

VANESSA ROCHA MACHADO

***Vernonia scorpioides*: da inspiração para a síntese total de poliacetilenos à semissíntese de derivados do lupeol**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Título de Doutor em Farmácia.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Maique Weber Biavatti

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rocha Machado, Vanessa
Vernonia scorpioides: da inspiração para a síntese
total de poliacetilenos à semissíntese de derivados
do lupeol / Vanessa Rocha Machado ; orientadora,
Maíque Weber Biavatti, 2017.
207 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de
Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. poliacetilenos. 3. lupeol. 4.
síntese. 5. atividade biológica. I. Weber Biavatti,
Maíque. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

**“Vernonia scorpioides: DA INSPIRAÇÃO PARA A
SÍNTESE TOTAL DE POLIACETILENOS À
SEMISSÍNTESE DE DERIVADOS DO LUPEOL”**

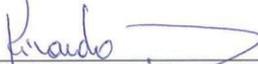
POR

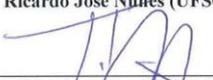
Vanessa Rocha Machado

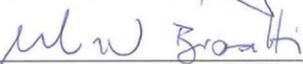
Tese julgada e aprovada em sua
forma final pelo(a) Orientador(a) e
membros da Banca Examinadora,
composta pelos Professores
Doutores:

Banca Examinadora:


Prof(a). Dr(a). Lilian Sibelle Campos Bernardes (UFSC – Membro
Titular)


Prof(a). Dr(a). Ricardo José Nunes (UFSC – Membro Titular)


Prof(a). Dr(a). Hélio Alexandre Stefani (USP – Membro Titular)


Prof(a). Dr(a). Maique Weber Biavatti (UFSC – Orientador)

Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 24 de agosto de 2017.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós Graduação em Farmácia e Programa de Pós Graduação em Química pela oportunidade de realização deste trabalho;

A CAPES pela bolsa de estudos concedida, e às outras agências de fomento CNPQ e FAPESC pelo apoio financeiro;

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Maique W. Biavatti pela orientação, oportunidade e confiança. Agradeço também ao Prof. Dr. Moacir Pizzolatti do departamento de Química da UFSC que abriu as portas do seu laboratório (LQPN) para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores do Departamento de Ciências Farmacêuticas que ao longo destes anos de pós-graduação contribuíram para minha formação acadêmica.

Aos professores membros da banca por aceitarem avaliar e logo, contribuir com este trabalho.

Ao Prof. Dr. Rick Lane Danheiser pela incrível oportunidade de vivenciar a atmosfera do MIT, além do intenso momento de aprendizado em síntese orgânica durante o período sanduíche deste doutoramento. *Thanks!* Agradeço também ao James Deng, aluno que colaborou em parte dos estudos visando à síntese total de (+)-vernoníina.

Ao Prof. Mario Steindel e à Dr.^a Milene H. Moraes pela colaboração com os ensaios de avaliação da atividade antileishmania e antitripanossoma.

Ao Prof. Louis P. Sandjo pela aquisição dos espectros de massas e por estar sempre disponível em colaborar.

Aos amigos do GEPRONAS, especialmente, Ana, Tamires, Narjara, Solomon e Dani: muito obrigada pelo carinho e amizade.

Aos amigos do LQPN pelo agradável convívio, proporcionando um ambiente de trabalho sempre muito leve e divertido, em especial ao Leko que embarcou junto nas aventuras nos EUA.

À minha família por toda dedicação e amor.

A todos os meus amigos que compreendem a minha ausência em certos momentos, mas continuam ao meu lado.

Ao Leonardo, pelo carinho e companheirismo.

E por último, O responsável por eu ter tanto a agradecer: obrigada, meu Deus!

*“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. **O que ela quer da gente é coragem.** O que Deus quer é ver a gente aprendendo a ser capaz de ficar alegre a mais, no meio da alegria, e inda mais alegre ainda no meio da tristeza! Só assim de repente, na horinha em que se quer, de propósito – por coragem. Será? Era o que eu às vezes achava. Ao clarear do dia.”*

Grande sertão: Veredas (1956)

João Guimarães Rosa, escritor brasileiro, 1908 – 1967.

RESUMO

Neste trabalho descrevemos os estudos que visam à síntese enantiosseletiva do poliacetileno *R*-(+)-5-octa-2,4,6-triínil-furan-2(5H)-ona **31** (nome comum *vernoniína*) e a semissíntese de derivados do triterpeno lupeol **8**. Ambas as substâncias (**31** e **8**) estão presentes no extrato etanólico de folhas e flores de *Vernonia scorpioides*, uma espécie nativa pertencente a família Asteraceae e conhecida popularmente como erva-de-são-simão ou piracá. Em virtude do baixo rendimento na fonte natural e da promissora atividade antitumoral, planejamos uma rota sintética linear para a síntese total de **31**, na qual a cadeia poliacetilênica foi preparada *via* reação de acoplamento de Cadiot-Chodkiewicz. O intermediário chave deca-4,6,8-triín-1-al **116** foi sintetizado em 5 etapas com rendimento global de 54% sendo utilizado como material de partida em duas metodologias diferentes para formação do centro estereogênico: α -oxiaminação assimétrica e di-hidroxilação assimétrica de Sharpless. No entanto, não foi possível obter êxito nesta etapa, fato que inviabilizou a síntese total de **31**. Na outra vertente do trabalho, o triterpeno lupeol **8** foi isolado em quantidades suficientes a partir de extratos de *V. scorpioides* remanescentes em nosso grupo de pesquisa aproveitando-se, dessa forma, a arquitetura estrutural triterpênica para a semissíntese de 10 derivados por meio de reações clássicas como acilação, oxidação e redução. As modificações foram direcionadas para o grupamento isopropilideno com a funcionalização de C30 com OH para atuar como nucleófilo em reação acilação, levando a obtenção de cinco derivados ésteres inéditos. Lupeol **8** e os derivados semissintéticos foram avaliados com relação à atividade antileishmania (*L. amazonensis*) e antitripanossoma (*T. cruzi*). O derivado $3\beta,30$ -dihidroxi-lup-20(29)-eno **183** foi o mais ativo ($CI_{50} = 12,48 \mu\text{g/mL}$) frente à forma amastigota de *T. cruzi* e o menos citotóxico ($CC_{50} = 161,50 \mu\text{g/mL}$). Dentre os derivados substituídos em C30, o tamanho da cadeia alquila parece ser importante para atividade antiparasitária, visto que o derivado 3β -acetoxi-30-octanoato-lup-20(29)-eno **191** foi mais ativo que o derivado 3β -acetoxi-30-butilato-lup-20(29)-eno **190**. Nenhum dos compostos ativos inibiram a atividade da enzima tripanotona redutase.

Palavras-chave: poliacetilenos, lupeol, *Vernonia scorpioides*, síntese, antileishmania, antitripanossoma.

ABSTRACT

We herein describe the studies towards the enantioselective total synthesis of polyacetylene *R*-(+)-5-octa-2,4,6-triínil-furan-2(5H)-ona **31** (common name vernoniína) and the semisynthesis of lupeol **8** derivatives. Both substances (**31** and **8**) are present in the ethanol extract of the leaves and the flowers of *Vernonia scorpioides*, a native species of the Asteraceae family and popularly known as the erva-de-são-simão or piracá. Due to the low yield of **31** from the natural source and the promising antitumor activity, we have planned a linear synthetic route for the total synthesis of **31**, which the polyacetylenic chain was prepared by multistep reaction with key one based on Cadiot-Chodkiewicz coupling reaction. The key intermediate deca-4,6,8-triyn-1-al **116** was synthesized in 5 steps with 54% overall yield. The compound **116** was used as a starting material in two different methodologies for the formation of the stereogenic center: asymmetric α -aminooxylation and Sharpless asymmetric dihydroxylation. However, it was not possible to be successful at this step, making impossible to finalize the total synthesis of **31**. In the other part of the work, the triterpene lupeol **8** was isolated with enough amounts from residual extracts of *V. scorpioides* in our research group, taking the opportunity the triterpene structural architecture to synthesize 10 derivatives by classical reactions such as acylation, oxidation and reduction. The modifications were focused at the isopropylidene fragment by creating a new functional group OH at C30, which participated as nucleophile in acyl substitutions providing 5 new esters derivatives. Lupeol **8** and semisynthetic compounds were evaluated regarding the antileishmanial (*L. amazonensis*) and antitrypanosomal (*T. cruzi*) activity. The 3 β ,30-dihydroxy-lup-20(29)-en **183** showed the best antitrypanosomal activity (IC₅₀ = 12.48 μ g / mL) and the lowest cytotoxicity (CC₅₀ = 161.50 μ g / mL). Among the C30 substituted derivatives, the size of the aliphatic chain seems to be important for the antiprotozoal activity, since the derivative 3 β -acetoxy-30-octanoate-lup-20(29)-ene **191** was most active than derivative 3 β -acetoxy-30-butyrate-lup-20(29)-ene **190**. None of the active compounds inhibited the trypanothione reductase activity.

Keywords: polyacetylenes, lupeol, *Vernonia scorpioides*, synthesis, antileishmanial, antitrypanosomal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos e os custos referentes a cada etapa.....	25
Figura 2. Estruturas químicas de importantes PNs na história do desenvolvimento de fármacos.	26
Figura 3. <i>Vernonia scorpioides</i>	31
Figura 4. Substâncias isoladas de <i>Vernonia scorpioides</i> :.....	34
Figura 5. Primeiro poliacetileno descrito na literatura 47 e seu derivado ácido encontrado em besouros 48	39
Figura 6. Poliacetilenos com atividade neurotóxica.....	42
Figura 7. Poliacetilenos encontrados em <i>Panax ginseng</i> : panaxadiol 65 e panaxatriol 66	43
Figura 8. Poliacetilenos antitumorais encontrados em <i>V. scorpioides</i> . .	44
Figura 9. Poliacetilenos com atividade antimicrobiana e fototóxicos ...	45
Figura 10. Poliacetileno (+)-vernoniína 31	46
Figura 11. Poliacetilenos inéditos isolados de <i>V. scorpioides</i>	47
Figura 12. Espectro RMN de ¹³ C do produto aleno 96	61
Figura 13. Espectro de RMN de ¹³ C do intermediário diíno 108	67
Figura 14. Espectro de RMN de ¹ H e ¹³ C do intermediário aldeído	109
.....	68
Figura 15. Espectro de RMN de ¹ H e ¹³ C do intermediário 87	71
Figura 16. Comparação dos espectros RMN de ¹ H: produto isolado APO1 e reagente nirosobenzeno.	82
Figura 17. Subproduto 127 obtido na síntese do anel γ -butenólídeo.....	86
Figura 18. Estrutura química de lupeol 8 : A) representação planar B) representação tridimensional na conformação com energia minimizada	113
Figura 19. Regiões endêmicas em LC (A) e LV (B) em 2015.	126
Figura 20. Estruturas químicas dos fármacos utilizados para o tratamento das leishmanioses.	128
Figura 21. Distribuição de casos de infecção por <i>T. cruzi</i> e a presença do vetor, segundo as estimativas oficiais de 2006-2009.	129
Figura 22. Medicamentos utilizados no tratamento da doença de Chagas.	131
.....	131
Figura 23. Espectro RMN de ¹ H de lupeol 8	133
Figura 24. Espectro RMN de ¹ H do derivado aldeído 162	136
Figura 25. Figura comparativa dos espectros RMN de ¹ H dos derivados de lupeol hidroxilados em C30	138

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Biossíntese de acetilenos a partir de ácidos graxos.	40
Esquema 2. Representação esquemática da biossíntese dos poliacetilenos derivados do ácido crepenínico 53 e classificação conforme número de carbonos.	41
Esquema 3. Estratégias para a síntese 1,3-diíno simétricos e assimétricos	50
Esquema 4. Metodologia de Glaser para a síntese de 1,3-diíno simétricos	51
Esquema 5. Reações de homoacoplamento e modificações do protocolo de Glaser.....	52
Esquema 6. Síntese de indigo por Baeyer em 1880 via acoplamento de Glaser.	52
Esquema 7. Reação de heteroacoplamento de Cadiot-Chodkiewicz.....	53
Esquema 8. Mecanismo da reação de Cadiot-Chodkiewicz.....	54
Esquema 9. Síntese dos PNs poliacetilenos virol A 62 , virol B 63 e virol C 64 por meio da reação de Cadiot-Chodkiewicz.	55
Esquema 10. Rearranjo FBW na etapa chave da síntese do produto natural deca-4,6,8-triín-1-ol 87	56
Esquema 11. Retrossíntese de (+)-vernoniína 31	58
Esquema 12. Reações envolvidas no planejamento sintético de (+)-vernoniína 31	59
Esquema 13. Síntese do composto modelo 3-fenil-2-propin-1-ol 94	60
Esquema 14. Reação de oxidação do composto modelo 94 com DMP. 61	
Esquema 15. Oxidação de 3-octin-1-ol 97 com DMP.....	62
Esquema 16. Mecanismo proposto para oxidação de 97 com DMP.	63
Esquema 17. Síntese do intermediário da cadeia poliacetilênica diíno 101	64
Esquema 18. Reação de oxidação do intermediário diíno 102	64
Esquema 19. Possíveis subprodutos da reação de bromação de 4-pentin-1-ol 81	65
Esquema 20. Síntese do intermediário diíno 108 a partir de (triisopropilsilil)acetileno	66
Esquema 21. Síntese do intermediário chave aldeído 109 (n = 2).	67
Esquema 22. Síntese da cadeia poliacetilênica de (+)-vernoniína 31	69
Esquema 23. Preparação do reagente 1-iodopropino 113 via rearranjo FBW.	70
Esquema 24. Síntese de deca-4,6,8-triín-1-ol 87 já descritas na literatura.	72

Esquema 25. Rearranjo FBW na etapa chave da síntese do produto natural deca-4,6,8-triín-1-ol 87 .	73
Esquema 26. Nova rota sintética para o PN deca-4,6,8-triín-1-ol 87 desenvolvida neste trabalho.	73
Esquema 27. Modelo de Sharpless para a determinação da estereoquímica mediante ataque da respectiva face da olefina.	75
Esquema 28. Retrossíntese do anel γ -butenolídeo via DA de Sharpless.	76
Esquema 29. Mecanismo proposto para a reação de olefinação de HWE	77
Esquema 30. Reação de olefinação HWE para obtenção do intermediário α,β -insaturado 118 .	77
Esquema 31. Reação de deconjugação para a obtenção do intermediário β,γ -insaturado 119 .	78
Esquema 32. Reação de α -oxiamação assimétrica.	79
Esquema 33. Preparação de γ -butenolídeos baseado na reação de α -oxiamação assimétrica.	79
Esquema 34. Abordagem sintética para a síntese de (+)-vernoniína 31 por meio da reação de α -oxiamação assimétrica.	80
Esquema 35. Reação de α -oxiamação assimétrica utilizando o intermediário 109 como material de partida.	81
Esquema 36. Reprodução da metodologia de Brown e colaboradores com composto referência 125 .	83
Esquema 37. Preparação do intermediário aldeído 116 .	84
Esquema 38. Síntese do anel γ -butenolídeo via metodologia de Davalankar e colaboradores.	84
Esquema 39. Síntese enantiosseletiva do poliacetileno natural diastaminoliína A baseada na reação de α -oxiamação assimétrica.	87
Esquema 40. Mecanismo de α -oxiamação assimétrica proposto por Córdova e colaboradores.	87
Esquema 41. Biossíntese de triterpenos.	114
Esquema 42. Semissíntese de ésteres de lupeol em C3 com atividade antihiperlipidêmica e antidislipidêmica.	116
Esquema 43. Semissíntese de derivados indólicos e pirazínicos de lupeol com atividade anti-inflamatória.	117
Esquema 44. Semissíntese de glicosídeos de lupeol.	118
Esquema 45. Influência da dupla ligação exocíclica na atividade citotóxica de ésteres de lupeol.	119
Esquema 46. Derivados de lupeol com modificações no grupo isopropilideno com atividade antiviral.	120

Esquema 47. Semissíntese de heterocíclicos de lupeol no grupamento isopropilideno.....	121
Esquema 48. Reação de oxidação de lupeol 8 mCPBA.	135
Esquema 49. Rota sintética para funcionalização da posição C30 de lupeol 8	135
Esquema 50. Mecanismo proposto para reação de oxidação alílica com SeO ₂	137
Esquema 51. Derivados ésteres do lupeol 188 - 191 obtidos via reação de substituição nucleofílica com cloretos de acila.	138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Citotoxicidade de (+)-vernoniína 31 e análogo natural 34 em diferentes linhagens celulares tumorais.....	48
Tabela 2. Classificação das DTNS e seus respectivos agentes etiológicos.	123
Tabela 3. Tratamentos disponíveis para leishmanioses.....	127
Tabela 4. Atividade antileishmania e antitripanossoma <i>in vitro</i> de lupeol e seus derivados semissintéticos frente às formas amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i> e <i>T. cruzi</i>	140
Tabela 5. Concentrações inibitórias dos derivados de lupeol frente às formas amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i> e <i>T. cruzi</i>	141

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A549	linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão
Ac	acetila
AcOEt	acetato de etila
B16F10	linhagem celular de melanoma murino
CCD	cromatografia em camada delgada
CG-MS	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CIM	concentração mínima inibitória
d	duplete
DBU	1,8-diazobicyclo[5,4,0]undec-7-eno
DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida
DCM	diclorometano
dd	duplo duplete
ddd	duplo duplo duplete
DE ₅₀	dose necessária para atingir 50% do efeito farmacológico desejado 50 % da população em teste
DL ₅₀	dose letal para 50% da população em teste
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N'</i> -dimetilformamida
DMP	periodinana de Dess Martin
DMSO	dimetilsulfóxido
ESI-TOF	ionização por <i>spray</i> eletrostático por tempo de voo
F.M.	fórmula molecular
FBW	reação ou rearranjo de Fritsch-Buttenberg-Wiechell
GABA _A	receptor do tipo A para o ácido γ -aminobutírico
HeLa	linhagem celular de câncer cervical
HEPG2	linhagem celular de carcinoma hepático
Hex	hexano
HMDS	hexametildissilazano
HWE:	reação de Horner-Wadsworth-Emmons
Hz	Hertz
Lit.	literatura

i.p.	intraperitoneal
CI ₅₀	concentração requerida para atingir 50% do efeito inibitório máximo
IL-1 β	interleucina 1 β
<i>J</i>	constante de acoplamento
J774A.1	linhagem celular de macrófagos murino
LAC	linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão murino
LDA	diisopropilamida de lítio
LiHMDS	hexametildisilazida de lítio
M.M.	massa molecular
m	múltiplo
mCPBA	ácido <i>m</i> -cloroperbenzóico
MeOH	metanol
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimida
P&D	pesquisa e desenvolvimento
p.f.	ponto de fusão
PCC	clorocromato de piridínio
PNs	produtos naturais
ppm	partes por milhão
RAW 264.1	linhagem celular de macrófagos murino
REA	relação estrutura-atividade
RMN de ¹³ C	ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN de ¹ H	ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	simpleto
sl	simpleto largo
t.a.	temperatura ambiente
t	triplete
THF	tetrahidrofurano
TMS	tetrametilsilano
TMEDA	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletilenediamina
TNF- α	fator de necrose tumoral α
v.o.	via oral
δ	deslocamento químico em partes por milhão (ppm) em relação ao padrão trimetilsilano (TMS= 0 ppm)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	25
CAPÍTULO I - <i>Vernonia scorpioides</i>	31
1.1. Apresentação do capítulo	31
1.2. Introdução	31
CAPÍTULO II - Estudos visando à síntese total do poliacetileno (+)-vernoniína	39
2.1. Apresentação do capítulo	39
2.2. Introdução	39
2.2.1. Atividades biológicas de poliacetilenos	41
2.2.2. Poliacetileno (+)-vernoniína	46
2.2.3. Abordagens sintéticas para síntese de poliacetilenos (1,3-diíno conjugados)	50
2.3. Objetivos	57
2.3.1. Objetivos específicos	57
2.4. Resultados e Discussão	58
2.4.1. Planejamento sintético	58
2.4.2. Preparação do intermediário chave aldeído	60
2.4.3. Finalização da síntese da cadeia poliacetilênica	69
2.4.4. Estudos visando à síntese do anel γ-butenolídeo	74
2.5. Conclusões e Perspectivas	88
2.5.1. Conclusões	88
2.5.2. Perspectivas	89
2.6. Parte Experimental	89
2.6.1. Considerações gerais	89
2.6.2. Procedimentos experimentais	90
CAPÍTULO III - Semissíntese de derivados do triterpeno lupeol e avaliação da atividade antileishmania e antitripanossoma	113
3.1. Apresentação do capítulo	113
3.2. Introdução	113
3.2.1. Derivados semissintéticos do lupeol	1166

3.2.2. <i>Doenças tropicais negligenciadas</i>	122
3.2.3. <i>Leishmanioses</i>	125
3.2.4. <i>Doença de Chagas</i>	129
3.3. Objetivos	132
3.3.1. <i>Objetivos específicos</i>	132
3.4. Resultados e Discussão	132
3.4.1. <i>Isolamento do triterpeno lupeol</i>	132
3.4.2. <i>Atividade antileishmania e antitripanossoma dos derivados semissintéticos do lupeol</i>	139
3.4.3. <i>Avaliação da atividade inibitória da enzima tripanotiona redutase</i>	142
3.5. Conclusões e Perspectivas	143
3.5.1. <i>Conclusões</i>	143
3.5.2. <i>Perspectivas</i>	143
3.6. Parte Experimental	144
3.6.1. <i>Isolamento do lupeol e preparação dos derivados semissintéticos</i>	144
3.6.2. <i>Atividade biológica</i>	156
REFERÊNCIAS	159
ESPECTROS SELECIONADOS DE RMN ¹H E ¹³C	181

INTRODUÇÃO

O processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos envolve muitas etapas, tornando-se longo e oneroso para as indústrias farmacêuticas. Estima-se que são necessários \$2558 milhões* de dólares durante 12 a 15 anos de pesquisa para o descobrimento de uma substância promissora até o lançamento do medicamento para o mercado consumidor (Figura 1).¹ A cada 10 mil substâncias bioensaiadas em modelos de animais na fase pré-clínica na busca do composto líder, somente 10 chegam aos estudos clínicos em humanos para que apenas 1 substância seja aprovada pelas agências reguladoras.²

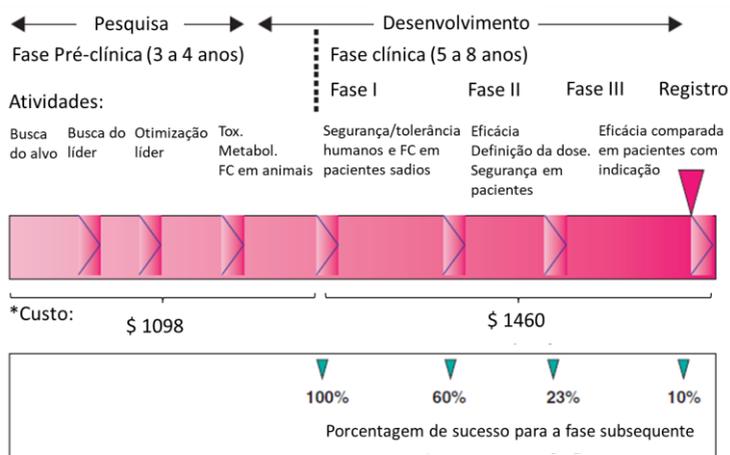


Figura 1. Processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos e os custos referentes a cada etapa. (FC: farmacocinética; tox.: toxicidade; metabol.: metabolismo) *Custo expresso em milhões de dólares e referentes ao período de 2005 a 2010¹. Fonte: adaptado³

De fato, os fármacos raramente são descobertos. A substância com atividade biológica promissora é denominada composto líder. Normalmente o composto líder precisa ser modificado sinteticamente para aperfeiçoar a atividade biológica, propriedades físico-químicas ou

* Autores consideraram a cotação do mercado financeiro em 2013.

características farmacocinéticas e farmacodinâmicas, tornando-se então um candidato a fármaco.³

A natureza, materializada nas plantas, organismos marinhos, fungos e até mesmo nos animais, constitui uma valiosa fonte de substâncias bioativas e, por conseguinte, compostos líderes. Assim como também, a história nos remete a célebres exemplos de fármacos descobertos em fontes naturais: morfina **1** (*Papaver somniferum*, 1804), penicilina **2** (*Penicillium chrysogenum*, 1928) e paclitaxel **3** (*Taxus brevifolia*, 1971) (Figura 2).

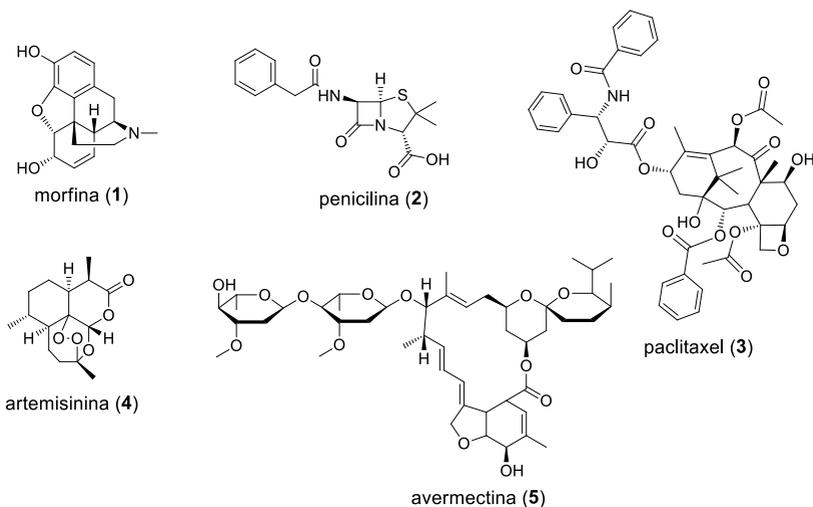


Figura 2. Estruturas químicas de importantes PNs na história do desenvolvimento de fármacos.

Em 2015, dois metabólitos secundários - também conhecidos como produtos naturais (PNs) - estiveram no centro das atenções da comunidade científica. Trata-se de artemisinina **4**, encontrada nas folhas de *Artemisia annua*; e avermectina **5**, produzida por bactérias do solo *Streptomyces avermitilis*. Ambos PNs são fármacos utilizados no tratamento de parasitoses (malária e filariose linfática/oncocercose, respectivamente) e tiveram seus descobridores laureados com o Prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina na ocasião: William Campbell, Satoshi Omura e Youyou Tu.⁴

A premiação dos responsáveis pela pesquisa com PNs, mesmo após 30 anos de efetividade dos fármacos na prática clínica, reacendeu a discussão da importância dos PNs no processo de descobrimento e desenvolvimento de fármacos. A expressão “*a nova era dourada dos PNs*” foi usada para descrever o momento.⁵ O fato é que com o avanço das técnicas de identificação, novas tecnologias para isolamento e o desenvolvimento das ferramentas de biologia molecular aplicadas a PNs, a “nova era” apresenta-se com perspectivas promissoras.⁶

Um dado representativo da relevância dos PNs está na análise feita dos 1592 fármacos aprovados no período entre 1981 a 2014. Cerca da metade das novas entidades química apresentam alguma relação com PNs, sendo que 21% são derivados de PNs e 4% são originalmente PNs. Especificamente para o tratamento do câncer, 12% dos medicamentos aprovados eram produtos naturais; 25% eram derivados de PNs, normalmente via semissíntese; 10% totalmente sintéticos, porém com o grupo farmacofórico pertencente à PNs e 19% totalmente sintéticos.⁷

As principais características que tornam os PNs estruturas privilegiadas no desenvolvimento de fármacos estão relacionadas com a diversidade química que estas substâncias normalmente apresentam, como o grande número de grupos funcionais e centros assimétricos, assim como a variedade de esqueletos químicos, incluindo a presença de diferentes heteroátomos. Estas peculiaridades produzidas pelos organismos vivos, em forma de metabólitos secundários, como resposta as condições ambientais e muitas vezes para garantir a sobrevivência dos mesmos no ecossistema, proporcionam estruturas químicas únicas que desafiam a criatividade humana.^{8,9}

No entanto, devido à pequena quantidade que os PNs são produzidos nas fontes naturais, torna-se essencial a síntese total das substâncias promissoras (líder) para viabilizar os estudos científicos, visto que se estima a necessidade de 1 a 10 g de substância para desenvolver os estudos de relação estrutura-atividade (REA) na fase pré-clínica e aproximadamente 100 g para todo o processo de desenvolvimento do candidato a fármaco.¹⁰

As modificações semissintéticas em produtos naturais é a estratégia mais eficiente para explorar as características de REA em pequena escala e apresentam a melhor relação custo/benefício, uma vez que utiliza fontes renováveis e sustentáveis para o provimento de esqueletos complexos para o desenvolvimento de novos protótipos.¹¹

O Brasil ocupa lugar de destaque no cenário mundial de fontes naturais de PNs, devido a sua grande extensão territorial com diferentes biomas, sendo detentor de aproximadamente 20% da biodiversidade

mundial.¹² Adicionalmente, a população nativa também detém vasto conhecimento tradicional do uso das plantas medicinais para o tratamento das mais diversas doenças, fato que motiva pesquisadores e a indústria a investigar as substâncias ativas das mesmas.

Inserido neste contexto, nosso grupo de pesquisa tem experiência na investigação química de plantas utilizadas na medicina popular, especialmente espécies pertencentes à família Asteraceae, no intuito de identificar as substâncias bioativas responsáveis pelas ações farmacológicas. Recentemente, o campo de pesquisa do grupo tem expandido para reações de modificação molecular das substâncias de interesse[†] e sendo esta tese o primeiro trabalho de síntese total de produtos naturais. Dentre as principais patologias investigadas em colaboração com outros pesquisadores estão leishmanioses, doença de Chagas, inflamação e câncer.

Esta tese foi organizada em três capítulos. No **Capítulo I** está contemplada uma revisão bibliográfica sobre a espécie *Vernonia scorpioides*. O **Capítulo II** descreve e discute os resultados obtidos no estudo visando à síntese total enantiosseletiva do poliacetileno (+)-vernoniína, encontrado em *V. scorpioides*. No **Capítulo III** estão apresentados os dados referentes ao isolamento do triterpeno pentacíclico lupeol de *V. scorpioides* e a semissíntese de derivados com atividade antileishmania e antitripanossoma.

[†] Artigo publicado contendo os resultados apresentados no capítulo III desta tese: MACHADO, V. R.; SANDJO, L. P.; MORAES, M.; PINHEIRO, L. G.; STEINDEL, .M.; PIZZOLATTI, M. G.; BIAVATTI, M. W. Synthesis of lupeol derivatives and their antileishmanial and antitrypanosomal activities. **Natural Product Research**, v. 32, n. 3, p. 275 - 281, 2017

CAPÍTULO I

Vernonia scorpioides

CAPÍTULO I - *Vernonia scorpioides*

1.1. Apresentação do capítulo

Neste capítulo será apresentada uma revisão bibliográfica sobre a espécie *Vernonia scorpioides*, assim como a contextualização histórica que motivou o grupo de pesquisa a investigá-la quimicamente, fato que proporcionou o isolamento de lactonas e poliacetilenos citotóxicos.

1.2. Introdução

Vernonia scorpioides (Lam.) Pers (Figura 3) é uma planta perene, subarborescente, medindo de 1 a 2 metros de altura, pertencente a família Asteraceae, popularmente conhecida como assa-peixe, enxuga, erva-de-são-simão ou piracá. Geralmente é encontrada em áreas desflorestadas e em solos de baixa qualidade, o que leva muitos a considerarem como uma erva daninha.¹³

Na medicina popular, o extrato alcoólico das folhas frescas é utilizado em aplicações tópicas para o tratamento de enfermidades da pele, parasitoses, feridas crônicas, alergias, processos inflamatórios em geral e úlceras nos membros inferiores (pé diabético).^{14,15}



Figura 3. *Vernonia scorpioides*. Foto: grupo de pesquisa.

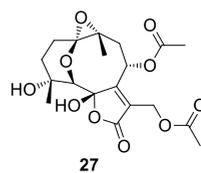
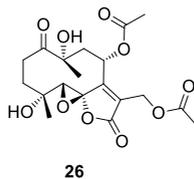
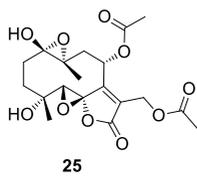
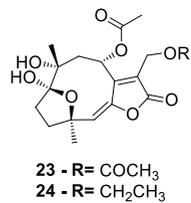
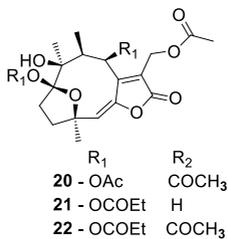
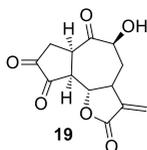
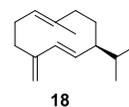
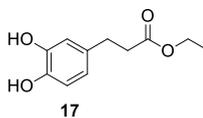
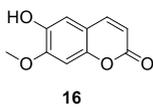
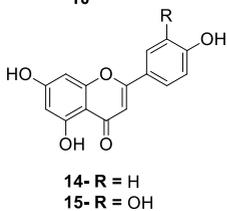
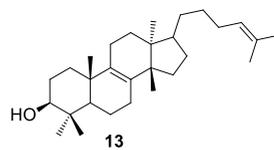
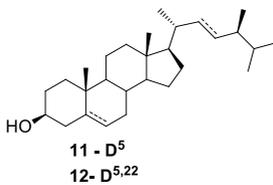
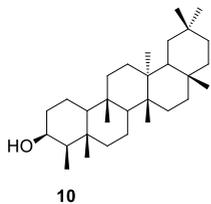
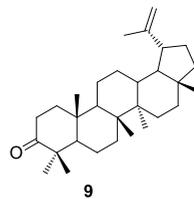
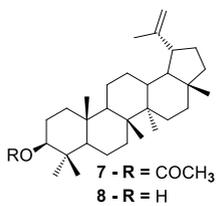
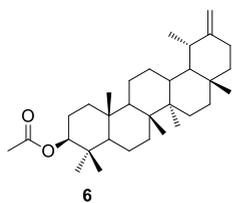
A fim de encontrar evidências científicas para o uso popular, alguns estudos de investigação farmacológica de extratos de *V. scorpioides* foram conduzidos. Em 1996, Freire e colaboradores¹⁴ avaliaram a atividade antifúngica *in vitro* dos extratos de clorofórmio e hexano de folhas e caules de *V. scorpioides*. Embora o estudo tenha

avaliado altas concentrações (1 mg, 3 mg e 5 mg), os extratos demonstraram-se ativos com halos de inibição de até 80 mm em cultura de *Penicillium citrinum*.

Estudos *in vivo* de cicatrização demonstraram que o extrato etanólico das folhas (100 mg) proporcionou uma melhor regeneração e organização do novo tecido sem apresentar sinais de necrose na úlcera, mas não apresentou significativo efeito de cicatrização.¹³ Já uma subfração de acetato de etila (50 µL) proveniente do fracionamento cromatográfico do extrato alcoólico apresentou promissora atividade cicatrizante em úlceras infectadas com *S. aureus* durante 7 dias de tratamento *in vivo*.¹⁶ A avaliação tópica *in vivo* da ação anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico de folhas e flores demonstrou efetividade na supressão de importantes mediadores inflamatórios como ácido araquidônico em processos agudos e crônicos.¹⁷

O potencial citotóxico e antitumoral dos extratos de *V. scorpioides* também é relatado na literatura. A fração de diclorometano do extrato hidroalcoólico das folhas e uma fração purificada da mesma inibiu totalmente o desenvolvimento de tumores ascíticos de Erlich e Sarcoma 180 quando administrado diretamente no tumor *in loco* (5 mg/kg) em 7 dias de tratamento e a longo prazo (30 dias) contribuiu para o aumento do tempo de vida e sem alterar o peso dos camundongos. Porém, não foi observada atividade antitumoral quando as frações foram administradas v.o. ou i.p. sugestionando a ação enzimática de inativação das substâncias bioativas.^{18,19}

A prospecção química dos extratos de *V. scorpioides* possibilitou a identificação de substâncias pertencentes a diferentes classes de metabólitos secundários, como lactonas sesquiterpênicas, triterpenos, esteroides, flavonoides, substâncias fenólicas e poliacetilenos (Figura 4). Destaque para as lactonas sesquiterpênicas **23-28** e os poliacetilenos **31-38**, descritos pela primeira vez na literatura pelo nosso grupo de pesquisa.



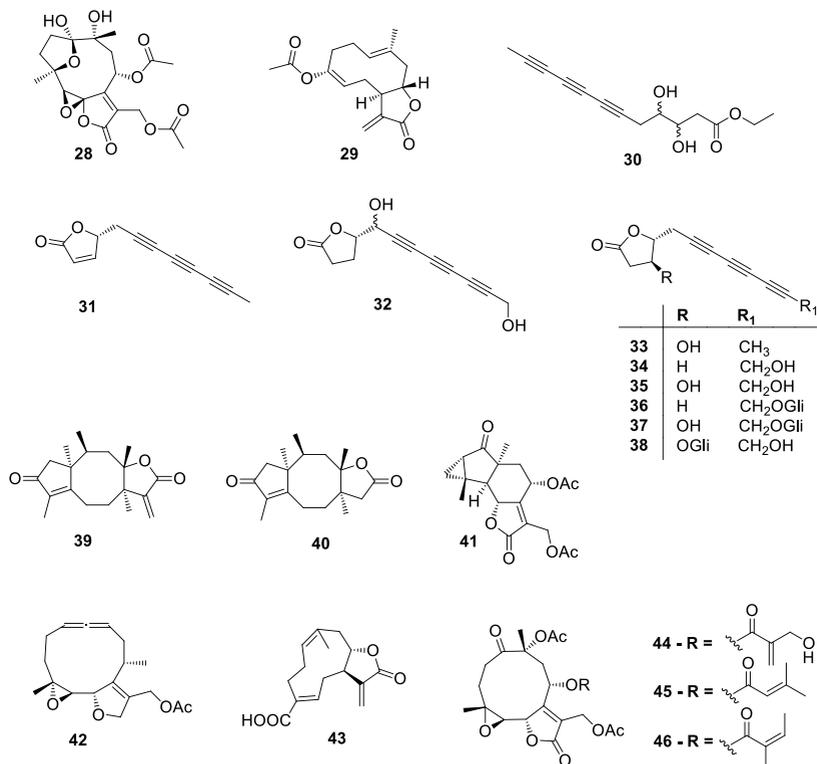


Figura 4. Substâncias isoladas de *Vernonia scorpioides*: **7,12,13,16,18-22**²⁰; **23-28**¹⁵; **29**²¹; **31**²²; **6-9, 11, 12, 14, 17, 30, 31**²³; **31-38**²⁴; **44-46**²⁵; **39, 40**²⁶; **41-43**²⁷.

A investigação fitoquímica de *V. scorpioides* pela investigadora principal do grupo professora Dr.^a Maique W. Biavatti foi motivada pelo relato do uso de preparações tópicas das folhas da planta no tratamento de escaras de decúbito em idosos de uma casa de repouso no município de Itajaí (SC). Apesar dos resultados obtidos nos modelos científicos descritos anteriormente não tenham sido promissores, os profissionais de saúde da instituição afirmavam observar uma melhora na cicatrização e cura das feridas nos idosos com o tratamento a base da planta.

Dentre as substâncias descritas na Figura 4, muitas apresentam atividade biológica destacada, como por exemplo, a lactona **25** que apresentou CI₅₀ de 3,3 µM em linhagem celular tumoral HeLa, valor

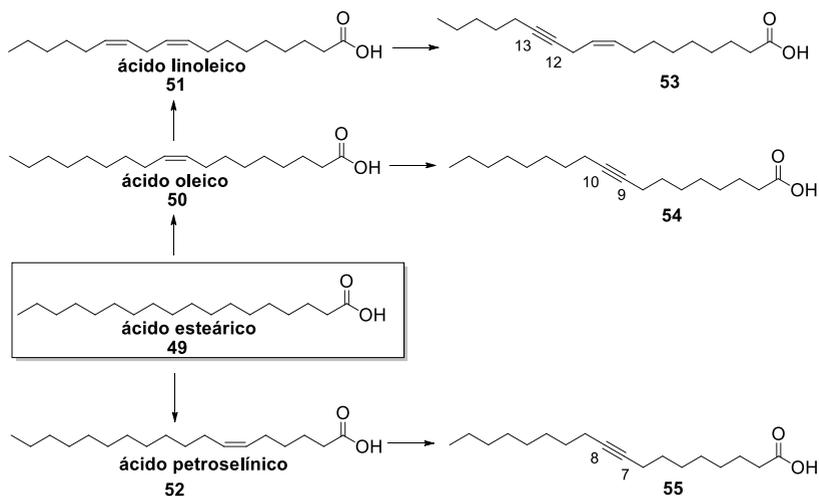
próximo ao exibido pelo fármaco paclitaxel ($CI_{50} = 2,5 \mu M$).²⁸ O foco da revisão bibliográfica nos próximos capítulos será direcionado para os poliacetilenos **31 - 38** (Cap. II) e o triterpeno pentacíclico lupeol **8** (Cap. III), visto que os mesmos são o objeto de estudo deste trabalho.

CAPÍTULO II

Estudos visando à síntese total do poliacetileno
(+)-vernoniína

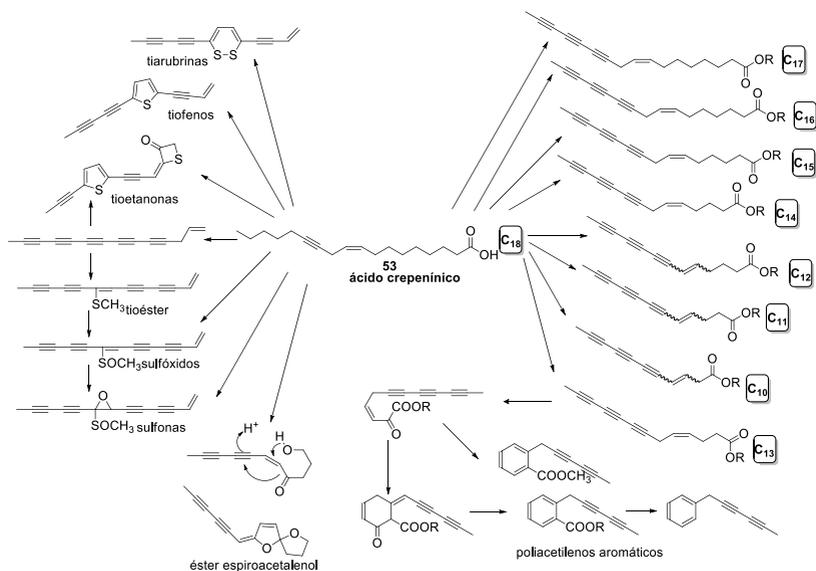
poliacetilenos já descritos. Muitos poliacetilenos estão presentes em plantas comestíveis, principalmente as pertencentes à família Apiaceae, como é o caso de cenoura, aipo e salsa.^{35,38}

A biossíntese dos poliacetilenos tem como ponto inicial a biossíntese de ácidos graxos saturados a partir da adição cabeça-cauda de unidades de malonil à cadeia crescente acila. Na sequência, ocorre uma série de derivatizações enzimáticas até a formação da tripla ligação a partir da dupla ligação pré-existente. O mecanismo de formação da tripla ligação mais aceito é a reação de eliminação de um intermediário enol carboxilato ativado^{29,30}. O Esquema 1 apresenta três intermediários acetilênicos biossintetizados a partir do ácido esteárico **49** e que são os precursores da grande variedade estrutural de poliacetilenos (ácido crepenínico **53**, ácido estearólico **54**, ácido tarírico **55**), uma vez que a principal diferença entre eles está na localização da ligação tripla.



Esquema 1. Biossíntese de acetilenos a partir de ácidos graxos.

Os intermediários acetilênicos, por sua vez, originam os poliacetilenos por meio das reações enzimáticas catalisadas por *desaturase/acetilase*, as quais introduzem novas unidades acetilênicas, muitas vezes conjugadas. A variedade estrutural desta classe de PNs é ampla e classificada, principalmente, de acordo com o número de carbonos, mas também pela presença de heterociclos ou anel aromático e a presença de aleno, conforme exemplificado na figura abaixo com alguns poliacetilenos derivados do ácido crepenínico **53** (Esquema 2).³⁰



2.2.1. Atividades biológicas de poliacetilenos

Pode-se dizer que um dos relatos mais antigos a respeito da ação farmacológica de um poliacetileno foi descrito por Platão em *Phaedo* (360 B.C.E), diálogo em que são descritos os últimos momentos de Sócrates (470 B.C.E - 399 B.C.E). A interpretação dos sintomas descritos por Platão pode ser atribuída à ação neurotóxica, provavelmente causada por cicutoxina **56** (Figura 6), um dos constituintes majoritários de espécies dos gêneros *Conium* sp. e *Cicuta* sp. Estas plantas tóxicas eram comumente utilizadas na forma de chá na execução de condenados nos tempos antigos.⁴⁰

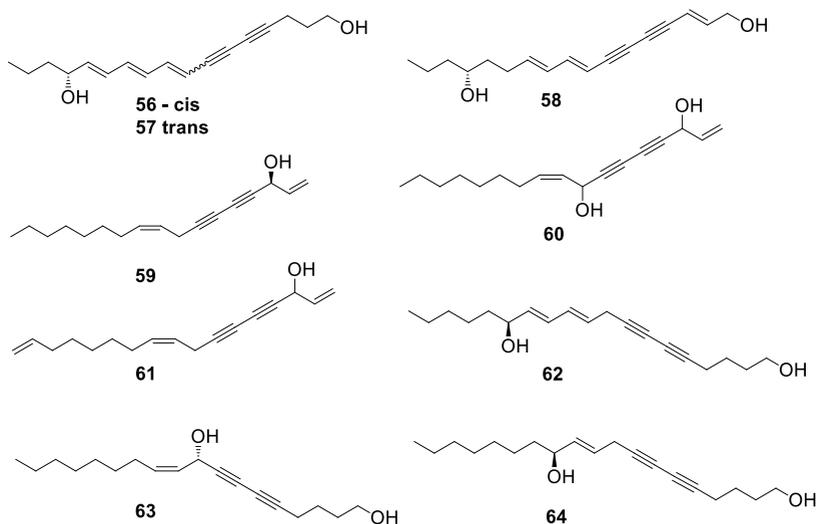


Figura 6. Poliacetilenos com atividade neurotóxica.

A ação de cicutoxina **56** ocorre diretamente no sistema nervoso central causando convulsões tônico-clônicas severas e paralisia respiratória podendo levar ao óbito, sendo a $DL_{50} < 3\text{mg/kg}$, determinada em camundongos. Estudos sugerem que o mecanismo de ação seja a interação de cicutoxina com os canais de cloro dos receptores $GABA_A$, causando a inibição da ligação específica de antagonistas $GABA_A$.⁴¹ Outros poliacetilenos alifáticos, como isocutoxina **57**, oenantotoxina **58**,⁴² falcarinol **59**,⁴⁴ falcarindinol **60**,⁴³ virol A **62**, virol B **63**, virol C **64**, também apresentam neurotoxicidade por meio de modulações no receptor GABA. Estudos de relação estrutura-atividade em camundongos indicam que o tamanho do sistema de ligações π conjugadas e a geometria das duplas ligações são importantes para os efeitos toxicológicos. Grupos terminais funcionalizados com oxigênio e o grupamento álcool alílico são essenciais para a toxicidade.⁴¹

Já a toxicidade em linhagens de células tumorais é uma das atividades farmacológicas mais abordadas na literatura para poliacetilenos. Destaque para os poliacetilenos alifáticos isolados em *Panax ginseng* C.A Meyer, uma das mais valiosas e populares plantas medicinais do Oriente (Figura 7). Diversos poliacetilenos com o esqueleto do tipo falcarinol foram isolados a partir da investigação, no início dos anos 80, da atividade citotóxica dos extratos lipofílicos de *P.*

ginseng.^{45,46} Dentre as substâncias, destacam-se falcarinol **59**, panaxadiol **65**, e panaxatriol **66**, os quais estão presentes em grandes quantidades nas raízes de *P. ginseng* (297, 250 e 320 $\mu\text{g/g}$, respectivamente).⁴⁷

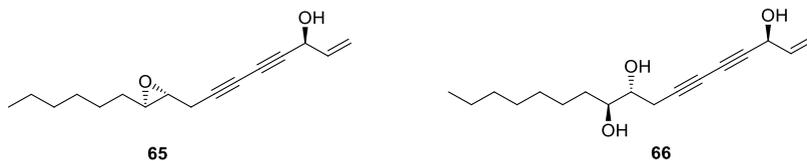


Figura 7. Poliacetilenos encontrados em *Panax ginseng*: panaxadiol **65** e panaxatriol **66**.

A citotoxicidade dos poliacetilenos de *P. ginseng* foi demonstrada *in vitro* em diferentes linhagens de células tumorais, incluindo leucemia (L-1210), melanoma (B-16), adeno carcinoma gástrico (MK-1). Especificamente para MK-1, os poliacetilenos exibiram extrema toxicidade com ED_{50} de 0,027 $\mu\text{g/mL}$ (falcarinol **59**), 0,016 $\mu\text{g/mL}$ (panaxadiol **65**) e 0,171 $\mu\text{g/mL}$ (panaxatriol **66**). A seletividade dos poliacetilenos para as células tumorais foi evidenciada quando doses cerca de 20 vezes maiores que aquelas utilizadas nas células tumorais foram necessárias para inibir o crescimento de fibroblastos humanos (MRC-5).⁴⁸

Embora diversos estudos apontem o potencial citotóxico de poliacetilenos *in vitro*, poucos são aqueles que avançam para a avaliação *in vivo*. Bernart e colaboradores verificaram modesta atividade de falcarinol **59** e desidrofalcarinol **61** i.p. em modelo de tumor xenográfico de melanoma em camundongos, sendo que desidrofalcarinol **61** apresentou o melhor efeito terapêutico na dose de 2 mg/kg, levando ao aumento de 40% no tempo de vida dos animais.⁴⁹ Falcarinol **59** apresentou efeitos inibitórios no desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas em ratos quando administrados via oral juntamente com a dieta do animal (35 $\mu\text{g/g}$ de alimento).⁵⁰ Cabe destacar o estudo realizado por Klein em colaboração com nosso grupo de pesquisa, no qual vernoniína **31** e o seu análogo **34** (Figura 8), isolados de *Vernonia scorpiodes*, apresentaram atividade antitumoral e antimetastática em camundongos⁵¹ (dados apresentados no próximo capítulo).

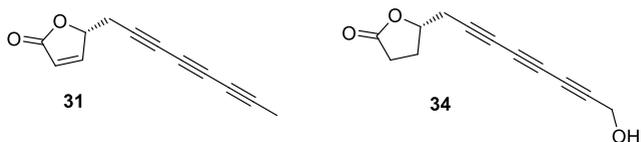


Figura 8. Poliacetilenos antitumorais encontrados em *V. scorpioides*.

A ação antibacteriana, antifúngica, antimicobacteriana e antiviral observada para alguns poliacetilenos está atribuída à função de proteção que esses metabólitos desempenham no organismo vivo dos quais são provenientes.^{30,52} Isolados de culturas de fungos basidiomicetos *Psathyrella subatrata* (anteriormente nomeada *Drosophia subatrata*), drosofilina D **67** e drosofilina C **68** demonstraram ação antimicrobiana frente à diferentes patógenos, incluindo *Mycobacterium penumoniae* (drosofilina A: CIM 13 mg/mL), *Klebsiella penumoniae* (drosofilina D: CIM 26 mg/mL) e *Staphylococcus aureus* (drosofilina A: CIM 2 mg/mL) (Figura 9).⁵³

Os tetra-acetilenos **69** e **70**, isolados da cultura de fungos *Mycena viridimarginata*, foram extremamente ativos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras e fungos filamentosos. A substância **69** mostrou-se a mais ativa apresentando CIM de 10 µg/mL em *Pseudomonas fluorescens* e 12,5 µg/mL em *Candida albicans*.⁵⁴ Petrosina Ia **71**, isolada da esponja *Petrosia* sp, foi ativa na concentração de 1 mg/mL em *Trichophyton mentagrophytes* e *S. aureus* (Figura 9).⁵⁵

na pele, como por exemplo, hera (*Hedera Helix*)⁶⁰, aipo (*Apium graveolens*) e cenoura (*Daucus carota*)⁶¹. Estudos destacam que falcarinol **59** seja o responsável pelas reações alérgicas em função da alta reatividade com os grupamentos mercapto e amino de proteínas (complexo hapteno-proteína), em virtude da sua hidrofobicidade e também a formação de um carbocátion extremamente estável com a perda de água. Este mecanismo ganha respaldo uma vez que falcarinona e falcarindiol **60** não demonstram atividade alérgica e, adicionalmente, parece estar relacionado às outras atividades farmacológicas de poliacetilenos C₁₇ como anti-inflamatória, antiagregante plaquetária, antibacteriana e citotóxica.⁶² No entanto, especificamente para a atividade alérgica, Leonti e colaboradores identificaram a ação antagonista de falcarinol **59** em receptores canabinóides CB1 que leva ao aumento de quimiocinas na pele que induzem a alergia.⁶³

2.2.2. Poliacetileno (+)-vernoniína

O poliacetileno (+)-vernoniína **31** foi descrito pela primeira vez em 2009, a partir do seu isolamento do extrato hidroalcoólico das folhas e flores de *Vernonia scorpioides*.²² A substância é quimicamente caracterizada pela presença na estrutura de uma cadeia lateral poliacetilênica contendo três ligações triplas conjugadas conectada a um anel γ -butenólídeo por meio de um centro estereogênico de configuração *R* (Figura 10).

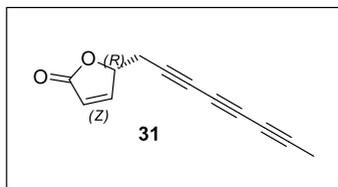


Figura 10. Poliacetileno (+)-vernoniína

Na ocasião de sua descoberta foram necessários 3 kg de planta para obter 6 mg do poliacetileno **31**, os quais possibilitaram a avaliação do potencial citotóxico *in vitro* em linhagens celulares de adenocarcinoma cervical (HeLa), células de melanoma murino (B16F10) e células não tumorais (L929). (+)-vernoniína **31** apresentou citotoxicidade seletiva para células HeLa com IC₅₀ de 158,1 μ M,

enquanto as células não tumorais foram resistentes à exposição ao poliacetileno **31** apresentando IC_{50} de 1330 μ M. Ainda, foram obtidos resultados preliminares sobre o mecanismo de morte celular sugerindo a apoptose via ativação das proteases caspases.

Em 2013, nosso grupo de pesquisa relatou o isolamento de sete poliacetilenos inéditos em *V. scorpioides* com estruturas análogas à (+)-vernoniína **32** - **38** (Figura 11). As diferenças estruturais incluem posições hidroxiladas, ausência da insaturação na lactona, assim como também a presença de unidade monossacarídica nos poliacetilenos **36** e **37**. As substâncias **32** a **38** foram avaliadas *in vitro* com relação à atividade anti-herpética (HSV-1) e antiproliferativa em células de adenocarcinoma humano de pulmão (A549), porém não foi observada atividade promissora em ambos os testes.⁶⁴

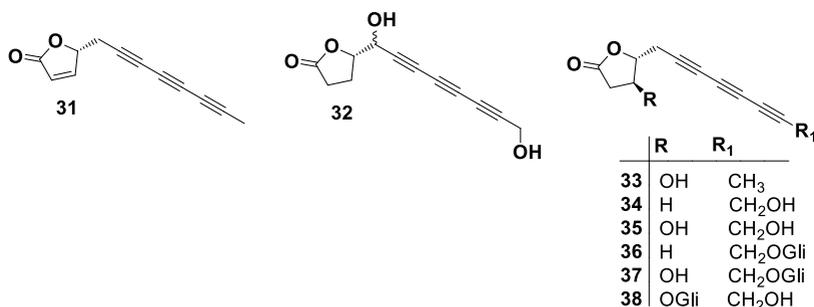


Figura 11. Poliacetilenos inéditos isolados de *V. scorpioides*.

Em colaboração com nosso grupo de pesquisa, Klein e colaboradores avançaram na investigação da citotoxicidade dos poliacetilenos naturais, especificamente, (+)-vernoniína **31** e o análogo **34** em diferentes linhagens celulares tumorais (Tabela 1). Estruturalmente, estes poliacetilenos diferenciam-se pela presença do álcool primário na porção final da cadeia poliacetilênica e a ausência da insaturação na lactona (**34**).

Tabela 1. Citotoxicidade de (+)-vernoniína **31** e análogo natural **34** em diferentes linhagens celulares tumorais.⁵¹

Linhagem celular*	vernoniína 31	poliacetileno 34 IC ₅₀ (µM)**	doxorubicina
PC3	17,2	136,04	4,2
LCCaP	20,2	21,30	3,1
H1299	17,2	18,5	8,9
OVCAR	41,5	120,7	2,2
NCI	17,9	161,8	12,8
MCF7	39,2	20,8	12,6
U138MG	26,2	18,5	1,8
VW473	21,5	134,2	4,6
HeLa	38,0	132,0	5,0
T84	19,3	120,5	18,5
HOS	20,5	18,0	1,8
MG63	18,0	20,4	0,8
B16F10	17,4	29,0	12,5

*PC3: câncer de próstata andrógeno independente humano; LNCaP: câncer de próstata andrógeno sensível humano; H1299: câncer de pulmão de células não pequenas humano; OVCAR: câncer de ovário humano; NCI: câncer de pulmão humano; MCF7: câncer de mama humano; U138MG: glioblastoma humano; VW473: meduloblastoma humano; HeLa: adenocarcinoma cervical humano; T84: câncer de cólon humano; HOS: osteossarcoma humano; MG63: osteossarcoma humano; B16F10: melanoma murinho.**Os poliacetilenos foram incubados durante 24 h com as células utilizando o ensaio colorimétrico do MTT.

Observa-se que (+)-vernoniína **31** mostrou-se mais citotóxico que o poliacetileno **34** nas linhagens celulares apresentadas na Tabela 1. A toxicidade *in vitro* foi determinada em linhagem celular de linfócito mononuclear humano (HMC), sendo que o poliacetileno **31** apresentou CI₅₀ > 100 µM e **34** não apresentou diferença significativa com controle negativo. Cabe destacar que na linhagem B16F10, (+)-vernoniína **31** teve valores comparáveis ao fármaco doxorubicina, que juntamente com baixa citotoxicidade em células saudáveis, motivou a continuidade da pesquisa com ensaios em tumores sólidos *in vivo* (camundongos).

O poliacetileno **31** foi administrado *i.p.*, uma vez ao dia, nas doses de 5,43 µM/kg e 54,34 µM/kg em camundongos que foram inoculados com células B16F10 (subcutânea). Após 12 dias de tratamento foi possível observar a redução da massa tumoral em 65 e

80%, respectivamente. As lesões metastáticas no pulmão também foram reduzidas em 62% quando comparadas com o grupo controle que apenas recebeu a injeção i.v. de células B16F10 para induzir o melanoma metastático no pulmão.⁵¹ Na avaliação da toxicidade aguda não foram observadas diferenças significativas na atividade locomotora dos animais que receberam o tratamento com **31** em ambas as doses, assim como mudanças morfológicas nos órgãos avaliados, corroborando com a informação de baixa toxicidade do mesmo.

Outros fatores importantes avaliados neste estudo foram a diminuição da mortalidade em 28% nos camundongos que receberam o tratamento com (+)-vernoniína **31**, enquanto o grupo não tratado apresentou 71% de mortalidade. Os animais não apresentaram ganho de peso e ainda houve redução da sensibilidade à dor, indicando ação analgésica. A hipótese inicial de morte celular por apoptose foi confirmada por meio da microscopia de fluorescência, sendo possível observar em poucas horas de exposição ao poliacetileno **31** as características de condensação da cromatina, corpos apoptóticos e a fragmentação do DNA nas células apoptóticas. A enzima caspase-3 foi quantificada e apresentou-se ativada de maneira dose-dependente nas células B16F10 incubadas *in vitro* com vernoniína **31**.

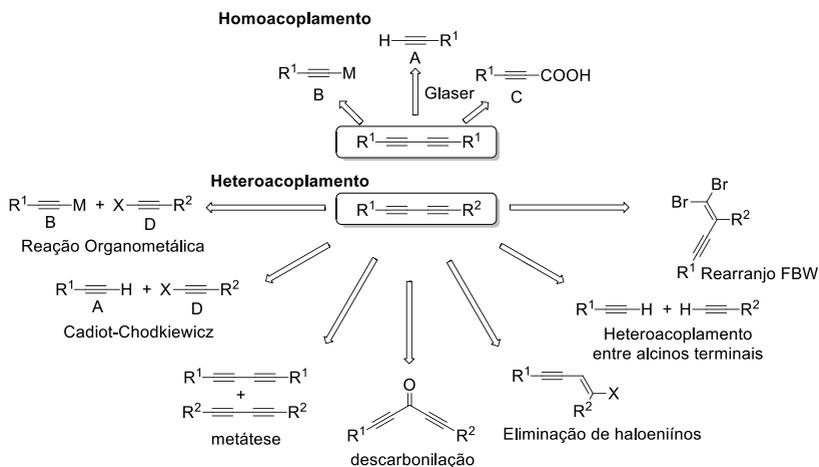
Adicionalmente as linhagens apresentadas na Tabela 1, foram avaliadas também 12 linhagens celulares leucêmicas, nas quais os poliacetilenos **31** e **34** apresentaram perfis similares de ação com valores de CI_{50} na faixa de 3,15 μM a 25,1 μM . A linhagem leucêmica mais sensível à ação citotóxica dos poliacetilenos foi NALM6 (leucemia linfoblástica aguda), na qual o poliacetileno **34** apresentou a maior citotoxicidade do ensaio com CI_{50} de 3,15 μM , enquanto (+)-vernoniína **31** demonstrou CI_{50} de 4,40 μM . O fármaco daunorrubicina foi empregado como controle positivo neste ensaio com linhagens leucêmicas e, no caso citado de NALM6, apresentou CI_{50} de 0,03 μM .

Devido ao baixo rendimento de (+)-vernoniína **31** em *V. scorpioides*, somado ao seu dispendioso processo de isolamento, tornou-se inviável o progresso na investigação farmacológica desta substância. Nesse sentido, a obtenção do poliacetileno **31** por meio da síntese total apresenta-se como uma estratégia interessante para dar continuidade aos estudos farmacológicos, especialmente relacionados a atividade antitumoral promissora, assim como expandir para a síntese de novos análogos.

2.2.3. Abordagens sintéticas para síntese de poliacetilenos (1,3-diínicos conjugados)

A ligação tripla é constituída pela formação de uma ligação σ e duas ligações π entre carbonos com orbitais *sp* hibridizados formando o ângulo de 180 °C entre os átomos envolvidos na ligação. A ligação *Csp-Csp* pode ser definida, baseada nas características geométricas e eletrônicas, como curta distância de ligação, lineares e rígidas, simetria cilíndrica, alta densidade eletrônica distribuída perpendicularmente ao eixo da ligação C-C, grande polarizabilidade paralela ao eixo da ligação C-C, além da alta energia de ligação.⁶⁵⁻⁶⁷

A síntese de 1,3-diínicos conjugados envolve o acoplamento de carbonos (a formação de ligação) *Csp-Csp* e pode ser alcançada sinteticamente por diferentes estratégias, sendo que a escolha da metodologia é direcionada pelo produto desejado: 1,3-diínicos simétricos (homoacoplamento) ou assimétricos (heteroacoplamento). No Esquema 3 estão representadas as principais abordagens sintéticas utilizadas na síntese de poliacetilenos:

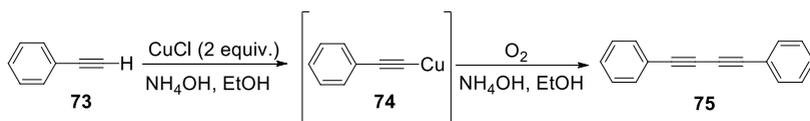


Esquema 3. Estratégias para a síntese 1,3-diínicos simétricos e assimétricos (X: halogênio e M: metal) (adaptado⁶⁸).

De acordo com o esquema 3, é possível encontrar na literatura metodologias para a obtenção de poliacetilenos simétricos (homoacoplamento) através de reações oxidativas entre acetilenos (A), alcinos organometálicos (B) ou ainda de ácidos propiólicos (C).⁶⁷ Já a

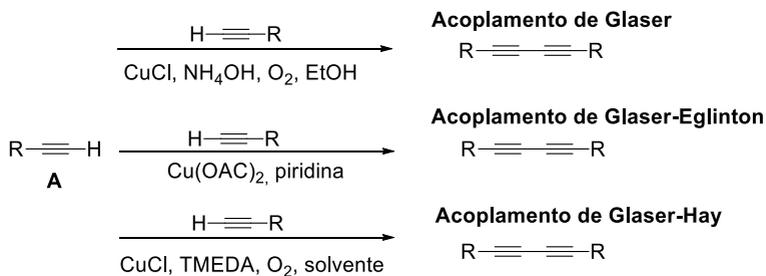
síntese de poliacetilenos assimétricos (heteroacoplamento) pode envolver a reação entre alcinos organometálicos (**B**) e 1-haloalcinos (**D**), reação de descarboxilação de derivados do ácido propiônico (**C**) com alcinos terminais e o acoplamento de dois alcinos terminais na presença de alta concentração de um dos alcinos. Outras metodologias alternativas para o acoplamento de *Csp-Csp* são reações de eliminação de haloeníns, metátese e o rearranjo Fritsch–Buttenberg–Wiechell (FBW).^{67,68} No que concerne à síntese de produtos naturais poliacetilenos, destacam-se as reações de Glaser e Cadiot-Chodkiewicz, incluindo as modificações nestas metodologias.

Em 1869, Carl Glaser descreveu pela primeira vez a síntese de diínos simétricos por meio da dimerização oxidativa de alcinos terminais. A publicação original envolve a formação do 1,4-difenilbuta-1,3-diíno **75** a partir da exposição do intermediário cuprato **74** ao ar (O₂) em uma solução etanólica na presença de amônia (Esquema 4).⁶⁹



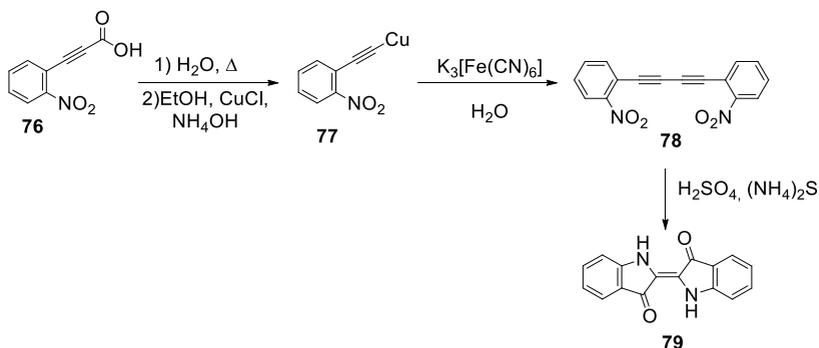
Esquema 4. Metodologia de Glaser para a síntese de 1,3-diínos simétricos

Os baixos rendimentos devido à instabilidade e a baixa solubilidade de intermediários cupratos impulsionaram as buscas por melhorias na reação. Em 1975, Egliton e Galbraith obtiveram excelentes resultados utilizando quantidades estequiométricas ou excesso de Cu(OAc)₂ na presença de piridina em metanol como solvente (Esquema 5). Estudos adicionais desenvolvidos por Hay⁷⁰ demonstraram que a natureza da amina influencia no rendimento e velocidade da reação. Os melhores resultados foram obtidos com *N,N,N',N'*-tetrametiletilenodiamina (TMEDA), uma vez que o mesmo forma complexo com CuCl quando utilizado em quantidade catalítica [Cu(I)-TMEDA], tornando o catalisador mais eficiente na maioria dos solventes orgânicos.^{68,71-73}



Esquema 5. Reações de homoacoplamento e modificações do protocolo de Glaser

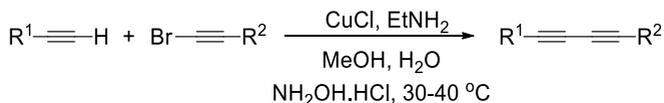
O acoplamento de Glaser-Eglinton-Hay é extensivamente utilizado para a síntese de 1,3-dífnos simétricos e importantes substâncias são sintetizadas por meio desta metodologia, como por exemplo, o indigo **79**, substância isolada de *Indigofera tinctoria* e utilizada como pigmento na indústria têxtil foi sintetizada em 1880 por Baeyer (Esquema 6).⁷³



Esquema 6. Síntese de indigo por Baeyer em 1880 via acoplamento de Glaser.

As modificações neste método continuam sendo exploradas, tendo o foco na utilização de outros metais de transição como paládio, ouro e níquel na forma de co-catalizadores, além de outros agentes oxidantes diferentes do oxigênio molecular proveniente do ar.⁷¹ No entanto, as condições empregadas no acoplamento de Glaser-Eglinton-Hay demonstram baixa seletividade quando são utilizados diferentes alcinos para o acoplamento na síntese de dífnos assimétricos, justamente pelo fato do homoacoplamento ser a reação favorecida. Para contornar

este obstáculo e viabilizar o heteroacoplamento de alcinos, Cadiot e Chodkiewicz, em 1955, propuseram a reação catalisada por CuCl entre 1-bromoalcinos e alcinos terminais na presença de uma amina como base (Esquema 7).⁷⁴

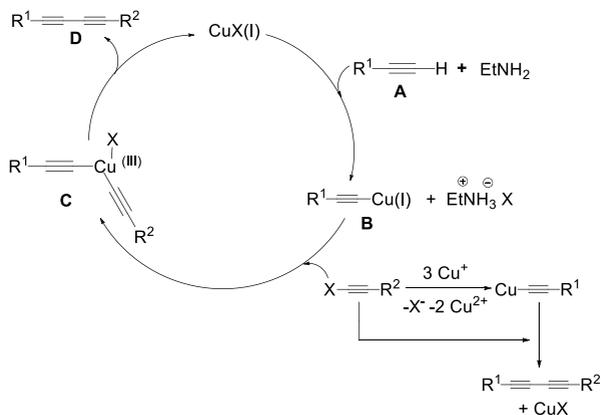


Esquema 7. Reação de heteroacoplamento de Cadiot-Chodkiewicz.

Desde sua descoberta, o acoplamento de Cadiot-Chodkiewicz é a abordagem sintética mais utilizada para a síntese de poliacetilenos, visto que apresenta como vantagens altos rendimentos, catalisador de baixo custo, condições reacionais moderadas, aplicabilidade em vários substratos e tolerância a diversos grupos funcionais como álcoois e polialcoois, aminas, epóxidos, acetais, carboxilatos, éster carboxílicos, amidas, dissulfetos, acetilenos com grupos protetores siliados e radicais nitroxilas.⁷⁵

Existem poucos estudos mecanísticos sobre o processo de formação da ligação Csp-Csp na reação de Cadiot-Chodkiewicz em virtude da alta reatividade dos haloalcinos, o que dificulta os estudos cinéticos. O mecanismo postulado envolve a desprotonação do alcino terminal (**A**) pela base amina, seguindo da formação do acetilídeo de cobre(I) (**B**). Uma reação de adição oxidativa ocorre entre o 1-halo-1-alcino e o acetilídeo de cobre(I) formado in situ levando a formação de espécies de Cu(III) (**C**), os quais na sequência participam de uma reação de eliminação redutiva proporcionando a formação de 1,3-diínos assimétricos (**D**) e a regeneração do Cu(I) (Esquema 8)

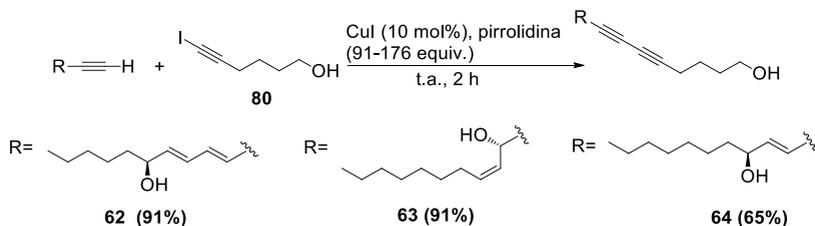
A participação da base é essencial, pois além de promover a desprotonação (etapa inicial), a base possibilita a neutralização do ácido hidrohalogênico resultante da reação, facilita a formação do acetilídeo de cobre(I) e influencia consideravelmente da oxidabilidade de Cu(I).⁷²



Esquema 8. Mecanismo da reação de Cadiot-Chodkiewicz.⁷²

Além de 1-bromo-1-alcinos, outros haloalcinos podem ser utilizados na reação de heteroacoplamento, como 1-iodo-1-alcino e 1-cloro-1-alcino, porém 1-bromo-1-alcinos são mais reativos que 1-cloro-1-alcinos, enquanto que 1-iodo-alcinos são evitados devido a facilidade de homocoplamento.⁷⁴ No entanto, em 1996, Alami e colaboradores avaliaram a influência da natureza da base na reatividade de 1-iodo-1-alcinos, bem como no tempo e rendimento das reações de acoplamento com alcinos terminais utilizando CuI (10 mol%) como catalisador. Os autores obtiveram os melhores resultados na presença da base pirrolidina, contribuindo, desta forma, com uma simples metodologia para a síntese de 1,3-diíno simétricos.⁷⁶

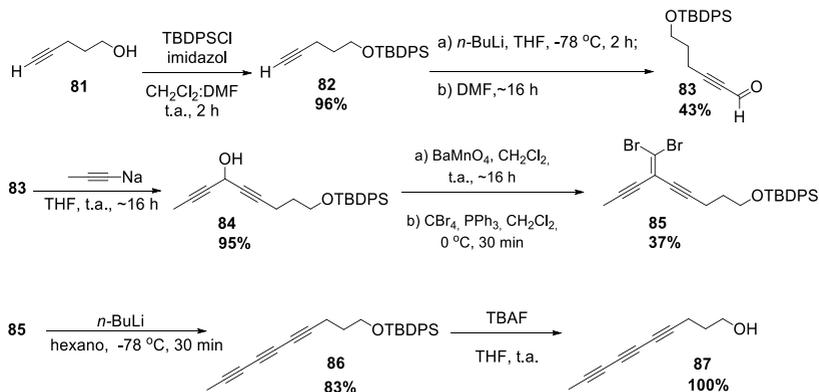
Cerca de três anos depois, a modificação proposta por Alami e colaboradores na reação de Cadiot-Chodkiewicz foi a abordagem escolhida para a síntese de virol A **62** e seus análogos (virol B **63** e virol C **64**), os quais são PNs encontrados em rizomas de *Cicuta virosa*. Tais poliacetilenos afetam o sistema nervoso central causando paralisia e parada respiratória. Para aprofundar os estudos sobre o mecanismo de ação farmacológica destas substâncias, Uwai e colaboradores,⁷⁷ propuseram a síntese total dos poliacetilenos utilizando CuI em pirrolidina na etapa chave para a obtenção dos 1,3-diíno assimétricos **62**, **63**, **64** (Esquema 9).



Esquema 9. Síntese dos PNs poliácetilenos virol A **62**, virol B **63** e virol C **64** por meio da reação de Cadiot-Chodkiewicz.

Outra importante contribuição para a metodologia de Cadiot-Chodkiewicz foi a utilização de co-catalisadores, especialmente os derivados de paládio, divulgada pela primeira vez na literatura em 1988 por Nye e Potts.⁷⁸ Os co-catalisadores mais comumente empregados são $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, PdCl_2 , $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$ e $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$ e demonstram eficiência, em termos de rendimento, em reações de heteroacoplamento com 1-iodo-1-alcinos e 1-cloro-1-alcinos.⁷⁵

Como mencionado anteriormente, as outras abordagens sintéticas para a síntese de poliácetilenos representadas no Esquema 3 são pouco utilizadas na síntese de produtos naturais, tendo maior aplicabilidade na área de síntese de materiais condutores e no desenvolvimento de metodologias sintéticas. No entanto, cabe destacar o trabalho de Luu e Tykwinski (2006), no qual apresentou a síntese do produto natural deca-4,6,8-triín-1-ol **87** e análogos utilizando o rearranjo de Fritsch-Buttenberg-Wiechell (FBW) como etapa chave (Esquema 10).³⁹



Esquema 10. Rearranjo FBW na etapa chave da síntese do produto natural deca-4,6,8-triín-1-ol **87**.

O rearranjo FBW baseia-se na formação da ligação *Csp-Csp* a partir de 1,1-dihalo-olefinas (ex. **85**) na presença de bases fortes como *n*-butil-lítio. Tal abordagem torna-se interessante quando estão presentes na estrutura grupos volumosos, uma vez que a reação é conduzida em baixas temperaturas e os mesmos tendem a ser instáveis em altas temperaturas. No entanto, as desvantagens são a baixa tolerância a grupos funcionais devido à presença de bases fortes e o maior número de etapas sintéticas envolvidas.⁶⁸

2.3. Objetivos

O objetivo principal deste capítulo II consiste no planejamento e desenvolvimento da síntese total enantiosseletiva de poliacetilenos para a avaliação da atividade antitumoral.

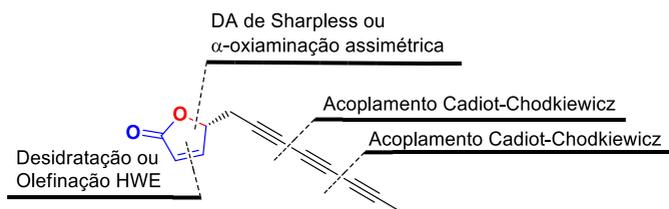
2.3.1. *Objetivos específicos*

- Sintetizar de maneira enantiosseletiva o produto natural poliacetileno *R*-(+)-5-octa-2,4,6-triínil-furan-2(5H)-ona, nomeado (+)-vernoniína **31**, com rendimentos consideráveis para dar continuidade nas pesquisas em virtude da atividade antitumoral promissora já descrita;
- Sintetizar uma série de análogos poliacetilenos com variações no número de insaturações, padrões de oxigenação, estereoquímica e diferentes heterociclos, para realizar a determinação da relação estrutura-atividade (REA).
- Avaliar a atividade citotóxica dos poliacetilenos sintéticos em diferentes linhagens celulares e dar continuidade aos estudos *in vivo* sobre o mecanismo de ação antitumoral (melanoma).

2.4. Resultados e Discussão

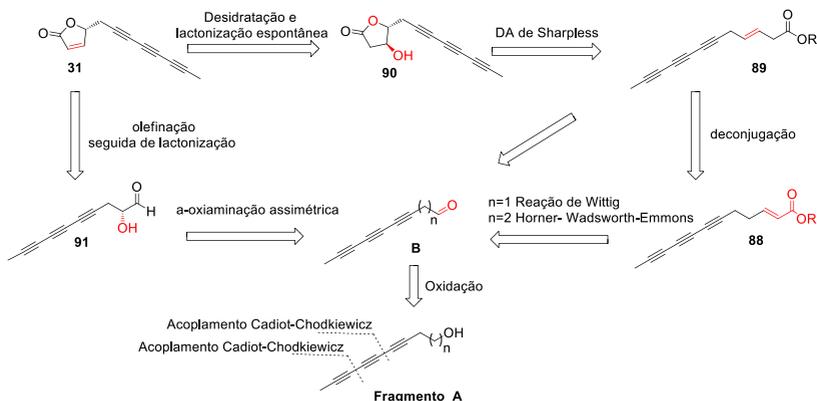
2.4.1. Planejamento sintético

A abordagem sintética idealizada para a síntese total de (+)-vernoniína **31** baseou-se em uma estratégia de síntese linear, iniciando-se pela formação da cadeia poliacetilênica com a subsequente formação do centro estereogênico e lactona (Esquema 11).



Esquema 11. Retrossíntese de (+)-vernoniína **31**

A formação das ligações *C_{sp}-C_{sp}* foi planejada por meio de reações de acoplamento Cadiot-Chodkiewicz, levando a formação da cadeia poliacetilênica funcionalizada com um álcool primário. A síntese enantiosseletiva do anel γ -butenolídeo foi proposta por duas estratégias diferentes: reações de di-hidroxilação assimétrica (DA) de Sharpless e α -oxiaminação assimétrica. Ambas as abordagens iniciam-se com o derivado aldeído (fragmento **B**). A reação DA de Sharpless pode ser desenvolvida com $n = 1$ ou $n = 2$ carbonos saturados na cadeia poliacetilênica (fragmento **A**). Já a reação de α -oxiaminação assimétrica, somente quando $n = 2$. O planejamento conforme o número de carbonos saturados foi previsto em virtude da possível instabilidade do aldeído (**B**) quando $n = 1$ (Esquema 12).



Esquema 12. Reações envolvidas no planejamento sintético de (+)-vernoniína **31**.

De acordo com Esquema 12, a dupla ligação (*trans*) em **89**, necessária para realizar a DA de Sharpless pode ser alcançada por reações de Wittig ou Horner-Wadsworth-Emmons (HWE), a partir do intermediário aldeído (fragmento **B**). Quando $n = 2$ foi previsto uma etapa adicional de deconjugação com **88**, a fim de obter a cetona β,γ -insaturada **89**. A formação enantiosseletiva do centro estereogênico pode ser obtida pela reação de DA de Sharpless, a qual está bem documentada na literatura, especificamente para a síntese de γ -butenólídeos,^{79,80} e apresenta alto valor de excesso enantiomérico (*ee*) baseado na escolha da formulação AD mix apropriada.

Seguindo a outra estratégia para a síntese do anel γ -butenólídeo, foi almejada uma reação em etapa única, a qual inclui a reação de α -oxidação assimétrica utilizando o aminoácido prolina na forma enantiomérica pura como catalisador e nitrosobenzeno como fonte de oxigênio. Na sequência, está prevista a olefinação HWE para formação da dupla ligação (*cis*) do anel e eliminação do grupamento nitrosobenzeno para proporcionar a lactonização.

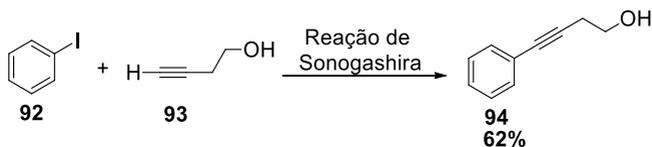
Inicialmente, foram previstos dois grandes desafios na síntese total de (+)-vernoniína **31**, os quais seriam a inserção do metilacetileno na porção terminal da cadeia poliacetilênica e a síntese enantiosseletiva do anel γ -butenólídeo. Nesse sentido, optou-se por investigar preliminarmente os desafios citados de forma independente, uma vez que de acordo com a estratégia linear seriam necessárias 4 etapas para a síntese de **A** para então dar início aos estudos visando à síntese do centro estereogênico. A fim de reduzir perdas e racionalizar o tempo,

utilizou-se um composto modelo para mimetizar o fragmento **A** e dar início aos estudos da síntese do centro estereogênico a partir da preparação do intermediário chave aldeído fragmento **B** (Esquema 12).

2.4.2. Preparação do intermediário chave aldeído

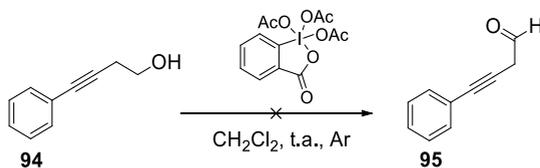
A utilização de compostos modelos é comum em síntese orgânica desde que a estrutura escolhida apresente características eletrônicas e/ou espaciais similares à estrutura alvo, fácil obtenção, reagentes acessíveis e dados de identificação documentados na literatura. Neste contexto, o composto 4-fenilbut-3-in-1-ol **94** foi escolhido como composto modelo para dar início aos estudos de síntese do anel γ -butenolídeo, nesse caso considerando a rota sintética quando $n=1$ (Esquema 12).

Para essa abordagem, o composto **94** foi sintetizado em uma única etapa a partir da reação de Sonogashira entre os reagentes comerciais iodobenzeno **92** e 3-butin-1-ol **93** (Esquema 13). Seguindo a metodologia de Alami e colaboradores,⁸¹ $\text{Pd}(\text{Ph}_3)_4$ (5 mol%) e CuI (10 mol%) foram empregados como catalizadores em piperidina à temperatura ambiente. O composto modelo **94** foi obtido com 62% de rendimento e teve a estrutura confirmada com base nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C em comparação com os dados da literatura.⁸²



Esquema 13. Síntese do composto modelo 3-fenil-2-propin-1-ol **94**

A próxima etapa consiste na obtenção do intermediário aldeído. A reação de Dess Martin foi escolhida por apresentar condições suaves de oxidação, comparativamente com os outros agentes oxidantes, sendo a metodologia indicada para substâncias sensíveis e instáveis como álcoois β,γ -insaturados.⁸³ O composto modelo **94** foi submetido à reação de oxidação utilizando o reagente periodinano de Dess Martin (DMP) em diclorometano à temperatura ambiente. De acordo com a análise do produto bruto reacional por RMN de ^1H foi possível constatar a presença do sinal em 9,61 ppm, característico de hidrogênio aldeídico, indicando a efetividade da reação (Esquema 14).



Esquema 14. Reação de oxidação do composto modelo **94** com DMP.

Uma investigação mais aprofundada no espectro demonstrou a presença de um duplete em 6,78 ppm ($J = 6,07$ Hz; 1H) e um duplo duplete em 6,25 ppm ($J = 6,07; 7,08$ Hz; 1H), além da multiplicidade do sinal em 9,61 ppm (d, $J = 7,08$ Hz; 1H), indicando não ser a estrutura do produto desejado **95**. Após a análise do espectro de RMN de ^{13}C , além do sinal da carbonila do grupamento aldeído em 191,5 ppm, foi possível observar a presença do sinal na região desblindada do espectro em 236,4 ppm, o qual é característico de alenos.⁷⁴ Estes sinais juntamente com a ausência do sinal referente ao carbono com hibridização sp^3 , possibilitou a confirmação da estrutura do produto aleno **96** (Figura 12)

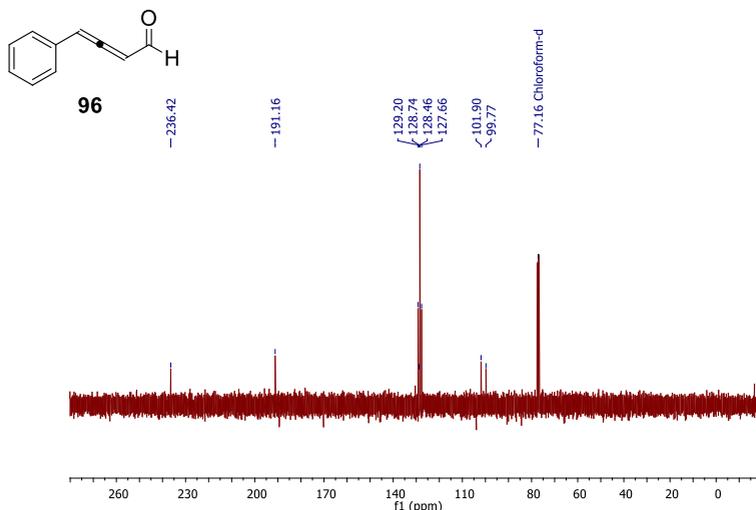


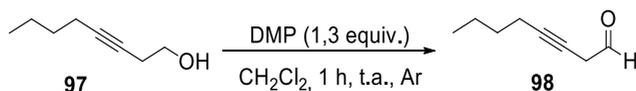
Figura 12. Espectro RMN de ^{13}C do produto aleno **96** (75 MHz, CDCl_3)

A formação de compostos alênicos (1,2-dienos) a partir de estruturas acetilênicas é descrita na literatura por meio de reações de isomerização pela migração da ligação π não acumulada (acetileno) para

a acumulação com uma segunda ligação π (aleno) (rearranjo prototrópico).⁸⁴ Normalmente este rearranjo é favorecido em condições básicas com a desprotonação estequiométrica, usualmente com reagente organolítio, seguido de protonação em meio ácido. Hashmi e colaboradores observaram a formação de derivados alenos, em bons rendimentos, durante a purificação cromatográfica em sílica gel após reações de oxidação de álcoois propargílicos terminais utilizando o reagente periodinana de Dess Martin.⁸⁵

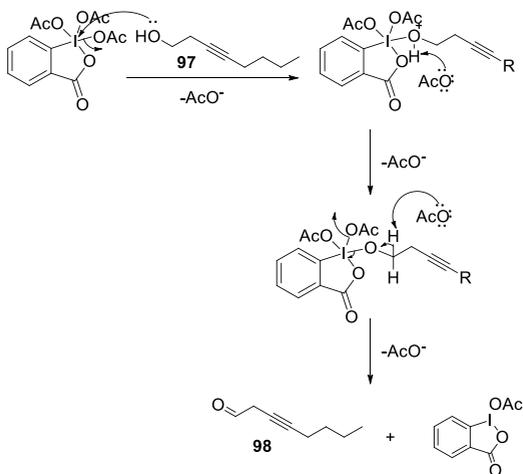
Dessa forma, algumas condições especiais foram utilizadas durante o processo de tratamento da reação de oxidação de **94** com DMP, como o isolamento cromatográfico em temperaturas baixas (-78°C) e atmosfera inerte (argônio).⁸⁶ Outros agentes oxidantes também foram avaliados como clorocromato de piridínio (PCC) e ácido 2-iodoxibenzoico (IBX), porém em todas as tentativas foram observados os sinais de formação do aleno **96**, baseados nos espectros de RMN.

No intuito de avaliar a eficiência da metodologia de oxidação utilizada, assim como a qualidade do reagente DMP, outro reagente comercial álcool homopropargílico **97** (3-octin-1-ol) foi submetido às mesmas condições de oxidação daquelas empregadas no composto modelo **94** (Esquema 15). Desta vez, foi possível obter o derivado aldeído desejado **98** foi obtido com 51% de rendimento.



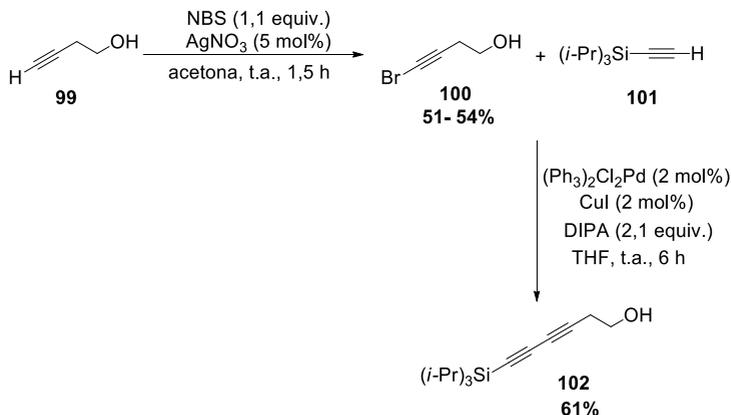
Esquema 15. Oxidação de 3-octin-1-ol **97** com reagente periodinana de Dess Martin.

O mecanismo proposto para a oxidação utilizando DMP envolve, primeiramente, o ataque do par de elétrons do oxigênio da hidroxila primária ao átomo de iodo hipervalente de DMP, ocorrendo a liberação de um íon acetato. Na sequência, ocorre a abstração de um próton em **97**, levando a formação da carbonila aldeídica (Esquema 16).



Esquema 16. Mecanismo proposto para oxidação de **97** com DMP.

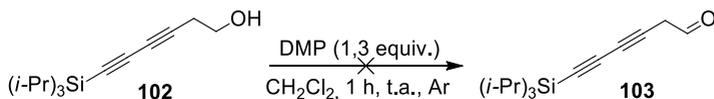
Baseado nos resultados obtidos na tentativa de obter o intermediário chave aldeído para a síntese do anel γ -butenólídeo, constatamos que o composto modelo escolhido **94** poderia não estar reproduzindo as características reais do fragmento **A** (Esquema 12). Uma possível justificativa seria o forte efeito indutivo de elétrons do anel aromático que em conjugação com a tripla ligação estaria contribuindo para a formação do produto aleno **96**. Nesse sentido, optou-se por dar continuidade aos estudos com o intermediário da síntese da cadeia poliacetilênica **102**, o qual é preparado em duas etapas sintéticas a partir do reagente comercial 3-butin-1-ol **99** (Esquema 17).



Esquema 17. Síntese do intermediário da cadeia poliacetilênica diíno **102**.

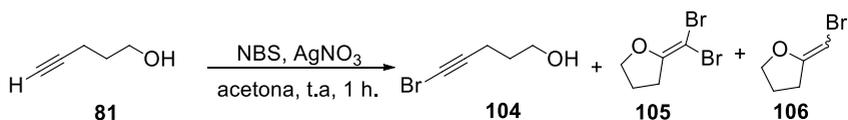
3-Bromobutin-1-ol **100**, previamente preparado via reação de bromação do reagente comercial 3-butin-1-ol **99** com N-bromosuccinimida (NBS),⁸⁷ foi submetido à reação de acoplamento de Cadiot-Chodkiewicz com o reagente comercial triisopropilsilacetileno (TIPS) **101**. A metodologia empregada baseou-se em Hwang e colaboradores,⁸⁸ a qual utiliza $(\text{Ph}_3)_2\text{PdCl}_2$ como co-catalizador e CuI na presença de base estericamente impedida diisopropilamina (DIPA) (Esquema 17). O intermediário diíno **102** foi obtido com rendimento moderado (61%), e na sequência foi utilizado como material de partida na reação de oxidação.

Tendo em vista a efetividade da reação de oxidação de Dess Martin com o álcool homopropargílico **97**, as mesmas condições reacionais foram reproduzidas para a oxidação do intermediário diíno **102** com o objetivo de obter o aldeído desejado **103** (Esquema 18). No entanto, similar ao ocorrido com o composto modelo **94**, foram observados no espectro de RMN de ^1H os sinais de formação do produto aleno.



Esquema 18. Reação de oxidação do intermediário diíno **102**.

Diante da impossibilidade de síntese do intermediário chave aldeído com as tentativas apresentadas, a rota sintética com 1 carbono saturado no fragmento **B** foi considerada inviável, sendo o trabalho direcionado para o material de partida 4-pentin-1-ol ($n=2$) (Esquema 12). O derivado bromoalcino **104** foi preparado a partir da reação de bromação do reagente comercial 4-pentin-1-ol **81** com NBS em presença de AgNO_3 , conforme descrito anteriormente para a síntese de **100** (Esquema 17). No entanto, para nossa surpresa o rendimento da reação foi abaixo do esperado (11 - 33%). A possível explicação para o baixo rendimento pode estar relacionada com produtos secundários oriundos de uma ligação intramolecular em **104**, a qual levaria a formação de intermediários estáveis cíclicos com 5 membros (**105-106**), fato esse que não seria favorável com o 3-butin-1-ol (anel de 4 membros) (Esquema 19). A reação intramolecular de 4-pentin-1-ol **81** durante reação de halogenação já foi descrita na literatura.⁸⁹

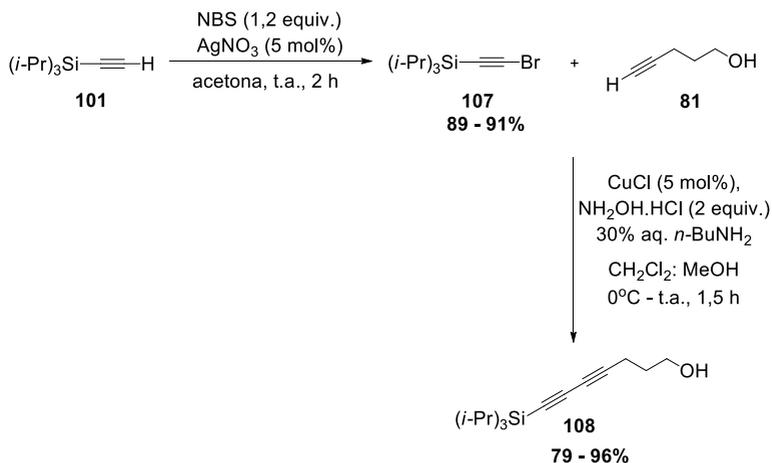


Esquema 19. Possíveis subprodutos da reação de bromação de 4-pentin-1-ol **81**.

Alternativamente foi avaliada a metodologia de halogenação proposta por Brandsma,⁷⁴ na qual utiliza solução aquosa concentrada de KOBBr com excesso de KOH , que permitiu obter o bromoalcino **104** com 50% de rendimento. Para contornar os baixos rendimentos obtidos na primeira etapa sintética com a bromação do reagente comercial 4-pentin-1-ol **81**, optou-se em alterar o padrão de haloalcino na reação de acoplamento de Cadiot-Chodkiewicz, etapa seguinte da rota.

Nesse sentido, a reação de bromação com NBS foi conduzida com o reagente comercial (triaisopropilsilil)acetileno **101** e apresentou excelentes rendimentos. O derivado (bromoetinizil)triaisopropilsilano **107** foi então acoplado com o reagente comercial 4-pentin-1-ol **81**, levando a obtenção do intermediário diíno **108** com ótimos rendimentos (Esquema 20). As condições reacionais do acoplamento também foram alteradas para a metodologia clássica de Cadiot-Chodkiewicz, com a utilização de do catalisado CuCl 5 mol% e sem a presença de co-catalisadores de Pd, além do meio básico aquoso com uma base alifática. Tais alterações

apresentaram melhor eficiência em termos de rendimento e tempo de reação, além de utilizar reagentes mais acessíveis.



Esquema 20. Síntese do intermediário diíno **108** a partir de (triisopropilsilil)acetileno.

O produto do acoplamento **108** foi caracterizado pela análise do espectro de RMN de ^{13}C , no qual apresentou 9 sinais, dentre os quais 4 estão na região entre 66,6 e 89,9 ppm, atribuídos aos carbonos acetilênicos (Figura 13). Já no espectro de RMN de ^1H , a presença do simpleto em 1,08 ppm com integral de 21 hidrogênios confirmou a presença do grupamento triisopropilsililano na estrutura.

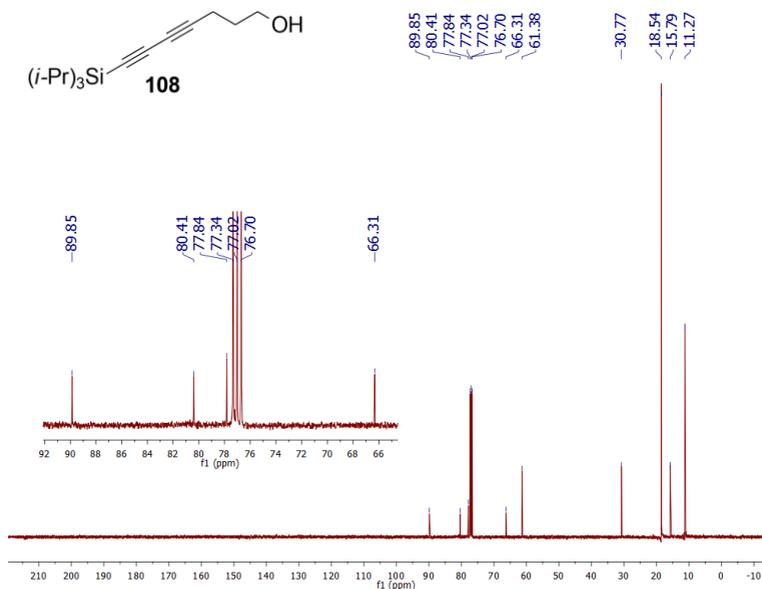
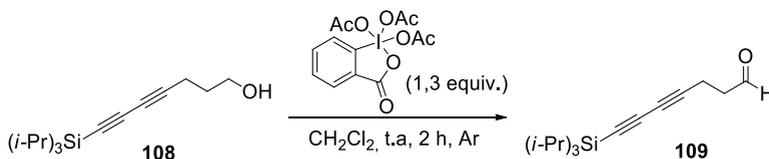


Figura 13. Espectro de RMN de ^{13}C do intermediário diíno **108** (125 MHz, CDCl_3)

Visando à obtenção do intermediário chave aldeído, neste caso com 2 carbonos saturados entre a carbonila e a tripla ligação, o diíno **108** foi submetido à reação de oxidação com periodinana de Dess Martin (Esquema 21). Dessa vez foi possível sintetizar o aldeído desejado **109** com ótimos rendimentos (78 – 90 %), não sendo observada a formação de sub-produtos ou sinais de formação do derivado aleno. Além disso, o intermediário aldeído derivado apresentou-se estável, não havendo a necessidade de condições especiais de tratamento ou durante a purificação cromatográfica.



Esquema 21. Síntese do intermediário chave aldeído **109** ($n = 2$).

A formação do derivado aldeído foi confirmada no espectro de RMN de ^1H pela presença de um tripleto em 9,80 ppm ($J = 0,84 \text{ Hz}$; 1H) referente ao hidrogênio localizado no grupamento carbonila, enquanto no espectro de RMN de ^{13}C a carbonila aldeídica foi confirmada pela presença do sinal característico em 199,4 ppm (Figura 14).

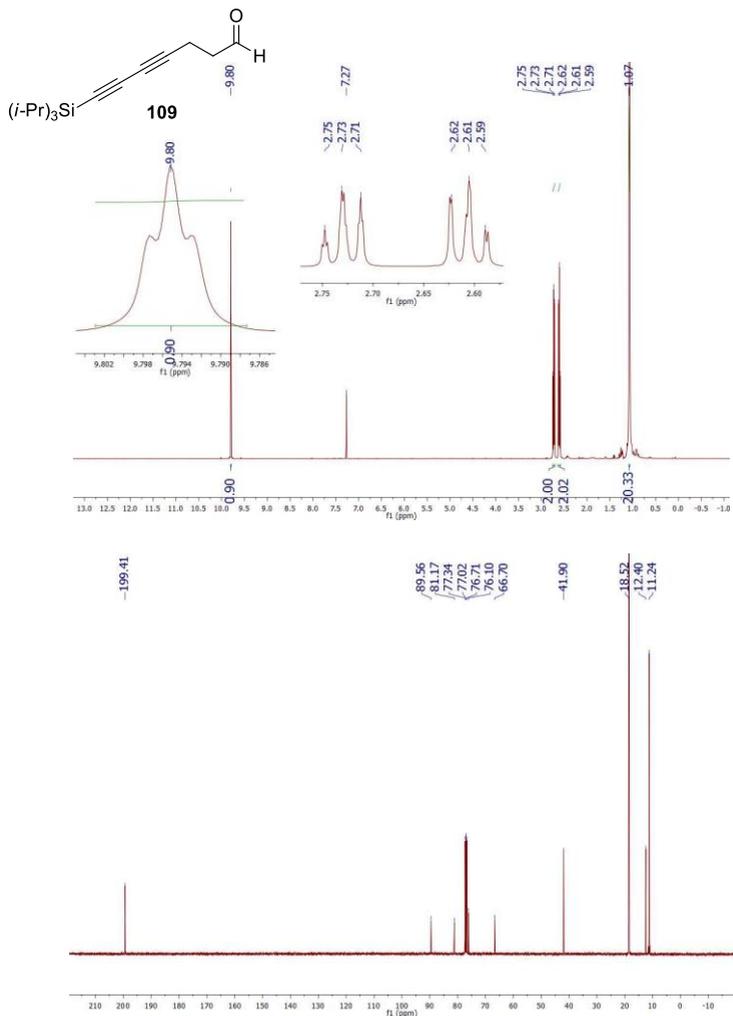


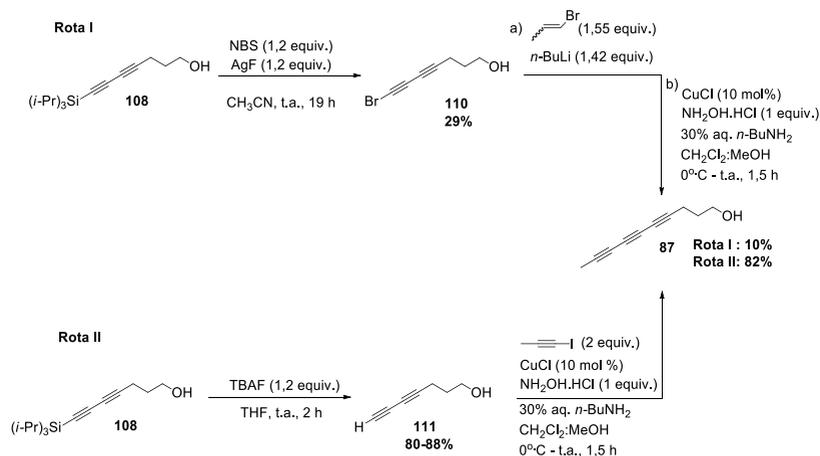
Figura 14. Espectro de RMN de ^1H (superior) e ^{13}C (inferior) do intermediário aldeído **109** (500 MHz e 125 MHz, CDCl_3)

Uma vez alcançado o sucesso na obtenção do intermediário chave aldeído **109**, essencial para dar continuidade ao planejamento sintético, os estudos visando à síntese de (+)-vernonifina **31** foram direcionados para a finalização da cadeia poliacetilênica e estudos visando à síntese anel γ -butenolídeo de maneira concomitante. Para fins didáticos, neste capítulo serão apresentados separadamente.

2.4.3. Finalização da síntese da cadeia poliacetilênica

A inserção da última unidade acetilênica na cadeia poliacetilênica presente na estrutura de (+)-vernonifina **31** foi realizada por duas abordagens sintéticas diferentes (rota I e rota II), no entanto ambas baseiam-se no acoplamento de Cadiot-Chodkiewicz como etapa principal (Esquema 22):

- Rota I: geração do alcino terminal propino *in situ* para a reação de acoplamento em etapa única com o derivado haloalcino;
- Rota II: síntese prévia do reagente iodopropino e o acoplamento com o derivado alcino terminal.

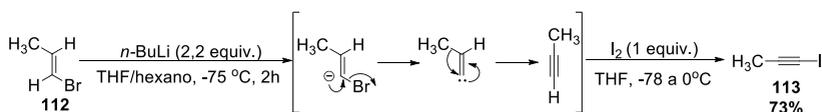


Esquema 22. Síntese da cadeia poliacetilênica de (+)-vernonifina **31**.

A rota **I**, inicialmente avaliada, apresentava-se vantajosa devido à proposta da reação em etapa única a partir do haloalcino. O derivado **110** foi obtido a partir da reação de bromação desililativa *in situ*

proposta por Hwang e colaboradores,⁸⁸ porém com rendimento bem abaixo daqueles reportado pelos autores (91%). O bromoalcino **110** foi submetido à reação de acoplamento com propino, o qual foi primeiramente gerado *in situ* por meio do rearranjo FBW do reagente 1-bromo-1-propeno (mistura de isômeros).⁹⁰ O produto desejado, deca-4,6,8-triín-1-ol **87**, foi obtido com 10 % rendimento.

A outra estratégia proposta para a finalização da cadeia poliacetilênica (rota **II**) envolve a síntese prévia do reagente 1-iodopropino **113**, o qual foi preparado em uma única etapa a partir do reagente comercial 1-bromo-1-propeno (mistura de isômeros) **112**. A reação em etapa única consiste na formação de 1-propino através do rearranjo de FBW, seguido da halogenação com I₂ (Esquema 23).



Esquema 23. Preparação do reagente 1-iodopropino **113** via rearranjo FBW.

O desenvolvimento da metodologia descrita acima para a síntese do reagente 1-iodopropino **113** foi motivada pela síntese da cadeia poliacetilênica de (+)-vernoniína **31** durante o período sanduíche de doutoramento no Instituto de Tecnologia de Massachusetts (MIT-EUA). Bartko e colaboradores⁹¹ publicaram uma síntese com o diferencial de utilizar reagentes acessíveis, bom rendimento e reprodutibilidade comprovada. As metodologias já descritas para a síntese de 1-iodopropino utilizam gás propino como material de partida (alto custo e difícil manuseio) ou reagentes explosivos, como amônia líquida com amida de lítio usando 1,2-dibromopropano como material de partida. Além disso, a aquisição do reagente comercial custa em média \$350 – 750/grama. Na ocasião do desenvolvimento desta metodologia foi possível sintetizar cerca de 30 g de 1-iodopropino **113**, dos quais boa parte foi utilizada na finalização da síntese da cadeia poliacetilênica de (+)-vernoniína **31**.

De acordo com a Rota II apresentada no Esquema 22, o alcino terminal **111** foi obtido em ótimos rendimentos a partir da reação de **108** com fluoreto de tetrabutílamônio (TBAF). Dessa forma, a reação de acoplamento de Cadiot-Chodkiewicz entre o reagente 1-iodopropino

113 e o alcino terminal **111** pode ser realizada nas mesmas condições já mencionadas, proporcionando a obtenção do derivado deca-4,6,8-triín-1-ol **87** com ótimo rendimento (82%). A estrutura do derivado **87** foi confirmada pelo espectro de RMN de ^1H devido a presença do simpleto em 1,96 ppm (3H) referente a metila terminal (Figura 15), enquanto no espectro de RMN de ^{13}C foram observado 6 sinais na região entre 60 e 80 ppm, referentes aos carbonos insaturados, no total de 10 sinais.

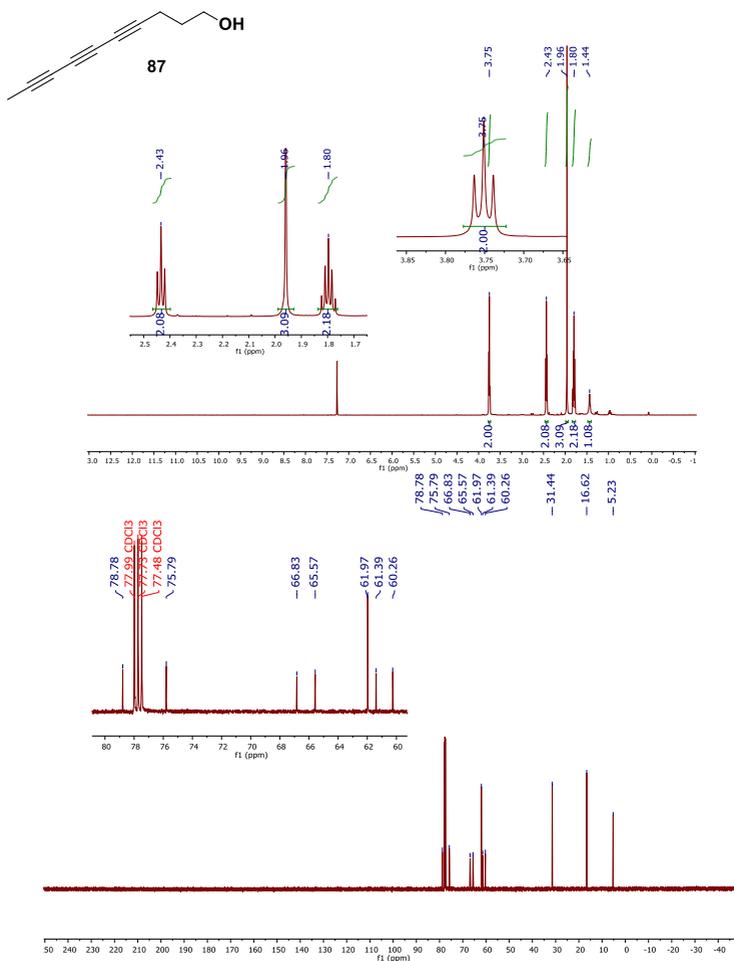
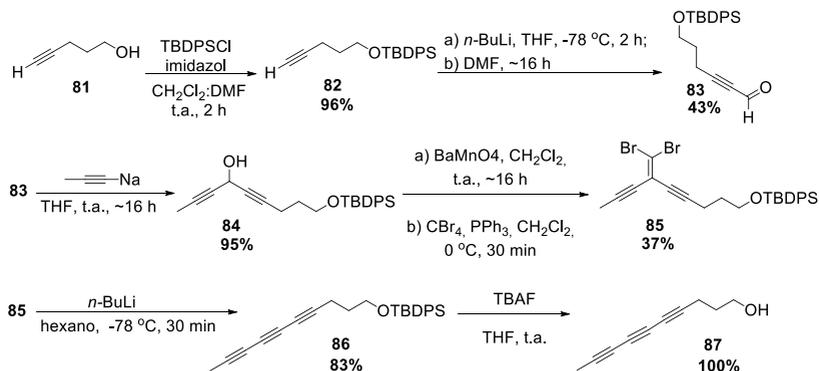
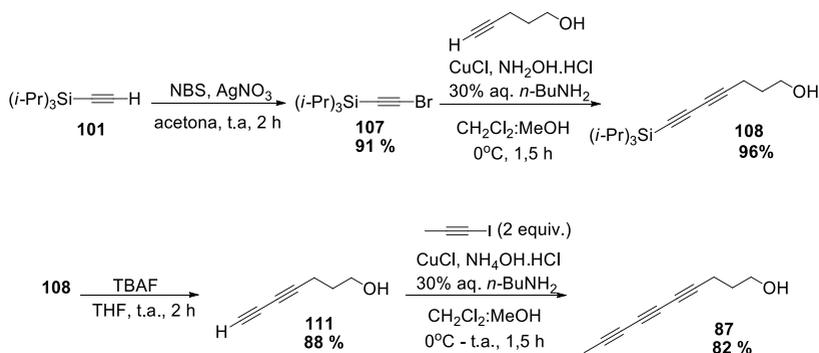


Figura 15. Espectro de RMN de ^1H (superior) e ^{13}C (inferior) do intermediário **87** (500 MHz e 125 MHz, CDCl_3)



Esquema 25. Rearranjo FBW na etapa chave da síntese do produto natural deca-4,6,8-triín-1-ol **87**.

Diante do exposto, destaca-se a abordagem sintética desenvolvida neste trabalho, a qual permitiu sintetizar o produto natural deca-4,6,8-triín-1-ol **87** em apenas quatro etapas sintéticas, a partir de reagentes acessíveis e estáveis com rendimento global de 63%, baseado no acoplamento de Cadiot-Chodkiewicz (Esquema 26).



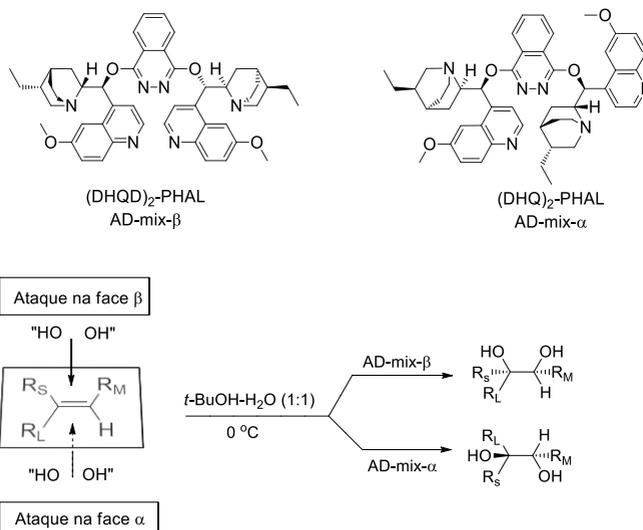
Esquema 26. Nova rota sintética para o PN deca-4,6,8-triín-1-ol **87** desenvolvida neste trabalho.

2.4.4. Estudos visando à síntese do anel γ -butenolídeo

Devido à ocorrência de γ -butirolactonas em PNs e ao fato de muitas destas desempenharem importantes atividades biológicas, diversas estratégias são estudadas com o objetivo de sintetizá-las de forma enantiosseletiva. Muitas estratégias partem de blocos de construção quirais, enquanto outras utilizam catalisadores ou ligantes quirais. Dentre as mais comumente citadas na literatura encontram-se a reação assimétrica de Michael utilizando 2(5*H*)-furanona como nucleófilo na presença de diferentes tipos de catalisadores,⁹⁶ reações enzimáticas com 5-hidroxi-2(5*H*)-furanona,⁹⁷ reação de Mukaiyama-Michael em siloxifuranonas com organocatalisadores,⁹⁸ alquilação *hetero*-alílica seguido do fechamento de anel⁹⁹ e di-hidroxilação assimétrica (DA) de Sharpless em ésteres β,γ -insaturados.¹⁰⁰

Com relação à reação de DA de Sharpless, estratégia escolhida neste trabalho, é a mais citada dentre as abordagens referenciadas anteriormente e baseia-se no uso de OsO₄, formado em *in situ* por K₂OsO₂(OH)₄, como agente oxidativo utilizado em quantidades catalíticas e da mistura K₃Fe(CN)₆/K₂CO₃ como agente co-oxidante. A enantiosseletividade é garantida, com altos valores de excesso enantiomérico (*ee*), pela adição de ligantes quirais que desempenham a função de selecionar uma das faces da ligação dupla a ser atacada pelo ósmio (Esquema 27).

Os derivados ftalazínicos dos alcaloides di-hidroquinona [(DHQD)₂-PHAL] e di-hidroquinidina [(DHQ)₂-PHAL] são os ligantes quirais mais utilizados e fazem parte da mistura de reagentes comercialmente disponíveis AD-mix- β e AD-mix- α , respectivamente, juntamente com os outros reagentes citados.¹⁰¹ A reação é normalmente conduzida em mistura de água e *tert*-butanol (1:1, v/v) e a adição de CH₃SO₂NH₂ (metanossulfonamida) proporciona maior velocidade de reação.¹⁰²

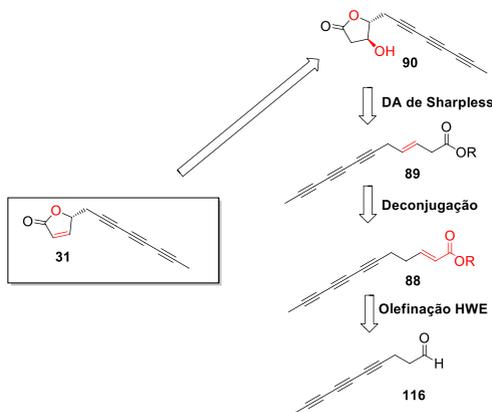


Esquema 27. Modelo de Sharpless para a determinação da estereoquímica mediante ataque da respectiva face da olefina.

A reação de DA de Sharpless foi a primeira estratégia a ser avaliada para a síntese do anel γ -butenolídeo de (+)-vernoniína **31** em virtude da simples metodologia, disponibilidade dos reagentes, previsibilidade da configuração do centro estereogênico a ser obtido, excelentes *ee* descritos na literatura e a contribuição da experiência do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Rick L. Danheiser.

Dessa forma, seguindo a estratégia sintética apresentada no Esquema 28, planejou-se a preparação do derivado éster com a carbonila β,γ -insaturada **89** para ser utilizado como material de partida na reação de DA de Sharpless O intermediário diíno **108** foi utilizado como o composto modelo para avaliar a efetividade das reações, tendo em vista a economia do reagente iodopropino **113**.

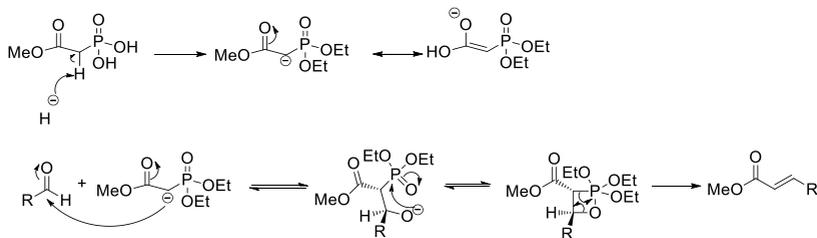
* Nesta fase, o trabalho estava sendo desenvolvido no MIT-EUA, conforme projeto aprovado CNPq-MIT 29/2012 (processo: 200168/2014-2).



Esquema 28. Retrossíntese do anel γ -butenolídeo via DA de Sharpless.

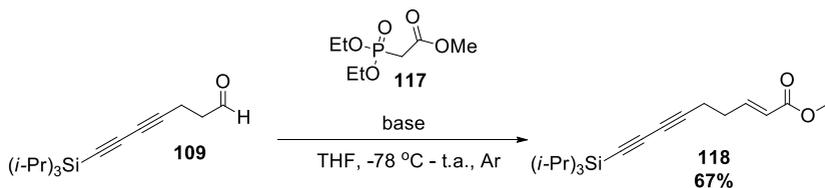
Dentre as possíveis reações de olefinação a partir de substâncias carboniladas, destacam-se as reações de Wittig e Horner-Wadsworth-Emmons (HWE). Ambas as reações apresentam a vantagem de total regioseletividade, visto que outras reações de olefinação podem levar ao rearranjo de duplas ligações pré-existentes.¹⁰³ No entanto, o grande diferencial está na estereosseletividade *E/Z* que pode ser alcançada com estas reações de olefinação de acordo com a escolha do reagente: fosforana (Wittig) ou éster de fosfonato (HWE).

Os ésteres de fosfonato são mais reativos que as fosforanas, além dos subprodutos da reação serem solúveis em água, sendo facilmente separados do produto desejado durante o tratamento da reação. O mecanismo da reação consiste na desprotonação do éster fosfonato pela base levando a formação de ânion do tipo enolato que reage com o aldeído para formar a dupla ligação (Esquema 29). A formação de duplas ligações com geometria *E* é termodinamicamente favorecido, embora seja possível direcionar a geometria de acordo com reagente fosfonato utilizado.¹⁰⁴



Esquema 29. Mecanismo proposto para a reação de olefinação de HWE

Avaliamos a eficiência de duas bases distintas (NaH e LiHMDS) para abstrair o próton do reagente **117**, o qual é um éster de fosfonato estabilizado que direciona para a formação de *E*-alcenos. Os melhores rendimentos foram alcançados quando gerada a base LiHMDS *in situ* a partir de *n*-BuLi (1,05 equiv.) e HMDS (1,10 equiv.) (Esquema 30).

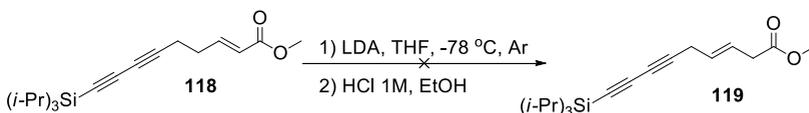


Esquema 30. Reação de olefinação HWE para obtenção do intermediário α,β-insaturado **118**.

A confirmação da ligação dupla formada em **118** foi possível devido à presença dos sinais no espectro de RMN de ¹H em 6,81 (m, 1H) e 6,13 ppm (d, 1H) com constante de acoplamento *J* = 15,9 Hz, valor este que assegura a seletividade para o produto *trans*. Adicionalmente, o simpleto em 2,28 ppm (3H) referente aos hidrogênios metilênicos da função éster evidenciou a formação do produto desejado **117**. No espectro de RMN de ¹³C foram observados 12 sinais, sendo que os sinais dos Csp² formados estão localizados em 145,6 e 132,9 ppm.

O material de partida requerido para a reação de DA de Sharpless é o intermediário éster β,γ-insaturado **119**, o qual pode ser obtido por meio do deslocamento da dupla ligação do intermediário éster α,β-insaturado **118** (Esquema 31). Esta reação pode ser realizada com o uso de fotoquímica ou bases fortes para a formação do enolato, seguido da protonação na posição α mediante controle cinético.

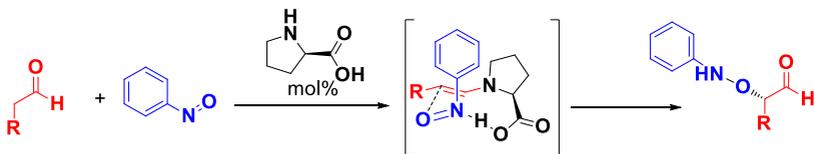
Baseado no trabalho de Gagné e colaboradores,¹⁰⁵ utilizamos a base diisopropilamido de lítio (LDA) gerada *in situ* a partir de *n*-BuLi (3 equiv.) e diisopropilamina (4 equiv.) para promover a formação do enolato. A mistura foi mantida em atmosfera inerte a -78 °C e sob agitação durante 30 minutos para garantir a formação de LDA. Após esse período, o éster α,β -insaturado **117** foi adicionado lentamente via cânula. Após 45 minutos da adição do éster α,β -insaturado **117**, a solução de HCl 1M foi adicionada para interromper a enolização e promover a protonação na posição α . Embora esta metodologia tenha sido repetida algumas vezes, não foi possível observar a formação do produto desejado **119**, recuperando-se o material de partida **118** no produto bruto reacional (Esquema 31).



Esquema 31. Reação de deconjugação para a obtenção do intermediário β,γ -insaturado **119**.

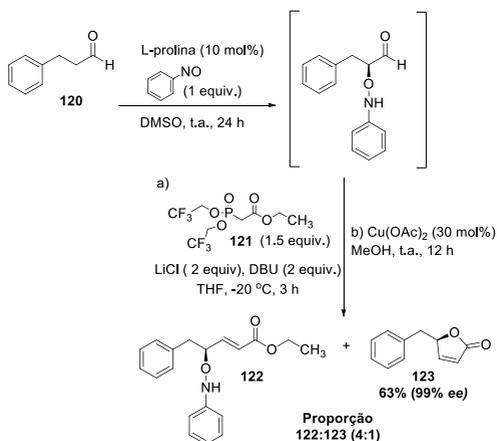
Devido a impossibilidade de sintetizar o intermediário β,γ -insaturado **119**, o qual é necessário para dar continuidade na estratégia de síntese do anel γ -butenolídeo via reação de DA de Sharpless, os esforços foram direcionados para a outra estratégia sintética prevista: a reação de α -oxiaminação assimétrica.

A formação da ligação C-O de maneira estereosseletiva na posição α de aldeídos e cetonas foi descrita pela primeira vez em 2003 por três grupos de pesquisas diferentes MacMillan (EUA),¹⁰⁶ Zhong (EUA)¹⁰⁷ e Hayashi (JP).¹⁰⁸ A reação consiste no uso do reagente nitrosobenzeno como fonte eletrofílica de oxigênio e o aminoácido prolina (enantiomericamente puro) como catalisador quiral (Esquema 32).¹⁰⁹⁻¹¹¹ Desde então, esta abordagem vem sendo amplamente aplicada na síntese de diversas substâncias de interesse biológico, como por exemplo do β -bloqueador (*S*)-propranolol.¹¹²



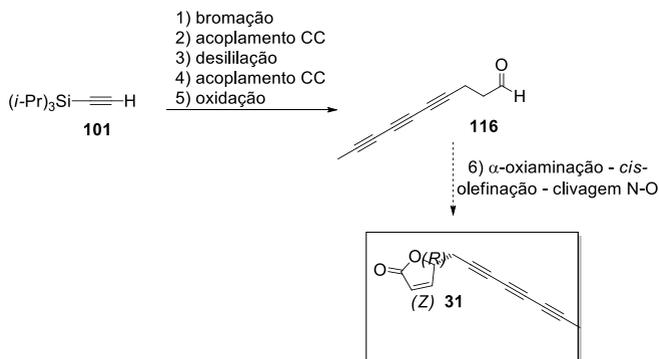
Esquema 32. Reação de α -oxiaminação assimétrica.

Devalankar e colaboradores¹¹³ descreveram a síntese de γ -butenolídeos com base na reação de α -oxiaminação assimétrica obtendo excelentes *ee* ($> 98\%$) e bons rendimentos com essa estratégia. O diferencial da abordagem utilizada pelos autores para a síntese da lactona foi a reação de olefinação HWE utilizando um fosfonato específico, também conhecido como reagente de Still-Gennari.¹¹⁴ Este reagente leva a formação predominante de olefinas com geometria (*Z*), em virtude do efeito retirador de elétrons dos grupos substituintes ligados ao fósforo. Uma vez obtido o éster insaturado *cis*, na sequência, o mesmo é submetido às condições reacionais para a clivagem da ligação N-O proporcionando a lactonização (Esquema 33). Embora os autores tenham descrito a formação da olefina (*E*), as proporções (*E:Z*) puderam ser controladas de acordo com o solvente e temperatura, além de serem facilmente separadas do produto desejado. Dessa forma, γ -butenolídeos foram sintetizados em etapa única a partir do aldeído, conforme exemplo abaixo:



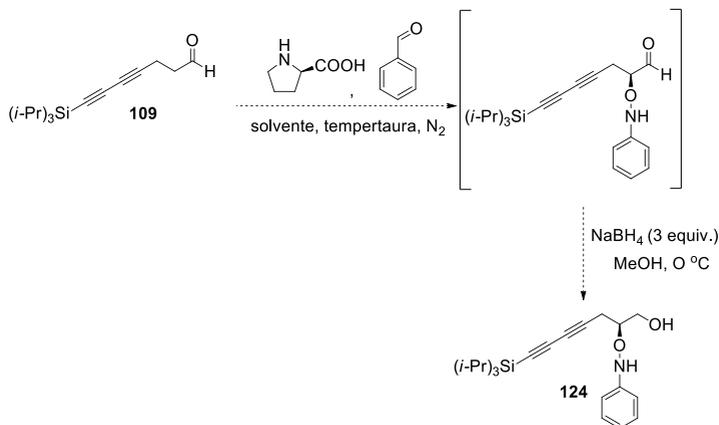
Esquema 33. Preparação de γ -butenolídeos baseado na reação de α -oxiaminação assimétrica, segundo Devalankar e colaboradores.¹¹³

Motivados pelos resultados descritos acima, vislumbramos a possibilidade de sintetizar (+)-vernoniína **31** em 6 etapas sintéticas direcionando a formação do centro estereogênico via reação de α -oxiaminação assimétrica (Esquema 34).



Esquema 34. Abordagem sintética para a síntese de (+)-vernoniína **31** por meio da reação de α -oxiaminação assimétrica. *CC: Cadiot-Chodkiewicz

Brown e colaboradores¹⁰⁶ relataram a impossibilidade de isolar o produto α -oxiamino aldeído, em virtude do mesmo encontrar-se na forma oligomérica em solução. Por este motivo, após a reação de α -oxiaminação ser concluída, o reagente NaBH_4 (3 equiv.) e excesso de MeOH são adicionados para reduzir o aldeído ao álcool primário e, então, isolar e caracterizar o produto assimétrico. Nesse sentido, aplicamos esta estratégia com o intuito de avaliar a reatividade apenas da reação de α -oxiaminação assimétrica utilizando o intermediário **109** como material de partida (Esquema 35).



Esquema 35. Reação de α -oxiamação assimétrica utilizando o intermediário **109** como material de partida.

Inicialmente, optamos em utilizar 40 mol% de L-prolina, em virtude de ser a quantidade máxima já avaliados nos trabalhos citados e DMSO como solvente à temperatura ambiente, visto que são relatados os maiores *ee* do produto com esta combinação. O reagente nitrosobenzeno (1 equiv.) foi preparado previamente ao uso, conforme Coleman e colaboradores.¹¹⁵ Este reagente apresenta instabilidade quando armazenado por longos períodos, uma vez que pode sofrer dimerização. Uma peculiaridade do nitrosobenzeno é a sua coloração, sendo que em solução apresenta-se verde quando monômero (ativo) e incolor na forma dímera (não reativo). Esta característica é utilizada para acompanhar o desenvolvimento da reação de α -oxiamação assimétrica, tendo como referencial para o término da reação o desaparecimento da coloração esverdeada, ou seja, consumo total do monômero reativo.

Em nosso experimento, cerca de 30 minutos foram necessários para a mudança gradativa da coloração até marrom escuro. O monitoramento da reação por CCD confirmou o consumo total de material de partida **109** e a presença de uma mancha apolar ($r_f = 0,9$; 10% AcOEt:hexano) com emissão de fluorescência sob radiação ultravioleta. No entanto, após a adição do agente redutor NaBH_4 foram observados pelo menos mais 3 produtos na CCD. Na tentativa de identificar os produtos formados, foi possível isolar a mancha fluorescente apolar descrita anteriormente, aparentemente pura pela análise da CCD e codificada como **APO1**. O espectro de RMN de ^1H de

APO1 apresentou apenas sinais na região de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos, assim como o espectro de RMN de ^{13}C mostrou apenas sinais de carbonos sp^2 (Figura 16).

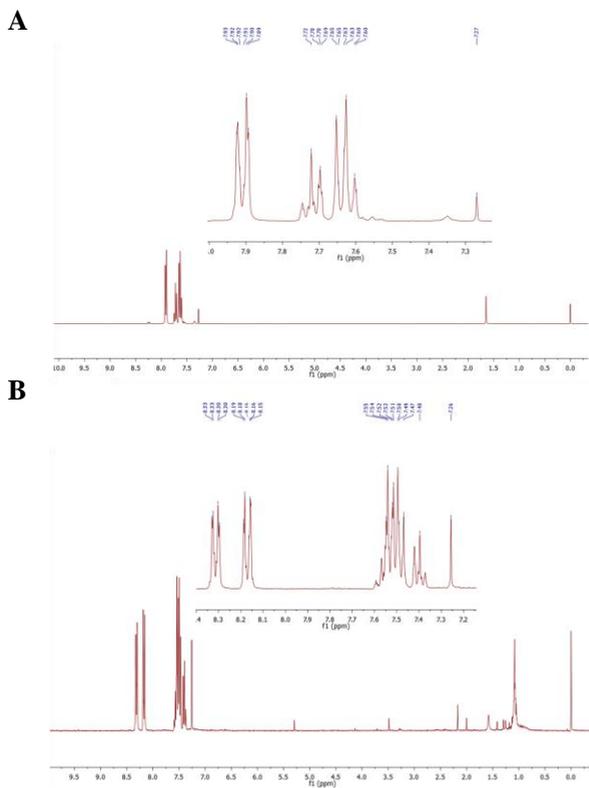


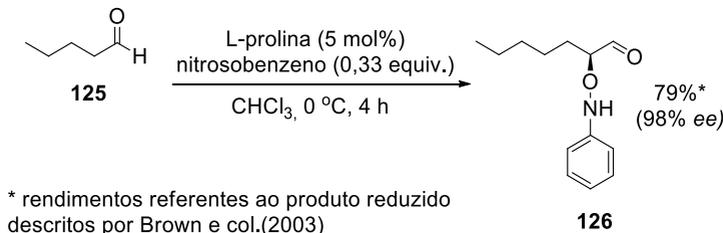
Figura 16. Comparação dos espectros RMN de ^1H (300 MHz): (A) produto isolado **APO1** e (B) reagente nitrosobenzeno.

A estrutura química do produto isolado **APO1** não foi elucidada apenas com as análises dos espectros de RMN, uma vez que não foi possível obter o espectro de massas em virtude da não ionização do composto. No entanto, pode-se inferir que o produto isolado não é o reagente nitrosobenzeno, devido à comparação dos descolamentos dos sinais no espectro de RMN de ^1H . A ausência dos sinais do poliacetileno nos espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C de **APO1** nos levaram a

suspeitar da ocorrência de reações paralelas com o reagente nitrosobenzeno.

Dessa forma, algumas alterações nas condições reacionais da reação de α -oxiaminação assimétrica foram avaliadas, como: solvente (CH_3CN e CHCl_3), adição do reagente nitrosobenzeno e início da reação a 0°C , tempo de reação até 24 horas após a mudança de coloração e aumento no número de equivalentes do aldeído (1,2 equiv.). Em todas as tentativas, após as análises dos respectivos espectros de RMN, não foi observada a formação do composto α -substituído **124**, sendo que o produto fluorescente anteriormente descrito **APO1**, tenha sido constatado na CCD já nos primeiros minutos da reação.

Diante dos resultados obtidos, dois possíveis fatores foram considerados como responsáveis pelo insucesso da reação: a qualidade do reagente nitrosobenzeno ou a natureza química do aldeído (material de partida). No intuito de solucionar estes questionamentos, iniciamos com a reprodução da metodologia descrita por Brown e colaboradores utilizando como material de partida o aldeído hexanal **125**, uma vez que este aldeído está presente no escopo dos compostos avaliados no artigo¹⁰⁴ (Esquema 36).

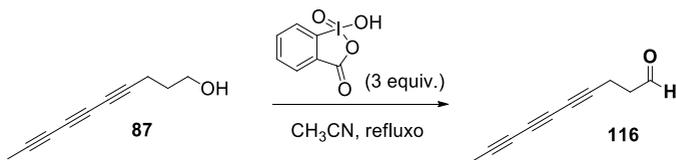


Esquema 36. Reprodução da metodologia de Brown e colaboradores com composto referência **125**.

O catalisador assimétrico L-prolina foi solubilizada em CHCl_3 e a solução foi resfriada em banho de gelo para a adição do reagente nitrosobenzeno. A esta mistura foi adicionado o aldeído hexanal **125** e a reação foi mantida em banho de gelo por 8 horas. Após 24 horas de reação ainda era possível observar o material de partida na CCD, assim como também a mancha apolar fluorescente **APO1** discutida anteriormente. Uma mistura complexa de 4 produtos foi obtida após a reação de redução. O espectro de RMN de ^1H da mistura de produtos não apresentou os sinais diagnósticos do produto desejado **126**. Dessa forma, constatamos que o reagente nitrosobenzeno poderia ser a causa da

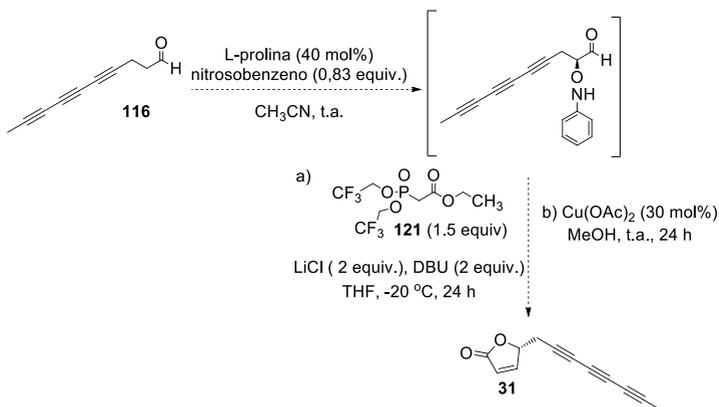
irreprodutibilidade da reação α -oxiaminação assimétrica e, então, optamos em adquiri-lo de fonte comercial (Sigma).

Com o reagente comercial nitrosobenzeno em mãos, e em decorrência do tempo reduzido para a conclusão deste trabalho, optamos em realizar todas as etapas sequenciais da metodologia de Devalankar e colaboradores com o intermediário final da rota planejada deca-4,6,8-triín-1-al **116**. Este foi obtido com ótimo rendimento (86%), a partir da reação de oxidação de **87** com o agente oxidante ácido *o*-iodoxibenzoico (IBX) em CH₃CN sob refluxo¹¹⁶ (Esquema 37).



Esquema 37. Preparação do intermediário aldeído **116**.

Com o objetivo de obter o produto final desejado (+)-(*R*)-vernoniína **31**, o intermediário aldeído **116** foi submetido à reação de α -oxiaminação assimétrica e todas as reações sequenciais, conforme apresentado no Esquema 38:



Esquema 38. Síntese do anel γ -butenolídeo via metodologia de Devalankar e colaboradores.

O tempo total envolvido nesta etapa foi de aproximadamente 72 horas, sendo 24 horas para cada reação (α -oxiaminação, *cis*-olefinação e clivagem N-O). Durante todo esse período a reação foi conduzida sob proteção da luz e sob atmosfera inerte (nitrogênio), tendo em vista a fotossensibilidade da cadeia poliacetilênica com metilacetileno terminal. Em função das reações sequenciais, perde-se um padrão referencial para o monitoramento do progresso da reação por CCD, fato que nos levou a estipular o tempo máximo de 24 horas para cada etapa.

Novamente não foi observado nenhum indício da formação do produto desejado (+)-vernoniína **31**, entretanto, foi constatada a formação do produto com estrutura relacionada ao reagente nitrosobenzeno e pelo menos 7 outros produtos. Na investigação destes produtos após a purificação e por meio da análise dos espectros de RMN de ^1H foi possível identificar a presença de sinais referentes ao reagente fosfonato, material de partida e uma estrutura com sinais referentes ao poliacetileno.

Especificamente para a estrutura relacionada ao poliacetileno, a análise mais aprofundada dos espectros de RMN de ^{13}C e 2D possibilitou propor a estrutura do poliacetileno acetal **127**, principalmente devido a presença do sinal no espectro de RMN de ^1H do sinal em 5,01 ppm, o qual está ligado ao carbono em 99,3 ppm. Observa-se ainda os sinais em 2,43 ppm e 1,88 ppm referentes aos hidrogênios metilênicos e o simpleto em 1,96 ppm correspondente à metila da cadeia poliacetilênica (Figura 17). A formação do acetal **127** pode ter ocorrido devido a presença de água no meio, levando assim a hidratação do aldeído.¹¹³

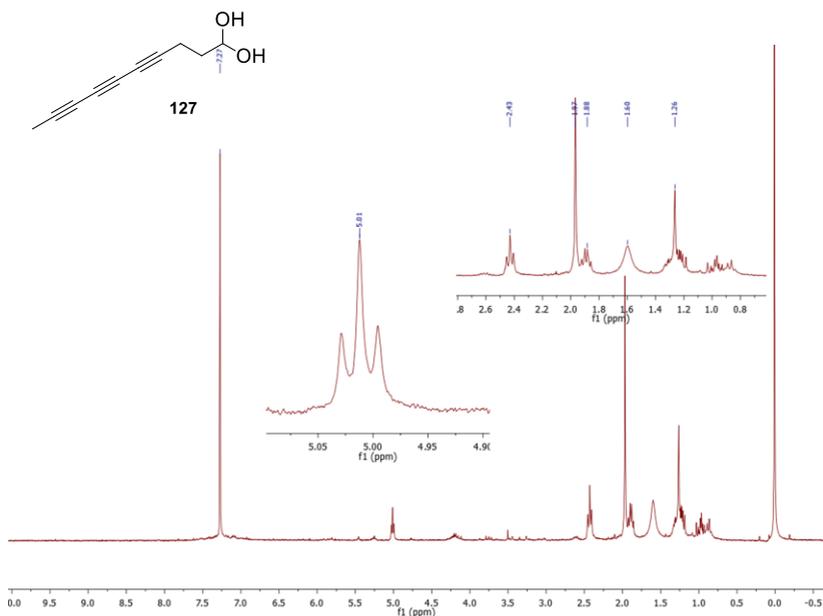
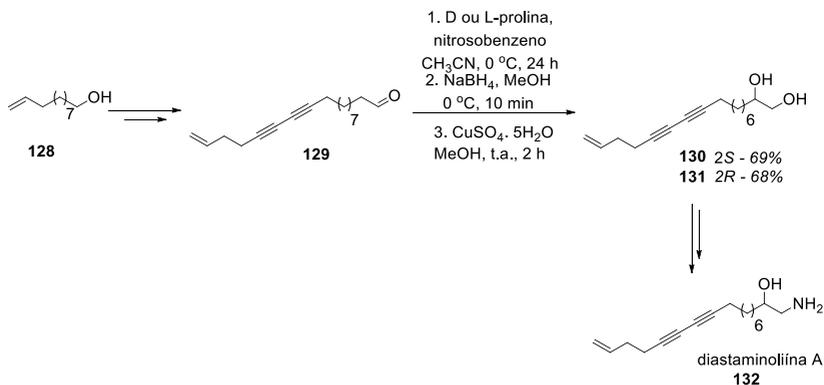


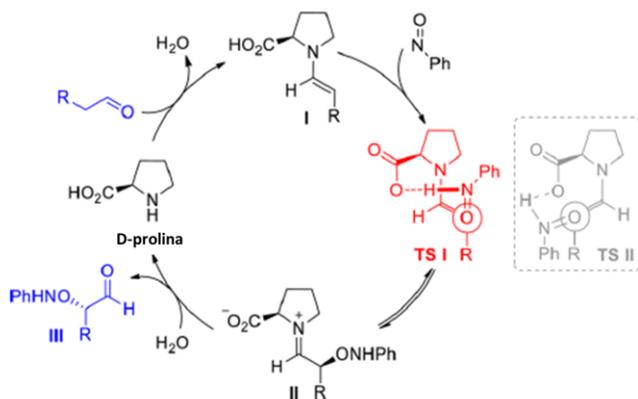
Figura 17. Subproduto **127** obtido na síntese do anel γ -butenolídeo.

De fato, em nenhuma das publicações que demonstraram a eficiência da reação de α -oxiaminação assimétrica continham em seu escopo compostos com alguma similaridade estrutural ao poliacetileno (+)-vernoniína **31** (insaturações conjugadas em cadeia alifática). Recentemente, Sun e colaboradores¹¹⁷ descreveram a síntese enantiosseletiva do poliacetileno de origem marinha diastaminoliína **A 132** e seu enantiômero baseado em uma estratégia sintética linear de 15 etapas obtendo 10 % de rendimento global. A reação de α -oxiaminação assimétrica foi empregada para obter o centro estereogênico. Cabe desatacar que o aldeído **129**, material de partida para a reação de α -oxiaminação assimétrica, era o constituído por uma cadeia saturada de 9 carbonos entre a carbonila aldeídica e as triplas ligações (Esquema 39).



Esquema 39. Síntese enantiosseletiva do poliácetileno natural diastaminolína A baseada na reação de α -oxiaminação assimétrica.¹¹⁸

O mecanismo proposto por Córdova e colaboradores¹¹⁸ para a reação de α -oxiaminação assimétrica catalisada por prolina envolve, inicialmente, a reação do aldeído com a prolina, levando a formação da enamina **I**. A enamina poderá reagir com nitrosobenzeno levando a formação do aduto imínio **II**, após o estado de transição **TS II**. Com a hidrólise do imínio, o aldeído assimétrico **III** é liberado, assim como a regeneração do catalizador prolina (Esquema 40).



Esquema 40. Mecanismo de α -oxiaminação assimétrica proposto por Córdova e colaboradores (adaptado¹¹⁸).

Baseado nos resultados obtidos com a reação de α -oxiaminação assimétrica visando à síntese total de (+)-vernoniína **31**, em consonância com o provável mecanismo da reação exposto acima, supomos que a possível explicação para o insucesso na obtenção do centro estereogênico esteja na incapacidade de formar a enamina (etapa inicial do mecanismo). O aldeído precisa sofrer a enolização para reagir com a prolina e formar a enamina e, possivelmente em virtude da deslocalização de elétrons da cadeia poliacetilênica esta etapa esteja comprometida. No entanto, um estudo mais aprofundado com outros aldeídos de diferentes tamanhos de cadeia alifática saturada ($n > 2$) precisa ser realizado para atestar esta evidência.

2.5. Conclusões e Perspectivas

2.5.1. Conclusões

- Embora não tenha sido alcançado o objetivo principal deste capítulo, foi possível preparar o intermediário chave aldeído 4,6,8-decatriín-1-al **116** maneira eficiente em 5 etapas com rendimento global de 54%, a partir do reagente (triisopropilsilil)acetileno. Este intermediário estava envolvido nas duas rotas sintéticas planejadas para a síntese total de (+)-vernoniína **31**.

- Uma nova rota sintética com menor número etapas (4), melhor rendimento global (63%) e reagentes mais estáveis e acessíveis foi desenvolvida para o produto natural deca-4,6,8-triín-1-ol **87**, encontrado em cultura de fungos *Psathyrella scobinaceae* e em plantas *Lactuca plumieri*.

- Uma nova metodologia para a síntese de 1-iodopropino a partir de 1-bromo-1-propeno foi desenvolvida em paralelo durante o desenvolvimento deste trabalho. O reagente 1-iodopropino **113** foi utilizado no acoplamento Cadiot-Chodkiewicz na síntese da cadeia poliacetilênica de (+)-vernoniína **31**, especificamente para inserção do metilacetileno na porção final da cadeia.

- Duas abordagens sintéticas visando à síntese enantiosseletiva do anel γ -butenolídeo de (+)-vernoniína **31** foram avaliadas. A primeira baseava-se na reação de di-hidroxilação de Sharpless, a qual tornou-se inviável devido à impossibilidade de obtenção do intermediário éster β,γ -insaturado. Na segunda abordagem a reação de α -oxiaminação assimétrica foi avaliada para a formação do centro assimétrico e consequente formação do anel, no entanto, sem sucesso.

2.5.2. *Perspectivas*

- Estudo mais detalhado da reação de α -oxiaminação assimétrica utilizando outros materiais de partida (aldeídos), a fim de identificar se é a natureza química do poliacetileno **116**, ou seja, o número de carbonos saturados, que está impedindo a formação do centro estereogênico;
- Planejamento de uma estratégia sintética convergente, na qual o anel γ -butenolídeo possa ser preparado de forma independente da cadeia poliacetilênica;
- Alguns poliacetilenos intermediários da síntese de (+)-vernoniína **31**, como por exemplo, o PN deca-4,6,8-triín-1-ol **87**, foram encaminhados para a avaliação do potencial citotóxico em linhagem celular de melanoma murino (B16F10). Os ensaios estão em andamento no Grupo de Estudos de Interação entre Micro e Macromoléculas (GEIMM) desta Universidade sob supervisão da Profa. Dra. Tânia B. C. Pasa.

2.6. Parte Experimental

2.6.1. *Considerações gerais*

Todas as reações para síntese do poliacetileno foram conduzidas em atmosfera inerte de argônio ou nitrogênio em vidraria previamente seca por 24 h em estufa a ~ 100 °C ou flambadas sob vácuo. Os solventes anidros utilizados nas reações foram purificados por filtração sob pressão em alumina ativada ou conforme procedimento específico para cada tipo de solvente.¹¹⁹ Alguns reagentes foram convenientemente purificados conforme métodos usuais descritos na literatura.¹¹⁹

Pontos de fusão foram determinados utilizando o equipamento Fisher-Johns disponível no laboratório. Espectros de infravermelho foram obtidos em um equipamento Perkin Elmer 2000 FT-IR, enquanto que os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C foram obtidos em espectrômetros Varian Mercury (300 MHz), Varian Inova (500 MHz), Bruker Fourier (300 MHz) e Bruker Avance-400 (400 MHz). Apenas para os compostos inéditos na literatura foram adquiridos o espectro de massa de alta resolução (HRMS) mensurados em um equipamento Bruker Daltonics APEXII 3 tesla com transformada de Fourier e espectrômetro de massas Xevo Qtof MS (Waters).

As cromatografias em camada delgada foram utilizadas placas de sílica gel 60 F-254 0.25 mm em suporte de vidro ou alumínio, enquanto que as colunas cromatográficas de purificação utilizaram sílica gel 60 (230-400 mesh). A revelação dos compostos nas cromatoplasas analíticas foi efetuada pela exposição das placas a lâmpada ultravioleta (UV), nos comprimentos de onda curto (254 nm) e longo (366 nm); e pela nebulização com o agente cromogênico anisaldeído sulfúrico e solução de KMnO_4 , seguido de aquecimento das placas por alguns minutos a altas temperaturas.

As baixas temperaturas foram alcançadas mediante a utilização de banhos de gelo com água ($\sim 0^\circ\text{C}$), gelo e solução saturada de NaCl ($\sim 5^\circ\text{C}$) e CO_2 sólido (gelo seco) com acetona ($\sim 78^\circ\text{C}$).

2.6.2. Procedimentos experimentais

4-Fenilbut-3-in-1-ol (94)^{81,82}



A um balão de 25 mL com duas bocas equipado com agitação magnética e sob atmosfera de argônio foi adicionado à temperatura ambiente iodobenzeno (1,1 mL; 2,0 g; 9,8 mmol; 1 equiv.) e 5 mL de piperidina, seguidos de CuI (0,186 g; 0,98 mmol; 0,1 equiv.) e $\text{Pd}(\text{Ph}_3)_4$ (0,566 g; 0,49 mmol; 0,05 equiv.). A mistura foi agitada por 5 minutos antes da adição da solução de 3-butin-1-ol (1,48 mL; 1,37 g; 19,6 mmol; 2 equiv.) em 3 mL de piperidina via seringa. A mistura reacional tornou-se gradativamente viscosa com coloração marrom escuro e após 15 minutos de agitação foram adicionados 15 mL de solução saturada de NH_4OH . A fase aquosa foi extraída com Et_2O (3 x 30 mL) e as fases orgânicas foram combinadas e lavadas com 50 mL de solução saturada de NaCl , seca com MgSO_4 , filtrada e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotatório a 25°C . A purificação por coluna cromatográfica de sílica gel utilizando como eluente a mistura de

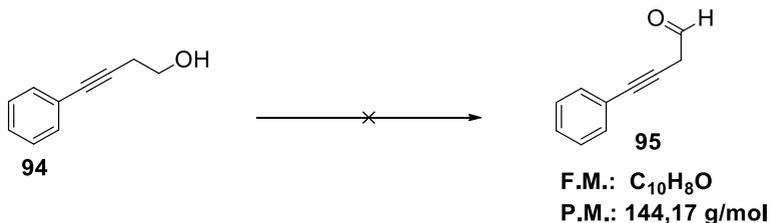
solventes hexano: acetato de etila (60:40, v/v) forneceu 0,902 g (62%) de **94** como um óleo amarelado.

R_f: 0,4 [hexano:acetato de etila (60:40, v/v)]

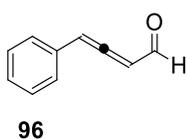
RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7,39 (m, 2H), 7,26 (m, 3H), 3,78 (t, *J* = 6,35 Hz, 2 H), 2,66 (t, *J* = 6.35 Hz, 2 H);

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 131,9; 128,5; 128,1; 123,6; 86,8; 82,5; 61,3; 23,9

Dados espectroscópicos estão de acordo com o reportado da literatura.⁸²

4-Fenilbut-3-in-1-ol (95)⁸⁶

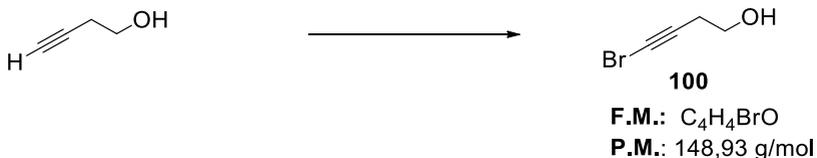
A um balão de 25 mL com duas bocas equipado com agitação magnética e atmosfera argônio foram adicionados o álcool **94** (0,123 g; 0,84 mmol, 1 equiv.) e 5 mL de CH₂Cl₂. A solução foi resfriada a 0°C e após 5 minutos de agitação foi adicionado o reagente periodinana de Dess Martin (DMP) (0,464 g; 0,109 mmol; 1,3 equiv.). Após 1 hora de agitação a mistura reacional foi resfriada a -78°C e foram adicionados 5 mL de *n*-pentano para a precipitação dos subprodutos do DMP. A suspensão de coloração branca obtida foi filtrada em um funil de placa sinterizada contendo sílica gel e eluída com 150 mL da mistura de solventes Et₂O:*n*-pentano (1:4,v/v). O filtrado foi coletado em 5 frações em balões mantidos em banho de gelo seco com acetona (-78 °C). As frações foram concentradas em evaporador rotatório (25 °C) a um volume de 5 mL e diluídas com benzeno para destilação azeotrópica em evaporador rotatório a 50 °C para a retirada do ácido acético (subproduto proveniente do DMP). Após a análise das frações foi possível constatar formação do produto aleno **96** na forma de óleo amarelado (0,060 g, 49 %).

**4-Fenilbut-2,3-dien-1-al (96)****F.M.:** C₁₀H₈O**P.M.:** 144,17 g/mol**R_f:** 0,7 [Et₂O:*n*-pentano (10:90, v/v)]

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 9,61 (d, *J* = 7,08 Hz, 1H), 7,36- 7,32 (m, H aromáticos), 6,78 (d, *J* = 6,7 Hz, 1H), 6,07 (dd, *J* = 6,7; 7,08 Hz 1 H).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 236,4; 191,5, 129,7, 129,2, 127,9, 99,9, 99,4.

Como alternativa ao processo de filtração em funil de placa sinterizada, um sistema em atmosfera inerte de argônio também foi avaliado. A suspensão resultante da reação foi transferida via cânula para uma coluna “*jacket*” resfriada com gelo seco e acetona (-78 °C) utilizando sílica gel como fase estacionária e eluída com 150 mL da mistura de solventes Et₂O:pentano (1:4,v/v) sob pressão positiva de argônio. As frações foram coletas como descrito anteriormente. A formação do produto aleno **96** também foi observada.

4-Bromobut-3-in-1-ol (100) ⁸⁷

A um balão de 50 mL com duas bocas equipado com agitação magnética e sob atmosfera de argônio foi adicionado à temperatura ambiente 3-butin-1-ol (0,54 mL; 0,500 g; 7,14 mmol; 1 equiv.) e 15 mL de acetona, seguidos de NBS (previamente recristalizado) (1,40 g; 7,80 mmol; 1,1 equiv.) e AgNO₃ (0,060 g; 0,36 mmol; 0,05 equiv.). O balão foi envolto em papel alumínio para proteção da luz e após 1 hora de agitação foram adicionados 30 mL de *n*-pentano e a mistura foi transferida para um funil de separação juntamente com 30 mL de água. A fase aquosa foi extraída com a mistura Et₂O: *n*-pentano (1:1; v/v) (3 x 25 mL) e as fases orgânicas foram combinadas e lavadas com 50 mL de solução saturada de NaCl, seca com MgSO₄, filtrada e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotatório a 50 °C. A purificação por coluna cromatográfica de sílica gel utilizando como eluente a mistura de solventes hexano: acetato de etila (70:30, v/v) forneceu 0,575 g (54%) de **100** como um óleo de coloração marrom.

R_f: 0,6 [hexano: acetato de etila (70:30, v/v)]

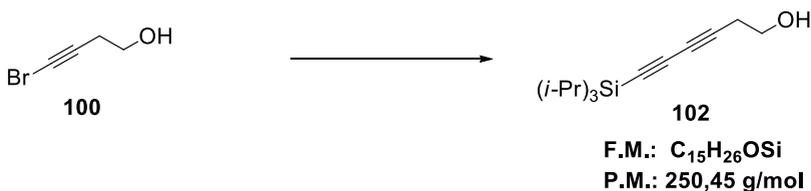
IV (filme): 3254, 2946, 2218, 1419, 1051 cm⁻¹

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 3,73 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H), 2,48 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H), 2,06 (sl, 1 H)

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 60,7; 40,0; 23,9

Dados espectroscópicos estão de acordo com o reportado da literatura. ⁸⁸

6-(Triisopropilsilil)hexa-3,5-diín-1-ol (**102**)⁸⁸



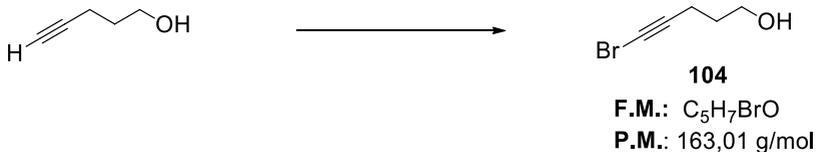
A um balão de 50 mL com duas bocas equipado com agitação magnética e sob atmosfera de argônio foi adicionado à temperatura ambiente 4-bromobut-3-in-1-ol **100** (0,540 g; 3,64 mmol; 1 equiv.) e 20 mL de THF, seguidos do reagente (triisopropilsilil)acetileno (TIPS) (0,98 mL; 0,797 g; 4,37 mmol; 1,2 equiv.). A mistura reacional foi agitada e PdCl₂(Ph₃)₂ (0,051 g; 0,073 mmol; 0,02 equiv.) e CuI (0,014 g; 0,073 mmol; 0,02 equiv.) foram adicionados em uma única porção à mistura e, na sequência, DIPA (1,07 mL; 0,773 g; 2,1 equiv.) foi adicionado lentamente durante 2 minutos. A mistura reacional mudou gradativamente coloração amarelada para esverdeado e marrom e após 5 horas de agitação foram adicionados 10 mL de solução saturada de NH₄Cl e 15 mL de Et₂O. A fase aquosa foi extraída com a mistura de solventes Et₂O: *n*-pentano (1:1, v/v) (3 x 20 mL) e as fases orgânicas foram combinadas e lavadas com 50 mL de solução saturada de NaCl, seca com MgSO₄, filtrada e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotatório a 50 °C. A purificação por coluna cromatográfica de sílica gel utilizando como eluente a mistura solventes hexano:acetato de etila (70:30, v/v) forneceu 0,552 g (61%) de **102** como um óleo amarelado.

R_f: 0,4 [hexano:acetato de etila (60:40, v/v)];

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 3,77 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H), 2,57 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H), 1,80 (sl, 1 H), 1,08 (s, 21 H)

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 89,8; 80,4; 77,8; 66,31; 61,3; 30,7; 18,5; 15,8; 11,3

Dados espectroscópicos estão de acordo com o reportado da literatura.⁸⁸

5-Bromopent-4-in-1-ol (104)^{87, 74}

Método A: A um balão de 50 mL com duas bocas equipado com agitação magnética e sob atmosfera de argônio foi adicionado à temperatura ambiente o reagente comercial 4-pent-1-ol (0,55 mL; 0,500 g; 5,9 mmol; 1 equiv.) e 20 mL de acetona, seguidos de NBS (previamente recristalizado) (1,16 g; 6,50 mmol; 1,1 equiv.) e AgNO₃ (0,051 g; 0,30 mmol; 0,05 equiv.). O balão foi envolto em papel alumínio para proteção da luz e após 1 hora de agitação foram adicionados 30 mL de pentano e a mistura foi transferida para um funil de separação juntamente com 30 mL de água. A fase aquosa foi extraída com a mistura Et₂O: *n*-pentano (1:1; v/v) (3 x 25 mL) e as fases orgânicas foram combinadas e lavadas com 50 mL de solução saturada de NaCl, seca com MgSO₄, filtrada e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotatório a 50 °C. A purificação por coluna cromatográfica de sílica gel utilizando como eluente a mistura de solventes hexano:acetato de etila (70:30, v/v) forneceu 0,317 g (33%) de **104** como um óleo de coloração marrom.

Método B: A um balão de 50 mL com três bocas equipado com termômetro interno, barra magnética e sob atmosfera de argônio foram adicionados KOH (0,947 g; 14,86 mmol; 2,5 equiv.; 88% pureza) e 15 mL de água destilada. A solução foi resfriada em banho de gelo com solução saturada de NaCl (-5 °C a 0 °C) para a adição lenta de Br₂ (0,30 mL; 0,950 g; 5,94 mmol; 1 equiv.) durante 2 minutos. A mistura reacional adquiriu coloração amarela e após 10 minutos de agitação, 4-pent-1-ol (0,55 mL; 0,500 g; 5,94 mmol; 1 equiv.) foi adicionado e a reação foi mantida a temperatura abaixo de 0 °C. Durante o progresso da reação foi possível observar a mudança de coloração até incolor. Após 90 min foi evidenciado o término da reação por CCD sendo adicionados 20 mL de solução saturada de NaCl. A fase aquosa foi extraída com a Et₂O (4 x 30 mL) e as fases orgânicas foram combinadas e lavadas com 50 mL de solução saturada de NaCl, seca com MgSO₄, filtrada e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotatório a 50 °C. A purificação por coluna cromatográfica de sílica gel

utilizando como eluente a mistura de solventes hexano: acetato de etila (70:30, v/v) forneceu 0,484 g (50 %) de **104** na forma de um óleo com coloração marrom.

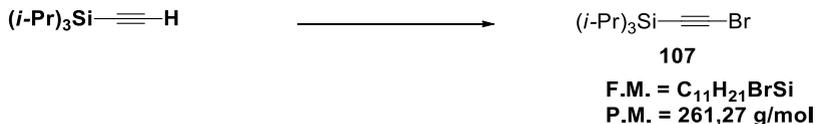
Rf: 0,4 [hexano:acetato de etila (70:30, v/v)];

IV (filme): 3348, 2946, 2287, 2218, 1419, 1184, 1051, 845 cm^{-1}

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 3,73 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H), 2,34 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H), 1,82 (sl, 1 H), 1,76 (m, 2H)

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 79,5; 61,3; 38,2; 30,9; 16,1

Dados espectroscópicos estão de acordo com o reportado da literatura.⁷⁴

Bromoetnil(triisopropilsilano) (107)⁸⁷

A um balão de 50 mL com uma boca equipado com agitação magnética e sob atmosfera inerte foi adicionado à temperatura ambiente triisopropilsilil(acetileno) (1,22 mL; 1 g; 5,48 mmol; 1 equiv.) e 15 mL de acetona, seguidos de NBS (previamente recristalizado) (1,20 g; 6,58 mmol; 1,2 equiv.) e AgNO₃ (0,046 g; 0,274 mmol; 0,05 equiv.). O balão foi envolto em papel alumínio para proteção da luz e após 1 hora de agitação o solvente foi evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotatório a 50 °C e o resíduo remanescente foi ressuspensionado em hexano e filtrado em papel filtro para a retirada do sólido branco (succinimida) e novamente o solvente foi evaporado. A purificação por coluna cromatográfica de sílica gel utilizando como eluente hexano (100%) forneceu 1,31 g (91 %) de **107** como um óleo incolor.

Rf : 0,96 [hexano:acetato de etila (90:10, v/v)];

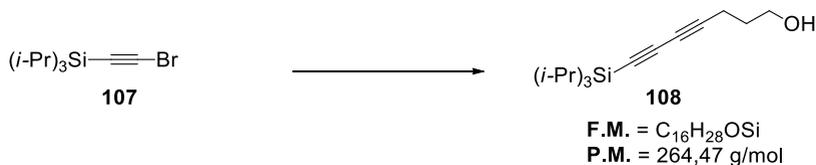
IV (filme):ν (cm⁻¹): 2944, 2866, 2361, 2121, 1463, 883, 804, 677.

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 1,10 – 1,08 (m)

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 83,4; 61,7; 18,4; 11,2

Dados espectroscópicos estão de acordo com o reportado da literatura.¹²⁰

7-(Triisopropilsilil)hept-4,6-diín-1-ol (**108**)⁷⁴



A um balão de 50 mL equipado com barra magnética e sob atmosfera inerte foram adicionados 10 mL da solução aquosa 30% *n*-BuNH₂ e CuCl (0,017 g; 0,48 mmol; 0,1 equiv.). A solução de coloração azul foi resfriada a 0 °C para a adição de NH₂OH.HCl (0,123 g; 1,78 mmol; 1 equiv.) que mudou a coloração da mistura para incolor instantaneamente. O alcino terminal adquirido comercialmente 4-pentin-1-ol (0,17 mL; 0,149 g; 1,78 mmol; 1 equiv.) em solução de CH₂Cl₂:MeOH (1:1, v/v) (3 mL) foi adicionado gota a gota via cânula, seguido da adição gota a gota via cânula de **107** (0,700 g; 2,68 mmol; 1,5 equiv.) [as cânulas fora lavadas com a mistura de solventes CH₂Cl₂:MeOH (1:1, v/v) (3x 1 mL, cada)]. Após 1 hora de agitação em banho de gelo, 10 mL de solução aquosa 10 % de NaCN ou solução aquosa saturada de NH₄Cl foram adicionados e a fase aquosa foi extraída Et₂O (3 x 40 mL). As fases orgânicas foram combinadas e lavadas com 50 mL de solução saturada de NaCl, seca com MgSO₄, filtrada e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotatório a 50 °C. A purificação por coluna cromatográfica de sílica gel utilizando como eluente a mistura de solventes hexano:acetato de etila (80:20, v/v) forneceu 0,453 g (96%) de **108** como um óleo de coloração amarelado.

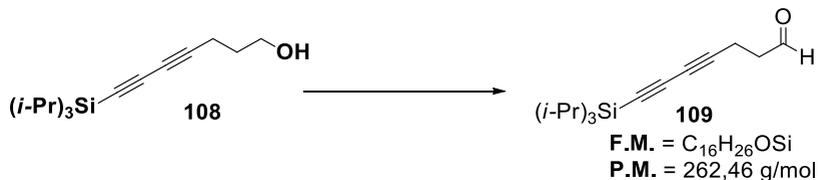
Rf: 0,4 [hexano:acetato de etila (80:20, v/v)]

IV (filme):v (cm⁻¹) 3322, 2944, 2866, 2361, 2224, 2104, 1463, 1183, 1060, 883, 677.

RMN de ¹H (500 MHz; CDCl₃): δ 3,76 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H); 2,43 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H); 1,80 (m, 2H); 1,60 (brs, 1H); 1,09 (d, *J* = 1,3 Hz, 21H).

RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 89,8; 80,4; 77,8; 66,3; 61,3; 30,7; 18,5; 15,7; 11,2

ESI-MS *m/z* (modo positivo): [M+H]⁺: calculado para C₁₆H₂₈OSi 265,1982; obtido 265,1977

7-(Triisopropilsilil)hepta-4,6-diín-1-al (**109**)⁸³

A um balão de 25 mL com duas bocas equipado com barra magnética, funil de adição e sob atmosfera inerte foram adicionados o álcool **108** (0,100 g; 0,38 mmol, 1 equiv.) e 5 mL de CH_2Cl_2 . A solução foi resfriada a 0°C e após 5 minutos de agitação foi adicionado o reagente DMP (0,209 g; 0,49 mmol; 1,3 equiv.). Após 1 hora de agitação a temperatura ambiente a mistura reacional foi filtrada em um funil de placa sinterizada contendo sílica gel e eluído com 100 mL da mistura de solventes Et_2O :*n*-pentano (1:4, v/v). O filtrado foi destilado azeotropicamente com benzeno (3 x 3 mL) em evaporador rotatório a 50°C para a retirada do ácido acético (sub-produto proveniente do DMP). A purificação por coluna cromatográfica de sílica gel utilizando como eluente a mistura de solventes hexano:acetato de etila (80:20, v/v) forneceu 0,090 g (90%) de **109** como um óleo de coloração amarelada.

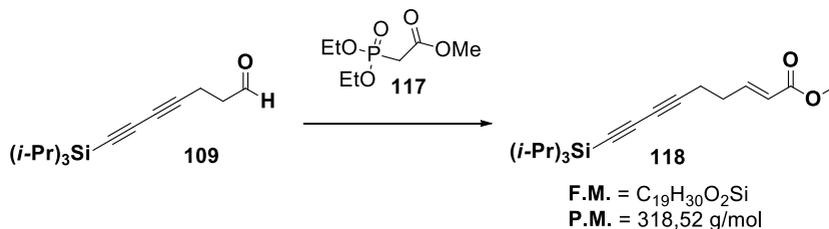
R_f: 0,33 [hexano:acetato de etila (70:30, v/v)]

IV (filme): ν (cm^{-1}) 3402, 2766, 2261, 2210, 1998, 1520, 1088, 1025, 824.

RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3): δ 9,80 (t, $J = 0,84$ Hz, 1H); 2,73 (m, 2H); 2,61 (m, 2H); 1,07 (s, 21H).

RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 199,4; 89,5; 81,1; 76,1; 66,7; 41,9; 18,5; 12,4; 11,2

ESI-MS m/z (modo positivo): $[\text{M}+\text{Na}]^+$: calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{OSi}$ 285,1645; obtido 285,1655

(E)-Metil-9-(triisopropilsilil)nona-2-en-6,8-diinoato (118)¹²¹

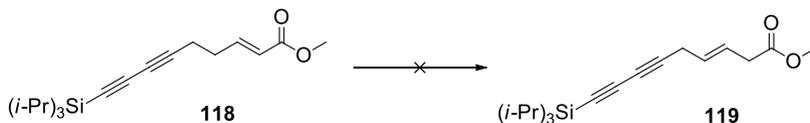
A um balão de 10 ml com duas bocas equipado com barra magnética e sob atmosfera de argônio foram adicionados 1 mL de THF e HMDS previamente destilado (0,88 μL ; 0,068 g; ,42 mmol; 1,10 equiv.). A solução foi resfriada a 0°C e a solução de 2,6 M de *n*-BuLi em hexano (0,15 mL; 0,399 mmol; 1,05 equiv.) foi adicionado gota a gota via cânula durante 4 minutos, seguido de resfriamento a -78 °C para a adição do reagente comercial dietilfosfanoacetato de etila **117** (0,1 mL; 0,109 g; 0,49 mmol, 1,3 equiv.) gota a gota. A mistura reacional foi agitada por 5 minutos antes da adição da solução do aldeído **109** (0,100 g; 0,38 mmol; 1 equiv.) em THF (4 mL) ser adicionado gota a gota via cânula a -78 °C. Após 1 hora de agitação a temperatura ambiente, 5 mL de solução saturada de NH_4Cl foram adicionados e a fase aquosa foi extraída Et_2O (3 x 20 mL). As fases orgânicas foram combinadas e lavadas com 40 mL de solução saturada de NaCl, seca com MgSO_4 , filtrada e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotatório a 50 °C. A purificação por coluna cromatográfica de sílica gel utilizando uma mistura de hexano: acetato de etila (90:10, v/v) como eluente forneceu 0,081 g (67%) de **118** como um óleo de coloração alaranjada.

R_f: 0,4[hexano:acetato de etila (90:10, v/v)]

RMN de ¹H (400 MHz; CDCl_3): δ 6,80 (m, 1H), 6,14 (d, J = 15,8 Hz, 1H), 2,48 (m, 4H), 2,28 (s, 3H), 1,09 (s, 21H)

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl_3) δ 199,1; 145,5; 132,9; 90,2; 81,9; 77,1; 67,6; 31,5; 27,8; 19,2; 19,0; 11,9

ESI-MS *m/z* (modo positivo): $[\text{M}+\text{H}]^+$: calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_2\text{Si}$ 319,2088; obtido 319,2096

(E)-Metil-9-(triisopropilsilil)nona-3-en-6,8-diinoato (119)¹⁰⁵

A um balão de 10 ml com duas bocas equipado com barra magnética, em banho termostatzado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob atmosfera de argônio contendo diisopropilamida (0,12 mL; 0,88 mmol; 4 equiv.) foi adicionado lentamente 2,56 M de *n*-BuLi em hexano (0,20 mL; 0,53 mmol; 3 equiv.) e a mistura foi agitada por 30 minutos. Na sequência o balão foi transferido para um banho de gelo seco e acetona (-78°C) para a adição de 1 mL de THF, seguido do do éster α,β -insaturado **118** (0,070g, 0,22 mmol, 1 equiv.) solubilizado em 3 mL de THF. A transferência foi feita via cânula durante 10 min (as cânulas foram lavadas com THF (2 x 1 mL)). Após 45 min em agitação a temperatura de -78°C , 3 mL de solução HCl 1M foi adicionado e retirada do resfriamento. Após atingir a temperatura ambiente, 5 mL de solução saturada de NH_4Cl foram adicionados e a fase aquosa foi extraída Et_2O (3 x 20 mL). As fases orgânicas foram combinadas e lavadas com 40 mL de solução saturada de NaCl, seca com MgSO_4 , filtrada e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotatório a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após purificação por coluna cromatográfica de sílica e análise dos produtos isolados por RMN de ^1H não foi possível constatar a formação do produto desejado **119**.

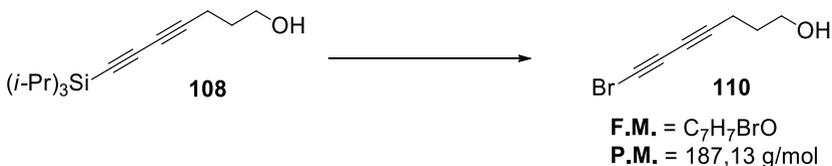
Hepta-4,6-diino-1-ol (111)¹²²

A um balão de 25 mL com duas bocas equipado com barra magnética e sob atmosfera inerte foram adicionados o intermediário diino **108** (0,540 g; 2,94 mmol; 1 equiv.) e 10 mL de THF e solução de TBAF 1M em THF (2,45 mL; 2,45 mmol; 1,2 equiv.) a 0°C. Após 5 minutos de agitação o resfriamento foi retirado e a mistura racional foi mantida a temperatura ambiente por 2 horas, seguido da adição de 10 mL de solução saturada de NH_4Cl . A fase aquosa foi extraída CH_2Cl_2 (3 x 30 mL) e as fases orgânicas foram combinadas e lavadas com 50 mL de solução saturada de NaCl , seca com MgSO_4 , filtrada e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotatório a 25 °C. A purificação por coluna cromatográfica de sílica gel utilizando como eluente a mistura de solventes hexano:acetato de etila (80:20, v/v) como eluente forneceu 0,180 g (88 %) de **111** como um óleo de coloração marrom escuro.

Rf: 0,40 [hexano:acetato de etila (70:30, v/v)]

RMN de ^1H (400 MHz; CDCl_3): δ 3,75 (t, J = 6,1 Hz, 2H), 2,40 (td, J = 6,97 Hz, J = 1,2 Hz, 2H), 1,97 (t, J = 1,2 Hz, 1H), 1,79 (m, 2H), 1,64 (sl, 1H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 78,2; 68,9; 65,8; 65,4; 61,9; 31,3; 16,2
 Dados espectroscópicos estão de acordo com o reportado da literatura.¹²²

7-Bromohepta-4,6-diín-1-ol (110) ⁸⁸

A um balão de 10 mL com duas bocas equipado com barra magnética e sob atmosfera de argônio foram adicionados o intermediário diíno **108** (0,250 mg; 0,95 mmol; 1 equiv.) e 5 mL de CH_3CN , seguidos de AgF (0,144 g; 1,14 mmol; 1,2 equiv.) e NBS (0,203 g; 1,14 mmol; 1,2 equiv.). O balão foi envolto com papel alumínio para proteção da luz e após 19 h de agitação a temperatura ambiente, a mistura reacional foi filtrada em um funil de placa sinterizado contendo Celite® e eluído com 20 mL de Et_2O . O solvente do filtrado foi evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotatório a 50 °C e a purificação por coluna cromatográfica de sílica gel utilizando como eluente a mistura de hexano: acetato de etila (70:30, v/v) como eluente forneceu 0,050 g (28%) de **110** como um óleo de coloração marrom.

Rf: 0,44 [hexano:acetato de etila (70:30, v/v)]

RMN de ^1H (400 MHz; CDCl_3): δ 3,74 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H), 2,39 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H), 1,90 (sl, 1H), 1,78 (m, 2H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 76,4; 65,8; 65,5; 61,2; 37,3; 30,7; 15,6.

Dados espectroscópicos estão de acordo com o reportado da literatura.¹²³

Deca-4,6,8-triim-1-ol (**87**)

Rota I:



A um balão de 10 mL com duas bocas equipado com barra magnética, resfriado a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ e sob atmosfera de argônio foram adicionados a mistura de isômeros 1-bromo-1-propeno (35 μL ; 0,41 mmol; 1,55 equiv.) e solução de 2,6 M de *n*-BuLi em hexano (0,15 mL, 0,38 mmol; 1,42 equiv.). Após 2 h de agitação a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, água destilada foi adicionada (10 μL ; 0,59 mmol; 2,2 equiv) e a temperatura elevada a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ para a adição de CuCl (0,0026 g; 0,027 mmol, 0,1 equiv.), NH₂OH.HCl (0,019 g; 0,27 mmol; 1 equiv.) e 2 mL de solução aquosa 30 % *n*-BuNH₂. A mistura reacional foi submetida a agitação a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o intermediário haloalcino **108** (0,050 g; 0,27 mmol; 1 equiv.) em solução de CH₂Cl₂:MeOH (1,1, v/v) (1 mL) foi adicionado lentamente via cânula e volume completado com 1 mL de CH₂Cl₂:MeOH (1,1, v/v). Após 90 minutos de agitação, 5 mL de solução aquosa 10 % de NaCN foi adicionado e a fase aquosa foi extraída com Et₂O (3 x 15 mL). As fases orgânicas foram combinadas e lavadas com 30 mL de solução saturada de NaCl, seca com MgSO₄, filtrada e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotatório a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. A purificação por coluna cromatográfica de sílica gel utilizando uma mistura de hexano: acetato de etila (70:30, v/v) como eluente forneceu 0,004 g (10%) de **87** como um sólido de coloração amarelada.

Rota II:



A um balão de 25 mL equipado com barra magnética e sob atmosfera inerte foram adicionados 3 mL da solução aquosa 30% *n*-BuNH₂ e CuCl

(0,028 g; 0,277 mmol; 0,1 equiv.). A solução de coloração azul foi resfriada a 0 °C para a adição de NH₂OH.HCl (0,192 g; 2,77 mmol; 1 equiv.) que mudou a coloração da mistura para incolor instantaneamente. O intermediário alcino terminal **111** (0,300 g; 2,77 mmol; 1 equiv.) em solução de CH₂Cl₂:MeOH (1:1, v/v) (3 mL) foi adicionado gota a gota, seguido da adição gota a gota da solução CH₂Cl₂:MeOH (1:1, v/v) (3 mL) de iodopropino **112** (0,922 g; 5,55 mmol; 2 equiv.) via cânula [as cânulas fora lavadas com a mistura de solventes CH₂Cl₂:MeOH (1:1, v/v) (3x 1 mL, cada)]. Após 3 horas de agitação a 0°C, 10 mL de solução aquosa saturada de NH₄Cl foram adicionados e a fase aquosa foi extraída CH₂Cl₂ (3 x 40 mL) e as fases orgânicas foram combinadas e lavadas com 50 mL de solução saturada de NaCl, seca com MgSO₄, filtrada e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotatório a 50 °C. A purificação por coluna cromatográfica de sílica gel utilizando como eluente a mistura de solventes hexano: acetato de etila (60:40, v/v) como eluente forneceu 0,332 g (82%) de **87** como um sólido de coloração amarelado.

Rf: 0,38 [hexano:acetato de etila (70:30, v/v)]

p.f.: 72 – 73 °C (lit.: 72 °C)⁹²

IV (filme): 3291, 2925, 2361, 2220, 1653, 1062, 667 cm⁻¹

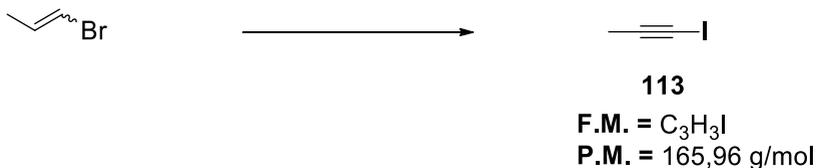
RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃): δ 3,73 (t, *J* = 5,9 Hz, 2H), 2,42 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H), 1,95 (s, 3H), 1,78 (q, *J* = 6,2 Hz, 2H)

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 78,0; 75,0; 66,1; 64,9; 61,3; 60,7; 59,5; 30,7; 15,9; 4,5

ESI-MS *m/z* (modo positivo): *z* [M+H]⁺: calculado para C₁₀H₁₀O 147,0804; obtido 147,0803

Dados espectroscópicos estão de acordo com o reportado da literatura.⁹¹

1-Iodoprop-1-íno (**113**)⁹¹



A um balão de 1 L com três bocas equipado com barra magnética, funil de adição, termômetro interno e sob atmosfera de argônio foram adicionados o reagente comercial 1-bromo-1-propeno (mistura de isômeros) (10,6 ml; 15,0 g; 124 mmol; 1,0 equiv.), 150 mL de THF e a solução foi resfriada a -78 °C. A mistura reacional foi submetida a agitação, enquanto a solução 2,6 M de *n*-BuLi em hexano (93,7 mL, 248 mmol, 2,0 equiv) foi adicionada lentamente através do funil de adição e após 2 horas de agitação a -75°C (temperatura interna), 80 mL de solução de I₂ (34,7 g, 137 mmol, 1,1 equiv.) em THF foram adicionados via cânula e a mistura reacional foi agitada por 10 minutos a -78 °C. A temperatura foi elevada para 0°C e após 30 min de agitação a 0°C, 125 mL de solução aquosa saturada de Na₂S₂O₃ em água deionizada foi adicionada via funil de adição. A fase aquosa foi extraída com pentano (3 x 50 mL). As fases orgânicas foram combinadas e lavadas com 100 mL de solução saturada de NaCl, seca com MgSO₄, filtrada e o solvente foi removido por meio de destilação fracionada com temperatura do banho a 95 °C até o volume de 50 mL. A solução remanescente foi destilada novamente utilizando o triângulo de Perkin (temperatura banho 50 °C e 250 mmHg) e o balão receptor resfriado a -78 °C. Um nova destilação fracionada foi realizada para retirada de solventes remanescentes com temperatura de banho a 50 °C e 250 mmHg, seguido do aumento da temperatura para 90 °C. Uma fração de 15 mL (p.e 20-35 °C, 100 mmHg) e a fração principal contendo 10 mL do produto desejado **113** (p.e. 35-57 °C, 100 mmHg) foram coletadas. 1-iodopropino **113** foi obtido como um óleo incolor com 76% (15,54 g) de rendimento.

Rf : 0,50 [hexano:acetato de etila (90:10, v/v)]

IV (filme): 2965, 2980, 2934, 229347, 1403, 1012,667,3 cm⁻¹

RMN de ¹H (500 MHz; CDCl₃): δ 2,01 (s)

RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 90,0; 6,0; -8,3

ESI-MS *m/z* (modo positivo): [M+H]⁺: calculado para C₃H₃I 166,9352; obtido 166,9350

Deca-4,6,8-triín-1-al (116)¹¹⁶

A um balão de 25 mL com duas bocas equipado com barra magnética e condensador de refluxo foram adicionados o álcool **87** (0,200 g; 1,37 mmol, 1 equiv.), o reagente IBX (1,19 g; 4,10 mmol; 3 equiv.) e 10 mL de CH₃CN. A mistura reacional foi submetida à agitação a temperatura de refluxo (~80 °C). Após 2 horas sob refluxo, a mistura reacional foi filtrada em um funil de placa sinterizada contendo sílica gel e eluído com 100 mL da mistura de solventes hexano: acetato de etila (50:50, v/v). O filtrado foi concentrado em evaporador rotatório (20 mmHg, 25 °C) e purificado por coluna cromatográfica de sílica gel utilizando como eluente a mistura de solventes hexano:acetato de etila (80:20, v/v) como eluente e forneceu 0,170 g (86%) de **116** como um sólido amorfo de coloração branca.

Rf: 0,75 [hexano:acetato de etila (80:20, v/v)]

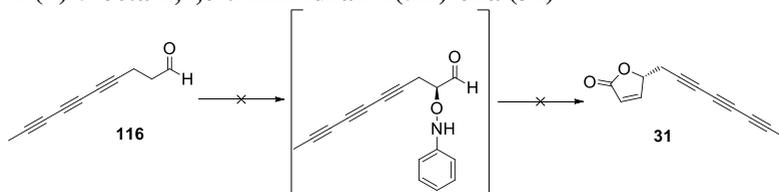
p.f.: 74 – 75 °C

IV (filme): 2361, 2340. 1718, 1559, 668

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 9.79 (s, 1H), 2.74 (dd, *J*=8,03; 7,03 Hz, 2H), , 2.61 (dd, *J*= 8,03; 7,03 Hz, 2H), 1.96 (s, 3H).

RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 199,5; 76,6; 75,7; 66,7; 64,9; 61,4; 59,5; 42,1; 12,7; 4,7

***R*-(+)-5-octa-2,4,6-triínil-furan-2(5H)-ona (**31**)**



A um balão de 25 mL equipado com barra magnética e sob atmosfera de nitrogênio foram adicionados o reagente comercial nitrosobenzeno (0,030 g, 0,289 mmol, 1 equiv.), o aldeído **116** (0,050 g; 0,347 mmol; 1,2 equiv.) e 5 mL de CH₃CN. A solução foi submetida à agitação e L-prolina (0,013 g; 40mol%) foi adicionada. A mistura foi mantida a temperatura ambiente, sendo evidenciada a mudança de coloração (verde-marrom) nos primeiros 30 minutos da reação. Após 24 horas de reação, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotatório a temperatura ambiente levando a obtenção de um óleo de cor marrom escuro, o qual foi diluído em 3 mL de THF seco e mantido em atmosfera inerte para a segunda etapa da reação (*cis*-olefinação).

Em outro balão de 25 mL com duas bocas equipado com barra magnética e sob atmosfera de nitrogênio foram adicionados LiCl (0,029 g; 0,694 mmol; 2 equiv.), etil[bis(2,2,2-trifluoroetoxi)fosfonil]acetato (0,172 g; 0,520 mmol; 1,5 equiv.) e 5 mL de THF seco. Esta mistura foi agitada por 15 minutos a temperatura ambiente, seguido do resfriamento a 0°C para a adição de DBU (0,105 g; 0,694 mmol; 2 equiv.). Após 30 minutos sob agitação, a temperatura foi resfriada para -78 °C para a adição da solução contendo o produto da primeira etapa da reação. A mistura foi mantida a -78 °C por 2 horas, seguindo o restante de 22 horas a temperatura ambiente. Na sequência, Cu(OAc)₂ (0,019 g, 30 mol%) e MeOH em excesso foram adicionados e a mistura foi agitada por 24 horas a temperatura ambiente. Ao final, 10 mL de solução aquosa saturada de NH₄Cl foram adicionados e a fase aquosa foi extraída com AcOEt (3 x 30 mL). As fases orgânicas foram combinadas e lavadas com 50 mL de solução saturada de NaCl, seca com MgSO₄, filtrada e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotatório a 50 °C. Na análise por CCD, o produto reacional bruto apresentou-se como uma mistura complexa de pelo menos 7 produtos. Não foi possível identificar o produto desejado **31** após a purificação por coluna cromatográfica de sílica gel utilizando como eluente a mistura de solventes hexano: acetato de etila (80:20, v/v).

CAPÍTULO III

**Semissíntese de derivados do triterpeno
lupeol e avaliação da atividade antileishmania
e antitripanossoma**

CAPÍTULO III - Semissíntese de derivados do triterpeno lupeol e avaliação da atividade antileishmania e antitripanossoma

3.1. Apresentação do capítulo

Neste capítulo serão apresentados os dados referentes ao isolamento cromatográfico do produto natural lupeol **8** das folhas e flores de *Vernonia scorpioides* e as reações químicas de modificação molecular no esqueleto triterpênico. Os derivados semissintéticos obtidos foram avaliados com relação ao potencial antiparasitário frente às amastigotas dos parasitos *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*, cujos ensaios biológicos foram desenvolvidos pela Dra. Milene H.de Moraes no Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Santa Catarina sob supervisão do Prof. Dr. Mario Steindel.

3.2. Introdução

Lup-20(29)-en-3 β -ol (**8**), também conhecido como fagarasterol ou monoginol, é um triterpeno com esqueleto do tipo lupano, estruturalmente composto por quatro ciclos de seis membros (A,B,C,D), um ciclo de cinco membro (E), apenas uma posição oxigenada (C3) e a presença da dupla ligação exocíclica no grupamento isopropilideno. (Figura 18).¹²⁴

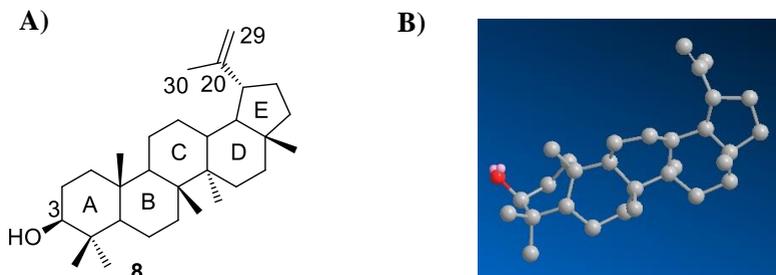
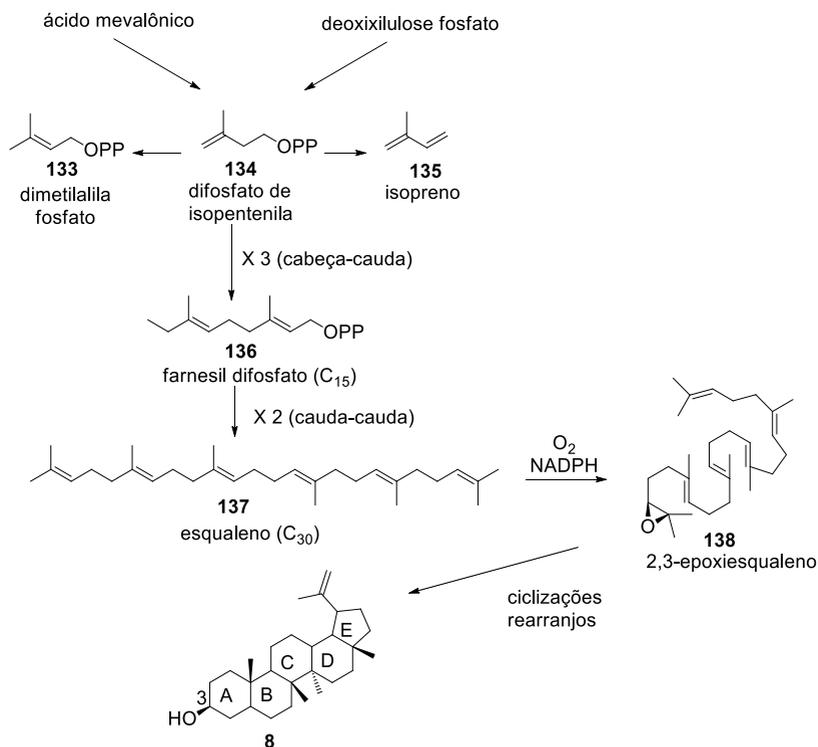


Figura 18. Estrutura química de lupeol **8**: A) representação planar B) representação tridimensional na conformação com energia minimizada. (Software Chem3D, versão 12.0.2.1076, CambridgeSoft)

De maneira geral, a biossíntese dos triterpenos provém do esqualeno **137**, o triterpeno mais simples de cadeia linear, que por sua

vez é formado por duas moléculas de farnesil difosfato (C_{15}) **136** sintetizadas a partir de 3 unidades isoprênicas **135** (Esquema 41). Após a formação do 2,3-epoxiesqualeno **138**, este sofre uma série de ciclizações e rearranjos em virtude da abertura do epóxido, fato que leva a migração de metila ou hidreto mediados por enzimas podendo formar os diferentes núcleos de triterpenos já descritos na literatura.¹²⁵



Esquema 41. Biossíntese de triterpenos.

Assim como em *V. scorpioides*, lupeol **8** está presente em diversas fontes naturais, muitas delas comestíveis. Estima-se que em nossa dieta alimentar cerca de 250 mg de triterpenos são consumidos diariamente e este valor pode chegar a 400 mg/kg/dia em países do Mediterrâneo.¹²⁶ A abundância deve-se ao fato de que lupeol está presente em diversos vegetais e frutas, como, por exemplo, tomate, manga, azeitona, uva, soja e cenoura. A ingestão diária de lupeol é um indicativo da baixa ou inexistente toxicidade desta substância, fato que

foi comprovado em estudos *in vivo* que doses administradas *v.o* de 2 g/kg em ratos e camundongos não causaram efeitos adversos e nem mortalidade nos animais após 76 horas da administração.¹²⁷ A ausência de efeitos tóxicos também pode ser observada quando lupeol foi aplicado topicamente na dose de 80 mg/kg, 3 vezes ao dia por 28 dias em camundongos.¹²⁸

A possível aplicação terapêutica do lupeol **8** é amplamente investigada e destacam-se os prováveis benefícios do mesmo para o tratamento do câncer, artrite, diabetes, infecções microbianas, doenças cardiovasculares, diabetes, inflamações, sendo que para muitas destas patologias já foram estudados os alvos moleculares nos quais o lupeol atua.¹²⁹ Alguns estudos avançaram para a fase clínica, como por exemplo, a avaliação da atividade antitumoral em cachorros com melanoma metastático. Neste estudo lupeol foi administrado nas doses de 0,75 a 1,5 mg em injeções intratumorais em 7 animais doentes e apresentou eficácia em 6 casos.¹³⁰ Adicionalmente, a prática de quimioprevenção com o uso contínuo de lupeol é relatada para algumas doenças, especialmente o câncer.¹³¹

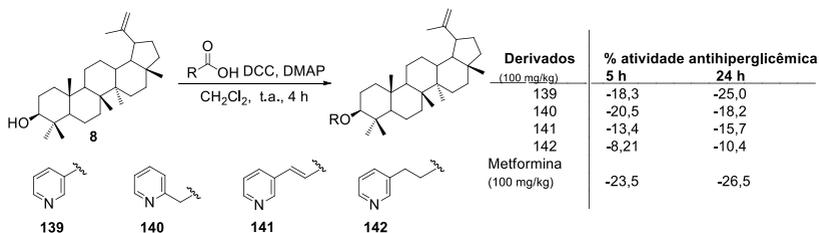
Poucos estudos relatam a atividade antiparasitária do lupeol. Os resultados mais promissores foram observados para a inibição de *Plasmodium falciparum* com uma CI_{50} de 1,5 $\mu\text{g/mL}$ por meio do bloqueio da invasão do parasito nos eritrócitos.^{132,133} Porém, o possível mecanismo de ação identificado neste estudo revelou a alteração da forma da membrana da célula hospedeira, fato que inviabilizou o avanço dos estudos.¹³⁴ Com relação aos protozoários tripanossonomatídeos (*Leishmania* sp. e *Trypanosoma* sp), os dados disponíveis reportam uma atividade fraca ($CI_{50} = 100 \mu\text{g/mL}$).¹³⁵

Considerando a complexidade estrutural do triterpeno lupeol **8**, levou-se certo tempo para que a síntese total do mesmo pudesse ser concluída. Os estudos visando a síntese total de lupeol iniciaram-se 1971 com o grupo de Gilbert Stork. No entanto, após 37 etapas sintéticas, e sem contar com avanços da catálise assimétrica, o grupo de Stork obteve lupeol na forma epimérica com 2% de rendimento global.¹³⁶ Somente em 2009, o grupo de Elias J. Corey propôs uma síntese enantiosseletiva eficiente em 14 etapas com 5% de rendimento global, a partir de acetato de 2,3-epoxifarnesil.¹³⁷

3.2.1. Derivados semissintéticos do lupeol

Em virtude da abundância do lupeol **8** em fontes naturais e da complexa síntese total do mesmo, a estratégia semissintética mostra-se vantajosa, uma vez que utiliza a arquitetura molecular enantiomericamente pura do lupeol para obter análogos com características físico-química e biológica melhoradas. Baseada nesta estratégia, a grande maioria dos trabalhos de semissíntese de derivados do lupeol **8** concentra-se na interconversão do grupo funcional (FGI, do inglês *Functional Group Interconversion*) na posição C3, principalmente com reações de esterificação, oxidação e *O*-glicosilação.

Papi Reddy e colaboradores sintetizaram uma série de derivados ésteres de lupeol com atividade anti-hiperglicêmica e antidislipidêmica, a partir da reação de ácidos carboxílicos com lupeol na presença de *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) e 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (Esquema 42).¹³⁸ Dentre os derivados sintetizados o derivado nicotínico **139** foi o mais potente anti-hiperglicêmico, seguido do derivado **140**, em modelo de estudo de ratos diabéticos induzidos com estreptomicina.

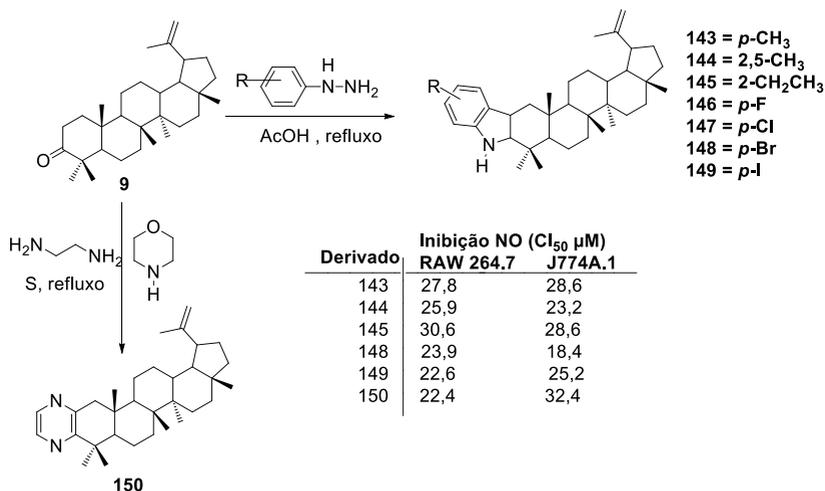


Esquema 42. Semissíntese de ésteres de lupeol em C3 com atividade antihiperglicêmica e antidislipidêmica.

Os autores observaram que o aumento da extensão da cadeia alquila dos derivados ésteres entre o grupamento carbonila e o anel piridina levava a diminuição da atividade (**141-142**). O derivado **139**, na dose de 50 mg/kg, também apresentou os melhores percentuais nos parâmetros avaliados para atividade antidislipidêmica, proporcionando a diminuição de 40% nos níveis de triglicerídeos, 30% glicerol e 24% colesterol, inclusive elevando em 5% os níveis plasmáticos de colesterol HDL.¹³⁸

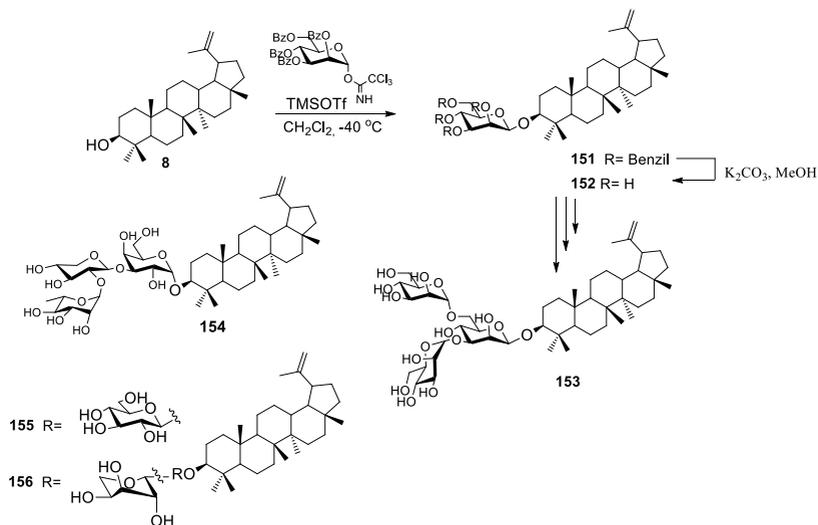
Ainda utilizando a hidroxila em C3 como ponto reativo da molécula, Bhandari e colaboradores¹³⁹ descreveram a semissíntese de derivados indólicos **143-149** e pirazínicos **150** a partir de lupenona **9**,

conforme rota sintética apresentada abaixo (Esquema 43). Os derivados heterocíclicos (**143-145**, **148** e **149**) apresentaram atividade anti-inflamatória significativa pela inibição da liberação de óxido nítrico (NO) em células de macrófagos murinos (RAW 264.7 e J774A.1), com valores de CI_{50} abaixo do inibidor seletivo de sintase de NO (L-NAME : RAW 264.7 = 69,21 μ M e J774A.1 = 73,18 μ M). No entanto, foram inibidores moderados das citocinas pró-inflamatórias como o fato de necrose tumoral alfa (TNF- α) (29-42%) e IL-1 β (10-22%).



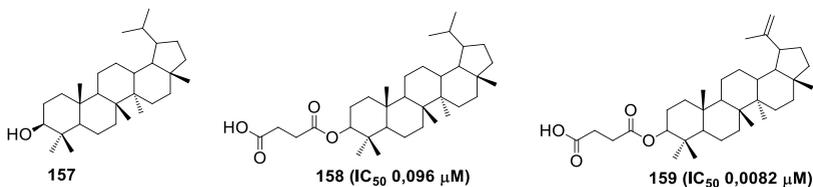
Esquema 43. Semissíntese de derivados indólicos e pirazínicos de lupeol com atividade anti-inflamatória.

A síntese de derivados glicosídeos de lupeol, exclusivamente na posição C3, também é descrita na literatura, principalmente via reação com imidatos glicosídicos (Esquema 44). O número de unidades monossacarídicas parece influenciar na atividade citotóxica *in vitro*, visto que o derivado monossacarídico D-manosídeo **152** apresentou valores de CI_{50} entre 26,2 e 45,1 μ M dentre as 7 linhagens tumorais avaliadas,¹⁴⁰ assim como o derivado *O*-glicosídico **155** foi citotóxico em linhagem celular A549 com CI_{50} de 14 μ M e o derivado D-arabinose **156** com CI de 28 μ M na mesma linhagem.¹⁴¹ No entanto os derivados trissacarídeos de lupeol **153** e **154** não foram citotóxicos.^{140,142}



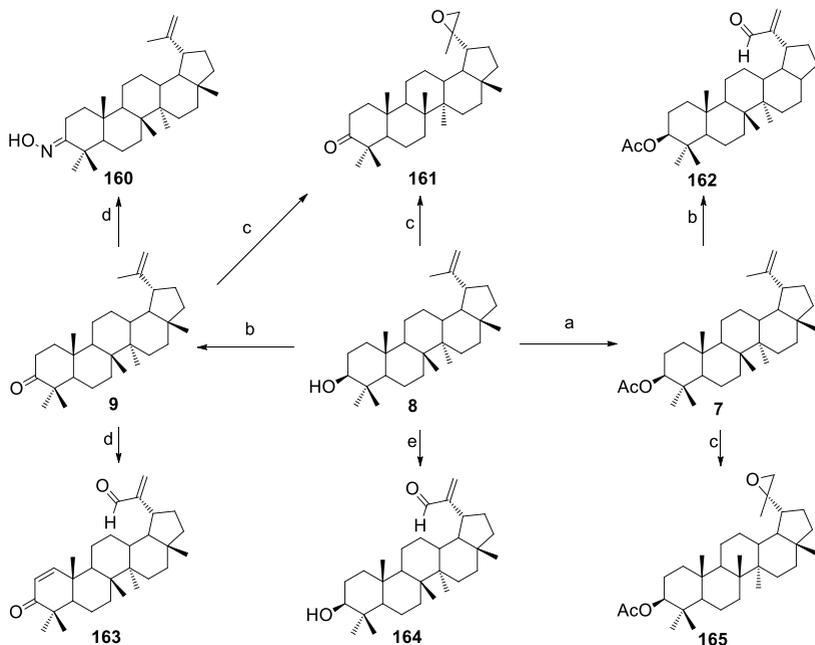
Esquema 44. Semissíntese de glicosídeos de lupeol.

Além das modificações estruturais em C3 no esqueleto de lupeol **8** apresentadas anteriormente, são poucos os estudos que avaliam a influência da dupla ligação exocíclica do esqueleto triterpênico na bioatividade dessa substância, assim como também derivados semissintéticos com variações no grupamento isopropilideno. Nesta perspectiva, Li e colaboradores¹⁴³ avaliaram a atividade citotóxica de ésteres dicarboxílicos substituídos em C3 de lupeol, sendo que os mesmos derivados foram sintetizados também com produto natural lupanol **157**, o qual não possui a insaturação exocíclica. O derivados de lupeol **8** mostram-se mais citotóxicos que os derivados de lupanol **157**, indicando que a dupla terminal em C20 e C30 é importante para atividade citotóxica em linhagens de células tumorais A549, LAC, HepG2 e HeLa (Esquema 45).¹⁴³



Esquema 45. Influência da dupla ligação exocíclica na atividade citotóxica de ésteres de lupeol.

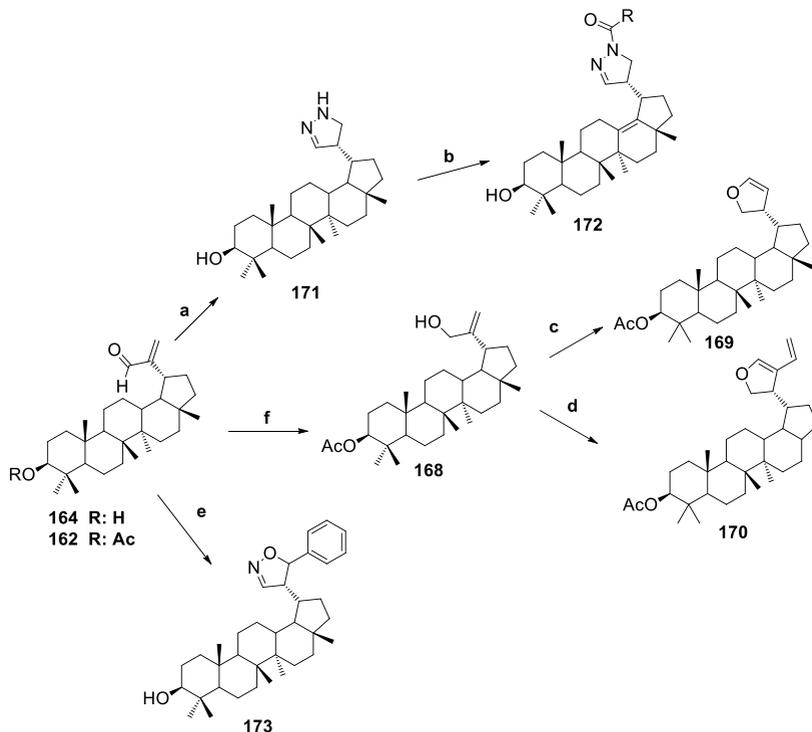
A dupla ligação de lupeol também foi importante para a inibição da fusão celular do vírus HIV, uma vez que na concentração 5 μM o derivado epóxido **165** foi menos ativo que o análogo com a dupla ligação exocíclica **7**. Os autores observaram que a introdução de uma função carbonila na posição α a dupla ligação, por meio da oxidação com SeO₂, resultou em derivados mais ativos (**163 e 164**). A presença do grupamento acetila em C3 é essencial para a atividade antiviral, visto que o lupeol **8** foi inativo, assim como a lupanona **9** (Esquema 46).¹⁴⁴



Reagentes e condições: a) Ac_2O , piridina, DMAP; b) Reagente de Jones; c) mCPBA, NaHCO_3 , CH_2Cl_2 ; d) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, NaOAc , $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$; e) SeO_2 , EtOH

Esquema 46. Derivados de lupeol com modificações no grupo isopropilideno com atividade antiviral.

Em outra abordagem, desta vez com a síntese de derivados do lupeol **8** contendo heterociclos no grupamento isopropilideno, Khan e colaboradores¹⁴⁵ descreveram a preparação de derivados com potencial antidiabético por meio da estimulação da receptação de glicose em células musculares esqueléticas L6 (Esquema 47). Os derivados heterocíclicos foram sintetizados por diferentes metodologias a partir dos derivados aldeídos **162/164**. No geral, as estruturas heterociclos no grupamento isopropilideno não contribuíram para a atividade desejada, enquanto que o intermediário aldeído **164** ($\text{CI}_{50} = 4,2 \mu\text{M}$) foi mais ativo que o fármaco rosiglitazona ($\text{CI}_{50} = 4,8 \mu\text{M}$). A relação estrutura-atividade dos derivados demonstrou que a presença de carbonilas α,β -insaturadas na posição alílica a dupla ligação são essenciais para a atividade.



Reagentes e condições: a) $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10 % KOH, EtOH, t.a., 4 h; b) DMAP, RCOOH, CH_2Cl_2 , t.a., 6 - 8 h; c) Reagente de Grubbs II, CH_2Cl_2 , $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$, 35 °C, 48 h; d) haleto de bromo, CH_2Cl_2 , K_2CO_3 , 0 °C - t.a., 2 h; e) FeCl_3 , álcool benzílico, DCE, 70 °C, 2 h; $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, EtOH, t.a., 1 h; NaBH_4 , EtOH, 0 °C, 2 h

Esquema 47. Semissíntese de heterocíclicos de lupeol no grupamento isopropilideno.

Mediante a revisão dos trabalhos descritos na literatura referentes à obtenção de derivados semissintéticos do lupeol **8**, foi possível constatar que a posição C3 é a mais explorada, embora com poucas variações nas abordagens sintéticas. Já modificações moleculares em outras posições da estrutura, como por exemplo, no grupamento isopropilideno, são menos frequentes, porém observa-se um aumento nas publicações nos últimos anos, principalmente em transformações com heterocícos. Não foram encontrados trabalhos de semissíntese de derivados de lupeol **8** visando a obtenção de compostos com atividade antiparasitária, especialmente frente aos parasitos tripanossomatídeos *Leishmania* sp. e *Trypanosoma cruzi*.

3.2.2. Doenças Tropicais Negligenciadas

Segundo a Organização Mundial da Saúde,¹⁴⁶ as doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são caracterizadas por patologias de origem infecciosas com ocorrência predominante ou exclusiva nas regiões dos trópicos, ou seja, em torno da linha do Equador e entre os trópicos de Câncer e Capricórnio.

Inicialmente, durante o período de colonização eram definidas como “patologias exóticas”. A denominação DTNs já foi tema de muita discussão na comunidade científica, visto que alguns pesquisadores posicionaram-se contrários à ideia que as doenças poderiam ser unicamente determinadas pelo clima e que tal descrição compromete o desenvolvimento socioeconômico em virtude da vulnerabilidade da região. O fato é que as peculiaridades climáticas e ambientais da região tropical, como a elevada umidade e temperatura, tem grande influência na ocorrência destas doenças, embora a disseminação seja em escala global.¹⁴⁷

Atualmente, 17 doenças estão classificadas como DTNs e acometem mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo, embora seja predominante em populações em condições vulneráveis e de extrema pobreza (Tabela 2).¹⁴⁸ Por se tratar de populações de poucos recursos, o investimento em pesquisa e desenvolvimento (P&D) para a busca de novos medicamentos eficientes, testes diagnósticos, vacinas e alternativas de controle e prevenção é irrisório quando comparado com outras doenças. Nesse sentido, o termo “negligenciado” adequa-se ao contexto destas doenças.

Tabela 2. Classificação das DTNS e seus respectivos agentes etiológicos.

Doença	Agente etiológico
Dengue	Vírus dengue
Hidrofobia (raiva)	Vírus <i>Rabies virus</i>
Tracoma	Parasito <i>Chlamydia trachomatis</i>
Úlcera de Buruli	Bactéria <i>Mycobacterium ulcerans</i>
Treponematoses endêmicas (bouba, sífilis endêmica e purupuru)	Bactéria <i>Treponema</i> spp.
Hanseníase	Bactéria <i>Mycobacterium leprae</i>
Doença de Chagas (tripanossomíase americana)	Protozoário <i>Trypanossoma cruzi</i>
Doença do sono (tripanossomíase humana)	Protozoário <i>Trypanossoma brucei</i> sp.
Leishmaniose	Protozoário <i>Leishmania</i> spp.
Cisticercose	Helminto <i>Taenia solium</i>
Dracunculíase (infecção pelo verme da Guiné)	Verme parasita <i>Dracunculus medinensis</i>
Equinococose	<i>Echinococcus</i> spp.
Infecções alimentares por trematódeos	Trematódeos <i>Clonorchis</i> spp., <i>Opisthorchis</i> spp., <i>Fasciola</i> spp., <i>Paragonimus</i> spp.
Filariose linfática	Nematóide <i>Wuchereria bancrofti</i> , <i>Brugia malayi</i> , <i>Brugia timori</i>
Oncocercose (cegueira dos rios)	Nematóide <i>Onchocerca volvulus</i>
Esquistossomose (bilharziose)	Helminto <i>Schistosoma</i> sp.
Helminthíases transmitidas pelo solo (HTS)	Helmintos <i>Ancylostoma duodenale</i> ; <i>Necator Americanus</i> ; <i>Ascaris lumbricoides</i> , <i>Trichuris trichiura</i>

O impacto das DTNs nas sociedades afetadas e na humanidade como um todo, é incalculável. Além da alta taxa de mortalidade, as enfermidades levam a incapacidade e muito sofrimento, comprometendo o desenvolvimento social e econômico. Apesar do conhecimento centenário das DTNs, somente nas últimas décadas, intensificaram-se os esforços de organizações governamentais e institucionais, assim como parcerias público-privadas, em ações para solucionar essa questão de saúde pública mundial. Entre os exemplos de parceria público-privada estão alguns acordos entre OMS e indústrias farmacêuticas no fornecimento de medicamentos, podendo-se citar o fornecimento de 400 milhões de comprimidos de albendazol por ano pela empresa GlaxoSmithKline (GSK) para o tratamento de crianças com parasitos intestinais.¹⁴⁹

No entanto, a P&D de novas terapias, testes de diagnósticos e estratégias de prevenção são os grandes desafios a serem superados. No período entre 2000 e 2011, das 850 terapias aprovadas (medicamentos, novas formulações e produtos biológicos), somente 37 (4%) apresentavam indicação para DTNs. Somente 4 destes medicamentos aprovados eram novas entidades químicas, sendo os mesmos indicados para malária (3) e diarreia (1), número que representa 1% dos medicamentos aprovados naquele período.¹⁵⁰

A Declaração de Londres, aprovada pela OMS em 2012, determina algumas medidas para erradicar, eliminar e intensificar o controle das principais DTNs até o final desta década, contando com parcerias de alguns governos, indústrias e fundações filantrópicas. Uma destas medidas envolve o avanço na P&D para o descobrimento de novos compostos para o tratamento e intervenção nas DTNs.¹⁵¹

Inserida nesse contexto, a organização internacional sem fins lucrativos “iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas” (DNDi, do inglês *Drugs for Neglected Disease initiative*) tem atuado ativamente na promoção desta medida por meio da conexão entre institutos de pesquisa, indústria, países desenvolvidos e as necessidades da população nas regiões de risco.¹³² Em 10 anos de atuação, a DNDi já contribuiu para a pesquisa de 6 novos tratamentos para as doenças malária, doença do sono, leishmaniose visceral e doença de Chagas.¹⁵²

Dentre as DTNs citadas na Tabela 2, a leishmaniose e a doença de Chagas merecem significativa importância mundial, sobretudo no Brasil. Juntas estas patologias levaram a óbito 61.394 brasileiros no período de 2000 a 2011, sendo a doença de Chagas responsável pela maioria (95,9%).¹⁵³ As leishmanioses cutânea e monocutânea são consideradas pelo Ministério da Saúde como uma das mais importantes

doenças dermatológicas, tendo em vista as deformidades que podem causar.¹⁵⁴ Nesse sentido, tais parasitoses serão discutidas com maior detalhe neste trabalho em virtude do direcionamento da busca por substâncias ativas para o tratamento das mesmas.

3.2.3. *Leishmanioses*

As leishmanioses são um conjunto de doenças infecciosas causadas por mais de 20 diferentes espécies de parasitos do gênero *Leishmania* spp (Família Trypanosomatidae). Manifesta-se clinicamente de diferentes formas, conforme o parasito, sendo as mais comuns: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose monocutânea (LMC) e leishmaniose visceral ou calazar (LV). De maneira geral, os principais sintomas na LC são lesões na pele em regiões expostas, normalmente ulcerosas; já na LMC as lesões são severas e desfigurantes, localizando-se nas mucosas do nariz, boca e faringe. Na LV, o parasito infecta o sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro mamífero, afetando principalmente o baço, fígado, medula óssea e tecidos linfoides.¹⁵⁵

Os protozoários *Leishmania* spp. são parasitos intracelulares obrigatórios e durante seu ciclo de vida circulam entre dois hospedeiros distintos: insetos flebotomíneos da família Psycholidae pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomia* (Novo Mundo) e hospedeiros mamíferos (homem e animais silvestres e/ou domésticos). Quando no vetor flebotomíneo, a forma evolutiva presente é flagelada promastigota e reproduz-se binariamente no tubo digestivo do inseto. Já no hospedeiro mamífero, a forma encontrada é amastigota (não flagelada) e origina-se a partir da diferenciação das formas promastigostas regurgitadas pelos insetos e fagocitadas pelos macrófagos do hospedeiro.¹⁵⁶

A infecção por *Leishmania* spp. ocorre quando um inseto (fêmea) infectado pica o mamífero e regurgita as formas promastigotas sobre a pele lesionada. Estas formas são fagocitadas por macrófagos e diferenciam-se para as formas amastigotas, as quais multiplicam-se e infectam novos macrófagos. Um inseto não infectado adquire o parasito ao se alimentar do sangue de um mamífero infectado, por meio da ingestão das amastigotas. Cabe destacar que alguns animais silvestres (preguiça, gambá, roedores) e domésticos (gatos, cães, cavalos) também são infectados com *Leishmania* spp. pelos mesmos vetores e constituem os chamados repositórios ou reservatórios do parasito, garantindo a circulação do protozoário na natureza.¹⁵⁷

Anualmente são reportados mais de um milhão de novos casos e estima-se que 350 milhões de pessoas estão vivendo em situação de risco em 98 países nos quais as leishmanioses são endêmicas. O Brasil faz parte desta estatística, sendo que no período de 2000 a 2013 foram registrados anualmente a média de 24.694 casos de LC no território nacional, enquanto com LV foram registrados 3.454 casos/ano).¹⁵² O perfil epidemiológico da LV é cíclico, com elevação de casos a cada 5 anos em média, e a letalidade apresenta-se em crescimento progressivo (3,2% em 2000 e 7,1% em 2013). A região nordeste registrou 53,6 % do total de casos de LV no país.¹⁵² Como pode ser observado na Figura 19, para ambas as leishmanioses (LC e LV), o nosso país apresenta a maior incidência de novos casos de acordo com a categorização por cores no mapa (marrom escuro): LC maior que 5 mil novos casos (A) e LV maior que 1 mil novos casos (B).¹⁵⁸

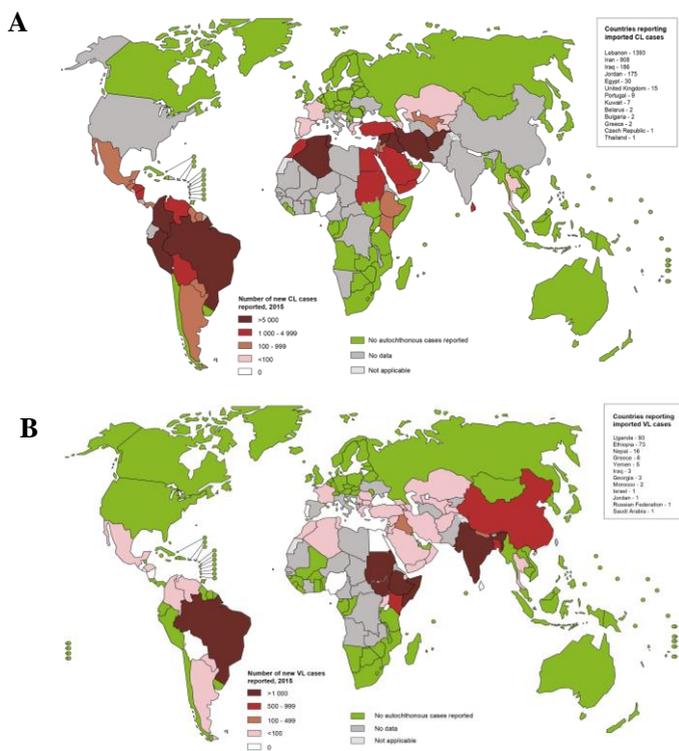


Figura 19. Regiões endêmicas em LC (A) e LV (B) em 2015.¹⁵⁸

O arsenal terapêutico disponível para o tratamento das leishmanioses ainda é limitado e apresenta alguns inconvenientes, como toxicidade, baixa eficácia, duração do tratamento, dificuldades na administração, custo e o surgimento de cepas resistentes (Tabela 3, Figura 20).¹⁵⁹

Tabela 3. Tratamentos disponíveis para leishmanioses

Fármaco	Eficácia	Vantagens	Limitações	Custo*
Anfotericina B (174)	> 95%	Efetivo em cepas resistentes à antimoniais pentavalentes	-hospitalização; -pode levar ao desenvolvimento de miocardites, hipocalemia, toxicidade renal e reações no local da infusão.	~ \$100
Anfotericina B lipossomal	~ 100%	Efetivo com baixo perfil de toxicidade	-alto custo; -febre e rubor durante a infusão	\$280
Mitelfosina (175)	94 – 97%	-primeiro tratamento oral efetivo em LC e LV; -alta potência	-altamente tóxica (fígado e rins); -complicações gastrointestinais; -teratogênico	~\$70
Paromomicina (176)	95% (Índia); 46 – 85% (África)	-baixo custo	-altamente hepatotóxico; -ototoxicidade reversível; -dor no local da injeção;	\$10
Pentamidina (177)	70 – 80%	-uso em baixa dosagem na combinação com outras terapias	-toxicidade renal; -Miocardite; -febre; Hipoglicemia e hipotensão; -diabetes insulino-dependente como efeito adverso irreversível	~ \$100
Antimoniais pentavalentes (178, 179)	35 – 95%	-pode ser usado em combinação com anfotericina B	-hospitalização; -resistência >60 % na Índia; -complicações no	\$50-70

		em grávidas e idosos	sistema cardíaco; -alta toxicidade em pacientes soropositivos	
--	--	----------------------	--	--

*Custo do tratamento estimado em dólares. Fonte: adaptado¹⁴³

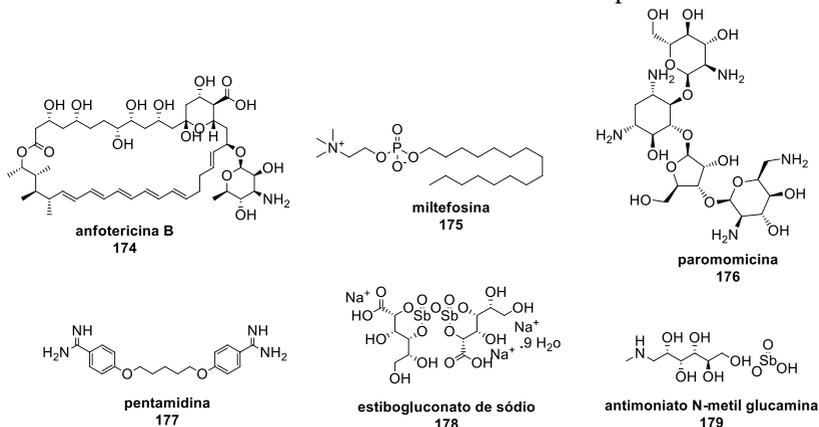


Figura 20. Estruturas químicas dos fármacos utilizados para o tratamento das leishmanioses citados na Tabela 3.

Com exceção de miltefosina **175**, os outros medicamentos foram lançados há mais de 50 anos no mercado. Os antimoniais pentavalentes (estibogluconato de sódio **178** e antimoniato de N-metil glucamina **179**) são o tratamento de primeira escolha tanto para LC quanto LV, seguido da segunda escolha anfotericina B **174** e pentamidina **177**. Para a escolha do tratamento mais apropriado, faz-se necessária a identificação da espécie do parasito *Leishmania* sp., fato este que depende do correto diagnóstico, de preferência nos estágios iniciais da doença.¹⁶⁰ No Brasil, os medicamentos antimoniato de N-metil glucamina **179**, anfotericina B **174** (nas apresentações desoxicolato e lipossomal) são disponibilizados gratuitamente na rede de serviços do Sistema Único de Saúde (SUS) para o tratamento de LV.¹⁶¹

Grandes avanços foram realizados nas últimas décadas no entendimento da estrutura molecular dos parasitos, identificando possíveis alvos para o desenvolvimento de novas terapias. A imunoterapia, no caso a vacina, seria o tratamento ideal para as áreas endêmicas, no entanto o variado número de espécies de protozoário e as peculiaridades das diferentes regiões afetadas dificultam o processo de desenvolvimento.¹⁵⁹ Atualmente, está disponível no mercado nacional

uma vacina contra LV canina, mas a vacinação em massa não é adotada como medida de controle de reservatórios pelo Ministério da Saúde.¹⁶²

Nesse sentido, torna-se imprescindível e urgente a busca por novas entidades químicas que representem uma alternativa eficiente para o tratamento deste número expressivo de pessoas infectadas e comprometidas pela doença.

3.2.4. Doença de Chagas

Descoberta em 1909 pelo médico sanitário brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, a tripanossomíase americana ou doença de Chagas, mostra-se prevalente no continente americano. Conforme observado na Figura 21, a América Latina é uma das regiões mais afetadas e com transmissão vetorial da doença. Estima-se que 70 milhões de pessoas estejam em situação eminente de infectar-se e 5,7 milhões já estão infectadas em 21 países da América Latina, somado a outros 6 milhões no mundo. Considerada a doença parasitária mais letal nas Américas, a doença de Chagas causa o óbito 7.000 pessoas por ano.¹⁶³

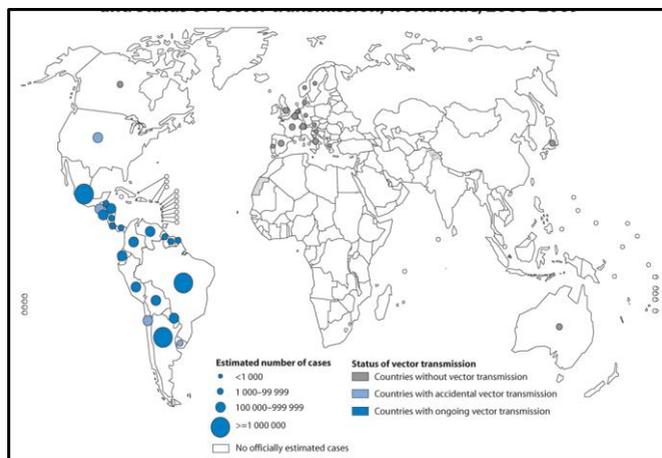


Figura 21. Distribuição de casos de infecção por *T. cruzi* e a presença do vetor, segundo estimativas oficiais de 2006-2009.¹⁶³

A parasitose tem como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi* (família Trypanosomatidae), o qual é transmitido por insetos das espécies *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e

Panstrongylus megistus, conhecidos popularmente como barbeiros. O nome popular do vetor deve-se à preferência do mesmo pela região da face para sua alimentação hematófaga em mamíferos.¹⁶⁴

O ciclo de vida de *T. cruzi* envolve três formas evolutivas: epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas. Quando o inseto é contaminado ao alimentar-se do sangue de um mamífero infectado, o mesmo adquire as formas tripomastigotas que se diferenciam para epimastigotas para a multiplicação no intestino do inseto. Ainda no vetor, as epimastigotas de *T. cruzi* transformam-se em tripomastigotas metacíclicas, as quais são a forma infectante, sendo liberadas pelas fezes e urina do barbeiro após o repasto sanguíneo. Já no mamífero, as tripomastigotas entram na corrente sanguínea por meio das mucosas ou lesão na pele ocasionada pela picada do inseto e no hospedeiro se transformam para a forma amastigota, a qual se multiplica binariamente atingindo principalmente o coração e sistema digestório.¹⁶⁵

Além da transmissão vetorial, existe ainda a possibilidade de transmissão por meio da transfusão sanguínea ou transplante de órgãos, acidental (laboratorial), congênita e oral. Esta última é rara, porém ocasiona surtos agudos em áreas não endêmicas. A transmissão oral está relacionada com o processamento de alimentos com insetos infectados ou ingestão de carne crua de animais contaminados.¹⁶⁴

Na fase aguda da doença, após a infecção pelo *T. cruzi*, a manifestação clínica é branda e caracteriza-se pelo inchaço no local da inoculação dos parasitos (conjutiva ocular: sinal de Romanã; outras partes: chagoma), além de outros sintomas comuns a infecções como febre e mal estar. No entanto, com a progressão da doença para a fase crônica, cerca de 10 a 30% dos infectados desenvolvem os sintomas mais graves e comprometedores como o aumento do volume do trato digestivo (megaesôfago, megacolo, etc.) e cardiomiopatia. O período entre a fase aguda e a fase crônica é chamado de fase crônica indeterminada e pode durar até 10 anos sem manifestar nenhum sinal da doença.¹⁶⁶

O tratamento medicamentoso disponível para a doença de Chagas é constituído por dois fármacos: benznidazol **180** e nifurtimox **181** (Figura 22). No Brasil, a única opção terapêutica é o benznidazol, visto que nifurtimox foi descontinuado em virtude da toxicidade na década de 80. O mecanismo de ação do benznidazol envolve a formação de intermediários reativos que se ligam de forma covalente à macromoléculas do parasito. A eficácia deste medicamento é estimada em 60% na fase aguda e de 5 a 20% na fase crônica.¹⁶⁷ As limitações do tratamento da doença de Chagas com benznidazol, além da falta de

eficácia na fase crônica, são os efeitos colaterais que levam muitos pacientes a abandonarem o tratamento (anorexia, náuseas, vômito, epigastralgia), longo período de tratamento (60 - 90 dias) e toxicidade dose dependente.¹⁶⁸

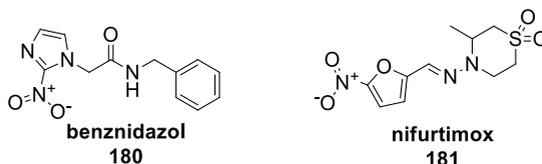


Figura 22. Medicamentos utilizados no tratamento da doença de Chagas.

Em 2011, foi registrada no Brasil a dosagem pediátrica de benznidazol **180** (comprimido 12,5 mg). A nova formulação foi a alternativa para contornar a ineficácia e a baixa adesão ao tratamento, dada a dificuldade no fracionamento da dose adulta (comprimido 100 mg) e o esquema de administração. A dosagem pediátrica de benznidazol está incluída na Lista de Medicamentos Essenciais para Crianças da OMS e representa um avanço no tratamento das crianças chagásicas, uma vez que é possível eliminar o parasito no primeiro ano de vida dos recém-nascidos que receberem o tratamento adequado em 90 % dos casos.¹⁶⁹

Nesse contexto, a doença de Chagas pode ser considerada a mais negligenciada das DTNs, sob a perspectiva de opções de tratamento e número de infectados. Estima-se que menos de 1% das pessoas infectadas recebam o tratamento adequado. Faz-se necessário, portanto, a busca contínua por novos agentes quimioterápicos, especialmente eficazes nas fases aguda e crônica da doença.¹⁶⁹

3.3. Objetivos

Preparar derivados semissintéticos de lupeol **8** com potencial atividade antileishmania e antitripanossoma.

3.3.1. Objetivos específicos

- Isolar o triterpeno lupeol de *V. scorpioides* em quantidade suficiente para as reações de modificação molecular;
- Obter derivados semissintéticos de lupeol, principalmente, com modificações no grupamento isopropilideno;
- Avaliar a atividade antileishmania e antitripanossoma dos derivados obtidos.

3.4. Resultados e Discussão

3.4.1. Isolamento do triterpeno lupeol

Ao longo dos últimos 7 anos, nosso grupo de pesquisa concentrou-se na investigação fitoquímica do extrato hidroalcoólico de folhas e flores de *V. scorpioides* com o intuito de explorar a diversidade química desta espécie. Nesse sentido, o protocolo experimental empregado baseava-se na maceração das partes aéreas da planta com etanol, e após a maceração, o extrato era particionado com solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano e acetato de etila). As frações diclorometano e acetato de etila eram escolhidas para a prospecção química, em virtude dos compostos de interesse. Já a fração hexano apresenta, principalmente, triterpenos e esteroides em sua composição, podendo ser constatado qualitativamente a abundância do triterpeno lupeol, apresentando-se como o constituinte majoritário.

Tendo em vista as peculiaridades químicas e aplicações biológicas descritas para lupeol, as frações hexano das folhas e flores de *V. scorpioides*, provenientes do processo descrito acima e subutilizadas em nosso laboratório, foram submetidas à purificação em coluna cromatográfica, seguido de recristalização em MeOH para a obtenção do triterpeno lupeol **8** em quantidade suficiente para utilizá-lo como material de partida nas reações de modificação molecular.

A caracterização estrutural do lupeol **8** foi baseada no espectro de RMN de ^1H e confirmada com os dados disponíveis na literatura.¹⁷⁰ Mesmo com a alta complexidade do esqueleto triterpênico ($\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$), a

elucidação estrutural do lupeol e seus derivados é facilitada em virtude dos poucos e característicos grupos funcionais, que por sua vez são os pontos alvos de modificação molecular. Sendo assim, cabe destacar no espectro de RMN de ^1H do lupeol **8** a presença dos sinais em 4,70 ppm (m, 1H) e 4,57 ppm (m, 1H), referentes aos hidrogênios olefínicos e do sinal em 3,20 ppm (dd, $J = 5,3; 10,8$ Hz, 1H), correspondente ao hidrogênio carbinólico em C3. Adicionalmente, observa-se o sinal dos hidrogênios metilênicos de C30 em 1,69 ppm (Figura 23).

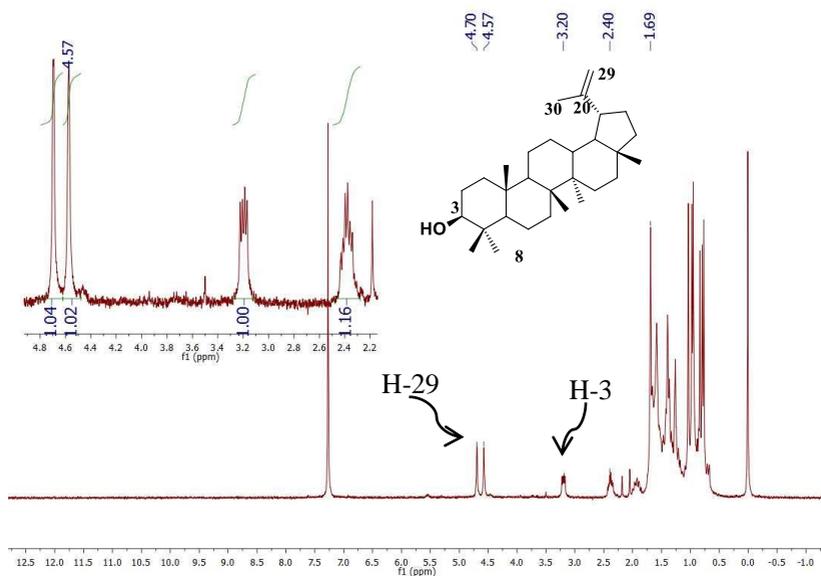
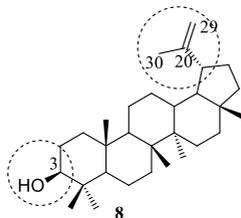


Figura 23. Espectro RMN de ^1H de lupeol **8** (300 MHz, CDCl_3).

3.1.1 Obtenção dos derivados semissintéticos de lupeol

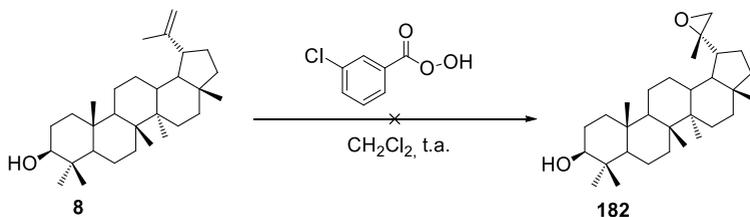
O esqueleto pentacíclico do lupeol **8** oferece dois pontos reativos para as reações de modificação molecular. Com maior número de trabalhos na literatura, a posição C3 é explorada, principalmente, por meio da interconversão do grupo funcional (FGI). Já a dupla ligação exocíclica em C20 é utilizada para a formação de novos anéis e/ou estruturas rígidas.



Como apresentado na introdução deste capítulo III, o alvo biológico para a busca de derivados bioativos do lupeol são os parasitos do gênero *Trypanosoma* sp e *Leishmania* sp., causadores das doenças de Chagas e leishmaniose, respectivamente. Não foram encontrados na literatura dados referentes à semissíntese de derivados do lupeol para a avaliação das atividades antitripanossoma e antileishmania.

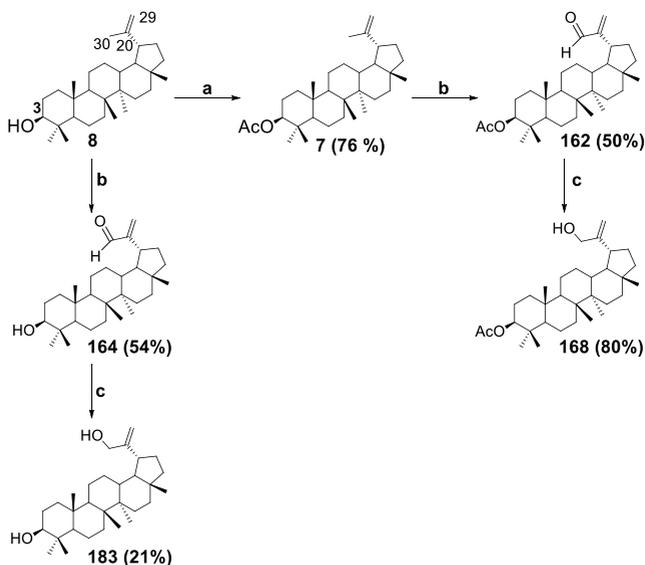
Inicialmente, os esforços foram concentrados nas modificações do centro eletrofílico da estrutura. Propusemos a oxidação na dupla ligação com mCPBA, a fim de obter o derivado epóxido **182** como intermediário para as reações de substituição nucleofílica (Esquema 48). Embora a obtenção do derivado epóxido com mCPBA esteja descrita na literatura com bons rendimentos,¹⁴⁴ não foi possível reproduzi-los neste trabalho.

Algumas variações foram testadas como proteção da hidroxila com grupo acetila, adição de NaHCO₃ para neutralização do ácido *m*-clorobenzóico formado no meio reacional, condições reacionais anidras, recristalização do reagente mCPBA previamente ao uso e aumento do número de equivalentes do mesmo (1 a 3 equiv.). Em todas as tentativas foram obtidas misturas complexas com muitos subprodutos, tornando inviável esta abordagem.



Esquema 48. Reação de oxidação de lupeol **8** mCPBA.

Tendo em vista os resultados obtidos com a oxidação utilizando o reagente mCPBA e considerando que os poucos trabalhos publicados envolvendo reações no grupamento isopropilideno do lupeol levou a transformação ou eliminação da dupla ligação exocíclica, direcionamos a rota sintética para a oxidação alílica, a fim de preservar a dupla ligação exocíclica. Na sequência, após a obtenção do intermediário aldeído **162** (protegido em C3) e **164** (desprotegido) foram preparados os derivados funcionalizados em C30 com OH (**168** e **183**), a partir da reação de redução dos aldeídos (Esquema 49)



Esquema 49. Rota sintética para funcionalização da posição C30 de lupeol **8**. Reagentes e condições: (a) Ac_2O , DMAP, AcOEt , t.a.; (b) SeO_2 , EtOH , refluxo; (c) NaBH_4 , EtOH , 0°C - t.a.

A primeira etapa da rota consiste na proteção da hidroxila em C3 com o grupamento acetila, a fim de orientar a regioselectividade das reações seguintes. Na sequência, o derivado acetilado **7** foi submetido à reação de oxidação com SeO_2 em EtOH sob refluxo, obtendo-se o derivado aldeído **162** com rendimentos baixo à moderados (35-50%). Observou-se uma diminuição no rendimento desta reação (35%) em tentativas de escalonamento e longos períodos de aquecimento, possivelmente em virtude da decomposição do SeO_2 em Se(II). Cabe destacar que a mesma reação também foi conduzida com lupeol **8** e apresentou rendimentos similares.

A confirmação estrutural dos derivados oxidados (**162** e **164**) foi possível no espectro de RMN de ^1H devido a presença do sinal em 9,52 ppm referente ao hidrogênio aldeídico, assim como o deslocamento para a região desblindada do espectro dos sinais dos hidrogênios olefínicos em 6,30 ppm e 5,93 ppm. A ausência do simpleto em 1,69 ppm, referente aos hidrogênios metílicos em C30 corroborou para a confirmação da estrutura química do produto desejado (Figura 24).

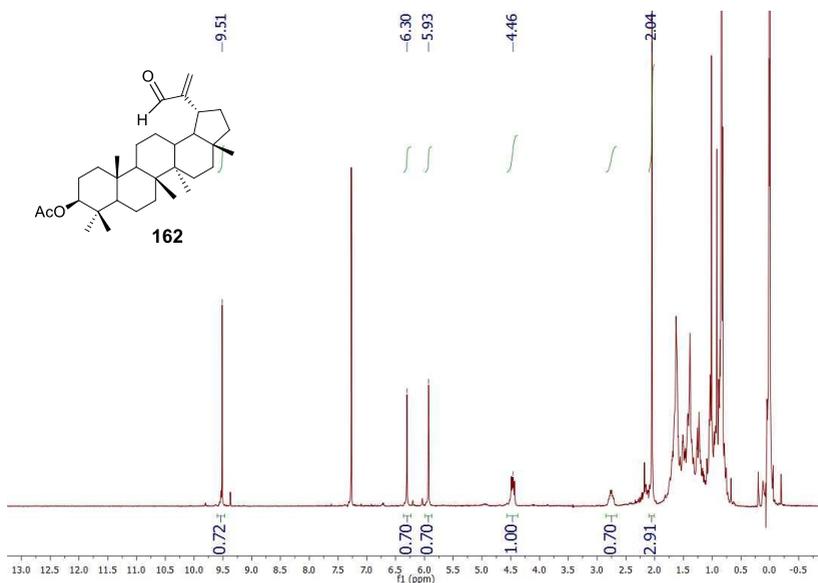
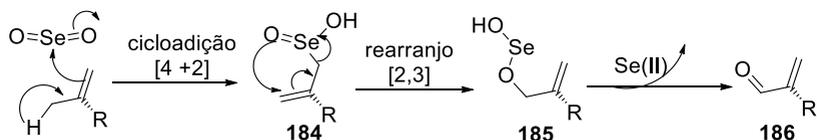


Figura 24. Espectro RMN de ^1H do derivado aldeído **162** (300 MHz, CDCl_3).

O reagente SeO_2 é um agente oxidante seletivo para oxidar posições alílicas de maneira regioseletiva. Dessa forma, SeO_2 reage com compostos que contêm metilenos ou metilas ativadas por duplas ligações adjacentes. O mecanismo da reação de oxidação alílica envolve no primeiro momento a formação do ácido alílico selenínico **184**, o qual sofre rearranjo formando o composto instável **185** que rapidamente se decompõe a aldeído **186** (Esquema 50).^{104, 171}



Esquema 50. Mecanismo proposto para reação de oxidação alílica com SeO_2

Seguindo a rota sintética apresentada no Esquema 49, os derivados hidroxilados em C30 foram obtidos a partir da reação de redução das carbonilas aldeídicas dos derivados **162** e **164** com o reagente NaBH_4 em etanol. Dessa forma, um novo centro nucleofílico foi originado para reações de substituição nucleofílica. Os derivados reduzidos **168** e **183** foram caracterizados no espectro de RMN de ^1H pela presença do simpleto em 4,13 ppm com integral para 2 hidrogênios equivalentes aos hidrogênios carbinólicos em C30, assim como o deslocamento dos hidrogênios olefínicos para a região mais desblindada do espectro (Figura 25).

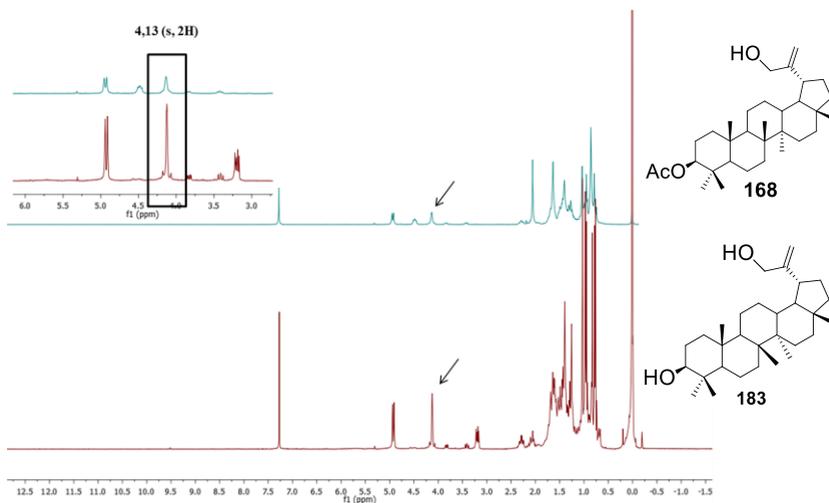
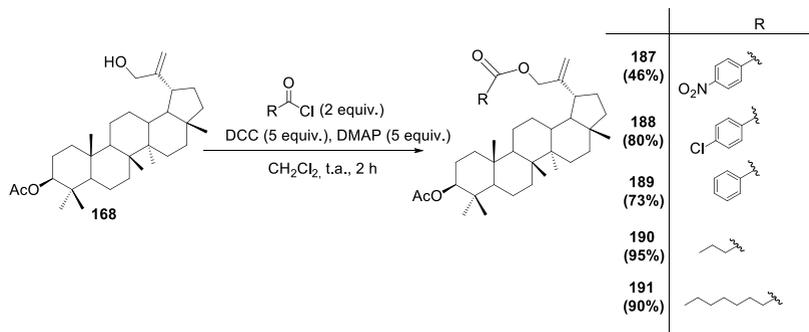


Figura 25. Figura comparativa dos espectros RMN de ^1H dos derivados de lupeol hidroxilados em C30: **168** (espectro superior) e **183** (espectro inferior) (300 MHz, CDCl_3).

Uma vez alcançada a funcionalização da posição C30, o derivado **168** foi então preparado em maior quantidade para atuar como nucleófilo nas reações de acilação. Os ésteres de lupeol **187 - 191** foram preparados em pequena escala (0,062 mmol) por meio da reação com os respectivos cloretos de acila na presença das bases DCC e DMAP em meio anidro (Esquema 51)



Esquema 51. Derivados ésteres do lupeol **188 - 191** obtidos via reação de substituição nucleofílica com cloretos de acila.

A escolha dos cloretos de acila foi baseada nas características eletrônicas e estéricas dos substituintes e presença de diferentes heteroátomos com o intuito de avaliar tais propriedades no efeito biológico. Dessa forma foi possível sintetizar cinco ésteres de lupeol inéditos na literatura. A principal evidência da formação dos ésteres **187-191** no espectro de RMN de ^1H é o deslocamento do sinal em 4,13 ppm, correspondente aos hidrogênios carbinólicos em C30, para a região desblindada do espectro com valor variável conforme o substituinte, além dos sinais adicionais pertinentes a cada novo derivado. Ainda, é possível observar no espectro de RMN de ^{13}C a presença de dois sinais na região entre 170 e 175 ppm confirmando a presença de duas carbonilas de grupamento éster. Os dados de identificação para cada derivado éster encontram-se na sessão experimental deste capítulo e os espectros em apêndices.

3.4.2. Atividade antileishmania e antitripanossoma dos derivados semissintéticos do lupeol

Não há relatos na literatura de derivados do lupeol com substituintes alifáticos ou arilas na posição C30 via ligação éster, tampouco a avaliação das atividades antileishmania e antitripanossoma para derivados semissintéticos deste triterpeno. Dada a relevância destas duas parasitoses e a contínua busca por substâncias ativas que representem uma alternativa eficiente aos tratamentos existentes, os derivados ésteres, assim como todos os intermediários envolvidos na rota sintética, foram encaminhados para o Laboratório de Protozoologia desta universidade para avaliação das atividades supracitadas, sob coordenação do Prof. Dr. Mario Steindel.

Os compostos sintetizados neste trabalho, incluindo os cinco derivados ésteres inéditos **187-191**, foram avaliados *in vitro* frente às formas amastigotas dos parasitos tripanossomatídeos *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*. Cabe destacar que a forma evolutiva dos parasitos em questão é intracelular obrigatória e encontra-se nos estágios patológicos crônicos do hospedeiro vertebrado, portanto, considerada a forma clinicamente relevante.¹⁶⁰

A triagem inicial foi realizada com os compostos na concentração de 50 μM quanto à capacidade de inibição de crescimento dos parasitos, sendo os valores expressos em porcentagem de inibição (PI). Como controles positivos foram utilizados os fármacos anfotericina B na concentração de 2 μM para *L. amazonensis*, enquanto benznidazol 20 μM para *T. cruzi*. Já o controle negativo foi avaliado o solvente

empregado na solubilização dos compostos (DMSO 1%) e o mesmo não apresentou interferência no crescimento dos parasitos. Os resultados estão compilados na Tabela 4:

Tabela 4. Atividade antileishmania e antitripanossoma *in vitro* de lupeol e seus derivados semissintéticos frente às formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* e *T. cruzi*.

Compostos ^a	Porcentual de inibição (PI)	
	<i>L. amazonensis</i>	<i>T. cruzi</i>
Lupeol 8	6,00 ± 0,06	38,69 ± 0,59
7	11,71 ± 1,86	20,36 ± 1,09
162	4,24 ± 0,30	77,03 ± 6,10
164	82,78 ± 0,97	97,62 ± 0,38
168	3,11 ± 0,66	31,14 ± 0,81
183	5,15 ± 0,93	91,65 ± 0,76
187	9,91 ± 0,81	ND ^b
188	8,47 ± 0,36	29,10 ± 11,34
190	3,24 ± 0,40	11,17 ± 5,52
191	68,04 ± 4,76	77,36 ± 6,55
Benznidazol (20 µM)	-	97,89 ± 0,19
Amfotericina B (2 µM)	93,33 ± 0,59	-

Os valores estão expressos como média ± desvio padrão de um ensaio realizado em triplicata. ^aDerivado **189** não foi avaliado; ^bND – atividade não detectada na concentração de 50 µM.

De modo geral, lupeol e seus derivados semissintéticos foram mais ativos frente a parasitos *T. cruzi*, ou seja, apresentaram maiores valores percentuais de inibição do crescimento (PI) neste parasito, comparativamente com *L. amazonensis*.

Considerações relativas ao desempenho da atividade inibitória do crescimento dos parasitos e a estrutura química dos derivados, embora tratando-se de uma triagem inicial, são importantes a serem analisadas. Dois compostos (**164** e **191**) se destacaram por apresentar perfis similares de atividade em ambos os parasitos. Especificamente o intermediário aldeído **164** foi o composto mais ativo (97,62%) nesta triagem, inclusive apresentando PI muito próximo do controle positivo, o fármaco benznidazol. Observou-se uma drástica redução na atividade deste intermediário quando o grupamento acetila estava substituído em C3 contra *L. amazonensis* (**162**), enquanto que nos parasitos *T. cruzi* não ocorreu uma diminuição expressiva da atividade.

Dentre os derivados substituídos em C30, o derivado de cadeia alifática octanoato **191** apresentou-se o mais ativo frente à ambos os parasitos. O tamanho da cadeia alquila parece influenciar na atividade, visto que o derivado com 3 carbonos a menos mostrou PI cerca de 16 vezes menor em *L. amazonensis* e 7 vezes menor em *T. cruzi*.

A etapa seguinte na avaliação do potencial antileishmania e antitripanossoma dos derivados semissintéticos do lupeol foi a determinação da concentração capaz de inibir o crescimento de 50 % dos parasitos (CI₅₀) e também a concentração citotóxica em linhagem celular de macrófagos humanos THP-1 (CC₅₀). Estes ensaios permitem determinar o índice de seletividade dos compostos (IS) por meio da razão entre CC₅₀ e CI₅₀. Importante salientar que a busca de substâncias bioativas deve-se priorizar a baixa ou nenhuma toxicidade à células humanas. Os três derivados que demonstraram PI maior que 50% (**164**, **183** e **191**) foram selecionados para os ensaios de CC₅₀ e CI₅₀, no qual os resultados estão apresentados na (Tabela 5):

Tabela 5. Concentrações inibitórias dos derivados de lupeol frente às formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* e *T. cruzi*.

Derivados	CI ₅₀ (µg/mL)		CC ₅₀	IS ^b	
	<i>L. amazonensis</i>	<i>T. cruzi</i>		<i>L. amazonensis</i>	<i>T. cruzi</i>
164	40,74 ± 4,12	39,43 ± 6,23	43,38 ± 2,74	1,06	1,10
183*	-	12,48 ± 0,89	161,50 ± 24,00	-	12,94
191	35,60 ± 3,71	23,07 ± 0,65	96,74 ± 7,93	2,72	4,19
Benznidazol (20 µM)	-	10,18 ± 0,3	> 500	-	>49,11
Anfotericina B (2 µM)	0,08 ± 0,02	-	10	>142	-

*A CI₅₀ do derivado 183 não foi avaliada em *L. amazonenses* em virtude do baixo PI apresentado (5,15%).

O derivado diol **183** (-OH em C3 e C30) foi seletivo para *T. cruzi* e exibiu a melhor atividade antitripanossoma com CI₅₀ de 12,48 µM, e a menor citotoxicidade (CC₅₀ = 161,50µM), propiciando o melhor IS dentre os compostos avaliados. Ainda, pode-se constatar que a CI₅₀ do derivado **183** foi muito próxima daquela apresentada pelo fármaco benznidazol, embora o comparativo do IS dos mesmos seja discrepante.

A presença da carbonila α,β-insaturada (**164**) parece ser importante para as atividades avaliadas, porém demonstra-se essencial

para a atividade antileishmania. Já a redução da carbonila α,β -insaturada levou a diminuição na citotoxicidade do composto cerca de 3 vezes (**183**).

3.4.3. Avaliação da atividade inibitória da enzima tripanotiona redutase

A investigação do mecanismo de ação molecular de substâncias bioativas é indispensável no processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. Trata-se da etapa na qual são considerados os possíveis modos de interação entre o fármaco e as biomacromoléculas, responsáveis por promover uma determinada resposta biológica, referindo-se a moléculas estruturalmente específicas.

Especificamente relacionado às DTNs, grandes esforços vêm sendo realizados na elucidação dos mecanismos envolvidos na manifestação clínica e desenvolvimento destas patologias, em especial no estudo de alvos moleculares, principalmente enzimas presentes nos parasitos e/ou hospedeiro. Os parasitos patogênicos da família Trypanosomatidae (*Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*) apresentam similaridades fenotípicas e muitos mecanismos moleculares são conservados entre todas as três linhagens.¹⁴² Nesse sentido, torna-se interessante a investigação de substâncias bioativas em alvos moleculares comuns às mesmas. Neste contexto, destacam-se tripanotiona redutase (TR) e tripanotiona sintase (TS), enzimas trypanosomatídeo-específica envolvidas na síntese e modulação do sistema tripanotiona redox dos parasitos, constituindo-se essenciais para a sobrevivência dos mesmos.¹⁷²

Os derivados semissintéticos de lupeol mais promissores na triagem inicial do potencial antileishmania e antitripanossoma (PI > 50 %) foram investigados com relação ao poder inibitório na enzima tripanotiona redutase (recombinante de *T.cruzi*). Os derivados **164**, **183** e **191** foram considerados inativos frente à enzima apresentando percentuais de inibição não significativos (1,97%, 2,15% e 16,24%, respectivamente) na concentração de 100 μ M. O resultado sugere que a atividade antileishmania e antitripanossoma não seja dependente da enzima tripanotiona redutase, fato esse que estimula os estudos adicionais para entendimento do mecanismo de ação.

3.5. Conclusões e Perspectivas

3.5.1. Conclusões

- Lupeol foi isolado do extrato hexano das folhas e flores de *Vernonia scorpioides* em quantidade suficiente para a semissíntese de 10 derivados com rendimentos moderados à excelentes.
- A abordagem sintética baseou-se na reação de acilação na posição C30 de lupeol após a funcionalização com grupamento hidroxila, levando a obtenção de 5 ésteres inéditos na literatura.
- Os derivados semissintéticos demonstraram potencial antileishmania (*L. amazonensis*) e antitripanossoma (*T. cruzi*), sendo este último mais pronunciado.
- Os derivados **164** e **191** foram ativos em ambos os parasitos, sendo que a presença da carbonila α,β -insaturada tornou o derivado mais citotóxico;
- O derivado **183** foi seletivo para *T. cruzi* e demonstrou CI_{50} próxima do fármaco de primeira escolha benznidazol.
- A atividade antitripanossomatídea apresentada pelos derivados não é dependente da enzima tripanotiona redutase.

3.5.2. Perspectivas

- Os derivados semissintéticos de lupeol sintetizados neste capítulo foram encaminhados para a avaliação do potencial citotóxico em linhagens celulares de leucemias humanas. Os ensaios estão em andamento no Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH) da UFSC sob supervisão da Professora Dra. Maria Cláudia Santos da Silva.

3.6. Parte Experimental

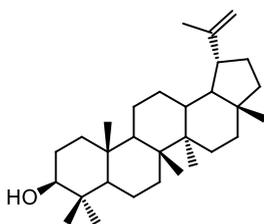
3.6.1. Isolamento do lupeol e preparação dos derivados semissintéticos

Isolamento de lupeol de *Vernonia scorpioides*

Foram utilizadas as frações hexano provenientes da partição líquido-líquido do extrato hidroalcoólico de folhas e flores de *V. scorpioides* remanescentes em nosso laboratório em virtude dos estudos com as frações diclorometano e acetato de etila que proporcionaram o isolamento dos poliacetilenos e lactonas descritos na introdução deste trabalho. Adicionalmente, foram preparados extratos hexano em extrator Soxhlet por um período de 5 horas das folhas e flores de *V. scorpioides* em Florianópolis em junho/2015.

As frações e extratos foram reunidos e submetidas a purificação por coluna cromatográfica em gel de sílica eluindo com sistema de solventes hexano:acetato de etila (90:10, v/v). As frações contendo lupeol **8**, porém ainda impuras, foram recristalizadas em MeOH para a obtenção do lupeol na forma de sólido amorfo com coloração branca.

3β-lup-20(29)-en-3-ol (**8**)



F.M. = C₃₀H₅₀O

P.M. = 426,71 g/mol

Rf: 0,54[hexano:acetato de etila (90:10, v/v)]

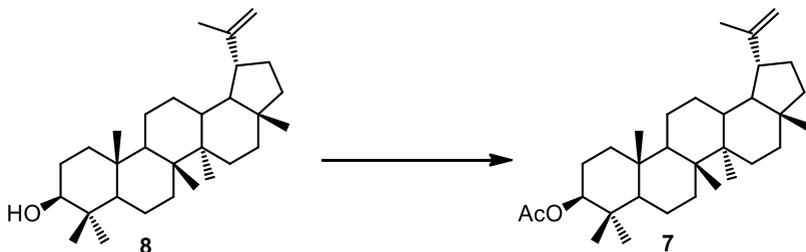
p.f. = 213,5 - 214°C (lit.: 212 - 213 °C)¹⁷⁰

RMN de ¹H(300 MHz, CDCl₃) δ 4,70 (m, 1H, H29a), 4,57 (m, 1H, H29b), 3,20 (dd, *J* = 5,3; 10,8 Hz, 1H, H3), 2,38 (dt, *J* = 4,2; 9,5 Hz, 1H, H19), 1,80-0,60 (sinais característicos

do substrato – sobrepostos), 1,69 (s, 3H, H30), 1,04 (s, 3H, H26), 0,97 (s, 3H, H23), 0,95 (s, 3H, H27), 0,84 (s, 3H, H25), 0,79, (s, 3H, H28) 0,77, (s, 3H, H24) **RMN de ¹³C** (75 MHz, CDCl₃) δ 151,2; 109,8; 82,0; 54,4; 50,1; 48,3; 48,0; 43,2; 42,5; 40,7; 40,0; 38,3; 38,0; 37,8; 37,1; 34,2; 29,8; 28,0; 27,4; 25,1; 23,7; 21,4; 20,9; 19,3; 18,2; 18,0; 16,5; 16,2; 16,0; 14,5

Dados espectroscópicos estão de acordo com o reportado da literatura.¹⁷⁰

3 β -acetoxi -lup-20(29)-eno (7)



A um balão de 25 mL com uma boca equipado com barra magnética foram adicionados lupeol **8** (0,300 g; 0,70 mmol), anidrido acético em excesso (2 mL), quantidade catalítica de DMAP e 1 mL de AcOEt. A mistura reacional foi submetida à agitação a temperatura ambiente e após 24 horas foi adicionado 5 mL de H₂O. A fase aquosa foi extraída com CH₂Cl₂ (3 x 20 mL) e as fases orgânicas foram combinadas e lavadas com 20 mL de solução de HCl 1 M seguido de solução saturada de NaCl, seca com MgSO₄, filtrada e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotatório a 50°C. A purificação por coluna cromatográfica de sílica gel utilizando uma mistura de hexano: acetato de etila (95:05) como eluente forneceu 0,250 g (76%) de **7** como um sólido amorfo de coloração branca.

R_f: 0,57 [hexano:acetato de etila (80:20, v/v)]

F.M. = C₃₂H₅₂O₂

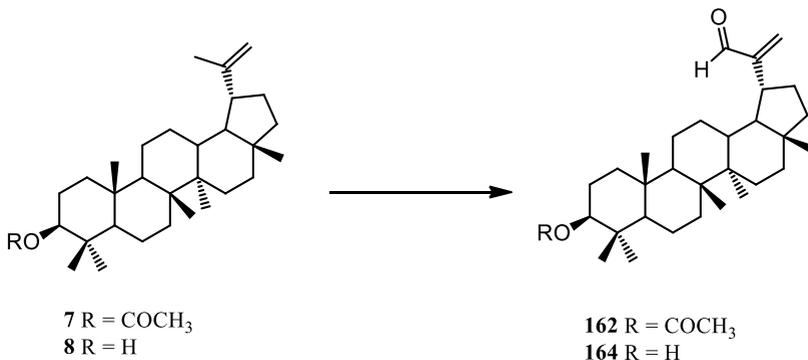
P.M. = 468,75 g/mol

p.f. = 215-216°C (lit.: 215 °C)¹⁷⁰

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 4,70 (sl, 1H, H29a), 4,57 (sl, 1H, H29b), 4,47 (dd, *J* = 5,3; 10,8 Hz, 1H, H3), 2,38 (dt, *J* = 4,2; 9,5 Hz, 1H, H19), 2,05 (s, 3H, -COOCH₃), 1,80-0,60 (sinais característicos do substrato – sobrepostos). **RMN de ¹³C** (75 MHz, CDCl₃) δ 171,0; 151,0; 109,4; 81,0; 55,4; 50,3; 48,3; 48,0; 43,0; 42,8; 40,8; 40,0; 38,4; 38,0; 37,8; 37,1; 35,6; 34,2; 29,8; 28,0; 27,4; 25,1; 23,7; 21,4; 20,9; 19,3; 18,2; 18,0; 16,5; 16,2; 16,0; 14,5

Dados espectroscópicos estão de acordo com o reportado da literatura.¹⁷⁰

Procedimento geral para obtenção do derivado aldeído



A um balão de 25 mL com duas bocas equipado com barra magnética e condensador foram adicionados lupeol **8** ou acetato de lupeol **7** (1 equiv.), SeO₂(1,5 equiv.) e 10 mL de EtOH (previamente destilado). A mistura reacional foi submetida ao aquecimento a 100 °C por 18 horas e em seguida diluído em 10 mL de EtOH e filtrado em funil de placa sinterizada contendo sílica gel eluído com hexano: acetato de etila (90:10). O solvente foi evaporado em evaporador rotatório a 50°C. e a purificação por coluna cromatográfica de sílica gel levou a obtenção do produto desejado **162** foi obtido como um sólido de coloração branca com rendimentos variáveis entre 35 a 50 %.

3β-acetoxi-lup-20(29)-en-30-al (**162**)

F.M. = C₃₂H₅₂O₂

P.M. = 482,74 g/mol

p.f. = 220-222 °C (lit.: 221-222 °C)¹⁴⁵

Rf: 0,51 [hexano:acetato de etila (90:10, v/v)]

RMN de ¹H(300 MHz, CDCl₃) δ 9,52 (s, 1H, CHO), 6,30 (s, 1H, H-29a), 5,93 (s, 1H, H-29b), 4,46 (m, 1H, H-3), 2,75 (m, 1H, H-19), 2,05 (s, 3H, -OCOCH₃), 1,80-0,60 (sinais característicos do substrato – sobrepostos)

Dados espectroscópicos estão de acordo com o reportado da literatura¹⁴⁵

3 β -hidroxi-lup-20(29)-en-30-al (164)

164– Foi obtido como um sólido de coloração branca com rendimentos variáveis entre 40 a 54 %

F.M. = C₃₀H₄₈O₂

P.M. = 440,70 g/mol

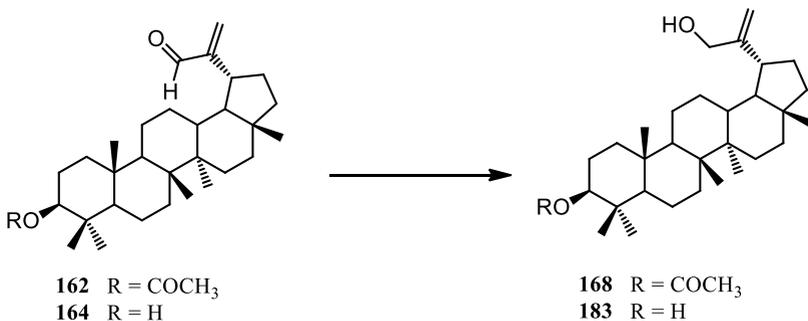
p.f. = 214 – 217 °C (lit.: 216 °C) ¹³⁹

R_f : **0,45** 0,57 [hexano:acetato de etila (90:10, v/v)]

RMN de ¹H(500 MHz, CDCl₃) δ 9,50 (s, 1H, CHO), 6,29 (s, 1H, H-29a), 5,91 (s, 1H, H-29b), 3,16 (dd, $J = 5,1; 10,8$ Hz 1H, H-3), 2,76 (m, 1H, H-19), 2,20-0,60 (sinais característicos do substrato – sobrepostos).

Dados espectroscópicos estão de acordo com o reportado da literatura ¹³⁹

Procedimento geral para obtenção do derivado reduzido



A um balão de 10 mL equipado com barra magnética foi adicionado o derivado aldeído **162** ou **164** (1 equiv.) e 4 mL de EtOH. A solução foi resfriada a 0 °C para a adição de NaBH₄ (3 equiv.) e submetida à agitação a temperatura ambiente. Depois de evidenciada a conversão completa por CCD (18 h para 118^a; 4 h para 118) foram adicionados 2 mL de H₂O destilada. A fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 x 15 mL) e as fases orgânicas foram combinadas e lavadas com 20 mL de solução saturada de NaCl, seca com MgSO₄, filtrada e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotatório a 50°C. A purificação por coluna cromatográfica de sílica gel levou a obtenção do composto desejado.

3β-acetoxi-30-hidroxi-lup-20(29)-eno (**168**)

168 – Foi obtido como um sólido de coloração branca com rendimentos variáveis entre 73 a 80 %

F.M. = C₃₂H₅₂O₃

P.M. = 484,75 g/mol

Rf: 0,51 [hexano:acetato de etila (90:10, v/v)];

p.f. = 225 - 227 °C (221-222 °C)¹⁷⁰

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 4,95 (sl, 1H, H-29a), 4,91 (sl, 1H, H-29b), 4,47 (m, 1H, H-3), 4,13 (s, 2H, H-30), 2,28 (m, 1H, H-19), 2,05 (s, 3H, -OCOCH₃), 2,10 – 0,70 (sinais sobrepostos- perfil característico do substrato) Dados espectroscópicos estão de acordo com o reportado da literatura¹⁷⁰

3 β ,30-dihidroxi-lup-20(29)-eno (183)

183 – Foi obtido como um sólido de coloração branca com rendimentos variáveis entre 21 %

F.M. = C₃₀H₅₀O₂

P.M. = 468,75 g/mol

Rf :0,28[hexano:acetato de etila (60:40, v/v)]

p.f. = 235 °C (lit.: 237-239 °C)¹⁷⁰

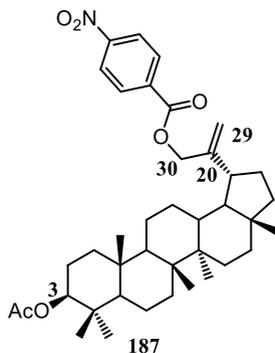
RMN de ¹H(500 MHz, CDCl₃) δ 4,94 (m, 1H, H-29a), 4,91 (sl, 1H, H-29b), 4,12 (m, 2H, H-30), 3,20 (m, 1H, H-3), 2,30 (m, 1H, H-19), 2,10 – 0,70 (sinais sobrepostos- perfil característico do substrato)

Dados espectroscópicos estão de acordo com o reportado da literatura¹⁷⁰

Procedimento geral para a reação de acilação com cloretos de acila

Os derivados ésteres de lupeol **187**, **188**, **189**, **190** e **191** foram preparados em pequena escala conforme metodologia descrita por Mallavadhani e colaboradores.¹⁷⁴ A uma solução do derivado álcool **168** (~0,0619 mmol; 1,0 eq.) em CH₂Cl₂ foram adicionados o cloreto de ácido carboxílico(2,0 equiv.), DCC(5,0 equiv.) e DMAP (5,0 equiv.). A mistura reacional foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente, até a conversão completa do material de partida. Em seguida, a mistura reacional foi filtrada, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotatório a 50°C e a purificação por coluna cromatográfica de sílica gel utilizando uma mistura de hexano: acetato de etila (95:05) como eluente forneceu o produto desejado.

3 β -acetoxi-30- *p*-nitrobenzoato-lup-20(29)-eno (187)



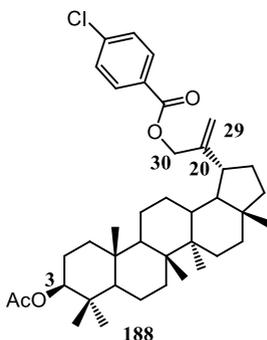
F.M. = C₃₉H₅₅NO₆
P.M. = 633,85 g/mol

Produto obtido na forma de um sólido amarelado com 46% de rendimento (0,018 g). R_f = 0,83 [hexano:acetato de etila (80:20, v/v)]; p.f. = 218 - 220 °C;

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 8,30 (m, 4H, H' aromáticos), 5,05 (sl, 1H, H-29a), 5,03 (sl, 1H, H-29b), 4,86 (s, 2H, H-30), 4,47 (m, 1H, H-3), 2,37 (m, 1H, H-19), 2,05 (s, 3H, -OCOCH₃), 2,10 - 0,70 (sinais sobrepostos- perfil característico do substrato).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 171,1; 164,4; 150,6; 148,8; 135,6; 130,7; 123,6; 110,4; 80,9; 67,7; 55,3; 50,2; 49,2; 44,0; 43,1; 42,8; 40,8; 39,8; 38,4; 38,0; 37,8; 37,1; 35,4; 34,7; 34,2; 31,6; 28,0; 27,3; 26,7; 23,7; 21,4; 21,0; 20,9; 18,2; 17,7; 16,5; 16,2; 16,0; 14,5.

ESI-MS *m/z* (modo positivo): calculado para C₃₉H₅₅NO₆ 656,3927; obtido 656,3920 [M + Na]⁺.

3 β -acetoxi-30-*p*-clorobenzoato-lup-20(29)-eno (188)

F.M. = C₃₉H₅₅ClO₄
 P.M. = 623,30 g/mol

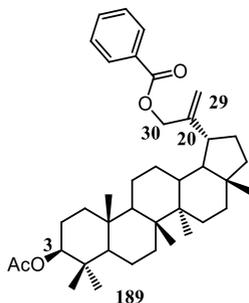
Produto obtido na forma de um óleo incolor com 80% de rendimento (0,016 g). R_f = 0,43 [hexano:acetato de etila (90:10, v/v)];

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,99 (m, 2H, H' aromáticos), 7,41 (m, 2H, H' aromáticos) 5,01 (sl, 1H, H-29a), 4,80 (sl, 1H, H-29b), 4,86 (s, 2H, H-30), 4,46 (m, 1H, H-3), 2,36 (m, 1H, H-19), 2,04 (s, 3H, -OCOCH₃), 2,10 – 0,70 (sinais sobrepostos- perfil característico do substrato)

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 171.0; 165.5; 149.2; 131.0; 128.7; 80.9; 55.8; 55.3; 50.2; 49.0; 47.8; 44.1; 43.0; 42.8; 40.8; 39.8; 38.4; 38.0; 37.8; 37.1; 35.4; 34.9; 34.2; 31.6; 27.9; 27.4; 26.6; 25.5; 24.7; 23.7; 21.4; 21.0; 18.2; 17.7; 16.5; 16.2; 16.0; 14.5; 14.5

ESI-MS *m/z* (modo positivo): calculado para C₃₉H₅₆ClO₄ 623,3867; obtido 623,3867 [M +H]⁺.

3 β -acetoxi-30-benzoato-lup-20(29)-eno (189)



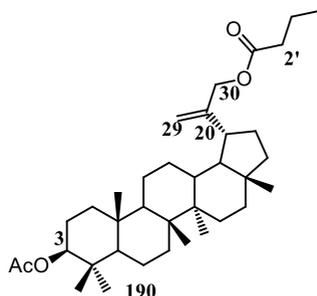
F.M. = $C_{39}H_{56}O_4$
P.M. = 588,85 g/mol

Produto obtido na forma de um óleo incolor com 73% de rendimento (0,027 g). R_f = 0,45 [hexano:acetato de etila (90:10, v/v)];

RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8,08 (m, 2H, H' aromáticos), 7,58 (m, 1H, H' aromáticos), 7,46 (m, 2H, H' aromáticos), 5,04 (sl, 1H, H-29a), 5,03 (sl, 1H, H-29b), 4,82 (s, 2H, H-30), 4,48 (m, 1H, H-3), 2,38 (m, 1H, H-19), 2,05 (s, 3H, $-OCOCH_3$), 2,10 – 0,70 (sinais sobrepostos-perfil característico do substrato).

RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ 171,0; 165,5; 149,2; 131,0; 128,7; 110,1; 80,9; 55,8; 55,3; 50,2; 49,0; 47,8; 44,1; 43,0; 42,8; 40,8; 39,8; 38,4; 38,0; 37,8; 37,1; 35,4; 34,9; 34,2; 31,6; 27,9; 27,4; 26,6; 25,5; 24,7; 23,7; 21,4; 21,0; 18,2; 17,7; 16,5; 16,2; 16,0; 14,5,

ESI-MS m/z (modo positivo): calculado para $C_{39}H_{55}NO_6$ 589,4257; obtido 589,4249 $[M + H]^+$.

3 β -acetoxi-30-butirato-lup-20(29)-eno (190)F.M. = C₃₆H₅₈O₄

P.M. = 554,84 g/mol

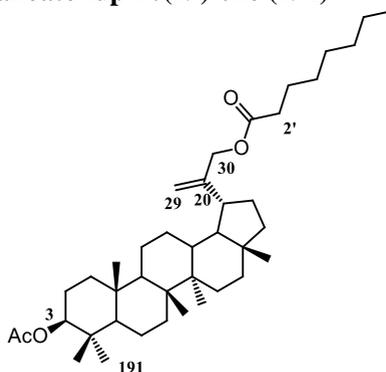
Produto obtido na forma de um sólido branco com 95% de rendimento (0,017 g). $R_f=0,60$ [hexano:acetato de etila (90:10, v/v)];

RMN de ¹H(300 MHz, CDCl₃) δ 4,95 (sl, 1H, H-29a), 4,92 (sl, 1H, H-29b), 4,58 (d, $J = 4,35$ Hz, 2H, H-30), 4,49 (m, 1H, H-3), 2,35 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H, H-2') 2,31 (m, 1H, H-19), 2,05 (s, 3H, -OCOCH₃), 2,10 – 0,70 (sinais sobrepostos- perfil característico do substrato).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 173,4; 171,0; 149,4; 109,9; 80,9; 65,8; 55,3; 50,2; 48,9; 43,0; 42,8; 40,8; 39,8; 38,4; 38,0; 37,8; 37,1; 36,3; 35,4; 34,2; 31,3; 27,9; 27,4; 26,5; 23,7; 21,4; 21,0; 18,4; 18,2; 17,7; 16,5; 16,2; 16,0; 14,5; 13,8

ESI-MS m/z (modo positivo): calculado para C₃₆H₅₉O₄ 555,4413; obtido 555,4409 [M +H]⁺.

3 β -acetoxi-30-octanoato-lup-20(29)-eno (191)



F.M. = C₄₀H₆₆O₄
P.M. = 610,94 g/mol

Produto obtido na forma de um óleo incolor com 90% de rendimento (0,017 g). $R_f = 0,66$ [hexano:acetato de etila (90:10, v/v)]; **RMN de ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ 300 MHz, CDCl₃) δ 4,95 (sl, 1H, H-29a), 4,92 (sl, 1H, H-29b), 4,58 (d, $J = 4,35$ Hz, 2H, H-30), 4,49 (m, 1H, H-3), 2,35 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H, H-2'), 2,31 (m, 1H, H-19), 2,05 (s, 3H, -OCOCH₃), 2,10 – 0,70 (sinais sobrepostos- perfil característico do substrato)

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 173,6; 171,1; 149,4; 109,9; 80,9; 55,3; 50,3; 48,9; 43,0; 42,8; 40,8; 39,8; 38,4; 38,0; 37,8; 37,1; 35,4; 34,9; 34,5; 34,2; 31,7; 29,2; 29,0; 28,0; 27,4; 25,5; 25,0; 24,7; 23,7; 22,6; 21,4; 21,0; 18,2; 17,7; 16,5; 16,2; 16,0; 14,5; 14,1

ESI-MS m/z (modo positivo): calculado para C₄₀H₆₇O₄ 611,5039; obtido 611,5056 [M + H]⁺.

3.6.2. Atividade biológica

Avaliação da inibição de crescimento de amastigotas de *L. amazonensis* e *T. cruzi*

A avaliação da atividade antileishmania e antitripanossoma *in vitro* foi realizada pela Dra. Milene H. Moraes sob supervisão do professor Dr. Mário Steindel nas dependências do Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

A linhagem celular de leucemia monocítica aguda THP-1 (ATCC TIB202) (células coletadas no 3º ou 4º dia de crescimento) foi cultivada em placas de 96 poços em meio de cultura RPMI-1640 na ausência de vermelho de fenol (Sigma-Aldrich, CO. St. Louis, MO, EUA) e suplementada com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Life Technologies, EUA), 12,5 mM de tampão HEPES, 100 U/mL de Penicilina, 100 µg/mL de Estreptomicina e 2 mM de Glutamax a temperatura de 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Posteriormente, essa cultura de células (4,0 x 10⁴ células/poço) foi acrescida de 100 ng/mL de forbol 12-miristato 13- acetato (PMA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) durante 72 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂, a fim induzir a sua diferenciação em fagócitos aderentes semelhantes a macrófagos.¹⁷⁵

As formas promastigotas de *L. amazonensis* MHOM/BR/77/LTB0016, expressando a enzima β-galactosidase, foram obtidas em meio Schneider (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) acrescido com 5% de SFB inativado e 2% de urina humana. As formas intracelulares amastigotas a serem utilizadas no screening leishmanicida foram obtidas a partir do cultivo de promastigotas. Após quatro dias de cultivo; uma suspensão de promastigotas, foram lavada duas vezes com PBS (Tampão Salino Fosfato, pH 7,4). A concentração de parasitos foi ajustada para 4,0 x 10⁶ células/mL em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de soro humano AB+ por 1 hora a 34 °C em estufa para opsonização do parasito. A suspensão de promastigotas opsonizadas foi adicionada sobre as células THP-1 na proporção de parasito/célula 10:1 e incubada durante 4 horas a 34 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Após este período, os parasitos não internalizados nas células foram removidos por meio de uma lavagem com PBS e, as células infectadas foram incubadas por 24 horas com 180 µL de meio RPMI-1640 suplementado completo a fim de permitir a transformação das promastigotas em amastigotas intracelulares.

A espécie *Trypanosoma cruzi* β -galactosidase, cepa Tulahuen, foi fornecida pelo Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte. As formas tripomastigotas, derivadas de cultura de células de fibroblastos L929 infectadas, foram utilizadas para infectar as células de macrófagos THP-1 diferenciadas ($4,0 \times 10^4$ células/poço) em microplacas de 96 poços, numa proporção de parasito/célula 3:1; e incubadas overnight a 37 °C em estufa com 5% de CO₂. O meio contendo os parasitos não internalizados foi removido e substituído por 180 μ L de meio de cultura fresco.¹⁷⁶

Todos os compostos avaliados foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídos nas concentrações seriadas de 50 a 1,56 μ M. Uma monocamada de células infectadas foi tratada pela adição de 20 μ L de cada composto teste, seguido por incubação em estufa durante 48 horas a 34 ou 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após o tratamento, as células foram cuidadosamente lavadas com PBS e incubadas durante 16 horas a 37 °C com 250 μ L do substrato cromogênico clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosídeo 100 μ M (CPRG) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) e Nonidet P-40 0,1% (NP-40) (Amresco Inc., Solon, Ohio, EUA). A densidade óptica foi lida em comprimento de onda de 570/630 nm em equipamento TECAM®, modelo Infinite M200.

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT), conhecido como método colorimétrico MTT. Para realização desse ensaio de citotoxicidade, as células THP-1 ($6,0 \times 10^4$ por poço) foram semeadas em microplacas de 96 poços e diferenciadas com 100 ng/mL de PMA durante 72 horas a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Em seguida, 20 μ L dos compostos testes, diluídos em meio de cultura em concentrações decrescentes de 500 a 15,6 μ M ou DMSO 1% (controle negativo), foram adicionados sobre as células e cultivados por 72 horas a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas (TECAN) a 540 nm, e os resultados foram expressos em CC₅₀ (concentração citotóxica 50%). O procedimento do ensaio colorimétrico usado na triagem dos compostos.

Avaliação da inibição da enzima tripanotona redutase

A avaliação da inibição da enzima tripanotona redutase foi realizada pela Dra. Milene H. Moraes sob supervisão do professor Dr.

Mário Steindel nas dependências do Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

O ensaio foi realizado com tripanotona redutase recombinante de *T. cruzi* (cTcTR). Em microplacas de 96 poços foram encubados tampão (40 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 7.5), a enzima TcTR (0.005 mU), 1 μ M T[S]₂ (Sigma-Aldrich), 150 μ M NADPH (Sigma-Aldrich) e os compostos na concentração de and compounds at 100 μ M

A reação foi incubada a 27 °C por 30 min antes da adição de 25 μ M de DTNB (Sigma-Aldrich). A atividade enzimática foi monitorada pelo aumento da absorbância em 412 nm usando espectrofotômetro (Infinite M200 TECAN).¹⁷⁷

REFERÊNCIAS

- 1 DIMASI, J. A.; GRABOWSKI, H. G.; HANSEN, R. W. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. **Journal of Health Economics**, v. 47, p. 20 - 33, 2016.
- 2 SILVERMAN, R. B. **The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action**. 2 ed. San Diego, CA: Academic Press, 2004.
- 3 WERMUTH, C. G. **The practice of medicinal chemistry**. 3. ed. Illkirch:Elsevier Science, 2008.
- 4 CALLAWAY, E.; CYRANOSKI, D. Anti-parasite drugs sweep Nobel prize in medicine 2015. **Nature**, v. 526, n. 7572, p. 174 - 175, 2015.
- 5 SHEN, B. A New golden age of natural products drug discovery. **Cell**, v. 163, n. 6, p. 1297 - 1300, 2015.
- 6 HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111 - 129, 2015.
- 7 NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.
- 8 BUTLER, M. S. the role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 12, p. 2141 - 2153, 2004.
- 9 NICOLAOU, K. C.; CHEN, J. S.; DALBY, S. M. From nature to the laboratory and into the clinic. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 17, n. 6, p. 2290-2303, 2009.
- 10 KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 3, p. 206 - 220, 2005.

- 11 BAUER, A.; BRÖNSTRUP, M. Industrial natural product chemistry for drug discovery and development. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 1, p. 35-60, 2014.
- 12 DESMARCHELIER, C. Neotropics and natural ingredients for pharmaceuticals: Why isn't south American biodiversity on the crest of the wave? **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 6, p. 791 - 799, 2010.
- 13 LEITE, S. N.; PALHANO, G.; ALMEIDA, S.; BIAVATTI, M. W. Wound healing activity and systemic effects of *Vernonia scorpioides* extract in guinea pig. **Fitoterapia**, v. 73, n. 6, p. 496 - 500, 2002.
- 14 FREIRE, M. D. F. I.; ABREU, H. S.; DA CRUZ, AL. C. H.; FREIRE, R. B. Inhibition of fungal growth by extracts of *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. **Journal of Brazilian Society of Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 1 - 6, 1996.
- 15 BUSKUH, H.; DE OLIVEIRA, F. L.; BLINF, L. Z.; DE FREITAS, R. A.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; CORILO, Y. E.; EBERLIN, M .N. CARAMORI, G. F.; BIAVATTI, M. W. Sesquiterpene lactones from *Vernonia scorpioides* and their in vitro cytotoxicity. **Phytochemistry**, v. 71, n. 13, p. 1539-1544, 2010.
- 16 KREUGER, M. R. O.; FARIAS, B. G.; MOREIRA, J.; BLIND, L. Z.; AMOAH, A. K. S.; LEITE, A. S.; BIAVATTI, M. W.; VAN HOFF, T.; D'HERDE, K.; CRUZ, A. B. Effects of the topical application of an ethyl acetate fraction from *Vernonia scorpioides* on excisional wounds infected with *Staphylococcus aureus* in rats. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 123 - 130, 2012.
- 17 RAUH, L. K.; HORINOUCI, C. D.; LODDI, A. M. PIETROVSKI, E. F.; NERIS, R.; SOUZA-FONSECA-GUIMARÃES, F.; BUCHI, D. F.; BIAVATTI, M. W.; OTUKI, M. F.; CABRINI, D. A. Effectiveness of *Vernonia scorpioides* ethanolic extract against skin inflammatory processes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, n. 2, p. 390-7, 2011.
- 18 PAGNO, T.; BLIND, L. Z.; BIAVATTI, M. W.; KREUGER, M. R. Cytotoxic activity of the dichloromethane fraction from *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. (Asteraceae) against Ehrlich's tumor cells in

mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 11, p. 1483 - 91, 2006.

19 KREUGER, M. R. O.; BIAVATTI, M. W.; PACHECO, E. S.; JÚNIO, R. R. A.; BLIND, L. Z.; PEDRINI, R. D. Cytotoxic activity of the sub-fraction 2125 from *Vernonia scorpioides* against Sarcoma 180 tumor cells in mice. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2 A, p. 353 - 357, 2009.

20 BOHLANN, F.; MAHANTA, P. K.; DUTTA, L. N. Hirsutinolides from *Vernonia species*. **Phytochemistry**, v. 18, n. 2, p. 289 - 91, 1979.

21 DREW, M. G. B.; HITCHMAN, S. P.; MANN, J.; LOPES, J. L. C. X-ray crystal structure of the sesquiterpene lactone scorpioidine. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 17, p. 802-3, 1980.

22 BUSKUHL, H.; FREITAS, R. A.; MONACHE, F. D.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; CORILO, Y. E.; EBERLIN, M. N.; BIAVATTI, M. W. A new polyacetylene from *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. (Asteraceae) and its in vitro antitumoral activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 7, p. 1327 - 1333, 2009.

23 MACHADO, A. L.; ARAGÃO, F. ..; BANDEIRA, P. N.; DOS SANTOS, H. S.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; PESSOA, O. D. L.; SILVEIRA, E. R.; NUNCES, E. P.; BRAZ-FILHO, R. Chemical constituents of *Vernonia scorpioides* (Lam) Pers. (Asteraceae). **Quimica Nova**, v. 36, n. 4, p. 540 - 543, 2013.

24 POLLO, L. A. E.; BOSI, C. F.; LEITE, A. S.; RIGOTTO, C.; KRATZ, J.; SIMÕES, C. M. O.; FONSECA, D. E. P.; COIMBRA, D.; CARAMORI, G.; NEPEL, A.; CAMPOS, F. R.; BARISON, A.; BIAVATTI, M. W. Polyacetylenes from the leaves of *Vernonia scorpioides* (Asteraceae) and their antiproliferative and antiherpetic activities. **Phytochemistry**, v. 95, p. 375 - 383, 2013.

25 JAKUPOVIC, J.; BARUAH, R. N.; THI, T. V.; BOHLMANN, F.; MSONTHI, J. D.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. New vernolepin derivatives from *Vernonia glabra* and glaucolides from *Vernonia scorpioides*. **Planta Medica**, v. 51, n. 5, p. 378-80, 1985.

- 26 GOMEZ C, D.; RIVERA, A. V.; GIL, E. R; VALERI, V.; TRIANA, J. X-ray structure of 6-deoxymikanokryptin, a new guaianolide from *Vernonia scorpioides* Pers: 3-oxo-1 α ,7 α ,8 β ,10 β (H)-guaia-4(5),11(13)-dien-8,12-olide. **Acta Crystallographica, Section. C: Crystal Structure Communications**, v. C43, n. 11, p. 2216 - 18, 1987.
- 27 WARNING, U.; JACUPOVIC, J.; BOHLMANN, F. Scorpiolide, a new type of sesquiterpene lactone from *Vernonia scorpioides*. **Liebigs Annalen der Chemie**, n. 5, p. 467 - 468, 1987.
- 28 BUSKUHLE, H.; DE OLIVEIRA, F. L.; BLIND, L. Z.; FREITAS, R. A.; CAMPOS, F. R.; CORILO, Y. E.; EBERLIN, M. N.; CARAMORI, G. F.; BIAVATTI, M. W. Sesquiterpene lactones from *Vernonia scorpioides* and their in vitro cytotoxicity. **Phytochemistry**, v. 71, n. 13, p. 1539 - 1544, 2010.
- 29 MINTO, R. E.; BLACKLOCK, B. J. Biosynthesis and function of polyacetylenes and allied natural products. **Progress in Lipid Research**, v. 47, n. 4, p. 233 - 306, 2008.
- 30 NEGRI, R. Polyacetylenes from terrestrial plants and fungi: Recent phytochemical and biological advances. **Fitoterapia**, v. 106, p. 92 - 109, 2015.
- 31 ZHOU, Z.-F.; MENNA, M.; CAI, Y. S.; GUO, Y. W. Polyacetylenes of marine origin: chemistry and bioactivity. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 3, p. 1543 - 1596, 2015.
- 32 CHRISTENSEN, L. P.; JAKOBSEN, H. B. Polyacetylenes: distribution in higher plants, pharmacological effects and analysis. *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*, p. 757 - 816, 2008.
- 33 BOHLMANN, F. Naturally occurring acetylenes. In: Miller, L. P. (Ed.) **Phytochemistry**, New York: Van Nostrand Reinhold, 1973, p. 112-131.
- 34 MEINWALD, J.; MEINWALD, Y. C.; CHALMERS, A. M.; EISNER, T. Dihydromatricaria acid: acetylenic acid secreted by soldier beetle. **Science**, v. 160, n. 3830, p. 890 - 892, 1968.

- 35 CHRISTENSEN, L. P.; BRANDT, K. Bioactive polyacetylenes in food plants of the Apiaceae family: Occurrence, bioactivity and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 3, p. 683 - 693, 2006.
- 36 HANSEN, L.; BOLL, P. M. Polyacetylenes in Araliaceae: their chemistry, biosynthesis and biological significance. **Phytochemistry**, v. 25, n. 2, p. 285 - 293, 1986.
- 37 KONOVALOV, D. A. Polyacetylene compounds of plants of the Asteraceae family. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 48, n. 9, p. 613 - 631, 2014.
- 38 CHRISTENSEN, L. P. Bioactivity of polyacetylenes in food plants. In: WATSON, R. S.; PREEDY, V. R. (Ed.). **Bioactive Foods in Promoting Health**. New York: Elsevier Science, 2010. p.285-306.
- 39 LUU, T.; TYKWINSKI, R. R. Synthesis and stability of a homologous series of triynol natural products and their analogues. **Journal of Organic Chemistry**, v. 71, n. 23, p. 8982 - 8985, 2006.
- 40 JACOBSON, C. A. Cicutoxin, the poisonous principle in water hemlock (Cicuta). *Journal American Chemical Society*, v. 37, p. 916-34, 1915.
- 41 UWAI, K.; OHASHI, K.; TAKAYA, Y.; OHTA, T.; TADANO, T.; KISARA, K.; SHIBUSAWA, K.; SAKAKIBARA, R.; OSHIMA, Y. Exploring the structural basis of neurotoxicity in C17-polyacetylenes isolated from water hemlock. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 23, p. 4508 - 4515, 2000.
- 42 DUBOIS, J. M.; SCHNEIDER, M. F. Block of sodium current and intramembrane charge movement in myelinated nerve fibers poisoned with a vegetable toxin. **Nature**, v. 289, n. 5799, p. 685 - 688, 1981.
- 43 WYREMBEK, P.; NEGRI, R.; KACZOR, P.; CZYEWKA, M.; APPENDINO, G.; MOZRZYMAS, J. W. Falcarindiol allosterically modulates GABAergic currents in cultured rat hippocampal neurons. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 4, p. 610 - 616, 2012.

- 44 CZYZEWSKA, M. M.; CHROBOK, L.; KANIA, A.; JATCZAK, M.; POLLASTRO, F.; APPENDINO, G.; MOZRZYMAS, J. W. Dietary acetylenic oxylipin falcarinol differentially modulates GABA_A receptors. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 12, p. 2671 - 2677, 2014.
- 45 POPLAWSKI, J.; WROBEL, J. T.; GLINKA, T. Panaxydol, a new polyacetylenic epoxide from *Panax ginseng* roots. **Phytochemistry**, v. 19, n. 7, p. 1539 - 1541, 1980.
- 46 SCAGLIONE, F.; PANNACCI, M.; PETRINI, O. The standardised G115® *Panax ginseng* C.A. Meyer extract: A review of its properties and usage. **Evidence-Based Integrative Medicine**, v. 2, n. 4, p. 195 - 206, 2005.
- 47 WASHIDA, D.; KITANAKA, S. Determination of polyacetylenes and ginsenosides in *Panax* species using high performance liquid chromatography. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 11, p. 1314 - 1317, 2003.
- 48 MATSUNAGA, H.; KATANO, M.; YAMAMOTO, H.; FUJITO, H.; MORI, M.; TAKATA, K. Cytotoxic activity of polyacetylene compounds in *Panax ginseng* C. A. Meyer. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 12, p. 3480- 3482, 1990.
- 49 BERNART, M. W.; CARDELLINA, H. H.; BALASCHAK, M. S.; ALEXANDER, M. R.; SHOEMAKER, R. H.; BOYD, M. R. Cytotoxic falcarinol oxylipins from *Dendropanax arboreus*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 8, p. 748 - 753, 1996.
- 50 KOBK-LARSEN, M.; CHRISTENSEN, L. P.; VACH, W.; RITSKES-HOITINGA, J.; BRANDT, K. Inhibitory effects of feeding with carrots or (-)-falcarinol on development of azoxymethane-induced preneoplastic lesions in the rat colon. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1823 - 1827, 2005.
- 51 KLEIN, J. B.; NOWILL, A. E.; FRANCHI JR, G. C.; BIAVATTI, M. W.; QUINTÃO, N. L. M.; FREITAS, R. A. Cytotoxic, antitumour and antimetastatic activity of two new polyacetylenes isolated from *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. **Basic Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 113, n. 5, p. 307 - 315, 2013.

- 52 CARBALLEIRA, N. M. New advances in fatty acids as antimalarial, antimycobacterial and antifungal agents. **Progress in Lipid Research**, v. 47, n. 1, p. 50 - 61, 2008.
- 53 ANCHEL, M. Some naturally occurring antibiotic polyacetylenes. **Transactions of the New York Academy of Sciences**, v. 16, n. 7, p. 337 - 342, 1954.
- 54 BÄUERLE, J.; ANKE, T.; JENTE, R.; BOSOLD, F. Antibiotics from basidiomycetes XVI. Antimicrobial and cytotoxic polyines from *Mycena viridimarginata* Karst. **Archives of Microbiology**, v. 132, n. 2, p. 194 - 196, 1982.
- 55 IGUCHI, K.; KITADE, M.; KASHIWAGI, T.; YAMADA, Y. Structure and synthesis of petrosynes, new acetylenic enol ether glycerides from the Okinawan marine sponge of the genus *Petrosia*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 58, n. 21, p. 5690 - 5698, 1993.
- 56 TOWERS, G. H. N.; ABRAMOWSKI, Z.; FINLAYSON, A. J.; ZUCCONI, A. Antibiotic properties of thiarubrine A, a naturally occurring dithiacyclohexadiene polyine. **Planta Medica**, v. 3, p. 225-229, 1985.
- 57 MCLACHLAN, D.; ARNASON, T.; LAM, J. Structure-function relationships in the phototoxicity of acetylenes from the Asteraceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 14, n. 1, p. 17 - 23, 1986.
- 58 HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. Antiviral properties of photosensitizers. **Photochemistry and Photobiology**, v. 48, n. 3, p. 289 - 296, 1988.
- 59 PAGE, J. E.; BLOCK, E.; TOWERS, G. H. N. Visible-light photochemistry and phototoxicity of thiarubrines. **Photochemistry and Photobiology**, v. 70, n. 2, p. 159 - 165, 1999.
- 60 PAULSEN, E.; CHRISTENSEN, L. P.; ANDERSEN, K. E. Dermatitis from common ivy (*Hedera helix*) in Europe: past, present, and future. **Contact Dermatitis**, v. 62, n. 4, p. 201 - 209, 2010.

- 61 PAULSEN, E.; PETERSEN, T. H.; FRETTE, X. C.; ANDERSEN, K. E.; CHRISTENSEN, L. P. Systemic allergic dermatitis caused by Apiaceae root vegetables. **Contact Dermatitis**, v. 70, n. 2, p. 98 - 103, 2014.
- 62 CHRISTENSEN, L. P. Bioactivity of polyacetylenes in food plants. In: WATSON, R. S.; PREEDY, V. R. (Ed.). **Bioactive Foods in Promoting Health**. New York: Elsevier Science, 2010. p. 285 - 306.
- 63 LEONTI, M.; CASU, L.; RADUNER, S.; COTTIGLIA, F.; FLORIS, C.; ALTMANN, K. H.; GERTSCH, J. Falcarinol is a covalent cannabinoid CB1 receptor antagonist and induces pro-allergic effects in skin. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, n. 12, p. 1815 - 1826, 2010.
- 64 POLLO, L. A. E.; BOSI, C. F.; LEITE, A. S.; RIGOTTO, C.; KRATZ, J.; SIMÕES, C. M. O.; FONSECA, D. E. P.; COIMBRA, D.; CARAMORI, G.; NEPEL, A.; CAMPOS, F. R.; BARISON, A.; BIAVATTI, M. W. Polyacetylenes from the leaves of *Vernonia scorpioides* (Asteraceae) and their antiproliferative and antiherpetic activities. **Phytochemistry**, v. 95, p. 375 - 383, 2013.
- 65 HENCHER, J. L. The structural chemistry of the CC bond. In: PATAI, S. (Ed.) **The chemistry of the Carbon-Carbon Triple Bond**. Cinchester: John Wiley & Sons, Inc., 1978. p. 57 - 67.
- 66 BRUCE, P. Y. **Organic chemistry**. 7 Ed. Boston: Pearson. 2014.
- 67 ALAMI, M.; HAMZE, A.; MESSAOUDI, S. Coupling reactions between sp carbon center. In: KNOCHEL, P.; MOLANDER, G. A. (Ed.). **Comprehensive Organic Synthesis**, Amsterdam: Elsevier. 2014. p. 528-577
- 68 SHI, W.; LEI, A. 1,3-Diyne chemistry: synthesis and derivations. **Tetrahedron Letters**, v. 55, n. 17, p. 2763 - 2772, 2014.
- 69 IEMSEN, P.; LIVINGSTON, R. C.; DIEDERICH, F. Acetylenic coupling: a powerful tool in molecular construction. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 39, n. 15, p. 2633 - 2657, 2000.
- 70 HAY, A. S. Oxidative coupling of acetylenes II. **Journal of Organic Chemistry**, v. 27, n. 9, p. 3320 - 3321, 1962.

- 71 SHI, W. Conjugated diyne chemistry: synthesis, natural existence and applications. **Current Organocatalysis**, v. 2, n. 1, p. 2 - 13, 2015.
- 73S IEMSEN, P.; LIVINGSTON, R. C.; DIEDERICH, F. Acetylenic coupling: a powerful tool in molecular construction. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 39, n. 15, p. 2632 - 2657, 2000.
- 74 BRANDSMA, L. Cross-coupling between 1-Alkyne and 1-Bromo-1-alkyne. In: **Synthesis of acetylenes, allenes and cumulenes : methods and techniques**. Amsterdam: Elsevier Academia Press., Julianlaan: Academic Press.2008. p. 273- 279.
- 75 SINDHU, K. S.; THANKACHAN, A. P.; SAJITHA, P. S.; ANILKUMAR, G. Recent developments and applications of the Cadiot-Chodkiewicz reaction. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 13, n. 25, p. 6891 - 6905, 2015.
- 76 ALAMI, M.; FERRI, F. A convenient route to unsymmetrical conjugated diynes. **Tetrahedron Letters**, v. 37, n. 16, p. 2763 - 2766, 1996.
- 77 UWAI, K.; OSHIMA, Y.; SUGIHARA, T.; OHTA, T. Syntheses and stereochemical assignment of toxic C17-polyacetylenic alcohols, virols A, B, and C, isolated from water hemlock (*Cicuta virosa*). **Tetrahedron**, v. 55, n. 31, p. 9469 - 9480, 1999.
- 78 NYE, S. A.; POTTS, K. T. Novel synthesis of unsymmetrical diarylbutadiynes. **Synthesis**, n. 5, p. 375-7, 1988.
- 79 BRUCKNER, R. The synthesis of gamma-alkylidenebutenolides. **Curent Organic Chemistry**, v. 5, n. 6, p. 679 - 718, 2001.
- 80 BRUCKNER, R. The β -elimination route to stereodefined γ -alkylidenebutenolides. **Chemical Communications**, n. 2, p. 141 - 152, 2001.
- 81 ALAMI, M.; FERRI, F.; LINSTRUMELLE, G. An efficient palladium-catalysed reaction of vinyl and aryl halides or triflates with terminal alkynes. **Tetrahedron Letters**, v. 34, n. 40, p. 6403 - 6406, 1993.

82 HESS, W.; BURTON, J. W. Palladium-catalysed cyclisation of N-alkynyl aminomalonates. **Chemistry - A European Journal**, v. 16, n. 41, p. 12303 - 12306, 2010.

83 WAVRIN, L.; VIALA, J. Clean and efficient oxidation of homoallylic and homopropargylic alcohols to β,γ -unsaturated aldehydes by the Dess-Martin periodinane. **Synthesis**, n. 3, p. 326-330, 2002.

84 HASHMI, A. S. K. Synthesis of Allenes by Isomerization Reactions. In: KRAUSE, N.; HASHMI, A.S.K (Org). **Modern Allene Chemistry**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, 2004, cap. 1.

85 HASHMI, A. S. K.; BATS, J. W.; CHOI, J.; SCHWARTZ, L. Isomerization on silica gel: synthesis of allenyl ketones and the first Nazarov Cyclizations of vinyl allenyl ketones. **Tetrahedron Letters**, v. 39, n. 41, p. 7491-7494, 1998.

86 THONGSORNKLEEB, C.; DANHEISER, R. L. A practical method for the synthesis of 2-alkynylpropenals. **Journal of Organic Chemistry**, v. 70, n. 6, p. 2364-2367, 2005.

87 HOFMEISTER, H.; ANNEN, K.; LAURENT, H.; WIECHERT, R. Novel entry to 17α -bromo- and 17α -iodoethynyl steroids. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 23, n. 9, p. 727-729, 1984.

88 HWANG, S.; KANG, H. R.; KIM, S. Synthesis of polyynes by in situ desilylative bromination and palladium-catalyzed coupling: (7-(benzyloxy)hepta-1,3,5-triynyl)triisopropylsilane. **Organic Syntheses**, v. 86, p. 225-235, 2009.

89 BRUNEL, Y.; ROUSSEAU, G. An easy preparation of iodoacetylenes. **Tetrahedron Letters**, v. 36, n. 15, p. 2619-2622, 1995.

90 ABRAHAM, E.; SUFFERT, J. In situ generation of 1-propyne: A useful introduction of 1-propyne on unsaturated halogenated compounds through the sonogashira reaction. **Synlett**, n. 2, p. 328-330, 2002.

- 91 BARTKO, S. G.; DENG, J.; DANHEISER, R. L.; Synthesis of 1-iodopropyne. **Organic Syntheses**, n. 93, p. 245 – 262, 2016.
- 92 BENTLEY, R. K.; JONES, E. R. H.; THALLER, V. Natural acetylenes. XXX. Polyacetylenes from *Lactuca* (lettuce) species of the Liguliflorae subfamily of the Compositae. **Journal of Chemical Society C**, n. 7, p. 1096 - 1099, 1969.
- 93 TAHA, A. A. Acetylenes and dichloroanisoles from *Psathyrella scobinacea*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 8, p. 921 - 926, 2000.
- 94 PREVOST, S.; MEIER, J.; CHODKIEWICZ, W.; CADIOT, O.; VILLEMART, A. Preparation of naturally occurring C10 and C13 polyacetylenes and of related compounds. **Bulletin De La Societe Chimique De France**, p. 2171 - 2175, 1961.
- 95 BEW, R. E.; CHAPMAN, J. R.; JONES, E. R. H.; LOWE, B. E.; LOWE, G. J. Journal of the Chemical Society C: Organic, p. 129 - 135, 1966.
- 96 JUSSEAU, X.; CHABAUD, L.; GUILLOU, C. Synthesis of γ -butenolides and α,β -unsaturated γ -butyrolactams by addition of vinylogous nucleophiles to Michael acceptors. **Tetrahedron**, v. 70, n. 16, p. 2595 - 2615, 2014.
- 97 VAN DER DEEN, H.; CUIPER, A. D.; HOF, R. P.; VAN OEVEREN, A.; FERINGA, B. L.; KELLOG, R. M. Lipase-catalyzed second-order asymmetric transformations as resolution and synthesis strategies for chiral 5-(acyloxy)-2(5H)-furanone and pyrrolinone synthons. Journal of the American Chemical Society, v. 118, n. 16, p. 3801 - 3803, 1996.
- 98 BROWN, S. P.; GOODWIN, N. C.; MACMILLAN, D. W. C. The First enantioselective organocatalytic Mukaiyama–Michael Reaction: a direct method for the synthesis of enantioenriched γ -butenolide architecture. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 5, p. 1192-1194, 2003.
- 99 MAO, B.; HEURTS, K.; FANANAS-MASTRAL, M.; VAN ZIJL, A.; FLETCHER, S. P.; MINNAARD, A. J.; FERINGA, B. L. Catalytic enantioselective synthesis of naturally occurring butenolides via hetero-

allylic alkylation and ring closing metathesis. **Organic Letters**, v. 13, n. 5, p. 948-951, 2011.

100 KAPFERER, T.; BRÜCKNER, R.; HERZIG, A.; KÖNIG, W. A. a enantioselective syntheses and configuration assignments of γ -chiral butenolides from Plagiomnium undulatum: butenolide synthesis from tetronic acids. **Chemistry - A European Journal**, v. 11, n. 7, p. 2154-2162, 2005.

101 SHARPLESS, K. B.; AMBERG, W.; BENNANI, Y. L.; CRISPINO, G. A.; JARTUNG, J.; JEONG, K. S.; KWONG, L.; MORIKAWA, K.; WANG, Z. M The osmium-catalyzed asymmetric dihydroxylation: a new ligand class and a process improvement. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 57, n. 10, p. 2768-2771, 1992.

102 KOLB, H. C.; VANNIEUWENHZE, M. S.; SHARPLESS, K. B. Catalytic asymmetric dihydroxylation. **Chemical Reviews**, v. 94, n. 8, p. 2483-2547, 1994.

103 CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced organic chemistry. Part B**. New York: Springer Verlag, 2007.

104 CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. G. **Organic chemistry**. Oxford: New York: Oxford University Press, 2012.

105 PROTEAU-GAGNÉ, A.; NADON, J. F.; BERNARD, S.; GUÉRIN, B.; GENDRON, L.; DORY, Y. L. Kinetic deconjugation: A gateway to the synthesis of Xxx-Gly (E)-alkene dipeptide isosteres. **Tetrahedron Letters**, v. 52, n. 49, p. 6603 - 6605, 2011.

106 BROWN, S. P.; BROCHU, M. P.; SINZ, C. J.; MACMILLAN, D. W. C. The direct and enantioselective organocatalytic α -oxidation of aldehydes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 36, p. 10808 - 10809, 2003.

107 ZHONG, G.; YU, Y. Enantioselective synthesis of allylic alcohols by the sequential aminooxylation-olefination reactions of aldehydes under ambient conditions. **Organic Letters**, v. 6, n. 10, p. 1637 - 1639, 2004.

- 108 HAYASHI, Y.; YAMAGUCHI, J.; HIBINO, K.; SHOJI, M. Direct proline catalyzed asymmetric α -aminoxylation of aldehydes. **Tetrahedron Letters**, v. 44, n. 45, p. 8293 - 8296, 2003.
- 109 VILAIVAN, T.; BHANTHUMNAVIN, W. Organocatalyzed asymmetric α -oxidation, α -aminoxylation and α -amination of carbonyl compounds. **Molecules**, v. 15, p. 917 - 958, 2010.
- 110 LANDA, A.; LÓPEZ, R.; MIELGO, A.; OIARBIDE, M.; PALOMO, C. Organocatalytic C-N bond formation. In: TORRES, R. R., (Ed.) **Stereoselective Organocatalysis: Bond Formation Methodologies and Activation Modes**. Hoboken, N.J: John Wiley & Sons, Inc., 2013. p. 381 - 431.
- 111 SHOJI, M.; HAYASHI, Y. Enantioselective Organocatalysis: A Powerful Tool for the Synthesis of Bioactive Molecules. In: COSSY, J.; ARSENIYADIS, S (Ed.). **Modern Tools for the Synthesis of Complex Bioactive Molecules**. Hoboken, N.J: John Wiley & Sons, Inc., 2012. p.189 - 212.
- 112 KUMAR, P.; DWIVEDI, N. Proline Catalyzed α -aminoxylation reaction in the synthesis of biologically active compounds. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n. 2, p. 289 - 299, 2013.
- 113 DEVALANKAR, D. A.; CHOUTHAIWALE, P. V.; SUDALAI, A. Organocatalytic sequential α -aminoxylation and cis-Wittig olefination of aldehydes: Synthesis of enantiopure γ -butenolides. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 23, n. 3, p. 240 - 244, 2012.
- 114 STILL, W. C.; GENNARI, C. Direct synthesis of Z-unsaturated esters. A useful modification of the horner-emmons olefination. **Tetrahedron Letters**, v. 24, n. 41, p. 4405 - 4408, 1983.
- 115 COLEMAN, G. H.; MCCLOSKEY, C. M.; STUART, F. A. Nitrosobenzene. **Organic Syntheses Collection**, v. 255, p. 80 -84, 1945
- 116 MORE, J. D.; FINNEY, N. S. A simple and advantageous protocol for the oxidation of alcohols with o-Iodoxybenzoic Acid (IBX). **Organic Letters**, v. 4, n. 17, p. 3001 - 3003, 2002.

117 SUN, D.-Y.; HAN, G-Y.; GONG, J-X.; NAY, B.; LI, X-W.; GUO, Y-W. Asymmetric total synthesis of distaminolyne A and revision of its absolute configuration. **Organic Letters**, v. 19, n. 3, p. 714 - 717, 2017.;

118 CÓRDOVA, A.; SUNDEN, H.; BOGEVIG, A.; JOHANSSON, M.; HIMO, F. The Direct Catalytic Asymmetric α -Aminoxylation Reaction: Development of Stereoselective Routes to 1,2-Diols and 1,2-Amino Alcohols and Density Functional Calculations. **Chemistry A European Journal**, v. 10, n. 15, p. 3673 – 3684, 2004.

119 PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L.; PERRIN, D. R. **Purification of Laboratory Chemicals**. 4. ed. EUA: Elsevier, 1996.

120 NICOLAI, S.; PIEMONTESE, C.; WASER, J. A palladium-catalyzes aminoalkynylation strategy towards bicyclic heterocycles: synthesis of (\pm)-trachelanthamidine. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 50, n. 20, p. 4680-4683, 2011.

121 NUHANT, F.; ROUSH, W. R. Enatio- and diastereoselective synthesis of N-acetyl dihydrotetrafibricin methyl ester. **Journal of the American Chemical Society**, v.135, n. 14, p. 5340-5343, 2013.

122 TURLINGTON, M.; DU, Y.; OSTRUM, S. G.; SANTOSH, V.; WREN, K.; LIN, T.; SABT, M.; PU, L. From highly enantioselective catalytic reaction of 1,3-diyne with aldehydes to facile asymmetric synthesis of polycyclic compounds. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 30, p. 11780 – 11794, 2011.

123 BURGHART, J.; BRÜCKNER, R. Sn/Li reaction in 1, ω -distannylated conjugated trienes and tetraenes: an enabling step for polyene synthesis. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2011, n. 1, p. 150-165, 2011.

124 TALAPATRA, S. K.; TALAPATRA, B. Triterpenes (C30). In: __. **Chemistry of Plant Natural Products: Stereochemistry, Conformation, Synthesis, Biology, and Medicine**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2015. p.517 - 552.

125 DEWICK, P. M. The Mevalonate and Methylerythritol Phosphate Pathways: Terpenoids and Steroids. In: __. **Medicinal Natural**

Products: A Biosynthetic Approach, :Cinchester:John Wiley & Sons, Ltd, 2009. p.187-310.

126 MOREAU, R. A.; WHITAKER, B. D.; HICKS, K. B. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress Lipidic Research*, v. 41, n. 6, p. 457 - 500, 2002.

127 PATOCKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *Journal of Applied Biomedice*, v. 1, n. 1, p. 7-12, 2003.

128 SALEEM, M.; AFAG, F.; ADHAMI, V. M.; MUKNTAR, H. Lupeol modulates NF- κ B and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice. *Oncogene*, v. 23, n. 30, p. 5203 - 5214, 2004.

129 SIDDIQUE, H. R.; SALEEM, M. Beneficial health effects of lupeol triterpene: a review of preclinical studies. *Life sciences*, v. 88, n. 7, p. 285-293, 2011.

130 HATA K., OGIHARA K., TAKAHASHI S., TSUKA T., MINAMI S., OKAMOTO Y. Effects of Lupeol on Melanoma In Vitro and In Vivo: Fundamental and Clinical Trials. In: KAMIHIRA M., KATAKURA Y., ITO A. (Eds) **Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects. Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects.** Dordrecht: Springechrt. 2010. p.339-344

131 CHATURVEDI, P. K.; BHUI, K.; SHUKLA, Y. Lupeol: Connotations for chemoprevention. *Cancer Letters*, v. 263, n. 1, p. 1-13, 2008.

132 ZIEGLER, H. L.; FRANZYK, H.; SAIRAFIANPOUR, M.; TABATABAI, M.; TEHRANI, M. D.; BAGERZADEH, K.; HÄGERSTRAND, 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 and Medicinal Chemistry*, v. 12, n. 1, p. 119-127, 2004.

133 ZIEGLER, H. L.; STAALSØ, T.; JAROSZEWSKI, J. W. Loading of erythrocyte membrane with pentacyclic triterpenes inhibits

Plasmodium falciparum invasion. **Planta Medica**, v. 72, n. 7, p. 640 - 642, 2006.

134 RODRIGUES, J. C. F.; DE SOUZA, W. Ultrastructural alterations in organelles of parasitic protozoa induced by different classes of metabolic inhibitors. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 9, p. 925-938, 2008.

135 FOURNET, A.; ANGELO, A.; MUNOZ, V.; ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Biological and chemical studies of Pera benensis, a Bolivian plant used in folk medicine as a treatment of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 37, n. 2, p. 159-164, 1992.

136 STORK, G.; SHOICHIRO, U.; WAKAMATSU, T. GRIECO, P.; LABOVITZ, J. Total synthesis of lupeol. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, n. 19, p. 4945-4947, 1971.

137 SURENDRA, K.; COREY, E. J. A Short Enantioselective Total Synthesis of the Fundamental Pentacyclic Triterpene Lupeol. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 39, p. 13928-13929, 2009.

138 PAPI REDDY, K.; SINGH, A. B.; PURI, A.; SRIVASTVA, A. K.; NARENDER, T. Synthesis of novel triterpenoid (lupeol) derivatives and their in vivo antihyperglycemic and antidyslipidemic activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 15, p. 4463 - 4466, 2009.

139 BHANDARI, P.; PATEL, N. K.; BHUTANI, K. K. Synthesis of new heterocyclic lupeol derivatives as nitric oxide and pro-inflammatory cytokine inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 15, p. 3596 - 3599, 2014.

140 CMOCH, P.; PAKULSKI, Z.; SWACZYNOVA, J.; STRNAD, M. Synthesis of lupane-type saponins bearing mannosyl and 3,6-branched trimannosyl residues and their evaluation as anticancer agents. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 6, p. 995 - 1003, 2008.

141 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, n. 19, p. 6713-6725, 2006.

142 GAO, J.; LI, X.; GU, G.; SUN, B.; CUI, M.; JI, M.; LOU, H. X. Efficient synthesis of trisaccharide saponins and their tumor cell killing effects through oncotic necrosis. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 2, p. 622-627, 2011.

143 LI, W.; HAO, J.; XIAO, Y. Synthesis and in vitro antitumor activities of lupeol dicarboxylic acid monoester derivatives. **Archives of Pharmacology Research**, v. 36, n. 12, p. 1447 - 1453, 2013.

144 GUTIÉRREZ-NICOLÁS, F.; GORDILLO-ROMÁN, B.; OBERTI, J. C.; ESTÉVES-BRAUN, A.; RAVELO, A. G.; JOSEPH-NTAHAN, P. Synthesis and anti-HIV activity of lupane and olean-18-ene derivatives. Absolute configuration of 19,20-epoxylupanes by VCD. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 4, p. 669 - 676, 2012.

145 KHAN, M. F.; MAURYA, C. K.; VED, K.; ARHA, D.; RAI, A. K.; TAMARAKAR, A. K.; MAURYA, R. Design and synthesis of lupeol analogues and their glucose uptake stimulatory effect in L6 skeletal muscle cells. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 12, p. 2674 - 2679, 2014.

146 WHO 2017. **Neglected tropical diseases**. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/en/>. Acesso em: 20 junho 2017.

147 CAMARGO, E. P. Doenças tropicais. **Estudos Avançados**, v. 22, p. 95 - 110, 2008.

148 WHO 2017. **Neglected tropical diseases**. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/>. Acesso em: 20 junho 2017.

149 DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Doenças tropicais negligenciadas: uma nova era de desafios e oportunidades. **Química Nova**, v. 36, p. 1552 - 1556, 2013.

150 PEDRIQUE, B.; STRUB-WOURGAFT, N.; SOME, C.; OLLIARO, P.; TROULLER, P.; FORD, N.; PÉCOUL, B.; BRADOL, J. H. The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000-11): a systematic assessment. **The Lancet Global Health**, v. 1, n. 6, p. 371-379, 2013.

151 MOLYNEUX, D. H. The 'Neglected Tropical Diseases': now a brand identity; responsibilities, context and promise. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 1, p. 23, 2012.

152 DNDi 2017. **Tratamentos**. Disponível em: <<http://www.dndial.org/pt/tratamentos.html>>. Acesso em: 23 de junho 2017.

153 MARTINS-MELO, F. R.; RAMOS, A. N.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J. Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000–2011. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 2, p. 103-110, 2016.

154 MS. Portal da Saúde 2017. **Leishmaniose tegumentar americana**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/leishmaniose-tegumentar-americana-lta>>. Acesso em: 23 de junho 2017.

155 DESJEUX, P. Leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v. 14, n. 5, p. 417 - 423, 1996.

156 HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191-1199, 1999.

157 KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604 - 615, 2011.

158 WHO 2017. **Leishmaniasis epidemiological situatuiion**. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em: 23 junho 2017.

159 FIELD, M. C.; HORN, D.; FAIRLAMB, A. H.; FERGUSON, M. A. J.; GRAY, D. W.; READ, K. D.; DE RYCKER, M.; TORRIE, L. S.;

WYATT, P. G.; WYLLIE, S.; GILBERT, I. H. Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 217-231, 2017.

160 NAGLE, A. S.; KHARE, S.; KUMAR, A. B.; SUPEK, F.; BUCHYNSKY, A.; MATHISON, C. J. N.; CHENNAMANENI, N. K.; PENDEM, M.; BUCKNER, F.; GELB, M. H.; MOLTENI, V. Recent developments in drug discovery for leishmaniasis and human african trypanosomiasis. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 22, p. 11305-11347, 2014.

161 MS. Portal da Saúde 2017. **Leishmaniose visceral: tratamento**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/726-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-visceral-lv/11335-tratamento>>. Acesso em: 23 de junho 2017.

162 MS. Portal da Saúde 2017. **Vacinação**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/727-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-visceral-lv/11-leishmaniose-visceral-lv/11858-vacinacao-leishmaniose>>. Acesso em: 23 de junho 2017

163 WHO 2017. **Chagas disease**. Disponível em: <<http://www.who.int/chagas/en/>>. Acesso em: 20 junho 2017>.

164 MALAFAIA, G.; RODRIGUES, A. S. D. L. Centenário do descobrimento da doença de Chagas: desafios e perspectivas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p. 483-485, 2010.

165 RASSI, A., JR.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010.

166 PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, 2017.

167 COURA, J. R.; CASTRO, S. L. D. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 3-24, 2002.

169 DNDi 2017. **Paediatric dosage form of benznidazole (Chagas)**. Disponível em: <<https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/paediatric-benznidazole/>>. Acesso em: 23 de junho 2017.

170 BETANCOR, C.; FREIRE, R.; GONZALEZ, A. G.; PASCARD, C.; PRANGE, T. Three triterpenes and other terpenoids from *Catha cassinoides*. **Phytochemistry**, v. 19, n. 9, p. 1989-1993, 1980.

171 SHARPLESS, K. B.; GORDON, K. M. Selenium dioxide oxidation of ketones and aldehydes. Evidence for the intermediacy of .beta.-ketoseleninic. **Journal of the American Chemical Society**, v. 98, n. 1, p. 300 - 301, 1976.

172 FAIRLAMB, A. H.; CERAMI, A. Metabolism and Functions of Trypanothione in the Kinetoplastida. **Annual Review of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 695 - 729, 1992.

173 FOTIE, J.; BOHLE, D. S.; LEIMANIS, M. L.; GEORGES, E.; RUKUNGA, G.; NKENGFAK, A. E. Lupeol long-chain Fatty acid esters with antimalarial activity from *Holarrhena floribunda*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 1, p. 62 - 67, 2006.

174 MALLAVADHANI, U. V.; MAGAPATRA, A.; JAMIL. K.; REDDY, P. S. Antimicrobial activity of some pentacyclic triterpenes and their synthesized 3-O-lipophilic chains. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v. 27, n. 10, p. 1576-1579, 2004.

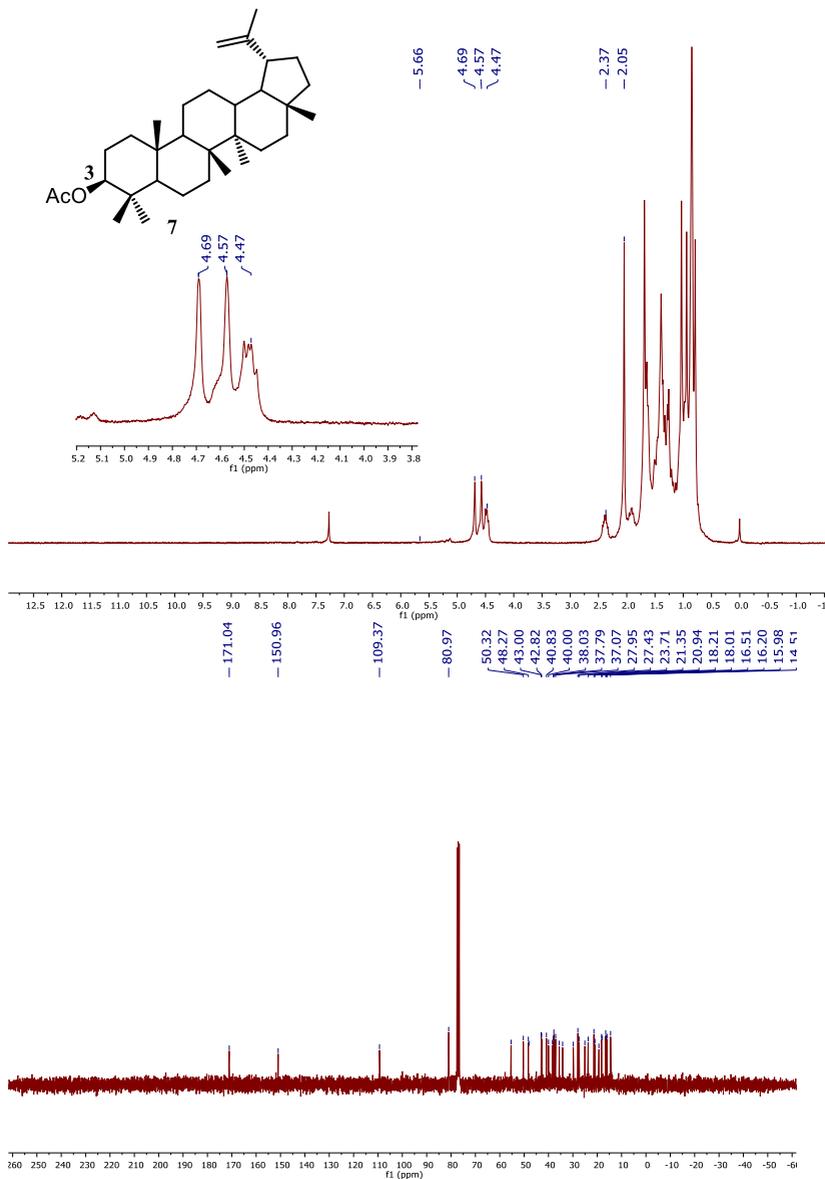
175 SCHWENDE, H.; FITZKE, E.; AMBS, P.; DIETER, P. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 59, n. 4, p. 555 -5561, 1996.

176 BUCKNER, F. S.; VERLINDE, C. L.; LA FLAMME, A. C.; VON VOORHIS, W. C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 11, p. 2592 - 2597, 1996.

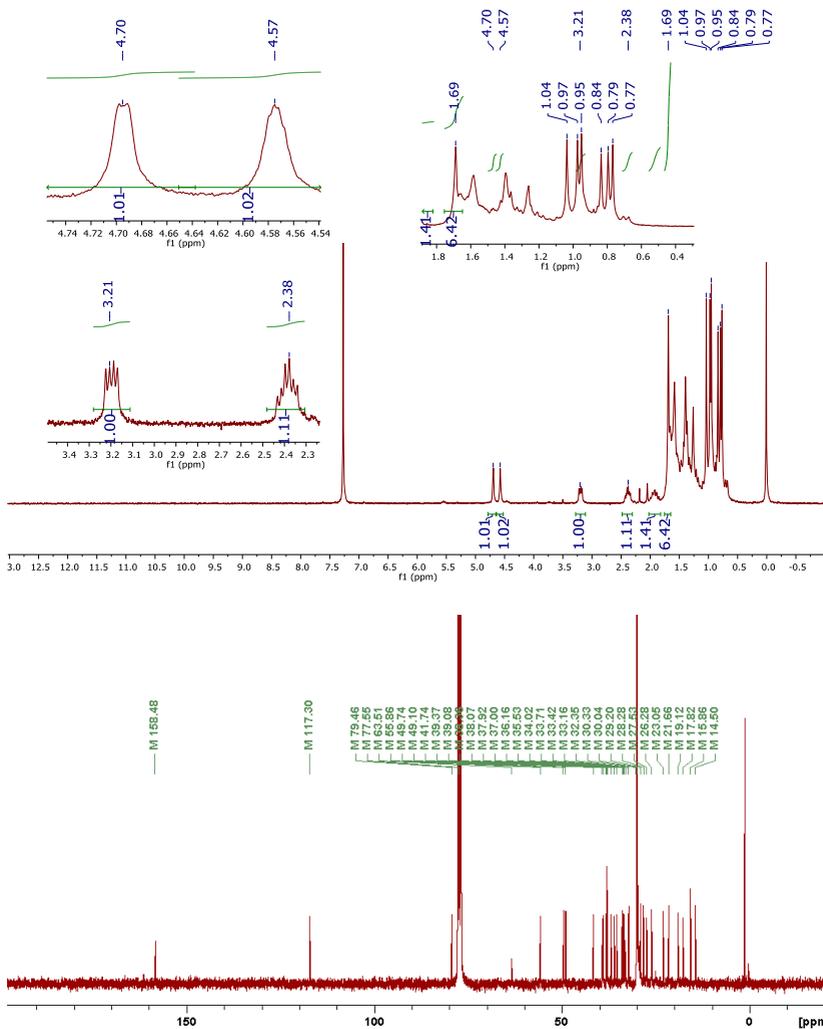
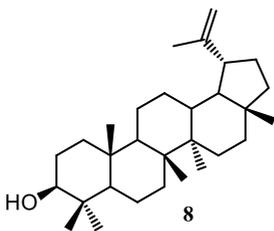
177 HAMILTON, C. J.; SARAVANAMUTHU, A.; EGGLESTON, I. M.; FAIRLAMB, A. H. Ellman's-reagent-mediated regeneration of

trypanothione in situ: substrate-economical microplate and time-dependent inhibition assays for trypanothione reductase. *Biochemical Journal*, v. 369, n. 3, p. 529-537, 2003.

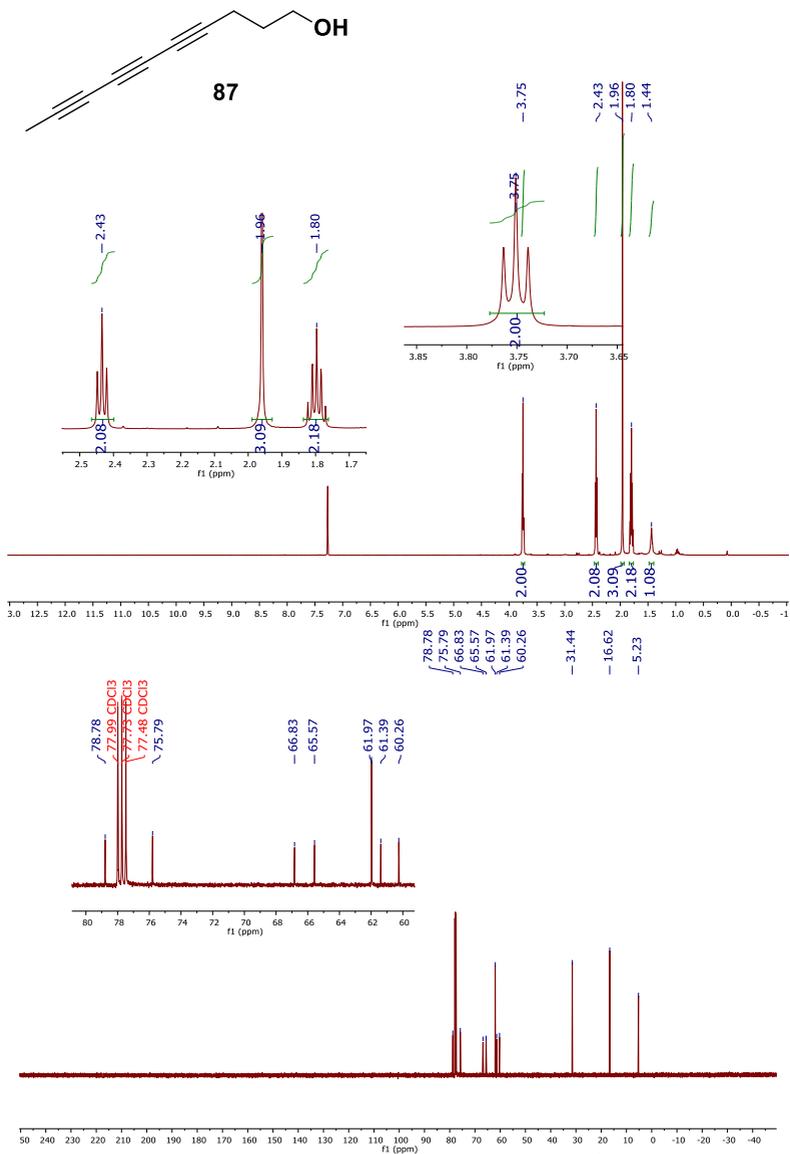
ESPECTROS SELECCIONADOS DE RMN ^1H E ^{13}C



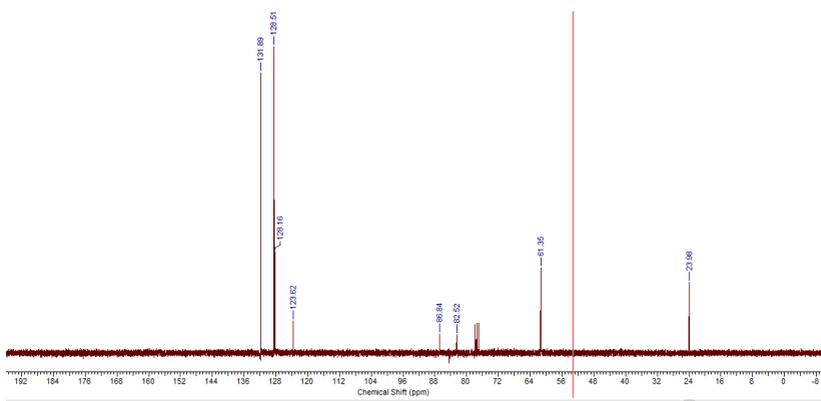
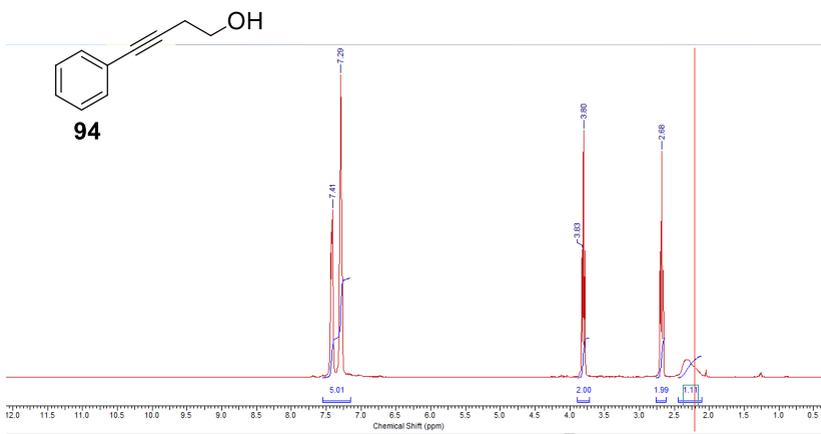
Espectros RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **7**.



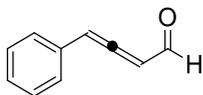
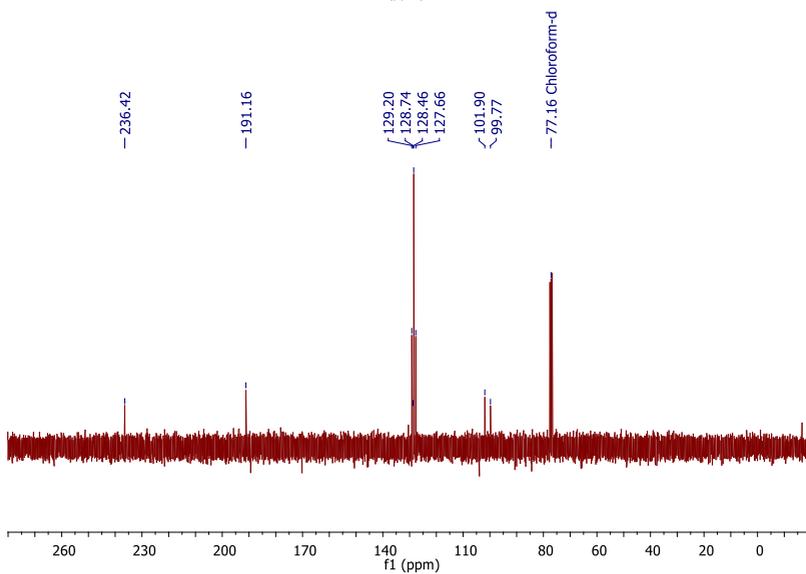
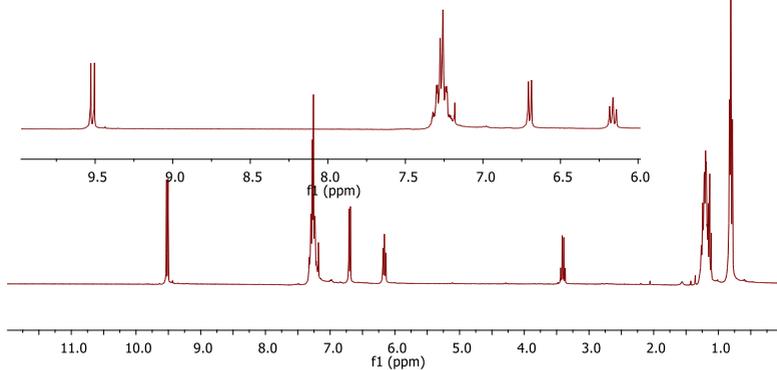
Espectros RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **8**.



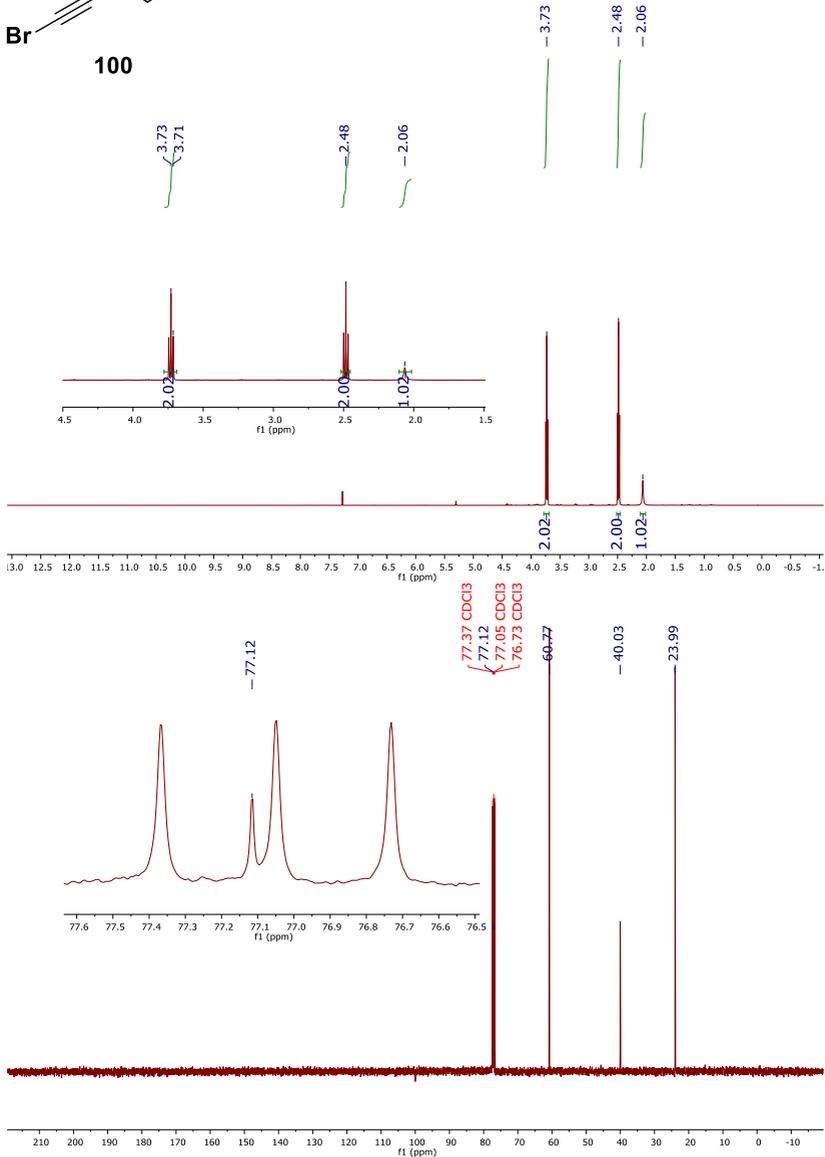
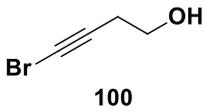
Espectros RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) e RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto **87**.



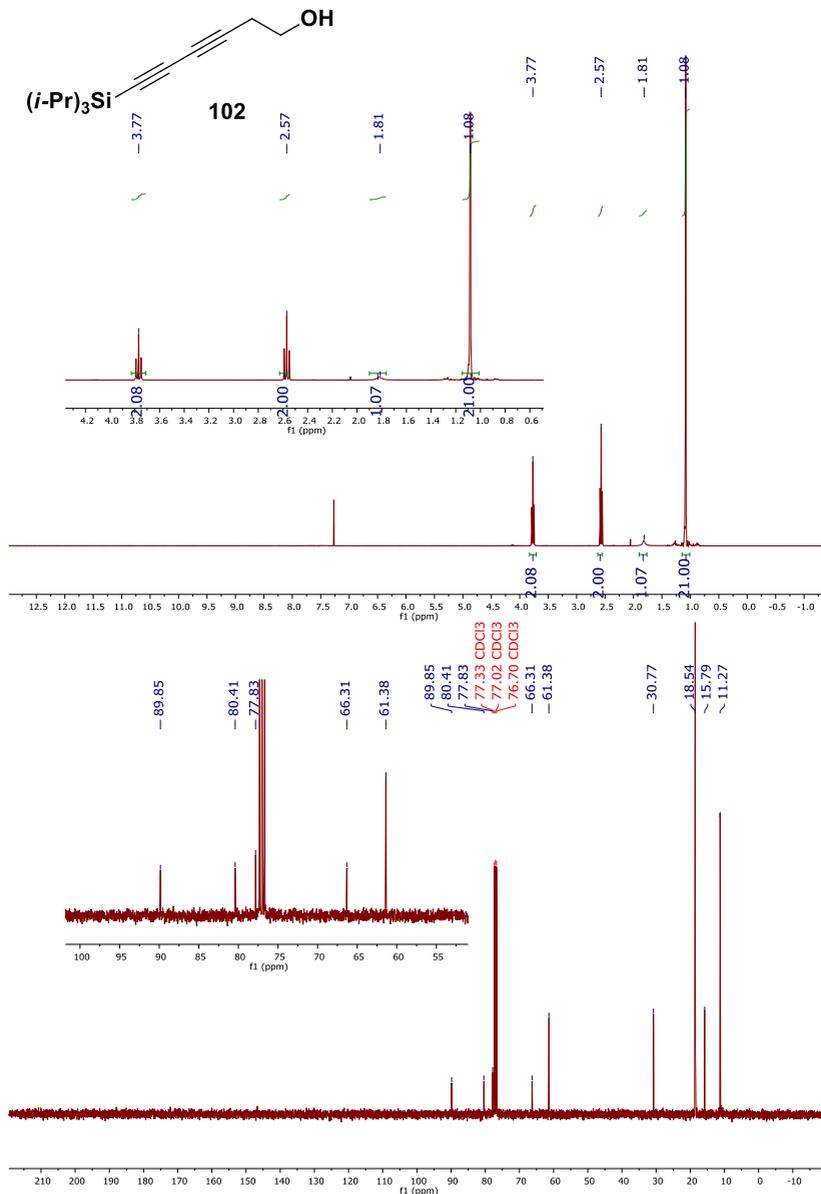
Espectros RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **94**.

**96**

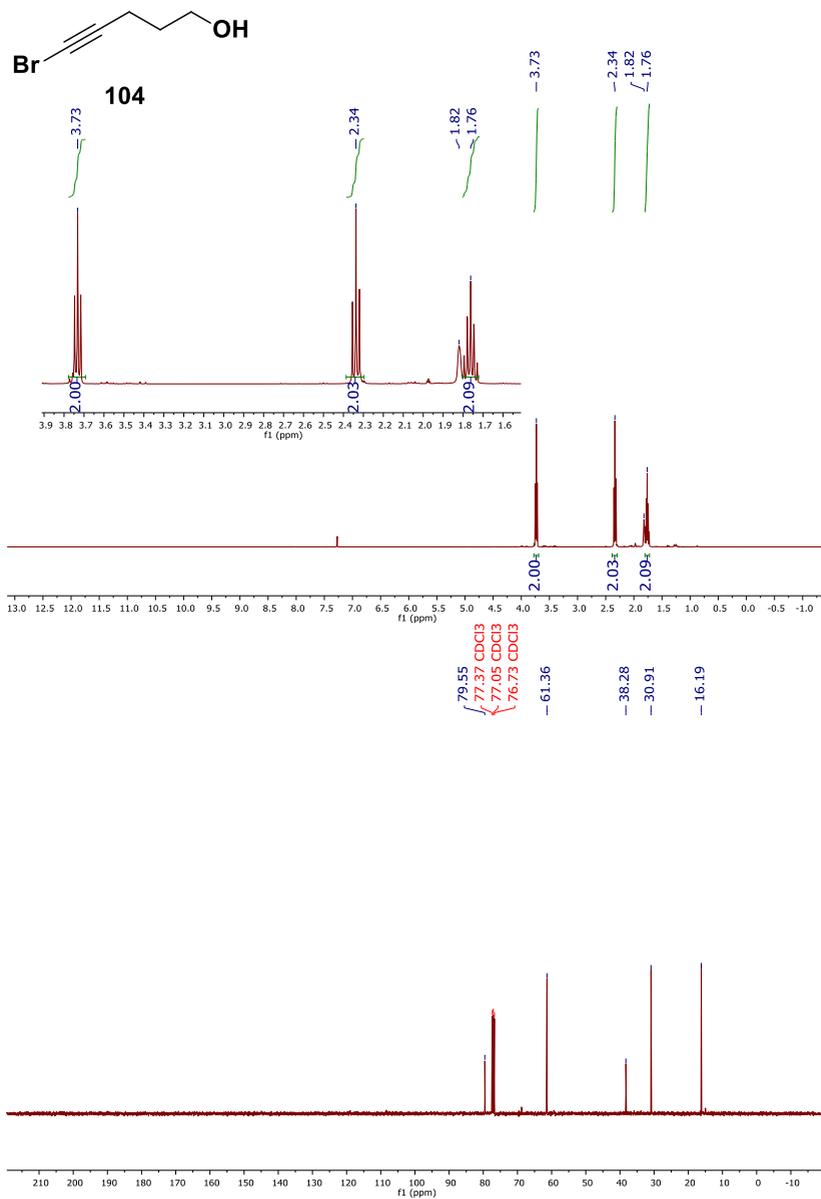
Espetros RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **96**.



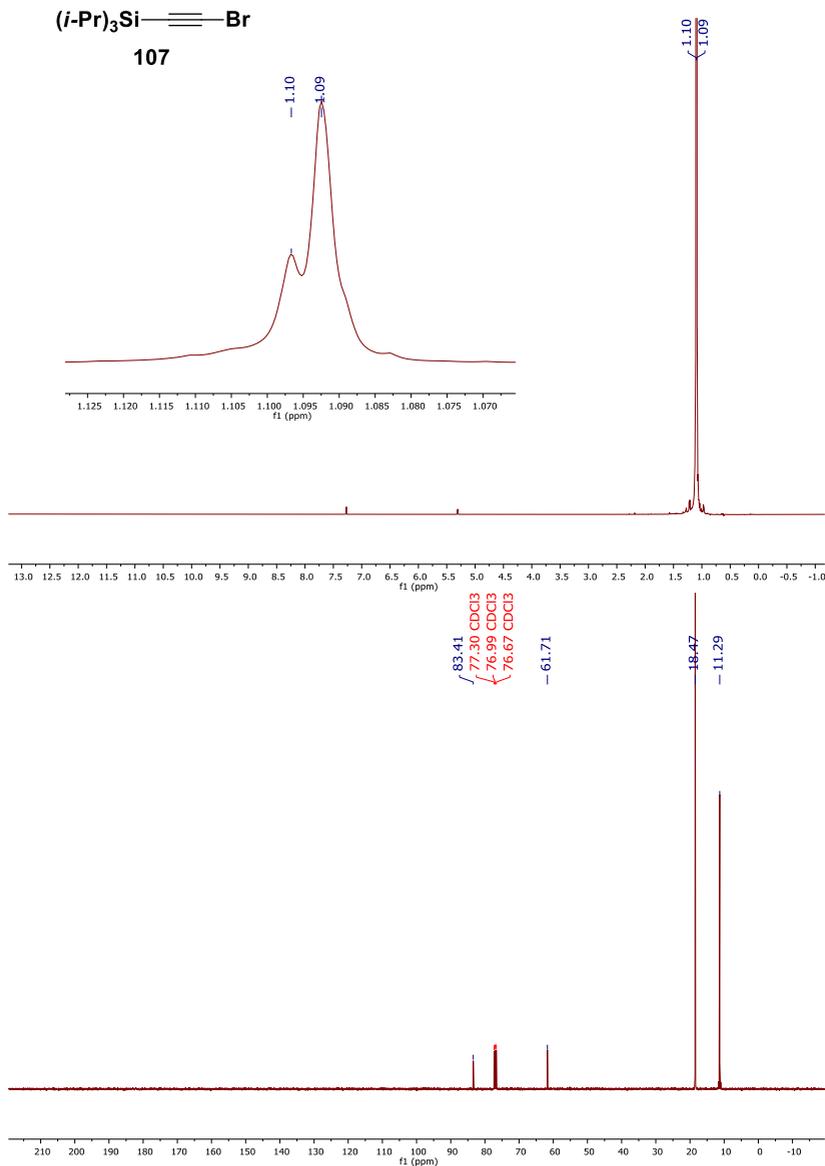
Espectros RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) e RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do composto **100**.



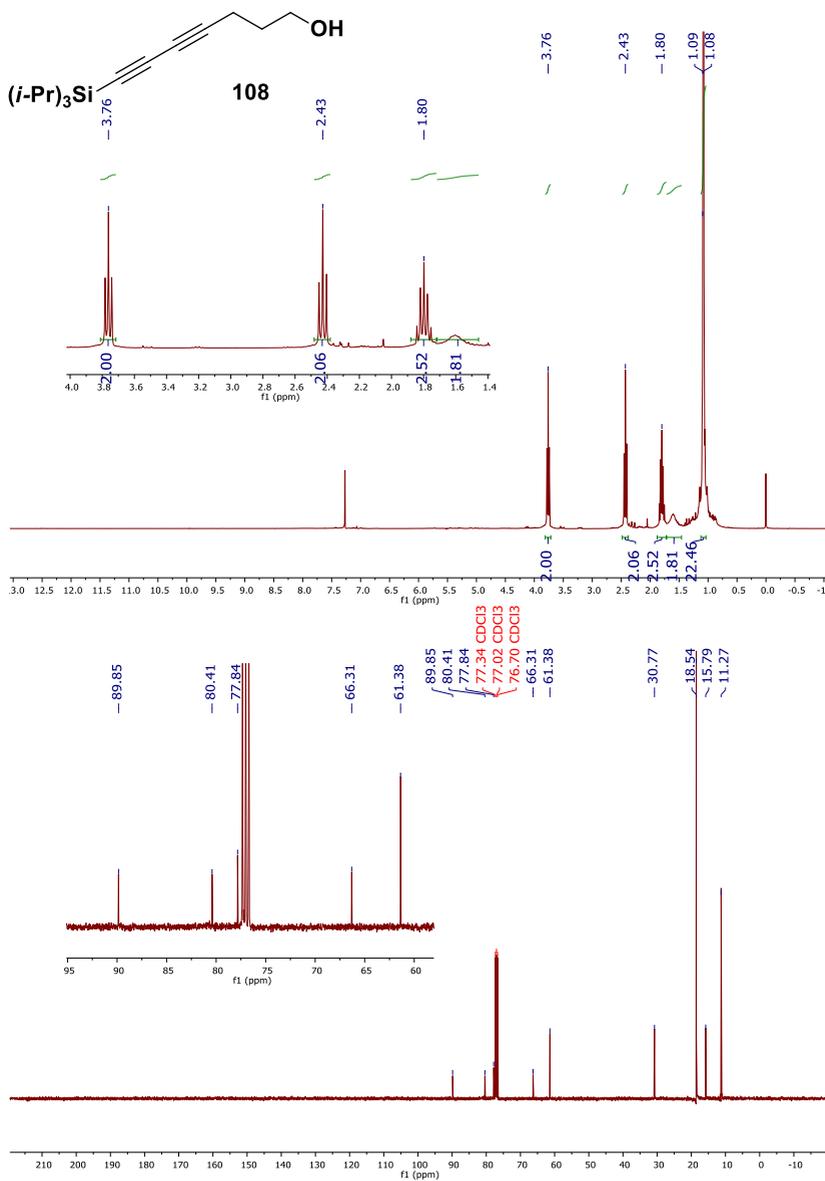
Espectros RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) e RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **102**.



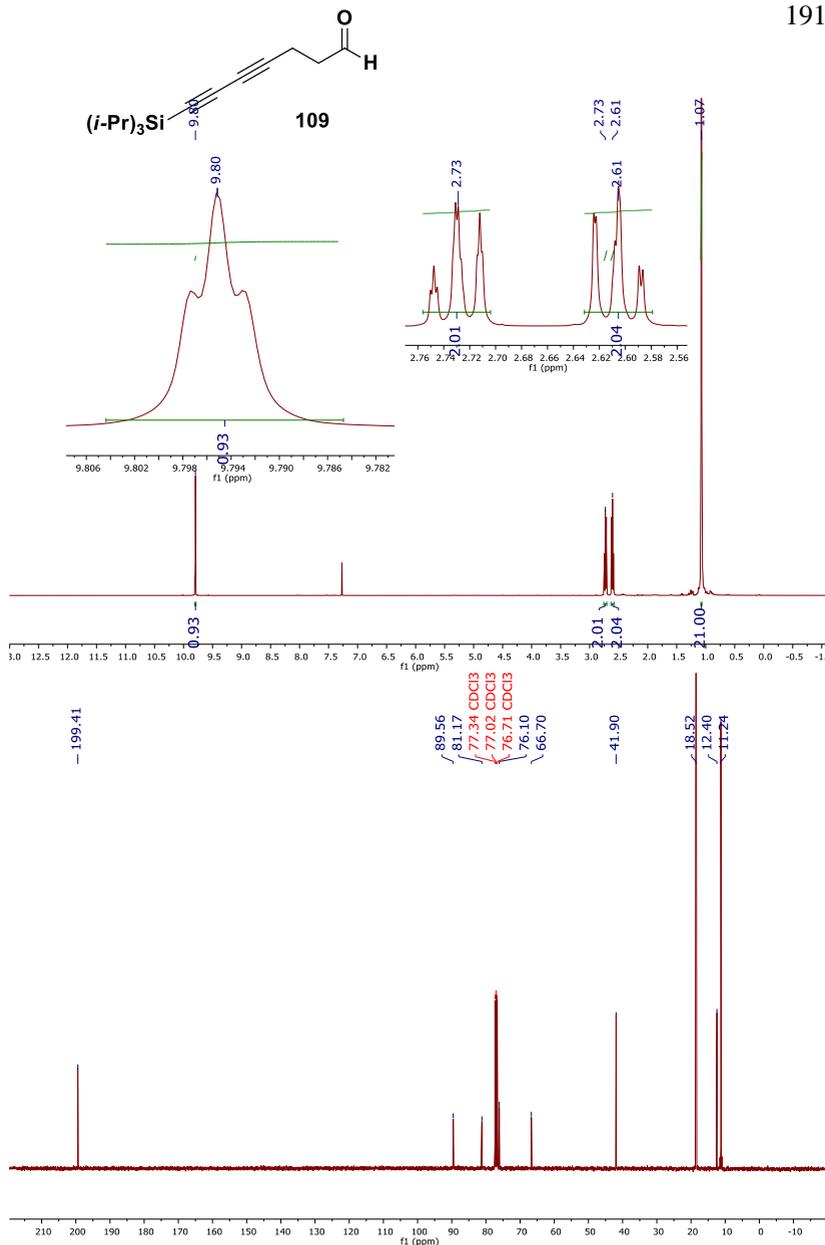
Espectros RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) e RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **104**.



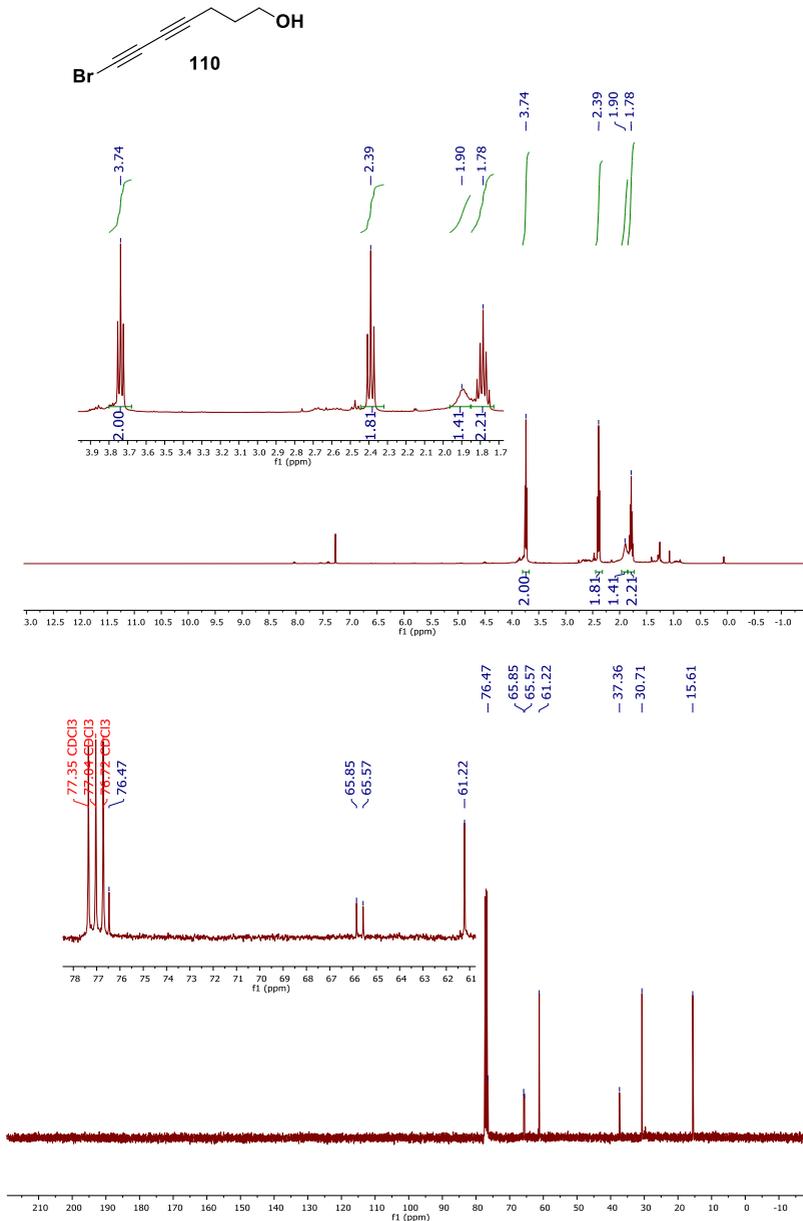
Espectros RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) e RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **107**.



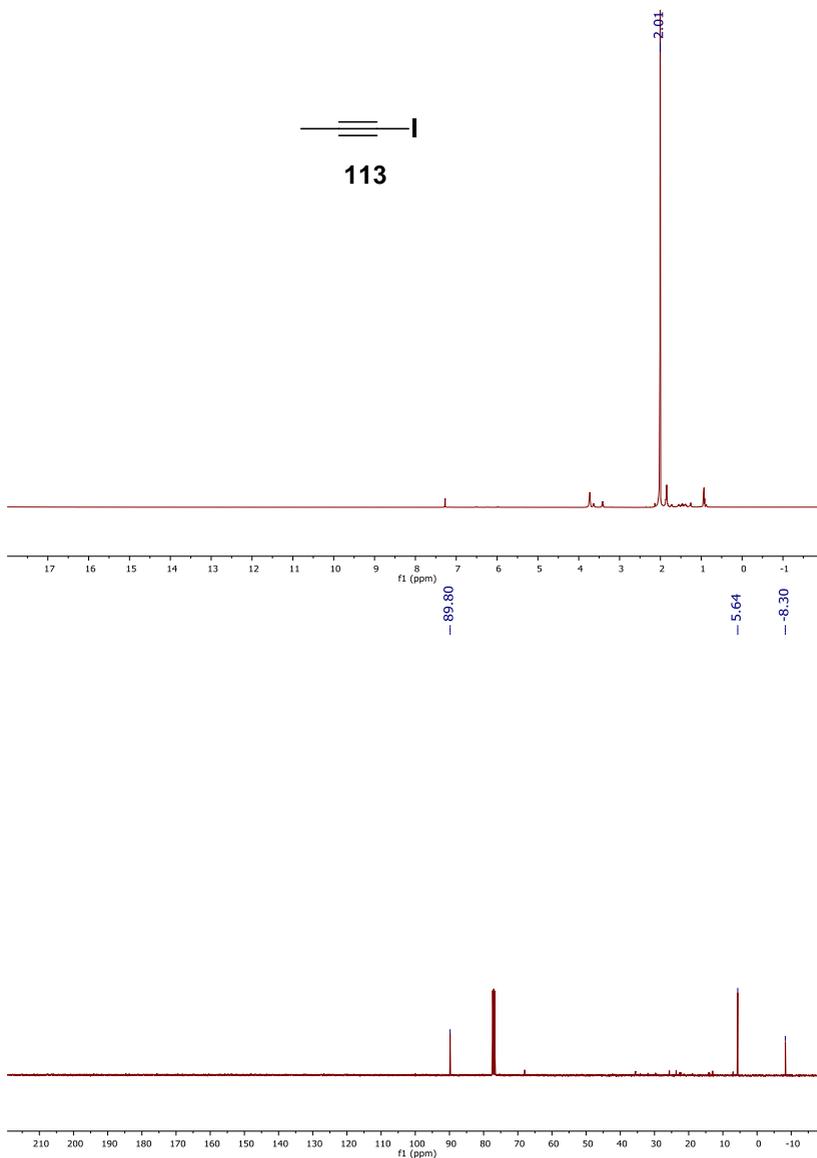
Espectros RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) e RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) do composto **108**.



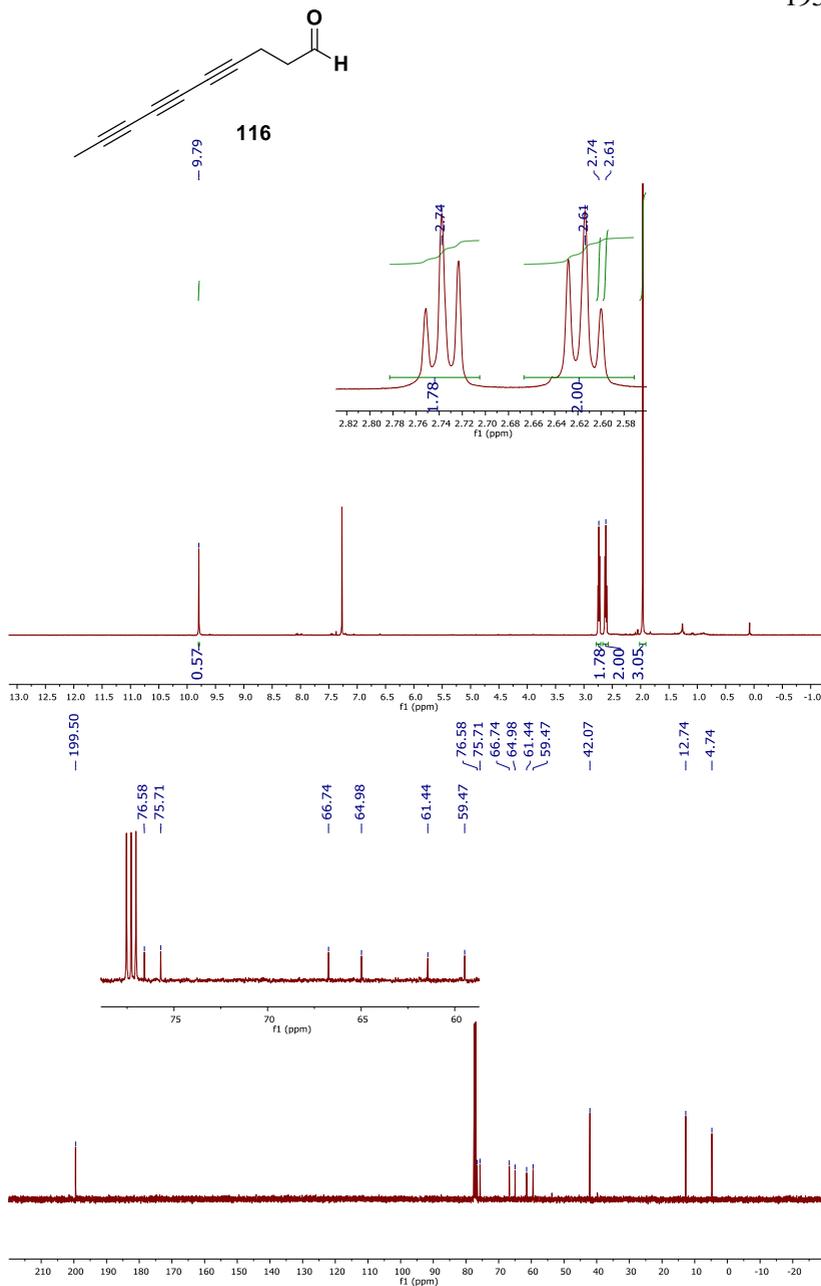
Espectros RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) e RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto **109**.



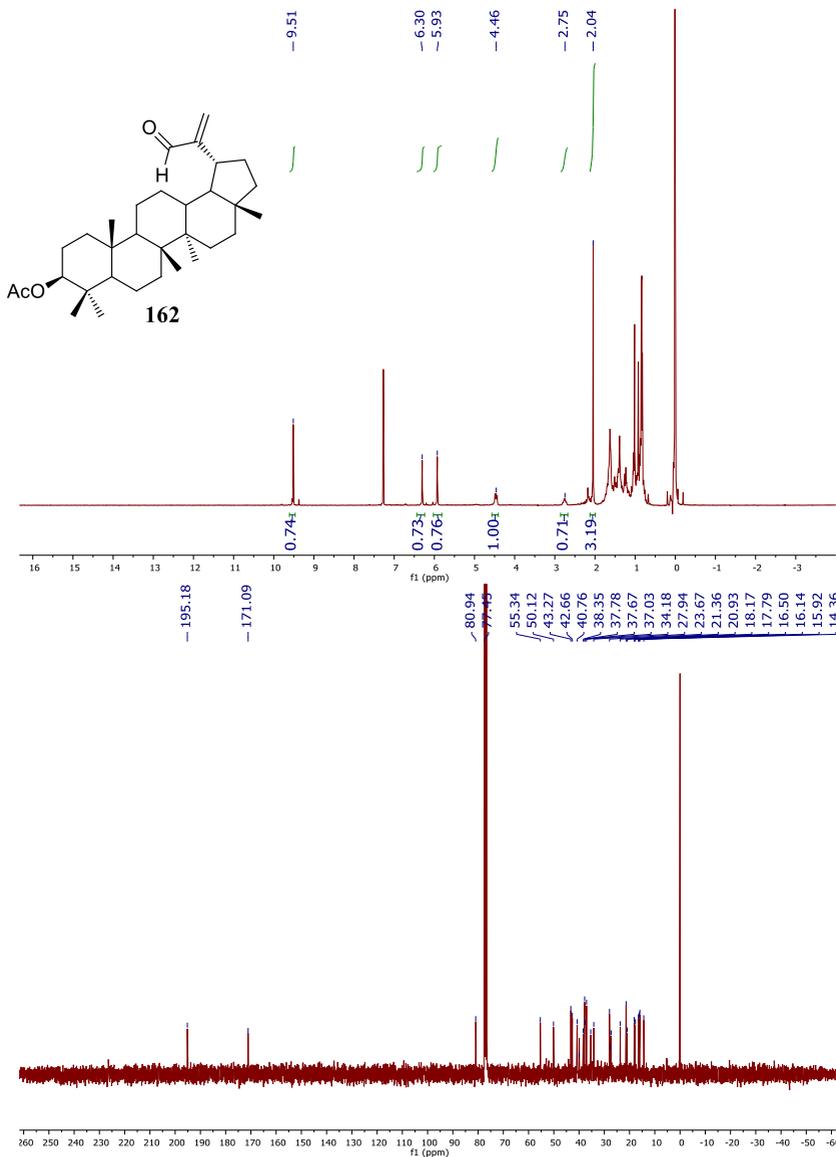
Espetros RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) e RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **110**.



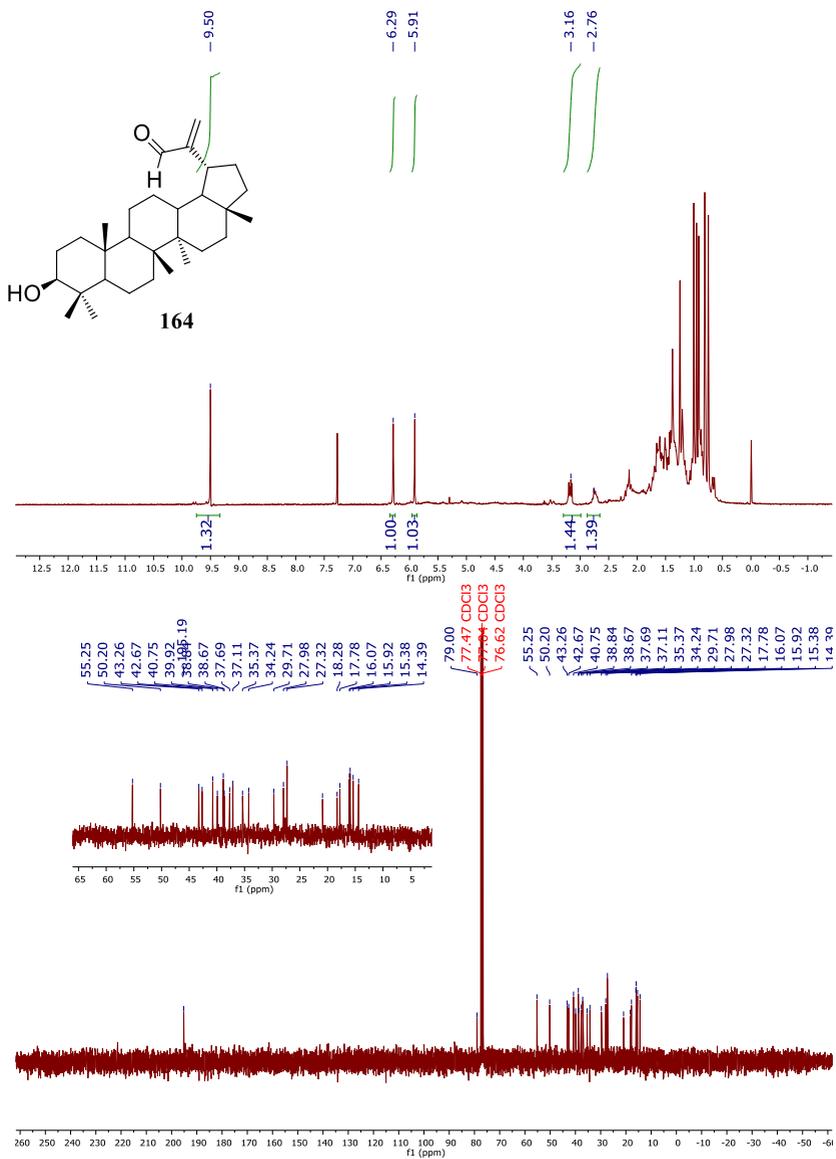
Espectros RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) e RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **113**.



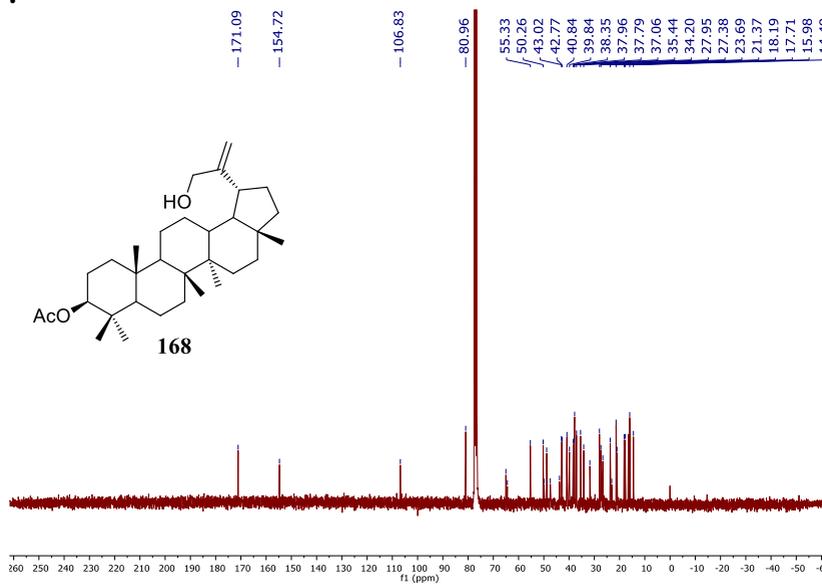
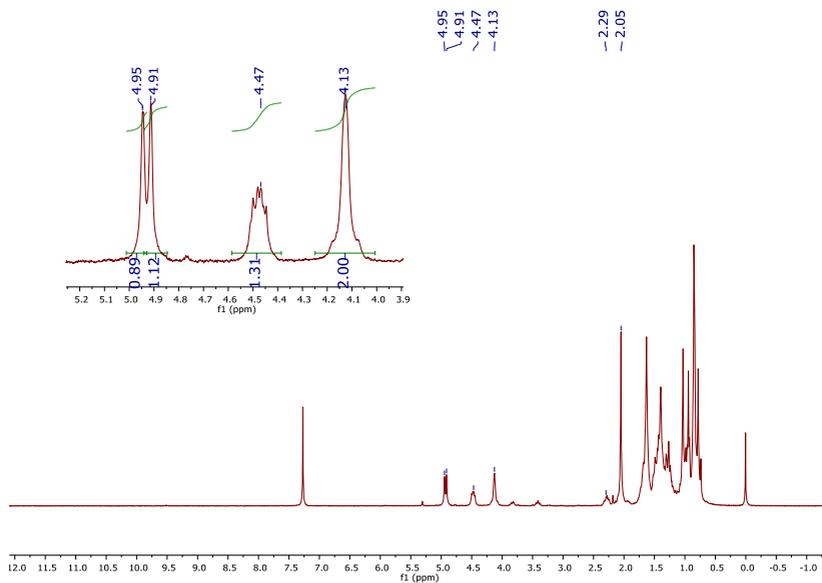
Espectros RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) e RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto **116**.



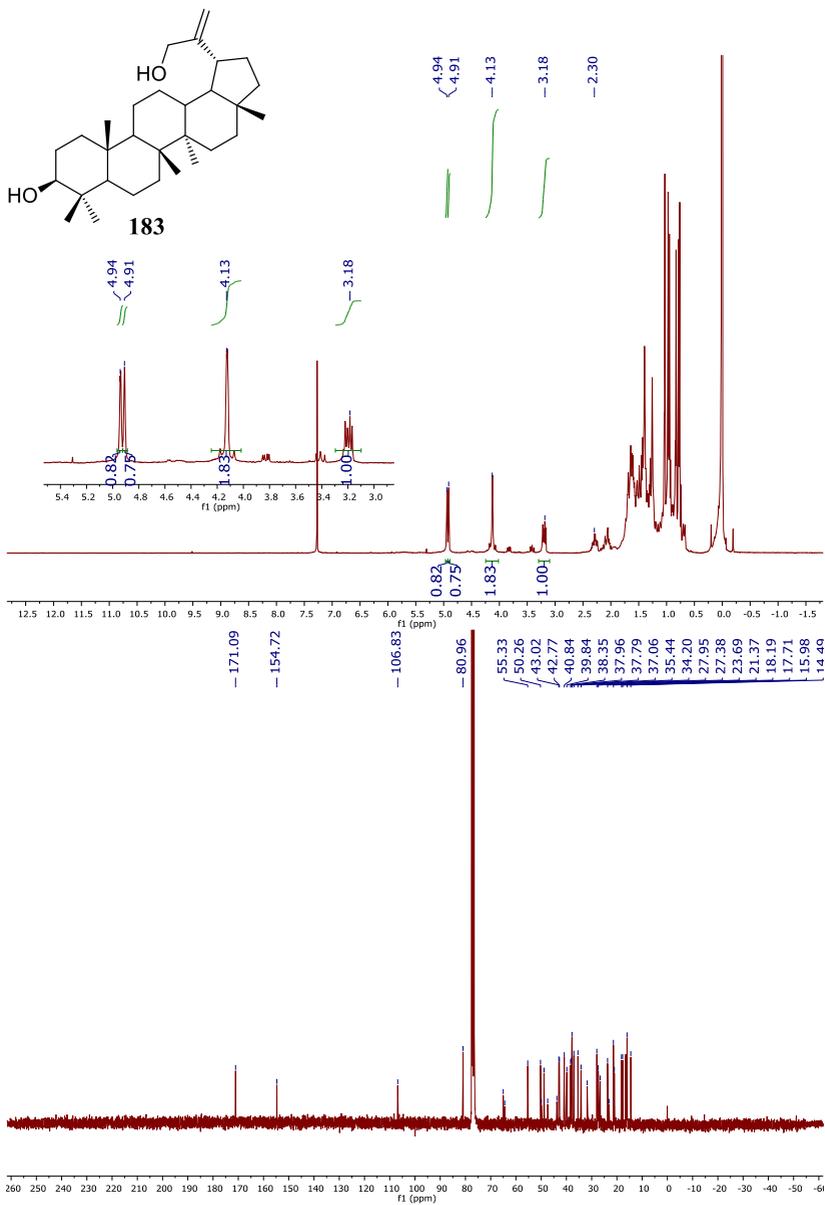
Espectros RMN de ¹H (100 MHz, CDCl₃) e RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **162**.



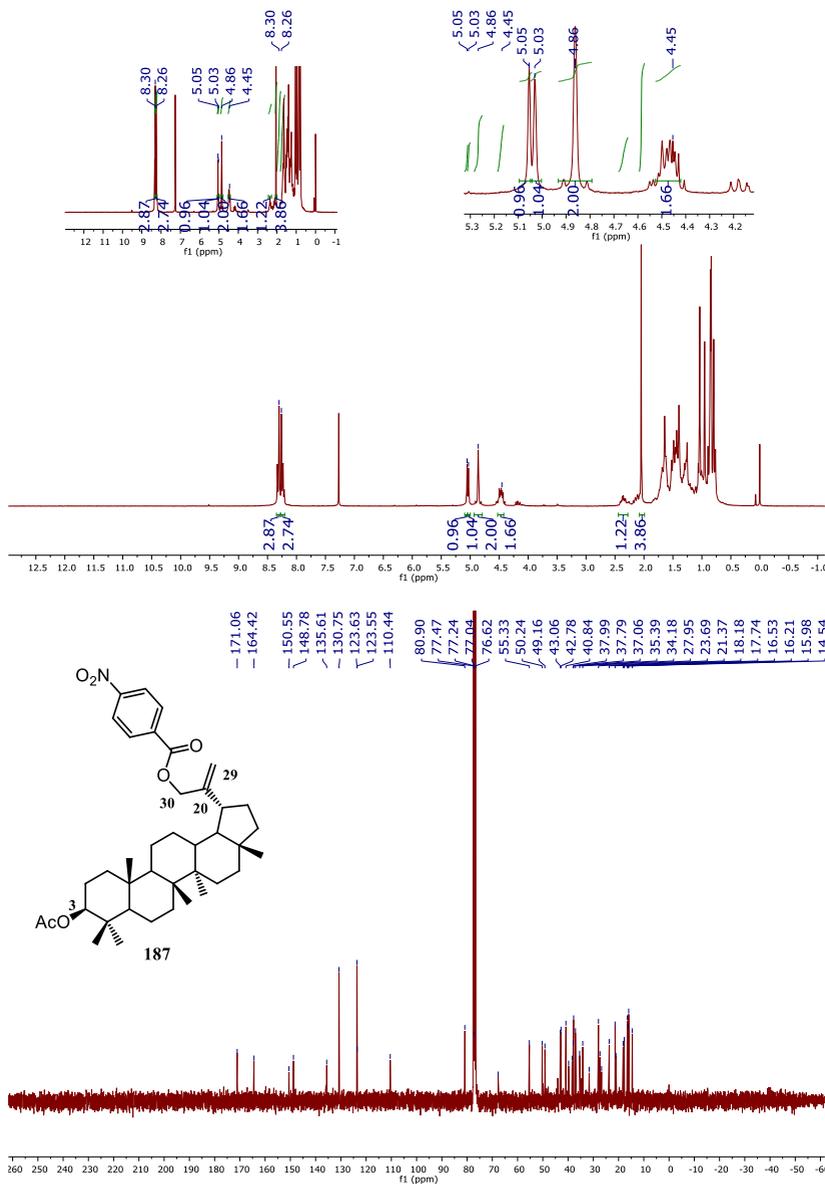
Espectros RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do derivado **164**.



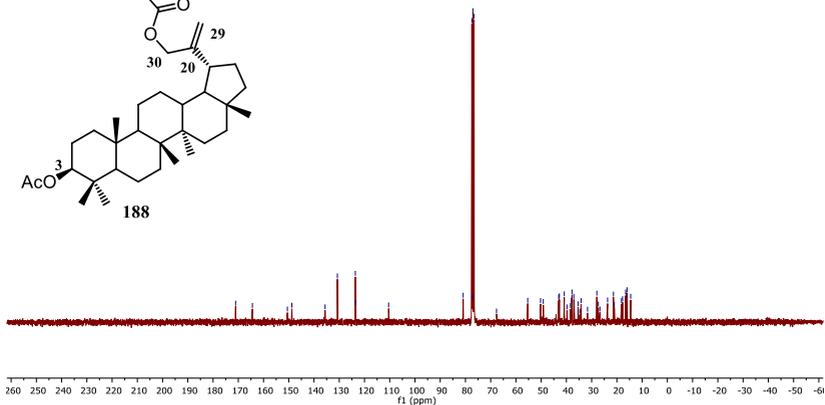
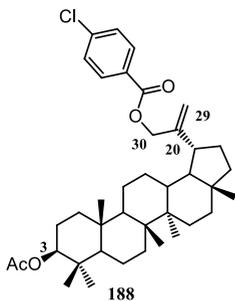
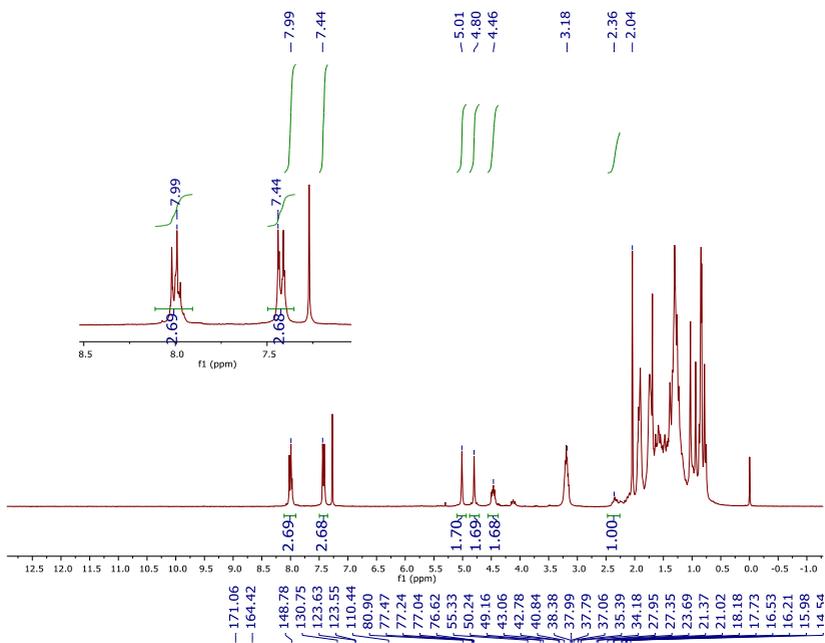
Espectros RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do derivado **168**.



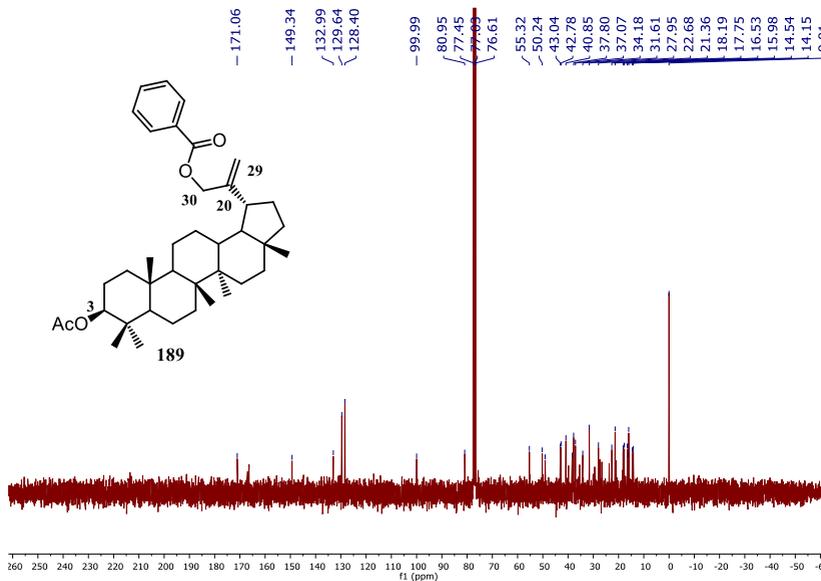
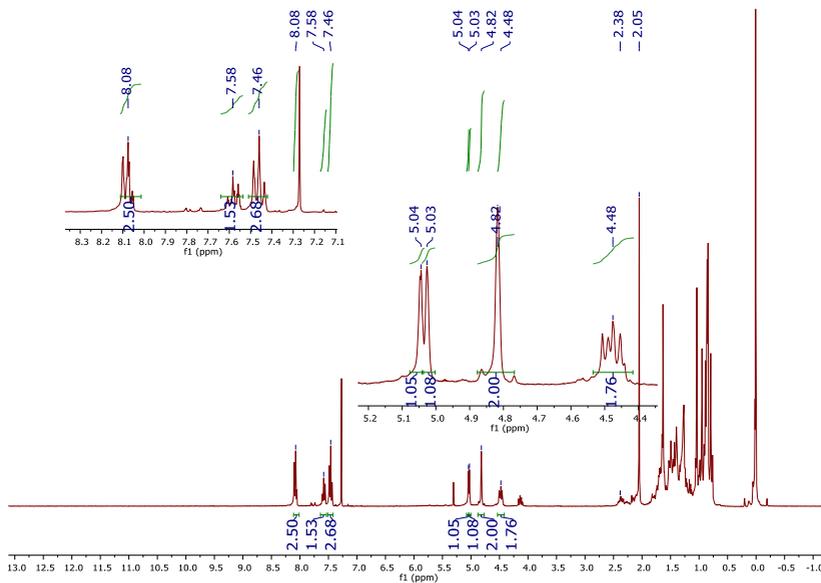
Espectros RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **183**.



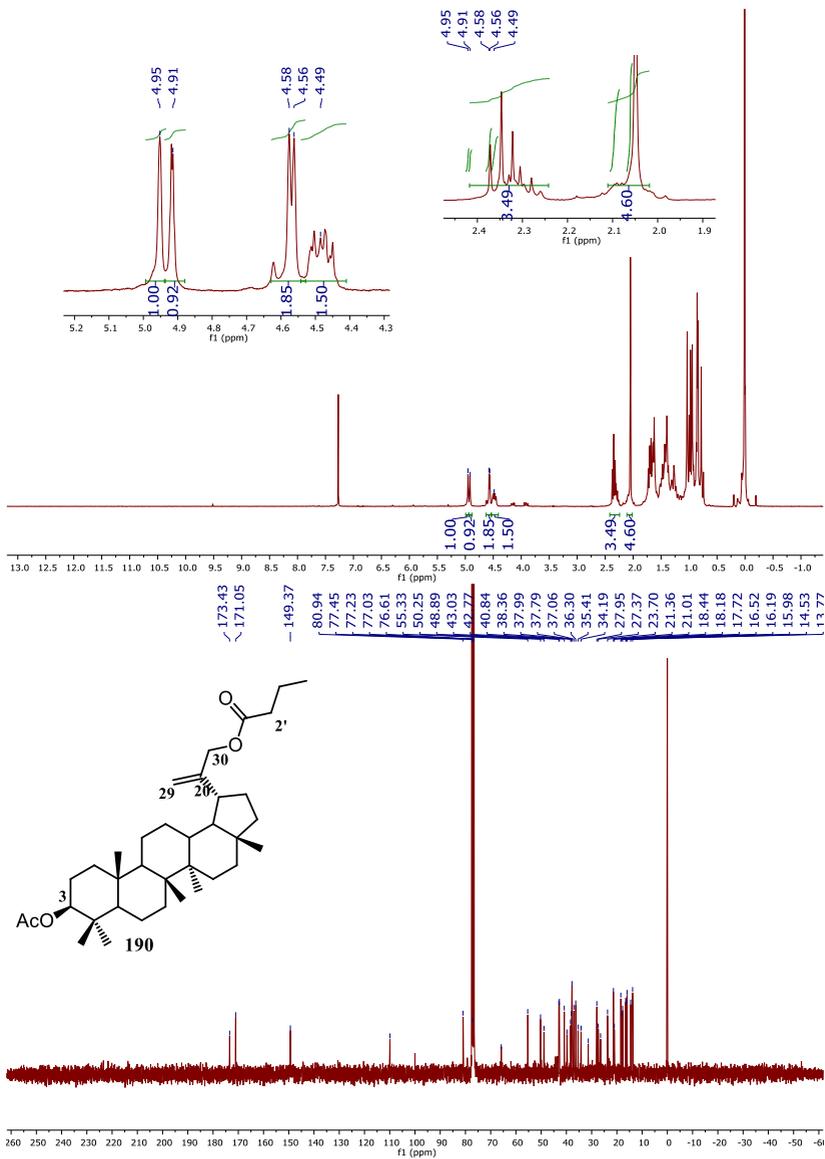
Espectros RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **187**



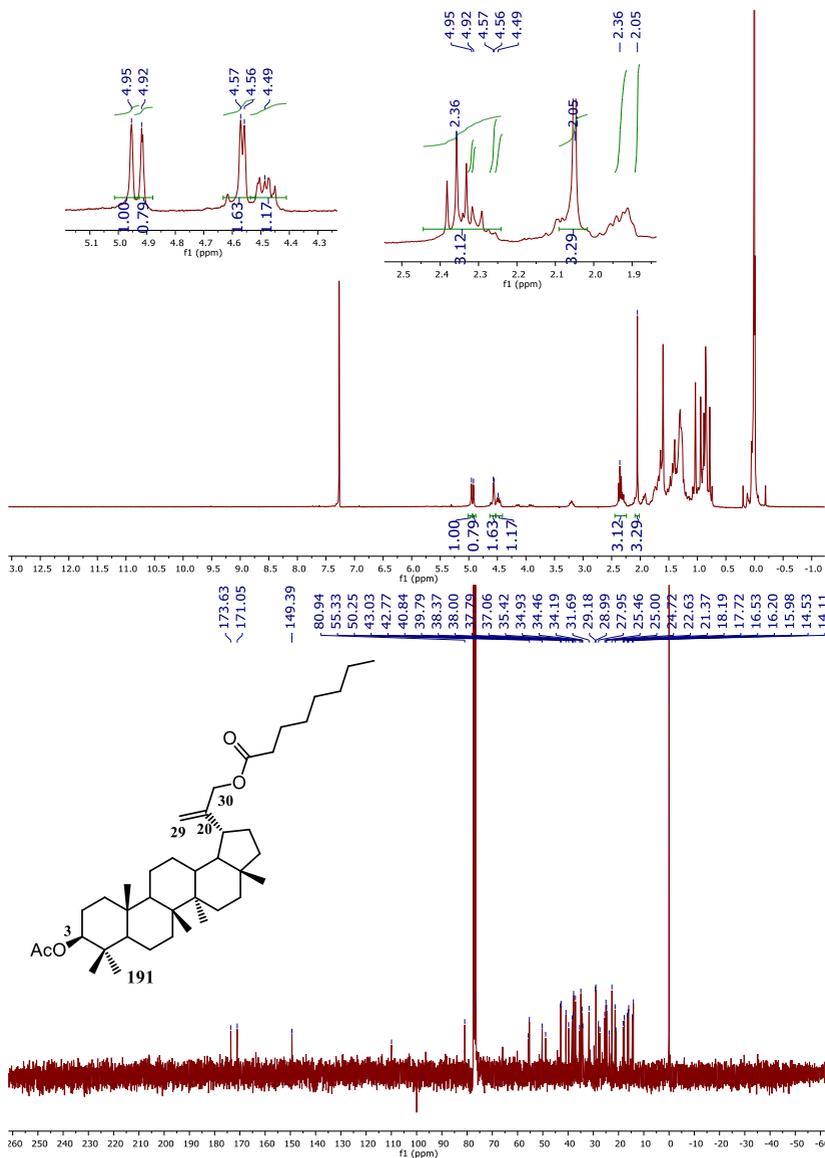
Espectros RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **188**.



Espectros RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **189**.



Espectros RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do derivado **190**.



Espectros RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) e RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **191**.

