

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS**

PAULA DA SILVA CARDOSO

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DO EXTRATO DE *Calea uniflora* Less. E DE
BENZOPIRANOS SINTETIZADOS DO TIPO *Calea* spp.**

CRICIÚMA, SC

2019

PAULA DA SILVA CARDOSO

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DO EXTRATO DE *Calea uniflora* Less. E DE
BENZOPIRANOS SINTETIZADOS DO TIPO *Calea* spp.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade do Extremo Sul Catarinense para obtenção do Título Doutor em Ciências Ambientais.

Área de Concentração: Ecologia e Gestão de Ambientes Alterados

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Patrícia de Aguiar Amaral
Coorientador: Prof^ª. Dr^ª. Sílvia Dal Bó
Coorientador: Prof. Dr. James Barlow
Coorientador: Prof. Dr. Tiago Elias Allievi Frizon

CRICIÚMA, SC

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

C268a Cardoso, Paula da Silva.

Avaliação biológica do extrato de *Calea uniflora* Less. e de benzopiranos sintetizados do tipo *Calea* spp. / Paula da Silva Cardoso. - 2019.

147 p. : il.; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Criciúma, 2019.

Orientação: Patrícia de Aguiar Amaral.

Coorientação: Sílvia Dal Bó, James Barlow, Tiago Elias Allievi Frizon.

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla – CRB 14/1101

Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC




unesc

Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC
Pró-Reitoria Acadêmica
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais


PARECER

Os membros da Banca Examinadora homologada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pela candidata **PAULA DA SILVA CARDOSO** sob o título: “**A AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DO EXTRATO DE Calca uniflora Less. E DOS BENZOPIRANOS SINTETIZADOS DO TIPO Calca spp**”, para obtenção do grau de **DOUTORA EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS** no Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC. Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Tese.

Criciúma/SC, 22 de fevereiro de 2019.


Profa. Dra. Simone Cristina Baggio Gnoato
Primeiro Examinador


Profa. Dra. Fátima de Campos Buzzi
Segundo Examinador


Prof. Dr. Robson dos Santos
Terceiro Examinador


Profa. Dra. Flávia Karine dos Santos
Quarto Examinador


Profa. Dra. Patrícia de Aguiar Amaral
Presidente da Banca e Orientadora

Dedico esta tese a todas as pessoas que já utilizaram ou utilizam a *Calea uniflora* (Arnica) para fins medicinais, pois foram elas que me inspiraram nesta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

À minha avó Carolina Vieira da Silva, por ser a primeira pessoa a me ensinar sobre os benefícios da Arnica (*Calea uniflora*).

À Professora Dra. Vanilde Citadini Zanette, que iniciou os primeiros questionamentos sobre o potencial terapêutico da *Calea uniflora* dentro da universidade.

As agentes da Pastoral da Saúde Sul IV e a comunidade do Balneário Rincão, por todo o conhecimento compartilhado.

À Professora Dra. Patrícia de Aguiar Amaral por ter aceito orientar este estudo, bem como, pela oportunidade que me proporcionou na graduação de iniciar em um grupo de pesquisa. Obrigada pelas orientações, críticas construtivas e ensinamentos sobre química.

À Professora Dra. Silvia Dal Bó por acreditar no meu potencial! Obrigada por aceitar lá no mestrado ser minha coorientadora e continuar na caminhada do doutorado, obrigada por tudo!

Ao Laboratório de Plantas Medicinais (LaPlaM), pois eu acompanhei o crescimento deste laboratório, e por isto, tenho um imenso carinho por este local. A todos os professores e alunos que contribuíram para o crescimento do LaPlaM. Afinal, foi este grupo de pesquisa que me proporcionou condições para colocar esta tese em prática. Em especial ao Renato Pagnan, Luan Ramos, Michele Daros Freitas e Monique Rezende Daros, por me auxiliarem nos experimentos farmacológicos e toxicológicos, e por todas as conversas científicas e pessoais, a minha sincera gratidão. E também meus agradecimentos a Elias Andrade que iniciou a jornada com as cromononas e a Marília Schutz Borges que continuará. Adoro todos vocês!

Ao Professor Dr. James Barlow por todo o auxílio no intercâmbio, bem como, por todo o ensinamento em síntese orgânica. Muito obrigada.

À *Royal College Surgeons Ireland* por me proporcionar a experiência do intercâmbio.

Ao Professor Dr. Tiago Elias Allievi Frizon por sempre estar disposto a me auxiliar, a minha sincera gratidão.

Ao Dr. Nicolas Gouault, por contribuir com seu conhecimento em síntese orgânica.

A Sandra Bourgeade Delmas e Anne Cecilie Le Lamer, pela parceria no teste leishmanicida.

À Professora Dra. Simone Gnoatto pelas análises instrumentais.

Aos demais pesquisadores Brasileiros que também trabalham com a *C. uniflora*, em especial a parceira do LaPlaM Vanessa Rodrigues Nicolau Torres.

Aos meninos do Horto Florestal da UNESC (aonde fica o LaPlaM), por todo o companheirismo e auxílio.

Ao pessoal do Biotério, Multilab e Laboratório de Química (UNESC), que sempre foram prestativos e atenciosos. Em especial aos meninos do biotério Heron e ao David, muito obrigada.

Ao Laboratório Multiusuário de Estudo em Biologia da UFSC, em especial a técnica Dra. Chirle Ferreira e ao Professor Dr. Paulo Fernando Dias pelo auxílio nas análises histológicas.

Aos professores e colegas do PPGCA (UNESC) que me ensinaram a ser ainda mais crítica e por todo conhecimento compartilhado nestes anos.

Aos professores que compõem a banca, pelo interesse em avaliar esta tese.

A CAPES pelo apoio financeiro, pois sem este apoio eu não teria condições de concluir este objetivo.

Aos meus pais Martinho Pereira Cardoso e Gecilda da Silva Cardoso por todo o carinho dedicado a mim. Mãe obrigada por ser meu porto seguro e por me confortar sempre que precisei. Pai você é o meu doutor em marcenaria, responsável por fabricar alguns equipamentos utilizados nesta tese. Vocês nem sempre entenderam realmente o que eu fazia, mas sempre me apoiaram. Amo vocês!

Ao meu Irmão Felipe da Silva Cardoso e Hiessa Fagundes pelo apoio, e por me tornarem tia da pequena Lívia, que transformou o final tenso desta tese, trazendo mais alegria, com seus sorrisos e choros. Muito obrigada.

Ao Maurício Augusto Wegner a minha sincera gratidão por toda a paciência e parceria comigo. Obrigada por escutar todos os meus lamentos e choros, e de me apoiar em todos os momentos, mesmo muitas vezes não concordando. Muito obrigada.

À minha parceira de quatro patas “Pipoca” que sempre estava pronta para me dar carinho, mesmo eu não dando muita atenção, por estar escrevendo esta tese. Obrigada por tornar meus dias mais divertidos.

Uma tese não se faz sozinha, foram várias pessoas que me auxiliaram ao decorrer desta jornada, então a minha sincera gratidão e carinho a todos que me ajudaram, seja cientificamente ou emocionalmente.

Obrigada Deus por sempre me acompanhar e me guiar!

“O investigador sofre decepções, os longos meses passados em uma direção errada, os fracassos. Mas as falhas também são úteis, porque, se bem analisadas, podem levar ao sucesso. E para o pesquisador não há alegria comparável à de uma descoberta, ainda que pequena.”

Alexander Fleming

RESUMO

Calea uniflora Less. é uma planta nativa do Brasil, popularmente utilizada para fins anti-inflamatórios. A literatura relata outras atividades biológicas pesquisadas, como por exemplo: leishmanicida e antinoceptiva. Então, este estudo teve como objetivo investigar o potencial biológico do extrato hidroalcoólico das inflorescências de *C. uniflora* (ECU), bem como de benzopiranos sintetizados do tipo *Calea* spp. A atividade anti-inflamatória do ECU foi avaliada através do modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton, ácido araquidônico, fenol, capsaicina e histamina, com tratamento de ECU por via tópica (1, 2, 4, 8 mg/orelha) e oral (100, 250, 500 mg/kg). O ECU também foi avaliado em relação ao seu efeito toxicológico através de testes seguindo os guias da *Organization for Economic Co-operation and Development* 423 e 407 adaptado. As doses utilizadas foram de 100, 250, 500 e 1000 mg/kg/via oral e 2000 mg/kg/via tópica. Os benzopiranos do tipo *Calea* spp. (análogos do uniflorol-B), foram sintetizados através de três rotas sintéticas distintas e avaliados em relação ao seu potencial leishmanicida *in vitro* (*Leishmania infantum*). O tratamento com ECU apresentou atividade anti-inflamatória reduzindo o edema causado óleo de cróton nas doses de 250 mg/kg e 500 mg/kg via oral, e nas doses de 2, 4 e 8 mg/orelha, via tópica. A dose de 4 mg/orelha via tópica foi utilizada para os testes com os demais irritantes. Nos testes com edema induzido por histamina e capsaicina, o ECU não foi eficaz para reduzir o edema. No entanto, o extrato reduziu os edemas causados por fenol e ácido araquidônico. O ECU administrado em dose única por via tópica obteve $DL_{50} > 5000$ mg/kg. O tratamento sub-agudo causou a morte dos animais nas doses de 250, 500 e 1000 mg/kg/via oral. Os sinais de toxicidade observados foram: dificuldade respiratória, aumento do peso dos pulmões, dano no tecido pulmonar e relaxamento muscular. As três rotas sintéticas propostas foram eficientes para síntese de benzopiranos do tipo *Calea* spp.. Os compostos foram divididos em três séries dependendo das modulações estruturais. A série 1 é formada de derivados de 6-(1-hidroxietil)-2,2-dimetilcroman-4-ona, sintetizados em cinco etapas: acetilação, rearranjo de Fries, ciclização, redução e esterificação. A série 2 é constituída de derivados de 6-(1-hidroxietil)croman-4-ona, sintetizados em cinco etapas: alquilação oxidação, ciclização, redução e esterificação. A série 3 é formada por derivados do 1-(2,2-dimetilcroman-6-il)etanol, sintetizados em três etapas: ciclização, redução e esterificação ou amidação. Dos 10 compostos testados para leishmania, três apresentaram IC_{50} menor que 10 $\mu\text{g/mL}$, cinco compostos com concentração entre 15 e 30 $\mu\text{g/mL}$ e dois compostos com concentração maior que 50 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados demonstram que o ECU tem atividade anti-inflamatória por via oral e tópica, sendo que o uso tópico agudo não causou nenhum efeito tóxico. No entanto, o uso oral repetido, causou, dependendo da dose, a morte e dano pulmonar nos animais. As rotas sintéticas propostas foram eficiente para síntese de análogos do uniflorol-B, sendo que, alguns destes compostos tem potencial leishmanicida relevante.

Palavras-chave: Anti-inflamatório. Arnica. Leishmania. Síntese de bezopiranos. Tóxico.

ABSTRACT

Calea uniflora Less. is a native Brazilian species, most popularly used in traditional medicine as an anti-inflammatory. It also has other biological activities supported by scientific evidence, for example, leishmanicidal and anti-nociceptive properties. However, this study aimed to investigate the biological potential of the hydroalcoholic extract of the inflorescences of *C. uniflora* (ECU) and of synthesized benzopyrans of the type found in *Calea* spp. The anti-inflammatory activity of the ECU was evaluated using the ear edema model induced by croton oil, arachidonic acid, phenol, capsaicin or histamine, with ECU administered either topically (1, 2, 4, 8 mg/ear) or orally (100, 250, 500 mg/kg). The ECU has been assessed for its toxicological effects using test protocols from the Organization for Economic Co-operation and Development (423 and 407, adapted). The doses used in these tests were 100, 250, 500 and 1000 mg/kg/orally and 2000 mg/kg/topically. Benzopyrans of the type found in *Calea* spp. (uniflorol-B analogs) were synthesized through 3 distinct synthetic routes and evaluated for their leishmanicidal potential in vitro (*Leishmania infantum*). Treatment with ECU showed anti-inflammatory activity, reducing the edema caused by croton oil at doses of 250 mg/kg and 500 mg/kg orally, and at doses of 2, 4 and 8 mg/ear topically. A dose of 4 mg/ear topically was used for tests with the remaining irritants. In the models of edema induced by histamine and capsaicin, ECU was not effective in reducing edema. However, the extract reduced edema caused by phenol and arachidonic acid. After topical administration of a single dose of ECU, the LD₅₀ was determined to exceed 5000 mg/kg. Sub-acute treatment caused animals to die at doses of 250, 500 and 1000 mg/kg/orally. Signs of toxicity observed included respiratory distress, increased lung weight, lung tissue damage, and muscle relaxation. The three proposed synthetic routes were efficient for synthesis of benzopyrans of the type found in *Calea* spp., however, the route elaborated for total synthesis of uniflorol-B itself was not effective. The compounds were divided into 3 series depending on their structural modifications. Series 1 is composed of 6-(1-hydroxyethyl)-2,2-dimethylchroman-4-one derivatives, synthesized in five steps: acetylation, Fries rearrangement, cyclization, reduction and esterification. Series 2 consists of 6-(1-hydroxyethyl)chroman-4-one derivatives, synthesized in five steps: alkylation, oxidation, cyclization, reduction and esterification. The third series consists of 1-(2,2-dimethylchroman-6-yl)ethanol derivatives, synthesized in three steps: cyclization, reduction and either esterification or amidation. Of the 10 compounds tested for activity against *Leishmania*, 3 displayed IC₅₀ values lower than 10 µg/mL, 5 with concentrations between 15 and 30 µg / mL and 2 compounds with an IC₅₀ greater than 50 µg / mL. Our results demonstrate that the ECU possesses both oral and topical anti-inflammatory activity; while topical application did not cause any toxic effects, however repeated oral use has resulted in death and lung damage in animals, depending on the dose. The proposed synthetic routes were efficient for the synthesis of uniflorol-B analogues, and some of these compounds have relevant leishmanicidal potential.

Keywords: Anti-inflammatory. Arnica. Leishmania. Synthesis of benzopyrans. Toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Formato estrutural da tese.....	22
Figura 2 - Distribuição geográfica de espécies de <i>Calea</i> no Brasil.....	23
Figura 3 - Lactonas sesquiterpênicas identificadas em espécies do gênero <i>Calea</i>	24
Figura 4 - Compostos isolados de espécies do gênero <i>Calea</i>	26
Figura 5 - <i>Calea uniflora</i> em seu habitat natural.....	27
Figura 6 - Distribuição geográfica de <i>Calea uniflora</i> no Brasil.....	27
Figura 7 - Compostos identificados no xilopódio de <i>Calea uniflora</i>	28
Figura 8 - Compostos identificados nas folhas de <i>Calea uniflora</i>	28
Figura 9 - Compostos identificados nas partes aéreas de <i>Calea uniflora</i>	29
Figura 10 – Cromatograma do ECU e dos padrões de referência ácido cafeico e 4-cromanona	33
Figura 11 - Fases da reparação tecidual (inflamação, proliferação e reparo) na pele e seus principais mediadores.....	38
Figura 12 - Diferenças morfológicas da pele humana e de roedores.....	39
Figura 13 – Efeito do ECU administrado por via oral no modelo edema de orelha induzido por óleo de cróton administrado em camundongos Swiss.....	43
Figura 14 - Efeito do ECU administrado por via tópica no modelo edema de orelha induzido por óleo de cróton administrado em camundongos Swiss.....	44
Figura 15 - Efeito do ECU administrado por via tópica no modelo de edema de orelha induzido por capsaicina em camundongos Swiss.....	46
Figura 16 - Efeito do ECU administrado por via tópica no modelo de edema de orelha induzido por histamina em camundongos Swiss.....	46
Figura 17 - Efeito do ECU administrado por via tópica no modelo de edema de orelha induzido por fenol via tópica em camundongos Swiss.....	47
Figura 18 - Efeito do ECU administrado por via tópica no modelo de edema de orelha induzido por ácido araquidônico via tópica em camundongos Swiss.....	48
Figura 19 - Desenvolvimento de fármaco através método convencional versus farmacologia reversa.....	51
Figura 20 - Fluxograma para teste toxicológico tópico agudo.....	58
Figura 21 - Percentual de sobrevivência ao tratamento com ECU 30 dias.....	60
Figura 22 - Evolução do peso corporal e consumo de ração e água dos machos.....	61
Figura 23 - Evolução do peso corporal e consumo de ração e água das fêmeas.....	62
Figura 24 - Resultados da análise comportamental no equipamento Labirinto de cruz elevada realizada do 15 dia e 30 dia de tratamento.....	63
Figura 25 - Resultados da análise comportamental no teste Nado forçado realizada do 15 dia e 30 dia de tratamento.....	64

Figura 26 - Resultados da análise comportamental no equipamento Campo aberto realizada do 15 dia e 30 dia de tratamento.....	65
Figura 27 - Efeitos do ECU na coordenação motora dos animais em modelo rota-rod.	66
Figura 28 - Histologia dos pulmões de animais tratados por 30 dias.	68
Figura 29 - Estruturas básicas de benzopiranos, conforme seu nível de saturação e oxidação.	74
Figura 30 -Compostos isolados de <i>C. uniflora</i> com núcleo benzopirano.....	75
Figura 31 – Benzopiranos do tipo <i>Calea</i> spp. protótipos do uniflorol-B [16] e uniflorol-A [17].	80
Figura 32 - Reagentes utilizados para realizar modificação estrutural na região R₄	80
Figura 33 - Ciclização de Kabbe.	84
Figura 34 - Espectros de RMN ¹³ C da dicetona [64] e do produto [8] da redução regioseletiva.	89
Figura 35 - Espectro RMN de próton e carbono do composto 85	93
Figura 36 - Diferenças estruturais dos benzopiranos do tipo <i>Calea</i> spp. testados para atividade leishmacida.	100
Figura 37 - Modificações estruturais da série 3 na região R ⁴	101
Figura 38 - Chalconas com atividade leishmanicida.	102
Figura 39 - Benzopiranos com atividade leishmania.....	103
Figura 40 - Encontro com as Agentes da Pastoral de Saúde Sul IV.....	121
Figura 41 - Encontro com a comunidade do Balneário Rincão, Santa Catarina.	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Substâncias utilizadas nos ensaios biológicos de edema de orelha.....	40
Tabela 2 - Efeitos do tratamento subagudo de ECU nos pesos do órgão (g/100 g de peso corporal) em ratos Wistar machos.....	67
Tabela 3 - Efeitos do tratamento subagudo de ECU no peso dos órgãos (g/100 g de peso corporal) em ratos Wistar fêmeas.....	67
Tabela 4 -Efeitos do tratamento subagudo de ECU nos parâmetros bioquímicos dos ratos Wistar machos.....	71
Tabela 5 - Efeitos do tratamento subagudo de ECU nos parâmetros bioquímicos dos ratos Wistar fêmeas.....	71
Tabela 6 - Efeitos do tratamento subagudo de ECU nos parâmetros hematológicos dos ratos Wistar machos.....	72
Tabela 7 - Efeitos do tratamento subagudo de ECU nos parâmetros hematológicos dos ratos Wistar fêmeas.....	72
Tabela 8 – Otimização das condições reacionais para etapa de esterificação utilizando o álcool intermediário [8] da série 1.....	91
Tabela 9 - Propriedades físico-químicas e bioatividade dos álcoois intermediários das três séries estimadas pelo <i>software molinspiration</i> e a toxicidade pelo <i>software OSIRIS (in silico)</i>	95
Tabela 10 -Propriedades físico-químicas dos produtos finais das três séries estimadas pelo <i>software molinspiration</i>	96
Tabela 11 - Bioatividade dos produtos finais das três séries estimadas pelo <i>software molinspiration</i>	97
Tabela 12 - Potencial toxicológicos <i>in silico</i> dos produtos finais das três séries estimadas pelo <i>software OSIRIS</i>	98
Tabela 13 - Efeito leishmanicida (<i>L. infantum</i> - amastigota) dos produtos da série 3	100

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Rota sintética para 4-cromanona através do ácido 3-fenilpropanoico.....	77
Esquema 2 - Rota sintética para 4-cromanona com substituição na posição 2.	78
Esquema 3 - Síntese de cromenos através de ciclo acoplamento em fenol.	79
Esquema 4 – Rota sintética dos compostos da série 1.....	82
Esquema 5 - Mecanismo reacional do rearranjo de Fries, 2 etapa do esquema 1.	83
Esquema 6 - Rota sintética dos compostos da série 2.	85
Esquema 7 - Rota sintética dos compostos da série 3	87
Esquema 8 - Bio-redução com <i>D. carota</i>	88
Esquema 9 - Mecanismo geral da reação de Esterificação de Steglich.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC ₂ O	Anidrido acético
ADA	Adenosina desaminase
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agencia de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato transaminase
B-16F-10	Células de melanoma murino
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência.
CFS-1	Fator estimulador de colônia 1
COX	Ciclo-oxigenase
DL ₅₀	Dose letal mediana
DMF	Dimetilformamida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DCC	N,N'Diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
ECU	Extrato hidroalcoólico das inflorescências de <i>C. uniflora</i>
EGF	Fator de crescimento epidérmico x
EI	Espessura da orelha inflamada
EMEA	<i>European medicines Agency</i>
ENI	Espessura da orelha não inflamada
E.P.M	Erro padrão da média
Et ₃ N	Trietilamina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGFs	Fator de crescimento de fibroblastosx
FPAT	Pentafluorofenil amônia triflete
GHS	Classificação Global Harmonizada para Substâncias Químicas e Misturas
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HaCaT	Queratinócitos humanos
HGF	Fator de crescimento de hepatócito.
IC ₅₀	Concentração inibitória
i.p	Intraperitoneal
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>

IFN	Interferon α
IFN- γ	Interferon- γ
IGFs	Fator de crescimento semelhante à insulina-
IL	Interleucinas
IL-1	Interleucina-1
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IL-17	Interleucina-17
INFs	Interferons
LAMEB	Laboratório multiusuários de estudos em biologia
LaPlaM	Laboratório de Plantas Medicinais
LPS	Lipopolissacarídeos
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos-1
MeOH	Metanol
MMPs	Metaloproteinase matriz
MPO	Mieloperoxidase
NF-k β	Fator de transcrição nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NO $_x$	Metabólitos do óxido nítrico
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
p38MAPK	Proteínas Quinases p38 Ativadas por Mitógeno
p50NF-k β	p50 fator de transcrição nuclear kappa B
p65NF-k β	p65 fator de transcrição nuclear kappa B
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE 2	Prostaglandina 2
PMAPs	Padrões moleculares associados a patógenos
RMN	Ressonância magnética nuclear
Ros	Espécies reativas de oxigênio
RRP	Receptores de reconhecimento padrão
ta	Temperatura ambiente
TAP	12-otetranol-13-acetato
TGF	Fatores de crescimento
TGF- α	Fator de crescimento transformador- α

TGF- β 1	Fator de crescimento transformador- β 1
TGF- β	Fator de crescimento transformador- β
THF	Tetraidrofurano
TIMPs	Inibidor tecidual de metaloproteinase
TLRs	Toll like receptors
TNF	Fator de crescimento tumoral
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α
TNF- γ	Fator de Necrose Tumoral- γ
TRPV1	Receptores vanilóides de potencial transitório 1
v.o	Via oral
v.t	Via tópica
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 HIPÓTESE	20
1.2 OBJETIVOS DA PESQUISA	20
1.2.1 Objetivo geral.....	20
1.2.2 Objetivos específicos.....	21
1.3 ESTRUTURA DA TESE	21
2 <i>Calea uniflora</i>	23
2.1 REFERÊNCIAL TEÓRICO	23
2.2 PREPARAÇÃO DA DROGA VEGETAL	31
3 POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DO EXTRATO DE <i>Calea uniflora</i>	34
3.1 REFERÊNCIAL TEÓRICO	34
3.1.1 Atividades biológicas da Asteraceae	34
3.1.2 Inflamação.....	36
3.2 METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA.....	40
3.2.1 Equipamentos e materiais.....	40
3.2.2 Animais	40
3.2.3 Edema de orelha induzido por óleo de cróton: via oral	41
3.2.4 Edema de orelha induzido por óleo de cróton: via tópica	41
3.2.5 Edema de orelha induzido por ácido araquidônico: via tópica.....	41
3.2.6 Edema de orelha induzido por fenol: via tópica	42
3.2.7 Edema de orelha induzido por capsaicina: via tópica.....	42
3.2.8 Edema de orelha induzido por histamina: via tópica.....	42
3.2.9 Medição do edema de orelha	42
3.2.10 Análise estatística.....	43
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO DA AVALIAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA.....	43
3.4 CONCLUSÃO PARCIAL.....	50
4 EFEITOS TOXICOLÓGICOS DO EXTRATO DE <i>Calea uniflora</i>	51
4.1 REFERÊNCIAL TEÓRICO	51
4.1.1 Espécies da Asteraceae com efeito tóxico	53
4.2 METODOLOGIA DA AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA.....	54
4.2.1 Animais	54
4.2.2 Ensaio Toxicológico subagudo oral.....	55
4.2.2.1 Análises comportamentais	55

4.2.2.1.1 Campo aberto (Open-field).....	55
4.2.2.1.2 Labirinto de cruz elevada (Elevated plus-maze)	56
4.2.2.1.3 Nado forçado (Forced Swimming Test)	56
4.2.2.1.4 Rota-Rod.....	56
4.2.2.2 Análise hematológica	56
4.2.2.3 Análise bioquímica.....	57
4.2.2.4 Análise histológica	57
4.2.2.5 Análise estatística	57
4.2.3 Ensaio Toxicológico tópico.....	57
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO DA AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA.....	59
4.4 CONCLUSÃO PARCIAL.....	73
5 SÍNTESE E ATIVIDADE LEISHMANICIDA DOS BENZOPIRANOS DO TIPO <i>Calea</i>	74
spp.	74
5.1 REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	74
5.1.1 Benzopiranos e atividade leishmanicida.....	74
5.1.2 Rotas sintéticas descritas em literatura para a síntese de 4-cromanona e cromano	77
5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO DA SÍNTESE dos BENZOPIRANOS DO TIPO <i>Calea</i>	79
spp.....	79
5.2.1 Rota sintética dos benzopiranos do tipo <i>Calea</i> spp.....	79
5.2.2 Rota sintética da série 1	81
5.2.3 Rota sintética da série 2	85
5.2.4 Rota sintética da série 3	86
5.2.5 Etapas reacionais convergentes nas rotas sintéticas realizadas	88
5.2.6 Avaliação <i>in silico</i> dos benzopiranos do tipo <i>Calea</i> spp. propostos	94
5.3 METODOLOGIA DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA <i>IN VITRO</i>	98
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DOS	
BENZOPIRANOS DOS TIPO <i>Calea</i> spp.....	99
5.5 DADOS EXPERIMENTAIS DA SÍNTESE DOS BENZOPIRANOS DO TIPO <i>Calea</i> spp.	
.....	103
5.5.1 Materiais e equipamentos	103
5.5.2 Dados da série 1	104
5.5.3 Dados da série 2	108
5.5.4 Dados da série 3	112
5.6 CONCLUSÃO PARCIAL.....	118
6 CONCLUSÃO GERAL	119
APÊNDICE A - Fitoquímicos isolados de <i>C. uniflora</i>, em destaque o uniflorol-A e uniflorol	
B	138

APÊNDICE B - Intermediários e produtos das rotas sintéticas da síntese de Benzopiranos do tipo <i>Calea</i> spp.....	139
APÊNDICE C - RMN de ^1H e ^{13}C do produto 62a da série 1.	140
APÊNDICE D - RMN de ^1H e ^{13}C do produto 79b da série 2	141
APÊNDICE E - RMN de ^1H e ^{13}C do produto 82 a da série 3.....	142
APÊNDICE F - Aprovações da comissão de ética no uso de animais.....	143
APÊNDICE G - Lista de presença do encontro com as agentes da Pastoral da Saúde .	145
APÊNDICE H - Lista de presença do encontro com a comunidade do Balneário Rincão	146

1 INTRODUÇÃO

Calea uniflora é uma angiosperma nativa do Brasil pertencente à Asteraceae, utilizada popularmente no sul de Santa Catarina como planta medicinal (HANAZAKI; ZANK; PINTO, 2012; RAMOS et al., 2016). Segundo Ramos et al., (2016) as indicações terapêuticas relatadas para *C. uniflora* são para: cicatrização, dor muscular e hematomas, sendo a principal via de administração tópica, mas também é utilizada por via oral. A preparação do extrato é realizada principalmente com as inflorescências, pelo método de maceração com um solvente hidroalcolóico, como a cachaça (RAMOS et al., 2016).

A atividade anti-inflamatória desta espécie já foi avaliada através do modelo de pleurisia induzida por carragininina, onde o extrato alcoólico das folhas de *C. uniflora* nas concentrações de 25 e 200 mg/kg, via intraperitoneal (dose única), teve resultados significativos na redução da inflamação (DA ROSA et al., 2017). Outra atividade significativa que a espécie demonstrou foi em relação a nocicepção, visto que o extrato hidroalcolóico das inflorescências de *C. uniflora* reduziram a reatividade dos animais nas doses de 100 e 300 mg/kg via oral (dose única) nos modelos experimentais de contorção abdominal (ácido acético), edema de pata (formalina) e placa quente (RODRIGUES-TORRES et al., 2016). Neste mesmo estudo os pesquisadores constataram que o extrato hidroalcolóico das inflorescências de *C. uniflora* não tem efeito citotóxico *in vitro* frente a duas linhagens de célula, HaCaT (queratinócitos humanos) e B-16F-10 (células de melanoma murino) (RODRIGUES-TORRES et al., 2016). Em relação aos efeitos toxicológicos Ferraz et al., (2009) constataram que o extrato metanólico das partes superiores de *C. uniflora* não tem efeitos genotóxicos quando administrado em dose única, por via intraperitoneal nas doses de 100 e 150 mg/kg. Já a administração oral do extrato hidroalcolóico das inflorescências nas doses 100, 250, 500 e 1000 mg/kg (ratos *Wistar*), em dose única, manifestou comportamento exacerbado de autolimpeza, piloereção, sinais de tosse e agitação nos animais (CARDOSO, 2014)

Estes estudos proporcionaram diversas informações relevantes em relação as atividades biológicas de *C. uniflora*. No entanto, não mimetizam as principais vias de administração (tópica ou oral), farmacógeno (inflorescência) e preparação (maceração em solução hidroalcolóica) relatados pela população do Balneário Rincão, Santa Catarina (RAMOS et al., 2016). Sabendo disto, este estudo realizou testes experimentais que se aproximam da via de administração (tópico e oral), farmacógeno (inflorescência) e preparação (maceração em solução hidroalcolóica) utilizados popularmente.

Alguns fitoquímicos já foram isolados e identificados na *C. uniflora*, sendo em sua maioria compostos fenólicos encontrados nas folhas, xilopódio e partes aéreas (DO NASCIMENTO et al., 2004, 2007; LIMA et al., 2016). Dentre estes compostos identificados nesta espécie, alguns tem atividades biológicas já descritas, como o orobol, isolado das folhas de *C. uniflora*, que tem atividade anti-inflamatória em modelo experimental de pleurisia induzida por carragininina (DA ROSA et al., 2017). O orobol tem estrutura básica de benzopirano. Outros fitoquímicos da *C. uniflora* tem esta mesma estrutura básica, como é o caso do uniflorol-A e uniflorol-B, que têm atividade leishmanicida (DO NASCIMENTO et al., 2007). Estruturas semelhantes ao uniflorol-A e B são encontradas também em outras espécies de *Calea*, com por exemplo, *C. clauseniana* (DO NASCIMENTO; DE OLIVEIRA, 2014). Devido a estrutura química do uniflorol-A e B apresentarem atividade leishmanicida, e não possuir rotas sintéticas específicas para produção deste composto, foram realizadas modulações químicas tendo como protótipo o uniflorol-B, postulando rotas sintéticas para produção de benzopiranos do tipo *Calea* spp. A síntese destes análogos do uniflorol-B foram realizadas a fim de potencializar os efeitos leishmanicidas já descritos para o uniflorol-A e B.

Estas investigações têm como intuito valorizar uma planta nativa agregando conhecimento científico e popular, bem como, buscar novas estruturas químicas com atividade terapêutica tanto para clínica humana como para clínica veterinária.

1.1 HIPÓTESE

O uso das inflorescências de *C. uniflora* é seguro e eficaz como anti-inflamatório tópico e oral, e os análogos do uniflorol-B (benzopiranos do tipo *Calea* spp.) podem gerar futuros protótipos bioativos com efeito leishmanicida?

1.2 OBJETIVOS DA PESQUISA

1.2.1 Objetivo geral

Investigar o potencial biológico do extrato hidroalcoólico das inflorescências de *Calea uniflora* (ECU) e análogos do uniflorol-B (benzopiranos do tipo *Calea* spp.) em testes *in vitro* e *in vivo*.

1.2.2 Objetivos específicos

- I. Preparar o extrato das inflorescências de *Calea uniflora* (ECU).
- II. Avaliar atividade anti-inflamatória oral e tópica do ECU.
- III. Analisar perfil de segurança do uso oral subagudo do ECU.
- IV. Avaliar perfil de segurança do uso tópico agudo do ECU.
- V. Sintetizar benzopiranos do tipo *Calea* spp.
- VI. Avaliar efeito leishmanicida dos benzopiranos do tipo *Calea* spp.

1.3 ESTRUTURA DA TESE

A formatação da tese seguiu a Norma para apresentação de Dissertação e Tese (2018) do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os elementos textuais foram divididos em introdução, desenvolvimento e conclusão, sendo que o desenvolvimento foi dividido em seções, conforme ilustra a figura 1.

O desenvolvimento inicia na seção 2 nomeada *Calea uniflora*, que conta com um referencial teórico sobre as espécies de *Calea*, especificamente com o de *C. uniflora*, como também apresenta a metodologia para o preparo de extrato que foi utilizado para os testes descritos na seção 3 e 4.

A seção 3 nomeada de Potencial anti-inflamatório do extrato de *C. uniflora* (ECU) apresenta um referencial teórico em relação as atividades biológicas das espécies da família Asteraceae, focando principalmente na atividade anti-inflamatória, como também consta informações teóricas sobre o processo inflamatório. Após o referencial teórico são descritos os procedimentos experimentais realizados para avaliar a atividade anti-inflamatória do ECU, seguido pelos resultados e discussão.

A seção 4 nomeada de Efeitos toxicológicos do extrato de *C. uniflora* (ECU) apresenta um referencial teórico sobre os testes toxicológicos pré-clínicos, como também informações de espécies da família Asteraceae em relação a toxicidade. Após este referencial teórico é descrito a metodologia utilizada para avaliar o perfil de segurança do ECU, seguido dos resultados e discussão.

A seção 5, nomeada Síntese de benzopiranos do tipo *Calea* spp. e atividade leishmanicida, inicia com um referencial teórico sobre benzopiranos e atividade leishmanicida, e a descrição das principais reações para síntese de benzopiranos. Na próxima subseção, constam os resultados e discussão divididos em subseções contendo informações sobre as rotas

sintéticas elaboradas, análise orgânica instrumental dos compostos sintetizados e atividade leishmanicida.

A ordem cronológica da realização dos experimentos, não seguiu a ordem de separação da tese escrita. Sendo que, os primeiros experimentos realizados foram os toxicológicos, pois seus resultados foram a base para definação das doses do experimento anti-inflamatório.

Figura 1 - Formato estrutural da tese.

Seção 1 - INTRODUÇÃO		
DESENVOLVIMENTO	Seção 2 <i>Calea uniflora</i>	Referencial teórico Preparação do extrato
	Seção 3 Potencial anti-inflamatório do extrato de <i>C. uniflora</i> (ECU)	Referencial teórico Metodologia Resultados e Discussão Conclusão parcial
	Seção 4 Efeitos toxicológicos do extrato de <i>C. uniflora</i> (ECU)	Referencial teórico Metodologia Resultados e Discussão Conclusão parcial
	Seção 5 Síntese de benzopiranos do tipo <i>Calea</i> spp. e atividade leishmanicida	Referencial teórico Resultados e Discussão Experimental-Metodologia Conclusão parcial
Seção 6 – CONCLUSÃO GERAL		

Fonte: Autor.

2 *Calea uniflora*

2.1 REFERÊNCIAL TEÓRICO

Entre as angiospermas, a família Asteraceae é uma das que possui maior número de gêneros e espécies distribuídas por todos os continentes, exceto Antártica, caracterizando, assim, sua distribuição como cosmopolita. Ocorre principalmente em regiões semi-áridas dos trópicos, subtropicais e temperadas. Estima-se que esta família possui aproximadamente 1.600 gêneros e 24.000 espécies. Plantas desta família podem ser classificadas em 5 subfamílias e aproximadamente 19 tribos (ROQUE; BAUTISTA, 2008). No Brasil, a Asteraceae está entre as 10 famílias mais frequentes na cobertura arbustiva-herbácea extra-amazônica. Minas Gerais e Bahia são os estados com maior representatividade destas plantas, distribuídas em campos rupestres e cerrado (ROQUE; BAUTISTA, 2008). Dentre os 278 gêneros, e aproximadamente 2.064 espécies de Asteraceae distribuídas por todos os estados do Brasil (NAKAJIMA et al., 2015), o gênero *Calea* possui diversas espécies endêmicas e nativas pouco estudadas em relação aos seus potenciais medicinais.

O gênero *Calea* possui aproximadamente 110 espécies encontradas em regiões tropicais e subtropicais do mundo (PRUSKI; URBATSCH, 1988). No Brasil já foram identificadas 82 espécies, sendo que 45 são endêmicas. Estas espécies estão distribuídas por 22 estados do país (Figura 2). São encontradas nas vegetações como caatinga, serrado, campo rupestre, campo limpo, floresta ciliar e restinga (*Calea* FLORA DO BRASIL, 2019).

Figura 2 - Distribuição geográfica de espécies de *Calea* no Brasil.



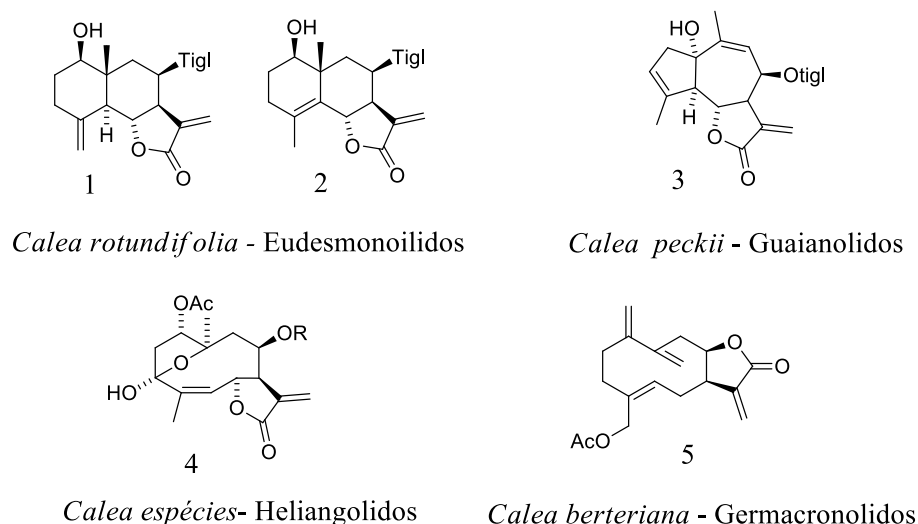
Fonte: Adaptado de *Calea* Flora do Brasil (2019). Nos estados destacados em coloração cinza há registrados da ocorrência de espécies de *Calea*; nos estados com coloração branca não há registros da ocorrência de espécies de *Calea*.

A composição química e atividade biológica de algumas espécies de *Calea* já são descritas em literatura científica. Dentre as inúmeras substâncias já identificadas nas espécies deste gênero, as mais encontradas são as lactonas sesquiterpênicas (BOHLMANN et al., 1981).

As lactonas sesquiterpênicas (terpenoides) têm como estrutura básica 15 carbonos com um anel de lactona fundido. As diferenças na posição dos carbonos classificam as lactonas sesquiterpênicas, isto faz com que estas substâncias sejam divididas em classes dependendo do seu esqueleto carbocíclico. Os terpenoides podem ser classificados como: germacronolidos, heliangolidos, guaianolidos, pseudoguaianolidos, hipocretenolidos e eudesmonoilidos (CHATURVEDI, 2011).

Diversas lactonas sesquiterpênicas já foram identificadas nas mais variadas espécies do gênero *Calea*, como por exemplo, na *Calea prunifolia* (CASTRO; TAMAYO-CASTILLO; JAKUPOVIC, 1989a), *Calea urticifolia* (BORGES DEL CASTILLO et al., 1981), *Calea leptoccephala* (OBER; URBATSCH; FISCHER, 1986) e *Calea jamaicensis* (OBER; FISCHER; PARODI, 1986). São encontradas principalmente as classes germacronolidos (OBER; URBATSCH; FISCHER, 1985a), heliangolidos (BOHLMANN et al., 1982), guaianolidos (OBER; URBATSCH; FISCHER, 1985b) e eudesmanolidos (OBER et al., 1984). A figura 3 apresenta a estrutura química de algumas lactonas sesquiterpênicas isoladas de espécies de *Calea*.

Figura 3 - Lactonas sesquiterpênicas identificadas em espécies do gênero *Calea*.



Fonte: *Calea rotundifolia* (BOHLMANN et al., 1981a), *Calea peckii* (CASTRO; TAMAYO-CASTILLO; JAKUPOVIC, 1989b), *Calea espécie* (BOHLMANN et al., 1981b) e *C. berteriana* (OBER; URBATSCH; FISCHER, 1985a).

Do ponto de vista etnobotânico, algumas espécies de *Calea* são utilizadas para fins terapêuticos: a *Calea zacatechichi*, que é popularmente utilizada no México para tratamento

de distúrbios gastrointestinais (SAŁAGA et al., 2015). Esta espécie também é utilizada por índios mexicanos para obter mensagens divinas através de sonhos (MAYAGOITIA; DÍAZ; CONTRERAS, 1986). Para validar a utilização descrita pelos índios mexicanos, um estudo foi realizado para avaliar a influência do extrato da planta no sono em humanos. O ensaio duplo-cego mostrou que *C. zacatechichi* aumentou o estágio do sono superficial e teve maior número de despertar espontâneo. Também foi constatada nos relatos dos voluntários da pesquisa uma maior frequência de sonhos naqueles que utilizaram o extrato da planta, comparando aos grupos placebo e grupo que recebeu o medicamento diazepam (MAYAGOITIA; DÍAZ; CONTRERAS, 1986).

Calea zacatechichi também possui outras atividades biológicas já comprovadas em teste *in vivo*. Estudo científico *in vivo* verificou que o extrato da *C. zacatechichi* inibiu significativamente a contratilidade do cólon intestinal dos animais, mostrando assim uma atividade antidiarreica. A planta também apresentou ação antinociceptiva em modelo de dor abdominal. Neste estudo foi comprovada a presença de cromononas e lactonas no extrato da *C. zacatechichi* (SAŁAGA et al., 2015).

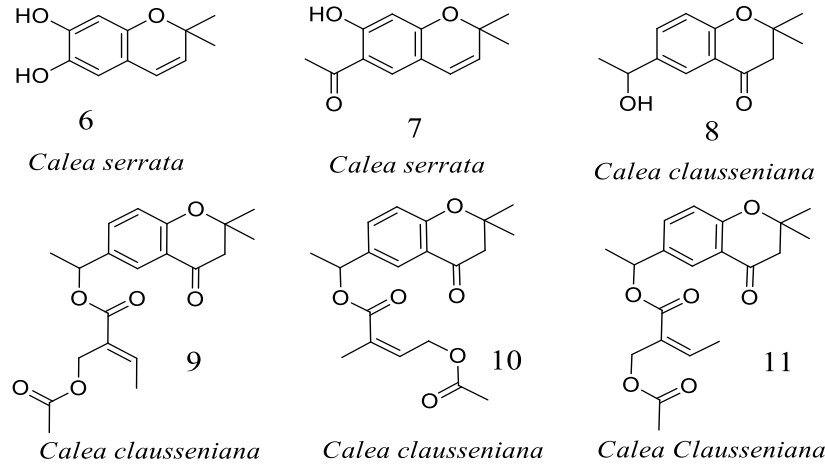
Em relação aos testes com compostos isolados, seis lactonas sesquiterpênicas da *C. zacatechichi* apresentaram ação significativa em teste leishmanicida (*Leishmania donovani*) *in vitro*. No entanto, para o teste da atividade antiplasmódica (*Plasmodium falciparum*) *in vitro*, estas moléculas não inibiram o crescimento parasitário significativamente em relação à cloriquina (WU et al., 2011). Resultados semelhantes em teste da atividade antiplasmódica *in vitro* foram apresentados com extrato de *C. prunifolia*, neste mesmo estudo o extrato foi considerado inativo para o *Plasmodium berghei* (GARAVITO et al., 2006). Quatro cromenos isolados da *Calea pinnatifida* foram também avaliados em relação à sua atividade leishmanicida, e os resultados demonstraram que dois cromenos possuem atividade leishmanicida e os outros dois compostos foram inativos (LIMA et al., 2015).

O composto prococeno II, isolado do óleo essencial, e o óleo essencial da *Calea serrata* foram avaliados em relação ao seu potencial acaricida [*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*]. Neste estudo foi comprovado que tanto o óleo, quanto o cromeno isolado, tem ações tóxicas contra este parasita (RIBEIRO et al., 2011).

Os cromenos (benzopiranos) compõem um grupo de moléculas muito encontrados nas espécies do gênero *Calea* (BOHLMANN et al., 1982; CASTRO; TAMAYO-CASTILLO; JAKUPOVIC, 1989b), que tem como estrutura básica a junção de um anel aromático e um anel pirona. (ELLIS, 2009). A figura 4 ilustra alguns cromenos identificados na *C. serrata* (STEINBECK et al., 1997) e algumas cromononas isoladas da *Calea clauseniana* (DO

NASCIMENTO; DE OLIVEIRA, 2014). Cromanonas e derivados *p*-hidroxiacetofenona também foram identificadas nas *Calea cuneifolia* (LOURENÇO; AKISUE; ROQUE, 1981) e *C. uniflora* (DO NASCIMENTO et al., 2007).

Figura 4 - Compostos isolados de espécies do gênero *Calea*.



Fonte: *Calea serrata* (STEINBECK et al., 1997); *C. clauseniana* (DO NASCIMENTO; DE OLIVEIRA, 2014).

Devido ao gênero *Calea* possuir substâncias com estruturas como as lactonas sesquiterpênicas e cromanos que possuem atividades biológicas relevantes, surge o interesse de investigar algumas espécies em relação ao seu potencial medicinal. Algumas atividades biológicas já foram pesquisadas para o gênero *Calea* e estão descritas no artigo de revisão de Amaral et al. (2017) como: antiplasmódica, leishmanicida, tripanocida, antibacteriano, acaricida, antidiarréico, antinocepcivo e anti-inflamatório.

Entre as espécies deste gênero a *C. uniflora* é encontrada na região sul catarinense, e possui relatos sobre sua utilização como planta medicinal. Informações estas descritas nos estudos etnobotânicos realizados no Balneário Rincão (SC) (RAMOS et al., 2016) e em Imbituba (SC) (HANAZAKI; ZANK; PINTO, 2012). No entanto, esta espécie possui poucos estudos em relação as suas atividades biológicas.

Calea uniflora (Figura 5) é uma erva terrícola nativa do Brasil, mas não endêmica, encontrada nas regiões centro-oeste (Mato Grosso do Sul), sudeste (Minas Gerais e São Paulo), sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) e sudeste (Rio de Janeiro), como ilustra a figura 6. Presente principalmente no cerrado, mata atlântica e pampa (*Calea uniflora* FLORA DO BRASIL, 2019).

Figura 5 - *Calea uniflora* em seu habitat natural



Foto: Autor, foto realizada no Bairro Pedreira, Balneário Rincão, SC.

Figura 6 - Distribuição geográfica de *Calea uniflora* no Brasil.



Fonte: Adaptado de *Calea uniflora* FLORA DO BRASIL (2019). Nos estados destacados em coloração cinza há registros da ocorrência de espécies de *Calea*; nos estados com coloração branca não há registros da ocorrência de espécies de *Calea*.

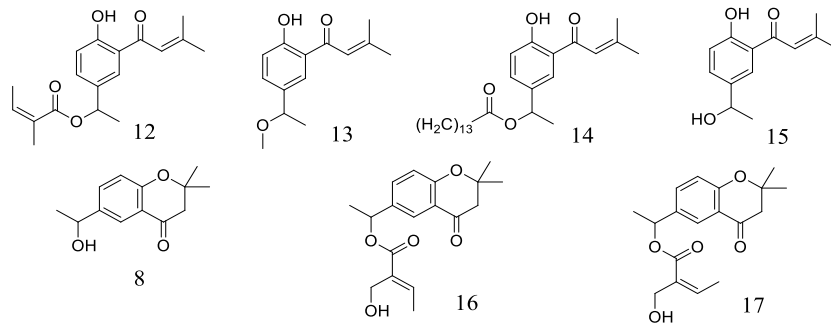
3

No sul de Santa Catarina há relatos que esta planta é utilizada para fins medicinais, como mostra um estudo realizado com a comunidade dos Areais da Ribanceira (Imbituba, Santa Catarina), onde os entrevistados citam *C. uniflora* como uma das espécies medicinais mais importantes utilizadas na região. Neste estudo, os participantes identificam a planta como Arnica (HANAZAKI; ZANK; PINTO, 2012). Outro estudo também realizado em Santa

Catarina, no município de Balneário Rincão, demonstrou que esta planta é muito utilizada na região, pois dos 372 participantes da pesquisa, 94% conhecem a planta, e destes 94%, 74% utilizam a planta para fins medicinais. As principais indicações mencionadas foram para cicatrização e dor muscular, por via tópica. E para resfriado, por via oral (RAMOS et al., 2016).

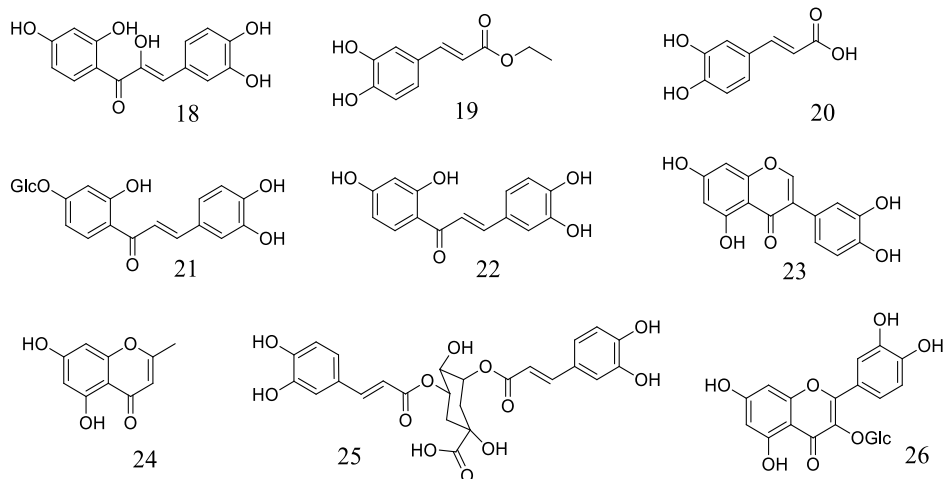
Mesmo sendo o uso popular desta espécie um fato na região sul catarinense, poucas informações científicas são encontradas em literatura sobre sua composição química e suas atividades biológicas, principalmente as atividades relacionadas às indicações do conhecimento popular. As figuras 7, 8 e 9 apresentam os fitoquímicos já identificados no extrato do xilopódio, folha e parte superior de *C. uniflora*.

Figura 7 - Compostos identificados no xilopódio de *Calea uniflora*.



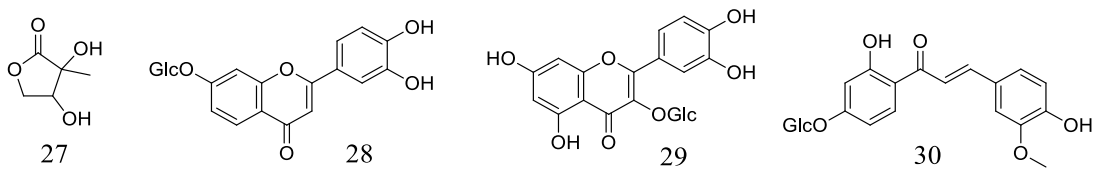
Fonte: adaptado de Do Nascimento et al. (2004, 2007).

Figura 8 - Compostos identificados nas folhas de *Calea uniflora*.



Fonte: adaptado de Lima et al. (2016).

Figura 9 - Compostos identificados nas partes aéreas de *Calea uniflora*.



Fonte: adaptada Do Nascimento e De Oliveira (2004).

Em relação à ação biológica, Do Nascimento, Albuquerque e Oliveira, (2002) avaliaram os extratos de diclorometano e etanólico do xilopódio ou parte superior da planta, em relação a atividade tripanocida *in vitro*. Todos os extratos, independente do solvente utilizado para extração ou farmacógeno, apresentaram ação tripanocida em teste *in vitro* contra a forma tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* na concentração 25 mg/mL. Neste mesmo trabalho o extrato de diclorometano do xilopódio obteve o melhor resultado, sendo capaz de causar morte de 98,81% dos parasitas.

Também foi avaliada a ação tripanocida *in vitro* de quatro fitoquímicos [12, 13, 14 e 15] isolados e do extrato de diclorometano do xilopódio, e novamente o extrato da planta apresentou ação tripanocida, assim como os quatro compostos isolados. O extrato foi testado na dose de 4 mg/mL e apresentou percentual de lise de 98,8%. Os compostos isolados foram testados nas concentrações de 100, 250 e 500 µg/mL, sendo que a concentração que obteve os melhores resultados foi a de 500 µg/mL, onde os percentuais de lise foram 36,2% [12], 42,0% [13], 70,9% [14] e 70,3% [15]. Os resultados deste estudo sugerem que a ação tripanocida deste extrato está relacionada com os compostos isolados e identificados, uma vez que estes também demonstraram ação tripanocida (DO NASCIMENTO et al., 2004).

Os compostos fenólicos isolados das folhas de *C. uniflora* também foram testados em relação à atividade tripanocida. Todos os 9 fitoquímicos avaliados na concentração de 50 µM inibiram o crescimento do parasita. O teste foi realizado *in vitro* com o *T. cruzi* na forma amastigota. Os fitoquímicos com percentual de inibição de crescimento relevante foram: 18 (76,06%), 19 (73,34%) e a mistura do 22 e 23 (36,18%) (LIMA et al., 2016)

Do Nascimento e colaboradores (2004) também avaliaram a atividade antifúngica do extrato de diclorometano do xilopódio e dos fitoquímicos isolados da *C. uniflora* [12, 13, 14 e 15] frente a espécies de *Candida spp.* e *Trichophyton spp.* Todas as amostras foram testadas na concentração de 1 mg/mL e inibiram o crescimento dos fungos variando as concentrações de 500 a 1000 µg/mL.

Estes mesmos compostos fenólicos também foram avaliados em relação à atividade leishmanicida, mas nenhum composto apresentou resultado significativo. O teste foi realizado

in vitro com *Leishmania amazonenses* na forma amastigota, onde os percentuais de inibição variaram entre 8,59 a 25,33%, sendo que os fitoquímicos com melhores resultados foram: **19**, **22** e **23** (LIMA et al., 2016). Contudo, as cromanonas **16** e **17**, isoladas do xilopódio de *C. uniflora*, apresentaram ação leishmanicida relevante. O teste foi realizado *in vitro* utilizando a forma promastigoda da *Leishmania major*. As concentrações testadas foram 25, 50 e 100 µg/mL, sendo a dose de 100 µg/mL a com melhor percentual de inibição, 88,9%. Já a mistura das cromanonas **16** e **17** inibiu o crescimento em todas as doses (DO NASCIMENTO et al., 2007).

O estudo de Do Nascimento et al., (2007) demonstra que esta planta possui, em sua composição química, compostos com relevante ação parasiticida, e substâncias que tem atividade parasiticida são consideradas tóxicas. Com isso, pode-se especular que *C. uniflora* tem em sua composição química substâncias com potencial tóxico. Ferraz et al. (2009) avaliaram o potencial genotóxico do extrato metanólico das inflorescências *in vivo* (camundongos) através do teste cometa, onde foram avaliadas duas doses (100 e 150 mg/kg, ip). Entretanto, o extrato não causou nenhum dano ao DNA (ácido desoxirribonucleico) neste experimento.

Pesquisa realizada *in vitro* avaliou a citotoxicidade de cinco diferentes extratos das inflorescências de *C. uniflora*, sendo eles: extrato hidroalcolico das folhas, extrato hidroalcolico das inflorescências e três frações provindas do extrato das inflorescências (dicloreto metano, butanol, acetato de etila). Porém, apenas a fração diclorometano apresentou inibição significativa para as linhagens de células HaCaT e B-16-F10. O extrato das folhas e a fração de acetato de etila apresentaram IC₅₀ de aproximadamente 50 µg/mL; o extrato das inflorescências e a fração de butanol apresentou IC₅₀ superior a 100µg/mL; e fração de diclorometano IC₅₀ de 25µg/mL (RODRIGUES-TORRES et al., 2016). Outro estudo toxicológico avaliou o perfil de segurança do uso agudo *in vivo* do extrato hidroalcolico das inflorescências. Foram avaliadas quatro doses (100, 250, 500 e 1000 mg/kg) do extrato da planta administrado por via oral. Os resultados demonstram que nas primeiras horas após administração do extrato os animais manifestaram comportamento exacerbado de autolimpeza, piloereção, sinais de tosse e agitação (CARDOSO, 2014).

O estudo de Cardoso (2014) apresentou resultados com possível potencial tóxico da planta, entretanto, há também estudos que apresentam resultados relevantes do extrato etanólico das inflorescências nas doses de 100 e 500 mg/kg/v.o como antinociceptivo nos testes *in vivo* da placa quente, contorção abdominal e formalina (RODRIGUES-TORRES et al., 2016).

Outra importante atividade biológica descrita em literatura para *C. uniflora* é a anti-inflamatória. O extrato etanólico das folhas e alguns fitoquímicos isolados [18, 22, 23, 24] da *C. uniflora* apresentaram esta ação em modelo de pleurisia induzida por carraginitina com tratamento por via intraperitoneal. O extrato etanólico das folhas e os compostos isolados de *C. uniflora* inibiram: migração de leucócitos, dano ao tecido pulmonar, reduziram a atividade da MPO (mieloperoxidase) e ADA (adenosina desaminase), níveis de NOx (metabolitos do óxido nítrico), níveis de citocinas pró-inflamatórias e fosforilação de p65NF-Kb (p65 fator de transcrição nuclear kappa B) e p38MAP (Proteínas Quinases p38 Ativadas por Mitógeno). Foram diversas doses testadas, mas o extrato foi capaz de reduzir os processos inflamatórios na dose de 50 mg/kg/i.p e os compostos isolados ou combinados nas doses de 5 e 2,5 mg/kg/i.p (DA ROSA et al., 2017).

Ainda, há relatos de uso medicinal popular mencionados pela pesquisa realizada no Balneário Rincão (RAMOS et al., 2016) e há uma importância medicinal relatada pela comunidade de Imbituba (HANAZAKI; ZANK; PINTO, 2012), demonstrando que esta planta possui também ações medicinais que devem ser investigadas em paralelo com os efeitos tóxicos, composição química e atividade biológica.

Com base em todas estas informações sobre as atividades biológicas de *C. uniflora*, este estudo tem entre seus objetivos avaliar a atividade anti-inflamatória tópica do extrato hidroalcoólico das inflorescências de *C. uniflora* (ECU), bem como avaliar seus efeitos tóxicos por via oral e tópica. A seguir estão as informações de coleta e preparo do ECU, extrato que foi utilizado nas avaliações realizadas na Seção 3 (Potencial anti-inflamatório do extrato de *C. uniflora* - ECU) e na Seção 4 (Efeito toxicológico do extrato de *C. uniflora* - ECU).

2.2 PREPARAÇÃO DA DROGA VEGETAL

O material vegetal utilizado para os experimentos descritos nas seções 3 e 4 foi as inflorescências de *C. uniflora*, coletadas no mês de fevereiro (2015, 2016 e 2017) no final de tarde, na rua Vereador Custódio Borges, Bairro Pedreira, Município de Balneário Rincão (SC), localizado no Sul do Estado de Santa Catarina, Brasil (28°48'20.0"S e 49°14'45.3"W). O material foi identificado pelas botânicas Dra. Vanilde Citadini Zanette e Dra. Mara Rejane Ritter, herborizado e exsiccado no Herbário Pe. Dr. Raulino Reitz (CRI) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) sob CRI 10304.

As inflorescências de *C. uniflora* foram secas em estufa entre 50 °C a 60 °C; após este procedimento o peso da planta reduziu 80%. Posteriormente foi realizado a preparação do

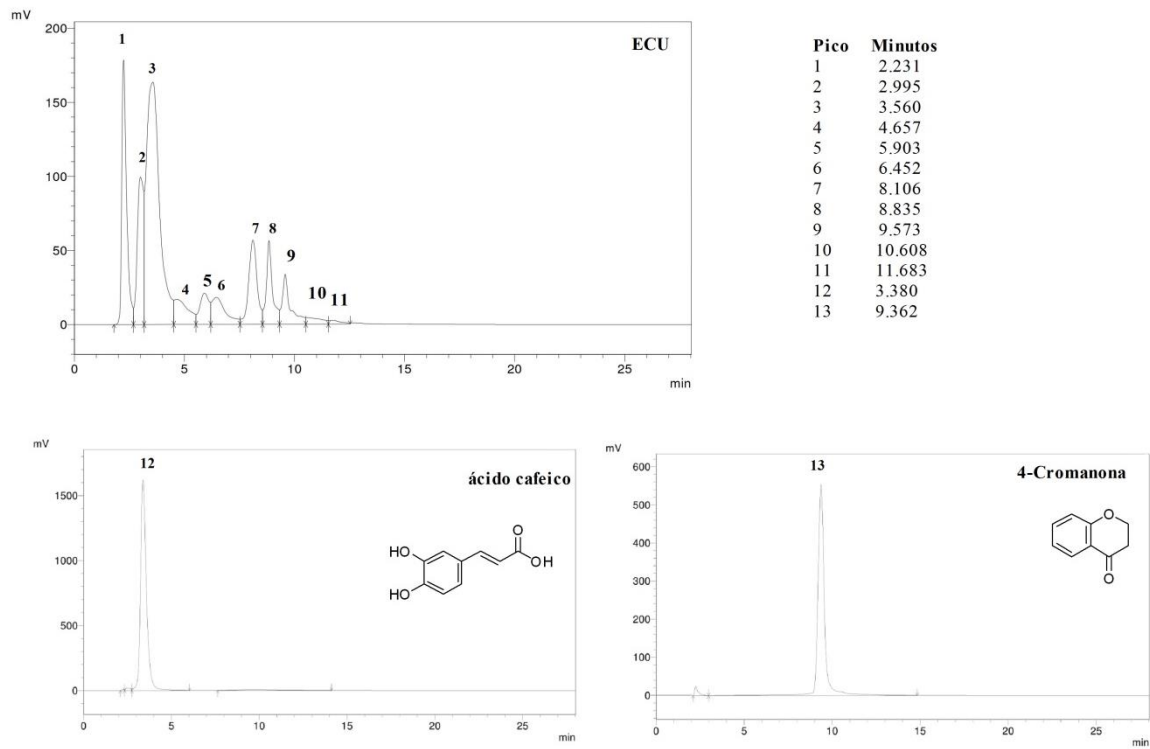
extrato pela técnica de maceração com álcool 70% na proporção 1:10 (p/v). A planta permaneceu por 15 dias em maceração com agitação ocasional, sendo então, filtrado e o solvente removido, formando assim o extrato hidroalcoólico das inflorescências de *C. uniflora* (ECU). Esta extração obteve um rendimento de 15%.

Para avaliar o perfil cromatográfico do o ECU (1 mg/mL em metanol) foi utilizado o equipamento cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da marca Shimadzu (Kyoto, Japão) em coluna C18 Ascentis®, 25 cm x 2,1 cm, tamanho de partícula de 5 µm. A detecção foi realizada usando espectros de absorção (UV/Vis) em 320 nm. A 4-cromanona e o ácido cafeico foram usados como padrões de referência (v = 20 µL). Os solventes utilizados para separação foram acetonitrilo de grau CLAE (solvente A) e ácido fosfórico a 1% (concentrado)/ácido acético a 10% (glacial)/acetonitrilo a 5% (v/v/v) em água (solvente B). O gradiente de eluição foi: 0 min, 100% (B); 30 min, 70% (B); 40 min, 100% (A) (RODRIGUES-TORRES et al., 2016).

A caracterização do ECU por CLAE apresentou sinais com tempo de retenção próximos aos padrões de referência, sendo o que o pico 3 tem tempo de retenção de 3,560 minutos e o pico do ácido cafeico (pico **12**) tem tempo de 3.380 minutos. O pico **9** tem tempo de retenção de 9,573 minutos, já o pico da 4-cromanona (pico **13**) apareceu em 9,362 minutos, conforme cromatogramas da figura 10. Do Nascimento et al. (2007) já isolaram e identificaram cromanonas no xilopódio de *C. uniflora*, e o ácido cafeico já foi identificado e isolado nas folhas dessa espécie (LIMA et al., 2015).

O ECU foi testado em relação à atividade anti-inflamatória através do teste de edema de orelha, descrito seção 3; o efeito toxicológico foi avaliado através de teste *in vivo* com administração oral e tópica, descrito na seção 4.

Figura 10 – Cromatograma do ECU e dos padrões de referência ácido cafeico e 4-cromanona



Fonte: Autor.

3 POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DO EXTRATO DE *Calea uniflora*

3.1 REFERÊNCIAL TEÓRICO

3.1.1 Atividades biológicas da Asteraceae

Uma das características relevantes para o sucesso evolutivo da Asteraceae, a qual pertence *C. uniflora*, são os seus compostos secundários. Plantas desta família geralmente possuem em sua composição química benzofuranos, cromenos (PROKSCH; RODRIGUEZ, 1983a) e lactonas sesquiterpênicas (EMERENCIANO et al., 1986).

Os benzofuranos são compostos heterocíclicos formados pela fusão de um benzeno e um anel furano. Alguns destes compostos têm potencial biológico importante como: hipoglicemiante, antiparasitário, antitumoral, antimicrobiano e analgésico (SHAMASUZZAMAN, 2015).

Uma classe de metabólito secundário relevante na Asteraceae é das lactonas sesquiterpênicas. Aproximadamente 3.000 estruturas diferentes já foram identificadas nas espécies desta família. Estas moléculas são produzidas através da via do ácido mevalônico, derivando da condensação de três fragmentos do isopreno. Algumas lactonas sesquiterpênicas apresentam atividades biológicas como: antitumoral, anti-inflamatória, antimalárica, antibacteriana e antifúngica. O medicamento Artezine, utilizado para quadros graves de malária, é um exemplo de um derivado da lactona sesquiterpena da planta *Artemisia annua*, pertencente à Asteraceae (CHATURVEDI, 2011).

Outras substâncias importantes que compõem a quimioteca das plantas da Asteraceae são os cromenos. Estes compõem a estrutura básica de vários tipos de polifenóis, alcaloides, flavonoides e antocianidinas. Alguns cromenos têm atividades biológicas já comprovadas como: antitumoral (THOMAS; MARY ZACHARIAH, 2013), antimicrobiana (REDDY; RAO; KRUPADANAM, 2015), antifúngica (REDDY; RAO; KRUPADANAM, 2015) e anti-inflamatória (THOMAS; MARY ZACHARIAH, 2013).

Entre as plantas da Asteraceae com potencial medicinal estão a *Mikania glomerata* (ROCHA et al., 2008), *Arnica montana* (MACÊDO et al., 2004) e *Matricaria recutita* (ZADEH; KOR; KOR, 2014). Essas são plantas com atividade farmacológica conhecida, forma farmacêutica desenvolvida e devidamente registrada em órgão competente para dispensação terapêutica.

Diversas espécies da Asteraceae possuem atividades biológicas comprovadas como: antioxidante (FABRI; NOGUEIRA; SCIO, 2011; GARCÍA-RISCO et al., 2017), antimicrobiana (FABRI; NOGUEIRA; SCIO, 2011), anti-inflamatória (CAPELARI-OLIVEIRA et al., 2011), antileishmania (JENSEN et al., 2017) entre outras. Shah, Seth e Maheshwari (2011) fizeram uma revisão de espécies de plantas com potencial anti-inflamatório, entre as plantas citadas no estudo estão a: *Mikania cordata*, *Artemisia monosperma*, *Bidens bipinnata*, entre outras espécies da Asteraceae. Neste mesmo estudo, espécies da Asteraceae foram citadas como: inibidoras da COX (ciclo-oxigenase), inibidoras da lipoxigenase, inibidoras da elastase e inibidoras da oxido nítrico sintase (SHAH; SETH; MAHESHWARI, 2011).

Um exemplo destas atividades se relaciona ao extrato etanólico das partes aéreas de *Lychnophora passerina* (Asteraceae), que em teste *in vitro* (macrófagos) inibiu a produção de NO (óxido nítrico) e TNF- α (fator de crescimento tumoral- α), e induziu a produção de IL-10 (interleucina-10), citocina anti-inflamatória, nas doses de 10, 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$ em modelo de inflamação induzido por LPS (lipopolissacarídeos) e TNF- γ (1 $\mu\text{g/ml}$ +10 UI/ml) (CAPELARI-OLIVEIRA et al., 2011). O extrato de *L. passerina* também foi avaliado em modelo de edema de pata induzido por carragenina. Neste teste o tratamento foi realizado via tópica; o grupo que recebeu tratamento com diclofenaco gel formou 6% de edema, o controle negativo 30% de edema e a pomada com 10% de extrato formou 12,6% de edema, demonstrando assim um efeito anti-inflamatório tópico da planta (CAPELARI-OLIVEIRA et al., 2011).

Não apenas os extratos das espécies da Asteraceae apresentam atividades biológicas, mas também compostos isolados. Podem ser citadas as lactonas sesquiterpenas isoladas de *Onopordum illyricum* (Asteraceae), que inibiram a transcrição do NF- κB nas concentrações de 3,6 e 8,6 μM (IC_{50}) em testes *in vitro*. Esta planta é usada popularmente na região do mediterrâneo para inflamações urinárias e respiratórias (FORMISANO et al., 2017).

Os exemplos acima relatam espécies da Asteraceae que possuem sua atividade anti-inflamatória comprovada em estudos experimentais. No entanto, espécies desta família também são relatadas como anti-inflamatória em estudos etnobotânicos. Dentro deste contexto de indicações populares ou tradicionais para fins anti-inflamatórios, cicatrização e hematomas, podem ser citadas algumas plantas, como: *Bidens pilosa*, indicada por moradores de um bairro de Porto Alegre, Rio Grande do Sul (VENDRUSCOLO; MENTZ, 2006); *Santolina chamaecyparissus* utilizada na região do mediterrâneo (TUNDIS; LOIZZO, 2018); *Santolina oblongifolia*; *Santolina rosmarinifolia* utilizada na Espanha (TUNDIS; LOIZZO, 2018) e *C. uniflora* (RAMOS et al., 2016). Estes são alguns exemplos de espécies que são indicadas

popularmente para processos inflamatórios, demonstrando a importância da Asteraceae em relação à atividade anti-inflamatória.

3.1.2 Inflamação

Para comprovar a atividade anti-inflamatória das plantas que são indicadas popularmente ou tradicionalmente para processos inflamatórios, existem diversos modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. A quimiotaxia de leucócitos é um exemplo de teste *in vitro*, e entre os modelos *in vivo*, pode-se citar o modelo inflamatório por irritante químico em cavidade, e o teste de edema de pata induzido por irritantes (SOUZA et al., 2003).

Entre os modelos experimentais inflamatórios *in vivo*, existem os cutâneos, onde a aplicação do agente irritante é realizada por via tópica ou subcutânea, e o tratamento pode ser realizado tanto por via tópica quanto oral (CAI et al., 2014; SARAIVA et al., 2011). Este tipo de modelo experimental *in vivo* foi selecionado para avaliação do ECU, levando em consideração o relato popular descrito no estudo de Ramos e colaboradores (2016), onde 98,1% dos usuários de *C. uniflora* utilizam via tópica e 33,8% por via oral. Sendo assim, um modelo experimental cutâneo é viável para avaliar as duas vias de administração.

O processo inflamatório pode ser desencadeado por estímulos exógenos, que são os geralmente utilizados em estudos experimentais, mas também por estímulos endógenos, como: necrose tecidual, trombose, infarto, hemorragia, entre outros (MACOVEI et al., 2017). Entre os agentes flogísticos exógenos, podemos citar: infecciosos (bactérias e toxinas), térmicos (queimaduras), de força mecânica (impacto ou lesão) ou químicos. Nos modelos *in vitro* e *in vivo* são utilizadas substâncias químicas irritantes, sendo alguns exemplos: carragina, óleo de cróton, TAP (12-otetracanoelforbol-13-acetato), fenol, lipopolissacarídeo (LPS), serotonina, entre outros agentes (CAI et al., 2014; MOON et al., 2018; SARAIVA et al., 2011). Esses servem como ferramenta para o estudo do processo inflamatório que, por sua natureza, se apresenta de modo bastante complexo.

A inflamação é caracterizada por reações no tecido conjuntivo vascularizado, ocasionando lesão celular. O acúmulo de líquidos, leucócitos e mediadores nos tecidos extracelulares decorrendo de reações dos vasos sanguíneos é o que caracteriza o processo inflamatório. A resposta protetora tem por objetivo eliminar a causa da lesão celular, seja ela ocasionada por bactéria, vírus ou toxina; já o processo de reparo consiste em substituir o tecido lesado por células parenquimatosas e/ou tecido fibroblástico (MACK, 2017).

O processo inflamatório envolve o tecido conjuntivo vascularizado, plasma, vasos sanguíneos e células circulantes (leucócitos e plaquetas). A inflamação pode ser dividida em aguda e crônica, onde a aguda é caracterizada pela curta duração, presença de proteínas plasmáticas, migração de leucócitos e exsudação de líquido; já a inflamação crônica é caracterizada pela proliferação de vasos, presença de linfócitos e macrófagos, fibrose, necrose e longa duração (PALOMINO; MARTI, 2015).

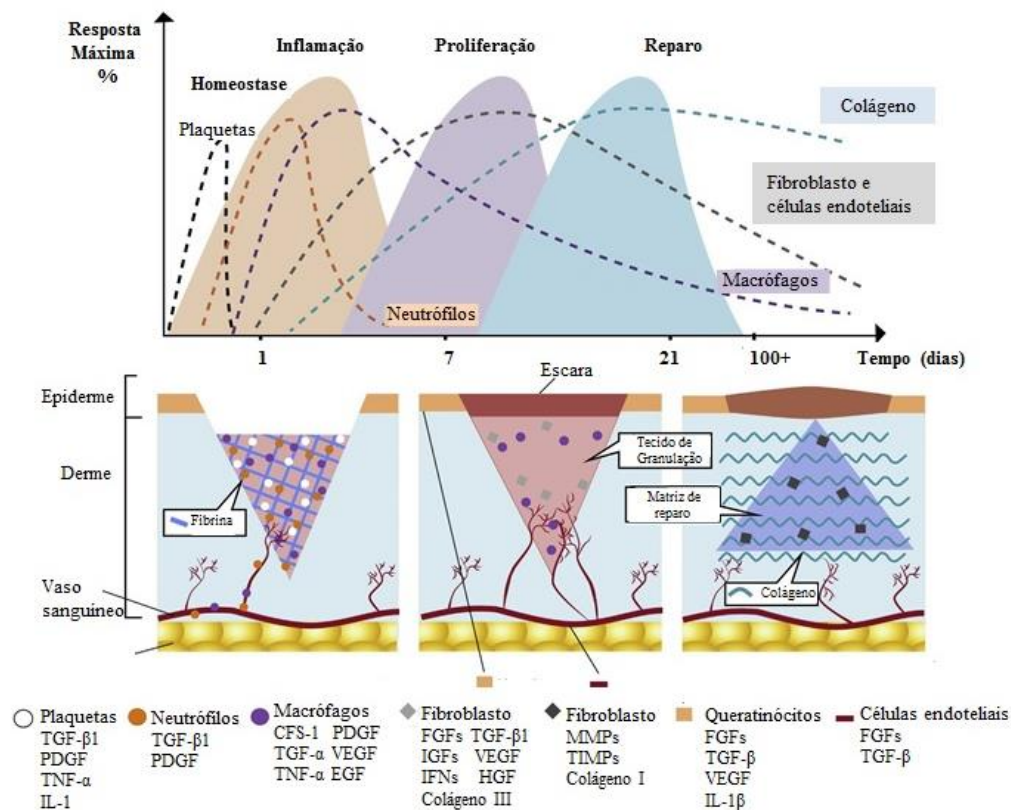
O processo inflamatório ocorre devido aos mediadores químicos da inflamação, que são produzidos a partir de algum estímulo e podem ter origem do plasma ou das células. Estes mediadores químicos iniciam sua ação biológica quando existe atividade enzimática direta, quando se ligam a um receptor específico na célula alvo ou quando à uma lesão oxidativa (MACK, 2017).

A resposta inflamatória faz parte da resposta imunológica; este mecanismo de defesa pode seguir dois caminhos, sendo eles a resposta imune inata ou imune adaptativa, que por sua vez são interligados (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000). O mecanismo imune inato detecta uma série de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) através do reconhecimento por diferentes receptores de reconhecimento padrão (RRP), presente em macrófagos, neutrófilos, células natural-Killer e células dendríticas. As principais respostas da imunidade inata são: liberação de mediadores inflamatórios, fagocitose, ativação de proteínas do complemento, citocinas, quimiocinas e proteínas de fase aguda (CRUVINEL et al., 2010; MEDZHITOV; JANEWAY, 2000). Já o sistema imune adaptativo tem por principais características a especificidade e memória, isto devido sua habilidade de reconhecer diferentes substâncias a exposições repetidas. As principais células responsáveis pela resposta imune adaptativa são os linfócitos, mas as células apresentadoras de antígenos têm um papel fundamental na sua ativação. Tem como principais mecanismos a produção de anticorpos, citocinas e quimiocinas (CRUVINEL et al., 2010; MEDZHITOV; JANEWAY, 2000).

Entre as diversas células de um organismo, os queratinócitos têm um papel ativo na expressão de respostas imunoprotetoras e imunopatológicas, já que esta é uma das células que constitui a pele, que é a primeira barreira de defesa dos mamíferos, répteis, aves e outros animais. A pele é constituída por epiderme e derme. A epiderme é a camada mais externa da pele, constituída geralmente por células como: queratinócitos, melanócitos, células de langerhans e Merkel. Já a derme é a camada mais interna, fornece a integridade estrutural, elasticidade e nutrição, é formada por fibroblastos e matriz extracelular rica em colágeno e fibras elásticas (KHAVKIN; ELLIS, 2011).

O processo inflamatório cutâneo, como em qualquer outro tecido, passa por três fases sendo elas: inflamação, proliferação e reparo. As plaquetas, neutrófilos, macrófagos, queratinócitos, células endoteliais e fibroblastos são as principais células do processo inflamatório cutâneo. As citocinas e seus receptores têm papel importante neste processo, estimulando a inflamação e o reparo tecidual. A IL-1 é um exemplo de citocina que estimula produção de quimiocinas em queratinócitos e fibroblastos. As citocinas podem ser classificadas em interleucinas (IL), fatores estimuladores de colônia (CDF), fator de necrose tumoral (TNF), interferons (IFN) e fatores de crescimento (TGF). A figura 11 representa as fases do processo inflamatório cutâneo e seus principais mediadores (ZOMER; TRENTIN, 2018).

Figura 11 - Fases da reparação tecidual (inflamação, proliferação e reparo) na pele e seus principais mediadores.



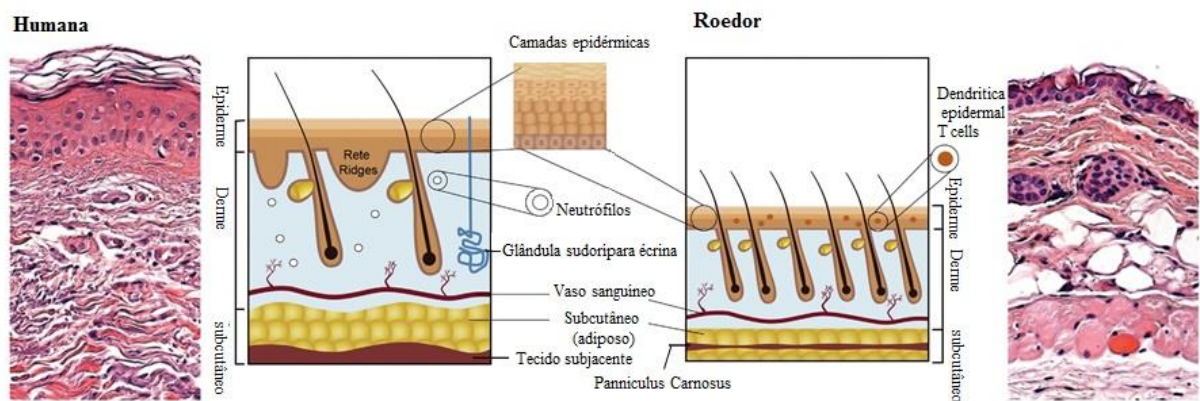
Fonte: adaptado de Zomer e Trentin (2018). MCP-1 - Proteína quimioatraente de monócitos; MMPs - Metaloproteína matriz; PDGF - fator de crescimento derivado de plaquetas; TGF- α – fator de crescimento transformador – α; TGF-β1 - O fator de crescimento transformador-β1; TGF-β - O fator de crescimento transformador-β; TIMPs - Inibidor tecidual de metaloproteinase; TNF-α - Fator de Necrose Tumoral-α; VEGF - Fator de Crescimento do Endotélio Vascular; HGF –fator de crescimento de hepatócito.

A inflamação nos modelos experimentais cutâneos pode ser induzida por óleo de cróton, ácido araquidônico, entre outros irritantes, e pode ser realizado em ratos, camundongos ou coelhos (BOUCLIER et al., 1990). Em 1975, Mills e Kligman descreveram o ensaio de edema

de orelha em coelhos utilizando compostos chamados comedogênicos, como: alcatrão de carvão, ácido oléico e tetradecano. A avaliação deste tipo de teste pode ser realizada quantificando o inchaço da orelha através da espessura ou peso (BOUCLIER et al., 1990). Nestes tipos de avaliações devem ser levadas em consideração as diferenças da pele dos roedores e da espécie humana (ZOMER; TRENTIN, 2018).

A pele dos roedores (Murinae) também é constituída por epiderme e derme, no entanto existem algumas diferenças com a pele humana. A pele dos roedores é mais fina (menos que 25 μm) que a humana (100 μm) e a epiderme humana é constituída por 5 a 10 células, enquanto as espécies de roedores têm de 2 a 3 células. Estas características influenciam nos aspectos de absorção percutânea e também na função de barreira (proteção/imunidade). Outra diferença relevante entre a pele humana e dos roedores é a presença do *Panniculus carnosus* (camada muscular fina) na camada subcutânea dos roedores e ausência na humana. Esta característica faz com que roedores tenham uma contração muscular potencial, característica esta que é altamente variável na pele humana, já que a derme é ligada apenas ao tecido subcutâneo (ZOMER; TRENTIN, 2018), conforme figura 12. Outro aspecto importante é a diferença do genoma entre as espécies; os ratos têm genes altamente expressos na pele em que a pele humana não expressa, sendo que alguns deles estão relacionados ao sistema imunológico (GERBER et al., 2014).

Figura 12 - Diferenças morfológicas da pele humana e de roedores.



Fonte: Gerber et al. (2014); Zomer e Trentin (2018).

3.2 METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA

3.2.1 Equipamentos e materiais

Para avaliação da anti-inflamatória através do modelo de edema de orelha, foi utilizado micrometro da Digimess, pipetas automáticas da Digipet e solventes da Synth, Sigma-Aldrich, Metaquímica, Aché, Lsbras, Vetnil, Sorimax e Bayer (Tabela 1).

Tabela 1 - Substâncias utilizadas nos ensaios biológicos de edema de orelha.

SUBSTÂNCIA	ORIGEM
Acetona	Synth
Ácido araquidônico	Sigma
Capsaicina	Galena
Dexametasona	Aché
Diclofenaco	Metaquímica
Etanol 96°GL	Lsbras
Fenol	Sigma
Histamina	Sigma
Óleo de cróton	Sigma
Quetamina	Vetnil
Solução salina 0,9%	Sorimax
Xilazina	Bayer

Fonte: autor.

3.2.2 Animais

Os animais utilizados foram camundongos *Swiss* machos (peso aproximado 25-30g), fornecidos pelo Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com cama de maravalha, com livre acesso à água e alimento e sob condições ambientais padronizadas (ciclos de claro-escuro de 12 horas e temperatura controlada de $21\pm 2^{\circ}\text{C}$). A utilização dos animais seguiu os Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório (*Principles of Laboratory Animal Care*, Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América, NIH, publicação número 85-23, revisada em 1996). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Extremo Sul Catarinense, sob o número 066/2014-2 que segue a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008.

3.2.3 Edema de orelha induzido por óleo de cróton: via oral

Os animais foram divididos em cinco grupos, sendo três grupos tratados com ECU nas doses 100, 250, 500 mg de ECU/kg, um grupo (controle positivo) tratado com diclofenaco sódio 50 mg/kg e 1 grupo (controle negativo) tratado com água: óleo de milho (1:1). Para administração do ECU foi utilizado como veículo água: óleo de milho (1:1), sendo este utilizado para tratamento do grupo controle. Todos os animais receberam o tratamento por via oral 1 hora antes da aplicação do agente irritante óleo de cróton 5% (v/v) diluído em acetona (20 µL) por via tópica. Na orelha contralateral foi aplicado 20 µL de acetona por via tópica (n= 6/grupo). O edema foi avaliado após 6 horas da aplicação do agente irritante (CAI et al., 2014; NOGUEIRA et al., 2005).

3.2.4 Edema de orelha induzido por óleo de cróton: via tópica

Os animais foram divididos em seis grupos, sendo quatro grupos tratados com ECU nas doses 1, 2, 4, 8 mg de ECU/orelha/20 µL, um grupo tratado com dexametasona 0,08 mg/orelha/20 µL (controle positivo) e um grupo (Controle negativo) tratado com acetona 80% 20 µL. Para aplicação do ECU foi utilizado como veículo acetona 80%, sendo este utilizado para tratamento do grupo controle. Todos os animais receberam o tratamento por via tópica em uma das orelhas, após 15 minutos foi aplicado nesta mesma orelha o agente irritante óleo de cróton 5% (v/v) em acetona (20 µL) e na orelha contralateral 20 µL de acetona (n= 6/grupo). O edema foi avaliado após 6 horas da aplicação do agente irritante (SARAIVA et al., 2011).

A dose de ECU que apresentou o melhor resultado em relação à atividade anti-inflamatória, foi utilizada nos demais testes de edema de orelha induzidos por diferentes agentes inflamatórios (ácido araquidônico, fenol, capsaicina e histamina) no intuito de estabelecer um possível mecanismo de ação.

3.2.5 Edema de orelha induzido por ácido araquidônico: via tópica

Os animais foram divididos em grupo ECU 4 mg/orelha/20 µL, grupo diclofenaco de sódio 3 mg/orelha/20 µL (controle positivo) e grupo controle negativo 20 µL acetona 80%. Todos os animais receberam tratamento por via tópica em uma das orelhas e após 15 minutos foi aplicado na mesma orelha por via tópica 20 µL de ácido araquidônico (0,1 mg/µL em

acetona) e as orelhas contralaterais receberam 20 µL de acetona (n= 6/grupo). O edema foi avaliado após 1 hora da aplicação do agente irritante (SARAIVA et al., 2011).

3.2.6 Edema de orelha induzido por fenol: via tópica

Os animais foram divididos em grupo ECU 4 mg/orelha/20 µL, grupo dexametasona 0,08 mg/orelha/20 µL (controle positivo) e grupo controle negativo 20 µL acetona 80%. Todos os animais receberam tratamento por via tópica em uma das orelhas e após 15 minutos foi aplicado na mesma orelha por via tópica 20 µL de fenol (solução 10% em acetona) e as orelhas contralaterais receberam 20 µL de acetona (n= 6/grupo). O edema foi avaliado após 1 hora da aplicação do agente irritante (SARAIVA et al., 2011).

3.2.7 Edema de orelha induzido por capsaicina: via tópica

Os animais foram divididos em grupo ECU 4 mg/orelha/20 µL, grupo dexametasona 0,08 mg/orelha/20 µL e (controle positivo) grupo controle 20 µL acetona 80%. Todos os animais receberam tratamento por via tópica em uma das orelhas e após 15 minutos foi aplicado na mesma orelha por via tópica 20 µL de capsaicina (0,01 mg/µL em álcool 90%) e as orelhas contralaterais receberam 20 µL de acetona (n= 6/grupo). O edema foi avaliado após 30 minutos da aplicação do agente irritante (SARAIVA et al., 2011).

3.2.8 Edema de orelha induzido por histamina: via tópica

Os animais foram divididos em grupo ECU 4 mg/orelha/20 µL, grupo dexametasona 0,08 mg/orelha/20 µL (controle positivo) e grupo controle negativo 20 µL acetona 80%. Todos os animais receberam tratamento por via tópica em uma das orelhas e após 30 minutos foi aplicado na mesma orelha por via subcutânea 5 µL histamina (0,1 mg/µL em salina) e as orelhas contralaterais receberam 5 µL de solução salina (n= 6/grupo). O edema foi avaliado após 2 horas da aplicação do agente irritante (SARAIVA et al., 2011).

3.2.9 Medição do edema de orelha

A espessura da orelha foi avaliada em micrômetros com o auxílio de um micrômetro digital. O percentual de edema foi expresso pela fórmula: percentual de edema % = $[(EI - ENI) / ENI] \times 100$

x100]/ ENI, onde EI é a espessura da orelha inflamada e ENI é a espessura da orelha não inflamada (SARAIVA et al., 2011; CAI et al., 2014).

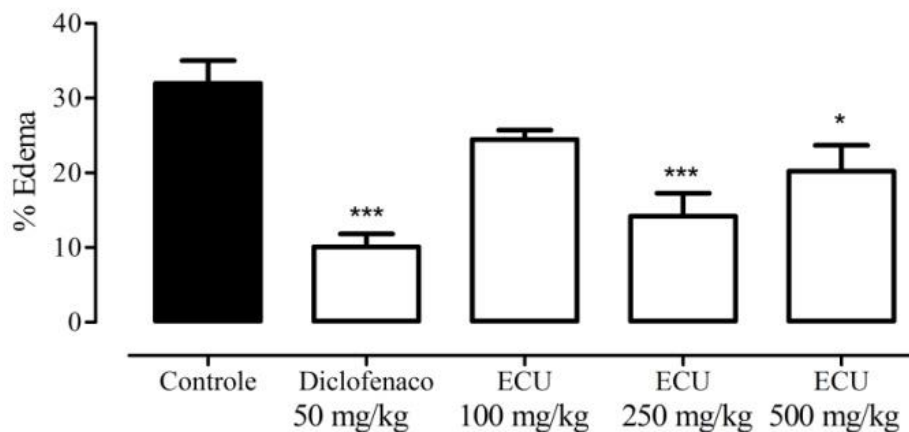
3.2.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram determinadas através da Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste Post Hoc Dunnet para determinação das diferenças estatísticas. Uma diferença de $P < 0.05$ foi considerada estatisticamente significativa. O pacote estatístico utilizado foi GraphPadPrism 5.0.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO DA AVALIAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA

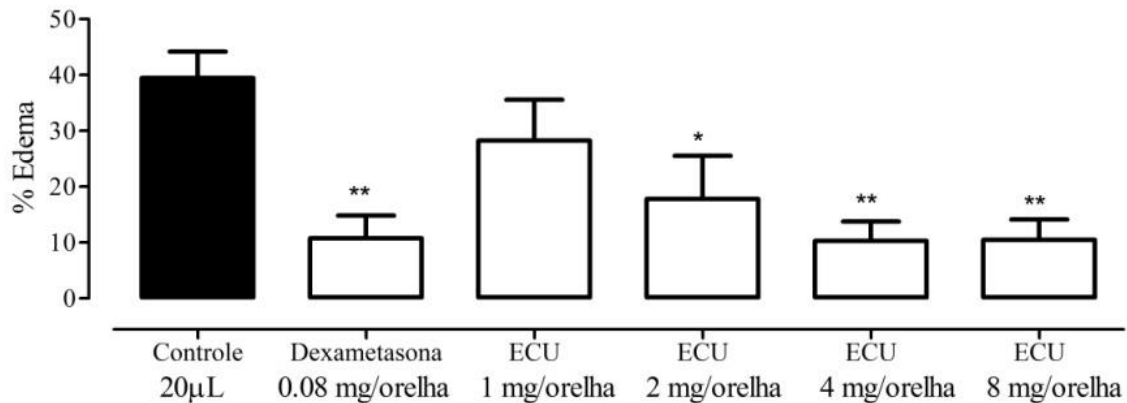
O ECU apresentou atividade anti-inflamatória tanto por via oral quanto via tópica em modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton. Com tratamento por via oral, o ECU reduziu o edema causado por óleo de cróton nas doses de 250 e 500 mg/kg (Figura 13). Já o tratamento por via tópica com ECU reduziu o edema por óleo de cróton nas doses de 2, 4, e 8 mg/orelha (Figura 14).

Figura 13 – Efeito do ECU administrado por via oral no modelo edema de orelha induzido por óleo de cróton administrado em camundongos Swiss.



Fonte: Autor. Controle (água e óleo de milho/v.o); diclofenaco (50 mg/kg/v.o); ECU (100 mg, 250 mg, 500 mg/kg/v.o.); (n=6/grupo). Após 6 horas a espessura da orelha foi medida com micrômetro, e os resultados expressos através do % de edema. As barras representam a média \pm E.P.M do edema de orelha (%), $p < 0,05$ representa o nível de significância em relação ao controle. A análise estatística foi realizada com GraphPadPrism 5.0 através do ANOVA de uma via seguido do teste Dunnet.

4Figura 14 - Efeito do ECU administrado por via tópica no modelo edema de orelha induzido por óleo de cróton administrado em camundongos *Swiss*.



Fonte: Autor. Controle (acetona 80%, 20µL/orelha/v.t); dexametasona (0,08mg/20µ/orelha/ v.t); ECU (1, 2, 4, e 8mg/20µ/orelha/v.t); (n=6/grupo). Após 6 horas a espessura da orelha foi medida com micrômetro, e os resultados expressos através do % de edema. As barras representam a média ± E.P.M do % edema de p< 0,05 representa o nível de significância em relação ao controle. A análise estatística foi realizada com GraphPadPrism 5.0 através do ANOVA de uma via seguido do teste Dunnet. ED50 =1,330 mg/orelha com intervalo de confiança de 95% (0,7523-2,352).

Sabe-se da atividade anti-inflamatória por via intraperitoneal do extrato alcoólico das folhas de *C. uniflora* pelo modelo de pleurisia induzido por carragenina. No entanto, o objetivo deste estudo é constatar esta ação em um modelo experimental que se aproxime do modo de preparo e uso da população. Conforme Ramos e colaboradores (2016), a população utiliza as inflorescências da *C. uniflora* preparadas pelo método de maceração a frio com uma solução hidroalcoólica. Por este motivo as inflorescências da planta foram coletadas no Balneário Rincão, Santa Catarina, Brasil, local relatado por Ramos e colaboradores como um local de coleta pela população, e preparados por maceração utilizando solvente hidroalcoólico. A população indica a aplicação do extrato por via tópica e oral para processos inflamatórios como edemas e dores musculares, e por este critério o modelo experimental utilizado neste estudo foi o edema de orelha, com tratamento por via tópica e oral.

O modelo experimental de edema de orelha foi utilizado para avaliar a *C. prunifolia*, onde o tratamento tópico na dose de 1 mg/orelha do extrato etanólico das partes superiores de *C. prunifolia* reduziu inflamação induzida por 12-otetracanoelforbol-13-acetato (TPA). Frações ricas de flavonoides e terpenos obtidas do extrato etanólico desta mesma espécie também reduziram o edema de orelha induzido por TPA nas doses de 0,5 e 1 mg/orelha (GUEVARA; GIRALDO; VELANDIA, 2011). Conforme figura 14, o ECU não reduziu edema induzido por óleo de cróton na dose de 1 mg/orelha, mas reduziu nas doses de 2, 4 e 8 mg/orelha.

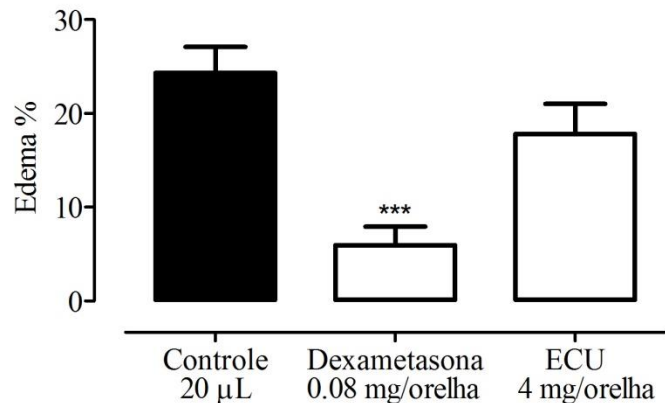
O óleo de cróton contém 12-otetracanoelforbol-13-acetato (TPA) e outros ésteres de forbol que são agentes irritantes que ativam a proteína quinase C, que, por sua vez, ativa as enzimas da cascata da inflamação (HANSEN; MONTEIRO-RIVIERE; SMART, 1990). Em queratinócitos humanos o óleo de cróton estimula a produção intracelular de IL-8, IL-1 β , TNF- α e GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos) (WILMER et al., 1994). Tubaro et al., (1986) avaliaram o tempo de contanto do óleo de cróton na orelha de roedores em relação ao seu peso; foi constatado que 6 horas após a aplicação do óleo de cróton ocorreu o maior nível de edema. Após, ocorre uma diminuição e novamente um aumento em 9 horas, e após diminui por completo em 48 horas. O óleo de cróton não causa necrose, mas proporciona uma intensa infiltração de polimorfonucleares na camada subepidérmica e dérmica.

O edema induzido por óleo de cróton pode ser reduzido por dexametasona (DA SILVA et al., 2018), indometacina (NOGUEIRA et al., 2005), ibuprofeno (CAI et al., 2014) e diclofenaco sódico (PONGPRAYOON et al., 1997). Os controles positivos (dexametasona e diclofenaco de sódio) utilizados foram eficientes para redução do edema.

O óleo de cróton é um dos principais agentes irritantes utilizados no modelo de edema de orelha. No entanto, outros agentes flogísticos também são utilizados, como o fenol (MURRAY et al., 2007) e o ácido araquidônico (DA SILVA et al., 2018). O uso de irritantes que causam inflamação por diferentes mecanismos é relevante para caracterizar uma possível via de ação farmacológica (SARAIVA et al., 2011). Por este motivo, neste estudo foi utilizado além do óleo de cróton, a capsaicina, a histamina, o ácido araquidônico e o fenol. O edema de orelha induzido por óleo de cróton foi avaliado tanto com tratamento por via oral quanto tópica. Já os demais agentes irritantes foram avaliados apenas com tratamento por via tópica, com a dose de 4 mg/orelhas de ECU e foram utilizados como controle positivo a administração tópica de dexametasona ou diclofenaco de sódio.

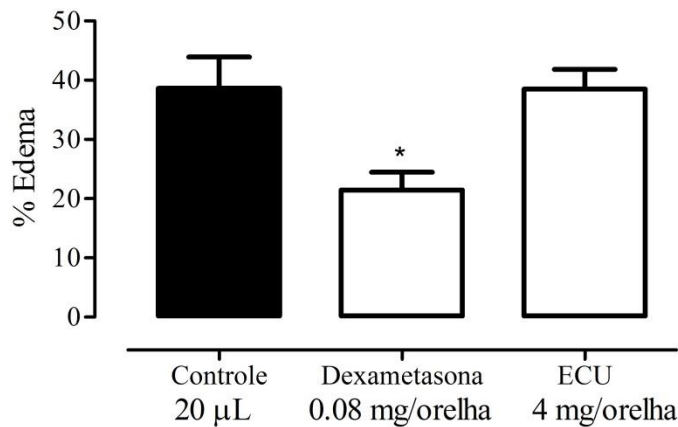
Nos modelos de edema induzido por capsaicina e histamina o ECU não reduziu o edema na dose de 4 mg/orelha, já a dexametasona foi eficiente na redução do edema para os dois modelos, conforme representado nas figuras 15 e 16.

Figura 15 - Efeito do ECU administrado por via tópica no modelo de edema de orelha induzido por capsaicina em camundongos *Swiss*.



Fonte: Autor. Controle (acetona 80%, 20µL/orelha/ v.t); dexametasona (0,08mg/20µL/orelha/ v.t); ECU (4mg/20µL/orelha/ v.t); (n=6/grupo). Após 30 minutos a espessura da orelha foi medida com micrômetro, e os resultados expressos através do % de edema. As barras representam a média ± E.P.M do edema de orelha (%), $p < 0,05$ representa o nível de significância em relação ao controle. A análise estatística foi realizada com GraphPadPrism 5.0 através do ANOVA de uma via seguido do teste Dunnet.

Figura 16 - Efeito do ECU administrado por via tópica no modelo de edema de orelha induzido por histamina em camundongos *Swiss*



Fonte: Autor. Controle (acetona 80%, 20µL/orelha/v.t); dexametasona (0,08mg/20µL/orelha/v.t); ECU (4mg/20µL/orelha/v.t); (n=6/grupo). Após 2 horas a espessura da orelha foi medida com micrômetro, e os resultados expressos através do % de edema. As barras representam a média ± E.P.M do edema de orelha (%), $p < 0,05$ representa o nível de significância em relação ao controle. A análise estatística foi realizada com GraphPadPrism 5.0 através do ANOVA de uma via seguido do teste Dunnet.

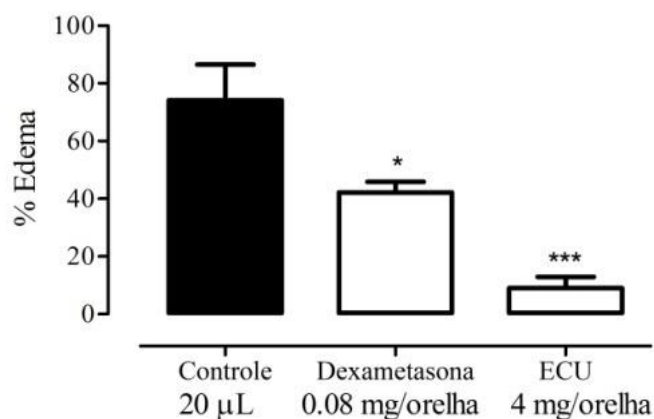
A capsaicina é um alcalóide irritante que induz a inflamação através da ativação do receptor TRPV1 (receptores vanilóides de potencial transitório 1), provocando uma sensação de queimação. Este receptor ativa com estímulos térmicos, funcionando como um transdutor de estímulos dolorosos e também estimulando a liberação de mediadores inflamatórios (CATERINA et al., 1997). A capsaicina quando aplicada por via tópica causa uma inflamação

neurogênica, causando vasodilatação, extravasamento plasmático e sensibilização dolorosa (HOLZER, 1991; INOUE; NAGATA; KOSHIHARA, 1995).

Gábor e Rázga (1992) causaram inflamação cutânea em orelhas de ratos com capsaicina; o edema foi avaliado por 24 horas e pode-se constatar que o maior nível de edema ocorreu em 1 hora após aplicação tópica deste agente flogístico, e este vai diminuindo ao passar do tempo, reduzindo por completo em 24h.

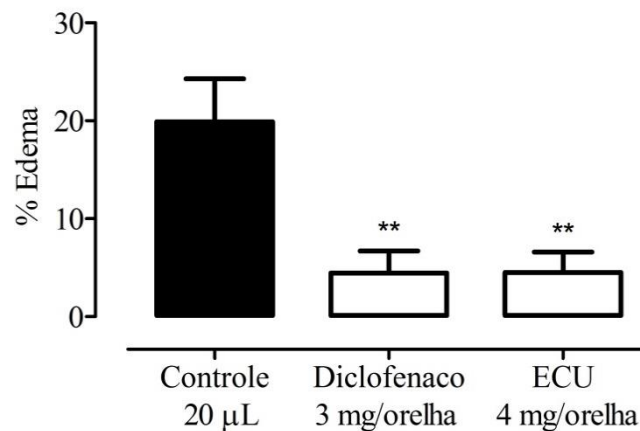
Os principais mediadores envolvidos na inflamação induzida por capsaicina são as aminas vasoativas, como a serotonina e histamina (HOLZER P., 1991; INOUE; NAGATA; KOSHIHARA, 1995). A histamina é uma amina vasoativa que está entre os primeiros mediadores a serem liberados na inflamação aguda (DVORAK et al., 2003). A ativação de receptores histaminérgicos causa diversos efeitos, sendo alguns deles importantes no processo inflamatório, tais como: aumento da permeabilidade vascular, produção de quimiocinas e produção de moléculas de adesão que facilitam a infiltração celular (ZAMPELI; TILIGADA, 2009). O ECU não reduziu o edema causado por capsaicina, como também não reduziu edema causado por histamina, sugerindo assim que o ECU não reduz inflamação causada por aminas vasoativas. No entanto, o ECU teve ação anti-inflamatória nos modelos de edema de orelha induzido por fenol e ácido araquidônico, conforme ilustrado nas figuras 17 e 18.

Figura 17 - Efeito do ECU administrado por via tópica no modelo de edema de orelha induzido por fenol via tópica em camundongos *Swiss*.



Fonte: Autor. Controle (acetona 80%, 20µL/orelha/v.t); dexametasona (0,08mg/20µ/orelha/v.t); ECU (4mg/20µ/orelha/VT); (n=6/grupo). Após 1 hora a espessura da orelha foi medida com micrômetro, e os resultados expressos através do % de edema. As barras representam a média ± E.P.M do edema de orelha (%), $p < 0,05$ representa o nível de significância em relação ao controle. A análise estatística foi realizada com GraphPadPrism 5.0 através do ANOVA de uma via seguido do teste Dunnet.

Figura 18 - Efeito do ECU administrado por via tópica no modelo de edema de orelha induzido por ácido araquidônico via tópica em camundongos *Swiss*.



Fonte: Autor. Controle (acetona 80%, 20µL/orelha/v.t); diclofenaco (3 mg/20µ/orelha/v.t); ECU (4mg/20µ/orelha/v.t); (n=6/grupo). Após 1 hora a espessura da orelha foi medida com micrômetro, e os resultados expressos através do % de edema. As barras representam a média ± E.P.M do edema de orelha (%), $p < 0,05$ representa o nível de significância em relação ao controle. A análise estatística foi realizada com GraphPadPrism 5.0 através do ANOVA de uma via seguido do teste Dunnet.

O fenol induz a inflamação por um mecanismo independente de proteína quinase. A inflamação por este irritante é decorrente de diversos mecanismos, entre eles a interrupção da membrana celular de queratócitos levando a liberação de citocinas inflamatórias, metabólitos do ácido araquidônico e espécies reativas de oxigênio. Estimulando mediadores como $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, NO e ROS (espécies reativas de oxigênio), este agente irritante causa uma resposta inflamatória potencializada pois induz o estresse oxidativo (MURRAY et al., 2007; SHVEDOVA et al., 2000). O ECU reduziu significativamente o edema por fenol, sugerindo assim que, além da atividade anti-inflamatória, indica que o ECU também pode ter uma atividade antioxidante.

O ECU também reduziu o edema causado por ácido araquidônico. Este é um derivado do ácido linoleico presente na membrana celular na forma esterificada como componente dos fosfolípidios, e é liberado da membrana através da ativação da fosfolipase celular por estímulos químicos, físicos ou mediadores inflamatórios (DAVIES et al., 1984; YANG et al., 2015). A aplicação tópica de ácido araquidônico na orelha de roedores induz a produção de leucotrienos e prostaglandinas (OPAS; BONNEY; HUMES, 1985). No entanto, o edema induzido por ácido araquidônico não é reduzido especificamente pela inibição das vias da lipoxigenase ou da ciclooxigenase, segundo Crummey et al. (1987) antagonista da histamina, inibidores de fosfodiesterase e antioxidantes também reduzem o edema causado por ácido araquidônico. Neste mesmo estudo foi confirmada a eficácia de inibidores da ciclooxigenase (2mg/orelha,

indometacina, 92.2% inibição do edema) e inibidores da lipoxigenase (2 mg/orelha, fenidona, 65,7% inibição do edema) para redução do edema por ácido araquidônico; e a ineficácia de corticosteroides que reduzem 4,4 ou 15% do edema (hidrocortisona 1 mg/orelha e dexametasona 0,66 mg/orelha (CRUMMEY et al., 1987).

Os resultados referentes aos tratamentos com o ECU, aonde houve a redução do edema causado por óleo de cróton, fenol e ácido araquidônico, sugerem que o extrato tenha atividade na via metabólica do ácido araquidônico (via lipoxigenase ou ciclooxigenase), e também sugere um potencial antioxidante, já que o extrato reduziu edema tanto no induzido por fenol e ácido araquidônico.

Este potencial anti-inflamatório e antioxidante pode estar relacionado as fitoquímicos presentes na planta como cromononas (DO NASCIMENTO et al., 2007) e flavonoides (DO NASCIMENTO; DE OLIVEIRA, 2004; LIMA et al., 2016). Os flavonoides têm o potencial de inibir mediadores da inflamação como TNF- α e IL-6, como também possuem capacidade de absorção de radicais livres (NILE et al., 2018). Alguns flavonoides também têm atividade anti-inflamatória em teste *in vivo*, diminuindo edema de orelha induzido por óleo de cróton nas doses 0,05, 0,1 e 0,5 mg/orelha (SHAIKH et al., 2012). Compostos com núcleo cromona (benzopirano) também tem atividade anti-inflamatória inibindo ciclooxigenase, 5-lipoxigenase, IL-5 e óxido nítrico (SILVA; PINTO; SILVA, 2016).

Entre as espécies de *Calea* estudadas em relação à atividade anti-inflamatória estão: *C. zacatechichi* (VENEGAS-FLORES; SEGURA-COBOS; VÁZQUEZ-CRUZ, 2002), *C. prunifolia* (GUEVARA; GIRALDO; VELANDIA, 2011), *C. pinnatifida* (FACCHIN, 2016), *C. urticifolia* (TORRES-RODRÍGUEZ et al., 2016) e *C. uniflora* (DA ROSA et al., 2017). Os farmacógenos utilizados para estas avaliações foram folhas ou partes áreas; os principais modelos utilizados foram edema de pata e pleurisia induzido por carragenina, edema de orelha induzido por TAP ou ensaio *in vitro* com inflamação induzida por LPS. Nestes estudos extratos brutos, frações e compostos isolados de espécies do gênero *Calea* obtiveram resultados relevantes em relação à atividade anti-inflamatória nos modelos de inflamação mencionados (DA ROSA et al., 2017; FACCHIN, 2016; GUEVARA; GIRALDO; VELANDIA, 2011; TORRES-RODRÍGUEZ et al., 2016; VENEGAS-FLORES; SEGURA-COBOS; VÁZQUEZ-CRUZ, 2002)

O extrato preparado por infusão aquosa das folhas *C. zacatechichi* reduziu o volume da inflamação e migração de neutrófilos no teste de edema de pata induzido por carragenina nas doses 10 e 100 mg/kg/v.o (VENEGAS-FLORES; SEGURA-COBOS; VÁZQUEZ-CRUZ, 2002). O extrato das folhas desta planta quando preparadas por refluxo em metanol 70%

também reduziu o edema causado por carragininina em teste de edema de pata nas doses de 150 e 300 mg/kg/v.o.; a partição deste extrato com clorofórmio gerou uma fração que também reduziu o edema na dose de 50 mg/kg/v.o, utilizando mesmo modelo de inflamação (SEGURA-COBOS; BAIZA-GUTMAN, 2010). Um teste *in vitro* realizado com fração do extrato clorofórmico de *C. zacatechichi* nomeada de SFD74 rica em flavonóides, mostrou redução dos níveis de prostaglandinas (PGE₂) em modelo de inflamação induzida por LPS em macrófagos de ratos (SEGURA-COBOS; BAIZA-GUTMAN, 2010).

Outro estudo *in vitro* relatou o potencial anti-inflamatório da *C. urticifolia*, onde o infuso das folhas desta espécie reduziu a expressão de COX-2 e p50-p65 NFkb, reduziu níveis de interferon, IL-1, IL-6 e diminui número de espécies reativas nas doses de 50, 75 e 100 µg/mL em macrófagos (RAW264.7) inflamados por LPS (TORRES-RODRÍGUEZ et al., 2016).

O extrato etanólico das folhas de *C. pinnatifida* nas doses 50 e 100 mg/kg/ip reduziu inflamação induzida pelo modelo de pleurisia induzida por carragininina, diminuiu da migração de leucócitos, neutrófilos, exsudação, MPO, ADA, NOx (metabólitos do óxido nítrico – nitrito e nitrato), TNF-α, IL-1 e IL-17 (FACCHIN, 2016). Este mesmo modelo experimental foi utilizado para avaliar o extrato das folhas *C. uniflora* preparado por maceração alcoólica, onde o extrato nas doses de 25 e 200 mg/Kg/ip reduziu níveis MPO, ADA, NOx, TNF-α, IFN-γ, MCP-1, e IL-6, migração celular (leucócitos, neutrófilos) e exsudação celular (DA ROSA et al., 2017).

3.4 CONCLUSÃO PARCIAL

Os resultados demonstram que o ECU foi eficaz na reduzir da inflamação em modelo edema de orelha induzido por óleo de crotón, nas doses de 2, 4 e 8 mg/orelha por via tópica; e nas doses por via oral de 250 e 500 mg/kg/v.o.

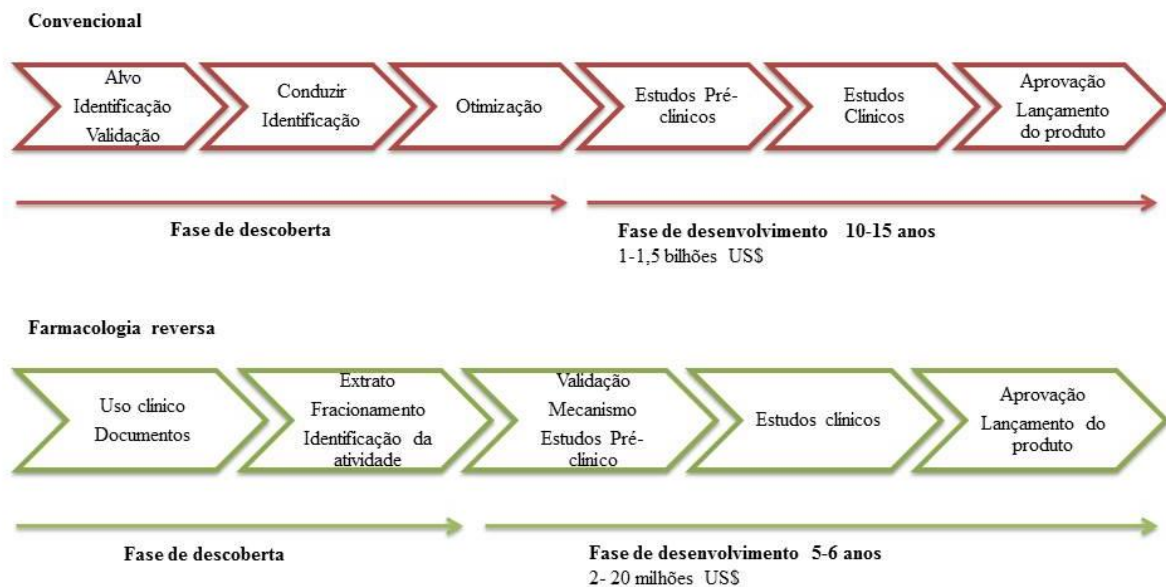
O conjunto de resultados dos testes de edema de orelha com diferentes irritantes (ácido araquidônico, fenol, histamina e capsaicina) com tratamento tópico (4 mg/orelha) demonstram que o extrato reduz a inflamação induzida por ácido araquidônico e fenol. Sugerindo assim, que o extrato tenha uma ação na via do ácido araquidônico, como também indica uma possível atividade antioxidante.

4 EFEITOS TOXICOLÓGICOS DO EXTRATO DE *Calea uniflora*

4.1 REFERÊNCIAL TEÓRICO

Para o desenvolvimento de um medicamento, seja ele sintético ou fitoterápico, é necessário uma série de investigações. Normalmente são realizados estudos pré-clínicos em ordem sequencial que são direcionados conforme seus resultados até chegar aos testes clínicos. No entanto, outra estratégia é bem utilizada para desenvolvimento de medicamentos, sendo ela, a farmacologia reversa ou etnofarmacologia. A farmacologia reversa baseia seu desenho experimental em efeitos terapêuticos de plantas reportados em textos antigos ou em conhecimento empírico relatado em estudos etnobotânicos. Esta estratégia visa comprovar cientificamente o potencial terapêutico de uma planta, ou composto isolado, através de ensaios de caracterização química, eficácia (testes farmacológicos) e segurança (teste toxicológico) (BUTTERWECK; NAHRSTEDT, 2012). As etapas para o desenvolvimento de um fármaco pelo método convencional e pelo método da farmacologia reversa estão ilustradas na figura 19 (PATWARDHAN; VAIDYA, 2010).

Figura 19 - Desenvolvimento de fármaco através método convencional versus farmacologia reversa.



Fonte: adaptado de Patwardhan e Vaidya (2010).

Dentre os estudos de eficácia e segurança no desenvolvimento de um fármaco, existem os ensaios pré-clínicos e os ensaios clínicos. Sendo os ensaios pré-clínicos todos os testes que não envolvem a administração em humanos, como testes *in silico*, *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*

(roedores principalmente); já os ensaios clínicos são aqueles realizados em humanos (SINGH, 2017).

Com isso, esta tese visa contribuir com os estudos pré-clínicos de *C. uniflora* utilizando a estratégia da farmacologia reversa. Como foi descrito na seção 3, os testes para atividade anti-inflamatória de *C. uniflora* foram baseados em um estudo etnobotânico realizado com esta espécie, considerando o conhecimento popular para preparação do extrato, ação terapêutica e administração (RAMOS et al., 2016). Os resultados obtidos na seção 3 sugerem o potencial anti-inflamatório do ECU em modelo experimental de edema de orelha. No entanto, além dos estudos farmacológicos, os estudos toxicológicos também são importantes, pois as informações destas duas áreas contribuem para: elucidar mecanismo de ação, estabelecer primeira dose em humanos, órgãos alvos, estabelecer parâmetros sorológicos e imunológicos, estabelecer riscos e benefícios, e orientar os estudos clínicos (KOCH; PLASSMANN, 2017; SHEETS, 2018).

Os testes preconizados para os estudos toxicológicos pré-clínico *in vivo*, são: teste toxicológico sistêmico (dose única, doses variadas e dose repetida), teste toxicológico com administração local (dérmica, foto-alergia, vaginal, retal, ocular, inalatória), teste toxicológico reprodutivo (fertilidade em machos, produtividade e desenvolvimento em fêmeas), alergenicidade, hipersensibilidade, mutagenicidade, genotoxicidade, cancerogenicidade e imonotoxicidade (SHEETS, 2018; SINGH, 2017).

Alguns destes testes são obrigatórios para início dos ensaios clínicos. Como por exemplo, para iniciar fase I dos ensaios clínicos, são necessários os testes toxicológicos sistêmicos. No entanto, alguns testes pré-clínicos podem ser realizados simultaneamente com os ensaios clínicos. Como por exemplo, os testes de fertilidade, que são necessários apenas para iniciar a III fase dos ensaios clínicos (SINGH, 2017). Por este motivo alguns autores usam o termo não-clínico para os testes pré-clínicos, já que nem todos são realizados antes dos ensaios clínicos, mas sim simultaneamente (SHEETS, 2018).

Os estudos toxicológicos pré-clínicos são estabelecidos por guias de diferentes órgãos. No entanto cada país possui seus próprios protocolos. No Brasil para o registro de um medicamento fitoterápico é necessário seguir a resolução RDC N 26, de 13 maio de 2014 do Ministério da Saúde, Agência de vigilância sanitária (ANVISA). As informações pré-clínicas e clínicas sobre a eficácia e segurança são necessárias para o relatório de registro. Esta resolução preconiza que os ensaios pré-clínicos de segurança devem ser realizados conforme a última versão do Guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessária para o desenvolvimento de medicamentos, elaborado por uma equipe da ANVISA.

Este documento foi elaborado seguindo os guias dos órgãos internacionais: *European medicines Agency* (EMA), *Food and drug administration* (FDA), *International conference on harmonisation* (ICH) e *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD).

Os guias destes órgãos são utilizados para avaliação de segurança de diversos extratos de plantas com potencial biológico, sendo que os guias da OECD são bem utilizados para o teste de dose única (aguda) e para o teste de dose repetida (AKRAM et al., 2018; UNUOFIN; OTUNOLA; AFOLAYAN, 2018), sendo que o próprio guia da ANVISA preconiza os guias da OECD para estes tipos de estudos.

4.1.1 Espécies da Asteraceae com efeito tóxico

Conforme a seção 3, o ECU tem atividade anti-inflamatória relevante em modelo experimental de edema de orelha, tanto por via oral como tópica. No entanto, a família Asteraceae a qual pertence à espécie estudada nesta tese (*C. uniflora*), possui espécies consideradas venenosas quando ingeridas por animais. São exemplos de plantas tóxicas: *Hymenoxys odorata*, *Hymenoxys richardsonii*, *Helenium autumnale*, *Helenium microcephalum*, *Gligeria africana*, *Baileya multiradiata* e *Xanthium strumarium* (RODRIGUEZ; TOWERS; MITCHELL, 1976).

Várias espécies da Asteraceae possuem atividades farmacológicas e toxicológicas, como o caso da *Senecio scandens* (Asteraceae), popularmente utilizada para febre fria, tosse, dor de garganta, amigdalite, rinite vermelha, rinite alérgica e outras indicações. Possui ações biológicas comprovadas como: antibacteriana, analgésica, antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral e antiviral (WANG; HUANG; CHEN, 2013). No entanto, espécies de *Senecio* têm na sua composição química alcalóides pirrolizidínicos, que são tóxicos para humanos e animais de grande porte (gado), dependendo da concentração da dose ingerida. A maioria dos alcaloides pirrolizidínicos pode causar hepatotoxicidade, pneumotoxicidade, genotoxicidade e neurotoxicidade (CASTELLS; MULDER; PÉREZ-TRUJILLO, 2014; WANG; HUANG; CHEN, 2013).

Outras espécies, como as do gênero *Pterocaulon* (Asteraceae), também apresentam estudos em relação a sua toxicidade, como é o caso de *Pterocaulon. Polystachyum* (extrato hexano) que causou modificações bioquímicas e alterações morfológicas em camundongos tratados na dose de 100, 200 e 400 mg/kg/v.o em teste agudo e subagudo. Já estudos em ratos constataram que o extrato hidroalcolóico de *Pterocaulon interruptum* tem DL₅₀ de 500 mg/kg/i.p e 1000 mg/kg/v.o (MEDEIROS-NEVES; TEIXEIRA; VON POSER, 2018).

São diversas as espécies desta família que possuem efeitos tóxicos descrito em literatura científica, o que demonstra a importância de avaliar o perfil de segurança das plantas desta família. Estudo preliminar com o extrato hidroalcoólico das inflorescências de *C. uniflora*, constatou algumas alterações comportamentais na primeira hora após a administração do extrato em teste toxicológico agudo com administração oral. Os animais tratados com doses de 100, 250, 500 e 1000 mg/kg administrados por via oral apresentaram sinais de alerta como: piloereção, agitação e tosse. Entretanto, estes sinais de toxicidade não foram observados com frequência, bem como o extrato não induziu mortalidade dos animais, sugerindo DL₅₀ maior que 1000 mg/kg/v.o (CARDOSO, 2014).

Devido ao ECU apresentar um potencial biológico (seção 3), como também ter relatado de sinais de toxicidade em estudo preliminar agudo (administração única, com diferentes doses), esta seção visa investigar os efeitos toxicológicos subagudo (dose repetida, 30 dias) via oral e também efeitos toxicológicos locais (agudo) com administração dérmica, verificando assim o perfil de segurança das duas vias utilizadas pela população.

4.2 METODOLOGIA DA AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA

4.2.1 Animais

Os animais utilizados para o estudo foram ratos *Wistar* machos (peso aproximado de 300 g) e fêmeas (peso aproximado de 200g), com 60 dias de vida, fornecidos pelo Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com cama de maravalha e livre acesso à água e alimento, sob condições ambientais padronizadas (ciclos de claro-escuro de 12 horas e temperatura controlada de 21±2°C). A utilização dos animais seguiu os Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório (*Principles of Laboratory Animal Care*, Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América, NIH, publicação número 85-23, revisada em 1996). Todos os procedimentos foram realizados após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Extremo Sul Catarinense (CEUA – UNESC), sob número 050/2014, que segue a Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008.

4.2.2 Ensaio Toxicológico subagudo oral

O ensaio seguiu a metodologia adaptada da norma 407 da *Organization for Economic Cooperation and Development* que avalia o efeito tóxico em dose repetida administrada por via oral (OECD, 2008). Para este teste foram utilizados animais de ambos os sexos, onde cada grupo foi composto por 10 machos e 10 fêmeas. Os animais foram tratados com ECU (diluído em água: óleo/ 1:1) nas concentrações de 100, 250, 500 e 1.000 mg/kg administrados uma vez ao dia, por via oral (gavagem). O grupo controle recebeu apenas veículo (água: óleo/ 1:1). Os animais foram tratados por um período de 30 dias. Estes foram pesados a cada 5 dias, aspectos comportamentais avaliados diariamente e a coleta de sangue para as análises bioquímicas e hematológicas foram realizadas no 30º dia do tratamento. Após o término do tratamento os animais foram submetidos à eutanásia. Fígado, rins, coração e pulmões foram retirados para análise macroscópica e histopatológica. Após análise macroscópica dos órgãos, estes foram conservados com formol 10% para posterior análise histológica.

4.2.2.1 Análises comportamentais

As análises comportamentais foram realizadas diariamente através da avaliação das atividades gerais dos animais, consumo de água, consumo de comida, peso corporal, piloereção, aumento da evacuação, comportamento estereotipado de autolimpeza, contorção, convulsão, respiração, ansiedade, depressão, capacidade exploratória, atividade motora, mortalidade, alteração visíveis na pelagem e coloração das mucosas.

A atividade exploratória e motora (espontânea) foi avaliada no modelo de campo aberto; a ansiedade e atividade exploratória foram avaliadas pelo modelo labirinto de cruz elevado; para avaliação de comportamento depressivo utilizou-se o modelo do nado forçado e as atividades motoras (forçada) foram avaliadas através do teste Rota-Rod. Estes testes foram realizados duas vezes durante o período observacional, sendo a primeira avaliação realizada no 15º dia de tratamento e a segunda no 30º dia de tratamento.

4.2.2.1.1 Campo aberto (Open-field)

Foi realizado em equipamento com 50 cm de altura e 60 cm de diâmetro, com piso dividido em 12 espaços demarcados por linhas. O animal foi cuidadosamente colocado no aparelho, onde explorou livremente o ambiente por 5 minutos. Foi analisado o número de linhas cruzadas, quantidade de bolos fecais depositados durante teste, frequência que o animal

permaneceu apoiado nas patas traseiras, tempo de permanência na periferia e centro do equipamento, além do tempo em que o animal permaneceu imobilizado. A cada troca de animal o equipamento foi higienizado com solução hidroalcoólica 30% (VIANNA et al., 2000).

4.2.2.1.2 Labirinto de cruz elevada (Elevated plus-maze)

Foi realizado com um aparelho que consiste de dois braços abertos (50 x 10 cm) e dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm), dispostos de forma perpendicular, formando uma plataforma central (5 x 5 cm), elevado a 50 cm do chão. O animal foi colocado na plataforma central virado para o braço aberto e teve 5 minutos para explorar o aparelho. Os parâmetros observados foram: tentativas de entradas e o tempo de permanência no braço aberto e fechado, além do número de bolos fecais depositados durante o período do teste. A cada troca de animal o equipamento foi higienizado com solução hidroalcoólica 30% (PELLOW et al., 1985).

4.2.2.1.3 Nado forçado (Forced Swimming Test)

Neste teste o animal foi colocado em um cilindro com água em temperatura de 23°C, em quantidade suficiente para o animal não conseguir apoiar as patas no fundo. Cada animal foi desafiado a nadar por 5 minutos onde se observou a imobilidade total ou movimentos para manter a cabeça fora da água sem intenção de escapar (DETKE; RICKELS; LUCKI, 1995).

4.2.2.1.4 Rota-Rod

O aparelho consiste em um cilindro giratório, onde foi avaliada a capacidade do animal de se manter sobre a barra em movimento. O animal foi colocado no equipamento que opera com a velocidade constante de 10 rpm, durante um período de 2 minutos, sendo reconduzido ao equipamento após a queda do animal por até três vezes (DI PATRE et al., 1989; PAUL; BALASUBRAMANIAM; KAZI, 1994).

4.2.2.2 Análise hematológica

As amostras de sangue foram acondicionadas em tubos heparinizados para posterior análise. Os parâmetros hematológicos analisados foram: número de hemácias, leucócitos e plaquetas, contadas em câmara de Neubauer. Para contagem das hemácias foi utilizada a solução de Hayen; para contagem de leucócitos a solução de Turk; para contagem de plaquetas

solução de Brecher. A diferenciação dos leucócitos foi realizada pela técnica de esfregaço, sendo utilizado para coloração das lâminas o corante panótico.

4.2.2.3 Análise bioquímica

As amostras de sangue total foram acondicionadas em tubos limpos e centrifugadas a 3.500 rpm (15min) para separação do soro. Os parâmetros bioquímicos analisados foram: aminotransferases (aspartato aminotransferase - AST e alanina aminotransferase - ALT), fosfatase alcalina, úreia, ácido úrico, colesterol (total), triglicerídeos, glicose e proteínas totais. Cada análise foi realizada de acordo com a bula dos Kits comerciais obtido da empresa Analisa® (Minas Gerais, Brasil).

4.2.2.4 Análise histológica

As amostras (fígado, rins, pulmões e coração) foram fixadas em solução de formalina e emblocadas em parafina. Após, foram cortadas 5 mm em micrótomo (Leica RM2255) e coradas com hematoxilina e eosina (corador Leica autosrainer XL). O emblocamento, corte e coloração seguiram os protocolos estabelecidos do Laboratório multiusuários de estudos em biologia (LAMEB) da Universidade Federal de Santa Catarina, disponíveis online no site do LAMEB. Então, foram analisadas por microscopia óptica em microscópio invertido Eclipse Ti-U (Nikon), e analisadas em aumento de 4x, 10x, 40x e 100x.

4.2.2.5 Análise estatística

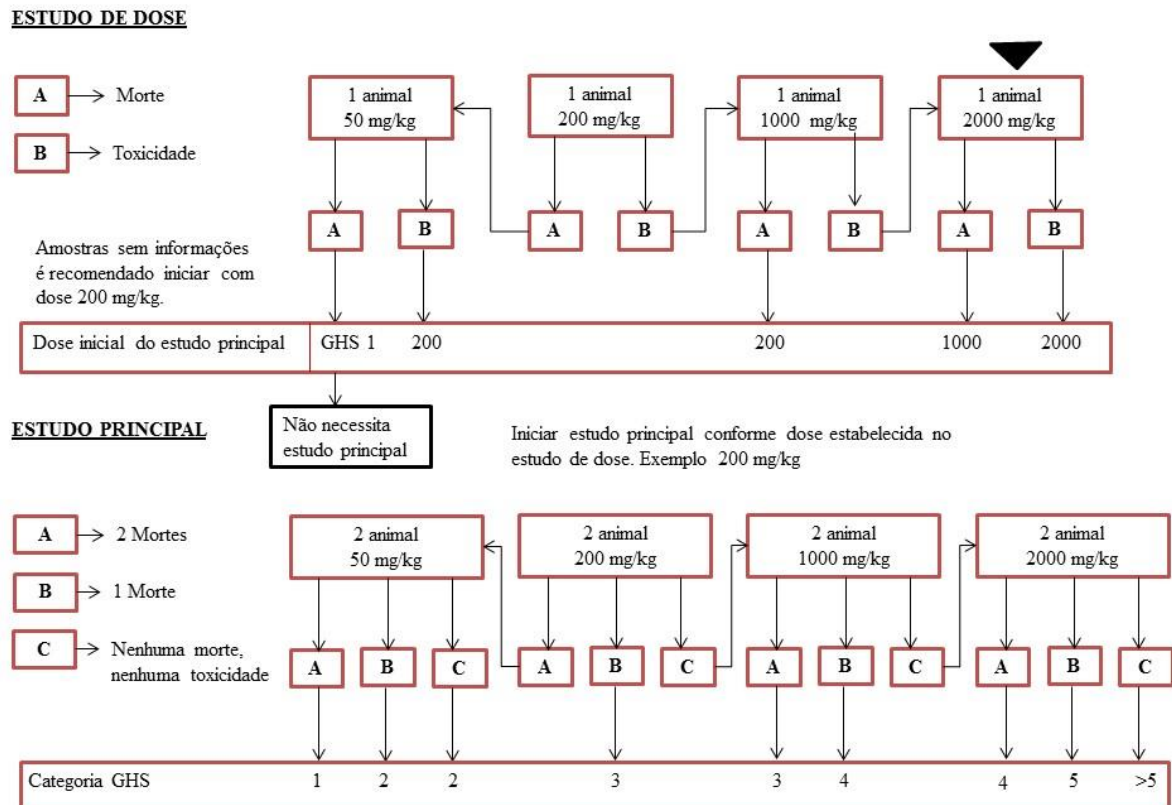
Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média ou mediana \pm intervalo interquartil. As diferenças entre os grupos foram determinadas através da Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste Dunnet para determinação das diferenças estatísticas. Uma diferença de $P < 0.05$ foi considerada estatisticamente significativa. O pacote estatístico utilizado foi GraphPadPrism 5.0.

4.2.3 Ensaio Toxicológico tópico

A toxicidade cutânea aguda do ECU foi avaliada conforme o guia número 402 adaptado (toxicidade aguda dérmica) da *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD, 2016). O procedimento seguiu o fluxograma do estudo de dose,

conforme figura 20, sendo utilizado 1 animal (fêmea) para cada dose de ECU (50, 200, 1000 e 2000 mg/kg; veículo: acetona 80%), iniciando com a dose 200 mg/kg. Em paralelo foi realizado o mesmo teste utilizando apenas o veículo. Para confirmar o resultado, foi realizado o teste seguindo o estudo principal (Figura 20).

Figura 20 - Fluxograma para teste toxicológico tóxico agudo



Fonte: adaptado de OECD (2016).

Para realizar o teste foi retirado o pêlo de uma área de 10% da superfície do corpo do animal, removido 24 horas antes da aplicação do ECU ou veículo. Foi aplicado o ECU ou veículo por via tópica na área depilada. O local de aplicação foi protegido com gaze porosa e fita não irritante. O período de exposição foi de 24 horas, após este período foi retirada a gaze porosa e realizou-se a higiene do local com água e gaze porosa. Os animais foram observados periodicamente durante as 24 horas seguintes após aplicação, com atenção especial entre 2 e 6 horas após aplicação do ECU e uma vez diariamente nos demais 14 dias. Foram observados sinais clínicos indicativos de toxicidade e mortalidade, ao fim do teste uma amostra da pele foi coletada e analisada conforme seção 4.2.2.4.

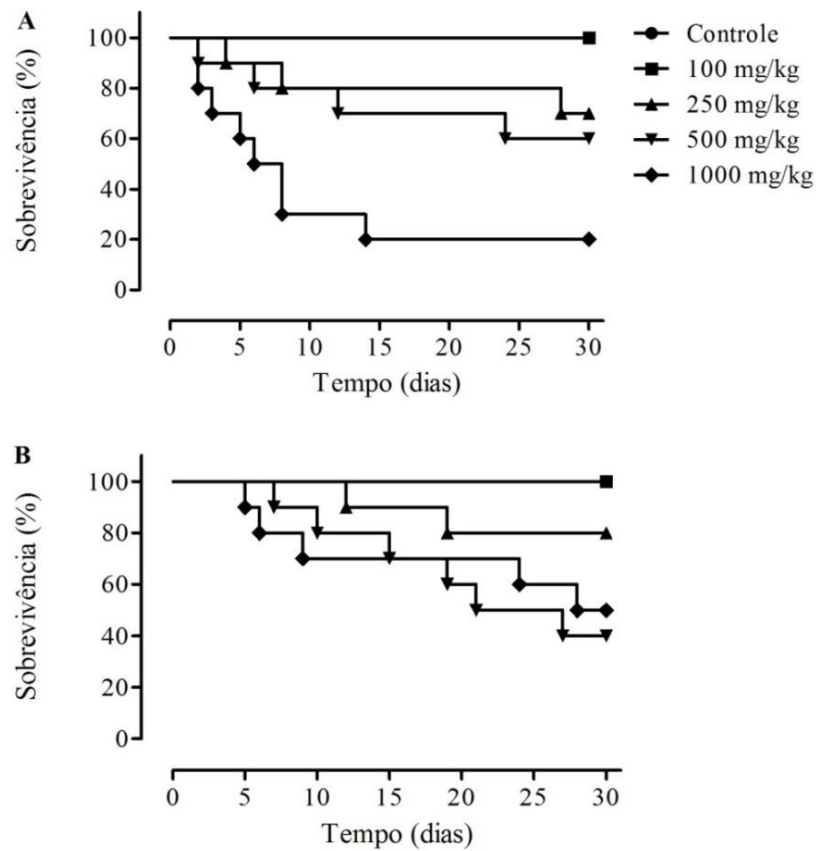
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO DA AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA

Na avaliação subaguda com administração oral, os animais apresentam sinais de toxicidade em todos os grupos que receberam ECU como: piloereção, sinais de tosse, dificuldade respiratória, sangramento nasal, comportamento sugestivo de dor e diarreia. Estes foram observados em todos os grupos tratados com a ECU, entretando na dose de 100 mg/kg os sinais foram menos frequentes. Os resultados contribuem com o estudo de Cardoso (2014), aonde foi observado piloereção, autolimpeza, sinais de agitação e tosse em ratos (*Wistar*) tratados com extrato hidroalcoólico das inflorescências de *C. uniflora* nas doses de 100, 250, 500 e 1000 mg/kg/v.o (dose única). Já no estudo de Ferraz e colaboradores (2009) não foi relatado nenhum destes sinais com a administração intraperitoneal (ratos *Wistar*) nas doses de 100 e 150 mg/kg do extrato metanólico das partes superiores de *C. uniflora* (dose única).

Na administração aguda do extrato de *C. uniflora*, tanto por via intraperitoneal (FERRAZ et al., 2009), quanto oral (CARDOSO, 2014), não houve registro de mortalidade. No entanto, 30 mortes ocorreram durante o tratamento subagudo (Figura 21), sendo que no grupo de 1000 mg/kg (machos) houve apenas 20% de sobrevivência, e por este motivo não foi possível realizar as análises nos testes: peso relativo dos órgãos, parâmetros bioquímicos, parâmetros hematológicos e testes comportamentais (campo aberto, labirinto em cruz elevado, natação forçada e rota-rod).

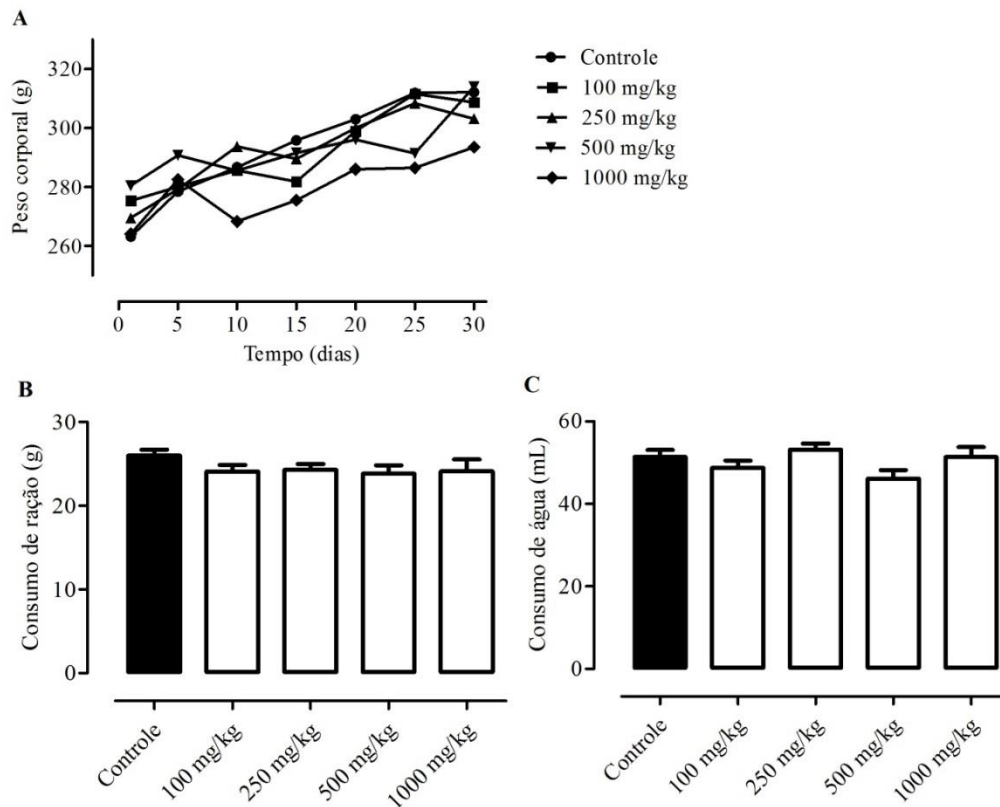
As figuras 22A (machos) e 23A (fêmeas) representam a evolução do peso corporal (média em g/animal) dos animais durante tratamento de 30 dias, relacionando com o consumo médio de água (Figuras 22B e 23B) e ração por animal (Figuras 22C e 23C). Os roedores foram pesados em intervalos de 5 dias, e o consumo de água e ração foi verificado diariamente. Em relação ao consumo de água e ração dos machos, não houve diferença estatísticas entre os grupos tratados com ECU e o grupo controle. Em todos os grupos o peso corporal dos animais aumentou durante os 30 dias de tratamento, no entanto, em alguns grupos houve oscilações de perda e ganho de peso. A queda do peso médio dos machos entre o 10^o e 15^o dia pode estar relacionada com o número elevado de mortes entre o 2^o e 10^o dia de tratamento.

Figura 21 - Percentual de sobrevivência ao tratamento com ECU 30 dias.



Fonte: Autor. Efeito do ECU na sobrevivência de machos (**A**) e fêmeas (**B**) tratados durante 30 dias com ECU (100, 250, 500 e 1000 mg/ kg/dia, v.o.). Os resultados foram expressos como porcentagem de sobrevivência (n = 10 por grupo). % de sobrevivência machos: controle n=10, 1000 mg/kg n=2, 500 mg/kg n=6, 250 mg/kg n=7, 100 mg/kg n=10; % de sobrevivência fêmeas controle n=10, 1000 mg/kg n=5, 500 mg/kg n=4, 250 mg/kg n=8, 100 mg/kg n=10).

Figura 22 - Evolução do peso corporal e consumo de ração e água dos machos.



Fonte: autor. O gráfico **A** apresenta a evolução da média do peso corporal (g) dos machos em 30 dias, avaliados em intervalos de 5 dias. Os gráficos **B** e **C** representam o consumo médio diário de ração (**B**) e água (**C**). O número de animais depende da % de sobrevivência de cada grupo (Machos: controle n=10, 1000 mg/kg n=2, 500 mg/kg n=6, 250 mg/kg n=7, 100 mg/kg n=10). A análise estatística foi realizada por análise de variância one-way (ANOVA) seguida do teste de Dunnett. *Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,05$; ** Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,01$; *** Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,001$.

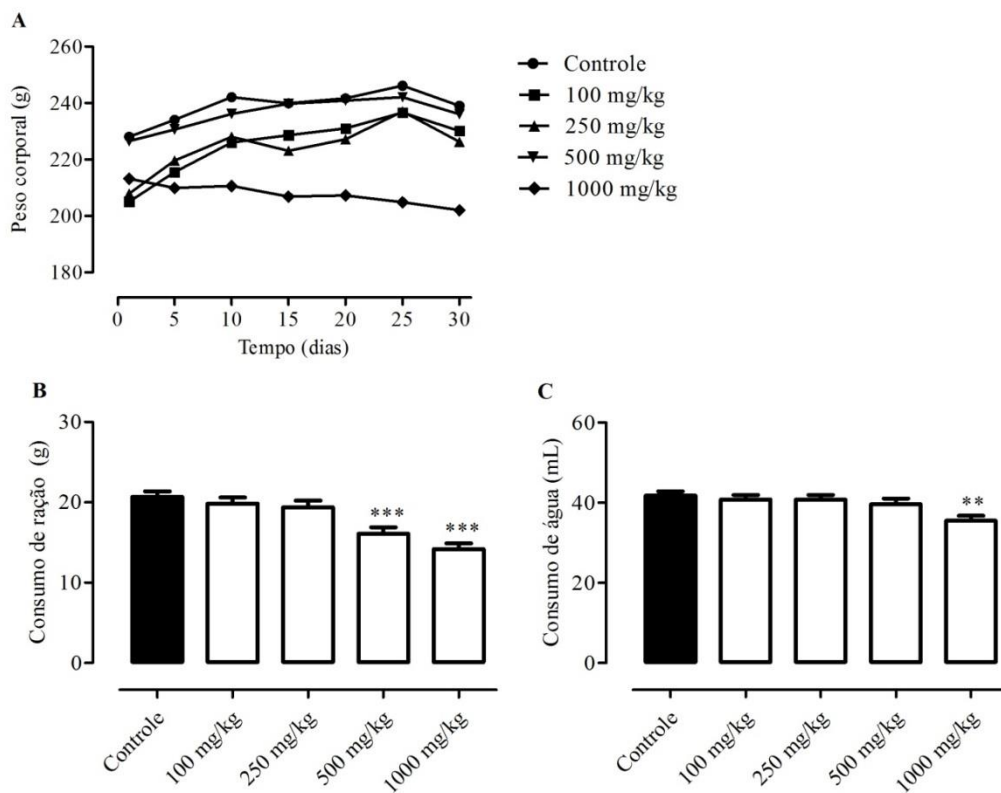
A figura 23A ilustra a evolução do peso corporal das fêmeas em 30 dias. Houve aumento do peso durante o tratamento nos grupos: controle, 100, 250 e 500 mg/kg/v.o/ECU-fêmea; com pequenas oscilações de ganho e perda de peso corporal. O grupo de 1000 mg/kg/v.o/ECU-fêmea foi o único onde os animais diminuíram o peso durante o tratamento, sem nenhuma oscilação referente a ganho de peso.

O consumo de ração (Figura 23B) e água (Figura 23C) podem estar relacionados a oscilação de peso corporal. Desta maneira, a diminuição no consumo de água e ração simultânea pode ter relação com a redução do peso dos animais do grupo 1000 mg/kg/v.o/ECU-fêmea. Entretanto, apenas a diminuição do consumo de ração não afetou o peso corporal do grupo de 500 mg/kg/v.o/ ECU-fêmea que teve uma evolução corporal equivalente ao grupo controle.

No teste do labirinto em cruz elevado foram analisados os parâmetros: entradas de braços abertos, entradas de braços fechados, tentativas de entradas de braços abertos, tentativas de entradas de braços fechados, frequência de defecação, tempo de braço aberto e tempo de

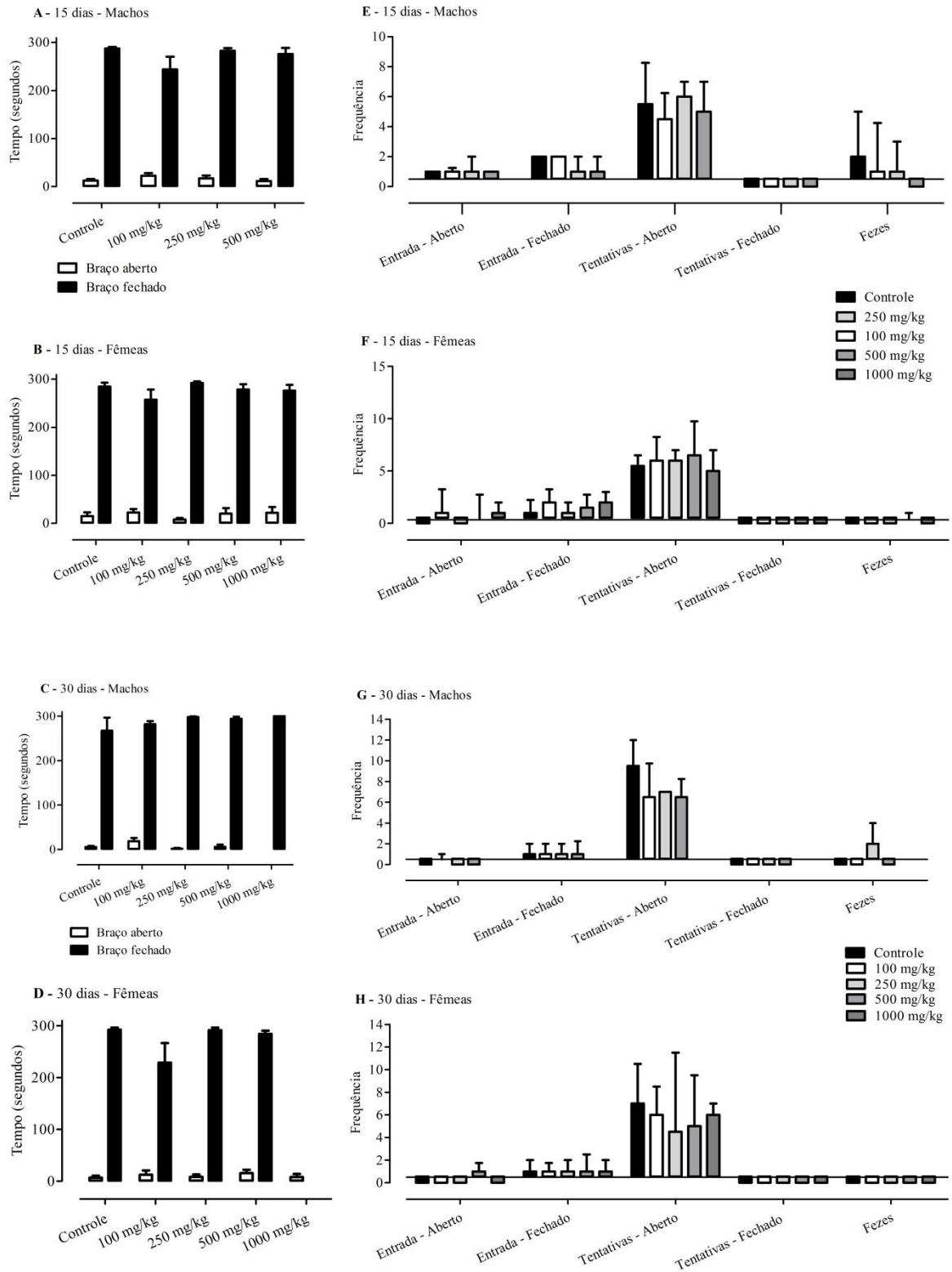
braço fechado. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos controle e tratamento em nenhum dos parâmetros (Figura 24). No estudo de Ferraz et al. (2009) os animais tratados com 100 mg/kg/i.p/ do extrato metanólico de *C. uniflora* exploraram menos os braços fechados do labirinto de cruz elevada que os animais do controle. Isso também foi observado no tratamento com extrato metanólico de *C. clematideae* nas doses de 100 e 150 mg/kg/i.p. No teste do nado forçado, todos os grupos animais nadaram o tempo total do experimento (Figura 25).

Figura 23 - Evolução do peso corporal e consumo de ração e água das fêmeas.



Fonte: autor. O gráfico **A** apresenta a evolução da média do peso corporal (g) das fêmeas em 30 dias, avaliados em intervalos de 5 dias. Os gráficos **B** e **C** representam o consumo médio diário de ração (**B**) e água (**C**). O número de animais depende do % de sobrevivência de cada grupo (Fêmeas controle n=10, 1000 mg/kg n=5, 500 mg/kg n=4, 250 mg/kg n=8, 100 mg/kg n=10). A análise estatística foi realizada por análise de variância one-way (ANOVA) seguida do teste de Dunnett. *Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,05$; ** Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,01$; *** Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,001$.

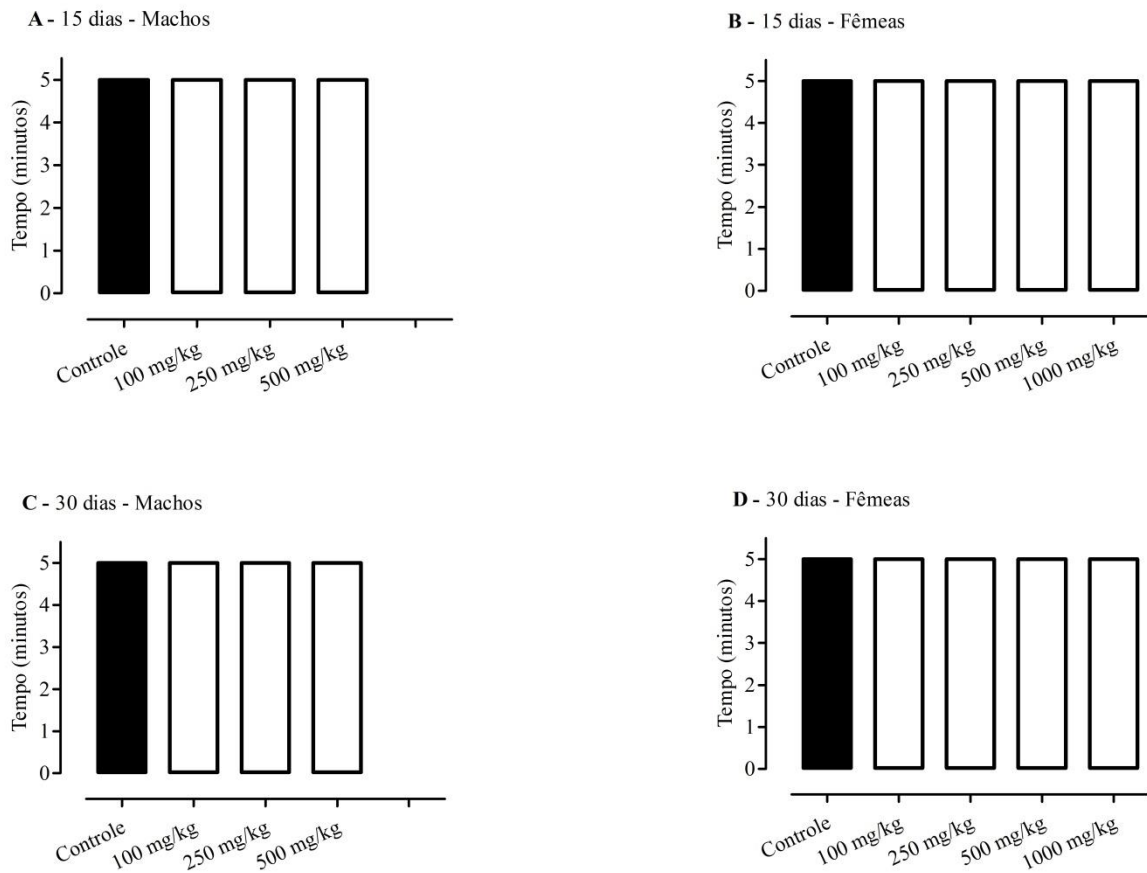
Figura 24 - Resultados da análise comportamental no equipamento Labirinto de cruz elevada realizada do 15 dia e 30 dia de tratamento.



Fonte: Autor. Os dados estão expressos em média \pm E.P.M (tempo) ou mediana e intervalo interquartil (frequência). Os gráficos **A** (machos), **B** (fêmeas), **C** (machos) e **D** (fêmeas) correspondem ao tempo que o animal ficou no braço aberto (barra branca) e no braço fechado (barra preta). Os gráficos **A** e **B** correspondem a análise em 15 dias e gráficos **C** e **D** em 30 dias. Os gráficos **E** (machos), **F** (fêmeas), **G** (machos) e **H** (fêmeas)

correspondem a frequência em que o animal: entrou no braço aberto (entrada-aberto), entrou no braço fechado (entrada-fechado), tentou entrar no braço aberto (tentativas-aberto), tentou entrar no braço fechado (tentativas-fechado) e defecou (fezes). Os gráficos **E** e **F** correspondem a análise em 15 dias e **G** e **H** em 30 dias. O número de animais depende da % de sobrevivência de cada grupo (Machos: controle n=10, 500 mg/kg n=6, 250 mg/kg n=7, 100 mg/kg n=10; Fêmeas controle n=10, 1000 mg/kg n=5, 500 mg/kg n=4, 250 mg/kg n=8, 100 mg/kg n=10). Não foi realizada análise estatística para o grupo de 1000 mg/kg/macho, pois sobreviveram apenas 2 animais. As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância one-way (ANOVA) seguida do teste de Dunnett. * Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,05$ ** Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,01$; *** Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,001$.

Figura 25 - Resultados da análise comportamental no teste Nado forçado realizada do 15 dia e 30 dia de tratamento.

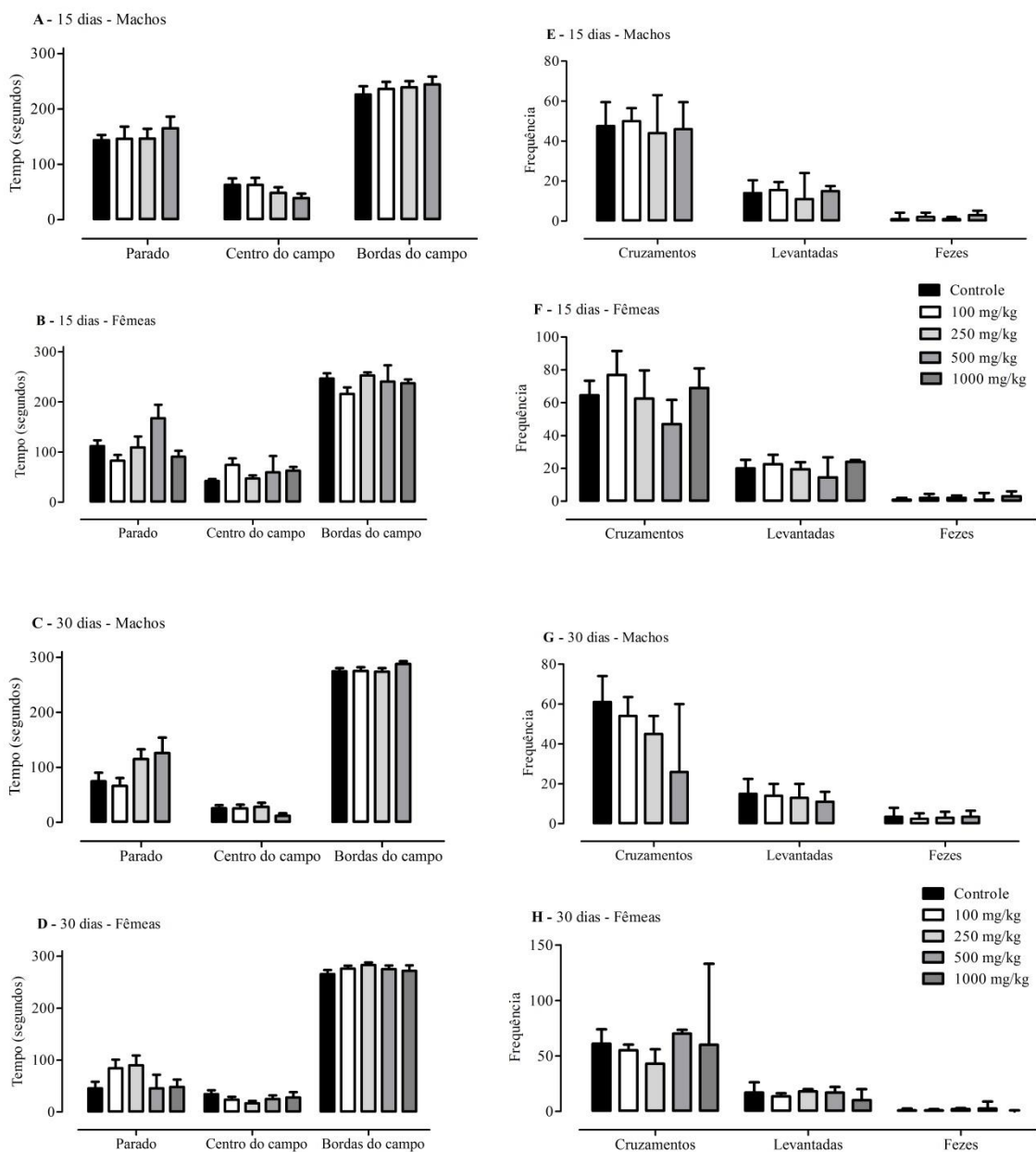


Fonte: Autor. Os dados estão expressos em média \pm E.P.M e representam o tempo que os animais permaneceram nadando. Os gráficos **A** (machos) e **B** (fêmeas) correspondem a avaliação em 15 dias e os gráficos **C** (machos) e **D** (fêmeas) correspondem a avaliação em 30 dias. O número de animais depende do % de sobrevivência de cada grupo (Machos: controle n=10, 500 mg/kg n=6, 250 mg/kg n=7, 100 mg/kg n=10; Fêmeas controle n=10, 1000 mg/kg n=5, 500 mg/kg n=4, 250 mg/kg n=8, 100 mg/kg n=10). Não foi realizada análise estatística para o grupo de 1000 mg/kg/macho, pois sobreviveram apenas 2 animais. As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância one-way (ANOVA) seguida do teste de Dunnett. * Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,05$ ** Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,01$; *** Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,001$.

No teste de campo aberto, os parâmetros: número de cruzamento, número de levantadas sobre as patas traseiras, frequência de defecação, tempo estacionário, tempo de permanência centro do campo e borda do campo foram analisados. Porém, não houve diferença significativa entre os grupos controle e tratamento (Figura 26). Ferraz e colaboradores (2009)

também avaliaram a administração em dose única do extrato metanólico de *C. uniflora* nas concentrações de 100 e 150 mg/kg/i.p, e constataram que o tratamento não alterou o comportamento dos animais no teste campo aberto em relação ao número de cruzamentos e levantadas. A figura 27 ilustra os resultados do teste de rota-rod onde o tratamento com ECU nas doses 100 e 250 mg/kg/v.o/ machos alterou a capacidade de permanecer em movimento no equipamento.

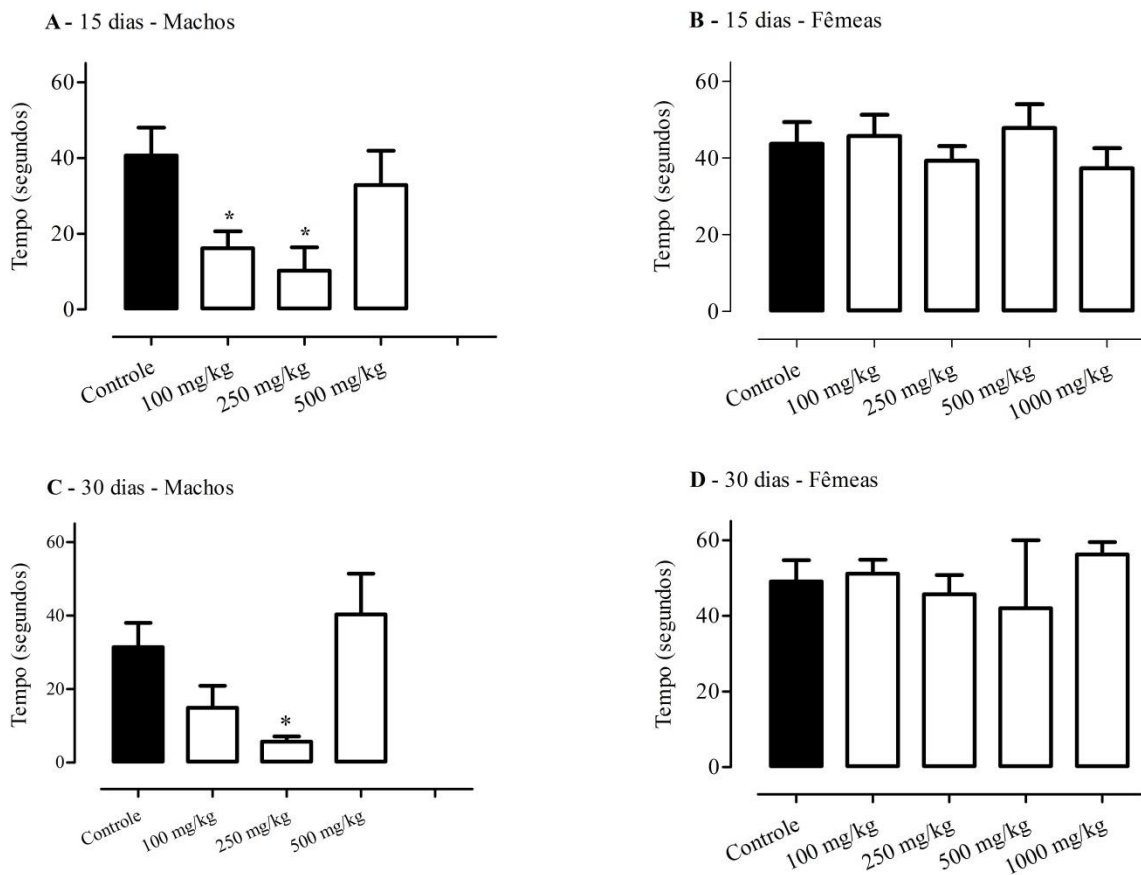
Figura 26 - Resultados da análise comportamental no equipamento Campo aberto realizada do 15 dia e 30 dia de tratamento.



Fonte: Autor. Os dados estão expressos em média \pm E.P.M (tempo) ou \pm mediana e intervalo interquartil (frequência). Os gráficos **A** (machos), **B** (fêmeas), **C** (machos) e **D** (fêmeas) correspondem ao tempo que o animal: ficou imóvel (parado), permaneceu em movimento ou parado no centro do campo aberto (centro do

campo) e permaneceu em movimento ou parado nas bordas do campo aberto (bordas do campo). Os gráficos **A** e **B** correspondem a análise em 15 dias e gráficos **C** e **D** em 30 dias. Os gráficos **E** (machos), **F** (fêmeas), **G** (machos) e **H** (fêmeas) correspondem a frequência em que o animal: cruzou as linhas do campo aberto (cruzamento), ficaram apenas nas patas traseiras (levantadas) e defecou (fezes). Os gráficos **E** e **F** correspondem a análise em 15 dias e **G** e **H** em 30 dias. O número de indivíduos por grupo depende da % de sobrevivência de cada grupo (Machos: controle n=10, 500 mg/kg n=6, 250 mg/kg n=7, 100 mg/kg n=10; Fêmeas controle n=10, 1000 mg/kg n=5, 500 mg/kg n=4, 250 mg/kg n=8, 100 mg/kg n=10). Não foi realizada análise estatística para o grupo de 1000 mg/kg/macho, pois sobreviveram apenas 2 animais. As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância one-way (ANOVA) seguida do teste de Dunnett. * Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,05$; ** Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,01$; *** Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,001$.

Figura 27 - Efeitos do ECU na coordenação motora dos animais em modelo rota-rod.



Fonte: Autor. A figura representa o tempo de permanência em segundos que os animais permaneceram no rota-rod. Os gráficos **A** e **C** representam os resultados referentes aos machos, sendo o painel **A** avaliação em 15 dias de tratamento e o gráfico **C** com 30 dias de tratamento. Os gráficos **B** e **D** representam os resultados referentes aos machos, sendo o gráfico **B** avaliação em 15 dias de tratamento e o gráfico **D** com 30 dias de tratamento. Os dados estão expressos em média \pm E.P.M. O número de animais depende da % de sobrevivência de cada grupo (Machos: controle n=10, 500 mg/kg n=6, 250 mg/kg n=7, 100 mg/kg n=10; Fêmeas controle n=10, 1000 mg/kg n=5, 500 mg/kg n=4, 250 mg/kg n=8, 100 mg/kg n=10). Não foi realizada análise estatística para o grupo de 1000 mg/kg/macho, pois sobreviveram apenas 2 animais. As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância one-way (ANOVA) seguida do teste de Dunnett. *Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,05$; **Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,01$; ***Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,001$.

Após o fim do tratamento foi avaliado o peso do órgão relativo (g/100 g de peso corpóreo) dos animais machos e fêmeas tratados com ECU por 30 dias (Tabelas 2 e 3). Nesta análise foi possível observar um aumento do peso do pulmão nos animais tratados com ECU

nas doses de 100 mg/kg/v.o machos e 1000 mg/kg/v.o/ fêmeas. As análises histológicas mostraram lesão pulmonar caracterizada por infiltração neutrofílica na dose 100, 250 500, 1000 mg /kg/ v.o, o que pode estar relacionado ao aumento do peso pulmonar tanto dos animais da dose 100 mg/kg/v.o/ ECU-macho e 1000 mg/kg/v.o/ ECU-fêmea que sobreviveram ao tratamento, como também o aumento dos animais que morreram durante o experimento, conforme ilustra a figura 28. Os demais órgãos analisados não apresentaram alterações morfológicas.

Tabela 2 - Efeitos do tratamento subagudo de ECU nos pesos do órgão (g/100 g de peso corporal) em ratos Wistar machos.

	Controle	ECU mg/kg		
		100	250	500
Fígado	3,512±0,093	3,508±0,135	3,920±0,244	3,655±0,342
Coração	0,428±0,022	0,420±0,017	0,444±0,035	0,438±0,043
Rim Esquerdo	0,458±0,013	0,439±0,020	0,494±0,041	0,476±0,030
Rim Direito	0,461±0,009	0,473±0,021	0,491±0,040	0,445±0,033
Pulmão	0,664±0,055	0,916±0,049*	0,834±0,095	0,866±0,095

Fonte: Autor. Os dados estão expressos em média ± E.P.M de 6 a 10 animais por grupo, dependendo da % de sobrevivência de cada grupo (controle n=10; 500 mg/kg n=6; 250 mg/kg n=7; 100 mg/kg n=10;). Não foi realizada análise estatística para o grupo de 1000 mg/kg/macho, pois sobreviveram apenas 2 animais. As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância one-way (ANOVA) seguida do teste de Dunnett.

* Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,05$; ** Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,01$; *** Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,001$.

Tabela 3 - Efeitos do tratamento subagudo de ECU no peso dos órgãos (g/100 g de peso corporal) em ratos Wistar fêmeas.

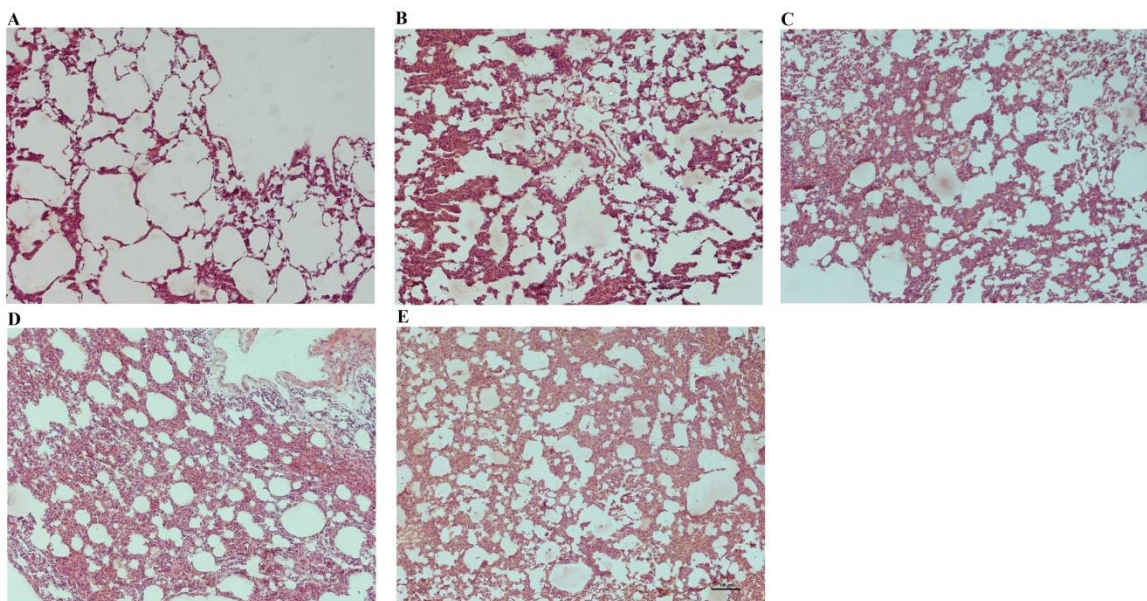
	Controle	ECU mg/kg			
		100	250	500	1000
Fígado	3,622±0,226	3,60±0,105	4,059±0,212	3,817±0,376	4,076±0,252
Coração	0,511±0,021	0,509±0,028	0,449±0,076	0,457±0,038	0,538±0,048
Rim Esquerdo	0,504±0,034	0,479±0,021	0,590±0,074	0,521±0,011	0,465±0,014
Rim Direito	0,519±0,030	0,491±0,017	0,543±0,032	0,516±0,001	0,516±0,001
Pulmão	0,744 ±0,043	0,844 ±0,055	0,968±0,059	0,769±0,044	1,575±0,396***

Fonte: Autor. Os dados estão expressos em média ± E.P.M de 4 a 10 animais por grupo, dependendo do % de sobrevivência de cada grupo (controle n=10; 1000 mg/kg n=5; 500 mg/kg n=4; 250 mg/kg n=8; 100 mg/kg n=10). As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância one-way (ANOVA) seguida do teste de Dunnett. * Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,05$; ** Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,01$; *** Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,001$

Algumas espécies da Asteraceae já têm seus efeitos toxicológicos *in vivo* bem estabelecidos, como é o caso das espécies de *Senecio*, que tem na sua composição alcalóides pirrolizidínicos (CASTELLS; MULDER; PÉREZ-TRUJILLO, 2014). Estas substâncias têm efeitos toxicológicos bem descritos, que são responsáveis por provocar hepatotoxicidade e pneumotoxicidade (PROKSCH; RODRIGUEZ, 1983b). Os alcalóides pirrolizidínicos são convertidos pelo fígado em pirroles (eletrolíticos potentes), sendo este metabólito o responsável pelos efeitos tóxicos no fígado, pulmão e rins. São caracterizados por provocar efeitos

cardiotóxicos, teratogênicos e carcinogênicos (DREGER et al., 2009; HUXTABLE, 1990). Pode-se citar a monocrotalina como exemplo, alcaloide pirrolizidínico majoritário no gênero *Crotalia* (Leguminosae). Este alcaloide é tóxico para o pulmão, podendo causar: edema e congestão pulmonar, lesões intersticial e arteriolar pulmonar, inflamação, hemorragia e fibrose. A administração subaguda de monocrotalina pode aumentar cerca de 55% do total de proteínas do pulmão (WILSON et al., 1992). Monocrotalina é utilizado em modelos experimentais como agente de indução de hipertensão pulmonar (VIGNOZZI et al., 2017).

Figura 28 - Histol6gia dos pulm6es de animais tratados por 30 dias.



Fonte: Autor. Microfotografia representativa do pulm6o a 100x, embebido em parafina e corado com hematoxilina e eosina. Imagem **A** Controle. Imagem **B** 100 mg/kg/dia v.o. de ECU. Imagem **C** 250 mg/kg/dia v.o. de ECU. Imagem **D** 500 mg/kg/dia v.o. de ECU. Imagem **E** 1000 mg/kg/dia v.o. de ECU.

Os alcaloides pirrozilidínicos est6o presentes principalmente nas tribos Senecioneae e Eupatorieae da Asteraceae. Estes alcaloides da Asteraceae s6o conhecidos pelos seus efeitos hepatot6xicos, mas tamb6m podem causar danos pulmonares. 6 o caso do *Senaetnine*, alcaloide do tipo *Senecio* que causou infiltra76o inflamat6ria, fibrose e aumento de espessura das paredes arteriais pulmonares com tratamento de 280 mg/kg/v.o ou ip/ratos (MATTACKS; DRIVER, 1987).

Alcaloides pirrozilidínicos s6o raros na tribo Heliantheae (PASSREITER, 1998), a qual pertence a *C. uniflora* (BERETTA et al., 2008). No entanto, estes tipos de alcaloides j6 foram identificados em esp6cies desta tribo, como por exemplo nas esp6cies *Arnica montana*, *Arnica chamissonis*, *Arnica foliosa*, *Arnica amplexicaulis*, *Arnica sachalinenses* e *Tussilago farfara*. (PASSREITER, 1992). Entretanto, n6o foram encontrados estudos que identifiquem alcaloides

no gênero *Calea*. Apenas uma análise qualitativa apresenta resultado positivo para alcaloides nas espécies *C. uniflora* (RODRIGUES-TORRES et al., 2016).

O dano pulmonar nos animais tratados com ECU foi observado por sinais típicos de desconforto respiratório durante o tratamento, tais como tosse, dificuldade respiratória, sangramentos pelo nariz e aumento significativo do peso do pulmão dos animais que não sobreviveram ao tratamento completo (dados não apresentados). Nos animais sobreviventes, foi observado aumento do peso pulmonar, sendo reforçado pelas análises histológicas, onde foi possível identificar lesão pulmonar, caracterizada por infiltração neutrofílica. Estas características são bem semelhantes aos danos causados por alcaloides pirrolozidínicos da Asteraceae. No entanto, outros compostos podem estar envolvidos com este efeito, já que a presença de alcaloides não é bem elucidada no gênero *Calea*.

C. uniflora possui em sua composição química substâncias derivadas da *p*-hidroxiacetofenona, como: as cromonas uniflorol-A e uniflorol-B (DO NASCIMENTO et al., 2007). Isso é relevante, pois alguns benzopiranos têm a capacidade de inibir enzimas determinadas, tais como acetilcolinesterase (ANAND; SINGH, 2013), quinase dependente de ciclina (LEE et al., 2007) e fosfatase alcalina (AL-RASHIDA et al., 2013).

Em diversas espécies da Asteraceae já foram identificados os compostos bezofuranos com potencial toxicológico. Alguns exemplos são: o tremetone, que causa toxicidade em determinadas espécies de peixes e o extrato de *Eupatorium urticae folium* (Asteraceae), que é rico em cromenos e que causa cetoacidose em filhotes de frango (PROKSCH; RODRIGUEZ, 1983a). Alguns estudos evidenciam que compostos presentes em plantas da Asteraceae inibem a enzima acetilcolinesterase, como triterpeno caledulodial isolado de *Chuquiraga erinacea*, que inibiu 31,2% da atividade da acetilcolinesterase (GUROVIC et al., 2010). O extrato metanólico da *Artemisia asiatica* inibiu 48% da atividade da acetilcolinesterase, sendo que este efeito foi identificado na presença de alcalóides no extrato (HEO et al., 2000). Outras plantas da Asteraceae, como *Inula graveolens*, *Artemisia dracunculus*, *Eupatorium odoratum* e *Arnica chamissonis*, também apresentam atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (BHADRA et al., 2015). Estudo com *C. Serrata* comprovou que extrato rico em cromenos obtidos de folhas inibiu a enzima acetilcolinesterase de estruturas cerebrais (córtex frontal, estriado e hipocampo) em ratos Wistar (RIBEIRO et al., 2012); dois cromenos foram isolados desta planta, sendo eles: precoceno e eupalorio (STEINBECK et al., 1997).

Com a inibição da acetilcolinesterase ocorre um acúmulo do neurotransmissor acetilcolina e, assim, uma maior estimulação dos receptores muscarínicos e nicotínicos,

causando diversos sintomas, como alterações locomotoras, sinais parassimpáticos no sistema respiratório e cardiovasculares (HIBBS; ZAMBON, 2012).

Quando os animais foram tratados com a ECU, observou-se diminuição de permanência no equipamento rota-rod (locomoção forçada) nas doses de 100 e 250 mg/kg/v.o em 15 dias e 250 mg/kg/v.o em 30 dias. Pode-se sugerir que este efeito reflita a uma estimulação excessiva do sistema colinérgico. Quando a acetilcolinesterase é inibida na junção neuromuscular (músculo esquelético), ocorre um aumento da concentração de acetilcolina na fenda sináptica, e ocorre o aumento da frequência de estímulos nos receptores nicotínicos. Esse estímulo prolongado causa um bloqueio muscular despolarizante, bloqueando a transmissão neuromuscular (HIBBS; ZAMBON, 2012). Algumas substâncias, como organofosforados, causam o relaxamento muscular, mas outros possíveis locais de ação não podem ser esquecidos, como os receptores de opióides e benzodiazepínicos, entre outros (WALDMAN, 1994). Já os testes comportamentais que avaliaram depressão mental, locomoção espontânea e ansiedade referente ao tratamento com ECU, os resultados demonstraram que o uso subagudo de ECU não modificou os parâmetros comportamentais dos animais nestes aspectos.

Quando um organismo é exposto a uma substância exógena, pode ocorrer alteração ou danos aos processos fisiológicos do organismo. Nesse contexto, os testes bioquímicos e hematológicos são ferramentas utilizadas para avaliar as possíveis mudanças no funcionamento de um organismo. Alguns marcadores químicos já são bem definidos e, dependendo de sua concentração no plasma ou na urina, podendo indicar uma lesão ou alteração em um órgão em particular. As análises hematológicas são relevantes para avaliar os parâmetros dos componentes sanguíneos e órgãos hematopoiéticos e, assim, avaliar possíveis alterações. Em testes de toxicologia, várias estratégias são usadas para identificar os possíveis órgãos lesionados (SHEETS, 2018). No entanto, não houve diferença estatística significativa nos parâmetros bioquímicos e hematológicos analisados ao fim do experimento (Tabelas 4 a 7).

Tabela 4 -Efeitos do tratamento subagudo de ECU nos parâmetros bioquímicos dos ratos Wistar machos.

	Controle	ECU mg/kg		
		100	250	500
Proteína total(g/dL)	6,587±0,741	6,975±0,616	7,156±0,853	6,135±6,135
Triglicerídeos (mg/dL)	58,19±11,50	42,06±10,04	45,35±12,40	58,81±21,25
Colesterol total (mg/dL)	91,42±26,78	90,39±27,22	137,8±48,63	90,06±39,03
Glicose (mg/dL)	174,6±44,02	189,2±22,72	216,6±32,34	196,2±34,39
Ácido úrico (mg/dL)	1,406±0,290	1,420±0,172	1,222±0,393	1,545±0,368
AST (U/L)	146,6±20,98	154,2±17,49	218,4±28,12	140,3±35,52
ALT (U/L)	29,16±5,810	48,89±8,693	45,73±14,86	36,76±10,42
Fosfatase alcalina (U/L)	29,76±6,755	29,21±6,838	32,09±11,57	27,64±11,51
Uréia (mg/dL)	51,13±8,441	50,28±8,925	66,71±20,33	46,52±13,51

Fonte: Autor. Os dados estão expressos em média ± E.P.M de 6 a 10 animais por grupo, dependendo do % de sobrevivência de cada grupo (controle n=10; 500 mg/kg n=6; 250 mg/kg n=7; 100 mg/kg n=10;).

Não foi realizada análise estatística para o grupo de 1000 mg/kg/macho, pois sobreviveram apenas 2 animais. As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância one-way (ANOVA) seguida do teste de Dunnett. * Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,05$; ** Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,01$; *** Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,001$.

Tabela 5 - Efeitos do tratamento subagudo de ECU nos parâmetros bioquímicos dos ratos Wistar fêmeas.

	Controle	ECU mg/kg			
		100	250	500	1000
Proteína total(g/dL)	7,090±0,552	7,156±0,526	6,641±0,687	8,706±2,390	7,120±1,152
Triglicerídeos (mg/dL)	28,52±3,670	32,02±3,538	31,72±8,098	26,78±7,128	41,52±13,40
Colesterol total (mg/dL)	99,13±30,00	98,91±23,69	63,50±5,436	59,45±17,13	64,31±8,082
Glicose (mg/dL)	200,2±26,25	193,6±35,20	128,9±31,14	153,6±38,63	201,2±37,66
Ácido úrico (mg/dL)	1,856±0,546	1,904±0,288	2,015±0,604	2,012±0,986	1,425±0,404
AST (U/L)	155,5±14,10	177,1±9,023	156,8±58,15	89,82±46,74	186,2±11,11
ALT (U/L)	26,77±4,628	35,91±6,289	32,98±4,429	22,89±15,77	37,25±8,674
Fosfatase alcalina (U/L)	9,213±4,236	10,25±5,844	26,72±5,505	20,73±2,303	17,97±17,97
Uréia (mg/dL)	31,49±7,569	44,39±8,820	51,46±13,43	46,52±46,52	61,98±20,61

Fonte: Autor. Os dados estão expressos em média ± E.P.M de 4 a 10 animais por grupo, dependendo do % de sobrevivência de cada grupo (controle n=10; 1000 mg/kg n=5; 500 mg/kg n=4; 250 mg/kg n=8; 100 mg/kg n=10). As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância one-way (ANOVA) seguida do teste de Dunnett. * Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,05$; ** Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,01$;

*** Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,001$.

Tabela 6 - Efeitos do tratamento subagudo de ECU nos parâmetros hematológicos dos ratos Wistar machos.

	Controle	ECU mg/kg		
		100	250	500
Eritrócitos ($\times 10^6\mu\text{L}^{-1}$)	3,704 \pm 0,496	3,969 \pm 0,3677	4,089 \pm 0,4723	5,265 \pm 0,265
Plaquetas ($\times 10^6\mu\text{L}^{-1}$)	0,843 \pm 0,379	2,112 \pm 0,752	0,592 \pm 0,176	1,700 \pm 1,405
Leucócitos ($\times 10^3\mu\text{L}^{-1}$)	3,789 \pm 0,631	3,528 \pm 0,698	3,614 \pm 0,642	3,510 \pm 0,808
Bastonetes (%)	1,500 \pm 0,718	0,833 \pm 0,307	1,167 \pm 0,792	1,600 \pm 0,678
Neutrófilos (%)	44,14 \pm 3,542	47,17 \pm 3,371	49,17 \pm 7,622	50,60 \pm 6,022
Eosinófilos (%)	1,600 \pm 1,600	0,0 \pm 0,0	0,166 \pm 0,166	1,500 \pm 0,957
Basófilos (%)	1,167 \pm 0,792	0,8333 \pm 0,542	0,3333 \pm 0,210	0,4000 \pm 0,244
Linfócitos (%)	44,86 \pm 5,157	48,33 \pm 2,305	46,00 \pm 7,394	34,60 \pm 4,675
Linfócitos atípicos (%)	3,333 \pm 1,085	1,833 \pm 0,872	1,833 \pm 1,641	8,000 \pm 2,449
Monócitos (%)	3,714 \pm 1,304	1,667 \pm 0,421	2,000 \pm 0,966	3,600 \pm 0,871

Fonte: Autor. Os dados estão expressos em média \pm E.P.M de 4 a 10 animais por grupo, dependendo do % de sobrevivência de cada grupo (controle n=10; 500 mg/kg n=6; 250 mg/kg n=7; 100 mg/kg n=10;). Não foi realizada análise estatística para o grupo de 1000 mg/kg/macho, pois sobreviveram apenas 2 animais. As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância one-way (ANOVA) seguida do teste de Dunnett. * Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,05$; ** Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,01$; *** Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,001$.

Tabela 7 - Efeitos do tratamento subagudo de ECU nos parâmetros hematológicos dos ratos Wistar fêmeas.

	Controle	ECU mg/kg			
		100	250	500	1000
Eritrócitos ($\times 10^6\mu\text{L}^{-1}$)	3,217 \pm 0,434	3,353 \pm 0,316	3,741 \pm 0,469	3,448 \pm 0,662	3,882 \pm 0,576
Plaquetas ($\times 10^6\mu\text{L}^{-1}$)	0,631 \pm 0,310	1,031 \pm 0,534	3,218 \pm 1,774	1,380 \pm 0,779	1,182 \pm 0,4732
Leucócitos ($\times 10^3\mu\text{L}^{-1}$)	2,500 \pm 0,425	3,035 \pm 4,987	2,021 \pm 4,873	3,100 \pm 5,962	3,930 \pm 8,981
Bastonetes (%)	0,833 \pm 0,307	1,429 \pm 0,571	0,666 \pm 0,494	0,750 \pm 0,478	0,400 \pm 0,244
Neutrófilos (%)	42,86 \pm 2,89	42,44 \pm 3,288	42,14 \pm 3,370	46,75 \pm 3,473	54,60 \pm 5,501
Eosinófilos (%)	0,142 \pm 0,142	0,875 \pm 0,515	0,857 \pm 0,857	1,000 \pm 1,000	0,800 \pm 0,800
Basófilos (%)	0,285 \pm 0,285	0,555 \pm 0,242	0,285 \pm 0,184	0,250 \pm 0,250	0,400 \pm 0,244
Linfócitos (%)	52,00 \pm 4,140	50,56 \pm 3,660	53,29 \pm 4,116	41,25 \pm 6,625	36,40 \pm 4,781
Linfócitos atípicos (%)	1,714 \pm 0,778	3,250 \pm 1,206	0,666 \pm 0,333	7,250 \pm 3,772	2,800 \pm 0,860
Monócitos (%)	2,143 \pm 0,737	2,889 \pm 0,873	2,714 \pm 2,388	3,250 \pm 1,493	3,200 \pm 2,177

Fonte: Autor. Os dados estão expressos em média \pm E.P.M de 4 a 10 animais por grupo, dependendo do % de sobrevivência de cada grupo (controle n=10; 1000 mg/kg n=5; 500 mg/kg n=4; 250 mg/kg n=8; 100 mg/kg n=10). As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância one-way (ANOVA) seguida do teste de Dunnett. * Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,05$; ** Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,01$; *** Significância contra o grupo controle: $p \leq 0,001$.

Conforme seção 3, onde o ECU foi avaliado em relação ao seu potencial anti-inflamatório, constatou-se que a administração oral em dose única nas doses de 250 e 500 mg/kg/v.o. tem a capacidade de diminuir edema causado por óleo de cróton. No entanto, foi possível verificar no ensaio toxicológico subagudo que estas doses, quando administradas repetidamente, podem causar danos no sistema motor do animal, mas principalmente danos no tecido pulmonar, levando até mesmo o animal à óbito.

O ECU também possui atividade anti-inflamatória em modelo experimental de edema de orelha com tratamento tópico (dose única). Esse dado vai ao encontro da informação

encontrada por Ramos e colaboradores (2016), que registraram o uso de *C. uniflora* pela população do município de Balneário Rincão especialmente por via tópica. Sabendo disto, o ECU também foi avaliado em relação aos seus efeitos tóxicos com aplicação tópica única, seguindo o método preconizado pela OECD.

O teste começou com a aplicação de 2000 mg/kg de ECU em 1 animal, que não causou nenhum sinal de toxicidade e mortalidade. Em seguida, o teste foi repetido com mais 2 animais na mesma dose, e novamente o extrato não causou nenhum efeito tóxico visível, bem como o seu diluente (acetona). Com este resultado o ECU entra na categoria 5 da classificação GHS (Classificação Global Harmonizada para Substâncias Químicas e Misturas). Ou seja, apresenta $LD_{50} > 5000$ mg/kg. Não houve alterações morfológicas na pele dos animais que entram em contato com ECU. Algumas espécies podem ser tóxicas por via oral e inofensivas por via tópica, como é o caso de *Senecio serratulooides* (Asteraceae), que é uma planta hepatotóxica, quando administrada por via oral, mas quando aplicada por via tópica não causa problemas hepáticos e ainda apresenta ação cicatrizante (GOULD et al., 2015).

4.4 CONCLUSÃO PARCIAL

Os resultados demonstram que o extrato das inflorescências de *C. uniflora* é seguro por via tópica (dose única), indicando uma $DL_{50} > 5000$ mg/kg. Entretanto, o tratamento por via oral (30 dias) morte dos animais nas doses de 250, 500, 1000 mg/kg/v.o. Os animais que sobreviveram ao tratamento apresentaram dano pulmonar, caracterizado por infiltração de neutrófilos nas doses de 100, 250, 500, 1000 mg/kg/v.o. Estes resultados indicam que o uso prolongado do ECU pode ser tóxico dependendo da dose.

5 SÍNTESE E ATIVIDADE LEISHMANICIDA DOS BENZOPIRANOS DO TIPO *Calea* spp.

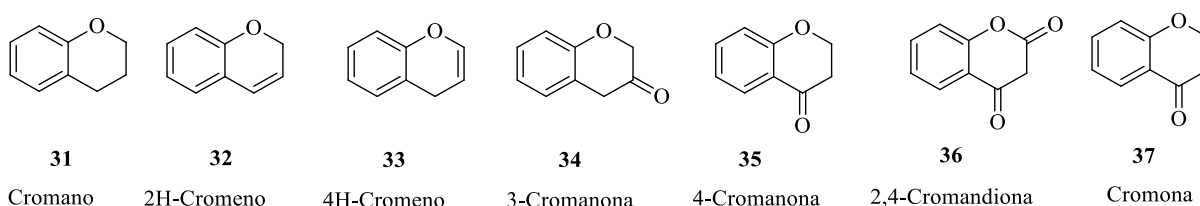
5.1 REFERÊNCIAL TEÓRICO

5.1.1 Benzopiranos e atividade leishmanicida

Na família Asteraceae já foram identificados diversos benzopiranos, em diferentes tribos como, por exemplo: *Senecioninae*, *Inuleae*, *Athrixinae* e *Heliantheae*, sendo que *C. uniflora* pertence a última tribo citada. Estes compostos se distribuem por todas as partes da planta, visto que um estudo confirmou a presença de benzopiranos nas raízes, caules, folhas, capítulos e aquênios da espécie *Encelia californica* (Asteraceae). Entretanto, nas raízes e nos aquênios foram detectados menor variedade de estruturas químicas que nas folhas. Nos caules e capítulos a variedade e quantidade de benzopiranos foram semelhantes (PROKSCH; RODRIGUEZ, 1983b).

Os benzopiranos têm como estrutura básica a junção de um anel aromático e um anel pirona, nomeados de acordo com seus diferentes níveis de saturação e oxidação, sendo eles: cromano, 2H-cromeno, 4H-cromeno, 3-cromanona, 4-cromanona, 2,4-cromandiona e cromona (Figura 29).

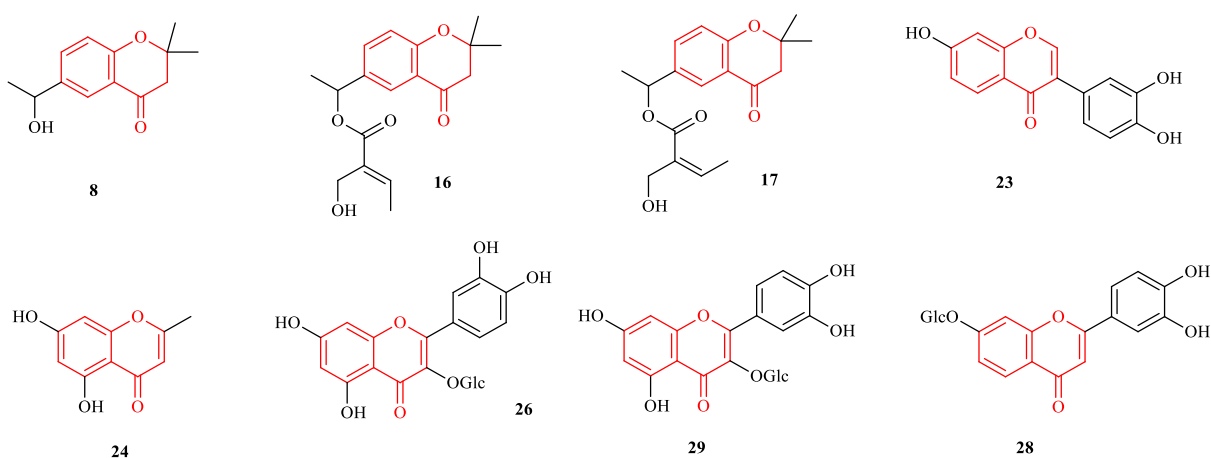
Figura 29 - Estruturas básicas de benzopiranos, conforme seu nível de saturação e oxidação.



Fonte: adaptado de ELLIS (1977).

Dos 20 compostos identificados no xilopódio e parte superior de *C. uniflora*, 8 tem a estrutura de benzopirano como núcleo básico, sendo 3 compostos da classe das cromanonas e 5 compostos pertencentes à cromenos (DO NASCIMENTO et al., 2004, 2007; DO NASCIMENTO; DE OLIVEIRA, 2004; LIMA et al., 2016). Em outras espécies do gênero *Calea* também já foram identificados 4-cromanonas e 2H-cromenos, como por exemplo, na *C. serrata* (STEINBECK et al., 1997). A figura 30 ilustra 8 compostos identificados de *C. uniflora*, em evidencia o núcleo benzopirano.

Figura 30 -Compostos isolados de *C. uniflora* com núcleo benzopirano.



Fonte: adaptado de Do Nascimento et al. (2004, 2007); Do Nascimento e De Oliveira (2004); Lima et al. (2016).

Existe uma diversidade de atividades biológicas associadas aos benzopiranos, e por este motivo, seu esqueleto químico é interessante como protótipo para elaboração de novos compostos bioativos. Entre as atividades relatadas em literatura estão: antitumoral, anti-hepática, anti-inflamatória, diurética, anticoagulante, antiviral, antifúngica, vasodilatadora, herbicida, anticonvulsivante, analgésica, antiespasmódica, antimicrobiana, leishmanicida entre outras (THOMAS; ZACHARIAH, 2013b; KERI et al., 2014).

A atividade anti-inflamatória dos benzopiranos está relacionada com a capacidade de inibir a COX, enzima envolvida na produção de prostaglandinas pela via do ácido araquidônico. No entanto, algumas estruturas com o mesmo núcleo também inibem a LOX, outra enzima da via do ácido araquidônico responsável pela produção de leucotrienos, como também benzopiranos inibem a produção de NO e IL5, sendo estes mediadores da inflamação (SILVA; PINTO; SILVA, 2016). Conforme Da Rosa et al. (2017), os compostos **23** e **24** da *C. uniflora*, administrados por via intraperitoneal, têm atividade anti-inflamatória em modelo de pleurisia induzido por carragininina, demonstrando a importância destes compostos na atividade anti-inflamatória do ECU apresentados na **seção 3**. Os resultados **da seção 3**, sugerem que ECU age via ácido araquidônico e como antioxidante, semelhante as vias de ação descritas para os compostos com núcleo benzopiranos. Todas estas informações corroboram com o uso popular da *C. uniflora* para cicatrização, dor e hematomas.

Além disto, os benzopiranos **16** e **17** de *C. uniflora* têm atividade leishmanicida (DO NASCIMENTO et al., 2007), sendo que outros compostos com este tipo de esqueleto químico inibiram o crescimento de promastigotas de *Leishmania major* em até 73%, em teste realizados *in vitro*, na concentração de 10 µg/mL (ALIZADEH et al., 2008). Cromanonas inibem o

crescimento *in vitro* do parasita tanto na forma promastigota quanto amastigota (MONZOTE et al., 2011).

A leishmaniose (visceral ou cutânea) é a doença causada por espécies de *Leishmania*, que pertence à família Trypanosomatidae, e pode acometer animais como humanos. A transmissão é comumente realizada pelos vetores (mosquitos) dos gêneros *Phlebotomus* e *Sergentomyia*. Este protozoário tem dois estágios de desenvolvimento, sendo um extracelular (promastigota) e outro intracelular (amastigota) (BERN et al., 2012; STEVERDING, 2017).

Esta doença é difundida em áreas tropicais e subtropicais do mundo, em aproximadamente 98 países, incluindo Europa, África, Ásia e Américas. No entanto, 90% dos casos novos são registrados em apenas 13 países, entre eles: Bolívia, Colômbia e Brasil. Dezoito espécies de *Leishmania* são consideradas patogênicas para humanos, destas, 9 são encontradas no Brasil, sendo elas: *Leishmania amazonenses*, *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania lainsoni*, *Leishmania lindenbergi*, *Leishmania naiffi*, *Leishmania panamensis* e *Leishmania shaw* (BERN et al., 2012; STEVERDING, 2017).

Entre as espécies de *Leishmania* encontradas no Brasil a *L. infantum* causa a Leishmaniose visceral. Nesta patologia o parasita na forma amastigota é lançado no sistema circulatório infectando células do sistema mononuclear fagocitário (ANVERSA et al., 2018).

O tratamento de primeira escolha para as formas de Leishmaniose no Brasil são os antimoniais pentavalentes de administração parenteral, com comercialização e distribuição realizada pelo Ministério da Saúde. Entretanto, estes fármacos têm efeitos colaterais relevantes no sistema cardíaco, hepático e renal. A segunda escolha de tratamento são os fármacos Anfotericina B ou a Pentamidina, que tem alto potencial tóxico (ANVERSA et al., 2018; RATH et al., 2003). Além dos efeitos colaterais elevados, o protozoário pode tornar-se resistente, dificultando o tratamento. Para minimizar estes problemas, uma alternativa é a terapia combinada de fármacos. Em decorrência destas poucas opções terapêuticas no tratamento da Leishmaniose, a busca por novos tratamentos para este tipo de infecção ainda é prioridade clínica (RATH et al., 2003; ANVERSA et al., 2018).

Levando em consideração o potencial biológico dos benzopiranos em relação a atividade leishmanicida e a necessidade de novas opções de tratamento para leishmaniose, esta **seção** transcorre sobre a síntese de benzopiranos do tipo *Calea* spp., utilizando a estrutura **16** e **17** isoladas de *C. uniflora* como protótipos, já que estes compostos apresentaram atividade leishmanicida *in vitro*.

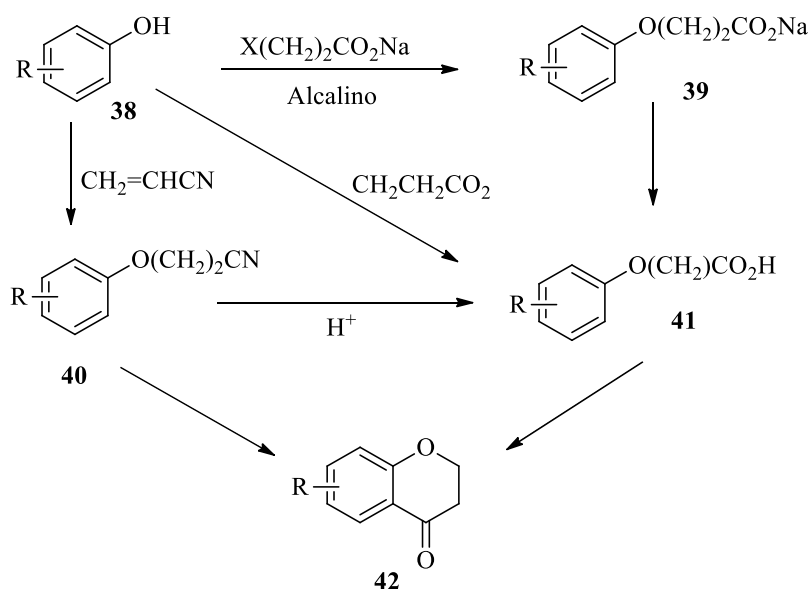
5.1.2 Rotas sintéticas descritas em literatura para a síntese de 4-cromanona e cromoano

Para a síntese de benzopiranos do tipo *Calea* spp. foram utilizados os núcleos básicos de 4-cromanona [35] e o cromoano [31] para a construção de três quimiotecas denominadas **série 1**, **série 2** e **série 3**. As rotas sintéticas para estas três quimiotecas estão descritas na **subseção (5.2.1)**: Rota sintética dos benzopiranos do tipo *Calea* spp.

A síntese de 4-cromanona iniciou na década de 1920 na Inglaterra e Alemanha, onde foi demonstrada que a principal reação para produção da 4-cromanona é a partir de uma ciclização intramolecular para a formação do heterocíclico. O produto formado pode ter características de cristais sólidos ou de forma líquida, são estruturas básicas para a biossíntese de compostos naturais como os flavonoides (LOCKHART, 2009; TAWFIK; EWIES; EL-HAMOULY, 2014).

Um dos principais métodos utilizados para formação da 4-cromanona é através da reação de ciclização do ácido 3-fenilpropiônico. Diferentes estratégias podem ser encontradas na literatura para a síntese de 4-cromanonas. O esquema 1 ilustra a rota sintética descrita por Lockhart (2009) para formação deste núcleo, iniciando com a alquilação do fenol para formação do ácido 3-fenilpropanóico, seguido de sua ciclização.

Esquema 1 - Rota sintética para 4-cromanona através do ácido 3-fenilpropanoico.



Fonte: adaptado de Lockhart (2009).

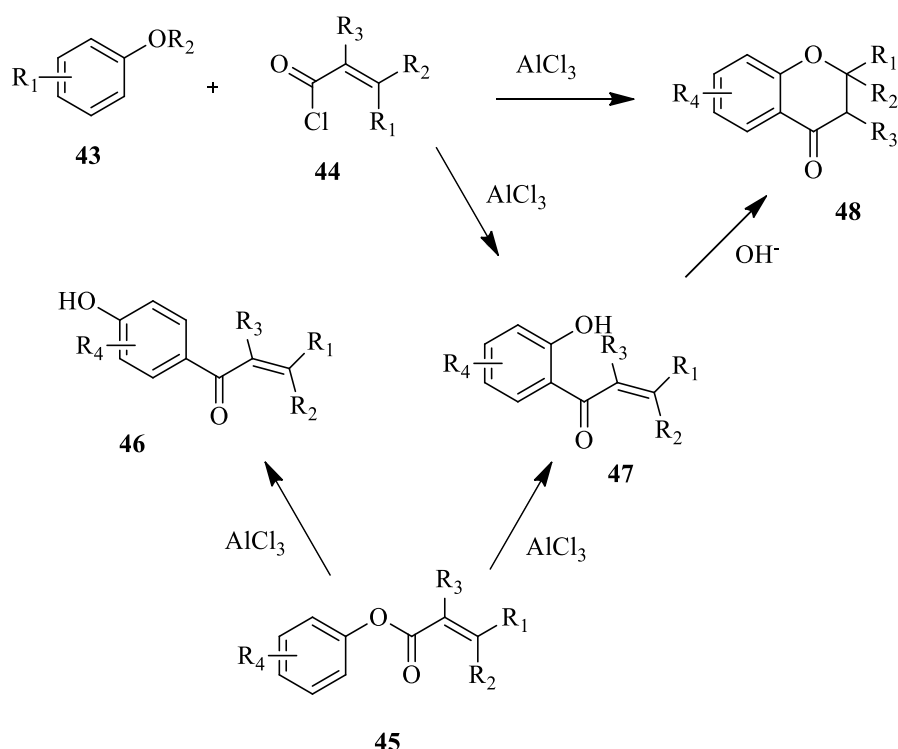
Diferentes reagentes são utilizados para proporcionar as condições adequadas para a ciclização. Contudo, os descritos em literatura que melhor se adequaram a nossa proposta de

síntese são: ácido polifosfórico, pentacloreto fosfórico, cloreto de alumínio, fluoreto de hidrogênio e ácido sulfúrico (TAWFIK; EWIES; EL-HAMOULY, 2014).

Kabbe e Widdig (1982) descreveram a síntese de 4-cromanona catalisada por pirrolidina, onde a hidroxiacetofenona reage com um aldeído alifático na presença da pirrolidina, formando, assim, a 4-cromanona.

As reações de Friedel-Crafts e rearranjo de Fries são outras estratégias sintéticas utilizadas para a produção de 4-cromanona com substituição na posição **R2**, conforme ilustra o esquema 2. Dependendo das substituições de radicais desejadas na estrutura básica da 4-cromanona, diferentes rotas sintéticas podem ser elaboradas. No entanto, há diversas rotas descritas em literatura, como por exemplo: a síntese de 4-cromanona [35] a partir da redução de cromona [37], ou através da condensação de hidroxiacetofenona, ou ainda a partir do resorcinol ou pela oxidação de cromano [31] (LOCKHART, 2009; EMAMI; GHANBARIMASIR, 2015).

Esquema 2 - Rota sintética para 4-cromanona com substituição na posição 2.

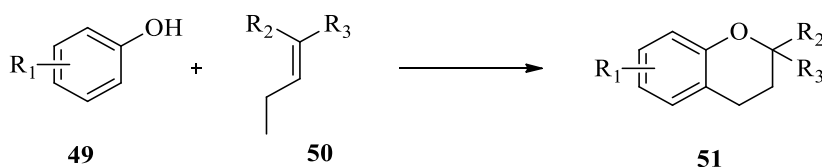


Fonte: adaptado de Lockhart (2009).

Para a síntese de cromano [31] a reação de Friedel-Crafts seguida por ciclização, ou então o ciclo acoplamento em fenol com um álcool alílico, são esquemas sintéticos utilizados (YAMAMOTO; ITONAGA, 2009; COUTANT et al., 2013), conforme esquema 3. Outras rotas

sintéticas são utilizadas para síntese de cromanos [31] dependendo das modificações estruturais desejadas, como por exemplo, a síntese a partir da desoxigenação redutiva da 4-cromanona, que pode ser direta ou em duas etapas, redução seguida de desoxigenação (FERNANDES; BERNARDO; FERNANDES, 2015).

Esquema 3 - Síntese de cromenos através de ciclo acoplamento em fenol.



Fonte: adaptado de Yamamoto e Itonaga (2009).

Algumas destas reações descritas, como: rearranjo de Fries e o ciclo acoplamento em fenol foram utilizadas nas rotas sintéticas propostas nesta tese para síntese de benzopiranos do tipo *Calea* spp. Contudo, cada rota foi elaborada com o intuito de obter modulações estruturais específicas. Todas as informações em relação as rotas sintéticas para produção de benzopiranos do tipo *Calea* spp. estão descritas na próxima subseção.

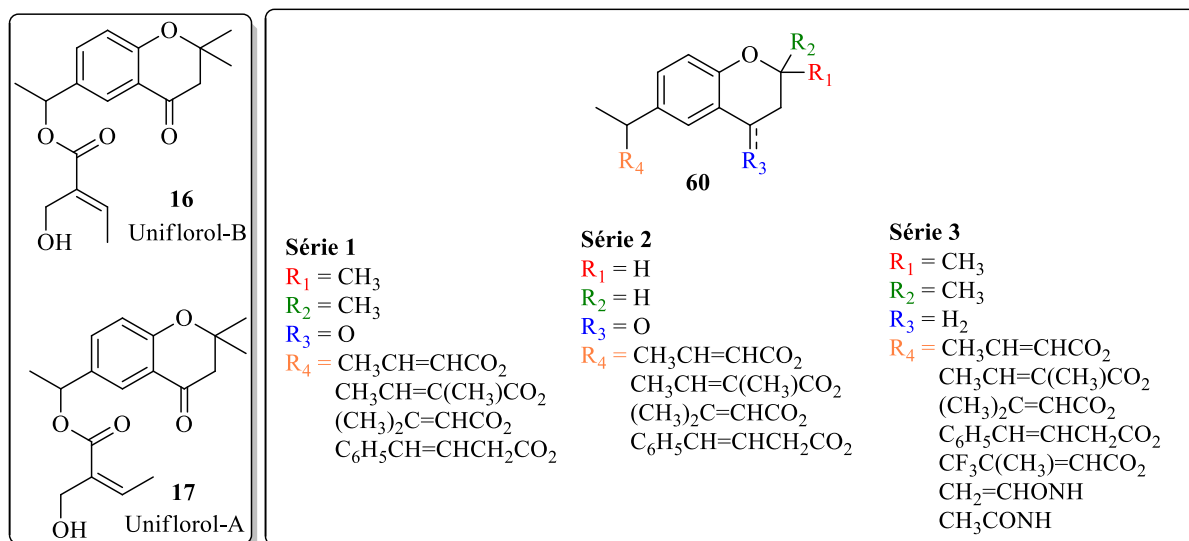
5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO DA SÍNTESE DOS BENZOPIRANOS DO TIPO *Calea* spp.

5.2.1 Rota sintética dos benzopiranos do tipo *Calea* spp.

O uniflorol-A [17] e uniflorol-B [16] isolados de *C. uniflora* tem como núcleo básico a 4-cromanona, e foram estas estruturas as fontes de inspiração para a síntese de uma quimioteca de benzopiranos do tipo *Calea* spp. Para tanto, foram elaboradas 3 rotas sintéticas, que produziram **duas séries** de compostos com núcleo básico de 4-cromanona e **uma série** com núcleo básico de cromano. A figura 31 ilustra o núcleo básico presente em todas as **séries**, bem como todas as regiões que foram moduladas quimicamente com o objetivo de estabelecer um estudo de Relação-Estrutura-Atividade (REA) e as estruturas do Uniflorol-A [17] e Uniflorol-B [16].

No total são 4 regiões que foram alvo de diversidade química, sendo que as modulações nas regiões **R¹**, **R²** e **R³** são inerentes ao substrato de partida e identificam as **3 séries** realizadas. Já na região **R⁴**, foram realizadas modificações químicas através de reações de esterificação ou amidação produzindo ésteres ou amidas dependendo da **rota** planejada.

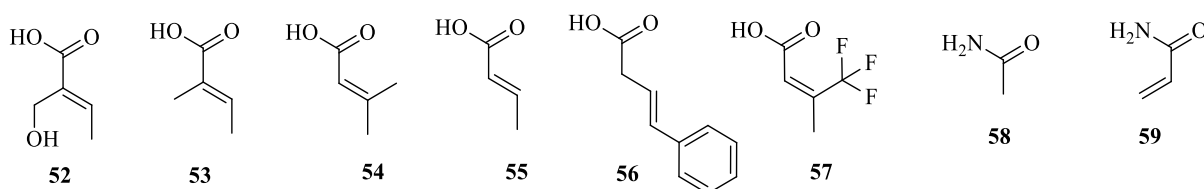
Figura 31 – Benzopiranos do tipo *Calea* spp. protótipos do uniflorol-B [16] e uniflorol-A [17].



Fonte: Autor.

Para introduzir os substituintes na região **R₄** foram utilizados os seguintes reagentes (Figura 32): ácido 2-(hidroximetil)but-2-enóico [52], ácido *trans*-2-metilbut-2-enóico [53], ácido *trans*-3-metilbut-2-enóico [54], ácido but-2-enóico [55], ácido 4-fenilbut-3-enóico [56], ácido 4,4,4-triofluro-3-metilbut-2-enóico [57], acetamida [58] e acrilamida [59]. O ácido 2-(hidroximetil)but-2-enóico [52] foi sintetizado no Laboratório de Química Medicinal da *Royal College Surgeons Ireland*, pelo professor James Barlow, e disponibilizado para realização da síntese do produto natural de *C. uniflora* (uniflorol-B [16]); os demais reagentes foram adquiridos comercialmente.

Figura 32 - Reagentes utilizados para realizar modificação estrutural na região **R₄**.



Fonte: Autor.

Conforme análises realizadas pelo *software Molinspiration* dos compostos [52, 53, 54, 55, 56, 57, 58 e 59] utilizados para introduzir diversidade química na posição **R₄**, observou-se os seguintes parâmetros físico-químicos segundo as Regras de Lipinski (LIPINSKI et al., 1997), sendo:

1) Doadores e aceptores de prótons: os ácidos carboxílicos selecionados possuem um grupamento doador de elétron e dois grupamentos aceptores de elétrons; já as amidas possuem dois grupamentos doadores e dois aceptores de elétrons.

2) Área de superfície polar: semelhante entre os ácidos carboxílicos, com área de superfície polar = 37,30, exceto para o ácido 2-(hidroximetil)but-2-enoico [52] aonde a área de superfície polar = 57,53; e semelhantes entre as amidas com área de superfície polar = 43,09.

3) Volume molecular: é diferente para os ácidos carboxílicos e amidas, sendo apenas semelhante no ácido trans-2-metilbut-2-enoico [53] e ácido trans-3-metilbut-2-enoico [54].

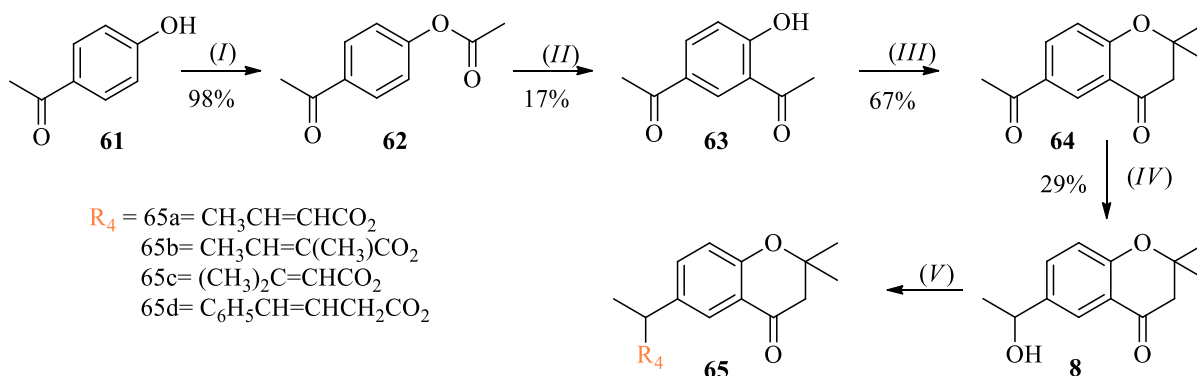
4) LogP (coeficiente de partição octanol/água): se diferenciou em todos os compostos utilizados para modulação na região **R⁴**.

A distribuição eletrônica, a estereoquímica e a hidrofobicidade são propriedades físico-químicas relevantes para estabelecer a atividade biológica entre um ligante e o biorreceptor. As estruturas químicas ilustradas na figura 32, foram selecionadas para introduzir diversidade química na região devido as suas características físico-químicas, de fácil obtenção, exceto para o composto **52**; tendo como objetivo sintetizar análogos do **Uniflorol A e B**.

5.2.2 Rota sintética da série 1

Os compostos da **série 1** foram obtidos através da rota sintética ilustrada no esquema 4. Partindo da 4-hidroxiacetofenona [61], realizou-se a reação de *o*-acilação para obtenção do composto **62**, com rendimento de 98%, sendo que as condições reacionais para esta etapa foram: diclorometano, anidrido acético, trietilamida, reação em temperatura ambiente, por 3 horas de agitação. Noji et al., (2003) também obtiveram rendimento de 98% para síntese de 4-acetilfenil acetato [62] em condições reacionais semelhantes às utilizadas no esquema 4.

Esquema 4 – Rota sintética dos compostos da série 1.



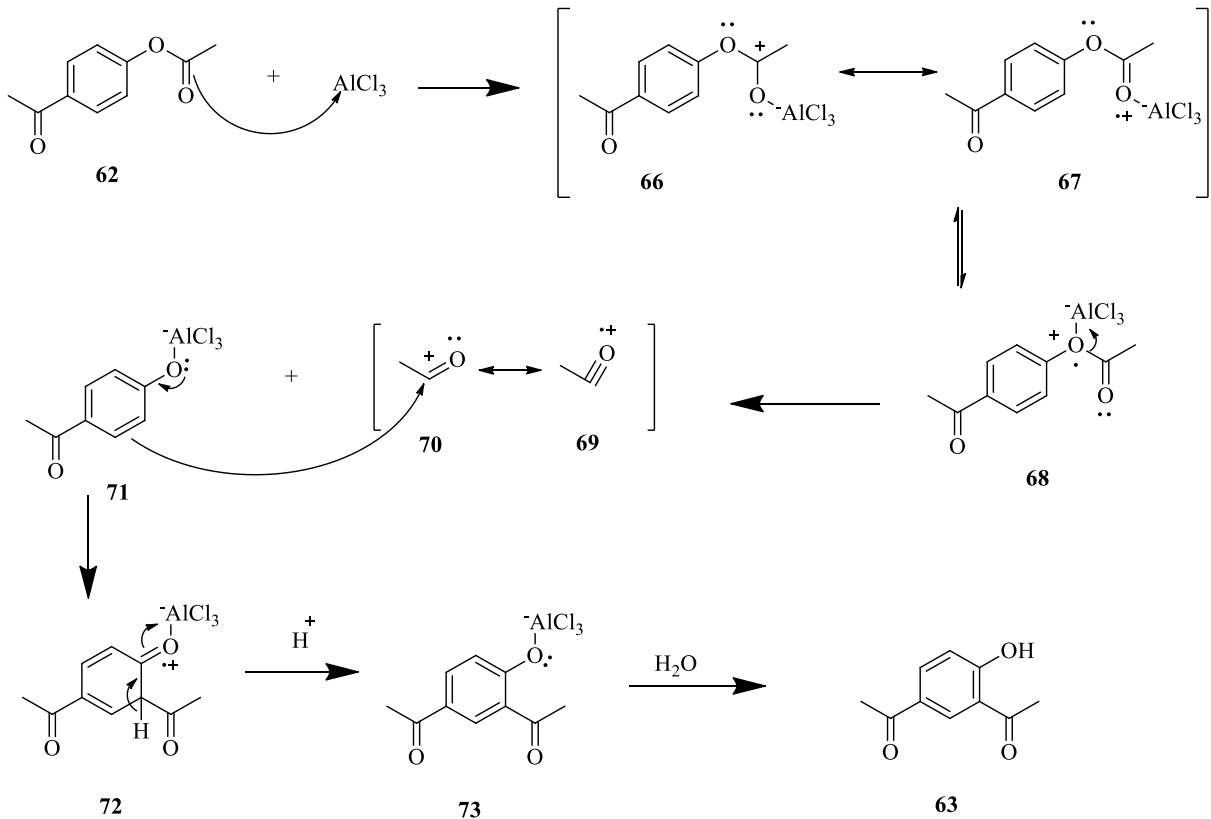
Fonte: Autor.

Reagentes e condições: (I) DCM, Ac_2O , Et_3N , t.a., 3 h; (II) AlCl_3 , 160°C , 3 h; (III) acetona, morfalina, líquido iônico [bbim]Br, 100°C , 8h; (IV) DMF, água, *Daucus carrota*, t.a., 7 dias; (V) DCM, DMAP, DCC, t.a., 20 h.

Os reagentes mais descritos em literatura para *o*-acilação são aletos de acila e anidridos (NAHMANY; MELMAN, 2004), sendo que, o reagente anidrido acético apresenta um rendimento superior ao cloreto de etila. O anidrido acético proporciona rendimento de até 98% (NOJI et al., 2003), enquanto o cloreto de etila proporciona rendimento de até 54% (KHERSONSKY; TAWFIK, 2005). O produto 4-acetilfenil acetato [62], obtido na primeira etapa (I) da rota sintética, foi caracterizado por espectro de RMN ^1H e ^{13}C , e os espectros foram semelhantes ao já descritos por Vogl et al., (2011) para esta estrutura [62].

A segunda etapa (II) da rota sintética consiste no rearranjo estrutural da posição do grupamento acila, através da reação de rearranjo de Fries, catalisada por AlCl_3 para obtenção do produto 63. As condições reacionais desta etapa foram AlCl_3 a 160°C sob agitação por 3 horas. A reorganização do éster de aril em hidroxil aril cetona é catalisada principalmente por compostos halogenados metálicos ou ácidos de Brønsted, sendo esta reação *orto/para* seletiva (HENNING; SCHWABE; KERNOHEN, 1984; JEON; MANGION, 2012). Entretanto, o produto de partida [62] já possui um radical na posição *para*, direcionando a entrada do grupamento funcional na posição *orto* (Esquema 5). O obtenção do composto 63 foi confirmada por espectros de RMN ^1H e ^{13}C que foram semelhantes aos já descritos em literatura para este produto [63] (GARCIA; MARTINEZ-UTRILLA; MIRANDA, 1985).

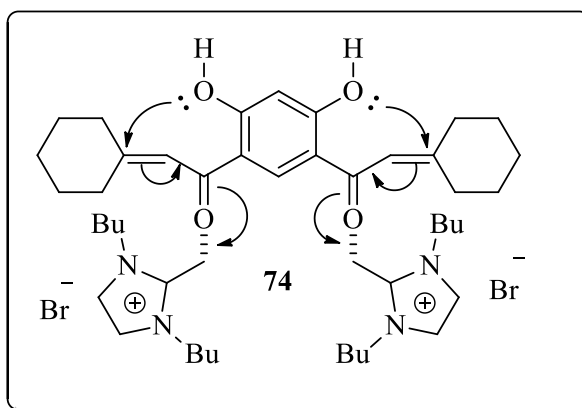
Esquema 5 - Mecanismo reacional do rearranjo de Fries, 2 etapa do esquema 1.



Fonte: adaptado de Organic chemistry portal (2018a).

Para formar o núcleo básico de 4-cromanona [64] a síntese foi realizada através da reação de ciclização de Kabbe, etapa (III) do esquema 4. O produto desta reação apresentou espectros de RMN ^1H e ^{13}C semelhantes aos já descritos em literatura para este composto [64] (ROCHA et al., 2007). O meio reacional desta etapa foi constituído por: acetona, morfalina e líquido iônico, mantidos em 100 °C por 8 horas. O líquido iônico utilizado na III etapa ([bbim]Br) tem por característica ser um ácido de Bronsted/Lewis, é segundo Muthukrishnan, Basavanag e Puranik, (2009), isto é importante, pois o 2H ácido do [bbim] Br ativa o carbono carbonílico, facilitando, assim, a formação da enamina e a ciclização do intermediário (cetona insaturada) para formação do produto, conforme exemplo apresentado na figura 33.

Figura 33 - Ciclização de Kabbe.



Autor: adaptado de Muthukrishnan; Basavanag; Puranik (2009).

A ciclização a partir de estruturas semelhantes ao composto **63** pode ser realizada em diferentes condições reacionais com diferentes catalisadores, como, por exemplo, a pirrolidina e a morfolina (MUTHUKRISHNAN; BASAVANAG; PURANIK, 2009), sendo que na etapa reacional **III** foi utilizado a morfolina como catalisador. O rendimento deste tipo de reação pode variar de 30 a 80% dependendo das condições reacionais e do tipo de material de partida (BANERJI; KALENA, 1989; MUTHUKRISHNAN; BASAVANAG; PURANIK, 2009). Neste caso, as condições reacionais utilizadas na etapa **III**, descritas no esquema 4, proporcionaram um rendimento de 67%.

A quarta etapa (**IV**) da rota sintética da **série 1**, consiste na redução seletiva da dicetona [64], utilizando o método de biocatálise utilizando uma fonte natural de enzimas capazes de diferenciar e selecionar a carbonila a ser reduzida, esta etapa foi desenvolvida a partir do trabalho realizado por Utsukihara et al. (2006).

O biocatalisador selecionado para esta etapa reacional foi a *Daucus carota* que, além de apresentar as características desejadas, como estereoseletividade, também apresenta de forma global, bons rendimento e de fácil acesso. Outras plantas também são utilizadas para biorredução, como as raízes de *Brassica napus* (UTSUKIHARA et al. 2006). Através do biocatalisador *D. carota* pode-se obter o composto **8** com rendimento de 29%. Conforme meio reacional descrito no esquema 4, utilizou-se água, *D. carota* e dimetilformamida, mantidos em temperatura ambiente por 7 dias sob agitação. Esta etapa reacional também está presente na rota sintética da **série 2**, e por isso, outras informações sobre esta reação são discutidas na subseção 5.2.5.

A última etapa (**V**) da **série 1** consiste na esterificação do composto [8], com os ácidos **53**, **54**, **55** e **56**, anteriormente apresentados, utilizando o sistema DCC/DMAP levando a

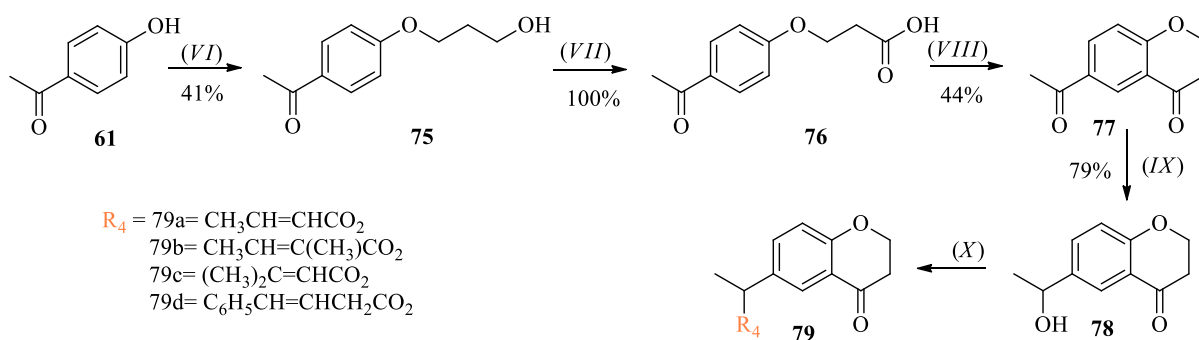
obtenção dos compostos **65a-d**, com rendimento aproximado de 15%. Esta etapa reacional também está presente na rota sintética das **séries 2 e 3**, e por esse motivo, as informações sobre esta etapa estão descritas na subseção 5.2.5.

5.2.3 Rota sintética da série 2

Os compostos **79a-d** da **série 2**, foram sintetizados via rota descrita no esquema 6. O composto **75** foi obtido através da alquilação da 4-hidroxiacetofenona [**61**] utilizando carbonato de cálcio, iodeto de potássio e como solvente dimetilformamida, obtendo-se o composto **75**, com rendimento de 41% (Esquema 6).

Reação realizada por Kilaru et al., (2013) utilizando o mesmo meio reacional utilizado na etapa **VI**, proporcionou a síntese do 1-(4-hidroxi-3-metoxifenil) etanona. Entretanto, outros meios reacionais podem ser utilizados para este tipo de alquilação. Um exemplo é o meio reacional contendo os reagentes carbonato de cálcio, acetona e 3-bromo-1-propanol em temperatura ambiente sob agitação (HEIDARY ALIZADEH et al., 2010), método este já utilizado por Chamsaz et al., (2014) para síntese do composto **76**.

Esquema 6 - Rota sintética dos compostos da série 2.



Fonte: autor.

Reagentes e condições: (VI) K_2CO_3 , KI, DMF, 100°C , 18h; (VII) acetona, KMnO_4 , ta, 18h; (VIII) PPA, 100° , 5h; (IX) DMF, água, *Daucus carota*, ta, 3 dias; (X) DCM, DMAP, DCC, ta, 20h.

Na segunda etapa (**VII**) do esquema 6 foi realizada uma reação de oxidação para formar o composto **76**, com rendimento de 100%. A formação do ácido carboxílico [**76**] a partir do álcool [**75**] foi realizada usando os reagentes acetona e permanganato de potássio em temperatura ambiente por 18 horas, seguindo as condições reacionais descritas por Dash, 2009. Em seguida na etapa reacional **VIII** foi sintetizado o composto **77**, formando assim o núcleo 4-cromanona, sendo que as condições reacionais desta etapa (ácido polifosfórico a 100°C , sob agitação) proporcionaram 44% de rendimento.

A ciclização ocorreu através da reação de C-acilação intramolecular de Friedel-Crafts usando ácido polifosfórico. Popp e Mcewen (1957) publicaram um estudo de revisão no periódico *Chemical Reviews* sobre o ácido polifosfórico e, dentre as informações sobre este reagente, os autores descrevem vários estudos aonde o ácido polifosfórico é utilizado em reações de ciclização e a variação de rendimento é apresentada conforme temperatura e tempo reacional testados. No entanto, outros regentes também são utilizados como: éster polifosfórico, ácido metanossulfônico e ácido sulfúrico (CUI et al., 2003; FILLION et al., 2005).

Na **série 2** também ocorreu formação da dicetona [77], e por isto a redução seletiva da carbonila (**etapa IX**) próxima ao anel aromático foi realizada segundo o método de biocatálise já descrito na **série 1** (UTSUKIHARA et al., 2006), tendo como meio reacional: água, dimetilformamida e *D. carota*, mantidos sob agitação por 3 dias, proporcionando um rendimento de 44% do composto 78. Esta etapa reacional também está presente na rota sintética de outra **série 1**, e será discutida na subseção 5.2.5.

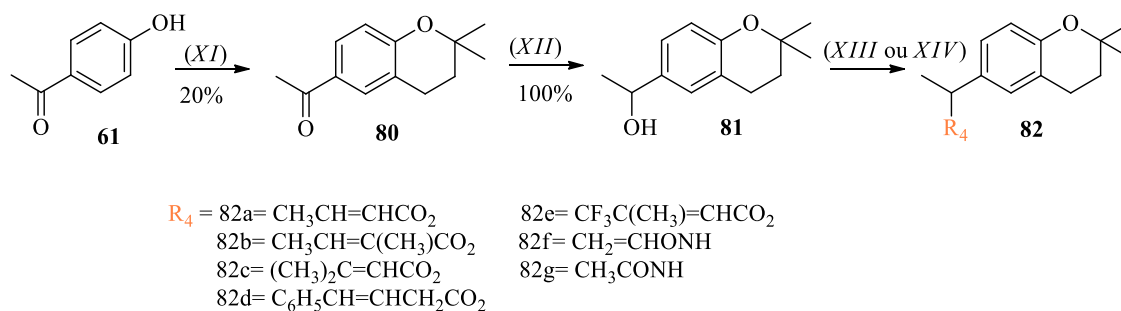
Na última etapa (**X**) foi realizado a esterificação do composto 78, seguindo a mesma condição reacional descrita para a quinta etapa da **série 1** (sistema DCC/DMAP), utilizando os ácidos 53, 54, 55 e 56, já apresentados anteriormente, para formação dos compostos 79a, 79b, 79c e 79d. Obteve-se rendimentos variando entre 17,5-20,3%. Esta etapa reacional também está presente na rota sintética das outras **séries** e, por motivo, as informações sobre esta etapa estão descritas na subseção 5.2.5.

5.2.4 Rota sintética da série 3

A rota sintética proposta para produzir os compostos da **série 3** consistiu em 3 etapas (Esquema 7). A primeira etapa inicia com a ciclocondensação da 4-hidroxiacetofenona [61] para obtenção do composto 80, formando o núcleo cromano; esta reação obteve 17% de rendimento. Este tipo de reação foi descrito na subseção 5.1.2, ilustrada no esquema 3.

Este tipo de ciclocondensação é descrita em literatura para a síntese de cromanos, utilizando diferentes materiais de partida dependendo do produto desejado, como por exemplo: álcoois aromáticos ou alifáticos em presença de fenol, um álcool e um ácido como catalizador. O 2-propin-1-ol e o 2-metibut-3-en-2-ol são exemplos de álcoois utilizados neste tipo de reação (PATEL et al., 2007).

Esquema 7 - Rota sintética dos compostos da série 3



Fonte: autor.

Reagentes e condições: (XI) ácido fórmico, 2-metilbut-3-en-2-ol, refluxo, 10 dias; (XII) MeOH, NaBH₄, ta, 2h; (XIII) DCM, DMAP, DCC, ta, 20h para **81a-d** ou (XIV) FeCl₃, nitrometano, *overnight*, ta, para **81g-h**.

A segunda etapa (XII) reacional da **série 3** consiste na redução do grupamento carbonílico utilizando borohidreto de sódio (YAMADA et al., 2003), método clássico de redução, uma vez que esta **série** não possui a presença de dicetona, não sendo necessário o uso de agente redutor seletivo como na **série 1** e na **série 2**.

A última etapa desta **série** consiste na introdução de uma cadeia alifática através de uma reação de esterificação (etapa XIII) ou amidação (etapa XIV) dependendo do composto final desejado (Esquema 7).

A reação de esterificação foi utilizada para produção dos compostos **82a-e** com rendimento entre 7% a 37%, sendo que as condições reacionais foram as mesmas utilizadas para a quinta etapa (V) da **série 1** e décima etapa (X) da **série 2**. Para obtenção dos diferentes compostos da série 3 foram utilizados os ácidos **53**, **54**, **55**, **56** e **57**. Esta etapa reacional também está presente na rota sintética nas **séries 1** e **2**, e por isso, as informações sobre esta etapa estão descritas na subseção 5.2.5.

A reação de amidação (etapa XIV) foi realizada para obtenção dos compostos **82f-g**. Para esta reação, o composto **81** foi submetido a um meio reacional contendo FeCl₃, nitrometano e acetamida [**58**] ou acrilamida [**59**] com rendimento de 24% e 53%, respectivamente, conforme Esquema 7.

Os metais de transição são catalisadores eficientes para reações de substituição com formação da ligação C-N, porém produzem quantidades estereoquímicas de resíduos de sal. Existem outros catalisadores que são eficientes como *Sodium tetrachloroaurate(III) dihydrate*, *H-Montmorillonite* e Cloreto de molibdênio, entretanto são reagentes tóxicos e com custo elevado (JANA; MAITI; BISWAS, 2008).

O ácido de Lewis FeCl₃ tem baixo custo e pouca toxicidade, e trata-se de um método eficiente na amidação de álcoois benzílicos e alílicos, e, portanto, ideal para a etapa (XIV) de

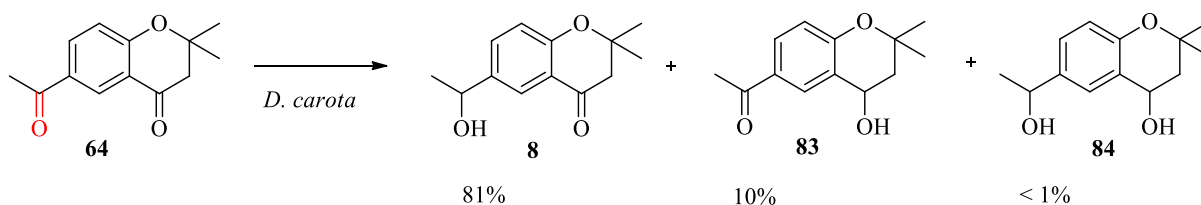
amidação da **série 3**. O mecanismo reacional da substituição nucleofílica do álcool com formação de amida catalisada por FeCl_3 ainda não é bem conhecido, sabe-se que o álcool benzílico é convertido no seu éter dimérico correspondente e ativado pelo ácido de Lewis para, assim, reagir com a amida presente no meio reacional e formar o produto (JANA; MAITI; BISWAS, 2008).

5.2.5 Etapas reacionais convergentes nas rotas sintéticas realizadas

As **séries 1 e 2** têm como intermediários dicetonas [**64 e 77**] e, por isto, antes da última etapa das rotas sintéticas ilustradas nos esquemas 4 e 6, se fez necessário a redução seletiva do grupamento cetona, representado em **vermelho** no esquema 8. Devido a esta seletividade, não foi possível ser utilizado a redução da carbonila por meios reacionais convencionais como, por exemplo, o borohidreto de sódio. (ZEYNIZADEH; BEHYAR, 2005). Para obter-se a seletividade desejada, o método utilizado foi o de biocatálise (UTSUKIHARA et al., 2006).

Orden e colaboradores (2008) testaram diversas espécies vegetais para redução do seletiva de um grupamento cetona do composto 6-acetil-2,2-dimetilcroman-4-ona [**64**], as espécies investigadas foram: *Baccharis crispa*, *Buddleja cordobensis*, *Tessaria absinthioides*, *Gaillardia pulchella*, *Gardenia augusta* e *Daucus carota*. Neste tipo de reação pode ocorrer a formação de três produtos (Esquema 8).

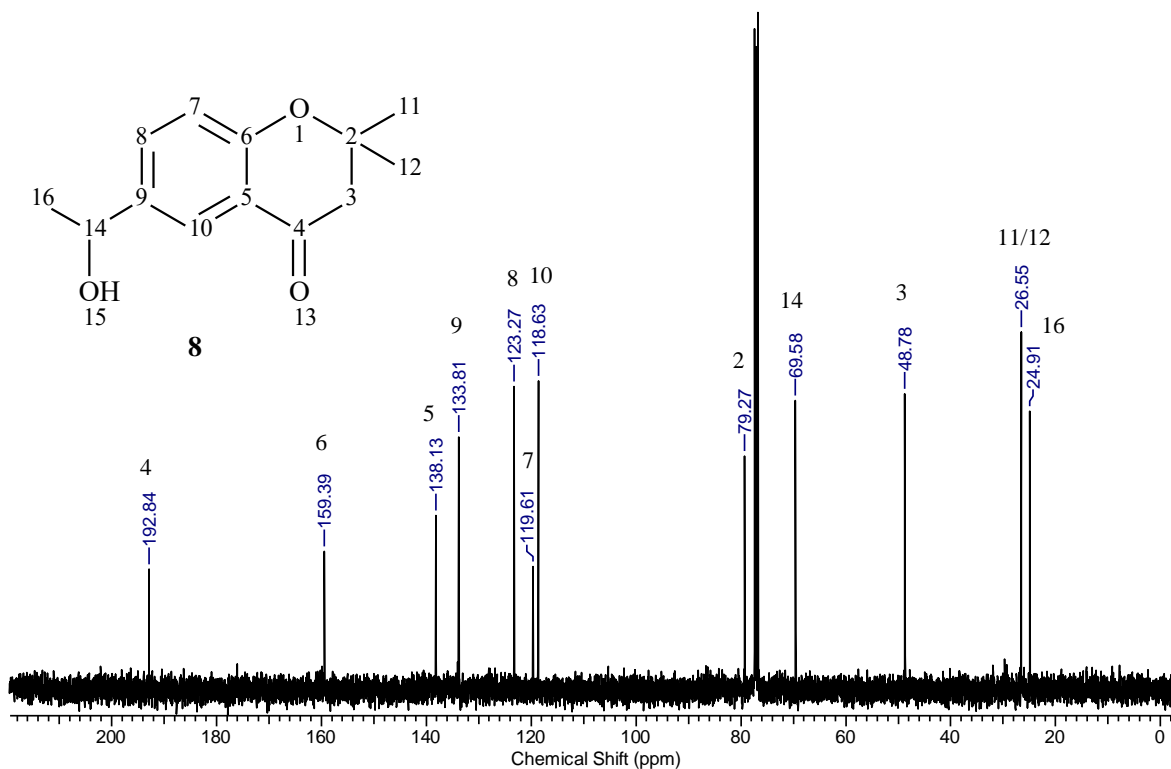
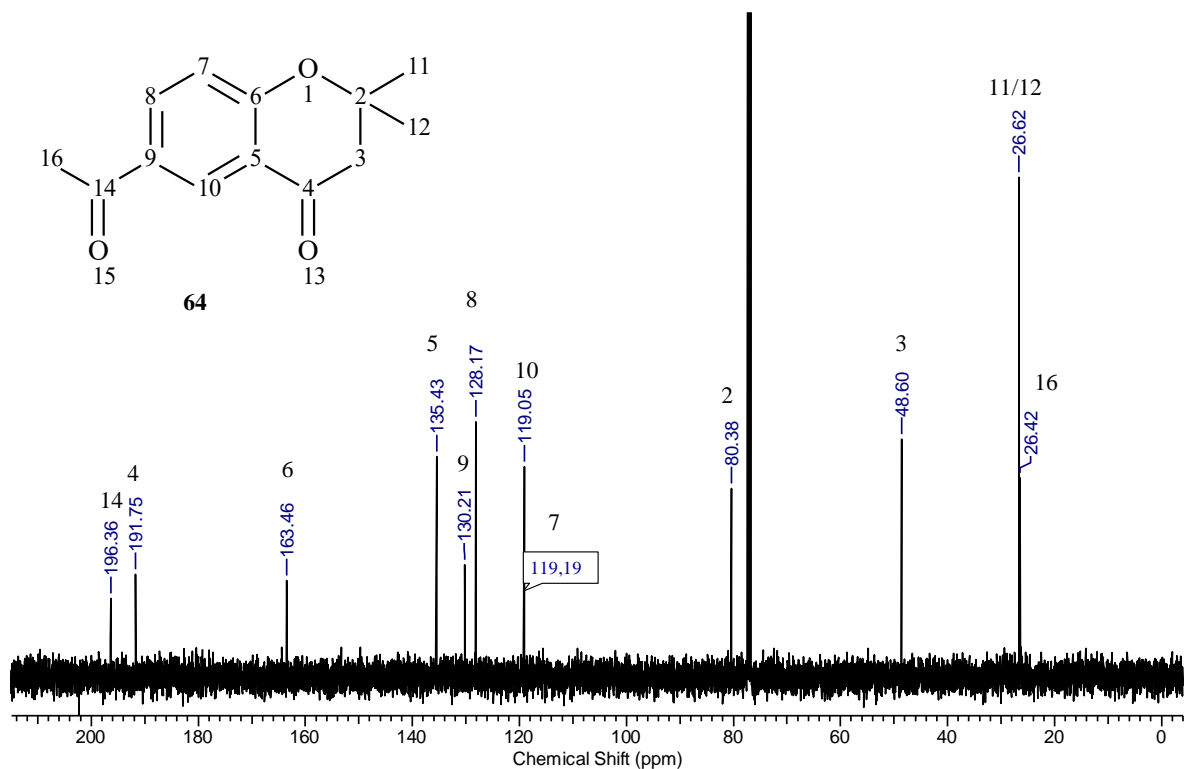
Esquema 8 - Bioredução com *D. carota*



Fonte: adaptado Orden et al. (2008).

A figura 34 ilustra os espectros de RMN de C^{13} do material de partida [**64**] e produto [**8**] obtido a partir da bioredução regioseletiva (etapa **IV - série 1**), demonstrando a redução do grupamento cetona no carbono 14.

Figura 34 - Espectros de RMN ^{13}C da dicetona [64] e do produto [8] da redução regioseletiva.



Fonte: autor.

Composto **64**: RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3): δ = 196,36 (CO), 191,75 (CO), 163,46 (C-Ar), 135,43(CH-Ar), 130,21 (C-Ar), 128,17(CH-Ar), 119,19(C-Ar), 119,05 (CH-Ar), 80,38 (C), 48,60 (CH_2), 26,62 (2CH_3), 26,42(CH_3). Composto **8**: RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3): δ = 192,84 (CO), 159,39 (C-Ar), 138,13 (CH-Ar), 133,81 (C-Ar), 123,27 (CH-Ar), 119,61 (C-Ar), 118,63 (CH-Ar), 79,27 (C), 69,58 (COH), 48,78 (CH_2), 26,55 (2CH_3), 24,91 (CH_3).

De acordo com os resultados de Orden e colaboradores (2008), a espécie *D. carota* foi a mais eficiente na produção do composto **8**, com 81% de conversão (Esquema 8). As demais espécies variaram a conversão para composto **8**, tendo um rendimento de 9 a 68%.

A bioredução com *D. carota* ocorre devido às enzimas álcool desidrogenase (ADH) presente na cenoura (MUSA et al., 2007). Este tipo de reação tem por características ser lenta, podendo levar até 10 dias (SCARPI; OCCHIATO; GUARNA, 2005). A temperatura também é um parâmetro que influencia no rendimento reacional, sendo que a faixa de temperatura mais adequada é entre 30 °C (ACHARYA et al., 2016).

Outra característica relevante deste tipo de reação, é a enantiosseletividade, dependendo da espécie vegetal utilizada como biocatalisador, a configuração pode ser seletiva para *Rectus* (R) ou *Sinister* (S), parâmetro relevante quando se trata de moléculas que interagem em sistemas biológicos (ACHARYA et al., 2016; YADAV et al., 2002).

A espécie *D. carota* é enantiosseletiva para configuração S com 98% de conversão (SCARPI; OCCHIATO; GUARNA, 2005; YADAV et al., 2007). O pH da mistura reacional é um dos fatores que pode alterar o percentual de enantiosseletividade. Para *D. carota* o pH entre 7 a 8 tem 95 a 98% de seletividade para configuração S. No entanto, com diminuição do pH (6,0 a 6,5) este percentual diminui para 72 a 65% (ACHARYA et al., 2016). Na etapa de bioredução das **séries 1 e 2** o meio reacional proporcionou um pH de 7,5, sugerindo assim uma seletividade de maior percentual para a configuração S. Os resultados de Orden e colaboradores (2008) para bioredução de 6-acetil-2,2-dimetilcroman-4-ona [**64**] demonstram a enantiosseletividade para configuração S (>98%) quando utilizado a *D. carota*, como também descrevem a enantiosseletividade para a configuração R (>98%) quando utilizado a *B. crispa*. Com isto, as reações de bioredução são importantes quando se necessita de regioseletividade ou enantiosseletividade. No caso das reações de redução da **série 1 e 2**, a biocatálise com *D. carota* foi fundamental por ser regioseletiva.

O primeiro espectro (figura 34) representa a dicetona do composto **64**, com a presença de dois sinais de carbonila na região entre 197 ppm (pertencente a **RCO-14**) a 190 ppm (atribuído ao **CO-4**). Os espectros da figura 33 representam a efetividade da biorredução para formação do composto **8**, aonde é caracterizado por apenas um sinal a região de 192,84 ppm (**CO-4**) e o pico na região de 69,58 ppm correspondente ao **RCOH-14**.

O composto **8** foi isolado por Do Nascimento et al., (2007) a partir do extrato do xilopódio de *C. uniflora* e posteriormente foi caracterizado, onde os sinais de RMN de hidrogênio e C¹³ foram semelhantes aos apresentados pelo composto **8** sintetizado, contendo sinais nas regiões 193,00 e 70,00 ppm semelhantes ao produto [**8**] sintetizado por bioredução.

Outro dado que corrobora a caracterização do composto **8** é presença de um quarteto na região de 4,79 ppm no RMN de H^1 , caracterizando a presença do **CH-4**. Estes dados são semelhantes aos registrados por de Orden et al., (2008) para o composto **8** na análise de RMN de H^1 , com a presença de um quarteto na região de 4,87 ppm.

A bioredução para formação dos compostos **8** e **78** e a redução por $NaBH_4$ para síntese do composto **81** foram eficientes, formando, assim, os núcleos básicos de cada **série**. A diferença entre as estruturas se dá pela ausência ou presença da carbonila e das metilas ($2CH_3$).

Estes intermediários [**8**, **78** e **81**] foram submetidos a esterificação para formação dos benzopiranos do tipo *Calea* spp. Diversas condições reacionais foram testadas antes da esterificação de Steglich (NEISES; STEGLICH, 1978) com DMAP (4-Dimetilaminopiridina) e DCC (N,N' diciclohexilcarbodiimida). A tabela 8 resume as condições reacionais testadas.

Tabela 8 – Otimização das condições reacionais para etapa de esterificação utilizando o álcool intermediário [**8**] da série 1.

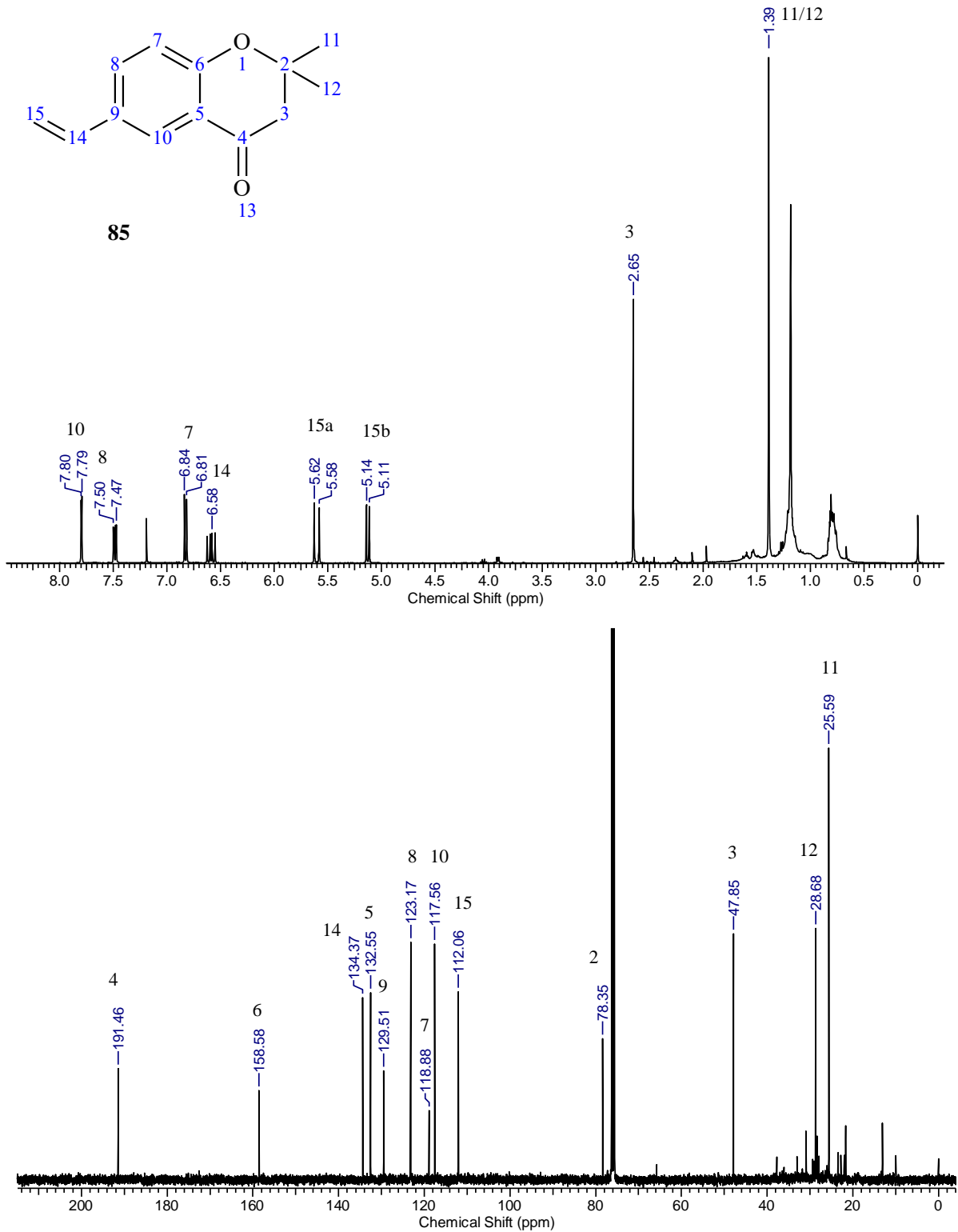
ROH	ROOH	Potência	RPM	°C	Tempo	Reagente	Solvente	Produto-éster
<i>Micro-ondas</i>								
8	53	110	60	80	10 min	-	THF	X
8	53	110	60	80	20 min	-	THF	X
8	53	110	60	80	30 min	-	THF	X
8	53	80	60	80	10 min	-	THF	X
8	53	80	60	80	20 min	-	THF	X
8	53	80	60	80	30 min	-	THF	X
8	53	80	60	80	10 min	-	THF	X
8	53	-	60	80	20 min	-	THF	X
8	53	-	60	80	30 min	-	THF	X
8	53	-	60	80	10 min	FPAT	THF	X
8	55	-	60	80	5 min	FPAT	THF	X
<i>Refluxo ou ta</i>								
8	53	-	-	80	9 h	FPAT	Tolueno	X
8	53	-	-	100	5 h	FPAT	Tolueno	X
8	53	-	-	ta	4 dias	FPAT	Tolueno	X
8	54	-	-	100	5 h	FPAT	Tolueno	X
8	52	-	-	100	5 h	FPAT	Tolueno	X
8	55	-	-	ta	20 h	DCC/DMAP	DCM	✓
8	52	-	-	ta	20 h	DCC/DMAP	DCM	X
81	52	-	-	ta	20 h	DCC/DMAP	DCM	X

Fonte: Autor. (ROH) álcool; (ROOH) ácido carboxílico, (RPM) rotação por minuto; (°C) temperatura; (-) ausência, (ta) temperatura ambiente; (x) não ocorreu a formação do éster; (✓) ocorreu a formação do éster.

O uso de micro-ondas (MO) juntamente com o catalisador pentafluorofenil amônia triflato (PFPAT) são descritos em literatura (FUNATOMI et al., 2006). Entretanto, não proporcionaram meios adequados para esterificação do álcool [**8**] da **série 1**. Para tanto, foram utilizados alguns parâmetros reacionais com o intuito de otimizar a reação, por exemplo: variações de temperatura, fonte de calor e presença ou ausência de PFPAT (Tabela 8).

A partir destes resultados descritos na tabela 8, foi possível identificar que em micro-ondas não há formação de produto, mas também não houve degradação dos reagentes, sendo possível recuperar o material de partida. Contudo, quando utilizado o catalisador PFPAT em refluxo ocorre a desidratação do álcool formando 2,2-dimetil-6-vinilcroman-4-ona [**85**], conforme confirmado por espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Figura 35). Os sinais 14 (6,58 ppm) 15a (5,62 ppm) e 15b (5,14 ppm) do RMN ^1H caracterizam a formação do composto **85**, bem como a presença dos sinais 14 (134,37 ppm) e 15 (112,06 ppm) do RMN ^{13}C .

Figura 35 - Espectro RMN de próton e carbono do composto **85**.



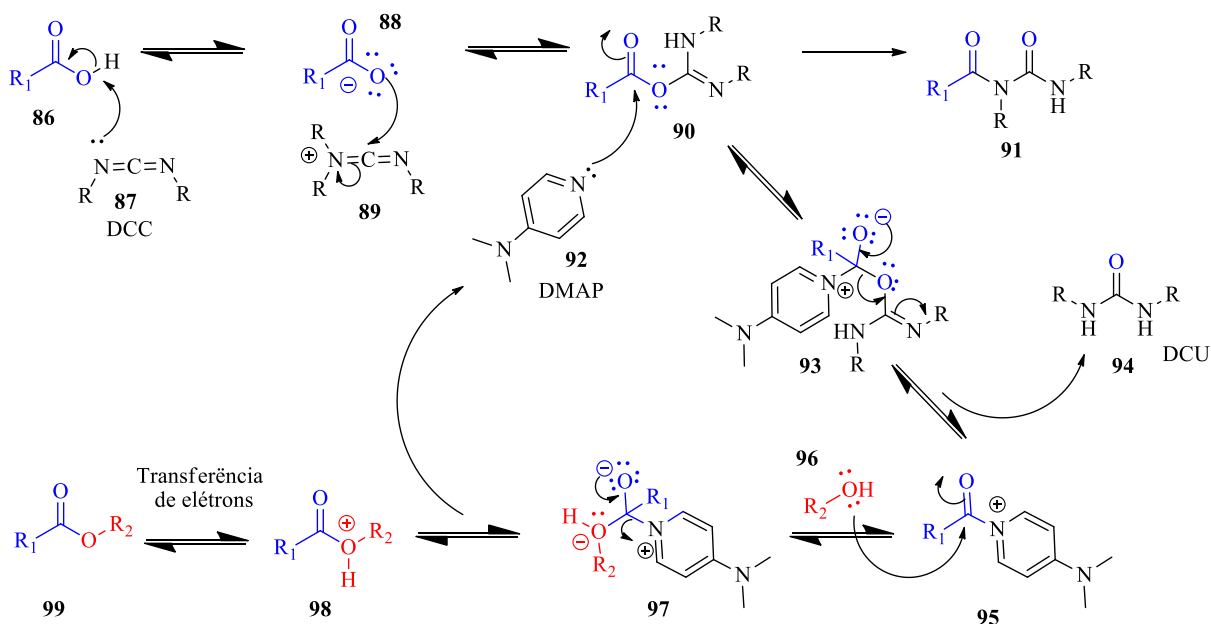
Fonte: autor.

NMR ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.79 (d, *J* = 2.26, 1H-Ar), 7.50 (d, *J* = 8.53, 2.26 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 8.53, 1H-Ar), 6.62-6.55 (m, 2H), 5.62 (d, *J* = 17.57, 1H), 5.14 (d, *J* = 10.79 Hz, 1H), 2.65 (s, 2H), 1.39 (s, 6H). NMR ¹³C (400 MHz, CDCl₃): δ = 191.46 (CO), 158.58 (C-Ar), 134.37 (CH), 132.55 (CH-Ar), 129.51 (C-Ar), 123.17 (CH-Ar), 118.88 (C-Ar), 117.56 (CH-Ar), 112.06 (CH₂) 78.35 (C), 47.85 (CH₂), 28.68 (2CH₃), 25.59 (CH₃).

A esterificação de *Steglich* foi eficiente para síntese dos compostos **65a-d**, **79a-d** e **82a-b**, mas ineficiente para a obtenção do produto natural uniflorol-B [**16**]. Provavelmente as características químicas do ácido carboxílico [**52**] pode ter interferido na síntese.

O mecanismo geral da reação de esterificação de *Steglich* (Esquema 9), aonde o ácido carboxílico é ativado pelo DCC [**87**], formando o *O*-acilisourea [**90**]. Este intermediário favorece o ataque nucleofílico do álcool [**95**] no carbono deficiente de elétrons, formando o éster. No entanto, quando utilizado apenas o DCC [**87**], ocorrem reações secundárias e a formação de subprodutos indesejados [**91**]. Estas reações foram minimizadas pela presença do DMAP [**92**], pois trata-se de um forte nucleófilo que age como um transferente do grupo acilo, como também se torna um intermediário [**95**] mais reativo favorecendo o ataque nucleofílico do álcool [**96**], gerando assim um deslocamento no equilíbrio químico para formação do éster [**99**], minimizando a formação de subproduto [**91**] (LUTJEN et al., 2018; NEISES; STEGLICH, 1978).

Esquema 9 - Mecanismo geral da reação de Esterificação de *Steglich*.



Autor: LUTJEN et al. (2018).

5.2.6 Avaliação *in silico* dos benzopiranos do tipo *Calea* spp. propostos

Os álcoois intermediários das séries [**8,78,81**] foram analisados *in silico* pelo *software molinspiration* (MOLINSPIRATION, 2018a) em relação as suas propriedades físico-químicas e bioatividade e pelo *software OSIRIS* (ORGANIC CHEMISTRY PORTAL, 2018b) quanto a possível toxicidade. O *software molinspiration* calcula as propriedade físico-químicas

relevantes para solubilidade e permeabilidade do fármaco, sendo elas: aceptores de ligações de hidrogênio (ALH), doadores de ligações de hidrogênio (DLH), massa molecular (MM), área e superfície polar topológica (TPSA), coeficiente de partição água/octano (logP), número de átomos (N átomos), volume e número de ligações rotativas (Nrotb). Com estes parâmetros é possível verificar se os compostos se enquadram nas regras de Lipinski. Conforme esta regra, a maioria dos compostos "semelhantes aos fármacos" têm $\log P \leq 5$, peso molecular ≤ 500 , número de aceptores de ligações de hidrogênio ≤ 10 e número de doadores de ligações de hidrogênio ≤ 5 . Compostos que violam mais de uma destas regras podem ter problemas com a biodisponibilidade (LIPINSKI, 2001).

Conforme a tabela 9 os álcoois intermediários [8, 78 e 81] não violam as regras de Lipinski. Esta tabela também apresenta a estimativa de interação com alguns alvos biológicos, sendo que o álcool [81] da série 3 é o único que apresentou *score* relevante como ligante de receptor nuclear.

Tabela 9 - Propriedades físico-químicas e bioatividade dos álcoois intermediários das três séries estimadas pelo *software molinspiration* e a toxicidade pelo *software OSIRIS (in silico)*.

Propriedades estimadas	ROH		
	Série 1 [8]	Série 2 [78]	Série 3 [81]
Físico-químicas			
LogP	1,95	1,14	2,85
ASPT	46,53	46,53	29,46
N átomos	16	14	15
MM	220,27	192,21	206,28
ALH	3	3	2
DLH	1	1	1
Nrotb	1	1	1
Volume	209,00	176,18	206,82
Bioatividade			
Ligante GPCR	-0,08	-0,28	-0,05
Modulador Canal Ion	0,01	-0,30	0,17
Quinase Inibidor	-0,87	-0,91	-0,70
Ligante Receptor Nuclear	-0,01	-0,26	0,26
InibidorProtease	-0,37	-0,80	-0,29
InibidorEnzimático	-0,02	-0,02	0,07
Toxicidade			
Mutagênico	●	●	●
Tumorigênico	●	●	●
Irritante	●	●	●
Efeito reprodutivo	●	●	●

Fonte: software molinspiration e OSIRIS.

ALH=aceptores de ligações de hidrogênio; DLH=doadores de ligações de hidrogênio; M= massa molecular, ASPT=área e superfície polar topológica; LogP coeficiente de partição água/octano; N átomos= número de átomos; Nrotb=número de ligações rotativas; GPCR = Receptor acoplado à proteína G; ●risco baixo; ●risco médio; ●risco alto.

A triagem em relação a bioatividade calculada no *software molinspiration* é baseada no modelo de fragmentos. O cálculo é feito através de uma soma de contribuições sobre a

atividade dos fragmentos da estrutura química, fornecendo uma pontuação de atividade variando entre -3 e 3. Basicamente é relacionado a semelhança entre as propriedades moleculares e características estruturais do ligante a ser analisado em relação aos fármacos já conhecidas (estatística Bayesian) (MOLINSPIRATION, 2018b).

A previsão da toxicidade calculada pelo *software OSIRIS* também é baseada no modelo de fragmentos. Conforme tabela 9, os álcoois [8, 78e 81] tem baixo risco de ser mutagênico, tumorigênico, irritante e ter efeitos na reprodução (ORGANIC CHEMISTRY PORTAL, 2018b).

Os intermediários das **séries 1 [8]** e **2 [78]** têm propriedade físico-químicas semelhantes, diferenciando principalmente no volume e massa molécula, devido as duas metilas presentes na **série 1[8]** e ausente na **série 2 [78]**. Já a **série 3 [81]**, além de se diferenciar das outras **séries** em relação ao volume e massa molecular, também se diferencia no LogP e ASPT, como foi o único entre os intermediários das **séries** que apresentou bioatividade como Ligante Receptor Nuclear.

As estruturas propostas para compor a quimioteca de benzopiranos do tipo *Calea* e a estrutura do uniflorol-B [16] foram analisados *in silico* pelos *software molinspiration* e *OSIRIS* (Tabelas 10, 11 e 12).

Tabela 10 -Propriedades físico-químicas dos produtos finais das três séries estimadas pelo *software molinspiration*.

Composto	LogP	TPSA	N átomos	MM	ALH	DLH	Nrotb	Volume
<u>Série 1</u>								
65a	3,48	52,61	21	288,34	4	0	4	272,93
65b	4,02	52,61	22	302,37	4	0	4	289,49
65c	4,26	52,61	22	302,37	4	0	4	289,49
65d	4,89	52,61	27	364,44	4	0	6	344,58
<u>Série 2</u>								
79a	2,67	52,61	19	260,29	4	0	4	240,11
79b	3,21	52,61	20	274,32	4	0	4	256,67
79c	3,45	52,61	20	274,32	4	0	4	256,67
79d	4,08	52,61	25	336,39	4	0	6	311,76
<u>Série 3</u>								
82a	4,38	35,54	20	274,36	3	0	4	270,75
82b	4,93	35,54	21	288,39	3	0	4	287,31
82c	5,16	35,54	21	288,39	3	0	4	287,31
82d	5,80	35,54	26	350,46	3	0	6	287,31
82e	5,58	35,54	24	342,36	3	0	5	302,05
82f	3,37	38,33	19	259,35	3	1	3	257,92
82g	2,77	38,33	18	247,34	3	1	2	246,75
Uniflorol-B 16	2,78	72,84	23	318,37	5	1	5	297,75

Fonte:software *molinspiration*. ALH=aceptores de ligações de hidrogênio; DLH=doadores de ligações de hidrogênio; MM= massa molecular, ASPT=área e superfície polar topológica; LogP coeficiente de partição água/octano; N átomos= número de átomos; Nrotb=número de ligações rotativas.

Tabela 11 - Bioatividade dos produtos finais das três séries estimadas pelo software *molinspiration*.

Composto	Ligante GPCR	Modulador Canal Ion	Quinase Inibidor	Ligante Receptor Nuclear	Inibidor Protease	Inibidor Enzimático
<i>Série 1</i>						
65a	0,15	-0,03	-0,71	0,30	-0,12	0,22
65b	0,12	-0,02	-0,69	0,42	-0,31	0,30
65c	0,16	-0,01	-0,29	0,43	-0,07	0,26
65d	0,28	0,06	-0,25	0,30	-0,02	0,22
<i>Série 2</i>						
79a	0,06	-0,21	-0,69	0,18	-0,40	0,20
79b	0,05	-0,19	-0,64	0,33	-0,59	0,29
79c	0,09	-0,19	-0,43	0,34	-0,33	0,25
79d	0,28	-0,08	-0,13	0,28	-0,15	0,21
<i>Série 3</i>						
82a	0,20	0,10	-0,57	0,54	-0,03	0,23
82b	0,17	0,11	-0,54	0,66	-0,23	0,31
82c	0,21	0,11	-0,33	0,67	0,01	0,27
82d	0,35	0,16	-0,10	0,51	0,09	0,23
82e	0,20	0,06	-0,30	0,80	0,07	0,24
82f	-0,12	-0,09	-0,58	-0,08	0,10	0,13
82g	-0,07	-0,07	-0,62	-0,18	-0,01	-0,11
<i>Uniflorol-B 16</i>	0,26	0,01	-0,53	0,44	-0,14	0,38

Fonte: software *molinspiration*. GPCR = Receptor acoplado à proteína G.

A tabela 10 apresenta os dados calculados em relação as propriedades físico-química dos compostos [65a-d, 79a-d e 82a-e], sendo que três compostos [82c,d,e] violaram 1 regra (LogP) de Lipinski, no entanto é aceitável uma violação. A estimativa em relação a bioatividade (Tabela 11), realizada pelo software *molinspiration*, indica a possível atividade dos benzopiranos do tipo *Calea* spp como: ligantes GPCR, ligante de receptor nuclear e inibidor enzimático, sendo as mesmas atividades estipuladas para uniflorol-B [16] (Tabela 11).

A pontuação (*score*) de bioatividade nos compostos da **série 3** são mais elevados em relação a **série 1** e **2**. Conforme tabela 9, o álcool intermediário [81] da **série 3** apresenta maior pontuação de bioatividade como ligante de receptor nuclear do que as demais **séries**, o que pode justificar o aumento da pontuação dos produtos da **série 3**.

A estimativa de toxicidade calculada para uniflorol-B [16] pelo software *OSIRIS* é de baixo risco como mutagênico, tumorgênico, irritante e em relação aos efeitos reprodutivos. Entretanto, alguns dos compostos sintetizados foram classificados como: mutagênico de médio [65a, 79a e 82a] e alto [82f] risco, tumorgênico de médio risco [82f], tóxico reprodutivo de médio risco [82f] e irritante de médio [65a,79a-b-c e 82a-b-c] e alto risco [65b-c] (Tabela 12).

Tabela 12 - Potencial toxicológicos *in silico* dos produtos finais das três séries estimadas pelo software *OSIRIS*.

Composto	Mutagênico	Tumorgênico	Irritante	Efeito reprodutivo
<u>Série 1</u>				
65a	●	●	●	●
65b	●	●	●	●
65c	●	●	●	●
65d	●	●	●	●
<u>Série 2</u>				
79a	●	●	●	●
79b	●	●	●	●
79c	●	●	●	●
79d	●	●	●	●
<u>Série 3</u>				
82a	●	●	●	●
82b	●	●	●	●
82c	●	●	●	●
82d	●	●	●	●
82e	●	●	●	●
82f	●	●	●	●
82g	●	●	●	●
<u>Uniflorol-B 16</u>	●	●	●	●

Fonte: software *OSIRIS*; ●risco baixo; ●risco médio; ●risco alto.

5.3 METODOLOGIA DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VITRO*

O *L. infantum* na forma promastigota (MHOM/MA/67/ITMAP-263, CNR Leishmania, Montpellier, França, expressando atividade da luciferase) foi cultivada em meio RPMI 1640, com suplementação de soro bovino fetal (5%), L-glutamina, (2 mM) e antibióticos (100 µL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina) e centrifugado a 900 rpm por minuto. O sobrenadante foi removido e substituído pelo mesmo volume de RPMI 1640 com pH 5,4, e incubado durante 24 h a 248 °C. O acidificado de promastigotas foi incubado por 24h à 378 °C em ambiente ventilado. As promastigotas foram então transformadas em amastigotas axênicas. Os efeitos dos compostos foram testados no crescimento de *L. infantum* amastigotas axênicas.

L. infantum amastigotas foram incubadas em uma densidade de 2×10^6 parasita/mL, em placas de 96 poços estéreis com concentrações crescentes do composto previamente dissolvidos em DMSO (concentração final <0,5% v/v). Os controles negativo (veículo - DMSO) e positivo (anfotericina B) foram adicionados a cada conjunto de experimentos. Após o período de incubação de 48 h a 37 °C, cada poço foi examinado por microscópio. O reagente de incandescência (Promega) foi adicionado de acordo com a instruções do fornecedor e as

placas foram incubadas por 2 min. A luminescência foi medida usando um contador de luminescência Microbeta (PerkinElmer).

O IC₅₀ foi determinado como a concentração do composto necessária inibir em 50% a atividade metabólica de *L. infantum* em relação ao controle negativo. Os valores de IC₅₀ foram calculados por regressão linear, análise de curva dose-resposta, usando o programa *TableCurve 2D V5*. Primeiro foi realizado um teste de triagem e após os compostos mais promissores (IC₅₀ < 10 µg/mL) foram avaliados em triplicata. Os valores de IC₅₀ na triagem representam o resultado de um experimento e os valores de IC₅₀ dos compostos com IC₅₀ < 10 µg/mL representam a média de três experimentos independentes.

Este teste foi realizado em parceria com as pesquisadoras Sandra Bourgeade-Delmas e Anne Cecile le Lame da *Université de Toulouse*, França.

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DOS BENZOPIRANOS DOS TIPO *Calea* spp.

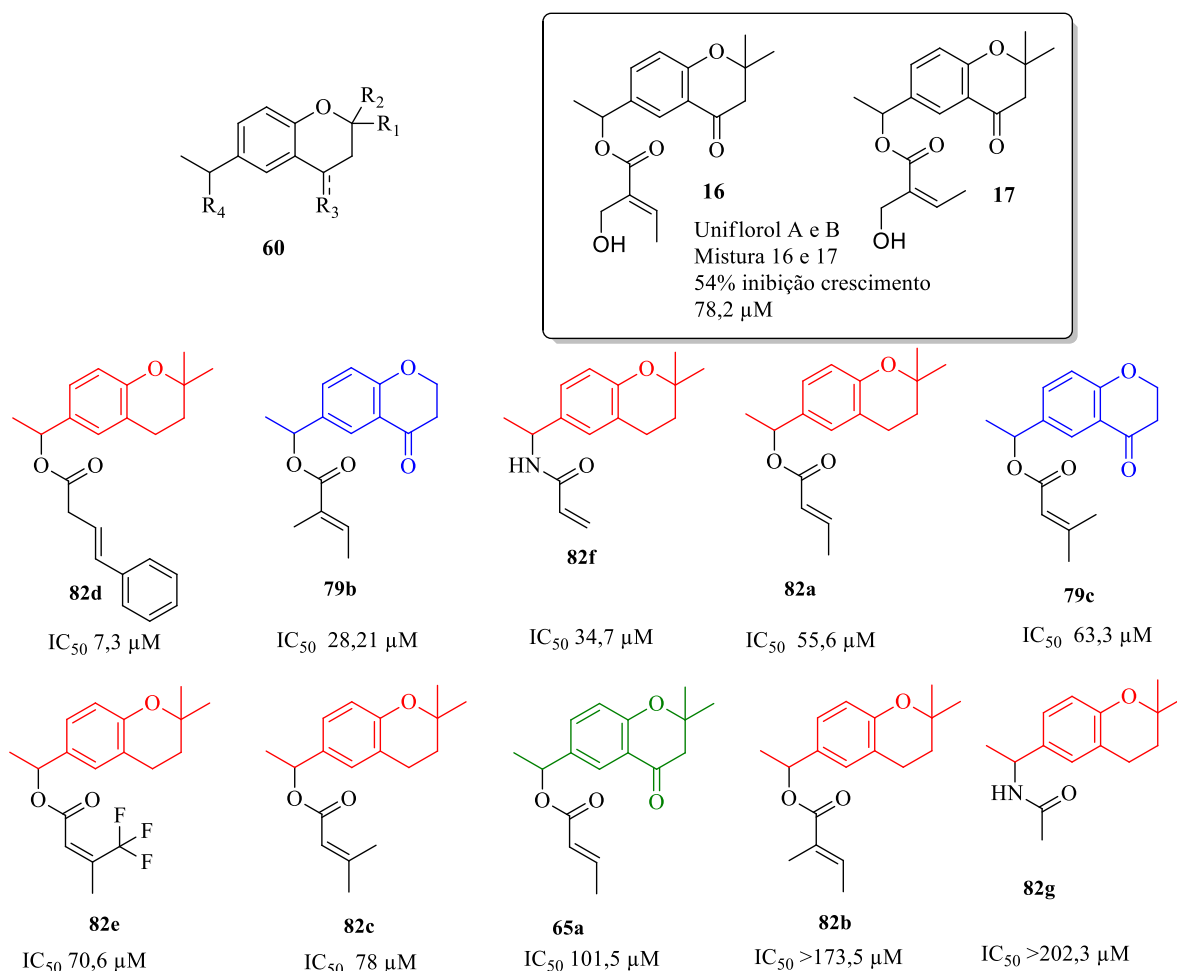
A mistura de uniflorol-B [16] e uniflorol-A [17] isolados da *C. uniflora* tem atividade leishmanicida inibindo o crescimento em 54,8% na dose de 25 µg/mL do *L. major* na forma promastigota. Neste mesmo estudo também foi avaliada a 6-(1-hidroxietil)-2,2-dimetilcroman-4-ona [8] isolada também da *C. uniflora*, no entanto, este composto não inibiu o crescimento do protozoário (DO NASCIMENTO et al., 2007).

Sabendo do potencial leishmanicida do uniflorol-A e B [16 e 17] e da bioatividade calculada para as três séries, todos os benzopiranos do tipo *Calea* spp. sintetizados [65a, 79b, 79c e 82a-g] passaram por uma triagem em relação ao seu efeito leishmanicida no *L. infantum* na forma amastigota. Após a triagem, os compostos que inibiram o crescimento com a menor concentração foram testados novamente para obter os resultados em triplicata. Na série 1 os compostos 65b, 65c e 65d e os compostos 79a e 79d da série 2, não foram triados para atividade leishmanicida, por não estarem purificados. A tabela 13 apresenta as concentrações em µg/mL de cada composto com a capacidade de inibir o crescimento do protozoário em 50% e a figura 36 apresenta as estruturas de cada composto testado com seu respectivo resultado (mesmos resultados da tabela 13) em µM.

Tabela 13 - Efeito leishmanicida (*L. infantum* - amastigota) dos produtos da **série 3**.

	IC ₅₀ µg/mL			IC ₅₀ µg/mL	
	Triagem	Média Triplicata		Triagem	Média Triplicata
Série 3			Série 1		
82 ^a	15,23	-	65a	29,25	-
82b	>50	-	Série 2		
82c	22,7	-	79b	8,09	7,74
82d	2,42	2,55	79c	17,32	-
82e	24,15	-			
82f	8,45	9,00			
82g	>50	-			
Anfotericina IC ₅₀ : 0,062 µM (média triplicata)			Anfotericina IC ₅₀ : 0,068 µM (média triplicata)		

Fonte: autor

Figura 36 - Diferenças estruturais dos benzopiranos do tipo *Calea* spp. testados para atividade leishmanicida.

Fonte: autor. Uniflorol A e B adaptado de Do Nascimento et al. (2007)

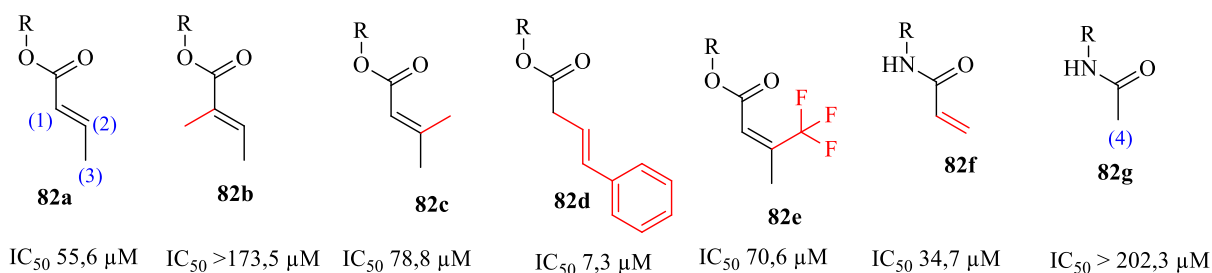
Os núcleos estruturais básicos de cada **série** estão destacados em verde (**série 1**), azul (**série 2**) e vermelho (**série 3**).

O único composto avaliado da **série 1** [65a] tem o **R⁴** semelhante ao 82a da **série 3**, com isto, foi possível concluir que a ausência do grupamento cetona na região **R³** aumenta a atividade leishmanicida. No entanto, quando comparado os compostos semelhantes no **R⁴** das

séries 2 [79b e 19c] e séries 3 [82b e 82c] foi constatado que a ausência das metilas (R^1 e R^2) e a presença do grupamento cetona aumentaram a atividade. É relevante ressaltar, que os R^4 da comparação entre série 1 e série 3 e da comparação da série 2 com a série 3 são diferentes. Entretanto, com estes resultados pode se constatar que as modificações estruturais na região R^1 R^2 e R^3 alteram a atividade biológica, podendo aumentar ou diminuir o potencial leishmanicida.

Relacionando os resultados referente a atividade leishmanicida com as sete modulações realizadas na região R^4 dos benzopiranos do tipo *Calea* spp. da série 3, pode-se constatar que a presença do radical metila na posição 1 (destacada em azul na imagem- Figura 37) ou posição 2 (destacada em azul na imagem- Figura 37) diminui a atividade leishmanicida, já que os compostos 82b e 82c tem IC_{50} superior ao composto 82a.

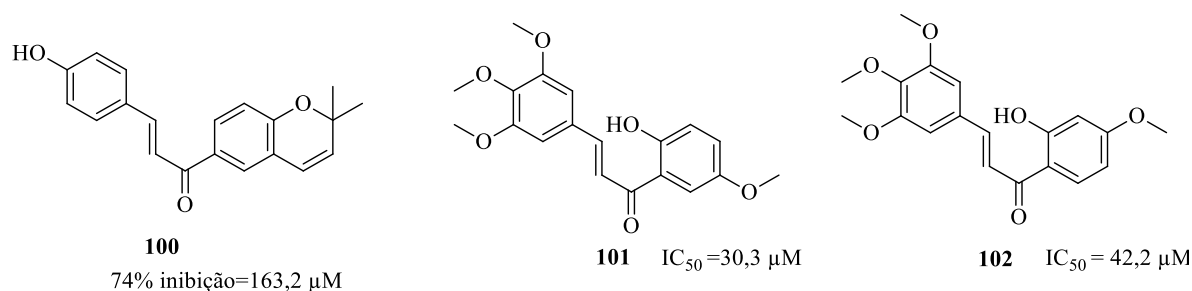
Figura 37 - Modificações estruturais da série 3 na região R^4



Fonte: autor.

O composto 82e teve IC_{50} semelhante ao 82c, constatando que a presença de flúor não apresentou diferença frente a atividade leishmanicida. A modulação na posição 3 (destacada em azul na imagem- Figura 37) que tem por características a presença do anel benzeno e a alteração na posição da dupla ligação, foi o composto [82d] com melhor efetividade no teste leishmanicida. O composto 82d se aproxima estruturalmente das chalconas. Estas estruturas estão entre os fitoquímicos que tem atividade leishmanicida (KAPIL; SINGH; SILAKARI, 2018), como por exemplo, a chalcona 100 (Figura 38) que inibiu o crescimento da espécie *L. donovani* em 84% na forma promastigota e 74% na forma amastigota, na concentração de 50 μ g/mL ou 163,2 μ M (NARENDER; GUPTA, 2004). Algumas chalconas (Figura 38) tem IC_{50} em concentrações em 30 e 40 μ M [101 e 102] em teste *in vitro*, frente a forma amastigota intracelular (DE MELLO et al., 2018).

Figura 38 - Chalconas com atividade leishmanicida.



Fonte: adaptado de De Mello et al. (2018); Narender; Gupta (2004).

Em relação as diferenças entre as amidas [**82f** e **82g**] foi possível perceber a importância da dupla ligação na região (4) para a atividade leishmanicida. O impedimento estérico da dupla ligação nos ésteres da série 3 [**82b**, **82c** e **82e**] diminuíram a atividade leishmanicida, já que os compostos **82a** e **82d** da série 3 apresentaram a melhor atividade e não demonstraram impedimento estérico com os demais compostos. O composto **82f** apresentou melhor atividade em relação ao **82g** e está entre os 3 compostos com melhor atividade testados. Entretanto, o composto **82f** apresentou na análise *in silico* alto risco como mutagênico.

Entre os compostos testados em relação atividade leishmanicida, os compostos **82d**, **82f** e **79b** foram os que demonstram os melhores resultados de IC_{50} . Entretanto, na análise *in silico* em relação a toxicidade, o composto **79f** tem médio risco como irritante e baixo risco para os demais parâmetros (mutagênico, tumorgênico e efeito reprodutivo) risco baixo; já o composto **82f** tem alto risco para mutagênico e médio risco para os demais parâmetros. O **82d** foi o que demonstrou melhor resultado no teste leishmanicida com IC_{50} de 7,3 μM , e tem baixo risco de toxicidade para os quatro parâmetros (mutagênico, tumorgênico, irritante e efeito reprodutivo) analisados pelo *software OSIRIS*. O composto **82d** juntamente com o **82c** e **82e** foram os únicos que violaram 1 regra de lipinski em relação ao $\log P$, sendo os resultados respectivamente 5,80, 5,16 e 5,58.

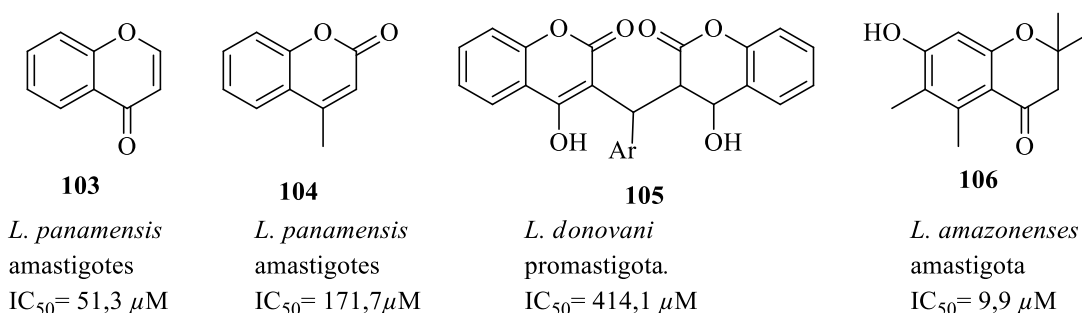
O uniflorol-B quando analisado pelo *software molinspiration* em relação a bioatividade obteve pontuação relevante para: ligante receptor acoplado à proteína G, ligante de receptor nuclear e inibidor enzimático. Dentre os 10 compostos testados para atividade leishmanicida, apenas 2 compostos têm pontuações relevantes para os mesmos ligantes (descritos a cima) do uniflorol-B, sendo eles os compostos **82c** e **82d**. O composto **82d** demonstrou o melhor IC_{50} (7,3 μM) entre os compostos analisados. Na pontuação de ligante receptor acoplado à proteína G o composto **82d** obteve a maior pontuação (0,35), superior ao do uniflorol-B (0,26).

Dos compostos testados para atividade leishmanicida, quatro compostos têm

pontuação superior ao uniflorol-B (0,44) em relação a ligante de receptor nuclear, destacando o **82d** com pontuação de 0,51; três com pontuação entre 0,30, destacando o **79b** com pontuação de 0,33; e dois compostos com pontuação negativa, destacando o **82f** (-0,08). Os compostos destacados anteriormente foram que demonstraram melhor IC₅₀. Em relação a pontuação para inibidor enzimático dos dez compostos avaliados em relação a atividade leishmanicida, todos obtiveram pontuação inferior ao uniflorol-B (0,38).

Alguns compostos benzopiranos [**103**, **104** e **105**] apresentam atividade frente à diversas espécies de leishmania como por exemplo: *L. donovani* e *L. panamensis* (BEKHIT et al., 2018). A inibição do crescimento do *L. amazonenses* foi constatada para derivados do cromanol, sendo que o composto **106**, ilustrado na Figura 39, inibiu o crescimento em 50% na concentração de 58 µM na forma promastigota e 9,9 µM na forma amastigota. Foi constatado também que estes derivados do cromanol têm esta atividade devido ao seu potencial em inibir a coenzima citocromo bc1 (complexo III) que tem como função o transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial em *L. tarentolae* (MONZOTE et al., 2011).

Figura 39 - Benzopiranos com atividade leishmania.



Fonte: adaptado de Bekhit et al. (2018); Monzote et al. (2011).

5.5 DADOS EXPERIMENTAIS DA SÍNTESE DOS BENZOPIRANOS DO TIPO *Calea* spp.

5.5.1 Materiais e equipamentos

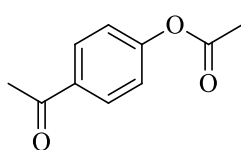
Todos os reagentes e solventes foram obtidos de forma comercial das empresas Sigma-Aldrich, Meck, Synth, Química moderna, Dinâm e Vetec. Todos os compostos sintetizados foram purificados por cromatografia em coluna ou preparativa (sílica gel 60). As análises de cromatografia em camada delgada foram realizadas em placas de alumínio Merck Silica Gel 60 F254.

As análises espectroscópicas de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio, flúor e carbono foram obtidas em espectrômetro *AvanceBruker ultrashield* operando em 400 MHz (RCSI), *Varian Mercury Plus Spectrometer* operando em 400 MHz (UFSC). As análises de espectrometria de massa (MS) foram realizadas no instrumento *Advion expression* (RCSI). As análises de espectroscopia no infravermelho foram obtidas no instrumento *Thermo scientific microlet I s10 1510* (RCSI) ou *IRAffinity-1s Shimadzu* (UNESC). Os pontos de fusão foram estimados com um aparelho de ponto de fusão *Gehaka PF 1000* (UNESC).

Os espectros foram analisados com pelo *software* ACD lab (*Advanced Chemistry Development*). O *software* Chemdraw foi utilizado para desenhar os compostos e os *softwares* OSIRIS e molinspiratin foram utilizados para avaliar os compostos *in silico* em relação as suas propriedades físico-químicas e bioatividade.

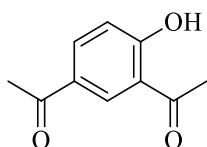
5.5.2 Dados da série 1

4-acetilfenil acetato [62]



Dissolveu-se 4-hidroxiacetofenona (10 g, 73,4 mmol) em diclorometano (50 mL). Após, foi adicionado anidrido acético (10,4 mL) e trietilamina lentamente (11,2 mL). Após da conversão total, foi adicionado água e a mistura reacional foi extraída com diclorometano (3x); a fração orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (éter de petróleo: acetato de etila, iniciou-se com 100% de éter de petróleo, aumentando a polaridade de 10 em 10% até total purificação). Solvente da CCD foi diclorometano: acetato de etila 8:2. Rendimento 98%; Sólido branco; PF: 50°C; IV (puro): 1170, 1671, 1596, 1355, 1267, 1188, 1165, 913, 853, 624, 590 cm^{-1} ; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ = 7,92-7,89 (m, 2H-Ar), 7,13-7,09 (m, 2H-Ar), 2,51 (s, 3H), 2,24 (s, 3H); RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3): δ = 196,83 (CO), 168,84 (COO), 154,36 (C-Ar), 134,71 (C-Ar), 129,92 (2CH-Ar), 121,76 (2CH-Ar), 26,56 (CH_3), 21,11 (CH_3).

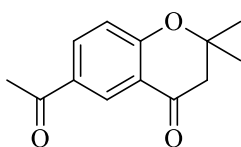
1,1'-(4-hidroxi-1,3-fenileno) dietanona [63]



4-acetilfenil acetato (4 g, 2,24 mmol) foi misturado com cloreto de alumínio (30 g, 225 mmol) e mantido a 150-160 °C durante 3 horas. Após foi adicionado o ácido clorídrico concentrado (HCl 37%) e gelo picado para

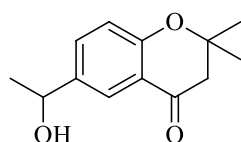
quebrar o complexo com cloreto de alumínio. Nesta mistura foi adicionada água, e extraída com diclorometano (3x). A fração orgânica foi combinada, seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (éter de petróleo: acetato de etila, iniciou-se com 100% de éter de petróleo, aumentando a polaridade de 10 em 10% até total purificação). Solvente da CCD foi diclorometano: acetato de etila 8:2. Rendimento 17%; Sólido amarelo; PF: 85 °C; IV (puro): 1671, 1635, 1355, 1215, 958, 804, 632, 587 cm^{-1} ; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ = 12,59 (s, 1H), 8,34 (d, J = 2,26 Hz, 1H-Ar), 7,98 (dd, J =8,78, 2,01 Hz, 1H-Ar), 6,93 (d, J = 8,78 Hz, 1H-Ar), 2,63 (s, 3H), 2,51 (s, 3H); RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3): δ = 204,78(CO), 195,65 (CO), 166,00 (COH-Ar), 136,28 (CH-Ar), 131,81(C-Ar), 128,62 (CH-Ar), 119,18 (C-Ar), 118,54 (CH-Ar), 26,68(CH_3), 26,24 (CH_3).

6-acetil-2,2-dimetilcroman-4-ona [64]



1,1'(4-hidroxi-1,3-fenileno) dietanona (2,5 g, 14,2 mmol), acetona (2,3 mL) e morfolina (0,7 mL) foram adicionados a um líquido iônico [bbim] Br (2 g) e agitado a 95-100 °C por 8 horas. A mistura reacional foi extraída com acetato de etila (3x) e a fração orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (éter de petróleo: acetato de etila, iniciou-se com 100% de éter de petróleo, aumentando a polaridade de 10 em 10% até total purificação). Solvente da CCD foi diclorometano: acetato de etila 8:2. Rendimento: 67%; Sólido amarelo; PF: 68 °C; IV (puro): 1668, 1609, 1566, 1424, 1357, 1266, 1219, 1168, 1136, 962, 845, 593 cm^{-1} ; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ = 8,37 (d, J = 2,26 Hz, 1H-Ar), 8,06 (dd, J = 8,78, 2,26 Hz, 1H-Ar), 6,94 (d, J = 8,78, 1H-Ar), 2,70 (s, 2H), 2,52 (s, 3H), 1,42 (s, 6H); RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3): δ = 196,36 (CO), 191,75 (CO), 163,46 (C-Ar), 135,43(CH-Ar), 130,21 (C-Ar), 128,17(CH-Ar), 119,19(C-Ar), 119,05 (CH-Ar), 80,38 (C), 48,60 (CH_2), 26,62 (2 CH_3), 26,42(CH_3).

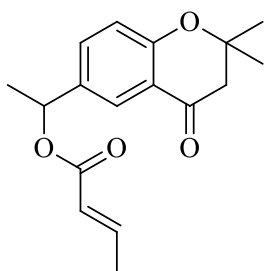
6- (1-hidroxietil) -2,2-dimetilcroman-4-ona [8]



6-acetil-2,2-dimetilcroman-4-ona (200 mg 0,9 mmol) foi dissolvida em dimetilformamida (1,5 mL). Depois adicionou-se água (500 mL) e fatias de *D. carota* - cenoura (150 g). A mistura reacional foi mantida em temperatura ambiente, sob agitação por 7 dias. O produto foi extraído com acetato de etila (6x)

e a fração orgânica foi seca sobre sulfato de sódio anidro e concentrado sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (éter de petróleo: acetato de etila, iniciou-se com 100% de éter de petróleo, aumentando a polaridade de 10 em 10% até total purificação). Solvente da CCD foi diclorometano: acetato de etila 8:2. Rendimento: 29%; líquido amarelo; IV (puro): 3393, 1724, 1679, 1616, 1488, 1371, 1251, 1202, 1127, 930, 834, 569 cm^{-1} ; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ = 7,74 (d, J = 2,26 Hz, 1H-Ar), 7,48 (dd, J =8,53, 2,26Hz, 1H-Ar), 6,85 (d, J = 8,53, 1H-Ar), 4,79 (q, J = 13,05, 6,53 Hz, 1H), 2,63 (s, 2H), 1,41 (s, 3H), 1,37 (s, 6H); RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3): δ = 192,84 (CO), 159,39 (C-Ar), 138,13 (CH-Ar), 133,81 (C-Ar), 123,27 (CH-Ar), 119,61 (C-Ar), 118,63 (CH-Ar), 79,27 (C), 69,58 (COH), 48,78 (CH_2), 26,55 (2CH_3), 24,91 (CH_3).

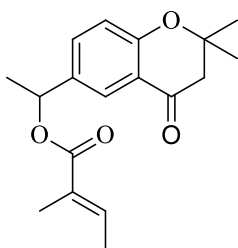
1- (2,2-dimetil-4-oxocroman-6-il) etil but-2-onoato [**65a**]



6- (1-hidroxietil) -2,2-dimetilcroman-4-ona (20 mg, 0,09 mmol), ácido but-2enoico (15 mg, 0,18 mmol), 4-dimetilaminopiridina (5 mg, 0,045 mmol) e o N, N-Diciclo-hexilcarbodiimida (37 mg, 18 mmol) foram dissolvidos em diclorometano (5 mL) e mantido em agitação em temperatura ambiente durante 20 h. A mistura reacional foi filtrada, lavada com solução de NaOH 1M e extraída com diclorometano. A

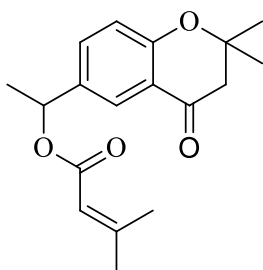
fração orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (éter de petróleo: acetato de etila, iniciou-se com 100% de éter de petróleo, aumentando a polaridade de 10 em 10% até total purificação). Solvente da CCD foi diclorometano: acetato de etila 9:1. Rendimento: 15%; Líquido; IV (puro): 1715, 1690, 1617, 1488, 1435, 1371, 1255, 1175, 1061, 967, 833, 567, 476 cm^{-1} ; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ = 7,80 (d, J = 2,26 Hz, 1H-Ar), 7,42 (dd, J = 8,78, 2,26 Hz 1H-Ar), 6,96-6,87 (m, 1H), 6,84 (d, J =8,78 Hz, 1H-Ar), 5,84-5,81(m, 1H), 5,78-5,77 (m, 1H), 2,64 (s, 2H), 1,81 (dd, J = 7,03, 1,76 Hz, 3H), 1,48 (d, J = 6,53 Hz, 3H), 1,38 (s, 6H); RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3): δ = 192,39 (C), 165,73 (COO), 159,52 (C-Ar), 144,95 (CH), 134,44 (CH-Ar), 134,38(C-Ar), 123,94 (CH-Ar), 122,85 (CH), 119,87 (C-Ar), 118,50 (CH-Ar), 79,31 (C), 71,20 (C), 48,83 (CH_2), 26,66(2CH_3), 21,99 (CH_3), 17,96 (CH_3); EM (m/z): calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_4$ = 288,1362, encontrado: $\text{CH}_{13}\text{H}_{15}\text{O}_2$ = 203,1106 [- $\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_2$ = 85,03].

2- (2,2-dimetil-4-oxocroman-6-il) etil 2-metilbut-2-enoato [**65b**]



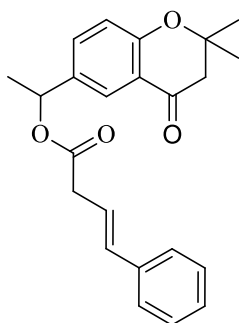
6- (1-hidroxietyl) -2,2-dimetilcroman-4-ona (30 mg, 0,13 mmol), ácido trans-2-metilbut-2-enoico (27 mg, 0,27 mmol), 4-dimetilaminopiridina (8 mg, 0,06 mmol) e N, N -Diciclo-hexilcarbodiimida (56 mg, 0,27 mmol) e diclorometano (5 mL), foram mantidos em agitação em temperatura ambiente durante 20 h. A mistura reacional foi filtrada, lavada com solução de NaOH 1M e extraída com diclorometano. A fração orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (éter de petróleo: acetato de etila, iniciou-se com 100% de éter de petróleo, aumentando a polaridade de 10 em 10% até total purificação). Solvente da CCD foi diclorometano: acetato de etila 9:1. O RMN de próton indica a formação do produto, no entanto, sinais de impureza ainda estão presentes. Rendimento: 12 % ; Líquido; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ = 7,57 (d, J = 1,83 Hz, 1H), 4,21 (dd, J = 8,62, 2,20 Hz 1H), 6,58 (d, 8,50 1H), 5,51-5,62 (m, 1H), 5,43 (s, 1H), 2,42 (s, 2H), 1,86 (s, 3H), 1,60 (s, 3H), 1,25 (d, J = 6,60 Hz, 3H), 1,18 (s, 6H).

1-(2,2-dimetil-4-oxocroman-6-il) etil 3-metilbut-2-enoato [65c]



6- (1-hidroxietyl) -2,2-dimetilcroman-4-ona (50 mg, 0,22 mmol), ácido trans-3- metilbut-2-enoico (45,4 mg, 0,45 mmol), 4-dimetilaminopiridina (13,6 mg, 0,11 mmol) e N, N -diciclo-hexilcarbodiimida (93 mg, 0,45 mmol) foram dissolvidos em diclorometano (5 mL) e mantido em agitação em temperatura ambiente durante 20 h. A mistura reacional foi filtrada, lavada com solução de NaOH 1M e extraída com diclorometano. A fração orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (éter de petróleo: acetato de etila, iniciou-se com 100% de éter de petróleo, aumentando a polaridade de 10 em 10% até total purificação). Solvente da CCD foi diclorometano: acetato de etila 9:1. O RMN de próton indica a formação do produto, no entanto, sinais de impureza ainda estão presentes. Rendimento: 11% ; Líquido; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): 7,89 (d, J = 2,32 Hz, 1H-Ar), 7,49 (dd, J = 8,56, 2,32 Hz 1H-Ar), 6,91 (m, 1H-Ar), 5,89 (m, 1H), 5,73(m, 1H), 2,73 (s, 2H), 2,17 (d, J = 1,22 Hz, 3H), 1,91 (d, J = 1,34 Hz, 3H), 1,54 (s, 3H), 1,47 (d, J = 1,83 Hz, 6H).

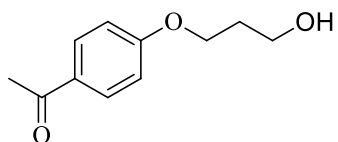
1- (2,2-dimetil-4-oxocroman-6-il) etil 3-metilbut-2-enoato [65d]



6- (1-hidroxietil) -2,2-dimetilcroman-4-ona (50 mg, 0,22 mmol), ácido 4-fenilbut-3-noico (71 mg, 0,44 mmol), 4-dimetilaminopiridina (13 mg, 0,11 mmol) e N, N -Diciclo-hexilcarbodiimida (90 mg, 44 mmol) foi dissolvido em diclorometano (5 mL) e mantidos em agitação em temperatura ambiente durante 20 h. A mistura reacional foi filtrada, lavada com solução de NaOH 1M e extraída com diclorometano. A fração orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (éter de petróleo: acetato de etila, iniciou-se com 100% de éter de petróleo, aumentando a polaridade de 10 em 10% até total purificação). Solvente da CCD foi diclorometano: acetato de etila 9:1. O RMN de próton indica a formação do produto, no entanto, sinais de impureza ainda estão presentes. Rendimento: 13% ; Líquido; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): 7,89 (m, 1H-Ar), 7,39 (m, 6 H-Ar), 6,91 (m, 1H-Ar), 6,48 (m, 1H), 6,28 (m, 1H), 5,89 (m, 1H), 5,38 (d, $J = 3,79$ Hz, 1H), 3,29 (m, 2H), 2,73 (m, 2H), 1,48 (t, 3H), 1,28 (s, 3H).

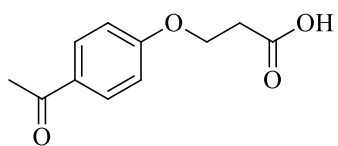
5.5.3 Dados da série 2

1- (4- (3-hidroxipropoxi) fenil) etanona [75]



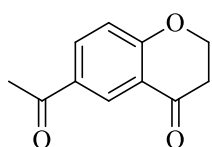
Dissolveu-se 4-hidroxiacetofenona (10 g, 73,44 mmol), 3-cloro-1-propanol (7,3 mL), K_2CO_3 (13 g, 94 mmol), KI (120 mg, 0,7 mmol) em DMF (100 mL) mantidos a 100 °C por 18 h. Após foi inserido água na mistura reacional e o produto foi extraído com éter dietílico (3x). A fração orgânica foi lavada com solução de NaOH 1M e solução saturada de NaCl, seca com sulfato de sódio anidro, concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (éter de petróleo: acetato de etila, iniciou-se com 100% de éter de petróleo, aumentando a polaridade de 10 em 10% até total purificação). Solvente da CCD foi diclorometano: acetato de etila 8:2. Rendimento 41%; Sólido branco; PF: 40 °C; IV (janela KBr): 3417, 2882, 1743, 1674, 1599, 1509, 141, 1360, 1257, 1175, 1058, 957, 834 cm^{-1} ; RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,94$ (d, $J = 8,97$ Hz, 2H-Ar), 6,92 (d, $J = 8,94$ Hz, 2H-Ar), 4,17 (t, $J = 6,04$ Hz, 2H), 3,86 (t, $J = 5,92$ Hz, 2H), 2,56 (s, 3H), 2,04 (m, 2H); RMN ^{13}C (67,5 MHz, CDCl_3): $\delta = 197,0$ (CO), 162,9 (C-Ar), 130,8 (2CH-Ar), 130,5 (C-Ar), 114,3 (2CH-Ar), 65,7 (CH_2), 60,1 (CH_2), 32,0 (CH_2), 26,5 (CH_3).

Ácido 3- (4-acetilfenoxi) propanóico [76]



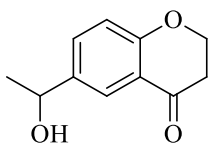
1- (4- (3-hidroxiopropoxi) fenil) etanona (3,3 g, 17 mmol), KMnO_4 (13,7, 86,8 mmol) foi dissolvido em acetona (150 mL) e mantido em agitação em temperatura ambiente durante 18 h. Após foi adicionado solução saturada com tiosulfato de sódio e depois acidificado com solução de HCl 1M, extraiu-se o produto com diclorometano (3x), lavou-se com solução saturada de NaCl e foi seco com sulfato de sódio anidro, concentrou-se sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (diclorometano: acetato de etila, iniciou-se com 100% diclorometano, aumentando a polaridade de 10 em 10% até total purificação). Solvente da CCD foi diclorometano: acetato de etila 8:2. Rendimento 99 %; Sólido branco; PF: 142 °C; IV (janela KBr): 3489, 2921, 2349, 2306, 1727, 1660, 1599, 1421, 1362, 1268, 1173, 1034, 960, 833, 671 cm^{-1} , RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3): δ = 7,92 (d, J = 8, 91 Hz, 2H-Ar), 6,93 (d, J = 8,88 Hz, 2H-Ar), 4,3 (t, J = 6,24 Hz, 2H), 2,87 (t, J = 6,21 Hz, 2H), 2,56 (s, 3H); RMN ^{13}C (CDCl_3 67,5 MHz): δ = 197,1 (CO), 175,1 (COOH), 162,44 (C-Ar), 130,8 (2CH-Ar), 114,35 (2CH), 63,36 (CH_2), 34,0 (CH_2), 26,5 (CH_3).

6-acetilcroman-4-ona [77]



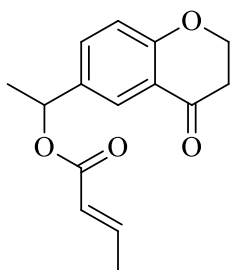
Ácido 3- (4-acetilfenoxi) propanóico (1 g, mmol) e PPA (20 g, mmol) foram mantidos em agitação a 100 °C por 5 h, após foi adicionado água e mantido em agitação por alguns minutos. A extração foi realizada com diclorometano, lavada com solução saturada de NaCl e seca com sulfato de sódio anidro, concentrado sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (diclorometano: acetato de etila, iniciou-se com 100% diclorometano, aumentando a polaridade de 10 em 10% até total purificação). Solvente da CCD foi diclorometano: acetato de etila 9:1. Rendimento 44%; Sólido amarelo; PF: 115 °C; IV (janela KBr): 2998, 2919, 1686, 1604, 1491, 1424, 1357, 1247, 1129, 1027, 837, 754 cm^{-1} ; RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3): δ = 8,48 (d, J = 2,28 Hz, 1H-Ar), 8,12 (dd, J = 8,76, 2,31 Hz, 1H-Ar), 7,04 (d, J = 8,77 Hz, 1H-Ar), 4,6 (t, J = 6,39 Hz, 2H), 2,85 (t, J = 6,58 Hz, 2H), 2,6 (s, 3H); RMN ^{13}C (67,5 MHz, CDCl_3): δ = 196,3 (CO), 190,9 (CO), 165,2 (C-Ar), 135,3 (CH-Ar), 130,9 (C-Ar), 128,7 (CH-Ar), 120,4 (C-Ar), 118,7 (CH-Ar), 67,3 (CH_2), 37,4 (CH_2), 26,42 (CH_3).

6- (1-hidroxietyl) cromoano-4-ona [78]



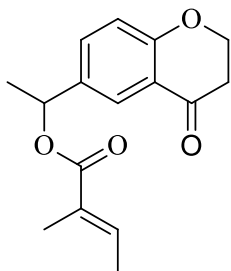
6-acetilcroman-4-ona (100 mg mmol) foi dissolvido em dimetilformamida (1,5 mL) e após foi adicionado água 500 mL e fatias de cenoura (40 g). A mistura reacional foi mantida em temperatura ambiente e mantida em agitação durante 3 dias. A extração foi realizada com acetato de etila (6x); a fração orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, concentrado sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (diclorometano: acetato de etila, iniciou-se com 100% diclorometano, aumentando a polaridade de 10 em 10% até total purificação). Solvente da CCD foi diclorometano: acetato de etila 8:2. Rendimento: 79%; Líquido amarelo; IV (janela Kbr)3517, 2232, 1708, 1681, 1607, 1498, 1357,1250,1135,1050,831, 733 cm^{-1} ; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ = 8,00 (d, J = 2,32 Hz, 1H-Ar), 7,86 (dd, J =8,68, 2,32 Hz, 1H-Ar), 6,89 (d, J =8,68 Hz, 1H-Ar), 4,88 (t, J =4,16Hz, 1H), 4,43-4,33 (m, 2H), 2,57 (s, 3H), 2,21-2,07(m, 2H); RMN ^{13}C (67,5 MHz, CDCl_3): δ = 196,79 (CO), 158,91 (C-Ar), 130,81 (C-Ar), 130,32 (C-Ar), 130,13 (CH-Ar), 124,19 (CH-Ar), 117,23 (CH-Ar), 63,05 (CH_2), 62,56 (COH), 30,45 (CH_2), 26,33 (CH_3).

1- (4-oxocroman-6-il) etil but-2-enoato [79a]



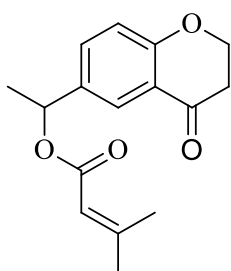
6-acetilcroman-4-ona (100 mg, 0,5 mmol), ácido but-2enoico (90 mg, 1 mmol), 4-dimetilaminopiridina (31 mg, 0,25 mmol) e N, N -Diciclohexilcarbodiimida (214 mg, 1 mmol) foram dissolvidos em diclorometano (5 mL) e mantidos em agitação em temperatura ambiente durante 20 h. A mistura reacional foi filtrada, lavada com solução de NaOH 1M e extraída com diclorometano. A fração orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (diclorometano: acetato de etila, iniciou-se com 100% diclorometano, aumentando a polaridade de 10 em 10% até total purificação). Solvente da CCD foi diclorometano: acetato de etila 9:1. O RMN de próton indica a formação do produto, no entanto, sinais de impureza ainda estão presentes. Rendimento: 7 %; Líquido; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): 7,65 (m, 2H-Ar), 6,64 (m, 1H-Ar, 1H), 5,72 (m, 2H), 4,08 (m, 2H), 2,25 (d, J =1,22, 2H), 1,62 (m, 3H), 1,26 (s, 3H)

2- (4-oxocroman-6-il) etil 2-metilbut-2-enoato [79b]



6-acetilcroman-4-ona (80 mg, 0,4 mmol), ido trans-2-metilbut-2-enco (83 mg, 0,8 mmol), 4-dimetilaminopiridina (25 mg, 0,2 mmol) e N, N-Diciclohexilcarbodiimida (Dissolveu-se 171 mg, 0,8 mmol em diclorometano (5 mL) e mantidos em agitação em temperatura ambiente durante 20 h. A mistura reacional foi filtrada, lavada com solução de NaOH 1M e extraída com diclorometano. A fração orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (diclorometano: acetato de etila, iniciou-se com 100% diclorometano, aumentando a polaridade de 10 em 10% até total purificação). Solvente da CCD foi diclorometano: acetato de etila 9:1. Rendimento: 17,5%; Líquido amarelo; IV (janela KBr): 3050, 2921, 1671,1605,1494,1435, 1250, 1134, 1134, 1057, 975, 828, 739 cm^{-1} . RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ = 7,97 (d, $J=2,20$ Hz,1H-Ar), 7,90 (dd, $J=8,68, 2,32$ Hz,1H-Ar), 6,94 (d, $J=8,68$ Hz,1H-Ar), 6,91-6,87 (m, 1H), 6,03 (t, $J= 3,79$ Hz, 1H), 4,44-4,31 (m, 2H), 2,56 (s, 3H), 2,32-2,15 (m, 2H),1,87 (t, $J= 1,25$ Hz,3H), 1,80 (dd, $J=7,09, 1,10$ Hz, 3H); RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3): δ = 196,66 (CO), 167,25 (COO), 159,36 (C-Ar), 138,22 ($\text{C}=\text{CH}$), 132,15 (C-Ar), 130,45 ($\text{C}=\text{CH}$), 130,19 (C-Ar), 128,49 (CH-Ar), 120,24 (CH-Ar), 117,34 (CH-Ar), 64,73 (CH₂), 62,78 (CH), 28,10 (CH₂),26,35 (CH₃), 14,44 (CH₃), 12,10 (CH₃); EM (m/z): calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_4= 274,12$, encontrado: $\text{CH}_{11}\text{H}_{11}\text{O}_2=175,0861$ [- $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2=99,05$].

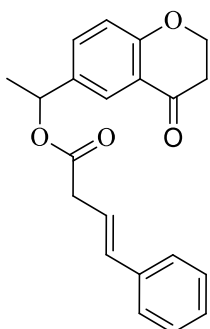
1- (4-oxocroman-6-il) etil 3-metilbut-2-enoato [79c]



6-acetilcroman-4-ona (80 mg, 0,4 mmol), ácido trans-3- metilbut-2-enco (83 mg, 0,8 mmol), 4-dimetilaminopiridina (25 mg, 0,2 mmol) e N, N-Diciclohexilcarbodiimida (171 Dissolveu-se mg, 0,8 mmol) em diclorometano (5 mL) foram mantidos em agitação em temperatura ambiente durante 20 h. A mistura reacional foi filtrada, lavada com solução de NaOH 1M e extraída com diclorometano. A fração orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (diclorometano: acetato de etila, iniciou-se com 100% diclorometano, aumentando a polaridade de 10 em 10% até total purificação). Solvente da CCD foi diclorometano: acetato de etila 9:1. Rendimento: 20,3%; Líquido amarelo; IV (janela KBr): 3055, 2925, 2223, 1713, 1677, 1607, 1501, 1358, 1253, 1140, 1076, 1018, 832, 735, 703 cm^{-1} ; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ = 7,97 (d, $J= 2,32$ Hz,1H-Ar), 7,89 (dd, $J= 8,68, 2,32$ Hz,1H-Ar), 6,92 (d, $J= 8,68$ Hz,1H-Ar), 6,00 (t, $J=3,91$ Hz,1H), 5,71-5,70 (m, 1H), 4,42-4,30 (m, 2H),

2,56 (s, 3H), 2,31-2,24 (m, 1H), 2,23 (d, $J=1,22$ Hz, 3H), 2,19-2,13 (m, 1H) 1,92 (d, $J=1,34$ Hz, 3H); RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 196,65$ (CO), 165,79 (COO), 159,38 (C-Ar), 158,20 (C), 132,05 (C-Ar), 130,38 (CH), 130,17 (C-Ar), 117,33 (CH-Ar), 115,78 (CH-Ar), 63,79 (CH_2), 62,78 (CH), 28,13 (CH_2), 27,50 (CH_3), 26,34 (CH_3), 20,41 (CH_3); EM (m/z): calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_4 = 274,12$, encontrado: $\text{CH}_{11}\text{H}_{11}\text{O}_2 = 175,0859$ [- $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2 = 99,04$].

1- (4-oxocroman-6-il) etil 4-fenilbut-3-enoato [79d]

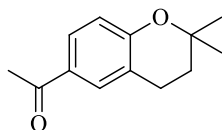


6-(1-hidroxi-2-etil) croman-4-ona (60 mg, 0,3 mmol), 4-fenilbut-3-enoico (50 mg, 0,6 mmol), 4-dimetilaminopiridina (20 mg, 0,15 mmol) e N, N-Diciclohexilcarbodiimida (130 mg, 0,6 mmol) foi dissolvido em diclorometano (5 mL) e mantidos em agitação em temperatura ambiente durante 20 h. A mistura reacional foi filtrada, lavada com solução de NaOH 1M e extraída com diclorometano. A fração orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por

cromatografia em coluna (diclorometano: acetato de etila, iniciou-se com 100% diclorometano, aumentando a polaridade de 10 em 10% até total purificação). Solvente da CCD foi diclorometano: acetato de etila 9:1. O RMN de próton indica a formação do produto, no entanto, sinais de impureza ainda estão presentes. Rendimento: 9%; Líquido; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): 7,96 (m, 1H-Ar), 7,88 (m, 1H-Ar), 7,37 (m, 5H-Ar), 7,20 (m, 1H-Ar), 6,94 (m, 1H), 6,34 (m, 1H), 6,04 (m, 1H), 4,38 (m, 2H), 2,55 (m, 4H), 1,28 (s, 3H).

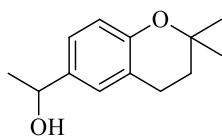
5.5.4 Dados da série 3

1- (2,2-dimetilcroman-6-il) etanona [80]



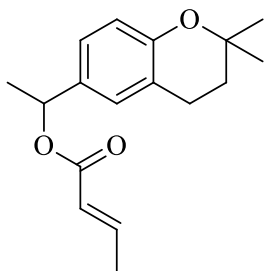
Dissolveu-se 4-hidroxiacetofenona (10 g, 73,4 mmol) em ácido fórmico (100 mL) e adicionou-se lentamente 2-metilbut-3-en-2-ol (6,3 g, 73,4 mmol), a reação foi mantida em refluxo e agitado durante 10 dias. Após foi adicionado água gelada (200 mL) e a mistura foi extraída com diclorometano (3x). A fração orgânica foi combinada e lavada com solução saturada de NaHCO₃ e a fração orgânica foi seca sobre sulfato de sódio anidro, concentrada sob pressão reduzida. A fração orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (éter de petróleo: acetato de etila, iniciou-se com 100% de éter de petróleo, aumentando a polaridade de 10 em 10% até total purificação). Solvente da CCD foi diclorometano: acetato de etila 8:2. Rendimento: 20%; Sólido amarelo; P.F.: 85 ° C; IV (puro): 1667, 1571, 1356, 1261, 1154, 1115, 945, 840, 607, 579 cm⁻¹; RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,66-7,63 (m, 2H), 6,73 (d, *J* = 8,28 Hz, 1H), 2,74 (t, *J* = 6,78 Hz, 2H), 2,46 (s, 3H) 1,76 (t, *J* = 6,43 Hz, 2H), 1,28 (s, 6H); RMN ¹³C (400 MHz, CDCl₃): δ = 197,05 (CO), 158,61 (C-Ar), 130,56 (CH-Ar), 129,36 (C-Ar), 128,34 (CH-Ar), 120,73 (C-Ar), 117,21 (CH-Ar), 75,53 (C), 32,50 (CH₂), 26,91 (2CH₃), 26,29 (CH₃), 22,35 (CH₂).

1- (2,2-dimetilcroman-6-il) etanol [81]



1- (2,2-dimetilcroman-6-il) etanona (1 g, 4,9 mmol) foi dissolvido em metanol (15 mL) e adicionado lentamente boro-hidreto de sódio (0,25 g, 6,6 mmol). A mistura foi mantida sob agitação em temperatura ambiente por 2 horas. O produto foi extraído com diclorometano (3x), a fração orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro. A fração orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (éter de petróleo: acetato de etila, iniciou-se com 100% de éter de petróleo, aumentando a polaridade de 10 em 10% até total purificação). Solvente da CCD foi diclorometano: acetato de etila 8:2. Rendimento: 99 %; Líquido amarelo; IV (puro): 3353, 1615, 1586, 1495, 1367, 1252, 1120, 1070, 820, 606, 499 cm⁻¹; RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,01-7,00 (m, 2H), 6,69 (d, *J* = 9,03 Hz, 1H-Ar), 4,72 (q, *J* = 12,80, 6,27 Hz, 1H), 2,69 (t, *J* = 6,78 Hz, 2H), 1,72 (t, *J* = 6,78 Hz, 2H), 1,39 (d, *J* = 6,27 Hz, 3H), 1,25 (s, 6H); RMN ¹³C (400 MHz, CDCl₃): δ = 153,44 (C-Ar), 136,88 (CH-Ar), 126,64 (C-Ar), 124,62 (CH-Ar), 120,79 (C-Ar), 117,19 (CH-Ar), 74,26 (C), 70,13 (COH), 32,79 (CH₂), 22,55 (CH₂), 24,90 (CH₃), 26,90 (CH₃), 26,85 (CH₃).

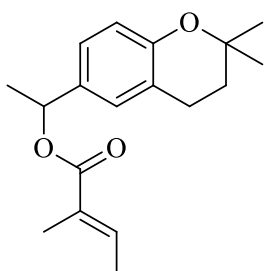
1- (2,2-dimetilcroman-6-il) etil but-2-enoato [82a]



1- (2,2-dimetilcroman-6-il) etanol (100 mg, 0,5 mmol) e ácido but-2-enoico (80 mg, 1 mmol), 4-dimetilaminopiridina (3 mg, 0,025 mmol) e N, N '-diciclohexilcarbodiimida (200 mg, 1 mmol) foram dissolvidos em diclorometano (5 mL) e mantidos em agitação em temperatura ambiente durante 20 h. A mistura reacional foi filtrada, lavada com solução de NaOH 1M e extraída com diclorometano. A fração orgânica

foi seca com sulfato de sódio anidro, concentrada sob pressão reduzida. A fração orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (éter de petróleo: acetato de etila, iniciou-se com 100% de éter de petróleo, aumentando a polaridade de 10 em 10% até total purificação). Solvente da CCD foi diclorometano: acetato de etila 9:1. Rendimento: 37%; Líquido amarelo; IV (puro): 1713,09, 1496,73, 1151,46, 1121,54, 1099,39, 1059,02, 967,13, 819,67 cm^{-1} ; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ = 7,01 (dd, J = 8,53, 2,26 Hz, 1H-Ar), 6,99 (s, 1H-Ar), 6,94-6,85 (m, 1H), 6,68 (d, J = 8,28 Hz, 1H-Ar), 5,82-5,76 (m, 2H), 2,68 (t, J =6,78 Hz, 2H), 1,79 (dd, J =6,58, 1,51 Hz, 3H), 1,71 (t, J =6,78 Hz, 2H), 1,46 (d, J =6,53 Hz, 3H), 1,24 (s, 6H); RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3): δ = 165,92 (CO), 153,71 (C-Ar), 144,51(CH), 132,72 (C), 127,65 (CH-Ar), 125,34 (CH-Ar), 123,14 (C-Ar), 120,64 (CH), 117,21 (CH-Ar), 74,30 (C), 71,86 (CH), 32,73 (CH_2), 26,93 (2CH_3), 22,51 (CH_3), 22,00 (CH_2), 17,98 (CH_3); EM (m/z): calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_4$ = 274.16, encontrado: $\text{CH}_{13}\text{H}_{17}\text{O} = 189,1249$ [- $\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_2=85,03$].

2- (2,2-dimetilcroman-6-il) etil 2-metil-2-enoato de etila [82b]

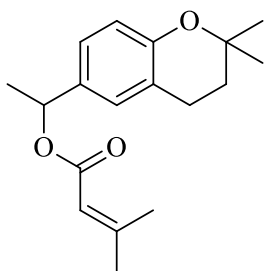


1- (2,2-dimetilcroman-6-il) etanol (200 mg, 1 mmol), ácido trans-2-metilbut-2-enóico (100 mg, 2 mmol), 4-dimetilaminopiridina (6 mg, 0,05 mmol) e N, N '-diciclohexilcarbodiimida (400 mg), 2 mmol) foi dissolvido em diclorometano (5 mL) e mantidos em agitação em temperatura ambiente durante 20 h. A mistura reacional foi filtrada, lavada com solução de NaOH 1M e extraída com diclorometano. A

fração orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, concentrada sob pressão reduzida. A fração orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (éter de petróleo: acetato de etila, iniciou-se com 100% de éter de petróleo, aumentando a polaridade de 10 em 10% até total purificação). Solvente da CCD foi diclorometano: acetato de etila 9:1. Rendimento: 7%, Líquido amarelo;

IV (puro): 1713, 1496, 1223, 1141, 1059, 946, 819, cm^{-1} ; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ ; 7,04 (dd, $J= 8,28, 2,01$ Hz, 1H-Ar), 6,98 (s, 1H-Ar), 6,81 (m, 1H), 6,68 (d, $J= 8,53$ Hz, 1H-Ar), 5,80 (q, $J= 13,05, 6,53$ Hz, 1H), 2,69 (t, $J= 2,78$ Hz, 2H), 1,71 (t, $J= 2,78$ Hz, 2H), 1,46 (d, $J= 6,78$ Hz, 3H), 1,24 (s, 6H); RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 167,41$ (CO), 153,63 (C-Ar), 136,92 (CH), 133,06 (C-Ar), 129,02 (C), 127,53 (CH-Ar), 125,53 (CH-Ar), 120,59 (C-Ar), 117,20 (CH-Ar), 74,25 (C), 72,04 (CH), 32,92 (CH_2), 26,92 (2CH_3), 22,52 (CH_2), 22,21 (CH_3), 14,33 (CH_3), 12,02 (CH_3); EM (m/z): calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_3= 288.1725$, encontrado: $\text{CH}_{13}\text{H}_{17}\text{O} = 189,1316$ [- $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2=99,04$].

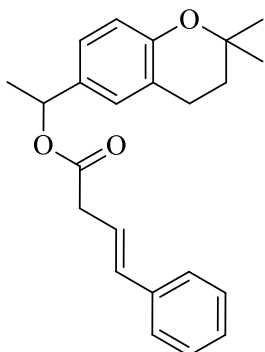
1- (2,2-dimetilcroman-6-il) etil 3-etilbut-2-enoato [**82c**]



1- (2,2-dimetilcroman-6-il) etanol (200 mg, 1 mmol), ácido trans-3-etilbut-2-enóico (100 mg, 2 mmol), 4-dimetilaminopiridina (6 mg, 0,05 mmol) e N, N '-diciclohexilcarbodiimida (400 mg, 2 mmol) foi dissolvido em diclorometano (5 mL) e mantidos em agitação em temperatura ambiente durante 20 h. A mistura reacional foi filtrada, lavada com solução de NaOH 1M e extraída com diclorometano. A

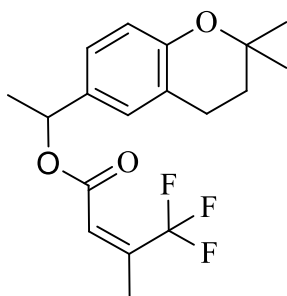
fração orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, concentrada sob pressão reduzida. A fração orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (éter de petróleo: acetato de etila, iniciou-se com 100% de éter de petróleo, aumentando a polaridade de 10 em 10% até total purificação). Solvente da CCD foi diclorometano: acetato de etila 9:1. Rendimento: 7%; Líquido amarelo; IV (puro): :1704,68, 1526,80, 1303,86, 1121,02, 1058,78, 819,47, 732,86 cm^{-1} ; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,01$ (dd, $J= 8,53$ Hz, 2,01 1H-Ar), 6,99 (s, 1H-Ar), 6,67 (d, $J= 8,28$ Hz, 1H-Ar), 5,78 (q, $J=13,05, 6,53$ Hz, 1H), 5,62 (d, $J= 1,00$ Hz, 1H), 2,68 (t, $J=6,53$ Hz, 2H), 2,08 (s, 3H), 1,79 (s, 3H), 1,71 (t, $J= 6,53$ Hz, 2H), 1,45 (d, $J= 6,53\text{Hz}$, 3H), 1,24 (s, 6H); RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 164,94$ (CO), 155,38 (C), 152,60 (C-Ar), 132,02 (C-Ar), 126,54, (CH-Ar), 124,29 (CH-Ar), 119,57 (C-Ar), 1116,16 (CH-Ar), 115,46 (CH), 73,20 (C), 70,08 (CH), 31,74 (CH_2) 26,34 (2CH_3), 25,89 (CH_3), 21,48 (CH_2), 21,10 (CH_3), 19,16 (CH_3); EM (m/z): calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_3= 288.1725$, encontrado: $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O} = 189,1309$ [- $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2 = 99,11$].

1- (2,2-dimetilcroman-6-il) etil 4-fenilbut-3-enoato [82d]



1- (2,2-dimetilcroman-6-il) etanol (200 mg, 1 mmol), ácido 4-fenilbut-3-noico (32 mg, 2 mmol), 4-dimetilaminopiridina (6 mg, 0,5 mmol) e N, N -Diciclo-hexilcarbodiimida (400 mg, 2 mmol) foi dissolvido em diclorometano (5 mL) e mantidos em agitação em temperatura ambiente durante 20 h. A mistura reacional foi filtrada, lavada com solução de NaOH 1M e extraída com diclorometano. A fração orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, concentrada sob pressão reduzida. A fração orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (éter de petróleo: acetato de etila, iniciou-se com 100% de éter de petróleo, aumentando a polaridade de 10 em 10% até total purificação). Solvente da CCD foi diclorometano: acetato de etila 9:1. Rendimento: 17%; Líquido amarelo; IV(puro): 1728,46, 1496,44, 1293,68, 1208,50, 1121,02, 1056,62, 818,90, 690,91 cm^{-1} ; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,29-7,27$ (m, 2H-Ar), 7,22 (t, $J=7,03$ Hz, 2H-Ar), 7,17-7,13 (m, 1H-Ar), 7,03 (dd, $J= 8,53, 2,26$ Hz, 1H-Ar), 6,99 (s, 1H-Ar), 6,68 (d, $J=8,28$ Hz, 1H-Ar), 6,41 (d, $J=16,06$ Hz, 1H), 6,26-6,18 (m, 1H), 5,79 (q, $J=13,05, 6,53$ Hz, 1H), 3,17 (d, $J= 6,27$ Hz, 2H), 2,68-2,65 (m, 2H), 1,70 (t, $J=6,78$ Hz, 2H), 1,46 (d, $J=6,53$ Hz, 3H), 1,24 (s, 6H); RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 169,89$ (CO), 152,76 (C-Ar), 135,87 (C-Ar), 132,25 (C-Ar), 131,32 (CH-Ar), 127,41 (2CH-Ar), 126,67(CH), 126,43 (CH-Ar), 125,22 (2CH-Ar), 124,34 (CH), 120,88 (CH-Ar), 119,64 (C-Ar), 116,64 (CH-Ar), 73,29 (C), 71,56 (CH), 37,65 (CH_2), 31,65 (CH_2), 25,86 (2 CH_3), 21,43 (CH_2) 20,88 (CH_3); EM (m/z): calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{O}_3 = 350,19$, encontrado: $\text{CH}_{13}\text{H}_{17}\text{O}$ 189,1346 [- $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_2 = 161,06$].

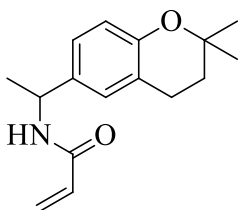
1- (2,2-dimetilcroman-6-il) etil 4,4,4-trifluoro-3-metilbut-2-enoato [82e]



1- (2,2-dimetilcroman-6-il) etanol (100 mg, 0,5 mmol), ácido 4,4,4-trifluoro-3- metilbut-2-enoico (150 mg, 1 mmol), 4-dimetilaminopiridina (3 mg, 0,025 mmol) e N, N -Diciclo-hexilcarbodiimida (200 mg, 1 mmol) foi dissolvida em diclorometano (5 mL) e mantidos em agitação em temperatura ambiente durante 20 h. A mistura reacional foi filtrada, lavada com solução de NaOH 1M e extraída com

diclorometano. A fração orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (éter de petróleo: acetato de etila, iniciou-se com 100% de éter de petróleo, aumentando a polaridade de 10 em 10% até total purificação). Solvente da CCD foi diclorometano: acetato de etila 9:1. Rendimento: 24%; óleo; IV (puro): 1722,28, 1497,99, 1292,75, 1196,75, 1122,32, 1095,96, 1058,70, 946,50, 892,42 cm^{-1} ; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 7,01(dd, J = 8,53, 2,26 Hz, 1H-Ar), 7,00 (s, 1H-Ar), 6,69 (d, J =8,28 Hz, 1H-Ar), 6,25 (t, J =1,25 Hz, 1H), 5,83 (q, J =13,05, 6,53 Hz, 1H) 2,69 (t, J = 6,78 Hz, 2H), 2,15 (d, J = 1,51 Hz 3H,), 1,72 (t, J =6,53 Hz, 1H), 1,50 (d, J = 6,53 Hz, 3H), 1,25 (s, 6H); RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3): δ = 163,17 (CO), 153,02 (C-Ar), 140,64 (C), 130,85 (C-Ar), 126,73 (CF_3), 124,44 (CH-Ar), 123,52 (CH-Ar), 120,91 (C-Ar), 119,80 (CH-Ar), 116,33(CH), 73,36 (C), 72,05(CH), 31,68 (CH_2), 25,89 (2 CH_3), 21,47(CH_2CHC), 20,80 (CH_3), 11,28 (CH_3); ^{19}F RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = -71,25 (3F); EM (m/z): calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{O}_3$ = 342,1443, encontrado $\text{CH}_{13}\text{H}_{17}\text{O}$ =189,1372 [- $\text{C}_5\text{H}_4\text{F}_3\text{O}_2$ =153,02].

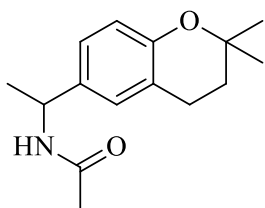
1- (2,2-dimetilcroman-6-il) etil acrilamida [82f]



1- (2,2-dimetilcroman-6-il) etanol (120 mg, 0,58 mg), acrilamida (40 mg, 0,58) e FeCl_3 (47 mg, 0,29 mmol) foram dissolvidos em nitrometano (5 mL) e mantidos em agitação *overnigh* em temperatura ambiente, após a mistura reacional foi concentrada sob pressão reduzida.

O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (éter de petróleo: acetato de etila, iniciou-se com 100% de éter de petróleo, aumentando a polaridade de 10 em 10% até total purificação). Solvente da CCD foi diclorometano: acetato de etila 9:1. Rendimento: 53%; Líquido; IV(puro): 3268,58, 1652,78, 1624,32, 1494,13, 1233,46, 1207,56, 1120,96, 946,10, 728,43 cm^{-1} ; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ = 6,98-6,94 (m, 2H-Ar), 6,66 (d, J = 8,28 Hz, 1H-Ar), 6,21-6,17 (m, 1H), 6,04-5,95 (m, 2H), 5,53 (dd, J =10,04, 1,51 Hz, 1H), 5,07-5,00 (m, 1H), 2,66 (t, J = 6,78, 2H), 1,70 (t, J = 6,53, 2H), 1,42 (d, J =6,78 Hz, 3H), 1,24 (s, 6H,); RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3): δ = 164,64 (CO), 153,28 (C-Ar), 134,06 (C-Ar), 131,10 (CH), 127,65 (CH-Ar), 126,30 (CH_2), 125,11 (CH-Ar), 120,83 (C-Ar), 117,31 (CH-Ar), 74,24 (C), 48,31 (CH), 32,74 (CH_2), 26,88 (2 CH_3) 22,50 (CH_2), 21,56 (CH_3); EM (m/z): calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_2$ = 259,34 e calculada para $\text{CH}_{13}\text{H}_{17}\text{O}$ = 189,13, encontrado: $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_2+\text{H}$ = 260,1646.

1- (2,2-dimetilcroman-6-il) etil acetamida [82g]



1- (2,2-dimetilcroman-6-il) etanol (50 mg, 0,25 mmol), acetamida (16 mg, 0,25 mmol) e FeCl₃ (20 mg, 0,12 mg) foram dissolvidos em nitrometano (3 mL) e mantidos em agitação *overnigh* em temperatura ambiente, após a mistura reacional foi concentrada sob pressão reduzida.

O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (éter de petróleo: acetato de etila, iniciou-se com 100% de éter de petróleo, aumentando a polaridade de 10 em 10% até total purificação). Solvente da CCD foi diclorometano: acetato de etila 9:1. Rendimento: 34%; Óleo; IV (puro): 3281,85, 1738,23, 1644,06, 1494,00, 1455,75, 1367,22, 1256,73, 1120,75, 946,39, 818,01 cm⁻¹, RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 6,97-6,94 (m, 2H-Ar), 6,68 (d, *J*= 8,3 Hz, 1H-Ar), 5,00-4,93 (m, 1H), 2,68 (t, *J*= 6,78 Hz, 2H), 1,89 (s, 3H) 1,71 (t, *J*= 6,78 Hz, 2H), 1,39 (d, *J*=6,78, 3H), 1,25 (s, 6H); RMN ¹³C (400 MHz, CDCl₃): δ = 167,95 (CO), 152,32 (C-Ar), 133,05 (C-Ar), 126,59 (CH-Ar), 124,01 (CH-Ar), 119,98 (C-Ar), 16,35 (CH-Ar), 73,25 (C), 47,28 (CH), 31,72 (CH₂), 28,68 (2CH₃), 25,85 (CH₃), 22,51 (CH₂), 21,51 (CH₃); EM (m/z): calculado para C₁₅H₂₁NO₂= 247,16 e calculada para CH₁₃H₁₇O = 189,13, encontrado: C₁₅H₂₁NO₂ + H = 248,1643.

5.6 CONCLUSÃO PARCIAL

As três rotas sintéticas propostas foram eficientes, 15 compostos inéditos foram sintetizados. Dez compostos foram avaliados em relação atividade leishmanicida, e destes três apresentaram resultados relevantes, sendo eles: 82d (IC₅₀=2,55 µg/mL) e 82f (IC₅₀ = 9 µg/mL) da série 3 e 79b (IC₅₀ =7,74 µg/mL) da série 2. Com isto, as modulações estruturais sugeridas alteram a atividade leishmanicida, proporcionando 3 protótipos com atividade leishmanicida, sendo o mais relavante o 82d.

6 CONCLUSÃO GERAL

Os resultados em relação aos testes com ECU demonstram que a planta apresentou atividade anti-inflamatória em modelo de edema orelha, por via tópica (2, 4 e 8 mg/orelha) e por via oral (250 e 500 mg/kg), indo ao encontro dos relatos populares. O conjunto de resultados do teste de edema de orelha com diferentes irritantes, indicam que o extrato reduz a inflamação agindo na via metabólica do ácido araquidônico (via lipoxigenase ou ciclooxygenase), como também pela atividade antioxidante. Contudo, o teste de toxicidade demonstrou que o ECU é seguro quando utilizado por via tópica aguda (dose única), mas quando utilizado de forma oral, em doses repetidas causou dano pulmonar e levou alguns animais à morte na (s) dose (s) 250, 500 e 1000 mg/kg/v.o. Estes resultados demonstram que o extrato tem um potencial anti-inflamatório tópico e oral, mas que seu uso oral deve ser realizado com cautela. Todos estes resultados ratificam as informações populares de forma a valorizar este conhecimento.

Além disso, o composto Uniflorol-B isolado e identificado na *Calea uniflora*, foi a inspiração para síntese de benzopiranos do tipo *Calea* spp. Três rotas sintéticas foram propostas e eficientes, formando compostos com núcleo básico de cromano (série 3) e 4-cromanona (série 1 e 2), no total foram sintetizados quinze compostos inéditos. As modulações estruturais proporcionaram alguns compostos com efeito relevante como leishmanicida para espécie *L. infantum*, como também apresentaram regiões e radicais que podem potencializar ou minimizar atividade biológica. Dos dez compostos avaliados em relação a atividade leishmanicida, três apresentaram resultados relevantes com $IC_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$, sendo eles: **82d** ($IC_{50} = 2,42 \mu\text{g/mL}$) e **82f** ($IC_{50} = 8,46 \mu\text{g/mL}$) da série 3 e **79b** ($IC_{50} = 7,74 \mu\text{g/mL}$) da série 2. Assim, as modulações e compostos obtidos podem ser protótipos para a síntese de novos benzopiranos mais eficazes.

O interesse por estudar *C. uniflora* surgiu do interesse da Dr. Vanilde Citadini-Zanette. A Professora Vanilde é botânica e relatou o uso desta espécie há gerações em sua família e é visualmente muito semelhante a *Arnica montana*. Esta espécie foi uma das plantas estudadas no ano de 2011 no projeto Fitoterapia Racional: aspectos taxonômicos, agroecológicos, etnobotânicos e terapêutico, realizado em parceria da UNESCO com as agentes da Pastoral da Saúde Sul IV, após o questionamento da botânica Profa. Dra. Vanilde Citadini Zanette sobre o uso medicinal desta espécie pelas agentes. Esta planta é visualmente muito semelhante com a *A. montana*, podendo facilmente ser confundida por imigrantes europeus naquele período, já que os relatos de uso se espalharam por descendentes destes imigrantes. Após o encontro específico para estudar a *C. uniflora*, popularmente chamada de Arnica pelas senhoras da Pastoral, foi constatado que esta planta é muito utilizada por elas. Entretanto, poucas informações

sobre esta espécie foram encontradas em literatura científica. Desde então, o LaPlaM (Laboratório de Plantas Mediciniais) vem realizando pesquisas com a *C. uniflora*, sendo que, tanto as informações relatadas pelas Agentes da Pastoral da Saúde Sul IV, como as informações registradas no estudo etnobotânico realizado no Balneário Rincão pelo LaPlaM (RAMOS et al, 2016), foram a base para as pesquisas experimentais realizadas com esta espécie.

Os experimentos realizados nesta tese fazem parte de diversos estudos realizados pela equipe do LaPlaM. Alguns experimentos desta tese foram realizados com o extrato da planta, utilizando as informações populares das Agentes da Pastoral da Saúde e da comunidade do Balneário Rincão, também objetivou-se compartilhar os resultados dos experimentos com as Agentes da Pastoral da Saúde e a comunidade do Balneário Rincão, que foram essenciais para elaboração de todo este estudo.

Os resultados dos experimentos desta tese, como também os resultados das dissertações de Vanessa Rodrigues Nicolau Torres e Paula da Silva Cardoso, foram compartilhados com as Agentes da Pastoral da Saúde Sul IV e a comunidade do Balneário Rincão. As informações foram repassadas através de uma apresentação oral com o auxílio de mídia digital (Powerpoint). As informações foram compartilhadas com uma linguagem popular abordando os principais resultados dos estudos do LaPlaM, bem como todos os benefícios proporcionados com os projetos com a *C. uniflora* (bolsas de iniciação científica, mestrado, doutorado e pós-doutorado).

O encontro com as Agentes da Pastoral da Saúde Sul IV foi realizado no encontro mensal das agentes da Pastoral da Saúde com os professores da UNESC, no dia 06/11/2018, registrado na figura 40. Neste encontro, os professores do projeto também compartilharam informações botânicas e agroecológicas sobre a *C. uniflora*. O projeto conta com aproximadamente a participação de 15 agentes da Pastoral da Saúde, que após o encontro repassam as informações adquiridas na sua comunidade. Neste encontro, as agentes da Pastoral também relataram suas experiências terapêuticas com a *C. uniflora*, como também ficaram felizes e agradecidas por fazer parte da história deste projeto.

O encontro com a comunidade do Balneário Rincão ocorreu no dia 14/11/2018, em um dos eventos do novembro azul realizado pela Secretária de Saúde do município, registrado na figura 41. A escolha deste município para compartilhar as informações, foi devido ao estudo etnobotânico realizado neste local pelo LaPlaM para o levantamento de informações sobre o uso medicinal de *C. uniflora*. Os participantes do encontro também relataram suas experiências terapêuticas com a planta, bem como ficaram contentes pelos estudos realizado com uma espécie tão presente no município. Além da apresentação oral, foi disponibilizado um pôster

com os resultados do estudo etnobotânico, para ficar em exposição na Unidade Básica de de saúde.

Figura 40 - Encontro com as Agentes da Pastoral de Saúde Sul IV.



Foto: Autor (2018).

Figura 41 - Encontro com a comunidade do Balneário Rincão, Santa Catarina.



Foto: Autor (2018)

Compartilhar as informações com as pessoas que tem o conhecimento popular sobre o uso da *C. uniflora*, visou valorizar o uso medicinal, bem como, sensibilizar a população para a conservação desta espécie.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, P. de A. et al. The genus *Calea* L.: A review of isolated compounds and biological activities. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 11, n. 33, p. 518–537, 2017.
- ACHARYA, C.; MANDAL, M.; DUTTA, T.; GHOSH, A. K.; JAISANKAR, P. Enzyme from *Daucus carota* root catalyzed asymmetric cross aldol reaction. **Tetrahedron Letters**, v. 57, n. 39, p. 4382–4385, 2016.
- AKRAM, M. M.; NAIMA, B.; EDDINE, M. S.; SOUMIA, B. Anti-Inflammatory , Anti-pyretic and Acute Toxicity Effects of n-Butanol Extract of *Atractylis flava* Desf in Rats. **Pharmacognosy Journal**, v. 10, n. 4, p. 763–767, 2018.
- AL-RASHIDA, M.; RAZA, R.; ABBAS, G.; SHAH, M. S.; KOSTAKIS, G. E.; LECKA, J.; SEVIGNY, J.; MUDDASSAR, M.; PAPATRIANTAFYLLOPOULOU, C.; IQBAL, J. Identification of novel chromone based sulfonamides as highly potent and selective inhibitors of alkaline phosphatases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 66, p. 438–449, 2013.
- ALIZADEH, B. H.; FOROUMADI, A.; ARDESTANI, S. K.; POORRAJAB, F.; SHAFIEE, A. Leishmanicidal evaluation of novel synthetic chromenes. **Archiv der Pharmazie Chemistry in Life Sciences**, v. 341, n. 12, p. 787–793, 2008.
- ANAND, P.; SINGH, B. Synthesis and Evaluation of Substituted 4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl Phenyl Carbamates as Potent Acetylcholinesterase Inhibitors and Anti-Amnestic Agents. **Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 5, p. 694–702, 2013.
- ANVERSA, L.; TIBURCIO, M. G. S.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; RAMIREZ3, L. E. Human leishmaniasis in Brazil : A general review. **Revista Associação Medica Brasileira**, v. 64, n. 3, p. 281–289, 2018.
- BANERJI, A.; KALENA, G. P. A New Method of Cyclodehydration of 3,3-Dialkyl-1-Oxo-1-(2- hydroxyaryl)propan-3-ols to 2,2-Dialkyl-4-chromanones: Synthesis of Cannabinoid Synthons. **Synthetic Communications**, v. 19, n. 1–2, p. 159–166, 1989.
- BEKHIT, A. A.; EL-AGROUDY, E.; HELMY, A.; IBRAHIM, T. M.; SHAVANDI, A.; BEKHIT, A. E. D. A. Leishmania treatment and prevention: Natural and synthesized drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 160, p. 229–244, 2018.
- BERETTA, M. E.; FERNANDES, A. C.; SCHNEIDER, A. A.; RITTER, M. R. A família Asteraceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 6, n. 3, p. 189–216, 2008.
- BERN, C.; DESJEUX, P.; CANO, J.; ALVAR, J. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PlosOne**, v. 7, n. 5, 2012.
- BHADRA, S.; DALAI, M. K.; CHANDA, J.; MUKHERJEE, P. K. **Evaluation of Bioactive Compounds as Acetylcholinesterase Inhibitors from Medicinal Plants**. [s.l.] : Elsevier Inc., 2015.
- BOHLMANN, F.; GUPTA, R. K.; JAKUPOVIC, J.; KING, R. M.; ROBINSON, H.

Eudesmanolides and heliangolides from *Calea rotundifolia*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 7, p. 1635–1637, 1981a.

BOHLMANN, F.; MATHUR, R.; JAKUPOVIC, J.; GUPTA, R. K.; KING, R. M.; ROBINSON, H. Furanoheliangolides and other compounds from *Calea hymenolepis*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 8, p. 2045–2048, 1982.

BOHLMANN, F.; ZDEROT, C.; KINGS, R. M.; ROBINSON, H.; JUNI, S.; BERLIN, D.; GERMANY, W. Heliangolides and nerolidol and p-hydroxyacetophenone derivatives from *Calea* species. **Phytochemistry**, v. 20, n. 7, p. 1643–1647, 1981b.

BORGES DEL CASTILLO, J.; MANRESA FERRERO, M. T.; RODRIGUEZ LUIS, F.; VAZQUEZ BUENO, P.; GENOVES LEONOR, N.; CASTILLO AREVALO, S. Salvadorian compositae. II. Juanislamin and 2,3-epoxy-juanislamin, two new sesquiterpenic lactones from *Caleb urticifolia*. **Section Title: Plant Biochemistry**, v. 44, n. 3, p. 348–350, 1981.

BOUCLIER, M.; CAVEY, D.; KAIL, N.; HENSBY, C. Experimental Models in Skin Pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 42, n. 2, p. 127–154, 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. - RDC N° 26, DE 13 DE MAIO DE 2014.

BUTTERWECK, V.; NAHRSTEDT, A. What Is the Best Strategy for Preclinical Testing of Botanicals. **Planta Medica**, v. 78, p. 747–754, 2012.

CAI, C.; CHEN, Y.; ZHONG, S.; JI, B.; WANG, J.; BAI, X.; SHI, G. Anti-inflammatory activity of N-butanol extract from *Ipomoea stolonifera* in vivo and in vitro. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

Calea in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB103751>>. Acesso em: 28 Fev. 2019.

Calea in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB103757>>. Acesso em: 28 Fev. 2019

CAPELARI-OLIVEIRA, P.; PAULA, C. A.; REZENDE, S. A.; CAMPOS, F. T.; GRABE-GUIMARÃES, A.; LOMBARDI, J. A.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. Anti-inflammatory activity of *Lychnophora passerina*, Asteraceae (Brazilian “Arnica”). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 2, p. 393–398, 2011.

CARDOSO, P. da S. **Calea uniflora Less (Asteraceae): Estudo etnobotânico, doseamento de compostos fenólicos e ensaio toxicológico agudo**. 2014. Universidade do Extremo Sul Catarinense, 2014.

CASTELLS, E.; MULDER, P. P. J.; PÉREZ-TRUJILLO, M. Diversity of pyrrolizidine alkaloids in native and invasive *Senecio pterophorus* (Asteraceae): Implications for toxicity. **Phytochemistry**, v. 108, p. 137–146, 2014.

CASTRO, V.; TAMAYO-CASTILLO, G.; JAKUPOVIC, J. Sesquiterpene lactones and other

- constituents from *Calea prunifolia* and *C. Peckii*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 9, p. 2415–2418, 1989. a. Disponível em: <doi: 10.1016/S0031-9422(00)97995-0>. Acesso em: 6 jul. 2017.
- CASTRO, V.; TAMAYO-CASTILLO, G.; JAKUPOVIC, J. Sesquiterpene lactones and other constituents from *Calea prunifolia* and *C. Peckii*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 9, p. 2415–2418, 1989.
- CATERINA, M. J.; SCHUMACHER, M. A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T. A.; LEVINE, J. D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, n. 6653, p. 816–824, 1997.
- CHAMSAZ, E. A.; SUN, S.; MADDIPATLA, M. V. S. N.; JOY, A. Photoresponsive polyesters by incorporation of alkoxyphenacyl or coumarin chromophores along the backbone. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 13, n. 2, p. 412–421, 2014.
- CHATURVEDI, D. Sesquiterpene lactones: Structural diversity and their biological activities. **Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry**, p. 313–334, 2011.
- COUTANT, E.; YOUNG, P. C.; BARKER, G.; LEE, A. L. Gold(I)-catalysed one-pot synthesis of chromans using allylic alcohols and phenols. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 1797–1806, 2013.
- CRUMMEY, A.; HARPER, G. P.; BOYLE, E. A.; MANGAN, F. R. Inhibition of arachidonic acid-induced ear oedema as a model for assessing topical anti-inflammatory compounds. **Agents and Actions**, v. 20, n. 1–2, p. 69–76, 1987.
- CRUVINEL, W. D. M.; JÚNIOR, D. M.; ANTÔNIO, J.; ARAÚJO, P.; TIEKO, T.; CATELAN, T. Fundamentals of innate immunity with. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 55, n. 11, 2010.
- CUI, D. M.; KAWAMURA, M.; SHIMADA, S.; HAYASHI, T.; TANAKA, M. Synthesis of 1-tetralones by intramolecular Friedel-Crafts reaction of 4-arylbutyric acids using Lewis acid catalysts. **Tetrahedron Letters**, v. 44, n. 21, p. 4007–4010, 2003.
- DA ROSA, J. S.; DE MELLO, S. V. G. V.; VICENTE, G.; MOON, Y. J. K.; DALTO?, F. P.; LIMA, T. C.; DE JESUS SOUZA, R.; BIAVATTI, M. W.; FR?DE, T. S. *Calea uniflora* Less. attenuates the inflammatory response to carrageenan-induced pleurisy in mice. **International Immunopharmacology**, v. 42, p. 139–149, 2017.
- DA SILVA, B. A. F.; DA COSTA, R. H. S.; FERNANDES, C. N.; LEITE, L. H. I.; RIBEIRO-FILHO, J.; GARCIA, T. R.; COUTINHO, H. D. M.; WANDERLEY, A. G.; DE MENEZES, I. R. A. HPLC profile and antiedematogenic activity of *Ximenia americana* L. (Olacaceae) in mice models of skin inflammation. **Food and Chemical Toxicology**, n. April, p. 0–1, 2018.
- DAVIES, P.; BAILEY, P. J.; GOLDENBERG, M. M.; FORD-HUTCHINSON, A. W. Products in. **Annual reviews of immunology**, v. 2, p. 337–357, 1984.
- DE MELLO, M. V. P.; ABRAHIM-VIEIRA, B. de A.; DOMINGOS, T. F. S.; DE JESUS, J. B.; DE SOUSA, A. C. C.; RODRIGUES, C. R.; SOUZA, A. M. T. De. A comprehensive review of chalcone derivatives as antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 150, p. 920–929, 2018.

- DETKE, M. J.; RICKELS, M.; LUCKI, I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. **Psychopharmacology**, v. 121, n. 1, p. 66–72, 1995.
- DI PATRE, P. L.; ABBAMONDI, A.; BARTOLINI, L.; PEPEU, G. GM1 ganglioside counteracts cholinergic and behavioral deficits induced in the rat by intracerebral injection of vincristine. **European Journal of Pharmacology**, v. 162, n. 1, p. 43–50, 1989.
- DO NASCIMENTO, A. M.; COSTA, F. C.; THIEMANN, O. H.; DE OLIVEIRA, D. C. R. Chromanones with leishmanicidal activity from *Calea uniflora*. **Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 62, n. 5–6, p. 353–356, 2007.
- DO NASCIMENTO, A. M.; DE OLIVEIRA, D. C. R. A 5-deoxyflavone glycoside from *Calea uniflora* L. (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 11, p. 1079–1081, 2004.
- DO NASCIMENTO, A. M.; DE OLIVEIRA, D. C. R. Three new chromanones from *calea clauseniana*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 97, n. 1, p. 146–150, 2014.
- DO NASCIMENTO, A. M.; SALVADOR, M. J.; CANDIDO, R. C.; DE ALBUQUERQUE, S.; DE OLIVEIRA, D. C. R. Trypanocidal and antifungal activities of p-hydroxyacetophenone derivatives from *Calea uniflora* (Heliantheae, Asteraceae). **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 56, n. 5, p. 663–669, 2004.
- DREGER, M.; DREGER, M.; STANISŁAWSKA, M.; KRAJEWSKA-PATAN, A.; MIELCAREK, S.; MIKOŁAJCZAK, P.; BUCHWALD, W. Pyrrolizidine alkaloids-chemistry, biosynthesis, pathway, toxicity, safety and perspectives of medicinal usage. **Herba polinica**, v. 55, n. 4, 2009.
- DVORAK, M.; WATKINSON, A.; MCGLONE, F.; RUKWIED, R. Histamine induced responses are attenuated by a cannabinoid receptor agonist in human skin. **Inflammation Research**, v. 52, n. 6, p. 238–245, 2003.
- ELLIS, G. P. Chromenes, chromanones, and chromones-Introduction. In: ELLIS, G. P. (Ed.). **Chromenes, chromanones, and chromones**, John Wiley & Sons, 2009, p. 1-10.
- EMAMI, S.; GHANBARIMASIR, Z. Recent advances of chroman-4-one derivatives: Synthetic approaches and bioactivities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 93, p. 539–563, 2015.
- EMERENCIANO, V. P.; KAPLAN, M. A. C.; GOTTLIEB, O. R.; BONFANTI, M. R. M.; FERREIRA, Z. S.; COMEGNO, L. M. A. Evolution of Sesquiterpene Lactones in Asteraceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 14, n. 6, p. 585–589, 1986.
- FABRI, R.; NOGUEIRA, M.; SCIO, E. Antioxidant and antimicrobial potential of Asteraceae species. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 2, p. 189–2011, 2011.
- FACCHIN, B. M. de C. **Estudo do efeito anti-inflamatório da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos**. 2016. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.
- FERNANDES, T. A.; BERNARDO, J. R.; FERNANDES, A. C. Direct Reductive

Deoxygenation of Aryl Ketones Catalyzed by Oxo-Rhenium Complexes. **ChemCatChem**, v. 7, n. 7, p. 1177–1183, 2015.

FERRAZ, A. D. B. F.; PINHEIRO, S. P.; DE OLIVEIRA, P. A.; LINO, F. L.; PICADA, J. N.; PEREIRA, P. Pharmacological and genotoxic evaluation of *Calea clematidea* and *Calea uniflora*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 6, p. 858–862, 2009.

FILLION, E.; FISHLOCK, D.; WILSILY, A.; GOLL, J. M. Meldrum's acids as acylating agents in the catalytic intramolecular Friedel-Crafts reaction. **Journal of Organic Chemistry**, v. 70, n. 4, p. 1316–1327, 2005.

FORMISANO, C.; SANNA, C.; BALLERO, M.; CHIANESE, G.; SIRIGNANO, C.; RIGANO, D.; MILLÁN, E.; MUÑOZ, E.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. Fitoterapia Anti-inflammatória sesquiterpene lactones from *Onopordum illyricum* L. (Asteraceae), an Italian medicinal plant. **Fitoterapia**, v. 116, p. 61–65, 2017.

FUNATOMI, T.; WAKASUGI, K.; MISAKI, T.; TANABE, Y. Pentafluorophenylammonium triflate (PFPAT): An efficient, practical, and cost-effective catalyst for esterification, thioesterification, transesterification, and macrolactone formation. **Green Chemistry**, v. 8, n. 12, p. 1022–1027, 2006.

GÁBOR, M.; RÁZGA, Z. Development and inhibition of mouse ear oedema induced with capsaicin. **Agents and Actions**, v. 36, n. 1–2, p. 83–86, 1992.

GARAVITO, G.; RINCÓN, J.; ARTEAGA, L.; HATA, Y.; BOURDY, G.; GIMENEZ, A.; PINZÓN, R.; DEHARO, E. Antimalarial activity of some Colombian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 3, p. 460–462, 2006.

GARCÍA-RISCO, M. R.; MOUHID, L.; SALAS-PÉREZ, L.; LÓPEZ-PADILLA, A.; SANTOYO, S.; JAIME, L.; MOLINA, A. R. De; REGLERO, G. Biological Activities of Asteraceae (*Achillea millefolium* and *Calendula officinalis*) and Lamiaceae (*Melissa officinalis* and *Origanum majorana*) Plant Extracts. **Plant Foods Hum Nutr**, v. 72, p. 96–102, 2017.

GARCIA, H.; MARTINEZ-UTRILLA, R.; MIRANDA, M. A. Cyclic acetals as carbonyl blocking groups in the photo-fries rearrangement of acyl substituted aryl esters. **Tetrahedron**, v. 41, n. 15, p. 3131–3134, 1985.

GERBER, P. A.; BUHREN, B. A.; SCHRUMPF, H.; HOMEY, B.; ZLOTNIK, A.; HEVEZI, P. The top skin-associated genes: A comparative analysis of human and mouse skin transcriptomes. **Biological Chemistry**, v. 395, n. 6, p. 577–591, 2014.

GOULD, A. N.; PENNY, C. B.; PATEL, C. C.; CANDY, G. P. Enhanced cutaneous wound healing by *Senecio serratuloides* (Asteraceae/Compositae) in a pig model. **South African Journal of Botany**, v. 100, p. 63–68, 2015.

GUEVARA, M. C. G.; GIRALDO, L. F. O.; VELANDIA, J. R. Actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones de *Myrcianthes leucoxila*, *Calea prunifolia*, *Curatella americana* y *Physalis peruviana* en los modelos edema auticular por TPA, edema plantar por carragenina y artritis inducida por colágeno. **Biosalud**, v. 10, n. 1, p. 9–18, 2011.

GUROVIC, M. S. V.; CASTRO, M. J.; RICHMOND, V.; FARAONI, M. B.; MAIER, M. S.;

MURRAY, A. P. Triterpenoids with acetylcholinesterase inhibition from chuquiraga erinacea D. Don. subsp. erinacea (Asteraceae). **Planta Medica**, v. 76, n. 6, p. 607–610, 2010.

HANAZAKI, N.; ZANK, S.; PINTO, M. Areas da Ribanceira de Imbituba: compreendendo a biodiversidade vegetal manejada para subsidiar a criação de uma Reserva de Desenvolvimento Sustentável. **Biodiversidade ...**, n. August, p. 50–64, 2012.

HANSEN, L. A.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; SMART, R. C. Differential Down-Regulation of Epidermal Protein Kinase C by 12- O -Tetradecanoylphorbol-13-acetate and Diacylglycerol : Association with Epidermal Hyperplasia and Tumor Promotion Differential Down-Regulation of Epidermal Protein Kinase C by 12-0- Tetrad. **Cancer Research**, v. 50, n. 20, p. 5740–5745, 1990.

HEIDARY ALIZADEH, B.; VOSOOGHI, M.; KHOOBI, M.; JAVIDNIA, A.; VOSOOGHI, M.; KHOOBI, M.; JAVIDNIA, A.; PANAH, F.; SAFAVI, M.; ARDESTANI, S.; SHAFIEE, A. Synthesis and Cytotoxic Activity of Novel 9-[Hydroxy(Substitutedphenyl) Methyl]-2,2-Dimethyl-2,3,8,9-Tetrahydro-4H,10H-Pyrano [2,3-f]Chromene-4,10-Diones. **Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 29, n. 4, p. 189–196, 2010.

HENNING, H. G.; SCHWABE, B.; KERNOHEN, F. Synthese von 6-Acetyl-3-alkyl-2-phenyl-chromen-4-onen in phasentransfer-katalysierter Baker-Venkataraman-Reaktion. **Journal für praktische Chemie**, v. 326, n. 3, p. 491–501, 1984.

HEO, H.-J.; YANG, H.-C.; CHO, H.-Y.; HONG, B.; LIM, S.-T.; PARK, H.-J.; KIM, K.-H.; KIM, H.-K.; SHIN, D.-H. Inhibitory effect of Artemisia asiatica alkaloids on acetylcholinesterase activity from rat PC12 cells. **Molecules and cells**, v. 10, n. 3, p. 253–262, 2000.

HIBBS EH, ZAMBON AC. Fármacos que atuam na junção neuromuscular e nos gânglios autônomos. In: BUNTON LL, CHABNER BA, KNOLLMANN BC (Eds.), **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**, Porto Alegre: McGraw Hill, 2012. p. 255-276.

HOLZER P. Capsaicin : Cellular Selectivity Targets , for Thin Mechanisms of Action , Sensory Neurons. **Pharmacological Review**, v. 43, n. 2, p. 143–201, 1991.

HUXTABLE, R. J. Activation and pulmonary toxicity of pyrrolizidine alkaloids. **Pharmacology & therapeutics**, v. 47, n. 3, p. 371–89, 1990.

INOUE, H.; NAGATA, N.; KOSHIHARA, Y. Participation of serotonin in capsaicin-induced mouse ear edema. **Japanese journal of pharmacology**, v. 69, n. 1, p. 61–8, 1995.

JANA, U.; MAITI, S.; BISWAS, S. An efficient FeCl₃-catalyzed amidation reaction of secondary benzylic and allylic alcohols with carboxamides or p-toluenesulfonamide. **Tetrahedron Letters**, v. 49, n. 5, p. 858–862, 2008.

JENSEN, B. B.; COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C. D.; BARROS, A. M. C.; SOARES, F. V.; GRAFOVA, I.; GRAFOV, A.; FRANCO, A. M. R. Avaliação da atividade antileishmania in vitro de Tanacetum vulgare (Asteraceae). **Acta Brasiliensis**, v. 1, n. 2, p. 33–37, 2017.

JEON, I.; MANGION, I. K. An improved synthesis of hydroxy aryl ketones by fries

rearrangement with methanesulfonic acid/methanesulfonic anhydride. **Synlett**, v. 23, n. 13, p. 1927–1930, 2012.

KABBE, H.; WIDDIG, A. Synthesis and Reactions of 4-Chromanones. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 21, p. 247–256, 1982.

KAPIL, S.; SINGH, P. K.; SILAKARI, O. An update on small molecule strategies targeting leishmaniasis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 157, p. 339–367, 2018.

KERI, R. S.; BUDAGUMPI, S.; PAI, R. K.; BALAKRISHNA, R. G. Chromones as a privileged scaffold in drug discovery: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 78, p. 340–374, 2014.

KHAVKIN, J.; ELLIS, D. A. F. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 19, n. 2, p. 229–234, 2011.

KHERSONSKY, O.; TAWFIK, D. S. Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase. **Biochemistry**, v. 44, n. 16, p. 6371–6382, 2005.

KILARU, R. B.; KURUVA, C. S.; KATLA, V. R.; CHAMARTHI, N. R. Isolation and Characterization of Process Related Substances of an Antipsychotic Drug : Iloperidone. **Asian Journal of Chemistry**, v. 25, n. 10, p. 5307–5310, 2013.

KOCH, E.; PLASSMANN, S. Critical Aspects of Integrated Nonclinical Drug Development. In: **A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development**. Second Edition. [s.l.] : Elsevier, 2017. p. 7–38.

KOTESWARA REDDY, M.; JAYAPRAKASH RAO, Y.; DAVID KRUPADANAM, G. L. Synthesis and anti-microbial activity of new (1-alkyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl-2H-chromene-3-carboxylates: A click chemistry approach. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 19, n. 4, p. 4–10, 2012.

LEE, J.; PARK, T.; JEONG, S.; KIM, K.-H.; HONG, C. 3-Hydroxychromones as cyclin-dependent kinase inhibitors: Synthesis and biological evaluation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 5, p. 1284–1287, 2007.

LIMA, T. C.; SANTOS, A. D. C.; COSTA, D. T. M.; SOUZA, R. J.; BARISON, A.; STEINDEL, M.; BIAVATTI, M. W. Chromenes from leaves of *Calea pinnatifida* and evaluation of their leishmanicidal activity. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 1, p. 7–10, 2015.

LIMA, T. C.; SOUZA, R. J.; SANTOS, A. D. C.; MORAES, M. H.; BIONDO, N. E.; BARISON, A.; STEINDEL, M.; BIAVATTI, M. W. Evaluation of leishmanicidal and trypanocidal activities of phenolic compounds from *Calea uniflora* Less. **Natural Product Research**, v. 30, n. 5, p. 551–557, 2016.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, p. 3–25, 1997.

LOCKHART, I. M. 4-chromanones. In: ELLIS, G. P. (Ed.). **Chromenes, chromanones, and**

chromones, John Wiley & Sons, 2009, p. 207-428.

LOURENÇO, T. O.; AKISUE, G.; ROQUE, N. F. Reduced acetophenone derivatives from *Calea cuneifolia*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 4, p. 773–776, 1981.

LUTJEN, A. B.; QUIRK, M. A.; BARBERA, A. M.; KOLONKO, E. M. Synthesis of (E)-cinnamyl ester derivatives via a greener Steglich esterification. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 2018.

MACÊDO, S. B.; FERREIRA, L. R.; PERAZZO, F. F.; TAVARES CARVALHO, J. C. Anti-inflammatory activity of *Arnica montana* 6cH: Preclinical study in animals. **Homeopathy**, v. 93, n. 2, p. 84–87, 2004.

MACK, M. Inflammation and fibrosis. **Matrix Biology**, v. 68–69, p. 106–121, 2017.

MACOVEI, L. A.; BIRSAN, M.; TEODOR, V. I.; CRISTOFOR, A. N. A. C.; IOANID, N.; REZUS, E. On the Role of Chemical and Molecular Biology in Inflammation Research. n. 4, p. 3–5, 2017.

MAYAGOITIA, L.; DÍAZ, J. L.; CONTRERAS, C. M. Psychopharmacologic analysis of an alleged oneirogenic plant: *Calea zacatechichi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 18, n. 3, p. 229–243, 1986.

MEDEIROS-NEVES, B.; TEIXEIRA, H. F.; VON POSER, G. L. The genus *Pterocaulon* (Asteraceae) – A review on traditional medicinal uses, chemical constituents and biological properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 224, n. March, p. 451–464, 2018.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. Innate Immunity. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 5, p. 338–344, 2000.

MOLINSPIRATION. **Molinspiration Virtual Screening**. Disponível em: <<http://www.molinspiration.com/docu/miscreen/virtualscreening.html>> Acesso em: 2018

MONZOTE, L.; STAMBERG, W.; PATEL, A.; ROSENAU, T.; MAES, L.; COS, P.; GILLE, L. Synthetic chromanol derivatives and their interaction with complex III in mitochondria from bovine, yeast, and *Leishmania*. **Chemical Research in Toxicology**, v. 24, n. 10, p. 1678–1685, 2011.

MOON, S. M.; LEE, S. A.; HONG, J. H.; KIM, J. S.; KIM, D. K.; KIM, C. S. Oleamide suppresses inflammatory responses in LPS-induced RAW264.7 murine macrophages and alleviates paw edema in a carrageenan-induced inflammatory rat model. **International Immunopharmacology**, v. 56, n. December 2017, p. 179–185, 2018.

MURRAY, A. R.; KISIN, E.; CASTRANOVA, V.; KOMMINENI, C.; GUNTHER, M. R.; SHVEDOVA, A. A. Phenol-induced in vivo oxidative stress in skin: Evidence for enhanced free radical generation, thiol oxidation, and antioxidant depletion. **Chemical Research in Toxicology**, v. 20, n. 12, p. 1769–1777, 2007.

MUSA, M. M.; ZIEGELMANN-FJELD, K. I.; VIEILLE, C.; ZEIKUS, J. G.; PHILLIPS, R. S. Asymmetric reduction and oxidation of aromatic ketones and alcohols using W110A secondary alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobacter ethanolicus*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 72, n. 1, p. 30–34, 2007.

MUTHUKRISHNAN, M.; BASAVANAG, U. M. V.; PURANIK, V. G. The first ionic liquid-promoted Kabbe condensation reaction for an expeditious synthesis of privileged bis-spirochromanone scaffolds. **Tetrahedron Letters**, v. 50, n. 22, p. 2643–2648, 2009.

NAHMANY, M.; MELMAN, A. Chemoselectivity in reactions of esteri fi cation. **The Royal Society of Chemistry**, v. 2, n. March, p. 1563–1572, 2004.

NAKAJIMA, J.N., LOEUILLE, B., HEIDEN, G.,DEMATTEIS, M.,HATTORI, E.K.O.,MAGENTA, M.A.G.,RITTER, M.R.,MONDIN, C.A.,ROQUE, N.,FERREIRA, S.C.,BORGES, R.A.X.,SOARES, P.N.,ALMEIDA, G.,SCHNEIDER, A.,SANCHO, G.,SAAVEDRA, M.M.,LIRO, R.M.,PEREIRA, A.C.M.,MORAES, M.D.,SILVA, G.A.R.,MEDEIROS, J.D.,LORENCINI, T.S.,TELES, A.M.,MONGE, M.,SINISCALCHI, C.M.,SOUZA-BUTURI, F.O.,BRINGEL JR., J.B. A.,CARNEIRO, C.R.,PASINI, E.,OLIVEIRA, C.T. **Asteraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015 Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/florado-brasil/FB55>>. Acesso em: 20 Nov. 2018.

NARENDER, T.; GUPTA, S. A convenient and biogenetic type synthesis of few naturally occurring chromeno dihydrochalcones and their in vitro antileishmanial activity q. v. 14, p. 3913–3916, 2004.

NASCIMENTO, A. M. Do; ALBUQUERQUE, S.; OLIVEIRA, D. C. R. De. Evaluation of trypanocidal activity from *Calea uniflora* (Heliantheae-Asteraceae) extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 49–50, 2002.

NEISES, B.; STEGLICH, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 17, n. 7, p. 522–524, 1978.

NILE, S. H.; KEUM, Y. S.; NILE, A. S.; JALDE, S. S.; PATEL, R. V. Antioxidant, anti-inflammatory, and enzyme inhibitory activity of natural plant flavonoids and their synthesized derivatives. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 32, n. 1, 2018.

NOGUEIRA, F. L. P.; FERNANDES, S. B. O.; REIS, G. M.; MATHEUS, M. E.; FERNANDES, P. D.; LAGE, C. L. S.; MENEZES, F. S. Atividade analgésica e antiedematogênica de *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae) selvagem e obtida por micropropagação. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 310–315, 2005.

NOJI, M.; OHNO, T.; FUJI, K.; FUTABA, N.; TAJIMA, H.; ISHII, K. Secondary Benzylation Using Benzyl Alcohols Catalyzed by Lanthanoid, Scandium, and Hafnium Triflate. **Journal of Organic Chemistry**, v. 68, n. 24, p. 9340–9347, 2003.

OBER, A. G.; FISCHER, N. H.; PARODI, F. Jamaicolides A-D, four sesquiterpene lactones from *Calea jamaicensis*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 4, p. 877–881, 1986.

OBER, A. G.; QUIJANO, L.; URBATSCH, L. E.; FISCHER, N. H. Eudesmanolides from *Calea trichomata*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 4, p. 910–912, 1984.

OBER, A. G.; URBATSCH, L. E.; FISCHER, N. H. Germacranolides, calbertolides A, B and C, from *Calea berteriana*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 8, p. 1743–1745, 1985. a.

OBER, A. G.; URBATSCH, L. E.; FISCHER, N. H. Two guaianolides from *calea solidaginea*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 11, p. 2728–2730, 1985. b.

OBER, A. G.; URBATSCH, L. E.; FISCHER, N. H. Sesquiterpene lactones from *Calea leptoccephala*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 2, p. 467–470, 1986.

OECD. Guidelines for the testing of chemicals. Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents **Oecd**, 2008. Seção October, p. 1–13. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-407-repeated-dose-28-day-oral-toxicity-study-in-rodents_9789264070684-en>. Acesso em: 3 jul. 2017.

OECD. Test Guideline 402 on Acute Dermal Toxicity INTRODUCTION2016. Disponível em: <https://www.oecd.org/env/ehs/testing/TG_402_final_draft_updated_Aug_2016_for_final_comments.pdf>. Acesso em: 3 jul. 2017.

OPAS, E. E.; BONNEY, R. J.; HUMES, J. L. Prostaglandin and leukotriene synthesis in mouse ears inflamed by arachidonic acid. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 84, n. 4, p. 253–256, 1985.

ORDEN, A. A.; BISOGNO, F. R.; GIORDANO, O. S.; KURINA SANZ, M. Comparative study in the asymmetric bioreduction of ketones by plant organs and undifferentiated cells. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, n. 1–2, p. 49–55, 2008.

ORGANIC CHEMISTRY PORTAL. **Fries Rearrangement**. Disponível em: <<https://www.organic-chemistry.org/namedreactions/fries-rearrangement.shtm>>. Acesso em: 2018a.

ORGANIC CHEMISTRY PORTAL. Toxicity Risk Assessment. Disponível em: <<https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/tox.html>>. Acesso em: 2018b.

PALOMINO, D. C. T.; MARTI, L. C. Chemokines and immunity. **Einstein (São Paulo)**, v. 13, n. 3, p. 469–473, 2015.

PASSREITER, C. M. Co-occurrence of 2-pyrrolidineacetic acid with the pyrrolizidines tussilaginic acid and isotussilaginic acid and their 1-epimers in *Arnica* species and *Tussilago farfara*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 12, p. 4135–4137, 1992.

PASSREITER, C. M. Pyrrolizidine alkaloids from *Neurolaena lobata*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, n. 8, p. 839–843, 1998.

PATEL, A.; LIEBNER, F.; NETSCHER, T.; MEREITER, K.; ROSENAU, T. Vitamin E chemistry. Nitration of non- α -tocopherols: Products and mechanistic considerations. **Journal of Organic Chemistry**, v. 72, n. 17, p. 6504–6512, 2007.

PATWARDHAN, B.; VAIDYA, A. D. B. Natural products drug discovery: Accelerating the clinical candidate development using reverse pharmacology approaches. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, n. 3, p. 220–227, 2010.

PAUL, V.; BALASUBRAMANIAM, E.; KAZI, M. The neurobehavioural toxicity of endosulfan in rats: a serotonergic involvement in learning impairment. **European Journal of Pharmacology: Environmental Toxicology and**, v. 270, n. 1, p. 1–7, 1994.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149–167, 1985.

PONGPRAYOON, U.; TUCHINDA, P.; CLAESON, P.; SEMATONG, T.; REUTRAKUL, V.; SOONTORN SARATUNE, P. Topical antiinflammatory activity of the major lipophilic constituents of the rhizome of *Zingiber cassumunar*. Part II: Hexane extractives.

Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology, v. 3, n. 4, p. 323–6, 1997.

POPP, F. D.; MCEWEN, W. E. Polyphosphoric Acids As A Reagent In Organic Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 58, n. 2, p. 321–401, 1957.

PROKSCH, P.; RODRIGUEZ, E. Chromenes and benzofurans of the asteraceae, their chemistry and biological significance. **Phytochemistry**, v. 22, n. 11, p. 2335–2348, 1983a.

PROKSCH, P.; RODRIGUEZ, E. Chromenes and benzofurans of the asteraceae, their chemistry and biological significance. **Phytochemistry**, v. 22, n. 11, p. 2335–2348, 1983b.

PRUSKI, J. F.; URBATSCH, L. E. Five new species of *Calea* (Compositae: Heliantheae) from Planaltine Brazil. **Brittonia**, v. 40, n. 4, p. 341–356, 1988.

RAMOS, L. S.; CARDOSO, P. S.; FREITAS, M. D.; PAGHAN, R.; BORGES, M. S.; CITADINI-ZANETTE, V.; BARLOW, J. W.; AMARAL, P. A.; DALBÓ, S. Popular medicinal uses of *Calea uniflora* Less. (Asteraceae) and its contribution to the study of Brazilian medicinal plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n. 4, p. 2319–2330, 2016.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N. De; MARZAL, C.; MEDICINA, I. De; SÃO, T. De; PAULO, U. D. S.; ENÉAS, A.; AGUIAR, D. C.; SP, S. P. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Quimica Nova**, v. 26, n. 4, p. 550–555, 2003.

RIBEIRO, V. L. S.; DOS SANTOS, J. C.; MARTINS, J. R.; SCHRIPSEMA, J.; SIQUEIRA, I. R.; VON POSER, G. L.; APEL, M. A. Acaricidal properties of the essential oil and precocene II obtained from *Calea serrata* (Asteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 179, n. 1–3, p. 195–198, 2011.

RIBEIRO, V. L. S.; VANZELLA, C.; MOYSÉS, F. dos S.; SANTOS, J. C. Dos; MARTINS, J. R. S.; POSER, G. L. Von; SIQUEIRA, I. R. Effect of *Calea serrata* Less. n-hexane extract on acetylcholinesterase of larvae ticks and brain Wistar rats. **Veterinary Parasitology**, v. 189, n. 2–4, p. 322–326, 2012.

ROCHA, D. D.; DANTAS, I. N. F.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; MONTENEGRO, R. C.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; PESSOA, O. D. L.; SILVEIRA, E. R.; COSTA-LORUFO, L. V. Studies on the cytotoxicity of miscellaneous compounds from *Eupatorium betonicaeforme* (D.C.) baker (Asteraceae). **Chemistry and Biodiversity**, v. 4, n. 12, p. 2835–2844, 2007.

ROCHA, L.; LUCIO, E. M. A.; FRANÇA, H. S.; SHARAPIN, N. *Mikania glomerata* Spreng: Desenvolvimento de um produto fitoterápico. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. SUPPL., p. 744–747, 2008.

RODRIGUES-TORRES, V. N.; DELUCA MACHADO, J.; DE, L.; RAMOS, S.; PAGHAN, R.; KAUTZ, J.; ROUAUD, I.; SAUVAGER, A.; TOMASI, S.; LOHÉZIC-LE DÉVÉHAT,

F.; DALBÓ, S.; DE AGUIAR AMARAL, P. Phytochemical investigation, antinociceptive activity and cytotoxicity of crude extracts of *Calea uniflora* Less. **Journal of medicinal Plants Research**, v. 10, n. 39, p. 695–704, 2016.

RODRIGUEZ, E.; TOWERS, G. H. N.; MITCHELL, J. C. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Phytochemistry**, v. 15, n. 11, p. 1573–1580, 1976.

ROQUE, N.; BAUTISTA, H. **Asteraceae: caracterização e morfologia floral**. Edufba, Brasil, p.73, 2008.

SALAĞA, M.; KOWALCZUK, A.; ZIELINSKA, M.; BŁAZEWICZ, A.; FICHNA, J. *Calea zacatechichi* dichloromethane extract exhibits antidiarrheal and antinociceptive effects in mouse models mimicking irritable bowel syndrome. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 388, n. 10, p. 1069–1077, 2015.

SARAIVA, R. A.; ARARUNA, M. K. A.; OLIVEIRA, R. C.; MENEZES, K. D. P.; LEITE, G. O.; KERNTOPF, M. R.; COSTA, J. G. M.; ROCHA, J. B. T.; TOM?, A. R.; CAMPOS, A. R.; MENEZES, I. R. A. Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p. 504–510, 2011.

SCARPI, D.; OCCHIATO, E. G.; GUARNA, A. Selectivity of *Daucus carota* roots and baker's yeast in the enantioselective reduction of γ -nitroketones. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 16, n. 8, p. 1479–1483, 2005.

SEGURA-COBOS, D.; BAIZA-GUTMAN, L. A. Pharmacologyonline 2: 1100-1110 (2010) Segura-Cobos et al. **Pharmacology online**, v. 2, p. 1100–1110, 2010.

SHAH, B. N.; SETH, A. K.; MAHESHWARI, K. M. A Review on Medicinal Plants as a Source of Anti-inflammatory Agents. **Research Journal of Medicinal Plant**, v. 5, n. 2, 2011.

SHAIKH, M. M.; KRUGER, H. G.; BODENSTEIN, J.; SMITH, P.; DU TOIT, K. Anti-inflammatory activities of selected synthetic homoisoflavanones. **Natural Product Research**, v. 26, n. 16, p. 1473–1482, 2012.

SHAMASUZZAMAN, H. K. Bioactive Benzofuran derivatives: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 483–504, 2015.

SHEETS, R. Preclinical Safety and Toxicology. In: **Fundamentals of Biologicals Regulation**. [s.l.] : Elsevier, 2018. p. 171–196.

SHVEDOVA, A. A.; KOMMINENI, C.; JEFFRIES, B. A.; CASTRANOVA, V.; TYURINA, Y. Y.; TYURIN, V. A.; SERBINOVA, E. A.; FABISIYAK, J. P.; KAGAN, V. E. Redox cycling of phenol induces oxidative stress in human epidermal keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 114, n. 2, p. 354–364, 2000.

SILVA, C. F. M.; PINTO, D. C. G. A.; SILVA, A. M. S. Chromones: A Promising Ring System for New Anti-inflammatory Drugs. **ChemMedChem**, v. 11, n. 20, p. 2252–2260, 2016.

SINGH, G. Preclinical Drug Development. In: **Pharmaceutical Medicine and Translational**

Clinical Research. [s.l.] : Elsevier, 2017. p. 47–63.

SOUZA, M. S. et al. Método de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. (Org). **Ciências Farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos.** Editora Univali, Itajaí, Santa Catarina, Brasil, p. 119-120, 2003.

STEINBECK, C.; SPITZER, V.; STAROSTA, M.; VON POSER, G. Identification of two chromenes from *Calea serrata* by Semiautomatic structure elucidation. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 6, p. 627–628, 1997.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Steverding Parasites & Vectors**, V.10, n.82, p. 1–10, 2017.

TAWFIK, H. a; EWIES, E. F.; EL-HAMOULY, W. S. Synthesis of chromones and their applications during the last ten years. **Ijrpc**, v. 4, n. 4, p. 1046–1085, 2014.

THOMAS, N.; ZACHARIAH, S. M. **Pharmacological activities of chromene derivatives: An overview**, 2013a.

THOMAS, N.; ZACHARIAH, S. M. Pharmacological activities of chromene derivatives: An overview. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 6, n. SUPPL. 2, p. 11–15, 2013b.

TORRES-RODRÍGUEZ, M. L.; GARCÍA-CHÁVEZ, E.; BERHOW, M.; DE MEJIA, E. G. Anti-inflammatory and anti-oxidant effect of *Calea urticifolia* lyophilized aqueous extract on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 188, p. 266–274, 2016.

TUBARO, A.; DRI, P.; DELBELLO, G.; ZILLI, C.; LOGGIA, R. Della; AL., E. The Croton oil ear test revisited. **Agents and Actions**, v. 17, n. 3–4, p. 347–349, 1986.

TUNDIS, R.; LOIZZO, M. R. A Review of the Traditional Uses , Phytochemistry and Biological Activities of the Genus *Santolina* Authors. **Planta Medica**, 2018.

UNUOFIN, J. O.; OTUNOLA, G. A.; AFOLAYAN, A. J. Acute and subacute toxicity of aqueous extract of the tuber of *Kedrostis africana* (L.) Cogn in Wistar rats. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, 2018.

UTSUKIHARA, T.; WATANABE, S.; TOMIYAMA, A.; CHAI, W.; HORIUCHI, C. A. Stereoselective reduction of ketones by various vegetables. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 41, n. 3–4, p. 103–109, 2006.

VENDRUSCOLO, G. S.; MENTZ, L. A. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa , Porto Alegre , Rio Grande do Sul . **Iheringia**, v. 61, n. 1–2, p. 83–103, 2006.

VENEGAS-FLORES, H.; SEGURA-COBOS, D.; VÁZQUEZ-CRUZ, B. Antiinflammatory Activity of the Aqueous Extract of *Calea zacatechichi*. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, v. 45, , p. 110–111, 2002.

VIANNA, M. R. M.; ALONSO, M.; VIOLA, H.; QUEVEDO, J.; PARIS, F. De; FURMAN,

M.; STEIN, M. L. De; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. Role of Hippocampal Signaling Pathways in Long-Term Memory Formation of a Nonassociative Learning Task in the Rat. **Learning Memory**, v. 7, p. 333–340, 2000.

VIGNOZZI, L.; MORELLI, A.; CELLAI, I.; FILIPPI, S.; COMEGLIO, P.; SARCHIELLI, E.; MANESCHI, E.; VANNELLI, G. B.; ADORINI, L.; MAGGI, M. Cardiopulmonary protective effects of the selective FXR agonist obeticholic acid in the rat model of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 165, p. 277–292, 2017.

VOGL, M.; KRATZER, R.; NIDETZKY, B.; BRECKER, L. Candida tenuis xylose reductase catalysed reduction of acetophenones: The effect of ring-substituents on catalytic efficiency. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 9, n. 16, p. 5863–5870, 2011.

WALDMAN, H. J. Centrally acting skeletal muscle relaxants and associated drugs. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 9, n. 7, p. 434–441, 1994.

WANG, D.; HUANG, L.; CHEN, S. Senecio scandens Buch.-Ham.: A review on its ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology, and toxicity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 1, p. 1–23, 2013.

WILMER, J. L.; BURLESON, F. G.; KAYAMA, F.; KANNO, J.; LUSTER, M. I. Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical-induced inflammation in mouse skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, n. 6, p. 915–922, 1994.

WILSON, D. W.; SEGALL, H. J.; PAN, L. C.; LAMÉ, M. W.; ESTEP, J. E. mechanisms-and-pathology-of-monocrotaline pulmonary toxicity. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 22, n. 5/6, p. 307–325, 1992.

WU, H.; FRONCZEK, F.; BURANDT, C.; ZJAWIONY, J. Antileishmanial Germacranolides from *Calea zacatechichi*. **Planta Medica**, v. 77, n. 07, p. 749–753, 2011.

YADAV, J. S.; NANDA, S.; THIRUPATHI REDDY, P.; BHASKAR RAO, A. Efficient enantioselective reduction of ketones with Daucus carota root. **Journal of Organic Chemistry**, v. 67, n. 11, p. 3900–3903, 2002.

YADAV, J. S.; REDDY, G. S. K. K.; SABITHA, G.; KRISHNA, A. D.; PRASAD, A. R.; HAFEEZ-U-R-RAHAMAN; VISHWASWAR RAO, K.; BHASKAR RAO, A. Daucus carota and baker's yeast mediated bio-reduction of prochiral ketones. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 18, n. 6, p. 717–723, 2007.

YAMADA, T.; NAGATA, T.; SUGI, K. D.; YOROZU, K.; IKENO, T.; OHTSUKA, Y.; MIYAZAKI, D.; MUKAIYAMA, T. Enantioselective borohydride reduction catalyzed by optically active cobalt complexes. **Chemistry - A European Journal**, v. 9, n. 18, p. 4485–4509, 2003.

YAMAMOTO, Y.; ITONAGA, K. Synthesis of Chromans via [3 + 3] Cyclocoupling of Phenols with Allylic Alcohols Using a Mo/o -Chloranil Catalyst System. n. c, p. 993–996, 2009.

YANG, B.; CHEN, H.; STANTON, C.; ROSS, R. P.; ZHANG, H.; CHEN, Y. Q.; CHEN, W. Review of the roles of conjugated linoleic acid in health and disease. **Journal of Functional Foods**, v. 15, p. 314–325, 2015.

ZADEH, J. B.; KOR, N. M.; KOR, Z. M. Chamomile (*Matricaria recutita*) As a Valuable Medicinal Plant. **International journal of Advanced Biological and Biomedical Research**, v. 2, n. 3, p. 823–829, 2014.

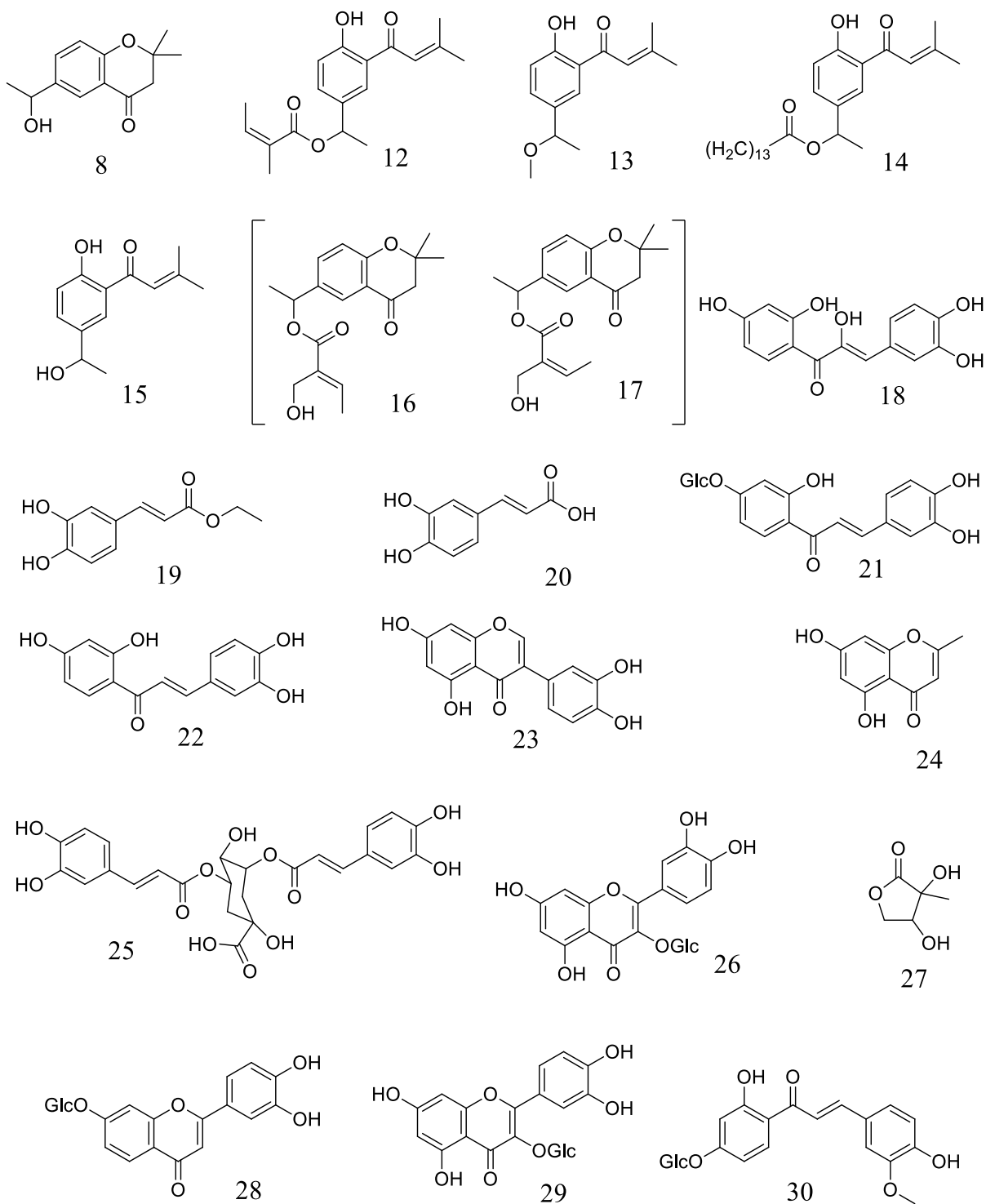
ZAMPELI, E.; TILIGADA, E. The role of histamine H₄ receptor in immune and inflammatory disorders. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, n. 1, p. 24–33, 2009.

ZEYNIZADEH, B.; BEHYAR, T. Wet THF as a suitable solvent for a mild and convenient reduction of carbonyl compounds with NaBH₄. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 78, n. 2, p. 307–315, 2005.

ZOMER, H. D.; TRENTIN, A. G. Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research. **Journal of Dermatological Science**, v. 90, n. 1, p. 3–12, 2018.

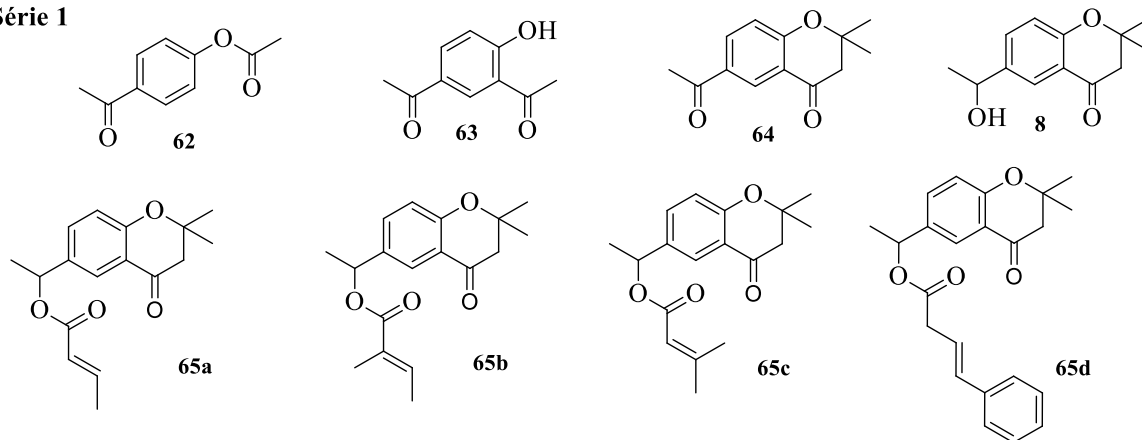
APÊNDICES

APÊNDICE A - Fitoquímicos isolados de *C. uniflora*, em destaque o uniflorol-A e uniflorol B

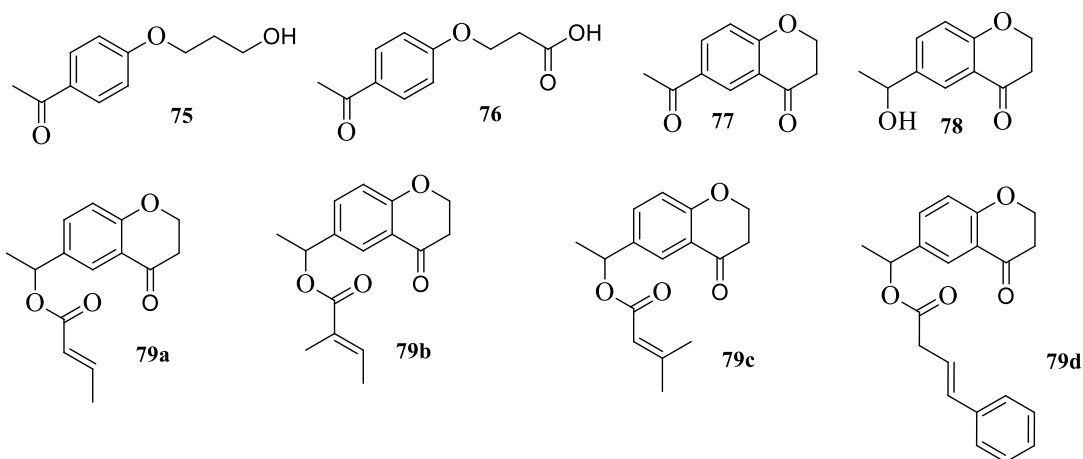


APÊNDICE B - Intermediários e produtos das rotas sintéticas da síntese de Benzopiranos do tipo *Calea* spp.

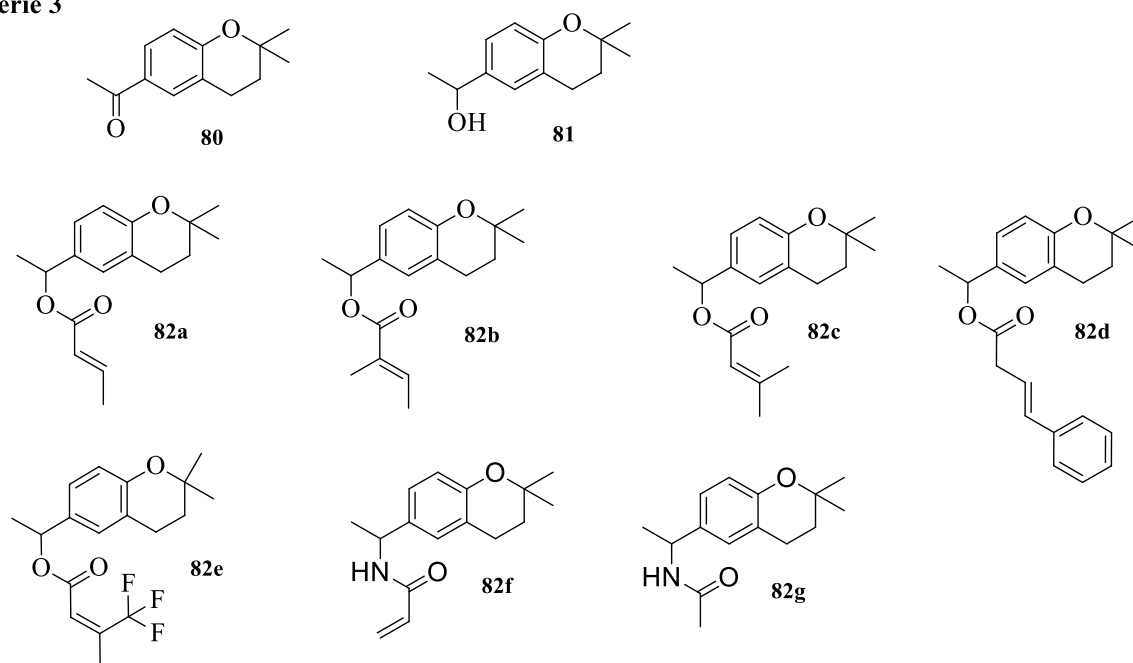
Série 1

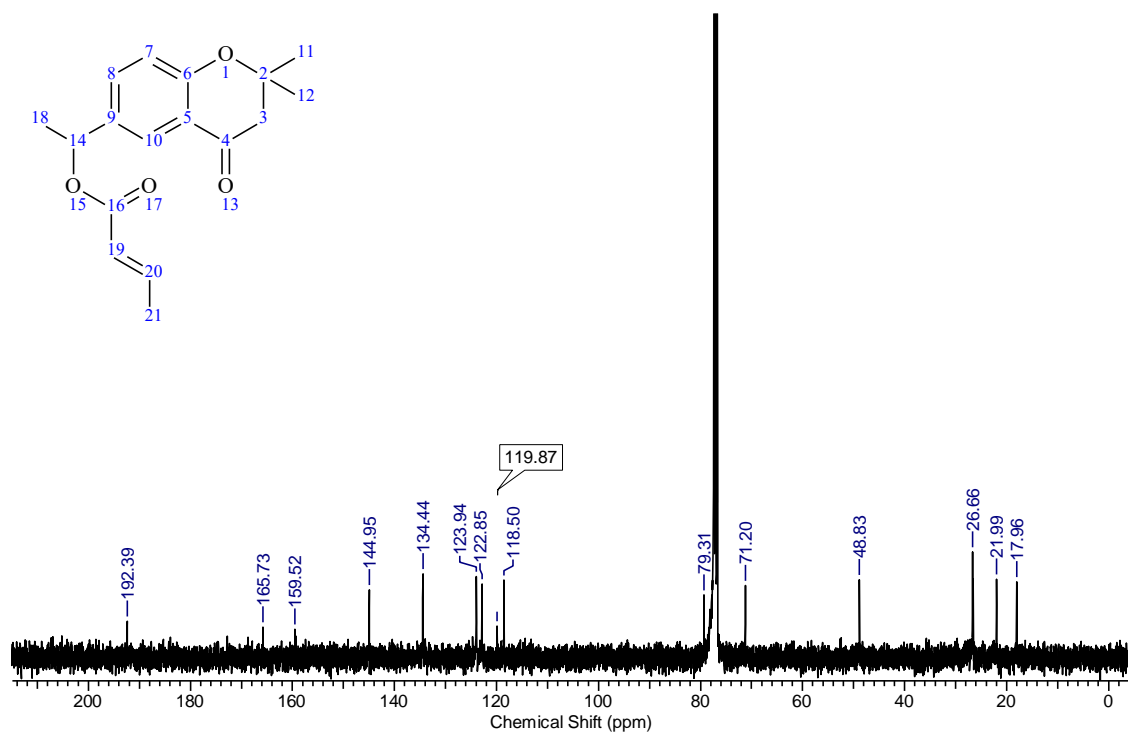
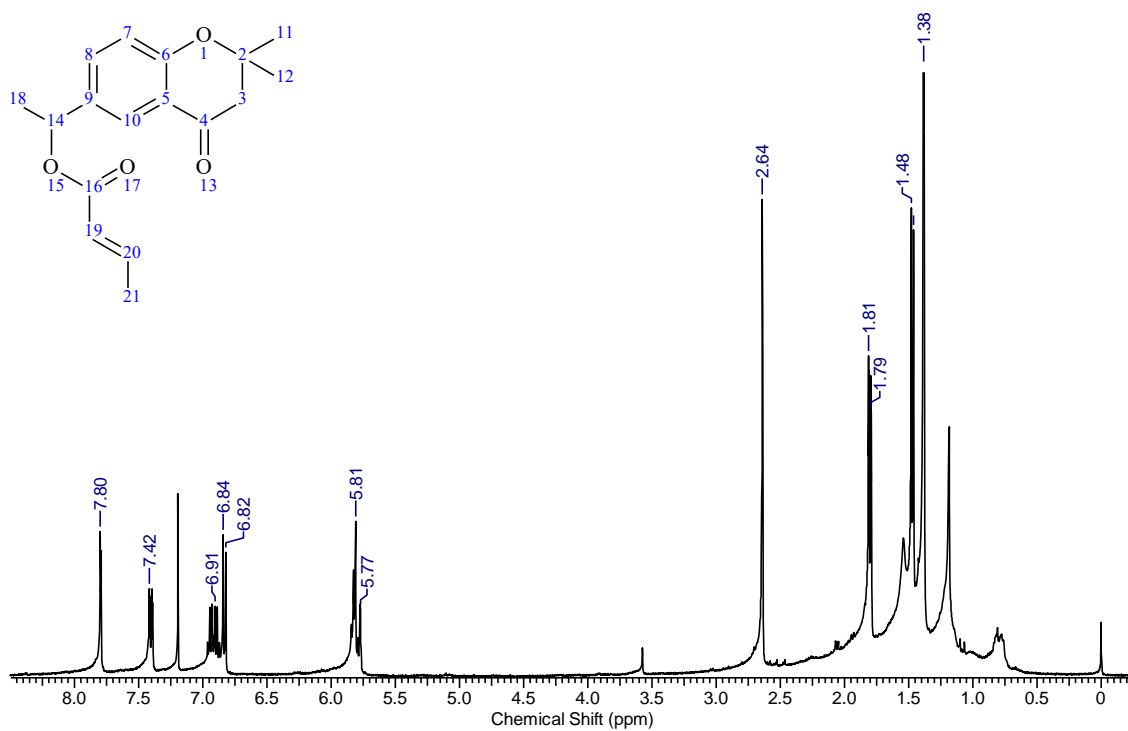


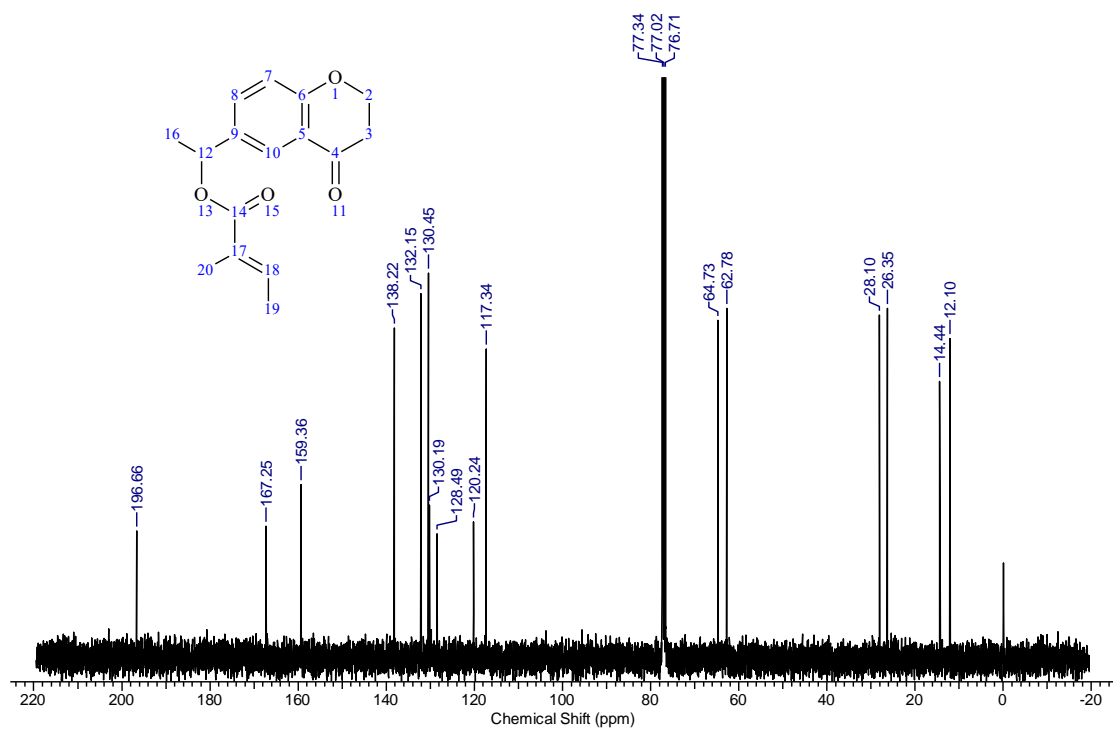
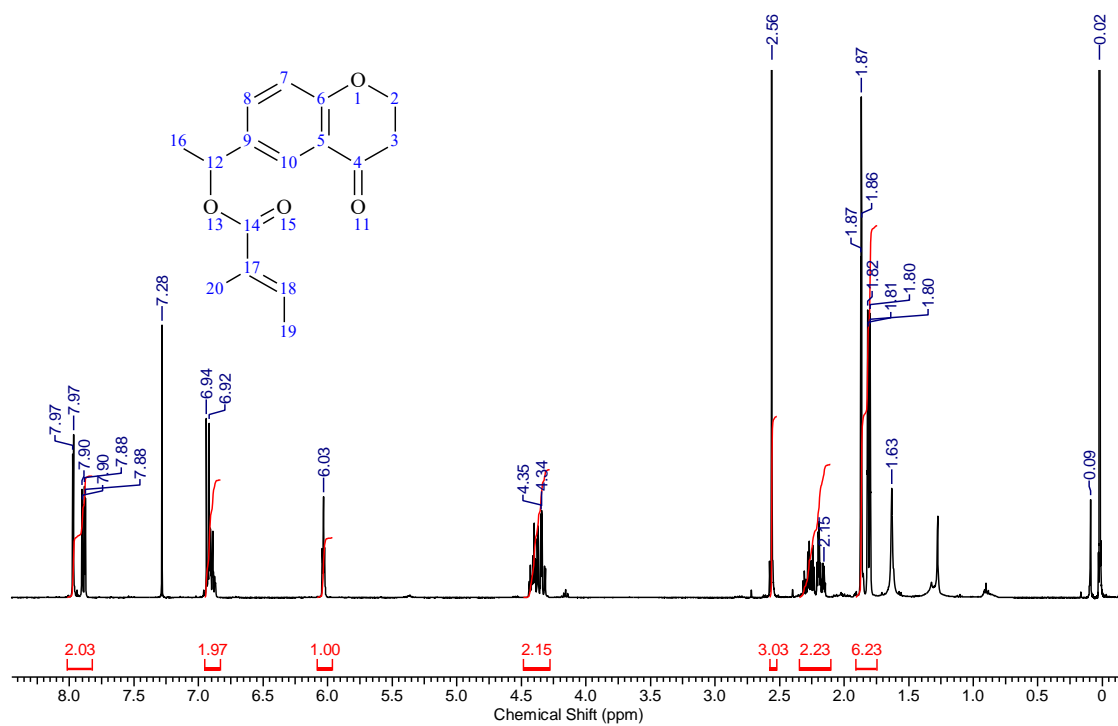
Série 2

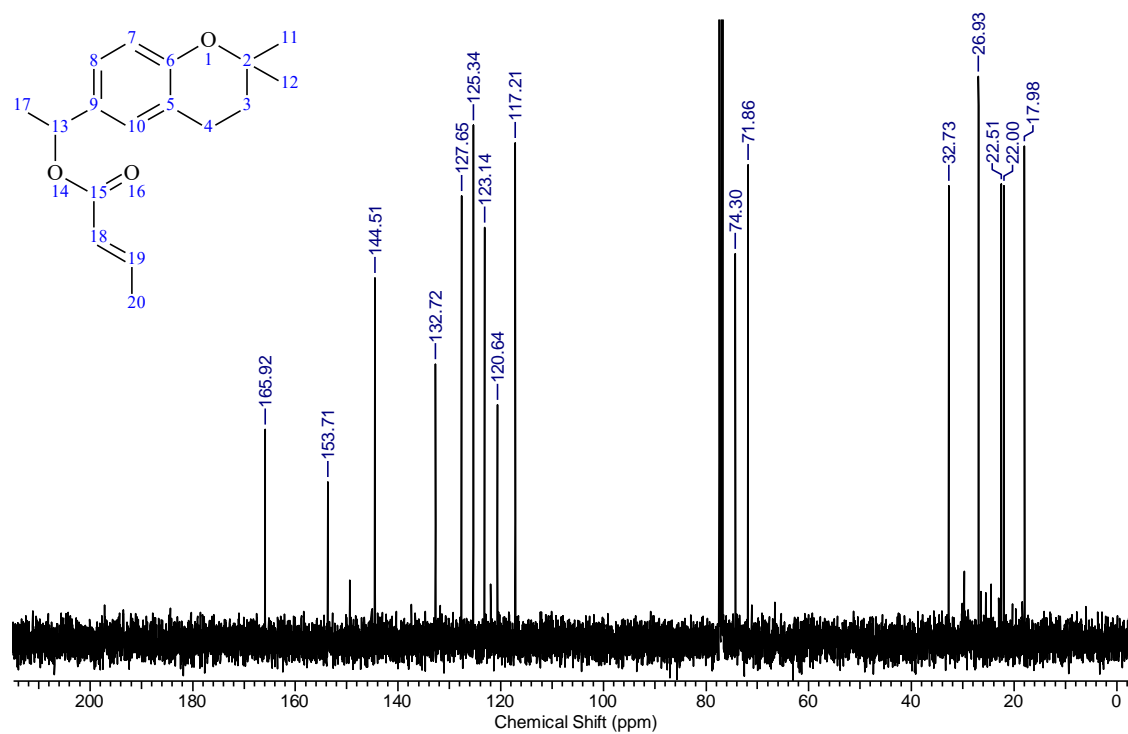
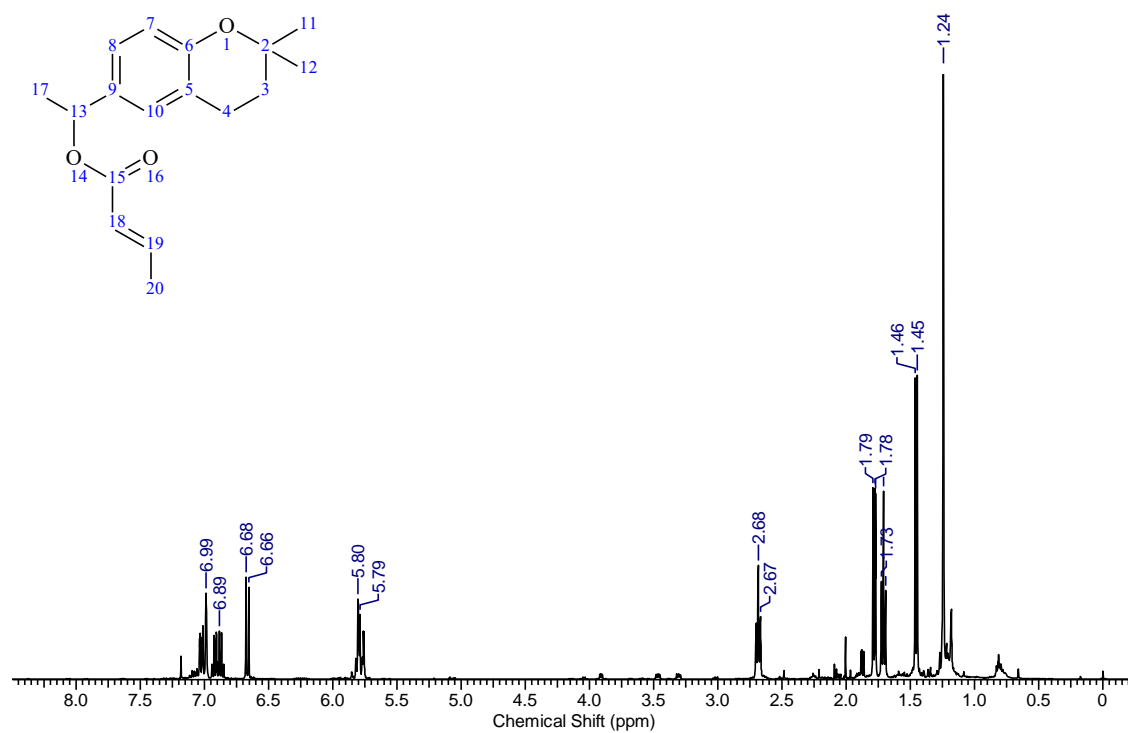


Série 3



APÊNDICE C - RMN de ^1H e ^{13}C do produto 62a da série 1.

APÊNDICE D - RMN de ^1H e ^{13}C do produto 79b da série 2

APÊNDICE E - RMN de ^1H e ^{13}C do produto 82 a da série 3Spectrum: NMR ^{13}C compound 14

APÊNDICE F - Aprovações da comissão de ética no uso de animais.



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais

Resolução

A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex e pela Lei Federal 11.794/08, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 050-2014-1

Professor responsável: Sílvia Dal Bó

Equipe: Paula da Silva Cardoso, Jéssica De Luca Machado, Luan de Souza Ramos

Título: "Avaliação toxicológica de *Calea uniflora* LESS".

*Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA. Foi autorizada a utilização do total de 160 Ratos Wistar de 60 dias pesando aproximadamente 300 g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesc.net.*

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794, has analyzed the following Project:

Protocol number: 050-2014-01

Principal Investigator: Sílvia Dal Bó

Researchers: Paula da Silva Cardoso, Jéssica De Luca Machado, Luan de Souza Ramos

Project title: "Toxicological evaluation of *Calea uniflora* LESS"

*The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.*

Criciúma, 23 de abril de 2014.

Patricia Fernanda Schuck
Patricia Fernanda Schuck
Coordenadora da CEUA



**Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais**

Resolução

A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex e pela Lei Federal 11.794/08, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 066/2014-2

Professor responsável: Sílvia Dal Bó

Equipe: Paula da Silva Cardoso, Luan de Souza Ramos, Renato Panhan, Marília Schutz Borges, Michele Daros de Freitas, Patrícia dos Santos

Título: "Investigação fitoquímica e farmacológica de *Calea uniflora*"

*Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA. Foi autorizada a utilização do total de 540 Camundongos SWISS de 90 dias, pesando aproximadamente 30 g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesc.net.*

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794, has analyzed the following Project:

Protocol number: 066/2014-2

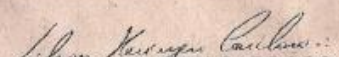
Principal Investigator: Sílvia Dal Bó

Researchers: Paula da Silva Cardoso, Luan de Souza Ramos, Renato Panhan, Marília Schutz Borges, Michele Daros de Freitas, Patrícia dos Santos

Project title: "Pharmacognostic and Phytochemical Investigations of *Calea uniflora*"

*The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.*

Criciúma, 02 de dezembro de 2014.



VILSON HEINZEN CARDOSO
 Coordenador Adjunto da CEUA

APÊNDICE G - Lista de presença do encontro com as agentes da Pastoral da Saúde

Professores UNESC	assinatura
Angela Lima Renato	<i>[Handwritten Signature]</i>
Silene Dal Bo	
Vanilde Catodini Landti	
Colaborador	Assinatura
Ronaldo Remer	<i>[Handwritten Signature]</i>
Acadêmicos UNESC	assinatura
Suelen de Bello da Rosa	Suelen de Bello da Rosa
Beatriz Reiser	Beatriz Reiser
Juliana M. Bonduzan	<i>[Handwritten Signature]</i>
Vanilde C. Zanetti	
Renata Silva Cardoso	RS
Luciana Maria Romo	R
Monique Rezende Caisi	MB
Kuonza Budny Nuno	Kuonza Budny Nuno
Maria S. Salzano	UFS
Residência Multiprofissional	quase Salzano
Lucimara Bento Fernandes	<i>[Handwritten Signature]</i>

Nome Popular	Assinatura	Paróquia/Instituição
Marcos F. Rosso		União antiga
Sônia Irene Savi Zaccaro		União antiga
Suzinha Bento Fernandes	<i>[Handwritten Signature]</i>	União antiga
Rosamaria Scopelacio		São José
Silvia F. Medeiros	<i>[Handwritten Signature]</i>	São José
Jamila ZN Romagnolo	<i>[Handwritten Signature]</i>	Nova União
Mrs da Graça Fernandes	<i>[Handwritten Signature]</i>	Prospera
Clara A. Romano	Clara	IFC - campus Sombrio
Laudes Gabriel Bittencourt	agb	S. Paulo Apóstolo
Mrs Sueli M. Glusi	indulgisi	São José
Lucir Aires Topanetti	L. Topanetti	S. Paulo Apóstolo
Vera Gláucia Botin	Dona Gláucia	S. Paulo Apóstolo
Mrs M. R. Galves	<i>[Handwritten Signature]</i>	S. Paulo Apóstolo
Luciana de Lencina	<i>[Handwritten Signature]</i>	M. Sra. Naturidade
Silvia de Foz de Iguaçu	<i>[Handwritten Signature]</i>	Cardeal Sul

APÊNDICE H - Lista de presença do encontro com a comunidade do Balneário Rincão

 ESTADO DE SANTA CATARINA
MUNICÍPIO DE BALNEÁRIO RINCÃO
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE
ATENÇÃO BÁSICA DE SAÚDE

LISTA DE PRESENÇA
NOVEMBRO AZUL


Roda de Conversa sobre saúde do Homem Rincônense: Prevenção e Vida Saudável.
Palestrante: En^{fa} Mestranda em saúde coletiva Sônia Silveira rocha da Silva

Roda de Conversa sobre Arnica: Contribuição Científica ao Conhecimento Popular do Balneário Rincão.
Palestrante: Paula Silva Cardoso Dr^a da Unesc

Data: 14/11/2018 13:30hs na Secretaria Municipal de Saúde.
Local: AV LEOBERTO LEAL, ANTIGA IGREJA QUADRANGULAR (AO LADO DO RESTAURANTE AVENIDA GRILL)

NOME	ENTIDADE/ESF/ESCOLA	PROFISSÃO	E-MAIL	ASSINATURA
Maria Augusta	Centro	-	-	[assinatura]
Marlene Cardoso	Centro	-	-	[assinatura]
André S. Ribeiro	Bairro do Centro	ACS	-	[assinatura]
Patrícia H. de Almeida	Lagoa dos Freitas	Tec. Enf.	-	[assinatura]
Renata de Aguiar	Área Sul	ACS	-	[assinatura]
Renata de Aguiar	Muroso Sul	Tec. enfermagem	-	[assinatura]
Janete	20 Ma Sul	ACS	-	[assinatura]
Janete	Centro	-	-	[assinatura]
Janete	Centro	-	-	[assinatura]
Paula Silva Cardoso	Japoeira	-	-	[assinatura]
Paula Silva Cardoso	Japoeira	-	-	[assinatura]
Paula Silva Cardoso	Japoeira	-	-	[assinatura]
Paula Silva Cardoso	Japoeira	-	-	[assinatura]
Paula Silva Cardoso	Japoeira	-	-	[assinatura]
Paula Silva Cardoso	Japoeira	-	-	[assinatura]
Paula Silva Cardoso	Japoeira	-	-	[assinatura]

Rua Luiz Maria Julia, nº 970 – Centro – Balneário Rincão – SC – CEP: 88828-000
Telefone: (48) 3468-7234

 ESTADO DE SANTA CATARINA
MUNICÍPIO DE BALNEÁRIO RINCÃO
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE
ATENÇÃO BÁSICA DE SAÚDE

LISTA DE PRESENÇA
NOVEMBRO AZUL

Roda de Conversa sobre saúde do Homem Rincônense: Prevenção e Vida Saudável.
Palestrante: En^{fa} Mestranda em saúde coletiva Sônia Silveira rocha da Silva

Roda de Conversa sobre Arnica: Contribuição Científica ao Conhecimento Popular do Balneário Rincão.
Palestrante: Paula Silva Cardoso Dr^a da Unesc

Data: 14/11/2018 13:30hs na Secretaria Municipal de Saúde.
Local: AV LEOBERTO LEAL, ANTIGA IGREJA QUADRANGULAR (AO LADO DO RESTAURANTE AVENIDA GRILL)

NOME	ENTIDADE/ESF/ESCOLA	PROFISSÃO	E-MAIL	ASSINATURA
Luciana de F. Silveira	Japoeira do Sul	ACS	[email]	[assinatura]
Marcos Hugo Pacheco	ESF Rincão Sul	ACS	-	[assinatura]
Alexsandra Lima Cardoso	ESF Rincão Sul	Tec. Enf.	-	[assinatura]
Luciana Custódio	ESF Rincão Sul	-	-	[assinatura]
Paula de J. Leopoldo	ESF Rincão Sul	Tec. Enf.	-	[assinatura]
Paula de J. Leopoldo	Centro	-	-	[assinatura]
Paula de J. Leopoldo	Centro	ACS	-	[assinatura]
Paula de J. Leopoldo	Centro	-	-	[assinatura]
Paula de J. Leopoldo	Lagoa	-	-	[assinatura]
Paula de J. Leopoldo	Centro	-	-	[assinatura]
Paula de J. Leopoldo	Centro	-	-	[assinatura]
Paula de J. Leopoldo	Centro	-	-	[assinatura]
Paula de J. Leopoldo	Centro	-	-	[assinatura]

Rua Luiz Maria Julia, nº 970 – Centro – Balneário Rincão – SC – CEP: 88828-000
Telefone: (48) 3468-7234



ESTADO DE SANTA CATARINA
MUNICÍPIO DE BALNEÁRIO RINCÃO
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE
ATENÇÃO BÁSICA DE SAÚDE

LISTA DE PRESEÇA
NOVEMBRO AZUL

Roda de Conversa sobre saúde do Homem Rincense: Prevenção e Vida Saudável.
Palestrante: Enª Mestranda em saúde coletiva Sônia Silveira rocha da Silva

Roda de Conversa sobre Arnica: Contribuição Científica ao Conhecimento Popular do Balneário Rincão.

Palestrante: Paula Silva Cardoso Drª da Unesc

Data: 14/11/2018 13:30hs na Secretaria Municipal de Saúde.

Local: AV LEOBERTO LEAL, ANTIGA IGREJA QUADRANGULAR (AO LADO DO RESTAURANTE AVENIDA GRILL)

NOME	ENTIDADE/ESF/ESCOLA	PROFISSÃO	E-MAIL	ASSINATURA
<i>Sônia da Silva</i>	<i>Grupo de Saúde</i>	-	-	<i>Sônia</i>
<i>Roseli Garcia</i>	<i>ESF Pedreiras</i>	<i>ACS</i>	-	<i>Roseli</i>
<i>Dolores Gonçalves Oliveira</i>	<i>ESF Pedreiras</i>	<i>ACS</i>	-	<i>Dolores</i>
<i>Luiz O. Lemos da Silva</i>	<i>Centro</i>	<i>ACS</i>	-	<i>Luiz</i>
<i>EDUARDO DAVIENSKI</i>	<i>PREFEITURA</i>	<i>ASSESSORIA</i>	<i>PREFEITURARINCÃO@GMAIL.COM</i>	<i>Ed</i>
<i>Damaris de Santos</i>	<i>Centro</i>	-	-	<i>Damaris</i>
<i>Isabela de Souza</i>	<i>Centro</i>	<i>ACS</i>	-	<i>Isabela</i>
<i>Paula da Silva</i>	<i>ESF Pedreiras</i>	<i>ACS</i>	<i>psilva@unesc.br</i>	<i>Paula</i>
<i>Maria Regina Faria da Silva</i>	<i>ESF Centro</i>	<i>ACS</i>	-	<i>Maria Regina</i>
<i>Maria M. R. Campes</i>	<i>Centro</i>	-	-	<i>Maria M. R.</i>
<i>Patrícia da Silva</i>	<i>Centro</i>	-	-	<i>Patrícia</i>
<i>Juliana da Silva</i>	<i>Centro</i>	-	-	<i>Juliana</i>
<i>Juliana da Silva</i>	<i>Centro</i>	-	-	<i>Juliana</i>
<i>Michelle da Silva</i>	<i>ESF Lagoa</i>	<i>Enfermeira</i>	<i>jesu@unesc.br</i>	<i>Michelle</i>
<i>Michelle da Silva</i>	<i>ESF Lagoa da Costa</i>	<i>Medica</i>	<i>michelle@unesc.br</i>	<i>Michelle</i>

Rua Luiz Maria Julia, nº 970 – Centro – Balneário Rincão – SC – CEP: 88828-000
Telefone: (48) 3468-7234



ESTADO DE SANTA CATARINA
MUNICÍPIO DE BALNEÁRIO RINCÃO
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE
ATENÇÃO BÁSICA DE SAÚDE

LISTA DE PRESEÇA
NOVEMBRO AZUL

Roda de Conversa sobre saúde do Homem Rincense: Prevenção e Vida Saudável.
Palestrante: Enª Mestranda em saúde coletiva Sônia Silveira rocha da Silva

Roda de Conversa sobre Arnica: Contribuição Científica ao Conhecimento Popular do Balneário Rincão.

Palestrante: Paula Silva Cardoso Drª da Unesc

Data: 14/11/2018 13:30hs na Secretaria Municipal de Saúde.

Local: AV LEOBERTO LEAL, ANTIGA IGREJA QUADRANGULAR (AO LADO DO RESTAURANTE AVENIDA GRILL)

NOME	ENTIDADE/ESF/ESCOLA	PROFISSÃO	E-MAIL	ASSINATURA
<i>Sônia da Silva</i>	-	-	-	<i>Sônia</i>
<i>Guilherme</i>	-	-	-	<i>Guilherme</i>
<i>Paula da Silva</i>	-	-	-	<i>Paula</i>
<i>Paula da Silva</i>	<i>UNESC</i>	<i>PROFESSORA</i>	-	<i>Paula</i>
<i>Michelle da Silva</i>	<i>ESF Lagoa</i>	<i>ACS</i>	<i>ll</i>	<i>Michelle</i>

Rua Luiz Maria Julia, nº 970 – Centro – Balneário Rincão – SC – CEP: 88828-000
Telefone: (48) 3468-7234