

Diana Sofia Marques dos Santos

# MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS EM COMPOSTOS TRITERPENÓIDES

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

Setembro 2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Aos meus pais, irmão, namorado e amigos

Às minhas companheiras e companheiro de laboratório

## **Agradecimentos**

Ao Professor Doutor Jorge António Ribeiro Salvador por me ter acolhido no Laboratório de Química Farmacêutica e me ter proporcionado as condições necessárias ao desenvolvimento do presente trabalho.

Ao meu companheiro de laboratório Bruno Gonçalves pela partilha de conhecimento científico e pelo apoio e disponibilidade demonstrada desde o início da minha atividade laboratorial.

Às minhas companheiras de laboratório Carolina Torres, Sandra Figueiredo, Salette Batista, Sofia Valdeira, Vanessa Mendes e Cátia Sousa pela amizade, boa disposição, companheirismo e ajuda.

Ao Pedro Cruz do L-RMN do Departamento de Química da FCTUC e à Fátima Nunes do LEM-CEF/UC pela disponibilidade e apoio prestados no trabalho de elucidação estrutural deste trabalho.

À D. Graça Santiago e D. Anabela Pinto pela simpatia e apoio prestados.

A todos os que de alguma maneira contribuíram para o sucesso deste trabalho.

## Índice

<b>RESUMO.....</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>ii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>iii</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>v</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS.....</b>	<b>vi</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Fármacos de Origem Natural.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Investigação e Desenvolvimento de Fármacos .....</b>	<b>4</b>
1.2.1 Investigação e Desenvolvimento de Fármacos de Origem Natural.....	4
1.2.1.1 Síntese de Compostos Naturais .....	5
1.2.1.2 Importância dos Compostos Naturais no Desenvolvimento de Novos Fármacos .....	7
1.2.1.2.1 Conclusões .....	10
<b>1.3 Metabolitos Secundários de Produtos Naturais.....</b>	<b>12</b>
1.3.1 Terpenos, Triterpenos e Triterpenóides Pentacíclicos.....	12
1.3.1.1 Biossíntese.....	14
<b>1.4 Centella asiatica.....</b>	<b>14</b>
1.4.1 Ácido Asiático .....	15
1.4.1.1 Modificações Estruturais do Ácido Asiático .....	15
<b>1.5 Objetivos Científicos.....</b>	<b>17</b>
1.5.1 Objetivos gerais .....	17
1.5.2 Objetivos específicos.....	17
<b>2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Derivados do Ácido Asiático: Semi-síntese e Elucidação Estrutural .....</b>	<b>19</b>
2.1.1 Preparação de Intermediários Semi-sintéticos .....	19
2.1.1.1 Composto (1).....	20
2.1.1.2 Composto (2).....	21
2.1.1.3 Composto (3).....	21
2.1.1.4 Composto (4).....	23
2.1.2 Preparação de Novos Derivados Semi-sintéticos.....	25
2.1.2.1 Halletos de ácido.....	25
2.1.2.1.1 Halletos de Flúor .....	26
2.1.2.1.1.1 Introdução .....	26
2.1.2.1.1.2 Preparação de um Haleto de Flúor.....	27
2.1.2.1.1.2.1 Composto (5).....	27
2.1.2.1.2 Cloretos de ácido .....	29
2.1.2.1.2.1 Introdução .....	29

2.1.2.1.2.2	Preparação de Cloretos de Ácido.....	29
2.1.2.1.3	Derivados Amida a partir de Aminas Primárias .....	30
2.1.2.1.3.1	Introdução .....	30
2.1.2.1.3.2	Preparação de Derivados Amida a partir de Aminas Primárias .....	31
2.1.2.1.3.2.1	Composto (6).....	31
2.1.2.1.3.2.2	Composto (7).....	33
2.1.2.1.4	Derivados Amida a partir de Aminoácidos .....	36
2.1.2.1.4.1	Introdução .....	36
2.1.2.1.4.2	Preparação de Derivados Amida a partir de Aminoácidos.....	37
2.1.2.1.4.2.1	Composto (8).....	37
2.1.2.1.4.2.2	Composto (9).....	39
<b>3</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>3.1</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>43</b>
<b>4</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>44</b>
<b>4.1</b>	<b>Química.....</b>	<b>45</b>
4.1.1	Composto (1) .....	45
4.1.2	Composto (2) .....	45
4.1.3	Composto (3) .....	46
4.1.4	Composto (4) .....	46
4.1.5	Composto (5) .....	47
4.1.6	Composto (6) .....	47
4.1.7	Composto (7) .....	48
4.1.8	Composto (8) .....	48
4.1.9	Composto (9) .....	49

## **Resumo**

O ácido asiático é um triterpenóide pentacíclico da família ursano com elevado potencial terapêutico. Estudos recentes evidenciam a sua eficácia, bem como a de alguns derivados semi-sintéticos, no tratamento de várias patologias.

A compreensão da relação estrutura-atividade (REA) destes compostos, isto é, o conhecimento das zonas dos núcleos cuja modificação estrutural leva ao aumento da bioatividade, tem vindo a ser essencial no desenvolvimento de derivados semi-sintéticos mais ativos. Reações simples de hidrogenação, hidroxilação, metilação e acetilação, por exemplo, podem dar origem a pequenas modificações estruturais que levem ao aumento da bioatividade do composto.

No presente trabalho procedeu-se à preparação de alguns derivados semi-sintéticos do ácido asiático tendo como objetivo a formação de ligações amina a partir da reação de grupos carboxílicos com aminas primárias e ésteres metílicos de aminoácidos. Posteriormente recorreu-se à ressonância magnética nuclear (RMN) –  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{135}\text{DEPT}$  – e à espectrometria de massa (EM) tendo como objetivo a elucidação estrutural dos compostos sintetizados.

## **Palavras-chave:**

Triterpenóides Pentacíclicos; Ácido Asiático; Derivados Semi-sintéticos; Haletos de Ácido; Ligações Amina; Derivados Amida; Ressonância Magnética Nuclear; Espectrometria de Massa

## **Abstract**

Asiatic acid is a member of the ursane family of pentacyclic triterpenoids with high therapeutic potential. Recent studies show its effectiveness, as well as of some semi-synthetic derivatives, in the treatment of several diseases.

The understanding of the structure-activity relationship (SAR) of this compounds, meaning, the knowledge of the areas where core structural modification leads to an increase in bioactivity, has been important in the development of more active semi-synthetic derivatives. Simple hydrogenation, hydroxylation, methylation and acetylation reactions, for instance, may lead to small structural modifications that increase bioactivity.

In the present work we proceeded to the preparation of some semi-synthetic derivatives of asiatic acid aiming amine bonds formation from the reaction of carboxylic groups with primary amines and amino acids methyl esters. Then we used nuclear magnetic resonance (NMR) –  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{135}\text{DEPT}$  – and mass spectrometry (MS) to elucidate the structure of the synthesized compounds.

## **Keywords:**

Pentacyclic Triterpenoids; Asiatic Acid; Semi-synthetic derivatives; Acyl Halide; Amine Bonds; Amide Derivatives; Nuclear Magnetic Resonance; Mass Spectrometry

## Lista de Abreviaturas

**Ac:** Acetil

**Ac<sub>2</sub>O:** Anidrido acético

**Atm N<sub>2</sub>:** Atmosfera de azoto

**<sup>13</sup>C-RMN:** Ressonância Magnética Nuclear de Carbono treze

**d:** Dubleto

**dd:** Dubleto de dubletos

**ddd:** Duplo dubleto de dubletos

**DAST:** do inglês “*Diethylaminosulfur trifluoride*” (dietilamino trifluoreto de enxofre)

**Deoxo-fluor:** bis (2-metoxietilo) aminosulfur trifluoreto

**DEPT:** do inglês “*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*”

**DI:** do inglês “*Direct Infusion*” (infusão direta)

**DMAP:** 4-dimetilaminopiridina

**EM:** Espetrometria de Massa

**ESI:** do inglês “*Electrospray Ionization*” (Ionização por *electrospray*)

**FDA:** do inglês “*Food and Drug Administration*”

**Glc:** Glucose

**<sup>1</sup>H-RMN:** Ressonância Magnética Nuclear de próton

**h:** Horas

**HTS:** do inglês “*High-throughput Screening*”

**Hz:** Hertz

**J:** Constante de acoplamento

**m:** Multiplete

**mg:** Miligramas

**MHz:** Mega hertz

**mmol:** Milimol

**m/z:** do inglês “*mass-to-charge ratio*” (razão massa/carga)

**ppm:** Partes por milhão

**REA:** Relação estrutura-atividade

**Rha:** do inglês “*rhamnose*”

**RMN:** Ressonância Magnética Nuclear

**r.t.:** do inglês “*room temperature*” (temperatura ambiente)

**s:** singleto

**t:** Tripleto

**THF:** Tetrahidrofurano

**TLC:** do inglês “*Thin Layer Chromatography*” (cromatografia de camada fina)

**u.m.a.:** unidade de massa atômica

**δ:** Desvio químico

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1</b> – Planta <i>Podophyllum peltatum</i> e a estrutura do composto ativo podofilotoxina (adapt <a href="http://www.noddingoniongardens.com/images/220_pope_003_svp.jpg">http://www.noddingoniongardens.com/images/220_pope_003_svp.jpg</a> ). .....	2
<b>Figura 1.2</b> – Compostos ativos isolados de plantas medicinais e de organismos marinhos. ....	3
<b>Figura 1.3</b> – Processo de investigação e desenvolvimento de fármacos. ....	4
<b>Figura 1.4</b> – Semi-síntese do paclitaxel e do análogo docetaxel a partir da 10-diacetilbacatina III. ....	6
<b>Figura 1.5</b> – Exemplo de via de síntese total do composto (+)discodermolide (adapt. [8]). ....	6
<b>Figura 1.6</b> – Síntese total a partir do farmacóforo do halicondrina B. ....	6
<b>Figura 1.7</b> – Estrutura do composto natural Ingenol e do derivado Mebutano de Ingenol. ....	7
<b>Figura 1.8</b> – Novas entidades químicas aprovadas no período de 1996 a 2002 (adapt. [14]). ....	8
<b>Figura 1.9</b> – Categoria das novas moléculas não-biológicas aprovados entre 1981 e 2002 (adapt. [14]). .....	8
<b>Figura 1.10</b> – Categoria dos vários fármacos anticancerígenos aprovados desde a década de 40 até 2002 (adapt. [14]). ....	9
<b>Figura 1.11</b> – Novas entidades químicas aprovadas desde 2000 a 2006 (adapt. [17]). ....	9
<b>Figura 1.12</b> – Categoria das novas moléculas não-biológicas aprovados entre 1981 e 2006 (adapt. [17]). ....	10
<b>Figura 1.13</b> – Categoria dos vários fármacos anticancerígenos aprovados desde a década de 40 a 2006 (adapt. [17]). ....	10
<b>Figura 1.14</b> – Diferentes espécies de triterpenos pentacíclicos. ....	12
<b>Figura 1.15</b> – Biossíntese dos diferentes derivados triterpenóides pentacíclicos (adapt. [20; 25]). ....	14
<b>Figura 1.16</b> – Principais constituintes da <i>Centella asiatica</i> (adapt [26]). ....	15
<b>Figura 1.17</b> – Estrutura do ácido asiático. ....	16
<b>Figura 2.1</b> – Síntese dos compostos intermediários (1), (2), (3) e (4). ....	19
<b>Figura 2.2</b> – Espetro de $^1\text{H}$ -RMN do composto (1). ....	20
<b>Figura 2.3</b> – Espetro de $^1\text{H}$ -RMN do composto (2). ....	21
<b>Figura 2.4</b> – Espetro de $^1\text{H}$ -RMN do composto (3) (em DMSO- $d_6$ ). ....	22
<b>Figura 2.5</b> – Espetro de $^{13}\text{C}$ -RMN do composto (3) (em DMSO- $d_6$ ). ....	22
<b>Figura 2.6</b> – Espetro de $^{135}\text{DEPT}$ -RMN do composto (3) (em DMSO- $d_6$ ). ....	23
<b>Figura 2.7</b> – Espetro de $^1\text{H}$ -RMN do composto (4). ....	24
<b>Figura 2.8</b> – Espetro de $^{13}\text{C}$ -RMN do composto (4). ....	24
<b>Figura 2.9</b> – Espetro de $^{135}\text{DEPT}$ -RMN do composto (4). ....	25
<b>Figura 2.10</b> – Composto corticosteróide bioativo com um substituinte flúor. ....	26
<b>Figura 2.11</b> – Regente Deoxo-fluor. ....	26
<b>Figura 2.12</b> – Síntese do composto (5). ....	27
<b>Figura 2.13</b> – Espetro de $^1\text{H}$ -RMN do composto (5). ....	27
<b>Figura 2.14</b> – Espetro de $^{13}\text{C}$ -RMN do composto (5). ....	28

<b>Figura 2.15</b> – Espectro de $^{135}\text{DEPT-RMN}$ do composto (5). .....	28
<b>Figura 2.16</b> – Reagentes utilizados na formação de cloretos de ácido. ....	29
<b>Figura 2.17</b> – Síntese do intermediário cloreto de ácido do composto (4). ....	30
<b>Figura 2.18</b> – Exemplos de fármacos com ligações amida. ....	30
<b>Figura 2.19</b> – Reagentes utilizados na síntese dos derivados amida. ....	31
<b>Figura 2.20</b> – Síntese do composto (6). ....	31
<b>Figura 2.21</b> – Espectro de $^1\text{H-RMN}$ do composto (6). ....	32
<b>Figura 2.22</b> – Espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ do composto (6). ....	32
<b>Figura 2.23</b> – Espectro de $^{135}\text{DEPT-RMN}$ do composto (6). ....	33
<b>Figura 2.24</b> – Espectro de massa do composto (6) obtido por ESI em modo ião positivo. ....	33
<b>Figura 2.25</b> – Síntese do composto (7). ....	34
<b>Figura 2.26</b> – Espectro de $^1\text{H-RMN}$ do composto (7). ....	34
<b>Figura 2.27</b> – Espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ do composto (7). ....	35
<b>Figura 2.28</b> – Espectro de $^{135}\text{DEPT-RMN}$ do composto (7). ....	35
<b>Figura 2.29</b> – Espectro de massa do composto (7) obtido por ESI em modo ião positivo. ....	36
<b>Figura 2.30</b> – Reagente utilizado na síntese do composto (8) e (9). ....	36
<b>Figura 2.31</b> – Síntese do composto (8). ....	37
<b>Figura 2.32</b> – Espectro de $^1\text{H-RMN}$ do composto (8). ....	37
<b>Figura 2.33</b> – Espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ do composto (8). ....	38
<b>Figura 2.34</b> – Espectro de $^{135}\text{DEPT-RMN}$ do composto (8). ....	38
<b>Figura 2.35</b> – Espectro de massa do composto (8) obtido por ESI em modo ião positivo. ....	39
<b>Figura 2.36</b> – Síntese do composto (9). ....	39
<b>Figura 2.37</b> – Espectro de $^1\text{H-RMN}$ do composto (9). ....	40
<b>Figura 2.38</b> – Espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ do composto (9). ....	40
<b>Figura 2.39</b> – Espectro de $^{135}\text{DEPT-RMN}$ do composto (9). ....	41
<b>Figura 2.40</b> – Espectro de massa do composto (9) obtido por ESI em modo ião positivo .....	41

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.1</b> – Compostos triterpenóides pentacíclicos como agentes terapêuticos para várias patologias (adapt [51]). ....	13
--	----

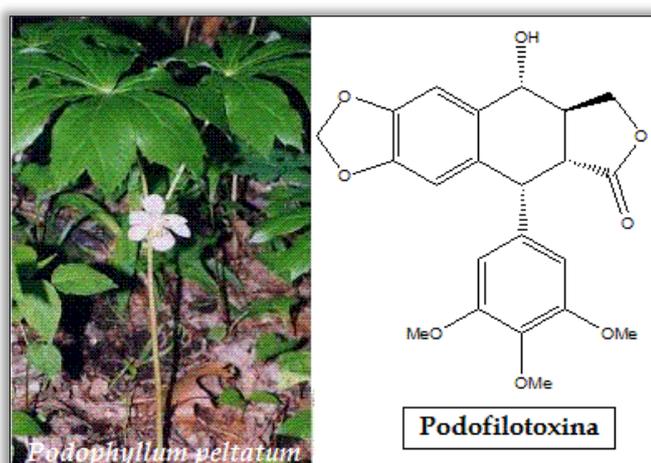
**1**

# **INTRODUÇÃO**

## 1.1 Fármacos de Origem Natural

O uso tradicional de medicamentos naturais no tratamento de várias patologias fez com que a medicina desde cedo estabelecesse uma forte ligação com os produtos naturais. Tal facto é evidenciado pelo estudo realizado pela Organização Mundial de Saúde onde se estima que aproximadamente 65% da população mundial utiliza compostos de origem natural nos seus cuidados de saúde primários [1]. Estes compostos provinham essencialmente de plantas pelo que a sua exploração, bem como a dos seus metabolitos secundários, evidenciou a existência de princípios ativos com interesse farmacêutico.

A planta *Podophyllum peltatum*, por exemplo, era utilizada no tratamento do cancro da pele. Assim, devido ao seu interesse farmacológico, procedeu-se à análise dos seus constituintes, resultando na descoberta do composto ativo podofilotoxina – agente anticancerígeno [2] (Figura 1.1).



**Figura 1.1** – Planta *Podophyllum peltatum* e a estrutura do composto ativo podofilotoxina (*adapt* [http://www.noddingoniongardens.com/images/220\\_pope\\_003\\_svp.jpg](http://www.noddingoniongardens.com/images/220_pope_003_svp.jpg)).

A exploração continuada dos constituintes das plantas medicinais resultou no isolamento de compostos ativos que continuam a ter grande aplicabilidade nas terapêuticas atuais, tais como a morfina, os vinca-alcaloides vimblastina e vincristina, a quinina, a artemisinina, o etopósido e o tenipósido, o paclitaxel e os derivados da camptotecina (topotecano e irinotecano) [3] (Figura 1.2).

A exploração dos organismos marinhos também tem vindo a evidenciar a sua importância como fonte de compostos bioativos, apesar da sua exploração só ter sido possível desde os anos 80 devido, essencialmente, aos avanços tecnológicos no que diz respeito à

recolha de amostras e à produção em larga escala através da aquicultura e da síntese química [4]. O primeiro derivado marinho anticancerígeno a ser incluído em ensaios clínicos foi a citarabina. Este composto, bem como o seu derivado vidarabina, continuam a ter grande aplicabilidade na medicina atual, bem como o composto anticancerígeno trabectedina (Yondelis) [5] (Figura 1.2).

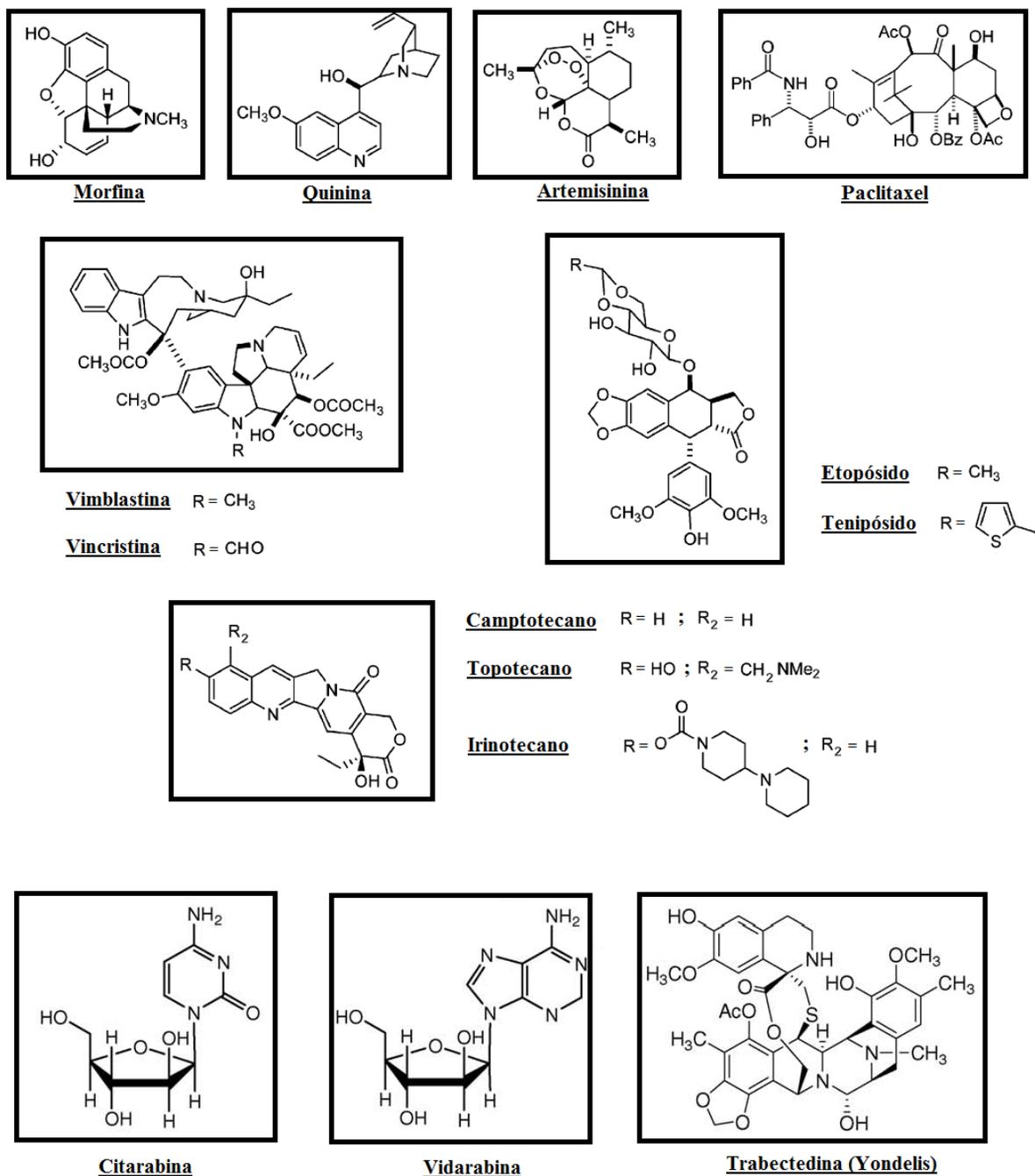
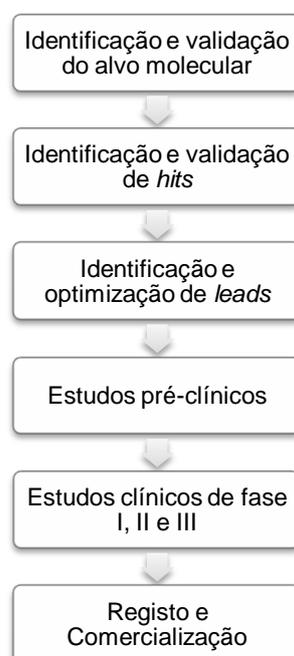


Figura 1.2 – Compostos ativos isolados de plantas medicinais e de organismos marinhos.

## 1.2 Investigação e Desenvolvimento de Fármacos

O processo de investigação e desenvolvimento de fármacos consiste, primeiramente, na identificação e caracterização do alvo terapêutico molecular para posterior identificação de compostos capazes de se modular ou estabelecerem uma ligação com este (*hits*). Após identificação, purificação e confirmação da sua atividade (*hits* validados) é possível o reconhecimento de uma série de compostos que, além da sua atividade e seletividade comprovadas, apresentam critérios de originalidade, patenteabilidade e acessibilidade (*leads*). Após verificação da sua não-toxicidade (*lead* otimizado) este prossegue para testes clínicos (fase I, II e III) onde, após confirmação da sua eficácia e segurança em testes humanos, é classificado como novo fármaco, podendo ser registado após submissão de um pedido à FDA. Por fim pode ser comercializado [6].



**Figura 1.3** – Processo de investigação e desenvolvimento de fármacos.

### 1.2.1 Investigação e Desenvolvimento de Fármacos de Origem Natural

A problemática do desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais prende-se com as limitações da disponibilidade do composto, além da sua evidente complexidade. Normalmente estes são produzidos em pequenas quantidades e não possuem características otimizadas de potência, seletividade e propriedades farmacocinéticas para a terapêutica humana [2]. O desenvolvimento eficiente de fármacos naturais depende, assim, da

colaboração interdisciplinar da síntese química, da química combinatória, da bioquímica e da biologia, sendo assim possível o isolamento e elucidação estrutural de *leads* naturais, o desenvolvimento de vias sintéticas que possibilitem um aumento de escala sustentável, a realização de estudos de REA, a otimização e aumento do potencial clínico do composto e por fim a sua avaliação clínica [1].

### 1.2.1.1 Síntese de Compostos Naturais

A síntese de produtos naturais, total ou parcial (semi-síntese), pode ser definida como a ciência que leva à produção laboratorial de moléculas naturais e posterior ajustamento estrutural [7]. Este ajustamento pode passar por modificações estruturais de grupos funcionais e remoção/introdução de centros estereoquímicos a fim de otimizar as propriedades físico-químicas e farmacocinéticas dos compostos [2].

A síntese total de produtos naturais é a arte mais difícil e desafiante na área da química orgânica. Traduz-se na réplica de moléculas naturais a partir de moléculas comerciais mais simples, ou derivados, permitindo o desenvolvimento de complexos naturais num curto espaço de tempo e de forma mais eficiente [7]. A síntese parcial de produtos naturais, ou semi-síntese, traduz-se na modificação estrutural de compostos, por métodos químicos ou enzimáticos, tendo como objetivo o desenvolvimento de compostos análogos [2]. As duas técnicas anteriores podem levar ainda à identificação da parte estrutural da molécula responsável pela sua bioatividade (farmacóforo), sendo assim possível a síntese de múltiplos compostos análogos de complexidade variável [2].

Estas técnicas são igualmente importante na produção de compostos que resultam da exploração de recursos naturais limitados. Por exemplo, a extração insustentável do paclitaxel a partir da casca da *Taxus brevifolia* impulsionou o desenvolvimento de uma via semi-sintética através da modificação estrutural de um composto natural presente nas agulhas de várias espécies *Taxus*, a 10-diacetilbacatina III. Assim, foi possível a sua produção em larga escala e posterior semi-síntese do composto análogo docetaxel (Figura 1.4) [6].

Também o composto marinho anticancerígeno discodermolide, presente na esponja marinha *Discodermia dissoluta*, não sendo passível de ser produzido fora do seu ambiente natural, levaria à insustentabilidade da sua produção, não fosse a criação de uma via de síntese total a partir de duas moléculas comerciais mais simples (Figura 1.5) [8].

A síntese total foi igualmente importante na exploração do composto marinho anti-tumoral halicondrina B. Esta permitiu revelar a estrutura da molécula responsável pela sua atividade, permitindo a síntese de vários derivados (Figura 1.6) [2; 9].

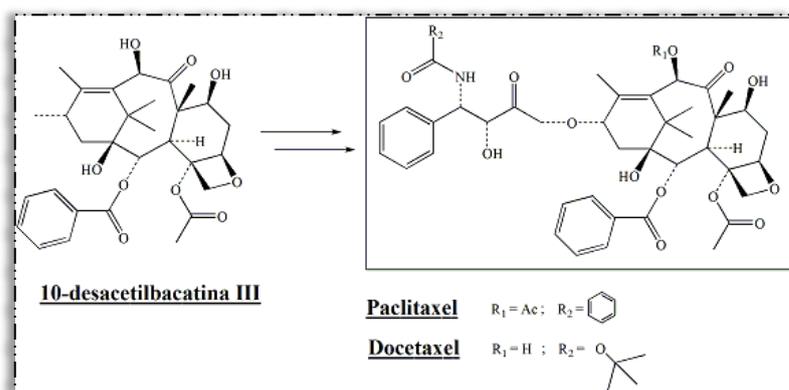


Figura 1.4 – Semi-síntese do paclitaxel e do análogo docetaxel a partir da 10-diacetilbacatina III.

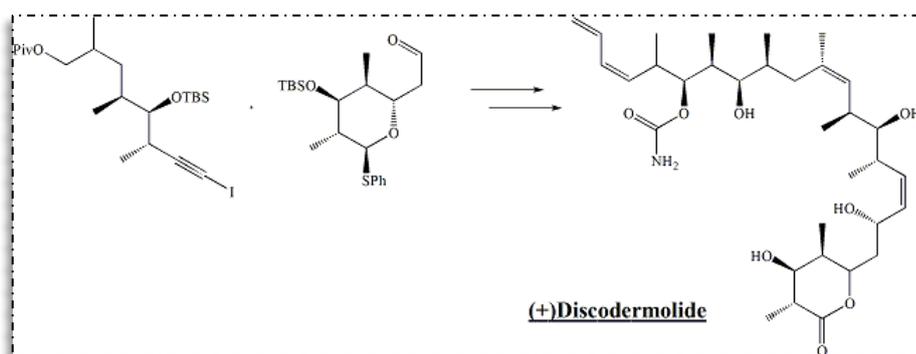


Figura 1.5 – Exemplo de via de síntese total do composto (+)discodermolide (adapt. [8]).

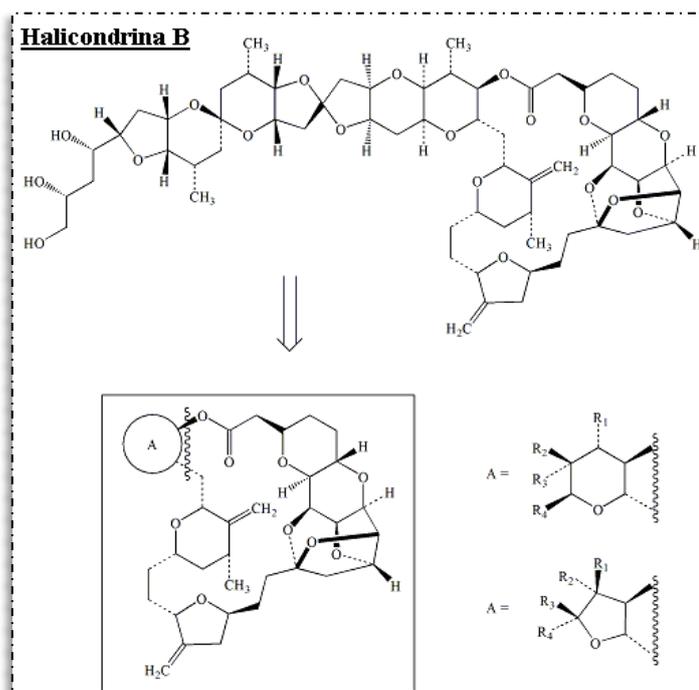
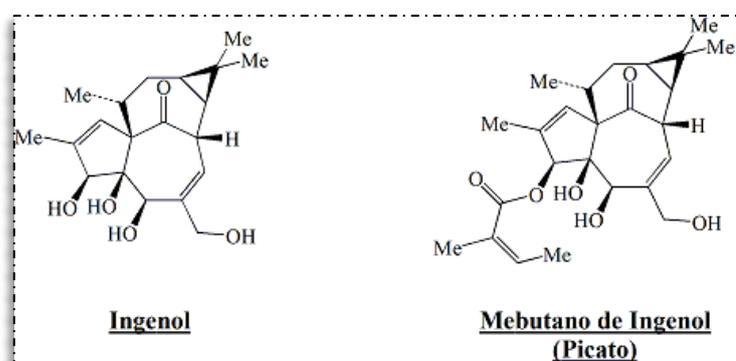


Figura 1.6 – Síntese total a partir do farmacóforo do halicondrina B.

Recentemente foi notícia [10] a descoberta feita por cientistas norte americanos no desenvolvimento de uma via de síntese mais eficaz na produção do ingenol (Figura 1.7) – um derivado natural diterpenóide – contribuindo para uma maior eficiência na produção industrial do derivado Picato (mebutato de ingenol) (Figura 1.7) – composto aprovado pela FDA para o tratamento de queratose actínica, uma doença de pele. A extração deste princípio ativo era efetuada a partir da planta *Euphorbia peplus* e era necessário utilizar 800kg de planta para extrair 1g de mebutato de ingenol. Assim, apesar de em 2002 se ter desenvolvido a primeira via de síntese total deste composto, esta englobava mais de 37 passos sintéticos e tinha baixo rendimento [11]. Através desta nova descoberta torna-se possível a síntese deste composto de forma eficiente e em apenas 14 passos sintéticos [12], enfatizando uma vez mais a importância da síntese química na produção de fármacos naturais.



**Figura 1.7** – Estrutura do composto natural Ingenol e do derivado Mebutano de Ingenol.

### 1.2.1.2 Importância dos Compostos Naturais no Desenvolvimento de Novos Fármacos

Em 1997 Cragg, Newman e Snader, através de um artigo de revisão, analisaram a origem e o número de agentes anticancerígenos e anti-infecciosos reportados no período de 1984 a 1995 e evidenciaram a importância dos compostos naturais na descoberta de novos fármacos. De acordo com a sua origem, estes podiam classificar-se como produtos biológicos [B], produtos naturais [N], derivados de produtos naturais (semi-sintéticos) [ND], sintéticos totais [S] e sintéticos totais a partir de farmacóforos naturais [S\*]. Concluíram assim que mais de 60% dos fármacos anticancerígenos e anti-infecciosos aprovados eram de origem natural ([N], [ND] e [S\*]), percentagem equivalente em relação aos candidatos pré-clínicos avaliados nesse período [13].

Em 2003 estendem a sua análise às novas entidades químicas, candidatas a fármacos, aprovadas no período de 1981 a 2002 e introduzem um novo conceito de compostos

miméticos de produtos naturais [NM], isto é, compostos desenvolvidos a partir do conhecimento adquirido no estudo dos produtos naturais.

Por esta altura a quantidade de recursos financeiros empregues na investigação e desenvolvimento clínico de novos fármacos era bastante elevada mas verificava-se o decréscimo do número de novas entidades químicas aprovadas (Figura 1.8). No entanto os compostos naturais continuavam a representar, aproximadamente, 50% das novas moléculas não-biológicas descobertas nesse período (6% [N], 27% [ND] e 16% [S\*]) (Figura 1.9) e em relação aos fármacos anticancerígenos, estes representavam mais de 60% dos compostos não-biológicos (excluindo [B] e [V]) (Figura 1.10) [14].

Reforçando a ideia de os compostos naturais continuavam a ser relevantes no desenvolvimento de novos fármacos, Butler referiu que em 2000, 2001 e 2002 estes se encontravam bem classificados no top de vendas mundiais, chegando a representar, em 2002, 40% dos fármacos mais vendidos. Também por esta altura eram aprovados 15 novos fármacos derivados de produtos naturais nos vários mercados (Estados Unidos, Europa e Japão) e outros 15 eram incorporados em ensaios clínicos de fase III no final de 2003 [15].

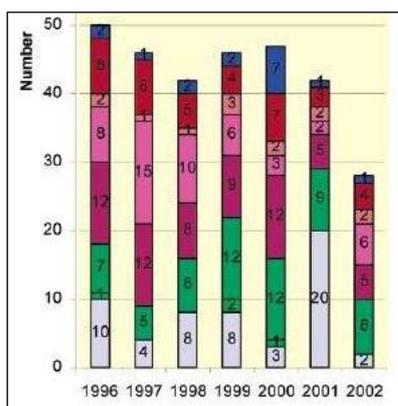


Figura 1.8 – Novas entidades químicas aprovadas no período de 1996 a 2002 (adapt. [14]).

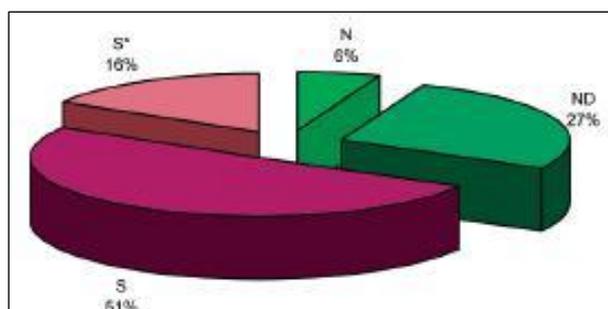
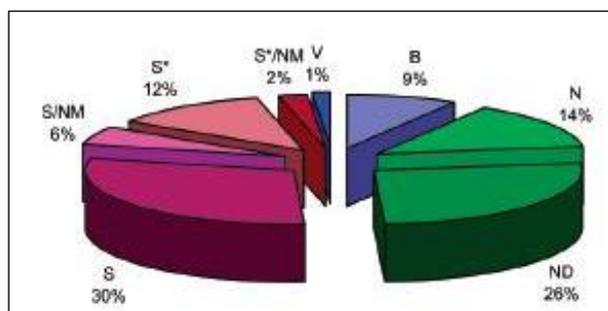


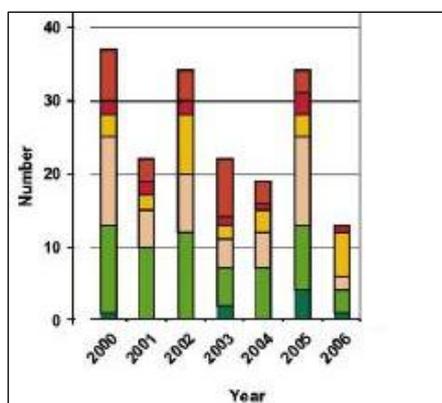
Figura 1.9 – Categoria das novas moléculas não-biológicas aprovadas entre 1981 e 2002 (adapt. [14]).



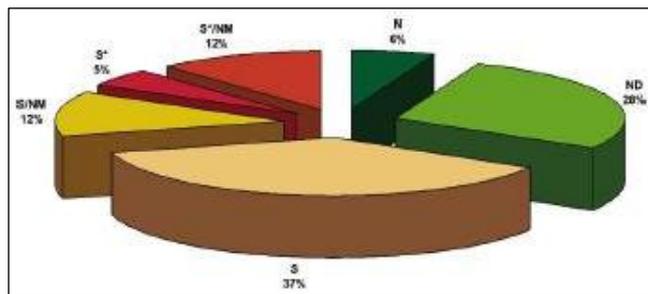
**Figura 1.10** – Categoria dos vários fármacos anticancerígenos aprovados desde a década de 40 até 2002 (adapt. [14]).

O facto de se verificar um decréscimo do número de fármacos aprovados pode ser justificado pelo aparecimento de técnicas de química combinatória que levou a indústria farmacêutica a mudar a sua estratégia no desenvolvimento de novos fármacos. Através desta técnica foi possível o desenvolvimento de bibliotecas de milhares de compostos químicos que, após seleção por *HTS*, levava à escolha dos melhores *hits*. Apesar de ser uma técnica rápida os resultados foram desanimadores e uma vez que esta está associada a elevados custos financeiros, a sua importância na descoberta de novos fármacos foi posta em causa [15]; facto evidenciado por Proudfoot ao reportar que esta técnica não apresentou nenhuma vantagem na descoberta de novos fármacos em 2000 uma vez que 8 dos 29 fármacos aprovados tinha origem em produtos naturais ou em hormonas [16].

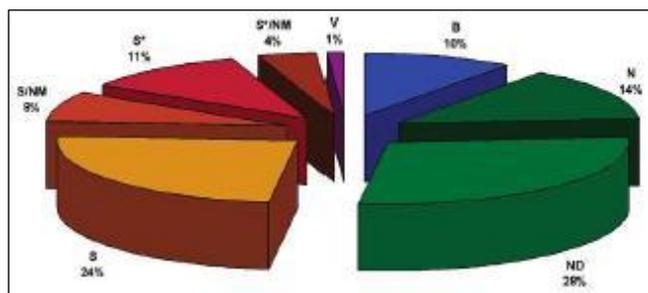
Em 2007 surgiu uma nova atualização do artigo de Cragg, Newman e Snader e mais uma vez foi evidente o decréscimo de novas entidades químicas aprovadas (Figura 1.11). No entanto os compostos de origem natural continuavam a representar 50% das novas moléculas não-biológicas aprovadas nesse período (Figura 1.12) e em relação aos compostos anticancerígenos representavam 57% dos fármacos não-biológicos (Figura 1.13) [17].



**Figura 1.11** – Novas entidades químicas aprovadas desde 2000 a 2006 (adapt. [17]).



**Figura 1.12** – Categoria das novas moléculas não-biológicas aprovados entre 1981 e 2006 (adapt. [17]).



**Figura 1.13** – Categoria dos vários fármacos anticancerígenos aprovados desde a década de 40 a 2006 (adapt. [17]).

### 1.2.1.2.1 Conclusões

A perceção de que o desenvolvimento de fármacos a partir de compostos naturais não acompanha outras técnicas de desenvolvimento de fármacos, tal como as técnicas de química combinatória e *HTS*, levam a que haja um desinteresse por parte da indústria farmacêutica na exploração destes compostos. No entanto estas técnicas mais recentes apenas levam à descoberta de *hits* que necessitam de posterior confirmação, avaliação e otimização de modo a determinar a sua viabilidade como *leads* [18]. A baixa eficiência destes métodos é confirmada pelo crescente decréscimo de fármacos aprovados ao longo do tempo, pelo que será legítimo averiguar se a crise de produtividade deriva da crescente dificuldade associada ao processo propriamente dito de desenvolvimento de novos fármacos ou se se relaciona com a falta de *screening* de produtos naturais [15].

Nos últimos anos foram vários os produtos naturais avaliados em modelos computacionais que exibiram melhores propriedades *drug-like*, isto é, apresentam maior similaridade com os fármacos existentes, do que as amostras preparadas por química combinatória [3]. Tal facto foi confirmado por Proudfoot que, após análise da origem de

alguns fármacos, constatou que estes derivam essencialmente de modificações estruturais de fármacos conhecidos [16]. Também a análise aos compostos presentes no *Dicionário de Produtos Naturais* revela que 65% dos compostos não viola a regra de Lipinski [19; 3], pelo que a conjugação destes fatores evidencia a importância dos compostos naturais como *leads* no desenvolvimento de novos fármacos.

Assim, a solução para a atual crise deve passar pela geração de bibliotecas de compostos naturais através de uma abordagem multidisciplinar combinada com metodologias de síntese e biossíntese combinatória [2]. Uma vez que a indústria farmacêutica possui elevados recursos e visto que em termos de análise e elucidação estrutural os avanços têm sido notórios, é importante voltar a apostar no *screening* destes compostos [18].

### 1.3 Metabolitos Secundários de Produtos Naturais

A importância dos metabolitos secundários das plantas na medicina, agricultura e indústria tem levado a numerosos estudos de síntese, biossíntese e atividade biológica destes compostos [20]. Os terpenos, os glicosídeos (saponinas), os alcaloides e os fenóis são exemplos de alguns compostos que têm vindo a ser isolados por exibirem potencial bactericida, fungicida, antiviral, citotóxico, analgésico, anticancerígeno, cardiovascular, antialérgico, entre outros [21]. Os terpenos e os seus derivados terpenóides, por exemplo, são uma classe de metabolitos naturais que têm vindo a ser intensamente explorada.

#### 1.3.1 Terpenos, Triterpenos e Triterpenóides Pentacíclicos

Os terpenos são constituídos por unidades isopreno ( $C_5$ ) pelo que podem ser classificados como hemiterpenos ( $C_5$ ), monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), sesterpenos ( $C_{25}$ ), triterpenos ( $C_{30}$ ), carotenoides ( $C_{40}$ ) e politerpenos ( $C_{5n}$ ). Podem encontrar-se nas plantas em forma de glicosídeo (saponinas) e quando contêm oxigénio na sua constituição são denominados de terpenóides.

Os triterpenóides pentacíclicos (saponinas triterpénicas) são constituídos por trinta átomos de carbono ( $C_{30}$ ) e cinco anéis. Estes podem ser constituídos por cinco anéis de seis membros (derivados ursano e oleanano) ou por quatro anéis de seis membros e um de cinco (derivados lupano) (Figura 1.14) [20].

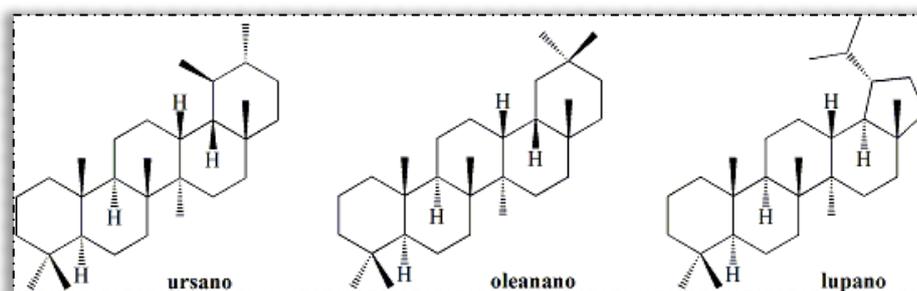


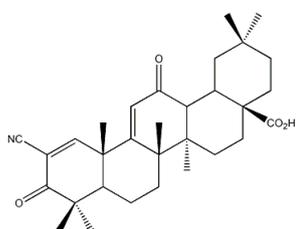
Figura 1.14 – Diferentes espécies de triterpenos pentacíclicos.

Esta família de compostos também é constituída por ácidos, que podem ser encontrados em várias plantas e frutos, tais como o ursólico, asiático, corosólico, pomólico, boswélico, tormêntico e madecássico (derivados ursano), o ácido oleanólico, maslínico e arjunólico (derivados oleanano) e o ácido betulínico (derivado lupano) [22; 23]. Estes exibem

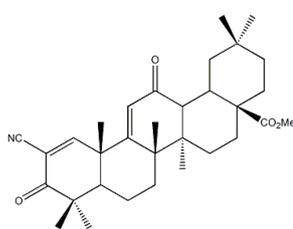
importante atividade biológica e farmacológica: atividade antibacteriana, antimicrobiana, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória, anti-tumoral, citotóxica, analgésica, antialérgica, anti-hiperglicémica, anti-HIV, hepatoprotetora e cardiovascular, entre outras [24; 22; 21]. Assim é compreensível a integração destes compostos em vários ensaios clínicos para o tratamento de várias patologias (Tabela 1.1).

**Tabela 1.1** – Compostos triterpenóides pentacíclicos como agentes terapêuticos inseridos em ensaios clínicos no tratamento de várias patologias (adapt [23]).

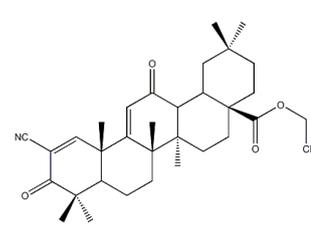
	Composto	Patologia	Ensaio Clínico
(1)	CDDO	Cancro	Fase I
(2)	CDDO-Me	Cancro e doenças renais	Fase II
(3)	RTA 404	Esclerose múltipla	Estudos pré-clínicos
(4)	Bevirimat	HIV	Fase II
(5)	S-0139	Doenças cerebrovasculares	Fase II
(6)	Ácido Oleanólico	Doenças hepáticas	Registado
(7)	Ácido Glicirrízico	Doenças hepáticas	Registado
(8)	Carbenoxolona	Úlceras gástricas	Registado
(9)	Asiaticosideo	Cicatrização de feridas	Registado



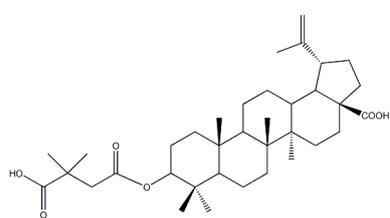
(1)



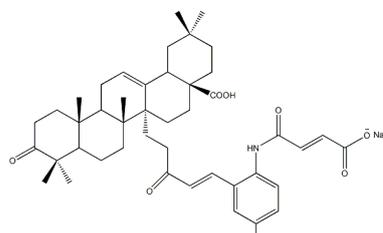
(2)



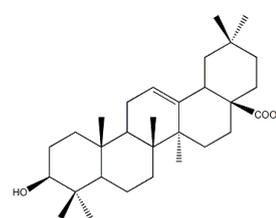
(3)



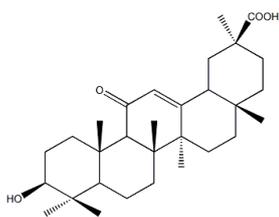
(4)



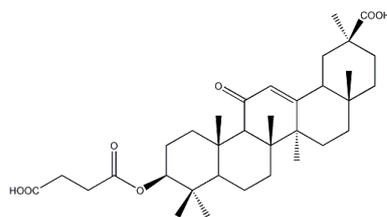
(5)



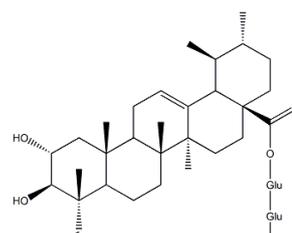
(6)



(7)



(8)



(9)

### 1.3.1.1 Biossíntese

A biossíntese dos terpenos é providenciada pela ação de várias enzimas e traduz-se, fundamentalmente, na formação do esqualeno (composto de estrutura  $(C_5)_n$ ), posterior oxidação e conseqüente formação do 2,3-óxido de esqualeno que, após ciclização e formação de intermediários catiónicos, dá origem aos vários precursores dos triterpenos pentacíclicos. Após hidroxilações e oxidações desses precursores formam-se os vários derivados triterpenóides pentacíclicos (Figura 1.15) [20].

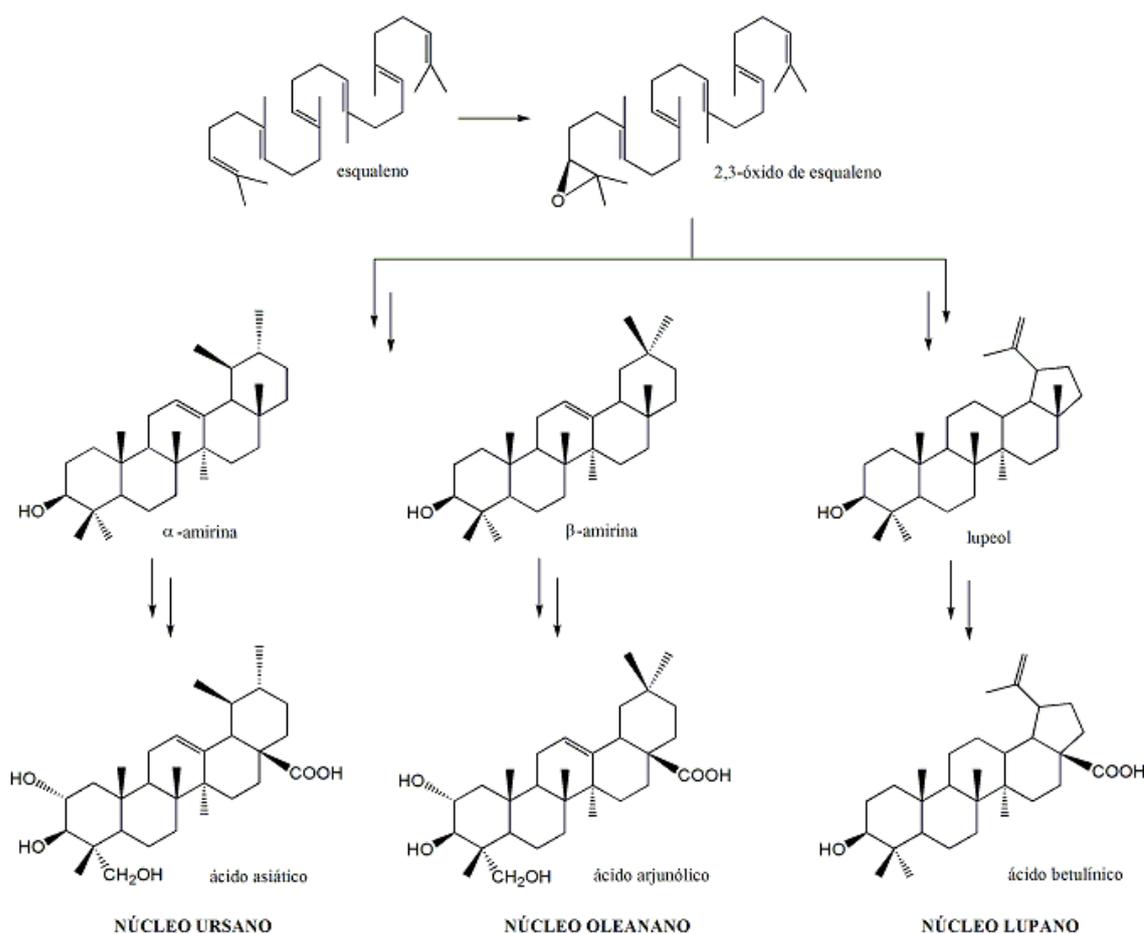
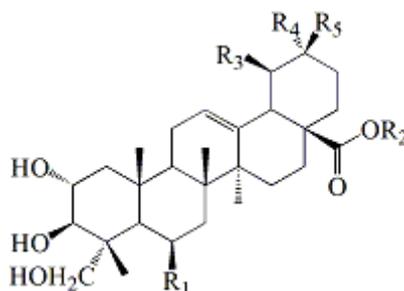


Figura 1.15 – Biossíntese dos diferentes derivados triterpenóides pentacíclicos (adapt. [20; 25]).

### 1.4 *Centella asiatica*

A *Centella asiatica* é uma planta medicinal cuja aplicação tradicional remete aos tempos pré-históricos. Era usada na medicina tradicional no tratamento de problemas dermatológicos (lepra, lúpus, eczemas, psoríase), venosos (insuficiência venosa crônica), nefrológicos e urogenitais, neurológicos e psiquiátricos, entre outros [26; 27].

A análise e caracterização dos seus constituintes evidencia a presença de triterpenos, óleos essenciais, aminoácidos, entre outros compostos, no entanto os constituintes que exibem maior importância nos seus efeitos terapêuticos são os triterpenóides. Os mais abundantes são as saponinas asiaticosídeo e madecassosídeo e as suas sapogeninas (ácido asiático e madecássico) (Figura 1.16). No entanto outros constituintes ácidos e respetivos glicosídeos são reportados na literatura [20].



Composto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Ácido asiático	-H	-H	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-H
Asiaticosídeo	-H	1)-β-D-glc-(6-1) - β -D-glc-(4-1)- -L-rha	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-H
Ácido madecássico	-OH	-H	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-H
Madecassosídeo	-OH	1)-β-D-glc-(6-1) - β -D-glc-(4-1)- -L-rha	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-H

Figura 1.16 – Principais constituintes da *Centella asiatica* (adapt [26]).

### 1.4.1 Ácido Asiático

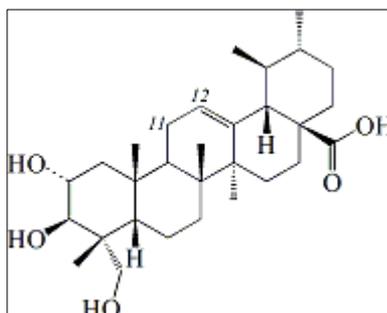
O ácido asiático é um triterpenóide pentacíclico pertencente à série ursano e tem vindo a ser usado principalmente em tratamentos dermatológicos, no entanto estudos recentes evidenciam a sua importância terapêutica no tratamento de várias patologias. Assim é possível verificar o seu efeito em casos de demência [28] bem como a sua atividade neuro-protetora [29; 30; 31], hepato-protetora [32; 33], anti-hiperglicémica [34; 35], anti-angiogénica [36], anti-parkinsoniana [37], anti-tumoral [38; 39; 40], anticancerígena [41; 42; 40], cicatrizante [43] e anti-inflamatória [44].

#### 1.4.1.1 Modificações Estruturais do Ácido Asiático

As propriedades químicas, físicas e biológicas dos compostos dependem essencialmente dos grupos funcionais presentes na sua estrutura. A compreensão das zonas

dos núcleos cuja modificação estrutural possa vir a incrementar bioatividade ao composto é fundamental para a obtenção de derivados semi-sintéticos mais ativos. Reações simples de hidrogenação, hidroxilação, metilação e acetilação, por exemplo, podem dar origem a pequenas modificações estruturais que podem aumentar a eficácia e seletividade do composto [6].

O ácido asiático (Figura 1.17) apresenta alguns grupos facilmente funcionalizáveis: três grupos hidroxilo, um grupo olefínico a C(12) e um ácido carboxílico [45]. Assim, é possível a mudança estrutural não só desses grupos mas também do grupo a C(11) e do anel A [47; 46]. Destas modificações estruturais advêm inúmeros derivados semi-sintéticos, sendo que alguns têm vindo a demonstrar boa atividade antidiabética [48], anti-tumoral [39], hepatoprotetora [51; 50; 49] e capacidade de melhorar o desempenho cognitivo em casos de demência [28] em vários ensaios biológicos.



**Figura 1.17** – Estrutura do ácido asiático.

## **1.5 Objetivos Científicos**

### **1.5.1 Objetivos gerais**

O objetivo principal do trabalho consiste na preparação de novos derivados semi-sintéticos do ácido asiático e posterior elucidação estrutural através da técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) – próton ( $^1\text{H}$ ), carbono ( $^{13}\text{C}$ ) e  $^{135}\text{DEPT}$  – e de espectrometria de massa (EM) com vista à obtenção de compostos com atividade anti-tumoral.

### **1.5.2 Objetivos específicos**

O objetivo inicial consiste na modificação estrutural do anel A do ácido asiático através da formação de uma estrutural lactol (composto (1)) e subsequente formação de um aldeído  $\alpha;\beta$ -insaturado (composto (2)). De seguida objetiva-se a formação de ligações amina a partir do grupo carboxilo presente na estrutura do composto e para tal procede-se à reação do substrato com duas aminas primárias, dando origem aos compostos finais (6) e (7), e com dois ésteres metílicos de aminoácidos, dando origem aos compostos finais (8) e (9). Para tal foi necessário a formação dos compostos intermediários (3), (4) e (5).

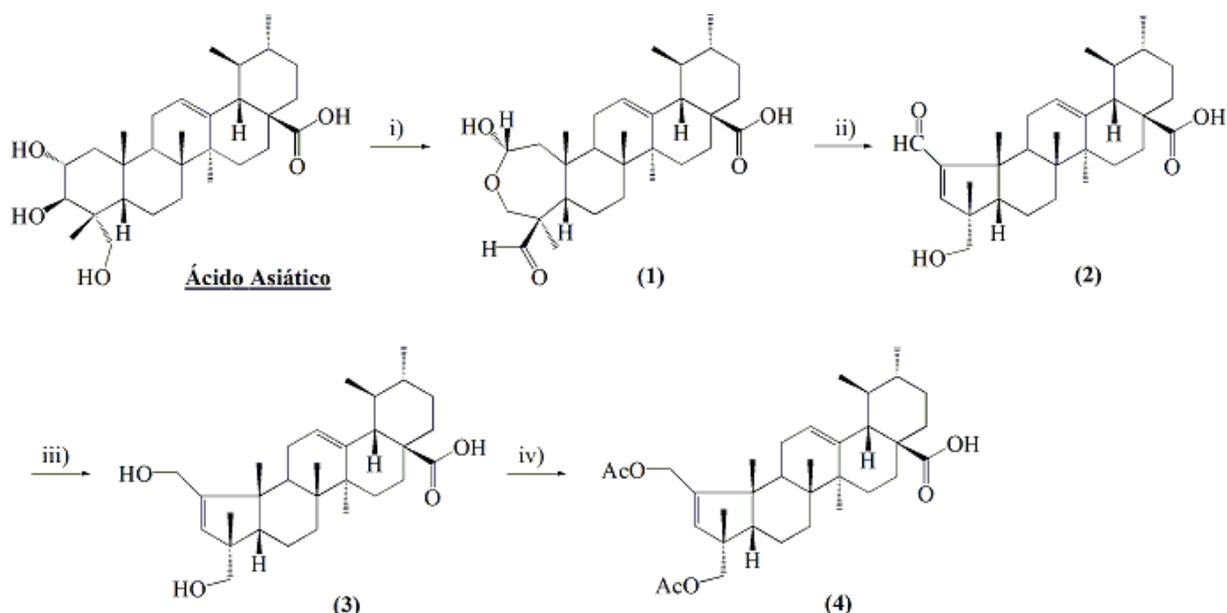
Alguns derivados semi-sintéticos foram preparados de acordo com procedimentos encontrados na literatura, outros foram preparados de acordo com procedimentos encontrados na literatura para compostos análogos. A sua elucidação estrutural foi obtida através de técnicas de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{135}\text{DEPT}$ - RMN, sendo que os novos derivados foram ainda analisados através da técnica de EM. Estes últimos serão posteriormente avaliados para a sua atividade anti-tumoral em diversas linhas celulares.

**2**

**RESULTADOS e  
DISCUSSÃO**

## 2.1 Derivados do Ácido Asiático: Semi-síntese e Elucidação Estrutural

### 2.1.1 Preparação de Intermediários Semi-sintéticos



**Figura 2.1** – Síntese dos compostos intermediários (1), (2), (3) e (4).

*Reagentes e condições:* i)  $\text{NaIO}_4$ ,  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ , r.t.; ii) a. ácido acético, piperidina,  $\text{C}_6\text{H}_6$  seco, refluxo  $60^\circ$ , atm  $\text{N}_2$ ; b.  $\text{MgSO}_4$  anidro, refluxo  $60^\circ\text{C}$ , atm  $\text{N}_2$ ; iii)  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{MeOH}$  seco, r.t.; iv)  $\text{Ac}_2\text{O}$ , DMAP, THF seco, r.t

De acordo com a literatura, a formação do **composto (1)** ocorre da reação com periodato de sódio ( $\text{NaIO}_4$ ) [46; 52] (Figura 2.1). Este reagente leva à quebra de uma ligação C-C e dá origem a duas ligações C=O, ou seja, é responsável pela clivagem do diol vicinal no anel A e pela origem de um dialdeído. Posteriormente dá-se o fecho do anel e formação de um anel lactol de sete membros com uma função acetal [52].

Do tratamento do composto anterior com uma quantidade catalítica de ácido acético e piperidina, ocorre a modificação do anel A através da abertura do anel lactol e posterior reciclagem, dando origem a um composto aldeído  $\alpha,\beta$ -insaturado (**composto (2)**) [46] (Figura 2.1). A utilização de sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ) anidro é indispensável para a criação de condições anidras uma vez que este composto é muito higroscópico.

A função aldeído pode ser facilmente reduzida a grupo hidroxilo através da reação com borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) [46], dando origem ao **composto (3)** (Figura 2.1). Geralmente este reagente é adicionado em excesso de modo a garantir que existe em quantidade suficiente para a reação ser completa e uma vez que este agente redutor é seletivo para aldeídos e cetonas, os restantes grupos funcionais não sofrem transformação [53].

De modo a obter-se a formação seletiva de ligações amina no grupo carboxilo, procedeu-se à proteção dos grupos hidroxilo na forma de acetato. Esta é uma reação clássica de proteção de grupos hidroxilo, tendo sido inclusive utilizada na proteção destes grupos no ácido asiático, e tem origem na utilização de anidrido acético ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ) na presença de uma quantidade catalítica de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) [51; 45; 39; 54; 48; 49]. De igual modo, tendo como substrato o **composto (3)**, obteve-se o **composto (4)** (Figura 2.1).

A estrutura dos compostos **(1)**, **(2)** e **(3)** foi verificada de acordo com os valores descritos na literatura de  $^1\text{H}$ -RMN. A estrutura do **composto (4)**, uma vez que não se encontra reportada na literatura, foi elucidada através da técnica de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{135}\text{DEPT}$ -RMN.

### 2.1.1.1 Composto (1)

Assim, no espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do **composto (1)** (Figura 2.2) verifica-se a existência de um pico singlete a 9.94 ppm referente ao protão do grupo aldeído a C3, de uma estrutura multipletto de 5.14 a 5.11 ppm referente ao protão olefínico a C2 e de uma estrutura AB quarteto a 3.93 e 3.74 ppm (com  $J = 13.3$  Hz) referente aos protões do grupo metileno ligado ao oxigénio a C23. O pico singlete alargado a 5.29 ppm diz respeito ao protão da insaturação a C12 e a presença dos seis grupos metilo é confirmada pelos picos singlete a 1.08, 1.06, 0.99 e 0.86 ppm e pelos picos dubleto a 0.94 ppm (com  $J = 5.7$  Hz) e a 0.84 ppm (com  $J = 4.68$  Hz) – valores de acordo com a literatura [46].

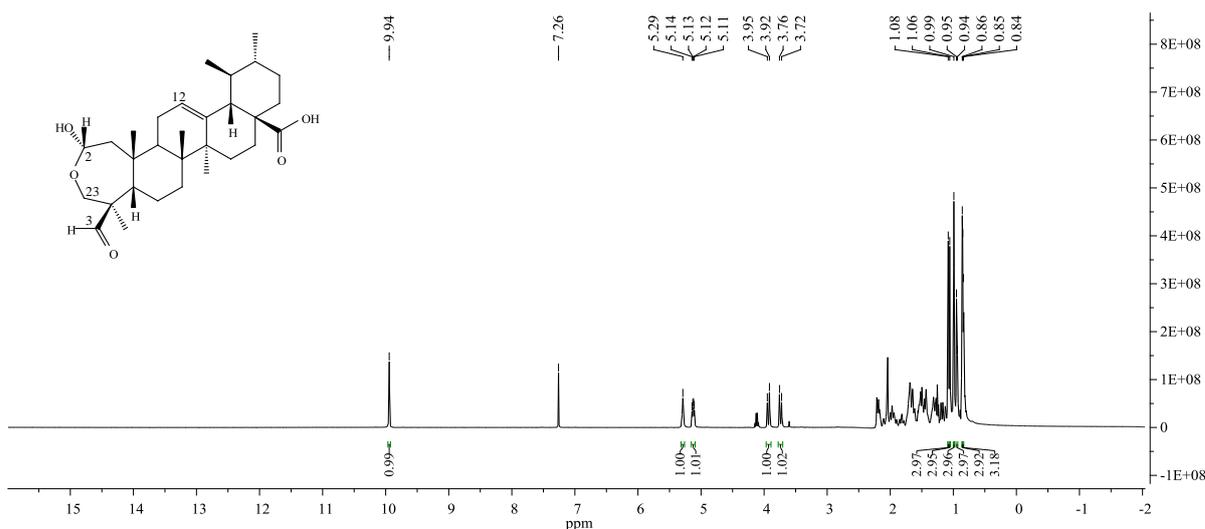


Figura 2.2 – Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto (1).

### 2.1.1.2 Composto (2)

No espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do **composto (2)** (Figura 2.3), comparativamente com o espectro do **composto (1)** (Figura 2.2) e de acordo com a literatura [46], verifica-se o aparecimento de um pico singlete a 6.67 ppm, relativo ao próton vinílico a C2, e a alteração do desvio químico do pico singlete relativo ao grupo aldeído para 9.71 ppm, comprovando-se, assim, a formação de um anel de cinco membros com um aldeído  $\alpha$ : $\beta$ -insaturado.

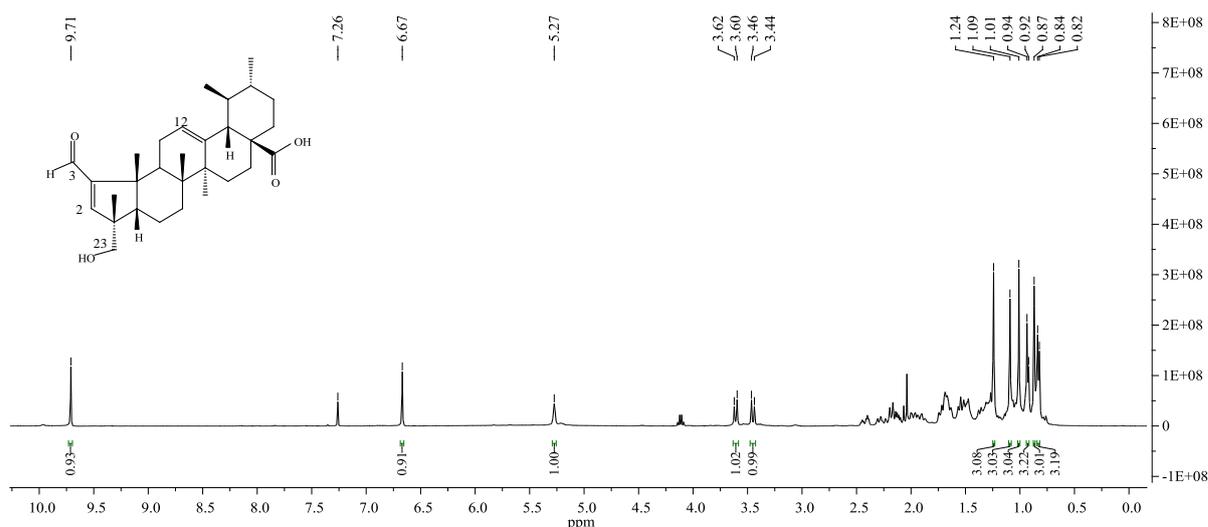
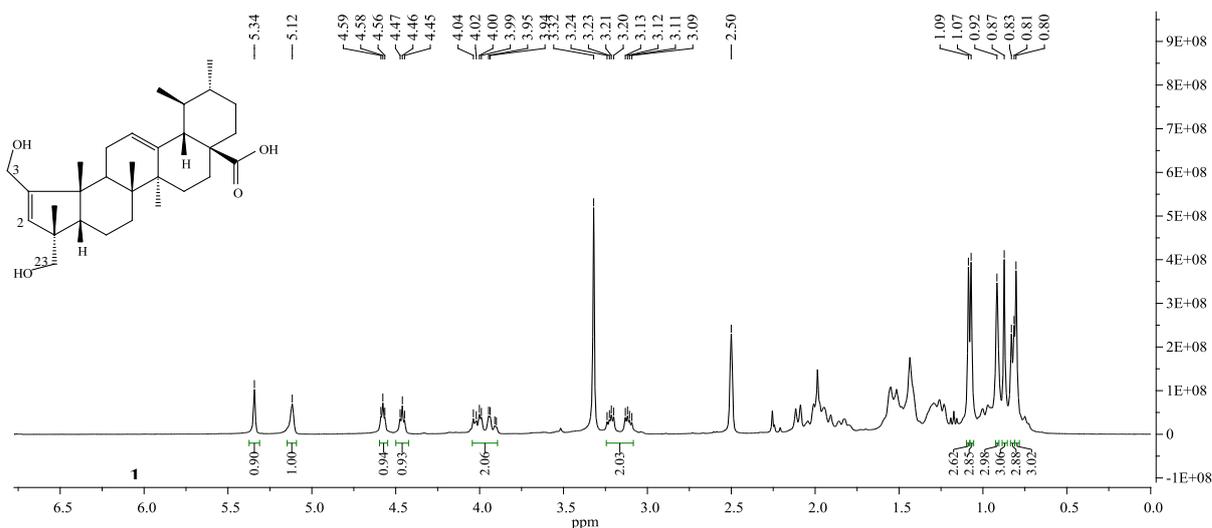


Figura 2.3 – Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto (2).

### 2.1.1.3 Composto (3)

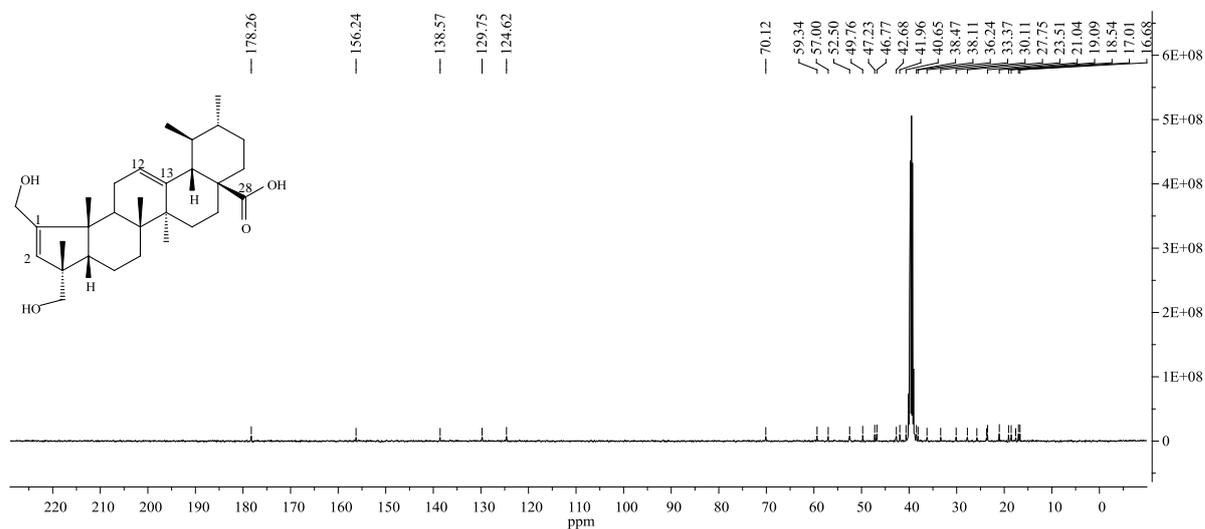
No espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do **composto (3)** (Figura 2.4) observa-se o aparecimento dos picos triplete a 4.58 ppm (com  $J = 4.8$  Hz) e a 4.46 ppm (com  $J = 5.26$  Hz) referentes aos prótons dos grupos hidroxilo ligados aos grupos metileno – C3 e C23 respetivamente – verificando-se desde logo a redução do grupo aldeído a C3. As estruturas duplo dubleto de dubleto (ddd) a 3.97 ppm (com  $J = 3.74, 4.77$  e  $15$  Hz) e a 3.17 ppm (com  $J = 5.28, 5.5, 10.6$  Hz) são relativas aos prótons dos grupos metileno ligados aos grupos hidroxilo – C3 e C23 respetivamente. Esta estrutura é devida ao acoplamento vicinal entre os prótons do mesmo carbono e posterior acoplamento com o próton do hidroxilo [55].

Uma vez que os dados encontrados na literatura relativos ao **composto (3)** [46] não eram muito esclarecedores, recorreu-se à técnica de  $^{13}\text{C}$  e  $^{135}\text{DEPT}$ -RMN de forma a validar de forma correta a estrutura do composto.

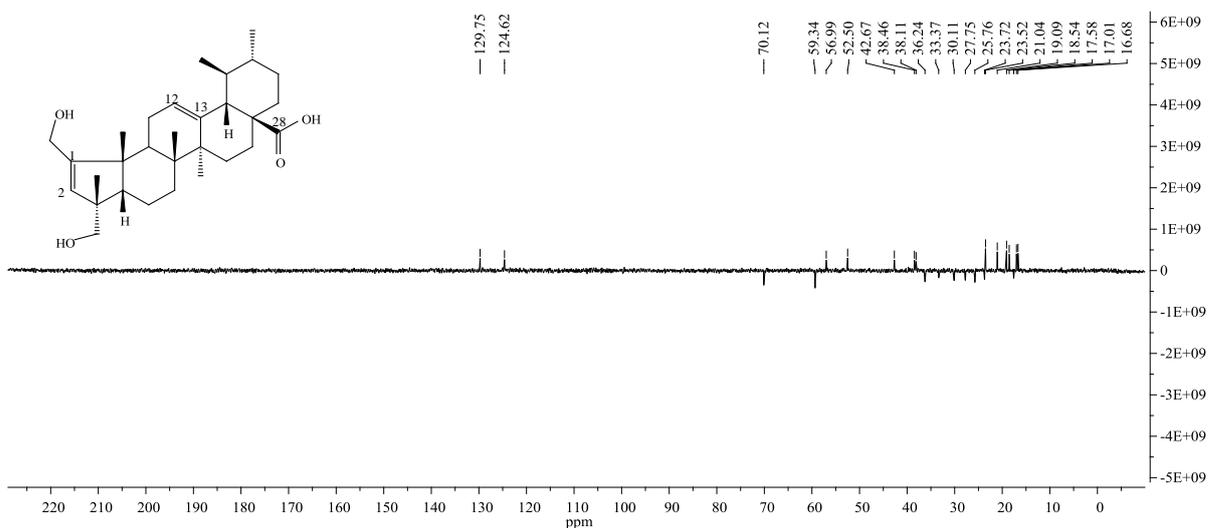


**Figura 2.4** – Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto (3) (em  $\text{DMSO-d}_6$ ).

Assim, do espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (Figura 2.5) verifica-se a existência de trinta carbonos e do espectro de  $^{135}\text{DEPT}$ -RMN (Figura 2.6) observa-se que treze são carbonos primários e terciários e que nove são carbonos secundários. Através do cruzamento desta informação conclui-se que oito carbonos são quaternários (aparecem no espectro de  $^{13}\text{C}$  mas não no espectro de  $^{135}\text{DEPT}$ ).



**Figura 2.5** – Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN do composto (3) (em  $\text{DMSO-d}_6$ ).

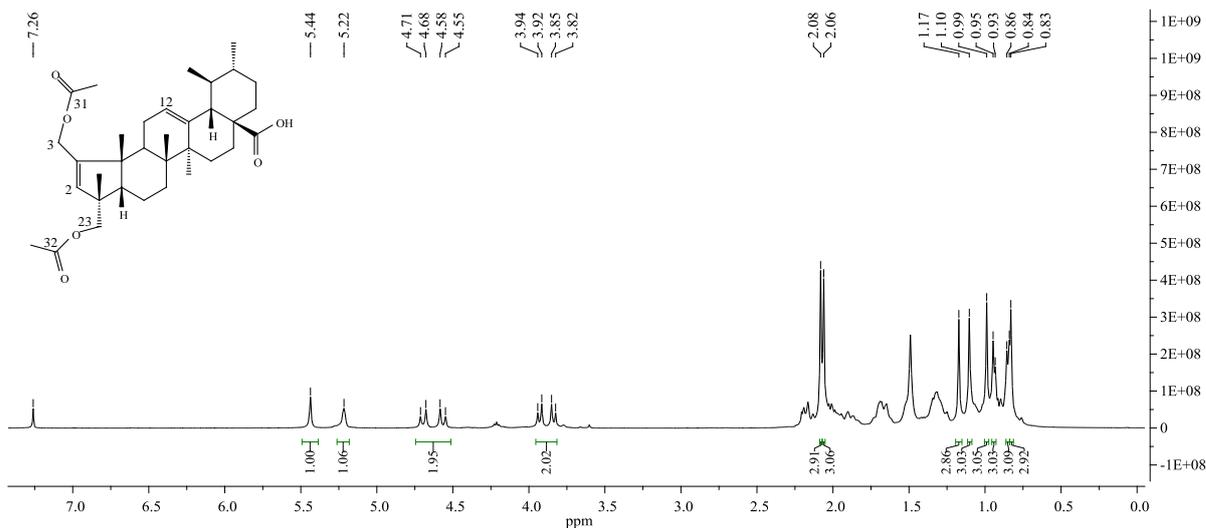


**Figura 2.6** – Espectro de  $^{135}\text{DEPT-RMN}$  do composto (3) (em  $\text{DMSO-d}_6$ ).

Na zona *downfield* (lado esquerdo) do espectro de  $^{13}\text{C}$  verifica-se a existência de um pico a 178.26 ppm (não visível no espectro de  $^{135}\text{DEPT}$ ) referente ao carbono carbonílico C28 – de acordo com a literatura [55] estes carbonos aparecem entre valores de 155 e 200 ppm. Os restantes picos nesta zona (156.24, 138.37, 129.75 e 124.62 ppm) são referentes aos carbonos insaturados – de acordo com a literatura [55] estes aparecem entre valores de 100 e 175 ppm. Uma vez que os dois primeiros picos não são visíveis no espectro de  $^{135}\text{DEPT}$  conclui-se que são carbonos quaternários – C1 e C13 – sendo os outros dois carbonos terciários – C2 e C12.

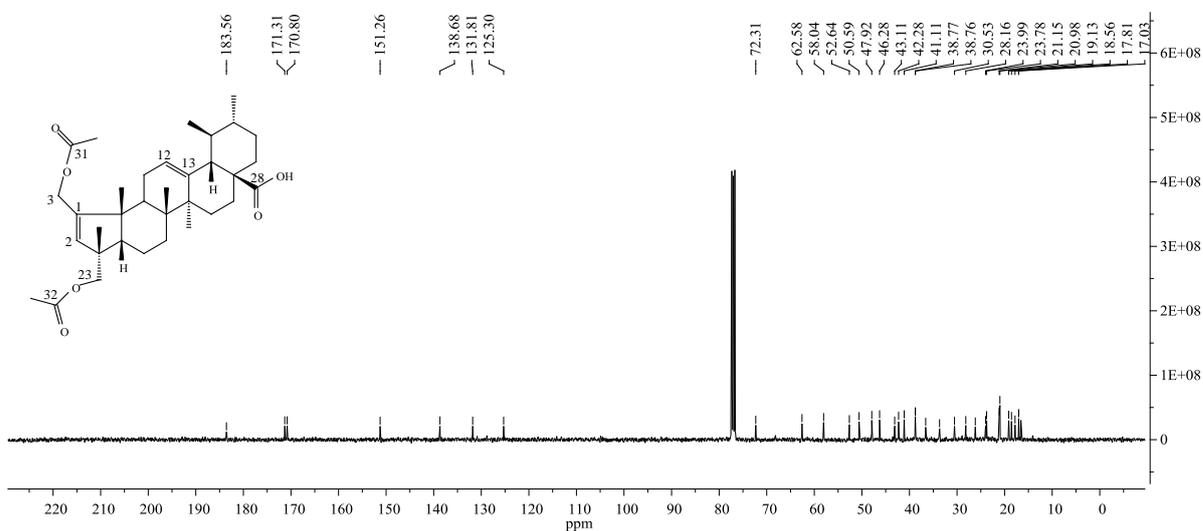
#### 2.1.1.4 Composto (4)

No espectro de  $^1\text{H-RMN}$  do **composto (4)** (Figura 2.7) verifica-se que os prótons dos grupos metileno a C3 e C23 adquirem estruturas AB quarteto, evidenciando a proteção dos grupos hidroxilo. Estas são visíveis a 4.70 e 4.57 ppm (com  $J = 14.3$  Hz) e a 3.93 e 3.84 ppm (com  $J = 10.6$  Hz), respetivamente. Os picos singletto a 2.08 e a 2.06 ppm são referentes aos prótons dos grupos metilo adjacentes ao grupo  $\text{C=O}$  a C31 e C32, respetivamente.

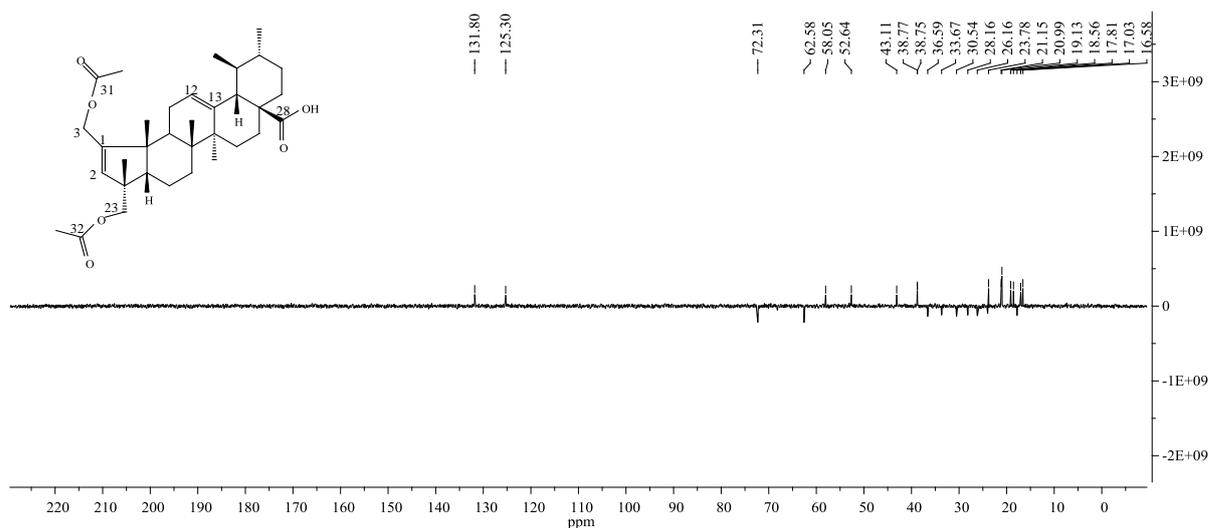


**Figura 2.7** – Espetro de <sup>1</sup>H -RMN do composto (4).

Através da técnica de <sup>13</sup>C e <sup>135</sup>DEPT-RMN foi possível validar a estrutura deste composto. Do espectro de <sup>13</sup>C-RMN (Figura 2.8) verifica-se a existência de trinta e quatro carbonos e do espectro de <sup>135</sup>DEPT-RMN (Figura 2.9) observa-se que quinze são carbonos primários e terciários e nove são carbonos secundários. Através do cruzamento desta informação conclui-se que dez carbonos são quaternários.



**Figura 2.8** – Espetro de <sup>13</sup>C -RMN do composto (4).



**Figura 2.9** – Espectro de  $^{135}\text{DEPT-RMN}$  do composto (4).

Na zona *downfield* do espectro de  $^{13}\text{C}$  observa-se um pico a 183.56 ppm relativo ao carbono carbonílico C28, além dos picos relativos aos carbonos insaturados C1, C2, C12 e C13 a 151.26, 138.68, 131.81 e 125.30 ppm. Verifica-se ainda o aparecimento de dois picos a 171.31 e 170.80 ppm. Uma vez que não são visíveis no espectro de  $^{135}\text{DEPT}$ , conclui-se que são carbonos quaternários e visto que apresentam desvio químico na zona dos carbonos carbonílicos, conclui-se que são relativos ao C31 e C32.

## 2.1.2 Preparação de Novos Derivados Semi-sintéticos

Uma vez que um dos objetivos específicos consistia na formação de ligações amina, e visto que estas não se formam facilmente pela reação direta de ácidos carboxílicos com aminas e aminoácidos, recorreu-se à ativação do ácido através da conversão do grupo  $-\text{OH}$  num *leaving group* [56] como por exemplo os haletos de ácido. Uma vez que são considerados bons *leaving groups*, estes são facilmente substituídos por outros grupos funcionais [57].

### 2.1.2.1 Haletos de ácido

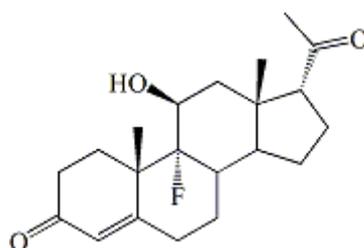
Os haletos de ácido, ou haletos de acilo, são compostos orgânicos que se caracterizam pela substituição do grupo hidroxilo dos ácidos carboxílicos por um haleto.

### 2.1.2.1.1 Halletos de Flúor

#### 2.1.2.1.1.1 Introdução

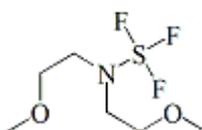
Os halletos de flúor são constituídos por um grupo acilo diretamente ligado a um átomo de flúor. A introdução destes átomos e de grupos fluorados na estrutura dos compostos apresenta vantagens ao nível das suas propriedades físico-químicas e biológicas. Por exemplo, o corticosteróide descoberto por Fried em 1954 apresentava um substituinte flúor que revelou ser responsável pelo aumento da atividade biológica do composto (Figura 2.10) [58].

Assim, devido à natureza da ligação C-F, os halletos de flúor são considerados grupos funcionais de elevada importância e visto que são mais estáveis que outros halletos de ácido, torna-se possível o seu isolamento por extração orgânica [59; 60].



**Figura 2.10** – Composto corticosteróide bioativo com um substituinte flúor.

Os reagentes mais utilizados na formação de cadeias fluoradas a partir de grupos hidroxilo, carbonilo e carboxilo são o tetrafluoreto de enxofre ( $\text{SF}_4$ ) e o dietilamino trifluoreto de enxofre (DAST) mas devido à sua instabilidade térmica e toxicidades tem-se vindo a apostar na utilização de reagentes análogos tal como o bis (2-metoxietilo) aminosulfur trifluoreto (Deoxo-fluor) (Figura 2.11) [61; 62].

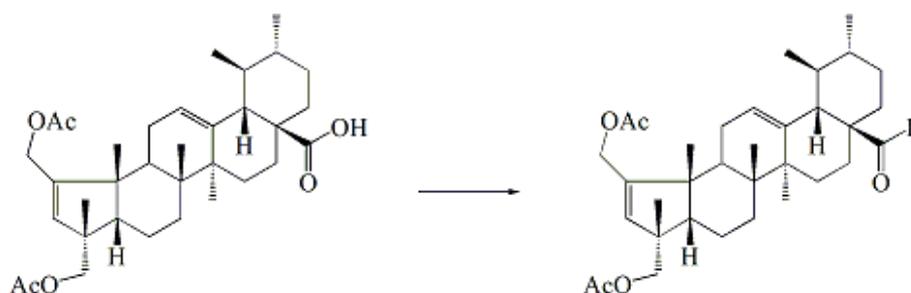


**Figura 2.11** – Regente Deoxo-fluor.

### 2.1.2.1.1.2 Preparação de um Haleto de Flúor

#### 2.1.2.1.1.2.1 Composto (5)

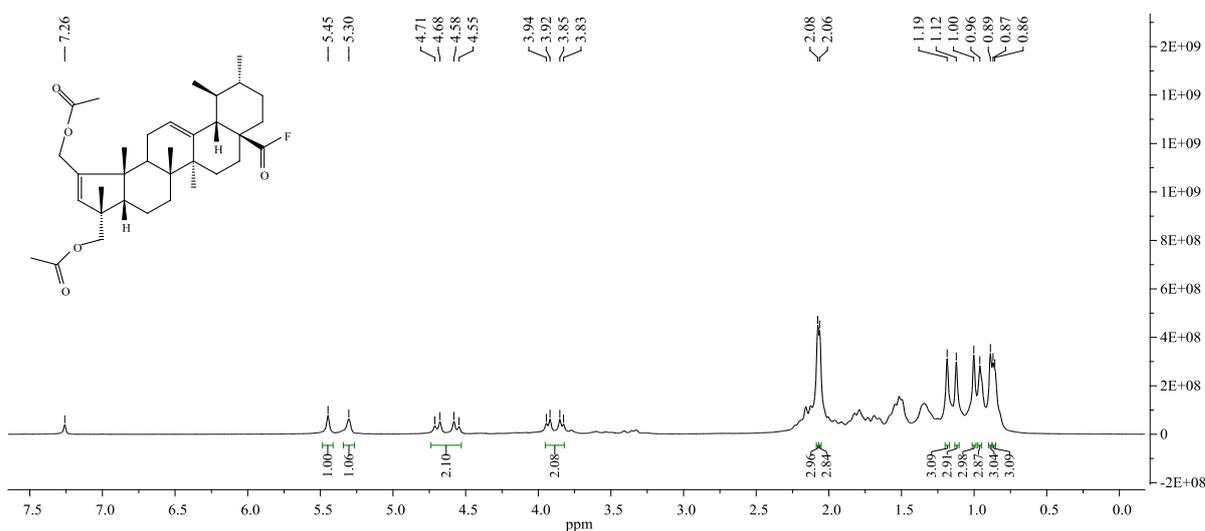
A modificação estrutural do grupo carboxílico do **composto (4)** foi efetuada através da utilização do reagente Deoxo-fluor, em diclorometano seco, a 0°C, obtendo-se assim o **composto (5)** (Figura 2.12).



**Figura 2.12** – Síntese do composto (5).

Reagentes e condições:  $(\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NSF}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco, 0°C, 3h.

A estrutura deste composto foi elucidada pela técnica de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{135}\text{DEPT}$ -RMN. O espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (Figura 2.13) é muito idêntico ao espectro do **intermediário (4)** (Figura 2.7), pelo que a formação do haleto apenas foi perceptível no espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN.



**Figura 2.13** – Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto (5).

Então, através do espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (Figura 2.14), comparativamente com o espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN do **intermediário (4)** (Figura 2.8), observa-se que na zona *downfield* não existe

nenhum pico referente ao carbono do ácido carboxílico. Nessa zona apenas se verifica dois picos relativos aos carbonos C31 e C32 a 171.27 e 170.76 ppm. A 144.64 ppm é então visível o aparecimento de um pico dubleto com baixa intensidade relativo ao carbono acoplado ao flúor (C28). O abaixamento de intensidade destes picos é normal e o desdobramento é devido ao efeito indutivo provocado pelo átomo de flúor [58]. Apesar deste efeito ir diminuindo ao longo da cadeia molecular [55], ainda se verifica a sua influência no carbono adjacente C17 visível através do pico dubleto a 48.82 ppm.

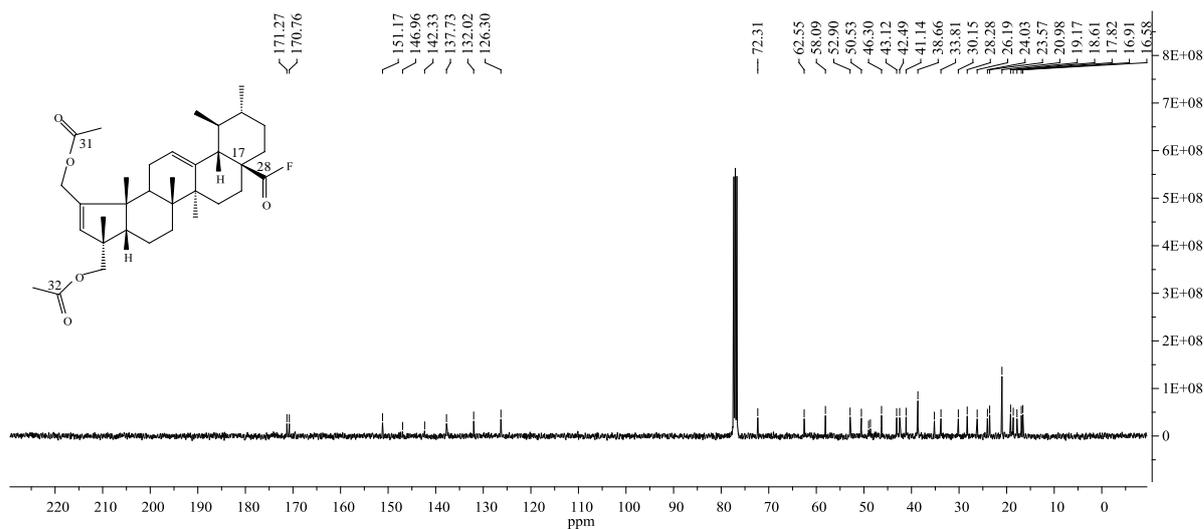


Figura 2.14 – Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN do composto (5).

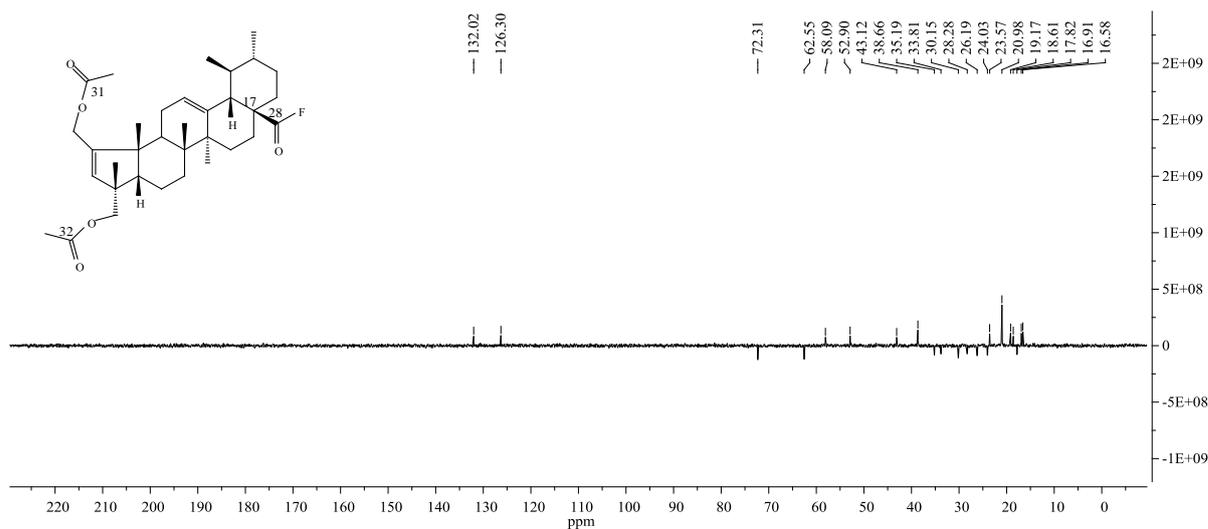


Figura 2.15 – Espectro de  $^{135}\text{DEPT}$ -RMN do composto (5).

Assim, do espectro de  $^{13}\text{C}$  verifica-se a existência de trinta e quatro carbonos e do espectro de  $^{135}\text{DEPT-RMN}$  (Figura 2.15) observa-se que quinze são carbonos primários e terciários e que nove são carbonos secundários. Através do cruzamento desta informação conclui-se que dez carbonos são quaternários. Para suportar a informação supracitada, verifica-se que o pico dubleto a 144.64 ppm e a 48.82 ppm não são visíveis no espectro de  $^{135}\text{DEPT}$ , sendo portanto carbonos quaternários (C28 e C17, respetivamente).

### 2.1.2.1.2 Cloretos de ácido

#### 2.1.2.1.2.1 Introdução

Os cloretos de ácido, ou cloretos de acilo, são compostos orgânicos constituídos por um grupo acilo diretamente ligado a um átomo de cloro. A sua formação torna-se útil na preparação de vários compostos que não podiam ser facilmente formados através da conversão direta de grupos hidroxilo. Assim, através do tratamento de ácidos carboxílicos com cloreto de tionilo, cloreto de oxalilo, tricloreto de fósforo, oxicloreto de fósforo e pentacloreto de fósforo (Figura 2.16), é possível a obtenção destes compostos [57].

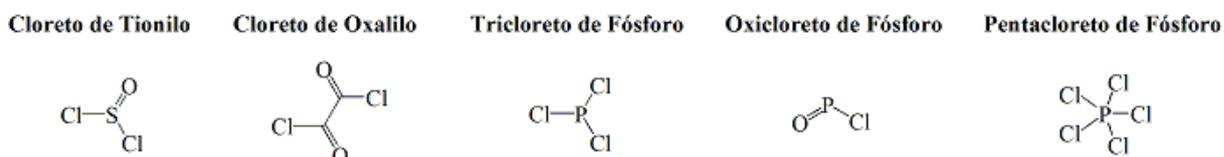
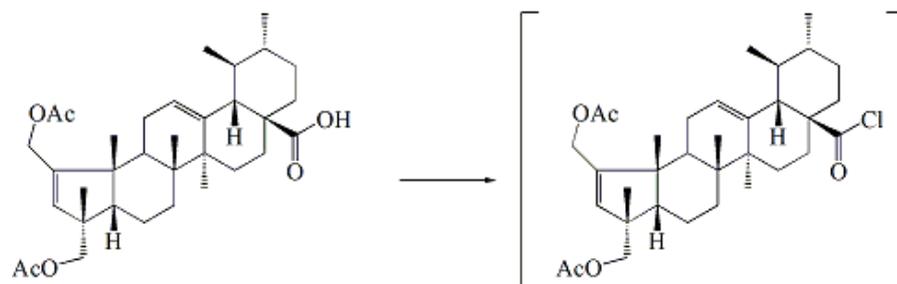


Figura 2.16 – Reagentes utilizados na formação de cloretos de ácido.

#### 2.1.2.1.2.2 Preparação de Cloretos de Ácido

A formação do cloreto de ácido a partir do **composto (4)** foi realizada em refluxo de benzeno seco, a  $80^{\circ}\text{C}$ , através da utilização do reagente cloreto de tionilo (Figura 2.17). Este composto, sem purificação prévia, foi usado na síntese dos **compostos finais (6), (7), (8) e (9)**.



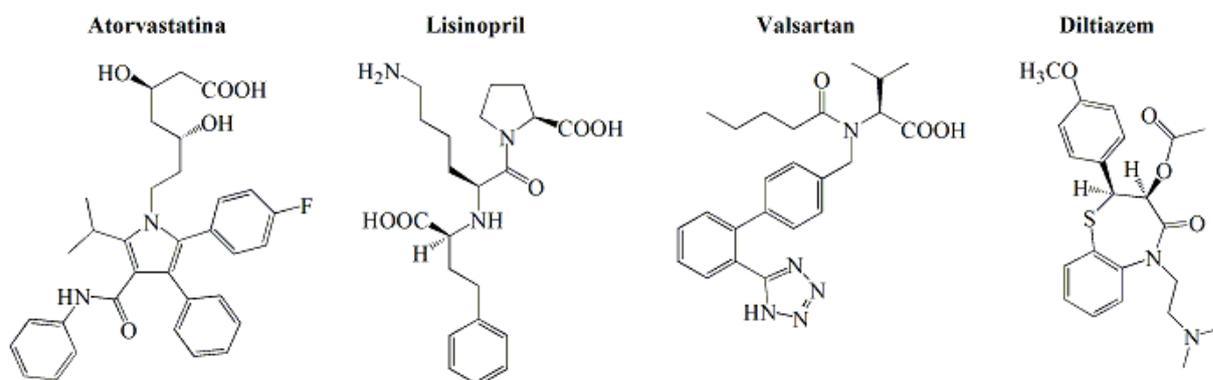
**Figura 2.17** – Síntese do intermediário cloreto de ácido do composto (4).

*Reagentes e condições:*  $\text{SOCl}_2$ ,  $\text{C}_6\text{H}_6$  seco, refluxo  $80^\circ\text{C}$ , 3h

### 2.1.2.1.3 Derivados Amida a partir de Aminas Primárias

#### 2.1.2.1.3.1 Introdução

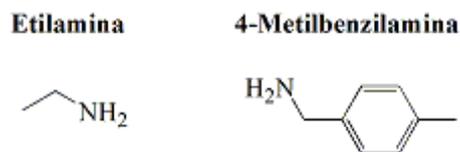
As ligações amida são muito importantes na arquitetura de sistemas biológicos representando, por exemplo, a principal ligação química responsável pela formação de proteínas. Também estão presentes em várias estruturas moleculares, incluindo alguns fármacos comercializados (Figura 2.18) [56; 60].



**Figura 2.18** – Exemplos de fármacos com ligações amida.

A formação de ligações amida através da reação de cloretos de ácido com aminas é efetuada em solventes secos inertes na presença de uma amina terciária não-nucleofílica, trietilamina por exemplo, podendo proceder-se à adição de uma quantidade catalítica de piridina ou DMAP para acelerar a reação [57].

No presente trabalho procedeu-se à síntese de três derivados amida a partir de duas aminas primária – etilamina e 4-metilbenzilamina (Figura 2.19) – obtendo-se como produtos finais o **composto (6)** e **(7)**.

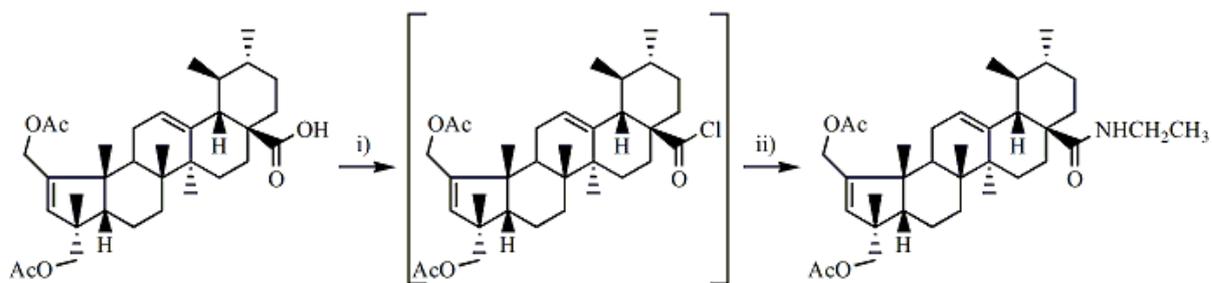


**Figura 2.19** – Reagentes utilizados na síntese dos derivados amida.

### 2.1.2.1.3.2 Preparação de Derivados Amida a partir de Aminas Primárias

#### 2.1.2.1.3.2.1 Composto (6)

A formação do **composto (6)** foi realizada a partir do cloreto de ácido do **composto (4)** em diclorometano seco, na presença de trietilamina, através da reação com a etilamina (Figura 2.20).



**Figura 2.20** – Síntese do composto (6).

*Reagentes e condições:* i)  $\text{SOCl}_2$ ,  $\text{C}_6\text{H}_6$  seco, refluxo ( $80^\circ\text{C}$ ), 3h; ii)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco,  $\text{NEt}_3$ ,  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ , rt, 1h.

A estrutura deste composto foi elucidada pela técnica de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{135}\text{DEPT-RMN}$ . Através do espectro de  $^1\text{H-RMN}$  (Figura 2.21) observa-se o aparecimento de um pico singlete largo a 5.81 ppm relativo ao próton ligado ao átomo de azoto, de duas estruturas multipletos de 3.34 a 3.24 ppm e de 3.15 a 3.05 ppm relativas aos prótons do grupo metileno ligado ao grupo amina e ao grupo metilo e a 1.08 ppm observa-se um pico triplo (com  $J = 7.35$  Hz) relativo ao grupo metilo ligado ao grupo metileno.

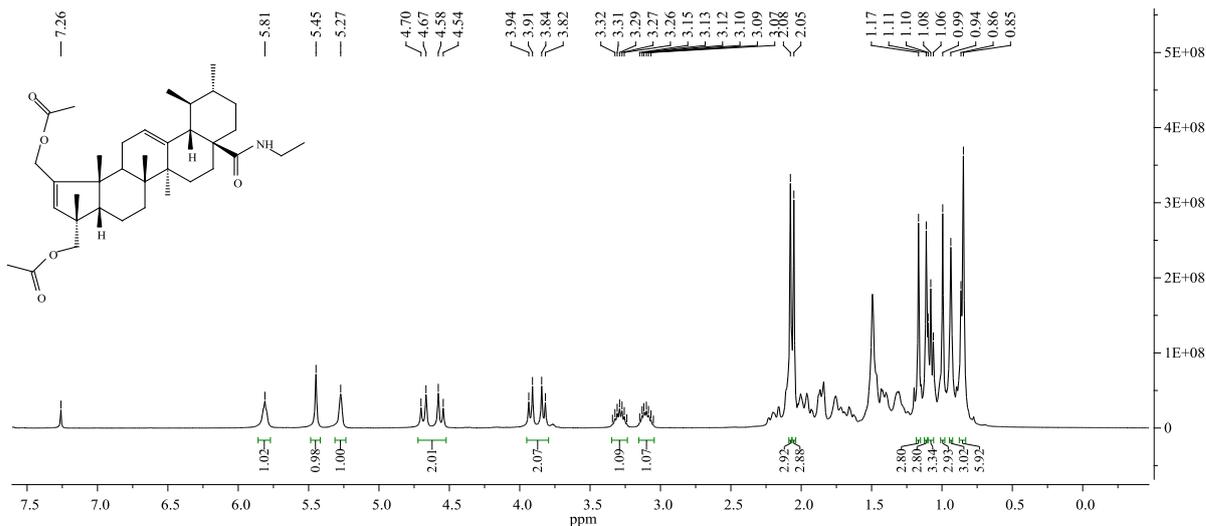


Figura 2.21 – Espetro de <sup>1</sup>H-RMN do composto (6).

Através da técnica de <sup>13</sup>C e <sup>135</sup>DEPT-RMN é possível validar a estrutura deste composto. Do espectro de <sup>13</sup>C-RMN (Figura 2.22) verifica-se a existência de trinta e seis carbonos e do espectro de <sup>135</sup>DEPT-RMN (Figura 2.23) observa-se que dezasseis são carbonos primários e terciários e dez são carbonos secundários. Através do cruzamento desta informação conclui-se que dez carbonos são quaternários.

Na zona *downfield* do espectro de <sup>13</sup>C- observa-se um pico a 177.84 ppm que não é visível no espectro de <sup>135</sup>DEPT, concluindo-se, assim, que se trata do carbono quaternário da função amida – valor de acordo com a literatura (155-185 ppm) [55].

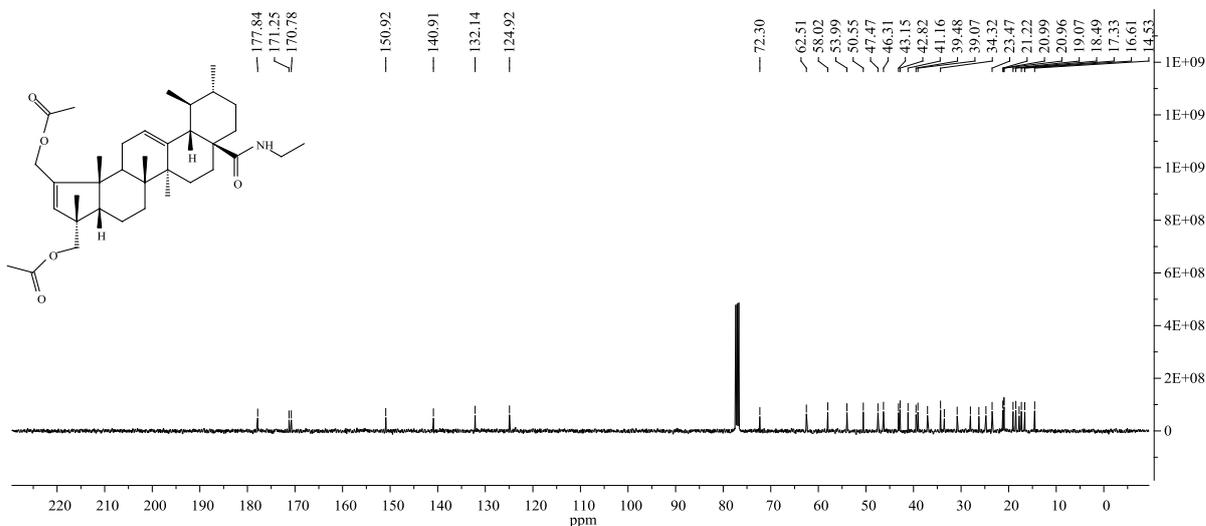
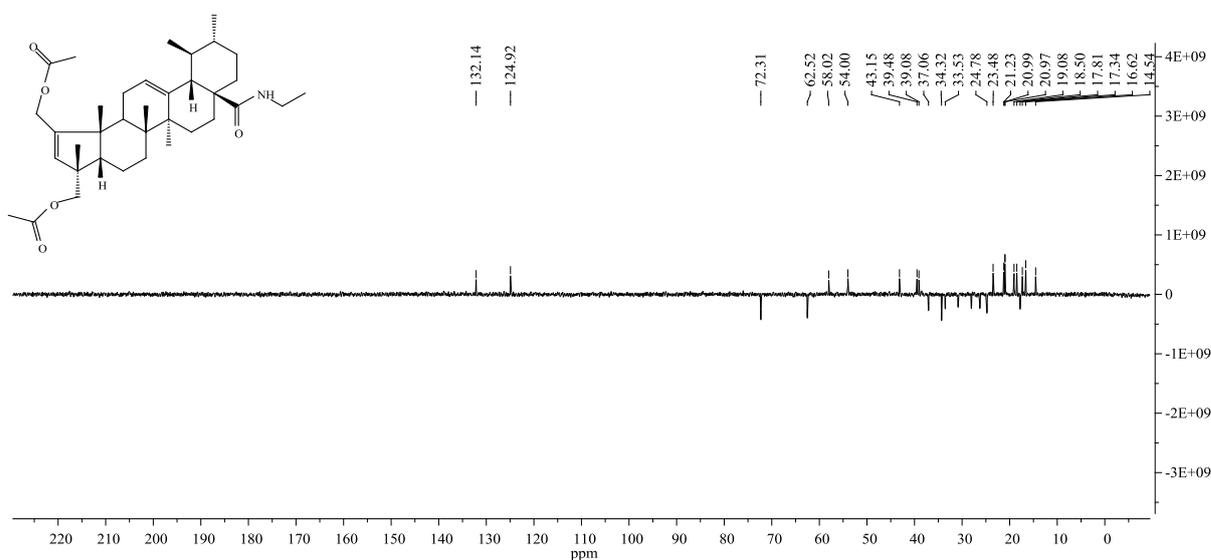
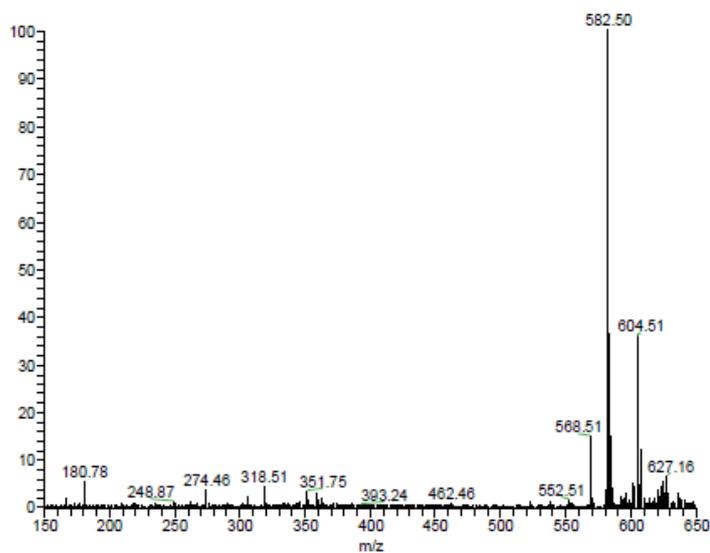


Figura 2.22 – Espetro de <sup>13</sup>C-RMN do composto (6).



**Figura 2.23** – Espetro de <sup>135</sup>DEPT-RMN do composto (6).

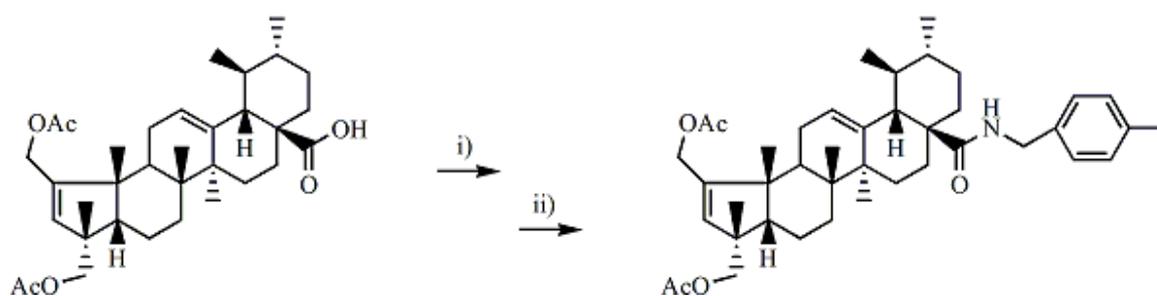
Da análise do espectro de massa do **composto (6)** obtido por ESI em modo ião positivo (Figura 2.24) verifica-se a presença do ião molecular a  $m/z$  582.5 [M + H]<sup>+</sup>.



**Figura 2.24** – Espetro de massa do composto (6) obtido por ESI em modo ião positivo.

#### 2.1.2.1.3.2.2 Composto (7)

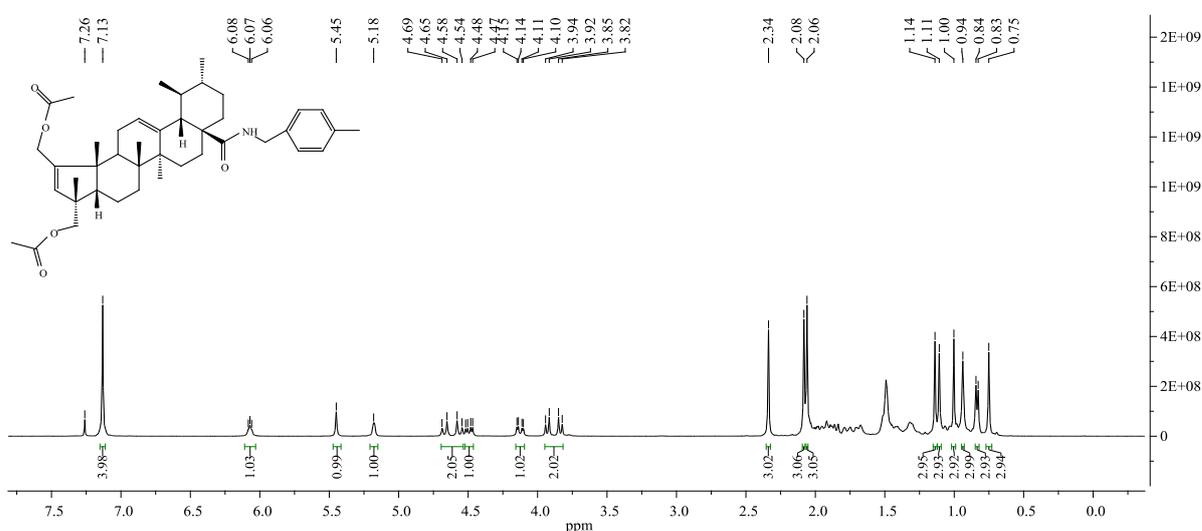
A formação do **composto (7)** foi realizada a partir do cloreto de ácido do **composto (4)** em diclorometano seco, na presença de trietilamina, através da reação com a 4-metilbenzilamina (Figura 2.25).



**Figura 2.25** – Síntese do composto (7).

*Reagentes e condições:* i)  $\text{SOCl}_2$ ,  $\text{C}_6\text{H}_6$  seco, refluxo ( $80^\circ\text{C}$ ), 3h; ii)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco,  $\text{NEt}_3$ ,  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_3$ , rt, 1h.

A estrutura deste composto foi elucidada pela técnica de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{135}\text{DEPT}$ -RMN. Através do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (Figura 2.26) observa-se um pico singlete a 7.13 ppm relativo aos prótons do anel aromático, um pico tripleto a 6.07 ppm (com  $J = 4.9$  Hz) relativo ao próton ligado ao átomo de azoto, uma estrutura duplo duplo dubleto a 4.31 ppm (com  $J = 4.27, 5.92$  e  $14.42$  Hz) relativa aos prótons do grupo metileno ligado ao grupo amina e ao anel aromático e um pico singlete a 2.34 ppm relativo aos prótons do grupo metilo ligado ao anel aromático.



**Figura 2.26** – Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto (7).

Através da técnica de  $^{13}\text{C}$  e  $^{135}\text{DEPT}$ -RMN é possível validar a estrutura deste composto. Do espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (Figura 2.27) verifica-se a existência de quarenta e dois carbonos e do espectro de  $^{135}\text{DEPT}$ -RMN (Figura 2.28) observa-se que dezanove são carbonos primários e terciários e dez são carbonos secundários. Através do cruzamento desta informação é possível concluir que treze carbonos são quaternários.

Na zona *downfield* do espectro de  $^{13}\text{C}$ , comparativamente com o espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN do **composto (6)** (Figura 2.22), observa-se o aparecimento de quatro novos picos a 137.11, 135.29, 129.35 e 127.91 ppm. Os dois últimos também são visíveis no espectro de  $^{135}\text{DEPT}$ , concluindo-se que são carbonos terciários, e apresentam intensidade relativa duplicada. Tal facto observa-se normalmente em compostos aromáticos uma vez que estes apresentam um plano de simetria que leva a que os carbonos sejam equivalentes, isto é,  $b = b'$  e  $c = c'$  [55]. Conclui-se então que os picos com intensidade duplicada são relativos aos carbonos  $b, b', c$  e  $c'$  e os outros relativos aos carbonos  $a$  e  $d$ , sendo possível confirmar a configuração *para* do anel aromático.

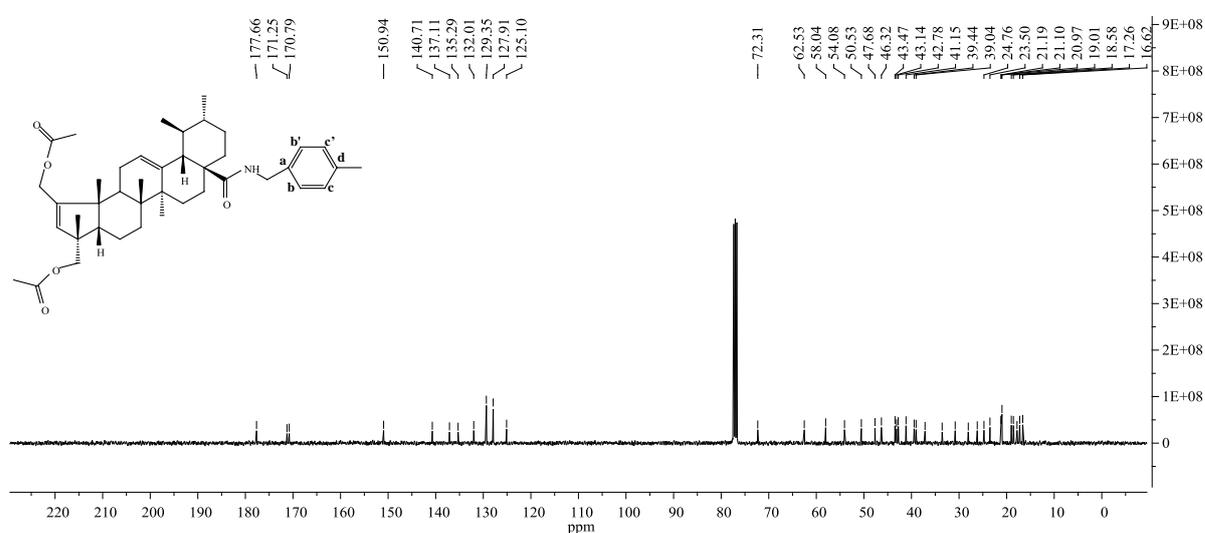


Figura 2.27 – Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN do composto (7).

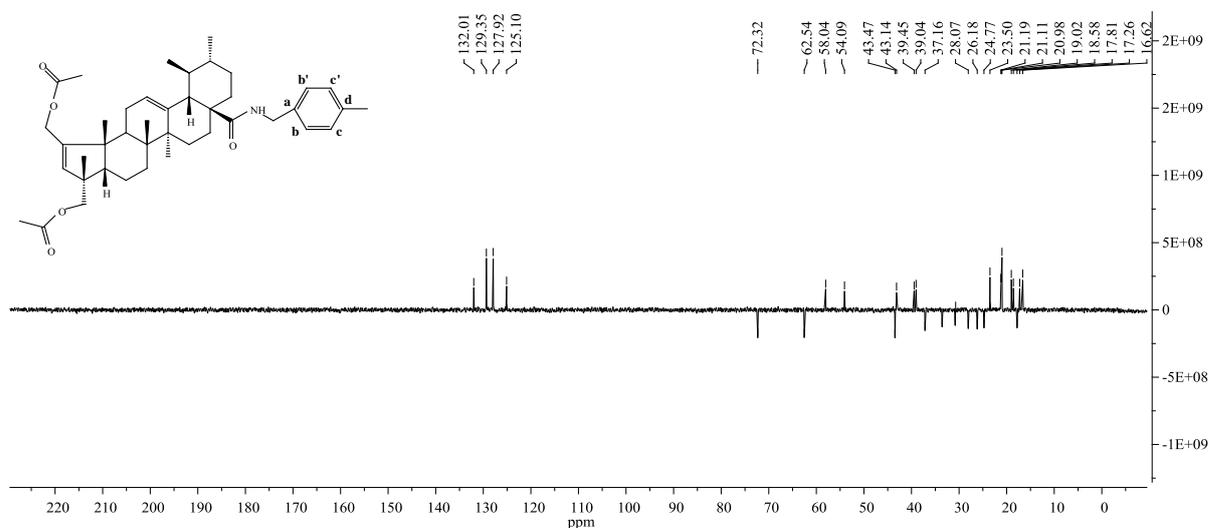


Figura 2.28 – Espectro de  $^{135}\text{DEPT}$ -RMN do composto (7).

Da análise do espectro de massa do **composto (7)** obtido por ESI em modo ião positivo (Figura 2.29) verifica-se a presença do ião molecular a  $m/z$  658.29  $[M + H]^+$  (mais 76 u.m.a. em relação ao composto (6)).

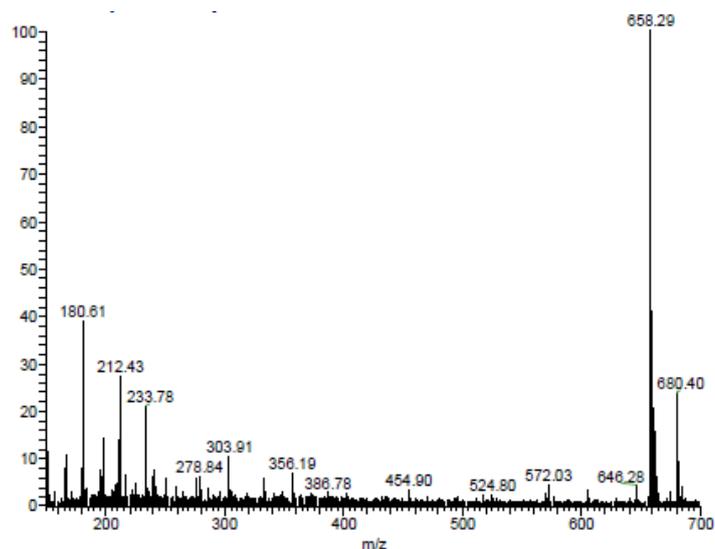


Figura 2.29 – Espectro de massa do composto (7) obtido por ESI em modo ião positivo.

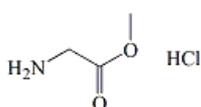
#### 2.1.2.1.4 Derivados Amida a partir de Aminoácidos

##### 2.1.2.1.4.1 Introdução

Os aminoácidos são compostos orgânicos constituídos por um grupo amina, um grupo carboxilo e uma cadeia lateral específica, de dimensão e características variáveis, ligados a um carbono  $\alpha$  saturado. De modo a limitar a sua reatividade, as funções amina e carboxilo podem ser protegidas. Exemplo disso é a metilação do grupo carboxilo, dando origem a ésteres metílicos de aminoácidos cuja reatividade se cinge à do grupo amina.

Como referido anteriormente, a formação de ligações amida através de ácidos carboxílicos exige a ativação do ácido. Assim procedeu-se à síntese de dois derivados aminoácidos – **composto (8)** e **(9)** – através da reação do cloreto de ácido do **composto (4)** com o cloridrato do éster metílico da glicina e da L-alanina (Figura 2.30).

Cloridrato do éster metílico da glicina



Cloridrato do éster metílico da L-alanina

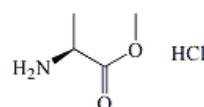
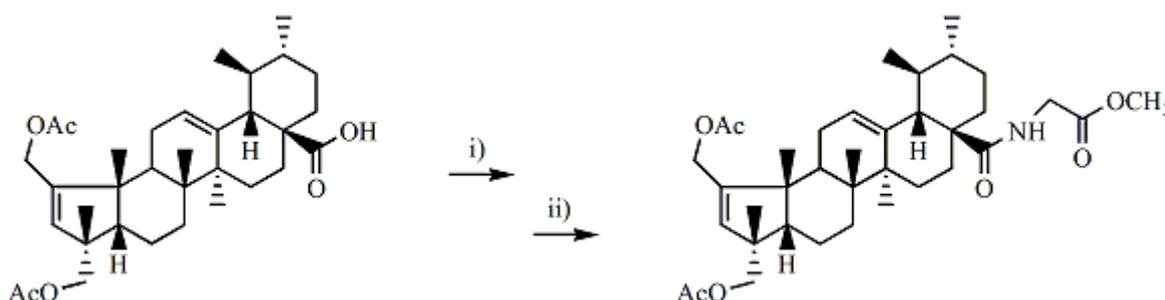


Figura 2.30 – Reagente utilizado na síntese do composto (8) e (9).

#### 2.1.2.1.4.2 Preparação de Derivados Amida a partir de Aminoácidos

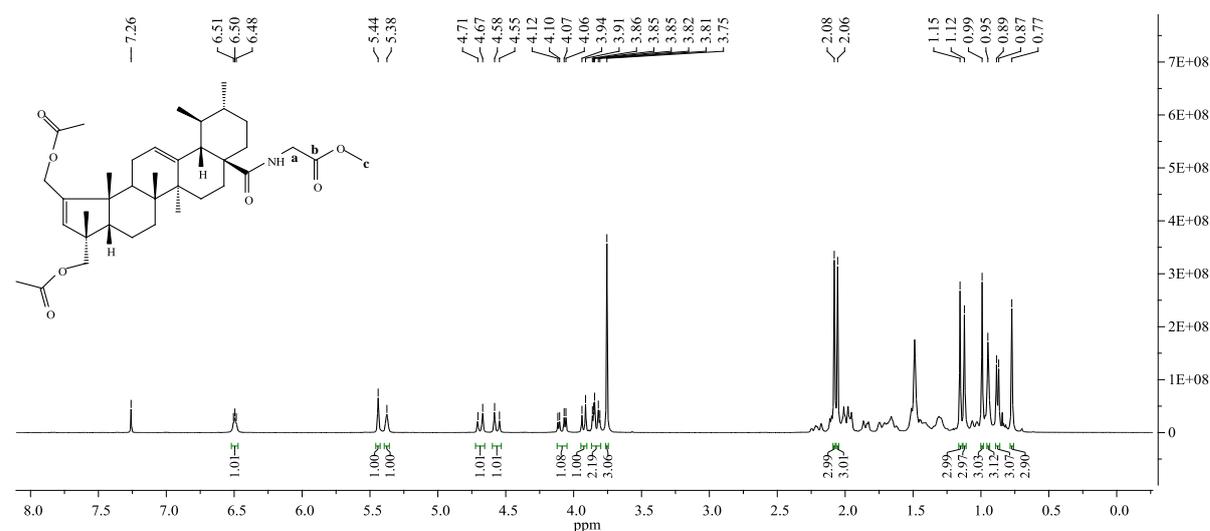
##### 2.1.2.1.4.2.1 Composto (8)

A formação do **composto (8)** foi realizada a partir do cloreto de ácido do **composto (4)** em diclorometano seco, na presença de trietilamina, através da reação com o cloridrato do éster metílico da glicina (Figura 2.31).



**Figura 2.31** – Síntese do composto (8). *Reagentes e condições:* i)  $\text{SOCl}_2$ ,  $\text{C}_6\text{H}_6$  seco, refluxo ( $80^\circ\text{C}$ ), 3h; ii)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco,  $\text{NEt}_3$ ,  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3 \cdot \text{HCl}$ , rt, 1h.

A estrutura deste composto foi elucidada pela técnica de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{135}\text{DEPT}$ -RMN. Através do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (Figura 2.32) observa-se um pico tripleto a 6.50 ppm (com  $J = 4.27$  Hz) que corresponde ao próton ligado ao azoto, duas estrutura multipletos de 4.12 a 4.06 e de 3.86 a 3.81 ppm relativas aos prótons do grupo metileno (a) e um pico singletos a 3.75 ppm relativo ao grupo metilo ligado ao oxigénio (c).



**Figura 2.32** – Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto (8).

Do espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (Figura 2.33) verifica-se a existência de trinta e sete carbonos e do espectro de  $^{135}\text{DEPT}$ -RMN (Figura 2.34) observa-se que dezasseis são carbonos primários e terciários e dez são carbonos secundários. Através do cruzamento desta informação conclui-se que onze são carbonos são quaternários.

A *downfield* do espectro de  $^{13}\text{C}$ , além do pico a 178.1 ppm relativo ao carbono carbonílico da função amida, observa-se três picos entre 172 e 170 ppm, sendo dois deles referentes aos carbonos carbonílicos das funções acetato (C31 e C32) e o outro referente ao carbono carbonílico do aminoácido (b). Esta informação é ainda sustentada pela ausência destes picos no espectro de  $^{135}\text{DEPT}$ , confirmando-se que se trata de carbonos quaternários.

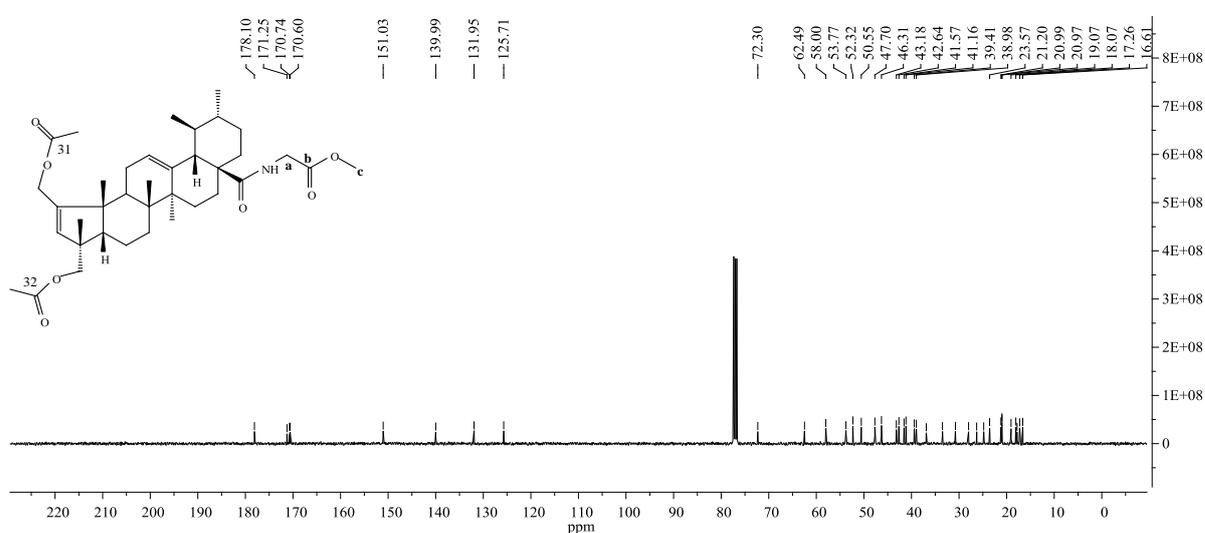


Figura 2.33 – Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN do composto (8).

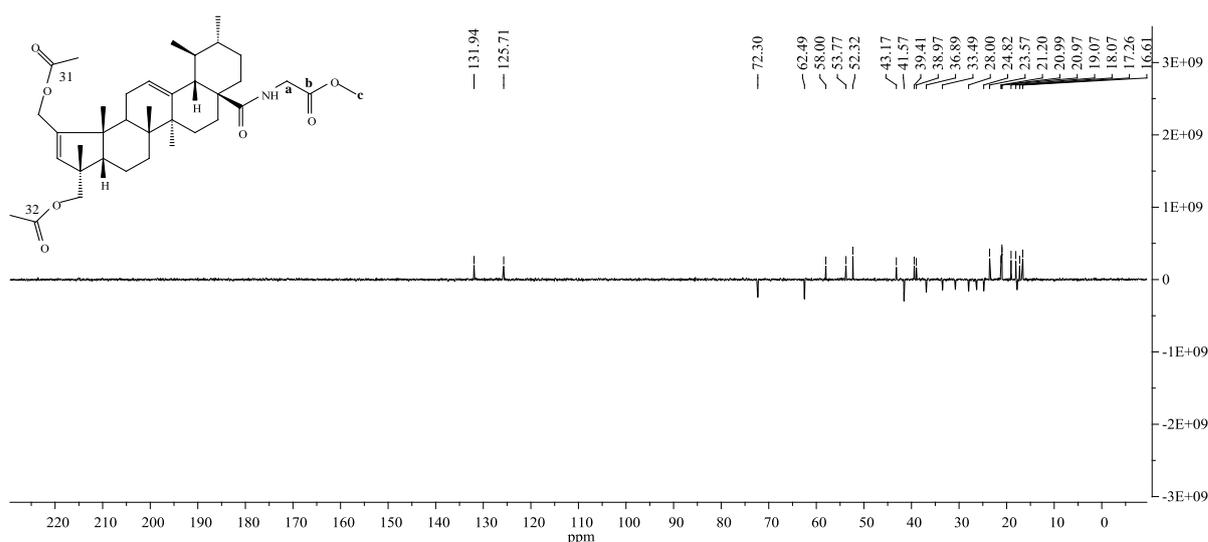


Figura 2.34 – Espectro de  $^{135}\text{DEPT}$ -RMN do composto (8).

Da análise do espectro de massa do **composto (8)** obtido por ESI em modo íon positivo (Figura 2.35) verifica-se a presença do íon molecular a  $m/z$  626.27  $[M + H]^+$ .

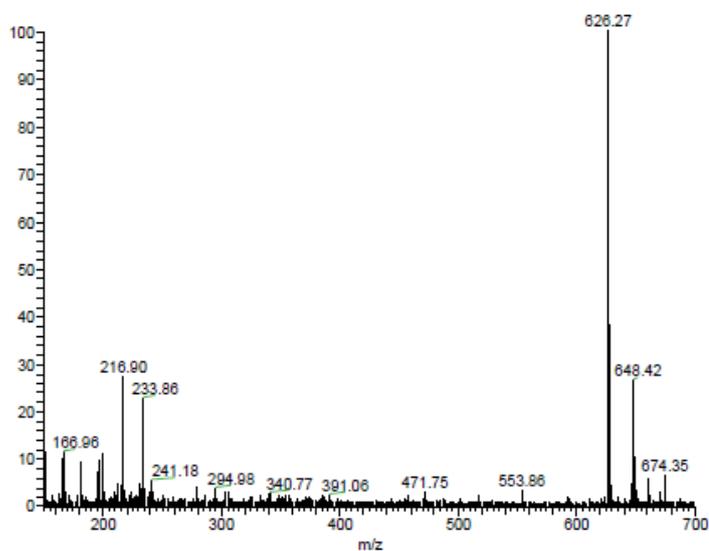


Figura 2.35 – Espectro de massa do composto (8) obtido por ESI em modo íon positivo.

#### 2.1.2.1.4.2.2 Composto (9)

A formação do **composto (9)** foi realizada a partir do cloreto de ácido do **composto (4)** em diclorometano seco, na presença de trietilamina, através da reação com o cloridrato do éster metílico de L-alanina (Figura 2.36).

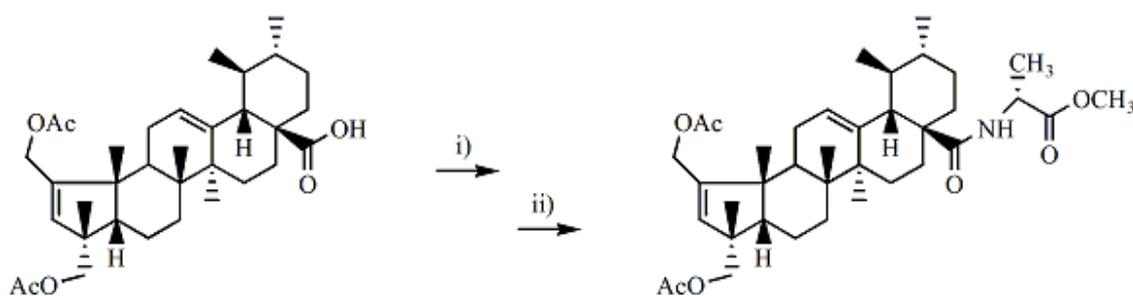


Figura 2.36 – Síntese do composto (9). *Reagentes e condições:* i)  $\text{SOCl}_2$ ,  $\text{C}_6\text{H}_6$  seco, refluxo ( $80^\circ\text{C}$ ), 3h; ii)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco,  $\text{NEt}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOCH}_3 \cdot \text{HCl}$ , rt, 1h.

A estrutura deste composto foi elucidada pela técnica de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{135}\text{DEPT}$ -RMN. Através do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (Figura 2.37) observa-se um pico dubleto a 6.58 ppm (com  $J = 5.75$  Hz) que corresponde ao próton do grupo amina, uma estrutura multipletto de 4.49 a

4.43 ppm relativa ao próton do grupo CH(a), um pico singlete a 3.73 ppm relativo ao grupo metilo ligado ao oxigénio (c) e a 1.36 ppm observa-se um pico duplete (com  $J = 7.04$  Hz) que corresponde aos prótons do grupo metilo (d).

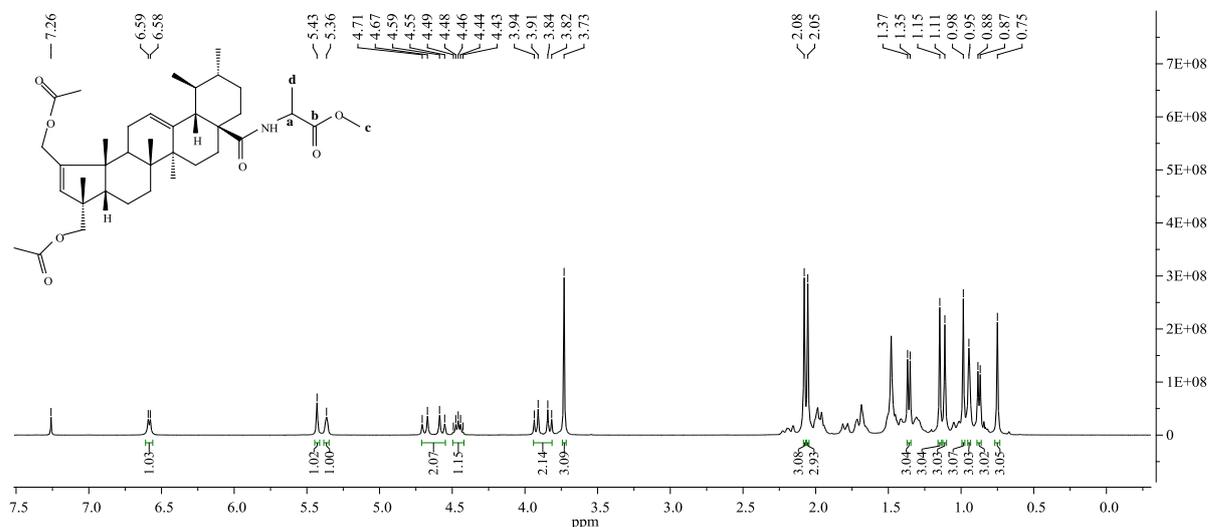


Figura 2.37 – Espectro de <sup>1</sup>H-RMN do composto (9).

Do espectro de <sup>13</sup>C-RMN (Figura 2.38) verifica-se a existência de trinta e oito carbonos e do espectro de <sup>135</sup>DEPT-RMN (Figura 2.39) observa-se que dezoito são carbonos primários e terciários e nove são carbonos secundários. Através do cruzamento desta informação conclui-se que onze são carbonos são quaternários.

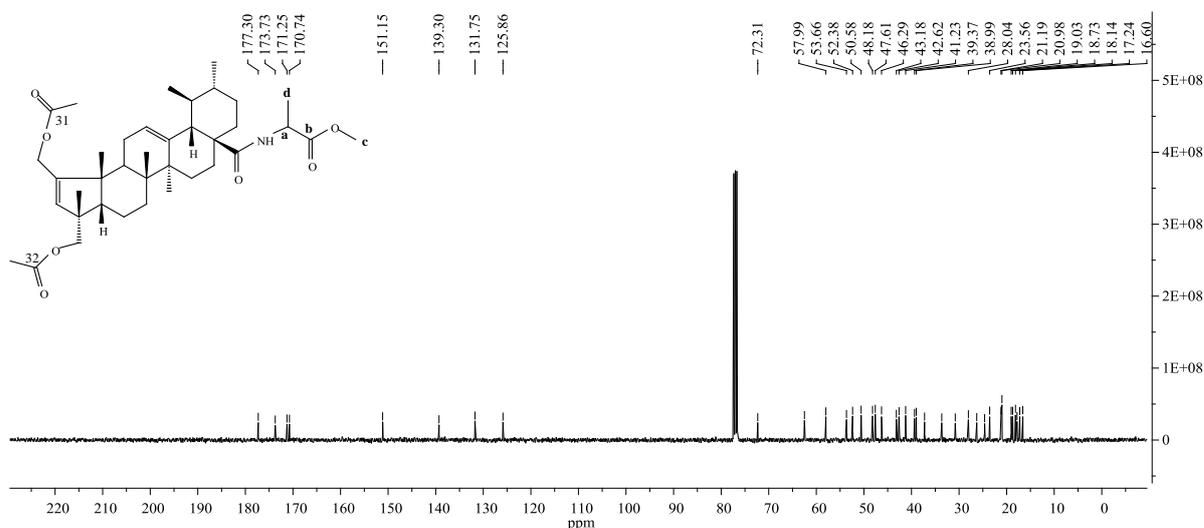


Figura 2.38 – Espectro de <sup>13</sup>C-RMN do composto (9).

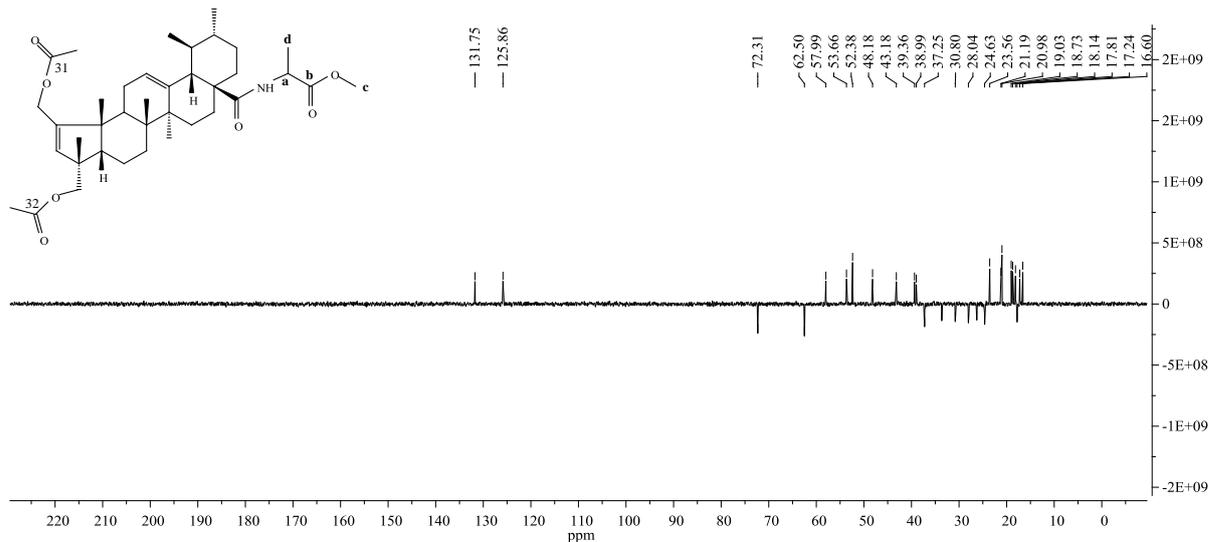


Figura 2.39 – Espetro de  $^{135}\text{DEPT-RMN}$  do composto (9).

A *downfield* do espectro de  $^{13}\text{C}$  observa-se um pico a 177.3 ppm relativo ao carbono carbonílico da função amida, e tal como no espectro de  $^{13}\text{C-RMN}$  do composto (8) (Figura 2.33) observa-se três picos entre 174 e 170 ppm, sendo dois deles referentes aos carbonos carbonílicos das funções acetato (C31 e C32) e o outro referente ao carbono carbonílico do aminoácido (b) – informação suportada pelo espectro de  $^{135}\text{DEPT}$ .

Da análise do espectro de massa do **composto (9)** obtido por ESI em modo ião positivo (Figura 2.40) verifica-se a presença do ião molecular a  $m/z$  640.2  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (mais 14 u.m.a. em relação ao composto (8))

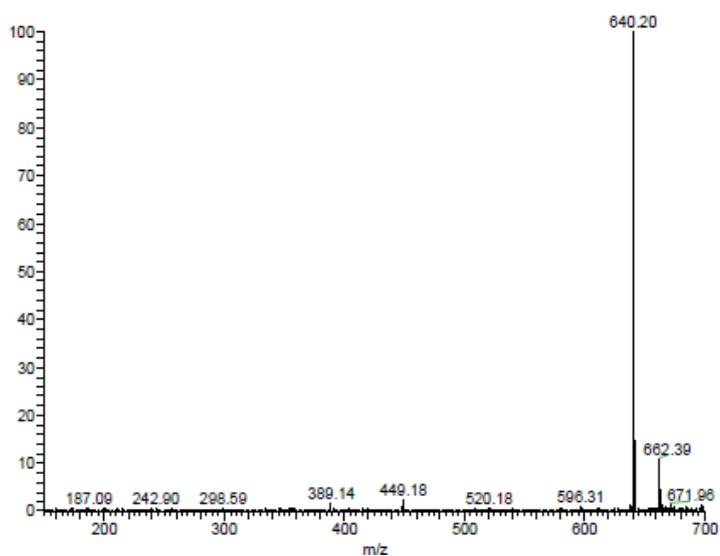


Figura 2.40 – Espetro de massa do composto (9) obtido por ESI em modo ião positivo

**3**

**CONCLUSÃO**

### 3.1 Conclusão

Neste trabalho tinha-se como principal objetivo a preparação de novos derivados semi-sintéticos a partir da molécula *lead* do ácido asiático e posterior elucidação estrutural através de técnicas de RMN e EM.

A estratégia definida inicialmente passava pela modificação estrutural do anel A e posterior formação de ligações amina a partir do grupo carboxilo. Após análise do trabalho é possível concluir que a estratégia adotada foi bem sucedida.

Ao longo do trabalho experimental optou-se por metodologias rápidas e eficazes, ou seja, foi possível obter bons rendimentos a partir de procedimentos simples e rápidos. A facilidade de recuperação dos produtos finais também foi uma mais valia, permitindo o seu rápido isolamento.

A importância da RMN e da EM na análise de compostos foi uma vez mais evidente, permitindo a elucidação estrutural dos compostos sintetizados.

Os novos derivados semi-sintéticos estão a ser avaliados quanto ao seu perfil de citotoxicidade para células de tumores malignos com o objetivo de compreender a sua importância no tratamento desta patologia.

**4**

**PARTE EXPERIMENTAL**

## 4.1 Química

Os solventes utilizados nas reações foram previamente purificados e secos de acordo com procedimentos encontrados na literatura. Os solventes utilizados nos *workups* foram de grau analítico e foram comprados à VWR Portugal; os reagentes foram comprados à Sigma Aldrich e à Merck. Utilizou-se placas comerciais Kieselgel 60 F<sub>254</sub> da Merck na análise cromatográfica de camada fina (TLC), sendo estas observadas à luz ultravioleta (UV) a 254 nm e reveladas numa mistura etanol-ácido sulfúrico (95:5) com posterior aquecimento a cerca de 120 °C. Na cromatografia de coluna utilizou-se sílica gel 60 (230 – 400 mesh) da Merck.

Os espectros de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e <sup>135</sup>DEPT-RMN foram registados num espectrómetro Bruker Avance III de 400 MHz. Na preparação das amostras utilizou-se clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>) e dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d<sub>6</sub>). Os desvios químicos foram apresentados em δ (ppm) e utilizou-se como padrões internos o δ 7.26 do CHCl<sub>3</sub> e o δ 2.50 do DMSO nos espectros de <sup>1</sup>H-RMN. As unidades dos desvios químicos (δ) e das constantes de acoplamento (J) foram apresentadas em partes por milhão (ppm) e hertz (Hz), respetivamente.

Os espectros de massa foram obtidos através do equipamento Thermo Finnigan, LCQ Advantage MAX, com ionização por *electrospray* (ESI), introdução da amostra por infusão direta (DI) e analisador de massas híbrido, o quadrupolo-*ion trap* (Q-IT).

### 4.1.1 Composto (1)

De acordo com a literatura [46], ao ácido asiático (1000 mg, 2,05 mmol) dissolvido em metanol:água (20:1) adicionou-se periodato de sódio (645,6 mg) e a mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente durante 3h. O solvente foi evaporado a pressão reduzida e a fase orgânica foi extraída com acetato de etilo, lavada com água, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e filtrada. O solvente foi evaporado a pressão reduzida e deu origem ao produto final (1,06g). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9.94 (s, 1H), 5.29 (s, 1H), 5.14 – 5.11 (m, 1H), 3.93, 3.74 (AB quarteto, J = 13.3 Hz, 2H), 2.21 – 2.16 (m, 2H), 1.08 (s, 3H), 1.06 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 0.94 (d, J = 5.7 Hz, 3H), 0.86 (s, 3H), 0.84 (d, J = 4.68 Hz, 3H).

### 4.1.2 Composto (2)

De acordo com a literatura [46], o composto (1) (500 mg, 1,03 mmol) foi dissolvido em benzeno seco e colocado em atmosfera de azoto. Após adição de ácido acético e piperidina, a solução foi mantida em refluxo de 60°C durante 1h. De seguida adicionou-se

sulfato de magnésio anidro (500 mg) e a reação permaneceu em refluxo por mais 5h. Após a reação terminar, o solvente foi evaporado a pressão reduzida e a fase orgânica foi extraída com acetato de etilo, lavada com água, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e filtrada. O solvente foi evaporado a pressão reduzida e deu origem ao produto final (502,2 mg). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9.71 (s, 1H), 6.67 (s, 1H), 5.27 (s largo, 1H), 3.61, 3.45 (AB quarteto, J = 10.6 Hz, 2H), 1.24 (s, 3H), 1.09 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 0.93 (d, J = 6.04 Hz, 3H), 0.87 (s, 3H), 0.83 (d, J = 6.38 Hz, 3H).

#### 4.1.3 Composto (3)

De acordo com a literatura [46], após dissolução do composto (2) (500 mg, 1,07 mmol) em metanol seco, adicionou-se borohidreto de sódio (101,2 mg, 2,68 mmol). A reação foi mantida à temperatura ambiente e ficou concluída em 2h. De seguida adicionou-se uma pequena quantidade de acetona de forma a eliminar o excesso de reagente e por fim procedeu-se à evaporação dos solventes a pressão reduzida. A fase orgânica foi extraída com acetato de etilo, lavada com água, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada e o solvente foi evaporado a pressão reduzida dando origem ao produto final (465 mg, 92,4%). RMN: <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 5.34 (s, 1H), 5.12 (s, 1H), 4.58 (t, J = 4.8 Hz, OH), 4.46 (t, J = 5.26 Hz, OH), 3,97 (ddd, J = 3.74, 4.77 e 15 Hz 2H), 3.32 (s, 2H, efeito *overlapped* com H<sub>2</sub>O), 3.17 (ddd, J = 5.28, 5.5 e 10.6 Hz 2H), 1.09 (s, 3H), 1.07 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.87 (s, 3H), 0.82 (d, J = 6.33 Hz, 3H), 0.80 (s, 3H); <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 178.26, 156.24, 138.57, 129.75, 124.62, 70.12, 59.34, 57.00, 52.50, 49.76, 47.23, 46.77, 42.68, 41.96, 40.65, 38.47, 38.11, 36.24, 33.37, 30.11, 27.75, 25.76, 23.72, 23.51, 21.04, 19.09, 18.54, 17.59, 17.01, 16.68.

#### 4.1.4 Composto (4)

O composto (3) (500 mg, 1,06 mmol) foi dissolvido em THF seco e após adição de anidrido acético (0,25 ml, 2,65 mmol) e de uma quantidade catalítica de DMAP, a reação foi mantida à temperatura ambiente durante 2h. Após a reação terminar, o solvente foi evaporado a pressão reduzida e a fase orgânica foi extraída com acetato de etilo, lavada com solução concentrada de HCl, solução aquosa de NaHCO<sub>3</sub> 10%, água e solução de NaCl 10%, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e filtrada. O solvente foi evaporado a pressão reduzida e deu origem ao produto final (574 mg, 97,6%). RMN: <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.44 (s, 1H), 5.22 (s, 1H), 4.70, 4.57 (AB quarteto, J = 14.3 Hz, 2H), 3.93, 3.84 (AB quarteto, J = 10.6 Hz, 2H), 2.08 (s,

3H), 2.06 (s, 3H), 1.17 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 0.94 (d, J = 5.6 Hz, 3H), 0.85 (d, J = 6.33 Hz, 3H), 0.83 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  183.56, 171.31, 170.80, 151.26, 138.68, 131.81, 125.30, 72.31, 62.58, 58.04, 52.64, 50.59, 47.92, 46.28, 43.11, 42.28, 41.11, 38.77, 38.76, 36.59, 33.67, 30.53, 28.16, 26.16, 23.99, 23.78, 21.15, 20.98 (2C), 19.13, 18.56, 17.81, 17.03, 16.58.

#### 4.1.5 Composto (5)

O composto (4) (50 mg, 0,09 mmol) foi dissolvido em diclorometano seco e de seguida procedeu-se à adição de Deoxo-fluor (68,1  $\mu\text{l}$ , 0,32 mmol) a 0°C. De seguida retirou-se o banho de gelo, a reação foi mantida à temperatura ambiente durante 3h e por fim procedeu-se à extração da fase orgânica com diclorometano. De seguida esta foi lavada com água e solução aquosa de NaCl 10%, seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro e filtrada. O solvente foi por fim evaporado a pressão reduzida e obteve-se o produto final (47,3 mg, 94,4%). RMN:  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.45 (s, 1H), 5.30 (s, 1H), 4.69, 4.56 (AB quarteto, J = 14 Hz, 2H), 3.93, 3.84 (AB quarteto, J = 10.24 Hz, 2H), 2.08 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.19 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 1.00 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.89 (s, 3H), 0.86 (d, J = 4.8 Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.27, 170.76, 151.17, 146.96 e 142.33 (1C), 137.73, 132.02, 126.30, 72.31, 62.55, 58.09, 52.90, 50.53, 49.01 e 48.63 (1C), 46.30, 43.12, 42.49, 41.14, 38.66 (2C), 35.19, 33.81, 30.15, 28.28, 26.19, 24.03, 23.57, 20.98 (3C), 19.17, 18.61, 17.82, 16.91, 16.58.

#### 4.1.6 Composto (6)

Após dissolução do composto (4) (150 mg, 0,27 mmol) em benzeno seco, a solução foi colocada em refluxo a 80°C. De seguida adicionou-se  $\text{SOCl}_2$  (41,1  $\mu\text{l}$ , 0,567 mmol) e ao fim de 3h procedeu-se à evaporação do solvente e do excesso de  $\text{SOCl}_2$ . De seguida dissolveu-se o resíduo em diclorometano seco e procedeu-se à adição de etilamina (70,7  $\mu\text{l}$ , 1.08 mmol). Após basificação da solução com trietilamina (pH 8-9), esta foi mantida à temperatura ambiente durante 1h. De seguida procedeu-se à evaporação do solvente e à extração da fase orgânica com acetato de etilo. A lavagem foi efetuado com uma pequena quantidade de solução concentrada de HCl (pH 3-4), seguida de solução aquosa de  $\text{NaHCO}_3$  10%, água e solução de NaCl 10%. Por fim foi seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, filtrada e o solvente foi evaporado a pressão reduzida, obtendo-se o composto final na forma de óleo (153,8 mg, 97,9 %). Este foi posteriormente purificado por coluna cromatográfica (éter de petróleo -

acetato de etilo) e obtido na forma de espuma branca (112,9 mg, 73,4%). RMN:  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.81 (sl, 1H), 5.45 (s, 1H), 5.27 (s, 1H), 4.68, 4.56 (AB quarteto,  $J = 14.3$  Hz, 2H), 3.92, 3.83 (AB quarteto,  $J = 10.6$  Hz, 2H), 3.34 – 3.24 (m, 1H), 3.15 – 3.05 (m, 1H), 2.08 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.17 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 1.08 (t,  $J = 7.35$  Hz, 3H), 0.99 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.86 – 0.65 (m, 6H);  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  177.84, 171.25, 170.78, 150.92, 140.91, 132.14, 124.92, 72.30, 62.51, 58.02, 53.99, 50.55, 47.47, 46.31, 43.15, 42.82, 41.16, 39.48, 39.07, 37.05, 34.32, 33.53, 30.82, 28.03, 26.26, 24.77, 23.47, 21.22, 20.99, 20.96, 19.07, 18.49, 17.80, 17.33, 16.61, 14.53; ESI-MS: 582.5 ( $[M + H]^+$ ).

#### 4.1.7 Composto (7)

O procedimento utilizado na obtenção do composto (7) foi idêntico ao do composto (6). O reagente utilizado foi 4-metilbenzilamina (137,5  $\mu\text{l}$ , 1,08 mmol) e obteve-se o produto final em forma de óleo (181 mg). Após coluna cromatográfica (éter de petróleo – acetato de etilo) foi obtido na forma de espuma branca (140,3 mg, 77,5%). RMN:  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.13 (s, 4H), 6,07 (t,  $J = 4.9$  Hz, 1H), 5.45 (s, 1H), 5.18 (s, 1H), 4.67, 4.56 (AB quarteto,  $J = 14.2$  Hz, 2H), 4.31 (ddd,  $J = 4.27, 5.9$  e  $14.42$  Hz, 2H), 3.93, 3.84 (AB quarteto,  $J = 10.6$  Hz, 2H), 2.34 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.14 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 1.00 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.84 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H) 0.75 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  177.66, 171.25, 170.79, 150.94, 140.71, 137.11, 135.29, 132.01, 129.35 (2C), 127.91 (2C), 125.10, 72.31, 62.53, 58.04, 54.08, 50.53, 47.68, 46.32, 43.47, 43.14, 42.78, 41.15, 39.44, 39.04, 37.15, 33.55, 30.81, 28.06, 26.17, 24.76, 23.50, 21.19, 21.10, 20.97 (2C), 19.01, 18.58, 17.81, 17.26, 16.62; ESI-MS: 658.29 ( $[M + H]^+$ ).

#### 4.1.8 Composto (8)

O procedimento utilizado na obtenção do composto (8) foi idêntico ao do composto (6). O reagente utilizado foi o cloridrato do éster metílico da glicina (54,2 mg, 0,432 mmol) e obteve-se o produto final na forma de óleo (156,1 mg, 94,8%). Após purificação por coluna cromatográfica (éter de petróleo - acetato de etilo) o produto foi obtido na forma de espuma branca (107,4 mg, 68,8%). RMN:  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.5 (t,  $J = 4,27$  Hz, 1H), 5.44 (s, 1H), 5.38 (s, 1H), 4.69, 4.56 (AB quarteto,  $J = 14.33$  Hz, 2H), 4.12 – 4.06 (m, 1H), 3.93, 3.83 (AB quarteto,  $J = 10.7$  Hz, 2H), 3.86 – 3.81 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.15 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.88 (d,  $J = 6.35$  Hz, 3H), 0.77 (s, 3H);

$^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  178.10, 171.25, 170.74, 170.60, 151.03, 139.99, 131.95, 125.71, 72.30, 62.49, 58.00, 53.77, 52.32, 50.55, 47.70, 46.31, 43.18, 42.64, 41.57, 41.16, 39.41, 38.98, 36.89, 33.49, 30.77, 28.00, 26.30, 24.82, 23.57, 21.20, 20.99, 20.97, 19.07, 18.07, 17.81, 17.26, 16.61; ESI-MS: 626.27 ( $[M + H]^+$ ).

#### 4.1.9 Composto (9)

O procedimento utilizado na obtenção do composto (9) foi idêntico ao do composto (6). O reagente utilizado foi o cloridrato do éster metílico de L-alanina (60,3 mg, 0,432 mmol) e obteve-se o produto final na forma de óleo (144 mg, 85,5%) Após purificação por coluna cromatográfica (éter de petróleo - acetato de etilo) o produto foi obtido na forma de espuma branca (100,8 mg, 70%). RMN:  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.58 (d,  $J = 5.75$  Hz, 1H), 5.43 (s, 1H), 5.36 (s, 1H), 4.69, 4.57 (AB quarteto,  $J = 14.25$  Hz, 2H), 4.50 – 4.42 (m, 1H), 3.92, 3.83 (AB quarteto,  $J = 10.58$  Hz, 2H), 3.73 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.36 (d,  $J = 7.04$  Hz, 3H), 1.15 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.88 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H), 0.75 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  177.30, 173.73, 171.25, 170.74, 151.15, 139.30, 131.75, 125.86, 72.31, 62.50, 57.99, 53.66, 52.38, 50.58, 48.18, 47.61, 46.29, 43.18, 42.62, 41.23, 39.37, 38.99, 37.25, 33.64, 30.80, 28.04, 26.28, 24.63, 23.56, 21.19, 20.98 (2C), 19.03, 18.73, 18.14, 17.81, 17.24, 16.60; ESI-MS: 640.2 ( $[M + H]^+$ ).

## Bibliografia

- [1] LEWIS N. MANDER, **Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology, Volume 10**. Elsevier Science & Technology, 2010. p. 210, ISBN 0080453813, 9780080453811
- [2] CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. **Chemical reviews**, v. 109, n. 7, p. 3012–43, jul. 2009.
- [3] KINGSTON, D. G. I. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 3, p. 496–511, 25 mar. 2011.
- [4] SCHWARTSMANN, G. et al. Marine organisms as a source of new anticancer agents. **The Lancet Oncology**, v. 2, n. 4, p. 221–5, abr. 2001.
- [5] MAYER, A. M. S. et al. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. **Trends in pharmacological sciences**, v. 31, n. 6, p. 255–65, jun. 2010.
- [6] WERMUTH, C. **The practice of medicinal chemistry**. Third ed., p. 942, ISBN 978-0-12-374194-3
- [7] NICOLAOU, K. The art and science of constructing the molecules of nature. **PNAS**, v. 101, n. 33, p. 11928, 2004.
- [8] SMITH, A. B.; FREEZE, B. S. (+)-Discodermolide: Total Synthesis, Construction of Novel Analogues, and Biological Evaluation. **Tetrahedron**, v. 64, n. 2, p. 261–298, 7 jan. 2008.
- [9] VALDIR CECHINEL-FILHO. **Plant Bioactives and Drug Discovery: Principles, Practice and Perspectives**. Wiley, p. 592
- [10] DRAHL, C. Chemists Find Efficient Route To Plant-Derived Compound Ingenol. **Chemical & Engineering News**, v. 91, n. 31, p. 7, 2013. Disponível na Internet: <http://cen.acs.org/articles/91/i31/Chemists-Find-Efficient-Route-Plant.html>
- [11] JEFFREY D. WINKLER, MEAGAN B. ROUSE, MICHAEL F. GREANEY, S. J. H. AND Y. T. J. The First Total Synthesis of (±)-Ingenol. **Journal of American Chemical Society**, v. 124, n. 33, p. 9726 – 9728, 2002.
- [12] LARS JØRGENSEN, STEVEN J. MCKERRALL, CHRISTIAN A. KUTTRUFF, FELIX UNGEHEUER, JAKOB FELDING, P. S. B. 14-Step Synthesis of (+)-Ingenol from (+)-3-Carene. **Science New York NY**, v. 878, 2013.
- [13] CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 1, p. 52–60, jan. 1997.
- [14] NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 1022–37, jul. 2003.
- [15] BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 12, p. 2141–53, dez. 2004.
- [16] PROUDFOOT, J. R. Drugs, leads, and drug-likeness: an analysis of some recently launched drugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, n. 12, p. 1647–50, 17 jun. 2002.
- [17] NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461–77, mar. 2007.
- [18] RISHTON, G. M. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. **The American Journal of Cardiology**, v. 101, n. 10A, p. 43D–49D, 22 maio. 2008.
- [19] HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19-20, p. 894–901, out. 2008.
- [20] JAMES, J. T.; DUBERY, I. A. Pentacyclic triterpenoids from the medicinal herb, *Centella asiatica* (L.) Urban. **Molecules**, v. 14, n. 10, p. 3922–41, jan. 2009.

- [21] PATOCKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 1, p. 7–12, 2003.
- [22] LESELLIER, E. et al. Fast separation of triterpenoids by supercritical fluid chromatography/evaporative light scattering detector. **Journal of Chromatography A**, v. 1268, p. 157–165, dez. 2012.
- [23] 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. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 3, p. 543–93, mar. 2011.
- [24] E SILVA, M. D. L. et al. Bioactive oleanane, lupane and ursane triterpene acid derivatives. **Molecules**, v. 17, n. 10, p. 12197–205, jan. 2012.
- [25] SALVADOR, J. A R. et al. Ursane-type pentacyclic triterpenoids as useful platforms to discover anticancer drugs. **Natural Product Reports**, v. 29, n. 12, p. 1463–79, dez. 2012.
- [26] BRINKHAUS, B. et al. Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant *Centella asiatica*. **Phytomedicine**, v. 7, n. 5, p. 427–448, out. 2000.
- [27] GOHIL, K. J.; PATEL, J. A.; GAJJAR, A. K. Pharmacological Review on *Centella asiatica*: A Potential Herbal Cure-all. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 72, n. 5, p. 546–56, set. 2010.
- [28] KIM, S. R. et al. Asiatic acid derivatives enhance cognitive performance partly by improving acetylcholine synthesis. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 10, p. 1275–82, out. 2004.
- [29] KRISHNAMURTHY, R. G. et al. Asiatic acid, a pentacyclic triterpene from *Centella asiatica*, is neuroprotective in a mouse model of focal cerebral ischemia. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, n. 11, p. 2541–50, 15 ago. 2009.
- [30] LEE, K. Y. et al. Asiatic acid attenuates infarct volume, mitochondrial dysfunction, and matrix metalloproteinase-9 induction after focal cerebral ischemia. **Stroke**, v. 43, n. 6, p. 1632–8, 1 jun. 2012.
- [31] ZHANG, X. et al. Asiatic acid protects primary neurons against C2-ceramide-induced apoptosis. **European Journal of Pharmacology**, v. 679, p. 51–9, 15 mar. 2012.
- [32] GAO, J. et al. Hepatoprotective activity of *Terminalia catappa* L. leaves and its two triterpenoids. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 11, p. 1449–55, nov. 2004.
- [33] MA, K. et al. Protective effects of asiatic acid against D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity in hepatocytes and kupffer cells co-cultured system via redox-regulated leukotriene C4 synthase expression pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 603, p. 98–107, 28 jan. 2009.
- [34] LIU, J. et al. Asiatic acid preserves beta cell mass and mitigates hyperglycemia in streptozocin- • induced diabetic rats. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, n. 26, p. 448–454, 2010.
- [35] RAMACHANDRAN, V.; SARAVANAN, R. Efficacy of asiatic acid, a pentacyclic triterpene on attenuating the key enzymes activities of carbohydrate metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. **Phytomedicine**, v. 20, p. 230–236, 2013.
- [36] KAVITHA, C. V et al. Asiatic acid inhibits pro-angiogenic effects of VEGF and human gliomas in endothelial cell culture models. **PloS One**, v. 6, n. 8, p. e22745, jan. 2011.
- [37] XIONG, Y. et al. Protective effects of asiatic acid on rotenone- or H2O2-induced injury in SH-SY5Y cells. **Neurochemical Research**, v. 34, n. 4, p. 746–54, abr. 2009.
- [38] GURFINKEL, D. M. et al. Disruption of the endoplasmic reticulum and increases in cytoplasmic calcium are early events in cell death induced by the natural triterpenoid Asiatic acid. **Apoptosis**, v. 11, n. 9, p. 1463–71, set. 2006.
- [39] MENG, Y. et al. Synthesis and antitumor activity evaluation of new asiatic acid derivatives. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 14, n. 9, p. 844–855, 2012.
- [40] PARK, B. C. et al. Asiatic acid induces apoptosis in SK-MEL-2 human melanoma cells. **Cancer Letters**, v. 218, n. 1, p. 81–90, 31 jan. 2005.

- [41] HSU, Y. et al. Asiatic acid, a triterpene, induces apoptosis and cell cycle arrest through activation of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in human breast cancer cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 313, n. 1, p. 333–344, 2005.
- [42] LEE, Y. S. et al. Asiatic acid, a triterpene, induces apoptosis through intracellular Ca<sup>2+</sup>-release and enhanced expression of p53 in HepG2 human hepatoma cells. **Cancer Letters**, v. 186, n. 1, p. 83–91, 1 dez. 2002.
- [43] SOMBOONWONG, J. Wound healing activities of different extracts of *Centella asiatica* in incision and burn wound models: an experimental animal study. **BMC Complementary & Alternative Medicine**, v. 12, n. 103, p. 1–7, 2012.
- [44] AGUIRRE, M. C. et al. Topical anti-inflammatory activity of 2 $\alpha$ -hydroxy pentacyclic triterpene acids from the leaves of *Ugni molinae*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 16, p. 5673–7, 15 ago. 2006.
- [45] JEW, S. S. et al. Structure-activity relationship study of asiatic acid derivatives against beta amyloid (A $\beta$ )-induced neurotoxicity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, n. 2, p. 119–21, 17 jan. 2000.
- [46] JEW, S. S. et al. Asiatic acid derivatives having modified A-ring, **US Patent US006071898A**, 1998.
- [47] JEW, S. et al. Asiatic acid derivatives its manufacturing method and dermatological agent containing it, **US Patent US005834437A**, 1998.
- [48] ZHANG, L. et al. Synthesis and biological evaluation of asiatic acid derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylases. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, n. 6, p. 864–74, jun. 2009.
- [49] ZHAO, L. et al. Modification of C11, C28, C2, 3, 23 or C2, 23, 28 functional groups on asiatic acid and evaluation of hepatoprotective effects. **Bull. Korean Chem. Soc.**, v. 28, n. 6, p. 970–976, 2007.
- [50] JEONG, B.-S. et al. Modification of C2 functional group on asiatic acid and the evaluation of hepatoprotective effects. **Archives of Pharmacal Research**, v. 30, n. 3, p. 282–9, mar. 2007.
- [51] JEONG, B.; KIM, Y.; LEE, E. Modification of C2, 3, 23, 28 functional groups on asiatic acid and evaluation of hepatoprotective effects. **Bull. Korean Chem. Soc.**, v. 28, n. 6, p. 977–982, 2007.
- [52] SANDJO, L. P. et al. Cytotoxicity of semisynthetic acetal triterpenes from one-pot vicinal diol cleavage following by lactolization: Reaction promoted by NaIO(4)/SiO(2) gel in THF. **Natural Product Research**, p. 1–8, 23 maio. 2012.
- [53] CHO, B. T. et al. Solvent-free reduction of aldehydes and ketones using solid acid-activated sodium borohydride. **Tetrahedron**, v. 62, n. 34, p. 8164–8168, ago. 2006.
- [54] SHIM, P. et al. Asiaticoside mimetics as wound healing agent. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 6, n. 24, p. 2937–2940, 1996.
- [55] PAVIA, D. L. **Introduction to spectroscopy**. Cengage Learning, 2009. third edit
- [56] VALEUR, E.; BRADLEY, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 606–31, fev. 2009.
- [57] MONTALBETTI, C. A. G. N.; FALQUE, V. Amide bond formation and peptide coupling. **Tetrahedron**, v. 61, n. 46, p. 10827–10852, nov. 2005.
- [58] DOLBIER, W. **Guide to fluorine NMR for organic chemists**. John Wiley & Sons, Inc., 2009. p. 256. ISBN 978-0-470-19341-9
- [59] LAL, G.; PEZ, G. Bis (2-methoxyethyl) aminosulfur trifluoride: a new broad-spectrum deoxofluorinating agent with enhanced thermal stability. **Journal of Organic Chemistry**, v. 64, p. 7048–7054, 1999.
- [60] WHITE, J.; TUNOORI, A. sulfur trifluoride, the Deoxo-Fluor reagent: Application toward one-flask transformations of carboxylic acids to amides. **Journal of Organic Chemistry**, n. 69, p. 2573–2576, 2004.

- [61] HUGENBERG, V.; HAUFE, G. Fluoro-Pummerer rearrangement and analogous reactions. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 143, p. 238–262, nov. 2012.
- [62] RAJENDRA P. SINGH, J. M. S. Recent advances in nucleophilic fluorination reactions of organic compounds using dioxofluor and DAST. **Synthesis**, n. 17, p. 2561–2578, 2002.