



Fábio Daniel Pedroso de Lima da Conceição

Síntese de derivados semi-sintéticos do ácido oleanólico com vista à atividade antitumoral

Mestrado em Química Medicinal

Departamento de Química

FCTUC

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Fábio Daniel Pedroso de Lima da Conceição

Síntese de derivados semi-sintéticos do ácido oleanólico com vista à atividade antitumoral

Mestrado em Química Medicinal

Departamento de Química

FCTUC

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Agradecimentos

A minha primeira palavra de apreço é dirigida ao Prof. Dr. Jorge Salvador pela oportunidade de trabalhar no seu grupo, pelos conselhos e tempo disponibilizado e por tudo o que me ensinou. Gostaria de agradecer também às «meninas do laboratório», à Salete e em especial à Sandra, por todos os ensinamentos, amizade e espírito saudável de trabalho com que me apresentaram durante toda a minha passagem pelo grupo, no qual destaco em especial a paciência e dedicação da Sandra e toda a ajuda que me deu durante o meu percurso. A vós, o meu muito obrigado. Gostaria de deixar também uma palavra de apreço à Graça e à Anabela por toda a disponibilidade e simpatia.

Depois, gostaria de me referir às pessoas que, talvez mais do que eu mesmo, fizeram com que este trabalho fosse possível. À Ana por ser um apoio incondicional contra as adversidades, e por nunca ter deixado que nada disto deixasse de ser possível e por fazer sempre o possível e o impossível. Ao meu pai por ser resiliente e dar carinho à sua maneira. À minha mãe por, apesar de tudo, transmitir carinho por pequenos atos. À minha irmã porque não me abandona mesmo quando tem motivos para estar desiludida, e por dar carinho e apoio de uma maneira que sabe como ninguém ser extremamente importante para mim. À minha avó por tudo o que faz por mim, pela preocupação constante, apoio e ajuda, e pelos importantíssimos «mimos» de avó que tanto amo. À minha família por serem todos, sem exceção, uma vital parte de mim, e sentir sempre o seu apoio em tudo o que fazem.

Aos meus amigos, em especial ao Alexandre, ao David e à Filipa, por serem parte dos pilares que me sustenta e apoia quando preciso, e porque sei que posso sempre contar com a sua preciosa amizade.

Por último, queria agradecer à minha namorada, por ser quem é e por toda a força que me deu diariamente durante este processo. Por me dar muito com pouco pensando que me dá pouco e tenta dar muito.

Índice

Abreviaturas	vii
Índice de figuras	xi
Índice de tabelas	xiii
Resumo	xv
Abstract	xvii
Nomenclatura	xix
Capítulo 1: Introdução	1
1.1 Cancro: breve contextualização	4
1.2 Biossíntese dos triterpenóides	6
1.3 Principais alvos moleculares	6
1.4 Papel dos triterpenóides no cancro	8
1.5 Ácido oleanólico	20
1.6 Ácido maslínico	22
1.7 Ácido ursólico	23
1.8 Aspetos QSAR importantes	24
1.9 Derivados fluorados e sua importância terapêutica	25
1.10 Metodologias de fluoração	27
1.11 Objetivos do trabalho	27
Capítulo 2: Resultados e discussão	31
2.1 Síntese do ácido maslínico via NaOH	36
2.1.1 Oxidação de Jones	37
2.1.2 Bromação via tribrometo de piridínio	38
2.1.3 Hidroxilação via NaOH	40
2.1.4 Breves conclusões	45
2.2 Síntese do ácido maslínico via m-CPBA	46
2.2.1 Proteção do grupo ácido carboxílico	47
2.2.2 Oxidação via m-CPBA	48
2.2.3 Breves conclusões	51

2.3 Otimização de uma via sintética de derivados fluorados do ácido oleanólico	52
2.3.1 Breves conclusões	61
2.4 Síntese de derivados do 3 β -hidroxi-12 α -fluor-olean-13,28 β -olido	62
2.4.1 Síntese de 3-oxo-12 α -fluor-olean-13,28 β -olido	62
2.4.2 Síntese de 3 β -(1-propan-1-carboniloxi)-12 α -fluor-olean-13,28 β -olido	65
2.4.3 Síntese de 3 β -(1-fenilcarboniloxi)-12 α -fluor-olean-13,28 β -olido	67
2.4.4 Breves conclusões	69
Capítulo 3: Conclusões	71
Capítulo 4: Secção experimental	75
Capítulo 5: Bibliografia	81
Anexo	89

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxiribonucléico
ARN	Ácido ribonucléico
AM	Ácido maslínico
AO	Ácido oleanólico
AP	Proteína ativadora (do inglês <i>Activating protein</i>)
ATF3	Fator de transcrição ativante 3 (do inglês <i>activating transcription factor</i>)
AU	Ácido ursólico
BID	Agonista associado à morte do domínio interactuante com a BH ₃ (do inglês <i>BH3 interacting-domain death agonist</i>)
CHOP	Proteína homóloga da C/EBP (do inglês <i>C/EBP homologous protein</i>)
COSY	Espectroscopia correlacional (do inglês <i>Correlated spectroscopy</i>)
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
DEPT	Transferência de polarização por reforço sem distorção (do inglês <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>)
DMAP	Dimetilaminopiridina
DMAPP	Dimetilalil pirofosfato
DR	Recetores da morte (do inglês <i>death receptors</i>)
EGK	Cinase do recetor de fator de crescimento epidermal (do inglês <i>epidermal growth factor kinase</i>)
ERK	Cinase regulada pelo sinal extracelular (do inglês <i>extracellular signal-regulated kinases</i>)
FGF	Fator de crescimento do fibroblasto (do inglês <i>fibroblast growth factor</i>)
FLIP	Proteína inibidora da enzima semelhante a domínio da morte associada ao Fas de conversão da interleucina 1 (do inglês <i>Fas-associated death domain-like interleukin-1-converting enzyme-like inhibitory protein</i>)

FPP	Farnesil pirofosfato (do inglês <i>farnesyl pyrophosphate</i>)
GGPP	Geranilgeranil pirofosfato (do inglês <i>geranylgeranyl pyrophosphate</i>)
GPP	Geranil pirofosfato (do inglês <i>geranyl pyrophosphate</i>)
HSP	Proteínas de choque térmico (do inglês <i>heat shock proteins</i>)
IAP	Inibidor de proteínas apoptóticas (do inglês <i>inhibitor of apoptotic proteins</i>)
ICAM	Molécula de adesão intercelular (do inglês <i>intercellular adhesion molecule</i>)
IKK	Cinase da I κ B α (do inglês <i>IκBα kinase</i>)
IL	Interleucina
iNOS	Sintase indutível do óxido nítrico (do inglês <i>inductible nitric oxide synthase</i>)
IPP	Isopentenil pirofosfato (do inglês <i>isopentenyl pyrophosphate</i>)
IRF	Fator regulatório do interferão (do inglês <i>interferon regulatory factor</i>)
JAK	Cinase ativada pelo Janus (do inglês <i>janus-activated kinase</i>)
JNK	Cinase do N-terminal c-Jun (do inglês <i>c-JUN N-terminal kinases</i>)
KEAP1	Proteína associada a ECH semelhante a kelch (do inglês <i>Kelch-like ECH-associated protein</i>)
m	Multipleteo
MAPK	Proteína cinase ativada por mitogénios (do inglês <i>mytogen-activated protein kinases</i>)
m-CPBA	Ácido meta-cloroperbenzóico (do inglês <i>meta-chloroperbenzoic acid</i>)
Me	Grupo metilo
MEKK1	Cinase da proteína cinase ativada por mitogénios (do inglês <i>MAPK kinase</i>)
mFasL	Ligando Fas ligado à membrana (do inglês <i>membrane Fas ligand</i>)
MMP	Metaloproteinases da matriz (do inglês <i>matrix metalloproteinases</i>)
mTOR	Alvo da rapamicina nos mamíferos (do inglês <i>mammalian target of rapamycin</i>)
NF-AT	Fator nuclear de células T ativadas (do inglês <i>nuclear factor of activated T cells</i>)
NF-κB	Fator nuclear κ B (do inglês <i>Nuclear factor kappa-B</i>)
NIK	Cinase indutora do NF- κ B (do inglês <i>NF-κB inducing kinase</i>)
NOESY	Espectroscopia de efeito Overhausen nuclear (do inglês <i>Nuclear Over</i>

hausen effect spectroscopy)

ORTEP	Diagrama térmico elipsoidal de Oak Ridge (do inglês <i>Oak Ridge Thermal ellipsoidal plot</i>)
OSC	Oxidoesqualeno ciclase (do inglês <i>oxidosqualene cyclase</i>)
PARP	Polimerase de poli-(ADP-ribose) (do inglês <i>Poly-(ADP-ribose) polymerase</i>)
PG	Prostaglandina
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase (do inglês <i>phosphatidylinositol-3-kinase</i>)
PKC	Proteína cinase C (do inglês <i>protein kinase C</i>)
PKR	Cinase da proteína dependente do RNA de dupla cadeia (do inglês <i>protein kinase-RNA dependent</i>)
PMA	13-acetato de 12-miristato de forbol (do inglês <i>phorbol 12-myristate 13acetate</i>)
QSAR	Relação estrutura-atividade quantitativa (do inglês <i>quantitative structure-activity relationship</i>)
RA	Recetor de androgénios
RANKL	Ativador do recetor do ligando NF- κ B (do inglês <i>receptor activator of NF-κB ligand</i>)
RMN	Ressonância magnética nuclear
SF	Selectfluor [®]
sFasL	Ligando Fas solúvel (do inglês <i>soluble Fas ligand</i>)
SMAC	Segundo ativador de caspases derivado de mitocôndrias (do inglês <i>second mitochondria-derived activator of caspases</i>)
Src	Cinase de proto-oncogenes tirosina-proteína (do inglês <i>proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src</i>)
STAT3	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (do inglês <i>signal transducers and activators of transcription</i>)
t	Tripleto
t.a	Temperatura ambiente
TAK1	Cinase ativada pelo TGF- β (do inglês <i>transforming growth factor beta-activated kinase</i>)
TGF	Fator de crescimento transformante (do inglês <i>transforming growth factor</i>)

TIMP	Tecido inibidor de metaloproteinases (do inglês <i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>)
TLC	Cromatografia de camada fina (do inglês <i>thin layer chromatography</i>)
TNF	Fator necrótico tumoral (do inglês <i>tumoral necrotic factor</i>)
TNFR	Recetor do fator necrótico tumoral (do inglês <i>tumoral necrotic factor receptor</i>)
TRADD	Domínio de morte associado ao TNFR (do inglês <i>tumor necrosis factor receptor-associated death domain</i>)
TRAF	Fator associado ao TNFR (do inglês <i>TNFR-associated factor</i>)
TRAIL	Ligando indutor da apoptose relacionado com o TNF (do inglês <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>)
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial (do inglês <i>vascular endothelial growth factor</i>)
VEGFR	Recetor do VEGF (do inglês <i>vascular endothelial growth factor receptor</i>)

Índice de figuras

Figura 1: Esquema da nomenclatura dos anéis fundidos (pág. xix)

Figura 2: Esquema da síntese do esqualeno (pág. 5)

Figura 3: Esquema da síntese dos derivados da série oleanano e de esteroides pela via do 2,3-oxidoesqualeno (pág. 5)

Figura 4: Papéis das vias da inflamação dependentes do NF- κ B nas transformações celulares e nos processos de transformação, sobrevivência, proliferação, invasividade, angiogênese e metástase celulares (adaptado de ref. 5) (pág. 8)

Figura 5: Exemplos de triterpenóides estudados como antitumorais (pág. 11)

Figura 6: Alvos moleculares dos triterpenóides com atividade anti-inflamatória que estão envolvidos na iniciação, progressão e metástase tumoral (adaptado de ref. 43) (pág. 14)

Figura 7: Alvos moleculares dos triterpenóides (ref. 50) (pág. 20)

Figura 8: Estruturas de AO, AU e AM (pág. 21)

Figura 9: Exemplos de reagentes fluorados nucleofílicos (A – TBAF; B – DAST; C – Deoxofluor) (pág. 27)

Figura 10: Exemplos de reagentes fluorados electrofílicos (D – Selectfluor; E – NFSI)(pág. 27)

Figura 11: Representação diagramática do projeto de trabalho (pág. 29)

Figura 12: Espectro RMN ^1H do ácido oleanólico (pág. 32)

Figura 13: Espectro RMN ^{13}C do ácido oleanólico (pág. 33)

Figura 14: Esquema proposto para a síntese de AM (ref. 37) (pág. 35)

Figura 15: Reação de síntese de 1 (pág. 36)

Figura 16: Espectro RMN ^1H de 1 (pág. 37)

Figura 17: Proposta de síntese de 2 (pág. 38)

Figura 18: Espectro RMN ^1H de 2 (pág. 39)

Figura 19: Proposta de síntese de 3 (ref. 44) (pág. 40)

Figura 20: Síntese de 4 (ref. 44) (pág. 40)

Figura 21: Síntese de **4** (ref. 38) (**pág. 41**)

Figura 22: Espectro RMN ^1H de **4** (**pág. 42**)

Figura 23: Espectro RMN ^1H de uma tentativa de síntese de **3** (**pág. 43**)

Figura 24: Esquema proposto para a síntese do **AM** (**pág. 46**)

Figura 25: Proposta de síntese de **5** (ref. 60) (**pág. 46**)

Figura 26: Espectro RMN ^1H de **5** (**pág. 47**)

Figura 27: Proposta de síntese de **6** (ref. 60) (**pág. 48**)

Figura 28: Exemplo de um espectro RMN ^1H obtido na tentativa de síntese de **6** (**pág. 50**)

Figura 29: Proposta de síntese de 3 β -hidroxi-12 α -fluor-olean-13,28 β -ólido (**8**) e de 3 β -hidroxi-12 β -fluor-olean-13,28 β -ólido (**9**) proposto na ref. **60** (**pág. 51**)

Figura 30: Algumas correlações detetadas por NOESY de **9** (**pág. 52**)

Figura 31: Condições experimentais otimizadas para a obtenção preferencial do isômero α (**pág. 54**)

Figura 32: Espectro RMN ^1H do produto da experiência **F** (em crude) (**pág. 54**)

Figura 33: Espectro RMN ^1H de **8** (**pág. 55**)

Figura 34: Espectro RMN ^{13}C de **8** (**pág. 56**)

Figura 35: Espectro DEPT 135 de **8** (**pág. 57**)

Figura 36: Detalhe do espectro HMBC de **8** (**pág. 58**)

Figura 37: Detalhe do espectro HMQC de **8** (**pág. 58**)

Figura 38: Painél de reações realizadas a partir de **8** (**pág. 61**)

Figura 39: Espectro RMN ^1H de **10** (**pág. 62**)

Figura 40: Espectro RMN ^{13}C de **10** (**pág. 63**)

Figura 41: Espectro RMN ^1H de **11** (**pág. 64**)

Figura 42: Espectro RMN ^{13}C de **11** (**pág. 65**)

Figura 43: Esquema de atribuição dos sinais dos prótons do anel aromático (**pág. 67**)

Figura 44: Espectro RMN ^1H de **12** (**pág. 67**)

Índice de tabelas

Tabela 1: Atribuição dos sinais em RMN ^1H (ref. 71) (pág. 33)

Tabela 2: Atribuição dos sinais em RMN ^{13}C (ref. 71) (pág. 34)

Tabela 3: Representação simplificada das experiências realizadas na fluoração de **AO** (pág. 53)

Tabela 4: Seleção de sinais ^1H de **8** (pág. 55)

Tabela 5: Seleção de sinais ^{13}C de **8** (pág. 59)

Tabela 6: Seleção de sinais RMN ^1H de **10** (pág. 62)

Tabela 7: Seleção de sinais RMN ^{13}C de **10** (pág. 63)

Tabela 8: Seleção de sinais RMN ^1H de **11** (pág. 65)

Tabela 9: Seleção de sinais RMN ^{13}C de **11** (pág. 66)

Tabela 10: Seleção de sinais RMN ^1H de **12** (pág. 68)

Resumo

Com cerca de 14,1 milhões de novos casos diagnosticados em todo o mundo, em 2012, e com uma mortalidade estimada em cerca de 8,2 milhões de pessoas, também em todo o mundo e em 2012 ([World cancer report, 2014](#)), o cancro é uma das patologias mais preocupantes do século 21, tendo sido nesse ano responsável por 14,1% das mortes humanas. Estes dados indicam que não só que esta patologia é responsável por uma grande percentagem da mortalidade humana como também mostram que a situação está longe de estar controlada. Desta feita, a investigação de novas moléculas capazes de prevenir e/ou tratar esta doença torna-se de extrema importância.

Neste âmbito, os compostos de origem natural têm tido um papel importante, embora por vários fatores terem saído um pouco de foco como pontos de partida para o desenvolvimento de novos fármacos. Ainda assim, em 2007, mais de 30 compostos de origem natural estavam em diversas fases de desenvolvimento clínico para o tratamento de diversos tipos de cancro. Neste campo, os triterpenóides têm sido bastante estudados para a sua aplicação em vários alvos envolvidos no desenvolvimento do cancro, e em particular as 12-fluorolactonas de compostos triterpenóides têm nos últimos anos surgido como compostos promissores, como evidenciado em vários trabalhos na literatura. Para a classe de compostos da série ursano, é evidenciado um processo de síntese seletivo para β -fluorolactonas embora existam evidências de que os compostos α -fluorolactonas possuam uma atividade biológica igualmente interessante.

Sabendo isto, resolveu estudar-se uma via de síntese de fluorolactonas da série oleanano, com vista a obter resultados que pudessem permitir aplicar esse processo a compostos da mesma série e em séries semelhantes, tendo-se tentado otimizar uma via de síntese para o ácido oleanólico e ao mesmo tempo sintetizar o ácido maslínico, composto da série oleanano comercialmente caro, por uma via sintética simples e descrita em artigos recentes, sendo que neste último pretendia obter-se derivados fluorados e não fluorados, sendo que no caso dos fluorados servirá então como uma referência na aplicação da via de síntese de fluorolactonas optimizadas em compostos de classes semelhantes ao ácido oleanólico.

Abstract

Having around 14,1 million new cases diagnosed around the world, in 2012, and with a mortality rate of around 8,2 million people worldwide, also in 2012 ([World Cancer Report, 2014](#)), cancer is one of the most worrying and studied disease of the 21st century, having in that year been responsible for 14,1% of all human deaths worldwide. This information tells us that not only cancer is responsible for a big percentage of human deaths but also that this situation is far from being a controlled situation. For this, research made in search of new compounds to prevent and/or treat this disease is of extreme relevance.

Having so, natural compounds have been important, although for many reasons they have been losing their position as a starting point for the development of new drugs. Even so, in 2007, more than 30 natural compounds were in development stages for the treatment of various types of cancer. In this field, triterpenoids have been well studied for their applications in various types of targets that are known to promote the development of different types of cancer, and 12-fluorolactones of triterpenoids, in particular, have been studied in the latest years as promising compounds, as evidenced in the literature. For the ursane-type, it appears in the literature a new method for the selective synthesis of β -fluorinated compounds, although there's also evidence that the α -fluorinated compounds also have an interesting biological activity in the field of cancer.

For this matter, it was intended to study a method for the synthesis of fluorolactones in the oleanane series, in order to obtain results that allowed us to apply the process in other compounds from the oleanane series, as well as extrapolate to similar series of compounds; for that, an optimization of the synthesis was tried for oleanolic acid and at the same time a simple and literature-guided synthetic pathway to obtain maslinic acid, a commercially expensive oleanane series compound, was also tried, being the latter not only to obtain maslinic acid non-fluorinated compounds but also fluorinated derivatives as they can be a good reference for the study of the application of the synthetic method to obtain fluorolactones in compounds from similar series.

Nomenclatura

A nomenclatura utilizada nesta dissertação de mestrado segue as regras gerais da nomenclatura IUPAC¹. Recorri ao sistema de Hantzsch-Widman¹ para a nomenclatura de anéis fundidos para nomear os carbonos e hidrogénios das moléculas apresentadas, recorrendo para isso à sua posição na mesma.

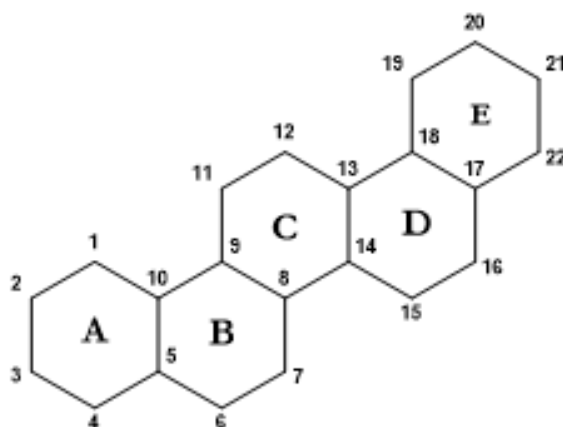


Figura 1: Esquema da nomenclatura dos anéis fundidos

Segundo esta nomenclatura, os carbonos que surgem como substituíntes são numerados por ordem da nomenclatura do anel fundido e dentro do mesmo anel por ordem numeral do carbono.

Capítulo 1

Introdução

1.1. Cancro: Breve contextualização

Com cerca de 14,1 milhões de novos casos de cancro diagnosticados em todo o mundo em 2012, e com uma mortalidade estimada em cerca de 8,2 milhões de pessoas, também em todo o mundo e em 2012², o cancro é uma das patologias mais preocupantes do século 21, tendo sido nesse ano responsável por 14,1% das mortes humanas² e passado a ser a 5ª maior causa de morte a nível mundial³. Só devido ao cancro da mama, 521.900 mulheres perderam a vida em 2012, sendo que 197.600 pertenciam a países desenvolvidos e 324.300 pertenciam a países em vias de desenvolvimento, e estima-se que em 2016 hajam cerca de 249.260 novos casos de cancro da mama e 40,890 de mortes relacionadas só nos Estados Unidos da América⁴.

De mecanismos ainda não completamente conhecidos, esta patologia pode manifestar-se de variadas formas e em variados órgãos, sendo a probabilidade de sucesso na terapêutica dependente de vários fatores, como o estadió da doença aquando do início do tratamento, do tipo de tumor, de fatores genéticos e epigenéticos do paciente, etc, mas na generalidade dos casos o prognóstico não é de todo positivo². Esta patologia normalmente surge como resultado de uma série de mutações que inviabilizam a correta regulação génica, resultando não só na imortalização da célula como também na incapacidade de regulação do crescimento celular, por inibição dos genes reguladores da transcrição e/ou supressores tumorais e/ou por expressão de oncogenes². É descrito na literatura que «os tipos e subtipos de cancro, bem como o espectro de mutações promotoras do cancro, variam consideravelmente consoante as várias populações mundiais como resultado de variações ambientais como exposições químicas, infecções, dietas, entre outros, e da diversidade populacional dos genes que codificam moléculas que interagem com fatores exógenos»².

Existe ainda uma cada vez mais evidente contribuição de alterações epigenéticas que levam a uma desregulação genética sem alteração da sequência génica, mas que ainda assim podem culminar em alterações semelhantes às levadas a cabo por mutações². Para além disso, tem-se tornado cada vez mais evidente que a comunicação entre as células cancerígenas e as componentes celular e molecular que constituem o microambiente tumoral circundante tomam também um papel importante na progressão da doença; muitas estratégias estão hoje voltadas não só para as células tumorais como também para a modificação de aspetos relacionados com este microambiente, como seja a vascularização, a inflamação associada, entre outros². A investigação de novos compostos para esta patologia, que sejam cada vez mais eficazes e específicos e que minimizem os efeitos secundários adjacentes são um tema muito em voga nos dias de hoje, dada a realidade desta doença e a necessidade crescente de novas formas terapêuticas

que se têm verificado ao longo dos anos. Neste âmbito, têm surgido os triterpenóides, que se têm revelado promissores em várias áreas do cancro².

1.2. Biossíntese dos triterpenóides

Os triterpenóides são metabolitos de oligómeros de pirofosfato de isopentenilo, estando distribuídos pelo reino vegetal de uma forma mais ou menos generalizada, na forma de triterpenóides livres, glicósidos de triterpenóides, fitoesteróis e/ou dos seus precursores⁵. Representam um grupo vasto e diverso de compostos com diversas atividades em variadas patologias, e que são caracterizados por serem derivados de uma molécula de esqualeno composta por 30 átomos de carbono, podem ser de cadeia aberta ou de cadeia fechada, derivando estes últimos da ciclização do esqualeno (processo que nos humanos é muito importante para a síntese de colesterol)^{5,6}. Representam o maior grupo de compostos fitoquímicos, estimando-se que existam na natureza mais de 20.000 triterpenóides diferentes⁷. São encontrados predominantemente em várias algas ou no revestimento seroso de vários frutos e ervas medicinais, sendo exemplo as maçãs, figos, azevinho, alfazema, orégãos, entre outros^{5,6,7}. Eles podem ainda ser divididos em vários grupos: cucurbitanos, cicloartanos, damaranos, eufanos, friedelanos, holostanos, hopanos, isomalabaricanos, lanostanos, limonóides, lupanos, oleananos, protostanos, esqualenos, tircalanos, ursanos e compostos variados, sendo que a grande maioria destes dizem respeito a triterpenóides cíclicos^{5,7}.

Os triterpenóides são sintetizados a partir do IPP ou do seu isómero DMAPP (derivados fosfatados do isopreno) que por intermédio de três preniltransferases formam as cadeias lineares de pirofosfatos de prenilo GPP, FPP e GGPP, sendo que do farnesil se sintetiza, por exemplo, o ácido ursólico por via da acção de enzimas ciclases⁵. O esqualeno é também derivado por esta via, por ciclização do GGPP, dando posteriormente às várias classes de triterpenóides (interessando especialmente para esta discussão os pentacíclicos)⁵. A variedade de triterpenóides na natureza resulta da evolução de uma larga superfamília de terpeno sintases. Um estudo da sequência de aminoácidos dos genes de terpeno sintases concluiu que todos são originários de uma diterpeno sintase ancestral, e que a diversidade dos triterpenóides se devia a alterações estruturais nas suas enzimas catalíticas respetivas⁵. De facto, os terpenos e os seus metabolitos são encontrados em vários sistemas vegetais que dependem de vários factores bióticos e não bióticos ambientais, tendo funções fisiológicas, de desenvolvimento e de defesa, que permitam a esses sistemas uma melhor adaptação; este último aspeto, o da defesa contra

agentes biológicos e *stress* ambiental, tem sido visto como um indicativo do potencial terapêutico desta família de compostos⁵.

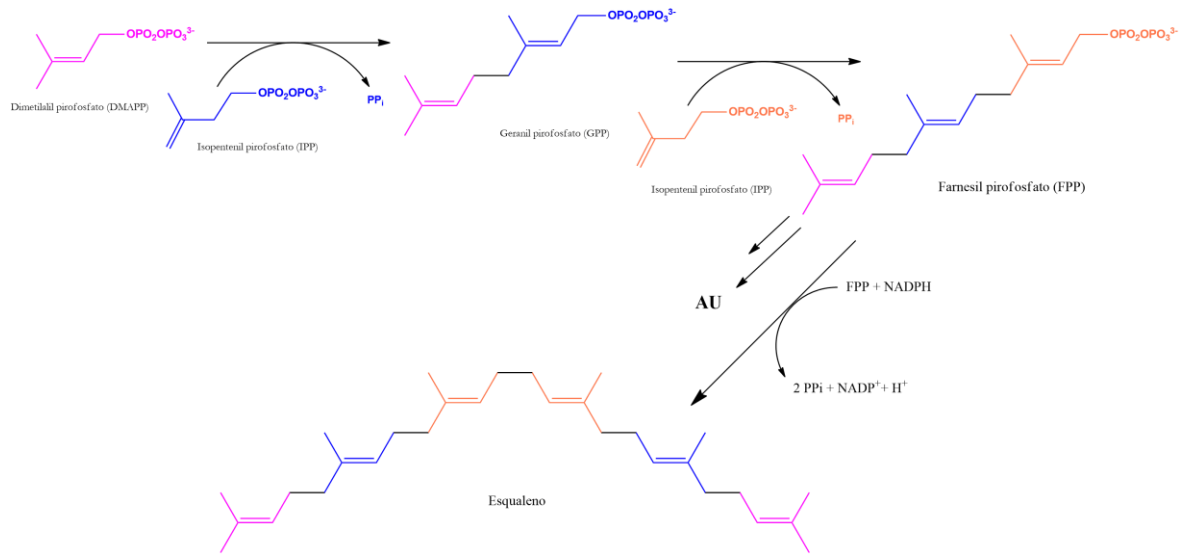


Figura 2: Esquema da síntese do esqualeno

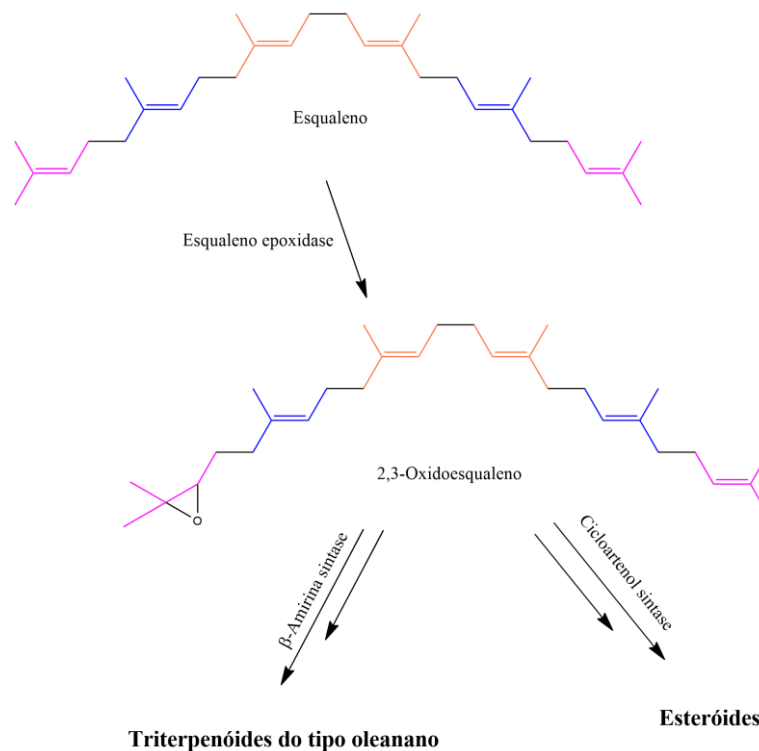


Figura 3: Esquema da síntese dos derivados da série oleanano e de esteroides pela via do 2,3-oxidoesqualeno

1.3. Principais alvos moleculares

A descoberta de que a inflamação toma um papel importante na evolução de vários tipos de cancro, e que um em cada sete tumores malignos diagnosticados a nível mundial resulta de inflamação crónica e infeção levou a que a inflamação fosse estudada no âmbito do cancro, sendo que as vias de inflamação envolvidas bem como marcadores que influenciem a progressão tumoral, ao longo destas vias, tomaram um papel importante no tratamento desta patologia¹. Existem vários estudos e evidências⁸⁻¹⁶ das várias linhas de ação biológica que em que os triterpenóides podem atuar, em particular como agentes antitumorais^{8,11,17-21}.

As terapias convencionais do cancro envolvem cirurgia, quimioterapia e/ou radioterapia, consoante o tipo de cancro em questão. Actualmente, começa-se a pensar em terapias com vários alvos, que atinjam a progressão tumoral e os processos envolvidos na sobrevivência tumoral e metástase, sendo que se tem tornado cada vez mais claro que o cancro não é uma doença monogénica simples, mas sim um conjunto de fatores genéticos multigénicos de interação intra e intercelular, pelo que uma abordagem por várias perspetivas deverá levar a uma melhor terapêutica^{5,22,23}.

NF-kB: Este ubíquo fator nuclear de transcrição tem como função ligar-se à região promotora da cadeia kB das imunoglobulinas nas células B⁵. No seu estado inativo, encontra-se no citoplasma como heterotrímero constituído pelas p50, p65 e pela subunidade inibitória IκBα, sendo ativado por radicais livres, estímulos inflamatórios, citocinas, carcinogénios, promotores tumorais, endotoxinas, radiação γ, luz ultravioleta e raios X⁵. Com a ativação, a proteína IκBα é fosforilada pela IKK, ubiquitinada e degradada, perdendo a sua função inibitória do complexo e permitindo o desacoplamento da p50 e da p65, que são então translocadas para o núcleo e se ligam à região promotora de vários genes, permitindo a transcrição de mais de 400 genes^{5,23}. Tendo a IKK de ser ativada ela própria também, existe aqui um ponto passível de ser explorado como potencial terapêutico, que ao que se conhece poderá ser a proteína cinase B (Akt), a MEKK1, MEKK3, a TGF, a TAK1, a cinase ativadora do NF-kB, a cinase indutora do NF-kB, a PKC e a PKR^{5,23}.

STAT3: Identificado inicialmente como um fator de ligação ao ADN, que se liga seletivamente à porção sensível à IL-6 do promotor, o STAT3 é um dos principais alvos moleculares dos triterpenóides⁵. A ativação deste factor é regulada pela fosforilação da tirosina 705 por

tirosinas cinase acopladas e não acopladas a receptores, como são exemplo a EGK, a Src, a JAK e a ERK, levando a sua fosforilação no citoplasma à sua dimerização, translocação para o núcleo e ligação ao ADN, resultando isso na regulação de vários genes envolvidos na proliferação, diferenciação e apoptose celular^{5,23}.

iNOS: Fazendo parte da família das sintases do óxido nítrico, a iNOS, embora sintetize de igual forma o óxido nítrico a partir da L-arginina, não é sensível ao cálcio; quando induzida pelo IRF1 e pelo NF-kB, o promotor iNOS é estimulado para a síntese de iNOS em ambiente pró-inflamatório⁵. A iNOS pode ser estimulada à produção de óxido nítrico em larga escala por citocinas pró-inflamatórias como IL-1, TNF- α e interferon- γ ^{5,22}. Sendo este estímulo normalmente desencadeado em ambientes oxidativos, a produção de óxido nítrico nestas condições possibilita a reação com o ião superóxido, levando à formação de peroxinitrilo e consequentemente a toxicidade celular, pelo que o papel na imunidade inata da iNOS é já bem aceite e fundamentado^{1,22}. Existem evidências de que os triterpenóides são capazes de inibir a iNOS e desta forma contribuir para a diminuição da inflamação, importante em patologias desencadeadas e/ou perpetuadas por processos inflamatórios crônicos^{5,23}.

COX-2 e 5-LOX: Estas enzimas, cicloxigenase 2 e a 5-lipoxigenase, são responsáveis pela oxigenação do ácido araquidónico (no caso da 5-LOX, também ácidos gordos essenciais) a prostaglandina H2 e leucotrienos A4, respectivamente, que por sua vez estão envolvidos em vários processos importantes na inflamação, como a adesão e ativação de leucócitos no endotélio, a migração de leucócitos, entre outros. Existem também aqui evidências de que os triterpenóides conseguem atuar na inflamação por inibição destas duas enzimas pró-inflamatórias^{5,23}.

Introdução

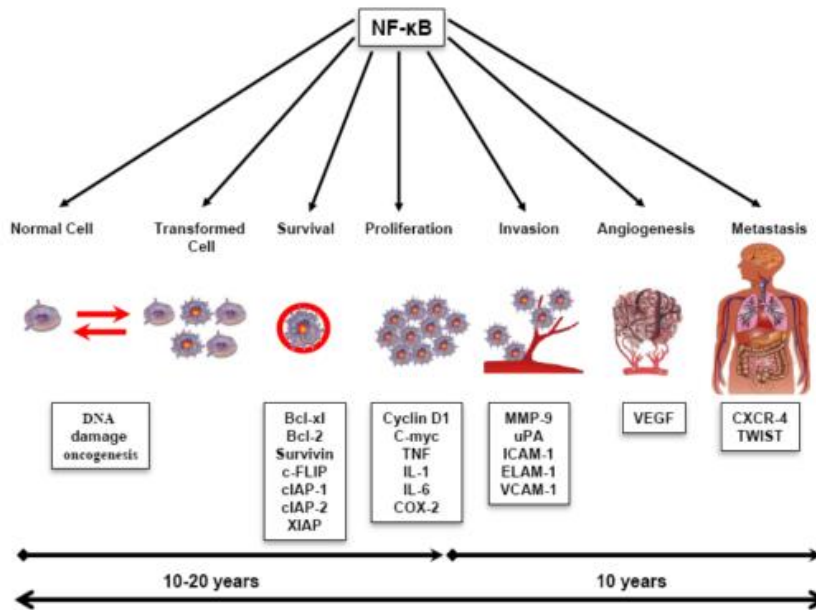


Figura 4: Papéis das vias da inflamação dependentes do NF-κB nas transformações celulares e nos processos de transformação, sobrevivência, proliferação, invasividade, angiogênese e metástase celulares (adaptado de ref. 5)

1.4. Papel dos triterpenóides no Cancro

Ação moduladora da inflamação

Antes de falar de triterpenóides no processo inflamatório, seria talvez relevante definir um ou dois pontos importantes acerca deste último. Este processo, bem conhecido por todos aquando de qualquer processo lesivo do nosso corpo, surge como resposta normal do sistema imunitário a infeções, irritações ou outras lesões, e caracteriza-se por quatro principais aspetos: vermelhidão, aquecimento, inchaço e dor^{5,22,23}. Estimula uma resposta imunitária ao local da lesão ou infeção e é ele próprio estimulado pela afluência sanguínea (aumentada) ao local e por aumento da permeabilidade vascular, o que permite uma maior passagem de plasma e leucócitos ao local lesado^{5,22,23}. Desta feita, este processo, chamado de inflamação aguda, não deve ser tomado como um alvo a extinguir nas diversas patologias, mas sim um alvo a modular, pois a sua função na imunidade inata e reparação tecidual é de crucial importância. Por outro lado, a inflamação crónica tem revelado, em estudos presentes na literatura⁵, ser promotor da progressão tumoral e que vários cancros aparentam surgir de locais de infeção, irritação crónica e

inflamação, acabando esta por regular o microambiente circundante dos tumores de uma forma que lhes permite a proliferação, sobrevivência e migração^{5,22,23}.

A inflamação promove o desenvolvimento tumoral por vias imunes e não imunes. O NF- κ B é um fator de transcrição que regula a inflamação e a resposta imune inata e pode ser ativado por citocinas, patógenos e fatores de stress, ou por citocinas pró-inflamatórias (TNF α , LPS (*Lipopolysaccharide*)), que pela via do IKK, mantém o NF- κ B ativado constitutivamente; por esta última via, mais especificamente a via do IKK β , o NF- κ B participa no aparecimento e progressão de tumores induzidos por inflamação^{5,24}.

A par deste, temos fatores como o TNF e as IL-1 β , IL-6 e IL-8 a participar como elo de ligação entre inflamação e cancro. No caso do TNF, libertado maioritariamente pelos macrófagos para regular células do sistema imunitário (e não só) por promoção da necrose de células em crescimento e desenvolvimento anormais, tem provado que a sua desregulação está também ligada ao aparecimento de neoplasias. Na via da IKK, o TNF parece ser capaz de a estimular por ligação a recetores membranares, o que por sua vez leva à ativação do NF- κ B^{5,24}.

As interleucinas, pela sua função na resposta inflamatória, tendem a promover uma inflamação não controlada quando se encontram desreguladas. A IL-1 β está essencialmente desregulada, e está essencialmente ligada ao processo inflamatório contra infeções, aumentando a expressão de fatores de adesão endotelial e dessa forma promoverem uma melhor infiltração de leucócitos nos locais de infeção⁵; a IL-6 encontra-se mais relacionada com o processo inflamatório associado a traumas e lesões tecidulares, levando à síntese de PGE₂, à mobilização de energia e a uma resposta a certos patógenos, pelos macrófagos⁵; por último, temos a IL-8, mais ligada a funções mitogénica, angiogénica e mutagénica, e portanto sendo um factor que promove a progressão tumoral⁵. Portanto, podemos perceber que as células inflamatórias e os seus fatores reguladores criam condições que facilitam a angiogénese e que promovem o crescimento, invasividade e metástase dos tumores, pois enquanto que níveis normais de iNOS e de COX-2 desempenham funções cruciais na resposta fisiológica a lesões tecidulares, níveis anormalmente elevados promovem a carcinogenicidade celular^{5,23}.

Na generalidade dos tumores, encontram-se níveis elevados de PG, que se pensa causar dano celular e carcinogénese por inibição da apoptose, estímulo da proliferação celular e promoção da angiogénese e invasividade tumoral⁵. Isto vem corroborar a teoria de que o cancro pode estar intimamente ligado à inflamação, já que as PG são mediadores endógenos da inflamação formados a partir do ácido araquidónico por intermédio da COX-1 constitutiva e da COX-2 indutível⁵. Neste âmbito, os triterpenóides possuem vários alvos moleculares. Sabe-se, por exemplo, que os triterpenóides da família dos cicloartanos retirados da *Cimicifuga daburica*

Introdução

suprimem a expressão de COX-2 e que isto implica que estes triterpenóides possuam potencial antitumoral e que exerçam a sua citotoxicidade através da apoptose e da paragem do ciclo celular em G2/M⁵. De facto, muitos triterpenóides de origem botânica tomam um papel importante na redução da inflamação, sendo exemplo a avicina, o ácido asiático, o ácido betulínico, o ácido bosuélico, a diosgenina, ácido oleanólico e ácido ursólico, sendo que muitos destes têm como alvo o NF-κB, levando à sua subexpressão⁵.

Os triterpenóides tendem a ter várias funções, sendo estas bastante dependentes da concentração. Dependendo da dose administrada, os triterpenóides podem apresentar atividades anti-inflamatória, citoprotetora, diferenciadora tumoral, antiproliferativa e apoptótica⁵. A sua atividade anticancerígena aparenta ser mediada, pelo menos parcialmente, pela sua capacidade de bloquear o NF-κB induzido pelo TNF por inibição da IKKβ⁵. Os alvos moleculares dos triterpenóides sintéticos da classe dos oleananos incluem a IKK e também as vias envolvendo a STAT, a IL-6, o TGF-β e o KEAP1 (que inibe o fator de transcrição Nrf2, que por sua vez se encontra relacionado com a resposta ao stress oxidativo)⁵. A inibição de vários alvos por parte dos triterpenóides tem vindo a ser explicada pela existência de uma reação de adição de Michael reversível na presença de grupos nucleofílicos expostos (como grupos tiol de cisteínas) de várias proteínas de sinalização que sejam susceptíveis⁵.

As avicinas são triterpenóides pentacíclicos electrofílicos com potencial pró-apoptótico, anti-inflamatório e antioxidante^{5,25}. Mostraram induzir modificações pós-translacionais dependentes de reações redox em resíduos de cisteína para regular funções proteicas, promovendo desta forma uma subexpressão tanto da atividade do STAT3 como da expressão de proteínas pró-sobrevivência celular reguladas pelo STAT3, contribuindo desta forma para a indução da apoptose *in vitro*^{5,25}. Mostraram ser potentes inibidores do NF-κB induzido pelo TNF e que conseguem atrasar a acumulação da subunidade p65 do NF-κB, no núcleo; adicionalmente, bloquearam a ligação do NF-κB ao ADN em ensaios *in vitro* de ligação⁵. Ensaios com DTT reverteram por completo a inibição do NF-κB induzida pela avicina G, o que sugere que grupos sulfidrílo importantes para a ligação do NF-κB ao ADN estavam a ser afetados. Para além disso, o tratamento com avicina G diminuiu a expressão de proteínas reguladas pelo NF-κB, como a iNOS e a COX-2⁵. Outros estudos mostraram que aplicar um pré-tratamento celular com triterpenóides durante 24 h reduzia significativamente a indução do NF-κB mediada pelo TNF-α⁵.

A prismiterina, um triterpenóide natural, promove respostas celulares que se assemelham aos inibidores do proteossoma, tais como a rápida indução das HSP, da ATF3 e da CHOP⁵. Inibe também a ativação do NF-κB ao inibir a IKK-α ou IKK-β, enquanto que os inibidores

do proteassoma suprimem o NF- κ B por diminuírem a degradação de I κ B ubiquitinado. Ao inibir tanto a IKK como o proteassoma, a prismetina suprime a ativação do NF- κ B constitutivo nas células do mieloma^{5,26}.

Os mielomas múltiplos são peculiarmente sensíveis ao proteassoma ou à inibição da via do NF- κ B, tendo a prismetina mostrado ser potente e seletivamente letal às células do mieloma primário e capaz de inibir tumores do plasmacitoma xenógrafos em murganhos. É também conhecida como antifúngico, antimicrobiano e anti-inflamatório, com efeito no sistema iNOS em macrófagos 264.7 RAW LPS-ativados⁵.

O celastrol, um triterpenóide natural de estrutura semelhante à da pristimerina, aparenta ter potencial para uso no tratamento do cancro pela sua capacidade de indução de morte em células do melanoma, bem como de inibição da sua proliferação⁵. Foi capaz de aumentar os níveis de proteínas ubiquitinadas, de reduzir os níveis de fosforilação do I κ B induzido pelo T-NF- α e de bloquear a translocação para o núcleo, na ordem dos nanomolar, de NF- κ B; contudo, os mecanismos para estes efeitos diferem⁵. O celastrol inibe a fosforilação induzida pelo LPS de proteínas cinase ativadas por mitogénios/cinases 1 e 2 reguladas por sinalização extracelular (MAPK/ERK1/2) e a capacidade de ligação ao ADN do NF- κ B⁵. Outros estudos indicaram que a ativação das IKK induzidas pelo TNF requer a ativação da TAK1 e que o celastrol inibe a ativação do NF- κ B induzida pelo TAK1⁵. Foi também capaz de inibir a inflamação das vias aéreas induzida pela ovalbumina, respostas exacerbadas e a remodelação tecidual ao regular o equilíbrio das MMP2 e MMP9 e das TIMP1 e TIMP2, recorrendo a citocinas inflamatória via MAPK e NF- κ B nas células inflamatórias⁵.

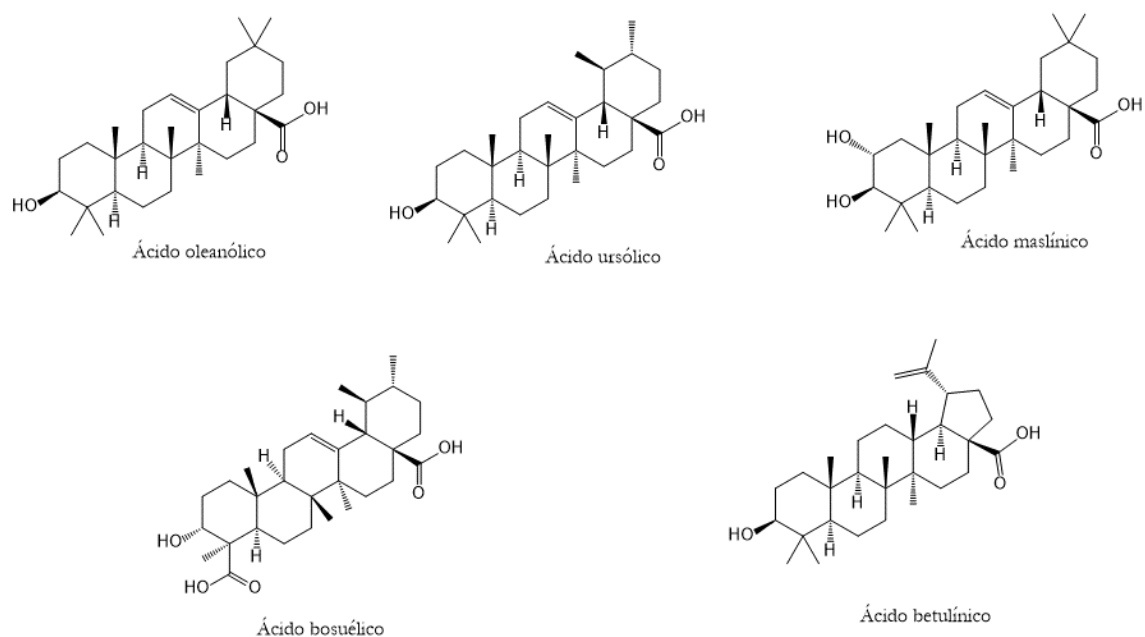


Figura 3: Exemplos de triterpenóides estudados como antitumorais

Introdução

Os triterpenóides eritrodiol e ácido madecássico são análogos estruturais e têm atividade antiproliferativa e anticancerígena⁵. Contudo, apenas o ácido madecássico demonstrou também a capacidade de inibição do NF- κ B estimulada pelo LPS com subsequente bloqueio da translocação das p65 para o núcleo, sendo que tal se poderá dever à presença de um grupo hidroxilo adicional em C₂⁵.

A momordina, análogo do ácido maslínico, não contém nenhum grupo hidroxilo em C2 mas continua a demonstrar inibição do NF- κ B na diferenciação osteoclástica, o que poderá dever-se à sua acção sobre o c-Fos, um componente do factor de transcrição da AP-1 que desempenha um papel fulcral na diferenciação osteoclástica⁵. Inibiu também a ativação do NF- κ B e da AP-1 em células RAW264.7 RANKL-induzidas, nas quais a momordina mostrou ter como alvo a degradação do I κ B e a expressão do c-Fos, mas não a via das MAPK⁵.

Saicosaponinas são saponinas triterpénicas derivadas da planta medicinal *Bupleurum falcatum* L. que demonstraram ter várias atividades imunomodulatórias e farmacológicas, das quais se podem destacar as atividades anti-inflamatória, antibacteriana e anticancerígena em várias linhas celulares, sendo exemplo as Caco-2 e as A549⁵. Estudos demonstraram que estes compostos não só suprimem a proliferação de células T humanas coestimuladas com OKT3 e CD28 mas também inibiu a ativação *in vitro* de células T de rato PMA-PMA/ionomicina- e concavalina A-induzidas⁵. Este efeito inibitório da ativação de células T PMA-induzidas foi associada à subexpressão da sinalização do NF- κ B via supressão da atividade das IKK e das Akt. Também conseguiram inibir tanto a ligação ao ADN como a translocação nuclear do NF-AT e da AP-1 nas células T estimuladas com PMA/ionomicina^{5,27}. Para além destes resultados, verificou-se que também alguns marcadores celulares de superfície, como os receptores de IL-2 (CD25), estavam também subregulados, e que a produção de citocinas pró-inflamatórias como as IL-6, o TNF- α e o Interferão- γ estava diminuída⁵; estes resultados indicam que as vias de sinalização do NF- κ B, o NF-AT e da AP-1 (c-Fos) estavam envolvidas na inibição das células T levada a cabo pelas saicosaponinas, demonstrando assim o seu potencial no tratamento de condições auto-imunes mediadas por células T^{5,8}.

Outro estudo demonstrou que as saicosaponinas têm envolvimento direto na indução da apoptose e da paragem do ciclo celular mediado pela p53, NF- κ B e Faz/ligando Faz, em linhas celulares de hepatoma humano, tendo conseguido também inibir a sinalização para a sobrevivência celular ao aumentar os níveis de I κ B α no citoplasma e reduzir os níveis e atividade do NF- κ B no núcleo, e subsequentemente atenuando a expressão da Bcl-xL em HepG2 e Hep3B. Portanto, as saicosaponinas diminuíram a proliferação celular e induziram a apoptose tanto em HepG2 p53-positivas como em Hep3B p53-negativas^{5,27}.

A diosgenina, um triterpenóide semelhante a esteroide com dois anéis pentacíclicos, tem demonstrado ser capaz de suprir a inflamação, inibir a proliferação e induzir a apoptose numa variedade de células tumorais⁵. A diosgenina inibe a osteoclastogênese, a invasividade e a proliferação por via da subexpressão da Akt, da ativação da IKK, da expressão génica regulada pelo NF-kB. Suprime o NF-kB por ligação direta ao ADN, ativação da IKK, fosforilação da I κ B α , degradação da I κ B α , fosforilação da p65 e translocação nuclear da p65 ao inibir a ativação da Akt⁵.

O CDDO e o CDDO-Me, dois triterpenóides do tipo oleanano de estrutura semelhante ao ácido ursólico, estão neste momento em ensaios para o tratamento da leucemia e tumores sólidos^{5,28}. O primeiro, o CDDO, bloqueia a ação do NF-kB ao prevenir a translocação nuclear da p65, o que promove um bloqueio da transativação dos genes NOS2 e PTGS2, e assim tendo uma acção anti-inflamatória e levando à paragem do ciclo celular (alguns outros triterpenóides, como o ácido bosuélico e o celastrol também bloquearam a acção do NF-kB ao inibir a transativação da COX-2)^{5,28}. Em concentrações na gama dos nanomolar, o CDDO conseguiu inibir a síntese *de novo* das enzimas inflamatórias iNOS e COX-2 em macrófagos ativados porque contém porções carbonilo α,β insaturadas^{5,28}. Visto que a sobreexpressão de iNOS e COX-2 tem vindo a ser provada como estando implicadas como possíveis promotores de carcinogénese, o CDDO tem potencial para ser usado como agente quimiopreventivo⁵.

Mais ainda, o CDDO também serve como um agente quimioterapêutico, visto que concentrações na gama dos micro e nanomolar conseguiram induzir de forma eficaz a diferenciação de células de leucemia mieloide humanas, inibiu a proliferação de vários tipos celulares tumorais humanos e induziu a apoptose em células leucémicas linfocitárias e mieloides humanas, células do osteossarcoma e células do cancro da mama, incluindo células resistentes à quimioterapia^{5,28}.

O ácido bosuélico tem mostrado ser capaz de induzir a apoptose em vários tipos de células tumorais⁵. A nível molecular, consegue inibir a sinalização pelo NF-kB ativado constitutivamente por interferir com a actividade da IKK⁵; a sinalização via resposta estimulada pelo IFN manteve-se inalterada, sugerindo uma especificidade para a a IKK⁵. Em estudos xenográficos em células de meningioma animal, o ácido bosuélico mostrou uma potente ação citotóxica com valores de IC₅₀ na ordem dos 2-8 micromolar⁵. A baixas concentrações na ordem dos micromolar, conseguiu uma rápida e potente inibição da fosforilação do ERK-1/2 e afetou a motilidade das células de meningioma estimuladas com factor de crescimento derivado de plaquetas BB⁵. A ação citotóxica do ácido bosuélico nas células do meningioma pode ser me-

Introdução

diada, pelo menos em parte, pela inibição da via de transdução de sinal da ERK, que toma um papel importante na transdução de sinal e tumorigênese⁵.

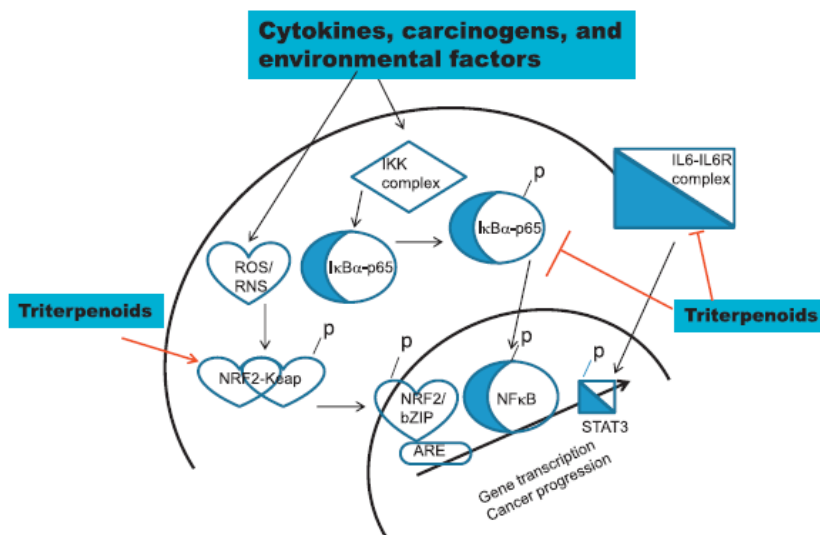


Figura 6: Alvos moleculares dos triterpenóides com atividade Anti-inflamatória, e que estão envolvidos na iniciação, progressão e metástase tumoral (adaptado de ref. 43)

Ação sobre a sobrevivência tumoral, apoptose e proliferação

A apoptose é o mecanismo natural para a destruição de células com irregularidades como danos no ADN, ativação oncogénica, deficiência em nutrientes ou hipoxia. As células tumorais têm a habilidade de escapar a estes mecanismos, pelo que a exploração deste processo no âmbito do cancro tem sido alvo de inúmeros estudos^{5,12,29,30}. A apoptose nas células tumorais pode ser desencadeada pela ativação de proteases como são exemplo as caspases, levando à destruição celular^{5,24}.

Existem, para este processo, duas vias de estímulo da apoptose diferentes. O primeiro é a via intrínseca por intermédio das mitocôndrias, que libertam proteínas do citocromo C, como são exemplo as SMACs, que se ligam e desativam as IAP, permitindo à apoptose ocorrer. Os sinais apoptóticos desta via podem surgir sob a forma de proteínas da família das Bcl-2 como as Bax pró-apoptóticas, que podem ser sobreestimuladas pela p53 em resposta aos danos no ADN^{5,24,31}.

A segunda via é a extrínseca, pela qual a apoptose é desencadeada pela ativação dos receptores pró-apoptóticos tais como os DR4 e 5 e as Fas, que estão presentes à superfície celular¹.

A ativação da via dos DR leva à agregação dos receptores, que então iniciam o recrutamento e ativação das caspase 8 iniciadoras. Enquanto a p53 estão envolvidas na via intrínseca, não têm função conhecida na via extrínseca^{5,24,31}.

A ativação da STAT3 tem sido associada à sobrevivência celular, proliferação e invasividade em vários câncros humanos. Alguns membros da família de proteínas da Bcl-2, tais como a Bcl-2 e a Bcl-xL, também desempenham um papel na apoptose e tem sido demonstrada a sua sobreexpressão em diferentes tipos de cancro. Estas proteínas levam algumas células a desenvolver resistências a quimioterapêuticos⁵. Outra proteína, a survivina, pode ter um papel na progressão tumoral e tem sido encontrada com valores anormalmente elevados de concentração em células tumorais⁵. Portanto, temos como possíveis alvos para o tratamento do cancro moléculas que promovam a subexpressão das Bcl-2, Bcl-xL e survivinas, e a sobreexpressão da p53, das Bax e das caspases⁵. Aparentemente, os triterpenóides actuam ao nível da via intrínseca para prevenir a progressão tumoral, induzindo a apoptose por vários mecanismos; é possível destacar, neste campo, o ácido asiático, o celastrol, a diosgenina e o lupeol. Estes têm um alvo em comum, a proteína antiapoptótica Bcl-2, conseguindo dessa forma promover a apoptose⁵. Para além disso, existem evidências de que o processo metastático é levado a cabo por uma série de mediadores químicos, como quimiocinas e seus recetores, onde se incluem as MMP, o VEGF e o TGF- β ^{31,32}.

A pristimerina mostrou ser capaz de induzir a morte celular mitocondrial em células cancerígenas humanas, onde a ativação dependente de ROS tanto das Bax como das PARP-1 toma um papel fundamental para promover a disfunção mitocondrial⁵. Demonstrou também que as JNK estão envolvidas na ativação das Bax dependentes de ROS, que por sua vez fazem aumentar a concentração de ROS intracelular, a ativação das JNK, alterações conformacionais e redistribuição mitocondrial das Bax, perda de potencial membranar mitocondrial e morte celular⁵. Um pré-tratamento com pristimerina também activou as PARP-1⁵. Outros estudos mostraram que a pristimerina induziu a apoptose via proteassoma em células do cancro da próstata⁵. Esta acção pode dever-se à acumulação de proteínas ubiquitinadas e de três proteínas alvo do proteassoma, as Bax, as p27 e as I κ B α , em células PC-3 de cancro da próstata RA-negativas, que suportam a teoria de que o proteassoma é inibido pela pristimerina⁵. Outro estudo demonstrou que esta apoptose pode ser induzida pela pristimerina por via de efeito directo sobre as caspases na mitocôndria em células MDA-MB-231⁵.

A momordina inibiu a proliferação e induziu a apoptose em células de leucemia promielocítica humanas (HL-60) e demonstrou efeito citotóxico também em células HL-60, com um IC₅₀ de 19.0 μ g/mL⁵. Os efeitos antiproliferativos da momordina aparentam ser devidos à indução

Introdução

da morte apoptótica, tendo a momordina induzido alterações morfológicas nucleares, fragmentação do ADN internucleossomal e aumento das proporções de células hipodiplóides. Conseguiu também diminuir a expressão das Bcl-2 mas aumentou a expressão das Bax; adicionalmente, tratamento com momordina induziu a ativação da caspase-3 e a clivagem dos PARP⁵.

As saicosaponinas provaram ser citotóxicas em diversas linhas celulares e ter ação inibitória significativa da produção de óxido nítrico em macrófagos RAW 264.7 LPS-induzidos^{5,15}. Mostraram ter também efeitos em células MDA-MB-231, tendo a saicosaponina A aumentado a população de células em fase sub-G1 do ciclo celular⁵. Estes resultados apontam para uma independência da apoptose da via das p53/p21 e que esta foi acompanhada por um aumento no rácio Bax/Bcl-2, de um aumento dos níveis de c-myc e de um aumento da ativação da caspase-3^{5,15}. Em contraste com este resultado, a apoptose de células MCF7 pode ter sido iniciada pelas Bcl-2 e envolvido a via das p53/p21, que foi acompanhado pelo aumento dos níveis de c-myc^{5,15}.

Num outro estudo, um aumento dos níveis de Fas e dos seus dois ligandos, mFasL e sFasL, bem como dos de Bax, mostrou ser o responsável pelo efeito apoptótico induzido pelas saicosaponinas⁵. Estes compostos também levaram a uma paragem do ciclo celular em fase G₀/G₁ de células T ativadas por subexpressão dos níveis de CDK6 e de ciclina D3 e sobreexpressão dos níveis de p27(kip)⁵. A inibição da ativação do NF-κB pelo ácido ursólico está correlacionada com a supressão da ciclina D1 dependente do NF-κB, da COX-2 e da expressão da MMP9⁵. Foi também capaz de bloquear a progressão do ciclo celular em fase G1 e foi associado a uma marcada diminuição da expressão proteica de ciclinas D1, D2 e E, e dos seus ativadores cdK2, cdK4 e cdK6 com concomitante indução da p21⁵. A acumulação de p21/WAF1 deverá ser dependente da p53, estando a sua acumulação também correlacionada com a sobreexpressão de Fas, dos ligandos Fas e de Bax e com a subexpressão de NF-κB, Bcl-2 e Bcl-xL⁵.

O ácido ursólico foi também capaz de sobreexpressar os genes apoptóticos p53 e caspase-3, enquanto que o gene antiapoptótico *Bcl-2* estava subexpresso⁵. O CDDO, a uma concentração de cerca de 1-5 μM, induziu um processo apoptótico em várias linhas celulares tumorais, tendo em conjunto com o TRAIL promoveu a apoptose⁵. Normalmente, o CDDO atua segundo as vias extrínseca e intrínseca por ativação da clivagem do BID e das caspases 3, 8 e 9, por subregular o FLIP ou por induzir a translocação da Bax para a mitocôndria e posterior libertação do citocromo C^{5,33}.

Já a atividade antitumoral do CDDO-Me foi associada com a inibição da p-Akt, mTOR e do NF-kB e aos seus alvos moleculares, como sendo exemplo a p-Bad e a p-Foxo3a para a Akt; p-S6K1, p-eIF-4E e p-4E-BPI para o mTOR; COX-2, VEGF e ciclina D1 para o NF-kB^{5,20}.

O AKBA, um derivado do ácido bosuólico, tem revelado ser capaz de induzir a apoptose em células tumorais através da inibição da via do PI3K/Akt⁵. Outro estudo revelou que os níveis de ciclina D1 e E, CDK2 e 4 e Rb fosforilada (proteína do retinoblastoma) estavam diminuídos em células tratadas com AKBA, enquanto que a expressão da p21 estava aumentada. Neste caso, o efeito inibitório estava relacionado com a p21, mas não com a p53⁵. Em células do cancro do cólon, o ácido bosuólico foram também capazes de induzir a apoptose por vias dependentes das caspase 8 mas independentes da interação Fas/ligando Fas⁵. Inibiu também a expressão do gene repórter dependente do NF-kB ativada pelo TNFR, TRADD, TRAF2, NIK e IKK, mas não o ativado pela subunidade p65 do NF-kB, o que indica que o AKBA estimula a apoptose induzida por citocinas e agentes quimioterapêuticos^{5,34,35}.

Poucos triterpenóides mostraram conseguir estimular a actividade das caspases como levar à subexpressão das Bcl-2 ou Bcl-xL, em simultâneo. A capacidade de impedir a proliferação e induzir a apoptose em células cancerígenas humanas é de importância clara para o desenho de fármacos que tenham como alvo tanto células malignas no tratamento como células pré-malignas na prevenção⁵.

Quando passamos para o campo da proliferação celular, existem alguns aspetos a ter em conta, que embora já tenham várias vezes sido referidos ao longo do trabalho, ainda não tiveram um enquadramento explicativo⁵. No controlo de fatores de crescimento, temos como principais agentes as ciclinas (sendo que no cancro toma principal destaque a ciclina D1, que promove a passagem de G1 à fase S), que regulam e controlam o ciclo celular, e a COX-2 e o c-myc, que oferecem suporte a esta função reguladora das ciclinas⁵. Nas células tumorais, a ciclina D1 encontra-se sobreexpressa, o que tem sido relacionada com a sua capacidade de desenvolvimento e progressão anormais⁵.

As avicinas subexpressam tanto o STAT3 como a expressão das proteínas pró-sobrevivência mediadas pelo STAT3, contribuindo dessa forma para a indução da apoptose em células tumorais⁵. Toma também um papel importante na inflamação e na recuperação de feridas, e na inibição *in vivo* do VEGF. Foram capazes, em modelos de carcinogénese de pele de murganho, de inibir a expressão da STAT3, o que levou à supressão do ambiente pró-inflamatório e pró-oxidante dos tumores⁵. Também demonstraram serem capazes de diminuir

Introdução

a energia metabólica das células tumorais ao ter como alvo a membrana mitocondrial externa, o que leva comumente à morte celular^{5,36}.

A potência do ácido ursólico foi associada ao sistema ZIP/p62 e à proteína cinase C-zeta (PKC-zeta), tendo inibido a sua interação. Posteriormente suprime também a ativação do NF- κ B e subexpressão a MMP9, que por sua vez contribui para o efeito inibitório do ácido ursólico sobre as IL-1 β e na invasividade das células C6 do glioma TNF-induzidas^{5,37}; esta ação sobre as IL-1 β leva também à inibição da expressão das ICAM-1 mediada pelo mesmo, o que contribui para a diminuição do processo inflamatório³⁷. A inibição da ativação do STAT3 pelo ácido bosuólico levou à supressão dos reguladores da proliferação, como a ciclina D1, da sobrevivência, como as Bcl-s, Bcl-xL e Mcl-1, e da angiogénese, como é o caso do VEGF⁵. O ácido betulínico, quando combinado com a vincristina, levou a uma ação sinérgica de citotoxicidade em células do melanoma, induzindo-lhes uma paragem do ciclo celular em diferentes pontos (o ácido betulínico em G1 e a vincristina em G2/M), e levou à apoptose de células do melanoma da linha B16F10^{5,36,38}.

Ação sobre a invasividade, metástase e angiogénese

Entre os aspectos que influenciam a invasividade tumoral estão as MMPs e o ICAM-1⁵. As MMPs, mais especificamente a MMP2 e a 9, são endopeptidases que degradam os componentes das membranas basais, separando-as das células que as rodeiam e do tecido em que se encontram, permitindo-lhes um movimento livre pelos vasos sanguíneos ou linfáticos⁵. O receptor de quimiocinas CCR7 toma especial importância na invasão linfática das células tumorais e encontra-se sobreexpresso em células de cancro da mama metastizado^{5,22}.

O vitanólido tubocapsanólido A bioactivo inibiu a TAK1 e diminuiu a expressão do CCR7 induzida pelo NF- κ B em células do cancro da mama, e tem-se revelado úteis na prevenção da penetração linfática deste tipo celular¹². O eritrodiol-3-acetato reduziu os níveis de MMP1 e induziu o pró-colagénio tipo 1 de uma forma dependente da dose. O processo angiogénico, normal em situações de crescimento celular e reparação tecidual, é um dos principais processos para a progressão tumoral, pelo fornecimento de oxigénio e outros nutrientes para que as células tumorais se possam multiplicar¹². Neste processo, existem alguns fatores importantes, que permitem e suportam o desenvolvimento de novos vasos, onde se incluem a IL-8, o TNF, o FGF-2 e o PDGF, sendo o fator mais importante o VEGF, o que tem feito dele um dos principais alvos moleculares para controlar a progressão do tumor¹².

A inibição da via de sinalização da tirosina cinase do VEGF bloqueia a angiogénese em tumores em crescimento, levando-os a um ponto estático de crescimento ou até de regressão⁵. Neste campo, a saicosaponina C possui ação indutora da viabilidade e crescimento das células endoteliais de vasos umbilicais humanos, bem como da migração de células endoteliais e da formação de capilares tubulares⁵. Este composto fá-lo através da indução da expressão génica ou ativação da MMP2, VEGF e da p42/p44MAPK, que estão correlacionados com o crescimento, migração e angiogénese das células endoteliais, respetivamente^{5,15}.

O CDDO-Me e o CDDO-Im mostraram serem capazes de inibir a ativação da via do ERK1/2 após estimulação com VEGF em células endoteliais de vasos umbilicais humanos⁵. O CDDO-Me também potenciou os efeitos citotóxicos do TNF e de agentes quimioterapêuticos, talvez devido ao facto de inibir o NF- κ B através da inibição da cinase da I κ B α , o que leva a uma supressão da expressão de produtos de genes regulados pelo NF- κ B (VEGF, COX-2 e MMP9)^{5,36}.

Os ácidos bosuélícos suprimiram a fosforilação da cinase do VEGFR2 mediada pelo VEGF (KDR/F1k-1)⁵. Mais especificamente, os ácidos bosuélícos inibiram a expressão de cinases do VEGFR2 que estão a montante no mecanismo, incluindo as cinases da família Src, a cinase de adesão focal, a ERK, AKT, mTOR e a cinase da proteína S6 ribossomal⁵. Num modelo *ex vivo*, os ácidos bosuélícos inibiram a proliferação celular induzida pelo VEGF, a motilidade quimiotática e a formação de estruturas semelhantes a capilares de culturas primárias de células endoteliais vasculares umbilicais humanas de forma dependente da dosagem⁵.

Vários estudos *in vivo* revelaram que o celastrol consegue subregular a densidade dos microvasos tumorais de forma significativa a doses diferentes⁵. Ensaios imunohistoquímicos mostraram que o celastrol também diminui os níveis de expressão de VEGFR1 e VEGFR2, mas não os níveis de expressão de VEGF e as avicinas conseguiram promover esta diminuição^{5,36}.

Os triterpenóides têm-se revelado cada vez mais promissores em diversas áreas de atividade farmacológica, uma vez que são compostos versáteis, com vários pontos de derivatização possível, e com várias atividades intrínsecas que lhes são conhecidas e que se vão descobrindo. Tal facto faz com que vão surgindo recentemente na literatura estudos de derivados³⁹.

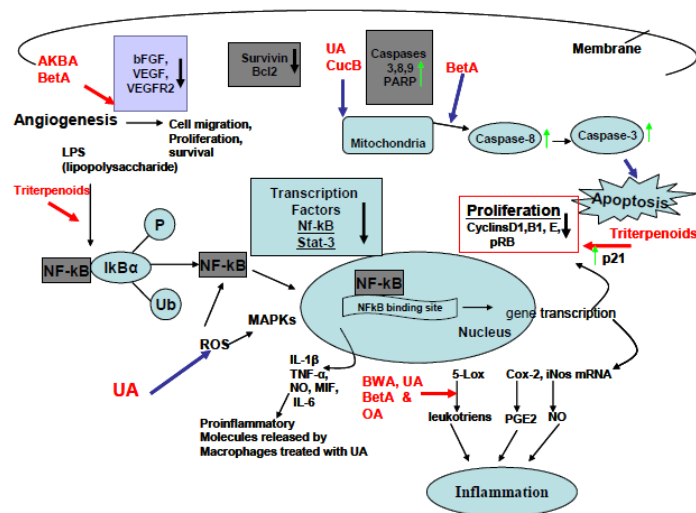


Figura 7: Alvos moleculares dos triterpenóides (adaptado de ref. 50)

1.5. Ácido oleanólico

O ácido oleanólico, encontrado em mais de 1620 espécies de plantas, obteve o seu nome pelo facto de se encontrar muito em plantas da família *Oleaceae*, entre as quais a azeitona (*Olea europaea*), de onde é feita a maior parte da extração comercial do ácido oleanólico^{30,39,40}. Existe na forma do seu isómero, o ácido ursólico, e sobre o qual já debatemos também várias das suas propriedades farmacológicas e terapêuticas, das quais muitas são partilhadas com o ácido oleanólico^{30,39,40}. A sua principal função natural é a prevenção da perda de água e defesa física contra agressões de patógenos, onde, por exemplo, nas folhas das oliveiras, se encontra sob a forma de cristal puro que forma uma barreira contra o ataque fúngico³⁹. São-lhes conhecidas funções antibacteriana, antiparasitária, antiosteoporótica, antifertilizante, antihipertensora, antihiperlipidémica, diurética, antidiabética, imunomoduladora, anti-inflamatória, gastroprotectora, hepatoprotectora, anti-VIH e ainda a capacidade de inibir a via do complemento^{30,39,40}.

A sua biossíntese tem como precursor o 2,3-oxidoesqualeno que é sintetizado no citoplasma a partir do isopentenil pirofosfato gerado pela via do mevalonato^{5,30}. A ciclização do 2,3-oxidoesqualeno forma um ponto de interseção entre o metabolismo primário dos esteroides e o metabolismo secundário dos triterpenóides, que leva à síntese do ácido oleanólico^{30,39}. Para a biossíntese dos fitoesteróis, o 2,3-oxidoesqualeno é ciclizado pela cicloartenolsintase (CAS) para dar origem ao precursor cicloartenol³⁹. No caso do ácido oleanólico, o 2,3-oxidoesqualeno é ciclizado pela OSC-β-amirina sintase (BAS), que dá origem à estrutura carbonada dos triterpenóides do tipo oleanano³⁸. No passo final da biossíntese, a β-amirina é oxi-

dada numa sequência de três passos no C₂₈ pelo citocromo p450 para dar origem ao ácido oleanólico a partir do eritrodiool⁵.

Foi já demonstrado que o ácido oleanólico aumenta a acumulação nuclear do Nrf2, um importante regulador transcripcional de enzimas antioxidantes e desintoxicantes e toma parte na indução de enzimas hepatoprotectoras³⁹. Posteriormente, foi provado que esta acumulação nuclear de Nrf2 era promovida pela ativação de cascatas de sinalização intracelular mediadas pela via da PI3K/Akt, do JNK e da ERK³⁹. O ácido oleanólico é também detentor de propriedades anti-inflamatórias e antitumorais por indução da apoptose e modulação do microambiente tumoral por, entre outras vias, inibir o NF-κB, embora ainda não seja possível dizer precisamente como³⁹. Estudos mostraram que este ácido foi capaz de diminuir a necrose, esteatose e degeneração induzida pelo CCl₄ em células parênquimais de fígado e preveniu a cirrose crónica induzida pelo CCl₄ em murganhos³⁹.

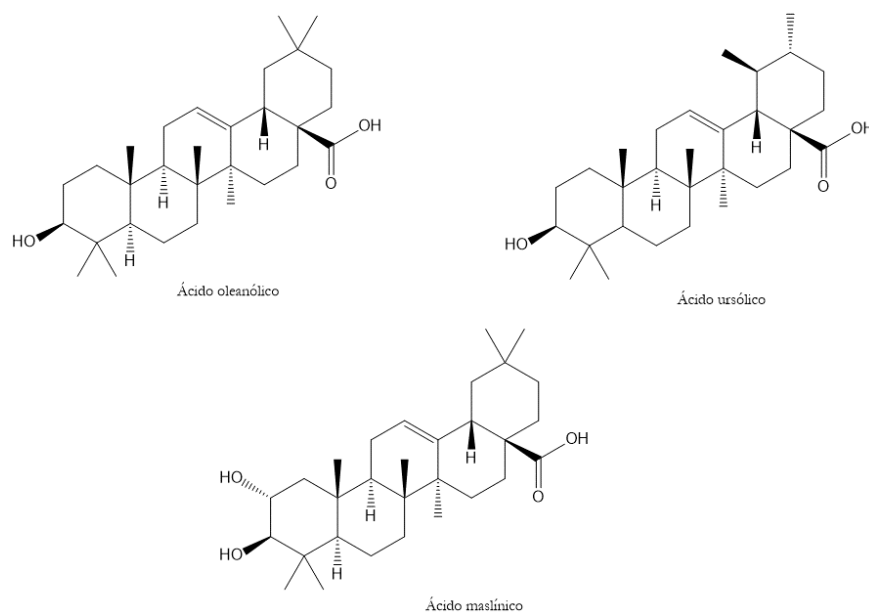


Figura 8: Estruturas de AO, AU e AM

Existem estudos com animais e humanos que indicam que o ácido oleanólico é absorvido de forma sistémica, biodisponibilidade e distribuição pelos tecidos de forma razoável quando administrados por via oral³⁰. Será provável também que o ácido oleanólico seja absorvido e atinja os alvos na sua forma intacta, que deverá ser aquela que é responsável pela sua atividade³⁰. Contudo, com o aprofundar de novos estudos, cada vez mais se torna evidente que existem ainda problemas de falta de solubilidade aquosa, inespecificidade de ação e promoção de efeitos secundários que o ácido oleanólico promove que ainda não estão resolvidos⁴¹. Dado o

seu largo espectro de atividades, biodisponibilidade inata e baixo custo, o ácido oleanólico tem sido muito estudado na síntese de derivados, sendo que se têm estudado principalmente as modificações no grupo hidroxilo da posição C3, na ligação dupla C12-C13 e no grupo ácido carboxílico da posição C28^{41,42}.

1.6 Ácido maslínico

De estrutura semelhante ao ácido oleanólico, diferindo apenas na presença de mais um grupo hidroxilo em C2, em posição anti relativamente ao grupo hidroxilo em C3, este composto tem vindo sendo referenciado na literatura^{31,36,44-49} como um composto biologicamente activo e com potencial terapêutico. Existem ensaios que revelaram que este composto era capaz de induzir a apoptose e a supressão da expressão da COX-2 em concentrações muito baixas quando comparadas com o ácido oleanólico^{36,45}. É capaz de suprimir a osteoclastogénese regulada pelo NF- κ B em monócitos da medula óssea e inibir a atividade do NF- κ B mediada pelo TNF- α e a expressão génica por este ativado em células pancreáticas cancerígenas⁴⁵. Estudos recentes^{31,45,46,50} demonstraram que o ácido maslínico foi eficaz contra o desenvolvimento do cancro coloretal em modelos Apc(Min/+) de rato, o que sugere que possua potencial quimiopreventivo contra este tipo de cancro e que a via apoptótica intrínseca é despoletada em células HT29 em resposta ao ácido maslínico (provavelmente por sobreexpressão da p53). Existem também evidências de que o ácido maslínico promove alterações morfológicas que são características da apoptose, como a condensação e fragmentação da cromatina e a diminuição do tamanho celular⁴⁶. Outros estudos³¹ indicam que o ácido maslínico é capaz de ativar a cascata de sinalização da caspase-8 em células Caco-2, cascata essa que é um dos principais processos despoletados na indução da morte celular por apoptose.

Contudo, a sua atividade na modulação da inflamação é ainda muito pouco conhecida, essencialmente por razões financeiras: uma pesquisa rápida no portal da Sigma-Aldrich® (acesso a 13/03/2016) revelou que o custo de encomenda de 5 mg de ácido maslínico (grau de pureza $\geq 98\%$; HPLC) custava cerca de 132,00 €, enquanto que a obtenção de 100 mg de ácido oleanólico (grau de pureza $\geq 97\%$) custa cerca de 120,50 €. Esta diferença de preços pode ser explicada pelas dificuldades obtidas nos processos de extração e purificação deste composto. Desde 1960, ano em que Caglioti conseguiu realizar a sua extração a partir de extratos de azeitona, o seu isolamento do óleo de bagaço de azeitona tem evoluído ao ponto de ser possível extrair quantidades significativas deste composto⁴⁴. Como este óleo se encontra prontamente disponível em países produtores de azeitona, a sua extração da azeitona verde e preta comestí-

veis surgiu como alternativa à extração. Contudo, os rendimentos destes processos tornam inviável o aumento em larga escala (cerca de 0,25% quando extraído do óleo de bagaço; cerca de 0,36% quando extraído da azeitona)⁴⁴. Como tal, têm surgido na literatura metodologias alternativas à extração natural deste composto e que passam pela hemisíntese deste a partir de derivados semelhantes, como é o caso do ácido oleanólico²³.

1.7 Ácido ursólico

O ácido ursólico, um triterpenóide pentacíclico isolado de vários tipos de plantas medicinais como a *Rosemarinus officinalis*, *Eriobotrya japonica* e a *Calluna vulgaris*¹⁴, possui várias atividades farmacológicas reportadas e está indiciado como um dos mais promissores agentes quimiopreventivos contra o cancro está muito presente em certas ervas medicinais e é o principal componente de coberturas protetoras cerosas de vários tipos de fruta, como maçãs, pêras, azeitonas, ameixas, arandos e figos, e são-lhe já conhecidas várias atividades farmacológicas como hepatoprotector, imunomodulador, anti-inflamatório, antidiabético, antibacteriano, antiviral, antiulceroso e anticancerígeno¹⁷. Este ácido, isómero do ácido oleanólico, partilha com este a grande maioria dos seus efeitos biológicos⁵¹. Os estudos apontam para que a sua atividade anticancerígena derive da sua capacidade de induzir a apoptose celular, impedir a tumorigénese e inibir a proliferação de células cancerígenas¹⁷, sendo que ativa a autofagia, a paragem do ciclo celular e a apoptose em diferentes tipos de linhas celulares por intermédio de variadas vias de sinalização que incluem o NF-κB, o STAT3 e o TRAIL^{14,17}. Foi demonstrado que este suprime a expressão de vários genes associados à tumorigénese^{17,52}. Suprime a ativação do NF-κB induzida por vários agentes carcinogénicos, incluindo o TNF, PMA, ácido ocaidaico, H₂O₂ e condensado de fumo de cigarro⁷; inibiu a ligação ao ADN do NF-κB, a degradação e fosforilação da IκBα, ativação da IKK, a fosforilação da p65, a translocação da p65, e a expressão do gene repórter dependente do NF-κB⁷. Inibiu também a expressão do gene repórter dependente do NF-κB ativada pelo receptor do TNF, pelo TRADD, pelo TRAF, pela NIK, pela IKK e pela p65¹⁴. Diz a literatura que este é capaz de inibir a atividade das MMP2 e 9; inibiu diretamente a interação entre ZIP/p62 com PKC-ξ e posteriormente a expressão e atividade da MMP-9 por bloqueio da via dependente do NF-κB ativada pela IL-1β ou TNF-α^{14,17,52}. Em células PC-3 de cancro da próstata, o ácido ursólico foi também capaz de inibir a invasividade celular por inibição da via da Akt, que por sua vez levava à subexpressão da MMP-9⁵².

1.8 Aspetos QSAR importantes

Segundo alguns estudos^{54,55}, tanto no ácido ursólico como no ácido oleanólico, como em alguns derivados específicos resultantes de modificações estruturais às estruturas destes dois compostos de partida, a introdução de um grupo 2 α -OH não teve influência na sua atividade antitumoral, enquanto que a introdução de um grupo 9 α -OH na série ursano prejudicou a sua atividade; para além disso, o ácido ursólico revelou também ser seletivamente mais potente contra células de tumores sólidos HeLa S₃ e SNU C₄, e inibiu de forma incompleta a atividade da PKC *in vitro* para concentrações superiores a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ⁵⁴. É importante referir também que o cinamoil pode ser encontrado em triterpenóides do tipo oleanano e ursano que exibem atividade antitumoral, mas não implica sempre um aumento da atividade antitumoral⁵⁴.

O ácido ursólico foi também avaliado⁵⁴ no que diz respeito à capacidade inibitória da ADN polimerase, o que pode ser uma estratégia de atuação como coadjuvante na terapia anticancerígena; contudo, este revelou resultados diferentes na inibição de ADN polimerase α -like, β e ADN polimerase I (origem vegetal) e ADN polimerase II, em percentagens de 92, 86, 0 e 9% respetivamente. Verificou-se também que a capacidade de inibição da topoisomerase I e II α dependia do anel pentacíclico, mas não era suficiente *per se*, ajudando nesta capacidade inibitória a combinação com uma conjugação de um grupo carboxilo em C₄ com dois metilos na posição C₂₀ e refletindo-se a potenciação adquirida por esta combinação na inibição de ambas as topoisomerasas⁵⁴.

Encontra-se descrito na literatura que a introdução de um substituinte hidroxilo na posição 9 aumenta o potencial biológico no que toca à capacidade citotóxica e a presença de sistemas α,β -insaturados apresentam-se como uma via promissora no que toca à capacidade de geração de espécies reativas de oxigénio⁵⁴. Foi possível constatar que a adição de uma porção glicosídica em C₃ da aglicona era essencial para o efeito citotóxico, e que não havia significativa diferença na adição de um grupo metil éster em C₂₈⁵⁴.

Atualmente, os estudos⁵⁴⁻⁵⁸ têm-se centrado essencialmente em derivações dos grupos hidroxilo em C3 e do grupo ácido carboxílico em C28, tendo-se evidenciado que estas derivações, normalmente originando ésteres e amidas, possuem uma atividade biológica efetiva com ação sobre vários alvos terapêuticos e com vários efeitos que resultam numa ação terapêutica combinada⁶; neste campo, temos como exemplo o caso de indução da p21^{waf1} e indução da apoptose com sobreexpressão do NOXA e subexpressão do c-FLIP em células tumorais, como descrito na literatura para o caso do ácido ursólico^{52,59,60}.

Estudos⁶¹ demonstram que grupos que formam pontes de hidrogénio em C3 numa posição β revelam-se mais potentes no seu efeito inibitório da proliferação celular do que os seus análogos α . De igual forma, compostos em que o grupo ácido carboxílico foi substituído por um grupo hidroximetilo perderam a sua actividade, o que dá a indicação de que a presença deste grupo é extremamente importante⁶⁰; de forma semelhante, a introdução de grupos aminoalquilo nesta posição em C28, formando amidas ligadas a aminoalquilos melhoraram significativamente a citotoxicidade destes compostos⁶⁰.

Alguns estudos recentes²¹ referem a derivação com um grupo éster de piperazina na posição 2 do ácido oleanólico como sendo particularmente interessante no que diz respeito ao potencial inibitório em células MCF7, HeLa e A549.

1.9 Derivados fluorados e sua importância terapêutica

O flúor tem no campo biológico um efeito ainda não totalmente compreendido, mas cuja exploração nos mais recentes trabalhos está bem presente e reportada por vários autores^{53,59,60,62-68}. Compreende-se já melhor o efeito de substituinte em intermediários reativos que lhes confere as propriedades químicas observadas, mas o seu efeito em propriedades físicas como a adsorção, a ligação a outras moléculas e o transporte membranar são ainda opacamente explicadas, embora o efeito estéreo da fluorina seja ainda menos conhecido⁶⁴. O seu uso na indústria farmacêutica passou de 2% em 1970 para cerca de 18% em 2006, sendo que em 2002, 9 em 31 novos fármacos aprovados nos Estados Unidos continham flúor⁶³; por essa razão, estimou-se que entre 20 a 25% dos fármacos que se encontravam no mundo dos compostos com atividade farmacêutica (aprovados e por aprovar), em todo o mundo, contivessem pelo menos um átomo de flúor⁶³. Este valor toma alguma relevância quando se atende à quase completa ausência de flúor em produtos de origem natural⁵⁴. O primeiro composto fluorado sintético usado para fins clínicos como um agente anticancerígeno data de 1957 e foi sintetizado por Charles Heidelberger, e desde então já se contabilizam usos na terapêutica em áreas como a inflamação, infeções virais e bacterianas e até em sondas, como no caso do 2-deoxy-2-fluor-D-glucosyl, ou FDG como é comumente conhecido⁵⁹.

Características como a elevada eletronegatividade, pequenas dimensões e baixa polarizabilidade da ligação C-F têm evidenciado alterar, por vezes de forma significativa, o comportamento molecular em ambiente biológico, como sendo em termos de ligação enzimática e/ou a recetores, de controlo do *clearance*, absorção, transporte membranar e em flúido circulante e

Introdução

interferência com atividade enzimática^{53,59}. A ligação C-F, por sua vez, apresenta-se como uma das ligações mais fortes, sendo que conferem geralmente aos compostos que as contêm uma estabilidade térmica e oxidativa elevada, baixa polaridade e uma baixa tensão superficial, tornando-as dessa forma menos susceptíveis à degradação enzimática a nível hepático, especialmente pelo complexo do citocromo P450⁶⁰. É uma ligação que, graças ao carácter fortemente eletronegativo do flúor, orienta o mesmo para centros eletropositivos, como são exemplo C-F---H-N, C-F---C=O e C-F---H-C^{59,60}. O átomo de flúor é também capaz de alterar o carácter básico de grupos funcionais próximos deste, o que por si promove alterações no pKa da molécula^{59,60}.

Estas propriedades fazem do flúor um elemento com um contributo importante para a modelação de propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas pretendidas, com bastante sucesso pelo que se tem vindo a observar, e a tendência é para aumentar com o aumento da compreensão por parte da comunidade científica das suas propriedades e potencialidades, pelo que não é de estranhar que a sua utilização no campo dos triterpenóides com vista a potenciar a sua actividade farmacológica tenha aumentado nos últimos anos^{10,53}. Estes compostos, tanto sintéticos como semi-sintéticos, possuem um largo espectro de atividades, que vão desde atividades anti-inflamatória (fluorometotrexato ou o celecoxib), anti-bacteriana (fluoroquinolonas), anti-depressiva (fluoxetina), anti-VIH (indinavir), anti-colesterolémica (ezetimibe), anti-trombótica (7,7-difluoro-tromboxano), monitorização terapêutica não-invasiva (2-desoxi-2-fluor-D-glicosil) e anti-tumorigénica (gemcitabine)⁶⁰.

No campo da oncologia, o primeiro composto fluorado sintético utilizado como agente anticancerígeno foi o 5-Fluoroacil, sintetizado pela primeira vez por Charles Heidelberger em 1957^{59,60}. Desde então, têm surgido vários compostos fluorados com atividade anti-tumoral e atualmente são classificados consoante o seu mecanismo de ação: inibidores da timidilato sintase (5-fluorouracil), inibidores da topoisomerase (gemcitabina), inibidores da resistência das glicoproteínas-P (zosuquidar), anti-estrogénico (panomifene), inibidores de proteínas cinase (gefitinib) e anti-androgénicos (flutamida)⁶⁰. Existe também evidência científica publicada¹⁰ de que fluorolactonas de derivados de compostos da série ursano possuem atividade antitumoral, com especial atenção dada para β -fluorolactonas mas com prova também da atividade, e mais pronunciada, de α -fluorolactonas, pelo que o interesse do estudo destes compostos está patente nesta evidência e agravado pelo facto de não haver publicação científica até à data de métodos de síntese eficiente destas α -fluorolactonas, tanto da série ursano como da série oleanano. Para além disso, não foi encontrado qualquer registo bibliográfico de estudos com fluorolactonas dos ácidos oleanólico, maslínico ou ursólico fora do nosso grupo de investigação, pelo que a investigação neste campo deverá trazer informações completamente desconhecidas da

comunidade científica, e poderá trazer um potencial agente antitumoral com interesse na terapêutica.

1.10 Metodologias de fluoração

Os compostos orgânicos fluorados podem ser obtidos através dos reagentes nucleofílicos, electrofílicos ou de radicais com reagentes de flúor⁵⁹. Os reagentes nucleofílicos como o fluoreto de tetrabutilamónio (TBAF), trifluoreto de dietilaminoenxofre (DAST) e trifluoreto de [bis(2-metoxietil)aminoenxofre] (Deoxofluor) são usados na preparação de compostos mono e difluorados a partir de álcoois, cetonas e aldeídos (Figura 9). Os reagentes electrofílicos “F+” tais como: Bis(tetrafluoroborato) de 1-clorometil-4-fluoro-1,4-diazoniabicyclo [2.2.2]octano (F-TEDA ou Selectfluor) e N-fluorobenzenosulfanimida (NFSI) fazem fluorados a partir de acetonas, esteres e heterocíclicos (Figura 10)⁶⁹.

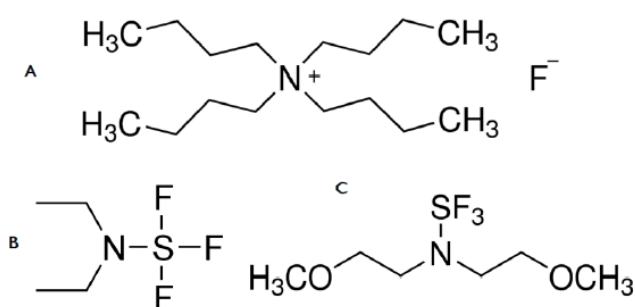


Figura 9: Exemplos de reagentes fluorantes nucleofílicos
(A – TBAF; B – DAST; C – Deoxofluor)

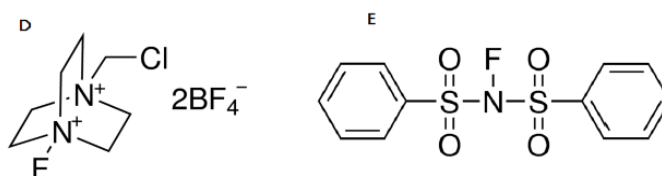


Figura 10: Exemplos de reagentes fluorantes electrofílios
(D – Selectfluor; E – NFSI)

1.11 Objetivos do trabalho

Sabendo-se hoje em dia que os compostos de origem natural são uma importante fonte de compostos com atividade antitumoral, sendo que em 2012, cerca de 42% dos compostos em ensaios clínicos eram produtos naturais, segundos metabolitos de origem natural ou compos-

Introdução

tos desenhados com base no farmacóforo de um produto natural⁷⁰, e que até à data estão caracterizados cerca de 20.000 triterpenóides extraídos de plantas medicinais²¹, a exploração de novos derivados de compostos triterpénicos com vista à potenciação da sua atividade antitumoral torna-se neste panorama um estudo com bastante relevância.

Havendo já também evidências na literatura de que os compostos fluorados possuem especiais propriedades^{25,52,53,59,60,66-69}, em especial no campo dos triterpenóides^{52,59,60,66-69}, a extensão destes estudos a outros compostos triterpénicos com potencial interesse neste campo surge como um trabalho interessante.

Existiam já no grupo de trabalho onde me inseri retratados e trabalhados estudos^{52,59,60,66-69}, realizados no sentido de obter produtos fluorados, em particular a síntese de fluorolactonas, cuja atividade anticancerígena se mostrou promissora^{52,59,60}, mas este estudo tinha sido realizado maioritariamente em torno do ácido ursólico e em particular com o seu derivado β -fluorado, havendo uma tentativa realizada com o derivado α -fluorado que revelou valores de IC_{50} em linhas celulares de cancro do pâncreas bastante interessantes, mesmo até comparativamente com os valores obtidos no homólogo β -fluorado⁵⁹; para além disso, existe também uma tentativa de adaptação desse método de fluoração no ácido oleanólico, em que se obteve uma mistura de produtos de difícil separação e a caracterização do derivado β -fluorado, trabalho esse que foi também pioneiro na comunidade científica.

A par disto, verifica-se na literatura alguma escassez de estudos com o ácido maslínico, muito provavelmente por causa do seu elevado custo de aquisição como produto purificado; para colmatar este aspeto, surgiu um artigo recente (setembro de 2014)⁴⁴ que relata uma via de síntese simples, mais barata e aplicável à escala laboratorial do ácido maslínico a partir do ácido oleanólico, sem recurso a cromatografia ou qualquer outro processo de purificação no decorrer da síntese (pois apresenta purificação por cristalização na etapa final) de forma simples e eficaz (4 passos, $\eta=12\%$), pelo que se tornava assim apetecível estudar o ácido maslínico no sentido de obter derivados fluorados e em especial fluorolactonas, campo ainda não explorado pela comunidade científica.

Neste sentido, este projeto visava aprofundar duas áreas de trabalho que se interrelacionam: por um lado, pretendia-se explorar o trabalho já conhecido para o ácido ursólico no ácido oleanólico e otimizar as suas condições experimentais no sentido de obter preferencialmente um dos isómeros, a fim de obter proporções isoméricas propícias à purificação e posterior isolamento para estudos futuros.

Por outro lado, pretendia-se sintetizar o ácido maslínico, apoiado no trabalho de Sommerwerk *et al.*⁴⁴, e posteriormente não só sintetizar derivados a partir deste como também, e

principalmente, aplicar a metodologia de fluoração otimizada para o ácido oleanólico a fim de verificar se se obtinha um resultado semelhante neste composto.

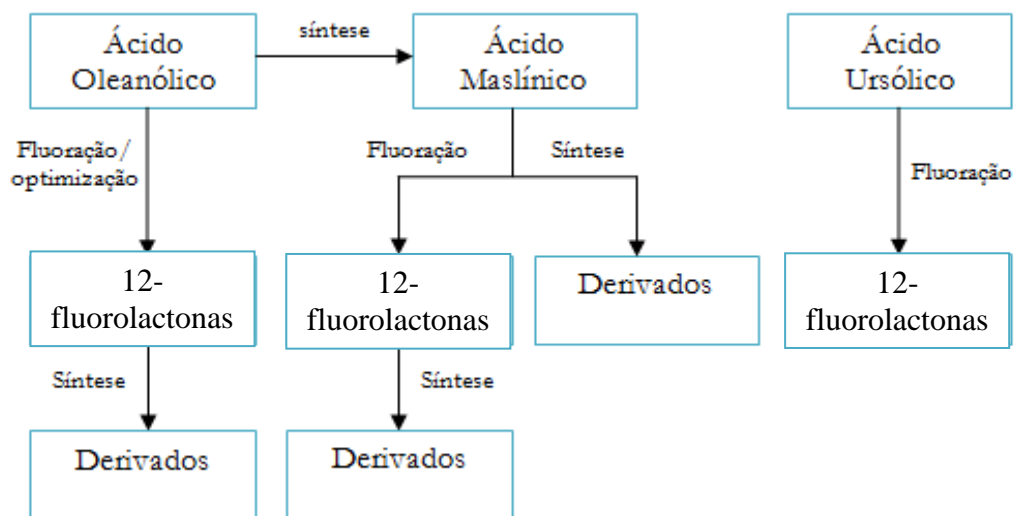


Figura 11: Representação diagramática do projeto de trabalho

Capítulo 2

Resultados e discussão

Em todas as reações abaixo descritas, foi utilizado um método de revelação de ácidos carboxílicos e aldeídos que envolvia uma solução 10% H₂SO₄ em H₂O. Começarei a discussão apresentando os espectros ¹H e ¹³C do ácido oleanólico com a respectiva atribuição segundo a literatura⁷¹. A atribuição de sinais por RMN foi feita na larga maioria dos casos aos grupos funcionais apenas, uma vez que esta é uma forma fidedigna de verificar a ocorrência de reação sem a necessidade de recorrer a técnicas ou atribuições adicionais, que é o principal foco nesta fase do trabalho.

Qualquer estudo adicional seria apenas realizado caso se suspeitasse de alguma alteração na região dos grupos –CH₂ e –CH₃ ou para caracterização completa de compostos purificados e dos quais existem evidências por RMN ¹H de que se obteve o que se esperava. Portanto, a região dos grupos –CH₂ e –CH₃ terá na maioria dos casos em RMN ¹H somente a contagem e identificação dos grupos –CH₃.

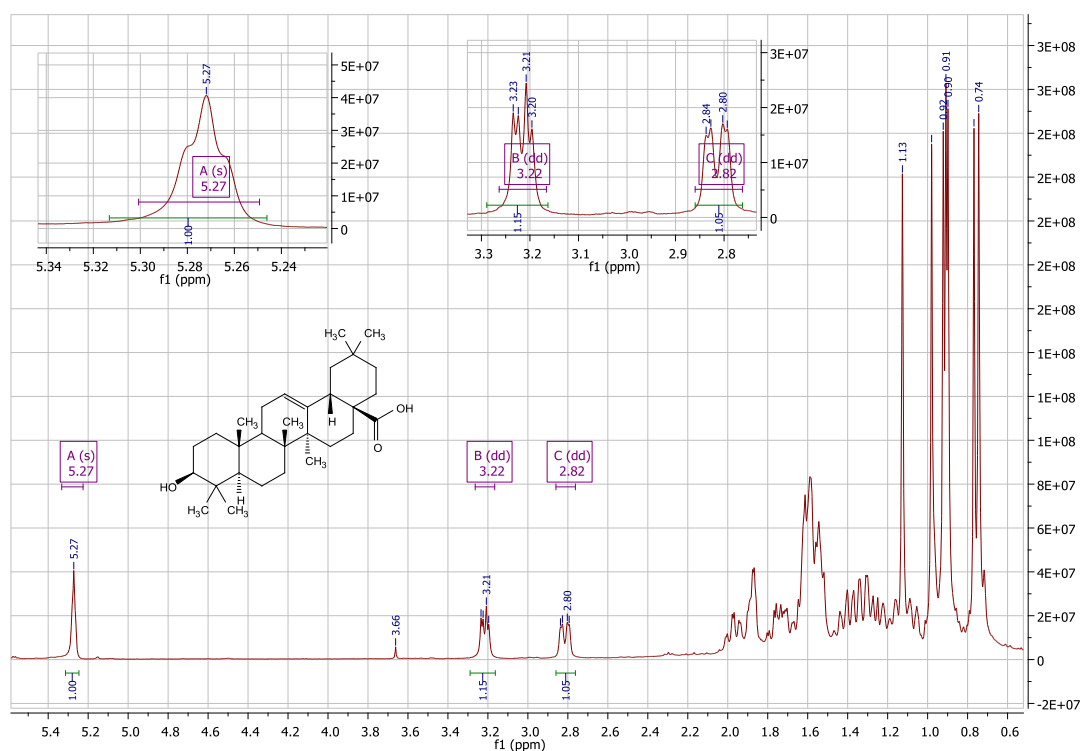


Figura 12: Espectro RMN ¹H do ácido oleanólico

Resultados e conclusões

H	Sinal (δ , ppm)	Integração	Multiplicidade	Forma
12	5,27	1H	triplete	CH
3	3,22	1H	duplo dubleto	CH
18	2,82	1H	duplo dubleto	CH
27	1,13	3H	singuleto	CH ₃
23	0,98	3H	singuleto	CH ₃
26	0,92	3H	singuleto	CH ₃
24 ou 30	0,91	3H	singuleto	CH ₃
24 ou 30	0,90	3H	singuleto	CH ₃
29	0,77	3H	singuleto	CH ₃
25	0,74	3H	singuleto	CH ₃

Tabela 1: Atribuição dos sinais em RMN ¹H (atribuição apoiada pela ref. 71)

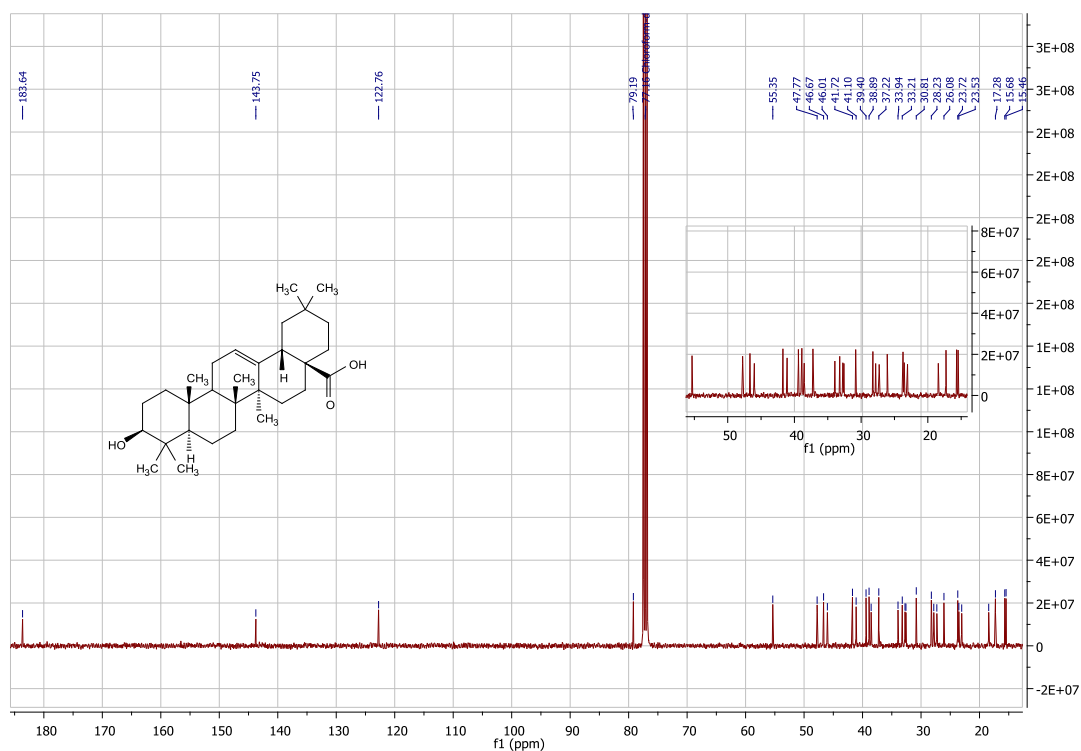


Figura 13: Espectro RMN ¹³C do ácido oleanólico

C	Sinal (δ , ppm)	Forma
28	183,64	COOH
13	143,75	Quaternário
12	122,76	Terciário
3	79,19	C-OH
5	55,35	Quaternário
9	47,77	Quaternário
17	46,67	Quaternário
19	46,01	Secundário
14	41,72	Quaternário
18	41,10	Terciário
8	39,40	Quaternário
4	38,89	Quaternário
1	38,53	Secundário
10	37,22	Quaternário
21	33,94	Secundário
29	33,21	CH ₃
7	32,74	Secundário
22	32,58	Secundário
20	30,81	Quaternário
23	28,23	CH ₃
15	27,82	Secundário
2	27,30	Secundário
27	26,08	CH ₃
30	23,72	CH ₃
11	23,53	Secundário
16	23,04	Secundário
6	18,43	Secundário
26	17,28	CH ₃
24	15,68	CH ₃
25	15,46	CH ₃

Tabela 2: Atribuição dos sinais em RMN ¹³C (atribuição apoiada pela ref. 71)

Resultados e conclusões

Nas figuras 12 e 13 e nas tabelas 1 e 2 encontram-se os espectros RMN ^1H e ^{13}C do ácido oleanólico, bem como as respectivas integrações dos sinais com recurso à literatura⁷¹. Os sinais que mais sofrerão alterações no decorrer dos trabalhos realizados são aqueles que correspondem aos grupos funcionais hidroxilo e ácido carboxílico, bem como a ligação dupla C12-C13 e a posição C3.

2.1 Síntese do Ácido Maslínico via NaOH

Esta via de síntese foi realizada tendo por base o artigo de Sommerwerk *et al*⁴⁴, embora posteriormente se tenham feito algumas modificações procedimentais que serão justificadas mais à frente na discussão. O objetivo era obter sinteticamente e sem recurso a cromatografia a síntese do ácido maslínico nas mesmas condições que a literatura assim o descrevia, partindo do ácido oleanólico e recorrendo maioritariamente a reagentes disponíveis comercialmente, sendo que, como no caso do reagente de Jones, alguns foram preparados a partir desses mesmos reagentes para se encontrarem disponíveis na sua forma final.

Neste artigo⁴⁴, é descrita uma síntese livre de processos cromatográficos do ácido maslínico e do ácido augústico, e apresentou-se como um trabalho apelativo para a realização da propoção final do projeto, que era a otimização de uma via de síntese de derivados fluorados de compostos da série oleanano e extrapolação para outras séries de triterpenóides pentacíclicos.

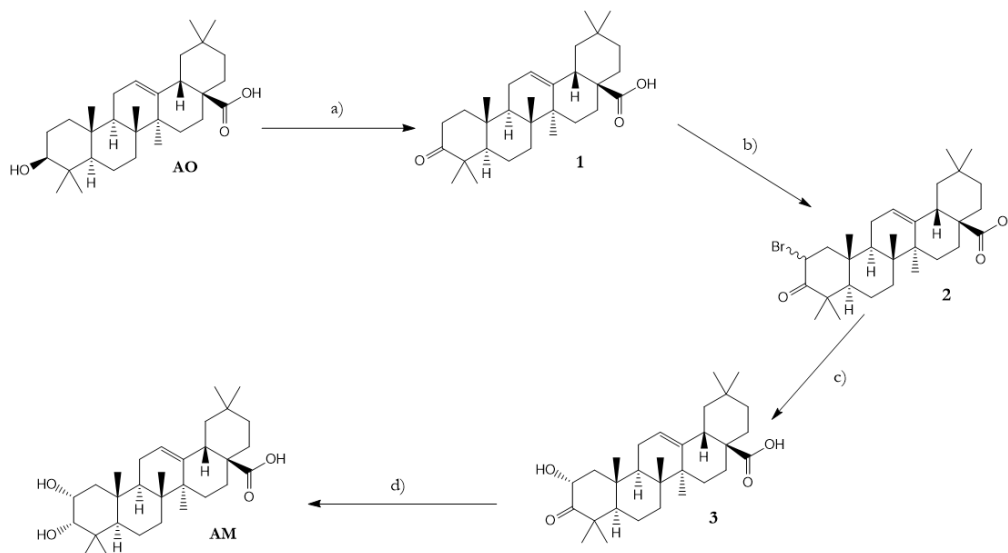


Figura 14: Esquema proposto para a síntese de **AM** (ref. 44)

- a) $\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$, $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$, 0°C , 1h
- b) Tribrometo de piridínio, CH_3COOH , t.a, 3h
- c) NaOH (2 equiv.), DMF , 0°C , 30 min.
- d) NaBH_4 , 0°C , 1h

2.1.1. Oxidação de Jones

A oxidação de Jones permite, de forma rápida, barata e eficiente, converter alcóois secundários a cetonas e a maioria dos alcóois primários a ácidos carboxílicos, sendo que no caso da maioria dos alcóois alílicos e benzílicos origina aldeídos. Trata-se de um método à base de crómio, que recorre à conversão do estado de oxidação 6 para 4 que o crómio é capaz de sofrer quando na forma de ácido crómico, passando ao ácido cromoso. O ácido crómico é formado, geralmente, a partir do dicromato de sódio, $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, quando a ele se adiciona ácido sulfúrico diluído, mantendo-se em equilíbrio com o ácido dicrómico⁷². Este, por sua vez, origina duas moléculas de ácido crómico, a responsável pela acção oxidante deste reagente⁷², convertendo-se em ácido cromoso quando reduzido por este método.

Esta reacção inicia o processo de síntese do ácido maslínico por esta via, ocorrendo uma oxidação no carbono 3 do ácido oleanólico e formando de forma rápida o produto ligeiramente amarelado **1** (Figura 15).

Esta reacção começou a ser realizada com recurso a sílica gel e processo de *work-up* como proposto na literatura¹¹, realizando-se a extração com éter dietílico e a posterior lavagem com NaHCO_3 e soulção de NaCl 10% (*Brine*) mas não envolvendo o aparelho de Soxhlet referido na literatura pois este não estava disponível. Verificou-se em várias reacções que este método levava a uma grande perda de rendimento; passou-se, por isso, a realizar uma filtração a pressão reduzida com recurso a celite e posteriormente retirou-se também o processo de *work-up*, tendo o espectro provado que se obtinha preferencialmente e de igual forma o produto **1**, mas desta feita com rendimentos do produto em bruto na ordem dos 96% e de produto puro na ordem dos 75%.

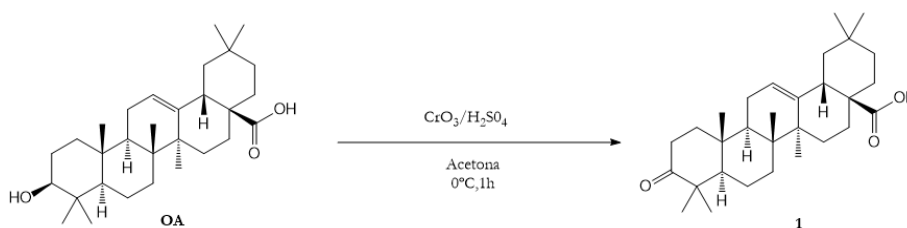


Figura 15: Reacção de síntese de **1**

O composto **1** é passível de ser identificado por TLC através de uma mancha mais apolar (eluente $\text{AcOEt}/n\text{-hexano}$ 1:5) quando comparada com o ácido oleanólico. Este composto poder-se-á detectar através do seu espectro de protão pela observação do desaparecimento do sinal característico do protão ligado a C3 (δ 3,22, 1H, dd) que resulta da formação do grupo cetona e pelo aparecimento em regiões mais desblindadas dos sinais dos protões ligados a C2.

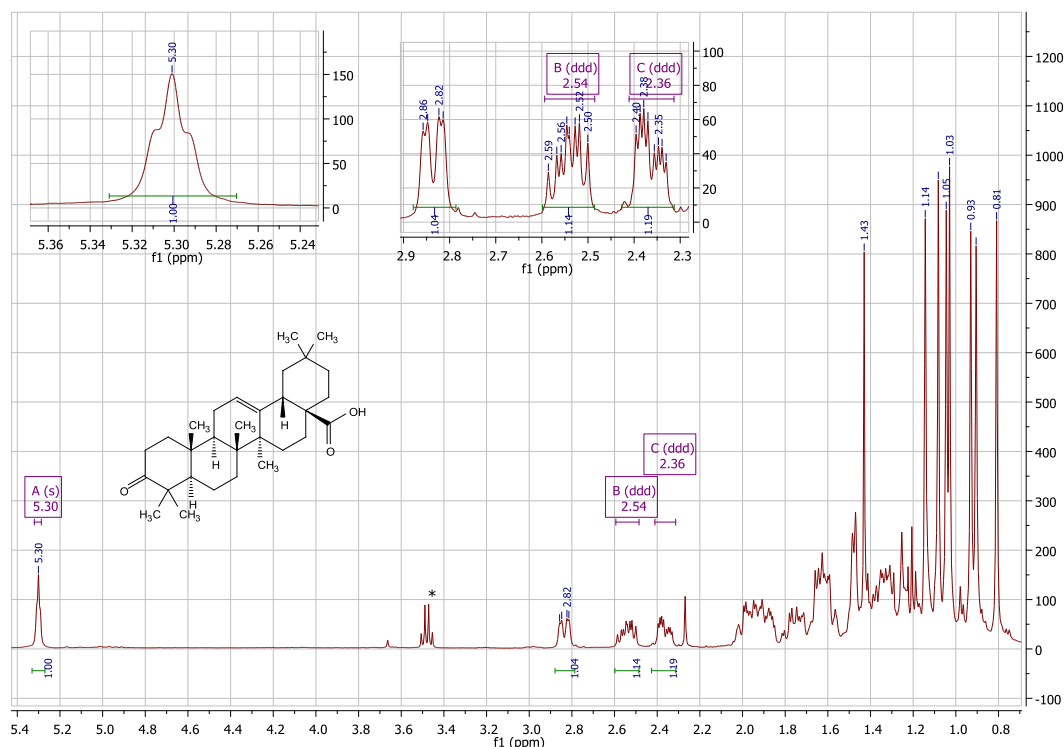


Figura 16: Espectro ^1H RMN de **1**

Observando o espectro, pode observar-se o desaparecimento do sinal de H3 a δ 3,22 ppm devido à formação da ligação dupla e o aparecimento de dois duplos dubletos entre δ 2,54 ppm (dd, $J = 16.0, 11.1, 7.3$ Hz, 1H, H1 $_{\alpha}$) e 2,36 ppm (dd, $J = 15.8, 6.6, 3.5$ Hz, 1H, H1 $_{\beta}$) que correspondem aos H2 $_{\alpha}$ e H2 $_{\beta}$, que sofrem o desvio por passarem a ser vicinais a um grupo cetona em vez de um grupo hidroxilo.

2.1.2 Bromação via tribrometo de piridínio

O recurso ao PyBr_3 como agente bromante estava referenciado na literatura como uma alternativa viável para a bromação na posição 2. É dado a entender pelos autores que existe falta de estereoespecificidade na reação e que esta não fará diferença em relação ao produto final que se obterá (ácido maslínico ou augústico) pois essa distinção é feita no passo seguinte.

São referidas as características espectroscópicas de cada um individualmente, após feita a separação por cromatografia mas não é dada qualquer indicação de qual é o isómero utilizado para o passo seguinte da via de síntese; uma vez que este artigo pretende traduzir uma síntese livre de processos cromatográficos, optou-se por não fazer purificação por coluna para também assim atender ao objectivo do trabalho e ao descrito na literatura. Apesar de haverem

outros processos de bromação conhecidos, optou-se por este nesta fase para tentar ser o mais fiel possível à literatura em questão.

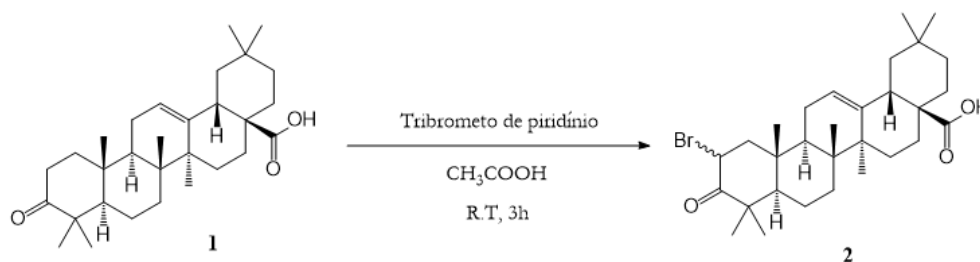


Figura 17: Proposta de síntese de 2

Por não se verificar repetibilidade entre as experiências, quando seguido o protocolo descrito por Sommerwerk *et al.*, fizeram-se algumas alterações ao processo de *work-up*. Alterou-se o processo de adição de H₂O e filtração com abundante lavagem também com H₂O, com recolha do sólido que fica no filtro para um processo que adiciona também H₂O mas que recorre à extração com Et₂O e lavagem com NaHCO₃ e NaCl 10%.

Estas alterações foram feitas por não se verificar, numa primeira fase, evidência da ocorrência de reação por TLC pelo método da literatura e, em segunda fase, por se verificar que a neutralização do ácido acético não estava a ser completa com esse método. A lavagem com NaHCO₃ mostrou evidências de neutralizar melhor o meio ácido promovido pelo ácido acético e a lavagem com *brine* provou ser capaz de uma melhor remoção das impurezas com carga. Foi obtido um rendimento médio de 80% (sem coluna cromatográfica).

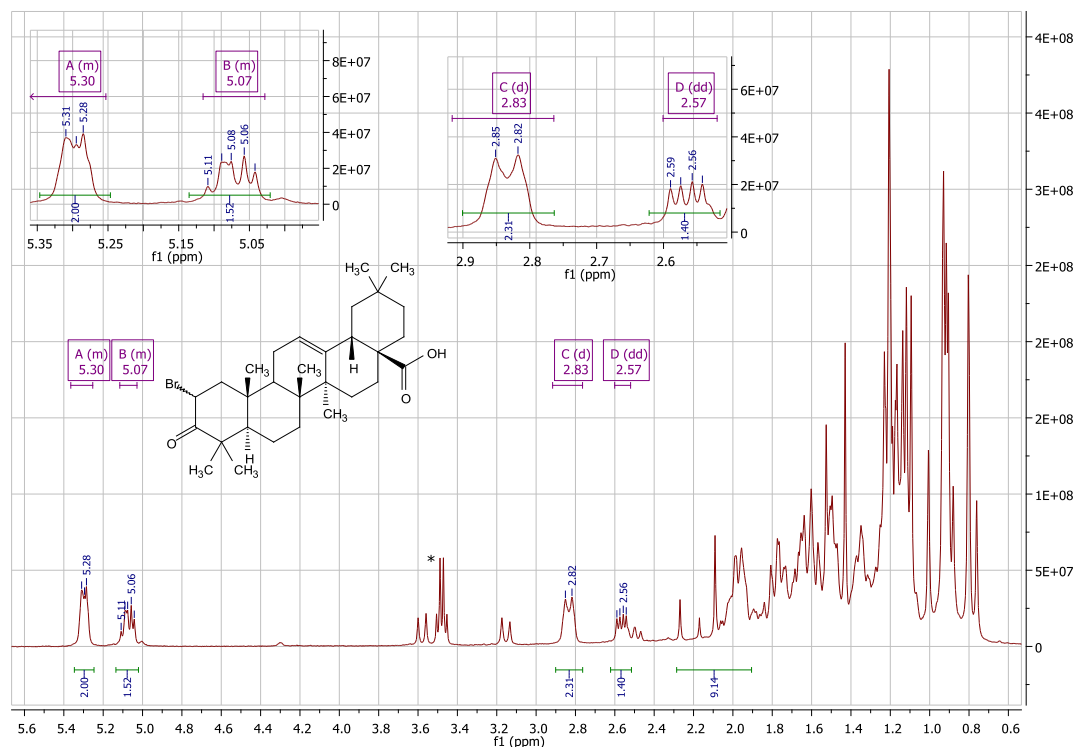


Figura 18: Espectro ^1H RMN de **2**

A detecção por RMN ^1H de **2** prende-se essencialmente com a verificação do desaparecimento do sinal de um dos prótons ligados a C2 como resultado da bromação e o aparecimento de um novo sinal a 5.08 (dd, $J = 13.5, 7.0$ Hz, 1H, CH (2)) que corresponde ao próton ligado a C2 e o desaparecimento do sinal a δ 2,36 ppm derivado da substituição do mesmo pelo bromo.

2.1.3 Hidroxilação via NaOH

Este processo de oxidação envolve, segundo a literatura⁴⁴, uma solubilização em DMF com formação de um precipitado que é posteriormente redissolvido em MeOH seguido de adição de H_2O . Tendo-se começado como indica a literatura., a reprodução das condições por este artigo descritas não foi possível, não se tendo verificado a ocorrência de reacção nas condições indicadas, pelo que se propuseram várias alterações ao procedimento. A literatura seguida indica a formação apenas do produto α -hidroxilado na ausência de excesso de NaOH (Figura 19), sendo descrito que a formação do produto precursor do ácido augústico seria obtida em condições de excesso de NaOH (Figura 20).

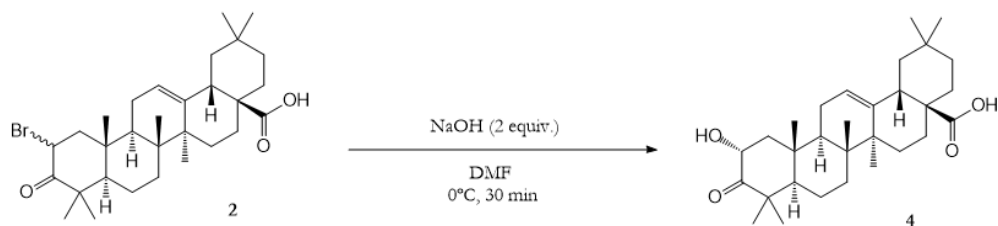


Figura 19: Proposta de síntese de **3** (ref. 44)

O composto **3** é facilmente detectado em RMN ^1H pela observação dos sinais de H2 (δ 4.54, dd, $J = 12.6, 6.6$ Hz, 1H) e de H1 (δ 2.40, dd, 1H).

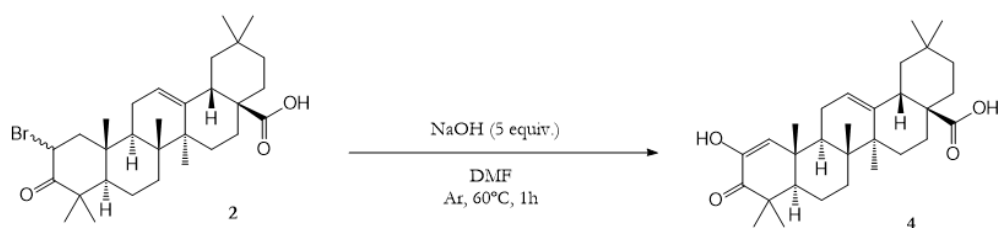


Figura 20: Síntese de **4** (ref. 44)

Utilizou-se uma quantidade pequena (25 mg) para realizar um screening inicial conforme indicado na literatura. Contudo, não se verificou a formação de um precipitado, não se tendo aliás verificado por TLC a presença de qualquer composto após a filtração. Tentei novamente a mesma reação com quantidades de massa superiores, mas sem continuar a verificar-se a formação de um precipitado.

Foi alterado então o procedimento de *work-up* para uma extração $\text{Et}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$, lavagem com HCl 10%, lavagem com NaCl 10%, adição de Na_2SO_4 , filtração e evaporação, por forma a tentar extrair o produto, tendo também tentado este procedimento de *work-up* com um aumento concomitante de massa para verificar se o problema residia numa permanência em solução no DMF sem haver uma passagem para a fase orgânica, mas sem sucesso.

Alterei ainda o solvente de reação para acetona pois estava convicto de que o problema estaria na não partição para a fase orgânica durante o processo de *work-up*. A mudança para acetona pareceu-me adequada pois é um solvente que possui características semelhantes ao DMF (índice de solubilidade em $\text{H}_2\text{O} = 100\%$ em ambos; índice de polaridade (P') = 5.1 vs 6.4 do DMF)⁷³. Novamente não se obteve sucesso, mas já se começou a observar um produto alaranjado que tendia a depositar durante o *work-up*.

Resultados e conclusões

Realizou-se então esta mesma reacção em acetona, mas desta vez à temperatura ambiente e começou a ser possível detectar o produto após o *work-up*, mas sem que fosse o produto desejado. Repetiram-se várias vezes com aumento de massa e de equivalentes de NaOH, aumento do tempo de reacção, mas sem que se conseguisse obter o produto desejado; este aumento de equivalentes e de tempo foi sempre uma alternativa menos desejada, já que se encontrava descrito na literatura que se formava o produto **4** com um excesso de NaOH e a presença de ar atmosférico.

Para se poder acompanhar por TLC qual dos produtos se estava a obter com mais certeza, sintetizou-se por uma outra via⁵² o composto **4** para ser usado como padrão de comparação (Figura 21).

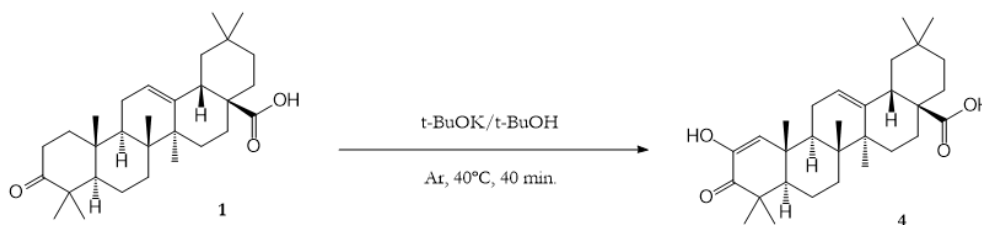


Figura 21: Síntese de **4** (ref. 38)

Este é facilmente observável no espectro pelos seus três sinais em região mais desblindada, que se atribuem na literatura³⁸ como sendo de H1 (δ 6,34, s, 1H), H2 (δ 5,94, s, 1H, OH) e de H12 (δ 5,31, dd, 1H).

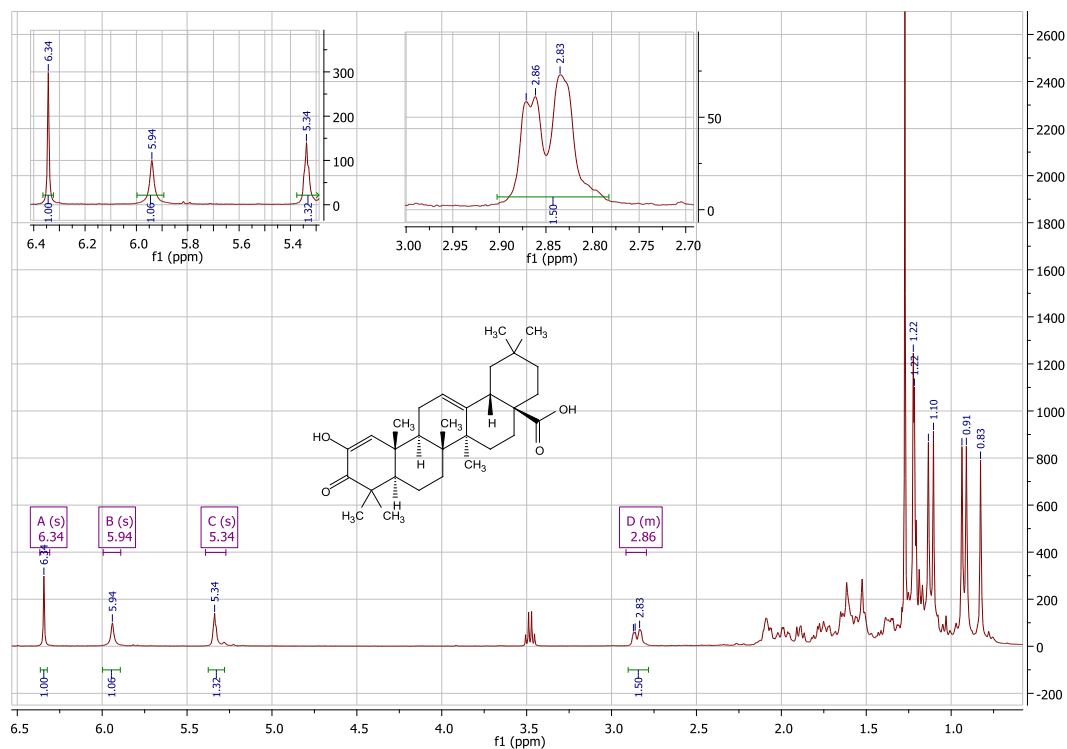


Figura 22: Espectro ^1H RMN de **4**

Utilizando este padrão, verificou-se em mais do que uma situação por TLC que se estava a lidar com um produto que não era **4**, por comparação de espectros RMN ^1H , mas verificava-se que era o produto **2**. Experimentou-se então retirar o ar atmosférico da reação, substituindo-a por uma atmosfera de N_2 , mas os resultados obtidos foram os mesmos.

Houve apenas uma tentativa em que se obteve uma indicação de que a reação ocorreu como esperado (Figura 22) com um rendimento do produto em bruto de cerca de 29%. Após a realização de uma TLC preparativa (com lâmpada UV como método de deteção), obtiveram-se 10 mg de um produto cujo espectro se apresenta na figura 23 e 25,7 mg de **4**. Em baixo apresenta-se o espectro do primeiro comparativamente ao espectro do padrão, **4**.

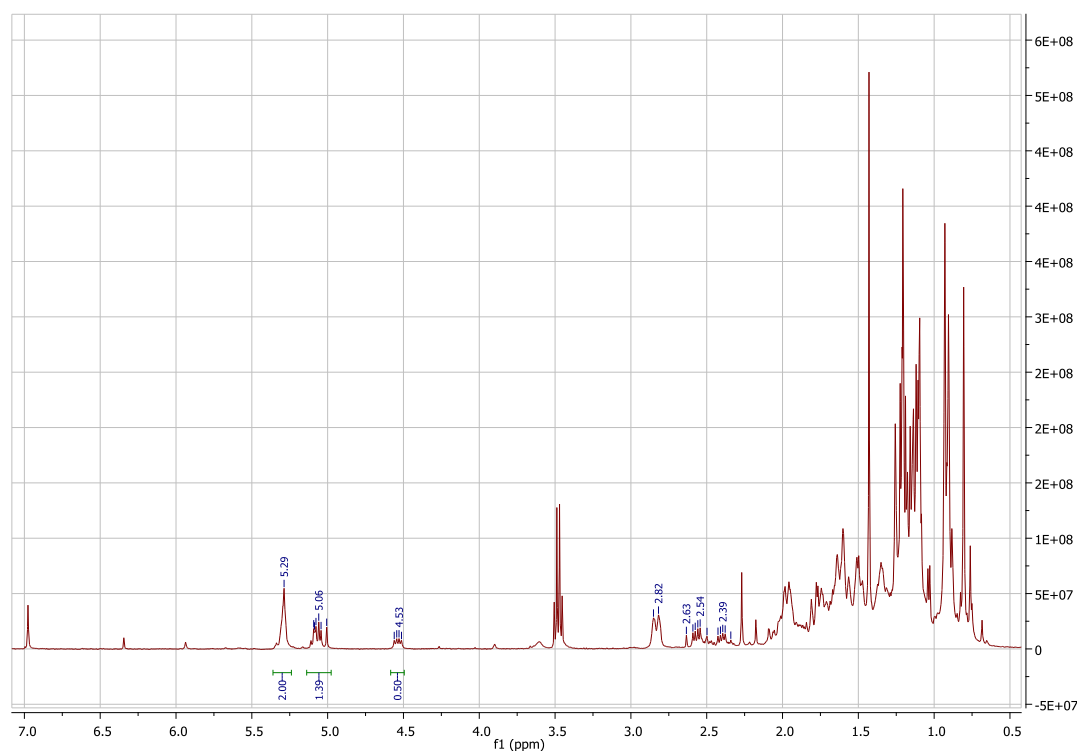


Figura 23: Espectro RMN ^1H de uma tentativa de síntese de **3**

Ao observar a figura **23**, encontra-se o sinal de H12 (δ 5,28 ppm, 2, 1H) e o sinal de H2 (δ 4,54 ppm, dd, $J = 12.5, 6.6$ Hz, 1H) atribuídos a **3**, observando-se também um novo sinal que se atribui a H1 (δ 2,4 ppm, dd, $J = 12.6, 6.6$ Hz, 1H). Contudo, verifica-se também que permanece ainda alguma quantidade de composto de partida **2** pela permanência do sinal a δ 5,08 ppm e pela proporção de integração de sinais comuns, como o de H12. Por isto, este espectro dá uma boa indicação de que o produto **3** foi obtido, tendo sido o rendimento do produto puro após purificação por TLC preparativa na ordem dos 3%.

Para tentar melhorar este rendimento, fizeram-se algumas alterações no protocolo, inclusive alterações na concentração da solução de HCl na neutralização e uma extração com CH_2Cl_2 . Em nenhum dos casos se verificou o mesmo resultado obtido nas experiências cujos espectros foram apresentados, obtendo-se sempre o composto **2**. Dadas estas evidências, tornei a realizar várias tentativas nas exatas condições que aparentemente tinham resultado na síntese do produto **3**, mas sem conseguir reproduzir novamente os mesmos resultados.

No extremo, retornei às condições iniciais propostas na literatura, na esperança de ter cometido um erro que não tivesse sido detetado no momento em que seguia esse protocolo, desta vez com maiores quantidades de **2**, mas sempre sem sucesso.

Realizei a reação a 0°C, com neutralização com solução 2M HCl e usando CH₂Cl₂ como solvente, pois este tinha provado ser capaz de melhorar o rendimento do produto em bruto que se obtinha. O espectro indicou haver sucesso na síntese de **3** pois observa-se o sinal de H₂ atribuído na literatura a **3** (δ 4, 54 ppm, dd, $J = 12.5, 6.6$ Hz, 1H), mas desta vez encontrou-se também **2** numa proporção de 25:75 e um rendimento do produto em bruto de cerca de 73%. Observa-se que existe uma sobreposição total dos sinais de H₁₂, H₂, H₁₈ e H₁ de **2** entre o espectro obtido e o que tinha sido adquirido no passo de síntese de **2**, integrando todos para 1H, o que mostra claramente que existe reagente de partida no produto final.

Após purificação por TLC preparativa, obteve-se **3** com um rendimento de cerca de 18%. Para melhorar este rendimento, realizei novamente a experiência nas mesmas condições mas sendo o solvente de reação novamente DMF, não só para verificar se desta forma haveria uma melhoria no rendimento da reação em bruto por promover uma melhor interação no meio de reação entre os reagentes, que possuem solubilidades diferentes para os meios aquosos e orgânicos em questão, como também para verificar se haveriam melhorias no processo de extração com CH₂Cl₂, mas não foi possível verificar novamente a ocorrência de reação.

Verificado o insucesso desta troca, reverti-a e tentei novamente, mas sem conseguir obter **3** mas sim apenas **2**, resultado esse que se verificou em todas as tentativas posteriores, mesmo quando repeti as condições que primeiro deram resultados satisfatórios. Para finalizar, tentei ainda mais uma vez as condições propostas na literatura⁴⁴ mas sem sucesso.

Dada então a não reprodutibilidade do processo ou qualquer uma das alterações realizadas, tomei a decisão de construir uma alternativa à síntese do ácido maslínico que não passasse por este passo.

2.1.4 Breves conclusões

A oxidação de Jones foi conseguida com sucesso, tendo resultado num produto facilmente identificável por espectroscopia RMN ¹H com um rendimento bastante satisfatório e sem evidência da existência de oxidações parciais.

A bromação via tribrometo de piridínio foi conseguida após algumas alterações ao protocolo previsto na literatura seguida, mas ainda assim com relativa facilidade, tendo resultado num produto facilmente identificável por espectroscopia RMN ¹H, mais uma vez com um rendimento bastante bom e sem evidência forte da ocorrência de reações parcelares.

Não foi possível contudo reproduzir as condições do protocolo descrito na literatura⁴⁴, tendo as experiências realizadas revelado pouca consistência e reprodutibilidade, sendo que

todos os resultados favoráveis que obtive não foram repetidos nas seguintes tentativas em que as exatas condições experimentais foram aplicadas, o que dificultou a descoberta dos pontos-chave que levavam ao sucesso das inúmeras tentativas que foram feitas. O acesso a pequenas quantidades de reagente limitaram a exploração devida deste processo, e a indicação da literatura de que o aumento para quantidades elevadas de NaOH levariam à síntese de outros produtos fizeram com que não aumentasse muito mais as quantidades de NaOH. Esta via foi, por isso, abandonada.

2.2 Síntese do Ácido Maslínico via m-CPBA

Esta via compreende mais um passo sintético que a anterior, e foi desenhada na mesma linha de pensamento da anterior: uma via fácil, barata e livre de cromatografia. Começando também pela oxidação de Jones, para que assim se pudesse obter o equilíbrio ceto-enólico na posição 2 e 3, seguida de uma metilação do ácido carboxílico na posição 28, obteve-se um produto que ao reagir com o m-CPBA ganha um grupo α -hidroxilo na posição 2, como descrito previamente em trabalho realizado pelo grupo de trabalho e não só^{13,60}.

A proteção serve, portanto, para evitar que a hidroxilação ocorra na posição 12, pois com o ácido carboxílico na forma de éster evita-se a formação da lactona por ataque nucleofílico na posição 13 por parte do grupo carboxilato, que segundo a literatura ocorre com preferência sobre a hidroxilação na posição 2 e não entra nos planos do projeto^{13,60}.

Após a reação com m-CPBA, a via comporta a redução da cetona com NaBH_4 e a desproteção do grupo ácido carboxílico recorrendo ao LiI, originando assim o ácido maslínico. A reação de oxidação de Jones não será apresentada nesta seção por se ter seguido exactamente o mesmo procedimento que foi descrito na seção anterior.

Mais uma vez tentou-se ao máximo evitar o recurso à cromatografia para efeitos do proposto no projeto de trabalho. Propus então uma oxidação via m-CPBA segundo o protocolo descrito na literatura²⁶ para o ácido ursólico, seguido de uma redução do grupo cetona a álcool¹¹, que se supõe que origine uma mistura de diastereoisómeros, mas cujo procedimento descrito para a recristalização permita obter o isómero pretendido (Figura 24).

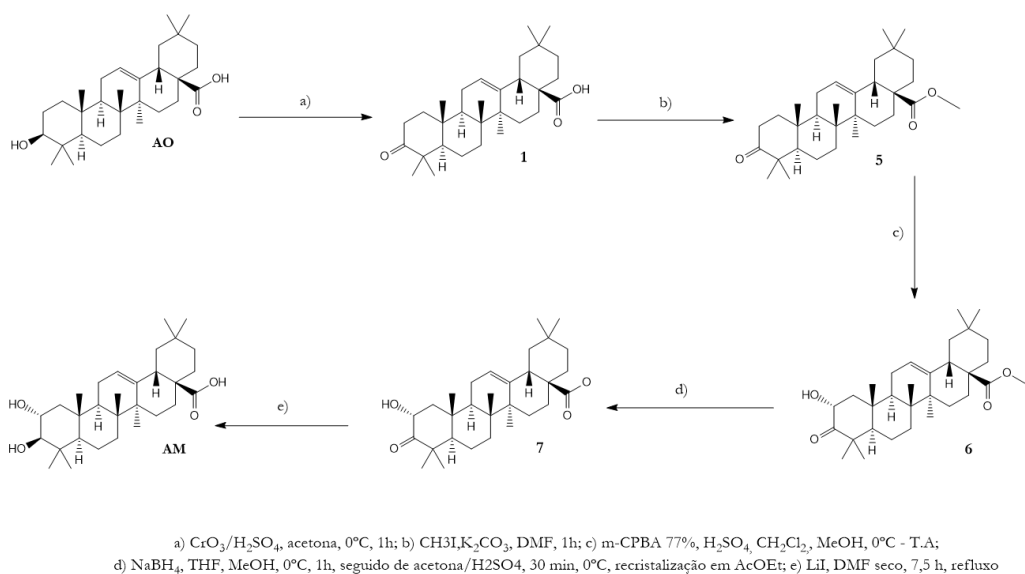


Figura 24: Esquema proposto para a síntese do AM

2.2.1 Proteção do grupo ácido carboxílico

Esta reação decorreu conforme a literatura⁶⁰, sendo a única diferença em relação a esta o recurso a DMF e não a DMF seco. Contudo, nada evidenciou que o composto sofresse qualquer alteração ou que a reação fosse incompleta a tal ponto que justificasse a troca para DMF seco.

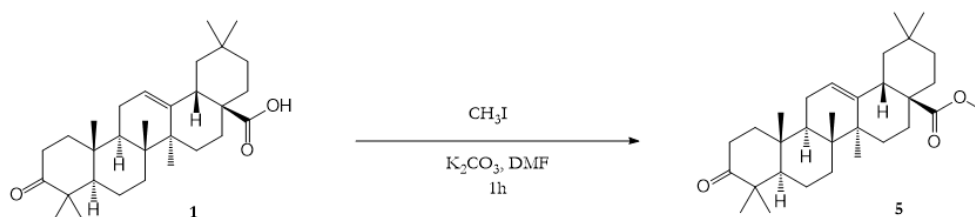


Figura 23: Proposta de síntese de 5 (ref. 60)

O composto 5 é facilmente identificável por observação do sinal que corresponde ao grupo O-CH_3 que resulta da proteção do grupo ácido carboxílico (δ 3,63, s, 3H). Todos os restantes sinais se mantêm inalterados (δ 5,30 ppm, t, $J = 3.4$ Hz, 1H; δ 2,87 ppm, dd, $J = 13.7$ Hz, 1H; δ 2,54 ppm, dd, $J = 15,8$ Hz, 6.6, 3.5, 1H), à exceção de um dos sinais na região dos grupos metilo, em que dois se agruparam no mesmo desvio químico, sendo que esse singuleto integra

Resultados e conclusões

aqui, *grasso modo*, para 6H, enquanto que no caso de **1** haviam 7 sinais nessa região, cada um com integração aproximada de 3H.

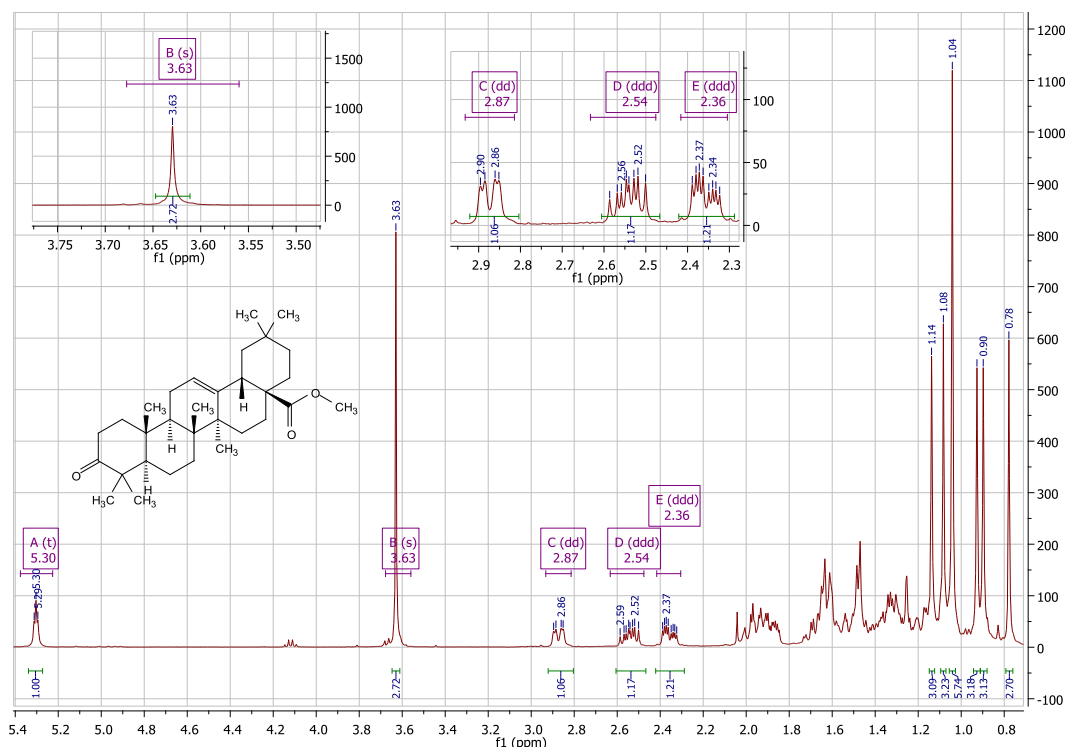


Figura 26: Espectro RMN ¹H de **5**

Os rendimentos do produto bruto foram sempre superiores a cerca de 75-80%, e por observação do espectro sou levado a crer que este rendimento deverá ser maioritariamente do produto final, embora nalguns casos fosse complicado remover por completo todo o K₂CO₃ do meio de reação.

2.2.2 Oxidação via m-CPBA

O processo de oxidação com recurso ao m-CPBA, um perácido bastante utilizado na formação de epóxidos a partir de duplas ligações e na oxidação de Baeyer-Villiger, está já bastante bem descrito na literatura^{19,60,61} como agente oxidante de triterpenóides pentacíclicos como os ácidos oleanólico, betulínico, ursólico, entre outros.

Na α -hidroxilação das posições 2 e 12, encontrava-se já descrito em trabalho do grupo⁶⁰ e não só⁶¹, recorrendo para isso a concentrações catalíticas de H₂SO₄ para a abertura estereoseletiva do epóxido, sendo reportados rendimentos de cerca de 80% na sua síntese em compostos praticamente idênticos (na ref. **60**, é reportada a mesma reação com um composto em

tudo semelhante a **5**, diferindo apenas no grupo protector do ácido carboxílico, que nesse caso é um grupo benzilo).

A reação ocorre segundo um mecanismo descrito por Prilezhaev, apelidado de mecanismo Borboleta, que envolve em primeiro lugar uma conformação de ponte de hidrogénio intramolecular, que lhe permite adquirir uma geometria de aproximação à ligação C=C que forma um estado de transição com um intermediário cuja geometria se assemelha a uma borboleta, daí a sua alcunha. Esta geometria do estado de transição permite a formação do epóxido com simultânea transferência protónica [1,3].

Esta reação foi realizada como proposta pela literatura^{13,60}, com um meio reacional composto por CH₂Cl₂/MeOH numa proporção de 1:2 para permitir uma adequada dissolução de **5** graças ao primeiro e de m-CPBA ao segundo, e com uma concentração catalítica de H₂SO₄, sendo realizada durante 21 horas e a uma temperatura de 0°C.

A literatura seguida aconselha o uso de uma massa de m-CPBA tal que haja uma proporção entre as massas de **5** e de m-CPBA de 2/3; contudo, utilizei sempre uma quantidade superior pois o grau de pureza dos reagentes a que tive acesso era de 77% enquanto que a utilizada pelos autores era de 85%.

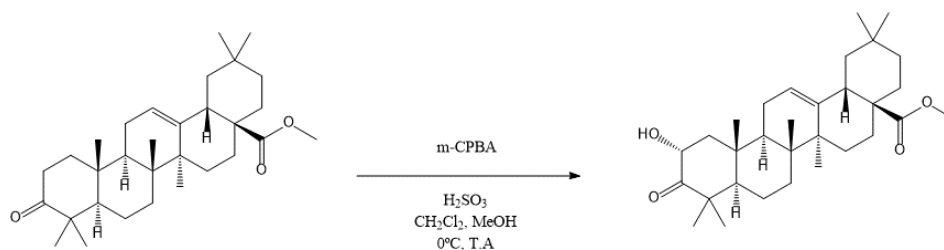


Figura 27: Proposta de síntese de **6** (ref. 13 e 60)

Tentei realizar esta experiência com o par de solventes proposto, mas por questões ambientais alterei para o par de solventes CHCl₃/MeOH. Estas alterações foram feitas pois esta bateria de experiências foi realizada numa altura de muito calor, e o ponto de ebulição do CH₂Cl₂ é relativamente baixo para as temperaturas ambientais (cerca de 39°C), o que poderia trazer problemas de evaporação deste solvente e alteração das condições experimentais aquando da permanência da reação *overnight*, o que se torna ainda mais gravoso pelo fato de se estar a lidar com quantidades de solvente relativamente pequenas. Enquanto isso, o clorofórmio possui um ponto de ebulição que ronda os 61°C, embora sendo bastante semelhante ao diclorometano nas propriedades mais influentes neste tipo de experiências, como o índice de polaridade e a miscibilidade com solventes aquosos e orgânicos, pelo que me pareceu mais seguro e rigoroso trabalhar com este solvente. Após se ter verificado que não se verificava qualquer alteração

Resultados e conclusões

significativa nem na aparente dissolução dos reagentes nem posteriormente por TLC (bastante semelhante ao verificado nas experiências anteriores), a alteração manteve-se.

Comecei por tentar fazer a experiência nas exactas condições descritas na literatura à excepção da quantidade de equivalentes correcta de H_2SO_4 , que por questões logísticas não foi possível fazer, pelo que foi neutralizada com um pequeno excesso. Não se verificou qualquer alteração durante o período da experiência, nem na tentativa seguinte, cuja única alteração foi o aparecimento dos sinais correspondentes ao m-CPBA. Para colmatar este excesso de m-CPBA, intensificou-se a quantidade de Na_2SO_3 e o tempo de neutralização do reagente em excesso.

Em experiências posteriores, utilizei uma solução diluída de H_2SO_4 e apliquei a exata quantidade prevista na literatura, tendo seguido em intervalos de tempo mais curtos as alterações por TLC, sem se observarem resultados positivos.

Numa nova tentativa, utilizei a mesma quantidade de H_2SO_4 da experiência anterior, recorrendo à mesma solução diluída, adicionando mais ácido a cada 1 hora a partir das 16 horas de reacção, para tentar perceber se de fato seria por defeito de ácido e haveria uma reversão da reacção, mas obtive um resultado semelhante ao observado anteriormente.

Feita esta observação, decidi prolongar por mais 48 horas o tempo de reacção, adicionando um excesso de metade da quantidade de m-CPBA inicialmente colocada e um excesso de H_2SO_4 (cerca de 0,01 mL da solução comercial a 99,99%) à temperatura ambiente; mais uma vez não obtive resultados positivos. Experimentei então tornar as condições do meio mais agressivas, realizando novas tentativas à temperatura ambiente, com quantidades muito superiores de m-CPBA e de H_2SO_4 e mais tempo de reacção, não obtendo novamente qualquer evidência do produto desejado.

Verificada esta situação, experimentei realizar a mesma reacção sem adição de mais m-CPBA para além do recomendado pela literatura mas fazendo uma adição controlada, gota-a-gota, de H_2SO_4 com controlo de pH com recurso a indicador ácido-base, parando a adição quando o meio se encontrava com um pH entre 5-3. Mesmo assim, não se obteve qualquer indício da ocorrência de reacção, pelo que esta via acabou por ser abandonada.

Encontra-se na figura **28** um exemplo de um espectro RMN ^1H obtido no decorrer destas experiências. O resultado obtido foi sempre muito semelhante em qualquer das experiências e alterações realizadas em cada situação, pelo que este exemplo é um bom ilustrador do que foi obtido nessas situações.

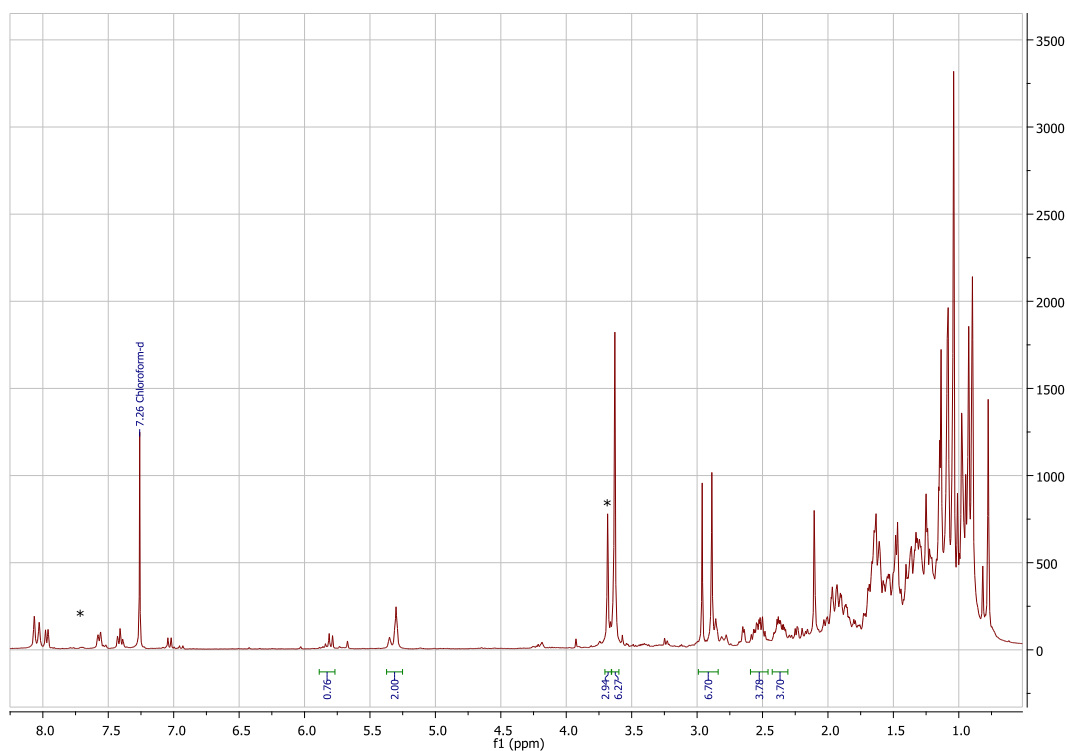


Figura 28: Exemplo de um espectro RMN ^1H obtido na tentativa de síntese de **6**

2.2.3 Breves conclusões

Dados os resultados apresentados, pode afirmar-se que a síntese de **5** foi conseguida com sucesso, uma vez que o espectro RMN ^1H apresenta de forma clara o sinal da metilação do grupo ácido carboxílico e não dá indícios de haver mistura com reagente de partida ou com produtos secundários e que o rendimento foi bastante satisfatório.

Na síntese de **6**, estando a utilização do m-CPBA descrita para várias reações diferentes e sendo já bem conhecida a reatividade do mesmo para a reação com vários tipos de compostos, sou levado a concluir que o problema encontrado se prende essencialmente com o reagente disponível, sendo o problema principal o elevado grau de desativação do m-CPBA que estava disponível.

2.3 Otimização de uma via sintética de derivados fluorados do ácido oleanólico

Nesta seção discutir-se-á a segunda parte do projeto, que envolvia a otimização de uma via sintética de derivados fluorados do ácido oleanólico recorrendo ao Selectfluor[®], um reagente de floração electrofílica comercializado pela Sigma-Aldrich[®] para a floração de alcenos. Este reagente é comercializado como um sólido branco cristalino, bastante estável a elevadas temperaturas e que traz bastantes vantagens na sua utilização, sendo talvez a maior a facilidade de remoção de produtos secundários por *work-up* em meio aquoso²⁶. Alguns autores referem a que a reação deve ser realizada na presença de um dador nucleofílico, sendo que a temperatura, os solventes e o dador nucleofílico influenciam o rendimento e o produto final, não só no que toca a produtos secundários, mas também ao tipo e quantidade de isómeros⁴⁷.

Neste sentido, foi realizado pelo grupo⁶⁰ a floração do ácido oleanólico utilizando o Selectfluor[®] e uma mistura de dois solventes, o dioxano e o acetonitrilo, a 50°C, tendo-se verificado que estas condições originavam o 3β-hidroxi-12β-fluor-olean-13,28β-olido e o 3β-hidroxi-12α-fluor-olean-13,28β-olido, isómeros originados pela floração da dupla ligação na posição 12 com concomitante perda do próton e ataque nucleofílico do grupo -OH do ácido carboxílico da posição 28 ao carbono da posição 13, gerando as referidas fluorolactonas (Figura 29).

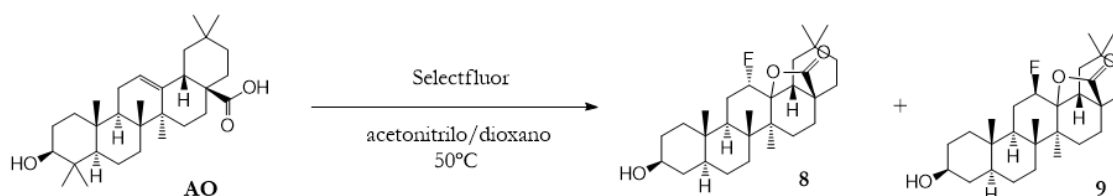


Figura 29: Proposta de síntese de 3β-hidroxi-12α-fluor-olean-13,28β-olido (**8**) e de 3β-hidroxi-12β-fluor-olean-13,28β-olido (**9**) proposto em **60**

Segundo a mesma fonte, esta reação resultou em 33% de 3β-hidroxi-12α-fluor-olean-13,28β-olido (**8**) e 25% de 3β-hidroxi-12β-fluor-olean-13,28β-olido (**9**) após purificação por coluna cromatográfica.

A mesma fonte afirma ser possível fazer a deteção por via de RMN ¹H, ¹³C, NOSY, COESY, HMBC e HMQC. Refere que a fluorolactona é passível de ser detetada pelo seu duplo dubleto por volta de δ 4,5 ppm para 3β-hidroxi-12β-fluor-olean-13,28β-olido (**8**) e de δ 4,6 ppm para 3β-hidroxi-12α-fluor-olean-13,28β-olido (**9**) no espectro de RMN ¹H e como dubletos correspondentes a C12 e C13 no espectro RMN ¹³C, com valores para **8** entre δ 97 e 88

ppm e entre δ 100 e 90 ppm para **9**. O sinal de C28 surge a cerca de δ 179 ppm para ambos os isómeros. Para a identificação dos isómeros é referido o recurso a NOESY para fazer corresponder a relação entre H12 e os restantes grupos da molécula, com o protão de **8** a estabelecer uma correlação com C27 e o de **9** a estabelecer uma correlação com C26; sabendo que C26 e C27 são antiperiplanares, é então possível estabelecer uma relação entre esta correlação e a presença de **8** e/ou **9**.

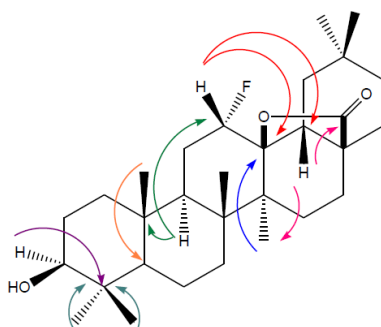


Figura 30: Algumas correlações detetadas por NOESY de **9** (adaptado de ref. 60)

O Selectfluor actua segundo um mecanismo de fluoração electrofílica, em que um nucleófilo ataca o átomo de F^+ com conseqüente formação da lactona por ataque nucleofílico em C13.

De fato, por observação do mecanismo de ação do selectfluor, pode suspeitar-se que a posição β do grupo ácido carboxílico facilite o ataque nucleofílico pela face oposta. Portanto, os isómeros que se esperam obter são aqueles que derivam da substituição electrofílica com entrada do átomo de flúor numa face ou noutra do plano formado pela estrutura de anéis fundidos, com uma ligeira tendência para a formação do isómero β em detrimento do α ; de fato, na literatura seguida, estava reportada a obtenção de produto após purificação de proporções bastante semelhantes de ambos os isómeros mas ligeiramente tendente para a formação de β (33% de **8** e 25% de **9**).

Num outro trabalho realizado também pelo grupo⁶⁹, existe reportado uma reação semelhante, com uma temperatura de 80°C em vez dos 50°C e com o nitrometano em vez do acetonitrilo, desta feita com resultados mais satisfatórios, onde se afirma ter-se obtido cerca de 70% do isómero α , ou seja, de **8**.

Para abordar este desafio, defini o estudo por etapas, que estão sintetizadas em baixo na tabela **3**, encontrando-se também a proporção estimada entre os isómeros por observação espectral. O desafio proposto para este projeto visava otimizar os resultados descritos na litera-

Resultados e conclusões

tura⁶⁰, com vista à otimização da reação nela proposta para obter uma melhor resolução diastereomérica e melhor rendimento que permitissem a sua purificação e posterior uso em novos estudos para fins terapêuticos. Partiu-se da convicção de que o isómero α poderia ser preferencialmente sintetizado pelo fato de C29 e C30 encontrarem-se ambos ligados a C20 e não haver nenhum ligado a C19 como acontece em moléculas de outras séries como é o caso do ácido ursólico.

O objetivo do trabalho foi então tentar perceber qual o efeito do solvente na proporção isomérica que se obtêm e quais as melhores condições para obter a fluoração preferencial de um dos isômeros em detrimento do outro.

Entrada	AO (mg)	SF (mg)	CH ₃ NO ₂ (mL)	CH ₃ CN (mL)	Dioxano (mL)	T (°C)	t (h)	α/β
A	50	116	2	-	1,4	80	24	83/17
B	50	116	-	2	1,4	80	24	56/44
C	50	116	1	1	1,4	80	24	83/17
D	50	116	1	1	1,4	80	48	81/19
E	50	116	1	1	1,4	80	30	74/26
F	50	116	1	1	1,4	80	26	83/17

Tabela 3: Representação simplificada das experiências realizadas na fluoração de **AO**

Selecionou-se a experiência **F**, tendo-se realizado um processo de separação cromatográfica em coluna com recurso a um eluente fixo (acetate de etilo/éter petróleo 1:5) e cuja polaridade se manteve constante ao longo do processo e a sílica gel, tendo-se recolhido os dois produtos maioritários. O produto em maior quantidade foi analisado por RMN ¹H, ¹³C, DEPT 135, COSY, NOESY e cristalografia de raio-X. A informação que se encontra descrita na literatura dava indicação de se ter obtido preferencialmente o isómero β , com os sinais a serem concordes com os obtidos pelas experiências que realizei.

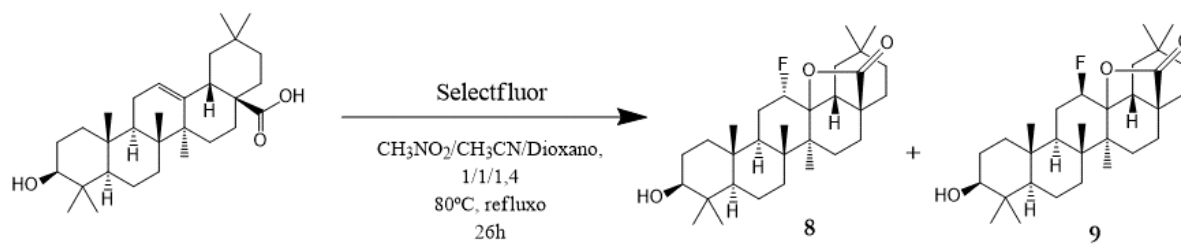


Figura 31: Condições experimentais otimizadas para a obtenção preferencial do isômero α

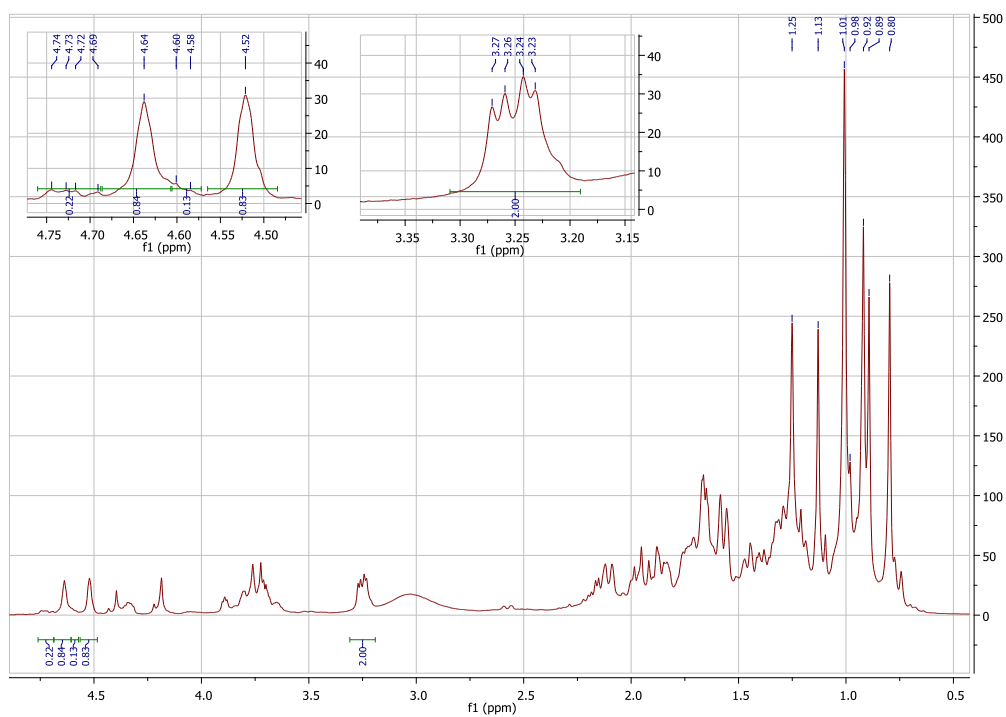


Figura 32: Espectro RMN ^1H da experiência F (crude)

Resultados e conclusões

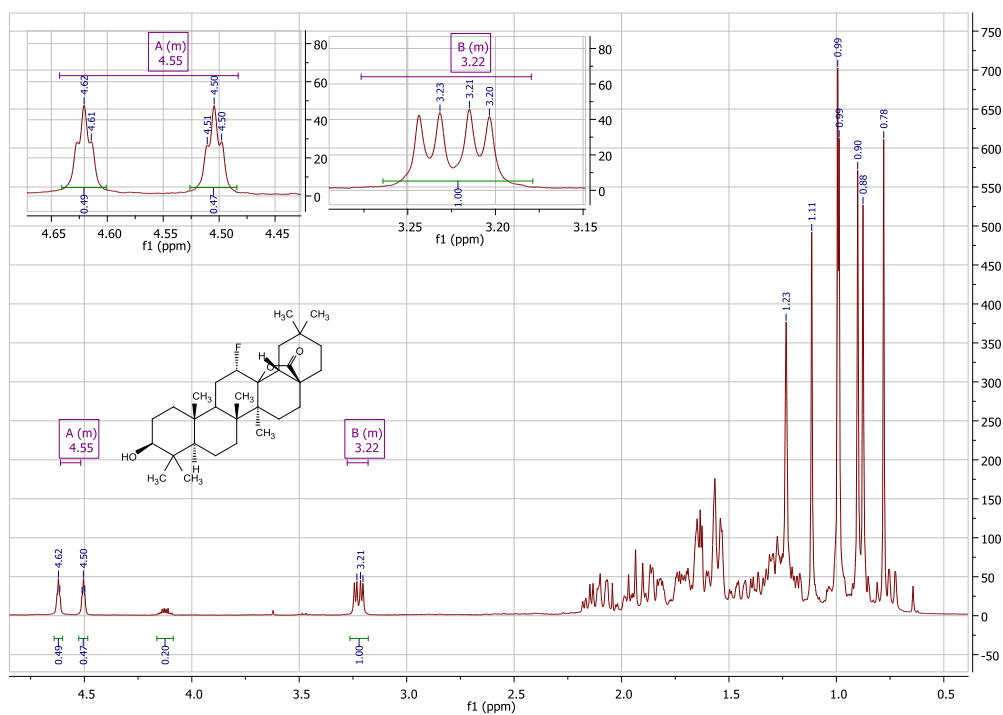


Figura 33: Espectro RMN ^1H de **8**

H	Sinal (δ , ppm)	Tipo	Forma
12	4,55 ($J = 46.6, 2.6$ Hz)	dt	H-C-F
3	3,22 ($J = 11.4, 4.7$ Hz)	dd	H-C-OH
24	-	s	CH_3
25	0.88	s	CH_3
26	1.11	s	CH_3
27	1.23	s	CH_3
29	-	s	CH_3
30	-	s	CH_3

Tabela 4: Seleção de sinais ^1H de **8**

Como se pode observar pela figura 33 não existe evidência da presença de dois isômeros, pelo que se conclui que a separação terá corrido de forma satisfatória, podendo observar-se claramente o desaparecimento de um dos sinais desta região, com a melhor definição dos tripletos de H12. Não é possível fazer a atribuição de H18, embora haja indícios em HMQC de que esse próton de encontre entre 1,55-1,50 ppm.

Os espectros de DEPT 135, NOSY e HMBC foram mais importante para a confirmação dos sinais atribuídos em ^1H e ^{13}C como sendo que os espectros de NOESY e HMQC foram mais importantes na determinação do isômero em questão.

Pode observar-se pelo espectro ^{13}C que os dupletos correspondentes a C12 e C13 se encontram visíveis e nos desvios químicos indicados na literatura, bem como C18.

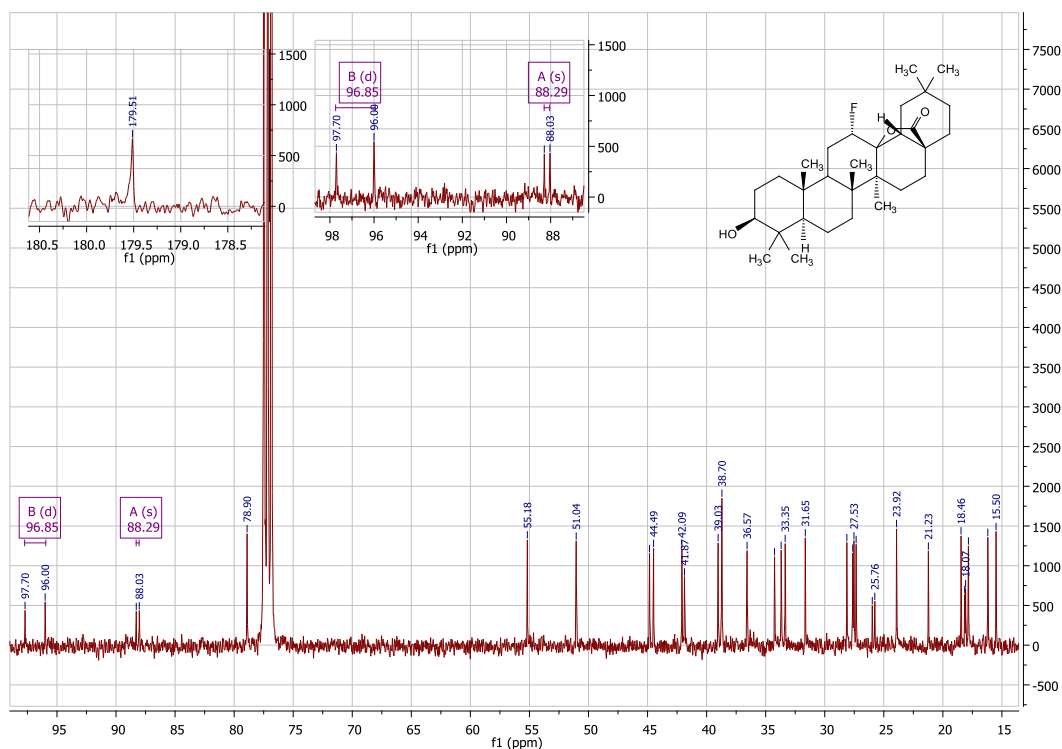


Figura 34: Espectro RMN ^{13}C de 8

Resultados e conclusões

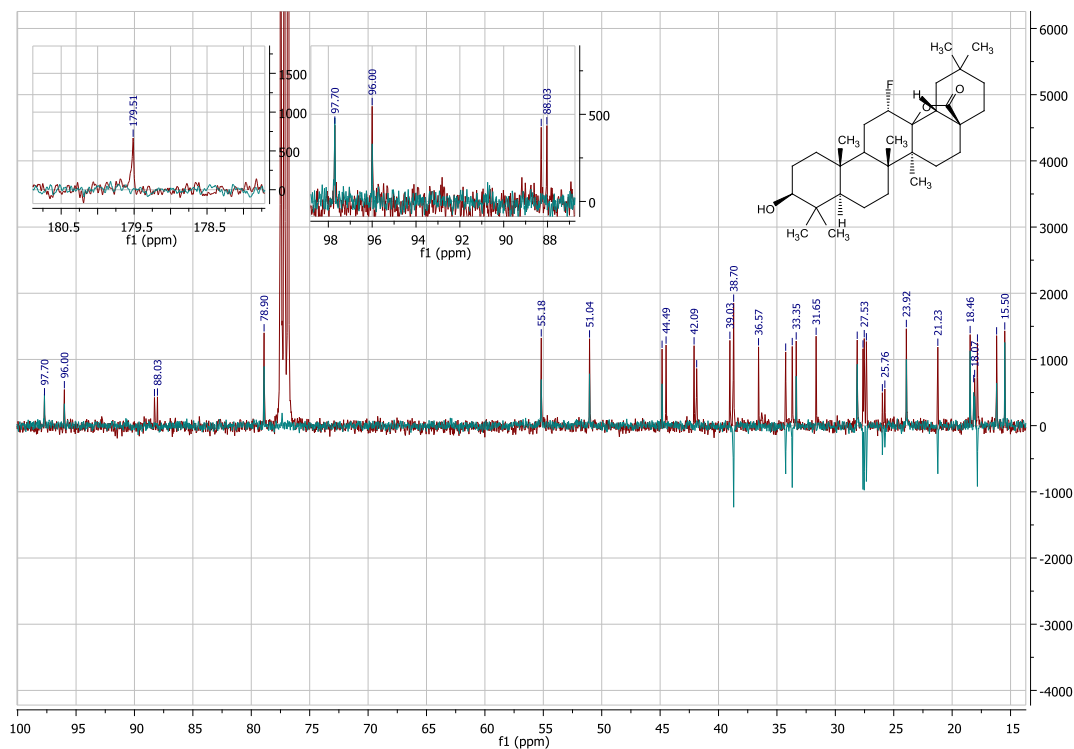


Figura 35: Espectro DEPT 135 de 8

Não existe, ao contrário do referido pela literatura⁶⁰, o sinal de correlação com H26 nem com H27, o que dificultou numa primeira análise a compreensão do isômero em questão. No espectro HMBC, verificou-se a correlação entre H12 e C13, mas mais uma vez não se verificou a correlação com C18, como é também referido pela literatura, corroborando a ocorrência de fluoração na posição 12. No espectro HMQC, observa-se perfeitamente a correlação entre H12 e C12, tendo assim mais um dado confirmativo de que a fluoração ocorreu e que esta ocorreu na posição 12.

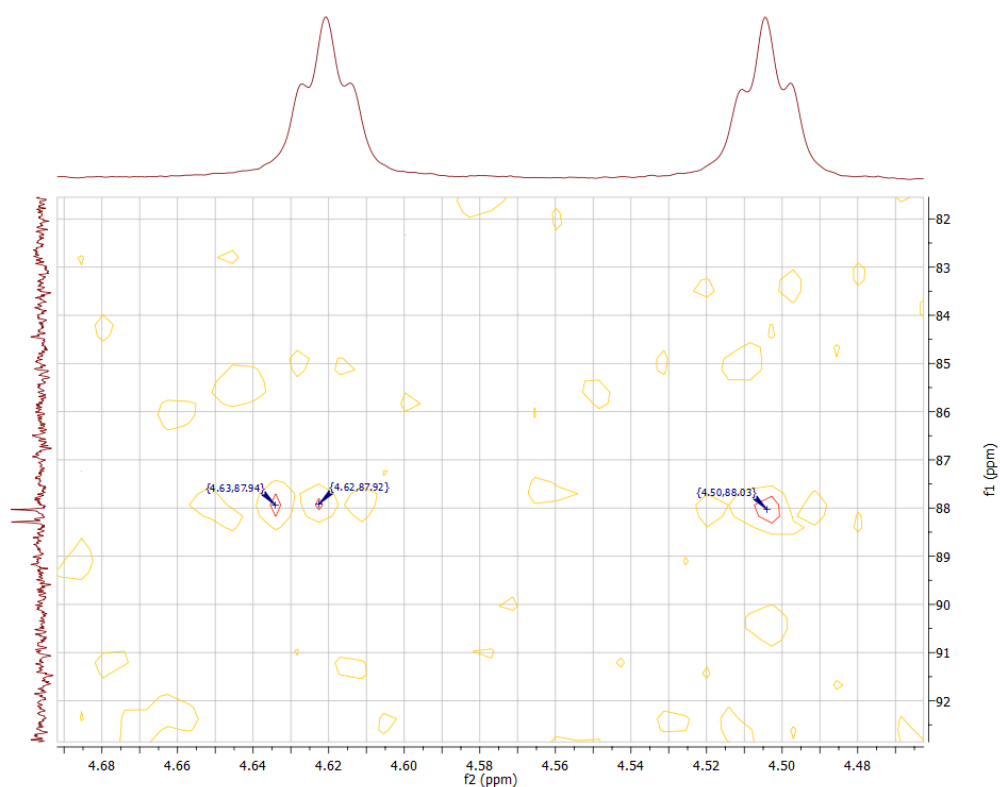


Figura 36: Detalhe do espectro HMBC de **8**;
encontra-se sinalizada a correlação entre H12 e C13

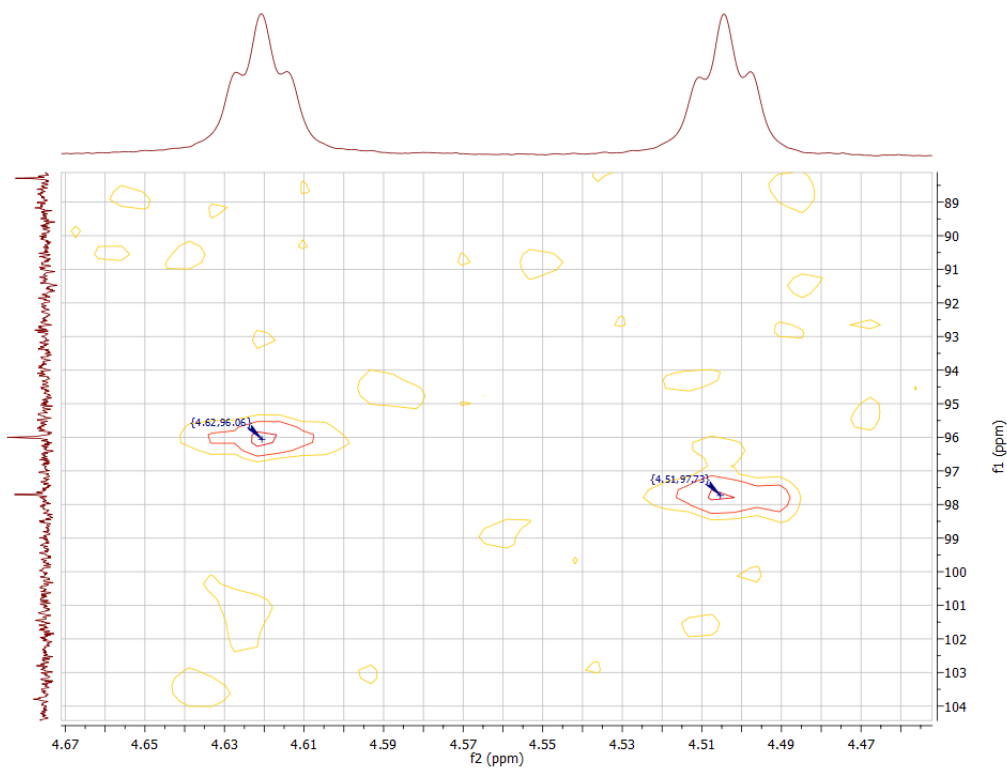


Figura 37: Detalhe do espectro HMQC de **8^a**;
encontra-se sinalizada a correlação entre H12 e C12

Resultados e conclusões

Como já foi referido, encontra-se referenciada uma série de correlações NOESY na literatura para estes isómeros fluorados, sendo dito que existe um sinal que permite correlacionar C26 ou C27 com H12 e assim saber se estamos perante **8** ou **9**. Contudo, o espectro NOESY obtido não indica qualquer correlação nem com um caso nem com outro, pelo que não foi possível determinar o isómero através deste. A confirmação de que o isómero em questão é de facto o isómero α foi realizada por cristalografia de raio-X, cujo ORTEP se apresenta no **Anexo 1**.

C	Sinal (δ , ppm)	Forma
28	179,51	lactona
12	96,85 ($J = 171,4$ Hz)	C-F
13	88,16 ($J = 25,80$ Hz)	Quaternário
3	78,90	C-OH
18	51,04	C-H
23	28,13	CH ₃
24	16,19	CH ₃
25	18,16	CH ₃
26	18,46	CH ₃
27	18,07	CH ₃
29	33,35	CH ₃
30	23,92	CH ₃

Tabela 5: Seleção de sinais ¹³C de **8**

2.3.1 Breves conclusões

Os resultados obtidos são bastante satisfatórios pois vieram acrescentar à literatura conhecida^{60,69} não só uma melhoria em termos de processo de separação de isómeros, processo que até então se tinha revelado bastante mais complexo, como também uma elucidação concreta do isómero ao qual se está a fazer a atribuição isomérica. Até então apresentava-se uma mistura de fluorolactonas e é referida a sua difícil separação pela semelhança de propriedades físico-químicas de ambos, por um protocolo em que se indica que o produto α é o produto maioritário em relação a β , mas cuja separação não tinha ainda sido efetuada.

Este trabalho permitiu então aprofundar qual a influência dos solventes no processo global de reação bem como numa melhoria da via sintética no seu todo. Foi possível então perceber que o acetonitrilo não é um solvente que faça tender a reação no sentido de uma separação diastereoisomérica nas proporções utilizadas, uma vez que os resultados demonstraram que a utilização deste numa proporção de 1:1 com o nitrometano apresentaram proporções de diastereoisómeros semelhantes quando se utilizou apenas o nitrometano. De igual forma, demonstrou-se que existe uma fase da reação em torno das 30 horas que de alguma forma afeta a reação ao ponto de tornar a resolução diastereoisomérica menos proeminente e que o aumento do tempo de reação para o dobro do inicialmente proposto pela literatura (48h) não promoveu qualquer tipo de alteração no processo de resolução dos compostos α e β fluorados quando comparado com o tempo inicialmente proposto pela literatura.

Conseguiu-se também realizar a purificação e caracterização do isómero α com recurso a uma única repetição do processo de separação por coluna cromatográfica com rendimentos que rondam valores entre os 40-60%, permitindo assim a purificação deste produto fluorado para posteriores estudos QSAR para vários alvos biológicos.

Para melhoria deste processo, poderia estudar-se o efeito de outros solventes no rendimento global da reação, bem como a compreensão plena do efeito da mistura de solventes em outras proporções e em tempos mais próximos das 30 horas de reação.

Conhecendo melhor o fenómeno envolvido, é possível melhorar as condições de reação em concordância com esses conhecimentos ou até mesmo redesenhar o procedimento experimental com outras condições que promovam melhor esses efeitos.

Apesar disso, foi possível obter uma via sintética que apesar de envolver uma mistura de três solventes e acrescentar mais variáveis ao problema, conseguiu melhorar significativamente a resolução diastereoisomérica do processo sem complicar o processo de separação e purificação da mesma.

2.4 Síntese de derivados do 3 β -hidroxi-12 α -fluor-olean-13,28 β -olido

Prepararam-se três compostos a partir de **8** segundo a figura 36:

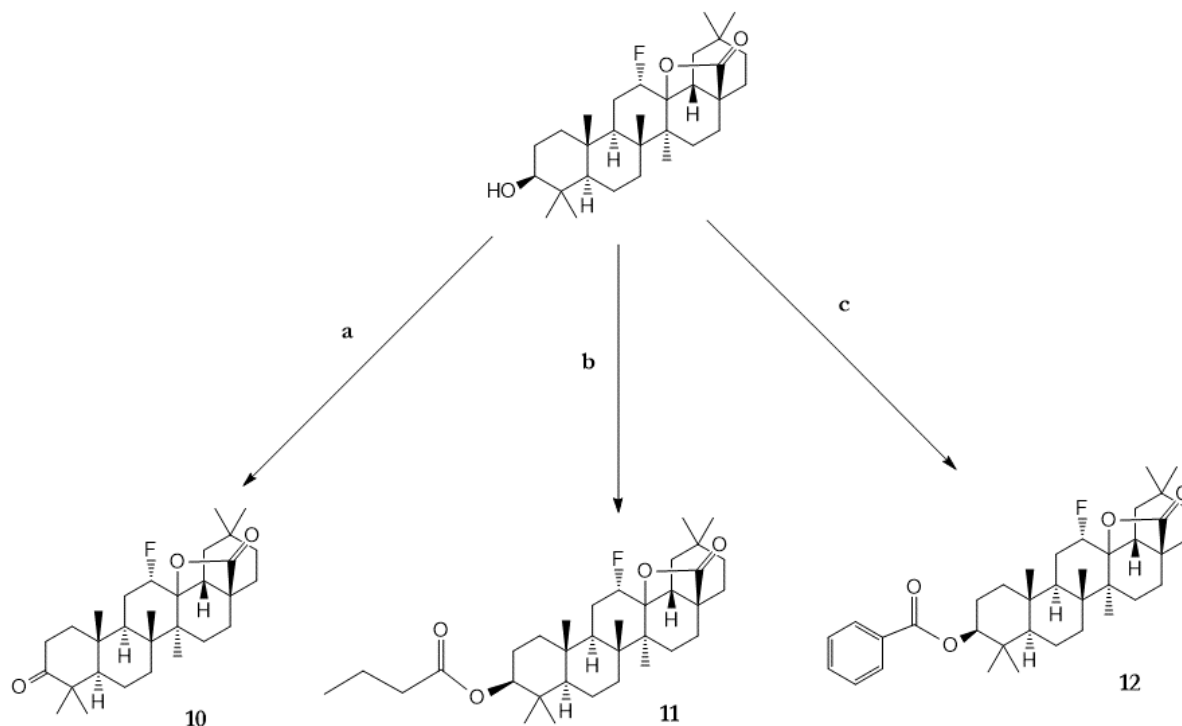


Figura 38: Painel de reações realizadas a partir de **8**

a) CrO₃/H₂SO₄, 0°C, 30 min.

b) Anidrido butírico, DMAP, THF, 1h, T.A

c) Anidrido benzóico, DMAP, THF, 8h, T.A

2.4.1 Síntese de 3-oxo-12 α -fluor-olean-13,28 β -olido

A síntese de **10** foi feita de forma em tudo idêntica à de **1**, inclusive no rendimento da reação, que foi neste caso de 91%. Como se pode observar pela figura **39**, o sinal correspondente a H3 (δ 3.22, dd, J = 11.4, 4.7 Hz, 1H) desaparece, o que dá a indicação de que a oxidação do grupo -OH ocorreu sem qualquer problema; verifica-se também que surge um outro sinal (δ 2,58-2.39, m, 2H) que se atribui aos prótons ligados a C2.

Em C¹³ (Figura **40**), observa-se o sinal correspondente ao grupo cetona com um desvio químico de δ 217, 49 ppm e o desaparecimento do sinal correspondente ao grupo -OH em C3, que se encontrava na região dos δ 78,90 ppm.

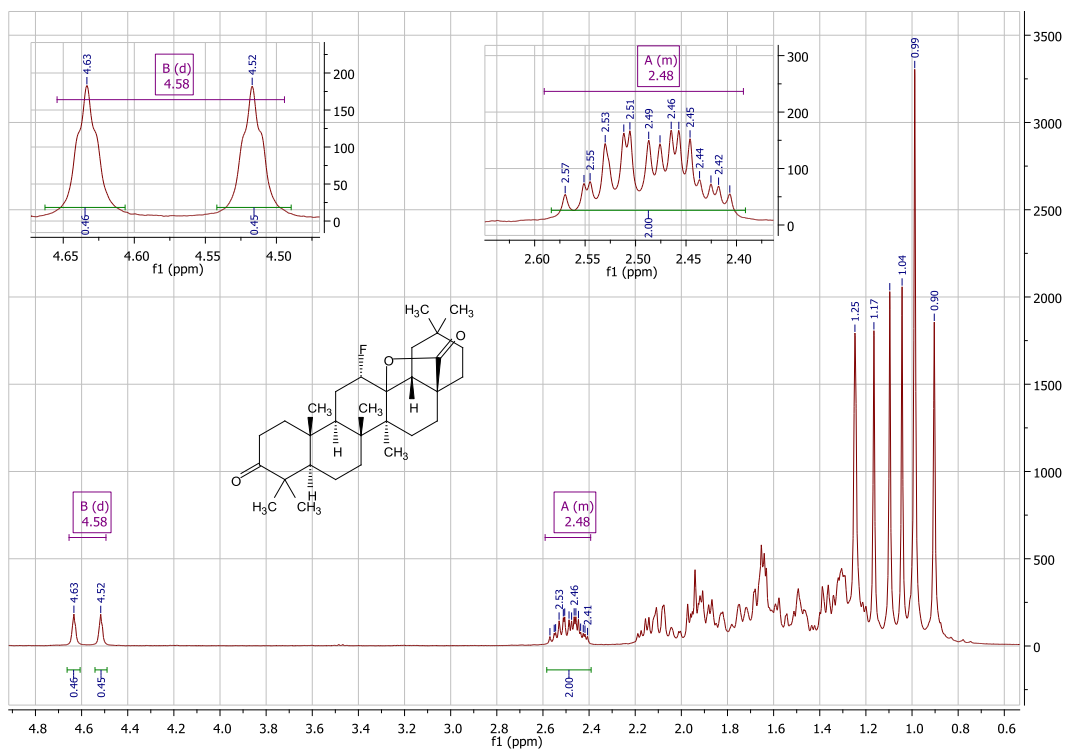


Figura 39: Espectro RMN ¹H de 10

H	Sinal (δ, ppm)	Tipo	Forma
12	4.58 (<i>J</i> = 46.6, 2.6 Hz)	dt	H-C-F
2	2.48	m	CH ₂

Tabela 6: Seleção de sinais RMN ¹H de 10

Resultados e conclusões

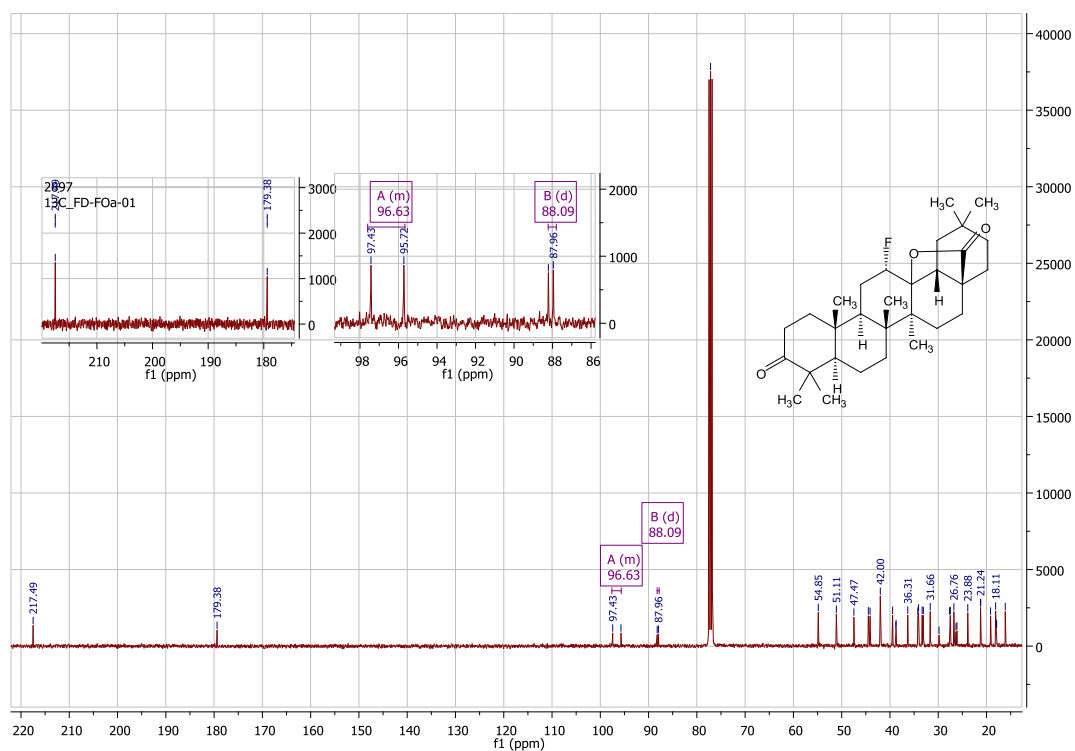


Figura 40: Espectro RMN ^{13}C de **10**

C	Sinal (δ , ppm)	Forma
3	217,49	C=O
28	179,38	lactona
12	96,63 ($J = 171,4 \text{ Hz}$)	C-F
13	88,09 ($J = 25,80 \text{ Hz}$)	Quaternário

Tabela 7: Seleção de sinais RMN ^{13}C de **10**

2.4.2 Síntese de 3 β -(1-propan-1-carboniloxi)-12 α -fluor-olean-13,28 β -olido

Observando as figuras 41 e 42 podemos afirmar que a síntese de **11** foi conseguida com sucesso, tendo-se obtido um rendimento de cerca de 62%. Pode identificar-se o composto **11** pelo aparecimento de quatro novos sinais: o desvio do sinal de H3 (δ 3.22, dd, J = 11.3, 4.3 Hz, 1H) para valores mais elevados devido à introdução do grupo éster (δ 4.51, t) que surge sobreposto com um dos sinais de H12, o que torna difícil determinar o seu acoplamento e integração de forma mais precisa; o aparecimento do sinal do protão do carbono mais próximo do grupo éster na cadeia butírica (δ 2.28, t, J = 7.4 Hz, 1H) e os dois sinais dos protões dos carbonos sucessivamente mais afastados deste (δ 1.68, m; δ 0.95, t, J = 7.4 Hz, 3H).

Estes espectros dão a indicação de estarmos na presença de um só produto, com a zona dos desvios químicos dos grupos metilo C23-C30 a apresentarem apenas 7 sinais de uma forma clara e sem surgirem sinais semelhantes de menor intensidade.

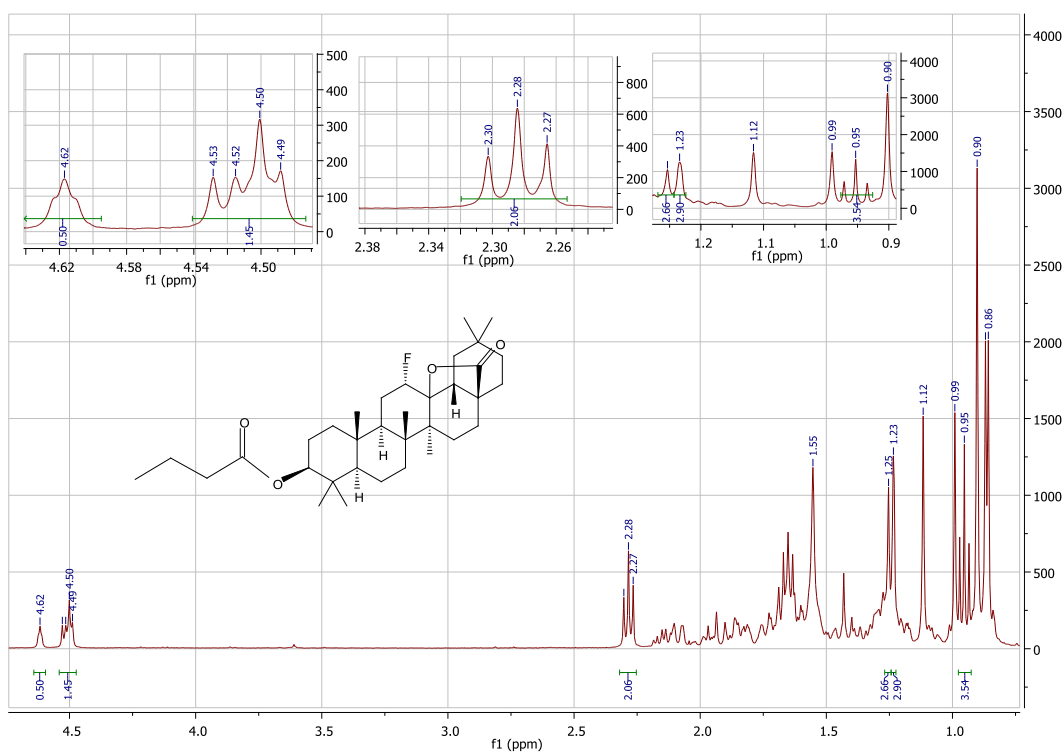


Figura 41: Espectro RMN ¹H de **11**

Resultados e conclusões

H	Sinal (δ , ppm)	Tipo	Forma
12	4.56 ($J = 46.6, 2.6$ Hz)	dt	H-C-F
3	4.51	t	H-C-Éster
32	2.28 ($J = 7.4$ Hz)	t	CH ₂ -C(O)O
33	1.68	m	CH ₂
34	0.95	t	CH ₃

Tabela 8: Seleção de sinais RMN ¹H de **11**

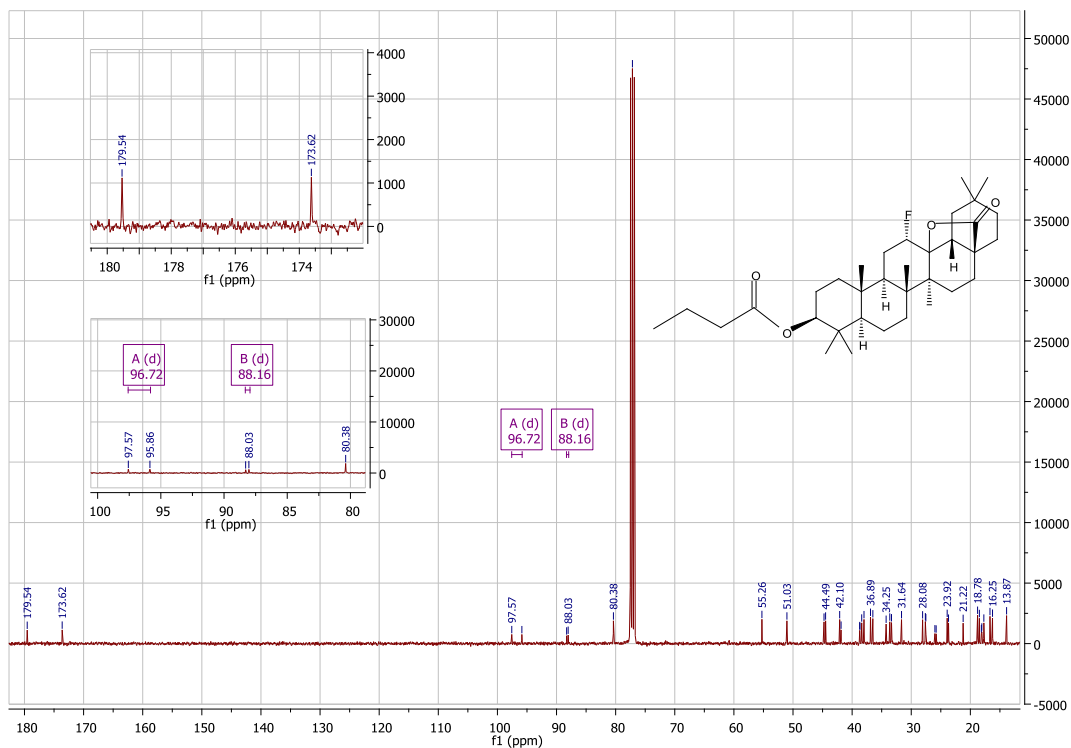


Figura 42: Espectro RMN ¹³C de **11**

C	Sinal (δ , ppm)	Forma
28	179,54	lactona
30	173.62	C(O)O
12	96,72 ($J = 171,4$ Hz)	C-F
13	88,16 ($J = 25,80$ Hz)	Quaternário
3	80.38	C-O-Éster
18	51,04	C-H

Tabela 9: Seleção de sinais RMN ^{13}C de **11**

2.4.3 Síntese de 3β -(fenilcarboniloxi)- 12α -fluor-olean- $13,28\beta$ -olido

A síntese de **12** foi conseguida com sucesso, embora o processo não tenha sido afinado o processo de purificação para além do que foi feito, pelo que se apresenta o espectro do produto o mais purificado quanto foi possível.

Podem observar-se claramente os sinais dos protões do anel aromático, identificando-se três tipos de sinais distintos que correspondem a três tipos de protões que se formam neste grupo conforme o plano de simetria que divide o plano do anel benzóico em duas metades idênticas e que passa pelo carbono que se encontra ligado à porção éster. Identificam-se também H12 e um novo sinal com desvio químico próximo deste (δ 4.75, dd, $J = 11.2, 5.0$ Hz, 1H) e que se atribui a H3, sendo que este passa para posições de desvio químico mais desblindadas quando comparado com o sinal de H3 de **8** pela conversão do grupo hidroxilo em éster. A região dos grupos metilo torna-se difícil de atribuir sem análise adicional por outras técnicas RMN e eventualmente não só. A região dos protões do anel aromático é de possível identificação proporcional mas de difícil integração, uma vez que atendendo às proporções se verifica que existe um excesso de anidrido benzóico. A atribuição foi feita conforme a figura **43** assim indica.

Resultados e conclusões

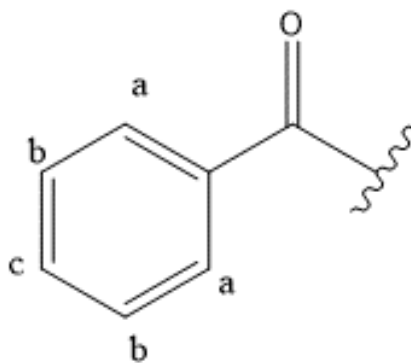


Figura 43: Esquema de atribuição dos sinais do anel aromático de **12**

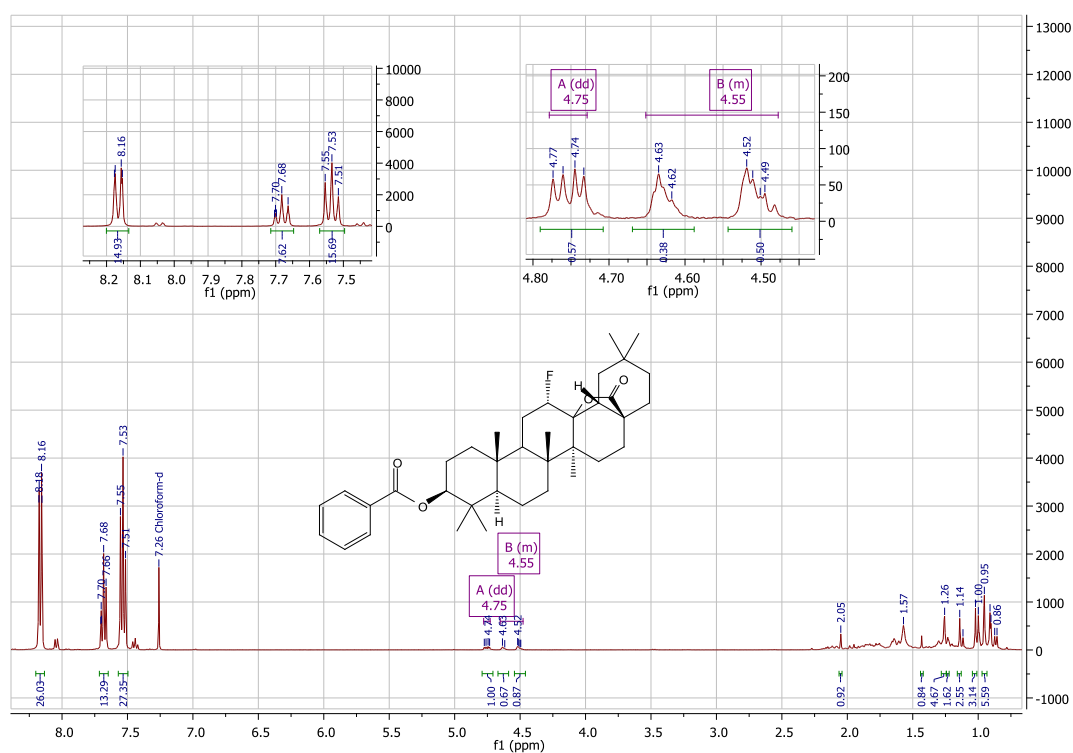


Figura 44: Espectro RMN ^1H de **12**

H	Sinal (δ , ppm)	Tipo	Forma
a	8,17	d	H-C
c	7,67	t	H-C
b	7,53	t	H-C
12	4.55 ($J = 46.6, 2.6$ Hz)	dt	H-C-F
3	4.75 ($J = 11.2, 5.0$ Hz)	dd	H-C-Éster

Tabela 10: Seleção de sinais RMN ^1H de **12**

2.4.4 Breves conclusões

Pode afirmar-se que os derivados de **8** foram sintetizados com sucesso, pois o rendimento da maioria foi bastante satisfatório e os seus espectros não dão a indicação de haver uma mistura de produtos. Contudo, no que diz respeito a **12**, o processo aparenta ter sido realizado com sucesso, tendo-se gasto **8** antes de gastar o anidrido benzóico. Desta feita, em tentativas posteriores, sugiro a diminuição da quantidade deste reagente.

Paralelamente, sugiro a melhoria do processo de purificação com um processo de lavagem que recorra a um outro solvente que permita uma melhor extração do reagente em excesso.

No geral, esta etapa do trabalho pretendia sintetizar alguns derivados do composto fluorado para que possam ser trabalhados posteriormente não só em termos de aferição das melhores condições de síntese como também para que possam ser estudados, eventualmente, quanto à sua atividade biológica. Nesse aspeto, penso que este objetivo foi cumprido.

Capítulo 3

Conclusões

Observando os resultados que aqui foram explanados, posso concluir em primeiro lugar que a síntese do ácido maslínico de uma forma que permita obtê-lo na sua forma pura e com bons rendimentos revelou-se um trabalho relativamente complexo por variados motivos. Embora não tenha sido possível chegar a uma das finalidades pretendida nesta via de trabalho, que era a obtenção do ácido maslínico, foi possível mostrar não só que a via disponível na literatura possui alguns pontos que merecem bastante atenção e que à primeira vista aparentavam ser de tratamento fácil e rápido como também que existem alternativas a essa via de síntese que, englobando apenas mais um passo do que o proposto na literatura, se revelam como sendo possível de realizar. Enquanto que no primeiro caso, não foram encontradas reações de hidroxilação deste tipo de compostos reportadas na literatura nas condições apresentadas no artigo que foi seguido para além do próprio, no segundo caso existem já vários exemplos reportados e experiência prévia no grupo; tal fato leva-me a concluir que o insucesso dessa via de síntese se prendeu essencialmente com a desativação das amostras de m-CPBA que existiam disponíveis do que com a impossibilidade de realizar a reação apresentada.

Em segundo lugar, posso afirmar que os resultados obtidos com a fluoração do ácido oleanólico revelaram-se um sucesso, observando-se uma melhoria na proporção do isómero 12 α -fluorado obtida nesta via de síntese, a separação e purificação com bom rendimento de um dos compostos e o esclarecimento inequívoco do isómero que se obteve em maior quantidade nas condições exploradas, de tal forma que passou a ser viável a separação dos isómeros por coluna cromatográfica e conseqüente exploração de síntese de derivados de α -fluorolactonas do ácido oleanólico.

Contudo, este passo poderá eventualmente ser melhorado, nomeadamente através do estudo de outros solventes em questão para melhor compreender qual o efeito efetivo que eles estão a ter no rendimento do processo, a outras temperaturas e proporções de solventes, e quais os fenómenos que promovem alterações na dissolução e no contato entre os reagentes, se promovem a reação por alterações nas propriedades físico-químicas do meio, como a constante dipolar do meio, o pH, etc, podendo inclusivé descobrir-se que existem solventes ou misturas de solventes ou até proporções diferentes que permitam obter uma maior proporção do isómero α . Apesar disso, parece-me que um importante passo foi dado nesse sentido.

Em terceiro lugar, gostaria de referir que embora se encontrem aqui descritos três derivados do 3 β -hidroxi-12 α -fluor-olean-13,28 β -olido cuja síntese não envolve passos muito complexos, estes compostos são completamente novos. Esta síntese foi realizada para que se pudesse, no tempo que ainda se dispunha, obter ainda alguns derivados purificados com alguma caracterização espectral que os definissem de forma razoável. Creio haver muito potencial nesta

metodologia de fluoração na obtenção de derivados α , bem como na melhoria do processo de síntese *per se*.

O trabalho está longe de estar concluído, faltando um trabalho mais aprofundado de otimização da via de síntese que passe pela alteração das condições de temperatura e pelo teste com outros solventes, bem como o processo de separação poderá ser passível de melhorias. Falta também explorar a via de síntese do ácido maslínico e verificar se as condições de fluoração apresentadas se traduzem em resultados similares em compostos da série oleanano.

Capítulo 4

Secção experimental

Os espectros ^1H , ^{13}C , DEPT-135, HMQC, HMBC, COESY e NOESY foram obtidos num espectrómetro Bruker Avance III 400 MHz. Todos os espectros foram obtidos em δ (ppm) recorrendo ao clorofórmio deuterado e aos seus sinais de δ 7.26 (^1H NMR) e δ 77.00 (^{13}C NMR) como padrão interno. Os desvios químicos são fornecidos em ppm e as constantes de acoplamento (J) em hertz (Hz).

Todas as análises cromatográficas por TLC foram realizadas com recurso a Kiesel gel 60HF254/kiesel gel 60G e as análises cromatográficas de coluna com recurso a Kieselgel 60 (230-400 mesh, Merck). O ácido oleanólico, o ácido ursólico, o Selectfluor, o THF, o dioxano, o nitrometano, o acetonitrilo, o DMF, o CH_3I e o tribrometo de piridínio foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. Os solventes utilizados no *work-up* foram obtidos da VWR Portugal e eram de purificação a nível analítico. O bicarbonato de potássio, o cloreto de sódio, o bicarbonato de sódio e o sulfito de sódio foram comprados da Merck Co.

No caso das vias de síntese em que o resultado não foi satisfatório e nas quais se efetuaram algumas alterações, bem como daquelas que não foram realizadas mas previstas, apresenta-se aqui o procedimento original segundo descrito na literatura, encontrando-se esses processos identificados com a indicação da bibliografia de onde foi retirado. A solução *brine* que surge várias vezes referida consiste numa solução de lavagem preparada previamente de uma solução aquosa de NaCl 10%; a solução de NaHCO_3 é também uma solução preparada previamente, de solução aquosa de NaHCO_3 a 10%. Em todas as reacções abaixo descritas, foi utilizado um método de revelação de ácidos carboxílicos e aldeídos que envolvia uma solução 10% H_2SO_4 em H_2O , que com aquecimento apresenta manchas com cores variadas, mas geralmente variações do vermelho.

Ácido 3-oxoolean-12-en-28-óico (1): A 1.0760 g de **OA** (2.37 mmol) em acetona (30 mL) adicionou-se lentamente reagente de Jones (1 mL) preparado segundo a literatura⁴⁴, a 0°C tendo ficado em agitação durante 30 minutos. Depois adicionou-se MeOH com seguimento por tira de pH até se obter um pH de cerca de 7, durante 30 minutos em agitação. Após este período, removeram-se os solventes por filtração a pressão reduzida com recurso a celite e evaporou-se o solvente a pressão reduzida. Obteve-se 1.0349 g de **1** (96% do produto de partida), sem passar por processo de separação. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 5.30 (t, J = 3.4 Hz, 1H, H12), 2.82 (dd, J = 13.7, 4.0 Hz, 1H, H18), 2.54 (m, J = 16.0, 11.2, 7.3 Hz, 1H, H2 α ou β), 2.36 (m, J = 15.9, 6.7, 3.6 Hz, 1H, H2 α ou β).

Secção experimental

Ácido 2ξ-bromo-3-oxoolean-12-en-28-óico (2): A 0,519 g (1.10 mmol) de **1** em ácido acético (13 mL) adicionou-se tribrometo de piridínio (400 mg, 1.13 mmol, 90%) à t.a. com adições em várias porções durante 1 hora, tendo a reação ficado em agitação durante 2 horas. Após este período, arrefeceu-se até os 0°C e fez-se extração com éter dietílico (2 x 40 mL) e lavagem com H₂O (3x 30 mL), NaHCO₃ 10% (3x30 mL) e NaCl 10% (3 x 30 mL). A solução etérea foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e evaporada a pressão reduzida, tendo-se obtido **2** com um rendimento de crude de 80% (0.487 mg). H¹ RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.30 (t, J = 3.4 Hz, 1H, H₁₂), 5.08 (t, 1H, H₂), 2.82 (dd, J = 13.7, 4.0 Hz, 1H, H₁₈), 2.56 (dd, 1H, H₁ α ou β).

Ácido 2α-hidroxi-3-oxoolean-12-en-28-óico (3): Este procedimento seria realizado da mesma forma como está descrita na referência **44**; foram efetuadas as modificações que foram descritas no capítulo **2**.

Ácido 2-hidroxi-3-oxoolean-1,12-dien-28-óico (4): A uma solução de **1** (51.5 mg, 0.113 mmol) em t-BuOH (4.4 mL) adicionou-se t-BuOK (444.2 mg, 3.96 mmol) a 40°C e na presença de ar atmosférico, tendo permanecido a reagir durante 40 minutos. Após este período, realizou-se uma lavagem com HCl (1x 10 mL HCl 0.4 M) e com *brine* (1x 20 mL). O produto final (31.3 mg, 59%) surge como um sólido amarelado. H¹ RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 6.34 (s, 1H, H₁), 5.94 (s, 1H, OH (2)), 5.34 (t, J = 3.4 Hz, 1H, H₁₂), 2.82 (dd, J = 13.7, 4.0 Hz, 1H, H₁₈).

Ácido maslínico (AM): Este procedimento seria efetuado segundo a literatura assim o descreve^{44,59}, sendo que os passos sintéticos seriam como já foram descritas no capítulo **2**. A via descrita na primeira referência corresponde ao método de síntese via NaOH e a segunda ao método via m-CPBA, com as modificações às vias que foram descritas no capítulo **2**.

3β-hidroxi-olean-12-en-28-oato de metilo (5): A uma solução de **1** (348.7 mg, 0.77 mmol) em DMF (7 mL) adicionou-se CH₃I (0,1 mL, 1.61 mmol) e K₂CO₃ (426.7 mg, 3.09 mmol) à T.A. A solução esteve em agitação a essa temperatura durante uma hora. Após esse período, o produto foi diluído em AcOEt (40 mL) e realizou-se uma extração com H₂O (3x 20 mL) e uma lavagem com *Brine* (20 mL), seguido de secagem com Na₂SO₄ anidro e filtração, com posterior evaporação a pressão reduzida do solvente. O produto final surgiu sob a forma de um sólido esbranquiçado, com a permanência de K₂CO₃ no produto final. H¹ RMN (400

MHz, CDCl₃): δ = 5.30 (t, J = 3.4 Hz, 1H, H12), 3.63 (s, 3H, O-CH₃ (28)), 2.87 (dd, J = 13.7, 4.0 Hz, 1H), 2.54 (m, J = 16.0, 11.2, 7.3 Hz, 1H, H2 α ou β), 2.36 (m, J = 15.9, 6.7, 3.6 Hz, 1H, H2 α ou β).

2 α -hidroxi-3-oxoolean-12-en-28-oato de metilo (6)⁶⁰: A uma solução de **5** (20.8 mg, 0.0444 mmol) em CH₂Cl₂ (2 mL), MeOH (4 mL) e H₂SO₄ (0.1 mL de solução de H₂SO₄ 1.71 M) adicionou-se m-CPBA (20,5 mg, 77%). A mistura ficou a reagir durante 21h a uma temperatura entre 0°C e a t.a (*overnight*). Ao fim deste período adicionou-se uma solução aquosa de NaHSO₄ (3.3 mg em 10 mL H₂O) e deixou-se em agitação durante 30 minutos. Após remoção dos solventes em vácuo a 35°C, acidificou-se o meio com HCl (20 mL solução HCl 37%) procedeu-se à extração em AcOEt (3x 40 mL), seguido de uma lavagem com NaHCO₃ (3x20 mL) e *brine* (3x 20 mL), secagem com Na₂SO₄ anidro, filtração e remoção dos solventes a vácuo. O produto resultante apresentou uma cor amarelada e uma consistência oleosa. ¹H NMR (400 MHz CDCl₃): δ 5.28 (t, J = 3.4 Hz, 1H, H12, 1H, 12), 4.53 (m, 1H, J =18.93 H2), 3.62 (3H s COCH₃), 2.86 (dd, J = 13.7, 4.0 Hz, H18), 1.25 (s, 3H), 1.15 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 1.09 (s, 3H), 0.91 (s, 3H), 0.88 (s, 3H), 0.77 (s, 3H).

3 β -hidroxi-12 α -fluor-olean-13,28 β -olido (8): A uma solução de **AO** (107.9 mg, 0.236 mmol) em CH₃CN (1 mL), CH₃NO₂ (1 mL) e dioxano (2 mL) adicionou-se SelectFluor[®] (238.6 mg, 0.674 mmol) a 80°C. A reação esteve em agitação a essa temperatura durante 26 horas e 30 minutos. No final deste período de tempo, adicionou-se 20 mL de H₂O e realizou-se uma extração em Et₂O (3x 40 mL), seguida de lavagem com solução de *brine* (3x 20 mL), seguida de secagem com Na₂SO₄ anidro, filtração a pressão reduzida e evaporação dos solventes a pressão reduzida. O produto em bruto foi obtido como um sólido ligeiramente amarelado (102.1 mg, 91%). Após coluna cromatográfica (AcOEt/ Éter Petróleo 40:60 (1:5)) obteve-se um produto branco (50 mg, 44,7 %). ¹H NMR (400 MHz CDCl₃): δ 4.55 (dt, J = 46.6, 2.6 Hz, 1 H, H12), 3.22 (dd, J = 11.4, 4.7 Hz, 1H, H3), 1.23 (s, 3H, H27), 1.11 (s, 3H, H26=), 0.88 (s, 3H, H25); ¹³C NMR (100 MHz CDCl₃): δ 179.51 (C28), 96.85 (C12, J = 171.4 Hz), 88.16 (C13, J = 15.80 Hz), 78.90 (C3), 51.04 (C18), 33.35 (C29), 28.13 (C23), 23.92 (C30), 18.46 (C26), 18.16 (C25), 18.07 (C27), 16.19 (C24).

3-oxo-12 α -fluor-olean-13,28 β -olido (10): A uma solução de **8** (42.5 mg, 0.0895 mmol) em acetona (2 mL) adicionou-se lentamente reagente de Jones (1 mL) preparado segundo a literatura⁴⁴, a 0°C, durante 30 minutos. Depois adicionou-se MeOH com seguimento por tira de pH até se obter um pH de cerca de 7, durante 30 minutos em agitação. Após este período, remo-

Secção experimental

veram-se os solventes por filtração a pressão reduzida com recurso a celite e evaporou-se o solvente a pressão reduzida. Obteve-se **10** como um produto esbranquiçado (41.9 mg, 0.0886 mmol, 99%). ^1H NMR (400 MHz CDCl_3): δ 4.58 (dt, $J = 46.6, 2.6$ Hz, 1 H, H12), 2.59-2.39 (m, 2H, H2), 1.23 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 0.88 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz CDCl_3): 217.49 (C3), 179.38 (C28), 96.63 (C12, $J = 171.4$ Hz), 99.09 (C13, $J = 25.9$ Hz).

3 β -(1-propan-1-carboniloxi)-12 α -fluor-olean-13,28 β -olido (11): A uma solução de **8** (47.6 mg, 0.1 mmol) em THF (3 mL), adicionou-se DMAP (5 mg, 0.0409 mmol) e anidrido butírico (0.1 mL, 6.13 mmol) à t.a. e deixou-se em agitação durante 1 hora. Após esse período, adicionaram-se 30 mL HCl (10%) e realizou-se uma extração em Et_2O (3x 50 mL), seguida de lavagens com NaHCO_3 (3x 40 mL) e H_2O (3x 40 mL). O produto foi então seco com Na_2SO_4 anidro, filtrado e foram evaporados os solventes a pressão reduzida. O produto originado apresentava-se com uma coloração esbranquiçada (36.3 mg, 62%). ^1H NMR (400 MHz CDCl_3): δ 4.53 (dt, $J = 46.6, 2.6$ Hz, 1 H, H12), δ 4.51 (t, 1H, H3), δ 2.28 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H32), δ 1.68 (m, H33), δ 0.95 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, H34).

3 β -(1-fenilcarboniloxi)-12 α -fluor-olean-13,28 β -olido (12): A uma solução de **8** (47.6 mg, 0.1 mmol) em THF (3 mL), adicionou-se DMAP (5 mg, 0.0409 mmol) e anidrido benzóico (237.542 mg, 1.05 mmol) à t.a. e deixou-se em agitação durante 1 hora. Após esse período, adicionaram-se 30 mL HCl (10%) e realizou-se uma extração em Et_2O (3x 50 mL), seguida de lavagens com NaHCO_3 (3x 40 mL) e H_2O (3x 40 mL). O produto foi então seco com Na_2SO_4 anidro, filtrado e foram evaporados os solventes a pressão reduzida. ^1H NMR (400 MHz CDCl_3): δ 4.75 (dd, $J = 11.2, 5.0$ Hz, 1H), δ 4.55 (dt, $J = 46.6, 2.6$ Hz, 1 H, H12).

Capítulo 5

Bibliografía

-
- [1] Lednicker, D., *Steroid Chemistry at a glance*, 1ª Edição, 2011.
- [2] World Heal. Organ. Geneva, International Agency for Research on Cancer, *World Cancer Report*, 2014, Lyon, France.
- [3] Wiemann, J. *et al*, Targeting cancer cells with oleanolic and ursolic acid derived hydroxamates, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2016, **26**, 907-909.
- [4] Li, Y. *et al*, Synthesis and anticancer activities of Glycyrrhetic acid derivatives, *Molecules*, 2016, **21**, 199.
- [5] Yadav, V.R. *et al*, Targeting Inflammatory Pathways by Triterpenoids for Prevention and Treatment of Cancer, *Toxins*, **2**, 2010, 2428-2466.
- [6] Gribble, W. *et al*, Synthetic Oleanane and Ursane Triterpenoids with Modified Rings A and C: A Series of Highly Active Inhibitors of Nitric Oxide Production in Mouse Macrophages, *J. Med. Chem.*, 2000, **43**, 4233-4246.
- [7] Bishayee, A. *et al*, Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer, *Front Biosci.*, 2011, **16**, 980-996.
- [8] Hsu, Y.L. *et al*, Involvement of P53, nuclear factor kappaB and Fas/Fas ligand in induction of apoptosis and cell cycle arrest by saikosaponin d in human hepatoma cell lines., *Cancer Lett.*, 2004, **213**, 213-221.
- [9] Hwang, Y.H. *et al*, Momordin I, an inhibitor of AP-1, suppressed osteoclastogenesis through inhibition of NF-kappaB and AP-1 and also reduced osteoclast activity and survival, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, **337**, 815-823.
- [10] Jung, H.W. *et al*, Celastrol inhibits production of nitric oxide and proinflammatory cytokines through MAPK signal transduction and NF-kappaB in LPS-stimulated BV-2 microglial cells., *Exp. Mol. Med.*, 2007, **39**, 715-721.
- [11] Kim, J.H. *et al*, Induction of apoptosis by momordin I in promyelocytic leukemia (HL-60) cells, *Anticancer Res.*, 2002, **22**, 1885-1889.
- [12] Pan, M.R. *et al*, Tubocapsanolide A inhibits transforming growth factor-beta-activating kinase 1 to suppress NF-kappaB-induced CCR7, *J. Biol. Chem.*, 2009, **284**, 2746-2754.
- [13] Santos, R. *et al*, Novel semisynthetic derivatives of betulin and betulinic acid with cytotoxic activity, *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, **17**, 6241-6250.

Bibliografia

- [14] Shishodia, S. *et al*, Ursolic acid inhibits nuclear factor-kappaB activation induced by carcinogenic agents through suppression of I κ B kinase and p65 phosphorylation: correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1, *Cancer Res.*, 2003, **63**, 4375-4383.
- [15] Shyu, K.G. *et al*, Saikosaponin C induces endothelial cells growth, migration and capillary tube formation, *Life Sci.*, 2004, **76**, 813-826.
- [16] Siu, F.M. *et al*, Proteomic and transcriptomic study on the action of a cytotoxic saponin (polyphyllin D): induction of endoplasmic reticulum stress and mitochondria-mediated apoptotic pathways, *Proteomics*, 2008, **8**, 3105-3117.
- [17] Chen, H. *et al*, Evolution in medicinal chemistry of ursolic acid derivatives as anti-cancer agents, *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, **92**, 648-655.
- [18] Chen, J.C. *et al*, Saikosaponin-A induces apoptotic mechanism in human breast MDA-MB-231 and MCF7 cancer cells, *Am. J. Chin. Med.*, 2003, **31**, 363-377.
- [19] Couch, R.D. *et al*, Studies on the reactivity of CDDO, a promising new chemopreventive and chemotherapeutic agent: implications for a molecular mechanism of action, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005, **15**, 2215-2219.
- [20] Deeb, D. *et al*, Oleanane triterpenoid CDDO-Me inhibits growth and induces apoptosis in prostate cancer cells through a ROS-dependent mechanism, *Biochem. Pharmacol.*, 2010, **79**, 350-360.
- [21] Zhao, C. *et al*, Design, synthesis, and biofunctional evaluation of novel pentacyclic triterpenes bearing O-[4-(1-piperazinyl)-4-oxo-butyl] moiety as antiproliferative agents, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2015, **25**, 20, 4500-4504.
- [22] Nathan, C., Points of control in inflammation, *Nature*, 2002, **420**, 846-852.
- [23] Coussens, L.M. *et al*, Inflammation and cancer, *Nature*, 2002, **420**, 2195-2224.
- [24] Fulda, S. *et al*, Signaling through death receptors in cancer therapy, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2004, **4**, 327-332.
- [25] Haridas, V. *et al*, Avicinylation (thioesterification): a protein modification that can regulate the response to oxidative and nitrosative stress, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2005, **102**, 10088-10093.
- [26] Wu, C.C. *et al*, Prismiterin induces caspase-dependent apoptosis in MDA-MB-231 cells via direct effects on mitochondria, *Mol. Cancer Ther.*, 2005, **4**, 1277-1285.

- [27] Haridas, V. *et al*, A family of triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benthams), inhibit activation of nuclear factor-kappaB by inhibiting both its nuclear localization and ability to bind DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2001, **98**, 11557-11562.
- [28] Gao, X. *et al*, CDDO-Me inhibits tumor growth and prevents recurrence of pancreatic ductal adenocarcinoma, *Int. J. Onc.*, 2015, **47**(6), 2100-2016.
- [29] Elsayed, H. *et al*, Discovery, optimization, and pharmacophore modeling of oleanolic acid and analogues as breast cancer cell migration and invasion inhibitors through targeting Brk/Paxillin/Rac1 axis, *Chem. Biol. Drug Des.*, 2015, **85**, 2, 231-243.
- [30] Parikh, R.N. *et al*, Oleanane triterpenoids in the prevention and therapy of breast cancer: current evidence and future perspectives, *Phytochem. Rev.*, 2014, **13**, 793-810.
- [31] Rufino-Palomares, E.E. *et al*, Maslinic acid, a triterpenic anti-tumoural agent, interferes with cytoskeleton protein expression in HT29 human colon-cancer cells, *Jour. Proteomics*, 2013, **83**, 15-25.
- [32] Noujaim, D. *et al*, N-Myc and Bcl-2 coexpression induces MMP-2 secretion and activation in human neuroblastoma cells, *Oncogene*, 2002, **21**, 4549-4557.
- [33] Shanmugam, M.K. *et al.*, Targeted inhibition of tumor proliferation, survival, and metastasis by pentacyclic triterpenoids: Potential role in prevention and therapy of cancer, *Cancer Lett.*, 2012, **320**, 158-170.
- [34] Liu, J.J. *et al*, Boswellic acids trigger apoptosis via a pathway dependent caspase-8 activation but independent on Faz/Faz ligand interaction in colon cancer HT-29 cells, *Carcinogenesis*, 2002, **23**, 2087-2093.
- [35] Pang, X. *et al.*, Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid inhibits prostate tumor growth by suppressing vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis, *Cancer Res.*, 2009, **93**, 417-425.
- [36] Shammugan, M.K. *et al*, Ursolic acid in cancer prevention and treatment: Molecular targets, pharmacokinetics and clinical studies, *Biochem. Pharm.*, **85**, 2013, 1579-1587.
- [37] Hiramatsu, R. *et al*, Betulinic acid and oleanolic acid, natural pentacyclic triterpenoids, interfere with N-linked glycanmodifications to intercellular adhesion molecule-1, but not its intracellular transport to the cell surface, *Eur. J. Pharmacol.*, 2015, **767**, 126-134.
- [38] Urban, M. *Et al*, Synthesis of A-Seco Derivatives of Betulinic Acid with Cytotoxic Activity, *J. Nat. Prod.*, 2004, **67**, 1100-1105.
- [39] Pollier, J. *et al*, Oleanolic acid, *Phytochem.*, 2012, **77**, 10-15.

Bibliografia

- [40] Bednarczyk-Cwynar, B. *et al*, Oleanolic Acid A-lactams Inhibit the Growth of HeLa, KB, MCF-7 and Hep-G2 Cancer Cell Lines at Micromolar Concentrations, *Anti-cancer agents in Med. Chem.*, 2016, **16**(5), 579-592.
- [41] Wu, J. *et al*, SZC015, a synthetic oleanolic acid derivative, induces both apoptosis and autophagy in MCF-7 breast cancer cells, *Chemico-Biological Interactions*, **244**, 2016, 94-104.
- [42] Gao, X. *et al*, CDDO-Me inhibits tumor growth and prevents recurrence of pancreatic ductal adenocarcinoma, *Int. J. Onc.*, 2015, **47**(6), 2100-2016.
- [43] To, C. *et al*, Comparison of oleanane triterpenoids and dimethyl fumarate in lung cancer, *Proceedings: AACR 106th Annual Meeting*, 2015, **75** (15 Suppl.).
- [44] Sommerwerk *et al*, Convenient and chromatography-free partial synthesis of maslinic acid and augustic acid, *Tetrahedron Lett.*, 2014, **55**, 5156-5158.
- [45] Fukumitsu, S. *et al*, Anti-inflammatory and anti-arthritic effects of pentacyclic triterpenoids maslinic acid through NF-kB inactivation, *Mol. Nutr. Food Res*, 2016, **60**, 399-409.
- [46] Reyes-Zurita, F.J. *et al*, Maslinic Acid, a Natural Triterpene, Induces a Death Receptor-Mediated Apoptotic Mechanism in Caco-2 p53-Deficient Colon Adenocarcinoma Cells, *PLoS ONE*, 2016, **11**(1).
- [47] Siewert, B. *et al*, Towards cytotoxic and selective derivatives of maslinic acid, *Bioorg. Med. Chem.*, 2014, **22**(1), 594 -615.
- [48] Wen, X. *et al*, Pentacyclic triterpenes. Part 2: Synthesis and biological evaluation of maslinic acid derivatives as glycogen phosphorylase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006, **16**, 722-726.
- [49] Lorazo-Mena, G. *et al*, Maslinic acid, a natural phytoalexin-type triterpene from olives – a promising nutraceutical ?, *molecules*, 2014, **19** (8), 11538-11559.
- [50] Patlolla, M.R. J. *et al.*, Triterpenoids for Cancer Prevention and Treatment: Current Status and Future Prospects, *Current Pharm. Biotechnol.*, Bentham Science Publishers, 2012, **13**, 147-155.
- [51] Liu, J. Pharmacology of oleanolic and ursolic acid, *J. Eth.*, 1995, **49**, 57-68.
- [52] Salvador, J.A.R. *et al*, Ursane-type pentacyclic triterpenoids as useful platforms to discover anticancer drugs, *Nat. Prod. Rep.*, 2012, **29**, 1463-1479.
- [53] Bégué, J. *et al*, Recent advances (1995–2005) in fluorinated pharmaceuticals based on natural products, *J. Fluor. Chem.*, 2006, **127**, 992-1012.

- [54] Sun, H. *et al.*, Structure-activity relationships of oleanane- and ursane-type triterpenoids, *Bot. Stud.*, 2006, **47**, 339-368.
- [55] Siewert, B. *et al.*, The chemical and biological potential of C ring modified triterpenoids, *Eur. J. Med. Chem.*, 2014, **72**, 84-101.
- [56] Zhang, D. *et al.*, Betulinic Acid and its derivatives as potential antitumor agents, *Med. Res. Rev.*, 2015, **35**(6), 1127-1155.
- [57] Liebscher, G. *et al.*, *In vitro* anticancer activity of Betulinic acid and derivatives thereof on equine melanoma cell lines from grey horses and *in vivo* safety assessment of the compound NVX-207 in two horses, *Chem. Biol. Interact.*, 2016, **246**, 20-29.
- [58] Midzak, A. *et al.*, Structure-activity relationship (SAR) analysis of a family of steroids acutely controlling steroidogenesis, *Steroids*, 2012, **77**(13), 1327-1334.
- [59] Leal, A. *et al.*, Semisynthetic Ursolic acid fluorolactone derivatives inhibit growth with induction of p21waf1 and induce apoptosis with upregulation of NOXA and down-regulation of c-FLIP in cancer cells, *Chem. Med. Chem*, 2012, **7**, 1635-1646.
- [60] Leal, A., Preparation and biological evaluation of new triterpene derivatives of ursolic and oleanolic acids, *Dissertation presented to the Faculty of Pharmacy, University of Coimbra, to obtain the degree of Doctor of Philosophy in Pharmacy in the speciality of Pharmaceutical Chemistry*, 2012, FFUC.
- [61] Wen, X. *et al.*, Pentacyclic triterpenes. Part 2: Synthesis and biological evaluation of maslinic acid derivatives as glycogen phosphorylase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006, **16**, 722-726.
- [62] Banks, R.E., Selectfluor™ reagent F-TEDA-BF, in action: tamed fluorine at your service, *J. Fluor. Chem.*, 1998, **87**, 1-17.
- [63] Isanbor, C. *et al.*, Fluorine in medicinal chemistry: A review of anti-cancer agents, *J. Fluor. Chem.*, 2006, **127**, 303-319.
- [64] Smart, B., Fluorine substituent effects (on bioactivity), *J. Fluor. Chem.*, 2001, **109**, 3-11.
- [65] Zhou, C. *et al.*, An efficient approach for monofluorination via highly regioselective fluorohydroxylation reaction of 3-aryl-1,2-allenes with selectfluor, *Org. Lett.*, 2008, **10**, 581-583.
- [66] Gonçalves, B.M.F. *et al.*, Design, synthesis, and biological evaluation of novel asiatic acid derivatives as potential anticancer agents, *RSC Advances*, 2016, **6**(45), 39296-39309.

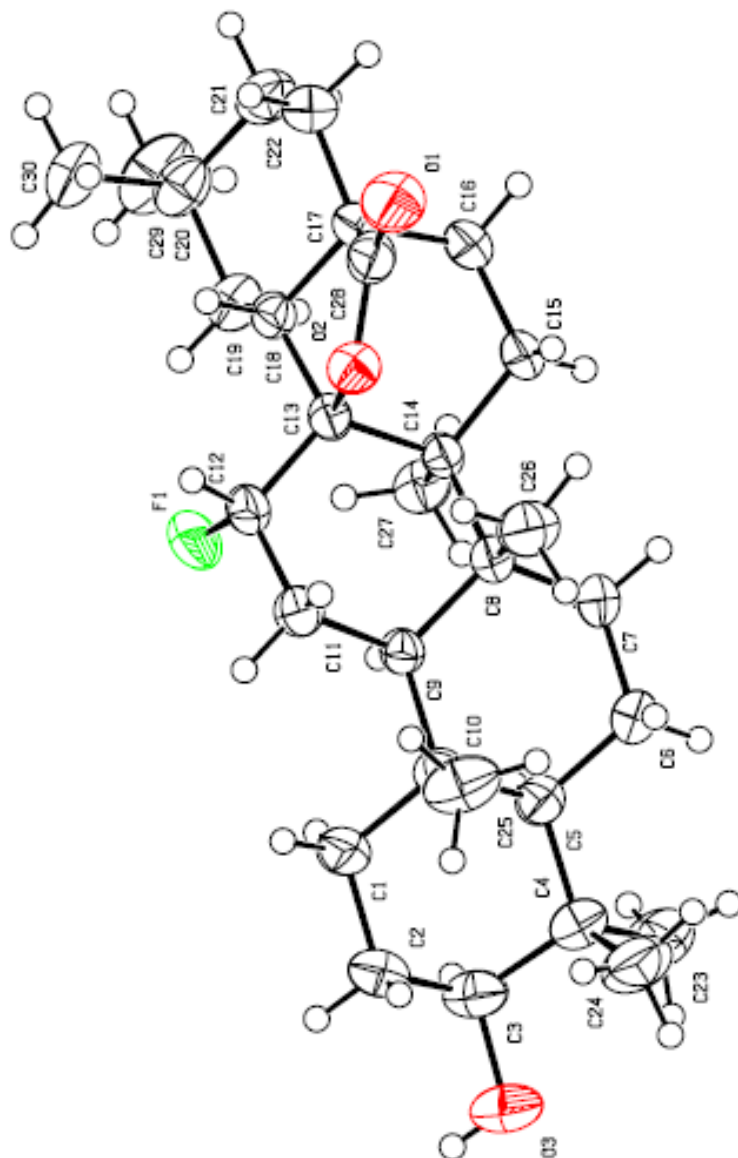
Bibliografia

- [67] Gonçalves, B.M.F. *et al*, Synthesis and anticancer activity of novel fluorinated asiatic acid derivatives, *Eur. J. Med. Chem.*, 2016, **114**, 101-117.
- [68] Gonçalves, B.M.F. *et al*, Synthesis and biological evaluation of novel asiatic acid derivatives with anticancer activity, *RSC Advances*, 2016, **6**(5), 3967-3985.
- [69] Faustino, A., Preparação de Novos Triterpenóides Semi-Sintéticos, *Dissertação de Mestrado em Química Farmacêutica Industrial, orientada pelo Professor Doutor Jorge António Ribeiro Salvador e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra*, 2015.
- [70] Alcántara-Flores, E. *et al*, Arbgentatin B inhibits proliferation of prostate and colon cancer by inducing cell senescence, *Molecules*, 2015, **20**, 21125-21137.
- [71] Seebacher, W. *et al*, Complete assignments of ¹H and ¹³C NMR resonances of oleanolic acid, 18a-oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives, *magn. resson. Chem.*, 2003, **41**, 636-638.
- [72] Tojo, G *et al*, Oxidation of alcohols to aldehydes and ketones, *Springler*, New York 2006, **1**.
- [73] Phenomenex catalog international, appendices, pg. 366.

Imagem de capa retirada de www.vectorstock.com (accedida a 18 de janeiro)

Anexo

Anexo



Anexo 1: Diagrama ORTEP de **8** ($R(5496; I > 2\Sigma) = 0.0383$;
átomos de H de tamanhos arbitrários)