



UNIVERSIDADE D
COIMBRA



Andreia Filipa de Oliveira Gonçalves

PREPARAÇÃO DE DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DO
TIPO DITERPENÓ

Dissertação no âmbito do Mestrado de Química Farmacêutica Industrial
orientada pelo Professor Doutor Jorge António Ribeiro Salvador e
co-orientada pela Doutora Vanessa Isabel da Silva Mendes e
apresentada à Faculdade de Farmácia.

Fevereiro de 2019



UNIVERSIDADE D
COIMBRA



Andreia Filipa de Oliveira Gonçalves

**PREPARAÇÃO DE DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DO
TIPO DITERPENO**

Dissertação no âmbito do Mestrado de Química Farmacêutica Industrial orientada pelo Professor Doutor Jorge António Ribeiro Salvador e co-orientada pela Doutora Vanessa Isabel da Silva Mendes e apresentada à Faculdade de Farmácia.

Fevereiro de 2019

Agradecimentos

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

Primeiramente, agradeço ao Professor Doutor Jorge António Ribeiro Salvador, orientador deste trabalho, por me ter acolhido no Laboratório de Química Farmacêutica e ter proporcionando as condições necessárias à realização deste trabalho, pelos ensinamentos, preciosos conselhos e pela revisão desta dissertação.

À minha coorientadora, a Doutora Vanessa Mendes, pelos ensinamentos e preciosos conselhos, por toda a ajuda dada ao longo desta etapa e pela correção desta dissertação.

A todos os docentes e funcionários do Laboratório de Química Farmacêutica e da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, agradeço todo o apoio prestado e por toda a convivência. À Dona Graça pela boa disposição e por toda a ajuda disponibilizada.

Aos meus colegas de laboratório, obrigado pela amizade e apoio demonstrado durante a realização deste trabalho. Ao Bruno, agradeço pelos conhecimentos e conselhos transmitidos e por me ter recebido tão bem no laboratório. À Salete, por toda a preocupação e carinho demonstrado e pela ajuda dada ao longo deste processo.

Por fim, agradeço em especial àqueles que sempre me apoiaram incondicionalmente. A todos os meus amigos, o meu sincero obrigado por todos os momentos de apoio e incentivo. Ao Telmo, por todo carinho dado, por estar sempre aqui para me apoiar e fazer sorrir. Aos meus pais e irmãos, as pessoas que mais admiro neste mundo, pelo amor dado, por serem o meu porto de abrigo, por acreditarem em mim e me terem proporcionado esta oportunidade.

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

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	iv
Abstract	v
Índice de figuras	vi
Índice de esquemas	viii
Índice de tabelas	ix
Lista de abreviaturas	x
1. Introdução	2
1.1 Cancro.....	3
1.2 Produtos naturais	5
1.2.1 História dos produtos naturais	5
1.2.2 Descoberta e desenvolvimento de fármacos.....	6
1.3 Terpenos e terpenóides	8
1.3.1 Biossíntese dos terpenos.....	9
1.4 Diterpenóides	13
1.4.1 Classificação e biossíntese.....	15
1.5 Abietanos	17
1.5.1 Biossíntese	17
1.5.2 Abietanos aromáticos	18
1.6 Ácido carnósico.....	19
1.6.1 Bioatividade	20
1.6.2 Derivados semissintéticos do ácido carnósico	22
2. Objetivos	26
3. Síntese química e elucidação estrutural	29
3.1 Conceitos gerais	29

3.2 Elucidação estrutural do ácido carnósico.....	31
3.3 Preparação e elucidação estrutural de derivados do ácido carnósico.....	34
3.3.1 Derivados da esterificação.....	35
3.3.2 Derivados da lactonização.....	49
4. Conclusão.....	58
5. Parte experimental.....	61
5.1 Equipamento laboratorial.....	61
5.2 Solventes e reagentes.....	61
5.3 Procedimentos experimentais.....	62
5.3.1 Composto 1.....	62
5.3.2 Composto 2.....	63
5.3.3 Composto 3.....	64
5.3.4 Composto 4.....	65
5.3.5 Composto 5.....	66
6. Bibliografia.....	67

Resumo

Desde da antiguidade, a humanidade tem usado os produtos naturais para o tratamento de diversas doenças. Atualmente, os produtos naturais ainda apresentam um papel importante na investigação e desenvolvimento farmacêutico, existindo na prática clínica vários fármacos que tiveram origem em produtos naturais.

Os diterpenóides são uma classe de produtos naturais com atividades biológicas ativas, encontrados em alguns seres vivos. Ao longo dos últimos anos, inúmeros estudos têm registado os diversos efeitos terapêuticos dos diterpenóides extraídos das plantas. Estes compostos apresentam atividades biológicas muito diversificadas, tais como, atividade anti-tumoral e citotóxica, anti-inflamatória, anti-infeciosa (antimicrobiana, antiviral, antifúngica, antiparasitária) e antioxidante, entre outras. Por este motivo, esta classe de compostos tem sido alvo de um grande interesse científico.

Com o intuito de melhorar a ação biológica dos diterpenóides, a comunidade científica têm vindo a recorrer a estratégias de síntese e/ou semissíntese de novos derivados diterpenóides, com vista a melhorar a sua relação estrutura-atividade (REA).

O ácido carnósico é um diterpenóide tetracíclico aromático da família abietano, que pode ser encontrado na *Salvia officinalis* e no *Rosmarinus officinalis*. Estudos recentes evidenciam o potencial terapêutico não só do ácido carnósico, como também de alguns dos seus derivados semi-sintéticos, no tratamento de várias patologias como o cancro.

No presente trabalho procedeu-se à preparação de derivados semi-sintéticos do ácido carnósico e posterior elucidação estrutural através da análise espectral de ressonância magnética nuclear.

Palavras-chaves: Produtos Naturais, Diterpenóides, Ácido Carnósico, Derivados Semissintéticos, Ressonância Magnética Nuclear.

Abstract

Since antiquity, humanity has used natural products for the treatment of various diseases. Natural products still have an important role in pharmaceutical research and development, with several natural product-derived drugs derived being still used in clinical practice.

Diterpenoids are a class of natural products with different biological activities that can be found in some living beings. Over the last few years, several studies have shown the different therapeutic effects of diterpenoids extracted from plants. These compounds have shown diverse biological activities, such as, antitumor and cytotoxic, anti-inflammatory, anti-infective (antimicrobial, antiviral, antifungal, antiparasitic), and antioxidant, among others activities. Due to this array of activities, this class of compounds has attracted a great deal of interest among the scientific community.

In order to improve the biological activity of diterpenoids, the scientific community has used synthesis and / or semi-synthesis strategies to prepare new diterpenoid derivatives, with the aim of improving their structure-activity relationship (SAR).

Carnosic acid is a member of the aromatic tetracyclic diterpenoid of the abietane family that can be found in *Salvia officinalis* and *Rosmarinus officinalis*. Recent studies have shown the therapeutic potential of carnosic acid and some of its semi-synthetic derivatives, in the treatment of several diseases such as cancer.

In the present work, some semi-synthetic derivatives of carnosic acid were prepared and their chemical structure was elucidated by spectral analysis of nuclear magnetic resonance.

Keywords: Natural Products, Diterpenoids, Carnosic Acid, Semi-synthetic Derivatives, Nuclear Magnetic Resonance.

Índice de figuras

Figura 1: Taxa de mortalidade do cancro em todo o mundo durante 2018. Adaptado da literatura. (Bray <i>et al.</i> , 2018).....	4
Figura 2: Distribuição da Incidência dos 10 cancros mais comum em 2018 Adaptado da literatura (Bray <i>et al.</i> , 2018)	4
Figura 3: Estrutura química do Paclitaxel	5
Figura 4: Processo de investigação e desenvolvimento de fármacos de origem natural	7
Figura 5: Metabolitos Primários e Metabolitos Secundários	8
Figura 6: Esquema simplificado da síntese do IPP através da via AV. (Croteau, 2000; Dewick, 2002; Heras, las <i>et al.</i> , 2003)	10
Figura 7: Esquema simplificado da síntese do IPP através da via MEP. (Croteau, 2000; Dewick, 2002; Heras, las <i>et al.</i> , 2003)	10
Figura 8: Esquema simplificado da biossíntese dos Terpenóides. (Borges <i>et al.</i> , 2019; Croteau, 2000; Heras, las <i>et al.</i> , 2003)	12
Figura 9: Exemplos de terpenos segundo a sua classificação de número de carbonos e anéis. (Breitmaier, 2006; Croteau, 2000; Dewick, 2002; Yadava, Yadava e Goyalb, 2014).....	13
Figura 10: Ácido copálico e seus derivados semissintéticos. (Matos <i>et al.</i> , 2015)	15
Figura 11: Estrutura química do Docetaxel.....	15
Figura 12: Exemplos de famílias dos Diterpenóides. (Devappa, Makkar e Becker, 2011; Sousa, De, Sousa Teixeira e Jacometti Cardoso Furtado, 2018)	16
Figura 13: Ciclizações dos diterpenos (Dewick, 2002)	17
Figura 14: Biossíntese do precursor da família dos abietanos. (Breitmaier, 2006; Croteau, 2000)	18
Figure 15: Alguns exemplos de Abietanos que ocorrem na natureza. (González, 2013, 2014, 2015).....	19
Figura 16: Estrutura química do Ácido Carnósico	19
Figura 17: Diagrama esquemático da síntese química.....	30
Figura 18: Espectro ¹ H-RMN do ácido carnósico	32
Figura 19: Espectro ¹³ C-RMN do ácido carnósico	33
Figura 20: Espectro Dept-135 do ácido carnósico.....	34
Figura 21: Mecanismo simplificado da esterificação do grupo hidroxilo com anidrido acético e DMAP. (Dewick, 2006; Xu <i>et al.</i> , 2005)	36
Figura 22: Espectro ¹ H-RMN do composto 1	38
Figura 23: Espectro ¹³ C-RMN do composto 1	39

Figura 24: Espectro Dept-135 do Composto 1	40
Figura 25: Espectro de ¹ H-RMN do composto 2	41
Figura 26: Espectro ¹³ C-RMN do composto 2	42
Figura 27: Espectro Dept-135 do composto 2	43
Figura 28: Espectro de ¹ H-RMN do composto 3	45
Figura 29: Espectro ¹³ C-RMN do Composto 3	46
Figura 30: Ampliação do espectro ¹³ C-RMN do composto 3	46
Figura 31: Espectro Dept-135 do composto 3	47
Figure 32: Aproximação do espectro de Dept-135 a campo alto	48
Figure 33: Esquema simplificado da reação de esterificação intermolecular entre o ácido carboxílico e o grupo hidroxila usando DCC e DMAP. (Neises e Steglich, 1978; Siengalewicz, Mulzer e Rinner, 2014; Tsakos et al., 2014)	49
Figura 34: Espectro ¹ H-RMN do composto 4	51
Figura 35: Espectro ¹³ C-RMN do composto 4	52
Figura 36: Espectro Dept-135 do composto 4	53
Figura 37: Espectro ¹ H-RMN do composto 5	54
Figura 38: Espectro ¹³ C-RMN do composto 5	55
Figura 39: Espectro Dept-135 do composto 5	56
Figura 40: Estrutura química do composto 1	62
Figura 41: Estrutura química do composto 2	63
Figura 42: Estrutura química do composto 3	64
Figura 43: Estrutura química do composto 4	65
Figura 44: Estrutura química do composto 5	66

Índice de esquemas

Esquema 1: Derivado do ácido carnósico. Derivado 1 (Pertino <i>et al.</i> , 2010)	23
Esquema 2: Derivados do ácido carnósico. Derivados 2- 4 (Li <i>et al.</i> , 2018), derivados 5 e 6 (Pertino <i>et al.</i> , 2015) e derivado 7 (Aoyagi <i>et al.</i> , 2006).....	23
Esquema 3: Derivados do ácido carnósico. Derivado 8 (Liang <i>et al.</i> , 2018) e derivado 9-11 (Theoduloz <i>et al.</i> , 2011)	24
Esquema 4: Síntese dos derivados semissintéticos propostos	35
Esquema 5: Reagentes e condições: Anidrido Acético, DMAP, THF seco, à temperatura ambiente.....	37
Esquema 6: Reagentes e condições: Anidrido Butírico, DMAP, THF seco, temperatura ambiente.....	41
Esquema 7: Reagentes e condições: Cloreto de cinamoílo, DMAP, tolueno seco, 60°C, atmosfera de N ₂	44
Esquema 8: Reagentes e Condições: DCC, DMAP em CH ₂ Cl ₂ seco, à temperatura ambiente	50
Esquema 9: Reagentes e condições: Cloreto de furoílo, DMAP, tolueno seco, 60°C, atmosfera N ₂	54

Índice de tabelas

Tabela 1: Algumas das propriedades do ácido carnósico	21
Tabela 2: Comparação do número de carbonos entre o Ácido carnósico e o Composto 1	40
Tabela 3: Comparação do número de carbonos entre o Ácido carnósico e o Composto 2	43
Tabela 4: Comparação do número de carbonos entre o Ácido carnósico e o Composto 3	48
Tabela 5: Comparação dos números de carbonos entre o Ácido carnósico e o Composto 4...	53
Tabela 6: Comparação dos números de carbonos entre o Composto 4 e o Composto 5	56

Lista de abreviaturas

¹³C-RMN: espectro de ressonância magnética nuclear de carbono-13

¹H-RMN: espectro de ressonância magnética nuclear de próton

AC: ácido carnósico

Acetil-CoA: acetil coenzima A

Acetoacetil-CoA: acetoacetil coenzima A

AM: ácido Mevalónico

CC: cromatografia em coluna

CCF: cromatografia em camada fina

CDCl₃: clorofórmio deuterado

d: dubleto

DCC: diciclohexilcarbodiimida

Dept: intensificação da distorção por transferência de polarização (“Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer”)

DMAP: 4-demetilaminopiridina

DMAPP: demetilalilo pirofosfato

HIV-1: vírus da imunodeficiência humana-1

IPP: isopentenil pirofosfato

J: constante de acoplamento

MEP: metileritritol-4-fosfato

OMS: Organização Mundial de Saúde

OPP: oxigênio pirofosfato

PPG: pirofosfato de geranilo

PPF: pirofosfato de farnesilo

PPGF: pirofosfato de gernilfarnesilo

PPGG: pirofosfato de gernilgeranilo

ppm: partes por milhão

RMN: ressonância magnética nuclear

s: singleto

THF: tetrahidrofurano

δ: desvio

Introdução

1. Introdução

1.1 Cancro

1.2 Produtos naturais

1.3 Terpenos e terpenóides

1.4 Diterpenóides

1.5 Abietanos

1.6 Ácido carnósico

1.1 Cancro

O cancro é um termo genérico para definir um conjunto de doenças com mecanismos patológicos complexos que envolvem o crescimento celular anormal, devido a alterações no genoma celular. (Akaberi, Mehri e Iranshahi, 2015; Biersack, 2016; Jacob *et al.*, 2017; Kastan e Bartek, 2004; Society, 2018; Yuan e Kaplowitz, 2011)

A interação de vários fatores de risco, não só internos, tais como genéticos e o envelhecimento; como também externos, como tabagismo, obesidade, maus hábitos alimentares, infeções, radiação ultravioleta e ionizante, entre outros, induzem alterações no processo de regulação do crescimento da célula. Estas alterações dão origem a células cancerígenas com capacidades distintas e complementares, como proliferação descontrolada e poder de invasão, levando à formação de tumores, com potencial de disseminação metastática. (Anand *et al.*, 2008; Jacob *et al.*, 2017; Kastan e Bartek, 2004; Society, 2018; Yuan e Kaplowitz, 2011)

O cancro é uma das principais causas de morte em todo o mundo. O Observatório Global do Cancro (GLOBOCAN) estima que no ano de 2018, esta patologia foi responsável por cerca de 9,6 milhões de mortes em todo o mundo (Fig. 1) e que este número tende a aumentar com o passar dos anos. Esta realidade demonstra a urgência existente pela procura de novas alternativas terapêuticas capazes de melhorar a eficácia do tratamento, diminuir a toxicidade induzida nas células normais, bem como prevenir esta doença. (Anand *et al.*, 2008; Bray *et al.*, 2018; International Agency for Research on Cancer (IARC), 2018; Siegel, Miller e Jemal, 2018; Society, 2018)

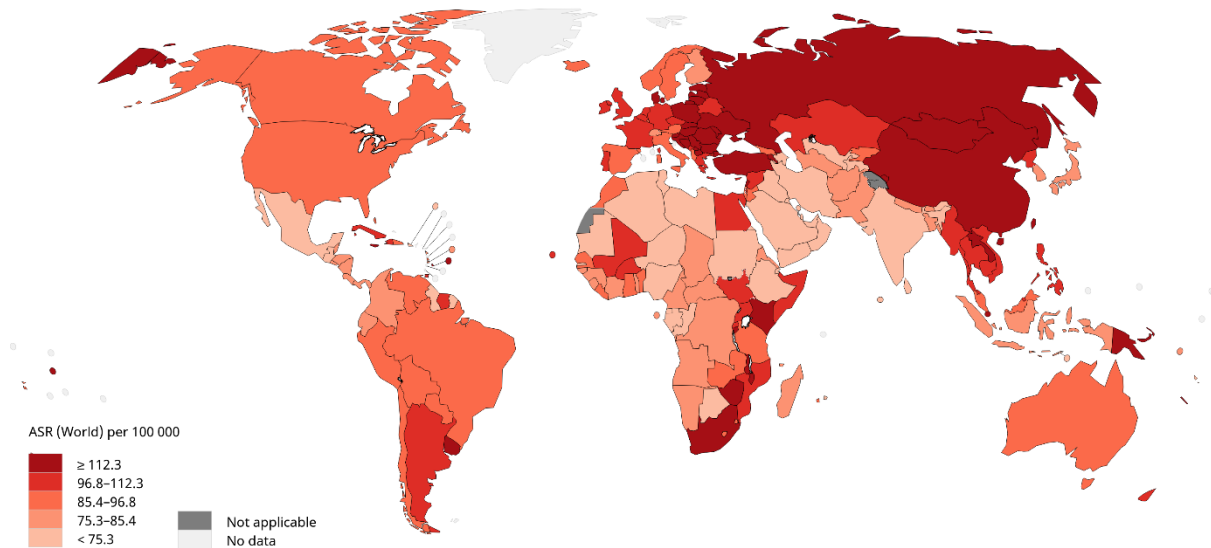


Figura 1: Taxa de mortalidade do cancro em todo o mundo durante 2018. Adaptado da literatura. (Bray *et al.*, 2018)

A incidência do tipo de cancro no ser humano é diferente entre sexos. O cancro da mama apresenta maior incidência entre as mulheres, enquanto nos homens o maior número de casos registados é representado pelo cancro do pulmão (Fig. 2). (Bray *et al.*, 2018)

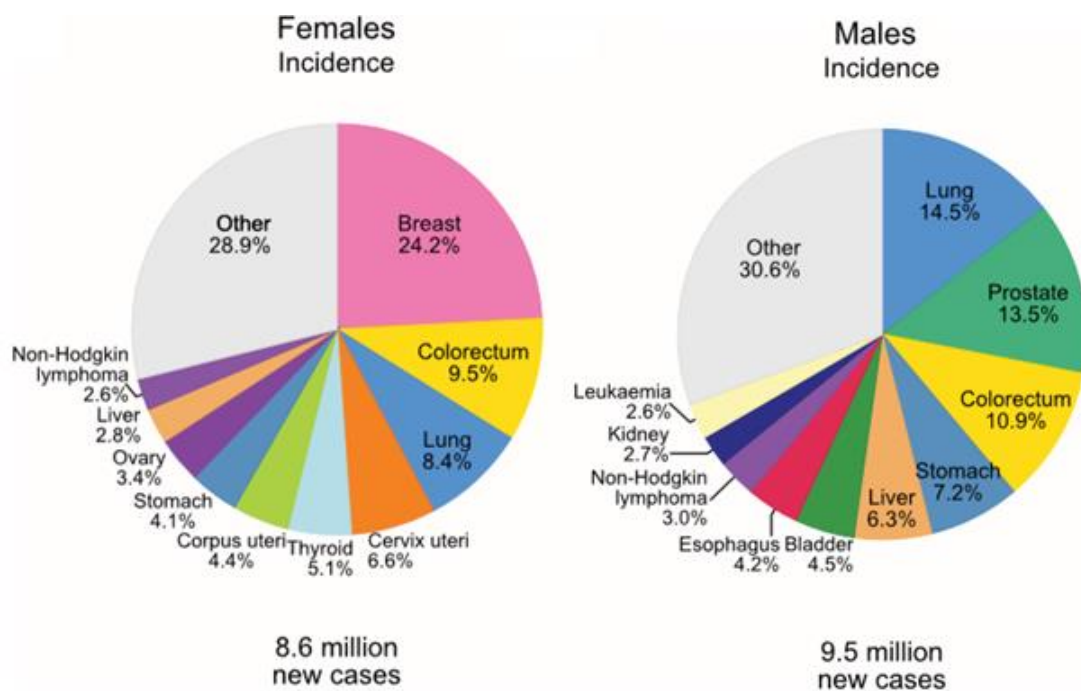


Figura 2: Distribuição da Incidência dos 10 cancros mais comum em 2018 Adaptado da literatura (Bray *et al.*, 2018)

1.2 Produtos naturais

1.2.1 História dos produtos naturais

Historicamente, a humanidade tem usado os compostos naturais para o tratamento de diversas doenças. Textos antigos atestam a sabedoria que foi adquirida e transmitida através de gerações sobre os efeitos benéficos dos mesmos. Como fontes de produtos de saúde, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 65% da população mundial continua a depender dos produtos naturais para os seus cuidados de saúde primários. Por este motivo, estes compostos continuam a atrair a atenção da comunidade científica, pois apresentam uma grande variedade de bioatividades e biodiversidades, possuindo um papel importante na investigação farmacêutica para o desenvolvimento de novos fármacos. (Andrade *et al.*, 2018; Cordell, 2000; Cragg e Newman, 2013; Cragg M., Grothaus G. e Newman j., 2009; Dias, Urban e Roessner, 2012; Fabricant e Farnsworth, 2001; Ji, Li e Zhang, 2009; Lahlou, 2013; McChesney, Venkataraman e Henri, 2007; Salminen *et al.*, 2008)

Na prática, a exploração dos constituintes ativos dos produtos naturais para uso clínico, resultou no isolamento de compostos ativos que ainda hoje são usados na terapêutica moderna, como é o caso do Paclitaxel (Fig.3). O Paclitaxel, também conhecido como Taxol[®], é um diterpeno da família dos taxanos que apresenta um efeito citotóxico através da destabilização dos microtúbulos durante a divisão celular. (Akaberi, Mehri e Iranshahi, 2015; Biersack, 2016; Cooper e Nicola, 2015; Cragg e Newman, 2013; Cragg M., Grothaus G. e Newman j., 2009; Salminen *et al.*, 2008)

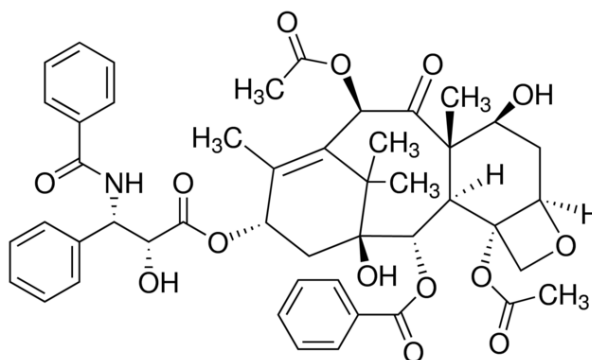


Figura 3: Estrutura química do Paclitaxel

1.2.2 Descoberta e desenvolvimento de fármacos

O desenvolvimento de qualquer fármaco, seja ele de origem natural ou sintética, não é uma tarefa fácil, estando envolvidas várias fases de investigação e desenvolvimento até que o fármaco seja comercializado. (McChesney, Venkataraman e Henri, 2007)

De uma forma bastante simplificada, o desenvolvimento de fármacos a partir dos compostos naturais ocorre da seguinte forma (Fig. 4): inicialmente, existe um *screening* de vários extratos de produtos naturais para uma determinada atividade biológica. Se os extratos demonstrarem ação na atividade pretendida, procede-se ao isolamento e purificação dos seus compostos, que após uma nova análise sobre o seu papel na atividade biológica, é possível identificar os potenciais *Hits*. Os potenciais *Hits* por sua vez são selecionados devido à sua capacidade de interagir com o alvo terapêutico. No processo de passagem de um *Hit* a *Lead*, os *Hits* são modificados estruturalmente, permitindo desta forma otimizar as propriedades biológicas e farmacocinéticas dos mesmos. Após o processo de otimização dos *Hits*, os promissores *Leads* são sujeitos a uma avaliação de atividade, seletividade e toxicidade através de ensaios *in vitro* e *in vivo*. Posteriormente também são avaliados critérios de originalidade e patenteabilidade. Depois desta avaliação prossegue-se para os ensaios clínicos de fase I, II e III de forma a comprovar a eficácia e segurança dos compostos em humanos. A fase seguinte depois de cumprir os regulamentos padrão de submissão de um pedido de comercialização às autoridades competentes do medicamento é a comercialização do composto eficaz e o acompanhamento do mesmo através de ensaios clínicos de fase IV de forma a comprovar a sua eficácia e estudar os efeitos colaterais. (Andrade *et al.*, 2018; Cordell, 2000; Cragg e Newman, 2013; Devappa, Makkar e Becker, 2011; Galli e Faller, 2003; Harvey, 2008; Koehn e Carter, 2005; Lahlou, 2007, 2013; Lam, 2007; McChesney, Venkataraman e Henri, 2007; Newman, Cragg e Kingston, 2015; Wermuth, 2008)

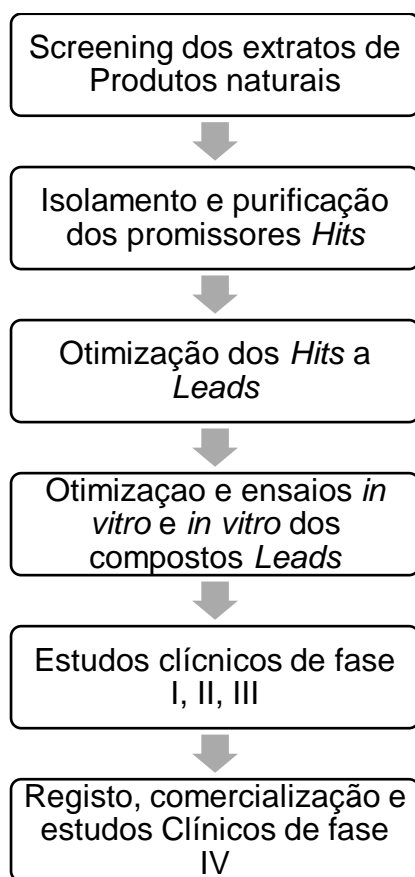


Figura 4: Processo de investigação e desenvolvimento de fármacos de origem natural

Contudo, o desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais pode apresentar diversas dificuldades, nomeadamente em relação à disponibilidade comercial, complexidade estrutural dos compostos, e ao do facto das características de potência, seletividade e farmacocinética não estarem otimizadas para a clínica. Deste modo, o desenvolvimento deste tipo de fármacos depende de uma colaboração interdisciplinar de várias áreas da ciência, para tornar possível o isolamento e elucidação estrutural de *Hit/Leads* naturais, o desenvolvimento de novas vias sintéticas e semissintéticas que possibilitem o aumento da escala sustentável, a realização de estudos de relação estrutura-atividade, a otimização e aumento do potencial clínico do composto e, por fim a sua avaliação clínica. (Andrade *et al.*, 2018; Cheuka *et al.*, 2017; Cragg e Newman, 2013; Cragg M., Grothaus G. e Newman j., 2009; McChesney, Venkataraman e Henri, 2007)

Os objetivos anteriormente referidos podem ser conseguidos através da síntese química, uma estratégia que replica as moléculas naturais num ambiente laboratorial. A síntese química pode ser dividida em síntese total ou em síntese parcial dos compostos. A síntese total consiste na replicação das moléculas naturais a partir de moléculas comerciais mais simples, ou derivados, permitindo o desenvolvimento de produtos naturais complexos de forma mais

eficiente. A síntese parcial de produtos naturais consiste na modificação estrutural de compostos intermediários, por métodos químicos ou enzimáticos, tendo como objetivo o desenvolvimento de compostos análogos. (Cragg e Newman, 2013; Cragg M., Grothaus G. e Newman j., 2009; Lahlou, 2013)

1.3 Terpenos e terpenóides

Os produtos naturais podem ser definidos como compostos orgânicos isolados de organismos vivos como plantas, animais e micro-organismos, que possuem atividades biológicas essenciais para os mesmos. Dos compostos anteriormente referidos, os derivados das plantas são os que assumem um papel mais importante no desenvolvimento de novos fármacos. (Cooper e Nicola, 2015; Devappa, Makkar e Becker, 2011; Dewick, 2002; Ignatius Enodiana *et al.*, 2016)

As plantas sintetizam uma enorme variedade de compostos que podem ser divididos em metabolitos primários, como carboidratos, lípidos, ácidos nucleicos, entre outros, que estão envolvidos em funções de crescimento, desenvolvimento, fotossíntese e reprodução; ou em metabolitos secundários, como compostos fenólicos, alcaloides ou terpenos, que estão envolvidos em funções ecológicas entre as plantas e o meio (Fig. 5). (Cooper e Nicola, 2015; Devappa, Makkar e Becker, 2011; Ignatius Enodiana *et al.*, 2016)

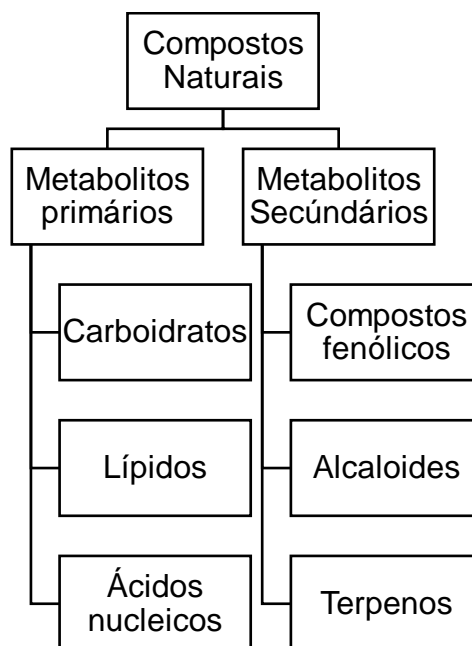


Figura 5: Metabolitos Primários e Metabolitos Secundários

Os terpenos constituem a maior e mais diversificada classe de metabolitos secundários, exercendo um controle metabólico e mediando interações entre espécies, tendo funções vitais em organismos como bactérias, leveduras, fungos, plantas e animais. (Cooper e Nicola, 2015; Croteau, 2000; Heras, las *et al.*, 2003; Ignatius Enodiana *et al.*, 2016; Salminen *et al.*, 2008)

O termo “terpeno” foi originalmente empregue para descrever uma mistura de hidrocarbonetos isoméricos naturais que ocorrem nos óleos essenciais obtidos da seiva e tecidos das plantas e árvores. Já o termo “terpenóides” é usado para descrever compostos hidrocarbonetos com fórmula geral de $(C_5H_8)_n$, assim como seus derivados oxigenados. (Yadava, Yadava e Goyalb, 2014)

Os terpenóides possuem uma grande aplicabilidade comercial, distribuindo-se pelas mais variadas áreas como as dos corantes, colas, polímeros, agroquímicos e fármacos, entre outras, sendo por isso uma classe de metabolitos que têm despertado grande interesse. Além do referido, este grupo de compostos também se encontra a ser investigado pelas suas funções antibacterianas e antineoplásicas entre outras. (Devappa, Makkar e Becker, 2011; Gershenzon e Dudareva, 2007; Ignatius Enodiana *et al.*, 2016; Yadava, Yadava e Goyalb, 2014)

Os terpenóides são compostos solúveis em solventes orgânicos e geralmente insolúveis em água. Por norma, possuem uma ou mais ligações duplas e são facilmente oxidados. (Ignatius Enodiana *et al.*, 2016; Yadava, Yadava e Goyalb, 2014)

1.3.1 Biossíntese dos terpenos

A biossíntese dos terpenóides pode ocorrer através de duas vias: pela via do ácido mevalônico ou mevalonato (AM), ou pela via do metileritritol-4-fosfato (MEP). (Bohlmann, Meyer-Gauen e Croteau, 1998; Breitmaier, 2006; Croteau, 2000; Devappa, Makkar e Becker, 2011; Dewick, 2002; González, 2013; Heras, las *et al.*, 2003)

A via AM (Fig. 6), que ocorre no citoplasma dos eucariotas superiores e bactérias, tem por base o acoplamento de duas unidades de acetil-CoA para a formação de acetoacetil-CoA. Seguidamente o acetoacetil-CoA é acoplado e condensado através de uma reação aldol com outra unidade acetil-CoA para a formação do ácido mevalônico. O ácido mevalônico é fosforilado, descarboxilado e desidratado dando origem ao isopentenil pirofosfato (IPP) que pode ainda se converter no seu isómero demetilalilo pirofosfato (DMAPP), através de uma isomerização regulada pela IPP isomerase. (Croteau, 2000; Devappa, Makkar e Becker, 2011; Dewick, 2002; Heras, las *et al.*, 2003)

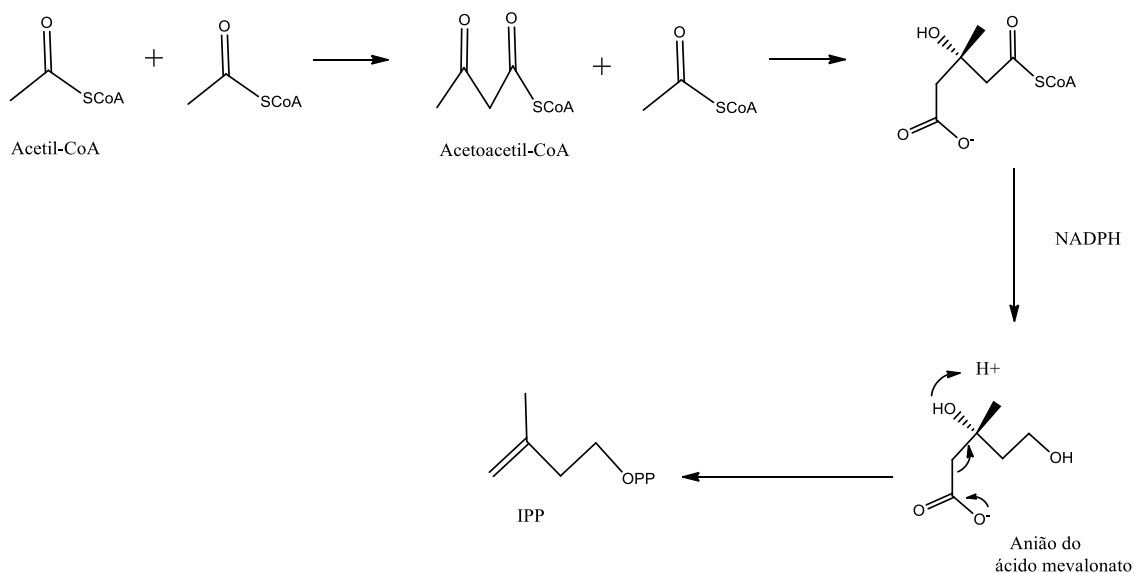


Figura 6: Esquema simplificado da síntese do IPP através da via AV. (Croteau, 2000; Dewick, 2002; Heras, las *et al.*, 2003)

A via MEP (Fig. 7), que ocorre nos cloroplastos das algas verdes e plantas superiores tem por base a condensação do gliceraldeído-3-fosfato e de dois átomos de piruvato, com formação do DMAPP, o qual pode ser convertido no seu isómero IPP. (Croteau, 2000; Devappa, Makkar e Becker, 2011; Dewick, 2002; Heras, las *et al.*, 2003)

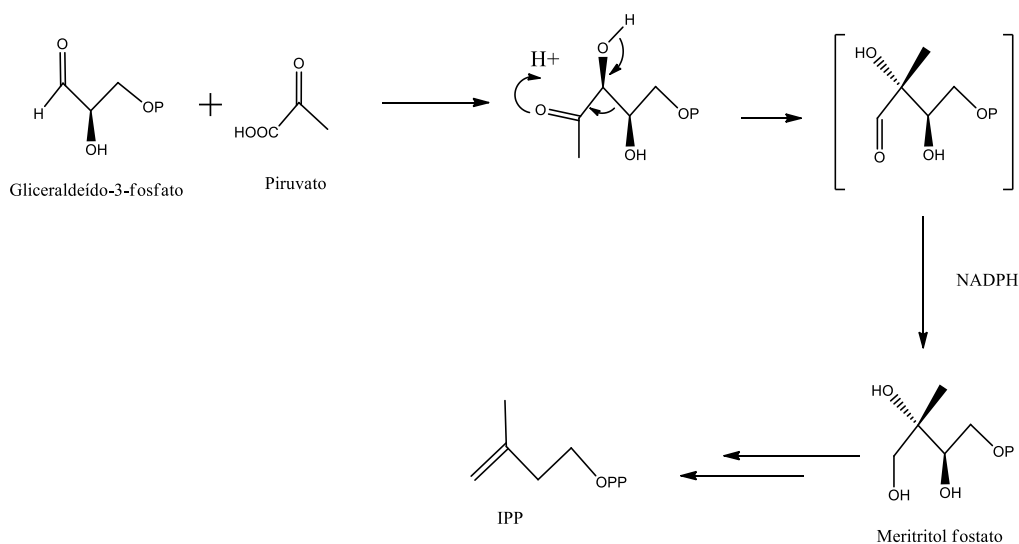


Figura 7: Esquema simplificado da síntese do IPP através da via MEP. (Croteau, 2000; Dewick, 2002; Heras, las *et al.*, 2003)

Em ambas as vias é possível obter os precursores dos terpenóides, o IPP e o DMAPP, que originam o isopreno (C₅H₈), precursor dos hemiterpenóides. O IPP e o DMAPP que possuem um bom grupo de saída, o oxigênio pirofosfato (OPP), sofrem uma protonação e

consequentemente ocorre a formação de um carbocatião alílico (Fig. 8). O carbocatião após uma dimerização e condensação “cabeça-cauda”, segundo a regra do isopreno, origina o pirofostato de geranilo (PPG). Por sua vez, o PPG possui dois destinos metabólicos, o de ser precursor da biossíntese de monoterpénóides, ou condensar novamente com outra molécula de IPP e desta forma originar o pirofosfato de farnesilo (PPF). Por outro lado, o PPF possui três destinos metabólicos, 1) ser precursor da biossíntese dos sesquiterpenóides, 2) gerar triterpenóides por uma dimerização “cauda-cauda” de duas moléculas de PPF, ou 3) gerar o pirofosfato de gernerilgeranilo (PPGG) por uma extensão da cadeia, através de uma nova condensação com uma molécula de IPP. Tal como o PPF, o PPGG também possui três possíveis destinos metabólicos, 1) ser precursor da biossíntese de diterpenóides, 2) gerar tetraterpenóides por uma dimerização “cauda-cauda” de duas moléculas de GGPP, ou 3) gerar o pirofosfato de gernerilfarnesilo (PPGF) por um alongamento da cadeia com a condensação de uma molécula de IPP. Por sua vez, o PPGF sofre uma extensão de múltiplas cadeias para produzir o pirofosfato poliprenil, que origina os politerpenóis e ocasionalmente sesterterpenóides (C₂₅). (Brückner e Tissier, 2013; Cooper e Nicola, 2015; Croteau, 2000; Devappa, Makkar e Becker, 2011; Dewick, 2002; Heras, las *et al.*, 2003; Ignatius Enodiana *et al.*, 2016; Salminen *et al.*, 2008; Sousa, De, Sousa Teixeira e Jacometti Cardoso Furtado, 2018)

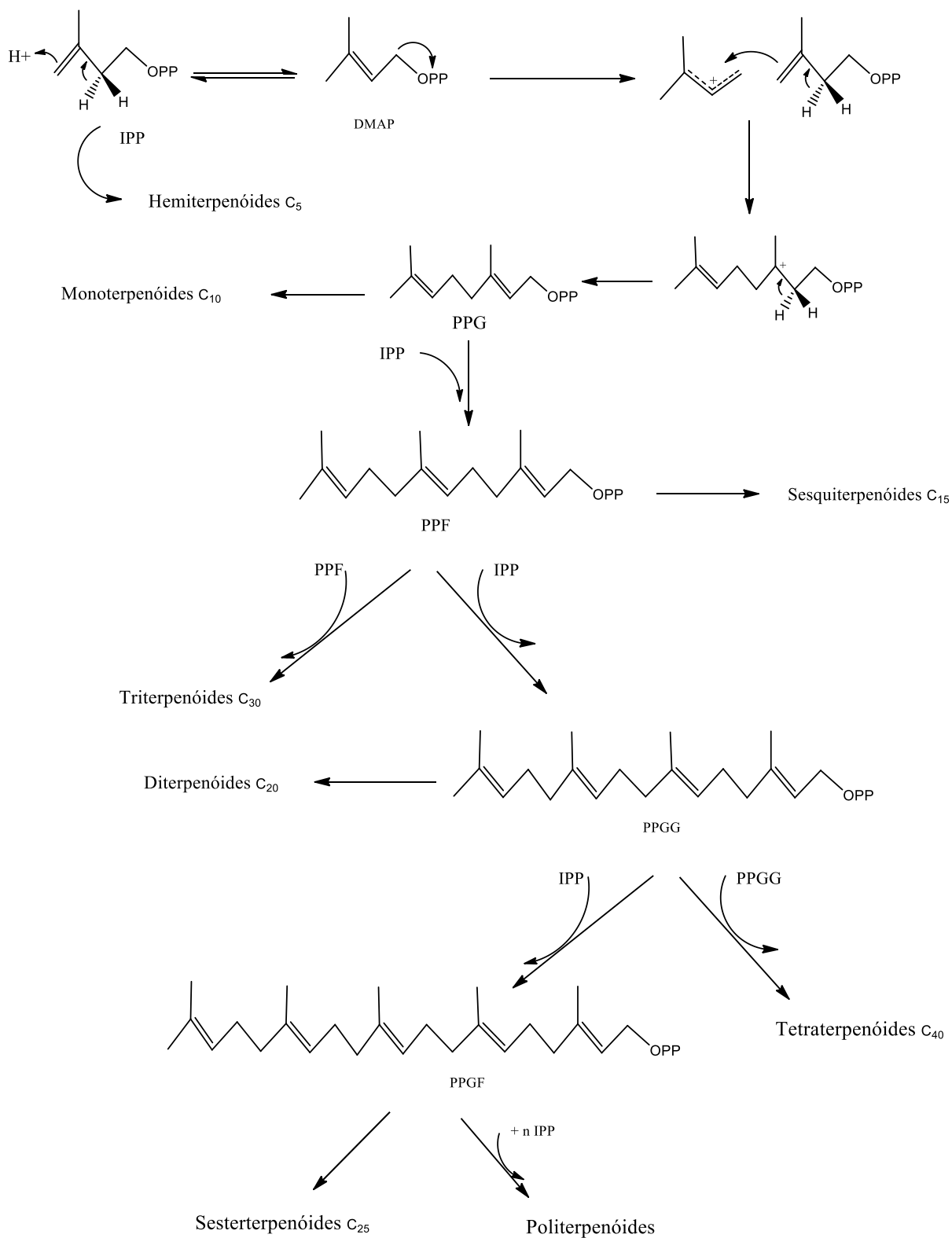


Figura 8: Esquema simplificado da biossíntese dos Terpenóides. (Borges *et al.*, 2019; Croteau, 2000; Heras, las *et al.*, 2003)

A maioria dos terpenóides têm uma fórmula geral de $(C_5H_8)_n$ e podem ser classificados quer com base no número de anéis presentes na organização estrutural dos carbonos, quer com base no número de unidades de isopreno (Fig. 9). Ao nível do número de anéis presentes na

organização estrutural dos carbonos, os terpenóides podem ser classificados como acíclicos (possuem estrutura aberta), monocíclicos (possuem um anel na estrutura), bicíclico (possuem dois anéis na estrutura), tricíclico (possuem três anéis na estrutura), tetracíclico (possuem quatro anéis na estrutura). Ao nível do número unidades de isopreno podem ser classificados como hemiterpenóides (C₅, possuem uma unidade de isopreno), monoterpénóides (C₁₀, possuem duas unidades de isoprenos), sesquiterpenóides (C₁₅, possuem três unidades de isopreno), diterpenóides (C₂₀, possuem quatro unidades de isopreno), triterpenóides (C₃₀, possuem seis unidades de isoprenos) e politerpenóides (C_{5n}, quando o número de isoprenos é superiores aos referidos anteriormente). (Breitmaier, 2006; Buckingham, 1996; Croteau, 2000; Dewick, 2002; Heras, las *et al.*, 2003; Salminen *et al.*, 2008; Yadava, Yadava e Goyalb, 2014)

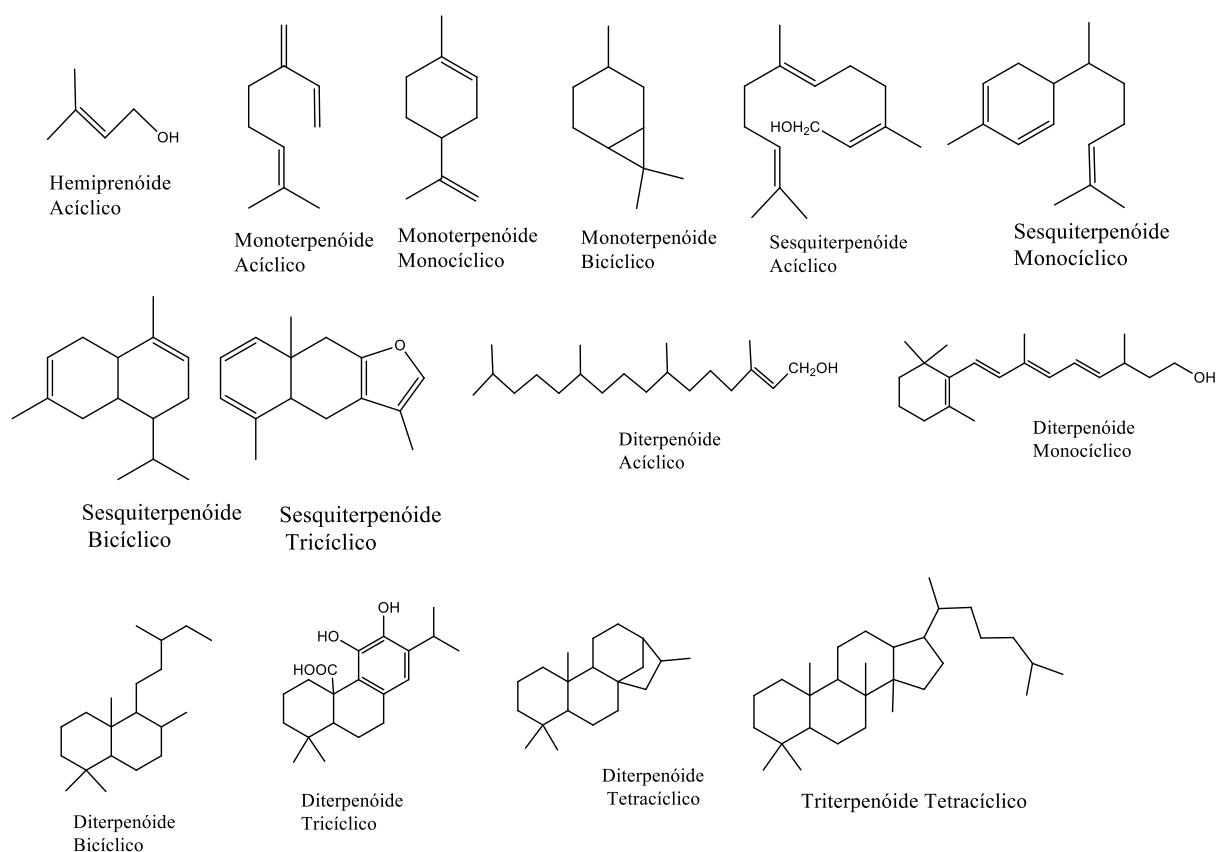


Figura 9: Exemplos de terpenos segundo a sua classificação de número de carbonos e anéis. (Breitmaier, 2006; Croteau, 2000; Dewick, 2002; Yadava, Yadava e Goyalb, 2014)

1.4 Diterpenóides

Como já foi referido anteriormente, os diterpenóides são uma subclasse dos terpenóides, que têm uma estrutura base com quatro unidades de isopreno e são predominantemente

biossintetizados pela via MEP, visto que na sua maioria se originam nos plastos. (Bohlmann, Meyer-Gauen e Croteau, 1998; Croteau, 2000; Munne-Bosch, 2001; Sousa, De, Sousa Teixeira e Jacometti Cardoso Furtado, 2018)

Os diterpenóides são metabolitos que possuem uma grande variedade de bioatividades. Nas plantas os diterpenóides apresentam diferentes funções, nomeadamente hormonais (giberelinas), reguladores de respostas induzidas por ferimentos (ácido abietanos), pigmentos fotossintéticos (cadeia fitofilina das clorofilas) e antioxidantes (porção fitila de tocofenóis). (González, 2015; Munne-Bosch, 2001)

O potencial terapêutico destes compostos tem sido associado às várias atividades demonstradas em ensaios *in vitro*, tais como anti-infeciosas (antimicrobiana, antiparasitária, antifúngica, antiviral), anti-tumorais, citotóxicas, antiúlcero-génicas, antioxidantes (inibidor do óxido nítrico), anti-inflamatórias, analgésicas, anti-plaquetárias, anti-hipertensivas, hipolipidémicas. (Batista *et al.*, 1994; Devappa, Makkar e Becker, 2011; González, 2015; Heras, las *et al.*, 2003)

Devido às promissoras atividades biológicas dos diterpenóides, existe um grande interesse em desenvolver métodos para obter derivados destes compostos que apresentem uma melhoria das propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas, eliminando ao máximo a toxicidade em relação ao composto original, de modo a que possam ser usados na clínica. As modificações estruturais podem ser obtidas por meio de uma biotransformação, utilizando enzimas, ou pela via química. A título de exemplo, as modificações químicas efetuadas no ácido copálico, um diterpeno encontrado na *Copaifera langsdorffii*, permitiu encontrar derivados semissintéticos que apresentaram um aumento da atividade anti-tubercular sem toxicidade expressiva, sendo que um dos derivados apresentou uma atividade semelhante a Estreptomicina, um medicamento usado na primeira linha do tratamento da tuberculose (Fig. 10). (Matos *et al.*, 2015; Sousa, De, Sousa Teixeira e Jacometti Cardoso Furtado, 2018) Através deste exemplo é possível verificar a importância dos derivados semissintéticos, pois de um composto com eventual atividade para o alvo terapêutico passou-se a ter um promissor *Lead* para o desenvolvimento farmacêutico.

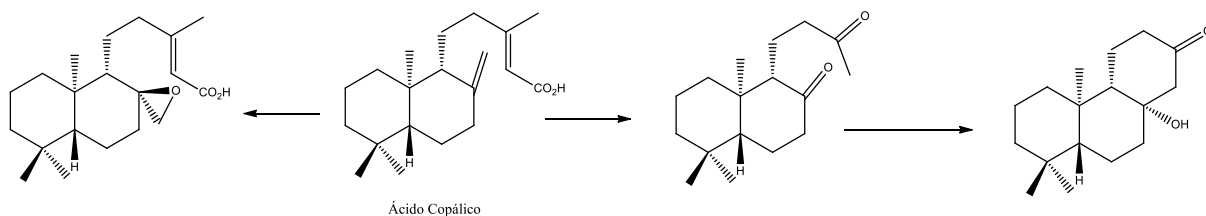


Figura 10: Ácido copálico e seus derivados semissintéticos. (Matos et al., 2015)

Um outro exemplo que demonstra que as modificações estruturais podem originar compostos importantes para o uso clínico, são os derivados semissintéticos do Paclitaxel (Fig. 3).

De forma a suprimir as dificuldades associadas à extração do Paclitaxel foi descoberto um composto intermediário, a 10-desacetilbacatina III, que após ter sido sujeita a modificações estruturais deu origem a vários derivados semissintéticos, entre eles o Docetaxel.

O Docetaxel (Fig. 11) é ligeiramente mais solúvel em água que o Paclitaxel e em ensaios *in vitro* e *in vivo* verificou-se que teria uma maior afinidade aos microtúbulos, verificando-se assim um aumento da potência do mesmo. Contudo os efeitos adversos associados ao Paclitaxel são também observáveis no Docetaxel. Atualmente está a ser desenvolvida associações com nanopartículas para diminuir os efeitos adversos verificados na utilização do Docetaxel. (Crown, 2004; Kim *et al.*, 2011; Newman, Cragg e Kingston, 2015; Varsha *et al.*, 2017; Verweij, Clavel e Chevalier, 1994)

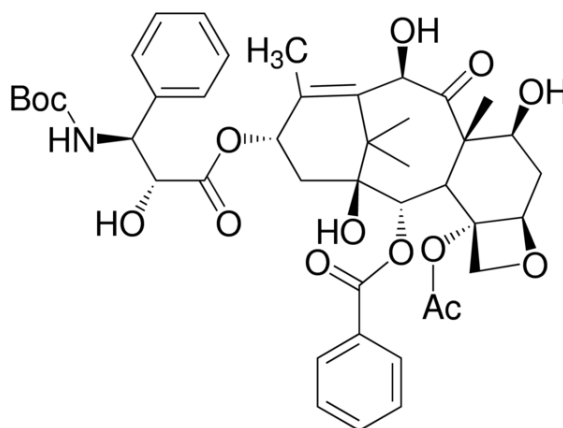


Figura 11: Estrutura química do Docetaxel

1.4.1 Classificação e biossíntese

De acordo com o número de anéis presentes na estrutura, os diterpenóides podem ser classificados como acíclicos (Fitanos), bicíclicos (Labanos e Clerodanos), tricíclicos

(Piramanos, Abietanos, Cassanos, Rosanos e Podocarpanos), tetracíclicos (Cauranos, Beieranos, Atisanos e Giberelinas), macrocíclicos (Taxanos, Dafnianos, Tiglianos e Casbenos) e diterpenóides diversos (Fig. 12). (Devappa, Makkar e Becker, 2011; Hanson, 2017; Heras, las *et al.*, 2003; Mafu e Zerbe, 2018; Peters, 2010; Salminen *et al.*, 2008; Sapio *et al.*, 2017; Sousa, De, Sousa Teixeira e Jacometti Cardoso Furtado, 2018)

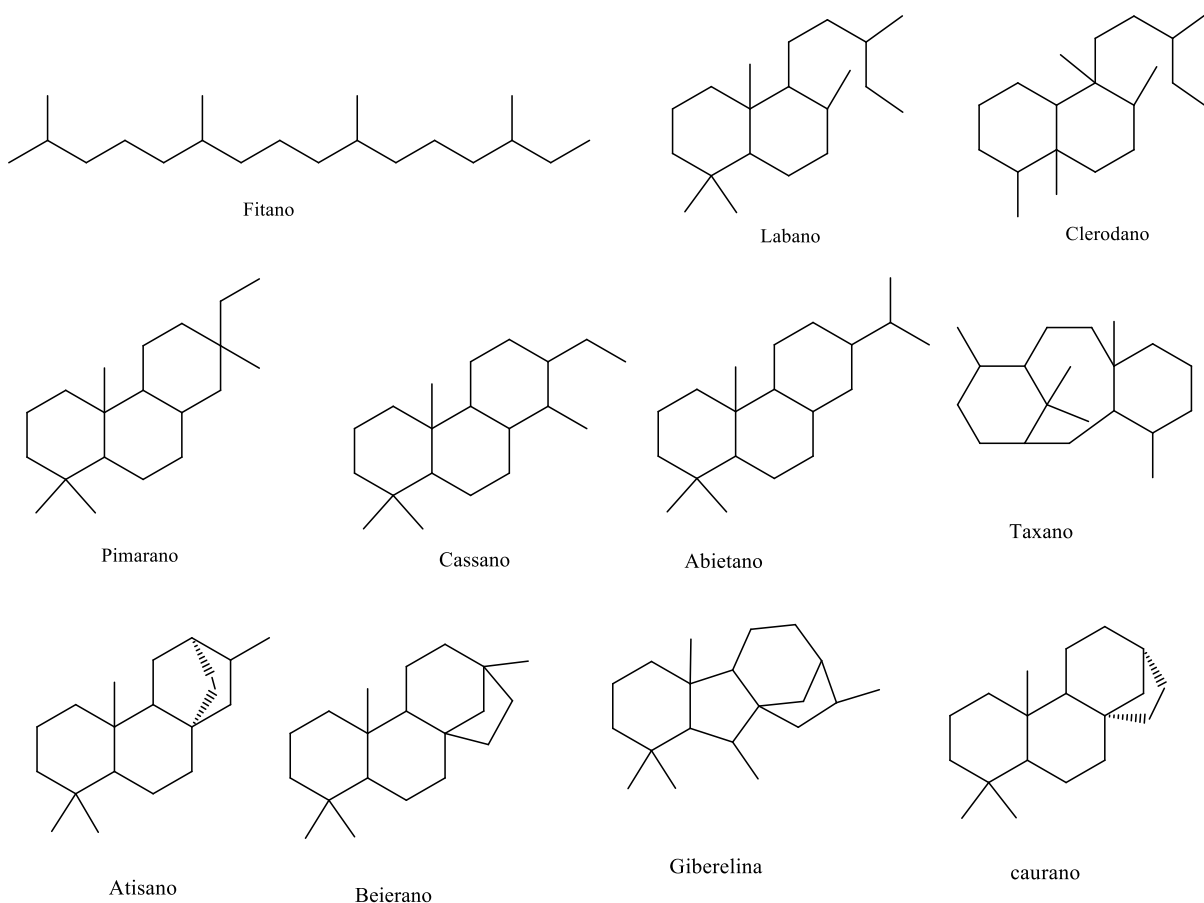


Figura 12: Exemplos de famílias dos Diterpenóides. (Devappa, Makkar e Becker, 2011; Sousa, De, Sousa Teixeira e Jacometti Cardoso Furtado, 2018)

Os diterpenóides cíclicos podem ser formados através da ciclização do PPGG mediados pela formação de carbocatiões e por potenciais rearranjos de Wagner-Meerwein. Se por um lado a origem de algumas famílias dos diterpenóides está associada à formação do carbocatião pela à perda do OPP, noutras famílias de diterpenóides a formação do carbocatião é iniciada pela protonação da ligação dupla que leva a uma ciclização, sendo que a perda do OPP acontece mais tarde, levando esta também a uma ciclização na estrutura diterpénica (Fig. 13). (Croteau, 2000; Dewick, 2002; Sousa, De, Sousa Teixeira e Jacometti Cardoso Furtado, 2018)

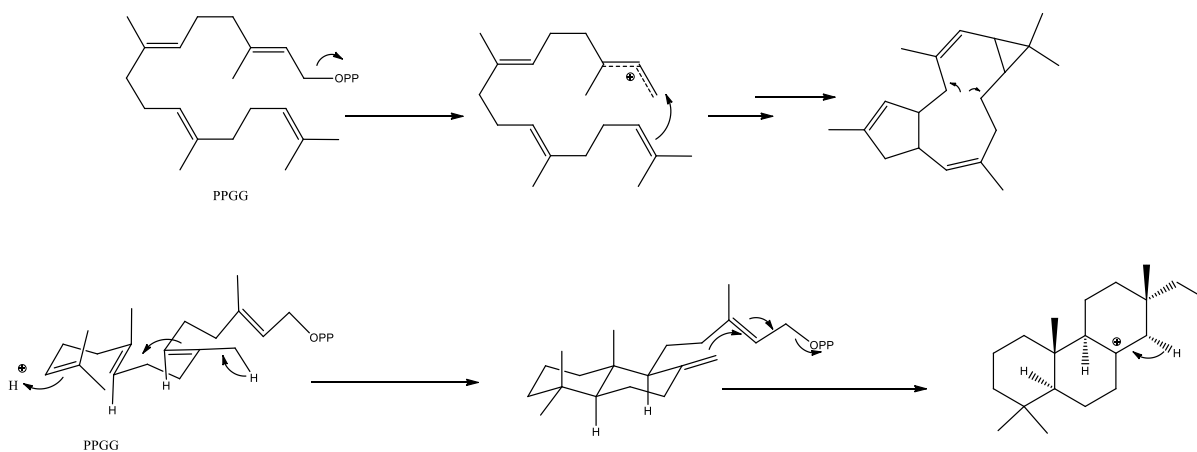


Figura 13: Ciclizações dos diterpenos (Dewick, 2002)

1.5 Abietanos

Os abietanos são uma família de diterpenos naturais com três anéis, encontrados em várias plantas, em especial nas coníferas, e em microrganismos. Possuem um grande espectro de bioatividades, as quais estão associadas aos vários graus de hidrogenação ou oxidação encontrados na sua estrutura. (Dewick, 2002; González, 2013, 2014, 2015)

1.5.1 Biossíntese

A família dos abietanos é biossintetizada (Fig. 14) a partir da protonação do PPGG que após a perda do grupo OPP, permite a formação de um catião. Em seguida, este catião perde um próton para originar um alceno, que por sua vez sofre uma migração do metilo em C₁₃ formando assim o catião abietadieno. A perda de um próton origina o (-)-abietadieno, o precursor da família dos abietanos. Todo este processo é catalisado pela enzima abietadieno sintase. (Breitmaier, 2006; Croteau, 2000; Dewick, 2002)

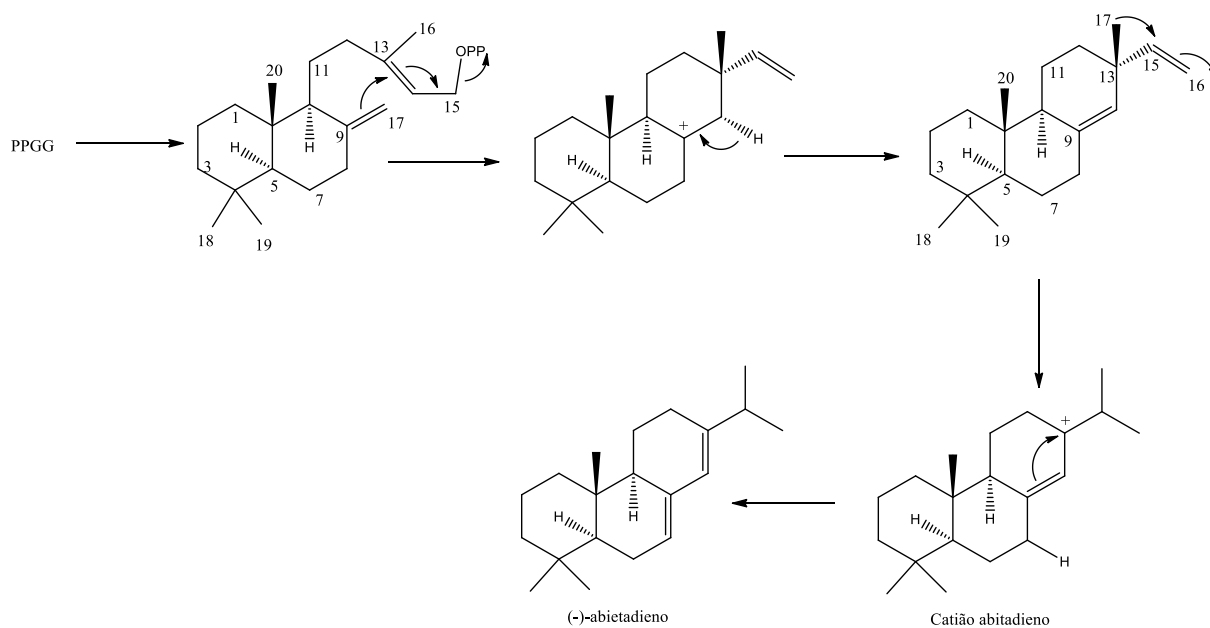


Figura 14: Biossíntese do precursor da família dos abietanos. (Breitmaier, 2006; Croteau, 2000)

1.5.2 Abietanos aromáticos

Os abietanos aromáticos abrangem o maior grupo de compostos do tipo abietano. Possuem vinte carbonos, três anéis de seis membros, em que geralmente o anel A não é funcionalizado, e apresentam vários níveis de oxidação nos anéis B e C (Fig. 15). (González, 2013, 2014, 2015)

Devido à grande variedade de estruturas químicas apresentadas, os abietanos aromáticos podem ser classificados de acordo com o número de ligações duplas e do tipo de estrutura carbocíclica. Os compostos que possuem três ligações duplas e um sistema de anel tetracíclico são designados de abietatrienos tricíclicos, os compostos que possuam três ligações duplas e um de anel lactona são designados de abietatrienos lactonas, e os compostos que possuam quatro ligações duplas são designados de abietatetraenos. (González, 2013)

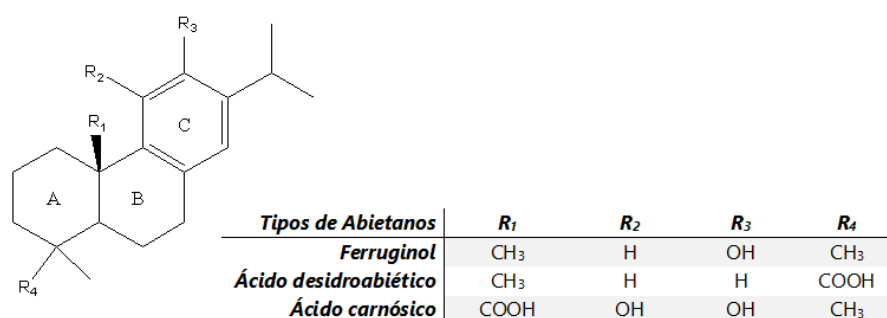


Figure 15: Alguns exemplos de Abietanos que ocorrem na natureza. (González, 2013, 2014, 2015)

1.6 Ácido carnósico

O ácido carnósico (Fig. 16) é um diterpenóide aromático natural do tipo abietano que possui como fórmula empírica C₂₀H₂₈O₄. Este composto foi descoberto em 1962 na Sálvia (*Salvia officinalis*) e mais tarde no Rosmaninho (*Rosmarinus officinalis*). Pode ser facilmente encontrado nas folhas, mais precisamente nos cloroplastos dos tricomas. (Bahri, Jameleddine e Shlyonsky, 2016; Birtić *et al.*, 2015; Mafu e Zerbe, 2018; Masuda *et al.*, 2002; Munne-Bosch, 2001; Petiwala e Johnson, 2015; Scheler *et al.*, 2016)

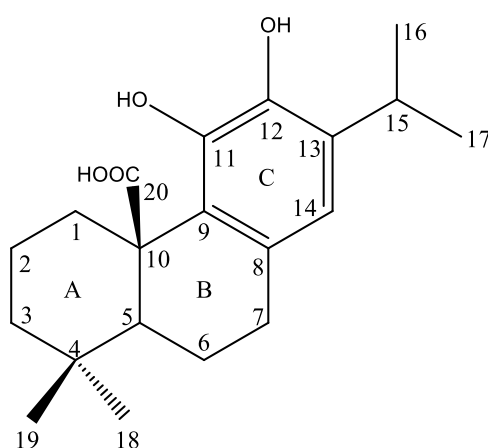


Figura 16: Estrutura química do Ácido Carnósico

Derivado do ferruginol, o ácido carnósico possui três anéis de seis membros, um anel aromático no anel C, um grupo catecol (grupos hidroxilos em posição *orto* no anel aromático) e um ácido carboxílico livre no carbono 20. (Banerjee, Poon Ng e Laya, 2003; Birtić *et al.*,

2015; González, 2013, 2015; Mafu e Zerbe, 2018; Petiwala e Johnson, 2015; Scheler *et al.*, 2016)

Devido ao grupo catecol, pode-se discutir a estabilidade do ácido carnósico. Na planta, quando sujeito a alterações do meio, como por exemplo luz intensa ou stress químico, pode sofrer uma desidrogenação enzimática na presença de oxigénio e/ou um ataque por radicais livres, dando origem a vários derivados como o carnosol, rosmanol e o isorosmanol. A formação dos derivados permite ao ácido carnósico exercer o seu efeito antioxidante e, por consequência, proteger a planta. (Bahri, Jameleddine e Shlyonsky, 2016; Banerjee, Poon Ng e Laya, 2003; Baño, Del *et al.*, 2003; Birtić *et al.*, 2015; Cuvelier, Berset e Richard, 1994; González, 2013; Hall *et al.*, 2018; Loussouarn *et al.*, 2017; Masuda, Inaba e Takeda, 2001; Masuda *et al.*, 2002; Munne-Bosch, 2001; Munné-Bosch *et al.*, 2001; Petiwala e Johnson, 2015)

Desta forma, o ácido carnósico pode atuar como um antioxidante lipídico que elimina os oxigénios singletos e os radicais hidroxilo, prevenindo assim a peroxidação lipídica e disrupção da membrana lipídica. (Bahri, Jameleddine e Shlyonsky, 2016; Birtić *et al.*, 2015; Munne-Bosch, 2001)

1.6.1 Bioatividade

Na literatura científica encontram-se estudos que descrevem as várias atividades biológicas do ácido carnósico, como por exemplo atividades antioxidantes, fotoprotetoras, anti-infecciosas (antimicrobianas, antifúngicas, antivirais), neuroprotetoras, anti-inflamatórias, analgésicas, antidepressivas, antiagregantes plaquetárias, antidiabéticas, adstringente, gastroprotetoras, anti arteriosclerose, anticancerígenas (atuando como anti-proliferativo, citotóxico, anti-angiogénico e indutor da apoptose), exibindo uma baixa toxicidade *in vivo*. (Akaberi, Mehri e Iranshahi, 2015; Albalawi *et al.*, 2017; Amaral *et al.*, 2013; Andrade *et al.*, 2018; Aoyagi *et al.*, 2006; Bahri, Jameleddine e Shlyonsky, 2016; Banerjee, Poon Ng e Laya, 2003; Barni *et al.*, 2012; Biersack, 2016; Birtić *et al.*, 2015; Christensen *et al.*, 2010; Danilenko *et al.*, 2003; Das *et al.*, 2018; Einbond *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2016; González, 2013, 2014; Hall *et al.*, 2018; Jacob *et al.*, 2017; Kar *et al.*, 2012; Kuo *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2018; Loussouarn *et al.*, 2017; Masuda, Inaba e Takeda, 2001; Masuda *et al.*, 2002; Mengoni *et al.*, 2011; Moosavi *et al.*, 2016; Petiwala *et al.*, 2016; Ribeiro-Santos *et al.*, 2015; Sasaki *et al.*, 2013; Satoh *et al.*, 2008; Satoh e Lipton, 2017; Scheler *et al.*, 2016; Shin *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2016; Szwajgier, 2013; Theoduloz *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012)

Tabela 1: Algumas das propriedades do ácido carnósico

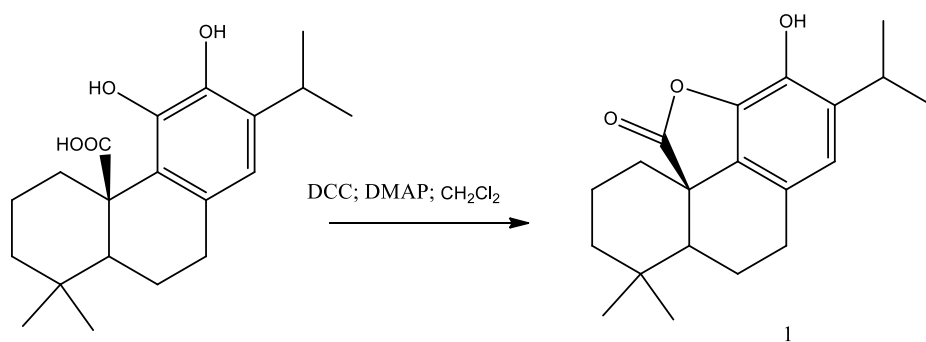
Propriedades biológicas	Exemplos de efeitos	Referência bibliográfica
Antiviral	<ul style="list-style-type: none"> • Inibe os efeitos da protéase HIV-1, e a replicação do vírus HIV-1 • Inibe a replicação do tipo A- e B- do vírus sincicial respiratório 	(González, 2013; Shin <i>et al.</i> , 2013)
Antimicrobiano	<ul style="list-style-type: none"> • Modula a resistência bacteriana a múltiplos fármacos 	(Birtić <i>et al.</i> , 2015; Theoduloz <i>et al.</i> , 2011)
Antidiabético	<ul style="list-style-type: none"> • Inibe a atividade da lípase pancreática e suprime a elevação dos triglicéridos séricos 	(Christensen <i>et al.</i> , 2010; Theoduloz <i>et al.</i> , 2011)
Antiagregante plaquetário	<ul style="list-style-type: none"> • Inibe a mobilização citosólica do cálcio • Inibe o colagénio, o ácido araquidónico, U46619 e o indutor da trombina 	Antiagregante plaquetário
Anti-inflamatório	<ul style="list-style-type: none"> • Suprime a produção de mediadores da inflamação 	(Satoh <i>et al.</i> , 2008; Scheler <i>et al.</i> , 2016; Theoduloz <i>et al.</i> , 2011)
Neuroprotetor	<ul style="list-style-type: none"> • Promove a síntese do factor de crescimento nervoso e inibi a acetilcolinesterase, prevenindo a doença de Alzheimer • Protege os neurónios do <i>stress</i> oxidativo e da excitose • Aumenta os níveis da redução da glutatona <i>in vivo</i> e protege o cérebro contra isquemia da artéria cerebral • Induz da via antioxidante Nrf2 envolvida em efeitos protetores doenças neurodegenerativas 	(Albalawi <i>et al.</i> , 2017; Bahri, Jameleddine e Shlyonsky, 2016; González, 2013; Hall <i>et al.</i> , 2018; Moosavi <i>et al.</i> , 2016; Satoh <i>et al.</i> , 2008; Satoh e Lipton, 2017; Scheler <i>et al.</i> , 2016; Szwajgier, 2013)
Antioxidante	<ul style="list-style-type: none"> • Atua sobre as espécies reativas de oxigénio • Reduz a peroxidação lipídica 	(Albalawi <i>et al.</i> , 2017; Birtić <i>et al.</i> , 2015; González, 2013; Loussouarn <i>et al.</i> , 2017; Masuda <i>et al.</i> , 2002; Ribeiro-Santos <i>et al.</i> , 2015; Scheler <i>et al.</i> , 2016)

Propriedades biológicas	Exemplos de efeitos	Referência bibliográfica
Anti-tumoral	<ul style="list-style-type: none"> • É quimioprotetor, antiproliferativo e citotóxico. Induz a apoptose, autofagia e a paragem do ciclo celular em G1. Inibe a capacidade migratória e a adesão celular. Aumenta a sensibilidade das células à cisplatina e vitamina D₃ no cancro do pulmão e leucemia, respetivamente • Estudos realizados demonstram que o ácido carnósico atua em vários tipos de cancro como o cancro da mama, da próstata, colón, do pulmão, dos rins, cervical, de cérebro e na leucemia. 	(Akaberi, Mehri e Iranshahi, 2015; Aoyagi <i>et al.</i> , 2006; Bahri, Jameleddine e Shlyonsky, 2016; Biersack, 2016; Danilenko <i>et al.</i> , 2003; González, 2015; Jacob <i>et al.</i> , 2017; LIU <i>et al.</i> , 2018; Petiwala <i>et al.</i> , 2016; Satoh <i>et al.</i> , 2008; Scheler <i>et al.</i> , 2016; Su <i>et al.</i> , 2016; Theoduloz <i>et al.</i> , 2011)

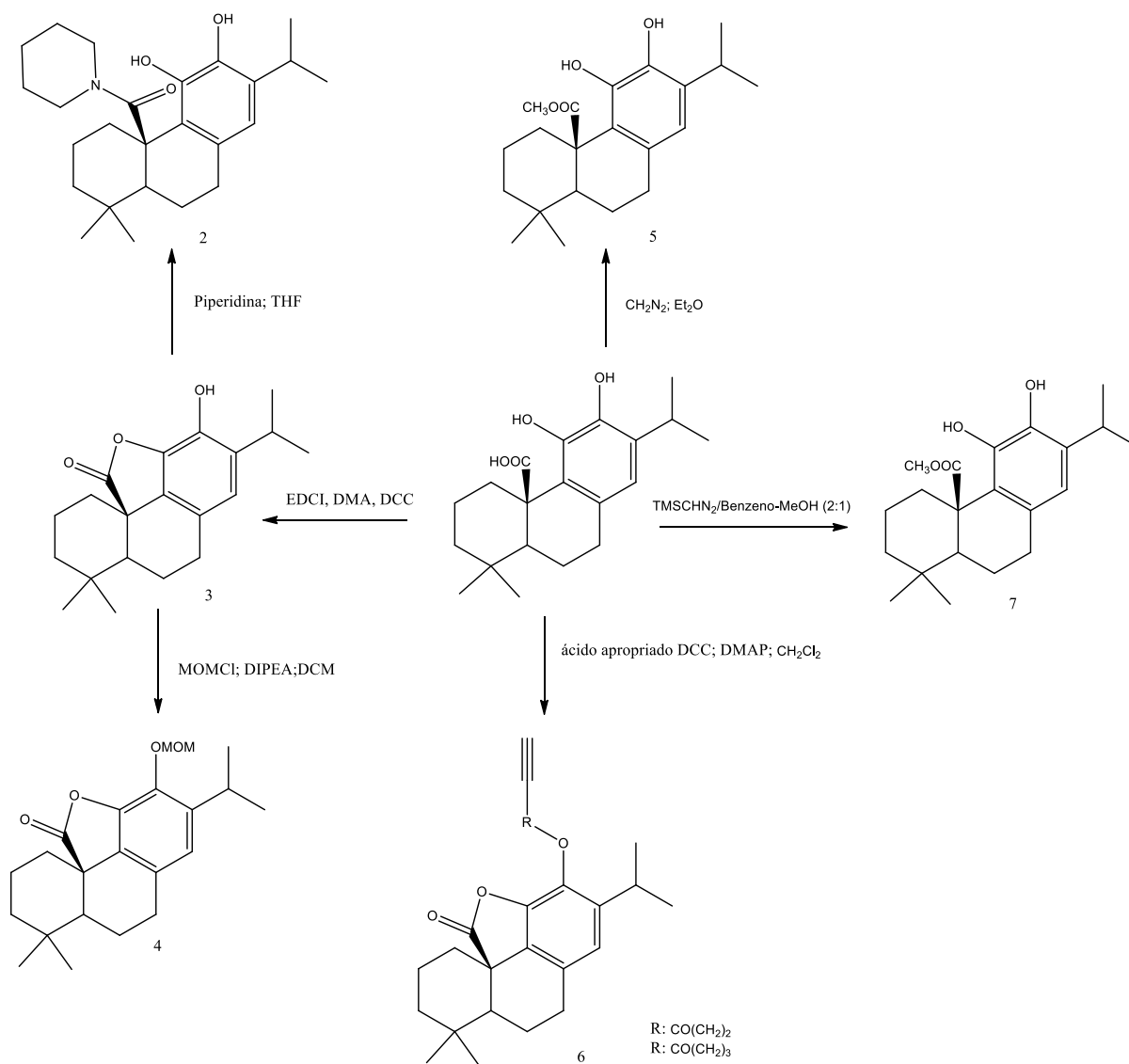
1.6.2 Derivados semissintéticos do ácido carnósico

Como foi possível verificar no subcapítulo anterior, o ácido carnósico apresenta um grande espectro de bioatividades, o que o torna um promissor *Hit* para o desenvolvimento de novos fármacos. Contudo, a maioria dos mecanismos de ação do ácido carnósico ainda continua por desvendar e as suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas necessitam de ser otimizadas de forma a obter análogos com utilidade clínica. Estes análogos podem ser obtidos através da semissíntese, modificando a estrutura química original do ácido carnósico.

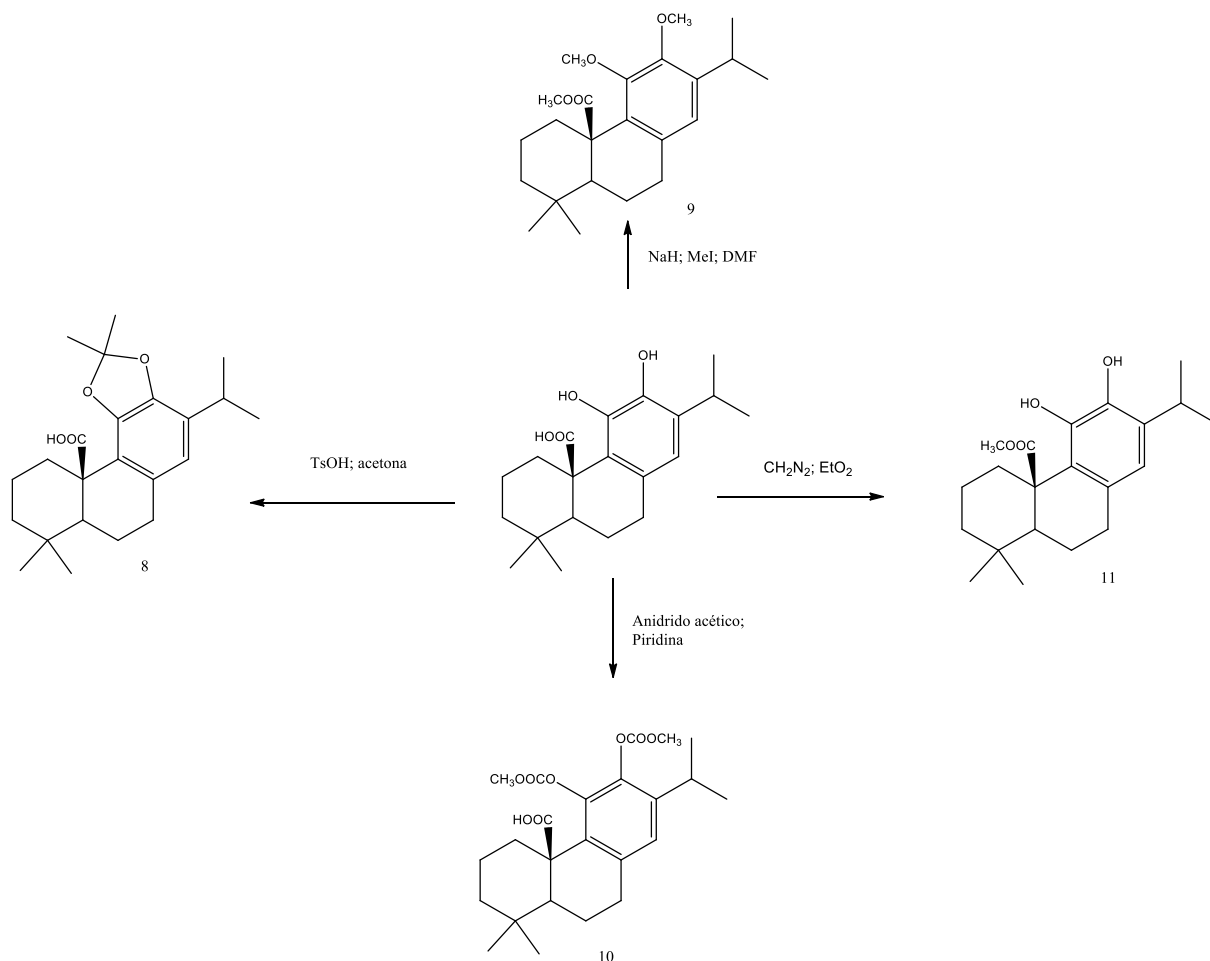
Na literatura científica, já é possível encontrar alguns derivados semissintéticos do ácido carnósico, os quais apresentam alterações estruturais ao nível dos grupos hidroxilos presentes em C₁₁ e C₁₂ e do ácido carboxílico em C₂₀, dando origem a derivados com éteres, ésteres, amins e lactonas. Alguns destes derivados demonstram ter atividades neuroprotetoras, citotóxicas, gastroprotetoras, antiproliferativas e antifúngicas iguais ou até mesmo superiores às do ácido carnósico (Esquema 1-3). (Aoyagi *et al.*, 2006; Bueno *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2018; Liang *et al.*, 2018; Pertino *et al.*, 2010, 2015; Theoduloz *et al.*, 2011; Theoduloz, Pertino e Schmeda-Hirschmann, 2014)



Esquema 1: Derivado do ácido carnósico. Derivado 1 (Pertino et al., 2010)



Esquema 2: Derivados do ácido carnósico. Derivados 2- 4 (Li et al., 2018), derivados 5 e 6 (Pertino et al., 2015) e derivado 7 (Aoyagi et al., 2006)



Esquema 3: Derivados do ácido carnósico. Derivado 8 (Liang et al., 2018) e derivado 9-11 (Theoduloz et al., 2011)

Apesar de existirem alguns derivados semissintéticos já descritos, é possível verificar que o número de derivados semissintéticos existentes é bastante baixo e que as modificações estruturais ainda foram pouco exploradas sendo por isso uma molécula interessante como ponto de partida para o desenvolvimento de novos fármacos.

Objetivos

2. Objetivos

Os diterpenos possuem uma diversidade estrutural e um espectro de bioatividades bastante grande, representando uma classe de compostos interessantes para o desenvolvimento de novos fármacos.

O ácido carnósico é um diterpeno natural do tipo abietano aromático, que apresenta várias atividades biológicas relevantes para a prática clínica, como por exemplo a atividade antioxidante e anti-tumoral.

As modificações estruturais, através da introdução de novos grupos químicos, permite melhorar as propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas dos compostos, sendo uma boa estratégia a ser utilizada. A semissíntese do ácido carnósico ainda se encontra pouco explorada existindo um número bastante limitado de derivados semissintéticos.

Baseado nestas afirmações, o objetivo principal deste trabalho consiste na preparação de derivados semissintéticos do ácido carnósico e posterior elucidação estrutural com vista à obtenção de compostos com atividade anti-tumoral.

Os derivados semissintéticos serão preparados tendo em conta estratégias sintéticas que permitirão converter os grupos hidroxilos em C₁₁ e C₁₂ em ésteres, de realizar uma esterificação intramolecular entre os grupos ácido carboxílico em C₂₀ e hidroxilo em C₁₁, com posterior conversão do hidroxilo em C₁₂ num éster.

A sua elucidação estrutural será obtida através de técnicas de ressonância magnética nuclear de próton (¹H-RMN), de carbono 13 (¹³C-RMN) e de Dept-135.

Síntese química e Elucidação estrutural

3. Síntese química e elucidação estrutural

3.1 Conceitos gerais

3.2 Elucidación estrutural do ácido carnósico

3.3 Preparação e elucidación estrutural de derivados do ácido carnósico

3. Síntese química e elucidação estrutural

3.1 Conceitos gerais

Para a obtenção de novos derivados semissintéticos que melhorem a atividade biológica é essencial entender todas as etapas envolvidas durante o trabalho experimental.

Existem três passos experimentais importantes: a reação química, a purificação e a análise estrutural (Fig. 17). Em suma, a reação química envolve um substrato inicial, neste caso o ácido carnósico, que combinado com o solvente e reagentes ideais, recorrendo ou não ao uso de um catalisador, e em condições controladas de temperatura e humidade, resulta por fim num ou mais produtos derivados do original.

Depois da síntese, o crude do derivado passa por um processo de *work-up*, que consiste no isolamento e purificação do produto principal, usando para tal várias técnicas, tais como cromatografia em coluna (CC) ou a cromatografia em camada fina (CCF).

A CC consiste na utilização de um adsorvente, do eluente e do derivado semissintético. O adsorvente utilizado neste trabalho foi a sílica Kieselgel 60 (230-400 mesh), enquanto que o eluente foi preparado através de uma mistura de solventes de baixo custo. Tanto a escolha dos solventes, como a sua proporção usada no eluente está diretamente relacionada com a polaridade do composto inicial.

A CCF é outra técnica utilizada tanto no controlo da reação, como na separação de misturas reacionais após uma reação química. A CCF baseia-se nos mesmos princípios da CC.

Após a purificação, a estrutura química do composto deve ser caracterizada, existindo para tal várias técnicas de elucidação estrutural, de que é exemplo a ressonância magnética nuclear (RMN) de protão (^1H -RMN), de carbono 13 (^{13}C -RMN) e de Dept-135.

O clorofórmio deuterado (CDCl_3), serviu de padrão interno para calibrar os espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN, apresentando os sinais de referência δ 7,26 ppm e δ 77,00 ppm nos espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN, respetivamente. (Pavia, Lampman e Kriz, 2001)

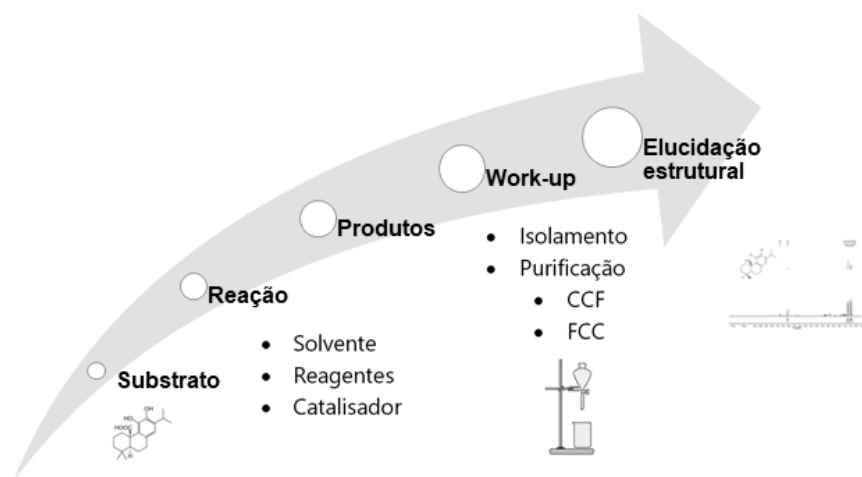


Figura 17: Diagrama esquemático da síntese química

O ácido carnósico apresenta uma ampla atividade biológica, sendo por isso um promissor *Hit* na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos.

Como se pode verificar pela figura 16, o ácido carnósico possui dois grupos hidroxilos em posição *orto*-fenólica (C11 e C12), os quais são altamente reativos, e um ácido carboxílico no carbono 20.

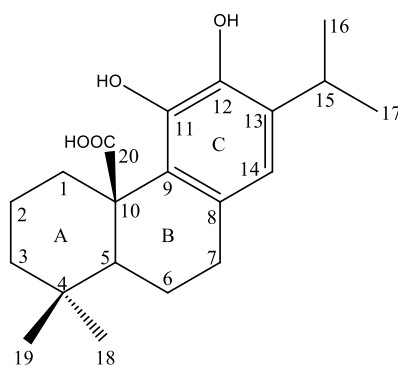


Figura 16: Estrutura química do Ácido Carnósico

As estratégias de semissíntese permitem potenciar a atividade biológica dos compostos, sendo que na literatura científica é possível encontrar alguns derivados semissintéticos do ácido carnósico que confirmam este princípio. Os derivados encontrados apresentam modificações estruturais ao nível dos grupos hidroxilos e/ou no grupo ácido carboxílico, dando origem a vários derivados como éteres, ésteres, aminas e lactonas. (Aoyagi *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2018; Pertino *et al.*, 2010, 2015; Theoduloz *et al.*, 2011)

Na literatura científica é possível observar que a modificação de grupos funcionais, como por exemplo, a conversão dos grupos hidroxilos e do ácido carboxílico a ésteres permitiu aumentar a atividade anti-tumoral de novos derivados semissintéticos de triterpenóides. (Gonçalves (B) *et al.*, 2016; Gonçalves *et al.*, 2016; Valdeira *et al.*, 2018) Tendo em consideração estes estudos a introdução de ésteres foi selecionada como estratégia para a preparação de novos derivados do ácido carnósico, uma vez que potencialmente pode melhorar os perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos deste composto.

3.2 Elucidação estrutural do ácido carnósico

No espectro de ^1H -RMN do ácido carnósico (Fig. 18) é possível observar um sinal singlete a δ 6,57 ppm, que corresponde ao próton aromático H_{14} . Tipicamente, o sinal do próton aromático apresenta uma ressonância por volta δ [6,5 e 8,0] ppm, o que corrobora com o sinal identificado para o H_{14} . (Pavia, Lampman e Kriz, 2001)

No espectro de ^1H -RMN do ácido carnósico, observa-se também dois dubletos a δ 1,22 e 1,20 ppm correspondentes aos grupos metilo em C_{16} e C_{17} com uma constante de acoplamento de 4,4 Hz. Adicionalmente, verifica-se a existência de dois singletos no espectro de ^1H -RMN a δ 1,01 e 0,99 ppm correspondentes aos metilos dos prótons C_{18} e C_{19} .

Os sinais correspondentes aos prótons do grupo hidroxilo e do grupo carboxilo não foram passíveis de ser observados no espectro de ^1H -RMN. Tal situação pode ser devida ao facto destes prótons serem acídicos e, geralmente não acoplarem com outros prótons vizinhos. Fatores como o solvente usado, concentração, temperatura e pureza da amostra são determinantes para o seu aparecimento no espectro. Geralmente quando se usa um solvente deuterado, como o CDCl_3 , estes prótons encolhem ou desaparecem totalmente do espectro de ^1H -RMN. (Pavia, Lampman e Kriz, 2001)

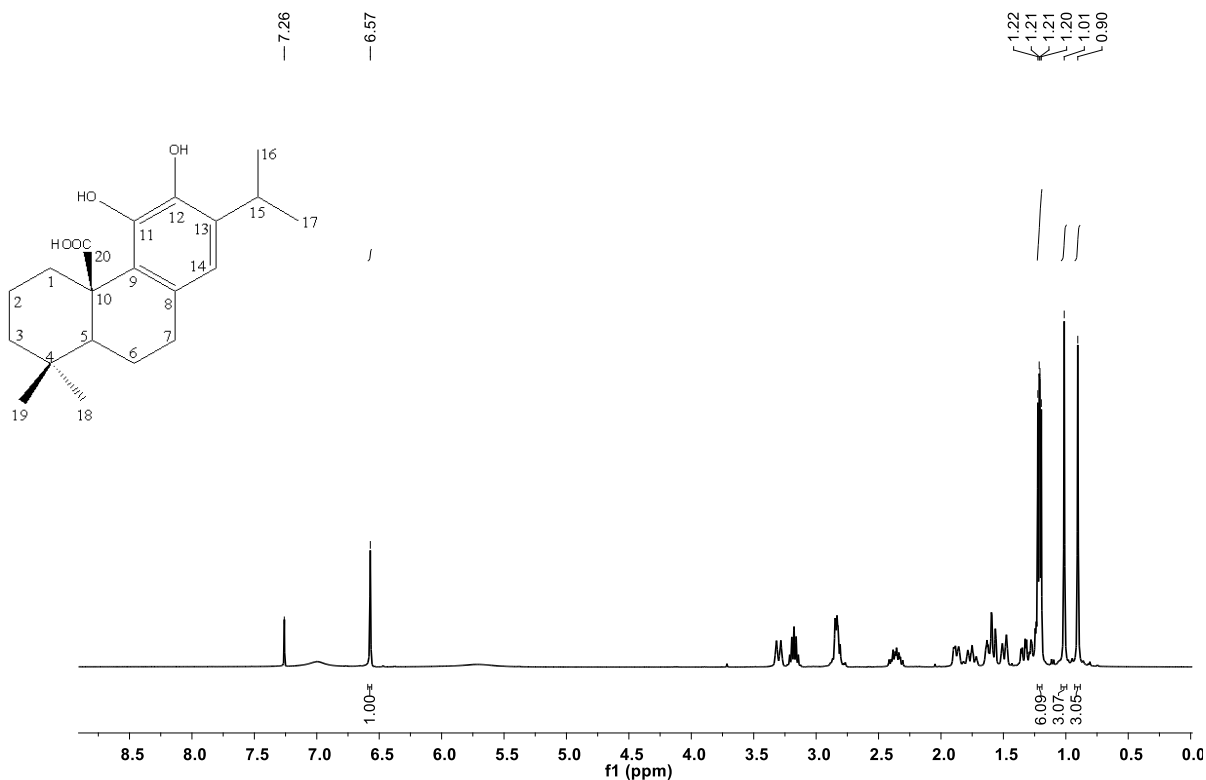


Figura 18: Espectro ¹H-RMN do ácido carnósico

No espectro de ¹³C-RMN (Fig. 19) consegue-se identificar vinte carbonos, o que está de acordo com o número de carbonos presentes no esqueleto-base do ácido carnósico. O sinal a δ 183,05 ppm corresponde ao C₂₀ do grupo carboxilo, enquanto que os seis sinais entre δ 119,53 ppm e 142,25 ppm correspondem aos átomos de carbono do anel aromático.

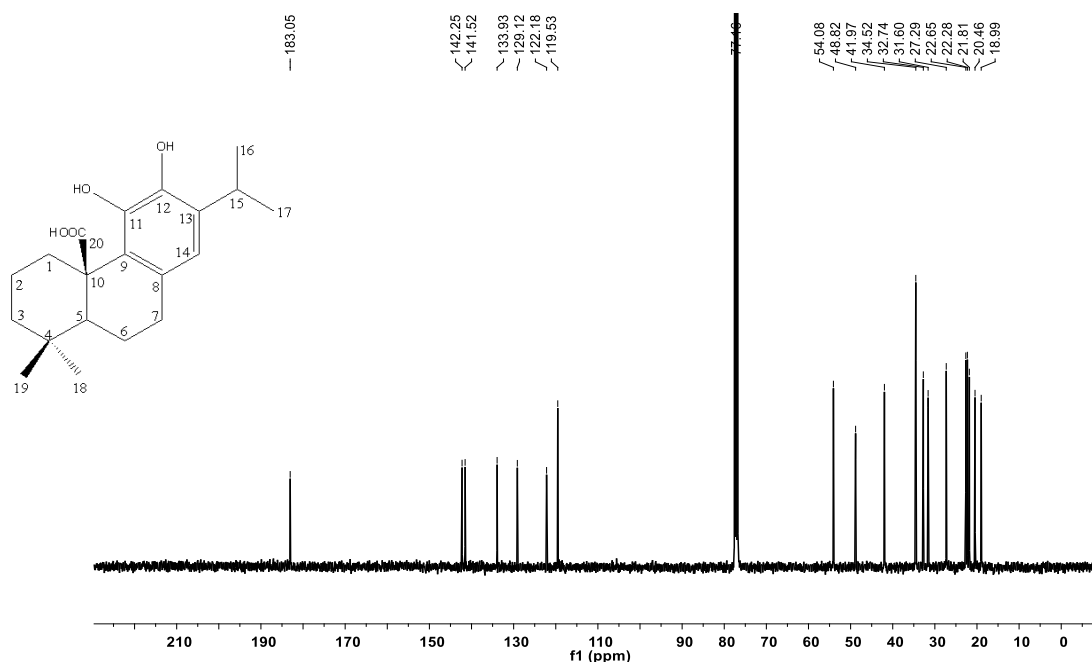


Figura 19: Espectro ¹³C-RMN do ácido carnósico

No espectro Dept-135 (Fig. 20) identificou-se a presença de cinco carbonos CH₂ (sinais negativos) e sete carbonos correspondentes aos CH e CH₃ (sinais positivos), como seria expectável para o ácido carnósico.

O espectro de Dept-135 permite distinguir os carbonos terciários dos carbonos quaternários, sendo que desta forma é possível identificar o sinal δ 119,39 ppm como sendo do carbono aromático C₁₄, e posteriormente voltar a identifica-lo no espectro de ¹³C-RMN.

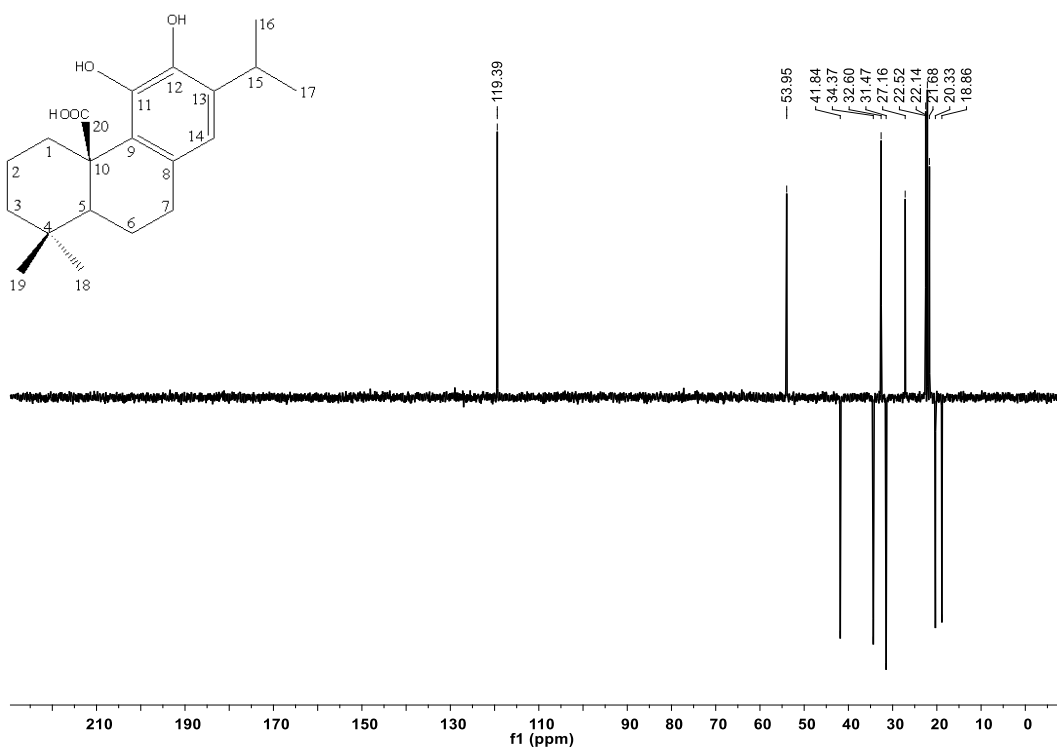
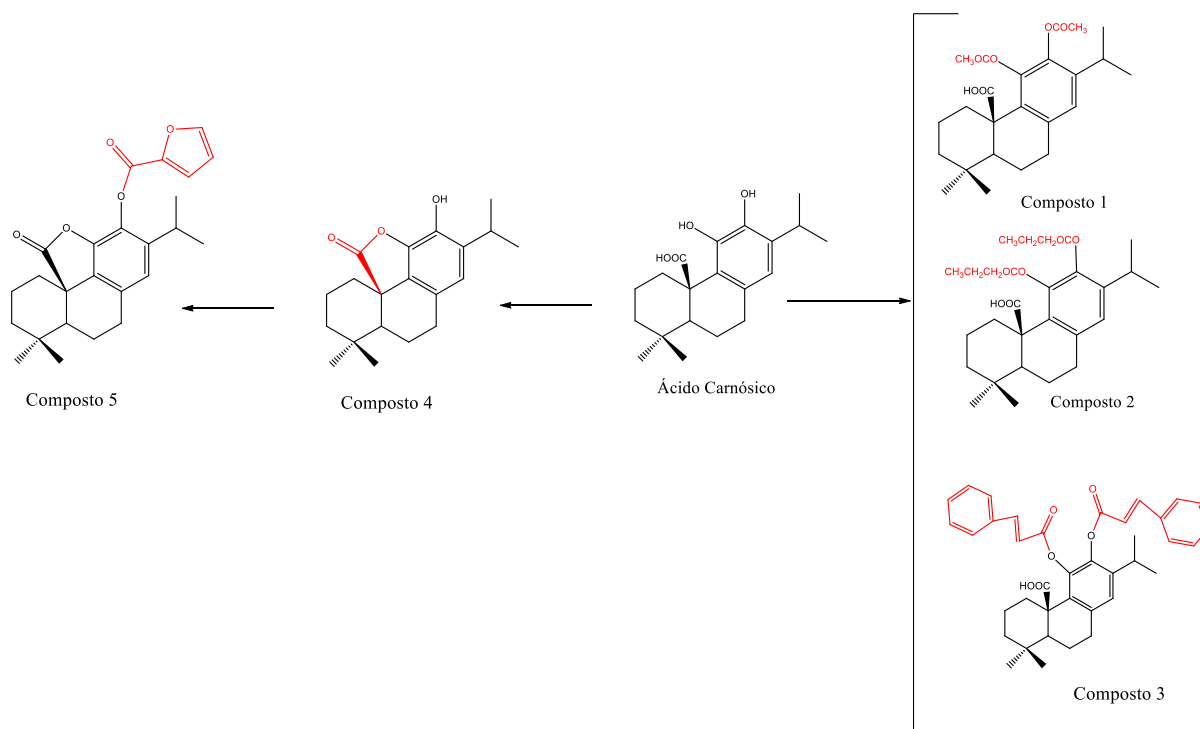


Figura 20: Espectro Dept-135 do ácido carnósico

3.3 Preparação e elucidação estrutural de derivados do ácido carnósico

O objetivo deste trabalho é a obtenção de compostos semissintéticos do ácido carnósico. Para tal foram adotadas diferentes estratégias de semissíntese como modificações estruturais nos grupos hidroxilos em C₁₁ e C₁₂ e no grupo carboxilo em C₂₀ (Esquema 4).



Esquema 4: Síntese dos derivados semissintéticos propostos

3.3.1 Derivados da esterificação

A esterificação é uma reação que permite introduzir um grupo éster, e geralmente utiliza anidridos, como por exemplo o anidrido acético ou o anidrido butírico, ou cloretos de ácidos, como por exemplo o cloreto de cinamoílo ou o cloreto de furoílo. (Bejblová-Voláková, Vlk e Procházková, 2010; Bejblová, Procházková e Vlk, 2009; Gonçalves (a) *et al.*, 2016; Gonçalves (B) *et al.*, 2016; Simion, Hashimoto e Mitoma, 2012; Valdeira *et al.*, 2018)

Na literatura científica, os compostos da esterificação são geralmente obtidos através de uma reação do substrato inicial com um anidrido ou cloretos de ácidos na presença de piridina (uma base que funciona como solvente e catalisador) e/ou do catalisador 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (Fig. 21). (Sartori *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2001) Embora a piridina seja um solvente barato existem alguns inconvenientes relativos à sua utilização como o facto de ser demasiado tóxico além de apresentar um odor desagradável. Alguns estudos demonstram bons rendimentos com o uso de outros solventes como é o caso de tetrahydrofurano (THF). (Gonçalves (a) *et al.*, 2016; Gonçalves (B) *et al.*, 2016; Lugemwa, Shaikh e Hochstedt, 2013; Meng *et al.*, 2009; Valdeira *et al.*, 2018)

De forma a tornar a reação mais eficiente pode-se utilizar o DMAP, um catalisador nucleófilo derivado da piridina, que é usado em várias reações de transferência de grupos, especialmente em esterificações. (Dewick, 2006; Xu *et al.*, 2005)

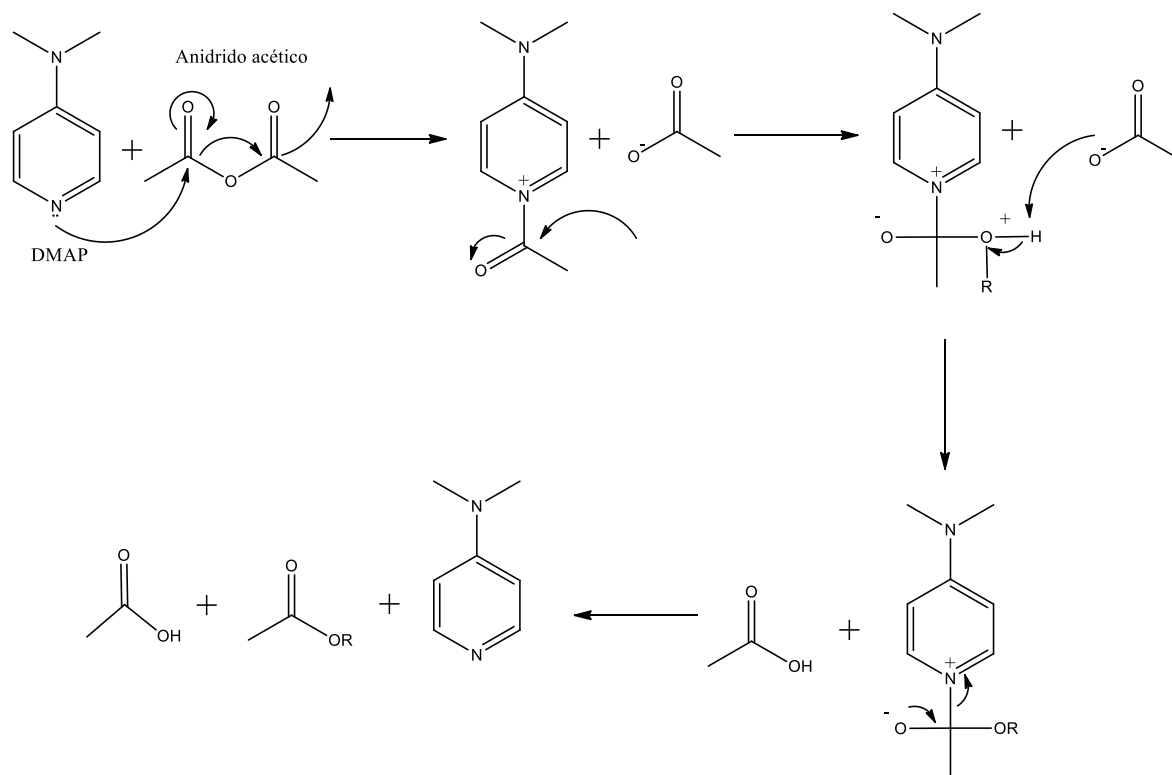
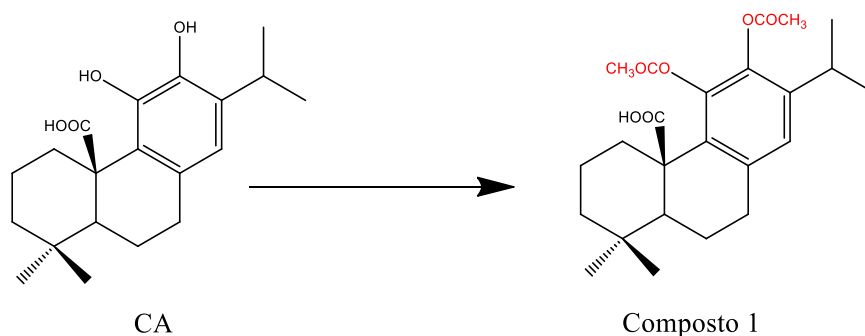


Figura 21: Mecanismo simplificado da esterificação do grupo hidroxilo com anidrido acético e DMAP. (Dewick, 2006; Xu *et al.*, 2005)

3.3.1.1 Composto 1

O composto 1 foi obtido através de uma reação de esterificação do ácido carnósico com o anidrido acético na presença de THF e DMAP à temperatura ambiente, tendo sido obtido com bom rendimento (Esquema 5). A sua estrutura química foi posteriormente caracterizada através da técnica de RMN (^1H ; ^{13}C ; Dept-135).



Esquema 5: Reagentes e condições: Anidrido Acético, DMAP, THF seco, à temperatura ambiente

No espectro de ^1H -RMN (Fig. 22) foi possível confirmar a introdução dos grupos acetato pela observação de dois sinais singletos a δ 2,26 e 2,24 ppm, os quais correspondem aos prótons dos metilos do grupo acetato. Estes sinais não são observáveis no espectro de ^1H -RMN do ácido carnósico.

Adicionalmente, o próton aromático H_{14} aparece no espectro ^1H -RMN como um sinal singlete a δ 6,95 ppm, tal como é observado no espectro do ácido carnósico. Os sinais correspondentes aos prótons do grupo isopropilmetilo nas posições C_{16} e C_{17} aparecem como dois dubletos a δ 1,21 e 1,14 ppm e com constantes de acoplamento de 6,9 Hz. Os prótons dos grupos metilos em C_{19} e C_{20} são observáveis como dois singletos a δ 0,96 e 0,86 ppm. Normalmente, os hidrogénios dos grupos metilos são os prótons que estão mais protegidos, sendo visíveis a campo alto. Este efeito é devido à sua proximidade com o núcleo, o qual provoca um maior efeito de blindagem fazendo com que estes sintam menos o efeito do campo magnético aplicado. (Pavia, Lampman e Kriz, 2001)

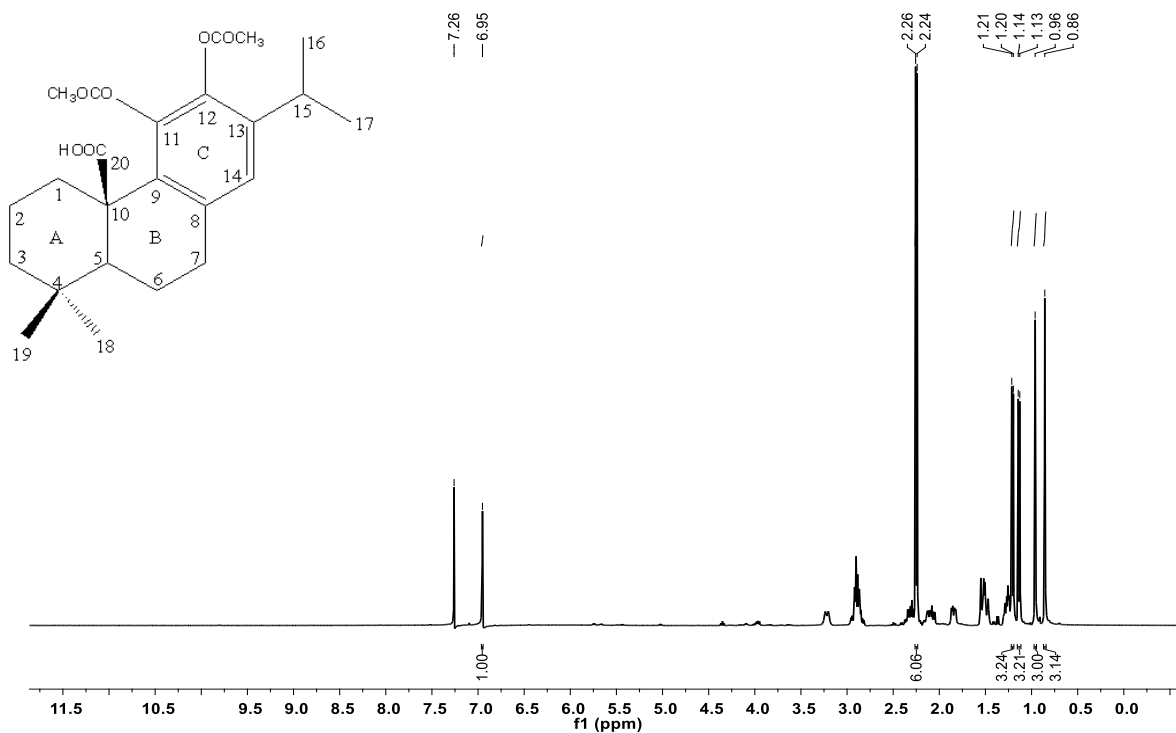


Figura 22: Espectro ¹H-RMN do composto 1

No espectro de ¹³C-RMN (Fig. 23) consegue-se identificar vinte e quatro carbonos, o que está de acordo com o número de carbonos presentes na estrutura do composto 1. A presença dos grupos acetatos pode ser confirmada pelos sinais a δ 168,80 e 168,34 ppm, os quais correspondem aos carbonos carboxílicos dos grupos introduzidos. Além do referido, é possível observar um sinal a δ 179,61 ppm, correspondem ao C₂₀ do grupo carboxílico e seis sinais entre δ 141,49 ppm e 125,36 ppm correspondentes aos átomos de carbono do anel aromático.

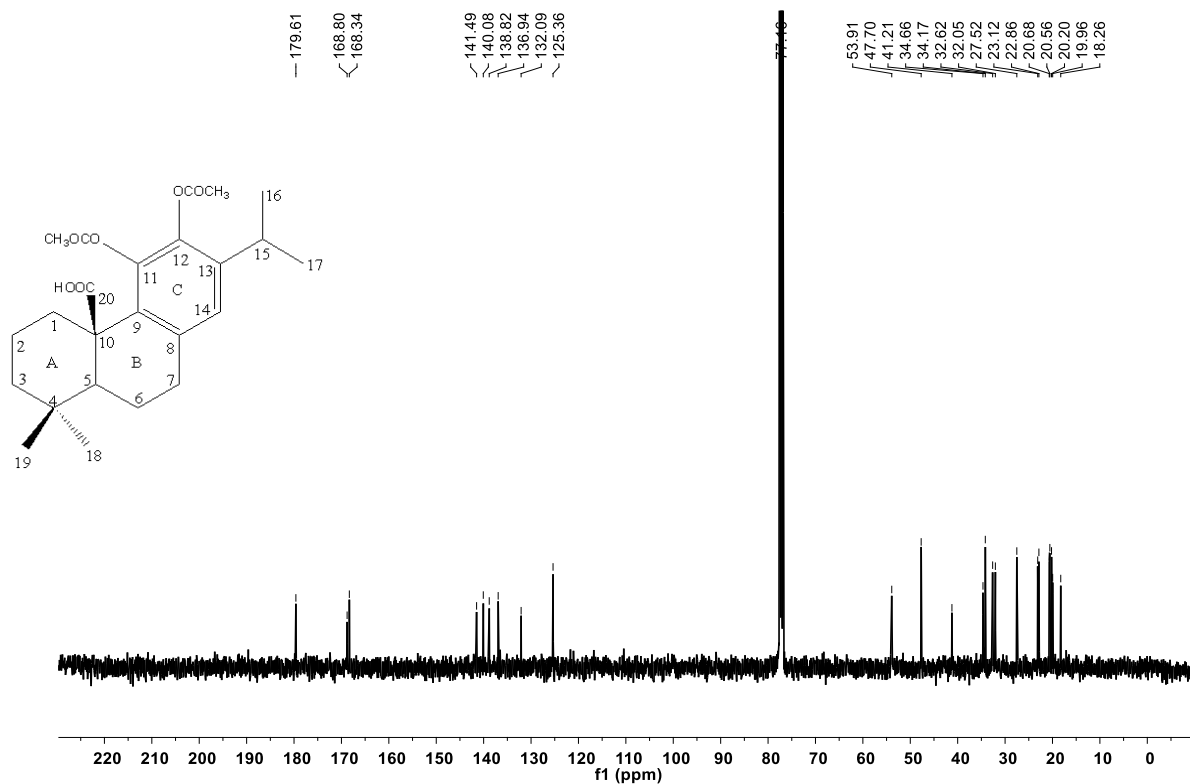


Figura 23: Espectro ¹³C-RMN do composto 1

No espectro de RMN de Dept-135 (Fig. 24) do composto 1 foi possível identificar a presença de cinco carbonos CH₂ (sinais negativos) e nove carbonos correspondentes aos CH e CH₃ (sinais positivos), como seria espectável para este composto.

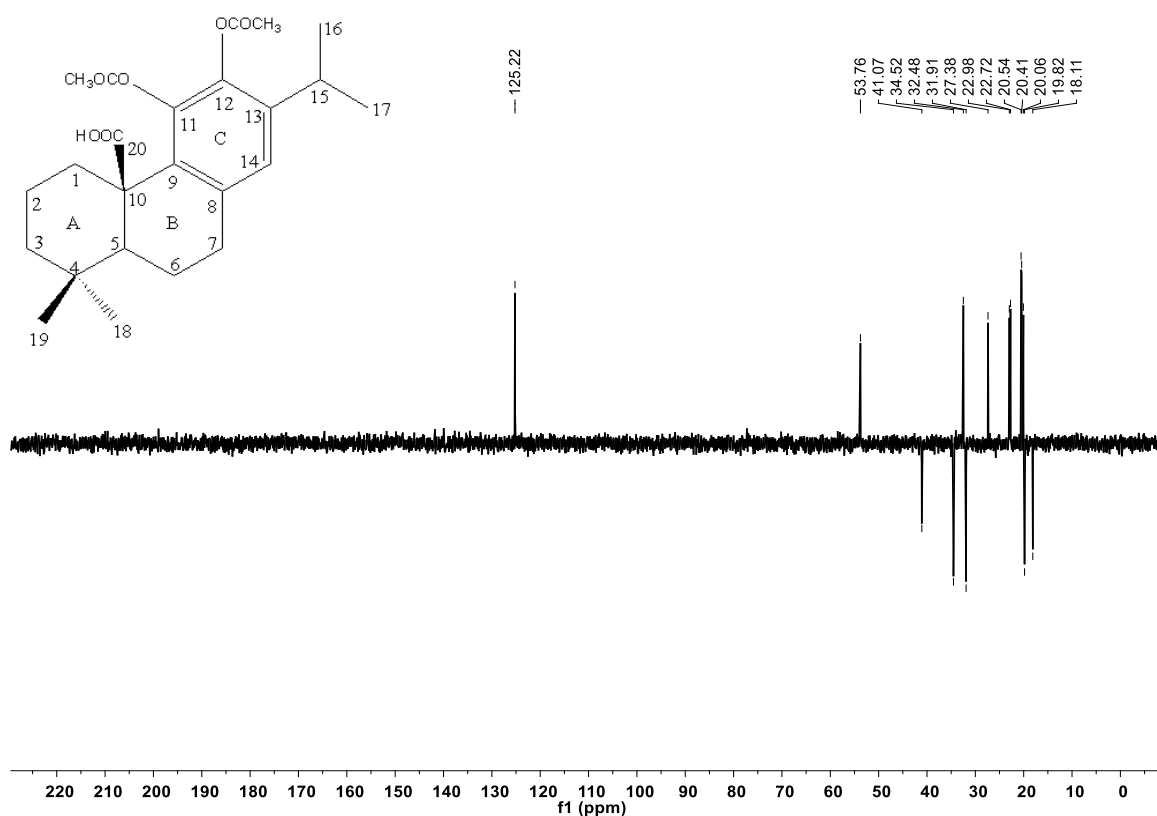


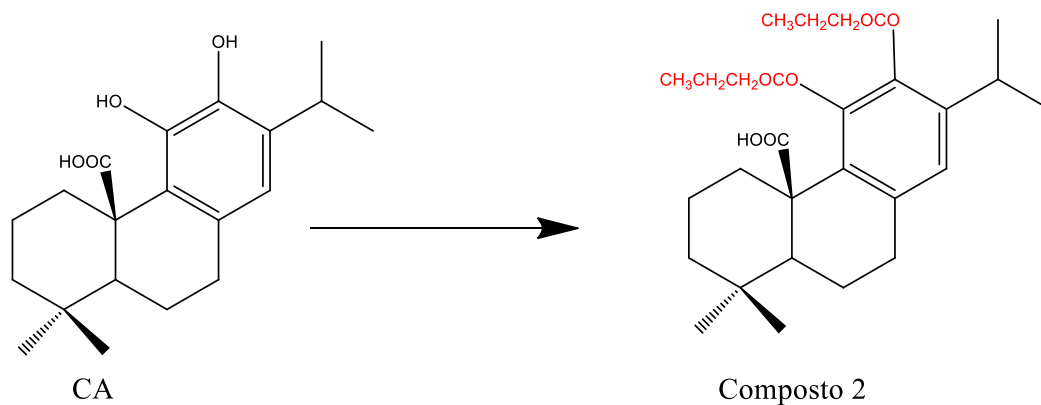
Figura 24: Espetro Dept-135 do Composto 1

Tabela 2: Comparação do número de carbonos entre o Ácido carnósico e o Composto 1

	<i>Ácido Carnósico</i>	<i>Composto 1</i>
<i>Carbonos primários (CH₃)</i>	4	6
<i>Carbonos secundários (CH₂)</i>	5	5
<i>Carbonos terciários (CH)</i>	3	3
<i>Carbonos quaternários</i>	8	10
<i>Nº total de carbonos</i>	20	24

3.3.1.2 Composto 2

O composto 2 foi obtido através da reação de esterificação do ácido carnósico com anidrido butírico em THF e DMAP, à temperatura ambiente, tendo sido obtido com bom rendimento (Esquema 6). A sua estrutura química foi posteriormente caracterizada através da técnica de RMN (¹H; ¹³C; Dept-135).



Esquema 6: Reagentes e condições: Anidrido Butírico, DMAP, THF seco, temperatura ambiente

A presença do grupo dibutanoato foi confirmada no espectro de ^1H -RMN (Fig. 25) pela observação não só de dois sinais multipletos a δ 1,73 e 2,47 ppm, correspondentes aos prótons dos quatro metilenos dos grupos butanoatos, como também pela presença de dois sinais multipletos a δ 1,02 e 1,01 ppm, correspondente aos dois metilos do grupo butanoato.

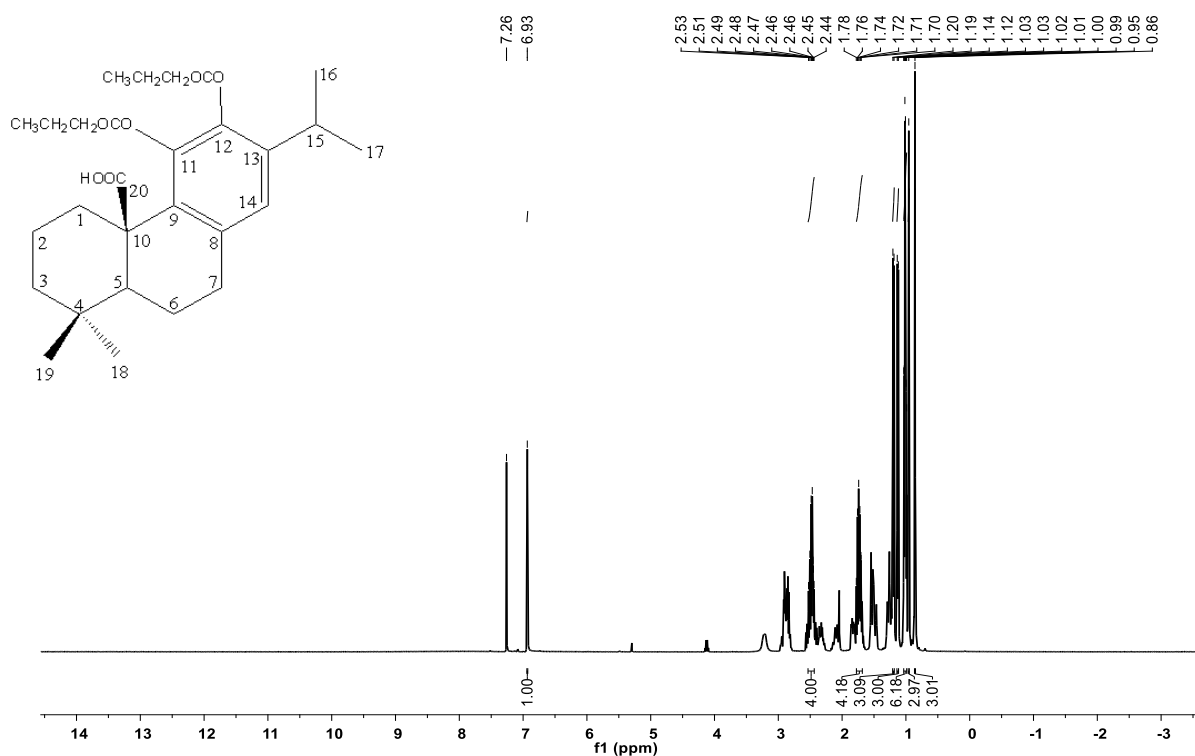


Figura 25: Espectro de ^1H -RMN do composto 2

No espectro de ^{13}C -RMN (Fig. 26) consegue-se identificar vinte e oito carbonos, que está de acordo com o número de carbonos presentes na estrutura do composto 2. A presença dos

grupos butanoatos foi confirmada pelos dois sinais a δ 171,27 e 170,65 ppm, os quais correspondem aos carbonos carbonílicos do grupo butanoato.

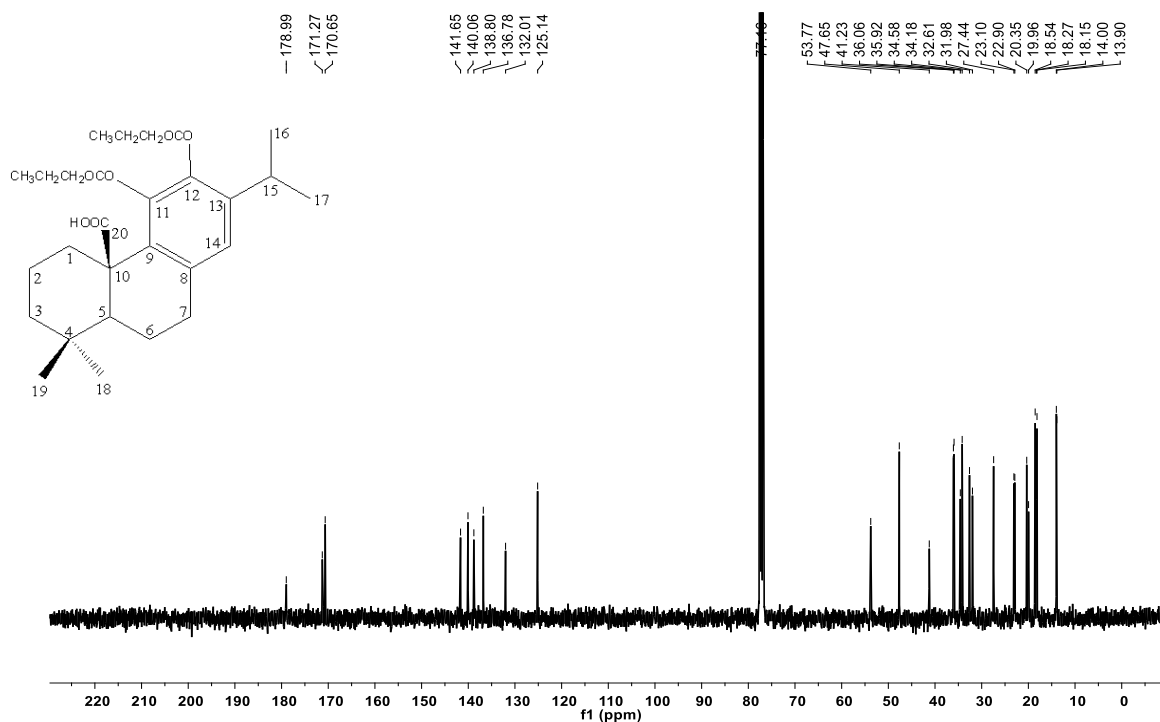


Figura 26: Espetro ^{13}C -RMN do composto 2

No espectro de RMN de Dept-135 do composto 2 (Fig. 27) foi possível identificar a presença de nove carbonos CH₂ (sinais negativos) e nove carbonos correspondentes aos CH e CH₃ (sinais positivos), como seria espectável para o composto 2.

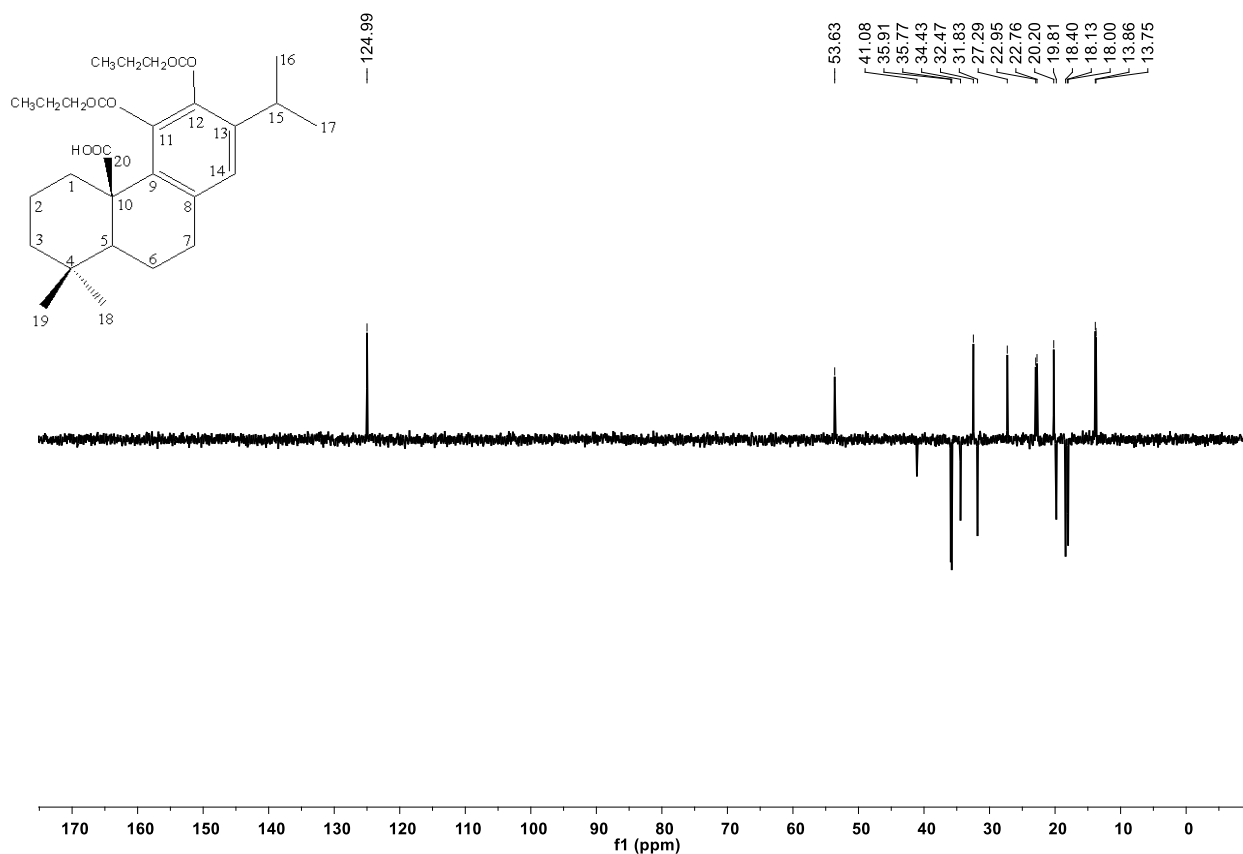


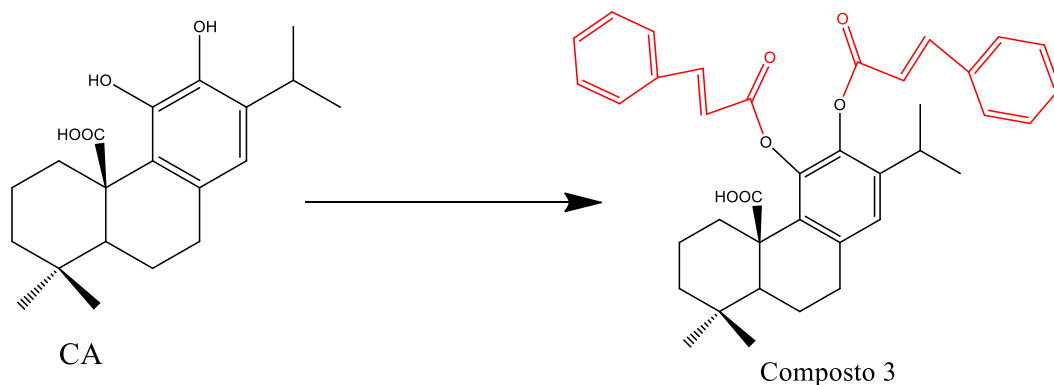
Figura 27: Espectro Dept-135 do composto 2

Tabela 3: Comparação do número de carbonos entre o Ácido carnósico e o Composto 2

	<i>Ácido Carnósico</i>	<i>Composto 2</i>
<i>Carbonos primários (CH₃)</i>	4	6
<i>Carbonos secundários (CH₂)</i>	5	9
<i>Carbonos terciários (CH)</i>	3	3
<i>Carbonos quaternários</i>	8	10
<i>Nº total de carbonos</i>	20	28

3.3.1.1 Composto 3

O composto 3 foi obtido através de uma reação de esterificação do ácido carnósico com o cloreto de cinamóilo na presença de tolueno seco e DMAP, a 60°C sob atmosfera de azoto (Esquema 7). A sua estrutura química foi posteriormente caracterizada através da técnica de RMN (¹H; ¹³C; Dept-135).



Esquema 7: Reagentes e condições: Cloreto de cinamoílo, DMAP, tolueno seco, 60°C, atmosfera de N₂

Nota: a numeração dos carbonos dos grupos cinamoílo foi efetuada apenas para simplificar a atribuição dos sinais nos espectros ¹H, ¹³C e Dept-135.

No espectro de ¹H-RMN do composto 3 (Fig. 28) é possível confirmar a introdução dos dois grupos cinamoílo pela observação de dez sinais entre δ [7,44 e 7,21] ppm, correspondentes aos prótons dos anéis aromáticos e de quatro dubletos a δ 7,82; 6,55 e 6,48 com constantes de acoplamento de 16,0 Hz correspondentes aos grupos metinos das funções cinamoílo introduzidas.

Neste caso em particular é necessário lembrar que foi usado como padrão interno o CDCl₃ para calibrar o espectro o qual apresenta um sinal a δ 7,26 ppm no espectro de ¹H-RMN. Este sinal foi observado entre os sinais dos prótons aromáticos dos grupos cinamoílos introduzidos.

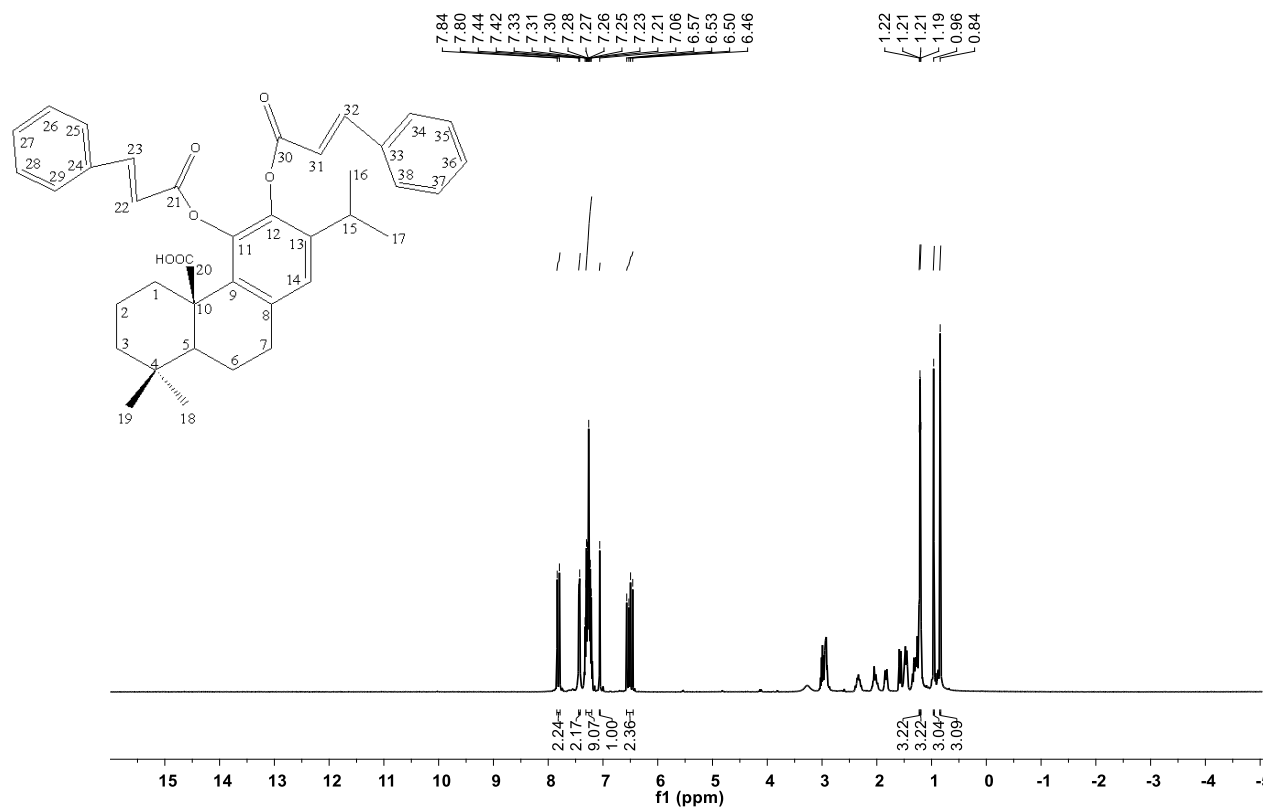


Figura 28: Espectro de ¹H-RMN do composto 3

No espectro de ¹³C-RMN (Fig. 29 e 30) consegue-se identificar trinta e oito carbonos, que está de acordo com o número de carbonos presentes na estrutura esperada para o composto 3. A presença dos dois grupos aromáticos cinamoílo foi confirmado pela observação de dezoito novos sinais a campo baixo quando comparado com o espectro do ácido carnósico. Os sinais observados entre δ [128,96 e 128,42] ppm correspondem a oito carbonos (C₂₅, C₂₆, C₂₈, C₂₉, C₃₄, C₃₅, C₃₇ e C₃₈) dos anéis aromáticos do grupo cinamoílo.

O sinal observado a δ 184,12 ppm corresponde ao C₂₀ do grupo carboxílico, enquanto que os sinais a δ 179,70 e 164,33 ppm correspondem aos carbonos carboxílicos dos cinamoílos (C₂₁ e C₃₀).

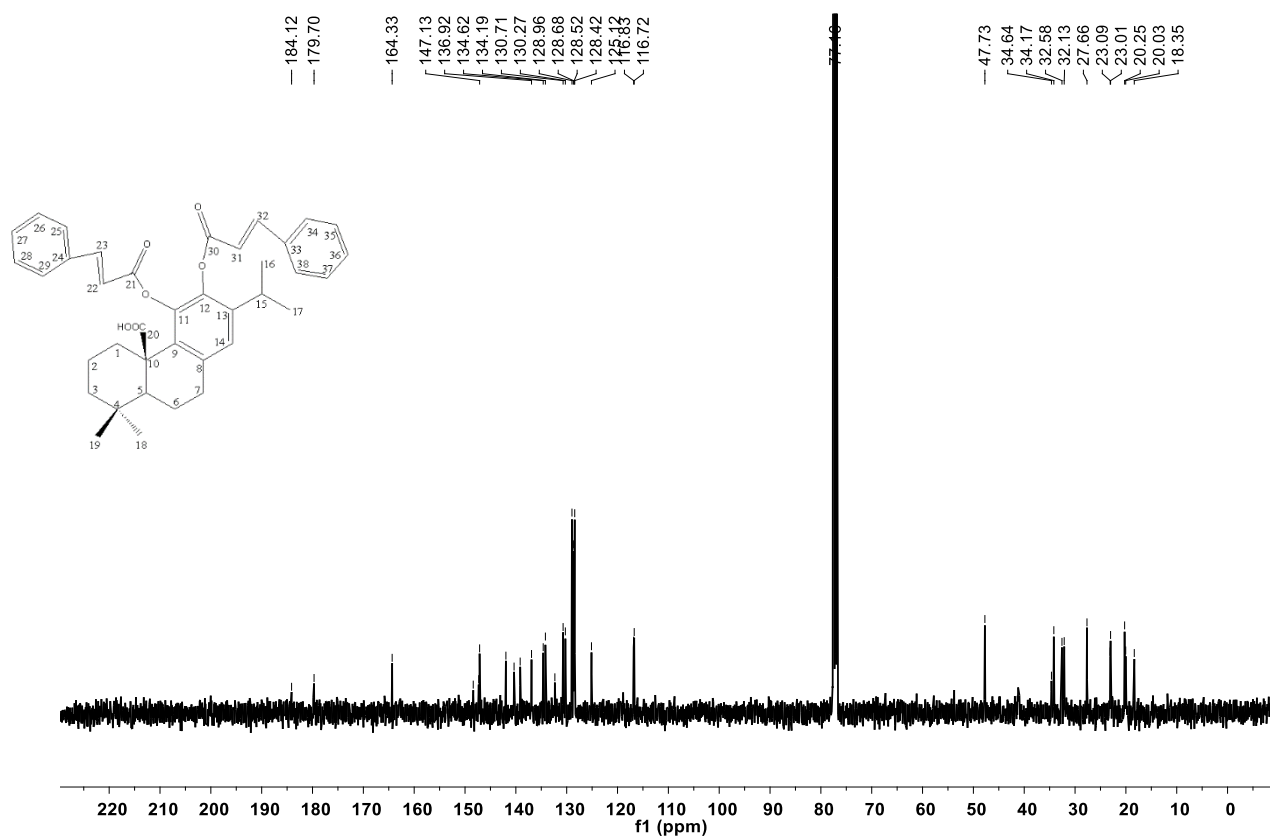


Figura 29: Espetro ^{13}C -RMN do Composto 3

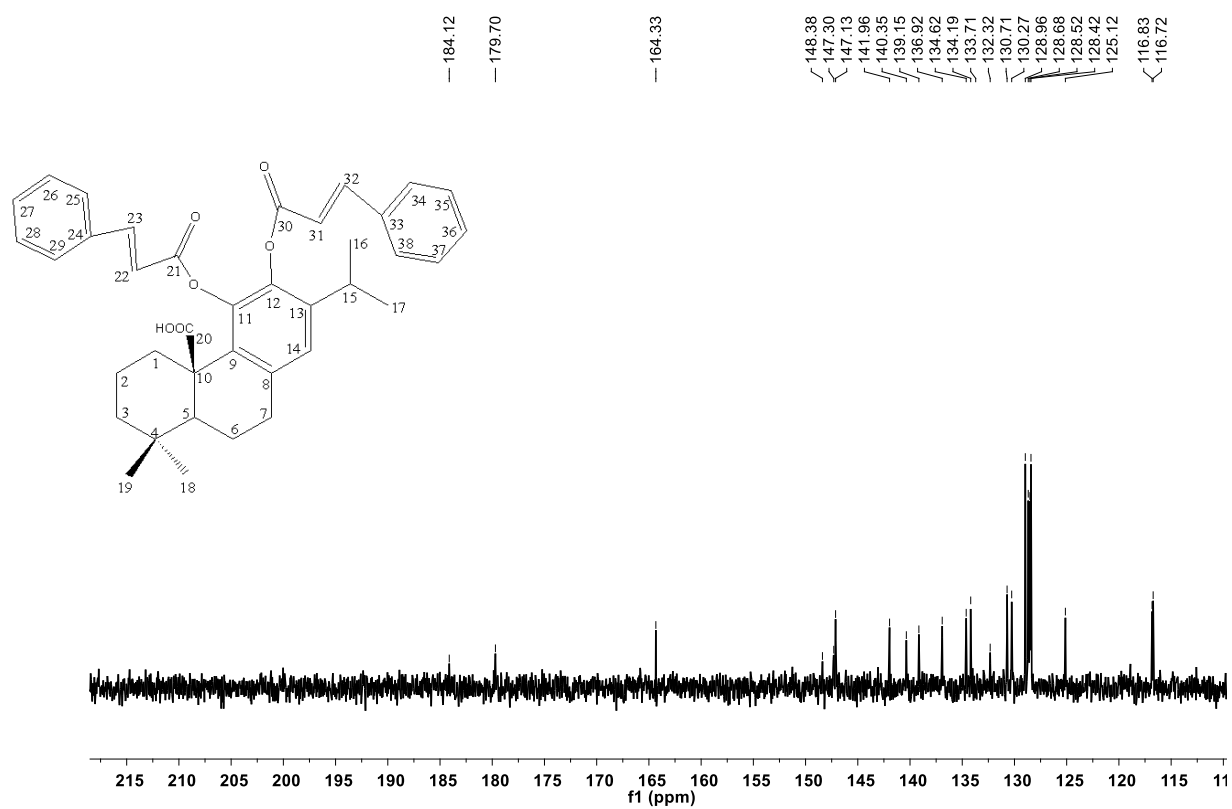


Figura 30: Ampliação do espectro ^{13}C -RMN do composto 3

No espectro de RMN de Dept-135 do composto 3 (Fig. 31 e 32) foi possível identificar a presença de cinco carbonos CH₂ (sinais negativos) e vinte e um carbonos correspondentes aos CH e CH₃ (sinais positivos), como seria espectável para este composto.

Como no espectro de Dept-135 não são observáveis os carbonos quaternários, é possível identificar os carbonos terciários do composto 3. Através do Dept-135, foi possível observar os dois sinais aromáticos dos grupos cinamoílo (C₂₇ e C₃₆) a δ 130,57 e 130,13 ppm e os sinais dos grupos metinos (C₂₂, C₂₃, C₃₁ e C₃₂) do grupo cinamoílo a δ 147,21; 146,99; 116,69 e 116,58 ppm.

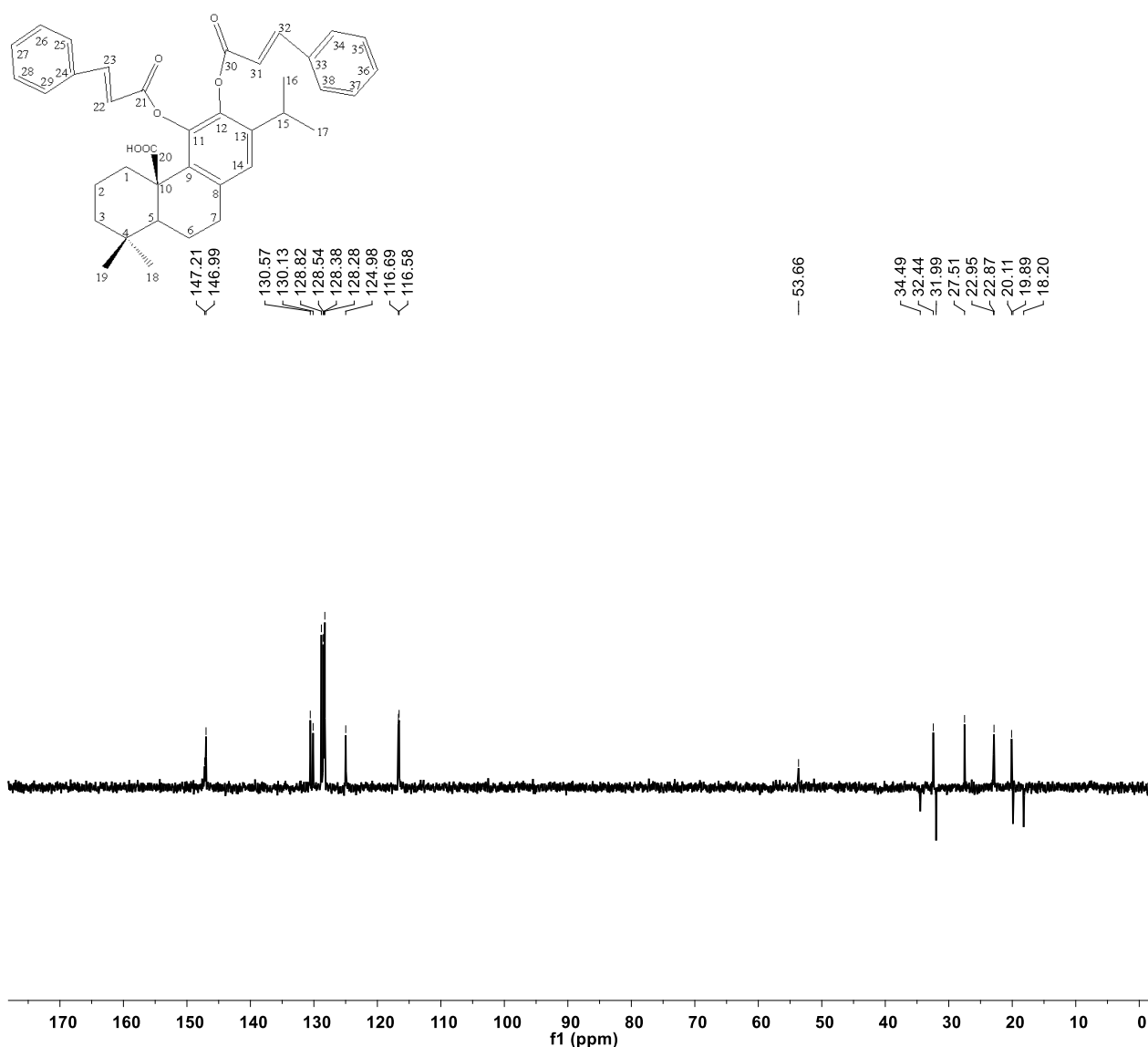


Figura 31: Espectro Dept-135 do composto 3

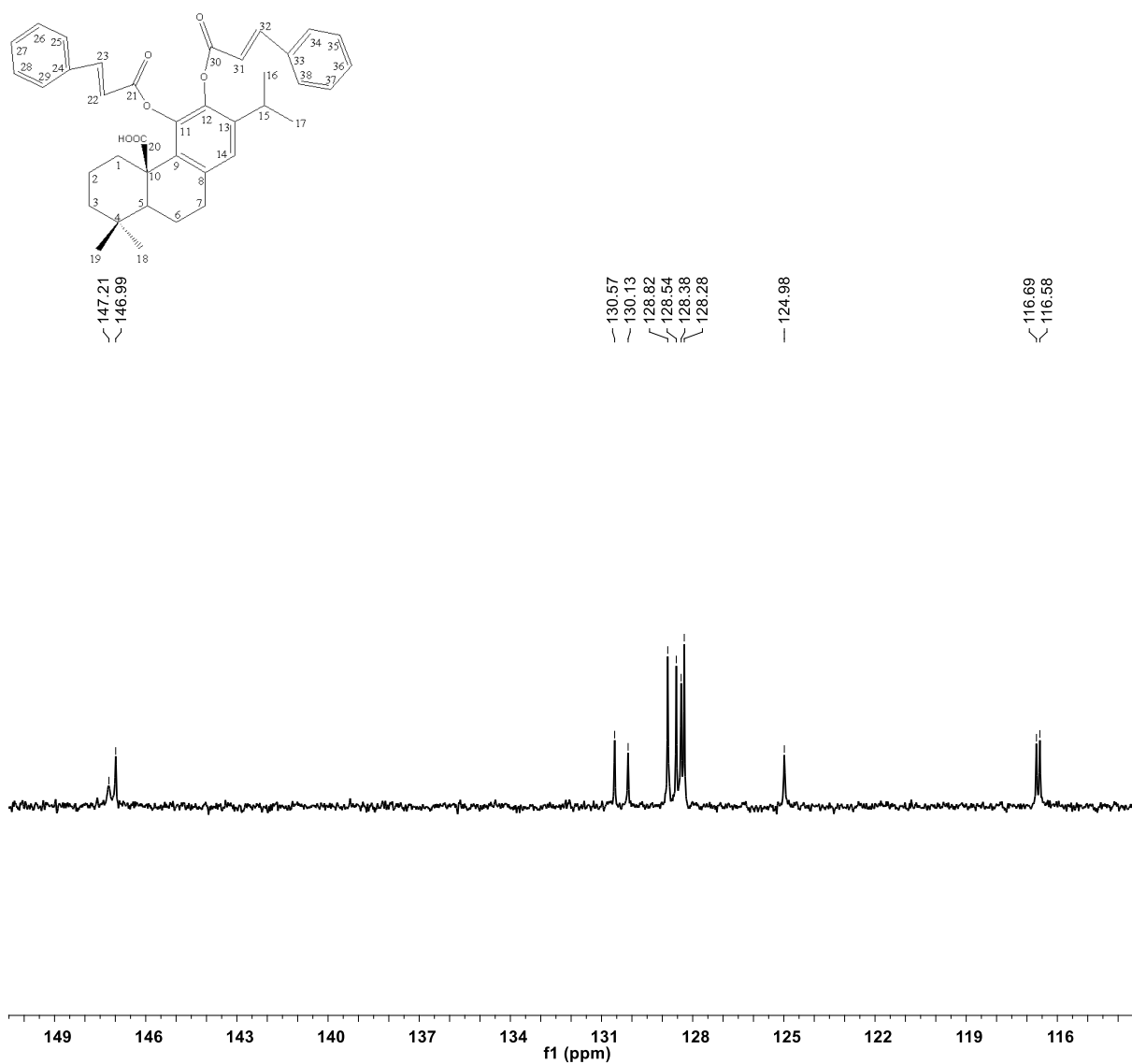


Figure 32: Aproximação do espectro de Dept-135 a campo alto

Tabela 4: Comparação do número de carbonos entre o Ácido carnósico e o Composto 3

	Ácido Carnósico	Composto 3
Carbonos primários (CH ₃)	4	4
Carbonos secundários (CH ₂)	5	5
Carbonos terciários (CH)	3	17
Carbonos quaternários	8	12
Nº total de carbonos	20	38

3.3.2 Derivados da lactonização

Na literatura científica, as lactonas são descritas como sendo ésteres cíclicos, geralmente formados por uma esterificação intramolecular entre o grupo hidroxilo e o grupo ácido carboxílico ou um átomo halogenado presentes na mesma molécula. A distância entre os grupos hidroxilo e carboxilo da molécula dá origem a diferentes tipos de lactonas, as quais podem ser divididas consoante o número de membros presentes no seu anel. A formação das lactonas de anel mais pequeno ocorre de forma mais espontânea que a formação das lactonas de anel macro. As lactonas de anel pequeno podem ser subdivididas em α -lactonas (três membros), β -lactonas (quatro membros), em γ -lactonas (cinco membros) e δ -lactonas (seis membros). (Dewick, 2006; Gawdzik, Kamizela e Szyszkowska, 2015; Shiina, 2007)

Tendo em consideração a literatura científica, a formação das γ -lactonas ser alcançadas através de uma esterificação intramolecular entre um grupo hidroxilo e um ácido carboxílico, na presença de *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) e DMAP em diclorometano seco. O DCC é um poderoso agente desidratante, que remove o protão do ácido carboxílico, produzindo um intermediário, O-acilisourea. Este intermediário reage com o DMAP dando origem a um éster, que após uma reação intramolecular leva à formação da lactona (Fig. 32). (Neises e Steglich, 1978; Siengalewicz, Mulzer e Rinner, 2014; Tsakos *et al.*, 2014)

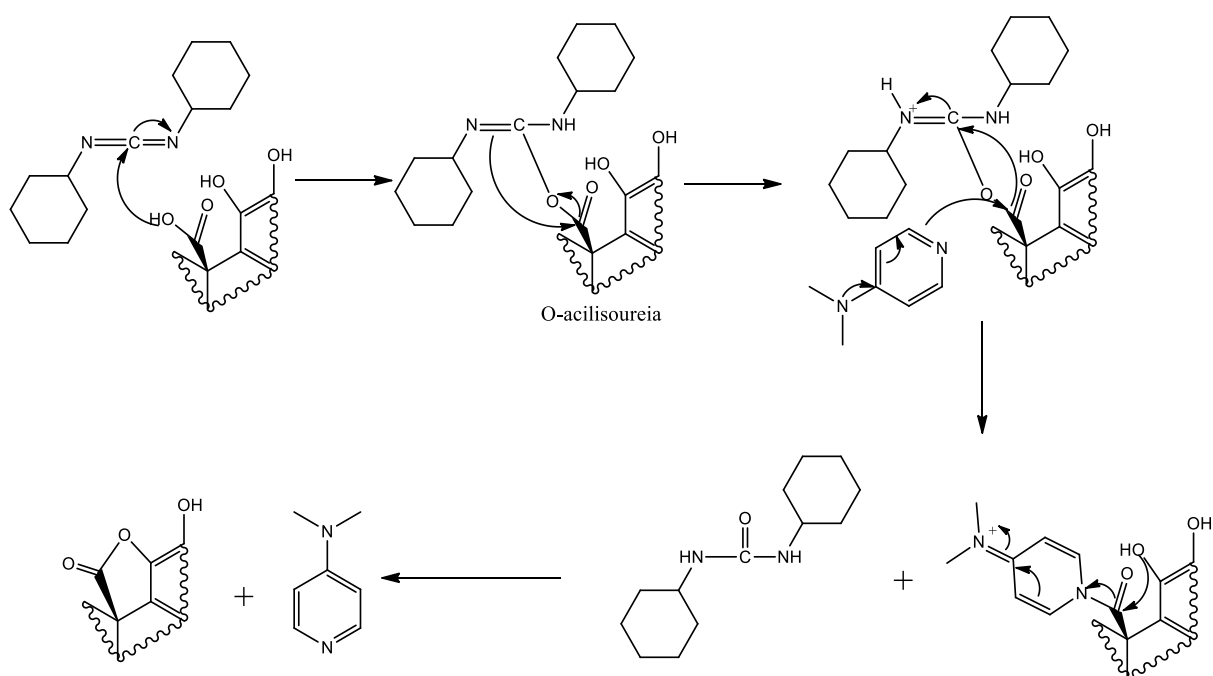
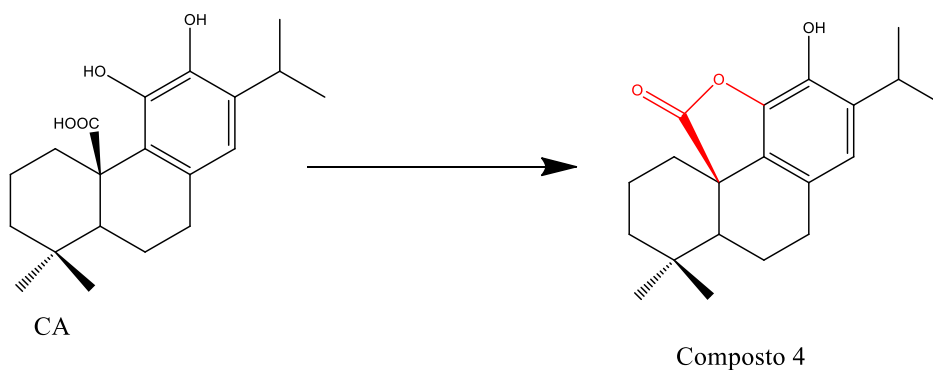


Figure 33: Esquema simplificado da reação de esterificação intermolecular entre o ácido carboxílico e o grupo hidroxilo usando DCC e DMAP. (Neises e Steglich, 1978; Siengalewicz, Mulzer e Rinner, 2014; Tsakos *et al.*, 2014)

3.3.2.1 Composto 4

O composto 4 foi sintetizado através de uma esterificação intermolecular do ácido carnósico na presença de DCC, DMAP em CH_2Cl_2 seco à temperatura ambiente (Esquema 8). A sua estrutura química foi posteriormente caracterizada através da técnica de RMN (^1H ; ^{13}C ; Dept-135).



Esquema 8: Reagentes e Condições: DCC, DMAP em CH_2Cl_2 seco, à temperatura ambiente

No espectro de ^1H -RMN do composto 4 (Fig. 33) foi possível observar um sinal singlete a δ 6,65 ppm, correspondente ao próton aromático H_{14} , e um sinal singlete a δ 4,74 ppm correspondente ao próton do grupo hidroxilo ligado ao C_{12} . Os sinais dos prótons ligados aos C_{16} e C_{17} aparecem como dois dubletos a δ 1,25 e 1,22 ppm e apresentam constantes de acoplamento de 6,9 Hz. Os prótons dos grupos metilos em C_{18} e C_{19} são observáveis como dois singletos a δ 1,15 e 1,08 ppm.

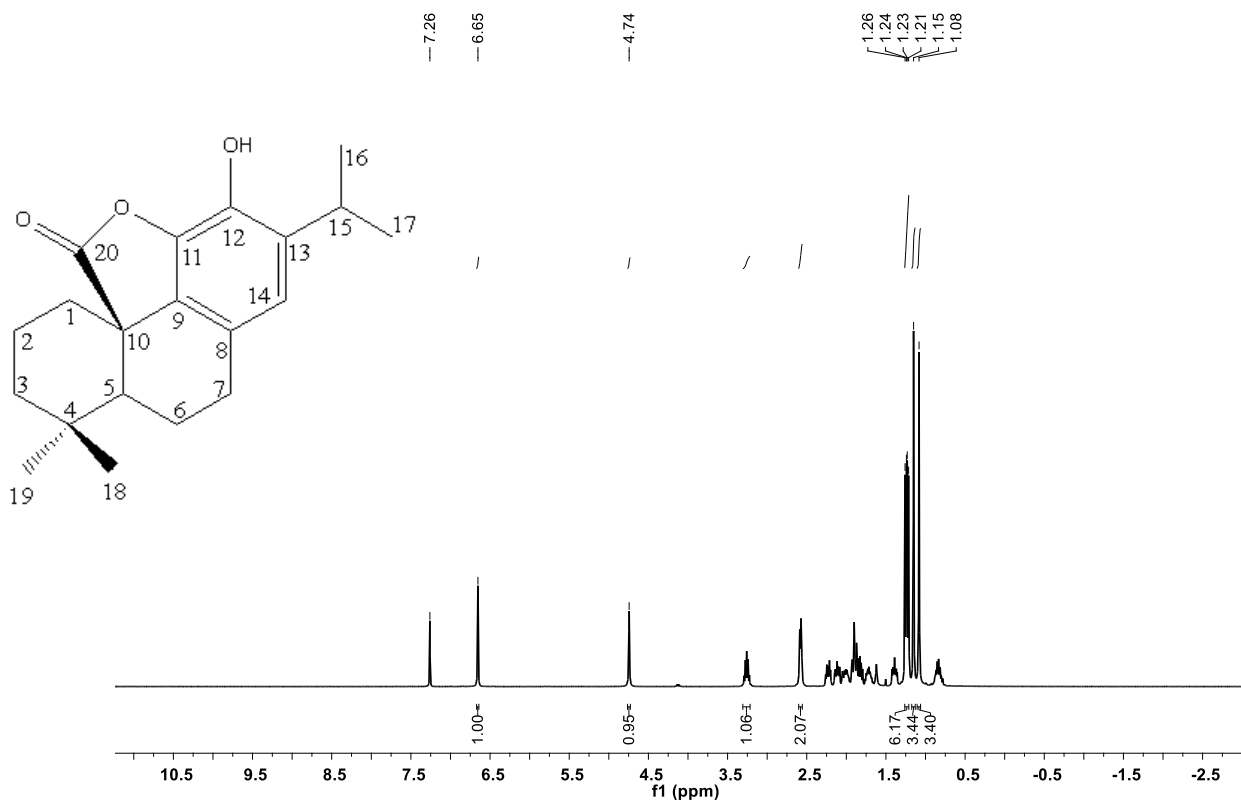


Figura 34: Espectro ¹H-RMN do composto 4

No espectro de ¹³C-RMN do composto 4 (Fig. 34) consegue-se identificar vinte carbonos, que está de acordo com o número de carbonos presentes na estrutura do composto 4. A presença do grupo lactona pode ser confirmada pela observação do sinal do carbono carbonílico a δ 178,39 ppm, que é um valor mais baixo comparativamente ao observado para o carbono carbonílico do ácido carboxílico do substrato de partida (δ 179,81 ppm).

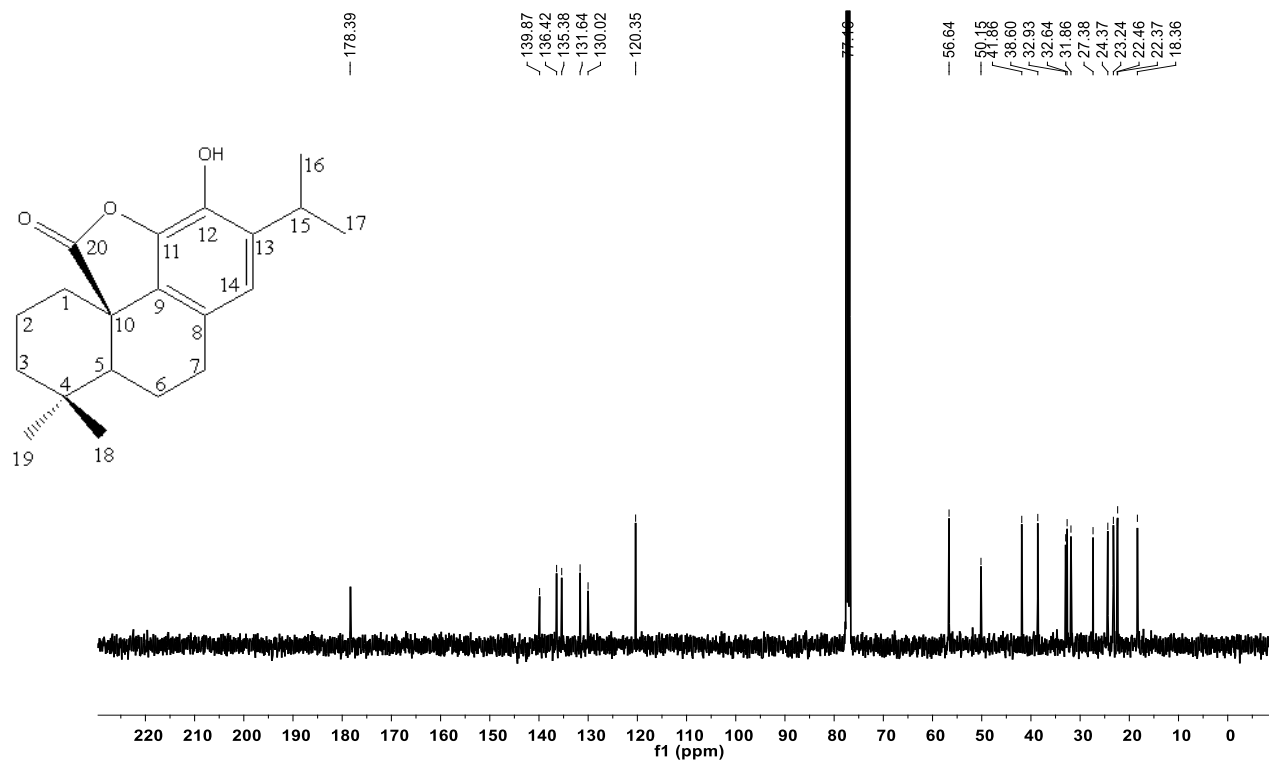


Figura 35: Espectro ¹³C-RMN do composto 4

No espectro de RMN do Dept-135 do composto 4 (Fig. 35) foi possível identificar a presença de cinco carbonos CH₂ (sinais negativos) e sete carbonos correspondentes aos CH e CH₃ (sinais positivos), como seria espectável para este composto.

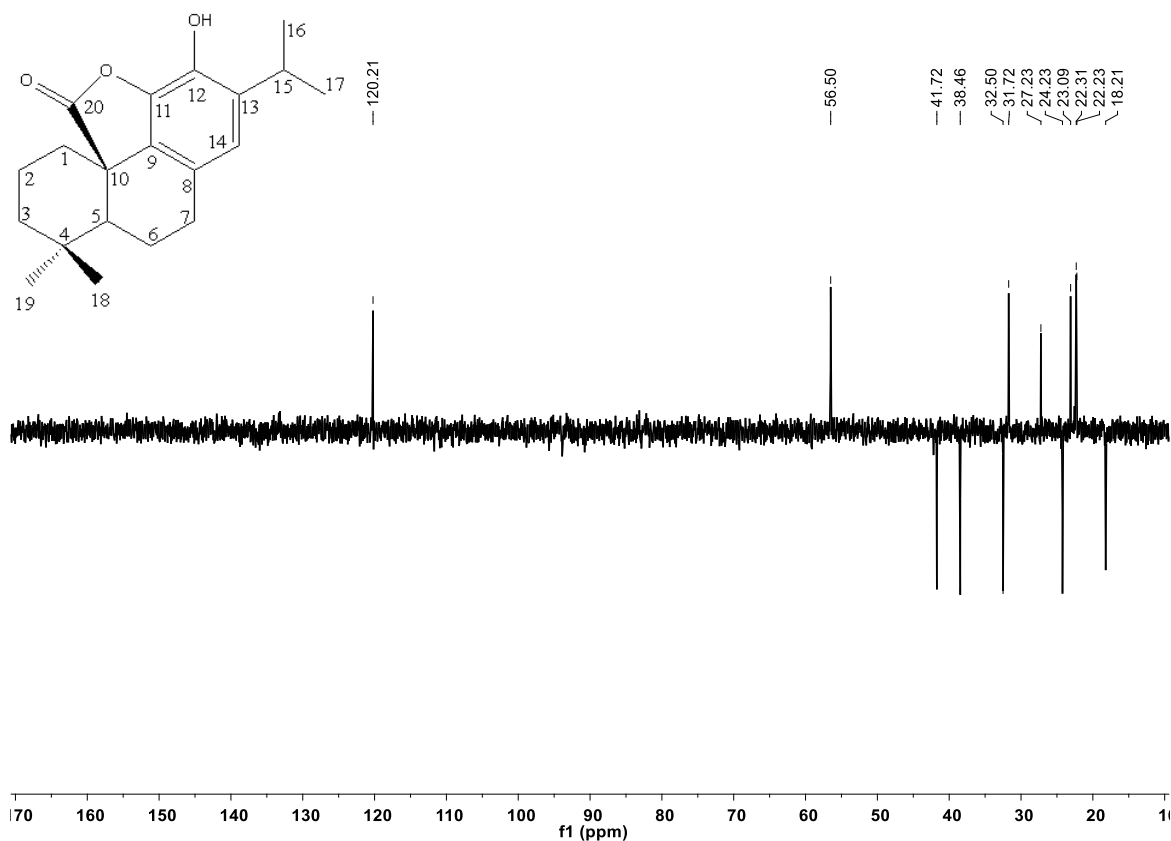


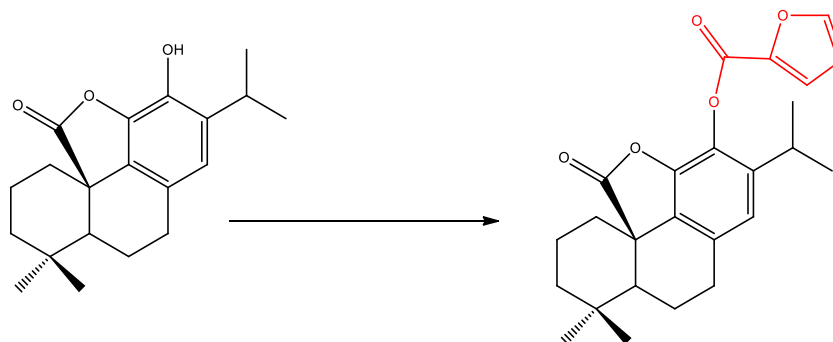
Figura 36: Espectro Dept-135 do composto 4

Tabela 5: Comparação dos números de carbonos entre o Ácido carnósico e o Composto 4

	<i>Ácido carnósico</i>	<i>Composto 4</i>
<i>Carbonos primários (CH₃)</i>	4	4
<i>Carbonos secundários (CH₂)</i>	5	5
<i>Carbonos terciários (CH)</i>	3	3
<i>Carbonos quaternários</i>	8	8
<i>Nº total de carbonos</i>	20	20

3.3.2.2 Composto 5

O composto 5 foi obtido através de uma reação de esterificação a partir do composto 4 com o cloreto de furoílo na presença de tolueno seco e DMAP, a 60°C sob atmosfera de azoto (Esquema 9). A sua estrutura química foi posteriormente caracterizada através da técnica de RMN (¹H; ¹³C; Dept-135).



Esquema 9: Reagentes e condições: Cloreto de furoílo, DMAP, tolueno seco, 60°C, atmosfera N₂

No espectro de ¹H-RMN (Fig. 36) foi possível confirmar a introdução do grupo furoílo através da presença de três novos sinais a campo baixo. Os sinais dos prótons metínicos do grupo furoílo nas posições C₂₅ e C₂₃ são observados como dois dubletos a δ 7,69 e 7,40 ppm, apresentando as respectivas constantes de acoplamento na ordem dos 0,7 e 3,4 Hz. Por outro lado, o sinal do próton em C₂₄ do grupo furoílo aparece como um multipletto a δ 6,60 ppm.

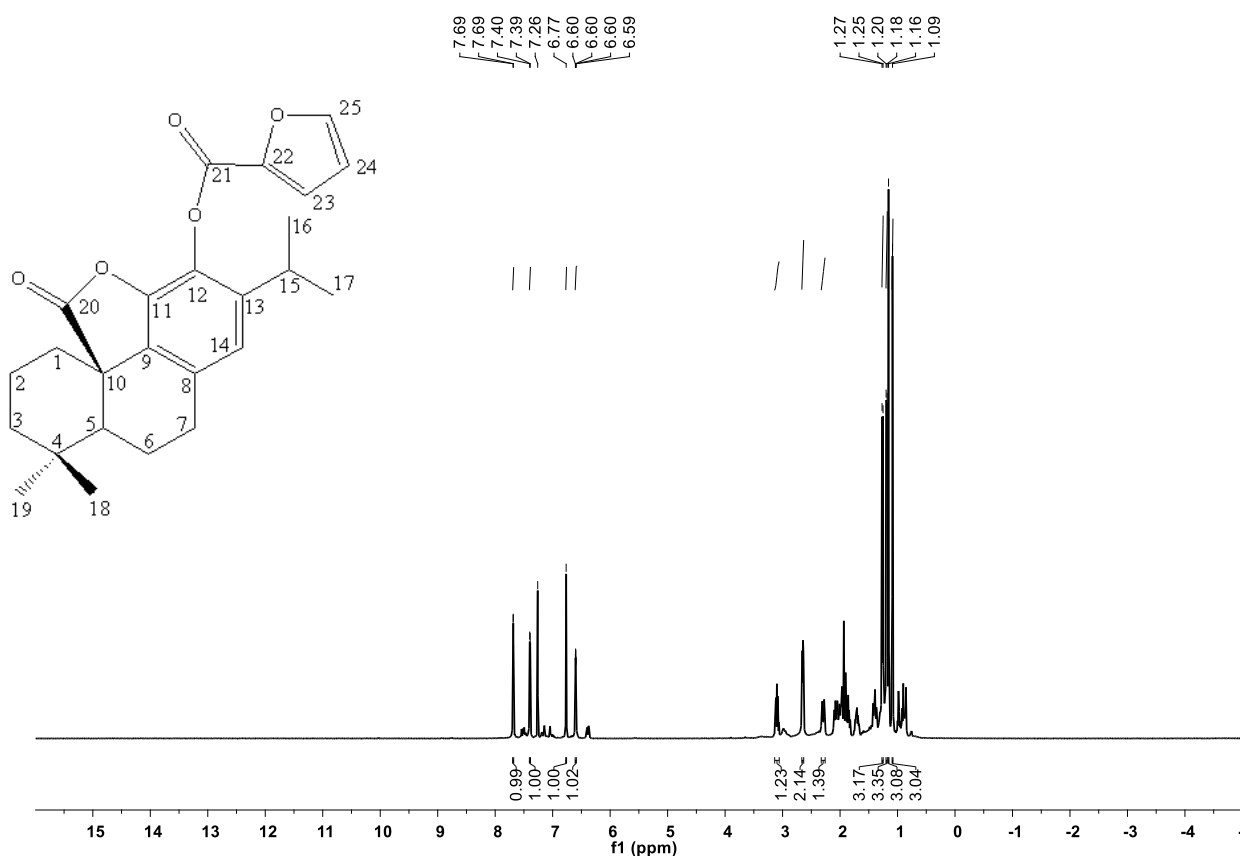


Figura 37: Espectro ¹H-RMN do composto 5

No espectro de ^{13}C -RMN (Fig. 37) consegue-se identificar vinte e cinco carbonos, o que está de acordo com o número de carbonos presentes na estrutura do composto 5. A presença do grupo furoílo foi confirmada pela observação de um sinal a δ 155,94 ppm, que corresponde ao carbono carbonílico do furoílo.

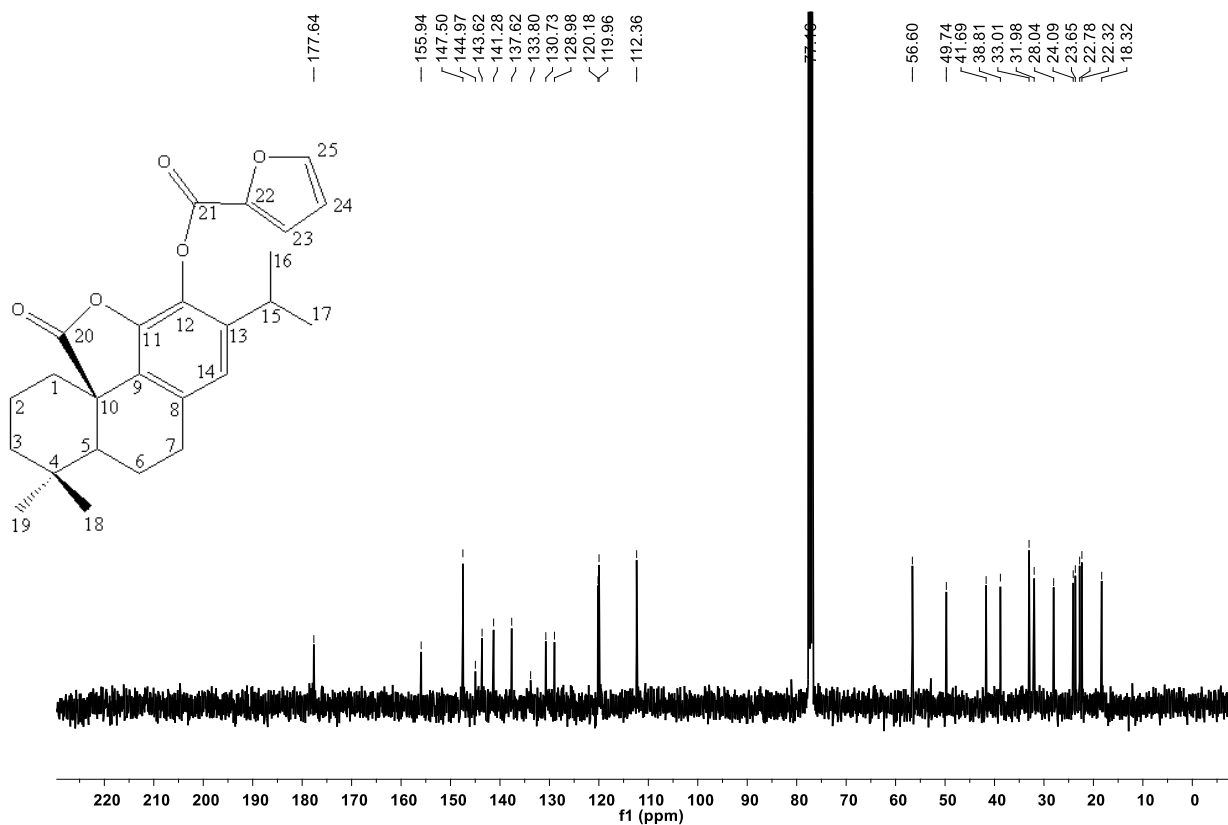


Figura 38: Espectro ^{13}C -RMN do composto 5

No espectro de RMN do Dept-135 do composto 5 (Fig. 38) foi possível identificar a presença de cinco carbonos CH_2 (sinais negativos) e dez carbonos correspondentes aos CH e CH_3 (sinais positivos), como espectável para este composto.

Uma vez que no espectro do Dept-135 os carbonos quaternários não aparecem, comparando os espectros de ^{13}C -RMN e Dept-135 é possível identificar os sinais a δ 147,36 e 112,22 ppm como sendo os carbonos dos dois metinos do grupo furoílo.

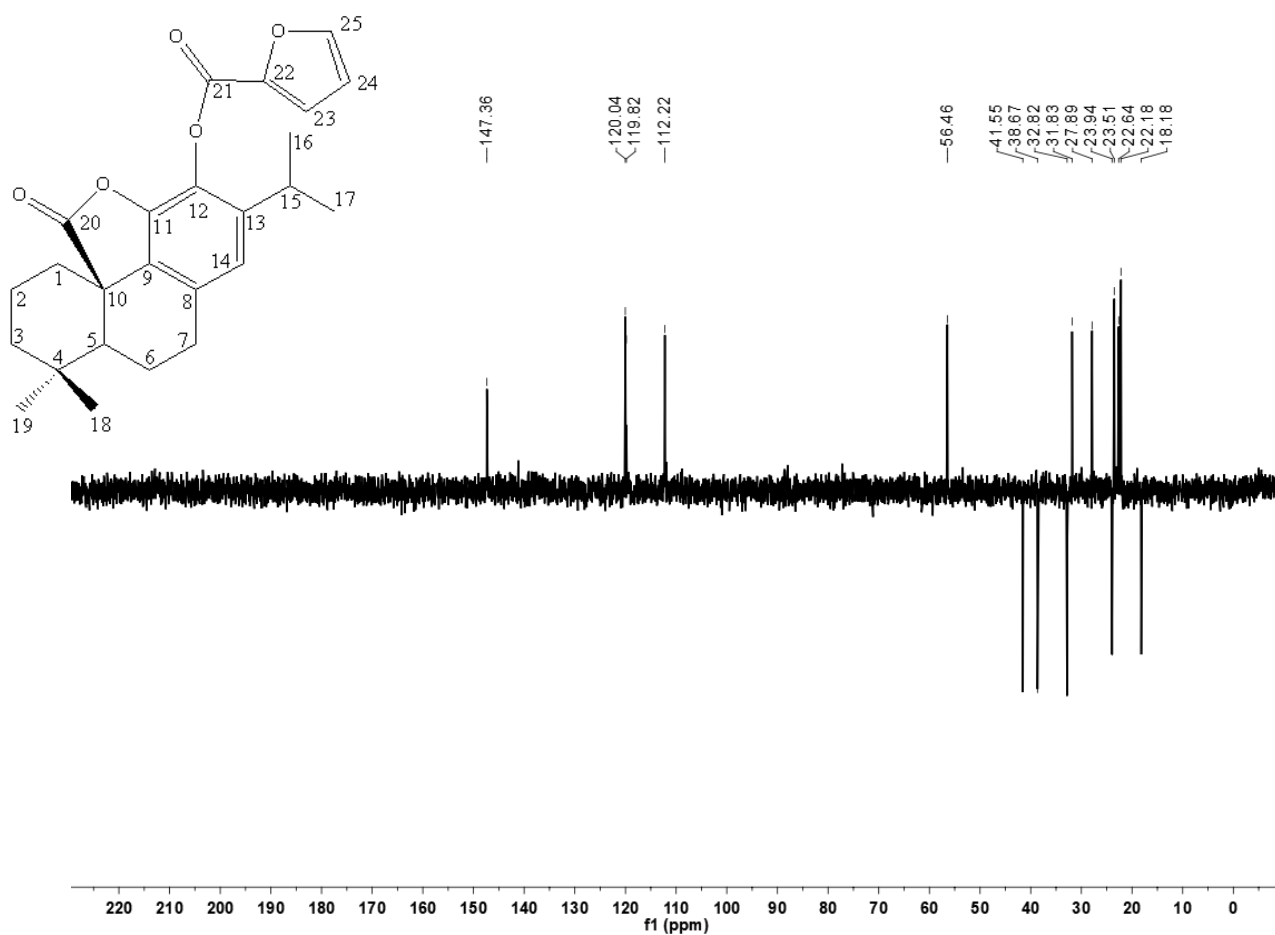


Figura 39: Espetro Dept-135 do composto 5

Tabela 6: Comparação dos números de carbonos entre o Composto 4 e o Composto 5

	Composto 4	Composto 5
Carbonos primários (CH₃)	4	4
Carbonos secundários (CH₂)	5	5
Carbonos terciários (CH)	3	6
Carbonos quaternários	8	10
Nº total de carbonos	20	25

Conclusão

4. Conclusão

Este trabalho tinha como principal objetivo a preparação de novos derivados semissintéticos do ácido carnósico e posterior elucidação estrutural através de técnicas de RMN (^1H , ^{13}C e Dept-135).

A estratégia definida para este trabalho experimental envolveu a modificação estrutural do anel C através de diferentes reações de esterificação dos grupos hidroxilos nas posições C₁₁ e C₁₂, uma esterificação intramolecular entre o grupo carboxilo em C₂₀ e o grupo hidroxilo em C₁₁. Posteriormente realizou-se a esterificação do grupo hidroxilo em C₁₂ de um dos derivados.

Ao longo do trabalho experimental optou-se por metodologias eficazes e económicas que permitissem obter os produtos finais após purificação com bons rendimentos.

A técnica de RMN aplicada à caracterização dos derivados do ácido carnósico revelou ser uma importante ferramenta de caracterização estrutural, uma vez que através da análise da natureza de cada sinal e por comparação dos desvios químicos com o substrato inicial e compostos semelhantes, podemos determinar os tipos de alteração funcionais efetuadas.

Após análise do trabalho realizado é possível concluir que a estratégia adotada foi bem sucedida, tendo contribuído para aprofundar o conhecimento relativo à reatividade química e estabilidade dos novos derivados do ácido carnósico.

Numa perspetiva futura, os derivados apresentados nesta tese de mestrado poderão ser sujeitos a ensaios *in vitro* para determinar a sua atividade biológica ou tornarem-se um ponto de partida para o desenvolvimento de novos derivados semissintéticos, que permitam potencializar as atividades do ácido carnósico e estabelecer a relação estrutura-atividade.

Parte experimental

5. Parte experimental

5.1 Equipamento laboratorial

5.2 Solventes e reagentes

5.3 Procedimentos experimentais

5. Parte experimental

5.1 Equipamento laboratorial

Os espectros de RMN (^1H , ^{13}C e Dept-135) foram obtidos a partir do espectrómetro Bruker Avance III 400 MHz (^1H -RMN) e 100 MHz (^{13}C -RMN).

Os desvios químicos (δ) foram medidos em partes por milhões (ppm). O clorofórmio deuterado (CDCl_3) foi usado como padrão interno, apresentando os sinais de referência δ 7,26 e δ 77,00 ppm nos espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN, respetivamente. As constantes de acoplamento (J) são expressas em Hertz (Hz).

Para análise das reações químicas usou-se cromatografia de camada fina (CCF), em placas de sílica kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) em suporte de alumínio revestido com o indicador de fluorescência F₂₅₄ (para deteção de absorção ultra violeta).

A separação e purificação dos compostos foi realizada usando as técnicas CCF preparativa, em placas com sílica gel 60HF₂₅₄/sílica gel 60G kieselgel (Merck) e CC, usando sílica kieselgel 60 (230-400 mesh, Merck).

5.2 Solventes e reagentes

O ácido carnósico, 4-dimetilaminopiridina (DMAP), anidrido acético ($(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$), anidrido butírico ($(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CO})_2\text{O}$), cloreto de cinamoílo ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}=\text{CHCOCl}$), cloreto de furoílo ($\text{C}_5\text{H}_3\text{ClO}_2$) e N,N'-Diciclohexilcarbodiimida (DCC), foram adquiridos à Sigma Aldrich Co. O tetrahidrofurano (THF), diclorometano e tolueno foram adquiridos à Merck Co. Os solventes usados no *work-up* foram adquiridos à VWR Portugal e apresentavam qualidade analítica. Os reagentes usados para as soluções aquosas de bicarbonato de sódio (NaHCO_3 , 10%) e o cloreto de sódio (NaCl , 10%) foram obtidos sob a forma comercial e produzidos no laboratório como soluções de lavagens para o *work-up*. Todos os solventes usados nas reações foram previamente destilados e secos de acordo com a literatura. (Armarego e Chai, 2003)

5.3 Procedimentos experimentais

5.3.1 Composto 1

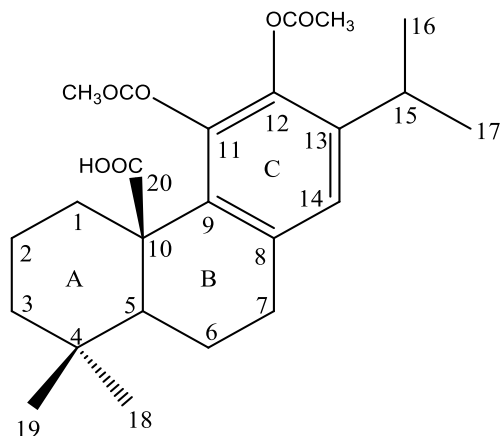


Figura 40: Estrutura química do composto 1

O composto 1 foi preparado de acordo com a literatura (Gonçalves (a) *et al.*, 2016; Gonçalves (B) *et al.*, 2016).

A uma mistura de ácido carnósico (AC) (150 mg; 0,45 mmol) em THF seco (3,5 ml), sob agitação e à temperatura ambiente, foi adicionado anidrido acético (0,24 ml; 2,52 mmol) e DMAP (15% da massa do AC). Após 23h 30min, evaporou-se o THF sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi re-dispersado em água destilada (15 ml) e extraído com acetato de etilo (3 x 30 ml). A fase orgânica resultante foi lavada com uma solução aquosa de HCl 5% (40 ml), uma solução aquosa de NaHCO₃ a 10% (40 ml), água destilada (2 x 40 ml) e uma solução aquosa de NaCl a 10% (40 ml). Após secar sob Na₂SO₄ anidro, a fase orgânica foi filtrada e evaporada sob pressão reduzida até obtenção de um produto sólido branco (182 mg; 97%).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 6,95 (s, 1H, H₁₄); 2,26 (s, 3H, CH₃CO); 2,24 (s, 3H, CH₃CO); 1,21 (d, *J*=6,9 Hz, 3H); 1,14 (d, *J*=6,9); 0,96 (s, 3H); 0,86 (s, 3H) ppm. ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 179,61 (COOH); 168,80 (COCH₃); 168,34 (COCH₃); 141,49; 140,08; 138,82; 136,94; 132,09; 125,36 (C₁₄); 53,91; 47,70; 41,21; 34,66; 34,17; 32,62; 32,05; 27,52; 23,12; 22,66; 20,68; 20,56; 20,20; 19,96; 18,26 ppm.

5.3.2 Composto 2

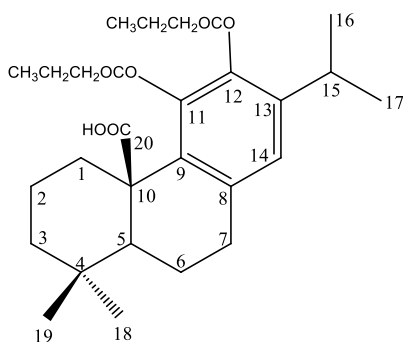


Figura 41: Estrutura química do composto 2

O composto 2 foi preparado de acordo com a literatura (Gonçalves (a) *et al.*, 2016; Gonçalves (B) *et al.*, 2016).

A uma mistura de ácido carnósico (AC) (250 mg; 0,75 mmol) em THF seco (14 ml), sob agitação e à temperatura ambiente, foi adicionado anidrido butírico (0,50 ml; 3,15 mmol) e DMAP (15% da massa do AC). Após 4h 20min, evaporou-se o THF sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi re-dispersado em água destilada (50 ml) e extraído com acetato de etilo (3 x 125 ml). A fase orgânica resultante foi lavada com solução aquosa de HCl 5% (150 ml), uma solução aquosa de NaHCO₃ a 10% aquoso (150 ml), água destilada (2 x 150 ml) e uma solução aquosa de NaCl a 10% aquoso (150 ml). Após secar sob Na₂SO₄ anidro, a fase orgânica foi filtrada e evaporada sob pressão reduzida até obtenção de um crude amarelo. O crude foi purificado através de uma CCF preparativa (éter de petróleo: acetato de etilo 3:1) com obtenção de um produto sólido branco. (250 mg; 71%).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 6,93 (s, 1H, H₁₄); 2,47 (m, 2H, OCOCH₂CH₂CH₃); 1,73 (m, 2H, OCOCH₂CH₂CH₃); 1,20 (d, *J*=6,9 Hz, 3H); 1,13 (d, *J*=6,9 Hz, 3H); 1,02 (m, 1H, OCOCH₂CH₂CH₃); 1,01 (m, 1H, OCOCH₂CH₂CH₃); 0,95 (s, 3H); 0,86 (s, 3H) ppm. ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 178,99 (COOH); 171,27 (OCOCH₂CH₂CH₃); 170,65 (OCOCH₂CH₂CH₃); 141,65; 140,06; 138,80; 136,78; 132,01; 125,14 (C₁₄); 53,77; 47,65; 41,23; 36,06; 35,92; 34,58; 34,18; 32,61; 31,98; 27,44; 23,10; 22,90; 20,35; 19,96; 18,54; 18,27; 18,15; 14,00; 13,90 ppm.

5.3.3 Composto 3

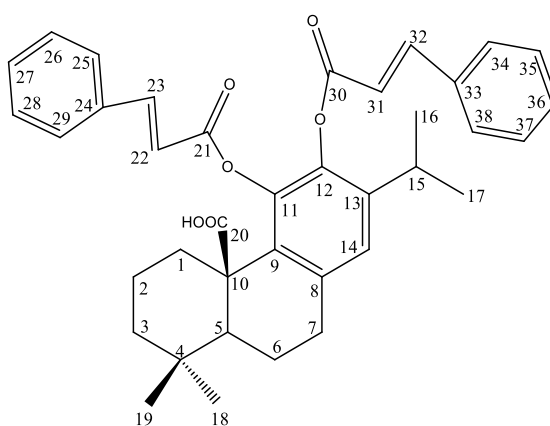


Figura 42: Estrutura química do composto 3

O composto 3 foi preparado de acordo com a literatura (Gonçalves (a) *et al.*, 2016; Gonçalves (B) *et al.*, 2016).

A uma mistura de ácido carnósico (AC) (150 mg; 0,45 mmol) em tolueno seco (13 ml), sob agitação e à temperatura de 60 °C, foi adicionado cloreto de cinamóilo (226,578 mg; 1,36 mmol) e DMAP (166,151 mg; 1,36 mmol) colocando a mistura sob atmosfera de azoto. Após 45min, evaporou-se o tolueno sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi re-dispersado em água destilada (40 ml) e extraído com acetato de etilo (3 x 80 ml). A fase orgânica resultante foi lavada com água destilada (3 x 120 ml) e uma solução aquosa de NaCl a 10% (120 ml). Após secar com Na₂SO₄ anidro, a fase orgânica foi filtrada e evaporada sob pressão reduzida até obtenção de crude amarelo. O crude foi purificado através de uma CCF preparativa (éter de petróleo: acetato de etilo 3:1) com obtenção de um produto sólido branco amarelado. (102 mg; 38%).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7,82 (d, *J*=16,0 Hz, 2H); 7,44; 7,42; 7,33; 7,31; 7,30; 7,28; 7,27; 7,25; 7,23; 7,21, 7,06 (s, 1H, H₁₄); 6,55 (d, *J*=16,0 Hz, 1H); 6,48 (d, *J*=16,0 Hz, 1H); 1,22 (d, *J* = 5,2 Hz); 1,20 (d, *J* = 5,2 Hz, 3H); 0,96 (s, 3H); 0,84 (s, 3H) ppm. ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 184,12 (COOH); 179,70 (COOR); 164,33 (COOR); 148,38; 147,30; 147,13; 141,96; 140,35; 139,15; 136,92; 134,62; 134,19; 133,71; 132,32; 130,71; 130,27; 128,96; 128,68; 128,52; 128,42; 125,12 (C₁₄); 116,83; 116,72; 47,73; 34,64; 34,17; 32,58; 32,13; 27,66; 23,09; 23,01; 20,25; 20,03; 18,35 ppm.

5.3.4 Composto 4

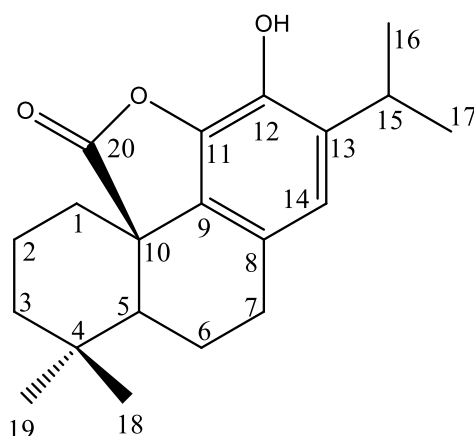


Figura 43: Estrutura química do composto 4

O composto 4 foi preparado de acordo com a literatura (Pertino *et al.*, 2010).

A uma mistura do ácido carnósico (AC) (1000 mg; 3,01 mmol) em diclorometano (20 ml), sob agitação e à temperatura ambiente, foi adicionado DCC (1024 mg, 4,96 mmol) e DMAP (10% da massa de AC). Após 5h 15min, evaporou-se o diclorometano sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi re-dispersado em água destilada (50 ml) e extraído com acetato de etilo (3 x 100 ml). A fase orgânica resultante foi lavada com uma solução aquosa de HCl 5% (2 x 150 ml), água destilada (2 x 150 ml) e uma solução aquosa de NaCl a 10% (150 ml). Após secar sob Na₂SO₄ anidro, a fase orgânica foi filtrada e evaporada sob pressão reduzida até obtenção de um produto sólido amarelo (182 mg; 97%). O crude foi purificado usando uma CC (éter de petróleo: acetato de etilo 60:1) com obtenção de um produto sólido amarelo claro (632 mg, 67%).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 6,65 (s, 1H, H₁₄); 4,74 (s, 1H, OH); 1,25 (d, *J*=6,9 Hz, 3H); 1,22 (d, *J*=6,9 Hz, 3H); 1,15 (s, 3H); 1,08 (s, 3H) ppm. ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 178,39 (COOR); 139,87; 136,42; 135,38; 131,64; 130,02; 120,35 (C₁₄); 56,64; 50,15; 41,86; 38,60; 32,93; 32,64; 31,86; 27,38; 24,37; 23,24; 22,46; 22,37; 18,36 ppm.

5.3.5 Composto 5

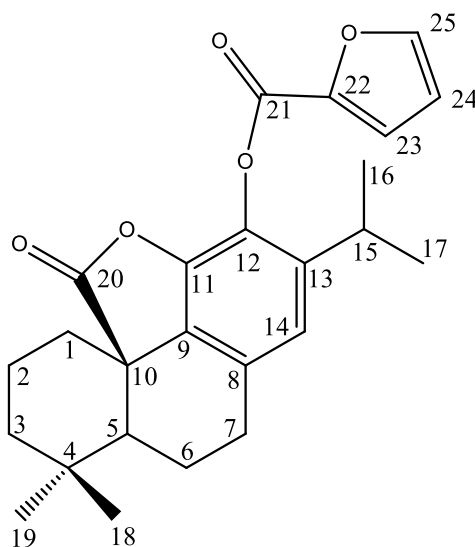


Figura 44: Estrutura química do composto 5

O composto 5 foi preparado de acordo com a literatura (Valdeira *et al.*, 2018).

A uma mistura do composto 4 (190 mg; 0,61 mmol) em tolueno seco (13 ml), sob agitação e à temperatura de 60 °C, foi adicionado cloreto de furoílo (0,18 ml; 1,84 mmol) e DMAP (224,79 mg; 1,84 mmol), colocando a mistura sob atmosfera de azoto. Após 40min, evaporou-se o tolueno sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi re-dispersado em água destilada (40 ml) e extraído com acetato de etilo (3 x 80 ml). A fase orgânica resultante foi lavada com água destilada (3 x 120 ml) e uma solução aquosa de NaCl a 10% (120 ml). Após secar com Na₂SO₄ anidro, a fase orgânica foi filtrada e evaporada sob pressão reduzida até obtenção de um produto sólido branco (243,8 mg; 98%).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,69 (d, *J*=0,7 Hz, 1H); 7,40 (d, *J*=3,4 Hz, 1H); 6,77 (H-14); 6,60 (1H, H₂₄); 1,26 (d, *J*=6,9 Hz, 3H); 1,19 (d, *J*=6,9 Hz, 3H); 1,16 (s, 3H); 1,09 (s, 3H) ppm. ¹³C-RMN (100MHz, CDCl₃) δ 177,64 (COOH, C₂₀); 155,94 (COOR, C₂₁); 147,50; 144,97; 143,62; 141,28; 137,62; 133,80; 130,73; 128,98; 120,18; 119,96; 112,36; 56,60; 49,74; 41,69; 38,81; 33,01; 31,98; 28,04; 24,09; 23,65; 22,78; 22,32; 18,32 ppm.

Bibliografia

6. Bibliografia

- AKABERI, M.; MEHRI, S.; IRANSHAHI, M. - Multiple pro-apoptotic targets of abietane diterpenoids from *Salvia* species. **Fitoterapia**. . ISSN 0367-326X. 100:2015) 118–132. doi: 10.1002/jssc.200700680.
- ALBALAWI, Aishah *et al.* - Protective effect of carnosic acid against acrylamide-induced toxicity in RPE cells. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 18736351. 2017). doi: 10.1016/j.fct.2017.01.026.
- AMARAL, Guilherme Pires *et al.* - Protective action of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. in gastric ulcer prevention induced by ethanol in rats. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 02786915. 55:2013) 48–55. doi: 10.1016/j.fct.2012.12.038.
- ANAND, Preetha *et al.* - Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. **Pharmaceutical Research**. . ISSN 07248741. 25:9 (2008) 2097–2116. doi: 10.1007/s11095-008-9661-9.
- ANDRADE, Joana M. *et al.* - *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. **Future Science OA**. . ISSN 2056-5623. 4:4 (2018) FSO283. doi: 10.4155/fsoa-2017-0124.
- AOYAGI, Yutaka *et al.* - Cytotoxicity of abietane diterpenoids from *Perovskia abrotanoides* and of their semisynthetic analogues. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. . ISSN 09680896. 14:15 (2006) 5285–5291. doi: 10.1016/j.bmc.2006.03.047.
- ARMAREGO, Wilfred L. F.; CHAI, Christina L. L. - **Purification of laboratory chemicals**. Fifth edit ed. ISBN 0750675713.
- BAHRI, Sana; JAMELEDDINE, Saloua; SHLYONSKY, Vadim - Relevance of carnosic acid to the treatment of several health disorders: Molecular targets and mechanisms. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. . ISSN 19506007. 2016). doi: 10.1016/j.biopha.2016.09.067.
- BANERJEE, Ajoy K.; POON NG, Po S.; LAYA, Manuel S. - **Synthesis of bioactive diterpenes** [Em linha]. [S.l.] : Elsevier Masson SAS, 2003 Disponível em WWW:<URL:http://dx.doi.org/10.1016/S1572-5995(03)80007-8>. ISBN 1572-5995.
- BAÑO, María José DEL *et al.* - Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. . ISSN 00218561. 51:15 (2003) 4247–4253. doi: 10.1021/jf0300745.
- BARNI, M. V. *et al.* - Carnosic acid inhibits the proliferation and migration capacity of human colorectal cancer cells. **Oncology Reports**. . ISSN 1021335X. 2012). doi:

10.3892/or.2012.1630.

BATISTA, Olga *et al.* - Structure and antimicrobial activity of diterpenes from the roots of *Plectranthus hereroensis*. **Journal of Natural Products**. . ISSN 15206025. 57:6 (1994) 858–861. doi: 10.1021/np50108a031.

BEJBLOVÁ-VOLÁKOVÁ, M.; VLK, J.; PROCHÁZKOVÁ, D. - Acylation of Ferrocene with Adamantoyl Chloride and Cinnamoyl Chloride. **Topics in Catalysis**. . ISSN 1022-5528. 53:19–20 (2010) 1411–1418. doi: 10.1007/s11244-010-9601-x.

BEJBLOVÁ, M.; PROCHÁZKOVÁ, D.; VLK, J. - Acylations with long-chain acid anhydrides and acyl chlorides over zeolite beta. **Topics in Catalysis**. . ISSN 10225528. 52:1–2 (2009) 178–184. doi: 10.1007/s11244-008-9142-8.

BIERSACK, Bernhard - Current state of phenolic and terpenoidal dietary factors and natural products as non-coding RNA/microRNA modulators for improved cancer therapy and prevention. **Non-coding RNA Research**. . ISSN 24680540. 1:1 (2016) 12–34. doi: 10.1016/j.ncrna.2016.07.001.

BIRTIĆ, Simona *et al.* - Carnosic acid. **Phytochemistry**. . ISSN 00319422. 2015). doi: 10.1016/j.phytochem.2014.12.026.

BOHLMANN, J.; MEYER-GAUEN, G.; CROTEAU, R. - Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. . ISSN 0027-8424. 1998). doi: 10.1073/pnas.95.8.4126.

BORGES, Raphaelle Sousa *et al.* - Rosmarinus officinalis essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. **Journal of Ethnopharmacology**. . ISSN 18727573. 229:September 2018 (2019) 29–45. doi: 10.1016/j.jep.2018.09.038.

BRAY, Freddie *et al.* - Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. . ISSN 00092770. 107:68 (2018) 394–424. doi: 10.3322/caac.21492.

BREITMAIER, Eberhard - **Terpenes Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones**

BRÜCKNER, Kathleen; TISSIER, Alain - High-level diterpene production by transient expression in *Nicotiana benthamiana*. **Plant Methods**. . ISSN 17464811. 9:1 (2013) 1–10. doi: 10.1186/1746-4811-9-46.

BUCKINGHAM, John - **Dictionary of Natural Products on CD-ROM**. ISBN 978-0412491504.

BUENO, Carlos Alberto *et al.* - Natural and semisynthetic diterpenoids with antiviral and

immunomodulatory activities block the ERK signaling pathway. **Medical Microbiology and Immunology**. . ISSN 14321831. 2015). doi: 10.1007/s00430-014-0383-9.

CHEUKA, Peter Mubanga *et al.* - The role of natural products in drug discovery and development against neglected tropical diseases. **Molecules**. . ISSN 14203049. 22:1 (2017). doi: 10.3390/molecules22010058.

CHRISTENSEN, K. B. *et al.* - Activation of the nuclear receptor PPAR γ by metabolites isolated from sage (*Salvia officinalis* L.). **Journal of Ethnopharmacology**. . ISSN 03788741. 132:1 (2010) 127–133. doi: 10.1016/j.jep.2010.07.054.

COOPER, Raymond; NICOLA, George - **Natural Products Chemistry Sources, Separations, and Structures**. ISBN 978-1-4665-6762-7.

CORDELL, Geoffrey A. - Biodiversity and drug discovery- a symbiotic relationship. **Phytochemistry**. 2000) 463–480. doi: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00230-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00230-2).

CRAGG, Gordon M.; NEWMAN, David J. - Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**. . ISSN 03044165. 1830:6 (2013) 3670–3695. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.02.008.

CRAGG M., Gordon; GROTHAUS G., Paul; NEWMAN J., David - Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents. **Chemical Reviews**. May (2009) 3012–3043. doi: DOI: 10.1021 / cr900019j.

CROTEAU, Edward M. Davi. . Rodney - Cyclization Enzymes in the Biosynthesis of Monoterpenes, Sesquiterpenes, and Diterpenes. © **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**. 209:2000). doi: 10.1007 / 3-540-48146-X_2.

CROWN, J. - Docetaxel and Paclitaxel in the Treatment of Breast Cancer: A Review of Clinical Experience. **The Oncologist**. . ISSN 1083-7159. 9:suppl_2 (2004) 24–32. doi: 10.1634/theoncologist.9-suppl_2-24.

CUVELIER, Marie-Elisabeth; BERSET, Claudette; RICHARD, Hubert - Antioxidant Constituents in Sage. 1994) 0–4. doi: 002 1-856 1 I941 1442-0005\$04.5QIO.

DANILENKO, Michael *et al.* - Carnosic acid potentiates the antioxidant and prodifferentiation effects of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 in leukemia cells but does not promote elevation of basal levels. **Cancer Research**. . ISSN 00085472. 63:2003) 1325–1332. doi: 10.1002/ijc.21736.Cooperative.

DAS, Sonjit *et al.* - Carnosic Acid, a Natural Diterpene, Attenuates Arsenic-Induced Hepatotoxicity via Reducing Oxidative Stress, MAPK Activation, and Apoptotic Cell Death Pathway. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. . ISSN 19420900. 2018:2018) 24. doi:

<http://dx.doi.org/10.1155/2018/1421438>.

DEVAPPA, Rakshit K.; MAKKAR, Harinder P. S.; BECKER, Klaus - Jatropha diterpenes: A review. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**. . ISSN 0003021X. 2011). doi: 10.1007/s11746-010-1720-9.

DEWICK, Paul M. - **Medicinal Natural Products**. 2. ed. ISBN 0470846275.

DEWICK, Paul M. - The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds. **Natural Product Reports**. . ISSN 02650568. 19:2 (2002) 181–222. doi: 10.1039/b002685i.

DEWICK, Paul M. - **Essentials of organic chemistry: For students of pharmacy, medicinal chemistry and biological chemistry**. ISBN 978-0-470-01666-4.

DIAS, Daniel A.; URBAN, Sylvia; ROESSNER, Ute - A Historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**. . ISSN 22181989. 2:2 (2012) 303–336. doi: 10.3390/metabo2020303.

EINBOND, Linda Saxe *et al.* - Carnosic acid inhibits the growth of ER-negative human breast cancer cells and synergizes with curcumin. **Fitoterapia**. . ISSN 0367326X. 83:7 (2012) 1160–1168. doi: 10.1016/j.fitote.2012.07.006.

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. - The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**. . ISSN 00916765. 109:SUPPL. 1 (2001) 69–75. doi: 10.1289/ehp.01109s169.

FERREIRA, Daniele S. *et al.* - Antimicrobial activity of compounds isolated from *Rosmarinus officinalis* and semi-synthetic derivatives against multidrug-resistant bacteria. **Latin American Journal of Pharmacy**. . ISSN 03262383. 2016). doi: 10.1101/gr.6049.

GALLI, Bruno; FALLER, Bernard - DISCOVER A DRUG SUBSTANCE, FORMULATE AND DEVELOP IT TO A PRODUCT. Em **Medicinal Chemistry** [Em linha]. Second Edi ed. [S.l.] : Elsevier Inc., 2003 Disponível em WWW:<[URL:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-744481-9.50044-1](http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-744481-9.50044-1)>. ISBN 0127444815. p. 687–695.

GAWDZIK, Barbara; KAMIZELA, Angelika; SZYSZKOWSKA, Agnieszka - Lactones with a fragrance properties. **Chemik**. . ISSN 00092886. 69:6 (2015) 346–349.

GERSHENZON, Jonathan; DUDAREVA, Natalia - The function of terpene natural products in the natural world. **NATURE CHEMICAL BIOLOGY**. . ISSN 15651088. 17:3 (2007) 408–414. doi: 10.1038/nchembio.2007.5.

GONÇALVES (A), Bruno M. F. *et al.* - Synthesis and biological evaluation of novel asiatic acid derivatives with anticancer activity. **RSC Advances**. . ISSN 20462069. 6:5 (2016) 3967–3985. doi: 10.1039/c5ra19120c.

- GONÇALVES (B), Bruno M. F. *et al.* - Synthesis and anticancer activity of novel fluorinated asiatic acid derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**. . ISSN 17683254. 114:2016) 101–117. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.02.057.
- GONÇALVES, Bruno M. F. *et al.* - Design, synthesis, and biological evaluation of novel asiatic acid derivatives as potential anticancer agents. **RSC Advances**. . ISSN 20462069. 6:45 (2016) 39296–39309. doi: 10.1039/c6ra04597a.
- GONZÁLEZ, Miguel A. - Aromatic Abietane Diterpenoids: Their Biological Activity and Synthesis. **Natural Product Reports Manuscript**. . ISSN 14757192. 2013). doi: 10.1039/x0xx00000x.
- GONZÁLEZ, Miguel A. - Synthetic derivatives of aromatic abietane diterpenoids and their biological activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**. . ISSN 17683254. 2014). doi: 10.1016/j.ejmech.2014.10.023.
- GONZÁLEZ, Miguel A. - Aromatic abietane diterpenoids: Total syntheses and synthetic studies. **Tetrahedron**. . ISSN 14645416. 71:13 (2015) 1883–1908. doi: 10.1016/j.tet.2015.01.058.
- HALL, Edward D. *et al.* - Newer pharmacological approaches for antioxidant neuroprotection in traumatic brain injury. **Neuropharmacology**. . ISSN 00283908. 145:August 2018 (2018) 247–258. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.08.005.
- HANSON, James R. - Diterpenoids of terrestrial origin. **Natural Product Reports**. . ISSN 14604752. 34:10 (2017) 1233–1243. doi: 10.1039/c7np00040e.
- HARVEY, Alan L. - Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**. . ISSN 13596446. 13:19–20 (2008) 894–901. doi: 10.1016/j.drudis.2008.07.004.
- HERAS, B. LAS *et al.* - Terpenoids: Sources, Structure Elucidation and Therapeutic Potential in Inflammation. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. . ISSN 15680266. 2003). doi: 10.2174/1568026033392462.
- IGNATIUS ENODIANA, Osamiabe *et al.* - The Chemistry Of Natural Product: Plant Secondary Metabolites Biomonitoring of Kainji Lake using Macrophytes and Algae View project The Chemistry Of Natural Product: Plant Secondary Metabolites. **INTERNATIONAL JOURNAL OF TECHNOLOGY ENHANCEMENTS AND EMERGING ENGINEERING RESEARCH**. . ISSN 2347-4289. 4:2016) 1.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) - **GLOBOCAN 2018: Latest global cancer data**. [Em linha] Disponível em WWW:<URL:<http://gco.iarc.fr/>>.
- JACOB, Joe Antony *et al.* - Autophagy: An overview and its roles in cancer and obesity.

Clinica Chimica Acta. . ISSN 18733492. 468:2017) 85–89. doi: 10.1016/j.cca.2017.01.028.

JI, Hong-Fang; LI, Xue-Juan; ZHANG, Hong-Yu - Natural products and drug discovery. **European Molecular Biology Organization**. . ISSN 1469-221X. 10:3 (2009) 194–200. doi: 10.1038/embor.2009.12.

KAR, Susanta *et al.* - Carnosic acid modulates Akt/IKK/NF- κ B signaling by PP2A and induces intrinsic and extrinsic pathway mediated apoptosis in human prostate carcinoma PC-3 cells. **Apoptosis**. . ISSN 13608185. 17:7 (2012) 735–747. doi: 10.1007/s10495-012-0715-4.

KASTAN, Michael B.; BARTEK, Jiri - Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**. . ISSN 00280836. 432:7015 (2004) 316–323. doi: 10.1038/nature03097.

KIM, Woo Young *et al.* - Toxicities, dose reduction and delay of docetaxel and paclitaxel chemotherapy in breast cancer without distant metastases. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**. . ISSN 00219193. 7:4 (2011). doi: 10.4103/0973-1482.92004.

KOEHN, Frank E.; CARTER, Guy T. - The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**. . ISSN 14741776. 4:3 (2005) 206–220. doi: 10.1038/nrd1657.

KUO, Chia Feng *et al.* - Anti-inflammatory effects of supercritical carbon dioxide extract and its isolated carnosic acid from rosmarinus officinalis leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. . ISSN 00218561. 59:8 (2011) 3674–3685. doi: 10.1021/jf104837w.

LAHLOU, Mouhssen - Screening of natural products for drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**. . ISSN 1746-0441. 2:5 (2007) 697–705. doi: 10.1517/17460441.2.5.697.

LAHLOU, Mouhssen - The Success of Natural Products in Drug Discovery Mouhssen. **Pharmacology & Pharmacy**. . ISSN 2157-9423. 4 (2013) 17–31. doi: 10.4236/pp.2013.43A003.

LAM, Kin S. - New aspects of natural products in drug discovery. **Trends in Microbiology**. . ISSN 0966842X. 15:6 (2007) 279–289. doi: 10.1016/j.tim.2007.04.001.

LEE, Jung Jin *et al.* - Antiplatelet activity of carnosic acid, a phenolic diterpene from Rosmarinus officinalis. **Planta Medica**. . ISSN 00320943. 73:2 (2007) 121–127. doi: 10.1055/s-2006-957066.

LI, Cheng-Ji *et al.* - Synthesis and Cytotoxicities of Royleanone Derivatives. **Natural Products and Bioprospecting**. . ISSN 2192-2195. 8:6 (2018) 453–456. doi: 10.1007/s13659-018-0173-y.

LIANG, Xinxin *et al.* - Protective effect of carnosic acid and its semisynthetic derivatives against H₂O₂-induced neurotoxicity. **Phytochemistry Letters**. . ISSN 18767486. 27:February

(2018) 82–86. doi: 10.1016/j.phytol.2018.06.014.

LIU, Wen *et al.* - Carnosic acid enhances the anti-lung cancer effect of cisplatin by inhibiting myeloid-derived suppressor cells. **Chinese Journal of Natural Medicines**. . ISSN 18755364. 16:12 (2018) 907–915. doi: 10.1016/S1875-5364(18)30132-8.

LOUSSOUARN, Margot *et al.* - Carnosic Acid and Carnosol, Two Major Antioxidants of Rosemary, Act through Different Mechanisms. **Plant Physiology**. . ISSN 0032-0889. 175:3 (2017) 1381–1394. doi: 10.1104/pp.17.01183.

LUGEMWA, Fulgentius; SHAIKH, Koonj; HOCHSTEDT, Edwin - Facile and Efficient Acetylation of Primary Alcohols and Phenols with Acetic Anhydride Catalyzed by Dried Sodium Bicarbonate. **Catalysts**. . ISSN 2073-4344. 3:4 (2013) 954–965. doi: 10.3390/catal3040954.

MAFU, Sibongile; ZERBE, Philipp - Plant diterpenoid metabolism for manufacturing the biopharmaceuticals of tomorrow: prospects and challenges. **Phytochemistry Reviews**. . ISSN 1572980X. 17:1 (2018) 113–130. doi: 10.1007/s11101-017-9513-5.

MASUDA, T.; INABA, Y.; TAKEDA, Y. - Antioxidant mechanism of carnosic acid: Structural identification of two oxidation products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. . ISSN 00218561. 49:11 (2001) 5560–5565. doi: 10.1021/jf010693i.

MASUDA, Toshiya *et al.* - Recovery mechanism of the antioxidant activity from carnosic acid quinone, an oxidized sage and rosemary antioxidant. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. . ISSN 00218561. 50:21 (2002) 5863–5869. doi: 10.1021/jf025605o.

MATOS, Priscilla M. *et al.* - New non-toxic semi-synthetic derivatives from natural diterpenes displaying anti-tuberculosis activity. **Molecules**. . ISSN 14203049. 20:10 (2015) 18264–18278. doi: 10.3390/molecules201018264.

MCCHESENEY, James D.; VENKATARAMAN, Sylesh K.; HENRI, John T. - Plant natural products: Back to the future or into extinction? **Phytochemistry**. . ISSN 00319422. 68:14 (2007) 2015–2022. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.04.032.

MENG, Yan Qiu *et al.* - The synthesis of ursolic acid derivatives with cytotoxic activity and the investigation of their preliminary mechanism of action. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. . ISSN 09680896. 17:2 (2009) 848–854. doi: 10.1016/j.bmc.2008.11.036.

MENGONI, Eleonora S. *et al.* - Suppression of COX-2, IL-1 β and TNF- α expression and leukocyte infiltration in inflamed skin by bioactive compounds from *Rosmarinus officinalis* L. **Fitoterapia**. . ISSN 0367326X. 82:3 (2011) 414–421. doi: 10.1016/j.fitote.2010.11.023.

MOOSAVI, Fatemeh *et al.* - Modulation of neurotrophic signaling pathways by polyphenols.

Drug Design, Development and Therapy. . ISSN 11778881. 2016) 23–42. doi: 10.2147/DDDT.S96936.

MUNNE-BOSCH, S. - Subcellular Compartmentation of the Diterpene Carnosic Acid and Its Derivatives in the Leaves of Rosemary. **PLANT PHYSIOLOGY**. . ISSN 00320889. 2001). doi: 10.1104/pp.125.2.1094.

MUNNÉ-BOSCH, Sergi *et al.* - Diterpenes and antioxidative protection in drought-stressed *Salvia officinalis* plants. **J. Plant Physiology**. (2001) 1431–1437. doi: <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00578>.

NEISES, Bernhard; STEGLICH, Wolfgang - Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. **Angewandte Chemie International Edition in English**. . ISSN 15213773. 17:7 (1978) 522–524. doi: 10.1002/anie.197805221.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M.; KINGSTON, David G. I. - Natural Products as Pharmaceuticals and Sources for Lead Structures. Em **The Practice of Medicinal Chemistry: Fourth Edition** [Em linha]. [S.l.] : Elsevier Ltd, 2015 Disponível em WWW:<[URL:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-417205-0.00005-5](http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-417205-0.00005-5)>. ISBN 9780124172050. p. 101–139.

PAVIA, Donald L.; LAMPMAN, Gary M.; KRIZ, George S. - **INTRODUCTION TO SPECTROSCOPY- A GUIDE FOR STUDENTS OF ORGANIC CHEMISTRY** [Em linha]. Third ed. Disponível em WWW:<[URL:http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S106418589690145X](http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S106418589690145X)>. ISBN 9781118309742.

PERTINO, Mariano Walter *et al.* - Gastroprotective effect of carnosic acid γ -lactone derivatives. **Journal of Natural Products**. . ISSN 01633864. 2010). doi: 10.1021/np900822x.

PERTINO, Mariano Walter *et al.* - Synthesis, antiproliferative and antifungal activities of 1,2,3-Triazole-substituted carnosic acid and carnosol derivatives. **Molecules**. . ISSN 14203049. 2015). doi: 10.3390/molecules20058666.

PETERS, Reuben J. - Two rings in them all: The labdane-related diterpenoids. **Natural Product Reports**. . ISSN 02650568. 27:11 (2010) 1521–1530. doi: 10.1039/c0np00019a.

PETIWALA, Sakina M. *et al.* - Carnosic acid promotes degradation of the androgen receptor and is regulated by the unfolded protein response pathway in vitro and in vivo. **Carcinogenesis**. . ISSN 14602180. 37:8 (2016) 827–838. doi: 10.1093/carcin/bgw052.

PETIWALA, Sakina M.; JOHNSON, Jeremy J. - Diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Defining their potential for anti-cancer activity. **Cancer Letters**. . ISSN 18727980. 2015). doi: 10.1016/j.canlet.2015.07.005.

RIBEIRO-SANTOS, Regiane *et al.* - A novel insight on an ancient aromatic plant: The rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Trends in Food Science and Technology**. . ISSN 09242244. 2015). doi: 10.1016/j.tifs.2015.07.015.

SALMINEN, A. *et al.* - Terpenoids: Natural inhibitors of NF- κ B signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. **Cellular and Molecular Life Sciences**. . ISSN 1420682X. 65:19 (2008) 2979–2999. doi: 10.1007/s00018-008-8103-5.

SAPIO, Luigi *et al.* - The Natural cAMP Elevating Compound Forskolin in Cancer Therapy: Is It Time? **Journal of Cellular Physiology**. . ISSN 10974652. 232:5 (2017) 922–927. doi: 10.1002/jcp.25650.

SARTORI, Giovanni *et al.* - Protection (and Deprotection) of Functional Groups in Organic Synthesis by Heterogeneous Catalysis. **Chemical Reviews**. . ISSN 00092665. 104:1 (2004) 199–250. doi: 10.1021/cr0200769.

SASAKI, Kazunori *et al.* - *Rosmarinus officinalis* polyphenols produce anti-depressant like effect through monoaminergic and cholinergic functions modulation. **Behavioural Brain Research**. . ISSN 01664328. 238:1 (2013) 86–94. doi: 10.1016/j.bbr.2012.10.010.

SATOH, Takumi *et al.* - Carnosic acid protects neuronal HT22 Cells through activation of the antioxidant-responsive element in free carboxylic acid- and catechol hydroxyl moieties-dependent manners. **Neuroscience Letters**. . ISSN 03043940. 434:3 (2008) 260–265. doi: 10.1016/j.neulet.2008.01.079.

SATOH, Takumi; LIPTON, Stuart - Recent advances in understanding NRF2 as a druggable target: development of pro-electrophilic and non-covalent NRF2 activators to overcome systemic side effects of electrophilic drugs like dimethyl fumarate. **F1000Research**. . ISSN 2046-1402. 6:0 (2017) 2138. doi: 10.12688/f1000research.12111.1.

SCHELER, Ulschan *et al.* - Elucidation of the biosynthesis of carnosic acid and its reconstitution in yeast. **Nature Communications**. . ISSN 20411723. 2016). doi: 10.1038/ncomms12942.

SHIINA, Isamu - Total synthesis of natural 8- and 9-membered lactones: Recent advancements in medium-sized ring formation. **Chemical Reviews**. . ISSN 00092665. 107:1 (2007) 239–273. doi: 10.1021/cr050045o.

SHIN, Han Bo *et al.* - Antiviral activity of carnosic acid against respiratory syncytial virus. **Virology Journal**. . ISSN 1743422X. 10:1 (2013) 1. doi: 10.1186/1743-422X-10-303.

SIEGEL, Rebecca L.; MILLER, Kimberly D.; JEMAL, Ahmedin - Cancer Statistics, 2018. **CA: a cancer journal for clinicians**. . ISSN 1542-4863. 68:2018) 7–30. doi: 10.3322/caac.21387.

SIENGALEWICZ, P.; MULZER, J.; RINNER, U. - **Synthesis of Esters and Lactones** [Em linha]. [S.l.] : Elsevier Ltd., 2014 Disponível em WWW:<URL:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-097742-3.00612-1>. ISBN 9780080977430.

SIMION, Alina Marieta; HASHIMOTO, Iwao; MITOMA, Yoshiharu - O-Acylation of Substituted Phenols with Various Alkanoyl Chlorides Under Phase- Transfer Catalyst Conditions. **Synthetic Communications**. 42 (2012) 921–931. doi: 10.1080/00397911.2011.584007.

SOCIETY, American Cancer - Cancer Facts & Figures 2018. **American Cancer Society**. . ISSN 14685833. 2018). doi: 10.1182/blood-2015-12-687814.

SOUSA, Ingrid P. DE; SOUSA TEIXEIRA, Maria V.; JACOMETTI CARDOSO FURTADO, Niede A. - An overview of biotransformation and toxicity of diterpenes. **Molecules**. . ISSN 14203049. 2018). doi: 10.3390/molecules23061387.

SU, Ke *et al.* - The inhibitory effects of carnosic acid on cervical cancer cells growth by promoting apoptosis via ROS-regulated signaling pathway. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. . ISSN 19506007. 2016). doi: 10.1016/j.biopha.2016.04.056.

SZWAJGIER, Dominik - Anticholinesterase activity of phenolic acids and their derivatives. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**. . ISSN 09395075. 68 C:3–4 (2013) 125–132.

THEODULOZ, Cristina *et al.* - Gastroprotective effect and cytotoxicity of carnosic acid derivatives. **Planta Medica**. . ISSN 00320943. 2011). doi: 10.1055/s-0030-1250648.

THEODULOZ, Cristina; PERTINO, Mariano Walter; SCHMEDA-HIRSCHMANN, Guillermo - Gastroprotective mechanisms of action of semisynthetic Carnosic Acid derivatives in human cells. **Molecules**. . ISSN 14203049. 2014). doi: 10.3390/molecules19010581.

TSAKOS, Michail *et al.* - Ester Coupling Reactions– an Enduring Challenge in the Chemical Synthesis of Bioactive Natural Products. **Natural Product Reports**. . ISSN 18196608. 2014). doi: 10.1039/b000000x.

VALDEIRA, Ana S. C. *et al.* - Synthesis and Biological Evaluation of New Madecassic Acid Derivatives Targeting ERK Cascade Signaling. **Frontiers in Chemistry**. . ISSN 2296-2646. 6:September (2018) 1–20. doi: 10.3389/fchem.2018.00434.

VARSHA, Kumari *et al.* - NATURAL PLANT-DERIVED ANTICANCER DRUGS NANOTHERAPEUTICS: A REVIEW ON PRECLINICAL TO CLINICAL SUCCESS. Em **Nanostructures for Cancer Therapy** [Em linha]. [S.l.] : Elsevier Inc., 2017 Disponível em WWW:<URL:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-46144-3/00028-3>. p. 775–809.

VERWEIJ, J.; CLAVEL, M.; CHEVALIER, B. - Paclitaxel (Taxol™) and docetaxel (Taxotere™): Not simply two of a kind. **Annals of Oncology**. . ISSN 1569-8041. 5:6 (1994) 495–505. doi: 10.1093/oxfordjournals.annonc.a058903.

WANG, Qun Lu *et al.* - Acute and 30-day oral toxicity studies of administered carnosic acid. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 02786915. 50:12 (2012) 4348–4355. doi: 10.1016/j.fct.2012.08.057.

WERMUTH, Camille Georges - **The practice of Medicinal Chemistry**. Third ed. ISBN 9780123741943.

XU, Shangjie *et al.* - The DMAP-catalyzed acetylation of alcohols - A mechanistic study (DMAP = 4-(dimethylamino)pyridine). **Chemistry - A European Journal**. . ISSN 09476539. 11:16 (2005) 4751–4757. doi: 10.1002/chem.200500398.

YADAVA, Nita; YADAVA, Rajesh; GOYALB, Anju - Chemistry of Terpenoids. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**. . ISSN 02782391. 2014) 272–278. doi: 10.1016/j.joms.2009.06.016.

YUAN, Liyun; KAPLOWITZ, Neil - The molecular biology of cancer. **Molecular Aspects of Medicine**. . ISSN 00982997. 30:2009 (2011) 29–41. doi: 10.1016/S0098-2997(00)00007-8.

ZHU, Yong-Ming Zhu *et al.* - Synthesis and Anti-HIV Activity of Oleanolic Acid Derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. . ISSN 05134870. 2001) 3115–3118.