

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Isolamento e estudo da interação da mangiferina e derivados sintéticos
com albumina sérica humana**

DOUGLAS CHAVES DE ALCÂNTARA PINTO

2017



UFRRJ

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ISOLAMENTO E ESTUDO DA INTERAÇÃO DA MANGIFERINA
E DERIVADOS SINTÉTICOS COM ALBUMINA SÉRICA
HUMANA**

DOUGLAS CHAVES DE ALCÂNTARA PINTO

Sob a Orientação do Professor

Prof. Dr. Marco Edilson Freire de Lima

Co-orientação

Prof^a. Dr^a Rosane Nora Castro

Dissertação de mestrado submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Orgânica (Química Medicinal).

Seropédica, Rio de Janeiro

Maio de 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C512 Chaves de Alcântara Pinto, Douglas , 29/10/1987-
i Isolamento e estudo da interação da mangiferina e
derivados sintéticos com albumina sérica humana /
Douglas Chaves de Alcântara Pinto. - 2017.
196 f.

Orientador: Marco Edilson Freire de Lima.
Coorientadora: Rosane Nora Castro.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em
Química, 2017.

1. Mangiferina. 2. albumina sérica humana. 3.
docking molecular. 4. atividade citotóxica. I. Freire
de Lima, Marco Edilson , 1965-, orient. II. Nora
Castro, Rosane, 1965-, coorient. III Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós
graduação em Química. IV. Título.

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

DOUGLAS CHAVES DE ALCÂNTARA PINTO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Química Orgânica (Química Medicinal)

Dissertação aprovada em 5 de maio de 2017.

Prof. Dr. Marco Edilson Freire de Lima
(DEQUIM-ICE-UFRRJ)
(Orientador e Presidente)

Prof^a. Dr^a. Wanda Pereira de Almeida
(IQ-UNICAMP)

Prof. Dr. Eduardo Salustiano Jesus dos Santos
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
(IBCCF-UFRJ)

Prof. Dr. Cedric Stephan Graebin (Membro Suplente)
(DEQUIM-ICE-UFRRJ)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por sempre estar ao meu lado guiando cada passo que dou em minha trajetória de vida, por me sustentar e instruir em cada momento de dificuldade, também o agradeço por me presentear com pais maravilhosos que sempre me apoiaram em todas as minhas escolhas, ainda que às vezes nem eu mesmo fosse capaz de acreditar em mim mesmo, pois eles nunca perderam a fé e esperança em mim. Agradeço de todo coração a minha mãe Maria Cristina e ao meu pai Dídimo pelo respeito, fé, carinho e amor, é graças a eles pude crescer e adquirir valores fundamentais para me torna um ser humano justo, humilde e carinhoso para com o próximo. Com eles aprendi que o segredo da vida esta em Amar ao Senhor Deus acima de todas as coisas e ao seu irmão, para que dessa forma eu tenha Paz, Alegria e Amor em meu coração.

Agradeço aos meus irmãos Wallace e Patrik pelos incentivos, e meu agradecimento em especial à minha esposa Mirian Cristina por ser minha fiel companheira e me dar total apoio em todas as situações e, principalmente por me auxiliar nas decisões mais difíceis, a ela dedico todo meu carinho e amor.

A todos os meus colegas e amigos de laboratório LaQmed, LaQmel (Laboratório 48 da UFRRJ): Paulo Pitasse, Larissa, Juliana, Lucas, Dominique, Luiza, Raissa e Fernanda.

À professora Débora Decotè Ricardo, por compartilhar seus conhecimentos nas áreas de microbiologia e imunologia e auxílio nos estudos biológicos.

Meu grande agradecimento ao amigo Otávio Augusto Chaves, o qual contribui significativamente para o desenvolvimento deste trabalho através de seus conhecimentos na área de estudo fotofísico.

Aos membros da banca pela disponibilidade em aceitar o convite.

À CAPES, CNPq e FAPERJ pelo auxílio financeiro deste e outros projetos.

Por fim, meu agradecimento em especial aos meus eternos mestres, Professores Rosane Nora Castro e Marco Edilson Freire de Lima, muito obrigado por acreditarem em mim, na minha capacidade, espero evoluir cada vez mais e que um dia possa dar muito orgulho a vocês, mais do que ajudarem na minha formação vocês também contribuíram para reforçar ainda mais meus valores pessoais, pois pude observar em ambos algo que considero vital e belo nos seres humanos, a forma com que tratam as pessoas com carinho, respeito e amor, sem fazer distinção alguma. Sozinho não seria

capaz, por isso, dedico este trabalho a cada uma dessas pessoas, jamais me esquecerei de cada um de vocês, Amo todos vocês meus amigos do fundo do coração.

RESUMO

CHAVES-ALCÂNTARA-PINTO, Douglas. **Isolamento e estudo da interação da mangiferina e derivados sintéticos com albumina sérica humana**. 2017, 179p. Dissertação (Mestrado em Química, área de concentração Química Orgânica - Química Medicinal). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

A mangiferina é um composto polifenólico isolada naturalmente de extratos de folhas de *Mangifera indica*, sendo a manga uma das frutas mais apreciadas em todo o mundo. Além da importância econômica da *M. indica*, em termos da comercialização de seus frutos e produtos, a mangiferina possui diferentes atividades farmacológicas, destacando-se atividade antioxidante, anti-inflamatória, imunomodulatória, antitumoral, antiviral, anti-helmíntica e antibacteriana. Suas características estruturais, aliadas à abundância da mangiferina no material vegetal e a facilidade de sua extração, a qualificam como um produto natural extremamente atraente para avaliação em diferentes modelos biológicos, além de tornar possível o seu uso como material de partida, visando o planejamento de derivados com potenciais aplicações farmacológicas. Neste trabalho a mangiferina, uma xantona glicosilada, foi o composto majoritário obtido, após processo de extração das folhas da *Mangifera indica*, através de Soxhlet e micro-ondas, sendo caracterizada pelo seu ponto de fusão, espectros no infravermelho e de ^1H NMR e ^{13}C RMN. A quantificação de mangiferina nos extratos e o seu grau de pureza de 99,9% foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo. A capacidade antioxidante *in vitro* do extrato foi realizado pelo método de captura de radical (DPPH). A modificação estrutural da mangiferina ocorreu através da reação de acetilação, desacetilação seletiva, alquilação e benzilação os produtos sintetizados foram devidamente caracterizados por ponto fusão, espectrometria de RMN, infravermelho, CLAE-DAD e espectrometria de massas de alta resolução. A interação entre mangiferina (MGF) e seus derivados com albumina sérica humana em solução foi investigada por estudos espectroscópicos (fluorescência e dicroísmo circular) e computacional (*docking* molecular). Os compostos foram avaliados quanto a sua capacidade citotóxica *in vitro* frente à linhagem de monócito humanos THP-1.

Palavras-chaves: Mangiferina, albumina sérica humana, *docking* molecular, atividade citotóxica.

ABSTRACT

CHAVES-ALCÂNTARA-PINTO, Douglas. **Isolamento, caracterização e derivatização da mangiferina, xantona C-glicosilada, isolada de *Mangifera indica*.** 2017, Xp. Dissertação (Mestrado em Química, área de concentração Química Orgânica - Química Medicinal). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

Mangiferin is a polyphenolic compound naturally isolated from leaf extracts of the mango tree (*Mangifera indica*), with mango being one of the most appreciated fruits in the world. In addition to the economic importance of *M. indica*, in terms of the commercialization of its fruits and products, mangiferin has different pharmacological activities, especially antioxidant, anti-inflammatory, immunomodulatory, antitumor, antiviral, anthelmintic and antibacterial activity. Its structural characteristics, together with the abundance of mangiferin in the vegetal material and the ease of its extraction, qualify it as an extremely attractive natural product for evaluation in different biological models, besides making possible its use as starting material, aiming the planning of Derivatives with potential pharmacological applications. In this work the mangiferin, a glycosylated xanthone, was the major compound obtained after the extraction of the leaves of *Mangifera indica*, by Soxhlet and microwave, characterized by its melting point, infrared spectra and ^1H and ^{13}C NMR. The quantification of mangiferin in the extracts and their purity of 99.9% was determined by high performance liquid chromatography with a diode arrangement detector. The in vitro antioxidant capacity of the extract was performed by the radical capture method (DPPH). The structural modification of mangiferin occurred through the reaction of acetylation, selective acetylation, alkylation and benzoylation. The synthesized products were suitably characterized by melting point, NMR spectrometry, infrared, HPLC-DAD and high resolution mass spectrometry. The interaction between mangiferin (MGF) and its derivatives with human serum albumin solution was investigated by spectroscopic (fluorescence and circular dichroism) and computational (molecular docking) studies. The compounds were evaluated for their cytotoxic capacity in vitro against the human monocyte line THP-1.

Key words: Mangiferin, human serum albumin, molecular docking, cytotoxic activity.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Participação dos produtos naturais na área de desenvolvimento de fármacos.....	2
Figura 2. Estruturas da quinina e da penicilina.....	3
Figura 3. Esquema da estrutura de um anel xantônico.....	4
Figura 4. Alguns representantes de cada classe das xantonas.....	5
Figura 5 Atividades biológicas dexantonas (adaptado de El-Seedi et al.,2010).....	8
Figura 6. Xantonas mono-oxigenadas.....	10
Figura 7. Estrutura das xantonas bisoxigenadas.....	11
Figura 8. <i>Mangifera indica</i> L. (mangueira) (http://www.vilamada.com.br/conteudo/vila-viva/arvores_praca.htm -acesso:01/05/2016).....	13
Figura 9. Estrutura química da mangiferina extraída de <i>M. indica</i>	14
Figura 10. Derivados sintetizados a partir da mangiferina.....	28
Figura 11. Representação dos diversos níveis organizacionais de uma proteína. Adaptado de Berg <i>et al.</i> , 2008.....	29
Figura 12. Da esquerda para a direita, estrutura cristalográfica da BSA (pdb: 3V03) e ASH (pdb: 1N5U), respectivamente. Nessas estruturas são mostradas a distinção de seus domínios I (castanho), II (verde) e III (cinza). Na ASB o triptofano Trp-134 está localizado no domínio I (castanho) e o Trp-212 no domínio II (verde), já na ASH o Trp-214 está localizado no domínio II (verde).....	31
Figura 13. Aparelho de Soxhlet utilizado na extração da mangiferina.....	35
Figura 14. Reator de microondas <i>CEM Discover System</i> , utilizado na extração da mangiferina.....	36
Figura 15. Curva analítica das médias das concentrações da solução de quercetina <i>versus</i> as leituras de absorbâncias (415 nm), após o ensaio com cloreto de alumínio.....	40
Figura 16. Gráfico que relaciona o percentual de atividade antioxidante e a concentração da quercetina.....	42
Figura 17. Curva analítica das médias das concentrações da solução etanólica da MGF <i>versus</i> as áreas nos cromatogramas.....	43

Figura 18. Folhas de mangueira de <i>Mangifera indica</i> L. (a), folhas trituradas (b), mangiferina isolada (c), estrutura da mangiferina (d).....	59
Figura 19. Cromatograma e espectro no UV da mangiferina purificada a partir de folhas de <i>M. indica</i> . Condições: Coluna C18, detector de arranjo de diodos (254nm), fase móvel- solvente A (água com 1% AcOH) e B (MeOH).....	60
Figura 20. Cromatogramas de CLAE-DAD do padrão de mangiferina (preto) e dos extratos da folha de <i>M. indica</i> : Água Mãe Etanólica MW (rosa), Água Mãe Etanólica Soxhlet (azul); Ext. Etanólico MW (marrom); Ext. Etanólico Soxhlet (verde).....	68
Figura 21. Representação dos principais acoplamentos observados no experimento de HMBC.....	82
Figura 22. Resultado do estudo de docagem molecular para o maior valor de pontuação obtido para ASH:MGF no sítio de Sudlow I (função <i>ChemPLP</i>). Resíduos de aminoácidos selecionados, ASH e MGF estão representados em amarelo, verde e cor-de-rosa, respectivamente. Cor dos elementos químicos: nitrogênio, oxigênio e hidrogênio em azul, vermelho e branco, respectivamente.....	84
Figura 23. Resultado do estudo de docagem molecular para o maior valor de pontuação obtido para ASH:AcMGF no sítio de Sudlow I (função <i>ChemPLP</i>). Resíduos de aminoácidos selecionados, ASH e AcMGF estão representados em amarelo, verde e castanho, respectivamente. Cor dos elementos químicos: nitrogênio, oxigênio e hidrogênio em azul, vermelho e branco, respectivamente.....	85
Figura 24. Resultado do estudo de docagem molecular para o maior valor de pontuação obtido para ASH:PAcMGF no sítio de Sudlow I (função <i>ChemPLP</i>). Resíduos de aminoácidos selecionados, ASH e PAcMGF estão representados em amarelo, verde e ciano, respectivamente. Cor dos elementos químicos: nitrogênio, oxigênio e hidrogênio em azul, vermelho e branco, respectivamente.....	87
Figura 25. Resultado do estudo de docagem molecular para o maior valor de pontuação obtido para ASH:PAcMGFMe no sítio de Sudlow I (função <i>ChemPLP</i>). Resíduos de aminoácidos selecionados, ASH e PAcMGFMe estão representados em amarelo, verde e bege, respectivamente. Cor dos elementos químicos: nitrogênio, oxigênio e hidrogênio em azul, vermelho e branco, respectivamente.....	88
Figura 26. Resultado do estudo de docagem molecular para o maior valor de pontuação obtido para ASH:PAcMGFEt no sítio de Sudlow I (função <i>ChemPLP</i>). Resíduos de aminoácidos selecionados, ASH e PAcMGFEt estão representados em amarelo, verde e	

laranja, respectivamente. Cor dos elementos químicos: nitrogênio, oxigênio e hidrogênio em azul, vermelho e branco, respectivamente.....	89
Figura 27. Resultado do estudo de docagem molecular para o maior valor de pontuação obtido para ASH:PAcMGFBz no sítio de Sudlow I (função <i>ChemPLP</i>). Resíduos de aminoácidos selecionados polares, resíduos de aminoácidos selecionados apolares, ASH e PAcMGFBz estão representados em amarelo, cor-de-rosa, verde e cinza, respectivamente. Cor dos elementos químicos: nitrogênio, oxigênio e hidrogênio em azul, vermelho e branco, respectivamente.....	91
Figura 28. Níveis de energia para os orbitais moleculares do formaldeído (HOMO: orbital molecular ocupado de mais alta energia; LUMO: orbital molecular desocupado de mais baixa energia) (VALEUR, 2001).....	93
Figura 29. Estrutura molecular do formaldeído.....	93
Figura 30. Estrutura de fenilalanina (phe), tirosina (tyr) e triptofano (trp).....	94
Figura 31. Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH sem e com adições sucessivas de MGF. $C_{ASH} = 1,0 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{MGF} = 0,17; 0,33; 0,50; 0,66; 0,83; 0,99; 1,15$ e $1,32 \times 10^{-5}$ mol/L, tamponada com PBS (pH= 7,4).....	95
Figura 32. Espectro de absorção no UV-Vis de MGF e seus derivados sintéticos. $C_{substâncias} = 1,32 \times 10^{-5}$ mol/L.....	96
Figura 33. Espectros de absorção no UV-Vis de MGF em etanol e ASH, ASH:MGF em solução tampão de PBS (pH = 7,4). $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{MGF} = 1,32 \times 10^{-5}$ mol/L.....	97
Figura 34. Distinção entre os estados singlete e triplete, usando o formaldeído como exemplo (VALEUR, 2001).....	98
Figura 35. Diagrama de Jablonsky. Esse esquema representa os níveis de energia eletrônicos singlete (S_0 , S_1 e S_2), triplete (T_1), e vibracionais (0, 1 e 2) de uma molécula. As setas dirigidas para cima indicam absorção de radiação ($h\nu_A$); as setas dirigidas para baixo, emissão de radiação ($h\nu_F$ e $h\nu_P$ - <i>Fluorescência e Fosforescência</i> , respectivamente); setas pontilhadas são para conversão interna.....	99
Figura 36. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280\text{nm}$) do fluoróforo interno da ASH (Trp-214) e sua supressão pela adição de MGF, em solução tampão de PBS	

(pH= 7,4). $C_{ASH} = 1,0 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{MGF} = 0,17; 0,33; 0,50; 0,66; 0,83; 0,99; 1,15$ e $1,32 \times 10^{-5}$ mol/L, a $T = 310K$101

Figura 37. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280nm$) pela (MGF) a diferentes temperaturas. $C_{ASH} = 1.00 \times 10^{-5}$ mol/L e pH = 7,4.....104

Figura 38. Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência ASH:MGF, a diferentes temperaturas. $C_{ASH} = 1.00 \times 10^{-5}$ mol/L e pH = 7,4.....105

Figura 39. Gráfico de Van't Hoff para associação ASH: MGF a três temperaturas diferentes.....108

Figura 40. Estrutura cristalográfica da ASH (código pdb: 1N5U) com distinção dos subdomínios. O resíduo Trp-214 está localizado no subdomínio IIA (amarelo). Adaptado de CHAVES, 2017.....109

Figura 41. Gráfico de competição para MGF proteína ASH e marcadores ibuprofeno e varfarina a temperatura 310K110

Figura 42. Semelhança estrutural entre as estruturas químicas dos marcadores para estudo de competição com a xantona111

Figura 43. Espectros de dicroísmo circular para ASH pH=7.4 em mangiferina (MGF), nas concentrações $C_{MGF} = 0,33; 0,66; 0,99$ e $1,32 \times 10^{-5}$ mol/L, $C_{HSA} = 1.00 \times 10^{-6}$ mol/L a 310K113

Figura 44. Avaliação da viabilidade celular em monócitos humanos THP-1 tratados com AcMGF (2-C- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1,3,6,7-tetraacetoxi-9H-xanten-9-ona.) nas concentrações indicadas. Os monócitos foram cultivados em triplicatas na concentração de 3×10^5 células.mL⁻¹. As células foram tratadas por 48h com diferentes concentrações do composto variando de 1 a 40 $\mu g.mL^{-1}$. A viabilidade celular foi obtida pelo método de exclusão, utilizando azul de Trypan. Os valores de $P \leq 0,005$ foram considerados estatisticamente significativos. Dados representativos de dois experimentos independentes.....115

Figura 45. Reação colorimétrica de formação do derivado formazana a partir do sal de XTT catalisada pelo PMS.....116

Figura 46. Avaliação da viabilidade celular em monócitos humanos THP-1 tratados com MGF, AcMGF, PAcMGF, PAcMGFMe e PAcMGFBz nas concentrações indicadas. Os monócitos foram cultivados em triplicatas na concentração de 3×10^5

células.mL⁻¹. As células foram tratadas por 48h, nas respectivas concentrações 1, 10, 20 e 40 µg. mL⁻¹. A viabilidade celular foi obtida pelo método colorimétrico, utilizando reagente XTT. Dados representativos de dois experimentos independentes.....**118**

Figura 47. Reação de redução do MTT à respectiva formazana.....**119**

Figura 48. Ensaio colorimétrico, realizado na ausência de células, onde o meio de cultura foi tratado com mangiferina e seus derivados, nas concentrações de 1-40µg.mL⁻¹. A leitura foi realizada após 4h de incubação com o reagente colorimétrico (XTT) e adição de PMS. Dados representativos de dois experimentos independentes.....**119**

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Rota biossintética de xantonas.....	19
Esquema 2. Degradação de xantonas glicosiladas.....	20
Esquema3. Alternativa biossintética de xantonas em culturas celulares.....	22
Esquema 4. Metodologia de síntese da mangiferina.....	23
Esquema 5. Síntese total da mangiferina.....	25
Esquema 6. Síntese de derivados aminados via reação de Mannich.....	26
Esquema 7. Reação de preparação de derivados <i>O</i> -benzilados.....	27
Esquema 8. Fluxograma de extração da mangiferina das folhas de <i>Mangifera indica</i> L.....	37
Esquema 9. Síntese do derivado acetilado <u>1</u>	45
Esquema 10. Síntese do derivado <u>2</u>	47
Esquema 11. Síntese do derivado <u>3</u>	49
Esquema 12. Síntese do derivado <u>4</u>	51
Esquema 13. Síntese do derivado <u>5</u>	53
Esquema 14. Reação para obtenção do derivado peracetilado octacetil MGF (1).....	70
Esquema 15. Análise retróssintética de neomangiferina (1).....	73
Esquema 16. Síntese do 3,6-dibenzil éter 3 passo A	75
Esquema 17. Síntese do 3,6-dibenzil éter 3 passo B	76
Esquema 18. Síntese do derivado (PAcMGF) (2).....	77

Esquema 19. Planejamento dos derivados da mangiferina acetilados na porção glicosídica e diferentemente alquilados nas posições desacetiladas.....	78
Esquema 20. Síntese do derivado (PAcMGFMe) (3).....	78
Esquema 21. Síntese do derivado (PAcMGFEt) (4).....	79
Esquema 22. Síntese do derivado (PAcMGFBz) (5).....	80

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Deslocamento químico de RMN ¹ H e RMN ¹³ C (500MHz, DMSO) da mangiferina isolada comparada com os dados da literatura (500MHz, C ₅ D ₅ N).....	44
Tabela 2. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e RMN ¹³ C (500MHz, CDCl ₃) para <u>1</u>	46
Tabela 3. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e RMN ¹³ C (400MHz, MeOD) para <u>2</u>	48
Tabela 4. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e RMN ¹³ C (500MHz, CDCl ₃) para <u>3</u>	50
Tabela 5. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e RMN ¹³ C (500MHz, CDCl ₃) para <u>4</u>	52
Tabela 6. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e RMN ¹³ C (500MHz, CDCl ₃) para <u>5</u>	55
Tabela 7. Principais técnicas empregadas com valores de massas e rendimentos do produto natural, mangiferina, obtidos após extrações.....	63
Tabela 8. Valores médios e os desvios padrões dos teores de fenólicos e flavonoides totais dos extratos.....	66
Tabela 9. Valores médios (n=3) dos teores de mangiferina nos extratos.....	67
Tabela 10. Valores médios e os desvios padrões das atividades antioxidantes dos extratos de <i>M. indica</i> . e da mangiferina.....	69
Tabela 11. Principais resíduos de aminoácidos no sítio de Sudlow I da ASH, e suas respectivas interações e distância com o ligante MGF.....	84
Tabela 12. Principais resíduos de aminoácidos no sítio de Sudlow I da ASH, e suas respectivas interações e distância com o ligante AcMGF.....	86
Tabela 13. Principais resíduos de aminoácidos no sítio de Sudlow I da ASH, e suas respectivas interações e distância com o ligante PAcMGF.....	87

Tabela 14. Principais resíduos de aminoácidos no sítio de Sudlow I da ASH, e suas respectivas interações e distância com o ligante PAcMGFMe.....	88
Tabela 15. Principais resíduos de aminoácidos no sítio de Sudlow I da ASH, e suas respectivas interações e distância com o ligante PAcMGFet.....	90
Tabela 16. Principais resíduos de aminoácidos no sítio de Sudlow I da ASH, e suas respectivas interações e distância com o ligante PAcMGFBz.....	91
Tabela 17. Constante de supressão Stern-Volmer (K_{sv} , L/mol), taxa de constante de supressão (K_q , L/mol) e constante de ligação modificada de supressão Stern-Volmer (K_a , L/mol) para ASH: MGF e Derivados, a 296K, 303K e 310K.....	106
Tabela 18. Parâmetros termodinâmicos (ΔH° , ΔS° , ΔG°) para ASH:MGF e Derivados em três temperaturas.....	108
Tabela 19. Constante de associação (K_a), para ASH: Marcadores: MGF e Derivados, à 310K.....	110
Tabela 20. Porcentagem de α -hélice para estrutura secundária de ASH após ligação com MGF e AcMGF. $C_{ASH} = 1.00 \times 10^{-6} M$, pH = 7.4 a temperatura T = 310K.....	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

MGF = mangiferina (2-*C-β-D*-glicopiranosil-1,3,6,7-tetraidroxixantona)
AcMGF = 2-*β-D*-tetraacetoxiglicopiranosil-1,3,6,7-tetraacetoxixantona
PAcMGF = 2-*β-D*-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-hidroxixantona
PAcMGFMe = 2-*β-D*-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-trimetoxixantona
PAcMGFEt = 2-*β-D*-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-trietoxixantona
PAcMGFBz = 2-*β-D*-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-triebenzilxantona
SE_{AR} = Substituição eletrofílica aromática
TCA = Ciclo do Ácido Tricarboxílico
ETC = Cadeia de Transporte de elétrons
TNF = fator de necrose tumoral
NF-κB = fator nuclear kappa B
ASH = Albumina do soro humano
CLAE-DAD = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos
DMAP = 4-dimetilaminopiridina
CCDA = Cromatografia em camada delgada analítica
CD = Dicroísmo circular
DPPH = 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
CE₅₀ = Concentração efetiva de 50%
CI₅₀ = Concentração Inibitória de 50%
DMSO = Dimetilsulfóxido
EMAR/ES⁺ = Espectrometria de Massa de Alta Resolução com ionização por *Eletronspray* no modo positivo
M^{+•} = Íon Molecular
Hz = Hertz
IV = Infravermelho
PBS = Solução Tampão de Fosfato
P.F. = Ponto de fusão
PN = Produto Natural
RMN^{1H} = Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN^{13C} = Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
HMBC = do inglês (*heteronuclear multiple bond correlation*)
HSQC = do inglês (*heteronuclear single quantum coherence*)
COSY = do inglês (*correlation spectroscopy*)
ppm = parte por milhão
δ = deslocamento químico
v = estiramento
s = simpleto
d = duplete
dd = duplo duplete
t = tripleto

λ = comprimento de onda

SFB = Soro Fetal Bovino

XTT = 2,3-Bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazol-5-carboxanilida

PDB = Banco de dados de proteínas

Trp-214 = Resíduo de aminoácido triptofano-214

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Relevância dos produtos naturais no desenvolvimento de novos compostos com propriedades farmacológicas.....	1
1.2- Produto natural xantona e sua classificação.....	3
1.3- Propriedades biológicas das xantonas.....	7
1.4- <i>Mangifera indica</i> L (Mangueira).....	11
1.5- A Mangiferina.....	14
1.6- Propriedades antitumorais da mangiferina.....	15
1.7- Metodologias de extração da mangiferina.....	17
2- BIODIVERSIDADE DA MANGIFERINA.....	18
2.1- Síntese da mangiferina.....	22
2.2- Síntese de derivados de mangiferina.....	25
3- Importância Biológica das Albuminas Séricas.....	28
4-OBJETIVOS.....	32
4.1-Objetivos Específicos.....	32
5- PARTE EXPERIMENTAL	33
5.1- Materiais e Métodos.....	33
5.1.2- Folhas de <i>Mangifera indica</i> L.....	34
5.1.3- Extração e isolamento de mangiferina das folhas de mangueira com Soxhlet.....	34
5.1.4- Extração da mangiferina com uso de reator de Micro-ondas.....	36
5.1.5- Extração da mangiferina com uso de Ultrassom e Micro-ondas.....	36
5.1.6- Determinação de fenólicos totais nos extratos com reagente de Folin-Denis.....	37
5.1.7- Preparo do reagente de Folin-Denis.....	38
5.1.8- Preparo da curva analítica do ácido gálico.....	38
5.1.9- Determinação de flavonóides totais nos extratos com cloreto de alumínio.....	39
5.2- Preparo da curva analítica com quercetina.....	39
5.2.1- Avaliação da capacidade antioxidante através do método DPPH.....	40
5.2.2- Quantificação de mangiferina nos extratos das folhas de <i>M. indica</i> por CLAE-DAD.....	42
5.2.3- Caracterização Estrutural da Mangiferina.....	43
5.2.3.1- Modificação Estrutural da Mangiferina (Síntese de derivados).....	45
5.2.3.2- Síntese de 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1,3,6,7-tetraacetoxixantona <u>1</u>	45
5.2.3.3- Síntese de 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-hidroxixantona <u>2</u>	47
5.2.3.4- Síntese de 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-trimetoxixantona <u>3</u>	49
5.2.3.5- Síntese de 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-trietoxixantona <u>4</u>	51
5.2.3.6- Síntese de 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-tribenzilxantona <u>5</u>	53

5.2.4- Determinação da Fluorescência por Espectroscopia.....	56
5.2.5- Metodologia para espectroscopia de dicroísmo circular.....	56
5.2.6- Metodologia para estudos de docking molecular.....	57
5.2.7-Ensaio biológico de citotoxicidade frente a linhagem de monócitos humanos THP-1.....	57
6- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
6.1- Isolamento e caracterização da mangiferina das folhas de <i>Mangifera indica</i> L.....	58
6.1.2- Determinação do teor de fenólicos e flavonoides totais.....	64
6.1.3 - Quantificação da mangiferina nos extratos etanólico.....	66
6.1.4- Avaliação da Capacidade Antioxidante <i>in vitro</i>	68
6.1.5- Síntese de derivados da mangiferina.....	70
6.1.5.1- Síntese do derivado 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1,3,6,7-tetraacetoxixantona (AcMGF).....	70
6.1.5.2- Síntese do derivado 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-hidroxixantona (PAcMGF).....	72
6.1.5.3-Preparação dos derivados 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-trialquilxantona (PAcMGF-alquil).....	78
6.1.5.4-Síntese do derivado 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-trimetoxixantona (PAcMGFMe).....	78
6.1.5.5-Síntese do derivado 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-trietoxixantona (PAcMGFet).....	79
6.1.5.6-Síntese do derivado 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-tribenzilxantona (PAcMGFBz).....	80
6.2 - Estudos de docking molecular.....	82
6.2.1 - Estudo Computacional da Interação entre ASH com MGF e Derivados.....	82
6.2.2 - Interação entre ASH com 2-C- β -D-glicopiranosil- 1,3,6,7-tetraidroxixantona (MGF).....	83
6.2.3 - Interação entre ASH com 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1,3,6,7-tetraacetoxixantona (AcMGF).....	84
6.2.4-Interação entre ASH com 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-hidroxixantona (PAcMGF).....	86
6.2.5 - Interação entre ASH com 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-trimetoxixantona (PAcMGFMe).....	87
6.2.6 - Interação entre ASH com 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-trietoxixantona (PAcMGFet).....	89
6.2.7 - Interação entre ASH com 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-tribenzilxantona (PAcMGFBz).....	90
6.3- Estudos espectroscópicos.....	92
6.3.1- Absorção de Luz no Ultravioleta-Visível (UV-Vis).....	92
6.3.2- Estudos Espectroscópicos de Emissão de Fluorescência.....	97
6.3.3- Absorção de Luz Circularmente Polarizada (Dicroísmo circular - DC) – Cálculo da Porcentagem de Estrutura de α -Hélice.....	111
6.4- Avaliação biológico.....	115
6.4.1- Ensaio de toxicidade do derivado peracetilado (AcMGF) frente à linhagem de monócitos humanos THP-1, com utilização dos reagentes colorimétricos Azul de Trypan e XTT.....	115
7- CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	120
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122
9- ANEXOS.....	140

1-INTRODUÇÃO

1.1-Relevância dos produtos naturais no desenvolvimento de novos compostos com propriedades farmacológicas

O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do planeta. As pesquisas envolvendo o conhecimento das substâncias oriundas do metabolismo especial de diferentes organismos vivos, presentes nos diferentes biomas brasileiros, principalmente dos vegetais, tem despertado um grande interesse tanto na academia quanto no setor produtivo, devido ao grande potencial destas moléculas atuarem na modulação de diferentes fenômenos biológicos (PINTO, 2002; HOSTETTMANN, 2003). Como a crescente demanda por insumos de origem natural pela indústria farmacêutica, tanto para o desenvolvimento e produção de novos fitofármacos, quanto no uso de produtos isolados como matérias-primas na síntese de novas moléculas com perfil farmacológico otimizado (SIMÕES & SCKENKEL, 2002), torna-se de vital importância à valorização da biodiversidade e preservação de espécies e a diminuição da degradação ambiental.

O isolamento e a caracterização de moléculas de origem vegetal, notadamente aquelas que ocorrem em quantidades adequadas para uso direto, ou ainda como matérias-primas para a síntese de novos derivados, são uma das principais vias para o desenvolvimento de novos fármacos (KADAM, 2013). Notadamente, as transformações químicas realizadas na estrutura destes produtos naturais têm como objetivo a otimização das atividades biológicas originais exibidas pelo mesmo, ou ainda a minimização de algum efeito tóxico indesejável. Outra razão para o uso de modificações estruturais envolve a melhoria do perfil farmacocinético de uma determinada molécula (HOSTETTMANN, 2003). A importância dos produtos naturais para a indústria farmacêutica pode ser visualizada a partir dos dados do trabalho de Newman e Cragg, que no ano de 2016 publicaram um levantamento onde é descrito que do total de 1.562 novos fármacos introduzidos no mercado entre os anos de 1981 e 2014, um total de 1.211 foram micromoléculas de origem natural, sintética ou semissintética (NEWMAN & CRAGG, 2016). Estas novas micromoléculas foram agrupadas por indicação terapêutica e por fonte de origem (**Figura 1**). A análise dos números levantados neste trabalho deixa clara a expressiva participação dos produtos naturais, direta ou indiretamente, no desenvolvimento destes novos fármacos. Por exemplo: na área dos antitumorais, de um total de 174 novas micromoléculas introduzidas para esta aplicação terapêutica, apenas 35,06 % (61 moléculas) não tiveram

a participação direta ou indireta de produtos naturais no seu planejamento. As demais 113 micromoléculas (64,94%) introduzidas como antitumorais foram oriundas de produtos naturais ou derivados semissintéticos de produtos naturais; ou derivados sintéticos que tiveram seus farmacóforos planejados a partir do conhecimento da atividade descrita para produtos naturais; ou ainda substâncias de origem sintética, que de alguma forma mimetizam produtos naturais (NEWMAN & CRAGG, 2016).

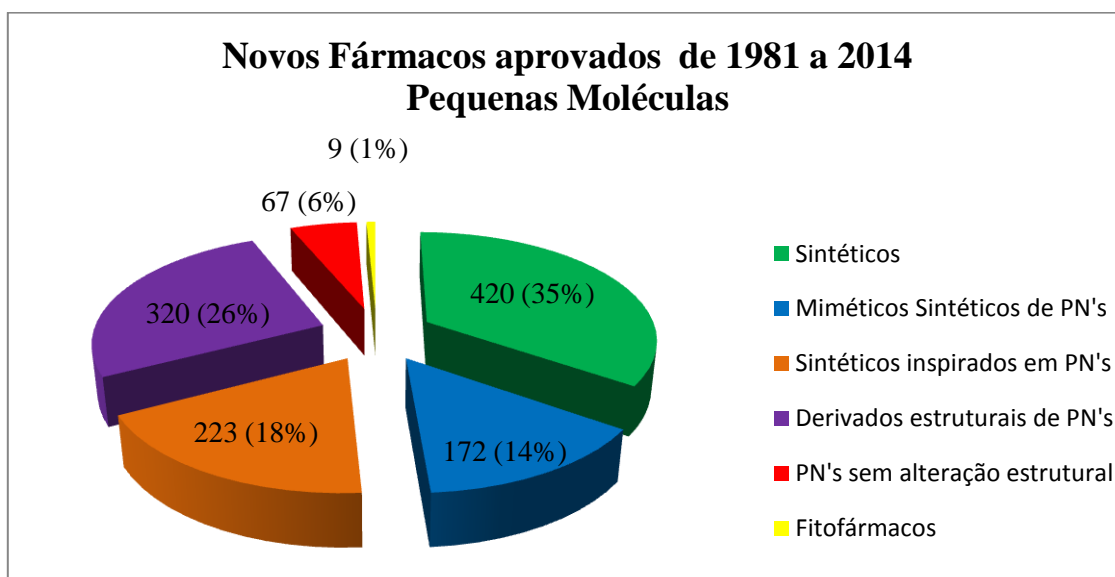


Figura 1. Participação dos produtos naturais na área de desenvolvimento de fármacos (adaptado de NEWMAN & CRAGG, 2016).

Ao considerarmos a perspectiva de obtenção de novos fármacos de origem natural vale salientar que os medicamentos que mais salvaram vidas humanas em toda a história foram, por exemplo, a quinina, extraída da *Cinchona officinales* e a penicilina-G, obtida de processos fermentativos do *Pennicilium chrysogenum* (**Figura 2**), o que coloca em posição de destaque os produtos de origem natural, principalmente na área de quimioterapia de doenças infecciosas.

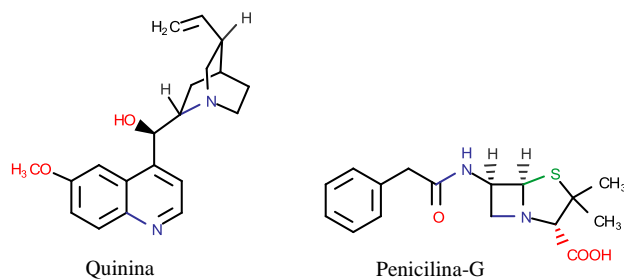


Figura 2. Estruturas da quinina e da penicilina.

As oportunidades para a identificação de produtos com possível utilização econômica como, por exemplo, no uso como matéria-prima na preparação de moléculas com diferentes tipos de aplicação na área biológica, aumentam com a diversidade das espécies e o Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas. (EMBRAPA, 2011).

Ao se considerar a possibilidade de obtenção de novos fármacos, os produtos obtidos de fontes naturais se distinguem dos sintéticos devido à diversidade molecular que estas substâncias apresentam, além das inúmeras funções biológicas. É importante ressaltar que a identificação de substâncias de origem natural não representou apenas o surgimento de um grupo novo de substâncias, mas originou a identificação de uma nova possibilidade de intervenção terapêutica. Exemplificando, não se conheciam anestésicos locais, bloqueadores musculares, anticolinérgicos, entre outras categorias terapêuticas, antes do isolamento e estudo da atividade da cocaína, tubocurarina e atropina, respectivamente (KÖLLER, 1928; KING, 1935; RAYMOND, 1952). Caso não tivesse ocorrido à descoberta dessas substâncias naturais bioativas a terapêutica atual seria muito deficiente.

1.2- Produto natural xantonas e sua classificação

A classe das xantonas abrange uma importante série de heterociclos oxigenados bastante estudados quimicamente. Dentro desta classe existe uma variedade de derivados xantônicos, onde os anéis são rotulados em A e B para os benzênicos e C para a γ -pirona. No anel A, as posições 1-4 e no anel B, posições 5-8 são as dos carbonos que podem ser substituídos, resultando em uma variedade de xantonas obtidas por meio

natural (VIEIRA & KIJJOA, 2005) ou por rotas sintéticas (SOUSA & PINTO, 2005), já as demais posições não estão susceptíveis a introdução de nenhum grupamento químico, pois já são completamente substituídas (**Figura 3**).

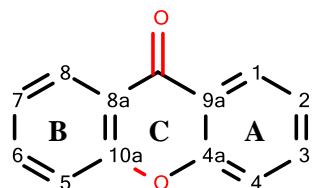


Figura 3. Esquema da estrutura de um anel xantônico.

É válido mencionar a existência de xantonas sintéticas que podem apresentar em seu esqueleto uma diversidade de grupos substituintes simples, tais como, o hidroxil, metoxil, metil, carboxil. Além de substituintes mais complexos, por exemplo, o epóxido azol, aminoálcool, sulfamoi, ácido metiltiocarboxílico, diidropiridina (SOUSA & PINTO, 2005). No entanto, a grande maioria das xantonas conhecidas é de proveniência natural ocorrendo como metabólitos secundários bastante comuns em várias famílias de fungos, líquens e, principalmente, plantas. Em geral, as plantas produzem esses compostos como finalidade de defesa contra o ambiente externo e de predadores (RAI & CARPINELLA, 2006). Os compostos xantônicos de origem natural são classificados e subdivididos de acordo com a natureza de seus substituintes. Uma classificação recente divide as xantonas em seis grandes grupos: xantonas simples, xantonas glicosiladas, xantonas preniladas, xantonolignóides, bis-xantonas e xantonas miscelâneas (VIEIRA & KIJJOA, 2005). Para ilustrar alguns integrantes destes grupos, na (**Figura 4**) estão representadas seis xantonas conhecidas e bastante estudadas biologicamente.

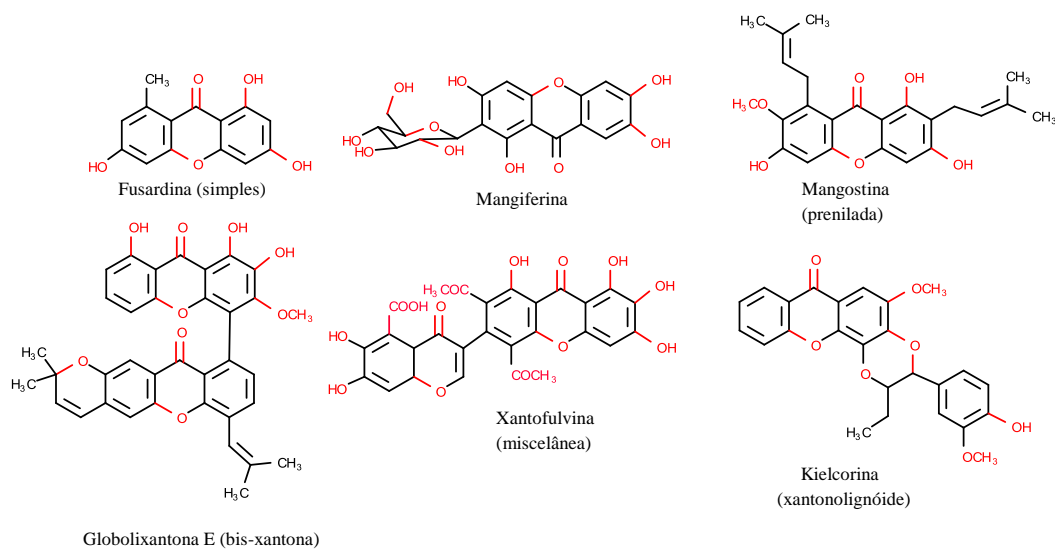


Figura 4. Alguns representantes de cada classe das xantonas.

A fusarindina é uma representante das xantonas simples, apresentando funcionalidades como hidroxila, metoxila, metila, dentre outras. Esta xantona tem sido isolada, tanto de plantas, quanto de fungos (PASTRE, 2007). Na grande maioria das vezes as xantonas metiladas são mais frequentes em fungos e línques, ao passo que as hidroxiladas e metoxiladas estão presentes com mais frequência em plantas.

Outra substância da classe das xantonas bastante conhecida por suas propriedades biológicas, é a mangiferina. Esta é uma xantona glicosilada presente em abundância na casca do tronco, folhas e frutos de *Mangifera indica*, conhecida popularmente como mangueira (DA CRUZ, 2008). Este composto mesmo apresentando hidroxilas substituídas nas posições 1, 3, 6, 7 está incluído dentro da classe das xantonas glicosiladas, pois o que define sua classificação neste caso é a presença do açúcar β -D-glicopiranosil ligado na posição 2. A existência de um substituinte C-glicosídeo presente no núcleo da molécula pode em algumas situações promover interações moderadas com transportadores presentes na membrana das células, e deste modo, podendo contribuir para o aumento de sua absorção no meio biológico, elevando assim a sua biodisponibilidade.

Uma classe bastante estudada também são as xantonas preniladas, que são caracterizadas por apresentar em sua estrutura um substituinte lipofílico com cinco átomos de carbonos, a prenila. Um composto alvo de várias investigações nos últimos

anos e que representa bem essa classe de xantonas, é a mangostina (**Figura 4**), um composto isolado do fruto do mangostão, cujo nome científico é *Garcinia mangostana*. Essa é uma espécie de planta nativa do sudeste asiático e que chama atenção por apresentar inúmeros derivados prenilados com atividade biológica (BALUNAS, 2008).

Os xantonolignóides são uma classe de compostos que apresentam um lignóide (grupo fenilpropânico) ligado ao núcleo xantônico. Em muitas rotas biossintéticas esse grupo fenilpropânico se liga ao anel xantônico intermediado pelo álcool coniferil. Um dos compostos mais conhecidos desta rota biossintética é chamado de kielcorina (figura 6) que tem sido isolado da planta *Kielmeyera variabilis* (PINHEIRO, 2003). Este composto tem apresentado moderado poder citotóxico contra células cancerígenas humanas (WILAIRAT, 2005).

Outra classe, bis-xantonas, é originada quando dois núcleos xantona se unem formando dímeros. Estruturalmente, esses compostos são os mais complexos dentre os constituintes xantônicos naturais, e têm sido frequentemente isolados a partir de fungos e líquens, e menos comuns em espécies de plantas. A globulixantona E (figura 6) é um dos poucos exemplares proveniente de uma planta. Esta bis-xantona foi isolada da raiz de *Symphonia globulifera*, uma árvore encontrada em florestas africanas e América Latina. No Brasil, esta planta é encontrada na floresta amazônica, onde é popularmente conhecida como Ananim, cujo extrato é utilizado como tônico. Estudos *in vitro* mostraram que globulixantona E é ativa contra bactérias Gram-positivas – *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Vibrio anguillarum* – mas inativa contra bactéria Gram-negativa, *Escherichia coli* (NKENGFACK, 2002).

Por fim, a classe das xantonas miscelâneas inclui xantonas que apresentam substituintes diferentes dos que foram relatados anteriormente. Considerando as seis classes relatadas de xantonas naturais, apenas as miscelâneas ainda não foram obtidas a partir de espécies de plantas. Até o momento, estes compostos foram encontrados apenas em espécies de fungos, sendo que um dos poucos integrantes dessa classe é a xantofulvina que foi isolada de *Penicillium sp.* e apresenta atividade antibiótica (KUMAGAI, 2003).

1.3-Propriedades biológicas das xantonas

O crescente interesse nas pesquisas com xantonas, sejam elas oriundas de fontes naturais ou sintéticas, está associado às diversas propriedades biológicas e farmacológicas que vêm sendo atribuídas a elas. As investigações farmacológicas de derivados xantônicos datam de 1968, quando o grupo liderado por Bhattacharya relatou atividades diuréticas e ações cardiotônicas do glicosídeo natural, mangiferina (FINNEGAN, 1968). Mais tarde, foram descritos, pela primeira vez, o potencial analéptico de derivados sintéticos de aminoalquilxantonas (DA RE, 1970). Uma investigação posterior com a mangiferina resultou na descoberta dos efeitos estimulantes desta xantona natural sobre o sistema nervoso central (BHATTACHARYA, 1972). Experiências *in vitro* mostraram que esse efeito seria causado pela inibição da enzima monoamina oxidase que é a enzima responsável pela degradação de neurotransmissores do sistema nervoso central e do tecido periférico que incluem noradrenalina, dopamina e serotonina (BHATTACHARYA, 1972).

Levando em consideração que a maioria das xantonas apresentam as mais variadas atividades biológicas (PINTO, 2005), dentre essas atividades algumas foram selecionadas para a realização das pesquisas, como a capacidade antioxidante, visto que um grande número de xantonas vem apresentando este tipo de propriedade, e atividade antitumoral, devido à importância e necessidade de fármacos que atuam sobre o câncer.

Como referido anteriormente, as xantonas constituem uma importante classe de compostos que possuem amplas propriedades biológicas (**Figura 5**), que estão associadas à sua estrutura, e muito dependentes da posição, do número e do tipo de substituintes ligados ao núcleo básico da xantona (FERNANDES, 1996; GOMES, 2005; PINTO, 2005; EL-SEEDI, 2010). Na figura 7 estão enumerados os principais efeitos que se encontram reportados na literatura para derivados naturais ou sintéticos de xantonas (PINTO, 2005; EL-SEEDI, 2010).

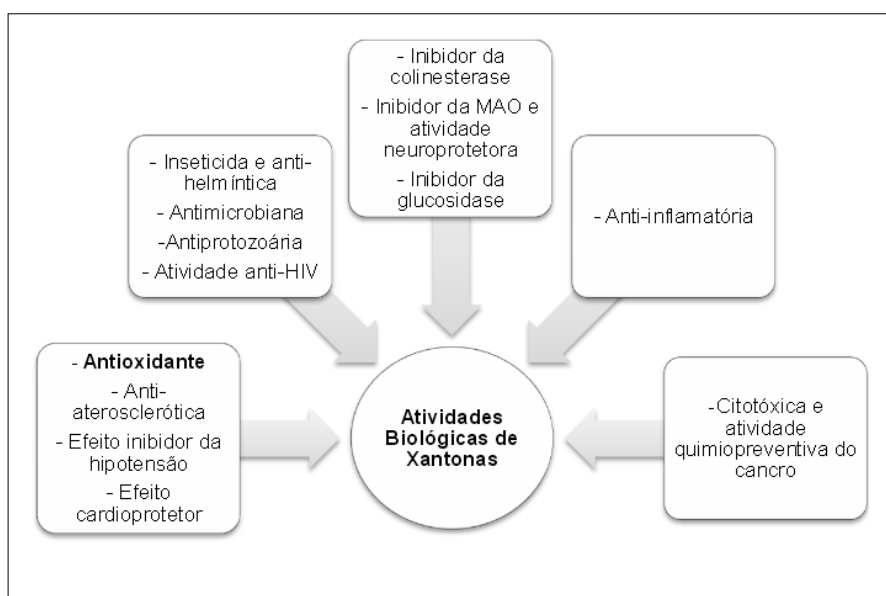


Figura 5. Atividades biológicas de xantonas (adaptado de El-Seedi, 2010).

A atividade antioxidante de xantonas deve-se sobre tudo a mecanismos de quelatação e redução de metais, captação de espécie reativa (através da doação de átomos de hidrogênio), e atuação em sistemas enzimáticos que são responsáveis por gerar espécie reativa inibindo assim a sua geração (PINTO, 2005; PANDA, 2013). Vale ressaltar que o conhecimento a respeito das constantes de equilíbrio da mangiferina em solução aquosa é extremamente necessário para o estudo farmacocinético subsequente e um passo para a compreensão dos seus efeitos biológicos. Em trabalho realizado por Gómez-zaleta e colaboradores, no qual foram realizados estudos para análise dos valores de pKa da mangiferina com emprego das técnicas de ultravioleta visível UV-Vis e espectroscopia de RMN, foi possível a determinação dos valores de pKa dos quatro átomos de hidrogenio H4 da (MGF) em solução aquosa. Os experimentos demonstraram alterações nos deslocamentos químicos dos hidrogênios do sistema aromático, este efeito ocorreu em consequência do aumento da alcalinidade do meio em que a molécula se encontrava, deste modo foi possível atribuir os valores de pKa para a mangiferina: pK_{a1} (6-H) = 6,52; pK_{a2} (3-H) = 7,97; pK_{a3} (7-H) = 9,44; pK_{a4} (1-H) = 12,10.

Geralmente, a alta atividade antioxidante de derivados fenólicos, como hidroxixantonas, é atribuída aos substituintes OH que atuam como poderosos doadores de próton. Isso se torna possível devido à deslocalização de elétrons ao longo da

molécula que estabiliza os radicais fenoxi RO[•]. A planaridade dessas moléculas é outra característica importante, pois permite a conjugação de elétrons π , aumentando a estabilidade desse radical. De acordo com Soobrattee e colaboradores (2005), ligações intramoleculares entre os grupos OH e C=O, contribuem para o aumento da conjugação do anel aromático, aumentando o poder de doação de próton, devido à deslocalização dos radicais formados. Em geral, a presença de hidroxilas no núcleo xantona contribui para o aumento da atividade antioxidante, uma vez que elas podem atuar como quelante de metais, na captura de radicais livres, bem como no impedimento da oxidação lipídica (SATO, 1992). Essa propriedade tem implicado na melhora de sua ação hepatoprotetora (FERNANDES, 1996; MARTINEZ, 2001) e quimiopreventiva ao câncer (MACKEEN, 2000), além de anti-inflamatória (MADAN, 2002; JIANG, 2004).

Muitas pesquisas científicas tem sido desenvolvidas sobre o poder biológico das xantonas, mas poucas estão relacionadas com a capacidade de inibir o crescimento de células cancerígenas. Estudos recentes vêm enfatizando a importância da natureza do substituinte e a posição onde ocorre a substituição sobre a atividade antitumoral. Além de aspectos como o efeito da densidade eletrônica, a geometria molecular e a presença de um quarto anel, como um cromeno, também devem ser levados em consideração (OLIVEIRA, 2007). Um estudo *in vitro* sobre o potencial anticancerígeno foi realizado por Pedro e colaboradores (2002), onde avaliaram o potencial de vinte e sete xantonas oxigenadas contra a inibição do crescimento de três linhagens de células tumorais humanas, como MCF-7 (células do câncer de mama), TK-10 (células cancerígenas renais) e UACC-62 (relacionada ao melanoma), os resultados obtidos demonstraram que a posição e o número de substituintes interferem nos efeitos antitumorais das xantonas.

Para as xantonas mono-oxigenadas, com substituintes na posição 2 ou 4, observou-se que houve mudanças drásticas no potencial da atividade inibitória do crescimento de célula tumoral, onde a xantona com hidroxila na posição 2 foi quase inativa, ao passo que, quando a substituição estava na posição 4, o composto passou a ter uma atividade considerável. Quando se compara a mudança de espécie química, substituindo OH por OCH₃, a xantona substituída por uma metoxila em 2 leva o aparecimento da atividade inibitória. Entretanto, o fenômeno oposto acontece quando na posição 4 insere-se uma metoxila, nesse caso o composto passa a ser praticamente inativo.

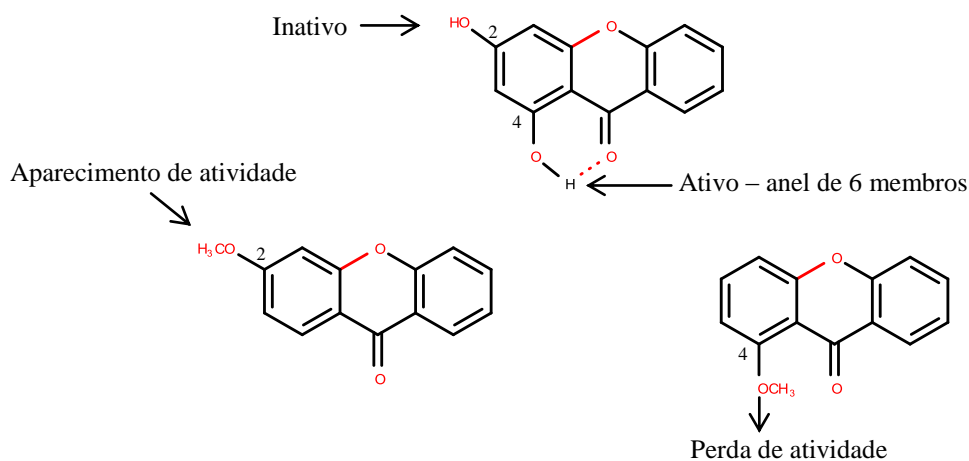


Figura 6. Xantonas mono-oxigenadas.

Quando se compara xantonas bis-oxigenadas, nota-se que se tratando de substituição apenas por hidroxilas, os compostos apresentaram-se ativos, ao contrário dos bis-metoxilados que se tornaram inativos. Com relação aos compostos mesclados com hidroxila e metoxila, resultados mostraram que tiveram sua atividade diminuída consideravelmente. De modo geral, as xantonas diidroxiladas, independente da posição, apresentaram-se mais ativas que as demais (mono-oxigenada e bi-oxigenada contendo metoxila), com isso os pesquisadores comprovaram a importância da presença de hidroxilas na inibição do crescimento de células tumorais em decorrência de suas melhores absorções pela célula (PEDRO, 2002).

Pedro e colaboradores (2002), descreveram a seletividade de algumas xantonas sobre células cancerígenas. Destacaram a seletividade das 1,2-diidroxixantona, 2,3-diidroxixantona, 3,4-diidroxixantona e 2,3-diidroxi-4-metoxixantona sobre células do melanoma em relação às células cancerígenas renais e de câncer de mama. Nesse caso, foi observado, que a presença de hidroxilas adjacentes pode ser uma explicação para a seletividade para o melanoma. Na **Figura 7** estão representadas as diferentes xantonas oxigenadas.

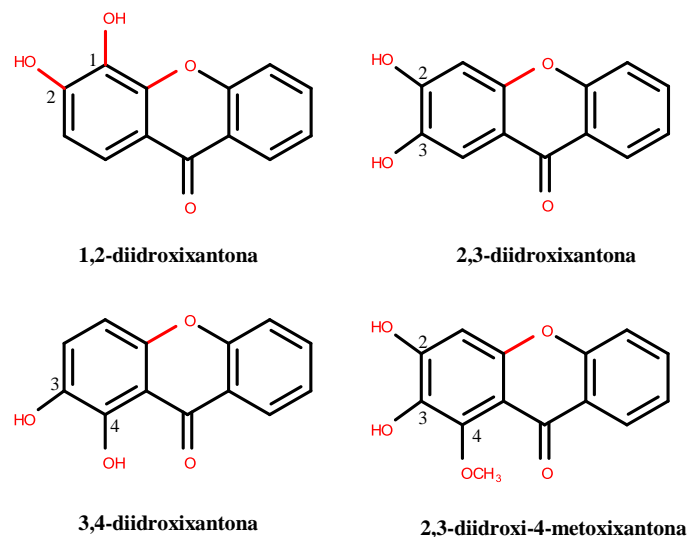


Figura 7. Estrutura das xantonas bisoxigenadas.

Além disso, um estudo teórico relacionando a densidade de carga molecular sobre a atividade antitumoral mostrou que o efeito causado pela densidade eletrônica local do grupo C=O parece ser o responsável pela especificidade da atividade observada sobre as células do câncer de mama (OLIVEIRA, 2007). Ainda de acordo com Oliveira e colaboradores (2007), os compostos que apresentaram densidade de carga eletrônica positiva mostraram um aumento da inibição do crescimento de células cancerígenas. Isso sugere que os compostos que apresentam anéis fundidos, como o cromeno, são de extrema importância para a atividade antitumoral exibida por esta família de substâncias.

1.4-*Mangifera indica* L (Mangueira)

A *Mangifera indica* (Anacardiaceae) é uma espécie nativa do sudeste asiático, mais precisamente da Índia, havendo relatos de seu cultivo nesta região há mais de quatro mil anos. A planta, devido à doçura, sabor e valor nutritivo de seus frutos, chegou ao oeste da Ásia em torno dos séculos 4-5 a.C., tendo sido introduzida pelos portugueses nas costas leste e oeste da África e depois na América, chegando ao Brasil, em torno do século XVI (CAMARGO-FILHO, 2004). É interessante notar o fato da manga, uma das frutas mais apreciadas em todo o mundo, consumida *in natura*, ou ainda na forma de polpa, sucos, molhos, ou mesmo entrando na composição de aromas e fragrâncias, pertencer a uma família de plantas altamente tóxicas, a família Anacardiaceae, que possui gêneros como o carvalho venenoso e a hera venenosa

(EMBRAPA, 2011). A manga é a sexta mais importante fruta brasileira em área colhida, com 75,2 mil hectares, e a terceira em volume de exportação, com 124,6 mil toneladas em 2010 (MAPA, 2011). O Brasil ocupa o sétimo lugar entre os produtores mundiais de manga (EMBRAPA, 2012). A produção concentra-se no nordeste e sudeste brasileiros, com destaque, nesta ordem de importância, para os estados da Bahia, Pernambuco, São Paulo e Minas Gerais (IBGE, 2012). Foi relatado que a manga ubá apresenta altos teores dos componentes como ácido ascórbico, carotenoides e compostos fenólicos, superando outras variedades cultivadas em Minas Gerais (RIBEIRO, 2007). Esta informação agrega valor à variedade ubá, podendo constituir incentivo à expansão do seu cultivo na Zona da Mata Mineira.

Os constituintes fitoquímicos presentes na manga por exibirem propriedades antioxidantes atuam retardando a velocidade da reação de oxidação, por ação sinérgica ou não, protegendo o organismo contra os radicais livres (KAUR; KAPOOR, 2001). Vale destacar que o teor destes compostos em vegetais varia, entre outros fatores, em função das condições edafoclimáticas do cultivo, variedade e grau de maturação da fruta (SCALZO *et al.*, 2005). Vale ressaltar, ainda, que algumas frutas podem potencialmente conter maior teor de compostos antioxidantes nas sementes e cascas do que na polpa, ou ainda, o perfil dos fitoquímicos antioxidantes ser diferenciado nestas partes do vegetal (GUO *et al.*, 2003).

Em 2011, Almeida e Rodrigues avaliaram os teores dos principais fitoquímicos antioxidantes presentes em três variedades de manga, manga Espada, Rosa e Tommy Atkins. A manga Espada e a Tommy Atkins apresentaram teor de carotenóides totais, estatisticamente semelhantes, porém significativamente inferior ao da manga Rosa (29,57 μg^{-1} Espada; 48,06 μg^{-1} Rosa; 28,13 μg^{-1} Tommy Atkins). No que se refere ao teor de ácido ascórbico evidencia-se que a manga Tommy Atkins exibiu, estatisticamente, o menor valor quando comparada com o da manga Espada, porém semelhante ao da manga Rosa (38,21 $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ Espada; 28,70 $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ Rosa; 20,85 $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ Tommy Atkins). A manga Espada, também exibiu o maior teor de fenólicos totais seguida da Tommy Atkins (279,54 $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ Espada; 126,08 $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ Rosa; 133,23 $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ Tommy Atkins). Em nossos estudos foi utilizada a variedade Espada para extração dos constituintes de interesse, especialmente do composto polifenólico mangiferina.

Após a obtenção de seus resultados Almeida e Rodrigues compararam seus dados com de outros autores, e encontraram diferenças nos resultados para as mesmas variedades estudadas. As discrepâncias entre as variedades possivelmente decorre do perfil diferenciado dos constituintes fitoquímicos apresentado pelas mesmas, além disso, as condições edafoclimáticas do cultivo e o grau de maturação dos frutos que influenciam o teor destes componentes presentes na matriz vegetal (CHEN; TAI; CHEN, 2004) podem justificar as diferenças entre as frutas até de mesma variedade.

Além da importância econômica da *M. indica* (**Figura 8**), em termos da comercialização de seus frutos e produtos gerados a partir deles, a planta possui ampla aplicação medicinal. Há relatos do uso tradicional de partes da mangueira para o tratamento de verminoses, diarreias, diabetes, asma, etc.



Figura 8. *Mangifera indica* L. (mangueira)
(http://www.vilamada.com.br/conteudo/vila_viva/arvores_praca.htm –acesso: 01/05/2016).

Em Cuba é comercializado um fitofármaco padronizado, que consiste no extrato aquoso das cascas da mangueira, chamado Vimang®. Este produto possui atividades antioxidantes, imunomodulatórias, analgésicas e anti-inflamatórias, comprovadas em diversos estudos pré-clínicos, e mesmo em alguns estudos clínicos. Estudos farmacológicos indicaram que o Vimang® apresenta efeitos imunomodulatórias, analgésicas, anti-inflamatórias e antioxidantes (MAKARE *et al.*, 2001, GARRIDO *et al.* 2004)

Anteriormente, foi demonstrado e concluiu-se que o extrato aquoso de *M. indica* Vimang® pode ser classificado como inibidor duplo, uma vez que inibe tanto COX (ciclooxigenase) como LOX (lipo-oxigenase) do metabolismo do araquidonato (GARRIDO *et al.*, 2004). Esta atividade anti-inflamatória que se pensava ser devido à sua alta atividade antioxidante exibida pelos constituintes como compostos fenólicos

incluindo mangiferina. Foi demonstrado que o Vimang® e mangiferina, exibem atividade inibitória contra líquido sinovial PLA2 (fosfolipase A2) (GARRIDO *et al.*, 2004).

O Vimang® possui elevado teor de compostos fenólicos, entre eles a xantona C-glicosilada, mangiferina (**Figura 9**), que é o seu principal constituinte. Há indicações que a mangiferina isolada reproduz várias das atividades farmacológicas do Vimang®, embora não com a mesma intensidade que o próprio suplemento, mostrando um sinergismo entre os seus diversos componentes: compostos fenólicos, terpenóides, sesquiterpenos e microelementos (MASIBO *et al.*, 2010).

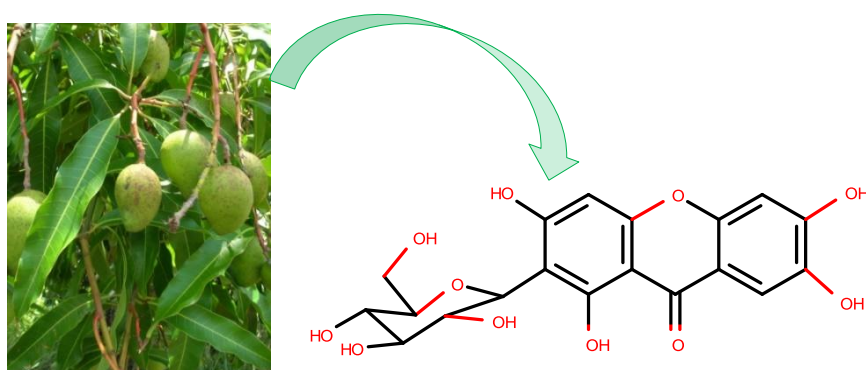


Figura 9. Estrutura química da mangiferina extraída de *M. indica*.

1.5- A Mangiferina

A mangiferina (MGF) é um composto fenólico da classe das xantonas, quimicamente denominada segundo as regras de nomenclatura sugeridas pela IUPAC, por 2-*C-β-D*-glicopiranosil-1,3,6,7-tetraidroxixantona. Este glicosídeo natural, possui fórmula molecular $C_{19}H_{18}O_{11}$, peso molecular de 422.35 u.m.a. e ponto de fusão igual a 271°C. Por ser um *C*-glicosídeo (ou seja, possuir a unidade de açúcar ligada à aglicona via uma ligação C-C), a mangiferina é muito mais resistente à perda da unidade de açúcar *in vivo* do que um *O*-glicosídeo, de ocorrência mais comum, no qual a ligação açúcar-aglicona se faz via uma ponte acetálica. A literatura preconiza diferentes formas de isolamento da mangiferina, em rendimentos de até 2%, principalmente das cascas do fruto e das folhas, sendo o método mais comum à extração em aparelhagem de Soxhlet, seguida de separação do glicosídeo dos demais componentes por meio de cristalização (ARITOMI, 1969).

Suas características estruturais, aliadas a sua abundância nos tecidos do vegetal além da facilidade de sua extração, a qualificam como um produto natural

extremamente atraente para avaliação em diferentes modelos biológicos. Todos esses fatores tornam possível o seu uso como material de partida, objetivando o planejamento de derivados com potenciais aplicações farmacológicas.

Singh (2006) relatou que a mangiferina desempenha importante papel fisiológico na indução do crescimento vegetativo da mangueira e na inibição da ocorrência de malformações. No entanto, o crescente interesse científico pela mangiferina é atribuído ao seu grande potencial farmacológico, cujo estudo permitiu a descoberta de várias atividades, tais como antioxidante, anti-inflamatória (GARRIDO, 2004; OJEWOLE, 2005; PARDO-ANDREU, 2008;), hipoglicemiante, imunomodulatória (MAKARE, 2001), entre outras. Dentre as diferentes partes de *M. indica*, a folha representa uma das mais importantes fontes de compostos fenólicos, inclusive de mangiferina, superando a casca, segundo investigação fitoquímica de diferentes cultivares produzidos no Brasil (BARRETO, 2008). Apesar do seu alto conteúdo de mangiferina e outros compostos fenólicos, estudos da bioatividade do extrato da folha *M. indica* ainda são pouco documentados, restringindo-se a pesquisa *in vitro* evidenciando suas propriedades antioxidantes, antiapoptótica e antibacteriana (BBOSA, 2007; OLABINRI, 2009; LING, 2009) e a pesquisas *in vivo* evidenciando atividades gastroprotetora (SEVERI et al., 2009) e hipoglicemiante (SHARMA, 1997; ADERIBIGBE, 1999; BHOWMIK, 2009).

1.6-Propriedades antitumorais da mangiferina

Estudos demonstram que a MGF apresenta importante atividade antiproliferativa frente a diferentes linhagens tumorais, como pulmão, colo do útero e mama. Atualmente, muitos estudos têm como principal objetivo a investigação dos mecanismos celulares e moleculares pelos quais a MGF desencadeia efeitos antitumorais. Contudo, são poucos os estudos sobre os prováveis mecanismos de ação envolvidos na atividade antitumoral exibida por esta xantona natural. Neste sentido, Li e colaboradores (2013) descreveram que a MGF regula a expressão de metaloproteinases, além de inibir a transição epitelial-mesenquimal, que são importantes fatores envolvidos no potencial metastático de um tumor (LI et al., 2013). Mais recentemente, Cuccioloni e colaboradores (CUCCIOLONI et al., 2016) demonstraram que a MGF induz a morte de células de adenocarcinoma de mama por apoptose, além de atuar na inibição da enzima HMG-CoA redutase, responsável pela biossíntese de colesterol na célula tumoral. O

grupo de Cuccioloni, neste mesmo trabalho, evidenciou ainda a capacidade da xantona natural em inibir o *turnover* proteico e a adesão das células de adenocarcinoma mamário.

Danos oxidativos e mutagênese são as causas básicas habituais de tumorigênese e metástase. A MGF tem a capacidade de aumentar as enzimas no ciclo TCA (Ciclo do Ácido Tricarboxílico) e ETC (Cadeia de Transporte de elétrons) (LIM *et al.*, 2014), e as enzimas de desintoxicação (glutathione transferase, quinona redutase e uridina 5-difosfato-glucuronosil transferase) (RAJENDRAN, 2008), e assim reduzir os danos ao DNA. Por exemplo, em animais portadores de cancro do pulmão. A MGF também demonstrou aumentar os níveis de glutathione e as atividades de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione redutase) impedindo o desenvolvimento do câncer de pulmão induzido por benzo (a) pireno em camundongos (RAJENDRAN, 2008). O NF- κ B é um importante fator de transcrição induzindo várias citocinas pró-inflamatórias, que estão intimamente associadas ao desenvolvimento do câncer. Em células MCF-7 mostraram que a molécula poderia inibir a indução pelo fator de necrose tumoral (TNF) de NF- κ B (SARKAR, 2004). Adicionalmente, Li e colaboradores (2013) mostraram que a MGF suprimiu a via da *para*-catenina que mede a proliferação em células MCF-7. A MGF também demonstrou diminuir a viabilidade das células MCF-7, provavelmente através da supressão da matrix metaloproteinase (MMP) -7 e -9 da matriz e da inibição da β -catenina. O efeito antiproliferativo da, MGF também foi observado em células K562, o que levou à indução eficiente a apoptose (PENG *et al.*, 2004).

Estes efeitos anti-proliferativos e pró-apoptóticos da MGF e o aumento concomitante dos efeitos da bioenergética mitocondrial e da desintoxicação parecem ser paradoxais. Curiosamente, há evidências que sugerem que a MGF tem um efeito citotóxico seletivo contra células cancerosas, mas não células normais (AHMAD *et al.*, 2012). Além do estresse oxidativo e da inflamação, a acidose e a hipóxia são os fatores do microambiente que promovem o crescimento de tumores. Como Warburg apontou na década de 1950, "a causa raiz do câncer é a restrição da respiração e adaptação à fermentação" e "as características das células cancerosas é acidose e hipóxia", tais fatores favorecem o desenvolvimento da doença (WARBURG, 1956), as células cancerosas são altamente dependentes da energia, ATP, produzida pelo processo de conversão de glicose em ácido láctico sob condições hipóxicas. Em estudo realizado por Apontes e colaboradores, observou-se que a MGF inibe a formação de ácido láctico

através da canalização do piruvato para a via metabólica oxidante (APONTES, 2014). Este novo efeito biológico da MGF poderia ser um mecanismo molecular adicional pelo qual a xantona natural exerce os seus efeitos anticancerígenos e são necessárias maiores investigações para demonstrar se este é efetivamente o caso.

1.7-Metodologias de extração da mangiferina

A extração é considerada um dos primeiros estágios básicos em pesquisas medicinais devido à preparação de extratos dos materiais é o início para separação e purificação dos constituintes químicos (ROMANIK *et al.*, 2007). Diferentes técnicas para a extração de produtos naturais podem ser aplicadas, muitas delas utilizadas podem ainda sofrer alterações com o objetivo de maximizar a recuperação dos produtos de interesse. Em 2013 Kulkarni e Rathod avaliaram a eficiência de uma extração convencional da mangiferina com emprego de técnicas avançadas. A técnica de extração convencional, realizada com aparelho de Soxhlet, requer um longo tempo, além de ocorrer sob aquecimento. As técnicas de extração avançadas, como a extração em ultrason, por fluido supercrítico, ou a assistida por micro-ondas tem aumentado a produtividade por fatores de influência como a cinética das taxas de transferência de massa, aumento da área de interface ou direcionamento de forças intermoleculares (WANG, 2006; CRAVOTTO *et al.*, 2008). Uma das grandes vantagens de usar a extração em ultrason é que o processo ocorre em bem menos tempo, quando comparado à extração convencional (MASON & LORIMER, 2002). Neste estudo também foram avaliados fatores como a frequência, potência aplicada, temperatura e geometria do frasco utilizado, onde foi observado aproximadamente 54% do rendimento para extração em ultrason, em apenas 4 minutos. Representando 31mg/g de mangiferina recuperada, contra 57mg/g de mangiferina, obtida via Soxhlet em 5 horas. Isto demonstra a superioridade da técnica de extração por ultrason.

Embora alguns processos de extração tais como, maceração, extração em refluxo, entre outros, sejam de fácil operação em muitos casos, podem ser árduos e dispendiosos consumindo o rendimento e ainda podem causar degradação química da maior parte dos fitoconstituintes, devido às altas temperaturas. Com o objetivo de aumentar a solubilidade dos metabólitos e aumentar a transferência de massa essas técnicas passam por modificações que se fizerem necessárias. Porém, o isolamento dos diferentes constituintes presentes no material é limitado pelos estágios de extração

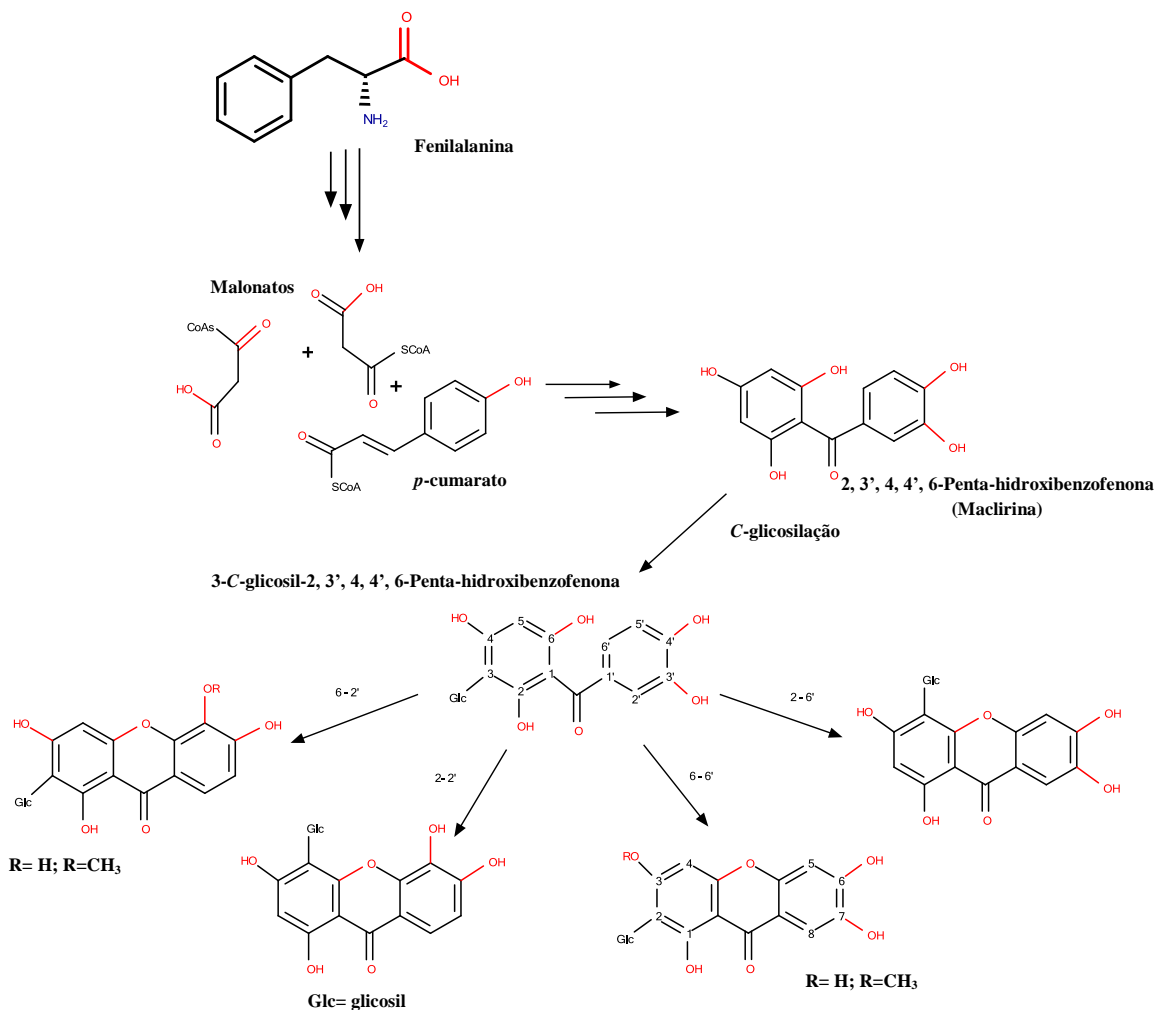
(MANDAL, 2007). Nos últimos anos, o use de micro-ondas para obtenção dos produtos do material vegetal tem demonstrado grande destaque. No entanto, a prática de utilizar micro-ondas em extrações não é nova, sendo utilizada desde 1986 na extração de compostos orgânicos (DEAN, 2010). Em 2014, Salomon e colaboradores utilizaram esta técnica para extração da MGF, neste trabalho eles avaliaram três parâmetros: tempo de irradiação, tempo de extração e razão do solvente. Os resultados obtidos foram comparados ao método tradicional (Soxhlet), não houve uma diferença significativa no aspecto da recuperação do produto de interesse, a extração em micro-ondas obteve um rendimento de 63% contra 64% para extração em refluxo. Porém, as vantagens da técnica de micro-ondas consiste no baixo consumo de solvente e um tempo de extração bastante reduzido (JAIN et al., 2009; MANDAL et al., 2007; CHAN et al., 2011).

2-Biossíntese da mangiferina

O trabalho realizado por Fujita e Inoue em 1977, teve como principal objetivo elaborar uma proposta para a via biossintética das xantonas. Nesse estudo eles utilizaram como ferramenta a marcação com isótopo de carbono ^{14}C , vários compostos foram marcados e administrados às partes aéreas da planta *Anemarrhena asphodeloides* bunge (Liliaceae), que produz mangiferina. Nesse trabalho a fenilalanina, o ácido *para*-cumárico, o ácido *para*-hidroxibenzóico e o ácido protocatecuico foram marcados isotopicamente. No entanto, apenas fenilalanina e o ácido *p*-cumárico demonstraram alta capacidade para se incorporar na porção da xantona, este resultado sugeriu que esses compostos poderiam ser os precursores diretos para a biossíntese da mangiferina.

Por outro lado, para obter evidências conclusivas da participação de uma unidade C-6 e C-3 referente ao ácido *p*-cumárico, uma mistura de ácido *p*-cumárico [anel-3,5- T_2] e -2- ^{14}C , ácido *p*-hidroxibenzóico e ácido protocatecuico, foram administrados à planta e a razão $\text{T}/^{14}\text{C}$ da MGF isolada foi comparada com a do precursor alimentado. Levando em consideração a perda (1/2) de T na aril-hidroxilação na biossíntese, as taxas de incorporação verificadas foram: 1,20%, 0,02% e 0,04%, respectivamente. Os dados obtidos demonstraram que o ácido *p*-cumárico duplamente marcado foi incorporado a mangiferina, sem haver alteração significativa da razão $\text{T}/^{14}\text{C}$. Essas análises indicaram que a aglicona pode ser biossintetizada através da ciclização de um intermediário derivado do *p*-cumarato e dois malonatos (**Esquema 1**).

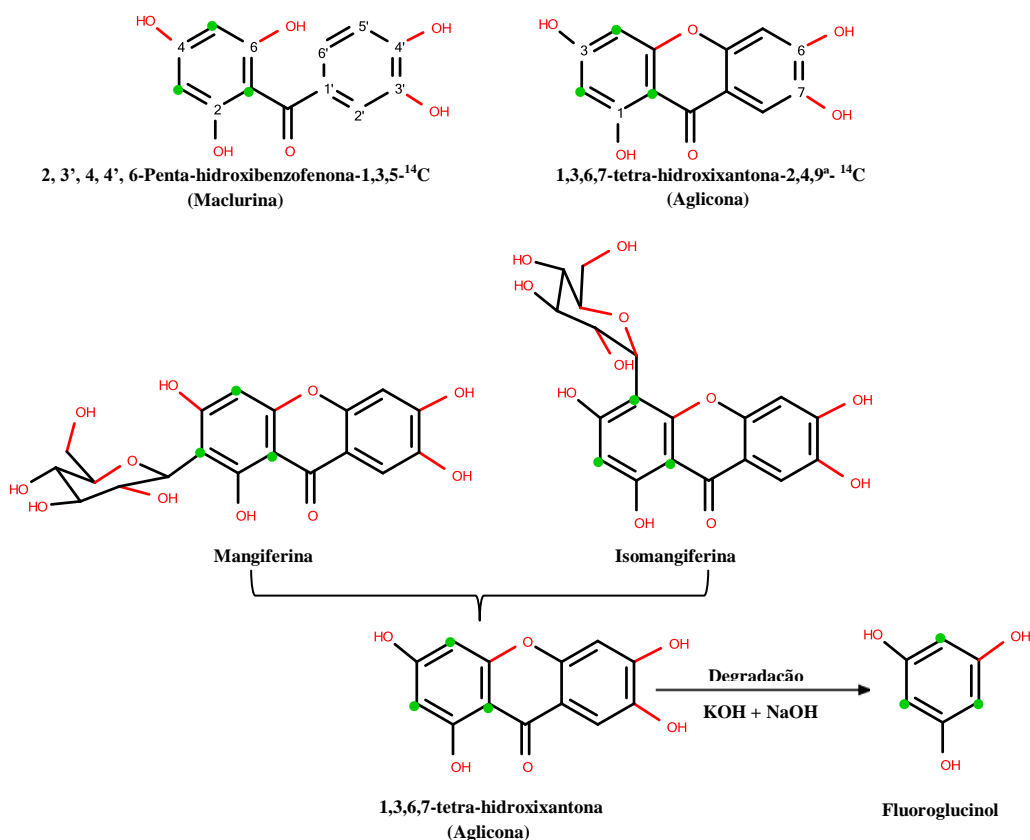
Bhatia e Seshadri (1968) sintetizaram mangiferina a partir da aglicona e o acetobromoglicose com base na consideração de que a C-glicosilação pode ocorrer na fase da aglicona. Aritomi e Kawasaki (1970) isolaram primeiro um isômero, a isomangiferina, juntamente com a mangiferina das partes aéreas de *Anemarrhena asphodeloides*, sugerindo que esses isômeros parecem ser formados por C-glicosilação de maclurina (2,3',4,4',6-penta-hidroxibenzofenona).



Esquema 1. Rota biossintética de xantonas (FUJITA e INOUE em 1977).

Em 1980 Fujita e Inoue, investigaram a etapa de C-glicosilação na formação da mangiferina e isomangiferina. Primeiramente, a aglicona e maclurina marcadas foram fornecidas às partes aéreas da planta *Anemarrhena asphodeloides*, a qual biossintetiza tanto a iso- quanto a mangiferina (Morita *et al*, 1965). Após o ensaio, a iso- e a

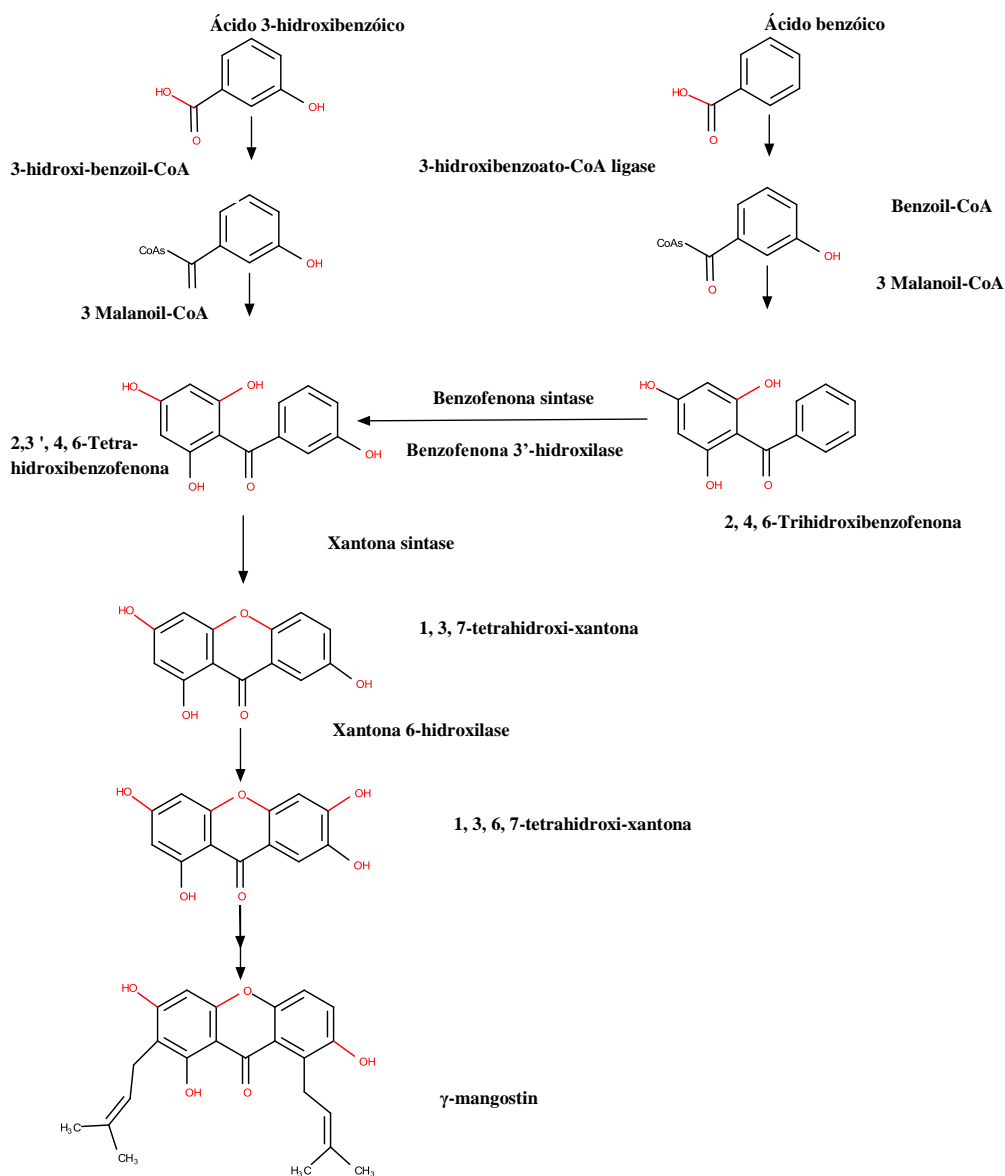
mangiferina marcadas foram isoladas do material vegetal e degradadas à aglicona. A MGF e a isomangiferina isoladas foram degradadas com ácido hidriódico para gerar a xantona aglicona (1,3,6,7-tetraidroxi-xantona) (Esquema 2). Foi verificado que o percentual de incorporação da aglicona marcada (1,3,6,7-tetra-hidroxixantona-2,4,9^a-¹⁴C), tanto na iso- quanto na mangiferina, foi muito baixo (aproximadamente 37,8%). Em contraste, a maclurina marcada (2,3',4,4',6-penta-hidroxibenzofenona-1,3,5-¹⁴C) foi mais eficiente na constituição da estrutura química da iso e mangiferina, com um percentual de incorporação de 96,4% e 97,9%, respectivamente em comparação a aglicona marcada, e a radioatividade foi largamente incorporada na porção que constitui o esqueleto base destas xantonas. Além disso, a aglicona obtida, após tratamento com maclurina marcada, foi degradada a floroglucinol (**Esquema 2**), demonstrando que a maclurina foi incorporada. Este resultado deixou clara a importância deste intermediário, a maclurina, na rota biossintética de xantonas.



Esquema 2. Degradação de xantonas glicosiladas (adaptado FUJITA e INOUE, 1980).

Em trabalho realizado por Peters, Schmidt & Beerhues em 1997, no qual foram utilizadas linhagens de células capazes de acumular diferentes xantonas, configurou-se como uma proposta alternativa para a biossíntese de xantonas.

Um segundo modelo apresentado consistia de uma cultura de *Centaureum erythrea* (Gentianaceae) na qual enzimas para a biossíntese de xantonas foram detectadas em um primeiro momento (PETERS, SCHMDT & BEERHUES, 1997). Os autores observaram um precursor imediato de xantonas, 2,3',4,6-tetraidroxibenzofenona, sendo regioseletivamente ciclizado a 1, 3, 5- e 1, 3, 7-tri-hidroxi-xantona através da síntese de xantonas pelo emprego destas células *C. erythrea* e *Hypericum androsaemum* L., respectivamente (PETERS, 1997). Neste trabalho foi reportada a detecção e a caracterização das enzimas envolvidas na formulação do intermediário chave (2,3', 4, 6-penta-hidroxibenzofenona) em culturas de células (**Esquema 3**).

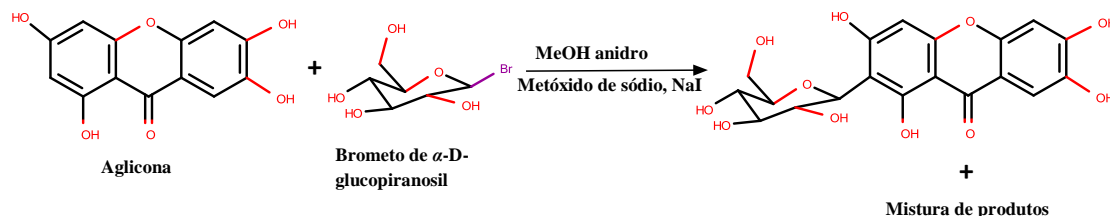


Esquema 3. Alternativa biossintética de xantonas em culturas celulares (SCHMIDT & BEERHUES, 1997).

2.1-Síntese da mangiferina

Um dos primeiros relatos em síntese da MGF foi reportado por Nott e Roberts no ano de 1967, baseados na metodologia empregada por Chopin e colaboradores para a síntese do 6-C-β-D-glicopiranosil-5,7-diidroxi-flavonoides (CHOPIN & DURIX, 1966). Percebeu-se naquele momento que era possível utilizar o mesmo método para obtenção de xantonas, visto que há certa similaridade existente entre as duas classes de compostos. Neste trabalho de síntese total da MGF Nott e Roberts, realizaram o tratamento de aglicona 1,3,6,7-tetra-hidroxi-xantona com um excesso de brometo de α-D-glucopiranosil. A mistura de produtos foi submetida à hidrólise ácida com o objetivo

de impedir a formação do *O*-glicosil e consequente formação do composto *C*-glicosil (**Esquema 4**), e foi isolado por longo e complicado processo envolvendo extração com solventes e técnicas cromatográficas. Contudo, o rendimento do produto obtido foi inferior a 1%, mas a significância deste resultado supera este inconveniente, sendo este um dos primeiros relatos de obtenção da MGF sinteticamente.

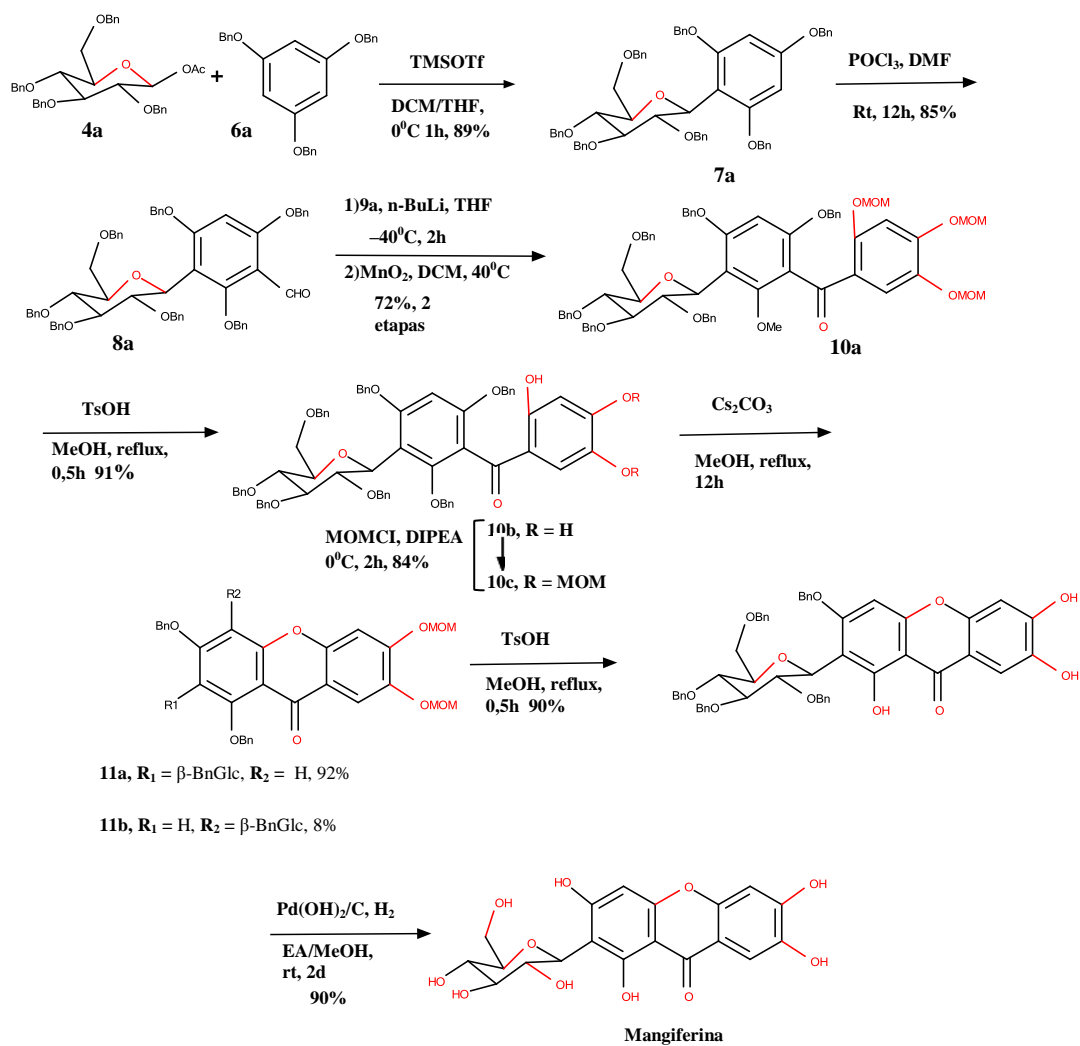


Esquema 4. Metodologia de síntese da mangiferina (NOTT & ROBERTS, 1967).

Wu e colaboradores (2010) realizaram um trabalho no qual relataram a síntese total da mangiferina, isomangiferina e homomangiferina, empregando uma reação de *C*-glicosilação altamente estereosseletiva entre um derivado de xantona e tetrabenzilglicopiranosil *N*-feniltrifluoro acetamideto, porém obteve-se um rendimento relativamente baixo, além de baixa regioseletividade (WU, YU, WEI & LIAN, 2010).

Mais recentemente, este mesmo grupo reportou a semi-síntese eficiente da neomangiferina, a partir do isolamento da mangiferina (WEI *et al.*, 2014). No entanto, a síntese total desta molécula, que possui tanto *O*- quanto *C*-glicosídeos, é ainda um desafio. Neste estudo Wei e colaboradores (2014) forneceram uma abordagem sintética eficiente para a mangiferina e a homomangiferina, e também relataram a primeira síntese total da neomangiferina. Estes pesquisadores realizaram, em 2016, um novo trabalho baseado nos estudos sintéticos e biossintéticos da mangiferina, no qual a benzofenona (Maclurina) atua como intermediário-chave e a reação de glicosilação ocorre antes da construção do esqueleto xantônico (FUJITA & INOUE, 1980). Contudo, os autores encontraram problemas em relação aos grupos protetores utilizados na etapa final da sequência sintética. Uma otimização da rota sintética desenvolvida foi descrita por Wei e colaboradores (2016) e encontra-se no (**Esquema 5**). A glicosilação de **6a** com glicosil acetato **4a**, seguido por formulação de Vilsmeier de **7a** levou ao β-*C*-glicosídeo **8a** desejado com 76% de rendimento global. Subseqüente acoplamento com aril-bromo **9a** litiado e oxidação imediata de um precursor, que então originou a

benzofenona **10a** (intermediário chave) com 72% de rendimento em duas etapas, que foi posteriormente convertido em **10c** por desmetoximetilação e reprotção seletiva (76% para duas etapas). A ciclização de **10c** procedeu com sucesso para 2-C-glicosídeo **11a** e em menor proporção 4-C- glicosídeo **11b** em 92% e 8% de rendimento, respectivamente. Para **11a**, a confirmação se deu através da correlação por técnicas de RMN bidimensionais HMBC (do inglês *heteronuclear multiple bond correlation*) observado entre o sinal do próton anomérico H-1' com os carbonos C-1 (159,4 ppm) e C-3 (162,5 ppm), enquanto para **11b** foi observado a correlação entre o sinal do próton anomérico H-1' com os carbonos C-3 (162,6 ppm) e C-4a (157,4 ppm). Eventualmente, a desproteção do grupo metoximetil e do éter benzílico com ácido *para*-toluenossulfônico e hidrogenólise catalítica proporcionou a obtenção da mangiferina com 81% de rendimento a partir de **11a** (WEI, LIANG, WANG, MENG & LI, 2016). Os dados espectroscópicos obtidos para a mangiferina sintetizada (H-1': 4,59 ppm, d, $J = 9,6$ Hz) foram correspondentes aos relatados para o composto natural (H-1': 4,59 ppm, d, $J = 9,6$ Hz) (ARITOMI *et al.*, 1970; QUIN *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2010 & LIU *et al.*, 2013).



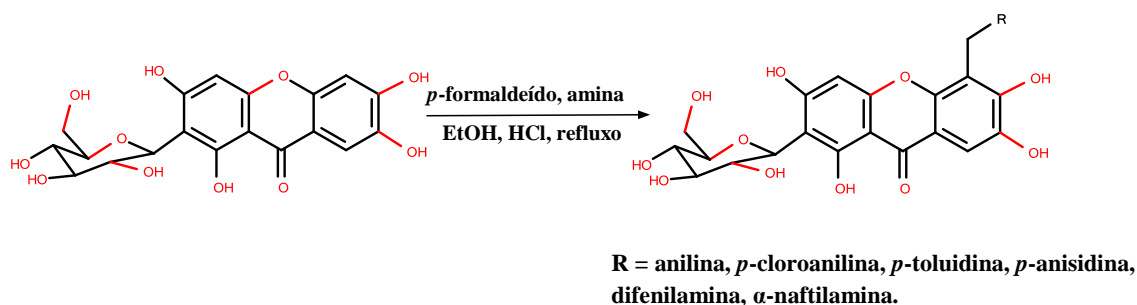
Esquema 5. Síntese total da mangiferina (WEI, LIANG, WANG, MENG & LI, 2016).

2.2-Síntese de derivados de mangiferina

Devido à importância dessa classe de compostos xantônicos com potencial aplicação farmacológica para o arsenal terapêutico atual, muitos trabalhos acerca da síntese desses sistemas heterocíclicos, bem como de sua derivatização vem sendo realizados com muito sucesso. Pinto e colaboradores (2011) realizaram a síntese de derivados xantônicos poli-hidroxilados/metilados em várias posições do núcleo, os quais foram investigados quanto as suas propriedades antifúngicas e contra várias cepas de microorganismos patogênicos. A resistência crescente de fungos patogênicos aos compostos antifúngicos e o número reduzido de medicamentos disponíveis levou à busca por novos derivados.

No trabalho realizado por Singh e colaboradores (2011) foram estudadas as reatividades do produto natural mangiferina frente à condição da reação de Mannich, diversas produtos foram obtidos usando diferentes tipos de aminas cíclicas, alifáticas e aromáticas e foram avaliados o potencial antipirético desses compostos (**Esquema 6**).

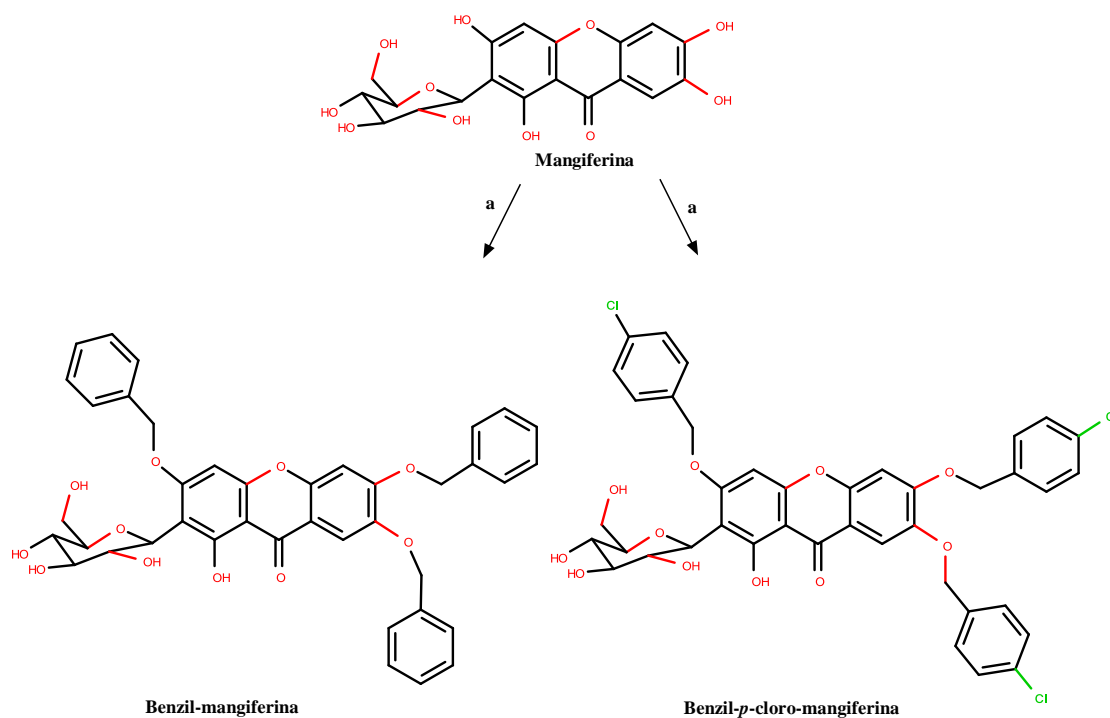
As reações de Mannich proporciona uma metodologia sintética muito eficiente na formação de ligações carbono-carbono, ou seja, por meio de uma condensação tricomponente essa ligação ocorre entre uma amina primária ou secundária, uma cetona enolizável (contendo hidrogênio ácido α a carbonila) e um aldeído em meio ácido, os mesmo reagem entre si através de uma reação tricomponente para formar uma base de Mannich (MARQUES, 2012; VIEIRA, 2006; KULKARNI, 2012). Em trabalho reportado por Singh e colaboradores (2011) no qual foi sintetizado uma série de derivados com a utilização de diferentes aminas aromáticas com diferentes substituintes (R= anilina, *p*-cloroanilina, *p*-toluidina, *p*-anisidina, difenilamina, α -naftilamina) sobre a mangiferina, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antipirético desses compostos (**Esquema 6**) (SINGH *et al.*, 2011).



Esquema 6. Síntese de derivados aminados *via* reação de Mannich (Adaptado de Singh *et al.*, 2011).

No ano de 2007, Hu e colaboradores realizaram um estudo sobre a síntese de derivados de mangiferina para avaliar atividade inibitória destes compostos frente à proteína tirosinase fosfatase B1, estudos clínicos revelaram que esta proteína é responsável pela defosforilação dos receptores de insulina, com isso os níveis ideais de insulina não são alcançados (ELCHEBLY *et al.*, 1999). A inibição desta proteína surgiu como uma nova intervenção terapêutica para o tratamento da diabetes tipo 2. Em trabalhos anteriores com a mangiferina, existem relatos que esta xantona natural possui atividade antidiabética significativa (MIURA *et al.*, 2001). Baseados nestes relatos Hu e colaboradores (2007) tiveram como objetivo avaliar atividade antidiabética, porém em um primeiro instante encontraram um problema, pois a mangiferina apresentava uma

solubilidade muito ruim na maioria dos solventes por eles utilizados para a reação de síntese desses derivados, eles propuseram o preparo de derivados *O*-alquilados e *O*-benzilados. Com base em estudos anteriores, uma série de substituintes benzílicos foi incorporada a mangiferina originando os derivados (**Esquema 7**). Porém os derivados benzilados tiveram resultados promissores para atividade antidiabética em relação aos demais. Os derivados benzil-mangiferina e benzil-*p*-cloro-mangiferina foram os que apresentaram as melhores atividades.



(a) K_2CO_3 , DMF, haleto de benzila adequado.

Esquema 7. Reação de preparação de derivados *O*-benzilados (Hu *et al.*, 2007).

Mahendran e colaboradores (2014) realizaram modificações estruturais na mangiferina com intuito de avaliar a relação estrutura-atividade para propriedades antioxidantes. Tem sido bem documentado na literatura os danos causados por radicais livres a membranas celulares, proteínas, enzimas e DNA, aumentando o risco de desenvolvimento de doenças degenerativas, como o câncer, Alzheimer, diabetes. A mangiferina já demonstrou efeitos antidiabéticos (MURUGANANDAN *et al.*, 2002), anticâncer (RAJENDRA *et al.*, 2008), antioxidante (DELGADO *et al.*, 2005). Logo, o planejamento para a elaboração de derivados a partir do composto natural, objetivando

aumentar as propriedades pré-existent tornou-se de vital importância para o desenvolvimento de novos compostos com potencial aplicação farmacológica. Bhatia e colaboradores (1967) reportaram a reação de acetilação e metilação da mangiferina (**Figura 10**). Adicionalmente, Hu e colaboradores (2007) sintetizaram uma série de derivados benzílicos da mangiferina. Contudo, os relatos da literatura tem demonstrado que a investigação farmacológica da mangiferina, bem como de seus derivados ainda não foram totalmente estudadas.

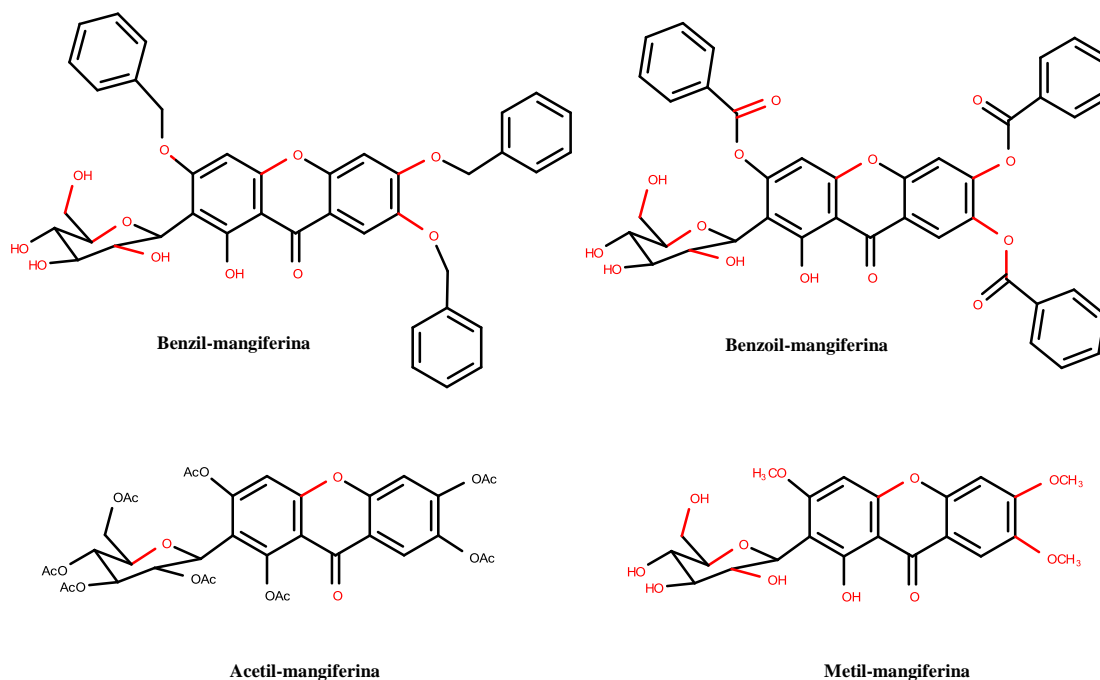


Figura 10. Derivados sintetizados a partir da mangiferina (MAHENDRAN *et al.*, 2014).

3- Importância Biológica das Albuminas Séricas

A estrutura molecular das proteínas é muito complexa; por essa razão é tipicamente dividida em níveis distintos de organização (**Figura 11**): a sequência de aminoácidos numa proteína (unidos por ligações peptídicas) é chamada de *estrutura primária*; a *estrutura secundária* corresponde a certos arranjos tridimensionais comuns de fragmentos da cadeia principal, mantidos por ligações de hidrogênio (*folha β pregueada*, *hélice α* , etc.); a *estrutura terciária* é o arranjo tridimensional de uma cadeia polipeptídica (e, conseqüentemente, dos elementos de estrutura secundária) determinado

por interações entre as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos, incluindo ligações de hidrogênio e de dissulfeto, além de interações hidrofóbicas; e a *estrutura quaternária* aplica-se somente a proteínas constituídas por duas ou mais cadeias polipeptídicas, e refere-se à disposição espacial dessas cadeias, ou seja ao arranjo espacial das subunidades. Um exemplo deste tipo de estrutura é a hemoglobina, que é composta por quatro subunidades (VOET, 2008).

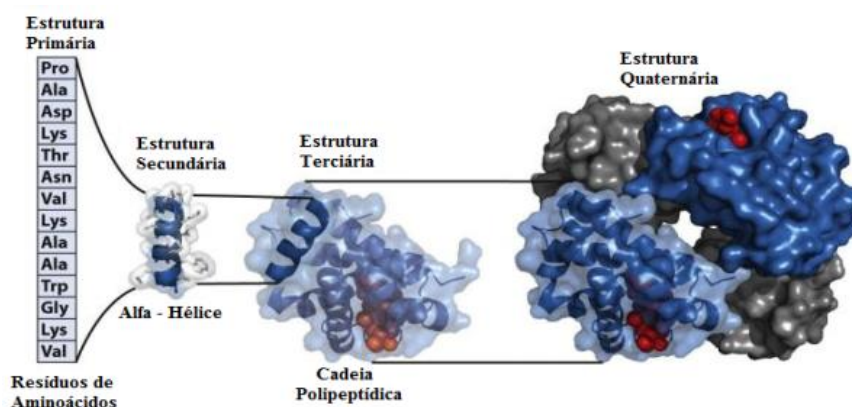


Figura 11. Representação dos diversos níveis organizacionais de uma proteína. Adaptado de Berg *et al.*, 2008.

A albumina é uma proteína de grande importância biológica e a mais abundante do plasma sanguíneo. As albuminas são provavelmente as mais conhecidas e mais estudadas de todas as proteínas existentes. Suas diversidades de funções têm atraído o interesse de cientistas por gerações (PETERS, 1996). A Albumina do Soro Humano (ASH) é a proteína mais abundante (40 mg/mL) no plasma sanguíneo. Esta proteína é composta por uma única cadeia polipeptídica não glicosilada contendo em sua sequência 585 resíduos de aminoácidos (66 kDa), a qual se divide em três domínios (I, II e III), cada um contendo dois subdomínios (A e B). Cada domínio contém dez hélices α e são divididos por seis hélices geometricamente antiparalelas, formando os subdomínios com quatro hélices cada. A estrutura terciária da ASH é estabilizada por 17 pontes de dissulfeto, (GHUMAN, 2005).

A ASH desempenha um importante papel no transporte e disposição de ligantes endógenos (ácidos graxos não esterificados, bilirrubina e composto lipofílicos) e exógenos presentes (flavonoides, varfarina e diazepam) no sangue. Devido a essa sua surpreendente capacidade de ligação a uma grande variedade de moléculas, a ASH apresenta um papel preponderante na farmacocinética e farmacodinâmica de drogas

(SUDLOW, 1975; SUDLOW, 1976; GHUMAN, 2005). O que também faz da ASH, uma proteína modelo para o estudo de interações proteína-ligante. Estudos mostram que a interação entre a ASH e ligantes aromáticos e heterocíclicos acontece dentro de dois bolsos hidrofóbicos dos subdomínios IIA e IIIA, nomeados de sítio I e II, respectivamente (SUDLOW, 1975; SUDLOW, 1976).

Experimentos de espectroscopia de fluorescência de estado estacionário e resolvida no tempo, espectroscopia de absorção UV-Vis (Ultravioleta-Visível), dicroísmo circular (Dicroísmo Circular –DC), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy – FTIR) e cálculos de modelagem molecular demonstram que flavonoides, tais como: quercetina, canferol, luteolina, catequina, naringina, naringenina e genisteína (ZSILA, 2003; DUFOUR, 2005; MISHRA, 2005; ZHANG, 2008; JURASEKOVA, 2009; BOLLI, 2010), ligam-se próximo ao Trp214 que se localiza dentro do bolso hidrofóbico no subdomínio IIA da ASH (sítio I) e causam mudanças conformacionais na estrutura dessa albumina. A ASH pode se ligar rapidamente e com grande afinidade a vários ligantes diferentes, tendo as reações de equilíbrio ASH -ligante constantes de velocidade de pseudo primeira ordem típicas de 10^{-5}s^{-1} , ou seja, que a reação atinge o equilíbrio na ordem de 1 microssegundo (VORUM, H. 1999). Isso sugere a capacidade da proteína de alterar sua conformação interna de modo rápido. Bolsões hidrofóbicos, por um lado, e grupos substituintes carregados, por outro, devem auxiliar esses ligantes a se fixarem na proteína. Contudo, essa capacidade de alteração conformacional não é ilimitada; o próprio ligante tem que preencher certos requisitos estéricos para ligações de alta afinidade.

Além disso, a presença de um ligante pode impedir a ligação de outro (competição pelos sítios de ligação) e proteger a proteína contra desnaturação pelo calor ou pela ação da uréia; contra hidrólise enzimática, etc. Uma decorrência desse fato é que, apesar das alterações conformacionais na proteína induzidas pelos ligantes, a quantidade de hélices α não se altera significativamente (KRAGH-HANSEN, U. 1990). Em geral, as albuminas de mamíferos possuem um baixo conteúdo de triptofano e metionina e um alto conteúdo de cisteína e de aminoácidos carregados como os ácidos aspártico, glutâmico e lisina. A albumina bovina apresenta dois triptofanos (Trp 134 e Trp 212) o que a diferencia da albumina humana que apresenta apenas um triptofano (Trp 214). Além disso, a diferença entre a ASB e a ASH no sítio N-terminal resume-se a um aminoácido, sendo Asp-Thr-His para a ASB e Asp-Ala-His para ASH. Tanto a

albumina bovina quanto a humana apresentam uma sequência *N*-terminal XY-His que constitui um forte sítio fisiológico de coordenação para íons de cobre II. Este sítio é estável, pois os quatro nitrogênios do tripeptídeo amino-terminal formam uma forte ligação quadrado planar com o metal. Assim, a albumina humana apresenta, por exemplo, aproximadamente 75% de homologia com as seqüências das albuminas bovina e equina. Em experiências laboratoriais a Albumina Sérica Humana (ASH, do inglês *Human Serum Albumin*) é geralmente substituída pela Albumina Sérica Bovina (BSA, do inglês *Bovine Serum Albumin*) devido à sua maior disponibilidade e baixo custo. Como a ASH partilha de 76% de identidade e 88% de similaridade de sequência com a BSA, os resultados obtidos com a albumina bovina podem ser análogos aos da humana (CURRY, 2011).

Na técnica de espectroscopia de fluorescência o resíduo de aminoácido triptofano (Trp) é frequentemente usado para o estudo de ligação dessas albuminas com moléculas endógenas e exógenas. A estrutura da ASH possui apenas um triptofano, localizado na região IIA (Trp-214), e a estrutura da ASB possui dois triptofanos, um localizado na região IB (Trp-134) e outro na região IIA (Trp-212), conforme apresentado na **Figura 12** (SUGIO, 1999; PETERS, 1985).

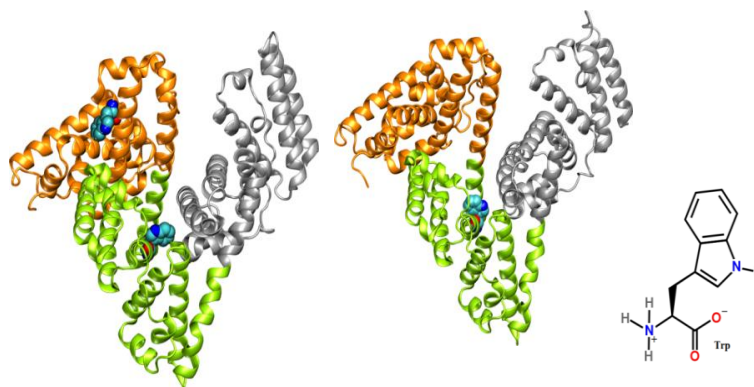


Figura 12. Da esquerda para a direita, estrutura cristalográfica da BSA (pdb: 3V03) e ASH (pdb: 1N5U), respectivamente. Nessas estruturas são mostradas a distinção de seus domínios I (**castanho**), II (**verde**) e III (**cinza**). Na ASB o triptofano Trp-134 está localizado no domínio I (**castanho**) e o Trp-212 no domínio II (**verde**), já na ASH o Trp-214 está localizado no domínio II (**verde**).

A xantona mangiferina apresenta um amplo espectro de atividades farmacológicas. Para que a mangiferina cause o efeito terapêutico desejado, existe a necessidade desta xantona glicosilada ser transportada por proteínas plasmáticas na corrente sanguínea para o seu local de ação. O estudo do mecanismo de ligação e transporte de mangiferina por proteínas plasmáticas, pode fornecer informações sobre a farmacocinética desse composto no organismo.

4-OBJETIVOS

Isolar, purificar e caracterizar a mangiferina obtida de folhas de mangueira (*Mangifera indica*), preparar diferentes derivados a partir deste produto natural e avaliar suas propriedades biológicas.

4.1-Objetivos específicos

1 – Avaliar diferentes metodologias de extração da mangiferina, comparando o método clássico (Soxhlet) com técnicas avançadas (irradiação com micro-ondas e ultrassom), além de testar diferentes solventes (etanol, metanol) para extração da mangiferina das folhas de *M. indica*.

2 - Identificar e quantificar a mangiferina presente nos extratos metanólico e etanólico por CLAE-DAD e comparar a eficiência dos métodos, quanto aos rendimentos obtidos e pureza dos produtos.

3 - Determinar a capacidade antioxidante, através do método radicalar com DPPH, dos diferentes extratos das folhas de mangueira.

4 - Realizar transformações químicas planejadas (acetilação, metilação, benzilação) na mangiferina para gerar novos compostos com possíveis propriedades biológicas.

5 - Avaliar as interações entre a proteína albumina sérica humana e os compostos por meio de estudos espectroscópicos e modelagem molecular.

6 – Avaliar a mangiferina e seus derivados quanto à suas potenciais atividades antitumorais, frente a linhagens de monócitos de origem humana.

5 - PARTE EXPERIMENTAL

5.1 - Material e Métodos

O solvente utilizado para os ensaios espectrofotométricos e análise por CLAE-DAD foi metanol grau espectroscópico (VETEC, RJ, Brasil) e todas as soluções aquosas foram preparadas usando água ultrapura, obtida em sistema de purificação Milli-Q (Millipore, SP, Brasil).

Os solventes graus analíticos (acetato de etila, acetona, éter de petróleo, diclorometano, etanol, éter etílico, metanol e dimetilformamida) e os reagentes carbonato de sódio anidro, cloreto de alumínio hexaidratado, bissulfito de sódio, ácido clorídrico concentrado, anidrido acético, hidróxido de sódio, sulfato de sódio anidro, formaldeído, DMAP, iodeto de metila, iodeto de etila, cloreto de benzila, 2,2-difenil-1-picril-hidrazil, 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) foram adquiridos da Vetec e/ou Tédia Brazil e utilizados sem purificação prévia.

O espectrofotômetro UV-Vis utilizado para as leituras de absorvâncias foi da marca NOVA 2000UV.

Os espectros de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) foram obtidos em espectrômetros de marca Bruker, modelo Ultrashield Plus (PPGQ – UFRRJ). Foi utilizado como referência interna o tetrametilsilano (TMS) e os solventes: clorofórmio (CDCl_3), metanol (MeOD) ou dimetilsulfóxido (DMSO-*D6*) para a solubilização das amostras. Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em parte por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz);

Os espectros de Infravermelho (IV) foram obtidos em espectrofotômetro da marca Bruker, modelo Vertex 70 (PPGQ-UFRRJ). As amostras sólidas foram pulverizadas e analisadas em pastilhas de KBr.

Os espectros de massa de alta resolução (EMAR) foram obtidos no equipamento Micromass Q-TOF (Waters, UK) do Instituto de Química da UNICAMP.

As análises por cromatografia de camada delgada analítica (CCDA) foram realizadas em cromatofolhas (alumínio) recobertas com gel de sílica 60 F₂₅₄ (camada de 0,2 mm), da marca Merck para o acompanhamento das reações.

Para as purificações realizadas por cromatografia de camada delgada preparativa foram utilizadas cromatoplasmas de vidro (20 x 20 cm, 500 μm) recoberta com gel de sílica F₂₅₄ da marca Silicycle.

Para os ensaios biológicos foram utilizadas placas para cultura de células de 96 poços, de fundo chato, estéril em poliestireno da marca (Suiça, TPPTM). Células THP-1 adquiridas do American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, EUA) foram cultivadas em meio RPMI-1640 completo (Roswell Park Memorial Institute) contendo 2 mM L-Glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL estreptomicina, e suplementado com 10% de SFB (HyClone Laboratories, Canadá), PBS (Phosphate-Buffered Saline, Sigma-Aldrich, EUA). Reagente colorimétrico sal monossódico de XTT (2, 3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -2H-tetrazólio-5-carboxanilida, Sigma-Aldrich, EUA), corante azul de Trypan, Sigma-Aldrich, EUA) e Leitor de placas iMark (BioRad).

Outros equipamentos

- Reator de micro-ondas - Modelo *Discover* - *CEM Inc*;
- Aparelho Aaker para medição dos pontos de fusão;
- Evaporador rotatório da Buchi - Modelo R-210;
- Placas de aquecimento e agitação da marca Fisaton e IKA.
- Jasco J-815 fluorimeter, PFD-425S15F.

5.1.2 – Folhas de *Mangifera indica* L.

As folhas da *Mangifera indica* L. var Alphonso (Anacardiaceae) foram coletadas no campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, uma primeira colheita feita apenas para testar o método, outra coleta foi realizada no mês de abril de 2015, onde foi observado que os rendimentos do produto natural obtido não apresentam variações significativas. Inicialmente, as folhas foram lavadas e secas naturalmente em sala ventilada, a temperatura ambiente, por aproximadamente 48 horas. As folhas secas foram então pulverizadas em liquidificador semi-industrial e armazenadas em frascos de plásticos a temperatura ambiente.

5.1.3. - Extração e isolamento de mangiferina das folhas de mangueira com Soxhlet

A extração com Soxhlet foi usada como um método referência para comparação com a extração assistida por micro-ondas. Inicialmente 10,0 g de folhas de *M. indica* pulverizadas foram colocadas no cartucho de papel em um aparelho de Soxhlet (**Figura 13**) e extraídas com 120,0mL de *n*-hexano, por 12 horas, etapa realizada para remoção de ceras e lipídeos. Em seguida, o material vegetal desengordurado foi extraído com

120 mL de metanol P.A durante 18 horas. Após esse tempo, o extrato etanólico foi resfriado e concentrado à pressão reduzida em evaporador rotatório. O extrato bruto concentrado foi redissolvido em etanol, e esta solução foi mantida no freezer por um dia onde ocorreu a precipitação de um sólido amarelo pálido. O material foi filtrado, a vácuo, em funil de Buchner, lavado sucessivas vezes com etanol gelado e após secar forneceu 0,220g (rendimento 2,2%) de um sólido amorfo de coloração amarelo pálido caracterizado como mangiferina. O sólido obtido foi caracterizado através do seu ponto de fusão (p.f : 271° C) comparado com o da literatura (p.f =270-272°C – MISHRA, 2006), pelos dados de IV, RMN e EM com os valores descritos na literatura Shaheen Faizi (2006), e através da comparação por CCDA com um padrão comercial de mangiferina (M3547-1G, Sigma, 98% grau por HPLC) usando o sistema de solvente *n*-butanol: água: ácido acético (4:2:2, Rf = 0,82).

Em uma segunda alternativa de extração utilizando o extrator Soxhlet, houve a mudança do solvente *n*-hexano por éter de petróleo no processo para desengordurar. Inicialmente 10g de folhas trituradas contidas no cartucho de papel foram extraídas com 120 mL de éter de petróleo durante 8 horas. Após esse período o material desengordurado foi extraído com 120 mL de etanol P.A. (95%) durante 18 horas. O extrato etanólico foi concentrado em evaporador rotatório, e o resíduo bruto foi lavado repetidas vezes com éter de petróleo. Em seguida, o resíduo bruto foi solubilizado em etanol, e esta solução etanólica foi mantida em freezer durante um dia, onde ocorreu a precipitação do sólido. O material foi filtrado a vácuo em funil de Buchner, lavado sucessivas vezes com etanol gelado e após secar forneceu 0,310 g (rendimento 3,1%) de um sólido amorfo de coloração amarelo pálido caracterizado como mangiferina.



Figura 13. Aparelho de Soxhlet utilizado na extração da mangiferina.

5.1.4 - Extração da mangiferina com uso de reator de Micro-ondas

Cerca de 10g de folhas de mangas trituradas foram desengorduradas previamente por 8 horas com éter de petróleo (60°C) através de extrator Soxhlet. Em seguida, o material vegetal foi extraído com 50mL de etanol usando reator micro-ondas (**Figura 14**) com 62 W de potência, na temperatura de 60-70°C, durante 56 minutos (VENKATESH *et al.*, 2010). O extrato etanólico obtido foi filtrado e em seguida concentrado em rota vapor. O extrato bruto concentrado foi desengordurado por repetidas lavagens com éter de petróleo e, finalmente o resíduo dissolvido em etanol à temperatura ambiente. O extrato etanólico foi deixado no freezer durante uma noite para que houvesse a precipitação de um sólido amarelo claro. O sólido foi filtrado, a vácuo, em funil de Buchner, lavado sucessivas vezes com etanol gelado e, em seguida recristalizado em etanol: água (5:2) fornecendo 0,200 g (rendimento 2,0%) de um sólido amarelo-pálido caracterizado como mangiferina.

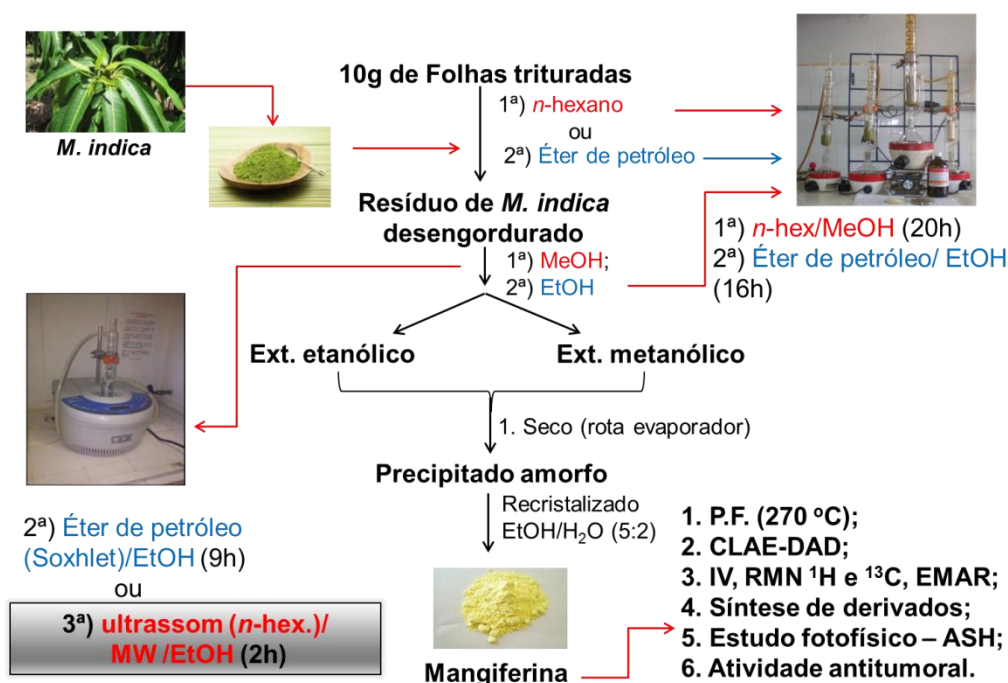


Figura 14. Reator de microondas *CEM Discover System*, utilizado na extração da mangiferina.

5.1.5- Extração da mangiferina com uso de Ultrassom e Micro-ondas

Neste método de extração da mangiferina foi utilizado o sistema de ultrassom com sonda de imersão para desengordurar as folhas da mangueira antes da extração no reator de micro-ondas. Cerca de 10,0g de folhas de manga pulverizadas foram desengorduradas previamente por 1 hora com *n*-hexano (100,0mL) usando sistema de ultrassom com sonda de imersão. Após remoção dos componentes apolares do material vegetal, o mesmo foi filtrado a vácuo. Em seguida este material passou por uma nova extração com 50,0mL de etanol usando reator micro-ondas com 62 W de potência, na temperatura de 70°C, durante 1 hora. Após extração, o extrato etanólico foi filtrado a vácuo e a solução obtida foi concentrada em evaporador rotatório, o resíduo contido no

balão foi novamente desengordurado com 3x 20,0 mL de éter de petróleo, e finalmente o resíduo foi solubilizado com etanol (40,0mL), e deixado no freezer durante a noite, onde houve a precipitação de um sólido amarelo claro. O sólido foi filtrado, a vácuo, em funil de Buchner, lavado sucessivas vezes com etanol gelado, e em seguida recristalizado em etanol: água (5:2) fornecendo 0,198g (rendimento 1,98%) de um sólido amorfo amarelo-pálido de mangiferina. O esquema 8 a seguir, representa o fluxograma da metodologia de extração utilizado nesse trabalho.



Esquema 8. Fluxograma de extração da mangiferina das folhas de *Mangifera indica L.*

5.1.6. Determinação de fenólicos totais nos extratos com reagente de Folin-Denis

A determinação do teor de fenóis totais presentes nos extratos estudados foi feita por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin-Denis com modificações, utilizando o reagente de Folin-Denis (FOLIN e DENIS, 1912; MEDA *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2006).

Para cada extrato foram preparados soluções na concentração de 100 mg/mL em água Milli-Q, e todas as análises foram feitas em triplicatas. A uma alíquota de 0,5 mL (utilizando micropipetas de 1000 µL) dessa solução adicionou-se 2,5 mL do reagente de Folin-Denis, e após 5 minutos adicionou-se 2,0 mL de uma solução aquosa 14% de

carbonato de sódio, recém-preparada. A mistura reacional ficou em repouso por 2h, e observou-se a mudança da coloração da solução de esverdeada para azul. Em seguida, fez-se a leitura da sua absorvância a 760 nm, utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico e água Milli-Q como branco (PÉREZ *et al.*, 2007).

O teor de fenóis totais dos extratos foi determinado por interpolação da absorvância das amostras contra uma curva analítica construída com padrões de ácido gálico e expressos como mg de equivalentes de ácido gálico por 100g de extrato ($\text{mgE}_{\text{AG}}/100\text{g}$).

5.1.7. Preparo do reagente de Folin-Denis

Em um balão de fundo redondo de 250 mL acoplado a um condensador de refluxo, foram inseridos 20g de tungstato de sódio diidratado ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 4g de ácido fosfomolibdico ($\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]_x \cdot \text{H}_2\text{O}$), 10 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) e 152 mL de água Milli-Q. Após duas horas de refluxo, a solução foi resfriada a temperatura ambiente, passada para balão volumétrico de 200 mL e seu volume completado com água Milli-Q. A solução apresentou coloração esverdeada, foi armazenada em frasco âmbar, sob refrigeração até o momento do uso (LIANDA, 2009).

5.1.8. Preparo da curva analítica do ácido gálico

Foi preparada uma curva analítica a partir da solução metanólica do padrão de ácido gálico ($1 \text{ mg/mL} \equiv 0,0059 \text{ mM}$). Alíquotas de 2, 6, 8, 10, 20, 30, 50, 75 e 100 μL desta solução mãe foram misturadas com 2,5 mL do reagente de Folin-Denis, e após 5 minutos adicionou-se 2,0 mL de solução aquosa 14% de carbonato de sódio, recém-preparada. As leituras foram feitas a 760 nm, utilizando-se água Milli-Q como branco. A curva analítica foi construída a partir do programa Origin 6.0, e sua equação foi definida como $Y = 0,083 + 81,759 \cdot X$, onde Y é a absorvância a 760 nm, X é a concentração de ácido gálico. O coeficiente de correlação (R) obtido foi de 0,999. Através dessa equação determinou-se indiretamente o teor de fenóis totais nas amostras (concentração X), substituindo Y pela média das absorvâncias de cada amostra de extrato. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

5.1.9. Determinação de flavonóides totais nos extratos com cloreto de alumínio

O teor de flavonóides totais foi determinado segundo adaptação da metodologia descrita na literatura (MEDA *et al.*, 2005; AHN *et al.*, 2007) utilizando como reagente o cloreto de alumínio. Foram preparadas as soluções dos extratos a 500 mg/mL, 100 mg/mL ou 50 mg/mL em metanol UV-HPLC/água Milli-Q (1:1). Foram feitas triplicatas das amostras. A 2,0 mL da solução de extrato e foram adicionados 2,0 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio 2%. Após 30 minutos em repouso as soluções foram lidas a 415 nm, utilizando metanol como branco.

A concentração dos flavonóides totais dos extratos foi determinada utilizando uma curva analítica estabelecida com soluções de concentração conhecida para quercetina padrão. Os resultados foram expressos, pela média de três determinações, em mg de equivalentes de quercetina por 100g de extrato (mgE_Q/100g).

5.2. Preparo da curva analítica com quercetina

Para a construção da curva analítica foi preparada uma solução padrão de quercetina, em metanol (1,78 mg/mL \equiv 0,0059 mM). Em seguida, alíquotas de 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 μ L desta solução padrão foram misturadas 2,0 mL solução metanólica de cloreto de alumínio 2%. Após 30 minutos em repouso, foi realizada a leitura espectrofotométrica em 415 nm, utilizando metanol como branco. A curva analítica foi feita a partir do programa Origin 6.0, sendo obtida a equação da reta $Y = 0,00482 + 47,44374 \cdot X$, onde Y é a absorbância a 415 nm e X é a concentração de quercetina. O coeficiente de correlação (R) obtido foi de 0,998. Através dessa equação determinou-se indiretamente o teor de flavonóides totais nos extratos, onde se substituiu Y pela média da absorbância de cada extrato. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

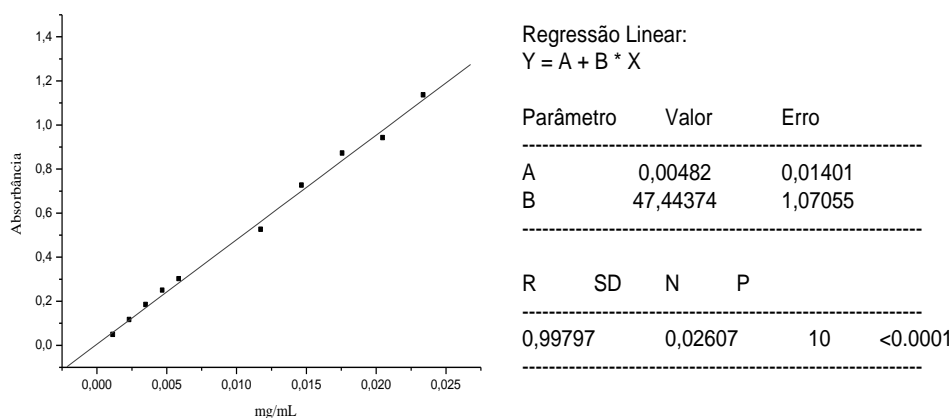


Figura 15. Curva analítica das médias das concentrações da solução de quercetina *versus* as leituras de absorvâncias (415 nm), após o ensaio com cloreto de alumínio.

5.2.1- Avaliação da capacidade antioxidante através do método DPPH

A avaliação da capacidade antioxidante dos extratos de folha de manga foi realizada segundo metodologia descrita por (PÉREZ, 2007), com pequenas alterações. A determinação da atividade antioxidante foi realizada com o radical 2,2-difenil-picril-hidrazil, no espectrofotômetro de ELISA, com leitura a 520 nm. A atividade antioxidante também pode ser avaliada por leitura em UV-Vis a este comprimento de onda, mas a utilização das microplacas dá a possibilidade da análise imediata de todas as absorvâncias presentes nos poços, sendo um método mais rápido e eficiente. A porcentagem de atividade antiradicalar (%AA) é calculada através da descoloração do radical DPPH[•], segundo a equação abaixo (MENSOR, 2001). Para determinação da atividade antiradicalar (%AA), foram selecionados para o controle negativo três valores, dos quais foi feita a média usada no cálculo ($Abs_{controle}$), e para o branco foi feita a média das leituras dos dois poços (10 e 11).

$$\%AA = 100 - \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100}{Abs_{controle}}$$

Onde: Abs amostra = absorvância da amostra com a solução de DPPH
 Abs branco = absorvância da amostra com metanol
 Abs controle = absorvância do metanol com a solução de DPPH

Para a determinação do CE₅₀ foram preparadas soluções dos extratos em metanol (extrato hexânico, éter de petróleo, etanólico em Soxhlet, e etanólico MW), partindo de

uma solução inicial de 1000 µg/mL, foram feitas as seguintes diluições: concentrações (5, 7, 9, 11, 13, 15 µg/mL).

Os ensaios foram realizados utilizando duas microplacas com 96 poços para cada amostra, com três concentrações em cada linha e em ordem crescente de diluição, onde foram pipetados 71µL das soluções (fileiras B, C e D, da coluna 1 a 11). Como controle, nos seis primeiros poços (fileira A) foram pipetados 71µL de metanol, e para o branco foi pipetados 29µL de metanol e 71µL da solução (colunas 10 e 11 da microplaca). Em seguida foram pipetados 29µL da solução de DPPH e adicionados em cada poço utilizado, exceto nos relativos aos brancos. Após 30 minutos de incubação no escuro, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro ELISA a 520nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Foram utilizadas para a construção das curvas, as concentrações iniciais presentes nos poços a partir das diluições que foram feitas a 71%. Sendo assim, pode ser calculada as concentrações obtidas em cada poço, representada por $[]_{\text{poço}} = 71 \mu\text{L} \cdot []_{\text{sol}}$. A concentração efetiva, quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (CE₅₀), foi determinada para as amostras usando o programa Origin 6.0, a partir de uma curva exponencial de primeira ordem, obtida plotando na abscissa as concentrações da amostra (µg/mL) e na ordenada, a porcentagem de atividade antioxidante (% AA).

Para avaliação do CE₅₀, foram preparadas soluções-estoque do padrão quercetina na concentração de 100 µM e foram feitas algumas diluições aleatórias para uma primeira avaliação (em triplicata) em busca do CE₅₀. Os dados obtidos foram utilizados para a construção do gráfico (**Figura 16**) que relaciona o percentual de atividade e a concentração da substância ensaiada, no caso a quercetina. Juntamente com o gráfico, obteve-se a equação da reta, que permitiu o cálculo do valor de CE₅₀, como exemplificado a seguir:

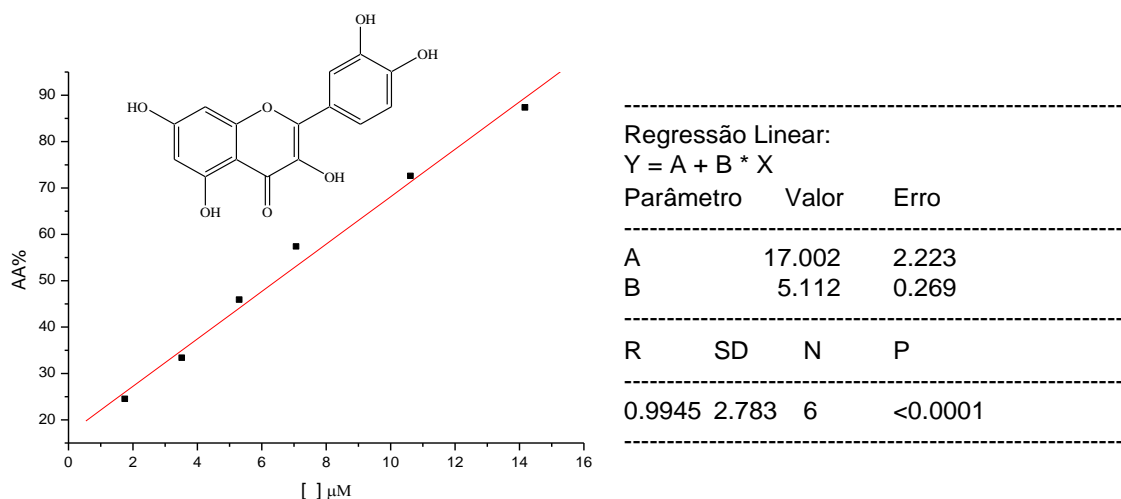


Figura 16. Gráfico que relaciona o percentual de atividade antioxidante e a concentração da quercetina

$$Y = A + B \cdot X$$

$$50 = 17,002 (\pm 2,223) + 5,112 (\pm 0,269) CE_{50}$$

$$CE_{50} = 6,46 \mu M$$

5.2.2- Quantificação de mangiferina nos extratos das folhas de *M. indica* por CLAE-DAD

A determinação de mangiferina nos diferentes extratos de *M. indica* foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de fotodiodos (CLAE-DAD). Um cromatógrafo líquido Prominence (Shimadzu) equipado com duas bombas (LC-20AT), detector de fotodiodos (SPD-M20A), injetor automático (SIL-10A) e forno para coluna (CTO-20A) foi utilizado para quantificação da mangiferina nos extratos. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna analítica de fase reversa C-18 (25cm x 4,6 mm, 5 μm de partícula, Betasil-Thermo), tendo como fase móvel água Mill-Q com 1% de ácido acético (solvente A) e metanol (solvente B), fluxo constante de 1,0 mL/min e temperatura de 30 °C. O volume de injeção foi de 20 μL e a detecção foi realizada a 280nm. O gradiente de eluição iniciou-se com 35% do solvente B até 70% por 5 minutos, 70 a 95% de B em 10 min., 95 a 35% B em 12 min, onde foi mantido a 35% de B por 3 minutos. Os cromatogramas foram adquiridos e processados através do software LCSolution (Shimadzu). Todas as soluções dos extratos de *M. indica* foram preparadas dissolvendo-se 1mg do extrato em 1,5mL de metanol/água (2:1, e 20 μL foram injetados no cromatógrafo após serem filtrados através de um filtro

de seringa (13mm, porosidade de 0,45 μm , PVDF, Analítica). A identificação e quantificação da mangiferina presente nos extratos foi baseada na comparação dos tempos de retenção e das curvas no UV com a mangiferina comercial (Sigma M3547-1g, 98% grau HPLC). A mangiferina foi quantificada com base na área do pico e comparação com a curva padrão usando método de calibração externo para esta substância com diferentes concentrações (5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 35,0 e 100 $\mu\text{g/mL}$). Para a construção da curva foi utilizado o valor médio dessas áreas nas suas concentrações correspondentes, estes dados foram tratados no programa Origin 6.0 e sua equação foi definida como $Y = -262,556 + 91,464.X$, com coeficiente de correlação (R) de 0.99883 (**Figura 17**). Todas as análises foram realizadas com três repetições e os resultados quantitativos foram expressos em mg de mangiferina por 100 mg de extrato. O tempo de retenção do padrão de mangiferina foi de 4,0 min.

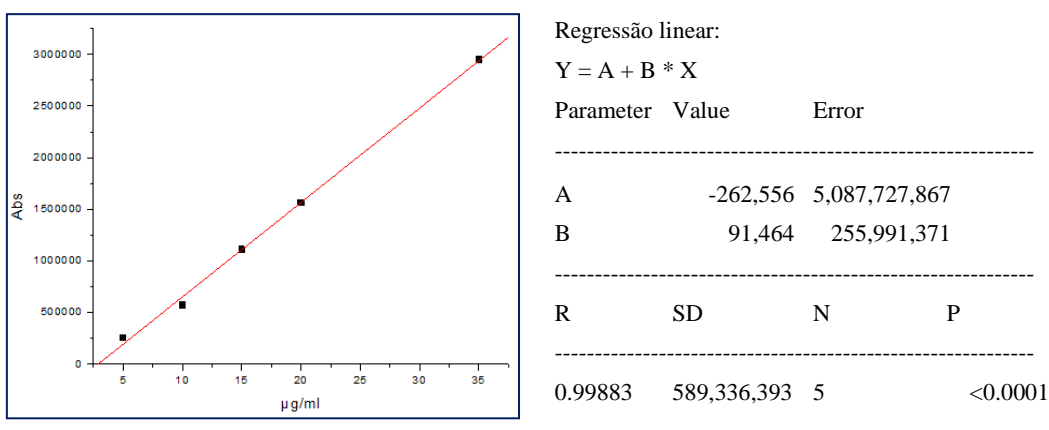
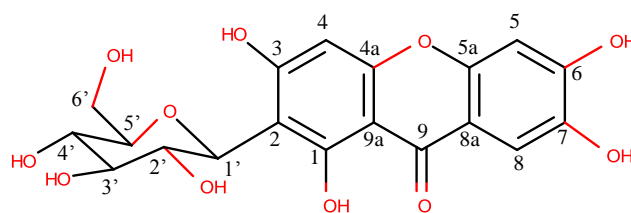


Figura 17. Curva analítica das médias das concentrações da solução etanólica da MGF *versus* as áreas nos cromatogramas.

5.2.3- Caracterização Estrutural da Mangiferina

A completa elucidação estrutural da mangiferina isolada dos extratos da folha de *M. indica* no presente trabalho foi realizada usando as técnicas RMN, IV, EMAR, e a através da determinação do seu ponto de fusão, e o seu grau de pureza através da análise por CLAE-DAD (espectros no anexo, pag. 140).

A mangiferina foi isolada como um sólido amarelo pálido com P.F. = 270°C.



2-C- β-D-glucopiranosil- 1,3, 6, 7-tetraidroxixantona

Tabela 1. Deslocamento químico de RMN ^1H e RMN ^{13}C (500MHz, DMSO) da mangiferina isolada comparada com os dados da literatura (500MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).

C	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Literatura* $\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	Literatura* $\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	----	----	162.26	163.21
2	----	----	108.09	108.80
3	----	----	164.31	165.29
4	6.38 (1H, s)	6.60 (1H, s)	93.77	94.41
4a	----	----	156.68	157.62
5	6.87 (1H, s)	7.14 (1H,s)	103.10	103.46
5a	----	----	151.24	152.14
6	----	----	154.49	156.05
7	----	----	144.19	145.51
8	7.39 (1H, s)	8.08 (1H, s)	108.54	109.35
8a	----	----	112.19	113.26
9	----	----	179.56	180.38
9a	----	----	101.77	102.90
1'	4.86 (1H, d)	5.84(1H, d)	70.70	72.06
2'	4.49 (1H, d)	5.22 (1H, t)	82.06	82.93
3'	4,06(1H, d)	4.47(1H, t)	79.46	80.66
4'	3,71(1H, m)	4.42(1H, t)	71.11	72.97
5'	3,40(1H, m)	4.19(1H, ddd)	73.54	75.62
6'	H _A =4,61(1H, dd) H _B =4,59(1H, dd)	H _A =4.56(1H,dd) H _B =4.45(1H,dd)	61.97	62.89
1-OH	13.76(1H, s)	14.50	----	----
3-OH	10.58	12.10	----	----
6-OH	----	5.12	----	----
7-OH	----	5,33	----	----

* Shaheen Faizi (2006).

EMAR (ES+) (m/z): 423,0927 ($[\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_{11}+1\text{H}]^{+}$), m/z calculado = 423,084911, variação = 0,0018%

Dados de infravermelho (pastilha em KBr, cm⁻¹):

$\nu_{\text{O-H}}$ = 3364,91 (estiramento –OH associado intermolecular, banda larga);

$\nu_{\text{O-H}}$ = 3181,69 (estiramento –OH em ligação de hidrogênio com C=O)

$\nu_{\text{C-H}}$ ($\text{C}_{\text{sp}3}$) = 2939,17 (estiramento C-H de CH_2);

$\nu_{\text{C-H}}$ ($\text{C}_{\text{sp}3}$) = 2891,44 (estiramento C-H de carbono terciário);

$\nu_{C=O} = 1648,95$ (estiramento de carbonila duplamente conjugada em sistema aromático, esqueleto xantônico);

$\nu_{C=C} (C_{sp^2}) = 1619,53, 1592,53$ (vibração da ligação C=C do anel aromático);

$\delta_{C-H} (C_{sp^2}) = 1490,32$ (deformação angular de CH₂);

$\delta_{C-OH} = 1251,17$ (deformação angular);

$\delta_{C-O} = 1190,91$ (deformação angular de éter);

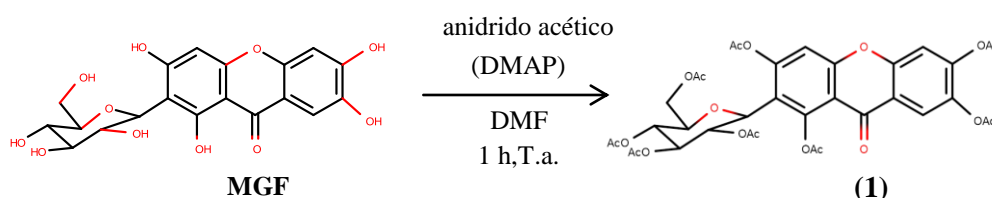
$\delta_{C-O-C} = 1074,23 - 1093,99$ (deformação angular de C-O de éter);

$\delta_{C-O} = 1050,60$ (deformação angular de C-O de éter);

$\delta_{C=C} (C_{sp^2}) = 828,33$ (vibração da ligação C=C de aromático tetrassubstituído);

5.2.3.1-Modificação Estrutural da Mangiferina (Síntese de derivados)

5.2.3.2- Síntese de 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1,3,6,7-tetraacetoxixantona **1**



Esquema 9. Síntese do derivado acetilado **1**.

Em um balão de 50 mL, uma solução de mangiferina (0,200 g, 0,4739 mmol) em dimetilformamida (16 mL, 206,7 mmol) foi tratada com anidrido acético (12 mL, 126,9 mmol) e depois agitada a temperatura ambiente durante 60 minutos (HERAVI, *et al.* 2006). O término da reação foi acompanhada por CCDA em sílica gel com eluente hexano/acetato de etila 75%. A mistura reacional foi vertida em água gelada e em seguida extraiu-se com acetato de etila (3 x 20mL) as frações solúveis. A fase orgânica foi reunida, particionada com 10 mL de HCl 10% , 15 mL de solução de NaHCO₃ 20% e 15 mL de solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado para fornecer a octaacetil mangiferina (AcMGF). O produto foi recristalizado em uma mistura de acetona/água para fornecer um sólido amarelo-pálido de peso 340mg (rendimento 93,0 %). A caracterização se deu por determinação experimental dos pontos de fusão, espectrometria no infra-vermelho (IV), espectrometria de massas de alta resolução (EMAR) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) e de carbono treze (RMN¹³C) (espectros no anexo, pag. 142).

P.f: 142°C (Lit: 141-143 – BHATIA, 1967) e 94,70% de pureza determinado por CLAE-DAD.

EMAR (ES+) (m/z): 759,1772 ([C₃₅H₃₄O₁₉+1H]⁺), m/z calculado = 759,1694, variação = 0,0010%

Dados de infravermelho (pastilha em KBr, cm⁻¹):

$\nu_{C=O}$ (C_{sp2}) = 1747,30 (estiramento C=O carbonila de éster);

$\nu_{C=C}$ (C_{sp2}) = 1666,30 (vibração da ligação C=C do anel aromático);

$\nu_{C=O}$ (C_{sp2}) = 1618,09 (estiramento de carbonila duplamente conjugada em sistema aromático);

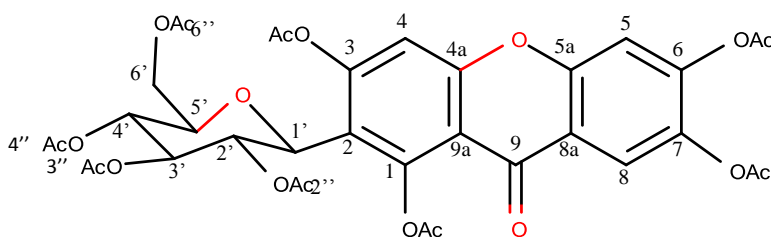
δ_{C-H} (C_{sp3}) = 1454,16 (deformação angular de CH₂);

δ_{C-H} (C_{sp3}) = 1369,30 (deformação angular de CH₃);

ν_{C-O-C} = 1215,01 e 1170,66 (estiramento C-O de éter);

δ_{C-O} = 1043,37 (deformação angular de éter);

$\delta_{C=C}$ (C_{sp2}) = 877,51 (vibração da ligação C=C de aromático tetrassubstituído).



2-β-D-tetraacetoxiglicopiranosil-1,3,6,7-tetraacetoxixantona **1**.

Tabela 2. Deslocamentos químicos de RMN ¹H e RMN ¹³C (500MHz, CDCl₃) para **1**.

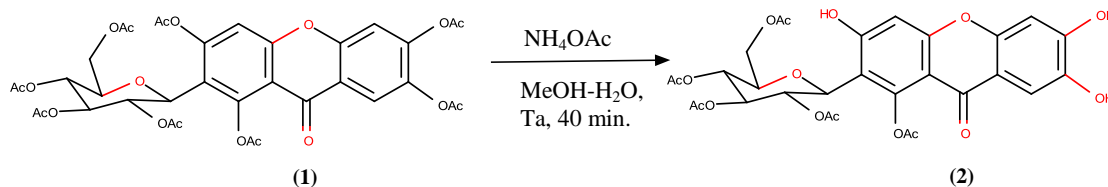
C	δ ¹ H (ppm)	Literatura* δ ¹ H (ppm)	δ ¹³ C (ppm)	Literatura* δ ¹³ C (ppm)	HMQC	COSY	HMBC
1	----	----	152.90	152.90			
2	----	----	118.26	118.35			
3	----	----	154.36	154.44			
4	7.27 (1H, s)	7.19 (1H, s)	111.73	111.62	C-4		C2;C3;C4 ^a
4a	----	----	157.41	156.44			
5	7.41 (1H, s)	7.31 (1H, s)	112.67	112.88	C-5		C1;C7;C9;C10 ^a
5a	----	----	147.65	147.72			
6	----	----	149.56	152.90			
7	----	----	139.35	139.44			
8	8.02 (1H, s)	7.92 (1H, s)	120.79	120.75	C-8		C1;C7;C9;C10 ^a
8a	----	----	120.11	120.13			
9	----	----	173.59	173.55			
9a	----	----	120.11	112.09			
1'	4.87 (1H, d)	4.81 (1H, d)	72.70	72.47	C-1'	H-2'	C1;C2
2'	5.74 (1H, t)	5.66 (1H, t)	72.40	69.67	C-2'	H-1'; H-3'	
3'	5.31(1H, t)	5.25(1H, t)	74.34	74.52	C-3'	H-2'; H-4'	C4';C3''
4'	5.19(1H, t)	5.11 (1H, t)	68.11	68.35	C-4'	H-3'; H-5'	C3';C5';C6'

5'	3.82(1H, dd)	3.78(1H,dd)	76.52	76.61	C-5'	H-4';H-6'A;	C4';C5';C6'' C6''
6'	H _A =4.00(1H,d) H _B =4.43(1H,dd)	H _A =3.94(1H,d) H _B =4.35(1H,dd)	61.89	62.02	C-6'	H-6'B	
1- OCOCH ₃	2.54	2.44					
3- OCOCH ₃	2.50	2.23					
6- OCOCH ₃	2.35	2.24					
7- OCOCH ₃	2.33	2.42					
2''- OCOCH ₃	2.08	1.98					
3''- OCOCH ₃	2.07	2.00					
4''- OCOCH ₃	2.04	1.95					
6''- OCOCH ₃	1.81	1.73					
1-O \overline{C} COCH ₃			170.50	170.38			
3- O \overline{C} COCH ₃			170.31	170.16			
6- O \overline{C} COCH ₃			169.63	169.76			
7- O \overline{C} COCH ₃			168.51	169.53			
2''- O \overline{C} COCH ₃			168.05	168.43			
3''- O \overline{C} COCH ₃			167.70	167.89			
4''- O \overline{C} COCH ₃			167.65	167.51			
6''- O \overline{C} COCH ₃			167.24	167.11			
			21.28	20.27	C-2'		
			22.20	21.16	C-1		
			21.38	20.60	C-6		
-OCOCH ₃			20.76	20.60	C-6'		
			20.68	20.56	C-7		
			20.63	20.56	C-3'		
			20.48	20.51	C-4'		
			20.41	20.33	C-3		

* Shaheen Faizi (2006).

5.2.3.3- Síntese de 2-β-D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-hidroxixantona

2



Esquema 10. Síntese do derivado 2.

Em um balão de 25 mL foram adicionados mangiferina acetilada 1 (0,1 g, 0,132 mmol), 10 mL de MeOH aquoso (1:4) e NH₄OAc (0,081g, 1,056 mmol) (RAMESH, *et al.*, 2003). A reação foi acompanhada por CCDA em sílica gel com eluente hexano/acetato de etila/ácido fórmico (45: 53: 2). A mistura reacional foi concentrada, o resíduo foi extraído com acetato de etila (3 x 10mL), e seco com sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado fornecendo um sólido branco de peso 79.7 mg (rendimento 96.02%) e P.f: 185°C, após recristalização em uma mistura de solventes acetona/água. O grau de pureza do derivado parcialmente desacetilado foi de 99,0% determinado por análise de CLAE-DAD. A caracterização se deu por determinação experimental do

ponto de fusão, espectrometria no infra-vermelho (IV), espectrometria de massas de alta resolução (EMAR) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) e de carbono treze (RMN¹³C) (espectros no anexo, pag. 145).

EMAR (ES+) (m/z): 633,1456 ([C₂₉H₂₈O₁₆ + 1H])⁺, m/z calculado = 633,1377, variação = 0,0012%

Dados de infravermelho (pastilha em KBr, cm⁻¹):

$\nu_{\text{O-H}} = 3366,25$ (estiramento -OH associado, banda larga);

$\nu_{\text{C-H}} (\text{C}_{\text{sp}3}) = 2920,85$ (estiramento C-H de CH₂);

$\nu_{\text{C-H}} (\text{C}_{\text{sp}3}) = 2851,42$ (estiramento C-H de carbono terciário);

$\nu_{\text{C=O}} = 1742,48$ (estiramento de carbonila de éster);

$\nu_{\text{C=O}} = 1615,20$ (estiramento de carbonila duplamente conjugada em sistema aromático, esqueleto xantônico);

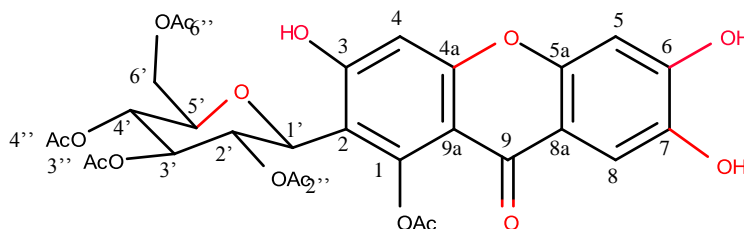
$\delta_{\text{C-H}} (\text{C}_{\text{sp}3}) = 1473,44$ (deformação angular de CH₂);

$\delta_{\text{C-H}} (\text{C}_{\text{sp}3}) = 1367,37$ (deformação angular de CH₃);

$\nu_{\text{C-O-C}} = 1215,01$ (estiramento C-O de éter);

$\delta_{\text{C-O}} = 1043,69$ (deformação angular de éter);

$\delta_{\text{C=C}} (\text{C}_{\text{sp}2}) = 837,97$ (vibração da ligação C=C de aromático tetrassubstituído).



2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-hidroxi-xantona **2**.

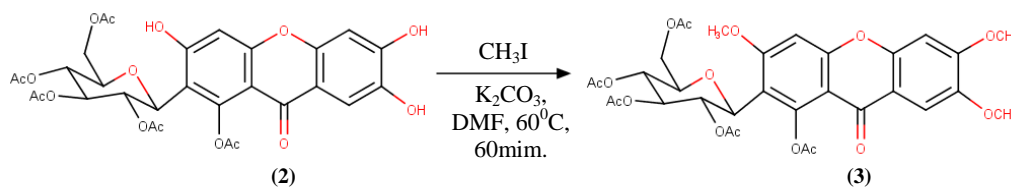
Tabela 3. Deslocamentos químicos de RMN¹H e RMN¹³C (400MHz, MeOD) para **2**.

C	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	----	158.30
2	----	113.57
3	----	158.51
4	6.78 (1H, s)	99.42
4a	----	160.86
5	6.83 (1H, s)	101.85
5a	----	150.84
6	----	153.43
7	----	143.58
8	7.43 (1H, s)	108.43
8a	----	114.28
9	----	174.40
9a	----	114.28

1'	4.96* (1H, d)	71.65
2'	5.71 (1H, t)	70.68
3'	5.37(1H, t)	74.58
4'	5.20(1H, t)	68.24
5'	4.00(1H, d)	76.00
6'	H _A =4.21(1H,dd) H _B =4.45(1H,dd)	61.89
1-OH	----	
3-OH		
6-OH		
7-OH		
1- <u>OCOCH₃</u>	2.52	
2''- <u>OCOCH₃</u>	2.08	
3''- <u>OCOCH₃</u>	2.05	
4''- <u>OCOCH₃</u>	2.01	
6''- <u>OCOCH₃</u>	1.80	
1- <u>O</u> COCH ₃		170.93
2''- <u>O</u> COCH ₃		170.01
3''- <u>O</u> COCH ₃		170.35
4''- <u>O</u> COCH ₃		169.61
6''- <u>O</u> COCH ₃		169.79
1- <u>OCOCH₃</u>		20.51
2''- <u>OCOCH₃</u>		20.02
3''- <u>OCOCH₃</u>		19.45
4''- <u>OCOCH₃</u>		19.26
6''- <u>OCOCH₃</u>		18.89

4.96* (1H, d) se encontra no mesmo deslocamento químico do solvente MeOD.

5.2.3.4- Síntese de 2-β-D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-trimetoxixantona **3**



Esquema 11. Síntese do derivado **3**.

Em um balão de 10 mL foi adicionada a mangiferina parcialmente desacetilada **2** (0,05g, 0,08mmol), juntamente com 2,38mL de DMF anidro, K₂CO₃ anidro (0,033g, 0,24mmol) e CH₃I (0,033g, 0,24mmol) (FAIZI *et al.*, 2006). O fim da reação foi acompanhada por CCDA em sílica gel com eluente hexano/acetato de etila/ácido fórmico (45: 53: 2). A mistura reacional foi concentrada em evaporador rotativo e o resíduo foi solubilizado com acetato de etila (10mL), a fase orgânica foi particionada com 10mL de H₂O, em seguida 10mL de solução 10% de bissulfito de sódio e posterior lavagem com 20mL de H₂O. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄, o solvente evaporado para fornecer o produto **3** como um sólido branco de peso 47,6mg (rendimento 89,81%) e P.f: 140°C, após recristalização em uma mistura de solventes

acetona/água. O produto apresentou pureza de 94,0% determinado por CLAE-DAD. A caracterização se deu por determinação experimental do ponto de fusão, espectrometria no infra-vermelho (IV), espectrometria de massas de alta resolução (EMAR) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) e de carbono treze (RMN¹³C).

EMAR (ES+) (m/z): 675,1925 ([C₃₂H₃₄O₁₆ + 1H])⁺, m/z calculado = 675,1847, variação = 0,0011%) (espectros no anexo, pag. 148).

Dados de infravermelho (pastilha em KBr, cm⁻¹):

ν_{C-H} (C_{sp3}) = 2931,46 (estiramento C-H de -CH₂-);

$\nu_{C=O}$ (C_{sp2}) = 1745,38 (estiramento da carbonila de éster);

$\nu_{C=O}$ (C_{sp2}) = 1618,09 (estiramento de carbonila conjugada ao sistema aromático);

δ_{C-H} (C_{sp3}) = 1459,94 (deformação angular CH₂);

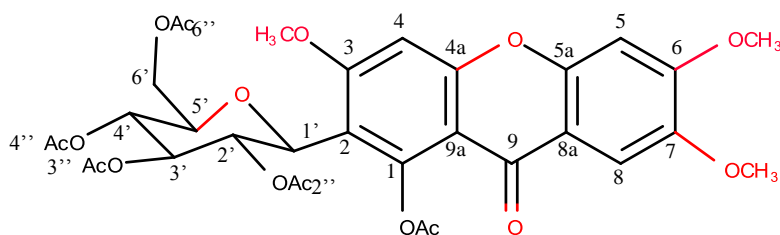
δ_{C-H} (C_{sp3}) = 1369,30 (deformação angular CH₃);

ν_{C-O-C} = 1213,08 (estiramento assimétrico de éter);

ν_{C-O} (C_{sp2}) = 1107,01 (estiramento C-O de éster);

ν_{C-O} = 1035,65 (deformação angular de éter);

$\delta_{C=C}$ (C_{sp2}) = 833,15 (vibração da ligação C=C de aromático tetrassubstituído);



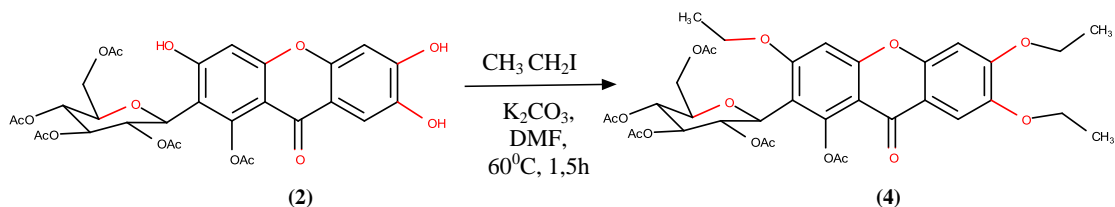
2-β-D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-trimetoxixantona **3**

Tabela 4. Deslocamentos químicos de RMN ¹H e RMN¹³C (500MHz, CDCL₃) para **3**.

C	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	----	161.29
2	----	114.03
3	----	158.88
4	6.81 (1H, s)	98.01
4a	----	163.51
5	6.83 (1H, s)	99.12
5a	----	155.08
6	----	158.70
7	----	146.85
8	7.54 (1H, s)	105.35
8a	----	151.26
9	----	173.90
9a	----	115.28
1'	4.82 (1H, d)	72.37
2'	5.95 (1H, t)	71.81
3'	5.33 (1H, t)	74.62
4'	5.21 (1H, t)	68.70

5'	3.82(1H, dd)	76.14
6'	H _A =4.17(1H,d) H _B =4.44(1H,dd)	62.49
1-OH	----	
3-OH	----	
6-OH	----	
7-OH	----	
1-OCOCH ₃	2.57	
2''-OCOCH ₃	2.09	
3''-OCOCH ₃	2.09	
4''-OCOCH ₃	2.04	
6''-OCOCH ₃	1.80	
1-OCOCH ₃		170.77
2''-OCOCH ₃		169.79
3''-OCOCH ₃		170.37
4''-OCOCH ₃		168.84
6''-OCOCH ₃		169.55
3-OCH ₃	4.05	56,49
6-OCH ₃	4.01	56,34
7-OCH ₃	3.97	56,28
1-OCOCH ₃		21.55
2''-OCOCH ₃		21.43
3''-OCOCH ₃		20.80
4''-OCOCH ₃		20.72
6''-OCOCH ₃		20.51

5.2.3.5- Síntese de 2-β-D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-trietoxixantona 4



Esquema 12. Síntese do derivado 4.

Em um balão de 10 mL foi adicionada a mangiferina parcialmente desacetilada 2 (0,065g, 0,103mmol), juntamente com 2,38mL de DMF anidro, K₂CO₃ anidro (0,0426g, 0,309mmol) e CH₃CH₂ I (0,048g, 0,309mmol) (HU *et al.*, 2007). O fim da reação foi acompanhada por CCDA em sílica gel com eluente hexano/acetato de etila/ácido fórmico (45: 53: 2). A mistura reacional foi concentrada e o resíduo foi solubilizado com acetato de etila (10mL), a fase orgânica foi particionada com 10mL de H₂O, em seguida com 10ml de uma solução 10% de bissulfito de sódio e posterior lavagem com 20mL de H₂O. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e o solvente evaporado para fornecer o produto 3 como um sólido branco de peso 53,0mg (rendimento 72,60%) e P.f: 175°C, após purificação por CLAE semipreparativa. O seu grau de pureza foi

98,7% por CLAE-DAD. A caracterização se deu por determinação experimental do ponto de fusão, espectrometria no infra-vermelho (IV), espectrometria de massas de alta resolução (EMAR) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) e de carbono treze (RMN¹³C) (espectros no anexo, pag. 151).

EMAR (ES+) (m/z): 717,2394 ([C₃₅H₄₀O₁₆+1H]⁺), m/z calculado = 717,2316, variação = 0,0010%

Dados de infravermelho (pastilha em KBr, cm⁻¹):

ν_{C-H} (C_{sp3}) = 2983,53 (estiramento C-H de -CH₂-);

$\nu_{C=O}$ (C_{sp2}) = 1747,30 (estiramento da carbonila de éster);

$\nu_{C=O}$ (C_{sp2}) = 1618,09 (estiramento de carbonila conjugada ao sistema aromático);

δ_{C-H} (C_{sp3}) = 1461,87 (deformação angular CH₂);

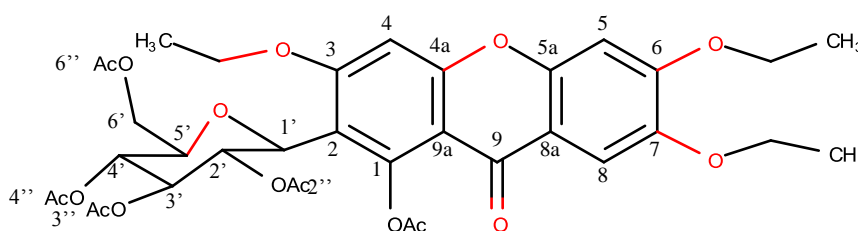
δ_{C-H} (C_{sp3}) = 1371,23 (deformação angular CH₃);

ν_{C-O-C} = 1201,51 (estiramento assimétrico de éter);

ν_{C-O} (C_{sp2}) = 1108,94 (estiramento C-O de éster);

δ_{C-O} = 1035,65 (deformação angular de éter);

$\delta_{C=C}$ (C_{sp2}) = 842,79 (vibração da ligação C=C de aromático tetrassubstituído);



2-β-D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-trietoxixantona 4

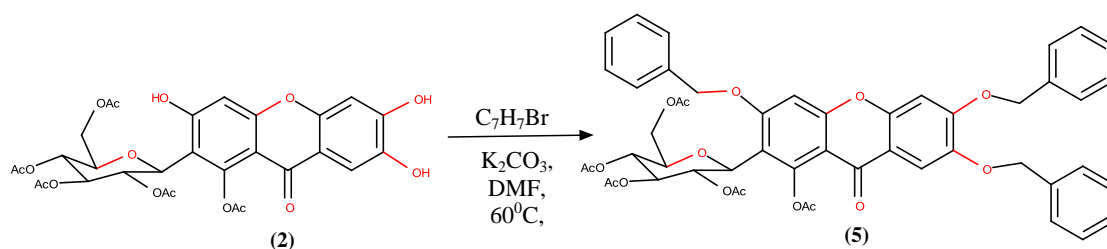
Tabela 5. Deslocamentos químicos de RMN ¹H e RMN¹³C (500MHz, CDCL₃) para 4.

C	δ ¹ H (ppm)	δ ¹³ C (ppm)
1	----	160.53
2	----	113.90
3	----	158.88
4	6.77 (1H, s)	98.35
4a	----	162.68
5	6.81 (1H, s)	99.78
5a	----	154.72
6	----	158.87
7	----	146.26
8	7.55 (1H, s)	106.65
8a	----	151.15
9	----	173.94
9a	----	115.11
1'	4.81 (1H, d)	72.37
2'	5.99 (1H, t)	71.92
3'	5.33 (1H, t)	74.59
4'	5.17 (1H, t)	68.47
5'	3.82 (1H, dd)	75.99

6'	H _A =4.01(1H,d) H _B =4.46(1H,d)	62.35
1-OH	----	
3-OH	----	
6-OH	----	
7-OH	----	
1- OCOCH₃	2.56	170.74
2''- OCOCH₃	2.09	170.41
3''- OCOCH₃	2.08	170.52
4''- OCOCH₃	2.04	168.84
6''- OCOCH₃	1.81	169.62
3- OCH₂CH₃	4.20	65.17
6- OCH₂CH₃	4.20	64.96
7- OCH₂CH₃	4.20	64.76
3- OCH₂CH₃	1.64	20.77
6- OCH₂CH₃	1.56	14.62
7- OCH₂CH₃	1.50	14.42

5.2.3.6- Síntese de 2-β-D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-tribenzilxantona

5



Esquema 13. Síntese do derivado **5**.

Em um balão de 10 mL foi misturado inicialmente a mangiferina parcialmente desacetilada **2** (0,05g, 0,08mmol), 2,0 mL de DMF anidro e K₂CO₃ anidro (0,044g, 0,32mmol). Após 10 minutos sob agitação e atmosfera inerte foram adicionados lentamente o brometo de benzila (0,0547g, 0,32mmol) (HU *et al.*, 2007). A reação foi acompanhada por CCDA em sílica gel com eluente hexano/acetato de etila/ácido fórmico (45: 53: 2). Após o término da reação, concentrou-se a mistura reacional e o resíduo foi solubilizado com acetato de etila (10mL), a fase orgânica foi particionada com 10mL de H₂O, em seguida com 10mL de solução 10% de bissulfito de sódio, com posterior lavagem com 20mL de água. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e o solvente evaporado para fornecer o produto bruto **5** como um sólido branco de peso 67,0mg (rendimento 94.36%) e P.f: 80°C. O grau de pureza de 96% foi determinado por CLAE-DAD. A caracterização se deu por determinação experimental do ponto de fusão, espectrometria no infra-vermelho (IV), espectrometria de massas de alta

resolução (EMAR) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) e de carbono treze (RMN¹³C) (espectros no anexo, pag. 154).

EMAR (ES+) (m/z): 903,2864 ([C₅₀H₄₆O₁₆+1H]⁺), m/z calculado = 903,2785, variação = 0,0008%

Dados de infravermelho (pastilha em KBr, cm⁻¹):

ν_{C-H} (C_{sp3}) = 3031,75 (estiramento C-H de aromático, banda fraca muitas vezes obscurecida);

ν_{C-H} (C_{sp3}) = 2935,32 (estiramento C-H de -CH₂-);

$\nu_{C=O}$ (C_{sp2}) = 1745,38 (estiramento da carbonila de éster);

$\nu_{C=O}$ (C_{sp2}) = 1614,23 (estiramento de carbonila conjugada ao sistema aromático);

δ_{C-H} (C_{sp3}) = 1452,23 (deformação angular CH₂);

δ_{C-H} (C_{sp3}) = 1369,30 (deformação angular CH₃);

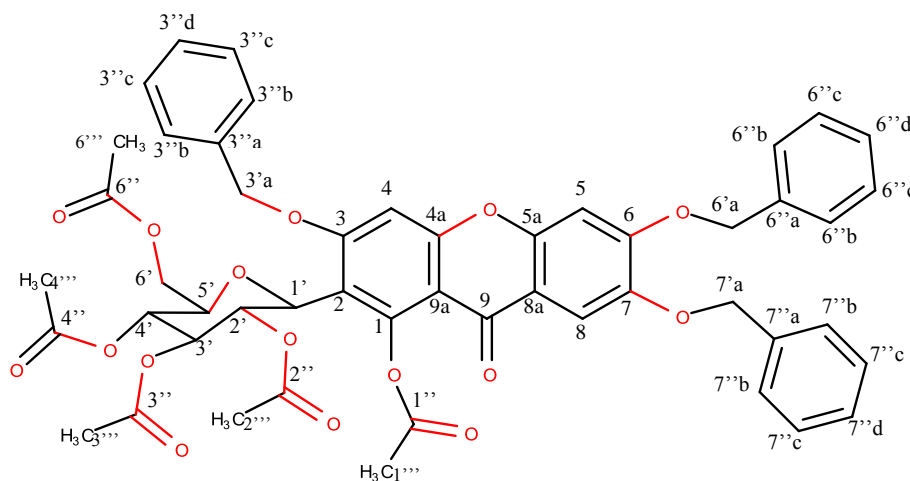
ν_{C-O-C} = 1201 (estiramento assimétrico de éter);

ν_{C-O} (C_{sp2}) = 1107,01 (estiramento C-O de éster);

δ_{C-O} = 1029,87 (deformação angular de éter);

$\delta_{C=C}$ (C_{sp2}) = 736,72 - 696,22 (deformação angular 5 átomos de hidrogênios adjacentes, anéis monossustituídos);

$\delta_{C=C}$ (C_{sp2}) = 831,22 (vibração da ligação C=C de aromático tetrassustituído);



2-β-D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-tribenzilxantona **5**

Tabela 6. Deslocamentos químicos de RMN ¹H e RMN ¹³C (500MHz, CDCL₃) para **5**.

C	δ ¹ H (ppm)	δ ¹³ C (ppm)	HMQC	COSY	HMBC
1	----	152.82			
2	----	114.27			
3	----	162.40			
4	6.83 (1H, s)	98.96	C-4		C-1;C-2;C-9
4a	----	151.24			
5	6.85 (1H, s)	101.20	C-5		C-6;C-7;C-8
5a	----	149.93			
6	----	154.70			
7	----	146.40	C-8		C-6;C-7;C-10 ^a
8	7.66 (1H, s)	108.02			
8a	----	115.48			
9	----	173.81			
9a	----	114.27			
1'	4.87 (1H, d)	72.45	C-1'	H-2'	C-2;C-3
2'	6.04 (1H, t)	70.68	C-2'	H-1'; H-3'	C-1';C-3';C-2''
3'	5.33 (1H, t)	74.44	C-3'	H-2'; H-4'	C-2';C-4';C-3''
4'	5.09 (1H, t)	68.40	C-4'	H-3'; H-5'	C-3';C-5';C-4''
5'	3.83 (1H, dd)	76.00	C-5'	H-4'; H-6' _A ; H-6' _B	C-4';C-6'
6'	H _{6A} =4.13 (1H,d) H _{6B} =4.26 (1H,dd)	62.26	C-6'	H-5	C-4';C-5';C-6''
1'''-CH ₃	2.57		C-1'''		C-1''
2'''-CH ₃	2.06		C-2'''		C-2''
3'''-CH ₃	2.02		C-3'''		C-3''
4'''-CH ₃	1.83		C-4'''		C-4''
6'''-CH ₃	1.95		C-6'''		C-6''
1'' OCOCH ₃		168.86	C-1''		
2'' OCOCH ₃		168.91	C-2''		
3'' OCOCH ₃		170.41	C-3''		
4'' OCOCH ₃		169.52	C-4''		
6'' OCOCH ₃		170.82	C-6''		
1''''-CH ₃		21.46	C-1''''		
2''''-CH ₃		20.71	C-2''''		
3''''-CH ₃		20.71	C-3''''		
4''''-CH ₃		20.67	C-4''''		
6''''-CH ₃		20.55	C-6''''		
3''a-CH ₂	5.31	71.24	C-3''a		C-3;C-3''a;C-3''b
3''a-C	----	135.64	C-3''a		
3''b-CH	7.49	127.11	C-3''b	H-3''c	C-3''a;C-3''c;C-3''d
3''b-CH	7.49	127.11	C-3''b	H-3''c	C-3''a;C-3''c;C-3''d
3''c-CH	7.42	128.54	C-3''c	H-3''b	C-3''a;C-3''b;C-3''d
3''c-CH	7.42	128.54	C-3''c	H-3''b	C-3''a;C-3''b;C-3''d
3''d-CH	7.63	127.97	C-3''d	H-3''c	C-3''c;C-3''b
6''a-CH ₂	5.27	70.96	C-6''a		C-6;C-6''a;C-6''b
6''a-C	----	135.85	C-6''a		
6''b-CH	7.49	127.25	C-6''b	H-6''c	C-6''a;C-6''c;C-6''d
6''b-CH	7.49	127.25	C-6''b	H-6''c	C-6''a;C-6''c;C-6''d
6''c-CH	7.38	128.72	C-6''c	H-6''b	C-6''a;C-6''b;C-6''d
6''c-CH	7.38	128.72	C-6''c	H-6''b	C-6''a;C-6''b;C-6''d
6''d-CH	7.40	128.36	C-6''d	H-6''c	C-6''a;C-6''b;C-6''c
7''a-CH ₂	5.20	71.12	C-7''a		C-7;C-7''a;C-7''b
7''a-C	----	136.55	C-7''a		
7''b-CH	7.49	127.33	C-7''b	H-7''c	C-7''a;C-7''c;C-7''d
7''b-CH	7.49	127.33	C-7''b	H-7''c	C-7''a;C-7''c;C-7''d
7''c-CH	7.39	128.80	C-7''c	H-7''b	C-7''a;C-7''b;C-7''d
7''c-CH	7.39	128.80	C-7''c	H-7''b	C-7''a;C-7''b;C-7''d
7''d-CH	7.61	128.23	C-7''d	H-7''c	C-7''b;C-7''c

5.2.4- Determinação da Fluorescência por Espectroscopia

A fluorescência foi determinada utilizando fluorímetro Jasco J-815, usando uma cubeta de quartzo 1,0 cm e empregando suporte de cuvete termostático Jasco PFD-425S15F. Todo o espectro foi obtido com correções de fundo. O espectro de emissão de fluorescência para albumina (1.00×10^{-5} M solution in PBS, pH = 7.4) foi obtido na faixa de 300-450 nm comprimento de onda ($\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm), nas temperaturas de 23, 30, 37 graus. Inicialmente, a medição do espectro de emissão de fluorescência para albumina ASH foi recuperado no comprimento de onda de 340 nm, que representa o máximo de emissão correspondendo à intensidade de emissão de fluorescência inicial (F_0). Em seguida, os volumes de MGF e AcMGF (1), ParcialAcMGF (2), ParcialAcMGFMetil (3), ParcialAcMGFEtil (4) e ParcialAcMGFBenzil (5) a partir de uma solução estoque (1.00×10^{-3} M em etanol) foram adicionadas, para se obter definitivas concentrações 0.17, 0.33, 0.50, 0.66, 0.83, 0.99, 1.15 e 1.32×10^{-5} M. A fluorescência assim obtida corresponde à intensidade de emissão na presença de supresores (F).

5.2.5- Metodologia para espectroscopia de dicroísmo circular

Os espectros de dicroísmo circular (CD) foram medidos em um espectropolarímetro Jasco J-815 e empregando a mesma suporte de cuvete termostática, conforme descrito no item anterior. Todos os espectros foram registrados com correções de fundo apropriados. As condições utilizadas para esta análise foram: varredura na faixa de 200- 260 nm, a linha de base foi a solução aquosa de PBS , pH= 7,4. Os espectros das soluções aquosas de albumina sérica humana (ASH) tamponada com PBS, pH= 7,4 com concentração de aproximadamente 1.00×10^{-6} M foram subtraídos desta linha de base. Para a realização das análises de dicroísmo circular foram colocados 3,00 mL de uma solução de albumina (ASH) tamponada com PBS, pH= 7,4 com concentração de aproximadamente 1.00×10^{-6} M em uma célula de quartzo, e medida a sua elipticidade (branco), em uma única temperatura 37 graus celsius. Os espectros de CD foram registrados para uma solução ASH (1.00×10^{-6} M em PBS, pH = 7,4) e para a ASH na presença de MGF e seus derivados AcMGF (1), ParcialAcMGF (2), ParcialAcMGFMetil (3), ParcialAcMGFEtil (4) e ParcialAcMGFBenzil (5) (0,17, 0,50; 0,99 e 1.32×10^{-5} mol/L), na faixa de 200-260 nm, a 37 °C.

5.2.6- Metodologia para estudos de docking molecular

A estrutura cristalográfica de ASH foi obtida a partir do banco de dados Protein Data Bank (PDB), cujo código de acesso é 1N5U (WARDELL, M. 2002). A estrutura da HSA tem uma resolução de 1,90 Å. As estruturas dos compostos MGF, AcMGF (1), ParcialAcMGF (2), ParcialAcMGFMetil (3), ParcialAcMGFEtil (4) e ParcialAcMGFBenzil (5) foram construídas e tiveram suas energias minimizadas pelo método semi-empírico PM6 (STEWART, 2007), disponível em Spartan 14 program (função de onda, Inc. Irvine, CA, EUA). O acoplamento molecular foi realizado com o programa GOLD 5.2 (Cambridge Centro cristalográfica de dados, CCDC, Cambridge, UK). Os átomos de hidrogênio foram adicionados para a proteína de acordo com a ionização e estados tautoméricos inferidos pelo programa (G. Jones e colaboradores 1997).

Os sítios de interação onde ocorre o ancoramento molecular na proteína foram estabelecidos com raio de 10 Å do aminoácido Trp-214. O número de operações genética (cruzamentos, migração, mutação) em cada execução de ancoragem utilizado no procedimento de pesquisa foi ajustado para 100.000. O programa otimiza geometrias de ligação de hidrogênio através da rotação de grupos hidroxil e amino de cadeias laterais de aminoácidos. A função de score foi "ChemPLP" (KORB, O. 2009), que é a função padrão do programa GOLD. A pontuação de cada pose identificada é calculada como o negativo da soma de uma série de condições de energias envolvidas no processo de interação proteína-ligante, quanto mais positiva for à pontuação, melhor é a interação. As figuras dos resultados das interações moleculares foram geradas pelo programa PyMOL 1.level (Delano Scientific LLC, San Fransisco, CA, EUA).

5.2.7-Ensaio biológico de citotoxicidade frente a linhagem de monócitos humanos THP-1

As células foram mantidas em garrafas de 25 cm² contendo meio de cultura, meio RPMI-1640 suplementado com 10% (v / v) de soro fetal de bovino, em câmara úmida a 37°C, com 5% de CO₂ (MULLER, 2003; CORSINI, 2011). Após a determinação do número de células viáveis para utilização nos ensaios, as células foram cultivadas durante 48h em placas de 96 poços transparente de fundo chato na concentração de 3,0 x10⁵ células/mL em meio RPMI e 10% de soro fetal bovino no volume final de 500uL/poço. O tratamento foi realizado com o derivado AcMGF nas

concentrações de 1, 10, 20 e 40µg/mL em triplicata, solubilizado em DMSO. Triplicatas de células sem tratamento (controle Vivo), tratadas com 0,8% de DMSO (veículo) e sem células (controle branco) utilizados como controles dos experimentos.

Ao fim do período de incubação foi realizada a contagem das células para cada poço com auxílio da câmara de Neubauer, as células foram comparadas com os controles e avaliadas quanto a sua integridade morfológica, foi utilizado corante azul de Trypan para avaliação da viabilidade celular.

Para a realização do ensaio utilizando o reagente colorimétrico XTT, primeiramente foi realizada a contagem do número de células viáveis. Em seguida a concentração de células viáveis foi ajustada para a faixa de $1-5 \times 10^6$ células/poço em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. Posteriormente, foram adicionados cerca de 100uL a uma placa de 96 poços transparente de fundo chato, sendo deixado uma triplicata para (controle branco) sem células, outra para o (veículo) 0,8% de DMSO e (controle Vivo) células sem tratamento. Após este procedimento a placa foi incubada em estufa (BOD, 37°C, 5% CO₂) por 48 h ao fim deste período cada um dos poços foram tratados com 50uL de solução de sal monossódico de XTT (1,2 mg/mL) + PMS (0,077 mg/mL) em PBS. Novamente a placa foi incubada por 2-4 horas, as leituras foram realizadas com 2, 3 e 4 horas em leitor de placas Elisa com filtro de luz de $\lambda = 490\text{nm}$.

6-RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Isolamento e caracterização da mangiferina das folhas de *Mangifera indica* L.

A parte inicial deste trabalho consistiu no isolamento, purificação e caracterização do produto natural, mangiferina, obtida das folhas de *M. indica* (ARITOMI, 1970), com objetivo de se obter quantidades suficientemente adequadas para a síntese de seus derivados (**Figura 18**).

A recuperação e isolamento de substâncias bioativas presentes em matrizes de origem vegetal ou animal consiste na sua extração (ROMANIK *et al.*, 2007). Geralmente, os métodos convencionais para a obtenção de substâncias de interesse são principalmente maceração, refluxo e extração com Soxhlet. Estes processos são, em geral, de fácil operação; entretanto, na maioria dos casos, são muito demorados, com rendimentos reduzidos e, sendo possível risco de degradação térmica para a maior parte dos constituintes da matriz.

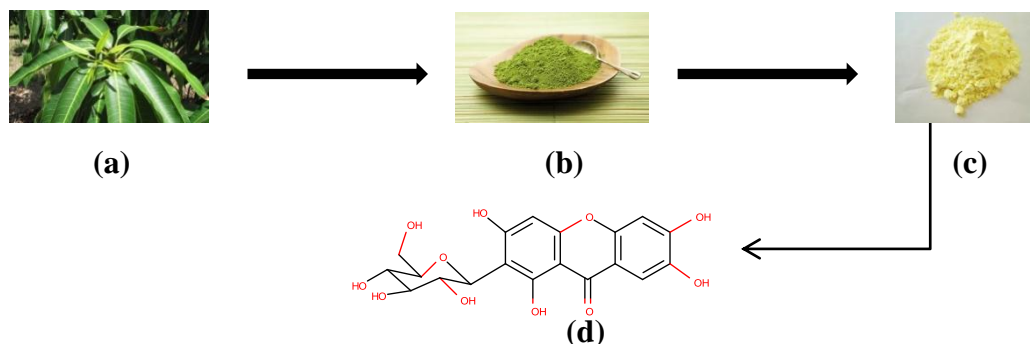


Figura 18. Folhas de mangueira de *Mangifera indica* L. (a), folhas trituradas (b), mangiferina isolada (c), estrutura da mangiferina (d).

O objetivo principal dos métodos de extração é a obtenção de uma amostra enriquecida com os componentes de interesse e, livres de interferência dos demais componentes da matriz. Para isso, a escolha correta dos solventes da extração e a utilização de métodos (calor ou agitação) são importantes para aumentar a solubilidade e a transferência de massa do metabólito escolhido.

Há descrito na literatura diferentes metodologias para a preparação de extratos. A busca de um método de extração prático e eficiente é um processo constante nas avaliações de compostos bioativos, onde diversos parâmetros devem ser observados, podendo ser influenciados pelo solvente, tempo e temperatura (KULKARNI & RATHOD, 2013).

Em meio às várias metodologias descritas, em um primeiro momento foi escolhida aquela que utiliza o extrator Soxhlet, pela facilidade de acesso ao equipamento e pela eficiência do método de extração. O extrator Soxhlet é um dos equipamentos mais usados para a extração sólido-líquido no isolamento de produtos naturais e seu funcionamento consiste na utilização de um solvente apropriado que é reciclado por destilações sucessivas (IKAN, 1991). Buscando avaliar o método mais eficaz quanto à extração da mangiferina das folhas de *M. indica* foram testados dois métodos de extração (Soxhlet e micro-ondas) e dois solventes (etanol e metanol). Como descrito na literatura estes solventes são os que possibilitam a extração de substâncias mais polares e de polaridades intermediárias (MANDAL, 2007).

As folhas de mangueira (*Mangifera indica* L) trituradas foram submetidas a diferentes metodologias de extração. Para a extração da mangiferina foi utilizada uma aparelhagem de Soxhlet, tendo como etapa preliminar o uso de *n*-hexano para remoção de ceras, lipídeos, com duração de 12h. Em uma segunda etapa, fez-se a troca deste solvente por metanol para que então se obtivesse o composto natural mangiferina

totalmente extraído do material vegetal, etapa realizada por 18h. O processo de purificação do extrato metanólico forneceu 0,220g de mangiferina, com um rendimento de 2,2% (p/p) em relação ao material vegetal (folhas secas e trituradas). O mesmo procedimento de extração foi empregado utilizando a troca do solvente *n*-hexano por éter de petróleo no processo de remoção de gorduras e a troca do solvente metanol por etanol na etapa de extração da mangiferina, possibilitando uma redução de 4h na etapa de remoção dos componentes apolares. O processo de purificação do extrato etanólico forneceu 0,308g de mangiferina, com rendimento de 3,1% (p/p).

Em ambos os procedimentos a mangiferina foi isolada como um sólido amarelo pálido que apresentou o cromatograma (análise por CLAE-DAD) com um pico único (tR = 4 min), espectro no UV compatível com o padrão (**Figura 19**), e o grau de pureza foi superior a 99%.

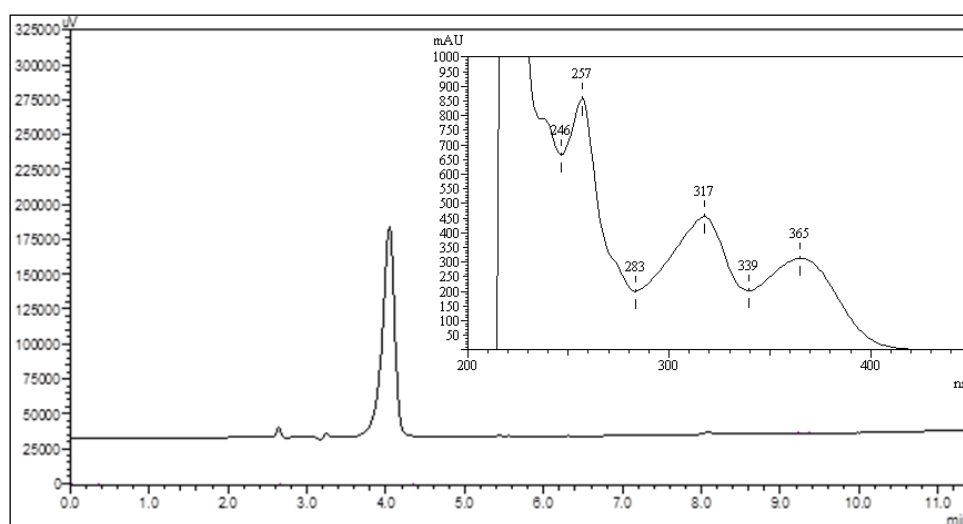


Figura 19. Cromatograma e espectro no UV da mangiferina purificada a partir de folhas de *M. indica*. Condições: Coluna C18, detector de arranjo de diodos (254nm), fase móvel- solvente A (água com 1% AcOH) e B (MeOH).

Os rendimentos aqui relatados foram superiores aos encontrados por Jutiviboonsuk e Sardsaengjun (2010) no processo de extração de mangiferina de extratos etanólicos das folhas de 3 diferentes cultivares tailandesas de *M. indica*, os quais variaram de 0,3 a 1% em relação ao material vegetal.

Em 2014, Mahendran e colaboradores realizaram a extração da mangiferina fazendo uso de éter de petróleo e etanol, durante 40h tempo total de extração, obtendo um percentual de recuperação de 0,45% em 1kg de material vegetal (folhas de *M. indica*). Neste trabalho os rendimentos também foram superiores ao relatado por Mahendran, além de ocorrer em um tempo bem menor.

No presente estudo a extração assistida por micro-ondas foi também utilizada como metodologia com o objetivo de avaliar o teor de mangiferina e também o tempo de extração. A extração de fito-constituintes realizada em reator de micro-ondas, embora esta não seja uma técnica nova, tem demonstrado grande destaque ao longo dos anos por apresentar muitas das vezes vantagens para obtenção do produto da fonte vegetal (DEAN, 2010). No trabalho realizado por Venkatesh e colaboradores (2010) foi comparada a eficiência da extração convencional (Soxhlet) com a técnica de micro-ondas para extração de mangiferina, utilizando os mesmos solventes em ambas as técnicas. Os resultados apresentados pelos autores deixou clara a alta eficiência da radiação micro-ondas sobre a matriz com o tempo de extração drasticamente menor, não havendo diferença significativa no rendimento.

No presente trabalho a extração da mangiferina utilizando micro-ondas procedeu do seguinte modo: inicialmente foi realizada a remoção de lipídeos, ceras entre outros componentes apolares com emprego de éter de petróleo em aparelho de Soxhlet por 8h de extração. Em seguida, procedeu-se a extração em reator micro-ondas utilizando etanol como solvente, por um período de 56 minutos. O processo de purificação do extrato etanólico de *M. indica* forneceu 0,200g da mangiferina, com rendimento de 2% (p/p). Embora a técnica convencional empregando Soxhlet tenha apresentado rendimento levemente superior (3,1% p/p), a extração em micro-ondas foi realizada em um tempo significativamente inferior (menor do que 10h), e o grau de pureza correspondeu a 99% (CLAE-DAD).

Visto que a técnica utilizando reator de micro-ondas reduziu consideravelmente o tempo de extração da mangiferina das folhas de mangueira, buscou-se neste estudo outra técnica capaz de reduzir ainda mais esse tempo. Segundo relatos de Wang *et al.* (2006), a extração utilizando sistema de ultrassom aumentou a obtenção dos produtos de interesse extraídos do material vegetal por fatores de influência como a cinética das taxas de transferência de massa, área de interface ou direcionamento de forças (WANG, 2006; CRAVOTTO *et al.*, 2008). O uso de ultrassom tem sido investigado como metodologia alternativa no preparo de extratos de produtos naturais e para obtenção de

substâncias específicas com maiores concentrações e massas. Uma das grandes vantagens dessa técnica é que o processo ocorre em bem menos tempo comparado à extração convencional (MASON & LORIMER, 2002). O aspecto mais importante para uma extração bem sucedida utilizando ultrassom é estabelecer parâmetros operacionais apropriados para conservar as características do extrato e também a estabilidade das substâncias bioativas (VRUSHALI & VIRENDRA, 2014). Assim, o uso de ultrassom com sonda de imersão foi aplicado nesse trabalho no processo de remoção de compostos apolares das folhas de *M. indica*. a fim de reduzir o tempo, até então realizado com extrator Soxhlet utilizando, inicialmente n-hexano por 12 horas, e depois com éter de petróleo como solvente, durante 8h. Além do uso de ultrassom nesta etapa da extração, também foi trocado o solvente éter de petróleo por *n*-hexano, devido ao seu menor ponto de ebulição. O emprego do ultrassom foi capaz de reduzir consideravelmente o tempo de remoção dos componentes apolares de 8h para 1h de extração. Assim, o uso do ultrassom com sonda de imersão e subsequente preparo do extrato etanólico no reator micro-ondas, forneceu 0,198g de mangiferina com um tempo total de ~2h, e rendimento global de 1,98% (p/p) em relação ao material vegetal . Com o emprego das técnicas de ultrassom e micro-ondas foi possível que se alcançasse uma redução bastante significativa no tempo de extração total da mangiferina. O emprego em conjunto dessas técnicas ocasionou em redução no gasto energético, além de possibilitar a realização de uma química limpa, menos agressiva ao meio ambiente, na qual foi utilizado solvente menos tóxico em quantidades reduzidas. Embora a extração convencional apresente rendimentos superiores, o tempo necessário para realizar a extração do material torna o processo árduo. Uma vez que se disponha dos equipamentos de ultrassom e micro-ondas, o uso dessas técnicas torna a aplicação desta metodologia para a extração da mangiferina justificável. Na tabela 7 a seguir se encontram os percentuais da mangiferina obtida em cada técnica que foi utilizada.

Tabela 7. Principais técnicas empregadas com valores de massas e rendimentos do produto natural, mangiferina, obtidos após extrações.

Técnicas	Massa de Mangiferina (g)	Rendimentos (%) (p/p)	Tempo (horas)
Soxhlet* (éter de petróleo /etanol)	0,117	1,17%	20
Soxhlet (<i>n</i> -hexano/metanol)	0,220	2,20%	20
Soxhlet (éter de petróleo /etanol)	0,308	3,10%	16
Soxhlet -Micro-ondas (éter de petróleo /etanol)	0,200	2,00%	9
Ultrassom -Micro-ondas (<i>n</i> -hexano/etanol)	0,198	1,98%	2

*Dados da literatura (ARAÚJO, 2012)

A confirmação da estrutura química da mangiferina isolada foi realizada por comparação dos dados no IV, UV e RMN com a literatura (SHAHEEN FAIZI, 2006).

A mangiferina isolada de coloração amarelo claro pálido apresentou no seu espectro no UV (**Figura 19**) três máximos de absorção em 257, 317, 365nm, estando de acordo com os dados da literatura (ARAÚJO, 2012).

Através da análise do seu espectro no infravermelho (**Espectro A.2, página 140**) foi confirmado o estiramento axial de carbonila conjugada (esqueleto xantônico) por uma intensa absorção em 1649 cm^{-1} , 3364 cm^{-1} estiramento axial de O-H (associado intermolecular), 3181 cm^{-1} estiramento axial de O-H em ligação de hidrogênio com C=O, absorções na região entre $2939 - 2891\text{ cm}^{-1}$ referentes aos estiramentos axiais das ligações C-H em Csp^3 , e 1050 cm^{-1} referente ao estiramento de C-O de -OH primária. No espectro de RMN ^1H (**Espectro A.3, página 141**), observou-se um simpleto em δ 13,76 ppm, relacionado ao hidrogênio da -O-H fenólica do anel xantônico em ligação de hidrogênio intramolecular com a carbonila, além de três simpletos em δ 7,39, δ 6,87 e δ 6,38 ppm com integração para 1 hidrogênio, referentes aos 3 hidrogênios aromáticos do sistema xantônico, e o sinal em δ 4,86 ppm, com integração par 1 hidrogênio, referente ao hidrogênio do carbono anomérico da porção glicosídica. No espectro de RMN ^{13}C (**Espectro A.4, página 142**) observou-se um sinal em δ 179,56 ppm relacionado à absorção do carbono da carbonila xantônica, além dos Csp^3 na faixa de 70,70 a 82,06ppm e o sinal para o carbono metílico em 61,97ppm para o a porção glicosídica. Os dados foram comparados com valores relatados na literatura (SHAHEEN FAIZI, 2006), sendo confirmada a estrutura da mangiferina.

6.1.2- Determinação do teor de fenólicos e flavonoides totais

Os métodos mais utilizados na literatura para a determinação do teor de ácidos fenólicos são os métodos de Folin-Denis e Folin-Ciocalteu. O método de Folin-Denis é o mais antigo, desenvolvido por Otto Folin e Willey Denis em 1912 (FOLIN e DENIS, 1912), enquanto o Folin-Ciocalteu data de 1927 e foi desenvolvido por Otto Folin e Vintila Ciocalteu (FOLIN e CIOCALTEAU, 1927). Ambos os métodos consistem na redução do molibdênio (Mo^{+6}) presente no reagente em meio básico, através da oxidação de compostos fenólicos a ortoquinonas, formando, parcialmente, a forma reduzida Mo^{+5} (AOAC, 2006). Neste trabalho, foi utilizado apenas o reagente de Folin-Denis, em virtude de o nosso laboratório dispor dos reagentes para sua síntese. A análise de polifenóis se dá através da reação ácido-base o carbonato de sódio e o ácido polifenólico, produzindo o ânion fenolato, que é o agente redutor do molibdênio, e ácido carbônico. Quanto à reatividade das substâncias fenólicas, sabe-se que pode haver uma grande variação no grau de oxidação de acordo com os aspectos estruturais, complexos também podem ser formados entre o reagente de Folin-Denis e outros polifenóis, taninos e flavonoides que estejam presentes na amostra, e, como a análise depende exclusivamente da oxidação do complexo do reagente e não do substrato, o método promove a leitura das substâncias fenólicas totais (flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, etc) que estiverem presentes.

No presente estudo, foi utilizada a curva padrão de ácido gálico (VIANNA, 2010), por ser a mais comumente utilizada para o cálculo de concentrações equivalentes. O conteúdo foi expresso em concentração de ácido gálico ($\text{mgE}_{\text{AG}}/100\text{g}$ de extrato). Foi utilizada uma curva analítica obtida a partir de diferentes concentrações de ácido gálico ($0-0,025 \text{ mg.mL}^{-1}$) para a determinação indireta dos teores de fenólicos totais dos méis conforme já havia sido utilizado em trabalhos anteriores realizados em nosso grupo de pesquisa (VIANNA, 2010; LIANDA, 2009).

Os flavonoides são os principais responsáveis pela coloração das flores e, absorvem radiação ultravioleta, o que é inclusive uma de suas funções na planta, pois além de promover a atração dos insetos protege contra a radiação. Por isso, os flavonoides podem ser identificados e quantificados por espectrometria no UV-Vis. Estes apresentam duas bandas de absorção, uma entre 240 a 285 nm, que é a absorção máxima, chamada de banda II, e outra em cerca de 300 a 400 nm, chamada de banda I.

A absorção na banda II é gerada pelas transições $\pi \rightarrow \pi^*$ do sistema benzênico do anel A, e a absorção na banda I, relativa às transições $n \rightarrow \pi^*$ do sistema cinamoíla, no anel B (MASELEV e KUNTIC, 2007). A maior parte dos flavonoides possui alguma atividade de complexação com íons metálicos, o que promove um efeito batocrômico por conta da extensão da conjugação. Essa complexação depende muito dos fatores estruturais, como a presença de grupos catecol (1,2-diidroxí), que possibilitam a interação com metais formando complexos em anéis de cinco membros, e também a presença de grupo carbonila na posição 4 e hidroxila na posição 5, que forma complexo em anéis de seis membros, mais estáveis, deslocando ainda mais o comprimento de onda.

Neste trabalho, foi feita a avaliação da quantidade de flavonoides dos extratos pelo método espectrofotométrico utilizando o cloreto de alumínio (AlCl_3). O cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonoides em metanol, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. A leitura dos complexos é feita a 415 nm, o que evita a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos.

Tendo em vista as diferentes capacidades de quelação dos flavonoides, estes apresentam diferentes intensidades de absorção a 415 nm, gerando curvas de absorvância *versus* concentração, com distintos coeficientes. Para a determinação indireta do teor de flavonoides totais para cada extrato, utilizou-se a quercetina como padrão, que é um flavonoide que apresenta uma boa capacidade complexante.

A curva analítica para a determinação indireta dos flavonoides totais dos extratos foi construída a partir das leituras de absorvância (415 nm) obtidas para cada concentração da solução padrão de quercetina (0 – 0,025 mg/mL). Na tabela 8 a seguir estão os resultados para os teores de fenólicos e flavonoides totais presentes nos extratos obtidos das folhas de *Mangifera indica* L.

O método de detecção dos teores de fenólicos e flavonoides nos extratos mostrou-se bastante satisfatório, visto que a mangiferina por possuir hidroxilas fenólicas, detém alta capacidade em formar complexos com os metais de transição, assim como os flavonoides. Na **tabela 8** estão apresentados os teores de fenólicos e flavonoides totais para os extratos metanólico, etanólico e água mãe etanólica da folha de *M. indica*. Conforme pode ser observado, o teor de fenólicos totais para os extratos

de *M. indica* variou de 6,47 a 31,86 mg E_{GA}/100 mg de extrato, enquanto o teor de flavonoides totais variou de 6,04 a 19,26 mg E_{QE}/100mg de extrato.

Tabela 8. Valores médios e os desvios padrões dos teores de fenólicos e flavonoides totais dos extratos.

Amostras ^a	Teor em Fenólicos Total (mg E _{GA} /100 mg de extrato) ^b	Teor em Flavonoides Total (mg E _{QE} /100 mg de extrato) ^c
Extração (Soxhlet)		
Ext. Metanólico	16,00 ±0,003	12,56 ±0,001
Água Mãe Etanólica	6,47 ±0,007	14,87 ±0,004
Extração (Soxhlet)		
Ext. Etanólico	20,70 ±0,038	15,21 ±0,001
Água Mãe Etanólica	8,43 ±0,048	10,40 ±0,006
Extração Microondas		
Ext. Etanólico	31,86 ±0,088	19,26 ±0,001
Água Mãe Etanólica	18,20 ± 0,069	6,04 ± 0,001

a- Extratos de mangiferina; b- E_{GA}- equivalentes em ácido gálico; c – E_{QE}- equivalentes em quercetina.

O teor em fenólicos para o extrato etanólico obtido na extração em aparelho de Soxhlet (20,70 mg E_{GA} por 100 mg de extrato) foi relativamente menor do que relatado por ARAÚJO (2012) (21,27 mg E_{GA} por 100 mg de extrato) sendo esta diferença considerada pouco significativa. Porém, o extrato etanólico obtido via micro-ondas apresentou maior valor (31,86 mg E_{GA} por 100 mg de extrato) comprovando que este extrato contém alto teor em componentes fenólicos, além de apresentar um valor de (19,26 mg E_{GA} por 100 mg de extrato) para o teor em flavonoides, isto demonstra que a metodologia de isolamento da mangiferina via micro-ondas consiste em um método bastante eficaz.

6.1.3. Quantificação da mangiferina nos extratos etanólico

A quantificação da mangiferina nos extratos secos (Soxhlet e micro-ondas) de *M. indica* foi realizada por CLAE-DAD, de acordo com (LING, 2009) com algumas modificações (Tabela 9).

O método de CLAE de fase reversa foi desenvolvido para fornecer uma análise específica e adequada para determinar o teor de mangiferina nos extratos etanólicos preparados por duas diferentes técnicas de extração (Soxhlet e micro-ondas). O método envolveu a utilização de uma coluna C18, e uma fase móvel contendo água acidificada (1% de ácido acético) e metanol. Uma alteração do comprimento de onda foi realizada

durante a corrida, a fim de alcançar a resposta máxima do detector e obter um melhor cromatograma sem picos de interferência. O sistema cromatográfico de análise permitiu obter os resultados de maneira confiável.

Realizou-se a quantificação injetando sete diferentes soluções de mangiferina nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25, 35 e 100µg/mL, em triplicata, para construir a curva de calibração da mangiferina. Verificou-se que a curva de calibração na faixa de de 5 a 100 µg / mL foi linear com um bom coeficiente de correlação 0,998-0,999. A tabela a seguir estão representados os resultados para avaliação do teor de mangiferina nos extratos alcóolicos.

Tabela 9–Valores médios (n=3) dos teores de mangiferina nos extratos

Extratos	Teor de MGF (mg MGF/100mg de extrato)
Extração (Soxhlet)	
Ext. Etanólico Soxhlet	10,93±0,0166
Água Mãe* Etanólica Soxhlet	5,93±0,0133
Extração (Micro-ondas)	
Ext. Etanólico MW	3,13±0,0155
Água Mãe* Etanólica MW	3,30±0,0100

* Água mãe – solução etanólica resultante após filtração para obtenção da mangiferina.

Como pode ser visto na tabela 9 acima o teor de mangiferina obtido pelo método convencional (Soxhlet) mostrou-se mais elevado/rico em comparação à metodologia de extração com reator de micro-ondas, isto se explica devido ao fato de que na extração em Soxhlet o solvente entra em contato com a matriz em maior número de ciclos, ou seja, durante o processo o solvente de extração é constantemente renovado a cada ciclo possibilitando que este seja exaurido ao máximo removendo o quanto for possível do constituinte de interesse da matriz. No entanto, vale ressaltar que a extração em Soxhlet ocorre em um tempo significativamente superior tornando o processo bastante árduo em relação ao tempo total para a realização da extração, além disso, houve o emprego de maiores quantidades de solvente. Embora o teor de mangiferina para a extração com micro-ondas seja inferior ao método convencional, a escolha para o uso desta técnica esta fundamentada principalmente nos fatores como: redução significativa do tempo de processo extrativo, reduzindo deste modo o gasto energético e também a redução na quantidade de solventes utilizados.

Na **Figura 20** estão apresentados os cromatogramas dos extratos de etanólicos analisados por CLAE-DAD. O perfil dos picos no cromatograma revelou que para todos os extratos (Etanólico Soxhlet, Água Mãe Etanólica Soxhlet, Etanólico MW, e Água Mãe Etanólica MW,) havia quantidades consideráveis de mangiferina. Esta análise demonstrou que as metodologias de extração empregadas no material vegetal foram satisfatoriamente adequadas para obtenção do produto natural mangiferina. Um estudo da pureza máxima do pico cromatográfico da mangiferina foi feita pela comparação do espectro no UV em diferentes partes do pico (Figura 20). Não foram observadas diferenças nos espectros obtidos para o pico da mangiferina, o que se pode concluir que não existem interferências na determinação da mangiferina nos extratos nas condições de análises utilizadas.

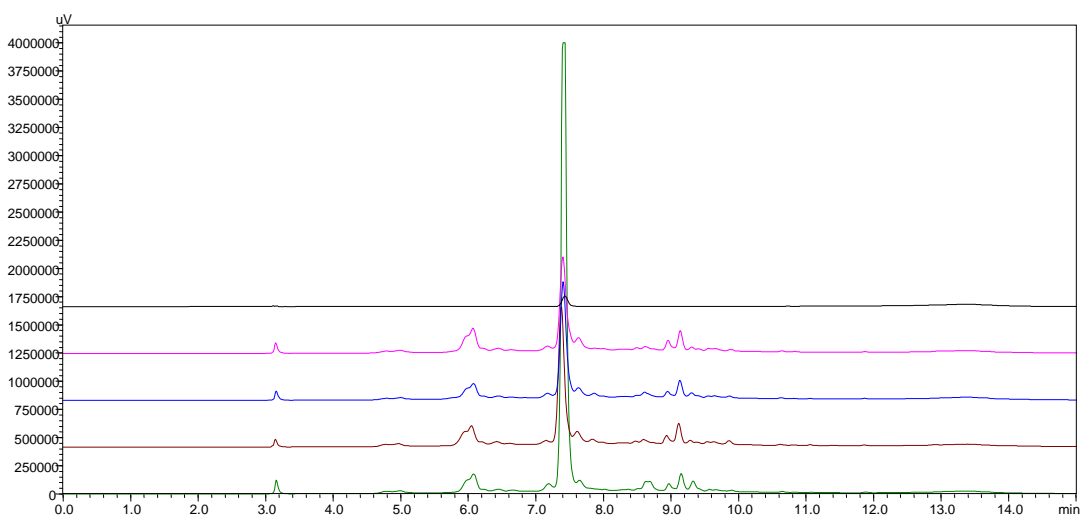


Figura 20. Cromatogramas de CLAE-DAD do padrão de mangiferina (**preto**) e dos extratos da folha de *M. indica*: Água Mãe Etanólica MW (**rosa**), Água Mãe Etanólica Soxhlet (**azul**); Ext. Etanólico MW (**marrom**); Ext. Etanólico Soxhlet (**verde**).

6.1.4. Avaliação da Capacidade Antioxidante *in vitro*

A capacidade antioxidante pode ser definida como a capacidade que algumas substâncias têm para reduzir reações oxidativas nos alimentos e no corpo humano. Notavelmente, essas reações oxidativas podem causar danos nos produtos alimentares (exemplo: oxidação lipídica em alimento, ou escurecimento enzimático em frutas e vegetais) e produzir efeitos adversos na saúde, tais como doenças crônicas e câncer (GHELDOF e ENGESETH, 2002). Os antioxidantes podem ser de grande benefício para a melhoria da qualidade de vida, já que eles têm a capacidade de proteger um

organismo dos danos causados pelos radicais livres, prevenindo ou adiando o início de várias doenças.

O potencial antioxidante da mangiferina tem sido amplamente investigado através de estudos *in vitro*, utilizando testes do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), da hipoxantina/xantina oxidase, da habilidade ferro-redutora plasmático (FRAP) e da capacidade de absorção de radicais oxigênicos (ORAC). A literatura tem descrito que a mangiferina demonstra atividades farmacológicas em diferentes órgãos e tecidos, exercendo efeito preventivo e terapêutico contra uma gama de doenças. Basicamente por meio de uma ação sequestradora de radicais livres, a mangiferina protege coração, neurônios, rins, fígado e estômago contra os efeitos nocivos de radicais livres, retardando ou prevenindo o surgimento de doenças neurodegenerativas, processos inflamatórios e até mesmo de neoplasias (CHI e BERNARD, 2015). Entretanto, a ação antioxidante não explica integralmente as propriedades biológicas da mangiferina.

No presente estudo a avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* dos diferentes extratos (Soxhlet e micro-ondas) de folhas de *M. indica* e da mangiferina isolada foi realizada com o emprego do método de captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), e foram representados pelo CE₅₀ (concentração do extrato para reduzir em 50% a absorvância inicial do DPPH a 520nm) (Tabela 10).

Os resultados obtidos para o extrato etanólico e água mãe etanólica da extração em (Soxhlet) apresentou alta capacidade antirradicalar, assim como o extrato etanólico e água mãe etanólica da extração realizada em micro-ondas.

Tabela 10. Valores médios e os desvios padrões das atividades antioxidantes dos extratos de *M. indica*. e da mangiferina

Amostras	DPPH - CE ₅₀ (µg/mL)
Extração (Soxhlet)	
Ext. Etanólico	4,79±1,736
Água Mãe*** Etanólica	4,45±0,041
Extração Microondas	
Ext. Etanólico	8,61±0,150
Água Mãe***Etanólica	5,89±0,051
MGF isolada	4,58±0,010
MGF**	5,80±0,010
Quercetina*	1,95

* Padrão quercetina

** MGF - dado literatura (Chi e Bernard, 2015).

*** Água mãe – solução etanólica resultante após filtração.

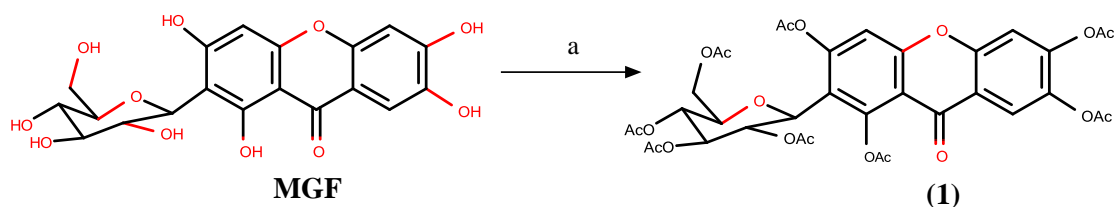
Em comparação com dados da literatura Chi e Bernard (2015) relataram o valor de CE_{50} de 5,80 $\mu\text{g/ml}$ para a mangiferina isolada. Neste trabalho o valor observado foi relativamente melhor ($CE_{50} = 4,58 \mu\text{g/ml}$). Os valores de CE_{50} para o extrato etanólico e água mãe etanólica da extração em Soxhlet demonstraram alta capacidade antirradicalar apresentando baixos valores de CE_{50} em comparação aos extratos etanólicos e água mãe da extração em micro-ondas, este resultado veio a corroborar com os dados obtidos para a quantificação da MGF descritos na tabela 8.

Em testes *in vitro*, para avaliação da ação antioxidante com DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), a mangiferina mostrou atividade cerca de três vezes superior a do α -tocoferol (substância de referência), porém duas vezes menor quando comparada a do Trolox (padrão) (CHEN *et al.*, 2008). A ação antioxidante de mangiferina também foi evidenciada em teste realizado com substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (ANDREU *et al.*, 2005).

6.1.5. Síntese de derivados da mangiferina

6.1.5.1 Síntese do derivado 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1,3,6,7 tetraacetoxixantona (AcMGF)

A preparação da mangiferina acetilada (AcMGF) e demais derivados sintetizados neste trabalho, surgiu como uma proposta alternativa, uma vez que os resultados obtidos na preparação dos derivados Mannich originalmente planejados não foram satisfatórios. Estes derivados, que seriam obtidos via reação de Mannich sobre o núcleo xantônico, geraram misturas de produtos, provavelmente devido à baixa seletividade das reações de SE_{AR} neste sistema, contrariamente aos resultados descritos na literatura por outros grupos (SINGH *et al.*, 2011).



Condições reacionais: (a) anidrido acético, DMF, T.A., DMAP, 1h. (96%).

Esquema 14. Reação para obtenção do derivado peracetilado, octacetil MGF (1).

A síntese do derivado AcMGF se deu através da reação de per-*O*-acetilação da glicose e das hidroxilas fenólicas presentes no composto natural com excesso de

anidrido acético. A utilização de dimetilformamida e DMAP como catalisador se mostrou mais eficaz do que o método convencional que emprega excesso de piridina como solvente e DMAP como catalisador (WANG *et al.*, 2014), levando à obtenção do produto após 1 hora à T.A. No presente trabalho a piridina foi trocada por dimetilformamida (DMF), com a vantagem deste reagente ser menos tóxico. Embora seja possível a ocorrência de um subproduto com uma OH intacta, sendo sua acetilação menos suscetível devido à ligação de hidrogênio intramolecular com a carbonila. Em 2014, WEI realizou a síntese deste derivado utilizando apenas anidrido acético, piridina a T. A por cerca de 12h, ao fim da reação verificou que o produto per-*O*-acetilado apresentou bom rendimento (93%), porém houve a formação do subproduto no qual a -OH em ligação com a carbonila não foi removida. Objetivando contornar este inconveniente Wei utilizou as mesmas condições, onde também fez uso do catalisador DMAP, além do emprego de temperatura (60°C), o tempo de reação foi de 0,5h, ao fim da reação Wei relatou que o percentual do produto de interesse aumentou e não foi mais detectada a presença de subproduto. No presente estudo procedimento análogo ao de Wei foi empregado para a síntese do derivado AcMGF com algumas modificações, a reação ocorreu em 1h sem utilizar aquecimento, apenas T.A, também utilizou-se DMAP e houve a mudança do reagente piridina por DMF. O rendimento obtido foi levemente inferior ao relatado por Wei, após o término da reação o produto foi obtido como um sólido amarelo claro com rendimento de 94% e ponto de fusão de 142°C, compatível com a literatura (Lit. 142-143°C) (ZHAO *et al.*, 2010). A mangiferina acetilada foi devidamente caracterizada pelos métodos convencionais de análise (IV, RMN e EM). Dados de infravermelho revelaram que as absorções em 3364 cm⁻¹ referente ao estiramento -OH associado intermolecular e 3181 cm⁻¹ estiramento -OH em ligação de hidrogênio com C=O não foram mais observados, esta ausência indica que o grupos -OH foram removidos, outra absorção importante foi detectada em 1747 cm⁻¹ estiramento característico de C=O carbonila de éster (**Espectro A.6, página 143**). Os dados de CLAE-DAD demonstrou aumento no tempo de retenção deste derivado em relação à mangiferina, além da mudança de bandas observadas no espectro de UV-Vis (**Espectro A.9, página 144**), estes fatores indicaram que a mudança dos grupos -OH pelos grupos acetila alterou a polaridade da molécula, ou seja, em fase reversa diferentemente do que ocorre com o composto natural, este derivado tende a ficar mais retido devido as suas características lipofílicas, o que justifica seu maior tempo de retenção. Além disso, dados de ¹H RMN indicaram o surgimento de oito simpletos com

deslocamentos químicos em: δ 1,81; 2,04; 2,01; 2,08; 2,33; 2,35; 2,50 e 2,54 ppm referentes às metilas dos grupos ésteres (**Espectro A.7, página 143**) e consequente aumento nos deslocamentos químicos dos hidrogênios isolados do esqueleto xantônico, o que é justificável uma vez que grupos ésteres se configuram como potenciais retiradores de densidade eletrônica. Também no espectro de ^{13}C RMN (**Espectro A.8, página 144**) foram observadas oito carbonilas com deslocamentos em: 167.24; 167.65; 167.70; 168.05; 168.51; 169.63; 170.31; 170.50 ppm, referentes às absorções dos carbonos das carbonilas dos grupos ésteres. Os resultados foram compatíveis com os anteriormente descritos na literatura e em outros trabalhos (ver Tabela 2, página 46). (SHAHEEN FAIZI, 2006).

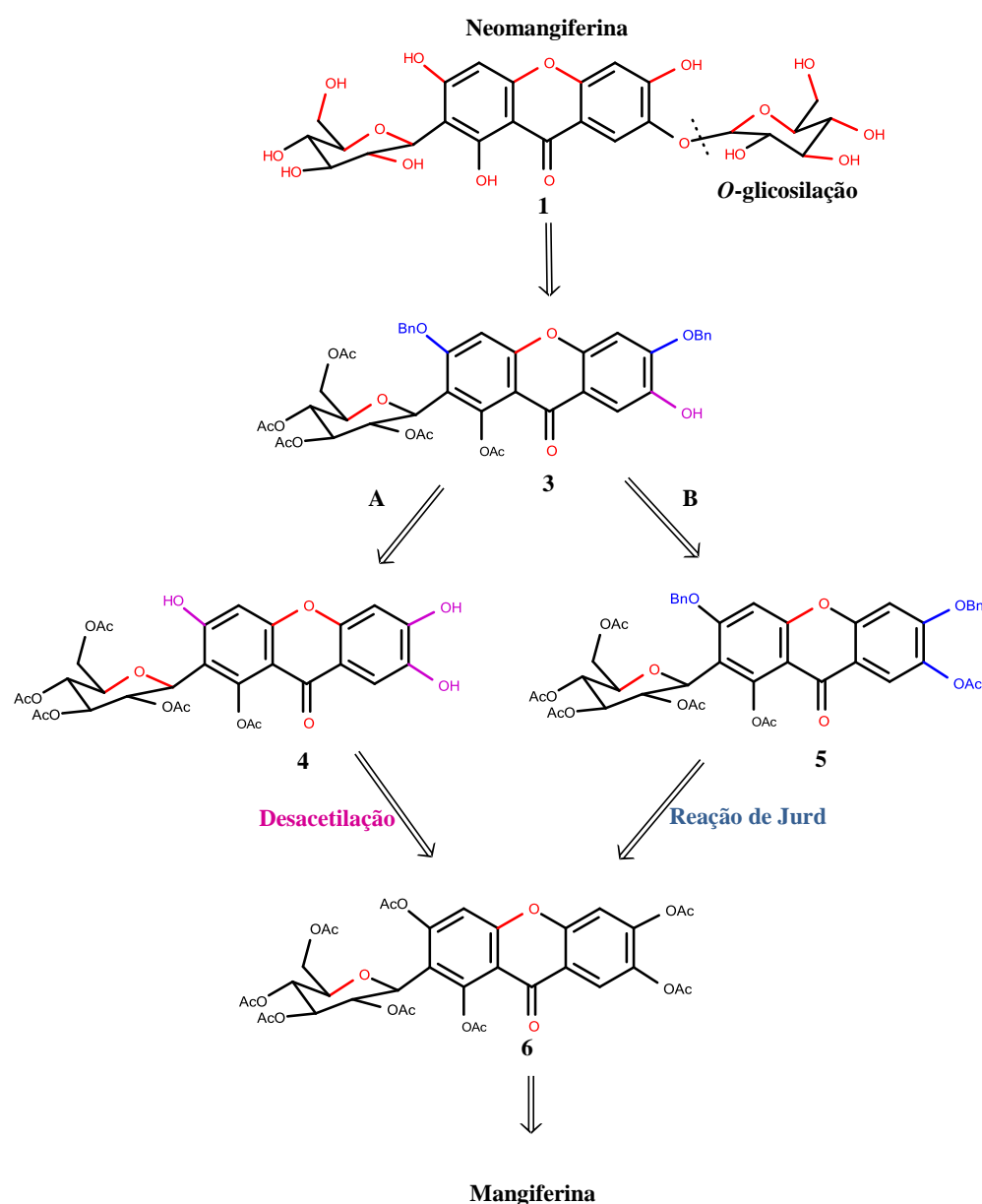
6.1.5.2 Síntese do derivado 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-hidroxixantona (PAcMGF)

Os derivados da mangiferina preparados neste estudo foram obtidos explorando-se as diferenças de reatividade entre os diferentes grupos hidroxila presentes na estrutura. Em trabalhos anteriores, envolvendo a síntese total destes esqueletos estas diferenças de reatividade já haviam sido exploradas, viabilizando a introdução e remoção de grupos protetores de maneira seletiva, culminando com a preparação da mangiferina e de outras xantonas naturais C-glicosiladas, que discutiremos a seguir.

Anteriormente ao ano de 2010 apenas alguns métodos sintéticos para a preparação de xantona glicosilada haviam sido reportados, foi em 2010 que Yu e seus colaboradores realizaram a primeira síntese total de C-glicosídeo mangiferina (2) (YU *et al.*, 2010). Porém, estudos para a síntese de xantonas portadoras de O-glicosídeo e C-glicosídeo como o neomangiferina (1) não foram descritos. Além disso, devido à falta de uma metodologia eficaz para distinguir os grupos de hidroxilas fenólicas em locais diferentes, diante disso a derivatização ficou restrita a múltiplas modificações como 3,6,7,esterificação, hepta-sulfatação e poliacilação ou apenas algumas modificações simples obtidas facilmente incluindo 3-alquilação, 6'-acilação e 6'-glicosilação (HU *et al.*, 2007). Esses estudos contribuíram para o melhor entendimento de como poderiam ser desenvolvidas as sínteses não apenas da mangiferina como também de diferentes derivados, servindo como base para o planejamento sintético.

Por estas razões, a síntese total e semi-síntese de neomangiferina, um polifenol duplamente glicosilado, até aquele momento demonstrava ser um desafio. Em trabalho

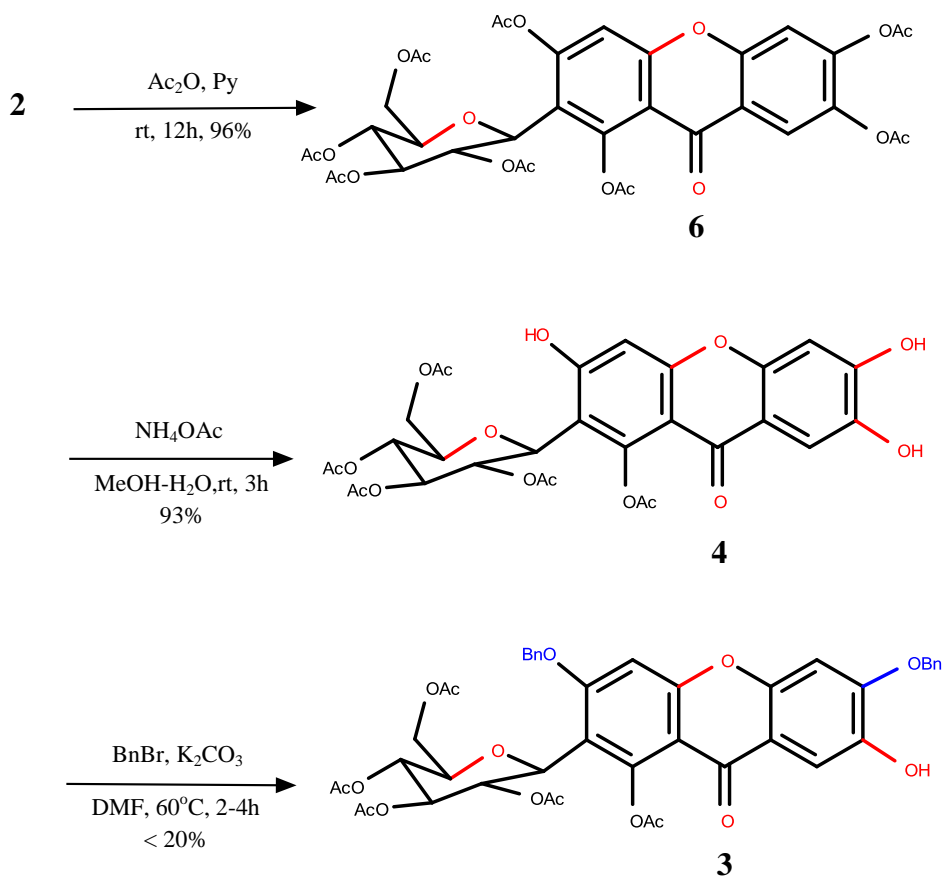
realizado por Wei e colaboradores em 2014, a primeira síntese concisa de neomangiferina a partir da mangiferina, os quais podem coexistir abundantemente em uma variedade de plantas (MATKOWSKI *et al.*, 2013). Nesse estudo, foi feita uma análise retrossintética de neomangiferina (**1**) representada abaixo, foi observado que o composto 7-*O*-glicosídeo seria obtido através do acoplamento de 3,6-di-*O*-benzil-7-hidroxi-mangiferina (**3**) com brometo de α -glucopiranosil sob condições gerais de catálise de transferência de fase ou pela promoção de sais de prata. Deste modo, ficou claro que o passo chave para a síntese é a proteção seletiva dos grupos 1,3,6-hidroxil da mangiferina, ficando o grupo 7-hidroxil livre para que ocorra a glicosilação. Foram analisados dois percursos como pode ser observado no (Esquema 15).



Esquema 15. Análise retrossintética de neomangiferina (**1**).

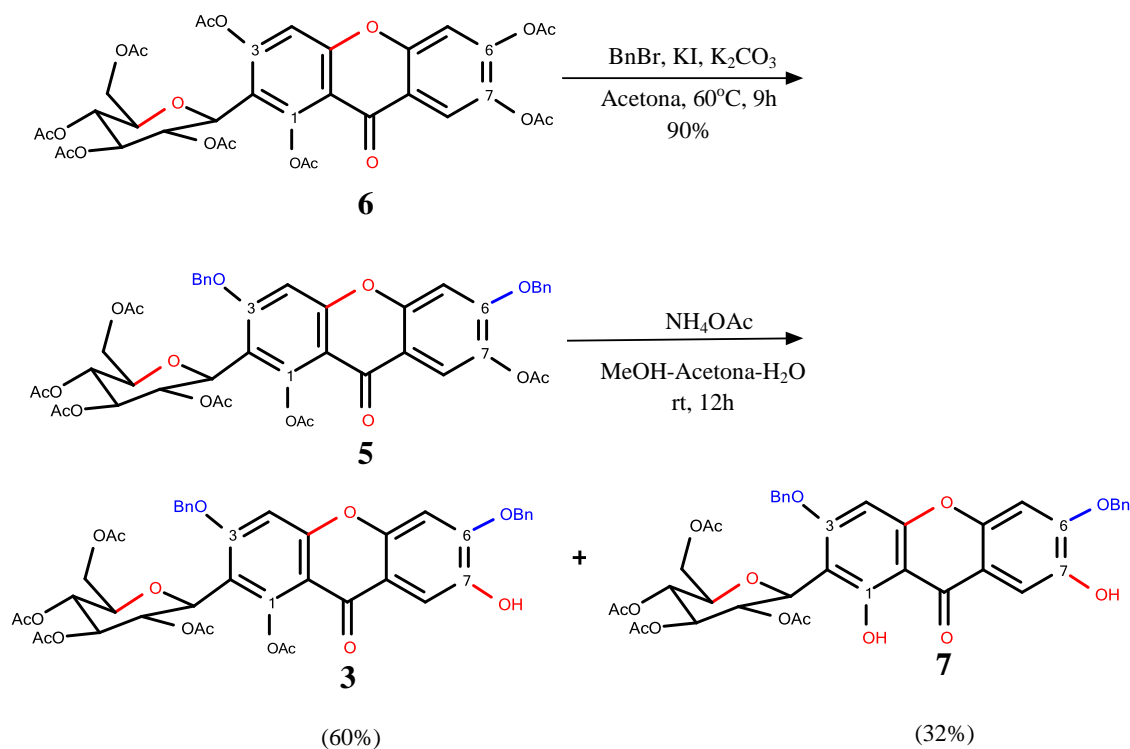
No passo **A**, o composto **3** seria obtido via reação de benzilação seletiva da mangiferina parcialmente acetilada **4** com base na diferença da reatividade dos grupos – OH fenólicos. Por outro lado, o passo **B** apresentaria a transformação do grupo 3,6-di-acetil **6** para 3,6-di-benzil **5** em concordância com o método de Jurd relatado para flavonas em 1958, seguido de desacetilação seletiva (RAMESH *et al.*, 2003; NARENDER *et al.*, 2009).

A princípio a síntese ocorreu com o passo **A** a fim de investigar as diferenças nas reatividades dos grupos 3,6,7-hidroxil (**Esquema 16**). Ao realizar o tratamento da mangiferina **2** com anidrido acético e piridina a temperatura ambiente foi obtido o composto **6** com 96% de rendimento, (FAIZI *et al.*, 2006). Foi observado que após a remoção seletiva dos grupos 3,6,7-tri-O-acetil feita com acetato de amônio, metanol e água (RAMESH *et al.*, 2003) proporcionando o composto **4** de interesse com 93% de rendimento mantendo o grupo 1-OAc intacto, que por sua vez pode estar sendo estabilizado devido ao impedimento estérico. Porém, a etapa seguinte de benzilação do polifenol **4** forneceu o produto 3,6-dibenziléter **3** com um rendimento inferior a 20% (HU *et al.*, 2007), mesmo com os ajustes das condições reacionais não foi possível obter melhorias e tão pouco reduzir o sub-produto tri-benzilado. Diante deste primeiro resultado notou-se que não havia diferenças suficiente na reatividade dos grupos 3,6,7-hidroxil para atingir a benzilação eficiente apenas dos grupos 3,6-hidroxil, uma vez que o rendimento de **3** foi insatisfatório o passo **A** foi abandonado.



Esquema 16. Síntese do 3,6-dibenzil éter **3** passo **A** (adaptado de Wei e colaboradores, 2014).

Para o passo **B** foi empregada a metodologia de Jurd, na qual os grupos acetila poderiam ser convertidos diretamente em grupos benzílicos. Devido a similaridade estrutural entre xantona e flavonas, este método foi testado com o composto **6**. O tratamento realizado com o éster peracetil **6** originou o produto intermediário **5** desejado em excelente rendimento de 90%. Mediante a desproteção de 7-OAc conduzida sob condições brandas como no passo **A**, obteve-se o produto 3,6-dibenzil éter **3** com 60% de rendimento havendo a formação do subproduto **7** com rendimento de 32%, no qual o 1-OAc também foi removido (**Esquema 17**). Por esta rota o rendimento do composto **3** foi significativamente melhorado em relação ao passo **A**. Contudo, ficou evidente que a formação de **3** ainda não era suficientemente seletiva para a síntese prática de neomangiferina.

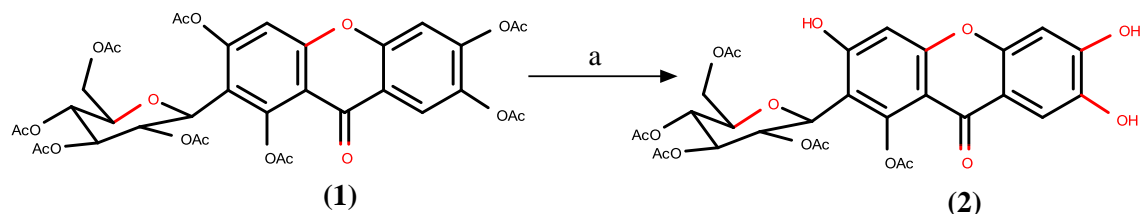


Esquema 17. Síntese do 3,6-dibenzil éter **3** passo **B**.

Com base nos resultados reportados por wei e colaboradores 2014 para a síntese de neomangiferina, onde o foco principal da pesquisa foi realizar uma análise retrossintética e avaliar duas possíveis rotas sintéticas A e B para a obtenção do intermediário-chave na formação de neomangiferina. Não só foi possível a obtenção do intermediário de interesse em quantidades apreciáveis, como também foi determinada a ordem de reatividade das hidroxilas fenólicas das xantonas, e com isso tem-se uma explicação plausível para a seletividade observada para cada uma delas. Como a transformação do grupo ocorrem na sequência seguinte, 3, 6, 7-OH, 1-OH, 3,6-OAc, 7-OAc, e 1-OAc, o que significa 3,6,7-OH reagem mais rapidamente e 1-OAc será o último a ser convertido.

Após a obtenção do derivado totalmente acetilado (AcMGF), e com as observações apontadas no trabalho de Wei e colaboradores (WEI *et al.*, 2014) no que diz respeito as reatividades dos grupos –OH e acetila, a síntese do derivado (PacMGF) teve seu planejamento fundamentado na sequência de ordem de reatividade dos grupos acetila, o objetivo foi realizar uma desacetilação seletiva apenas dos grupos 3,6,7-OAc, mantendo os grupos –OAc da porção glicosídica e 1-OAc preservados. Com isso,

formou-se uma espécie de “híbrido” com características intermediárias entre a mangiferina e o derivados (AcMGF), possibilitando na sequência a produção de outros derivados. Deste modo optou-se por utilizar as mesmas condições reacionais descritas por Wei e colaboradores (2014), com emprego do reagente acetato de amônio e uma mistura alcóolica de metanol e água (**Esquema 18**).



Condições reacionais: (a) NH_4OAc , $\text{MeOH-H}_2\text{O}$, agitação, T. A, 3h, (96%).

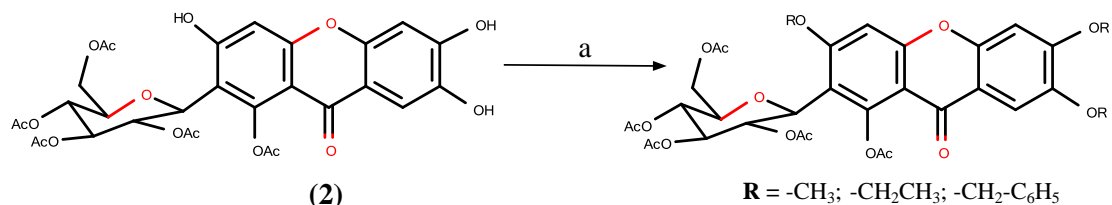
Esquema 18. Síntese do derivado (PAcMGF) (2).

Ao fim da reação foi obtido o derivado (PAcMGF) com 96% de rendimento e ponto de fusão igual P.f: 185°C compatível com os dados da literatura (WEI *et al*, 2014), através do espectro de infravermelho (**Espectro A.11, página 145**) pode ser confirmada a presença da função carbonila de éster com absorção em 1742 cm^{-1} , também foi observado absorção em 1615 cm^{-1} estiramento de carbonila duplamente conjugada em sistema aromático da xantona, outra absorção significativa para a confirmação do composto foi observada em 3362 cm^{-1} referente ao estiramento -OH, região característica de associado de grupos hidroxila apresentando uma banda larga específica desses grupos, além da banda em 1215 cm^{-1} estiramento de fenol. Os resultados das análises de CLAE-DAD demonstrou que o tempo de retenção deste derivado se encontra entre a mangiferina e o composto AcMGF, além da alteração de bandas observadas no espectro de UV-Vis (**Espectro A.14, página 147**), estes dados indicaram a mudança dos grupos -OAc pelos grupos -OH. No espectro de RMN ^1H (**Espectro A.12, página 146**) observou-se simpletos em δ 1,80; 2,01; 2,05; 2,08; 2,51ppm, com integração para três hidrogênios cada, referente aos hidrogênios dos cinco grupos acetila mantidos. Além disso, nota-se que os deslocamentos químicos dos hidrogênios do esqueleto xantônico foram deslocados para campo alto, ou seja, voltaram a ficar mais protegidos indicando a presença dos grupos-OH, os quais aumentam a densidade eletrônica dos anéis por meio do efeito de ressonância. No espectro de RMN ^{13}C (**Espectro A.13, página 147**) notou-se os sinais com

deslocamentos em δ 169,23; 169,61; 170,35; 170,01; 170,93 cm^{-1} referentes às absorções das carbonilas de éster.

6.1.5.3 Preparação dos derivados 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-trialquilxantona (PACMGF-alquil)

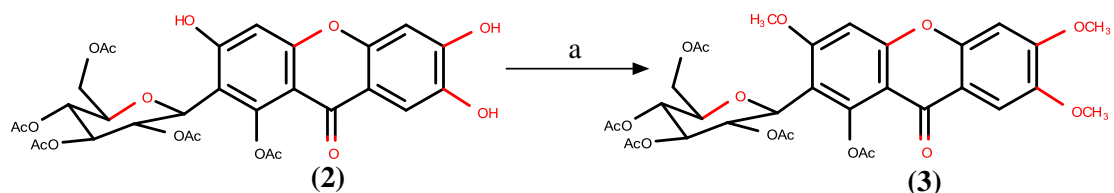
Uma vez dispondo da metodologia adequada para a desacetilação seletiva da octa-acetil-mangiferina (AcMGF), como descrito acima, planejamos a preparação de uma série de derivados mistos, acetilados na porção glicosídica e na hidroxila fenólica em C-1, posicionada *orto* à carbonila cetônica; e diferentemente alquilados nas posições desacetiladas. Como mostrado no (Esquema 19) a seguir, planejamos a preparação dos derivados metilado, etilado, e benzilado (AcMGFMe, AcMGFEt, AcMGFBz). Com a introdução destes grupamentos estaremos progressivamente aumentando o volume estérico, bem como a lipofilicidade destes derivados, o que pode influenciar nas atividades biológicas que forem estudadas posteriormente. Imaginamos ainda que a manutenção dos resíduos acetato na porção açúcar do glicosídeo deva facilitar a absorção destes derivados, podendo ser posteriormente removidos através da ação de esterases “*in vivo*”, caracterizando estes derivados como possíveis pró-fármacos.



Condições reacionais: (a) Haleto de alquila adquado, K_2CO_3 , DMF, agitação, temp. 60°C , 60mim.

Esquema 19. Planejamento dos derivados da mangiferina acetilados na porção glicosídica e diferentemente alquilados nas posições desacetiladas

6.1.5.4 Síntese do derivado 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-trimetoxixantona (PACMGFMe)

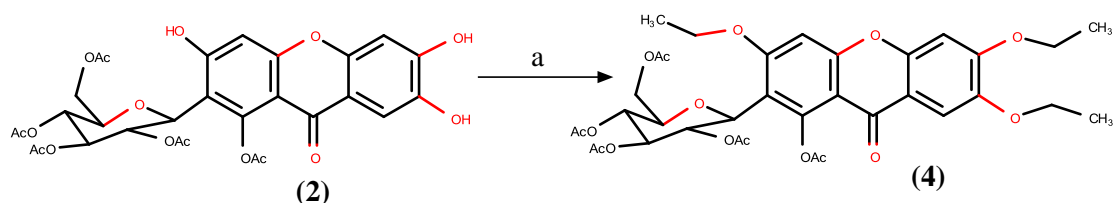


Condições reacionais: (a) CH_3I , K_2CO_3 , DMF, agitação, temp. 60°C , 60mim.

Esquema 20. Síntese do derivado (PACMGFMe) (3).

Após o processo reacional, o produto foi isolado como descrito (**parte experimental, página 49**), fornecendo o derivado (PAcMGFMe) com 89% de rendimento e ponto de fusão (P.f: 140). O espectro de infravermelho (**Espectro A.16, página 148**) revelou a presença da banda com absorção em 1369 cm^{-1} que é referente à deformação angular de metílicos $-\text{CH}_3$. Após ter sido analisado através de CLAE-DAD observou-se um sensível alteração das bandas observadas no espectro de UV-Vis (**Espectro A.19, página 150**), comparadas com as bandas do derivado PAcMGF, também apresentou maior tempo de retenção indicando a ocorrência de mudança dos grupos $-\text{OH}$ pelos grupos $-\text{OCH}_3$. A análise dos dados de espectroscopia de RMN ^1H (**Espectro A.17, página 149**) demonstrou a presença de três simpletos com deslocamentos químicos em δ 3,97; 4,01; 4,05 ppm com integração para três hidrogênios, sinais específicos para metoxilas. O espectro de RMN ^{13}C (**Espectro A.18, página 150**) apresentou os deslocamentos em δ 169,55; 168,84; 169,79; 170,37; 170,77 referentes às carbonilas de éster, além disso, foram observados os carbonos das metoxilas com deslocamentos em δ 56,34; 56,49; 56,56 ppm.

6.1.5.5 Síntese do derivado 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-trietoxixantona (PAcMGFEt)



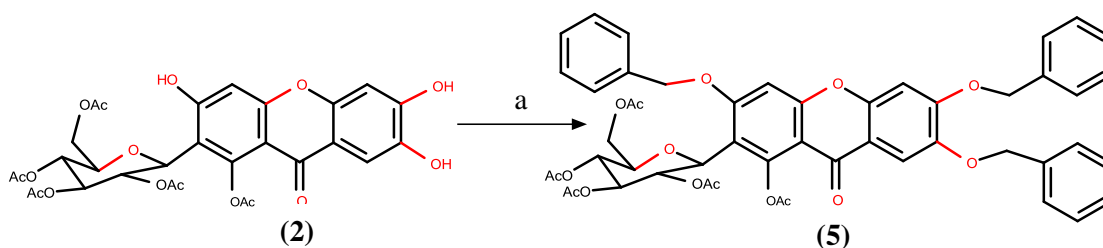
Condições reacionais: (a) CH_3I , K_2CO_3 , DMF, agitação, temp. 60°C , 60min.

Esquema 21. Síntese do derivado (PAcMGFEt) (4).

Após o término da reação, a metodologia de isolamento seguiu procedimento análogo para o derivado (PAcMGF). O produto (PAcMGFEt) foi obtido com 72% de rendimento e ponto de fusão P.f: 145°C . O produto foi devidamente caracterizado pelos métodos convencionais de análise (IV, CLAE-DAD, ^1H RMN e ^{13}C RMN). Os resultados foram compatíveis com os anteriormente descritos na literatura. Os dados de infravermelho demonstrou valores de absorção em 1461 cm^{-1} deformação angular C-H de carbono $-\text{CH}_2$ e uma absorção em 1371 cm^{-1} para deformação angular de carbono $-\text{CH}_3$ (**Espectro A.21, página 151**). Os resultados das análises de CLAE-DAD demonstrou que não houve uma da alteração significativa de bandas no espectro de UV-Vis (**Espectro A.24, página 153**), tanto que para este derivado o tempo de retenção foi

quase idêntico ao derivado PAcMGF que é o precursor para a síntese deste composto. Apenas com esses dados não seria possível afirmar com certeza se houve mudança dos grupos -OH pelos grupos -OCH₂CH₃, sendo necessário o emprego das técnicas seguintes. O espectro de RMN ¹H (**Espectro A.22, página 152**) apresentou deslocamento entre δ 4,15 a 4,25ppm com integração para seis hidrogênios, estes hidrogênios absorvem na mesma faixa de deslocamento, isto ocorre porque o ambiente químico entre eles é quase idêntico. Foi identificado nessa região à presença de um quarteto, esta feição de sinal é característico de hidrogênios em acoplamento com metilas. Por outro lado, foi observado três tripletes com deslocamentos δ 1,50; 1,56; 1,64ppm com integração para três hidrogênios cada um, estes sinais indicam acoplamento com o grupamento -CH₂, esses resultados por si só indicam que a inserção dos grupos etila ocorreu como o esperado. Além disto, o espectro de RMN ¹³C (**Espectro A.23, página 153**) apresentou os deslocamentos em δ 64,76; 64,96; 65,17ppm referentes aos carbonos -CH₂, também foi verificado os deslocamentos para as três metilas em δ 14,42; 14,62; 20,77ppm observadas anteriormente no espectro de hidrogênio.

6.1.5.6 Síntese do derivado 2-β-D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-tribenzilxantona (PAcMGFBz)



Condições reacionais: (a) C₇H₇Br, K₂CO₃, DMF, agitação, temp. 60°C, 40min.

Esquema 22. Síntese do derivado (PAcMGFBz) (5).

Uma vez obtida o composto (PAcMGFBz), este foi devidamente caracterizada através dos métodos convencionais de análise, nesta reação foi possível obter o produto com 94% de rendimento e ponto de fusão igual a P.f: 80°C . Através do espectro de infravermelho (**Espectro A.26, página 154**) pode ser confirmada a presença da função carbonila conjugada por uma intensa absorção em 1614 cm⁻¹ e 1745 cm⁻¹ carbonila de éster. As absorções na região em 1218-1189 cm⁻¹ estiramento assimétrico Ar-O-R, também foi observada uma absorção em 736 - 696 cm⁻¹ referente à deformação angular dos 5 átomos de hidrogênios adjacentes para anéis aromáticos monossubstituídos. As

análises de CLAE-DAD para este composto demonstrou uma alteração peculiar no perfil das bandas no espectro de UV-Vis (**Espectro A.31, página 157**), associado a este fato o tempo de retenção foi bem maior quando relacionado ao derivado PAcMGF. Contudo, esse comportamento é justificável uma vez que os grupos inseridos trata-se de grupos aromáticos, os quais apresentam características apolares e como esta análise ocorre em fase reversa C18 é perfeitamente compreensível o maior tempo de retenção devido a maior interação do composto com a fase estacionária da coluna. No espectro de RMN ^1H (**Espectro A.29, página 156**) observou-se três sinais simples em δ 5,20; 5,27; 5,31 ppm, referentes aos seis hidrogênios dos grupos metilênicos $\text{Ar-O-CH}_2\text{-Ar}$, os quinze átomos hidrogênios dos substituintes aromáticos inseridos foram detectados na faixa de deslocamento químico em δ 7,25 – 8,00ppm (**Espectro A.28, página 155**). No espectro de RMN ^{13}C (**Espectro A.30, página 156**) foram observados os três sinais de deslocamento químico para os átomos de carbono metilênicos em δ 70,96; 71,12; 71,24ppm. Além desses experimentos, ainda foram realizados outros experimentos como HSQC, COSY e HMBC. Os dados do experimento de HMBC forneceram informações que foram determinantes para a definição do posicionamento de cada um dos substituintes aromáticos, onde foram avaliados os principais acoplamentos dos carbonos metilênicos com os átomos de carbono do esqueleto xantônico nas posições (**3-C, 6-C e 7-C**). A **Figura 21**, mostrada a seguir, demonstra os principais acoplamentos observados no experimento, que ocorrem entre o hidrogênio (**H-3'a**), que apresenta acoplamento com o carbono da posição (**C-3**) do anel xantônico; e os hidrogênios (**H-6'a**) e (**H-7'a**), os quais estão acoplados com os carbonos (**C-6**) e (**C-7**), respectivamente. Deste modo, foi possível realizar de forma adequada a atribuição dos sinais observados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C do derivado benzilado.

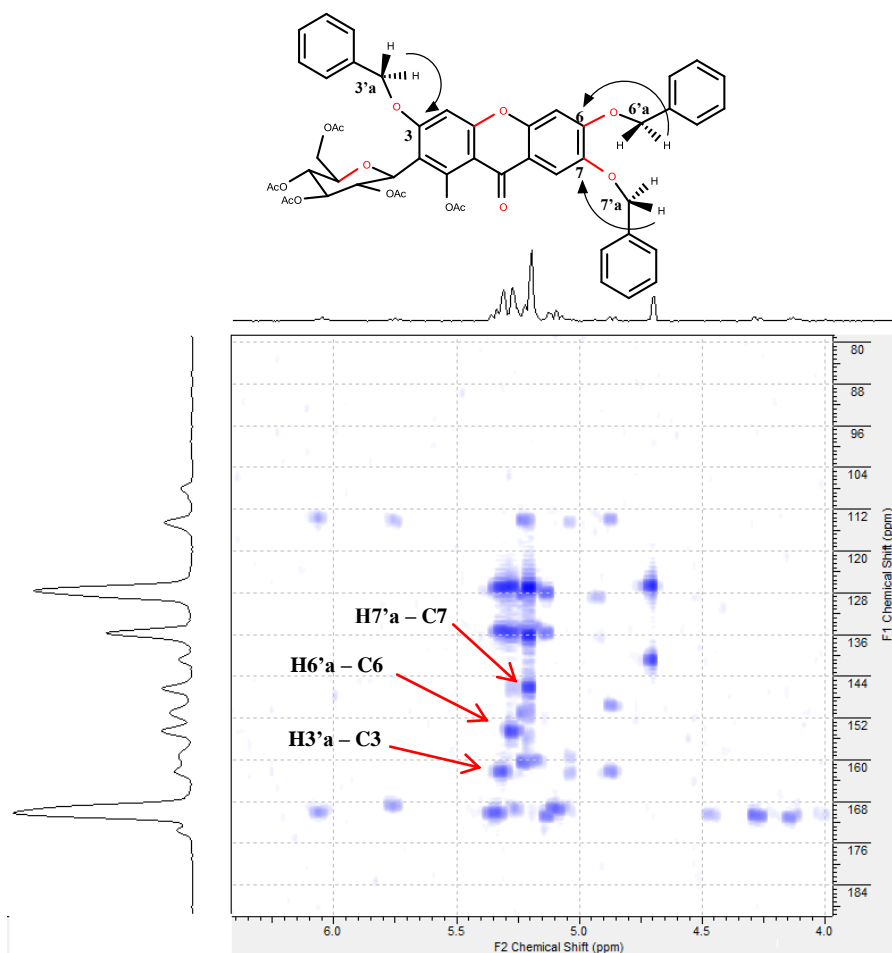


Figura 21. Representação dos principais acoplamentos observados no experimento de HMBC.

6.2 - Estudos de docking molecular

6.2.1 - Estudo Computacional da Interação entre ASH com MGF e Derivados

A análise da estrutura cristalográfica tridimensional da ASH, obtida no Banco de Dados de Proteínas (do inglês *Protein Data Bank* – código 1N5U (WARDELL *et al.*, 2002), mostra que a ASH é uma proteína monomérica, que contém três domínios helicoidais estruturalmente homólogos (I-III), que se unem para formar a estrutura da biomolécula. Cada domínio é subdividido em dois subdomínios (A e B), tendo os subdomínios IIA e IB com nomes específicos: sítio de Sudlow I e II, respectivamente. O sítio de Sudlow I por estar em uma região mais interna da albumina tem caráter predominantemente hidrofóbico e já o sítio de Sudlow II por estar em uma região mais externa tem um caráter predominantemente hidrofílico (SUDLOW, 1975). Vale à pena

ressaltar que existe apenas um resíduo de triptofano na albumina (Trp-214), localizado no subdomínio IIA (LIU *et al.*, 2010).

O estudo computacional de docagem molecular (do inglês *molecular docking*) foi realizado a fim de obter uma visão no nível molecular da interação ASH/Ligantes, ao sugerir os principais resíduos de aminoácidos presentes no sítio de Sudlow I (subdomínio IIA) da ASH que poderiam interagir com os ligantes estudados. Foi escolhido esse sítio para análise computacional, porque foi observado a partir dos resultados experimentais de supressão de emissão de fluorescência do Trp-214, que a MGF e seus derivados, possivelmente estariam ligados na cavidade onde se encontra o fluoróforo interno da albumina (subdomínio IIA) e os estudos de competição com os marcadores ibuprofeno e varfarina comprovaram tal dado.

Os maiores valores computacionais de pontuação para a interação ASH:MGF, ASH:AcMGF, ASH:PAcMGF, ASH:PAcMGFMe, ASH:PAcMGFEt e ASH:PAcMGFBz, obtidos a partir da função *ChemPLP* (função padrão do programa Gold 5.2), foram 54,6; 79,0; 63,6; 59,2; 61,9 e 102,2; respectivamente. O resultado referente ao maior valor de pontuação para cada associação foi analisado. As figuras a seguir apresentam os principais resíduos de aminoácidos do sítio de Sudlow I que interagem com cada ligante e as tabelas abaixo mostram os tipos de interações e suas distâncias entre cada ligante com os resíduos de aminoácidos da ASH.

6.2.2 - Interação entre ASH com 2-C- β -D-glicopiranosil- 1,3,6,7-tetraidroxixantona (MGF)

O resultado de docagem molecular para ASH:MGF (**Figura 22**) sugere que os pares de elétrons do oxigênio do grupo hidroxila presente na parte glicosídica do ligante é um potencial acceptor de ligação de hidrogênio com o hidrogênio do resíduo de aminoácido Lys-194, a uma distância de 2,40 Å e já o oxigênio do resíduo de aminoácido Ser-453 é potencial acceptor de ligação de hidrogênio com outra hidroxila glicosídica, a uma distância de 3,00 Å. Os resíduos Arg-217, Arg-221, Gln-220 e Val-342 interagem com o esqueleto da xantona: os grupos guanidínicos dos resíduos de Arg-217 e Arg-221 são doadores de ligação de hidrogênio, a uma distância de 3,90 Å e 2,10 Å, respectivamente; enquanto que o resíduo de aminoácido Gln-220 é acceptor de ligação de hidrogênio da hidroxila do anel aromático C do ligante a uma distância de 3,60 Å. O hidrogênio do NH da ligação peptídica do resíduo de Val-342 é doador de

ligação de hidrogênio com o oxigênio do grupo éter a uma distância de 3,80 Å. Uma interação hidrofóbica por empilhamento T foi detectada pelo estudo de ancoramento molecular, entre o anel A da xantona com o resíduo de aminoácido Trp-214, a uma distância de 2,70 Å.

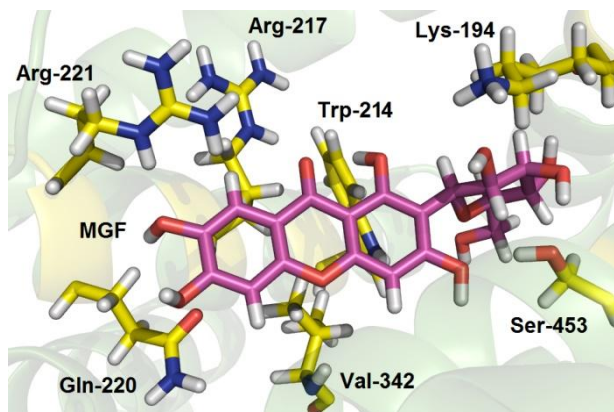


Figura 22. Resultado do estudo de docagem molecular para o maior valor de pontuação obtido para ASH:MGF no sítio de Sudlow I (função *ChemPLP*). Resíduos de aminoácidos selecionados, ASH e MGF estão representados em amarelo, verde e cor-de-rosa, respectivamente. Cor dos elementos químicos: nitrogênio, oxigênio e hidrogênio em azul, vermelho e branco, respectivamente.

Tabela 11. Principais resíduos de aminoácidos no sítio de Sudlow I da ASH, e suas respectivas interações e distância com o ligante MGF.

Amostra	Resíduos de aminoácidos	Interação	Doador/Aceptor de lig-H	Distância (Å)
MGF	Lys-194	Lig. H	Doador	2,40
	Trp-214	<i>t</i> -Stacking	-	2,70
	Arg-217	Lig. H	Doador	3,90
	Gln-220	Lig. H	Doador	3,60
	Arg-221	Lig. H	Doador	2,10
	Val-342	Lig. H	Doador	3,90
	Ser-453	Lig. H	Doador	3,00

6.2.3 - Interação entre ASH com 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1,3,6,7-tetraacetoxixantona (AcMGF)

Os dados obtidos por meio do estudo de docagem molecular demonstraram que o derivado AcMGF se encontra inserido no sítio de ligação da ASH (**Figura 23**) sendo capaz de realizar interações com os resíduos de aminoácidos Gln-220 e Asn-294 através dos grupos acetila do anel B da AcMGF, estes resíduos são: Gln-220 e Asn-294 ambos

atuando como doadores de ligação de hidrogênio a uma distância de 3,90 Å e 2,50 Å, respectivamente (para MGF apenas o resíduo Gln-220 interagia nessa posição). Por outro lado, a porção glicosídica da molécula onde estão presentes os grupos acetatos interage com os resíduos de aminoácidos Lys-194, Lys-198, His-241, Arg-256 e Ser-191 como potenciais doadores de ligação de hidrogênio, nas distâncias de 2,90 Å, 2,00 Å, 2,10 Å, 3,40 Å e 1,60 Å, respectivamente. O resíduo de aminoácido Arg-217 interage como doador de ligação de hidrogênio com o oxigênio do anel C do sistema xantônico, a uma distância de 2,40 Å. Por último o resíduo de aminoácido Trp-214 localizado próximo ao anel A apresentou uma interação por empilhamento T, a uma distância favorável de 2,40 Å. A modificação estrutural dos grupos hidroxilas por grupamentos acetila, possibilitou a interação com outros resíduos de aminoácidos, os quais não ocorria anteriormente. De fato, este maior número de interações e maior proximidade entre os acetatos presentes na estrutura e os resíduos apresentam uma justificativa plausível para seu maior valor de pontuação, dando indícios que a formação do complexo ASH:AcMGF ocorre de modo mais favorável quando comparado a formação do complexo AcMGF:MGF.

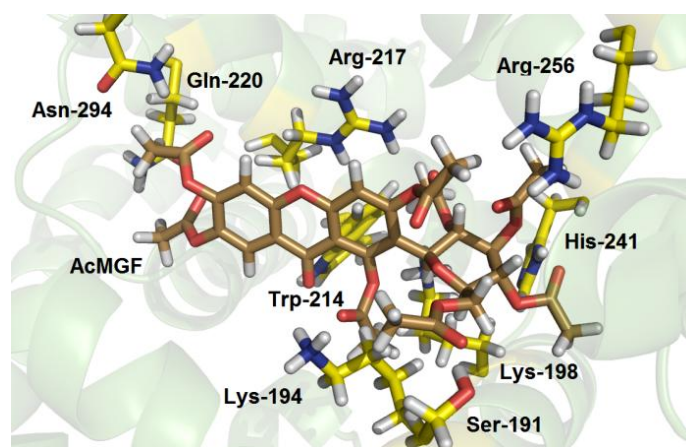


Figura 23. Resultado do estudo de docagem molecular para o maior valor de pontuação obtido para ASH:AcMGF no sítio de Sudlow I (função *ChemPLP*). Resíduos de aminoácidos selecionados, ASH e AcMGF estão representados em amarelo, verde e castanho, respectivamente. Cor dos elementos químicos: nitrogênio, oxigênio e hidrogênio em azul, vermelho e branco, respectivamente.

Tabela 12. Principais resíduos de aminoácidos no sítio de Sudlow I da ASH, e suas respectivas interações e distância com o ligante AcMGF.

Amostra	Resíduos de aminoácidos	Interação	Doador/Aceptor de lig-H	Distância (Å)
AcMGF	Ser-191	Lig. H	Doador	1.60
	Lys-194	Lig. H	Doador	2.90
	Lys-198	Lig. H	Doador	2.00
	Trp-214	<i>t</i> -Stacking	-	2.40
	Arg-217	Lig. H	Doador	2.40
	Gln-220	Lig. H	Doador	3,90
	His-241	Lig. H	Doador	2.10
	Arg-256	Lig. H	Doador	3.40
	Asn-294	Lig. H	Doador	2.50

6.2.4 - Interação entre ASH com 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-hidroxixantona (PAcMGF)

Os resultados de docagem molecular para formação do complexo ASH:PAcMGF (**Figura 24**) sugere que os pares de elétrons não compartilhados do nitrogênio do grupo NH da ligação peptídica do resíduo de aminoácido Asp-450 é um aceptor de ligação de hidrogênio com o hidrogênio da hidroxila presente no anel B a distância de 3,70 Å, além disso o resíduo Lys-443 atua como doador de ligação de hidrogênio com outro grupo hidroxila do anel B a uma distância de 3,60 Å. Na outra porção do ligante onde os grupos acetatos foram mantidos (parte glicosídica e posição 1 do anel A), verificou-se que os resíduos Ser-191, Lys-194, e Arg-256 interagem preferencialmente como doadores para formação da ligação de hidrogênio com os grupos acetila do ligante, a distância de 2,80 Å, 2,10 Å, e 2,20 Å, respectivamente. Observou-se que o resíduo de aminoácido Lys-198 interagiu com a porção glicosídica, contudo agora o mesmo resíduo de aminoácido para PAcMGF interage *via* ligação de hidrogênio com a hidroxila do anel A, a uma distância de 2,10 Å. Também ao comparar as interações das associações ASH:AcMGF e ASH:PAcMGF foi verificada a ausência da participação dos resíduos de aminoácidos Arg-217, Gln-220, His-241 e Asn-294 na estabilização do complexo ASH com o derivado parcialmente acetilado. O hidrogênio do grupo guanidínico do resíduo de aminoácido Arg-221 interage como doador de ligação de hidrogênio com a carbonila do anel C a uma distância favorável de 3,50 Å. Esse derivado continuou apresentando interação hidrofóbica com o resíduo de aminoácido Trp-214 empilhamento T, a uma nova distância de 3,00 Å. Mesmo o derivado parcialmente acetilado apresentando semelhanças estruturais com a MGF e

AcMGF, ao manter as características na porção glicosídica igual a AcMGF e na porção xantônica igual a MGF, os resultados de docagem molecular sugerem que o novo derivado interage com outros resíduos de aminoácidos da cavidade protéica que não foram detectados para a MGF e AcMGF.

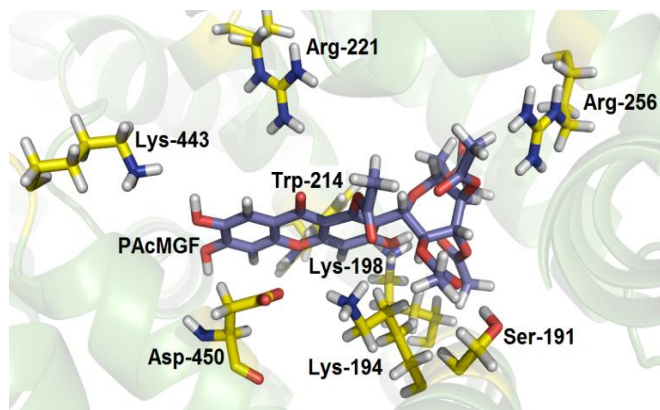


Figura 24. Resultado do estudo de docagem molecular para o maior valor de pontuação obtido para ASH:PACMGF no sítio de Sudlow I (função *ChemPLP*). Resíduos de aminoácidos selecionados, ASH e PACMGF estão representados em amarelo, verde e ciano, respectivamente. Cor dos elementos químicos: nitrogênio, oxigênio e hidrogênio em azul, vermelho e branco, respectivamente.

Tabela 13. Principais resíduos de aminoácidos no sítio de Sudlow I da ASH, e suas respectivas interações e distância com o ligante PACMGF.

Amostra	Resíduos de aminoácidos	Interação	Doador/Aceptor de lig-H	Distância (Å)
PACMGF	Ser-191	Lig. H	Doador	2,80
	Lys-194	Lig. H	Doador	2,10
	Lys-198	Lig. H	Doador	2,10
	Trp-214	<i>t</i> -Stacking	-	3,00
	Arg-221	Lig. H	Doador	3,50
	Arg-256	Lig. H	Doador	2,20
	Lys-443	Lig. H	Doador	3,60
	Asp-450	Lig. H	Aceptor	3,70

6.2.5 - Interação entre ASH com 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-trimetoxixantona (PACMGFMe)

O resultado do estudo de docagem molecular para o derivado (PACMGFMe), demonstrou que apenas quatro resíduos de aminoácidos se encontram em proximidade suficiente para realizar interações favoráveis (**Figura 25**). Todos estes resíduos se encontram próximos ao anel A do sistema aromático e do glicosídeo. O hidrogênio do

grupo guanidínico do resíduo de aminoácido Arg-221 interage como doador para ligação de hidrogênio com o grupamento acetila da posição 1 do anel A, a uma distância de 2,10 Å. Os oxigênios dos grupos acetilas da porção glicosídica do ligante interagem por ligação de hidrogênio com hidrogênios dos resíduos de aminoácidos Lys-194 e Lys-198 a uma distância de 3,60 Å e 2,00 Å, respectivamente. Em contrapartida, diferentemente do que foi observado para os demais ligantes descritos anteriormente, o resíduo de aminoácido Trp-214 não interage com o anel xantônica A, mas sim com o grupo acetila da porção glicosídica, por ligação de hidrogênio, a uma distância de 3,60 Å.

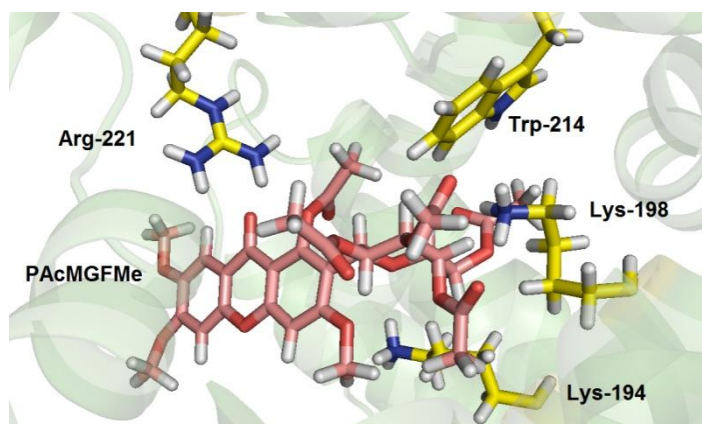


Figura 25. Resultado do estudo de docagem molecular para o maior valor de pontuação obtido para ASH:PAcMGFMe no sítio de Sudlow I (função *ChemPLP*). Resíduos de aminoácidos selecionados, ASH e PAcMGFMe estão representados em amarelo, verde e bege, respectivamente. Cor dos elementos químicos: nitrogênio, oxigênio e hidrogênio em azul, vermelho e branco, respectivamente.

Tabela 14. Principais resíduos de aminoácidos no sítio de Sudlow I da ASH, e suas respectivas interações e distância com o ligante PAcMGFMe.

Amostra	Resíduos de aminoácidos	Interação	Doador/Aceptor de lig-H	Distância (Å)
PAcMGFMe	Lys-194	Lig. H	Doador	3,60
	Lys-198	Lig. H	Doador	2,00
	Trp-214	Lig. H	Doador	3,60
	Arg-221	Lig. H	Doador	2,10

6.2.6 - Interação entre ASH com 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-trietoxixantona (PAcMGFEt)

As análises dos resultados de docagem molecular (**Figura 26**) revelaram que um dos oxigênios dos grupos etóxi, presente no anel B do ligante interage com o resíduo de aminoácido Lys-443, sendo que o hidrogênio desse resíduo é doador de ligação de hidrogênio, a uma distância de 2,80 Å. Observou-se que para o derivado parcialmente acetilado etoxilado, o hidrogênio do grupo guanidínico do resíduo de aminoácido Arg-221 não interage mais com a carbonila do ligante, como foi detectado para o PAcMGFMe, mas sim com o oxigênio do grupo etóxi do anel B a uma distância de 3,90 Å. Já os resíduos de aminoácidos, Lys-198, Arg-217 e Ser-291 atuam todos como doadores de ligação de hidrogênio com os grupos acetila da porção glicosídica do ligante a distâncias de 2,10 Å, 3,20 Å e 2,30 Å, respectivamente; enquanto que o resíduo Trp-214 apresentou interação de caráter hidrofóbico empilhamento T com o anel A do sistema xantônico, a uma distância de 3,20 Å.

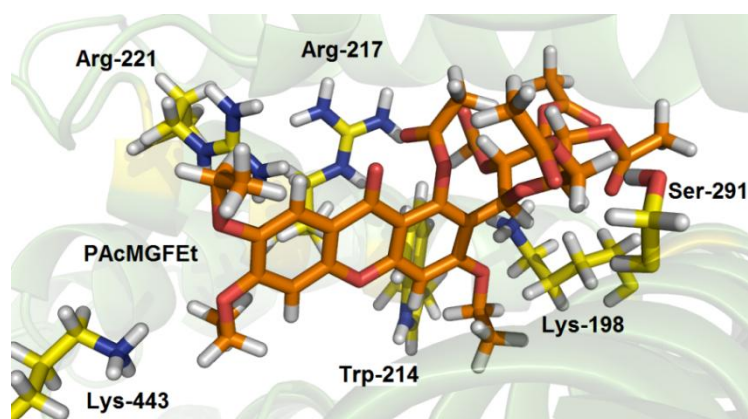


Figura 26. Resultado do estudo de docagem molecular para o maior valor de pontuação obtido para ASH:PAcMGFEt no sítio de Sudlow I (função *ChemPLP*). Resíduos de aminoácidos selecionados, ASH e PAcMGFEt estão representados em amarelo, verde e laranja, respectivamente. Cor dos elementos químicos: nitrogênio, oxigênio e hidrogênio em azul, vermelho e branco, respectivamente.

Tabela 15. Principais resíduos de aminoácidos no sítio de Sudlow I da ASH, e suas respectivas interações e distância com o ligante PAcMGFEt.

Amostra	Resíduos de aminoácidos	Interação	Doador/Aceptor de lig-H	Distância (Å)
PAcMGFEt	Ser-191	Lig. H	Doador	2,30
	Lys-198	Lig. H	Doador	2,10
	Trp-214	<i>t</i> -Stacking	-	3,20
	Arg-217	Lig. H	Doador	3,20
	Arg-221	Lig. H	Doador	3,90
	Lys-443	Lig. H	Doador	2,80

6.2.7- Interação entre ASH com 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-tribenzilxantona (PAcMGFBz)

As análises dos resultados de docagem molecular para a interação ASH:PAcMGFBz (**Figura 27**), sugerem que os grupos acetilas da porção glicosídica do ligante apresentam interações de ligação de hidrogênio com os hidrogênios dos resíduos de aminoácidos Arg-221, Lys-443 e Asn-294 a uma distância de 1,90 Å, 2,80 Å e 3,10 Å, respectivamente. Além disso, o oxigênio do grupo éter do anel C do ligante interage *via* ligação de hidrogênio com o hidrogênio do resíduo de aminoácido Lys-198 a uma distância de 3,70 Å. O resíduo de aminoácido Trp-214 realiza uma interação hidrofóbica empilhamento T com o anel aromático ligado na posição 6 do anel C xantônico, a uma distância de 3,08 Å. Apenas para esse derivado da mangiferina foi observado esse tipo de interação para com o fluoróforo interno da albumina. Dentre os derivados estudados, este composto foi o que apresentou o maior valor de pontuação. Isso possivelmente estaria associado à presença dos anéis aromáticos no PAcMGFBz que fez com que esse derivado interagisse com os resíduos de aminoácidos apolares Leu-197, Ala-209, Ala-290, Val-343, Phe-210, Leu-452, Leu-456, Leu-480 e Val-481, permitindo que o ligante realizasse um maior número de interações dentro do sítio da proteína (os resíduos apolares estão representados em cor-de-rosa na figura 38).

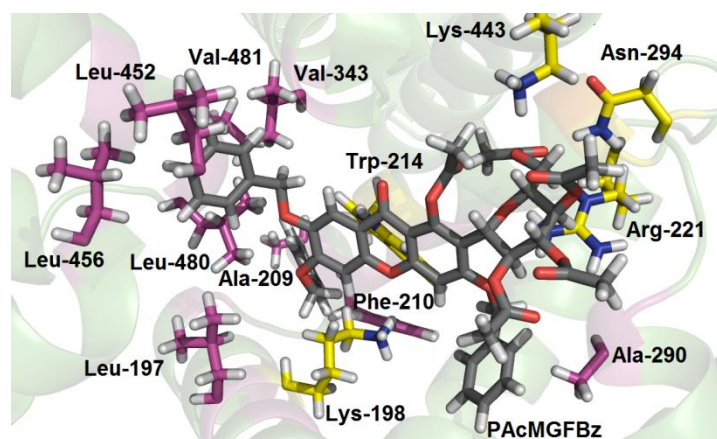


Figura 27. Resultado do estudo de docagem molecular para o maior valor de pontuação obtido para ASH:PAcMGFBz no sítio de Sudlow I (função *ChemPLP*). Resíduos de aminoácidos selecionados polares, resíduos de aminoácidos selecionados apolares, ASH e PAcMGFBz estão representados em amarelo, cor-de-rosa, verde e cinza, respectivamente. Cor dos elementos químicos: nitrogênio, oxigênio e hidrogênio em azul, vermelho e branco, respectivamente.

Tabela 16. Principais resíduos de aminoácidos no sítio de Sudlow I da ASH, e suas respectivas interações e distância com o ligante PAcMGFBz.

Amostra	Resíduos de aminoácidos	Interação	Doador/Aceptor de lig-H	Distância (Å)
PAcMGFBz	Lys-198	Lig. H	Doador	3,70
	Trp-214	π -Stacking	-	3,10
	Arg-221	Lig. H	Doador	1,90
	Asn-294	Lig. H	Doador	3,10
	Lys-443	Lig. H	Doador	2,80
	Leu-197	Hidrofóbica	-	-
	Ala-209	Hidrofóbica	-	-
	Phe-210	Hidrofóbica	-	-
	Ala-290	Hidrofóbica	-	-
	Val-343	Hidrofóbica	-	-
	Leu-452	Hidrofóbica	-	-
	Leu-456	Hidrofóbica	-	-
	Leu-480	Hidrofóbica	-	-
	Val-481	Hidrofóbica	-	-

6.3 - Estudos espectroscópicos

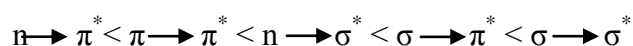
6.3.1-Absorção de Luz no Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

A absorção de um fóton pode ser relacionada, em muitos casos, à transição eletrônica de um cromóforo de uma molécula. Na espectroscopia na região do UV-Vis a transição eletrônica consiste na promoção de um elétron (por absorção de um fóton) contido em um orbital molecular ligante ou não-ligante do estado fundamental (menor energia) para um orbital vazio, que no caso da espectroscopia de absorção, seria de mais alta energia não ocupado, chamados pela abreviatura LUMO – (do inglês *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*), ou LUMO+1, cujo nome varia dependendo do nível energético.

Para as moléculas orgânicas, os elétrons podem ser excitados a partir dos orbitais moleculares ligantes σ ou π , que são chamados de HOMO (do inglês *Highest Occupied Molecular Orbital*). Também pode haver excitação de elétrons de orbital molecular não ligante NBMO (do inglês *Non-bonding Molecular Orbital*) (**Figura 28**).

A espectroscopia no ultravioleta é limitada, na maior parte, aos sistemas conjugados, pois para muitas estruturas eletrônicas esta absorção ocorre em uma porção pouco acessível do ultravioleta (SILVERSTEIN *et al.*, 1994). Os grupos que têm absorções características são chamados de cromóforo e sua presença é responsável, com frequência, pela coloração das substâncias (ATKINS e DE PAULA, 2004).

No exemplo abaixo, **Figura 29** para formaldeído, a transição eletrônica responsável pela absorção de compostos que possuem a função carbonila pode ser atribuída aos pares de elétrons isolados do átomo de oxigênio, gerando a transição $n \rightarrow \pi^*$. As energias típicas de absorção são da ordem de 4 eV (290nm). Como as transições $n \rightarrow \pi^*$ são proibidas por simetria, isto é, possuem baixa probabilidade de ocorrer, suas absorções são consideradas como fracas (ATKINS e DE PAULA, 2004). Isso pode ser verificado experimentalmente através da leitura de espectros de UV-Vis em várias concentrações para obtenção do ϵ - através da Lei de Beer-Lambert: $A = \epsilon \cdot b \cdot l$. Ao organizar em ordem crescente as transições eletrônicas geralmente tem-se:



Para ilustração desses níveis de energia, a **Figura 28** apresenta todas as possibilidades de transições eletrônicas para a molécula de formaldeído.

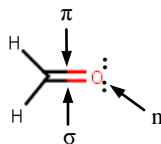


Figura 29. Estrutura molecular do formaldeído.

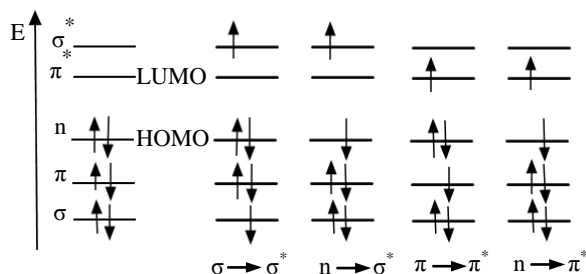


Figura 28. Níveis de energia para os orbitais moleculares do formaldeído (HOMO: orbital molecular ocupado de mais alta energia; LUMO: orbital molecular desocupado de mais baixa energia) (VALEUR, 2001).

A absorção de luz não-polarizada pode ser descrita pela absorbância (A), que é definida pela **Equação 1** (LAKOWICZ, 2006).

$$A = \log (I_0/I) \quad (1)$$

Onde:

A - absorbância;

I₀ - intensidade da luz incidente;

I - intensidade após a luz percorrer uma distancia l no meio.

É possível determinar segundo a lei de Lambert-Beer (**Equação 2**), o coeficiente de extinção molar, também conhecido como coeficiente de absorção molar, ou apenas absorvidade molar (ϵ) (PACE, 1995).

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (2)$$

Onde:

A - absorbância;

c - concentração da espécie que absorve a luz (em mol/L);

l - distância que a luz percorre no meio (em cm); ϵ = coeficiente de extinção molar (em L/cm.mol).

A proteína albumina sérica humana (ASH) possui uma banda de absorção molecular no ultravioleta a 280nm, referente à transição $\pi \rightarrow \pi^*$, que é atribuída principalmente à absorção por três de resíduos de aminoácido aromáticos: triptofano (Trp), fenilalanina (Phe) e tirosina (Tyr). Por serem aminoácidos relativamente não polares, estes podem participar de interações hidrofóbicas, que são relativamente fortes. Os grupos aromáticos ligados à estrutura base destes aminoácidos podem eventualmente participar de interações do tipo π ou *t*-Stacking. Contudo, o grupo hidroxila do resíduo de aminoácido tyr pode participar de interações polares, como doador ou acceptor de ligações de hidrogênio. Os resíduos de aminoácidos Tyr e trp apresentam maior polaridade por conta dos grupos hidroxila e indólico, respectivamente. Dentre estes aminoácidos, o que tem maior absorção e emissão de fluorescência mais intensa é o triptofano, isso ocorre devido ao seu alto valor de absorvidade molar (trp, $\epsilon = 5600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; phe, $\epsilon = 200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e tyr, $\epsilon = 1400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (LAKOWICZ, 2006).

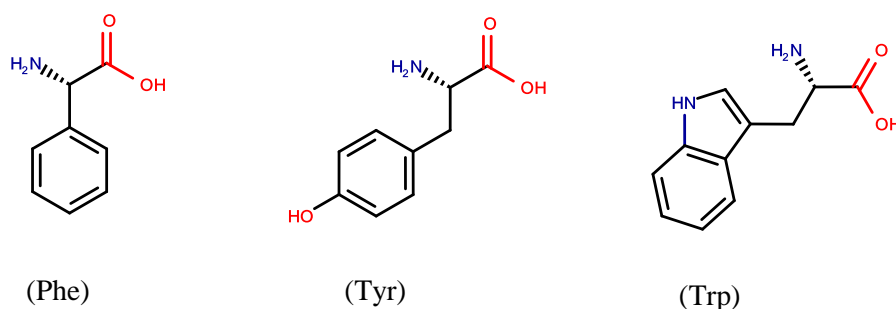


Figura 30. Estrutura de fenilalanina (phe), tirosina (tyr) e triptofano (trp).

A sobreposição e coplanaridade dos orbitais π em sistemas conjugados permite que os elétrons estejam deslocalizados sobre todo o sistema (efeito ressonância). Por não haver sobreposição entre os orbitais σ e π , o sistema de elétrons π pode ser considerado como independente das ligações σ . Pode-se dizer que a extensão do sistema π é inversamente proporcional à energia para a transição $\pi - \pi^*$ e, por isso, o comprimento de onda da banda de absorção correspondente é maior. Esta regra aplica-se a sistemas conjugados lineares (polienos) e sistemas conjugados cíclicos (moléculas aromáticas).

Efeitos de deslocamentos na banda de absorção máxima da ASH, próximo à região de $\lambda_{\text{máx}} = 280 \text{ nm}$, referente à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ - associada ao resíduo trp - podem

indicar a formação de um complexo de associação (interação ligante) entre os compostos bioativos e proteínas no estado fundamental. Um deslocamento para menores comprimentos de onda, comparado com o espectro de absorção da proteína livre, indicam um ambiente químico mais hidrofóbico (deslocamento hipsocrômico), enquanto que o oposto, um deslocamento batocrômico, está diretamente associado a um ambiente químico mais hidrofílico próximo ao resíduo de triptofano (CHAVES *et al.*, 2016).

Inicialmente foram avaliadas as interações entre ASH e a xantona natural mangiferina (MGF) e seus derivados (AcMGF, PAcMGF, PAcMGFEt, PAcMGFMe e PAcMGFBz) através de espectros de absorção na região do UV-Vis. Os espectros de absorção na região entre 200 a 450nm para ASH em solução 10^{-5} mol/L em tampão de PBS (pH = 7,4), na ausência e na presença de concentrações variadas das xantonas estudadas. A **Figura 31** mostra os espectros de absorção no UV-Vis para ASH:MGF e já para os derivados sintéticos as figuras encontram-se em anexo (Figuras A.32, 33, 34, 35, 36).

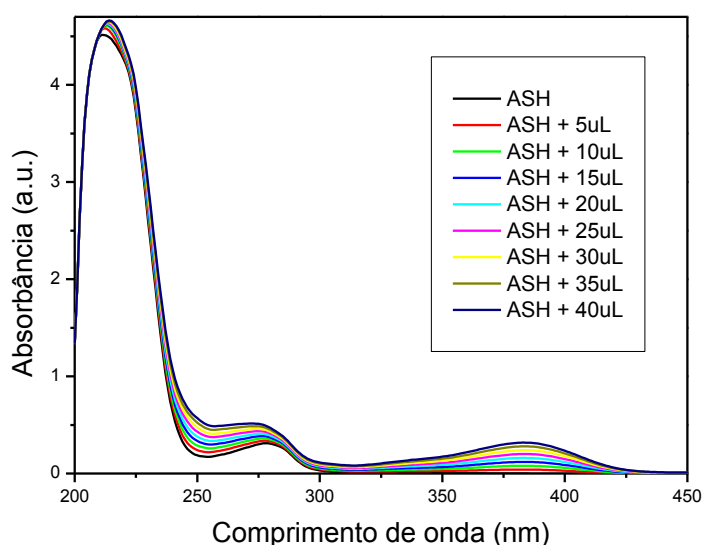


Figura 31. Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH sem e com adições sucessivas de MGF. $C_{ASH} = 1,0 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{MGF} = 0,17; 0,33; 0,50; 0,66; 0,83; 0,99; 1,15$ e $1,32 \times 10^{-5}$ mol/L, tamponada com PBS (pH= 7,4).

Como pode ser observado na (**Figura 31**), a MGF em PBS apresentou máximos de absorção em 275nm, que é coincidente com o máximo de absorção do triptofano da

ASH, a 280nm, a explicação para o deslocamento hipsocrômico do espectro de ASH seria que ele é resultante da adição destas xantonas. Este deslocamento ocorre em consequência do aumento da concentração de ligantes adicionados, deste modo indicando a existência de uma possível associação entre as substâncias estudadas com a proteína.

Avaliando-se apenas os resultados dos espectros de absorção no UV-Vis contidos na **(Figura 32)** obtidos na máxima concentração de análise para os compostos, não é possível chegar a uma conclusão definitiva quanto à formação de um pré-associação ASH:Xantonas.

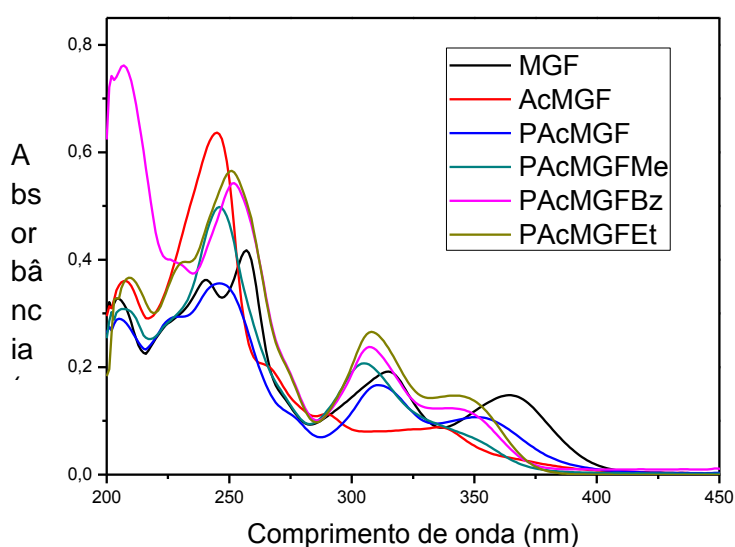


Figura 32. Espectro de absorção no UV-Vis de MGF e seus derivados sintéticos. $C_{\text{substâncias}} = 1,32 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

Ao observar o espectro de absorção contido na **(Figura 33)** e em anexo os derivados (Figuras A.37, 38, 39, 40, 41) é possível notar que a contribuição da MGF na região a 280nm não apresenta absorção significativa, sua parcela de contribuição é mínima assim como para seus derivados, porém quando se observa neste mesmo espectro a banda de absorção apenas da ASH e da ASH com adição de 40uL de MGF na concentração máxima de $(1,32 \times 10^{-5} \text{ mol/L})$ como também para seus derivados, espectros em anexo (Figuras A.37, 38, 39, 40, 41), nota-se claramente a ocorrência do mesmo deslocamento hipsocrômico observado na figura 22, estes resultados estão em concordância e indicam a existência da formação de um complexo entre ASH e as xantonas. Para a aquisição dos espectros das xantonas puras, foi utilizada a

concentração máxima delas que foi empregada nas experiências de fluorescência estacionária ($1,32 \times 10^{-5}$ mol/L).

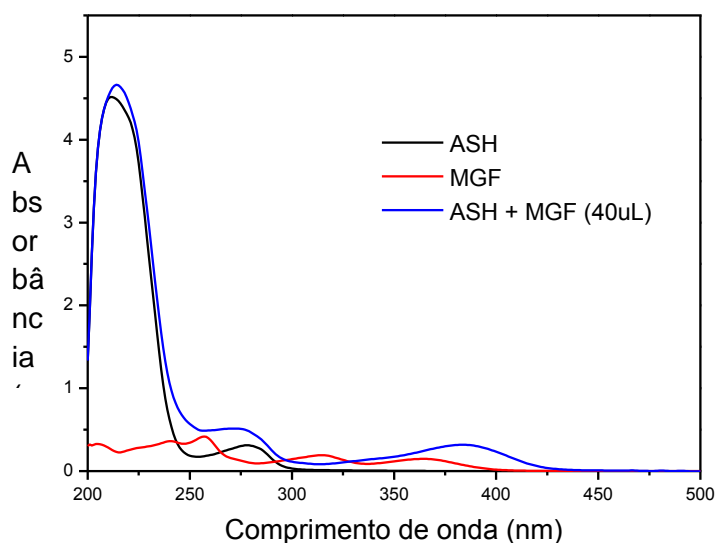


Figura 33. Espectros de absorção no UV-Vis de MGF em etanol e ASH, ASH:MGF em solução tampão de PBS (pH = 7,4). $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{MGF} = 1,32 \times 10^{-5}$ mol/L.

6.3.2- Estudos Espectroscópicos de Emissão de Fluorescência

A supressão de fluorescência se refere a qualquer processo no qual diminui a intensidade de fluorescência de uma amostra. Há uma variedade de interações moleculares que pode resultar em supressão, incluindo reações de estado excitado, rearranjos moleculares, transferência de energia, formação de complexo de estado fundamental e supressão colisional. Os diferentes mecanismos de supressão são geralmente classificados como supressão estática ou dinâmica (ou colisional). Supressão estática e dinâmica pode ser distinguida pelas suas diferentes dependências com a temperatura e viscosidade ou preferencialmente pela medida do tempo de vida de fluorescência (LAKOWICZ, 1999).

Quando um dos elétrons do orbital HOMO de spins opostos é transferido para um orbital molecular de maior energia, seu spin, em princípio, não é alterado, sendo que ambos estados são chamados de singlete (normalmente denominado S_0 para o estado fundamental, e S_1, S_2, \dots, S_n para os estados excitados) (**Figura 34**) e a transição correspondente é chamada de uma transição singlete-singlete.

Uma molécula no estado excitado singlete pode sofrer conversão para um estado em que o elétron excitado tenha seu spin modificado, e por existirem dois elétrons com spins paralelos, o número quântico total de spin é 1 e a multiplicidade é 3. Tal estado é chamando de estado triplete porque corresponde a três estados de mesma energia. De acordo com a regra de Hund, o estado triplete em uma energia menor que a do estado singlete de mesma configuração (VALEUR, 2001).

$$M = 2S + 1$$

$$S = \sum S_i, \text{ com } S_i = +1/2 \text{ ou } -1/2$$

Equação 3. Equação para o cálculo da multiplicidade.

Onde: **S** é o número quântico de spin total; **M** é a multiplicidade; **S_i** é o número quântico de spin.

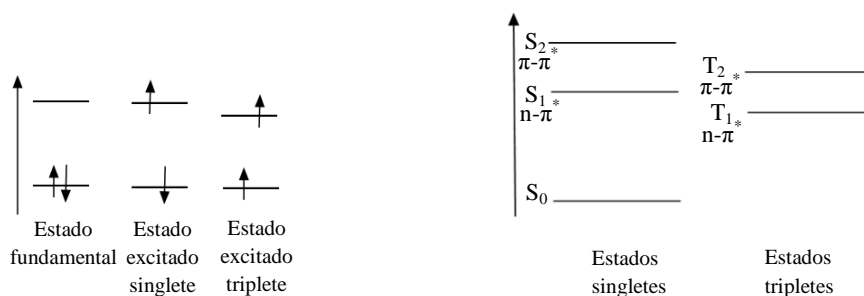


Figura 34. Distinção entre os estados singlete e triplete, usando o formaldeído como exemplo (VALEUR, 2001).

A absorção de radiação eletromagnética em forma de fótons por átomos ou moléculas ocorre em tempos da ordem de 10^{-15} segundos, a energia ganha durante o processo de absorção de um fóton, promove-os para seus estados eletrônicos mais energéticos (S₁ e S₂). Entretanto os átomos ou moléculas não permanecem em seus estados eletrônicos excitados, visto que a energia absorvida é perdida ou convertida para que os átomos ou moléculas retornem ao estado fundamental. Essa desativação do estado excitado pode ocorrer por meio de diversos tipos de mecanismos, conforme pode ser observado pelo Diagram de Jablonsky (**Figura 35**) (LAKOWICZ, 1999; SKOOG, 2002).

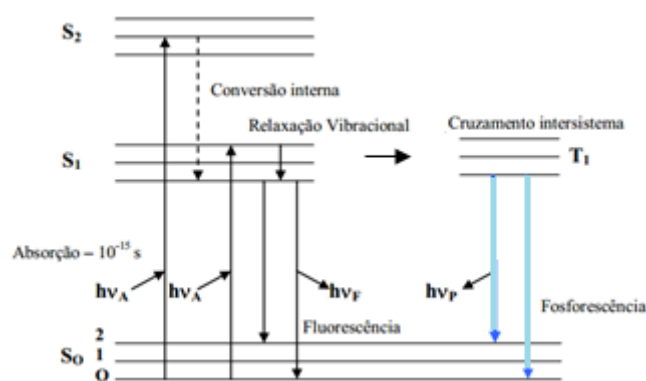


Figura 35. Diagrama de Jablonsky. Esse esquema representa os níveis de energia eletrônicos singlete (S_0 , S_1 e S_2), tripleto (T_1), e vibracionais (0, 1 e 2) de uma molécula. As setas dirigidas para cima indicam absorção de radiação ($h\nu_A$); as setas dirigidas para baixo, emissão de radiação ($h\nu_F$ e $h\nu_P$ - *Fluorescência* e *Fosforescência*, respectivamente); setas pontilhadas são para conversão interna.

Quando uma molécula é excitada ao seu nível eletrônico singlete de maior energia S_1 ou S_2 , isso a permite acessar níveis vibracionais e rotacionais de maiores energias. Com a relaxação para níveis vibracionais e rotacionais de menor energia, dentro do mesmo nível eletrônico singlete S_1 ou S_2 para o qual a molécula foi excitada, parte da energia absorvida na excitação dá origem ao processo denominado de **Relaxação Vibracional (Figura 35)**, com um tempo de duração característico da ordem de 10^{-12} s. Como o tempo de vida de um estado eletrônico excitado é da ordem de 10^{-8} s, o restante da energia absorvida no processo de excitação é então irradiado para que a molécula volte ao seu estado fundamental, esse é o fenômeno chamado **Fluorescência (Figura 35)**. O processo de relaxação vibracional se completa antes da emissão de fluorescência. A radiação emitida apresenta menor energia por fóton que a radiação excitante e, portanto, possui um maior comprimento de onda (LAKOWICZ, 1999; SKOOG, 2002). O processo de relaxação entre níveis eletrônicos excitados é denominado de **Conversão interna**, esta conversão consiste em uma transição não-radiativa entre dois estados eletrônicos de mesma multiplicidade de spin. Este processo é seguido por uma relaxação vibracional (em solução) para o nível vibracional mais baixo do estado eletrônico, S_1 por exemplo, com transferência do excesso de energia vibracional para moléculas vizinhas este fenômeno possui tempo característico de 10^{-11} a 10^{-9} s (LAKOWICZ, 1999. SKOOG, 2002). A **Fluorescência** é o processo no qual a emissão de fótons é acompanhada da relaxação radiativa $S_1 - S_0$. A emissão de

fluorescência, geralmente, ocorre a partir de S_1 e suas características não são dependentes do comprimento de onda de excitação. O **Cruzamento Intersistema** é uma transição não-radiativa entre dois níveis vibracionais isoenergéticos pertencentes a estados eletrônicos de multiplicidades diferentes. Moléculas no estado S_1 podem experimentar uma conversão de spin para o primeiro estado tripleto, T_1 . As transições para o estado fundamental (singleto), a partir de um estado tripleto (T_1) dão origem ao fenômeno de fosforescência, envolvendo tempos de até milissegundos (**Figura 35**) (EWING, 1972; LAKOWICZ, 1999; SKOOG, 2002). A desativação unimolecular não-radiativa a partir do estado tripleto T_1 em uma solução considerando temperatura ambiente é predominante sobre a desativação radiativa, que para este caso é chamada de fosforescência. A transição T_1-S_0 tem baixíssima probabilidade de ocorrência por conta da diferença entre as respectivas multiplicidades, por isso dita proibida, (pode ser observada devido ao acoplamento spin-órbita), e a constante de decaimento radiativo é muito pequena. O espectro de fosforescência é localizado em comprimentos de onda maiores que no espectro de fluorescência, porque a energia do nível vibracional mais baixo do estado tripleto T_1 é menor que o do estado singleto S_1 . O fenômeno de fosforescência é melhor observado a baixas temperaturas, por conta da diminuição de processos de desativação competitivos, como a transferência de energia eletrônica e vibracional.

Medições de fluorescência podem dar algumas informações sobre as principais forças intermoleculares responsáveis pela ligação de pequenas moléculas de proteína, bem como o mecanismo, as constantes relacionada a esta associação, sítios e modo de ligação (ZANG, 2008). A supressão de fluorescência é um dos métodos mais empregados para estudar as interações moleculares envolvendo proteínas, isto porque consiste de uma técnica sensível, rápida, simples, seletiva e com fundamento teórico abundante. O máximo da fluorescência intrínseca do resíduo de Trp presente na ASH (Trp-214) em 340 nm é sensível à presença de supressores. A supressão de fluorescência desse aminoácido pode revelar a acessibilidade do supressor frente a albumina e, desse maneira, ajudar a compreender o mecanismo de ligação e a natureza da associação (CHAVES, 2016; ZHANG, 2008). Esta supressão expressa como a redução do rendimento quântico da fluorescência de um fluoróforo induzida por uma variedade de interações moleculares com uma molécula de supressor.

Os resultados dos estudos da supressão de fluorescência da proteína ASH como resultado da interação com a mangiferina e seus derivados (AcMGF, PAcMGF, PAcMGFet, PAcMGFMe e PAcMGFBz), em solução tampão de PBS (pH= 7,4) na temperatura 310K, estão apresentados na **(Figura 36)** para MGF e no anexo para seus derivados (Figuras A.42, 43, 44, 45, 46).

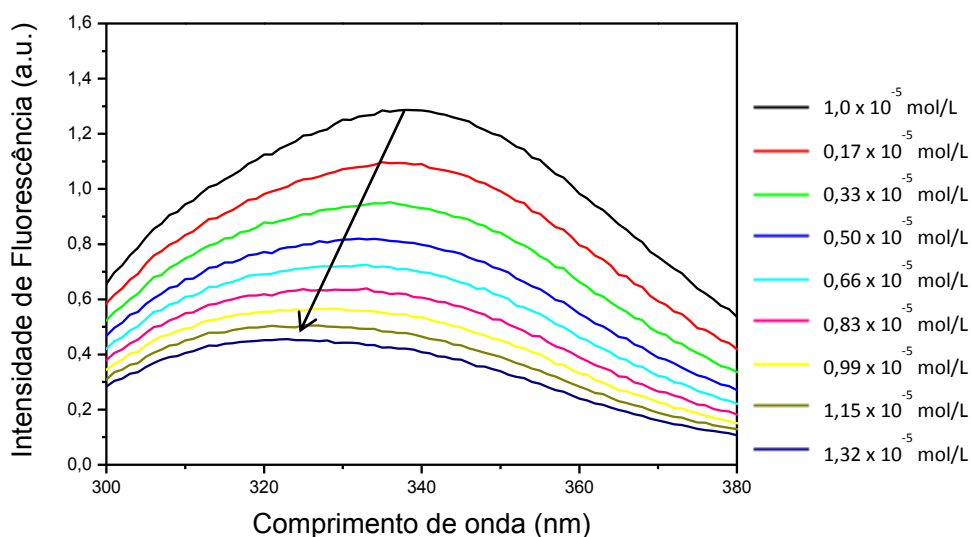


Figura 36. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280\text{nm}$) do fluoróforo interno da ASH (Trp-214) e sua supressão pela adição de MGF, em solução tampão de PBS (pH= 7,4). $C_{ASH} = 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{MGF} = 0,17; 0,33; 0,50; 0,66; 0,83; 0,99; 1,15$ e $1,32 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, a $T = 310\text{K}$.

A **Figura 36** demonstra que a intensidade de fluorescência da proteína (ASH) apresentou uma diminuição gradativa na intensidade de emissão máxima de fluorescência de ASH em 340 nm (Figuras A.42, 43, 44, 45, 46 para os derivados) em função da adição de alíquotas sucessivas de MGF, o que também foi verificado para seus derivados. O aumento dessas substâncias em solução ocasiona a supressão de emissão de fluorescência do resíduo de aminoácido triptofano (Trp-214) da proteína, esta é uma clara indicação de uma interação entre ASH: MGF e ASH: Derivados (T. WANG, 2010).

O aumento na concentração das xantonas, decorrente de adições sucessivas, resultou em um leve deslocamento na banda de emissão de fluorescência da albumina para região azul indicando a ocorrência de interações do composto na cavidade hidrofóbica da albumina, ocasionando pequenas mudanças estruturais nesta região, ou

seja, há uma diminuição de polaridade do microambiente da cavidade em torno do resíduo de aminoácido triptofano (SHI *et al.*, 2007; TANG *et al.*, 2006 & CHANG *et al.*, 2009). Além disso, também foi observado no espectro de absorção UV-Vis (figuras 22 e 24) da proteína deslocamentos de banda para regiões de menores comprimentos de onda, demonstrando que estes deslocamentos estão diretamente relacionados, indicando provável interação entre ASH e supressor.

A intensidade de fluorescência é diretamente proporcional à concentração do fluoróforo quando em soluções muito diluídas (ou seja, absorvância muito baixa). Para concentrações baixas o suficiente (absorvância <0,1 u.a.) a luz incidente é ligeiramente atenuada ao longo da cubeta. Já em concentrações altas, uma parte significativa da luz incidente é absorvida antes de chegar ao ponto onde a fluorescência é observada (efeito de filtro interno). Outra parte significativa da luz emitida também é reabsorvida antes desta sair da cubeta (efeito de filtro interno secundário), levando a um aparente decréscimo da intensidade de fluorescência (LAKOWICZ, 2006; CHAVES *et al.*, 2016). Como a concentração máxima de ligante ($1,32 \times 10^{-5}$ mol/L) usada na espectroscopia de fluorescência possui valor de absorção acima de 0,1 u.a., em 280 nm e 340 nm, indica que mais de 10% da luz incidida e emitida são absorvidas pelo supressor. Com objetivo de compensar esse efeito, foi necessário realizar correções nos valores de intensidade de fluorescência obtidos para todas as amostras analisadas. Estas correções foram empregadas de acordo com a **Equação 4**:

$$F_{\text{corr.}} = F_{\text{obs.}} \cdot 10^{[(A_{\text{ex.}} + A_{\text{em.}})/2]} \quad (4)$$

Onde:

F_{corr} = Fluorescência corrigida; F_{obs} = Fluorescência observada; A_{ex} = Absorção do ligante a 280nm; A_{em} = Absorção do ligante a 340nm.

Afim de obter parâmetros fotofísicos que possam identificar o(s) principal(is) mecanismo(s) de supressão de fluorescência do Trp-214 pelos derivados de xantona (MGF, AcMGF, PAcMGF, PAcMGFEt, PAcMGFMe e PAcMGFBz), a diferentes temperaturas (296K, 303K e 310K), empregou-se as **Equações 5A e 5B**. Os gráficos de Stern-Volmer para MGF estão apresentados na **Figura 37** e já no anexo estão apresentados os gráficos para os demais compostos (Figuras A 47, 48, 49, 50, 51).

$$(A) \frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (B) \quad k_q = \frac{K_{sv}}{\tau_0} \quad (5)$$

Onde: $\tau_0 = 1.00 \times 10^{-8} \text{s}$

Equação 5. Equação para a determinação de K_{sv} , e conseqüentemente, k_q . τ_0 é o termo de vida de fluorescência de ASH (SKLAR et al., 1977).

Onde:

K_{sv} = constante de supressão de Stern-Volmer; k_q = constante de supressão bimolecular; τ_0 = tempo de vida do fluoróforo na ausência do supressor; $[Q]$ = concentração do supressor; F_0 = intensidade de emissão de fluorescência na ausência de supressor; F = intensidade de emissão de fluorescência na presença do supressor.

Sob condições de pH fixo, temperatura e força iônica, a supressão de fluorescência pode resultar na formação de um complexo de fundo, transferência de energia ou processo de supressão dinâmica (X. GUO, X. HAN, J. TONG, C. GUO, W. YANG, J. ZHUN, B. FU, J. 2010). Objetivando determinar que tipo de mecanismo poderia estar ocorrendo em cada situação, os dados de supressão de fluorescência obtidos para cada um dos três valores de temperatura empregado, foram analisados aplicando a equação de Stern-Volmer e também a relação entre a constante cinética k_q (constante de velocidade de supressão) com K_{sv} (constante de supressão de Stern-Volmer).

O gráfico de Stern-Volmer (**Figura 37**) para o composto natural (MGF) demonstra a existência de uma relação linear, a baixa concentração de MGF, mas com o aumento da concentração deste ligante, foi observado em seu gráfico uma ligeira curvatura indicando a presença de dois mecanismos competitivos de supressão. Estes resultados indicam a formação de uma pré-associação na qual, o mecanismo estático suprime a baixas concentrações de supressor e em contra partida o mecanismo estático e dinâmico estaria ocorrendo em altas concentrações de MGF (J. LAN *et al.*, 2009). Por outro lado, os valores de K_{sv} para os derivados AcMGF e PAcMGF apresentaram em seus gráficos de Stern-Volmer, figura 47 e 48 em anexo, uma relação linear tanto em baixas quanto a altas concentrações de ligantes, e os valores de K_{sv} diminuíram com o aumento da temperatura indicando para esses casos a existência apenas do mecanismo estático (Y. YUE *et al.*., 2009). Os derivados PAcMGFMe, PAcMGFEt também

apresentou em seus gráficos a mesma relação linear a baixas e altas concentrações, figuras 49 e 50 no anexo. Porém, para os valores de K_{sv} observou-se que com o aumento da temperatura ocorreu o aumento no valor da constante indicando a existência do mecanismo estático, mas com uma parcela de contribuição do mecanismo dinâmico. Para o derivado PAcMGFBz a mesma relação linear foi observada em seu gráfico figura 51 no anexo, no entanto, os valores de K_{sv} se mantiveram constante após aumento da temperatura, desta forma ficou claro a presença apenas do mecanismo estático.

Os valores das constantes de velocidade de supressão (k_q) obtidos para as xantonas representados na tabela 10, estão na ordem de (10^{12} L/mol.s) valores superiores a constante de velocidade de difusão ($k_{diff} \approx 5,00 \times 10^9$ L/mol.s a 298 K em água), (D. BRUNE *et al.*, 1993). Este dado indica que o processo de supressão de fluorescência da ASH pelas xantonas não ocorre única e exclusivamente pelo mecanismo dinâmico ou estático, mas também pode ocorrer em alguns casos a existência apenas do mecanismo estático ou a existência de ambos, com maior ou menor contribuição. Em uma situação onde se tenha a presença do mecanismo estático, ocorre a formação de uma pré-associação no estado fundamental não fluorescente entre o fluoróforo e o supressor (SATHESHKUMAR, 2014).

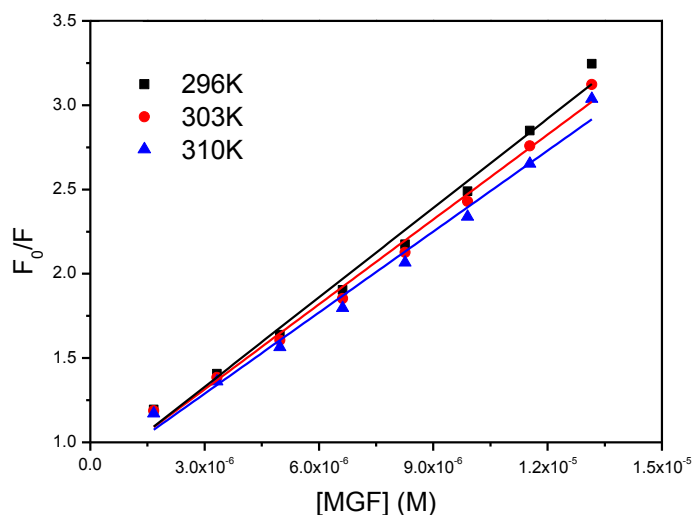


Figura 37. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280\text{nm}$) pela (MGF) a diferentes temperaturas. $C_{ASH} = 1.00 \times 10^{-5}$ mol/L e $\text{pH} = 7,4$.

As constantes de supressão efetivas para as xantonas, ou constantes de ligação de Stern-Volmer modificada (K_a), foram calculadas através de gráficos de Stern-Volmer modificados (CUI *et al.* 2008 & LI *et al.* 2009). Utilizando os dados dos experimentos

de supressão de fluorescência aplicados à equação de Stern-Volmer modificada (**Equação. 6**) foi possível calcular a constante de ligação/associação (K_a) de ASH com MGF **Figura 38** e no anexo para os demais compostos (Figuras A.52, 53, 54, 55, 56).

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{fK_a} \frac{1}{[Q]} + \frac{1}{f} \quad (6)$$

Onde : K_a = constante de supressão efetiva para os fluoróforos acessíveis, ou constante de ligação de Stern-Volmer modificada; $[Q]$ = concentração de supressor (ligantes); f = intensidade de fluorescência máxima fracional da proteína ou fração da fluorescência inicial que é acessível ao supressor (ligantes) $f= 1.00$ fluorescencia max. Fracional e referente ao residuo Trp-214 no sitio da ASH; F_0 = intensidade de emissão de fluorescência na ausência de supressor; F = intensidade de emissão de fluorescência na presença de supressor.

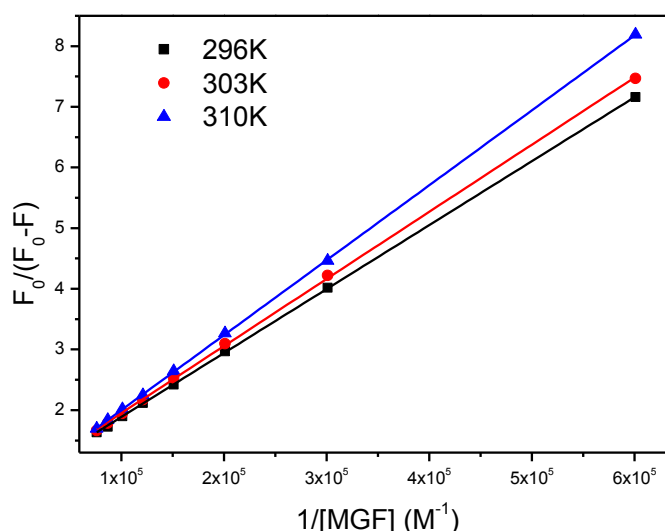


Figura 38. Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência ASH:MGF, a diferentes temperaturas. $C_{ASH} = 1.00 \times 10^{-5}$ mol/L e pH = 7,4.

Na **Tabela 17** se encontram os valores da constante de Stern-Volmer modificada (K_a) obtidos neste trabalho. Os valores dessa constante estão na ordem de 10^4 L/mol, indicando que a MGF e seus derivados ligam-se de maneira reversível e exibem afinidades moderadas pela proteína ASH (J. LAN, 2009). Os valores de K_a obtidos estão no mesmo intervalo, quando comparado com os dados da literatura para diversos flavonóides (W.Y. HE, 2005). Como pode ser visto na (**Figura 38**) e no anexo para os demais compostos (Figuras A.52, 53, 54, 55, 56). Uma vez que uma associação

moderada é preferencial em comparação com forte ou fraca (alto ou baixo valor de K_a , respectivamente), indicam que as moléculas estudadas podem ser armazenadas e transportadas pela albumina plasmática no plasma sanguíneo (ZHANG *et al.*, 2010).

Tabela 17. Constante de supressão Stern-Volmer (K_{sv}), taxa de constante de supressão (k_q) e constante de ligação modificada de supressão Stern-Volmer (K_a) para ASH: MGF e Derivados, a 296K, 303K e 310K.

Compostos	T	K_{sv}	k_q	r^2	K_a	r^2
	(K)	($\times 10^4$)	($\times 10^{12}$)		($\times 10^4$)	
MGF	296	(12.0 \pm 0.02)	12.0	0.9998	(7.91 \pm 0.03)	0.9999
	303	(11.8 \pm 0.03)	11.8	0.9980	(7.23 \pm 0.03)	0.9998
	310	(11.2 \pm 0.04)	11.2	0.9970	(6.20 \pm 0.03)	0.9999
AcMGF	296	(8.30 \pm 0.01)	0.83	0.9998	(9.22 \pm 0.03)	0.9903
	303	(8.10 \pm 0.01)	0.81	0.9988	(3.93 \pm 0.04)	0.9980
	310	(7.70 \pm 0.01)	0.77	0.9987	(2.14 \pm 0.01)	0.9993
PAcMGF	296	(2.52 \pm 0.04)	2.52	0.9993	(6.78 \pm 0.01)	0.9997
	303	(2.40 \pm 0.03)	2.40	0.9994	(4.70 \pm 0.02)	0.9990
	310	(1.91 \pm 0.02)	1.91	0.9996	(3.78 \pm 0.02)	0.9997
PAcMGFMe	296	(1.33 \pm 0.03)	1.33	0.9994	(1.02 \pm 0.02)	0,9994
	303	(1.46 \pm 0.03)	1.46	0.9998	(9.96 \pm 0.01)	0.9998
	310	(1.50 \pm 0.04)	1.50	0.9999	(8.99 \pm 0.05)	0.9999
PAcMGFEt	296	(3,33 \pm 0,04)	3,33	0,9995	(1,36 \pm 0,01)	0,9993
	303	(3,53 \pm 0,05)	3,53	0,9994	(1,45 \pm 0,06)	0,9997
	310	(3,72 \pm 0,03)	3,72	0,9997	(1,42 \pm 0,07)	0,9995
PAcMGFBz	296	(1,99 \pm 0,03)	1,99	0,9991	(1,58 \pm 0,06)	0,9980
	303	(1,98 \pm 0,02)	1,98	0,9998	(1,17 \pm 0,03)	0,9991
	310	(1,99 \pm 0,01)	1,99	0,9998	(1,34 \pm 0,02)	0,9994

As principais interações entre proteínas e ligantes incluem ligações de hidrogênio, hidrofóbica, Van der Waals e interações eletrostáticas. Para obter evidências sobre os parâmetros termodinâmicos ΔH° , ΔS° e ΔG° controladores da interação ASH: MGF e ASH: Derivados. Para obter evidências sobre esses parâmetros, inicialmente utilizou-se

o tratamento a partir da equação de Van't Hoff (**Equação 7**) e **Figura 39** para MGF e no anexo para os demais compostos (Figuras A.57, 58, 59, 60, 61), enquanto que (ΔG°) foi obtido a partir da equação de energia livre de Gibbs (**Equação 8**):

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (7) \qquad \Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (8)$$

Onde: ΔH° , ΔS° e ΔG° são as variações de entalpia, entropia e energia livre de Gibbs, respectivamente; R é a constante dos gases perfeitos ($R = 8.314 \times 10^{-3}$ kJ/molK), T é a temperatura (296K, 303K e 310K) e K_a constante de ligação Stern-Volmer.

Os parâmetros termodinâmicos obtidos a partir da equação 7 e 8. De acordo com a teoria de Ross e Subramanian (1981), valores negativos de ΔH° indicam ligações de hidrogênio e/ou forças eletrostáticas como a principal força envolvida na interação ASH: MGF e ASH: Derivados (ZHANG. Q, JIANG. L & LIU. Y, 2010). Por outro lado, para interação composto bioativo-proteína valores positivos de ΔS° frequentemente levam a evidência de que a interação é do tipo hidrofóbica (ROSS & SUBRAMANIAN, 1981; YUE *et al.*, 2008 & LI *et al.*, 2009), devido à diminuição do nível de organização das moléculas de água que estão arranjadas ao redor do ligante. Tais interações são melhores exploradas nas análises de ancoramento molecular.

A estrutura da MGF assim como a de seus derivados não apresentam grupos capazes de sofrerem protonação ou desprotonação para gerar cargas a pH = 7,4, de modo que a força eletrostática não é a principal força envolvida nas interações. Por outro lado, a ligação de hidrogênio pode ocorrer. Os parâmetros termodinâmicos avaliados são consistentes com a espontaneidade das interações, os valores negativos de ΔG° revelaram que o processo de interação é espontâneo para estas moléculas na faixa de temperatura avaliada, sendo entalpicamente e entropicamente dirigida (YANG. Z; TANG. R; ZHANG. Z, 2012). Os parâmetros negativos de entalpia e positivos de entropia sugerem que a associação ASH:Xantonas possivelmente estejam sendo governadas pela desolvatação e/ou fatores hidrofóbicos (TIMASEFF, 1972). Os valores de entalpia e ΔG° para o derivado AcMGF mostraram-se altamente favoráveis comparados aos demais, este derivado liga-se espontaneamente, isto ocorre devido ao fato de os grupos acetatos poderem contribuir para a interação do ligante com outros resíduos de aminoácidos no interior da cavidade/sítio de ligação.

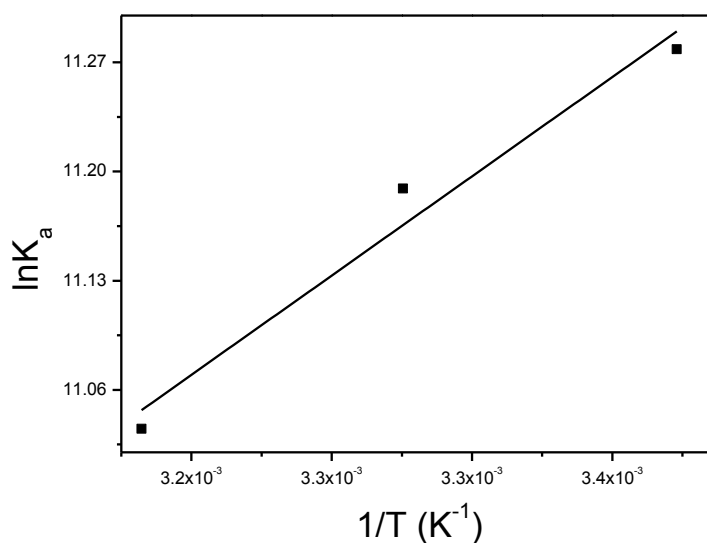


Figura 39. Gráfico de Van't Hoff para associação ASH: MGF a três temperaturas diferentes.

Tabela 18. Parâmetros termodinâmicos (ΔH° , ΔS° , ΔG°) para ASH:MGF e Derivados em três temperaturas.

Compostos	T (K)	ΔH° (kJ/mol)	ΔS° (kJ/molK)	ΔG° (kJ/mol)	r^2	Compostos	T (K)	ΔH° (kJ/mol)	ΔS° (kJ/molK)	ΔG° (kJ/mol)	r^2
MGF	296			-28,0	0,9460	PAcMGFMe	296			-28,4	0,9991
	303	-13,2	0,0492	-27,8			303	-3,20	0,0851	-28,6	
	310			-27,9			310			-29,9	
AcMGF	296			-133,2	0,9860	PAcMGFEt	296			-28,8	0,9970
	303	-79,5	0,1738	-133,1			303	-2,39	0,0907	-29,5	
	310			-133,3			310			-29,7	
PAcMGF	296			-36,5	0,9990	PAcMGFBz	296			-29,1	0,9994
	303	-32,0	0,0154	-36,6			303	-24,3	0,0173	-29,5	
	310			-36,7			310			-29,6	

Para melhor análise das interações entre proteína e ligantes foi realizado estudo teórico de ancoramento molecular (do inglês *docking molecular*), descrito posteriormente. Para validar os resultados de *docking* molecular realizados neste trabalho assim como o sítio específico de interação dos ligantes com a proteína ASH, foram utilizados os marcadores ibuprofeno e varfarina. No processo de análise estes marcadores são adicionados à solução de ASH seguido dos ligantes, este ensaio tem como objetivo avaliar possíveis alterações nos valores das constantes de associação

(K_a), a qual deve apresentar o valor de 10^5 M^{-1} . Se após as adições houver alteração no valor da constante, percebe-se que a competição está ocorrendo, ou seja, cada um desses marcadores se liga a um sítio específico da proteína.

Para a ASH pode utilizar dois marcadores de sítio: varfarina e ibuprofeno. O marcador varfarina se liga ao sítio I o qual está localizada no subdomínio IIA e já o marcador ibuprofeno interage no sítio III da proteína que se encontra no subdomínio IB

Figura 40 (CHAVES, 2017).

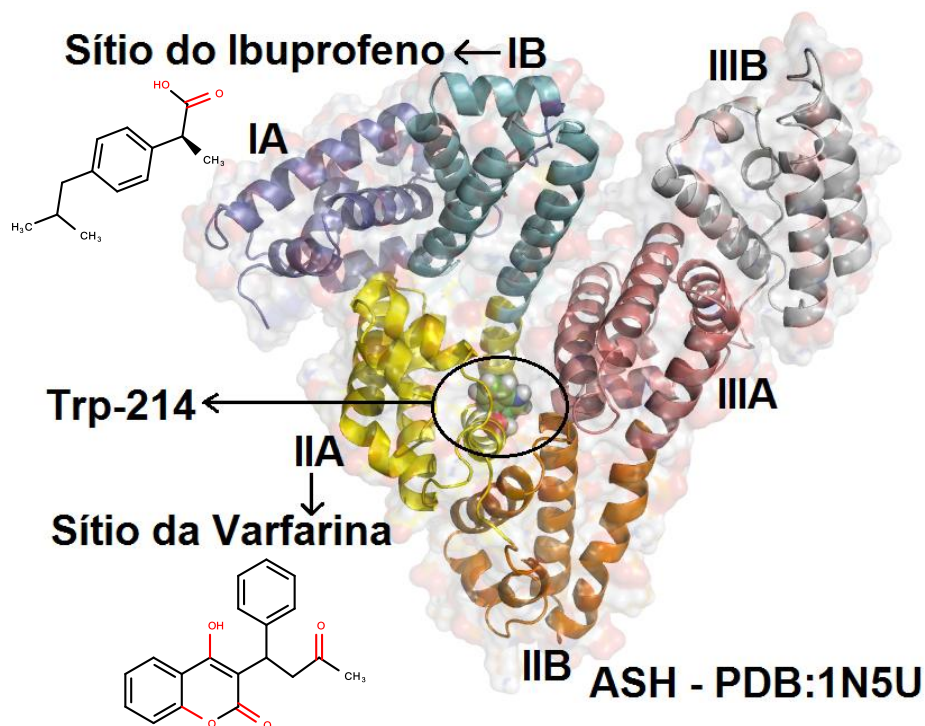


Figura 40. Estrutura cristalográfica da ASH (código pdb: 1N5U) com distinção dos subdomínios. O resíduo Trp-214 está localizado no subdomínio IIA (amarelo). Adaptado de CHAVES, 2017.

De acordo com os resultados apresentados na **tabela 19** (MGF - **Figura 41** - e derivados em anexo - Figuras A.62, 63, 64, 65, 66) as análises de ensaio de competição indicam que o marcador varfarina causou maior alteração na constante de ligação de Stern-Volmer modificada (K_a), sugerindo uma competição entre tal marcador e os ligantes estudados. Portanto, o sítio I no subdomínio IIA da proteína é o principal local de ligação da MGF e derivados na albumina. Posteriormente, serão apresentados resultados de ancoramento molecular para o sítio I.

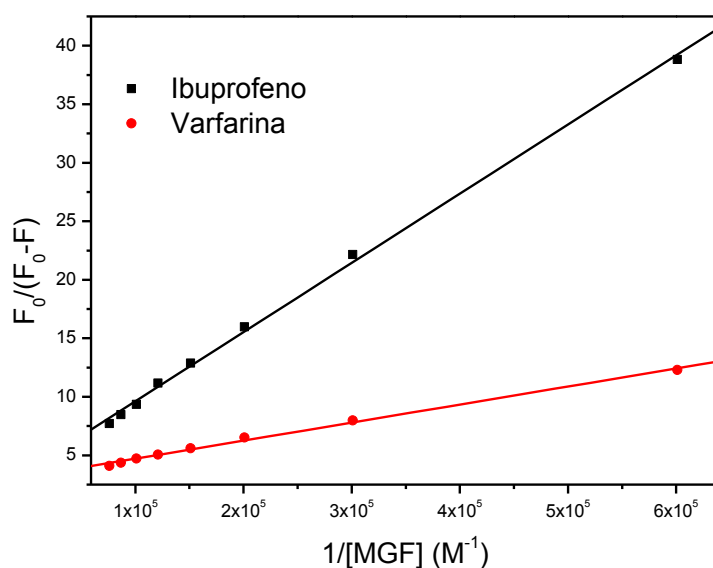


Figura 41. Gráfico de competição para MGF proteína ASH e marcadores ibuprofeno e varfarina a temperatura 310K

Tabela 19. Constante de associação (K_a), para ASH: Marcadores: MGF e Derivados, à 310K.

Compostos	T (K)	K_a	r^2	Compostos	T (K)	K_a	r^2
MGF	310	$(5.90 \times 10^5)^a$	0.9991	PAcMGFMe	310	$(2.56 \times 10^5)^a$	0.9989
		$(7.70 \times 10^6)^b$	0.9760			$(8.96 \times 10^6)^b$	0.9985
AcMGF	310	$(2.10 \times 10^5)^a$	0.9987	PAcMGFEt	310	$(1.10 \times 10^5)^a$	0.9990
		$(8.07 \times 10^6)^b$	0.9990			$(6.30 \times 10^6)^b$	0.9984
PAcMGF	310	$(4.44 \times 10^5)^a$	0.9990	PAcMGFBz	310	$(2.60 \times 10^5)^a$	0.9994
		$(6.37 \times 10^6)^b$	0.9987			$(7.57 \times 10^6)^b$	0.9985

a=Ibuprofeno

b = Varfarina

Na (**Figura 42**) estão representadas as estruturas químicas desses marcadores, Analisando a estrutura química desses marcadores com o composto natural mangifeirna e seus derivados percebe-se relativa semelhança estrutural.

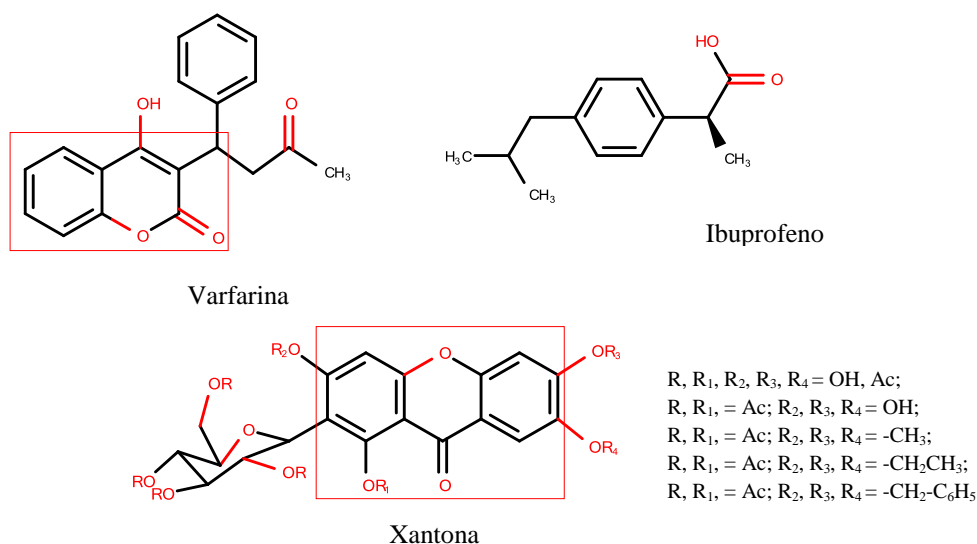


Figura 42. Semelhança estrutural entre as estruturas químicas dos marcadores para estudo de competição com a xantona.

Uma das explicações para o resultado de competição observado entre a varfarina e os ligantes no sítio I está nesta similaridade estrutural existente entre este marcador e as xantonas, a varfarina por sua vez, apresenta em sua estrutura dois anéis fundidos além de mais um anel aromático tornando esta estrutura bastante semelhante ao esqueleto base das xantonas. Como pode ser visto na tabela 12, a varfarina foi o marcador que provocou alteração no valor de K_a , competindo pelo sítio I da proteína no subdomínio IIA, dessa forma é possível inferir que as interações realizadas por este marcador ocorrem de modo similar às interações realizadas pelas xantonas.

6.3.3-Absorção de Luz Circularmente Polarizada (Dicroísmo circular - DC) – Cálculo da Porcentagem de Estrutura de α -Hélice

Para verificar melhor a mudança estrutural da ASH após a adição de MGF e seus derivados, o dicroísmo circular foi a técnica utilizada devido à sua previsão sensível para monitorar possíveis alterações conformacionais em proteínas após interação com ligantes (VARLAN *et al.*, 2010 & YUE, 2008). O dicroísmo circular é útil para o estudo de moléculas opticamente ativas (moléculas quirais), macromoléculas, e também para moléculas de origem biológica, como proteínas, carboidratos, dendrímeros, é uma forma de espectroscopia que faz uso da absorção diferenciada da luz polarizada no sentido horário (direita) ou no sentido anti-horário (esquerda). É uma técnica

amplamente usada para a determinação da estrutura secundária de macromoléculas (KELLY, 2005 & CHENG, 2009).

As medidas de dicroísmo circular permitem analisar as estruturas secundárias e terciárias de proteínas. Valores negativos máximos de elepticidade (θ) em 208 nm e 222 nm são indicativos da presença de estrutura predominantemente em α -hélice, e valores de elepticidade negativos entre 215 nm e 225 nm sugerem a presença de estrutura em folha- β (JOHNSON 1998, VENY AMINOV & YANG 1996, CORDEIRO 2005).

Estimativas acerca do percentual de α -hélice para a estrutura secundária de ASH na ausência e na presença de supressor podem ser estimadas usando as **(Equações 9, 10a e 10b)** (STAN *et al.*, 2009).

$$MRE = \frac{\theta}{(10.n.l.C_p)} \quad (9)$$

Onde:

MRE = elepticidade molar residual (deg.cm²/dmol);

θ = elepticidade observada (mdeg);

n = número de amino ácidos residuais (585 para ASH) (STAN *et al.*, 2009);

l = comprimento ótico da cubeta (1cm);

C_p = concentração molar de ASH (1,00 x 10⁻⁶ mol/L).

$$\alpha - helice \% = \left[\frac{(-MRE_{208} - 4000)}{(33000 - 4000)} \right] \times 100 \quad (10a)$$

$$\alpha - helice \% = \left[\frac{(-MRE_{222} - 2340)}{30300} \right] \times 100 \quad (10b)$$

Onde:

MRE₂₀₈ - elepticidade molar residual em 208 nm (deg.cm²/dmol);

MRE₂₂₂ - elepticidade molar residual em 222 nm (deg.cm²/dmol);

α - hélice % - percentual de α -hélice na estrutura da ASH.

Os espectros de DC foram registrados na presença e na ausência dos compostos, em diferentes concentrações a 310K (**Figura 43**) no anexo para os demais compostos (Figuras A.67, 68, 69, 70, 71). Após adições sucessivas de alíquotas de ligantes, foi observado um leve decaimento na intensidade dos máximos de absorção na região do

ultravioleta a 208nm e a 222nm (HE *et al.* 2005; OBERG & UVERSKY, 2001; QING *et al.*, 2009). Essas bandas contribuem para a transição $\pi - \pi^*$ e $n - \pi^*$, respectivamente na ligação peptídica da estrutura de α -hélice da proteína (SHI *et al.*, 2015). Os resultados indicam que a estrutura secundária da ASH sofreu uma pequena alteração em sua estrutura, sendo este fato mais um indicativo da formação de complexos entre ASH e as xantonas. Foi observado após as adições dos ligantes que a absorção em 208nm, apresentou uma perturbação, a qual não foi verificada para o comprimento de onda 222nm. Este comportamento pode ser devido às moléculas (ligantes) possuírem centros quirais que são óticamente ativos, de modo que estes centros causam influências no momento das análises. Objetivando avaliar se esta perturbação de fato estaria ocorrendo ou não na absorção em 222nm, foram analisados espectros para a mínima, média e máxima concentração de ligantes, como resultado não houve influência significativa. Contudo, os espectros de CD da ASH na presença e na ausência de cada amostra são semelhantes em intensidade e forma, deste modo pode-se concluir que a MGF e seus derivados não afetam significativamente a integridade da estrutura α -hélice da albumina (KHAN *et al.*, 2008).

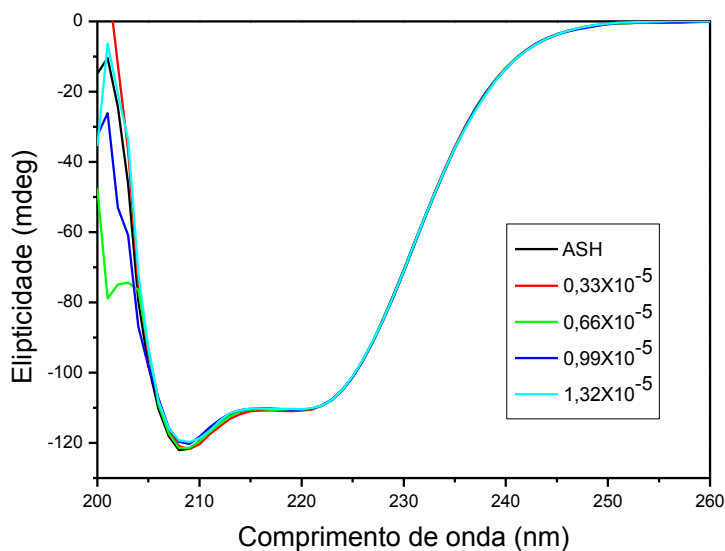


Figura 43. Espectros de dicroísmo circular para ASH pH=7.4 em mangiferina (MGF), nas concentrações $C_{MGF} = 0,33; 0,66; 0,99$ e $1,32 \times 10^{-5}$ mol/L, $C_{HSA} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L a 310K.

Como pode ser visto na **Tabela 20** a porcentagem de α -hélice a 208 nm e a 222nm apresentou alterações pouco significativas ao comparar o valor de ASH livre com o valor para ASH na presença de cada ligante. Foi observado para a perturbação da estrutura da proteína em 208nm reduções nos valores de elipticidade quando comparado à proteína livre, este fato ocorre em virtude do efeito causado pela quiralidade das substâncias, ainda assim, é possível assumir esses dados obtidos como um resultado plausível, dando indícios de que a perturbação causada sobre a estrutura secundária durante a interação Proteína-Moléculas não seja capaz de influenciar de modo significativo à estrutura da proteína. Valores percentuais para a perturbação da estrutura secundária da proteína para a mangiferina e seus derivados, nos respectivos comprimentos de onda, dados calculados para concentração máxima de análise: MGF 1,7% (208nm), 0,1% (222nm); AcMGF -1,1% (208nm), 0,2% (222nm); AcMGFP -1,8% (208nm), 0,5% (222nm); AcMGFPMe -0,5% (208nm), 1,4% (222nm); AcMGFPEt -0,2% (208nm), 2,2% (222nm); AcMGFPBz -0,2% (208nm), 0,6% (222nm).

Tabela 20. Porcentagem de α -hélice para estrutura secundária de ASH após ligação com MGF e AcMGF. $C_{ASH} = 1.00 \times 10^{-6} M$, pH = 7.4 a temperatura T = 310K.

Compostos	Conc. (M)	208 nm	222 nm	Compostos	Conc. (M)	208 nm	222 nm
	ASH livre	58,5	54,3		ASH livre	58,0	54,1
MGF	0.33×10^{-3}	57,9	54,3	AcMGF	0.33×10^{-3}	58,0	54,2
	0.66×10^{-3}	57,9	54,3		0.66×10^{-3}	58,8	54,0
	0.99×10^{-3}	57,1	54,2		0.99×10^{-3}	58,9	53,9
	1.32×10^{-3}	56,8	54,2		1.32×10^{-3}	59,1	53,9
	ASH livre	57,6	53,7		ASH livre	58,4	55,0
PAcMGF	0.33×10^{-5}	58,1	53,6	PAcMGFMe	0.33×10^{-5}	59,0	54,5
	0.66×10^{-5}	59,0	53,5		0.66×10^{-5}	58,9	54,3
	0.99×10^{-5}	59,2	53,4		0.99×10^{-5}	58,4	53,7
	1.32×10^{-5}	59,4	53,2		1.32×10^{-5}	58,9	53,6
	ASH livre	58,0	53,8		ASH livre	58,6	54,9
PAcMGFEt	0.33×10^{-5}	57,5	53,4	PAcMGFBz	0.33×10^{-5}	58,9	54,8
	0.66×10^{-5}	58,1	53,1		0.66×10^{-5}	59,9	54,7
	0.99×10^{-5}	58,4	52,3		0.99×10^{-5}	60,0	54,5
	1.32×10^{-5}	58,2	51,6		1.32×10^{-5}	60,6	54,3

6.4 - Avaliação biológica

6.4.1 - Ensaio de toxicidade do derivado peracetilado (AcMGF) frente à linhagem de monócitos humanos THP-1, com utilização dos reagentes colorimétricos Azul de Trypan e XTT

Para a análise de viabilidade celular utilizou-se o corante azul de Trypan, que não atravessa membranas íntegras. Assim, células vivas não permitem a passagem do corante e, logo, não adquirem nenhuma coloração. Como as células mortas têm suas membranas danificadas, ocorre o fluxo de corante para o interior da célula, fornecendo uma coloração azul. Na (Figura 44), a seguir, está representado o gráfico obtido após a realização do ensaio. Os resultados foram analisados utilizando-se o programa GraphPad Prisma e revelaram o valor de $IC_{50} = 17,81 \mu\text{mol.mL}^{-1}$. Todas as situações foram avaliadas comparando-as com o veículo DMSO, observou-se que há uma relação linear, ou seja, a relação dose resposta para atividade citotóxica frente à linhagem tumoral THP-1 é dependente da concentração. As concentrações de 10 e $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram as que apresentaram melhor atividade, às quais obtiveram valores de significância satisfatórios. Por meio desse ensaio foi possível determinar que o composto testado (AcMGF) apresentou atividade significativa contra a linhagem celular THP-1.

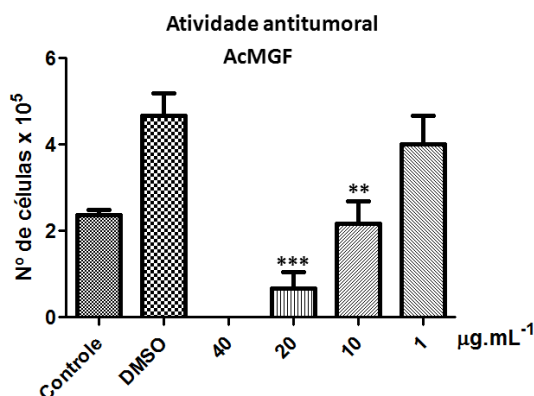


Figura 44. Avaliação da viabilidade celular em monócitos humanos THP-1 tratados com AcMGF (2-C-β-D-tetraacetoxiglicopiranosil-1,3,6,7-tetraacetoxi-9H-xanten-9-ona.) nas concentrações indicadas. Os monócitos foram cultivados em triplicatas na concentração de 3×10^5 células.mL⁻¹. As células foram tratadas por 48h com diferentes concentrações do composto variando de 1 a $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A viabilidade celular foi obtida pelo método de exclusão, utilizando azul de Trypan. Os valores de $P \leq 0,005$ foram considerados estatisticamente significativos. Dados representativos de dois experimentos independentes.

Neste trabalho também foram realizados ensaios com emprego do reagente XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazol-5-carboxanilida) tetrazolium, que é um sólido de coloração amarelo-pálido (PAULL *et al.*, 1988). Os ensaios para o monitoramento da proliferação celular são amplamente realizados com a utilização do reagente colorimétrico XTT, bem como testes de sensibilidade a fármacos, devido aos resultados obtidos serem reprodutíveis (SCUDIERO *et al.*, 1988; ARMAL & AFIFI, 2007). Durante a realização do ensaio colorimétrico, o reagente XTT (que possui o núcleo tetrazolium) sofre uma reação de redução pela ação das enzimas desidrogenases mitocondriais presentes em células metabolicamente viáveis, sofrendo abertura do núcleo heterocíclico tetrazolium, sendo convertido em uma formazana (Figura 45), que é solúvel em água, gerando uma solução de coloração avermelhada (ROEHM *et al.*, 1991).

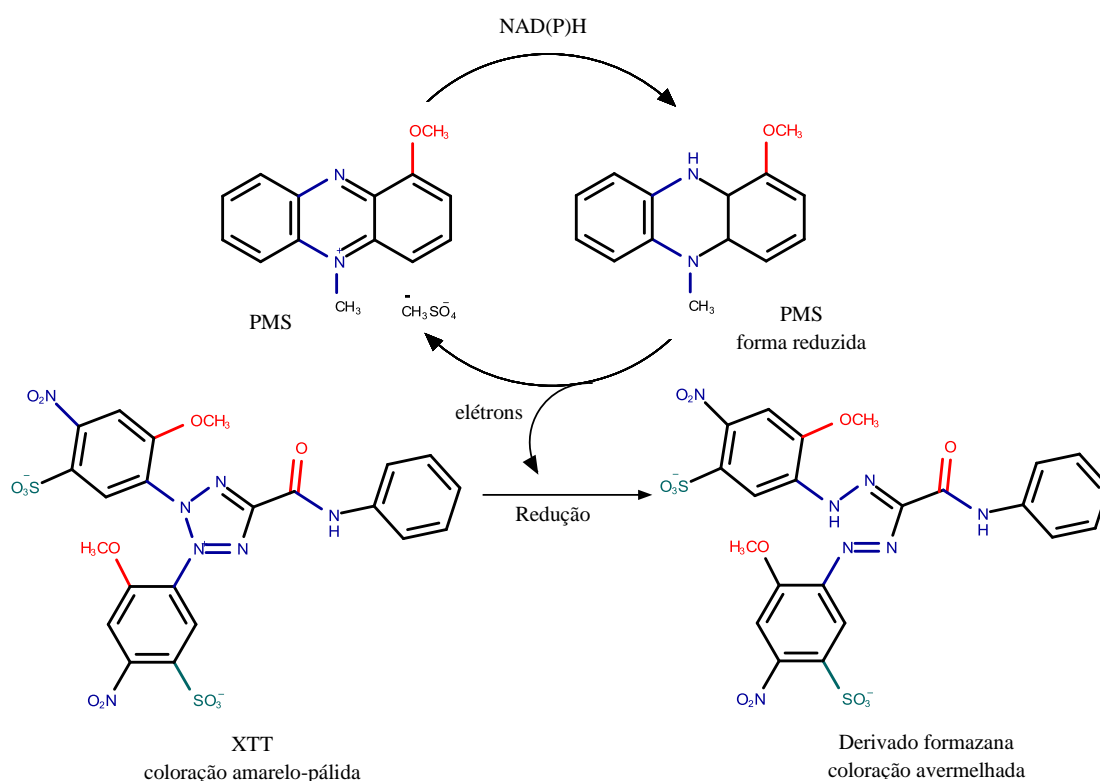


Figura 45. Reação colorimétrica de formação do derivado formazana a partir do sal de XTT catalisada pelo PMS (ROEHM *et al.*, 1991; PAULL *et al.*, 1988).

A viabilidade celular foi mensurada após tratamento com a solução de XTT na concentração de $1,2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e PMS (N-metil dibenzopirazina metil sulfato, na concentração de $0,0765\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). O sal de XTT sofre redução na superfície da membrana interna da mitocôndria, sendo convertido a sua forma reduzida. O PMS atua

como carreador de elétrons, catalisando a reação de oxirredução. O NAD(P)H, carreador de elétrons responsável por realizar a transferência de elétrons na cadeia transportadora de elétrons no ciclo respiratório, doa elétrons para o PMS, que por sua vez assume sua forma reduzida, e em seguida os elétrons adquiridos são cedidos para a reação de redução do XTT à formazana. Então o PMS retorna à sua forma oxidada de origem.

Os ensaios de citotoxicidade frente à linhagem THP-1 para a mangiferina e seus derivados, foram realizados nas concentrações de 1, 10, 20 e 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada derivado, utilizando o reagente colorimétrico XTT. Os resultados obtidos, representados no gráfico a seguir (**Figura 46**), demonstraram que a princípio nenhum dos compostos avaliados obteve atividade considerável frente à linhagem THP-1, a leitura da placa foi realizada em intervalos de 2, 3 e 4 horas. Após cada leitura foram verificados aumentos gradativos nos valores de absorção, dando indícios de que estaria ocorrendo aumentos no número de células. No entanto, o intervalo entre cada leitura ocorreu em um tempo bastante curto para permitir que as células pudessem proliferar tão rapidamente. Caso fosse possível haver este aumento na população celular, isto deveria ter sido observado no poço contendo as células vivas (controle Vivo), o que não foi verificado, uma vez que os valores de absóvância se mativeram constantes a cada leitura nessa situação. Esses aumentos elevados foram observados apenas para as situações que foram administradas com os compostos, a hipótese mais provável seria que estas moléculas poderiam estar interagindo com o reagente colorimétrico de modo a influenciar no momento da realização das leituras. Isto pode ser percebido claramente no gráfico, uma interferência expressiva para o composto natural MGF, sendo esta uma substância polihidroxilada com características antioxidantes considerável, o mesmo efeito foi verificado para seu derivado PAcMGF no qual apenas as hidroxilas fenólicas foram mantidas. Imaginamos que, possivelmente, esses compostos estariam envolvidos no processo de oxirredução do reagente XTT. Os demais compostos apresentaram em menor grau o mesmo efeito, fato que poderia ser explicado devido à ausência das hidroxilas fenólicas, o que teria impacto em suas atividades antioxidantes.

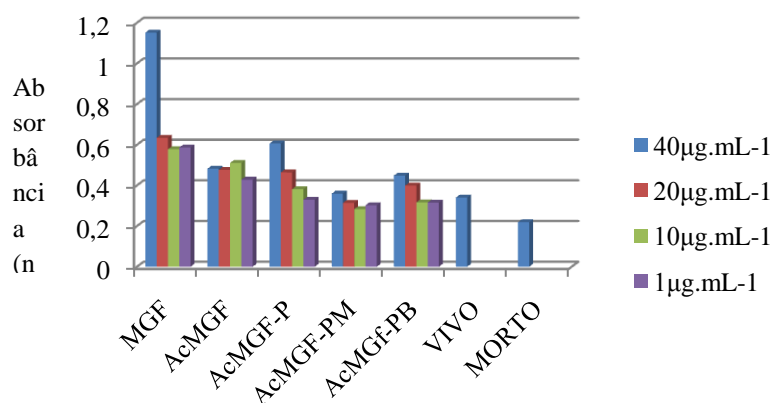


Figura 46. Avaliação da viabilidade celular em monócitos humanos THP-1 tratados com MGF, AcMGF, PAcMGF, PAcMGFMe e PAcMGFBz nas concentrações indicadas. Os monócitos foram cultivados em triplicatas na concentração de 3×10^5 células.mL⁻¹. As células foram tratadas por 48h, nas respectivas concentrações 1, 10, 20 e 40 µg. mL⁻¹. A viabilidade celular foi obtida pelo método colorimétrico, utilizando reagente XTT. Dados representativos de dois experimentos independentes.

Após obtenção destes resultados (**Figura 47**), um levantamento bibliográfico detalhado foi realizado, visando embasar o entendimento sobre a interferência dos derivados fenólicos no processo de oxirredução envolvido no ensaio colorimétrico utilizado. A literatura relata, em diferentes trabalhos, a utilização do ensaio colorimétrico com MTT (brometo de 3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium, **Figura 47**), onde também ocorre a formação de um derivado do tipo formazana, após abertura de um tetrazolium. Mais recentemente, Liu e Nair (2010), descreveram a padronização do método com MTT para quantificação da atividade antioxidante de diferentes compostos, além de extratos vegetais (LIU *et al.*, 2010), tendo o método sido utilizado em trabalhos posteriores do grupo (ZHANG *et al.*, 2013).

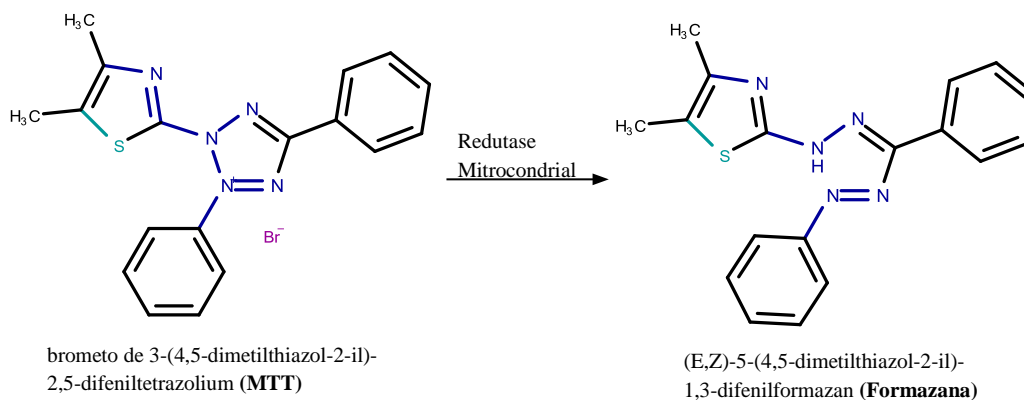


Figura 47. Reação de redução do MTT à respectiva formazana.

Tendo como base os resultados obtidos no ensaio com XTT, além das informações obtidas na literatura, foi realizado um ensaio colorimétrico na ausência de células, mantendo o PMS, necessário à etapa de redução e abertura do núcleo tetrazólico. Após análise dos resultados mostrados na **Figura 48**, observa-se claramente a participação dos derivados fenólicos da mangiferina no processo de oxirredução. Este efeito é mais pronunciado no produto natural (MGF), no qual o núcleo xantônico tem todas as hidroxilas fenólicas livres, e no derivado parcialmente acetilado (AcMGF-P), que possui três das quatro hidroxilas fenólicas livres.

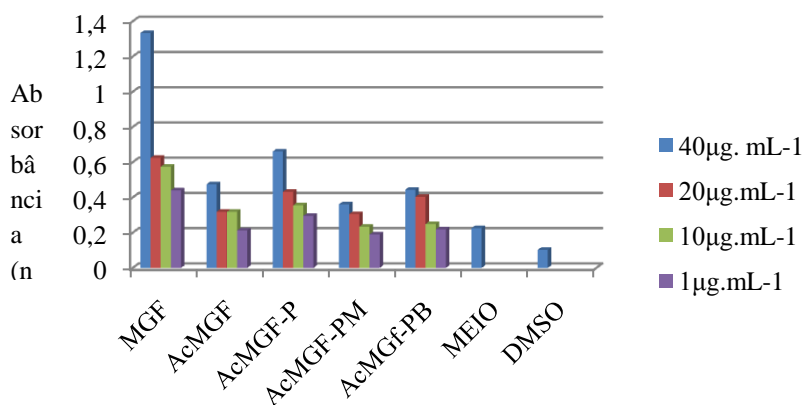


Figura 48. Ensaio colorimétrico, realizado na ausência de células, onde o meio de cultura foi tratado com mangiferina e seus derivados, nas concentrações de 1-40 µg.mL⁻¹. A leitura foi realizada após 4h de incubação com o reagente colorimétrico (XTT) e adição de PMS. Dados representativos de dois experimentos independentes.

7- CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos para extração da mangiferina aplicando a metodologia de extração via Ultrassom e Micro-ondas, mostrou-se altamente satisfatória em relação ao processo convencional (Soxhlet). Embora os rendimentos para extração em Soxhlet sejam relativamente superiores, as vantagens adquiridas com o uso das técnicas de ultrassom e micro-ondas justificam a sua escolha, a qual possibilitou redução considerável no tempo, gasto energético, além da utilização de menores quantidades de solventes, fornecendo um produto com alto grau de pureza determinado por CLAE-DAD.

As reações de modificações estruturais realizadas sobre a mangiferina mostraram-se adequadas, fornecendo produtos com bons rendimentos entre 72 e 96% os quais foram devidamente caracterizados pelos métodos convencionais de análise.

Os resultados dos estudos por supressão de fluorescência no estado estacionário da interação entre albumina sérica humana (ASH) com MGF, AcMGF, AcMGFP, AcMGFPMe, AcMGFPet, AcMGFBz, mostraram que ocorreu a supressão da banda de emissão de fluorescência da ASH que apresenta máximo de emissão a 340nm ($\lambda_{ex}=280nm$), indicando o envolvimento do triptofano na interação entre as xantonas e ASH.

Os valores das constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) ($K_{sv} = 10^4$ L/mol) indicam que o provável processo de supressão de ASH pela interação com as xantonas ocorre através do mecanismo estático e/ou dinâmico, com pouca contribuição do processo de supressão dinâmica, com formação de pré-associação ASH:Xantonas antecedendo o processo de transferência de energia. Por outro lado, para o composto natural (MGF) a supressão ocorre via mecanismos distintos, a baixas concentrações do ligante a supressão inicia-se com o mecanismo estático após adição de alíquotas da substância o mecanismo dinâmico ocorre a altas concentrações. Os altos valores encontrados para as constantes de velocidade de supressão de fluorescência (k_q) para a interação entre ASH e xantonas ($k_q= 10^{12}$ L/mol.s), quando comparados com a constante de difusão em água ($k_q= 5 \times 10^9$ L/mol.s) indicam em alguns casos o caráter estático com a formação de complexos no estado fundamental entre ASH com as moléculas supressoras.

Os valores de K_a obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer modificados das xantonas apresentaram valores ($K_a = 10^4$ L/mol), indicando que os ligantes ligam-se de

modo reversível e exibem afinidades moderadas pela proteína, como essas moléculas apresentam interações moderadas e reversíveis, esses compostos podem ser armazenados e transportados pela ASH. Os valores de ΔH° negativos para as xantonas indicam que as interações nesse caso devem possuir um caráter hidrofílico, sugerindo ligações do tipo ligação de hidrogênio. Por outro lado, considerando o valor positivo encontrado para o termo entrópico (ΔS°) é possível atribuir, como demonstrado no parâmetro entálpico, que não se pode descartar a possibilidade de contribuições de caráter hidrofóbico da interação ASH:ligantes para esta classe de compostos. Os valores termodinâmicos de energia livre de Gibbs, calculados para todas as moléculas, estão em total acordo com a espontaneidade da associação.

Os estudos de dicroísmo circular, mostraram que ocorreu pequenas alterações da % de α -hélice da estrutura secundária da proteína, como consequência do aumento da concentração das xantonas. Estas variações ficaram evidentes nos espectros de dicroísmo circular, nas intensidade das bandas negativas 208 e 222nm, indicando uma possível formação de complexos.

Os resultados de *docking* molecular permitiram avaliar as interações no interior do sítio da ASH, o estudo forneceu valores de pontuação para cada ligante e quanto maior for estes valores, isto, reflete em interações mais significativas. Através da docagem molecular foi possível determinar os principais resíduos de aminoácidos envolvidos nas interações, e dessa forma avaliar como esses compostos se ligam dentro do sítio da proteína e como interagem com os resíduos de aminoácidos da ASH.

Os ensaios para avaliação da atividade biológica em monócitos humanos (linhagem THP-1) realizados com reagente colorimétrico azul de tripan para o derivado AcMGF demonstrou que este composto apresenta atividade citotóxica contra as células tratadas, com valor de $IC_{50} = 17,81 \mu\text{mol.mL}^{-1}$. Contudo, ao realizar os ensaios com o reagente colorimétrico XTT para a mangiferina e seus derivados os resultados para as absorções demonstraram aumentos do número de células após tratamento com os compostos, possivelmente as substâncias estariam interagindo provocando a redução do reagente XTT. Nesse contexto, consideramos como perspectivas para este estudo a realização de novos testes biológicos com possíveis modificações que se fizerem necessárias para avaliar a atividade destas moléculas frente a esta linhagem tumoral, entre outras, além dos ensaios de toxicidade dessas substâncias.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADERIBIGBE, A. O.; EMUDIANUGHE, T. S.; LAWAL, B.A.S. Antihyperglycaemic Effect of *Mangifera indica* in Rat. *Phytotherapy Research*, 13, p. 504-507, **1999**.

AHMAD, A.; PADHYE, S AND SARKAR, F. H. Role of Novel Nutraceuticals Garcinol, Plumbagin and Mangiferin in the Prevention and Therapy of Human Malignancies: Mechanisms of Anticancer Activity. *Nutraceuticals and Cancer*, p. 179-199, **2012**.

ALMEIDA, M. E.; RODRIGUES, A. C. Mangas das variedades espada, rosa e tommy atkins: compostos bioativos e potencial antioxidante. *Ciências Agrárias*, 32(4), p. 1451-1460, **2011**.

ANDREU, G. P.; DELGADO, R.; VELHO, J.A.; CURTI, C.;VERCESI, A. E.; Iron complexing activity of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone, inhibits mitochondrial lipid peroxidation induced by Fe²⁺-citrate. . *European Journal of Pharmacology*, 513, p. 47-55, **2005**.

AOAC, 2005. Official Methods of Analysis. Disponível em: <<http://www.aoac.org/dietsupp6/Dietary-Supplement-web-site/Jul2006.htm>>. Acesso em 10/06/2016.

APONTES, P.; LUI, Z.; SU, K.; BENARD, O.; YOUN, D. Y.; LI, X.; LI, W.; MIRZA, R, H.; BASTIE, C. C.; JELICKS, L. A.; PESSIN, J. E.; MUZUMDAR, R. H.; SAUVE, A. A.; CHI, Y. Mangiferin stimulates carbohydrate oxidation and protects against metabolic disorders induced by high-fat diets. *Diabetes*, 63 (11), p. 3626-3636, **2014**.

ARITOMI, M.; KAWASAKI, T. A new xanthone c-glucoside, position isomer of mangiferin, from *Anemarrhena asphodeloides* Bunge. *Tetrahedron Letters*, 12, p. 941-944, **1970**.

ARAÚJO, B. M. Bioatividades do extrato da folha da mangueira (*Mangifera indica*, variedade ubá) e da mangiferina em camundongos apoe. *Tese de doutorado*, Viçosa, MG, **2012**.

ARMAL, G. AL-BAKRI.; FATMA, U. AFIFI. Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *Journal of Microbiological Methods*, 68, p. 19-25, **2007**.

ATKINS, P.; PAULA, J De. Físico-Química, 7 ed, LTC, 2, **2004**.

BALUNAS, M. J. et al. Xanthonas from the botanical dietary supplement mangosteen (*Garcinia mangostana*) with aromatase inhibitory activity. *Journal of Natural Products*, 71(7), p. 1161-1166, **2008**.

BARRETO, J. C.; TREVISAN, M. S. T.; HULL, W. E.; ERBEN, G' DE BRITO, E. S.; PFUNDSTEIN, B; WURTELE, G.; SPIEGELHALDER, B.; OWEN, R. W.; Characterization and Quantitaion of polyphenolic Compounds in Bark, Kernel. Leaves, and Peel of Mango (*Mangiferina Indica L.*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, p. 5599-610, **2008**.

BOLLI, A.; MARINO, M.; RIMBACH, G.;FANALI, G.; FASANO, M.; ASCENZI, P. Flavonoid binding to human serum albumin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 398, p. 444-449, **2010**.

BBOSA, G.S.; LUBEGA, A.; MUSISI, N.; KYEGOMBE, D. B.; WAAKO, P.; OGWAL-OKENG, J.;ODYEK, O. The activity of *Mangifera indica L.* leaf extracts against the tetanus causing bacterium, *Clostridium tetani*. *Africa Journal of Ecology*, 45 (3), p. 54-58, **2007**.

BHATIA, V. K.; SESHADRI, T. R. *Tetrahedron Letters*, 1741, **1968**.

BHATTACHARYA. *Canscora decussate* (Gentianaceae) xanthonas. Pharmacological studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 61(11), p. 1838-1838, **1972**.

BHOWMIK, A.; KHAN, L.A.; AKHTER, M.; ROKEYA, B. Studies on the antidiabetic effects of *Mangifera indica* stem-barks and leaves on nondiabetic type 1 and type 2 diabetic models rats. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 4, p. 110-114, **2009**.

BRUNE, D.; KIM, S. *Biophysics*, 90, p. 3835, 1993.

CAMARGO-FILHO, W.P; ALVES, H. S.; MAZZELI, A.R. Mercado de manga no Brasil: contendo mundial, variedade e estacionalidade, *Informações Econômicas, SP*, 34 (5), **2004**.

CORDEIRO, Y. M. L. Bases estruturais e termodinâmicas para a conversão conformacional da proteína do príon e possíveis implicações sobre a patogênica. Tese de Doutorado, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Fevereiro, **2005**.

CORSINI, E.; AVOGADRO, A.; GALBIATI, V.; DELL'AGLI, M.; MARINOVICH, M.; GALLI, C.L.; GERMOLEC, D.R. In vitro evaluation of the immunotoxic potential of perfluorinated compounds (PFCs). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 250(2), p. 108–116, **2011**.

CUI, F.; QIN, L. X.; GUI-SHENG ZHANG, G, S.; YAO, X. J.; DU, J.; *Int. J. Biol. Macromol.* 42, p. 221, **2008**.

CUCCIOLONI, M.; BONFILI, L.; MOSSICAFREDDO, M.; CECARINI, V.; SCURI, S.; COCCHIONI, M.; NABISSI, M.; SANTONI, G.; ELEUTERI, M, A.; ANGELETTI, M. Mangiferin blocks proliferation and induces apoptosis of breast cancer cells via suppression of the mevalonate pathway and by proteasome inhibition. *Royal society of chemistry*. 7, p. 4299-4309, **2016**.

CURRY, S. X-ray crystallography of albumin, in Human Serum Albumin - New Insights on its Structural Dynamics. *Functional Impacts and Pharmaceutical Applications*, ed. M. Otagiri, p. 1-29. Sojo Univ. Pub., Kumamoto, **2011**.

CHAN, C. H.; YUSOFF, R.; NGOH, G. and KUNG, F. W. L. Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *J. Chromatogr. A*. 1218, p. 6213–6225, **2011**.

CHAVES, O.A. SCHAEFFER, E. SANT'ANNA, C.M.R. NETTO-FERREIRA, J.C. CESARIN-SOBRINHO, D. FERREIRA, A.B.B. *Mediterr. J. Chem.* 5, p. 331-339, **2016**.

CHAVES, O. A. CATARINA, S. H. PEDRO, F. C. SANT'ANNA, C.M.R. RUI, M. M. BRITO. C. S. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 169, p. 175-181, **2016**.

CHAVES, O.A. CESARIN-SOBRINHO, D. SANT'ANNA, C.M.R., CARVALHO, M.G. SUZART, L.R. CATUNDA-JUNIOR, F.E.A NETTO-FERREIRA, J.C. FERREIRA, A.B.B. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 336, p. 32-41, **2017**.

CHENG, X. X.; LUI, Y.; ZHOU, B.; XIAO, X-H.; LIU, Y.; *Spectrochim. Acta Part A*, 72, p. 922, **2009**.

CHEN, H. E.; TAI, C. Y.; CHEN, B. H. Improved liquid chromatographic method for determination of carotenoids in Taiwanese mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of Chromatography A*, 1054(1/2), p. 261-268, **2004**.

CHEN, Y. H.; CHANG, F. R.; LIN, Y. J.; HSIEH, P. W.; WU, M. J.; WU, Y. C. Identification of antioxidants from rhizome of *Davallia solida*. *Food Chemistry*, 107, p. 684-691, **2008**.

CHENG, X. X.; LUI, Y.; ZHOU, B.; XIAO, X-H.; LUI, Y. *Spectrochim. Acta Part A*, 72, p. 922, **2009**.

CHI, Y.; BENARD, O. Medicinal Properties of Mangiferin, Structural Features, Derivative Synthesis, Pharmacokinetics and Biological Activities. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 15, p. 582-594, **2015**.

CHOPIN, J.; DURIX, A and BOUILLANT, L, M. *Tetrahedron Letters* 3657, **1966**.

CRAVOTTO, G.; BOFFA, L.; MANTEGNA, S.; PEREGO, P.; AVOGRADO, M.; CINTAS, P. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves, *Ultrasonics Sonochemistry*, 15, p. 898-902, **2008**.

DA CRUZ, J. W. Crystalline structure of mangiferin, a C-glycosyl-substituted 9H-xanthen-9-one isolated from the stem bark of *Mangifera indica*. *Helvetica Chimica Acta*, 91(1), p. 144-154, **2008**.

DA RE, P. Central nervous system stimulants of xanthone group. *Journal of Medicinal Chemistry*, 13(3), p. 527-527, **1970**.

DEAN, J. R. *Extraction Techniques in Analytical Sciences*. Wiley, New York, p. 167–183, **2010**.

DELGADO, R.; ANDREU, GP.; VELHO, JA.; CURTI, C.; VERCESI, AE. Iron complexing activity of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone, inhibits mitochondrial lipid peroxidation induced by Fe²⁺-citrate. *Eur. J. Pharmacol.* 513, p. 47-55, **2005**.

EMBRAPA– Cultivo da mangueira.
<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mangua/CultivodaMangueira2ed/socioeconomia.htm>. Acessado em julho de 2015.

ELCHEBLY, M.; PAYETTE, P.; MICHALISZYN, E.; CROMLISH, W.; COLLINS, S.; LOY, A.L.; NORMANDIN, D.; CHENG, A.; HIMMS-HAGEN, J.; CHAN, C.C.; RAMACHADRAN, C.; GRESSER, M.J.; TREMBLAY, M.L.; KENNEDY, B.P. *Science* 283, p. 1544, **1999**.

EL-SEEDI, H.R. EL-BARBARY, M.A. EL-GHORAB, D.M.H. BOHLIN, L. BORG-KARLS on AK, GORANSSON, U. Recent insights into the biosynthesis and biological activities of natural xanthenes. *Curr. Med. Chem.*, 17, p. 854-901, **2010**.

EWING, G. W. *Métodos Instrumentais de Análise Química*. São Paulo: Edgard Blücher:EDUSP, 2, **1972**.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Pesquisa. Área plantada, área colhida, quantidade produzida e valor da produção da lavoura permanente em manga 2012.
<http://WWW.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1613&z=p&o=21&i=P>.
Acessado em julho de 2015.

FAIZI, S.; ZIKR-UR-REHMAN, S.; ALI, M.; NAZ, A. Temperature and solvent dependent NMR studies on mangiferin and complete NMR spectral assignments of its acyl and methyl derivatives, *Magn. Reson. Chem.*, 44, p. 838–844, **2006**.

FERNANDES, E.G. Síntese e elucidação estrutural das xantonas, xantonolignóides e determinação da actividade biológica[dissertação]Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, **1996**.

FOLIN, O.; DENIS, W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *The Journal of Biological Chemistry*, (2), p. 239-243, **1912**.

FOLIN, O.; CIOCALTEAU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Biochemical Laboratory of Harvard Medical School*, Boston, **1927**.

FUJITA, M.; INOUE, T. Biosynthesis of mangiferin in *Anemarrhena asphodeloides*. *Tetrahedron Letters*, 51, p. 4503-4506, **1977**.

FUJITA, M.; INOUE, T. Biosynthesis of mangiferin in *Anemarrhena asphodeloides* Bunge II. *Chem. Pharm. Bull*, 28(8), p. 2482-2486, **1980**.

GARRIDO, G.; GONZÁLEZ, D.; LEMUS, Y.; GARCIA, D.; LODEIRO, L.; QUINTERO, G.; DELPORTE, C.; NÚÑEZ-SÉLLES, A.J.; DELGADO, R. In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANGO). *Pharmacological Research*, 50, p. 143–149, **2004**.

GOMES, A.F. Determinação de parâmetros físico-químicos em xantonas [dissertação]. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, **2005**.

GUO, C.; YANG, J.; WEI, J.; LI, Y.; XU, J.; JIANG, Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research*, 23(12), p. 1719-1726, **2003**.

GHELDOLF, N. *et al.* Identification and Quantification of Antioxidant Components of Honeys from Various Floral Sources. *J. Agric. Food Chem.*, 50, p. 5870-5877, **2002**.

GHUMAN, J.; ZUNSZAIN, P. A.; PETITPAS, I.; BHATTACHARYA, A. A.; OTAGIRI, M.; CURRY, S. Structural Basis of the Drug-binding Specificity of Human Serum Albumin. *Journal of Molecular Biology*, 353, p. 38-52, **2005**.

HE, W.Y. LI, Y. XUE, C.X. HU, Z.D. CHEM, X.G. SHENG, F.L. *Bioorg. Med. Chem*, 13, p. 1837-1845, **2005**.

HERAVI, M. M.; BEHBAHANI, F. K. ZADSIRJAN, V.; OSKOOIE H. A. Copper (II) Sulfate Pentahydrate (CuSO₄.5H₂O). A Green Catalyst for Solventless Acetylation of Alcohols and Phenols with Acetic Anhydride, *J. Braz. Chem. Soc.*, 17, p. 1045-1047, **2006**.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. *Princípios Ativos de Plantas Superiores*. São Carlos: EdUFSCAR, **2003**.

HU, H. G.; WANG, M. J.; ZHAO, Q. J.; YU, S. C.; LIU, C. M.; WU, Q. Y. Synthesis of mangiferin derivatives and study their potent PTP1B inhibitory activity. *Chinese Chemical Letters*. 15, p. 1323-1326, **2007**.

IKAN, R. In: *Natural Products: A Laboratory Guide*, Academic Press, 2nd Edition: 233-238, **1991**.

JAIN, T.; JAIN, V.; PANDEY, R.; VYAS, A. and SHUKLA, S. S. Microwave assisted extraction for phytoconstituents - *An overview*. *Asian J. Res. Chem.* 2, p. 19-25, **2009**.

JIANG, D. J. Demethylbellidifolin preserves endothelial function by reduction of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor level. *Journal of Ethnopharmacology*, 93(2-3), p. 295-306, **2004**.

JUTIVIBOONSUK, A; SARDAENGGUN, C. Mangiferin in leaves of Three Thai Mango (*Mangifera indica* L.) varieties. *India Journal Pharmaceutical Sciences*, 6(3), p. 122-129, **2010**.

JOHNSON, W. C. *Jr. Ann. Rev. Biophys. Chem.*, 17, p. 145, **1988**.

JURASEKOVA, Z.; MARCONI, G.; SANCHEZ-CORTES, S.; TORREGGIANI, A. Spectroscopic and Molecular Modeling Studies on the Binding of the Flavonoid Luteolin and Human Serum Albumin. *Biopolymers*, 91(11), p. 917-927, **2009**.

KADAM. *International research journal of pharmacy*, 4(5), p. 189, **2013**.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables - the millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology*, 36(7) p. 703-725, **2001**.

KELLY, S. M.; TESS, T. J.; PRICE, N. C. *Biochim. Biophys. Acta*, 1751, p. 119, **2005**.

KING, H. Curare alkaloids, part I, Tubocurarine. *J. Chem. Soc.*, 2 ed. p. 1381-1389, **1935**.

KORB, O.; STUTZLE, T.; EXNER, T. E. *J. Chem. Inf. Model.* 49, p. 84. **2009**.

KÖLLER C-Personal reminiscences of the first use of cocaine as a local anesthetic in eye surgery. *Anesth. Analg.* 7, p. 9-11, **1928**.

KUAMGAI, K. et al. Xanthofulvin, a novel semaphoring inhibitor produced by a strain of *Penicillium*. *Journal of Antibiotics*, 56(7), p. 610-616, **2003**.

KULKARNI, M., RATHOD, K. A novel method to augment extraction of mangiferin by application of microwave on three phase partitioning. *Biotechnology reports*, p. 8-12, **2013**.

KULKARNI, P.; TOTAWAR, B.; ZUBAIDHA, P. K. An efficient synthesis of β -aminoketone compounds through three-component Mannich reaction catalyzed by calcium chloride. *Monatshefte für Chemie.*, 143(4), p. 625-629, **2012**.

KHAN, S. N.; ISLAM, B.; YENNAMALLI, R.; SULTAN, A.; SUBBARAO, N. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 35, p. 371, **2008**.

KRAGH-HANSEN, U. Structure and ligand binding properties of human serum albumin. *Dan. Med. Bull.*, 37(1), p. 57-84, **1990**.

LAKOWICZ, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, third ed. Springer, New York, **2006**.

LAKOWICZ, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. New York: Kluwer Academic Publishers/Plenum Press, 2ed, **1999**.

LAN, J. LAN, M. GUAN, F. SHENG, H. ZHANG, *Spectrochim. Acta A.* 73, p. 936-941, **2009**.

LIANDA, R. L. P. *Tese de doutorado*. Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência. UFRRJ, Seropédica, p. 32 - 33, **2009**.

LING, L.T.; YAP, S.; RADHAKRISHNAN, A.K.; SUBRAMANIAM, T.; CHENG, H.M.; PALANISAMY, U.D. Standardised *Mangifera indica* extract is an ideal antioxidant. *Food Chemistry*, 113: p. 1154-1159, **2009**.

LI, Q.; Seeger, S. *Sens. Actuators B Chem.*, 139, p. 118, **2009**.

LI, Y.-S. GE, Y.-S. ZHANG, Y. ZHANG, A.-Q. SUN, S.-F. JIANG, F.-L. LIU, Y. J. *Mol. Struct.* 968, p. 24-31, **2010**.

- LI, D.; Ji, B.; Sun, H. *Spectrochim. Act Part A*, 73, p. 35, **2009**.
- LI, H.; HUANG, J.; YANG, B.; XIANG, T.; YINM, X.; PENG, W.; CHENG, W.; WAN, J.; LUO, F.; LI, H.; REN, G.; Mangiferin exerts antitumor activity in breast cancer cells by regulating matrix metalloproteinases, epithelial to mesenchymal transition, and betacatenin signaling pathway. *Toxicol. App. Pharmacol.*, , 272 (1), p. 180-90, **2013**.
- LIU, Y; NAIR, G. M. An Efficient and Economical MTT Assay for Determining the Antioxidant Activity of Plant Natural Product Extracts and Pure Compounds. *J. Nat. Prod*, 73, p. 1193-1195, **2010**.
- LIU, Y.; HU, Y.-J.; WANG, Y.; OU-YANG, Y.; ZHOU, J. *J. Lumin.*, 130, p. 1394-1399, **2010**.
- LI, H.; HUANG, J.; YANG, B.; XIANG, T.; YIN, X.; PENG, W.; CHENG, W.; WAN, J.; LUO, F.; REN, G. Mangiferin exerts antitumor activity in breast cancer cells by regulating matrix metalloproteinases, epithelial to mesenchymal transition, and β -catenin signaling pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*, p. 180-190, **2013**.
- MADAN, B. Xanthenes as inhibitors of microsomal lipid peroxidation and TNF-alpha induced ICAM-1 expression on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 10(11), p. 3431-3436, **2002**.
- MACKEEN, M. M. Antimicrobial, antioxidant, atitumour-promoting and cytotoxic activities of different plant part extracts of *Garcinia atroviridis* Griff. Ex T. Anders. *Journal of Ethnopharmacology*, 72(3), p. 395-402, **2000**.
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Uma década de bons frutos. Infotmativo CGPCP Fruticultura, Brasília, 5(46), p. 1-7, **2011**.
- MAHENDRAN, S.; BADAMI, S.; RAVI, S.; THIPPESWAMY, B. S, and VEERAPUR, V. P. Synthesis and Evaluation of Analgesic and Anti-inflammatory Activities of Most Active Free Radical Scavenging Derivatives of Mangiferin. *British Journal of Applied Science & Technology*, 4(35), p. 4959-4973, **2014**.

- MAKARE, N.; BODHANKAR, S.; RANGARI, V. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 78, p. 133–137, **2001**.
- MANDAL, V.; MOHAN, Y and HEMALATHA, S. Microwave assisted extraction – an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacog. Rev.* 1(1), p. 7-18, **2007**.
- MARQUES, M. V.; BISOL, T. B.; SÁ, M. M. Reações multicomponentes de biginelli e de mannich nas aulas de química orgânica experimental. Uma abordagem didática de conceitos da química verde. *QuímicaNova*, 35(8), p. 1696-1699, **2012**.
- MARTINEZ, G. et al. Effect of *Mangifera indica* L. extract (QF808) on protein and hepatic microsome peroxidation. *Phytherapy Research*, 15(7), p. 581-585, **2001**.
- MASIBO, M.; He, Q. Mango Bioactive Compounds and Related Nutraceutical Properties. *Foods Reviews Internetal*, 25, p. 346-370, **2010**.
- MASON, T.J.; LORIMER, J.P. The uses of power ultrasound in chemistry and processing, Wiley-VCHVerlag GmbH, Weinheim, *Applied sonochemistry*, **2002**.
- MATKOWSKI, A.; KÚS, P.; GÓRALSKA, E.; WÓZNIAK, D. *Mini-Rew. Med. Chem*, **2013**.
- MEDA, A. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem*, 91, p. 571-577, **2005**.
- MENSOR, L. L. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant acitivity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*, 15(2), p. 127-130, **2001**.
- MIURA, T.; ICHIKI, H.; HASHIMOTO, I.; IWAMOTO, N.; KATO, M.; KUBO, M.; ISHIHARA, E.; KOMATSU, Y.; OKADA, M.; ISHIDA, T.; TANIGAWA, K. *Phytomedicine* 8, p. 85, **2001**.
- MISHRA, B.; INDIRAPRIYADARSINI, K.; SUDHEERKUMAR, M.; UNNIKRISSHNA N, MK.; MOHAN, H. Pulse radiolysis studies of mangiferin: A C-glycosylxanthone isolated from *Mangifera indica*. *Rad. Phy. Chem.*, 75, p. 70-77, **2006**.

- MISHRA, B.; BARIK, A.; PRIYADARSINI, K. I.; MOHAN, H. Fluorescence spectroscopic on binding of a flavonoid antioxidante quercetin to sérum albumins. *Journal of Chemical Sciences*, 117(6), p. 641-647, **2005**.
- MORITA, N.; SHIMIZU, M.; FUKUTA, M. *Yakugaku Zasshi*, 85, p. 374, **1965**.
- MULLER, G.; ROSNER, H.; ROHRMANN, B.; ERLER, W.; GESCHWEND, G.; GRAFE, U.; BURKERT, B.; MOLLER, U.; DILLER, R.; SACHSE, K.; KOHLER, H. Effects of the mycotoxin ochratoxin A and some of its metabolites on the human cell line THP-1. *Toxicology*, 184(1), p. 69-82, **2003**.
- MURUGANANDAN, S.; GUPTA, S.; KATARIA, M.; LAI, J.; GUPTA, PK. Mangiferin protects the streptozotocin induced oxidative damage to cardiac and renal tissues in rats. *Toxicology*, 176, p. 165-73, **2002**.
- NARENDER, T.; REDDY, K. P.; MADHUR, G. *Synth. Commun*, 39, p. 1949, **2009**.
- NEWMANN, D. J.; CRAGG, G. M. J. Natural Products as Sources of New Drugs From 1981 to 2014. *J. Nat. Prod*, 79, p. 629-661, **2016**.
- NOTT, P. E and ROBERTS, C. A synthesis of mangiferin. *Phytochemistry*, 6, p. 1597-1599, **1967**.
- NKENGFAK, A. E. Globulixanthes C, D and E: three prenylated xanthes with antimicrobial properties from the root bark of *Symphonia globulifera*. *Phytochemistry*, 61(2), p. 181-187, **2002**.
- OBERG, K. A.; UVERSKY, V. M. *Pro. Pept. Lett.*, 8, p. 297, **2001**.
- OJEWOLE, J. A. O. Antiinflammatory, analgesic and hypoglycemic effects of *Mangifera indica* Linn. (Anacardiaceae) stem-bark aqueous extract. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27, p. 547-554, **2005**.
- OLABINRI, B.M.; ADBISI, J.A.; ODESOMI, O.F.; OLABINRI, P.F.; ADELEKE, G.E. Experimental Classification of the antioxidant capacity of the leaf, stem and root barks of *Mangifera indica* and *Azadirachta indica*. *Africa Journal of Biotechnology*, 8 (13), 2968-2972, **2009**.

OLIVEIRA, A. Synthesis and antitumor evaluation of benzopsoralen analogues. *Chemistry & Biodiversity*, 4(5), p. 980-990, **2007**.

PAULL, K.D.; SHOEMAKER, R.H.; BOYD, M.R.; PARSONS, J.L.; RISHOOD, P.A.; BARBERA, W.; SHARMA, M.; BAKER, D.C.; HAND, E.; SCUDIERO, D.A.; MONKS, A.; ALLEY, MC. and GROTE, M. The synthesis of XIT- a new tetrazolium reagent that is bio-reducible to a water-soluble formazan. *J. Heterocyclic Chem.* 25, p. 911-914, **1988**.

PACE, C. N.; VAJDOS, F.; FEE, L.; GRIMSLEY, G.; GRAY, T. *Protein Sci.*, 4, p. 2411, 1995.

PANDA, SS.; CHAND, M.; SAKHUJA, R.; JAIN, SC. Xanthonas as potential antioxidants. *Curr. Med. Chem.*, 20 p.4481-4507, **2013**.

PARDO-ANDREU, G. L.; BARRIOS, M.F., CURTI, C., HERNÁNDEZ, I., MERINO, N., LEMUS, Y., MARTINEZ, I., RIAÑO, A.; DELGADO, R. Protective effects of *Mangifera indica* L extract (Vimang), and its major component mangiferin, on iron-induced oxidative damage to rat serum and liver. *Pharmacological Research*, 57, p. 79-86, **2008**.

PASTRE, R. Diversity of polyketides produced by *Penicillium* species isolated from *Melia azedarach* and *Murraya paniculata*. *Química Nova*, 8, p. 1867-1871, **2007**.

PEDRO, M. Xanthonas as inhibitors of growth of human cancer cell lines and their effects on the proliferation of human lymphocytes in vitro. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 10(12), p. 3725-3730, **2002**.

PENG, Z. G.; LUO, J.; XIA, L. H.; CHEN, Y.; SONG, S. J., [CML cell line K562 cell apoptosis induced by mangiferin]. *Journal of experimental hematology/Chinese Association of Pathophysiology*, , 12 (5), p. 590-594, **2004**.

PÉREZ, R. A. Amino Acid Composition and Antioxidant Capacity of Spanish Honeys. *J. Agric. Food Chem.* 55, p. 360-365, **2007**.

- PETERS, S., SCHMIDT, W. and BEERHUES, L. Alternative pathways of xanthone biosynthesis in cell cultures of *Hypericum androsaemum* L. *FEBS Letters* 420, p. 143-146, **1997**.
- PETERS, T. All About Albumin. Biochemistry, Genetics and Medical Application, San Diego: Academic Press, **1996**.
- PETERS, T. Serum Albumin. *Advances in Protein Chemistry*, New York: Academic Press, 37, **1985**.
- PINTO, A.C. Produtos naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*, 25, p. 45-61, **2002**.
- PINTO, M. M. M. et al. Xanthone derivatives: New insights in biological activities. *Current Medicinal Chemistry*, 12(21), p. 2517-2538, **2011**.
- PINHEIRO, L. Antibacterial xanthenes from *Kielmeyera variabilis* Mart. (Glusiaceae). *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(4), p. 549-552. **2003**.
- QING, W. Y.; PING, T. B.; MEI, Z. H.; HUA, Z. Q.; CHENG, Z. G. J. *Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 94, p. 183, **2009**.
- RAI, M. CARPINELLA, C. Naturally occurring bioactive compounds. *Elsevier*, p. 251-268, **2006**.
- RAMESH, C.; MAHENDER, G.; RAVINDRANATH, N.; DAS, B. *Tetrahedron*, 59, p. 1049, **2003**.
- RAJENDRAN, P.; EKAMBARAM, G.; SAKTHISEKARAN, D., Cytoprotective effect of mangiferin on benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 103(2), p. 137-142, **2008**.
- RAYMOND, L.; CAHEN, K. T. Homatropine Methylbromide: A Pharmacological Reevaluation in: *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 105 (2), p. 166-177, **1952**.
- RIBEIRO, S.M.R.; QUEIROZ, J.H.; QUEIROZ, M.E.L.R.; CAMPOS, F.M.C.; SANT'ANA, H.M.P. Antioxidant in Mango (*Mangifera Indica* L.) Pulp. *Plant Foods for Human Nutrition*, 62, 13-17, **2007**.

- ROEHM, N. W.; RODGERS, G. H.; HATFIELD, S. M.; & GLASEBROOK, A. L. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *Journal of Immunological Methods*, 142(2), p. 257-265, **1991**.
- ROMANIK, G. E.; GILGENAST, A.; PRZYJAZNY and M. KAMINSKI. Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70, p. 253-261, **2007**.
- ROSS, P. D.; SUBRAMANIAN, S. *Biochem.*, 20, p. 3096, **1981**.
- SANT'ANNA, C. M. R. *Rev. Virtual Quim.*, 1 (1), p. 49- 57, **2009**.
- SARKAR, A.; SREENIVASAN, Y.; RAMESH, G. T.; MANNA, S. K. *beta-D-Glucoside* suppresses tumor necrosis factor-induced activation of nuclear transcription factor kappa B but potentiates apoptosis. *J. Biol. Chem.*, , 279(32), p. 33768-81, **2004**.
- SARTORI, G.; BALLINI, R.; BIGI, F.; BOSICA, G.; MAGGI, R.; RIGHI, P. Protection (and Deprotection) of Functional Groups in Organic Synthesis by Heterogeneous Catalysis; *Chem. Rev.*, 104, p. 199-250, **2004**.
- SATHESHKUMAR, A.; ELANGO, K. P. *Spectrochim. Acta Mol. Biomol*, 130, p. 337, **2014**.
- SATO, T. Mechanism of antioxidant action of pueraria glycoside (PG)-1 (an isoflavonoid) and mangiferin (a xanthonoid). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 40(3), p. 721-724, **1992**.
- SEVERI, J.A.; LIMA, Z.P.; KUSHIMA, H.; BRITO, A.R.M.S.; SANTOS, L.C.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, A. Polyphenols with Antiulcerogenic Action from Aqueous Decoction of Mango Leaves *Mangifera indica* L. *Molecules*, 14, p. 1098-110, **2009**.
- SILVA, S. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *Olea europaea* L. Fruits and Leaves. *Food Science and Technology International*, 12, p. 385- 395, **2006**.
- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos, 5 ed, Editor Guanabara Koogan, **1994**.

SIMÕES, C.M.O.; SCKENKEL, E.P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 12(1), 35-40, **2002**.

SINGH, S, K.; SINHA, S, K.; PRASAD, SK.; KUMAR, R.; BITHU, B, S.; KUMAR, S, S.; SINGH, P. Synthesis and evaluation of novel analogues of mangiferin as potent antipyretic. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, p. 866-869, **2011**.

SINGH, V. K. Physiological and biochemical changes with special reference to mangiferin and oxidative enzymes level in malformation resistant and susceptible cultivars of mango (*Mangifera indica* L.). *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, 108, p. 43-48, **2006**.

SOUSA, M. E.; PINTO, M. M. M. Synthesis of xanthenes: Na overview. *Current Medicinal Chemistry*, (12) 21, p. 2447-2479, **2005**.

SUDLOW, G.; BIRKETT, D. J.; WADE, D. N. Characterization of Two Specific Drug Binding Sites on Human Serum Albumin. *Molecular Pharmacology*, 11, p. 824-832, **1975**.

SUDLOW, G.; BIRKETT, D. J.; WADE, D. N. Further Characterization of Specific Drug Binding Sites on Human Serum Albumin. *Molecular Pharmacology*, 12, p. 1052-1061, **1976**.

SUGIO, S.; KASHIMA, S.; MACHIZUKI, S.; NODA, M.; KABAYASHI, K. "Crystal Structure of Human Serum Albumin at 2.5 Å resolution", *Protein Engineering Design & Selection*, 12, p. 439-446, **1999**.

SCALZO, J.; POLITI, A.; PELEGRINI, N.; MEZZETTI, B. M. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition*, 21(2), p. 207-213, **2005**.

SCUDIERO, D.A.; SHOEMARKER, R.H.; PAULL, K.D.; MONKS, A.; TIERNEY, S.; NOFZIGER, T.H.; CURRENS, M.J.; SENIFF, D. and BOYD, M.R. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 48, p. 4827-4833, **1988**.

SHARMA, S.R.; DWIVEDI, S. K; SWARUP, D. Hypoglycemic potencial of *Mangifera indica* leaves in rats. *International Journal of Pharmacology*, 35 (2), p. 130- 133, **1997**.

- SHI, X. Y.; CAO, H.; REN, F. L.; XU, M. *Chem. Biodiver.*, 4, p. 2780, **2007**.
- SHI, J. H.; CHEN, J.; WANG, J.; ZHU, Y. Y.; WANG, Q. *Spectrochim. Acta Mol. Biomol.*, 149, p. 630, **2015**.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, J. F.; NIEMAN, T. A. *Princípios de Análise Instrumental*. Porto Alegre:Bookma, 5ed, **2002**.
- SKLAR, L. A.; HUDSON, B. S.; SIMONI, R. D. *Biochemistry-US*, 16, p. 5100, **1977**.
- STAN, D.; MATEI, I.; MIHAILESEU, C.; SAVIN, M.; MATAACHE, M.; HILLEBRAND, M.; BACIU, I. *Mol.*, 14, p. 1614, **2009**.
- STEWART, J. J. P. *J. Mol. Model.* 13, p. 1173, **2007**.
- TANG, J.; LUAN, F.; CHEN, X. *Bioorg. Med. Chem.*, 14, p. 3210, **2006**.
- TIMASEFF, S. N; in: H. Peeters (Ed.) *Proteins of Biological Fluids*, v. 1, Oxford Pergamon Press, Oxford, **1972**.
- VALEUR, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH ISBNs: 3-527-29919-X (Hardcover); 3-527-60024-8 (*Eletronic*). **2001**.
- VARLAN, A. ; HILLEBRAND, M. *Molecules*, 15, p. 3905-3919, **2010**.
- VENKATESH, P.; SOUMYA, V.; HARIPRASATH, K.; HARI PRASAD, R. Microwave assisted extration of mangiferin from *Mangifera indica* L., p. 209-212, **2010**.
- VENYAMINOV, S. Y.; YANG, J. T. Determination of protein secondary structure. Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules. Ed. Fasman, G. D., Plenum Press, New York, EUA, 69, **1996**.
- VIEIRA, L.M.; KIJOA, A. Naturally-occurring xanthones: recent developments. *Current Medicinal Chemistry*, 12, p. 2413-2446, **2005**.
- VIEIRA, A. S. Síntese estereosseletivade α -fenilseleno- β -amino ésteres pela reação do tipo-Mannich e efeito promotor de tiofenol na reação de Pictet-spengler. Tese de doutorado em química. UFSM, p. 22-45, **2006**.

VOET, D; VOET, J. G.; PRATT, C. W. Fundamentos de Bioquímica – A Vida em Nível Molecular, 2ªed., Porto Alegre. *Artmed*, **2008**.

VORUM, H. Reversible ligand binding to human serum albumin. Theoretical and clinical aspects. *Dan. Med. Bull.*, 46(5), p. 379-399, **1999**.

VRUSHALI, M. K.; VIRENDRA, K. R. Mapping of an ultrasonic bath for ultrasound assisted extraction of mangiferin from *Mangifera indica* leaves. *Ultrasonics Sonochemistry*. 21, p. 606-611, **2014**.

WANG, T. ZHAO, Z. WEI, B. ZHANG, L. JI, L. *J. Mol. Struct.* 970, p. 128–133, **2010**.

WANG, L. and WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Technol.* 17, p. 300-312, **2006**.

WARBURG, O. On the origin of cancer cells. *Science*, 123 (3191), p. 309-314, **1956**.

WARDELL, M.; WANG, X.; HO, J.X.; ROBERT, J.; RUKER, F.; RUBLE, J.; CARTER, D. C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, p. 913, **2002**.

WEI, X.; LIANG, D.; WANG, Q.; MENG, X and LI, Z. Total synthesis of mangiferin, homomangiferin, and neomangiferin. *Royal society of chemistry*, 14, p. 8821-8831, **2016**.

WEI, X.; LIANG, D.; NING, M; WANG, Q.; MENG, X and LI, Z. Semi-synthesis of neomangiferin from mangiferin. *Tetrahedron Letters*, p. 3083-3086, **2014**.

WILAIRAT, R. Cytotoxicities of xanthenes and cinnamate esters from *Hypericum hookerianum*. *Planta Medica*, 71(7), p. 680-682, **2005**.

WU, Z;. WEI, G.; LIAN, G. and YU, B. *J. Org. Chem.*, 75, 5725, **2010**.

YUE, Y.; QIN, J.; CHEN, X. *J. Mol. Struc.*, 888, p. 25, **2008**.

YOUNG, D. C. *Computacional Chemistry: A Practical Guide for Applying Techniques to Real-World Problems*, John Wiley & Sons, Inc, New York, **2001**.

YUE, Y. CHEM, X.QIN, J. YAO, X. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49, p. 753-759, **2009**.

ZHAO, G.L.; ZHANG, F. X.; WANG, Z. F.; XU, W. R.; WANG, Y. R.; LIU, W.; TANG, L. D.; WANG, J W. *Synth. Comm*, 40, p. 351, **2010**.

ZHANG, Y.Z.ZHOU, B. LIU, Y.X. ZHOU, C.X. DING, X.L. LIU, Y. *J. Fluoresc.* 18, p. 109-118, **2008**.

ZHANG, G.; MA, Y.; WANG,L.; ZHANG, Y.; ZHOU, J. *Food Chem.*, 133, p. 264, **2012**.

ZHANG, Y.; LI, Y.; DONG, L.; LI, J.; HE, W.; CHEN, X.; HU, Z. Investigation of the interaction between naringin and human serum albumin. *Journal of Molecular Structure*, 875, p. 1-8, **2008**.

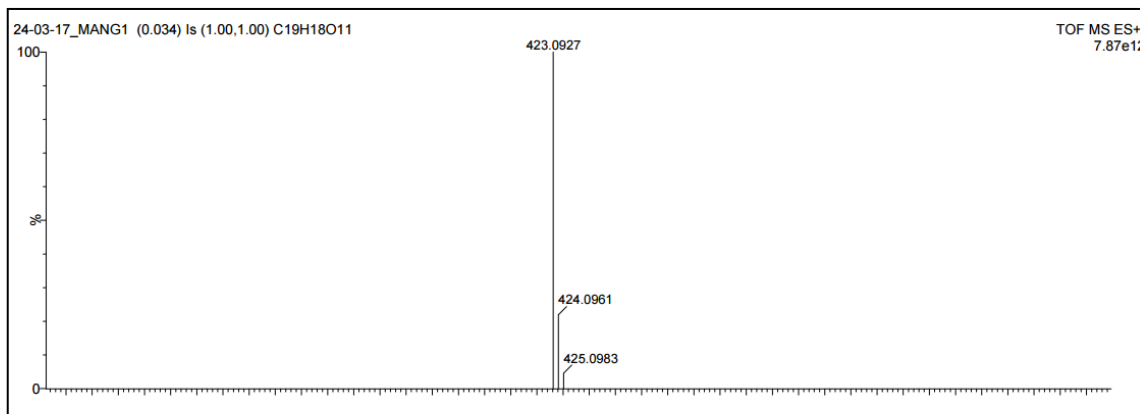
ZHANG, R. C.; ALDOSARI, A, S.; VIDYASAGAR, V, P, S, P.; NAIR, M, K.; NAIR, G, M. Antioxidant and Anti-inflammatory Assays Confirm Bioactive Compounds in Ajwa Date Fruit. *Journal Agricultural and Food Chemistry.*, 61, p. 5834-5840, **2013**.

ZSILA, F.; BIKÁDI, Z.; SIMONYI, M. Probing the binding of the flavonoid, quercetin to human serum albumin by circular dichroism, electronic absorption spectroscopy and molecular modeling methods. *Biochemical Pharmacology*, 65, p. 447-456, **2003**.

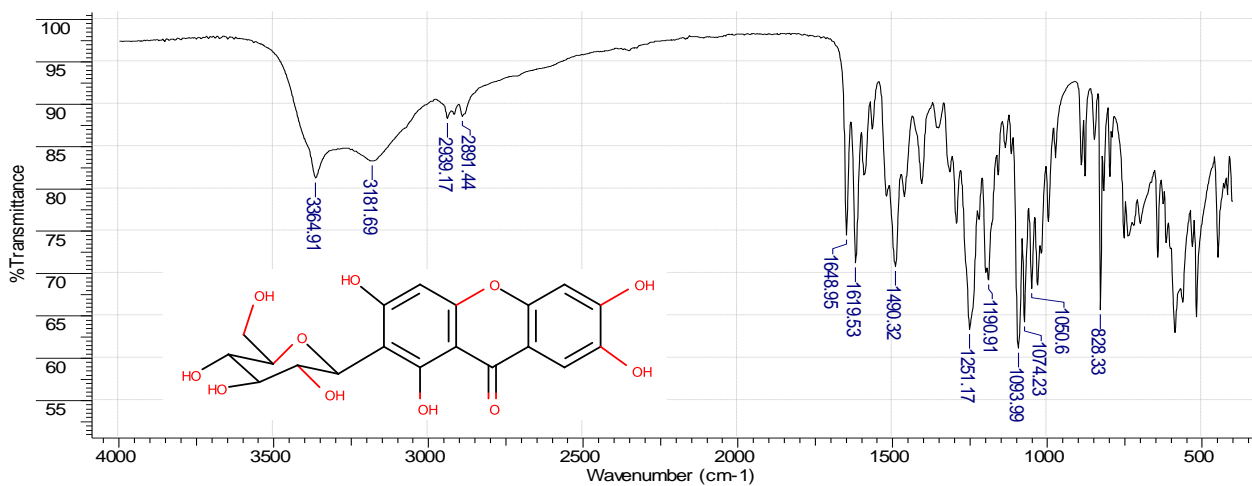
9- ANEXO

10.1. Caderno de Espectros

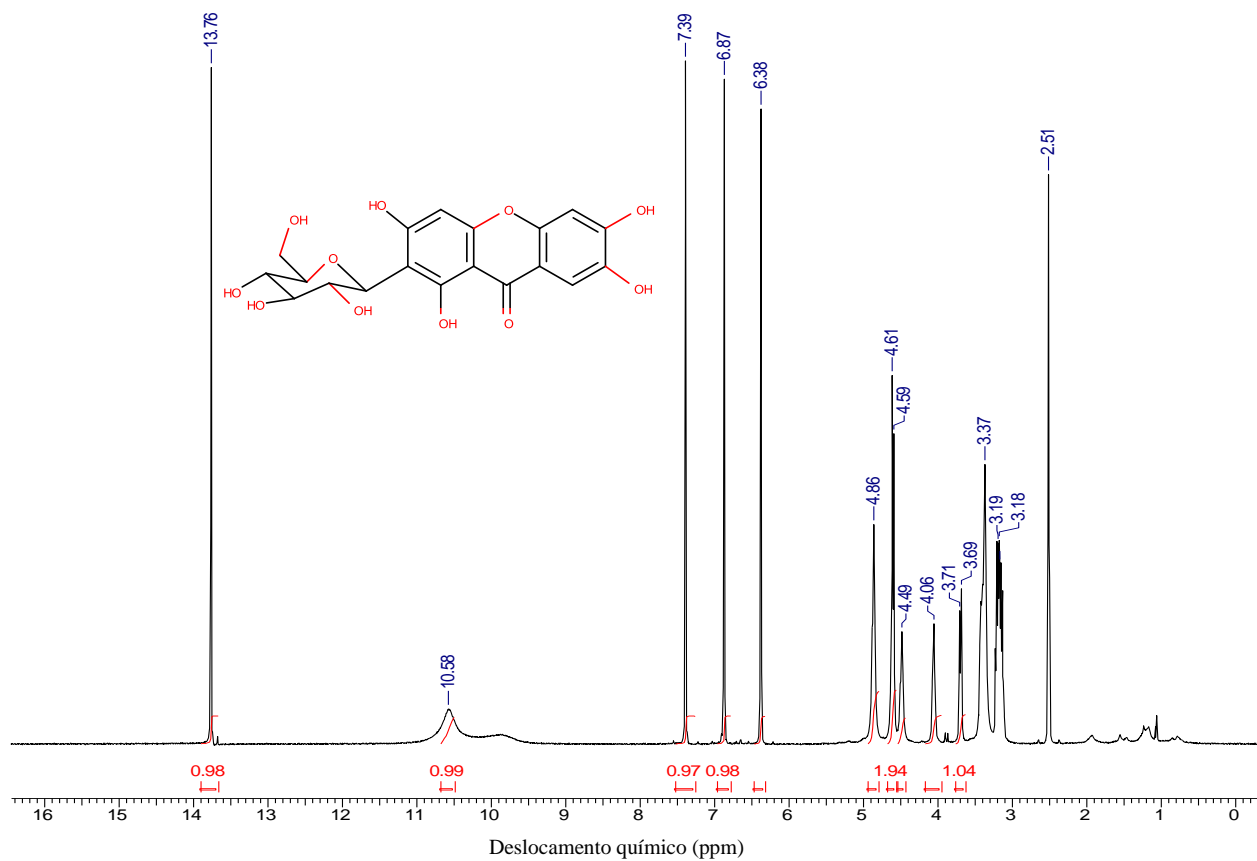
a) Mangiferina (2-C- β -D-glocopiranosil- 1,3, 6, 7-tetraidroxixantona)



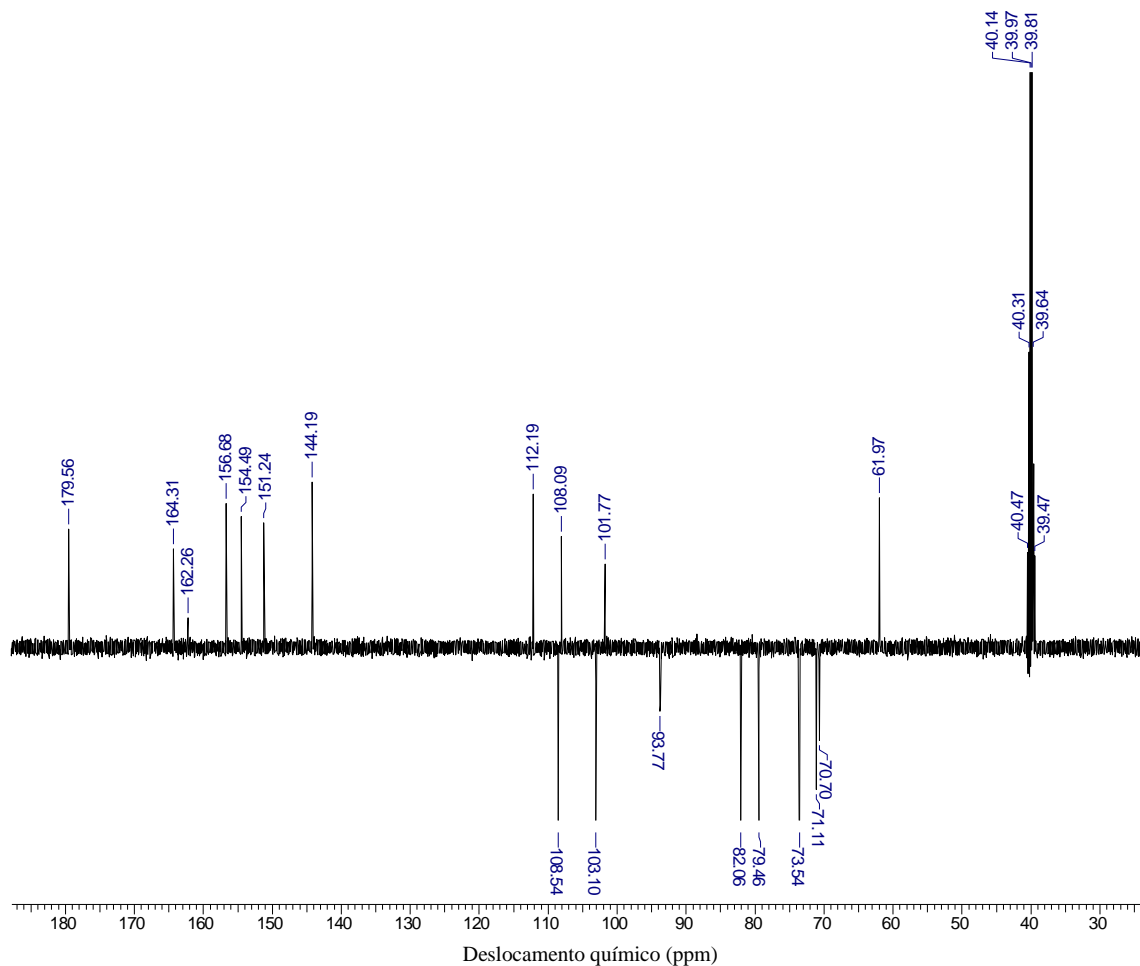
Espectro A.1. EMAR (ES+) para XX MGF.



Espectro A.2. Espectro de IV (KBr) da mangiferina (2-C- β -D-glocopiranosil- 1,3, 6, 7-tetraidroxixantona)

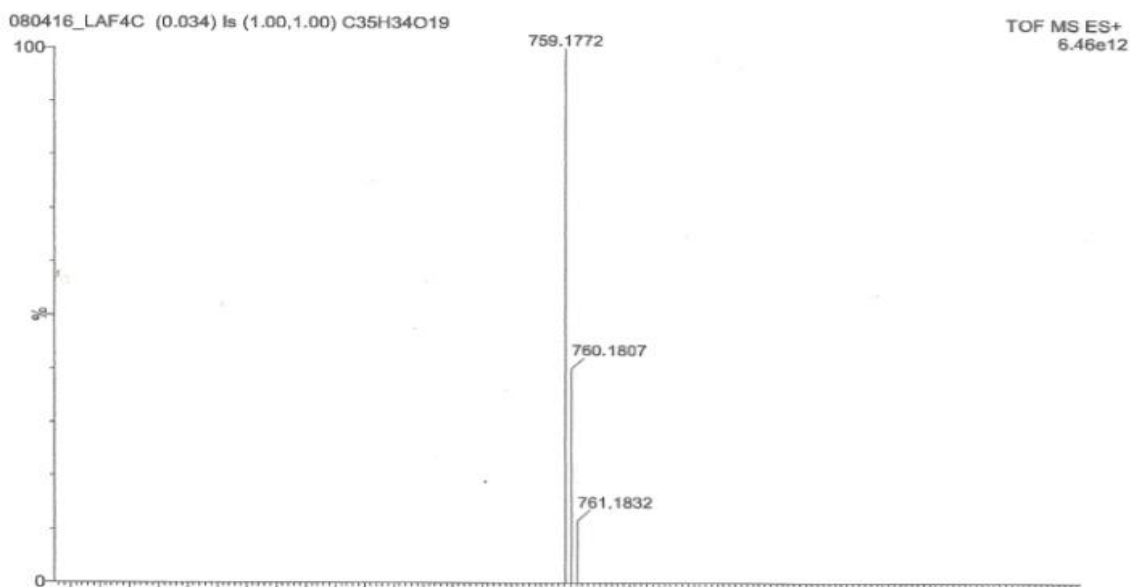


Espectro A.3. Espectro de RMN ¹H (500MHz, DMSO) da mangiferina (2-C- β-D-glocopiranosil- 1,3, 6, 7-tetraidroxixantona).

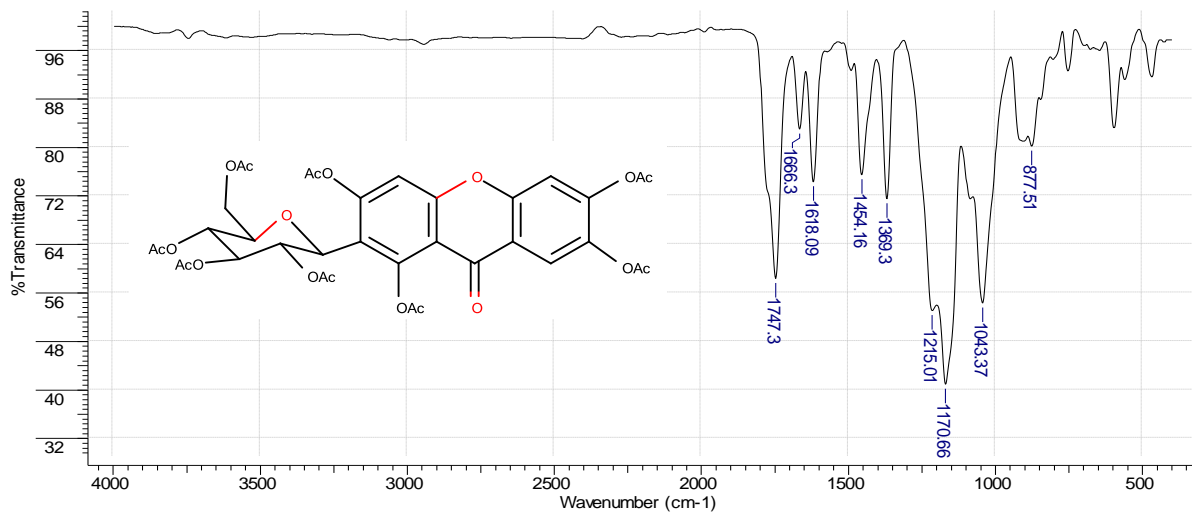


Espectro A.4. Espectro de RMN ^{13}C (500MHz, DMSO) da mangiferina (2-C- β -D-glocopiranosil- 1,3, 6, 7-tetraidroxixantona).

b) Derivado Acetilado 1 (2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1,3,6,7 tetraacetoxixantona)

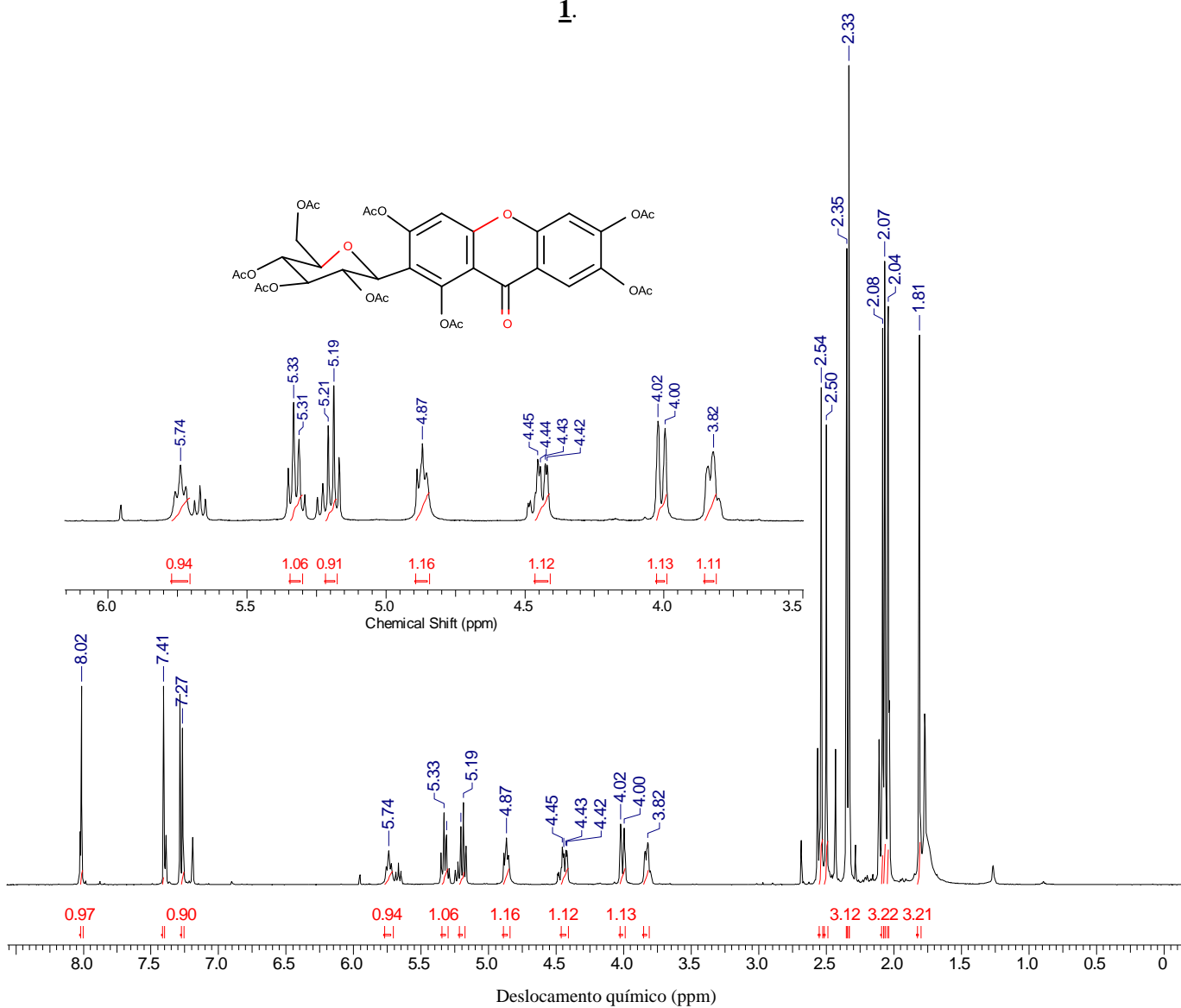


Espectro A.5. Espectro de EMAR (ES+) do derivado 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1,3,6,7-tetraacetoxixantona 1.

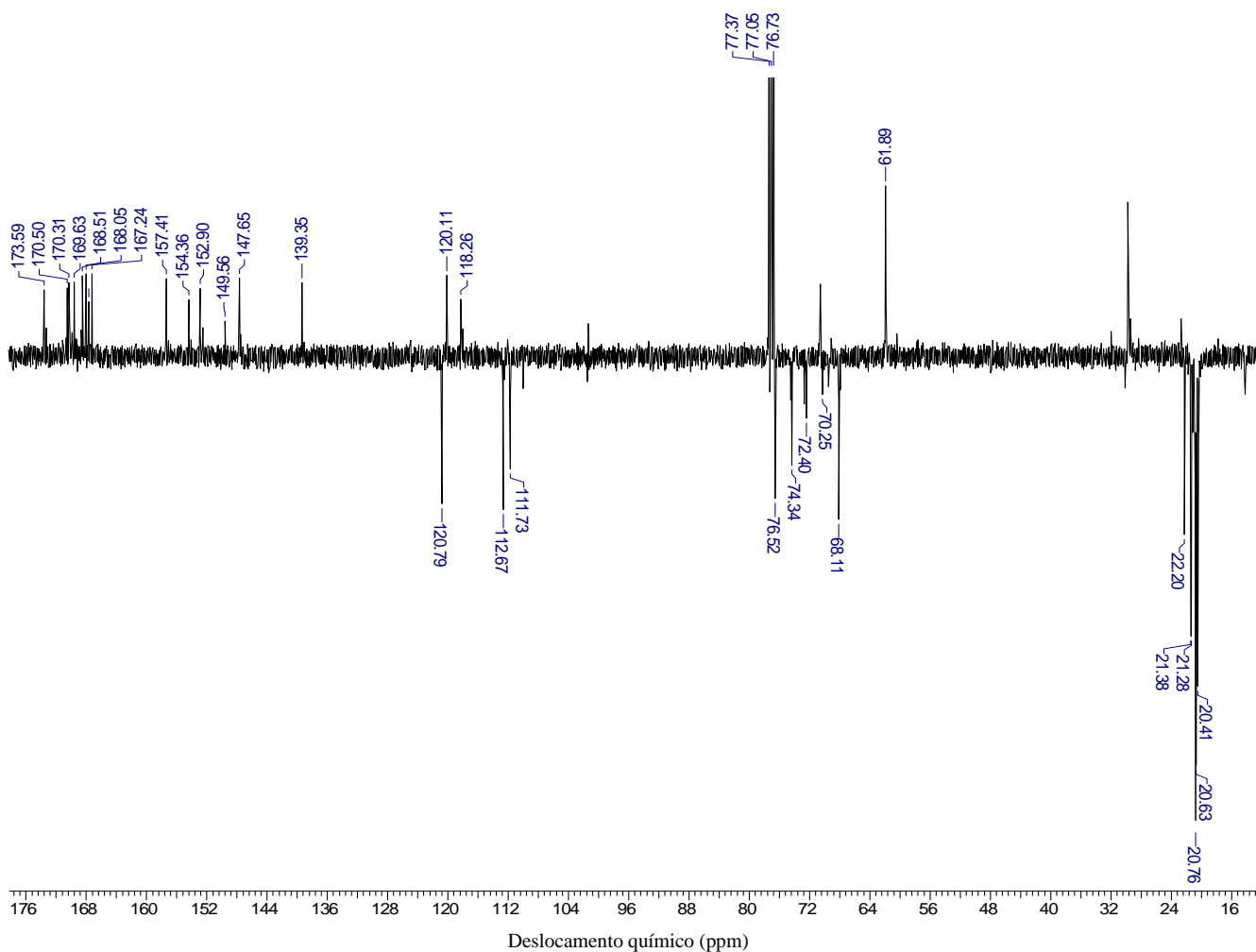


Espectro A.6. Espectro de IV de 2-β-D-tetraacetoxiglicopiranosil-1,3,6,7-tetraacetoxixantona

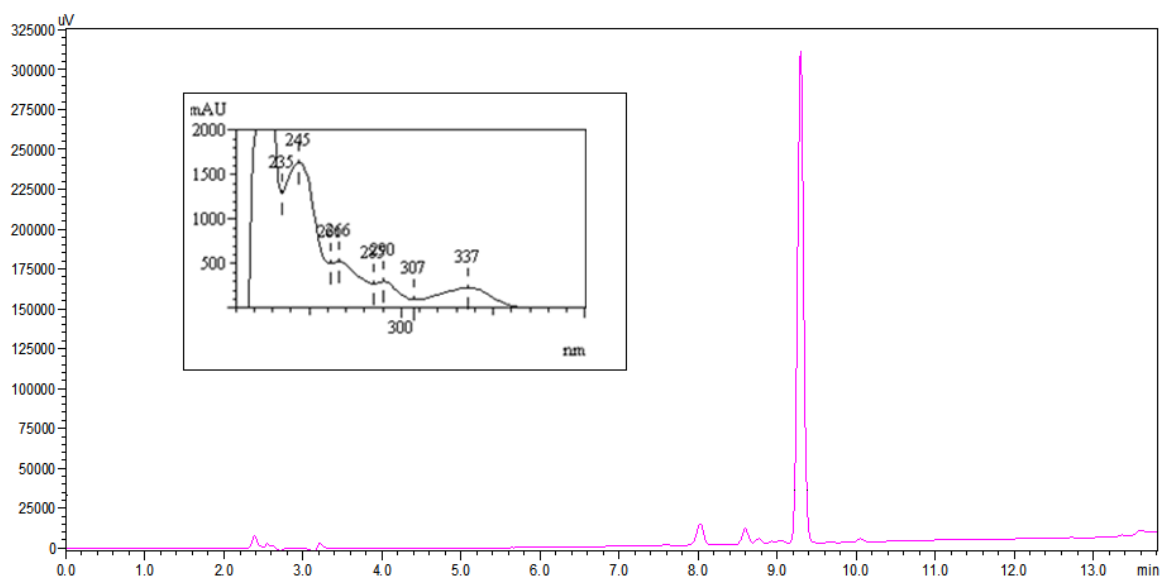
1.



Espectro A.7. Espectro de RMN ^1H (500MHz, CDCl_3) do 2-β-D-tetraacetoxiglicopiranosil-1,3,6,7-tetraacetoxixantona **1.**

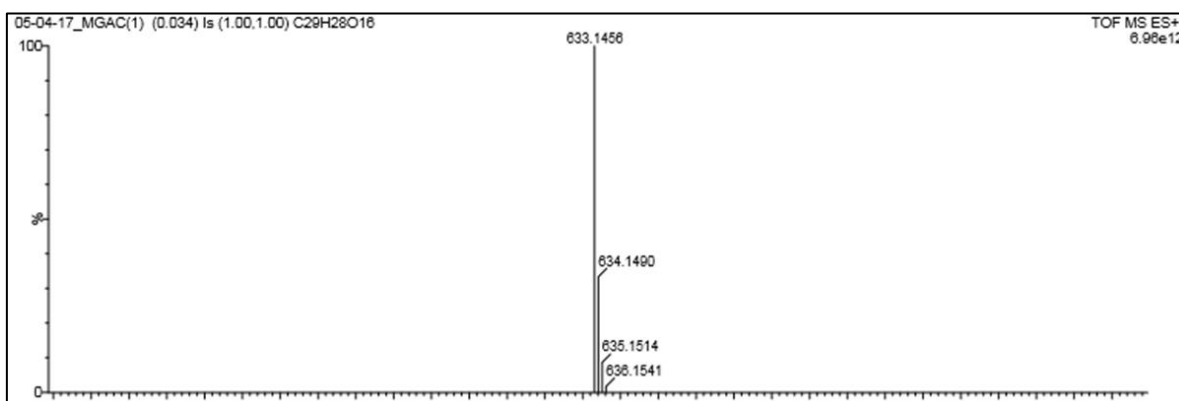


Espectro A.8. Espectro de RMN¹³C – DEPT Q (500MHz, CDCl₃) do 2-β-D-tetraacetoxiglicopiranosil-1,3,6,7-tetraacetoxixantona **1**.

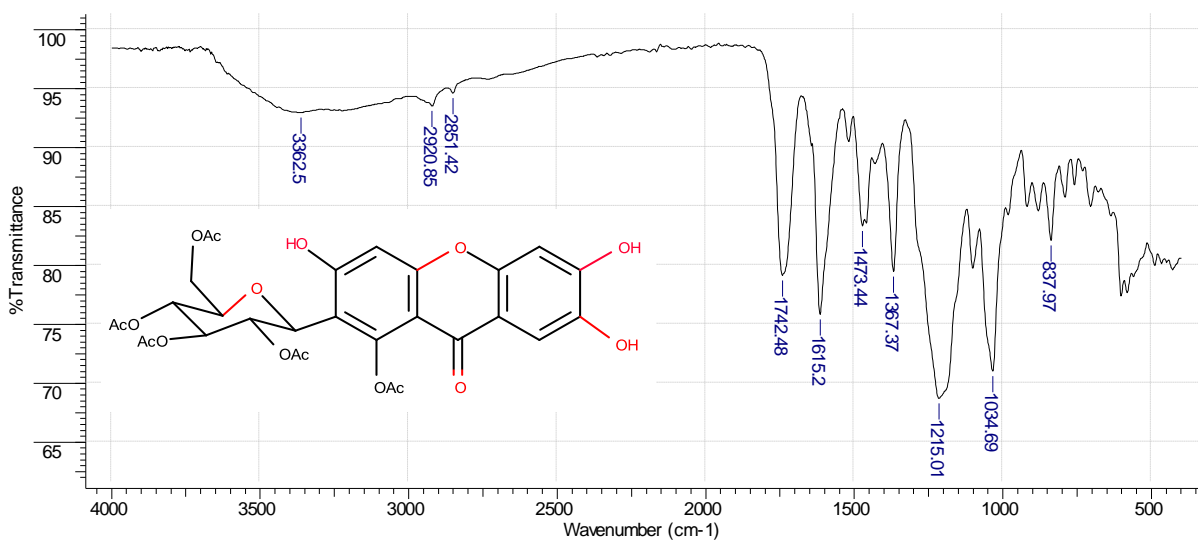


Espectro A.9. Análise por CLAE-DAD e curva no UV-Vis de 2-β-D-tetraacetoxiglicopiranosil-1,3,6,7-tetraacetoxixantona **1**.

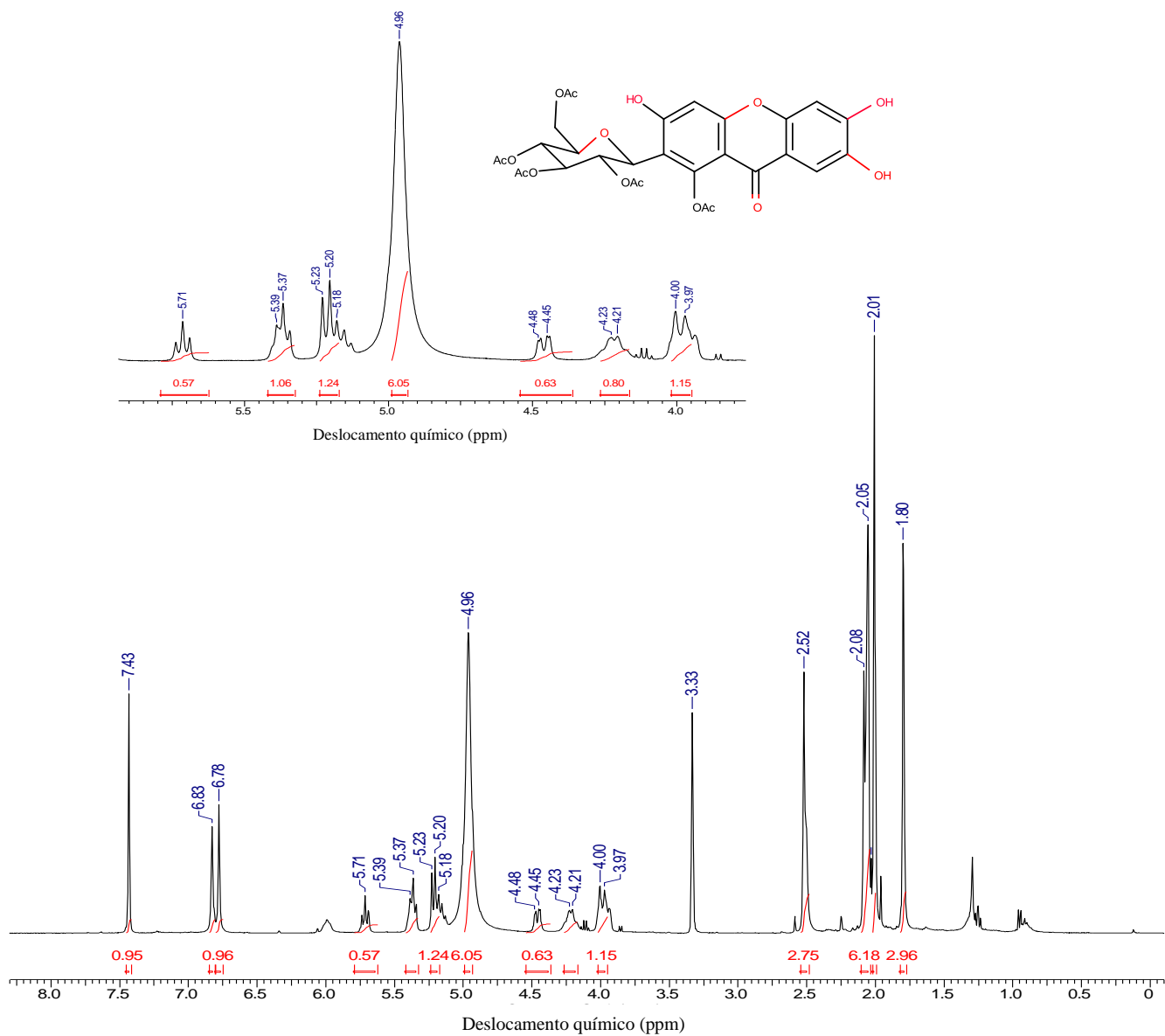
c) Derivado parcialmente acetilado: 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-hidroixantona 2.



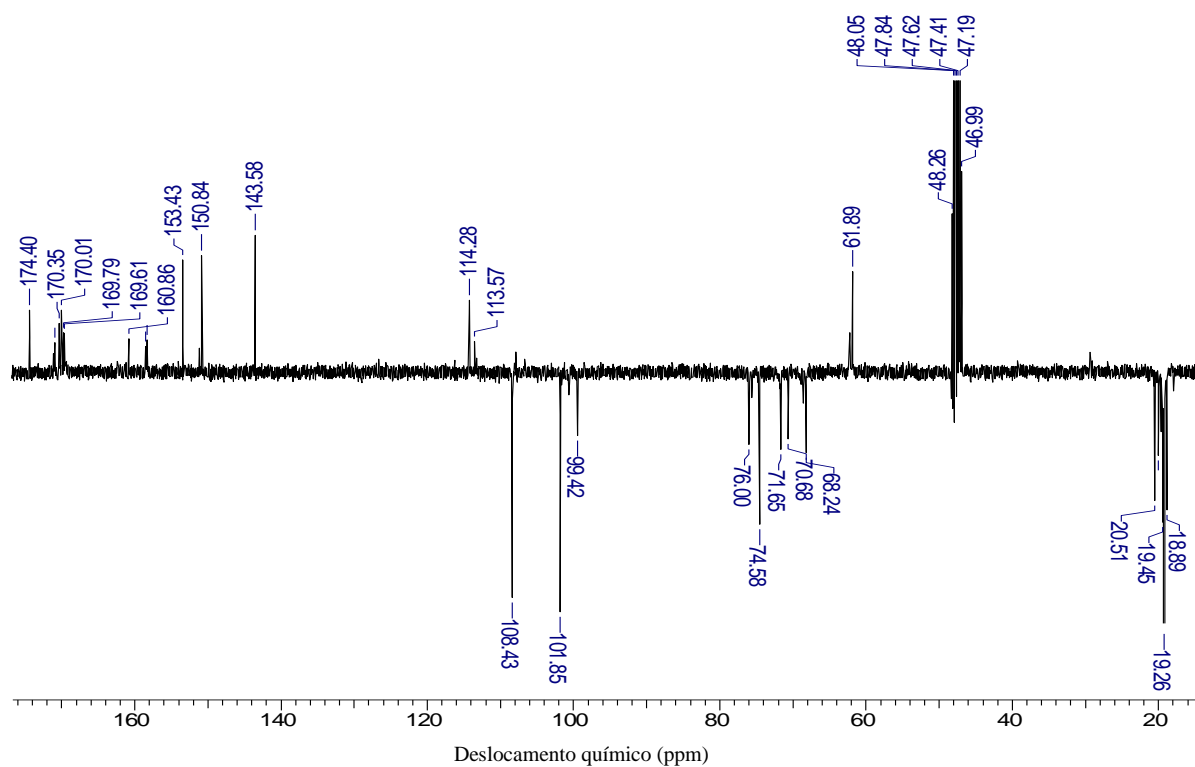
Espectro A.10. Espectro de EMAR (ES+) do derivado 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-hidroixantona 2.



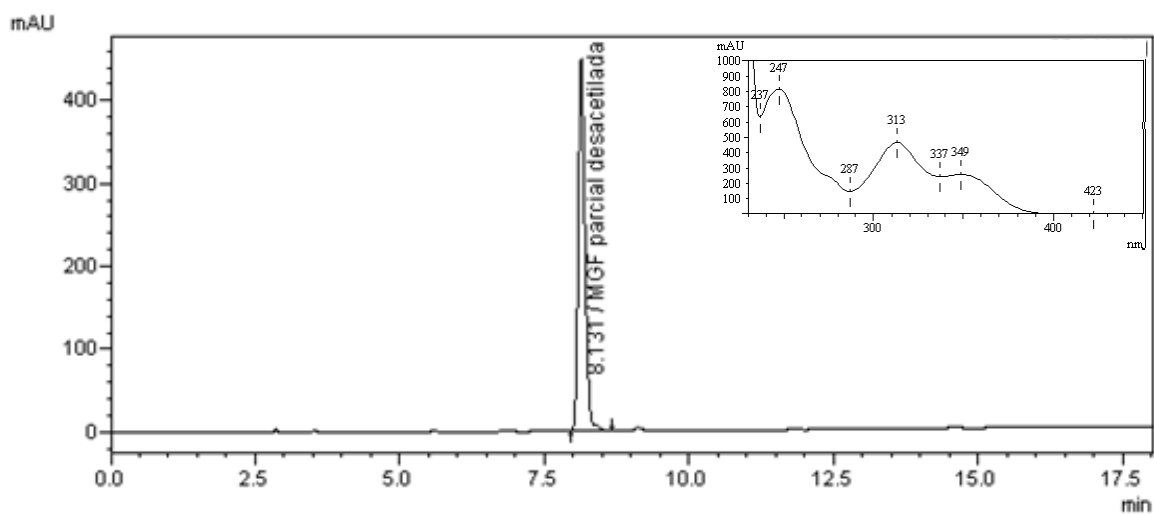
Espectro A.11. Espectro de IV 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-hidroixantona 2.



Espectro A.12. Espectro de RMN ^1H (400MHz, MeOD) do 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-hidroxixantona **2**.

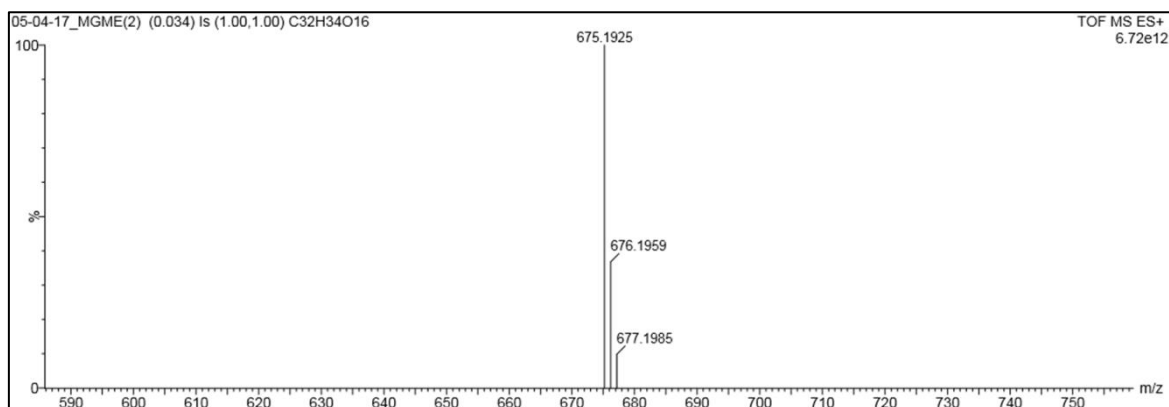


Espectro A.13. Espectro de RMN¹³C – DEPT Q (400MHz,MeOD) do 2-β-D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxy-3,6,7-hidroxixantona **2**.

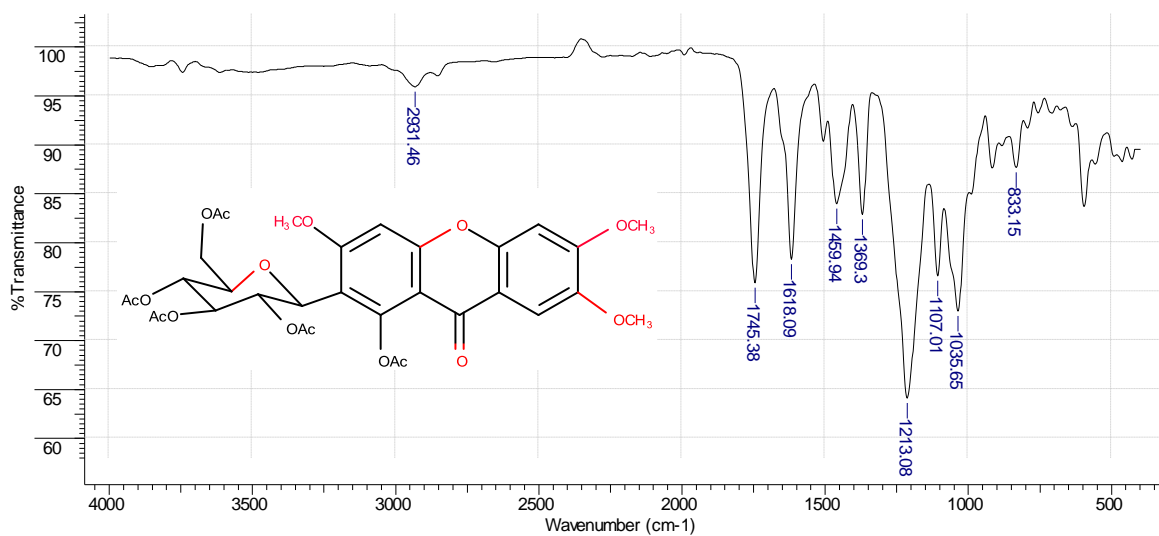


Espectro A.14. Análise por CLAE-DAD e curva no UV-Vis de 2-β-D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxy-3,6,7-hidroxixantona **2**.

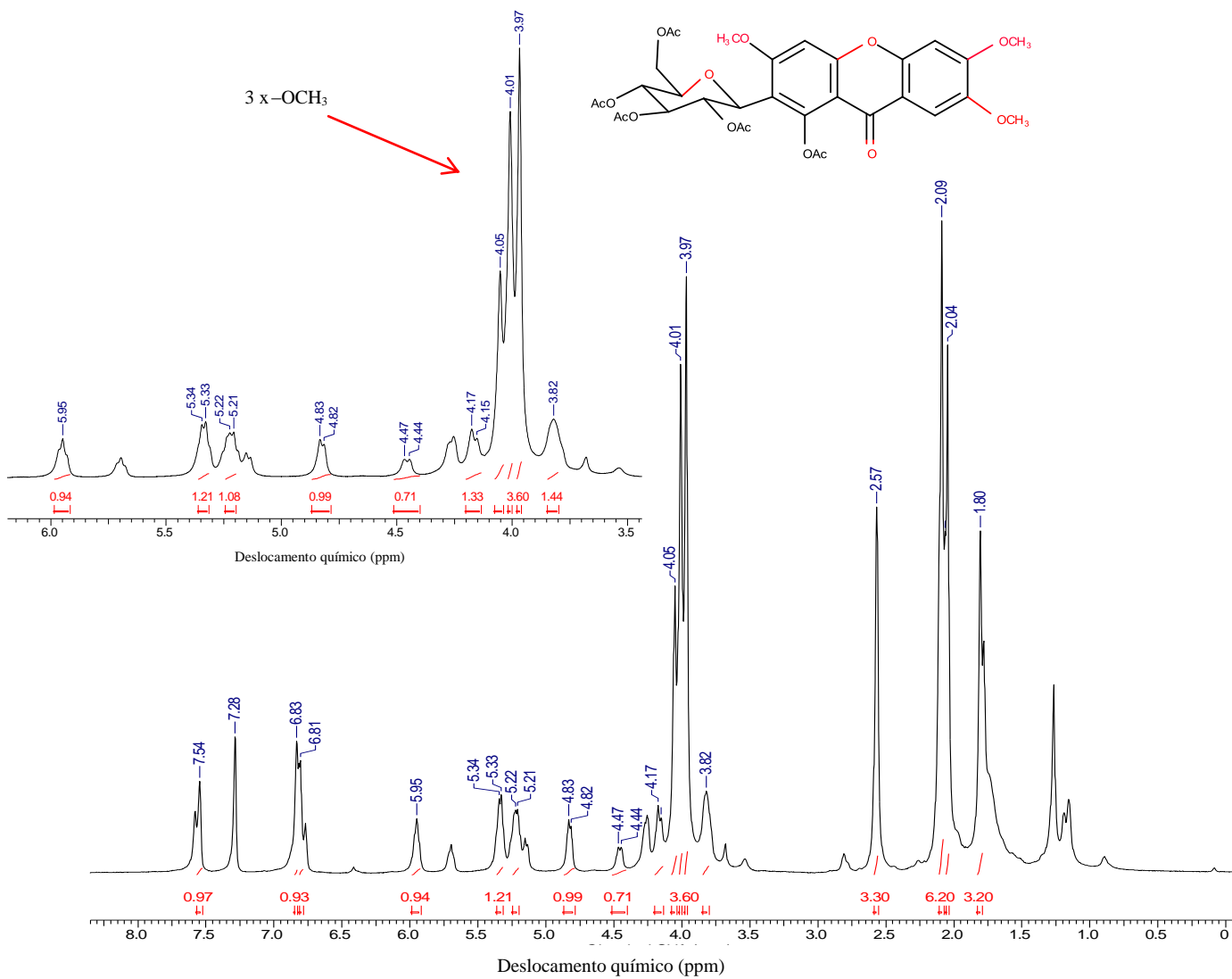
d) Derivado **3** (2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-trimetoxixantona)



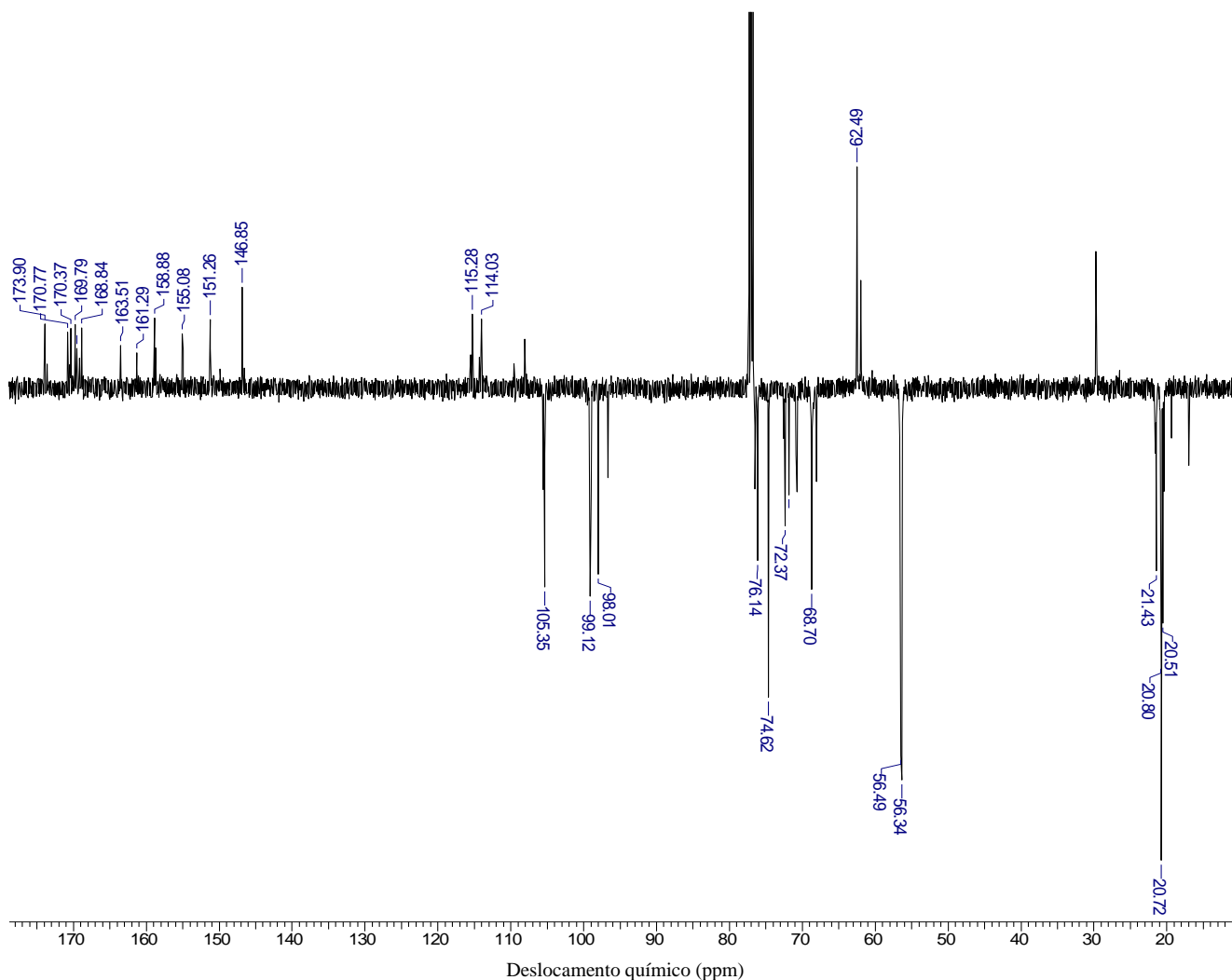
Espectro A.15. Espectro de EMAR (ES+) do derivado 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-trimetoxixantona **3**.



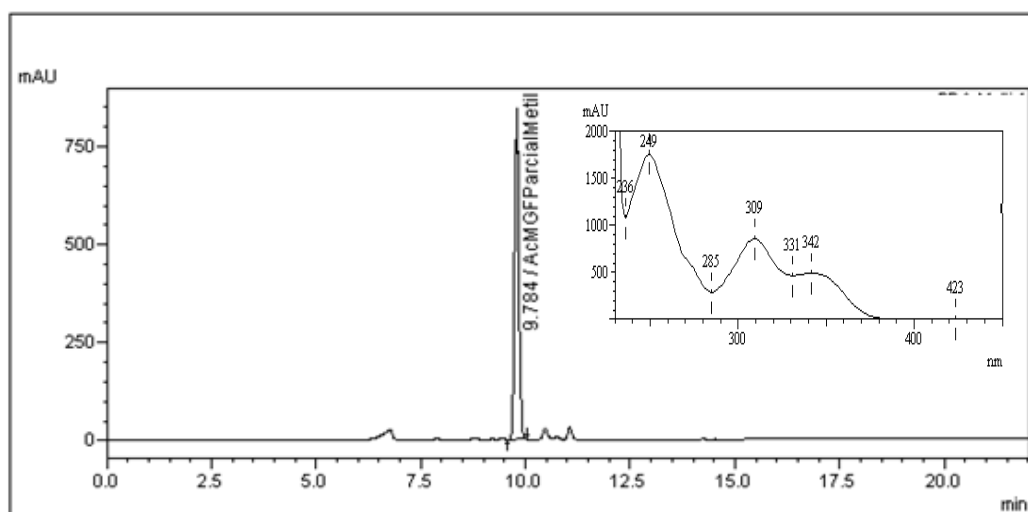
Espectro A.16. Espectro IV 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-trimetoxixantona **3**.



Espectro A.17. Espectro de RMN ¹H (500MHz, CDCL₃) 2-β-D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-trimetoxixantona **3**.

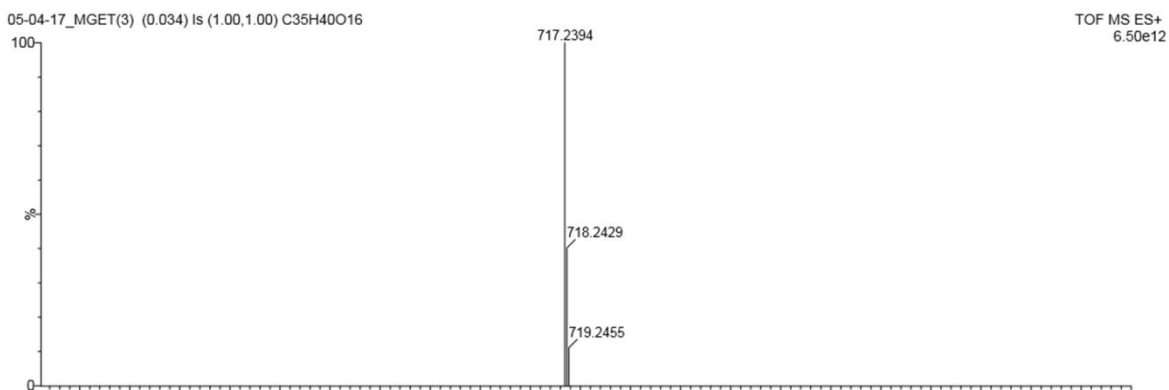


Espectro A.18. Espectro de RMN¹³C – DEPT Q (500MHz, CDCl₃) do 2-β-D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-trimetoxixantona **3**.

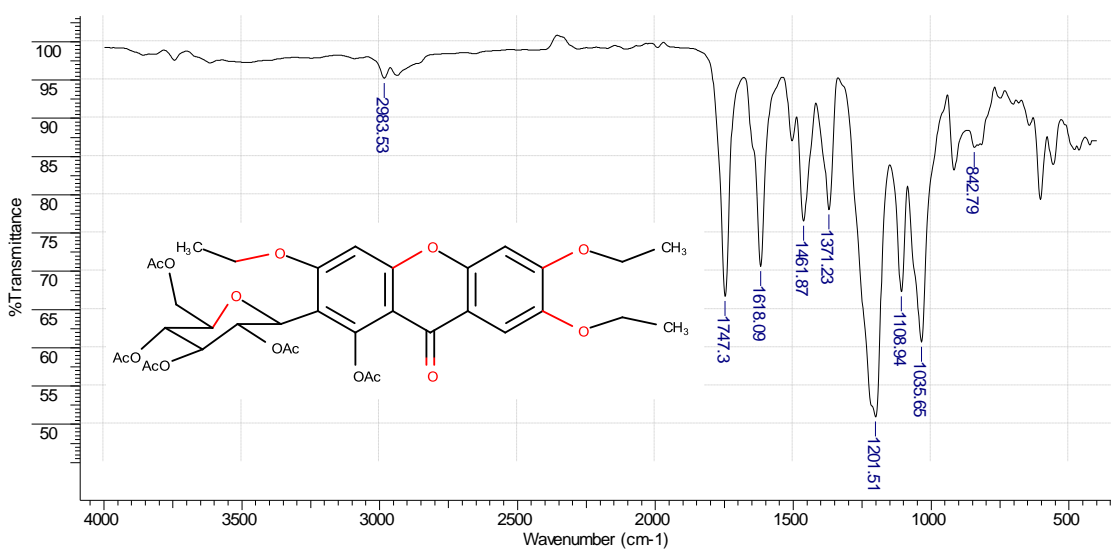


Espectro A.19. Análise por CLAE-DAD e curva no UV-Vis de 2-β-D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-trimetoxixantona **3**.

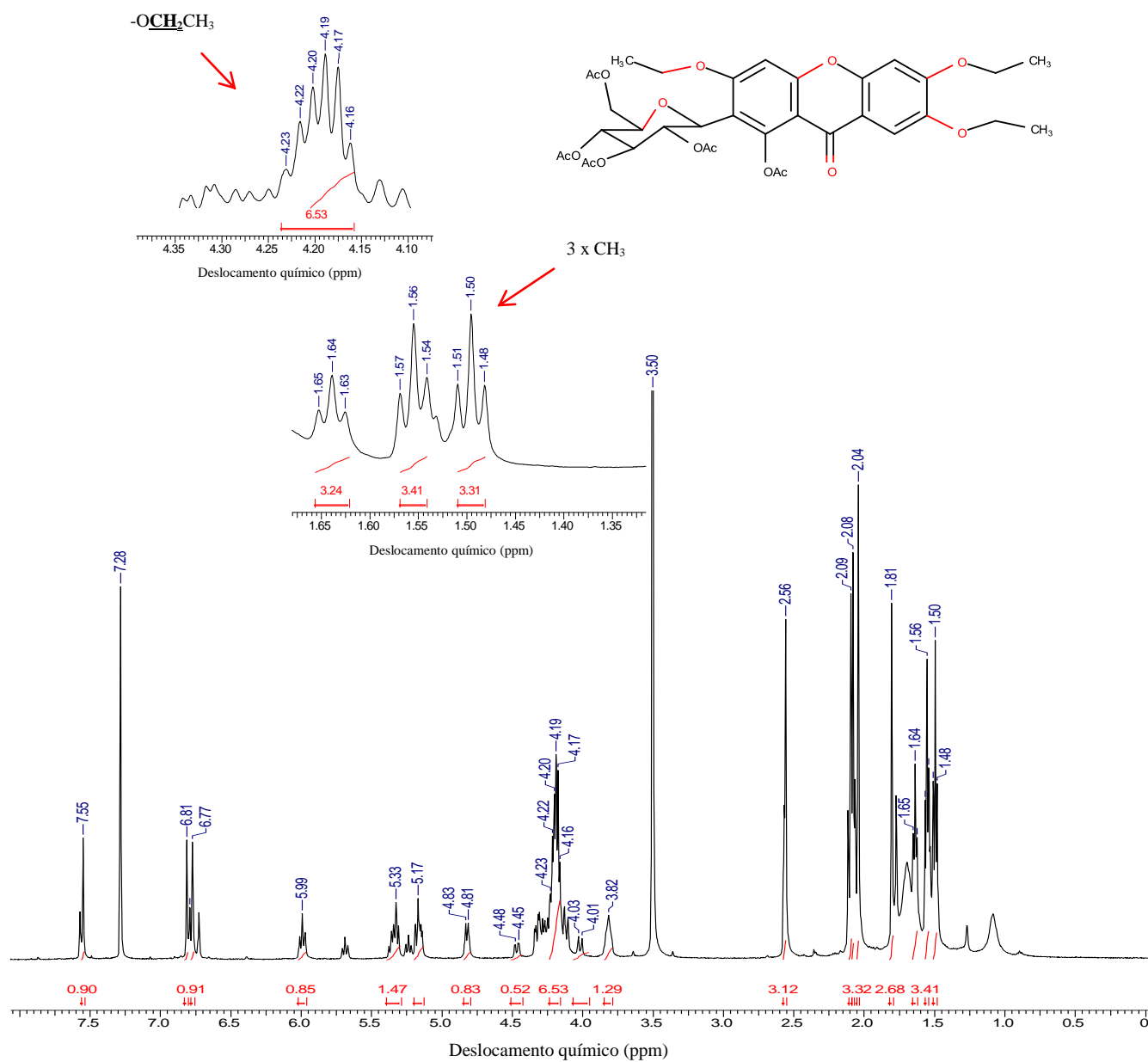
e) Derivado 4 (2-β-D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-trietoxixantona)



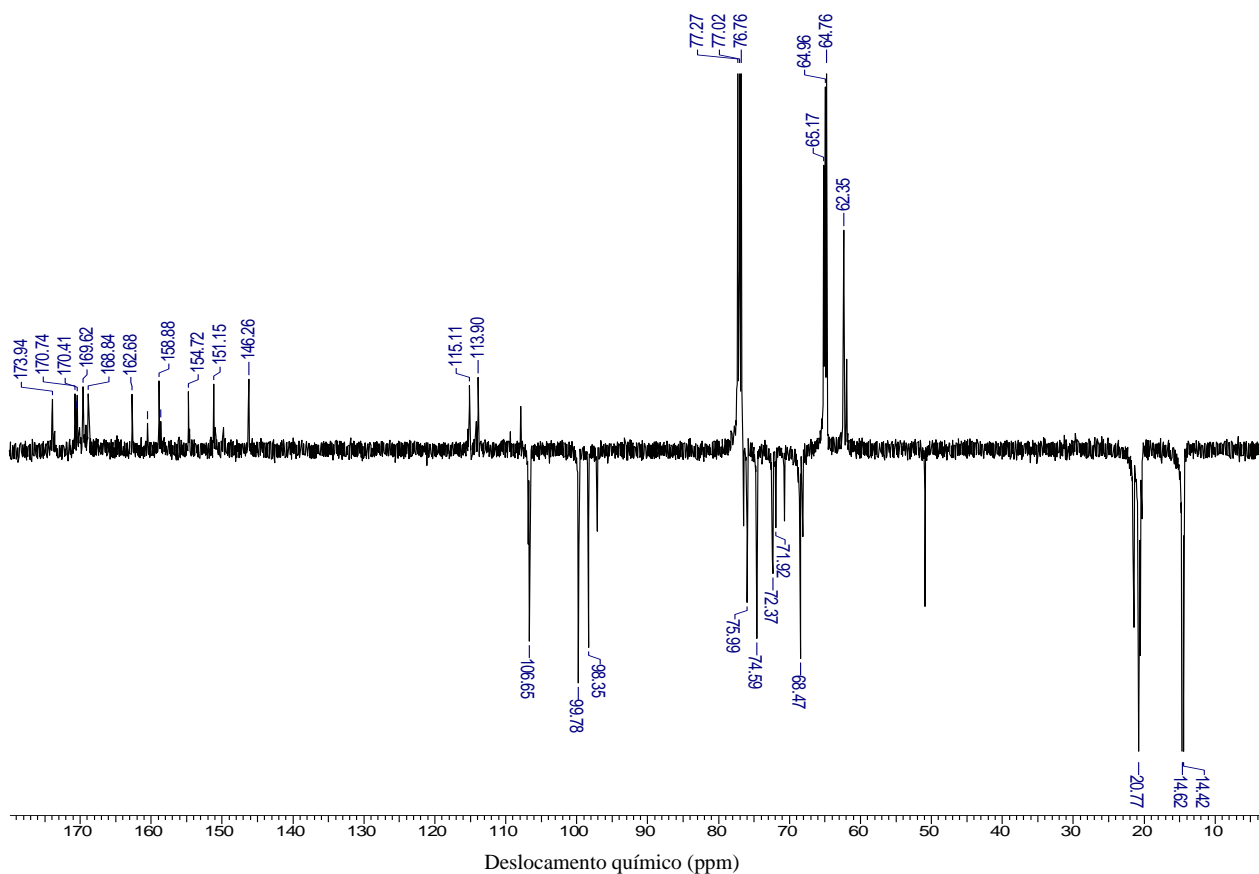
Espectro A.20. Espectro de EMAR (ES+) do derivado 2-β-D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-trietoxixantona **4**.



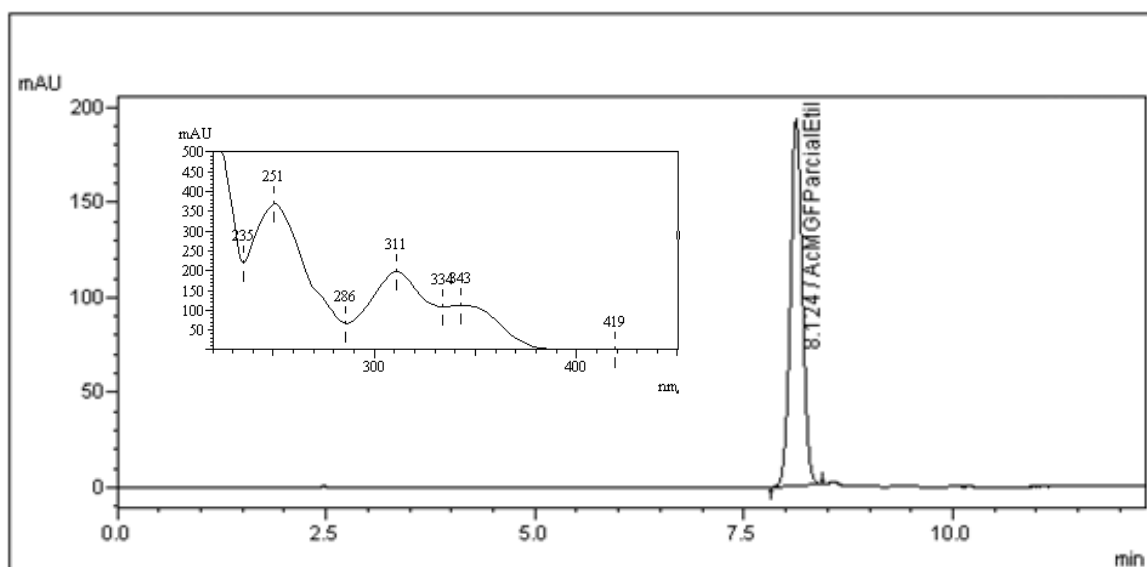
Espectro A.21. Espectro de IV de (2-β-D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-trietoxixantona) **4**.



Espectro A.22. Espectro de RMN ¹H (500MHz, CDCl₃) 2-β-D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-trietoxixantona **4**.

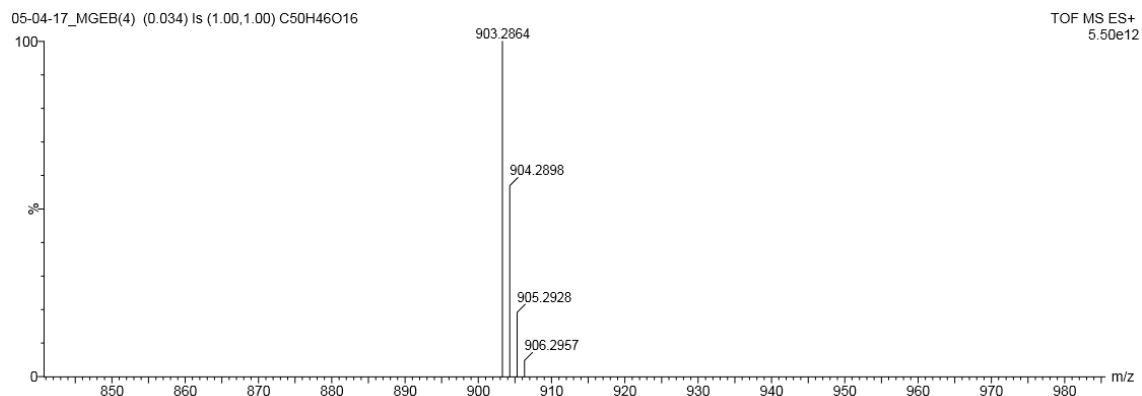


Espectro A.23. Espectro de RMN¹³C – DEPT Q (500MHz, CDCL₃) 2-β-D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-trietoxixantona **4**.

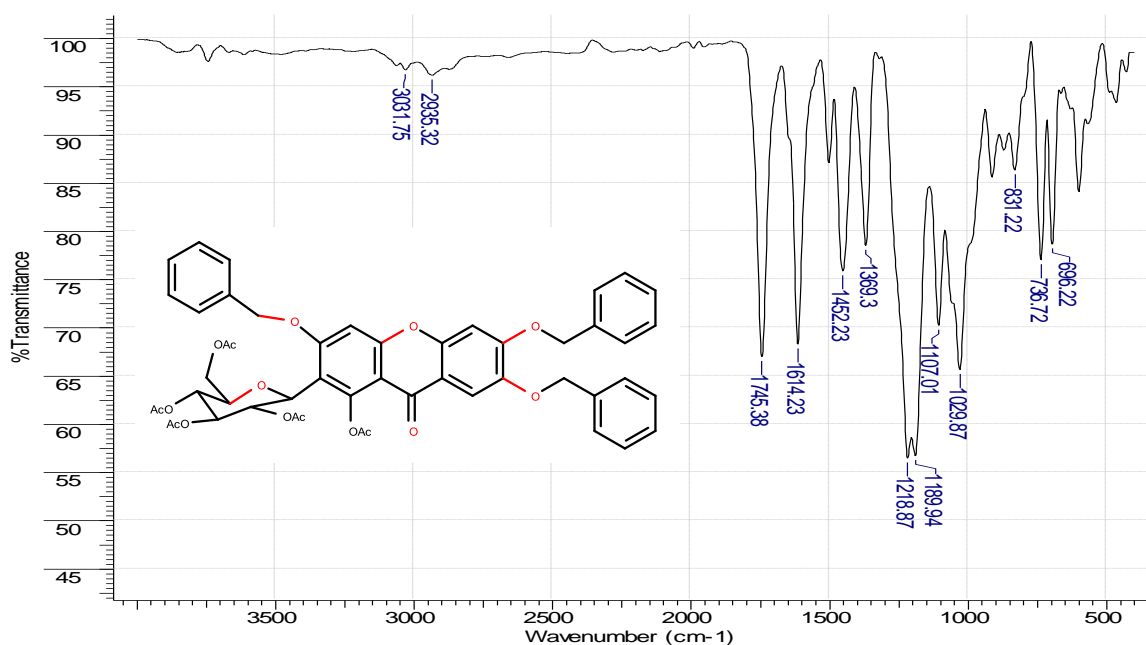


Espectro A.24. Análise por CLAE-DAD e curva no UV-Vis de 2-β-D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-trietoxixantona **4**.

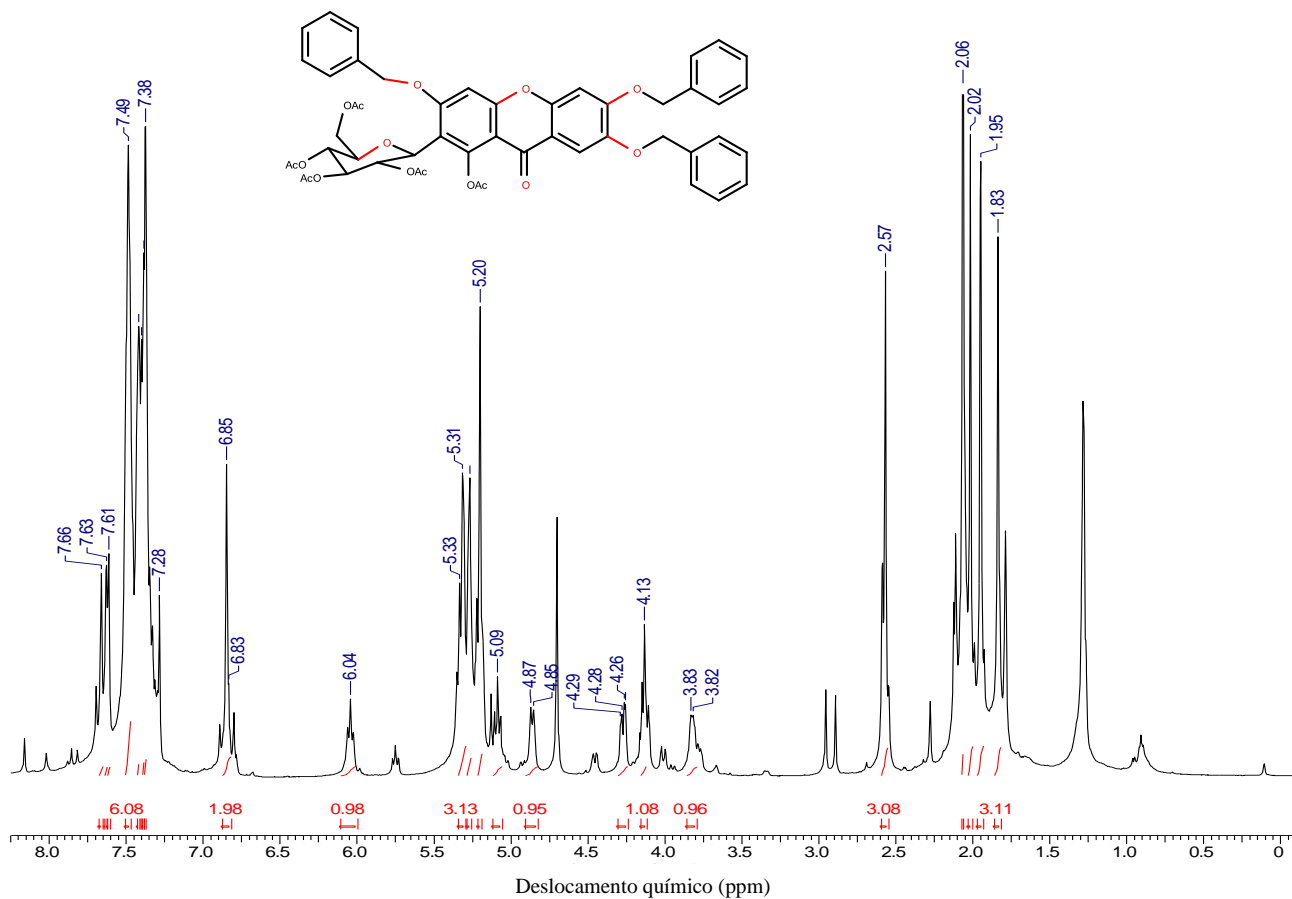
f) Derivado 5 (2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-tribenzilxantona)



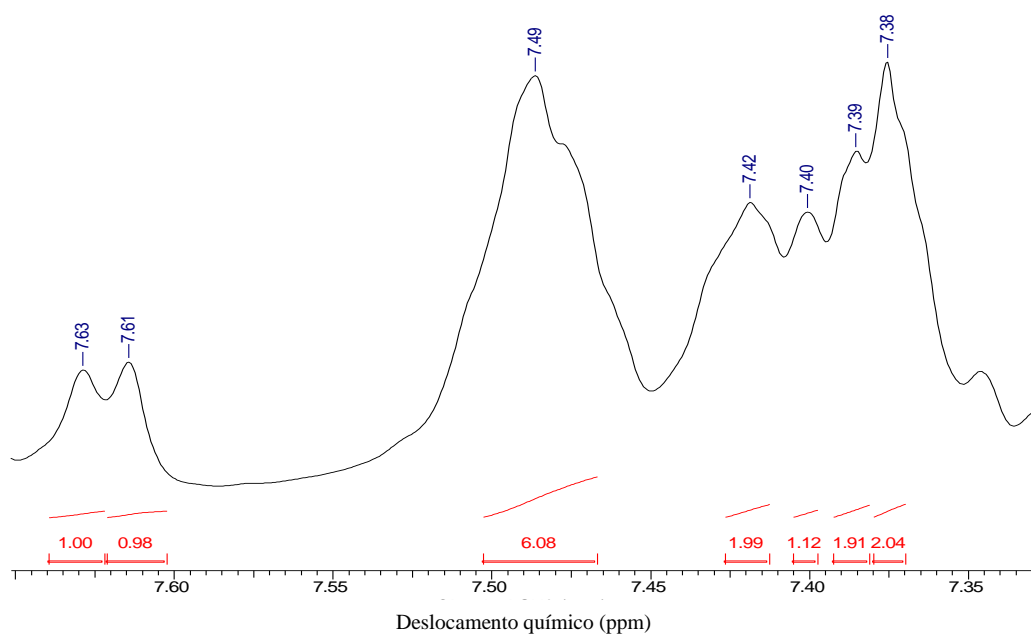
Espectro A.25. Espectro de EMAR (ES+) do derivado 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-tribenzilxantona 5.



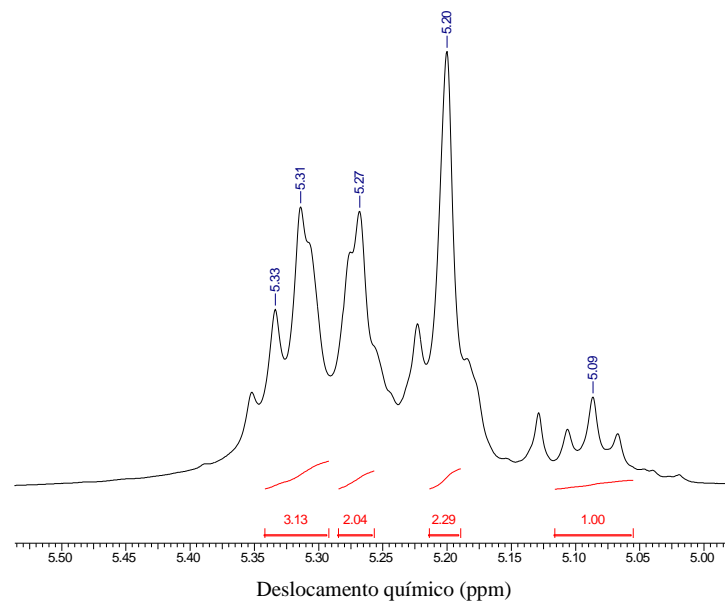
Espectro A.26. Espectro de IV 2- β -D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-tribenzilxantona 5.



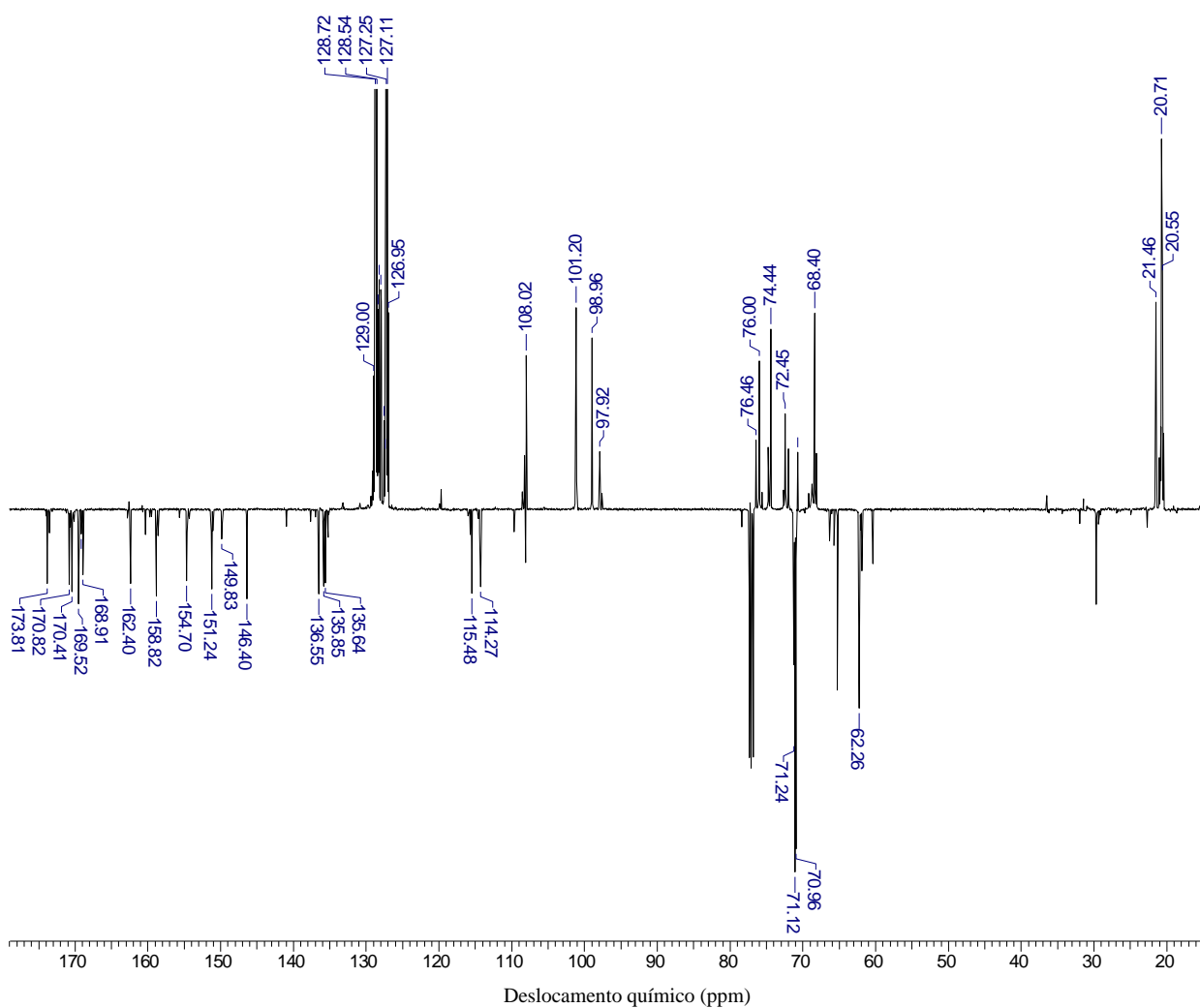
Espectro A.27. Espectro de RMN ^1H (500MHz, CDCl_3) 2-β-D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxy-3,6,7-tribenzilxantona **5**.



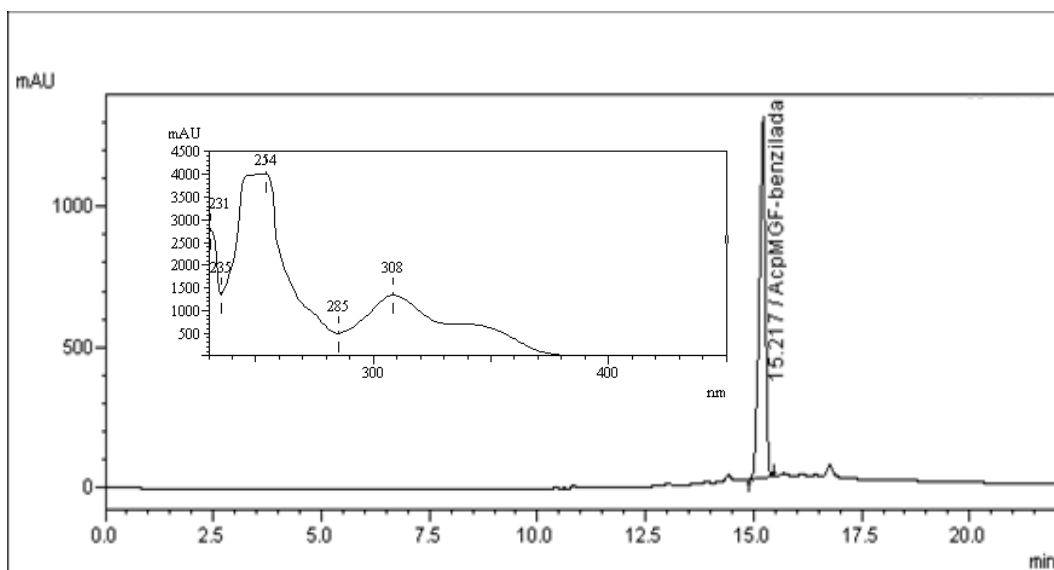
Espectro A.28. Ampliação da região (7,25-8,00 ppm) do espectro de RMN ^1H do derivado **5**.



Espectro A.29. Ampliação da região (5,00-5,40 ppm) do espectro de RMN ¹H do derivado **5**.



Espectro A.30. Espectro de RMN¹³C – DEPT Q (500MHz, CDCL₃) 2-β-D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-tribenzilxantona **5**.



Espectro A.31. Análise por CLAE-DAD e curva no UV-Vis de 2-β-D-tetraacetoxiglicopiranosil-1-acetoxi-3,6,7-tribenzilxantona **5**.

10.2. Estudo fotofísico

a) Espectros de absorção no UV-Vis

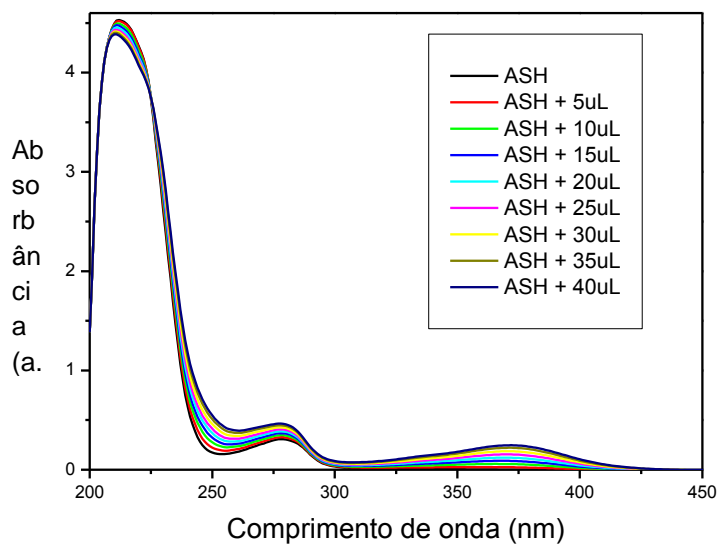


Figura A.32. Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH= 7,4) e contendo diferentes concentrações da xantona (AcMGF), $C_{ASH} = 1,0 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{AcMGF} = 0,17; 0,33; 0,50; 0,66; 0,83; 0,99; 1,15$ e $1,32 \times 10^{-5}$ mol/L).

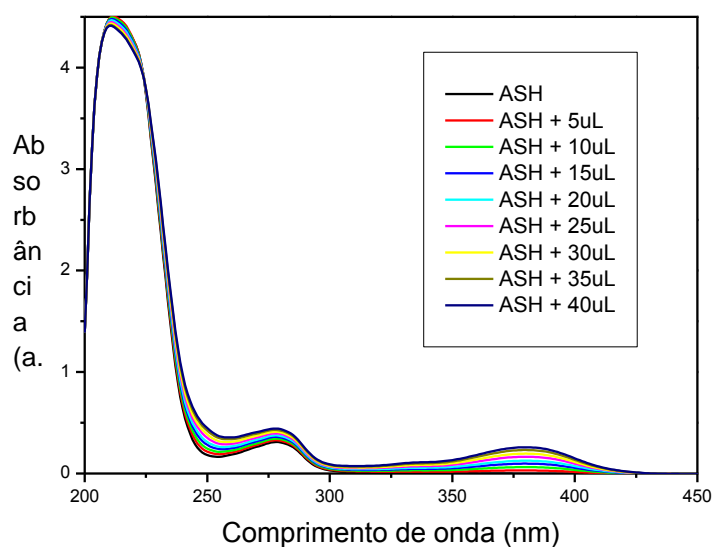


Figura A.33. Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH= 7,4) e contendo diferentes concentrações da xantona (PAcMGF), $C_{ASH} = 1,0 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{PAcMGF} = 0,17; 0,33; 0,50; 0,66; 0,83; 0,99; 1,15$ e $1,32 \times 10^{-5}$ mol/L).

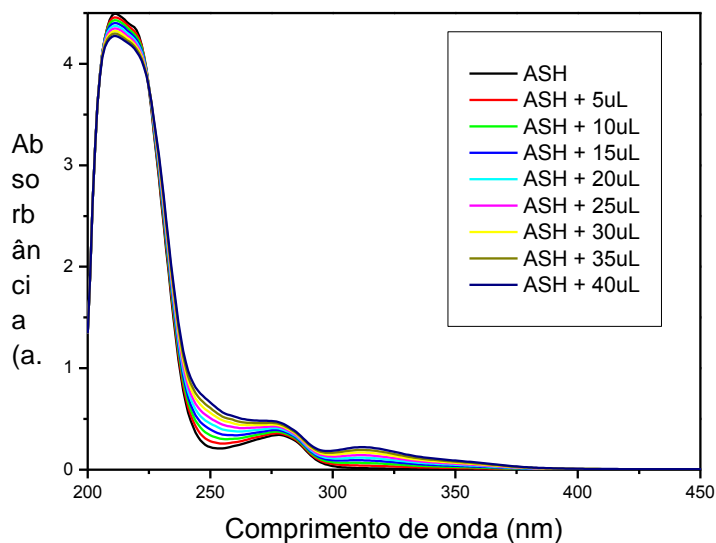


Figura A.34. Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH= 7,4) e contendo diferentes concentrações da xantona (PAcMGFMe), $C_{ASH} = 1,0 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{PAcMGFMe} = 0,17; 0,33; 0,50; 0,66; 0,83; 0,99; 1,15$ e $1,32 \times 10^{-5}$ mol/L).

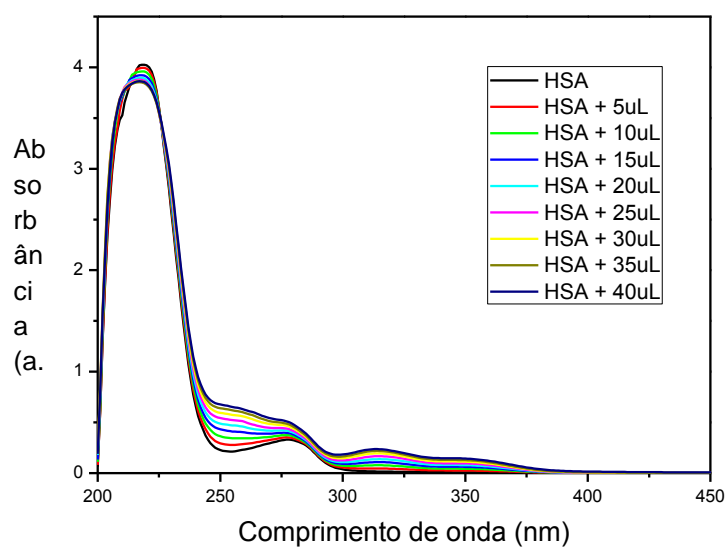


Figura A.35. Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH= 7,4) e contendo diferentes concentrações da xantona (PACMGFEt), $C_{ASH} = 1,0 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{PACMGFEt} = 0,17; 0,33; 0,50; 0,66; 0,83; 0,99; 1,15$ e $1,32 \times 10^{-5}$ mol/L).

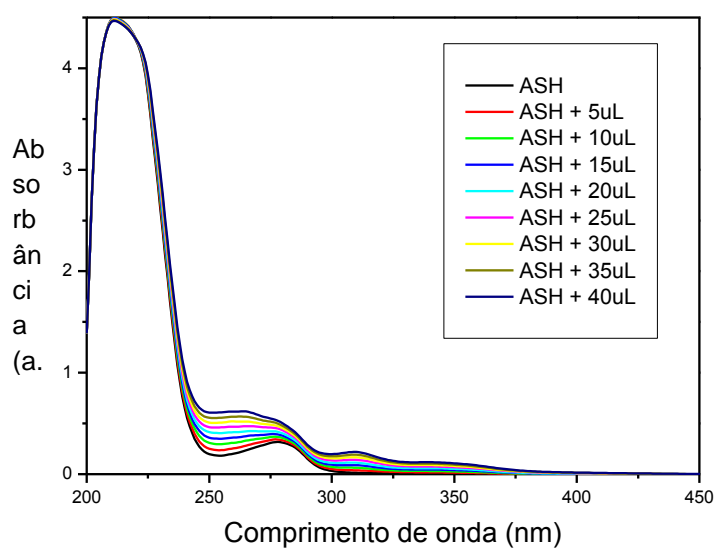


Figura A.36. Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH= 7,4) e contendo diferentes concentrações da xantona (PACMGFBz), $C_{ASH} = 1,0 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{PACMGFBz} = 0,17; 0,33; 0,50; 0,66; 0,83; 0,99; 1,15$ e $1,32 \times 10^{-5}$ mol/L).

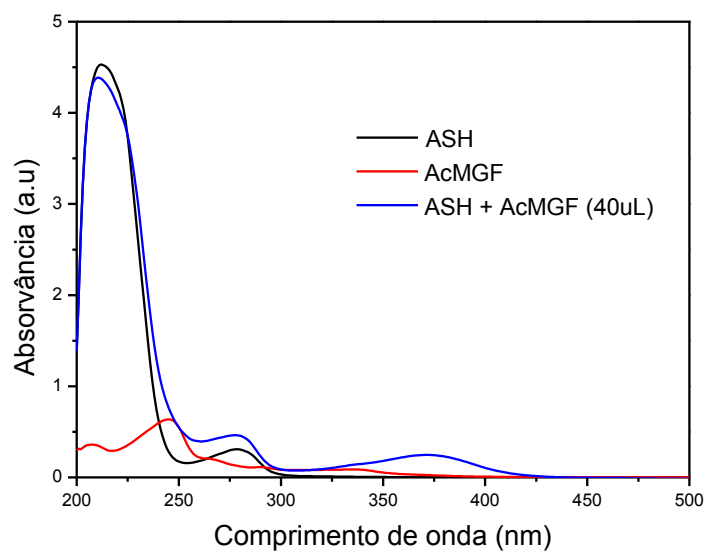


Figura A.37. Espectros de absorção de ASH 10^{-5} mol/L em preto, ASH + 40uL de AcMGF em azul e AcMGF em metanol, vermelho.

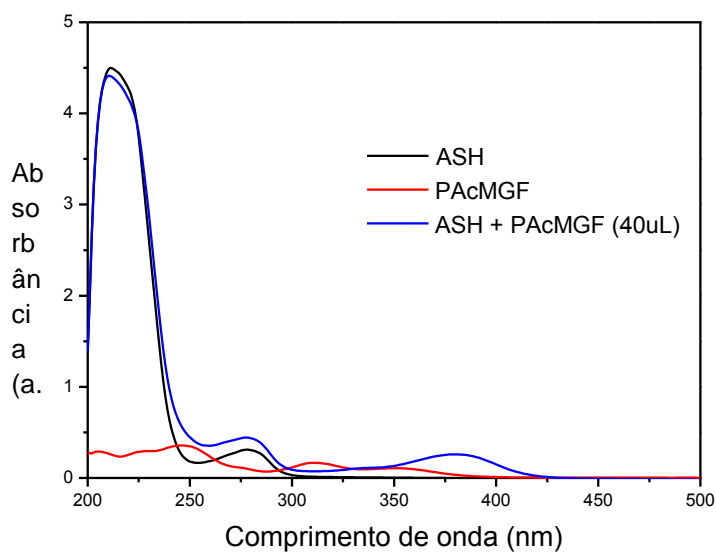


Figura A.38. Espectros de absorção de ASH 10^{-5} mol/L em preto, ASH + 40uL de PAcMGF em azul e PAcMGF em metanol, vermelho.

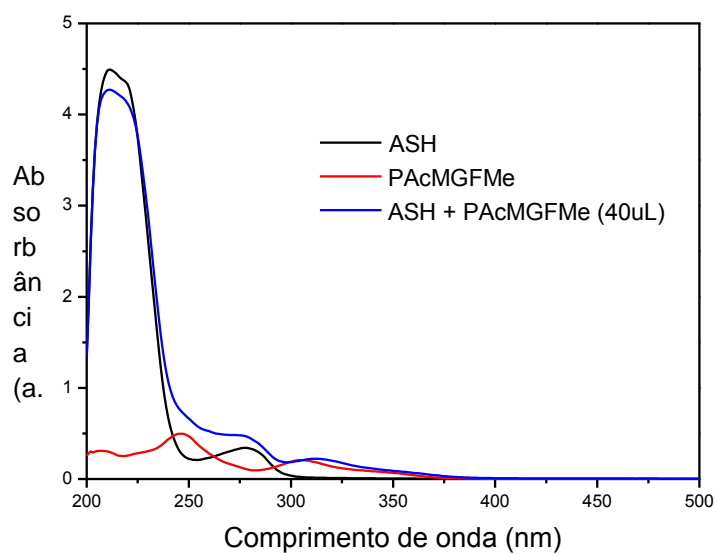


Figura A.39. Espectros de absorção de ASH 10^{-5} mol/L em preto, ASH + 40uL de PAcMGFMe em azul e PAcMGFMe em metanol, vermelho.

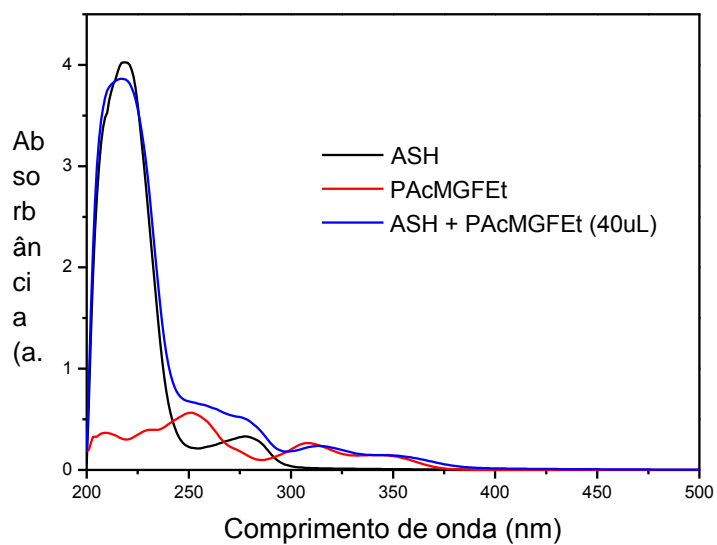


Figura A.40. Espectros de absorção de ASH 10^{-5} mol/L em preto, ASH + 40uL de PAcMGFEt em azul e PAcMGFEt em metanol, vermelho.

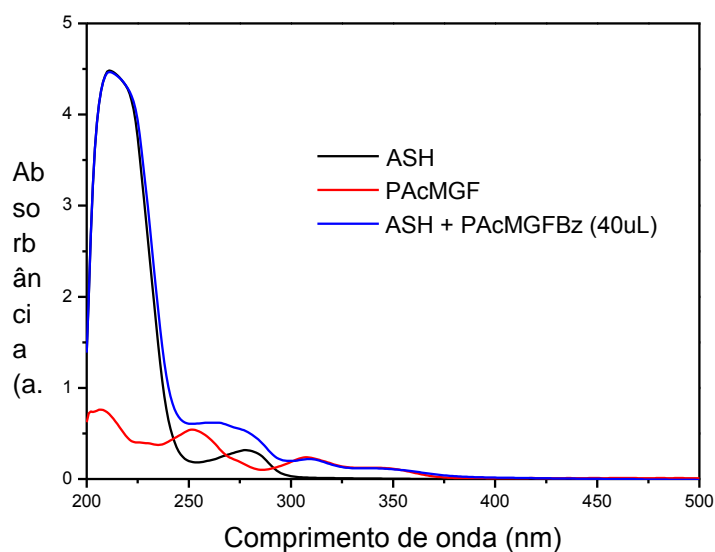


Figura A.41. Espectros de absorção de ASH 10^{-5} mol/L em preto, ASH + 40uL de PAcMGFBz em azul e PAcMGFBz em metanol, vermelho.

b) Espectros de emissão de fluorescência

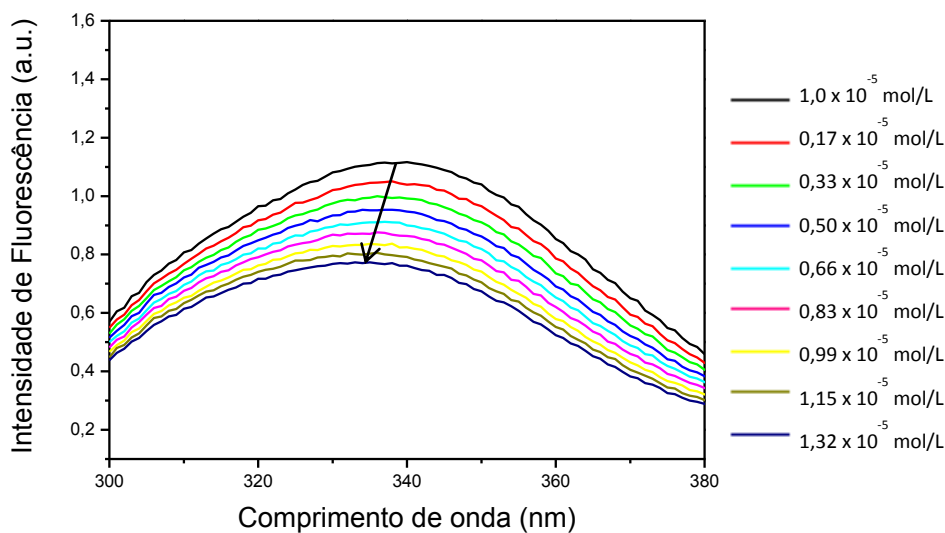


Figura A.42. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280\text{nm}$) do fluoróforo interno da ASH (Trp-214) e sua supressão pela adição de AcMGF. ASH em solução tampão PBS (pH= 7,4) em (AcMGF), $C_{ASH} = 1,0 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{AcMGF} = 0.17, 0.33, 0.50, 0.66, 0.83, 0.99, 1.15$ e 1.32×10^{-5} mol/L), a $T= 310\text{K}$.

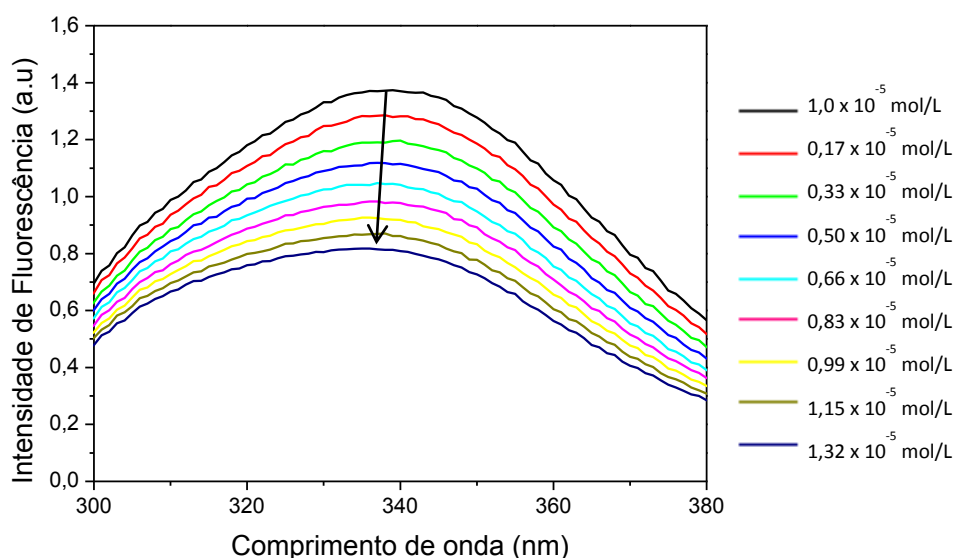


Figura A.43. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280\text{nm}$) do fluoróforo interno da ASH (Trp-214) e sua supressão pela adição de PAcMGF. ASH em solução tampão PBS (pH= 7,4) em (PAcMGF), $C_{ASH} = 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{PAcMGF} = 0.17, 0.33, 0.50, 0.66, 0.83, 0.99, 1.15$ e $1.32 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, a $T= 310\text{K}$.

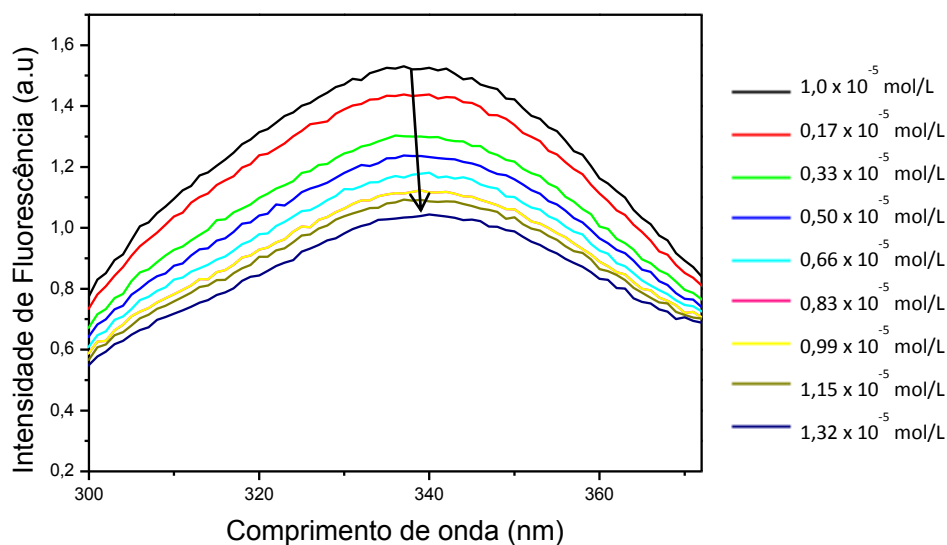


Figura A.44. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280\text{nm}$) do fluoróforo interno da ASH (Trp-214) e sua supressão pela adição de PAcMGFMe. ASH em solução tampão PBS (pH= 7,4) em (PAcMGFMe), $C_{ASH} = 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{PAcMGFMe} = 0.17, 0.33, 0.50, 0.66, 0.83, 0.99, 1.15$ e $1.32 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, a $T= 310\text{K}$.

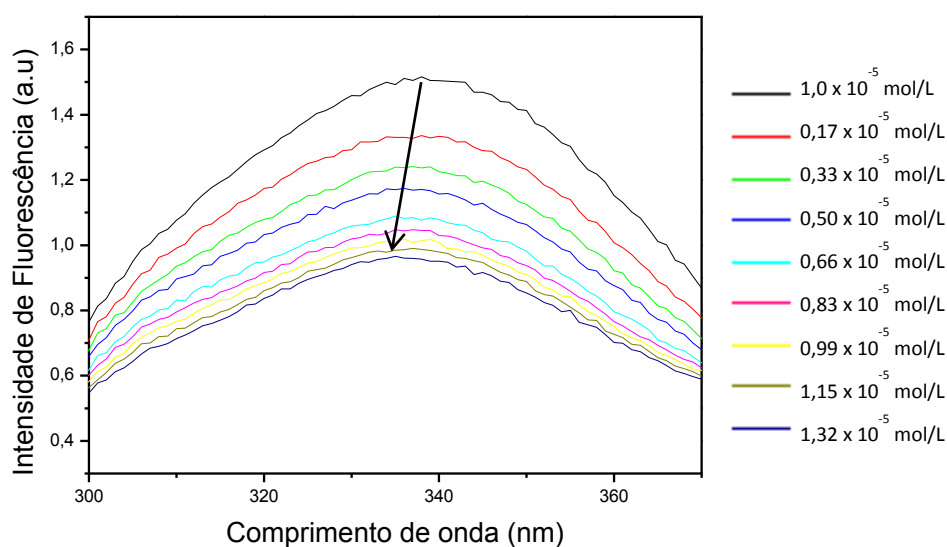


Figura A.45. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280\text{nm}$) do fluoróforo interno da ASH (Trp-214) e sua supressão pela adição de PAcMGFEt. ASH em solução tampão PBS (pH= 7,4) em (PAcMGFEt), $C_{ASH} = 1,0 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{PAcMGFEt} = 0.17, 0.33, 0.50, 0.66, 0.83, 0.99, 1.15$ e 1.32×10^{-5} mol/L), a $T= 310\text{K}$.

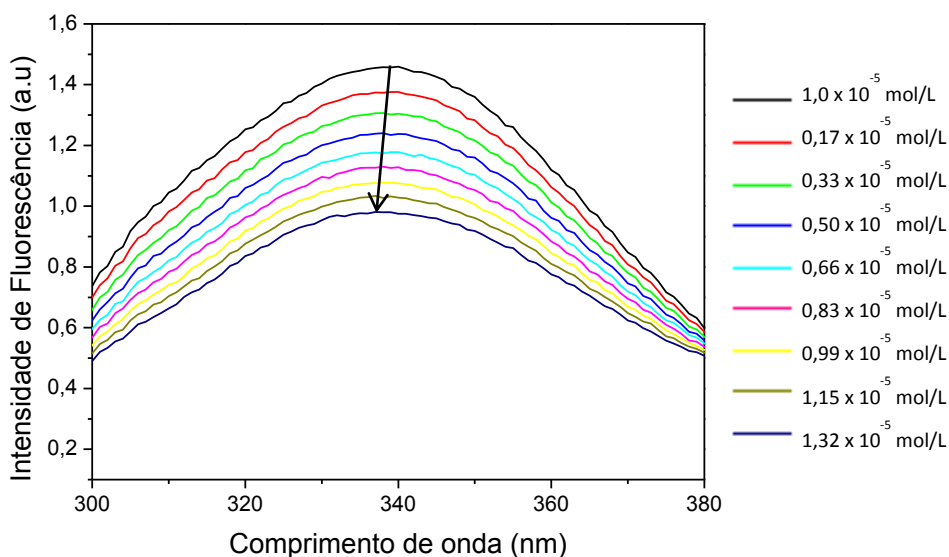


Figura A.46. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280\text{nm}$) do fluoróforo interno da ASH (Trp-214) e sua supressão pela adição de PAcMGFBz. ASH em solução tampão PBS (pH= 7,4) em mangiferina (PAcMGFBz), $C_{ASH} = 1,0 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{PAcMGFBz} = 0.17, 0.33, 0.50, 0.66, 0.83, 0.99, 1.15$ e 1.32×10^{-5} mol/L), a $T= 310\text{K}$.

c) Gráficos de Stern-Volmer

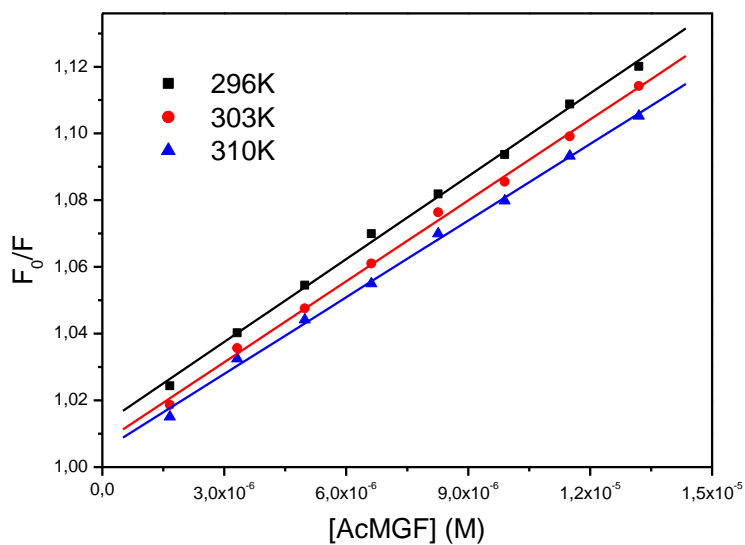


Figura A.47. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280\text{nm}$) pela (AcMGF) a diferentes temperaturas. $C_{ASH} = 1.00 \times 10^{-5}$ mol/L e um pH = 7,4.

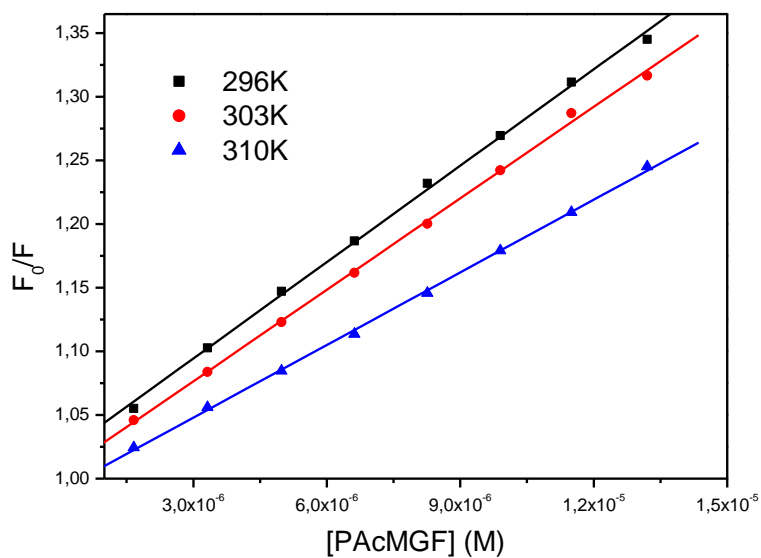


Figura A.48. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280\text{nm}$) pela (PAcMGF) a diferentes temperaturas. $C_{ASH} = 1.00 \times 10^{-5}$ mol/L e um pH = 7,4.

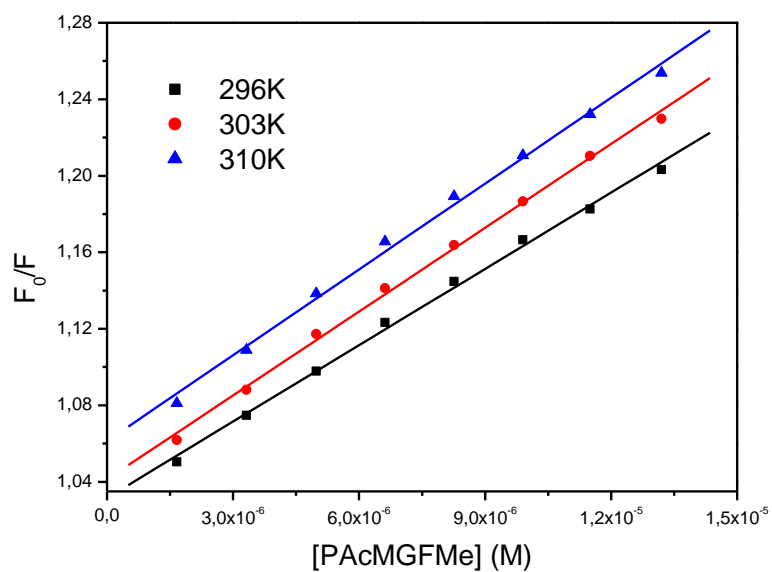


Figura A.49. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280\text{nm}$) pela (PacMGFMe) a diferentes temperaturas. $C_{ASH} = 1.00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e um $\text{pH} = 7,4$.

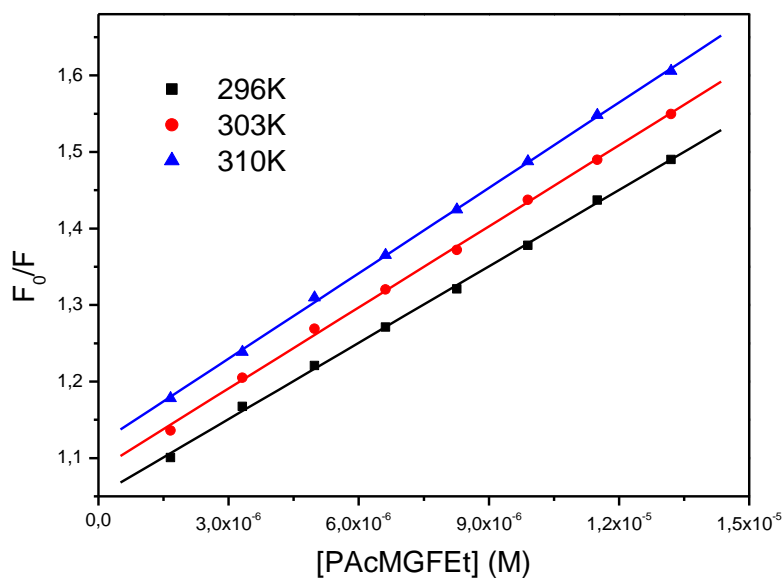


Figura A.50. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280\text{nm}$) pela (PacMGFEt) a diferentes temperaturas. $C_{ASH} = 1.00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e um $\text{pH} = 7,4$.

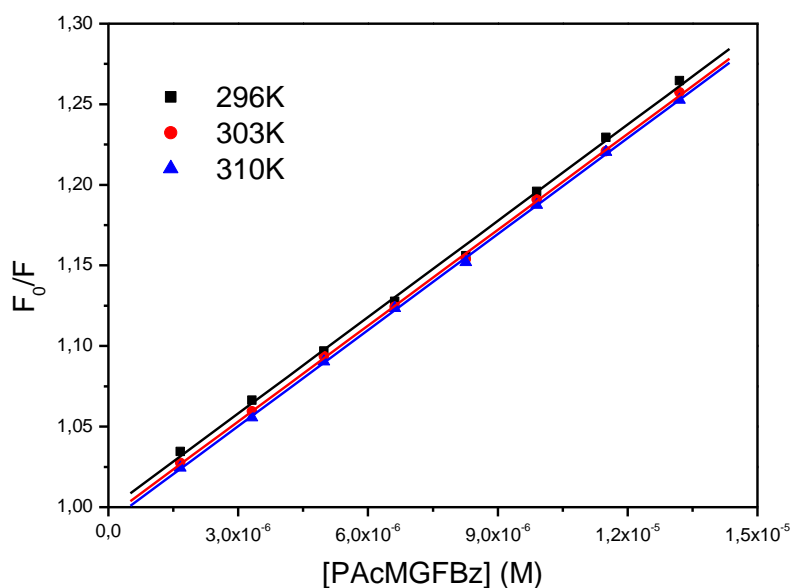


Figura A.51. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280\text{nm}$) pela (PAcMGFBz) a diferentes temperaturas. $C_{ASH} = 1.00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e um $\text{pH} = 7,4$.

d) Gráficos modificado de Stern-Volmer

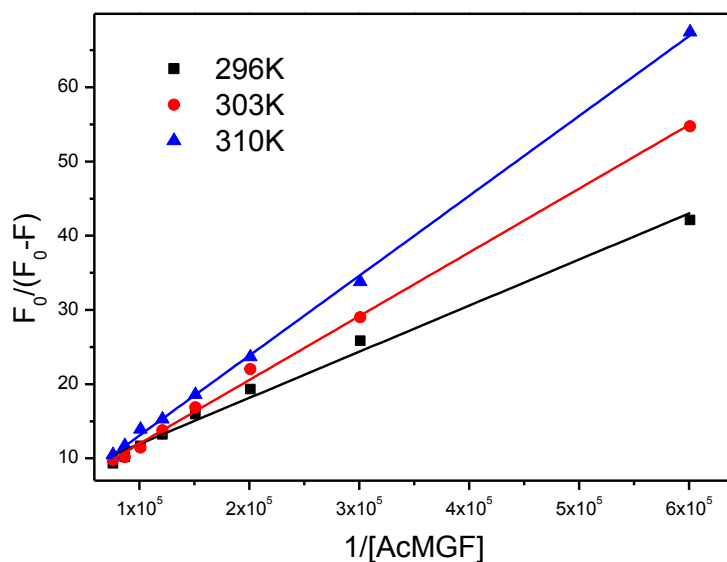


Figura A.52. Gráfico modificado de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência ASH: AcMGF, sistema a diferentes temperaturas. $C_{ASH} = 1.00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $\text{pH} = 7,4$.

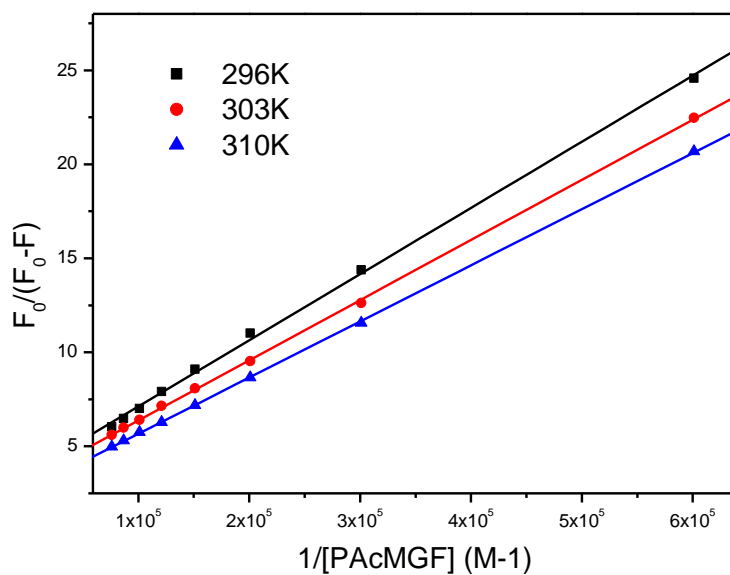


Figura A.53. Gráfico modificado de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência ASH: PACMGF, sistema a diferentes temperaturas. $C_{ASH} = 1.00 \times 10^{-5}$ mol/L e pH = 7,4.

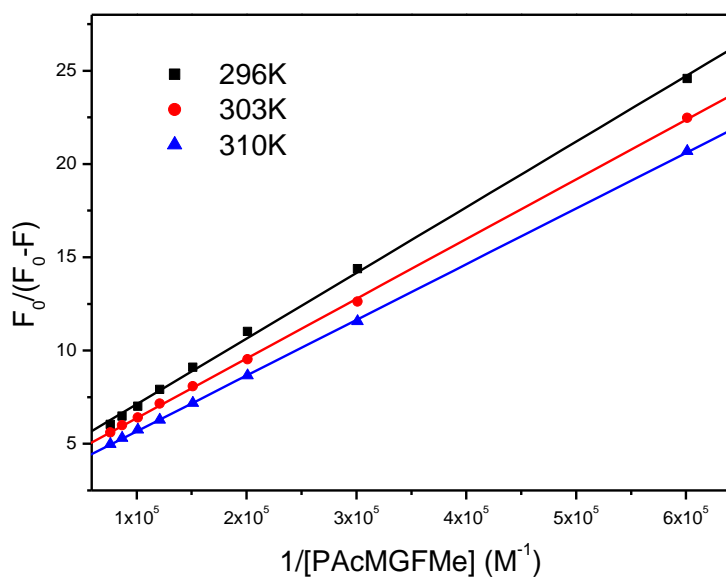


Figura A.54. Gráfico modificado de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência ASH: PACMGFMe, sistema a diferentes temperaturas. $C_{ASH} = 1.00 \times 10^{-5}$ mol/L e pH = 7,4.

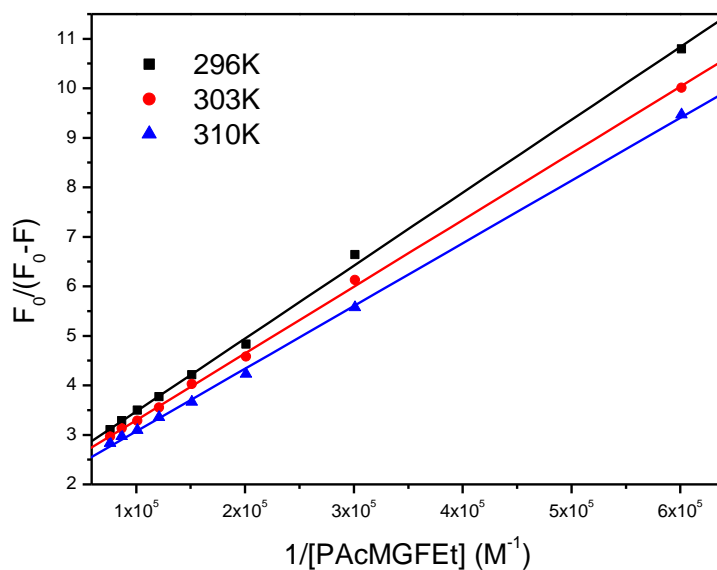


Figura A.55. Gráfico modificado de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência ASH: PAcMGFEt, sistema a diferentes temperaturas. $C_{ASH} = 1.00 \times 10^{-5}$ mol/L e $pH = 7,4$.

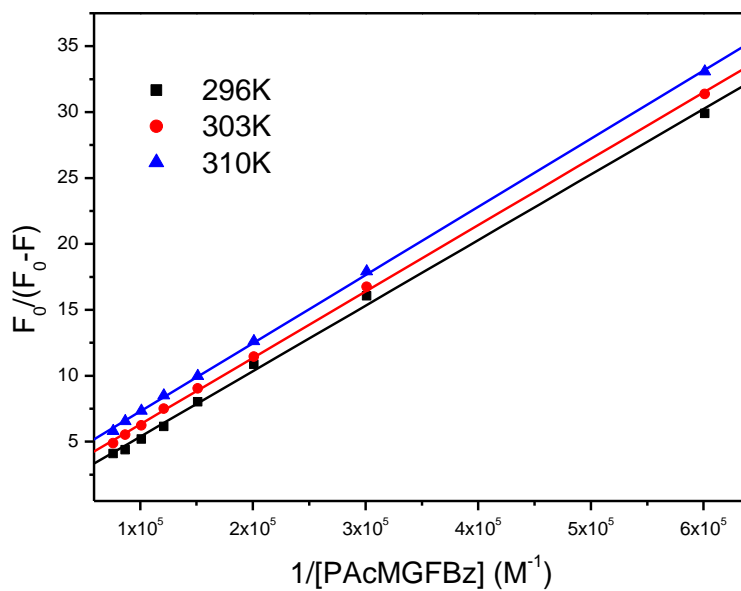


Figura A.56. Gráfico modificado de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência ASH: PAcMGFBz, sistema a diferentes temperaturas. $C_{ASH} = 1.00 \times 10^{-5}$ mol/L e $pH = 7,4$.

e) Gráficos de Van't Hoff para associação Proteína-Ligantes

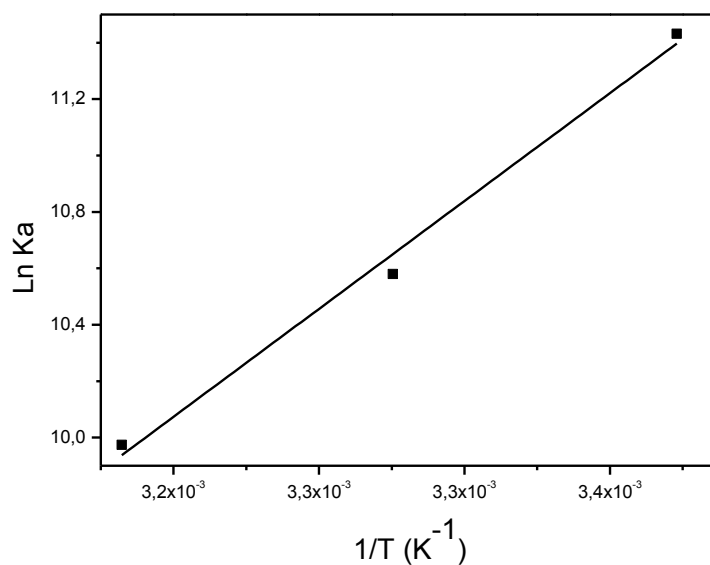


Figura A.57. Gráfico de Van't Hoff para associação ASH: AcMGF a três temperaturas diferentes.

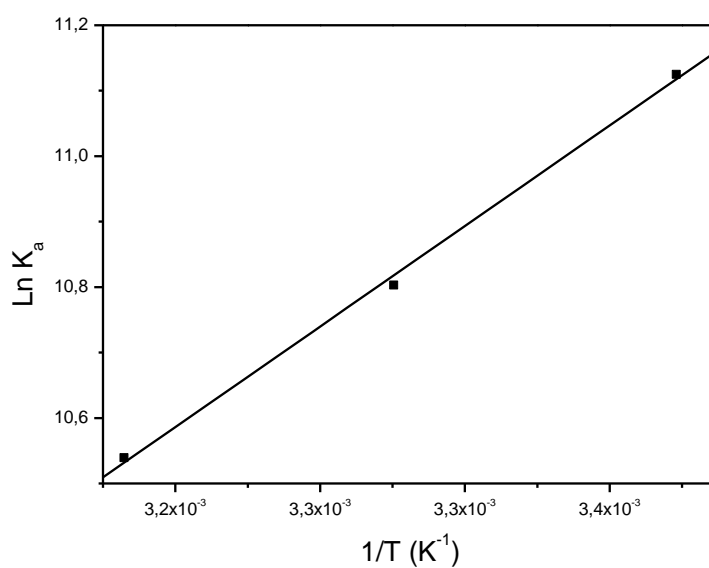


Figura A.58. Gráfico de Van't Hoff para associação ASH: PAcMGF a três temperaturas diferentes.

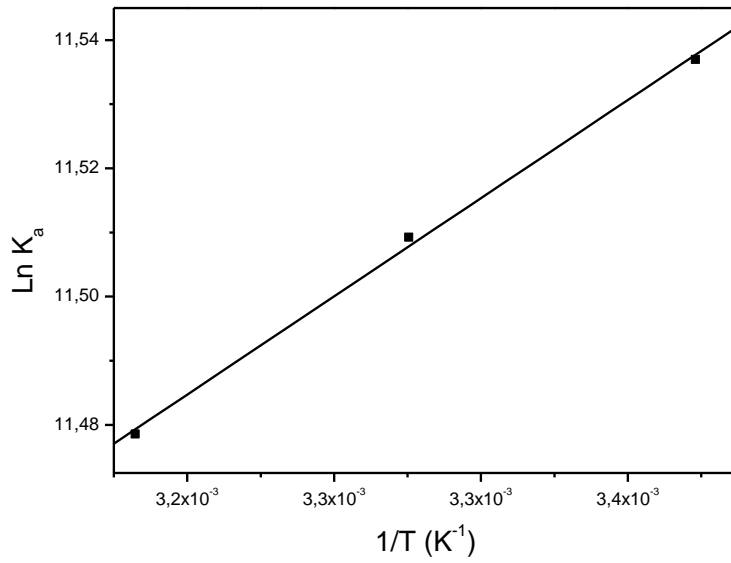


Figura A.59. Gráfico de Van't Hoff para associação ASH: PACMGFMe a três temperaturas diferentes.

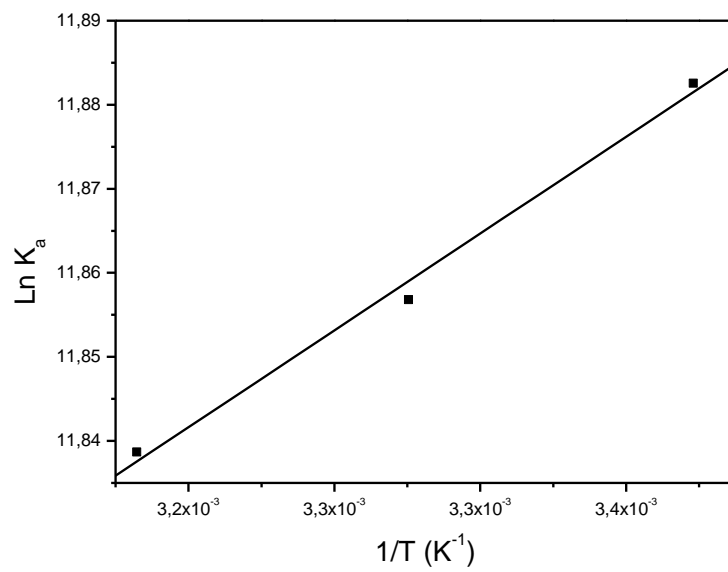


Figura A.60. Gráfico de Van't Hoff para associação ASH: PACMGFET a três temperaturas diferentes.

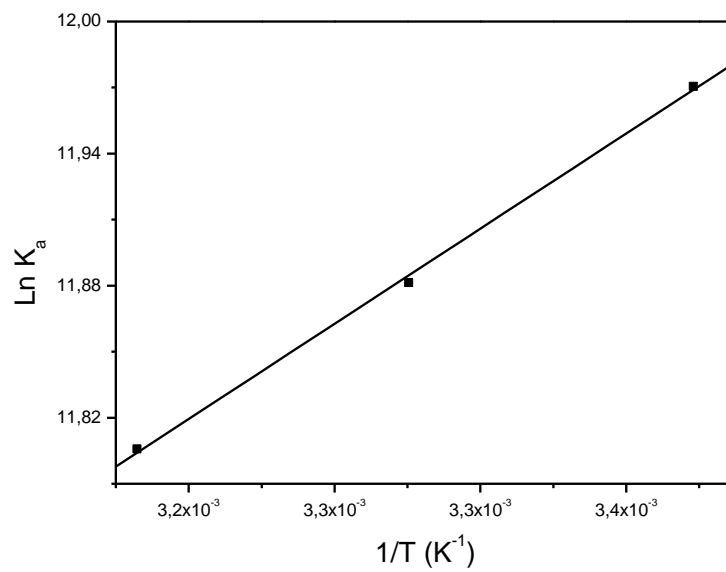


Figura A.61. Gráfico de Van't Hoff para associação ASH: PAcMGFBz a três temperaturas diferentes.

f) Gráficos de competição

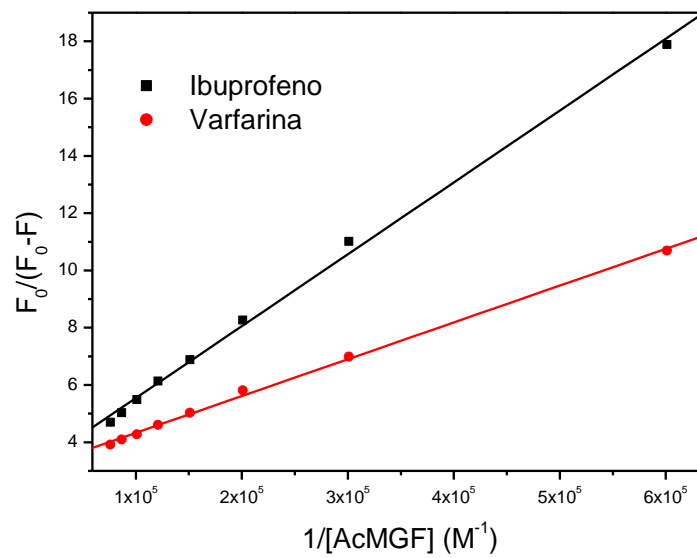


Figura A.62. Gráfico de competição para AcMGF proteína ASH e marcadores Ibuprofeno e Varfarina a temperatura 310K.

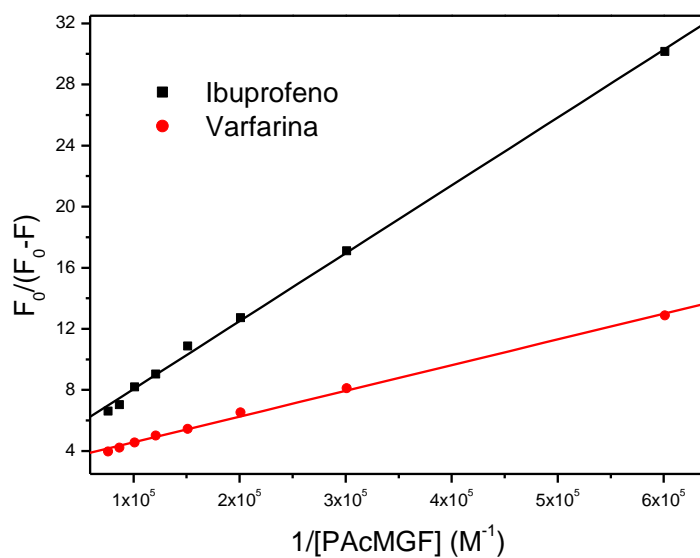


Figura A.63. Gráfico de competição para PAcMGF proteína ASH e marcadores Ibuprofeno e Varfarina a temperatura 310K.

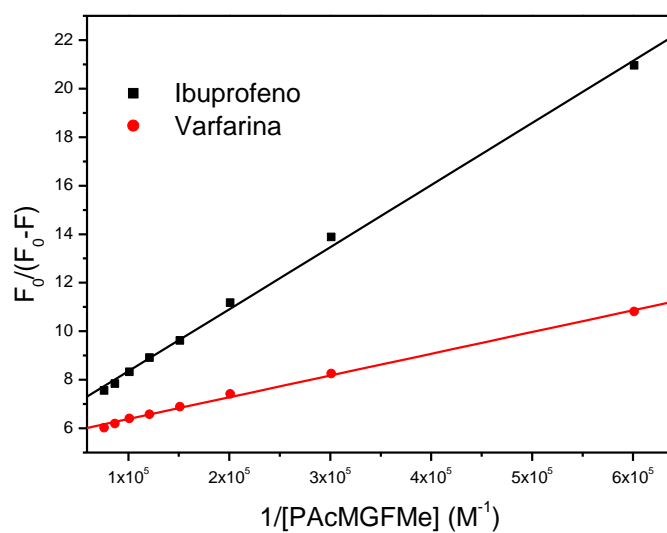


Figura A.64. Gráfico de competição para PAcMGFMe proteína ASH e marcadores Ibuprofeno e Varfarina a temperatura 310K.

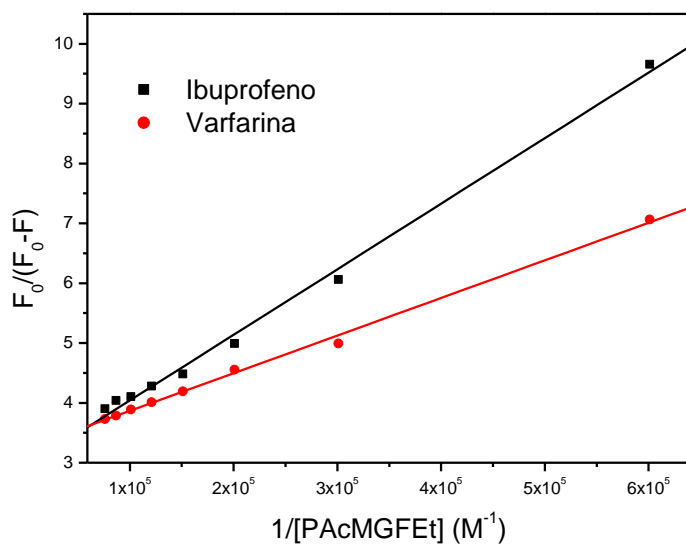


Figura A.65. Gráfico de competição para PAcMGFEt proteína ASH e marcadores Ibuprofeno e Varfarina a temperatura 310K.

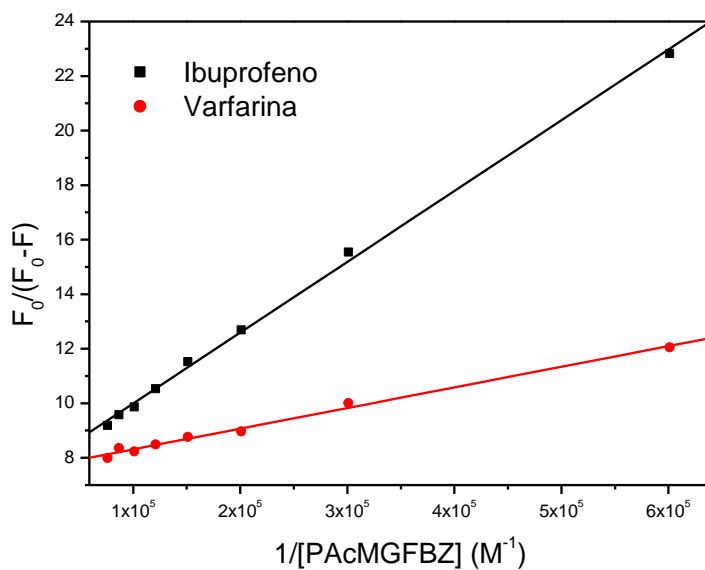


Figura A.66. Gráfico de competição para PAcMGFBZ proteína ASH e marcadores Ibuprofeno e Varfarina a temperatura 310K.

g) Espectros de dicroísmo circular

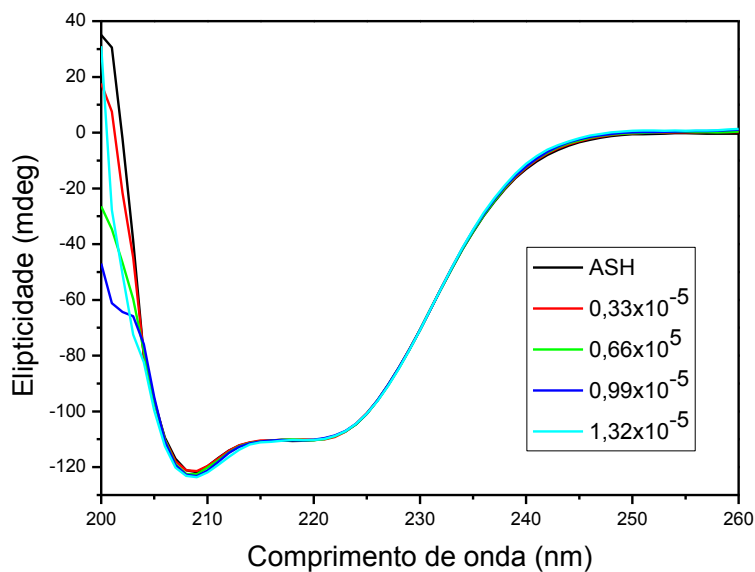


Figura A.67. Espectros de dicroísmo circular para ASH pH=7.4 em (AcMGF), nas concentrações $C_{AcMGF} = 0,33, 0,66, 0,99$ e $1,32 \times 10^{-5}$ mol/L, $C_{HSA} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L a 310K.

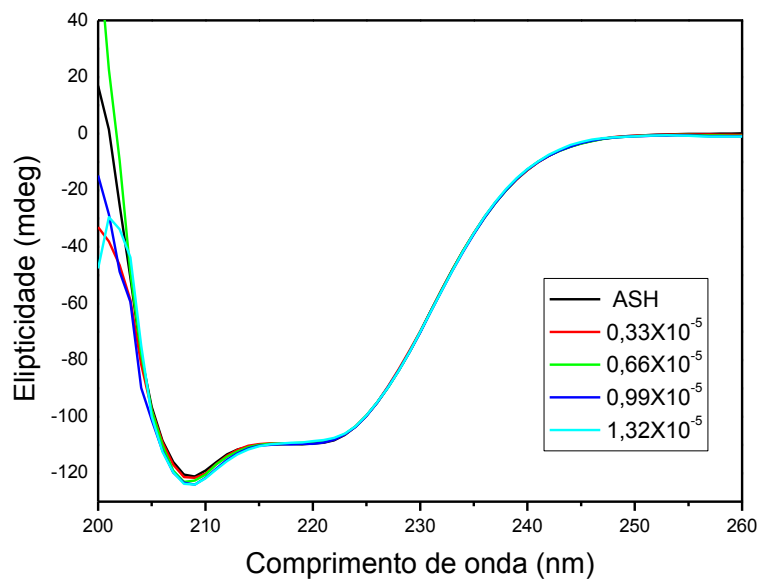


Figura A.68. Espectros de dicroísmo circular para ASH pH=7.4 em (PAcMGF), nas concentrações $C_{PAcMGF} = 0,33, 0,66, 0,99$ e $1,32 \times 10^{-5}$ mol/L, $C_{HSA} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L a 310K.

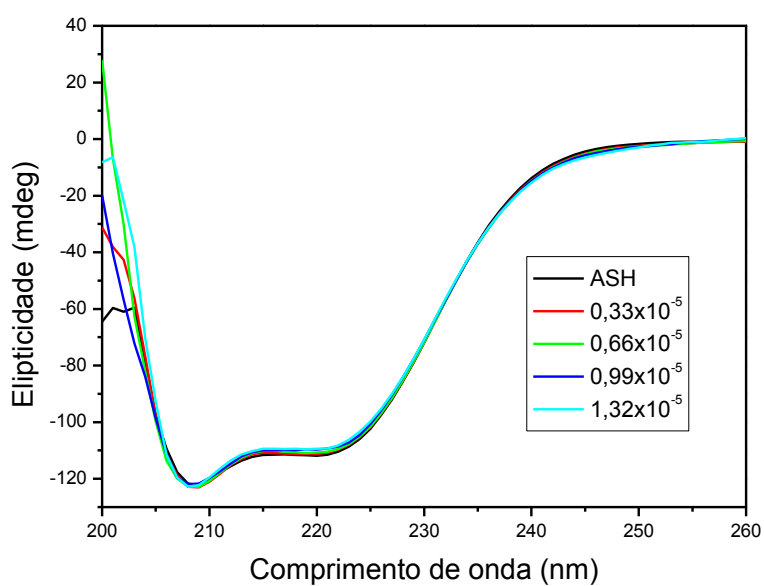


Figura A.69. Espectros de dicroísmo circular para ASH pH=7.4 em (PAcMGFMe), nas concentrações $C_{\text{PAcMGFMe}} = 0,33, 0,66, 0,99$ e $1,32 \times 10^{-5}$ mol/L, $C_{\text{HSA}} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L a 310K.

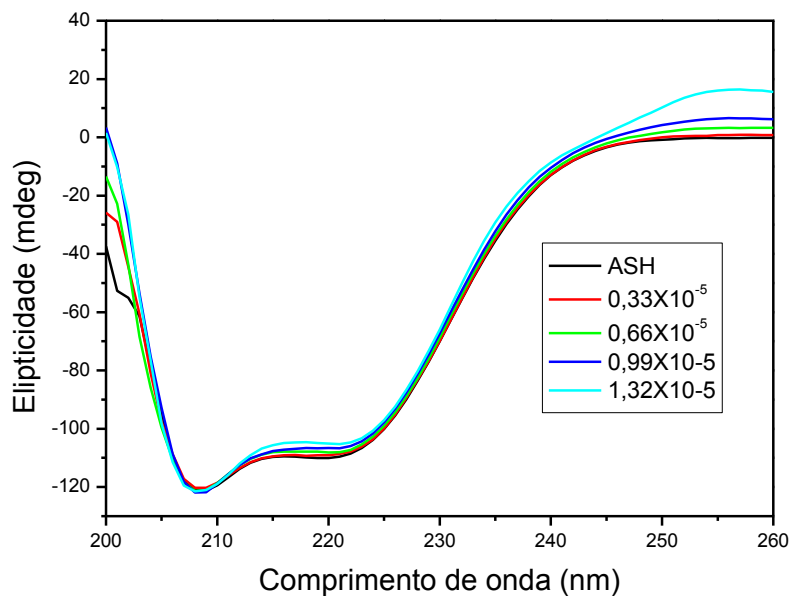


Figura A.70. Espectros de dicroísmo circular para ASH pH=7.4 em (PAcMGFEt), nas concentrações $C_{\text{PAcMGFEt}} = 0,33, 0,66, 0,99$ e $1,32 \times 10^{-5}$ mol/L, $C_{\text{HSA}} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L a 310K.

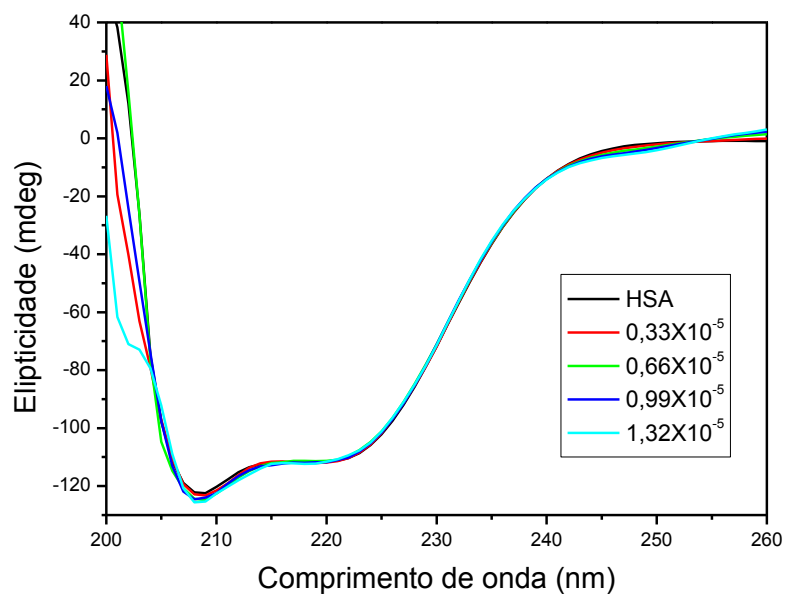


Figura A.71. Espectros de dicroísmo circular para ASH pH=7.4 em (PAcMGFBz), nas concentrações $C_{\text{PAcMGFBz}} = 0,33, 0,66, 0,99$ e $1,32 \times 10^{-5}$ mol/L, $C_{\text{HSA}} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L a 310K.