

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**LEOPOLDO CLEMENTE BARATTO**

**OBTENÇÃO DE DERIVADOS DO ÁCIDO BETULÍNICO POR MEIO DE  
REAÇÕES DE BIOTRANSFORMAÇÃO E SEMISSÍNTESE E  
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTITUMORAL, ANTIMICROBIANA,  
ANTIMALÁRICA E ANTI-HIV**

**CURITIBA**

**2013**

**LEOPOLDO CLEMENTE BARATTO**

**OBTENÇÃO DE DERIVADOS DO ÁCIDO BETULÍNICO POR MEIO DE  
REAÇÕES DE BIOTRANSFORMAÇÃO E SEMISSÍNTESE E  
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTITUMORAL, ANTIMICROBIANA,  
ANTIMALÁRICA E ANTI-HIV**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração de Insumos, Medicamentos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Brás H. de Oliveira

**CURITIBA**

**2013**

# TERMO DE APROVAÇÃO

**LEOPOLDO CLEMENTE BARATTO**

**Título: Obtenção de derivados do ácido betulínico por meio de reações de biotransformação e semissíntese e avaliação das atividades antitumoral, antimicrobiana, antimalárica e anti-HIV**

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.

  
Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira  
(Orientador)

  
Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana  
(Universidade Federal de Alagoas)

  
Prof.ª Dr.ª Angela Cristina Leal Badaró Trindade  
(Universidade Federal do Paraná)

  
Prof. Dr. José Domingos Fontana  
(Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR)

  
Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas  
(Universidade Federal do Paraná)

Curitiba, 18 de outubro de 2013.

## AGRADECIMENTOS

À CAPES/REUNI pela bolsa de doutorado no Brasil e à Cooperação Bilateral Brasil-Alemanha CNPq/DAAD pela bolsa de doutorado-sanduíche na Martin-Luther-Universität, Halle (Saale), Alemanha.

Ao Prof. Dr. Brás H. de Oliveira pela orientação deste trabalho, pela amizade ao longo destes quatro anos, e pelo profissionalismo e interesse científico que dedica à vida acadêmica.

À Profa. Dra. Ida C. Pimentel e a sua aluna MSc. Mariana V. Porsani, do Departamento de Patologia Básica da UFPR, pela parceria e colaboração nos experimentos de biotransformação com micro-organismos e atividade antimicrobiana.

Ao Prof. Dr. Aducto B. Pereira-Netto, do Departamento de Botânica da UFPR, pela colaboração nos experimentos de biotransformação com células vegetais.

Aos colegas do Laboratório de Produtos Naturais e Biotransformação pelos momentos compartilhados, pela cumplicidade e espírito de amizade que tornaram esses anos mais divertidos e produtivos. Obrigado Karina B. de Oliveira, Keylla L. Mischiatti, Daniela F. Maluf, Kelly C. Garcia e Asad Ullah!

Um obrigado especial à Astrid Wiens Souza, Marianna Erban, Thalita G. dos Santos, Maria da Graça T. de Toledo (Gracinha) e à Profa. Dra. Francinete R. Campos, colegas dos Departamentos de Farmácia e Química, pelo auxílio, amizade e bate-papos eventuais que sempre se transformaram em ideias produtivas.

Aos demais professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, do Departamento de Química e da Universidade Federal do Paraná pelo auxílio, presteza e cooperação durante esses anos.

O meu muito obrigado sincero a todos os colegas e amigos que encontrei na Alemanha durante o doutorado-sanduíche em Halle (Saale) entre abril de 2012 a março de 2013: Reinhard Paschke, Bianka Siewert, Kranthi Vanchanigiri, Valentina Tayurskaya, Jutta Kalbitz, Barbara Kampa, Antje Breitenstein, Anja Banke, Scarlett Wachholz, Beatrix Günther, Daniel Emmerich, Goran Kaluderovic, Thomas Müller, Shaimaa Abouelmagd, Marwa Hegab, Tânia Kuhnen, Isaac Reis, Henrique Carvalho, Daniel Puig, Gustavo Cunha, Poliana Coeli, Julia Kowalowa, Mirna Bulatovic e Gergely Dávid.

Em especial, agradeço...

Ao Prof. Dr. Reinhard Paschke que me acolheu em seu grupo de pesquisa e permitiu que eu pudesse desenvolver parte deste trabalho. Toda a sua experiência, profissionalismo, disponibilidade e amizade contribuíram para obter resultados muito interessantes. Com toda a minha gratidão, meus sinceros agradecimentos.

À Jutta Kalbitz pelos espectros de massa.

À Valentina Tayurskaya pelo auxílio e ensinamentos sobre cultivo celular.

À Bianka Siewert pelos ensinamentos sobre citometria de fluxo e pelas conversas inspiradoras sobre livros, filmes, ciência e sobre a complexidade da vida.

A Kranthi Vanchanagiri pelo trabalho em conjunto e pelo espírito de equipe.

À Mirna Bulatovic, que veio de Belgrado (Sérvia) e contribuiu para o mês mais divertido do ano de 2012.

A Gergely Dávid, de Pápa (Hungria), pela amizade inesperada e pelas viagens pela Europa, que tornaram a estadia no exterior mais divertida.

Por último, mas não menos importante, agradeço em especial minha família que sempre me apoiou e deu suporte em todas as decisões ao longo da vida. Sem o carinho, união e confiança depositados pelos meu pais Lídia e Fábio Baratto, e pelos meus irmãos Rodolfo Augusto e Ricardo Luís, a transposição dos obstáculos teria sido mais difícil e a celebração das vitórias, banal.

**Muito obrigado a todos!**

## EPÍGRAFE

“Um homem precisa viajar. Por sua conta, não por meio de histórias, imagens, livros ou TV. Precisa viajar por si, com seus olhos e pés, para entender o que é seu. Para um dia plantar as suas próprias árvores e dar-lhes valor. Conhecer o frio para desfrutar o calor. E o oposto. Sentir a distância e o desabrigo para estar bem sob o próprio teto. Um homem precisa viajar para lugares que não conhece para quebrar essa arrogância que nos faz ver o mundo como o imaginamos, e não simplesmente como é ou pode ser. Que nos faz professores e doutores do que não vimos, quando deveríamos ser alunos, e simplesmente ir ver.”

***Amyr Klink***

## RESUMO

Tendo em vista a necessidade contínua da busca de novas moléculas com potencial farmacológico e o crescente interesse pelas atividades biológicas dos triterpenos pentacíclicos, o objetivo deste trabalho foi produzir derivados do ácido betulínico (**AB**), tanto por métodos químicos quanto por biotransformação usando células de fungos e vegetais, visando modificações nas posições C3, C20-29 e C28. Por semissíntese, foi preparada uma série de derivados inéditos contendo uma molécula de 2,4-dinitrofenil-hidrazona (**2,4-DNPH**) nas posições C3 e/ou C20. Por biotransformação usando os fungos *Mycelia sterilia*, *Penicillium* sp. e *P. citreonigrum*, e suspensão celular de cenoura (*Daucus carota*), **AB** foi convertido a produtos da oxidação da hidroxila C3, da esterificação do ácido carboxílico C28 ou da oxidação da ligação dupla terminal C20-29. Os derivados foram testados frente às atividades antitumoral, antimicrobiana, antimalárica e anti-HIV. O perfil citotóxico dos derivados foi avaliado contra as linhagens tumorais A2780 (ovário), 8505c (carcinoma anaplásico da tireoide), 518A2 (melanoma), MCF-7 (mama) e A549 (pulmão). Os isômeros *R* e *S* (em C20) do ácido 3-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]-29-oxolupan-28-oico (**DAB3** e **DAB4**) foram os derivados mais ativos ( $IC_{50}$  = 1,76-2,51  $\mu$ mol/L). O ácido 3-hidroxi-20-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]-29-norlupan-28-oico (**DAB11**), entretanto, foi considerado o derivado mais seletivo, cerca de cinco a oito vezes mais seletivo para células tumorais que células normais (CCD 18co, fibroblasto normal de cólon humano). Análises microscópicas e por citometria de fluxo evidenciaram que o mecanismo de ação dos derivados mais ativos é por meio de indução da apoptose, com bloqueio inicial das células em fase G0/G1 do ciclo celular, conduzindo ao processo de morte celular programada. Observações microscópicas comprovaram o comportamento apoptótico das células da linhagem A549 tratadas com os derivados, como encolhimento celular, condensação e fragmentação do material genético, formação de ondulações na membrana plasmática e corpos apoptóticos. O ensaio de ativação de caspases confirmou que inicialmente a via extrínseca é disparada, com ativação da caspase iniciadora 8, sendo que posteriormente a caspase 9 também é ativada. Os resultados mostraram que os derivados **2,4-DNPH**, embora mais ativos e seletivos, possuem um mecanismo de ação mais lento que o precursor **AB**, sendo que a apoptose é ativada após 48 h. A avaliação da atividade antimalárica mostrou que o ácido 3-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]lup-20(29)-en-28-oico (**DAB2**) e **DAB11** foram ativos contra cepas de *Plasmodium falciparum* W2 (cloroquina resistente), com valores de  $IC_{50}$  de 9,96 e 6,45  $\mu$ g/mL, respectivamente. Além do mais, ambas as moléculas foram consideradas não tóxicas contra células HepG2 A16 (hepatoblastoma humano), apresentando índice de seletividade maior que 100, mostrando que tais derivados possuem uma ação direcionada contra o parasita. Por outro lado, os derivados testados foram considerados inativos frente a ensaios de atividade antimicrobiana e antirretroviral por meio dos testes realizados. Este trabalho demonstrou que derivados **2,4-DNPH** do **AB** podem representar uma classe promissora de novos agentes antitumorais e antimaláricos.

**Palavras-chave:** ácido betulínico, biotransformação, citotoxicidade, *Plasmodium falciparum*, triterpenos pentacíclicos.

## ABSTRACT

Regarding the continuous need to search new potent molecules and the increasing interest for the biological activities of pentacyclic triterpenes, the aim of this work was to produce betulinic acid derivatives (**BA**), both by chemical methods and by biotransformation using fungi or plant cells, looking for modifications at positions C3, C20-29 and C28. By semi-synthesis a series of novel derivatives containing a 2,4-dinitrophenylhydrazone (**2,4-DNPH**) moiety at positions C3 and/or C20 was prepared. By biotransformation using the fungi *Mycelia sterilia*, *Penicillium* sp. and *P. citreonigrum*, and carrot cell suspension (*Daucus carota*), **BA** was converted to oxidation products of the hydroxyl group at C3, esterification of carboxylic acid at C28 or oxidation of the terminal double bond at C20-29. The derivatives were tested against antitumor, antimicrobial, antimalarial and anti-HIV activities. The cytotoxic profile was evaluated against A2780 (ovary), 8505c (anaplastic thyroid carcinoma), 518A2 (melanoma), MCF-7 (breast) and A549 (lung) tumor cell lines. Both *R* and *S* isomers (at C20) of 3-[(2,4-dinitrophenyl)hydrazono]-29-oxolupan-28-oic acid (**DAB3** and **DAB4**) were the most active derivatives ( $IC_{50}$ = 1,76-2,51  $\mu$ mol/L). 3-hydroxy-20-[(2,4-dinitrophenyl)hydrazono]-29-norlupan-28-oic acid (**DAB11**), on the other hand, was considered the most selective, around five to eight times more selective towards tumor cells than normal cells (CCD 18co, normal human colon fibroblast). Microscopy and flow cytometry analysis highlighted that the mechanism of action of the most active compounds is due to apoptosis induction, with initial arrest of the cells in G0/G1 phase of the cell cycle, driving to the programmed cell death process. Microscopic observations confirmed the apoptotic behavior of treated A549 cells, such as cell shrinkage, DNA condensation and fragmentation, blebbings and apoptotic bodies. The caspase activation assay showed that initially the extrinsic pathway is triggered, with activation of initiator caspase 8, afterwards caspase 9 being also activated. The results showed that the **2,4-DNPH** derivatives, even though more active and selective, have a slower mechanism of action than the precursor **BA**, since apoptosis is triggered approximately after 48 h. The antimalarial assay showed that both 3-[(2,4-dinitrophenyl)hydrazono]lup-20(29)-en-28-oic acid (**DAB2**) and **DAB11** were active against *Plasmodium falciparum* W2 (chloroquine-resistant), with  $IC_{50}$  of 9,96 and 6,45  $\mu$ g/mL, respectively. Both molecules were considered non-toxic against HepG2 A16 cells (human hepatoblastoma), with selectivity index higher than 100, showing that the derivatives have a direct action to the parasite. On the other hand, the test compounds were inactive against antimicrobial and antiretroviral activities by carried assays. This work demonstrated that **2,4-DNPH BA** derivatives could represent a promising class of new antitumor and antimalarial agents.

**Keywords:** betulinic acid, biotransformation, cytotoxicity, *Plasmodium falciparum*, pentacyclic triterpenes.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> O papel regulatório geral dos triterpenos pentacíclicos sobre a homeostase da glicose, lipídios e vascular em diferentes órgãos.....	26
<b>Figura 2.</b> As fases do ciclo celular.....	38
<b>Figura 3.</b> Regulação da apoptose pelas vias extrínseca e intrínseca.....	43
<b>Figura 4.</b> Modelo esquemático do processo autofágico.....	45
<b>Figura 5.</b> <i>Platanus orientalis</i> L., Platanaceae.....	58
<b>Figura 6.</b> Perfil citotóxico do ácido betulínico (AB) e DAB3 sobre a linhagem de câncer de pulmão A549 determinado pelo método SRB por 96 h.	112
<b>Figura 7.</b> Curvas dose-resposta do ácido betulínico (AB) e seus derivados sobre a linhagem de câncer de pulmão A549 e fibroblastos normais de cólon CCD 18co obtidas pelo método SRB após 96 h.....	118
<b>Figura 8.</b> Análise morfológica por microscopia óptica da linhagem de células de câncer de pulmão A549 tratadas com a concentração IC <sub>80</sub> de ácido betulínico (AB) e seus derivados durante 24 h, em comparação com um controle não tratado.....	119
<b>Figura 9.</b> Análise de células de câncer de pulmão A549 por microscopia de fluorescência tratadas com a concentração IC <sub>80</sub> de ácido betulínico (AB) e DAB2 após 24 h, em comparação com um controle não tratado.....	121
<b>Figura 10.</b> Análise de células de câncer de pulmão A549 por microscopia de fluorescência tratadas com a concentração IC <sub>80</sub> de DAB3 após 24 h	122
<b>Figura 11.</b> Análise de células de câncer de pulmão A549 por microscopia de fluorescência tratadas com a concentração IC <sub>80</sub> de DAB9 e DAB11 após 24 h.....	123
<b>Figura 12.</b> Ensaio de autofagia: análise de células de câncer de pulmão A549 em microscópio de fluorescência tratadas com a concentração IC <sub>80</sub> de ácido betulínico (AB) e seus derivados após 24 h, em comparação com um controle não tratado.....	125
<b>Figura 13.</b> Distribuição de células da linhagem de câncer de pulmão A549 em cada fase do ciclo celular, após tratamento com a concentração IC <sub>80</sub> de ácido betulínico (AB) e derivados, e cisplatina (2 µmol/L), por 24 e 48 h.....	127
<b>Figura 14.</b> Histogramas da análise da distribuição de células da linhagem de câncer de pulmão A549 em cada fase do ciclo celular, após tratamento com a concentração IC <sub>80</sub> de ácido betulínico (AB) e derivados, e cisplatina (2 µmol/L), por 24 e 48 h.....	128
<b>Figura 15.</b> Histogramas da análise da distribuição de células da linhagem de câncer de pulmão A549 em cada fase do ciclo celular, após tratamento com ácido betulínico (AB) (IC <sub>80</sub> ) e DAB3 (23 µmol/L), por 24 e 48 h.....	130

<b>Figura 16.</b> Análise de morte celular (%) das células de câncer de pulmão A549 tratadas com a concentração IC <sub>80</sub> de ácido betulínico (AB) e DAB3 após 24 e 48 h pelo teste de incorporação da anexina V-FITC e IP em citômetro de fluxo.....	132
<b>Figura 17.</b> Ensaio da incorporação de anexina V-FITC em citômetro de fluxo: células de câncer de pulmão A549 tratadas com a concentração IC <sub>80</sub> de ácido betulínico (AB) e DAB3 após 24 e 48 h, em comparação a um controle não tratado.....	133
<b>Figura 18.</b> Análise de morte celular (%) das células de câncer de pulmão A549 tratadas com a concentração IC <sub>80</sub> de DAB11 após 24 e 48 h pelo teste de incorporação da anexina V-FITC e IP em citômetro de fluxo.....	134
<b>Figura 19.</b> Ensaio da incorporação de anexina V-FITC em citômetro de fluxo: células de câncer de pulmão A549 tratadas com a concentração IC <sub>80</sub> de DAB11 após 24 e 48 h, em comparação a um controle não tratado.....	135
<b>Figura 20.</b> Análise da ativação (%) de caspases 3, 8 e 9 de células de câncer de pulmão A549 após tratamento com a concentração IC <sub>80</sub> de ácido betulínico (AB) e derivados DAB3 e DAB11, e estaurosporina (STP) (0,5 µmol/L) durante 24, 48 e 72 h por citometria de fluxo.....	137
<b>Figura 21.</b> Ensaio de fragmentação do DNA em gel de agarose: células de câncer de pulmão A549 tratadas com a concentração IC <sub>80</sub> de ácido betulínico (AB) e DAB3 após 72 h, em comparação com controle (CTL) não tratado.....	139
<b>Figura 22.</b> Avaliação da atividade antimicrobiana do ácido betulínico (AB) e seus derivados pelo teste de difusão em disco.....	143
<b>Figura 23.</b> Curvas dose-resposta de ácido betulínico (AB), DAB2, DAB11 e cloroquina avaliados contra parasitos do ciclo sanguíneo de <i>P. falciparum</i> W2, mostrando os valores da concentração inibitória de 50% do crescimento (IC <sub>50</sub> ).....	145
<b>Figura 24.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (200 MHz, Pyr-d5) do ácido betulínico (AB)....	169
<b>Figura 25.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (50 MHz, Pyr-d5) do ácido betulínico (AB).....	169
<b>Figura 26.</b> Expansão (região entre 14,9 e 56,6 ppm) do espectro de RMN- <sup>13</sup> C (50 MHz, Pyr-d5) do ácido betulínico (AB).....	170
<b>Figura 27.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C-DEPT (50 MHz, Pyr-d5) do ácido betulínico (AB).....	170
<b>Figura 28.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de Myc15b.....	171
<b>Figura 29.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de Myc15b.....	171
<b>Figura 30.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de PEN10b.1.....	172
<b>Figura 31.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de PEN10b.1.....	172
<b>Figura 32.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C-DEPT (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de PEN10b.1.....	173
<b>Figura 33.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> +Pyr-d5) de PEN13b.....	173
<b>Figura 34.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> +Pyr-d5) de PEN13b.....	174
<b>Figura 35.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C-DEPT (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> +Pyr-d5) de PEN13b..	174

<b>Figura 36.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> +Pyr-d <sub>5</sub> ) de CEN2.....	175
<b>Figura 37.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> +Pyr-d <sub>5</sub> ) de CEN2.....	175
<b>Figura 38.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C-DEPT (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> +Pyr-d <sub>5</sub> ) de CEN2.....	176
<b>Figura 39.</b> Mapa de correlação HSQC de CEN2.....	176
<b>Figura 40.</b> Mapa de correlação HMBC de CEN2.....	177
<b>Figura 41.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do ácido betulônico (DAB1)	177
<b>Figura 42.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do ácido betulônico (DAB1)	178
<b>Figura 43.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C-DEPT (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do ácido betulônico (DAB1).....	178
<b>Figura 44.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do DAB2.....	179
<b>Figura 45.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do DAB2.....	179
<b>Figura 46.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C-DEPT (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do DAB2.....	180
<b>Figura 47.</b> Mapa de correlação HMBC de DAB2.....	180
<b>Figura 48.</b> Mapa de correlação HSQC de DAB2.....	181
<b>Figura 49.</b> Mapa de correlação COSY de DAB2.....	181
<b>Figura 50.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> +Pyr-d <sub>5</sub> ) do DAB3.....	182
<b>Figura 51.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> +Pyr-d <sub>5</sub> ) do DAB3.....	182
<b>Figura 52.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C-DEPT (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> +Pyr-d <sub>5</sub> ) do DAB3.....	183
<b>Figura 53.</b> Mapa de correlação HSQC de DAB3.....	183
<b>Figura 54.</b> Mapa de correlação HMBC de DAB3.....	184
<b>Figura 55.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> +Pyr-d <sub>5</sub> ) do DAB4.....	184
<b>Figura 56.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> +Pyr-d <sub>5</sub> ) do DAB4.....	185
<b>Figura 57.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C -DEPT (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> +Pyr-d <sub>5</sub> ) do DAB4.....	185
<b>Figura 58.</b> Mapa de correlação HSQC de DAB4.....	186
<b>Figura 59.</b> Mapa de correlação HMBC de DAB4.....	186
<b>Figura 60.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do DAB5.....	187
<b>Figura 61.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do DAB5.....	187
<b>Figura 62.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C-DEPT (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do DAB5.....	188
<b>Figura 63.</b> Mapa de correlação HSQC de DAB5.....	188
<b>Figura 64.</b> Mapa de correlação HMBC de DAB5.....	189
<b>Figura 65.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do DAB6.....	189
<b>Figura 66.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do DAB6.....	190
<b>Figura 67.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C-DEPT (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do DAB6.....	190
<b>Figura 68.</b> Mapa de correlação HSQC de DAB6.....	191
<b>Figura 69.</b> Mapa de correlação HMBC de DAB6.....	191
<b>Figura 70.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do DAB7.....	192
<b>Figura 71.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do DAB7.....	192

<b>Figura 72.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do DAB8.....	193
<b>Figura 73.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do DAB8.....	193
<b>Figura 74.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C-DEPT (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do DAB8.....	194
<b>Figura 75.</b> Mapa de correlação HMBC de DAB8.....	194
<b>Figura 76.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do DAB9.....	195
<b>Figura 77.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do DAB9.....	195
<b>Figura 78.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C-DEPT (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do DAB9.....	196
<b>Figura 79.</b> Mapa de correlação HMBC de DAB9.....	196
<b>Figura 80.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> +Pyr-d <sub>5</sub> ) do DAB10.....	197
<b>Figura 81.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> +Pyr-d <sub>5</sub> ) do DAB10.....	197
<b>Figura 82.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> +Pyr-d <sub>5</sub> ) do DAB11.....	198
<b>Figura 83.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> +Pyr-d <sub>5</sub> ) do DAB11.....	198
<b>Figura 84.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C-DEPT (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> +Pyr-d <sub>5</sub> ) do DAB11....	199
<b>Figura 85.</b> Mapa de correlação HMBC de DAB11.....	199
<b>Figura 86.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> +Pyr-d <sub>5</sub> ) do DAB12.....	200
<b>Figura 87.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> +Pyr-d <sub>5</sub> ) do DAB12.....	200

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Micro-organismos utilizados no experimento em escala analítica para a biotransformação do ácido betulínico.....	60
<b>Tabela 2.</b> Deslocamentos químicos ( $\delta$ , ppm) de RMN- <sup>1</sup> H, - <sup>13</sup> C e DEPT do ácido betulínico e comparação com valores descritos na literatura....	91
<b>Tabela 3.</b> Deslocamentos químicos ( $\delta$ , ppm) de RMN- <sup>1</sup> H, - <sup>13</sup> C e DEPT do ácido betulínico (DAB1) e comparação com valores relatados na literatura.....	99
<b>Tabela 4.</b> Valores de IC <sub>50</sub> ( $\mu$ mol/L) $\pm$ DP do ácido betulínico (AB) e seus derivados avaliados contra linhagens de células tumorais pelo método SRB durante 96 h.....	111
<b>Tabela 5.</b> Índice de seletividade (IS) do ácido betulínico (AB) e seus derivados.....	117
<b>Tabela 6.</b> Análise da distribuição (%) de células de câncer de pulmão A549 em cada fase do ciclo celular, após tratamento com a concentração IC <sub>80</sub> de ácido betulínico (AB) e derivados, e cisplatina (2 $\mu$ mol/L), durante 24 e 48 h.....	126
<b>Tabela 7.</b> Análise da distribuição (%) de células de câncer de pulmão A549 em cada fase do ciclo celular, após tratamento com DAB3 (23 $\mu$ mol/L), durante 24 e 48 h.....	130
<b>Tabela 8.</b> Análise de células (%) de câncer de pulmão A549 tratadas com a concentração IC <sub>80</sub> de ácido betulínico (AB) e DAB3 após 24 e 48 h pelo teste de incorporação da anexina V-FITC e IP por citometria de fluxo.....	132
<b>Tabela 9.</b> Análise de células (%) de câncer de pulmão A549 tratadas com a concentração IC <sub>80</sub> de DAB11 após 24 e 48 h pelo teste de incorporação da anexina V-FITC e IP por citometria de fluxo.....	134
<b>Tabela 10.</b> Ativação (%) de caspases 3, 8 e 9 de células de câncer de pulmão A549 tratadas com a concentração IC <sub>80</sub> de ácido betulínico (AB), DAB3 e DAB11, e estaurosporina (STP) (0,5 $\mu$ mol/L) usado como controle positivo, durante 24, 48 e 72 h por citometria de fluxo.....	136
<b>Tabela 11.</b> Redução do crescimento (%) de <i>P. falciparum</i> W2 (resistente à cloroquina) tratados com ácido betulínico (AB) e seus derivados nas concentrações de 25 e 50 $\mu$ g/mL, calculada pelo método de incorporação de [ <sup>3</sup> H]-hipoxantina ou pelo método do LDH.....	144
<b>Tabela 12.</b> Valores de IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL) $\pm$ DP de ácido betulínico (AB) e seus derivados avaliados contra <i>P. falciparum</i> W2 (resistente à cloroquina).....	144
<b>Tabela 13.</b> Valores de CC <sub>50</sub> , IC <sub>50</sub> e IS de DAB2 e DAB11 obtidos para HepG2 A16 e <i>P. falciparum</i> W2 (resistente à cloroquina), respectivamente...	146
<b>Tabela 14.</b> Inibição da transcriptase reversa do HIV-1 (%), <i>in vitro</i> , pelo ácido betulínico (AB) e seus derivados testados nas concentrações de 10 e 50 $\mu$ g/mL.....	147

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Acoplamentos de HSQC e HMBC na região do grupamento aldeído de CEN2.....	96
<b>Esquema 2.</b> Mecanismo geral da reação de adição-eliminação nucleofílica entre aldeídos/cetonas e 2,4-dinitrofenil-hidrazina, formando um derivado 2,4-dinitrofenil-hidrazona.....	100
<b>Esquema 3.</b> Acoplamento de HMBC mostrando correlação do C3 com o hidrogênio do grupamento hidrazona em DAB2.....	102
<b>Esquema 4.</b> Síntese de DAB1.....	167
<b>Esquema 5.</b> Síntese de DAB2, DAB3, DAB4, DAB5 e DAB6.....	167
<b>Esquema 6.</b> Síntese de DAB7, DAB8 e DAB9.....	168
<b>Esquema 7.</b> Síntese de DAB10, DAB11 e DAB12.....	168

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>2,4-D</b>	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
<b>2,4-DNP</b>	2,4-dinitrofenil-hidrazina
<b>2,4-DNPH</b>	2,4-dinitrofenil-hidrazona
<b>AB</b>	ácido betulínico
<b>ABTS</b>	ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
<b>ACB</b>	ácido acetilbetulínico
<b>AcOEt</b>	acetato de etila
<b>AG</b>	ácido glicirrético
<b>AMH</b>	ágar Müller-Hinton
<b>anti-DIG-POD</b>	anticorpo anti-digoxigenina conjugado à peroxidase
<b>AO</b>	ácido oleanólico
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>AU</b>	ácido ursólico
<b>BE</b>	brometo de etídio
<b>Boc</b>	<i>tert</i> -butiloxicarbonila
<b>CAD</b>	DNAse ativada por caspase
<b>CC<sub>50</sub></b>	concentração citotóxica que inibe em 50% o crescimento celular
<b>CCD</b>	cromatografia em camada delgada
<b>CDK</b>	proteína quinase dependente de ciclina
<b>COSY</b>	<i>Correlation Spectroscopy</i>
<b>DCM</b>	diclorometano
<b>DEPT</b>	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
<b>DISC</b>	complexo sinalizador de morte celular ( <i>Death-Inducing Signal Complex</i> )
<b>DMEM</b>	meio de cultura " <i>Dubelcco's Modified Eagle Medium</i> "
<b>DMSO</b>	dimetilsulfóxido
<b>DO</b>	densidade óptica
<b>DP</b>	desvio padrão
<b>EC<sub>50</sub></b>	concentração efetiva média, na qual 50% da população sofre os efeitos da droga
<b>ED<sub>50</sub></b>	dose efetiva, na qual 50% da população sofre os efeitos da droga
<b>EDTA</b>	ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>EM</b>	Espectrometria de Massas
<b>EROs</b>	espécies reativas de oxigênio
<b>ESI</b>	ionização por eletrospray
<b>EtOH</b>	etanol
<b>FACS</b>	Separador de células ativado por fluorescência ( <i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> )
<b>FITC</b>	isotiocianato de fluoresceína

<b>HEPES</b>	ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico
<b>HMBC</b>	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy</i>
<b>HSQC</b>	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy</i>
<b>IC<sub>50</sub>/IC<sub>80</sub></b>	concentração que inibe em 50% ou 80%, respectivamente, a viabilidade celular
<b>ICAD</b>	inibidor de DNAse ativada por caspase
<b>IP</b>	iodeto de propídio
<b>IS</b>	índice de seletividade
<b>ITRNN</b>	inibidor da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeo
<b>IUPAC</b>	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<b>KPC</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
<b>LA</b>	laranja de acridina
<b>LDH</b>	lactato desidrogenase
<b>m-CPBA</b>	ácido <i>m</i> -cloroperbenzoico
<b>MeOH</b>	metanol
<b>MIC</b>	concentração inibitória mínima
<b>MRSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina
<b>MS</b>	meio de cultura Murashige & Skoog
<b>MTT</b>	brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
<b>NBT</b>	nitroazul de tetrazólio
<b>PARP</b>	poli-(ADP-ribose) polimerase
<b>PBS</b>	tampão fosfato-salino
<b>PES</b>	etosulfato de fenazina
<b>p.f.</b>	ponto de fusão
<b>PN</b>	produtos naturais
<b>Pyr-d5</b>	piridina deuterada
<b>REA</b>	relação estrutura-atividade
<b>RMN-<sup>1</sup>H</b>	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
<b>RMN-<sup>13</sup>C</b>	Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13
<b>RPMI</b>	meio de cultura " <i>Roswell Park Memorial Institute</i> "
<b>SBF</b>	soro bovino fetal
<b>SRB</b>	sulforrodamina B
<b>STP</b>	estaurosporina
<b>TAE</b>	TRIS-acetato-EDTA
<b>TCA</b>	ácido tricloroacético
<b>TDZ</b>	tidiazuron
<b>TP</b>	triterpenos pentacíclicos
<b>TR</b>	transcriptase reversa
<b>TRIS</b>	tris(hidroximetil)aminometano
<b>UFC</b>	unidades formadoras de colônia
<b>UI</b>	unidade internacional
<b>UV</b>	ultravioleta

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. Desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais .....	20
1.2. Triterpenos pentacíclicos .....	22
1.3. Ácido betulínico.....	26
1.3.1. Derivados do ácido betulínico obtidos por biotransformação e semissíntese.....	28
1.3.2. Relação estrutura-atividade dos derivados do ácido betulínico e análogos .....	32
1.3.2.1. Atividade antitumoral.....	32
1.3.2.1.1. Mecanismos de ação antitumoral.....	37
1.3.2.1.1.1. Ciclo celular e apoptose.....	37
1.3.2.1.1.2. Apoptose dependente de caspases.....	41
1.3.2.1.1.3. Autofagia.....	44
1.3.2.2. Atividade antimicrobiana .....	46
1.3.2.3. Atividade antimalárica .....	49
1.3.2.4. Atividade anti-HIV.....	52
2. OBJETIVOS.....	55
2.1. Objetivo geral .....	55
2.2. Objetivos específicos .....	55
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	56
3.1. Procedimentos gerais.....	56
3.1.1. Instrumentação .....	56
3.1.2. Técnicas cromatográficas.....	56
3.1.3. Solventes.....	57
3.2. Material vegetal.....	57
3.3. Isolamento do ácido betulínico.....	57
3.4. Derivados do ácido betulínico .....	59
3.4.1. Reações de biotransformação por fungos .....	59
3.4.1.1. Micro-organismos.....	59
3.4.1.2. Triagem de micro-organismos em escala analítica .....	59
3.4.1.3. Reações de biotransformação em escala preparativa .....	60

3.4.1.4.	Biotransformação por <i>Mycelia sterilia</i> (15b)	61
3.4.1.5.	Biotransformação por <i>Penicillium</i> sp. (10b)	61
3.4.1.6.	Biotransformação por <i>Penicillium citreonigrum</i> (13b)	62
3.4.2.	Reações de biotransformação por suspensão de células vegetais	63
3.4.2.1.	Suspensão celular de brotos de cenoura	63
3.4.2.2.	Suspensão celular de folhas jovens de macieira	65
3.4.3.	Semissíntese de derivados	65
3.4.3.1.	Preparo do DAB1 - ácido betulônico	65
3.4.3.2.	Preparo do DAB2	66
3.4.3.3.	Preparo do DAB3 e DAB4	67
3.4.3.4.	Preparo do DAB5	69
3.4.3.5.	Preparo do DAB6	70
3.4.3.6.	Preparo do DAB7	71
3.4.3.7.	Preparo do DAB8 e DAB9	72
3.4.3.8.	Preparo do DAB10	74
3.4.3.9.	Preparo do DAB11	75
3.4.3.10.	Preparo do DAB12	76
3.5.	Atividades biológicas	77
3.5.1.	Atividade antitumoral	77
3.5.1.1.	Linhagens celulares	77
3.5.1.2.	Ensaio de citotoxicidade	77
3.5.1.2.1.	Preparo das substâncias-teste	77
3.5.1.2.2.	Ensaio colorimétrico da Sulforrodamina B (SRB)	77
3.5.1.2.3.	Seletividade	78
3.5.1.3.	Análise microscópica	79
3.5.1.3.1.	Lâminas de vidro	79
3.5.1.3.2.	Lâminas-câmara ( <i>chamber slides</i> )	79
3.5.1.4.	Citometria de Fluxo	80
3.5.1.4.1.	Análise do ciclo celular	80
3.5.1.4.2.	Análise de morte celular	81
3.5.1.4.3.	Análise de ativação das caspases 3, 8 e 9	82
3.5.1.5.	Ensaio de fragmentação do DNA ( <i>DNA laddering</i> )	83
3.5.2.	Atividade antimicrobiana	84

3.5.2.1. Método de difusão em disco .....	84
3.5.2.2. Método de macrodiluição em caldo .....	84
3.5.3. Atividade antimalárica.....	85
3.5.3.1. Citotoxicidade .....	87
3.5.3.2. Índice de seletividade .....	87
3.5.4. Atividade anti-HIV .....	88
3.5.5. Análise estatística.....	89
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	90
4.1. Caracterização do ácido betulínico .....	90
4.2. Derivados do ácido betulínico .....	91
4.2.1. Reações de biotransformação .....	91
4.2.1.1. Caracterização de Myc15b, PEN10b.2 e CEN1.....	92
4.2.1.2. Caracterização de PEN10b.1.....	93
4.2.1.3. Caracterização de PEN13b .....	94
4.2.1.4. Caracterização de CEN2 .....	94
4.2.1.5. Biotransformação por suspensão celular de folhas jovens de macieira.....	97
4.2.2. Semissíntese de derivados .....	97
4.2.2.1. DAB1- ácido betulínico .....	98
4.2.2.2. DAB2- ácido 3-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]lup-20(29)-en-28-oico.....	100
4.2.2.3. DAB3- ácido 3-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]lup-(20R)-29-oxolupan-28-oico e DAB4- ácido 3-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]lup-(20S)-29-oxolupan-28-oico....	102
4.2.2.4. DAB5- 3-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]-lup-20(29)-en-28-oato de metila	103
4.2.2.5. DAB6- 3-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]lup-20(29)-en-28-oato de benzila	104
4.2.2.6. DAB7- ácido 3,20-dioxo-29-norlupan-28-oico.....	106
4.2.2.7. DAB8- ácido 3,20-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]lupan-28-oico .....	106
4.2.2.8. DAB9- ácido 3-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]-20-oxolupan-28-oico .....	107
4.2.2.9. DAB10- ácido 3-hidroxi-20-oxo-29-norlupan-28-oico.....	108
4.2.2.10. DAB11- ácido 3-hidroxi-20-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]-29-norlupan-28-oico .....	109
4.2.2.11. DAB12- ácido 3-hidroxi-20-hidroxi-tanimidoil-lupan-28-oico .....	110
4.3. Atividades biológicas.....	111
4.3.1. Atividade antitumoral .....	111
4.3.1.1. Citotoxicidade .....	111
4.3.1.2. Seletividade .....	116

4.3.1.3. Análise microscópica .....	119
4.3.1.4. Citometria de Fluxo .....	126
4.3.1.4.1. Análise do ciclo celular .....	126
4.3.1.4.2. Análise de morte celular .....	131
4.3.1.4.3. Análise de ativação das caspases 3, 8 e 9 .....	135
4.3.1.5. Ensaio de fragmentação do DNA ( <i>DNA laddering</i> ) .....	138
4.3.2. Atividade antimicrobiana .....	142
4.3.2.1. Método de difusão em disco .....	142
4.3.2.2. Método de macrodiluição em caldo .....	142
4.3.3. Atividade antimalárica .....	144
4.3.4. Atividade anti-HIV .....	147
5. CONCLUSÃO .....	148
6. REFERÊNCIAS .....	150
7. ANEXOS .....	166

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais

A necessidade contínua de novas substâncias potencialmente ativas contra um número cada vez maior de alvos moleculares enfatiza a relevância dos produtos naturais (PN) na descoberta de novos fármacos. Quando comparadas à substâncias obtidas pela síntese química tradicional, as moléculas de origem natural, sejam elas derivadas de vegetais, animais ou micro-organismos, representam uma fonte mais econômica e consistente de protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que apresentam grande diversidade estrutural (HARVEY, 2000).

O conhecimento acumulado ao longo de gerações pelos povos primitivos e pelos indígenas foi de fundamental importância para o descobrimento de substâncias tóxicas e medicamentosas ao longo do tempo. O resgate desse conhecimento empírico contribuiu para o desenvolvimento da pesquisa em PN, já que a natureza forneceu muitos modelos moleculares que fundamentaram estudos de relação estrutura-atividade (REA) e inspiraram o desenvolvimento da síntese orgânica clássica (VIEGAS JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Com a Revolução Industrial, o avanço da ciência e da tecnologia provocou profundas mudanças sociais e comerciais. Talvez o marco mais importante para o desenvolvimento de fármacos a partir de PN isolados de plantas tenha sido o descobrimento dos salicilatos obtidos de *Salix alba*, e posteriormente a acetilação do ácido salicílico, que minimizou os efeitos colaterais e produziu um dos medicamentos mais vendidos do mundo até os dias de hoje, iniciando a era dos fármacos sintéticos (VIEGAS JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Esse exemplo mostra que os PN podem ser aprimorados tanto em termos de eficácia e seletividade quanto na melhora das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas. Outro exemplo, a morfina, um alcaloide do ópio, é uma droga obtida da papoula (*Papaver somniferum*), que conduziu à descoberta de muitos compostos semissintéticos e totalmente sintéticos baseados no mesmo farmacóforo, os quais representam uma bem sucedida classe de opioides de segunda geração (GANESAN, 2008).

De acordo com as definições da IUPAC (1998), a química medicinal é uma disciplina baseada na química, também envolvendo aspectos das ciências biológicas, médicas e farmacêuticas, buscando o planejamento, a descoberta, a

invenção, a identificação e o preparo de substâncias biologicamente ativas, o estudo do seu metabolismo, a interpretação do mecanismo de ação a nível molecular e o estabelecimento de uma REA, ou seja, a relação entre a estrutura química e a atividade biológica de uma série de compostos.

A introdução de novas tecnologias tornou a química medicinal mais ampla em sua concepção, ampliando seu caráter interdisciplinar (BARREIRO; FRAGA, 2001). Nos últimos anos, a descoberta de novos fármacos entrou em uma era altamente competitiva, na qual a qualidade das bibliotecas químicas e o tempo gasto entre experimentos e desenvolvimento do produto são fatores cruciais no sucesso de uma companhia farmacêutica. Entretanto, apesar dos esforços dedicados pelas indústrias farmacêuticas em aprimorar as tecnologias e os processos de análise, os PN competem com substâncias sintéticas, que têm aumentando consideravelmente. A pesquisa de PN oferece várias vantagens, como por exemplo o fato de serem uma fonte potencialmente infinita de diversidade química, incomparável a qualquer coleção obtida por química sintética ou combinatória (STROHL, 2000). Neste contexto, é importante uma proposta multidisciplinar para a descoberta de fármacos, envolvendo uma geração de diversidade molecular nova a partir de fontes naturais, combinada com metodologias de síntese total e combinatória, e incluindo a manipulação de vias biossintéticas (biossíntese combinatória) (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003). Baseando-se na estrutura dos PN para a síntese e semissíntese de novas moléculas, seja como esqueleto estrutural básico ou simplesmente como *building block*, é possível criar bibliotecas combinatórias com uma elevada chance de se descobrir substâncias com potencial terapêutico (NIELSEN, 2002).

Uma vez que um composto biologicamente ativo é obtido, pode-se lançar mão de estudos envolvendo modificação estrutural, que é uma metodologia bem-sucedida na procura de novos fármacos, onde procura-se simplificar a estrutura, ou conservar a mesma, ou ainda aumentá-la pela incorporação de novos grupos funcionais. As modificações produzidas pela introdução de um substituinte podem atingir várias propriedades físico-químicas da molécula, tais como hidrofobicidade, densidade eletrônica, conformação estrutural e propriedades farmacocinéticas, entre outras (CECHINEL-FILHO; YUNES, 2001). A complexidade da maioria dos PN, como a presença de centros estereogênicos e funções oxigenadas, representam um desafio na busca de novas moléculas ativas. Geralmente o caminho mais efetivo é a realização de simples modificações na estrutura do que alterações radicais no

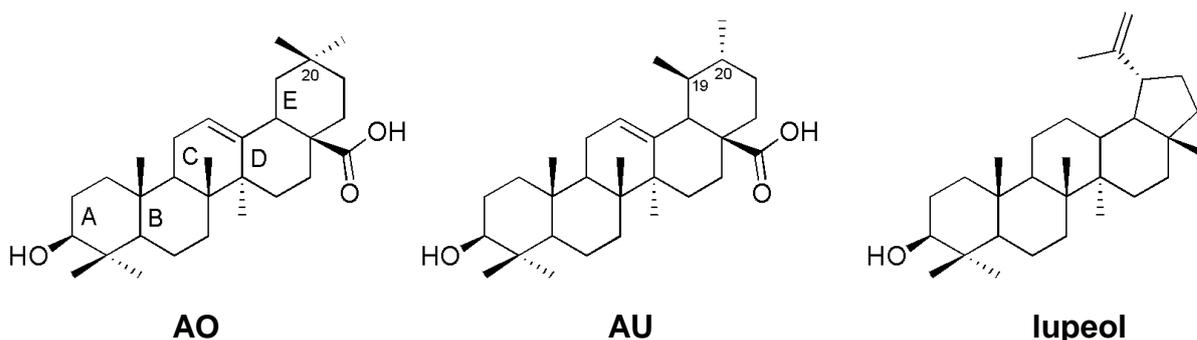
esqueleto básico da molécula. O ideal seria identificar o farmacóforo da molécula e propor modificações nos grupos adicionais ligados a ele, por vias sintéticas ou semissintéticas, resultando numa série de moléculas com propriedades terapêuticas superiores ao do protótipo inicial (GANESAN, 2008). A maioria dos PN apresenta grupos hidroxila, duplas ligações, grupos carbonila e outros que são susceptíveis de serem modificados por reações extremamente simples, permitindo obter rapidamente uma ideia da REA. Com estas modificações pode-se obter informações sobre a importância do grupo modificado na atividade da molécula e ainda a importância de alguns efeitos como mudança de hidrofobicidade, eliminação de grupo doador de ligações de hidrogênio, mudança da densidade eletrônica de determinados grupos, entre outros (CECHINEL-FILHO; YUNES, 2001).

Para que um protótipo seja considerado um candidato a fármaco, evoluindo do processo de descoberta para a etapa de desenvolvimento, alguns fatores devem ser considerados, tais como: simplicidade estrutural, com possibilidade de modificações, visando a otimização de seu perfil farmacoterapêutico; ser membro de uma série congênere com REA bem estabelecida; possuir situação patentária favorável e apresentar boas propriedades farmacocinéticas, como absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (LIMA, 2007). A etapa de otimização compreende o melhoramento da estrutura do protótipo, através de modificações planejadas com o auxílio de técnicas definidas, que podem identificar os diferentes níveis de contribuição farmacofórica, fornecer informações sobre a conformação bioativa e antecipar o índice de reconhecimento molecular pelo alvo selecionado, visando o aumento da potência, seletividade, diminuição da toxicidade, adequação do perfil farmacocinético e estabelecimento da REA, a partir da síntese e avaliação farmacológica, *in vitro* e *in vivo*, de séries congêneres ao protótipo identificado originalmente (BARREIRO; FRAGA, 2001).

## 1.2. Triterpenos pentacíclicos

O interesse pelas atividades biológicas dos triterpenos vem aumentando consideravelmente nos últimos anos, sobretudo dos triterpenos pentacíclicos (TP) (CICHEWICZ; KOUZI, 2004; CONNOLLY; HILL, 2001). Os TP, que são derivados da ciclização do esqualeno (XU; FAZIO; MATSUDA, 2004), podem ser divididos em três grupos principais segundo o seu esqueleto:  $\beta$ -amirina ou oleananos,  $\alpha$ -amirina ou ursanos, e lupeol ou lupanos. Os do tipo oleanano, sendo o ácido oleanólico (AO) o

seu principal representante, possuem dois grupos metila em C20, enquanto os ursanos, representado pelo ácido ursólico (AU), possuem um grupo metila em C20 e outro em C19. A estereoquímica entre os anéis A/B, B/C e C/D é *trans*, e entre D/E é *cis*. Os lupanos diferem desses dois tipos porque a estereoquímica entre os anéis D/E é *trans*, além do fato do anel E possuir cinco carbonos, ao invés de ter um anel de seis membros como naqueles dois primeiros tipos (SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2004). Entre os triterpenos do tipo oleanano destacam-se ainda os ácidos maslínico, augústico, bredemólico, arjunólico, oleanônico, morólico, morônico, miricérico A, hiptático A, glicirrizínico, glicirrético e  $\alpha$ -boswélico. Os triterpenos do tipo ursano incluem os ácidos corosólico, pigênico A, asiático, ursônico,  $\beta$ -boswélico, além do uvaol, asiaticosídeo e madecassosídeo. Já os triterpenos com esqueleto lupano englobam o lupeol e a betulina, e ainda os ácidos betulínico (AB) e alfitólico (SHENG; SUN, 2011).



Desde 1985, Hill & Connolly (2012) vêm revisando regularmente a caracterização de triterpenoides em fontes naturais. A distribuição dos TP no Reino Vegetal é ampla, sendo que em algumas espécies, triterpenos como AB, AO e AU, podem chegar a concentrações de 2-3%, como é o caso das cascas de plátano (*Platanus acerifolia*) e folhas de oliveira (*Olea europeae*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*), respectivamente (JÄGER *et al.*, 2009). Uma das fontes vegetais mais ricas em triterpenos do tipo lupano são as cascas de árvores do gênero *Betula* sp. (*B. pendula*, *B. pubescens*, *B. papyrifera*, *B. neoalaskana*), sendo a betulina o componente majoritário, em torno de 68-78% da composição química total de extratos das cascas externas (KRASUTSKY, 2006).

Os triterpenos representam uma promissora e expansiva plataforma de compostos naturais biologicamente ativos, cujo potencial vem sendo explorado pelos grupos de pesquisa e companhias farmacêuticas. Essas moléculas são alvo de

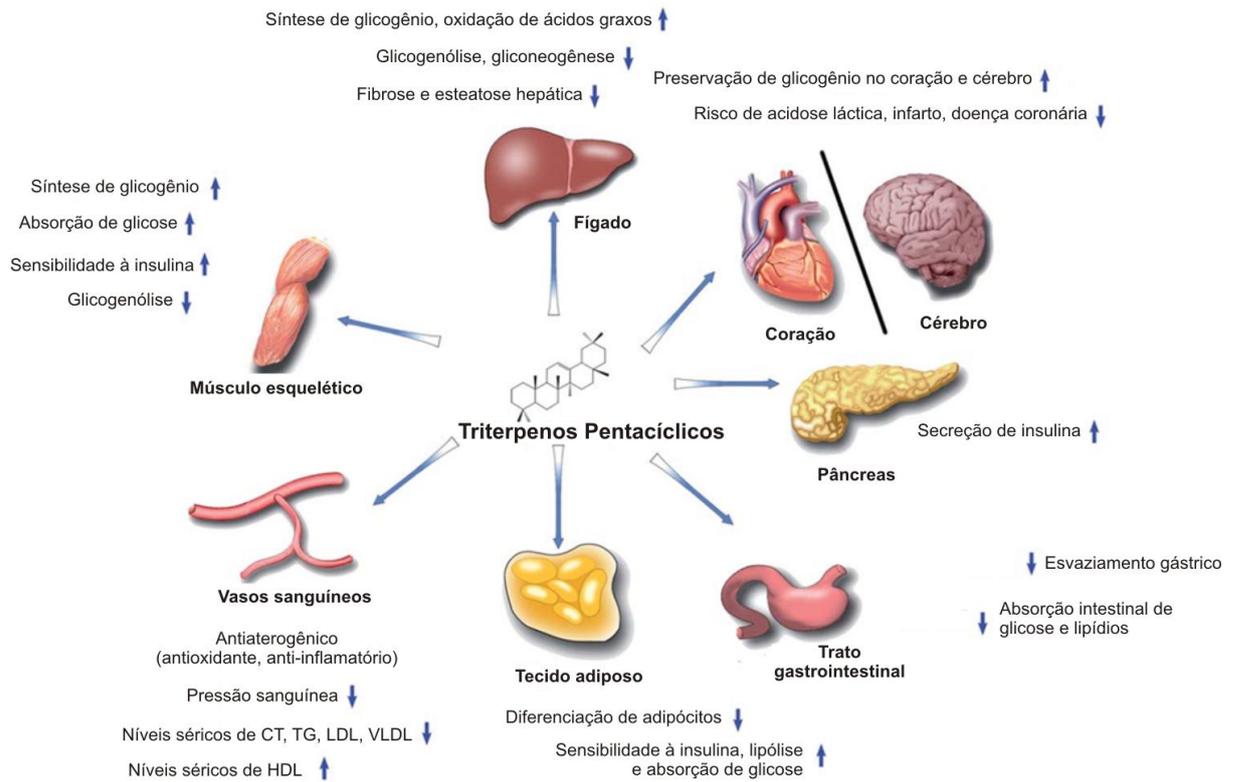
estudos devido às suas propriedades anti-inflamatória, hepatoprotetora, analgésica, antimicrobiana, antimicótica, virostática, imunomoduladora e tônica, e algumas atuam na prevenção e tratamento de hepatites, infecções parasíticas e protozoárias, e acima de tudo, têm efeitos citostático e citotóxico (DZUBAK *et al.*, 2006). Embora sejam moléculas com elevado potencial biológico, a baixa solubilidade em água, o alto log *P* e a massa molecular grande pesam contra os triterpenos na corrida pela busca de novos medicamentos (KRASUTSKY, 2006). Mesmo assim, tendo em vista o número de publicações com análogos de triterpenos pentacíclicos biologicamente ativos, a química de triterpenoides tem se desenvolvido muito nos últimos dez anos (SHENG; SUN, 2011).

AO, AU e seus derivados semissintéticos geralmente compartilham uma série de efeitos biológicos, entre eles atividades antioxidante (inibição da formação de espécies reativas de oxigênio - EROs), antibacteriana, antiparasitária, antiosteoporótica, antifertilidade, anti-hipertensiva, anti-hiperlipidêmica, diurética, antidiabética, imunomoduladora, anti-inflamatória (inibição da iNOS e COX-2), antinociceptiva, gastroprotetora/antiulcerogênica, hepatoprotetora (interação com citocromo P450), anti-HIV (inibição da protease e transcriptase reversa do vírus HIV-1) e antitumoral (inibição da iniciação e promoção de tumores; indução de diferenciação celular de tumores e apoptose; inibição de topoisomerasas I e II; inibição de DNA polimerases  $\alpha$  e  $\beta$ ; inibição da angiogênese, invasão de células tumorais e metástase), assim como a habilidade de inibir a via do sistema complemento (inibição da C3 convertase) (LIU, 2005; DZUBAK *et al.*, 2006; KUO *et al.*, 2009; LASZCZYK, 2009; WANG; FANG, 2009; PATLOLLA; RAO, 2012; POLLIER; GOOSSENS, 2012; SALVADOR *et al.*, 2012).

O ácido boswélico apresenta propriedades citotóxicas contra células de glioma e leucemia, e também inibidoras das topoisomerasas I e II, envolvidas na proliferação de células tumorais. Já o ácido glicirrético (AG), antiproliferativo e antimutagênico, também inibe a enzima 11- $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase, que controla os níveis circulantes de cortisona (DZUBAK *et al.*, 2006). A inibição dessa enzima pelo AG, e também pela glicirrizina, leva a um excesso de cortisol endógeno, resultando em hipertensão, hipercalemia e supressão do eixo renina-aldosterona (hiperaldosteronismo). Tais efeitos colaterais são geralmente observados em indivíduos que consomem grande quantidade de produtos a base de alcaçuz (WANG; NIXON, 2001). Já entre os lupanos, o lupeol manifesta efeitos antioxidante

(SALEEM *et al.*, 2001), antiangiogênico (YOU *et al.*, 2003) e contra uma variedade de outras desordens, como inflamação, artrite, diabetes, problemas cardiovasculares e renais, toxicidade hepática, infecções microbianas e câncer (SIDDIQUE; SALEEM, 2011).

Até o momento, um grupo de alvos moleculares através dos quais TP, entre eles AB, AO, AU e AG, desempenham papéis pivotais na modulação do metabolismo da glicose e lipídios tem sido descoberto. De um ponto de vista holístico, os TP exibem eficácia oral e segurança como agentes hipoglicêmicos e hipolipidêmicos em humanos, uma vez que plantas contendo essa classe de substâncias vêm sendo consumidas para o tratamento de diabetes e obesidade na Ásia, principalmente na China, por milhares de anos. Devido ao sucesso de fármacos antitumorais inibidores de quinases *multi-targets*, uma onda de interesse no desenvolvimento de substâncias com múltiplos alvos terapêuticos tem surgido. Assim como o resveratrol e a curcumina, os TP surgem como a grande promessa para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos e preventivos multi-alvos. Através de interações com diferentes alvos moleculares no mesmo órgão ou com os mesmos alvos em órgãos diferentes, os TP sinergisticamente modulam o metabolismo da glicose e lipídios no corpo inteiro, através da interação com uma gama de enzimas, receptores e hormônios (Fig. 1). No mesmo contexto, as doenças cardiovasculares geralmente surgem lado-a-lado com os distúrbios metabólicos e correspondem a 80% da mortalidade diabética. Propriedades ateroscleróticas dos TP já foram relatadas na literatura, com destaque para os ácidos 2 $\alpha$ -hidroxiursólico, euscáfico, tomêntico, arjunólico e ainda lupeol, e propriedades anti-hipertensivas já foram descritas para os AO e AU. Esses dois últimos TP são inibidores competitivos da TGF- $\beta$ , o fator de transformação de crescimento que está envolvido na patogênese de doenças fibróticas, aterosclerose, câncer, entre outras. Além deste, outros alvos moleculares, que estão envolvidos direta ou indiretamente com estas doenças, são regulados pelos TP, como receptor de endotelina, receptores AT1 e enzima conversora de angiotensina (ECA), LDL oxidado, lipase pancreática,  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glucosidase, fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), entre outros (SHENG; SUN, 2011).

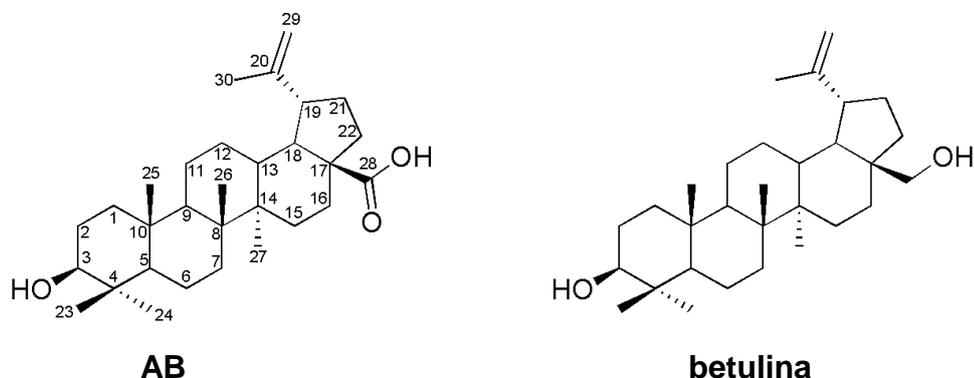


**Figura 1.** O papel regulatório geral dos triterpenos pentacíclicos sobre a homeostase da glicose, lipídios e vascular em diferentes órgãos. Adaptado de Sheng & Sun (2011).

### 1.3. Ácido betulínico

O ácido  $3\beta$ -hidroxi-lup-20(29)-en-28-oico (AB) pode ser considerado como a forma oxidada da betulina na posição C28. A oxidação direta da betulina para ácido betulínico com o reagente de Jones e subsequente redução estereoseletiva com  $\text{NaBH}_4/\text{THF}$  para  $3\alpha$ - e  $3\beta$ -AB (5:95) é a maneira mais clássica de se obter essa substância (KRASUTSKY, 2006). Juntamente com AO e AU, AB é um dos triterpenos mais amplamente distribuídos no Reino Vegetal (FRIGHETTO *et al.*, 2005) e pode ser isolado a partir de diferentes fontes vegetais como *Betula* spp. (Betulaceae), *Ziziphus* spp. (Rhamnaceae), *Syzygium* spp. (Myrtaceae), *Diospyros* spp. (Ebenaceae) e *Paeonia* spp. (Paeoniaceae) (CICHEWICZ; KOUZI, 2004), às vezes atingindo concentrações elevadas, maior que 2% (GALGON; HÖKE; DRÄGER, 1999; JÄGER *et al.*, 2009). Ao contrário da betulina, AB possui um número impressionante de efeitos farmacológicos, incluindo propriedades anti-inflamatória, antibacteriana, antimalárica, tripanocida, analgésica, anti-HIV e antitumoral (FUJIOKA *et al.*, 1994; BRINGMANN *et al.*, 1997; CICHEWICZ; KOUZI,

2004; YOGESHWARI; SRIRAM, 2005; NYASSE *et al.*, 2009; DOMÍNGUEZ-CARMONA *et al.*, 2010).



A partir do início dos anos 1990, os efeitos do AB começaram a ser relatados (DZUBAK *et al.*, 2006). Pisha e colaboradores (1995) relataram pela primeira vez os efeitos do AB como inibidor seletivo de células de melanoma humano (MEL-1-4, ED<sub>50</sub>= 1-5 µg/mL), tanto *in vitro* quanto em modelos animais, e comprovaram que o mecanismo de ação era por meio de indução de apoptose. Essa descoberta causou uma onda de interesse sobre AB e seus derivados, por terem grande potencial como substância antineoplásica e serem altamente seletivos para as células tumorais (SANTOS *et al.*, 2011). Atualmente, AB encontra-se na fase IIb de ensaios clínicos para tratamento de nevo melanocítico displásico (SALVADOR *et al.*, 2012).

Há vários trabalhos na literatura descrevendo os efeitos antitumorais do AB contra um amplo espectro de células cancerígenas, tais como melanoma, pescoço e cabeça, ovário, mama, pulmão, tireoide, cervical, cólon, lipossarcoma, sendo que ele atua em concentrações micromolares com maior seletividade para essas células (ZUCO *et al.*, 2002; RZESKI *et al.*, 2006; KESSLER *et al.*, 2007; KOMMERA *et al.*, 2010b; KOMMERA *et al.*, 2010c; KOMMERA *et al.*, 2011). AB é capaz de induzir apoptose através de alterações na permeabilidade da membrana da mitocôndria, que perde seu potencial de membrana, liberando fatores pró-apoptóticos, os quais irão ativar uma cascata de eventos, culminando com a ativação de caspases e fragmentação do DNA. A formação de EROs e ativação de NF-κB também estão envolvidos no mecanismo apoptótico do AB (FULDA, 2009; FULDA; KROEMER, 2009; FULDA, 2010).

AB também está relacionado à ação anti-HIV, sendo considerado um potente inibidor da replicação viral (FUJIOKA *et al.*, 1994; EVERS *et al.*, 1996) e seus derivados, por sua vez, têm sido descritos como inibidores da entrada do vírus HIV-1

dentro das células hospedeiras, e inibidores de protease-HIV e transcriptase reversa. Desta forma, estes compostos têm grande potencial para tornarem-se moléculas adicionais para a atual terapia anti-HIV (YOGEE SWARI; SRIRAM, 2005).

### **1.3.1. Derivados do ácido betulínico obtidos por biotransformação e semissíntese**

Há um grande interesse em descobrir quais são as características estruturais responsáveis pelos efeitos farmacológicos do AB, de modo a otimizar seu perfil farmacocinético e farmacodinâmico (CICHEWICZ; KOUZI, 2004). Muitos estudos de derivatização, relatados em artigos científicos e patentes, já foram realizados para produzir análogos do AB, uma vez que esse triterpeno possui as posições C3, C28, C29 e C30 susceptíveis a modificações (KRASUTSKY, 2006).

Embora o número de derivados do AB obtido por semissíntese seja expressivo, eles são resultados de modificações de poucas posições ativadas na estrutura. De modo a reagir posições não ativadas da estrutura de PN, o uso da biotransformação por micro-organismos ou células vegetais é uma alternativa viável que tem produzido derivados igualmente potentes aos obtidos sinteticamente (CORDELL *et al.*, 2007; MUFFLER *et al.*, 2011). Além da busca por novos derivados mais ativos, o estudo dessas reações de biotransformação oferece outro aspecto interessante. Muitos compostos ativos frequentemente não são aplicáveis na terapia por causa da sua insolubilidade em água. Geralmente esses problemas são resolvidos por meio de formulações, como por exemplo os lipossomas. Uma vez que as reações de biotransformação são realizadas em meio aquoso, há a tendência de que os compostos derivados exibam uma maior solubilidade em água. O resultado pode ser uma maior biodisponibilidade (FABER, 1997).

Reações de biotransformação ou biocatálise são definidas como aquelas reações que utilizam enzimas para realizar modificações estruturais em compostos orgânicos. Pode-se utilizar enzimas isoladas ou sistemas celulares inteiros, como micro-organismos, células animais ou vegetais (OLIVEIRA, 2009). Segundo Faber (1997), o uso de biocatalisadores em reações de modificação estrutural apresenta mais vantagens que desvantagens: a) as enzimas são catalisadores muito eficientes; b) as taxas dos processos mediados por enzimas são acelerados por um fator de  $10^8$  a  $10^{10}$ , quando comparadas com as reações não enzimáticas correspondentes; c) as enzimas são ecologicamente aceitáveis, facilmente

maneáveis e completamente degradáveis, ao contrário dos metais pesados e outros reagentes químicos; d) as enzimas atuam sob condições médias, com pH= 5 a 8 e temperatura de 20 a 30°C, o que minimiza reações colaterais indesejadas, como decomposição, isomerização, racemização e rearranjos, os quais são comuns nas metodologias tradicionais; e) as enzimas são compatíveis entre si, uma vez que enzimas geralmente atuam sob as mesmas ou similares condições e várias reações biocatalíticas usando sistemas multienzimáticos podem ser realizadas em um único frasco; f) as biotransformações se beneficiam da chamada “promiscuidade enzimática”, isto é, muitas enzimas possuem certa tolerância em relação ao substrato de modo que elas podem aceitar em seus sítios ativos moléculas diferentes; g) enzimas podem catalisar um amplo espectro de reações, desde hidrólise, adição, óxido-redução, até halogenação/desalogenação, alquilação/desalquilação, isomerização, etc.

Além do mais, esta técnica é especialmente importante na obtenção de derivados de moléculas orgânicas muito complexas ou sensíveis a condições reacionais extremas. Nesses casos, o uso de reagentes químicos clássicos podem produzir reações colaterais indesejáveis e a substância de partida pode requerer extensas etapas de proteção/desproteção de grupos funcionais sensíveis. Dentre as desvantagens, as mais importantes se referem aos rendimentos das biotransformações, que geralmente são mais baixos em comparação às reações de síntese, aos custos mais elevados e ainda à solubilidade limitada da maioria das moléculas orgânicas em meio aquoso, tendo em vista que a substituição por um solvente orgânico pode levar a perda da atividade enzimática (FABER, 1997; OLIVEIRA, 2009).

Embora a biotransformação represente uma ferramenta alternativa para o desenvolvimento sustentável de tecnologias para a obtenção de produtos químicos e fármacos, o número e a diversidade de aplicações são ainda modestos, considerando a disponibilidade de micro-organismos e o amplo espectro de reações que eles podem catalisar (BORGES *et al.*, 2009). Vários exemplos (OLIVEIRA, 2009; TAO; XU, 2009; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2012) têm mostrado o potencial dessa técnica, seja em escala analítica ou industrial, como é o caso do emprego da biotransformação na produção da cortisona, taxol e estatinas, e também na derivatização do AB.

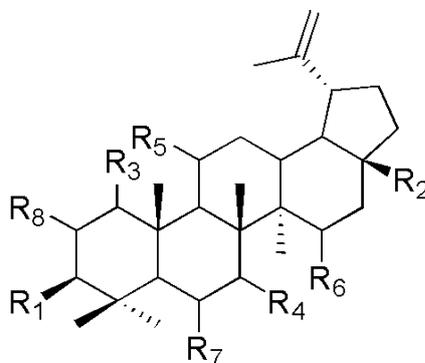
Um exemplo é o trabalho de Chatterjee, Pezzuto & Kouzi (1999), descrevendo a biotransformação do AB pelo fungo *Cunninghamella* spp. para 28-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-3 $\beta$ -hidroxi-lup-20(29)-en-28-oato (rendimento de 0,77%) (I), um derivado glicosilado, enquanto a bactéria *Bacillus megaterium*, de acordo com Chatterjee e colaboradores (2000), converteu-o nos ácidos 3-oxo-lup-20(29)-en-28-oico (rendimento de 4,10%) (II), 3-oxo-11 $\alpha$ -hidroxi-lup-20(29)-en-28-oico (rendimento de 0,19%) (III), 1 $\beta$ -hidroxi-3-oxo-lup-20(29)-en-28-oico (rendimento de 0,13%) (IV) e 3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,15 $\alpha$ -tri-hidroxi-lup-20(29)-en-oico (rendimento de 0,54%) (V), os quais possuem atividade antimelanoma.

Kouzi e colaboradores (2000) observaram que *B. megaterium* foi capaz de transformar AB nos ácidos betulônico (rendimento de 0,44%) (II), 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -di-hidroxi-lup-20(29)-en-28-oico (rendimento de 0,085%) (VI) e 3 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -tri-hidroxi-lup-20(29)-en-28-oico (rendimento de 0,45%) (VII). *Cunninghamella elegans*, por sua vez, produziu o ácido 1 $\beta$ ,3 $\beta$ ,7 $\beta$ -tri-hidroxi-lup-20(29)-en-28-oico (rendimento de 0,37%) (VIII), enquanto *Mucor mucedo* transformou-o no ácido 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -di-hidroxi-lup-20(29)-en-28-oico (rendimento de 1,30%) (VI).

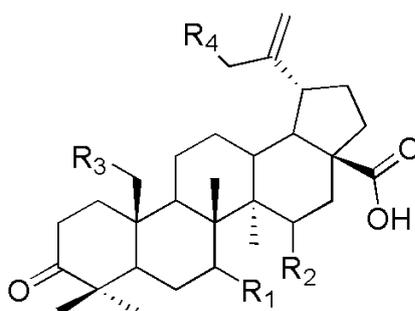
A bactéria *Nocardia* sp. demonstrou ser capaz de conduzir reações seletivas para obter ésteres do AB na posição C28, uma vez que ela catalisou a conversão deste em um derivado éster metílico (rendimento não informado) (IX) (ZHANG *et al.*, 2005). Essa bactéria também é capaz de realizar a  $\alpha$ -hidroxilação assimétrica do AB e posterior acetilação do grupo hidroxila, convertendo-o a metil-2 $\alpha$ -acetoxi-3-oxo-lup-20(29)-en-28-oato (rendimento de 6,42%) (X) e metil-3-oxo-lup-20(29)-en-28-oato (rendimento de 49,8%) (XI) (QIAN *et al.*, 2009b).

Em estudo prévio conduzido no nosso grupo de pesquisa obteve-se derivados do AB biotransformados por fungos filamentosos. O fungo *Colletotrichum* sp. converteu AB em ácido 3-oxo-15 $\alpha$ -hidroxilup-20(29)-en-28-oico (rendimento de 2,34%) (XII), enquanto o gênero *Chaetophoma* e *Dematium*, encontrados nas cascas do plátano (*Platanus orientalis*), foram capazes de convertê-lo a ácido betulônico (rendimentos de 0,94% e 0,62%, respectivamente) (II). Partindo-se do ácido betulônico como precursor, o fungo *Arthrobotrys* sp. converteu-o nos ácidos 3-oxo-7 $\beta$ -hidroxilup-20(29)-en-28-oico (rendimento de 1,64%) (XIII), 3-oxo-7 $\beta$ ,15 $\alpha$ -di-hidroxilup-20(29)-en-28-oico (rendimento de 0,62%) (XIV) e 3-oxo-7 $\beta$ ,30-di-hidroxilup-20(29)-en-28-oico (rendimento de 1,33%) (XV). *Colletotrichum* sp. transformou II em XII (rendimento de 2,97%) e XV (rendimento de 1,72%), e

*Chaetophoma* sp. em ácido 3-oxo-25-hidroxiup-20(29)-en-28-oico (rendimento de 4,22%) (**XVI**). Esses três fungos mostraram seletividade para oxidações nas posições C3, C7, C15 e C30 (BASTOS *et al.*, 2007).



	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
<b>I</b>	OH	COO-β-D-glucose	H	H	H	H	H	H
<b>II</b>	=O	COOH	H	H	H	H	H	H
<b>III</b>	=O	COOH	H	H	OH	H	H	H
<b>IV</b>	=O	COOH	OH	H	H	H	H	H
<b>V</b>	OH	COOH	H	OH	H	OH	H	H
<b>VI</b>	OH	COOH	H	OH	H	H	H	H
<b>VII</b>	OH	COOH	H	OH	H	H	OH	H
<b>VIII</b>	OH	COOH	OH	OH	H	H	H	H
<b>IX</b>	OH	COOCH <sub>3</sub>	H	H	H	H	H	H
<b>X</b>	=O	COOCH <sub>3</sub>	H	H	H	H	H	AcO
<b>XI</b>	=O	COOCH <sub>3</sub>	H	H	H	H	H	H



	R1	R2	R3	R4
<b>XII</b>	H	OH	H	H
<b>XIII</b>	OH	H	H	H
<b>XIV</b>	OH	OH	H	H
<b>XV</b>	OH	H	H	OH
<b>XVI</b>	H	H	OH	H

Há diversos relatos na literatura descrevendo as atividades biológicas dos derivados do AB obtidos por semissíntese e conseqüentemente a REA destas moléculas (MUKHERJEE *et al.*, 2006), principalmente no que se refere à atividade

antitumoral. Já foram descritas várias classes de derivados do AB preparadas por métodos sintéticos, entre eles derivados hidroxil- (BI *et al.*, 2007), succinil- (GENET *et al.*, 2010; QIAN *et al.*, 2010), éster- (SA *et al.*, 2009; NAKAGAWA-GOTO *et al.*, 2009; DOMÍNGUEZ-CARMONA *et al.*, 2010), amida- (LAI *et al.*, 2008; QIAN *et al.*, 2009a), anel A heterocíclico (KUMAR *et al.*, 2008), cloroacetil- (KOMMERA *et al.*, 2010d; KOMMERA *et al.*, 2011), carbamato (KOMMERA *et al.*, 2010b; SANTOS *et al.*, 2010), fenil-hidrazono-, bromo- (MUKHERJEE *et al.*, 2004), fluoro-, amino-, hidrazono- (RAJENDRAN *et al.*, 2008), seco- (URBAN *et al.*, 2004), imino- (GENET *et al.*, 2010), imidazol- (SANTOS *et al.*, 2009), etc. Com relação a estrutura-atividade dos derivados de AB e seus análogos, algumas considerações puderam ser feitas sobre as propriedades antitumoral, antimicrobiana, antimalárica e anti-HIV destas moléculas.

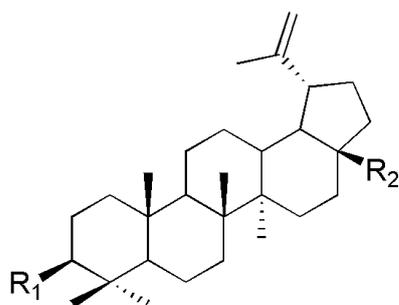
### **1.3.2. Relação estrutura-atividade dos derivados do ácido betulínico e análogos**

#### **1.3.2.1. Atividade antitumoral**

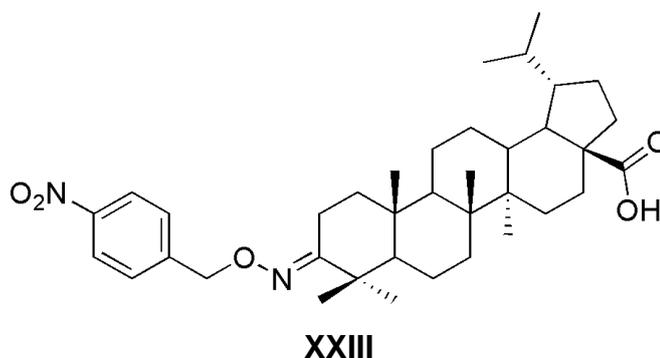
Kim, Pezzuto & Pisha (1998) observaram que existe uma limitação quanto ao tamanho dos grupos substituintes na posição C3. A introdução de uma molécula de metoxilamina em C3 (**XVII**) ou de duas moléculas em C3 e C28 (**XVIII**) leva à redução ou à perda total da atividade sobre células de melanoma (MEL-2), respectivamente. Já grupos como cetona (ácido betulônico, **II**), amina (**XX**) e oxima (**XXI**) produzem substâncias tão ativas quanto AB, porém menos seletivas. A ligação dupla terminal não é essencial para a atividade de algumas substâncias, já que a sua hidrogenação manteve os mesmos efeitos. O derivado benzoato do lupeol (**XXII**) mostrou ser totalmente inativo, demonstrando a importância do grupo ácido carboxílico para a atividade antimelanoma. Parece que a combinação de tamanho do substituinte, nucleofilicidade e força da ligação de hidrogênio formada são fundamentais para a citotoxicidade sobre células de melanoma.

Os derivados oximino, éster, amina e hidrazona na posição C3 preparados por Rajendran e colaboradores (2008), embora mais ativos que AB, apresentaram baixa solubilidade em água e pouca permeabilidade passiva através de membrana lipídica artificial, o que sugere que estes compostos não são efetivos quando ingeridos via oral. O derivado ácido 3-(4-nitrobenzil-oximino)-di-hidrobetulínico (**XXIII**) foi testado

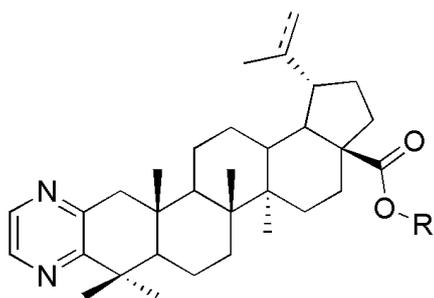
*in vivo* em modelo de câncer de cólon (PTC, células primárias de adenocarcinoma de cólon) em camundongo. Na dose de 10 mg/kg i.v., após 27 dias de tratamento, o tamanho do tumor regrediu 81% com o oximino, enquanto que com AB a inibição foi de cerca de 52%, além de que efeitos colaterais comumente relatados para o uso de antineoplásicos como perda de peso e mortalidade não foram observados.



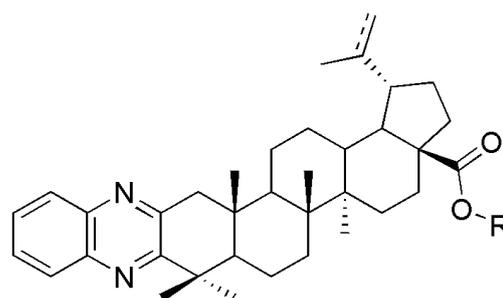
	R1	R2
<b>XVII</b>	=NOCH <sub>3</sub>	COOH
<b>XVIII</b>	=NOCH <sub>3</sub>	=NOCH <sub>3</sub>
<b>II</b>	=O	COOH
<b>XX</b>	NH <sub>2</sub>	COOH
<b>XXI</b>	=NOH	COOH
<b>XXII</b>	-OCOPh	CH <sub>3</sub>



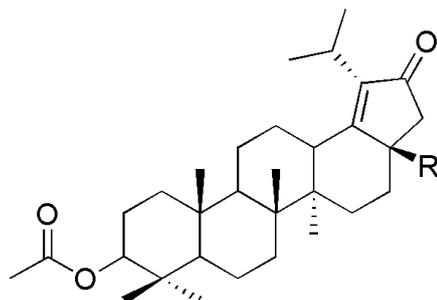
Urban e colaboradores (2007) sintetizaram uma série de derivados pirazínicos (**XXIV**) e benzopirazínicos (**XXV**). Derivados contendo um grupo pirazina condensado com o anel A foram considerados os mais ativos, com valores de IC<sub>50</sub> a partir de 8 µmol/L. Os derivados benzopirazínicos foram ativos somente em elevadas concentrações. Os grupos pirazina e benzopirazina quando condensados com o anel E foram responsáveis por tornar as moléculas inativas. Por outro lado, Sarek e colaboradores (2003) modificaram o anel E do AB com diferentes funções oxigenadas, nomeando tais estruturas de betulininas, e constataram que a citotoxicidade destas moléculas foi devido a presença de um grupo cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada (**XXVI**) ou  $\beta$ -dicarbonil (**XXVII**).



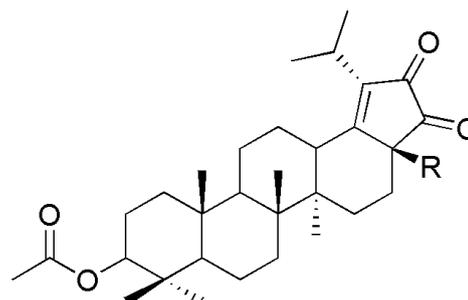
XXIV



XXV

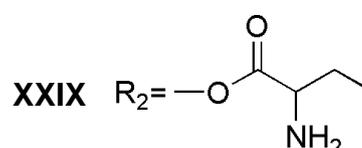
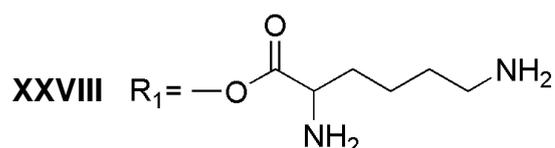
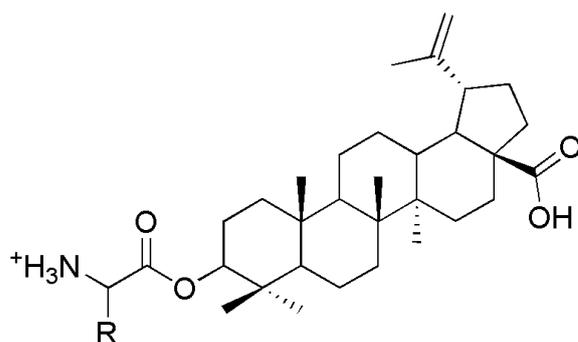


XXVI



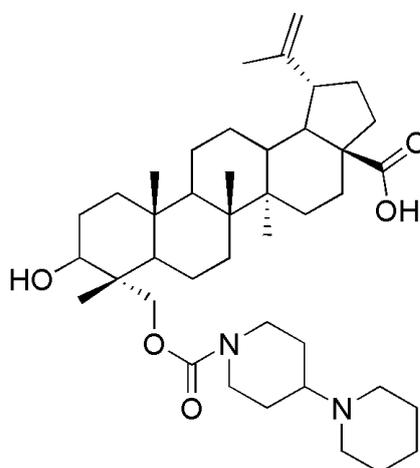
XXVII

Drag-Zalesinska e colaboradores (2009) verificaram que derivados do AB condensados a ésteres de aminoácidos, além de ter maior solubilidade em água, têm o mecanismo de ação contra carcinomas gástrico (EPG85-257P) e pancreático (EPP85-181P) mais rápido que o da molécula original. Os ésteres de lisina (**XXVIII**) e do ácido L- $\alpha$ -aminobutanoico (**XXIX**) foram os mais ativos contra câncer pancreático ( $IC_{50}$ = 14 e 26  $\mu$ mol/L, respectivamente) e gástrico ( $IC_{50}$ = 9,7 e 33  $\mu$ mol/L, respectivamente), induzindo as células à apoptose, enquanto moléculas com grupos volumosos e cadeias laterais hidrofóbicas foram praticamente inativos. Os resultados mostraram que os compostos mais ativos foram os mais solúveis em água. Segundo os autores, a cadeia lateral básica da lisina facilitaria a penetração na membrana plasmática.



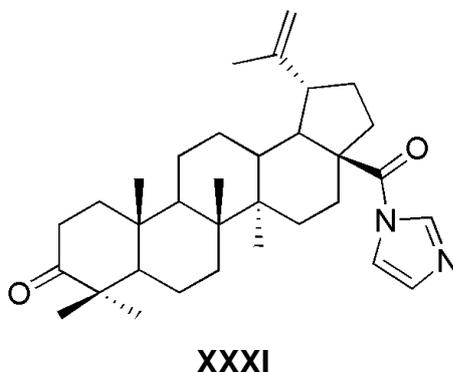
Bi e colaboradores (2007) sintetizaram derivados do ácido 23-hidroxibetulínico modificados na posição C17 com alcoóis primários de cadeia longa e cadeias hidrocarbônicas insaturadas, todos eles mais ativos que o precursor contra câncer de pulmão humano (A549), melanoma murino (B16), cerebroma humano (SF-763), hepatoma humano (BEL-7402) e neuroglioma murino (C6).

Lan e colaboradores (2011b) também sintetizaram derivados do ácido 23-hidroxibetulínico e observaram que todos foram capazes de inibir a proliferação de células de hepatoma humano (HepG2), carcinoma cervical (HeLa), câncer de mama (MCF-7), melanoma murino (B16) e melanoma humano (A375) em algum grau, alguns com valores de  $IC_{50}$  menores que  $10 \mu\text{mol/L}$ . Os derivados 3,23-O-diacetil foram mais ativos que os correspondentes 3,23-di-hidroxi, indicando que os grupos acetil nas posições C3 e C23 influenciaram no potencial antiproliferativo. Um grupo doador de elétrons e substituintes hidrofílicos como grupos contendo um átomo de N em posição terminal da cadeia lateral em C17 beneficiaram a potência. Derivados ésteres no C17 provaram ser tão potentes quanto amidas na mesma posição. Derivados ésteres metílicos de dipeptídeos exibiram melhor perfil citotóxico quando comparado aos dipeptídeos precursores, o que sugere que o grupo carboxílico terminal em C17 não é essencial para a atividade, mas é um grupo favorável para se obter derivados mais potentes. A adição de um grupo 1',4'-dipiperidina-1'-carbonil na posição C23 (**XXX**) gerou um derivado potente, sugerindo que grupos volumosos e hidrofílicos nesta posição favorecem a atividade antiproliferativa. A introdução de hidroxila em C30 produziu derivados levemente menos potentes, o que mostra que grupos hidrofílicos nesta posição não são favoráveis. Da mesma forma, o C19 não é uma posição favorável à modificações.

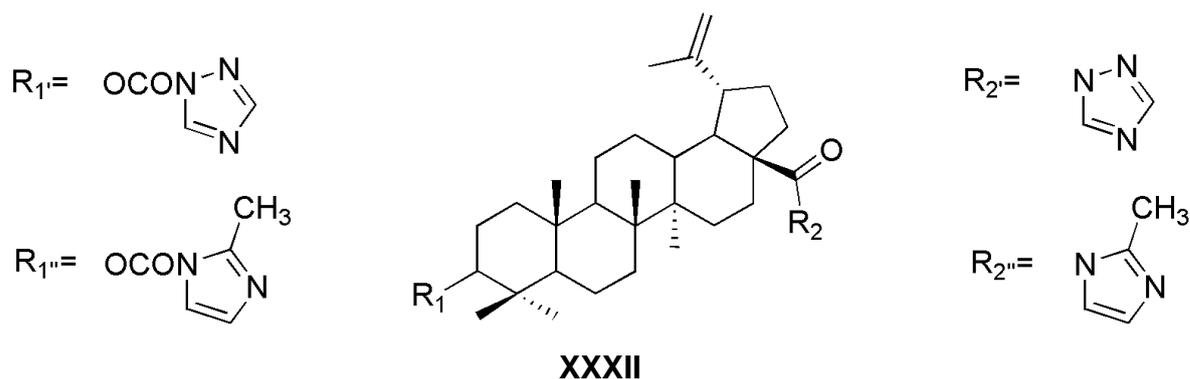


**XXX**

Derivados imidazólicos (C28) do ácido betulônico (**XXXI**) foram os compostos mais ativos ( $IC_{50} < 2 \mu\text{mol/L}$ ) no estudo de Santos e colaboradores (2009), mostrando que a oxidação da hidroxila para cetona no C3 influenciou o potencial citotóxico de AB. A introdução de um carbamato no C3, por sua vez, reduziu drasticamente a atividade, provavelmente devido a um fator limitante quanto ao tamanho do grupo substituinte nesta posição. Modificações nos derivados imidazólicos nas posições C20, como aldeído, e C30, como metoxila, resultaram em perda da atividade, indicando que tais posições são sensíveis ao tamanho e a densidade eletrônica dos substituintes, não sendo sítios favoráveis à modificação estrutural.



Triterpenos do tipo lupano contendo um grupo *N*-acil-heterocíclico em C3 e/ou C28 são considerados citotóxicos contra células tumorais humanas, inclusive mais ativos que derivados carbamatos. Os grupos 2'-metilimidazolil e triazolil (**XXXII**) exerceram um impacto positivo na atividade anticâncer de tais triterpenos, conforme verificado por Santos e colaboradores (2010). Esses autores ainda observaram que acil ésteres dos derivados imidazólicos e triazólicos não foram significativamente ativos ( $IC_{50} > 30 \mu\text{mol/L}$ ), assim como carbamatos (C3) em derivados C28 substituídos, indicando uma limitação de tamanho na posição C3. Por outro lado, um grupo carbonila em C3 foi capaz de elevar o perfil citotóxico dos derivados ( $IC_{50} < 6 \mu\text{mol/L}$ ), demonstrando que, além do tamanho, a densidade eletrônica dos grupos substituintes na posição C3 influenciou o efeito citotóxico. Grupos imidazólico ou éster metílico em C28 reduziram drasticamente a atividade antiproliferativa quando comparados a moléculas contendo grupo ácido carboxílico livre, demonstrando a importância da capacidade da molécula em fazer ligações de hidrogênio e ainda da acidez inerente à molécula.



Jeong e colaboradores (1999) constataram que a conjugação de aminoácidos com o C28 forneceu derivados marcadamente mais citotóxicos e hidrossolúveis. Os derivados contendo resíduos de aminoácidos com o grupo carboxílico terminal livre melhoraram o perfil citotóxico, como por exemplo os ácidos livres de alanina e glicina, este último o mais solúvel em água; mais uma evidência de que um grupo ácido carboxílico livre é considerado crucial para a atividade (LIU *et al.*, 2004).

#### 1.3.2.1.1. Mecanismos de ação antitumoral

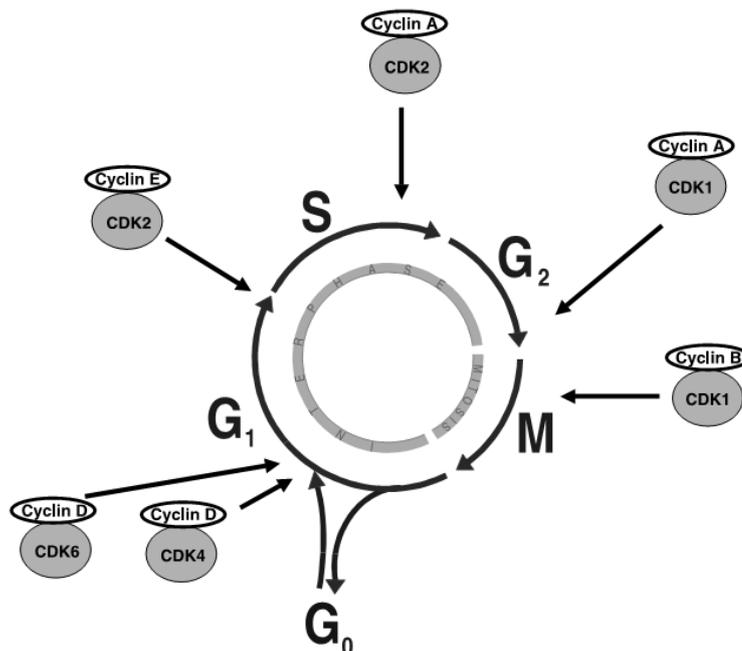
O mecanismo de ação antitumoral descrito para os triterpenos, de um modo geral, parece ser bastante amplo, tendo em vista que já foram descritas interferências no ciclo celular de células cancerígenas, indução de apoptose dependente de caspases e também autofagia.

##### 1.3.2.1.1.1. Ciclo celular e apoptose

O ciclo celular é um processo complexo, envolvido no crescimento e proliferação das células, desenvolvimento do organismo, regulação de reparo ao DNA danificado, hiperplasia de tecidos em decorrência a injúrias, e doenças como o câncer. O ciclo celular envolve inúmeras proteínas regulatórias que direcionam as células através de uma sequência específica de eventos culminando com a mitose e a produção de duas células filhas. As fases G1 e G2 do ciclo representam o intervalo entre as duas fases principais, a síntese de DNA (S) e a mitose (M). Na fase G1, a célula prepara-se para a síntese de DNA, enquanto que na fase S a célula sintetiza o DNA, e por isso tem conteúdo de DNA aneuploidico entre  $2n$  e  $4n$ . A fase G2 é o segundo intervalo, no qual a célula prepara-se para a mitose (SCHAFER, 1998). A fase G0 representa o estágio em que as células retiram-se reversivelmente do ciclo de divisão celular em resposta à elevada densidade celular ou privação de

mitógenos, ou ainda irreversivelmente em estados de diferenciação terminal ou senescência (WILLIAMS; STOEBER, 2012).

O ciclo celular é regulado por complexos contendo CDKs (proteínas quinases dependentes de ciclinas) e ciclinas, os quais são ativados em pontos específicos do ciclo, a saber G<sub>1</sub> (CDK4, CDK6 e CDK2), S (CDK2), G<sub>2</sub>/M (CDK1) (Fig. 2). A regulação do ciclo celular é majoritariamente determinada por estados de fosforilação, e a inativação das CDKs previne a mitose. As ciclinas direcionam as CDKs para o núcleo; elas contêm sinalizadores de localização nuclear que estão ausentes naquelas proteínas. As ciclinas são expressadas apenas durante o ciclo celular e por causa desta expressão cíclica, CDKs podem ser ativadas somente em posições específicas do ciclo. Desta forma, a célula entra e sai das fases do ciclo celular em associação com a síntese e degradação de ciclinas específicas. Antes de uma célula poder entrar na próxima fase do ciclo celular, a ciclina da fase anterior é degradada e a ciclina da próxima fase é sintetizada. Complexos CDK-ciclina D são essenciais para a entrada na fase G<sub>1</sub> e a ciclina D é sintetizada enquanto o estímulo do fator de crescimento persiste. Outra ciclina importante em G<sub>1</sub> é a ciclina E, a qual associa-se com CDK2 para regular a progressão de G<sub>1</sub> para S. No final de G<sub>2</sub> e começo de M, complexos de ciclina A com CDK1 promovem a entrada na mitose. A mitose é adicionalmente regulada por ciclina B em complexo com CDK1 (SCHAFER, 1998; VERMEULEN; BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).



**Figura 2.** As fases do ciclo celular. A posição da atividade regulatória dos complexos proteína quinase CDK/ciclina é mostrada. Fonte: VERMEULEN, BOCKSTAELE & BERNEMAN (2003).

O bloqueio do ciclo celular, também referido como um atraso, é produzido por uma variedade de fatores que podem ser intrínsecos ou extrínsecos, e podem afetar vários *checkpoints* (ou pontos de restrição) diferentes. Um exemplo de fator intrínseco é o tamanho da célula, importante para a maturação celular e progressão no ciclo celular. Um fator extrínseco pode ser exemplificado pela nutrição celular, já que células em cultura tornam-se quiescentes em condições de carência nutricional, saindo do ciclo celular e entrando em G0. Agentes que danificam o DNA ativam *checkpoints* que produzem bloqueio nos estágios G1 e G2 do ciclo celular. Células podem também parar em S, as quais chegam a prolongar a fase S com síntese vagarosa de DNA. O bloqueio em G1 permite reparar o DNA antes da replicação, enquanto que o bloqueio em G2 permite repará-lo antes da separação cromossômica na mitose. O bloqueio em G1 é dependente de p53, uma proteína que tem múltiplas funções relacionadas ao bloqueio dessa fase do ciclo celular. p53 reconhece e liga-se a vários tipos de DNA danificado. Uma vez causado dano ao DNA, p53 estimula a transcrição de diferentes genes, entre eles p21, que por sua vez inibe CDK G1, bloqueando a célula na fase G1, prevenindo a replicação do DNA danificado. Um estímulo de apoptose dependente de p53 é liberado em casos de danos gravíssimos ao DNA. A proteína pRb também tem papel importante no ciclo celular, atuando como supressor de tumor nos pontos de restrição, inativando o ciclo enquanto encontra-se no estado fosforilado (SCHAFER, 1998).

O gene supressor de tumor p53 é considerado como o “guardião do genoma”, devido ao seu papel essencial no controle de danos ao DNA, regulação do ciclo celular e papel regulatório na apoptose. O gene p53 tipo selvagem é essencial para o crescimento celular e a perda da função desse gene pode estar envolvida nos estágios iniciais de formação de tumores por meio da sobrevivência de células com mutações genéticas. Assim que p53 detecta dano ao DNA, subsequentemente o ciclo celular é bloqueado em G1, permitindo o reparo do dano. Caso a injúria não possa ser reparada, o sinal para apoptose é disparado (BOLD; TERMUHLEN; McCONKEY, 1997). No caso de dano severo ao DNA, p53 induz morte celular pela ativação de genes (ex. Bax, Fas e genes envolvidos na via do estresse oxidativo) que estão envolvidos na sinalização apoptótica. Diferentes proteínas quinases reconhecem o dano ao DNA. Estas quinases fosforilam p53 em resposta ao DNA danificado, resultando em bloqueio do ciclo celular pela p21, pelo menos no *checkpoint* G1/S (VERMEULEN; BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

De acordo com Liu, Ho & Che (2005), muitos agentes antitumorais induzem apoptose precedida pelo bloqueio do ciclo celular, como halicondrina B e perorusídio, enquanto outros, como a rotenona ou estaurosporina A, induzem apoptose sem qualquer alteração no ciclo celular. A indução de morte celular programada sem acúmulo em outras fases do ciclo celular de células tumorais tratadas com triterpenos já foi descrita na literatura, como nos casos do próprio AB (100 µg/mL; 24 h) sobre células eritroleucêmicas K562 (FERNANDES *et al.*, 2003), ácidos 3-oxo-23-hidroxibetulínico e 23-hidroxibetulínico (12,5 µg/mL; 48 h) sobre células de melanoma murino B16 (LIU *et al.*, 2004), ácido ganodérico X (40 µmol/L; 12 h) sobre células de hepatoma humano HuH-7 (LI *et al.*, 2005), metilanteinato, ácidos zhankuico A e C (50 µmol/L; 48 h) sobre células de câncer de cólon HT-29 (YEH *et al.*, 2009), geotidina A (5 µg/mL; 28 h) sobre células leucêmicas promielocíticas humanas HL60 (LIU; HO; CHE, 2005), e 2-amino-3-hidroxi-2-(hidroximetil)-propil betulonato (KOMMERA *et al.*, 2010c). Sarek e colaboradores (2003) observaram que após apenas 3 h de tratamento de células CEM com ácido 3β,28-diacetoxi-18-oxo-19,20,21,29,30-pentanorlupan-22-oico (10 µmol/L), as primeiras células apoptóticas surgiram, sem nenhuma alteração em outras fases do ciclo celular.

De um modo geral, a interferência dos triterpenos sobre o ciclo celular de células tumorais parece ser bastante diversificada, sendo relatados frequentemente bloqueios nas fases G1, direcionando em seguida tais células para o processo apoptótico, ou G2/M, menos comum. De acordo com Zhang e colaboradores (2012), células bloqueadas na fase G1 são impedidas de seguir o seu progresso através do *checkpoint* ou de reentrar na fase G1 de um segundo ciclo celular e, desta forma, são direcionadas à apoptose. Foi observado que mais de 50% das células HL60 tratadas com geotidina B (5 µg/mL) após 24 h estavam bloqueadas em G1 (LIU; HO; CHE, 2005). Em células HeLa tratadas com ácido 3β-hidroxi-12-oleanen-27-oico (15 µg/mL; 24 h) foi notado um acúmulo de células na fase G1 e uma queda em S e G2/M, em uma maneira dose-dependente. Após o tratamento por 24 h, um pico subdiploide de DNA característico de apoptose foi observado (SUN; ZHENG; TU, 2006). Células SK-OV-3 tratadas com ácido pomólico (50 µmol/L) apresentaram bloqueio na fase G1 e aumento do pico SubG1 após 12 h de tratamento, de maneira dependente do tempo e da concentração (YOO *et al.*, 2013). Células Lu99 tratadas por 72 h com 2 µmol/L de lup-28-al-20(29)-en-3-ona também acumularam-se na fase

G1 do ciclo celular (HATA *et al.*, 2003). Células B16 tratadas com 10  $\mu\text{mol/L}$  de AU acumularam-se em G1 (60% após 16 h) (ES-SAADY *et al.*, 1996).

Uma fração etanólica rica em triterpenos obtida do cogumelo *Ganoderma lucidum* aumentou a população de células HuH-7 na fase G2/M, cerca de quatro vezes mais que o controle. O bloqueio de células na fase G2/M pode ser devido a deficiência de fatores promotores na fase M. Para isto foi analisado o nível de ciclinas e foi observado uma queda gradual nos níveis de ciclina B e nenhuma alteração na ciclina A. A deficiência de ciclina B poderia explicar o bloqueio em G2/M, que resultaria num atraso da divisão celular. A atividade deste extrato é semelhante ao taxol, o qual ativa a via de sinalização MAP quinase e também provoca bloqueio G2/M em vários tipos de células tumorais (LIN *et al.*, 2003).

#### **1.3.2.1.1.2. Apoptose dependente de caspases**

Apoptose e necrose são dois tipos diferentes de morte celular, caracterizados por alterações morfológicas e bioquímicas específicas nas células. Necrose é um processo incontrolado e passivo que geralmente afeta grandes áreas de células, caracterizada por inchaço celular, formação de vacúolos citoplasmáticos, disfunção de organelas e ruptura (lise) da membrana plasmática, que resultam num processo inflamatório. A perda da integridade da membrana celular resulta em liberação do conteúdo citoplasmático e nuclear no tecido adjacente, enviando sinais quimiotáticos com eventual recrutamento de células inflamatórias. A apoptose, por sua vez, é um processo controlado e dependente de energia, que pode afetar células individuais ou grupos celulares. Além do mais, a apoptose envolve a ativação de um grupo de cisteína proteases chamadas caspases, as quais desencadeiam uma cascata complexa de eventos que conectam o estímulo inicial com a morte da célula. Suas principais características são encolhimento celular, perda da adesão intercelular, formação de *blebbings* (ondulações) na membrana e corpos apoptóticos, e fragmentação do DNA. Ao contrário da necrose, a membrana celular permanece intacta e dessa forma não ocorre um processo inflamatório (ELMORE, 2007).

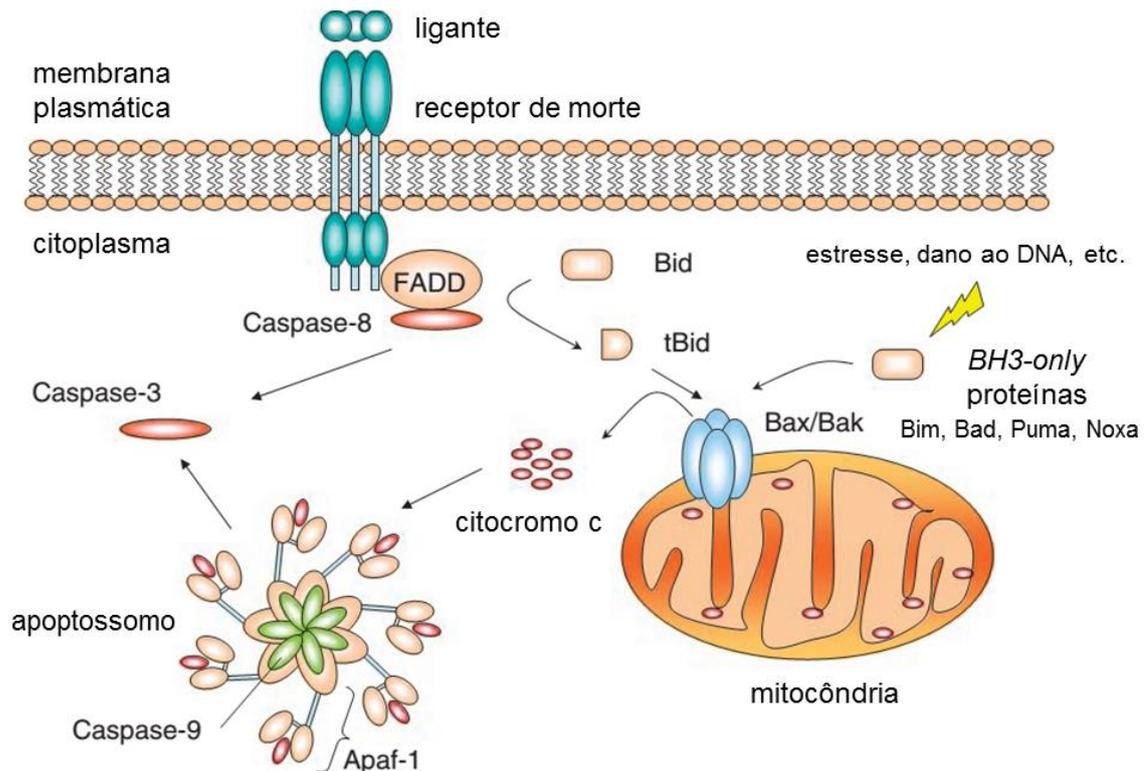
De acordo com suas funções majoritárias, as caspases são agrupadas em duas subfamílias, pró-apoptóticas e pró-inflamatórias. Caspases pró-apoptóticas (2,3,6,7,8,9,10) estão envolvidas na tradução do sinal de morte celular, enquanto caspases pró-inflamatórias (1,4,5,11,12) regulam a maturação de citocinas durante o processo inflamatório. Uma classificação alternativa divide as caspases de acordo

com o comprimento dos seus pró-domínios, que também correspondem a sua posição na cascata sinalizadora da apoptose. Desta forma, dividem-se em iniciadoras (1,2,4,5,8,9,10,11,12) e efetoras (3,6,7). Caspases iniciadoras possuem pró-domínio longo, necessário para a interação proteína-proteína com moléculas adaptadoras, enquanto caspases executoras possuem pró-domínio curto e clivam substratos celulares e são ativadas pelas caspases iniciadoras (LI; YUAN, 2008).

A apoptose é subclassificada em dois tipos de vias de morte celular, as vias intrínseca e extrínseca (Fig. 3). Pela via intrínseca, sinais de estresse intracelular, tais como retirada de fatores de crescimento, dano ao DNA, estresse oxidativo ou ativação de oncogenes, alteram a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria devido a abertura de poros de transição de permeabilidade mitocondrial (MPT). Consequentemente, há a perda do potencial de membrana mitocondrial, promovendo a liberação de citocromo c e outras proteínas pró-apoptóticas (Smac/DIABLO, AIF) do espaço intermitocondrial que irão propagar o sinal apoptótico e o bloqueio da função bioenergética da organela. A liberação de citocromo c é regulada pela família de proteínas Bcl-2, que inclui proteínas pró- (Bax, Bak, Bad, Bid) e anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1). Dentre elas, Bax e Bak são essenciais, pois formam poros na membrana mitocondrial, facilitando a permeabilização. Proteínas BH3-*only* membros da família pró-apoptótica Bcl-2 (Bid, Bim, Bad, Noxa, Puma) ativam Bax e/ou Bak. A consequente liberação de citocromo c leva a formação de um apoptossomo, o qual contém citocromo c, Apaf-1 e pró-caspase iniciadora 9. A forma ativa da caspase 9 cliva e ativa as caspases executoras 3 e 7, desencadeando o processo de fragmentação do DNA. Smac/DIABLO liga-se as IAPs (proteínas inibidoras de apoptose), desativando-as, impedindo que o processo apoptótico seja interrompido pela inativação das caspases (KIECHLE; ZHANG, 2002; BRUIN; MEDEMA, 2008; FRANCO *et al.*, 2009; INDRAN *et al.*, 2011).

Já pela via extrínseca, ligantes extracelulares (Fas, TNF $\alpha$ , TRAIL) ligam-se aos seus respectivos receptores de morte localizados na membrana plasmática. Os domínios de morte intracelulares destes receptores recrutam proteínas adaptadoras (ex. FADD, TRADD, FLIP) e pró-caspase 8 iniciadora (em alguns casos pró-caspase 10), sendo que juntos compreendem o complexo sinalizador de indução de morte (DISC). Caspase 8 e 10 são ativadas no complexo DISC; a ativação é controlada por c-FLIP, um inibidor de caspase. Uma vez que a caspase 8 é ativada, ela propaga a

apoptose diretamente por clivagem e ativação de caspases executoras, entre elas a caspase 3 (KIECHLE; ZHANG, 2002; BRUIN; MEDEMA, 2008; FRANCO *et al.*, 2009; INDRAN *et al.*, 2011). Adicionalmente, a caspase 8 pode desencadear a ativação da caspase 9 por meio da clivagem de Bid em tBid, o qual segue até a mitocôndria, induzindo a liberação de citocromo c e a formação do apoptossomo (NAGATA, 2000).



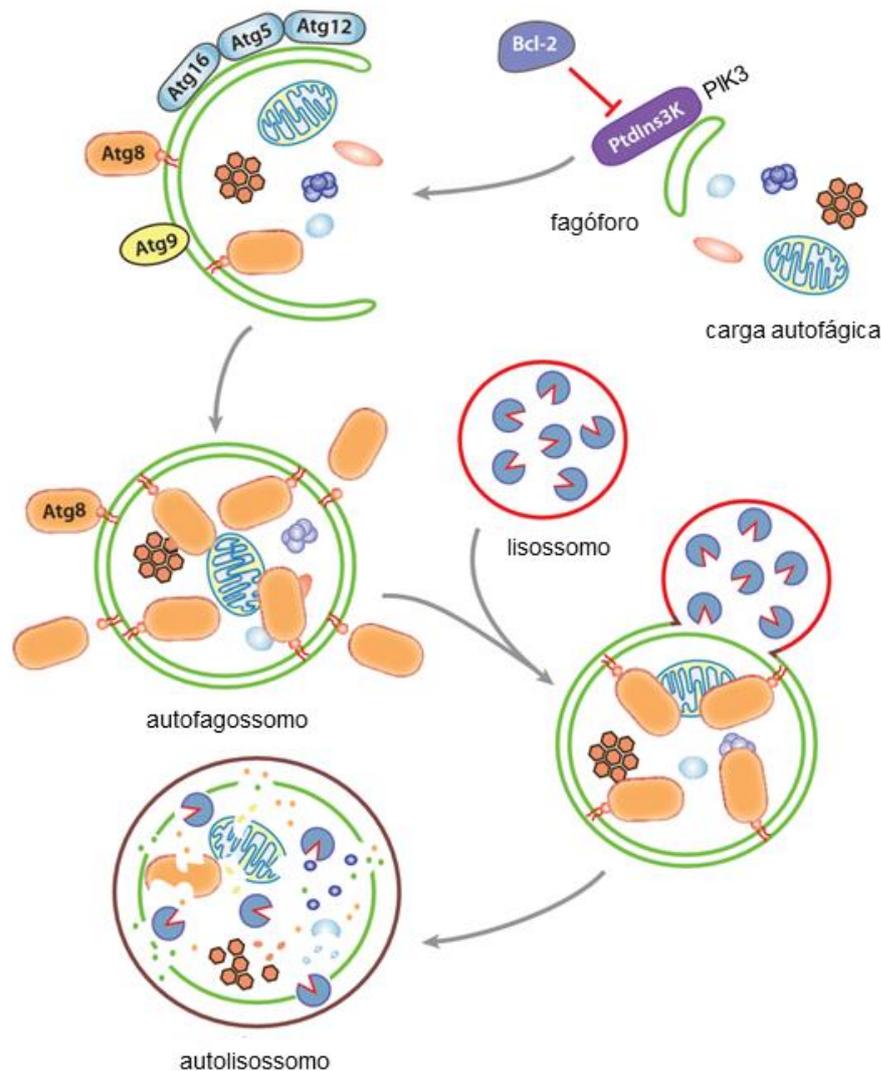
**Figura 3.** Regulação da apoptose pelas vias extrínseca e intrínseca. A sinalização apoptótica pelo receptor de morte (via extrínseca) pode envolver a ativação direta da caspase 3 mediada pela caspase 8 ou por uma etapa de amplificação mitocondrial dependente de clivagem do Bid. Na via intrínseca, diversos estímulos ativam proteínas BH3-only, as quais recrutam os oligômeros Bax/Bak e alteram a permeabilidade da membrana mitocondrial externa. Citocromo c é liberado no citoplasma e incita a formação do apoptossomo. A caspase 9 ativa propaga então uma cascata de eventos proteolíticos envolvidos na apoptose. Adaptado de Li & Yuan (2008).

As caspases executoras ativas são as responsáveis pelos eventos que culminam com a morte celular. A caspase 3 media a externalização da fosfatidilserina presente apenas na face interna da membrana plasmática para a face externa, e desta forma as células apoptóticas são marcadas para a fagocitose. A perda da distribuição assimétrica da fosfatidilserina é causada pela atividade deficiente da enzima aminofosfolípido translocase, a qual é regulada pela caspase 3 (MANDAL *et al.*, 2002).

O término do processo de morte celular ocorre quando as caspases executoras ativam a maquinaria de degradação do DNA. A caspase 3 ativa, além de outras caspases executoras, participa deste processo. No citoplasma, a enzima DNase ativada por caspase (CAD) é sintetizada nos ribossomos e o seu inibidor (ICAD-L) liga-se a sua cadeia recém-formada a fim de auxiliar no dobramento da proteína. Após a síntese de CAD, ICAD permanece complexada à enzima na forma de um complexo CAD/ICAD, o que a mantém inativada. A caspase 3 cliva ICAD para liberar a forma ativa da enzima e desta forma CAD transloca-se para o núcleo da célula e realiza a fragmentação do DNA cromossômico em segmentos de 50-200 kb na fase inicial da apoptose; posteriormente o DNA é clivado em unidades nucleossomais (NAGATA, 2000; NAGATA *et al.*, 2003). Adicionalmente, as caspases executoras clivam duas enzimas envolvidas no processo de reparo do DNA, a poli-(ADP-ribose) polimerase (PARP) e a proteína quinase dependente de DNA, inativando-as. Desta forma, ocorre a fragmentação irrestrita da cromatina (KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

#### **1.3.2.1.1.3. Autofagia**

Durante o processo de autofagia (Fig. 4), proteínas e organelas são degradadas por proteases lisossomais. A autofagia fornece uma fonte alternativa de macromoléculas como aminoácidos e ácidos graxos para a síntese de novas proteínas ou fonte energética suplementar, servindo como mecanismo de adaptação sob condições de estresse com o intuito de aumentar a sobrevivência. Entretanto a autofagia pode resultar em morte celular, principalmente quando organelas ou proteínas defeituosas são detectadas pela célula, ou ainda se o DNA estiver danificado em células anormais. O termo autofagia não pode ser confundido com “morte celular com autofagia”, já que é um processo acompanhado de intensa vacuolização autofágica do citoplasma sem haver condensação da cromatina. Além do mais, células autofágicas podem sobreviver após a retirada do estímulo (KROEMER *et al.*, 2009).



**Figura 4.** Modelo esquemático do processo autofágico. O complexo fosfatidilinositol-3-quinase classe III (PtdIns3K ou PIK3) media a nucleação da membrana do fagóforo, envolvendo proteínas citosólicas, agregados protéicos e organelas (por ex. mitocôndria). Bcl-2 bloqueia essa etapa ligando-se à Beclin 1 (componente do complexo PIK3), tornando-a inibida. Conjugados de Atg12-Atg5-Atg16 e Atg8-fosfatidiletanolamina (LC3-II em células de mamíferos) são recrutados para o fagóforo, junto com a proteína transmembrana Atg9, facilitando a etapa de expansão do fagóforo. Após a formação da vesícula, a maioria das proteínas Atg dissocia-se do autofagossomo, permitindo a fusão autofagossomo-lisossomo e a degradação da carga autofágica por proteases lisossomais. Adaptado de He & Klionsky (2009).

Resumidamente, as proteínas Atg estão envolvidas na formação dos autofagossomos: Atg12 e Atg8/LC3 são ativadas por Atg7 e conjugam-se com Atg5 e fosfatidiletanolamina, respectivamente. Os dois complexos estão relacionados, uma vez que Atg12-Atg5 é requerido por Atg8/LC3 para atingir a membrana vesicular. Ocorre um alongamento de uma pequena membrana chamada fagóforo, a qual envolve proteínas, lipídios, patógenos ou organelas de interesse (carga autofágica). A fusão do autofagossomo com o lisossomo é modulada pelo pH interno

dessas organelas, controlado por bombas de próton e uma pletera de enzimas hidrolíticas. A acidificação dos compartimentos das organelas promove a fusão, enquanto o aumento do pH inibe o processo. Por fim, a degradação do conteúdo citoplasmático é realizada por hidrolases lisossomais. A proteína quinase mTOR regula todas as outras proteínas relacionadas à autofagia. mTOR tem papel fundamental no início do processo autofágico, uma vez que a inibição de mTOR aumenta a autofagia, enquanto ativação de mTOR suprime o processo. Outra proteína importante no início da formação do autofagossomo é a fosfatidilinositol-3-quinase classe III (PIK3), a qual depende da complexação com as proteínas Atg6/Beclin1 (BRUIN; MEDEMA, 2008; RODRIGUEZ-ROCHA *et al.*, 2011; GIULIANI; DASS, 2013).

Triterpenos pentacíclicos já foram descritos como sendo capazes de induzir autofagia em células tumorais, como por exemplo 3 $\beta$ -O-succinil-lupeol em células de câncer de pulmão A549 (HAO *et al.*, 2011). Já o AU induziu autofagia apenas na fase inicial do processo de morte celular de câncer de próstata humano (PC3). Quando um inibidor de autofagia (3-MA) foi adicionado às células contendo AU, os níveis da proteína LC3 diminuíram, assim como a viabilidade celular, evidenciada por um aumento do pico SubG1 no ciclo celular. Esses resultados indicaram que a autofagia provavelmente é um mecanismo de proteção e/ou resistência para as células cancerosas escaparem da apoptose. A autofagia ajudaria inicialmente a manter a homeostase celular, eliminando eficientemente organelas danificadas e outras macromoléculas citoplasmáticas, prevenindo as injúrias proccadas pela ação do AU (SHIN; KIM; PARK, 2012). Conforme Giuliani & Dass (2013), a autofagia pode contribuir para a proliferação, sobrevivência e resistência a quimioterápicos das células cancerosas.

### **1.3.2.2. Atividade antimicrobiana**

Mais de 50 mil TP são conhecidos, mas estudos antimicrobianos comparativos que poderiam permitir a compreensão e elucidação de uma possível REA são ainda incomuns (FONTANAY *et al.*, 2008). No caso de AB, normalmente ele é descrito na literatura como uma substância com baixa ou nenhuma atividade antimicrobiana (NICK *et al.*, 1995; BRACA *et al.*, 2000; DJOUKENG *et al.*, 2005; HU *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2011; CESARI *et al.*, 2013).

AB não apresentou atividade antibacteriana significativa contra mais de 20 cepas diferentes (MIC>312,5 µg/mL), inibindo fracamente apenas *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (MIC= 78,1 µg/mL) (KUETE *et al.*, 2007). De acordo com Horiuchi e colaboradores (2007), AB, assim como a betulina, não apresentou qualquer atividade inibitória sobre cepas de *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *Serratia marcescens*, MRSA, *Streptococcus pneumoniae*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (MICs>128 µg/mL). Entretanto, outros TP como os AU e AO mostraram-se ativos contra algumas cepas, com valores de MIC entre 4 e 16 µg/mL. Da mesma forma, Fontanay e colaboradores (2008) também verificaram que AB não apresentou atividade antibacteriana (MIC>256 mg/L) sobre cepas de *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa*, e ainda sobre alguns isolados clínicos resistentes a antibióticos. Em contrapartida, os AU e AO mostraram um espectro antibacteriano bastante similar, sendo ativos somente contra bactérias Gram-positivas.

AB foi considerado inativo (MIC= 1000 µg/mL) quando testado contra os patógenos orais *Streptococcus mutans* e *Porphyromonas gingivalis*, da mesma forma que a betulina. No entanto, o AO, oleanólico aldeído e outros derivados mostraram ser ativos na inibição de ambos os micro-organismos (MIC= 250 a 625 µg/mL), demonstrando que provavelmente as diferenças no anel E, como a presença de duas metilas ao invés do grupo isoprenil, possam influenciar diretamente no potencial antimicrobiano. O sal de sódio do AO foi cerca de 100 vezes mais potente (MIC= 3,9 µg/mL) que o precursor, evidenciando que um efeito surfactante possa estar envolvido na ação antibacteriana (RIVERO-CRUZ *et al.*, 2008).

Nick e colaboradores (1995) avaliaram outros triterpenos oleananos, entre eles os triterpenos naturais ácidos dilênico A (ácido 2 $\alpha$ -hidroxi-3-oxo-olean-12-en-30-oico), B (ácido 2-oxo-3 $\beta$ -hidroxi-olean-12-en-30-oico), C (ácido 1 $\alpha$ -hidroxi-3-oxo-olean-12-en-30-oico), D (ácido 2,3-seco-2-oxo-olean-12-en-3-metil éster-30-oico) e E (ácido 1 $\alpha$ ,3 $\beta$ -di-hidroxi-olean-12-en-30-oico), ácido 3-oxo-olean-12-en-30-oico e ácido 3-oxo-olean-1,12-dien-30-oico contra *E. coli*, *B. subtilis* e *Micrococcus luteus* em ensaio de bioautografia. O único triterpeno inativo foi o ácido dilênico E e a ausência de atividade sugere que não apenas a ligação dupla  $\Delta^{12,13}$  e o grupo carboxílico em C20, mas também uma cetona adicional no anel A, são necessários para a atividade antimicrobiana dos outros derivados oleananos.

Nunez e colaboradores (2005) testaram uma série de triterpenos do tipo lupano, tais como ácido 3-*epi*-betulínico, 11 $\alpha$ -hidroxi-*epi*-betulina, 6 $\beta$ -hidroxibetulina e 28-hidroxiglochidona, contra bactérias Gram-positivas e negativas, e também contra *Candida albicans*. Entre eles, apenas o ácido 6 $\beta$ -hidroxi-3-oxolup-20(29)-en-28-oico mostrou leve atividade antibacteriana contra cepas de *Bacillus subtilis*, *B. cereus* e *B. pumilus* (MIC= 20 a 35  $\mu$ g/mL). Djoukeng e colaboradores (2005) testaram dez diferentes triterpenos naturais contra *E. coli*, *B. subtilis* e *Shigella sonnei*, e verificaram que os ácidos arjunólico e asiático, ambos contendo uma hidroxila em C23, apresentaram os melhores resultados de inibição pelo teste de bioautografia. A hidroxilação do C6 daquelas substâncias - ácidos terminólico e 6-hidroxi-asiático, respectivamente - reduziu levemente a atividade antimicrobiana. Os demais triterpenos - ácidos 2-hidroxioleanólico e 2-hidroxiursólico, ésteres 28- $\beta$ -glicopiranosil dos ácidos arjunólico e asiático - foram inativos contra aquelas cepas.

Kazakova e colaboradores (2010) avaliaram a atividade antimicrobiana de amidas *N*-metilpiperazinil de alguns ácidos triterpênicos (ácidos platânico, morônico, AG, AO e AU). Ácido betulônico e betulina exibiram ação bactericida contra *S. aureus* na concentração de 90 mg/mL, enquanto (4-metilpiperazin-1-il)-amida do ácido betulônico inibiu o crescimento da cepa a 100 mg/mL. Os demais derivados apresentaram baixa ou nenhuma atividade antimicrobiana.

Tanachatchairatana e colaboradores (2008) investigaram se a introdução do grupo cinamoil e seus análogos no C3 influenciaria a atividade antimicrobiana de TP. AB exibiu baixa atividade (MIC= 50  $\mu$ g/mL) contra *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra, da mesma forma que o observado por Gu e colaboradores (2004), onde AB apresentou MIC= 62,1  $\mu$ g/mL e a betulina MIC= 30  $\mu$ g/mL. A substituição do C3 com cinamoil, *p*-metoxicinamoil, *p*-clorocinamoil, éster ferrulato e seu acetato, e éster cafeato e seu acetato foram considerados muito pouco ativos ou inativos (MIC>200  $\mu$ g/mL). Por outro lado, os radicais *p*-cumaroil e seu acetato apresentaram uma atividade satisfatória (MIC= 6,25 e 12,5  $\mu$ g/mL, respectivamente) contra o agente causador da tuberculose.

AB mostrou ser um potente candidato antifúngico, uma vez que foi capaz de inibir moderadamente o crescimento dos fungos *Sporothrix schenckii*, *Microsporium canis*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *C. guilliermondi* e *C. spicata*, com valores de MIC entre 12 e 47  $\mu$ g/mL, a semelhança

do AU e seu derivado ácido 2 $\alpha$ -hidroxiursólico (SHAI *et al.*, 2008). AB também foi capaz de inibir o crescimento do fungo *Alternaria alternata* (IC<sub>50</sub>= 2,3  $\mu$ g/mL), enquanto foi considerado inativo contra *Fusarium fusiformes* (CHAUDHURI *et al.*, 2004). AB foi ainda ativo contra fungos dermatófitos como *Trichophyton mentagrophytes* (MIC= 12,5  $\mu$ g/ml), *T. soudanense* (MIC= 25  $\mu$ g/ml), *T. ajelloi* (MIC= 4  $\mu$ g/mL) e *T. rubrum* (MIC= 64  $\mu$ g/mL) em comparação com a griseofulvina (MIC= 4 a 8,5  $\mu$ g/mL). Fungos dermatófitos infectam tecidos queratinizados do corpo, produzindo dermatofitoses, doenças de pele que são muito frequentes em países onde há deficiências nas condições sanitárias (KUIATE *et al.*, 2007; TCHAKAM *et al.*, 2012).

### 1.3.2.3. Atividade antimalárica

Embora os índices de infecção e mortalidade por malária tenham reduzido 25% em todo o mundo na última década, a doença ainda mata 660 mil pessoas a cada ano, principalmente crianças (SLUTSKER; KACHUR, 2013). De acordo com dados epidemiológicos do Ministério da Saúde, no Brasil, entre 2010 e 2011, foram registrados mais de 600 mil casos da doença, sendo que 43% destes foram notificados apenas no estado do Pará. Na ausência de uma vacina funcional e segura contra malária e tendo em vista o surgimento de cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes aos fármacos usados na terapia antimalárica convencional, como a cloroquina, pesquisas vêm sendo realizadas nos últimos anos para a busca e o desenvolvimento de novas substâncias capazes de combater o parasita. Atovaquona, quinina, artemisinina e seus derivados semissintéticos são exemplos de PN com efetivas propriedades antimaláricas, inclusive contra cepas resistentes à cloroquina (BATISTA; SILVA JÚNIOR; OLIVEIRA, 2009).

Há vários trabalhos na literatura descrevendo ensaios de atividade antiplasmódica investigando extratos de plantas ricas em triterpenos, muitas vezes sendo AB o componente responsável pelo efeito. A atividade antimalárica de AB foi investigada pela primeira vez por Bringmann e colaboradores (1997), apresentando uma ação moderada sobre *P. falciparum* (NF 54) com IC<sub>50</sub> de 10,5  $\mu$ g/mL. Desde então, outros estudos vêm relatando o potencial antimalárico desse triterpeno sobre diferentes cepas do mesmo protozoário (DUKER-ESHUN *et al.*, 2004; ATTIOUA; WENIGER; CHABERT, 2007; LENTA *et al.*, 2007; LENTA *et al.*, 2008; DOMÍNGUEZ-CARMONA *et al.*, 2011; ZOFOU *et al.*, 2011). Steele e colaboradores

(1999) demonstraram que AB possui atividade antiplasmódica moderada tanto contra *P. falciparum* resistente (K1) quanto sensível (T9-96) à cloroquina ( $IC_{50}$ = 19,6 e 25,9  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente). A betulina, por sua vez, mostrou ser completamente inativa às mesmas cepas, com  $IC_{50}$  de 500  $\mu\text{g/mL}$ , evidenciando que a modificação da posição C17 altera drasticamente a atividade. Betulinaldeído, com um aldeído em C28, mostrou-se ativo com  $IC_{50}$  de 6,5  $\mu\text{g/mL}$  (SUKSAMRARN *et al.*, 2006).

Em outro estudo, AB, ácido betulônico e ácido acetilbetulínico (ACB) apresentaram atividade antiplasmódica contra *P. falciparum* (W2), com valores de  $IC_{50} < 10 \mu\text{mol/L}$ . Entretanto, quando AB e ACB foram esterificados na posição C28, gerando os seus respectivos ésteres metílicos, a atividade antiplasmódica diminuiu consideravelmente ( $IC_{50} > 45 \mu\text{mol/L}$ ) (SA *et al.*, 2009). Domínguez-Carmona e colaboradores (2010) e Innocente e colaboradores (2012) também verificaram que a acetilação da posição C3 de AB favorece o aumento da atividade antimalárica contra *P. falciparum* sensível à cloroquina (3D7) ( $IC_{50}$ = 4  $\mu\text{mol/L}$ ) e *P. falciparum* (F32) ( $IC_{50}$ = 11,8  $\mu\text{mol/L}$ ). A adição de um radical piperazinil à posição C28 da molécula de ACB forneceu uma substância mais ativa - *N*-{3-[4-(3-aminopropil)piperazinil]propil}-3-*O*-acetil betulinamida - com um  $IC_{50}$  de 220  $\text{nmol/L}$ . A proteção da amina terminal do grupo piperazinil com um radical Boc, no entanto, reduziu a capacidade antiparasitária ( $IC_{50}$ = 5  $\mu\text{mol/L}$ ) (INNOCENTE *et al.*, 2012).

A derivatização de AB com diferentes anidridos forneceu uma série de ésteres no C3, com o intuito de avaliar a influência do comprimento da cadeia lateral e da presença de grupos polares ou lipofílicos sobre a viabilidade dos parasitas. Os radicais contendo quatro carbonos mostraram-se de três a cinco vezes mais ativos ( $IC_{50}$ = 5 a 8  $\mu\text{mol/L}$ ) que o precursor. Foi observado que as cadeias laterais contendo um segundo grupo ácido carboxílico ou algum halogênio como cloro ou flúor não contribuíram para o aumento do potencial antimalárico (SILVA *et al.*, 2013).

Alguns estudos verificaram que a introdução de radicais fenólicos à molécula de AB pode resultar em um aumento da atividade antimalárica. Dois ésteres fenólicos naturais de AB, os ácidos 3 $\beta$ -*O*-*cis*-cumaroil e 3 $\beta$ -*O*-*trans*-cumaroil betulínico, apresentaram atividade moderada sobre *P. falciparum* sensível à cloroquina (D10), com  $IC_{50}$  de 8,3 e 2,2  $\mu\text{mol/L}$ , respectivamente. A adição do grupo cumaroil no C3 aumentou o efeito antiplasmódico, uma vez que a introdução de uma molécula fenólica alterou a estrutura da substância assim como as suas propriedades físico-químicas. A estereoquímica da ligação dupla do grupo cumaroil

não influenciou significativamente a atividade (GRAZIOSE *et al.*, 2012). O ácido 2-*O-E-p*-cumaroil-alfitólico e o ácido alfitólico também são análogos naturais de AB, com modificação na posição C2 do anel A. O primeiro mostrou-se altamente ativo ( $IC_{50}=0,9 \mu\text{g/mL}$ ), enquanto o segundo foi inativo, evidenciando que a presença do grupo cumarato foi crucial para o aumento do potencial antimalárico contra *P. falciparum* K1 multidroga-resistente (SUKSAMRARN *et al.*, 2006). Os ácidos messagênico A e B, análogos naturais de AB modificados em C27 com uma molécula de cumaroil (ésteres 27-*O-p-(Z)* e 27-*O-p-(E)*-cumarato) apresentaram elevada atividade antiplasmódica ( $IC_{50}=1,5$  e  $3,8 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente), apontando para a melhora da atividade na presença de um grupo cumaroil, independentemente da geometria da ligação dupla. Entretanto, a metoxilação do C3 do *p-(E)*-cumarato – o ácido wínchico (ácido 27-*O*-ferruloiloxibetulínico) – resultou em completa perda da atividade (SUKSAMRARN; TANACHATCHAIRATANA; KANOKMEDHAKUL, 2003). O derivado natural 3-cafeato de AB foi ativo contra *P. falciparum* D6 (sensível à cloroquina) e W2 (resistente à cloroquina), com  $IC_{50}$  de 1,40 e  $0,98 \mu\text{mol/L}$ , respectivamente. A acetilação das hidroxilas do grupo cafeato (3-diacetilcafeato de AB) não alterou as propriedades antiplasmódicas da molécula precursora, apresentando inclusive um leve aumento na sua atividade (MA *et al.*, 2008).

AB e análogos da posição C28 (betulina, aldeído, amida, lupeol e éster metílico) foram capazes de alterar a membrana de eritrócitos não infectados com *P. falciparum* em diferentes padrões de um modo dependente da concentração, induzindo a formação de equinócitos e estomatócitos, além da formação de vesículas. Eritrócitos parasitados com *P. falciparum* 3D7 foram incubados com AB e seu respectivo aldeído, e betulina, durante seis dias, quando foi observado que a maioria dos parasitas estava no meio extracelular. Após oito dias não havia mais qualquer parasita viável. Estes resultados confirmaram que AB e derivados são potentes agentes que atuam sobre a membrana plasmática, exercendo ação estomatocitogênica e equinocitogênica. As substâncias equinocitogênicas (AB, amida e betulina) possuem grupos funcionais em C28 capazes de formar ligações de hidrogênio, enquanto as estomatocitogênicas (aldeído, lupeol e éster metílico) não formam ligações de hidrogênio, indicando desta forma a importância das ligações de hidrogênio no mecanismo de incorporação das substâncias pelos eritrócitos infectados (ZIEGLER *et al.*, 2004).

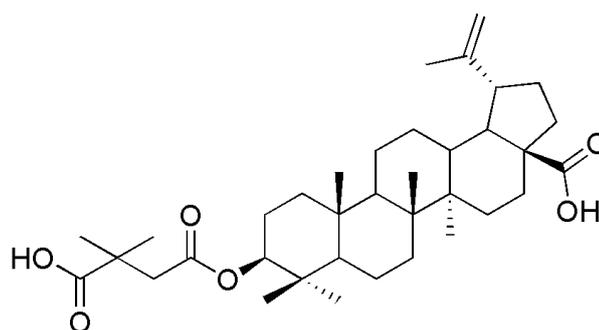
#### 1.3.2.4. Atividade anti-HIV

O esqueleto triterpênico por si só desempenha papel importante na atividade anti-HIV (QIAN *et al.*, 2010). AB e ácido platânico foram os dois primeiros triterpenos com um esqueleto lupano que demonstraram atividade antirretroviral ( $EC_{50}$ = 1,4 e 6,5  $\mu\text{mol/L}$ , respectivamente). Ácido di-hidrobetulínico também é um inibidor da replicação do vírus HIV-1, mais potente que aqueles dois primeiros ( $EC_{50}$ = 0,9  $\mu\text{mol/L}$ ). Os resultados evidenciaram que os substituintes no grupo isopropenil em C19 desempenham um papel importante na atividade. A substituição do COOH em C17 por um CH<sub>2</sub>OH (betulina) ou por um éster diminuiu a atividade, indicando que a presença do ácido carboxílico é essencial para o efeito inibitório do vírus da imunodeficiência humana. A esterificação da hidroxila C3 com grupos acetil, benzoil, crotonil, sulfonil e succinil levou a uma queda na atividade, mostrando que a hidroxila livre também é fundamental para manter a atividade anti-HIV (FUJIOKA *et al.*, 1994).

A substituição do C3 é crítica para a atividade anti-HIV-1 (QIAN *et al.*, 2010). Variações estruturais no anel A de derivados amida do AB confirmaram a importância do substituinte 3 $\beta$ -OH, uma vez que a substituição dessa posição por 3 $\alpha$ -OH reduziu em 10 vezes a atividade contra células MT-4 infectadas por HIV-1. Um derivado cetona em C3 apresentou atividade intermediária, enquanto os análogos 3-desoxi, 3 $\beta$ -metoxi e 3 $\beta$ -amino não tiveram atividade alguma, o que demonstrou a importância da formação de ligações de hidrogênio que ocorrem preferencialmente na posição 3 $\beta$ . A inatividade do grupo metoxi pôde ser explicada pelo impedimento estérico devido à presença das metilas na posição C4 combinada com a metila do grupo metoxila. A introdução de uma segunda metila levou à perda total de atividade. Por outro lado, a ausência de hidroxilas no anel A, como o derivado 2,3-desoxi, mostrou resultados com baixa atividade (EVERS *et al.*, 1996).

A adição de um grupo 3',3'-dimetilsuccinil na posição C3 parece ser essencial para a atividade, sendo a modificação com o maior potencial anti-HIV (LAN *et al.*, 2011a), tanto que a troca do grupo dimetil para a posição 4' reduz a atividade (QIAN *et al.*, 2009a). Ácido 3-O-3',3'-dimetilsuccinilbetulínico (bevirinato, **XXXIII**) e ácido di-hidrobetulínico mostraram atividade HIV extremamente potente contra células de linfócitos H9 infectadas ( $EC_{50} < 3,5 \times 10^{-4}$   $\mu\text{mol/L}$ ). Já os respectivos isômeros 2',2'-dimetilsuccinil desses derivados mostraram efeitos reduzidos, com  $EC_{50}$  de 2,7 e 0,56  $\mu\text{mol/L}$ , respectivamente (KASHIWADA *et al.*, 1996; HASHIMOTO *et al.*, 1997).

O bevirimato é o primeiro composto da classe de antirretrovirais chamados de inibidores da maturação, e está atualmente na Fase IIb de estudos clínicos. A molécula inibe o processamento da proteína *gag* de HIV-1, necessária para a maturação das cápsulas virais. Desta forma, a condensação do capsídeo é prejudicada, gerando partículas não infecciosas. A  $IC_{50}$  para o HIV-1 tipo selvagem é de aproximadamente 5,8 ng/mL (=10 nmol/L) (BROWN; PAUL; KASHUBA, 2009; LEE, 2010).



XXXIII

De um modo geral, 3',3'-dimetilsuccinil e  $-NH-(CH_2)_n-NH-COCH_3$  ou seus análogos em C3 e C28, respectivamente, são essenciais para uma atividade anti-HIV-1 excelente (LAN *et al.*, 2011a). Derivados éster 28-O-benzílico exibiram queda na potência anti-HIV (KASHIWADA *et al.*, 1996; HASHIMOTO *et al.*, 1997). Amida e sua substituição para éster no C28 e a substituição da carbonila por um metileno levou à completa perda da atividade. A importância do grupo doador de hidrogênios -NH é realçada pelo fato de que os correspondentes ésteres são completamente inativos (EVERS *et al.*, 1996). Um segundo grupo amida e grupos polares no final da cadeia em C28 são necessários para o aumento da atividade anti-HIV (QIAN *et al.*, 2009a).

A posição C30 não é favorável para modificações, mas é uma boa posição para incorporar grupos que aumentam a solubilidade em  $H_2O$  (QIAN *et al.*, 2009a). Entretanto, essa posição pode ser modificada com diferentes substituintes e ainda assim reter as propriedades anti-HIV, embora os derivados não substituídos apresentem maior potência. Exceções foram verificadas com grupos acídicos (tiocarboximetil), aromáticos ou amina secundária, os quais reduziram a atividade. A hidrogenação da ligação dupla levou a derivados de duas a cinco vezes menos ativos. O grupo isopropilideno pareceu ser importante para a atividade ótima, uma vez que provavelmente liga-se a bolsos hidrofóbicos nos alvos moleculares (EVERS

*et al.*, 1996). A introdução de um grupo hidroxila livre em C30 reduziu a atividade. Isso indica que a introdução de grupos doadores de ligações de hidrogênio próximo ao isoprenil em C19 não é tolerado, enquanto que derivados éteres na mesma posição não acarretaram em perda da atividade (QIAN *et al.*, 2009a).

Uma cadeia lateral na posição C3 é necessária para a atividade anti-maturação do HIV, enquanto uma cadeia lateral em C28 é requerida para a atividade anti-entrada do HIV. Grupos volumosos em C3 no anel A comprometem o efeito anti-entrada (LAI *et al.*, 2008). Com relação ao mecanismo de ação, nenhum dos derivados do AB sintetizados por Kashiwada e colaboradores (1996) e Hashimoto e colaboradores (1997) foram capazes de inibir a transcriptase reversa (TR) de HIV-1 numa faixa de concentração entre 167-219  $\mu\text{mol/L}$ . Por outro lado, alguns derivados inibiram a fusão de membranas induzida pelo HIV-1, sugerindo que este pode ser o mecanismo de ação envolvido na atividade anti-HIV, da mesma forma que o observado para os derivados avaliados por Mayaux e colaboradores (1994). De todo modo, os mecanismos de ação anti-HIV dos derivados do AB ainda não foram completamente elucidados e, portanto, investigações adicionais são necessárias.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Obter derivados do ácido betulínico por meio de reações de biotransformação e semissíntese, e avaliar o perfil biológico desses derivados frente a ensaios antitumoral, antimicrobiano, antimalárico e anti-HIV.

### 2.2. Objetivos específicos

- Isolar o ácido betulínico das cascas externas de *Platanus orientalis* em quantidade adequada para a obtenção de derivados.
- Obter derivados do ácido betulínico por meio de reações de biotransformação usando fungos e suspensão de células vegetais.
- Preparar derivados do ácido betulínico por meio de reações semissintéticas visando modificar as posições C3, C20-29 e C28.
- Analisar a atividade antitumoral dos derivados por meio de ensaios de citotoxicidade, seletividade, microscopia, ciclo celular, anexina V, caspases e fragmentação do DNA.
- Analisar a atividade antimicrobiana dos derivados por meio dos métodos de difusão em disco e macrodiluição em caldo.
- Analisar a atividade antimalárica dos derivados por meio dos métodos da <sup>3</sup>[H]-hipoxantina e lactato desidrogenase (LDH).
- Analisar a atividade anti-HIV dos derivados por meio de ensaio de inibição da transcriptase reversa (TR) do vírus HIV-1.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Procedimentos gerais

##### 3.1.1. Instrumentação

A estrutura das substâncias foi determinada por meio de técnicas espectroscópicas. Para análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram utilizados equipamentos Bruker DPX-200 (para RMN-<sup>1</sup>H, 200 MHz; e RMN-<sup>13</sup>C e DEPT, 50 MHz) e Bruker Advance DPX-400 (para COSY, HSQC e HMBC), localizados no Departamento de Química da UFPR. TMS ou o próprio solvente foram utilizados como referência interna. Para análise de Espectrometria de Massas (EM) foi utilizado equipamento Thermo Finnigan LCQ Classic LC/MS/MS, quadrupolo, com fonte de ionização eletrospray (ESI), em modo positivo ou negativo, localizado no Instituto de Farmácia da Martin-Luther-Universität, Halle (Saale), Alemanha. Os dados de ultravioleta (UV) foram obtidos por meio de análise em detector UV/vis DAD acoplado a HPLC. O ponto de fusão foi obtido através do método do capilar em aparelho PFM-II (MS, Tecnopon Instrumentação, Brasil).

Para os ensaios de atividade antitumoral foram utilizados os seguintes equipamentos, todos localizados no Biozentrum da Martin-Luther-Universität, Halle (Saale), Alemanha: contador automático de células (Countess Cell Counter, Invitrogen<sup>®</sup>, Alemanha); lavador automático de placas de 96 poços (Hydrospeed, Tecan<sup>®</sup>, Áustria); leitor de placas (Infinite F200 Pro, Tecan<sup>®</sup>, Áustria); microscópio óptico (Telaval 31, Zeiss<sup>®</sup>, Alemanha); microscópio de fluorescência (Axioskop HB050/AC, Zeiss<sup>®</sup>, Alemanha) acoplado à câmera fotográfica (AxioCam MRC, Zeiss<sup>®</sup>, Alemanha); citômetro de fluxo (FACS Attune Acoustic Focusing Cytometer, Applied Biosystems<sup>®</sup>, EUA); transiluminador (UV solo TS Imaging System, Biometra<sup>®</sup>, Alemanha).

##### 3.1.2. Técnicas cromatográficas

Todas as reações e procedimentos de purificação foram monitorados por CCD, visualizados em luz UV ( $\lambda = 254$  e  $366$  nm) e/ou revelação através de pulverização com vanilina sulfúrica seguida de aquecimento.

Foram utilizados os seguintes suportes cromatográficos:

- a) Cromatografia em camada delgada (CCD): placas de sílica gel 60 PF<sub>254</sub> sobre alumínio (Merck<sup>®</sup>, Alemanha).
- b) Cromatografia em coluna tradicional: sílica gel 60 (0,04-0,063 mm) (Merck<sup>®</sup>, Alemanha).
- c) Cromatografia preparativa circular (Chromatotron, Harrison Research<sup>®</sup>, EUA) e cromatografia a vácuo em funil de vidro sinterizado: sílica gel 60 com gesso e indicador de fluorescência, para cromatografia em camada delgada, 5-40 µm (Merck<sup>®</sup>, Alemanha).

### 3.1.3. Solventes

Os solventes foram adquiridos comercialmente e foram destilados antes do uso. Para as análises de RMN foram utilizados solventes deuterados (CDCl<sub>3</sub> e Pyr-d<sub>5</sub>). Para as análises de EM e UV foram utilizados solventes grau HPLC.

## 3.2. Material vegetal

Foram coletadas folhas, inflorescências e cascas externas (ritidoma<sup>1</sup>) de espécimes de *Platanus orientalis* L., Platanaceae (Fig. 5), localizados no Centro Politécnico no campus da Universidade Federal do Paraná (UFPR), nos meses de março e abril de 2010. O material botânico foi identificado pelo Prof. Dr. Olavo Guimarães e uma exsicata está depositada no Herbário do Departamento de Botânica da UFPR, sob o registro UPCB 47812.

## 3.3. Isolamento do ácido betulínico

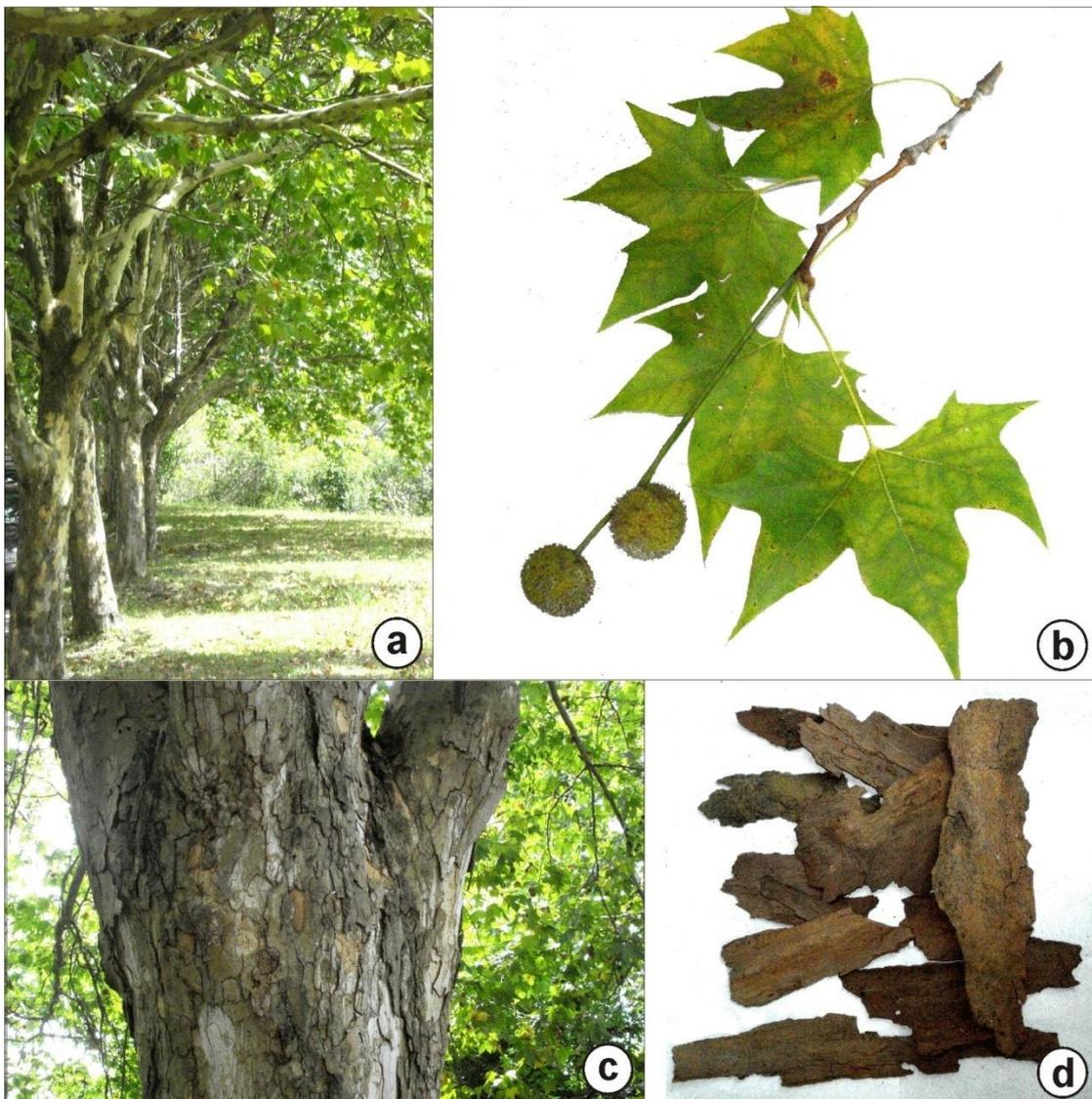
O isolamento do AB foi realizado de acordo com adaptação do método de Draeger e colaboradores (2001). Cascas de *P. orientalis* foram secas à temperatura ambiente e moídas em moinho de facas. O material vegetal pulverizado (0,81 kg) foi transferido para um percolador e extraído a frio com *n*-hexano (aprox. 2 L) durante 30 min. Em seguida, o material desengordurado foi extraído da seguinte maneira: a) maceração com DCM (aprox. 3 L) durante 12 h; b) após 12 h, percolação lentamente, até que todo o extrato orgânico fosse recolhido, filtrado e evaporado sob pressão reduzida à secura. Esse procedimento foi repetido até o completo

---

<sup>1</sup> Porções mais velhas do súber que vão se destacando da superfície dos troncos das plantas lenhosas, constituindo a sua camada mais externa. É a camada exterior, constituída por células mortas, da casca das árvores e outras plantas lenhosas, com função protetora.

esgotamento da droga vegetal e a extração foi monitorada por CCD (DCM:MeOH, 95:5; vanilina sulfúrica).

O extrato bruto foi ressuspendido com uma mistura de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (1:2) a quente. A solução foi resfriada lentamente até a temperatura ambiente e em seguida mantida a  $0^\circ\text{C}$  *overnight*, quando então o AB precipitou na forma de um sólido de coloração amarelada. O material sólido foi filtrado em funil de Büchner, lavado com MeOH gelado e submetido à recristalização, utilizando o mesmo processo, para isolar o AB com elevado grau de pureza (14,8 g; rendimento= 1,82%, *p/p* em relação à droga vegetal). A amostra foi analisada por meio de RMN e EM, e os resultados foram comparados com dados da literatura (PENG *et al.*, 1998).



**Figura 5.** *Platanus orientalis* L., Platanaceae. a) árvores no hábito; b) ramo contendo folhas e inflorescências; c) cascas externas desprendendo-se do tronco; d) cascas externas após a coleta. Fonte: O Autor.

### 3.4. Derivados do ácido betulínico

#### 3.4.1. Reações de biotransformação por fungos

##### 3.4.1.1. Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados neste trabalho foram gentilmente disponibilizados pela Profa. Dra. Ida Chapaval Pimentel (Laboratório de Microbiologia, Departamento de Patologia Básica, UFPR). As cepas foram mantidas sob refrigeração a 4°C em meio de cultura sólido PDA (ágar batata-dextrose) e foram repicadas para um novo meio de cultura a cada 15 dias.

##### 3.4.1.2. Triagem de micro-organismos em escala analítica

O meio de cultura líquido foi preparado contendo 20 g/L de D-(-)-glucose (dextrose), 8 g/L de extrato de malte e 4 g/L de extrato de levedura em H<sub>2</sub>O destilada. Um volume de 50 mL de meio de cultura líquido foi transferido para *erlenmeyers* (250 mL), os quais foram esterilizados em autoclave por 20 min (120°C, 1 kgf/cm<sup>2</sup>). Foram testados um total de 25 micro-organismos (23 fungos e duas leveduras), os quais podem ser conferidos na Tabela 1. Os micro-organismos foram inoculados no meio de cultura líquido estéril e incubados em um agitador-incubador orbital (*shaker*) a 28°C e 150 rpm durante 24 a 72 h, dependendo de cada cepa. Após esse período, 0,5 mL de uma solução de AB dissolvido em DMSO (20 mg/mL) foi adicionado ao meio de cultura e os *erlenmeyers* foram mantidos por mais sete dias no *shaker*, naquelas mesmas condições. Para cada micro-organismo foi preparado um *erlenmeyer* controle, contendo apenas meio de cultura e DMSO (0,5 mL).

Após sete dias de fermentação, o caldo foi filtrado em funil de Büchner. O micélio foi lavado com H<sub>2</sub>O destilada (20 mL). O filtrado foi transferido para um funil de separação e extraído com DCM (3x20 mL), separando-se a fase orgânica da aquosa. Em seguida, o filtrado foi extraído com AcOEt (3x20 mL). O micélio foi extraído com DCM:MeOH (1:1), sob sonicação durante 30 min, e o extrato orgânico foi filtrado. As fases orgânicas foram secas com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, evaporadas à secura em rotavapor e analisadas em CCD, empregando-se várias fases móveis com diferentes graus de polaridade, comparando-se com os controles. A fase aquosa foi descartada ao final.

**Tabela 1.** Micro-organismos utilizados no experimento em escala analítica para a biotransformação do ácido betulínico.

Micro-organismos	Incubação* (h)	Micro-organismos	Incubação* (h)
<i>Acremonium</i> sp. 321	72	<i>Penicillium</i> sp. 64	72
<i>Acremonium</i> sp. 193	72	<i>Penicillium</i> sp. (3a)	48
<i>Aspergillus</i> sp. S195	72	<i>Penicillium</i> sp. (10b)	72
<i>Chaetomium</i> sp.56	72	<i>Penicillium citreonigrum</i> (13b)	48
Demáceo S278	72	LB3-2b (N.I.)	24
Demáceo S328	48	LB3-5a (N.I.)	72
<i>Fusarium</i> sp. 162	24	LB3-6b (N.I.)	48
<i>Fusarium</i> sp. (14a)	48	LB3-7b (N.I.)	72
<i>Geotrichum</i> sp. S168	72	LB3-12a (N.I.)	72
<i>Gibberella</i> sp.	48	LB3-18a (N.I.)	48
<i>Hansenula</i> sp. (19a)	24	LB3-21a (N.I.)	24
<i>Hansenula</i> sp. (20a)	48	LB3-22a (N.I.)	48
<i>Mycelia sterilia</i> (15b)	72		

N.I.= fungo não identificado

\*tempo de crescimento de cada fungo antes de adicionar AB ao meio.

### 3.4.1.3. Reações de biotransformação em escala preparativa

Os fungos *Mycelia sterilia* (15b), *Penicillium* sp. (10b) e *Penicillium citreonigrum* (13b) foram selecionados na etapa de triagem em escala analítica, uma vez que evidenciaram por meio de CCD a presença de derivados do AB, e ainda apresentaram maior rendimento em termos de biomassa e facilidade de extração. Esses fungos foram incubados em meio de cultura líquido previamente esterilizado (50 mL) e incubados em *shaker* orbital a 28°C e 150 rpm, respeitando o tempo de crescimento necessário de cada fungo. Após esse período, os micro-organismos foram transferidos para *erlenmeyers* de 1000 mL contendo 200 mL de meio de cultura líquido fresco, onde cresceram por mais 48 h. Após este período, cerca de 65 mg de AB dissolvido em DMSO foram adicionados em cada *erlenmeyer*. Um *erlenmeyer* controle, no qual foi adicionado apenas DMSO, foi preparado para cada fungo.

Após sete dias de fermentação, os caldos foram filtrados em funil de Büchner, enquanto o micélio foi lavado com H<sub>2</sub>O destilada (50 mL). O filtrado foi transferido para um funil de separação e extraído apenas com AcOEt (3x100 mL), já que na escala analítica verificou-se que DCM extraiu os mesmos compostos. Os micélios foram sonicados em DCM:MeOH (1:1) durante cerca de 2 h. As frações orgânicas foram secas com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, evaporadas à *secura* e analisadas por CCD.

Para a obtenção de quantidades dos derivados adequadas à caracterização estrutural e aos testes biológicos, os experimentos em escala preparativa foram repetidos de duas a três vezes, sob as mesmas condições. Os extratos brutos

oriundos da biotransformação foram submetidos a técnicas cromatográficas (cromatografias em coluna e a vácuo) e a processos de recristalização para o fracionamento dos extratos e isolamento dos derivados do AB.

Neste trabalho foram isolados e caracterizados quatro produtos da biotransformação do AB por fungos. Os derivados obtidos foram caracterizados como Myc15b e PEN10b.2 (que correspondem à mesma substância), PEN10b.1 e PEN13b; esses derivados já foram obtidos por biotransformação usando outros micro-organismos (CHATTERJEE *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2005; BASTOS *et al.*, 2007; QIAN *et al.*, 2009b).

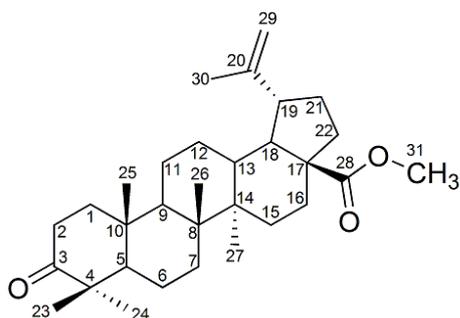
#### **3.4.1.4. Biotransformação por *Mycelia sterilia* (15b)**

585,0 mg de AB foram adicionados ao meio de cultura contendo o fungo *Mycelia sterilia* em crescimento, divididos em nove frascos. Após comparação por CCD, os extratos do filtrado e do micélio (488,0 mg) foram reunidos para fracionamento em coluna a vácuo, usando gradientes de DCM e MeOH, com proporção crescente de MeOH. A fração contendo a substância de interesse foi ressuspensa em *n*-hexano:DCM (1:1) gelados, precipitando o AB remanescente na forma de um sólido esbranquiçado, enquanto que o sobrenadante foi filtrado com auxílio de pipeta Pasteur e algodão. Esse procedimento foi repetido até que o sobrenadante estivesse num grau de pureza elevado, permitindo o isolamento de **Myc15b** (15,1 mg, rendimento de 2,58%).

**Myc15b.** Para dados físico-químicos, ver DAB1 (Pg. 98).

#### **3.4.1.5. Biotransformação por *Penicillium* sp. (10b)**

1,17 g de AB foram adicionados ao meio de cultura contendo o fungo *Penicillium* sp. (10b) em crescimento, divididos em 18 frascos. Após comparação por CCD, foi verificado que apenas o extrato do micélio (1,11 g) continha supostos derivados, sendo fracionado em coluna a vácuo, usando como eluente gradiente de DCM e MeOH, com proporção crescente de MeOH. As frações contendo as substâncias de interesse foram reunidas e purificadas por cromatografia em coluna, usando um gradiente de DCM e MeOH, com proporção crescente de MeOH até 5%, permitindo o isolamento de **PEN10b.1** (19,7 mg, rendimento de 1,68%) e **PEN10b.2** (27,4 mg, rendimento de 2,34%).

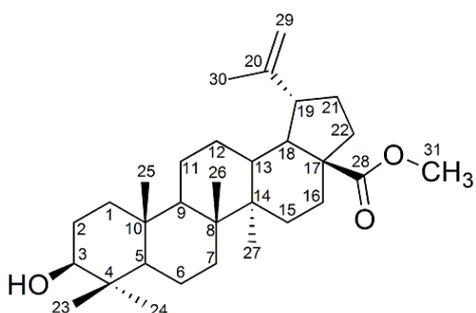


**PEN10b.1.** Substância resinosa amarela. RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,92 (3H, s, H25), 0,95 (3H, s, H26), 0,97 (3H, s, H27), 1,02 (3H, s, H24), 1,07 (3H, s, H23), 1,69 (3H, s, H30), 3,67 (3H, s, H31), 4,60 (1H, s, H29), 4,74 (1H, s, H29). RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 14,6 (C27), 15,8 (C25), 15,9 (C26), 19,4 (C30), 19,6 (C6), 21,0 (C24), 21,4 (C11), 25,5 (C12), 26,6 (C23), 29,7 (C15), 30,6 (C21), 32,1 (C16), 33,6 (C7), 34,1 (C2), 36,9 (C10, C22), 38,3 (C13), 39,6 (C1), 40,6 (C8), 42,4 (C14), 46,9 (C19), 47,3 (C4), 49,4 (C18), 49,9 (C9), 51,3 (C31), 55,0 (C5), 56,5 (C17), 109,6 (C29), 150,5 (C20), 176,6 (C28), 218,1 (C3).

**PEN10b.2.** Para dados físico-químicos, ver DAB1 (Pg. 98).

#### 3.4.1.6. Biotransformação por *Penicillium citreonigrum* (13b)

1,75 g de AB foram adicionados ao meio de cultura contendo o fungo *P. citreonigrum* (13b) em crescimento, divididos em 27 frascos. Após comparação por CCD, foi verificado que apenas o extrato do micélio continha supostos derivados. O extrato do micélio (3,74 g) foi fracionado em coluna a vácuo, usando como eluente gradiente de DCM e MeOH, com proporção crescente de MeOH. As frações contendo a substância de interesse foram reunidas e submetidas à cromatografia em coluna, eluindo-se com um gradiente de DCM e MeOH, com proporção crescente de MeOH até 2%, permitindo o isolamento de **PEN13b** (31,6 mg, rendimento de 1,80%).



**PEN13b.** Sólido branco-amarelado amorfo, p.f. 214-217°C. RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>+Pyr-d<sub>5</sub>) δ 0,79 (3H, s, H24), 0,82 (3H, s, H25), 0,92 (3H, s, H23), 0,97 (3H, s, H26), 1,00 (3H, s, H27), 1,69 (3H, s, H30), 3,66 (3H, s, H31), 4,61 (1H, s, H29), 4,75 (1H, s, H29). RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>+Pyr-d<sub>5</sub>) δ 14,7 (C27), 15,6 (C25), 16,0 (C26), 16,1 (C24), 18,3 (C6), 19,4 (C30), 20,9 (C11), 25,5 (C12), 27,5 (C2), 28,1 (C23), 29,7 (C15), 30,6 (C21), 32,2 (C16), 34,4 (C7), 37,0 (C22), 37,2 (C10), 38,3 (C13), 38,9 (C1), 39,0 (C4), 40,7 (C8), 42,4 (C14), 47,0 (C18), 49,5 (C19), 50,6 (C9), 51,2 (C31), 55,5 (C5), 56,5 (C17), 78,5 (C3), 109,6 (C29), 150,5 (C20), 176,6 (C28).

### 3.4.2. Reações de biotransformação por suspensão de células vegetais

#### 3.4.2.1. Suspensão celular de brotos de cenoura

Sementes de cenoura (*Daucus carota* var. Nantes calibrada média, Isla<sup>®</sup>) adquiridas no comércio local foram esterilizadas com uma solução de hipoclorito de sódio a 20% da solução comercial (v/v) e etanol 70% (v/v), por 2 e 1 min, respectivamente. Por último, as sementes foram enxaguadas três vezes com H<sub>2</sub>O esterilizada e transferidas para um meio de cultura MS<sup>2</sup> semissólido (MURASHIGE; SKOOG, 1962), ausente de hormônios de crescimento, e foram mantidas sob temperatura e luz controladas. Cerca de trinta dias após a germinação, a região do hipocótilo (parte abaixo do cotilédone) foi seccionada em pedaços de aproximadamente 2,0 cm. Os explantes foram transferidos para um meio MS semissólido contendo 2,5 µmol/L do hormônio ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) para induzir a formação de calos (30 a 60 dias).

A suspensão de células foi preparada transferindo-se os calos para 50 mL de meio de cultura MS líquido contendo 2,5 µmol/L de 2,4-D em *erlenmeyers* (250 mL), sob agitação contínua a 120 rpm e 25°C no escuro. Os frascos foram pesados antes e após a transferência dos calos para o meio líquido para calcular a massa de células suspensas, que totalizou entre 1,0 e 2,0 g de células/frasco. Após uma semana de incubação em meio líquido, 30 mg de AB dissolvido em acetona foi adicionado a cada frasco da suspensão celular (10 frascos) e a reação ocorreu por mais duas semanas. Frascos controle contendo células apenas em meio de cultura líquido e acetona foram preparados. Após 14 dias, as suspensões foram diluídas na proporção de 1:1 (1 parte de suspensão celular/1 parte de meio de cultura fresco) e foi adicionado mais 15 mg de AB em cada frasco. Esse procedimento de diluição foi repetido seis vezes, com o intuito de obter maior massa de células para realizar a biotransformação. Após a sexta diluição, as suspensões foram filtradas. O filtrado foi extraído com AcOEt (3x100 mL), enquanto as células foram maceradas com gral e pistilo, e posteriormente sonicadas com DCM:MeOH (1:1) por cerca de 2,5 h. As fases orgânicas foram secas com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e evaporadas à secura. Após comparação por CCD, foi verificado que apenas o extrato das células da suspensão

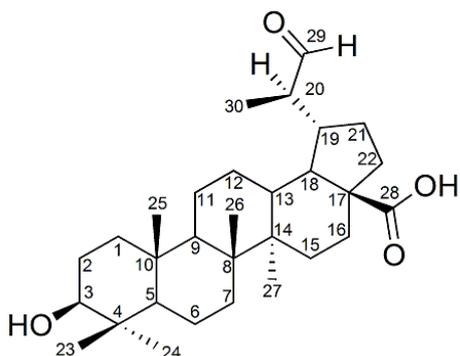
---

<sup>2</sup> **Composição do meio de cultura MS:** sacarose, mioinositol, sais minerais (A. NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; B. KNO<sub>3</sub>; C. H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KI, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; D. CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; E. CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; F. FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), vitaminas (tiamina, ácido nicotínico, piridoxina), glicina, H<sub>2</sub>O destilada; pH= 5,7-5,8.

de cenoura apresentou compostos diferentes do controle, evidenciando a presença de prováveis derivados.

O extrato bruto das células (1,5 g) foi fracionado em coluna a vácuo, utilizando um gradiente de heptano:DCM, com proporção crescente de DCM, e de DCM:MeOH, com proporção crescente de MeOH. As frações contendo os compostos de interesse foram reunidas e purificadas. A substância **CEN1** (19,7 mg, rendimento de 1,64%) foi isolada por meio de cristalização em *n*-hexano e DCM gelados, uma vez que cristais do AB remanescente precipitaram e, com auxílio de pipeta Pasteur e algodão, o sobrenadante foi filtrado. O processo foi repetido algumas vezes até que o sobrenadante estivesse num grau de pureza elevado. A substância **CEN2** (26,2 mg, rendimento de 2,18%) foi isolada por cromatografia em coluna, usando como fase móvel DCM:MeOH (95:5).

**CEN1.** Para dados físico-químicos, ver DAB1 (Pg. 98).



**CEN2.** Sólido branco-amarelado amorfo, p.f. 219-222°C. EM  $[M-H]^-$   $m/z$  471,3,  $C_{30}H_{48}O_4$ . RMN- $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3+Pyr-d_5$ )  $\delta$  0,82 (3H, s, H24), 0,83 (3H, s, H25), 0,98 (3H, s, H26), 1,04 (3H, s, H23, H27), 1,11 (3H, d,  $J=6,8$  Hz, H30), 3,26 (1H, t, H3), 9,88 (1H, d,  $J=1,5$  Hz, H29). RMN- $^{13}C$  (50 MHz,  $CDCl_3+Pyr-d_5$ )  $\delta$  14,5 (C27,C30), 15,7 (C24, C25), 16,1 (C26), 18,4 (C6), 20,9 (C11), 25,8 (C12), 27,5 (C2), 27,6 (C21), 28,2 (C23), 29,8 (C15), 32,2 (C16), 34,5 (C7), 37,1 (C22), 37,2 (C10), 38,2 (C13), 38,9 (C1), 39,0 (C4), 40,8 (C8), 42,6 (C14), 42,7 (C19), 49,4 (C20), 50,0 (C9), 50,3 (C18), 55,5 (C5), 56,5 (C17), 78,2 (C3), 178,9 (C28), 207,0 (C29).

A obtenção dos derivados CEN1 e CEN2 é inédita por meio da técnica de biotransformação do AB por suspensão de células de cenoura. Embora com baixo rendimento e extremamente laboriosa, do ponto de vista biotecnológico a técnica poderia representar uma alternativa na obtenção dessas substâncias.

### 3.4.2.2. Suspensão celular de folhas jovens de macieira

Explantos de folhas jovens de macieira (*Pirus malus* L.) cultivadas *in vitro* foram transferidas para um meio de cultura<sup>3</sup> semissólido contendo 15 µmol/L de tidiazuron (TDZ), para induzir a formação de calos, e foram mantidos sob temperatura controlada no escuro. Após cerca de trinta dias, os calos foram transferidos para *erlenmeyers* (250 mL) contendo 50 mL de meio de cultura MS líquido acrescido de TDZ. Após uma semana de incubação, 30 mg de AB dissolvido em acetona foi adicionado a cada frasco da suspensão celular (10 frascos) e a reação ocorreu por mais três semanas. Ao completar quatro semanas de cultivo, a suspensão celular de macieira foi filtrada. O filtrado foi extraído com AcOEt (3x100 mL), enquanto a massa de células foi triturada e sonicada com DCM:MeOH (1:1) durante 2 h.

### 3.4.3. Semissíntese de derivados

Neste trabalho foram sintetizados oito derivados inéditos do AB, todos contendo uma ou duas moléculas de 2,4-dinitrofenil-hidrazona (2,4-DNPH), seja nas posições C3 e/ou C20. Os derivados conhecidos DAB1, DAB7, DAB10 e DAB12 foram preparados de acordo com métodos da literatura e seus dados espectroscópicos foram comparados com aqueles previamente descritos (KIM; KOO; KIM, 2001; SAMOSHINA *et al.*, 2003; BASTOS *et al.*, 2007; DENISENKO *et al.*, 2011; SATIRAPHAN *et al.*, 2012). Os esquemas das reações de semissíntese descritas abaixo podem ser encontrados na seção Anexos (Pgs. 167-168).

#### 3.4.3.1. Preparo do DAB1 - ácido betulônico

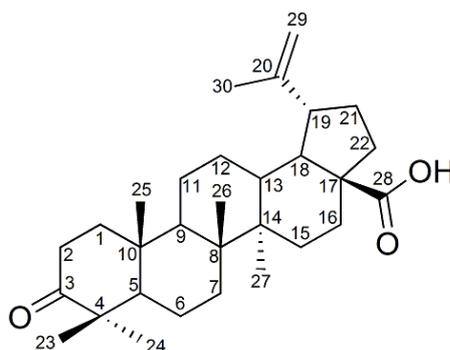
A uma solução de **AB** (0,52 g; 1,14 mmol) dissolvido em acetona (20 mL) resfriada em banho de gelo foi adicionado Reagente de Jones<sup>4</sup> (10 mL) gota a gota, e a reação ocorreu por 1,5 h a 0°C sob agitação. Foi adicionado MeOH (10 mL), agitando-se por mais 5 min, seguido pela adição de H<sub>2</sub>O destilada (30 mL). Os solventes orgânicos foram evaporados em rotavapor e o resíduo aquoso foi extraído

<sup>3</sup> **Composição do meio de cultura:** sorbitol, mioinositol, sais minerais (A. NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; B. KNO<sub>3</sub>; C. H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KI, Na<sub>2</sub>Mo<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; D. CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; E. CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; F. FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), vitaminas (tiamina, ácido nicotínico, piridoxina), glicina, H<sub>2</sub>O destilada; pH= 5,7-5,8.

<sup>4</sup> **Reagente de Jones (solução 8,0 N):** CrO<sub>3</sub> (26,7 g; 0,27 mol) foi dissolvido em H<sub>2</sub>O destilada (40 mL). Em seguida foi adicionado H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. (23 mL), com resfriamento em banho de gelo. O volume da solução foi completado até 100 mL (qsp) com H<sub>2</sub>O destilada.

com AcOEt (5x20 mL). A fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada e evaporada à secura. O resíduo foi purificado em coluna a vácuo (*n*-hexano:AcOEt; 85:15), possibilitando o isolamento do produto **DAB1** (0,3 g; rendimento de 57,7%).

O produto foi analisado por EM ([M-H]<sup>-</sup> 453,3 *m/z*) e RMN-<sup>1</sup>H e -<sup>13</sup>C, e os dados foram comparados com valores da literatura (SATIRAPHAN *et al.*, 2012).

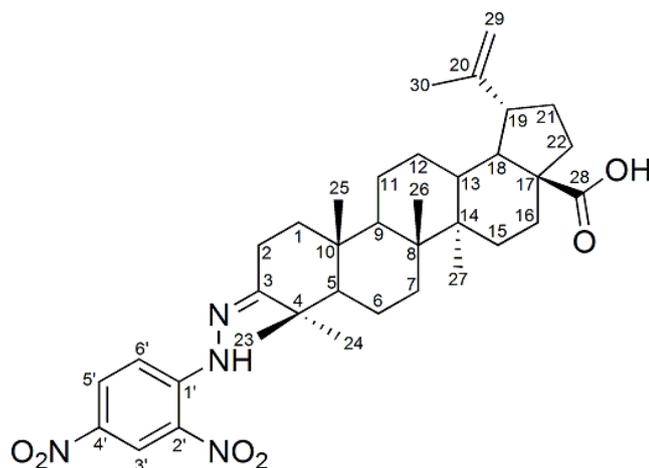


### 3.4.3.2. Preparo do DAB2

A uma solução de **DAB1** (0,50 g; 1,10 mmol) dissolvido em EtOH (20 mL) foi adicionada uma solução de 2,4-DNP<sup>5</sup> (5 mL). A reação ocorreu à temperatura ambiente por aproximadamente 15 h, sob agitação. Após esse período, foi adicionada H<sub>2</sub>O destilada (40 mL) e a mistura reacional foi extraída com AcOEt (4x20 mL). A fração orgânica foi purificada em coluna cromatográfica, utilizando como fase móvel DCM 100%, fornecendo **DAB2** (0,37 g; rendimento de 73,0%).

**ácido 3-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]lup-20(29)-en-28-oico (DAB2).** Sólido alaranjado escuro, p.f. 265-268°C. UV-vis (MeOH-CH<sub>3</sub>CN) λ<sub>max</sub> 350, 388 nm. EM [M+CH<sub>3</sub>OH-H]<sup>-</sup> *m/z* 665,5, C<sub>36</sub>H<sub>50</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>. RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,94 (3H, s, H25), 0,99 (3H, s, H27), 1,00 (3H, s, H26), 1,15 (3H, s, H24), 1,28 (3H, s, H23), 1,70 (3H, s, H30), 4,62 (1H, s, H29), 4,75 (1H, s, H29), 7,94 (1H, d, J= 9,6 Hz, H6'), 8,29 (1H, dd, J= 2,5 Hz, 9,6 Hz, H5'), 9,12 (1H, d, J= 2,5 Hz, H3'), 11,17 (1H, s, -NH). RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 14,6 (C27), 15,6 (C25), 16,0 (C26), 19,4 (C30), 19,7 (C6), 20,8 (C2), 21,4 (C11), 23,8 (C24), 25,5 (C12), 28,9 (C23), 29,7 (C15), 30,6 (C21), 32,2 (C16), 33,8 (C7), 37,1 (C10, C22), 38,4 (C1), 38,5 (C13), 40,8 (C8), 42,3 (C4), 42,5 (C14), 47,0 (C19), 49,2 (C18), 49,8 (C9), 55,2 (C5), 56,5 (C17), 109,8 (C29), 116,5 (C6'), 123,6 (C3'), 129,0 (C2'), 129,9 (C5'), 137,5 (C4'), 145,6 (C1'), 150,3 (C20), 167,4 (C3), 182,4 (C28).

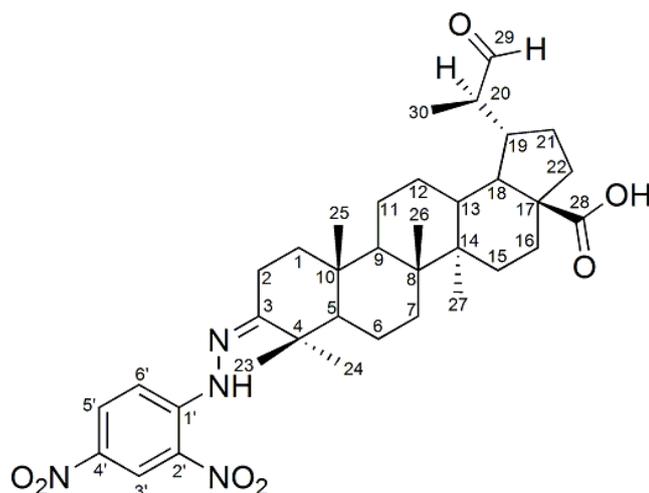
<sup>5</sup> **Solução de 2,4-DNP:** cerca de 0,8 g (4,04 mmol) de 2,4-DNP foi dissolvido em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. (4 mL), aquecido até a completa solubilização, e em seguida foi adicionada H<sub>2</sub>O destilada (6 mL), gota a gota. Esta solução foi usada imediatamente após seu preparo.



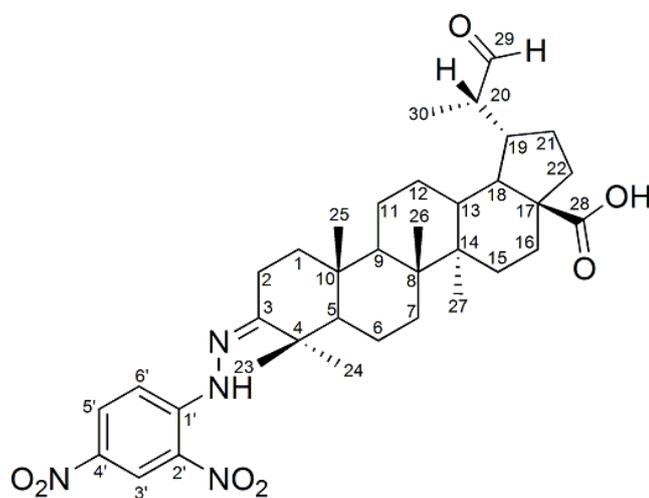
### 3.4.3.3. Preparo do DAB3 e DAB4

A uma solução de **DAB2** (0,25 g; 0,39 mmol) dissolvido em DCM (5 mL) resfriada em banho de gelo foi adicionado *m*-CPBA (0,41 g; 2,37 mmol) e a reação ocorreu a 0°C por 5 h sob agitação. A reação permaneceu em repouso até atingir a temperatura ambiente. Em seguida foi adicionada uma solução aquosa de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 10% (10 mL) e a mistura foi agitada por mais 10 min. A mistura foi extraída com DCM (2x10 mL). A fase orgânica foi lavada com uma solução aquosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3x10 mL), seca em Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e evaporada em rotavapor. A fração orgânica foi purificada por cromatografia preparativa circular, utilizando uma placa cromatográfica de 2 mm de espessura e fase móvel de DCM 100%, fornecendo os produtos **DAB3** (123,3 mg; rendimento de 48,4%) e **DAB4** (28,7 mg; rendimento de 11,2%).

**ácido 3-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]-(20R)-29-oxolupan-28-oico (DAB3).** Sólido alaranjado escuro, p.f. 226-229°C. UV-vis (MeOH-CH<sub>3</sub>CN) λ<sub>max</sub> 361 nm. EM [M-H]<sup>-</sup> *m/z* 649,5, C<sub>36</sub>H<sub>50</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>. RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>+Pyr-d<sub>5</sub>) δ 0,93 (3H, s, H<sub>25</sub>), 0,98 (3H, s, H<sub>27</sub>), 1,02 (3H, s, H<sub>26</sub>), 1,11 (3H, s, H<sub>30</sub>), 1,15 (3H, s, H<sub>24</sub>), 1,29 (3H, s, H<sub>23</sub>), 7,95 (1H, d, J= 9,6 Hz, H<sub>6'</sub>), 8,28 (1H, dd, J= 2,5 Hz, 9,6 Hz, H<sub>5'</sub>), 9,11 (1H, d, J= 2,5 Hz, H<sub>3'</sub>), 9,87 (1H, d, J= 1,6 Hz, H<sub>29</sub>), 11,19 (1H, s, -NH). RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>+Pyr-d<sub>5</sub>) δ 14,4 (C<sub>27</sub>, C<sub>30</sub>), 15,6 (C<sub>25</sub>), 16,0 (C<sub>26</sub>), 19,7 (C<sub>6</sub>), 20,7 (C<sub>2</sub>), 21,3 (C<sub>11</sub>), 23,8 (C<sub>24</sub>), 25,8 (C<sub>12</sub>), 27,5 (C<sub>21</sub>), 28,8 (C<sub>23</sub>), 29,7 (C<sub>15</sub>), 32,1 (C<sub>16</sub>), 33,8 (C<sub>7</sub>), 37,0 (C<sub>10</sub>, C<sub>22</sub>), 38,2 (C<sub>13</sub>), 38,3 (C<sub>1</sub>), 40,7 (C<sub>8</sub>), 42,2 (C<sub>4</sub>), 42,6 (C<sub>14</sub>, C<sub>19</sub>), 49,4 (C<sub>9</sub>, C<sub>20</sub>), 49,9 (C<sub>18</sub>), 55,0 (C<sub>5</sub>), 56,5 (C<sub>17</sub>), 116,5 (C<sub>6'</sub>), 123,5 (C<sub>3'</sub>), 128,9 (C<sub>2'</sub>), 129,9 (C<sub>5'</sub>), 137,4 (C<sub>4'</sub>), 145,5 (C<sub>1'</sub>), 167,4 (C<sub>3</sub>), 179,0 (C<sub>28</sub>), 207,2 (C<sub>29</sub>).



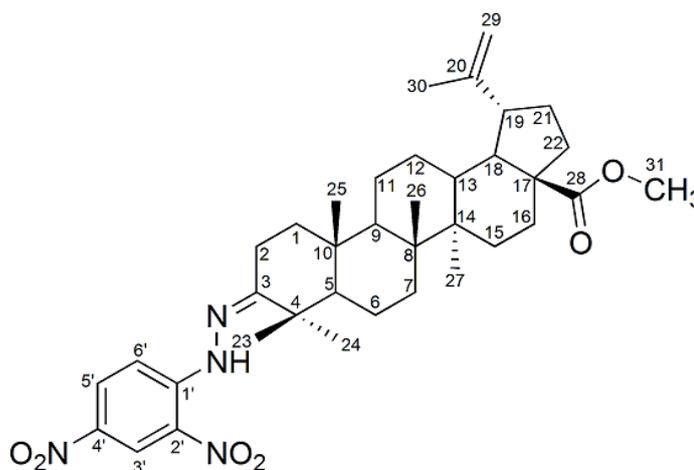
**ácido 3-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]-(20S)-29-oxolupan-28-oico (DAB4).** Sólido alaranjado, p.f. 220-222°C. UV-vis (MeOH-CH<sub>3</sub>CN)  $\lambda_{\text{max}}$  361 nm. RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>+Pyr-d<sub>5</sub>)  $\delta$  0,94 (3H, s, H25), 1,00 (6H, s, H27, H30), 1,03 (3H, s, H26), 1,16 (3H, s, H24), 1,29 (3H, s, H23), 7,94 (1H, d, J= 9,6 Hz, H6'), 8,28 (1H, dd, J= 2,5 Hz, 9,6 Hz, H5'), 9,11 (1H, d, J= 2,5 Hz, H3'), 9,66 (1H, s, H29), 11,17 (1H, s, -NH). RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>+Pyr-d<sub>5</sub>)  $\delta$  6,79 (C30), 14,4 (C27), 15,6 (C25), 16,0 (C26), 19,7 (C6), 20,7 (C2), 21,3 (C11), 23,8 (C24), 24,5 (C12), 26,7 (C21), 28,8 (C23), 29,7 (C15), 32,3 (C16), 33,8 (C7), 37,0 (C10, C19), 37,6 (C22), 38,2 (C1), 38,4 (C13), 40,8 (C8), 42,2 (C4), 42,7 (C14), 48,1 (C18), 49,5 (C9), 50,1 (C20), 55,1 (C5), 56,3 (C17), 116,5 (C6'), 123,5 (C3'), 128,9 (C2'), 129,9 (C5'), 137,4 (C4'), 145,6 (C1'), 167,3 (C3), 178,9 (C28), 204,8 (C29).



### 3.4.3.4. Preparo do DAB5

A uma solução de **DAB2** (0,20 g; 0,31 mmol) dissolvido em éter etílico (2 mL) foi adicionada uma solução etérea de diazometano<sup>6</sup> gota a gota, até que não fosse mais observada efervescência. A reação foi acompanhada por CCD. Para eliminar o excesso de diazometano, foi gotejado ácido acético glacial até que a efervescência não fosse mais observada. A solução foi evaporada à secura e purificada por cromatografia preparativa circular, usando placa de 1 mm de espessura e fase móvel *n*-hexano:DCM (70:30), fornecendo o produto **DAB5** (196,0 mg; rendimento de 98%).

**3-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]-lup-20(29)-en-28-oato de metila (DAB5)**. Sólido alaranjado, p.f. 198-201°C. UV-vis (MeOH-CH<sub>3</sub>CN)  $\lambda_{\max}$  350, 380 nm. EM [M-H]<sup>-</sup> *m/z* 647,1, C<sub>37</sub>H<sub>52</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>. RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0,92 (3H, s, H25), 0,97 (3H, s, H26, H27), 1,16 (3H, s, H24), 1,28 (3H, s, H23), 1,69 (3H, s, H30), 3,68 (3H, s, H31), 4,61 (1H, s, H29), 4,74 (1H, s, H29), 7,94 (1H, d, J= 9,6 Hz, H6'), 8,29 (1H, dd, J= 2,5 Hz, 9,6 Hz, H5'), 9,12 (1H, d, J= 2,5 Hz, H3'), 11,17 (1H, s, -NH). RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  14,6 (C27), 15,6 (C25), 15,9 (C26), 19,4 (C30), 19,7 (C6), 20,8 (C2), 21,4 (C11), 23,8 (C24), 25,5 (C12), 28,8 (C23), 29,6 (C15), 30,6 (C21), 32,1 (C16), 33,8 (C7), 36,9 (C22), 37,1 (C10), 38,3 (C13), 38,4 (C1), 40,7 (C8), 42,2 (C4), 42,5 (C14), 46,9 (C19), 49,4 (C18), 49,8 (C9), 51,3 (C31), 55,2 (C5), 56,6 (C17), 109,7 (C29), 116,5 (C6'), 123,6 (C3'), 128,9 (C2'), 129,9 (C5'), 137,5 (C4'), 145,6 (C1'), 150,4 (C20), 167,4 (C3), 176,6 (C28).



<sup>6</sup> **Solução etérea de diazometano (16,6 mmol):** A uma solução de KOH (5,0 g; 89,1 mmol) dissolvido em H<sub>2</sub>O destilada (8 mL) foi adicionado EtOH 95% (10 mL). Uma solução de *N*-metil-*N*-nitroso-*p*-toluenosulfonamida (5,0 g; 23,3 mmol) (Diazald, Aldrich®, Alemanha) dissolvido em éter etílico (50 mL) foi gotejada lentamente sobre a solução hidroalcoólica de KOH. A mistura amarelada foi destilada a 65 °C, obtendo-se a solução etérea de diazometano.

### 3.4.3.5. Preparo do DAB6

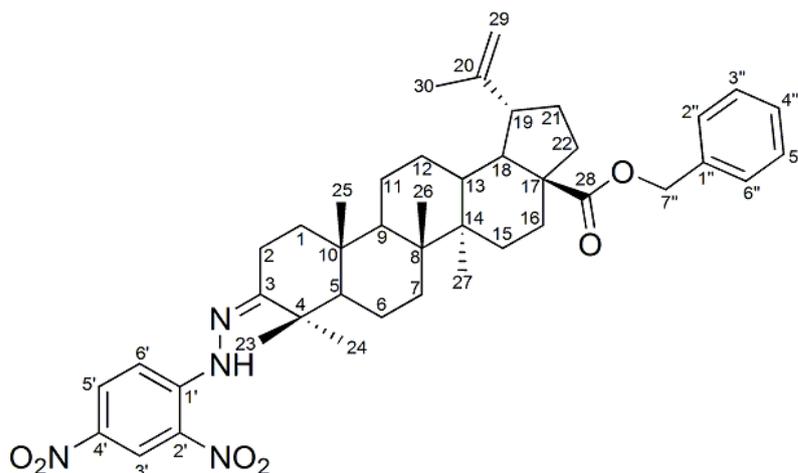
**DAB1** (0,10 g; 0,22 mmol), cloreto de benzila (0,5 mL) e  $K_2CO_3$  (0,20 g; 1,45 mmol) foram refluxados em acetona (10 mL) por 2 h. O sal inorgânico foi filtrado e a solução resultante concentrada em rotavapor. O resíduo oleoso amarelado foi purificado em coluna cromatográfica, utilizando-se como fase móvel DCM 100%, fornecendo o éster benzílico correspondente (94,5 mg; rendimento de 90%).

A uma solução do éster benzílico (94,5 mg; 0,17 mmol) dissolvido em EtOH (5 mL) foi adicionada uma solução de 2,4-DNP<sup>7</sup> e a reação ocorreu por aproximadamente 15 h, sob agitação, à temperatura ambiente. Foi adicionada  $H_2O$  destilada (20 mL) e a mistura foi extraída com DCM (3x20 mL). A fase orgânica foi seca em  $Na_2SO_4$  anidro, o solvente evaporado em rotavapor e o resíduo purificado em coluna cromatográfica, utilizando-se como fase móvel *n*-hexano:DCM (70:30, 50:50), fornecendo **DAB6** (67,4 mg; rendimento de 71,3%).

### **3-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]lup-20(29)-en-28-oato de benzila (DAB6).**

Substância amorfa, resinosa, alaranjada. UV-vis (MeOH- $CH_3CN$ )  $\lambda_{max}$  354, 371 nm. EM [M-H]<sup>-</sup> *m/z* 723,5,  $C_{43}H_{56}N_4O_6$ . RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  0,81 (3H, s, H26), 0,90 (3H, s, H25), 0,94 (3H, s, H27), 1,15 (3H, s, H24), 1,27 (3H, s, H23), 1,68 (3H, s, H30), 4,60 (1H, s, H29), 4,73 (1H, s, H29), 5,12 (1H, d, J= 12,2 Hz, H7'', -OCH<sub>2</sub>-Ar), 5,20 (1H, d, J= 12,2 Hz, H7'', -OCH<sub>2</sub>-Ar), 7,36 (5H, m, H2''-6''), 7,94 (1H, d, J= 9,6 Hz, H6'), 8,28 (1H, dd, J= 2,5 Hz, 9,6 Hz, H5'), 9,12 (1H, d, J= 2,5 Hz, H3'), 11,17 (1H, s, -NH). RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  14,6 (C27), 15,6 (C25), 15,7 (C26), 19,4 (C30), 19,7 (C6), 20,7 (C2), 21,3 (C11), 23,8 (C24), 25,5 (C12), 28,8 (C23), 29,7 (C15), 30,6 (C21), 32,1 (C16), 33,7 (C7), 36,9 (C22), 37,0 (C10), 38,2 (C13), 38,4 (C1), 40,7 (C8), 42,2 (C4), 42,5 (C14), 46,9 (C19), 49,4 (C18), 49,8 (C9), 55,2 (C5), 56,5 (C17), 65,8 (-OCH<sub>2</sub>-Ar, 7''), 109,7 (C29), 116,4 (C6'), 123,6 (C3'), 128,1 (C4''), 128,2 (C2'', C6''), 128,5 (C3'', C5''), 128,9 (C2'), 129,9 (C5'), 136,5 (C1''), 137,4 (C4'), 145,6 (C1'), 150,4 (C20), 167,4 (C3), 175,8 (C28).

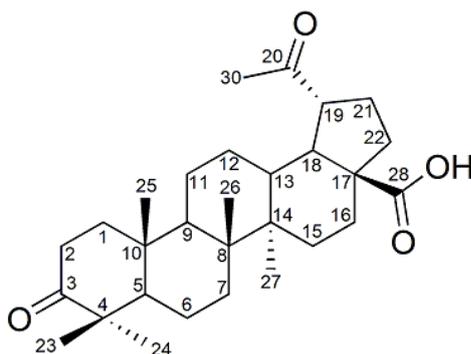
<sup>7</sup> **Solução de 2,4-DNP:** cerca de 0,1 g (0,5 mmol) de 2,4-DNP foi dissolvido em  $H_2SO_4$  conc. (0,5 ml), aquecido até a completa solubilização, e em seguida foi adicionada  $H_2O$  destilada (0,75 ml), gota a gota. Esta solução foi usada imediatamente após seu preparo.



### 3.4.3.6. Preparo do DAB7

A uma solução de **DAB1** (0,30 g; 0,66 mmol) dissolvido em dioxano:H<sub>2</sub>O (10,5:1,5) foi adicionado OsO<sub>4</sub> (15 mg; 0,059 mmol). Após 1 h sob agitação, a solução tornou-se cinza escuro. NaIO<sub>4</sub> (1,5 g; 7,01 mmol) foi adicionado em pequenas porções durante 3 h. Após a completa adição do periodato, a reação ocorreu por 3 dias, sob agitação, à temperatura ambiente. A mistura foi transferida para um funil de separação contendo AcOEt (50 mL) e lavada com H<sub>2</sub>O destilada (3x50 mL). A fase aquosa foi separada e extraída novamente com AcOEt (2x50 mL). A fase orgânica foi seca em Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, o solvente evaporado em rotavapor e o resíduo foi purificado em coluna cromatográfica, utilizando-se como fase móvel DCM 100%, fornecendo o composto **DAB7** (150,8 mg; rendimento de 50,3%).

**ácido 3,20-dioxo-29-norlupan-28-oico (DAB7)**. Sólido acinzentado, p.f. 230-233°C. EM [2M+Na-2H]<sup>-</sup> *m/z* 933,3, C<sub>29</sub>H<sub>44</sub>O<sub>4</sub>. RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,91 (3H, s, H25), 0,95 (3H, s, H26), 1,01 (3H, s, H27), 1,02 (3H, s, H24), 1,07 (3H, s, H23), 2,19 (3H, s, H30). RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 14,6 (C27), 15,7 (C25), 16,0 (C26), 19,6 (C6), 21,0 (C24), 21,4 (C11), 26,8 (C23), 27,2 (C12), 28,2 (C21), 29,7 (C15), 30,1 (C30), 31,4 (C16), 33,5 (C7), 34,0 (C2), 36,7 (C22), 36,9 (C10), 37,6 (C13), 39,5 (C1), 40,5 (C8), 42,3 (C14), 47,3 (C4), 49,0 (C18), 49,7 (C9), 51,2 (C19), 54,7 (C5), 56,2 (C17), 181,9 (C28), 212,2 (C20), 218,3 (C3).

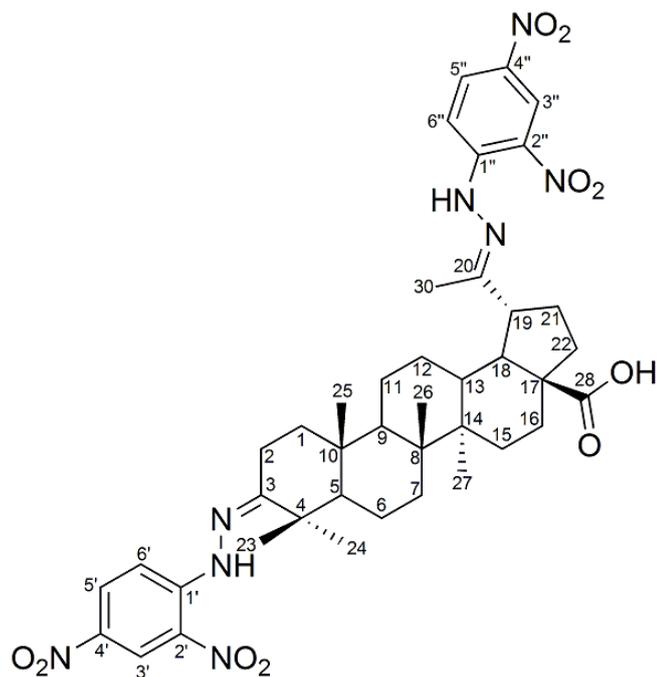


### 3.4.3.7. Preparo do DAB8 e DAB9

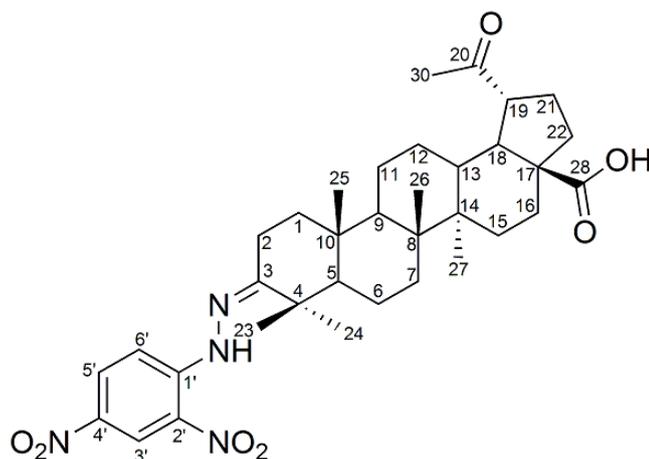
A uma solução de **DAB7** (126,0 mg; 0,27 mmol) dissolvido em EtOH (6,5 mL) foi adicionada uma solução de 2,4-DNP<sup>8</sup>. A reação ocorreu por cerca de 15 h, sob agitação, à temperatura ambiente. Foi adicionada H<sub>2</sub>O destilada (20 mL) e a mistura foi extraída com DCM (3x20 mL). A fase orgânica foi seca em Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, evaporada em rotavapor e purificada por coluna cromatográfica, utilizando-se como fase móvel DCM 100% e DCM:MeOH (99:1), fornecendo os compostos **DAB8** (53,1 mg; rendimento de 42,1%) e **DAB9** (48,3 mg; rendimento de 38,3%).

**ácido 3,20-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]lupan-28-oico (DAB8)**. Sólido alaranjado, p.f. 292-295°C. UV-vis (MeOH-CH<sub>3</sub>CN)  $\lambda_{\max}$  360 nm. EM [M-H]<sup>-</sup> *m/z* 815,0, C<sub>41</sub>H<sub>52</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>. RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0,93 (3H, s, H25), 1,02 (3H, s, H26), 1,07 (3H, s, H27), 1,14 (3H, s, H24), 1,28 (3H, s, H23), 2,07 (3H, s, H30), 7,94 (2H, t, J= 9,7 Hz, H6',H6''), 8,26 (1H, dd, J= 2,5 Hz, 5,5 Hz, H5'), 8,31 (1H, dd, J= 2,5 Hz, 5,5 Hz, H5''), 9,09 (1H, d, 2,5 Hz, H3''), 9,12 (1H, d, J= 2,5 Hz, H3'), 11,05 (1H, s, -NH''), 11,13 (1H, s, -NH'). RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  14,6 (C27), 15,0 (C25), 15,7 (C26), 15,9 (C30), 19,6 (C6), 20,6 (C2), 21,3 (C11), 23,7 (C24), 26,9 (C12), 28,8 (C23), 29,2 (C15), 29,7 (C21), 31,9 (C16), 33,8 (C7), 36,8 (C22), 37,1 (C10), 38,1 (C13), 38,3 (C1), 40,7 (C8), 42,2 (C4), 42,5 (C14), 48,0 (C19), 49,3 (C18), 49,7 (C9), 55,1 (C5), 56,2 (C17), 116,3 (C6''), 116,4 (C6'), 123,6 (C3', C3''), 128,9 (C2''), 129,1 (C2'), 129,9 (C5'), 130,0 (C5''), 137,5 (C4''), 137,6 (C4'), 145,2 (C1''), 145,5 (C1'), 161,4 (C20), 167,0 (C3), 181,3 (C28).

<sup>8</sup> **Solução de 2,4-DNP:** cerca de 0,13 g (0,65 mmol) de 2,4-DNP foi dissolvido em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. (0,65 ml), aquecido até a completa solubilização, e em seguida foi adicionada H<sub>2</sub>O destilada (1,0 ml), gota a gota. Esta solução foi usada imediatamente após seu preparo.



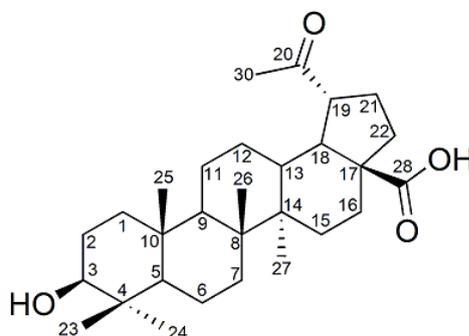
**ácido 3-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]-20-oxolupan-28-oico (DAB9).** Sólido alaranjado oscuro, p.f. 163-165°C. UV-vis (MeOH-CH<sub>3</sub>CN)  $\lambda_{\max}$  360 nm. EM [M-H]<sup>-</sup> *m/z* 635,5, C<sub>35</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>. RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0,93 (3H, s, H25), 0,98 (3H, s, H26), 1,02 (3H, s, H27), 1,15 (3H, s, H24), 1,28 (3H, s, H23), 2,20 (3H, s, H30), 7,93 (1H, d, J= 9,6 Hz, H6'), 8,29 (1H, dd, J= 2,5 Hz, 9,6 Hz, H5'), 9,12 (1H, d, J= 2,5 Hz, H3'), 11,17 (1H, s, -NH'). RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  14,6 (C27), 15,6 (C25), 15,9 (C26), 19,6 (C6), 20,7 (C2), 21,3 (C11), 23,7 (C24), 27,2 (C12), 28,2 (C21), 28,8 (C23), 29,7 (C15), 30,1 (C30), 31,4 (C16), 33,6 (C7), 36,7 (C22), 37,0 (C10), 37,5 (C13), 38,3 (C1), 40,6 (C8), 42,2 (C4), 42,3 (C14), 49,0 (C18), 49,6 (C9), 51,1 (C19), 55,0 (C5), 56,2 (C17), 116,4 (C6'), 123,6 (C3'), 128,9 (C2'), 129,9 (C5'), 137,5 (C4'), 145,6 (C1'), 167,2 (C3), 181,7 (C28), 212,1 (C20).



### 3.4.3.8. Preparo do DAB10

A uma solução de **AB** (1,03 g; 2,25 mmol) dissolvido em dioxano:H<sub>2</sub>O (35:5) foi adicionado OsO<sub>4</sub> (85 mg; 0,33 mmol). Após 1 h de agitação, a solução tornou-se cinza escura. NaIO<sub>4</sub> (5,0 g; 23,4 mmol) foi adicionado ao meio reacional em pequenas porções durante 3 h. Após a total adição do periodato, a reação ocorreu por 3 dias, sob agitação, à temperatura ambiente. A mistura foi transferida para um funil de separação contendo AcOEt (100 mL) e foi lavada com H<sub>2</sub>O destilada (3x100 mL). A fase aquosa foi separada e extraída novamente com AcOEt (2x100 mL). A fase orgânica foi seca em Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, o solvente evaporado em rotavapor e o resíduo foi fracionado em coluna a vácuo, utilizando-se um gradiente de DCM:MeOH, com proporção crescente de MeOH. A fração contendo a substância de interesse foi purificada por coluna cromatográfica, utilizando-se como fase móvel heptano:AcOEt (1:1), fornecendo o composto **DAB10** (839,7 mg; rendimento de 81,3%).

**ácido 3-hidroxi-20-oxo-29-norlupan-28-oico (DAB10)**. Sólido acinzentado, p.f. 275-277°C. EM [2M-H]<sup>-</sup> *m/z* 914,4, C<sub>29</sub>H<sub>46</sub>O<sub>4</sub>. RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>+Pyr-d<sub>5</sub>) δ 0,78 (3H, s, H24), 0,81 (3H, s, H25), 0,95 (3H, s, H26), 0,99 (3H, s, H23), 1,02 (3H, s, H27), 2,18 (3H, s, H30). RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>+Pyr-d<sub>5</sub>) δ 14,7 (C27), 15,5 (C24), 16,0 (C25), 16,1 (C26), 18,3 (C6), 20,9 (C11), 27,4 (C2, C12), 28,1 (C23), 28,5 (C21), 29,8 (C15), 30,1 (C30), 31,9 (C16), 34,3 (C7), 36,9 (C22), 37,2 (C10), 37,4 (C13), 38,8 (C1), 39,0 (C4), 40,6 (C8), 42,3 (C14), 49,4 (C18), 50,5 (C9), 51,5 (C19), 55,4 (C5), 56,2 (C17), 78,5 (C3), 179,0 (C28), 212,8 (C20).

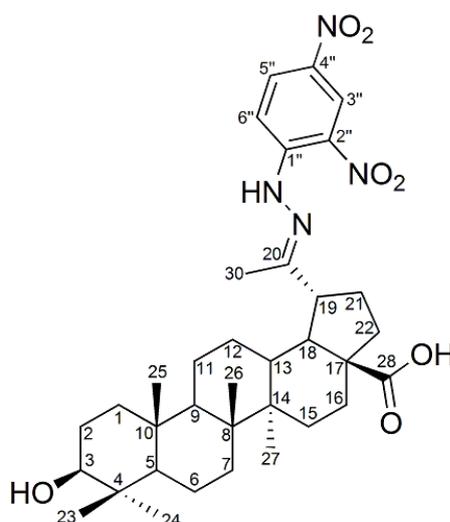


### 3.4.3.9. Preparo do DAB11

A uma solução de **DAB10** (192,0 mg; 0,42 mmol) dissolvido em EtOH (10 mL) foi adicionada uma solução de 2,4-DNP<sup>9</sup>. A reação ocorreu por cerca de 15 h, sob agitação, à temperatura ambiente. Foi adicionado H<sub>2</sub>O destilada (20 mL) e a mistura foi extraída com DCM (4x25 mL). A fase orgânica foi seca em Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, evaporada em rotavapor e purificada por coluna cromatográfica, utilizando-se como fase móvel gradiente de DCM:MeOH, com proporções crescentes de MeOH até 10%. A fração contendo a substância de interesse foi purificada em nova coluna cromatográfica, utilizando-se como fase móvel DCM:MeOH (98:2), fornecendo o composto **DAB11** (140,8 mg; rendimento de 73,3%).

#### ácido 3-hidroxi-20-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]-29-norlupan-28-oico (**DAB11**).

Sólido alaranjado, p.f. 285-288°C. UV-vis (MeOH-CH<sub>3</sub>CN)  $\lambda_{\max}$  355, 372 nm. EM [M-H]<sup>-</sup> *m/z* 637,5, C<sub>35</sub>H<sub>50</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>. RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>+Pyr-d<sub>5</sub>)  $\delta$  0,79 (3H, s, H24), 0,80 (3H, s, H25), 0,99 (3H, s, H26), 1,00 (3H, s, H23), 1,07 (3H, s, H27), 2,04 (3H, s, H30), 7,99 (1H, d, J= 9,6 Hz, H6''), 8,29 (1H, dd, J= 2,5 Hz, 9,6 Hz, H5''), 9,09 (1H, d, J= 2,5 Hz, H3''), 11,04 (1H, s, -NH''). RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>+Pyr-d<sub>5</sub>)  $\delta$  14,6 (C27, C30), 15,6 (C25), 16,1 (C24, C26), 18,4 (C6), 21,0 (C11), 26,9 (C21), 27,4 (C2), 28,1 (C23), 29,3 (C12), 29,8 (C15), 32,4 (C16), 34,4 (C7), 37,0 (C22), 37,2 (C10), 37,9 (C13), 38,9 (C1), 39,0 (C4), 40,8 (C8), 42,4 (C14), 48,2 (C19), 49,7 (C18), 50,5 (C9), 55,5 (C5), 56,1 (C17), 78,3 (C3), 116,5 (C6''), 123,5 (C3''), 128,9 (C2''), 129,9 (C5''), 137,4 (C4''), 145,3 (C1''), 162,5 (C20), 178,8 (C28).

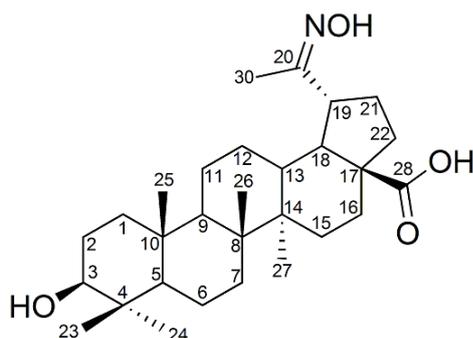


<sup>9</sup> **Solução de 2,4-DNP:** cerca de 0,25 g (1,26 mmol) de 2,4-DNP foi dissolvido em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. (1,0 ml), aquecido até a completa solubilização, e em seguida foi adicionada H<sub>2</sub>O destilada (1,5 ml), gota a gota. Esta solução foi usada imediatamente após seu preparo.

### 3.4.3.10. Preparo do DAB12

A uma solução de **DAB10** (217,2 mg; 0,47 mmol) dissolvido em MeOH (4 mL) foi adicionado cloridrato de hidroxilamina (cerca de 880,0 mg; 12,6 mmol) dissolvido em EtOH:H<sub>2</sub>O (1:1, 4 mL) e acetato de sódio (cerca de 880,0 mg; 10,7 mmol). A reação ocorreu por 2 h sob agitação e posteriormente permaneceu em repouso *overnight*, à temperatura ambiente. Foi adicionado H<sub>2</sub>O destilada (20 mL) e a mistura foi extraída com AcOEt (3x15 mL). A fase orgânica foi seca em Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, o solvente evaporado em rotavapor e o resíduo foi purificado por coluna cromatográfica, utilizando-se como fase móvel DCM:MeOH (95:5), fornecendo o composto **DAB12** (116,4 mg; rendimento de 53,6%).

**ácido 3-hidroxi-20-hidroxietanimidoil-lupan-28-oico (DAB12).** Sólido esbranquiçado, p.f. 268-270°C. EM [M+H]<sup>+</sup> *m/z* 474,3, C<sub>29</sub>H<sub>47</sub>N<sub>1</sub>O<sub>4</sub>. RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>+Pyr-d<sub>5</sub>) δ 0,79 (3H, s, H24), 0,80 (3H, s, H25), 0,96 (3H, s, H26), 0,99 (3H, s, H23), 1,00 (3H, s, H27), 1,89 (3H, s, H30). RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>+Pyr-d<sub>5</sub>) δ 11,2 (C30), 14,6 (C27), 15,6 (C24), 16,0 (C25), 16,1 (C26), 18,4 (C6), 20,9 (C11), 25,8 (C12), 27,4 (C2), 28,1 (C23), 28,6 (C21), 29,7 (C15), 32,5 (C16), 34,4 (C7), 37,2 (C10, C22), 37,8 (C13), 38,9 (C1), 39,0 (C4), 40,7 (C8), 42,4 (C14), 45,1 (C19), 49,4 (C18), 50,5 (C9), 55,5 (C5), 55,9 (C17), 78,4 (C3), 161,4 (C20), 179,0 (C28).



### 3.5. Atividades biológicas

#### 3.5.1. Atividade antitumoral

##### 3.5.1.1. Linhagens celulares

As linhagens de células tumorais A2780 (ovário), 8505c (carcinoma anaplásico da tireoide), 518A2 (melanoma), MCF-7 (mama) e A549 (pulmão), e a linhagem CCD 18co (fibroblastos de cólon humano), foram incluídas neste estudo, as quais foram gentilmente cedidas pelo Dr. Thomas Müller<sup>10</sup>. As culturas foram mantidas como monocamadas em meio RPMI completo<sup>11</sup> a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. Para a replicação das linhagens, a monocamada foi lavada com 4 mL de PBS<sup>12</sup> e as células destacadas com 1 mL de tripsina-EDTA (1x) (PAA®, Áustria) por no máximo 5 min a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>; em seguida, alíquotas da suspensão de células foram transferidas para garrafas de cultivo (25 cm<sup>2</sup>) contendo meio RPMI completo e mantidas em incubadora.

A linhagem de câncer de pulmão A549 foi selecionada para os ensaios de microscopia, citometria de fluxo e fragmentação do DNA pelo fato de apresentar relevância clínica e também alta taxa de proliferação *in vitro*.

##### 3.5.1.2. Ensaio de citotoxicidade

###### 3.5.1.2.1. Preparo das substâncias-teste

Soluções-estoque dos compostos investigados foram preparadas em DMSO a uma concentração de 20 mmol/L e em seguida foram diluídas com meio RPMI completo em diferentes concentrações (0,01 a 100 µmol/L). A concentração final de DMSO nunca excedeu mais que 0,5%, a qual não foi considerada tóxica para as células.

###### 3.5.1.2.2. Ensaio colorimétrico da Sulforrodamina B (SRB)

A atividade citotóxica das substâncias foi avaliada através do ensaio colorimétrico SRB, de acordo com Skehan e colaboradores (1990). Células em crescimento exponencial foram semeadas em placas de 96 cavidades no dia zero

---

<sup>10</sup> Universitätsklinik für Innere Medizin IV – Onkologie und Hämatologie, Martin-Luther-Universität, Halle (Saale), Alemanha.

<sup>11</sup> **Meio RPMI completo:** RPMI 1640 com L-glutamina (PAA®, Áustria), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Sigma-Aldrich®, Alemanha) e 1% de penicilina/estreptomicina (100x) (PAA®, Áustria).

<sup>12</sup> **PBS 1x (1 L):** 100 mL de 10x Dulbecco's PBS sem Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> (PAA®, Áustria) em 900 mL de água Aqua Braun (B. Braun Melsungen®, Alemanha).

(100 µL de suspensão de células por cavidade), com densidades celulares apropriadas para prevenir confluência das células durante o período do experimento (A2780: 2000 cél./cavidade; 8505c: 2500 cél./cavidade; 518A2: 1000 cél./cavidade; MCF-7: 2000 cél./cavidade; A549: 2500 cél./cavidade). Após 24 h, as células foram tratadas com as diluições seriadas (100 µL de amostra por cavidade) dos compostos (0,01 a 100 µmol/L). As porcentagens de células sobreviventes relativas aos controles não tratados foram determinadas 96 h após o início da exposição às substâncias testadas. Após 96 h de tratamento, o sobrenadante das placas de 96 cavidades foi removido e as células foram fixadas com solução aquosa de TCA 10% (100 µL por cavidade). Para uma fixação completa, as placas permaneceram em repouso por no mínimo 2 h sob refrigeração a 4°C. Após a fixação, as placas foram lavadas com H<sub>2</sub>O destilada (5x) em lavador automático, usando procedimentos alternados de dispensação e aspiração. As placas foram então coradas com solução acética de SRB 0,4%<sup>13</sup> (100 µL por cavidade) por 45 minutos. Após a coloração, as placas foram novamente lavadas automaticamente, desta vez com ácido acético 1% (5x) para remover o corante. As placas permaneceram secando a temperatura ambiente *overnight*. O volume de 100 µL de solução tampão TRIS 10 mmol/L foi adicionado a cada cavidade da placa, e após 30 min a absorvância foi medida a 570 nm usando um leitor de placas. Os valores de absorvância expressos como densidade óptica (DO) foram transformados em porcentagens de viabilidade (%), em relação ao controle celular que é considerado 100% viável, através da seguinte fórmula:

$$\% = \text{DO substância} \times 100 / \text{DO controle}$$

Os valores de IC<sub>50</sub>, definidos como a concentração do composto na qual 50% de inibição celular é observada, foram determinados a partir de três curvas dose-resposta semilogarítmicas independentes, desenhadas pelo software GraphPad Prism 5.

### 3.5.1.2.3. Seletividade

AB e os derivados mais ativos foram avaliados quanto a sua seletividade para células tumorais. Para tanto, foi utilizada uma linhagem celular de fibroblastos

---

<sup>13</sup> **Solução acética de SRB 0,4% (1 L):** a) Solução estoque de SRB 4%: 25 g de SRB (Sigma-Aldrich®, Alemanha) em 625 mL de ácido acético 1% (sol. aq.); b) Solução de trabalho: 100 mL de SRB 4% em 900 mL de ácido acético 1% (sol. aq.).

normais de cólon humano (CCD 18co), que foram mantidos em meio DMEM *low glucose* (Gibco<sup>®</sup>, Escócia), suplementado com 10% de SBF e 1% de penicilina/estreptomicina (100x). O experimento foi realizado conforme o ensaio de SRB (SKEHAN *et al.*, 1990), durante 96 h de tratamento das células com os compostos-teste nas concentrações de 0,01 a 100  $\mu\text{mol/L}$ . O índice de seletividade (IS) foi calculado como a razão entre o valor de  $\text{IC}_{50}$  em fibroblastos humanos e o valor de  $\text{IC}_{50}$  nas linhagens tumorais correspondentes.

### 3.5.1.3. Análise microscópica

#### 3.5.1.3.1. Lâminas de vidro

Células da linhagem A549 em suspensão ( $4,0 \times 10^5$  células) foram semeadas em garrafas ( $25 \text{ cm}^2$ ) contendo 10 mL de meio RPMI completo. Após 24 h, o meio de cultura foi removido e 10 mL de solução das substâncias-teste na concentração  $\text{IC}_{80}$  foram adicionados em cada garrafa. Após 24 h de tratamento, o sobrenadante contendo células flutuantes foi recolhido, assim como as células aderentes, após enxágue com 1,0 mL de PBS e tripsinização com 1,0 mL de tripsina-EDTA (5-10 min,  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). A suspensão celular foi centrifugada (1500 rpm, 5 min,  $4^\circ\text{C}$ ), o sobrenadante removido e o *pellet* foi ressuspenso em 100  $\mu\text{L}$  de PBS gelado. As células foram coradas com 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de laranja de acridina (LA) e brometo de etídio (BE) ( $10 \mu\text{g/mL}$ )<sup>14</sup>, a fim de verificar a presença de células em diferentes estágios de morte celular (apoptose inicial, apoptose tardia e necrose). O volume de 20  $\mu\text{L}$  de suspensão de células coradas foi transferido para uma lâmina de vidro, sendo recoberta com uma lamínula e vedada com esmalte. A lâmina foi imediatamente analisada em microscópio de fluorescência com filtro 488 nm, e as observações foram comparadas com um controle não tratado.

#### 3.5.1.3.2. Lâminas-câmara (*chamber slides*)

Células da linhagem A549 em suspensão ( $4,0 \times 10^4$  células) foram semeadas em três lâminas microscópicas contendo uma câmara com oito cavidades (0,6 mL de meio RPMI completo por cavidade). Após 24 h, o meio de cultura foi removido e 0,5 mL de solução das substâncias-teste na concentração  $\text{IC}_{80}$  foi adicionado em cada cavidade. Após 24 h de tratamento, o sobrenadante foi descartado, as células

---

<sup>14</sup> Solução LA/BE (10  $\mu\text{g/mL}$ ): 10  $\mu\text{L}$  de LA/BE, Merck<sup>®</sup>, Alemanha (1 mg/mL, 1:1) em 1 mL de PBS.

lavadas com 0,5 mL de PBS gelado e as células aderentes foram manipuladas de acordo com o objetivo da análise: a) não corada, a fim de verificar alterações na morfologia celular; b) 100 µL de solução corante de LA/BE (10 µg/mL) por 1-2 min, a fim de verificar a presença de células em diferentes estágios de morte celular; c) 100 µL de uma solução de LA (10 µg/mL)<sup>15</sup> por 20 min a 37°C, a fim de observar a presença de vacúolos autofagolisossomais característicos do processo de autofagia. Os corantes foram removidos, as lâminas cobertas com lamínula e analisadas imediatamente em microscópio óptico ou microscópio de fluorescência com filtro 488 nm. As observações foram comparadas com um controle não tratado.

### 3.5.1.4. Citometria de Fluxo

#### 3.5.1.4.1. Análise do ciclo celular

A interferência de AB e dos derivados mais ativos nas fases do ciclo celular da linhagem A549 foi avaliada por citometria de fluxo usando um separador de células ativado por fluorescência (FACS). Células em suspensão ( $2,0 \times 10^5$  células) foram semeadas em garrafas (25 cm<sup>2</sup>) contendo 10 mL de meio RPMI completo e incubadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, durante 24 h. No dia seguinte, o meio de cultura foi removido e 10 mL de soluções das substâncias-teste em concentrações equitóxicas (IC<sub>80</sub>) foram adicionados em cada garrafa. No frasco controle, foi adicionado apenas 10 mL de veículo. As células foram tratadas durante 24, 48 e 72 h. Em cada período de tempo, o sobrenadante de cada garrafa foi recolhido em tubos de centrifuga, assim como as células aderentes, após enxágue com 1,0 mL de PBS e tratamento com 1,0 mL de tripsina-EDTA (5-10 min, 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>). Um volume de 2,0 mL de meio RPMI foi adicionado às células tripsinizadas a fim de facilitar a sua coleta. A suspensão de células foi centrifugada (1500 rpm, 5 min, 4°C), o sobrenadante descartado e o *pellet* cuidadosamente ressuspensionado em 1,0 mL de PBS gelado. A suspensão celular foi transferida para um *ependorf* e foi novamente centrifugada (1500 rpm, 5 min, 4°C). O sobrenadante foi descartado e as células foram fixadas com 1,0 mL de EtOH 70% gelado. As amostras foram mantidas sob refrigeração a 4°C por no mínimo 1 h antes da análise em FACS.

As células fixadas foram centrifugadas (1500 rpm, 5 min, 4°C), o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspensionado em 1,0 mL de tampão corante

---

<sup>15</sup> **Solução LA (10 µg/mL):** 10 µL de LA, Merck®, Alemanha (1 mg/mL) em 1 mL de PBS.

(*Staining Buffer*)<sup>16</sup>. As amostras foram centrifugadas novamente (1500 rpm, 5 min, 4°C) e o sobrenadante da mesma forma descartado. As células foram ressuspensas em 100 µL de RNase A (100 µg/mL)<sup>17</sup> e as amostras foram incubadas a 37°C durante 30 min. Em seguida foi adicionado 1,0 mL de tampão IP (20 µg de iodeto de propídio/1 mL de tampão corante)<sup>18</sup> e as amostras foram mantidas no escuro durante 30 min, quando então foram ressuspensas e analisadas em FACS, utilizando o comprimento de onda BL-2 (488 nm – filtro 575 nm). Cada análise foi realizada tomando-se de cada amostra cerca de  $2,0 \times 10^4$  eventos e os resultados foram comparados com controles não tratados.

#### 3.5.1.4.2. Análise de morte celular

Células da linhagem A549 em suspensão ( $4,0 \times 10^5$  células) foram semeadas em garrafas (25 cm<sup>2</sup>) contendo 10 mL de meio RPMI completo e incubadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, durante 24 h. No dia seguinte, o meio de cultura foi removido e 10 mL de soluções das substâncias-teste em concentrações equitóxicas (IC<sub>80</sub>) foram adicionados em cada garrafa. No frasco controle, foi adicionado apenas 10 mL de veículo. As células foram tratadas durante 24 e 48 h. Em cada período de tempo, o sobrenadante de cada garrafa foi recolhido em tubos de centrífuga, assim como as células aderentes, após enxágue com 1,0 mL de PBS e tratamento com 1,0 mL de tripsina-EDTA (5-10 min, 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>). Um volume de 2,0 mL de meio RPMI foi adicionado às células tripsinizadas a fim de facilitar a sua coleta. A suspensão de células foi centrifugada (1500 rpm, 5 min, 4°C), o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspensado em 1,0 mL de PBS (Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) gelado. A suspensão celular foi transferida para um *ependorf* e foi novamente centrifugada (1500 rpm, 5 min, 4°C). O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 400 µL de tampão de ligação (1x) (*Binding Buffer*)<sup>19</sup>. As células foram contadas em FACS e as amostras foram padronizadas para a concentração de  $1,0 \times 10^6$  células/mL, diluídas em tampão de ligação (1x). O controle não tratado foi dividido em quatro partes (100 µL para cada parte) e manipulado de maneiras diferentes: 1) não corado;

<sup>16</sup> **Tampão corante (Staining Buffer):** 2 mL de SBF e 0,5 mL de NaN<sub>3</sub> 2% (sol. aq.) em 98 mL de PBS com Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>.

<sup>17</sup> Uma vez que IP também intercala-se com o RNA, esse último é removido pela adição de RNase A (Pozarowski; Darzynkiewicz, 2004). Para uma solução 100 µg/mL, 5 mL de RNase A (1 mg/mL) em 45 mL de PBS (1x).

<sup>18</sup> **Tampão IP:** 250 µL de IP (1 mg/mL) em 12,25 mL de tampão corante.

<sup>19</sup> **Tampão de ligação (10x) (Binding Buffer)** (Pharmingen BD Biosciences®, Alemanha): 0,1 mol/L HEPES/NaOH (pH= 7,4); 1,4 mol/L NaCl; 25 mmol/L CaCl<sub>2</sub>. Utilizar solução 1x em PBS com Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>.

2) 5  $\mu\text{L}$  de IP (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Pharmingen BD Biosciences<sup>®</sup>, Alemanha); 3) 5  $\mu\text{L}$  de anexina V- FITC (Pharmingen BD Biosciences<sup>®</sup>, Alemanha); 4) 5  $\mu\text{L}$  de IP e 5  $\mu\text{L}$  de anexina V- FITC. O volume de 100  $\mu\text{L}$  de cada amostra (células tratadas) foi tratado com 5  $\mu\text{L}$  de IP e 5  $\mu\text{L}$  de anexina V-FITC. As amostras foram mantidas no escuro, a temperatura ambiente, por 15 min. Em seguida, 400  $\mu\text{L}$  de tampão de ligação (1x) foi adicionado e as amostras analisadas em FACS, utilizando os comprimentos de onda BL-1 (488 nm - filtro 530 nm para anexina V- FITC) e BL-2 (488 nm - filtro 575 nm para IP). Cada análise foi realizada tomando-se de cada amostra cerca de  $1,0 \times 10^4$  eventos.

#### 3.5.1.4.3. Análise de ativação das caspases 3, 8 e 9

Células da linhagem A549 em suspensão ( $8,0 \times 10^5$  células) foram semeadas em garrafas ( $25 \text{ cm}^2$ ) contendo 10 mL de meio RPMI completo e incubadas a  $37^\circ\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$ , durante 24 h. No dia seguinte, o meio de cultura foi removido e 10 mL de soluções das substâncias-teste em concentrações equitóxicas ( $\text{IC}_{80}$ ) foram adicionados em cada garrafa. No frasco controle, foi adicionado apenas 10 mL de veículo. As células foram tratadas durante 24 e 48 h, e adicionalmente 72 h. O sobrenadante contendo células flutuantes e as células aderentes (após enxágue com 1 mL de PBS e tratamento com 1 mL de trispina-EDTA, 5-10 min,  $37^\circ\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$ ) foram recolhidos em tubos de centrífuga. O volume de 2,0 mL de meio RPMI foi adicionado às células tripsinizadas a fim de facilitar a sua coleta. Os tubos foram centrifugados (1500 rpm, 5 min,  $4^\circ\text{C}$ ), o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspensionado em 1,0 mL de PBS ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) gelado. Os tubos foram novamente centrifugados e o sobrenadante descartado. Este procedimento foi repetido mais uma vez e as células foram contadas em citômetro de fluxo.

A concentração das amostras foi ajustada para  $1,0 \times 10^6$  células/mL e 300  $\mu\text{L}$  de cada solução foi transferido para tubos de *ependorf*. O volume de 1,0  $\mu\text{L}$  de inibidores de caspase 3, 8 ou 9<sup>20</sup> foi adicionado em cada tubo, os quais foram incubados por 1 h a  $37^\circ\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$ . Após 1 h, os tubos foram centrifugados (1500 rpm, 5 min,  $4^\circ\text{C}$ ), os sobrenadantes removidos e as células ressuspensionadas

---

<sup>20</sup> **Inibidores de caspase** (PromoKine<sup>®</sup>, Alemanha): estes inibidores de caspase são conjugados com um marcador fluorescente, FITC ou sulforodamina (caspase 3: FITC-DEVD-FMK; caspase 8: FITC-IETD-FMK; caspase 9: Red-LEHD-FMK), permeáveis às células, não tóxicos e ligam-se irreversivelmente às caspases ativadas em células apoptóticas, permitindo a detecção através de citometria de fluxo.

em 500 µL de tampão de lavagem (*Wash Buffer*) (PromoKine<sup>®</sup>, Alemanha), sendo novamente centrifugadas. O processo de lavagem foi repetido mais uma vez. As células foram ressuspensas em 300 µL de tampão de lavagem e diretamente analisadas em FACS, usando canal BL-1 (488 nm - filtro 530 nm) para caspase 3 e 8, e BL-3 (488 nm - filtro 640 nm) para caspase 9. Cada análise foi realizada tomando-se de cada amostra cerca de  $1,0 \times 10^4$  eventos.

### 3.5.1.5. Ensaio de fragmentação do DNA (*DNA laddering*)

Células da linhagem A549 em suspensão ( $6,0 \times 10^5$  células) foram semeadas em garrafas (25 cm<sup>2</sup>) contendo 10 mL de meio RPMI completo e incubadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, durante 24 h. No dia seguinte, o meio de cultura foi removido e 10 mL de soluções das substâncias-teste em concentrações equitóxicas (IC<sub>80</sub>) foram adicionados em cada garrafa. As células foram tratadas durante 72 h. O sobrenadante contendo células flutuantes e as células aderentes (após enxágue com 1 mL de PBS e tratamento com 1 mL de trispina-EDTA, 5-10 min, 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) foram separados e recolhidos em dois tubos de centrifuga. O volume de 2,0 mL de meio RPMI foi adicionado às células tripsinizadas a fim de facilitar a sua coleta. Os tubos foram centrifugados (1500 rpm, 5 min, 4°C), o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspensado em 1,0 mL de PBS gelado. Os tubos foram novamente centrifugados, o sobrenadante descartado e o *pellet* seco foi congelado a -20°C até o seu uso no dia seguinte. Sobre o *pellet* foi adicionado 30 µL de tampão de lise do DNA (*DNA lysis buffer*)<sup>21</sup>, permanecendo em repouso sobre gelo durante 10 min. O volume de 10 µL de RNase A (100 µg/mL) foi adicionado em cada amostra, incubando-se por 2 h a 37°C. Em seguida, 10 µL de proteinase K (20 mg/mL) foi adicionado às amostras, incubando-se *overnight* a 50°C. Uma alíquota de 10 µL de tampão de corrida (6x) (*DNA loading dye*)<sup>22</sup> foi adicionada em cada amostra e as mesmas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 2% (4 g de agarose, 200 mL de tampão TAE<sup>23</sup>, 15 µL de BE), com uma corrida de 90 min a 120 V. O gel foi analisado sob luz UV em um transiluminador para o reconhecimento das bandas.

<sup>21</sup> **Tampão de lise do DNA (*DNA lysis buffer*):** EDTA (20 mmol/L), dodecilsulfato de sódio (0,8%), TRIS-HCl (100 mmol/L, pH= 8,0) em H<sub>2</sub>O destilada.

<sup>22</sup> **Tampão de corrida (6x) (*DNA loading dye*)** (MBI Fermentas GmbH<sup>®</sup>, Alemanha): 10 mmol/L Tris-HCl (pH= 7,6); 0,03% azul de bromofenol; 0,03% xileno cianol; 60% glicerol; 60 mmol/L EDTA.

<sup>23</sup> **Tampão TAE:** EDTA (1 mmol/L, pH= 8,3), ácido acético (20 mmol/L), TRIS-HCl (40 mmol/L) em H<sub>2</sub>O destilada.

### 3.5.2. Atividade antimicrobiana

#### 3.5.2.1. Método de difusão em disco

A avaliação da atividade antimicrobiana do AB e derivados foi inicialmente realizada através de ensaio biológico qualitativo, em triplicata, utilizando como controles positivos o antibiótico eritromicina (15 µg) para *Staphylococcus aureus*; polimixina B (300 µg/mL) para KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase); nistatina (100.000 UI/mL) para *Candida albicans*; vancomicina (200 µg/mL) para MRSA (*S. aureus* resistente à meticilina); aztreonam (30 µg) para *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. O ensaio foi realizado através do método de difusão em disco, adaptado do manual M7-A6 padronizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2003).

Em placas de Petri contendo 30 mL de ágar Müller-Hinton (AMH)<sup>24</sup> foram inoculados com o auxílio de um *swab*, na superfície do meio de cultura, as seguintes cepas microbianas: *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *C. albicans* (ATCC 10231), MRSA e KPC (linhagens selvagens, Hospital Universitário de Curitiba, PR). Os inóculos apresentaram uma concentração de 10<sup>8</sup> UFC/mL e foram originários de uma cultura prévia em meio AMH de 24 h. A concentração do inóculo foi ajustada com auxílio de uma escala MacFarland n° 0,5. Posteriormente, em discos de papel Whatman n°. 4 (diâmetro 5 mm) esterilizados, foram aplicados 20 µL de soluções a 10 mg/mL das amostras AB, DAB1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, PEN10b.1 e PEN13b. Em seguida, cada placa recebeu cinco discos de papel, sendo um o controle positivo. Após a distribuição destes discos, as placas foram incubadas a 35±2°C por 24 a 48 h, respectivamente, para bactérias e levedura. Para a análise dos resultados foi investigada a presença de halos de inibição do crescimento bacteriano ou leveduriforme.

#### 3.5.2.2. Método de macrodiluição em caldo

O ensaio de macrodiluição em caldo foi adaptado do manual M7-A6 padronizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2003). Em tubo de ensaio contendo 1 mL de caldo Müller-Hinton, já adicionado com as substâncias AB, DAB2, DAB3 e DAB11 nas concentrações de 12,5, 25, 50, 100 e 200 µg/mL, foi

---

<sup>24</sup> **Meio AMH:** infusão de carne bovina (30 g), peptona de caseína ácida (17,5 g), amido (1,5 g), ágar (17 g), H<sub>2</sub>O destilada (1000 mL), pH 7,3±0,2 a 25°C.

inoculado 1 mL do micro-organismo a ser combatido na concentração de  $10^6$  UFC/mL proveniente de uma cultura prévia em AMH de 24 h (*S. aureus* - ATCC 27213, *E. coli* - ATCC 35219, *C. albicans* - ATCC 10231 e MRSA - linhagem selvagem). A concentração do micro-organismo foi ajustada com o auxílio de uma escala MacFarland nº. 0,5 seguida de diluição. Um controle de crescimento do inóculo foi preparado contendo 1 mL de caldo Müller-Hinton e 1 mL do micro-organismo na mesma concentração do ensaio. Para controlar a influência do solvente (DMSO) no ensaio, foram preparados controles contendo o volume de solvente igual ao volume das substâncias-teste. Os tubos de ensaio foram incubados a 35°C por 24 e 48 h, respectivamente, para bactérias e levedura, e em seguida o padrão de turbidez, indicativo de multiplicação do micro-organismo, foi analisado. Para uma análise mais exata dos resultados, alguns tubos foram semeados com o auxílio de um *swab* em placa de Petri contendo AMH e esta foi incubada a 35°C por 24 e 48 h (bactérias e levedura, respectivamente) para posterior análise do crescimento por contagem das colônias. O teste foi realizado em duplicata. Como controles positivos foram utilizados gentamicina (*S. aureus* e *E. coli*), vancomicina (MRSA) e nistatina (*C. albicans*) na concentração de 200 µg/mL. Tubos-brancos, contendo apenas as substâncias-teste e o caldo Müller-Hinton foram preparados para confrontar com os resultados de turbidez.

### 3.5.3. Atividade antimalárica

A avaliação da atividade antimalárica *in vitro* do AB e seus derivados foi realizada no Laboratório de Bioensaios da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), como parte da Rede de Produtos Naturais para Quimioterapia Antimalárica - Projeto PRONEX CNPq/FAPEMIG, sob coordenação da Profa. Alaíde Braga de Oliveira (UFMG) e do Prof. Fernando de Pilla Varotti (UFSJ). Os testes foram realizados utilizando hemácias infectadas por *P. falciparum*, clone W2, resistente à cloroquina, através do método de incorporação de [<sup>3</sup>H]-hipoxantina (DESJARDINS *et al.*, 1979) para o AB e do método da lactato desidrogenase (LDH) (MAKLER; HINRICHS, 1993) para os demais derivados. Os experimentos foram realizados da seguinte maneira:

1. Preparo da amostra: as amostras foram diluídas em DMSO a uma concentração de 50 mg/mL e diluições subsequentes foram preparadas em meio RPMI, nas concentrações de 1,56 a 50 µg/mL.

2. Incubação parasito-droga: 20 µL de cada diluição das substâncias testadas foram adicionados em microplacas de 96 poços, em triplicata, onde já se encontravam 180 µL da suspensão de hemácias infectadas com parasitas em estágio de anel sincronizados em sorbitol (2% hematócrito, 1% de parasitemia). Foram usados controles sem substâncias-teste, com hemácias infectadas (controle positivo) ou hemácias não infectadas (controle negativo).

3. **Avaliação do AB:** as placas foram incubadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 h na presença da amostra, seguindo-se com a adição de 25 µL de meio contendo [<sup>3</sup>H]-hipoxantina (0,5 µCi<sup>25</sup> por poço) e mais 18 h de incubação. Após esse período as microplacas foram congeladas (-20°C por no mínimo 24 h), para promover a lise das hemácias. O lisado celular foi transferido para filtros de fibra de vidro com auxílio de um coletor de células seguido de adição de líquido de cintilação e leitura da radioatividade, registrada em leitor automático. A inibição do crescimento do parasita foi avaliada através dos níveis de incorporação de [<sup>3</sup>H]-hipoxantina e os percentuais de redução do crescimento foram calculados a partir da média de contagem por minuto (cpm).

4. **Avaliação dos derivados:** as placas foram incubadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, por 48 h na presença das substâncias. Após esse período as microplacas foram congeladas (-20°C por no mínimo 24 h), para promover a lise das hemácias. O lisado celular foi transferido para placas de 96 poços, aos quais foram adicionados 100 µL de reagente de Malstat<sup>26</sup> e 25 µL de reagente NBT/PES<sup>27</sup>. Após 1 h de incubação, a absorvância das placas foi registrada em espectrofotômetro (540 nm). Os percentuais de redução do crescimento dos parasitos foram calculados a partir da absorvância.

5. Os resultados foram avaliados no programa Origin 8.0 com determinação das curvas dose-resposta traçadas com ajuste sigmoidal. Foram determinadas as concentrações inibitórias do crescimento de 50% dos parasitos (IC<sub>50</sub>) em relação aos controles sem substâncias-teste. De acordo com os resultados, as amostras foram classificadas conforme escala padronizada pelo grupo da Rede Malária PRONEX CNPq/FAPEMIG (UFMG) em:

---

<sup>25</sup> µCi: micro Curie, unidade não SI de radioatividade (1 µCi= 3,7x10<sup>4</sup> desintegrações/segundo).

<sup>26</sup> **Reagente de Malstat:** L-lactato de sódio (20 mg), tampão TRIS básico (5,5 mg), 3-acetilpiridina adenina dinucleotideo – APAD (3,7 mg), H<sub>2</sub>O destilada (1 mL).

<sup>27</sup> **Reagente NBT/PES:** nitrozul de tetrazólio (NBT, 1,6 mg), etosulfato de fenazina (PES, 0,1 mg), H<sub>2</sub>O destilada (1 mL).

**Muito ativas:** valores de IC<sub>50</sub> abaixo de 1 µg/mL

**Ativas:** valores de IC<sub>50</sub> de 1 até 15 µg/mL

**Moderadamente ativas:** valores de IC<sub>50</sub> entre 15,1 e 25 µg/mL

**Pouco ativas:** valores de IC<sub>50</sub> entre 25,1 e 50 µg/mL

**Inativas:** IC<sub>50</sub> acima de 50 µg/mL

### 3.5.3.1. Citotoxicidade

Os derivados mais ativos foram submetidos aos testes de citotoxicidade *in vitro* usando a linhagem celular HepG2 A16, derivada de um hepatoblastoma primário humano (VAROTTI, 2008; VAROTTI *et al.*, 2008). Resumidamente, as células derivadas da linhagem celular HepG2 foram distribuídas em microplacas de 96 poços (4x10<sup>4</sup> células/poço) e incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> à 37°C por 24 h para a adesão das células à placa. Em seguida foram adicionados 100 µL de meio completo (RPMI 1640 suplementado com 5% SBF e 40 mg/L de gentamicina) contendo diferentes concentrações das substâncias testadas (1, 10, 100 e 1000 µg/mL) em triplicata. As placas foram incubadas por mais 24 h. Ao final deste período, foram adicionados 20 µL/poço de uma solução de MTT, na concentração de 5,0 mg/mL (DENIZOT; LANG, 1986). Após 4 h de incubação com o MTT, o sobrenadante foi retirado e 200 µL de uma solução de isopropanol ácido (HCl 0,1 mol/L) foram adicionados em cada poço. As microplacas foram lidas em espectrofotômetro com filtro de 570 nm e um filtro diferencial de 630 nm. Os resultados foram avaliados no programa Origin 8.0 com determinação das curvas dose-resposta traçadas com ajuste sigmoidal. Foram determinadas as concentrações citotóxicas que inibem em 50% o crescimento das células (CC<sub>50</sub>) em relação aos controles sem substâncias-teste.

### 3.5.3.2. Índice de seletividade

Para as amostras consideradas ativas foi calculado o índice de seletividade (IS), que é dado pela razão entre o valor obtido para CC<sub>50</sub> em células HepG2 e o valor de IC<sub>50</sub> para *P. falciparum*. Por meio do IS é possível inferir se a amostra possui um efeito direcionado apenas ao parasito ou se sua ação ocorre devido a sua toxicidade para quaisquer tipos celulares.

### 3.5.4. Atividade anti-HIV

A avaliação da atividade antirretroviral do AB e derivados foi realizada pela Dra. Roberta C. S. Ferreira, do Laboratório de Farmacologia Antiviral e Celular (LAVIC) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), através de um método colorimétrico quantitativo imunoenzimático (Reverse Transcriptase Assay, Roche<sup>®</sup>, Alemanha), utilizando a enzima transcriptase reversa (TR) recombinante do vírus HIV-1. As amostras foram solubilizadas em DMSO, na concentração de 1,0 mg/mL e foi realizado um controle com DMSO, na concentração usada em cada teste, sendo os resultados posteriormente corrigidos. Para verificação da inibição enzimática, a enzima foi incubada da seguinte maneira: 1) sem inibidores (controle da atividade enzimática da TR); 2) com os derivados; e 3) com um inibidor da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeo (ITRNN), o fármaco efavirenz (controle positivo).

Brevemente, foi utilizada TR recombinante do HIV-1, diluída em tampão de lise na concentração de 2 ng/poço e um tempo de incubação de 2 h. Em uma placa de 96 poços, foram adicionados 40 µL de solução com nucleotídeos e um *template/primer* híbrido<sup>28</sup>, 40 µL de tampão de lise com 4 ng de TR recombinante do HIV-1 e 40 µL de tampão de lise com os extratos a serem testados. A placa foi incubada por 2 h a 37°C, para que a TR, utilizando o *template/primer*, pudesse produzir DNA pró-viral, incorporando nucleotídeos marcados com digoxigenina e biotina. Após a incubação, foram transferidos 60 µL desta mistura para cada poço de uma placa tratada com estreptavidina, incubando-se por 1 h a 37°C para que a biotina pudesse ligar o DNA pró-viral sintetizado à superfície da microplaca revestida com estreptavidina. A seguir, cada poço foi lavado cinco vezes com 250 µL de tampão de lavagem e foram adicionados 200 µL/poço da solução de anticorpos anti-digoxigenina conjugados à peroxidase (anti-DIG-POD) na concentração de 200 mU/mL. Incubou-se a placa por 1 h a 37°C, a fim de que o anti-DIG-POD se ligasse ao DNA marcado com digoxigenina. Removeu-se então a solução dos poços e estes foram lavados cinco vezes com 250 µL de tampão de lavagem. Na etapa final adicionou-se 200 µL/poço do substrato para peroxidase ABTS. A enzima peroxidase cataliza a clivagem do substrato, produzindo um produto de reação colorimétrica. A intensidade da coloração das amostras foi determinada utilizando-se

---

<sup>28</sup> **Template/primer híbrido:** Template corresponde à fita molde de RNA, enquanto primer, à sequência iniciadora ou à porção inicial do RNA que será transcrito pela TR. O primer emparelha-se com o template, formando um híbrido.

um leitor de microplaca no comprimento de onda de 490 nm. A intensidade da coloração, e consequentemente a absorvância, está diretamente correlacionada ao nível de atividade da TR na amostra.

A porcentagem de inibição da atividade da TR pelas substâncias testadas foi calculada aplicando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição da TR} = 100 - \left\{ \frac{(\text{Média Abs. T} - \text{Média Abs. B}) \times 100}{\text{Média Abs. CTR} - \text{Média Abs. B}} \right\}$$

onde:

Média Abs. = média da absorvância

T= substância-teste

B = branco

CTR = controle TR (enzima sem inibidores)

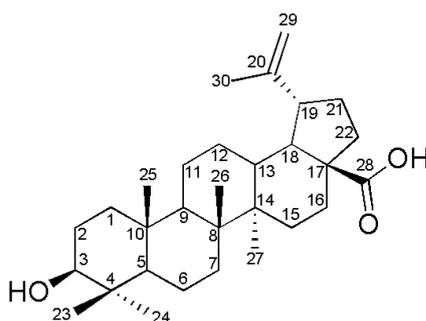
### **3.5.5. Análise estatística**

Os resultados de atividades biológicas estão apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão (DP) das repetições dos experimentos. Para a avaliação estatística, foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de Tukey; um valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Caracterização do ácido betulínico

AB foi isolado das cascas de *P. orientalis* na forma de um sólido cristalino (p.f. 298-300°C), branco, em forma de agulha, solúvel em  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (1:1), num rendimento de 1,82% (p/p); outros métodos de extração usando cascas de *Platanus* spp. relataram rendimentos entre 2 e 6% (p/p) (SAUTER, 2005; PUDER *et al.*, 2007; REN, OMORI, 2011). O espectro de massas apresentou íon molecular  $m/z$  455,3 [M-H]<sup>-</sup>, correspondente a massa de  $m/z$  456 para um composto de fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ . A estrutura do AB foi confirmada por meio de RMN-<sup>1</sup>H e -<sup>13</sup>C, comparando-se os valores de  $\delta$  com os dados relatados na literatura (PENG *et al.*, 1998), conforme a Tabela 2. O espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Fig. 24, pg. 169) apresentou-se bastante sobreposto na região entre 1,0 e 2,5 ppm, característico de hidrogênios ligados a carbonos  $\text{sp}^3$ , condizente com uma estrutura triterpênica. Foi possível observar a presença de singletos correspondentes a hidrogênios dos grupos metila em 0,83; 1,02; 1,06; 1,08; 1,23 e 1,80 ppm (H25; H24; H26; H27; H23; H30), de um multipletto em 3,47 ppm correspondente ao H3, e de singletos largos em 4,78 e 4,95 ppm correspondentes aos hidrogênios da ligação dupla terminal no C29. O espectro de RMN-<sup>13</sup>C (Figs. 25,26, pgs. 169,170) revelou a presença de 28 sinais, tendo em vista que os sinais em 16,4 (C25 e C26) e 37,5 (C10 e C22) ppm correspondem a dois carbonos cada, totalizando 30 carbonos. Foi possível observar sinais de carbonos  $\text{sp}^3$  na região entre 14,0 e 60,0 ppm; um sinal em 78,1 ppm correspondente ao carbono ligado à hidroxila C3; sinais característicos do grupamento olefínico em 109,9 (C29) e 151,3 (C20) ppm; e um sinal em 178,8 ppm do carbono carboxílico C28. A análise do espectro de DEPT (Fig. 27, pg. 170) permitiu confirmar a atribuição dos sinais observados no espectro de RMN-<sup>13</sup>C.



**Tabela 2.** Deslocamentos químicos ( $\delta$ , ppm) de RMN- $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT do ácido betulínico e comparação com valores descritos na literatura.

C	Experimental (Pyr-d5)			PENG <i>et al.</i> (1998) (Pyr-d5)	
	RMN- $^{13}\text{C}$ (50 MHz)	RMN- $^{13}\text{C}$ -DEPT (50 MHz)	RMN- $^1\text{H}$ (200 MHz)	RMN- $^{13}\text{C}$ (180 MHz)	RMN- $^1\text{H}$ (720 MHz)
1	39,3	CH <sub>2</sub>	-	39,3	$\alpha$ : 0,99 ( <i>m</i> ) $\beta$ : 1,67 ( <i>m</i> )
2	28,3	CH <sub>2</sub>	-	28,3	1,85 ( <i>m</i> )
3	78,1	CH	3,47 (1H, <i>m</i> , H3)	78,1	3,45 ( <i>m</i> )
4	39,5	C <sub>q</sub>	-	39,5	-
5	55,9	CH	-	55,9	0,82 ( <i>m</i> )
6	18,8	CH <sub>2</sub>	-	18,8	$\alpha$ : 1,56 ( <i>m</i> ) $\beta$ : 1,38 ( <i>m</i> )
7	34,8	CH <sub>2</sub>	-	34,9	$\alpha$ : 1,45 ( <i>m</i> ) $\beta$ : 1,38 ( <i>m</i> )
8	41,1	C <sub>q</sub>	-	41,1	-
9	51,0	CH	-	51,0	1,38 ( <i>m</i> )
10	37,5	C <sub>q</sub>	-	37,5	-
11	21,2	CH <sub>2</sub>	-	21,2	$\alpha$ : 1,43 ( <i>m</i> ) $\beta$ : 1,21 ( <i>m</i> )
12	26,1	CH <sub>2</sub>	-	26,1	$\alpha$ : 1,21 ( <i>m</i> ) $\beta$ : 1,94 ( <i>m</i> )
13	38,6	CH	-	38,6	2,74 ( <i>m</i> )
14	42,8	C <sub>q</sub>	-	42,9	-
15	30,3	CH <sub>2</sub>	-	30,3	$\alpha$ : 1,26 ( <i>m</i> ) $\beta$ : 1,88 ( <i>m</i> )
16	32,9	CH <sub>2</sub>	-	32,9	$\alpha$ : 1,55 ( <i>m</i> ) $\beta$ : 2,63 ( <i>m</i> )
17	56,6	C <sub>q</sub>	-	56,6	-
18	49,8	CH	-	49,8	1,77 ( <i>m</i> )
19	47,7	CH	-	47,8	3,52 ( <i>m</i> )
20	151,3	C <sub>q</sub>	-	151,3	-
21	31,2	CH <sub>2</sub>	-	31,2	$\alpha$ : 1,53 ( <i>m</i> ) $\beta$ : 2,24 ( <i>m</i> )
22	37,5	CH <sub>2</sub>	-	37,6	$\alpha$ : 1,57 ( <i>m</i> ) $\beta$ : 2,25 ( <i>m</i> )
23	28,7	CH <sub>3</sub>	1,23 (3H, <i>s</i> , H23)	28,7	1,22 ( <i>s</i> )
24	16,3	CH <sub>3</sub>	1,02 (3H, <i>s</i> , H24)	16,3	1,00 ( <i>s</i> )
25	16,4	CH <sub>3</sub>	0,83 (3H, <i>s</i> , H25)	16,4	0,83 ( <i>s</i> )
26	16,4	CH <sub>3</sub>	1,06 (3H, <i>s</i> , H26)	16,4	1,06 ( <i>s</i> )
27	14,9	CH <sub>3</sub>	1,08 (3H, <i>s</i> , H27)	14,9	1,07 ( <i>s</i> )
28	178,8	C <sub>q</sub>	-	178,8	-
29	109,9	CH <sub>2</sub>	4,95 (1H, <i>s</i> , H29) 4,78 (1H, <i>s</i> , H29)	109,9	$\alpha$ : 4,95 ( <i>s</i> ) $\beta$ : 4,77 ( <i>s</i> )
30	19,5	CH <sub>3</sub>	1,80 (3H, <i>s</i> , H30)	19,5	1,79 ( <i>s</i> )

## 4.2. Derivados do ácido betulínico

### 4.2.1. Reações de biotransformação

Os rendimentos dos derivados de AB, obtidos tanto nas reações de biotransformação com fungos quanto com suspensão de células de cenoura, foram notadamente baixos. Entretanto, quando comparados os rendimentos verificados neste estudo com os rendimentos de obtenção de outros derivados descritos na

literatura (pgs. 30,31), observa-se que os valores assemelham-se. Embora os baixos rendimentos sejam comuns em experimentos de biotransformação, representando uma desvantagem em relação às reações de síntese, no caso do AB o fator solubilidade pode contribuir. O AB é uma molécula insolúvel em água, o que representa um grande desafio nos estudos envolvendo essa substância sob ponto de vista biológico e tecnológico. Como os experimentos de biotransformação normalmente são conduzidos em meio aquoso, é possível que parte do AB precipite e não esteja disponível para a conversão enzimática. Nesse estudo foi observado que os derivados foram identificados apenas nos extratos do micélio - com exceção de Myc15b, também verificado no caldo – ou no extrato das células de cenoura, ou seja, o AB foi absorvido e interiorizado pelas células dos fungos e de cenoura, para então ser bioconvertido pela maquinaria enzimática no interior das células. O transporte de AB através da membrana e parede celulares também constitui um fator limitante, que associado a baixa solubilidade em meio aquoso, pode ter contribuído para os baixos rendimentos.

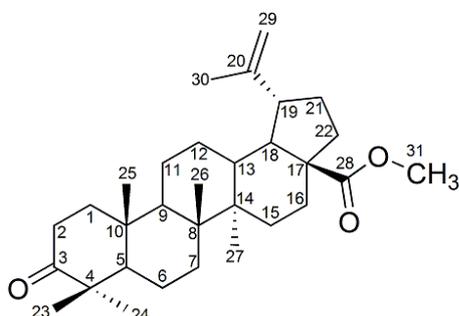
#### **4.2.1.1. Caracterização de Myc15b, PEN10b.2 e CEN1**

As substâncias Myc15b, PEN10b.2 e CEN1 foram produtos da biotransformação do AB por *Mycelia sterilia* (15b), *Penicillium* sp. (10b) e suspensão celular de brotos de cenoura, respectivamente. Foram obtidas na forma de um sólido amorfo, amarelo-esbranquiçado, solúvel em  $\text{CHCl}_3$ . Esses derivados foram analisados por CCD (DCM:MeOH, 99:1) através de comparação com padrão de ácido betulônico, confirmando sua identidade. Os espectros de RMN- $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , exemplificados por Myc15b (Figs. 28,29, pg. 171), foram analisados, evidenciando a presença de 30 carbonos, com valores de deslocamentos ( $\delta$ ) semelhantes aos observados para o ácido betulônico, tanto em dados experimentais (vide seção 4.2.2.1. *DAB1 - ácido betulônico*, pg. 98) quanto em dados da literatura (SATIRAPHAN *et al.*, 2012).

O ácido betulônico é o produto da oxidação do C3 do AB, e portanto, um dos derivados mais simples dessa molécula. O ácido betulônico já foi obtido por outros autores em reações de biotransformação com micro-organismos e enzimas que catalisam reações de oxidação de álcoois primários e secundários, como as desidrogenases, podem estar envolvidas na obtenção dessas moléculas por meio dessa técnica.

#### 4.2.1.2. Caracterização de PEN10b.1

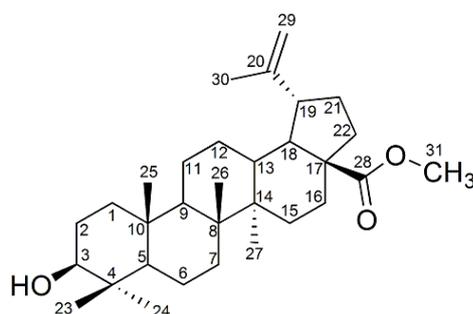
3-oxolup-20(29)-en-28-oato de metila (PEN10b.1) foi isolado como uma substância resinosa, amorfa, amarelada, solúvel em  $\text{CHCl}_3$ , produto da biotransformação de AB por *Penicillium* sp. O espectro de RMN- $^1\text{H}$  (Fig. 30, pg. 172) evidenciou a presença de sinais em 0,92; 0,95; 0,97; 1,02; 1,07 e 1,69 ppm correspondentes aos grupos metila; de um singlete em 3,67 ppm (H31) correspondente ao grupo metila do éster em C28; e de dois singletos em 4,60 (H29) e 4,74 (H29) ppm correspondentes aos hidrogênios da ligação dupla terminal do C29. Não foi verificada a presença do multiplete em 3,47 ppm correspondente ao hidrogênio do C3 ligado a hidroxila observado para AB. O espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (Fig. 31, pg. 172) revelou a presença de 31 carbonos. A presença de um sinal de carbonila cetônica em 218,1 ppm mostrou que o C3 de AB foi oxidado. A presença de um sinal de metoxila adicional em 51,3 ppm, o qual foi definido como carbono metílico pelo experimento de DEPT (Fig. 32, pg. 173), e a alteração de deslocamento do C28 de 178,8 (AB) para 176,6 ppm, evidenciaram a esterificação do grupo carboxílico na posição C28, confirmando que PEN10b.1 corresponde ao éster metílico do ácido betulônico.



AB foi modificado simultaneamente nas posições C3 e C28. Entretanto, a conversão do ácido betulônico a 3-oxolup-20(29)-en-28-oato de metila já foi descrita por Qian e colaboradores (2009b) utilizando a bactéria *Nocardia* sp. NRRL 5646 como biocatalisador. Segundo Zhang e colaboradores (2005), esta bactéria é frequentemente usada em biotransformações devido ao seu amplo espectro de atividades enzimáticas, incluindo redução de ácidos carboxílicos e aldeídos, metilação de fenóis e rearranjos, e ainda é eficiente na conversão de substratos a derivados menos polares. Entretanto, não há relatos na literatura da conversão biológica catalisada pelo fungo *Penicillium* sp.

#### 4.2.1.3. Caracterização de PEN13b

3-hidroxi-20(29)-en-28-oato de metila foi isolado na forma de um sólido cristalino, em forma de agulha, amarelo-esbranquiçado, parcialmente solúvel em  $\text{CHCl}_3$ , solubilizando totalmente com a adição de algumas gotas de MeOH, produto da biotransformação de AB por *Penicillium citreonigrum*. Pelo espectro de RMN- $^1\text{H}$  (Fig. 33, pg. 173) foram visualizados sinais em 0,79; 0,82; 0,92; 0,97; 1,00 e 1,69 ppm, correspondentes às metilas; de um singlete em 3,66 ppm (H31) correspondente ao grupo metila do éster em C28; e de dois singletos em 4,61 (H29) e 4,75 (H29) ppm correspondentes aos hidrogênios olefínicos do C29. O espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (Fig. 34, pg. 174) revelou a presença de 31 carbonos, destacando-se a presença do carbono carbinólico em 78,5 ppm (C3) e o carbono carboxílico em 176,6 ppm (C28), este último apresentando alteração de deslocamento em torno de 2 ppm em relação ao AB. A presença de um carbono adicional em 51,2 ppm (C31), o qual foi definido como carbono metílico pelo experimento DEPT (Fig. 35, pg. 174), confirmou que o ácido carboxílico (C28) de AB foi metilado, convertendo-o em um éster metílico.

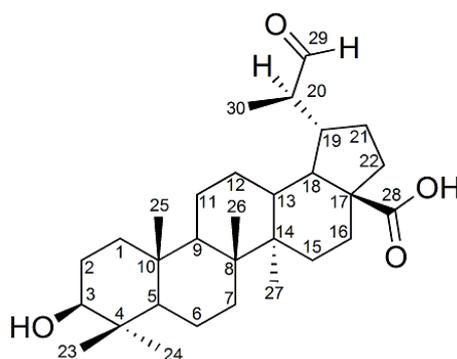


A conversão de AB ao seu respectivo éster metílico também já foi descrita utilizando a bactéria *Nocardia* sp. NRRL 5646 (ZHANG *et al.*, 2005), porém não há relatos na literatura descrevendo essa conversão pelo fungo *P. citreonigrum*. Em relação às metilações, segundo o mesmo autor, a formação de ésteres metílicos provavelmente é devido a enzimas metiltransferases S-adenosilmetionina-dependente.

#### 4.2.1.4. Caracterização de CEN2

Ácido 3-hidroxi-(20*R*)-29-oxolupan-28-oico foi obtido na forma de um sólido amorfo, esbranquiçado, parcialmente solúvel em  $\text{CHCl}_3$ , totalmente solúvel após adição de algumas gotas de MeOH, produto da biotransformação de AB por

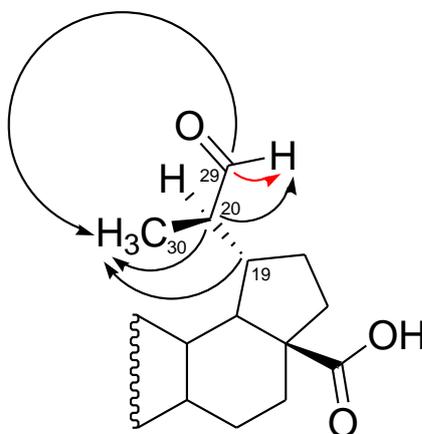
suspensão celular de cenoura. O espectro de massas apresentou íon molecular  $m/z$  471,3 [M-H]<sup>-</sup>, correspondente a massa de  $m/z$  472 para um composto de fórmula molecular C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>4</sub>. No espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Fig. 36, pg. 175) foram observados singletos em 0,82; 0,83; 0,98 e 1,04 ppm, e um duplete em 1,11 ppm, correspondentes aos grupos metila; e de um sinal em 9,88 ppm (H29) correspondente ao hidrogênio de um grupamento aldeído. A ausência dos sinais da ligação dupla terminal verificados em AB evidenciaram a modificação na posição C29. O espectro de RMN-<sup>13</sup>C (Fig. 37, pg. 175) mostrou 29 sinais de carbonos, sendo que o sinal em 15,7 ppm (C24 e C25) corresponde a dois carbonos. Destacam-se o carbono carbinólico em 78,2 ppm (C3) e o carbono carboxílico em  $\delta$  178,9 (C28). A ausência dos sinais característicos da ligação dupla terminal verificados em AB, e a presença de um sinal em 207,0 ppm (C29) confirmaram que houve modificação no grupo isopropenil de AB. Pelo espectro de DEPT (Fig. 38, pg. 176) foi possível verificar que o C29 é um carbono metínico.



Através da análise do mapa de correlação de HSQC (Fig. 39, pg. 176) foi observado que o C29 apresenta correlação com o H29, evidenciando o grupamento aldeído. O mapa de correlação de HMBC (Fig. 40, pg. 177) mostrou que o C29 possui correlação com o H30; que o C20 (49,4 ppm) correlaciona-se com os H29 e H30; e que o C19 (42,7 ppm) possui correlação com o H30. Estes experimentos em conjunto confirmaram que AB sofreu modificação na região da ligação dupla terminal para um grupo aldeído (Esquema 1).

Com relação a estereoquímica da posição C20, a estrutura trata-se provavelmente de um enantiômero (*R*), uma vez que dados de RMN da literatura (SANTOS *et al.*, 2009) de derivados aldeídicos da betulina obtidos por síntese indicam que valores próximos a 206,8 ppm (<sup>13</sup>C, C29), 9,86 ppm (<sup>1</sup>H, H29) e

1,10 ppm ( $^{-1}\text{H}$ , H30) na região do grupo isopropenil são característicos de enantiômero (*R*).



**Esquema 1.** Acoplamentos de HSQC (seta vermelha) e HMBC (setas pretas) na região do grupamento aldeído de CEN2.

A obtenção do derivado aldeído CEN2 pode ter sido precedida por uma reação intermediária de epoxidação. A presença de mono-oxigenases (ex. citocromo P450), enzimas que catalisam reações de epoxidação, em células vegetais, podem ter causado a oxidação do alceno terminal de AB. Além do mais, a instabilidade dos epóxidos pode levar a rearranjos e convertê-los em aldeídos.

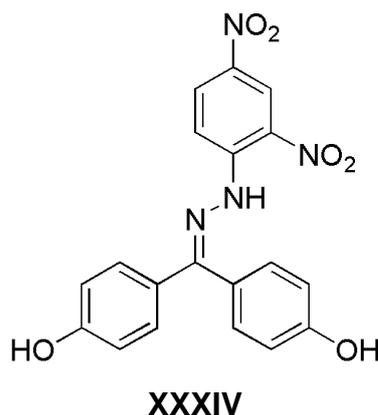
Por outro lado, a ativação da ligação dupla C=C pertence às transformações catalíticas essenciais realizadas por enzimas do grupo heme. Especificamente, o citocromo P450 realiza essa função como forma de desintoxicação de xenobióticos que entram nas células. Convertendo alcenos em epóxidos, esses últimos podem ser transformados adicionalmente em álcoois ou ácidos carboxílicos, os quais são subsequentemente secretados. Essas reações catalíticas de epoxidação, no entanto, são geralmente dificultadas pela aparição de produtos colaterais indesejados, os quais são chamados de complexos suicidas, entre eles aldeídos (VISSER; KUMAR; SHAIK, 2004). Em células vegetais, as proteínas citocromo P450, dentre outras funções, realizam a desintoxicação metabólica de substâncias estranhas (GONZÁLES-MENDOZA, 2007). Devido ao seu caráter eletrofílico, os epóxidos são agentes alquilantes poderosos, tóxicos e por isso incompatíveis com células vivas (FABER, 1997). Por esse motivo, é comum observar na literatura produtos dióis (ou glicóis) oriundos da biotransformação de alcenos (ISHIHARA *et al.*, 2003).

#### 4.2.1.5. Biotransformação por suspensão celular de folhas jovens de macieira

Diferentemente dos calos de cenoura, os calos de macieira eram compactos, sólidos e, após sua transferência para o meio líquido sob agitação contínua, poucas células desprenderam-se e inclusive alguns calos começaram a formar raízes (rizogênese). Portanto, não houve a formação de uma suspensão celular propriamente dita. Após procedimento de extração e análise em CCD, não foi observada a presença de nenhuma substância diferente do controle. Parte dessa ausência de biotransformação pode ser explicada pelo fato do calo de maçã ter permanecido intacto durante a incubação em meio líquido. Como o calo era compacto e as células não se desprenderam do mesmo, a área de contato entre as células e o AB foi muito reduzida, e conseqüentemente sua entrada nas células para a catálise enzimática foi dificultada. De todo modo, também não se pode descartar a hipótese de que as células de macieira não contêm enzimas capazes de biocatalisar o AB.

#### 4.2.2. Semissíntese de derivados

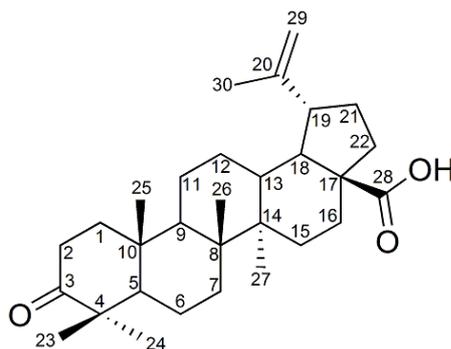
Os derivados 2,4-DNPH do AB foram preparados tendo em vista que outras substâncias que compartilhavam o mesmo grupo funcional mostraram-se bastante ativas contra células cancerígenas. Um exemplo é a 4,4'-di-hidroxi-benzofenona-2,4-dinitrofenil-hidrazona (**XXXIV**), considerada muito ativa contra câncer metastático cutâneo e ainda apresentou resultados positivos em ensaios antitumorais contra câncer de mama, melanoma e linfoma não-Hodgkin, quando aplicada via tópica, isenta de toxicidade significativa (MORGAN *et al.*, 2002; EILENDER *et al.*, 2006). Derivados hidrazônicos do AB, como 3-fenil-hidrazona (MUKHERJEE *et al.*, 2004), benzoil-hidrazona e 4-fluorofenil-hidrazona (RAJENDRAN *et al.*, 2008) também mostraram-se promissores em estudos prévios. Desta forma, considerando o potencial biológico desta classe de substâncias, foi proposta a semissíntese de derivados 2,4-DNPH do AB. As estruturas intermediárias (DAB1, DAB7, DAB10 e DAB12), já conhecidas, foram sintetizadas e avaliadas biologicamente a fins de comparação.



#### 4.2.2.1. DAB1 - ácido betulônico

Ácido betulônico foi isolado na forma de um sólido amorfo branco-amarelado (p.f. 250-252°C), solúvel em  $\text{CHCl}_3$ , produto da reação de oxidação de Jones do álcool secundário (C3) por meio do ácido crômico em acetona (HARDING; MAY; DICK, 1975). O rendimento da reação foi de 57,7%; Bastos (2005) relatou um rendimento de 67%. O espectro de massas apresentou íon molecular  $m/z$  453,3 [M-H]<sup>-</sup> correspondente a massa de  $m/z$  454 para um composto de fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3$ .

Através do espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Fig. 41, pg. 177) foi possível observar sinais de grupos metila em 0,93; 0,97; 0,99; 1,02; 1,07 e 1,69 ppm, e de dois singletos em 4,62 (H29) e 4,75 (H29) ppm correspondentes aos hidrogênios olefínicos. Foi verificada a ausência do multiplete em 3,47 ppm, característico de H3 do AB. O espectro de RMN-<sup>13</sup>C (Fig. 42, pg. 178) revelou a presença de 30 carbonos, que através da comparação com o espectro de DEPT (Fig. 43, pg. 178) puderam ser definidos como quaternários (8), metínicos (5), metilênicos (11) e metílicos (6). Foi possível identificar os carbonos  $\text{sp}^3$  típicos da estrutura triterpênica do esqueleto lupano com deslocamentos entre 14 e 60 ppm; os carbonos da ligação dupla terminal em 109,8 (C29) e 150,3 (C20) ppm e o carbono carboxílico em 182,4 ppm (C28). Um sinal em 218,3 ppm evidenciou a oxidação da hidroxila do C3 de AB, assim como alterações nos deslocamentos dos C2 e C4 em relação ao precursor de, respectivamente, 5,8 e 7,8 ppm. Estes dados coincidem com os relatados para o ácido betulônico (SATIRAPHAN *et al.*, 2012) e estão descritos na Tabela 3.

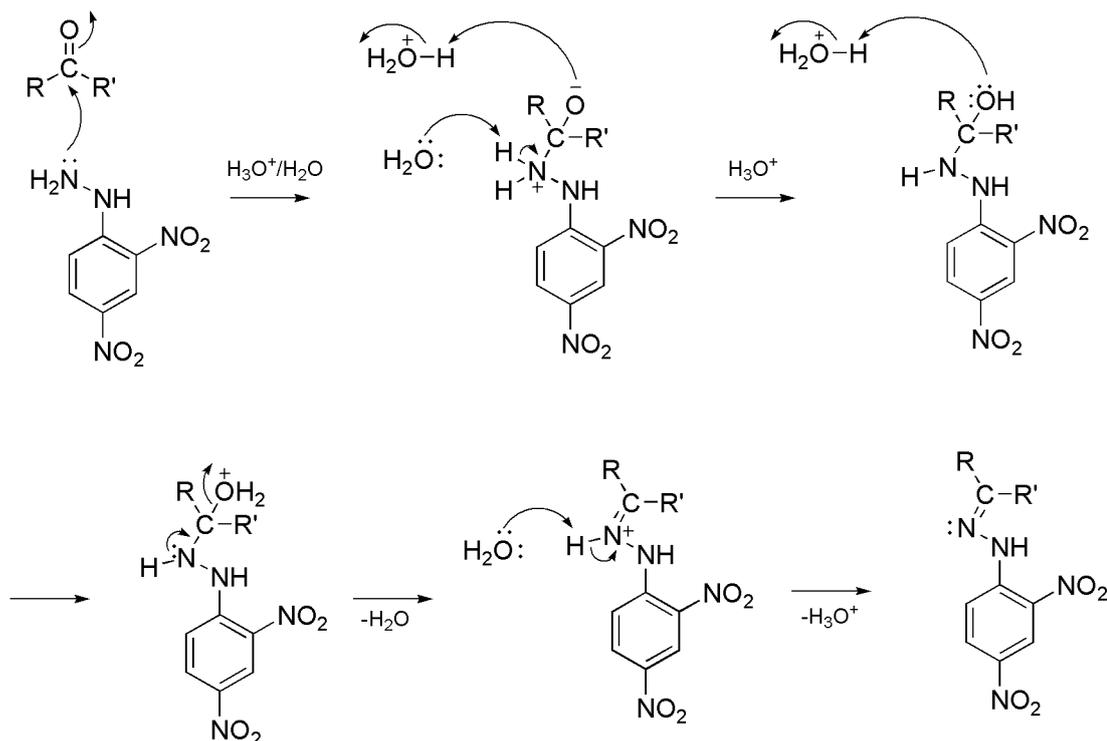


**Tabela 3.** Deslocamentos químicos ( $\delta$ , ppm) de RMN- $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT do ácido betulônico (DAB1) e comparação com valores relatados na literatura.

C	Experimental ( $\text{CDCl}_3$ )			SATIRAPHAN <i>et al.</i> , 2012 ( $\text{CDCl}_3$ )	
	RMN- $^{13}\text{C}$ (50 MHz)	RMN- $^{13}\text{C}$ -DEPT (50 MHz)	RMN- $^1\text{H}$ (200 MHz)	RMN- $^{13}\text{C}$ (75 MHz)	RMN- $^1\text{H}$ (400 MHz)
1	39,6	$\text{CH}_2$	-	39,6	1,38 (m) 1,91 (m)
2	34,1	$\text{CH}_2$	-	34,1	2,42 (m) 2,50 (m)
3	218,3	$\text{C}_q$	-	218,2	-
4	47,3	$\text{C}_q$	-	47,3	-
5	55,0	CH	-	54,9	1,35 (m)
6	19,6	$\text{CH}_2$	-	19,6	1,52 (m)
7	33,6	$\text{CH}_2$	-	33,6	1,44 (m)
8	40,7	$\text{C}_q$	-	40,6	-
9	49,9	CH	-	49,9	1,38 (s)
10	36,9	$\text{C}_q$	-	36,9	-
11	21,4	$\text{CH}_2$	-	21,4	1,34 (m) 1,44 (m)
12	25,5	$\text{CH}_2$	-	25,4	1,06 (m) 1,73 (m)
13	38,5	CH	-	38,5	2,23 (m)
14	42,5	$\text{C}_q$	-	42,5	-
15	30,6	$\text{CH}_2$	-	30,5	1,42 (m) 1,99 (m)
16	32,1	$\text{CH}_2$	-	32,1	1,44 (m) 2,28 (m)
17	56,4	$\text{C}_q$	-	56,3	-
18	49,2	CH	-	49,2	1,64 (m)
19	46,9	CH	-	46,9	3,02 (td)
20	150,3	$\text{C}_q$	-	150,3	-
21	29,7	$\text{CH}_2$	-	29,7	1,22 (m) 1,54 (m)
22	37,1	$\text{CH}_2$	-	37,0	1,47 (m) 1,99 (m)
23	26,7	$\text{CH}_3$	1,07 (3H, s, H23)	26,6	1,08 (3H, s)
24	21,0	$\text{CH}_3$	1,02 (3H, s, H24)	21,0	1,03 (3H, s)
25	15,9	$\text{CH}_3$	0,93 (3H, s, H25)	16,0	0,94 (3H, s)
26	15,8	$\text{CH}_3$	0,97 (3H, s, H26)	15,8	0,99 (3H, s)
27	14,6	$\text{CH}_3$	0,99 (3H, s, H27)	14,6	1,00 (3H, s)
28	182,4	$\text{C}_q$	-	180,8	-
29	109,8	$\text{CH}_2$	4,62 (1H, s, H29); 4,75 (1H, s, H29)	109,8	4,62 (1H, s) 4,75 (1H, s)
30	19,4	$\text{CH}_3$	1,69 (3H, s, H30)	19,4	1,70 (3H, s)

#### 4.2.2.2. DAB2 – ácido 3-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]lup-20(29)-en-28-oico

Ácido 3-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]lup-20(29)-en-28-oico foi obtido como um sólido amorfo, alaranjado, solúvel em  $\text{CHCl}_3$ , produto da reação de adição-eliminação nucleofílica (ou condensação) entre o grupo cetona de DAB1 e 2,4-DNP em meio ácido; ocorreu a adição nucleofílica do grupo  $-\text{NH}_2$  ao grupo  $-\text{C}=\text{O}$ , seguida da eliminação de uma molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  (Esquema 2).

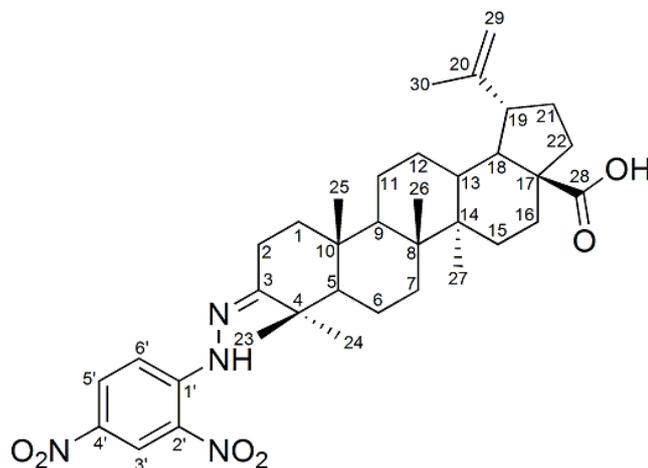


**Esquema 2.** Mecanismo geral da reação de adição-eliminação nucleofílica entre aldeídos/cetonas e 2,4-dinitrofenil-hidrazina, formando um derivado 2,4-dinitrofenil-hidrazona. Baseado em mecanismo descrito por Bruckner (2002).

O espectro de massas apresentou íon molecular  $m/z$  667,4  $[\text{M}+\text{CH}_3\text{OH}+\text{H}]^+$ , correspondente a massa de  $m/z$  634 para um composto de fórmula molecular  $\text{C}_{36}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_6$ . No espectro de RMN- $^1\text{H}$  (Fig. 44, pg. 179) foi possível observar a presença de hidrogênios metílicos em 0,94; 0,99; 1,00; 1,15; 1,28 e 1,70 ppm, e de dois singletos em 4,62 (H29) e 4,75 (H29) ppm correspondentes aos hidrogênios olefínicos do C29. Em região mais desblindada do espectro foram observados sinais em 7,94, 8,29 e 9,12 ppm correspondentes aos hidrogênios do anel 2,4-dinitrobenzeno, e de um sinal em 11,17 ppm relacionado a hidrogênio do grupo hidrazona.

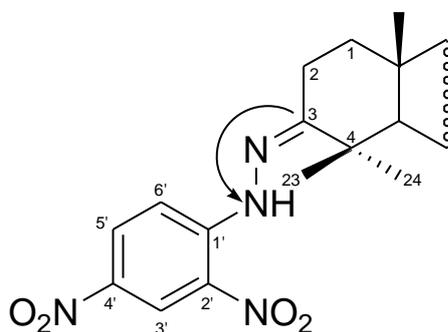
No espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (Fig. 45, pg. 179) foram observados 35 sinais de carbonos, tendo em vista que o sinal em 37,1 ppm (C10 e C22) corresponde a dois

carbonos, totalizando 36 carbonos, sendo estes definidos pelo espectro de DEPT (Fig. 46, pg. 180) como carbonos quaternários (11), metínicos (8), metilênicos (11) e metílicos (6). Foi possível identificar os carbonos  $sp^3$  típicos da estrutura triterpênica do esqueleto lupano com deslocamentos entre 14 e 60 ppm, os carbonos da ligação dupla terminal em 109,8 (C29) e 150,3 (C20) ppm, e o carbono carboxílico em 182,4 ppm (C28). O grupo dinitrofenil-hidrazona foi confirmado pela presença dos carbonos do grupo 2,4-dinitrobenzeno em 145,6 (C1'), 129,0 (C2'), 123,6 (C3'), 137,5 (C4'), 129,9 (C5') e 116,5 (C6'). A formação da 2,4-dinitrofenil-hidrazona foi evidenciada principalmente pela ausência do sinal da carbonila cetônica no C3 observado em DAB1 (218,3 ppm), e pela presença de um sinal em 167,4 ppm, assim como alterações nos deslocamentos dos C2 (20,8 ppm), C4 (42,3 ppm) e C24 (23,8 ppm).



A modificação no C3 e a atribuição dos sinais de RMN- $^1H$  e - $^{13}C$  foi confirmada pelos mapas de correlação de HSQC e HMBC. A análise do mapa de contornos de HMBC (Fig. 47, pg. 180) permitiu observar correlação entre o carbono em 167,4 ppm (C3) com o hidrogênio em 11,17 ppm (-NH), evidenciando o grupamento hidrazona no C3 (Esquema 3). O C3 correlacionou-se ainda com os H23 e H24. Na região da ligação dupla terminal, os carbonos em 109,8 (C29), 150,3 (C20) e 47,0 (C19) ppm apresentaram correlação com H30 (1,70 ppm). Os C19 e C30 (19,4 ppm) ainda correlacionaram-se com os hidrogênios vinilidênicos (H29) em 4,62 e 4,75 ppm. Essas correlações confirmaram a atribuição dos sinais na região isopropenilica. O mapa de correlação de HSQC (Fig. 48, pg. 181) permitiu identificar os hidrogênios dos C23, C24, C25, C26, C27, C29 e C30, além dos hidrogênios do

grupo 2,4-DNPH. O mapa de correlação de COSY (Fig. 49, pg. 181) demonstrou correlação entre H29 e H30, H3' e H5', e H5' e H6'.



**Esquema 3.** Acoplamento de HMBC mostrando correlação do C3 com o hidrogênio do grupamento hidrazona em DAB2.

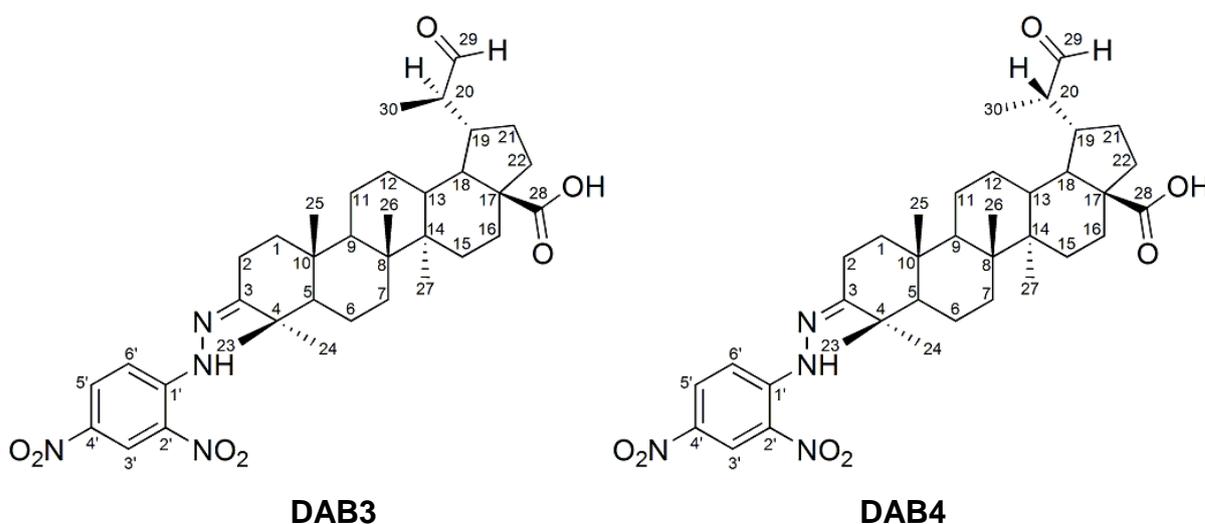
#### 4.2.2.3. DAB3 – ácido 3-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]lup-(20R)-29-oxolupan-28-oico e DAB4 – ácido 3-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]lup-(20S)-29-oxolupan-28-oico

Na tentativa de epoxidação da olefina terminal de DAB2 com *m*-CPBA, o epóxido sofreu rapidamente rearranjo para aldeídos, sendo obtido o ácido 3-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]lup-(20R)-29-oxolupan-28-oico na forma de um sólido amorfo, alaranjado, solúvel em  $\text{CHCl}_3$ . O rearranjo de substituição de hidrogênio 1,2 de epóxidos terminais tem sido explorado para a preparação de aldeídos quirais (ZHUANG; DU, 2013). O espectro de massas apresentou íon molecular  $m/z$  649,5 [M-H]<sup>-</sup>, correspondente a massa de  $m/z$  650 para um composto de fórmula molecular  $\text{C}_{36}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_7$ . Da mesma forma obteve-se o ácido 3-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]lup-(20S)-29-oxolupan-28-oico com as mesmas características.

Nos espectros de RMN-<sup>1</sup>H (Figs. 50,55, pgs. 182,184) de ambas as substâncias foram observados singletos correspondentes aos hidrogênios metílicos entre 0,93 e 1,29 ppm (H23 a H27). Os H30 foram observados em 1,11 e 1,00 ppm, respectivamente, para DAB3 e DAB4. Em região mais desblindada do espectro foram observados sinais entre 7,94 e 9,11 ppm, que correspondem aos hidrogênios H3', H5' e H6' do anel dinitrobenzeno, e do -NH (11,19 e 11,17 ppm) do grupo hidrazona. A diferenciação das duas estruturas deu-se pelo sinal do hidrogênio aldeídico H29 em 9,87 ppm (*d*) para DAB3 e 9,66 ppm (*s*) para DAB4, juntamente com a ausência dos sinais olefínicos observados em DAB2.

No espectro de RMN-<sup>13</sup>C de DAB3 (Fig. 51, pg. 182) foram observados 32 sinais de carbonos, tendo em vista que os sinais em 14,4 (C27 e C30), 37,0 (C10 e

C22), 42,6 (C14 e C19) e 49,4 (C9 e C20) ppm correspondem a dois carbonos cada. Já no espectro de DAB4 (Fig. 56, pg. 185) foram evidenciados 35 sinais de carbonos, sendo que o sinal em 37,0 ppm (C10 e C19) corresponde a dois carbonos. Os sinais do carbono aldeídico (C29) e do C30 foram observados em 207,2 ppm e 14,4 ppm para DAB3, e 204,8 ppm e 6,79 ppm para DAB4. Pelos espectros de DEPT de ambas as substâncias (Figs. 52,57, pgs. 183,185) observou-se que os C29 são carbonos metínicos.



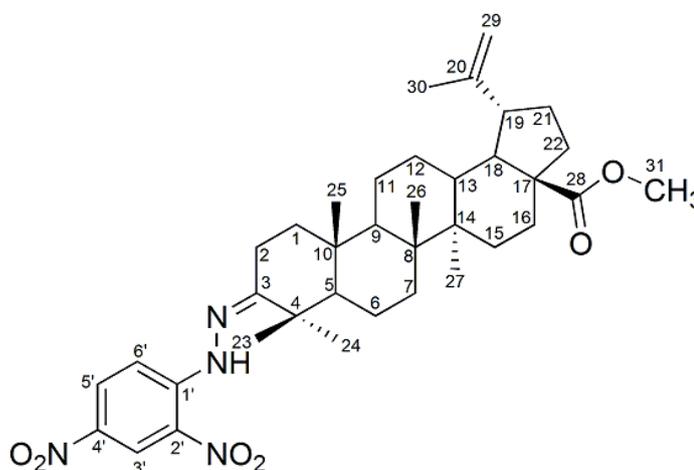
Através dos mapas de correlação de HSQC (Figs. 53,58, pgs. 183,186) foi observada a correlação dos C29 com H29. Os mapas de correlação de HMBC (Figs. 54,59, pgs. 184,186) revelaram correlação dos C29 com H30; DAB3 apresentou ainda correlações entre C20/H29 e H30, enquanto que para DAB4 os C30/H29 e C20/H30 e H29 correlacionaram-se entre si. A estereoquímica do C20 foi definida de acordo com Santos e colaboradores (2009), que após a síntese de aldeídos da betulina diferenciaram os isômeros *R* ( $\delta_{H29}$ : 9,86 e  $\delta_{H30}$ : 1,10;  $\delta_{C29}$ : 206,8) e *S* ( $\delta_{H29}$ : 9,62 e  $\delta_{H30}$ : 1,04;  $\delta_{C29}$ : 204,8).

#### 4.2.2.4. DAB5 – 3-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]-lup-20(29)-en-28-oato de metila

A esterificação do C28 com diazometano produziu o 3-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]-lup-20(29)-en-28-oato de metila, que foi obtido na forma de um sólido amorfo, alaranjado, solúvel em  $CHCl_3$ . Na formação do éster metílico, o ácido carboxílico protonou o diazometano, formando um íon diazônio altamente instável; em seguida, ocorreu uma substituição nucleofílica  $S_N2$  do grupo  $-N_2$  do íon diazônio pelo carboxilato formado anteriormente. O espectro de massas apresentou

íon molecular  $m/z$  647,1  $[M-H]^-$ , correspondente a massa de  $m/z$  648 para um composto de fórmula molecular  $C_{37}H_{52}N_4O_6$ .

Pelo espectro de RMN- $^1H$  (Fig. 60, pg. 187) foi identificado um sinal adicional em 3,68 ppm (H31), de metila ligada a oxigênio, quando comparado ao espectro de DAB2. O espectro de RMN- $^{13}C$  (Fig. 61, pg. 187) mostrou 37 carbonos. O carbono carboxílico (C28) de DAB5 (176,6 ppm) sofreu alteração de deslocamento de 5,8 ppm em relação a DAB2 (182,4 ppm), em decorrência da formação do éster metílico. O carbono adicional em 51,3 ppm (C31), definido como carbono metílico pelo experimento DEPT (Fig. 62, pg. 188), foi observado.



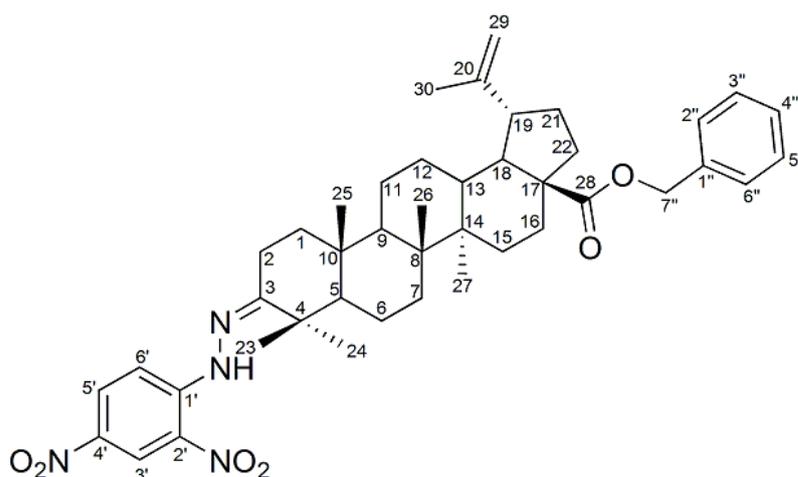
O mapa de correlação de HSQC (Fig. 63, pg. 188) mostrou correlação dos sinais em 51,3 (C31) e 3,68 (H31) ppm. O mapa de correlação de HMBC (Fig. 64, pg. 189) evidenciou a correlação do C28 com o H31, confirmando a esterificação do grupamento ácido carboxílico.

#### 4.2.2.5. DAB6 – 3-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]lup-20(29)-en-28-oato de benzila

A reação de substituição nucleofílica de DAB1 com cloreto de benzila e  $K_2CO_3$  formou o éster benzílico e, posteriormente, a reação da cetona (C3) com 2,4-DNP em meio ácido forneceu o 3-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]lup-20(29)-en-28-oato de benzila, obtido na forma de uma substância de aspecto resinoso, alaranjada, solúvel em  $CHCl_3$ . O espectro de massas apresentou íon molecular  $m/z$  723,5  $[M-H]^-$ , correspondente a massa de  $m/z$  724 para um composto de fórmula molecular  $C_{43}H_{56}N_4O_6$ .

No espectro de RMN- $^1H$  (Fig. 65, pg. 189) foram observados sinais em 5,12 e 5,20 ppm (H7''), correspondente aos hidrogênios ligados ao carbono metilênico do

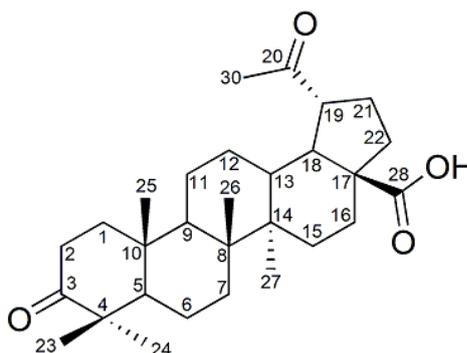
grupo benzila. Em região mais desblindada do espectro foi observado um multipeto em 7,36 ppm (H2'' a H6''), correspondente aos hidrogênios aromáticos do benzoato. No espectro de RMN-<sup>13</sup>C (Fig. 66, pg. 190) foram observados 41 sinais de carbono, sendo que os sinais em 128,2 ppm (C2'' e C6'') e 128,5 ppm (C3'' e C5'') correspondem a dois carbonos cada, totalizando 43 carbonos. A formação da ligação hidrazona com o C3 foi confirmada pela ausência do carbono cetônico em 218,1 ppm do ácido betulônico, substituído por um carbono em 167,4 ppm. Em relação a DAB2 (182,4 ppm), o carbono carboxílico (C28) de DAB6 (175,8 ppm) sofreu alteração de deslocamento de 6,6 ppm, devido ao efeito de blindagem do anel aromático ou efeito anisotrópico. O grupo benzila foi evidenciado pela presença dos carbonos aromáticos em 136,5 (C1''), 128,2 (C2'', C6''), 128,5 (C3'', C5'') e 128,1 (C4'') ppm, e também do carbono metilênico em 65,8 ppm (C7''). A atribuição dos sinais observados no espectro de RMN-<sup>13</sup>C foi confirmada através de comparação com o espectro de DEPT (Fig. 67, pg. 190).



O mapa de correlação de HSQC (Fig. 68, pg. 191) mostrou correlação do C7'' com H7'' e dos C2'', C4'' e C6'' com 7,36 ppm (H2''-H6''). A esterificação do carbono carboxílico com o grupo benzila foi evidenciada pelo mapa de correlação de HMBC (Fig. 69, pg. 191), que mostrou correlação do C28 com H7''. Também foi observada correlação do C7'' com o sinal em 7,36 ppm e dos carbonos em 128,2 ppm (C2'' e C6'') e 136,5 ppm (C1'') com H7''. O mapa de correlação de HMBC mostrou correlação do C3 com o sinal em 11,16 ppm (-NH), e também com H23 e H24.

#### 4.2.2.6. DAB7 – ácido 3,20-dioxo-29-norlupan-28-oico

A clivagem oxidativa do alceno terminal de DAB1 com OsO<sub>4</sub> e NaIO<sub>4</sub> (oxidação de Lemieux-Johnson) forneceu o ácido 3,20-dioxo-29-norlupan-28-oico, obtido na forma de um sólido amorfo, branco-acinzentado, solúvel em CHCl<sub>3</sub>. O espectro de massas apresentou íon molecular  $m/z$  933,3 [2M+Na-2H]<sup>-</sup>, correspondente a massa de  $m/z$  456 para um composto de fórmula molecular C<sub>29</sub>H<sub>44</sub>O<sub>4</sub>. Em relação a DAB1, no espectro de RMN-<sup>1</sup>H de DAB7 (Fig. 70, pg. 192) foi observado que o sinal de H30 deslocou-se para região mais desblindada, em 2,19 ppm. No espectro de RMN-<sup>13</sup>C (Fig. 71, pg. 192) observou-se 29 carbonos, uma vez que o C29 foi oxidado a uma cetona (C20), com deslocamento em 212,2 ppm, além da cetona (C3) em 218,3 ppm. A ausência dos sinais correspondentes ao grupo olefínico terminal confirmou a oxidação na posição C29 de DAB1.

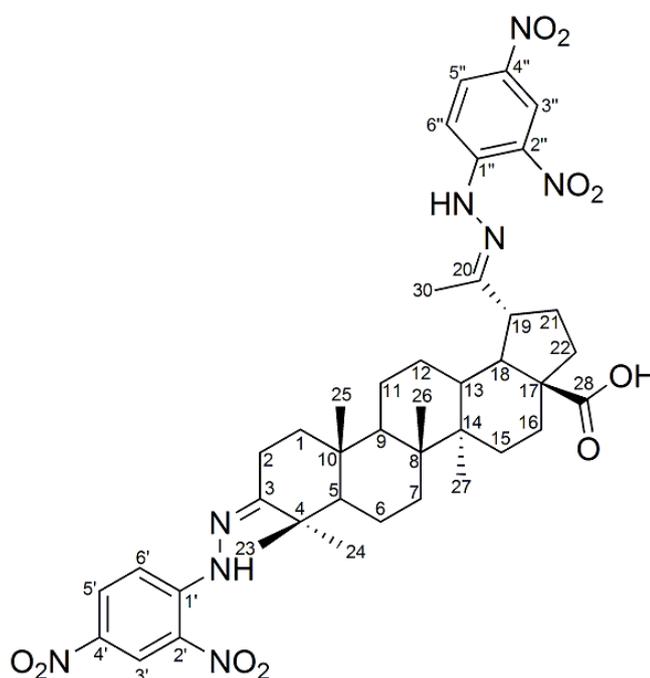


#### 4.2.2.7. DAB8 – ácido 3,20-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]lupan-28-oico

A reação de condensação de DAB7 com 2,4-DNP em meio ácido forneceu o ácido 3,20-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]lupan-28-oico, obtido na forma de um sólido amorfo, alaranjado, solúvel em CHCl<sub>3</sub>. O espectro de massas apresentou íon molecular  $m/z$  815 [M-H]<sup>-</sup>, correspondente a massa de  $m/z$  816 para um composto de fórmula molecular C<sub>41</sub>H<sub>52</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>.

Pelo espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Fig. 72, pg. 193) foram observados sinais de hidrogênios metílicos entre 0,93 e 2,07 ppm. Em região mais desblindada do espectro foi observada a presença de sinais em 7,94, 8,26, 8,31, 9,09, 9,12 ppm, correspondentes aos dois anéis 2,4-dinitrobenzeno, e de dois sinais em 11,13 (-NH') e 11,05 (-NH'') relacionados ao grupo hidrazona. No espectro de RMN-<sup>13</sup>C (Fig. 73, pg. 193) foram observados 40 sinais de carbonos, sendo que o sinal em 123,6 ppm (C3' e C3'') equivale a dois carbonos, totalizando 41 carbonos. A inserção dos dois

grupos 2,4-dinitrofenil-hidrazona foi confirmada pela presença dos sinais dos carbonos do grupo 2,4-dinitrobenzeno: 145,2 (C1''), 145,5 (C1'), 128,9 (C2''), 129,1 (C2'), 123,6 (C3' e C3''), 137,5 (C4''), 137,6 (C4'), 129,9 (C5'), 130,0 (C5''), 116,3 (C6'') e 116,4 (C6') ppm. Outra diferença em relação a DAB7 foi a ausência dos sinais referentes às duas cetonas (C3 e C20). A alteração no C3 (167,0 ppm) foi evidenciada por uma alteração de deslocamento de 51,3 ppm, enquanto que o C20 (161,4 ppm) sofreu alteração de 50,8 ppm. A atribuição dos sinais observados no espectro de RMN-<sup>13</sup>C foi confirmada através de comparação com o espectro de DEPT (Fig. 74, pg. 194).



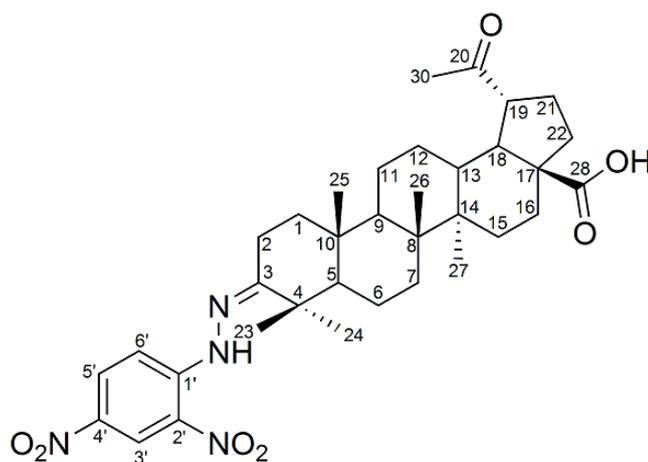
O mapa de correlação de HMBC (Fig. 75, pg. 194) evidenciou correlação do C3 com o hidrogênio em 11,13 ppm, e também com os H23 e H24. O C20, por sua vez, correlacionou-se com o hidrogênio em 11,05 ppm e com o H30.

#### 4.2.2.8. DAB9 – ácido 3-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]-20-oxolupan-28-oico

A reação de condensação de DAB7 com 2,4-DNP em meio ácido forneceu um segundo produto, o ácido 3-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]-20-oxolupan-28-oico, obtido na forma de um sólido amorfo, alaranjado, solúvel em CHCl<sub>3</sub>. O espectro de massas apresentou íon molecular  $m/z$  635,5 [M-H]<sup>-</sup>, correspondente a massa de  $m/z$  636 para um composto de fórmula molecular C<sub>35</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.

No espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Fig. 76, pg. 195) foi possível observar a presença de sinais de hidrogênios metílicos entre 0,93 e 2,20 ppm, dos hidrogênios do anel 2,4-

dinitrobenzeno (7,93 a 9,12 ppm) e de -NH (11,17 ppm) do grupo hidrazona. No espectro de RMN-<sup>13</sup>C (Fig. 77, pg. 195) foram observados sinais relativos a 35 carbonos, com destaque para a carbonila cetônica do C20 em 212,1 ppm. Em relação a DAB7, foi confirmada a ausência da carbonila cetônica do C3, evidenciada pela alteração de deslocamento deste carbono em 51,1 ppm, de 218,3 ppm em DAB7 para 167,2 ppm em DAB9. A atribuição dos sinais observados no espectro de RMN-<sup>13</sup>C foi confirmada através de comparação com o espectro de DEPT (Fig. 78, pg. 196).



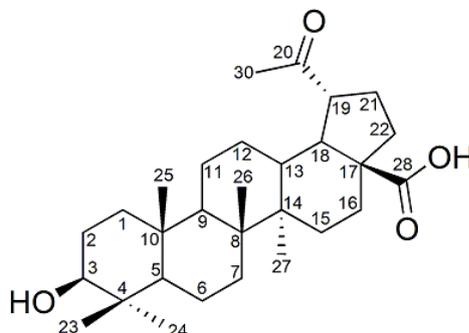
O mapa de correlação de HMBC (Fig. 79, pg. 196) evidenciou correlação entre C3 com o hidrogênio em 11,17 ppm (-NH), e também com H23 e H24. O carbono do grupo cetona em 212,1 ppm correlacionou-se com H30.

#### 4.2.2.9. DAB10 – ácido 3-hidroxi-20-oxo-29-norlupan-28-oico

A clivagem oxidativa da ligação dupla terminal de AB com OsO<sub>4</sub> e NaIO<sub>4</sub> (oxidação de Lemieux-Johnson) forneceu o ácido 3-hidroxi-20-oxo-29-norlupan-28-oico, obtido na forma de um sólido amorfo, acinzentado, parcialmente solúvel em CHCl<sub>3</sub>, totalmente solúvel após a adição de algumas gotas de MeOH. O rendimento da reação foi de 81,3%, enquanto que Kim, Koo & Kim (2001) obtiveram rendimento de 75%. O espectro de massas apresentou íon molecular *m/z* 914,4 [2M-H]<sup>-</sup>, correspondente a massa de *m/z* 458 para um composto de fórmula molecular C<sub>29</sub>H<sub>46</sub>O<sub>4</sub>.

O espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Fig. 80, pg. 197) evidenciou sinais de hidrogênios metílicos entre 0,78 e 1,02 ppm, e 2,18 ppm (H30). No espectro de RMN-<sup>13</sup>C (Fig. 81, pg. 197) observou-se a presença de 28 sinais de carbonos, sendo que o sinal em 27,4 ppm (C2 e C12) corresponde a dois carbonos, totalizando 29

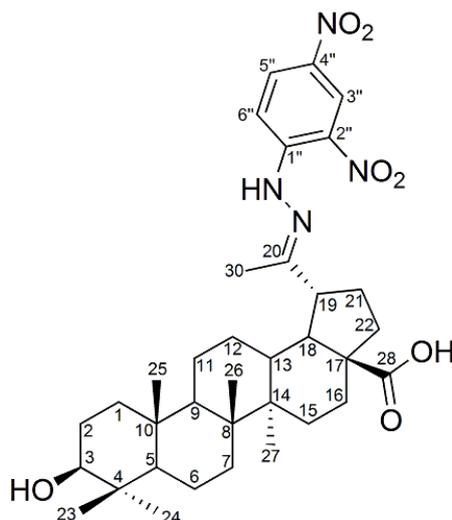
carbonos, com destaque para o carbono carbinólico C3 (78,5 ppm) e a carbonila cetônica C20 (212,8 ppm). A ausência dos sinais da ligação dupla terminal evidenciaram a alteração da região do grupo isopropenila de AB.



#### 4.2.2.10. DAB11 – ácido 3-hidroxi-20-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]-29-norlupan-28-oico

A reação de condensação de DAB10 com 2,4-DNP em meio ácido forneceu o ácido 3-hidroxi-20-[(2,4-dinitrofenil)hidrazono]-29-norlupan-28-oico, obtido na forma de um sólido amorfo, alaranjado, parcialmente solúvel em  $\text{CHCl}_3$ , totalmente solúvel após adição de algumas gotas de MeOH. O espectro de massas apresentou íon molecular  $m/z$  637,5  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , correspondente a massa de  $m/z$  638 para um composto de fórmula molecular  $\text{C}_{35}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_7$ .

No espectro de RMN- $^1\text{H}$  (Fig. 82, pg. 198) foram observados sinais dos hidrogênios metílicos (0,79 a 1,07 ppm) e o H30 (2,04 ppm). Em região mais desblindada do espectro foi observada a presença de sinais de hidrogênios em 7,99, 8,29 e 9,09 ppm, correspondentes ao anel 2,4-dinitrobenzeno, e em 11,04 ppm (NH) do grupo hidrazona. No espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (Fig. 83, pg. 198) verificou-se a presença de 34 sinais de carbonos, considerando que o sinal em 14,6 ppm (C27 e C30) corresponde a dois carbonos, totalizando 35 carbonos, com destaque para a presença do carbono carbinólico C3 (78,3 ppm). Pelo espectro de DEPT (Fig. 84, pg. 199) foi possível confirmar que o C3 corresponde a um carbono metínico. O grupo dinitrofenil-hidrazona acoplado ao C20 (162,5 ppm) foi evidenciado pelos carbonos em 145,3 (C1''), 128,9 (C2''), 123,5 (C3''), 137,4 (C4''), 129,9 (C5'') e 116,5 (C6''). A ausência da cetona (C20) foi observada pela alteração de deslocamento de 50,3 ppm, uma vez que em DAB10 esse carbono apresentou deslocamento de 212,8 ppm.

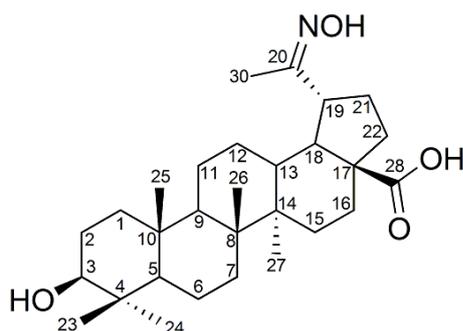


O mapa de correlação de HMBC (Fig. 85, pg. 199) mostrou correlação do C20 com o hidrogênio 11,04 ppm (-NH'') e com H30.

#### 4.2.2.11. DAB12 – ácido 3-hidroxi-20-hidroxi-tanimidoil-lupan-28-oico

A reação de adição-eliminação nucleofílica (ou condensação) de DAB10 com cloridrato de hidroxilamina para a formação de uma oxima forneceu o ácido 3-hidroxi-20-hidroxi-tanimidoil-lupan-28-oico, obtido na forma de um sólido amorfo, esbranquiçado, parcialmente solúvel em  $\text{CHCl}_3$ , totalmente solúvel após adição de algumas gotas de MeOH. O espectro de massas apresentou íon molecular  $m/z$  474,3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , correspondente a massa de  $m/z$  473 para um composto de fórmula molecular  $\text{C}_{29}\text{H}_{47}\text{N}_1\text{O}_4$ .

No espectro de RMN- $^1\text{H}$  (Fig. 86, pg. 200) foram evidenciados os sinais dos hidrogênios metílicos entre 0,79 e 1,00 ppm, e 1,89 ppm (H30). No espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (Fig. 87, pg. 200) foram observados 28 sinais de carbonos, sendo que o sinal em 37,2 ppm (C10 e C22) corresponde a dois carbonos, totalizando 29 carbonos, com destaque para o carbono carbinólico C3 (78,4 ppm) e o carbono ligado à oxima C20 (161,4 ppm), esse último evidenciado pela alteração de deslocamento de 51,4 ppm em relação a DAB10 (212,8 ppm).



### 4.3. Atividades biológicas

#### 4.3.1. Atividade antitumoral

##### 4.3.1.1. Citotoxicidade

A citotoxicidade *in vitro* do AB e derivados foi avaliada sobre cinco linhagens tumorais diferentes através de um ensaio colorimétrico (SRB). Os compostos mostraram atividade antitumoral de maneira dose-dependente e os resultados foram calculados como valores de IC<sub>50</sub>, os quais podem ser verificados na Tabela 4.

Investigações preliminares do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Reinhard Paschke<sup>29</sup> (KOMMERA, 2010; KOMMERA *et al.*, 2010a; KOMMERA *et al.*, 2010b; KOMMERA *et al.*, 2010c; KOMMERA *et al.*, 2010d; KOMMERA *et al.*, 2011) da Martin-Luther Universität, juntamente com dados da literatura, mostraram que AB e seus análogos como a betulina são compostos com grande potencial para o desenvolvimento de novos agentes antitumorais, apresentando citotoxicidade contra um amplo espectro de linhagens de células cancerígenas.

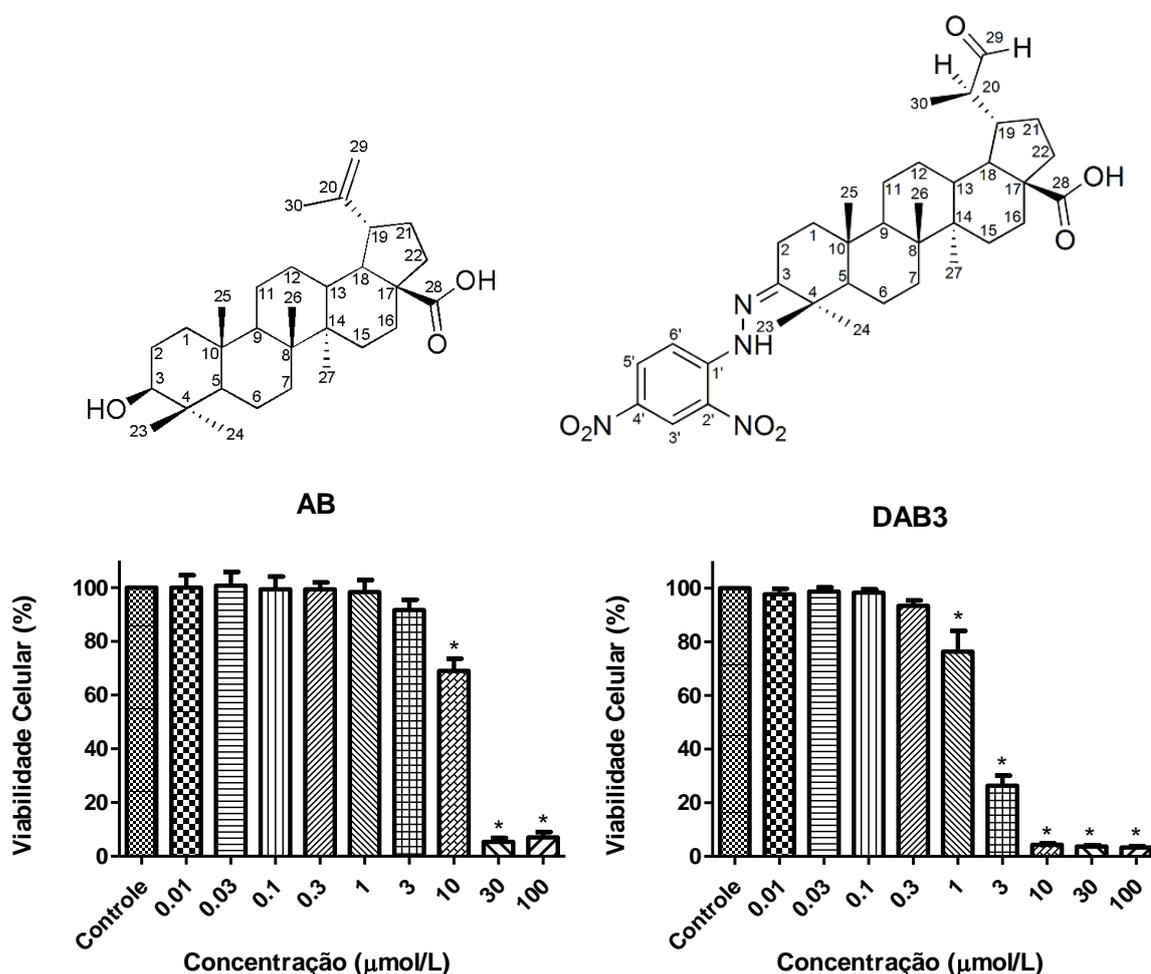
**Tabela 4.** Valores de IC<sub>50</sub> (µmol/L) ± DP do ácido betulínico (AB) e seus derivados avaliados contra linhagens de células tumorais pelo método SRB durante 96 h. Os resultados correspondem à média de três experimentos independentes.

Substância	A2780	8505c	518A2	MCF-7	A549
<b>AB</b>	8,75±0,96	12,6±1,67	14,8±0,60	14,0±1,21	13,3±0,82
<b>ACB</b>	5,21±0,33	8,49±0,39*	12,8±0,58	6,93±0,32*	9,87±0,42
<b>Betulina</b>	7,63±0,65	12,5±2,36	6,08±0,89*	10,5±2,53	8,85±2,04
<b>DAB1</b>	5,97±0,37	14,0±0,69	12,9±0,29	10,4±0,49	10,4±0,86
<b>DAB 2</b>	6,22±0,14	25,9±2,66*	13,5±1,21	8,17±0,68*	21,3±1,20*
<b>DAB 3</b>	1,76±0,11*	2,44±0,06*	1,91±0,04*	2,51±0,26*	1,79±0,18*
<b>DAB 4</b>	1,81±0,05*	2,17±0,30*	1,76±0,11*	2,41±0,20*	2,00±0,25*
<b>DAB 5</b>	>100*	>100*	>100*	>100*	>100*
<b>DAB 6</b>	66,7±3,82*	>100*	>100*	>100*	>100*
<b>DAB 7</b>	16,1±1,68*	64,1±2,60*	43,5±1,27*	47,1±1,34*	59,1±4,21*
<b>DAB 8</b>	53,8±4,65*	>100*	>100*	60,2±1,77*	>100*
<b>DAB 9</b>	9,1±0,74	16,9±0,40*	14,6±0,35	7,52±0,47*	12,1±1,00
<b>DAB 10</b>	68,0±1,91*	93,6±2,25*	97,5±2,19*	63,2±3,00*	75,4±3,10*
<b>DAB 11</b>	11,3±0,52	8,72±0,35	9,09±0,37*	6,84±0,47*	7,62±0,47*
<b>DAB 12</b>	54,4±2,25*	55,9±1,33*	63,2±1,44*	52,2±2,15*	53,7±1,27*
<b>PEN 10b.1</b>	36,2±2,05*	>100*	68,0±1,91*	98,1±2,69*	>100*
<b>PEN 13b</b>	16,2±0,75*	17,2±0,81*	16,9±0,40	16,9±0,40	17,2±0,40
<b>CEN 2</b>	50,3±5,80*	55,2±1,33*	52,9±1,27*	44,4±1,80*	46,9±2,14*

A2780: câncer de ovário; 8505c: tumor anaplásico da tireoide; 518A2: melanoma; MCF-7: câncer de mama; A549: câncer de pulmão. [\*] valores significativamente diferentes (p<0,05) em relação ao AB, considerado como controle positivo.

<sup>29</sup> Co-orientador durante o período de doutorado-sanduiche no Biozentrum, Martin-Luther-Universität, Halle (Saale), Alemanha, no período de abril de 2012 a março de 2013 sob vigência de bolsa de estudos da Cooperação Bilateral Brasil-Alemanha CNPq/DAAD.

Neste estudo, AB apresentou  $IC_{50} = 8,75$  a  $14,8 \mu\text{mol/L}$ , sendo que alguns dos derivados testados apresentaram atividade citotóxica superior à molécula de partida. De acordo com Gauthier e colaboradores (2006), valores de  $IC_{50}$  menores que  $20 \mu\text{mol/L}$  são considerados altamente ativos, enquanto que valores entre 20 e  $75 \mu\text{mol/L}$  são moderadamente ativos, e valores entre 75 a  $165 \mu\text{mol/L}$  são levemente ativos ou inativos. O melhor perfil citotóxico foi observado para as substâncias DAB3 (Fig. 6) e DAB4, sendo de cinco até oito vezes mais ativos que AB, com valores de  $IC_{50}$  entre 1,76 a  $2,51 \mu\text{mol/L}$ , em todas as linhagens tumorais testadas.



**Figura 6.** Perfil citotóxico do ácido betulínico (AB) e DAB3 sobre a linhagem de câncer de pulmão A549 determinado pelo método SRB por 96 h. As células foram tratadas com as substâncias em concentrações entre 0,01 e  $100 \mu\text{mol/L}$ , e mantidas a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . As barras representam a porcentagem média  $\pm$  DP e correspondem à células metabolicamente ativas em relação ao controle (100%). [\*]  $p < 0,05$  ( $n=3$ ).

As substâncias DAB9 e DAB11 mostraram atividade citotóxica superior a de AB na linhagem MCF-7 ( $IC_{50} = 7,52$  e  $6,84 \mu\text{mol/L}$ , respectivamente), enquanto DAB11 ainda foi mais ativo que AB sobre as linhagens 8505c, 518A2 e A549 ( $IC_{50} =$

8,72, 9,09 e 7,62  $\mu\text{mol/L}$ , respectivamente). O derivado PEN13b, obtido por biotransformação, mostrou-se ativo ( $\text{IC}_{50}$ = 16,3 a 17,2  $\mu\text{mol/L}$ ), porém levemente menos citotóxico que o seu precursor. Uma queda drástica na citotoxicidade dos compostos DAB6, DAB7, DAB8, DAB10, DAB12, PEN10b.1 e CEN2 foi observada na maioria das linhagens testadas, com valores de  $\text{IC}_{50}$  entre 36,2 a  $>100$   $\mu\text{mol/L}$ . Uma exceção foi observada quando o composto DAB7 foi avaliado contra a linhagem A2780, apresentando apenas uma leve queda na sua atividade ( $\text{IC}_{50}$ = 16,1  $\mu\text{mol/L}$ ) em relação ao padrão. O composto DAB5 foi considerado inativo ( $\text{IC}_{50} > 100$   $\mu\text{mol/L}$ ), não apresentando qualquer atividade citotóxica na faixa de concentração avaliada. O derivado DAB2 apresentou melhora no perfil citotóxico contra as linhagens A2780, 518A2 e MCF-7 ( $\text{IC}_{50}$ = 6,22, 13,5 e 8,17  $\mu\text{mol/L}$ , respectivamente), enquanto que perdeu atividade nas linhagens 8505c e A549 ( $\text{IC}_{50}$ = 25,9 e 21,3  $\mu\text{mol/L}$ , respectivamente). Para fins de comparação, análogos conhecidos do AB foram avaliados. ACB apresentou melhora na atividade citotóxica em relação ao precursor contra todas as linhagens celulares ( $\text{IC}_{50}$ = 5,21 a 12,8  $\mu\text{mol/L}$ ), da mesma forma que a betulina ( $\text{IC}_{50}$ = 6,08 a 12,5  $\mu\text{mol/L}$ ) e o ácido betulônico – DAB1 ( $\text{IC}_{50}$ = 5,97 a 12,9  $\mu\text{mol/L}$ ), com exceção da linhagem 8505c ( $\text{IC}_{50}$ = 14,0  $\mu\text{mol/L}$ ) para esse último.

Uma vez que a estrutura de um composto influencia fortemente a capacidade de uma substância entrar dentro da célula através da membrana plasmática, assim como a capacidade de interagir com componentes celulares, é esperado que alterações estruturais levem a diferentes valores na citotoxicidade (KOMMERA *et al.*, 2010). Considerando a relação estrutura-atividade das moléculas, a adição do grupo 2,4-DNPH na posição C3 de AB forneceu DAB2 e alterou levemente a atividade citotóxica em relação à molécula original. A ausência de funções carboxílicas livres nas moléculas levou à redução ou perda total da atividade, como foi observado nos derivados que foram esterificados na posição C28 (DAB5 e DAB6). De um modo geral, esterificações do ácido carboxílico na posição C28, tanto com cadeias alquílicas curtas quanto longas, como por exemplo éster metílico, levam à perda ou diminuição da citotoxicidade (KOMMERA *et al.*, 2010a; KOMMERA *et al.*, 2011), provavelmente devido a baixa capacidade hidrolítica de ésteres alquílicos sob condições fisiológicas. Desta forma, a presença de um grupo carboxílico livre aumenta a citotoxicidade das moléculas (SAREK *et al.*, 2003). A adição de duas

moléculas de 2,4-DNPH nas posições C3 e C20 (DAB8) levou à redução da atividade, embora a função carboxílica do C28 tenha permanecido livre.

A presença de uma molécula de 2,4-DNPH juntamente com duas funções oxigenadas mostrou-se a modificação mais eficiente para o aumento da citotoxicidade em relação ao precursor, como observado em DAB3, DAB4, DAB9 e DAB11, sendo que todos estes derivados mantiveram o grupo carboxílico na posição C28 livre e foram oxidados nas posições C20 (aldeído em DAB3 e DAB4; cetona em DAB9) ou mantiveram a hidroxila livre em C3 (DAB11). A simples modificação da ligação dupla terminal na posição C20 do AB ou DAB1 com funções oxigenadas como cetona (DAB7, DAB10), oxima (DAB12) ou aldeído (CEN2), levou à redução significativa da citotoxicidade, demonstrando que a modificação desta posição não é favorável para obter derivados mais potentes quando a posição C3 permanece livre (hidroxila ou cetona). Neste caso observa-se que a presença do grupo 2,4-DNPH é de fundamental importância quando há outras funções oxigenadas na molécula, principalmente na posição C20.

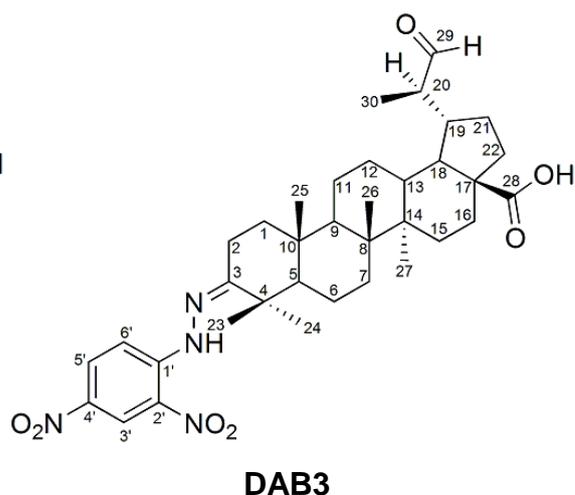
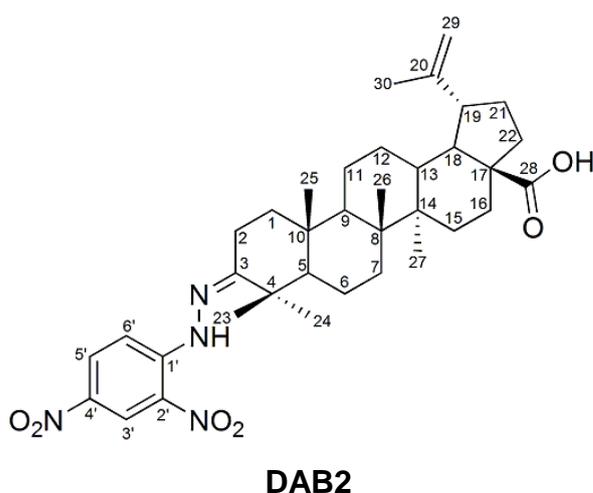
A esterificação da posição C28 observada em PEN10b.1 levou à redução da atividade, demonstrando que o grupo carboxílico livre é essencial para a citotoxicidade do ácido betulônico. A esterificação do AB (PEN13b), por sua vez, não alterou significativamente a citotoxicidade, demonstrando que neste caso o grupo hidroxila em C3 é importante para a atividade antitumoral, provavelmente devido a capacidade de realizar ligações de hidrogênio.

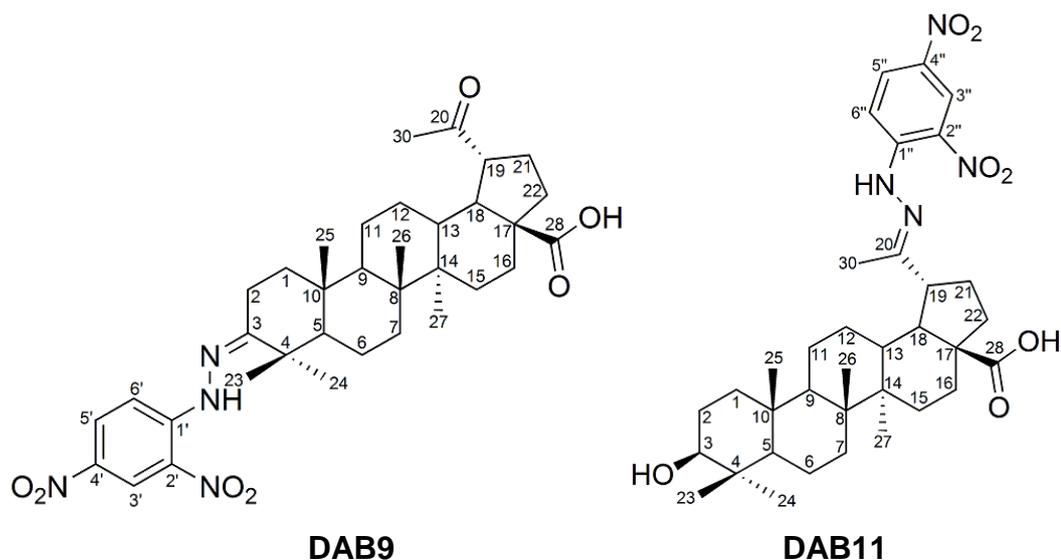
Os resultados observados sugerem que a presença de funções químicas doadoras de hidrogênio ou que fazem ligações de hidrogênio é importante para o efeito citotóxico dos derivados dinitrofenil-hidrazônicos do AB. Derivados hidrazônicos do AB, assim como modificações na posição C20, já foram relatados na literatura. O ácido 3-fenil-hidrazono-20,29-di-hidrobetulínico ( $ED_{50} = 0,6 \mu\text{g/mL}$ ) mostrou-se cerca de duas vezes mais ativo que AB ( $ED_{50} = 1,13 \mu\text{g/mL}$ ) contra câncer de próstata (DU145). Esse composto foi considerado muito ativo também contra câncer de ovário (PA-1), com valor de  $ED_{50} = 0,4 \mu\text{g/mL}$  ( $AB > 10 \mu\text{g/mL}$ ). Estes resultados indicaram que a função hidrazona foi o melhor substituinte para AB contra essas linhagens tumorais, quando comparada com derivados 3-hidroxiloxima, 3-acetil, 3-(2-acetoxi)-propionil e 3-O-trimetilacetil (MUKHERJEE *et al.*, 2004).

Kim, Koo & Kim (2001) converteram o grupo isoprenil do AB produzindo desta forma derivados modificados em C20. AB exibiu significativo efeito citotóxico contra

as linhagens tumorais testadas ( $IC_{50}$  = 1,5 a 3,2  $\mu$ mol/L). Porém, quando a olefina foi oxidada a uma cetona foi observada considerável queda na citotoxicidade ( $IC_{50}$  > 50  $\mu$ mol/L). Ao reduzir a cetona para um álcool secundário ou convertê-la para suas oximas correspondentes, hidroxilamina e metoxilamina, também foi verificada queda no perfil citotóxico ( $IC_{50}$  > 50  $\mu$ mol/L). Os autores sugeriram que a presença de átomos de oxigênio altamente eletronegativos podem alterar as propriedades eletroestáticas do AB, levando, desta forma, a derivados menos tóxicos. Também foi observado que a dupla ligação no C20 não é fundamental para a atividade antitumoral, uma vez que o ácido di-hidrobetulínico reteve os mesmos valores de  $IC_{50}$ , evidenciando que esta posição, quando modificada isoladamente, não é favorável a modificações na busca de novos derivados mais potentes. Em contrapartida, as posições C3 e C17, principalmente quando esse último é modificado com um grupamento ácido carboxílico livre (C28), parecem ter grande importância quanto à citotoxicidade e seletividade dos derivados (HATA *et al.*, 2003; GAUTHIER *et al.*, 2006; HATA *et al.*, 2006).

Após a triagem citotóxica pelo método SRB, os derivados DAB2, DAB3, DAB9 e DAB11 foram selecionados para as análises adicionais, uma vez que apresentaram os melhores valores de  $IC_{50}$ . O objetivo foi avaliar a importância do grupo 2,4-DNPH nos mecanismos celulares, assim como a participação de funções oxigenadas distintas.





#### 4.3.1.2. Seletividade

Uma das considerações primárias da quimioterapia do câncer é quanto a inibição seletiva das substâncias sobre as células tumorais, enquanto a toxicidade sobre tecidos normais é minimizada, o que leva a um índice terapêutico favorável, o qual é um requerimento fundamental para um novo medicamento ser desenvolvido (KOMMERA, 2010). Desta forma, AB e os derivados DAB2, DAB3, DAB9 e DAB11 foram avaliados primeiramente quanto a seletividade para células tumorais. Os compostos foram testados em fibroblastos normais de cólon humano (CCD 18co) e o índice de seletividade (IS) pode ser observado na Tabela 5. O valor de  $IC_{50}$  de AB sobre CCD 18co foi  $43,6 \pm 3,70 \mu\text{mol/L}$ , enquanto os derivados DAB2, DAB3, DAB9 e DAB11 apresentaram valores de  $IC_{50}$  de  $18,1 \pm 3,60$ ,  $8,3 \pm 0,5$ ,  $43,5 \pm 1,30$  e  $56,7 \pm 3,30 \mu\text{mol/L}$ , respectivamente. Todos os compostos foram menos tóxicos sobre fibroblastos humanos em comparação com as linhagens tumorais testadas, com exceção do derivado DAB2 sobre as linhagens 8505c e A549. O derivado mais ativo DAB3 mostrou-se de três a cinco vezes mais tóxico nas linhagens cancerígenas, da mesma forma que AB. DAB2 mostrou-se uma a três vezes mais seletivo para as linhagens A2780, 518A2 e MCF-7, enquanto que foi igualmente tóxico para as outras duas linhagens. DAB9 apresentou seletividade de 2,5 a seis vezes maior que o precursor. O composto DAB11 foi considerado o mais seletivo para células tumorais, em torno de cinco a oito vezes. De um modo geral, os compostos avaliados foram seletivos para células tumorais e os fibroblastos humanos mostraram melhor tolerância aos compostos em comparação com as células

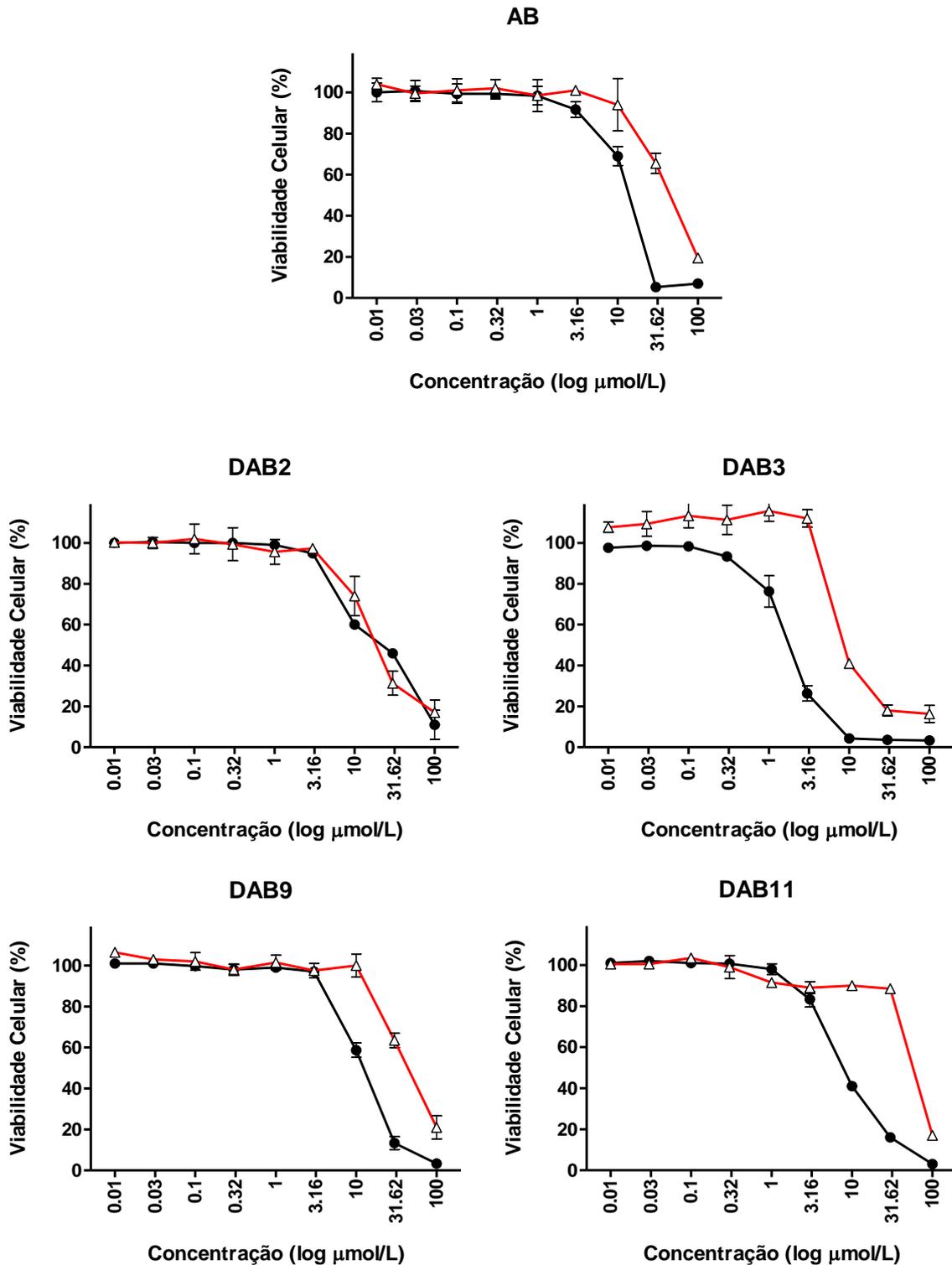
cancerígenas. Entretanto, DAB2 que possui um grupo 2,4-DNPH e ligação dupla terminal mostrou-se tóxico aos fibroblastos e menos seletivo para células tumorais, o que foi alterado quando a ligação dupla foi oxidada a aldeído e cetona, ou ainda com o grupo 2,4-DNPH na posição C20.

**Tabela 5.** Índice de seletividade (IS)\* do ácido betulínico (AB) e seus derivados.

Substância	Linhagens de células tumorais				
	A2780	8505c	518A2	MCF-7	A549
AB	4,98	3,45	2,94	3,10	3,28
DAB2	2,91	0,69	1,34	2,21	0,84
DAB3	4,7	3,4	4,34	3,31	4,64
DAB9	4,78	2,57	2,98	5,80	3,59
DAB11	5,02	6,50	6,23	8,28	7,44

\* valor de IC<sub>50</sub> sobre fibroblastos / valor de IC<sub>50</sub> sobre células tumorais

As curvas dose-resposta obtidas através de regressão não-linear pelo método SRB após 96 h de tratamento com os derivados sobre as linhagens A549 e CCD 18co estão representadas na Figura 7.

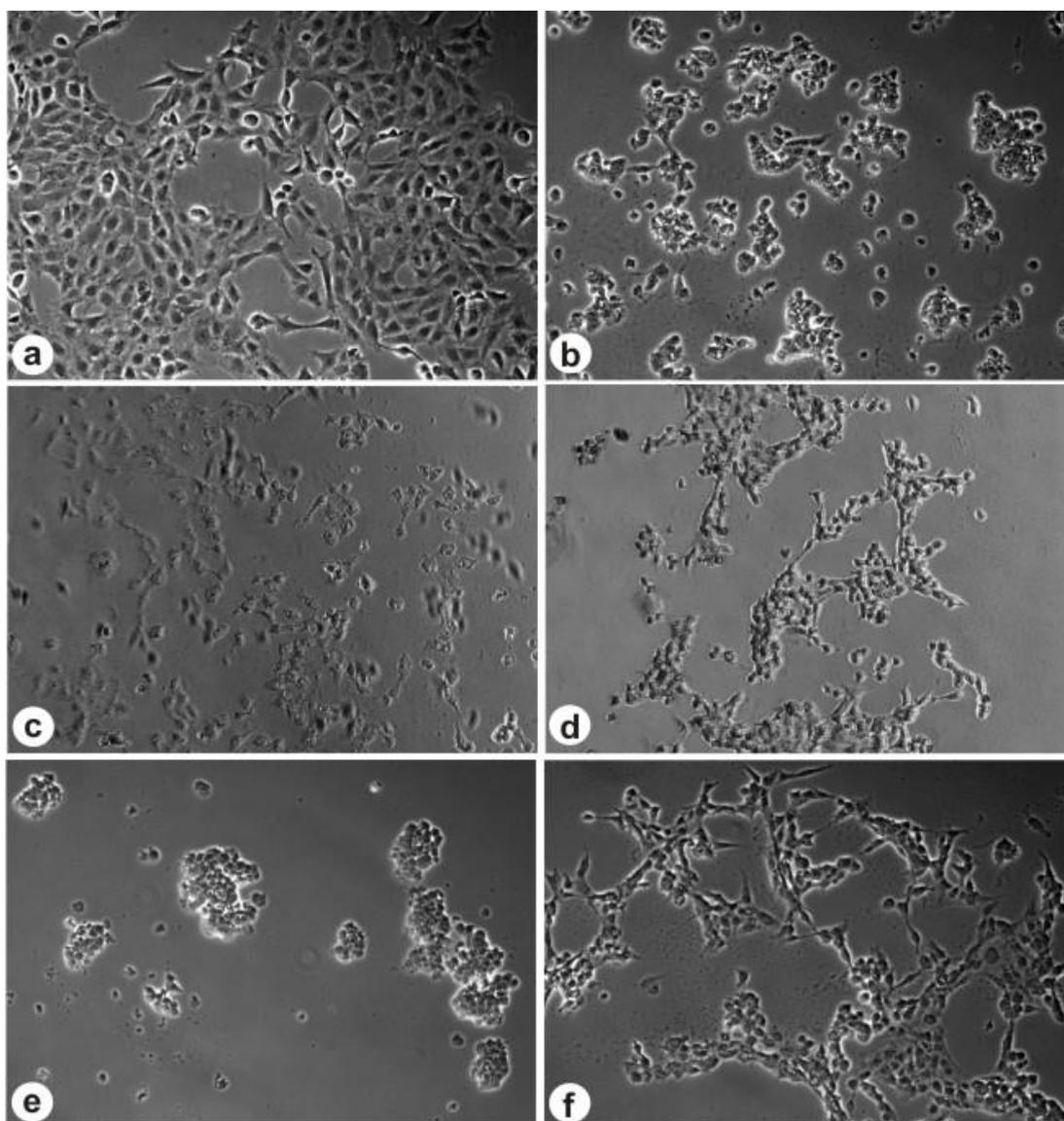


**Figura 7.** Curvas dose-resposta do ácido betulínico (AB) e seus derivados sobre a linhagem de câncer de pulmão A549 (linha preta e ponto) e fibroblastos normais de cólon CCD 18co (linha vermelha e triângulo) obtidas pelo método SRB após 96 h. A densidade óptica do grupo controle foi considerada como 100% de viabilidade (ponto não mostrado). Cada ponto ou triângulo nas curvas representa a média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. As concentrações foram expressas como log.

#### 4.3.1.3. Análise microscópica

A análise morfológica da linhagem A549 em microscópio óptico apresentou diferenças entre as células tratadas com a concentração  $IC_{80}$  por 24 h de AB (23,3  $\mu\text{mol/L}$ ) e dos seus derivados (DAB2= 71,8  $\mu\text{mol/L}$ , DAB3= 4,11  $\mu\text{mol/L}$ , DAB9= 24,9  $\mu\text{mol/L}$  e DAB11= 24,0  $\mu\text{mol/L}$ ) e o controle não tratado.

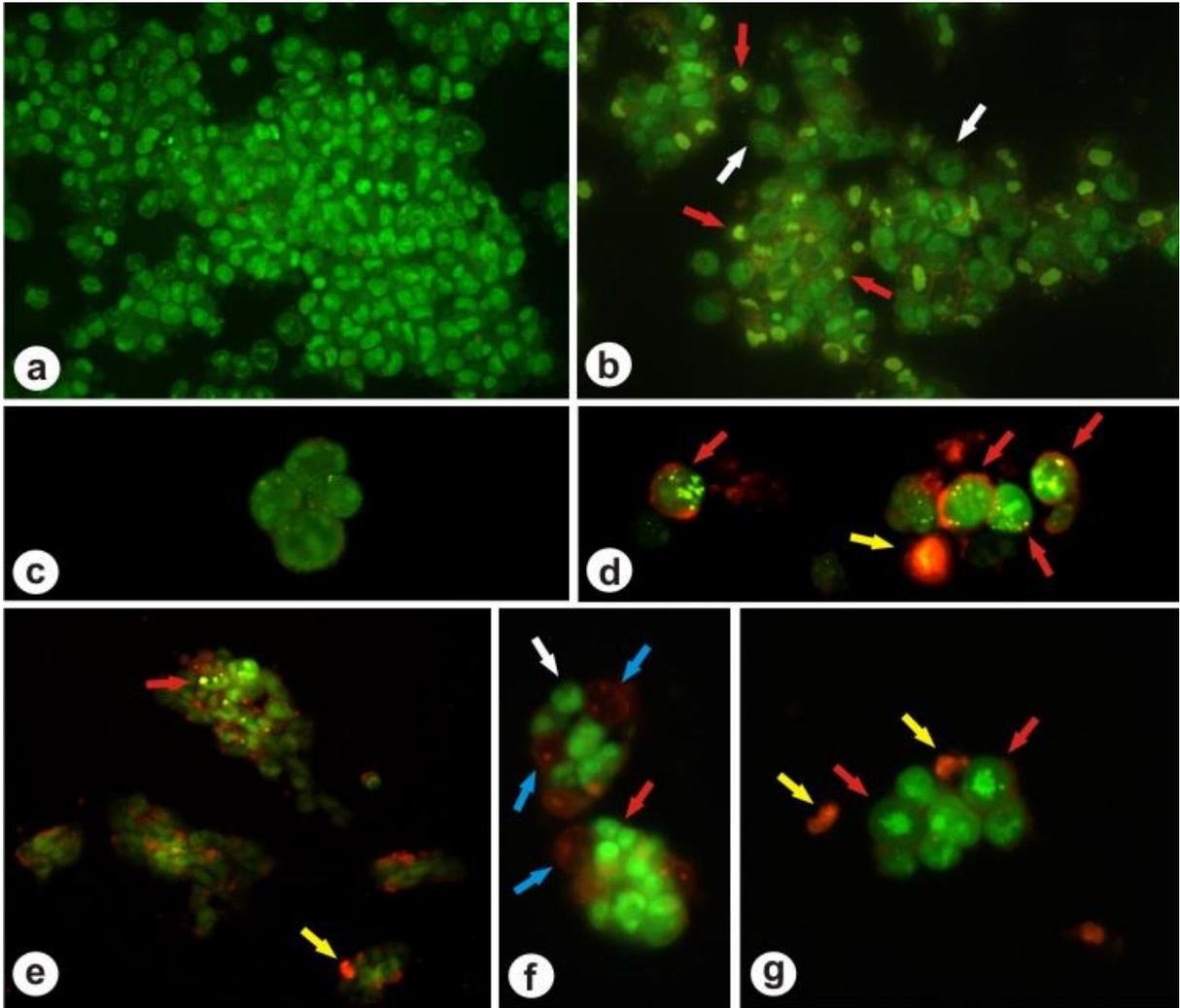
Enquanto as células do controle apresentaram-se mais alongadas e de contorno poligonal, as células tratadas tornaram-se esféricas e menores, formando grupos (*clusters*) após 24 h, evidenciando processo de morte celular. Além disso, a monocamada observada no controle foi alterada na presença dos derivados testados (Fig. 8).



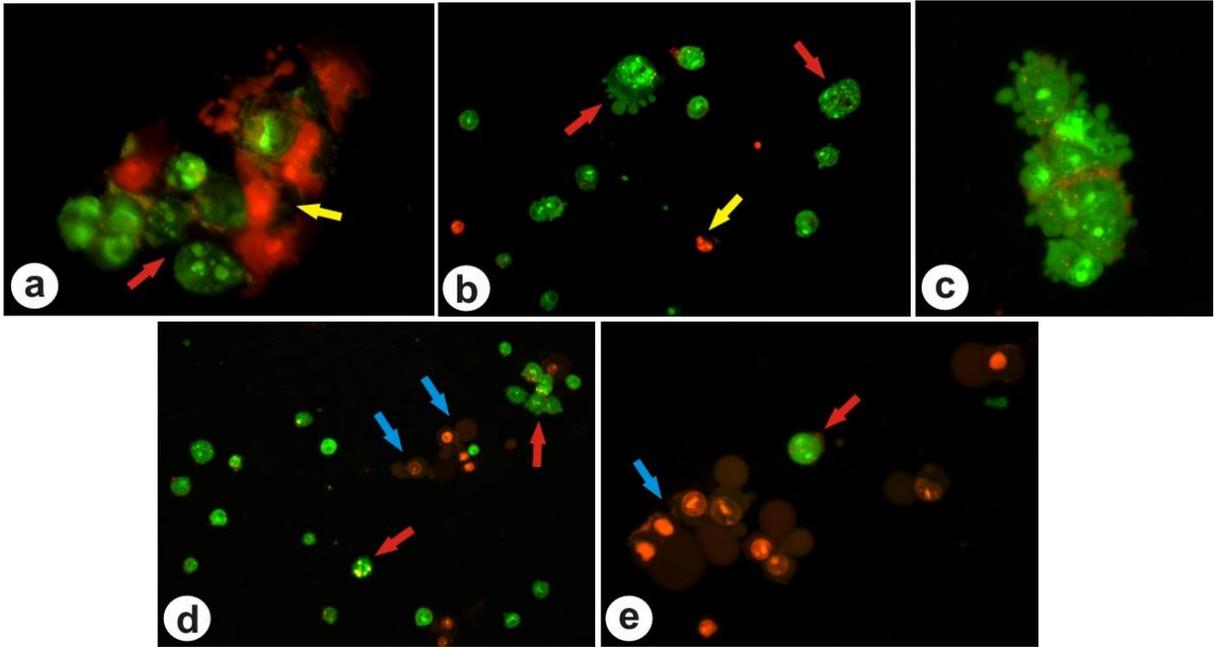
**Figura 8.** Análise morfológica por microscopia óptica da linhagem de células de câncer de pulmão A549 tratadas com a concentração  $IC_{80}$  de ácido betulínico (AB) e seus derivados durante 24 h, em comparação com um controle não tratado. Controle não tratado (a). AB (b). DAB2 (c). DAB3 (d). DAB9 (e). DAB11 (f). Aumento 10x. As figuras são representativas de dois experimentos independentes.

A análise das células com laranja de acridina (LA) e brometo de etídio (BE) evidenciou células em diferentes estágios do processo de apoptose e também necrose (Figs. 9-11). Estes corantes emitem diferentes tons de fluorescência e possuem habilidades diferentes para penetrar nas células. LA penetra células viáveis e não viáveis, pois é permeável à membrana plasmática e nuclear, emitindo fluorescência verde após intercalação com a dupla fita de DNA, enquanto BE emite fluorescência vermelha/alaranjada nas células com membranas alteradas ou rompidas, evento observado na apoptose tardia e necrose. De um modo geral pode-se classificar as células em quatro categorias diferentes dependendo da fluorescência emitida: 1) células viáveis (núcleo verde normal); 2) apoptose inicial (núcleo irregular, verde brilhante, com cromatina condensada ou fragmentada); 3) apoptose tardia ou necrose secundária (núcleo vermelho/alaranjado com cromatina condensada ou fragmentada); e 4) necrose (núcleo vermelho/alaranjado uniforme) (KOSMIDER *et al.*, 2004; ELMORE, 2007; ATTARI *et al.*, 2009). Nas células tratadas com AB por 24 h foram observadas células necróticas e células em apoptose inicial e tardia, caracterizadas pela fragmentação do DNA. Nas células tratadas com DAB2, DAB3, DAB9 e DAB11 foi possível observar um conjunto de características típicas do processo de morte celular programada, como condensação da cromatina, fragmentação do DNA, formação de ondulações na membrana plasmática (*blebbings*) e formação de corpos apoptóticos.

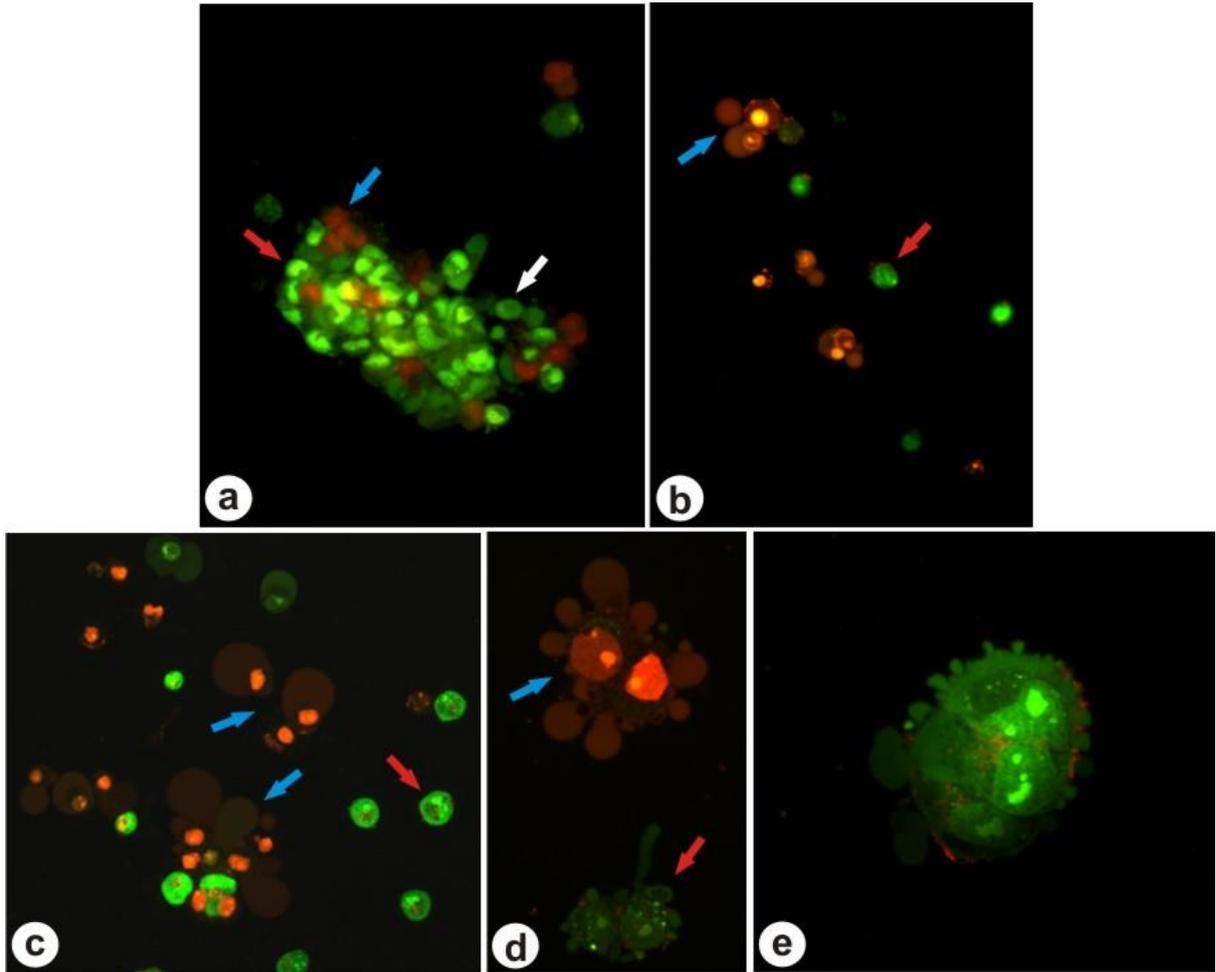
As características mais comuns do processo apoptótico inicial são arredondamento da célula, núcleo eletronicamente denso (marginalização na fase inicial) com conseqüente redução do volume celular (picnose), fragmentação nuclear (cariorrexe), membrana celular intacta mesmo durante o início da desintegração celular, organelas citoplasmáticas desorganizadas, vacúolos grandes e ondulações na superfície celular. Com o encolhimento, as células são menores em tamanho, o citoplasma é denso e as organelas estão firmemente empacotadas. Conforme a apoptose progride, as células perdem a adesão umas com as outras e separam-se das células vizinhas. Durante o estágio final da apoptose, a célula fragmenta-se em corpos apoptóticos, os quais são delimitados por membrana celular intacta, contendo organelas citoplasmáticas, com ou sem fragmentos nucleares. No organismo estes corpos apoptóticos são subsequentemente fagocitados por macrófagos e são degradados dentro de fagolisossomos (ELMORE, 2007; KROEMER *et al.*, 2009).



**Figura 9.** Análise de células de câncer de pulmão A549 por microscopia de fluorescência tratadas com a concentração  $IC_{80}$  de ácido betulínico (AB) e DAB2 após 24 h, em comparação com um controle não tratado. As células foram analisadas com LA e BE. Controle não tratado (a. 20x; c. 40x). AB (b. 20x; d. 40x). DAB2 (e. 20x; f. 40x; g. 40x). As figuras são representativas de dois experimentos independentes. Legenda: célula normal (seta branca): fluorescência verde uniforme; célula apoptótica inicial (seta vermelha): fluorescência verde brilhante, não uniforme, núcleo compactado ou fragmentado; célula apoptótica tardia (seta azul): núcleo com fluorescência alaranjada/avermelhada, célula com membrana definida, com fragmentos citoplasmáticos ou corpos apoptóticos; célula necrótica (seta amarela): fluorescência alaranjada/avermelhada, célula sem membrana definida.

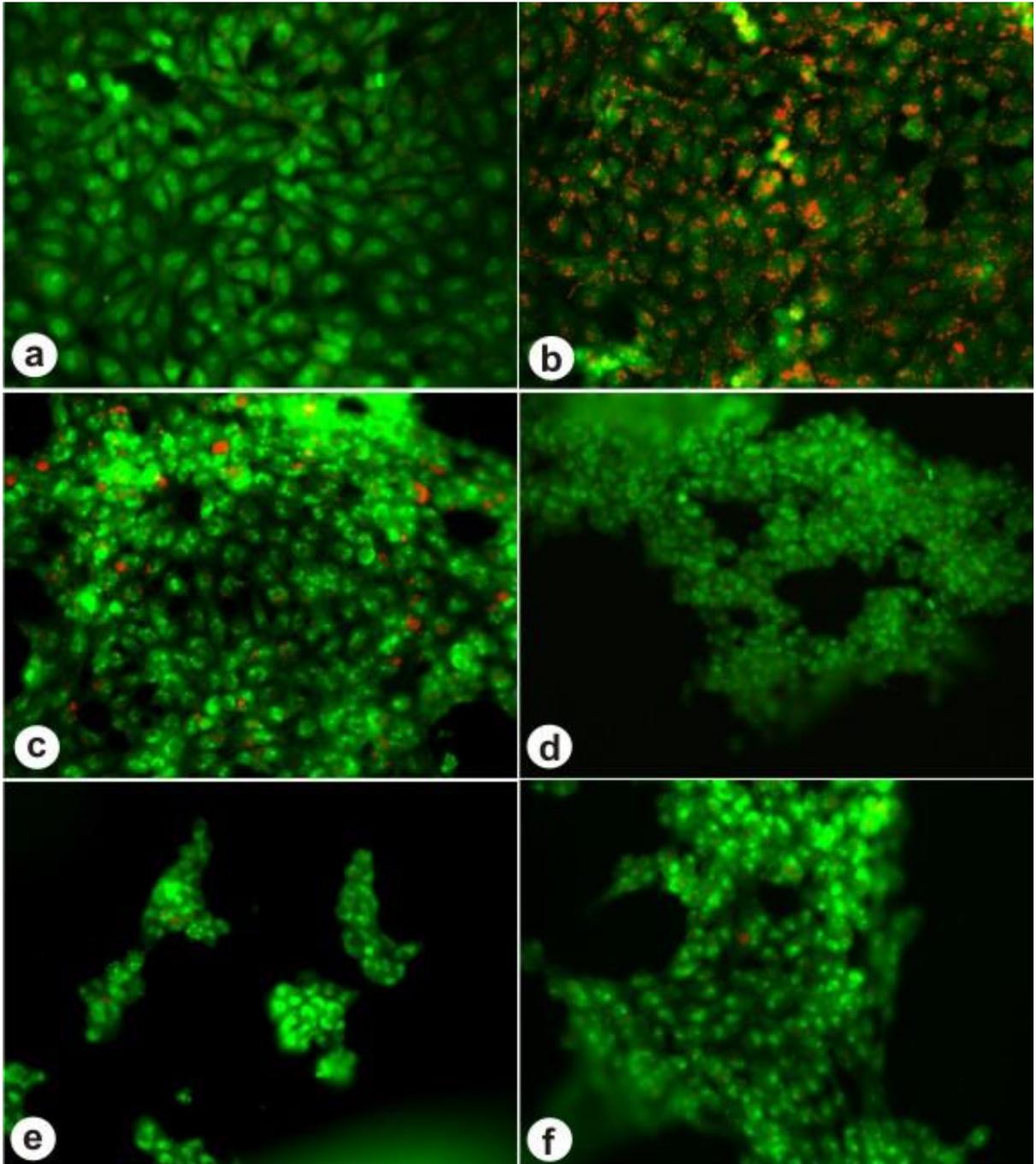


**Figura 10.** Análise de células de câncer de pulmão A549 por microscopia de fluorescência tratadas com a concentração  $IC_{80}$  de DAB3 após 24 h. As células foram analisadas com LA e BE. DAB3 (a. 40x; b. 20x; c. 40x; d. 20x; e. 40x). As figuras são representativas de dois experimentos independentes. Legenda: célula apoptótica inicial (seta vermelha): fluorescência verde brilhante, não uniforme, ondulações da membrana plasmática, núcleo compactado ou fragmentado; célula apoptótica tardia (seta azul): núcleo com fluorescência alaranjada/avermelhada, célula com membrana definida, com fragmentos citoplasmáticos ou corpos apoptóticos; célula necrótica (seta amarela): fluorescência alaranjada/avermelhada, célula sem membrana definida.



**Figura 11.** Análise de células de câncer de pulmão A549 por microscopia de fluorescência tratadas com a concentração  $IC_{80}$  de DAB9 e DAB11 após 24 h. As células foram analisadas com LA e BE. DAB9 (a. 20x; b. 20x). DAB11 (c. 20x; d. 40x; e. 40x). As figuras são representativas de dois experimentos independentes. Legenda: célula normal (seta branca): fluorescência verde uniforme; células apoptóticas iniciais (seta vermelha): fluorescência verde brilhante, não uniforme, ondulações da membrana plasmática, núcleo compactado ou fragmentado; célula apoptótica tardia (seta azul): núcleo com fluorescência alaranjada/avermelhada, célula com membrana definida, com fragmentos citoplasmáticos ou corpos apoptóticos.

A análise das células apenas com LA teve como objetivo observar a presença de autofagolisossomos no interior das células tratadas com os compostos. LA é uma base fraca e um agente lisossomotrópico, ou seja, tem a capacidade de acumular-se nos lisossomos (KOSMIDER *et al.*, 2004). Durante a autofagia, vacúolos autofágicos acídicos - também chamados de autofagolisossomos - são formados como resultado da fusão de autofagossomos com lisossomos e são considerados como uma característica de células envolvidas na autofagia. Em células normais, LA emite fluorescência verde em componentes citoplasmáticos e nucleares. Em grandes compartimentos acídicos como os autofagolisossomos, a forma protonada do LA acumula-se e emite fluorescência avermelhada/alaranjada (GABRIEL *et al.*, 2012). Após 24 h, foi observado um aumento significativo de autofagolisossomos nas células tratadas com AB, em relação ao controle, enquanto que nas células tratadas com os derivados DAB2, DAB3, DAB9 e DAB11, a presença de tais estruturas foi observada em baixa quantidade ou não, evidenciando que estes derivados dinitrofenil-hidrazônicos não induziram o processo de autofagia após 24 h de tratamento (Fig. 12).



**Figura 12.** Ensaio de autofagia: análise de células de câncer de pulmão A549 em microscópio de fluorescência tratadas com a concentração  $IC_{80}$  de ácido betulínico (AB) e seus derivados após 24 h, em comparação com um controle não tratado. Controle não tratado (a). AB (b). DAB2 (c). DAB3 (d). DAB9 (e). DAB11 (f). Aumento 20x. As células foram analisadas com LA e as estruturas com fluorescência alaranjada/avermelhada correspondem aos autofagossomos. As figuras são representativas de dois experimentos independentes.

#### 4.3.1.4. Citometria de Fluxo

##### 4.3.1.4.1. Análise do ciclo celular

A análise das perturbações provocadas no ciclo celular das células da linhagem A549 tratadas com concentrações  $IC_{80}$  de AB e seus derivados (DAB2, DAB3, DAB9, DAB11) demonstrou que essas substâncias atuam de uma maneira dependente do tempo, conforme pode ser verificado na Tabela 6 e nas Figuras 13 e 14. Cisplatina (CDDP, *cis*-diamino-dicloro-platina (II), Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Alemanha) foi utilizada como controle positivo para observar o bloqueio (*arrest*) nas fases S e G2/M.

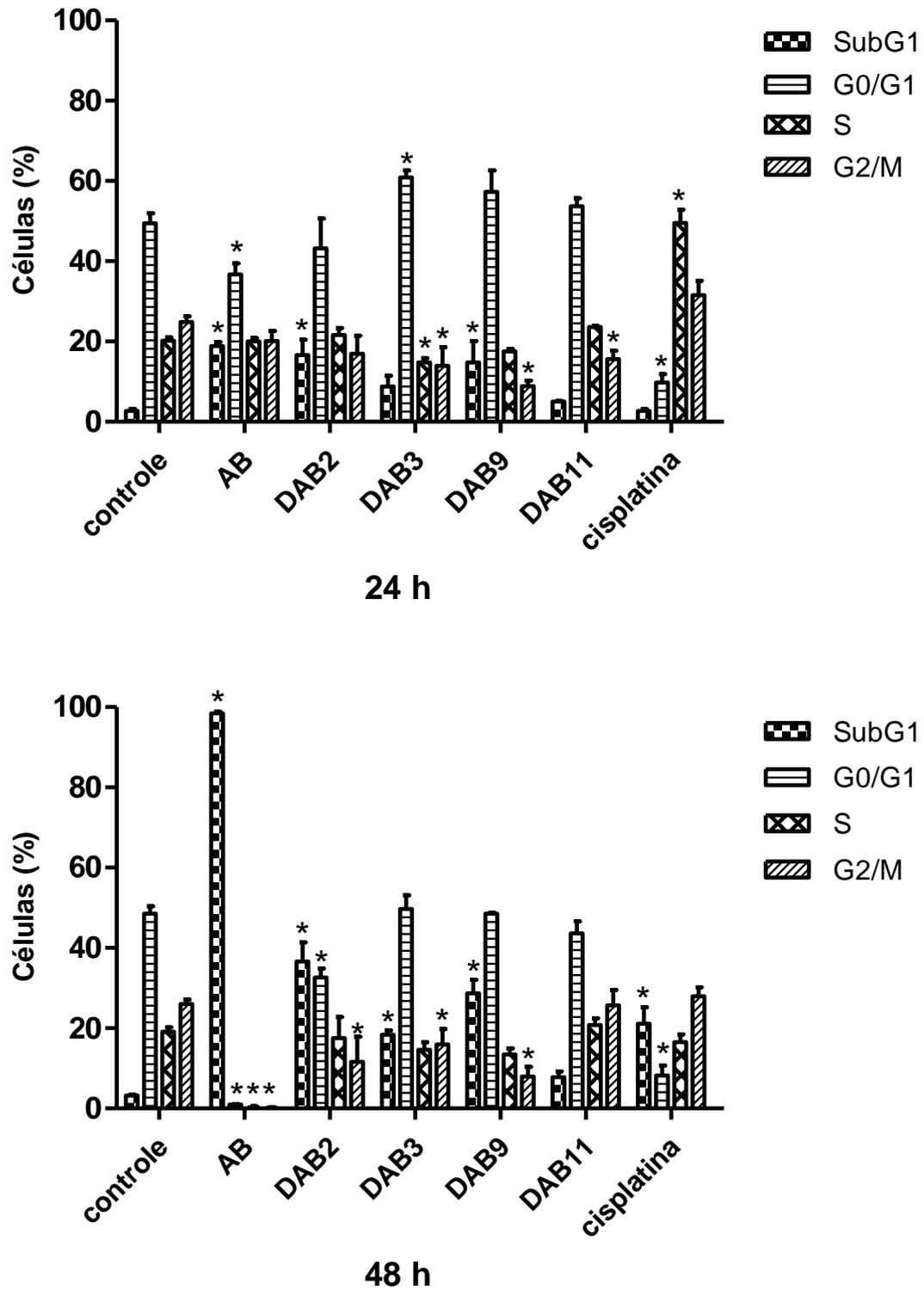
**Tabela 6.** Análise da distribuição (%) de células de câncer de pulmão A549 em cada fase do ciclo celular, após tratamento com a concentração  $IC_{80}$  de ácido betulínico (AB) e derivados, e cisplatina (2  $\mu$ mol/L), durante 24 e 48 h. Os resultados foram obtidos por meio da análise do conteúdo de DNA corado com IP por citometria de fluxo e foram comparados com um controle não tratado. Os resultados expressam a média  $\pm$  DP de três experimentos independentes.

Fase	Controle	AB	DAB2	DAB3	DAB9	DAB11	Cisplatina
<b>24 h</b>							
<i>subG1</i>	2,73 $\pm$ 0,49	18,8 $\pm$ 1,01	16,6 $\pm$ 3,79	8,77 $\pm$ 2,70	14,83 $\pm$ 5,31	5,00 $\pm$ 0,20	2,75 $\pm$ 0,39
<i>G0/G1</i>	49,5 $\pm$ 2,51	36,7 $\pm$ 2,72	43,2 $\pm$ 7,46	60,9 $\pm$ 1,71	57,3 $\pm$ 5,29	53,7 $\pm$ 2,00	9,81 $\pm$ 2,05
S	20,2 $\pm$ 0,81	20,1 $\pm$ 0,78	21,6 $\pm$ 1,74	14,8 $\pm$ 1,05	17,6 $\pm$ 0,55	23,7 $\pm$ 0,21	49,5 $\pm$ 3,39
<i>G2/M</i>	24,9 $\pm$ 1,46	20,1 $\pm$ 2,46	17,0 $\pm$ 4,51	13,9 $\pm$ 4,68	8,90 $\pm$ 1,39	15,6 $\pm$ 2,06	31,6 $\pm$ 3,53
<b>48 h</b>							
<i>subG1</i>	3,23 $\pm$ 0,25	98,5 $\pm$ 0,38	36,6 $\pm$ 4,74	18,3 $\pm$ 1,09	28,7 $\pm$ 3,30	7,80 $\pm$ 1,39	21,1 $\pm$ 4,06
<i>G0/G1</i>	48,5 $\pm$ 1,82	0,96 $\pm$ 0,05	32,6 $\pm$ 2,20	49,7 $\pm$ 3,38	48,5 $\pm$ 0,17	43,6 $\pm$ 2,95	8,17 $\pm$ 2,50
S	19,1 $\pm$ 1,05	0,33 $\pm$ 0,23	15,6 $\pm$ 5,23	14,6 $\pm$ 1,89	13,5 $\pm$ 1,48	20,8 $\pm$ 1,67	16,5 $\pm$ 1,93
<i>G2/M</i>	26,0 $\pm$ 1,10	0,17 $\pm$ 0,11	11,63 $\pm$ 6,20	15,9 $\pm$ 3,86	7,93 $\pm$ 2,45	25,7 $\pm$ 3,89	27,94 $\pm$ 2,29

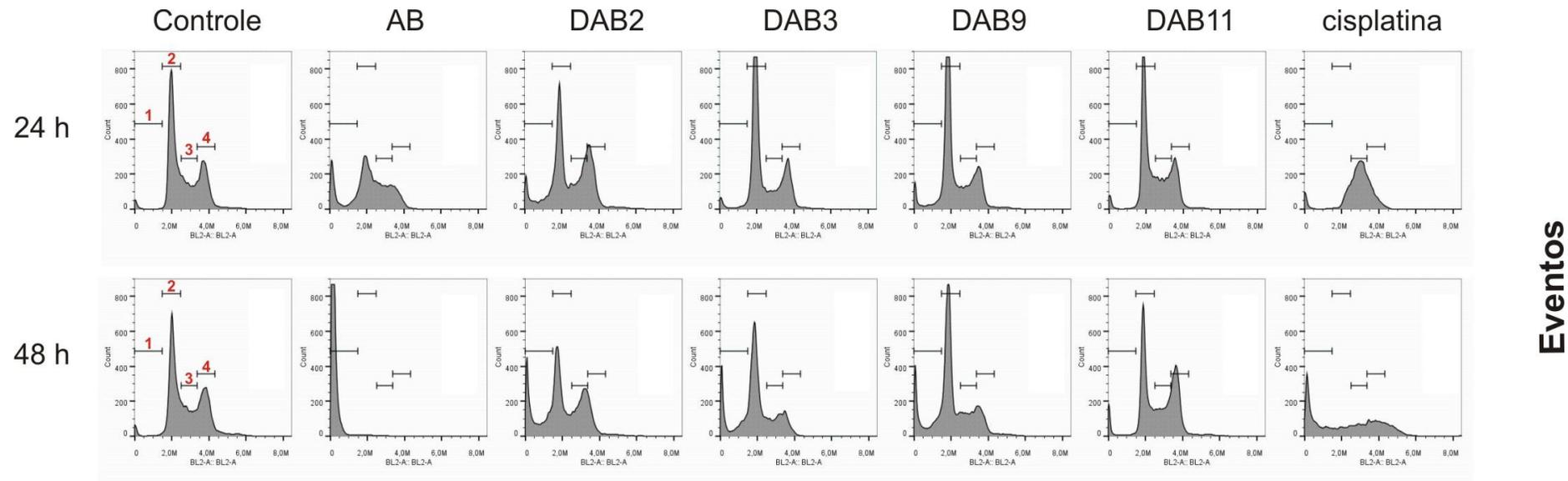
Em relação ao controle da linhagem A549 não tratado, AB não induziu acúmulo em qualquer fase do ciclo celular, mas sim induziu diretamente morte celular após 24 h de tratamento, evidenciada pelo pico SubG1 (18,8%) e redução significativa de G0/G1 (36,7%), sendo o mesmo perfil observado para DAB2 (SubG1= 16,6%; G0/G1= 43,2%). Os derivados DAB3, DAB9 e DAB11 induziram acúmulo de células na fase G0/G1 (60,9; 57,3; 53,7%, respectivamente), com redução significativa do pico G2/M (13,9; 8,90; 15,6%, respectivamente) após 24 h de tratamento.

Após 48 h, praticamente todas as células tratadas com AB não eram viáveis (SubG1= 98,5%), com a ausência das fases G0/G1, S e G2/M. O percentual de células acumuladas em G0/G1 pelos derivados DAB3, DAB9 e DAB11 diminuiu, enquanto um aumento da fase SubG1 foi observado, da mesma forma que o observado para DAB2. O percentual de células acumuladas nas fases S e G2/M

permaneceu praticamente o mesmo que após 24 h, com exceção de DAB11, onde curiosamente foi observado um aumento na fase G2/M (25,7%).



**Figura 13.** Distribuição de células da linhagem de câncer de pulmão A549 em cada fase do ciclo celular, após tratamento com a concentração IC<sub>80</sub> de ácido betulínico (AB) e derivados, e cisplatina (2 µmol/L), por 24 e 48 h. Os resultados foram obtidos por meio da análise do conteúdo de DNA corado com IP por citometria de fluxo e foram comparados com um controle não tratado. Os resultados expressam a média ± DP de três experimentos independentes. [\*] p<0,05.



Eventos

### Quantidade de DNA

**Figura 14.** Histogramas da análise da distribuição de células da linhagem de câncer de pulmão A549 em cada fase do ciclo celular, após tratamento com a concentração  $IC_{80}$  de ácido betulínico (AB) e derivados, e cisplatina ( $2 \mu\text{mol/L}$ ), por 24 e 48 h. Os resultados foram obtidos por meio da análise do conteúdo de DNA corado com IP por citometria de fluxo e foram comparados com um controle não tratado. Fases do ciclo celular: 1. SubG1, 2. G0/G1, 3. S, 4. G2/M. Os histogramas são representativos de três experimentos independentes.

Após 72 h (dados não mostrados) foi observado um aumento considerável do pico SubG1, com a ausência de picos nas demais fases do ciclo celular em todos os tratamentos. A análise das células em cultura por microscopia óptica mostrou que a maioria das células não estava mais aderente ao frasco de cultura, ou seja, estava flutuante no meio, evidenciando processo de morte celular.

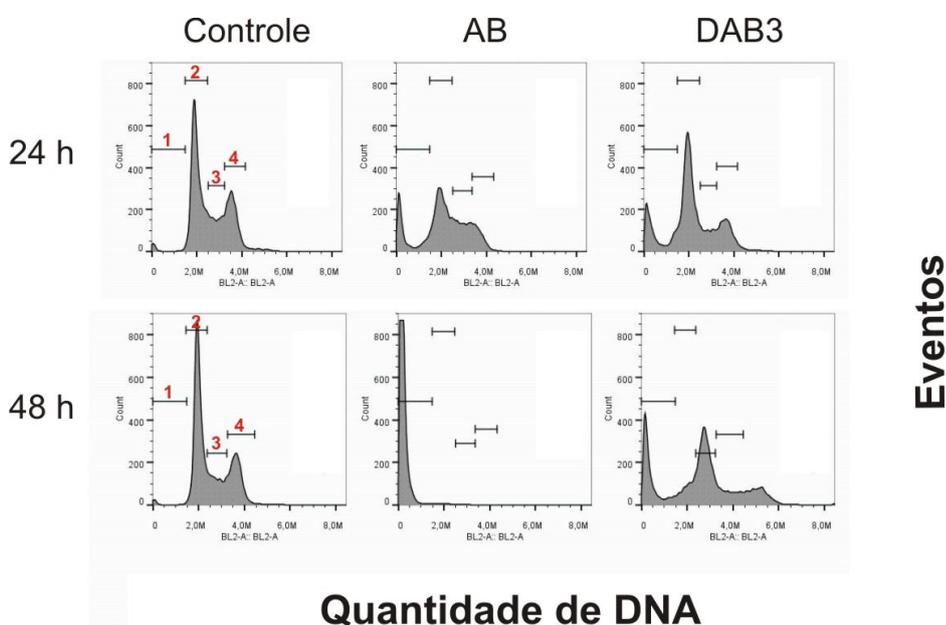
Segundo Reyes-Zurita e colaboradores (2011), toda célula que sofre apoptose pode ser detectada como um pico subdiploide (= hipodiploide) ou SubG1 por citometria de fluxo. O pico SubG1 corresponde às células com DNA fragmentado, sugerindo desta forma que elas sofreram apoptose (SANTOS *et al.*, 2011).

Os resultados sugerem que os derivados dinitrofenil-hidrazônicos do AB interferiram no ciclo celular da linhagem A549 através do bloqueio da fase G0/G1 após 24 h de tratamento, com exceção de DAB2. Entretanto, quando comparados com AB, a indução de apoptose mostrou ser um efeito mais lento, tendo em vista que praticamente todas as células tratadas com o precursor não eram viáveis após 48 h, enquanto que o pico SubG1 das células tratadas com os derivados começou a tornar-se mais evidente após o mesmo período, com exceção de DAB11. DAB2 mostrou comportamento semelhante ao AB após 24 h de tratamento, embora as concentrações-teste fossem bastante diferentes, provocando provavelmente um efeito dose-dependente.

As concentrações IC<sub>80</sub> de AB, DAB9 e DAB11 eram semelhantes, e mesmo assim apresentaram diferentes alterações no ciclo celular, dependentes do tempo, evidenciando que as modificações na molécula original influenciaram o mecanismo de ação. Entretanto, a IC<sub>80</sub> da substância mais ativa DAB3 (4,11 µmol/L) foi muito diferente dos demais compostos. Um experimento adicional foi realizado para verificar se o efeito de DAB3 não poderia ser do tipo dose-dependente, sendo testado na mesma concentração de AB (23 µmol/L). Nessa concentração, em relação ao controle não tratado, DAB3 não induziu acúmulo de células em nenhuma fase do ciclo celular, sendo observado um aumento significativo em SubG1 (21,1%) e redução nas fases G0/G1, S e G2/M após 24 h de tratamento. Após 48 h de tratamento, SubG1 continuou aumentando, enquanto as fases G0/G1 e G2/M reduziram. Interessantemente, observou-se que houve um deslocamento da fase G0/G1 para a fase S, com acúmulo de 30,7% (Tabela 7 e Fig. 15).

**Tabela 7.** Análise da distribuição (%) de células de câncer de pulmão A549 em cada fase do ciclo celular, após tratamento com DAB3 (23  $\mu\text{mol/L}$ ), durante 24 e 48 h. Os resultados foram obtidos por meio da análise do conteúdo de DNA corado com IP por citometria de fluxo e foram comparados com um controle não tratado. Os resultados expressam a média $\pm$ DP de três experimentos independentes.

Fase	Controle	DAB3
<b>24 h</b>		
<i>subG1</i>	2,69 $\pm$ 0,17	21,1 $\pm$ 1,21
<i>G0/G1</i>	50,5 $\pm$ 1,49	45,5 $\pm$ 0,74
S	19,4 $\pm$ 1,97	12,2 $\pm$ 1,05
<i>G2/M</i>	25,0 $\pm$ 1,07	16,4 $\pm$ 1,17
<b>48 h</b>		
<i>subG1</i>	2,92 $\pm$ 0,78	28,7 $\pm$ 3,46
<i>G0/G1</i>	50,4 $\pm$ 0,81	13,2 $\pm$ 1,65
S	17,6 $\pm$ 0,57	30,7 $\pm$ 3,46
<i>G2/M</i>	24,8 $\pm$ 0,77	9,72 $\pm$ 2,97



**Figura 15.** Histogramas da análise da distribuição de células da linhagem de câncer de pulmão A549 em cada fase do ciclo celular, após tratamento com ácido betulínico (AB) ( $\text{IC}_{80}$ ) e DAB3 (23  $\mu\text{mol/L}$ ), por 24 e 48 h. Os resultados foram obtidos por meio da análise do conteúdo de DNA corado com IP por citometria de fluxo e foram comparados com um controle não tratado. Fases do ciclo celular: 1. SubG1, 2. G0/G1, 3. S, 4. G2/M. Os histogramas são representativos de três experimentos independentes.

Com estes resultados foi verificado que os derivados dinitrofenil-hidrazônicos do AB, além de exercerem efeito tempo-dependente, também atuam de maneira dose-dependente. De todo modo, foi constatado que os derivados influenciaram o ciclo celular pelo bloqueio das células na fase G0/G1 quando a  $\text{IC}_{80}$  foi testada, impedindo que elas prosseguissem adiante até a mitose, direcionando tais células para apoptose. Exceção foi observada para DAB11, cujo bloqueio das células na

fase G0/G1 após 24 h parece ter sido superado, com as células sendo bloqueadas na fase G2/M após 48 h. Há evidências de que o dano causado por DAB11 às células foi reparado e elas puderam prosseguir com a mitose, uma vez que o pico SubG1 não aumentou. Portanto, o bloqueio do ciclo celular pode ser um dos mecanismos de ação envolvidos no potencial antitumoral destas moléculas. No entanto, a introdução do grupo 2,4-DNPH (C3 ou C20) assim como a oxidação da posição C20 retardaram a ação das moléculas, tornando o mecanismo de ação mais lento.

#### **4.3.1.4.2. Análise de morte celular**

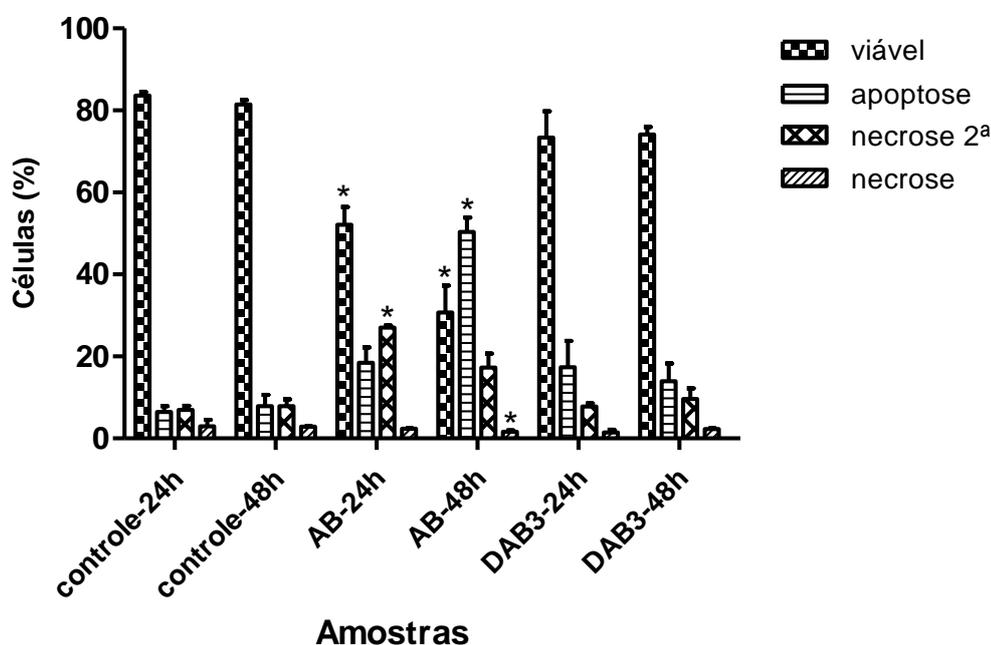
A indução de morte celular pelo AB e o derivado mais ativo - DAB3 - também foi avaliada pelo ensaio de incorporação com anexina V-FITC e IP, através do qual foi possível diferenciar células da linhagem A549 em apoptose inicial (anexina V+ e IP-), apoptose tardia/necrose secundária (anexina V+ e IP+) e necrose (anexina V- e IP+).

Os eventos iniciais do processo apoptótico incluem a perda da assimetria da membrana juntamente com a translocação de fosfatidilserina da membrana interna para a membrana externa (SANTOS *et al.*, 2011). Este é o princípio fundamental da técnica, já que a proteína ligadora de fosfolípido anexina V tem alta afinidade pela fosfatidilserina e liga-se à células marcadas fluorescentemente com FITC (REYES-ZURITA *et al.*, 2009), indicando células em estágio inicial de apoptose. Os macrófagos possuem um receptor de fosfatidilserina na membrana, que permite que células apoptóticas sejam reconhecidas pelos fagócitos *in vivo*, contribuindo com a remoção das células mortas (FADOK *et al.*, 2000).

Um aumento no número de células apoptóticas foi observado nas células tratadas em comparação ao controle após 24 h. Para células tratadas com AB foi observado um aumento de cerca de 32% de células apoptóticas (apoptose inicial+necrose secundária) em relação ao controle, enquanto que para células tratadas com DAB3, o aumento de células apoptóticas foi cerca de 12%. Após 48 h, mais de 50% das células tratadas com AB eram apoptóticas, enquanto que o número de células em apoptose registrado para DAB3 caiu para 8% (Tabela 8 e Figs. 16 e 17). Um elevado número de células em estágio de necrose secundária foi verificado para AB após 24 h.

**Tabela 8.** Análise de células (%) de câncer de pulmão A549 tratadas com a concentração  $IC_{80}$  de ácido betulínico (AB) e DAB3 após 24 e 48 h pelo teste de incorporação da anexina V-FITC e IP por citometria de fluxo. Os resultados foram comparados com um controle não tratado e correspondem à média  $\pm$  DP de dois experimentos independentes.

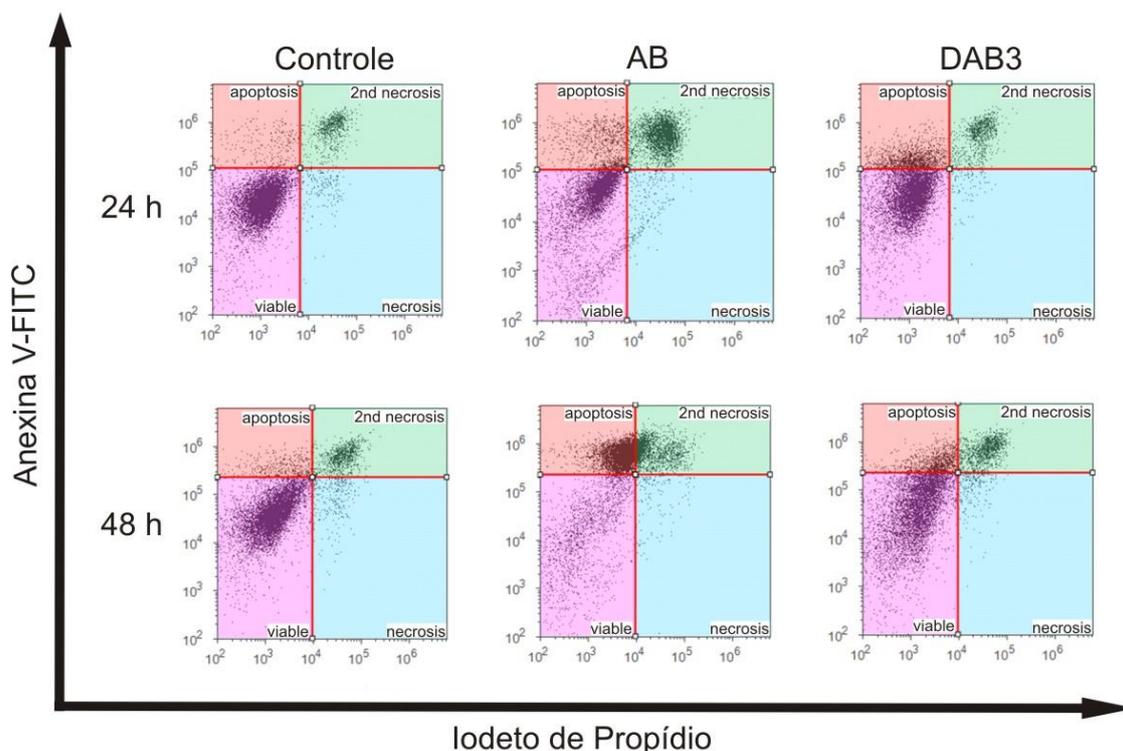
Células	Controle	AB	DAB3
<b>24 h</b>			
Viável	83,7 $\pm$ 0,81	52,1 $\pm$ 4,33	73,3 $\pm$ 6,42
Apoptose	6,47 $\pm$ 1,37	18,5 $\pm$ 3,75	17,4 $\pm$ 6,36
Necrose	2,54 $\pm$ 2,16	2,38 $\pm$ 0,11	1,47 $\pm$ 0,68
Necrose 2 <sup>a</sup>	6,94 $\pm$ 1,03	27,0 $\pm$ 0,47	7,79 $\pm$ 0,74
<b>48 h</b>			
Viável	81,4 $\pm$ 1,07	30,7 $\pm$ 6,58	74,1 $\pm$ 1,87
Apoptose	7,83 $\pm$ 2,82	50,4 $\pm$ 3,48	14,0 $\pm$ 4,33
Necrose	2,88 $\pm$ 0,06	1,66 $\pm$ 0,31	2,31 $\pm$ 0,15
Necrose 2 <sup>a</sup>	7,82 $\pm$ 1,73	17,3 $\pm$ 3,41	9,59 $\pm$ 2,60



**Figura 16.** Análise de morte celular (%) das células de câncer de pulmão A549 tratadas com a concentração  $IC_{80}$  de ácido betulínico (AB) e DAB3 após 24 e 48 h pelo teste de incorporação da anexina V-FITC e IP em citômetro de fluxo. Os resultados foram comparados com um controle não tratado e correspondem à média  $\pm$  DP de dois experimentos independentes. [\*]  $p < 0,05$ .

Apesar do valor de  $IC_{50}$  de AB ser maior que o de DAB3, ou seja, é menos tóxico, o precursor parece induzir maior magnitude de apoptose em um curto período de tempo. Embora o processo apoptótico inicie-se após 24 h de tratamento, DAB3 aparentou ter um mecanismo de ação lento, fato que já havia sido observado na análise do ciclo celular para a classe de derivados dinitrofenil-hidrazônicos. A redução do percentual de apoptose registrado para DAB3 pode ser correlacionada ao bloqueio da fase G0/G1 no ciclo celular. Provavelmente DAB3 incitou alguma injúria mais leve ao metabolismo celular ou ao material genético, e como resposta o

ciclo celular foi parado em G0/G1, impedindo que a célula prosseguisse com a replicação, sendo marcada para morrer. O tempo entre o bloqueio do ciclo celular, as tentativas de reparo ao dano celular, a marcação de morte celular e ativação metabólica das vias apoptóticas poderia explicar o mecanismo de ação mais lento de DAB3.



**Figura 17.** Ensaio da incorporação de anexina V-FITC em citômetro de fluxo: células de câncer de pulmão A549 tratadas com a concentração  $IC_{80}$  de ácido betulínico (AB) e DAB3 após 24 e 48 h, em comparação a um controle não tratado. Os histogramas são representativos de dois experimentos independentes.

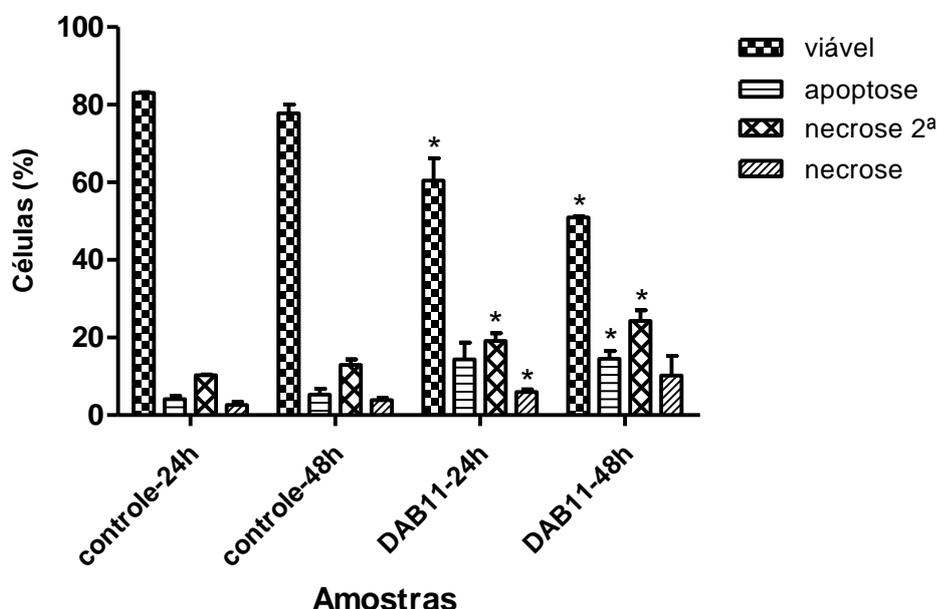
A diferença na taxa de apoptose dependente do tempo poder ser explicada tendo-se em vista prováveis diferenças físicas e farmacêuticas das moléculas, como solubilidade em meio aquoso, capacidade de penetração intracelular, estabilidade, ativação metabólica, entre outros. As células apoptóticas em qualquer sistema podem morrer e desaparecer rapidamente, já que a indução da apoptose depende do tempo de exposição e da concentração da substância associada a vários eventos morfológicos e químicos, eventualmente resultando em necrose secundária (SUN; ZHENG; TU, 2006).

Para fins de comparação, o derivado DAB11 também foi posteriormente avaliado frente ao ensaio de incorporação da anexina V-FITC, com o intuito de verificar se a presença do grupo hidroxila no C3 poderia contribuir no processo de indução de apoptose. Em relação ao controle, cerca de 19% das células tratadas

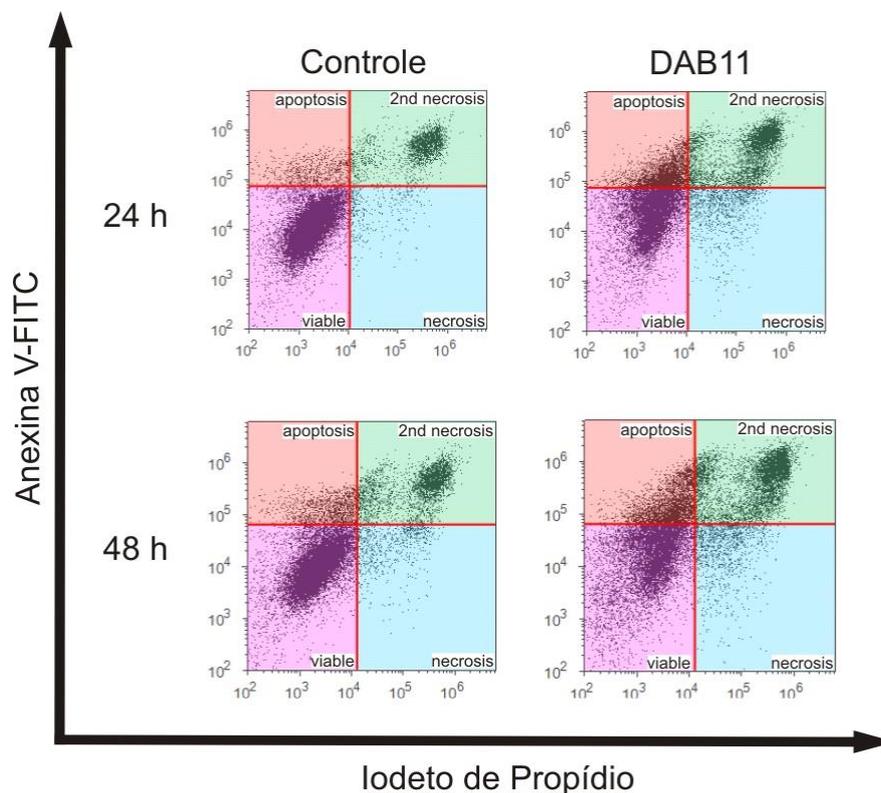
após 24 h com a dose IC<sub>80</sub> eram apoptóticas (apoptose inicial+necrose secundária), enquanto que após 48 h de tratamento o percentual de células apoptóticas permaneceu praticamente o mesmo (20,5%), conforme verificado na Tabela 9 e nas Figuras 18 e 19. Embora não tenha apresentado o mesmo perfil que AB, o derivado DAB11 apresentou maior percentual de indução de apoptose que DAB3, evidenciando que a presença de um grupo hidroxila livre possa favorecer o efeito apoptótico de AB substituído com uma molécula de 2,4-DNPH.

**Tabela 9.** Análise de células (%) de câncer de pulmão A549 tratadas com a concentração IC<sub>80</sub> de DAB11 após 24 e 48 h pelo teste de incorporação da anexina V-FITC e IP por citometria de fluxo. Os resultados foram comparados com um controle não tratado e correspondem à média ± DP de dois experimentos independentes.

Células	controle	DAB11
<b>24 h</b>		
<i>Viável</i>	83,0±0,18	60,5±5,74
<i>Apoptose</i>	4,10±0,89	14,4±4,32
<i>Necrose</i>	2,59±0,89	6,00±0,59
<i>Necrose 2<sup>a</sup></i>	10,3±0,18	19,1±2,02
<b>48 h</b>		
<i>Viável</i>	77,8±2,23	50,9±0,29
<i>Apoptose</i>	5,33±1,45	14,5±2,03
<i>Necrose</i>	3,87±0,60	10,2±5,07
<i>Necrose 2<sup>a</sup></i>	13,0±1,36	24,3±2,74



**Figura 18.** Análise de morte celular (%) das células de câncer de pulmão A549 tratadas com a concentração IC<sub>80</sub> de DAB11 após 24 e 48 h pelo teste de incorporação da anexina V-FITC e IP em citômetro de fluxo. Os resultados foram comparados com um controle não tratado e correspondem à média ± DP de dois experimentos independentes. [\*] p<0,05.



**Figura 19.** Ensaio da incorporação de anexina V-FITC em citômetro de fluxo: células de câncer de pulmão A549 tratadas com a concentração IC<sub>80</sub> de DAB11 após 24 e 48 h, em comparação a um controle não tratado. Os histogramas são representativos de dois experimentos independentes.

#### 4.3.1.4.3. Análise de ativação das caspases 3, 8 e 9

Os resultados mostraram que AB ativou as caspases 3 e 8 em praticamente 90% após 24 h de tratamento com a dose IC<sub>80</sub>, enquanto que a caspase 9 foi ativada em pouco mais de 50%. Após 48 h, todas as caspases encontravam-se praticamente 100% ativas. O mecanismo de ação mais lento observado para os derivados dinitrofenil-hidrazônicos de AB nos ensaios de ciclo celular e anexina V-FITC foi também verificado nos ensaios de ativação de caspases. Após 24 h, DAB3 e DAB11 não ativaram significativamente nenhuma das caspases. DAB3 não foi capaz de ativar significativamente as caspases analisadas após 48 h, sendo que uma ativação significativa foi observada apenas após 72 h, em torno de 50%. DAB11, por sua vez, ativou consideravelmente as caspases 3 e 8 após 48 h; valores de ativação significativamente expressivos para todas as caspases foram observados após 72 h, de até 75%. Estaurosporina (0,5 µmol/L) foi utilizada como controle positivo de ativação de caspases (Tabela 10 e Fig. 20).

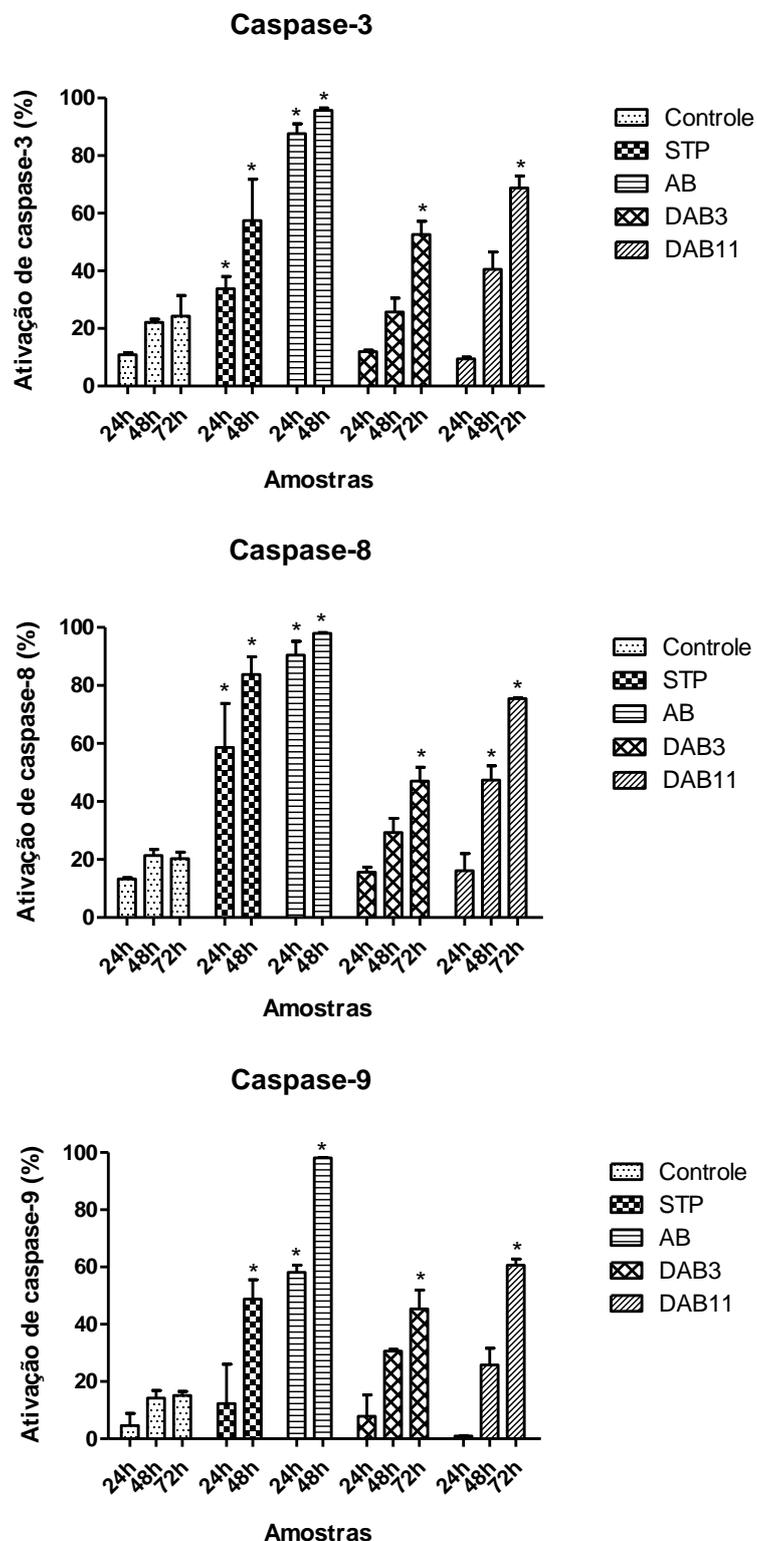
**Tabela 10.** Ativação (%) de caspases 3, 8 e 9 de células de câncer de pulmão A549 tratadas com a concentração IC<sub>80</sub> de ácido betulínico (AB), DAB3 e DAB11, e estaurosporina (STP) (0,5 µmol/L) usado como controle positivo, durante 24, 48 e 72 h por citometria de fluxo. Foram utilizados inibidores de caspase: FITC-DEVD-FMK (caspase 3); FITC-IETD-FMK (caspase 8); Red-LEHD-FMK (caspase 9). Os resultados foram comparados com um controle não tratado e correspondem à média ± DP de dois experimentos independentes.

Caspases	Controle	STP	AB	DAB3	DAB11
3 – 24h	10,8±0,71	33,8±4,28	87,6±3,44	11,9±0,48	9,44±0,56
3 – 48h	22,1±1,13	57,5±14,3	95,7±0,87	25,7±4,81	40,6±5,98
3 – 72h	24,3±7,23	-	-	52,6±4,57	68,8±4,12
8 – 24h	13,3±0,42	58,6±15,2	90,5±4,74	15,6±1,77	16,1±5,89
8 – 48h	21,4±2,09	83,8±6,06	98,0±0,22	29,3±4,90	47,4±4,87
8 – 72h	20,3±2,20	-	-	47,0±4,77	75,5±0,25
9 – 24h	4,63±4,24	12,3±13,7	58,1±2,48	7,87±7,39	0,95±0,16
9 – 48h	14,2±2,68	48,8±6,73	98,1±0,23	30,6±0,58	25,8±5,78
9 – 72h	15,1±1,36	-	-	45,4±6,55	60,6±2,18

De acordo com a literatura, em células de neuroblastoma, meduloblastoma, glioblastoma e sarcoma de Ewing, AB incita apoptose preferencialmente pela via mitocondrial, alterando o potencial de membrana e induzindo a liberação de citocromo c para o citosol, com ativação da caspase 9. A incubação de extratos citoplasmáticos com mitocôndrias isoladas de células tratadas com AB induziram a clivagem de caspase 8, caspase 3 e PARP, de uma maneira tempo-dependente, sendo primeiramente detectada após 12 h de tratamento. Foi verificado que a clivagem da caspase 8 não é direta e depende da permeabilidade da membrana mitocondrial. Além do mais, a adição de citocromo c ao extrato citosólico não clivou a caspase 8, sendo que a clivagem foi observada quando o fator pró-apoptótico AIF foi adicionado ao meio. A clivagem da caspase 8 pode ser causada pela mitocôndria ativada na ausência de formação do complexo DISC (CD95) da via extrínseca (FULDA *et al.*, 1998a; FULDA *et al.*, 1998b; FULDA; DEBATIN, 2000).

A perturbação da função mitocondrial constitui o evento central na morte celular induzida por AB, resultando na ativação da cascata de caspases e consequentemente apoptose. As mitocôndrias de células que foram tratadas com AB induziram a clivagem de ambas as caspases 3 e 8 em extratos citosólicos. A clivagem de caspase 3 e 8 foi precedida por um distúrbio no potencial de membrana da mitocôndria e pela geração de EROs, que estão envolvidos no processo inicial de permeabilização da membrana mitocondrial. Os resultados mostraram que a caspase 8 foi ativada após alteração do potencial de membrana da mitocôndria durante apoptose induzida por AB. A ativação de caspases foi restrita apenas à células que já haviam perdido o seu potencial de membrana mitocondrial,

evidenciando o papel central da mitocôndria (FULDA, 2009; FULDA; KROEMER, 2009).



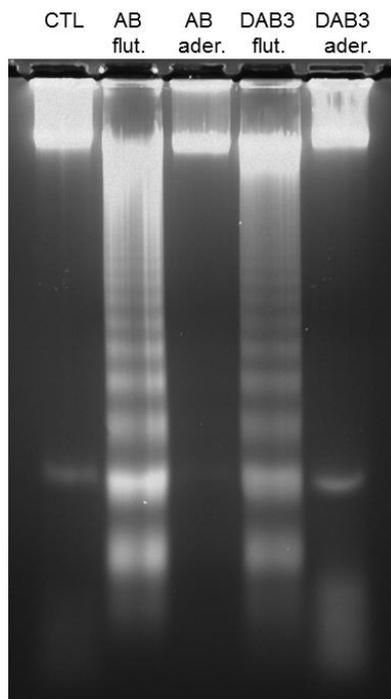
**Figura 20.** Análise da ativação (%) de caspases 3, 8 e 9 de células de câncer de pulmão A549 após tratamento com a concentração  $IC_{80}$  de ácido betulínico (AB) e derivados DAB3 e DAB11, e estaurosporina (STP) ( $0,5 \mu\text{mol/L}$ ) durante 24, 48 e 72 h por citometria de fluxo. Os resultados foram comparados com um controle não tratado e representam a média  $\pm$  DP de dois experimentos independentes. [\*]  $p < 0,05$ .

A liberação de citocromo c da mitocôndria ocorre após a queda do potencial da membrana mitocondrial interna. O atraso observado em alguns processos apoptóticos pode estar relacionado ao tempo requerido entre a mudança do potencial transmembrana e a liberação de citocromo c. Uma vez iniciado o processo, todas as mitocôndrias liberam citocromo c dentro de 5 min (KIECHLE; ZHANG, 2002).

Neste estudo, os resultados mostraram que todas as caspases foram ativadas durante o período do experimento, com maior magnitude para a caspase iniciadora 8 e a caspase efetora 3. Pelo menos sobre a linhagem A549, há uma indicação de que os derivados testados atuem de alguma forma sobre a membrana e ativem inicialmente a via extrínseca, com a participação de ligantes de receptores de morte, ativando a caspase 8. Posteriormente, a via mitocondrial é ativada, com participação da caspase 9. De acordo com Kiechle & Zhang (2002), Bruin & Medema (2008) e Li & Yuan (2008), as vias extrínseca e intrínseca se cruzam no nível mitocondrial. Quando o sinal apoptótico é iniciado por uma quantidade insuficiente de caspase 8 ativa, a sinalização apoptótica do receptor de morte deve ser amplificada por uma etapa de amplificação mitocondrial. A caspase 8 também pode clivar a proteína Bid na sua forma ativa tBid. Sendo um membro pró-apoptótico da família Bcl2, tBid induz permeabilização da membrana mitocondrial externa Bax/Bak-dependente e a liberação de citocromo c. Ambas as vias apoptóticas levam a ativação das caspases executoras (caspases 3, 6 e 7).

#### **4.3.1.5. Ensaio de fragmentação do DNA (*DNA laddering*)**

Foi possível observar que as células flutuantes da linhagem A549 após 72 h de tratamento com a dose  $IC_{80}$  de AB e DAB3 sofreram apoptose, por meio do teste de fragmentação do DNA em gel de agarose (Fig. 21), que confirmou que o material genético foi fragmentado em pequenos pares de base, tendo em vista o controle e as células aderentes. A fragmentação do DNA corrobora com outros resultados obtidos em ensaios de morte celular, como as características apoptóticas das células analisadas sob microscopia óptica e de fluorescência, o pico SubG1 no ciclo celular, a análise de anexina V-FITC e a ativação de caspases, que em conjunto confirmaram que o processo de morte celular envolvido no mecanismo de ação dos derivados 2,4-dinitrofenil-hidrazônicos é por meio de apoptose.



**Figura 21.** Ensaio de fragmentação do DNA em gel de agarose: células de câncer de pulmão A549 tratadas com a concentração  $IC_{80}$  de ácido betulínico (AB) e DAB3 após 72 h, em comparação com controle (CTL) não tratado. Cada banda corresponde a fragmentos com cerca de 180 pares de bases ou seus múltiplos. *flut.*= células flutuantes (apoptóticas); *ader.*= células aderentes (viáveis).

Analisando-se os resultados obtidos nos ensaios de ciclo celular, anexina V-FITC, ativação de caspases e fragmentação do DNA, inferiu-se que o mecanismo de ação pelo qual AB e seus derivados 2,4-DNPH atuam sobre células tumorais é por meio de apoptose com a participação de caspases. Entretanto, existe uma diferença bastante clara em relação a cinética de ação. Os efeitos apoptóticos de AB foram pronunciadamente observados logo após as primeiras 24 h de tratamento das células, enquanto os derivados 2,4-DNPH induziram morte celular programada após 48 h. Essas observações levaram a crer que as diferenças estruturais entre precursor e derivados foram responsáveis por tais diferenças no mecanismo de ação, e que provavelmente ocorreu inicialmente uma ação diferenciada sobre a membrana celular da célula tumoral.

Broniatowski, Flasiński & Wydro (2012) sugeriram que a interação dos TP do tipo lupano com fosfolípidios de membranas celulares pode ser a etapa mais importante dos seus mecanismos de ação farmacológica. Os TP do tipo lupano são incorporados não somente pela membrana mitocondrial contendo fosfolípidios específicos como cardiolipinas, mas também por membranas celulares normais ricas em glicerofosfatidilcolinas e esfingomielinas. Os autores prepararam sistemas de

monocamadas contendo lupoanos e lipídios de membrana externa com uma cabeça de colina (glicerofosfatidilcolina e esteroilesfingomielina, ambos considerados os principais lipídios estruturais da membrana externa de células animais e vegetais). AB e lupeol foram testados, uma vez que um possui a capacidade de formar ligações de hidrogênio no C28 e o outro não, respectivamente. Os resultados evidenciaram que tanto AB como lupeol formaram monocamadas binárias miscíveis com os lipídios selecionados; a incorporação dos lupoanos pelo filme fosfolipídico alterou significativamente a morfologia da membrana, o que provou a miscibilidade mútua dos componentes. Os TP do tipo lupano são estruturalmente similares a esteroides e por isso análogos ao colesterol e a esteroides vegetais, e desta forma são facilmente incluídos dentro das biomembranas, exercendo, entretanto, um efeito mais fluidizante.

Houve diferenças na ação do lupeol e AB sobre as membranas lipídicas, o que foi correlacionado com a diferença estrutural entre ambos. AB tem uma estrutura anfifílica do tipo bola, possuindo dois grupos hidrofílicos em ambas as extremidades da cadeia hidrofóbica. Ele pode assumir duas orientações diferentes na interface ar/água e dentro da membrana. Em ambas as orientações, AB pode formar ligações de hidrogênio com o grupo cabeça da esteroilesfingomielina e tal comportamento introduz desordem adicional à monocamada. Num filme binário, moléculas de AB formam ligações de hidrogênio umas com as outras via o grupo polar direcionado para o ar e com a esfingomielina via o grupo imerso na subfase aquosa. Esteroilesfingomielina pode formar ligações de hidrogênio via grupos OH livres. Já no caso do lupeol, existe apenas uma orientação da molécula, e a ligação da hidroxila do lupeol com a hidroxila da esfingomielina via ligações de hidrogênio estabiliza a monocamada e reduz a migração dos componentes, permitindo uma ordenação periódica das moléculas (BRONIATOWSKI; FLASINSKI; WYDRO, 2012).

Além do caráter anfifílico das moléculas, outros fatores também podem influenciar na passagem de uma substância através de bmembranas lipídicas, entre eles lipossolubilidade, pH e pKa, peso molecular, estabilidade, entre outros. Substâncias mais lipossolúveis, caracterizadas por um coeficiente de partição óleo/água ( $\log P$ ) mais alto, atravessam rapidamente as membranas biológicas. Segundo Seydel & Schaper (1982), normalmente o coeficiente de partição ótimo ( $\log P_o$ ) dos fármacos em geral é encontrado numa faixa de 2 a 7, e desvios de  $\log P_o$  diminuem a taxa de transporte através das membranas. Desta forma, valores abaixo

desse intervalo dificultam a permeação da substância pela membrana plasmática, enquanto valores acima dessa faixa podem fazer com que os fármacos fiquem retidos na bitembrana lipídica, devido a sua elevada lipossolubilidade.

O log P calculado pelo software ChemDraw<sup>®</sup> Ultra 8.0 (CambridgeSoft Corporation, EUA) para AB foi 7,38, enquanto que valores encontrados na literatura foram de 6,61 (ELUSIYAN *et al.*, 2011) e 6,85 (CLAUDE *et al.*, 2004). Já os valores de log P calculados para os derivados DAB2, DAB3, DAB9 e DAB11 foram de 9,87, 9,13, 8,44 e 8,77, respectivamente, demonstrando que os derivados 2,4-DNPH do AB são mais lipossolúveis que a molécula de partida.

De acordo com as evidências da literatura, AB desestabiliza e desorganiza as membranas celulares, e apresenta alta miscibilidade e conseqüentemente permeabilidade às mesmas. Desta forma, a alteração da estabilidade da bicamada lipídica provocada pelo AB pode causar algum dano irreversível à membrana celular e conseqüentemente o recrutamento de sinalizadores extracelulares (por ex. Fas, TNF $\alpha$ , TRAIL) e sua ligação à receptores de morte celular localizados na membrana externa ativa a via extrínseca da apoptose. Concomitantemente, devido a sua elevada permeabilidade à membrana plasmática, AB atravessa a bicamada lipídica e desta forma pode interagir com mecanismos citoplasmáticos e nucleares, o que prejudica o funcionamento normal da mitocôndria, desencadeando a via intrínseca da apoptose.

Neste estudo verificou-se que os derivados 2,4-DNPH do AB também foram capazes de ativar as caspases 8 e 9, entretanto expressivamente após 72 h. Tal mecanismo de ação mais lento em relação ao AB pode estar relacionado com os valores de log P. Os derivados 2,4-DNPH são notadamente mais lipossolúveis, apresentam maior peso molecular e também grupos funcionais mais volumosos que o seu precursor. Portanto, acredita-se que os derivados 2,4-DNPH apresentem maior dificuldade em atravessar a membrana plasmática tendo em vista sua maior afinidade por substâncias lipídicas. Portanto, as substâncias provavelmente ficaram retidas na bicamada lipídica. Outra hipótese é a de que os derivados 2,4-DNPH, ao atravessarem a membrana, em função do seu tamanho e volume, poderiam alterar a organização da bicamada lipídica e o grupo 2,4-dinitrofenil-hidrazona poderia funcionar como uma espécie de “gancho”, dificultando a passagem das moléculas para o citoplasma. Essas evidências justificariam o mecanismo de ação mais lento desses novos derivados em relação à molécula precursora.

Com maior dificuldade para atravessar a membrana plasmática e apresentando maior afinidade pelos lipídios da mesma, os derivados 2,4-DNPH acabariam trazendo algum dano, o que desencadearia a via extrínseca da apoptose, com a ativação da caspase 8. Com a necessidade de amplificar o sinal apoptótico, a via intrínseca seria ativada posteriormente, com a participação da caspase 9.

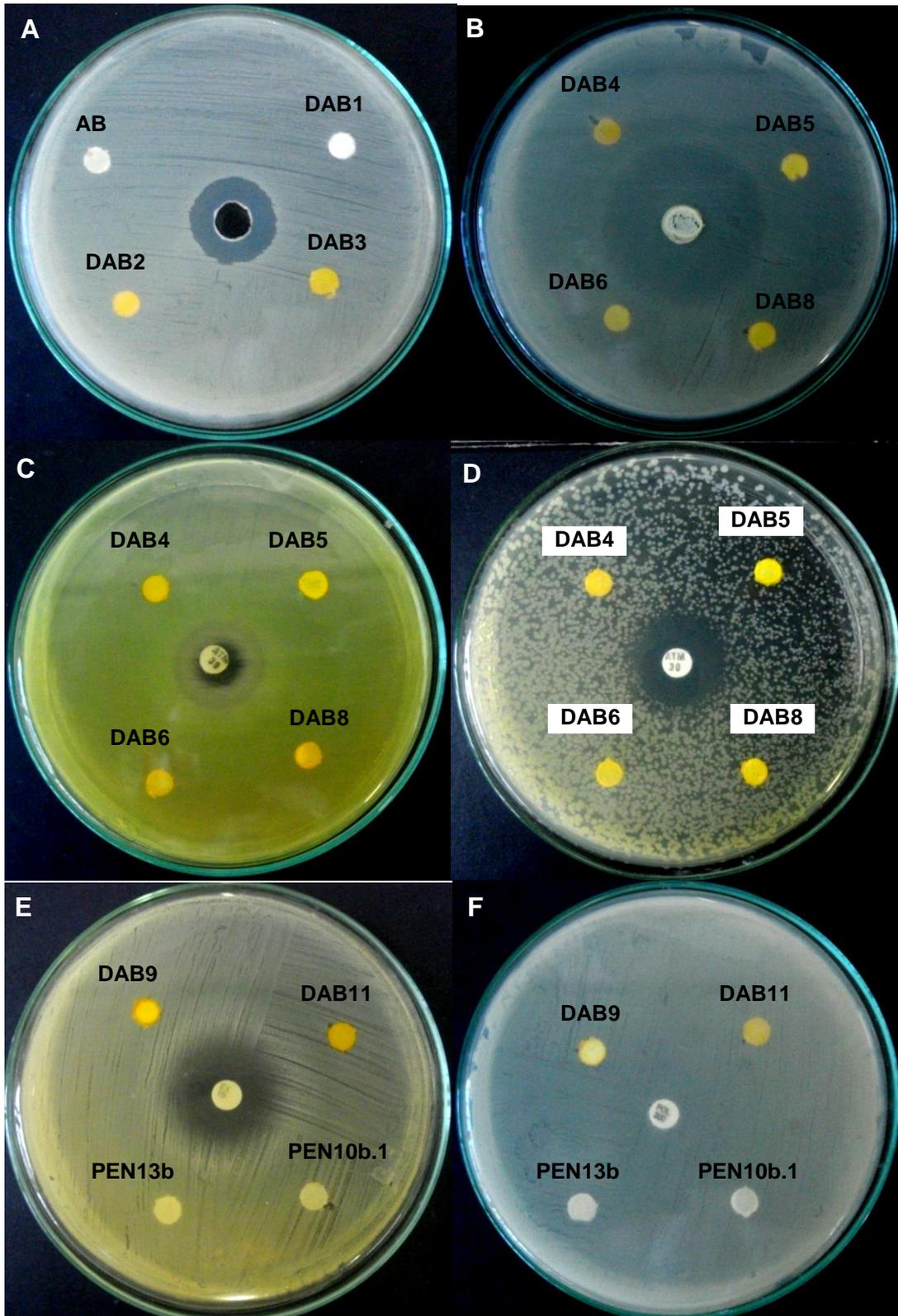
#### **4.3.2. Atividade antimicrobiana**

##### **4.3.2.1. Método de difusão em disco**

Tanto AB assim como os seus derivados testados (DAB1-6, 8, 9, 11, PEN10b.1 e PEN13b) não foram capazes de inibir o crescimento dos micro-organismos avaliados pelo método de difusão em disco, já que não foi observada a formação de halos de inibição. O antibiótico polimixina B, usado como controle positivo para a cepa KPC, não apresentou efeito de inibição conforme era previsto, embora de qualquer maneira não tenham sido observados halos de inibição para as substâncias testadas. Um exemplo de cada micro-organismo pode ser visualizado na Figura 22.

##### **4.3.2.2. Método de macrodiluição em caldo**

Considerando a possibilidade de que as substâncias avaliadas pelo método de difusão em disco pudessem não ter se difundido apropriadamente no ágar em virtude da baixa solubilidade em meio aquoso, AB, DAB2, DAB3 e DAB11 foram selecionados para o ensaio de macrodiluição em caldo. Entretanto, os derivados mostraram-se novamente inativos nesse ensaio, uma vez que todos os tubos em todas as concentrações avaliadas (12,5-200 µg/mL) turvaram, ou seja, as substâncias não apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* e MRSA.



**Figura 22.** Avaliação da atividade antimicrobiana do ácido betulínico (AB) e seus derivados pelo teste de difusão em disco. MRSA (A). *Candida albicans* (B). *Pseudomonas aeruginosa* (C). *Escherichia coli* (D). *Staphylococcus aureus* (E). KPC (F). O disco central corresponde ao antibiótico utilizado como controle positivo (vancomicina para MRSA; nistatina para *C. albicans*; aztreonam para *P. aeruginosa* e *E. coli*; eritromicina para *S. aureus*; polimixina B para KPC).

### 4.3.3. Atividade antimalárica

Em uma triagem inicial, AB e seus derivados (DAB1-6, 8, 9, 11, PEN10b.1 e PEN13b) foram testados sobre *P. falciparum* W2 (resistente à cloroquina) em duas concentrações diferentes, 25 e 50 µg/mL, para verificar o percentual de redução do crescimento do protozoário (Tabela 11). Posteriormente, os valores de IC<sub>50</sub> foram determinados (Tabela 12).

**Tabela 11.** Redução do crescimento (%) de *P. falciparum* W2 (resistente à cloroquina) tratados com ácido betulínico (AB) e seus derivados nas concentrações de 25 e 50 µg/mL, calculada pelo método de incorporação de [<sup>3</sup>H]-hipoxantina\* ou pelo método do LDH. Os resultados representam a média de três experimentos independentes.

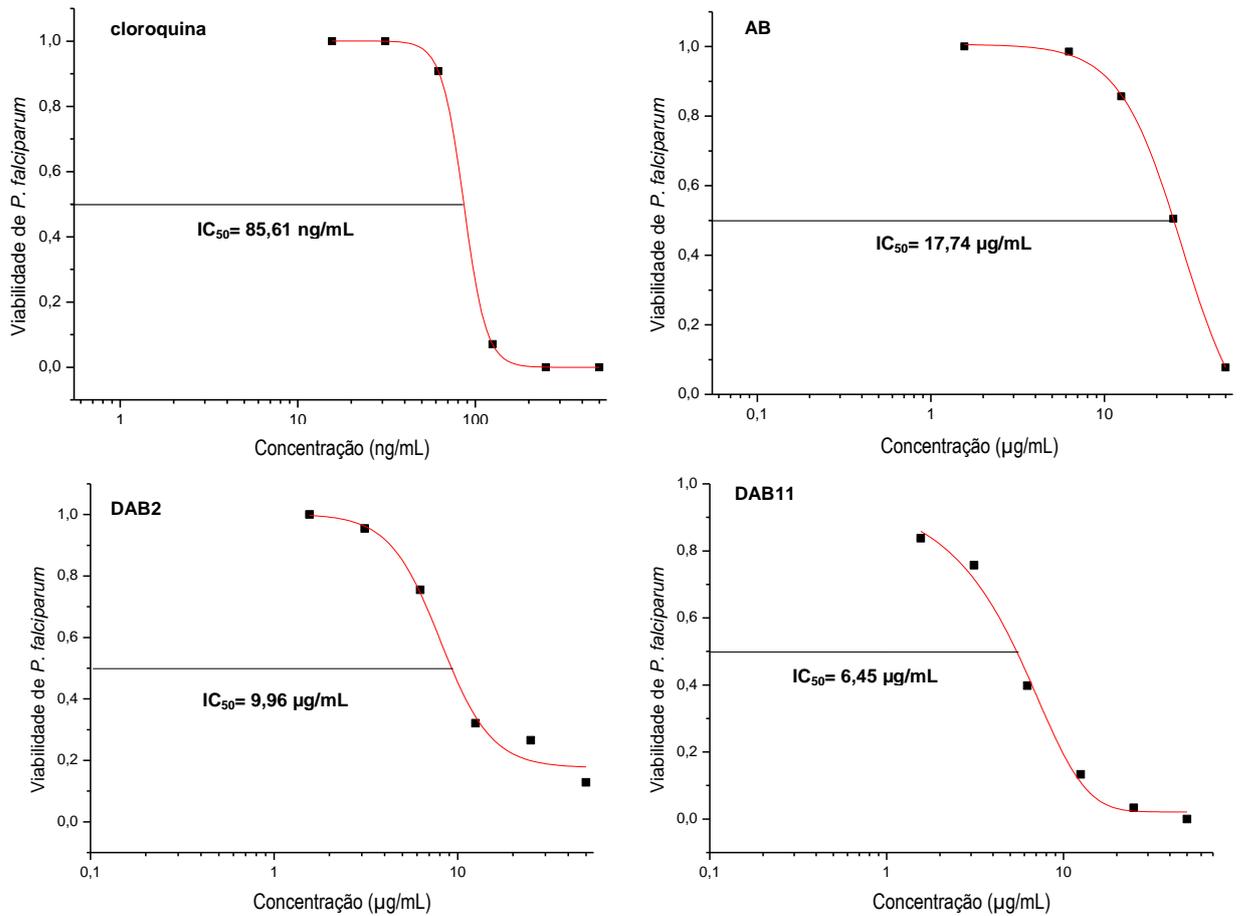
Conc. (µg/mL)	AB*	DAB									PEN 10b.1	PEN 13b
		1	2	3	4	5	6	8	9	11		
25	84	5	60	0	0	12	15	0	4	88	0	18
50	97	21	80	0	4	19	32	14	15	90	0	48

**Tabela 12.** Valores de IC<sub>50</sub> (µg/mL) ± DP de ácido betulínico (AB) e seus derivados avaliados contra *P. falciparum* W2 (resistente à cloroquina). Os resultados representam a média ± DP de três experimentos independentes.

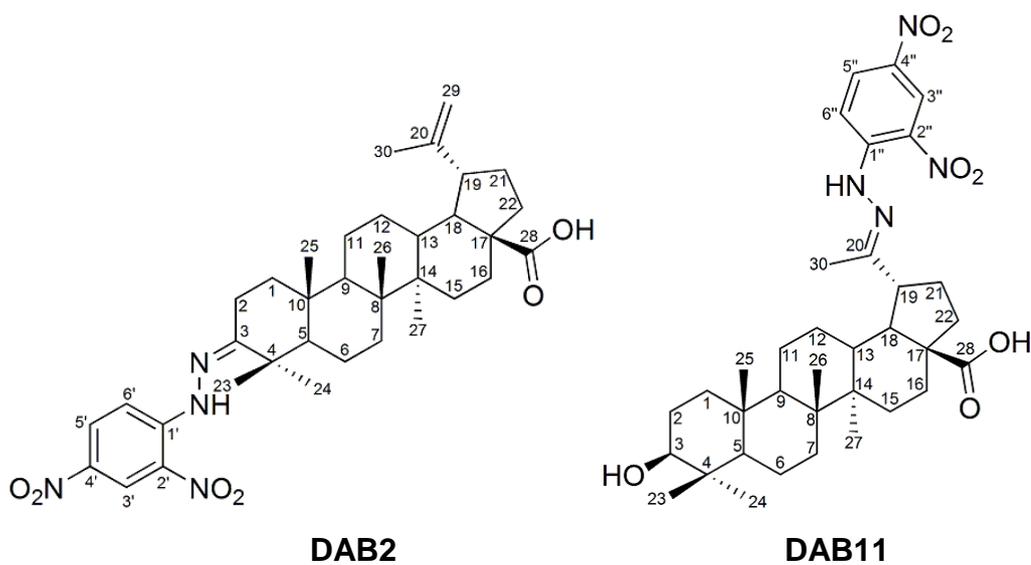
Substâncias	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	Classificação <sup>30</sup>
AB	17,7±1,3	moderadamente ativa
DAB1	>50	inativa
DAB2	9,96±1,20	ativa
DAB3	>50	inativa
DAB4	>50	inativa
DAB5	>50	inativa
DAB6	>50	inativa
DAB8	>50	inativa
DAB9	>50	inativa
DAB11	6,45±1,47	ativa
PEN10b.1	>50	inativa
PEN13b	>50	inativa
Cloroquina	0,085±0,0201	muito ativa

Das 12 amostras avaliadas, nove foram inativas. AB foi considerado moderadamente ativo (IC<sub>50</sub>= 17,7 µg/ml), enquanto que os derivados DAB2 (IC<sub>50</sub>= 9,96 µg/ml) e DAB11 (IC<sub>50</sub>= 6,45 µg/ml) foram considerados ativos. A cloroquina, utilizada como antimalárico padrão, foi considerada muito ativa (IC<sub>50</sub>= 0,085 µg/ml) (Fig. 23).

<sup>30</sup> Classificação segundo escala padronizada pela Rede Malária PRONEX CNPq/FAPEMIG (UFMG).



**Figura 23.** Curvas dose-resposta de ácido betulínico (AB), DAB2, DAB11 e cloroquina avaliados contra parasitos do ciclo sanguíneo de *P. falciparum* W2, mostrando os valores da concentração inibitória de 50% do crescimento ( $IC_{50}$ ).



É interessante observar que a única similaridade estrutural que as moléculas mais ativas compartilham entre si é o grupo carboxílico livre em C28. A introdução

de uma molécula 2,4-DNPH tanto no C3 quanto no C20 mostrou-se eficiente na obtenção de derivados ativos do AB. Em termos de relação estrutura-atividade, pode-se sugerir superficialmente que a ligação dupla terminal, juntamente com o ácido carboxílico livre, é importante para o efeito antiplasmódico, tendo em vista que os demais derivados com modificações nessa posição foram inativos. Por outro lado, a modificação do grupo isoprenil em C20-29 também mostrou-se favorável à atividade, desde que a hidroxila em C3 permaneça livre juntamente com o grupo ácido do C28.

Com relação à citotoxicidade sobre células HepG2, DAB2 e DAB11 foram considerados não tóxicos contra células de hepatoblastoma humano, evidenciando que ambas as moléculas possuem uma ação direcionada contra o parasita. Por causa do seu potencial de ativação metabólica, células HepG2 são frequentemente usadas em triagens toxicológicas *in vitro* (CASTERA-DUCROS *et al.*, 2011), já que são consideradas marcadores de citotoxicidade hepática (ROJAS RUIZ *et al.*, 2011).

O IS mostrou que os derivados testados são pelo menos 100 vezes mais seletivos contra *P. falciparum* que para outros tipos celulares. De acordo com Bezivin e colaboradores (2003), moléculas com valores de  $IS > 3$  são consideradas promissoras, sendo que  $IS > 10$  é indicativo de ausência de toxicidade (AGUIAR, 2011). A cloroquina, utilizada como padrão, apresentou  $IS = 2277,5$ . Os valores de  $CC_{50}$ ,  $IC_{50}$  e IS de DAB2 e DAB11 podem ser conferidos na Tabela 13.

**Tabela 13.** Valores de  $CC_{50}$ ,  $IC_{50}$  e  $IS^*$  de DAB2 e DAB11 obtidos para HepG2 A16 e *P. falciparum* W2 (resistente à cloroquina), respectivamente. Os resultados expressam a média de três experimentos independentes.

Amostra	$CC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	IS
DAB2	>1000	9,96	100,4
DAB11	>1000	6,45	155,0
Cloroquina	193,59	0,085	2277,5

\*valor de  $CC_{50}$  para HepG2 A16 / valor de  $IC_{50}$  para *P. falciparum* W2

Embora os fármacos antimaláricos de referência como a mefloquina e a cloroquina apresentem valores de  $IC_{50}$  em escala nanomolar, os derivados dinitrofenil-hidrazônicos de AB mostraram-se promissores na busca de novos agentes antiplasmódicos, uma vez que apresentaram um alto índice de seletividade, o que levaria à minimalização dos efeitos colaterais relacionados aos fármacos

tradicionais. Muitos produtos naturais com potencial antimalárico descritos na literatura foram avaliados apenas *in vitro* e poucos deles foram avaliados quanto a citotoxicidade e menos ainda foram ensaiados *in vivo* (BATISTA; SILVA JÚNIOR; OLIVEIRA, 2009). Poucos estudos de derivatização enfatizando na relação estrutura-atividade contra *P. falciparum* são encontrados, demonstrando que esse é um campo ainda a ser explorado, tendo em vista que apresenta boas perspectivas.

#### 4.3.4. Atividade anti-HIV

AB e os derivados (DAB1-6, 8, 9, 11, PEN10b.1 e PEN13b) foram avaliados no ensaio de inibição da enzima transcriptase reversa (TR) do vírus HIV-1. Das substâncias analisadas, apenas AB, DAB4, DAB6 e DAB9 inibiram fracamente a TR, quando comparadas ao efavirenz (Tabela 14). Entretanto, as substâncias que demonstraram atividade inibidora da TR neste teste, mesmo que levemente, podem ser consideradas “Inibidores da TR não análogos de nucleosídeo (ITRNN)”, uma vez que conseguiram inibir a TR fora do ambiente celular onde não poderiam ser trifosforiladas por quinases celulares. Entretanto, mesmo as substâncias que não foram capazes de inibir a TR, não têm que necessariamente ser descartadas como agentes antivirais, uma vez que podem vir a inibir o vírus por outros mecanismos.

**Tabela 14.** Inibição da transcriptase reversa do HIV-1 (%), *in vitro*, pelo ácido betulínico (AB) e seus derivados testados nas concentrações de 10 e 50 µg/mL. Efavirenz (1 µg/mL) foi usado como controle positivo. Os resultados representam a média das repetições de cada tratamento.

Substância	Concentração (µg/mL)	Inibição da TR (%)	Concentração (µg/mL)	Inibição da TR (%)
AB	10	0	50	5,49
DAB1	10	0	50	0
DAB2	10	0	50	0
DAB3	10	0	50	0
DAB4	10	1,2	50	12,8
DAB5	10	0	50	0
DAB6	10	0	50	6,1
DAB8	10	0	50	0
DAB9	10	3,5	50	17,1
DAB11	10	0	50	0
PEN10b.1	10	0	50	0
PEN13b	10	0	50	0
Efavirenz	1	98	1	98

## 5. CONCLUSÃO

Neste trabalho, a partir da biotransformação e da semissíntese do ácido betulínico (AB), foram obtidos uma série de derivados.

A biotransformação de AB usando fungos resultou no ácido betulônico e em derivados ésteres metílicos, enquanto por meio de suspensão de células de cenoura, além do ácido betulônico, a molécula foi biotransformada a um derivado aldeído.

As reações de semissíntese forneceram doze derivados, sendo oito deles inéditos (DAB2, DAB3, DAB4, DAB5, DAB6, DAB8, DAB9 e DAB11). Esses novos derivados compartilharam entre si um ou dois grupos dinitrofenil-hidrazona (2,4-DNPH) nos C3 e/ou C20.

Os derivados foram avaliados biologicamente em ensaios antitumoral, antimicrobiano, antimalárico e anti-HIV.

De todos os derivados, o mais ativo contra células tumorais foi DAB3 ( $IC_{50}$ = 1,76-2,51  $\mu$ mol/L), enquanto que o mais seletivo foi DAB11. Os resultados indicaram que os derivados 2,4-DNPH atuaram de maneira dose e tempo-dependente e que o mecanismo de ação envolvido, de um modo geral, foi por meio de bloqueio da fase G0/G1 do ciclo celular e indução de apoptose com ativação inicial da via extrínseca por meio da ação da caspase 8 e posteriormente envolvimento da caspase 9. Embora mais citotóxicos e seletivos, o mecanismo de ação desses derivados foi mais lento que o de AB.

Os derivados 2,4-DNPH, notadamente DAB2 ( $IC_{50}$ = 9,96  $\mu$ g/mL) e DAB11 ( $IC_{50}$ = 6,45  $\mu$ g/mL), por sua vez, foram considerados ativos, não tóxicos e bastante seletivos contra a cepa de *P. falciparum* W2 (resistente à cloroquina), demonstrando potencial como agentes antiplasmódicos.

Por outro lado, os derivados foram considerados inativos frente a ensaios antimicrobiano e antirretroviral. Ensaio adicionais avaliando outros mecanismos de ação precisam ser realizados a fim de confirmar estes resultados.

Os resultados demonstraram que modificações na estrutura do AB são capazes de produzir novos derivados potentes, os quais podem melhorar o perfil de toxicidade e seletividade. Entretanto, resultados de um estudo mais aprofundado usando um grande número de derivados de triterpenos pentacíclicos são

necessários para estabelecer a relação estrutura-atividade para o desenvolvimento e síntese de agentes mais efetivos. Além do mais, problemas relacionados à solubilidade dos derivados devem ser contornados, uma vez que a maioria dessas substâncias são pouco solúveis ou insolúveis em H<sub>2</sub>O, o que dificulta as investigações *in vivo*. De todo modo, todas essas evidências fazem destes compostos promissoras moléculas para serem consideradas em novas estratégias de busca de fármacos antitumorais ou antiplasmódicos. Investigações mais detalhadas dos mecanismos de ação, com vistas aos alvos moleculares e ensaios em cobaias, assim como a ação destas moléculas sobre outras linhagens de células tumorais e outras cepas de *Plasmodium*, são necessárias.

## 6. REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A. C. C. **Avaliação da atividade citotóxica e antimalárica de análogos da cloroquina**. 60 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia Bioquímica e Molecular) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.
- ATTARI, F.; SEPEHRI, H.; DELPHI, L.; GOLIAEI, B. Apoptotic and necrotic effects of pectic acid on rat pituitary GH3/B6 tumor cells. **Iranian Biomedical Journal**, v. 13, n. 4, p. 229-236, 2009.
- ATTIOUA, B.; WENIGER, B.; CHABERT, P. Antiplasmodial activity of constituents isolated from *Croton lobatus*. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, n. 4, p. 263-266, 2007.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. Porto Alegre: Artmed, 2001.
- BASTOS, D. Z. L. **Biotransformação por fungos do ácido betulínico e derivados**. 116 f. Tese (Doutorado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- BASTOS, D. Z. L.; PIMENTEL, I. C.; JESUS, D. A. de; OLIVEIRA, B. H. de. Biotransformation of betulinic and betulonic acids by fungi. **Phytochemistry**, v. 68, n. 6, p. 834-839, 2007.
- BATISTA, R.; SILVA JÚNIOR, A. J.; OLIVEIRA, A. B. de. Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phytomedicines. Part II. Non-alkaloidal natural products. **Molecules**, v. 14, n. 8, p. 3037-3072, 2009.
- BEZIVIN, C.; TOMASI, S.; LOHEZIC-LE DEVEHAT, F.; BOUSTIE, J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. **Phytomedicine**, v. 10, n. 6-7, p. 499-503, 2003.
- BI, Y.; XU, J.; WU, X.; YE, W.; YUAN, S.; ZHANG, L. Synthesis and cytotoxic activity of 17-carboxylic acid modified 23-hydroxy betulinic acid ester derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 5, p. 1475-1478, 2007.
- BOLD, R. J.; TERMUHLEN, P. M.; McCONKEY, D. J. Apoptosis, cancer and cancer therapy. **Surgical Oncology**, v. 6, n. 3, p. 133-142, 1997.
- BORGES, K. B.; BORGES, W. S.; DURÁN-PATRÓN, R.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S.; COLLADO, I. G. Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 20, p. 385-397, 2009.
- BRACA, A.; MORELLI, I.; MENDEZ, J.; BATTINELLI, L.; BRAGHIROLI, L.; MAZZANTI, G. Antimicrobial triterpenoids from *Licania heteromorpha*. **Planta Medica**, v. 66, n. 8, p. 768-769, 2000.
- BRINGMANN, G.; SAEB, W.; ASSI, L. A.; FRANCOIS, G.; SANKARA NARAYANAN, A. S.; PETERS, K.; PETERS, E. M. Betulinic acid: isolation from *Triphyophyllum peltatum* and *Ancistrocladus heyneanus*, antimalarial activity, and crystal structure of the benzyl ester. **Planta Medica**, v. 63, n. 3, p. 255-257, 1997.

- BRONIATOWSKI, M.; FLASINSKI, M.; WYDRO, P. Investigation of the interactions of lupane type pentacyclic triterpenes with outer leaflet membrane phospholipids – Langmuir monolayer and synchrotron X-ray scattering study. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 381, p. 116-124, 2012.
- BROWN, K. C.; PAUL, S.; KASHUBA, A. D. Drug interactions with new and investigational antiretrovirals. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 48, n. 4, p. 211-241, 2009.
- BRUCKNER, R. **Advanced Organic Chemistry – Reaction Mechanisms**. Burlington: Harcourt/Academic Press, 2002.
- BRUIN, E. C. de; MEDEMA, J. P. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. **Cancer Treatment Reviews**, v. 34, n. 8, p. 737-749, 2008.
- CASTERA-DUCROS, C.; AZAS, N.; VERHAEGHE, P.; HUTTER, S.; GARRIGUE, P.; DUMETRE, A.; MBATCHI, L.; LAGET, M.; REMUSAT, V.; SIFREDI, F.; RAULT, S.; RATHELOT, P.; VANELLE, P. Targeting the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: *in vitro* identification of a new antiplasmodial hit in 4-phenoxy-2-trichloromethylquinazoline series. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 4184-4191, 2011.
- CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Estudo químico de plantas medicinais orientado para a análise biológica. Obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Ed.). **Plantas medicinais sob a ótica da Química Medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 48-75.
- CESARI, I.; HOERLE, M.; SIMÕES-PIRES, C.; GRISOLI, P.; QUEIROZ, E. F.; DACARRO, C.; MARCOURT, L.; MOUNDIPA, P. F.; CARRUPT, P. A.; CUENDET, M.; CACCIALANZA, G.; WOLFENDER, J. L.; BRUSOTTI, G. Anti-inflammatory, antimicrobial and antioxidant activities of *Diospyros bipindensis* (Gurke) extracts and its main constituents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, n. 1, p. 264-270, 2013.
- CHATTERJEE, P.; PEZZUTO, J. M.; KOUZI, S. A. Glucosidation of betulinic acid by *Cunninghamella* species. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 5, p. 761-763, 1999.
- CHATTERJEE, P.; KOUZI, S. A.; PEZZUTO, J. M.; HAMANN, M. T. Biotransformation of the antimelanoma agent betulinic acid by *Bacillus megaterium* ATCC 13368. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 9, p. 3850-3855, 2000.
- CHAUDHURI, P. K.; SRIVASTAVA, R.; KUMAR, S.; KUMAR, S. Phytotoxic and antimicrobial constituents of *Bacopa monnieri* and *Holmskioldia sanguinea*. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 2, p. 114-117, 2004.
- CICHEWICZ, R. H.; KOUZI, S. A. Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. **Medicinal Research Reviews**, v. 24, n. 1, p. 90-114, 2004.

- CLAUDE, B.; MORIN, Ph.; LAFOSSE, M.; ANDRE, P. Evaluation of apparent formation constants of pentacyclic triterpene acids complexes with derivatized  $\beta$ - and  $\gamma$ -cyclodextrins by reversed phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1049, p. 37-42, 2004.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI (antigo NCCLS). **M7-A6**: Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbico; Norma aprovada - Sexta edição. v. 23, n. 2, 2003.
- CONNOLLY, J. D.; HILL, R. A. Triterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 2, p. 131-147, 2001.
- CORDELL, G. A.; LEMOS, T. L.; MONTE, F. J.; MATTOS, M. C. de. Vegetables as chemical reagents. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 478-492, 2007.
- DENISENKO, M. V.; SAMOSHINA, N. F.; DENISENKO, V. A.; DMITRENOK, P. S. Synthesis of  $3\beta$ -hydroxy-20-oxo-30-norlupan-28-oic (platanic) acid and its glycosides. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 47, n. 5, p. 741-748.
- DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, p. 271-277, 1986.
- DESJARDINS, R. E.; CANFIELD, C. J.; HAYNES, J. D.; CHULAY, J. D. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 16, p. 710-718, 1979.
- DJOUKENG, J. D.; ABOU-MANSOUR, E.; TABACCHI, R.; TAPONDJOU, A. L.; BOUDA, H.; LONTSI, D. Antibacterial triterpenes from *Syzygium guineense* (Myrtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, n. 1-3, p. 283-286, 2005.
- DOMÍNGUEZ-CARMONA, D. B.; ESCALANTE-EROSA, F.; GARCÍA-SOSA, K.; RUIZ-PINELL, G.; GUTIERREZ-YAPU, D.; CHAN-BACAB, M. J.; GIMÉNEZ-TURBA, A.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. Antiprotozoal activity of betulinic acid derivatives. **Phytomedicine**, v. 17, p. 379-382, 2010.
- DOMÍNGUEZ-CARMONA, D. B.; ESCALANTE-EROSA, F.; GARCÍA-SOSA, K.; RUIZ-PINELL, G.; GUTIERREZ-YAPU, D.; CHAN-BACAB, M. J.; MOO-PUC, R. E.; VEITCH, N. C.; GIMÉNEZ-TURBA, A.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. Metabolites from roots of *Colubrina greggii* var. *yucatanensis* and evaluation of their antiprotozoan, cytotoxic and antiproliferative activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 7, p. 1279-1285, 2011.
- DRAEGER, B.; GALGON, T.; NEUBERT, R.; WOHLRAB, W. **Method of producing betulinic acid**. US 6,175,035 B1, 2001.
- DRAG-ZALESINSKA, M.; KULBACKA, J.; SACZKO, J.; WYSOCKA, T.; ZABEL, M.; SUROWIAK, P.; DRAG, M. Esters of betulin and betulinic acid with amino acids have improved water solubility and are selectively cytotoxic toward cancer cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 16, p. 4814-4817, 2009.
- DUKER-ESHUN, G.; JAROSZEWSKI, J. W.; ASOMANING, W. A.; OPPONG-BOACHIE, F.; BROGGER CHRISTENSEN, S. Antiplasmodial constituents of *Cajanus cajan*. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 2, p. 128-130, 2004.

- DZUBAK, P.; HAJDUCH, M.; VYDRA, D.; HUSTOVA, A.; KVASNICA, M.; BIEDERMANN, D.; MARKOVA, L.; URBAN, M.; SAREK, J. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. **Natural Product Reports**, v. 23, n. 3, p. 394-411, 2006.
- EILENDER, D.; LoRUSSO, P.; THOMAS, L.; McCORMICK, C.; RODGERS, A. H.; HOOPER, C. L.; TORNOS, K.; KREMENTZ, E. T.; PARKER, S.; MORGAN, L. R. 4,4'-Dihydroxybenzophenone-2,4-dinitrophenylhydrazone (A-007): a topical treatment for cutaneous metastases from malignant cancers. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 57, n. 6, p. 719-726, 2006.
- ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, p. 495-516, 2007.
- ELUSIYAN, C. A.; MSAGATI, T. A. M.; SHODE, F. O.; MAMBA, B. B. Measurements of distribution coefficients and lipophilicity values for oleanolic acid and betulinic acid extracted from indigenous plants by hollow fibre supported liquid membrane. **Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia**, v. 25, n. 3, p. 321-332, 2011.
- ES-SAADY, D.; SIMON, A.; OLLIER, M.; MAURIZIS, J. C.; CHULIA, A. J.; DELAGE, C. Inhibitory effect of ursolic acid on B16 proliferation through cell cycle arrest. **Cancer Letters**, v. 106, n. 2, p. 193-197, 1996.
- EVERS, M.; POUJADE, C.; SOLER, F.; RIBEILL, Y.; JAMES, C.; LELIEVRE, Y.; GUEGUEN, J. C.; REISDORF, D.; MORIZE, I.; PAUWELS, R.; DE CLERCQ, E.; HENIN, Y.; BOUSSEAU, A.; MAYAUX, J. F.; LE PECQ, J. B.; DEREU, N. Betulinic acid derivatives: a new class of human immunodeficiency virus type 1 specific inhibitors with a new mode of action. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 5, p. 1056-1068, 1996.
- FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. 3. ed. Berlin: Springer, 1997.
- FADOK, V. A.; BRATTON, D. L.; ROSE, D. M.; PEARSON, A.; EZEKEWITZ, R. A.; HENSON, P. M. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. **Nature**, v. 405, n. 6782, p. 85-90, 2000.
- FERNANDES, J.; CASTILHO, R. O.; COSTA, M. R.; WAGNER-SOUZA, K.; KAPLAN, M. A. C.; GATTASS, C. R. Pentacyclic triterpenes from Chrysobalanaceae species: cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines. **Cancer Letters**, v. 190, p. 165-169, 2003.
- FONTANAY, S.; GRARE, M.; MAYER, J.; FINANCE, C.; DUVAL, R. E. Ursolic, oleanolic and betulinic acids: antibacterial spectra and selectivity indexes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 272-276, 2008.
- FRANCO, R.; SANCHEZ-OLEA, R.; REYES-REYES, E. M.; PANAYIOTIDIS, M. I. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: menage a trois. **Mutation Research**, v. 674, n. 1-2, p. 3-22, 2009.
- FRIGHETTO, N.; WELENDORF, R. M.; SILVA, A. M. P.; NAKAMURA, M. J.; SIANI, A. C. Purification of betulinic acid from *Eugenia florida* (Myrtaceae) by High-speed Counter-current Chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 16, p. 411-414, 2005.

- FUJIOKA, T.; KASHIWADA, Y.; KILKUSKIE, R. E.; COSENTINO, L. M.; BALLAS, L. M.; JIANG, J. B.; JANZEN, W. P.; CHEN, I. S.; LEE, K. H. Anti-AIDS agents, 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzygium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 2, p. 243-247, 1994.
- FULDA, S.; SCAFFIDI, C.; SUSIN, S. A.; KRAMMER, P. H.; KROEMER, G.; PETER, M. E.; DEBATIN, K. M. Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptogenic factors by betulinic acid. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 51, p. 33942-33948, 1998a.
- FULDA, S.; SUSIN, S. A.; KROEMER, G.; DEBATIN, K. M. Molecular ordering of apoptosis induced by anticancer drugs in neuroblastoma cells. **Cancer Research**, v. 58, n. 19, p. 4453-4460, 1998b.
- FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Betulinic acid induces apoptosis through a direct effect on mitochondria in neuroectodermal tumors. **Medical and Pediatric Oncology**, v. 35, n. 6, p. 616-618, 2000.
- FULDA, S. Betulinic acid: a natural product with anticancer activity. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53, n. 1, p. 140-146, 2009.
- FULDA, S.; KROEMER, G. Targeting mitochondrial apoptosis by betulinic acid in human cancers. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 17-18, p. 885-890, 2009.
- FULDA, S. Modulation of apoptosis by natural products for cancer therapy. **Planta Medica**, v. 76, n. 11, p. 1075-1079, 2010.
- GABRIEL, L. M.; SANCHEZ, E. F.; SILVA, S. G.; SANTOS, R. G. Tumor cytotoxicity of leucurolysin-B, a P-III snake venom metalloproteinase from *Bothrops leucurus*. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 18, n. 1, p. 24-33, 2012.
- GALGON, T.; HÖKE, D.; DRÄGER, B. Identification and quantification of betulinic acid. **Phytochemical Analysis**, v. 10, p. 187-190, 1999.
- GANESAN, A. The impact of natural products upon modern drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 3, p. 306-317, 2008.
- GAUTHIER, C.; LEGAULT, J.; LEBRUN, M.; DUFOUR, P.; PICHETTE, A. Glycosidation of lupane-type triterpenoids as potent *in vitro* cytotoxic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 6713-6725, 2006.
- GENET, C.; STREHLE, A.; SCHMIDT, C.; BOUDJELAL, G.; LOBSTEIN, A.; SCHOONJANS, K.; SOUCHET, M.; AUWERX, J.; SALADIN, R.; WAGNER, A. Structure-activity relationship study of betulinic acid, a novel and selective TGR5 agonist, and its synthetic derivatives: potential impact in diabetes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 1, p. 178-190, 2010.
- GIULIANI, C. M.; DASS, C. R. Autophagy and cancer: taking the 'toxic' out of cytotoxics. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 6, p. 777-789, 2013.
- GONZÁLEZ-MENDOZA, D. El complejo enzimático citocromo P450 en las plantas. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, v. 23, n. 4, p. 177-183, 2007.

- GRAZIOSE, R.; ROJAS-SILVA, P.; RATHINASABAPATHY, T.; DEKOCK, C.; GRACE, M. H.; POULEV, A.; ANN LILA, M.; SMITH, P.; RASKIN, I. Antiparasitic compounds from *Cornus florida* L. with activities against *Plasmodium falciparum* and *Leishmania tarentolae*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 2, p. 456-461, 2012.
- GU, J. Q.; WANG, Y.; FRANZBLAU, S. G.; MONTENEGRO, G.; YANG, D.; TIMMERMANN, B. N. Antitubercular constituents of *Valeriana laxiflora*. **Planta Medica**, v. 70, p. 509-514, 2004.
- HAO, J.; PEI, Y.; JI, G.; LI, W.; FENG, S.; QIU, S. Autophagy is induced by 3 $\beta$ -O-succinyl-lupeol (LD9-4) in A549 cells via up-regulation of Beclin 1 and down-regulation mTOR pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 670, n. 1, p. 29-38, 2011.
- HARDING, K. E.; MAY, L. M.; DICK, K. F. Selective oxidation of allylic alcohols with chromic acid. **Journal of Organic Chemistry**, v. 40, n. 11, p. 1664-1665, 1975.
- HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 7, p. 294-300, 2000.
- HASHIMOTO, F.; KASHIWADA, Y.; COSENTINO, L. M.; CHEN, C. H.; GARRETT, P. E.; LEE, K. H. Anti-AIDS Agents - XXVII. Synthesis and anti-HIV activity of betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 12, p. 2133-2143, 1997.
- HATA, K.; HORI, K.; OGASAWARA, H.; TAKAHASHI, S. Anti-leukemia activities of lup-28-al-20(29)-en-3-one, a lupane triterpene. **Toxicology Letters**, v. 143, p. 1-7, 2003.
- HATA, K.; MUKAIYAMA, T.; TSUJIMURA, N.; SATO, Y.; KOSAKA, Y.; SAKAMOTO, K.; HORI, K. Differentiation-inducing activity of lupane triterpenes on a mouse melanoma cell line. **Cytotechnology**, v. 52, p. 151-158, 2006.
- HE, C.; KLIONSKY, D. J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. **Annual Review of Genetics**, v. 43, p. 67-93, 2009.
- HILL, R. A.; CONNOLLY, J. D. Triterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 29, n. 7, p. 780-818, 2012.
- HORIUCHI, K.; SHIOTA, S.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; KURODA, T.; TSUCHIYA, T. Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE). **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 6, p. 1147-1149, 2007.
- HU, H. B.; ZHENG, X. D.; JIAN, Y. F.; LIU, J. X.; ZHU, J. H. Constituents of the root of *Anemone tomentosa*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, n. 7, p. 1097-1105, 2011.
- INDRAN, I. R.; TUFO, G.; PERVAIZ, S.; BRENNER, C. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1807, n. 6, p. 735-745, 2011.
- INNOCENTE, A. M.; SILVA, G. N.; CRUZ, L. N.; MORAES, M. S.; NAKABASHI, M.; SONNET, P.; GOSMANN, G.; GARCIA, C. R.; GNOATTO, S. C. Synthesis and antiplasmodial activity of betulinic acid and ursolic acid analogues. **Molecules**, v. 17, n. 10, p. 12003-12014, 2012.

- ISHIHARA, K.; HAMADA, H.; HIRATA, T.; NAKAJIMA, N. Biotransformation using plant cultured cells. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 23, p. 145-170, 2003.
- IUPAC. Glossary of terms used in Medicinal Chemistry. **Pure & Applied Chemistry**, v. 70, n. 5, p. 1129-1143, 1998.
- JÄGER, S.; TROJAN, H.; KOPP, T.; LASZCZYK, M. N.; SCHEFFLER, A. Pentacyclic triterpene distribution in various plants - rich sources for a new group of multi-potent extracts. **Molecules**, v. 14, p. 2016-2031, 2009.
- JEONG, H. J.; CHAI, H. B.; PARK, S. Y.; KIM, D. S. Preparation of amino acid conjugates of betulinic acid with activity against human melanoma. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 9, n. 8, p. 1201-1204, 1999.
- KASHIWADA, Y.; HASHIMOTO, F.; COSENTINO, L. M.; CHEN, C. H.; GARRETT, P. E.; LEE, K. H. Betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives as potent anti-HIV agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, p. 1016-1017, 1996.
- KAZAKOVA, O. B.; GINIATULLINA, G. V.; TOLSTIKOV, G. A.; MEDVEDEVA, N. I.; UTKINA, T. M.; KARTASHOVA, O. L. Synthesis, modifications, and antimicrobial activity of the methylpiperazinyl amides of triterpenic acids. **Bioorganicheskaia Khimiia**, v. 36, n. 3, p. 416-422, 2010.
- KESSLER, J. H.; MULLAUER, F. B.; ROO, G. M. de; MEDEMA, J. P. Broad *in vitro* efficacy of plant-derived betulinic acid against cell lines derived from the most prevalent human cancer types. **Cancer Letters**, v. 251, n. 1, p. 132-145, 2007.
- KIECHLE, F. L.; ZHANG, X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. **Clinica Chimica Acta**, v. 326, n. 1-2, p. 27-45, 2002.
- KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. **Histologia e Embriologia Celular: uma introdução à Patologia**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- KIM, D. S.; PEZZUTO, J. M.; PISHA, E. Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 8, n. 13, p. 1707-1712, 1998.
- KIM, J. Y.; KOO, H. M.; KIM, D. S. Development of C-20 modified betulinic acid derivatives as antitumor agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, n. 17, p. 2405-2408, 2001.
- KOMMERA, H. **Synthesis and *in vitro* antitumor activity of novel lupane type pentacyclic triterpenoids**. 76 p. Dissertation (Doctor Rerum Naturalium – Dr. Rer. Nat.) - Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale), 2010.
- KOMMERA, H.; KALUDEROVIC, G. N.; BETTE, M.; KALBITZ, J.; FUCHS, P.; FULDA, S.; MIER, W.; PASCHKE, R. *In vitro* anticancer studies of  $\alpha$ - and  $\beta$ -D-glucopyranose betulin anomers. **Chemico-Biological Interactions**, v. 185, p. 128-136, 2010a.
- KOMMERA, H.; KALUDEROVIC, G. N.; DITTRICH, S.; KALBITZ, J.; DRÄGER, B.; MUELLER, T.; PASCHKE, R. Carbamate derivatives of betulinic acid and betulin with selective cytotoxic activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 3409-3412, 2010b.

- KOMMERA, H.; KALUDEROVIC, G. N.; KALBITZ, J.; DRÄGER, B.; PASCHKE, R.. Small structural changes of pentacyclic lupane type triterpenoid derivatives lead to significant differences in their anticancer properties. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 3346-3353, 2010c.
- KOMMERA, H.; KALUDEROVIC, G. N.; KALBITZ, J.; PASCHKE, R. Synthesis and anticancer activity of novel betulinic acid and betulin derivatives. **Archiv der Pharmazie - Chemistry in Life Sciences**, v. 8, p. 449-457, 2010d.
- KOMMERA, H.; KALUDEROVIC, G. N.; KALBITZ, J.; PASCHKE, R. Lupane triterpenoids - betulin and betulinic acid derivatives induce apoptosis in tumor cells. **Investigational New Drugs**, v. 29, p. 266-272, 2011.
- KOSMIDER, B.; ZYNER, E.; OSIECKA, R.; OCHOCKI, J. Induction of apoptosis and necrosis in A549 cells by the cis-Pt(II) complex of 3-aminoflavone in comparison with *cis*-DDP. **Mutation Research**, v. 563, n. 1, p. 61-70, 2004.
- KOUZI, S. A.; CHATTERJEE, P.; PEZZUTO, J. M.; HAMANN, M. T. Microbial transformations of the antimelanoma agent betulinic acid. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 12, p. 1653-1657, 2000.
- KRASUTSKY, P. A. Birch bark research and development. **Natural Product Reports**, v. 23, n. 6, p. 919-942, 2006.
- KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; EL-DEIRY, W. S.; GOLSTEIN, P.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; MALORNI, W.; NUNEZ, G.; PETER, M. E.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3-11, 2009.
- KUETE, V.; WABO, G. F.; NGAMENI, B.; MBAVENG, A. T.; METUNO, R.; ETOA, F. X.; NGADJUI, B. T.; BENG, V. P.; MEYER, J. J.; LALL, N. Antimicrobial activity of the methanolic extract, fractions and compounds from the stem bark of *Iringia gabonensis* (Ixnanthaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 1, p. 54-60, 2007.
- KUIATE, J. R.; MOUOKEU, S.; WABO, H. K.; TANE, P. Antidermatophytic triterpenoids from *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 149-152, 2007.
- KUMAR, V.; RANI, N.; AGGARWAL, P.; SANNA, V. K.; SINGH, A. T.; JAGGI, M.; JOSHI, N.; SHARMA, P. K.; IRCHHAIYA, R.; BURMAN, A. C. Synthesis and cytotoxic activity of heterocyclic ring-substituted betulinic acid derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 18, p. 5058-5062, 2008.
- KUO, R. Y.; QIAN, K.; MORRIS-NATSCHKE, S. L.; LEE, K. H. Plant-derived triterpenoids and analogues as antitumor and anti-HIV agents. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 10, p. 1321-1344, 2009.
- LAI, W.; HUANG, L.; HO, P.; LI, Z.; MONTEFIORI, D.; CHEN, C. H. Betulinic acid derivatives that target gp120 and inhibit multiple genetic subtypes of human immunodeficiency virus type 1. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 128-136, 2008.

- LAN, P.; CHEN, W. N.; HUANG, Z. J.; SUN, P. H.; CHEN, W. M. Understanding the structure-activity relationship of betulinic acid and derivatives as anti-HIV-1 agents by using 3D-QSAR and docking. **Journal of Molecular Modeling**, v. 17, p. 1643-1659, 2011a.
- LAN, P.; WANG, J.; ZHANG, D. M.; SHU, C.; CAO, H. H.; SUN, P. H.; WU, X. M.; YE, W. C.; CHEN, W. M. Synthesis and antiproliferative evaluation of 23-hydroxybetulinic acid derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 6, p. 2490-2502, 2011b.
- LASZCZYK, M. N. Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. **Planta Medica**, v. 75, n. 15, p. 1549-1560, 2009.
- LEE, K. H. Discovery and development of natural product-derived chemotherapeutic agents based on a medicinal chemistry approach. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 3, p. 500-516, 2010.
- LENTA, B. N.; NGOUELA, S.; FEKAM-BOYOM, F.; TANTANGMO, F.; FEUYA-TCHOUYA, G. R.; TSAMO, E.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J.; DONALD-CONNOLLY, J. Anti-plasmodial activity of some constituents of the root bark of *Harungana madagascariensis* Lam. (Hypericaceae). **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 3, p. 464-467, 2007.
- LENTA, B. N.; DEVKOTA, K. P.; NGOUELA, S.; FEKAM-BOYOM, F.; NAZ, Q.; CHOUDHARY, M. I.; TSAMO, E.; ROSENTHAL, P. J.; SEWALD, N. Anti-plasmodium and cholinesterase inhibiting activities of some constituents of *Psorospermum glaberrimum*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, n. 2, p. 222-226, 2008.
- LI, C. H.; CHEN, P. Y.; CHANG, U. M.; KAN, L. S.; FANG, W. H.; TSAI, K. S.; LIN, S. B. Ganoderic acid X, a lanostanoid triterpene, inhibits topoisomerases and induces apoptosis of cancer cells. **Life Sciences**, v. 77, p. 252-265, 2005.
- LI, J.; YUAN, J. Caspases in apoptosis and beyond. **Oncogene**, v. 27, n. 48, p. 6194-6206, 2008.
- LIMA, L. M. Química Medicinal Moderna: desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1456-1468, 2007.
- LIN, S. B.; LI, C. H.; LEE, S. S.; KAN, L. S. Triterpene-enriched extracts from *Ganoderma lucidum* inhibit growth of hepatoma cells via suppressing protein kinase C, activating mitogen-activated protein kinases and G2-phase cell cycle arrest. **Life Sciences**, v. 72, p. 2381-2390, 2003.
- LIU, J. Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 92-94, 2005.
- LIU, W. K.; HO, J. C.; CHEUNG, F. W.; LIU, B. P.; YE, W. C.; CHE, C. T. Apoptotic activity of betulinic acid derivatives on murine melanoma B16 cell line. **European Journal of Pharmacology**, v. 498, n. 1-3, p. 71-78, 2004.
- LIU, W. K.; HO, J. C. K.; CHE, C. T. Apoptotic activity of isomalabaricane triterpenes on human promyelocytic leukemia HL60 cells. **Cancer Letters**, v. 230, p. 102-110, 2005.

- MA, C. Y.; MUSOKE, S. F.; TAN, G. T.; SYDARA, K.; BOUAMANIVONG, S.; SOUTHAVONG, B.; SOEJARTO, D. D.; FONG, H. H.; ZHANG, H. J. Study of antimalarial activity of chemical constituents from *Diospyros quaesita*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 5, n. 11, p. 2442-2448, 2008.
- MAKLER, M. T.; HINRICHS, D. J. Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 2, p. 205-210, 1993.
- MANDAL, D.; MOITRA, P. K.; SAHA, S.; BASU, J. Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes. **FEBS Letters**, v. 513, p. 184-188, 2002.
- MAYAUX, J. F.; BOUSSEAU, A.; PAUWELS, R.; HUET, T.; HÉNIN, Y.; DEREU, N.; EVERS, M.; SOLER, F.; POUJADE, C.; DE CLERCQ, E.; LE PECQ, J. B. Triterpene derivatives that block entry of human immunodeficiency virus type 1 into cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, p. 3564-3568, 1994.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Dados epidemiológicos de malária, por estado**. Brasília: Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Malária (CGPNM), 2010/2011. Disponível em: <[http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Fev/08/dados\\_malaria\\_brasil\\_2010\\_2011\\_at2013\\_svs.pdf](http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Fev/08/dados_malaria_brasil_2010_2011_at2013_svs.pdf)>. Acesso em: 20/05/2013.
- MORGAN, L. R.; JURISIC, B. S.; HOOPER, C. L.; NEUMANN, D. M.; THANGARAJ, K.; LeBLANC, B. Anticancer activity for 4,4'-Dihydroxybenzophenone-2,4-dinitrophenylhydrazone (A-007) analogues and their abilities to interact with lymphoendothelial cell surface markers. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, n. 23, p. 3407-3411, 2002.
- MUFFLER, K.; LEIPOLD, D.; SCHELLER, M. C.; HAAS, C.; STEINGROEWER, J.; BLEY, T.; NEUHAUS, H. E.; MIRATA, M. A.; SCHRADER, J.; ULBER, R. Biotransformation of triterpenes. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1-15, 2011.
- MUKHERJEE, R.; JAGGI, M.; SIDDIQUI, M. J.; SRIVASTAVA, S. K.; RAJENDRAN, P.; VARDHAN, A.; BURMAN, A. C. Synthesis and cytotoxic activity of 3-O-acyl/3-hydrazine/2-bromo/20,29-dibromo betulinic acid derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 15, p. 4087-4091, 2004.
- MUKHERJEE, R.; KUMAR, V.; SRIVASTAVA, S. K.; AGARWAL, S. K.; BURMAN, A. C. Betulinic acid derivatives as anticancer agents: structure activity relationship. **Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 271-279, 2006.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NAGATA, S. Apoptotic DNA fragmentation. **Experimental Cell Research**, v. 256, p. 12-18, 2000.
- NAGATA, S.; NAGASE, H.; KAWANE, K.; MUKAE, N.; FUKUYAMA, H. Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 10, p. 108-116, 2003.

- NAKAGAWA-GOTO, K.; YAMADA, K.; TANIGUCHI, M.; TOKUDA, H.; LEE, K. H. Cancer preventive agents 9. Betulinic acid derivatives as potent cancer chemopreventive agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 13, p. 3378-3381, 2009.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.
- NICK, A.; WRIGHT, A. D.; RALI, T.; STICHER, O. Antibacterial triterpenoids from *Dillenia papuana* and their structure-activity relationships. **Phytochemistry**, v. 40, n. 6, p. 1691-1695, 1995.
- NIELSEN, J. Combinatorial synthesis of natural products. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, n. 3, p. 297-305, 2002.
- NUNEZ, M. J.; REYES, C. P.; JIMENEZ, I. A.; MOUJIR, L.; BAZZOCCHI, I. L. Lupane triterpenoids from *Maytenus* species. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 7, p. 1018-1021, 2005.
- NYASSE, B.; NONO, J. J.; NGANSO, Y.; NGANTCHOU, I.; SCHNEIDER, B. *Uapaca* genus (Euphorbiaceae), a good source of betulinic acid. **Fitoterapia**, v. 80, p. 32-34, 2009.
- OLIVEIRA, B. H. Obtenção de novos fármacos através da biotransformação de produtos naturais. In: YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. (Ed.). **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: Univali, 2009. p. 103-120.
- OLIVEIRA, B. H.; OLIVEIRA, K. B. Obtenção de substâncias bioativas através da biotransformação de produtos naturais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 9, n. 1, p. 89-99, 2012.
- PATLOLLA, J. M.; RAO, C. V. Triterpenoids for cancer prevention and treatment: current status and future prospects. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 147-155, 2012.
- PENG, C.; BODENHAUSEN, G.; QIU, S.; FONG, H. H. S.; FARNSWORTH, N. R.; YUAN, S.; ZHENG, C. Computer-assisted structure elucidation: application of CISOC-SES to the resonance assignment and structure generation of betulinic acid. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 36, p. 267-278, 1998.
- PISHA, E.; CHAI, H.; LEE, I. S.; CHAGWEDERA, T. E.; FARNSWORTH, N. R.; CORDELL, G. A.; BEECHER, C. W.; FONG, H. H.; KINGHORN, A. D.; BROWN, D. M.; WANI, M. C.; WALL, M. E.; HIEKEN, T. J.; GUPTA, T. K. D.; PEZZUTO, J. M. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. **Nature Medicine**, v. 1, n. 10, p. 1046-1051, 1995.
- POLLIER, J.; GOOSSENS, A. Oleanolic acid. **Phytochemistry**, v. 77, p. 10-15, 2012.
- POZAROWSKI, P.; DARZYNKIEWICZ, Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry. In: SCHÖNTHAL, A. H. (Ed.). **Methods in Molecular Biology: Checkpoint controls and cancer**. Totowa: Humana Press, 2004. p. 301-311.
- PUDER, C. H.; GRAEF, H.; THUMERER, M. J.; HEITZMANN, M. **Process for the extraction of betulinic acid**. US 2007/0149490 A1, 2007.

- QIAN, K.; YU, D.; CHEN, C. H.; HUANG, L.; MORRIS-NATSCHKE, S. L.; NITZ, T. J.; SALZWEDEL, K.; REDDICK, M.; ALLAWAY, G. P.; LEE, K. H. Anti-AIDS Agents. 78. Design, synthesis, metabolic stability assessment, and antiviral evaluation of novel betulinic acid derivatives as potent anti-human immunodeficiency virus (HIV) agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, p. 3248-3258, 2009a.
- QIAN, L. W.; ZHANG, J.; LIU, J. H.; YU, B. Y. Direct microbial-catalyzed asymmetric  $\alpha$ -hydroxylation of betulonic acid by *Nocardia* sp. NRRL 5646. **Tetrahedron Letters**, v. 50, p. 2193-2195, 2009b.
- QIAN, K.; KUO, R. Y.; CHEN, C. H.; HUANG, L.; MORRIS-NATSCHKE, S. L.; LEE, K. H. Anti-AIDS agents 81. Design, synthesis, and structure-activity relationship study of betulinic acid and moronic acid derivatives as potent HIV maturation inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, p. 3133-3141, 2010.
- RAJENDRAN, P.; JAGGI, M.; SINGH, M. K.; MUKHERJEE, R.; BURMAN, A. C. Pharmacological evaluation of C-3 modified Betulinic acid derivatives with potent anticancer activity. **Investigational New Drugs**, v. 26, n. 1, p. 25-34, 2008.
- REN, H.; OMORI, S. **Method for extracting betulinic acid from *Platanus orientalis* bark**. CN 102206244 A, 2011.
- REYES-ZURITA, F. J.; RUFINO-PALOMARES, E. E.; LUPIÁÑEZ, J. A.; CASCANTE, M. Maslinic acid, a natural triterpene from *Olea europaea* L., induces apoptosis in HT29 human colon-cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway. **Cancer Letters**, v. 273, n. 1, p. 44-54, 2009.
- REYES-ZURITA, F.J., PACHÓN-PEÑA, G.; LIZÁRRAGA, D.; RUFINO-PALOMARES, E. E.; CASCANTE, M.; LUPIÁÑEZ, J. A. The natural triterpene maslinic acid induces apoptosis in HT29 colon cancer cells by a JNK-p53-dependent mechanism. **BMC Cancer**, v. 11, p. 154-166, 2011.
- RIBEIRO, P. R.; FERRAZ, C. G.; GUEDES, M. L.; MARTINS, D.; CRUZ, F. G. A new biphenyl and antimicrobial activity of extracts and compounds from *Clusia burllemarxii*. **Fitoterapia**, v. 82, n. 8, p. 1237-1240, 2011.
- RIVERO-CRUZ, J. F.; ZHU, M.; KINGHORN, A. D.; WU, C. D. Antimicrobial constituents of Thompson seedless raisins (*Vitis vinifera*) against selected oral pathogens. **Phytochemistry Analysis**, v. 1, p. 151-154, 2008.
- RODRIGUEZ-ROCHA, H.; GARCIA-GARCIA, A.; PANAYIOTIDIS, M. I.; FRANCO, R. DNA damage and autophagy. **Mutation Research**, n. 711, n. 1-2, p. 158-166, 2011.
- ROJAS RUIZ, F. A.; GARCIA-SANCHEZ, R. N.; ESTUPINAN, S. V.; GOMEZ-BARRIO, A.; TORRES AMADO, D. F.; PEREZ-SOLORZANO, B. M.; NOGAL-RUIZ, J. J.; MARTINEZ-FERNANDEZ, A. R.; KOUZNETSOV, V. V. Synthesis and antimalarial activity of new heterocyclic hybrids based on chloroquine and thiazolidinone scaffolds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 15, p. 4562-4573, 2011.
- RZESKI, W.; STEPULAK, A.; SZYMANSKI, M.; SIFRINGER, M.; KACZOR, J.; WEJKSZA, K.; ZDZISINSKA, B.; KANDEFER-SZERSZEN, M. Betulinic acid decreases expression of bcl-2 and cyclin D1, inhibits proliferation, migration and induces apoptosis in cancer cells. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 374, n. 1, p. 11-20, 2006.

- SA, M. S. de; COSTA, J. F.; KRETTLI, A. U.; ZALIS, M. G.; MAIA, G. L.; SETTE, I. M.; CAMARA, C. de A.; FILHO, J. M.; GIULIETTI-HARLEY, A. M.; SANTOS, R. R. dos; SOARES, M. B. Antimalarial activity of betulinic acid and derivatives *in vitro* against *Plasmodium falciparum* and *in vivo* in *P. berghei*-infected mice. **Parasitology Research**, v. 105, n. 1, p. 275-279, 2009.
- SALEEM, M.; ALAM, A.; ARIFIN, S.; SHAH, M. S.; AHMED, B.; SULTANA, S. Lupeol, a triterpene, inhibits early responses of tumor promotion induced by benzoyl peroxide in murine skin. **Pharmacological Research**, v. 43, n. 2, p. 127-134, 2001.
- SALVADOR, J. A.; MOREIRA, V. M.; GONÇALVES, B. M.; LEAL, A. S.; JING, Y. Ursane-type pentacyclic triterpenoids as useful platforms to discover anticancer drugs. **Natural Product Reports**, v. 29, n. 12, p. 1463-1479, 2012.
- SAMOSHINA, N. F.; DENISENKO, M. V.; DENISENKO, V. A.; UVAROVA, N. I. Synthesis of glycosides of lupane-type triterpene acids. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 39, n. 6, p. 575-582.
- SANTOS, R. C.; SALVADOR, J. A. R.; MARÍN, S.; CASCANTE, M. Novel semisynthetic derivatives of betulin and betulinic acid with cytotoxic activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 6241-6250, 2009.
- SANTOS, R. C.; SALVADOR, J. A.; MARIN, S.; CASCANTE, M.; MOREIRA, J. N.; DINIS, T. C. Synthesis and structure-activity relationship study of novel cytotoxic carbamate and N-acylheterocyclic bearing derivatives of betulin and betulinic acid. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 12, p. 4385-4396, 2010.
- SANTOS, R. C.; SALVADOR, J. A. R.; CORTÉS, R.; PACHÓN, G.; MARÍN, S.; CASCANTE, M. New betulinic acid derivatives induce potent and selective antiproliferative activity through cell cycle arrest at the S phase and caspase dependent apoptosis in human cancer cells. **Biochimie**, v. 93, p. 1065-1075, 2011.
- SAREK, J.; KLINOT, J.; DZUBAK, P.; KLINOTOVA, E.; NOSKOVA, V.; KRECEK, V.; KORINKOVA, G.; THOMSON, J. O.; JANOST'AKOVA, A.; WANG, S.; PARSONS, S.; FISCHER, P. M.; ZHELEV, N. Z.; HAJDUCH, M. New lupane derived compounds with pro-apoptotic activity in cancer cells: synthesis and structure-activity relationships. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 25, p. 5402-5415, 2003.
- SATIRAPHAN, M.; PAMONSINLAPATHAM, P.; SOTANAPHUN, U.; SITTISOMBUT, C.; RAYNAUD, F.; GARBAY, C.; MICHEL, S.; CACHET, X. Lupane triterpenes from the leaves of the tropical rain forest tree *Hopea odorata* Roxb. and their cytotoxic activities. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 44, p. 407-412, 2012.
- SAUTER, M. **Process for obtaining betulinic acid**. US 6,943,260 B2, 2005.
- SCHAFER, K. A. The Cell Cycle: A Review. **Veterinary Pathology**, v. 35, p. 461-478, 1998.
- SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004. cap. 27, p. 711-740.
- SEYDEL, J. K.; SCHAPER, K. J. Quantitative structure-pharmacokinetic relationships and drug design. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 15, p. 131-182, 1982.

- SHAI, L. J.; MCGAW, L. J.; ADEROGBA, M. A.; MDEE, L. K.; ELOFF, J. N. Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata* (Burm.f) C.A. Sm. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 238-244, 2008.
- SHENG, H.; SUN, H. Synthesis, biology and clinical significance of pentacyclic triterpenes: a multi-target approach to prevention and treatment of metabolic and vascular diseases. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 543-593, 2011.
- SHIN, S. W.; KIM, S. Y.; PARK, J. W. Autophagy inhibition enhances ursolic acid-induced apoptosis in PC3 cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1823, n. 2, p. 451-457, 2012.
- SIDDIQUE, H. R.; SALEEM, M. Beneficial health effects of lupeol triterpene: a review of preclinical studies. **Life Sciences**, v. 88, n. 7-8, p. 285-293, 2011.
- SILVA, G. N. da; MARIA, N. R.; SCHUCK, D. C.; CRUZ, L. N.; MORAES, M. S. de; NAKABASHI, M.; GRAEBIN, C.; GOSMANN, G.; GARCIA, C. R.; GNOATTO, S. C. Two series of new semisynthetic triterpene derivatives: differences in anti-malarial activity, cytotoxicity and mechanism of action. **Malaria Journal**, v. 12, p. 89, 2013.
- SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; McMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.
- SLUTSKER, L.; KACHUR, S. P. It is time to rethink tactics in the fight against malaria. **Malaria Journal**, v. 12, p. 140, 2013.
- STEELE, J. C.; WARHURST, D. C.; KIRBY, G. C.; SIMMONDS, M. S. *In vitro* and *in vivo* evaluation of betulinic acid as an antimalarial. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 2, p. 115-119, 1999.
- STROHL, W. R. The role of natural products in a modern drug discovery program. **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 2, p. 39-41, 2000.
- SUKSAMRARN, A.; TANACHATCHAIRATANA, T.; KANOKMEDHAKUL, S. Antiplasmodial triterpenes from twigs of *Gardenia saxatilis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, n. 2-3, p. 275-277, 2003.
- SUKSAMRARN, S.; PANSEETA, P.; KUNCHANAWATTA, S.; DISTAPORN, T.; RUKTASING, S.; SUKSAMRARN, A. Ceanothane- and lupane-type triterpenes with antiplasmodial and antimycobacterial activities from *Ziziphus cambodiana*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, n. 4, p. 535-537, 2006.
- SUN, H. X.; ZHENG, Q. F.; TU, J. Induction of apoptosis in HeLa cells by 3 $\beta$ -hydroxy-12-oleanen-27-oic acid from the rhizomes of *Astilbe chinensis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1189-1198, 2006.
- TANACHATCHAIRATANA, T.; BREMNER, J. B.; CHOKCHASIRI, R.; SUKSAMRARN, A. Antimycobacterial activity of cinnamate-based esters of the triterpenes betulinic, oleanolic and ursolic acids. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, n. 2, p. 194-198, 2008.
- TAO, J.; XU, J. H. Biocatalysis in development of green pharmaceutical processes. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 13, p. 43-50, 2009.

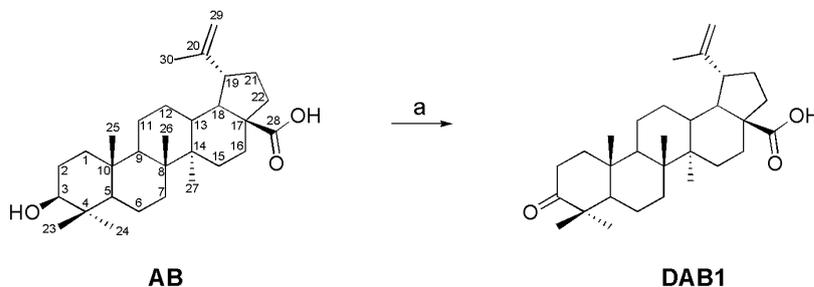
- TCHAKAM, P. D.; LUNGA, P. K.; KOWA, T. K.; LONFOUO, A. H.; WABO, H. K.; TAPONDJOU, L. A.; TANE, P.; KUIATE, J. R. Antimicrobial and antioxidant activities of the extracts and compounds from the leaves of *Psorospermum aurantiacum* Engl. and *Hypericum lanceolatum* Lam. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, p. 136, 2012.
- URBAN, M.; SAREK, J.; KLINOT, J.; KORINKOVA, G.; HAJDUCH, M. Synthesis of A-seco derivatives of betulinic acid with cytotoxic activity. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 7, p. 1100-1105, 2004.
- URBAN, M.; SAREK, J.; KVASNICA, M.; TISLEROVA, I.; HAJDUCH, M. Triterpenoid pyrazines and benzopyrazines with cytotoxic activity. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 4, p. 526-532, 2007.
- VAROTTI, F. P. **Quimioterapia antimalárica experimental e mecanismos de ação de antimaláricos envolvendo íons cálcio e prótons**. 166 f. Tese (Doutorado em Farmacologia Bioquímica e Molecular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.
- VAROTTI, F. P.; BOTELHO, A. C. C.; ANDRADE, A. A.; PAULA, R. C. de; FAGUNDES, E. M. S.; VALVERDE, A.; MAYER, L. M. U.; MENDONÇA, J. S.; SOUZA, M. V. N. de; BOECHAT, N.; KRETTLI, A. U. Synthesis, antimalarial activity, and intracellular targets of MEFAS, a new hybrid compound derived from mefloquine and artesunate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 11, p. 3868-3874, 2008.
- VERMEULEN, K.; BOCKSTAELE, D. R. van; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, v. 36, p. 131-149, 2003.
- VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
- VISSER, S. P. de; KUMAR, D.; SHAIK, S. How do aldehyde side products occur during alkene epoxidation by cytochrome P450? Theory reveals a state-specific multi-state scenario where the high-spin component leads to all side products. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, p. 1183-1193, 2004.
- WANG, Z. Y.; NIXON, D. W. Licorice and cancer. **Nutrition and Cancer**, v. 39, n. 1, p. 1-11, 2001.
- WANG, S. R.; FANG, W. S. Pentacyclic triterpenoids and their saponins with apoptosis-inducing activity. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 16, p. 1581-1596, 2009.
- WILLIAMS, G. H.; STOEBER, K. The cell cycle and cancer. **Journal of Pathology**, v. 226, p. 352-364, 2012.
- XU, R.; FAZIO, G. C.; MATSUDA, S. P. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. **Phytochemistry**, v. 65, n. 3, p. 261-291, 2004.
- YEH, C. T.; RAO, Y. K.; YAO, C. J.; YEH, C. F.; LI, C. H.; CHUANG, S. E.; LUONG, J. H.; LAI, G. M.; TZENG, Y. M. Cytotoxic triterpenes from *Antrodia camphorata* and their mode of action in HT-29 human colon cancer cells. **Cancer Letters**, v. 285, p. 73-79, 2009.

- YOGEE SWARI, P.; SRIRAM, D. Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 657-666, 2005.
- YOO, K. H.; PARK, J. H.; LEE, D. K.; FU, Y. Y.; BAEK, N. I.; CHUNG, I. S. Pomolic acid induces apoptosis in SK-OV-3 human ovarian adenocarcinoma cells through the mitochondrial-mediated intrinsic and death receptor-induced extrinsic pathways. **Oncology Letters**, v. 5, p. 386-390, 2013.
- YOU, Y. J.; NAM, N. H.; KIM, Y.; BAE, K. H.; AHN, B. Z. Antiangiogenic activity of lupeol from *Bombax ceiba*. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 4, p. 341-344, 2003.
- ZHANG, J.; CHENG, Z. H.; YU, B. Y.; CORDELL, G. A.; QIU, S. X. Novel biotransformation of pentacyclic triterpenoid acids by *Nocardia* sp. NRRL 5646. **Tetrahedron Letters**, v. 46, p. 2337-2340, 2005.
- ZHANG, X. H.; ZHANG, N.; LU, J. M.; KONG, Q. Z.; ZHAO, Y. F. Tetrazolium violet induced apoptosis and cell cycle arrest in human lung cancer A549 cells. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 20, n. 2, p. 177-182, 2012.
- ZHUANG, M. Y.; DU, H. F. Asymmetric rearrangement of racemic epoxides catalyzed by chiral Bronsted acids. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 11, n. 9, p. 1460-1462, 2013.
- ZIEGLER, H. L.; FRANZYK, H.; SAIRAFIANPOUR, M.; TABATABAI, M.; TEHRANI, M. D.; BAGHERZADEH, K.; HAGERSTRAND, H.; STAERK, D.; JAROSZEWSKI, J. W. Erythrocyte membrane modifying agents and the inhibition of *Plasmodium falciparum* growth: structure-activity relationships for betulinic acid analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 119-127, 2004.
- ZOFOU, D.; KOWA, T. K.; WABO, H. K.; NGEMENYA, M. N.; TANE, P.; TITANJI, V. P. *Hypericum lanceolatum* (Hypericaceae) as a potential source of new anti-malarial agents: a bioassay-guided fractionation of the stem bark. **Malaria Journal**, v. 10, p. 167, 2011.
- ZUCO, V.; SUPINO, R.; RIGHETTI, S. C.; CLERIS, L.; MARCHESI, E.; GAMBACORTI-PASSERINI, C.; FORMELLI, F. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. **Cancer Letters**, v. 175, n. 1, p. 17-25, 2002.

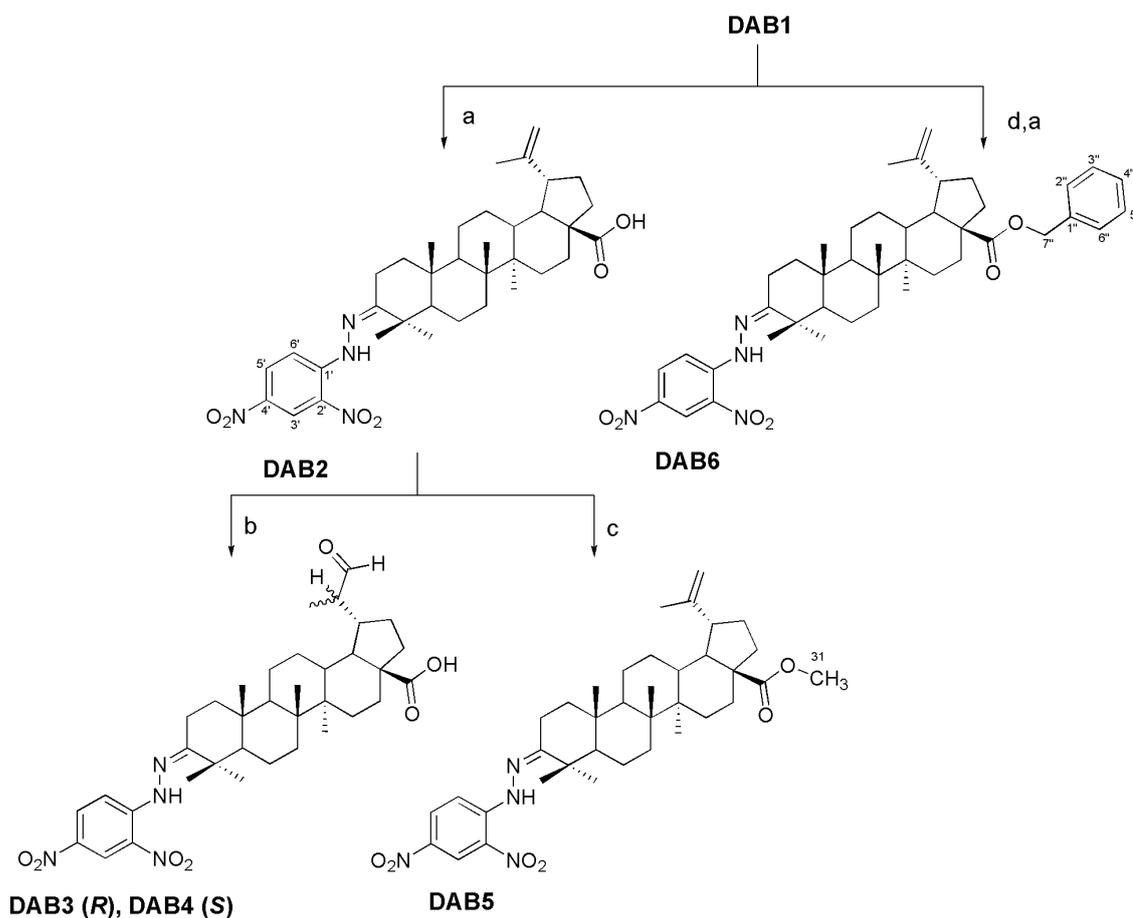
## 7. ANEXOS

- Esquemas das reações de preparo dos derivados DAB1 a DAB12.
- Espectros de RMN- $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ , DEPT e bidimensionais das substâncias.

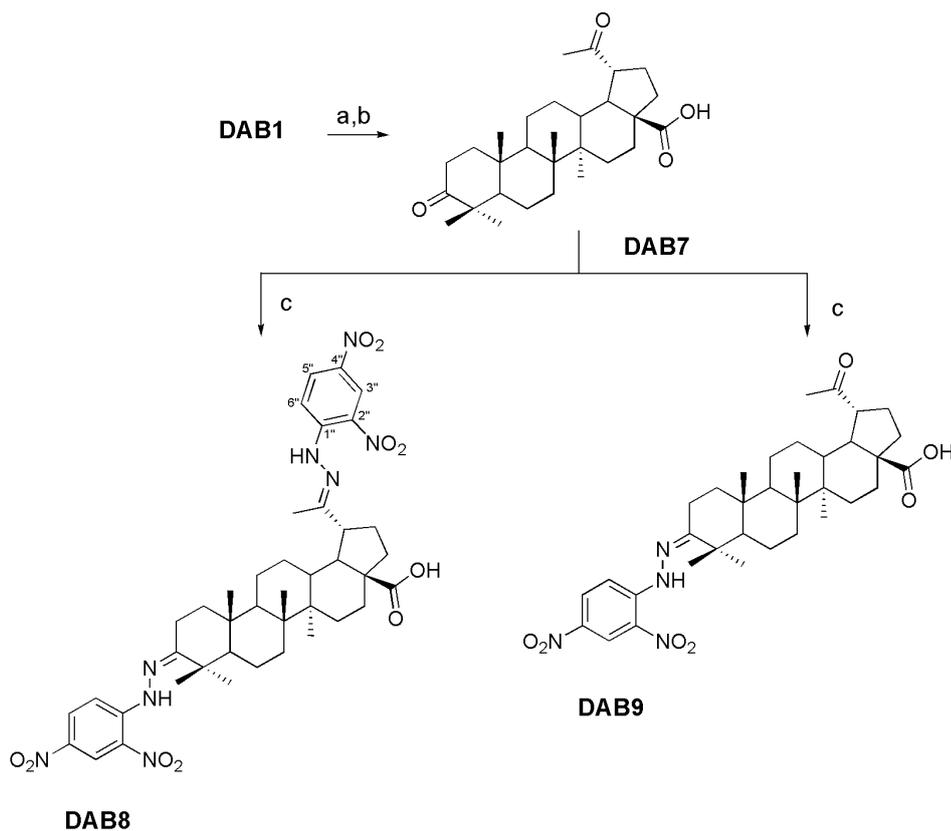
## ESQUEMAS DAS REAÇÕES DE SEMISSÍNTESE



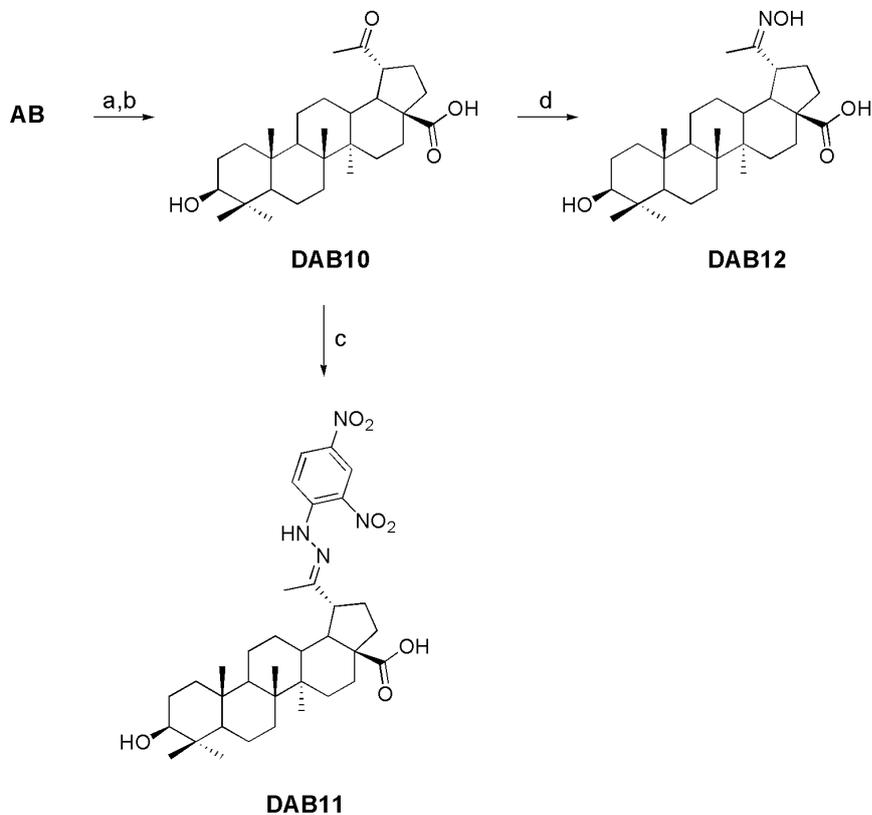
**Esquema 4.** Síntese de DAB1. a)  $\text{CrO}_3$ ;  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; 1,5 h;  $0^\circ\text{C}$ .



**Esquema 5.** Síntese de DAB2, DAB3, DAB4, DAB5 e DAB6. a) 2,4-DNPH;  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; 15 h; temperatura ambiente. b) *m*-CPBA; 5 h;  $0^\circ\text{C}$ . c) diazometano; temperatura ambiente. d) cloreto de benzila;  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ; 2 h; refluxo.

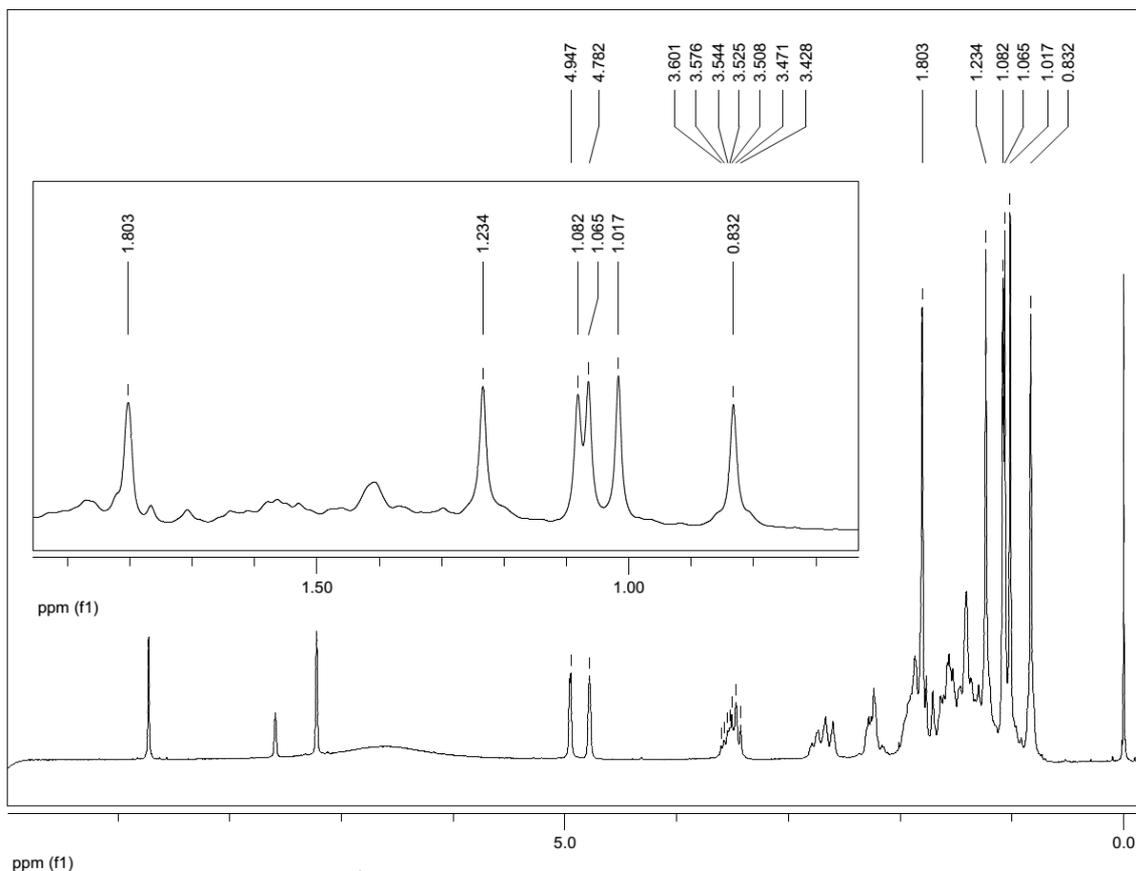


**Esquema 6.** Síntese de DAB7, DAB8 e DAB9. a)  $\text{OsO}_4$ ; dioxano: $\text{H}_2\text{O}$ ; 1 h; temperatura ambiente. b)  $\text{NaIO}_4$ ; 3 dias; temperatura ambiente. c) 2,4-DNPH;  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; 15 h; temperatura ambiente.

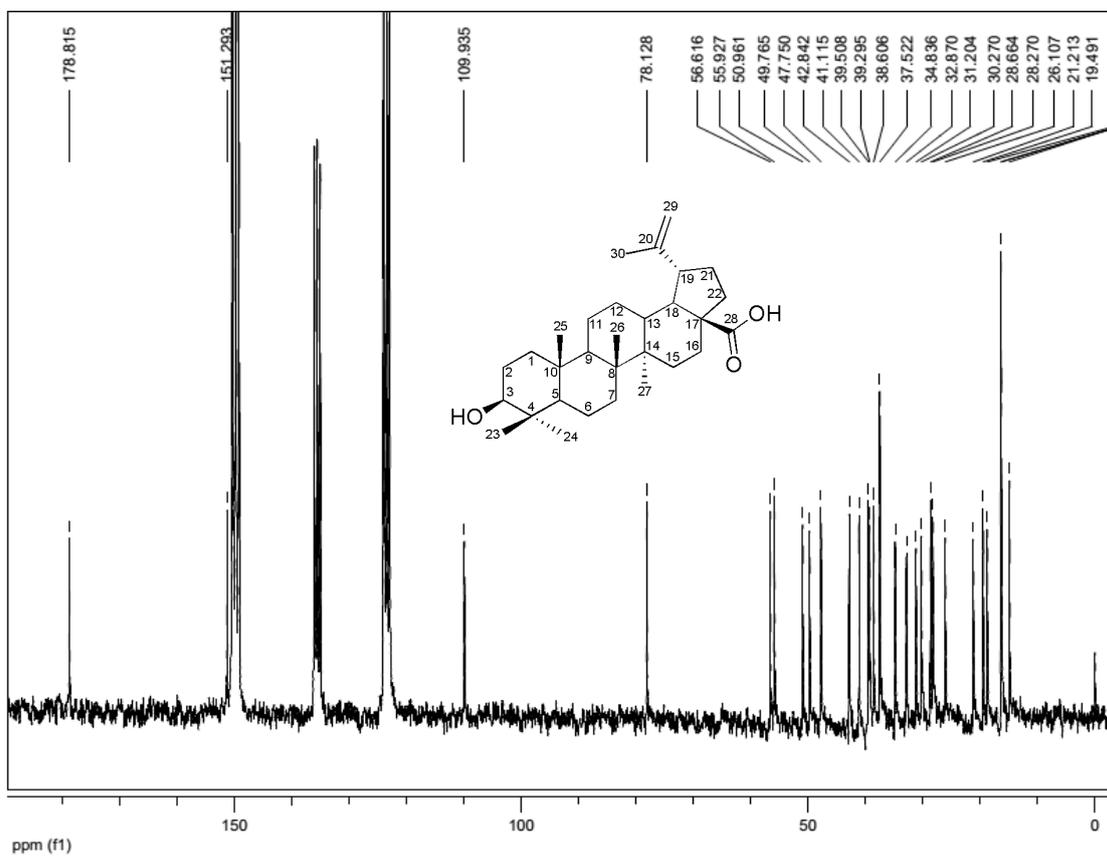


**Esquema 7.** Síntese de DAB10, DAB11 e DAB12. a)  $\text{OsO}_4$ ; dioxano: $\text{H}_2\text{O}$ ; 1 h; temperatura ambiente. b)  $\text{NaIO}_4$ ; 3 dias; temperatura ambiente. c) 2,4-DNPH;  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; 15 h; temperatura ambiente. d) cloridrato de hidroxilamina,  $\text{NaOAc}$ , *overnight*, temperatura ambiente.

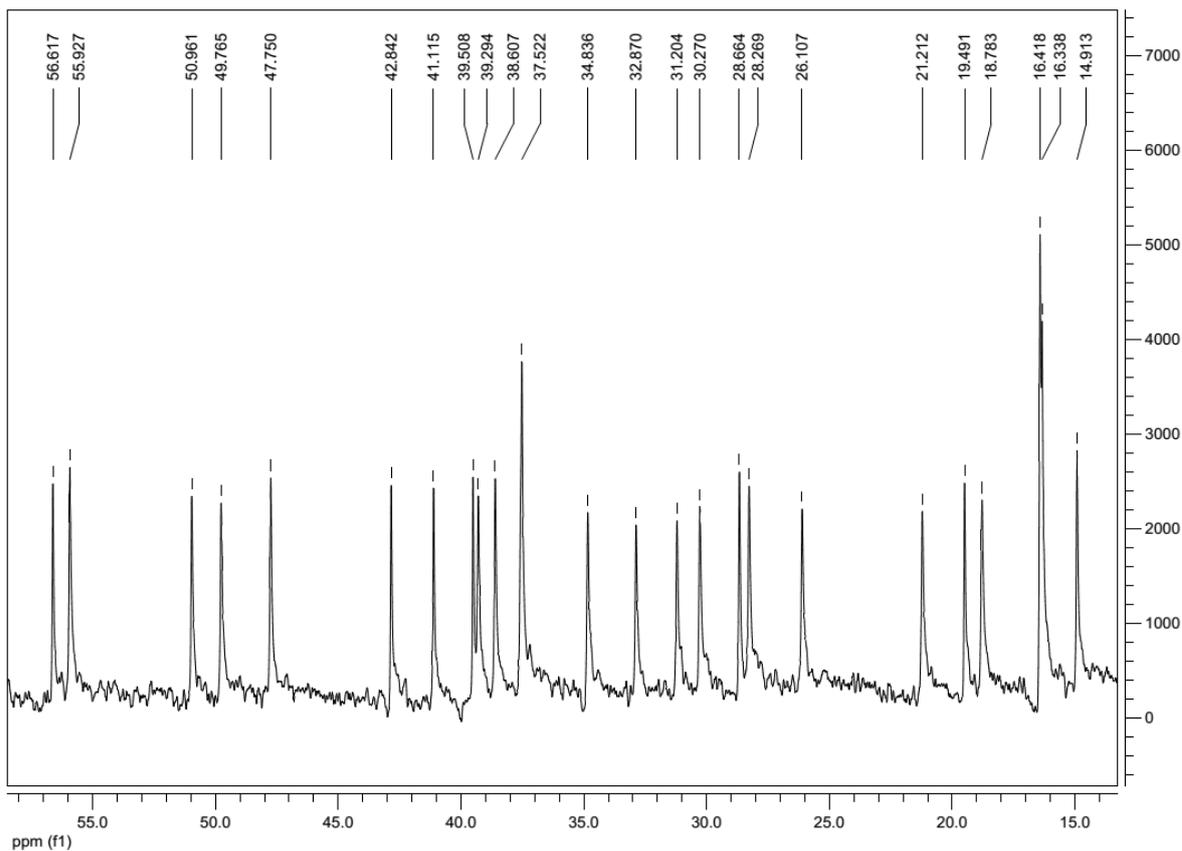
## ESPECTROS



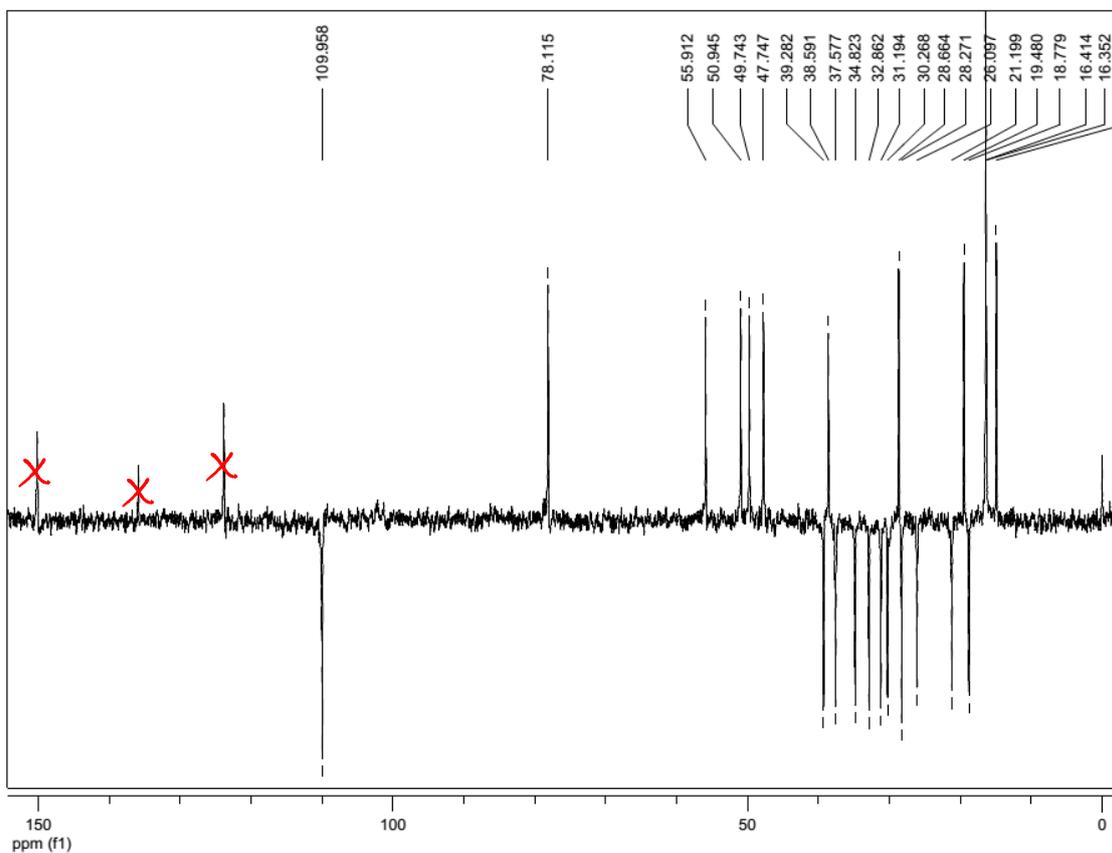
**Figura 24.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz, Pyr-d<sub>5</sub>) do ácido betulínico (AB).



**Figura 25.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz, Pyr-d<sub>5</sub>) do ácido betulínico (AB).



**Figura 26.** Expansão (região entre 14,9 e 56,6 ppm) do espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (50 MHz, Pyr- $d_5$ ) do ácido betulínico (**AB**).



**Figura 27.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$ -DEPT (50 MHz, Pyr- $d_5$ ) do ácido betulínico (**AB**).

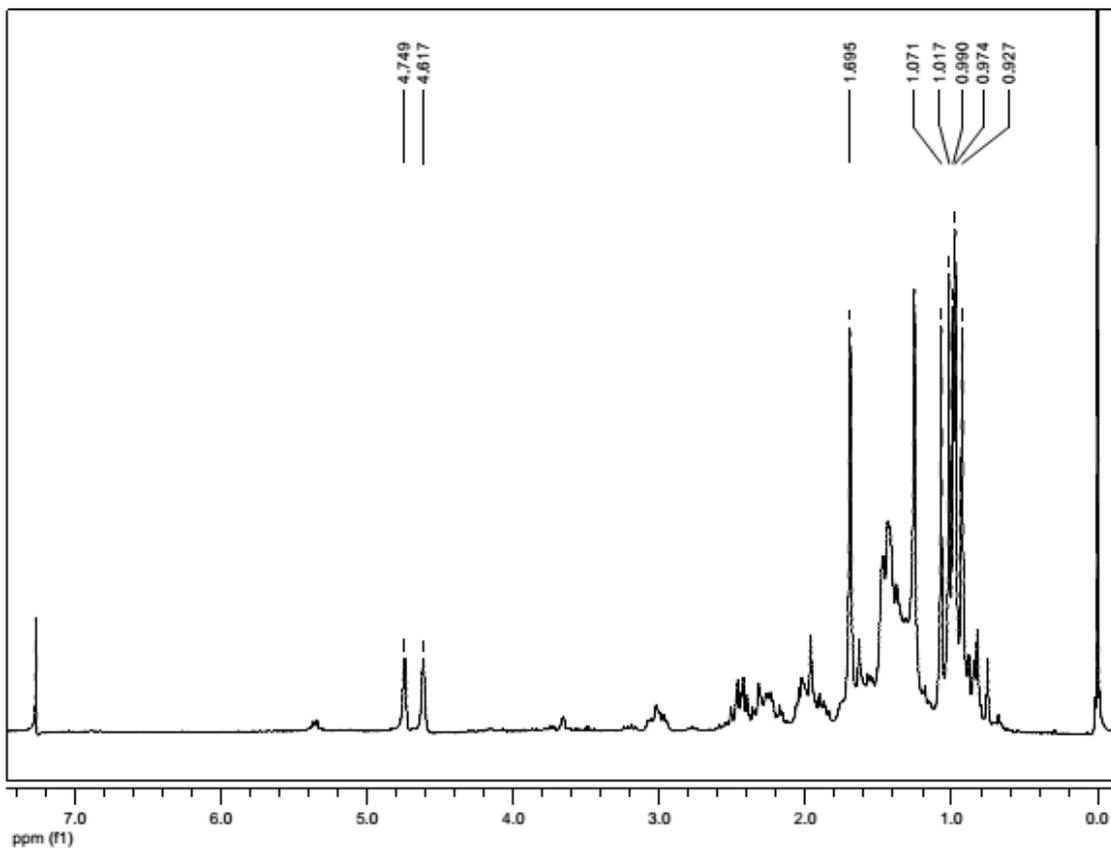


Figura 28. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de Myc15b.

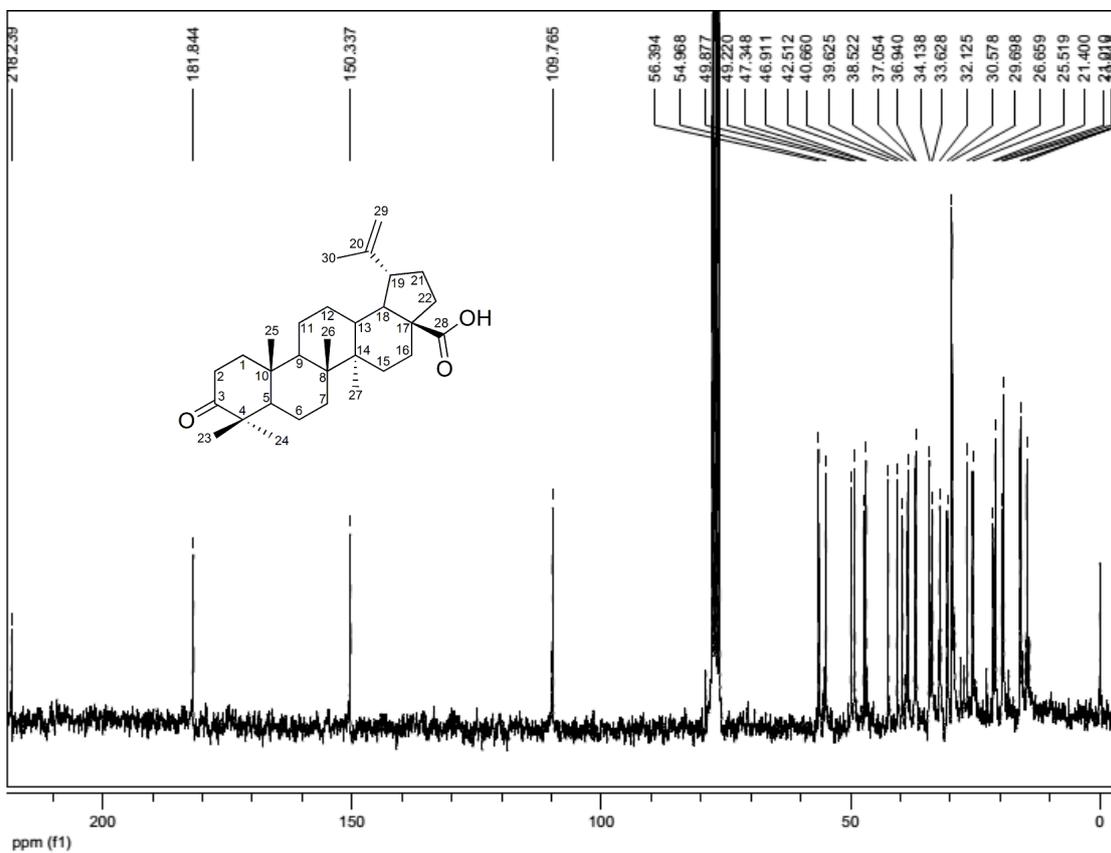


Figura 29. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de Myc15b.

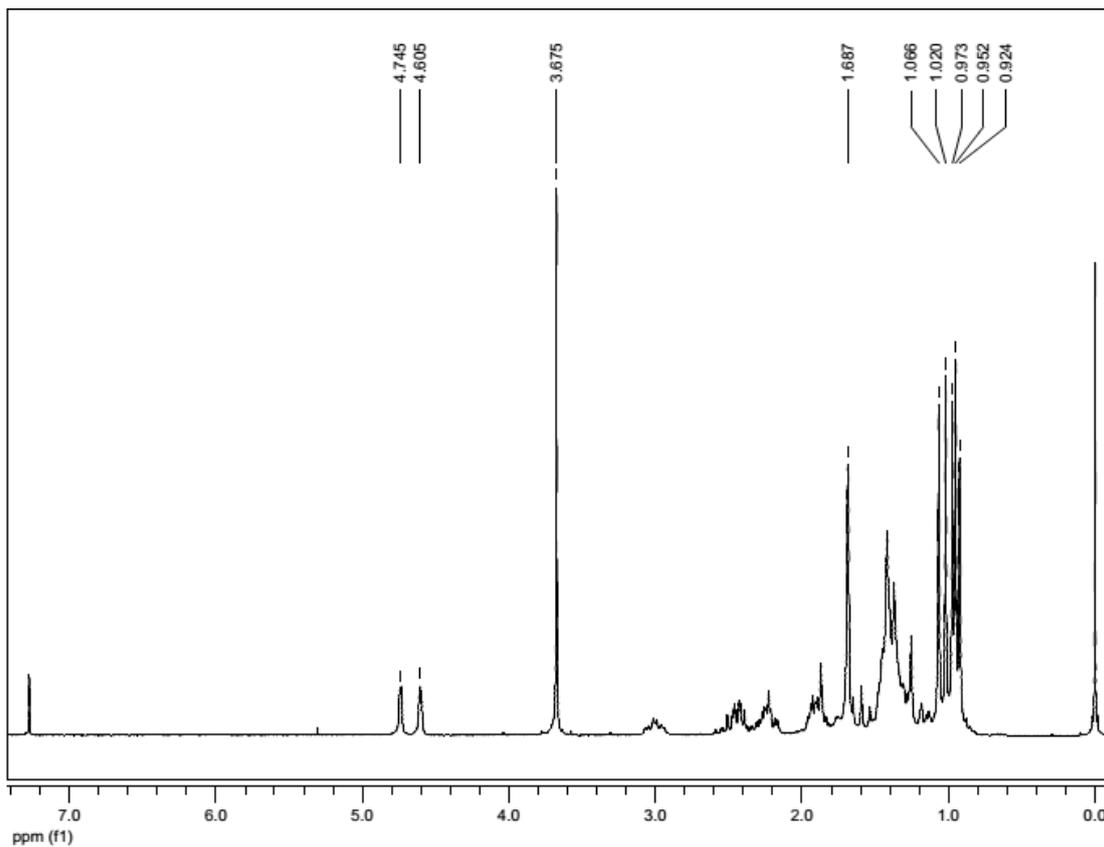


Figura 30. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PEN10b.1.

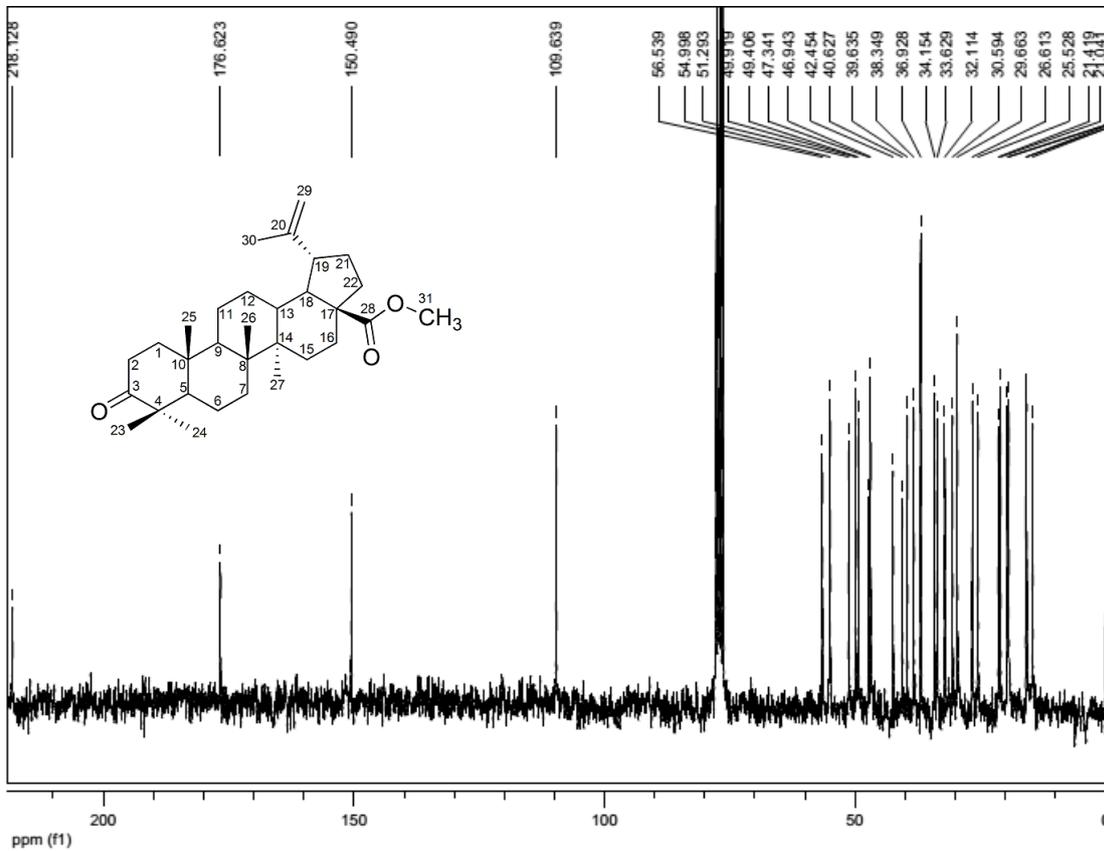


Figura 31. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PEN10b.1.

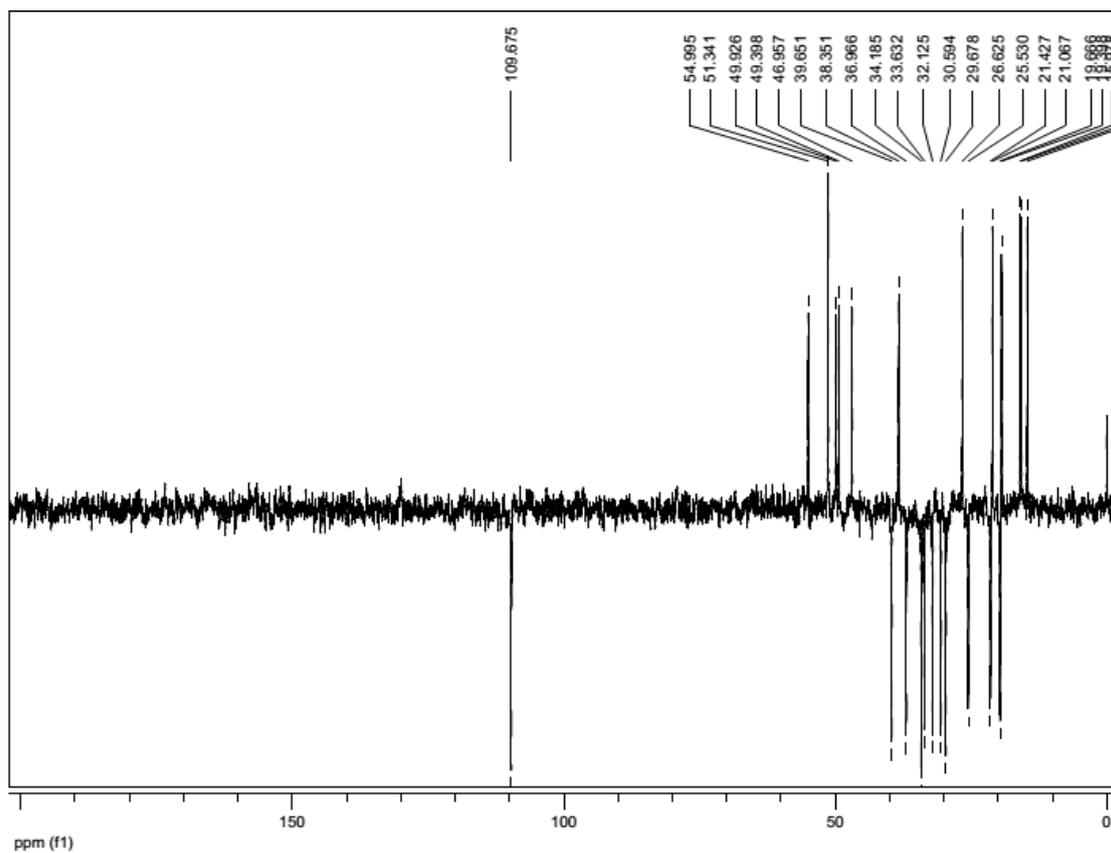


Figura 32. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$ -DEPT (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **PEN10b.1**.

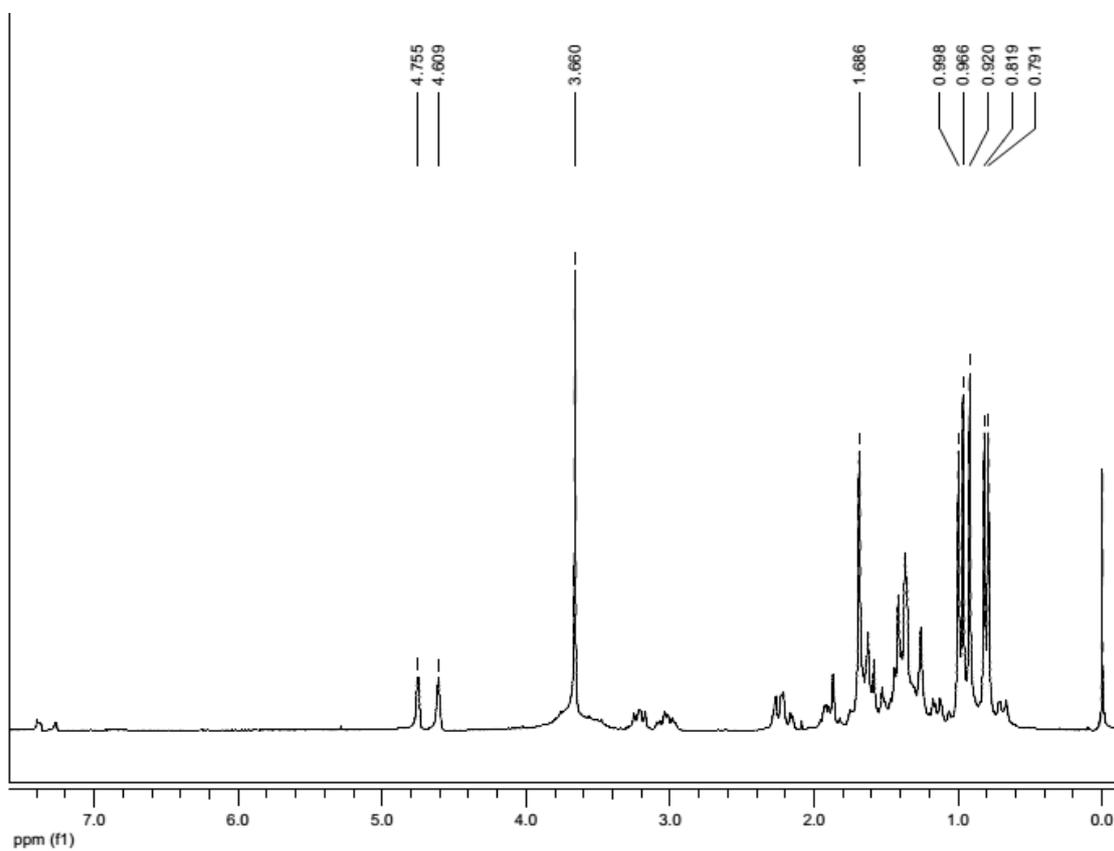


Figura 33. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ +Pyr- $d_5$ ) de **PEN13b**.

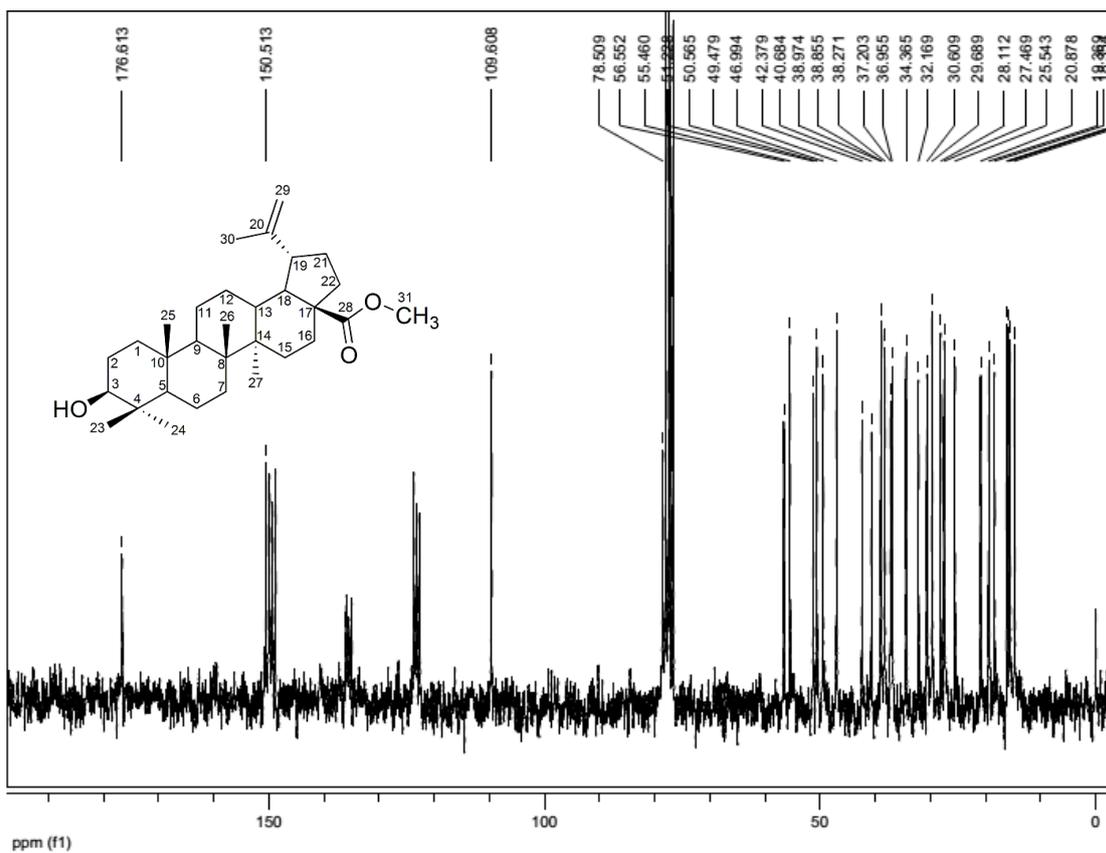


Figura 34. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ +Pyr-d<sub>5</sub>) de PEN13b.

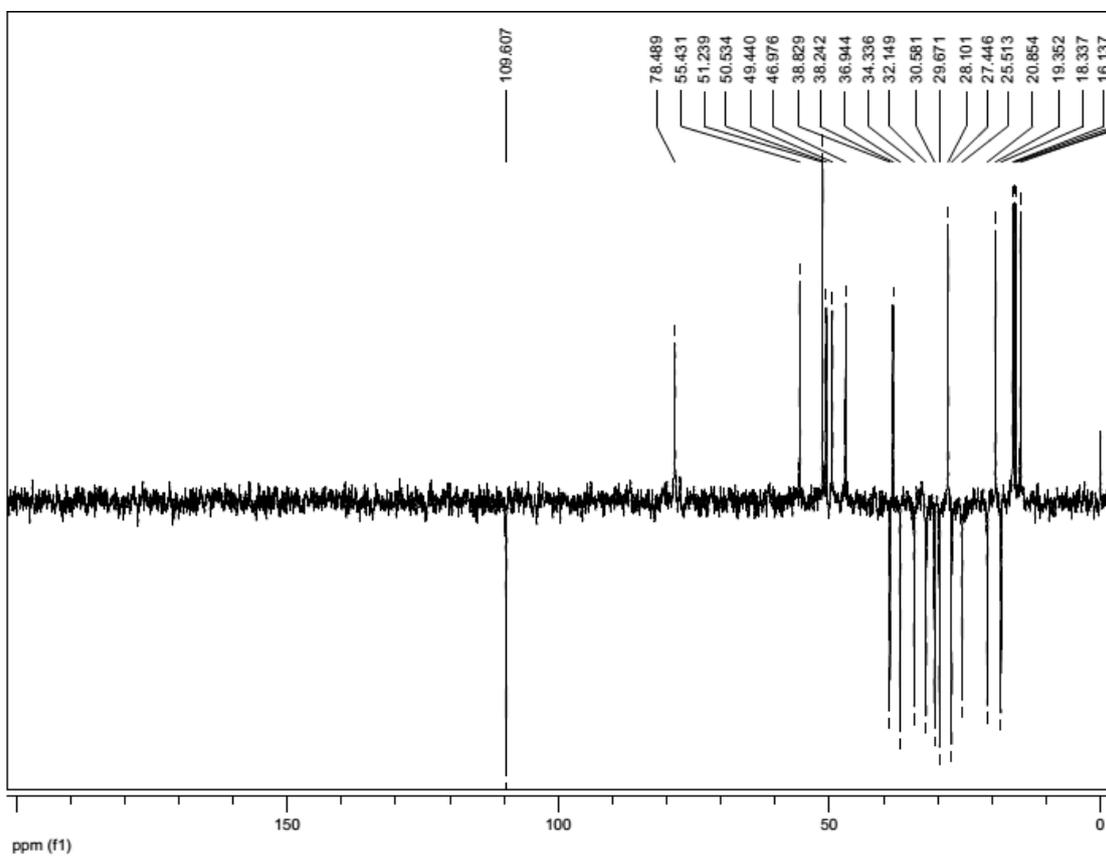


Figura 35. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$ -DEPT (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ +Pyr-d<sub>5</sub>) de PEN13b.

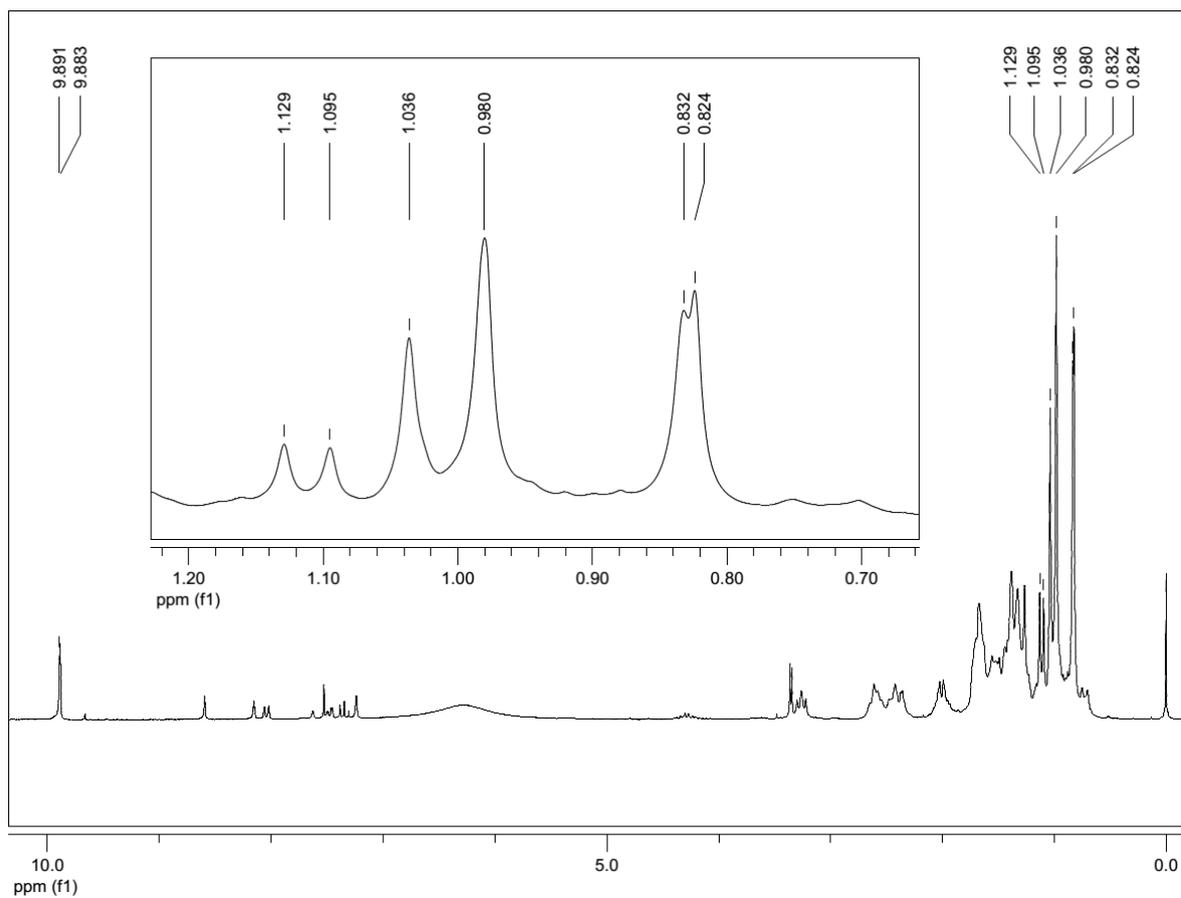


Figura 36. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ +Pyr- $d_5$ ) de **CEN2**.

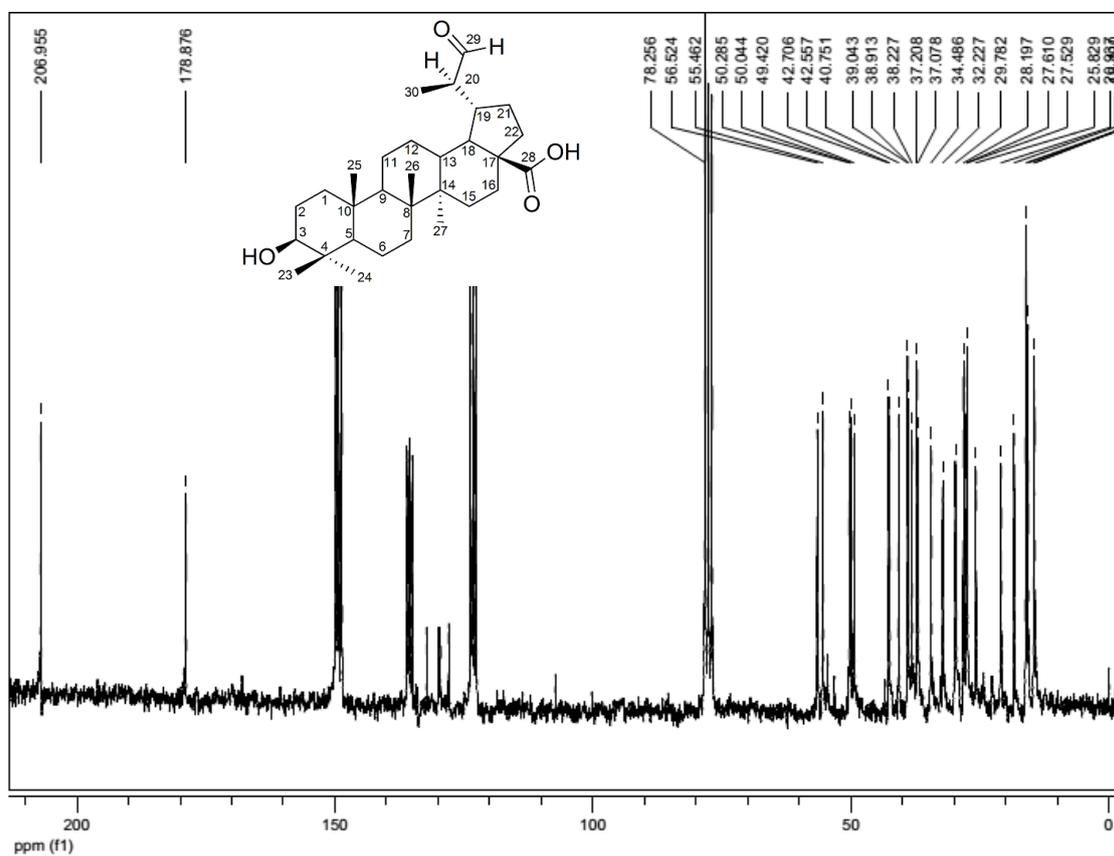


Figura 37. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ +Pyr- $d_5$ ) de **CEN2**.

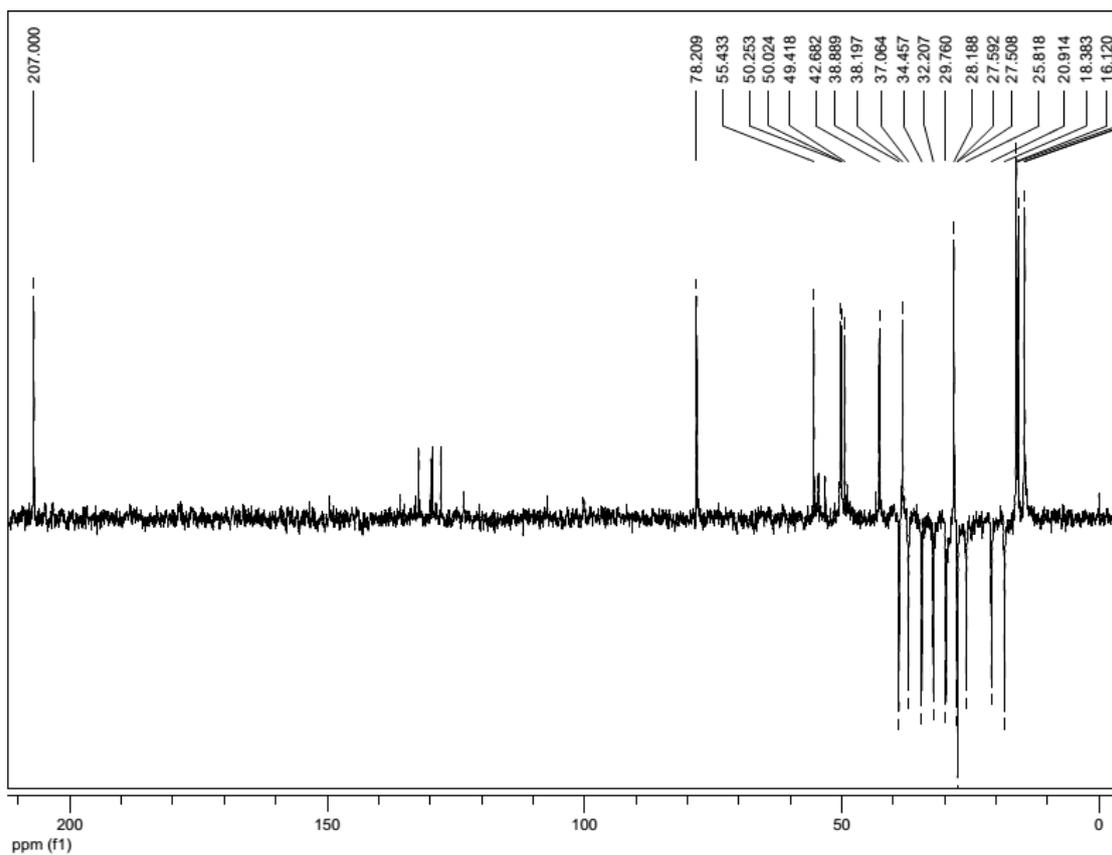


Figura 38. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$ -DEPT (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ +Pyr-d5) de CEN2.

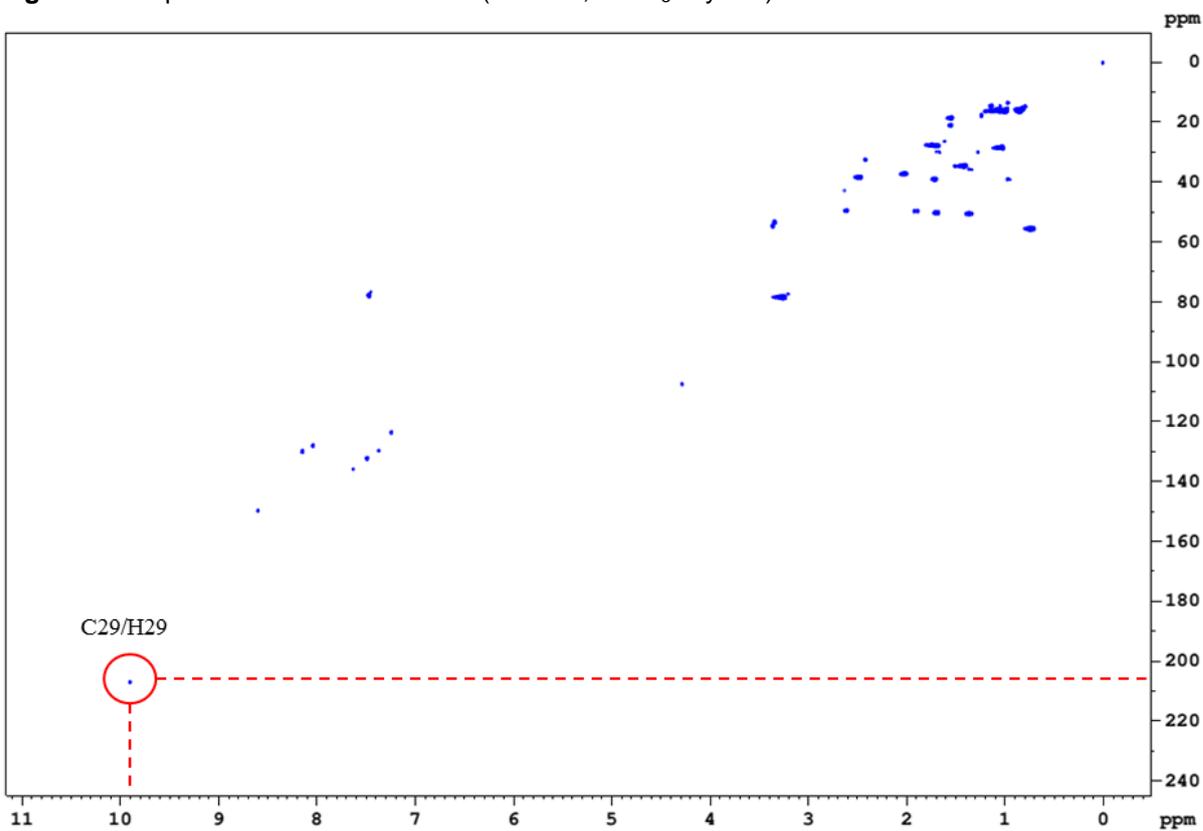


Figura 39. Mapa de correlação HSQC de CEN2.

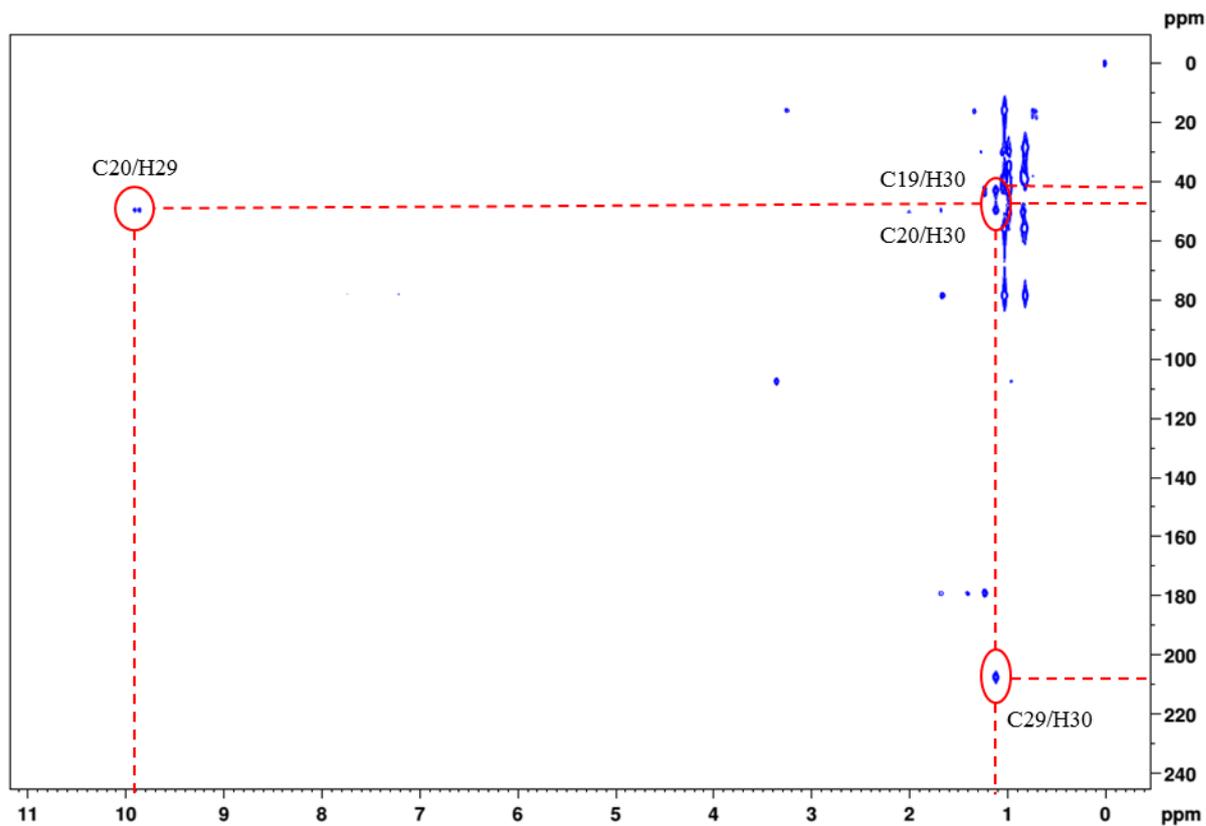


Figura 40. Mapa de correlação HMBC de CEN2.

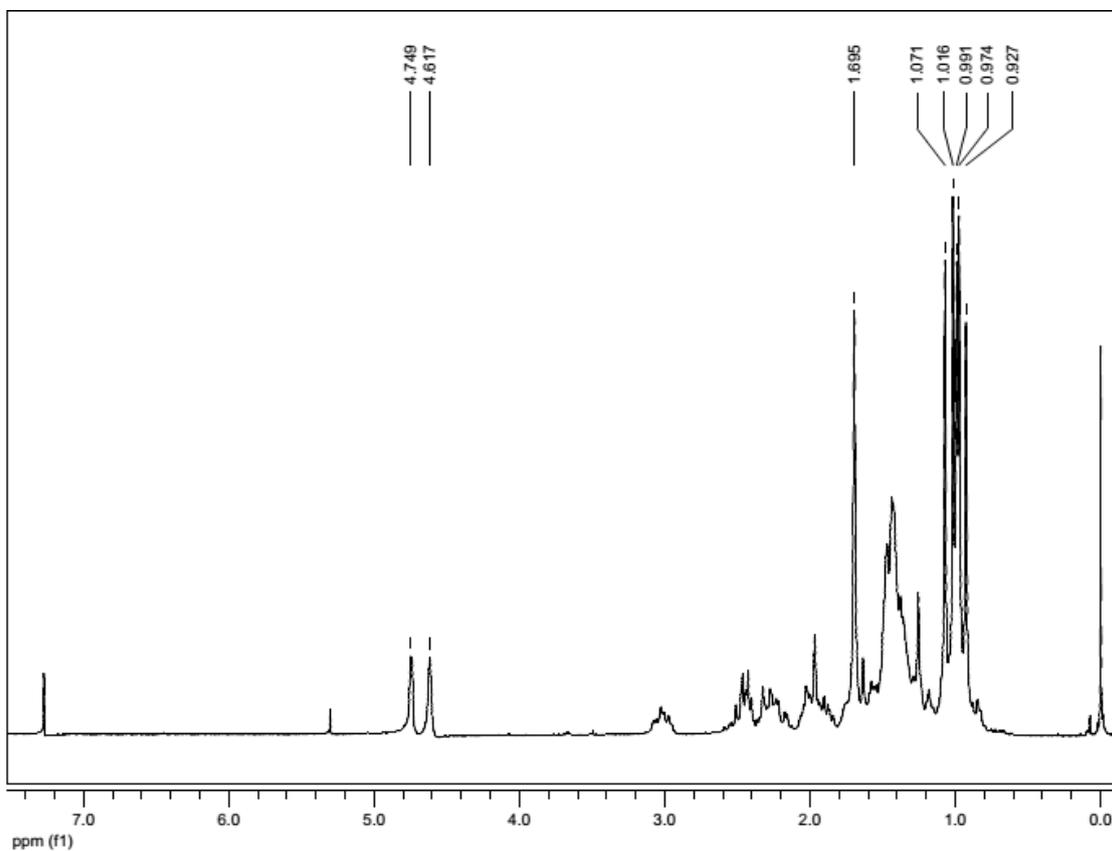


Figura 41. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do ácido betulônico (DAB1).

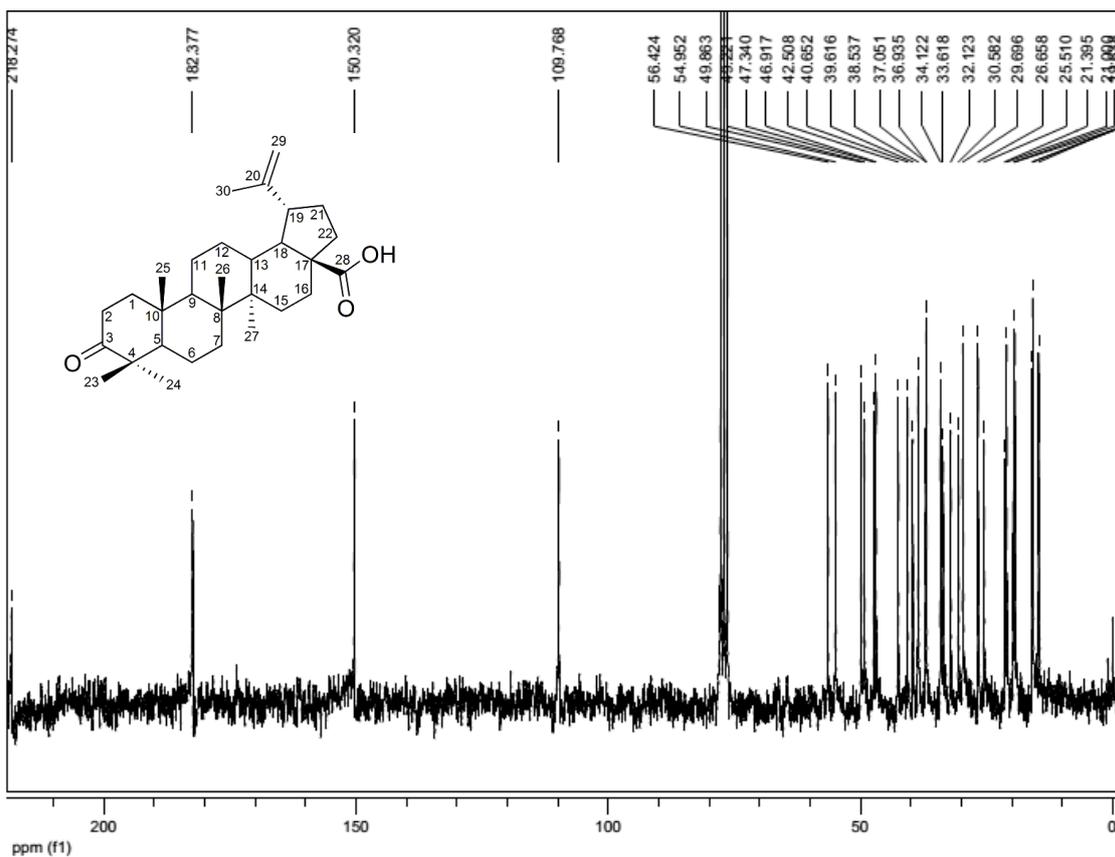


Figura 42. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do ácido betulônico (DAB1).

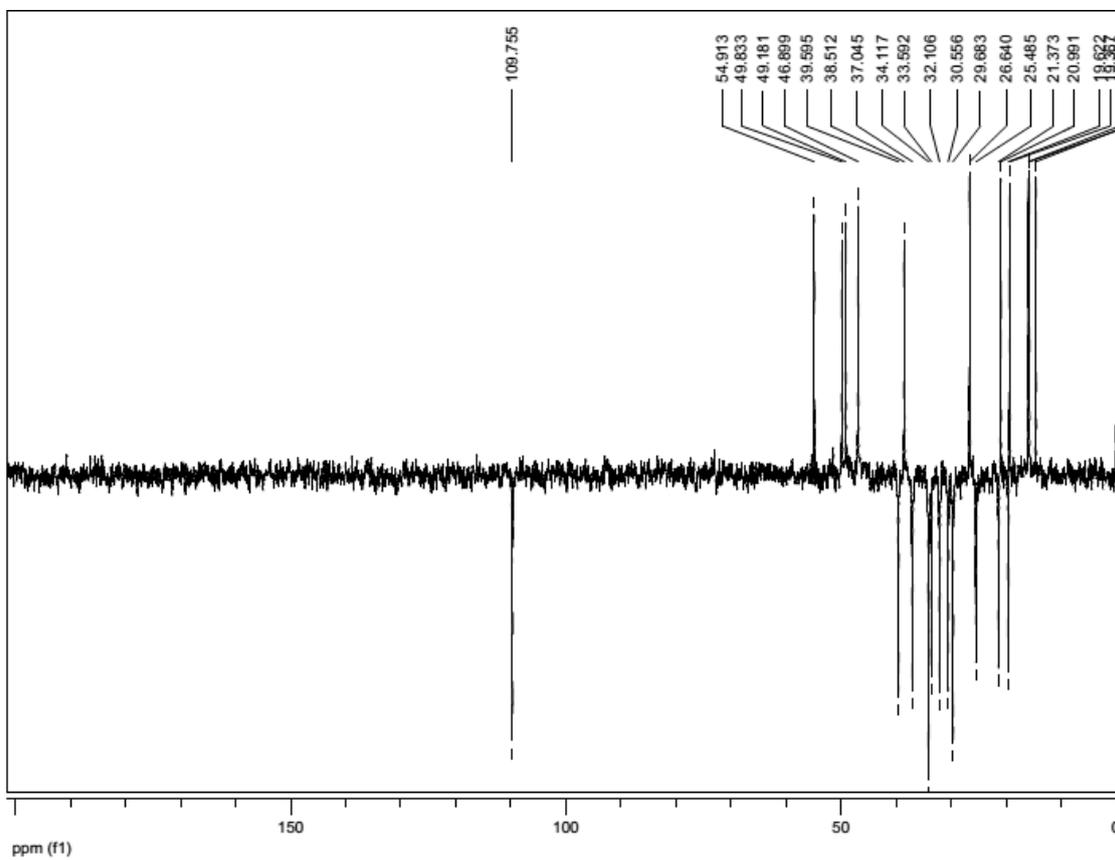


Figura 43. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$ -DEPT (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do ácido betulônico (DAB1).

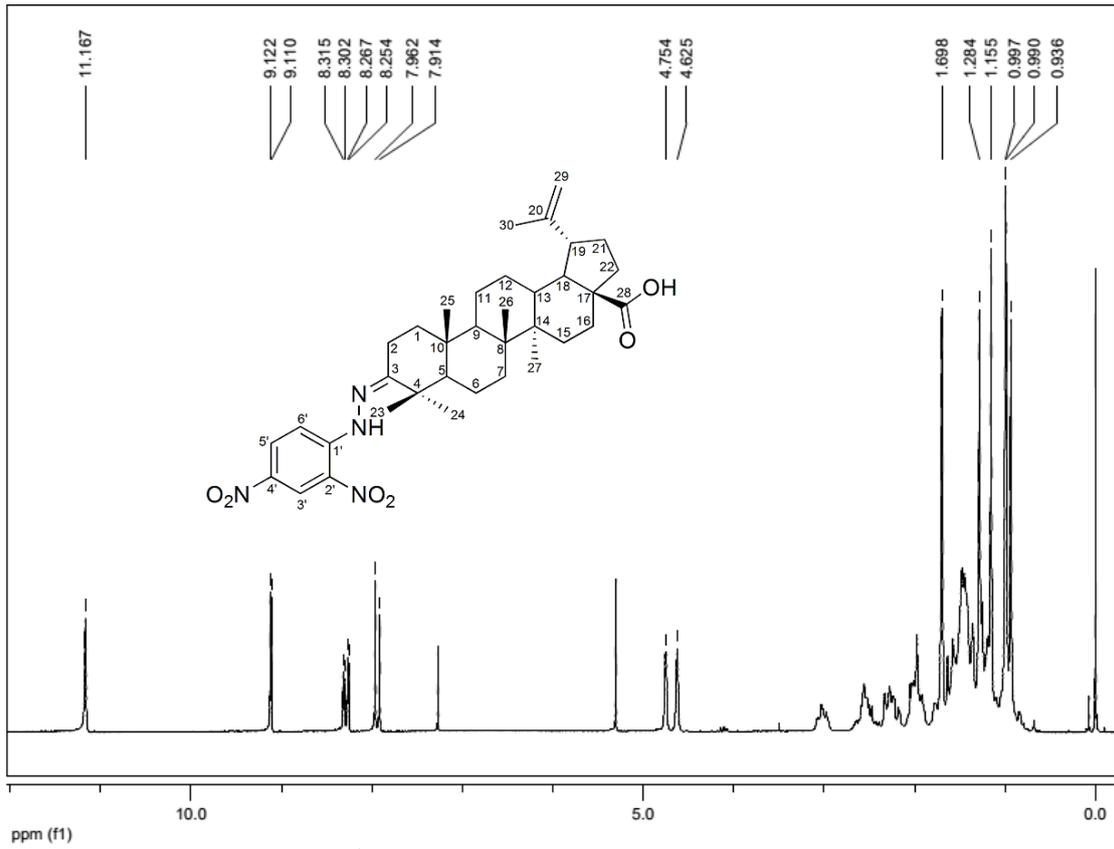


Figura 44. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do DAB2.

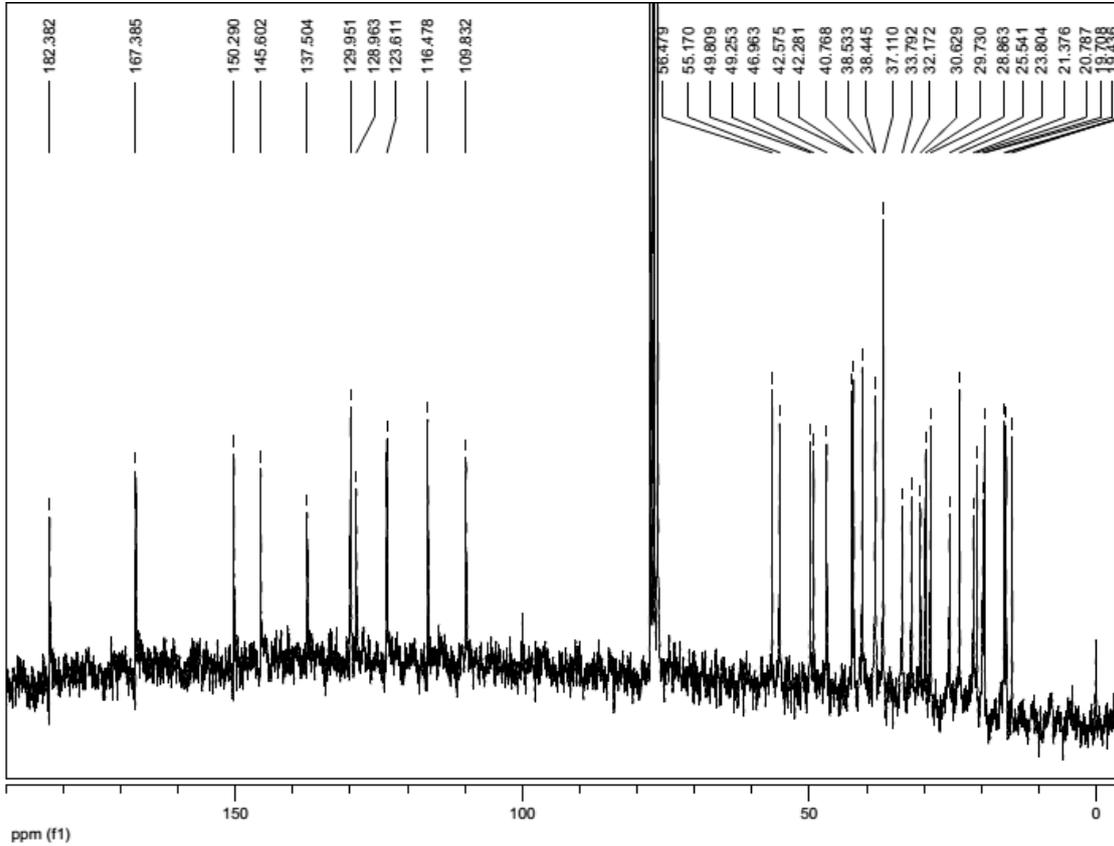


Figura 45. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do DAB2.

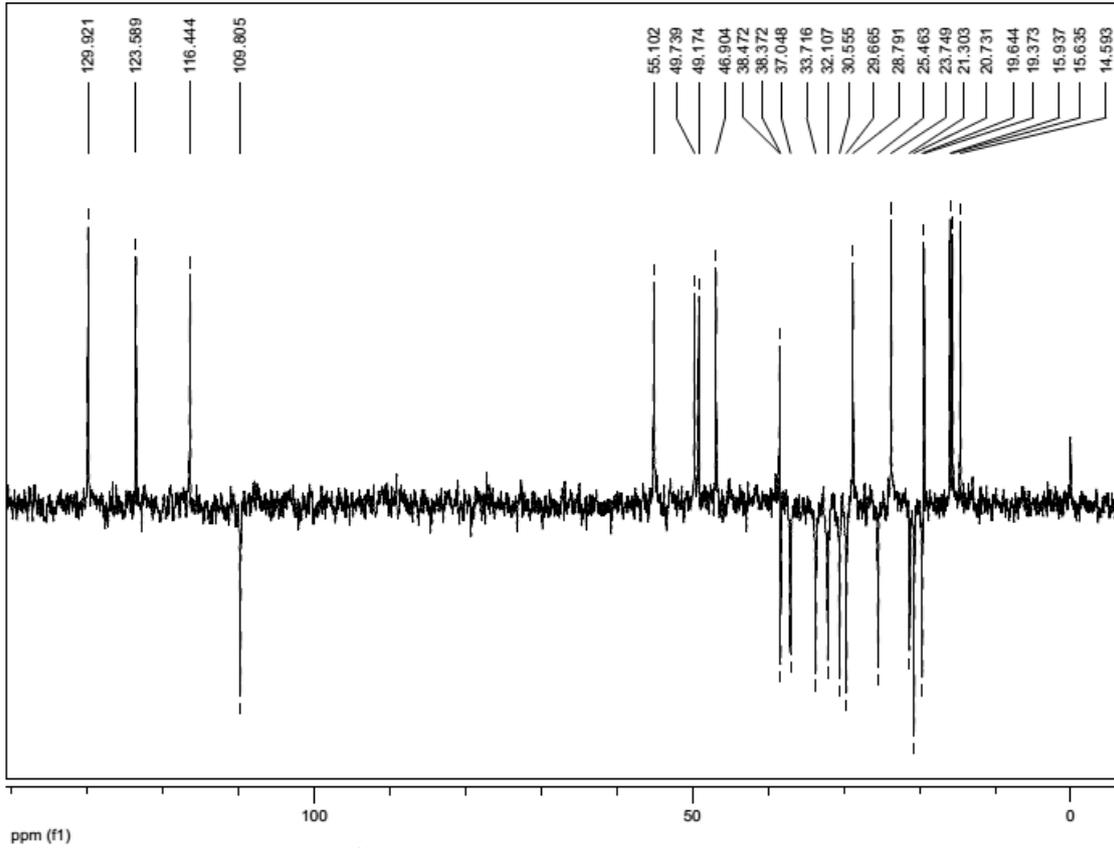


Figura 46. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$ -DEPT (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do DAB2.

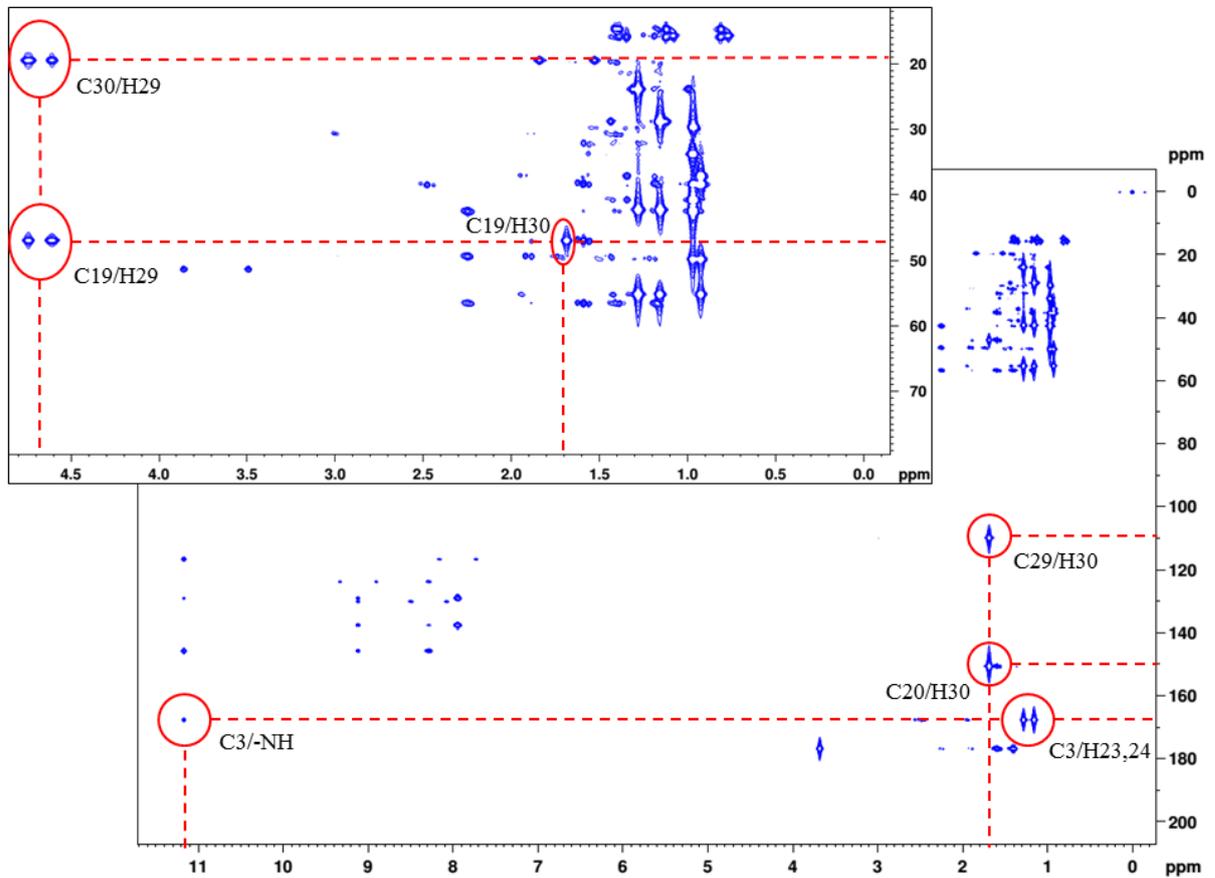


Figura 47. Mapa de correlação HMBC de DAB2.

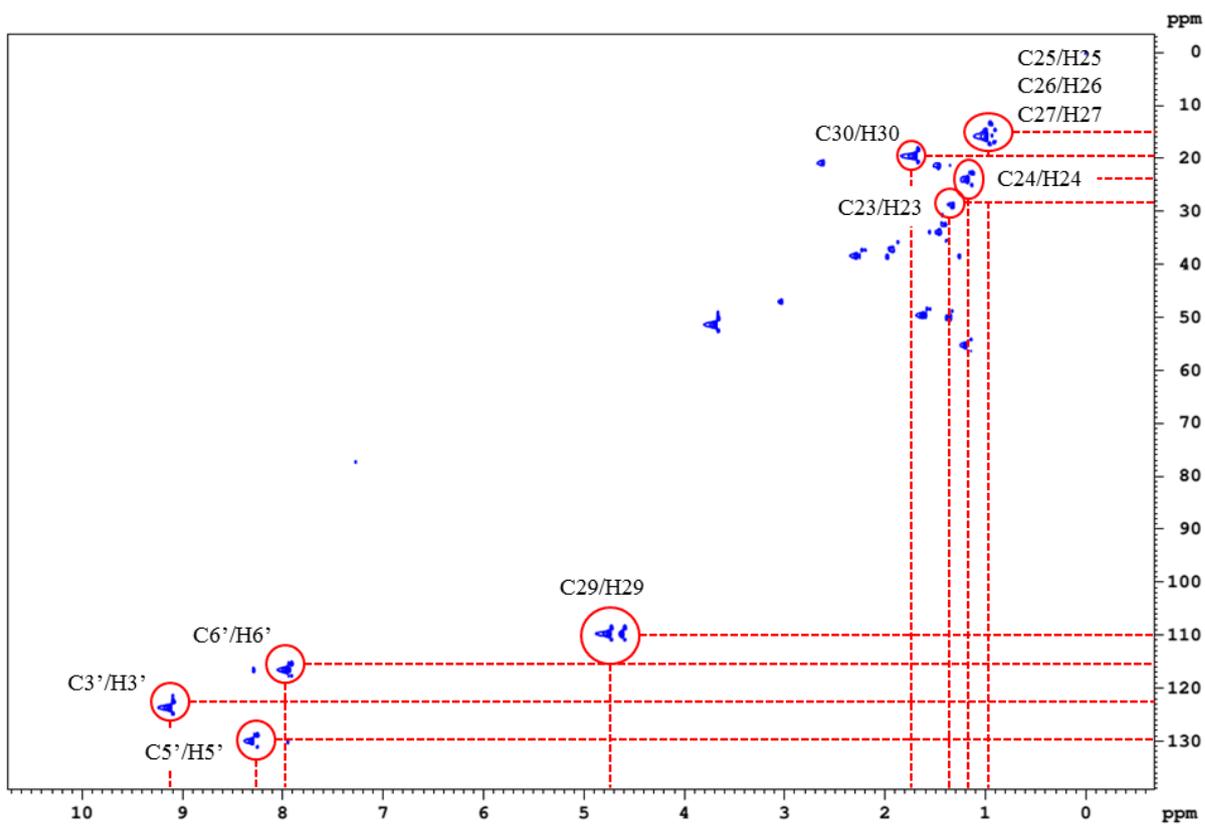


Figura 48. Mapa de correlação HSQC de DAB2.

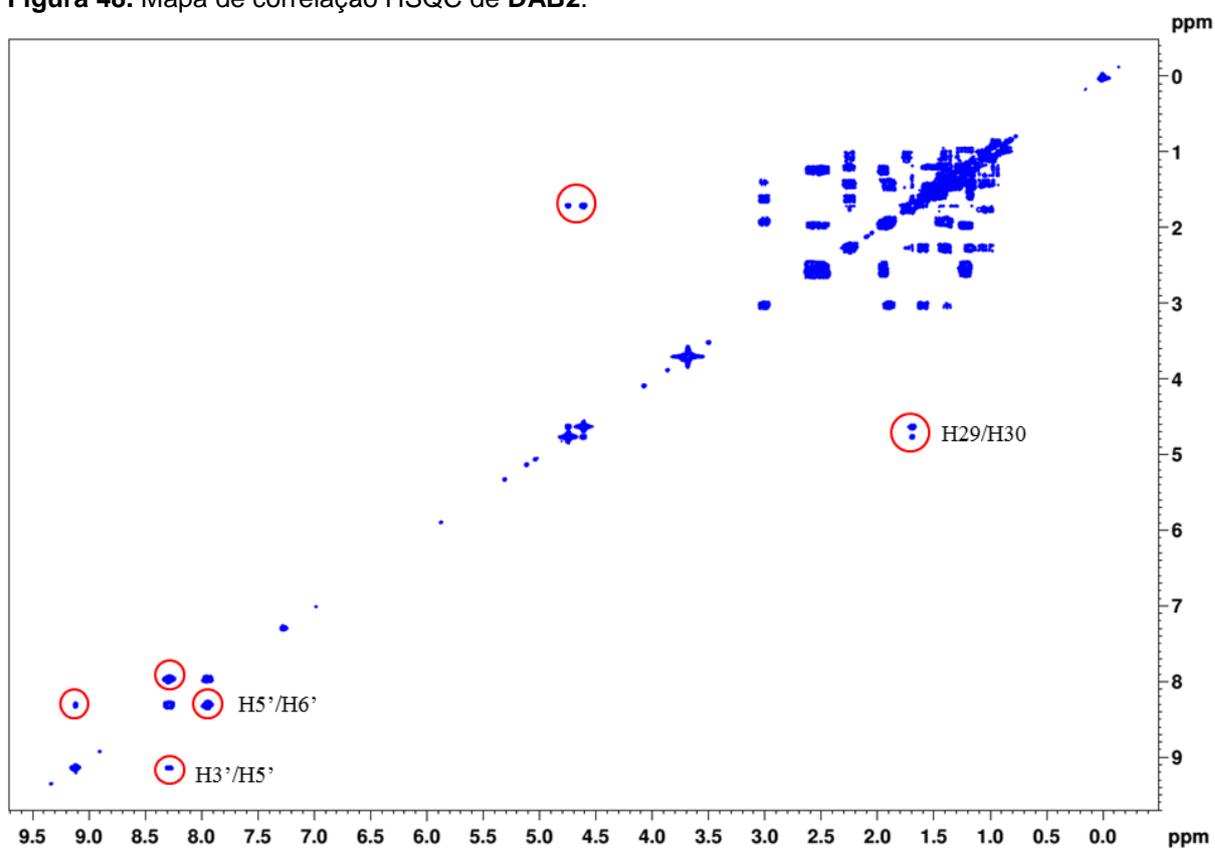


Figura 49. Mapa de correlação COSY de DAB2.

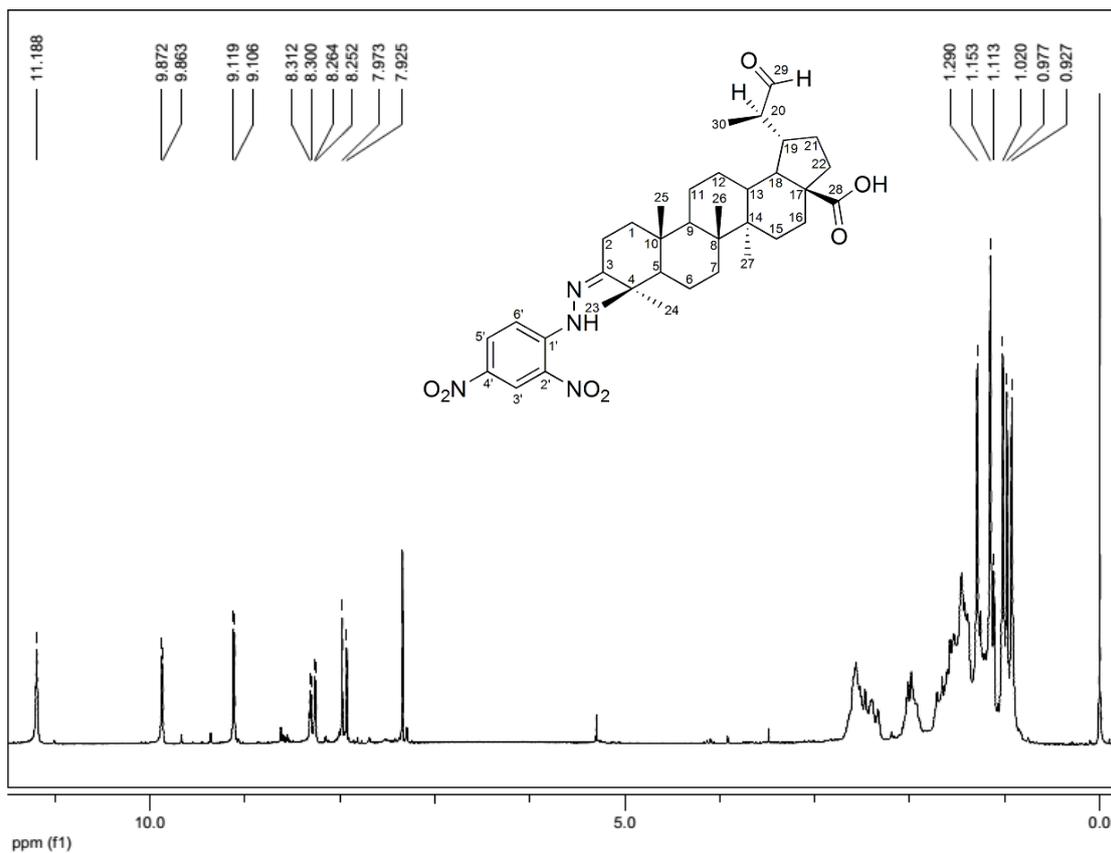


Figura 50. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ +Pyr- $d_5$ ) do DAB3.

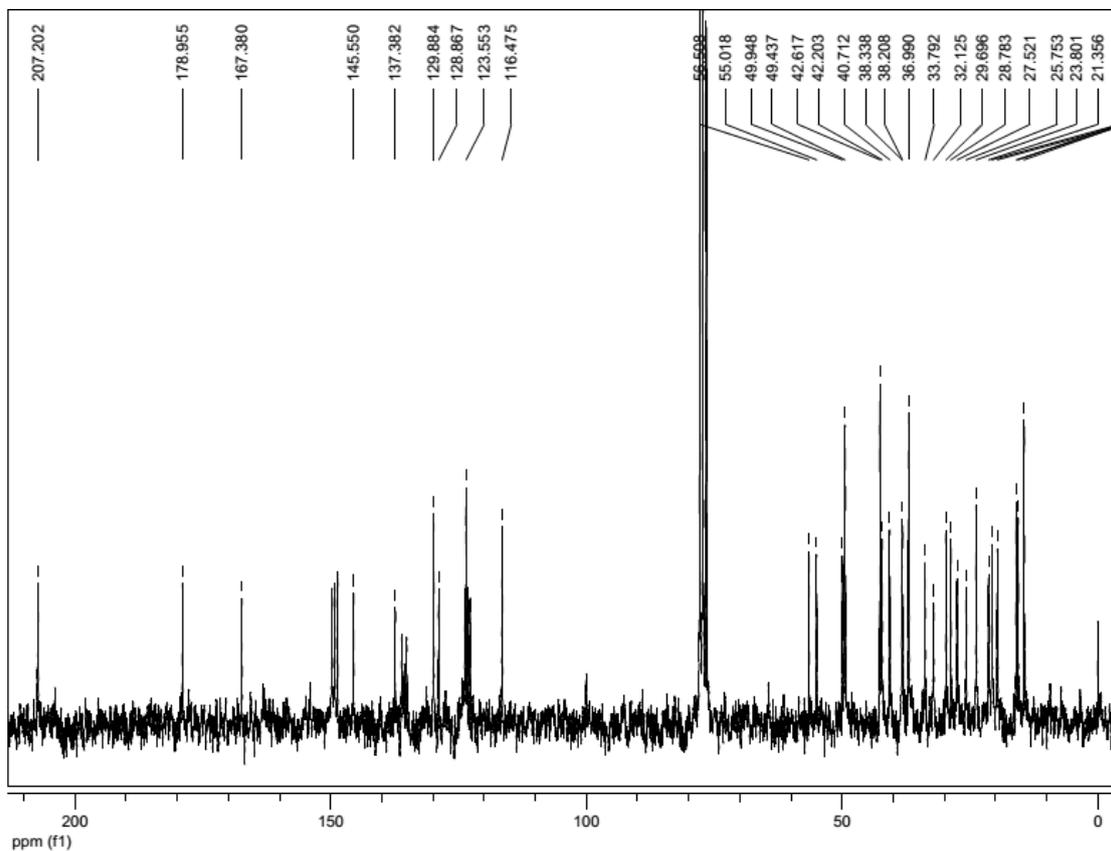


Figura 51. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ +Pyr- $d_5$ ) do DAB3.

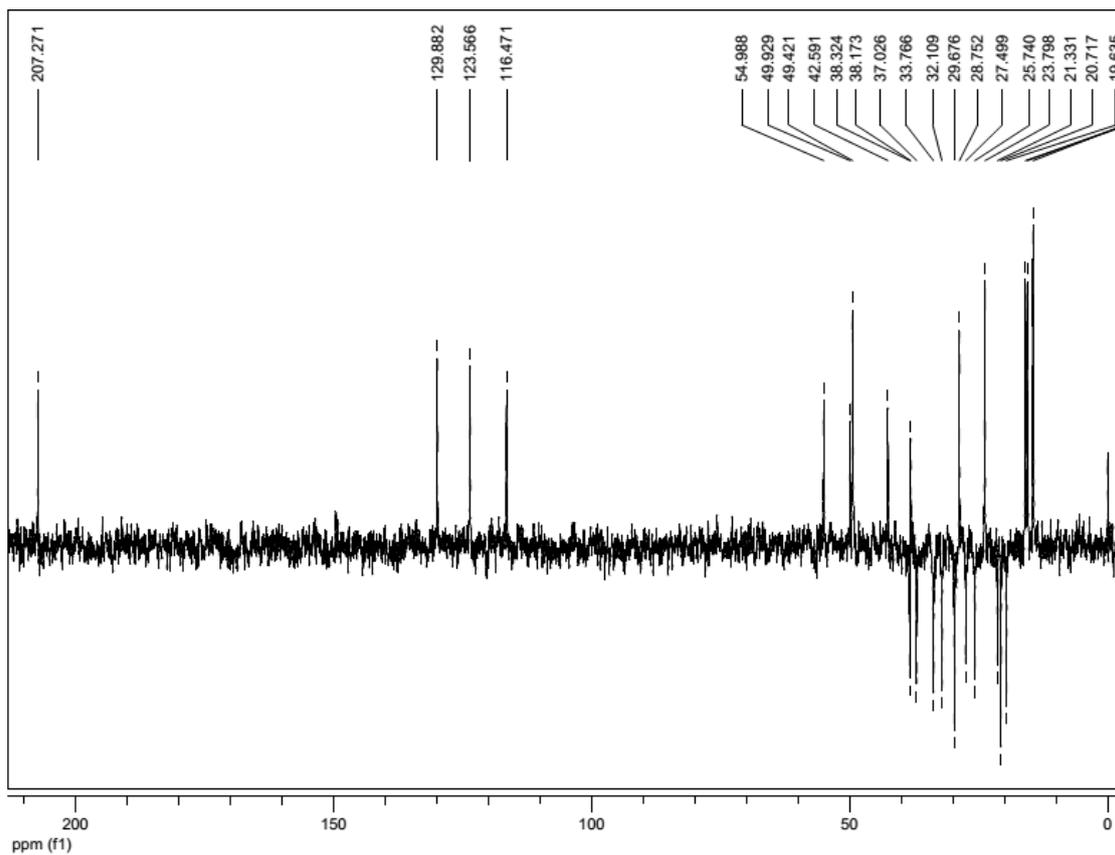


Figura 52. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$ -DEPT (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ +Pyr-d $_5$ ) do **DAB3**.

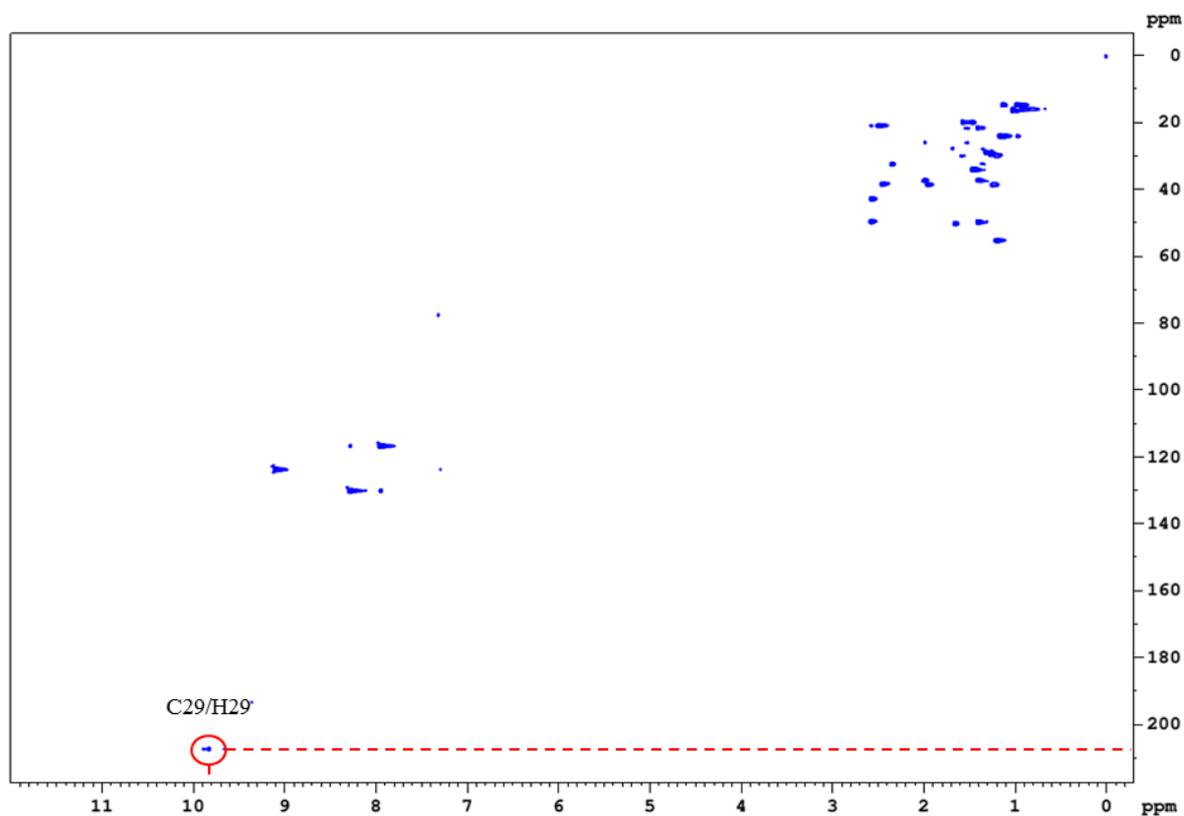


Figura 53. Mapa de correlação HSQC de **DAB3**.

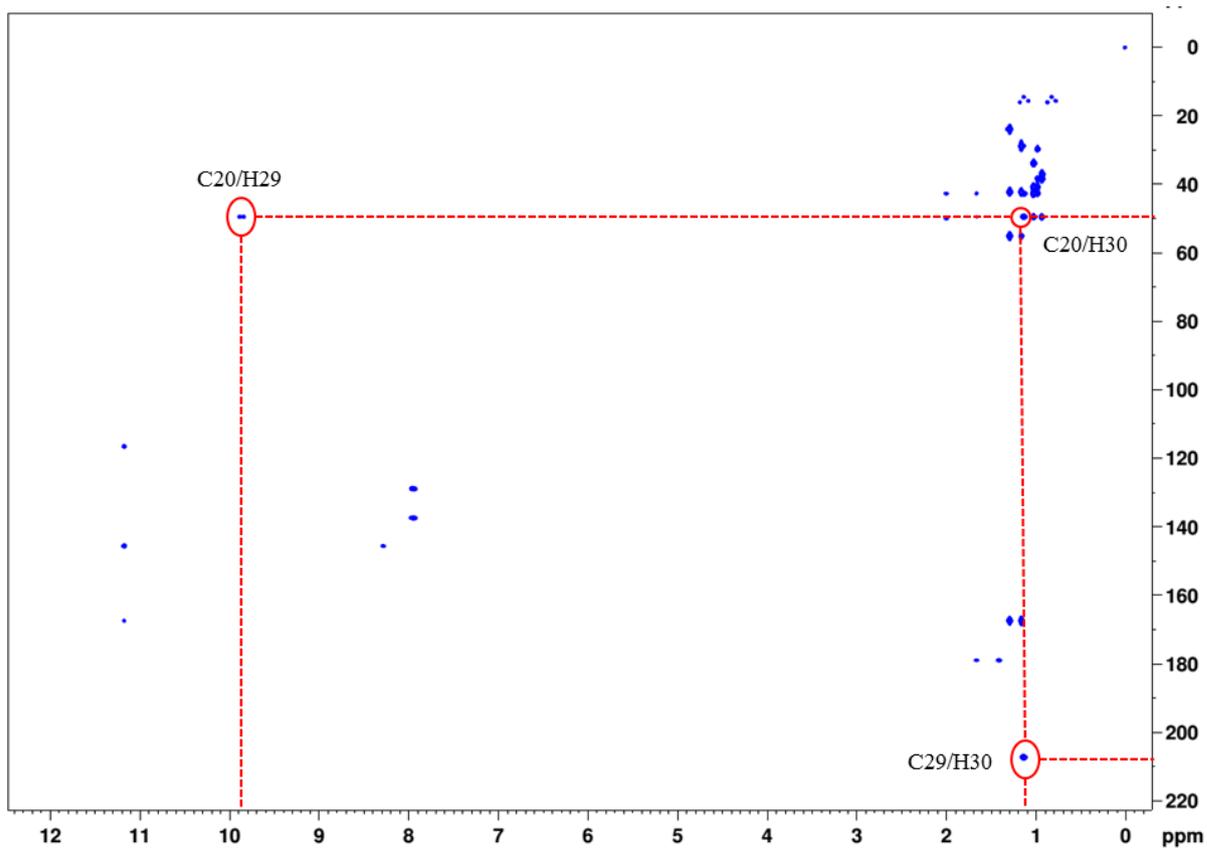


Figura 54. Mapa de correlação HMBC de **DAB3**.

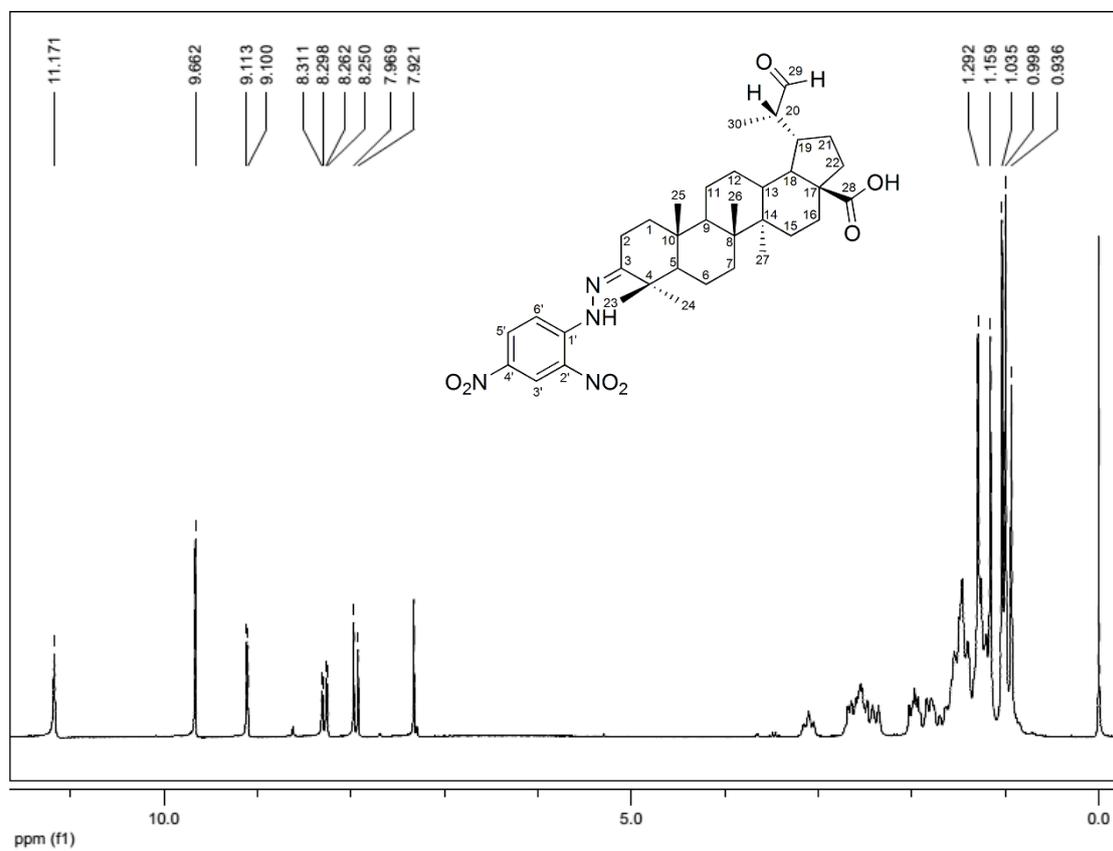


Figura 55. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ +Pyr- $d_5$ ) do **DAB4**.

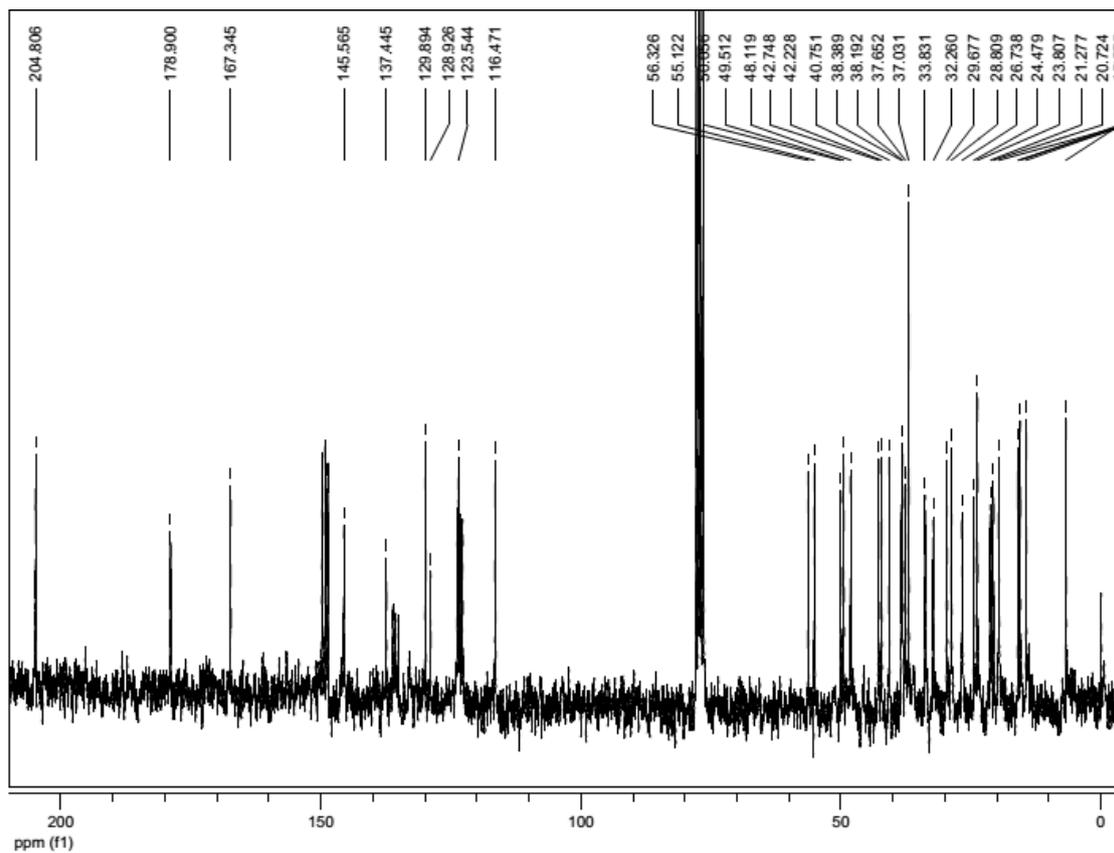


Figura 56. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ +Pyr-d5) do **DAB4**.

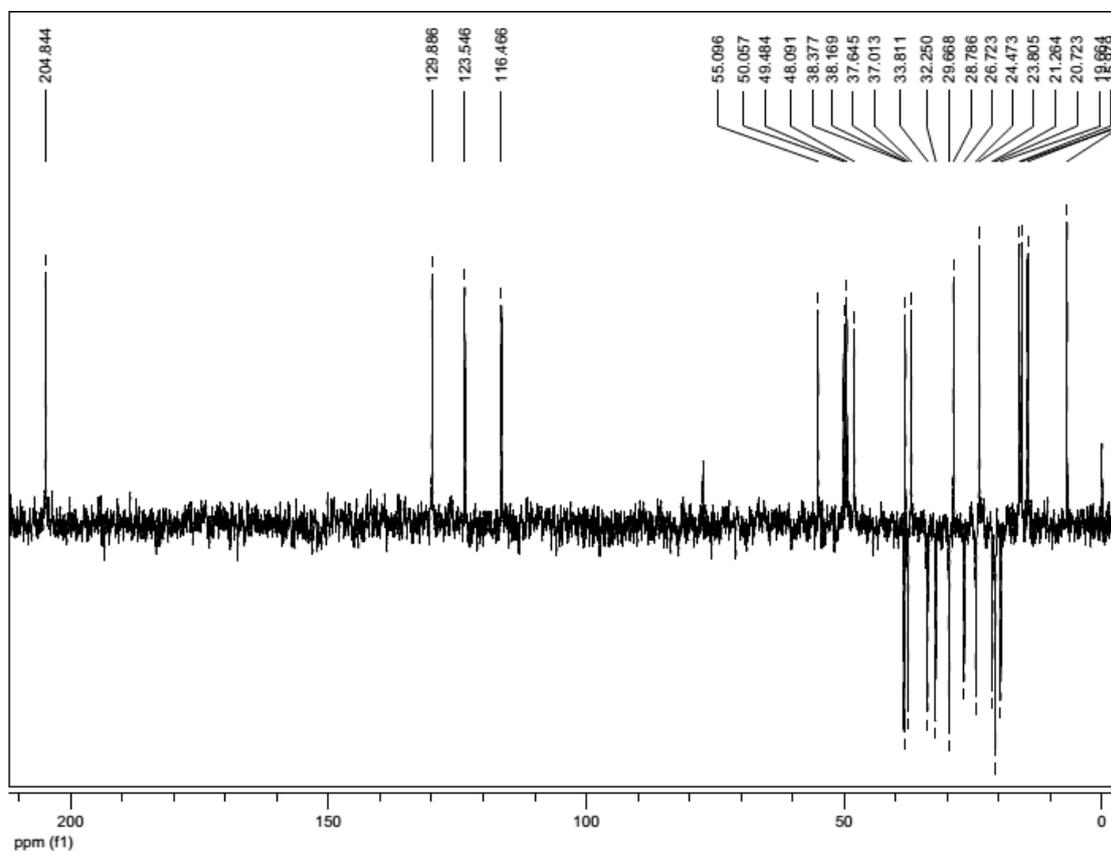


Figura 57. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  -DEPT (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ +Pyr-d5) do **DAB4**.

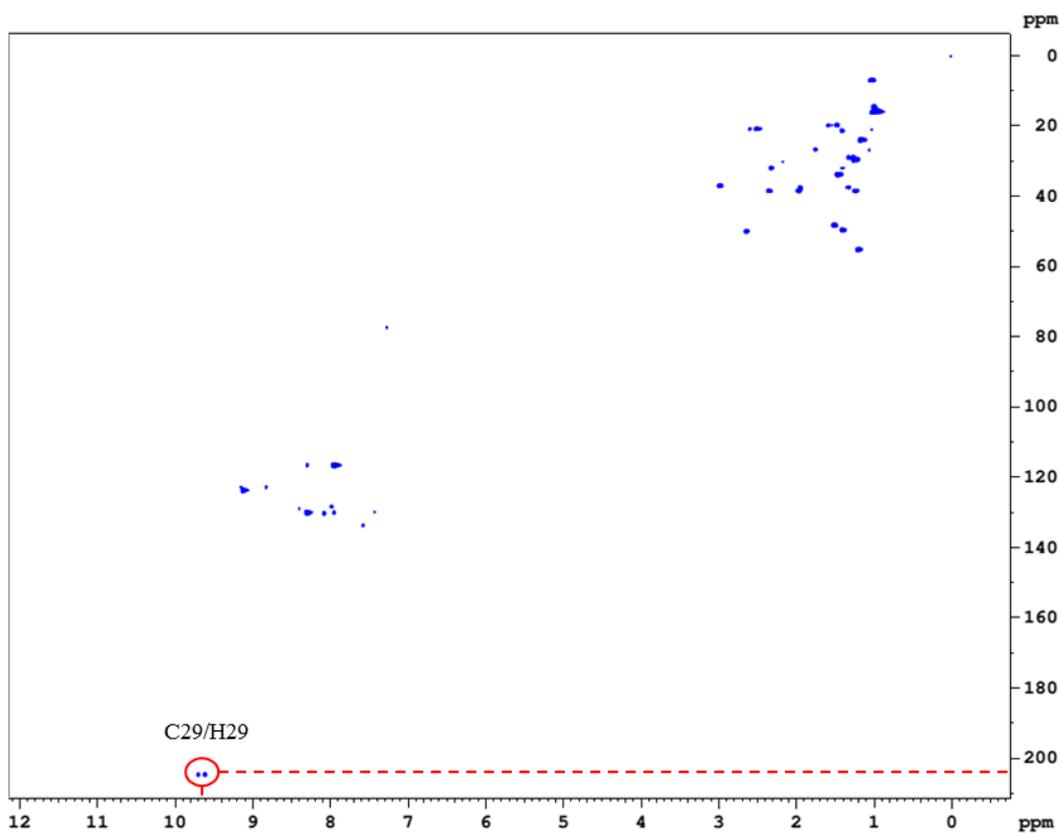


Figura 58. Mapa de correlação HSQC de DAB4.

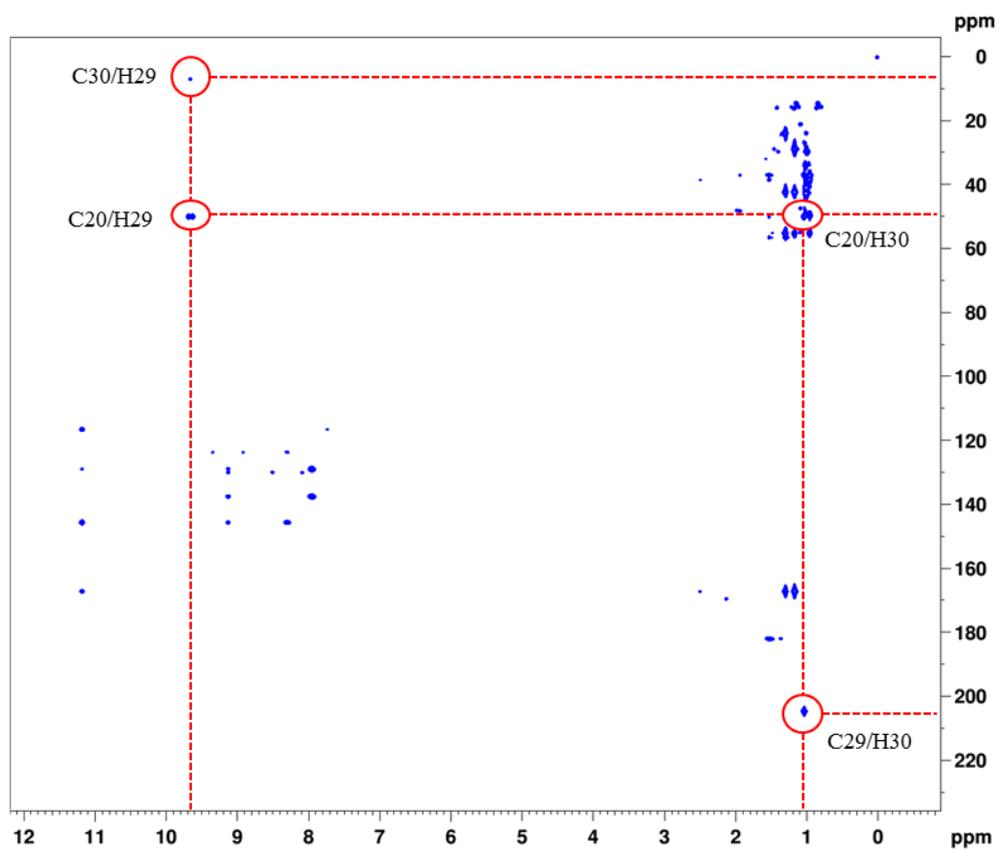


Figura 59. Mapa de correlação HMBC de DAB4.

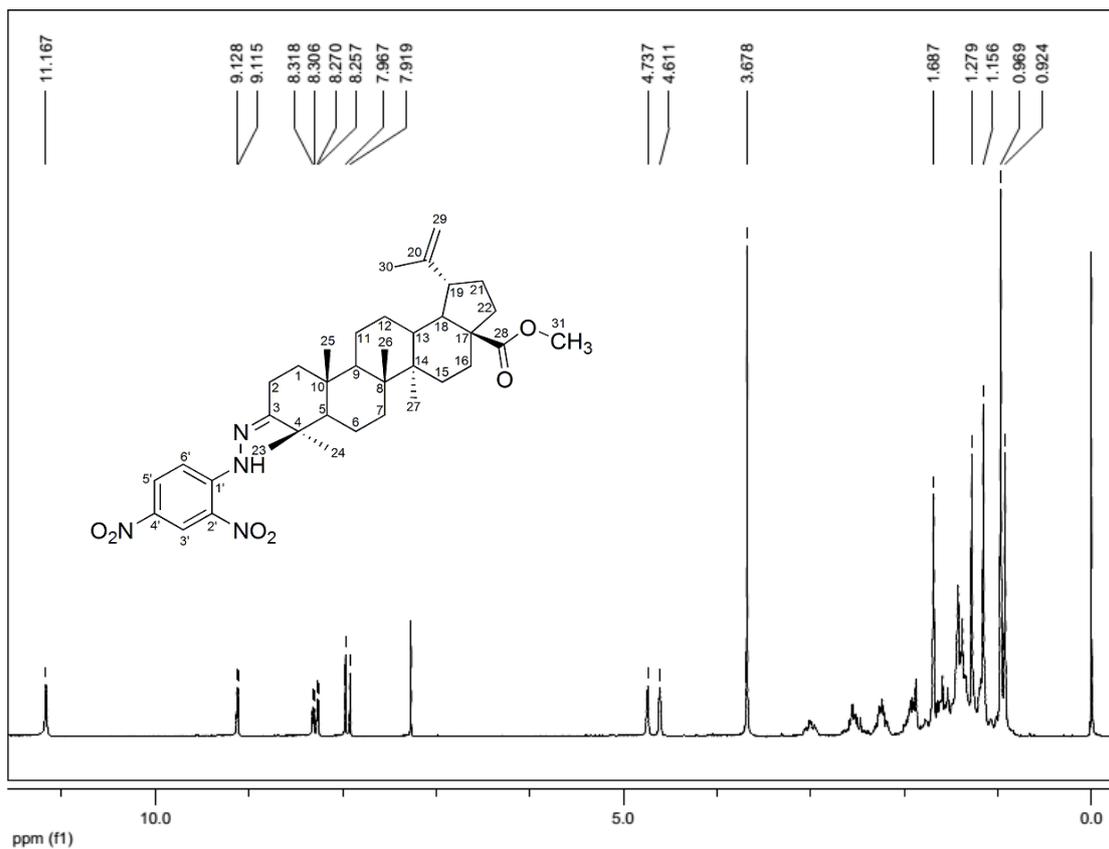


Figura 60. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do DAB5.

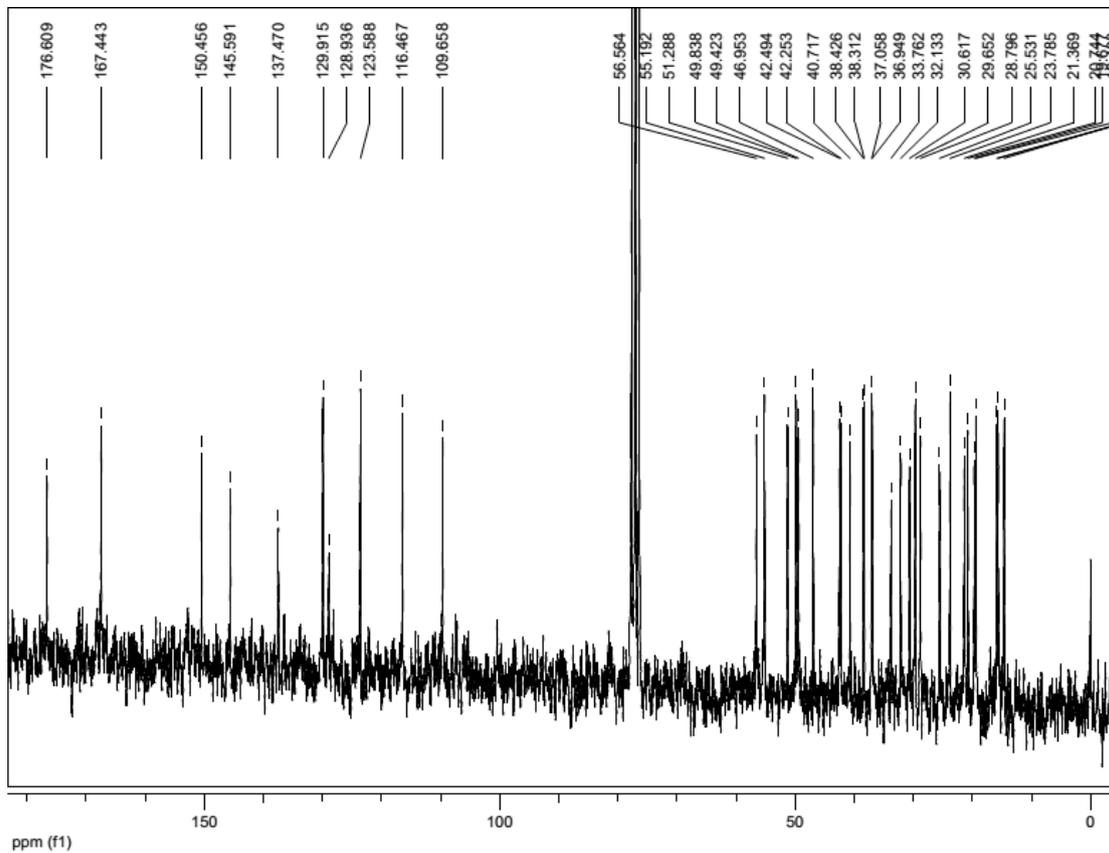


Figura 61. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do DAB5.

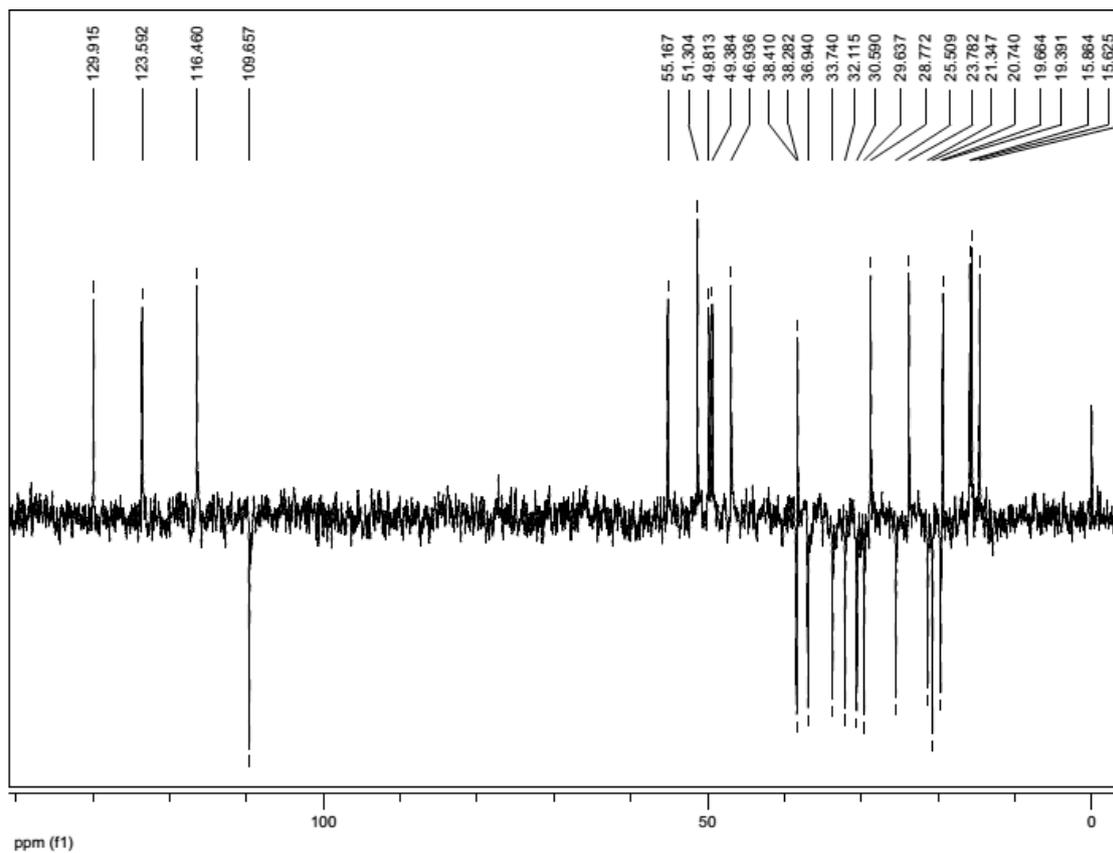


Figura 62. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$ -DEPT (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do DAB5.

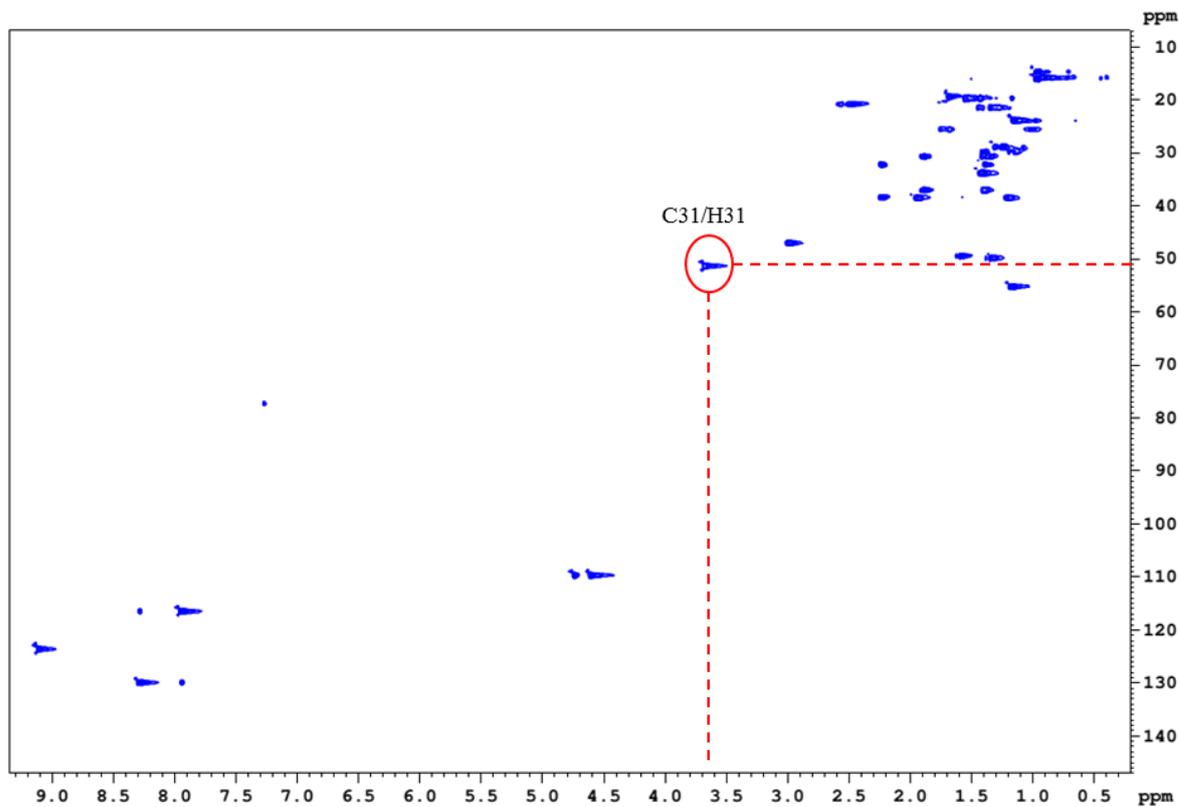


Figura 63. Mapa de correlação HSQC de DAB5.

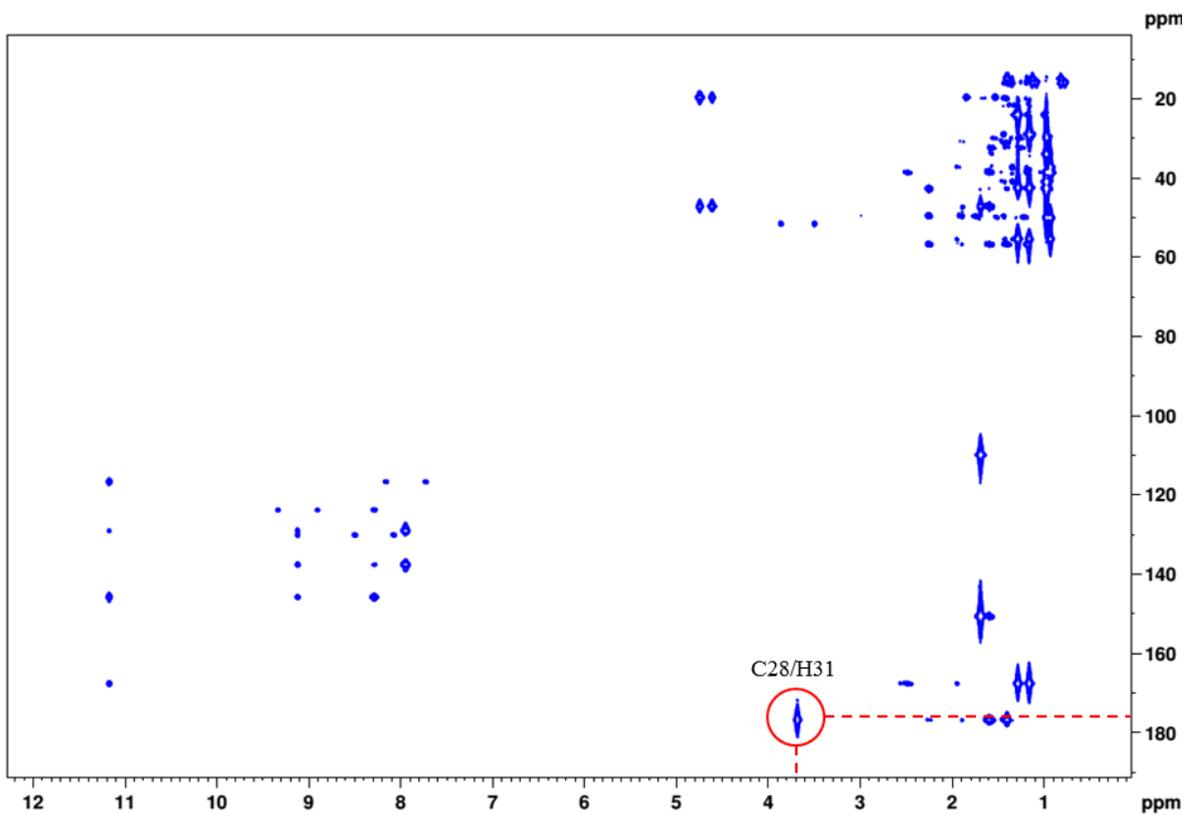


Figura 64. Mapa de correlação HMBC de DAB5.

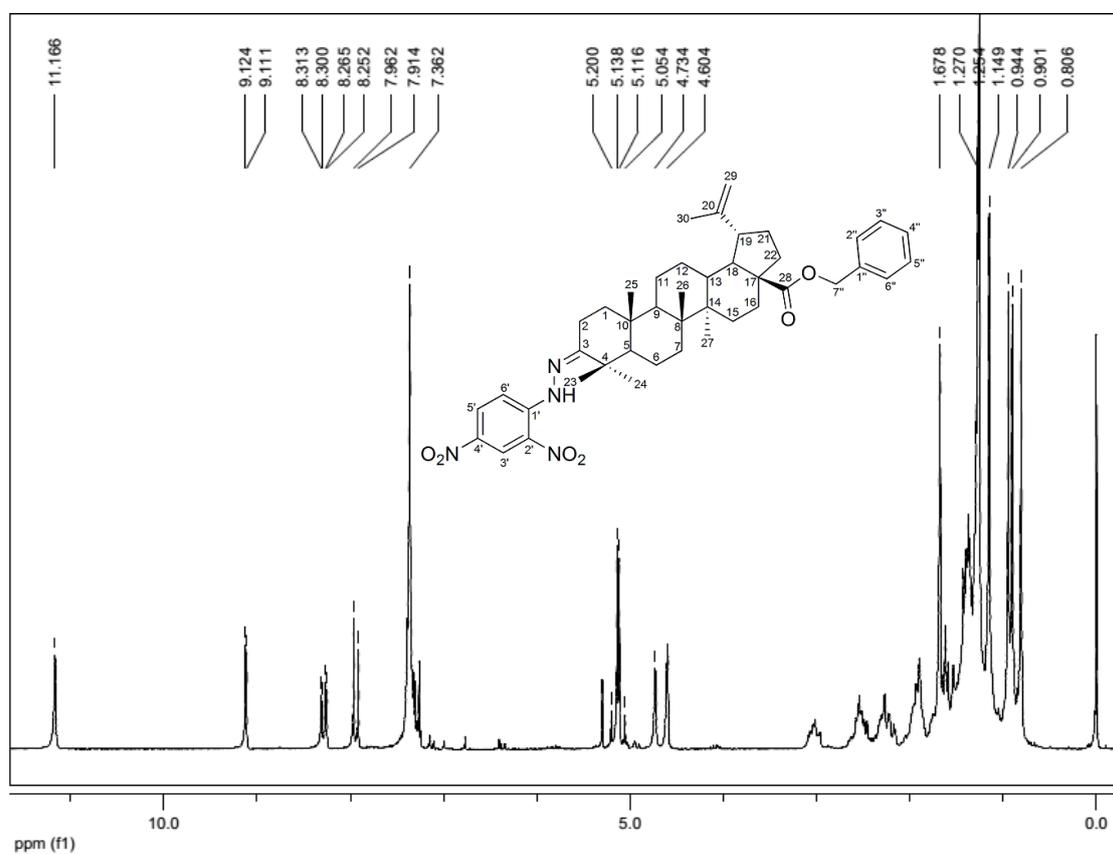


Figura 65. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do DAB6.

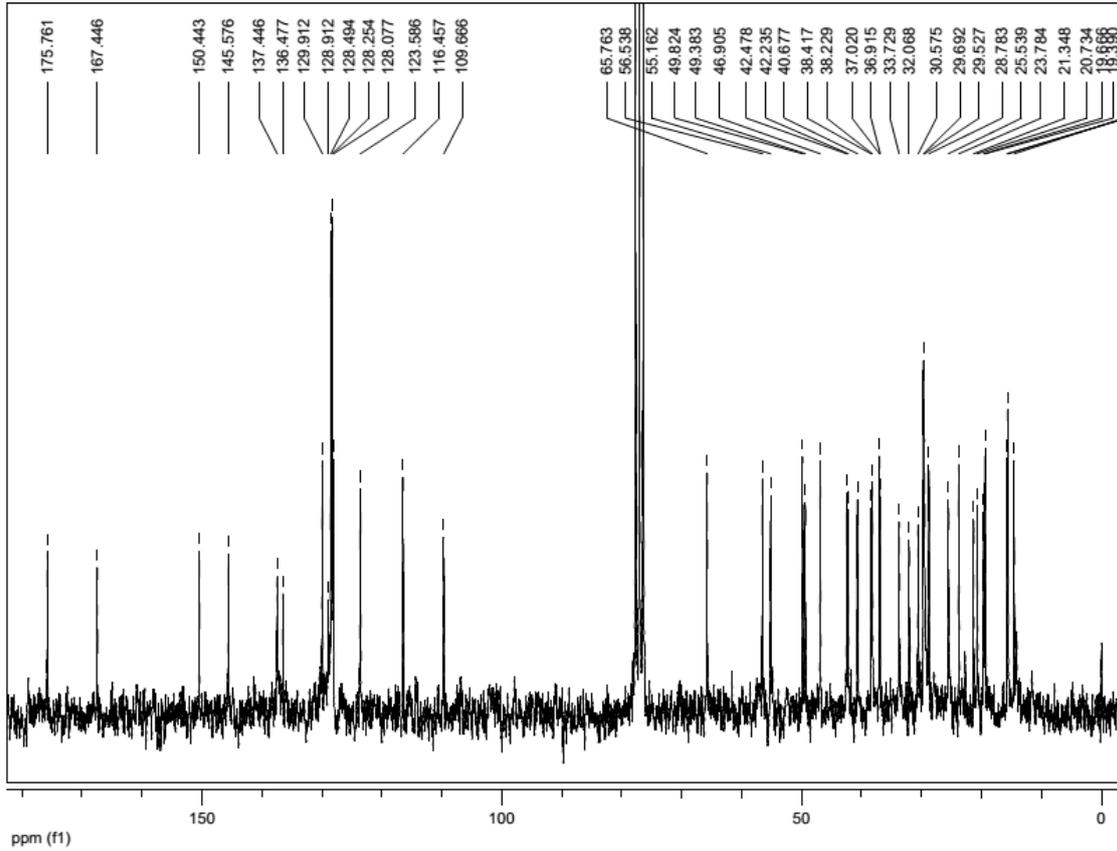


Figura 66. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do DAB6.

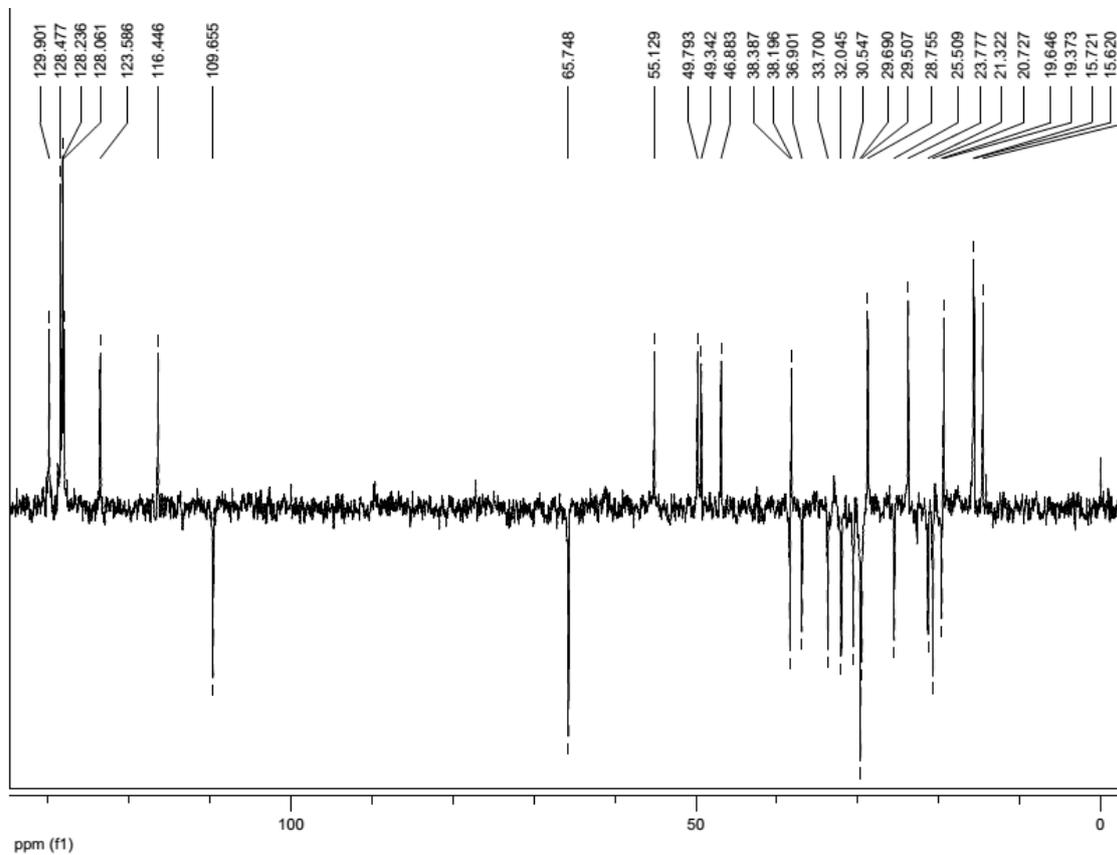


Figura 67. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C-DEPT (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do DAB6.

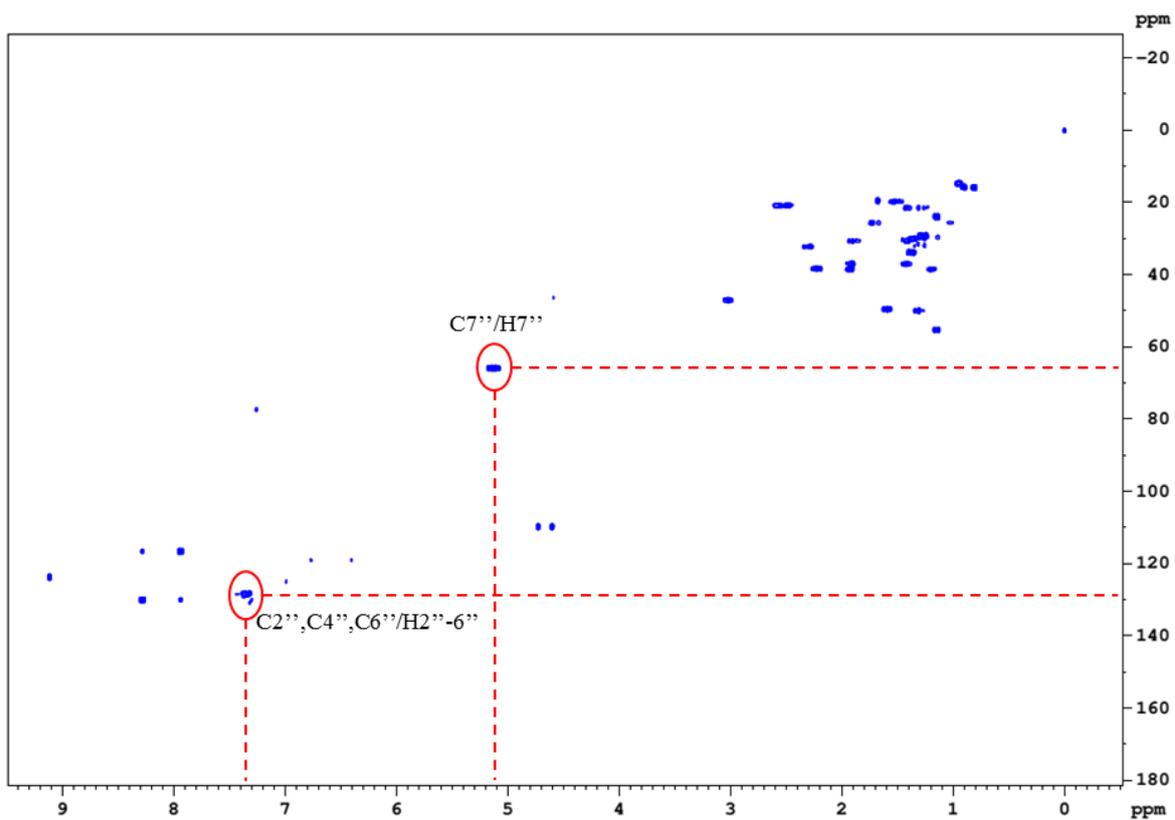


Figura 68. Mapa de correlação HSQC de DAB6.

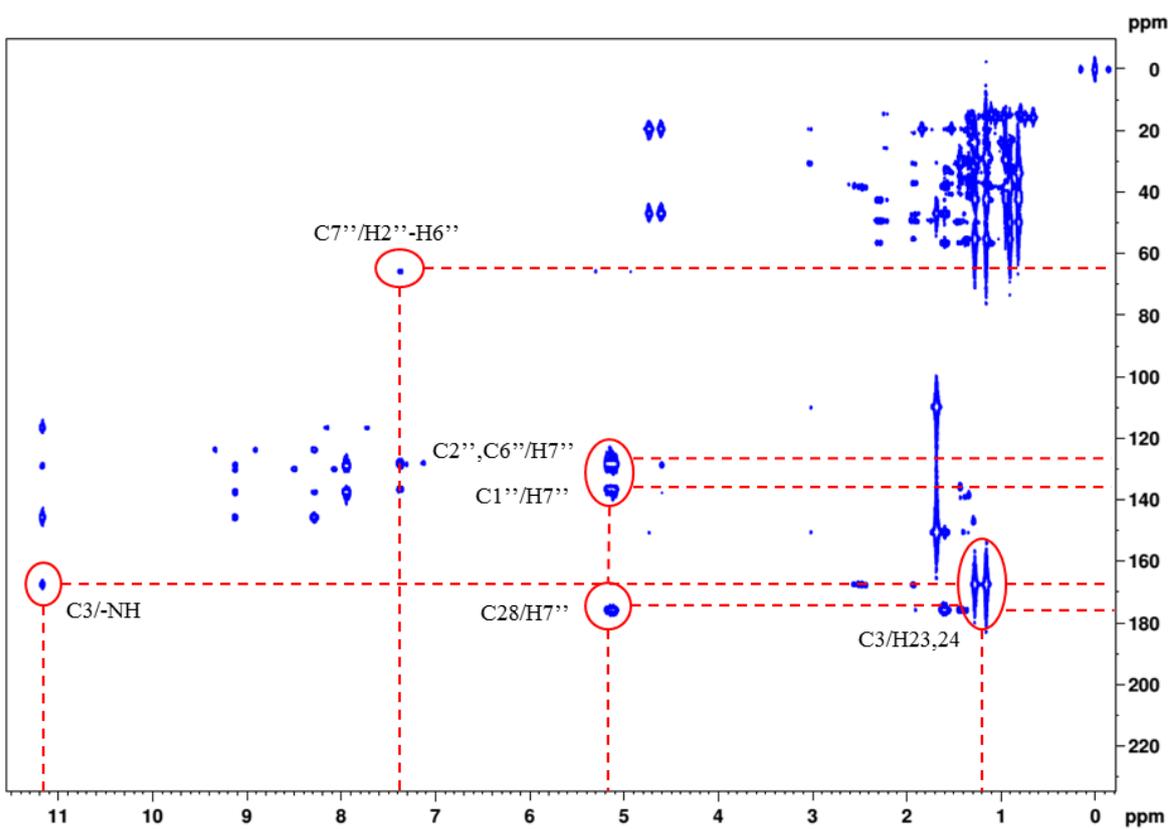


Figura 69. Mapa de correlação HMBC de DAB6.

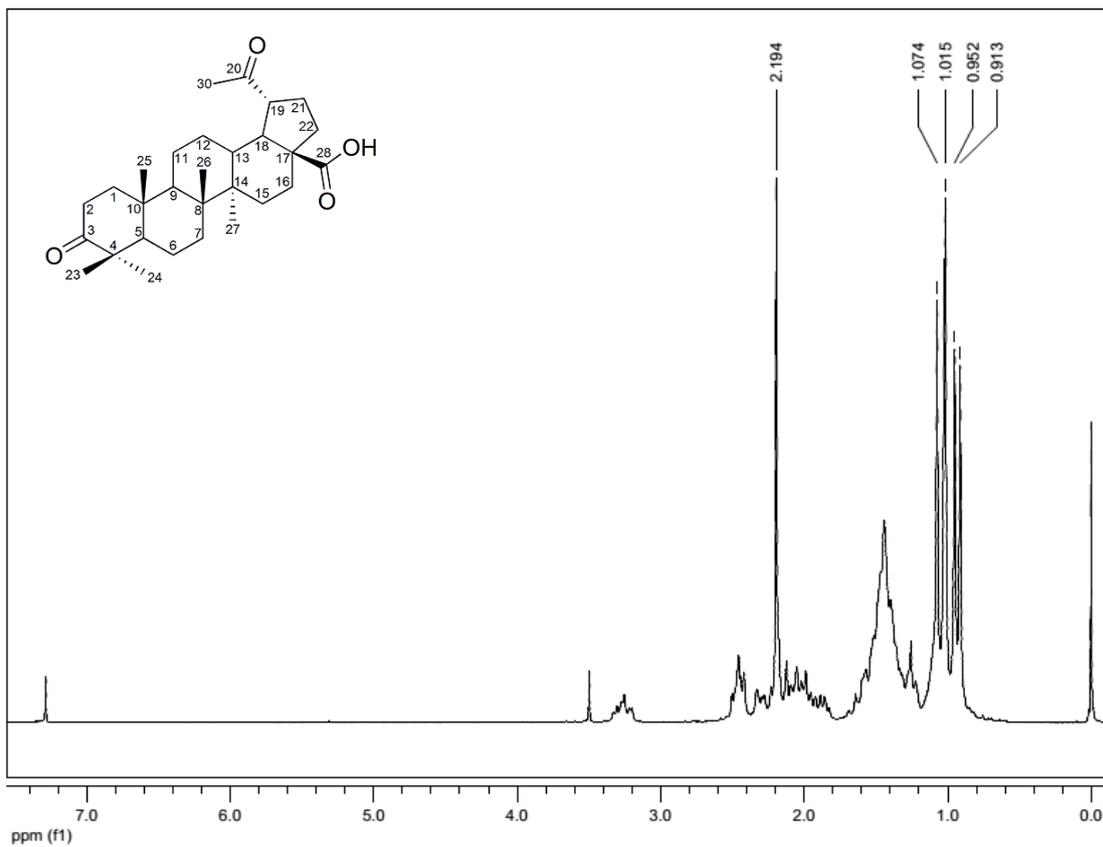


Figura 70. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do DAB7.

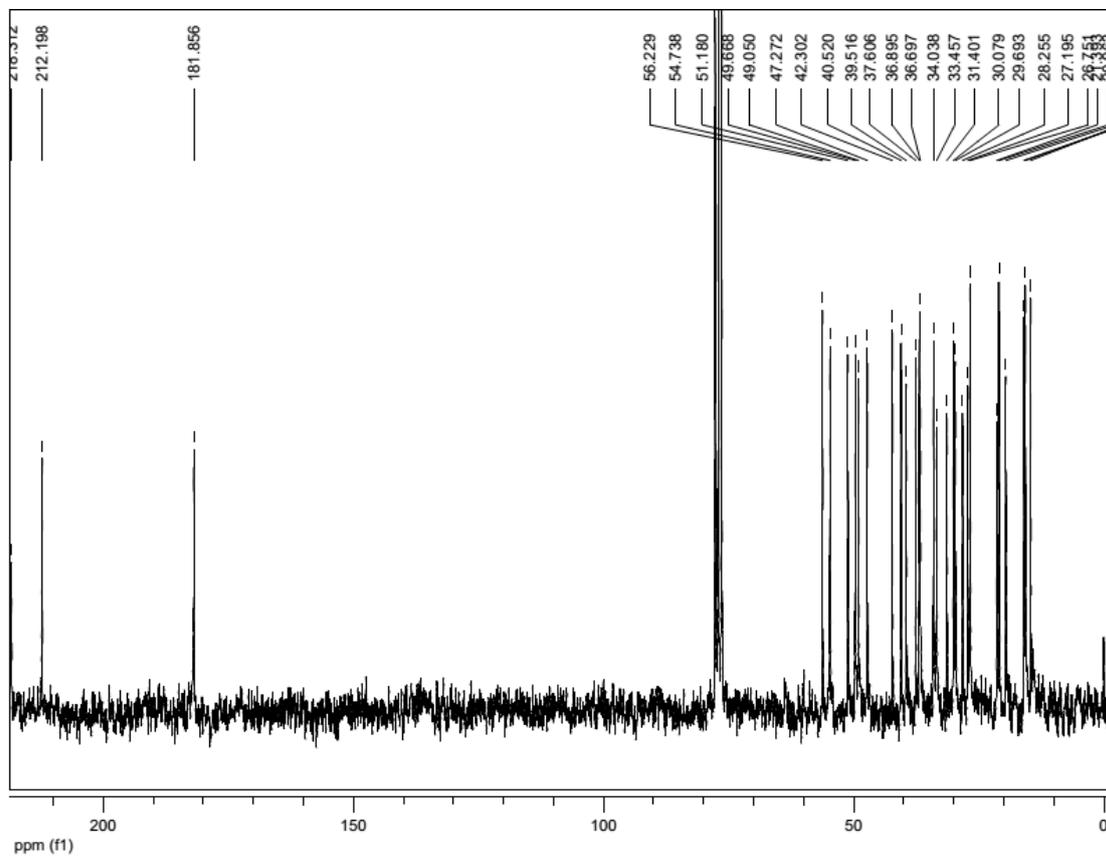


Figura 71. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do DAB7.

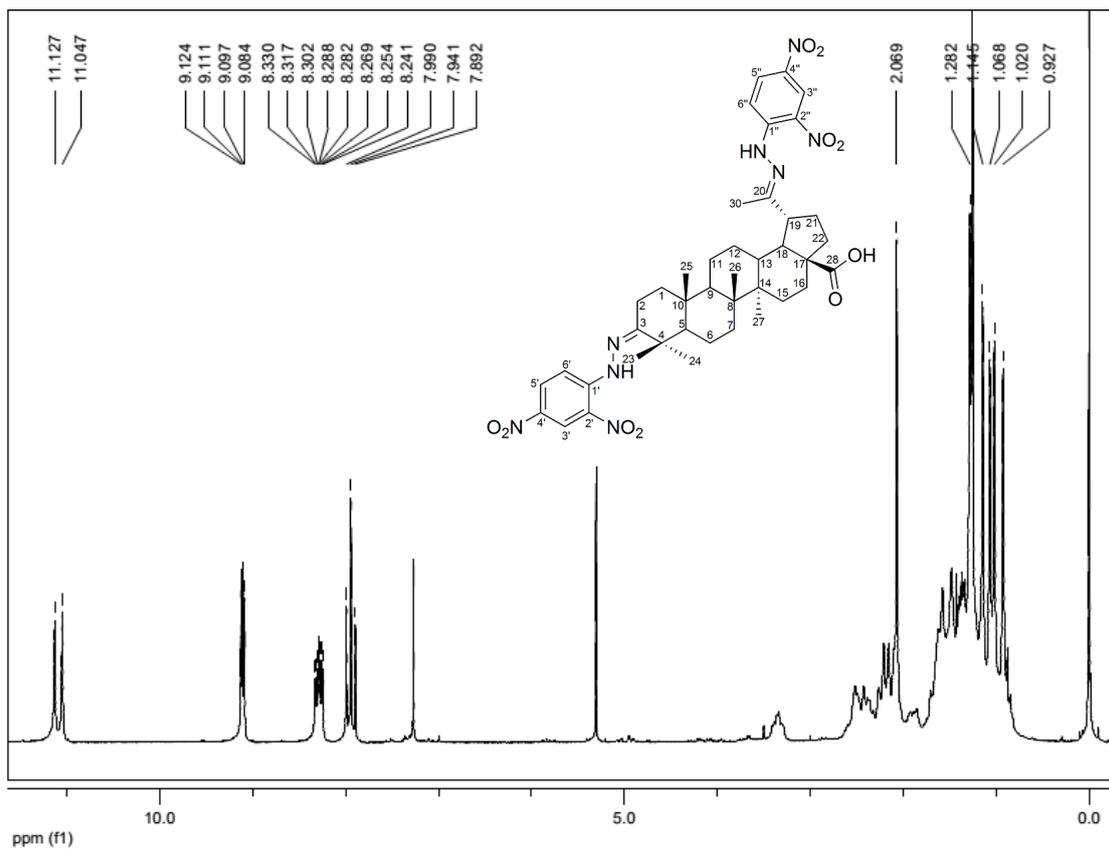


Figura 72. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do DAB8.

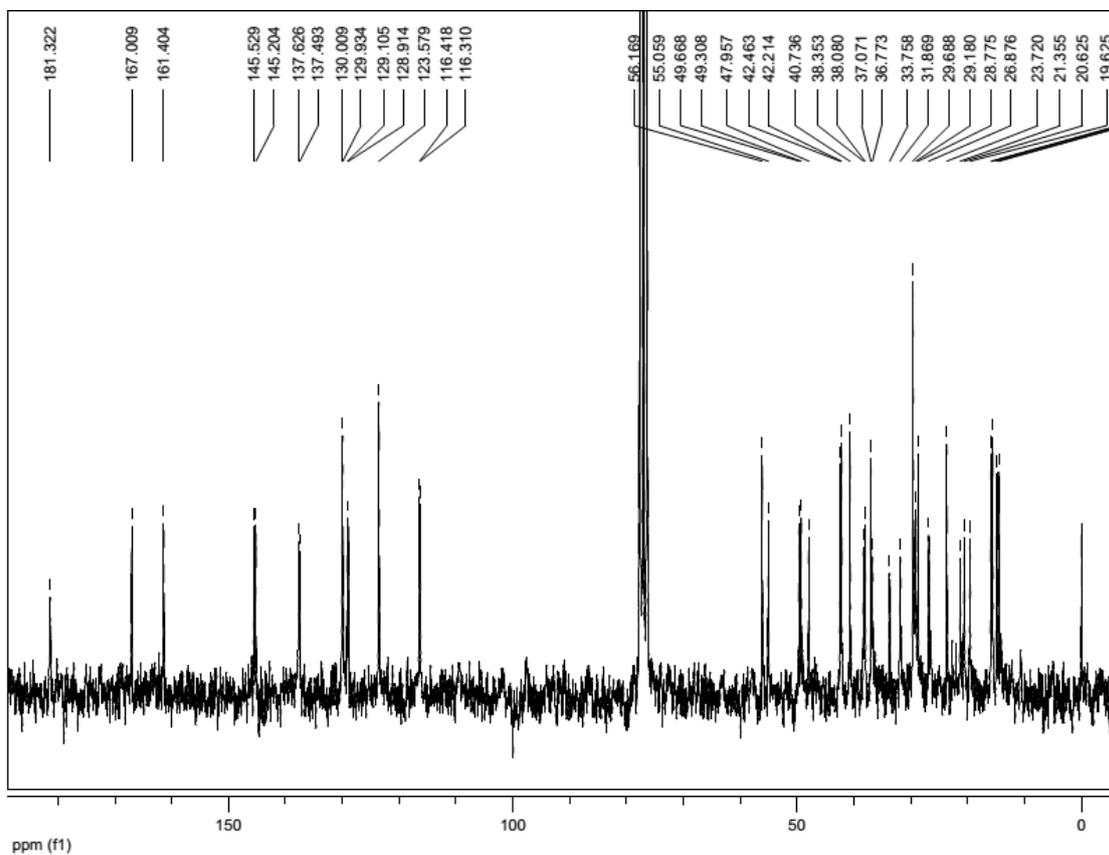


Figura 73. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do DAB8.

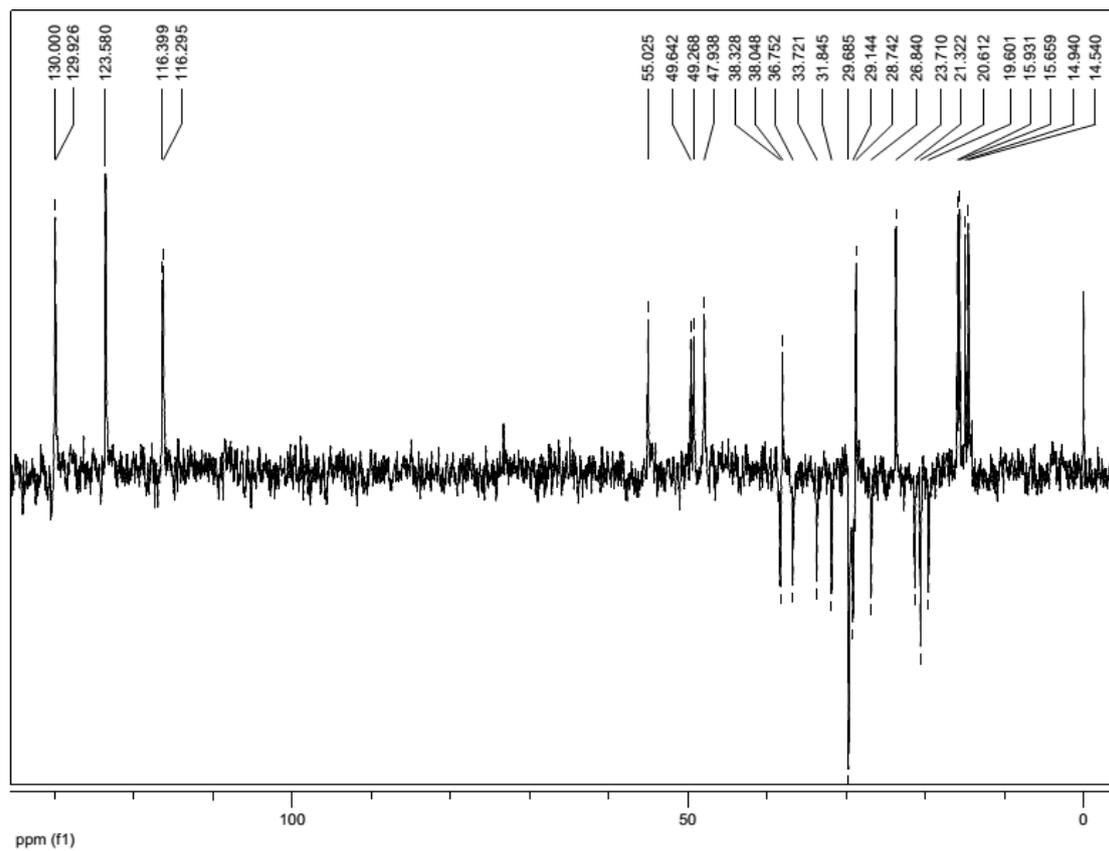


Figura 74. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$ -DEPT (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do DAB8.

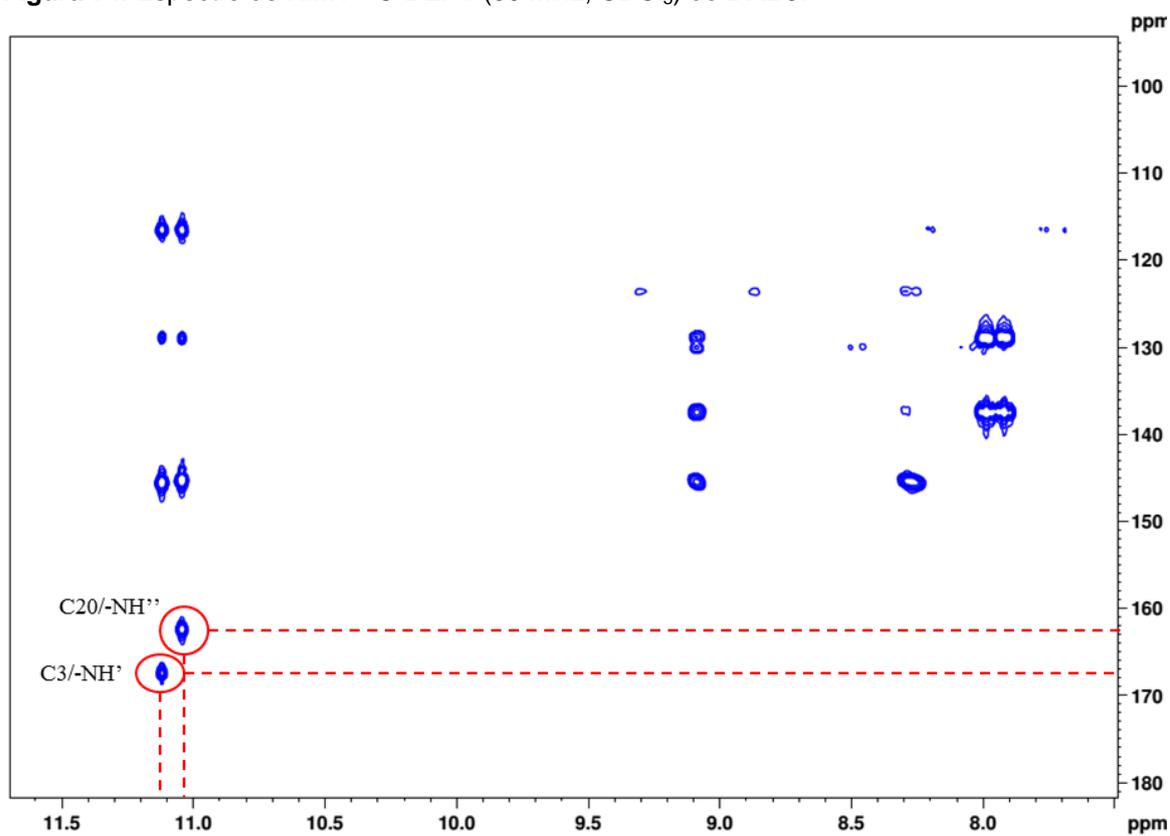


Figura 75. Mapa de correlação HMBC de DAB8.

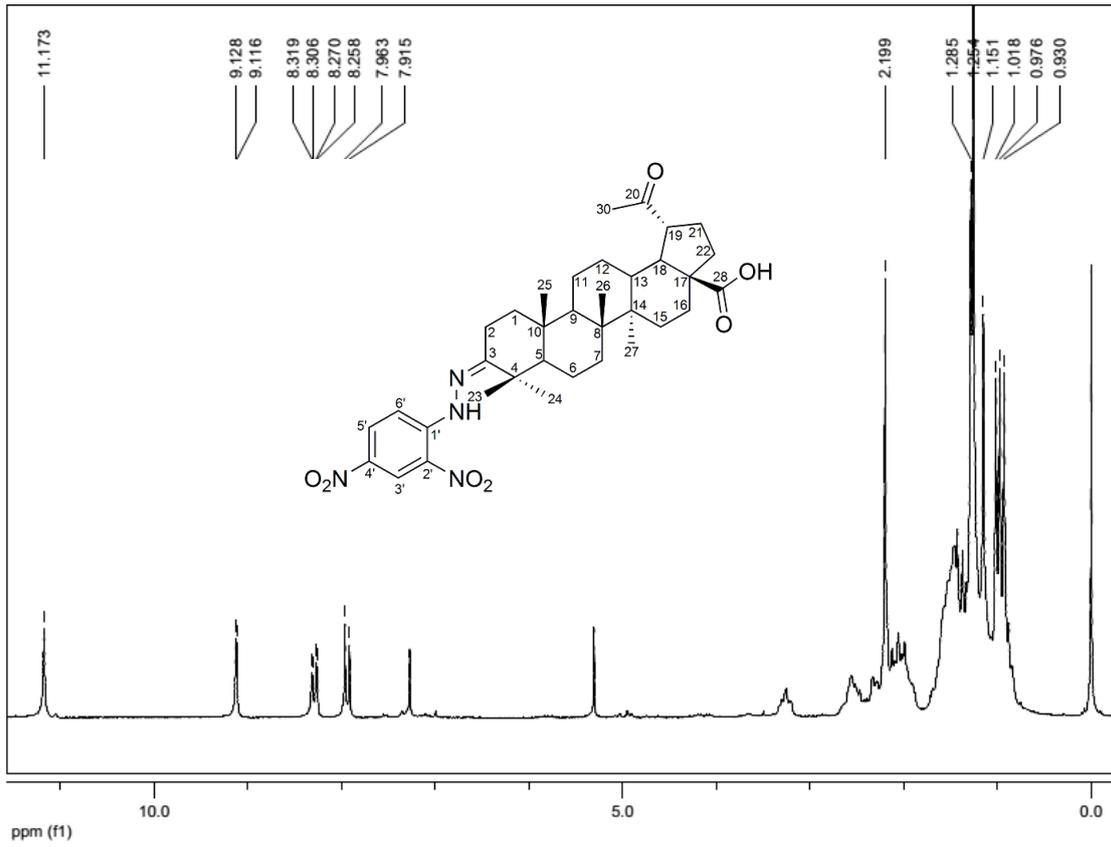


Figura 76. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do DAB9.

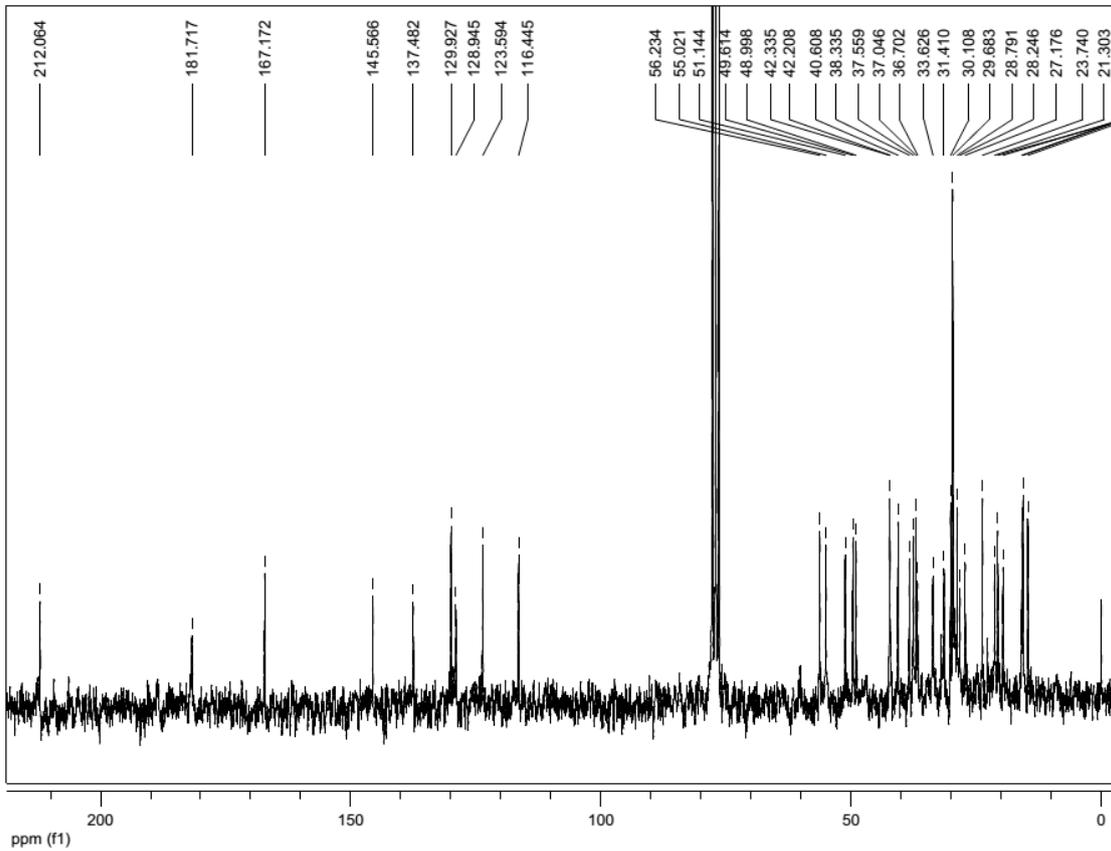


Figura 77. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do DAB9.

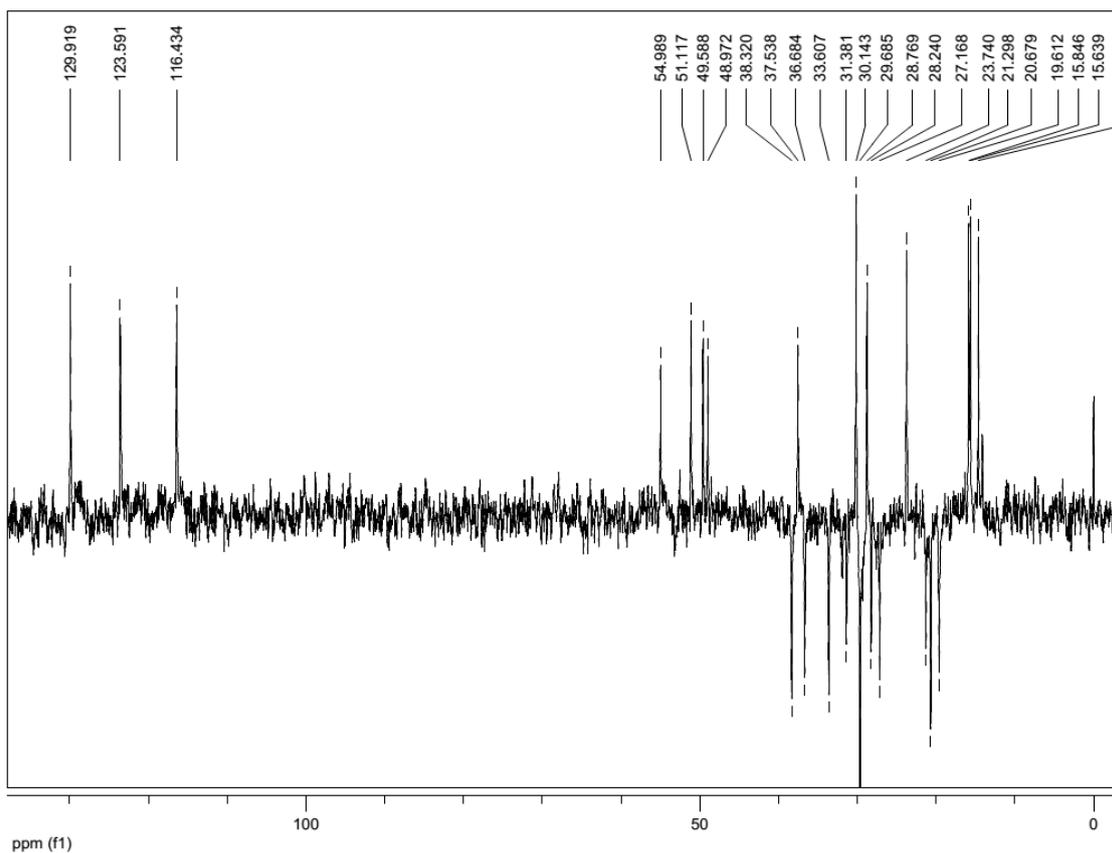


Figura 78. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$ -DEPT (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do DAB9.

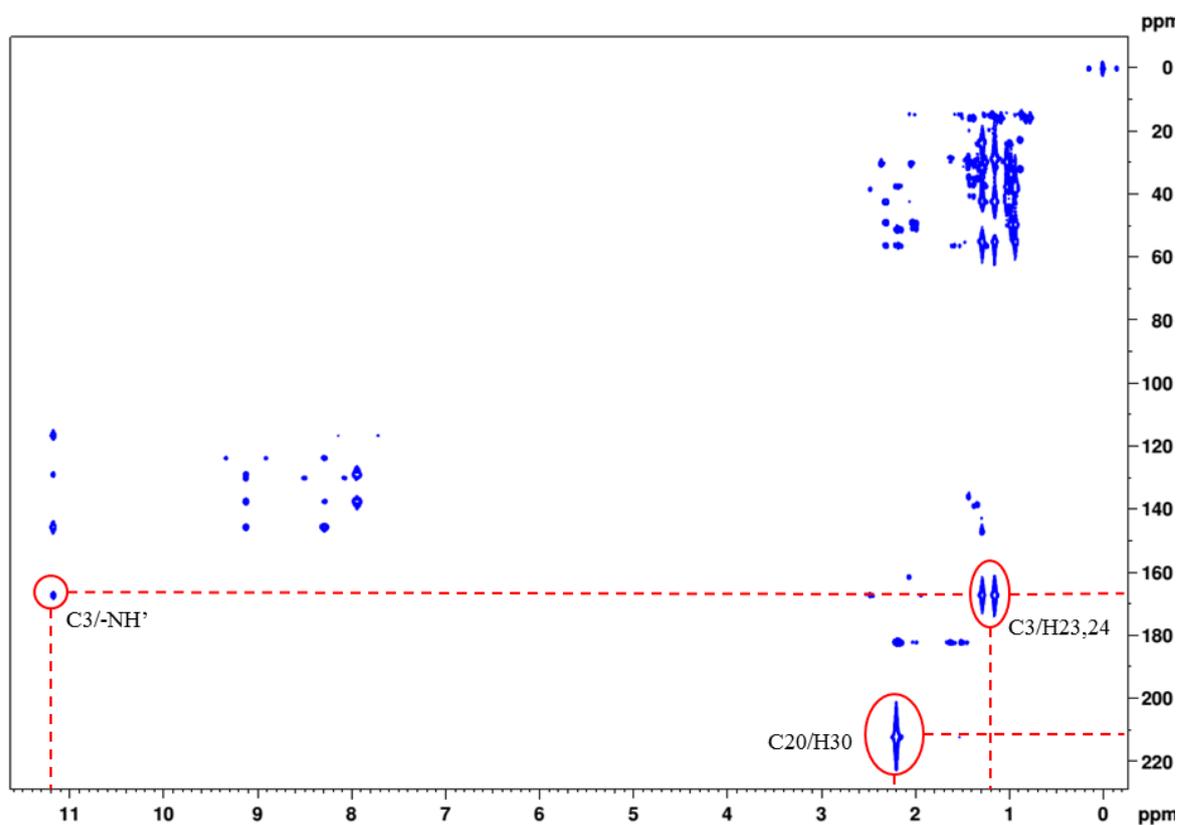
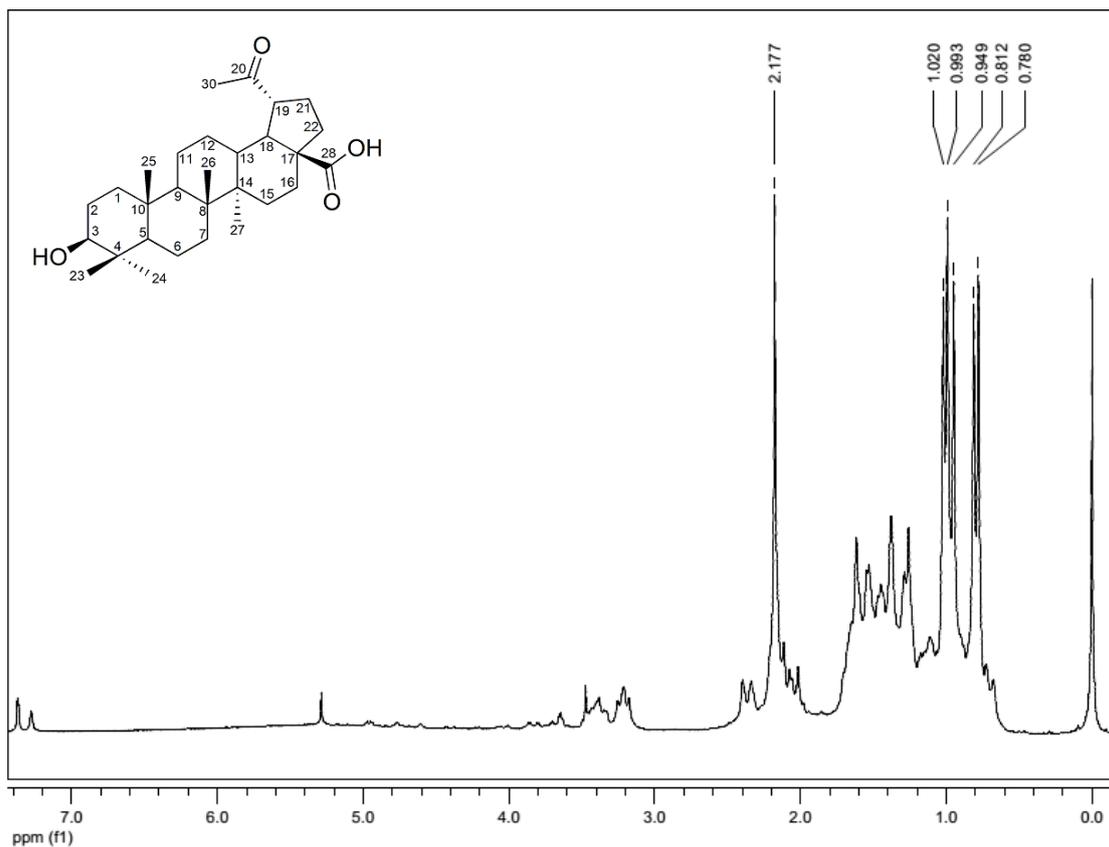
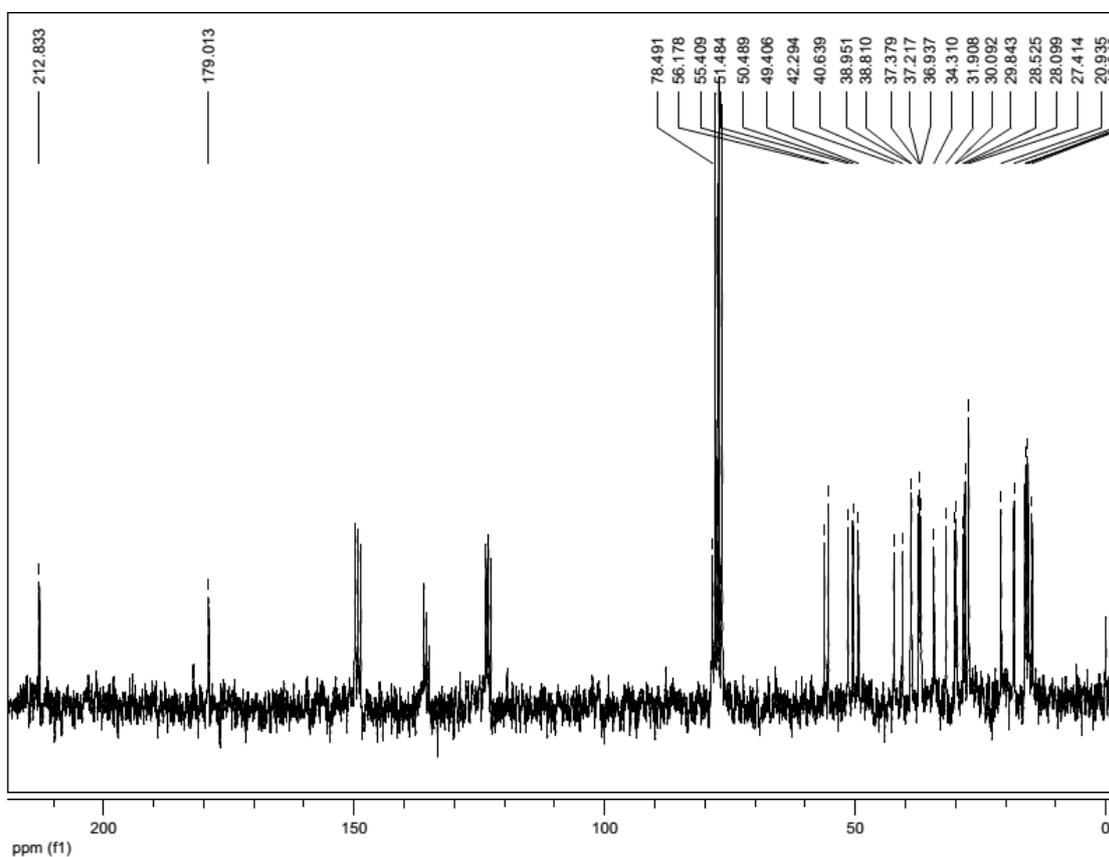


Figura 79. Mapa de correlação HMBC de DAB9.



**Figura 80.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>+Pyr-d<sub>5</sub>) do **DAB10**.



**Figura 81.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>+Pyr-d<sub>5</sub>) do **DAB10**.

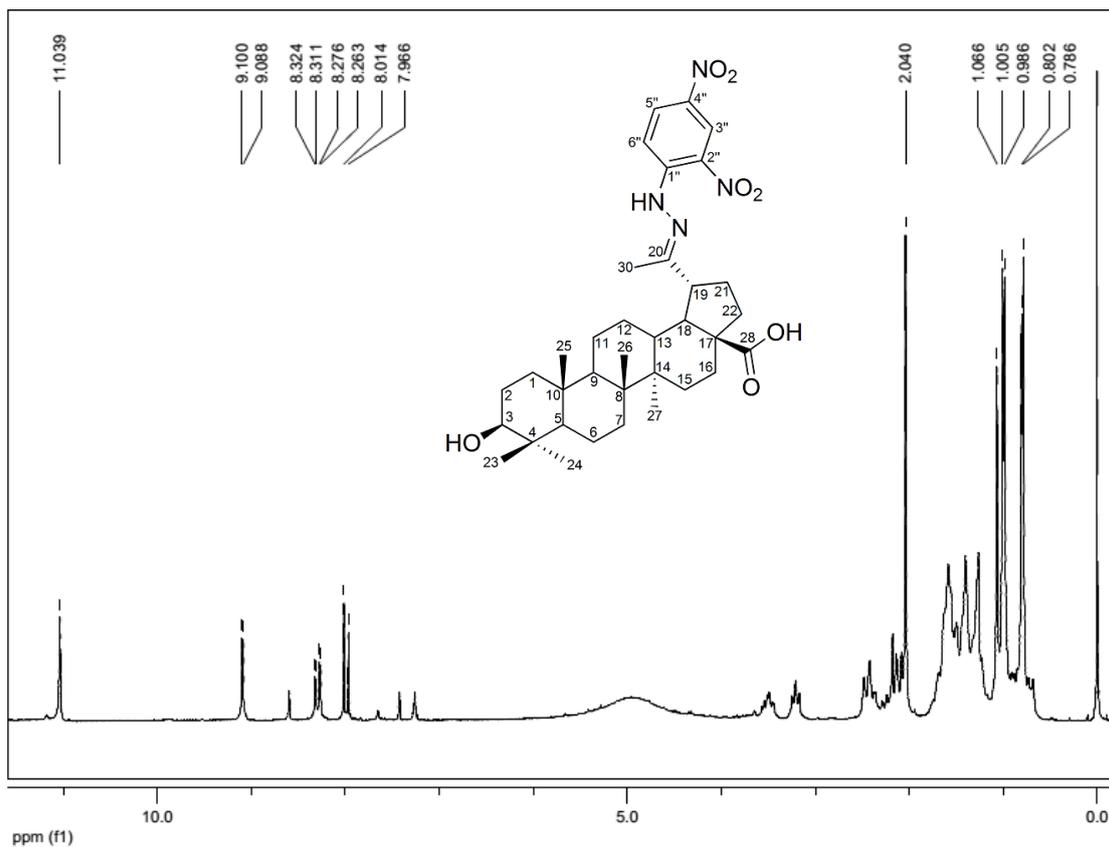


Figura 82. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>+Pyr-d<sub>5</sub>) do DAB11.

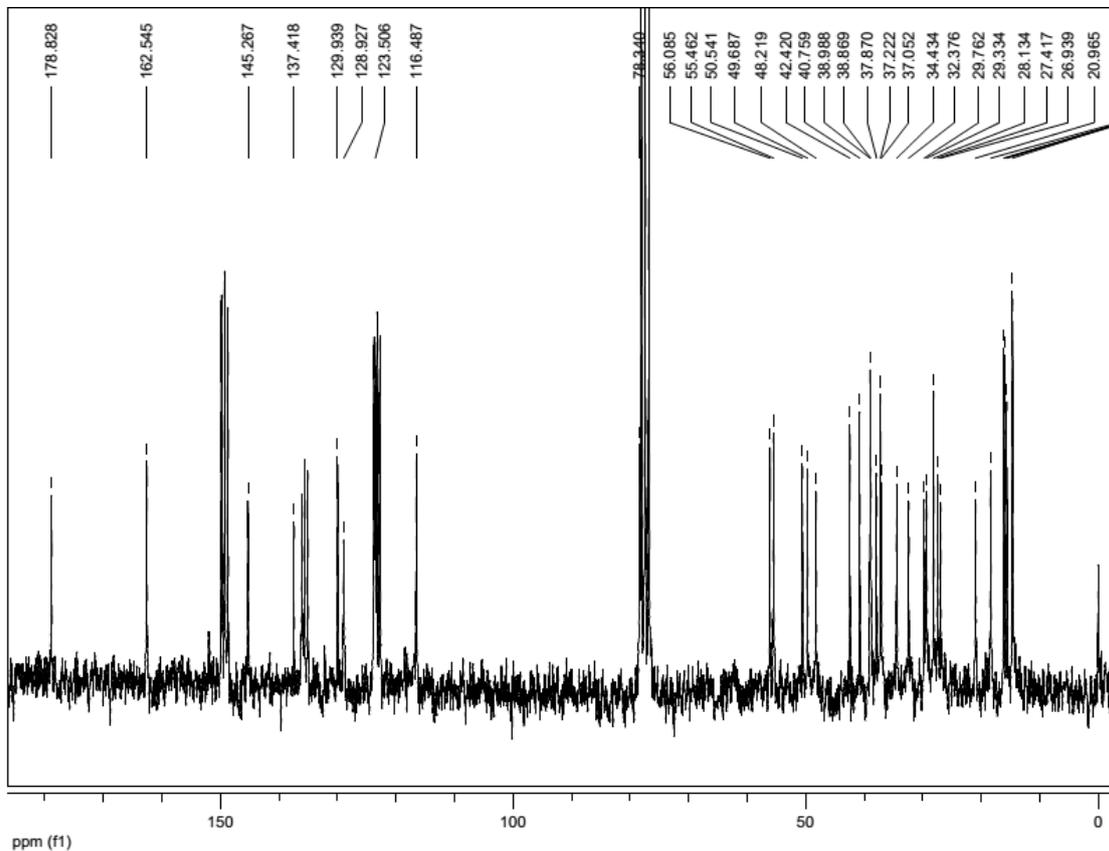


Figura 83. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>+Pyr-d<sub>5</sub>) do DAB11.

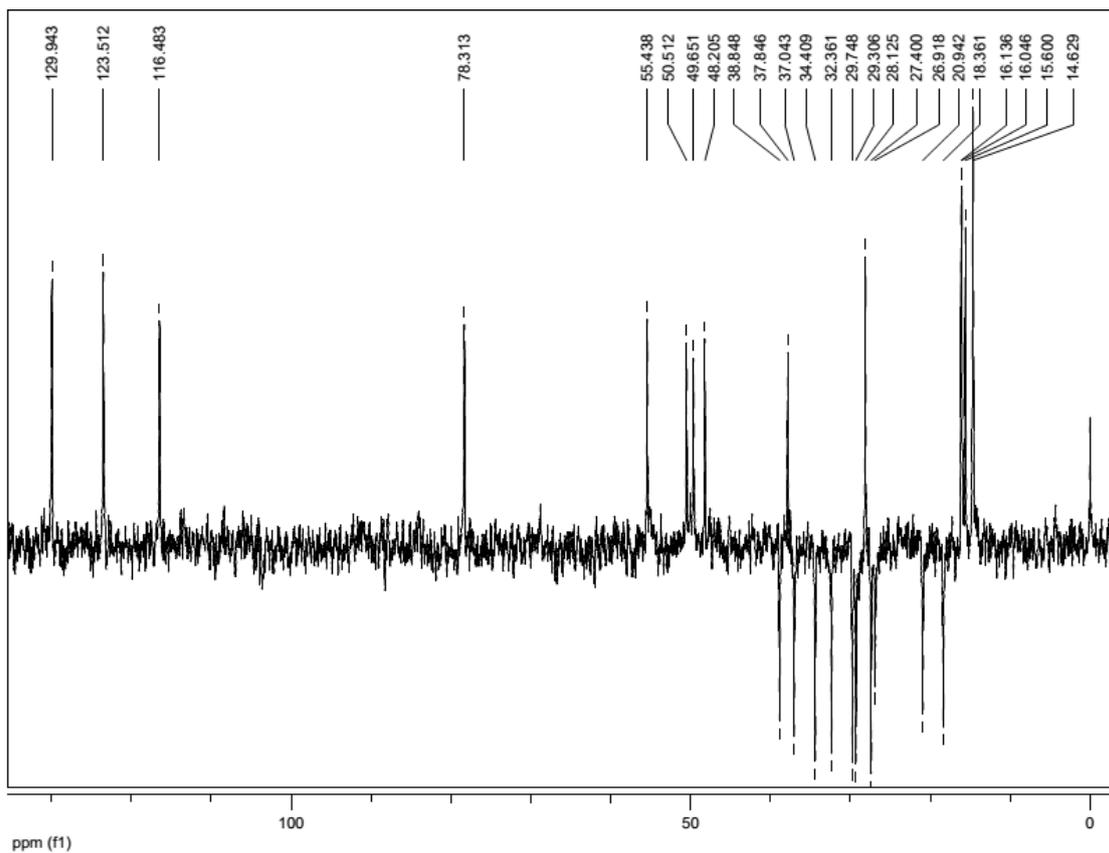


Figura 84. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$ -DEPT (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ +Pyr-d $_5$ ) do DAB11.

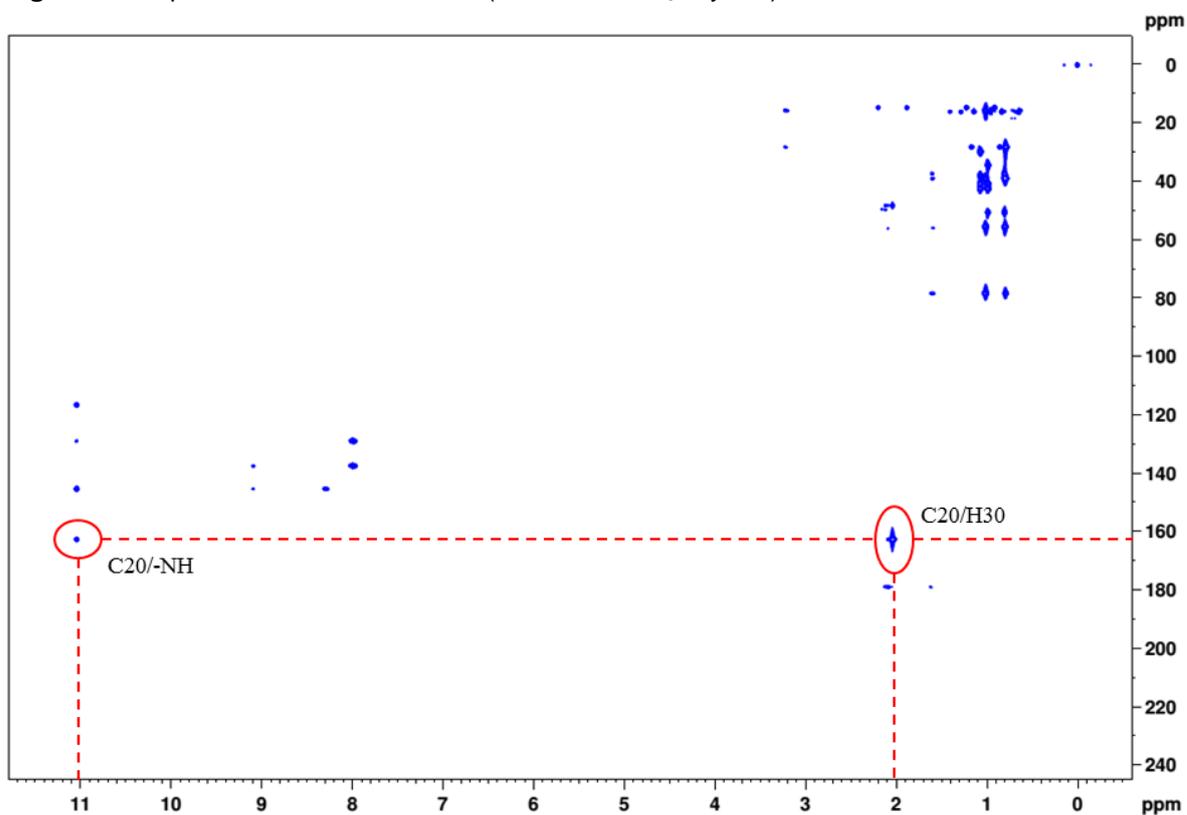


Figura 85. Mapa de correlação HMBC de DAB11.

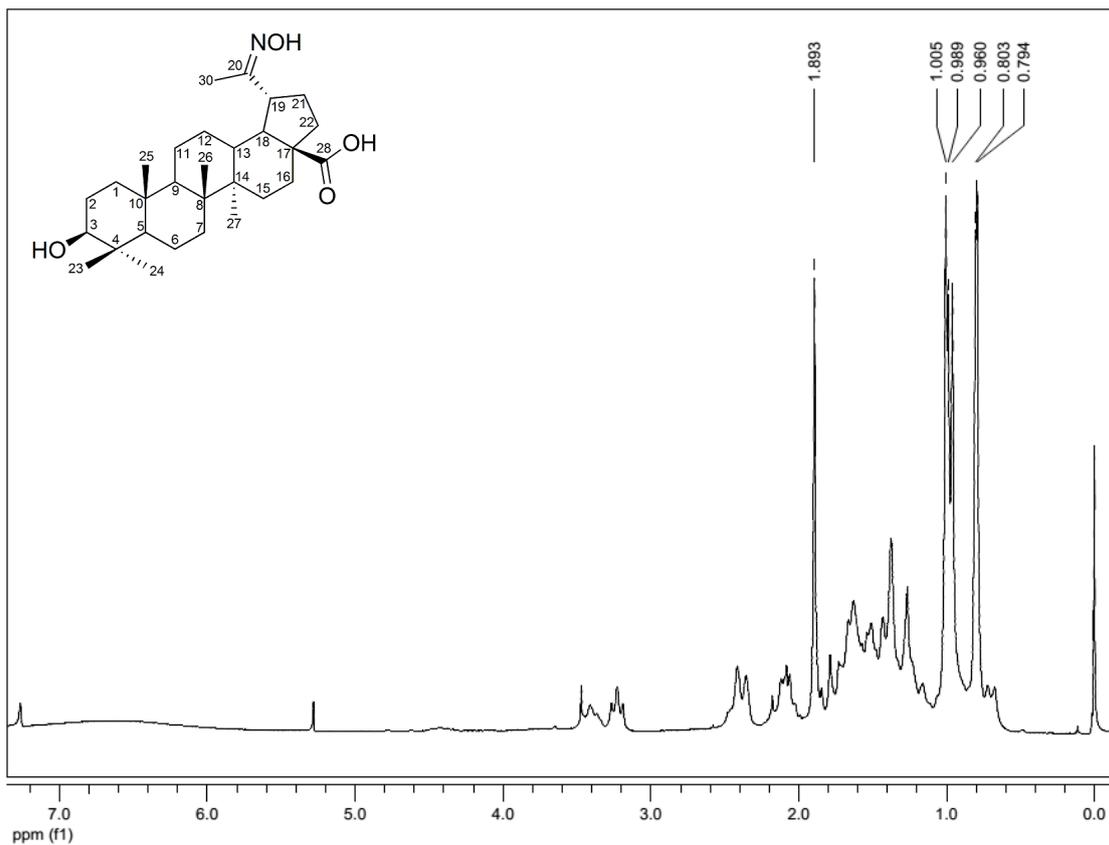


Figura 86. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ +Pyr- $d_5$ ) do DAB12.

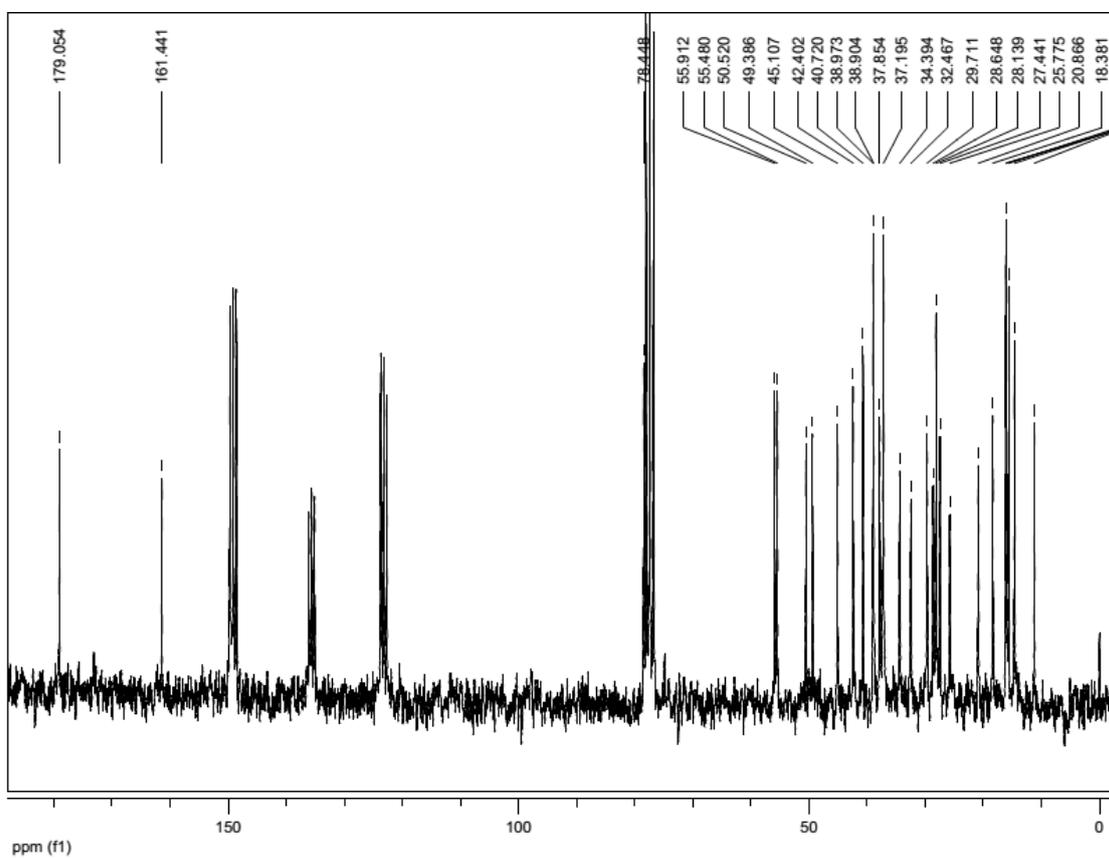


Figura 87. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ +Pyr- $d_5$ ) do DAB12.