

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

**SÍNTESE E MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS DE DERIVADOS
CURCUMINÓIDES E AVALIAÇÃO DE SUAS ATIVIDADES ANTI-LEISHMANIA**

DENISE DE CASTRO FERREIRA GOMES

Seropédica, Rio de Janeiro
Maio - 2000

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

**SÍNTESE E MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS DE DERIVADOS
CURCUMINÓIDES E AVALIAÇÃO DE SUAS ATIVIDADES ANTI-LEISHMANIA**

DENISE DE CASTRO FERREIRA GOMES

SOB ORIENTAÇÃO DA PROFESSORA DOUTORA

LEILA VILELA ALEGRIO

E CO-ORIENTAÇÃO DO PROFESSOR DOUTOR

MARCO EDILSON FREIRE DE LIMA

Tese submetida como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em Ciências.
Área de concentração em Química Orgânica.

Seropédica, Rio de Janeiro

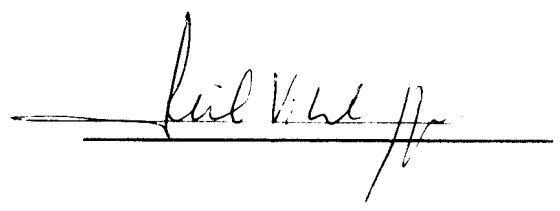
Maio, 2000

SÍNTESE E MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS DE DERIVADOS CURCUMINÓIDES E AVALIAÇÃO DE SUAS ATIVIDADES ANTI-LEISHMANIA

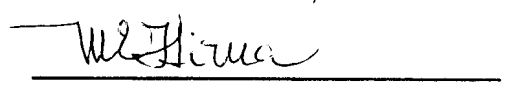
DENISE DE CASTRO FERREIRA GOMES

APROVADA EM: 05 de Maio de 2000

Prof.^aDr.^a Leila Vilela Alegrio
(UFRRJ)-DEQUIM



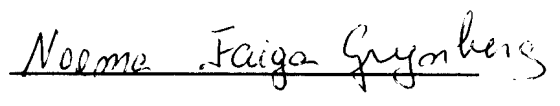
Prof. Dr. Marco Edilson Freire de Lima
(UFRRJ) - DEQUIM



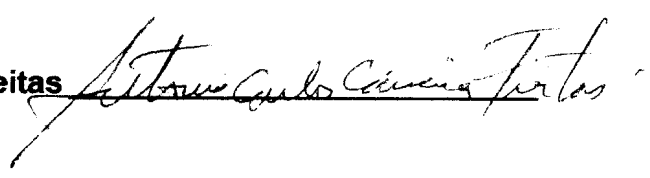
Prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho
(UFRRJ)-DEQUIM



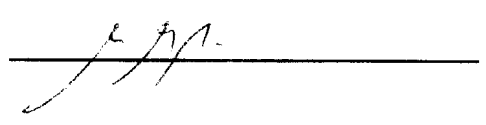
Prof.^aDr.^a Noema Faiga Grynberg
(UFRRJ)-DEQUIM



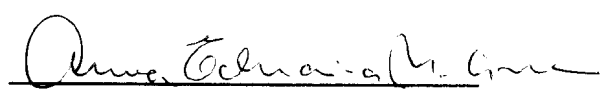
Prof. Dr. Antônio Carlos Carreira de Freitas
(UFF) Faculdade de Farmácia



Prof. Dr. César Cornélio Andrei
(UEL) - DEQUIM



Prof.^aDr.^a Aurea Echevarria A. N. Lima
(UFRRJ) - DEQUIM (Suplente)



Dedico este trabalho aos meus pais, José e Nadir.

"Trabalhe com entusiasmo e paciência,
sabendo que os pensamentos
e os esforços corretos o
levarão inevitavelmente à obtenção
dos melhores resultados."

James Allen

AGRADECIMENTOS

À professora Leila Vilela Alegrio, pela orientação, ensinamentos, amizade e estímulo, sem o qual este trabalho se tornaria impossível.

Ao professor Marco Edilson Freire de Lima, pela co-orientação, amizade, contribuição para a minha formação e carinho.

À doutora Leonor Leon pelo trabalho em colaboração, pelos testes de atividade antiparasitária, pelo carinho, apoio e estímulo.

À Catarina Andréa Araújo, pela realização dos testes de atividade antiparasitária.

À funcionária Aurea de Almeida Tatagiba, pelos espectros de RMN¹H e ¹³C (UFRRJ) e pela amizade e carinho constantes.

À funcionária Frances Regiane dos Santos, pelos espectros de RMN¹H e ¹³C (UFRRJ), pelas análises cromatográficas e pela amizade.

Ao funcionário Maurício Lemos Matos, pela colaboração constante.

Aos Professores João Batista Neves, Victor Rumjanek, Aurélio Baird Buarque Ferreira, Anselmo Alpande, Mário Geraldo de Carvalho, Silas Varela Fraiz Jr., Aparecida Cayoco Ponzoni, Rosane Nora Castro, Aurea Echevarria, Noema Grynberg, pelo convívio e pela minha formação.

Ao funcionários do Programa de Pós-graduação em Química Orgânica e do Departamento de Química da UFRRJ, Osmar, Reginaldo, Fábio, Eli, Carlos, Conceição, Arlete, Aldir, Rubens, Rui e Neli, pela colaboração e amizade.

Aos amigos Roberto Carlos, Andréa Luzia, Rosane Alves, Heloísa Melo, Andressa, Edson, Miguel, Patrícia, Rogéria, Daniela, Cássia, Raquel, Carlão, Márcia Cristina, Margareth, André Gabriel, Helena e Paulo Afonso.

À amiga muito querida Luciana Vignólio Alves, pelo carinho e amizade de sempre.

À amiga Ana Paula, pelo convívio no laboratório e amizade.

Aos amigos Sandro Ricardo, Luiz Magno, Cinara, Iago e Taís, que se tornaram a minha segunda família.

À amiga Geizi Jane Alves de Carvalho pelo companheirismo e amizade.

À amiga Irmã Aurilúcia pela amizade e convivência do mestrado.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Conselho de Amparo à Pesquisa (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

À toda minha família, em especial meus pais José e Nadir, e irmã Eliane, pelo apoio estímulo e compreensão constantes.

Ao amigo Mauro Torres Ferreira Gomes.

BIOGRAFIA

Denise de Castro Ferreira Gomes, filha de José de Castro Pinto e Nadir Leal de Castro, nasceu no Rio de Janeiro a 18 de Janeiro de 1967.

Concluiu o 1º grau na Escola Municipal João Proença (Campo Grande-RJ) em 1981 e o 2º grau no Colégio Estadual Fernando Antônio Raja Gabaglia (Campo Grande-RJ) em 1984. Prestou concurso vestibular (CESGRANRIO) em 1985 e ingressou no curso de Licenciatura em Ciências, habilitação em Química na UFRRJ, concluindo-o em 1988.

Concluiu em 1996 seu curso de Mestrado defendendo a tese intitulada Saponinas de *Pithecellobium cauliflorum*.

Atuou como professora substituta das disciplinas Prática de Ensino de Química e Didática da Química no Instituto de Educação da UFRRJ, no período de novembro de 1994 a janeiro de 1995.

Foi professora secundária nos colégios Resultante (Campo grande-RJ), Hoje (Realengo-RJ), Centro Escolar EDP (Campo Grande-RJ), Sociedade de Ensino Fernando Pedro (Campo Grande-RJ) e na rede pública municipal de Itaguaí e do Rio de Janeiro. Nesta última lecionou na Escola Municipal Barão de Santa Margarida (Campo Grande-RJ).

ÍNDICE GERAL

	Página
ÍNDICE DE ESQUEMAS	xiv
ÍNDICE DE TABELAS	xvi
ÍNDICE DE FIGURAS	xxi
ÍNDICE DE ESPECTROS	xxiii
ABREVIATURAS	xxiv
RESUMO	xxvi
ABSTRACTS	xviii
PRODUTOS OBTIDOS	1
INTRODUÇÃO	9
Capítulo 1 – Leishmaniose	29
1.1- Introdução	30
1.2- Multiplicação e ciclo de vida dos tripanossomatídeos	36
1.3- Sobrevivência intracelular da <i>leishmania</i>	37
1.4- Oxigênio como mecanismo de defesa	40
1.5- Modo de ação das drogas anti-tripanosomatídeos	43
1.6- Vacinas anti- <i>leishmania</i>	48
1.7- Tratamento da Leishmaniose	50
1.7.1- Tratamento clássico	50
1.7.2- Tratamento experimental	58
1.8- Definições importantes no contexto do estudo das atividades biológicas	59

OBJETIVOS	72
Capítulo 2 – Materiais e métodos	76
2.1- Especificações de materiais e equipamentos	78
2.2- Modificações estruturais	78
2.2.1- Reação de acilação	78
2.2.2- Reações de redução	79
a) Redução das carbonilas	79
b) Redução das ligações duplas	81
2.2.3- Reação de formação de cetais	84
a-1) Preparação do acetonídeo a partir da substância 3	84
a-2) Preparação do acetonídeo a partir da substância 5	84
2.2.4- Reação de metilação	86
2.2.5- Reação de desmetilação	87
2.2.6- Reação de alquilação da hidroxila fenólica	87
2.3- Reações de síntese dos curcuminóides	88
2.3.1 a 2.3.13- Sínteses	88
2.4- Extração do centrolol e hidróxicentrolol	91
2.5- Caracterização dos substâncias.	91
2.6- Ensaio biológico <i>in vitro</i> com <i>Leishmania amazonensis</i> promastigotas	95

Capítulo 3- Discussão	96
3.1- Hipóteses sobre características estruturais responsáveis pelas atividades biológicas nos curcuminóides	97
3.1.1- Grupos hidróxi vicinais no anel aromático	97
3.1.2-Substituintes alquil no anel aromático	98
3.1.3- Produtos influência da coplanaridade molecular	99
3.1.4- Ação inibitória da curcumina no fator NF- κ B	102
3.1.5- Mecanismo de ação antiinflamatória	106
3.1.6- Interações de substâncias carboniladas α,β -insaturadas com sistemas de biotransformações relacionados a glutathione	107
3.2- Dados físicos e espectrais	110
3.2.1- Produtos de modificação estrutural	110
3.2.2- Produtos extraídos de <i>Centrolobium sclerophyllum</i>	124
3.2.3- Produtos sintetizados	126
3.3- Análise dos resultados de atividade biológica	140
3.3.1- Comparação entre substâncias β -dicarboniladas insaturadas e saturadas	141

3.3.2- Comparação das substâncias β- diidróxi insaturadas	
com as substâncias β - diidróxi saturadas	141
3.3.3- Comparação dos efeitos das substituições no anel	
aromático nas substâncias β -dicarbonílicas insaturadas	141
3.3.4- Comparando as substâncias β-dicarboniladas	
com as β - diidróxi saturadas	142
3.3.5- Efeito de proteção do sistema β-dicarbonilado	
e β -diidróxi sobre a atividade	142
Capítulo 4 – Conclusão	143
4.1- Hipóteses sobre a relação entre a estrutura e a atividade	
dos curcuminóides	144
4.2- Hipótese sobre o mecanismo de ação	146
Capítulo 5-Espectros	148
Referências Bibliográficas	170

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1- Hidrólise do complexo de Boro	15
Esquema 2- Cascata do ácido araquidônico	24
Esquema 3- Formação de radicais reativos	38
Esquema 4- Rota de ação de drogas anti-tripanosomatídeos	45
Esquema 5- Acetilação da curcumina	78
Esquema 6- Reação de redução das substância 29	79
Esquema 7- Reação de redução da substância 13	80
Esquema 8- Reação de redução da substância 8	80
Esquema 9- Reação de redução da curcumina	81
Esquema 10- Reação de hidrogenação das ligações duplas da curcumina acetilada	83
Esquema 11- Reação de hidrogenação das ligações duplas da substância 17	83
Esquema 12- Preparação do acetonídeo a partir da substância 3	84
Esquema 13- Preparação do acetonídeo a partir da substância 5	84
Esquema 14- Reação de metilação da curcumina	86
Esquema 15- Reação de desmetilação da curcumina	15
Esquema 16- Reação de alquilação da hidroxila fenólica	87
Esquema 17- Esquema geral da síntese dos curcuminóides	89
Esquema 18- Esquema de formação do complexo de Boro	89

Esquema 19- Hidrólise ácida do complexo de Boro	89
Esquema 20- Possível sítio de ação da curcumina na ativação do fator NF- κ B induzida por TNF, PMA e H ₂ O ₂ .	105
Esquema 21- Interações entre os três aspectos de sistemas de biotransformações relacionados à glutatona.	107

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Principais nomes atribuídos a turmérico em vários países	11
Tabela 2- Rendimentos das reações de síntese	90
Tabela 3- Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a curcumina em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$	110
Tabela 4- Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a curcumina acetilada em CDCl_3	111
Tabela 5- Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 3 em CDCl_3	112
Tabela 6- Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 4 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$	113
Tabela 7- Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 5 em CDCl_3	114

Tabela 8- Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 6 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$	115
Tabela 9- Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 7 em CDCl_3	116
Tabela 10- Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 8 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$	117
Tabela 11- Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 9 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$	118
Tabela 12- Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 10 em CDCl_3	119
Tabela 13- Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 11 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$	120
Tabela 14- Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substancia 12 em CDCl_3	121
Tabela 15- Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substancia 13 em CDCl_3	122

Tabela 16- Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 14 em CDCl_3	123
Tabela 17- Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 15 em CDCl_3	124
Tabela 18- Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 16 em CDCl_3	125
Tabela 19- Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 17 em CDCl_3	126
Tabela 20- Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 18 em CDCl_3	127
Tabela 21- Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 19 em CDCl_3	128
Tabela 22- Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 20 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$	129
Tabela 23- Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 21 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$	130

Tabela 24- Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 22 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$	131
Tabela 25- Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 23 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$	132
Tabela 26- Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 24 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$	133
Tabela 27- Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 25 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$	134
Tabela 28- Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 26 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$	135
Tabela 29- Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 27 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$	136
Tabela 30- Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 28 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$	137
Tabela 31- Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 29 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$	138

Tabela 32- Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 30 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$	139
Tabela 33- Valores de DL_{50} para as substâncias obtidas	140

ÍNDICE DE ESTRUTURAS

Estrutura 1- Curcumina	14
Estrutura 2- Vitamina E	16
Estrutura 3- BHT	16
Estrutura 4- BHA (dois isômeros)	16
Estrutura 5- <i>p,p'</i> - diidroxicinamoil metano	17
Estrutura 6- <i>p</i> - hidroxicinamoilferuloil metano	17
Estrutura 7- Curcumina 5-metoxilada	18
Estrutura 8- Deidrozingerona	19
Estrutura 9- Desmetóxicurcumina	19
Estrutura 10- Fenilbutazona	21
Estrutura 11- 2, 8 - dimetoxibenz[a]antraceno	22
Estrutura 12- 20- metilcolantreno	23
Estrutura 13- Azoximetano	25
Estrutura 14- Anetol tritiona	26
Estrutura 15- Sinefungin	44
Estrutura 16- Melarsoprol	44
Estrutura 17- Nifurtimox	17
Estrutura 18- Benzonidazol	46
Estrutura 19- Lapachol	47
Estrutura 20- Tartarato de potássio e antimônio trivalente	50
Estrutura 21- Estibogluconato de sódio	52
Estrutura 22- Glucantime	52
Estrutura 23- Pentamidina	54
Estrutura 24- Anfotericina B	55
Estrutura 25- Cetoconazol	56

Estrutura 26- Clotrimazol	57
Estrutura 27- Miconazol	57
Estrutura 28- Fluconazol	57
Estrutura 29- Itraconazol	57
Estrutura 30- Alopurinol	58
Estrutura 31- Ácido 3-(3,4-diidróxifenil) propanóico [β-(3,4-diidróxifenil) etil] amida	98
Estrutura 32- Metil-3,4-diidróxicinamato	98
Estrutura 33- Quercetina	101
Estrutura 34- Arranjo <i>sin</i> de C=C e C=O	102
Estrutura 35- Arranjo <i>anti</i> de C=C e C=O	102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- <i>Curcuma longa</i> L.	13
Figura 2- <i>Phlebotomus</i>	31
Figura 3- Distribuição da Leishmaniose no mundo	32
Figura 4- Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> ssp.	36
Figura 5- Cinco dos oito estágios morfológicos de tripanossomatídeos flagelados	39

ÍNDICE DE ESPECTROS

- Espectro 1:** Espectro de RMN¹H (200 MHz), da curcumina **1** em (CD₃)₂CO . **149**
- Espectro 2:** Espectro de RMN¹H (200 MHz), da curcumina **1** em (CD₃)₂CO **150**
- Espectro 3:** Espectro de RMN¹³C (50,3 MHz), totalmente desacoplado da curcumina **1** em (CD₃)₂CO. **151**
- Espectro 4:** Espectro de RMN¹C (50,3 MHz), DEPT, da curcumina **1** em (CD₃)₂CO . **152**
- Espectro 5:** Espectro na região do infravermelho de curcumina **1**, em NaCl. **153**

- Espectro 6:** Espectro de RMN¹H (200 MHz),
da substância **5** em CDCl₃. **154**
- Espectro 7:** Espectro de RMN¹³C (50,3 MHz),
totalmente desacoplado, da substância **5** em CDCl₃. **155**
- Espectro 8:** Espectro de RMN¹³C (50,3 MHz),
DEPT da substância **5** em CDCl₃. **156**
- Espectro 9:** Espectro na região do infravermelho
da substância **5** em pastilha de NaCl. **157**
- Espectro 10:** Espectro de RMN¹H (200 MHz),
da substância **4** em CDCl₃. **158**
- Espectro 11:** Espectro de RMN¹³C (50,3 MHz), totalmente
desacoplado da substância **4** em CDCl₃. **159**

Espectro 12: Espectro de RMN¹³C (50,3 MHz), DEPT da substância **4** em CDCl₃. 160

Espectro 13: Espectro na região do infravermelho da substância **4** em pastilha de NaCl. 161

Espectro 14: Espectro de RMN¹H (200 MHz), da substância **4** em CDCl₃. 162

Espectro 15: Espectro de RMN¹³C (50,3 MHz), totalmente desacoplado substância **4** em CDCl₃. 163

Espectro 16: Espectro de RMN¹³C (50,3 MHz), DEPT da substância **4** em CDCl₃. 164

Espectro 17: Espectro na região do infravermelho da substância **4** em pastilha de NaCl. 165

Espectro 18: Espectro de RMN¹H (200 MHz), da substância **16** em (CD₃)₂CO. 166

- Espectro 19:** Espectro de RMN¹³C (50,3 MHz), totalmente desacoplado da substância **16** em (CD₃)₂CO. **167**
- Espectro 20:** Espectro de RMN¹³C (50,3 MHz), DEPT da substância **16** em (CD₃)₂CO. **168**
- Espectro 21:** Espectro na região do infravermelho da substância **16** em pastilha de KBr **169**

ABREVIATURAS

ARN- ácido ribonucléico

ADN- ácido desoxoribonucléico

AIDS- acquired immuno deficiency syndrome

ATPase- enzima adenosina trifosfato

Ac- Acetil

CCF- cromatografia de camada fina

d- dupleteo

dd- duplo dupleteo

ddd- duplo duplo dupleteo

DEPT- "Distortionless Enhancement by Polarization Transfer"

DMAP- dimetilaminopiridina

g- grama

GSH- glutationa SH

GST- glutationa S transferase

Hz- hertz

I.V.- infravermelho

J- constante de acoplamento

Kg- quilogramas

m- multipleteo

mL- mililitros

mmol- milimoles

mg- miligramas

MHz- Megahertz

NF- κ B- fator de necrose κ -B

pág.- página

p.f.- ponto de fusão

RMN¹³C - Ressonância magnética nuclear de carbono 13

RMN¹H- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

s- singleto

sl- singleto largo

TMS – tetrametilsilano

TPA- 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato

TNF- fator de necrose tumoral

t-triplete

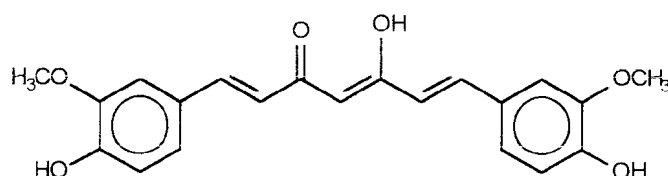
TsOH – ácido *p*-toluenosulfônico

u.m.a. – unidade de massa atômica

δ - deslocamento químico

RESUMO

A curcumina [1,7- bis -(4- hidróxi- 3- metóxifenil) - 1,6 - heptadieno - 3,5- diona] **(1)** é extraída de diferentes espécies de *Curcuma*, e seu uso é bastante difundido em medicina popular na Ásia, Índia e África.



(1)

A partir do conhecimento das suas atividades farmacológicas, e também das possibilidades reacionais oferecidas pela sua estrutura, foram realizadas modificações estruturais na curcumina, utilizando vários tipos de reações

Também foram feitas sínteses de derivados curcuminóides diferentemente substituídos no anel aromático.

Os substâncias obtidas foram identificados por espectros de IV (1600 FT), RMN¹H (200 MHz) , RMN ¹³C (50.3 MHz) e espectrometria de massas (70 ev).

Neste estudo, além das reações realizadas, foram feitas análises, através de testes *in vitro*, da potencial atividade antiparasitária contra as formas promastigotas de *leishmania amazonensis*.

Os valores de DL_{50} obtidos, permitiram lançar hipóteses sobre a relação entre a estrutura e atividade biológica exibida por estes produtos.

ABSTRACTS

Curcumin (1,7- bis (hydroxy-3-methoxyphenyl) – 1,6- heptadiene – 3,5-dione) is extracted from different *curcuma* species and its use in folk medicine in Asia, India and Africa is widespread.

Having in mind both the pharmacological activities and the possibilities for chemical modification of curcumin, a series of derivatives was prepared through different reactions.

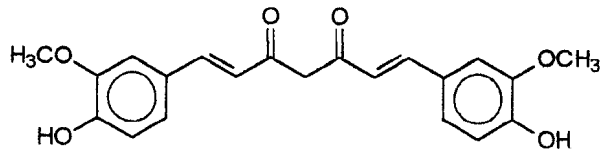
The curcuminoid compounds thus obtained were characterized by IR, ^1H and ^{13}C NMR and mass spectrometry.

In this work the potential anti-parasite activity against *Leishmania* promastigotes of these compounds was also investigated *in vitro*.

The LD₅₀ values obtained allowed the suggestion of possible correlations between structure and activity of these compounds.

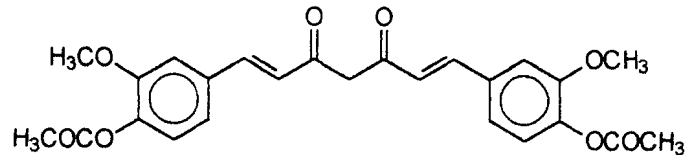
PRODUTOS OBTIDOS

Produtos de modificação estrutural



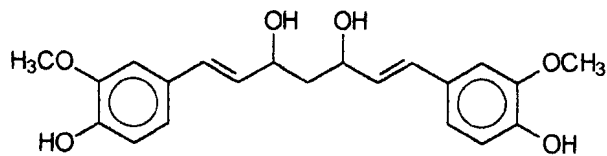
(1)

Nomenclatura: [1,7- bis -(4- hidróxi- 3- metóxi- fenil)] - 1,6 - heptadieno - 3,5- diona



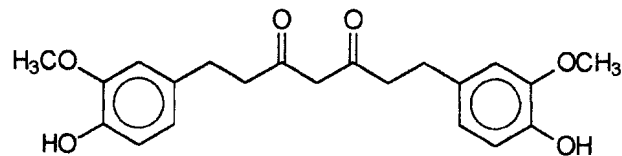
(2)

Nomenclatura: [1,7- bis -(4- acetóxi- 3- metóxi- fenil)] - 1,6 - heptadieno - 3,5- diona



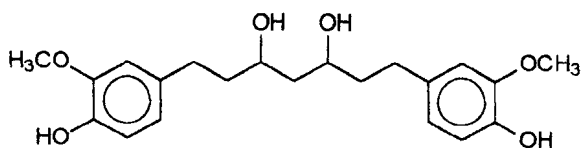
(3)

Nomenclatura: [1,7- bis -(4- hidróxi- 3- metóxi- fenil)] - 1,6 - heptadieno - 3,5- diol



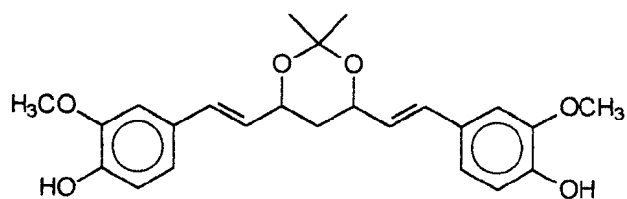
(4)

Nomenclatura: [1,7- bis -(4- hidróxi- 3- metóxi- fenil)] - heptano - 3,5- diona



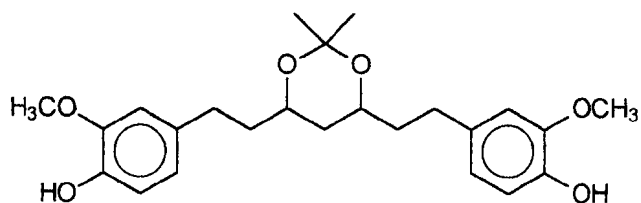
(5)

Nomenclatura: [1,7- bis -(4- hidróxi- 3- metóxiifenil)] - heptano - 3,5- diol



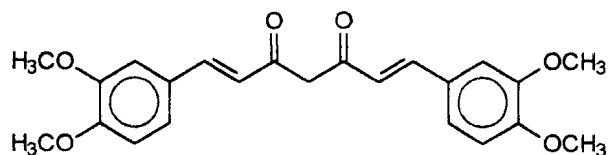
(6)

Nomenclatura: [1,7- bis -(4- hidróxi- 3- metóxiifenil)] - 1,6- heptadieno - 3,5- acetoniideo



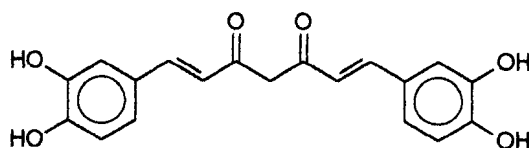
(7)

Nomenclatura: [1,7- bis -(4- hidróxi- 3- metóxiifenil)] - heptano - 3,5- acetoniideo



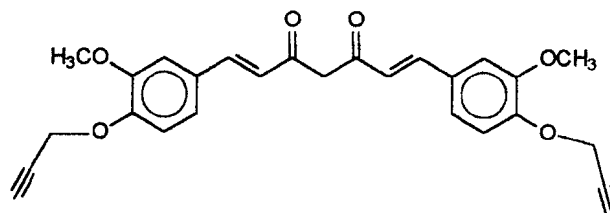
(8)

Nomenclatura: [1,7- bis -(3,4- metóxiifenil)] - 1,6- heptadieno - 3,5- diona



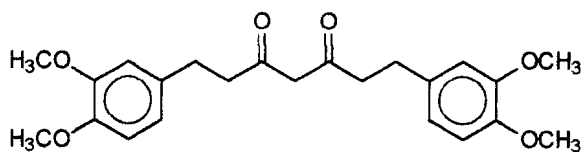
(9)

Nomenclatura: [1,7- bis -(3,4- diidróxifenil)]- 1,6- heptadieno - 3,5- diona



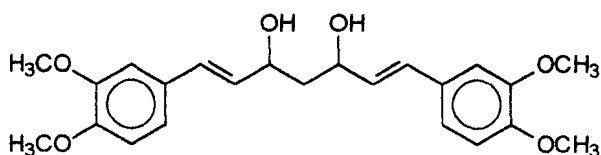
(10)

Nomenclatura: [1,7- bis -(4- propargil- 3- metóxifenil)]- 1,6-heptadieno - 3,5- diona



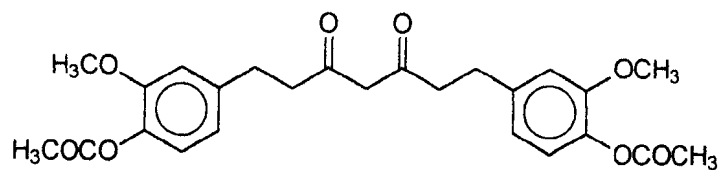
(11)

Nomenclatura: [1,7- bis -(3, 4- dimetóxifenil)]-heptano - 3,5- diona



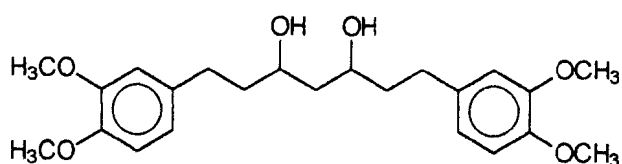
(12)

Nomenclatura: [1,7- bis -(3,4 -dimetóxifenil)]- 1,6 -heptadieno - 3, 5 - diol



(13)

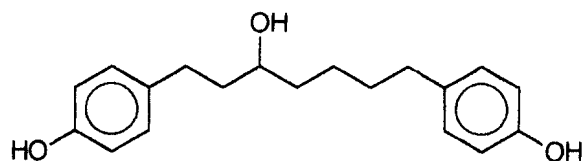
Nomenclatura: [1,7- bis -(4- acetóxi- 3- metóxi- fenil)] - heptano - 3,5- diona



(14)

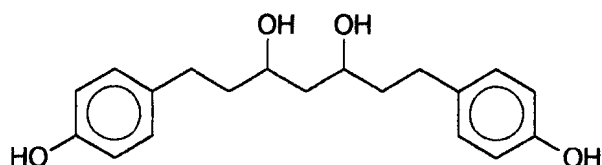
Nomenclatura: [1,7- bis -(3,4- metóxi- fenil)] - heptano - 3,5- diol

Produtos Extraídos de *Centrolobium sclerophyllum*



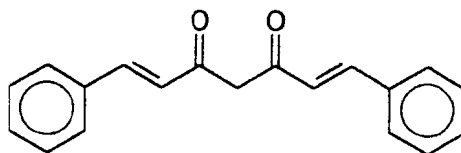
(15)

Nomenclatura: [1,7- bis -(4- hidróxi- fenil)] - heptano - 3 - ol

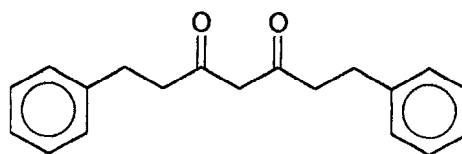


(16)

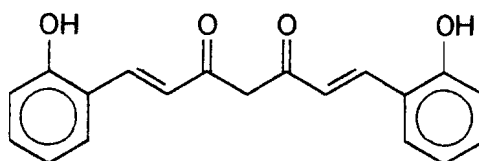
Nomenclatura: [1,7- bis -(4- hidróxi- fenil)] - heptano - 3, 5 - diol

Produtos sintetizados

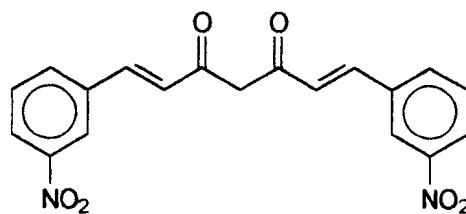
Nomenclatura: [1,7-bis -(fenil)] -1, 6-heptadieno - 3, 5-diona



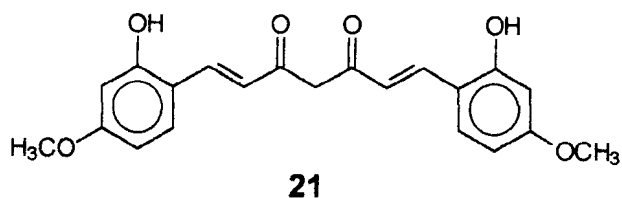
Nomenclatura: [1,7-bis - (fenil)] - heptano - 3, 5-diona



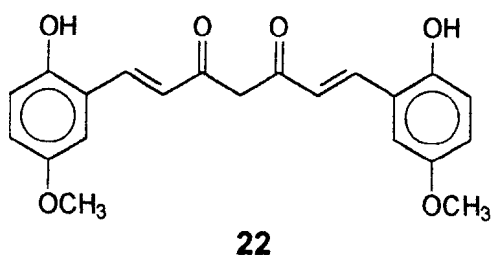
Nomenclatura: [1,7- bis - (2 - hidróxifenil)] -1,6 - heptadieno - 3,5- diona



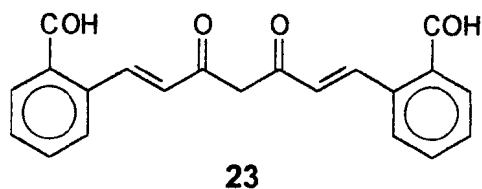
Nomenclatura: [1,7- bis - (3- nitrofenil)] -1,6 - heptadieno - 3,5- diona]



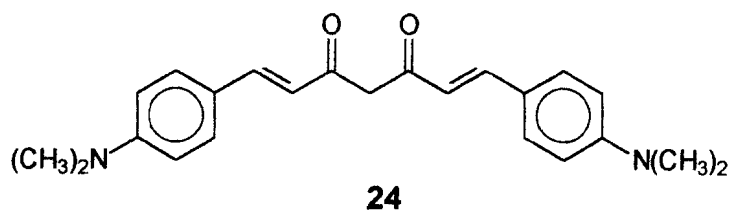
Nomenclatura: [1,7-bis-(2-hidróxi-4-metóxi-fenil)] -1,6 - heptadieno - 3,5- diona



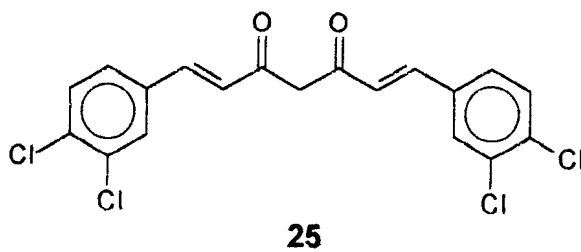
Nomenclatura: [1,7-bis-(2-hidróxi-5-metóxi-fenil)] -1,6 - heptadieno - 3,5- diona



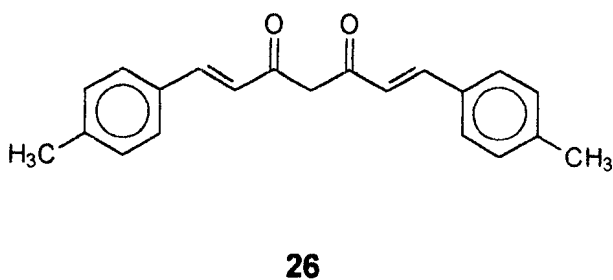
Nomenclatura: [1,7- bis - (2- formilfenil)] -1,6 - heptadieno - 3,5- diona



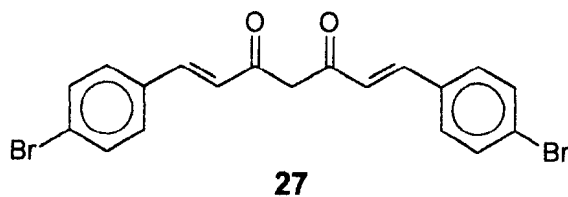
Nomenclatura: [1,7- bis-(2- N,N-dimetilfenil)] -1,6 - heptadieno - 3,5- diona



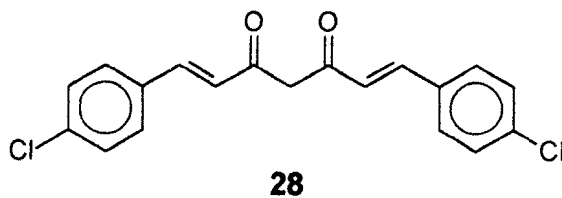
Nomenclatura: [1,7- bis - (3,5- diclorofenil)]-1,6 - heptadieno - 3,5- diona



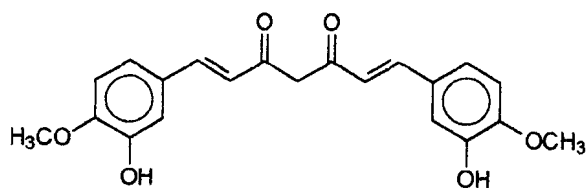
Nomenclatura: [1,7- bis - (4-metilfenil)] -1,6 - heptadieno - 3,5- diona



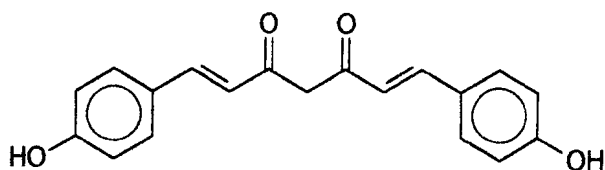
Nomenclatura: [1,7- bis -(4-bromofenil)] -1,6 - heptadieno-3,5- diona



Nomenclatura: [1,7- bis - (4-clorofenil)] -1,6-heptadieno -3,5- diona

**29**

Nomenclatura: [1,7- bis - (3- hidróxi-4-metóxi-fenil)]-1,6-heptadieno-3,5- diona

**30**

Nomenclatura: [1,7- bis - (4- hidróxi)] -1,6 - heptadieno - 3,5- diona

INTRODUÇÃO

Através dos tempos os temperos têm sido usados para tornar os alimentos mais apetitosos, adicionando aroma e sabor a cereais insípidos ou a pratos de carne, ajudando a mascarar o cheiro desagradável de certos alimentos. Turmérico, que significa raiz amarela, é um desses temperos. Haridara, como turmérico é conhecido nos textos da Índia antiga, tem sido usado continuamente por sua cor, aroma e propriedades digestivas, e adquiriu importância adicional quando Ayurveda, um antigo médico da Índia, sistematizou o seu uso, que foi expandido e difundido por todo Oriente Médio e Extremo Oriente. Também teve importante papel como matéria-prima para os cosméticos femininos, por possuir cor amarela brilhante e perfume fresco característico. Sua cor foi também determinante na escolha do seu uso em cerimônias religiosas (Shankaracharya & Natarajan, 1973). Estes usos e práticas continuam no sudeste da Ásia até hoje (Govindarajan, 1980).

Como outros temperos, turmérico fez sua jornada em direção ao ocidente através das regiões mediterrâneas. A raiz "Kurkum", do árabe, aparentemente deu origem à palavra latina "curcuma", para o gênero ao qual turmérico pertence. Turmérico é mencionado no herbário Assírio, datado aproximadamente 600 a.C., como uma planta indiana que possui cor amarela e gosto amargo quando mastigada. Nas memórias de Marco Polo (A.D. 1280), turmérico é citado como um vegetal originário da China, que possui todas as propriedades, cheiro e cor do

açafrão e que no entanto diferencia-se do açafrão. Daí surgindo o nome "açafrão indiano" usado na Europa medieval, tendo sido um substituto barato para colorir alimentos e bebidas, e possivelmente preferido por causa da sua reputação terapêutica como carminativo e corretivo do mal funcionamento da vesícula biliar (Parry, 1969).

A cor amarela do turmérico foi usada por muitos séculos, no Oriente e Ocidente, como uma tintura vegetal para colorir seda e algodão. Com a introdução de corantes sintéticos seu uso foi sendo deixado de lado.

Em virtude da ampla distribuição destas espécies, existe grande dificuldade de reconhecimento das que são chamadas raiz amarela, *Curcuma longa* na Índia e "temoe lawak", *C. xanthorrhiza*, da Indonésia. Por causa da similaridade dos rizomas e de partes vegetais, e por falta de plantas padrão para a sistematização, a confusão foi inadvertidamente perpetuada na literatura a respeito da química ou da ação fisiológica dos extratos e constituintes de diferentes espécies de *Curcuma*. Outra fonte de confusão é encontrada quando dois diferentes nomes são usados para a mesma planta, ou o mesmo nome para diferentes plantas. O uso de nomes comuns como: curcuma, turmérico, turmérico silvestre, zedoaria amarela e preta, e nomes locais, e o crescimento de diferentes espécies na mesma localidade, precipita uma mistura não intencional de rizomas, e promove assim uma confusão adicional. Na tabela 1 a seguir, estão representados alguns sinônimos da raiz amarela em diversos países (Maheshwari & Singh, 1965).

Tabela 1- Principais nomes atribuídos a turmerico em vários países.

País	Sinônimo
Países árabes	<i>Kurkum</i>
Bengala	<i>Halud</i>
China	<i>Wong geund, Yu chin</i>
Holanda	<i>Geelwortel</i>
Inglaterra	<i>Indian saffron</i>
Estônia	<i>Harilik kurkuma</i>
França	<i>Curcuma, Safran des indes, Terr-mérite, Souchet des Indes</i>
Alemanha	<i>Curcuma, Kurkuma, Indischer Safran, Gelbwurz</i>
Indonésia	<i>Kunyit, Daun kunyit (folhas)</i>
Itália	<i>Curcuma</i>
Japão	<i>Ukon</i>
Canadá	<i>Arishina</i>
Noruega	<i>Gurkemeie</i>
Rússia	<i>Zholty imbir</i>
Sanscrito	<i>Haridara, Marmarii</i>
Espanha	<i>Curcuma</i>
Suécia	<i>Gurkmeja</i>
Vietnã	<i>Cu nghe, Bot nghe</i>
Portugal	<i>Açafrão da Índia, Curcuma</i>

Nativo do Sudeste e Sul da Ásia, provavelmente originado nas encostas das florestas tropicais da Costa Oeste do Sul da Índia; esta é uma das plantas que tem se espalhado vegetativamente por milhares de anos. *Curcuma*, um gênero da família *zingiberaceae* consiste em centenas de espécies de ervas rizomatosas distribuídas na Índia, China, Indonésia, Siam, Arquipélago da Malásia, e Nordeste da Austrália. *Curcuma* pode crescer em diversas condições tropicais, em montanhas a 1500 metros acima do nível do mar, em temperaturas em torno de 20 a 30 °C, sob pluviosidade de 150 cm ou mais por ano, ou sob condições de irrigação (Annual report, 1977).

DESCRIÇÃO BOTÂNICA

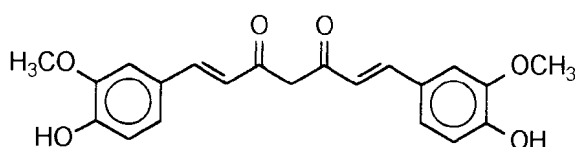
Curcuma longa L. (Lineu) é uma planta herbácea com rizomas espessos e folhas com bainhas que caracterizam a família *zingiberaceae*. A planta alcança alturas acima de um metro. Folhas alternando, oblíquas eretas ou subsésseis, são oblongas, lanceoladas e de cor verde escuro, superando folhas embainhadas estreitando-se próximo à extremidade e alargando-se próximo à base, envolvendo o broto sucessivamente. A inflorescência é terminal, nas folhas falsos caules aparecem entre a bainha. Flores, que são vistas ocasionalmente nas plantas, são cilíndricas suportando numerosas brácteas branco esverdeadas, e pequenas de cor branco amarelada (Melchior & Kastner, 1974).



Figura 1: *Curcuma longa* L.

Fonte <http://www.mobot.org/MOBOT/research/library/koehler/taxa.html>

COMPOSIÇÃO, ESTRUTURA E ISOLAMENTO



curcumina (1)

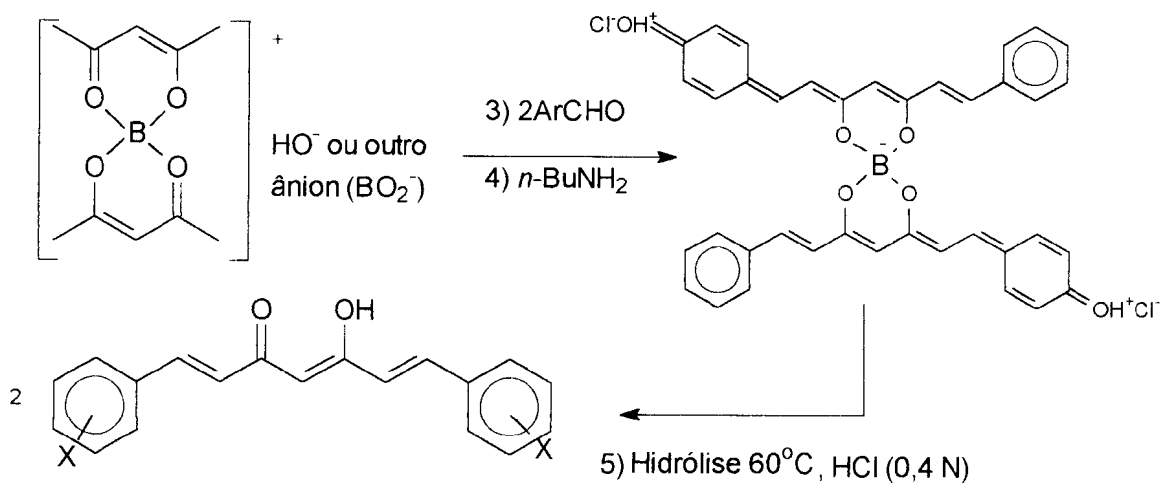
Hoje sabe-se que as espécies de *Curcuma* possuem como principal constituinte químico a curcumina **(1)**. Foi descrito um método de obtenção da curcumina com rendimentos de 0.65 %, por precipitação como um sal de chumbo a partir do extrato alcoólico e posterior purificação por decomposição do sal (Mayer, 1943).

Pesquisas descrevem a preparação da curcumina pura com altos rendimentos. O processo envolve uma extração prévia do rizoma com hexano para remover os constituintes voláteis e ácidos graxos. O concentrado é cristalizado sob aquecimento e posteriormente purificado por recristalização em etanol (Janaki & Bose, 1967).

SÍNTESE (Mayer, 1943)

A síntese da curcumina a partir de acetilacetona e vanilina foi descrita (Pabon, 1964) com rendimentos na faixa de 80%. A vanilina foi dissolvida em acetato de etila seco, e tri-(*S*-butil) borato foi adicionado (esquema 1).

Ao complexo formado por agitação da acetil acetona com óxido bórico (esquema 1) foi adicionada *n*-butilamina, gota a gota, e a solução foi deixada em repouso. Após a adição de ácido clorídrico a 60 °C foi extraída com acetato de etila. O sólido no extrato foi recuperado por evaporação do solvente, agitado ainda 1 hora com ácido clorídrico diluído, lavado e purificado por extração e cristalização.

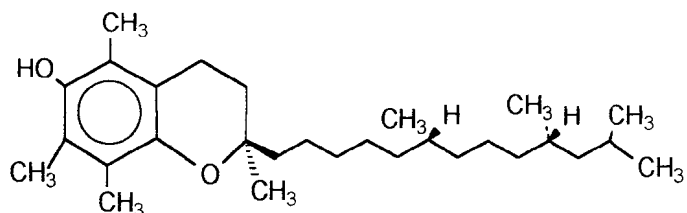


Esquema 1: Hidrólise do complexo de Boro.

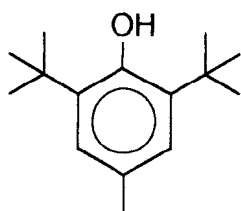
FARMACOLOGIA

1- Propriedade antioxidante

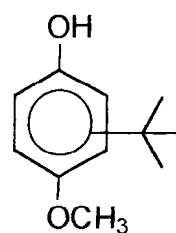
A curcumina pertence a um grupo de potentes antioxidantes. Com uma atividade antioxidante maior que a da vitamina E (2), e foi menos ativo que os antioxidantes sintéticos BHA (3) e BHT (4). Baseado nestes resultados, a hipótese do mecanismo de atividade antioxidante da curcumina pode ser atribuída a quelação de um íon metálico por um grupo β -dicetônico central (Larson, 1988).



vitamina E (2)

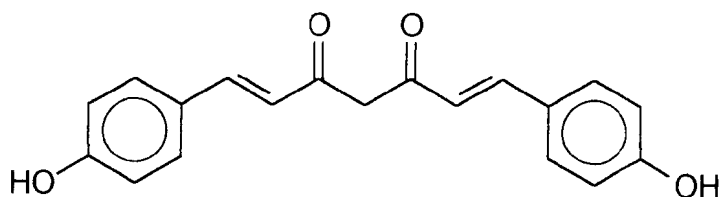


BHT (3)

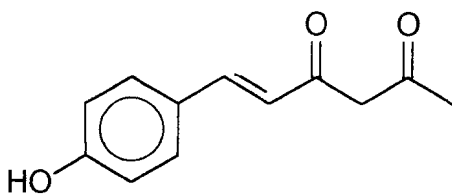


BHA (dois isômeros) (4)

Em outro trabalho, a atividade antioxidante da curcumina e de dois análogos *p,p'*- diidroxicinamoil metano (**5**) e *p*-hidroxicinamoilferuloil metano (**6**) foram comparadas,

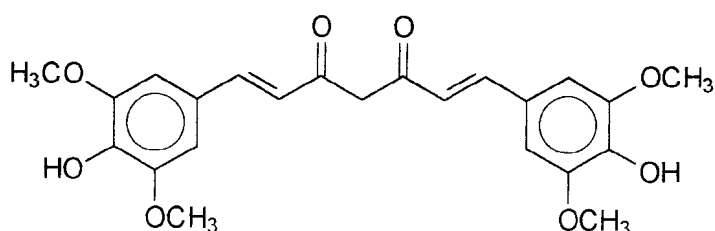


***p,p'*- diidroxicinamoil metano (5)**



***p*- hidroxicinamoilferuloil metano (6)**

e a curcumina foi o mais ativo entre os três curcuminóides, indicando que o grupo metóxi próximo ao grupo hidróxi aumenta a atividade antioxidante. Curcumina 5'-metoxilada (**7**), isolada de *Curcuma xanthorrhiza*, foi mais ativa que a curcumina (Masuda & Jitoe, 1994).



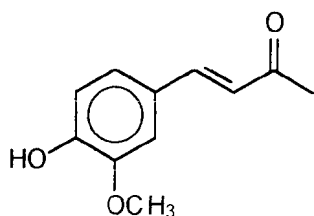
curcumina 5'-metoxilada (7)

O resultado descrito acima mostra que o grupo metoxila na posição 5' da curcumina, provoca um aumento na atividade antioxidante.

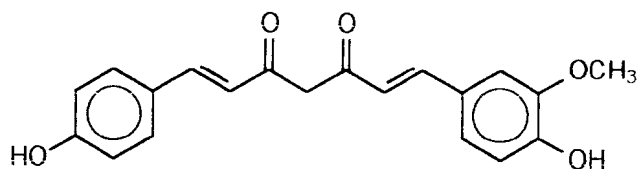
A curcumina e seus derivados, e em menor extensão outros antioxidantes naturais, oferecem proteção significativa frente a oxidação do DNA por $^1\text{O}_2$. A proteção máxima conseguida com curcumina em concentração saturada, entretanto foi de apenas 50%. Sabe-se que a parte da molécula do DNA na forma helicoidal, não é acessível à ação antioxidante devido ao impedimento estérico. Embora esteja claramente estabelecido que $^1\text{O}_2$ induz quebras nas ligações das bases do DNA, o mecanismo exato ainda não é conhecido. Na hipótese de que as quebras resultem de reações envolvendo mais de um intermediário, a curcumina e seus derivados podem ser ábeis em bloquear ou inibir um ou mais desses intermediários (Sreejayan & Rao, 1993). Apesar de saber-se que curcumina reage com espécies radiculares do tipo $\cdot\text{OH}$ e $\cdot\text{O}_2$, a reação com $^1\text{O}_2$ não foi ainda esclarecida (Subramanian *et al.*, 1994).

A curcumina tem sido considerada mais efetiva na prevenção de danos causados ao DNA, induzidos pelo oxigênio singlete. A remoção do grupo metoxila de um anel aromático ou de ambos os anéis resulta na redução da atividade.

Deidrozingeronona (**8**), um análogo da curcumina com cerca de metade do seu peso molecular, possui substituintes similares no anel aromático, mas não possui o sistema β -dicetônico central presente na curcumina. Este produto apresentou uma maior atividade do que a desmetoxicurcumina (**9**) e bis-desmetoxicurcumina (**5**) à baixa concentração ($10\mu\text{M}$) e foi igualmente ativo em alta concentração ($100\mu\text{M}$) (Reddy & Lokesh, 1994).



deidrozingeronona (8)



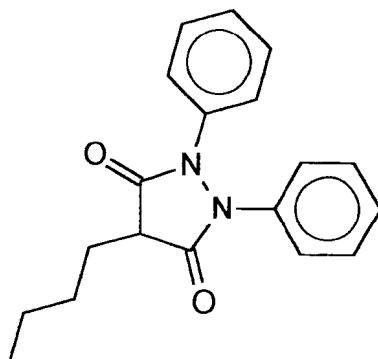
desmetoxicurcumina (9)

Os resultados descritos anteriormente sugerem que o sistema β -dicetônico central não seja o único grupamento importante para a atividade, a presença de substituintes no anel aromático, bem como a porção estiril cetona são relevantes.

Estudos anteriores mostraram que a curcumina e seus derivados são capturadores de radicais livres e inibem reações mediadas por eles, como oxidações de oxiemoglobina induzidas por nitritos e peroxidação de lipídios. A curcumina possui ainda a propriedade de prevenir danos causados à pele pela exposição à luz do sol (Kikuzaki & Nakatani, 1993).

2- Propriedade antiinflamatória

A curcumina mostrou-se ativa em modelos de inflamação aguda e crônica e sua atividade foi comparável, em alguns casos, com a atividade da fenilbutazona **(10)**, um agente antiinflamatório usado comumente como modelo (Srimal & Dhawan, 1973). Além disso, a curcumina faz com que os níveis séricos das enzimas transaminases (SGOT, soro transaminase oxalacético glutâmico; e SGPT, soro transaminase pirúvico glutâmico) voltem ao normal, após terem sido aumentados pela inflamação, possivelmente pela ausência de mudanças na atividade da ATPase do fígado durante o processo inflamatório. Tanto a curcumina **(1)**, quanto a fenilbutazona **(10)** estimulam a atividade da ATPase em 23% (Mukhopadhyay, *et al.*, 1982). Muitas outras drogas antiinflamatórias são conhecidas por aumentar a atividade da ATPase das mitocôndrias do fígado. A potência antiinflamatória da curcumina é aproximadamente igual a da fenilbutazona, mas a toxicidade da curcumina é muito menor, além disso a curcumina provoca um menor índice ulcerogênico do que a fenilbutazona. Finalmente, a fenilbutazona produz leucopenia significativa (diminuição da quantidade de glóbulos brancos do sangue) e linfocitopenia (diminuição da quantidade de linfócitos do sangue), que não são provocadas pela curcumina.



fenilbutazona (10)

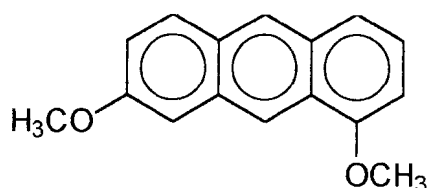
O mecanismo de ação da curcumina como antiinflamatório ainda não foi esclarecido. Ela é muito menos ativa em animais adrenalectomizados, sugerindo uma ação indireta através do córtex adrenal. Não produz mudanças significantes nos níveis de colesterol e de ácido ascórbico na adrenal, que diminui se um aumento de atividade adrenocortical estiver envolvida na ação antiinflamatória. Entretanto, a curcumina não provoca diminuição de linfócitos e eosinófilos como poderia ser esperado com o aumento da secreção de cortisona e hormônios relativos ao córtex da adrenal. É possível que muitos tecidos sensibilizados pela ação de hormônios adrenocorticais afetem a sua secreção. Trabalhos para elucidar o mecanismo de ação da curcumina, ainda estão em progresso (Huang *et al.*, 1992).

3-Atividade anticarcinogênica

Os anticarcinogênicos demonstram ter um profundo efeito na expressão de tumores em experimentos com animais e idealmente mostraram ter efeito similar em câncer humano. Os anticarcinogênicos podem ser substâncias químicas sintéticas ou substâncias derivados de produtos naturais. Muitos fenóis de origem vegetal, especialmente os derivados do tipo cinamoil, possuem esta propriedade, devido possivelmente às suas atividades antioxidantes (Rao, 1995).

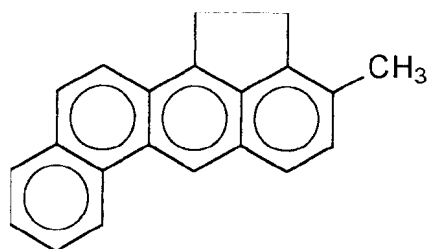
A curcumina é um derivado dicinamoil metano com ligações duplas conjugadas com as carbonilas e tem mostrado ser um bom capturador de radicais livres (Tanaka, 1994).

Aplicações repetidas de extratos de turmérico e curcumina na fase de promoção carcinogênica, produziu a redução na expressão de papilomas na pele de camundongos induzida por 2,8- dimetoxibenz[a]antraceno (**11**).



2,8- dimetoxibenz[a]antraceno (11)

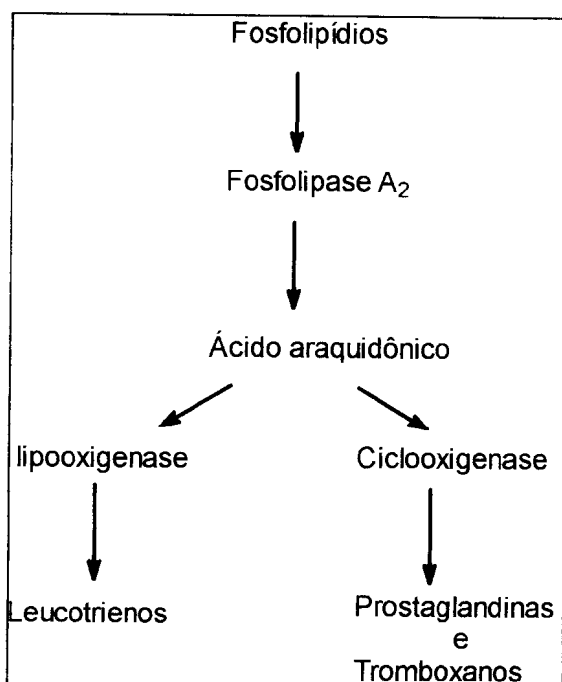
O potencial anticarcinogênico foi calculado pela redução na formação do tumor, induzido pela injeção subcutânea de 20-metilcolantreno (**12**).



20-metilcolantreno (12)

Curcumina e o extrato de turmérico, possuem capacidade antioxidante que reduz a peroxidação de lipídios. Logo, a captura de peróxidos e superóxidos pode ser a principal hipótese para o mecanismo de ação da curcumina. A última reação é mediada pela superóxido dismutase que é inibida por indutores tumorais (Soudamine & Kuttan, 1989).

Outros estudos mostram que a curcumina inibe o metabolismo epidermal do ácido araquidônico, via o caminho da lipooxigenase e ciclooxigenase. Como a curcumina possui atividade antioxidante, ela pode inibir a formação de tumores pela inibição do metabolismo epidermal do ácido araquidônico e/ou pela remoção dos radicais livres que são produzidos durante o metabolismo do ácido araquidônico (esquema 2).

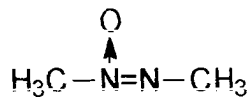


Esquema 2: Cascata do ácido araquidônico.

A curcumina pode também inibir a atividade da fosfolipase epidermal A₂ e/ou inibir o metabolismo do ácido araquidônico induzido por TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato). A curcumina é um dos mais potentes inibidores do metabolismo do ácido araquidônico induzido por TPA. Inibe ainda a formação de tumores em pele de camundongos, induzidos por TPA, também inibe a ativação metabólica de várias mutações químicas e o efeito de iniciação de tumores por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. A curcumina também inibiu a quantidade de células tumorais *in vitro*, e levou ao aumento da sobrevivência de animais com linfomas. O mecanismo destes efeitos ainda não é conhecido.

Estudos anteriores mostraram que a aplicação tópica e administração na dieta de curcumina inibe tumores induzidos de pele e estômago (Huang *et al* , 1992)

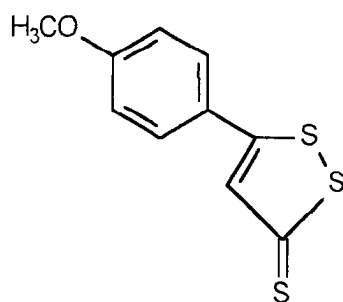
Estudos recentes em ratos mostraram que a administração na dieta de 5-20 ppm de curcumina reduz a incidência de tumores no intestino. Altos níveis de curcumina na dieta (2000 ppm) inibe significativamente a incidência, multiplicidade e tamanho de adenocarcinomas de cólon nestes animais. O resultado do presente estudo foi de grande interesse, porque a longo prazo alimentação com a curcumina inibe significativamente tumores de cólon induzidos por azoximetano (**13**), mas também não produz efeitos graves no fígado, rim, estômago, intestinos e pulmões.



azoximetano (13)

É também interessante notar que, quando comparados a outros agentes quimiopreventivos de câncer do cólon, como ditioltionas, a curcumina produz melhor ou igualmente potente ação inibitória dos tumores. A curcumina quando administrada na dieta desses animais em 5 a 10% produz insignificantes efeitos tóxicos, quando comparados a ditioltionas como anetol tritona (5-*p*-metóxfenil) -3H-1,2—ditiol-3-tiona) (**14**), que produz significante toxicidade quando administrados a 0.05% na dieta (Huang, 1994).

Estes resultados indicaram que a dieta rica em curcumina inibiu significativamente a atividade da fosfolipase A₂ e C_γ1 em mucosa colônica e em tumores. O exato mecanismo pelo qual curcumina inibe estas atividades enzimáticas não está bem definido. Mas é possível que a curcumina exerça atividade inibitória agindo diretamente na fosfolipase A₂ ou C_γ1, ou alternativamente, pela ação nos seus reguladores, resultando numa diminuição nos níveis do ácido araquidônico e de seus metabólitos de formação. A curcumina suprime também as atividades das ciclooxigenases e lipooxigenases de cólon (Grunberger, 1988).



anetol tritiona (14)

4 - Atividade anti-HIV

Várias etapas enzimáticas no ciclo de replicação do HIV podem ser alvo de intervenção quimioterapêutica, principalmente a transcrição reversa e a clivagem proteolítica. Pesquisas em andamento se direcionam ao desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos com ação sobre outras etapas do ciclo de vida

viral. Em direção a esta meta, vários pesquisadores têm se dedicado a investigar a atividade farmacológica de várias drogas como inibidoras da enzima HIV-integrase (Mazunder *et al.*, 1995).

Estudos demonstraram que a curcumina inibe a proteína HIV-1 integrase, indicando que a inibição desta enzima pode contribuir para a atividade anti-HIV apresentada por ela (Fesen *et al.*, 1994).

A replicação eficiente do DNA retroviral requer o estabelecimento de um estado pró-viral, isto é, a integração da cópia do genoma do DNA viral, sintetizado pela transcriptase reversa, no cromossomo da célula hospedeira. A integração é catalizada pela proteína integrase viral. Antes da integração, dois nucleotídeos são retirados de cada 3'- final do DNA viral linear. Esta reação expõem o 3'-hidroxil do CA dinucleotídeo que é conservado entre todos os retrovirus. Cada um desses 3'-hidroxil finais do DNA viral são associados ao DNA cromossomial na tira subsequente de DNA no passo de transferência, esta é uma reação de transesterificação. A HIV-1 integrase cataliza o ataque nucleofílico de cada grupo 3'-hidroxil no fim do processo viral na ligação do par fosfodiéster. A curcumina age impedindo a catálise do processo (La Femina *et al.*, 1995). Estes resultados demonstram que a curcumina é inibidora da HIV- 1 integrase, sugerindo que ela e seus análogos podem ser aplicados como potenciais drogas anti-AIDS (Artico *et al.*, 1998).

São também atribuídas à curcumina as seguintes atividades:

5 -Atividade fotobiológica (Tonnensen *et al.*, 1987).

6-Atividade antiartrítica (Sharma *et al.*, 1987)

7- Propriedade hepatoprotetora (Donatus *et al.*, 1990)

8-Propriedade antiparasitária (Kiuchi *et al.*, 1993)

CAPÍTULO 1 - A LEISHMANIOSE

1.1- INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral foi descrita pela primeira vez por Leishman e Donovan em 1903. Estes dois médicos identificaram os parasitas, simultaneamente, mas separadamente, na bile expelida por pacientes que sofriam de doença semelhante a malária. Estes parasitas mais tarde foram identificados como sendo os agentes causadores da leishmaniose visceral que foram denominados *Leishmania donovani*, em homenagem a estes pesquisadores.

Em 1922 foi descrita uma epidemia de calazar que ocorreu em Garo, cidade da Arábia Saudita, por volta de 1870. Cunningham recordou uma doença similar que ocorreu em 1885, causada por um parasita que foi mais tarde denominado *Leishmania tropica*, agente causador da leishmaniose cutânea. Nicolle em 1908 reportou que mamíferos incluindo cachorros podem agir como hospedeiros reservatórios do parasita da leishmaniose. Swaminath *et al.* em 1942, provou usando voluntários humanos, que o parasita da leishmaniose pode ser transmitido pelo flebótomo (WHO - World Health Organization, [www site](http://www.who.int), 1997).

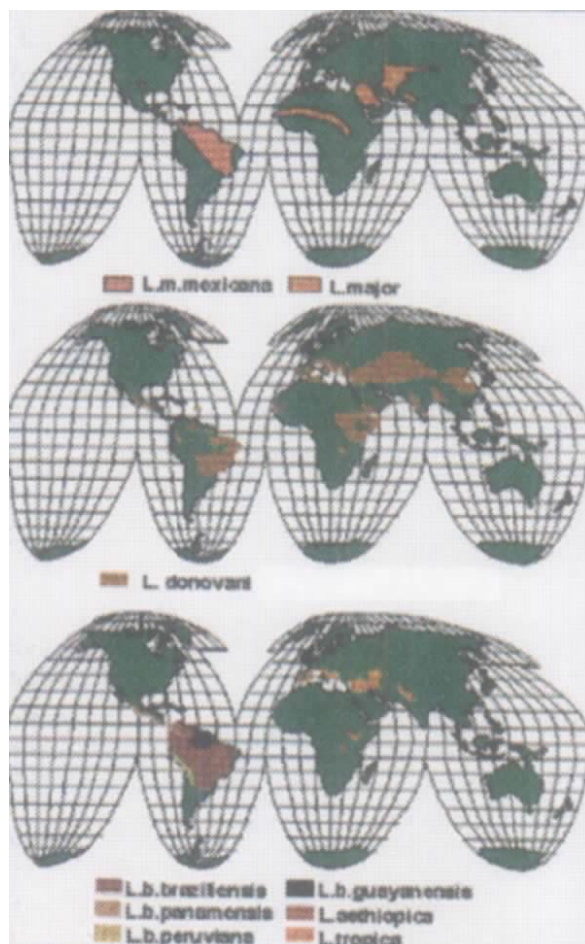
Os protozoários do gênero *Leishmania* predominam em diversas regiões do Velho e Novo Mundo, causando no homem uma enfermidade denominada Leishmaniose (Araújo, 1999). A transmissão ocorre através da picada da fêmea do inseto vetor (Díptero: *Psycodidae*), dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* (**Figura 2**), respectivamente no Novo e no Velho Mundo.



Fonte: <http://www.icp.ucl.ac.be/~opperd/parasites/leishmap.htm>

Figura 2- *Phlebotomus*

O inseto se reproduz em território úmido, áreas de florestas, grutas ou em tocas de roedores e se alimentam do sangue de humanos ou animais, que podem estar infectados .



Fonte: <http://www.icp.ucl.ac.be/~opperd/parasites/leishmap.html>

Figura 3- Distribuição da Leishmaniose no mundo

As leishmanioses prevalecem em quatro continentes e são consideradas endêmicas em 88 países (22 do Novo Mundo e 66 do Velho Mundo), 16 são países desenvolvidos, 71 são países em desenvolvimento e 1 subdesenvolvido (figura 3).

Mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral no mundo são encontrados em Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão e mais de 90% dos casos de leishmaniose cutânea estão no Afeganistão, Iran, Arábia Saudita e Síria no Velho Mundo, Brasil e Peru no Novo Mundo.

A leishmaniose atualmente afeta cerca de 12 milhões de pessoas. Estima-se que 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de infecção por diferentes espécies de parasitas da leishmaniose.

A doença apresenta quatro formas principais:

- **Leishmaniose visceral (VL)** - a forma mais séria da doença e fatal se não tratada.
- **Leishmaniose cutânea (CL)** - a infecção mais comum, causando uma ou mais lesões simples de pele que cicatriza após muitas semanas ou meses, mas deixa marcas disformes.
- **Leishmaniose mucocutânea (MCL)** - que apresenta úlceras de pele simples, que podem alastrar-se, causando horrível destruição dos tecidos, particularmente no nariz e na boca.
- **Leishmaniose cutâneo difusa (DCL)** - que produzem lesões disseminadas e crônicas que lembram aquelas das pessoas leprosas e são de tratamento mais difícil.

Correntemente, a incidência anual é de cerca de 2 milhões de novos casos (1,5 milhão de leishmaniose cutânea e 500 mil de leishmaniose visceral), mas está claro que os dados oficiais são freqüentemente uma estimativa grosseira da realidade.

Por muitos anos o impacto da leishmaniose na saúde pública vinha sendo subestimada, principalmente devido a falta de consciência da seriedade desta doença. Durante as duas últimas décadas, tem sido observado que formas de leishmaniose aparentemente menos difundidas, têm se mostrado mais predominantes que anteriormente.

Como muitas outras doenças tropicais, as leishmanioses são encontradas em países em desenvolvimento econômico e onde mudanças ambientais provocadas pelo homem aumentam a exposição ao inseto vetor.

Extração de madeira, exploração de minas, construção de represas, ampliação de áreas de cultivo, novos esquemas de irrigação, construção de estradas em florestas primárias como a da Amazônia, difusão econômica, migração e urbanização rápida do mundo selvagem, são algumas das muitas causas do aumento da incidência dessa doença.

Recentemente, tem sido observado um aumento na coincidência de leishmaniose visceral e infecção por HIV. A co-infecção leishmaniose/HIV é considerada uma doença em ascensão, especialmente no sul da Europa, onde 25 a 70% dos casos de leishmaniose visceral em adultos, estão associados a infecção por HIV, e 1,5 a 9,5% dos casos de AIDS sofrem novas infecções ou têm suas infecções por *leishmania* reativadas (Alvar, 1994).

Também no sul da Europa, a leishmaniose que ocorre em crianças é principalmente causada pela *Leishmania donnovani infantum*, que ocorre também em cães. Na França o número de casos em adultos aumentou de 8 para 16 por ano nos últimos 10 anos. Isto é devido principalmente à AIDS e à imunossupressão provocada pela quimioterapia de câncer e transplantes de órgãos. Isto mostra que muitos adultos podem ter sido infectados com o parasita da leishmaniose sem ter apresentado nenhum sintoma da doença (Brener, 1990).

O uso de drogas intravenosas tem sido identificado como o principal risco de contaminação.

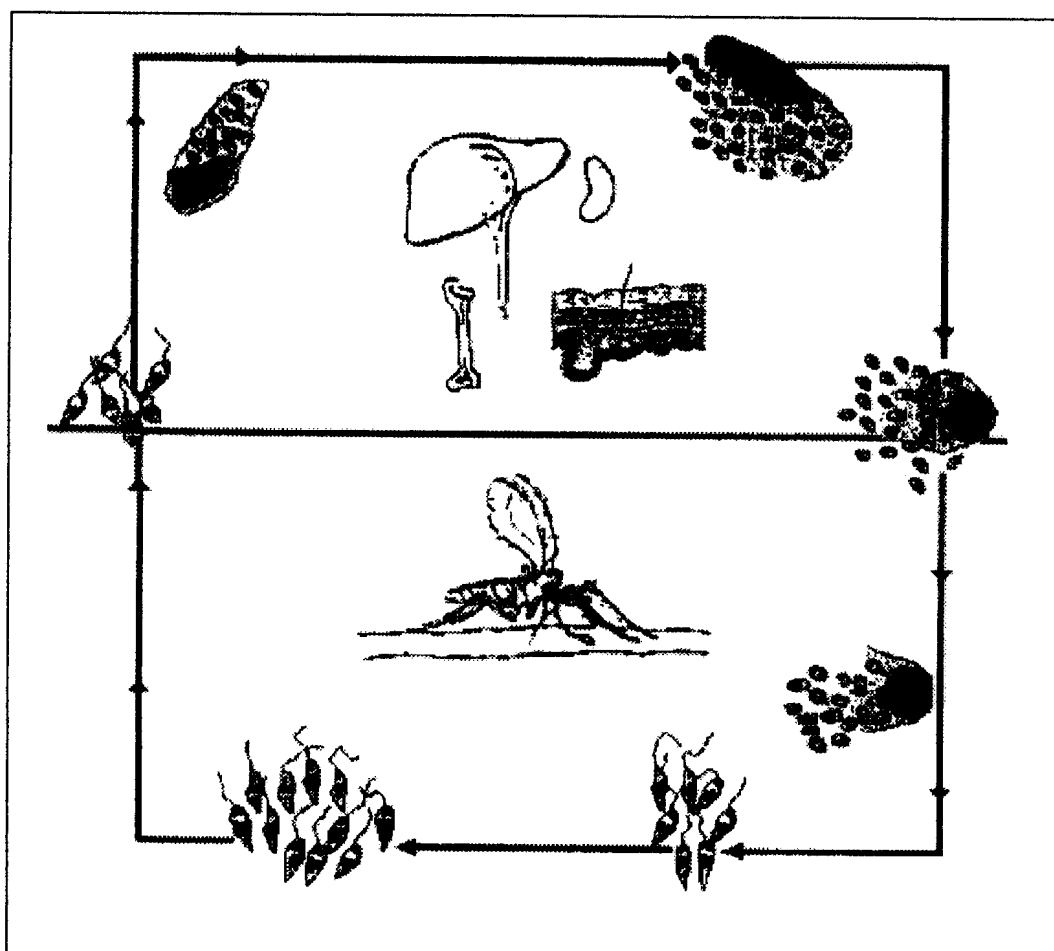
As leishmanioses são zoonoses com distribuição geográfica mundial, com predominância nas regiões tropicais e subtropicais, em face do “habitat” limitado dos seus vetores a estas áreas.

As *leishmanias* são capazes de produzir no hospedeiro vertebrado um largo espectro da doença. As leishmanioses do Novo Mundo podem ser agrupadas em duas amplas categorias clínicas: leishmaniose visceral americana e leishmaniose cutânea americana.

A doença é considerada um grande problema para a saúde pública, já que a sua incidência tem crescido de maneira progressiva nos últimos anos. No Novo Mundo o controle da doença é bastante complicado, devido a dificuldade de se controlar os vetores e os reservatórios, considerando-se o grande número e variedade de “habitats” das espécies incriminadas; à existência de uma quimioterapia precária; à falta de vacinas adequadas e a heterogeneidade do parasita em questão, ou seja, a variedade de diferentes espécies do parasita e sua ampla diversidade de manifestações clínicas (Bryan, 1994).

Os procedimentos terapêuticos e métodos de controle desta enfermidade, dependem essencialmente da espécie ou cepa do parasita com o qual o indivíduo encontra-se infectado.

1.2- Multiplicação e ciclo de vida dos tripanossomatídeos



Fonte: <http://www.cdfound.to/it/HTML/don1c.htm>

Figura 4- Ciclo de vida de *Leishmania* ssp.

Nos mamíferos hospedeiros, as formas amastigotas são fagocitadas pelos macrófagos, mas resistem à digestão e se dividem ativamente nos fagolisossomos (figura 4). Parasitas ingeridos pela fêmea dos flebótomos que sugam o sangue de uma pessoa ou animal infectado passam ao estômago, se transformando em promastigotas, e se multiplicam ativamente. A forma paramastigota também ocorre nos flebótomos. O parasita finalmente ganha um flagelo na parede do esôfago do flebótomo, e alguns eventualmente alcançam o probóscide e são novamente inoculados num novo hospedeiro (figura 5) (Convit *et al.*, 1993).

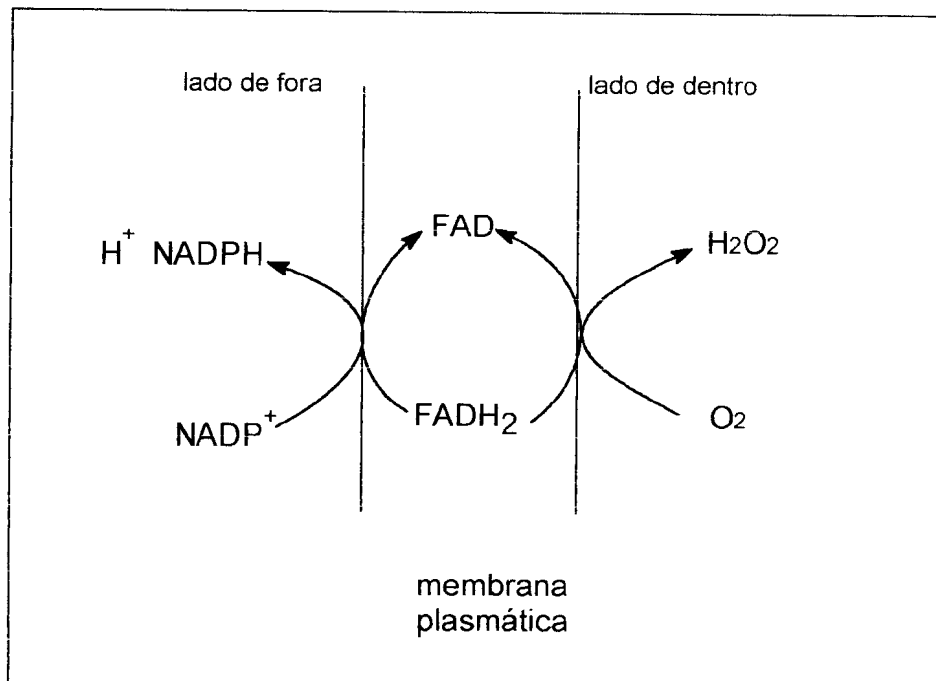
1.3- Sobrevivência intracelular da *Leishmania* (Hontebeyrie-Jaskowicz, 1993)

A *Leishmania* sobrevive da morte lisossomal é quando se divide dentro do compartimento fagolisossômico dos macrófagos. O compartimento lisossomal é um ambiente muito hostil onde células que devem ser interiorizadas pelos macrófagos são normalmente mortas pela série dos seguintes mecanismos:

Quebra oxidativa

Quando o macrófago engloba um corpo estranho como uma bactéria, um parasita ou outro patógeno potencial, a enzima chamada NADPH oxidase na membrana plasmática dos macrófagos é ativada. Estas enzimas reduzem

equivalentes de NADPH à oxigênio molecular levando a formação dos radicais superóxido e hidroxila (O_2^\bullet e OH^\bullet) extremamente reativos (esquema 3).

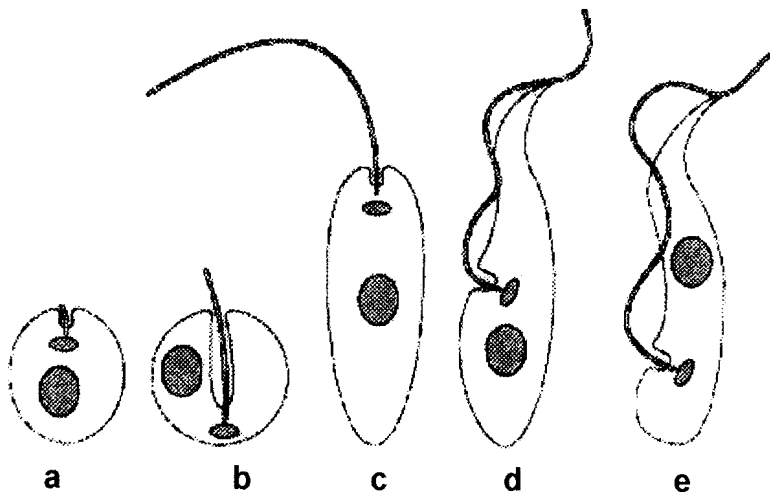


Esquema 3: Formação de radicais reativos.

Como intermediários de reação são formados os radicais O_2^\bullet e OH^\bullet . A formação desses intermediários radicais ocorre em torno do local onde ocorre o englobamento. A seguir, as espécies de oxigênio ativos reagem com os fosfolípidos da membrana do patógeno, que então torna-se permeável. Radicais também reagem com macromoléculas dos patógenos, como o DNA, introduzindo quebras nas ligações de suas bases.

Acidificação

Seguindo à fusão do fagossomo com o compartimento endossomal da célula, ocorre uma acidificação deste compartimento, pela ação do próton da ATPase nesta membrana, levando a uma significativa diminuição do pH (pH 5).



Fonte: [http/ 129.109.112.248/microbook/ch082.htm](http://129.109.112.248/microbook/ch082.htm)

- a- amastigota
- b- paramastigota
- c- promastigota
- d- epimastigota
- e- tripomastigota

Figura 5- Cinco dos oito estágios morfológicos de tripanossomatídeos flagelados.

Como resultado, as proteínas iniciam sua desnaturação e desdobramento que leva então ao acesso das hidrolases.

Digestão

A fusão do compartimento endossomal com lisossomos primários, formando o compartimento fagolisossomal, leva à liberação das enzimas digestivas neste compartimento. Macromoléculas como DNA, RNA, proteínas e carboidratos são agora degradados e o patógeno digerido.

A *Leishmania* ao contrário do que se esperaria, sobrevive neste ambiente hostil, as custas deste desconhecido mecanismo de defesa ao ataque pelo macrófago. As seguintes observações podem ser feitas:

***Leishmania* promastigotas e amastigotas produzem uma fosfatase ácida em sua superfície que mostrou inibir a quebra oxidativa do macrófago;**

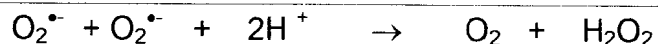
***Leishmania* amastigota tem um próton ativo pronto para manter seu pH intracelular próximo ao valor natural.**

1.4- Oxigênio como mecanismo de defesa (<http://www.travelhealth>)

O oxigênio molecular pode utilizar um simples elétron para reduzir o íon ferroso, ou a partir de elementos altamente redutores presentes nas células. O ânion superóxido que é formado como um radical extremamente reativo, que pode também reduzir moléculas pela doação deste elétron ou oxidar quando recebe um segundo elétron formando peróxido de hidrogênio. Quando estas reações ocorrem entre dois radicais superóxidos, a dismutação segue à formação do oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio.

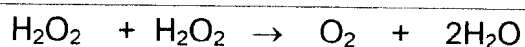
Ânions superóxido podem também reagir com peróxido de hidrogênio para formar o radical hidróxi que é extremamente reativo, embora o peróxido de hidrogênio por ele mesmo também possa causar vários danos às células. Logo é importante reduzir ao mínimo o dano causado por estas espécies de oxigênio. Entretanto, todos têm mecanismos à sua disposição que os protege contra o “stress” oxidativo. Estes são superóxido dismutase, catalase, peroxidase e glutathiona. Juntos estes sistemas previnem contra danos à membrana e ao seu DNA.

Superóxido dismutase (SOD), é a primeira defesa contra os intermediários tóxicos do oxigênio. Ela acelera significativamente a reação espontânea de superóxido dismutação, mencionada a seguir:

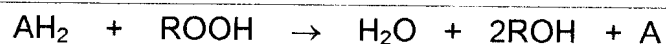


Entretanto a meia-vida do ânion superóxido em água é extremamente curta, na presença de SOD dentro da célula reduz esta meia-vida mil vezes.

Catalase é a segunda defesa contra os intermediários tóxicos do oxigênio. A inativação do peróxido é catalizada pela seguinte reação.



Peroxidases são a terceira defesa contra os intermediários do oxigênio. Ela cataliza o seguinte tipo de reação:

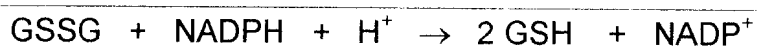


Glutathione (GSH ou gama-glutamil-cisteinil glicina) é outra importante defesa contra o “stress” oxidativo. Reage facilmente não enzimaticamente com peróxido, de acordo com a seguinte reação:



Uma reação similar pode também ser catalizada pela enzima glutathione peroxidase.

A glutathione oxidada (GSSG) é então reduzida enzimaticamente pela enzima glutathione redutase:



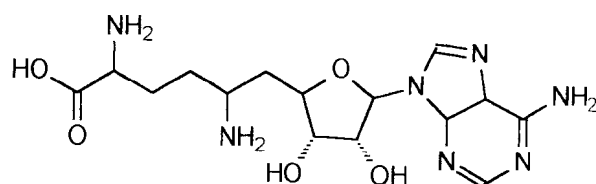
Os equivalentes redutores na forma de NADPH, requeridos para a manutenção da glutathione na forma reduzida são desviados da via das pentoses-fosfato, nas etapas em que as enzimas glucose-6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase produzem NADPH.

1.5- Modo de ação das drogas anti-tripanosomatídeos (Pentreath, 1989)

Muitas das drogas recomendadas e experimentais que agem fora do ciclo de vida dos tripanossomatídeos, interferem com uma ou outra reação no caminho da tripanotiona. Este caminho leva à formação de tripanotiona, um aduto de duas moléculas de glutathione ligados a dois grupos amino terminais de espermidina, que é formado a partir da ornitina, após descarboxilação. Embora os tripanossomatídeos não possuam enzimas que agem na glutathione redutase ou glutathione peroxidase, eles possuem enzimas equivalentes que agem na tripanotiona. Como tripanotiona está em equilíbrio redox com glutathione, o balanço redox pode ser mantido. A maioria das drogas mostradas no esquema a seguir aumentam a sensibilidade dos tripanossomatídeos ao “stress” oxidativo, pela diminuição dos níveis de tripanotiona reduzida. Ambos inibem a biossíntese da tripanotiona, ou inibem a redução desta forma oxidada, ou aumentam o “stress” oxidativo a nível celular.

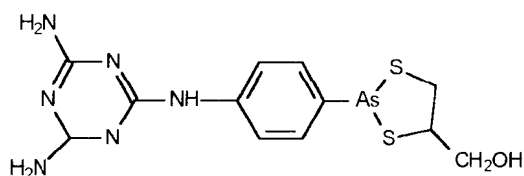
Eflornitina, difluorometilornitina ou DMFO é um inibidor irreversível da enzima ornitina descarboxilase (1) (**Esquema 4**). Sua introdução no tratamento, em estágio inicial, de *Leishmania gambiense* não foi resultado de pesquisa específica de tripanossomíases. Eflornitina foi primeiramente desenvolvida como

um anti-tumoral (Sunkara *et al.* 1985), e como droga de modulação de diferenciação celular (Heby *et al.* 1987) , mas a triagem clínica mostrou resultados pouco satisfatórios (Schechter *et al.* 1987).

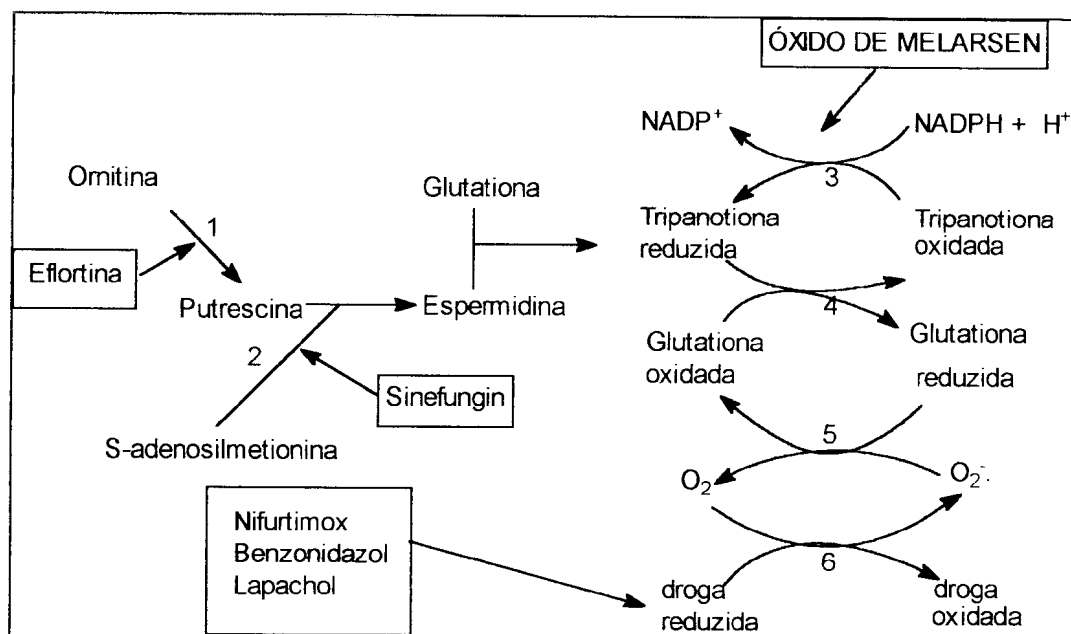


sinefungin (15)

Sinefungin **(15)** é um inibidor da enzima S-adenosilmetionina descarboxilase (**esquema 4**) envolvida na conversão da putricina à espermidina. A principal droga ativa melarsoprol **(16)**, mel B ou arsobal, é o óxido de melarsen que forma um aduto com a tripanotona. Este complexo comporta-se como um potente inibidor da enzima tripanotona redutase, prevendo a redução da tripanotona oxidada.

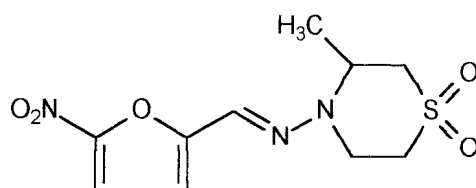


melarsoprol (16)



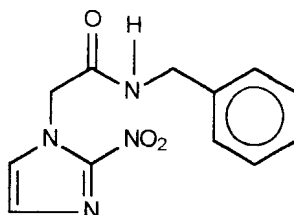
Esquema 4: Rota de ação das drogas anti-tripanosomatídeos

No período entre 1965 e 1975, foram introduzidos no tratamento das tripanossomíases, o nifurtimox (17) e o benzonidazol (18), revolucionando a quimioterapia da época.



nifurtimox (17)

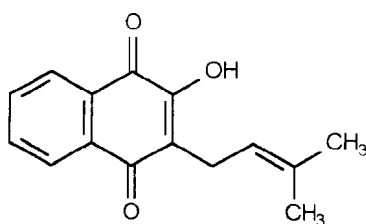
O nifurtimox (**17**), um derivado 5-nitrofurfurilideno (3-metil-4-[5'-nitrofurfurilidenoamino]-tetraidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dioxano) mostrou-se uma droga bastante ativa durante o período agudo da infecção, com um índice de cura em torno de 80%. Porém, na fase crônica praticamente não surtiu efeito. O nifurtimox (**17**) não vem sendo mais produzido desde o começo dos anos 90, devido ao grande número de efeitos colaterais que ele apresenta como: distúrbios neurológicos (convulsões e insônia), distúrbios gastrointestinais, anorexia, e a suspeita de ser um agente carcinogênico, não sendo mais comercializada no Brasil. Nos Estados Unidos a droga é encontrada somente no Centro para Controle de Doenças (Santos, 2000).



benzonidazol (18)

O benzonidazol (**18**), um derivado 2-nitroimidazólico, quimicamente denominado N-benzil-2-nitroimidazol-1-acetamida, apresenta atividade também contra outros microrganismos, mas seu principal uso medicinal é no tratamento da Doença de Chagas. Ele cura 70% dos pacientes em fase aguda e menos de 5% na fase crônica. Apresenta boa tolerância em crianças com menos de 13 anos, mostrando diferentes resultados nos adultos. Não é encontrado atualmente nos Estados Unidos, sendo o único medicamento específico para a moléstia de

Chagas comercializado no Brasil. Seus efeitos colaterais são comparáveis aos do nifurtimox (17), porém menos intensos se comparados aos deste, com menor índice de abandono do tratamento por intolerância à droga (Santos, 2000).



lapachol (19)

O lapachol (19) é um substância de origem natural que mostrou ser eficiente na inibição de formas epimastigotas na concentração de 10 μ g/mL, apresentando também efeitos na redução de radicais livres nas células intactas do parasita. Apesar da alta atividade que apresenta, ela é terapeuticamente inviável, devido à sua rápida inativação no sangue (Santos, 2000).

As outras drogas indicadas são reconhecidas pela capacidade redutiva, levando à produção de radicais superânion, que levam ao “stress” oxidativo.

A noção de que várias drogas diferentes agem na sensibilidade dos parasitas ao “stress” oxidativo, leva à percepção de que a combinação de terapias, usando duas ou mais drogas, pode levar ao sinergismo, resultando num efeito superior com baixas dosagens de drogas que caso contrário seriam necessárias em maior concentração (Petry & Eisen, 1989).

1.6- Vacinas anti-*leishmania* (Report of a WHO, 1990)

O espectro de alcance das *leishmanias* se auto limita a lesões cutâneas e destrutivas das mucosas, e de forma subclínica, infecções viscerais fatais. Baseado nestas informações que leishmaniose cutânea causada por *L. major* e *L. tropica* no Oriente Médio, é uma doença auto imune, e que a recuperação da infecção confere imunidade a reinfecção, sugere que o controle da leishmaniose por vacinação pode ser possível.

Leishmanias mortas, como antígenos em testes de pele (teste de Montenegro) como uma ajuda no diagnóstico e como ferramenta epidemiológica para determinar a exposição da população às *leishmanias* foram usadas por décadas.

O processo de vacinação com promastigotas mortas têm sido realizada no Brasil, Venezuela e Iran sob a supervisão da Organização Mundial de Saúde.

Brasil (*L. amazonensis*)

Iran (*L. major*)

Venezuela (*L. mexicana* e *L. braziliensis*)

O Instituto Razi no Iran, tem testado a vacina que consiste de BCG (60.000 organismos vivos) e 1200 µg de *L. major* morta. Entretanto esta vacina produz muitas lesões não curadas.

Por outro lado a expansão das infecções por HIV (AIDS), a difusão do uso das drogas imunossupressivas (no caso de transplantes de órgãos) e quimioterapia do câncer que compromete o sistema imune, têm levado a repentina explosão de infecções por *leishmania* até então latentes. Isto faz com que a perspectiva do uso de microrganismos vivos ou atenuados em vacina, não seja boa.

Manipulação genética (com genes marcados) de *Leishmania major* levou a produção bem sucedida de parasitas atenuados, sem o gene diidrofolato redutase/timidilato sintase. Inoculação desta estirpe em ratos, provocou uma substancial resistência ao subsequente desafio com *L. major* virulento sem o inconveniente de persistência a longo prazo de organismos infecciosos. O uso de genes auxotrópicos elimina conseqüentemente a segurança e induz a proteção imunológica.

Além disso algumas vacinas moleculares (subunidades de vacinas) são candidatas e foram selecionadas para teste. Estas são:

⇒ **GP63**, a maior superfície de glicoproteína da *leishmania*, introduzida em outra recombinante BCG ou em *Salmonella typhimurium*, ou na vacina plasmídeo DNA.

⇒ **LPG**, lipofosfoliglicans da superfície do parasita.

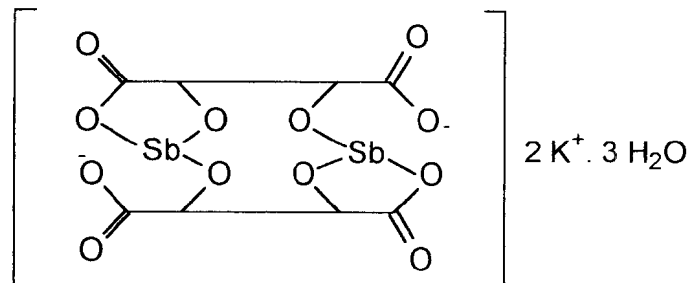
Subunidades de vacinas por elas mesmas não são muito imunogênicas. Elas podem ser administradas em combinação com outras vacinas como a BCG, óxido de alumínio e outras.

1.7-Tratamento da Leishmaniose:

1.7.1- Tratamento clássico

Quimioterapia da Leishmaniose - Drogas sistêmicas

⇒ **Substâncias antimoniais**

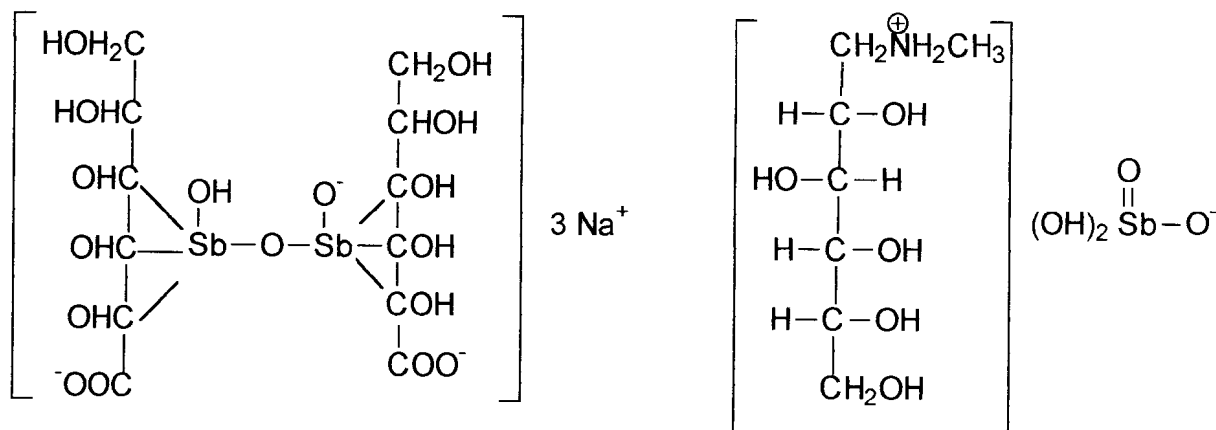


tartarato de potássio e antimônio trivalente (20)

Foi Gaspar Viana quem definiu pela primeira vez a terapêutica da leishmaniose. Em 1912, esse cientista demonstrou que o tártato emético (20)

(tartarato de potássio e antimônio trivalente) à 1% determinava uma rápida cicatrização das lesões cutâneas, chegando a curar alguns pacientes e melhorando outros, e esses resultados tiveram grande importância para o Brasil. Entretanto efeitos secundários extremamente graves foram observados como tosse, dores no tórax, depressão, fazendo com que muitos pacientes desistissem do tratamento. Na tentativa de minimizar estes efeitos, outras substâncias foram testadas, desenvolvendo-se então, o primeiro antimonial pentavalente, a uréia estilbilamina (Reports of a WHO, 1984).

Posteriormente surgiu um outro antimonial mais estável desenvolvido na Alemanha por Schmidt, em 1937, com o nome de Solustibosan® (gliconato de antimônio pentavalente), que podia ser ministrado via intramuscular, intravenosa e subcutânea, uma vez que não era irritante. Este produto inicialmente foi produzido pela Bayer e foi usado com bastante eficácia na Índia e na China (Voller *et al.*, 1963).



estibogluconato do sódio (21) e glucantime (22)

O estibogluconato de sódio (21) (Pentostam®), é atualmente usado, juntamente com o antimoniato de meglumina (Glucantime®) (22), desenvolvido no final da segunda guerra mundial. Atualmente no Brasil não se fabrica o Pentostam® (21) e o Glucantime®(22) é produzido pela Rhodia (British Pharmacopeia, 1973).

Eficácia clínica- A resposta ao tratamento da leishmaniose, utilizando tanto o Glucantime® como o Pentostam® varia de acordo com a espécie do parasita, assim como a forma clínica da doença. Sabe-se que várias espécies de *Leishmania* responsáveis pela forma cutânea, possuem diferentes níveis de sensibilidade ao antimônio pentavalente. Quando administrados nas doses e duração adequadas, os antimoniais pentavalentes têm se mostrado bem eficazes contra a leishmaniose visceral em vários países do mundo. Eles têm se mostrado eficazes em torno de 70 a 100% em casos de leishmaniose cutânea quando

administrados em doses de 10-30mg Sb/Kg por cerca de 15 dias (Walto *et al.*, 1974).

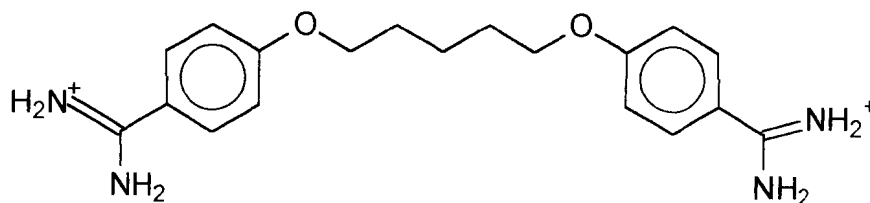
Apesar do Pentostam ainda ser utilizado para o tratamento da leishmaniose, existem diversas desvantagens como a necessidade de se fazer um uso prolongado do mesmo e o custo relativamente alto de produção.

Efeitos colaterais- Alterações cardíacas, disfunções hepáticas e renais, dores de cabeça e outros (Chulay *et al.*, 1985).

⇒ Outras drogas

Apesar dos antimoniais pentavalentes serem as drogas padrão utilizadas no tratamento das leishmanioses, existem controvérsias e questionamentos em relação ao seu uso. Além disso, falhas no tratamento têm sido frequentemente observadas (Bryceson *et al.*, 1985; Oster *et al.*, 1985). Mas recentemente, linhagens de *leishmanias* resistentes têm surgido em proporções alarmantes. Os seguintes agentes têm sido usados como drogas anti-*leishmaniais* de segunda escolha para a leishmaniose cutânea, para os pacientes que não respondem ao tratamento com antimoniais pentavalentes, ou que são intolerantes a estas substâncias.

Pentamidina

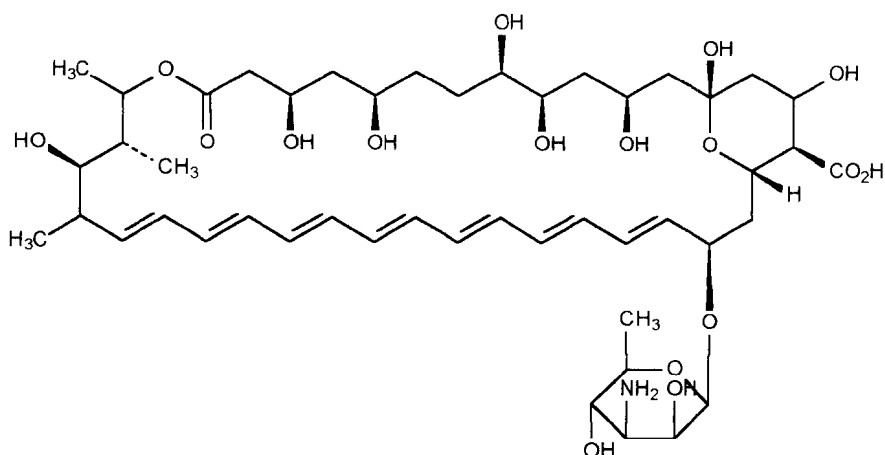


pentamidina (23)

A pentamidina (4,4'-diamidinodifenoxipentano) (**23**) pertence a uma série de diamidinas aromáticas. Foi inicialmente sintetizada na década de trinta, e entre os anos de 1967 e 1984 foi utilizada na quimioterapia de infecções parasitárias. O isotionato de pentamidina, um sal derivado da pentamidina, vem sendo utilizado no tratamento das leishmanioses cutânea e visceral e apesar de sua toxicidade essa droga ainda é a mais útil na clínica, devido a sua estabilidade relativa e também por ser de fácil administração (Bryceson, 1970; Sen Gupta, 1953).

Efeitos colaterais- A eliminação da pentamidina através da urina é muito lenta e tem como efeitos colaterais, o grande acúmulo nos tecidos, diversas reações imediatas como: apnéia, taquicardia, tontura, cefaléia, vômitos, hipoglicemia, diabetes, disfunções hepáticas e renais e dores no local onde a droga foi injetada.

Anfotericina B

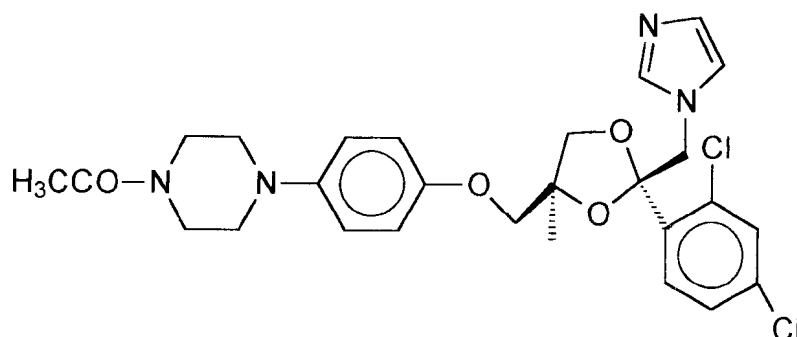


anfotericina B (24)

A anfotericina B(24) é um antibiótico polieno, efetivo contra vários tipos de fungos e *leishmanias*. *In vitro* bem como *in vivo* (em animais e humanos), estudos demonstram a atividade leishmanicida da anfotericina B. É indicada no tratamento da leishmaniose mucocutânea quando os antimoniais pentavalentes não foram efetivos (Bryceson, 1980; Maegrath, 1980; Ganor, 1967).

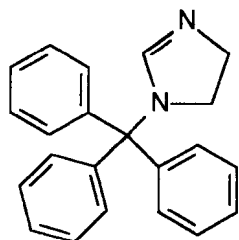
A anfotericina B foi introduzida na clínica em 1955, sendo utilizada no tratamento das leishmanioses mucocutâneas no Brasil, com ação limitada contra algumas espécies de *leishmanias*.

Substâncias imidazólicas

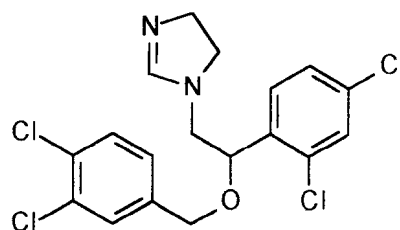


cetoconazol (25)

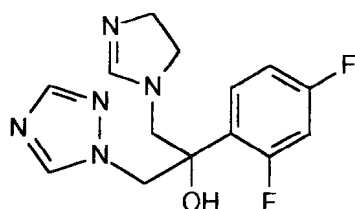
Substâncias imidazólicas antifúngicas, como o cetoconazol (25), clotrimazol (26), miconazol (27), fluconazol (28), e itraconazol (29), são caracterizado por possuir um amplo espectro antimicótico para o tratamento de infecções sistêmicas e superficiais, destes o Cetoconazol vem sendo utilizado na clínica das leishmanioses e tem sido sugerido que o seu mecanismo de ação se baseia na inibição da biossíntese de esteróides, não só nos parasitas como também nos pacientes e pela inibição dos sistemas enzimáticos que dependem do citocromo P 450. Vale a pena ressaltar que os esteróides inibidos no hospedeiro vertebrado por esta droga são diferentes dos esteróides existentes nos parasitas (Weinrauch, *et al.*, 1983; Jollife, 1986).



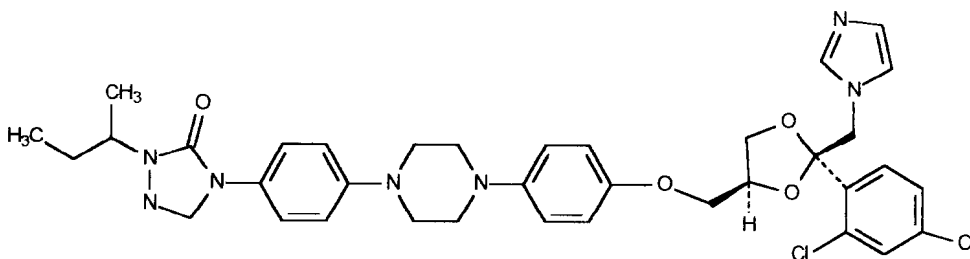
clotrimazol (26)



miconazol (27)



fluconazol (28)



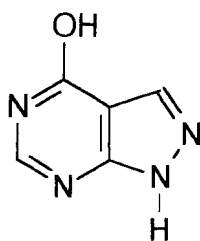
itraconazol (29)

Efeitos colaterais- O cetoconazol (25) apresenta diversos efeitos colaterais tais como: náuseas, vômitos, anorexia dose-dependente que ocorre em cerca de 20% dos pacientes tratados com 400mg diárias. A hepatite sintomática induzida pela droga é rara, mas pode ser fatal. Não é indicado para o uso durante a gravidez e durante a amamentação, devido a secreção da droga no leite materno. Apesar de todos os efeitos colaterais, o cetoconazol (25) é um fármaco ainda muito indicado para o tratamento da candidíase.

1.7.2-Tratamento experimental

Não têm sido desenvolvidas novas drogas recentemente, entretanto algumas drogas experimentais estão em processo clínico. São elas:

Alopurinol (30)



allopurinol (30)

Droga em uso para o tratamento de gota. É suposto que funcione como um substrato alternativo para a enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferase (HGPRTase), seguindo assim à incorporação de allopurinol ribosídeo no RNA, que leva à inibição da síntese de proteínas no parasita. Este é também um processo para o tratamento da Doença de Chagas, e a droga é agora largamente usada no tratamento da leishmaniose em cães (Santos, 2000).

Ambisome - Anfotericina B em lipossomos (24)

Corresponde à formulação da anfotericina B em lipossomos (24). Devido à alta capacidade dos macrófagos, da célula hospedeira do parasita (*leishmania*), para fagocitar a droga, é especificamente marcado e ocupado por estas células. Isto pode aumentar a eficácia e reduzir a toxicidade da droga (Bryceson, 1980).

1.8- Definições importantes no contexto do estudo das atividades biológicas

Dose Letal ou DL₅₀

Dose letal, ou DL, é um termo técnico usado para descrever a toxicidade aguda de uma substância. O valor subscrito deste termo, como DL₅₀, é usado para mostrar que 50% dos animais expostos a uma quantidade específica da substância morrem como resultado. Muitos animais têm sido sacrificados para alcançar estes valores, embora a informação mais importante para a toxicidade humana vem do intencional ou acidental envenenamento humano. Valores de DL₅₀ para humanos não são conhecidos para a maioria das substâncias. Assim valores de DL₅₀ baseados em experimento animal são usados para estimar a dose letal de substâncias para humanos. Estimativa é a palavra chave aqui, já que muitos fatores podem aumentar ou diminuir a toxicidade de uma substância (Kingsbury, 1979).

O valor de DL_{50} pode ser expresso em miligramas (mg) de substância por quilograma (Kg) de peso corpóreo do animal assim mg / Kg. O peso do indivíduo (em Kg) é multiplicado pelo valor do DL_{50} para obter a quantidade da droga (em mg).

Quanto maior o valor do DL, menor a toxicidade. Por exemplo, a dose oral de óleo de eucalipto (baseadas nas doses dadas a ratos) é de 44,40 mg, e para um adulto é de 310,80 mg. É claro que estes valores podem ser interpretados para várias substâncias de maneira racional (Blumenthal, 1991).

Toxicidade aguda e crônica

Aguda- refere-se à habilidade da substância em causar um dano sistêmico como resultado da exposição de uma só vez a quantidades relativamente grandes da substância. São notificados efeitos bastante rápidos após exposição à substância.

Crônica- refere-se a habilidade da substância em causar dano similar ou diferente como resultado da exposição repetida a pequenas quantidades da substância. Estes efeitos podem não ser evidentes em dias ou até meses depois.

Substâncias podem ser tóxicas de forma aguda ou crônica, ou de ambas as formas. Por exemplo, o mercúrio na sua forma metálica não é tóxico de forma aguda. Uma criança pode morder e abrir o bulbo de um termômetro, engolir alguma quantidade de mercúrio e não sofrer efeitos nocivos. Porém, a inalação de

pequenas quantidades de mercúrio por muitos anos provoca efeitos neurotóxicos nocivos. O elemento mercúrio possui toxicidade crônica e não aguda (Liener, 1969).

Indicadores de resposta tóxica

A morte, é claro, é a mais visível resposta a uma intoxicação. Sintomas de envenenamento podem ser citados como: aumento ou diminuição da temperatura, diminuição ou valor imprevisível da pulsação, variação da velocidade respiratória, variação da pressão arterial do sangue, náuseas e vômitos, alucinações, câimbras musculares, convulsões, coma e paralisia.

Marcadores de resposta tóxica são evidentes pela presença nos tecidos ou fluidos, de metabólitos ou substâncias tóxicas.

Existe uma ampla série de marcadores de efeito, como os lançados pelas enzimas no sangue por tecidos danificados, indução da síntese de enzimas ou “stress” de proteínas, e aumento da produção de metabólitos intermediários. Marcadores indiretos incluem mudanças no sistema imune ou no ciclo reprodutivo do organismo. Entretanto, muitas respostas a toxinas são difíceis de serem detectadas.

No entanto a medicina moderna pode medir o dano celular, isto é geralmente reconhecido somente após evidências clínicas de que sérios danos tenham realmente ocorrido (Ottoboni, 1991).

O caminho das drogas: absorção, distribuição, metabolismo e excreção.

Locais de absorção

Existem muitos caminhos para se introduzir uma substância num organismo vivo. Os pulmões são muito sensíveis a intoxicações através de inalação. Apesar da maior parte das intoxicações não ocorrerem por inalação, entretanto, reações alérgicas ocorrem por este caminho.

A pele é uma boa proteção contra a absorção de substâncias tóxicas, mas se a substância é corrosiva ela pode avançar até a camada protetora da pele (Pusztai, 1991).

Composição celular

Membranas celulares diferem em todos os tecidos no organismo, mas elas são todas compostas principalmente de fosfolipídios e proteínas. As células não permitem a entrada de todas as substâncias dentro delas. As membranas celulares possuem permeabilidade seletiva. Isto é, elas podem permitir a passagem de substâncias suficientemente pequenas, ou suficientemente solúveis. Os processos que as membranas celulares usam e que permitem a passagem de substâncias estranhas através delas são:

- filtração através de poros;
- difusão passiva através da membrana fosfolipídica;
- transporte ativo;
- difusão facilitada;
- fagocitose.

Estes são alguns processos usados pelas células para absorver e excretar substâncias endógenas bem como sódio, neurotransmissores e hormônios.

A solubilidade das substâncias é extremamente importante. Substâncias insolúveis podem passar inofensivamente pelo corpo porque elas não podem reagir ou ligar-se com muitas outras moléculas ou tecidos. Substâncias solúveis são normalmente muito polares e podem ser reativas. Estas reações podem resultar numa substância menos tóxica ou numa substância inalterada.

Como as membranas celulares são formadas por lipídios, isto significa que substâncias solúveis em lipídios podem atravessar mais facilmente a membrana. As membranas celulares podem também permitir a passagem de substâncias que sejam muito similares às endógenas. Se a substância tem a polaridade correta pode atravessar a membrana celular.

Algumas substâncias tóxicas são lipofílicas (solúveis em lipídios). Existe, entre a maioria das toxinas, dificuldade de serem excretadas do corpo porque elas possuem uma afinidade pela camada lipídica das membranas celulares e são facilmente reabsorvidas pela célula por difusão passiva.

A molécula do DDT, por exemplo, permanece no nosso organismo por anos, porque elas são muito lipossolúveis e difíceis de serem excretadas pelo organismo (Timbrell, 1995).

Receptores

Receptores são áreas na superfície celular onde várias substâncias podem se ligar. Muitas substâncias se encaixam exatamente como chave na fechadura. Hormônios, como o estrogênio, ligam-se aos receptores de estrogênio. Pesticidas também são ábeis a se ligarem aos receptores de estrogênio. Xenobióticos e substâncias endógenas podem levar sinais semelhantes as células, uma vez que se ligam aos receptores (Hobbs, 1990).

Como as toxinas causam danos ?

As toxinas podem interferir com processos básicos do organismo. Elas podem alterar funções importantes como a respiração, digestão e excreção. As toxinas podem destruir enzimas ou alterar seu funcionamento com a produção de resultados prejudiciais.

Substâncias químicas xenobióticas podem competir por ligações em um mesmo receptor. A toxina do cogumelo Amanita (*Amanita verna*) pode ligar-se a receptores específicos nas células do fígado e destruí-las. Silimarin, um complexo flavonolignana em leite de cardo (*Silybum marianum*), protege o fígado por meio

de ligação deste complexo com sítios receptores, deste modo tornando os sítios não disponíveis a toxina de Amanita, que é eventualmente excretada.

Substâncias altamente reativas podem reagir e danificar as membranas celulares, o suficiente para permitir uma rápida perda de conteúdo celular e afluxo de íons externos e substâncias estranhas ao meio celular. Algumas substâncias tóxicas interferem diretamente com funções celulares vitais como a respiração, que pode levar a morte celular, e algumas destas reações tóxicas podem ocorrer lentamente. Entretanto, outras respostas tóxicas podem causar a mudança na pressão arterial por alterações nos β -adrenoceptores ou causando dilatação ou constrição vascular. A pressão de um gota de sangue pode ser suficiente para iniciar outra resposta como o dano isquêmico aos tecidos devido ao fluxo insuficiente de sangue (Haley, 1987).

Excreção

A mais importante rota de eliminação de substâncias é através dos rins, embora o fígado também remova muitas toxinas. Outras rotas são através dos pulmões, trato gastrointestinal, leite, suor, outros fluidos excretórios e secreção na bile. Como a bile é reabsorvida e reciclada pelo organismo, as toxinas que seguem esse caminho podem retornar ao organismo. A toxicidade de algumas substâncias é cumulativa e feita por esse caminho metabólico. Entretanto outras substâncias, como as encontradas nas ervas cardioativas (*Convallaria*), são

diferentemente metabolizadas e são rapidamente excretadas, tendo assim baixa toxicidade (Manahan, 1989).

Metabolismo

Substâncias tóxicas podem passar por vários processos metabólicos. O corpo desenvolve vários esforços para eliminar substâncias estranhas. O metabolismo de substâncias estranhas geralmente é feito pelo fígado, mas estas podem também passar pelos rins, intestino delgado ou pulmões. Toxinas podem ser facilmente eliminadas ou serem convertidas a substâncias mais tóxicas. Eles podem ser armazenados nas gorduras ou tecido ósseo, podem ligar-se a enzimas ou tecidos, ou entrar nas células e causar danos ou alterações em algum caminho metabólico.

Muitos fatores estão envolvidos no processo pelo qual o organismo trata esses produtos tóxicos (Low dog, 1993).

Sistemas enzimáticos

Enzimas são proteínas produzidas pelo corpo para facilitar o metabolismo de substâncias endógenas e exógenas. As enzimas catalisam processos metabólicos essenciais como a respiração, síntese de ATP ou síntese de lipídios. Muitos desses sítios enzimáticos estão nas camadas lipídicas da membrana celular e desempenham um papel importante na comunicação intercelular.

As enzimas são produzidas em resposta a substâncias que são ingeridas pelo organismo. Elas podem produzir a quebra destas substâncias para torná-las menos nocivas ou para transformá-las de maneira que possam ser excretadas mais facilmente.

As enzimas podem também ser inibidas por substâncias xenobióticas. Algumas drogas sintéticas têm sido designadas como inibidoras ou invasoras das enzimas no tratamento da depressão. Drogas classificadas como inibidoras das monoamina oxidases são usadas para bloquear o metabolismo da serotonina a assim aumentar a concentração deste neurotransmissor.

A ligação das enzimas a produtos tóxicos pode impedir o seu funcionamento, o que é evidenciado algumas vezes pelos sintomas de envenenamento. Estas ligações podem ser reversíveis ou não. Se o receptor se liga a uma substância tóxica, não pode desempenhar suas funções biológicas, o que pode levar a resposta tóxica.

A ligação irreversível de um receptor a uma substância química é chamada de lesão química. Isto pode levar algumas vezes a inibição da enzima. Metais pesados como chumbo inibem enzimas. Ligações irreversíveis de cianetos com ferrocitocromo oxidase, em metaloenzimas contendo ferro são cruciais para processos em que o corpo utiliza oxigênio molecular, na respiração celular, por exemplo.

A maior parte dos sistemas enzimáticos de desintoxicação são comuns em todos os organismos, entretanto a quantidade relativa e a capacidade dos caminhos enzimáticos, e o tempo necessário para a degradação de substâncias em particular, pode variar consideravelmente de espécie para espécie.

Algumas enzimas importantes que metabolizam substâncias estranhas são: glutathione transferase, superóxido dismutase, oxidases de função mista, aldeído redutases e monoamina oxidases. Estes sistemas enzimáticos estão concentrados no retículo endoplasmático liso das células do fígado e rins.

Estas enzimas agem nas substâncias tóxicas através de processos bioquímicos específicos. Alguns desses processos são: oxidação, hidroxilação, hidrólise, desalquilação, desalogenação, epoxidação, redução, conjugação, metilação e acetilação (Manahan, 1989). Substâncias tóxicas podem ser metabolizadas por uma série de diferentes enzimas simultaneamente num mesmo organismo e também por várias rotas metabólicas e diferentes metabólitos. Uma revisão de alguns processos bioquímicos são dados para melhor entendimento de como eles operam o metabolismo de substâncias tóxicas e outras substâncias estranhas (Miller, 1987).

Conjugação

Reações de conjugação são importantes mecanismos de desintoxicação. O processo de conjugação, liga moléculas endógenas com as substâncias estranhas para torná-las mais solúveis em água, e assim facilitar a excreção. Entretanto, algumas vezes a conjugação pode produzir produtos que são altamente reativos e perigosos, como os radicais livres. Eles podem atacar as células e danificá-las também. Muitos agentes causadores do câncer são ativados através da conjugação.

Outras enzimas como a superóxido dismutase podem desintoxicar e neutralizar radicais livres. Uma dieta rica em antioxidantes como a vitamina C e E, β -carotenos e flavonóides também desempenham papel de proteção, eliminando radicais livres e outras toxinas (Crawley, 1983).

Glucuronidação

A principal proposta para este processo é a desintoxicação de substâncias nocivas, especialmente lipofílicas ou solúveis em gorduras. Glucuronosil transferase, é a enzima microsossomal responsável pela quebra das moléculas lipofílicas.

A conjugação da glucose a forma glicosídica é o processo de glucuronidação de alguns insetos (Crawley, 1983).

Conjugação da glutathione

Este processo envolve a remoção de intermediários reativos. Glutathione é um tripeptídeo produzido especialmente no fígado. Ele tem o maior papel protetor do organismo e faz a limpeza das substâncias reativas. Pela combinação com eles, é reduzida a toxicidade dessas substâncias (Crawley, 1983).

Oxidação

O único sistema enzimático responsável por esta reação é o citocromo P450 monooxigenase que é produzido no retículo endoplasmático liso das células. O fígado possui altas concentrações destas enzimas, embora elas sejam produzidas em muitos outros tecidos. A proteína citocromo P450 torna as substâncias tóxicas mais reativas ou sensíveis. Certas reações de oxidação são catalisadas por outras enzimas como a álcool desidrogenase, xantina oxidase, amina oxidase microssomal, monoamina e diamina oxidases. As peroxidases também são um importante grupo de enzimas que catalisam reações de oxidação de substâncias estranhas. Os processos enzimáticos de oxidação, redução e hidrólise rearranjam ou mudam a lipossolubilidade de modo que eles possam ser mais facilmente excretados (Crawley, 1983).

Acetilação

Esta é uma reação metabólica incomum, em que o produto obtido pode ser menos solúvel em água do que o produto de partida, e portanto mais tóxico. As enzimas envolvidas são as acetil transferases, que são produzidas no citossol de células no fígado, mucosa gástrica e glóbulos brancos do sangue. Estas enzimas utilizam acetil coenzima A como cofator (Crawley, 1983)..

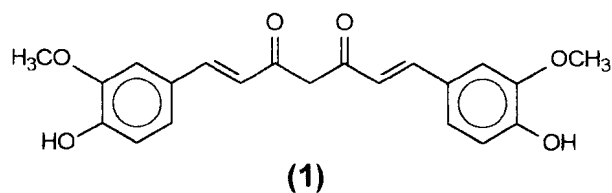
Metilação

As metiltransferases cuidam de reduzir, até certo ponto, o aumento da solubilidade em água, o que pode criar substâncias mais perigosas.

A quantidade de proteínas de transporte presentes no plasma pode afetar muito o metabolismo de substâncias endógenas e exógenas. A ligação de substâncias estranhas com proteínas do sangue pode alterar sua distribuição e excreção e assim a sua atividade (Crawley, 1983).

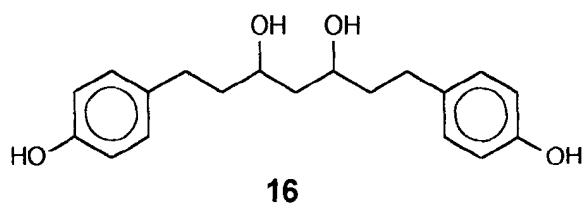
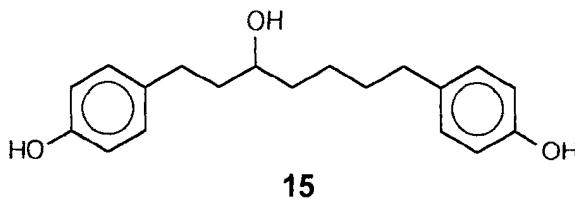
OBJETIVOS

A leishmaniose e a tripanosomose, em suas formas metamórficas são importantes causas de mortalidade em países tropicais e podem ser especialmente difíceis de evitar ou curar; as drogas existentes são demasiado tóxicas. São necessárias mais pesquisas para compreendermos o mecanismo de ação das drogas mais antigas atualmente em uso, assim como para identificar novos alvos bioquímicos nos parasitas, que possam ser explorados com vantagens quimioterápicas. O tratamento com antimoniais pentavalentes ou drogas de segunda escolha, mesmo quando eficazes, causam níveis inaceitáveis de toxicidade nas doses terapêuticas.



A curcumina**(1)** e seus derivados se apresentam como uma alternativa para o desenvolvimento de uma série de testes, contra as formas promastigotas de *leishmania*, com o objetivo de identificar novos quimioterápicos menos tóxicos aos seres humanos. Tendo em vista o resultado apresentado nos testes de atividade anti-*leishmania* pelos diarileptanóides centrolobol **(15)** e hidroxicentrolobol**(16)**

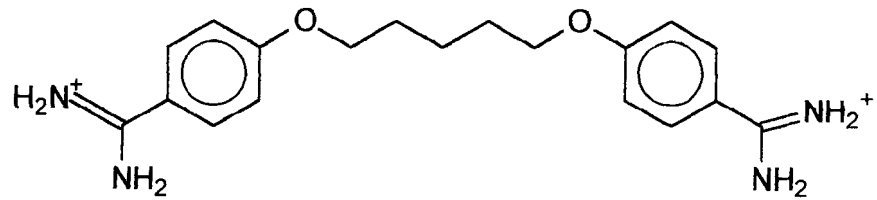
isolados de *centrolobium sclerophyllum*, que possuem estrutura similar à da curcumina (1).



Apesar de um grande número de produtos naturais terem sido testados contra as leishmanioses, decidimos estudar a potencial atividade de substâncias da classe dos curcuminóides, que não haviam sido estudados contra tripanossomatídeos. Neste trabalho usamos como modelo de estudo uma cepa de *Leishmania amazonensis*, pelo fato desta espécie estar associada à todas as formas clínicas da doença, desde as formas menos graves até as formas cutâneo-difusa e visceral.

Neste trabalho, foram estudados a curcumina, que pertence à classe dos curcuminóides, derivados curcuminóides sintéticos e derivados obtidos através de modificações estruturais na molécula original, com o objetivo de se observar variações na atividade antiparasitária dessas moléculas, contra formas

promastigotas de *Leishmania amazonensis*, em comparação com a droga pentamidina (23).



Pentamidina (23)

CAPÍTULO 2- MATERIAIS E MÉTODOS

2.1- ESPECIFICAÇÕES DE MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- Os pontos de fusão (p.f.) foram determinados utilizando-se um aparelho Kofler (Reichert) e não foram corrigidos.
- Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV), foram registrados em um espectrofotômetro Perkin Elmer modelo 1420. As amostras foram analisadas sob a forma de pastilha (KBr) ou como filme líquido sobre placas de cloreto de sódio (NaCl).
- Os espectros de RMN foram registrados em um espectrômetro Bruker AC-200, operando a 200 MHz para hidrogênio (RMN¹H) e 50,3 MHz para carbono-13 (RMN ¹³C), com pulsos de frequência e transformada de Fourier (FT). Utilizou-se tetrametilsilano (TMS) como referência interno. Os valores de deslocamentos químicos (δ) foram medidos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). O número de hidrogênios foi deduzido da integração relativa aos sinais. As multiplicidades dos sinais foram descritas como: s (singlete); sl (singlete largo); d (dubleto); dl (dubleto largo); t (triplete); m (multiplete); dd (duplo dubleto).
- As hidrogenações catalíticas foram realizadas em hidrogenador de Paar, à pressão de 50 psi.

- Nos métodos cromatográficos foram utilizadas cromatofolhas de alumínio recobertas com sílica-gel 60 F₂₅₄ para cromatografia em camada fina, com 0,2 mm de espessura da camada. Também foram utilizadas placas de vidro, preparadas com sílica-gel Merck 60 H (Art. 7736). As purificações e isolamentos por cromatografia de adsorção em coluna foram realizadas com sílica-gel com tamanho de partícula 0.063-0.20mm (Vetec). A visualização das substâncias nas placas de cromatografia de camada fina (C.C.F.) foi realizada sob lâmpada de luz ultravioleta ou sob exposição a vapores de iodo. As misturas eluentes, usadas nas separações cromatográficas, foram preparadas volume a volume (v/v) e foram expressas em porcentagem (%). Na cromatografia de camada delgada preparativa (CCDP) as placas foram preparadas com sílica tipo PF 254 (Merck) com espessura de camada de 1mm.

- As evaporações dos solventes foram realizadas em evaporador rotatório (à pressão reduzida) controlando-se a temperatura do banho de água.

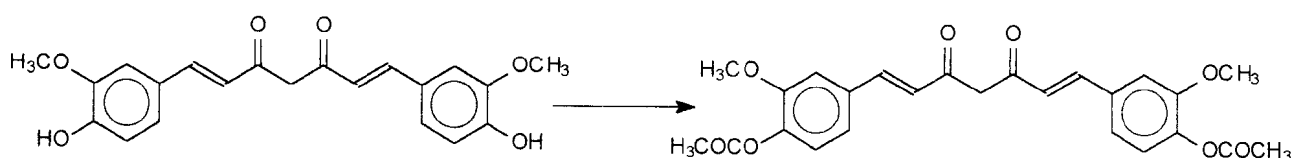
- A curcumina utilizada foi extraída de *Curcuma longa*. (Govindarajan, 1980)

- Os solventes e reagentes secos foram obtidos pelos tratamentos usuais. Os reagentes, quando necessário, foram purificados pelos métodos apropriados.

- Os solventes utilizados para reações, extrações e colunas cromatográficas possuíam grau analítico das seguintes marcas: Merck, Grupo Química, Riedel de -Haën e Vetec.

2.2- MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS

2.2.1- Reação de acetilação



Esquema 5: Acetilação da curcumina

Foram colocados em balão de fundo redondo de 25 mL de capacidade, 0,5 mL de anidrido acético, 0,5 mL de piridina, 60 mg (1,63 mmol) de curcumina e quantidade catalítica de DMAP (dimetilaminopiridina) (esquema 5).

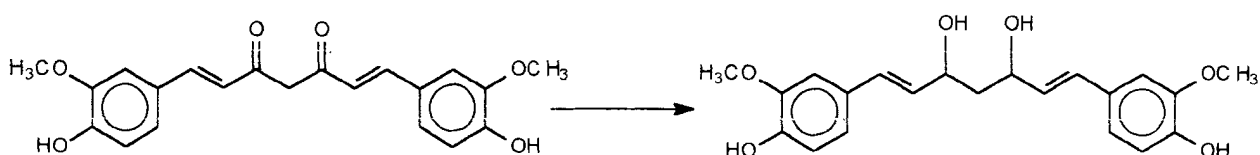
A solução foi deixada reagindo durante 12 h, à temperatura ambiente e sob agitação. A mistura reacional foi vertida em 50 mL de uma solução 2N de ácido clorídrico à baixa temperatura, e então extraída com 20 mL de diclorometano por 3 vezes. A fase orgânica foi lavada com água destilada, seca com cloreto de cálcio anidro e evaporada até secura em evaporador rotatório. O produto obtido foi purificado através de cromatografia em coluna de sílica-gel, utilizando como

eluente *n*-hexano e acetona (2:1), fornecendo como produto um sólido amarelo de ponto de fusão 128° C, com rendimento de 34% (25,04 mg).

2.2.2- Reações de redução

a) Redução das carbonilas

a-1) Redução da substância 29

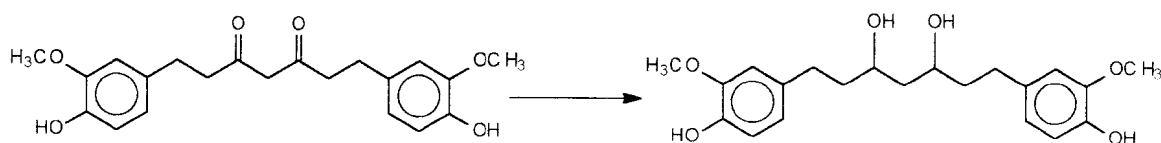


Esquema 6: reação de redução da substância 29

Em balão de fundo redondo de 75mL de capacidade, foram colocados 140 mg (0,38mmol) de curcumina em 50 mL de dioxano/ água (4:1). Foram adicionados 500 mg (1,34mmol) de boro hidreto de sódio previamente solubilizados em 25 mL de dioxano. A mistura reacional foi deixada reagindo por 12h, sendo então acidificada com uma solução 1 N de ácido clorídrico. A solução foi evaporada em evaporador rotatório até à secura. Após adição de 10 mL de água destilada, o produto foi então extraído com 10 mL de clorofórmio por 3 vezes, as fases orgânicas reunidas sobre 20 g de sulfato de sódio anidro, e em

seguida o solvente foi evaporado. O produto foi purificado em coluna de sílica-gel, utilizando como eluente diclorometano e metanol (97:3). Um óleo amarelo foi obtido com rendimento de 73,7% (105,5 mg) (esquema 6).

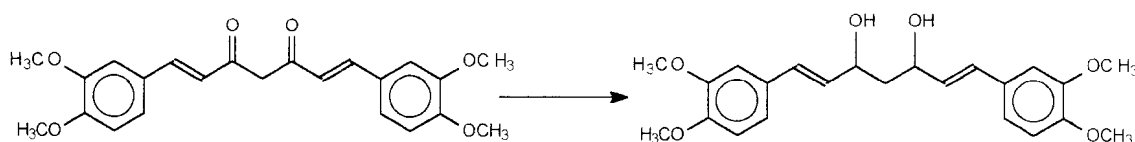
a-2) Redução da substância 13



Esquema 7: Reação de redução da substância 13

A solução de 70 mg (0,19mmol) de curcumina reduzida em 25 mL de dioxano / água (4:1) em balão de fundo redondo de 25 mL de capacidade, foi tratada como na reação a. Um óleo amarelo foi obtido com rendimento de 65% (46,4 mg).

a-3) Redução da substância 8

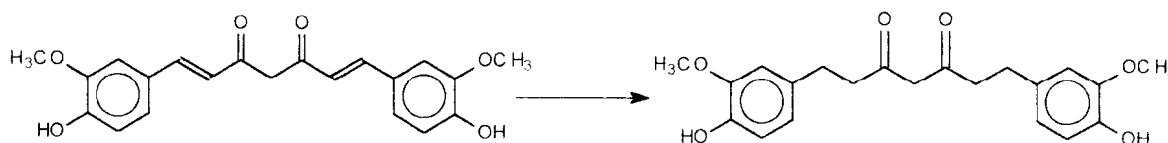


Esquema 8: Reação de redução da da substância 8

500 mg (1,34 mmol) de NaBH_4 (25 ml de dioxano) e 140 mg (0,38 mmol) de curcumina metilada (50ml de dioxano/água 4:1) foram misturados em balão de fundo redondo de 100mL de capacidadee recebeu tratamento descrito anteriormente. Um óleo amarelo foi obtido com rendimento de 57% (80,1 mg).

b) Redução das ligações duplas

b-1) Redução da curcumina com amálgama de sódio



Esquema 9: Reação de redução da curcumina

0,15 g (3,5 mmol) de NaOH em pastilhas, foram dissolvidos em 4,5 mL de água destilada em balão de fundo redondo de 25 mL de capacidade. Nesta solução foram adicionados 1,28 g (3,49 mmol) de curcumina. Amálgama de sódio (11g) foi adicionada lentamente à solução, sob agitação magnética, finda a adição, a solução foi aquecida à 70°C por 15 minutos, em banho de silicone. A solução foi vertida para um funil de decantação de 50 mL, para a separação do mercúrio, e acidificada com HCl 5N, o produto foi extraído com 20 mL de CH_2Cl_2 , por 3 vezes, sendo obtidos 786 mg (60,5%) do produto reduzido, na forma de um óleo

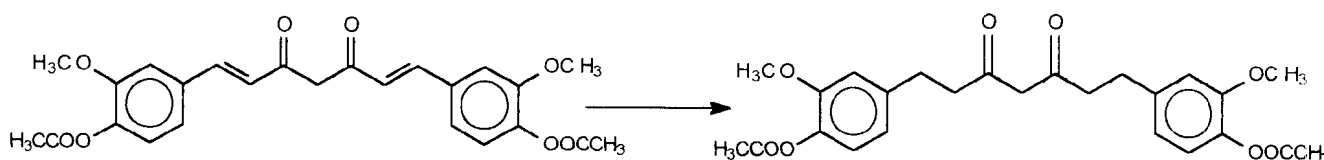
amarelo, após purificação por cromatografia em coluna de sílica-gel, utilizando como eluente CH_2Cl_2 .

A reação de redução das ligações duplas foi realizada pelo método descrito na literatura (Roughley & Whiting, 1973) e pelo método da amálgama de sódio, descrito a seguir.

□ ***Preparação da amálgama de sódio*** (Vogel, 1985)

22,8 g de sódio limpo em 20mL de tolueno seco são colocados em balão de duas bocas, de fundo redondo de 300mL de capacidade, equipado com funil de separação contendo o 750g de mercúrio. Desloca-se o ar com nitrogênio. Adiciona-se cerca de 5mL de mercúrio e aquece-se o balão suavemente até o começo da reação. Mantém-se a reação pela adição lenta de mercúrio. Quando a metade do mercúrio tiver sido introduzida, a amálgama começará a se solidificar; devendo ser mantido fundido por aquecimento, com agitação ocasional. Concluída a adição do mercúrio, o amálgama quente fundido é colocado em cadinho de porcelana, reduzido a pó em um gral e guardado vedado em dessecador.

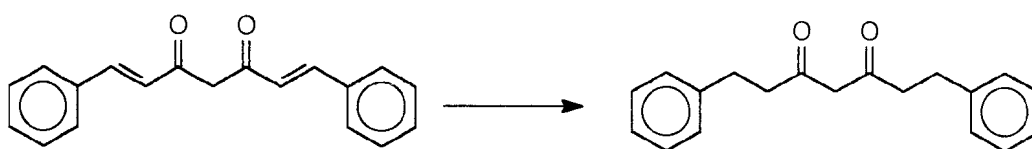
b-2) Hidrogenação catalítica da curcumina acetilada



Esquema 10: Reação de hidrogenação das ligações duplas da curcumina acetilada

500mg (1,36 mmol) de curcumina acilada, 50mg de Pd/C e 10mL de clorofórmio, foram agitados vigorosamente em hidrogenador de Paar à pressão de 50 psi. O produto, após filtração, foi evaporado sob pressão reduzida e teve como rendimento 78% (391 mg).

b-3) Hidrogenação catalítica da substância 17

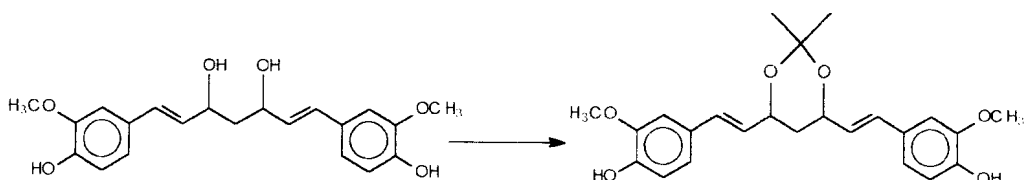


Esquema 11: Reação de hidrogenação das ligações duplas da substância 17

100 mg (0,35 mmol) do produto de partida, 10 mg de Pd/C e 50 mL de clorofórmio, foram agitados vigorosamente em hidrogenador de Paar, à pressão de 50 psi, para obter o produto com 51,4% (52 mg) de rendimento.

2.2.3- Reação de formação de cetais

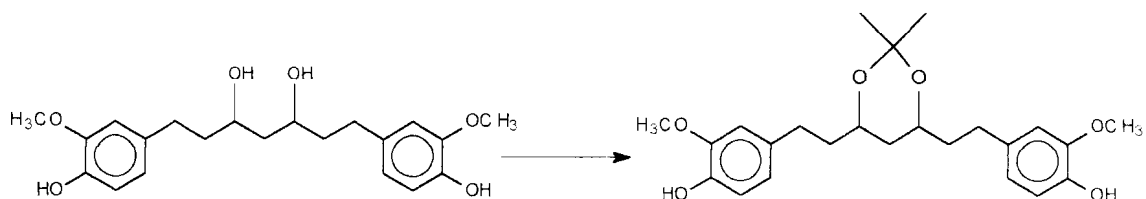
a-1) Preparação do acetonídeo a partir da substância 3



Esquema 12: Preparação do acetonídeo a partir da substância 3

Em balão de fundo redondo de 50mL de capacidade, foram colocados 120 mg (0,32mmol) do diol, 20 mg de ácido *p*-toluenossulfônico e 20 mL de acetona seca. A mistura reacional foi mantida em refluxo por 1 hora. Após resfriamento da solução, tratou-se com carbonato de sódio (3%) e extraiu-se com clorofórmio (3 vezes 20 mL). A solução clorofórmica foi seca com sulfato de sódio anidro (20 g) e destilada, obtendo-se o acetonídeo, com rendimento de 59,3% (80mg).

a-2) Preparação do acetonídeo a partir da substância 5



Esquema 13: Preparação do acetonídeo a partir da substância 5

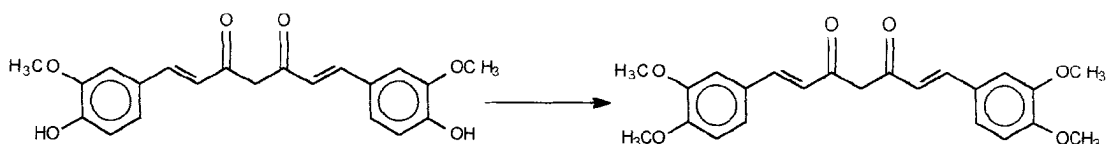
□ **Método 1:**

A solução de 0,2g do diol (0,53mmol) e N,N-dimetilformamida (4mL) em balão de fundo redondo de 10mL de capacidade foi agitada magneticamente a 0°C. O 2,2-dimetóxiopropano (0,16mL) foi adicionado seguido por quantidade catalítica de ácido *p*-toluenossulfônico (TsOH) e a mistura reacional foi agitada por 1 hora e filtrada. O filtrado foi evaporado e forneceu 70.9 mg do produto, com rendimento de 32%.

□ **Método 2:**

Em balão de fundo redondo de 50 mL de capacidade, foi colocado o diol 0,2g (0,53 mmol), 20 mg de ácido *p*-toluenossulfônico (TsOH) e a acetona seca (20mL). A mistura reacional foi mantida em refluxo por 1 hora. Após resfriamento, tratou-se com solução de carbonato de sódio (3%) e extraiu-se com clorofórmio. A solução clorofórmica foi seca com Na₂SO₄ anidro e evaporada à vácuo obtendo-se 124,0 mg do acetoneo (56%), na forma de um óleo de aroma agradável.

2.2.4- Reação de metilação



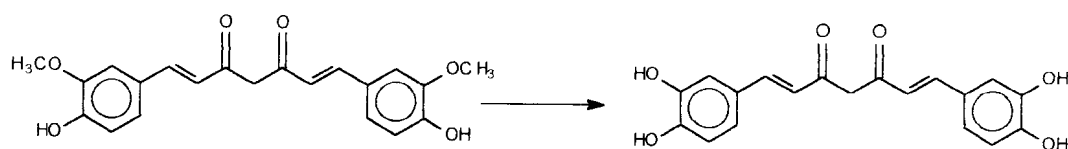
Esquema 14: Reação de metilação da curcumina

Em balão de fundo redondo de 10 mL de capacidade, 0,20g (4,6 mmol) de NaOH em pastilhas, foi dissolvido 0,84mL de água e resfriado a 10^oC, a seguir foi adicionada a 1g (2,72 mmol) de curcumina sob agitação. 0,70mL de (CH₃)₂SO₄ (0,5 mmol) foi adicionado à esta solução, gota a gota durante 1 hora, sob agitação vigorosa.

A solução foi resfriada e transferida para um funil de separação de 75 mL de capacidade, a camada inferior foi removida e lavada uma vez com água (20 mL), duas vezes com ácido sulfúrico (20mL) diluído, até que as lavagens se apresentaram neutras ao papel de tornassol. A solução foi seca em sulfato de sódio anidro e destilada à vácuo.

O produto foi purificado por cromatografia de coluna em sílica-gel utilizando como eluentes clorofórmio e metanol (95:5) com rendimento de 77,2% (910mg).

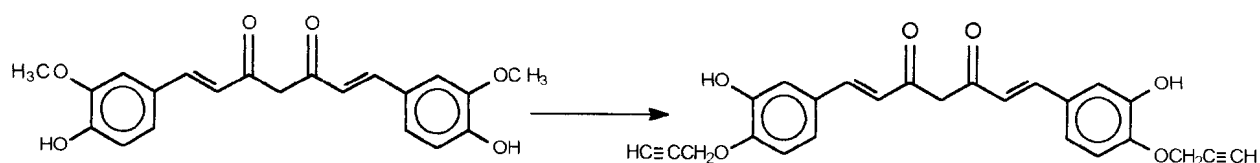
2.2.5- Reação de desmetilação



Esquema 15: Reação de desmetilação da curcumina

A mistura reacional de 200 mg (0,54 mmol) de curcumina, 1,5 moles de AlCl_3 e 70 mL de benzeno foi colocada sob refluxo em balão de fundo redondo de 100 mL de capacidade por 20 minutos, e deixada em repouso à temperatura ambiente por 24 horas, foi então adicionado à 100 mL de HCl 6N, à baixa temperatura, a camada aquosa foi separada e lavada com 3 porções de 20mL de éter etílico. A fase orgânica foi evaporada a secura, sendo obtido 72,6 mg (43%) do produto.

2.2.6- Reação de alquilação da hidroxila fenólica



Esquema 16: Reação de alquilação da hidroxila fenólica

A mistura de 600 mg (1,63 mmol) de curcumina, 15 mL de solução metanólica de metóxido de sódio (30%) e metanol anidro em balão de fundo redondo de 25mL de capacidade, foram adicionados 2 mL de brometo de propargila em banho de gelo e então refluxado por 4 horas. Após remoção do solvente à vácuo em evaporador rotatório, excesso de água foi derramada à mistura e então acidificada com HCl concentrado.

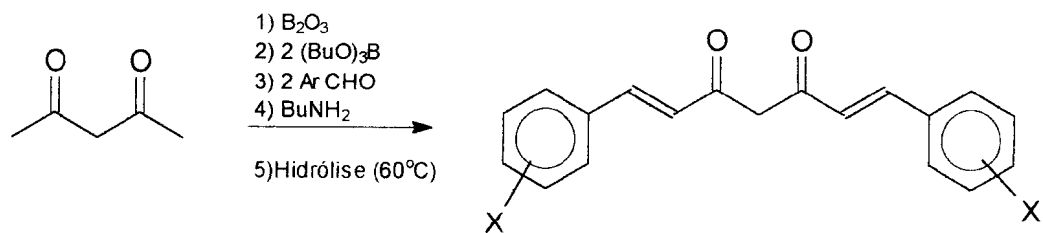
O sólido foi cromatografado em sílica-gel, usando como eluente CHCl_3 .

Rendimento 48% (350mg).

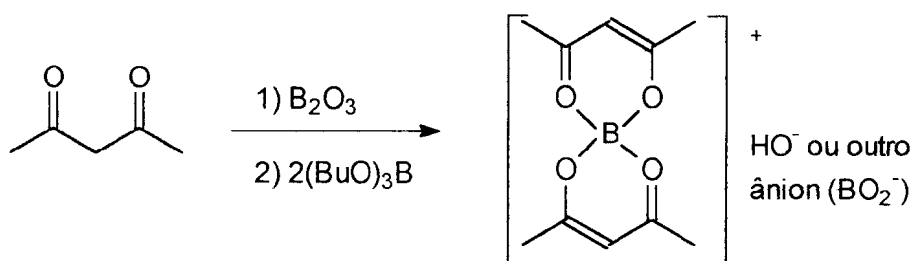
2.3-REAÇÕES DE SÍNTESE DOS CURCUMINÓIDES

2.3.1 a 2.3.13 - Sínteses (Pabon, 1964)

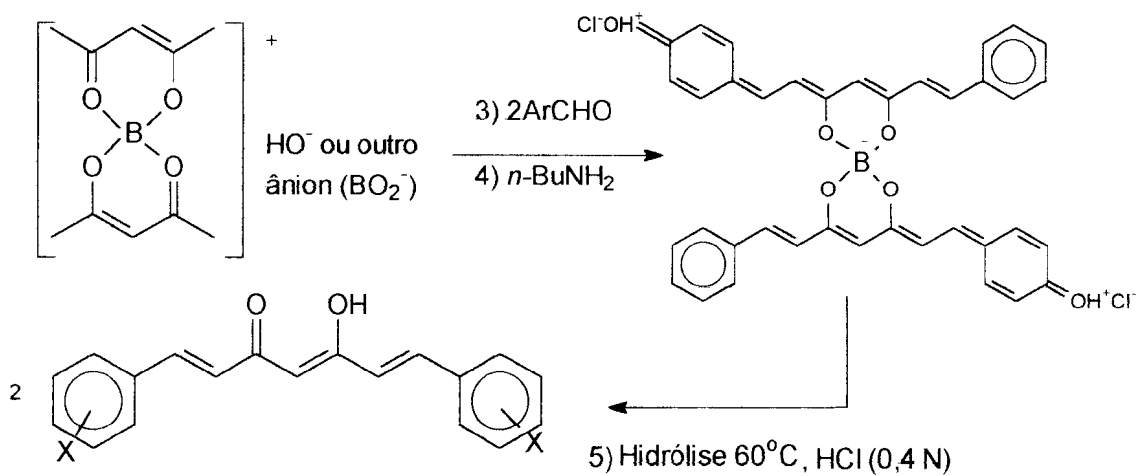
Aldeído aromático (0.02 mmol), tributilborato (0.04 mmol) em 100 mL de acetato de etila seco em balão de 250 mL de capacidade, foram adicionados ao complexo formado por agitação durante 1 hora de 5g de acetil acetona (0,05 mmol) com 2,5g de óxido bórico (0,035 mmol). Foi adicionada então *n*-butilamina (1mL) gota a gota por 40 minutos, que após agitação adicional por 4 horas foi deixada em repouso por 24 horas. Foi então adicionado ácido clorídrico (75 mL) à 60 °C e agitada por 1 hora para ser extraída com acetato de etila. O sólido no extrato foi recuperado por evaporação do solvente, agitado ainda 1 hora com ácido clorídrico diluído, lavado e purificado por extração e cristalização em etanol (tabela 2).



Esquema 17: Esquema geral da síntese dos curcuminóides



Esquema 18: Esquema de formação do complexo de Boro



Esquema 19: Hidrólise ácida do complexo de Boro.

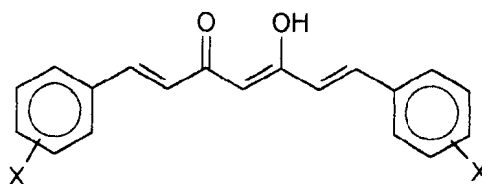


Tabela 2 - Rendimentos das reações de síntese

X	Rendimento / Massa	Reação
H	73% (56mg)	1
2-OH	36% (45mg)	2
3-NO ₂	25% (27mg)	3
2-OH, 4-OCH ₃	80% (56mg)	4
2-OH, 5- OCH ₃	62% (43mg)	5
2-COH	14% (28mg)	6
4-N(CH ₃) ₂	39% (62mg)	7
3,4-Cl	30% (45mg)	8
4- CH ₃	63% (74mg)	9
4-Br	28% (47mg)	10
4-Cl	43% (35mg)	11
3-OH, 4- OCH ₃	37% (56mg)	12
2,4-OH	58% (48mg)	13
2-NO ₂	21% (39mg)	14

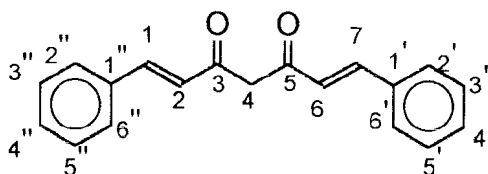
2.4- EXTRAÇÃO DE HIDROXICENTROLOBOL E CENTROLOBOL

A extração do centrolobol e hidróxicentrolobol seguiu o método utilizado por Alegrio *et al.* , 1989.

2.5- CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS

A caracterização dos substâncias foi efetuada através da análise dos dados espectroscópicos de IV, RMN¹H, e RMN¹³C, incluindo a técnica de DEPT, que permitiram identificar C, CH, CH₂ e CH₃ .

2.6.1- Todas as substâncias possuem o esqueleto básico abaixo:



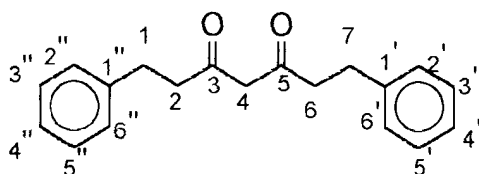
A análise do espectro na região do IV permite verificar os sinais característicos de carbonilas de cetona conjugada em torno de 1630 cm⁻¹ (COCH₂CO), observados nas substâncias 1, 2, 4, 8, 9, 10, 11, 13 e outros sinais compatíveis com anel aromático.

Os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN H¹ e ¹³C de todas as substâncias, estão descritos nas tabelas 3 a 32 (páginas 110 à 139).

Os sinais em torno de δ 7,00 e 7,60 ppm com constante de acoplamento de aproximadamente 16Hz, são relativos aos hidrogênios olefínicos em *trans*. Estes sinais aparecem agrupados com os sinais dos hidrogênios aromáticos, em torno de δ 6,85 e 7,15 ppm, que, dependendo do padrão de substituição podem se apresentar compatíveis com os sistemas AA', BB' ou ABC. O singlete em torno de δ 5,90 ppm (1H), pode ser atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono central do sistema β -dicetônico na sua forma enólica.

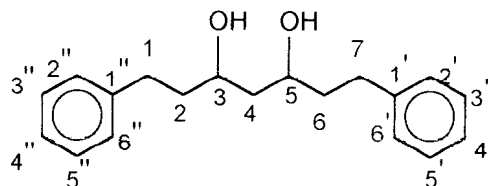
Os espectros de RMN¹³C (espectro 2), mostram sinais característicos para este tipo de esqueleto. O sinal em δ_c 101,00 ppm (CH), corresponde ao deslocamento químico do carbono central do enol do sistema β -dicetônico. O valor em δ_c 182,30 ppm referente ao deslocamento químico do carbono carbonílico. O valor em δ_c 149,60 e 124,10 ppm são atribuídos ao carbono olefínico (α , β) e os sinais em δ_c 111,35 e 141,34 ppm são atribuídos aos carbonos aromáticos.

2.5.2- Substâncias que sofreram redução nas ligações duplas



Para os derivados **4**, **11**, **13** e **18**, foram identificados pela ausência dos sinais relativos as ligações duplas no espectro de RMN¹H. Os sinais referentes aos dois grupos metilênicos vizinhos, são representados pelo multipletto, em torno de δ 2,69 ppm.

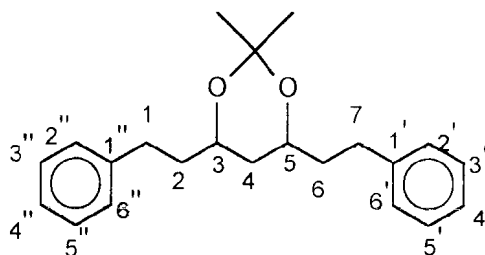
2.5.3- Substâncias reduzidas a dióis



Nos espectros de IV de **3**, **5**, **12**, **14**, **16**, observam-se sinais referentes à grupamento hidroxila em torno de 3400 e 1260 cm^{-1} (OH e C-O) e a ausência dos sinais referentes à carbonilas cetônicas. As substâncias **3**, **6** e **12** apresentam sinais de duplas ligações em $7,00$ e $7,60\text{ ppm}$ e as substâncias **3** e **7** possuem grupos metilênicos que são identificados pelos sinais em $7,20$ e $7,60\text{ ppm}$.

A análise dos espectros de RMN^1H , destes derivados permitiu identificar sinais referentes as hidroxilas e sinais de hidrogênios carbinólicos a $4,30\text{ ppm}$ (*m*). Os espectros de RMN^{13}C (PND e DEPT), revelaram sinais da carbonos metilênicos em $31,6$ (C-1 e 7, efeito gama de proteção do OH), $40,84$ (C-2 e C-6) e metínicos a $\delta_{\text{CH}}=67,4\text{ ppm}$.

2.5.4- Substâncias derivadas dos dióis



Os espectros na região do infravermelho de **6** e **7** revelam a ausência de sinais referentes à grupamento hidroxila em 3400 cm^{-1} (ν_{OH}) e presença de sinais de deformação axial 1260 ($\nu_{\text{C-O}}$).

Os espectros de RMN¹H destas substâncias, possuem sinais referentes aos hidrogênios carbinólicos $\delta_{\text{H}}=2,70\text{ppm}$ em **6** e $\delta_{\text{H}}=3,84\text{ ppm}$ em **7**, e os sinais dos grupos metílicos do acetonídeo. Os espectros de RMN C¹³ destes derivados possuem sinais em $\delta_{\text{C}}=99\text{ ppm}$ e $\delta_{\text{CH}_3}=21,00\text{ ppm}$.

2.6- Ensaios biológicos in vitro com formas promastigotas Leishmania amazonensis

Leishmania amazonensis, estirpe MHOM/ BR/77/LT/LTB0016, foram mantidos em meio *Drosophila* Schneider, a 25°C suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado a quente (40°C durante 30 minutos)). As células foram recentemente coletadas e resuspensas em soro fresco, contadas em câmara de Neubauer e ajustadas a concentração de $4 \times 10^6 / \text{mL}$.

As drogas foram adicionados, assepticamente solubilizadas em DMSO 1,6% (dimetilsulfóxido), à cultura de promastigotas, nas seguintes concentrações ($160\text{ }\mu\text{g/mL}$ à $5\mu\text{g/mL}$) e incubados a 25°C . Após 24 horas de incubação, os parasitas sobreviventes foram contados e comparados ao controle, que continha apenas os parasitas em DMSO. Todos os testes foram realizados em triplicata e

Pentamidina isotionato foi usada como droga de referência, no mesmo valor de concentração usado para as nossas substâncias.

Os dados obtidos foram então sistematizados para o cálculo dos valores de DL_{50} (dose letal para 50% da população), através da determinação da equação da reta que melhor se ajusta aos pontos experimentais, utilizando o cálculo da regressão linear. Foram plotados no gráfico no eixo Y (% de vivos) e no eixo X (log da concentração da dose utilizada da droga).

Os valores de DL_{50} encontrados para os diversos substâncias estão descritos na tabela **33** (página **140**) na discussão deste trabalho.

CAPÍTULO 3 – DISCUSSÃO

3.1- Hipóteses sobre características estruturais responsáveis pelas atividades biológicas nos curcuminóides

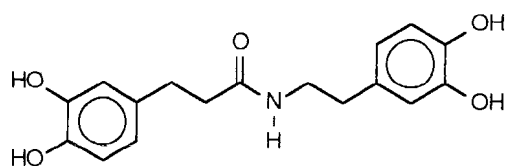
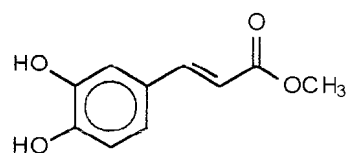
3.1.1- Grupos hidróxi vicinais no anel aromático (Burke *et al.*, 1995)

O principal fator para uma potente inibição da enzima HIV-1 integrase segundo os resultados obtidos por Burke *et al.*, foram os dois grupos hidróxi presentes no anel aromático. Esta conclusão está de acordo com estudos anteriores de SAR em outras classes de inibidores de HIV-1 integrase, incluindo flavonas (Fesen *et al.*, 1994), biscatecois (La Femina *et al.*, 1995), e lignanas. Nas lignanas, substituição de um ou ambos grupos hidróxi adjacentes por grupos metóxi, reduz severamente a atividade, ou torna o substância inativa. Quando é adicionado um terceiro grupo hidróxi adjacente aumenta a potência. Estas descobertas podem ser consistentes com processos de oxidação-redução, que podem indicar que a inibição dessa enzima é irreversível.

Alternativamente, a inibição da enzima integrase, pode envolver uma quelação da enzima com um íon metálico divalente que é considerado ser parte do sítio ativo da enzima (Katz *et al.*, 1990 e Engelman *et al.*, 1993).

Outra possibilidade pode ser a de que a formação de ligações hidrogênio pelas funções hidróxi sejam necessárias para que a molécula se acomode no sítio ativo enzimático. O modelo de grupos hidróxi adjacentes não pode ser aplicado a todos os inibidores da HIV-1 integrase que são conhecidos. De particular interesse

são certos difenóis ativos, como os curcuminóides, em que aparece apenas um grupo hidróxi em cada um dos dois anéis aromáticos separados por uma cadeia (Mazumder et al., 1995). Esta potente inibição pode requerer dois grupos hidróxi no espaço, mas não necessariamente, grupos hidróxi *orto* um em relação ao outro no mesmo anel aromático. Esta possibilidade pode ser pertinente a alta potência dos derivados de amidas, por causa da presença de grupos hidróxi em ambos anéis fenílicos (ácido 3-(3,4- diidróxifenil) propanóico [β- (3,4- diidróxifenil) etil] amida **(31)** . O éster correspondente (metil-3,4- diidróxicinamato), entretanto, somente requer grupos hidróxi em *orto*, no único anel aromático **(32)**, sugerindo que fatores conformacionais sutis podem vir a apresentar grande influência na atividade.

**(31)****(32)**

3.1.2- Substituintes alquil no anel aromático (Sreejayan & Rao, 1993)

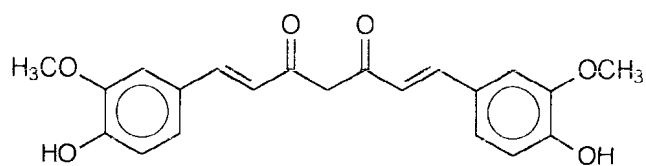
Os resultados de Sreejayan & Rao, 1993, mostraram que os três curcuminóides naturais (curcumina **(1)**, desmetóxicurcumina **(9)** e bis-

desmetóxicurcumina(5)) são potentes inibidores da peroxidação de lipídios em homogenados de cérebro de ratos e em microsossomos de fígado de ratos.

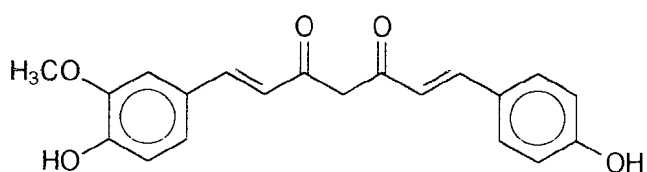
Curcumina tem sido estudada extensivamente devido a suas propriedades antioxidantes. O grupo metóxi e hidróxi no anel fenílico e o sistema 1,3-dicetona são os fatores estruturais que contribuem para sua propriedade antioxidante. Tem sido sugerido que a atividade antioxidante do grupo fenólico aumenta com o grupo metóxi na posição *orto* (Cuvelier et al., 1992). Toda et al., 1988 estudou a ação de curcuminóides em hemólise e peroxidação de lipídios de eritrócitos de ratos, induzidos por peróxido de hidrogênio. Estes autores mostraram que curcumina foi mais ativa que os análogos desmetilados. Entretanto, no presente estudo, foi observado que os três curcuminóides foram quase igualmente ativos. Desta forma, no caso da inibição da peroxidação de lipídios por curcumina, o grupo metóxi pode não ser de maior importância.

Para avaliar a importância do grupo fenólico, foram estudados os derivados acetilados, onde os grupos fenólicos, são bloqueados por um grupo acetil. Acetilcurcumina e curcumina foram igualmente ativos, indicando que o grupo fenólico pode não ser essencial para as propriedades antioxidantes de curcumina.

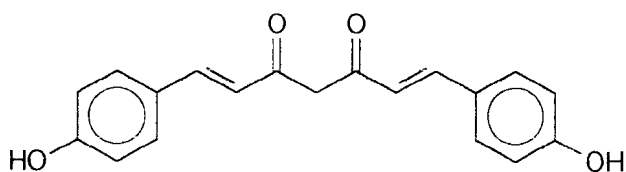
A atividade quase similar mostrada por todos os curcuminóides e acetilcurcumina no presente estudo, sugere que os grupos hidróxi ou metóxi no anel benzênico não são importantes para a inibição da peroxidação de lipídios catalizada por ferro. O sistema 1,3-dicetônico é um potente ligante para metais como o ferro. A partir de estudos espectrais está claro que os curcuminóides são capazes de interagir com Fe^{2+} .



curcumina (1)



Desmetóxicurcumina (9)

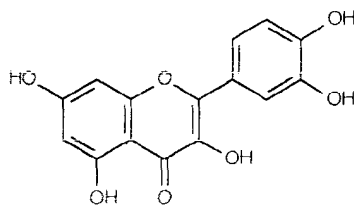


Bis-desmetóxicurcumina (5)

3.1.3- Influência da coplanaridade molecular (Artico et al., 1998)

A análise de estudos de SAR desenvolvidos com curcuminóides e análogos, interpretados através de cristalografia e análise de modelagem molecular, levou a novas descobertas concernentes a determinantes moleculares da atividade inibitória desta classe de substâncias. Todas estas substâncias agem

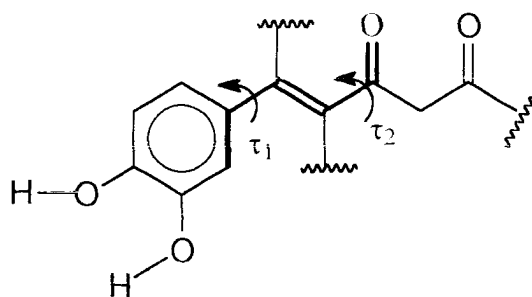
hipoteticamente na conformação com o grupo carbonil orientado em *sin* em relação a dupla ligação vinílica (valores de τ_1 e τ_2 em torno de 0° C na figura **34**).



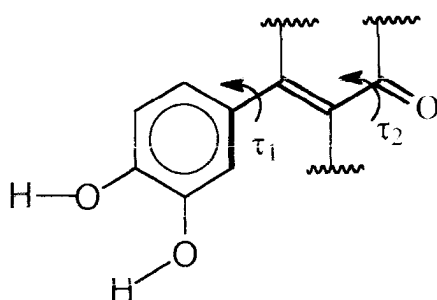
quercetina (33)

Isto implica que o modelo de ligação apresentado por estes inibidores é diferente dos derivados da flavona por exemplo, como a quercetina (**33**), caracterizada por uma disposição *anti* da porção C=C-C=O incorporada ao núcleo piranona (valores de τ_2 em torno de 180° C) (**35**) (Artico et al., 1998). Ao contrário do que foi sugerido por Mazumder et al., 1995, foi proposto que os inibidores bis-monoidroxilados como a curcumina não alcançam a conformação dobrada em que os dois anéis fenílicos estão empilhados um sobre o outro. Como um ou dois grupos hidróxi catecois, ambos são cruciais para a alta potência, pode ser compensada pela presença de outras subestruturas que favorecem a interação com o sítio farmacofórico. A falta de coplanaridade na estrutura do

inibidor pode abolir a atividade, somente se a porção fora do plano é orientada para uma posição estérica propícia ao sítio ligante, ou se o arranjo coplanar é associado a uma excessiva energia de tensão.



Arranjo *sin* de C=C e C=O (34)



Arranjo *anti* de C=C e C=O (35)

3.1.4 – Ação inibitória da curcumina no fator NF- κ B

As propriedades anti-inflamatória, anticarcinogênica e antioxidante da curcumina são bem conhecidas. Entretanto como a curcumina realiza estas funções não está ainda muito claro. Neste trabalho foram investigados os efeitos

da curcumina na ativação do fator NF- κ B (fator de necrose - κ B), porque este fator está envolvido em muitas atividades que são bloqueadas pela curcumina. NF- κ B faz o papel de eixo em células do sistema imune porque é rapidamente ativado por uma ampla variedade de indicadores patogênicos. A intervenção na ativação do fator NF- κ B pode ser benéfica na supressão tóxica, no choque séptico, reações inflamatórias agudas, replicação do HIV, resposta na fase aguda e danos causados por radiação (Singh & Aggarwal, 1995).

Os resultados deste trabalho mostraram que curcumina bloqueia completamente a ativação TNF (fator de necrose tumoral) dependente do NF- κ B. A ativação induzida por vários outros agentes incluindo forbol éster e peróxido de hidrogênio foram também inibidos por curcumina (Singh & Aggarwal, 1995).

Todos os três indutores de NF- κ B usados neste estudo são conhecidos por produzir como intermediário reativo o oxigênio. Entretanto, é possível que o efeito de curcumina esteja relacionado a produção deste intermediário. Tem sido mostrado que curcumina promove a inibição do transporte eletrônico mitocondrial para impedir a ativação de NF- κ B, TNF-induzida. Várias evidências indiretas sugerem um papel para intermediários reativos de oxigênio com um denominador comum e crítico, incluindo evidências de que os níveis celulares de oxigênio reativo aumentam em resposta ao TNF, interleucina-1, lipopolissacarídeos, luz de UV, e irradiação γ . De vários intermediários reativos de oxigênio administrados à células em cultura, apenas peróxido de hidrogênio mostrou ser ativador efetivo de NF- κ B (Singh & Aggarwal, 1995).

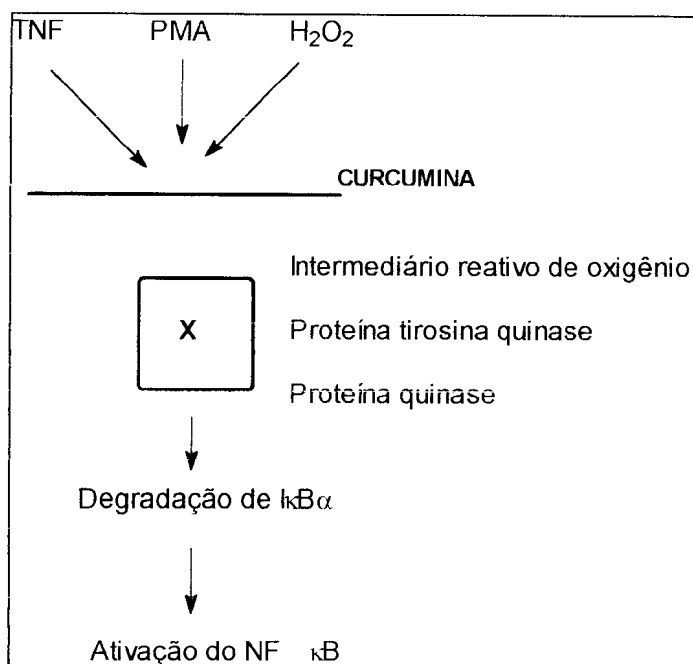
A curcumina pode também bloquear a ativação de NF- κ B por inibição da proteína quinase. *In vitro*, curcumina também tem atividade inibitória das proteínas serina treonina quinase e proteína tirosina quinase. Entretanto PMA (Forbol-12-miristato-13- acetato) é um ativador da proteína quinase C, e TNF e peróxido de hidrogênio agem como ativadores da proteína quinase C e da proteína tirosina quinase. Inibidores tanto de proteína quinase C quanto de proteína tirosina quinase bloqueiam a ativação do fator NF- κ B por TNF e peróxido de hidrogênio. A proteína tirosina quinase também está implicada na ativação de NF- κ B por luz ultravioleta e lipopolissacarídeos.

A curcumina não inibe apenas as ligações do DNA com o fator de transcrição c-jun / AP-1, mas também diminui os níveis de c-jun pela prevenção da transcrição (Singh & Aggarwal, 1995).

Estas observações podem ser explicadas baseadas nos resultados obtidos neste trabalho, como uma expressão desta enzima (tirosina quinase) é dependente do fator NF- κ B. Isto é consistente com a observação que TPCK - a L-1-tosilamido-2-feniletil clorometil cetona inibe a protease que bloqueia a ativação do fator NF- κ B e a expressão da óxido nítrico sintase. O TPCK, entretanto, pode exercer um efeito de modo diferente da curcumina. Tem sido mostrado que TPCK modifica quimicamente o fator NF- κ B, esta alteração é realizada pelo I γ B α . Curcumina entretanto não modifica quimicamente as propriedades ligantes do DNA com o fator NF- κ B (esquema 20) (Singh & Aggarwal, 1996).

A observação que a fosforilação e degradação de $I\kappa B\alpha$, induzida por TNF é abolida pela curcumina indica que a etapa no caminho da transcrição é inibida antes da fosforilação do fator NF- κ B.

Foi concluído que por ser muito baixa a toxicidade farmacológica da curcumina e por sua habilidade em modular a ativação do fator NF- κ B por vários agentes, a curcumina possui um alto potencial para uso em modulação da expressão de genes regulados por NF- κ B (Singh & Aggarwal, 1996).



Esquema 20: Possível sítio de ação da curcumina na ativação do fator NF- κ B induzida por TNF, PMA e H₂O₂.

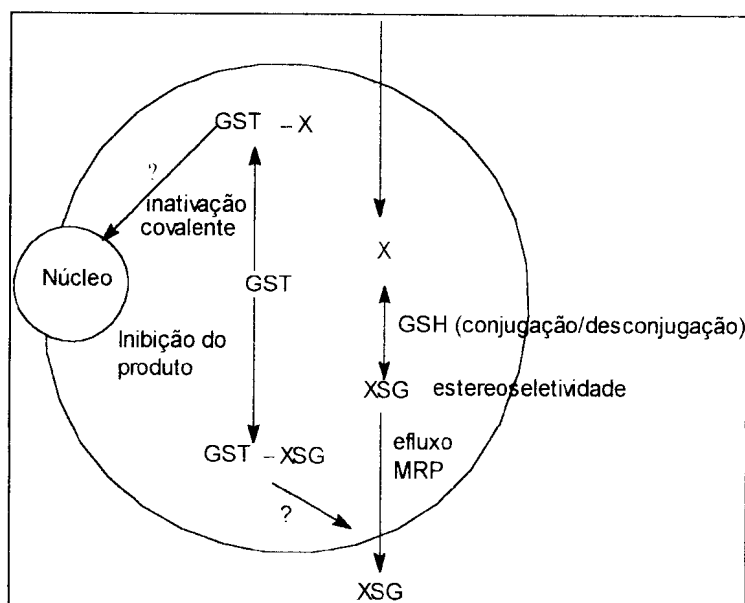
3.1.5- Mecanismo de ação antiinflamatória

Até agora das duas vias principais do metabolismo do ácido araquidônico (esquema 2) somente dois princípios de atividades são avaliados em terapia. Primeiro: substâncias que inibem a síntese de prostaglandinas por interferência com o sistema das ciclooxigenases (ácido salicílico, etc.). Segundo: Os glucocorticosteróides que inibem ambos os caminhos ciclooxigenase e lipooxigenases por interferência com a reação das fosfolipases A_2 . Os efeitos indesejáveis desta classe de agentes antiinflamatório são muito conhecidos. Devemos saber como as interferências com a cascata do ácido araquidônico são relevantes.

Mas o que é preciso são substâncias que inibam ambos os ramos da cascata do ácido araquidônico por mecanismos diferentes da ação de glucocorticosteróides.

Curcumina é uma substância que inibe as enzimas dioxigenases incluindo 5-lipooxigenase, 12-lipooxigenase e ciclooxigenase. Este efeito seria devido provavelmente a sua capacidade antioxidante(Ammon et al. , 1993).

3.1.6- Interações de substâncias carboniladas α,β -insaturados com sistemas de biotransformação relacionados a glutathiona (Iersel, 1998)



Fonte: <http://www.sbp.wau.nl>

Esquema 21: Interações entre os três aspectos do sistema de biotransformações relacionadas à glutathiona.

Os passos da modulação das biotransformações relacionadas a glutathiona, podem representar um papel importante em fenômenos como anticarcinogenicidade e resistência múltiplas drogas. Biotransformações relacionadas a glutathiona compreendem três principais aspectos: glutathiona (GSH), glutathiona S-transferase (GST) e resistência a multidrogas (RM). O tripeptídeo glutathiona é o maior tiol proteico intracelular presente em virtualmente todas as células, e protege as células contra substâncias nocivos, incluindo carcinogênicos.

Devido a variações no conteúdo das GSHs de células tumorais indicam que pode ocorrer a proteção das células da alquilação de drogas anticâncer (Iersel, 1998).

As glutionas S-transferases são uma importante classe de enzimas que tem a função de desintoxicação de uma grande variedade de substâncias eletrofilicos, pela catálise da conjugação destas substâncias com a glutiona reduzida (esquema 21).

O terceiro fator chave é o MRP (resistência à multiplas drogas “pump”), esta glicoproteína foi isolada de linhagens de células de tumores de câncer de pulmão de pequenas células resistentes à drogas, cuja característica era a falta de expressão do gene *mdr-1* (Cole *et al.*, 1992).

Em 1993 foi iniciado um trabalho que focalizava os efeitos de uma classe de substâncias carbonílicos α,β -insaturados nos processos relacionados a glutiona, especialmente glutiona S-transferase P1-1, enquanto o alvo secundário fornece a penetração no metabolismo destes substâncias. Alguns deles são originados em meios externos como escapamento de automóveis e de alimentos (curcumina). Entretanto, um número de substâncias endógenos bioativos também estão neste grupo (Prostaglandinas E_2 , na peroxidação de lipídios produz o 4-hidroxi-2-nonenal). O ácido etacrínico, foi escolhido como substância modelo porque ele tem mostrado efeito na modulação de sistemas de biotransformação envolvidos com a glutiona nos três aspectos. As outras substâncias usados foram acroleína, crotonaldeído (do escapamento de automóveis e fumaça de cigarro), cinamaldeído (principal componente do

cinamon), citral (em frutas cítricas e aroma de alimentos), curcumina (pigmento constituinte do “curry”), 4-hidroxi-2-nonenal, trans-2-hexenal (ambos produtos de peroxidação de lipídios) e prostaglandinas E_2 (um mediador de inflamação).

Vários mecanismos de modulação puderam ser investigados incluindo a depleção de GSH, inibição reversível e irreversível da atividade da GST, e modulação do efluxo de conjugados de glutathiona pelo efeito na resistência à múltiplas drogas associadas a proteína (MRP) . Usando este sistema, pode ser mostrado que curcumina, seguido do ácido etacrínico foram os melhores inibidores de sistemas de biotransformação relacionados a GSH. Estas duas substâncias modulam o sistema por todos os mecanismos citados acima (Iersel, 1998).

3.2 - Dados físicos e espectrais

3.2.1- Produtos de modificação estrutural

Curcumina

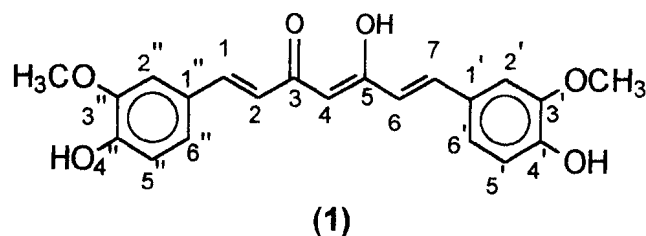


Tabela 3 - Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a curcumina em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

C	^1H (δ , ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ , ppm)
1 e 7	7,57 (2H, <i>d</i> , J=15,8)	141,34
2 e 6	6,69 (2H, <i>d</i> , J=15,8)	121,88
3	-	184,38
4	5,96 (2H, <i>s</i>)	101,70
5	-	160,36
1'e 1''	-	127,56
2'e 2''	7,15 (2H, <i>dd</i> , J=1,45 e 8,2)	111,34
3'e 3''	-	148,62
4'e 4''	-	149,66
5'e 5''	6,85 (2H, <i>d</i> , J=8,2)	116,72
6'e 6''	7,31 (2H, <i>d</i> , J=2)	123,68
OH	8,15 (2H, <i>s</i>)	-
OCH₃	3,90 (6H, <i>s</i>)	56,17

Ponto de fusão: 187°C

I.V.: ν^{NaCl} cm^{-1} : 3343,8; 3006,1; 2931,6; 2841,3; 1711,2; 1591,3; 1513,3; 1026,2; 813,7.

Curcumina acetilada

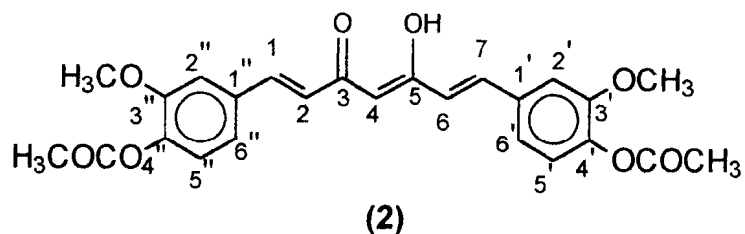


Tabela 4 - Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a curcumina acetilada em CDCl_3

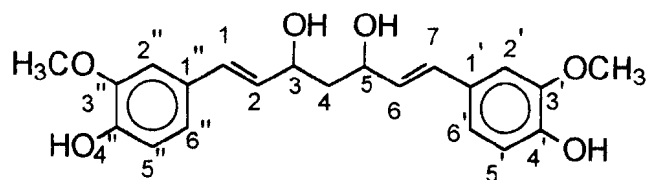
C	^1H (δ , ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ , ppm)
1 e 7	7,64 (1H, <i>d</i> , J=16)	139,00
2 e 6	6,58 (1H, <i>d</i> , J=16)	120,86
3	-	182,91
4	5,84 (2H, <i>s</i>)	101,71
5	-	190,92
1'e 1''	-	133,74
2'e 2''	7,48 (2H, <i>m</i>)	111,27
3'e 3''	-	141,07
4'e 4''	-	151,18
5'e 5''	7,48 (2H, <i>m</i>)	124,04
6'e 6''	7,12 (2H, <i>m</i>)	123,08
OCOCH₃	2,31 (6H, <i>s</i>)	20,48
OCOCH₃	-	168,63
OCH₃	3,86 (6H, <i>s</i>)	55,66

Ponto de fusão: 128°C

I.V.: ν^{KBr} cm^{-1} : 1757,8; 1629,2; 1595,1; 1510,7; 1458,3; 1413,6; 1370,3; 1299,4;

1200,0; 1029,7.

Curcumina Reduzida a diol



(3)

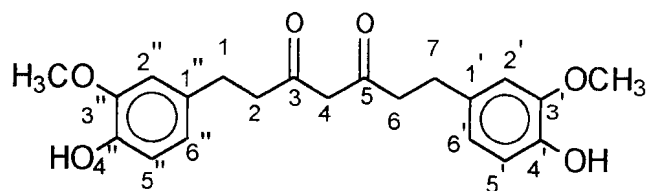
Tabela 5 - Atribuições de ¹H (200 MHz) e ¹³C (50,3 MHz) para a substância 3 em CDCl₃

C	¹ H (δ , ppm, J, Hertz)	¹³ C (δ , ppm)
1 e 7	7,60 (1H, <i>d</i> , J=15,7)	154,25
2 e 6	6,94 (1H, <i>d</i> , J=15,7)	120,68
3 e 5	4,30 (2H, <i>m</i>)	67,44
4	2,83 (2H, <i>m</i>)	40,87
1'e 1''	-	133,18
2'e 2''	6,53 (1H, <i>d</i> , J=2)	111,06
3'e 3''	-	146,35
4'e 4''	-	143,45
5'e 5''	7,15 (2H, <i>m</i>)	115,20
6'e 6''	7,71 (2H, <i>m</i>)	120,65
OH	4,30 (4H, <i>s</i>)	-
OCH₃	3,97 (6H, <i>s</i>)	55,67

Ponto de fusão: óleo

I.V.: ν^{KBr} cm⁻¹: 3392,0; 1598,0; 1514,1; 1037,0.

Curcumina reduzida nas ligações duplas



(4)

Tabela 6 - Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 4 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$

C	^1H (δ , ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ , ppm)
1 e 7	2,66 (2H, <i>m</i>)	29,52
2 e 6	2,66 (2H, <i>m</i>)	44,94
3 e 5	-	208,53
4	5,16 (2H, <i>s</i>)	66,50
1'e 1''	-	132,30
2'e 2''	6,59 (2H, <i>s</i>)	114,23
3'e 3''	-	146,31
4'e 4''	-	143,58
5'e 5''	6,89 (2H, <i>d</i> , J=8,0)	114,92
6'e 6''	6,53 (2H, <i>d</i> , J=8,0)	120,18
OH	-	-
OCH₃	3,70 (6H, <i>s</i>)	55,32

Óleo

I.V.: ν^{KBr} cm^{-1} : 3409,1; 3015,4; 2930,8; 2846,2; 1707,7; 1607,7; 1030,8; 930,8; 861,5.

Diol Reduzido

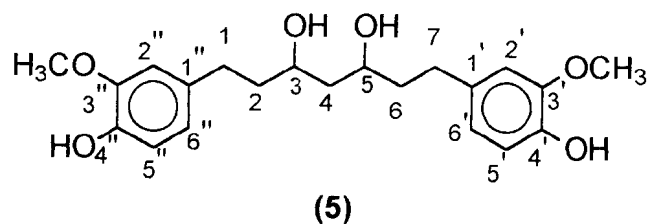


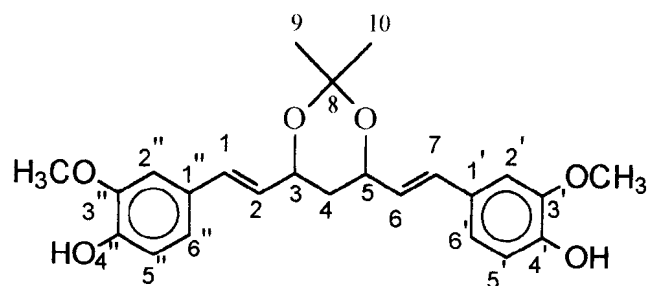
Tabela 7 - Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 5 em CDCl_3

C	^1H (δ , ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ , ppm)
1 e 7	2,66 (2H, <i>m</i>)	31,59
2 e 6	1,68 (4H, <i>m</i>)	31,00
3 e 5	3,80 (2H, <i>m</i>)	67,41
4	1,56 (2H, <i>m</i>)	40,84
1'e 1''	-	133,84
2'e 2''	6,81 (1H, <i>d</i> , J=1,8)	114,30
3'e 3''	-	146,40
4'e 4''	-	143,45
5'e 5''	6,79 (1H, <i>m</i>)	115,17
6'e 6''	6,68 (1H, <i>sl</i>)	120,65
OH	5,47 (1H, <i>sl</i>)	-
OCH₃	3,83 (3H, <i>s</i>)	55,67

Óleo

I.V.: ν^{KBr} cm^{-1} : 3380,0; 1605,4; 1515,9; 1071,0.

Acetonídeo



(6)

Tabela 8 - Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 6 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$

C	^1H (δ , ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ , ppm)
1 e 7	6,69 (2H, <i>d</i> , J=15,3)	129,96
2 e 6	6,53 (2H, <i>d</i> , J=15,3)	129,96
3 e 5	2,70 (2H, <i>m</i>)	70,75
4	1,69 (2H, <i>m</i>)	40,65
8	-	-
9 e 10	1,18 (6H, <i>s</i>)	20,13
1'e 1''	-	134,11
2'e 2''	7,02 (2H, <i>s</i>)	115,82
3'e 3''	-	146,57
4'e 4''	-	143,79
5'e 5''	6,97 (2H, <i>d</i> , J=8,2)	114,79
6'e 6''	7,01 (2H, <i>d</i> , J=8)	120,61
OH	-	-
OCH₃	3,02 (6H, <i>s</i>)	55,54

Ponto de fusão: 117° C

I.V.: ν^{NaCl} cm^{-1} : 2997,2; 2913,9; 1664,2; 1412,1; 1311,6; 1219,4; 1052,5; 954,2.

Acetonídeo reduzido

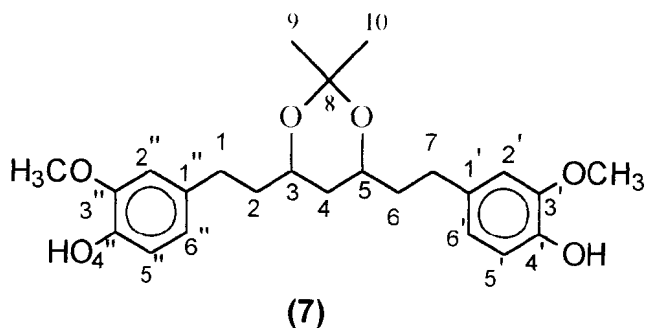


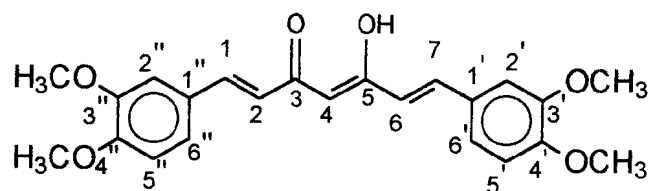
Tabela 9 - Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 7 em CDCl_3

C	^1H (δ , ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ , ppm)
1 e 7	2,88 (4H, <i>m</i>)	30,81
2 e 6	1,69-1,86 (4H, <i>m</i>)	27,36
3 e 5	3,84 (2H, <i>m</i>)	66,66
4	1,77 (2H, <i>m</i>)	40,81
8	-	-
9 e 10	1,21-1,18 (6H, <i>m</i>)	23,01
1'e 1''	-	133,75
2'e 2''	7,24 (2H, <i>s</i>)	114,26
3'e 3''	-	146,57
4'e 4''	-	143,79
5'e 5''	6,98 (2H, <i>m</i>)	114,96
6'e 6''	6,98 (2H, <i>m</i>)	120,51
OH	7,98 (2H, <i>s</i>)	-
OCH₃	3,84 (6H, <i>s</i>)	55,54

Ponto de fusão: 112° C

I.V.: ν^{NaCl} cm^{-1} : 3376,9; 2915,4; 1607,7; 1515,4; 1446,2; 1361,5; 1269,2; 1030,8; 954,2.

Curcumina Metilada



(8)

Tabela 10 - Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 8 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$

C	^1H (δ , ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ , ppm)
1	7,63 (2H, <i>d</i> , J=16)	146,06
2	6,69 (2H, <i>d</i> , J=16)	123,53
3	-	183,07
4	5,96 (2H, <i>s</i>)	101,19
5	-	161,08
1'e 1''	-	130,28
2'e 2''	6,91 (2H, <i>d</i> , J=2)	111,81
3'e 3''	-	148,93
4'e 4''	-	149,13
5'e 5''	6,85 (2H, <i>d</i> , J=8)	116,37
6'e 6''	7,14 (2H, <i>dd</i> , J=8 e 2)	122,47
OCH₃	3,86 (12H, <i>s</i>)	55,60

Ponto fusão: 123° C

I.V.: ν^{NaCl} cm^{-1} : 3426,4; 2929,7; 1709,6; 1590,5; 1512,4; 1460,7; 1262,3; 1136,8; 1025,0; 971,9.

Curcumina desmetilada

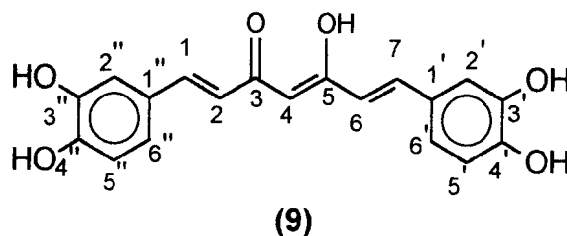


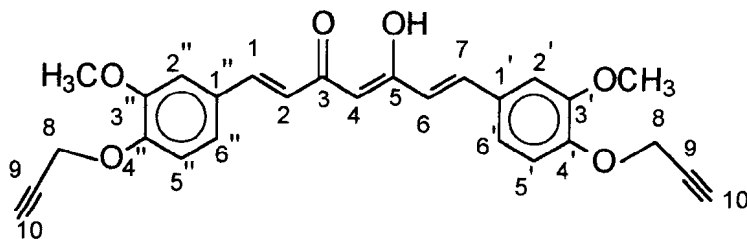
Tabela 11 - Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 9 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$

C	^1H (δ , ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ , ppm)
1 e 7	7,60 (2H, <i>d</i> , J=16)	145,36
2 e 6	6,66 (2H, <i>d</i> , J=16)	125,42
3	-	179,80
4	5,97 (2H, <i>s</i>)	106,12
5	-	168,50
1'e 1''	-	129,66
2'e 2''	7,56 (2H, <i>s</i>)	114,25
3'e 3''	-	145,36
4'e 4''	-	144,97
5'e 5''	7,54 (2H, <i>d</i> , J=8)	116,15
6'e 6''	6,89 (2H, <i>d</i> , J=8)	120,17
OH	8,99 (4H, <i>s</i>)	-

nto de fusão: 119° C

$\therefore \nu^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 2923,6; 2852,9; 1724,9; 1571,2; 1515,7; 1450,0; 1275,9; 1164,26,4; 1028,6.

Curcumina alquilada



(10)

Tabela 12 - Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 10 em CDCl_3

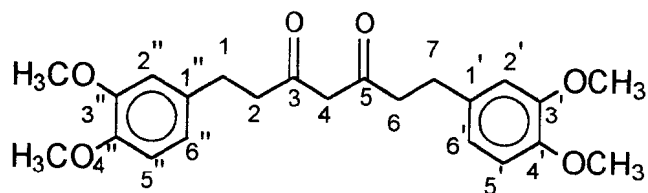
C	^1H (δ , ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ , ppm)
1 e 7	7,54 (2H, <i>s</i>)	144,22
2 e 6	6,66 (2H, <i>m</i>)	123,71
3	-	-
4	5,93 (2H, <i>s</i>)	109,7
5	-	-
8	3,94 (4H, <i>s</i>)	39,09
9	-	70,50
10	2,49 (1H, <i>s</i>)	81,04
1'e 1''	-	126,84
2'e 2''	7,37 (2H, <i>m</i>)	114,82
3'e 3''	-	123,71
4'e 4''	-	146,16
5'e 5''	6,89 (2H, <i>d</i> , J=8)	125,61
6'e 6''	7,23 (2H, <i>dd</i> , J=8 e 2)	123,53
OCH₃	3,94 (6H, <i>s</i>)	55,95

Ponto de fusão: 91° C

I.V.: ν^{NaCl} cm^{-1} : 3368,1, 3005,0; 2919,0; 2120,9; 1647,6; 1434,3; 1020,5; 952,9;

903,3.

Curcumina metilada reduzida



(11)

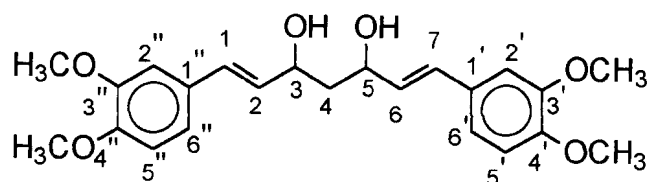
Tabela 13 - Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 11 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$

C	^1H (δ , ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ , ppm)
1 e 7	2,90 (2H, s)	30,19
2 e 6	2,90 (2H, s)	39,28
3 e 5	-	203,00
4	4,68 (2H, s)	56,32
1'e 1''	-	142,63
2'e 2''	6,59 (2H, s)	111,14
3'e 3''	-	148,75
4'e 4''	-	147,37
5'e 5''	6,54 (2H, m)	115,10
6'e 6''	6,81 (2H, s)	123,34
OCH₃	3,77 (6H, s)	55,99

Ponto de fusão: 119° C

I.V.: ν^{NaCl} cm^{-1} : 3441,3; 2924,5; 2854,2; 1721,3; 1595,5; 1022,9; 809,5.

Diol metilado



(12)

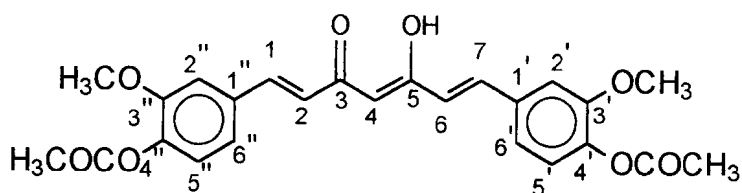
Tabela 14 - Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 12 em CDCl_3

C	^1H (δ , ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ , ppm)
1 e 7	6,89 (2H, <i>d</i> , J=14)	126,05
2 e 6	6,25 (2H, <i>d</i> , J=14)	130,09
3 e 5	3,14-3,34 (2H, <i>m</i>)	55,38
4	4,17 (2H, <i>m</i>)	29,66
1'e 1''	-	126,95
2'e 2''	6,87 (2H, <i>m</i>)	110,96
3'e 3''	-	149,19
4'e 4''	-	151,48
5'e 5''	7,08 (2H, <i>m</i>)	110,91
6'e 6''	7,49 (2H, <i>m</i>)	123,14
OCH₃	3,89 (12H, <i>s</i>)	55,95

Óleo

I.V.: ν^{NaCl} cm^{-1} : 2960,2; 2928,7; 2876,9; 1725,7; 1598,7; 1514,6; 1463,7; 1037,1; 979,9.

Curcumina acetilada reduzida



(13)

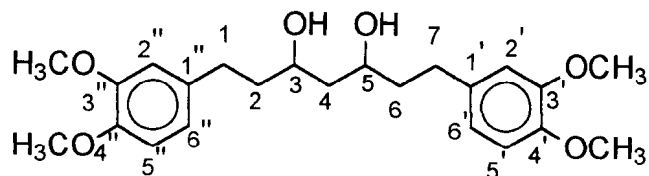
Tabela 15 - Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 13 em CDCl_3

C	^1H (δ , ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ , ppm)
1 e 7	2,21 (2H, s/)	31,49
2 e 6	2,51 (2H, s/)	37,92
3	-	192,73
4	5,44 (2H, s/)	99,64
5	-	-
8	-	169,08
1'e 1''	-	139,45
2'e 2''	6,66 (1 H, d, J=2)	112,44
3'e 3''	-	150,62
4'e 4''	-	139,45
5'e 5''	6,72 (2H, d, J=8)	122,45
6'e 6''	6,83 (2H, d, J=8)	120,24
OCOCH₃	2,29 (6H, s)	20,48
OCH₃	3,77 (6H, s)	55,62

Ponto de fusão: 112° C

I.V.: ν^{NaCl} cm^{-1} : 3473,3; 2936,0; 2856,2; 1762,0; 1603,5; 1510,7; 1459,4; 1420,0; 1369,5; 1121,9; 1033,2; 903,2.

Diol metilado reduzido



(14)

Tabela 16 - Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 14 em CDCl_3

C	^1H (δ , ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ , ppm)
1 e 7	2,60 (4H, <i>m</i>)	31,64
2 e 6	2,11 (4H, <i>m</i> ,)	33,95
3 e 5	3,76 (2H, <i>m</i>)	68,33
4	1,22 (2H, <i>s</i>)	45,69
1'e 1''	-	133,05
2'e 2''	6,60-6,90 (6H, <i>m</i>)	114,71
3'e 3''	-	150,41
4'e 4''	-	149,19
5'e 5''	6,60-6,90 (6H, <i>m</i>)	110,96
6'e 6''	6,60-6,90 (6H, <i>m</i>)	123,14
OCH₃	3,77 (3H, <i>s</i>)	56,88

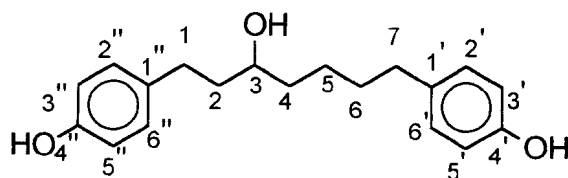
Óleo

I.V.: ν^{NaCl} cm^{-1} : 3483,5; 2934,1; 2840,4; 1712,3; 1669,0; 1600,1; 1512,9; 1461,1;

1027,6; 810,4.

3.2.2 - PRODUTOS EXTRAÍDOS DE *Centrolobium sclerophyllum*

Centrolobol



(15)

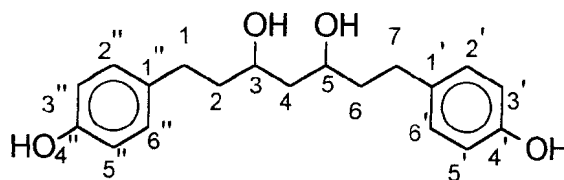
Tabela 17 - Atribuições de ^1H (100 MHz) e ^{13}C (25,2 MHz) para a substância 15 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

C	^1H (δ , ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ , ppm)
1	2,6-2,8 (<i>m</i> , 2H)	31,50
2	1,3-2,0 (<i>m</i> , 2H)	40,00
3	3,4-4,0 (<i>m</i> , 1H)	71,70
4	1,3-2,0 (<i>m</i> , 2H)	37,60
5	1,3-2,0 (<i>m</i> , 2H)	25,70
6	1,3-2,0 (<i>m</i> , 2H)	32,30
7	2,6-2,8 (<i>m</i> , 2H)	35,30
1'e 1''	-	133,60
2'e 2''	6,8-7,0 (<i>m</i> , 2H)	129,60
3'e 3''	6,8-7,0 (<i>m</i> , 2H)	115,50
4'e 4''	-	155,40
5'e 5''	6,8-7,0 (<i>m</i> , 2H)	115,50
6'e 6''	6,8-7,0 (<i>m</i> , 2H)	129,60
OH	-	-

Ponto de fusão: 118-119 $^\circ$

I.V.: ν^{KBr} cm^{-1} : 3570,0; 3450,0; 1610,0; 1595,0.

Hidroxicentrolobol



(16)

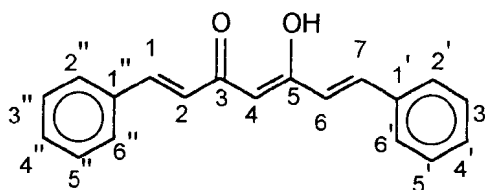
Tabela 18 - Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 16 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

C	^1H (δ , ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ , ppm)
1 e 7	2,62-2,77 (<i>m</i> , 4H)	31,34
2 e 6	1,28-2,04 (<i>m</i> , 4H)	38,64
3 e 5	3,40-3,71 (<i>m</i> , 2H)	71,55
4	1,28-2,04 (<i>m</i> , 4H)	40,94
1'e 1''	-	134,71
2'e 2''	6,73 (<i>d</i> , 2H, J=8)	130,39
3'e 3''	6,73 (<i>d</i> , 2H, J=8)	115,26
4'e 4''	-	156,54
5'e 5''	6,70 (<i>d</i> , 2H, J=8)	116,35
6'e 6''	6,70 (<i>d</i> , 2H, J=8)	130,39
OH	8,08 (<i>sl</i> , 4H)	-

Ponto de fusão: 139-140° C

I.V.: ν^{KBr} cm^{-1} : 3437,4; 3269,9; 1605,0; 1512,7; 1455,0.

3.2.3 - Produtos sintetizados



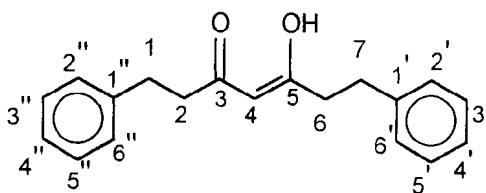
17

Tabela 19 - Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 17 em CDCl_3

C	^1H (δ , ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ , ppm)
1 e 7	7,69 (2H, <i>d</i> , J=16)	140,54
2 e 6	6,66 (2H, <i>d</i> , J=16)	123,95
3	-	183,20
4	5,83 (2H, <i>s</i>)	101,80
5	-	170,25
1'e 1''	-	134,90
2', 2''	7,53-7,35(4H, <i>m</i>)	128,06
6'e 6''		
3', 3'',	7.53 (4H, <i>m</i>)	128,84
5'e 5''		
4'e 4''	7,39 (2H, <i>m</i>)	130,08

Ponto de fusão: 140° C

I.V.: ν^{NaCl} cm^{-1} : 1627,7; 1577,0; 1502,8; 1444,0; 1330,6; 1278,8; 1135,1; 970,2; 869,1.



18

Tabela 20 - Atribuições de ¹H (200 MHz) e ¹³C (50,3 MHz) para a substância 18 em CDCl₃

C	¹ H (δ , ppm, J, Hertz)	¹³ C (δ , ppm)
1 e 7	2,99 (4H, <i>m</i>)	29,30
2 e 6	2,61 (4H, <i>m</i>)	31,45
3	-	192,96
4	5,46 (2H, <i>s</i>)	99,50
5	-	190,16
1'e 1''	-	141,30
2', 2''	7,23(4H, <i>sl</i> ,)	128,41
6'e 6''		
3', 3''	7.32 (4H, <i>m</i>)	125,80
5'e 5''		
4'e 4''	7,35 (2H, <i>m</i>)	126,13

Ponto de fusão: 106° C

I.V.: ν^{NaCl} cm⁻¹: 2926,6; 2858,4; 1948,0; 1763,0; 1707,8; 1604,2; 1033,5; 933,8; 699,3.

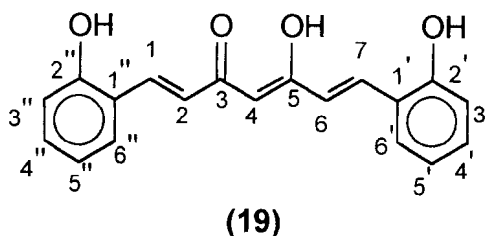
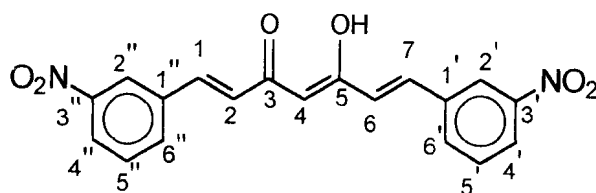


Tabela 21 - Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 19 em CDCl_3

C	^1H (δ , ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ , ppm)
1 e 7	7,53 (2H, <i>d</i> , J=16)	142,30
2 e 6	6,94 (2H, <i>d</i> , J=16)	121,68
3	-	180,22
4	3,18 (2H, <i>s</i>)	101,38
5	-	173,30
1'e 1''	-	124,13
2'e 2''	-	165,21
3'e 3'',	6,98 (4H, <i>m</i>)	116,01
4'e 4''	7,19 (2H, <i>m</i>)	129,02
5'e 5''	7,04 (2H, <i>m</i>)	127,68
6'e 6''	7,28 (2H, <i>m</i>)	137,57
OH	-	-

Ponto de fusão: 116° C

I.V.: ν^{NaCl} cm^{-1} : 3186,4; 2848,9; 2752,0; 1664,0; 1581,6; 1486,4; 1027,5; 760,6.



(20)

Tabela 22 - Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 20 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$

C	^1H (δ , ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ , ppm)
1 e 7	7,74-7,66 (2H, <i>d</i> , J=16)	139,09
2 e 6	6,82 (2H, <i>d</i> , J=16)	124,96
3	-	184,48
4	6,04 (2H, <i>s</i>)	102,45
5	-	169,31
1'e 1''	-	135,80
2'e 2''	8,32 (2H, <i>s</i>)	129,74
3'e 3'',	-	145,13
4'e 4''	7,92(2H, <i>d</i> , J=2)	123,13
5'e 5''	7,40 (2H, <i>m</i>)	128,70
6'e 6''	7,84-7,88 (2H, <i>m</i>)	131,20

Ponto do fusão: 221° C

I.V.: ν^{KBr} cm^{-1} : 3448,7; 3051,6; 1625,0; 1578,0; 1503,2; 1444,2; 1331,0; 1279,5; 1198,2; 713,4.

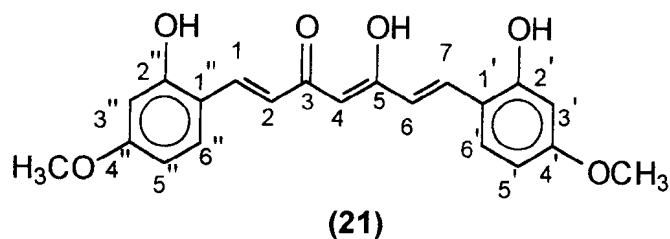


Tabela 23 - Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 21 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

C	^1H (δ , ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ , ppm)
1 e 7	7,65 (2H, d, J=16)	138,18
2 e 6	6,72 (2H, d, J=16)	129,50
3	-	184,16
4	5,58 (2H, s)	101,17
5	-	170,83
1'e 1''	-	119,15
2'e 2''	-	158,16
3'e 3'',	6,67 (2H, s)	103,35
4'e 4''	-	157,36
5'e 5''	6,56 (2H, d, J=8)	108,13
6'e 6''	6,98 (2H, d, J=8)	132,39
OCH₃	3,87 (3H, s)	56,06
OH	9,78 (2H, s)	-

Ponto de fusão: 172° C

I.V.: ν^{KBr} cm^{-1} : 3425,2; 3040,7; 2924,6; 1674,7; 1613,7; 1583,2; 1487,5; 1457,5; 1230,1; 906,0.

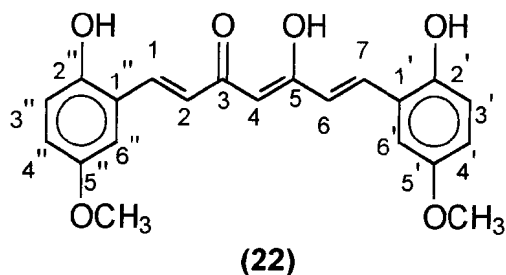
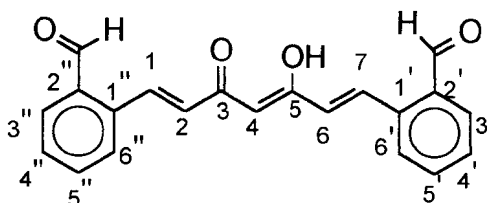


Tabela 24 - Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 22 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

C	^1H (δ , ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ , ppm)
1 e 7	7,67 (2H, <i>d</i> , J=16))	141,08
2 e 6	6,88 (2H, <i>d</i> , J=16)	129,68
3	-	184,26
4	5,90 (2H, <i>s</i>)	102,53
5	-	170,42
1'e 1''	-	116,14
2'e 2''	-	150,19
3'e 3'',	6,90 (2H, <i>d</i> , J=8)	118,15
4'e 4''	7,16 (2H, <i>d</i> , J=8)	115,33
5'e 5''	-	155,42
6'e 6''	7,26 (2H, <i>s</i>)	124,89
OCH₃	3,88 (3H, <i>s</i>)	56,03
OH	8,95 (2H, <i>s</i>)	-

Ponto de fusão: 178° C

I.V.: ν^{NaCl} cm^{-1} : 2944,0; 2840,1; 1660,2; 1625,8; 1590,1; 1486,9; 1328,8; 1271,6; 1188,6; 1153,5; 1036,2; 970,9.



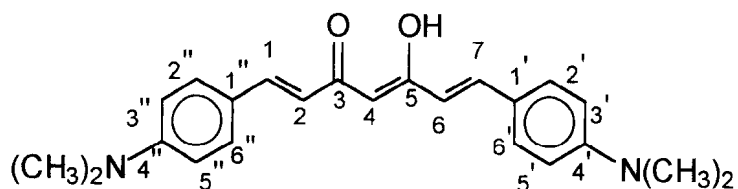
(23)

Tabela 25 - Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 23 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$

C	^1H (δ , ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ , ppm)
1 e 7	7,71 (2H, <i>d</i> , J=14)	141,33
2 e 6	7,08 (2H, <i>d</i> , J=14)	129,71
3	-	178,85
4	5,37 (2H, <i>s</i>)	102,26
5		168,62
1'e 1''	-	137,43
2'e 2''	-	133,52
3'e 3'',	7,91 (4H, <i>m</i>)	133,15
4'e 4''	7,53 (2H, <i>m</i>)	130,85
5'e 5''	7,57 (2H, <i>m</i>)	134,82
6'e 6''	7,36 (2H, <i>m</i>)	122,60
COH	10,52(2H, <i>s</i>)	193,58

Óleo

I.V.: ν^{NaCl} cm^{-1} : 3321,9; 3062,2; 2921,8; 2653,7; 2526,4; 1760,4; 1694,7; 1596,4; 1404,1; 910,4; 745,0; 692,4.



(24)

Tabela 26 - Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 24 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

C	^1H (δ , ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ , ppm)
1 e 7	7,69 (2H, d, J=14)	144,24
2 e 6	6,66 (2H, d, J=14)	124,20
3	-	184,42
4	6,11 (2H, s)	102,48
5	-	170,32
1'e 1''	-	125,11
2', 2'',	6,39 (2H, s)	129,04
6'e 6''		
3',3'',	6,45 (4H, s)	111,87
5'e 5''		
4'e 4''	-	-
$\text{N}(\text{CH}_3)_2$	3,07 (12H, s)	40,05

Ponto de fusão: 206° C

I.V.: ν^{KBr} cm^{-1} : 3364,0; 2924,6; 2856,5; 2730,7; 1896,1; 1722,8; 1675,1; 1513,1; 1451,5; 1376,8; 1280,3; 1008,5; 816,5.

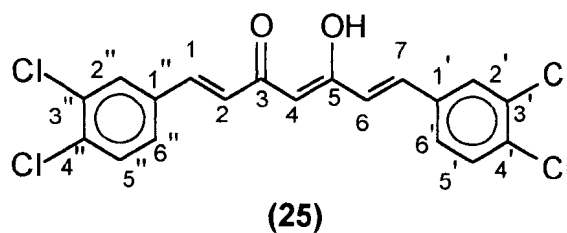
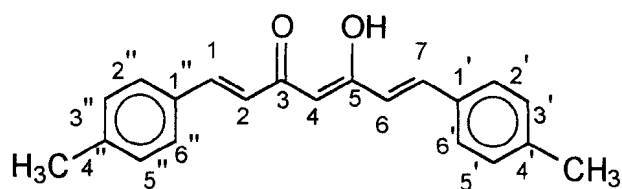


Tabela 27 - Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 25 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

C	^1H (δ , ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ , ppm)
1 e 7	7,70 (2H, <i>d</i> , J=16)	135,92
2 e 6	6,92 (2H, <i>d</i> , J=16)	129,01
3	-	185,73
4	6,10 (2H, <i>s</i>)	102,50
5	-	170,13
1'e 1''	-	135,63
2'e 2''	7,33 (2H, <i>m</i>)	132,55
3'e 3'' ,	-	136,92
4'e 4''	-	125,06
5'e 5''	7,43 (2H, <i>m</i>)	134,30
6'e 6''	7,96 (4H, <i>s</i>)	130,16

Ponto de fusão: 198° C

I.V.: ν^{KBr} cm^{-1} : 1624,7; 1500,9; 1442,5; 1327,5; 1191,4; 1132,4; 967,8; 756,4.



(26)

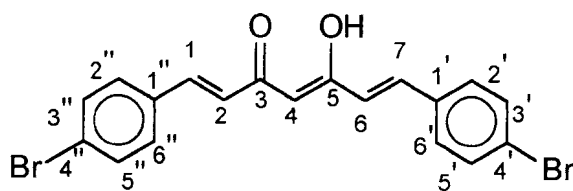
Tabela 28 - Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 26 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

C	^1H (δ , ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ , ppm)
1 e 7	7,44 (2H, d, J=16)	141,32
2 e 6	6,58 (2H, d, J=16)	129,21
3	-	184,35
4	6,11 (2H, s)	102,53
5	-	172,15
1' e 1''	-	130,91
2', 2'',	7,33 (4H, m)	132,14
6' e 6''		
3', 3'',	7,46 (4H, s)	128,71
5', e 5''		
4' e 4''	-	135,83
CH₃	2,37 (6H, s)	24,53

Ponto de fusão: 164° C

I.V.: ν^{KBr} cm^{-1} : 3472,0; 2974,7; 2831,1; 1925,5; 1805,3; 1677,9; 1609,3; 1573,6;

1515,3; 960,7.



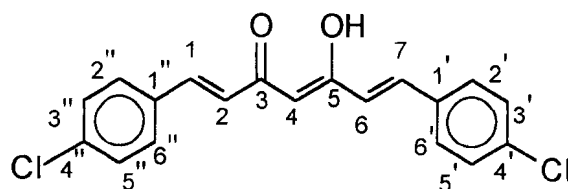
(27)

Tabela 29 - Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 27 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

C	^1H (δ , ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ , ppm)
1 e 7	7,52 (2H, <i>d</i> , J=16)	141,20
2 e 6	6,66 (2H, <i>d</i> , J=16)	129,19
3	-	184,43
4	6,08(2H, <i>s</i>)	102,46
5	-	170,52
1'e 1''	-	132,79
2', 2'',	6,58 (4H, <i>sl</i>)	130,97
6'e 6''		
3', 3'',	7,02 (4H, <i>s</i>)	132,87
5',e 5''		
4'e 4''	-	133,90

Ponto de fusão: 186° C

I.V.: ν^{KBr} cm^{-1} : 2923,8; 2853,3; 2674,1; 2559,1; 1679,7; 1625,5; 1584,1; 1502,4; 1429,7; 1323,3; 1133,6; 970,8; 850,8.



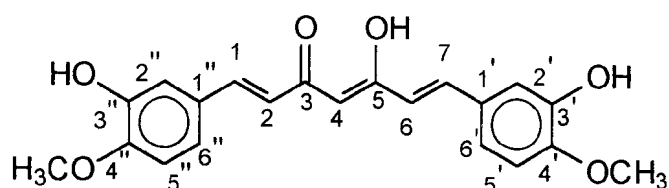
(28)

Tabela 30 - Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 28 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

C	^1H (δ , ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ , ppm)
1 e 7	7,87 (2H, <i>d</i> , J=16)	140,79
2 e 6	7,55 (2H, <i>d</i> , J=16)	129,90
3	-	184,22
4	6,08 (2H, <i>s</i>)	102,49
5	-	172,17
1'e 1''	-	135,80
2', 2'',	7,38 (4H, <i>m</i>)	131,96
6'e 6''		
3', 3'',	7,02 (4H, <i>m</i>)	130,86
5'e 5''		
4'e 4''	-	133,90

Ponto de fusão: 189° C

I.V.: ν^{NaCl} cm^{-1} : 3411,1; 3036,8; 2924,0; 2853,7; 1685,8; 1280,0; 970,0.



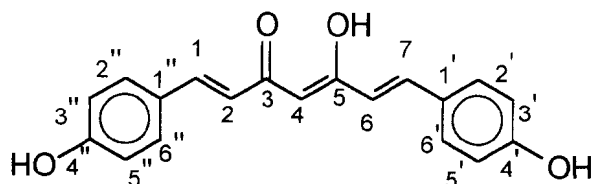
(29)

Tabela 31 - Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 29 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

C	^1H (δ , ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ , ppm)
1 e 7	7,66 (2H, <i>d</i> , J=16)	141,22
2 e 6	6,90 (2H, <i>d</i> , J=16)	125,10
3	-	184,38
4	6,11 (2H, <i>s</i>)	102,49
5	-	168,86
1'e 1''	-	128,99
2', 2''	7,43 (2H, <i>d</i> , J=2)	111,79
3'e 3''	-	148,38
4'e 4''	-	150,30
5'e 5''	7,10 (2H, <i>d</i> , J=8)	114,41
6'e 6''	7,36(2H, <i>dd</i> , J=8 e 2)	121,30
OCH₃	3,93 (3H, <i>s</i>)	56,32
OH	8,40 (2H, <i>s</i>)	-

Ponto de fusão: 177° C

I.V.: ν^{KBr} cm^{-1} : 3448,4; 1624,5; 1577,8; 1507,4; 1444,2; 1331,9; 970,6.



(30)

Tabela 32 - Atribuições de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a substância 30 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

C	^1H (δ , ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ , ppm)
1 e 7	7,64 (2H, <i>d</i> , J=16)	141,03
2 e 6	6,69 (2H, <i>d</i> , J=16)	121,86
3	-	184,37
4	5,96 (2H, <i>s</i>)	101,79
5	-	172,03
1'e 1''	-	127,52
2', 2'',	7,54 (2H, <i>m</i>)	130,90
6'e 6''		
3, 3'',	7,63 (2H, <i>m</i>)	116,58
5'e 5''		
4'e 4''	-	160,37
OH	8,91 (2H, <i>s</i>)	-

Ponto de fusão: 115° C

I.V.: ν^{KBr} cm^{-1} : 3400,0; 3223,9; 1600,4; 1563,7; 1513,9; 1442,6; 1341,6; 1138,9; 980,5.

3.3- Análise dos resultados de atividade biológica

Tabela 33- Valores de DL₅₀ das substâncias obtidas.

Substância	DL ₅₀ ±DP (μg/mL)	DL ₅₀ ±DP (μmoles)	Substância	DL ₅₀ ±DP (g/mL)	DL ₅₀ ±DP (μmoles)
1	9,00±2	24,45±5	16	32,56±2	103,03±5
2	17,55±3	38,82±7	17	77,67±4	281,41±6
3	39,24±4	105,48±9	18	113,31±3	407,58±5
4	23,10±2	62,09±5	19	27,32±3	88,70±6
5	51,23±3	136,25±6	20	Inativo	-
6	14,12±2	34,27±5	21	9,16±5	24,89±7
7	31,57±7	76,25±12	22	11,38±3	30,92±7
8	2,00±5	5,05±9	23	53,80±2	162,04±5
9	3,96±7	12,53±13	24	56,65±3	156,49±5
10	1,24±5	2,79±9	25	37,31±4	90,55±7
11	48,50±6	119,45±15	26	41,03±3	134,96±5
12	9,26±1	23,15±3	27	22,46±4	51,75±6
13	27,10±4	59,42±6	28	35,48±5	103,13±7
14	25,32±5	55,52±8	29	18,36±3	59,61±7
15	25,80±8	86,00±15	30	15,32±4	49,74±8
Pentamidina	0,04	0,11			

DP- desvio padrão

Para as substâncias utilizadas neste teste, valores de DL₅₀ até 2,00 μg/mL, foram considerados interessantes para teste *in vivo*.

3.3.1- Comparação entre substâncias β -dicarbonílicas insaturadas e saturadas

Influência da ligação dupla: A perda das duplas ligações leva a uma perda significativa de atividade, quando se compara **8** com **11** e **1** com **4**.

Influência da metilação do grupo *p*-hidróxi: A metilação do grupo *p*-hidróxi leva-nos a crer que o aumento da densidade eletrônica também favorece o aumento da atividade. Talvez, um aumento da lipofilicidade, embora pequeno, mas interessante. Comparando **1** com **8** e **4** com **11**.

3.3.2- Comparação das substâncias β -diidróxi insaturadas com as substâncias β -diidróxi saturadas.

- Neste caso, para substâncias com um sistema β -diidróxi parece que a perda da conjugação afeta a atividade. No entanto, a presença de grupos metóxi parecem favorecer o aumento da atividade.

3.3.3- Comparação dos efeitos das substituições no anel aromático nas substâncias β -dicarbonílicas insaturadas.

- O produto sem substituintes é o menos ativo, o que leva a crer que a substituição é fundamental para o aumento da atividade.

- Grupos doadores de elétrons também favorecem o aumento da atividade. Desta forma, o produto **1** deveria ser mais ativo que o produto **9**, ou pode-se ainda levantar a hipótese de que o substituinte na posição *meta* não afeta ou favorece significativamente o aumento da atividade.

3.3.4- Comparando as substâncias β -dicarboniladas com as β - diidróxi saturadas.

- Comparando as substâncias **5** e **1** é interessante notar que o sistema β -dicarbonílico e β -diidróxi não altera a atividade, por outro lado quando compara-se **11** e **5** é relevante o aumento da atividade do substância β -diidróxi.

3.3.5 – Efeito de proteção do sistema β -dicarbonilado e β - diidróxi sobre a atividade.

- A observação que se faz neste caso é de que no sistema saturado **5** e **7** a proteção dos grupos hidróxi diminui a atividade, e pode-se observar o contrário para o sistema insaturado **3** e **6**.

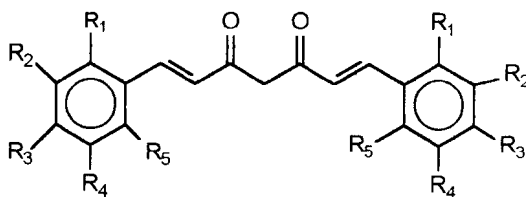
- A proteção das carbonilas interfere de alguma forma na atividade em relação ao substância **1**, nesta comparação devem ser levados em consideração tensões criadas na molécula devido ao grupo volumoso que é inserido.

CAPÍTULO 4- CONCLUSÃO

Como resultado da análise dos testes de atividade biológica das substâncias obtidas, podemos considerar algumas hipóteses sobre a relação entre a estrutura e a atividade destas substâncias:

4.1-Hipóteses sobre a relação entre a estrutura e a atividade dos curcuminóides

- A perda da conjugação, pela redução das ligações duplas, revela a diminuição da atividade biológica, esta diminuição pode ser atribuída a perda da rigidez sofrida pela molécula com a redução, como mostra a tabela a seguir.
- A redução dos grupos carbonila, resulta em queda da atividade biológica, indicada na tabela a seguir.
- Funções oxigenadas ligadas ao anel aromático do curcuminóide parecem favorecer o aumento da atividade biológica independente das suas posições, quando comparado com o produto sem substituintes.



17) $R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=H$ ($LD_{50}= 281,41 \mu\text{moles}$)

30) $R_1=R_2=R_4=R_5=H$, $R_3=OH$ ($LD_{50}= 49,74 \mu\text{moles}$)

10) $R_1=R_4=R_5=H$, $R_2=OCH_3$, $R_3=O-CH_2-C\equiv H$ ($LD_{50}= 2,79 \mu\text{moles}$)

9) $R_1=R_4=R_5=H$, $R_2=R_3=OH$ ($LD_{50}= 12,53 \mu\text{moles}$)

1) $R_1=R_4=R_5=H$, $R_3=OH$, $R_4=OCH_3$ ($LD_{50}= 24,45 \mu\text{moles}$)

21) $R_1=OH$, $R_2=R_4=R_5=H$, $R_3=OCH_3$ ($LD_{50}=24,89 \mu\text{moles}$)

22) $R_1=OH$, $R_2=R_3=R_5=H$, $R_4=OCH_3$ ($LD_{50}=30,92 \mu\text{moles}$)

- Outras substituições no anel aromático diferentes das funções oxigenadas, parecem não favorecer o aumento da atividade biológica. Como nas substâncias **23 à 28**.

4.2-Hipótese sobre o mecanismo de ação.

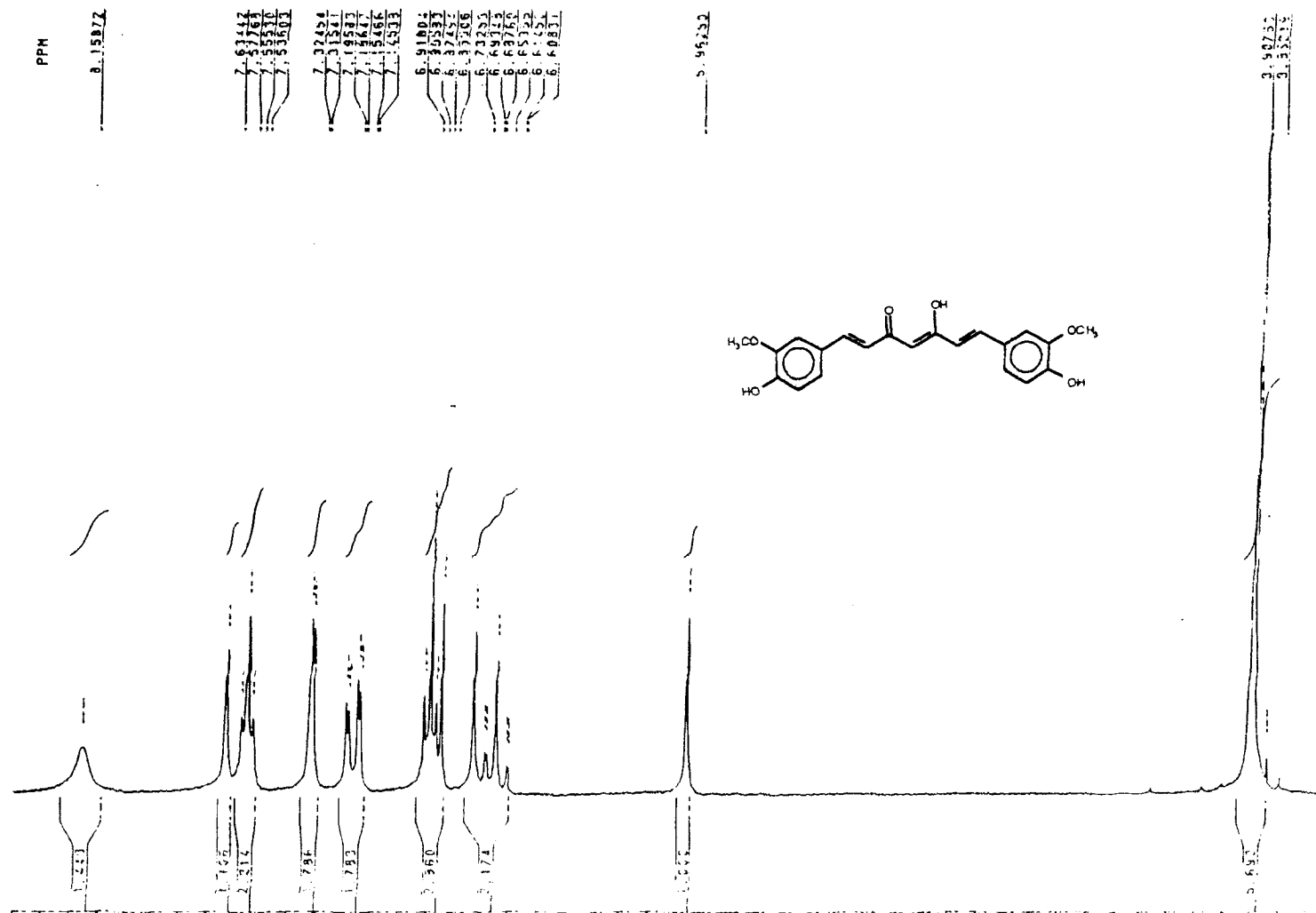
Conforme foi amplamente exposto na discussão deste trabalho sobre mecanismo de ação da curcumina em diversas atividades biológicas relatados na literatura, poderíamos levantar algumas hipóteses sobre o mecanismo de ação das substâncias obtidas neste trabalho sobre às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* em cultura:

- É nitidamente observado que a propriedade antioxidante da curcumina é a principal responsável pelas suas atividades biológicas, na captura de radicais livres.
- Observamos que todas as substâncias testadas que possuem substituintes oxigenados no anel aromático, foram também aquelas que apresentaram uma maior atividade biológica, o que sugere que estas substâncias também podem possuir o mesmo modo de ação da curcumina.
- Uma outra hipótese a ser sugerida como modo de ação de nossas substâncias é aquela onde existe a interação das substâncias α,β - insaturadas com o sistema de biotransformação relacionados à glutathione.
- A substância **10** que apresentou o menor valor de DL_{50} , teve a sua atividade atribuída a presença do grupo propargila inserido na hidroxila fenólica, o que lhe confere um maior caráter lipofílico.

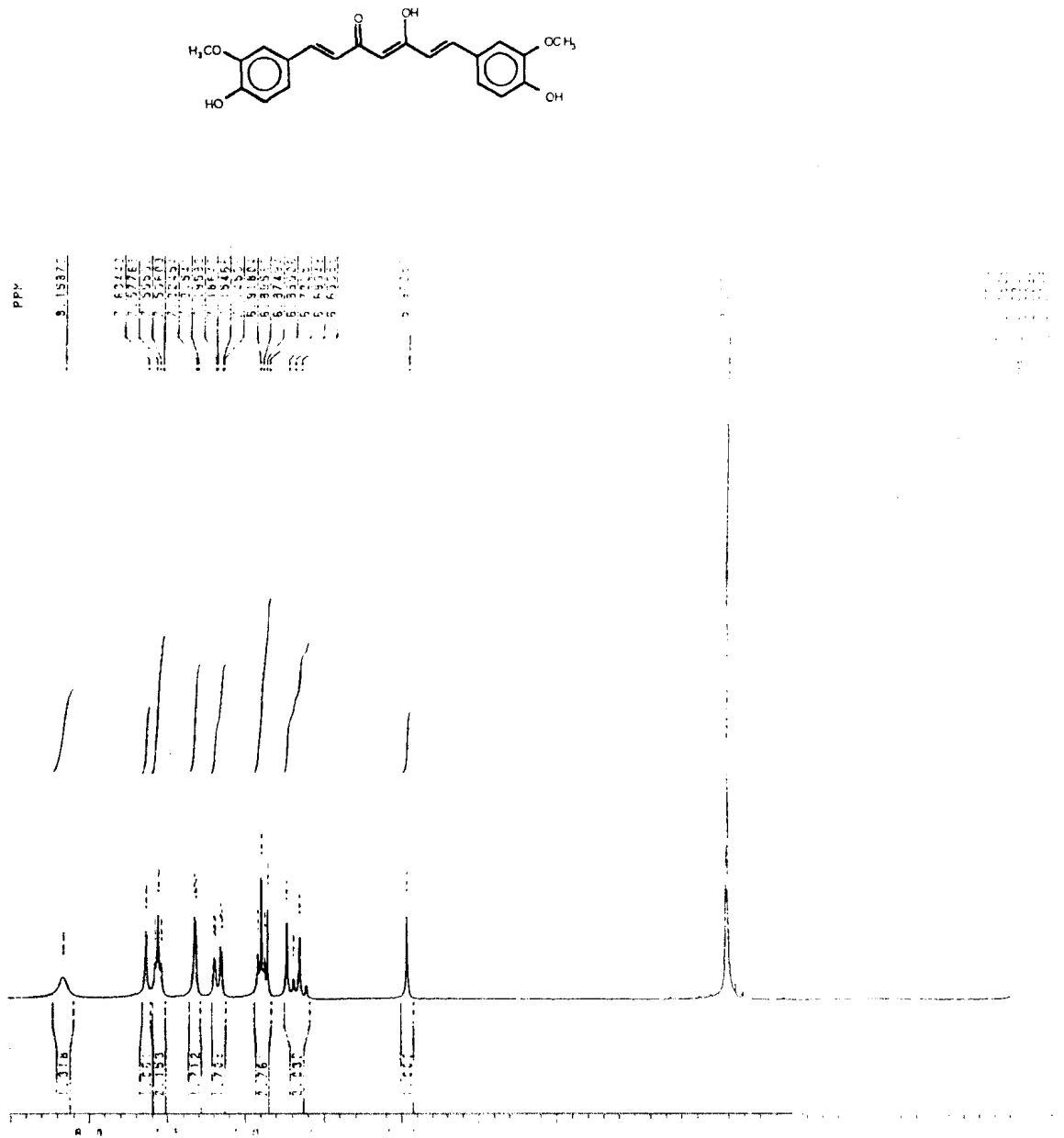
Para finalizar nossas conclusões verificamos que nossas substâncias apresentaram de um modo geral uma atividade biológica representativa quando comparados com a pentamidina **(23)**.

Com este trabalho esperamos ter contribuído para a busca de novos quimioterápicos, menos tóxicos que a pentamidina, que poderão ser posteriormente avaliados para outras formas de *leishmania*. Há necessidade de aprofundar estes estudos *in vitro* e a realização de testes *in vivo*, até se chegar a indicações de novas moléculas que possam efetivamente ser usadas como novos agentes quimioterápicos.

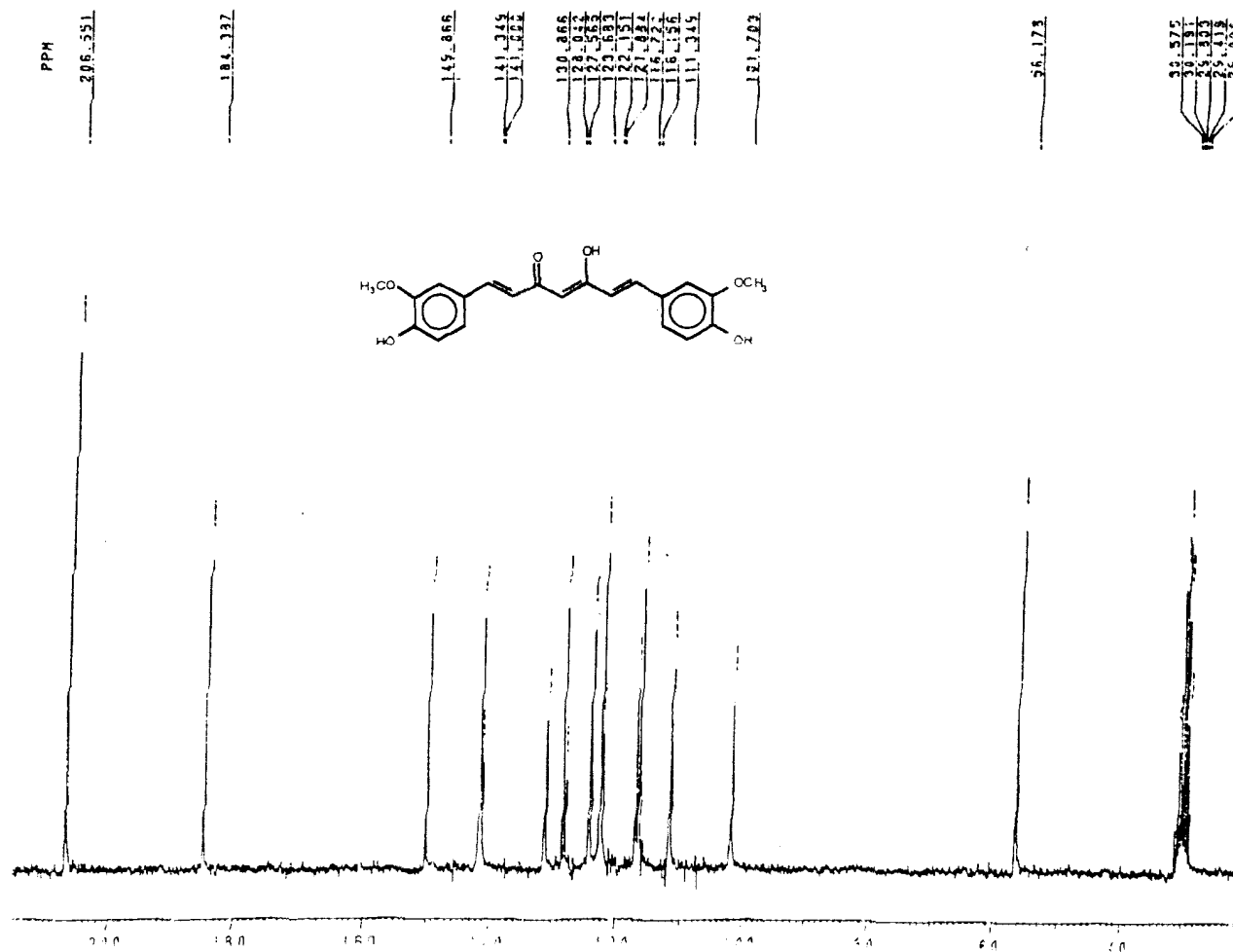
CAPÍTULO 5- ESPECTROS



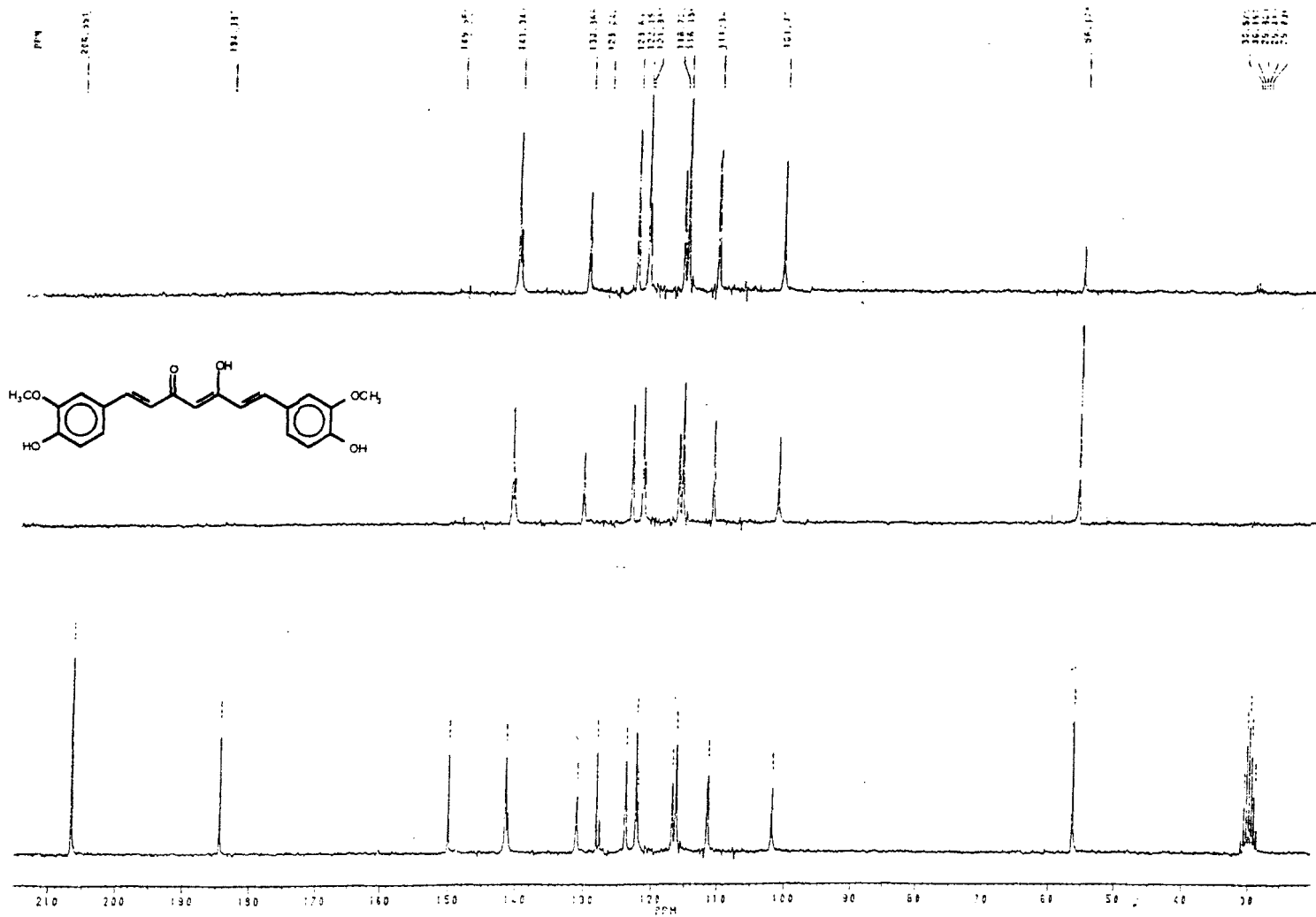
Espectro1: Espectro de RMN¹H (200 MHz), da curcumina 1 em (CD₃)₂CO .



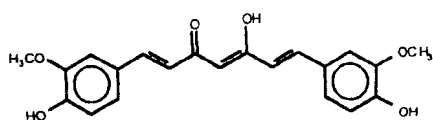
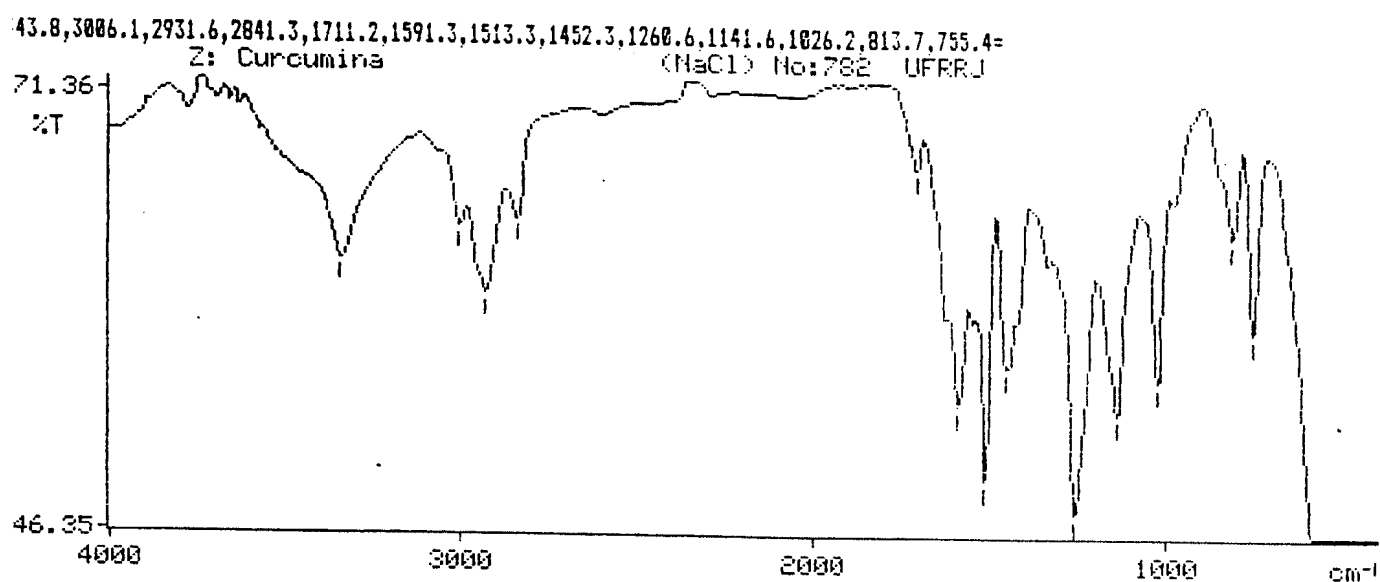
Espectro 2: Espectro de RMN¹H (200 MHz), da curcumina 1 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.



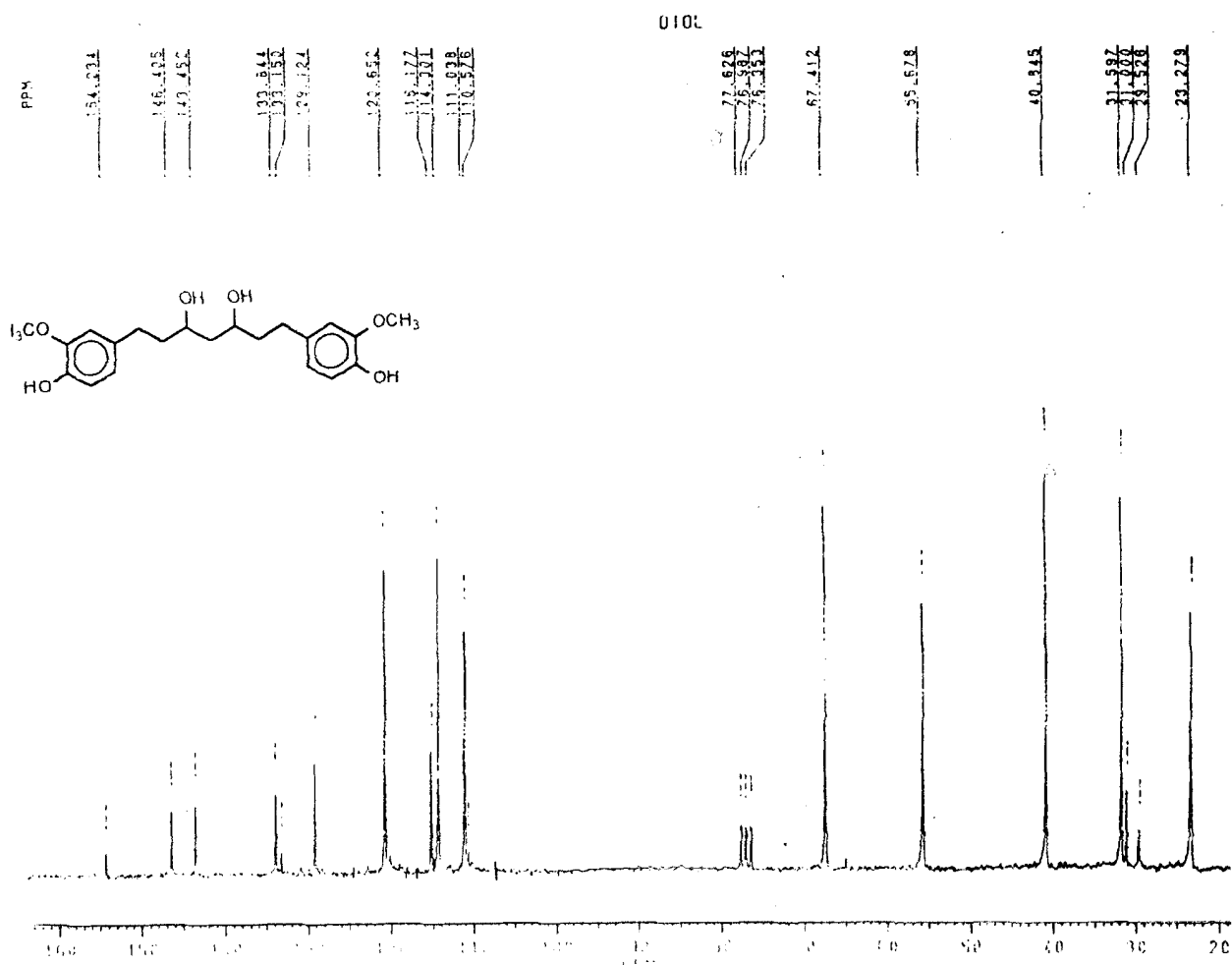
Espectro 3: Espectro de RMN¹³C (50,3 MHz), totalmente desacoplado da curcumina 1 em (CD₃)₂CO.



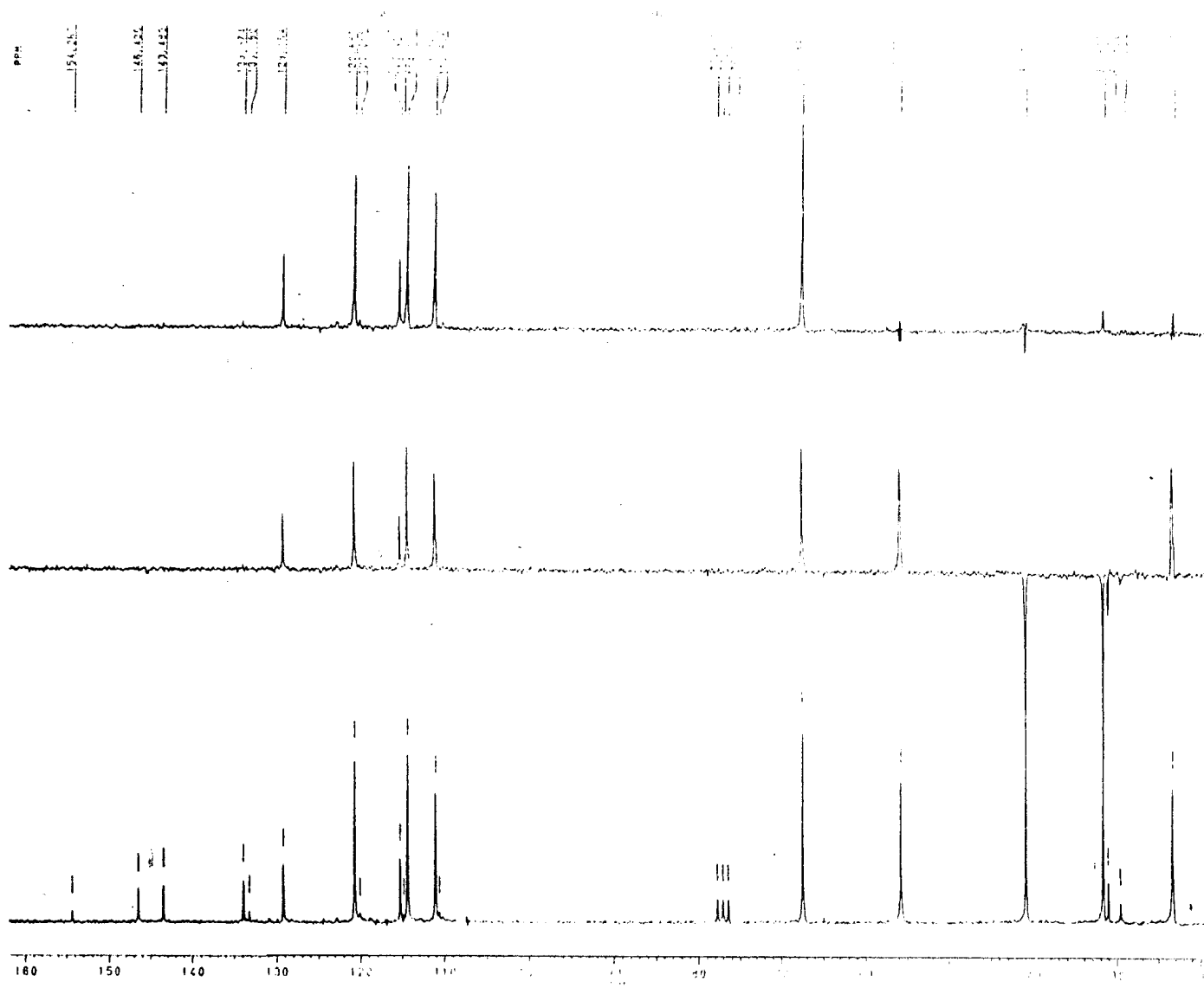
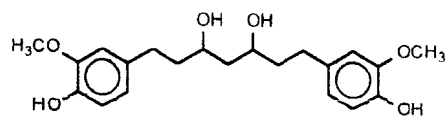
Espectro 4: Espectro de RMN¹³C (50,3 MHz), DEPT, da curcumina **1** em (CD₃)₂CO .



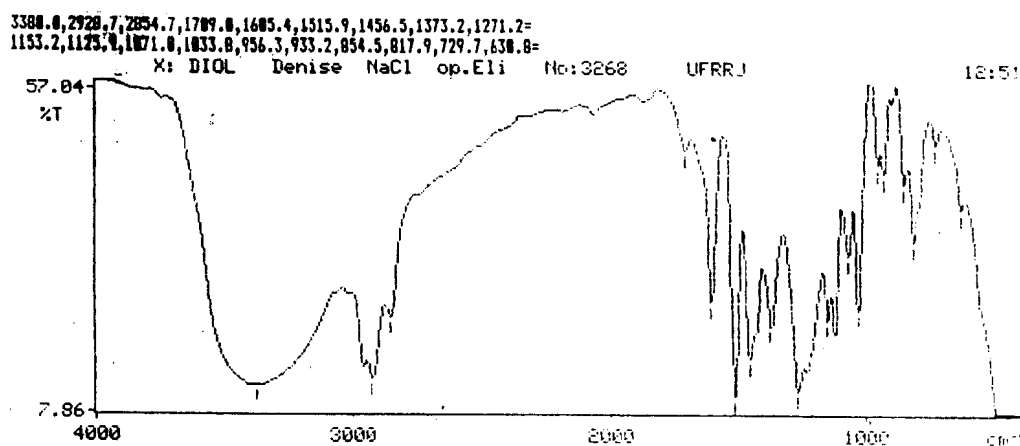
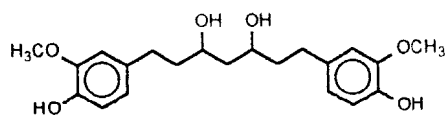
Espectro 5: Espectro na região do infravermelho de curcumina 1, em NaCl.



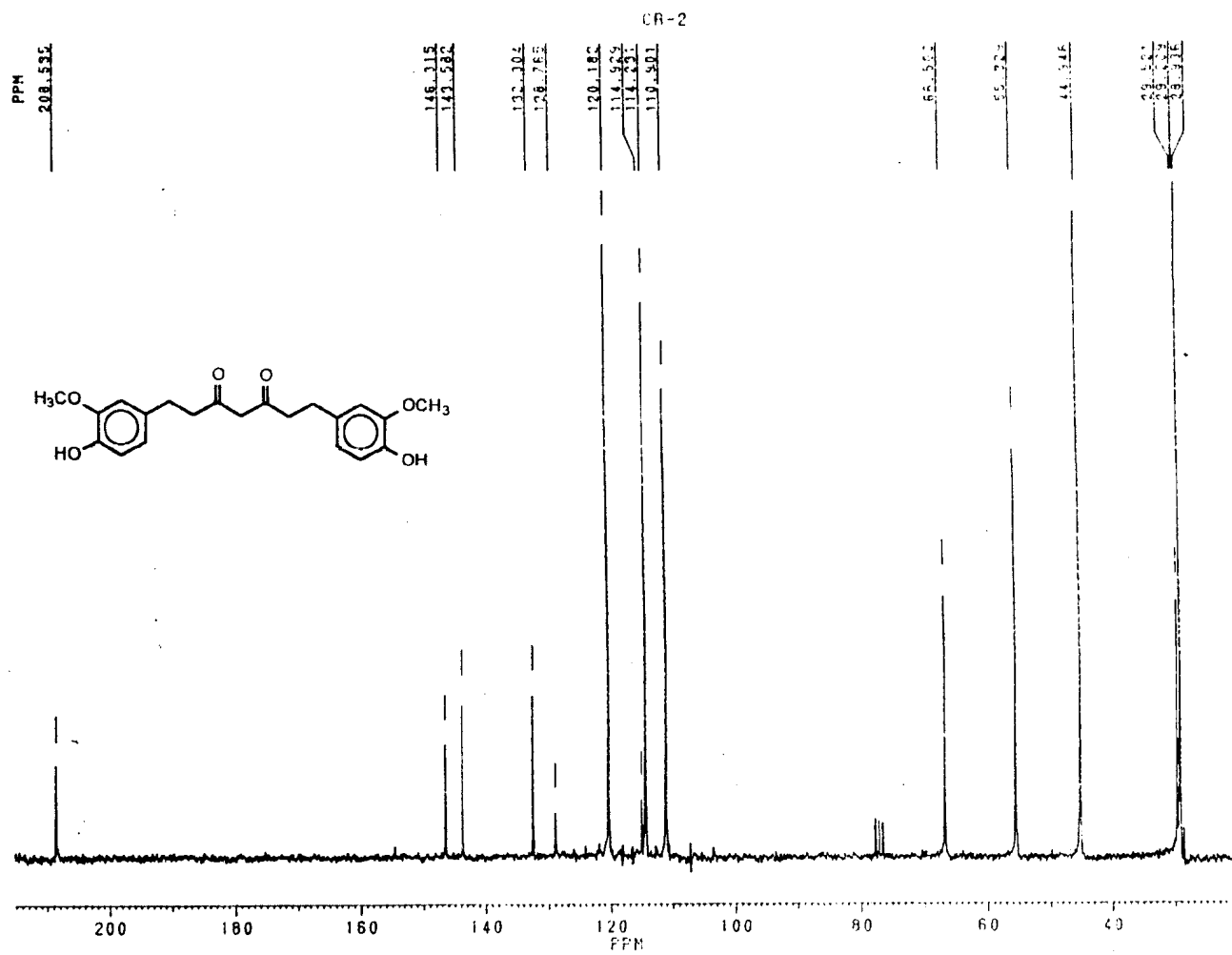
Espectro 7: Espectro de RMN¹³C (50,3 MHz), totalmente desacoplado, da substância 3 em CDCl₃.



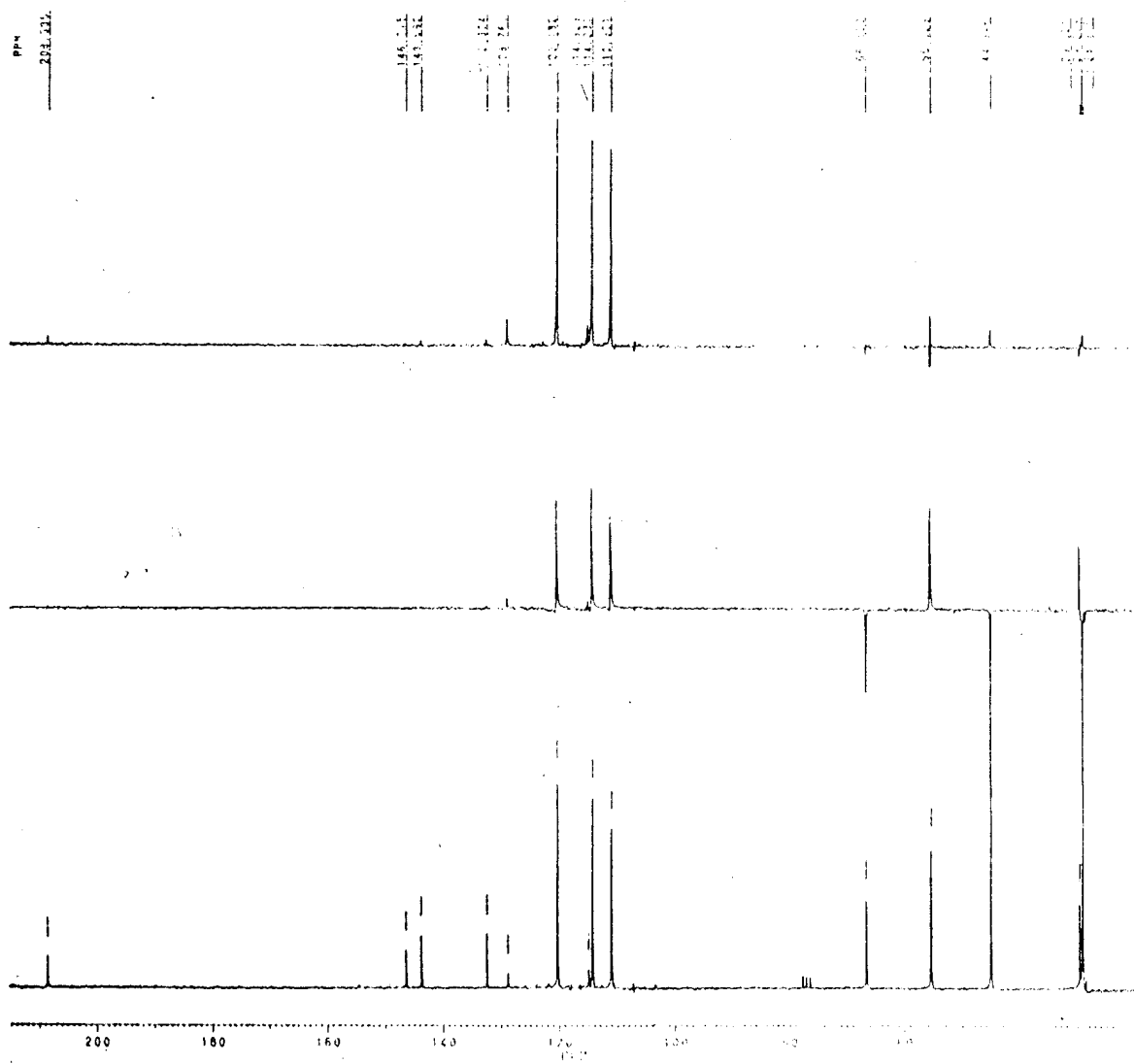
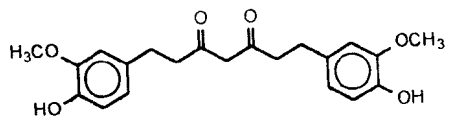
Espectro 8: Espectro de RMN¹³C (50,3 MHz), DEPT da substância 3em CDCl₃.



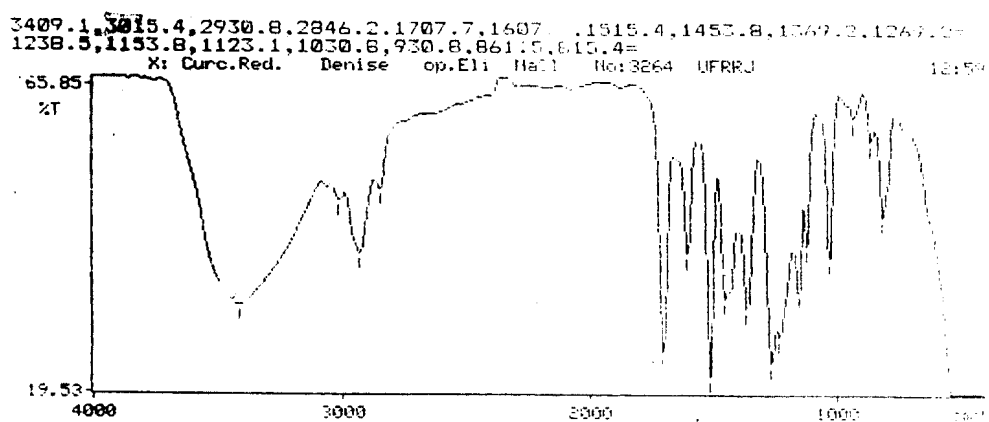
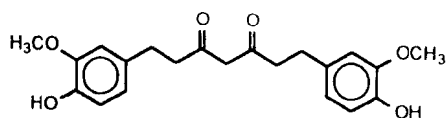
Espectro 9: Espectro na região do infravermelho da substância 3 em pastilha de NaCl.



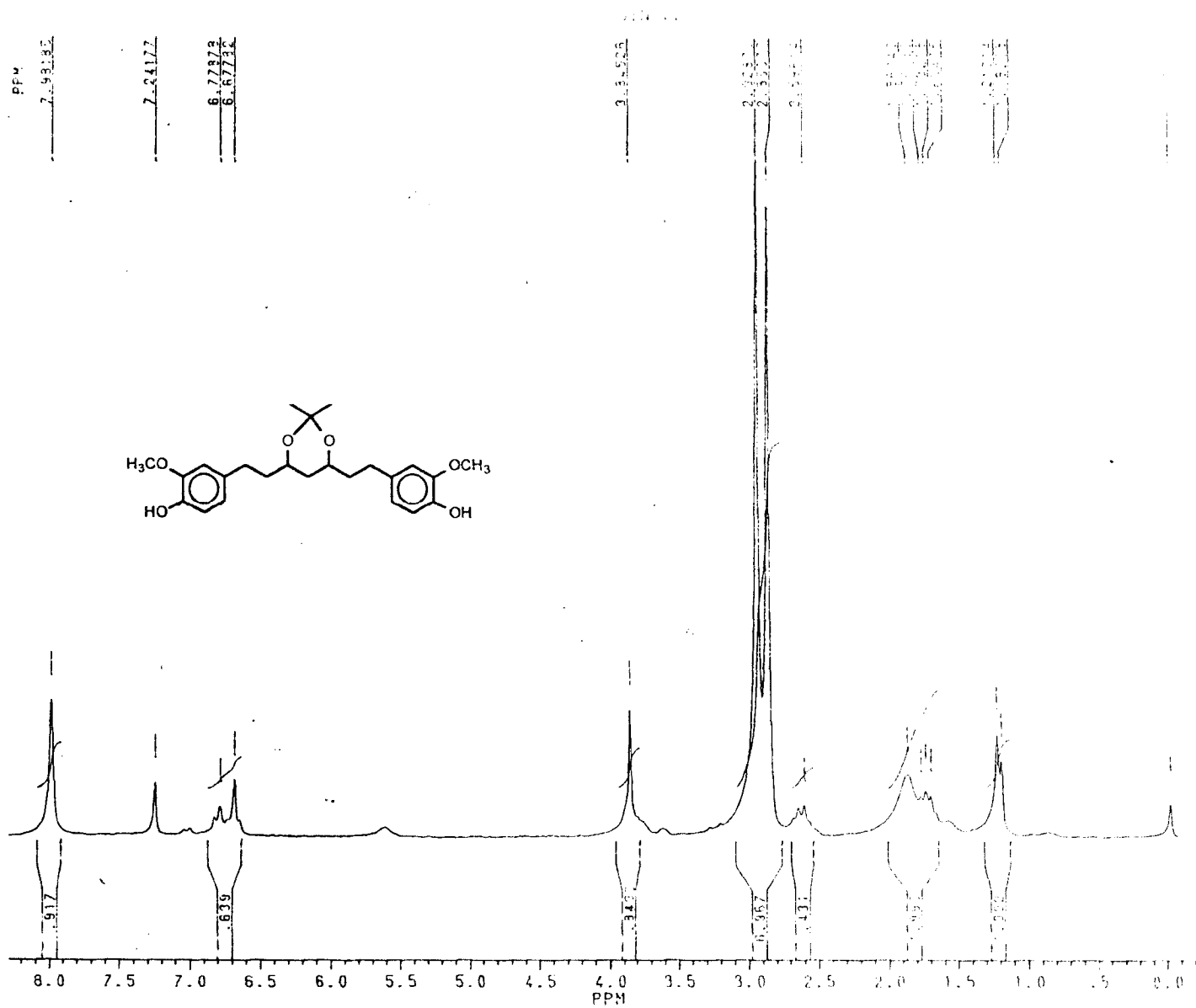
Espectro 11: Espectro de RMN¹³C (50,3 MHz), totalmente desacoplado da substância 4 em CDCl₃.



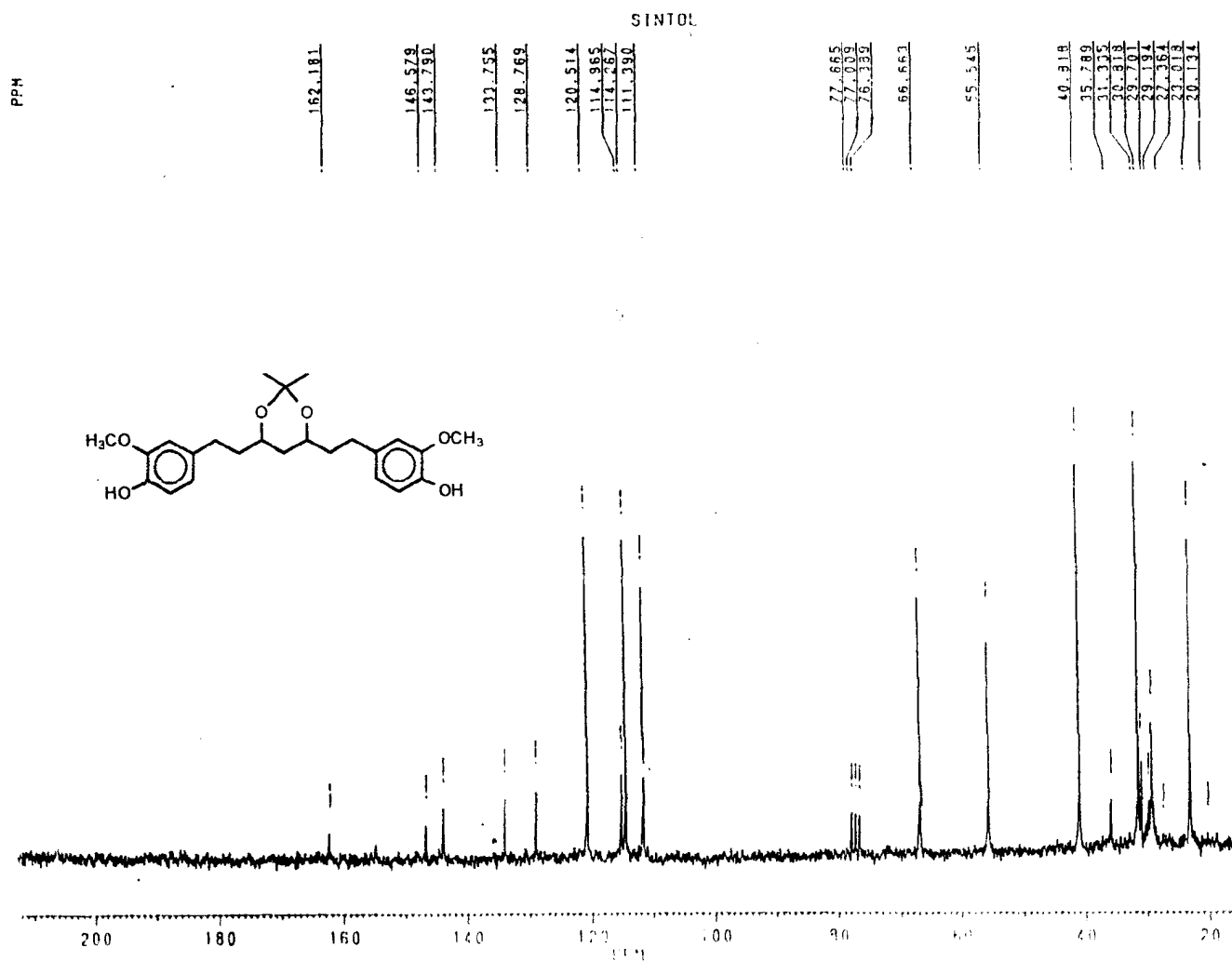
Espectro 12: Espectro de RMN^{13}C (50,3 MHz), DEPT da substância 4 em CDCl_3 .



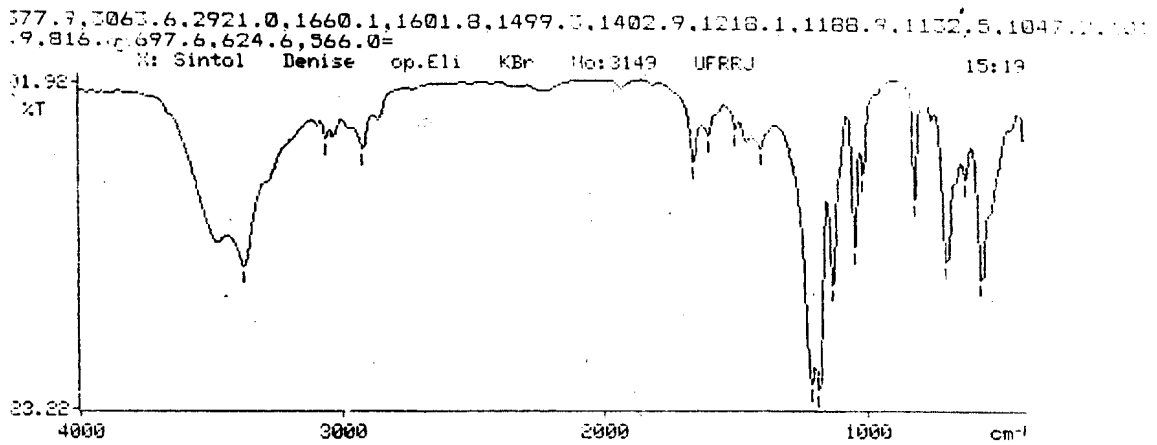
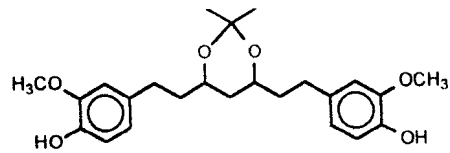
Espectro 13: Espectro na região do infravermelho em pastilha de NaCl.



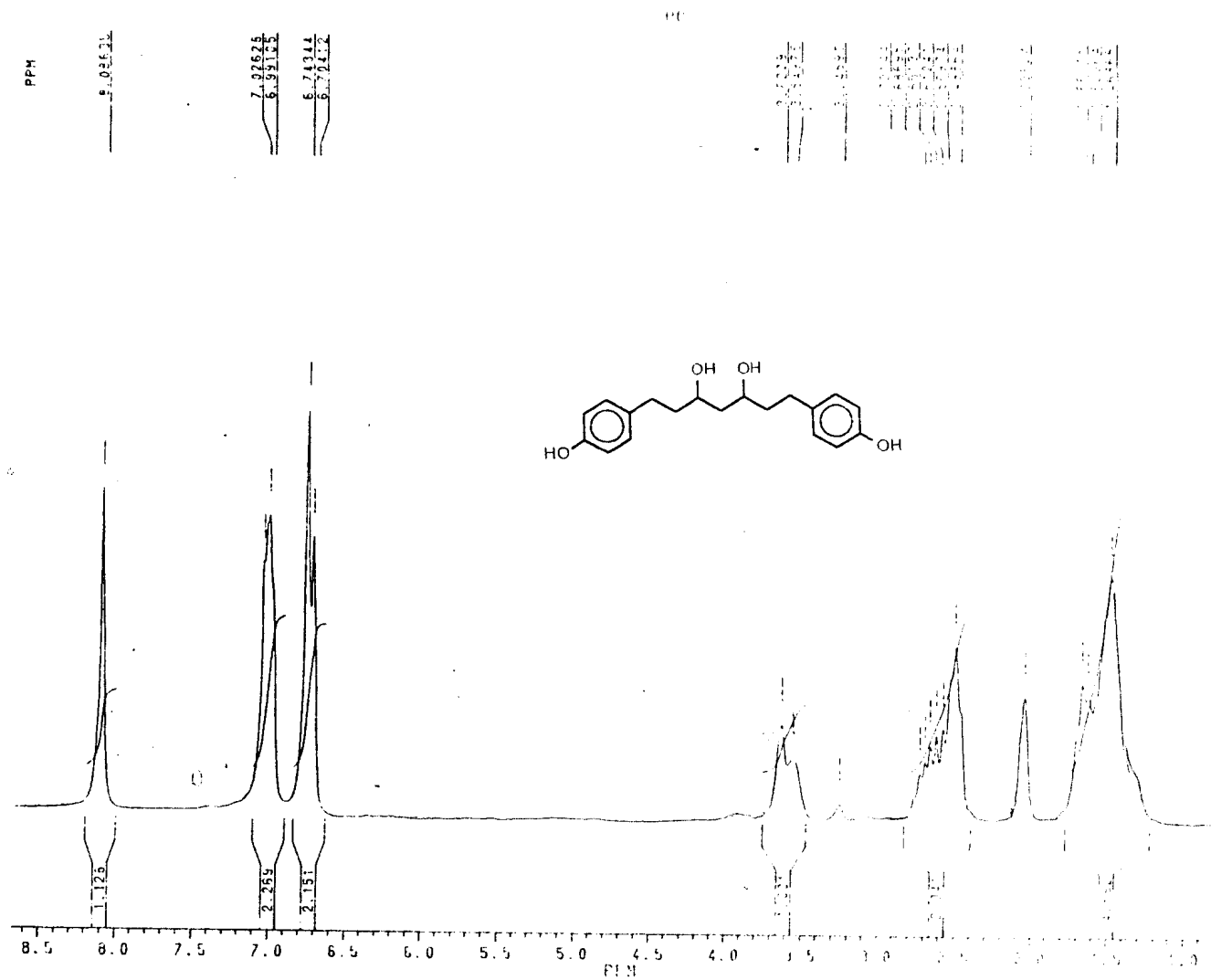
Espectro 14: Espectro de RMN ^1H (200 MHz), da substância 7 em CDCl_3 .



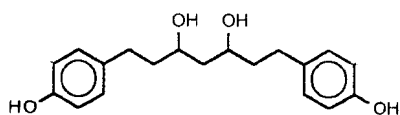
Espectro 15: Espectro de RMN¹³C (50,3 MHz), totalmente desacoplado da substância 7 em CDCl₃.



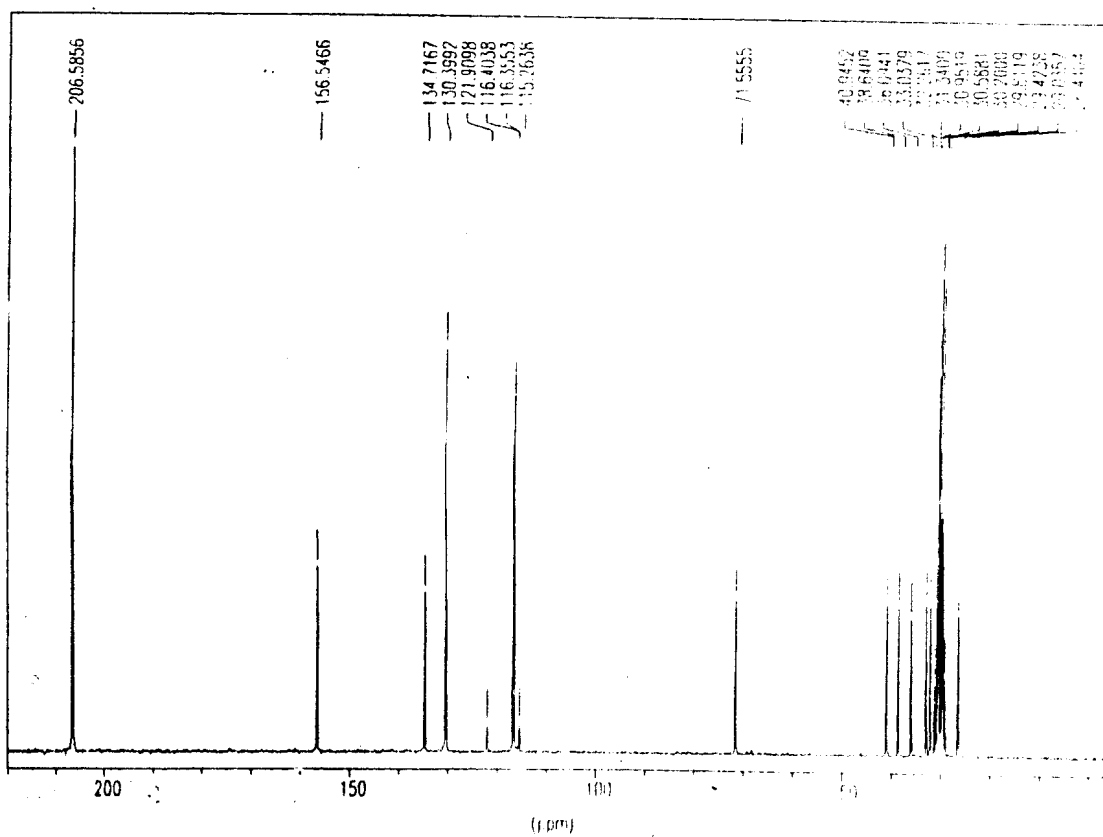
Espectro 17: Espectro na região do infravermelho da substância 7 em pastilha de NaCl.



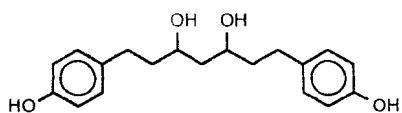
Espectro 18: Espectro de RMN¹H (200 MHz), da substância 16 em (CD₃)₂CO.



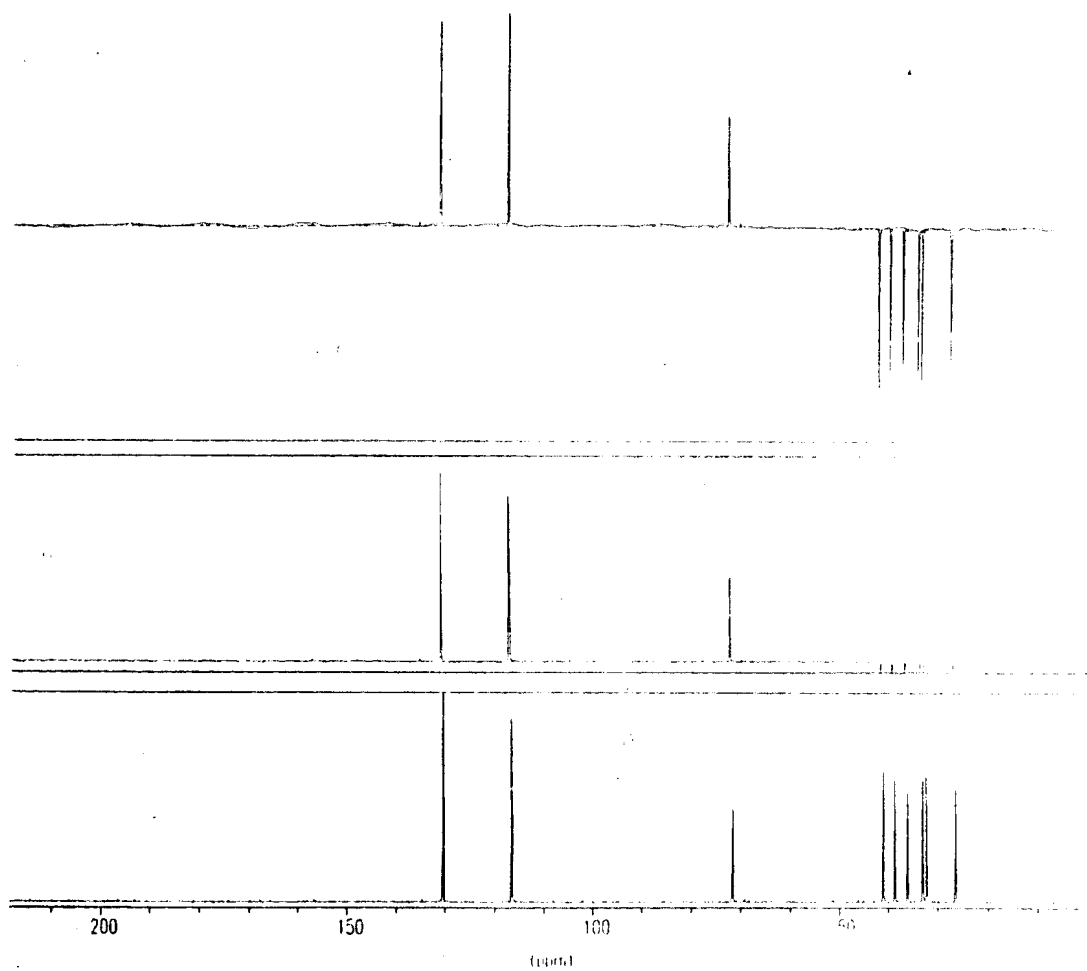
HC



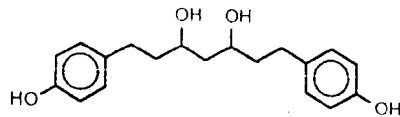
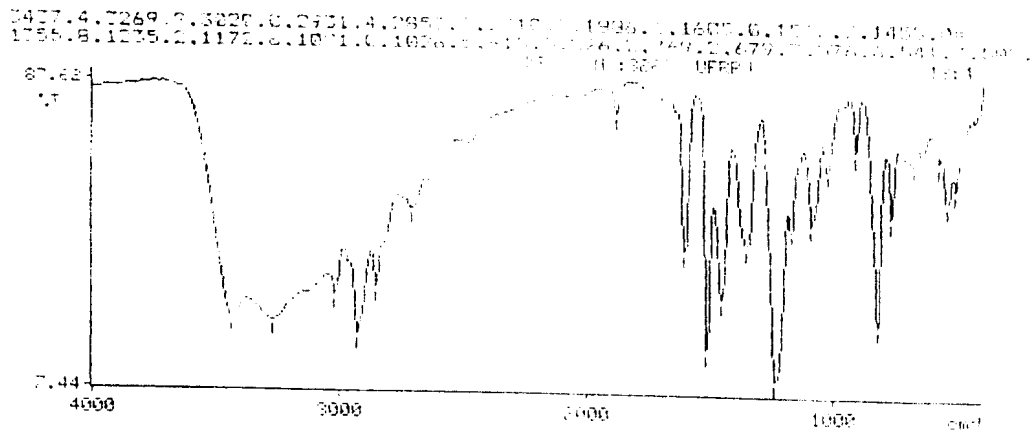
Espectro 19: Espectro de RMN¹³C (50,3 MHz), totalmente desacoplado da substância **16** em (CD₃)₂CO.



16 (DEPT 135, 90, 45)



Espectro 20: Espectro de RMN¹³C (50,3 MHz), DEPT da substância 16 em (CD₃)₂CO.



Espectro 21: Espectro na região do infravermelho da substância 16 em pastilha de KBr

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEGRIO L.V., Braz-Filho, R., Gottlieb, O.R., Diarylheptanoids and isoflavonoids from *Centrolobium* species, 1989, 28(9), 2359-2362.

- ALI, M., Bagati A., Gupta J., Synthesis and anti-inflammatory activity of some curcumin analogues, *Indian Journal of Chemistry*, 1995, 34B, 884-888.

- ALVAR, J., Leishmaniasis and AIDS co-infection: The spanish example. *Parasitol. Today*, 1994, 10, 160-165.

- AMMON, H.P.T., Safhayhi, H., Mack, T. and Sabieraji J., Mechanism of antiinflammatory actions of curcumine and boswellic acids, *J. Ethnopharmacol.*, 1993, 38, 113-119.

- ANNUAL REPORTS, Central Plantaton Crops Research Institute, Kasaragod, Índia, 1974 and 1975; personal communication, 1977.

- ARAÚJO, C. A .C., Alegrio, L.V., Gomes, D.C.F., Lima, M.E.F., Leon, L.L., Studies on effectiveness of diarylheptanoids derivatives against *Leishmania amazonensis*, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1999, 94(6), 791-794.

- ARTICO, M., Di Santo, R., Costi, R., Novellino, E., Greco, G., Massa, S., Tramontano, E., Marongiu, M. E., De Montis, A., La Colla, P., Geometrically and conformationally restrained cinnamoyl compounds as inhibitors of HIV-1 integrase: synthesis, biological evaluation, and molecular modeling, *J. Med. Chem.*, 1998, 41, 3948-3960.

- BLUMENTHAL, M., Santa Maria feverfew, not the feverfew of commerce. *HerbalGram*, 25, 1991.

- BOONE, C.W., Steele, V.E., Kelloff, G.J., Screening for chemopreventive (anticarcinogenic) compounds in rodents, *Mutation Research*, 1995, 267, 251-255.

- BOUVIER, G., Hergenbahn, M., Polack, A., Bornkamm, G.W., Bartsch, H., Validation of two test systems for detecting tumor promoters and EBV inducers: comparative responses of several agents in DR-CAT Raji cells and in human granulocytes, *Carcinogenesis*, 1993, 14(8), 1573-1578.

- BRENER, Z., Krettli, A.U., Immunology of Chaga's disease. In Wyler DL (ed): Modern Parasite Biology: Cellular, Immunological and Molecular Aspects. WH Freeman, New York, 1990.

- BRITISH Pharmacopeia. HMSO, London, 1973, 439-440.

- BRYAN, R.T., Balderrama F., Tonn R.J., *et al.* Community participation in vector control: lessons from Chaga's disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1994, 50-61.

- BRYCESON, A. D. M., Chulay, J.D., Mugambi M., Were, J.B., Gachihi, G., Chung, C.N., Visceral *leishmaniasis* unresponsive to antimonial drugs II: response to high-dose sodium stibogluconate treatment with pentamidine, *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1985, 79, 705-714.

- BRYCESON, A. D. M., *Leishmaniases*. In: Wyngaarden, J.B., Smith Jr., L.H., editors. Cecil textbook of medicine. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1980, 815-818.

- BRYCESON, A. D. M., Diffuse cutaneous *leishmaniasis*: treatment, *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1970, 64, 369-379.

- BURKE, T.R. Jr., Fesen, M.R., Mazumder, A., Wang, J., Carothers, A. M., Grunberger, D., Driscoll, J., Kohn, K., Pommier, Y., Hydroxylated aromatic inhibitors of HIV-1 integrase, *J. Med. Chem.*, 1995, 38, 4171-4178.
- CHAN, M.M.Y., Inhibition of tumor necrosis factor by curcumin, a phytochemical, *Biochemical Pharmacol.*, 1995, 49(11), 1551-1556.
- CHULAY, J. D., Spencer, H.G., Mugambi, M., Electrocardiographic changes during treatment of *leishmaniasis* with pentavalent antimony (sodium stibogluconate), *Am. J. Trop Med Hyg*, 1985, 34, 702-709.
- CLAESON, P., Panthong, A., Tuchinda, P., Reutrakul, V., Kanjanapothi, D., Taylor, W.C., Santisuk, T., Three non-phenolic diarylheptanoids with anti-inflammatory activity from *Curcuma xanthorrhiza*, *Planta Med.*, 1993, 59, 451-454.
- CLAESON, P., Pongprayoon, U., Sematong, T., Tuchinda, P., Reutrakul, V., Soontornsaratune, P., Taylor, W.C., Non-phenolic linear diarylheptanoids from *Curcuma xanthorrhiza*: A novel type of topical anti-inflammatory agents: Structure-activity relationship, *Planta Med.*, 1996, 62, 236-240.
- CONVIT, J., Ulrich, M., Fernández C.T., et al., The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis, *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1993, 87, 444-449.

- CRAWLEY, M.J., *Herbivory: The dynamics of animal – Plant interaction. Studies in Ecology*, Berkeley: University of California Press, 10, 1983.
- CUVELIER, M.E., Richard, H., Berset, C., Comparison of antioxidative activity of some acid-phenols: structure-activity relationship, *Biosci. Biothec. Biochem.*, 1992, 56, 324-325.
- DONATUS I. A., Nico S., Vermeulen P. E., Cytotoxic and cytoprotective activities of curcumin, *Biochemical Pharmacology*, 1990, 39(12), 1869-1875.
- ENGELMAN, A., Bushman, F. D., Craigier, R., Identification of discrete functional domains of HIV-1 integrase and their organization within an active multimeric complex. *EMBO J.*, 1993, 12, 3269-3275.
- FESEN M. R., Pommier Y., Leteurtre F., Hiroguchi S., Yung J., Kohn K. W., Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and related compounds, *Biochemical Pharmacology*, 1994, 48(3), 595-608.
- GANOR, S., The treatment of *leishmaniasis* residuals with local injections of amphotericin B, *Dermatol. Int.*, 1967, 6, 141-143.
- GOVINDARAJAN V.S., Turmeric-chemistry, technology and quality, *CRC critical Reviews in food*, 1980, 199-301.

- GRUNBERGER, D., Banerjee, R., Eisinger, K., Oltz, E.M., Efros, L., Caldwell, M., Estevez, V., Nakanishi, K., Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis, *Experientia*, 1988, 44, 230-232.
- HALEY, T.J., Bernedt, W.O., Handbook of Toxicology, Hemisphere Publishing Corp., Washington, 1987.
- HANAZAWA, S., Takeshita, A., Amano, S., Semba, T., Nirazuka, T., Katoh, H., Kitano, S., Tumor necrosis factor- α induces expression of monocyte chemoattractant JE via *fos* and *jun* genes in clonal osteoblastic MC3T3-E1 cells, *The journal of biological chemistry*, 1993, 268(13), 9526-9532.
- HEBY, O., Luk, G.D., Schindler, J., Polyamine synthesis inhibitors act as both inducers and suppressors of cell differentiation, *Inhibition of polyamine metabolism*, 1987, 165-186.
- HOBBS, C., Foundations of Health: The liver & Digestive Herbal, by Botanical Press, 1990, 25-28.

- HONTEBEYRIE-JASKOWICZ M., Immunopathologie de la trypanosomiase américaine, *Bull. Inst. Pasteur*, 1993, 91, 75-80.
- HUANG, M. T., Lou Y.R., Ma W., Newmark H.L., Reuhi K.R., Conney A. H., Inhibitory effects of dietary curcumin on Forestomach, duodenal, and colon carcinogenesis in mice, *Cancer Research*, 1994, 54, 5841-5847.
- HUANG, M. T., Lysz T., Ferraro T., Abidi T. F., Laskin J. D., Conney A. H., Inhibitory effects of curcumin on *in vitro* lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis, *Cancer Research*, 1991, 51, 813-819.
- HUANG, M. T., Smart R. C., Wong C. Q., Conney A. H., Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O- Tetradecanoylphorbol-13-acetate, *Cancer Research*, 1988, 48, 5941-5946.
- HUANG, M. T., Wang Z. Y., Georgiadis C. A., Laskin J. D., Conney A.H., Inhibitory effects of curcumin on tumor initiation by benzo [a] pyrene and 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene, *Carcinogenesis*, 1992, 13(11), 2183-2186.
- HUANG, T.S., Lee, S.C., Lin, J.K., Suppression of c-Jun/AP-1 activation by an inhibitor of tumor promotion in mouse fibroblast cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1991, 88, 5292-5296.

- IERSEL, M.V., Interactions of α,β -insaturated carbonyl compounds with the glutathione related biotransformation system, *Research report M&T Mail*, 1998, 6(2), 103-109.

- JANAKI, N. and Bose, J.L., Na improved method for the isolation of curcumin from turmeric, *Curcuma longa*, L., *J. Indian Chem. Soc.*, 1985, 44, 985-990.

- JOLLIFE, D.S., Cutaneous *leishmaniasis* from Belize: treatment with ketoconazole, *Clin. Exp. Dermatol.*, 1986, 11, 62-68.

- IWAKAMI, S., Shibuya, M., Tseng, C.F., Hanaoka, F., Sankawa U., Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase by phenolic compounds, *Chem. Pharm. Bull.*, 1986, 34(9), 3960-3963.

- JOE, B., Lokesh, B.R., Role of capsaicin, curcumin and dietary $n - 3$ fatty acids in lowering the generation of reactive oxygen species in rat peritoneal macrophages, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1994, 1224, 255-263.

- KANEKO, T., Kaji, K., Matsuo, M., Protection of linoleic acid hydroperoxide-induced cytotoxicity by phenolic antioxidants, *Free radical Biology & Medicine*, 1994, 16(3), 405-409.

- KATZ, R.A ., Merkel, G., Kulkosky, J., Leis, J., Skalka, A.M., The avian retroviral IN protein is both necessary and sufficient for integrative recombination *in vitro*. *Cell.*, 1990, 63, 87-95.

- KIKUZAKI, H., nakatani, N., Antioxidant effects of some Ginger constituents, *Journal of food science*, 58 (6), 1993, 1407-1410.

- KIUCHI, F., Goto Y., Sugimoto N., Akao N., Kondo K., Tsuda Y., Nematocidal activity of turmeric: synergistic action of curcuminoids, *Chem. Pharm. Bull.*,1993, 41(9), 1640-1643.

- LA FEMINA, L.R., Graham P.L., LeGrow K., Hastings J. C., Wolfe A., Young S. D., Emini E. A., Hazuda D. J., Inhibition of human Immunodeficiency virus integrase by Bis-Catechols, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1995, 39(2), 320-324.

- LARSON, R.A., Review – The antioxidants of higher plants, *Phytochemistry*, 1988, 27(4), 969-978.

- LI, C. J., Zhang, L.J., Dezube, B.J., Crumpacker, C.S. and Pardee, A.B., Three inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90, 1839-1842.

- LIU, J. Y., Lin S. J., Lin J. K., Inhibitory effects of curcumin on protein kinase C activity induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate in NIH 3T3 cells, *Carcinogenesis*, 1993, 14(5), 857-861.
- LU, Y.P., Chang, R.L., Huang, M.T., Conney, A.H., Inhibitory effect of curcumin on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced increase in ornithine decarboxylase mRNA in mouse epidermis, *Carcinogenesis*, 1993, 14(2), 293-297.
- MAEGRATH, B., *Clinical tropical diseases*, 7th edition. London: Blackwell Scientific Publications, 1980, 12, 184.
- MAHESHWARI, P. and Singh, U., *Dictionary of Economic Plants in India*, Indian Council of Agricultural Research, New Dheli, 1965.
- MANAHAN, S.E., *Toxicological Chemistry; a guide to Toxic Substances in Chemistry*, 1989, Lewis Publishers, Inc.
- MASUDA, T., Junko, I., Jitoe, A., Nakatani, N., Antioxidative curcuminoids from rhizomes of *Curcuma xanthorrhiza*, *Phytochemistry*, 1992, 31(10), 3645-3647.

- MASUDA, T., Jitoe, A., Antioxidative and antiinflammatory compounds from Tropical Gingers: Isolation, Structure determination, and activities of cassumunins A, B and C, new complex curcuminoids from *Zingiber cassumunar*, *J. Agric. Food. Chem.*, 1994, 42, 1850-1856.
- MASUDA, T., Jitoe, A., Mabry, T.J., Isolation and structure determination of cassumunarins A, B, C: New anti-inflammatory antioxidants from a Tropical Ginger, *Zingiber cassumunar*, *JAOCS*, 1995, 72 (9), 1053-1057.
- MAYER, F., The chemistry natural coloring matters, New York, 1943, 93.
- MAZUMDER, A., Raghavan K., Weinstein J., Kohn K. W., Pommier Y., Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 integrase by curcumin, *Biochemical Pharmacology*, 1995, 49(8), 1165-1170.
- MAZUMDER, A., Neamati, N., Sunder, S., Schulz, J., Pertz, H., Eich, E., and Pommier, Y., Curcumin analogues with altered potencies against HIV-1 integrase as probes for biochemical mechanisms of drug action, *J. of Med. Chem.*, 1997, 40(19), 3057-3063.
- MELCHIOR, H. and Kastner, H., *Kurcuma in Gewurz, Botanische und Chemische Untersuchung*, Verlag Paul Paray, Berlin, 1974, 157.

- MEYER, M., Schreck, R., Baeuerle, A.P., H₂O₂ and antioxidatives have opposite effects on activation of NF- κ B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor, *The EMBO Journal*, 1993, 12(5), 2005-2015.

- MUKHOPADHYAY A., Basu N., Ghatak N.,Gujral, P. K., Anti-inflammatory and irritant of curcumin analogues in rats, *Agents and actions*, 1982, 12(4), 508-515.

- NAGABHUSHAN, M., Amonkar, A.J., Bhide, S.V., *In vitro* antimutagenicity of curcumin against environmental mutagens, *Fd. Chem. Toxicol.*, 1987, 25(7), 545-547.

- OSHIMA, H., Bartsch, H., Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis, *Mutation Research*, 1994, 305, 253-264.

- OSTER, C.N., Chulay, J.D., Hendricks, L.D., McGarvy, P.B., Takafuji, E.J., Pamplan, C.L., American cutaneous *leishmaniasis*: a comparison of three sodium stibogluconate treatment schedules, *Am. J. Trop.Med. Hyg.*, 1985, 34, 856-860.

- PABON, H. J. J., A synthesis of curcumin and related compounds, *Recueil*, 1964, 83, 379-386.
- PARRY, J.W., Spices, Vol. 1 – The story of spices and spices described, Vol. 2, Morphology, histology and chemistry, *Chemical Publishing*, New York, 1969.
- PENTREATH, V.W., Neurobiology of sleeping sickness, *Parasitol. Today*, 1993, 5, 524-528.
- PETRY, K., Eisen, H., Chaga's disease: A model for the study of autoimmune diseases, *Parasitol Today*, 1989, 5, 111-115.
- RAJAKUMAR, D.V., Rao, M.N. A., Antioxidant properties of dehydrozingerone and curcumin in rat brain homogenates, *Molecular and cellular Biochemistry*, 1994, 140, 73-79.
- RAO, T.S., Basu N., Siddiqui H.H., Anti-inflammatory activity of curcumin analogues, *Indian J. Med. Res.*, 1982, 75, 574-578.
- RAO, C. V., Tokomo K., Kelloff G., Reddy B. S., Inhibition by dietary oltipraz of experimental intestinal carcinogenesis induced by azoxymethane in male F344 rats, *Carcinogenesis*, 1991, 12(6), 1051-1055.

- RAO, C.V., Simi B., Reddy B. S., Inhibition by dietary curcumin of azoxymethane-induced ornithine decarboxylase, tyrosine protein kinase, arachidonic acid metabolism and aberrant crypt foci formation in the rat colon, *Carcinogenesis*, 1993, 14(11), 2219-2225.
- RAO, C.V., Rivenson A., Simi B., Reddy B. S., Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary curcumin, a naturally occurring plant phenolic compound, *Cancer Research*, 1995, 55, 259-266.
- REDDY, A.C.P., Lokesh, B. R., Studies on the inhibitory effects of curcumin and eugenol on the formation of reactive oxygen species and the oxidation of ferrous iron, *Molecular and cellular Biochemistry*, 1994, 137, 1-8.
- ROUGHLEY, J.P. and Whiting, A.D., Experiments in the Biosynthesis of curcumin, *J. Chem. Trans., Perkin Trans. 1*, 1973, 2379-2388.
- SANTOS, M.B., Síntese e atividade tripanomicida de novos derivados 1-*H* pirazolo [3,4-*b*] piridínicos, *Tese de mestrado*, Universidade Federal Fluminense, 2000, 7-26.
- SATOSKAR, R. R., Shah S. J., Shenoy S. G., Evaluation of anti-inflammatory property of curcumin (diferuloyl methane) in patients with postoperative inflammation, *International journal of clinical, Pharm., Thera. and Toxicol.*, 1986, 24(12), 651-654.

- SCHECHTER, P.J., Barlow, J.L.R., Sjoerdsma A., Clinical aspects of inhibition of ornithine decarboxylase with emphasis on therapeutic trials of eflornithine (DFMO) in cancer and protozoan diseases, *Inhibition of polyamine metabolism*, Academic Press, New York, 1987, 345-364.
- SEN GUPTA, P.C., Chemotherapy of *leishmanial* diseases: a resume of recent researchs, *Ind. Med. Gazette*, 1953, 88, 20-35.
- SHANKARACHARYA, N.B. and Natarajan, C.P., Turmeric, chemistry technology and uses, *Indian spices*, , 1973,10 (3), 7-8.
- SHARMA O.P., Antioxidant activity of curcumin and related compounds, *Biochemical Pharmacology*, 1976, 25, 1811-1812.
- SHARMA K.K., Chandra S., Basu D. K., Synthesis and antiarthritic study of a new orally active diferuloyl methane (curcumin) gold complex, *Inorganica Chimica acta*, 1987, 135, 47-48.
- SINGH, S. and Aggarwal, B.B., Activation of transcription factor NF- κ B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane), *J. Biol. Chem.*, 1995, 270(42), 24995-25000.

- SREEJAYAN and Rao, M.N.A, Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1994, 46, 1013-1016.

- SRIMAL, R.C., Dhawan, B.N., Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non-steroidal anti-inflammatory agent, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1973, 25, 447-452.

- SOUDAMINE, K.K., Kuttan, R., Inhibition of chemical carcinogenesis by curcumin, *J. of Ethnopharmacol.*, 1989, 27, 227-233.

- SUBRAMANIAN, M., Sreejayan, M.N.O., Rao, P.A., Singh, B.B., Diminution of singlet oxygen-induced DNA damage by curcumin related antioxidants, *Mutation Research*, 1994, 311, 249-255.

- SUNKARA, P.S., Baulin, S.B., Luk, G.D., Inhibition of polyamine biosynthesis: cellular and *in vivo* effects on tumor proliferation, *Inhibition of polyamine metabolism*, Academic Press, New York, 1987, 121-140.

- TANAKA T., Makita H., Ohnishi M., Hirose Y., Wang A., Mori H., Satoh K., Hara A., Ogawa H., Chemoprevention of 4-Nitroquinolone 1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary curcumin and heperidin: comparison with the protective affect of β - carotene, *Cancer Research*, 1994, 54, 4653-4659.

- TIMBRELL, J.A., *Introduction to Toxicology*, 2nd edition., 1995, Taylor & Francis

- TODA, S., Ohnishi, M., Kimura, M., Nakashima, K., Curcumin inhibits liposomal lipid peroxidation, *J. Ethnopharmacol.*, 1988, 23, 105-108.

- TODA, S., Miyase, T., Arichi, H., Tanizawa, H., Takino, Y., Natural antioxidants.III. Antioxidative components isolated from Rhizome of *Curcuma longa* L., *Chem. Pharm. Bull.*, 1985, 33(4), 1725-1728.

- TONNENSEN, H.H., Vries, H., Karlsen, J., Henegowven, G.B.V., Studies on curcumin and curcuminoids IX: investigation of the photobiological activity of curcumin using bacterial indicator system, *J. Pharmaceutical Sci.*, 1987, 76 (5), 371-373.

- VALSARAJ, R., Pushpangadan, P., Smitt, U.V., Adsersen, A., Søren, S.C., Sittie, A., Nyman, U., Nielsen, C., Olsen, C.E., New anti-HIV-1, antimalarial, and antifungal compounds from *Terminalia bellerica*, *J. Nat. Prod.*, 1997, 60, 739-742.

- VERMA, A.K., Inhibition of tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced synthesis of epidermal ornithine decarboxylase messenger RNA and diacylglycerol-promoted mouse skin tumor formation by retinoic acid, *Cancer research*, 1988, 48, 2168-2173.

- VOGEL, A. I., Química Orgânica, 1985, (Vol. 3), 213-214.

- VOLLER, A ., Shaw J.J., Bryant, C ., The effects of two antimony drugs on the *in vitro* metabolism of radioactive glucose forms of *Leishmania tropica*, *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 1963, 57, 404-408.

- WALTO, B.C., Paulson, J.E., Arjona, M.A ., Peterson, C.A ., American cutaneous leishmaniasis: inefficacy of metronidazole in treatment, *JAMA*, 1974, 228, 1256-1258.

- WEINRAUCH, L., Livishin R., El On, J., Cutaneous *leishmaniasis* treatment with ketoconazole, *Cutis*, 1983, 32, 288-289.

- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) Report of expert committee. The leishmaniasis: world health organization technical reports series 701, World Health Organization, Geneva 1984.

- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) Control of leishmaniasis. Report of a WHO expert committee, WHO Tech. Rep. Ser., 1990, 793-795.