



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102017003112-8

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102017003112-8

(22) Data do Depósito: 16/02/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 02/10/2018

(51) Classificação Internacional: A61K 35/644; C07D 311/38; A61P 33/02.

(54) Título: PROCESSO DE OBTENÇÃO, ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ISOFLAVONOIDE BOLUSANTHOL D (4,7,2- TRIIDROXI-4-METOXI-ISOFLAVANOL)

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS, Sociedade com intuito não econômico. CGC/CPF: 24464109000148. Endereço: AV. LOURIVAL MELO MOTA, S/N, TABULEIRO DO MARTINS, Maceió, AL, BRASIL(BR), 57072-970, Brasileira

(72) Inventor: TICIANO GOMES DO NASCIMENTO; JOSÉ MARCOS DOS SANTOS OLIVEIRA; SÂMIA ANDRÍCIA SOUZA DA SILVA; EDSON DE SOUZA BENTO; ADILSON RODRIGUES SABINO; JOSEALDO TONHOLO; IRINALDO DINIZ BASÍLIO JÚNIOR; ISABEL CRISTINA CELERINO DE MORAES PORTO; JOHNNATAN DUARTE DE FREITAS; ALAN JOHN DUARTE DE FREITAS; DEMETRIUS PEREIRA MORILLA; JONAS DOS SANTOS SOUSA; PABLO HENRIQUE DE SOUZA LIMA; CRISTIAN BERNARDO DA SILVA; CARLA KARINE BARBOSA PEREIRA; JOÃO VICTOR LESSA DE OLIVEIRA.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 16/02/2017, observadas as condições legais

Expedida em: 15/10/2024

Assinado digitalmente por:

Alexandre Dantas Rodrigues

Diretor de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

Relatório Descritivo para a patente de invenção:

**"PROCESSO DE OBTENÇÃO, ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO DO ISOFLAVONOIDE BOLUSANTHOL D (4,7,2'-
TRIIDROXI-4'-METOXI-ISOFILAVANOL) "**

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção está inserida no campo da química de produtos naturais no processo de obtenção e isolamento do metabólito secundário bolusanthol D (3R,4R)-3-(2-Hydroxy-4-methoxyphenyl)-4,7-chromanediol, Figura 1), pertencente à classe dos isoflavonóides, a partir do extrato bioativo da Própolis Vermelha de Alagoas (PVA). Adicionalmente, são propostos os processos de caracterização do marcador químico "Bolusanthol D" através de diferentes técnicas cromatográficas e espectroscópicas para a sua elucidação químico-estrutural. Por fim, são propostos os usos do "Bolusanthol D" com atividade leishmanicida frente à espécie *Leishmania braziliensis* e como marcador químico de identificação e padronização dos extratos bruto e hexânico da própolis vermelha de Alagoas.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] A literatura descreve que a própolis é utilizada pelo ser humano desde o Egito Antigo (como ingrediente no processo de embalsamento de pessoas e animais) até a atual medicina popular (como agente antimicrobiano e cicatrizante), sendo o seu uso popular bem estabelecido na história da humanidade (KUROPATNICKI, A.K.; SZLISZKA, E.; KROL, W. Historical aspects of propolis research in modern times. **Evidence-Based Complementary and alternative Medicine**. v.2013, article ID964149, p.1-11, 2013).

[003] A caracterização da composição química da PVA, através da identificação e quantificação de seus marcadores por

diversos métodos cromatográficos e espectroscópicos, é de extrema importância para a garantia do controle de qualidade desse bioproduto e também de seus produtos derivados. O "Bolusanthol D", ora identificado e extraído da PVA, até o momento não havia sido identificado como parte da composição de nenhum outro tipo de própolis. Desse modo, o isoflavonóide "Bolusanthol D isolado por esse processo pode ser utilizado como padrão analítico no controle de qualidade da Própolis Vermelha de Alagoas *in natura*, bem como dos seus extratos e produtos derivados, configurando uma espécie de impressão digital deste tipo especial de própolis. O Bolusanthol D contido em extratos e tinturas de Própolis Vermelha de Alagoas e isolado por esse método, pode ser utilizado também como padrão químico em estudos de desenvolvimento de novas composições nutracêuticas, farmacêuticas, cosméticas e como padrão biológico em estudos pré-clínicos e clínicos para o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos, cosméticos e alimentos nutracêuticos/opoterápicos.

[004] A importância técnica e econômica da PVA é destacada ao ponto de ter merecido o registro da Indicação Geográfica como Denominação de Origem de número IG201101, concedido pelo Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) na categoria Denominação de Origem em 17 de julho de 2012.

[005] Própolis é uma resina elaborada por abelhas (*Apis melífera*) com o objetivo de ser utilizada como agente antimicrobiano ao revestir o interior da colmeia, mantendo-o, assim, asséptico (RÚBIO, O.C.; PICCINELI, A.N; FERNANDEZ, M.C.; HERNÁNDEZ, I.M.; ROSADO, A.; RASTRELLI, L. Chemical characterization of Cuban propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and RMN: the brown, red yellow Cuban varieties of propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v.55, p.7502-7509, 2007). Esses insetos coletam materiais (exsudatos,

pólen, brotos e partes de flores, folhas e frutos) provenientes da vegetação circunvizinha à colmeia, onde, por fim, adicionam sua saliva a esses materiais coletados (FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. Análise de própolis. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v.26, n.1, p.171-178, 2006).

[006] No Brasil existem 13 classificações de grupos de própolis (DAUGSCH, A.; MORAES, C.S.; FORT, P.; PARK, Y.K. Brazilian red propolis - chemical composition and botanical origin. **eCAM.** v.5, n.4, p.435-441, 2008; ALENCAR, S.M.; OLDONI, T.L.C.; CASTRO, M.L.; CABRAL, I.S.R.; COSTA-NETO, C.M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; IKEGARI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **Journal of Ethnopharmacology.** v.113, p.278-283, 2007), essa distinção se dá pela elucidação de sua constituição fitoquímica e pelas características organolépticas preconizadas pelo Ministério da Agricultura, sendo elas: cor, sabor, consistência à temperatura ambiente e granulometria (BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. Instrução Normativa nº3, ANEXO VI. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil.** 2001).

[007] As própolis vermelhas brasileiras pertencem à 13ª classificação, sendo provenientes do nordeste brasileiro (CABRAL, I.S.R.; OLDONI, T.L.C.; PRADO, A.; BEZERRA, R.M.N.; ALENCAR, S.M.; IKEGARI, M.; ROSALEN, P.L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova.** v.32, n.6, p.1523-1527, 2009). Além de sua composição possuir ácidos fenólicos, a própolis vermelha brasileira se destaca dos demais tipos por apresentar grande quantidade e variedade de flavonóides, tais como: formononetina, vestitol,

liquiritigenina, isoliquiritigenina, daidzeína, biochanina A, luteolina, pinobanksina, quercetina, catequina, genisteína e medicarpina, além de benzofenonas isopreniladas (gutiferonas C, D, E e F) (MENDONÇA, I.C.G.; PORTO, I.C.C.M.; NASCIMENTO, T.G.; SOUZA, N.S.; OLIVEIRA, J.M.S.; ARRUDA, R.E.S.; MOUSINHO, K.C.; SANTOS, A.F.; BASÍLIO-JÚNIOR, I.D.; PAROLIA, A.; BARRETO, F.S. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity, and effect against câncer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v.15, n.357, p.1-12, 2015). Toda essa variedade de tipos de própolis em função de seus marcadores está relacionada à localização geográfica onde o apiário está inserido, uma vez que a flora local será a fonte de coleta de materiais vegetais por parte das abelhas para a produção da própolis (LÓPEZ, B.G.C.; SCHIMIDT E.M.; EBERLIN, M.N.; SAWAYA, A.C.H.F. Phytochemical markers of different types of red propolis. **Food Chemistry** v.146, p.174-180, 2014).

[008] A Própolis Vermelha de Alagoas é proveniente das regiões de mangue do Estado, apresentando ocorrência nas regiões do litoral e do estuarino-lagunar de Alagoas. Segundo seu Certificado de Indicação Geográfica, atestado pelo INPI e identificado pelo código IG201101, a composição da PVA deve apresentar os flavonóides medicarpina, vestitol, isoliquiritigenina, formononetina e daidzeína, dentre outros compostos químicos. O perfil fitoquímico da própolis é dependente da flora local ao redor do apiário, uma vez que as abelhas coletam pólen, exsudatos, e partes de vegetais a um raio de 2 km de sua colméia, por esse motivo, cada tipo de própolis possui uma origem botânica diferente. A PVA tem a *Dalbergia ecastophyllum* (Fabaceae), localmente conhecida como Rabo de Bugio, como sua origem botânica (DA SILVA, R.O.; ANDRADE, V.M.; RÊGO, E.S.B.; DÓRIA, G.A.A.; LIMA, B.S.; DA

SILVA, F.A.; ARAÚJO, A.A.S.; JÚNIOR, R.L.C.A.; CARDOSO, J.C. GOMES, M.Z., Acute and sub-acute oral toxicity of Brazilian red propolis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v.170, p.66-71, 2015; NOVAK, E.M.; SILVA, M.S.C; MARCUCCI, M.C.; SAWAYA, A.C.H.F.; LÓPEZ, B.G.C.; FORTES, M.A.H.Z.; GIORGI, R.R.; MARUMO, K.T.; RODRIGUES, R.F.; MARIA, D.A. Antitumoral activity of Brazilian red propolis fraction enriched with xanthochymol and formononetin: An in vitro and in vivo study. **Journal of Functional Foods**. v.2, p.91-102, 2014).

[009] As atividades biológicas comprovadamente relacionadas à Própolis Vermelha de Alagoas são: antibacteriana (CABRAL, I.S.R.; OLDONI, T.L.C.; PRADO, A.; BEZERRA, R.M.N.; ALENCAR, S.M.; IKEGARI, M.; ROSALEN, P.L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**. v.32, n.6, p.1523-1527, 2009), antifúngica (TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M.C.; MIORIN, P.L.; PASIN, F.R.; TSVETKOVA, I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evidence-Based Complementary and alternative Medicine**. v.3, p.249-254, 2006), antiinflamatória (BUENO-SILVA, B.; ALENCAR, S.M.; KOO, H.; IKEGARI, M. SILVA, G.V.J; NAPIMOGA, M.H.; ROSALEN, P.L. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.61, p.4546-4550, 2013), antioxidante e anticáries (FREIRES, I.A.; ALENCAR, S.M.; ROSALEN, P.L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.110, p.267-279, 2016), leishmanicida (AYRES, D.C.; MARCUCCI, M.C.; GIORGIO, S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*.

Mem. Inst. Oswaldo Cruz. v.102, n.2, p.215-220, 2007), dentre outras.

[010] Os flavonoides são os principais constituintes químicos da própolis vermelha, e consequentemente, são os principais responsáveis pelas atividades biológicas atribuídas à PVA destacadas anteriormente. A caracterização da composição química da PVA, através da identificação e quantificação de seus marcadores por diversas técnicas cromatográficas e espectroscópicas, é de extrema importância para a garantia do controle de qualidade dessa matéria prima e também de seus produtos derivados. Desse modo, o isoflavonoide bolusanthol D isolado por esse procedimento pode ser utilizado como padrão analítico no controle de qualidade da Própolis Vermelha de Alagoas *in natura*, bem como dos seus extratos e produtos derivados. A Própolis Vermelha de Alagoas é caracterizada por ter uma composição química rica em isoflavonóides e ácidos fenólicos, sendo esses constituintes químicos os responsáveis pelas atividades biológicas atribuídas à PVA, tais como: antioxidante, antimicrobiano, antiparasitária, imunoestimulante, anticâncer, antiviral, dentre outras.

[011] A pesar de já ter sido isolado e identificado duas vezes na literatura (BOJASE, G.; WANJALA, C.C.W.; MAJINDA, G. Two new isoflavonoids from *Bolusanthus speciosus*. **Bull. Chem. Soc. Ethiop.** v. 15, n. 2, p. 131-136, 2001; Ren-Neng, T.; Xiao-Bo, Q.; Shu-Hong, G.; Ping-Ping, X.; Yang-Yang, S.; De-An, G. Chemical constituents of *Spatholobus suberectus*. **Chinese Journal of Natural Medicines.** v. 10, n. 1, p. 032-035, 2012), não há registro prévio para a determinação da atividade biológica do isoflavonoide bolusanthol D, assim como também não há registro prévio de sua presença como constituinte química da Própolis Vermelha de Alagoas. Os

dois trabalhos supracitados não descrevem o processo de isolamento como realizado pelo método proposto por essa patente.

[012] Bojase et al. (2001) (BOJASE, G.; WANJALA, C.C.W.; MAJINDA, G. Two new isoflavonoids from *Bolusanthus speciosus*. **Bull. Chem. Soc. Ethiop.** v. 15, n. 2, p. 131-136, 2001) utilizam o pó da casca do caule da *Bolusanthus speciosus* para realização de extração por método não descrito, seguido de cromatografia líquida clássica, filtração molecular (sephadex LH-20), cromatografia líquida clássica e sucessivos processos de cromatografia em camada delgada. O trabalho de Bosaje et al. (2001) lança mão de vários passos para o isolamento do bolusanthol D, tornando-o um processo longo.

[013] O isolamento do bolusanthol D, Figura 1, é reportado apenas duas vezes na literatura, primeiramente a partir do extrato da casca do caule da *Bolusanthus speciosus* coletada em Mapoka, Botswana (BOJASE, G.; WANJALA, C.C.W.; MAJINDA, G. Two new isoflavonoids from *Bolusanthus speciosus*. **Bull. Chem. Soc. Ethiop.** v. 15, n. 2, p. 131-136, 2001) e posteriormente a partir do extrato da casca da *Spatholobus suberectus* coletada na província de Guangxi, China (REN-NENG, T.; XIAO-BO, Q.; SHU-HONG, G.; PING-PING, X.; YANG-YANG, S.; DE-AN, G. Chemical constituents of *Spatholobus suberectus*. **Chinese Journal of Natural Medicines**. v. 10, n. 1, p. 032-035, 2012). Apesar desse fato, não há qualquer registro da obtenção, isolamento e identificação do isoflavonoide bolusanthol D em qualquer tipo de própolis ou seus extratos.

[014] Ren-Neng et al. (Ren-Neng, T.; Xiao-Bo, Q.; Shu-Hong, G.; Ping-Ping, X.; Yang-Yang, S.; De-An, G. Chemical

constituents of *Spatholobus suberectus*. **Chinese Journal of Natural Medicines**. v. 10, n. 1, p. 032-035, 2012) utilizam as cascas secas da *Spatholobus suberectus* no processo de isolamento do bolusanthol D a partir da extração por refluxo com o auxílio de etanol e sob elevada temperatura, seguida de particionamento para obtenção de fase clorofórmica, duas cromatografias líquidas clássicas com emprego de sílica gel, filtração molecular (sephadex LH-20) e HPLC semipreparativo. O processo de extração utilizado por Ren-Neng pode ter degradado os constituintes químicos de seu objeto de estudo, inclusive o bolusanthol D. Além disso, o emprego de duas cromatografias clássicas mais a filtração molecular deixa o processo de isolamento do bolusanthol D mais longo e aumenta a perda de compostos químicos, uma vez que estes tendem a aderir na sílica gel.

[015] Os únicos dois processos citados acima para o isolamento do bolusanthol D empregam rotas cromatográficas longas e tediosas para chegar ao resultado em questão. O primeiro (BOJASE, G.; WANJALA, C.C.W.; MAJINDA, G. Two new isoflavonoids from *Bolusanthus speciosus*. **Bull. Chem. Soc. Ethiop.** v. 15, n. 2, p. 131-136, 2001) se utiliza de extração, cromatografia líquida clássica, filtração molecular (sephadex), cromatografia líquida clássica novamente e múltiplos passos de cromatografia em camada delgada preparativa, totalizando mais de 6 etapas. O segundo processo (REN-NENG, T.; XIAO-BO, Q.; SHU-HONG, G.; PING-PING, X.; YANG-YANG, S.; DE-AN, G. Chemical constituents of *Spatholobus suberectus*. **Chinese Journal of Natural Medicines**. v. 10, n. 1, p. 032-035, 2012) utilizou extração por refluxo com emprego de temperatura elevada durante duas horas, particionamento, cromatografia líquida clássica por

duas vezes, filtração molecular (sephadex) e HPLC semipreparativo, totalizando 6 etapas.

[016] O bolusanthol D, seus derivados ditos equol como Bolusanthol A, Bolusanthol B e C e produtos de oxidação são citados em documentos de patente. A patente CA2797752A1 desenvolve método de planejamento, preparação e uso de novos protonóforos incluindo doenças como diabetes, síndrome metabólica, síndrome do fígado gordo, cardiomiopatias, ateroscleroses, doenças coronárias dentre outras. A patente CA2806427A1 relaciona isoflavonóides incluindo Bolusanthol A, Bolusanthol B e Bolusanthol C e métodos relacionados com a proliferação celular da pele e também proliferação capilar podendo ser utilizado em composições farmacêuticas e cosméticas. Patente de invenção EP2404995B1 desenvolve método de síntese de equol e dihidrodaidzeína a partir da daidzeína e estabelece enzimas relacionadas com a síntese de flavonoides relacionados ao equol.

[017] O processo proposto nesta patente de invenção é o primeiro a descrever o isolamento do isoflavanol bolusanthol D a partir de própolis, em especial a PVA e seus extratos, provenientes dos manguezais alagoanos. Difere em relação aos demais supracitados, diminuindo a quantidade de passos na rota de isolamento do bolusanthol D. O método aqui proposto apresenta as etapas de extração por maceração, particionamento, cromatografia líquida clássica, e HPLC semipreparativo, totalizando 4 etapas. O mesmo método tem o objetivo de ser rápido e econômico. Vale ainda destacar que o isolamento de isoflavanol bolusanthol D a partir da própolis vermelha de Alagoas ainda não foi descrito, pois o Bolusanthol D é uma molécula que facilmente se converte em medicarpina ou em outros isoflavonóides.

[018] A invenção proposta no presente documento busca padronizar: a) um processo de obtenção e isolamento do isoflavonoide bolusanthol D proveniente da Própolis Vermelha de Alagoas e seus extratos, sem o emprego de processos térmicos e com redução do número de etapas (quatro etapas) no processo de isolamento e purificação, tornando-o simples, relativamente rápido e economicamente viável; (b) estabelecer condições de identificação de procedência para a PVA e desta forma pode ser utilizado como marcador da própolis vermelha de Alagoas e seus extratos e; c) os usos do bolusanthol D como marcador químico específico da PVA, em preparações farmacêuticas contendo os extratos de própolis vermelha e uso para tratamento de leishmanioses.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[019] A presente invenção refere-se ao processo de obtenção e isolamento do metabólito secundário bolusanthol D (4,7,2'-triidroxí-4'-metoxi-isoflavanol), pertencente à classe dos isoflavonóides, a partir da Própolis Vermelha de Alagoas (PVA). O processo de isolamento e purificação do novo marcador químico da própolis vermelha foi realizado em quatro etapas, a saber: extração por maceração, particionamento líquido-líquido, cromatografia em coluna e cromatografia líquida de alta eficiência semipreparativo para obter o Bolusanthol D com pureza cromatográfica de 98%. O processo de caracterização químico-estrutural do marcador químico "Bolusanthol D" foi realizado através das técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjos de diodo (DAD), FTIR-ATR, RMN ^1H e RMN ^{13}C , DEPT 90, DEPT 135, incluindo as técnicas bidimensionais de RMN (COSY, HMBC e NOESY). Por fim, são utilizados os usos do novo marcador da própolis vermelha de Alagoas, o Bolusanthol D com atividade leishmanicida, uso do composto

em composições farmacêuticas contendo própolis vermelha e seus extratos e como novo marcador químico da própolis vermelha de Alagoas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FIGURAS

[020] As **Figuras 1A e 1B** mostram a estrutura química do isoflavonoide bolusanthol D.

[021] A **Figura 2** apresenta os fluxogramas do processo de isolamento do bolusanthol D a partir do extrato bruto de própolis vermelha (A) e da fase hexânica obtida após particionamento líquido-líquido (B).

[022] A **Figura 3** apresenta o cromatograma do extrato bruto hidroalcoólico (A), fase hexânica (B), fração hexânica FR21 (C) e marcador químico purificado (D).

[023] A **Figura 4** mostra a caracterização do marcador químico, Bolusanthol D, usando a espectroscopia na região do ultravioleta-visível.

[024] A **Figura 5** mostra a caracterização do marcador químico, Bolusanthol D, usando a espectroscopia na região do infravermelho através da técnica FTIR-ATR.

[025] A **Figura 6** mostra a caracterização do marcador químico, Bolusanthol D, usando a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

[026] A **Figura 7** mostra a caracterização do marcador químico, Bolusanthol D, usando a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13.

[027] A **Figura 8** mostra a caracterização do marcador químico, Bolusanthol D, usando a espectroscopia de ressonância

magnética nuclear de carbono 13 no modo bidimensional DEPT 90 (A) e no modo bidimensional DEPT 135 (B).

[028] A **Figura 9** mostra a caracterização do marcador químico, Bolusanthol D, usando a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton e carbono 13 no modo bidimensional HMBC.

[029] A **Figura 10** mostra ensaio biológico de atividade leishmanicida e IC₅₀ contra *Leishmania braziliensis*. Foram ensaiados o extrato bruto, fase hexânica, Fração 21 e Fração 10 proveniente da fase hexânica.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[030] Os processos de obtenção, isolamento, caracterização e usos do Bolusanthol D descritos na presente invenção podem ser melhores detalhados e compreendidos mediante referência às figuras presentes neste documento e a seguinte descrição:

- Coleta, extração e particionamento

[031] Foram coletadas 250,0 g de própolis vermelha *in natura* proveniente do apiário Primavera, localizado na cidade de Marechal Deodoro - AL (latitude sul : 9° 42.258' - latitude oeste: 35° 54.391'). A coleta foi realizada em março de 2015 e a amostra foi acondicionada sob refrigeração e protegida da luz.

[032] Realizou-se a extração por maceração exaustiva a partir de 150,0 g da amostra *in natura*. Foram utilizados 320,0 mL de solução hidroalcoólica (80 % etanol absoluto: 20 % H₂O, V/V) como meio extrator. A amostra foi mantida em contato com o meio extrator por 48 horas, à temperatura ambiente e protegida da luz. Após o tempo de extração, o macerado foi retirado (280 mL de extrato em solução hidroalcoólica),

acondicionado separadamente em outro frasco âmbar e o processo foi repetido por mais 2 vezes sob as mesmas condições até a completa extração dos constituintes ativos.

[033] Todo o macerado (840 mL de extrato em solução hidroalcoólica) foi concentrado em rotaevaporador, obtendo assim uma massa sólida de extrato bruto hidroalcoólico de própolis vermelha de Alagoas, contendo uma percentagem máxima entre 3 e 6 % de solvente.

[034] Uma quantidade de 10,0 g do extrato bruto foi solubilizado em 14 mL de etanol absoluto para obter uma solução alcoólica que foi transferida para funil de separação com posterior adição de 6 mL de água para a realização do particionamento líquido-líquido. Deu-se início ao particionamento líquido-líquido com a adição de 80 mL de hexano. A fase hexânica foi separada e retirada do funil de separação. Um novo particionamento líquido-líquido foi realizado usando o mesmo volume de hexano e então, as fases hexânicas (160 mL da fase hexânica) foram reunidas e concentradas em rotaevaporador. Um extrato hexânico (3,0 g) foi obtido o qual foi submetido ao fracionamento por cromatografia líquida em coluna de sílica gel (Fig. 2).

- Fracionamento do extrato hexânico oriundo da fase hexânica utilizando cromatografia líquida em coluna (CLC)

[035] O processo de fracionamento foi realizado através da cromatografia líquida em coluna em sílica gel. Foram pesadas 35,0 g de sílica gel (Sigma-Aldrich, tamanho de poro 60 Angström, tamanho de partículas 60-100 mesh, lote BCBD5189V) que foi suspendida em hexano para empacotar a coluna por via úmida.

[036] A coluna foi acondicionada com hexano antes de receber a amostra a ser fracionada. Foram pesadas 1,60 g da fase hexânica de própolis vermelha para serem fracionadas. A fase móvel utilizada foi um sistema binário de gradiente de concentração de solventes, partindo de 100% de hexano até 100% de acetato de etila com variação entre 2,5% até 10% durante a etapa de mudança da polaridade do solvente. Cada uma das concentrações da fase móvel foi eluída uma única vez com um volume de 60,0 mL. As frações hexânicas (FrHex 1 a FrHex 112) obtidas foram coletadas separadamente na ordem de eluição, em volumes de 20,0 mL e acondicionadas em frascos para a secagem do solvente à temperatura ambiente e ao abrigo da luz durante um período de 72 horas (Fig. 2).

- Obtenção e isolamento do Bolusanthol D

[037] O processo de obtenção e isolamento do Bolusanthol D foi monitorado através de cromatografia líquida de alta eficiência no modo analítico usando um equipamento *Ultra High Performance Liquid Chromatograph* (UHPLC) Shimadzu Nexera XR equipado com duas bombas, injetor automático e detector SPD-20A. A separação cromatográfica foi realizada usando uma coluna Phenomenex C-18 (Kinetex® 150 x 4,6mm), um sistema binário de gradiente de concentração de solventes contendo água (solvente A) e acetonitrila (solvente B) com fluxo de 0,300 mL/min, tempo de análise de 60 min e volume de injeção de 2 µL. O sistema gradiente iniciou com 30% de acetonitrila (solvente B) entre 0 e 2 minutos, aumentou para 36% de acetonitrila em 5 minutos, aumentou para 42% de solvente B em 8 minutos, 48% de solvente B em 11 minutos, 52% de solvente B em 14 minutos, permanecendo 52% até 17 minutos. O solvente B aumentou para 56% em 20 minutos, aumentou para 62% em 24 minutos, aumentou para 68% de solvente B em 28 minutos, aumentou para 72% de solvente B em

32 minutos, aumentou para 90% de solvente B em 36 minutos, aumentou para 97% de solvente B em 40 minutos, e aumentou para 100% de solvente B em 53 minutos permanecendo em 100% de solvente B até 57 minutos e depois o solvente B foi reduzido para a condição inicial (30% de solvente B) em 58 minutos e permanecendo nesta condição até 60 minutos onde ocorreu a finalização da análise.

[038] O extrato bruto, fase hexânica, e frações hexânicas com grau crescente de polaridade entre 100% de hexano e 100% de acetato de etila foram monitoradas com variação de 10% de polaridade e que apresentavam melhor rendimento com quantidade maior que 30 mg.

[039] Frações hexânicas FRHex20, FRHex21 e FRHex22 apresentaram rendimentos entre 50 e 150 mg e melhores características de pureza (> 40%) para o pico cromatográfico com eluição no tempo de retenção em 21 minutos.

- Purificação do Bolusanthol D

[040] O processo de purificação do bolusanthol D foi realizado através de cromatografia líquida de alta eficiência no modo semipreparativo usando um equipamento da Shimadzu modelo Proeminence, HPLC LC-10A equipado com duas bombas LC-6AD, injetor automático SIL-20A ht e detector SPD-20A, fração coletora FRC-10A. A separação cromatográfica foi realizada usando uma coluna Shimpak C-18 (250 x 20mm; 10µm), um sistema binário de gradiente de concentração de solventes contendo água (solvente A) e acetonitrila (solvente B) com fluxo de 5,000 mL/min, tempo de análise de 60 min e volume de injeção de 300µL. As frações foram preparadas para injetar concentração de 20 mg/mL. O sistema gradiente iniciou com 50% de acetonitrila (solvente B) entre 0 e 5 minutos, aumentou para 60% de acetonitrila em 8 minutos, permanecendo

em 60 de solvente B até 12 minutos, aumentou para 70% de solvente B em 20 minutos, aumentou para 75% de solvente B em 25 minutos, aumentou para 90% de solvente B em 35 minutos, aumentou para 100% de solvente B em 40 minutos, permanecendo em 100% até 48 minutos e depois o solvente B foi reduzido para a condição inicial (50% de solvente B) em 50 minutos e permanecendo nesta condição até 60 minutos onde ocorreu a finalização da análise.

[041] Durante processo de purificação do Bolusanthol D usando Cromatografia líquida de alta eficiência semipreparativo, as frações Hexânicas FrHex 20 a FrHex 22 foram injetadas com concentração de 20 mg/mL e foram obtidos 5 picos cromatográficos, os quais foram coletados em tubos de ensaio de 20 mL e em seguida, eles foram devidamente identificados e submetidos a processo de rotaevaporação, obtendo massa sólida entre 2 a 6 mg.

[042] Os 5 picos cromatográficos de cada fração hexânica (Fração Hexânica denominada FrHex 20, Fração Hexânica denominada FrHex 21, Fração Hexânica denominada FrHex 22) obtidos durante o processo de purificação foram novamente monitorados em HPLC no modo analítico para detecção de pico cromatográfico com tempo de retenção 21 minutos e com pureza superior a 95%. Picos cromatográficos com estas características foram submetidos a processo de caracterização da elucidação estrutural usando técnicas espectroscópicas.

- Caracterização do marcador químico "Bolusanthol D"

[043] O bolusanthol D foi caracterizado através de técnicas cromatográfica e espectroscópicas: **A)** a cromatografia líquida de alta eficiência no modo analítico foi utilizada para monitorar o Bolusanthol D, que correspondia ao tempo de

retenção de 21,10 minutos; **B)** O pico cromatográfico apresentava no detector de arranjo de fotodiodo (DAD) comprimentos de onda máximos de 205 nm e 286 nm; **C)** O espectro de infravermelho FTIR-ATR foi obtido em equipamento da Thermo Scientific, modelo Nicolet IS 10 a partir de 1 mg da amostra no estado sólido no modo ATR (Reflexão Total Atenuada) e sem preparação adicional de KBr, com número de scans 64 e na faixa de número de ondas entre 4000 cm^{-1} a 500 cm^{-1} ; **D)** Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, carbono 13 e as suas variantes bidimensionais (COSY, DEPT 90, DEPT 135, HMBC e NOESY) foram obtidos num espectrômetro Bruker Avance 400 operando a 400 MHz para prótons e 100 MHz para C13. Uma quantidade de amostra (6,5 mg) previamente monitorada em cromatografia líquida de alta eficiência no modo analítico com pureza > 95% foi solubilizado em 500 μL de metanol deuterado (MEOD), transferidos para tubo especial de RMN contendo quantidade do TMSP (ácido trimetilsililpropanóico) como substância de referência (padrão interno) para obter o valor 0 de deslocamento químico do equipamento.

- Caracterização da Atividade leishmanicida dos extratos bruto, hexânico e fases hexânicas

[044] A atividade leishmanicida da própolis vermelha de Alagoas foi verificada frente às formas promastigotas de *Leishmania* (V.) *braziliensis* (IOC-L0566 - MHOM/BR/1975/M2903) provenientes do Departamento de Imunologia, Laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ - PE), Campus UFPE.

[045] As amostras utilizadas foram o extrato hidroalcoólico, fase hexânica e as frações hexânicas FRHex10 e FRHex21,

provenientes do processo de fracionamento da fase hexânica. Foram preparadas soluções estoque a uma concentração de 10 mg/mL em DMSO para cada uma das amostras. Uma série de diluições foi realizada a partir de cada solução estoque, originando soluções de trabalho nas concentrações de 5000, 2500, 1000, 800, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 75, 50, 25, 10 e 5 µg/mL em água milli-Q e meio Shneider suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina à 50 U/mL e estreptomicina à 50 µg/mL. Para o preparo das microplacas foram adicionados 10 µL das soluções de trabalho e 190 µL do meio para então adicionar o inóculo de 150 µL contendo uma carga de 1×10^7 células. As concentrações finais de cada amostra foram de 250; 125; 50; 40; 25; 20; 15; 12,5; 10; 7,5; 5; 3,75; 2,5; 1,25 e 0,5 µg/mL.

EXEMPLOS

[046] O bolusanthol D foi caracterizado através de técnicas cromatográfica e espectroscópicas. Os resultados obtidos estão representados nas tabelas e figuras indicadas.

EXEMPLO 1

[047] As frações hexânicas FrHex 20 (115,6 mg), FrHex 21 (55,9 mg) e FrHex 22 (46,3 mg) (FrHex 20, 21 e 22) que foram obtidas da fase hexânica (Figura 2) se destacaram por apresentar um pico cromatográfico em 21 minutos, tendo essa substância (pico em 21 minutos) um grau de pureza entre 31 e 51% nas três frações hexânicas. Por essa razão, essas três frações foram selecionadas para a purificação em HPLC semipreparativo.

[048] A cromatografia líquida de alta eficiência no modo analítico foi utilizada para monitorar o Bolusanthol D, que correspondia ao tempo de retenção de 21,10 minutos com pureza

cromatográfica entre 5% no extrato bruto de própolis vermelha e pureza de 97,80% na massa sólida obtida após processo de purificação por CLAE semipreparativo (Figura 3).

[049] O pico cromatográfico apresentava no detector de arranjo de fotodiodo (DAD) comprimentos de onda máximos de 205 nm (maior banda de absorção) e 286 nm (menor banda de absorção) (Figura 4).

Exemplo 2

[050] O composto isolado Bolusanthol D apresentou características organolépticas de um sólido amorfo. O espectro de infravermelho obtido pela técnica FTIR-ATR apresentou estiramentos, deformações axiais e/ou angulares de 3400 cm^{-1} , 2928 cm^{-1} , 1595 cm^{-1} , 1496 cm^{-1} , 1347 cm^{-1} , 1148 cm^{-1} e 1109 cm^{-1} . O estiramento em 3400 cm^{-1} corresponde a deformação axial de hidroxila (O-H), estiramento em 2928 cm^{-1} corresponde a deformação axial (C-H) de grupos metilas, metilenos e grupos metínicos, estiramentos de 1595 cm^{-1} e 1496 cm^{-1} correspondentes a deformação axial (C=C) de esqueleto de anel aromático, 1347 cm^{-1} deformação angular (C-H) de metilas e metilenos, 1148 cm^{-1} e 1109 cm^{-1} (C-O-C) de aril éter e aquil éter. A ausência de banda da região entre 1730 a 1700 cm^{-1} indica a ausência de carbonila cetônica na estrutura desse flavonoide (Figura 5).

Exemplo 3

[051] O espectro de RMN ^1H (400 MHz, MeOD) apresentou seguintes sinais de deslocamento químico: δ 3.51 (m, 1H, H-2a), δ 4.21 (m, 1H, H-2b), δ 3.52 (m, 1H, H-3), δ 5.46 (m, 1H, H-4), δ 7.28 (d, 1H, $J = 8.41\text{ Hz}$, H-5), δ 6.49 (dd, 1H, $J = 2.23\text{ Hz}$ e 2.49 Hz , H-6), δ 6.30 (d, 1H, $J = 2.6\text{ Hz}$, H-8), δ 6.38 (d, 1H, $J = 2.34\text{ Hz}$, H-3'), δ 6.44 (dd, 1H, $J =$

2.23 Hz e 2.16 Hz, H-5'), δ 7.16 (d, 1H, J = 8.19 Hz, H-6'), δ 3.73 (s, 3H, -OCH₃) (Figura 6).

[052] O espectro de RMN de ¹H evidencia a presença de três sinais: dois deles na forma de multipletos em δ 3,51 ppm e δ 3,52 ppm, cada um equivalente a um hidrogênio, sendo esses dois hidrogênios localizados nas posições H-2a e H-3 do flavonóide, respectivamente. O terceiro sinal, em δ 3,73 ppm, na forma de singlete e com integração equivalente a três hidrogênios, confirma a presença de uma única metoxila na estrutura. Também mostra a presença de multipletos em δ 4,21 ppm com integração equivalente a um hidrogênio, sendo este localizado na posição H-2b da molécula. A feição deste sinal indica o acoplamento do hidrogênio em questão com os seus vizinhos localizados nas posições H-2a, H-3 e H-4 o que pode ser confirmado com os dados de COSY. O espectro RMN ¹H também um multipletos em δ 5,46 ppm com integração equivalente a um hidrogênio, sugerindo a identificação do hidrogênio localizado na posição H-4 e confirmando o resultado de IV que indicou a ausência de carbonila na molécula.

[053] O espectro de RMN ¹H na região entre δ 7,28 e 6,30 ppm apresenta a presença de seis hidrogênios aromáticos que estão distribuídos nos anéis A e B do isoflavonóide bolusanthol D. Ambos os deslocamentos químicos em δ 6,30 e 6,38 ppm se apresentam na forma de dubletos (J = 2,60 e 2,68 Hz, respectivamente), cada um equivalendo a um hidrogênio, sendo esses localizados nas posições H-8 e H-3', respectivamente. A forma de dubletos indica que cada um desses prótons está acoplado a um único hidrogênio vizinho. Além desses, foram observados dois sinais em δ 6,44 e 6,49 ppm, ambos com sinal na forma de duplo dubletos (J = 2,36 e 2,27 Hz; 2,41 e 2,34 Hz, respectivamente), sendo cada um equivalente a um hidrogênio (H-5' e H-6, respectivamente). A feição de duplo

dubleto indica que cada um desses hidrogênios em questão se acopla com outros dois distintos.

[054] o espectro de RMN de ^1H apresenta a presença de dois hidrogênios em δ 7,16 e 7,28 ppm, ambos são caracterizados por se acoplar com um único hidrogênio vizinho, uma vez que seus sinais têm feição de dubleto ($J=$ 8,07 e 8,38 Hz, respectivamente), esses hidrogênios estão nas posições H-6' e H-5, respectivamente. Não foram observados os sinais referentes a três hidrogênios, evidenciando a presença de três grupamentos hidroxilas na molécula. Essa evidência é justificada pelo uso de metanol deuterado. Esse resultado corrobora com a banda característica de hidroxila encontrada no IV.

Exemplo 4

[055] O espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) apresentou os seguintes sinais de deslocamento químico: δ 67.7 (C-2), δ 41.0 (C-3), δ 80.2 (C-4), δ 133.3 (C-5), δ 110.8 (C-6), δ 160.2 (C-7), δ 104.2 (C-8), δ 158.2 (C-9), δ 113.0 (C-10), δ 121.0 (C-1'), δ 162.1 (C-2'), δ 97.7 (C-3'), δ 162,7 (C-4'), δ 107.3 (C-5'), 126.1 (C-6'), δ 56.0 (-OCH₃) (Figura 7).

[056] O espectro de RMN de ^{13}C em MeOD possui dezesseis sinais, dentre eles: 1 de metoxila (δ 56,0 ppm), 3 carbonos sp^3 alifáticos (δ 67,7; δ 41,0 e 80,2 ppm) e 12 carbonos sp^2 aromáticos (δ 97,7; δ 104,2; δ 107,3; δ 110,8; δ 113,0; δ 121,0; δ 126,1; δ 133,3; δ 158,2; δ 160,2; δ 162,1 e δ 162,7 ppm).

Exemplo 5

[057] O espectro DEPT 90 mostra presença de 6 carbonos sp^2 aromáticos com sinais em δ 97,7; δ 104,2; δ 107,3; δ 110,8; δ 126,1 e δ 133,3 ppm em região desprotegida que sustentam

um átomo de hidrogênio cada. Também são evidenciados os carbonos sp^3 metínicos alifáticos em δ 41,0 e 80,2 ppm em região de maior proteção (Figura 8A).

[058] O espectro DEPT 135 é apresentado **na figura 8 B**, onde se observa que o carbono sp^3 em δ 56,0 ppm apresentou sinal de mesma fase que os carbonos evidenciados no DEPT 90, como este carbono em questão não havia aparecido no experimento DEPT 90, fica evidenciado que ele sustenta três átomos de hidrogênio, logo, podemos caracterizar o carbono em δ 56,0 ppm como o da metoxila. O espectro DEPT 135 demonstra também que o carbono sp^3 em δ 67,7 ppm apresentou sinal de fase oposta em relação às fases dos outros sinais, caracterizando-o como sendo ligado a dois átomos de hidrogênio.

[059] Os dados DEPT 90 e DEPT 135 não revelaram a observação dos carbonos em δ 113,0; δ 121,0; δ 158,2; δ 160,2; δ 162,61 e δ 162,7 ppm em nenhum dos ensaios DEPT evidencia que esses seis carbonos em questão não sustentam átomos de hidrogênios, portanto são carbonos quaternários aromáticos.

Exemplo 6

[060] Os dados HMBC para o bolusanthol D evidencia as correlações entre hidrogênios e carbonos que apresentam constante de acoplamento de 3 (3J) e 2 (2J) ligações covalentes (Figura 9). Os dados de HMBC na tabela 1 demonstra que o hidrogênio H-2b (δ 4,21 ppm) se correlaciona com o carbono (C4, 3J) δ 80,2 ppm. Os hidrogênios da metoxila (δ 3,73 ppm) se correlacionam com o carbono δ 162,7 ppm (C4', 3J), sugerindo a posição desta metoxila no carbono C4' da molécula. Na tabela 1 são observadas as correlações entre os carbonos e hidrogênios dos anéis aromáticos A e B da molécula. Para o anel A, observamos que o hidrogênio em δ 6,30 ppm (H-8) apresenta correlação com os carbonos em δ

113,0 ppm (C10, 3J), δ 110,8 (C6, 3J), δ 158,2 (C9, 2J) e δ 160,2 ppm (C7, 2J); além das correlações entre o hidrogênio em δ 6,49 ppm (H-6) com o carbono em δ 104,2 ppm (C8, 3J) e entre o hidrogênio em δ 7,28 ppm (H-5) com os carbonos (C9, 3J) e (C7, 3J). Para o anel B, observamos que o hidrogênio em δ 6,38 ppm (H-3') apresenta correlação com os carbonos em δ 121,0 (C1', 3J), δ 107,3 (C5', 3J), δ 162,7 (C4', 2J) e δ 162,1 ppm (C2', 2J); além das correlações entre o hidrogênio em δ 6,44 ppm (H-5') com o carbono em δ 97,7 ppm (C3', 3J) e entre o hidrogênio em δ 7,16 ppm (H-6') com os carbonos C2' (3J) e C4' (3J).

Exemplo 7

[061] A estrutura do bolusanthol D e as correlações observadas no espectro COSY em MeOD são apresentadas para os hidrogênios 2a, 2b, 3 e 4. O espectro COSY evidencia a correlação entre os hidrogênios em δ 3,51 (H-2a); δ 3,52 (H-3); δ 4,21 (H-2b) e δ 5,46 ppm (H-4). Essas correlações são observadas nos sinais A (entre os hidrogênios em δ 3,51 e 3,52 ppm com hidrogênio em δ 4,21 ppm), sinais B (entre os hidrogênios em δ 3,51 e 3,52 ppm com o hidrogênio em δ 5,46 ppm) e sinais D (entre os hidrogênios em δ 4,21 ppm com o hidrogênio em 5,46 ppm), todas essas correlações são confirmadas nos sinais A', B' e D', respectivamente. O sinal C confirma que os três hidrogênios referentes ao singlete em δ 3,73 ppm não se correlacionam com nenhum outro hidrogênio, sendo estes pertencentes ao grupamento metoxila presente na molécula (Tabela 1).

[062] O espectro COSY em MeOD evidencia as correlações do próton em δ 6,49 ppm (H-6) com os prótons em 6,30 (H-8) e 7,28 ppm (H-5), justificando a feição de duplo dubleto que o sinal do próton H-6 apresenta no espectro de RMN de 1H . O

espectro COSY evidencia também as correlações do próton em δ 6,44 ppm (H- 5') com os prótons em δ 6,38 (H-3') e 7,16 ppm (H-6'), justificando também a feição de duplo dubleto no que o sinal do próton H-5' apresenta no espectro de RMN de ^1H (Tabela 1).

[063] Tabela 1 mostra os demais dados de RMN de ^{13}C , de ^1H , COSY, HMBC e NOESY em modo bidimensional.

Posição	δ ^{13}C	δ ^1H - J (Hz)	COSY	HMBC (2J)	HMBC (3J)	NOESY
2 ^a	67.7,	3.51, 1H,	H-2b, H-	-----	-----	H-6'
2b	CH ₂	m	4	-----	C-4	H-4, H-3
	-----	4.21, 1H,	H-4			
		m				
3	41.0,	3.52, 1H,	H-2b,	-----	-----	H-4, H-
	CH	m	H-4			2b
4	80.2,	5.46, 1H,	H-2b	-----	-----	H-3, H-
	CH	m,				2b,
						H-5
5	133.3,	7.28, 1H,	H-6	-----	C-9,	H-6, H-4
	CH	d, (8.41)			C7	
6	110.8,	6.49, 1H,	H-8, H-	-----	C-8	-----
	CH	dd, (2.23,	5			
		2.49)				
7	160.2,	-----	-----	-----	-----	-----
	C					
8	104.2,	6.30, 1H,	H-6	C-7,	C-6,	-----
	CH	d, (2.60)		C-9	C-10	
9	158.2,	-----	-----	-----	-----	-----
	C					
10	113.0,	-----	-----	-----	-----	-----
	C					
1'	121.0,	-----	-----	-----	-----	-----
	C					
2'	162.1,	-----	-----	-----	-----	-----
	C					
3'	97.7,	6.38, 1H,	H-5'	C-4',	C-1',	-OCH ₃
	CH	d, (2.34)		C-2'	C-5'	
4'	162.7,	-----	-----	-----	-----	-----
	C					
5'	107.3,	6.44, 1H,	H-3',	-----	C-3'	-OCH ₃
	CH	dd, (2.23,	H-6'			
		2.16)				

6'	126.1,	7.16, 1H,	H-5'	-----	C2',	H-2a, H-
	CH	d, (8.19)			C4'	5'
(-OCH ₃)	56.0,	3.73, 3H,	-----	-----	C-4'	H-3, H-
CH ₃		s				5''

Exemplo 8

[064] As correlações espaciais entre os hidrogênios (Dados NOESY) do composto Bolusanthol D e permite observar que o hidrogênio H-3 (δ 3,52 ppm) se correlaciona com H-4 (δ 5,46 ppm), além das correlações entre o próton H-2b (δ 4,21 ppm) com os prótons H-4 (δ 5,46 ppm) e H-3 (δ 3,52 ppm), respectivamente. Essa evidência indica que os três hidrogênios H-2b, H-3 e H-4 possuem a mesma orientação espacial entre eles e diferentes orientações espaciais em relação ao hidrogênio H-2a, à hidroxila ligada ao carbono C4 e ao anel B da molécula. A estereoquímica relativa para os hidrogênios H-3 e H-4 foi definida usando o espectro NOESY onde o composto Bolusanthol D apresentou interação axial e uma relação *cis* entre os hidrogênios H-3 e H-4 (Tabela 1).

[065] As correlações espaciais entre os hidrogênios (Dados NOESY) para H-5' (δ 6,44 ppm) e H-6' (δ 7,18 ppm) nos picos C e C', além da correlação entre os hidrogênios H-6 (δ 6,49 ppm) e H-5 (δ 7,28 ppm) (Tabela 1).

[066] Correlação espacial entre hidrogênios (Dados NOESY), porém com de menores intensidades. A Tabela 1 mostra as correlações espaciais entre H-2a (δ 3,51 ppm) e H-6' (δ 7,17 ppm), entre H-4 (δ 5,46 ppm) e H-5 (δ 7,28 ppm), entre H-3' (δ 6,38 ppm) com um dos hidrogênios da metoxila em δ 3,73 ppm e finalmente entre H-5' também com um dos hidrogênios da metoxila.

Exemplo 9

[067] Os dados de espectroscopia de RMN ^1H , RMN ^{13}C , DEPT 90, DEPT 135, HMBC, COSY e NOESY demonstram que a molécula isolada e purificada corresponde ao isoflavonóide Bolusanthol D, apresenta nome IUPAC (3R,4R)-3-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-4,7-diol (site do pubchem) e também conhecido na literatura científica com os seguintes sinônimos: 4,7,2'-triidroxi-4'-metoxi-isoflavanol, (3R,4R)-3-(2-Hydroxy-4-methoxyphenyl)-4,7-chromandiol, (3R,4R)-3-(2-Hydroxy-4-methoxyphenyl)-4,7-chromanediol, (3R,4R)-3-(2-Hydroxy-4-méthoxyphényl)-4,7-chromanediol, 2H-1-Benzopyran-4,7-diol, 3,4-dihydro-3-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-, (3R,4R)-, (3R,4R)-3-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)chromane-4,7-diol, (3R,4R)-7,2'-dihydroxy-4'-methoxyisoflavanol.

Exemplo 10

[068] A atividade leishmanicida foi expressa em função da IC₅₀ para o extrato bruto, fase hexânica, Fração Hexânica FrHex 21 e Fração Hexânica FrHex 10. Essas amostras apresentaram IC₅₀ iguais à 38,30; 32,31; 83,65 e 191,0 ug/mL, respectivamente, figura 10. O extrato bruto se mostrou semelhante à fase hexânica, sendo essa última levemente mais ativa contra os parasitos. A atividade da fração hexânica pode ser atribuída ao sinergismo de substâncias ativas, dentre elas o bolusanthol D (pico em 21 mim), substância em 28 mim, além das substâncias em 34, 42, 51 e 54 mim, todas elas presentes na própolis vermelha de Alagoas.

[069] A Fração Hexânica, FrHex 21, é constituída de 44% de bolusanthol D (tempo de retenção de 21 mim) e 31% do pico com tempo de retenção de 28 mim, ainda não identificada, logo é possível afirmar que o bolusanthol D é um dos

responsáveis pela atividade leishmanicida desta fração. A fase hexânica apresentou maior atividade que a Fração Hexânica FrHex 21, indicando sinergismo entre bolusanthol D e outras substâncias presentes na mesma fase. A atividade leishmanicida da Fração Hexânica FrHex 10 foi a mais baixa, com IC_{50} de 191,0 ug/mL (Figura 10).

Reivindicações

1. Processo de obtenção, isolamento, purificação e caracterização do isoflavanol Bolusanthol D caracterizado pelo fato de ser obtido a partir da própolis vermelha de Alagoas e compreender as seguintes etapas:

a) Coleta da matéria-prima própolis vermelha de Alagoas na região de Marechal Deodoro;

b) Obtenção do extrato bruto a partir da matéria-prima de própolis vermelha de Alagoas utilizando a técnica de extração por maceração e percentagem de etanol entre 75% e 85%, preferencialmente de 80% para obter um sistema de solvente hidroalcoólico a 80%;

c) Obtenção da fase hexânica e fase hidroalcoólica utilizando a técnica de particionamento líquido-líquido;

d) Obtenção e isolamento de frações hexânicas ricas em Bolusanthol D utilizando a técnica de cromatografia líquida em coluna de sílica gel com especificação de tamanho de partícula de sílica gel entre 60 e 100 mesh, bem como um gradiente de eluição de baixa polaridade para alta polaridade com sistema de solvente hexano 100% até acetato de etila 100% no gradiente de eluição com variação entre 2,5% até 10% durante a etapa de mudança da polaridade do solvente;

e) Monitoramento das frações hexânicas ricas em Bolusanthol D através da técnica de Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de fotodiodo no modo analítico;

f) Purificação do Bolusanthol D através da técnica de Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de ultravioleta no modo semipreparativo;

g) Caracterização química do isoflavanol, Bolusanthol D, através de técnicas cromatográficas, espectroscópicas de UV-vis, FTIR-ATR; e técnicas de espectroscopia de ressonância magnética: RMN ¹H, RMN ¹³C, e variantes bidimensionais, DEPT 90, DEPT 135, HMBC, COSY e NOESY;

h) Caracterização biológica do extrato bruto, fase hexânica e frações hexânicas enriquecida com Bolusanthol D através de ensaio leishmanicida e IC₅₀ contra o parasita *Leishmania braziliensis*.

2. Processo de obtenção, isolamento, purificação e caracterização do isoflavanol Bolusanthol D, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender um marcador químico da própolis vermelha de Alagoas.

3. Processo de obtenção, isolamento, purificação e caracterização do isoflavanol Bolusanthol D, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de, na etapa e), utilizar método de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de fotodiodo (DAD) para monitorar em diferentes comprimentos de onda quaisquer impurezas que possa interferir ou inviabilizar o processo de purificação do isoflavanol Bolusanthol D.

4. Processo de obtenção, isolamento, purificação e caracterização do isoflavanol Bolusanthol D, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de, na etapa f), utiliza-se método de cromatografia líquida de alta

eficiência acoplada ao detector UV-vis no modo semipreparativo para garantir uma purificação maior que 95% de pureza durante o processo de purificação do isoflavanol Bolusanthol D.

5. Processo de obtenção, isolamento, purificação e caracterização do isoflavanol Bolusanthol D, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de, na etapa g), utiliza-se método espectroscopia de UV-vis para caracterizar o isoflavanol Bolusanthol D.

6. Processo de obtenção, isolamento, purificação e caracterização do isoflavanol Bolusanthol D, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de, na etapa g), no método de caracterização através da espectroscopia de UV-vis o isoflavanol Bolusanthol D apresenta os comprimentos de onda máximos de 206 nm e 286 nm na região do UV-visível.

7. Processo de obtenção, isolamento, purificação e caracterização do isoflavanol Bolusanthol D, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de, na etapa g), utiliza-se método espectroscopia de FTIR-ATR para caracterizar o isoflavanol Bolusanthol D.

8. Processo de obtenção, isolamento, purificação e caracterização do isoflavanol Bolusanthol D, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de, na etapa g), no método espectroscopia de FTIR-ATR usado para caracterizar o isoflavanol Bolusanthol D apresenta estiramentos e deformações nos números de ondas 3400 cm^{-1} (O-H), 2928 cm^{-1} (C-H, de metila), 1595 cm^{-1} e 1496 cm^{-1} (C=C, de aromático), 1347 cm^{-1} (C-H, de metileno e metila), 1148 cm^{-1} e 1109 cm^{-1} (C-O-C, de de aril éter e aquil éter) referentes aos

principais grupos funcionais presentes na estrutura do Bolusanthol D).

9. Processo de obtenção, isolamento, purificação e caracterização do isoflavanol Bolusanthol D, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de, na etapa g), no método espectroscopia de FTIR-ATR usado para caracterizar o isoflavanol Bolusanthol D apresenta ausência de deformações nos números de ondas entre 1730 cm^{-1} a 1700 cm^{-1} indica a ausência de carbonila cetônica na estrutura do Bolusanthol D).

10. Processo de obtenção, isolamento, purificação e caracterização do isoflavanol Bolusanthol D, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de, na etapa g), utiliza-se método espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, carbono 13 e variantes bidimensionais (DEPT 90, DEPT 135, HMBC, COSY e NOESY) para caracterizar o isoflavanol Bolusanthol D.

11. Processo de obtenção, isolamento, purificação e caracterização do isoflavanol Bolusanthol D, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de, na etapa g), no método espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) usado para caracterizar o isoflavanol Bolusanthol D, apresenta deslocamentos químicos: δ 3.51 (m, 1H, H-2a), δ 4.21 (m, 1H, H-2b), δ 3.52 (m, 1H, H-3), δ 5.46 (m, 1H, H-4), δ 7.28 (d, 1H, $J = 8.41\text{ Hz}$, H-5), δ 6.49 (dd, 1H, $J = 2.23\text{ Hz}$ e 2.49 Hz , H-6), δ 6.30 (d, 1H, $J = 2.6\text{ Hz}$, H-8), δ 6.38 (d, 1H, $J = 2.34\text{ Hz}$, H-3'), δ 6.44 (dd, 1H, $J = 2.23\text{ Hz}$ e 2.16 Hz , H-5'), δ 7.16 (d, 1H, $J = 8.19\text{ Hz}$, H-6'), δ 3.73 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$).

12. Processo de obtenção, isolamento, purificação e caracterização do isoflavanol Bolusanthol D, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de, na etapa g), no método espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN 13C) usado para caracterizar o isoflavanol Bolusanthol D, apresenta sinais de deslocamentos químicos para carbono 13 em: δ 67.7 (C-2), δ 41.0 (C-3), δ 80.2 (C-4), δ 133.3 (C-5), δ 110.8 (C-6), δ 160.2 (C-7), δ 104.2 (C-8), δ 158.2 (C-9), δ 113.0 (C-10), δ 121.0 (C-1'), δ 162.1 (C-2'), δ 97.7 (C-3'), δ 162,7 (C-4'), δ 107.3 (C-5'), 126.1 (C-6'), δ 56.0 (-OCH₃).

13. Processo de obtenção, isolamento, purificação e caracterização do isoflavanol Bolusanthol D, de acordo com as reivindicações 10 e 12, caracterizado pelo fato de, na etapa g), no método espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13, DEPT 90 e DEPT 135 usados para caracterizar o isoflavanol Bolusanthol D, apresenta sinais de deslocamentos químicos para carbono 13, os quais indicam presença de 6 carbonos sp² aromáticos ligados a átomo de hidrogênio, 2 carbonos sp³ metínicos alifáticos (-CHR₂), 1 carbono sp³ metílico da metoxila (-OCH₃), 1 carbonos sp³ metilênico (-CH₂-) e 6 carbonos quaternários aromáticos.

14. Processo de obtenção, isolamento, purificação e caracterização do isoflavanol Bolusanthol D, de acordo com as reivindicações 10, 11 e 12, caracterizado pelo fato de, na etapa g), no método espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN 13C) e bidimensional HMBC ³J usados para caracterizar o isoflavanol Bolusanthol D, apresenta sinais de correlação bidimensional Carbono-Hidrogênio a 3 ligações, os quais indicam presença de

correlação do hidrogênio H-2b (δ 4,21 ppm) e o carbono (C4, 3J) δ 80,2 ppm.

15. Processo de obtenção, isolamento, purificação e caracterização do isoflavanol Bolusanthol D, de acordo com as reivindicações 10, 11 e 12, caracterizado pelo fato de, na etapa g), no método espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN 13C) e bidimensional HMBC 3J usados para caracterizar o isoflavanol Bolusanthol D, apresenta sinais de correlação bidimensional Carbono-Hidrogênio a 3 ligações, os quais indicam presença de correlação dos hidrogênios da metoxila (δ 3,73 ppm) se correlacionam com o carbono δ 162,7 ppm (C4', 3J).

16. Processo de obtenção, isolamento, purificação e caracterização do isoflavanol Bolusanthol D, de acordo com as reivindicações 10, 11 e 12, caracterizado pelo fato de, na etapa g), no método espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN 13C) e bidimensional HMBC 3J usados para caracterizar o isoflavanol Bolusanthol D, apresenta sinais de correlação bidimensional Carbono-Hidrogênio a 3 ligações, os quais indicam presença de correlação o hidrogênio em δ 6,30 ppm (H-8) apresenta correlação com os carbonos em δ 113,0 ppm (C10, 3J), δ 110,8 (C6, 3J), δ 158,2 (C9, 2J) e δ 160,2 ppm (C7, 2J).

17. Processo de obtenção, isolamento, purificação e caracterização do isoflavanol Bolusanthol D, de acordo com as reivindicações 10, 11 e 12, caracterizado pelo fato de, na etapa g), no método espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN 13C) e bidimensional HMBC 3J usados para caracterizar o isoflavanol Bolusanthol

D, apresenta sinais de correlação bidimensional Carbono-Hidrogênio a 3 ligações, os quais indicam presença de correlação o hidrogênio em δ 7,28 ppm (H-5) com os carbonos (C9, 3J) e (C7, 3J).

18. Processo de obtenção, isolamento, purificação e caracterização do isoflavanol Bolusanthol D, de acordo com as reivindicações 10, 11 e 12, caracterizado pelo fato de, na etapa g), no método espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN 13C) e bidimensional HMBC 3J usados para caracterizar o isoflavanol Bolusanthol D, apresenta sinais de correlação bidimensional Carbono-Hidrogênio a 3 ligações, os quais indicam presença de o hidrogênio em δ 6,38 ppm (H-3') apresenta correlação com os carbonos em δ 121,0 (C1', 3J), δ 107,3 (C5', 3J), δ 162,7 (C4', 2J) e δ 162,1 ppm (C2', 2J).

19. Processo de obtenção, isolamento, purificação e caracterização do isoflavanol Bolusanthol D, de acordo com as reivindicações 10, 11 e 12, caracterizado pelo fato de, na etapa g), no método espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN 13C) e bidimensional HMBC 3J usados para caracterizar o isoflavanol Bolusanthol D, apresenta sinais de correlação bidimensional Carbono-Hidrogênio a 3 ligações, os quais indicam presença de o hidrogênio em δ 6,44 ppm (H-5') com o carbono em δ 97,7 ppm (C3', 3J) e entre o hidrogênio em δ 7,16 ppm (H-6') com os carbonos C2' (3J) e C4' (3J).

20. Processo de obtenção, isolamento, purificação e caracterização do isoflavanol Bolusanthol D, de acordo com as reivindicações 10 e 11, caracterizado pelo fato de, na

etapa g), no método espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e bidimensional COSY usados para caracterizar o isoflavanol Bolusanthol D, apresenta sinais de correlação bidimensional hidrogênio-hidrogênio, os quais indicam presença de correlação entre os hidrogênios em δ 3,51 (H-2a); δ 3,52 (H-3); δ 4,21 (H-2b) e δ 5,46 ppm (H-4).

21. Processo de obtenção, isolamento, purificação e caracterização do isoflavanol Bolusanthol D, de acordo com as reivindicações 10 e 11, caracterizado pelo fato de, na etapa g), no método espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e bidimensional COSY usados para caracterizar o isoflavanol Bolusanthol D, apresenta sinais de correlação bidimensional hidrogênio-hidrogênio, os quais evidencia as correlações do próton em δ 6,49 ppm (H-6) com os prótons em 6,30 (H-8) e 7,28 ppm (H-5) e também as correlações do próton em δ 6,44 ppm (H- 5') com os prótons em δ 6,38 (H-3') e 7,16 ppm (H-6').

22. Processo de obtenção, isolamento, purificação e caracterização do isoflavanol Bolusanthol D, de acordo com as reivindicações 10 e 11, caracterizado pelo fato de, na etapa g), no método espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e bidimensional NOESY usados para caracterizar o isoflavanol Bolusanthol D, apresenta sinais de correlação espacial hidrogênio-hidrogênio, os quais permite observar que o hidrogênio H-3 (δ 3,52 ppm) se correlaciona com H-4 (δ 5,46 ppm), além das correlação entre o próton H-2b (δ 4,21 ppm) com os prótons H-4 (δ 5,46 ppm) e H-3 (δ 3,52ppm).

23. Processo de obtenção, isolamento, purificação e caracterização do isoflavanol Bolusanthol D, de acordo com as reivindicações 10 e 11, caracterizado pelo fato de, na etapa g), no método espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e bidimensional NOESY usados para caracterizar o isoflavanol Bolusanthol D, apresenta sinais de correlação espacial hidrogênio-hidrogênio, os quais permite estabelecer a estereoquímica relativa para os hidrogênios H-3 e H-4 foi definida usando o espectro NOESY onde o composto Bolusanthol D apresentou interação axial e uma relação *cis* entre os hidrogênios H-3 e H-4.

24. Processo de obtenção, isolamento, purificação e caracterização do isoflavanol Bolusanthol D, de acordo com as reivindicações 10 e 11, caracterizado pelo fato de, na etapa g), no método espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e bidimensional NOESY usados para caracterizar o isoflavanol Bolusanthol D, apresenta sinais de correlação espacial hidrogênio-hidrogênio, os quais permite estabelecer correlações espaciais entre H-2a (δ 3,51 ppm) e H-6' (δ 7,17 ppm), entre H-4 (δ 5,46 ppm) e H-5 (δ 7,28 ppm), entre H-3' (δ 6,38 ppm) com um dos hidrogênios da metoxila em δ 3,73 ppm.

25. Processo de obtenção, isolamento, purificação e caracterização do isoflavanol Bolusanthol D, de acordo com as reivindicações 1 e 24, caracterizado pelo fato de, na etapa g), nos métodos espectroscópicos usados para caracterizar o marcador químico Bolusanthol D que apresenta nomenclatura oficial IUPAC (3R,4R)-3-(2-Hydroxy-4-methoxyphenyl)-4,7-chromanediol.

26. Processo de obtenção, isolamento, purificação e caracterização do isoflavanol Bolusanthol D, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de, na etapa h), utiliza-se ensaio biológico leishmanicida para caracterizar os extratos e frações hexânicas ricas no isoflavanol Bolusanthol D.

27. Processo de obtenção, isolamento, purificação e caracterização do isoflavanol Bolusanthol D, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de, na etapa h), no ensaio biológico contra *Leishmania braziliensis* comprova-se atividade leishmanicida dos extratos e frações hexânicas ricas no isoflavanol Bolusanthol D, os valores de IC₅₀ do extrato bruto, fase hexânica, Fração Hexânica denominada FrHex 21 e Fração Hexânica denominada FrHex 10 foram iguais à 38,30; 32,31; 83,65 e 191,0 µg/mL, respectivamente.

DESENHOS

FIG. 1

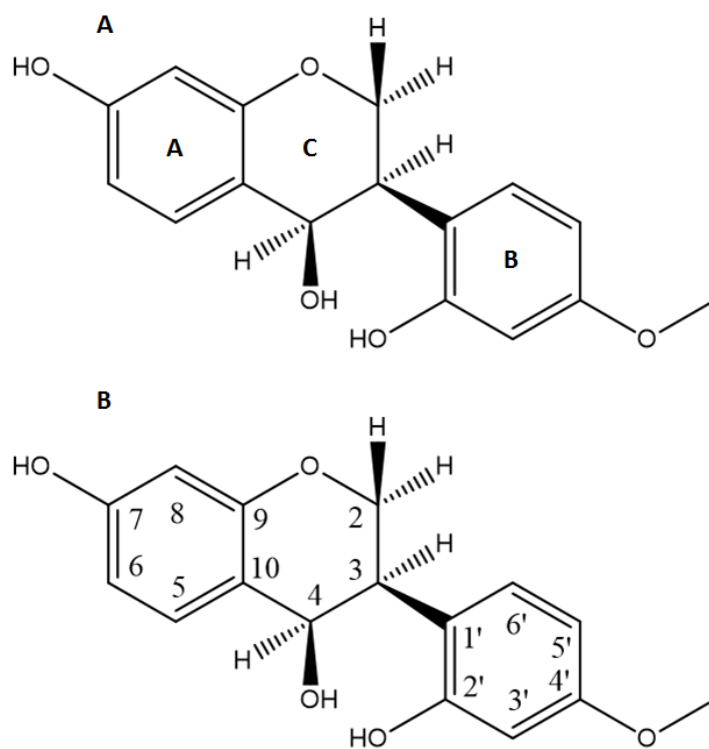


FIG. 2

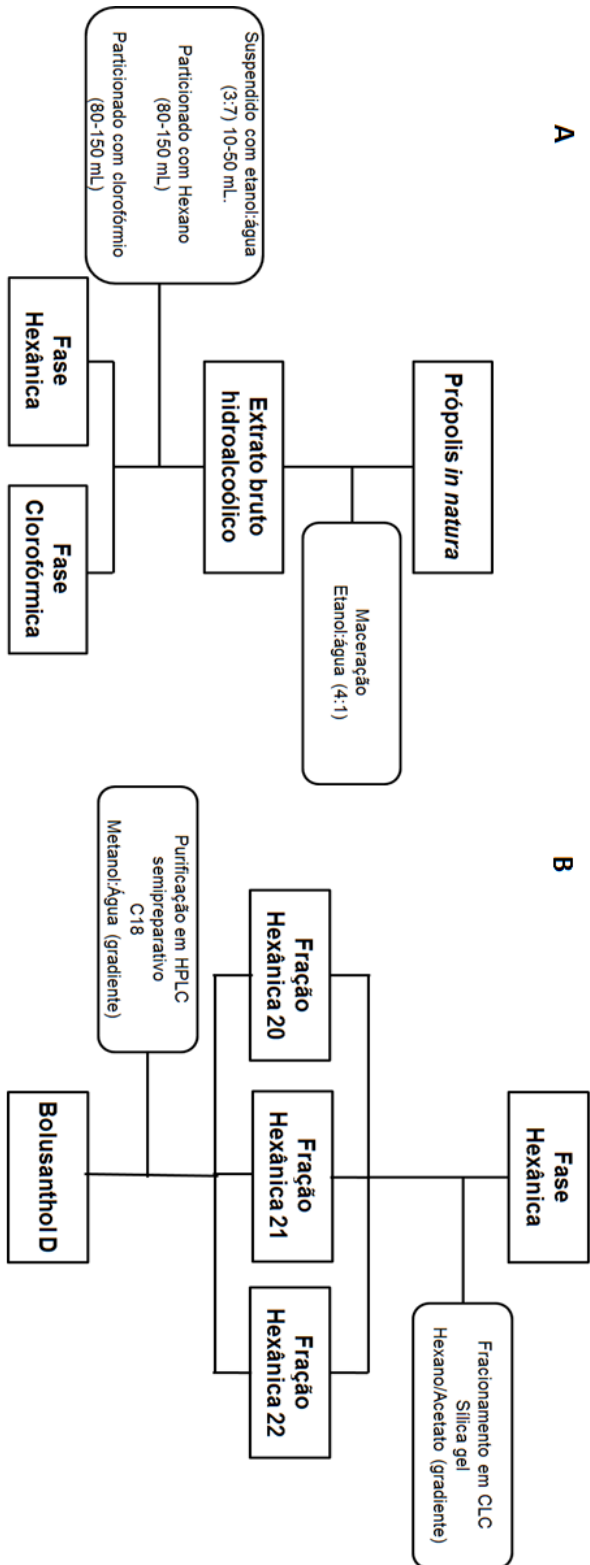


FIG. 3

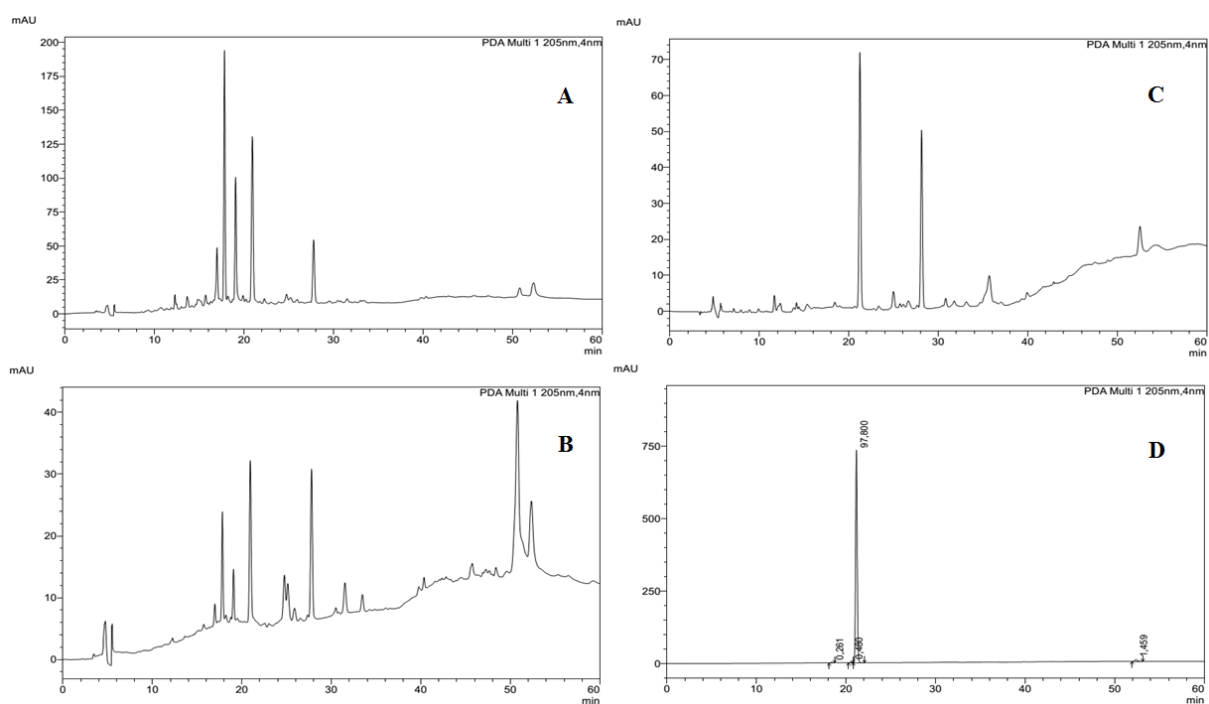


FIG. 4

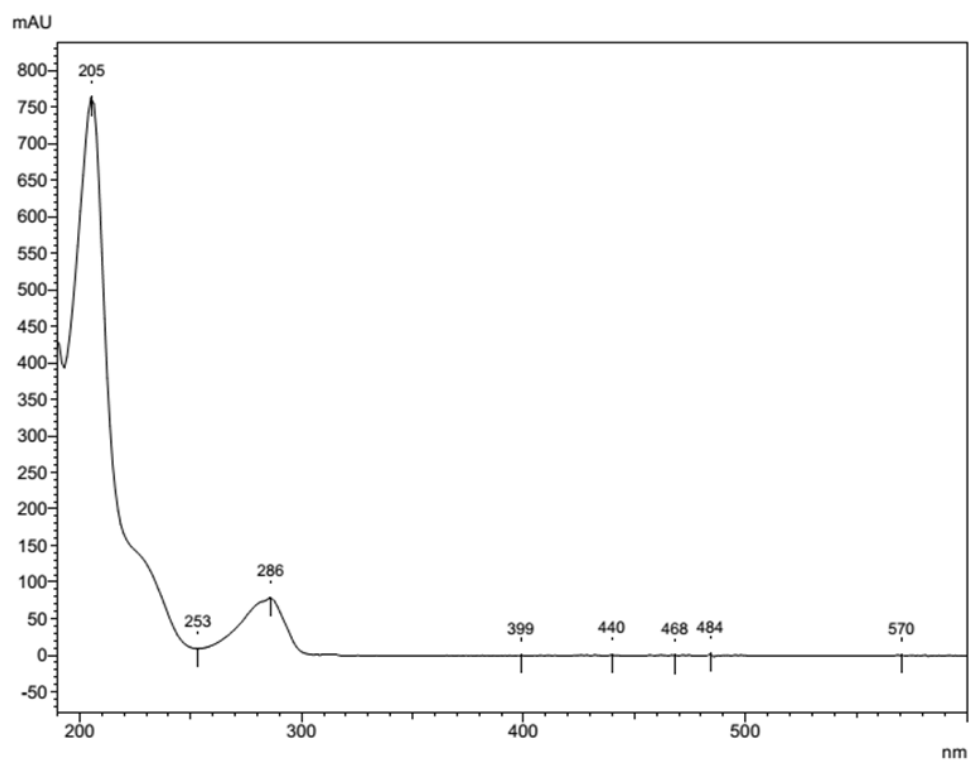


FIG. 5

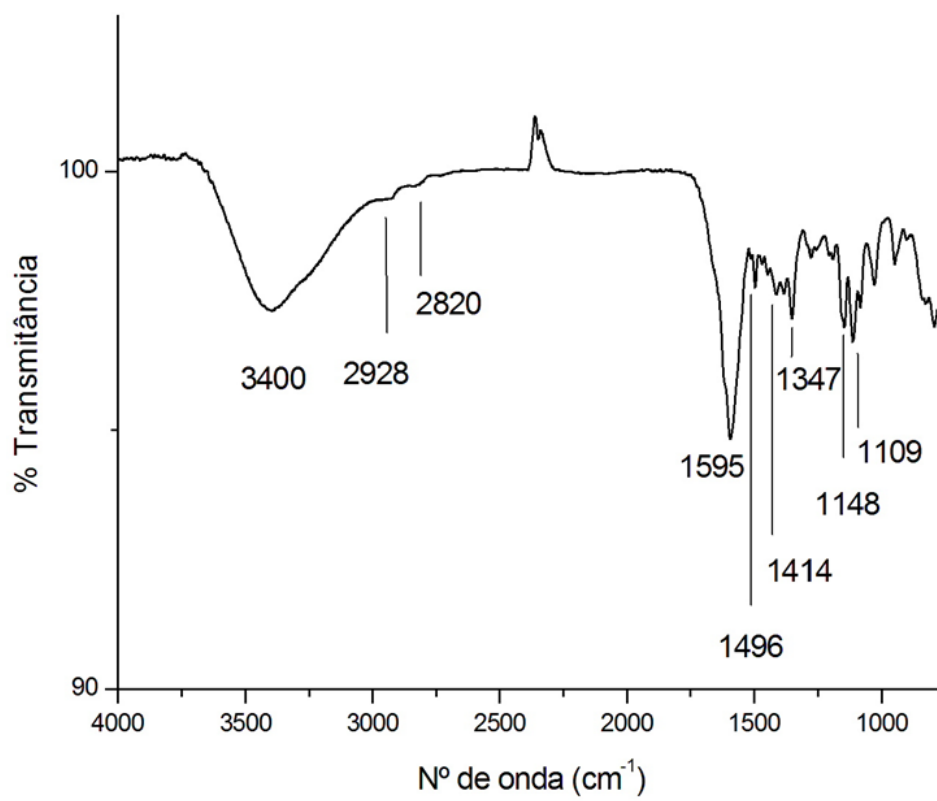


FIG. 6

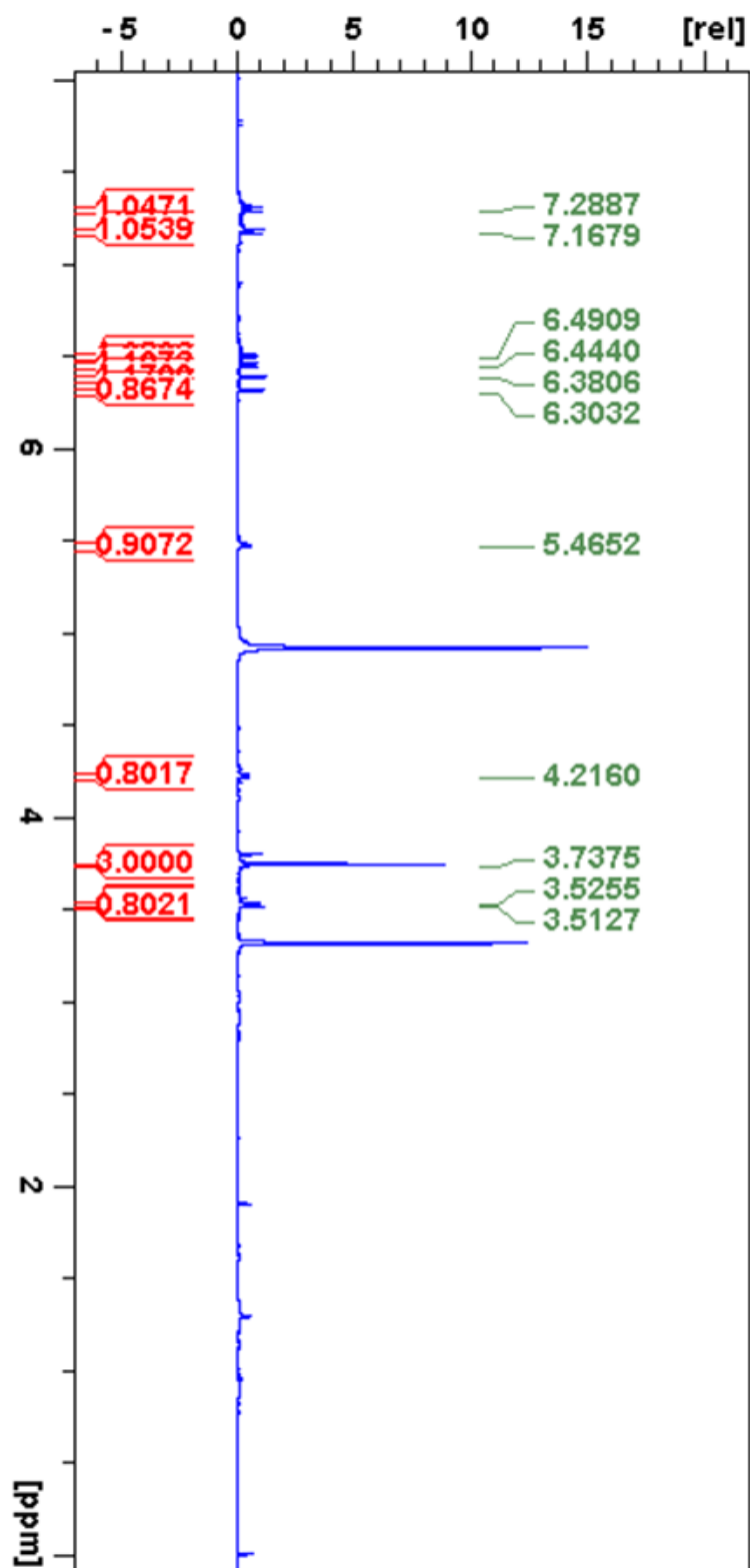


FIG. 7

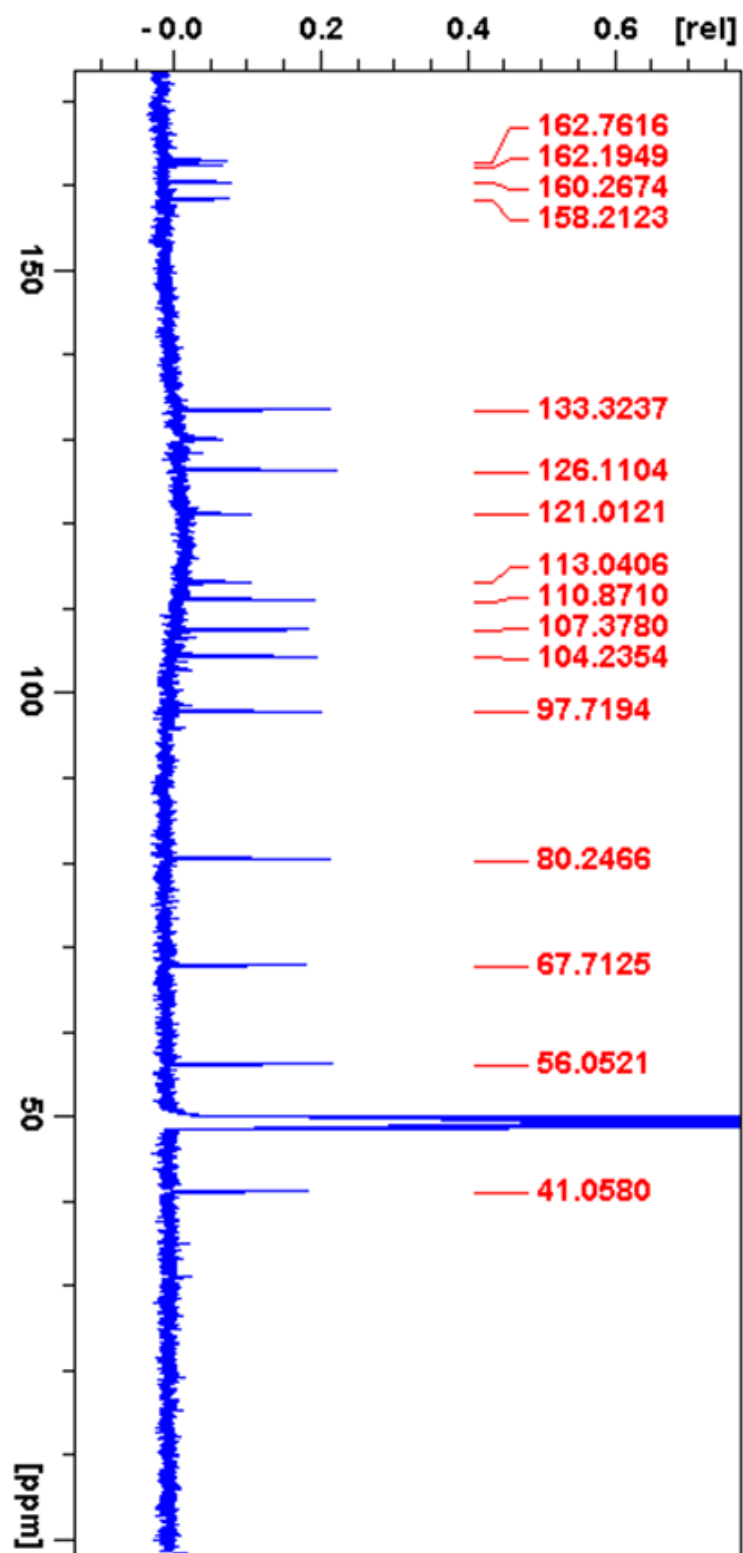


FIG. 8

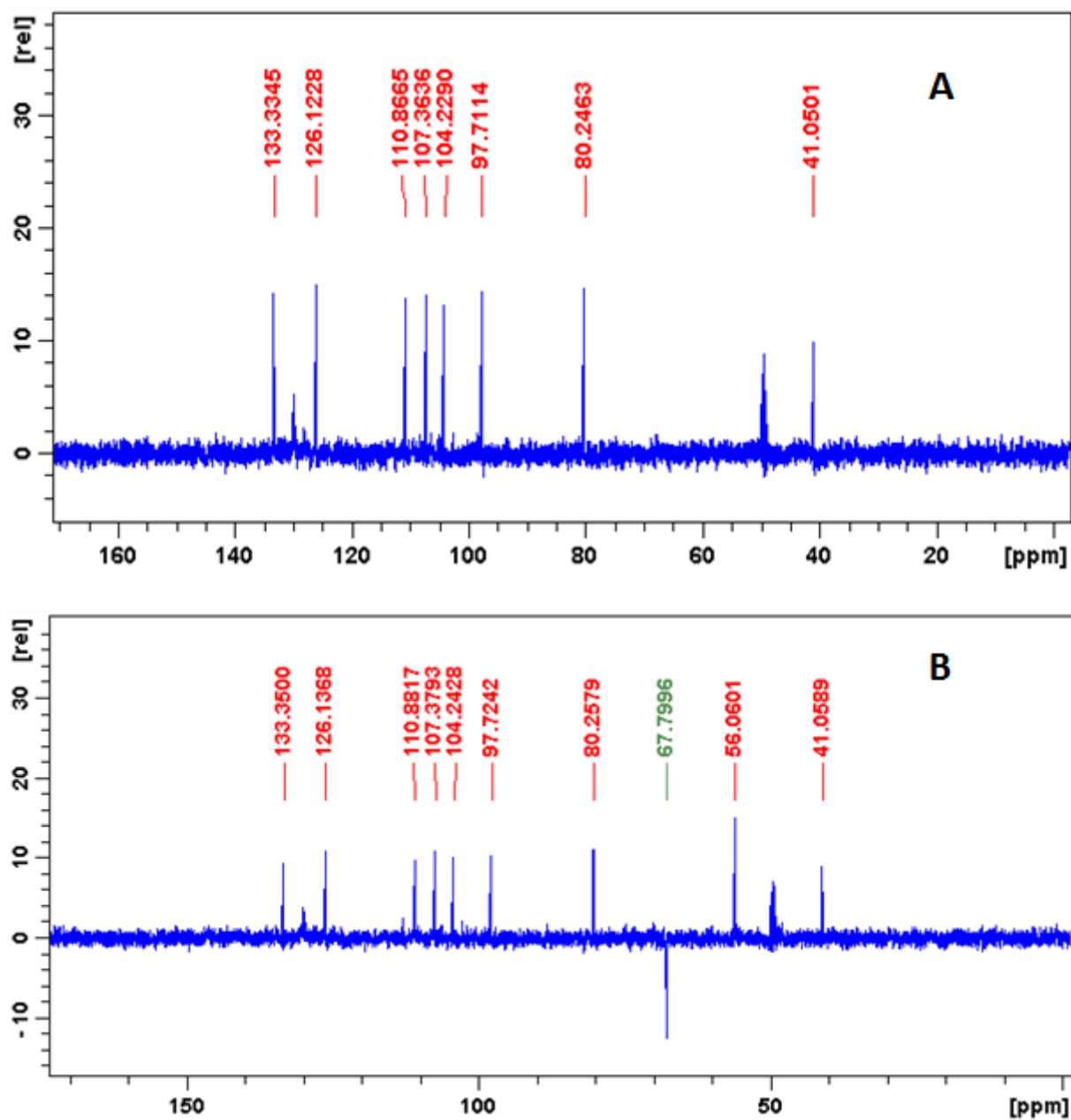


FIG. 9

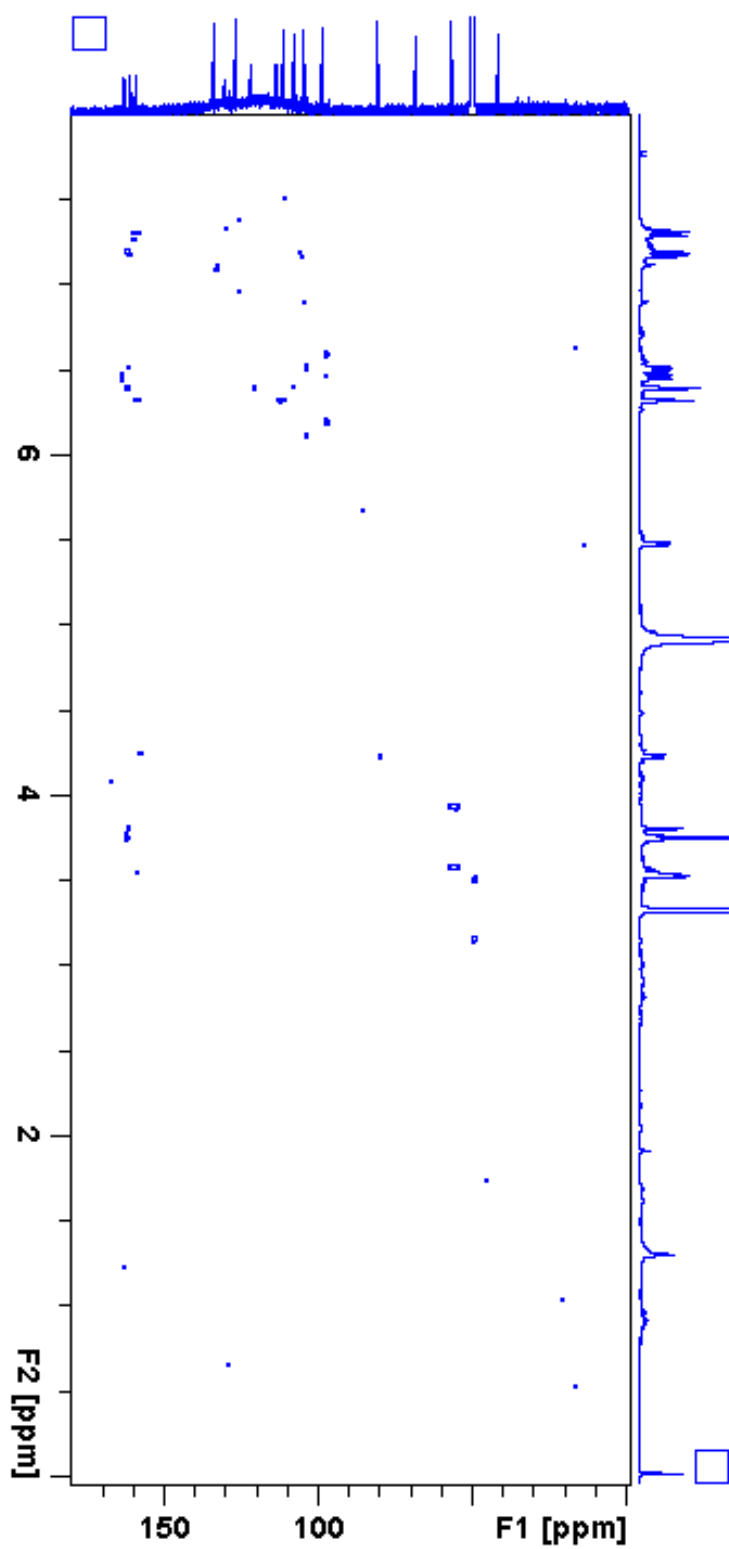


FIG. 10

