

Ana Rita da Costa Faustino

Preparação De Novos Triterpenóides Semi-Sintéticos

Dissertação de Mestrado em Química Farmacêutica Industrial, orientada pelo Professor Doutor Jorge António Ribeiro Salvador e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Março de 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Rita da Costa Faustino

Preparação De Novos Triterpenóides Semi-Sintéticos

Dissertação de Mestrado em Química Farmacêutica Industrial, orientada pelo Professor
Doutor Jorge António Ribeiro Salvador e apresentada à Faculdade de Farmácia da
Universidade de Coimbra

Março de 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, não sou o que irei ser. . .mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)

AGRADECIMENTOS

A realização do presente trabalho não teria sido possível sem a orientação, o apoio e incentivo de diversas pessoas, a quem quero deixar expresso o meu sincero agradecimento.

Primeiramente, agradeço ao Professor Doutor Jorge Salvador, orientador deste trabalho, pelos ensinamentos e preciosos conselhos, pela revisão e por toda a confiança depositada em mim na realização desta dissertação.

A todos os docentes e funcionários do Laboratório de Química Farmacêutica e da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, agradeço todo o apoio prestado, e toda a convivência e ensinamentos científicos.

Aos meus colegas de laboratório, obrigado pelo apoio constante e disponibilidade demonstrado em inúmeras ocasiões durante a realização deste trabalho. À Sandra Figueiredo o meu sincero agradecimento pela dedicação demonstrada na revisão desta dissertação e por todos os conselhos concedidos diariamente. E ainda aos meus colegas de mestrado, pela amizade e companheirismo durante estes dois anos.

Agradeço também ao Pedro Cruz, pelo trabalho técnico desenvolvido na elucidação estrutural de inúmeras amostras, no Laboratório de Ressonância Magnética (L-RMN) do Departamento de Química da Universidade de Coimbra.

À D. Ana e a todas as funcionárias da Reprografia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, pela paciência prestada e pela revisão minuciosa desta dissertação.

A todos os meus amigos, o meu sincero agradecimento por todos os momentos de apoio e incentivo, vocês tornaram-me uma pessoa melhor.

A ti amiga, Manuela Pereira, obrigada pela disponibilidade, pela ajuda constante, e por todo o apoio demonstrado, sem ti nada disto seria possível, obrigada por teres sempre a palavra certa no momento certo.

Por fim, agradeço em especial àqueles que sempre me apoiaram incondicionalmente, aos meus pais e irmã, que apostaram em mim mais do que ninguém.

O meu obrigado a todas as outras pessoas que indiretamente participaram nesta fase da minha vida.

RESUMO

Os triterpenóides são uma classe de produtos naturais biologicamente ativos, encontrados em alguns seres vivos. Ao longo dos últimos séculos, as plantas medicinais contendo triterpenóides na sua composição apresentaram-se como uma fonte ideal no tratamento de diversas doenças. Atualmente, inúmeros estudos têm registado os diversos efeitos terapêuticos dos triterpenóides extraídos a partir de plantas. Estes compostos apresentam atividades biológicas muito diversificadas, tais como, antitumoral, anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, antifúngica e hepatoprotetora. Os triterpenóides pentacíclicos mais citados e que apresentam um maior número de atividades biológicas registadas são o ácido ursólico e oleanólico. No entanto, estes compostos apresentam algumas limitações, nomeadamente nas suas ações biológicas, apesar de ser diversificada, estudos comprovam que não são as mais eficazes.

Com o intuito de melhorar a ação biológica dos triterpenóides, a comunidade científica tem centrado atenções na síntese e/ou semi-síntese de novos derivados triterpenóides, isto é, têm-se efetuado modificações estruturais específicas na estrutura química do triterpenóide, com vista a melhorar a sua relação estrutura-atividade (REA).

Nesta tese realizou-se a semi-síntese de quatro derivados triterpenóides pentacíclicos obtidos a partir do ácido ursólico e oleanólico e a sua elucidação estrutural através da análise espectral.

ABSTRACT

The triterpenoids are a class of natural products biologically active, found in some living beings. Over the past centuries, medicinal plants contain triterpenoids in its composition, presenting itself as a major source in treatment of several diseases. Nowadays, several studies had reported different therapeutic effects of triterpenoids extracted from plants. These compounds present biological activities very diverse, such as, antitumor, anti-inflammatory, antibacterial, antiviral, antifungal, and hepatoprotective. The most triterpenoids frequently mentioned and present the higher number of biological activities recorded are ursolic and oleanolic acids. However, these compounds have some limitations, specifically its biological actions, although many studies show that aren't the most effective.

In order to improve the triterpenoids action, the scientific community has focused attention on the synthesis and/or semi-synthesis of new triterpenoids derivatives, that is, have been made specific structural changes in chemistry structure of triterpenoid to improve structure-activity (SAR).

In this thesis was made four semi-synthetic pentacyclic triterpenoid obtained from ursolic and oleanolic acids and the structural elucidation by spectral analysis.

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ANPC	Antigénio Nuclear de Proliferação Celular
AO	Ácido oleanólico
AU	Ácido ursólico
CCF	Cromatografia de Camada Fina
CDCl ₃	Clorofórmio Deuterado
CDDO	Ácido 2-ciano-3,12-dioxoolean-1,9(11)-dien-28-óico
CDKs	Ciclina Dependentes de Kinases
COX	Cicloxygenase
d	Dubleto
dd	Duplo Dubleto
DEPT	<i>“Distortionless Enhancement by Polarization Transfer”</i>
DEPT-135	<i>“Distortionless Enhancement by Polarization Transfer”</i> com uma largura de impulso 135°
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
EMA	<i>“European Medicines Agency”</i>
FCEV	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
FDA	<i>“Food and Drug Administration”</i>
J	Constante de acoplamento
MVA	Melovato ou Ácido Mevalónico
NaCl	Cloreto de Sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
ON	Óxido Nítrico
PF	Pirofosfato de Farnesilo
PG	Pirofosfato de Geranilo
PGG	Pirofosfato de Geranil-Geranilo
PIP	Pirofosfato de Isopentenila

PNR	Peptídeos Não Ribossomais
PPDMA	Pirofosfato de Dimetilalilo
RA	Receptor Nuclear Andrógeno
REA	Relação Estrutura-Atividade
RhA	Receptor Hidrocarboneto de Arilo
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Protão
s	Singleto
SNC	Sistema Nervoso Central
SON	Sintetase de Óxido Nítrico
t	Tripleto
THF	Tetrahidrofurano
VHB	Vírus da Hepatite B
VHC	Vírus da Hepatite C
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana
VPH	Vírus do Papiloma Humano
WHO	<i>“World Health Organization”</i>
δ	Desvio químico (RMN)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Origem de todos os novos fármacos aprovados entre 1981 e 2010 (n=1355)....	4
Figura 1.2. Esquemática da diversidade biossintética dos principais precursores da classe dos terpenos.....	7
Figura 1.3. Esquema representativo da biossíntese do esqualeno	8
Figura 1.4. Classificações químicas e representação das principais estruturas químicas de alguns triterpenóides.....	9
Figura 1.5. Estrutura química dos triterpenóides: ursólico (11) e oleanólico (12)	10
Figura 1.6. Exemplo de uma saponina triterpenóide (13 - <i>Platycoside</i>)	11
Figura 1.7. Estrutura química do AO e de produtos semi-sintéticos com potencial terapêutico no tratamento do cancro	13
Figura 1.8. Taxa de mortalidade do cancro em todo mundo durante 2008	15
Figura 1.9. Os 10 principais tipos de cancro causados nos homens e nas mulheres	16
Figura 1.10. Representação do ciclo celular	17
Figura 1.11. Representação das <i>Hallmarks</i> do cancro.....	19
Figura 1.12. Representação do mecanismo apoptótico extrínseco e intrínseco numa célula.....	20
Figura 1.13. Exemplos de compostos alcalóides com atividade antitumoral.....	21
Figura 1.14. Representação da estrutura química do Paclitaxel (Taxol®)	22
Figura 1.15. Representação da estrutura química do Docetaxel (Taxotere®)	22
Figura 1.16. Representação da podofolotoxina e alguns derivados.....	23
Figura 1.17. Representação da camptotecina e dos seus derivados.....	24
Figura 1.18. Representação da hipericina utilizada como fotossensibilizante	24
Figura 1.19. Diagrama esquemático dos diversos alvos moleculares dos triterpenóides e a reversão da multirresistência aos fármacos anticancerígenos.....	25
Figura 1.20. Diagrama esquemático da relação da concentração dos triterpenóides com o <i>stress</i> oxidativo	27
Figura 1.21. Mecanismo de ação dos triterpenóides no VHC.....	30
Figura 3.22. Representação estrutural de um triterpenóide pentacíclico.....	36
Figura 3.23. Diagrama esquemático de uma sequência química.....	37
Figura 3.24. Produto secundário 11.2 da reação a)	40

Figura 3.25. Espectro ^1H -RMN do derivado 11.1.....	41
Figura 3.26. Espectro ^{13}C -RMN do derivado 11.1.....	42
Figura 3.27. Espectro DEPT-135 do derivado 11.1.....	42
Figura 3.28. Espectro ^1H -RMN do derivado 11.3.....	44
Figura 3.29. Espectro ^{13}C -RMN do derivado 11.3.....	45
Figura 3.30. Espectro DEPT-135 do derivado 11.3.....	45
Figura 3.31. Espectro ^1H -RMN do derivado 11.4.....	47
Figura 3.32. Espectro ^{13}C -RMN do derivado 11.4.....	47
Figura 3.33. Espectro DEPT-135 do derivado 11.4.....	48
Figura 3.34. Exemplos de reagentes fluorados nucleófilos.....	49
Figura 3.35. Exemplos de reagentes fluorados eletrófilos.....	49
Figura 3.36. Espectro ^1H -RMN dos derivados 12.1 e 12.2.....	51

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1. Fontes de triterpenóides na Natureza e respetiva atividade biológica	14
Tabela 1.2. Resposta biológica dos triterpenóides dependente da sua concentração.....	27
Tabela 1.3. Determinação <i>in vitro</i> do IC50 (μ M) do AU nas várias formas da leishmânia	29

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 3.1. Síntese do derivado 11.1.....	39
Esquema 3.2. Síntese do derivado 11.3.....	43
Esquema 3.3. Síntese do derivado 11.4.....	46
Esquema 3.4. Síntese dos derivados 12.1 e 12.2.....	50

ÍNDICE

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE ABREVIATURAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE TABELAS	vii
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. PRODUTOS NATURAIS.....	3
1.1.1. Os Produtos Naturais na Indústria Farmacêutica	3
1.2. TERPENOS.....	6
1.2.1. Conceitos Gerais	6
1.2.2. Diversidade Biossintética dos Triterpenóides.....	7
1.2.3. Propriedade Químicas dos Triterpenóides.....	9
1.2.4. Semi-Síntese dos Triterpenóides.....	11
1.3. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS TRITERPENÓIDES	14
1.3.1. Atividade Antitumoral.....	14
1.3.1.1. Ciclo Celular	17
1.3.1.2. Células Cancerígenas	18
1.3.1.3. Produtos Naturais com Atividade Antitumoral	20
1.3.1.4. Mecanismo de Ação dos Triterpenóides.....	25
1.3.2. Atividade Anti-Inflamatória.....	28
1.3.3. Atividade Microbiana.....	29
1.3.4. Outras Atividades Biológicas.....	30
2. OBJETIVOS.....	32
3. SÍNTESE QUÍMICA E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	34
3.1. Conceitos Gerais	36
3.2. Ácido Ursólico	38
3.3. Ácido Oleanólico	48
3.4. Parte Experimental	52
4. CONCLUSÃO	54
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

I. INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

I.1. PRODUTOS NATURAIS

I.1.1. Os Produtos Naturais na Indústria Farmacêutica

I.2. TERPENOS

I.2.1. Conceitos Gerais

I.2.2. Diversidade Biossintética dos Triterpenóides

I.2.3. Propriedade Químicas dos Triterpenóides

I.2.4. Semi-Síntese dos Triterpenóides

I.3. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS TRITERPENÓIDES

I.3.1. Atividade Antitumoral

I.3.1.1. Ciclo Celular

I.3.1.2. Células Cancerígenas

I.3.1.3. Produtos Naturais com Atividade Antitumoral

I.3.1.4. Mecanismo de Ação dos Triterpenóides

I.3.2. Atividade Anti-Inflamatória

I.3.3. Atividade Microbiana

I.3.4. Outras Atividades Biológicas

I.1. PRODUTOS NATURAIS

Durante a evolução humana, os produtos naturais foram utilizados para o tratamento de diversas doenças durante vários séculos. Estes compostos naturais apresentam atividades biológicas essenciais e são derivados de fontes naturais, como por exemplo, plantas, animais e micro-organismos. Os químicos no final do século XVIII começaram a dedicar mais tempo ao estudo das substâncias presentes nos organismos vivos, com o objetivo de isolá-las e então, identifica-las.^{1,2} No início do século XX, 80% de todos os medicamentos utilizados provinham de fontes naturais, nomeadamente das raízes, cascas e folhas.³

Os produtos naturais derivam do fenómeno da biodiversidade, apresentando certas características únicas comparativamente com as moléculas que são sintetizadas pela química medicinal, e constituem uma das maiores fontes na descoberta de novos fármacos para o tratamento de doenças infecciosas, neurológicas, cardiovasculares, inflamatórias, e oncológicas.^{1,4,5}

I.1.1. OS PRODUTOS NATURAIS NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

A indústria farmacêutica tem como princípios básicos o conhecimento e a descoberta de novos produtos naturais para a produção de novos fármacos. Com este desenvolvimento descobriu-se que os produtos naturais apresentavam algumas propriedades específicas importantes para o avanço da medicina moderna.³ No entanto, o facto de serem produzidos biologicamente, em organismos vivos, levanta algumas dúvidas à sua utilização e desenvolvimento. Inicialmente, os produtos naturais eram descritos em muitos livros como desperdícios metabólicos, no entanto a partir de 1970, novas análises revelaram que os organismos que produziam estes metabolitos libertavam substâncias químicas, muitas delas tóxicas, como forma de proteção ou até mesmo de comunicação.^{6,7}

A importância dos produtos naturais na medicina, na agricultura e na indústria tem conduzido a inúmeros estudos de síntese, biossíntese e de atividades biológicas para estas substâncias. Os produtos naturais são divididos em várias classes estruturais: polipeptídeos, peptídeos não ribossomais (PNR), terpenos, alcalóides, entre outros.⁶

Hoje em dia, a indústria farmacêutica moderna, baseia o seu estudo na descoberta de novos produtos naturais bioativos, identificando-os como novos compostos “lead”

(apresentam certas características propícias para gerar um novo fármaco). Apesar das companhias farmacêuticas durante muitos anos terem negligenciado o potencial farmacêutico dos produtos naturais, atualmente, cerca de metade dos fármacos utilizados clinicamente são produtos de origem natural.^{5,8-10}

No estudo realizado por Newman e Cragg¹¹, foram analisados os novos fármacos aprovados entre 1981 e 2010, e foram agrupados em diversas categorias de acordo com a sua origem (Figura 1.1).^{11,12}

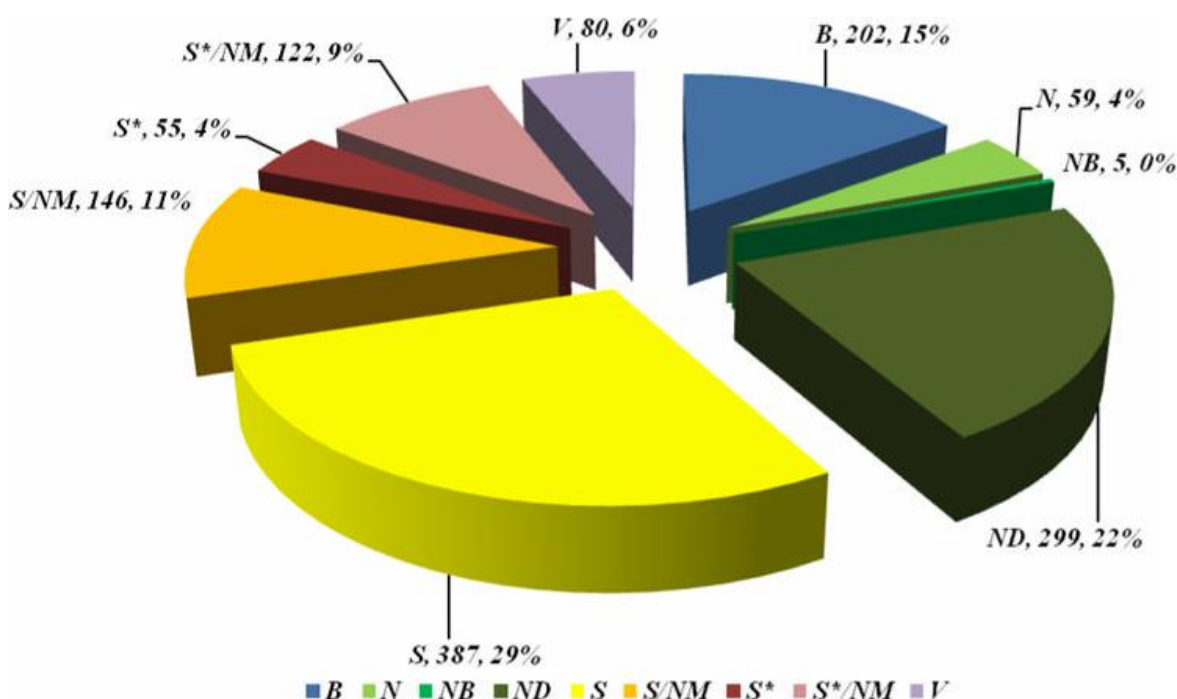


Figura 1.1. Origem de todos os novos fármacos aprovados (nº=1355). V - vacinas ; B - Biológico (peptídeo ou proteína isolado de um organismo/célula ou produzido meios biotecnológicos); N - produto natural não modificado; NB - produto natural botânico; ND - derivado de produto natural; S - composto sintético sem nenhuma conceção de produtos naturais; S* - composto sintético mas o farmacóforo é/era de origem natural NM - simulação de um produto natural.¹¹

Consegue-se perceber que apesar dos produtos naturais existirem em bastante abundância na natureza a sua transformação em fármacos não é diretamente proporcional à sua abundância. Na realidade, existem mais produtos sintéticos comercializados do que produtos naturais. Este estudo demonstra a importância atribuída à contribuição da natureza como inspiração para a síntese e semi-síntese de novas moléculas.¹¹

As indústrias farmacêuticas nas últimas décadas têm diminuído o seu investimento na procura e desenvolvimento de novos fármacos a partir de produtos naturais. O difícil acesso

aos produtos naturais, o seu fornecimento ou a difícil separação das misturas dos compostos obtidos são alguns dos principais problemas que contribuíram para a crescente falta de interesse das indústrias farmacêuticas. Recentemente, a evolução de novas tecnologias revolucionou o *screening* dos produtos naturais; a sua aplicação permite contornar algumas limitações iniciais.¹³⁻¹⁵

O interesse da *síntese total* na produção de compostos orgânicos semelhantes aos produtos naturais devido às atividades biológicas interessantes que exibem tem provocado inúmeros desafios no ponto de vista químico, até mesmos aos melhores grupos de Química Orgânica em todo o mundo.¹⁶ Os desenvolvimentos ocorridos na Química Farmacêutica baseiam-se principalmente no estudo da semi-síntese, ou seja, em modificações na estrutura do composto. Por exemplo, os produtos naturais de difícil isolamento necessitam que as modificações estruturais sejam realizadas em compostos com uma estrutura química semelhante, para obter o produto natural inicialmente desejado, em quantidades suficientes para o seu desenvolvimento e consequente comercialização. O fornecimento dos compostos para o desenvolvimento de ensaios pré-clínicos é um dos principais problemas para a criação de um novo fármaco na indústria farmacêutica. Muitos grupos de síntese também têm em atenção a apresentação de uma estratégia que seja economicamente mais viável na produção do novo fármaco.^{15,17}

A descoberta e comercialização de novos fármacos é um processo demorado sendo necessário em média entre uma a duas décadas para que um novo fármaco seja aprovado e comercializado. Existem muitos protocolos que têm de ser cumpridos pelas entidades especializadas que regulam os medicamentos inseridos no mercado. Em 1997, a *Food and Drug Administration* (FDA), entidade reguladora nos Estados Unidos da América, aprovou um programa que permite que os candidatos a fármacos sejam testados em humanos antes que sejam introduzidos no mercado, devido ao longo tempo de espera e à existência de muitos pacientes em risco de vida. Esta decisão foi depois alargada a outras entidades reguladoras na Europa, Japão e Austrália. A *European Medicines Agency* (EMA) é a entidade que rege na União Europeia.⁵

Apesar do todo o benefício que os produtos naturais podem trazer para a indústria farmacêutica, apenas aproximadamente 10% da biodiversidade em todo o mundo foi explorada para a procura de novos compostos biologicamente ativos. É importante lembrar que a Mãe-Natureza apresenta cerca de 3 biliões de anos e apenas foi explorada superficialmente.^{6,13}

I.2. TERPENOS

I.2.1. CONCEITOS GERAIS

As plantas sintetizam uma enorme variedade de metabolitos classificando-os como: metabolitos primários aqueles que são sintetizados para processos metabólicos (fotossíntese e regulação do crescimento e desenvolvimento) no interior da planta, e os metabolitos secundários aqueles que estimulam reações ecológicas entre a planta e o meio ambiente. Os terpenos são considerados um metabolito secundário, identificando-se também como uma classe de produtos naturais presente em muitas fontes biológicas, tais como, as frutas, vegetais, cereais, leguminosas, ervas aromáticas e também em plantas medicinais. As plantas são capazes de produzir uma grande variedade de terpenos e muitos delas são utilizadas na medicina tradicional há várias centenas de anos.¹⁸⁻²¹

Os terpenos são metabolitos resultantes da condensação do pirofosfato de isopentenilo (PIP) e do pirofosfato de dimetilalilo (PPDMA), que atuam como precursores na biossíntese de moléculas em diversos processos, nomeadamente na manutenção da membrana celular. O PIP e PPDMA utilizados para a formação de terpenos são constituintes da via do mevalonato (MVA), também denominada como via HMG-CoA ou via dependente do mevalonato. Todos os terpenos são sintetizados a partir das estruturas básicas isoprenos, constituídas por uma cadeia acíclica de cinco carbonos (C_5H_8) (Figura 1.2).²²⁻²⁴

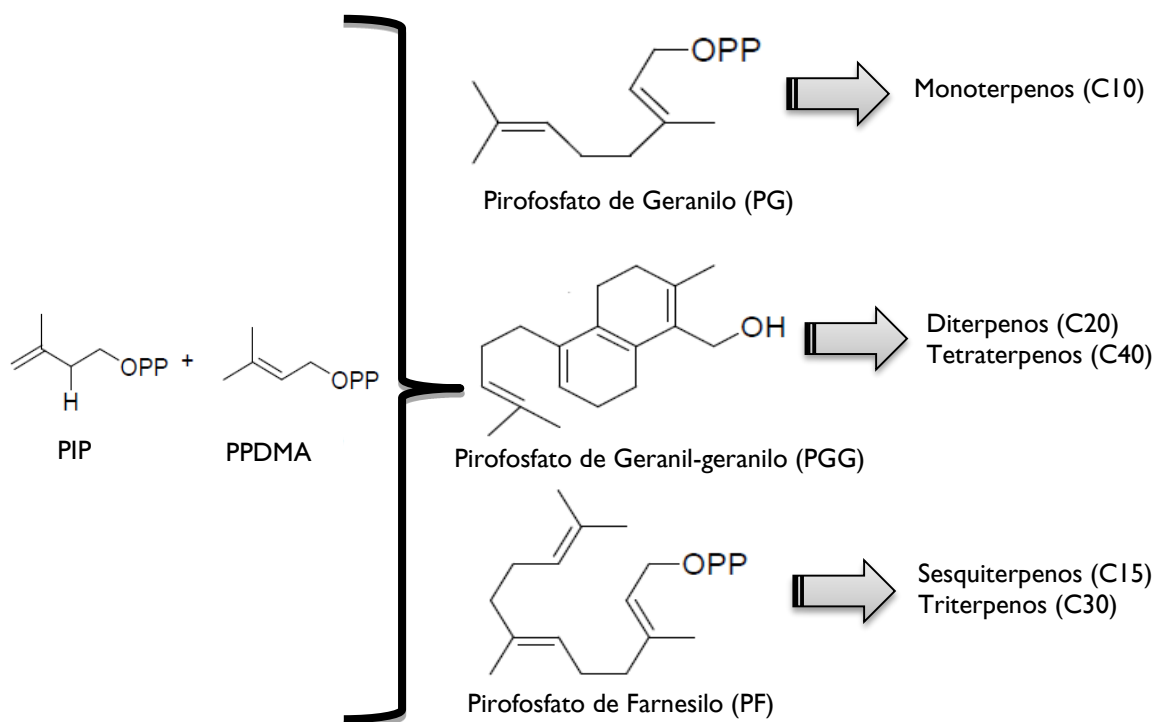


Figura 1.2. Esquemática da diversidade biossintética dos principais precursores da classe dos terpenos.

Existe um amplo espectro de diferentes tipos de terpenos, caracterizados tendo em conta o seu esqueleto, ou seja, o número de carbonos presentes na estrutura principal. Os terpenos são classificados como monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40), entre outros (Figura 1.2).^{22,23,25}

1.2.2. DIVERSIDADE BIOSSINTÉTICA DOS TRITERPENÓIDES

Os triterpenóides são derivados do esqualeno ou de outros precursores acíclicos de 30 carbonos. O mecanismo de biossíntese dos triterpenóides consiste num ataque catiónico, ativando os precursores através da cascata de ciclizações catião-olefina desencadeando um ciclo, que pode progredir para nova reorganização e nova ciclização. Estas reações são acompanhadas pelas sintases dos triterpenóides, ou seja, um grupo de enzimas específicas para estas reações, classificadas como ciclases do esqualeno e do óxido esqualeno (Figura 1.3).²⁶⁻²⁸

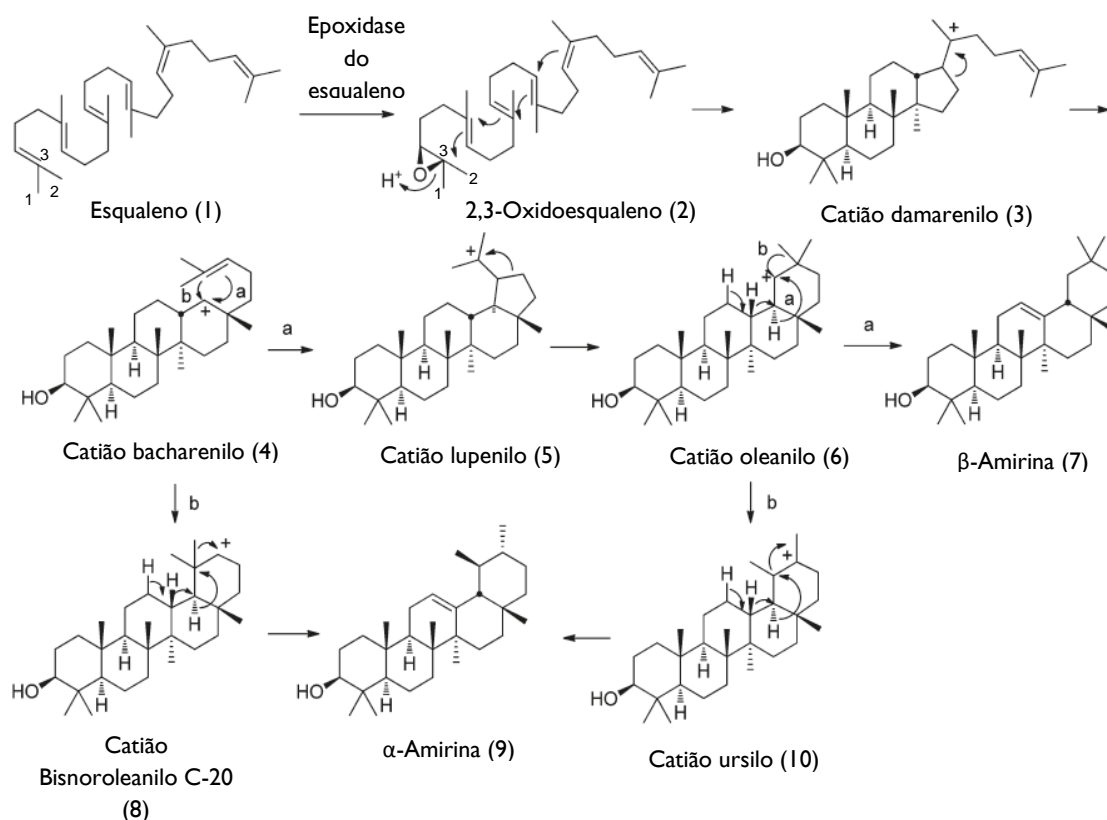


Figura 1.3. Esquema representativo da biossíntese do esqualeno. Adaptado da literatura.²⁸

O esqualeno é um precursor do grupo dos triterpenóides policíclicos; devido à presença de ligações insaturadas na sua estrutura, apresenta também algumas características específicas como a reatividade e termolabilidade. O esqualeno foi isolado pela primeira vez a partir do óleo de fígado de peixe, podendo também ser encontrado em óleos vegetais e gorduras de mamíferos. O óxido esqualeno é o principal precursor na formação dos triterpenóides, tem a particularidade de apresentar um grupo OH no C3 (Figura 1.3). A formação destas estruturas ocorre através da oxidação do esqualeno inicial formando depois um grupo OH no C3.^{28,29}

Frequentemente, os termos terpeno e terpenóide são utilizados de forma pouco clara. O terpeno é um termo coletivo adequado para descrever terpenos naturais, ao passo que, o termo terpenóide inclui igualmente os produtos de degradação natural, bem como os derivados naturais e sintéticos. Os terpenóides são o maior grupo de produtos naturais presentes na natureza, exercendo diferentes funções em diversos organismos, como nas bactérias, leveduras, fungos, plantas, animais e em alguns organismos marinhos. Os terpenóides são caracterizados pela sua diversidade estrutural, ou seja, a sua estrutura inicial pode apresentar diversos rearranjos de ligações carbono-carbono.^{14,30-32}

I.2.3. PROPRIEDADES QUÍMICAS DOS TRITERPENÓIDES

A maioria dos estudos realizados nestes compostos são efetuados com triterpenóides tetracíclicos (quatro anéis) e pentacíclicos (cinco anéis). Os triterpenóides tetracíclicos incluem os damaranos, lanostanos, cicloartanos, cucurbitanos e tirucalanos, e os triterpenóides pentacíclicos são por exemplo, os oleananos, ursanos, lupanos e fridelanos (Figura I.4).^{33,34}

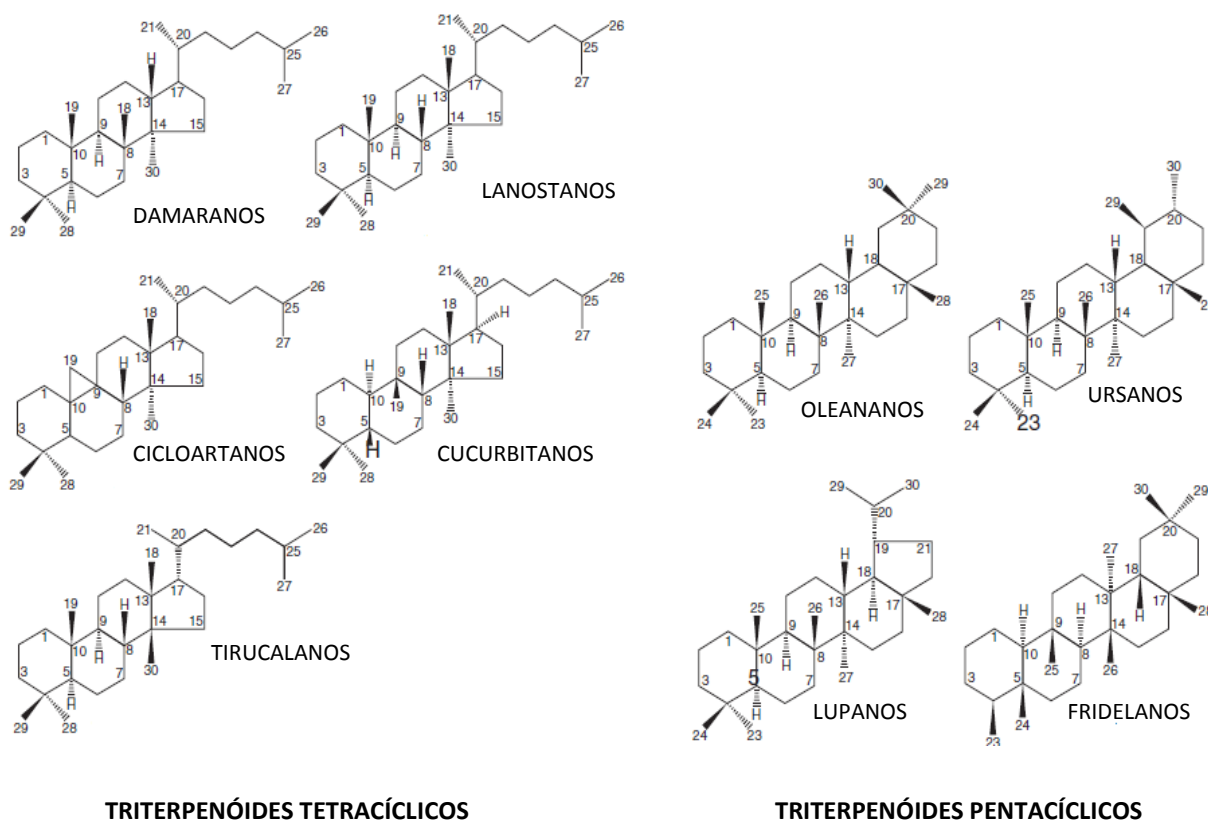


Figura I.4. Classificações químicas e representação das principais estruturas químicas de alguns triterpenóides. Adaptado da literatura.³⁴

Os triterpenóides pentacíclicos apresentam uma estrutura química $C_{30}H_{48}$. O triterpenóide β -amirina (Figura I.3) dá origem aos triterpenóides do tipo do ácido oleanólico (AO) (ácido 3- β -hidroxi-olean-12-en-28-óico), enquanto, α -amirina (Figura I.3) origina o ácido ursólico (AU) (ácido 3- β -hidroxi-urs-12-en-28-óico) (Figura I.5).²⁸ Estes são os dois

triterpenóides mais testados nos últimos anos em inúmeras experiências apresentando uma ampla abordagem farmacológica na literatura.^{25,35-37}

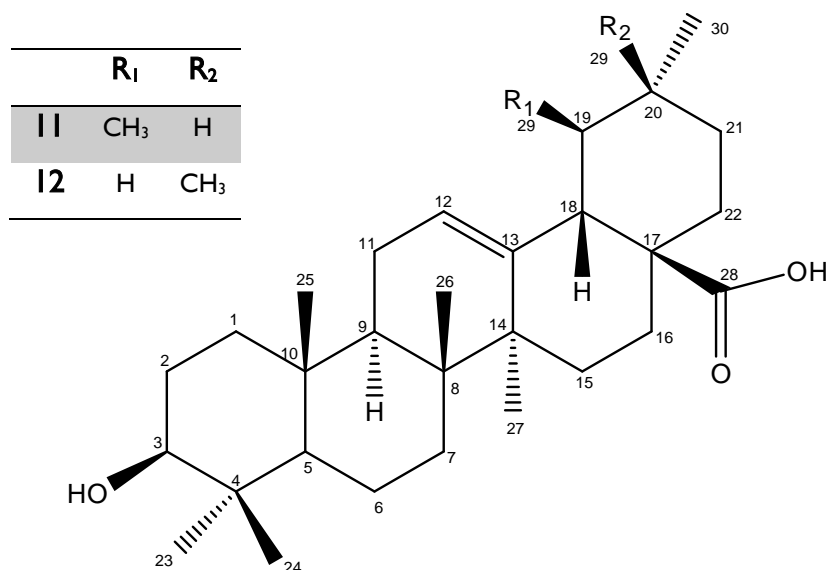


Figura I.5. Estrutura química dos triterpenóides: ursólico (I) e oleanólico (II)

O ácido ursólico (AU) pode ser facilmente obtido com elevada pureza por meio de uma extração com metanol da folha de alecrim. Quanto ao ácido oleanólico (AO), a oliveira (*Olea europaea*) é a sua principal fonte de obtenção, apresentando um elevado rendimento na extração da polpa das azeitonas e das folhas.^{30,36}

Os triterpenóides existem na forma livre ou conjugada com açúcares sob a forma de glicosídeos, denominados como triterpenóides saponinas (Figura I.6).³⁵ Estes são compostos conjugados com carboidratos, existentes em muitas plantas medicinais, alimentos e também em alguns organismos marinhos. As saponinas são consideradas compostos bioativos geralmente produzidos para combater agentes patogênicos e herbívoros.^{33,38,39}

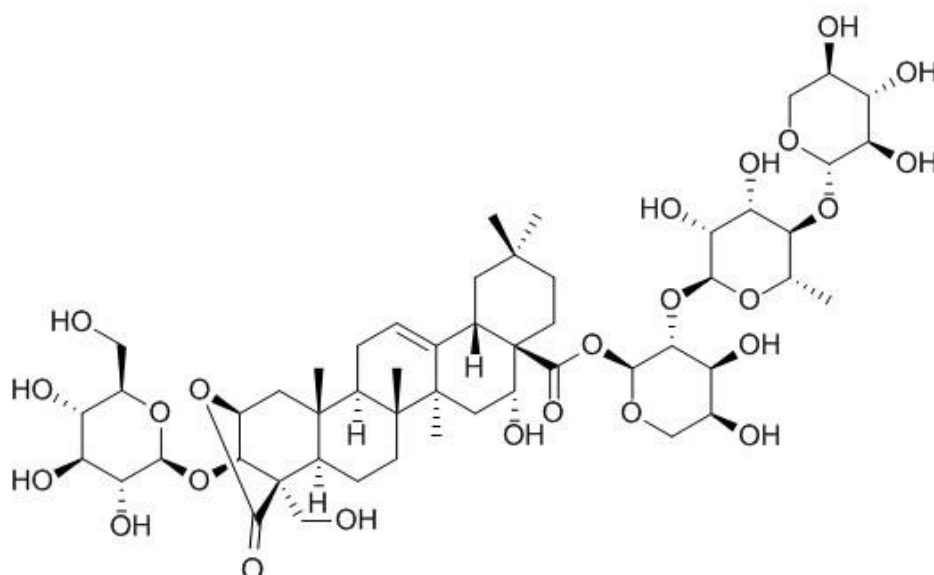


Figura 1.6. Exemplo de uma saponina triterpenóide (13 - *Platycoside*)

As saponinas são classificadas consoante o número de cadeias laterais de sacarídeos ligados à estrutura central (aglicona). As mais comuns são as monodesmosídicas (constituídas por apenas uma cadeia de açúcares), também existem as bidesmosídicas (duas cadeias de açúcares) e as menos abundantes são as tridesmosídicas (três cadeias de açúcares). Os açúcares que normalmente se ligam à saponina são a D-glucose, D-xilose, L-arabinose, L-raminose, D-galactose, ácido glucurónico e acetilo amino açúcar, entre outros.³⁸⁻⁴⁰

Os extratos de plantas contendo saponinas são hoje em dia bastante explorados pela indústria, sendo utilizados na produção de aditivos para alimentos e cosméticos. As saponinas também são conhecidas como sendo um dos maiores constituintes de muitos medicamentos tradicionais.⁴⁰

1.2.4. SEMI-SÍNTESE DOS TRITERPENÓIDES

As modificações estruturais efetuadas na estrutura do triterpenóide podem melhorar as atividades biológicas devido às suas propriedades hemolíticas e citostáticas limitantes para o uso farmacêutico. Para ultrapassar estas limitações e também para expandir a gama de triterpenóides com interesse terapêutico, uma transformação do composto por técnicas químicas apresenta-se como um ponto de vista vantajoso. As modificações são realizadas através de bioprocessos (técnicas biotecnológicas) ou por semi-síntese química.^{28,32,41} No entanto, a necessidade de otimizar reações previamente conhecidas deve-se à importância que

a química verde tem hoje em dia na síntese química. A “química verde” consiste no uso de processos químicos mais viáveis, tanto financeiramente como ambientalmente.⁴²

Os principais locais onde ocorrem as modificações estruturais são nos carbonos: C2, C3, C11, C23 e C28 da estrutura básica de um triterpenóide. Estas modificações realizadas nos grupos funcionais do triterpenóide podem apresentar uma informação importante no estudo da relação estrutura-atividade (REA). A comparação dos diferentes derivados triterpenóides semi-sintéticos para a atividade biológica em estudo ajuda a encontrar a melhor modificação estrutural efetuada para o triterpenóide em análise.^{43,44}

Os diferentes derivados triterpenóides sintetizados têm sido sujeitos nos últimos anos a vários estudos *in vitro* para diversas atividades biológicas. Por exemplo, em vários estudos realizados demonstrou-se os efeitos inibitórios contra a proliferação e crescimento das células cancerígenas, evidenciado a atividade anti-proliferativa. Na última década, assistiu-se ao início de ensaios *in vivo*, em ratos, de alguns derivados triterpenóides. O primeiro composto semi-sintético testado em seres humanos foi o derivado CDDO em 2010. O mecanismo de ação do triterpenóide CDDO e dos seus derivados (CDDO-Me, CDDO-Im, CDDO-EA, CDDO-TFEA) envolve as proteínas reguladoras do ciclo celular, como por exemplo, a ciclina D1, p21, p27, entre outras (Figura 1.7).⁴⁵

O baixo custo como também a biodisponibilidade que o ácido oleanólico apresenta fazem dele um triterpenóide ideal para o desenvolvimento da semi-síntese de derivados triterpenóides.⁴⁵

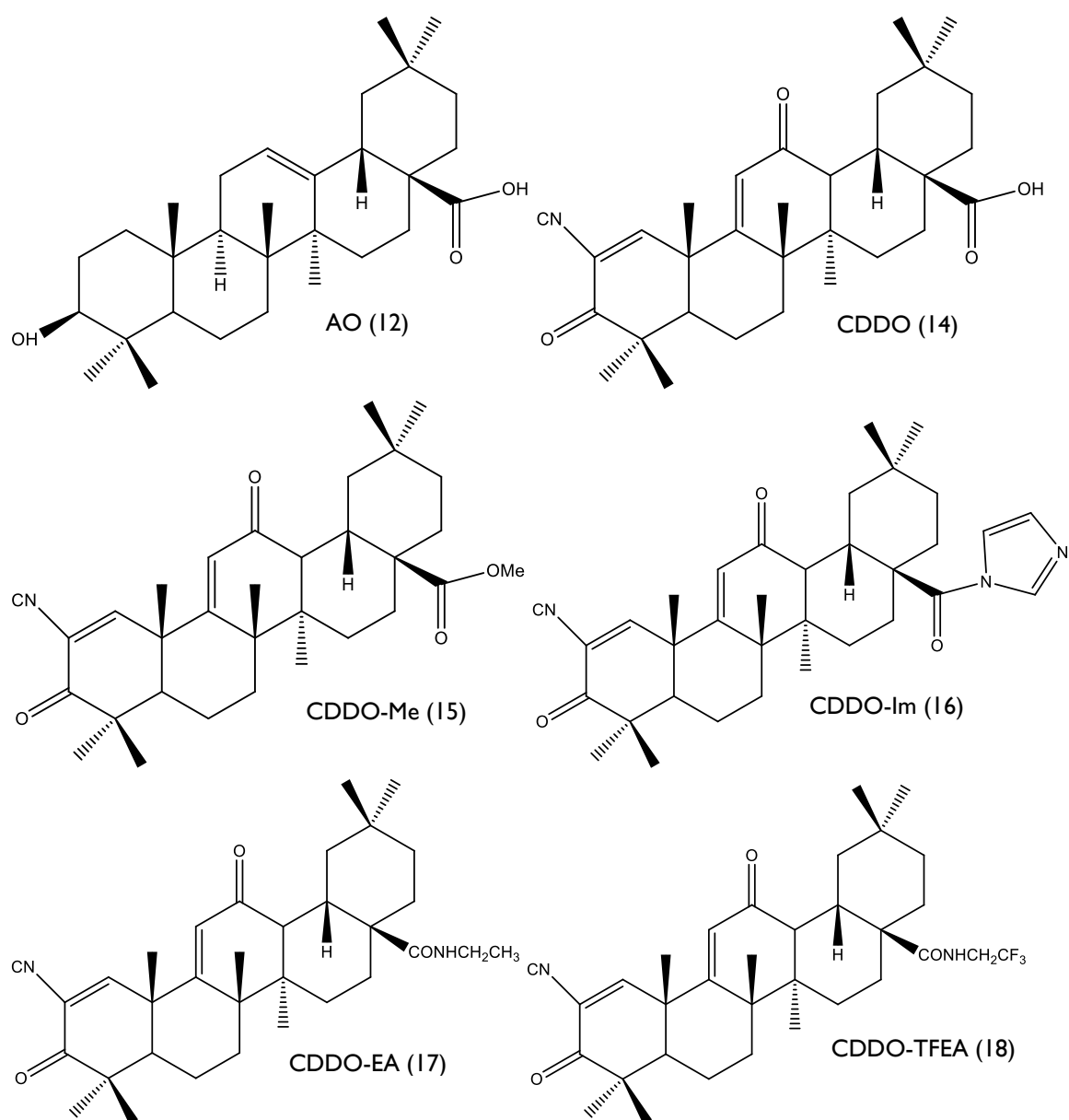


Figura 1.7. Estrutura química do AO e de produtos semi-sintéticos com potencial terapêutico no tratamento do cancro. (12 - AO ; 14 - CDDO ; 15 - CDDO-Me ; 16 - CDDO-Im ; 17 - CDDO-EA ; 18 - CDDO-TFEA)

I.3. AS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS TRITERPENÓIDES

Nas últimas décadas, os triterpenóides têm atraído bastante interesse por causa dos seus efeitos farmacológicos, combinados com uma toxicidade reduzida. Diferentes estudos têm apresentado resultados importantes da ação dos triterpenóides em diferentes atividades biológicas, mais especificamente, em doenças anti-inflamatórias, antibacterianas, antivirais, antidiabéticas, hepatoprotetoras e antitumorais (Tabela I.1).^{25,37,46-48}

Tabela I.1. Fontes de triterpenóides na Natureza e respetiva atividade biológica.

ESPÉCIE	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIA
<i>D. dendo</i>	Antimicrobiano	[49]
<i>Pourouma guianensis</i>	Antileishmania	[50]
<i>Geum japonicum</i>	Anti-HIV	[51]
<i>Lycopus lucidus</i>	Anti-aterosclerótico	[52]
<i>Origanum majorana</i>	Anti-alzheimer	[53]
<i>Eucalyptus tereticornis</i>	Hepatoprotetor	[54]
<i>Nepeta sibthorpii</i>	Analgésico	[55]
<i>Salvia officinalis</i>	Anti-inflamatório e antimicrobiano	[56]
<i>Perilla frutescens</i>	Anti-inflamatório e antitumoral	[57]
<i>Calluna vulgaris</i>	Antitumoral	[58]
<i>Siphonodon celastrineus</i>	Antitumoral	[59]

I.3.1. ATIVIDADE ANTITUMORAL

O cancro é um conjunto complexo de mecanismos patológicos caracterizado pelo crescimento de células anormais, as quais são formadas devido a uma série de fatores provocando alterações no genoma da célula (ADN). No entanto, as alterações verificadas podem ser provocadas por fatores externos ou internos, que não foram devidamente corrigidos pelo processo de regulação da célula (homeostasia).⁶⁰ A evolução do conhecimento nas últimas décadas, nas áreas da química, biologia, bioquímica e genética, tem como objetivo

melhorar o conhecimento dos vários processos que envolvem esta doença, assim como descobrir outros processos ainda por identificar.⁶¹

O cancro é uma das maiores causas de morte em todo o mundo, tornando-a numa das maiores preocupações da saúde pública. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que em 2030, uma em cada quatro mortes seja devida ao cancro. Este facto inflaciona a urgência na procura de novos meios terapêuticos capazes de melhorar o tratamento, assim como a prevenção desta doença.⁶¹ Estudos realizados indicam que cerca de 7,6 milhões de pessoas em todo o mundo morreram de cancro só em 2008 (Figura 1.8).⁶²

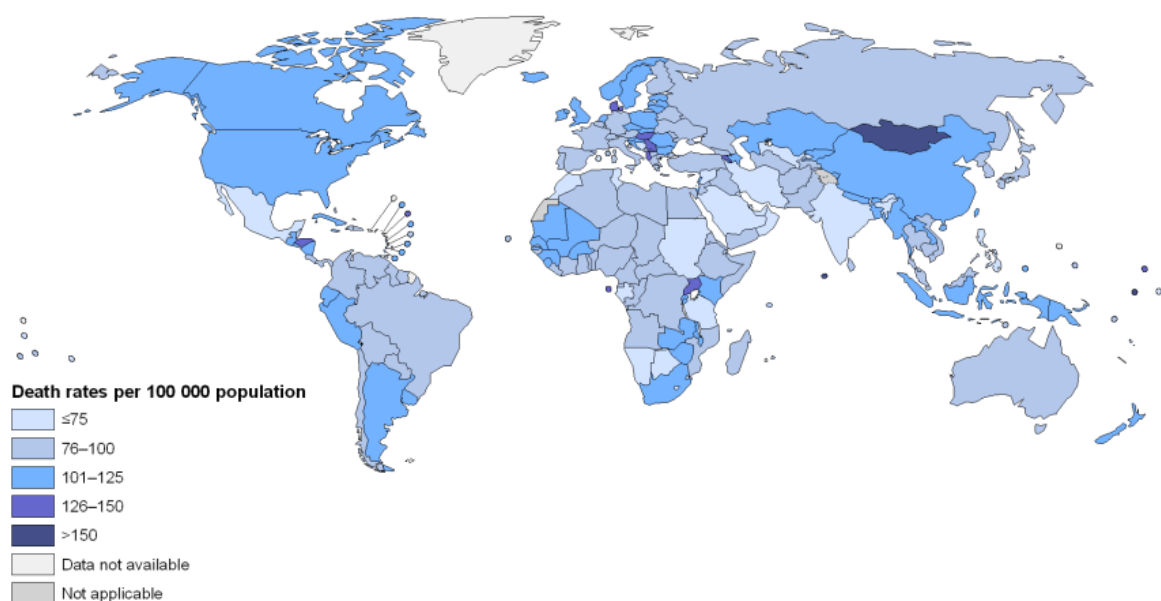


Figura 1.8. Taxa de mortalidade do cancro em todo o mundo durante 2008. Adaptado da literatura.⁶²

Um quinto dos casos de cancro registados em todo mundo é causado por uma infeção crónica, por exemplo, o vírus do papiloma humano (VPH) provoca o cancro do colo do útero enquanto o vírus da hepatite B (VHB) pode originar o cancro do fígado. Nos países em desenvolvimento, cerca de 20% das mortes poderiam ser prevenidas através da imunização contra o VPH e VHB. Mais de 30% dos cancros evidenciados podem ser prevenidos, devido à ação dos fatores externos. Evitar o uso do tabaco, o consumo moderado de álcool, a realização de uma dieta saudável, e a prática de exercício físico são princípios importantes na prevenção do cancro. O consumo de frutas e vegetais, baseado numa típica dieta Mediterrânea é fortemente associada à baixa incidência do cancro assim como outras doenças.^{62,63}

A incidência do tipo de cancro no ser humano é diferente entre sexos. O cancro da mama apresenta uma incidência maior entre as mulheres, no entanto, nos homens o maior número de casos registados é representado pelo cancro da próstata.⁶⁴ Devido ao comportamento social e económico das populações nos últimos anos, registou-se uma mudança na ocorrência de mortes relacionadas com cancro. Em 2014, nos Estados Unidos da América, as mortes por cancro foram maioritariamente relacionadas com o cancro do pulmão e dos brônquios tanto nos homens como nas mulheres (Figura 1.9).^{45,64}

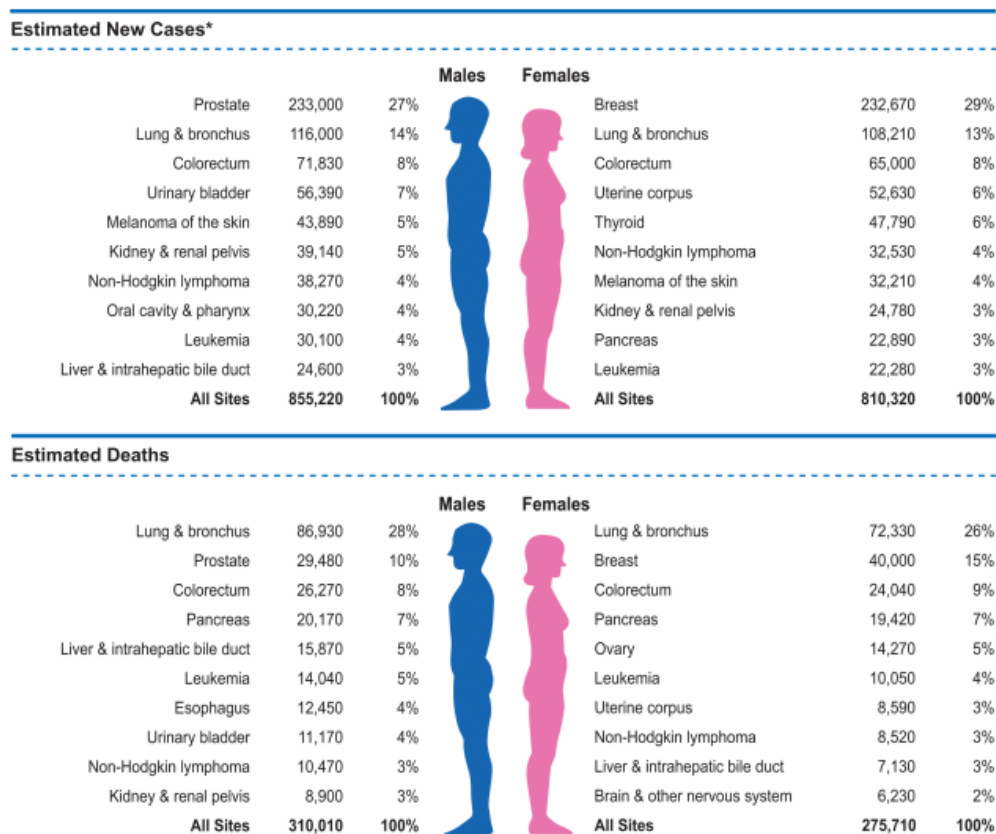


Figura 1.9. Os 10 principais tipos de cancro causados nos homens e nas mulheres. Adaptado da literatura.⁶⁴

A descoberta e desenvolvimento de novos fármacos têm-se centralizado nas últimas décadas, essencialmente na área oncológica, devido ao défice de meios terapêuticos existentes nesta área em comparação com o número de novos casos registados. O tratamento e a quimioprevenção existentes estão longe de ser uma solução ideal, sendo importante melhorar o conhecimento envolvente de todo o mecanismo desta doença, como por exemplo, o conhecimento pormenorizado das moléculas alvo dos fármacos administrados.^{2,61}

I.3.1.1. CICLO CELULAR

O ciclo celular desempenha um papel importante no desenvolvimento de diversas doenças, nomeadamente no cancro, pois é um processo complexo caracterizado pelo crescimento e proliferação das células, pelo desenvolvimento do organismo e pela regulação do ADN danificado.⁶⁵

Ao longo do ciclo celular estão envolvidas várias proteínas reguladoras que orientam a célula numa série de eventos (no decorrer da mitose e da meiose). O ciclo celular apresenta duas etapas: a Interfase dividida em três períodos (intervalo G1, fase S, intervalo G2); e a Fase mitótica (M) (mitose e citocinese) (Figura I.10).⁶⁶

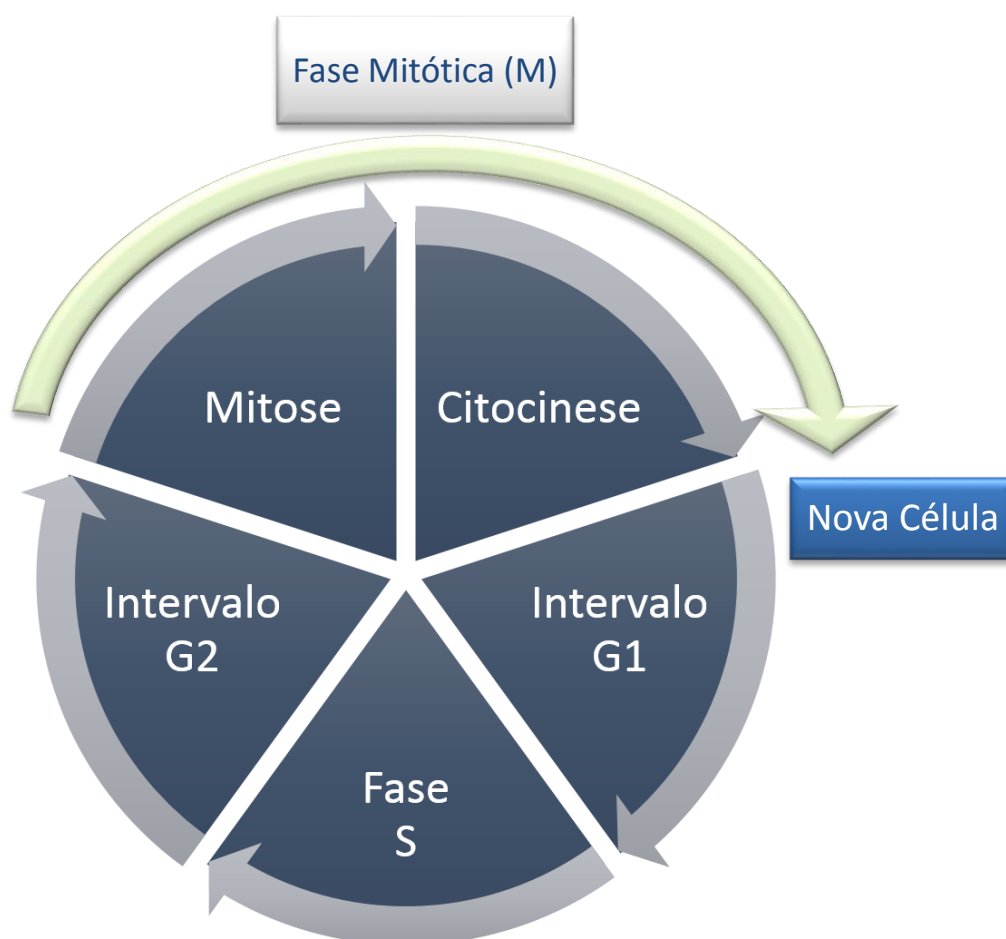


Figura I.10. Representação do ciclo celular.

Durante o ciclo celular existem vários *checkpoints* que asseguram a continuação do processo. Os *checkpoints* estão localizados no final da fase G1, S e G2; não permitindo que a célula seja replicada se o ADN estiver danificado. A fase M também apresenta um *checkpoint* que controla se os cromátídeos estão corretamente dispostos no fuso mitótico. Em células

normais, se os *checkpoints* detetarem incorreções no ADN replicado sucede-se uma série de respostas biológicas dependentes do tipo de erro ocorrente, desencadeando imediatamente a paragem do ciclo celular e consequentemente a indução da morte celular. No caso das células cancerígenas, estas têm a particularidade de serem capazes de evitar estes *checkpoints* permitindo a conclusão de um ciclo celular defeituoso. Estes *checkpoints* são proteínas que intervêm na progressão do ciclo celular denominadas por ciclinas e cinases dependentes de ciclinas (CDKs).⁶⁷

Uma das hipóteses para o tratamento do cancro é definir como alvo os componentes do ciclo celular, os quais por sua vez vão interromper o ciclo celular e a consequente multiplicação de células cancerígenas.⁶⁷

1.3.1.2. CÉLULAS CANCERÍGENAS

As células cancerígenas apresentam uma dinâmica singular em comparação com as células normais. As células normais evoluem progressivamente para um estado neoplásico através de um processo envolvente de várias etapas, onde estas adquirem um conjunto de capacidades específicas que permitem tornarem-se tumorais, e por fim, malignas. A desregulação do ciclo celular subjacente à proliferação anormal da célula descreve o cancro e a perda de controlo dos checkpoints, promovendo a instabilidade genética.⁶⁸

As “*Hallmark of cancer*” correspondem às seis capacidades biológicas adquiridas pelas células cancerígenas, acrescentando capacidades distintas e complementares para o crescimento dos tumores e a sua disseminação metastática (Figura 1.11). As seis “*Hallmark of cancer*” têm como princípio racionalizar a complexidade da doença neoplásica, sendo elas, a sinalização proliferativa, a evasão dos supressores de crescimento, a resistência à morte celular, permite a replicação infinita, a indução angiogénese, e a ativação da invasão e metástase.^{68,69}

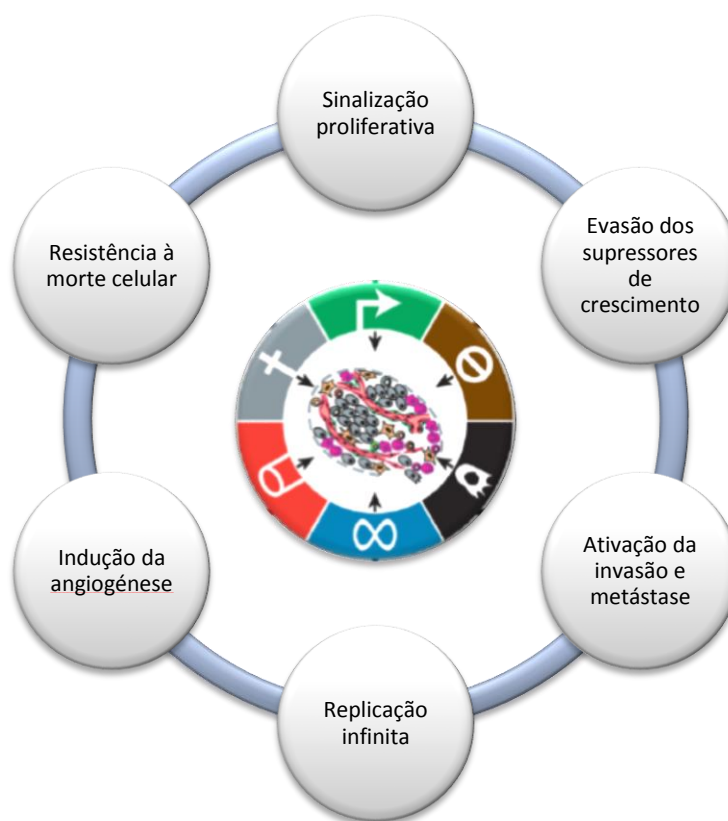


Figura 1.11. Representação das *hallmarks of cancer*.

A morte celular é um dos processos biológicos que permite controlar a homeostasia da célula; esta eliminação das células, pode ocorrer através da apoptose, autofagia ou necrose.⁷⁰ A apoptose é um processo distinto em relação aos outros dois tipos de morte celular, consistindo na contração celular, condensação citoplasmática, fragmentação nuclear, formação de bolhas na membrana citoplasmática e na formação de corpos apoptóticos, além disso, é um processo restrito a uma célula e sem um processo inflamatório associado. A apoptose é iniciada por duas vias: a extrínseca, que culmina com a ativação da caspase-8, e a intrínseca ou mitocondrial, ativa a caspase-9. A via extrínseca ocorre através da ligação dos recetores membranares da célula (FasR, TNF α e TRAIL) e pelo recrutamento da FADD e consequente ativação da caspase-8. A outra via, a intrínseca, envolve a libertação do citocromo c da mitocôndria devido à ativação do p53, consequentemente, desencadeia a libertação da proteína Bax (representa um membro pró-apoptótico da família da Bcl2). A libertação do citocromo c provoca a ativação da Apaf-1 (uma proteína ATP ou dATP dependente) capaz de ligar-se à pró-caspase-9 (Figura 1.12).⁷¹⁻⁷³

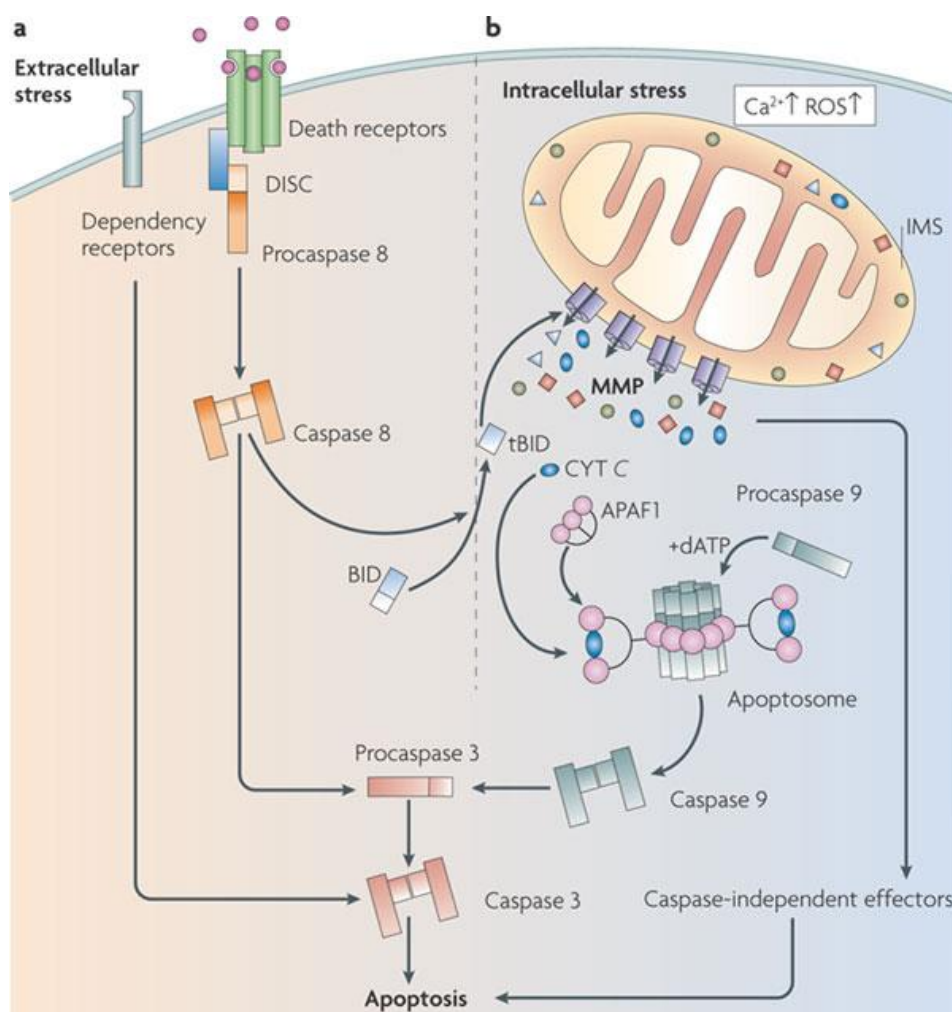


Figura 1.12. Representação do mecanismo extrínseco e intrínseco apoptótico numa célula. Adaptado da literatura.⁷³

A maioria dos fármacos anticancerígenos promove a apoptose celular. As mutações ocorrentes nas vias apoptóticas podem conduzir à quimiorresistência ao fármaco.⁷⁰

I.3.1.3. PRODUTOS NATURAIS COM ATIVIDADE ANTITUMORAL

As principais limitações dos fármacos quimioterapêuticos são os efeitos secundários uma vez que são altamente tóxicos e provocam tanto a destruição das células cancerígenas como das células normais nos pacientes sujeitos ao tratamento. Por isso, o desenvolvimento de novos fármacos através das plantas medicinais representou uma etapa importante para uma futura prevenção e tratamento do cancro.^{2,74}

Os produtos naturais desde cedo foram testados clinicamente no tratamento do cancro.^{3,40} De facto, na última metade do século, a maioria dos metabolitos secundários das

plantas e dos seus derivados têm sido aplicados no combate ao cancro. Os metabolitos secundários estão diretamente ligados com a regulação do crescimento dos organismos.

Face aos novos conhecimentos sobre o mecanismo de ação do cancro e a capacidade dos produtos naturais atuarem em vários alvos moleculares pode ser vantajoso e traduzem numa melhoria da terapia no tratamento do cancro.^{6,23}

Atualmente, vários produtos naturais são usados clinicamente no tratamento do cancro. Os produtos naturais com atividade antitumoral podem ser divididos em seis grandes classes: terpenos, alcalóides de vinca, taxanos, epipodofilotoxinas, camptotecinas e fotossensibilizantes; entre outros.^{21,75,76}

Os alcalóides de vinca são isolados a partir da *Catharanthus roseus*. A vincristina e a vimblastina foram os primeiros alcalóides vinca a serem isolados (Figura I.13).⁷¹ Estes alcalóides inibem a integração dos microtúbulos dissolvendo os fusos mitóticos das células, impedido a mitose e o crescimento celular, demonstrando ser bastante útil no tratamento de células cancerígenas. Através dos primeiros alcalóides isolados, vários derivados foram sintetizados como a vinflunine, que se encontra no mercado desde 2009 para o tratamento do cancro da bexiga.⁷⁷

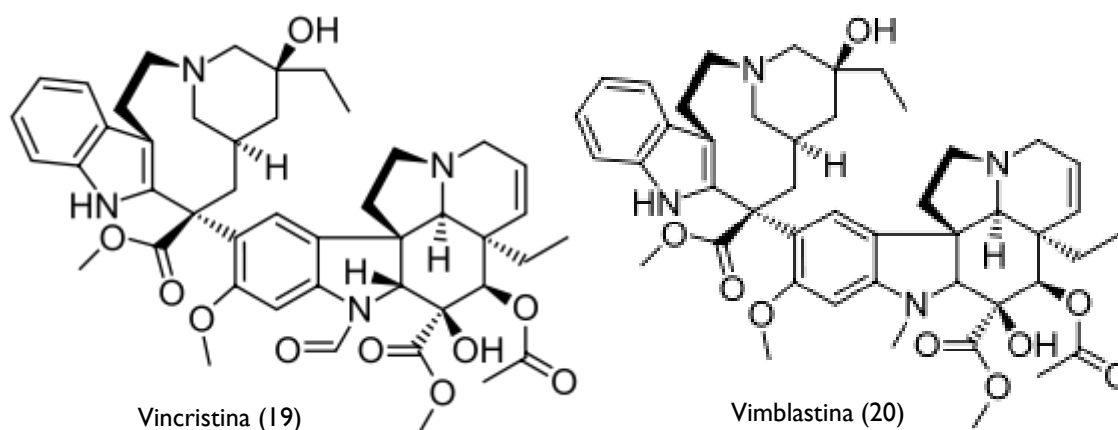


Figura I.13. Exemplos de compostos alcalóides com atividade antitumoral. (19 - Vincristina ; 20 - Vimblastina)

O Paclitaxel (Taxol®), representante da classe dos taxanos, foi uma das principais descobertas realizadas nas últimas décadas, tendo sido identificado como um constituinte ativo citotóxico no extrato de *Taxus brevifolia*, em 1971 (Figura I.14). O seu mecanismo de ação está associado à destabilização dos microtúbulos durante a divisão celular.⁷⁸ Apenas no final do ano de 1992, o Taxol foi aprovado comercialmente como um agente quimioterapêutico usado no cancro do ovário, e em 1994 no cancro da mama.⁷⁹

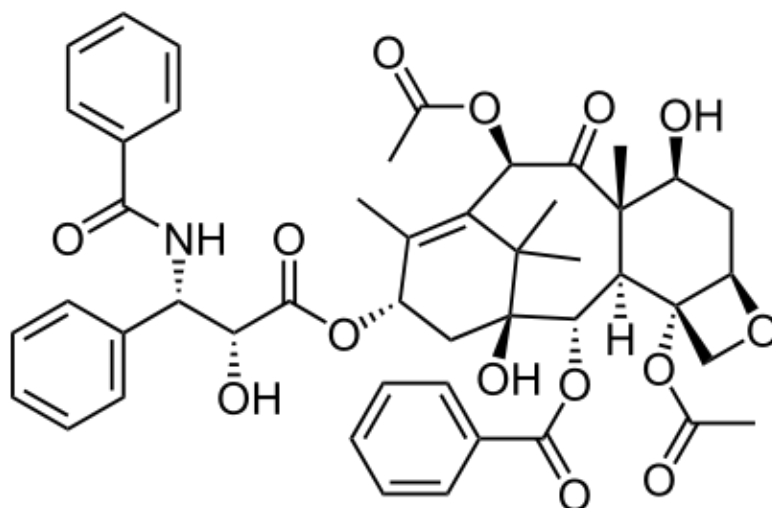


Figura I.14. Representação da estrutura química do Paclitaxel (Taxol®). (21 - Paclitaxel)

As vendas do Paclitaxel chegaram a atingir lucros de aproximadamente 1 bilhão de dólares anuais. Hoje em dia, este fármaco é vendido sob a forma de genérico por diversas companhias farmacêuticas. O sucesso obtido pelo Paclitaxel gerou inúmeros estudos para a obtenção de análogos, este facto contribuiu para a melhoria das suas propriedades, nomeadamente, o aumento da solubilidade em meio aquoso e a diminuição dos elevados níveis de toxicidade. O primeiro análogo a ser desenvolvido foi o Docetaxel (Taxotere®); atualmente o paclitaxel com a formulação de nanopartículas ligadas à albumina é conhecido como Abraxane® (Figura I.15).⁷⁴

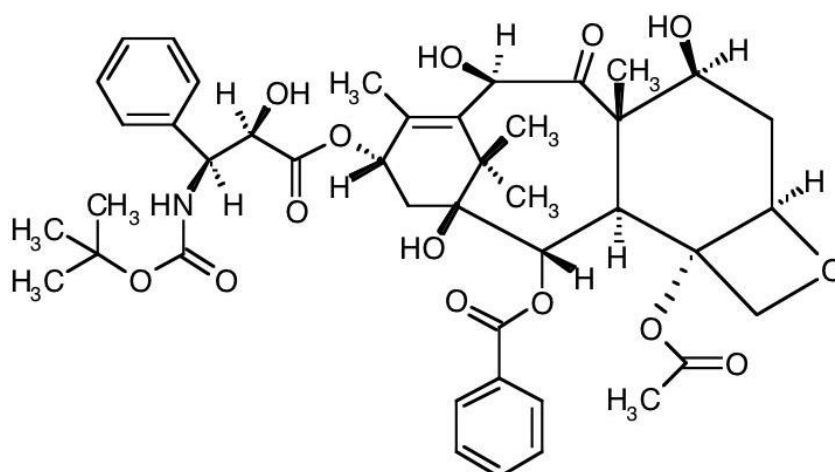


Figura I.15. Representação da estrutura química do Docetaxel (Taxotere®). (22 - Docetaxel)

Os epipodofilotoxinas são derivados glicosídeos da podofilotoxina, isolados de diferentes espécies da *Podophyllum*. A descoberta das suas propriedades anti-mitóticas deu-se nos anos 1940 e 1950, no entanto, os elevados níveis de toxicidade, levaram à procura de novos derivados, tais como o tenipósido e o etopósido (Figura I.16). Estes dois derivados inibem a topoisomerase II provocando a apoptose da célula.⁸⁰

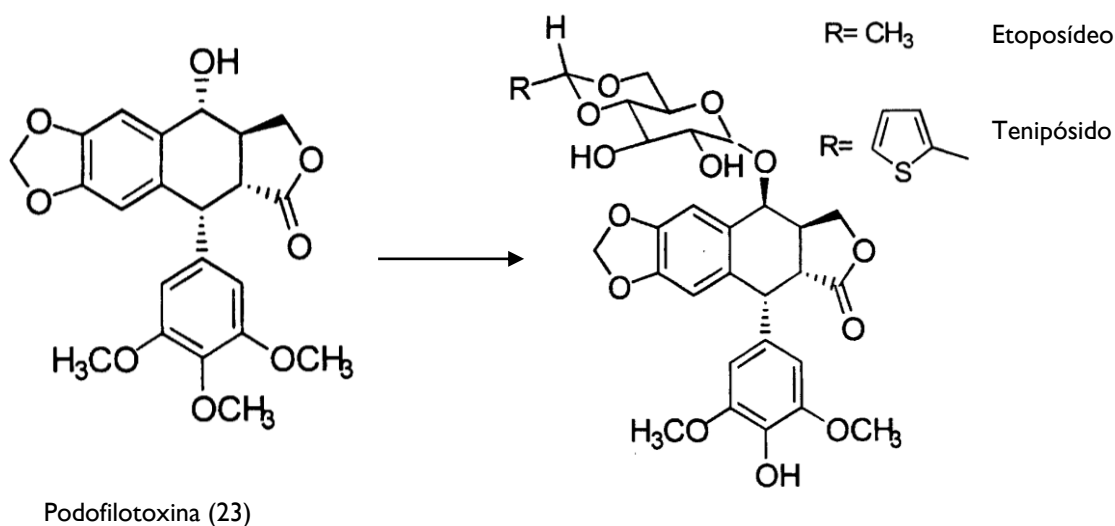


Figura I.16. Representação da podofilotoxina e alguns derivados. (23 - Podofilotoxina ; 24 - Etopósido ; 25 - Tenipósido)

A camptotecina é um alcalóide de quinolina isolada através da *Camptotheca acuminata*. Este composto nunca foi testado em ensaios clínicos devido à sua baixa solubilidade e elevada toxicidade. Os seus derivados semi-sintéticos topotecano e irinotecano foram preparados para superar estes problemas (Figura I.17). O seu mecanismo de ação baseia-se na inibição da topoisomerase I através da destabilização de um complexo intermediário produzido durante a síntese do ADN.^{74,79}

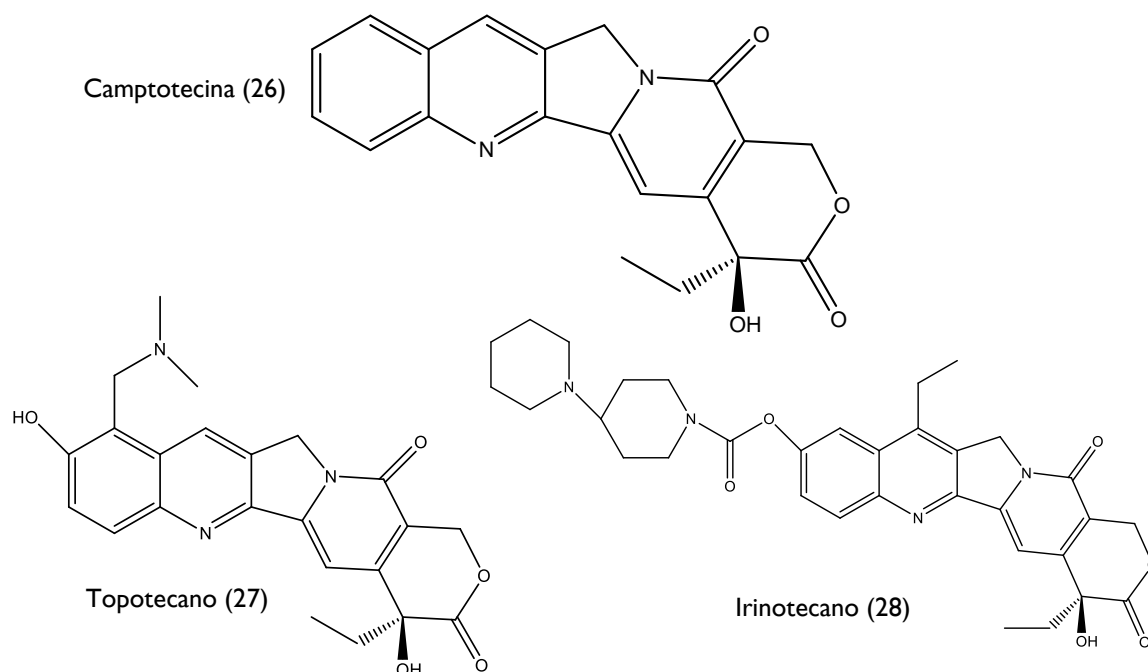


Figura I.17. Representação da camptotecina e dos seus derivados. (26 - Camptotecina ; 27 - Topotecano ; 28 - Irinotecano)

Os compostos fotossensibilizantes têm uma baixa citotoxicidade no escuro, no entanto quando sujeitos a uma radiação produzem espécies com elevada reatividade e toxicidade. As porfirinas são uma classe de moléculas orgânicas com uma estrutura capaz de acomodar um íon metálico no centro (Figura I.18). A hipericina tem sido estudada nos últimos anos como um fotossensibilizante, exibindo uma elevada afinidade para tumores, e desencadeando a necrose e a apoptose celular, dependendo dos níveis de *stress* oxidativo.⁷⁴

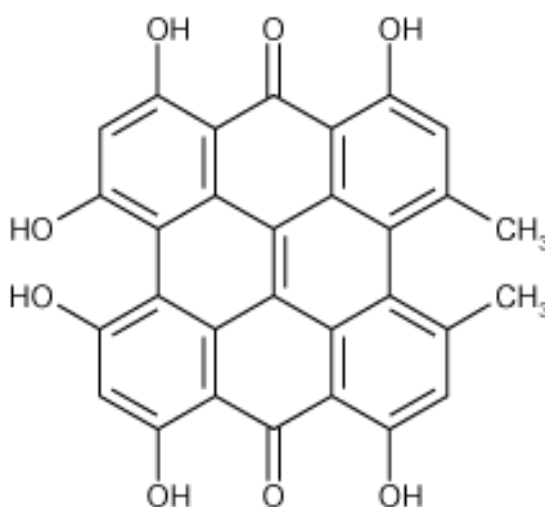


Figura I.18. Representação da hipericina utilizada como fotossensibilizante. (29 - Hipericina)

Hoje em dia, a prevenção precoce do cancro é o melhor tratamento possível. A quimioprevenção do cancro é definida pelo uso de agentes naturais e sintéticos capazes de reverter, suprimir e impedir a progressão do tumor maligno.⁸⁰

I.3.1.4. MECANISMO DE AÇÃO DOS TRITERPENÓIDES

Os triterpenóides são altamente multifuncionais e a sua atividade antitumoral é avaliada consoante a capacidade de bloquear a ativação do fator de transcrição nuclear (NF)- κ B, de induzir a apoptose, de inibir os transdutores de sinais e a proliferação celular, de suprimir a angiogénese, de causar a disfunção mitocondrial e a capacidade de reverter a multirresistência de vários fármacos e das suas proteínas (Figura I.19). Os triterpenóides podem direcionar-se para diversas etapas no desenvolvimento do cancro demonstrando serem uma ferramenta muito importante no tratamento e na quimioprevenção do cancro.^{34,81-83}

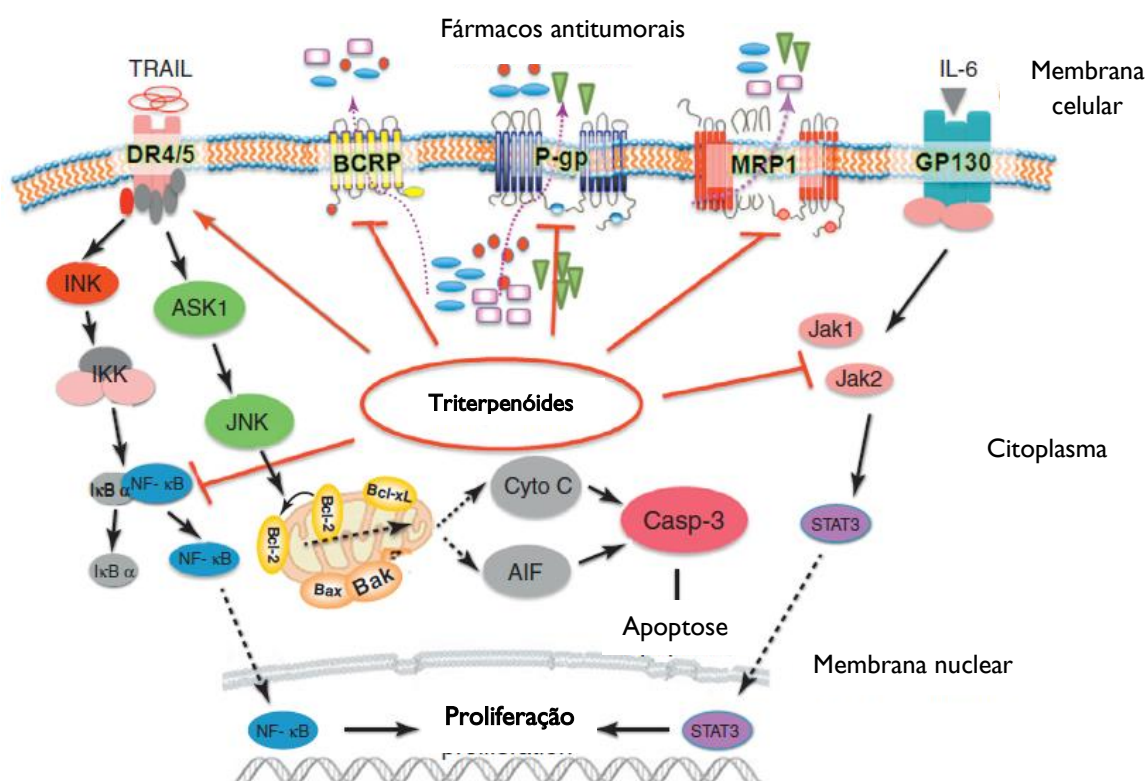


Figura I.19 Diagrama esquemático dos diversos alvos moleculares dos triterpenóides e a reversão da multirresistência aos fármacos anticancerígenos. Adaptado da literatura.³⁴

O mecanismo de ação antitumoral dos triterpenóides apresentado na literatura contém ainda muitas informações e parâmetros inconsistentes. Ainda assim, as duas principais

atividades farmacológicas associadas ao mecanismo antitumoral dos triterpenóides são: a atividade citotóxica e a atividade anti-inflamatória. Em diversos estudos de antitumorais efetuados identificaram-se, inicialmente, o alvo primário da ação biológica e as vias de sinalização celulares nas células tratadas com triterpenóides, que provocam a morte celular ou apoptose, com o objetivo de esclarecer o mecanismo de ação envolvente.^{40,57}

A atividade citotóxica deriva do comportamento dos triterpenóides nas enzimas metabólicas do ADN (como a ADN polimerase β , ADN ligase e as topoisomerases I e II) atuando na manutenção e replicação celular, desencadeando o mecanismo de ação citotóxico nas células cancerígenas. A inibição das enzimas envolvidas no metabolismo do ADN atuam em todo o mecanismo celular responsável pela manutenção na estabilidade do genoma, podendo provocar a morte celular.^{37,84}

O mecanismo inflamatório dos triterpenóides, interfere com o *stress* oxidativo na célula, responsável por gerar várias mutações e promover o desenvolvimento tumoral. Algumas das enzimas envolvidas no mecanismo inflamatório são a SON (sintetase do óxido nítrico) e o COX-2 (ciclooxigenase-2), têm um papel importante na resposta aos tecidos danificados e aos agentes infecciosos. Os triterpenóides AO e o AU foram testados como modeladores dos níveis das enzimas SON e COX-2. Os resultados obtidos apresentam uma diminuição da taxa de transcrição das duas enzimas, estando também diretamente relacionado com a supressão do fator de transcrição NF- κ B no decorrer da ação inflamatória.^{34,84-86}

A indução de SON é um dos principais processos inflamatórios no cancro. Algumas vias de sinalização do processo anti-inflamatório estão estritamente relacionadas com a promoção, proliferação e invasão de células cancerígenas.⁸⁷⁻⁸⁹ A produção de níveis elevados de ON (óxido nítrico) em células cancerígenas induz a apoptose e a assistência dos macrófagos, prevenindo assim a metastização nas células tumorais. Nos estudos realizados por Honda *et al.*,^{89,90} sintetizaram-se novos derivados do ácido ursólico (AU) que inibem a produção de ON nos macrófagos dos ratos. A maioria dos derivados semi-sintéticos nestes estudos apresentaram melhores atividades comparadas com o ácido ursólico.^{90,91}

Existem também outros mecanismos antitumorais descritos na literatura para a ação dos triterpenóides. Vários recetores celulares têm sido reportados como estando envolvidos na atividade anticancerígena dos triterpenóides, nomeadamente, o recetor hidrocarboneto de arilo (RhA), o recetor nuclear andrógeno (RA) e os membros da família de proteínas do fator de crescimento endotelial vascular (FCEV).⁸⁶ No entanto, estudos mais recentes

demonstraram outras formas de induzir a apoptose através da redução da expressão do gene da telomerase.⁸⁸

Um estudo realizado por Andre Nel *et al.*,⁹² demonstrou que o *stress* oxidativo está diretamente relacionado com o tipo de ação biológica celular. Para uma resposta antioxidante, os níveis de *stress* oxidativo são relativamente baixos, no caso de uma resposta anti-inflamatória os níveis de *stress* oxidativo já são um pouco mais elevados, no entanto, para uma resposta citotóxica, verificaram-se os níveis máximos de *stress* oxidativo (Figura 1.20).^{92,93}

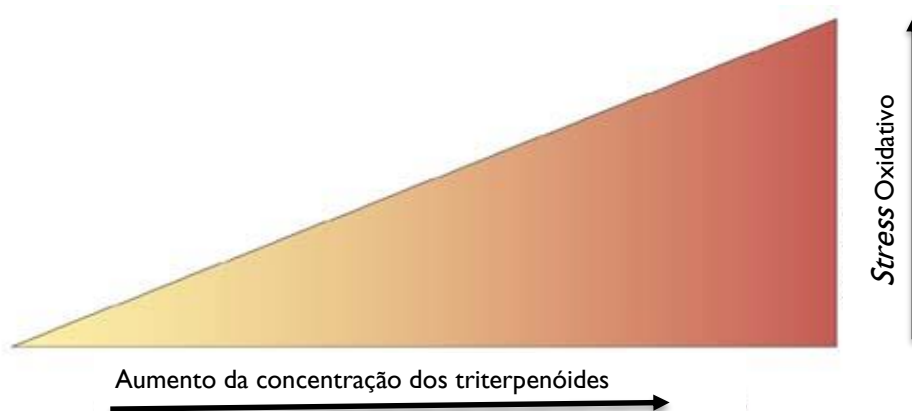


Figura 1.20. Diagrama esquemático da relação da concentração dos triterpenóides com o *stress* oxidativo. Adaptado da literatura.⁹³

Tabela 1.2 Resposta biológica dos triterpenóides dependente da sua concentração. (KEAPI-NRF2-ARE: Atividade antioxidante; Ciclinas, MYC, p21, p27: Atividade anti-inflamatória; IKK, recetores TNF, mitocôndria: Atividade antitumoral).

Alvo Molecular	KEAPI-NRF2-ARE	Ciclinas, MYC, p21, p27	IKK, recetores TNF, mitocôndria
Resposta Biológica	Indução das enzimas de fase 2; previne a libertação citoquinas	Bloqueio da síntese do ADN e da progressão do ciclo celular	Ativação das caspases
Resultado Final	Citoproteção; Anti-inflamatória	Inibe a proliferação celular; induz a diferenciação	Apoptose

I.3.2. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Os triterpenóides foram inicialmente identificados por apresentarem propriedades anti-inflamatórias em diversos estudos com culturas de células *in vitro* e em experiências *in vivo*. A capacidade anti-inflamatória está relacionada com a habilidade de inibir várias enzimas pró-inflamatórias, tais como, a lipoxigenase, a cicloxigenase (COX), a produção de óxido nítrico (ON) e a matriz metaloproteína-9 (MMP-9, estimulação da translocação nuclear pelo recetor glucocorticoide).⁸⁹ A ocorrência de um processo anti-inflamatório é acelerado pelo sistema imunitário, que reage a uma imensa variedade de agentes patogénicos, desde vírus a parasitas, e distingue-os do tecido humano saudável desencadeando de seguida um processo de proteção do organismo contra os agentes exteriores.⁹³

A doença de Alzheimer é classificada enquanto transtorno neuro-degenerativo devido à perda neuronal seletiva e neurofibrilar e ao aumento dos depósitos extracelulares da proteína amiloide insolúvel. O *stress* oxidativo contribui para a formação de placas amilóides, que podem ser uma fonte de espécies oxidativas. Um estudo *in vitro* demonstrou que o AU inibe a formação do SON das placas amiloides, promovendo uma melhoria na viabilidade celular através da diminuição da neurotoxicidade.⁹⁴

Aterosclerose é uma doença crónica inflamatória, sendo também considerada como uma das principais causas das doenças cardiovasculares.⁹⁵ O *stress* oxidativo também está relacionado com a aterosclerose e é responsável pela migração, proliferação e apoptose das células do músculo liso vascular. Alguns estudos realizados com AU exibiram sinais de inibição da quimiotaxia, com a redução na expressão do antígeno nuclear da célula proliferativa (ANPC) e a desorganização da β -tubulina registado nas células do músculo liso vascular.⁹⁵⁻⁹⁷

A esclerose múltipla é uma doença autoimune, ou seja, uma doença anti-inflamatória degenerativa do sistema nervoso central (SNC). Os triterpenóides, mais especificamente, o AO foi capaz de melhorar os sinais neurológicos de um paciente com esclerose múltipla, provocado a inibição dos componentes da inflamação. Esta experiência foi previamente realizada num modelo de rato.⁹⁸

I.3.3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A resistência a infecções bacterianas é um problema comum em muitos hospitais e em indivíduos com uma atividade deficiente ou reduzida no sistema imunológico. A formação de biofilmes nas infecções bacterianas é uma problemática causada pela recorrência dos sintomas e pela falha no tratamento bacteriano. O biofilme é um conjunto complexo de microrganismos que apresenta muitas vezes um baixo metabolismo e um reduzido consumo de oxigênio, originando condições propícias na resistência aos antibióticos. No entanto, Ren *et al.*,⁴⁹ demonstrou que o AU é um bom inibidor na formação de biofilmes.^{49,99,100}

Em diversos estudos, os triterpenóides apresentaram uma atividade bacteriana assinalável contra alguns microrganismos responsáveis pelas infecções bacterianas que afetam habitualmente a saúde pública.^{53,100}

Tanto a tuberculose, como a leishmaniose e a malária são doenças provocadas pela presença no organismo de uma bactéria e protozoários, respetivamente.^{28,96,97} A tuberculose é causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, sendo uma doença de longa data e que continua diariamente a provocar um número elevado de mortes em todo o mundo. O AO foi testado contra esta bactéria e outras.¹⁰¹

No caso da leishmaniose e da malária, são doenças causadas pela presença de protozoários. Estes parasitas afetam cerca de 3 biliões de pessoas em todo o mundo. Leishmania é uma infecção no protozoário transmitida por insetos, sendo o seu tratamento baseado em antimoniais pentavalentes, que são muito tóxicos para o organismo. Alguns derivados triterpenóides demonstraram inibir o crescimento de dois estágios morfológicos principais, a amastigota intracelular e promastigota flagelada devido à ativação dos intermediários do ON pelos macrófagos (Tabela 1.3).^{50,101-103}

Tabela 1.3. Determinação *in vitro* do IC₅₀ (μM) do AU nas várias formas da leishmania.

Espécie	IC50 (μM)	Referência
<i>L. amazonensis</i> promastigotes	20	[50]
<i>L. infantum</i> promastigotes	>25	[50]
<i>L. amazonensis</i> amastigotes	24	[102]

I.3.4. OUTRAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

A infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) em seres humanos é atualmente um grande problema de saúde mundial, ainda sem tratamento. Os triterpenóides neste contexto atuam como inibidores provocando um efeito inibitório sobre a transcriptase reversa do VIH.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶

Num estudo mais recente realizado por Fei Yu *et al.*,¹⁰⁷ verificou-se que os triterpenóides, mais especificamente os derivados do AO, inibem a entrada do Vírus da Hepatite C (VHC) na célula (Figura 1.21). Esta técnica representa uma nova abordagem eficaz em relação à mistura de outros inibidores normalmente utilizados.¹⁰⁷ A cirrose e a fibrose hepática são habitualmente causadas pelo vírus da hepatite C.¹⁰⁸

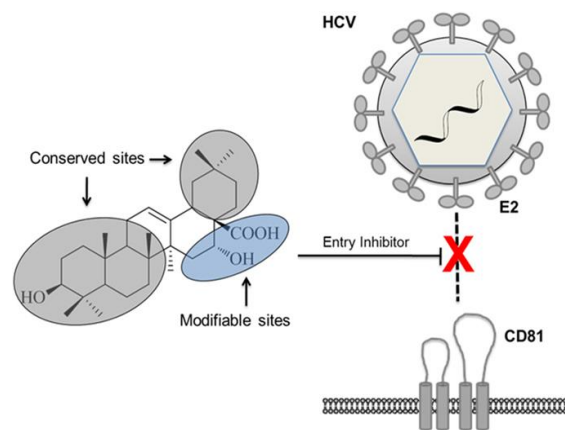


Figura 1.21. Mecanismo de ação dos triterpenóides no VHC. Adaptado da literatura.¹⁰⁷

Como mencionado anteriormente, os triterpenóides apresentam diversas atividades biológicas. Hoje em dia, existem novos hábitos tanto sociais como alimentares, suscetíveis ao aparecimento de novas doenças. A diabetes e a obesidade são exemplos do tipo de doenças que atualmente afetam o Homem.¹⁰⁹

A diabetes e as complicações diabéticas são responsáveis por gastos significativos em medicamentos específicos. O tratamento desta doença é geralmente efetuado através da aplicação de uma injeção de insulina, apesar de hoje em dia, já terem sido testadas outras formas de aplicação alternativas. A diabetes de tipo 2 é considerada uma doença metabólica devido à desordem nos níveis da glucose sanguínea. Um agente antidiabético ideal é responsável pela diminuição dos níveis de glucose no sangue. O glicogénio fosforilase é uma enzima responsável pela decomposição do glicogénio para produzir energia, o AO é um inibidor natural desta enzima. A tirosina fosfatase está envolvida no processo de desfosforalização do recetor da insulina, e a introdução do AO vai surgir como um inibidor competitivo. No caso da enzima α -glicosilase que hidrolisa a ligação da glucose, a inibição desta enzima vai retardar a digestão de hidratos de carbono causando um aumento da glucose sanguínea. O AU também inibe esta enzima, α -glicosilase.¹⁰⁹⁻¹¹¹

A obesidade é um problema de saúde mundial que afeta principalmente os países desenvolvidos, pode ser considerado como um fator importante na predisposição a outras doenças, como por exemplo, distúrbios metabólicos, dislipidemia, aterosclerose e diabetes do tipo 2. Os triterpenóides atuam ao nível dos triglicerídeos no plasma, através da inibição da lipase pancreática e também pela estimulação da lipólise no tecido adiposo. Assim sendo, os triterpenóides também conseguem reduzir os níveis de colesterol plasmático, assim como os triglicéridos.^{112,113}

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O ácido ursólico (AU) e o ácido oleanólico (AO) são triterpenóides pentacíclicos que apresentam diversas propriedades farmacológicas, no entanto, exibem um potencial terapêutico reduzido. Contudo, estudos de relação estrutura-atividade (REA) identificaram potenciais modificações estruturais nos triterpenóides que podem conduzir à formação de novos derivados semi-sintéticos com uma atividade terapêutica aumentada em relação aos triterpenóides AU e AO.

Com este princípio, efetuou-se a semi-síntese de derivados triterpenóides pentacíclicos e a sua análise estrutural através da espectrometria magnética nuclear (RMN) para identificar as estruturas químicas dos novos compostos.

3. SÍNTESE QUÍMICA E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

3. SÍNTESE QUÍMICA E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

3. SÍNTESE QUÍMICA E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

- 3.1. Conceitos Gerais
- 3.2. Ácido Ursólico
- 3.3. Ácido Oleanólico
- 3.4. Parte Experimental

3.1. CONCEITOS GERAIS

O conhecimento da química existente nos processos biológicos, tem permitido identificar novos alvos biológicos para agentes terapêuticos, através de um conjunto de diversas técnicas como a obtenção de compostos de síntese e/ou semi-síntese, a elucidação estrutural e a avaliação da relação estrutura-atividade (REA).¹¹⁴

Como mencionado anteriormente, a semi-síntese de compostos triterpenóides representa um passo essencial na descoberta e desenvolvimento de novos derivados triterpenóides com potencial terapêutico aumentado. Geralmente, a ocorrência de modificações no anel A, por exemplo, na presença de grupos carboxílico na posição C-3 conduzem a um aumento significativo da atividade antitumoral. Uma modificação estrutural na posição C-17 do grupo carboxílico, também pode levar a um aumento significativo da atividade biológica do triterpenóide.^{32,115,116}

O triterpenóide pentacíclico AU (II) apresenta uma estrutura química muito semelhante ao AO (I2), a diferença entre ambos consiste apenas na localização de dois grupos metilos, no AO encontram-se no C20, enquanto que no AU um grupo metilo está no C20 e outro no C19 (Figura 3.22).

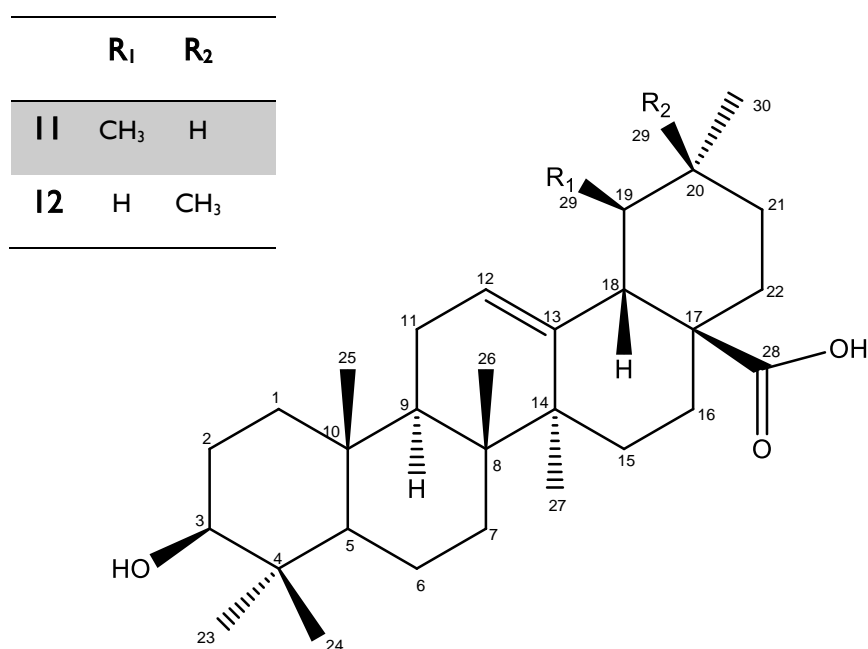


Figura 3.22. Representação estrutural de um triterpenóide pentacíclico. (II - AU ; I2 - AO)

3. SÍNTESE QUÍMICA E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

Para a obtenção de novos derivados triterpenóides é essencial perceber todas as técnicas envolvidas na síntese química. Existem três etapas importantes: a reação química, a purificação e a análise estrutural. Uma reação química envolve um substrato inicial, neste caso o ácido ursólico (11) e oleanólico (12), solventes, reagentes, e também pode conter um catalisador, resultando por fim num ou mais produtos. A pressão e temperatura são fatores externos que podem influenciar algumas reações, existindo a necessidade de um controle das mesmas (Figura 3.23).¹¹⁷

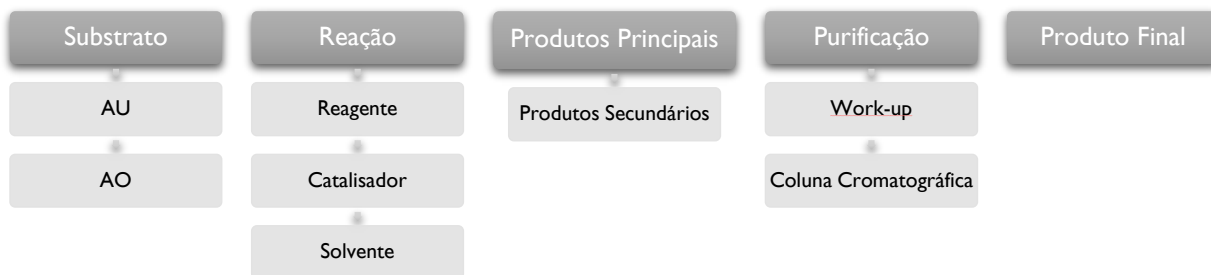


Figura 3.23. Diagrama esquemático de uma sequência química. (Substrato: AU ou AO; na reação vai reagir com um reagente, na presença de um catalisador e solvente(s); resultando nos produtos principais, e também em produtos secundários; segue-se a purificação dos produtos principais por work-up e coluna cromatográfica; resultando no produto final.)

O processo de semi-síntese não envolve apenas a reação química; o *work-up*, em síntese orgânica, consiste numa série de eventos necessários para o isolamento e purificação do produto principal. A cromatografia de camada fina (CCF) é uma técnica muito simples e importante para o controle da reação tanto durante como após a sua conclusão. A CCF é fundamental no acompanhamento das reações, principalmente naquelas que resultam em vários produtos reacionais (misturas). Esta apresenta algumas vantagens na sua utilização, nomeadamente o uso de pequenas quantidades, o baixo custo e também permite que a separação dos compostos seja visível e obtida em pouco tempo. Esta técnica consiste na utilização de um adsorvente, do eluente, do composto em análise e do composto inicial. O adsorvente utilizado neste trabalho foram as placas comerciais de sílica (TLC Sílica gel 60H F₂₅₄), enquanto que o eluente foi preparado através de uma mistura de solventes de baixo custo. A proporção usada na mistura de solventes para o eluente é muito importante e está diretamente relacionada com a polaridade do composto inicial.

A coluna cromatográfica é outra técnica utilizada na separação de misturais reacionais, após uma reação química, sendo esta a técnica cromatográfica mais utilizada no nosso grupo.

A coluna cromatográfica apresenta os mesmos princípios de uma CCF consistindo na separação dos produtos obtidos na reação química, pois podem ainda conter algumas impurezas mesmo após a realização do *work-up*, sendo necessário purificá-los.

A espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica de elucidação estrutural muito utilizada em compostos orgânicos e neste caso usada na análise estrutural dos derivados triterpenóides semi-sintéticos. Esta técnica é baseada na detecção e medição do spin nuclear, sendo a posição do sinal de ressonância de um núcleo influenciada pelo meio onde este se encontra inserido (na estrutura da molécula). O núcleo do átomo que está a ser observado pode gerar mais que um sinal, de acordo com a região vizinha característica da molécula. Os núcleos ^1H (protão) e ^{13}C (carbono 13 - isótopo estável do carbono) são os mais utilizados na observação do fenômeno de ressonância magnética, uma vez que estão presentes em todos os compostos orgânicos, no entanto existem outros núcleos. O Dept (intensificação da distorção por transferência de polarização) é um método muito útil na determinação de carbonos primários (CH_3), secundários (CH_2) e terciários (CH). O espectro de Dept-135 é o mais utilizado e diferencia os CH_2 (sinais negativos) dos CH_3 e CH (sinais positivos). Os sinais dos carbonos quaternários, sem prótons acoplados, não são identificados no espectro.¹¹⁸

A análise estrutural dos derivados semi-sintéticos foi efetuada por RMN (^1H , ^{13}C e Dept-135). Esta análise foi realizada através da comparação dos espectros dos derivados triterpenóides com os espectros do AU e AO já descritos na literatura.¹¹⁹

3.2. ÁCIDO URSÓLICO (II)

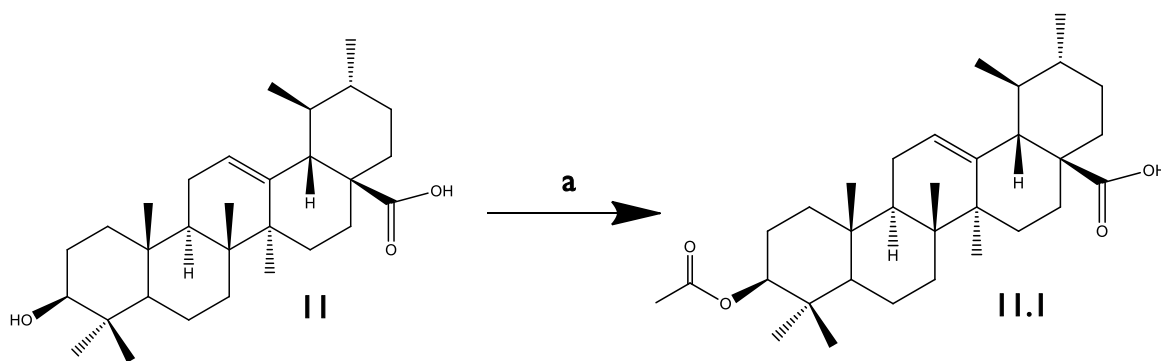
As seguintes reações apresentadas foram todas efetuadas com o ácido ursólico (AU) como substrato inicial. Neste trabalho, realizou-se a semi-síntese de compostos triterpenóides, mais especificamente a derivatização no grupo hidroxilo, C3 e no grupo carboxilo, C28 no AU.¹¹⁶

Uma das principais reações de partida destes compostos consiste na introdução do grupo acetato no C3 do anel A. Os compostos com acetato são geralmente obtidos através de uma reação do substrato inicial (AU) com um anidrido na presença da piridina (solvente) e do catalisador 4-dimetilaminopiridina (DMAP). O anidrido acético (CH_3CO)₂O é um reagente eletrofílico forte muito versátil e muito utilizado em reações de acilação para transferir o grupo CH_3CO .^{120,121}

3. SÍNTESE QUÍMICA E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

O DMAP é um catalisador nucleofílico, derivado da piridina, e usado em várias reações nomeadamente nas esterificações. Nos últimos tempos, o DMAP foi usado como catalisador com o anidrido acético para as reações de acetilação (reação de esterificação específica).¹²¹⁻¹²³ Apesar de a piridina ser um solvente barato, é demasiado tóxico e apresenta também um odor intenso desagradável, colocando assim alguns inconvenientes à sua utilização. Para evitar o seu uso como solvente nesta reação, algumas publicações demonstraram bons rendimentos com o uso de tetrahydrofurano (THF) como solvente alternativo.^{124,125} O composto 11.1 foi preparado e obtido a partir do AU (11) segundo estas condições (Esquema 3.1).

Esquema 3.1. Síntese do derivado 11.1



a) Condições: Anidrido Acético, DMAP, THF, Temperatura Ambiente

O aumento de escala da reação de semi-síntese do composto 11.1 (substrato superior a 100 mg) resulta na formação de um produto secundário 11.2 (Figura 3.24) para além do produto principal. Este produto secundário deve-se à presença de um grupo carboxilo no C28 do AU. Apesar de ser extremamente instável, só após a realização de uma coluna cromatográfica é que o produto 11.2 foi convertido quase na sua totalidade no composto 11.1 pretendido. No entanto, se a reação for realizada numa escala menor (substrato inferior a 100 mg) este problema não se verifica, pois após o *work-up* este produto secundário é imediatamente convertido na sua totalidade no composto 11.1. Denotou-se ainda que nestas condições, a formação do produto secundário 11.2 é quase inexistente após as 24 horas de reação. É importante referenciar que a coluna cromatográfica foi realizada em ambas as condições devido à presença de outras impurezas menos relevante após a reação.

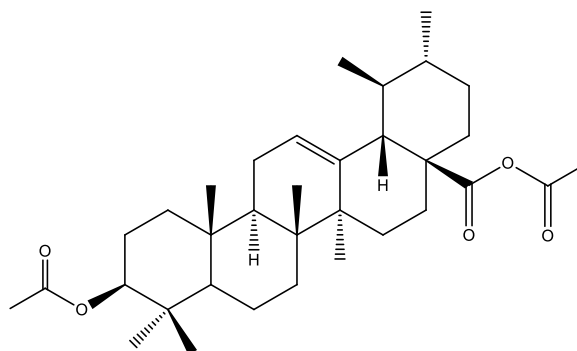


Figura 3.24. Produto secundário 11.2. na reação a)

O composto 11.1 foi sintetizado e posteriormente caracterizado através do RMN (¹H, ¹³C e Dept-135) (Figura 3.25, 3.26 e 3.27). A presença do sinal δ 5.23 ppm corresponde ao próton H12 relativo à presença da insaturação da molécula projetando o sinal (triplete (t)) para um maior desvio químico. O composto 11.1 exibe ainda no seu espectro ¹H-RMN um duplo dubleto (dd) a δ 4.50 ppm correspondente ao próton H3 do C3 (carbono quiral) devido à proximidade do grupo acetato introduzido neste carbono; o sinal a δ 2.16 ppm representa um dubleto (d) referente ao próton H18 do C18, este próton também apresenta um desvio químico considerável devido à presença do grupo carboxilo no C17; e a δ 2.04 ppm, o sinal com maior intensidade, um singleto (s), corresponde aos 3 prótons do grupo acetato introduzido no C3 da molécula. Os restantes 5 sinais identificados correspondem aos prótons dos 6 metilos (CH₃) do composto 11.1 nos carbonos C23, C24, C25, C26, C29, C30, no entanto os prótons (3H) do C27 não se encontram identificados devido à proximidade do grupo carboxílico (C28) apresentado assim um maior desvio químico. Os restantes prótons encontram-se entre os 1.10 ppm e os 2.00 ppm, na zona dos CH₂, onde os sinais são difíceis de diferenciar devido ao elevado número de prótons.^{124,125}

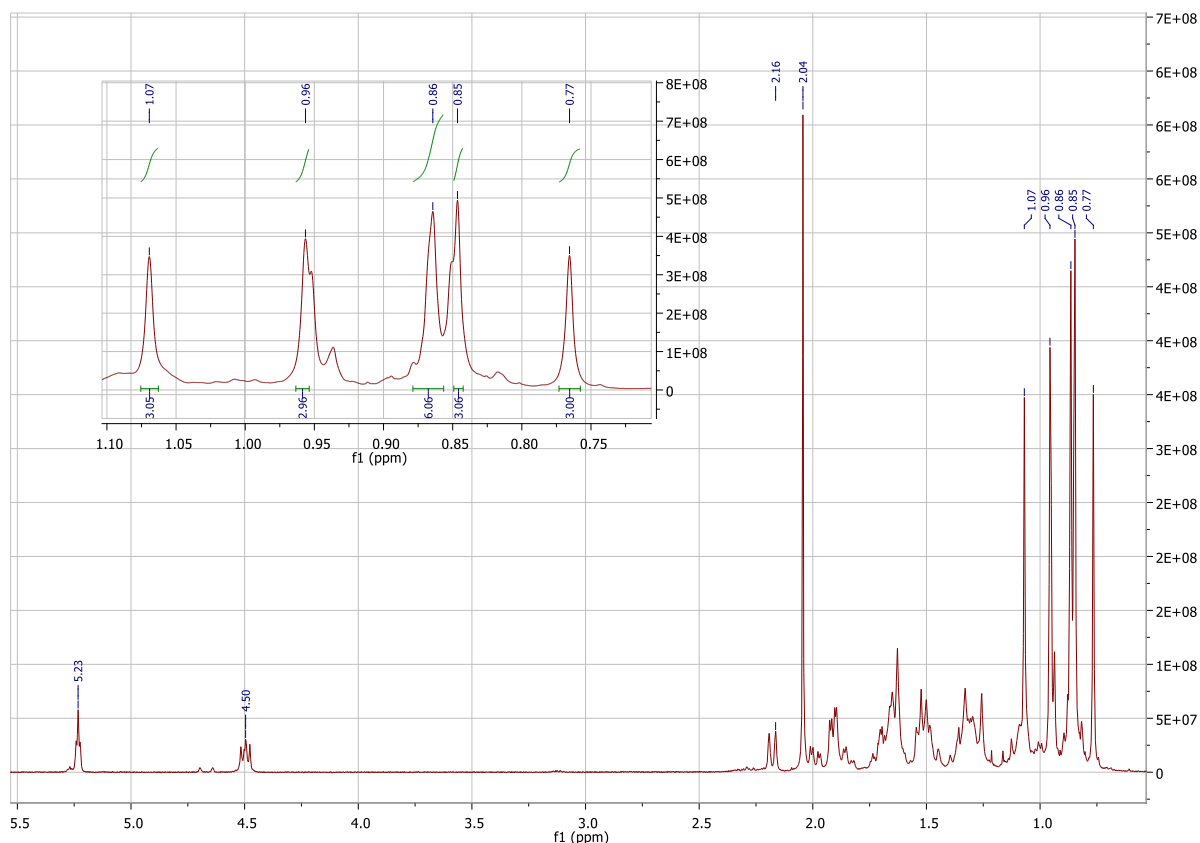


Figura 3.25. Espectro ¹H-RMN do derivado III.I

No espectro de ¹³C-RMN consegue-se facilmente identificar os 5 carbonos à esquerda do clorofórmio. O sinal a δ 183.29 ppm corresponde ao C28 do grupo carboxilo, pois apresenta o maior desvio químico; o δ 170.87 ppm ao carbono carbonilo do grupo do acetato (OCOCH₃); o sinal a δ 137.78 ppm ao C13, enquanto o δ 125.57 ppm ao C12, e por fim o sinal δ 80.77 ppm corresponde ao C3. O espectro apresenta 31 sinais, correspondentes aos 32 carbonos existentes no composto III.I. O sinal a δ 23.40 ppm corresponde ao C23 e C24, pois estão no mesmo plano na molécula, consequentemente o seu sinal é o mesmo, por isso, apresentam uma intensidade mais elevada em relação aos outros picos (Figura 3.26).

3. SÍNTESE QUÍMICA E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

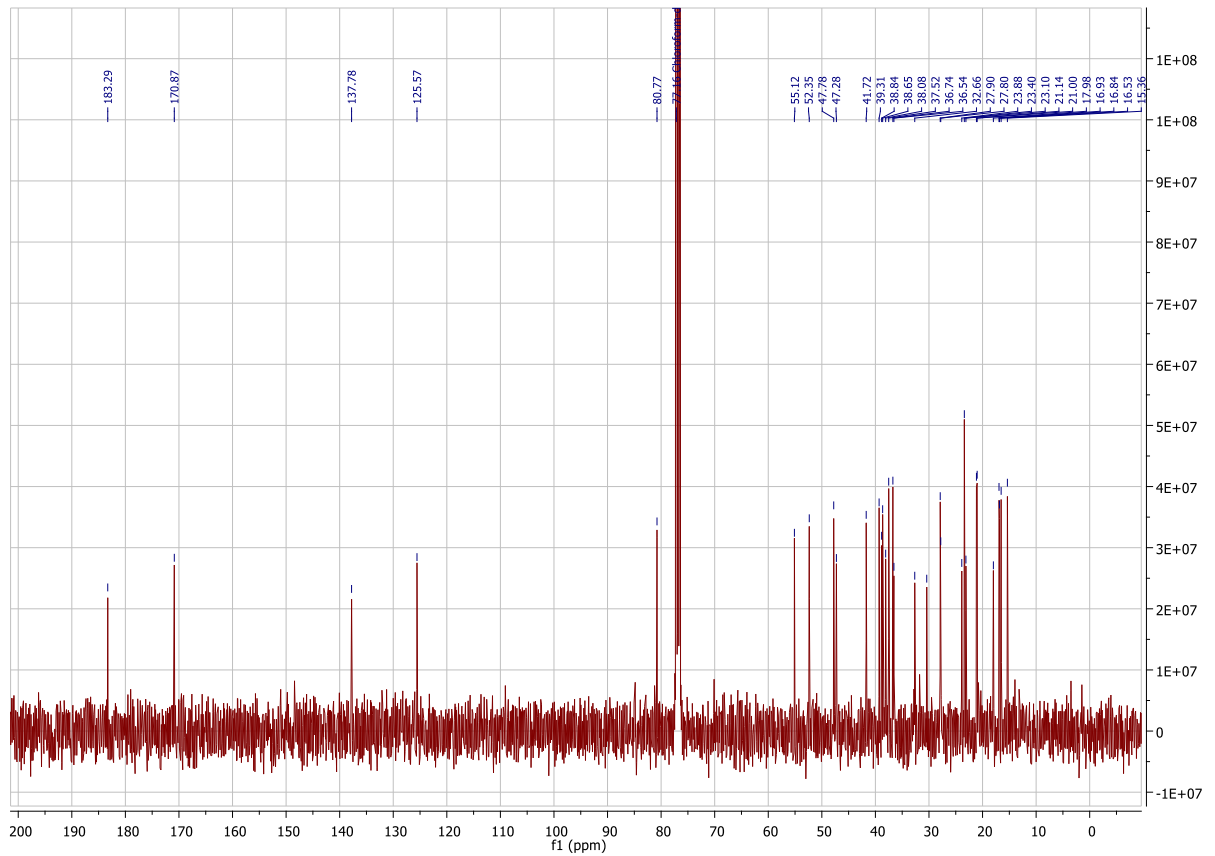


Figura 3.26. Espectro ^{13}C -RMN do derivado II.I

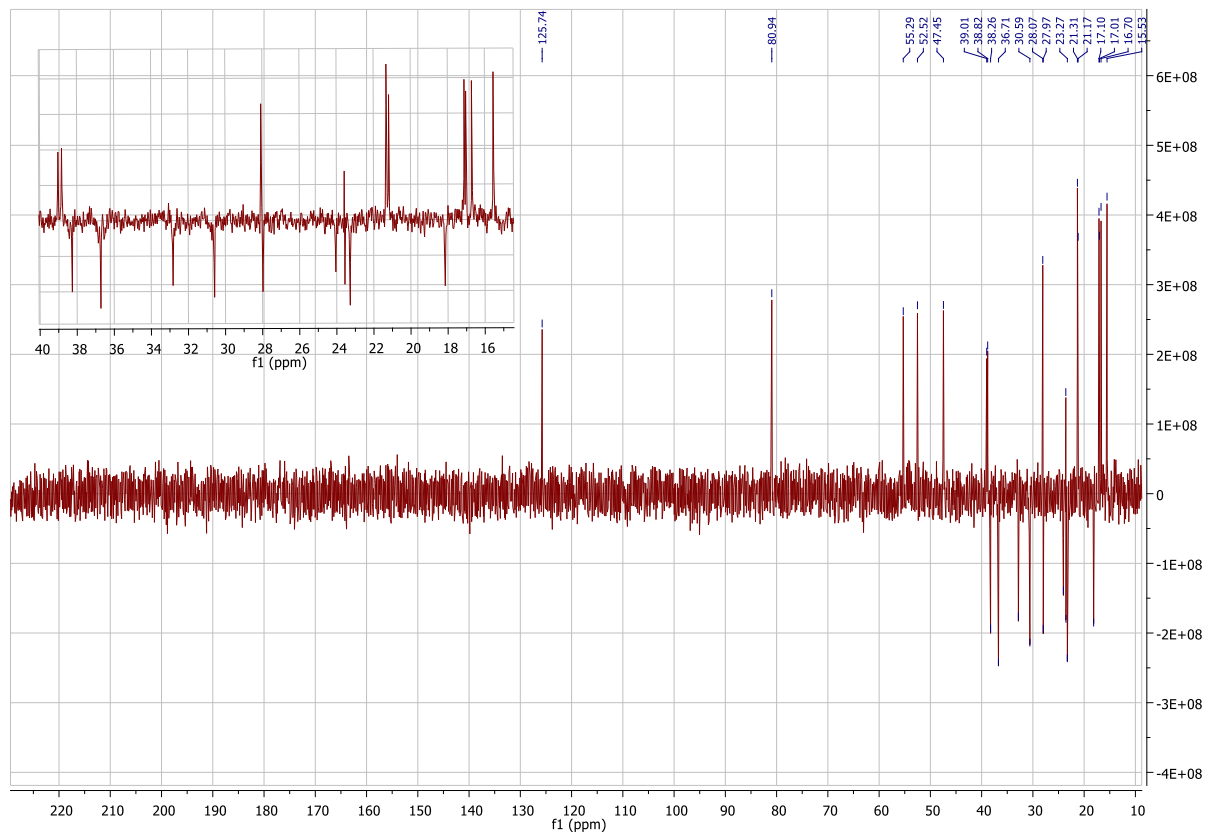
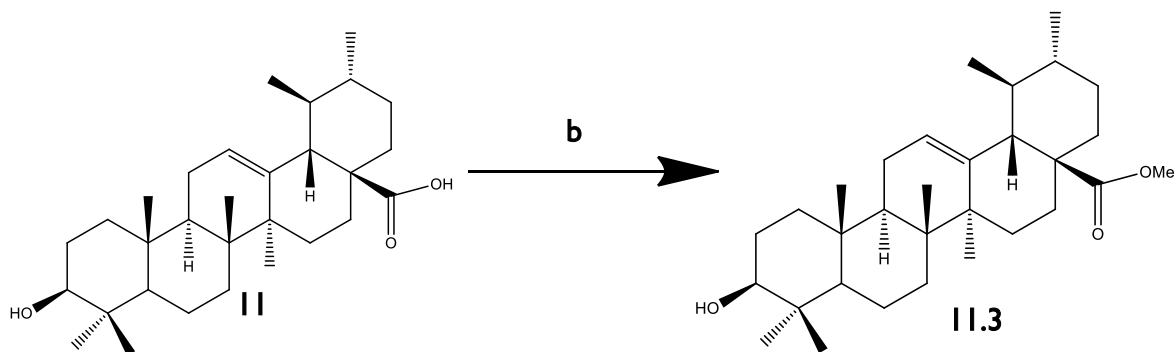


Figura 3.27. Espectro Dept-135 do derivado II.I

No espectro Dept-135 do composto 11.1 identificou-se a presença de 9 carbonos CH₂ (sinais negativos) e 15 carbonos CH e CH₃ (sinais positivos), como esperado (Figura 3.27).

Esquema 3.2. Síntese do derivado 11.3



- b) Condições: Carbonato de Potássio, Iodometano, DMF (dimetilformamida), N₂, Temperatura Ambiente

Esta reação baseia-se numa substituição electrófila com a introdução do grupo metilo (CH₃) no C28 do AU, denominada como uma metilação. (Esquema 3.2). O iodometano (CH₃I) é muito utilizado nas reações de metilação em ácidos carboxílicos, portando-se como um reagente eletrofilico, na presença do carbonato de potássio (K₂CO₃) sob atmosfera de azoto (N₂).

O composto 11.3 foi sintetizado e depois caracterizado através do RMN (¹H, ¹³C e Dept-135). No espectro do ¹H-RMN correspondente ao composto 11.3 (Figura 3.28), verifica-se a presença de um singleto (s) a δ 5.24 ppm corresponde ao protão H12, tal como no espectro ¹H-RMN do composto 11.1 (Figura 3.25), relativo à presença da insaturação da molécula. O sinal a δ 3.60 ppm com maior intensidade representa os 3 protões do grupo metilo (CH₃) introduzido no C28. O composto 11.3 exibe também no seu espectro ¹H-RMN um duplo dubleto (dd) a δ 3.20 ppm correspondente ao protão H3 do C3, devido à presença do grupo hidroxilo nesta posição. Os restantes 8 sinais identificados na zona de menor desvio químico correspondem aos 7 metilos (CH₃) do composto 11.3. Os sinais a 0.85 ppm e a 0.86 ppm correspondem apenas a 3 protões de um CH₃, apresentando-se como um dubleto (d).¹⁴¹

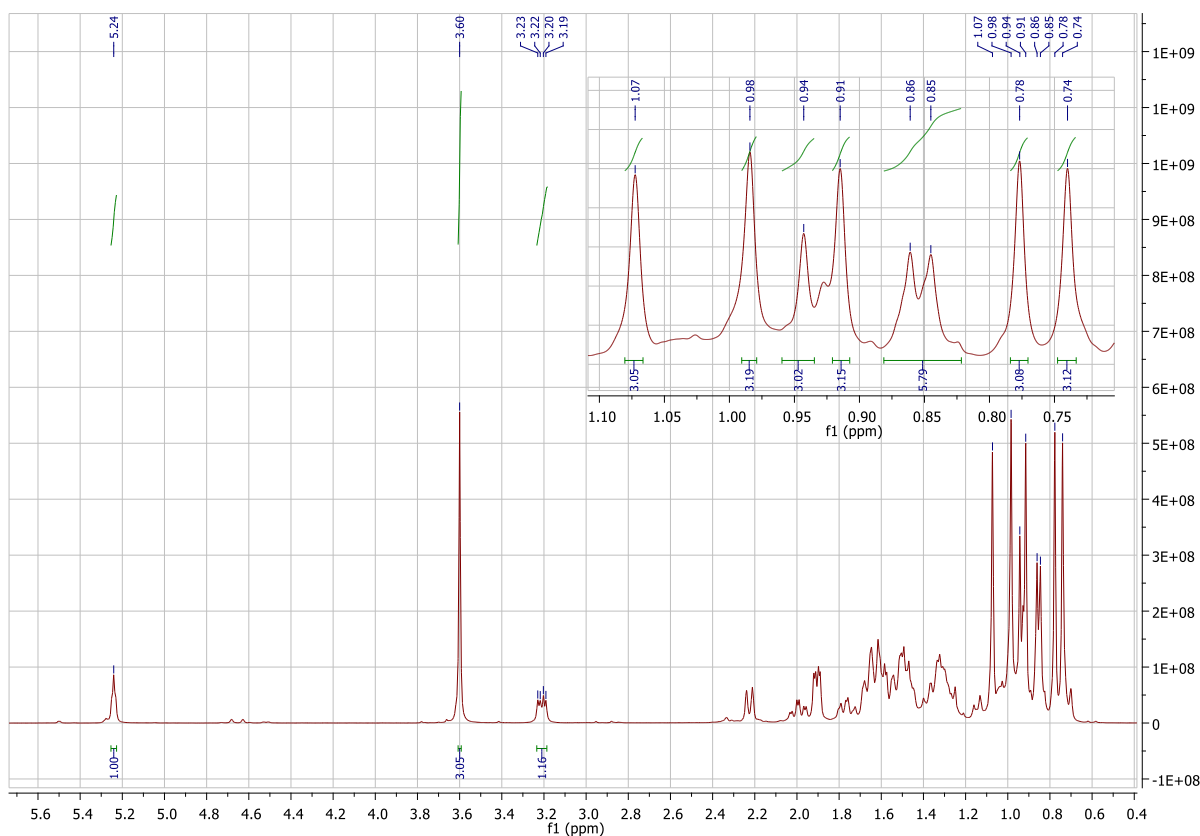


Figura 3.28. Espectro ^1H -RMN do derivado II.3

No espectro de ^{13}C -RMN (Figura 3.29), consegue-se facilmente identificar os 4 carbonos à esquerda do clorofórmio, todos eles apresentam valores muito semelhantes do espectro de ^{13}C -RMN do derivado II.1, apresentando também as mesmas correspondências nos carbonos devido às semelhanças estruturais entre os dois compostos. O sinal a δ 178.21 ppm corresponde ao C28 do grupo carboxílico, a δ 138.29 ppm ao C13, a δ 125.57 ppm ao C12, e por fim o sinal δ 79.18 ppm corresponde ao C3.

3. SÍNTESE QUÍMICA E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

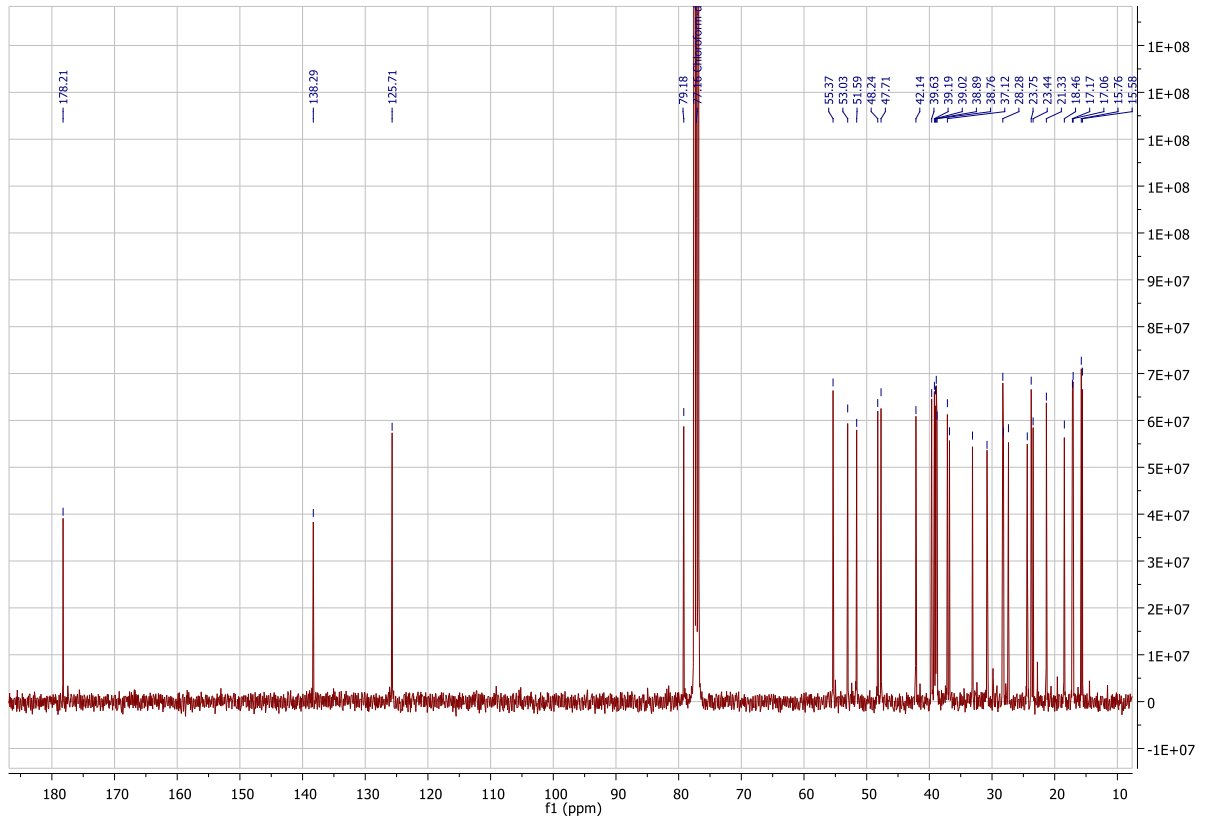


Figura 3.29. Espectro ^{13}C -RMN do derivado II.3

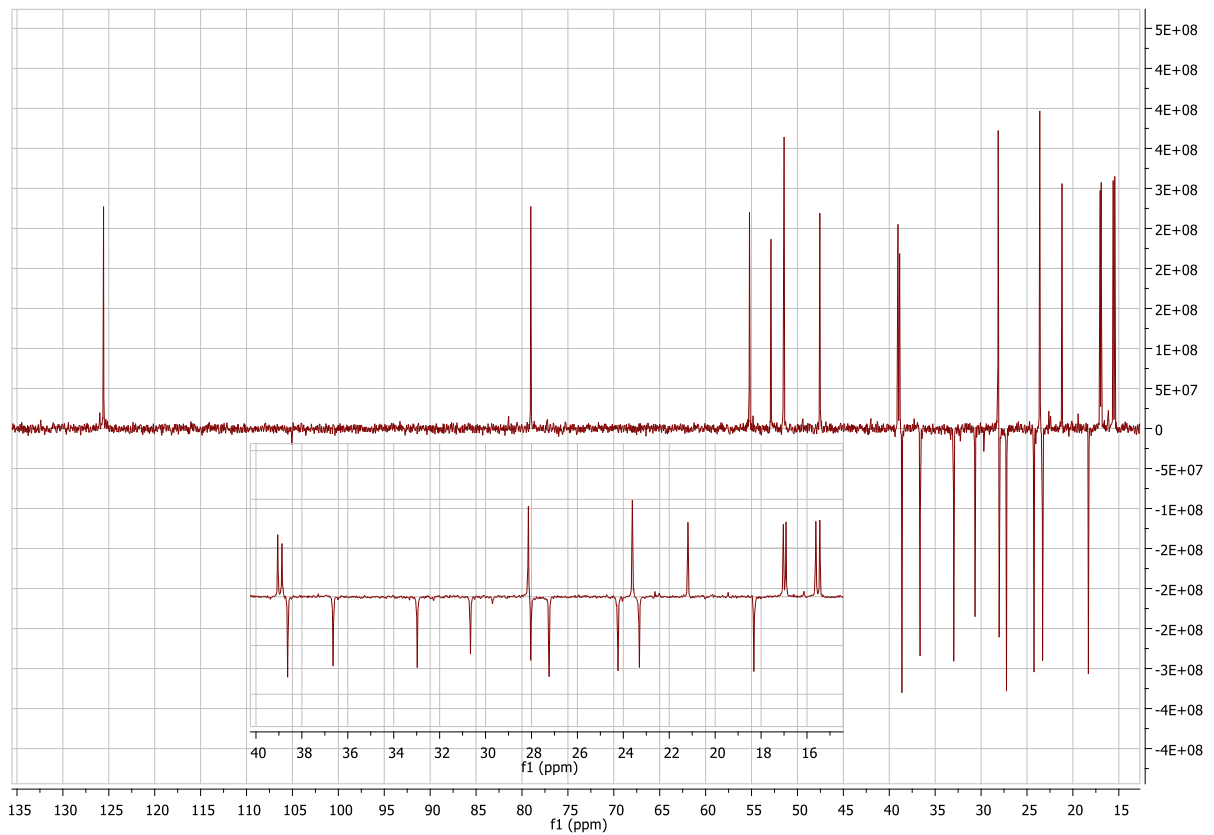
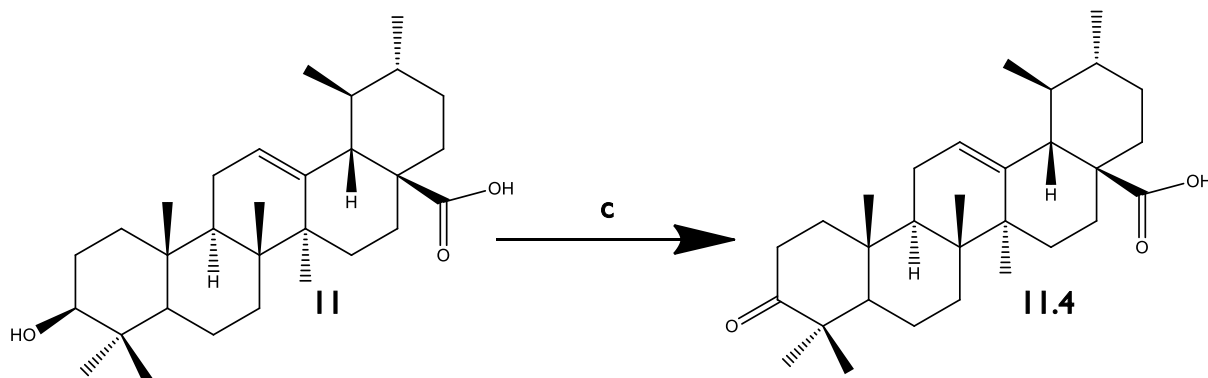


Figura 3.30. Espectro DEPT-135 do derivado II.3

O espectro Dept-135 do derivado 11.3 apresenta 9 sinais negativos correspondentes aos 9 carbonos CH₂ e 15 sinais positivos relativos aos 15 carbonos CH e CH₃ (Figura 3.30).

Esquema 3.4. Síntese do derivado 11.4



c) Condições: Jones, Acetona, 2-propanol, 0°C

Na reação representada no Esquema 3.3 ocorre uma oxidação no C3 do AU, correspondente à perda de um próton e consequente formação de um grupo funcional cetona. O reagente de Jones é uma solução previamente preparada, usada como agente oxidante, e produzida pela diluição do trióxido de crômio (Cr(VI)O₃) em ácido sulfúrico (HCl) e acetona (CH₃(CO)CH₃). Esta reação processa-se, após a adição cuidadosa do reagente de Jones à solução o que originou uma alteração de cor para castanho (inicialmente a solução encontrava-se incolor devido à cor branca do AU). No entanto, o solvente 2-propanol utilizado para o término da reação provocou uma nova alteração de cor, neste caso a solução passou a verde-escuro. Verificou-se que a adição em excesso do 2-propanol altera a cor da reação para azul e não verde-escuro, nestas condições verificou-se também dificuldades na realização do *work-up*.

O derivado 11.4 sintetizado foi analisado por RMN (¹H, ¹³C e Dept-135). No espectro ¹H-RMN do composto 11.4 (Figura 3.31), detona-se uma falta de resolução devido ao alargamento dos sinais, ou seja, os picos não se encontram bem definidos, contudo estão representados todos os prótons comparativamente ao espectro do AU. O sinal δ 5.26 ppm corresponde a um singlete do próton H12 (semelhante aos outros derivados analisados), apenas este sinal se encontra em desvios químicos maiores. O derivado 11.4 exhibe também no seu espectro ¹H-RMN um sinal a δ 1.08 ppm com maior intensidade que os restantes sinais na mesma gama, correspondente aos 6H, ou seja, 2 metilos (CH₃). Os restantes 5 sinais

3. SÍNTESE QUÍMICA E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

identificados são representativos dos outros metilos (5) presentes no derivado II.4, correspondente a quinze prótons (5x3H).¹²⁵

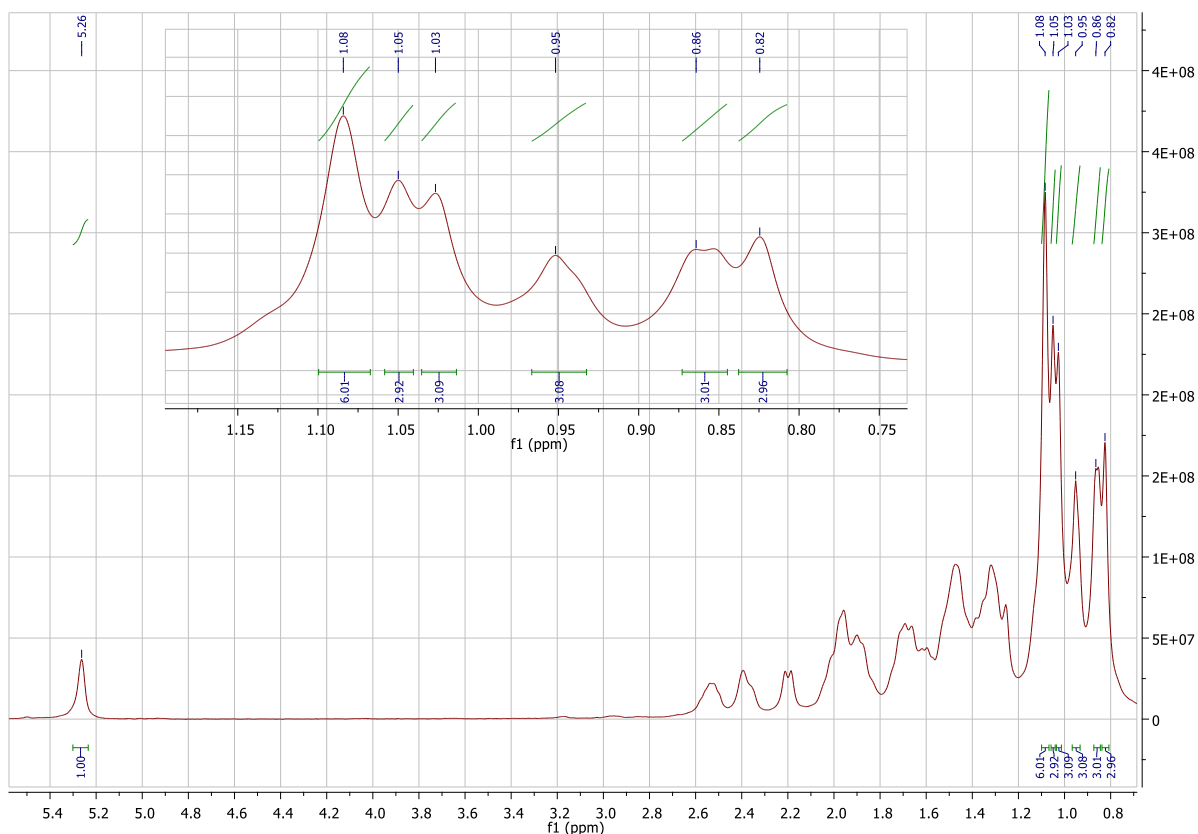


Figura 3.31. Espectro ¹H-RMN do derivado II.4

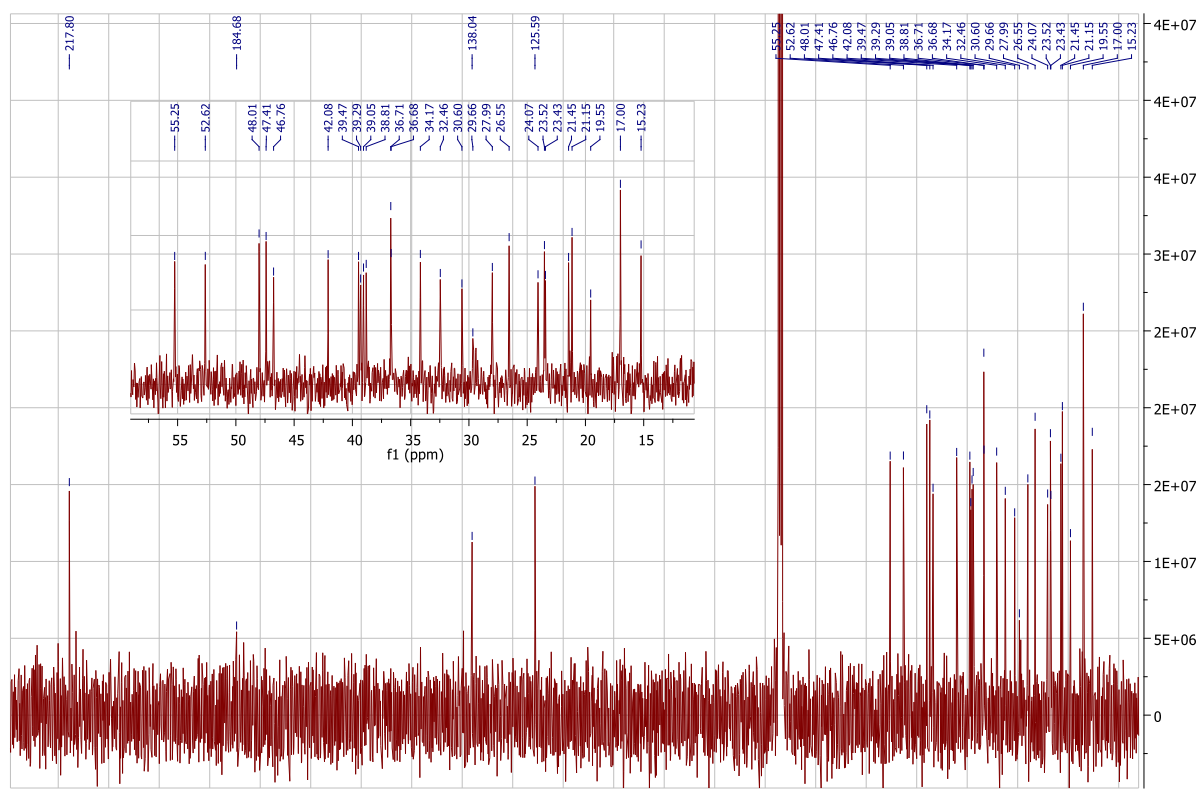


Figura 3.32. Espectro ¹³C-RMN do derivado II.4

No espectro de ^{13}C -RMN consegue-se facilmente identificar os 3 carbonos à esquerda do clorofórmio, pode-se ainda vislumbrar um pequeno sinal a δ 184.82 correspondente ao C28, de acordo com a literatura (Figura 3.32).¹²⁵

O espectro Dept-135 do derivado 11.4 apresenta 9 carbonos CH_2 e 15 carbonos CH e CH_3 , representados pelos sinais negativos e positivos, respetivamente (Figura 3.33).

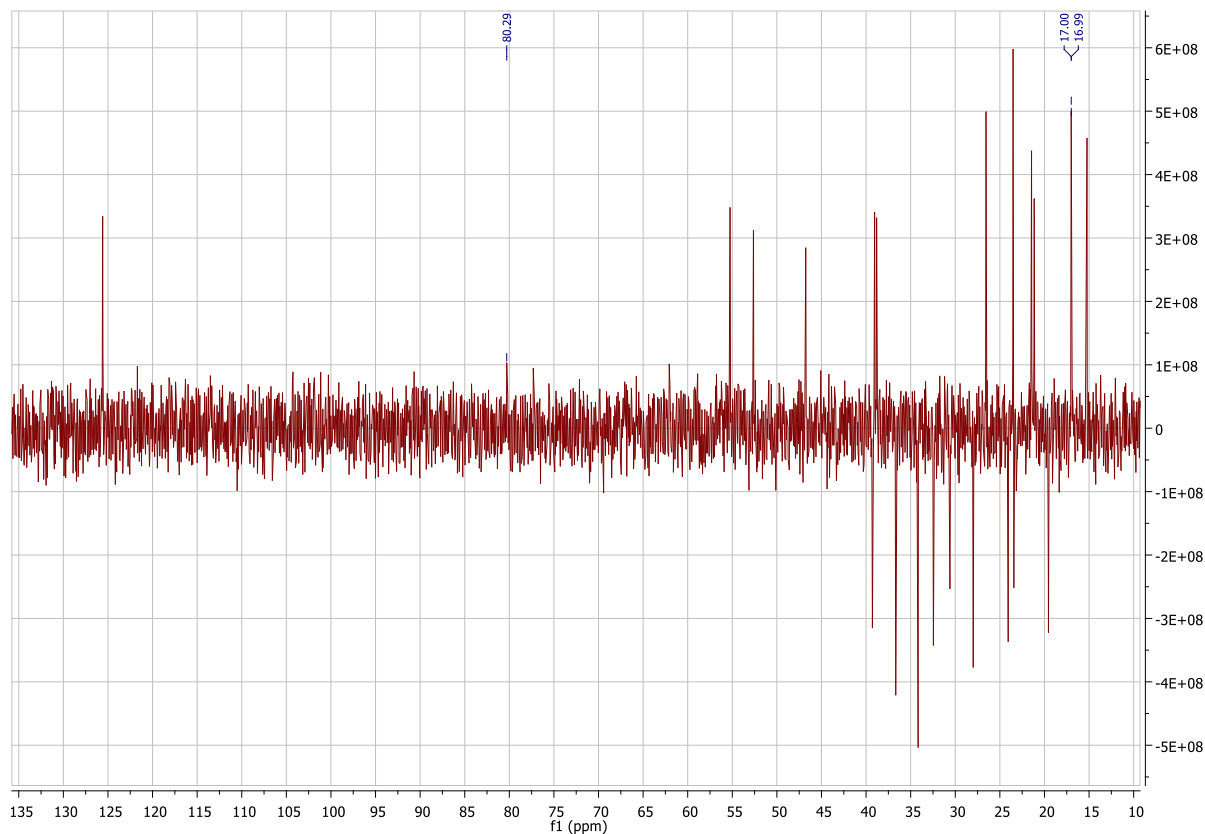


Figura 3.33. Espectro DEPT-135 do derivado 11.4

3.3. ÁCIDO OLEANÓLICO (12)

A química medicinal tradicional baseava-se no uso de compostos naturais ou derivados semelhantes, com uma baixa abundância em átomos de flúor. Os compostos fluorados são raramente encontrados na química medicinal até 1970, apenas 2% dos compostos continham flúor na sua estrutura, atualmente, são cerca de 20% dos compostos.¹²⁶ Este átomo é o décimo terceiro elemento químico mais abundante na natureza, apresenta propriedades únicas em comparação com os outros átomos do grupo 17 da série dos halogénios (Cloro, Bromo ou Iodo), e é o elemento mais eletronegativo e de menor tamanho de todos os elementos químicos.^{127,128} Fried¹²⁹ revelou como introduzir o flúor num composto biologicamente ativo,

3. SÍNTESE QUÍMICA E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

no acetato 9 α -fluorohidro cortisona, conferindo propriedades benéficas ao composto. Hoje em dia, muitos compostos fluorados são sintetizados na investigação farmacêutica e são amplamente utilizados no tratamento de doenças. Estes compostos são bastante atrativos porque um único átomo de flúor numa posição específica da molécula pode melhorar drasticamente as suas propriedades farmacológicas.^{130,131} O composto 5-fluorouracilo foi sintetizado por Charles Heidelberger em 1957, e foi o primeiro composto fluorado sintetizado e usado como agente anticancerígeno.^{132,133}

Os compostos orgânicos fluorados podem ser obtidos através dos reagentes nucleofílicos, electrofílicos ou de radicais com reagentes de flúor.¹³⁴ Os reagentes nucleofílicos como o fluoreto de tetrabutilamónio (TBAF), trifluoreto de dietilaminoenxofre (DAST) e trifluoreto de [bis(2-metoxietil)aminoenxofre] (Deoxofluor) são usados na preparação de compostos mono e difluorados a partir de álcoois, cetonas e aldeídos (Figura 3.34). Os reagentes electrofílicos “F⁺” tais como: Bis(tetrafluoroborato) de 1-clorometil-4-fluoro-1,4-diazoniabicyclo [2.2.2]octano (F-TEDA ou Selectfluor) e *N*-fluorobenzenosulfanimida (NFSI) formam um composto fluorado a partir de acetonas, esterés e heterocíclicos (Figura 3.35).^{134,135}

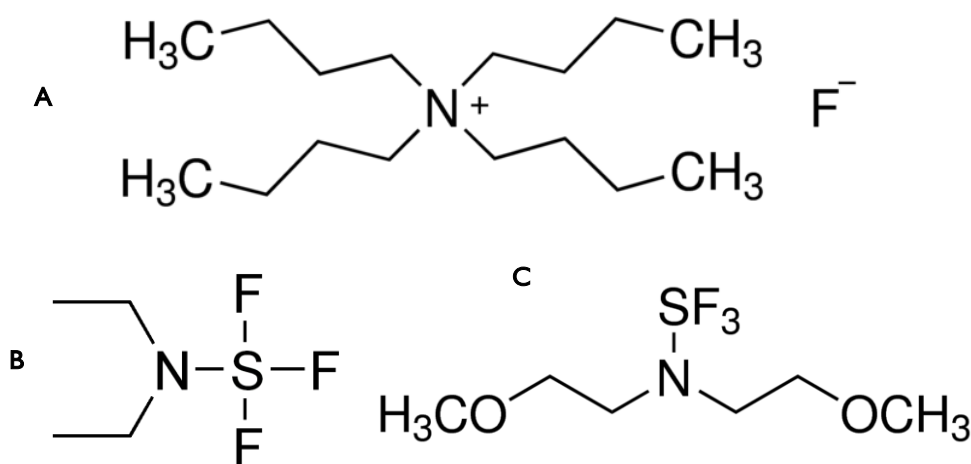


Figura 3.34. Exemplos de reagentes fluorados nucleofílicos. (A - TBAF ; B - DAST ; C - Deoxofluor)

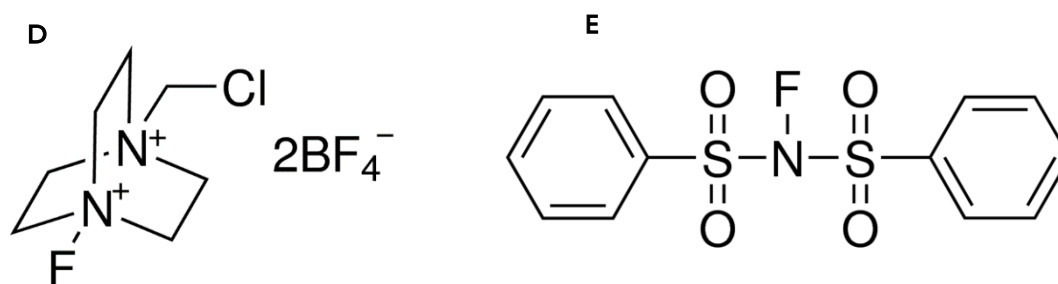
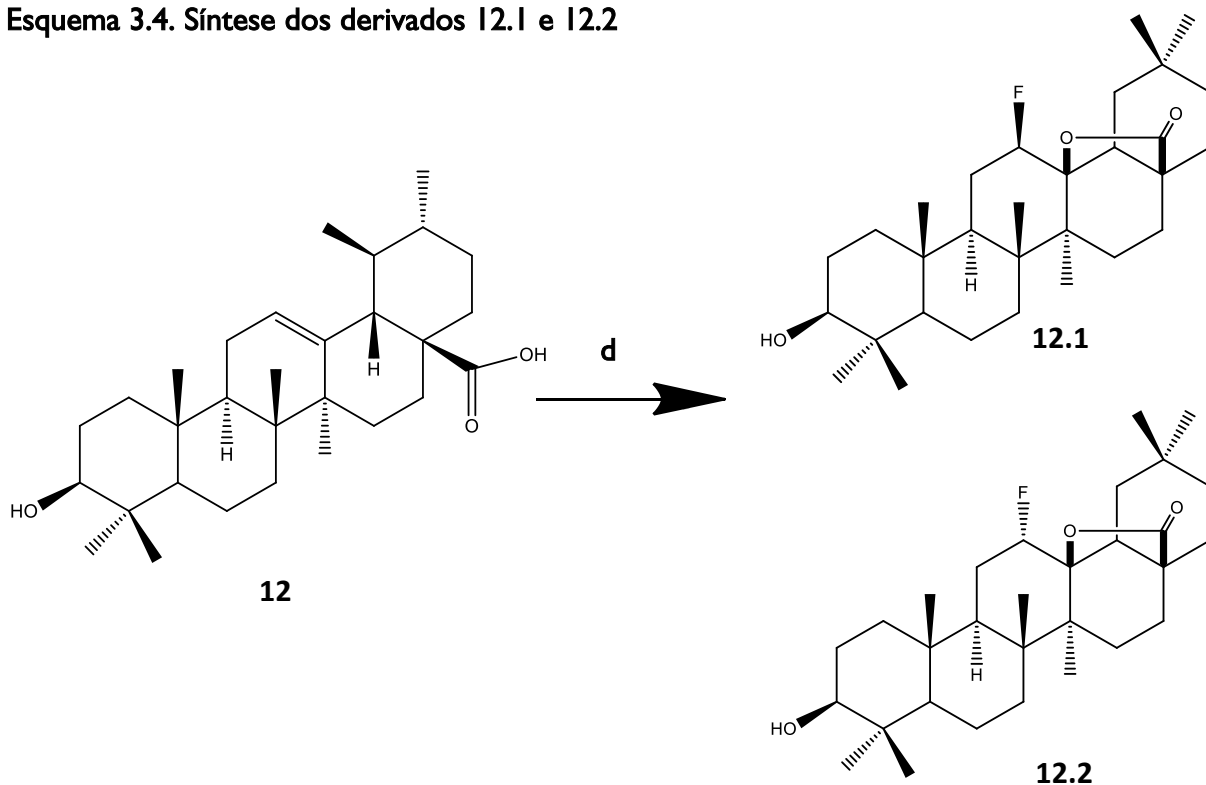


Figura 3.35. Exemplos de reagentes fluorados eletrófilos. (D - Selectfluor ; E - NFSI)

Diversos estudos descrevem a reação dos alcenos com o selectfluor como um agente electrofílico, na presença de um dador nucleófilo. O selectfluor tem a particularidade de ser um sólido branco, pouco tóxico, estável a temperaturas elevadas sendo fácil de trabalhar devido à simples remoção dos produtos secundários através de um *work-up* aquoso.¹³⁶ O selectfluor tem-se tornado um reagente bastante popular com variadíssimas aplicações farmacológicas como agrícolas.¹³⁶⁻¹³⁸

Os solventes, a temperatura e o dador nucleofílico podem influenciar a eficácia e o número de produtos secundários e isómeros resultantes desta reação.^{137,138} As fluorações nas posições adjacentes ao grupo carboxilo do AU estão descritas na literatura, com o isómero α o produto principal a ser formado.¹³⁹

Esquema 3.4. Síntese dos derivados 12.1 e 12.2



d) Condições: selectfluor, nitrometano, dioxano, 80°C

Esta reação foi efetuada com ácido oleanólico (12), como substrato, na presença do selectfluor, com uma mistura de dois solventes inertes, nitrometano e dioxano a 80°C, resultando numa mistura de α e β -fluorolactonas no C12. O ácido carboxílico comporta-se como um dador nucleófilo, perdendo um protão, promovendo assim a ciclização com o C13 do AO (Esquema 3.4). A utilização do AO como substrato inicial na preparação de novos derivados com fluorolactona resulta em reações quimicamente estáveis com um bom

rendimento, no entanto, a mistura de produtos (12.1 e 12.2) resultante apresenta polaridades muito semelhantes, fazendo com que a purificação de cada produto seja difícil.

A elucidação estrutural dos derivados 12.1 (isómero β) e 12.2 (isómero α) foi determinada por RMN (^1H) (Figura 3.36). No espectro ^1H -RMN, verifica-se a presença de um sinal a δ 3,70 ppm relativo ao solvente dioxano, o qual não foi devidamente removido após a reação. Estes derivados do AO identificam-se pela presença de um duplo dubleto (dd) a δ 3,22 ppm referente ao H3 do C3. O sinal (d) detetado a δ 4,56 ppm referente ao H12 identifica a presença dos dois derivados. Denota-se ainda que um derivado encontra-se em maior quantidade devido à maior intensidade dos sinais δ 4,62 ppm e δ 4,50 ppm. Segundo Leal *et al.*,¹³⁹ o sinal correspondente à α -fluorolactana encontra-se δ 4,6 ppm enquanto que a β -fluorolactona a δ 4,50 ppm. Sendo assim, o derivado que se encontra-se em maior quantidade é a β -fluorolactana (12.1), apresentando-se numa proporção de cerca de 70%.

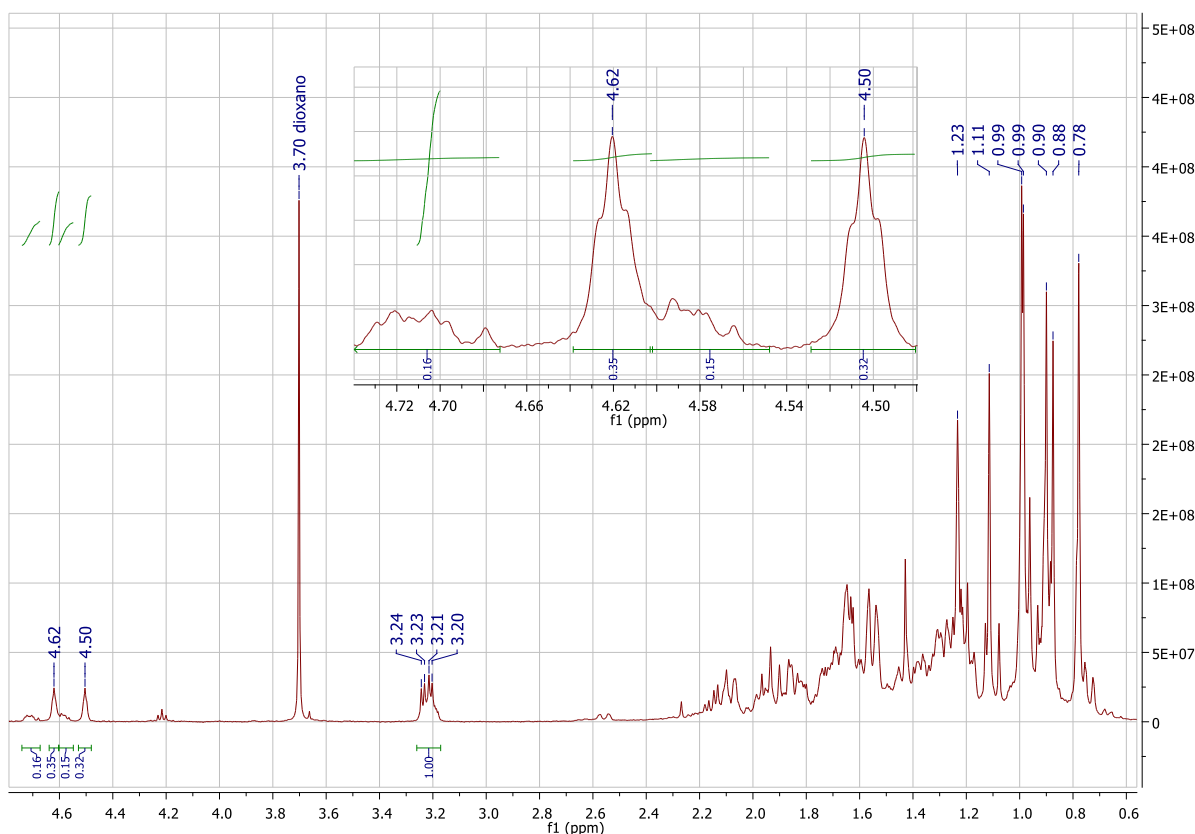


Figura 3.36. Espectro ^1H -RMN dos derivados 12.1 e 12.2.

3.4 PARTE EXPERIMENTAL

Os espectros de RMN, ^1H , ^{13}C , Dept-135 foram obtidos a partir do espectrómetro Bruker Avance III 400 MHz, propriedade do Centro de Química de Coimbra no Laboratório de RMN, da Universidade de Coimbra. Os desvios químicos foram medidos em δ (ppm) usando o δ 7.26 para o clorofórmio deuterado (CDCl_3) em ^1H -RMN e δ 77.00 para ^{13}C -RMN como padrões base. Os desvios químicos medidos são dados em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

Para a análise da Cromatografia de Camada Fina (TLC, *Thin Layer Chromatography*) analisado em Sílica gel 60H_{F254}/Sílica gel 60G. Para as colunas cromatográficas a sílica usada foi a Sílica gel 60 (230-400 mesh, Merck).

Todos os substratos, ácido ursólico (AU) e o oleanólico (AO), assim como os reagentes e solventes, Selectfluor, 4-dimetilaminopiridina (DMAP), anidrido acético ($(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$), tetrahydrofurano (THF), carbonato de potássio (K_2CO_3), iodometano (CH_3I), reagente de Jones, acetona ($\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$), 2-propanol, dioxano ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$), nitrometano (CH_3NO_2), éter etílico ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$), dimetilformamida (DMF), sulfato de sódio (Na_2SO_4), foram adquiridos a partir de Sigma Aldrich Co. Enquanto que todos os solventes usados nos *work-up's* foram comprados VWR Portugal e apresentavam elevada qualidade analítica. O bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e o cloreto de sódio (NaCl) foram obtidos sob a forma comercial e produzidos no laboratório como soluções de lavagens para os *work-up's*.

Todos os solventes usados nas reações foram previamente destilados e secos de acordo a literatura.¹⁴⁰

Ácido 3 β -Acetoxi-urs-12-en-28-óico (11.1).^{124,125} AU (150 mg; 0,328 mmol) reagiu em 15 ml THF à temperatura ambiente, adicionou-se depois anidrido acético (0,07 mL; 0,656 mmol) e DMAP (10% da massa do AU). Após 24 horas foi adicionado mais anidrido acético (0,018 mL; 0,164mmol). Depois de 3 horas, foi removido o solvente sob pressão reduzida, a mistura da reação foi dissolvida em AcOEt. A fase aquosa foi extraída com acetato de etilo (3x75 mL) e de seguida, a fase orgânica foi acidificada com HCl 10% (2x50mL). A fase orgânica foi lavada com NaHCO_3 (4x50 mL) até que o pH fosse 7 e depois seca em Na_2SO_4 anidro. O resultante foi filtrado e evaporado até secar, obtendo-se um sólido branco. O sólido foi então purificado por coluna cromatográfica [éter de petróleo/acetato de etilo (10:1) resultando num sólido branco (124 mg ; 0,248 mmol ; 75%). ^1H RMN (400 MHz CDCl_3): δ 5.23 (1H t $J=3.40$), δ 4.50 (1H dd $J=9.21$), δ 2,16 (1H d $J=11.60$), δ 2.04 (3H s), δ 1.07 (3H s), δ 0.96 (3H s), δ 0.86 (6H

s), δ 0.85 (3H s), δ 0.77 (3H s). ^{13}C RMN (100 MHz CDCl_3): δ 183.29 (C28), 170.87 (OCOCH_3), 137.78 (C13), 125.56 (C12), 80.77 (C3).

3 β -Hydroxi-urs-12-en-28-oato de metilo (11.3): Preparação de acordo a literatura¹⁴¹, a partir do AU (100 mg ; 0,218 mmol) em 2 mL DMF à temperatura ambiente, com Carbonato de Potássio (80 mg ; 0,55 mmol) e Iodometano (0,03 mL ; 0,436 mmol) sob atmosfera de azoto. A reação terminou após 6 horas e evaporou-se o solvente antes de realizar a diluição com AcOEt. A fase aquosa foi extraída com acetato de etilo (3x25 mL). A fase orgânica resultante foi lavada com H_2O (2x15 mL) e com NaCl 10% (3x25ml), sendo seca em Na_2SO_4 anidro. O resultante foi filtrado e evaporado até a obtenção de um sólido branco (94 mg; 0,232 mmol ; 91%). ^1H NMR (400 MHz CDCl_3): δ 5.24 (1H t $f=7.00$ H12), 3.60 (3H s COOCH_3), 3.20 (1H dd $f=10,70$ H3), 1.07 (3H s), 0.98 (3H s), 0.94 (3H s), 0.91 (3H s), 0.86 (3H d $f=6.40$), 0.78 (3H s), 0.74 (3H s). ^{13}C NMR (100 MHz CDCl_3): δ 178.21 (C28), 138.29 (C13), 125.71 (C12), 79.18 (C3).

Ácido 3-Oxours-12-en-28-óico (11.4): A preparação foi efetuada de acordo com a literatura¹²⁵, a partir do AU (100 mg ; 0,218 mmol) em 2,5 mL Acetona à temperatura de 0°C e adicionou-se depois o reagente de Jones. Após a alteração de cor adiciona-se 2 mL 2-propanol à temperatura ambiente. De seguida, efetuou-se a filtração e posteriormente a evaporação do solvente, até à obtenção de um sólido branco-sujo (97 mg ; 0,213 mmol ; 97%). ^1H RMN (400 MHz CDCl_3): δ 5.26 (1H t), δ 1.08 (6H s), δ 1.05 (3H s), δ 1.03 (3H s), δ 0.95 (3H s), δ 0.85 (3H s), δ 0.82 (3H s). ^{13}C RMN (100 MHz CDCl_3): δ 217.95 (C3), 184.82 (C28), 138.19 (C13), 125.74 (C12).

3 β -ol-12 α -fluor-olean-13,28 β -olide (12.1) e 3 β -Ol-12 β -fluor-olean-13,28 β -olide (12.2): Preparação de acordo a literatura¹³⁹ a partir de 12 (50 mg ; 0,109 mmol) em 1 mL nitrometano (CH_3NO_2) e 0,066 mL dioxano ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$) à temperatura de 80°C com Selectfluor (116 mg ; 0,326 mmol). Após 28 h a mistura da reação foi dissolvida em éter etílico e H_2O . A fase aquosa foi extraída com éter etílico (3x20 mL Et_2O). A fase orgânica resultante foi lavada com NaCl 10% (3x20 mL) e seca em Na_2SO_4 anidrido, sendo depois filtrada e evaporada até a obtenção de um sólido amarelo (45 mg ; 0,095 mmol ; 87%). Mistura de isómeros (β : α 70:30 por integração do H12). Caracterização do derivado 12.1: ^1H NMR (400 MHz CDCl_3): δ 4.56 (1H d $f=46.5$ H12), 3.22 (1H dd $f=11.38$ H3), 1.23 (3H s C27), 1.11 (1H s C26), 0.99 (3H d), 0.98 (3H s), 0.89 (3H s), 0.87 (3H s C25), 0.77 (3H s).

4. CONCLUSÃO

4. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram sintetizados derivados semi-sintéticos triterpenóides, a partir do ácido ursólico 11 (ácido 3- β -hidroxi-urs-12-en-28-óico) e do ácido oleanólico 12 (ácido 3- β -hidroxi-olea-12-en-28-óico) e caracterizados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

Os derivados semi-sintéticos (11.1, 11.3 e 11.4) obtidos a partir do AU, resultaram em reações quimicamente estáveis com ótimos rendimentos e foram analisados estruturalmente em ^1H -RMN, ^{13}C -RMN e Dept-135, encontrando-se devidamente caracterizados de acordo com a literatura. Os novos derivados triterpenóides (12.1 e 12.2) foram sintetizados a partir do AO e caracterizados por ^1H -RMN. Estes derivados são dois enantiómeros obtidos por uma reação com o selectfluor resultando num ótimo rendimento, no entanto, o seu processo de purificação não foi realizado devido à semelhante polaridade identificada nos derivados (12.1 e 12.2). O derivado semi-sintético (12.1) representa o isómero β , enquanto que o outro derivado (12.2) corresponde à forma α . A β -fluorolactona encontra-se aproximadamente em 70% da mistura dos derivados 12.1 e 12.2.

A espectrometria de ressonância magnética nuclear aplicada à caracterização dos derivados triterpenóides semi-sintéticos do AO e AU revelou ser uma importante ferramenta devido à elevada especificidade, uma vez que, através de uma análise comparativa dos desvios químicos dos derivados obtidos e a literatura de compostos semelhantes, podemos determinar o tipo de alteração funcional efetuada, assim como, a sua localização na estrutura.

Os resultados obtidos dos novos derivados e o volume de publicações existentes com aplicações farmacológicas para este tipo de compostos demonstram a importância dos compostos preparados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MISHRA, B.B.; TIWARI, V.K. - Natural products: an evolving role in future drug discovery. "Eur. J. Med. Chem." 46, 10 (2011) 4769-4807.
2. NEIDLE, S.; THURSTON, D.E. - Chemical approaches to the discovery and development of cancer therapies. "Nature" 5, 4 (2005) 285-296.
3. MCCHESENEY, J. D. *et al.*, - Plant natural products: Back to the future or into extinction? *Phytochemistry*. 68 (2007) 2015-2022.
4. BUTLER, M.S. - Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. "Nat. Prod. Rep." 22, 2 (2005) 162-195.
5. BUTLER, M. S. - Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. "Nat. Prod. Rep." 25 (2008) 475-516.
6. CRAGG, G. M.; GROUTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. - Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. "Chem. Rev." 109 (2009) 3012-3043.
7. GERSHENZON, J.; DUDAREVA, N. L. - The function of terpene natural products in the natural world. "Nature chemical biology." 3, 7 (2007), 409-414.
8. PAN, S. *et al.*, - New Perspectives on Innovative Drug Discovery: An Overview. "J. Pharm. Pharmaceut. Sci." 13, 3 (2010) 450-471.
9. NEWMAN, D. J. ; CRAGG, G. M. - Marine-sourced anti-cancer and cancer pain control agents in clinical and late preclinical development. "Mar. Drugs" 12 (2014) 255-278.
10. CRAGG, G. M ; GROTHAUS, P. G. ; NEWMAN, D. J. - New horizons for old drugs leads. "J. Nat. Prod." 77 (2014) 703-723.
11. NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. - Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. "J. Nat. Prod." 75, 3 (2012) 311-335.
12. NEWMAN, D. J. - Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery? "J. Med. Chem." 51 (2008) 2589-2599.
13. LI, J. W.-H.; VEDERAS, J. C. - Drug discovery and natural products: End of an era or endless frontier? "Science" 325 (2009) 161-165.
14. PATERSON, I.; ANDERSON, E. A. - The renaissance of natural products as drugs candidates. "Science" 310 (2005) 451-453
15. LAM, K. S. - New aspects of natural products in drug discovery. "Trends Microbiol." 15 (2007), 279-289.
16. CLARDY, J.; WALSH, C. - Lessons from natural molecules. *Nature*. 432, (2004) 829-837.

17. HARVEY, A. L. - Natural products in drug discovery. *Drug Discov. Today*. 13, (2008) 894-901.
18. IKEDA, Y.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H. - Ursolic acid: An anti- and pro-inflammatory triterpenoid. "*Mol. Nutr. Food Res.*" 52 (2008), 26-42.
19. MOSES, T. - Bioengineering of plant (tri)terpenoids: from metabolic engineering of plants to synthetic biology *in vivo* and *in vitro*. "*New Phytologist*" 200 (2013) 27-43.
20. LI, Y.-X. ; HIMAYA, S. W. A. ; KIM, S.-K. - Triterpenoids of Marine Origin as Anti-Cancer Agents. "*Molecules*" 18 (2013) 7886-7909.
21. JÄGER, S. *et al.*, - Pentacyclic Triterpene Distribution in Various Plants - Rich Sources for a New Group of Multi-Potent Plant Extracts. "*Molecules*" 14 (2009) 2016-2031.
22. CHAPPELL, J. - The genetics and molecular genetics of terpene and sterol origami. "*Cur. Opinion in plant biology*" 5 (2002) 151-157.
23. AJIKUMAR, P. K. *et al.*, - Terpenoids: Opportunities for Biosynthesis of Natural Product Drugs Using Engineered Microorganisms. "*Molecular pharmaceutics*" 5, 2 (2008), 167-190.
24. EISENREICH, W. *et al.*, - F. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. "*Cell Mol. Life Sci.*" 61 (2004) 1401-1426.
25. DZUBAK, P. *et al.*, - Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. "*Nat. Prod. Rep.*" 23 (2006) 394-411.
26. XU, R.; FAZIO, G. C.; MATSUDA, S. P.T. - On the origins of triterpenoid skeletal diversity. "*Phytochemistry*" 65 (2004) 261-291
27. PHILIPS, D.R. *et al.*, - Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. "*Curr. Opin. Plant Biol.*" 9 (2006) 305-314.
28. SPORN, M. B. - New synthetic triterpenoids: potent agents for prevention and treatment of tissue injury caused by inflammatory and oxidative stress. "*J. Nat. Prod.*" 74 (2011) 537-545.
29. ABE, I. - Enzymatic synthesis of cyclic triterpenes. "*Nat. Prod. Rep.*" 24 (2007) 1311-1331.
30. CONNOLLY, J. D.; HILL, R. A. - Triterpenoids. "*Natural Product Reports*" 53 (1984).
31. AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S. - Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. "*Biochemical Pharmacology*" 71 (2006) 1397-1421.
32. SHENG, H.; SUN, H. - Synthesis, biology and clinical significance of pentacyclic triterpenes: a multi-target approach to prevention and treatment of metabolic and vascular diseases. "*Nat. Prod. Rep.*" 28 (2011) 543-593.

33. HILL, R. A.; CONNOLLY, J. D. - Triterpenoids. "Nat. Prod. Rep." 29 (2012) 780-818.
34. YAN, Xiao-Jian *et al.*, - Triterpenoids as reversal agents for anti cancer drug resistance treatment. "Drug Discov. Today." 2013.
35. LIU, Jie - Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. "Journal of Ethnopharmacology" 49 (1995) 57-68.
36. POLLIER, J. ; GOOSSENS, A. - Oleanolic Acid. "Phytochemistry" 77 (2012) 10-15.
37. LASZCZYK, M. N. - Pentacyclic Triterpenes of the Lupane, Oleanane and Ursane Group as Tools in Cancer Therapy. "Planta Med" 75 (2009) 1549-1560.
38. YU, B.; SUN, J. - Current Synthesis of Triterpene Saponins. "Chem. Asian J." 4 (2009) 642-654.
39. DINDA, B. *et al.*, - Naturally occurring triterpenoid saponins. "Chemistry & biodiversity" 7 (2010).
40. AUGUSTIN, J. M. *et al.*, - Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. "Phytochemistry" 72 (2011) 435-457.
41. MALINOWSKA, M.; SIKORA, E.; OGONOWSKI, J. - Production of triterpenoids with cell and tissue cultures. "Biochimica Polonica" 60, 4 (2013) 731-735.
42. PINTO, Rui - **A química verde**. Revista Super Interessante. Nº165 (2012) [Acedido a 23 de Março de 2015] Disponível na Internet: http://www.superinteressante.pt/index.php?option=com_content&id=1222:a-quimica-verde&Itemid=98
43. CICHEWICZ, R. H.; KOUZI, S. A. - Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potencial of betulinic for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. "Medicinal Research Reviews" 24, 1 (2004) 90-114.
44. ZHAO, L.-X. *et al.*, - Modification of C11, C28, C2,3, 23 or C2, 23, 28 functional groups on Asiatic acid and evolution of hepatoprotective effects. "Bull. Korean Chem. Soc." 28, 6 (2007) 970-976.
45. PARIKH, N. R. *et al.*, - Oleanane triterpenoids in the prevention and therapy of breast cancer: current evidence and future perspectives. "Phytochem." (2014).
46. YADAV, V. R. *et al.*, - Targeting Inflammatory Pathways by Triterpenoids for Prevention and Treatment of Cancer. "Toxins." 2 (2010) 2428-2466.
47. LIBY, K. T.; SPORN, M. B. - Synthetic Oleanane Triterpenoids: Multifunctional Drugs with a Broad Range of Applications for Prevention and Treatment of Chronic Disease. "Pharmacol. Rev." 64 (2012) 972-1003.

48. SPORN, M. B.; LIBY, K. T. - Cancer chemoprevention: scientific promise, clinical uncertainty. "Nature clinical practice oncology" 2, 10 (2005) 518-525.
49. REN, D. C. *et al.*, - Differential gene expression for investigation of Escherichia coli biofilm inhibition by plant extract ursolic acid. "Appl. Environ. Microb." 71 (2005) 4022-4034.
50. TORRES-SANTOS, E. C. *et al.*, - Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from Pourouma guianensis. "Phytomedicine" 11 (2004) 114-120.
51. XU, H. X. *et al.*, - Anti-HIV triterpene acids from Geum japonicum. "J. Nat. Prod." 59 (1996) 643-645.
52. LEE, W.S. *et al.*, - Human ACAT-1 and ACAT-2 inhibitory activities of pentacyclic triterpenes from the leaves of Lycopus lucidus Turcz. "Biol. Pharm. Bull." 29 (2006) 382-384.
53. HEO, H.J. *et al.*, - Ursolic acid of Origanum majorana L. reduces A beta-induced oxidative injury. "Mol. Cells" 13 (2002) 5-11.
54. SARASWAT, B.; VISEN, P.K.S.; AGARWAL, D.P. - Ursolic acid isolated from Eucalyptus tereticornis protects against ethanol toxicity in isolated rat hepatocytes. "Phytother. Res." 14 (2000) 163-166.
55. TAVIANO, M.F. *et al.*, - Ursolic acid plays a role in Nepeta sibthorpii Benthams CNS depressing effects. "Phytother. Res." 21 (2007) 382-385.
56. HORIUCHI, K. *et al.*, - Antimicrobial activity of oleanolic acid from Salvia officinalis and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE). "Biol. Pharm. Bull." 30 (2007) 1147-1149.
57. BANNO, N. *et al.*, - Triterpene acids from the leaves of Perilla frutescens and their anti-inflammatory and antitumor-promoting effects. "Biosci. Biotech. Bioch." 68 (2004) 85-90.
58. ESSAADY, D. *et al.*, - Effects of Ursolic Acid and Its Analogs on Soybean 15-Lipoxygenase Activity and the Proliferation Rate of a Human Gastric Tumor-Cell Line. "Mediat. Inflamm." 3 (1994) 181-184.
59. KAWEETRIPOB, W. *et al.*, - Lupane, friedelane, oleanane and ursane triterpenes from the stem of Siphonodon celastrineus Griff. "Phytochemistry" 2013.
60. BERTRAM, J. S. - The molecular biology of cancer. "Molecular Aspects of Medicine" 21 (2001) 167-223
61. WEINBERG, R.A. - **The Biology of Cancer**. "Garland Science: New York" (2007).
62. FERLAY, J. *et al.*, - Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: Globocan 2008. "Int. J. Cancer" 127 (2010) 2893-2917.

63. SHANMUGAM, M. K.; KANNAIYAN, R.; SETHI, G. - Targeting cell signaling and apoptotic pathways by dietary agents: role in the prevention and treatment of cancer. "Nutrition and Cancer" 62, 2 (2011) 161-173.
64. SIEGEL, R. *et al.*, - Cancer Statistics, 2014. "Ca-Cancer J. Clin." 64 (2014) 9-29.
65. SCHAFER, K. A. - The cell cycle: a review. "Vet. Pathol." 35 (1998) 461-478.
66. WILLIAMS, G. H.; STOEBER, K. - The cell cycle and cancer. "J. Pathol." 226 (2012) 352-364.
67. KASTAN, M. B.; BARTEK, J. - Cell-cycle checkpoints and cancer. "Nature" 432 (2004) 316-323.
68. HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. - Hallmarks of Cancer: The Next Generation. "Cell" 144 (2011).
69. HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. - The hallmarks of cancer. Cell, 100, (2000) 57-70.
70. HENGARTNER, M. O. - The biochemistry of apoptosis. "Nature" 407, (2000), 770-776.
71. GREEN, D. R. - Apoptosis: death deceiver. "Nature" 396 (1998) 629-630.
72. LOWE, S.W.; LIN, A.W. - Apoptosis in cancer. "Carcinogenesis" 21 (2000) 485-495.
73. VERMEULEN, K. *et al.*, - Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. "Ann Hematol." 84 (2005) 627-639.
74. GORDALIZA, M. - Natural products as leads to anticancer drugs. "Clin. Transl. Oncol." 9 (2006) 767-776.
75. MAZUMBER, K.; TANAKA, K.; FUKASE, K. - Cytotoxic activity of ursolic acid derivatives obtained by isolation and oxidative derivatization. "Molecules" 18 (2013) 8929-8944.
76. PFISTERER, P.H. *et al.*, - Natural Products in Structure-Assisted Design of Molecular Cancer Therapeutics. "Curr. Pharm. Design." 16 (2010) 1718-1741.
77. MAKAROV, A. A. *et al.*, - Vinflunine, a novel microtubule inhibitor, suppresses calmodulin interaction with the microtubule-associated protein Stop. "Biochemistry" 46 (2007) 14899-14906.
78. WANI, M.C. *et al.*, - Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. "J. Am. Chem. Soc." 93, 9 (1971) 2325-7.
79. CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. - Natural products: A continuing source of novel drug leads. "Biochimica et Biophysica" 1830, 6 (2013) 3670-3695.

80. THANGAIYAN, R.; ANUPAM, B. - Terpenoids and breast cancer chemoprevention. "Breast Cancer Res. Treat." 115 (2009) 223-239.
81. LIBY, K. T.; YORE, M. M.; SPORN, M. B. - Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer. "Nature Reviews" 7 (2007) 357-369.
82. SHANMUGAN, M. K. - Targeted inhibition of tumor proliferation, survival, and metastasis by pentacyclic triterpenoids: Potencial role in prevention and therapy of cancer. "Cancer Letters" 320 (2012) 158-170.
83. ZANG, L.-L. - Research of ursolic acid's anti-tumor actions. "Chin. J. Integ. Med." 20, 2 (2014) 72-79.
84. VECHIA, L. D. *et al.*, - Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. "Quim. Nova" 32, 5 (2009) 1245-1252.
85. HONDA, T. *et al.*, - New enone derivatives of oleanolic acid and ursolic acid as inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages. "Bioorg. Med. Chem. Lett." 7 (1997) 1623-1628.
86. SALMINEN, A. *et al.*, - Terpenoids: natural inhibitors of NF-kappaB signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. "Cell. Mol. Life Sci." 65 (2008) 2979-2999.
87. DEEB, D. *et al.*, - Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis by oleanane triterpenoid (CDDO-Me) in pancreatic cancer cells is associated with the suppression of hTERT gene expression and its telomerase activity. "Biochem. Biophys. Res. Commun." 422 (2012) 561-567.
88. MOLNAR, J. *et al.*, - Inhibition of multidrug resistance of cancer cells by natural diterpenes, triterpenes and carotenoids. "Curr. Pharm. Des." 12 (2006) 287-311.
89. SUH, N. *et al.*, - Novel triterpenoids suppress inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2) in mouse macrophages. "Cancer Res." 58 (1998) 717-723.
90. HONDA, T. *et al.*, - Novel Synthetic Oleanane and Ursane Triterpenoids with Various Enone Functionalities in Ring A as Inhibitors of Nitric Oxide Production in Mouse Macrophages. "J. Med. Chem." 43 (2000) 1866-1877.
91. HONDA, T. *et al.*, - Synthetic oleanane and ursane triterpenoids with modified rings A and C: A series of highly active inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages. "J. Med. Chem." 43 (2000) 4233-4246.

92. ANDRE NEL *et al.*, - Toxic potential of materials at the nanolevel. "Science" 311 (2006) 622-627.
93. LIBY, K. T.; SPORN, M. B. - Synthetic oleanane triterpenoids: Multifunctional drugs with a broad range of applications for prevention and treatment of chronic disease. "Pharmacology rev." 64 (2012) 972-1003.
94. HEO, H.J. *et al.*, - Ursolic acid of *Origanum majorana* L. reduces A beta-induced oxidative injury. "Mol. Cells" 13 (2002) 5-11.
95. LIBBY, P. - Inflammation in atherosclerosis. "Nature" 420 (2002) 868-874.
96. POZO, M. *et al.*, - Ursolic acid inhibits neointima formation in the rat carotid artery injury model. "Atherosclerosis" 184 (2006) 53-62.
97. FENG, J. *et al.*, - PI3K and ERK/Nrf2 Pathways Are Involved in Oleanolic Acid-Induced Heme Oxygenase-1 Expression in Rat Vascular Smooth Muscle Cells. "J. Cell. Biochem." 112 (2011) 1524-1531.
98. MARTIN, R. *et al.*, - Beneficial actions of oleanolic acid in an experimental model of multiple sclerosis: A potential therapeutic role. "Biochem. Pharmacol." 79 (2010) 198-208.
99. PERNA, N. T. *et al.*, - Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. "Nature" 409 (2001) 529-533.
100. POTERA, C. - Forging a link between biofilms and disease. "Science" 19 (1999) 1837-1838.
101. FONTANAY, S. *et al.*, - Ursolic, oleanolic and betulinic acids: Antibacterial spectra and selectivity indexes. "J. Ethnopharmacol." 120 (2008) 272-276.
102. MULLIE, C. *et al.*, - Inhibitory effect of ursolic acid derivatives on hydrogen peroxide- and glutathione-mediated degradation of hemin: A possible additional mechanism of action for antimalarial activity. "Exp. Parasitol." 125 (2010) 202-207.
103. GNOATTO, S.C.B. *et al.*, - Synthesis and preliminary evaluation of new ursolic and oleanolic acids derivatives as antileishmanial agents. "J. Enzym. Inhib. Med. Chem." 23 (2008) 604-610.
104. YOGESHWARI, P.; SRIRAM, D. - Betulinic acid and its derivatives: A review on their biological properties. "Curr. Med. Chem." 12 (2005) 657-666.
105. KASHIWADA, Y. *et al.*, - Anti-AIDS agents 38. Anti-HIV activity of 3-O-acyl ursolic acid derivatives. "J. Nat. Prod." 63 (2000) 1619-1622.
106. DENG, S.L. *et al.*, - Synthesis of ursolic phosphonate derivatives as potential Anti-HIV agents. "Phosphorus Sulfur" 182 (2007) 951-967.

107. YU, F. *et al.*, - Development of Oleanane-Type Triterpenes as a New Class of HCV Entry Inhibitors. "J. Med. Chem." 56 (2013) 4300-4319.
108. CHEN, J. *et al.*, - Pentacyclic triterpenes. Part 3: Synthesis and biological evaluation of oleanolic acid derivatives as novel inhibitors of glycogen phosphorylase. "Bioorg. Med. Chem. Lett." 16 (2006) 2915-2919.
109. ZHANG, Y.N. *et al.*, - Oleanolic acid and its derivatives: New inhibitor of protein tyrosine phosphatase 1B with cellular activities. "Bioorg. Med. Chem." 16 (2008) 8697-8705.
110. ALI, M.S. *et al.*, - Inhibition of alpha-glucosidase by oleanolic acid and its synthetic derivatives. "Phytochemistry" 60 (2002) 295-299.
111. KOPELMAN, P.G. - Obesity as a medical problem. "Nature" 404 (2000) 635-643.
112. LARSSON, B.; BJORNTORP, P.; TIBBLIN, G. - The Health Consequences of Moderate Obesity. "Int. J. Obesity" 5 (1981) 97-116.
113. JANG, D.S. *et al.*, - A new pancreatic lipase inhibitor isolated from the roots of *Actinidia arguta*. "Arch. Pharm. Res." 31 (2008) 666-670.
114. GLISH, G. L.; VACHET, R. W. - The Basics of mass spectrometry in the twenty-first century. "Nature Reviews" 2 (2003) 140-150.
115. SANTOS, R.C. - Synthesis and structure-activity relationship study of novel cytotoxic carbamate and N-acylheterocyclic bearing derivatives of betulin and betulinic acid. "Bioorg. Med. Chem." 18 (2010) 4385-4396.
116. MA, C.M. *et al.*, - The cytotoxic activity of ursolic acid derivatives. "European Journal of Medicinal Chemistry" 40 (2005) 582-589.
117. DUARTE, R. C. C. ; RIBEIRO, M. G. T. C. ; MACHADO, A. A. S. C. - Avaliação da "Microverdura" de sínteses com a estrela verde. "Quim. Nova" 37, 6 (2014) 1085-1093.
118. GONSALVES, A. ; PINHO E MELO, T. - **Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear**. "CHYMIOTECHNON" Coimbra, 2000.
119. SEEBACHER, W. *et al.*, - Spectral assignments and reference data. "Magn. Reson. Chem." 41 (2003) 636-638.
120. ZHU, Y.M. *et al.*, - Synthesis and anti-HIV activity of oleanolic acid derivatives. "Bioorg. Med. Chem. Lett." 11 (2001) 3115-3118.
121. DENG, S.L. *et al.*, - Synthesis of phosphonodipeptide conjugates of ursolic acid and their homologs. "Heteroatom Chem." 19 (2008) 55-65.
122. HELD, I. *et al.*, - Domino Catalysis in the Direct Conversion of Carboxylic Acids to Esters. "Adv. Synth. Catal." 350 (2008) 1891-1900.

123. LUAN, Y.-H. *et al.*, - Highly efficient propionylation and butyralation of cellulose in an ionic liquid catalyzed by 4-dimethylminopyridine. "Carbohydrate Polymers" 92 (2013) 307-311.
124. MENG, Y.Q. *et al.*, - The synthesis of ursolic acid derivatives with cytotoxic activity and the investigation of their preliminary mechanism of action. "Bioorg. Med. Chem." 17 (2009) 848-854.
125. MENG, Y.-Q. *et al.*, - Synthesis of Novel Ursolic Acid Derivatives. 2010.
126. HAGMANN, W. K. - The Many Roles for Fluorine in Medicinal Chemistry. "Journal of Medicinal Chemistry" 51, 15 (2008) 4359-4369.
127. GOUVERNEUR, V. - Fluorine in medicinal chemistry. "Chem. Soc. Rev." 37 (2008) 320-330.
128. SHAH P.; WESTWELL, A. D. - The role of fluorine in medicinal chemistry. "Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry" 22, 5 (2007) 527-540.
129. FRIED J.; SABO E.F. - 9 α -fluoro derivatives of cortisone and hydrocortisone. "J. Am. Chem. Soc." 76 (1954) 1455-1456.
130. SUN, H. *et al.*, - Structure-activity relationships of oleanane- and ursane-type triterpenoids. "Botanical Studies" 47 (2006) 339-368.
131. KIRK, K. L. - Fluorination in Medicinal Chemistry: Methods, Strategies, and Recent Developments. "Organic Process Research & Development" 12 (2008) 305-321.
132. HEIDELBERGER, C. *et al.*, - Fluorinated Pyrimidines, a New Class of Tumour-Inhibitory Compounds. "Nature" 179 (1957) 663-666.
133. DUSCHINSKY, R.; PLEVEN, E.; HEIDELBERGER, C. - The Synthesis of 5-Fluoropyrimidines. "J. Am. Chem. Soc." 79 (1957) 4559-4560.
134. BANKS, R. E. - SelectfluorTM reagent F-TEDA-BF, in action: tamed fluorine at your service. "Journal of Fluorine Chemistry" 87 (1998) 1-17.
135. ZHOU, C. *et al.*, - An Efficient Approach for Monofluorination via Aqueous Fluorolactonization Reaction of 2,3-Allenic Acids with Selectfluor. "J. Org. Chem." 73 (2008) 772-774.
136. ZHOU C. *et al.*, - An Efficient Approach for Monofluorination via Highly Regioselective Fluorohydroxylation Reaction of 3-Aryl-1,2-allenes with Selectfluor. "Org. Lett." 10, 4 (2008) 581-583.
137. FUGLSETH, E. *et al.*, - Electrophilic and nucleophilic side chain fluorination of para-substituted acetophenones. "Tetrahedron" 64 (2008) 7318-7323.

138. LAL, G. S. - Site-Selective Fluorination of Organic-Compounds Using 1-Alkyl-4-Fluoro-1,4-Diazabicyclo[2.2.2]Octane Salts (Selectfluor Reagents). "J. Org. Chem." 58 (1993) 2791-2796.
139. LEAL, A. S. *et al.*, - Semisynthetic Ursolic Acid Fluorolactone Derivatives Inhibit Growth with Induction of p21^{waf1} and Induce Apoptosis with Upregulation of NOXA and Downregulation of c-FLIP in Cancer Cells. "Chem. Med. Chem." 7 (2012) 1635-1646.
140. ARMAREGO, W. L. E; CHAI, C. L. L. - **Purification of laboratory chemicals**. 5ªEd. "Butterworth Heinemann", 2003. ISBN: 0-7506-7571-3.
141. JEONG, B.-S.; KIM, Y. C.; LEE, E.-S. - Modification of C2,3,23,28 Functional Groups on Asiatic Acid and Evaluation of Hepatoprotective Effects. Bull. "Korean Chem. Soc." 28, 6 (2007), 977-982.

Imagem de capa: RATH, M. - **Forming "Equations" of Development**. [Acedido a 22 de Março de 2015]. Disponível na Internet: <http://mondaymorning.nitrkl.ac.in/index.php/departments/2012-07-19-05-44-20/department-of-chemistry>