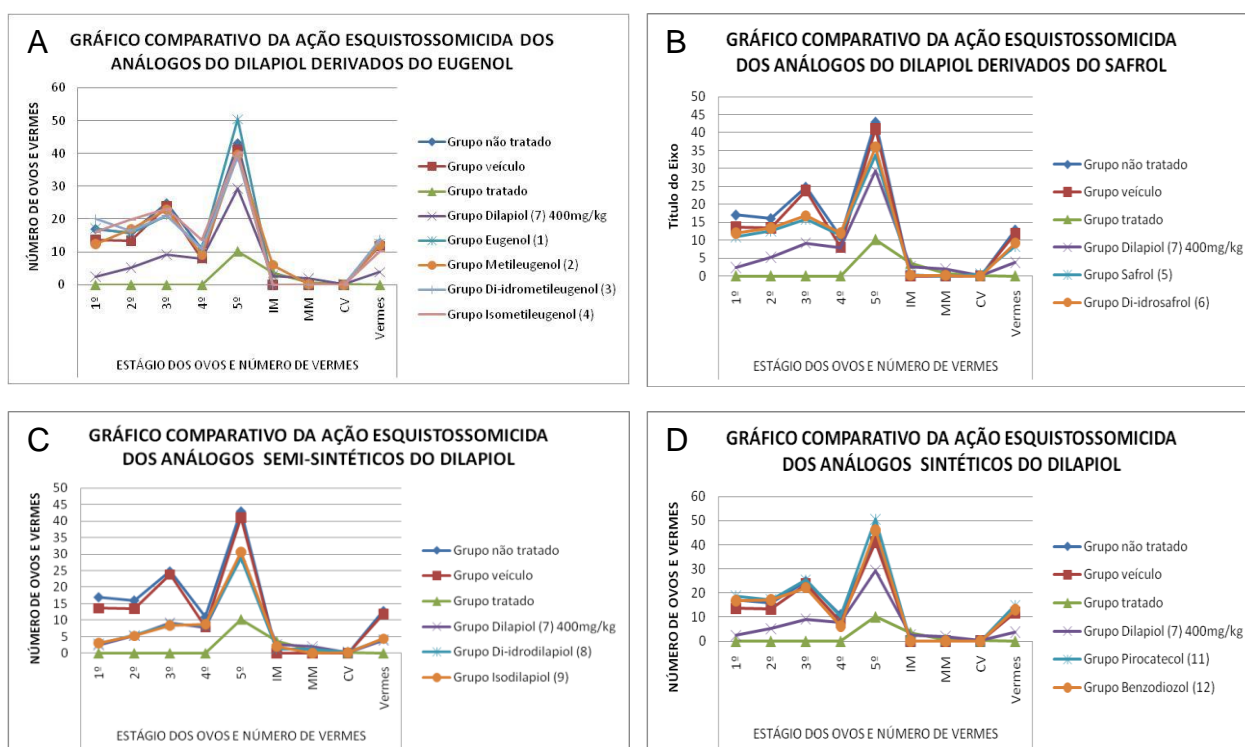


FIGURA 14 – Perfil comparativo do oograma quantitativo obtido pela utilização de análogos do dilapiol. (A) Comparação da atividade esquistossomicida do dilapiol e análogos derivados do eugenol; (B) Comparação da atividade esquistossomicida do dilapiol e análogos derivados do safrol; (C) Comparação da atividade esquistossomicida do dilapiol e análogos semi-sintéticos; (D) Comparação da atividade esquistossomicida do dilapiol e análogos sintéticos.

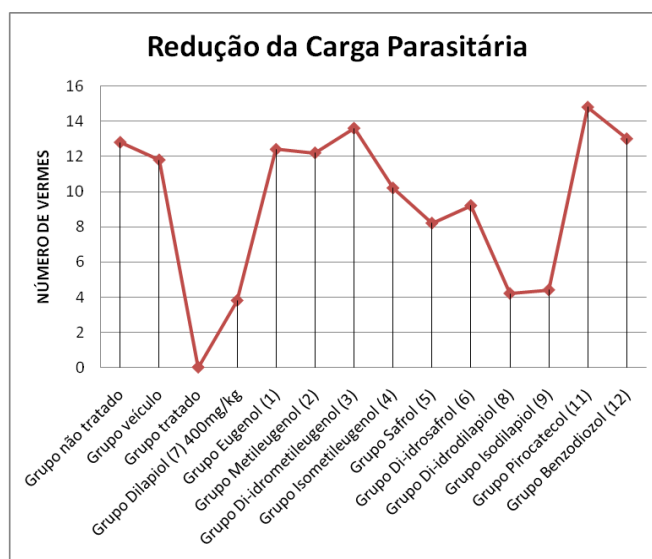


FIGURA 15 – Perfil de redução da carga parasitária pela utilização dos análogos do dilapiol na dose de 400 mg/kg.

Ao analisar os gráficos das FIGURAS 13, 14 e 15, pode-se observar que todas as substâncias ensaiadas, com exceção dos análogos di-idrodilapiol (8) e isodilapiol (9), apresentaram baixa eficácia esquistosomicida. O pior resultado foi obtido para os análogos eugenol (1), metileugenol (2), di-idrometileugenol (3) e isometileugenol (4). Nestes casos, não houve redução da oviposição e da carga parasitária em relação aos grupos controle. Embora o safrol (5) e di-idrosafrol (6) tenham mostrado redução de oviposição e de carga parasitária, esta não foi significativa em relação aos grupos controle veículo e não tratado. Dessa forma, foi observado que as melhores substâncias - ainda não ideais - que podem provocar alteração significativa no oograma quantitativo e também na quantidade de vermes presentes são: dilapiol (7), di-idrodilapiol (8) e isodilapiol (9). Quando comparadas entre si, estas substâncias não apresentam diferença significativa de eficácia.

Analisando os resultados obtidos a partir das atividades biológicas acima citadas, pode-se elucidar dados preliminares de Relação Estrutura-Atividade (REA). Estes dados podem ser visualizados e interpretados na FIGURA 16.

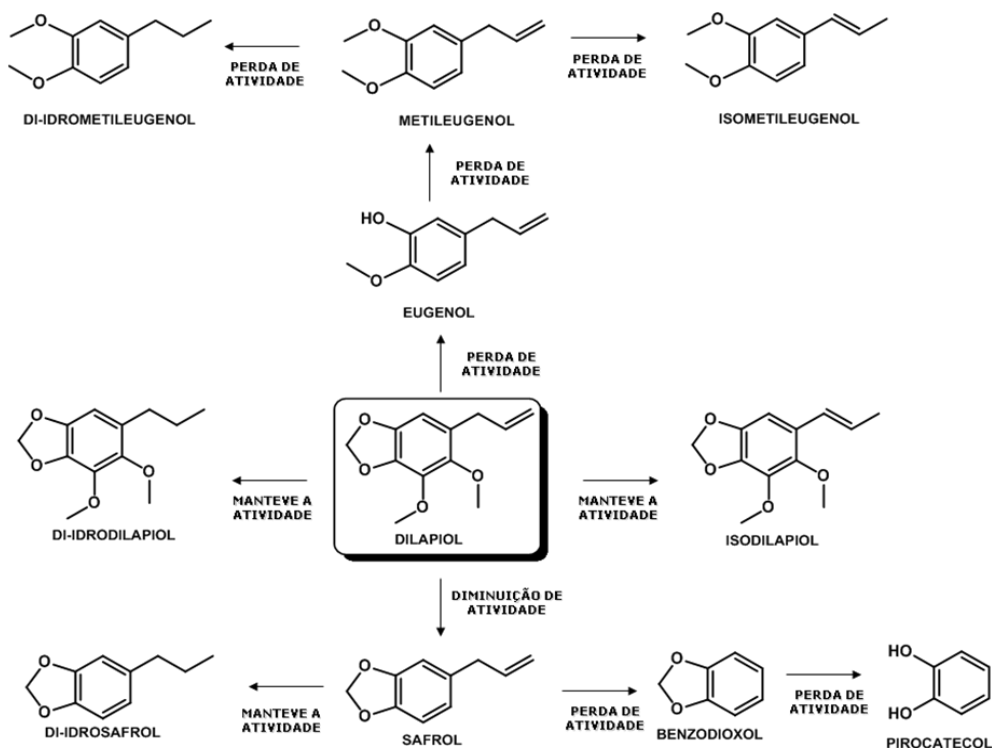


FIGURA 16 – Elucidação da Relação Estrutura-Atividade do Dilapiol.

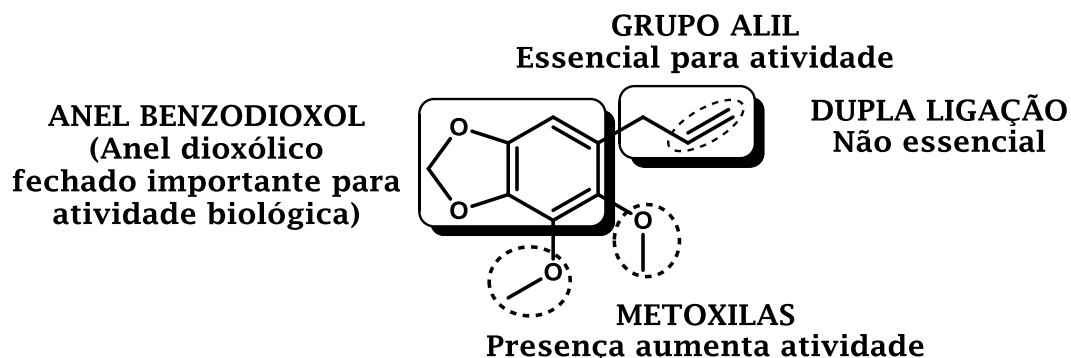
Pela análise das estruturas e dos dados de atividade da FIGURA 16 foi possível verificar que o dilapiol apresentou-se como estrutura padrão para obtenção de análogos com atividade potencialmente superior. Como pode ser visto, os análogos propostos não apresentaram aumento de potência, característica que só predominou de forma insignificante para os análogos di-idrodilapiol (**8**) e isodilapiol (**9**). Com estes resultados pode-se atribuir a atividade esquistossomicida ao sistema benzodioxol substituído por duas metoxilas aromáticas e um grupo alil da cadeia lateral. Qualquer simplificação neste padrão estrutural acarreta em diminuição ou perda de atividade esquistossomicida.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

5.1 CONCLUSÕES

- A extração do dilapiol das folhas de *Piper aduncum*, segundo procedimento descrito por Lago *et al.*, 2006, foi realizada com sucesso. O rendimento médio de cada extração foi de 88% de óleo essencial;
- A purificação e isolamento do dilapiol a partir do óleo essencial foram realizados por coluna cromatográfica resultando num rendimento de 76%;
- Ensaios biológicos indicaram que o dilapiol apresentou atividade esquistossomicida moderada, porém nas doses ensaiadas, não foi possível ocasionar a cura das cobaias;
- As reações de redução e isomerização da dupla ligação das substâncias avaliadas foram bastante efetivas, fato que permitiu a obtenção de vários análogos, com bons rendimentos;
- A nitração aromática do dilapiol não foi método eficiente, pois o produto final, nitrodilapiol, não foi obtido. Em consequência, não foi possível realizar novas modificações moleculares no dilapiol
- Em relação aos análogos propostos, apenas aqueles que dependiam da derivatização do composto nitrado não foram obtidos.
- Novas metodologias sintéticas para obtenção de análogos do dilapiol estão sendo estudadas, como por exemplo, novas formas de nitração de anéis.
- Utilizando os dados de atividade esquistossomicida e, sabendo-se que alguns compostos anteriormente propostos não foram sintetizados e testados, pode-se elucidar os seguintes dados preliminares sobre a REA do dilapiol: (a) o dilapiol para manter sua atividade deve estar íntegro. A abertura do anel dioxólico da unidade benzodioxol é desfavorável para ação esquistossomicida; (b) as metoxilas do dilapiol são favoráveis mas não essenciais; (c) O grupo alil da cadeia lateral é importante para a atividade e; (d) A

retirada da dupla ligação ou mudança de posição não interfere significativamente na atividade. A seguir está apresentado um modelo esquemático que sintetiza os resultados de REA obtidos:



5.2 PERSPECTIVAS

O presente trabalho foi de grande importância para o desenvolvimento interpessoal e científico do grupo de pesquisa ora formado. Em relação à parte prática, sabe-se que muitas arestas ainda necessitam de melhor estudo e compreensão, mas pode-se afirmar que um novo campo, ainda insipiente na própria universidade está evoluindo. Com os resultados obtidos até o momento fica visível que uma continuação dos ensaios de modificação molecular do dilapiol será válida, podendo chegar a compostos com grande potencial esquistossomicida, além do fato de que "novas" propriedades biológicas atribuídas aos análogos poderão ser descobertas.

O atual trabalho ainda mostra-se inovador e passível de patente, tendo em vista que uma nova substância, de origem natural, com potencial atividade está sendo estudada. Análogos semi-sintéticos poderão apresentar eficácia superior ao protótipo e também terão grandes chances de se tornarem recursos terapêuticos importantes.

A utilização de produtos naturais da flora brasileira ou até mesmo protótipos de origem natural para obtenção de compostos com atividade superior aos fármacos atualmente existentes constitui-se método bastante interessante e excitante. Sendo assim, o presente trabalho terá continuação e não será postergado, tendo em vista alcançar objetivos ainda maiores.

Os pesquisadores continuarão atuando de forma interdisciplinar, de maneira ética, crítica e reflexiva visando gerar e disseminar o conhecimento científico-tecnológico, propiciando a obtenção de produtos e/ou serviços com vistas à melhoria da qualidade de vida nacional.

Pretende-se ainda promover a formação de “novos” recursos humanos para atuar no ensino, na geração e na aplicação de tecnologias no contexto sócio-econômico em que estão inseridos.

Após 12 meses de trabalho intenso, um artigo científico está sendo elaborado para publicação em revista de abrangência internacional. Este artigo trata da elucidação da relação entre estrutura-química e atividade esquistossomocida do dilapiol. Pretende-se, até a metade do ano de 2011, apresentar ao conselho responsável pelo MackPesquisa esta publicação.

A descoberta de novos e melhores fármacos, a partir de fontes naturais ou até mesmo de fontes sintéticas, é relevante para o desenvolvimento da ciência nacional, principalmente no que tange a saúde pública e coletiva. Esta nova área mostra-se como pivô central para a comunidade científica que agora tem em mãos novas possibilidades de aperfeiçoar os tratamentos usuais e melhorar a vida dos pacientes.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-GHANI, R.; LOUTFY, N. SAHN, A. E.; HASSAN, A. Current chemotherapy arsenal for schistosomiasis mansoni: alternatives and challenges. *Parasitol. Res.*, v.104, p.955-965, 2009.

ALMEIDA, A.E.; FERREIRA, A.G.; CRESPI, M.S.; ANDRADE, Z.A.; MAN-CHIN, C. Synthesis and thermal study of prodrug of oxamniquine. *J. Therm. Anal. Cal.*, v.83, p. 277–281, 2006.

ARAÚJO, N., KATZ, N., DIAS, E. P. *et al.* Susceptibility of chemotherapeutic agents of strains of *Schistosoma mansoni* isolated from treated and untreated patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Northbrook, v.29, p.890-894, 1980.

ATSUMI, T.; FUJISAWA, S., SATOH, K.; SAKAGAMI, H.; IWAKURA, I.; UEHAI, T.; SUGITA, Y.; YOKOE, I. Cytotoxicity and radical intensity of eugenol, isoeugenol or related dimers. *Anticancer Res.*, v.20, n.4, p.2519-2524, 2000.

AVERY, M. A.; CHONG, W. K. M.; WHITE, C. J. Stereoselective total synthesis of (+)-artemisinin, the antimalarial constituent of *Artemisia annua* L. *J. Am. Chem. Soc.*, v.114, p.974, 1992.

BARBERATO FILHO, S. *Novos derivados da oxamniquina potencialmente esquistossomicidas*. São Paulo, 1996. 128p. [Tese – Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. A utilização do safrol, principal componente químico do óleo de sassafráz, na síntese de substâncias bioativas na cascata do ácido araquidônico: antiinflamatórios, analgésicos e antitrombóticos. *Quím. Nova*, v. 22, n.5, p.744-759, 1999.

BASHALL, A. P.; COLLINS, J. F. A convenient, high-yieldin method for the methylenation of catechols. *Tetrahedron Lett.*, n.40, p.3489-3490, 1975.

BASTOS, C. N. Efeito do óleo de *P. aduncum* sobre *Crinipellis perniciosa* e outros fungos fitopatogênicos. *Fitopatol. Bras.*, v.3, n.22, p.441-443, 1997.

BELZILE, A. S.; MAJERUS, S. L.; PODESZFINSKI, C.; GUILLET, G.; DURST, T., ARNASON, J. T. Dillapiol derivatives as synergists: structure-activity relationship analysis. *Pest. Biochem. Physiol.*, v.66, p.33-40, 2000.

BERNARD, C. B.; KRISHINAMURTY, H. G.; CHAURET, D.; DURST, T.; PHILOGENE, B. J. R.; SANCHÉS-VINDAS, P.; HASBAUN, C.; POVEDA, L.; ROMAN, L. S.; ARNASON, J. T. Insecticidal defenses of piperaceae from the neotropics. *J. Chem. Ecol.*, v.21, p.801-814, 1995.

BEZERRA, J. C. B.; SILVA, I. A.; FERREIRA, H. D.; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of brazilian cerrado medicinal plants. *Fitoterapia*, v.73, p. 428-430, 2002.

BHATT, M. V.; BABU, J. R. New reagents: aluminium iodide – a highly regioselective ether-cleaving reagent with novel cleavage pattern. *Tetrahedron Lett.* v.25, n.32, p.3497-3500, 1984.

BONTHRONE, W.; CORNFORTH, J. W. The Methylenation of Catechols. *J. Chem. Soc.*, v.1, p.1202-1204, 1996.

BOWMAN, W. R.; CLARK, D. N.; MARMON, R. J. Generation of aminyl radicals using sulfenamides as synthetic precursors. *Tetrahedron*, v.50, n.4, p.1275-94, 1994.

BRANDT, C. A.; FERRAZ, H. M. C.; COMASSETO, J. V. Ciclofuncionalizações envolvendo reagentes de enxofre, selenio e telurio. *Quím. Nova*, v. 14, p. 165-174, 1991.

BRAY, D. H.; WARHUST, D. C.; CONNOLY, J. D.; O'NEILL, M. J.; PHILLIPSON, J. D.. Plants as sources of antimalarial drugs, Part 7. Activity of some species of Meliaceae plants and their constituent limonoids. *Phytotherap. Res.*, 4:29-35, 1990.

BRINDLEY, P. J. Drug resistance to schistosomicides and other antihelmentics of medical significance. *Acta Trop.*, Shannon, v.56, p.213-231, 1994.

BUDZINSKI, J. W.; FOSTER, B. C.; VANDENHOCK, S.; ARNASON, J. T.. An *in vitro* evaluation by semiautomated microdilution technique. *Antimicrobial Agents and Chem.*, 16:710-718, 2000.

CAMACHO, M.R.; PHILLIPSON, S.L.; CROFT, P.N.; MARSHALL, S.J.; GHAZANFAR, S.A. Screening of plants extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. *Journal of Ethnopharmacology*, v.89, p.185-191, 2003.

CARVALHO, S. A., SHIKANAI-YASUDA, M. A., AMATO NETO, V. *et al.* Neurotoxicidade do oxamniquine no tratamento da infecção humana pelo *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v.27, n.3, p.132-142, 1985.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Quím. Nova*, v. 21, n.1, p.99-105, 1998.

CHENG, X. M. *Ann. Rep. Med. Chemi.*, v.31, p.337-355, 1996.

CHITSULO, L., ENGELS, D., MONTRESOR, A. *et al.* The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop.*, Shannon, v.77, p.41-45, 2000.

CHRISTOPHERSON, J. B. The successful use of antimony in bilharziosis. Administered as intravenous injections of antimonium tartaratum (tartar emetic). *Lancet ii.*, London, p.325-327, 1918. Apud: CIOLI, D., PICAMATTOCCIA, L., ARCHER, S. Antischistosomal drugs: past, present...and future? *Pharmacol. Ther.*, Oxford, v.68, n.1, p. 35-85, 1995.

CICCIÓ, J. F.; BALLESTERO, C. M. Constituyentes volátiles de las hojas y espigas de *Piper aduncum* (Piperaceae) da Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.*, v.45, n.2, p.783-793, 1997.

CIOLI, D. Chemotherapy of schistosomiasis: an update. *Parasitol. Today*, Oxford, v.14, n.10, p.418-422, 1998.

CIOLI, D., PICA-MATTOCCIA, L., ARCHER, S. Antischistosomal drugs: past, present...and future? *Pharmacol. Ther.*, Oxford, v.68, n.1, p. 35-85, 1995.

COELHO, F. A. S.; *Tese de Mestrado*, Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1983.

COELHO, P. M. Z., RIBEIRO, F., MELLO, R.T. *et al.* Activity of oxamniquine at skin, pulmonary and sexual maturation phases, on a *Schistosoma mansoni* strain (R1) previously reported as resistant at the adult phase. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.93, suppl. 1, p.267-268, 1998.

COELHO, P. M. Z., SILVA, F. C. L., NOGUEIRAMACHADO, J. A. Resistance to oxamniquine of *Schistosoma mansoni* strain isolated from patient submitted to repeated treatments. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v.39, p.101-106, 1997.

COMASSETO, J.V.; FERREIRA, J. T. B.; BRANDT, C. A.; PETRAGNANI, N. Generation of arylselenolate anions under phase-transfer conditions. *J. Chem. Res.*, v. 8, p. 212-213, 1982.

CONCEIÇÃO, M. J., ARGENTO, C. A., CORRÊA, A. Study of *Schistosoma mansoni* isolates from patients with failure of treatment with oxamniquine. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.93, n.3, p.375-380, 2000.

COSTA, P. R. R. Safrol e eugenol: estudo da reatividade química e uso em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e seus derivados. *Quím. Nova*, v.23, n.3, p.357-369, 2000.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Antineoplastic agentes from natural sources: achievements and future directions. *Experimental Opin. Invest. Drugs*, v.9, p.2783-2797, 2000.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*, v.60, p.52-60, 1997.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. The influence of natural products in drug discovery. *Nat. Prod. Rep.*, v.17, p.215-234, 2000.

DE MARCO, R.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Schistosomes-proteomics studies for potential novel vaccines and drug targets. *Drug Discovery Today*. v.14, n.9/10, p.472-478, 2009.

DIAS, L. C. S., PEDRO, R. J., REGO, E. *et al.* Linhagem humana de *Schistosoma mansoni* resistente a esquistossomicidas. *Rev. Saúde Pública*, v.72, p.110, 1978.

DIAZ, P. P.; RAMOS, B. C.; MATTA, G. E. New C₆-C₃ and C₆-C₁ compounds from *Piper lenticillosum*. *J. Nat. Prod.*, v. 49, n.4, p.690-691, 1986.

DOENHOFF, M. J. A vaccine for schistosomiasis: alternative approaches. *Parasitol. Today*, Oxford, v.14, n. 3, p.105-109, 1998.

DUKE, J. A. *Handbook of Medicinal Herbs*, CRC Press: New York, 1985. p.378-383.

FALLON, P. G., DOENHOFF, M. J. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Northbrook, v.51, n.1, p.83-88, 1994.

FARIAS, F. M. C.; *Tese de Mestrado*, Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1984.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L. V.; CATANI, V.; LIMA, M. S.; ALÉCIO, M, R. Toxicidade de óleo de *Piper aduncum* L. a adultos de *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleóptera: Chrysomelidae). *Neotrop. Entomol.*, v.34, n.3, p.485-489, 2005.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L. V.; CATANI, V.; LIMA, M. S.; ALÉCIO, M, R. Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C. DC.; *Piper aduncum* L. e *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum sobre *Tenebrio molitor* L., 1758. *Ciênc. Agrotec.*,v.31, n.1, p.113-120, 2007.

FERREIRA, H. S., COUTINHO, E. M. Should nutrition be considered as a supplementary measure in schistosomiasis control? *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, Oxon, v.93, n.5, p.437-447, 1999.

FOWLER, R., LEE, C., KEYSTONE, J. S. The role of corticosteroids in the treatment of cerebral schistosomiasis caused by *S. mansoni* – case report and discussion. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Northbrook, v.61, n.1, p.47-50, 1999.

FRITSCHÉ, T. R., SMITH, J. W. Parasitologia médica. In: HENRY, J. B., ed. *Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais*. 19. ed. São Paulo: Editora Manole Ltda., 1999. cap.53, p. 1292-1293.

GAIA, J. M. D.; MOTA, M. G. C.; CONCEIÇÃO, C. C. C.; COSTA, M. R; MAIA, J. G. S. Similaridade genética de populações naturais de pimenta-de-macaco por análise RAPD. *Horticult. Bras.*, v. 22, n.4, p.686-689, 2004.

GANESH, T.; KRUPADANAM, G. L. D. A novel synthesis of 2-hydroxymethyl-3-phenyl-1,4-benzodioxanes. *Synthetic Comm.*, v.28, n.16, p.3121-3131, 1998.

GARETH, T. *Química Medicinal: uma introdução*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

GOMÉZ, P.; CUBILLO, D.; MORA, G. A.; HILJE, L.. Evaluation of possible repellents for *Bemisia tabaci*. II. Botanical Substances. *Manejo Integrado de Plagas*, 1997.

GONTIJO B.; BITTENCOURT F.V.; LOURENÇO L.F.S.. Manifestações cutâneas decorrentes do uso de drogas ilícitas. *Anais Bras. Dermatol.*, v. 81, n.4, p.307-317, 2006.

GOTTLIEB, O. R. M.; KOKETSU, M.; MAGALHÃES, M. T.; MAIA, J. G. S.; MENDES, P. H.; ROCHA, A. I.; SILVA, M. L.; WILBERG, V. C. Óleos essenciais da Amazônia VII. *Acta Amazonica*, v. 11, p. 143-148, 1981.

GREEN, T. P.; TREADWELL, E. M.; WIEMER, D. F. Arieianal, a prenylated benzoic acid from *Piper arieianum*, *J. Nat. Prod.*, v.62, p.367-368, 1999.

GUITTI, J. C. S., GORDAN, L. N., BALDY, J. L. S. Arritmia cardíaca com uso de oxamniquine oral no tratamento de esquistossomose mansônica. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v.35, n.6, p.585-587, 1993.

HAGAN, P., EL MELEIGY, M., TRAORE, M. Schistosomiasis research: the end of the beginning, *Parasitol. Today*, Oxford, v.14, n.10, p.392-394, 1998.

HOTEZ, P. J.; MOLYNEUX, D. H.; FENWICK, A.; KUMARESAN, J.; SACHS, S. E.; SACHS, J. D.; SAVIOLI, L. Control of Neglected Tropical Diseases. *New England J. Med.*, v. 357, n.10, p. 1018-1027, 2007.

HOWARD, R. A. Flora of the Lesser Antilles, Leeward and Windward Islands. *Dicotyledoneae*, v. 4, p.1, 1998.

IBRAHIM; ABU-SAID, J. A.; ABDUL-RASHIH, A.; NOR-AZAH, M. A.; ZARIDAH, M. Z.; AZIZOL, A. K.; NORHARA-HUSSEIN; BACON, P. S.; KHOO, K. C.. Essential oils of selected Malaysian plants and their potential uses. *Forestry and Forest Products Research, Proceedings of the Third Conference Oct. 3-4, 1995*, 1996.

ISMAIL, M., BOTROS, S., METWALLY, A., WILLIAM, S., FARGHALLY, A., TAO, L, DAY, T. A., BENNETT, J. Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 60, p. 932–935, 1999.

JAMES, S., COLLEY, D. Schistosomiasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, London, v.8, p.351-355, 1995.

JENNET-SIEMS, K.; MOCKENHAUPT, F. P.; BIENZIE, U.; GUPTA, H. P.; EICH, E.. *In vitro* antiplasmodial activity of Central American medicinal plants. *Tropical Medicine and International Health*, 1999.

KABALKA, G. W.; SASTRY, K. A. R.; HSU, H. C.; HYLARIDES, M. D. Facile conversion of alkenes into alkyl bromides via reaction of organoboranes with bromine or bromine chloride. *J. Org. Chem.*, v.46, n.15, p.3113-3115, 1981.

KANAZAWA, A. M.; DENIS, J-N.; GREENE, A. E. highly stereocontrolled and efficient preparation of the protected, esterification-ready docetaxel (taxotere) side chain. *J. Org. Chem.*, v.59, p.1238, 1994.

KATZ, N. Dificuldades no desenvolvimento de uma vacina para esquistossomose mansoni, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Rio de Janeiro, v.32, n.6, p.705-711, 1999.

KOROLKOVAS, A., BURCKHALTER, J. H. *Química Farmacêutica*, São Paulo: Guanabara Dois, 1988.

KRAJDEN, S., KEYSTONE, J. S., GLENN, C. Safety and toxicity of oxamniquine in the treatment of *Schistosoma mansoni* infections, with particular reference to electroencephalographic abnormalities. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Northbrook, v.32, n.6, p.1344-1346, 1983.

KUMAR, S.; ARYA, P.; MUKHERJEE, C.; SINGH, B. K.; SINGH, N.; PARMAR, V. S.; PRASAD, A. K.; GHOSH, B. Novel aromatic ester from *Piper longum* and its analogues inhibit expression of cell adhesion molecules on endothelial cells. *Biochem.*, v.44, p.15944-15952, 2005.

LAGO, J. H. G.; SOARES, M. G.; BATISTA-PEREIRA, L. G.; SILVA, M. F. G. F.; CORREA, A. G.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P.C.; ROQUE, N.F. Volatile oil from *Guarea macrophylla* ssp. *tuberculata*: seasonal variation and electroantennographic detection by *Hypsipyla grandella*. *Phytochem.*, v.67, p.589-594, 2006.

LAGO, J.H.G.; RAMOS, C.S.; CASANOVA, D.C.C.; MORANDIM, A.; BERGAMO, D.C.B.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M.; GUIMARÃES, E.F.; YOUNG, M.C.M.; KATO, M.J. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. *J. Nat. Prod.*, v.67, p.1783, 2004.

LAGO, J.H.G.; TANIZAKI, T.M.; YOUNG, M.C.M.; GUIMARÃES, E.F.; KATO, M.J. Antifungal piperolides from *Piper malacophyllum* (Prels) C. DC. *J. Braz. Chem. Soc.*, v.16, p.153, 2005.

LEYTON, V.; HENDERSON, T. O.; MASCARA, D.; KAWANO, T. Atividade moluscicida de princípios ativos de folhas de *Lycopersicon esculentum* (Solanales, Solanaceae) em *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Planorbidae). *Iheringia, Sér. Zool.*, v.95, n.2, p.213-216, 2005.

LI, S. *et al.* Studies on prophylactic effect of artesunate on schistosomiasis japonica. *Chin. Med. J.*, v.109, p.848- 853. 1996. Apud: CIOLI, D. Chemotherapy of schistosomiasis: an update. *Parasitol. Today*, Oxford, v.14, n.10, p.418-422, 1998.

LI, X.; FERREIRA, D.; JACOB, M. R.; ZHANG, Q.; KHAN, S. I.; ELSOHLY, H. N.; NAGLE, D. G.; SMILLIE, T. J.; KHAN, I. A.; WALKER, L. A.; CLARK, A. M. Antifungal cyclopentenediones from *Piper coruscans*. *J. Am. Chem. Soc.*, v.126, p.6872-6873, 2004.

LIMA, M. E. F., GABRIEL, A. J. A., CASTRO, R. N. Synthesis of a new strigol analogue from natural safrole. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 11, n. 4, p. 371-374, 2000.

LIOGIER, H. A.. Descriptive flora of Puerto Rico and adjacent islands. *Spermatophyta*, v. 1; 1985.

LIOGIER, H. A.. Plantas medicinales de Puerto Rico y del Caribe. *Iberoamericana de Ediciones, Inc.* 566 p., 1990.

LITTLE, E. L.; WADSWORTH, F. H.. Common trees of Puerto Rico and the Virgin Islands. *Agriculture Handbook 249*, 1964.

LOBATO, A. K. S.; SANTOS, D. G. C., OLIVIRA, F. C.; GOUVEA, D. D. S.; TORRES, G. I. O. S.; LIMA-JUNIOR, J. A.; OLIVEIRA-NETO, C. F.; SILVA, M. H. L. Ação do óleo essencial de *Piper aduncum* L. utilizada como fungicida natural no tratamento de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Rev. Bras. Biocienc.*, v.5, supl.2, p.915-917, 2007.

MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. G. S.; ANDRADE, E. H. A.; SANTOS, A. S.; SILVA, M. L.; LUZ, A. I. R.; BASTOS, C. N. Constituintes of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing in the Amazon Region. *Flavour and Fragrance J.*, v. 13, p. 269-272, 1998.

MAJERUS, S. L.; ALIBHAI, N.; TRIPATHY, S.; DURST, T. New syntheses of dillapiol [4,5-dimethoxy-6-(2-propenyl)-1,3-benzodioxole], its 4-methylthio and other analogs. *Canadian J. Chem.*, v.78, p.1345-1355, 2000.

MAJERUS, S. L.; ALIBHAI, N.; TRIPATHY, S.; DURST, T. New syntheses of dillapiol [4,5-dimethoxy-6-(2-propenyl)-1,3-benzodioxole], its 4-methylthio and other analogs. *Canadian J. Chem.*, v.78, p.1345-1355, 2000.

MASUDA, T.; INAZUMI, A.; YAMADA, Y.; PADOLINA, W. G.; KIKUZAKI, H.; NAKATANI, N. Constituintes of Piperaceae. 4. Antimicrobial phenylpropanoids from *Piper sarmentosum*. *Phytochem.*, v. 30, n.10, p.3227-3228, 1991.

MATOS, L. G.; SANTOS, L. D. A. R.; VILELA, C. F.; PONTES, I. S.; TRESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R.; COSTA, E. A. Atividade analgésica e/ou antiinflamatória da fração aquosa do

extrato etanólico das folhas de *Spiranthera odoratissima* A. St. Hillaire (manacá). *Rev. Bras. Farmacog.*, v.13, p.15-16, 2003.

MAXWELL, A.; RAMPERSAD, D. A new amide from *Piper demeraranum*. *J. Nat. Prod.*, v.52, n.4, p.891-892, 1989.

MENEGATTI, R.; FRAGA, M. C. A.; BARREIRO, E. J. A importância da síntese de fármacos. *Cadernos Temáticos da Química Nova na Escola*, n.3, p.16-22, 2001.

MENEZES, L. E. Q., SIQUEIRA, R. B., SILVA, O. L. *et al.* Treatment of schistosomiasis. *Rev. Bras. Med.*, v.50, n.3, p.358-387, 1993.

MESQUITA, J.M.O. Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae. *Rev. Bras. Farmacog.*, v.15, n.1, p.46-50, 2005.

MIYAKE, H.; TSUMURA, T.; SASAKI, M. Simple Desprotection of acetal types protecting groups under neutral conditions. *Tetrahedron Lett.*, v. 45, p. 7213-7215, 2004.

MOHAKHUD, P. K., KUMAR, S., KUMAR, V., KUMAR, R., BABU, M., REDDY, O. Diastereoselective synthesis of some novel benzopyranopyridine derivatives. *Beilstein J. Org. Chem.*, v.2, p.25, 2006.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Quím. Nova*, v.24, n.1, p.105-111, 2001.

MONTEIRO, G. M.; LIRA, D. S.; MAIA, J. G. S.; BARROS, C. A. L.; SOUSA, P. J. C. Acute and subacute toxicity of the essential oil of *Piper aduncum*. *European J. Pharm. Sci.*, v.13, p.S153, 2001.

MOREIRA, D. L.; SOUZA, P. O.; KAPLAN, M. A. C.; PEREIRA, N. A.; CARDOSO, G. L.; GUIMARÃES, E. F. Effect of leaf essential oil from *Piper solmsianum* C.DC. in mice behaviour. *Anais da Acad. Bras. Cienc.*, v.73, n.1, p.33-37, 2001.

MOREIRA, R. C. R.; COSTA, G. C.; LOPES, T. C. BEZERRA, J. L.; GUERRA, R. N. M.; REBELO, J. M. M.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; COSTA, J. M. L. Efeito leishmanicida *in vitro* de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae). *Rev. Bras. Farmacog.*, v.17, n.1, p.59-63, 2007.

MURRAY-SMITH, S.Q., SCOTT, B.J., BARTON, D.P. & WEINSTEIN, P. A case of refractory schistosomiasis. *Med. J. Australia*, v.165, p.458, 1996.

NARISADA, M., HORIBE, I., WATANABE, F., TAKEDA K. Selective reduction of aryl halides and α,β -unsaturated esters with sodium borohydride-cuprous chloride in methanol and its application to deuterium labeling. *J. Org. Chem.*, v.54, p. 5308-5313, 1989.

OKUNADE, A. L.; HUFFORD, C. D.; CLARK, A. M.; LENTZ, D. Antimicrobial properties of the constituents of *Piper aduncum*. *Phytotherapy Res.*, v. 2, p.142-144, 1997.

OMAR, S.; GODARD, K.; INGHAM A.; HUSSAIN, H.; WONGPANICH, V.; PEZZUTO, J.; DURST, T.; EKLU, C.; GBEASSOR, M.; SANCHEZ-VINDAS, P.; POVEDA, L.; PHILOGENE, B. J. R.; ARNASON, J. T.. Antimalarial activities of gedunin and 7-methoxygedunin and synergistic activity with dillapiol. *Ann. Appl. Biol.*, 143:135-141, 2003.

ORJALA, J.; WRIGHT, A. D.; BEHREND, H.; FOLKERS, G.; STICHER, O.; RUEGGER, H.; RALI, T. Cytotoxic and antibacterial dihydrochalcones from *Piper aduncum*. *J. Nat. Prod.*, v.56, p.18, 1994.

PARISE-FILHO, R., ARAÚJO, A. A. S., SANTOS-FILHO, M., MATOS, J. R., SILVEIRA, M.A.B, BRANDT, C. A. Thermoanalytical characterization of potentially schistosomicide polymeric derivatives, *J. Therm. Anal. Calor.*, v. 75, p.487-494, 2004.

PARISE-FILHO, R., MENEZES, C. M. S., PINTO, P. L. S., PAULA, G. A., BRANDT, C. A., SILVEIRA, M. A. B. Design, synthesis and in vivo evaluation of oxamniquine methacrylate and acrylamide prodrugs. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 15, p.1229-1236, 2007.

PARISE-FILHO, SILVEIRA, M. A. B. Panorama atual da esquistossomíase no mundo. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v.37, n.2, p.123-135, 2001.

PARMAR, V.; JAIN, S.C.; BISHT, K.S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O.D.; PRASAD, A.K.; WENGEL, J.; OLSEN, C.E.; BOLL, P.M. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochem.*, v.46, p.597, 1997.

PATANI, G. A.; LAVOIE, E. J. Bioisosterism: A rational approach in drug design. *Chem. Rev.*, v.96, p.3147-3176, 1996.

PATRICK, G. L. *An introduction to medicinal chemistry*. 2.ed., New York: Oxford University Press, 2001.

PELLEGRINO, J.; FARIA, J. The oogram Method for the Screening of Drugs in Schistosomiasis Mansoni *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.14, p.363, 1965.

PELLEGRINO, J.; SIQUEIRA, A. F. TÉCNICA de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infectadas. *Rev. Bras. Malar. Doen. Trop.*, v.8, p.589, 1956.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; NETO, F. R. A., Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Quím. Nova*, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.

PINK, R., HUDSON, A., MOURIÈS, M. A., BENDIG, M. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nature Rev. Drug Discov.*, v. 4, p.727-740, 2005.

RACHID, M.; SCHECHTER, M. Medicamentos anti-retrovirais e Drogas Recreativas: Interações Medicamentosas. *Prática Hospitalar*, Ano VI, n°34, 2004.

REMAIS, J., LIANG, S., SPEAR, R. Coupling Hydrologic and Infectious Disease Models To Explain Regional Differences in Schistosomiasis Transmission in Southwestern China. *Environment Science Technology*, v.42, p.2643-2649, 2008.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, G.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; LEITE, L. C. C. Schistosomiasis – a century searching for chemotherapeutic drugs. *Parasitol. Res.*, v.99, p.505-521, 2006.

RONKETTI, F.; RAMANA, A. V.; CHAO-MING, X.; PICA-MATTOCCIA, L.; CIOLI, D.; TODD, M. H. Praziquantel derivatives I: Modification of aromatic ring. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 17, p.4154-4157, 2007.

SAMPAIO, S. C. Obtenção de macrófagos peritoneais. *In: Peres, C. M.; Curi, R. Como cultivar células*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Cap. 19, 2005. p.111-113.

SANTOS, M. L. G.; VILELA, L. D. A. R.; PONTES, I. S.; TRESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R.; COSTA, E. A. Atividades analgésica e/ou anti-inflamatória da fração aquosa do extrato etanólico das folhas da *Spiranthera odoratissima* A. St. Hillaire (manacá). *Rev. Bras. Farmacog.*, v.13, p.15-16, 2003.

SATO, K.; KISHIMOTO, T.; MORIMOTO, M.; SAIMOTO, H.; SHIGEMASA, Y. Hidrolysis of acetals under hydrothermal conditions. *Tetrahedron Lett.*, v. 44, p.8623-8625, 2003.

SAYED, A. A., SIMEONOV, A., THOMAS, C. J., INGLESE, J., AUSTIN, C. P. WILLIAMS, D. L. Identification of oxadiazoles as new drug leads for the control of schistosomiasis. *Nature Med.*, v. 14, n.4, 2008.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RAZMILIC, I.; SAUVAIN, M.; MORETTI, C.; MUNOZ, V. Antiprotozoal activity of jatrogrossidione from *Jatropha grossidentada* and jatrophone from *Jatropha isabelli*. *Phytotherapy Res.*, v.10, p. 375-378. 1996

SENGUPTA, S.; RAY, A. B. The chemistry of *Piper* species: A review. *Fitoterapia*, v.58, p.147-166, 1987.

SHUHUA, X. *et al.* Experimental studies on early treatment of schistosomal infection with artemether. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health.*, Bangkok, v.26, p.306-318, 1995. Apud: CIOLI, D. Chemotherapy of schistosomiasis: an update. *Parasitol. Today*, Oxford, v.14, n.10, p.418-422, 1998.

SHUHUA, X., CATTO, B. A. *In vitro* and *in vivo* studies of the effect of artemether on *Schistosoma mansoni*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v.33, p.1557-1562, 1989.

SHUHUA, X., CHOLLET, J., WEISS, A. *et al.* Preventive effect of artemether in experimental animals infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitol. Int.*, London, v.49, p.19-24, 2000.

SHULGIN, A. Possible implication of myristicin as a psychotropic substance. *Nature*, v.210, p. 380-384, 1966.

SILVA, D. M. M. H.; BASTOS, C. N. Antifungal activity of essential oils of *Piper* species against *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* and *Phytophthora capsici*. *Fitopatol. Bras.*, v. 32, n. 2, 2007.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. *Biometry – the principles and practice of statistics*. 2. ed. New York: W. H. Freeman. 1981. 859p.

SOUSA, P. J. C.; BARROS, C. A. L.; ROCHA, J. C. S.; LIRA, D. S.; MONTEIRO, G. M., MAIA, J. G. S. Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper aduncum* L. *Rev. Bras. Farmacog.*, v.18, n. 2, p.10-13, 2008.

SOUSA, P.J.C., ROCHA, J.C.S., PESSOA, A.M., ALVES, L.A.D., CARVALHO, J.C.T. Estudo preliminar da atividade antiinflamatória de *Bryophillum calycinum* Salisb. *Rev. Bras. Farmacog.*, v.15, p.60-64, 2005.

SOUZA, I. P.; KANG, H. C.; NARDINELLI, L.; BORELLI, P. Desnutrição protéica: efeito sobre o espriamento, fagocitose e atividade fungicida de macrófagos peritoneais. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v.37, n.2, 2001.

SOYEZ, H., SCHACHT, E., VANDERKERDEN, S. The crucial role of spacer groups in macromolecular prodrug design. *Adv. Drug Delivery Rev.*, Amsterdam, v.21, n.2, p.81-106, 1996.

SPARG, S. G.; VAN STADEN, J.; JÄGER, A.K. Efficiency of traditionally use south African plants agains schistosomiasis. *J. Ethnopharmacol.*, v.73, p. 209-214, 2000.

STOKVIS, H., BAUER, A. G. C., STUIVER, P. C. *et al.* Convulsions after oxamniquine. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v.81, p.880, 1987.

TANEMURA, K.; SUZUKI, T.; NISHIDA, Y.; SATSUMABAYASHI, K.; HORAGUCHI, T. A mild and efficiente procedure for α -bromination of ketones using *N*-bromosuccinimide catalysed by ammonium acetate. *Chem. Commun.*, p.470-471, 2004.

VIEGAS-JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Quím. Nova*, v.29, n.2, p.326-337, 2006.

WERMUTH, C. G. (Ed.) *The Practice of Medicinal Chemistry*, 2.ed., Elsevier Academic Press, London, 2003.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Memoranda: molluscicide screening and evaluation. *Bulletin of the World Health Organization*, v.33, p.567-576, 1965.

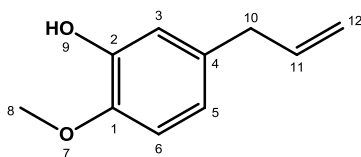
WILLIAMS, D. A.; LEMKE, T. L. *Foye's Principles os Medicinal Chemistry*. 5ª Ed., Philadelphia, EUA: Lippincott Williams & Wilkins, 2002.

YUE, W-j., YU, S-h., XU, X-j. Failure to induce resistance of *Schistosoma japonicum* to praziquantel. Apud: *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, Bangkok, v.21, p.85-89, 1990.

YUNKER, T. G. The Piperaceae of Brazil I-Piper-Group I, II, III, IV. *Hohenia*, v.2, p.19-366, 1972.

ANEXOS

ANEXO A – Cromatogramas de CG-MS e espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do Eugenol



Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

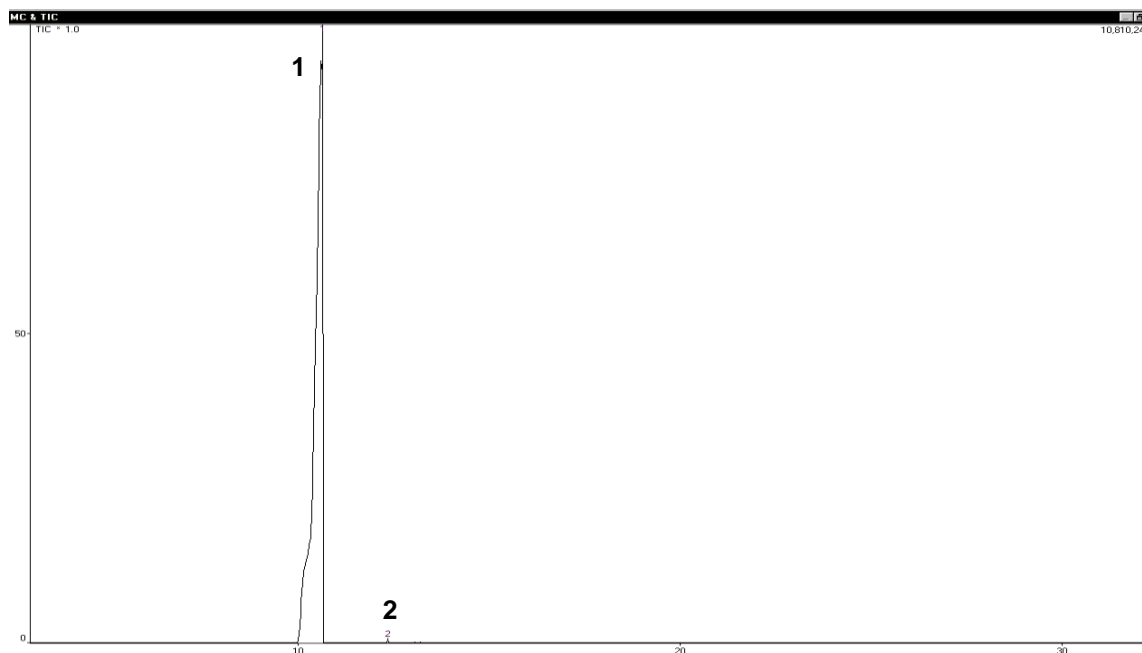
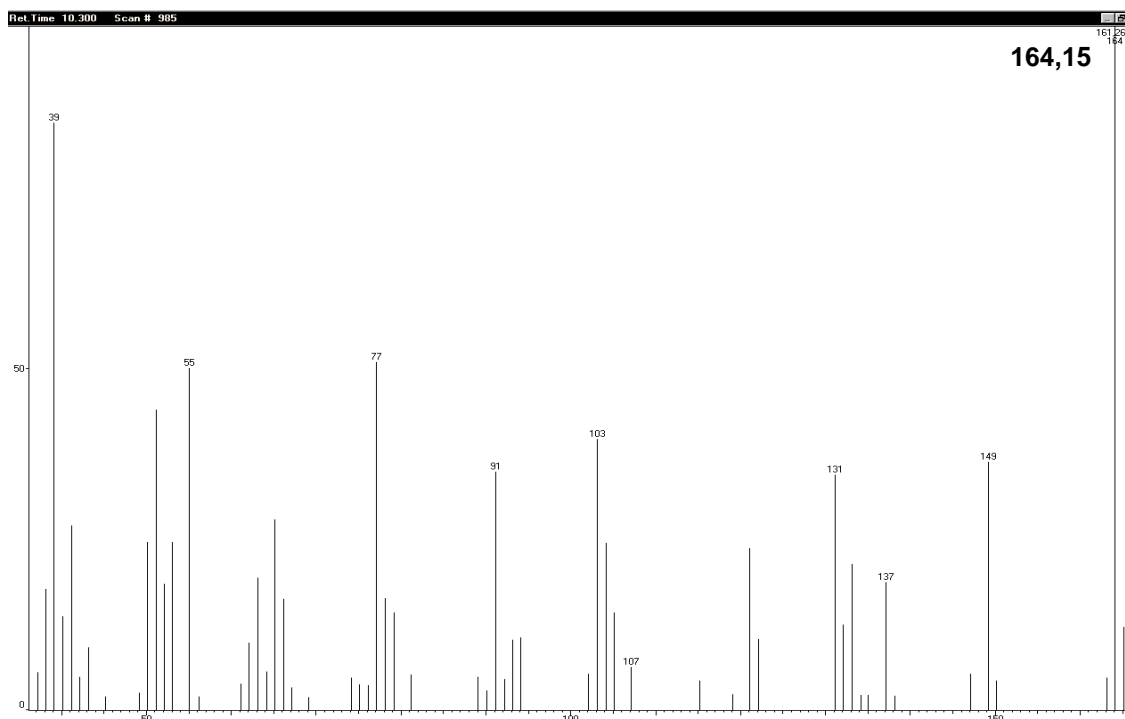
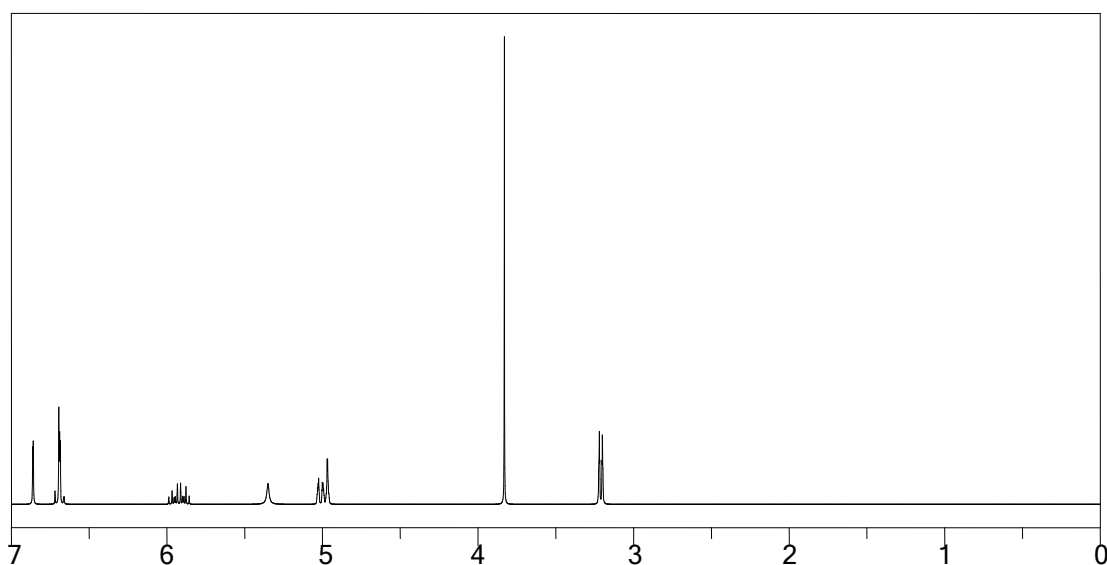


TABELA XXII - Picos obtidos no cromatograma de CG-MS e suas porcentagens para a composição do óleo de eugenol.

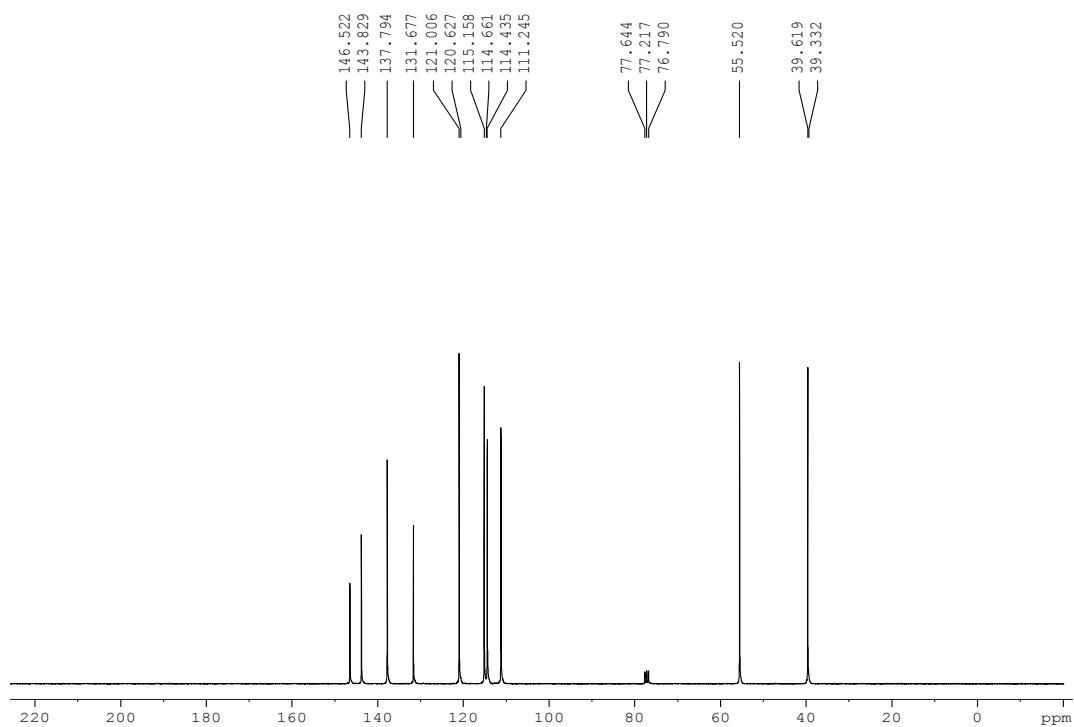
PKNO	%Total
1	99,91
2	0,09



Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

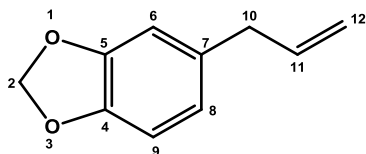


ATRIBUIÇÕES: RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz, δ =ppm) 3,21 (d, 2H, H-10); 3,83 (s, 3H, H-8); 4,98-5,00 (m, 1H, H-12); 5,35 (s, 1H, H-9); 5,92 (t, 1H, H-11); 6,68 (d, 1H, H-5); 6,70 (d, 1H, H-6); 6,86 (s, 1H, H-3).

Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C 

ATRIBUIÇÕES: RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75MHz, δ =ppm) 39,61(C10); 55,52(C8); 111,24(C6); 114,35(C3); 115,15(C12); 121,00(C5); 131,67(C4); 137,79(C11); 143,82(C2); 146,52(C1).

ANEXO B – Cromatogramas de CG-MS e espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do Safrol



Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

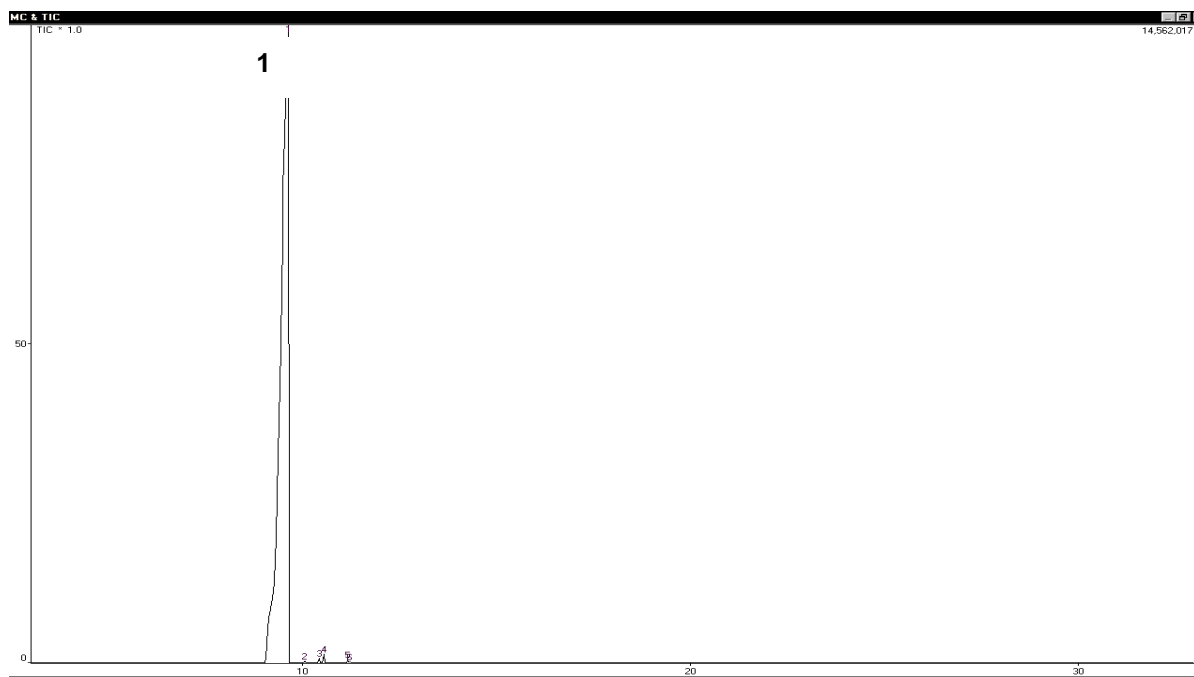
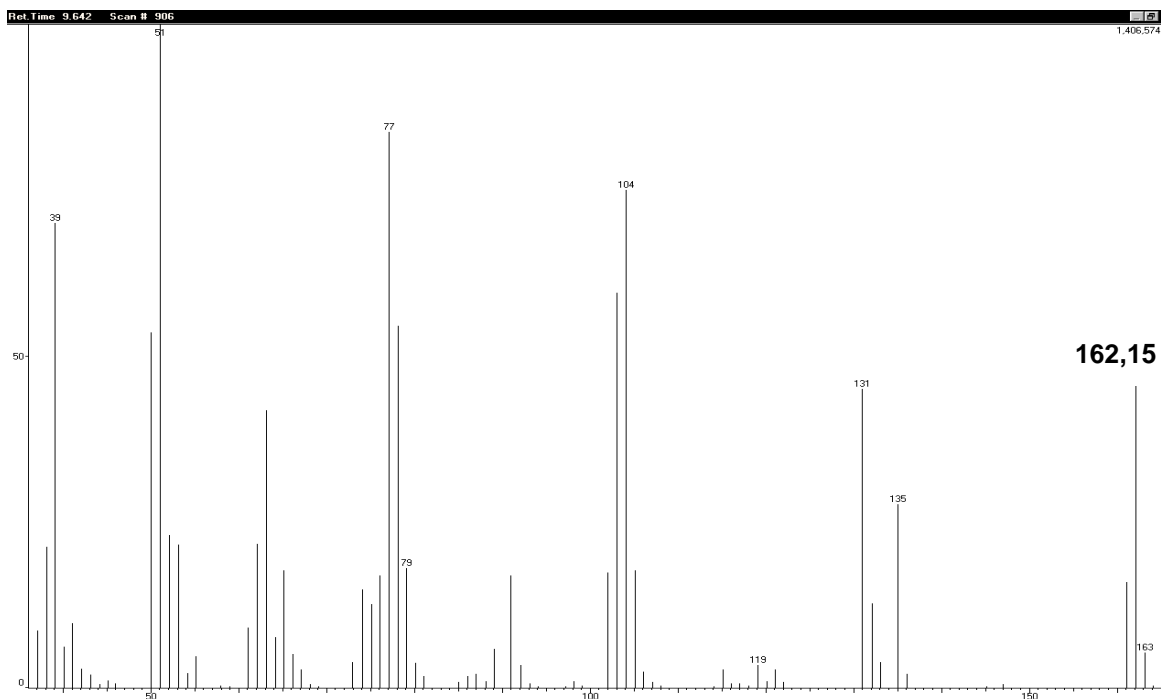
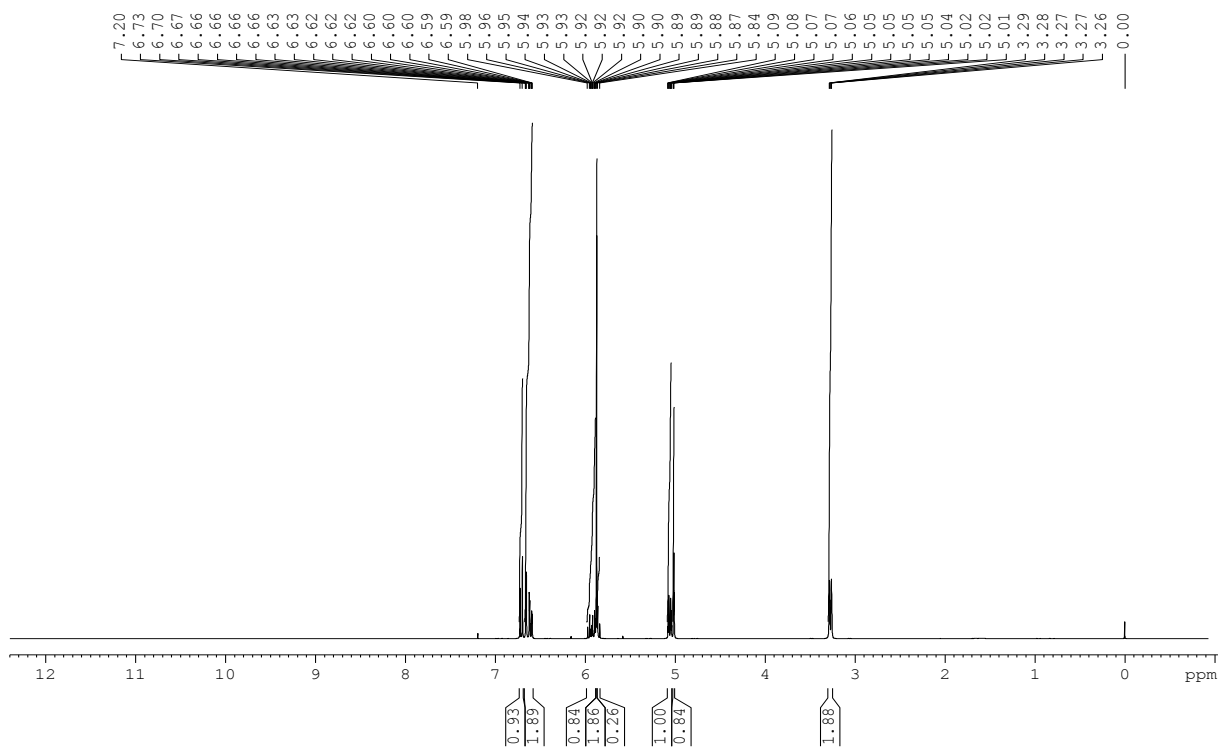


TABELA XXIII - Picos obtidos no cromatograma de CG-MS e suas porcentagens para a composição do óleo de safrol.

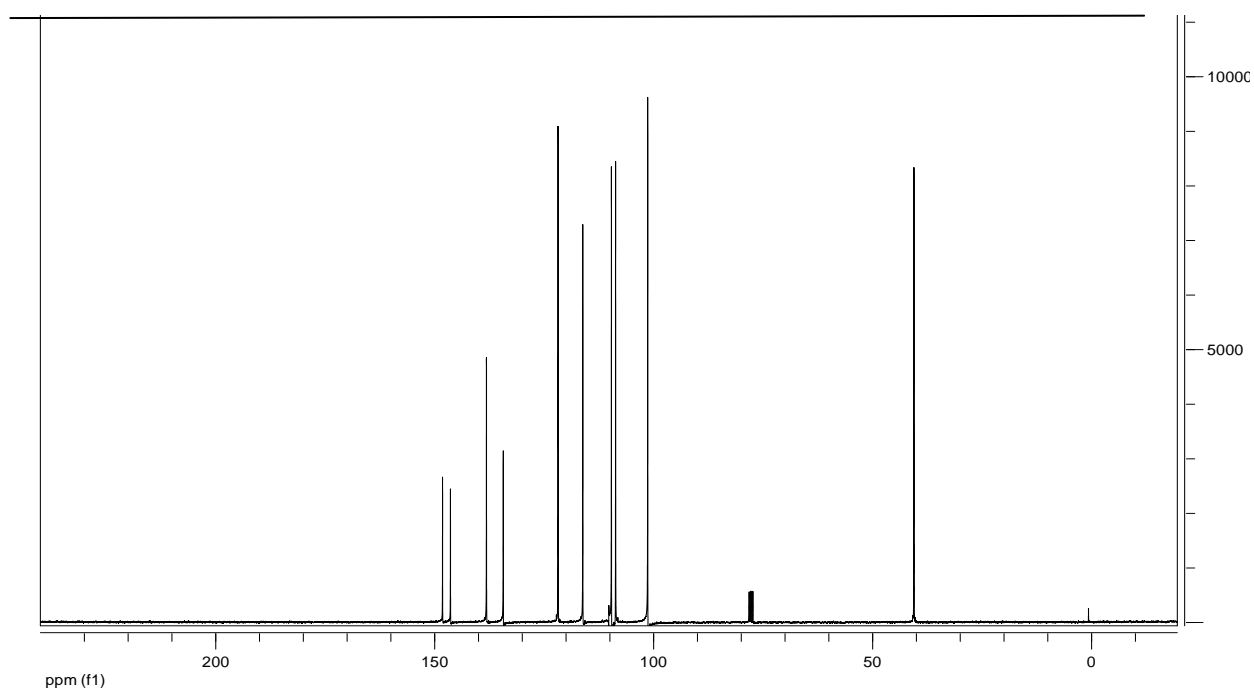
PKNO	%Total
1	99,69
2	0,02
3	0,07
4	0,15
5	0,05
6	0,01



Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

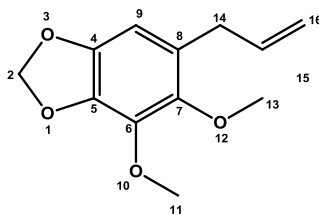


ATRIBUIÇÕES: RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz, δ =ppm) 3,27 (d, 2H, H-10); 5,01-5,09(m, 2H, H-12); 5,84-5,98 (m, 1H, H-11); 5,88 (s,2H, H-2); 6,59-6,67 (m, 2H, H-9,H-8); 6,70 (s, 1H, H-4).

Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C 

ATRIBUIÇÕES: RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75MHz, δ =ppm) 40,21(C10); 101,09(C2); 108,43(C9); 109,75(C4); 115,93(C12); 121,59(C8); 133,99(C7); 138,36(C11); 146,7(C4); 148,41(C5).

ANEXO C – Cromatogramas de CG-MS e espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do Dilapiol



Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

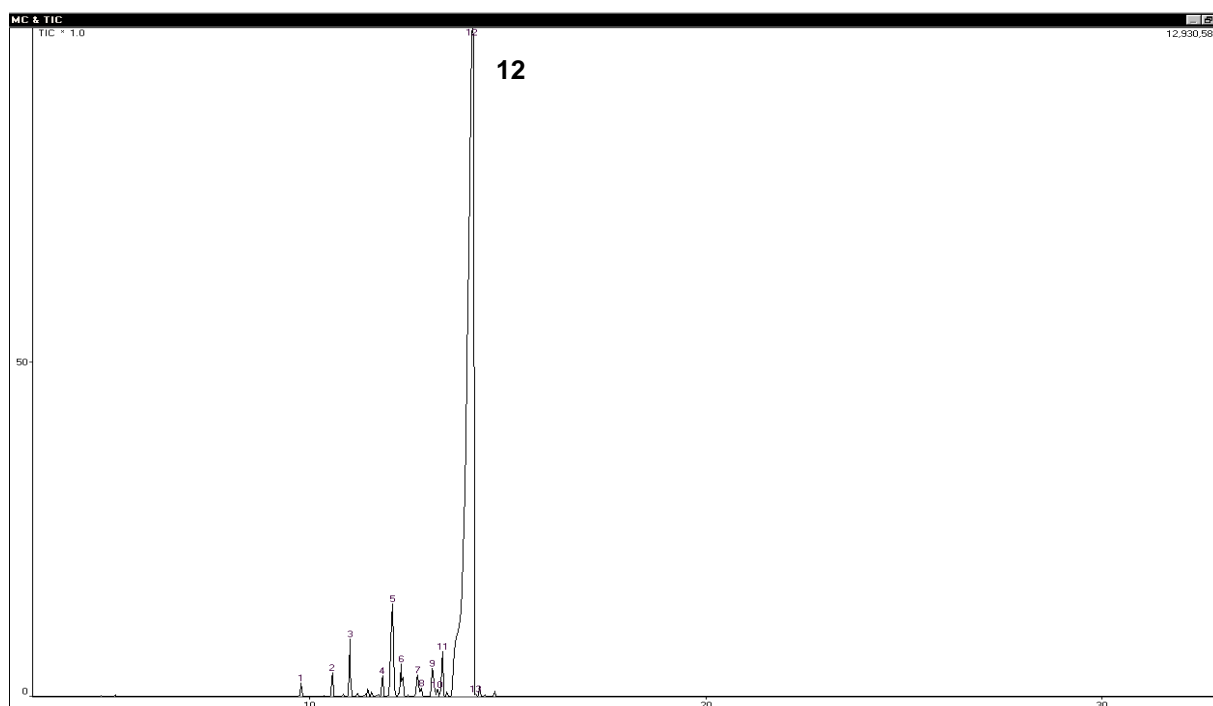
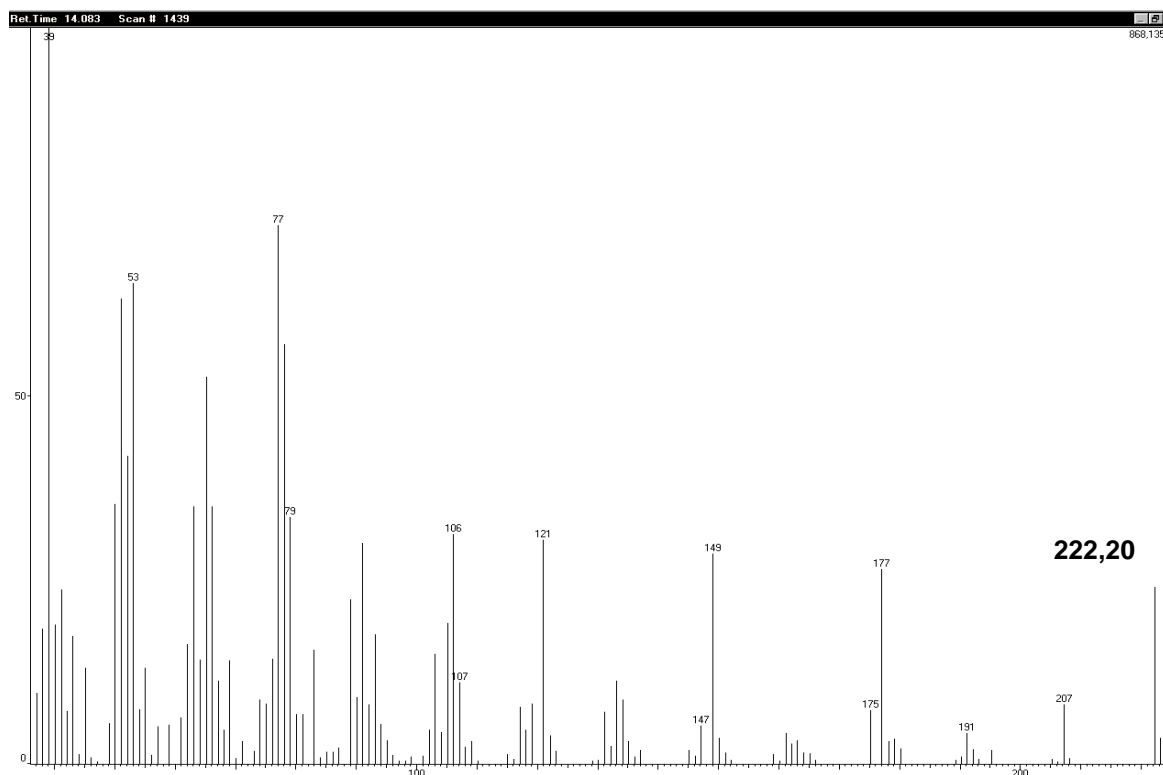
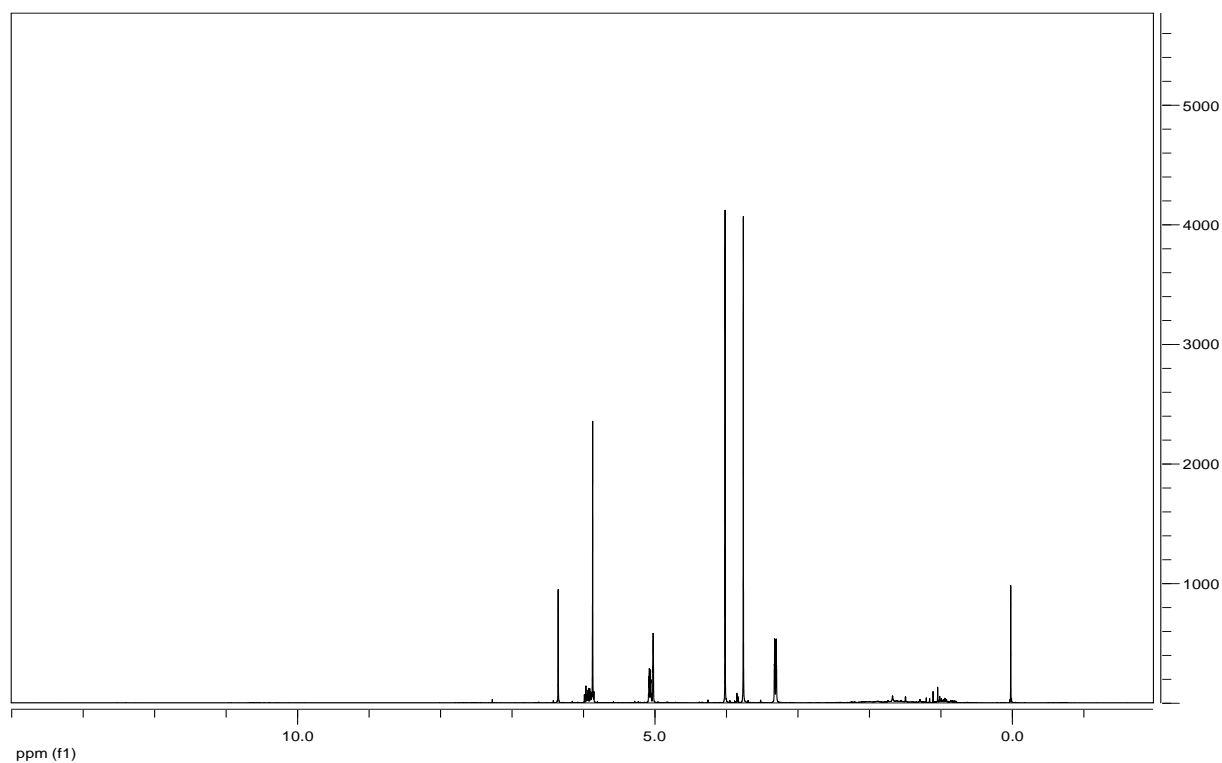


TABELA XXIV - Principais picos obtidos no cromatograma de CG-MS e suas porcentagens para a composição do óleo de dilapiol.

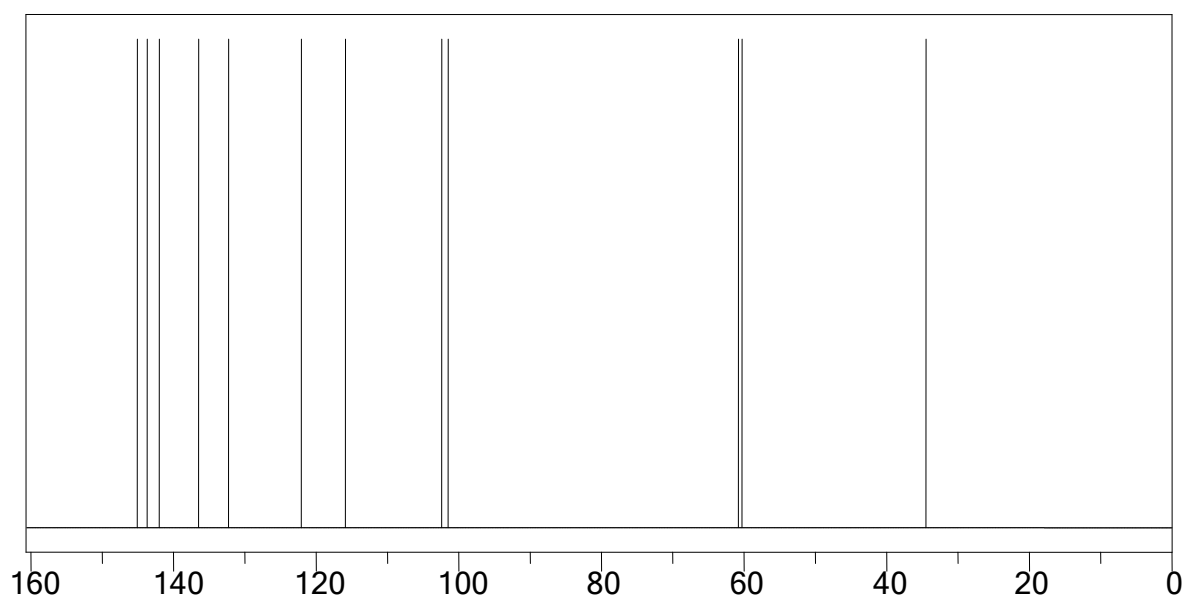
PKNO	%Total
3	1,32
5	4,18
6	1,28
9	1,00
11	1,12
12	88,61



Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

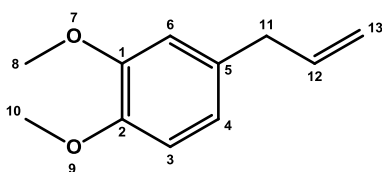


ATRIBUIÇÕES: RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz, δ =ppm) 3,31(d,2H,H14); 3,75(s,3H,H-13); 4,00(s,3H,H-11); 5,01(d,2H,H-16); 5,88(m,1H,H-15); 6,15(s,2H,H-2); 6,35(s,1H,H-9).

Ressonância Magnética de ^{13}C 

ATRIBUIÇÕES: RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75MHz, δ =ppm) 34,5(C14); 60,3(C13); 60,8(C14); 101,5(C2); 102,4(C9); 115,9(C16); 122,1(C8); 132,3(C5); 136,5(C15); 142,0(C4); 143,6(C7); 145,1(C6).

ANEXO D – Cromatogramas de CG-MS e espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do Metileugenol



Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

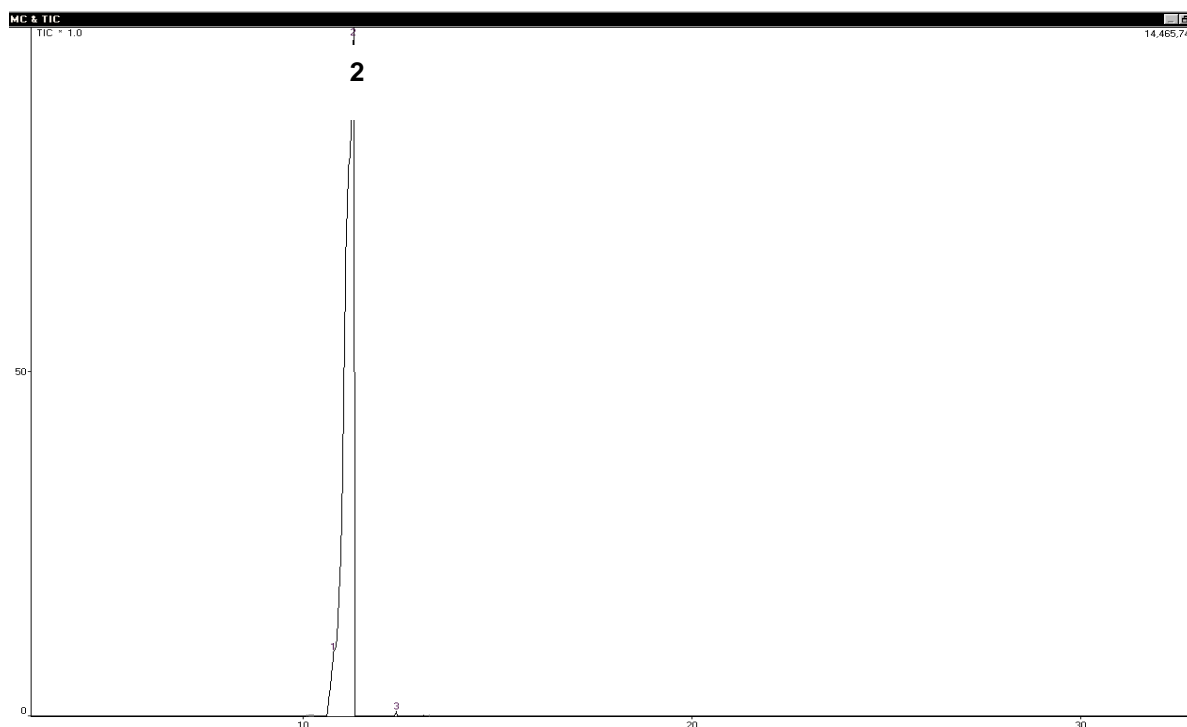
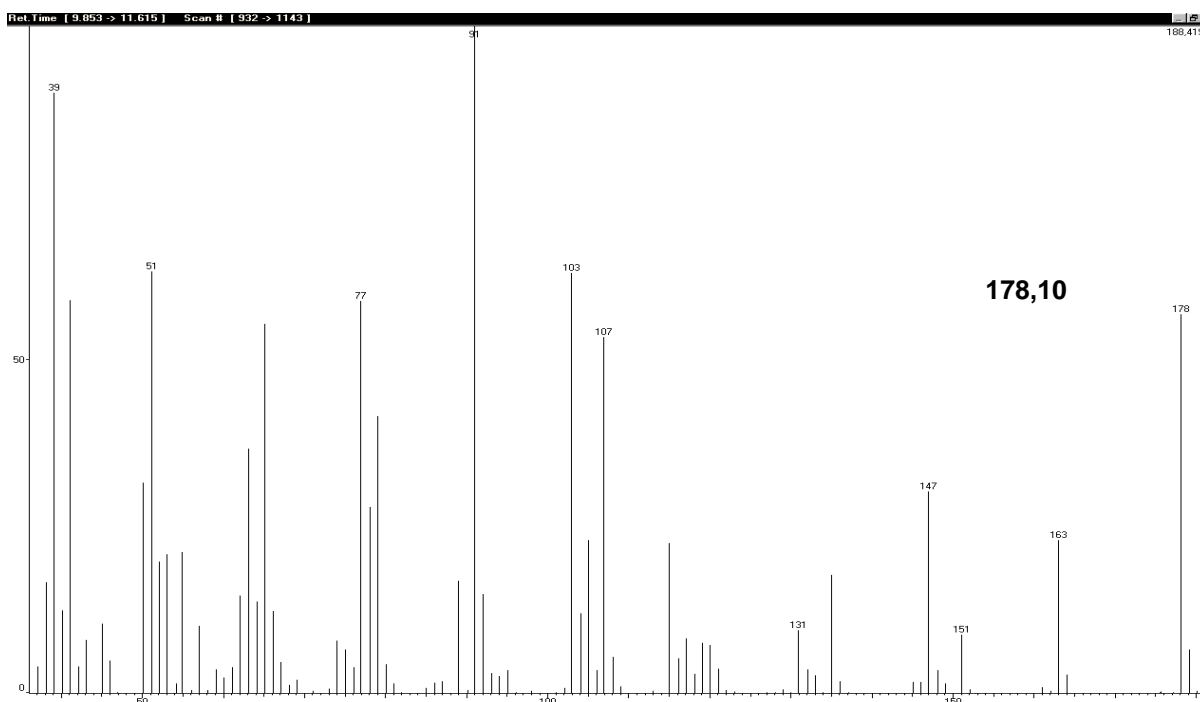
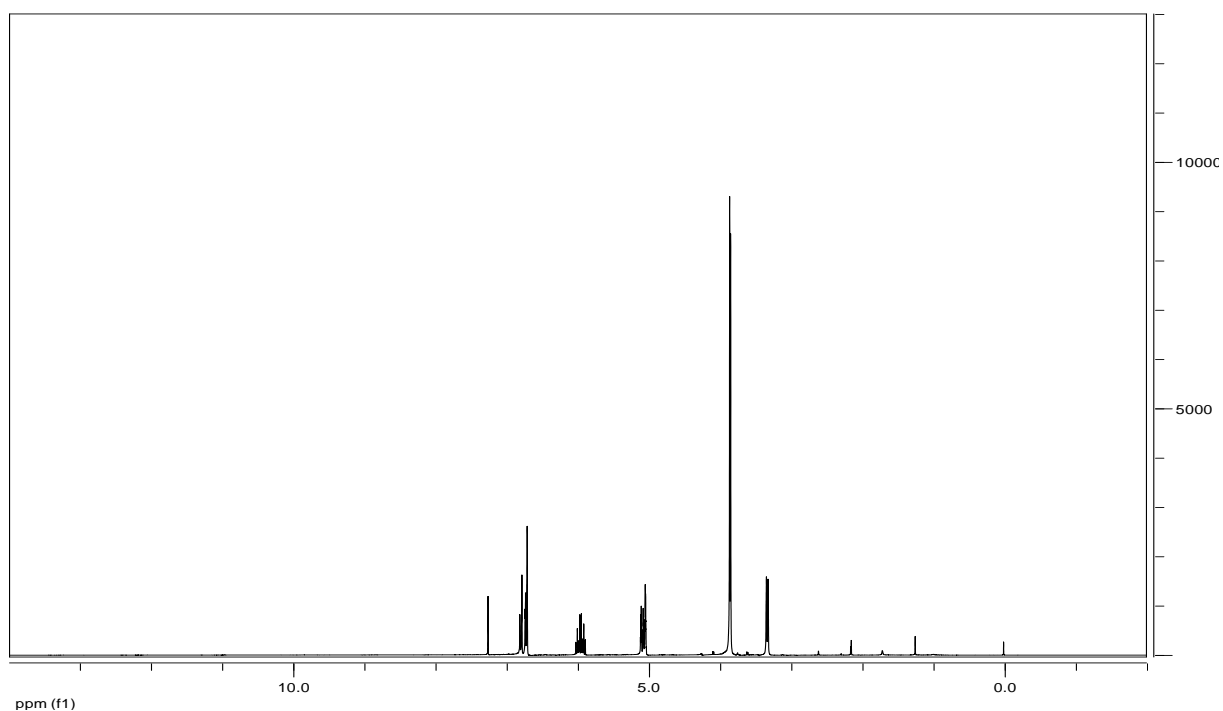


TABELA XXV - Principais picos obtidos no cromatograma de CG-MS e suas porcentagens para a composição do Metileugenol.

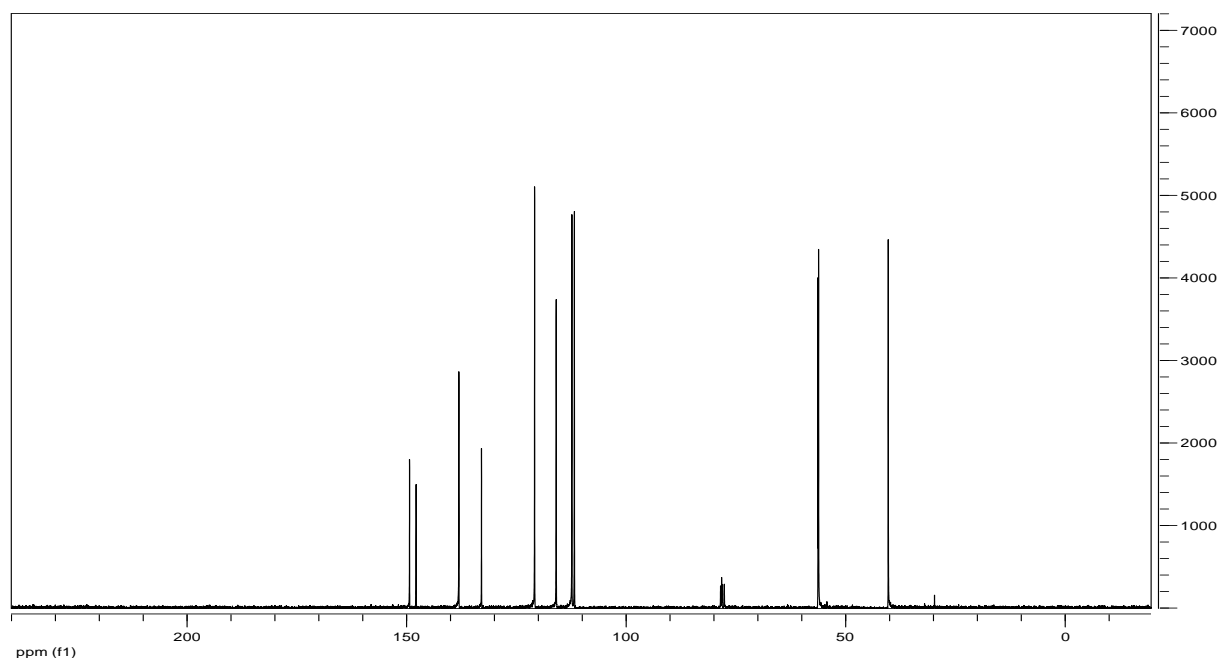
PKNO	%Total
1	3,12
2	96,81
3	0,06



Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

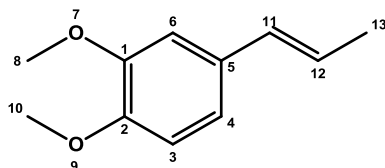


ATRIBUIÇÕES: RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz, δ =ppm) 3,31-3,33(d,2H,H-11); 3,84-3,85(s,6H,H-8,H-10); 5,02-5,11(m,2H,H-13); 5,88-5,94(m,1H,H-12); 6,70(d,1H,H-4); 6,72-6,77(d,1H,H-3); 6,80(s,1H,H-6).

Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C 

ATRIBUIÇÕES: RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75MHz, δ =ppm) 39,23(C11); 55,12(C13); 55,24(C10); 110,81(C3); 114,96(C6); 119,89(C4); 132,00(C5); 137,17(C12); 146,91(C8); 148,42(C10).

ANEXO E – Cromatogramas de CG-MS e espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do Isometileugenol



Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

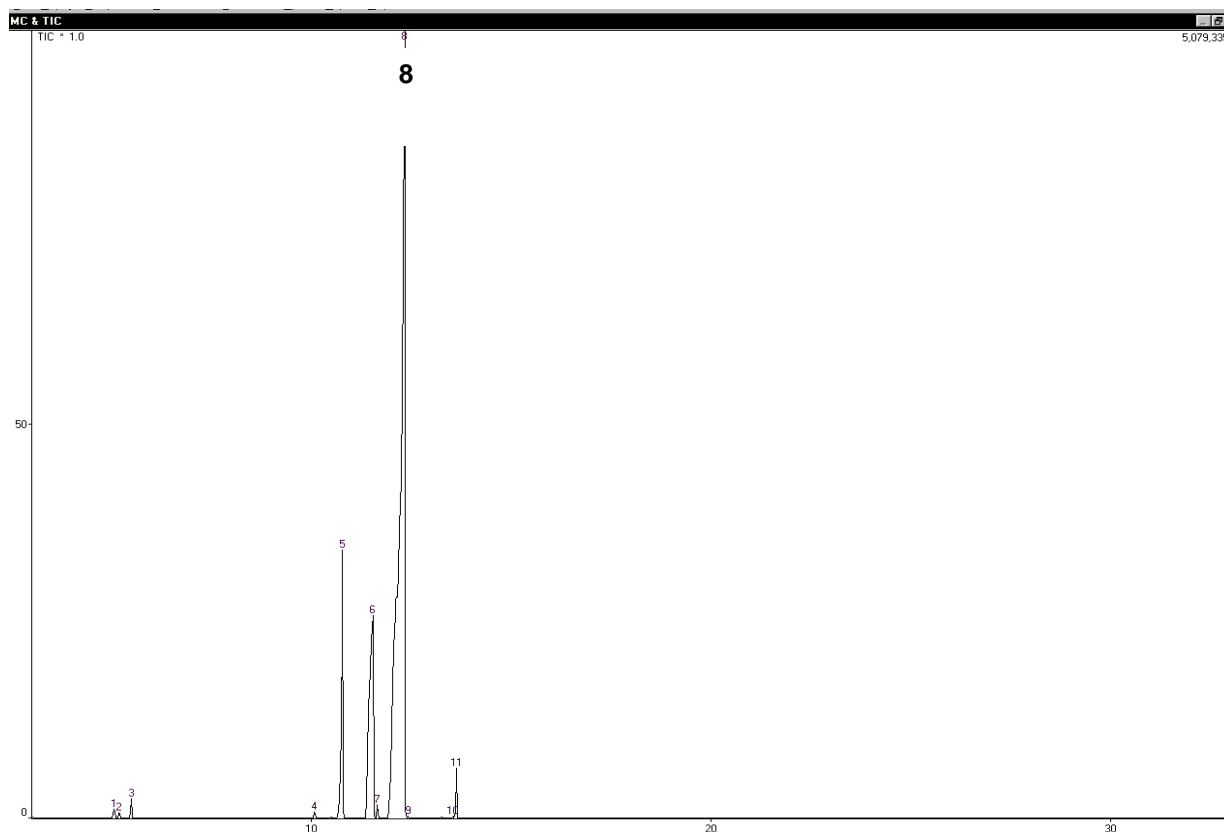
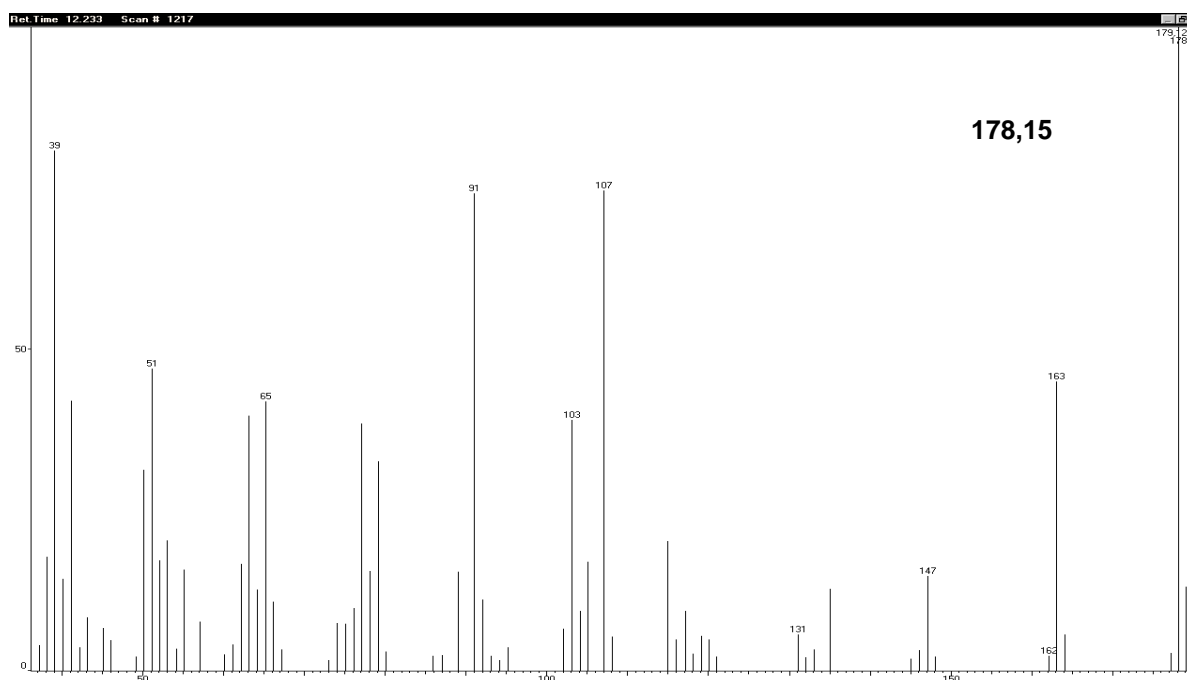
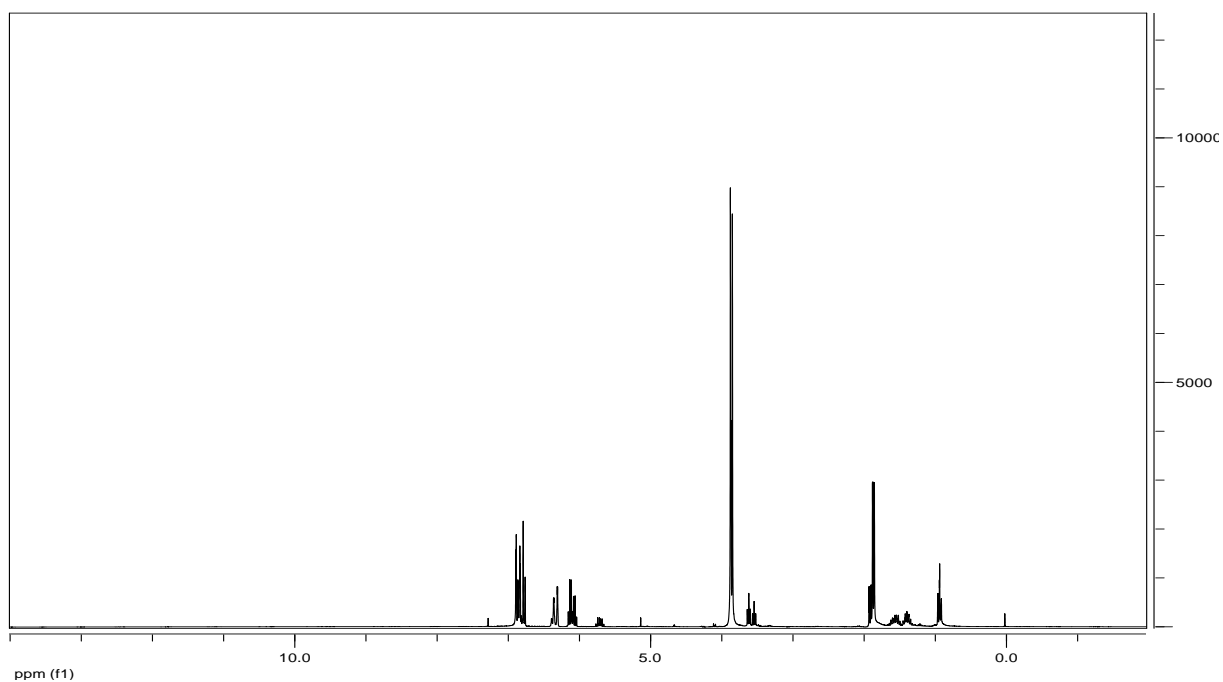


TABELA XXVI - Principais picos obtidos no cromatograma de CG-MS e suas porcentagens para a composição do Isoeugenol Metilado.

PKNO	%Total
5	8,08
6	16,44
8	73,66%

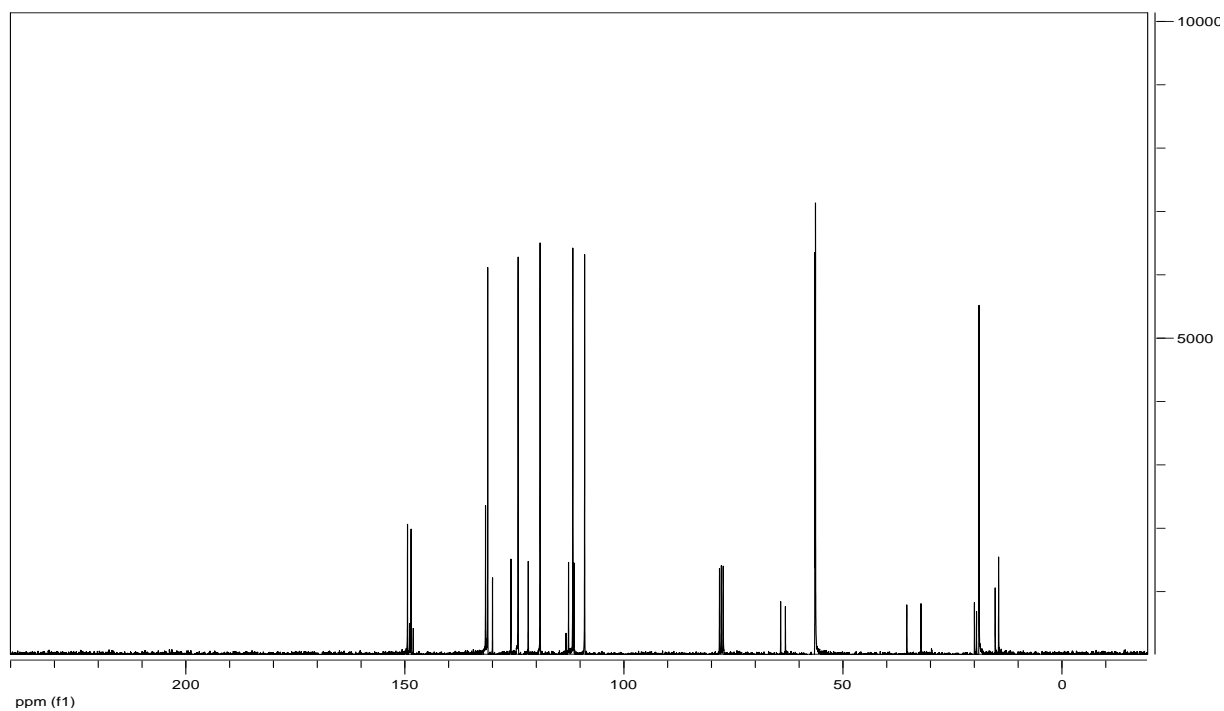


Ressonância Magnética Nuclear de ^1H



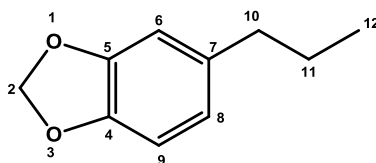
ATRIBUIÇÕES: RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz, δ =ppm) 1,84-1,91(dd,3H,H-13); 3,50-3,62(m,3H,H10); 3,81-3,86(m,3H,H-8); 6,02-6,14(m,1H,H-12); 6,29-6,37(d,1H,H-11); 6,74-6,77(d,1H,H-3); 6,80-6,87(m,1H,H-6).

Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C



ATRIBUIÇÃO: RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75MHz, δ =ppm) 18,34(C13); 55,72(C8); 55,85(C10); 111,20(C6); 112,75(C3); 118,66(C4); 123,69(C12); 130,65(C11); 131,14(C5); 148,16(C2); 148,98(C1).

ANEXO F – Cromatogramas de CG-MS e espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do Di-idrosafrol



Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa

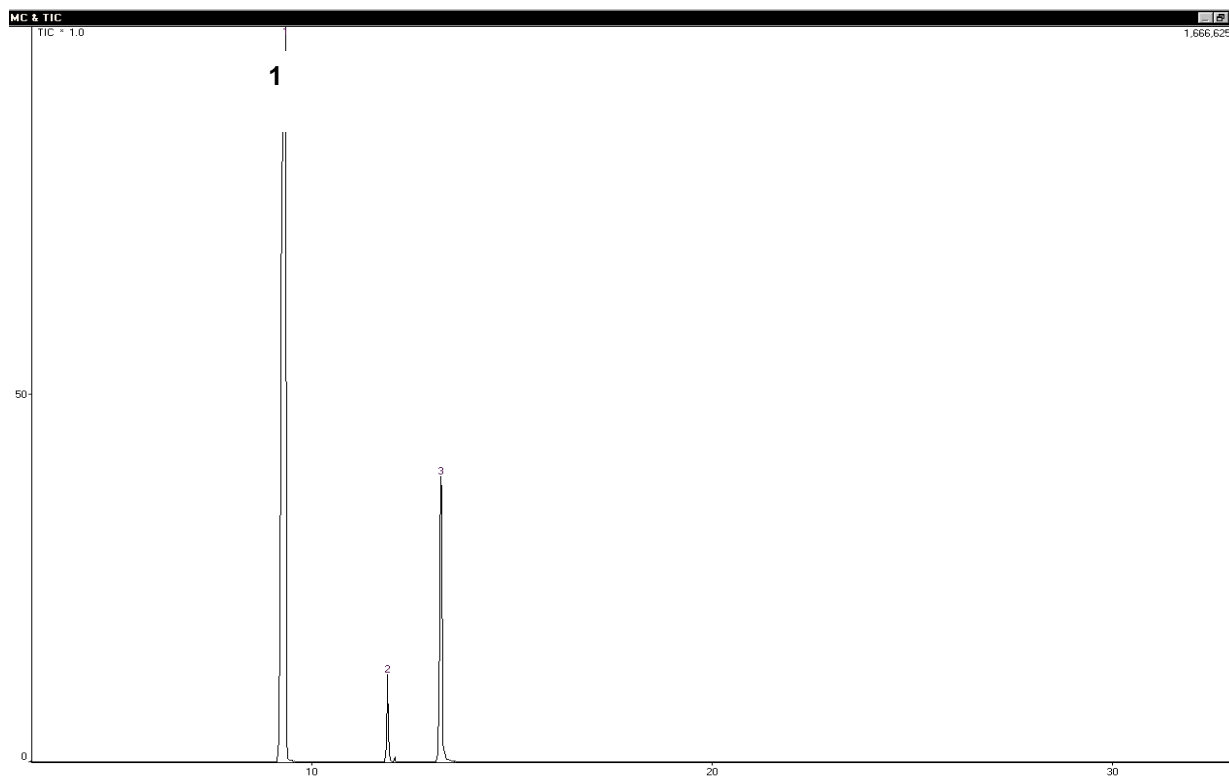
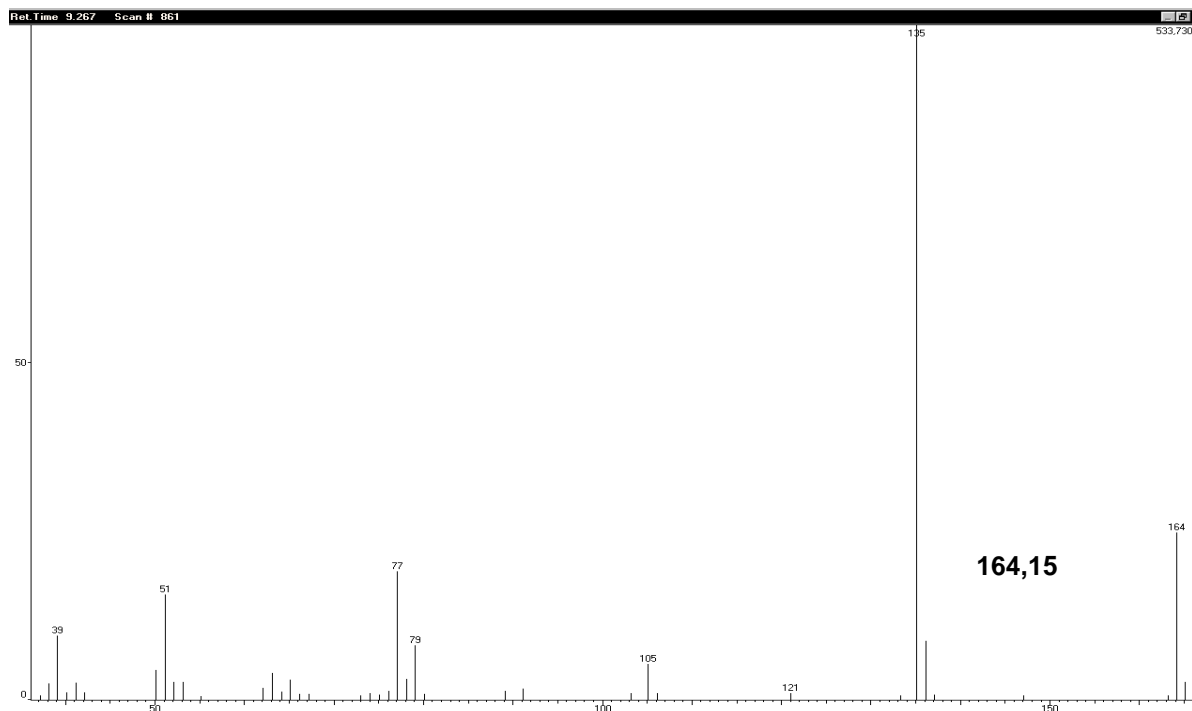
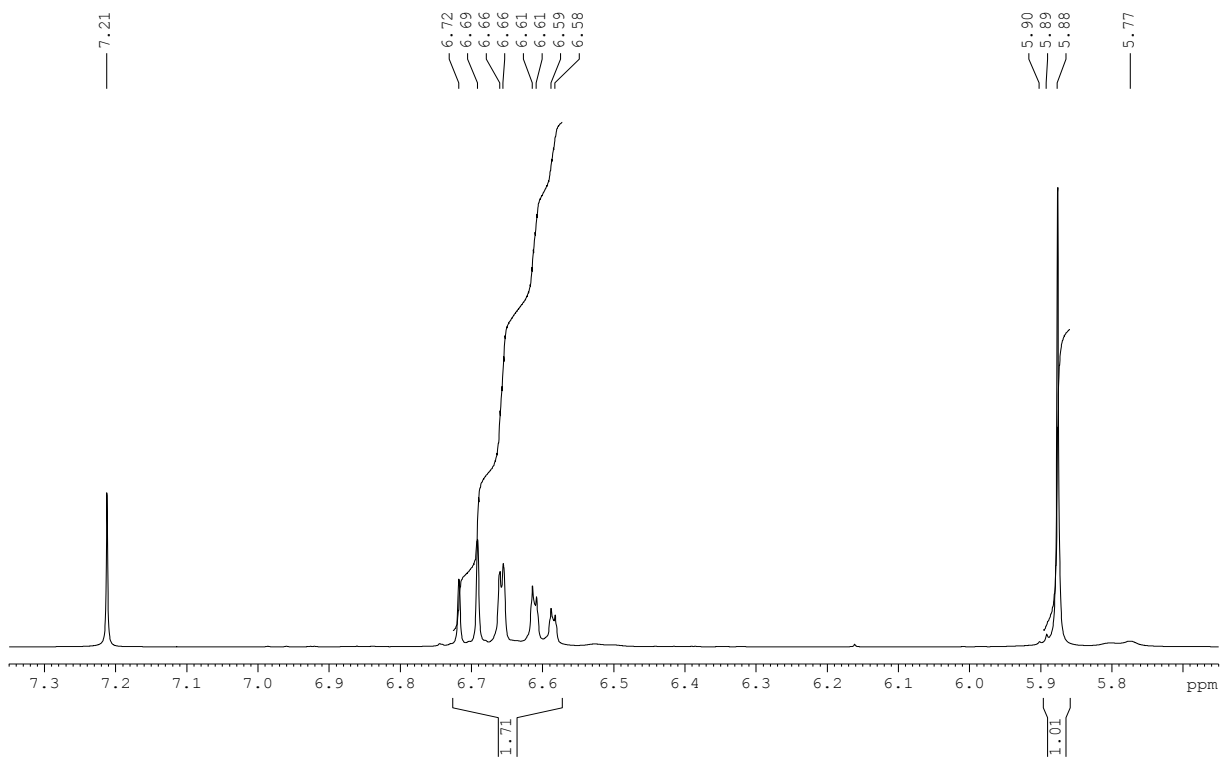


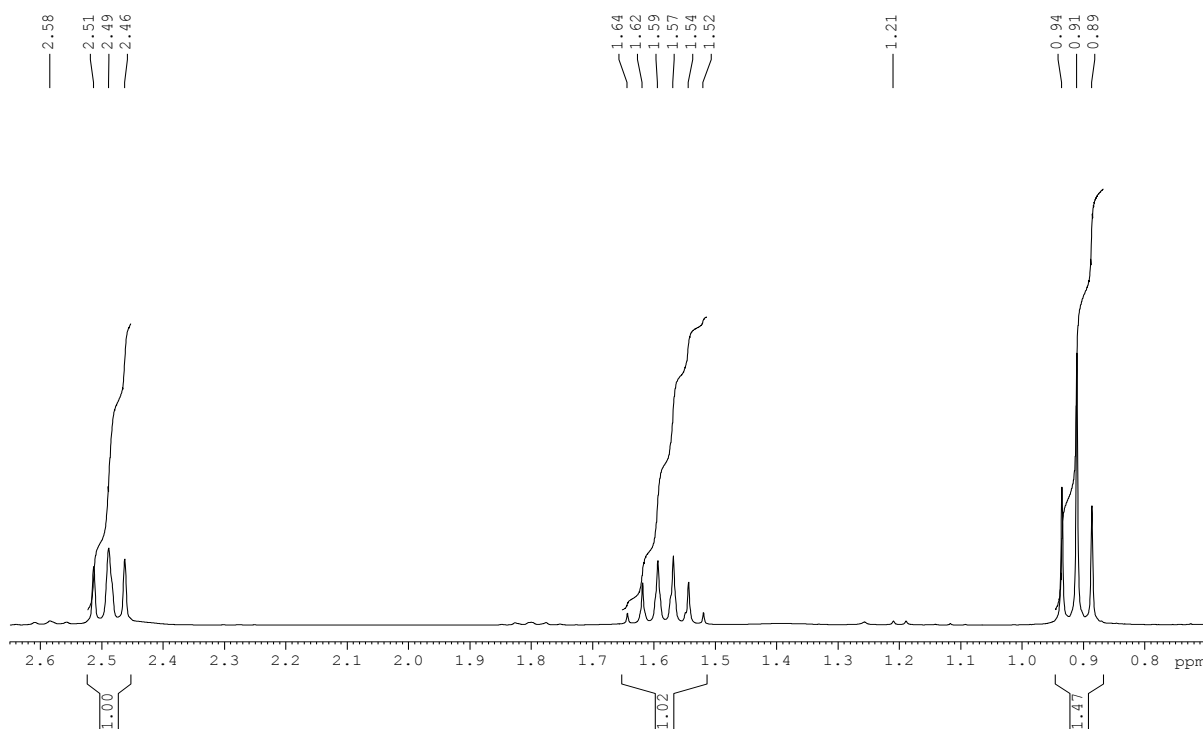
TABELA XXVII - Principais picos obtidos no cromatograma de CG-MS e suas porcentagens para a composição do Di-idrosafrol.

PKNO	%Total
1	82,25
2	3,04
3	14,71



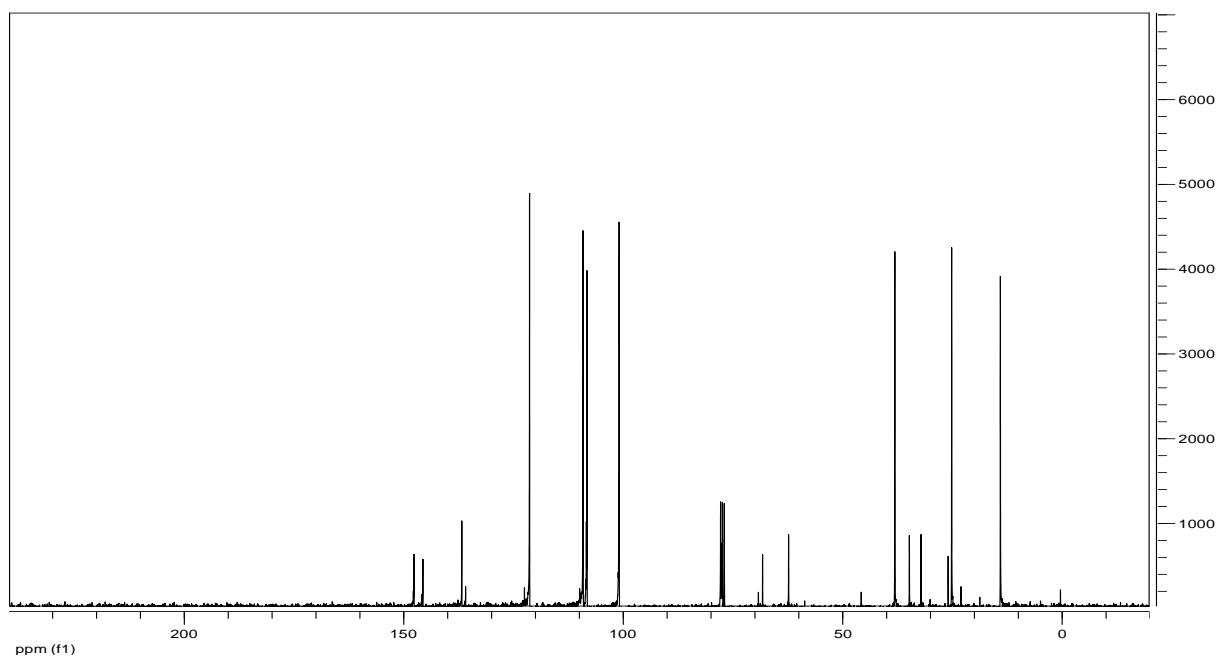
Ressonância Magnética Nuclear de ^1H





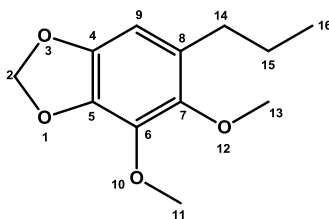
ATRIBUIÇÕES: RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz, δ =ppm) 0,89-0,94(t,3H,H-12); 1,52-1,64(m,2H,H-11); 2,46-2,51(t,2H,H-10); 5,88-5,90(d,2H,H-2); 6,66(d,1H,H-8); 6,69(s,1H,H-6); 6,72(d,1H,H-9).

Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C



ATRIBUIÇÕES: RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75MHz, δ =ppm) 13,70(C12); 24,82(C11), 37,78(C10); 100,67(C2); 108,0(C9); 108,9(C6); 121,11(C5).

ANEXO G – Cromatogramas de CG-MS e espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do Di-idrodilapiol



Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

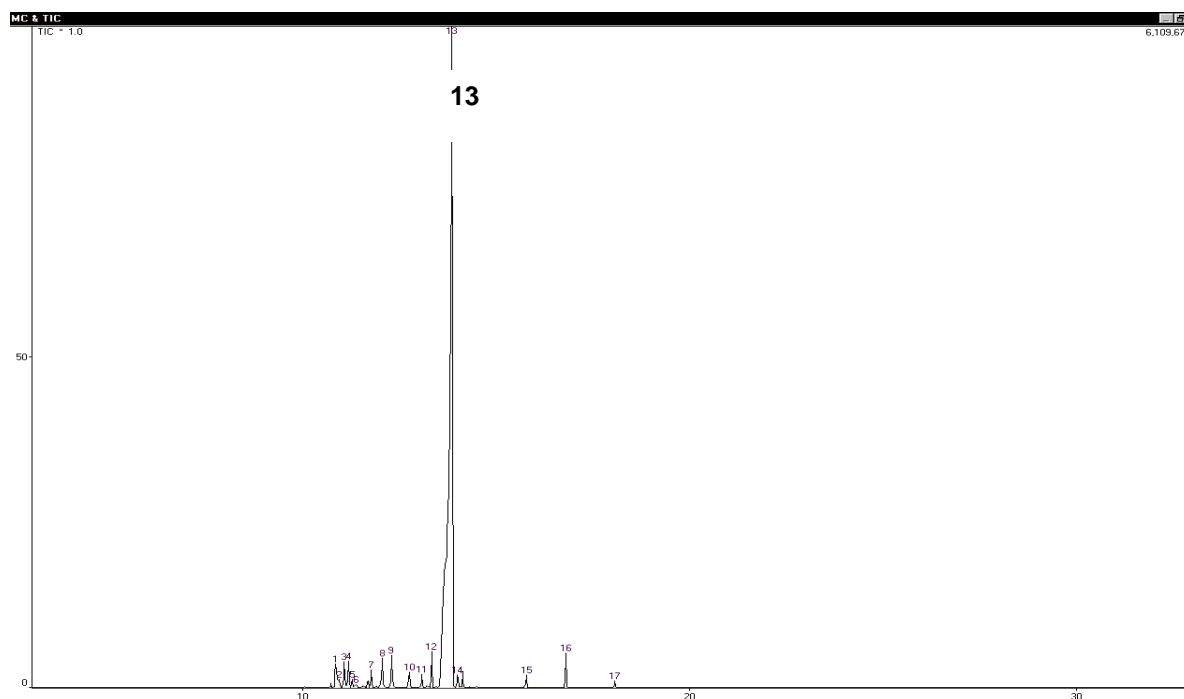
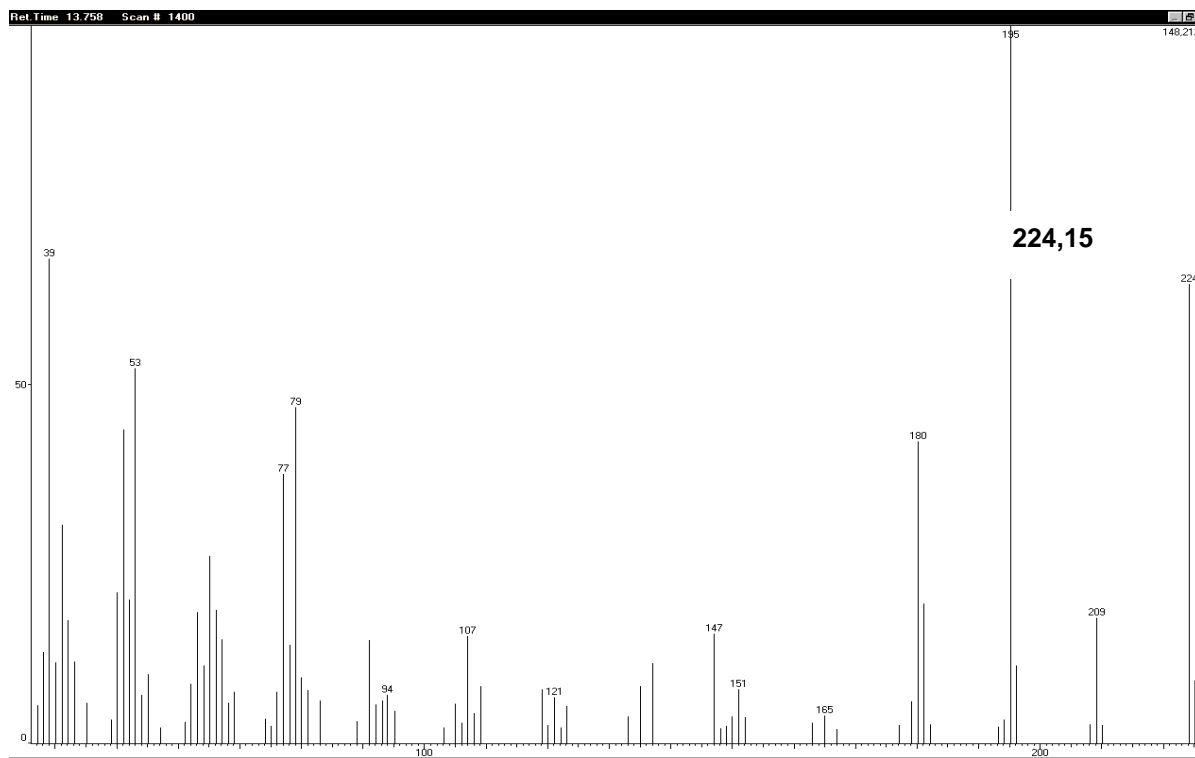
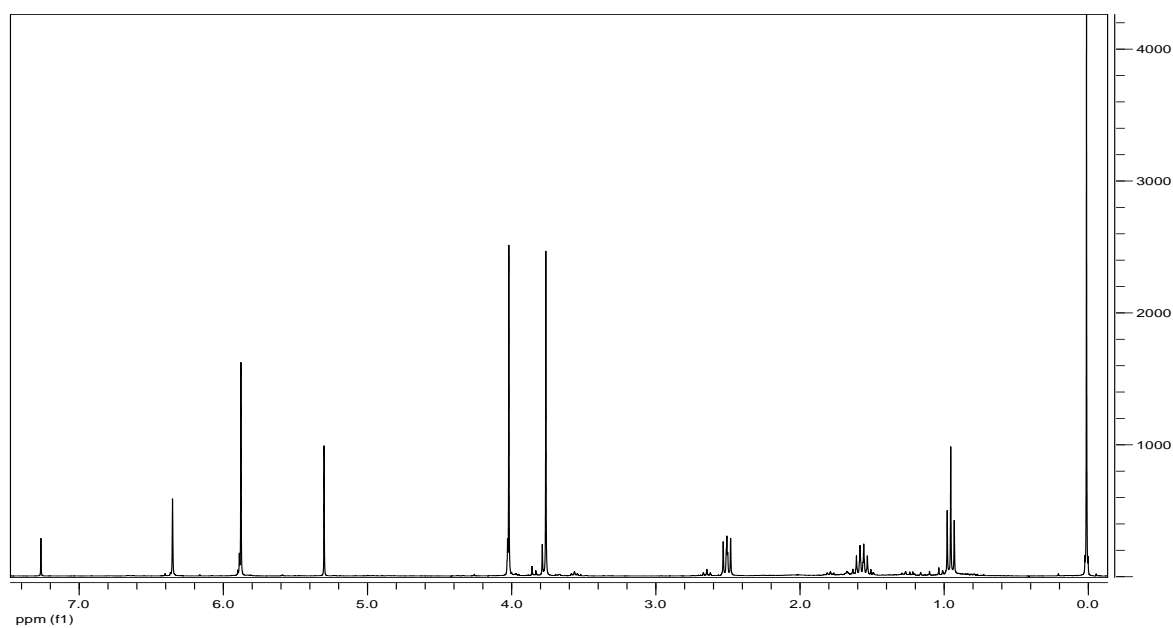


TABELA XXVIII - Principais picos obtidos no cromatograma de CG-MS e suas porcentagens para a composição do Di-idrodilapiol.

PKNO	%Total
1	1,45
3	1,11
8	1,67
9	1,55
13	86,34

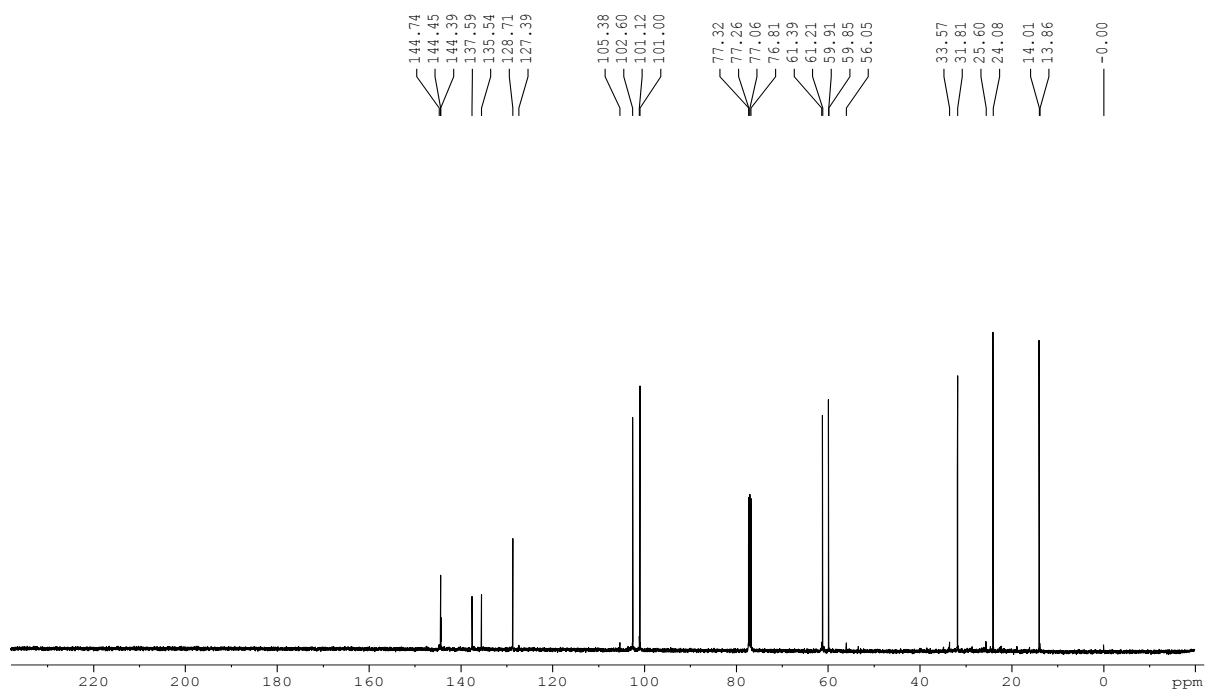


Ressonância Magnética Nuclear de ^1H



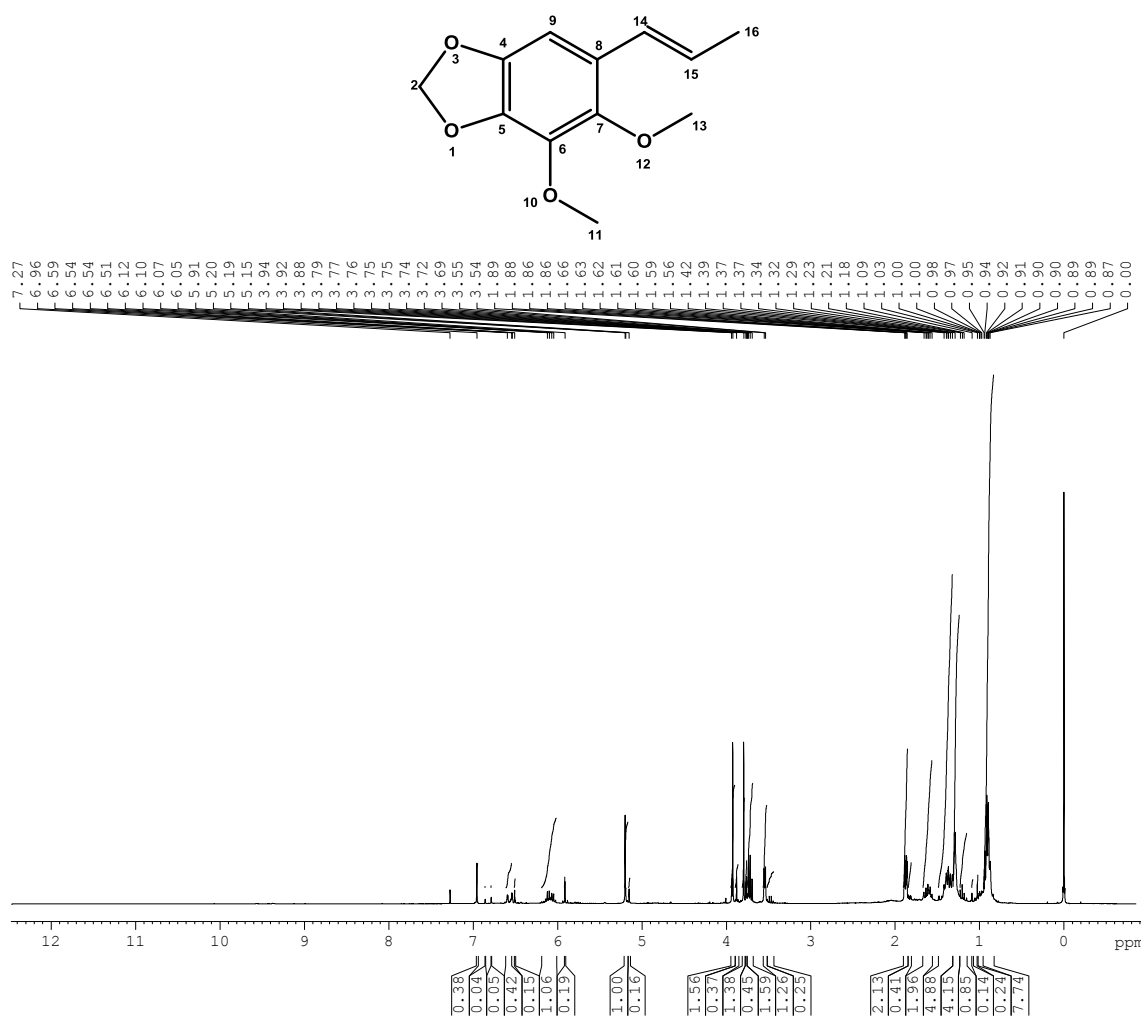
ATRIBUIÇÕES: RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz, δ =ppm) 0,91(t,3H,H-16); 1,54(m,2H,H-15); 2,49(t,2H,H-14); 3,72-3,73(m,6H,H-8,H-9); 5,87(s,2H,H-2); 6,34(s,1H,H-9).

Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C



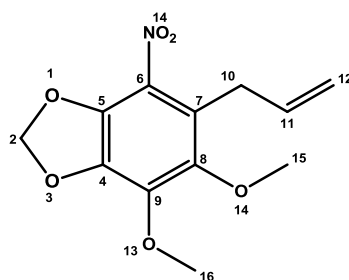
ATRIBUIÇÕES: RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75MHz, δ =ppm) 13,86(C16); 25,60(C15), 33,57(C14); 59,85(C12); 59,91(C11); 101,00(C2); 105,38(C9); 127,39(C8); 135,54(C5); 137,59(C4); 144,39(C6); 144,45(C7).

ANEXO H - Espectro de RMN de ^1H do Isodilapiol

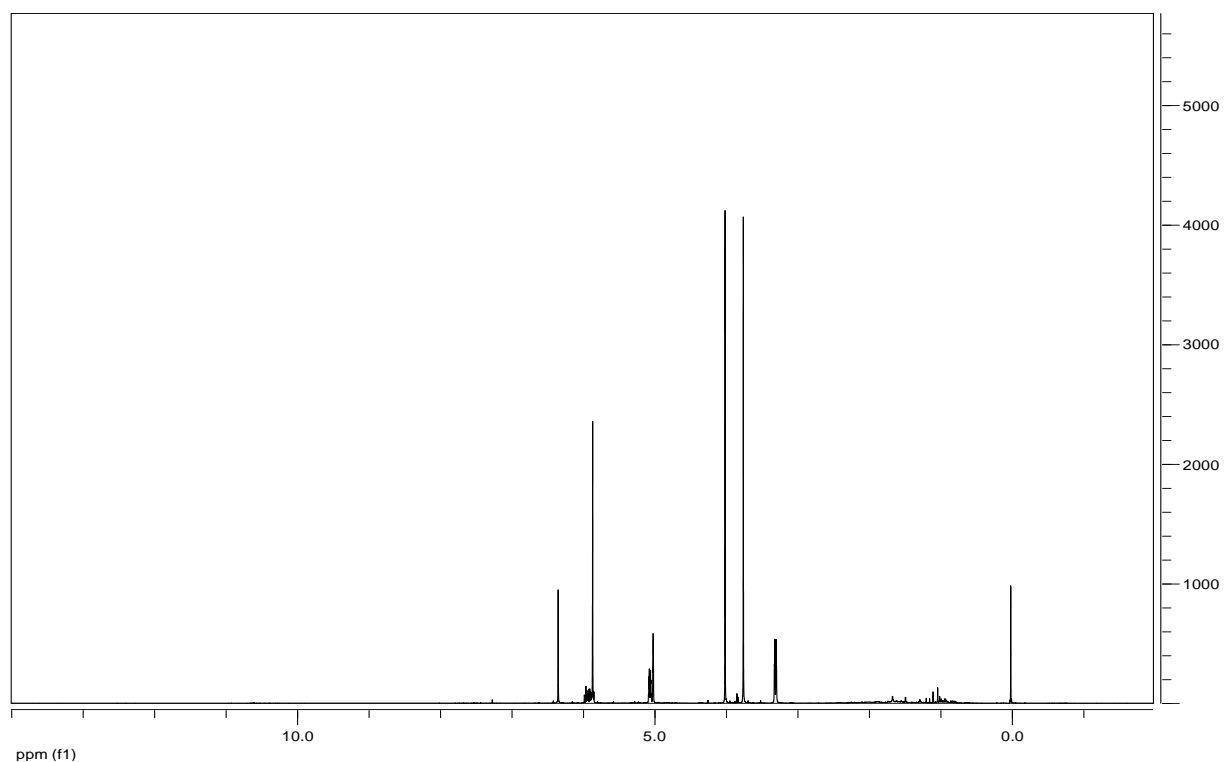


ATRIBUIÇÕES: RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz, δ =ppm) 1,86-1,89(d,3H,H-16); 3,72-3,79(m,3H,H-13); 3,88-3,94(m,3H,H-11); 5,91(m,1H,H-15); 6,05-6,07(d,2H,H2); 6,51-6,59(m,1H,H-9); 6,96(d,1H,H-14).

ANEXO I - Espectro de RMN de ^1H Nitrodilapiol

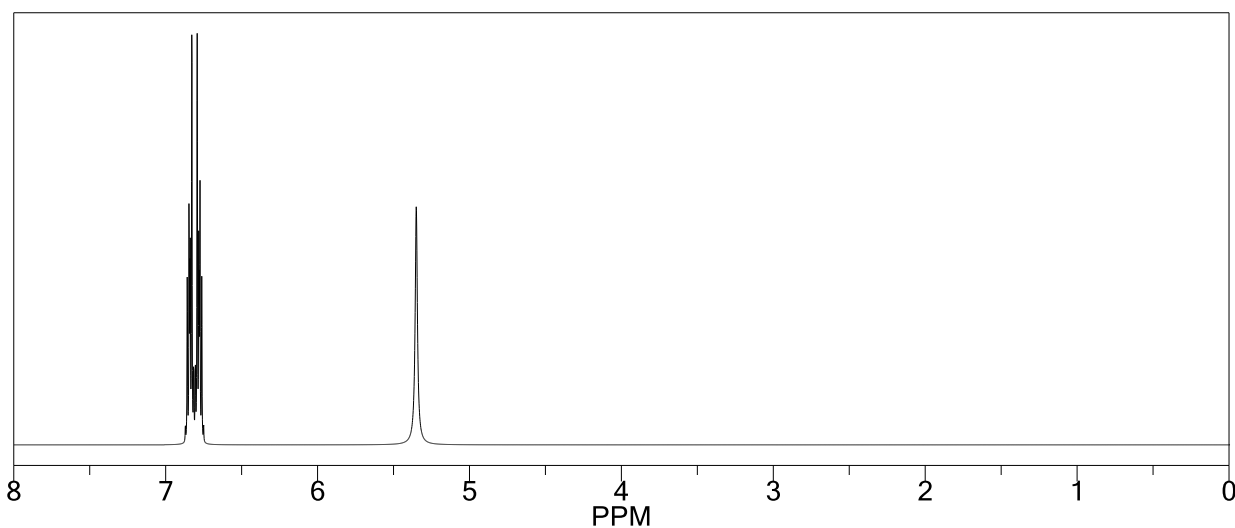
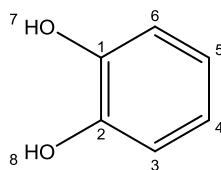


Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

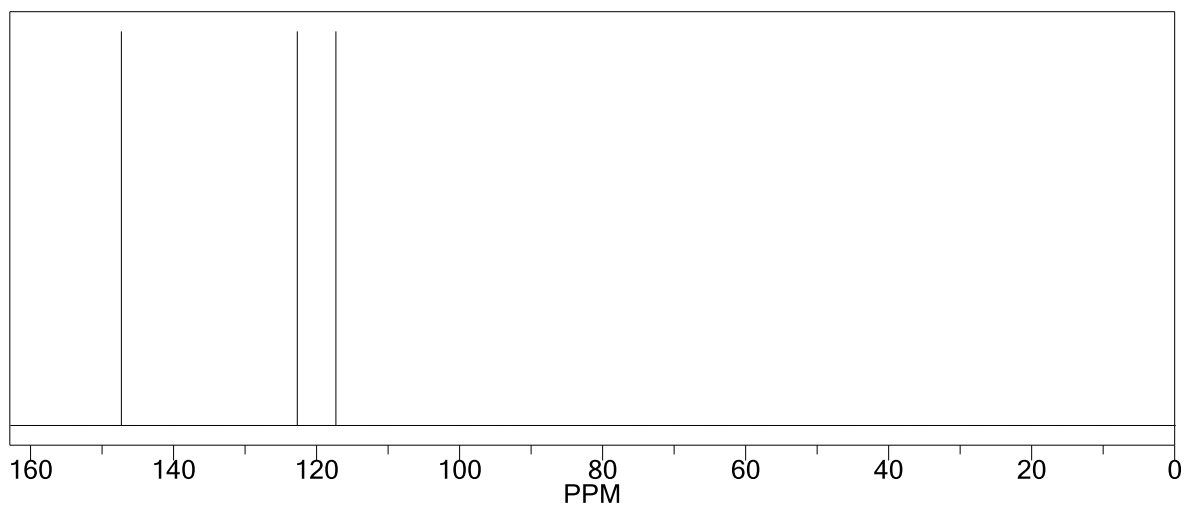


ATRIBUIÇÕES: RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz, δ =ppm) 3,31(d,2H,H14); 3,75(s,3H,H-13); 4,00(s,3H,H-11); 5,01(d,2H,H-16); 5,88(m,1H,H-15); 6,15(s,2H,H-2); 6,35(s,1H,H-6).

ANEXO J - Espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do Pirocatecol

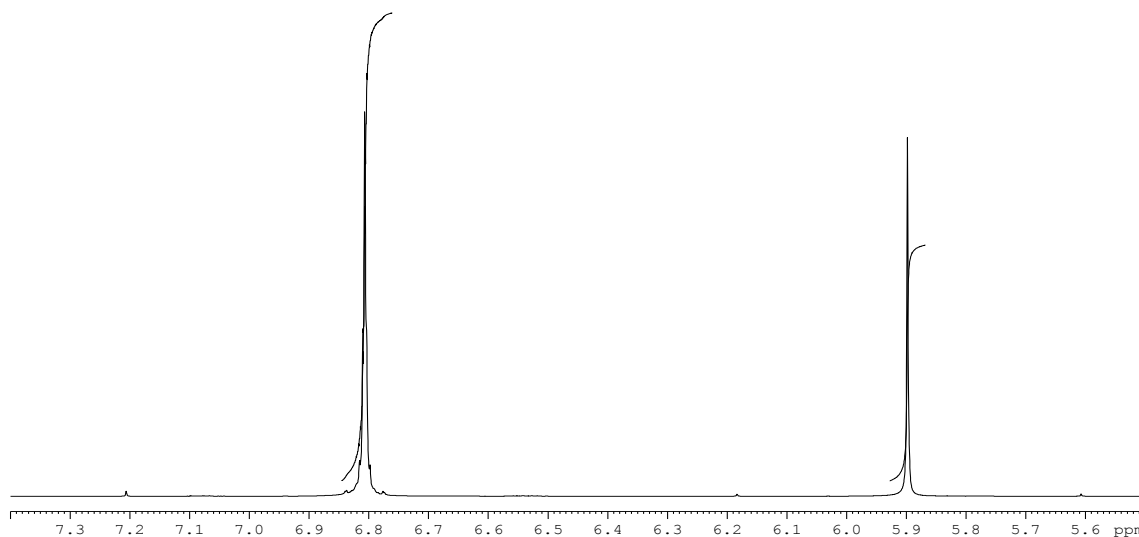
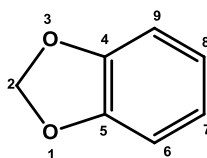


ATRIBUIÇÕES: ^1H RMN (DMSO- d_6 , 300 MHz, δ =ppm): 5,35 (s_{largo} , 2H, H-7, H-8), 6,78-6,84 (m, 4H, H-3, H-4, H-5, H-6)

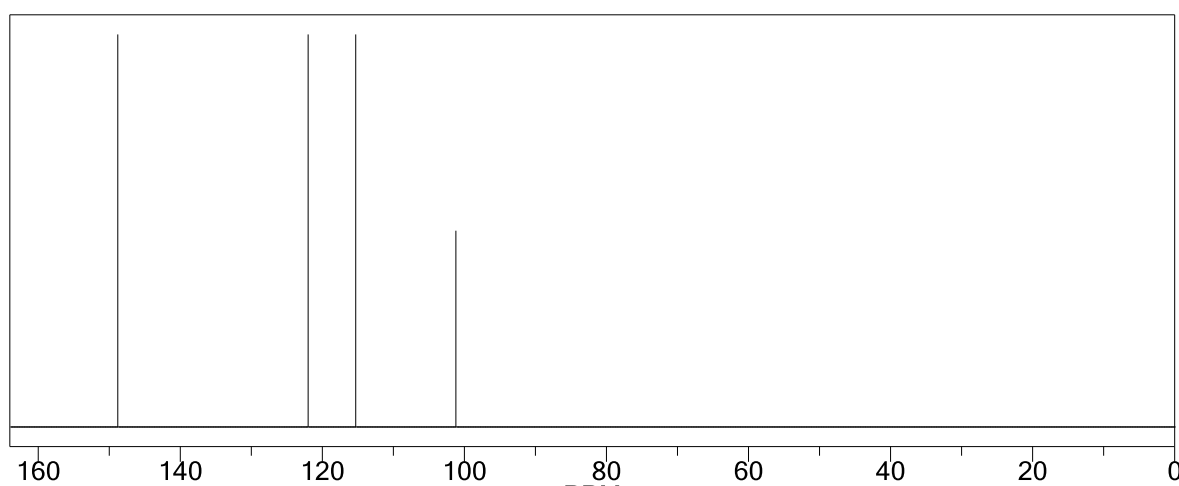


ATRIBUIÇÕES: ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 75MHz, δ =ppm) 147,3 (C1; C2); 122,7 (C4, C5); 117,3 (C3, C6)

ANEXO K - Espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do Benzodioxol



ATRIBUIÇÕES: ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz, δ =ppm): 5,9 (s, 2H, H-2); 6,78-6,84 (m, 4H, H-6, H-7, H-8, H-9)



ATRIBUIÇÕES: ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75MHz, δ =ppm): 148,8 (C4; C5); 122,0 (C7, C8); 115,3 (C6, C9) 101,2 (C2)