



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CARLOS JOSÉ ALVES DA SILVA FILHO

**TRANSFORMAÇÃO QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS COMO ESTRATÉGIA
DE PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS: TRITERPENOS 3 β ,6 β ,16 β -TRI-
HIDROXILUP-20(29)-ENO ISOLADO DE *Combretum leprosum***

FORTALEZA

2020

CARLOS JOSÉ ALVES DA SILVA FILHO

TRANSFORMAÇÃO QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS COMO ESTRATÉGIA DE
PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS: TRITERPENO 3 β ,6 β ,16 β -TRI-
HIDROXILUP-20(29)-ENO ISOLADO DE *Combretum leprosum*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Jair Mafezoli.

Coorientador: Prof. Dr. Francisco G. Barbosa.

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S579t Silva Filho, Carlos José Alves da.
Transformação química de produtos naturais como estratégia de produção de compostos bioativos: triterpeno 3b,6b,16b-tri-hidroxilup-20(29)-eno isolado de *Combretum leprosum* / Carlos José Alves da Silva Filho. – 2020.
98 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2020.
Orientação: Prof. Dr. Jair Mafezoli.
Coorientação: Prof. Dr. Francisco Geraldo Barbosa.
1. *Combretum leprosum*. 2. 3b,6b,16b-tri-hidroxilup-20(29)-eno. 3. Derivados semissintéticos. I.
Título.
-

CARLOS JOSÉ ALVES DA SILVA FILHO

TRANSFORMAÇÃO QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS COMO ESTRATÉGIA DE
PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS: TRITERPENO 3 β ,6 β ,16 β -TRI-
HIDROXILUP-20(29)-ENO ISOLADO DE *Combretum leprosum*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovada em: 30/01/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jair Mafezoli (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Francisco Geraldo Barbosa (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª. Dra. Fátima Miranda Nunes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª. Dra. Mirna Marques Bezerra
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, aos meus irmãos e aos meus
melhores amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder forças para trilhar este árduo caminho e por me levar tão longe na carreira acadêmica.

A meus irmãos, Carla e Daniel, e à minha mãe, Ana, pela companhia tanto nos momentos difíceis quanto nos momentos felizes.

À minha namorada Ana Kely, pelo companheirismo durante este período final de mestrado e por ter me proporcionado ânimo e alívio das tensões do ambiente acadêmico.

Aos meus melhores amigos, Leandro e Gabriel, e aos meus companheiros e amigos participantes do meu grupo de pesquisa (Laboratório de Fitoquímica Aplicada - LABFITO), mestre André, Rodrigo, Safira, Karol, Sarah, grande Osmar, Giullia, Ismael e Augusto, pela amizade e pela ajuda.

Aos meus amigos do Clube da Química - CluQui, Stephani, Pedro Oribio, Harisson, Carla, Ricardo, Joan, João Francisco, Kayron, grande Ronald Leocadio, Marcos, Vitória, Nicolas e Diana, pelo apoio e por compartilharem com alegria as minhas conquistas.

Ao meu grande amigo Luciano, por ser uma pessoa tão singular e pela grande ajuda durante esse período de mestrado.

Ao Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica (LABS) e ao Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), que contribuíram com os resultados apresentados neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jair Mafezoli e ao Prof. Dr. Francisco Geraldo Barbosa pela excelente orientação, e a todos os meus professores da graduação e pós-graduação, que contribuíram grandemente para a minha formação.

RESUMO

A espécie *Combretum leprosum* Mart. (Cobretaceae), com ampla dispersão na região Nordeste do Brasil, é um arbusto popularmente conhecido como Mufumbo, Mofumbo ou Cipoaba. É amplamente utilizada na medicina popular como agente cicatrizante, sedativo, antidiarreico, expectorante, em erupções cutâneas e agente hemostático. A principal substância isolada de *C. leprosum* é o triterpeno $3\beta,6\beta,16\beta$ -tri-hidroxilup-20(29)-eno (CL-1), o qual possui diversas atividades biológicas, tais como leishmanicida, anti-inflamatória, antimicrobiana, antinociceptiva, cicatrizante e anticancerígena. Neste trabalho descreve-se o isolamento deste metabólito e a obtenção dos derivados semissintéticos desidratado (CL-P1), triacilado (CL-P2), diacilado (CL-P2A), oxidado (CL-P3), hidrogenado (CL-P5), hidrazona (CL-P6) e oxima (CL-P8 e CL-P9), bem como a avaliação da atividade citotóxica e antinociceptiva destes. Todos os compostos tiveram suas estruturas determinadas por métodos espectrométricos (EM, IV, RMN uni e bidimensionais). Os derivados CL-P1, CL-P2, CL-P2A, CL-P5, CL-P6, CL-P8 e CL-P9 são inéditos na literatura. Com exceção dos derivados acilados (CL-P2, CL-P2A) e oximas (CL-P8 e CL-P9), todos os demais tiveram a atividade citotóxica contra quatro linhagens de células tumorais humanas (HL-60 (Leucemia), HCT-116 (Cólon humano), PC-3 (Próstata) e SNB-19 (Glioblastoma)) testadas. O produto natural (CL-1) e o derivado hidrogenado (CL-P5) apresentaram percentual de inibição de crescimento celular acima de 75% em todas as linhagens, enquanto o derivado desidratado (CL-P1) foi ativo somente na linhagem HCT-116. O metabólito natural e o derivado hidrogenado apresentaram variação de CI_{50} de 4,66 - 8,93 e 3,78 a 13,61 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O derivado triacilado (CL-P2) apresentou atividade antinociceptiva e ausência de toxicidade em fibroblastos murinos e humanos a partir da concentração de 0,1 $\mu\text{g/Kg}$. Estes resultados evidenciam que os estudos de semissíntese em metabólitos secundários são uma importante ferramenta no desenvolvimento e na potencialização terapêutica de novos fármacos.

Palavras-chave: *Combretum leprosum*. $3\beta,6\beta,16\beta$ -tri-hidroxilup-20(29)-eno. Derivados semissintéticos.

ABSTRACT

The species *Combretum leprosum* Mart. (Cobretaceae), with wide dispersion in the Northeast region of Brazil, is a shrub popularly known as Mufumbo, Mofumbo or Cipoaba. It is widely used in folk medicine as a healing agent, sedative, antidiarrheal, expectorant, in rashes and hemostatic agent. The main isolated substance of *C. leprosum* is triterpene 3 β ,6 β ,16 β -tri-hydroxylup-20(29)-eno (CL-1), which has various biological activities such as leishmanicide, anti-inflammatory, antimicrobial, antinociceptive, healing and anticancer. This work describes the isolation of this metabolite and the production of the semi-synthetic derivatives dehydrated (CL-P1), triacylated (CL-P2), diacylated (CL-P2A), oxidized (CL-P3), hydrogenated (CL-P5), hydrazine (CL-P6) and oxime (CL-P8 e CL-P9), as well as the evaluation of their cytotoxic and analgesic activity. All compounds had their structures determined by spectrometric methods (MS, IR, uni and two-dimensional NMR). The CL-P1, CL-P2, CL-P2A, CL-P5, CL-P6, CL-P8 e CL-P9 derivatives are unpublished. With the exception of the acylated (CL-P2, CL-P2A) and oximes (CL-P8 e CL-P9) derivatives, all others had cytotoxic activity against four human tumor cell lines (HL-60 (Leukemia), HCT-116 (Human colon), PC-3 (Prostate) and SNB-19 (Glioblastoma)) tested. The natural product (CL-1) and the hydrogenated (CL-P5) derivative presented cell growth inhibition percentage above 75% in all strains, while the dehydrated derivative (CL-P1) was active only in the HCT-116 strain. The natural metabolite and the hydrogenated derivative showed an IC₅₀ variation of 4.66 - 8.93 and 3.78 at 13.61 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectively. The triacylated derivative (CL-P2) showed antinociceptive activity and absence of toxicity in murine and human fibroblasts at 0,1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. These results show that the studies of semisynthesis in secondary metabolites are an important tool in the development and therapeutic enhancement of new drugs.

Keywords: *Combretum leprosum*. 3 β ,6 β ,16 β -tri-hydroxylup-20(29)-ene. Semisynthetic derivatives.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produtos naturais usados como fármacos e potenciais candidatos a fármacos...	17
Figura 2 - Salicinina e fármacos derivados de produtos naturais.	20
Figura 3 - Compostos isolados de <i>C. aculeatum</i>	26
Figura 4 - Outros compostos isolados de <i>C. aculeatum</i>	28
Figura 5 - Estruturas químicas dos compostos isolados de <i>C. racemosum</i>	29
Figura 6 - Estrutura química da (-)-trachelogenina, isolada de <i>C. fruticosum</i>	30
Figura 7 - Estrutura do triterpeno 28-O- β -D-glicopiranosil-2 α ,3 β ,21 β ,23-tetrahidroxiolean-18-en-28-oato isolado de <i>Combretum racemosum</i>	31
Figura 8 - Estruturas químicas dos compostos isolados de <i>Combretum racemosum</i>	31
Figura 9 - Estrutura química dos compostos isolados de <i>Combretum microphyllum</i>	32
Figura 10 - Estrutura química dos triterpenos ácido betulônico e cabraleona isolados de <i>Combretum gruticosum</i>	33
Figura 11 - Estrutura química dos triterpenos Combretina A e B isolados de <i>Combretum fragrans</i> F. Hoffm.	34
Figura 12 - Estruturas químicas dos compostos isolados de <i>Combretum adenogonium</i>	35
Figura 13 - Estrutura química dos compostos isolados de <i>Combretum apiculatum</i>	36
Figura 14 - Estruturas químicas dos compostos isolados de <i>Combretum quadrangulare</i>	37
Figura 15 - Estrutura química do triterpeno 3 β ,6 β ,16 β -tri-hidroxilup-20(29)-eno (CL-1). .	38
Figura 16 - Derivados já obtidos de CL-1 por Teles e colaboradores (2011).	39
Figura 17 - Esquema reacional da reação de desidratação de CL-1.	43
Figura 18 - Esquema reacioanal da reação de acilação de CL-1 com cloreto de propanoíla	44
Figura 19 - Esquema reacional da reação de oxidação de CL-1.	45
Figura 20 - Esquema reacional da reação de hidrogenação de CL-P1.	45
Figura 21 - Esquema reacional da reação de CL-P3 com 2,4-dinitrofenilhidrazina.	46
Figura 22 - Esquema reacional para a obtenção das oximas CL-P8 e CL-P9.	47
Figura 23 - Conversão do 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) em (E,Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazan (azul de formazan).	49
Figura 24 - Estrutura química da sulfurodamina B.	50
Figura 25 - Estrutura químca do inibidor zinco-protoporfirina (ZnPP-IX).	51
Figura 26 - Espectro de infravermelho de CL-1.	53
Figura 27 - Espectro de RMN ^1H de CL-1 ($\text{CDCl}_3/300\text{ MHz}$).	54
Figura 28 - Espectro de RMN 2D COSY ^1H - ^1H de CL-1 ($\text{CDCl}_3/500\text{ MHz}$).	54

Figura 29 - Principais correlações do espectro COSY ^1H - ^1H de CL-1 ($\text{CDCl}_3/300\text{ MHz}$)..	55
Figura 30 - Espectro de RMN ^{13}C - BBD de CL-1 ($\text{CDCl}_3/75\text{ MHz}$).....	56
Figura 31 - Espectro de RMN ^{13}C -APT de CL-1 ($\text{CDCl}_3/75\text{ MHz}$).	56
Figura 32 - Espectro de RMN 2D HSQC ^1H - ^{13}C de CL-1 ($\text{CDCl}_3, 300/75\text{ MHz}$).	57
Figura 33 - Espectro de RMN 2D HMBC ^1H - ^{13}C de CL-1 ($\text{CDCl}_3, 300/75\text{ MHz}$).....	58
Figura 34 - Estrutura química do triterpeno CL-1.....	58
Figura 35 - Espectro de massa de alta resolução de CL-P1.....	60
Figura 36 - Espectro de Infravermelho de CL-P1.	60
Figura 37 - Espectro de RMN ^1H de CL-P1 ($\text{CDCl}_3/300\text{ MHz}$).....	61
Figura 38 - Espectro de RMN ^{13}C - BBD de CL-P1 ($\text{CDCl}_3/75\text{ MHz}$).	62
Figura 39 - Espectro de RMN 2D HSQC ^1H - ^{13}C de CL-P1 ($\text{CDCl}_3, 300/75\text{ MHz}$).....	62
Figura 40 - Estrutura química do derivado CL-P1.	63
Figura 41 - Espectro de massa de alta resolução de CL-P2.....	64
Figura 42 - Espectro de Infravermelho de CL-P2.....	64
Figura 43 - Espectro de RMN ^1H de CL-P2 ($\text{CDCl}_3/300\text{ MHz}$).	65
Figura 44 - Espectro de RMN ^{13}C - BBD de CL-P2 ($\text{CDCl}_3/75\text{ MHz}$).	65
Figura 45 - Espectro de RMN ^{13}C -Jmod de CL-P2($\text{CDCl}_3/75\text{ MHz}$).....	66
Figura 46 - Estrutura química do derivado CL-P2	66
Figura 47 - Espectro de massa de alta resolução de CL-P2A.....	67
Figura 48 - Espectro de infravermelho de CL-P2A.....	68
Figura 49 - Espectro de RMN ^1H de CL-P2A ($\text{CDCl}_3/300\text{ MHz}$).	69
Figura 50 - Espectro de RMN ^{13}C - BBD de CL-P2A ($\text{CDCl}_3/75\text{ MHz}$).....	69
Figura 51 - Estrutura química do derivado CL-P2A.	70
Figura 52 - Espectro de massa de alta resolução de CL-P3.....	71
Figura 53 - Espectro de infravermelho de CL-P3.....	71
Figura 54 - Espectro de RMN ^1H de CL-P3 ($\text{CDCl}_3/300\text{ MHz}$).	72
Figura 55 - Espectro de RMN ^{13}C - BBD de CL-P3 ($\text{CDCl}_3/75\text{ MHz}$).	72
Figura 56 - Estrutura química do derivado CL-P3.	73
Figura 57 - Espectro de massa de alta resolução de CL-P5.....	74
Figura 58 - Espectro de Infravermelho de CL-P5.	74
Figura 59 - Espectro de RMN ^1H de CL-P5 ($\text{CDCl}_3/300\text{ MHz}$).	75
Figura 60 - Espectro de RMN ^{13}C - BBD de CL-P5 ($\text{CDCl}_3/75\text{ MHz}$).	76
Figura 61 - Estrutura química do derivado CL-P5.	76
Figura 62 - Espectro de massa de alta resolução de CL-P6.....	77

Figura 63 - Espectro de Infravermelho do derivado CL-P6.	77
Figura 64 - Espectro de RMN ^1H de CL-P6 ($\text{CDCl}_3/300$ MHz).	78
Figura 65 - Espectro de RMN ^{13}C - BBD de CL-P6 ($\text{CDCl}_3/75$ MHz).	79
Figura 66 - Estrutura química do derivado CL-P6.	79
Figura 67 - Espectro de RMN ^{13}C BB-decoupled (BBD) de CL-P8 ($\text{CDCl}_3/75$ MHz).	81
Figura 68 - Espectro de Infravermelho do derivado CL-P8.	81
Figura 69 - Espectro de RMN 2D HMBC ^1H - ^{13}C de CL-P8 (CDCl_3 , 300/75 MHz).....	82
Figura 70 - Estrutura química do derivado CL-P8.	82
Figura 71 - Espectro de RMN ^{13}C BB-decoupled (BBD) ($\text{CDCl}_3/75$ MHz) de CL-P9.	84
Figura 72 - Espectro de Infravermelho do derivado CL-P9.	84
Figura 73 - Espectro RMN 2D HMBC ^1H - ^{13}C de CL-P9 (CDCl_3 , 300/75 MHz).....	85
Figura 74 - Estrutura química do derivado CL-P9.	85
Figura 75 - Análise da relação-estrutura atividade de CL-1 em dos derivados CL-P1 e CL-P5.	87
Figura 76 - Efeito de CL-P2 e CL-P3 sobre a viabilidade celular de fibroblastos pelo SRB expressa após 24 h, 48 h e 72 h de incubação..	89
Figura 77 - Efeito da administração (i.p.) de CL-P2 sobre o número de contorções induzidas por Zymosan em camundongos.	90
Figura 78 - Efeito da coadministração sistêmica de zinco-protoporfirina IX (ZnPP-IX) (inibidor da via da HO-1) e CLP-2 sobre o número de contorções induzidas por zymosan em camundongos.	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados para atividades anti-inflamatória, anti-helmíntica e esquistossomícida para o extrato das folhas de algumas plantas do Gênero Combretum.....	24
Tabela 2 - Estrutura química de todos os derivados obtidos de CL-1.	47
Tabela 3 - Dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C de CL-1 (CDCl_3 , 300/75 MHz) e comparação com dados da literatura.....	59
Tabela 4 - Média do percentual de inibição do crescimento celular (CI%) com desvio padrão (DP) das amostras na concentração única de (25 $\mu\text{g/mL}$).	88
Tabela 5 - Valores de CI_{50} com intervalo de confiança obtido por regressão não linear a partir de dois experimentos independentes, realizados em duplicata.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

J	Constante de Acoplamento
s	Singleto
t	Tripleto
q	Quarteto
dd	Dupleto de dupleto
dq	Dupleto de quarteto
m	Multipleteo
2D	Bidimensional
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
APT	<i>Attached Proton Test</i>
BBD	<i>Broad Band Decoupling</i>
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CENAUREMN	Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear
CI ₅₀	Concentração Inibitória 50%
CL-1	3 β , 6 β , 16 β - tri-hidroxilup-20(29)-eno
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
DMAP	4-Dimetilaminopirida
DMEM	Dulbecco's Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
DQOI	Departamento de Química Orgânica e Inorgânica
EM	Espectrometria de Massa
EMAR	Espectrometria de Massa de Alta Resolução
EMBR	Espectrometria de Massa de Baixa Resolução
EPM	Erro Padrão da Média
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
HO-1	Heme Oxigenase 1
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
Hz	Hertz
i.p.	intraperitoneal

IV	Infravermelho
MTT	Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono - 13
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio - 1
SFB	Soro Fetal Bovino
SRB B	Sulfurodamina B
s.c.	subcutânea
v.o.	via oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Uma breve definição de produtos naturais	14
1.2	Os produtos naturais na história e na Medicina popular	14
2	OBJETIVOS	22
2.1	Geral	22
2.2	Específicos	22
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3	O gênero <i>Combretum</i>	23
3.1.1	<i>Atividades biológicas encontradas em plantas do gênero <i>Combretum</i></i>	23
3.1.2	<i>Compostos presentes em plantas do gênero <i>Combretum</i> e suas atividades biológicas</i>	27
3.1.3	<i>A espécie <i>Combretum leprosum</i> e seu potencial biológico</i>	37
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	40
4.1	Métodos cromatográficos	40
4.2	Métodos espectrométricos	40
4.2.1	<i>Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i>	40
4.2.2	<i>Espectroscopia de Absorção na Região do infravermelho (IV)</i>	41
4.2.3	<i>Espectrometria de Massa de Alta Resolução (EMAR)</i>	41
4.3	Ponto de Fusão	42
4.4	Solventes e reagentes	42
4.5	Coleta de <i>Combretum leprosum</i>	42
4.6	Isolamento do 3β,6β,16β-tri-hidroxilup-20(29)-eno	42
4.7	Preparação dos derivados do 3β, 6β, 16β-tri-hidroxilup-20(29)-eno (CL-1)	43
4.7.1	<i>Síntese do derivado CL-P1 (desidratado)</i>	43
4.7.2	<i>Síntese dos derivados CL-P2 e CL-P2A (triacilado e diacilado)</i>	43
4.7.3	<i>Síntese do derivado CL-P3 (oxidado)</i>	44
4.7.4	<i>Síntese do derivado CL-P5 (hidrogenado)</i>	45

4.7.5	<i>Síntese do derivado CL-P6 (hidrazona)</i>	46
4.7.6	<i>Síntese dos derivados CL-P8 e CL-P9 (oximas)</i>	46
4.7.6	<i>Síntese dos derivados CL-P8 e CL-P9 (oximas)</i>	46
4.8	Ensaio de atividade biológica do 3b,6b,16b-tri-hidroxilup-20(29)-eno e derivados	48
4.8.1	<i>Ensaio da atividade citotóxica</i>	48
4.8.2	<i>Ensaio de atividade citotóxica de CL-P2 e CL-P3</i>	50
4.8.3	<i>Ensaio de atividade analgésica de CL-P2</i>	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1	Caracterização estrutural do triterpeno 3β,6β,16β-tri-hidroxilup-20(29)-eno (CL-1)	53
5.2	Determinação estrutural dos derivados reacionais de CL-1	60
5.2.1	<i>Identificação estrutural de CL-P1 (desidratado)</i>	60
5.2.2	<i>Identificação estrutural de CL-P2 (triacilado)</i>	63
5.2.3	<i>Identificação estrutural de CL-P2A (diacilado)</i>	67
5.2.4	<i>Identificação estrutural de CL-P3 (oxidado)</i>	70
5.2.5	<i>Identificação estrutural de CL-P5 (hidrogenado)</i>	74
5.2.6	<i>Identificação estrutural de CL-P6 (hidrazona)</i>	77
5.2.7	<i>Identificação estrutural de CL-P8 (mono-oxima)</i>	80
5.2.8	<i>Identificação estrutural do derivado CL-P9 (di-oxima)</i>	83
5.3	Ensaio biológicos	86
5.3.1	<i>Teste de atividade citotóxica</i>	86
5.3.2	<i>Ensaio de atividade citotóxica de CL-P2 e CL-P3</i>	88
5.3.3	<i>Ensaio de atividade analgésica de CL-P2</i>	89
6	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS	92

1 INTRODUÇÃO

1.1. Uma breve definição de produtos naturais

Os produtos naturais são entidades químicas com propriedades farmacológicas produzidas por organismos vivos, tais como plantas, fungos, bactérias, protozoários ou animais. Tais entidades possuem estruturas químicas únicas e diversas e, são divididas em duas classes principais: metabólitos primários e metabólitos secundários, sendo vitais para a indústria farmacêutica pelo fato de serem a base para o desenvolvimento de medicamentos (MATHUR e HOSKINS, 2017).

Os metabólitos secundários são produzidos em resposta a uma adaptação do organismo ao ambiente no qual vive e que se modifica com o tempo (mudanças como clima, radiação, quantidade de nutrientes), infecção, competição e defesa contra predadores. Estes geralmente não são essenciais para o crescimento, desenvolvimento ou reprodução do organismo e, muitas vezes, são produzidos especificamente por uma determinada espécie, expressando sua individualidade (TIWARI e RANA, 2015).

O metabolismo primário é essencial para todo organismo e compreende a biossíntese e a quebra de determinadas moléculas no interior dos seres vivos, como proteínas, gorduras, ácidos e carboidratos, sendo chamadas de metabólitos primários. Já o metabolismo secundário baseia-se na formação de blocos de intermediários biossintéticos utilizados para a formação dos metabólitos secundários por meio de processos como a fotossíntese, glicólise e ciclo de Krebs. Embora o número de blocos seja finito, o número de combinações para a formação de metabólitos secundários é praticamente infinito, o que proporciona a formação das mais variadas estruturas químicas, desde as mais simples até as mais complexas e, que muitas vezes apresentam atividades biológicas. Além disso, modificações nos caminhos biossintéticos em decorrência de causas naturais (como vírus ou mudanças ambientais) ou não naturais (como químicas ou radiação), a fim de promover adaptação ou sobrevivência do organismo resulta na produção de novos metabólitos secundários (DEWICK, 2009; TIWARI, 2015).

1.2. Os produtos naturais na história e na Medicina popular

A utilização dos produtos naturais para o tratamento das mais variadas doenças é evidenciada desde os tempos mais remotos, sendo os primeiros registros encontrados por volta de 2600 a.C. Tais registros foram encontrados em placas de argila, que documentavam o uso do óleo de *Cupressus sempervirens* (Cypress) e espécies de *Commiphora* (Mirra), utilizadas até hoje no tratamento de inflamação, resfriados e tosses. Outros povos antigos

também registraram o uso de medicamentos a base de plantas, tais como os egípcios, chineses, gregos, romanos e árabes (CRAGG e NEWMAN, 2013; ATANASOV *et al.*, 2015).

A busca pelo tratamento das mais variadas doenças conduziu os seres humanos à investigação do potencial das plantas como agentes terapêuticos, o que acarretou, ao longo de vários anos, na construção de todo o conhecimento da medicina tradicional, baseado no método da tentativa e erro (KINGHORN *et al.*, 2011; HICKS, 2014). Vários são os exemplos da utilização da medicina tradicional, dos quais se podem citar as plantas do gênero *Salvia* e *Alhagi*. As cinzas de *Salvia* eram utilizadas por tribos indígenas do sul da Califórnia para cozinhar as crianças recém-nascidas masculinas, uma vez que acreditavam que estas cresceriam mais fortes, mais saudáveis, e imunes de todas as doenças respiratórias (HICKS, 2014). Um dos usos de *A. maurorum* consistia no cozimento de suas raízes e ingestão do extrato a fim de tratar diarreia com sangue. Outros povos também utilizavam essa espécie para o tratamento de asma, onde o método de tratamento consistia em fumar a planta (DUKE, 2008).

Além das plantas, outras fontes também foram utilizadas pela medicina popular, como os fungos das espécies *Piptoporus betulinus*, *Agaricus campestris* e *Usnea dillenius*, além de seres vivos marinhos, como as algas *Chondrus crispus*, *Mastocarpus stellatus*, *Porhyra umbicaicallis*. Tiras da espécie *P. betulinus* eram cortadas e utilizadas para estancar sangramentos. *A. campestris* era cozinhado em leite e consumido para amenizar o câncer de garganta, enquanto *U. dillenius* era utilizado para tratar doenças relacionadas ao couro cabeludo, sendo ainda hoje vendido em farmácias como um constituinte de shampoos anti-caspa (BERNARDINI *et al.*, 2018). Uma das utilidades das algas vermelhas *C. crispus* e *M. stellatus* consistia no tratamento de problemas nos rins e queimaduras, enquanto a espécie *P. umbilicalis* apresentava efeito contra cânceres (BERNARDINI *et al.*, 2018; DIAS, URBAN e ROESSNER, 2012).

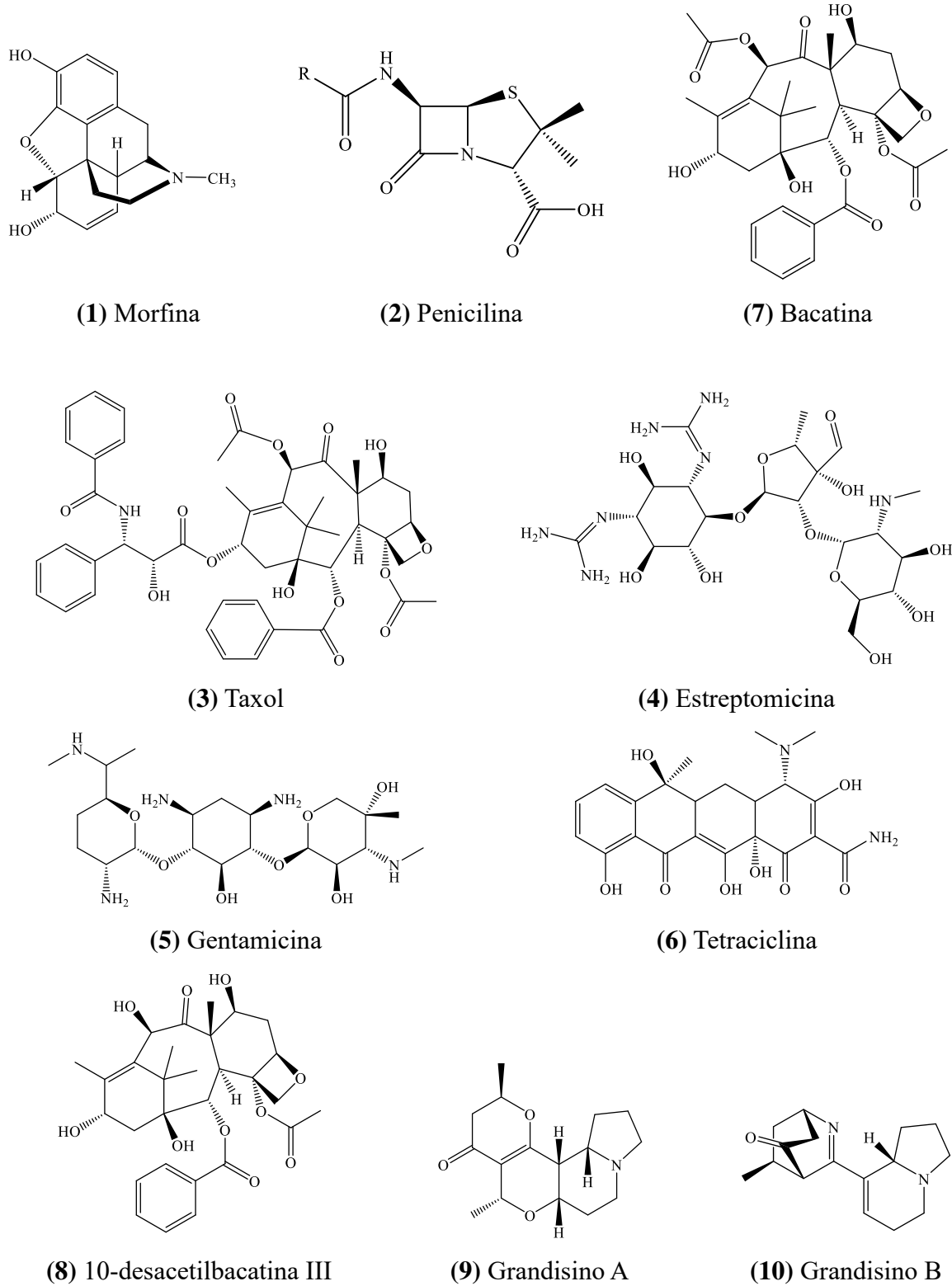
O conhecimento construído pela medicina popular forneceu a base para a investigação e produção racional de medicamentos baseados em produtos naturais. Estes desempenham um papel altamente significativo na descoberta de novos fármacos, onde podem compor grandes bibliotecas que serão usadas como base para o *design* de novas moléculas. São vários os produtos naturais inalterados que já foram utilizados como fármacos ou que são potenciais candidatos. Uma das principais descobertas históricas aconteceu por volta de 1804 com o isolamento de vários alcaloides da planta *Papaver somniferum* L., dentre os quais estava presente a morfina (**1**), uma importante substância com atividade analgésica (DIAS, URBAN e ROESSNER, 2012). O farmacêutico H. E. Merk (Darmstadt,

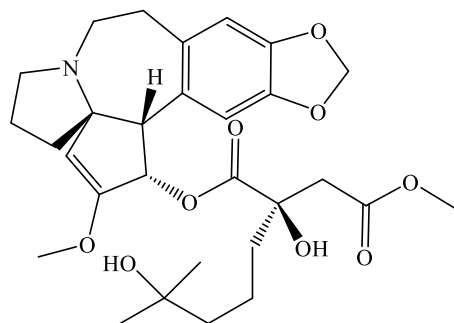
Alemanha) foi o primeiro a iniciar o processo de extração e purificação da morfina em 1826, sendo um dos progenitores das grandes indústrias farmacêuticas. Outros importantes marcos históricos no ramo de fármacos provindos de produtos naturais foram a descoberta da penicilina (2) em 1928 pelo médico e bacteriologista Alexander Fleming, e a descoberta do taxol (3) em 1964 pelo botânico Arthur Barclay, a serviço do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (DAEU). A molécula da penicilina, que apresentava atividade antibiótica, foi isolada do fungo *Penicillium chrysogenum* e, sua descoberta impulsionou a busca pelo isolamento de produtos naturais provindos de microrganismos. Além disso, conduziu ao surgimento das indústrias farmacêuticas modernas, que focaram principalmente na busca por novas substâncias com atividade antibiótica. Antes e durante a Segunda Guerra Mundial, novos antibióticos foram descobertos, como a streptomina (4), gentamicina (5), tetraciclina (6) dentre outros (BARKER *et al.*, 2007). O taxol, por sua vez, é uma das drogas quimioterápicas mais efetivas e amplamente utilizadas no tratamento de vários tipos de câncer. Trata-se de um diterpenoide cíclico polioxigenado presente nas cascas da árvore *Taxus brevifolia*, que foi isolado e caracterizado pelos cientistas Mansukh Wani and Monroe Wall em 1967. A utilização do taxol encontrou e ainda encontra restrição por conta do esgotamento de suas fontes, uma vez que as árvores morrem após retirada de suas cascas, apresentam lento crescimento e produzem uma pequena quantidade deste produto natural (0,01 % - 0,05 %). Essa baixa disponibilidade e o aumento da sua aplicação na quimioterapia ocasionaram o aumento nos custos de isolamento deste fármaco, o que impulsionou os laboratórios do mundo todo a investirem na busca pela síntese total dessa molécula. Embora várias rotas sintéticas tenham sido desenvolvidas, estas envolvem árduas 40 etapas reacionais (WEAVER, 2014). Outras fontes, ainda que menos utilizadas, envolvem o uso de precursores semissintéticos, como o bacatina III (7) e 10-desacetilbacatina III (8). Novas tecnologias estão surgindo a fim de reduzir os custos e aumentar o rendimento da produção de taxol, como o uso da fermentação microbiana. Neste sentido, pode-se citar a utilização de fungos endofíticos, tais como o *Aspergillus fumigatus*, como fonte para a produção de uma grande quantidade de taxol. (KUMAR *et al.*, 2019).

Além destes, muitos produtos naturais são importantes candidatos a fármacos ou já foram aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) sem alteração em suas estruturas. Neste sentido, pode-se citar os grandisinóis A (9) e B (10), dois alcaloides indólicos isolados das folhas da árvore *Elaeocarpus grandis*, como potenciais candidatos a agentes analgésicos (CARROL *et al.*, 2005) e, os agentes anticancerígenos Homoharringtonina (11) (2012) e PICN (nanopartículas de placlitaxel) (2014), recentemente aprovados (CRAGG e

NEWMAN, 2016). Os produtos naturais usados como fármacos e potenciais candidatos a fármacos citados são mostrados na Figura 1.

Figura 1 - Produtos naturais usados como fármacos e potenciais candidatos a fármacos.





(11) Homoharringtonina

Fonte: O autor, 2020.

Novas ferramentas surgiram por conta da necessidade da indústria farmacêutica em obter, de forma mais rápida, novos agentes terapêuticos, tais como a química combinatória, a modelagem molecular computacional e a síntese. Atrelado a isso, os desafios enfrentados na investigação de produtos naturais, tais como os altos custos, dificuldades de fornecimento/coleta de material de partida biológico, variabilidade, baixo retorno econômico, baixos rendimentos, dificuldades de isolamento e/ou purificação e alta toxicidade de alguns compostos ativos, ocasionaram na diminuição do interesse pelas indústrias farmacêuticas nesse ramo (DAVID *et al.*, 2015, BUCAR, WUBE e SCHMID, 2013; ATANASOV *et al.* 2015, AMIRKIA AND HEINRICH, 2014). Todavia, os produtos naturais continuam tendo uma grande importância, uma vez que possuem várias propriedades e vantagens tais como: maior interação com proteínas, enzimas e outras moléculas biológicas, maior rigidez molecular quando comparado com compostos sintéticos, menos efeitos colaterais e diversidade estrutural (LAHLOU, 2013; PASCOLUTTI e QUINN, 2014). Embora a popularidade dos produtos sintéticos tenha aumentado por conta do seu custo de produção, eficiência de tempo, fácil controle de qualidade, regulamentação rigorosa e rápido efeito, a contribuição das plantas como fontes de agentes medicinais, modelos químicos para o projeto de síntese ou semissíntese de novos compostos bioativos e construção de bibliotecas combinatórias é enorme (LAHLOU, 2013; BLAKEMORE *et al.*, 2018).

A utilização da modificação química (derivatização) na obtenção de derivados de produtos naturais com melhores atividades biológicas, menor toxicidade e menos efeitos colaterais, bem como a utilização da síntese química para a obtenção de novos fármacos têm-se mostrado muito relevante. Neste sentido, dos 1562 novos fármacos aprovados de 1981 a 2014, 4% são produtos naturais inalterados, 1% são ditos fármacos botânicos (mistura definida de substâncias), 16% são macromoléculas biológicas, 31% são fármacos sintéticos,

21 % são sintéticos imitadores de produtos naturais, 21% são derivados de produtos naturais e 6% são vacinas, reforçando a importância da derivatização e síntese química na obtenção ou no aperfeiçoamento de novos compostos bioativos (NEWMAN e CRAGG, 2016).

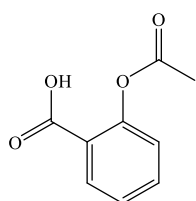
Um dos primeiros derivados desenvolvidos e ainda amplamente utilizados é o ácido acetilsalicílico (aspirina) (**12**), cujo precursor é o produto natural salicilina (**13**), isolada das cascas da árvore Salgueiro (*Salix alba* L.). A aspirina passou a ser utilizada por volta do ano de 1897 inicialmente como agente antipirético e anti-inflamatório e, atualmente, representa um marco histórico na prevenção contra doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e alguns tipos de câncer. A história envolvendo toda a sua descoberta tem início desde os tempos mais remotos. Já a mais de 3500 anos, os sumérios e egípcios já utilizavam as cascas de *S. alba* L. no tratamento de dores e febre. A primeira extração da salicilina foi realizada por volta de 1824 por dois farmacêuticos italianos, Francesco Fontana e Bartolommeo Rigatelli, onde Rigatelli foi o primeiro a utilizar o termo “salicilina”. Este produto natural trata-se de um beta-glicosídeo alcoólico que quando consumido é quebrado produzindo outras duas moléculas, a glicose e o álcool salicílico, sendo este oxidado a ácido salicílico (**14**) no organismo (MONTINARI, MINELLI e CATERINA, 2019).

Pesquisas foram direcionadas a fim de obter o ácido salicílico mais puro, mais barato e mais tolerável. Foi em 1859 que Hermann Kolbe, professor de química na Universidade de Marburg na Alemanha, conseguiu sintetizar o ácido salicílico através de um processo conhecido como reação de Kolbe-Schmitt, em homenagem ao seu assistente Rudolf Wilhelm Schmitt, que aperfeiçoou o processo. Neste tipo de síntese, o fenóxido de sódio é aquecido com CO₂ sob pressão (125 °C, 100 atm), e a mistura reacional acidificada com ácido sulfúrico para produzir ácido salicílico. Contudo, o gosto amargo e os efeitos colaterais limitaram o uso a longo prazo deste derivado como medicamento. A fim de contornar essa situação, os laboratórios da companhia Bayer retomaram os desenvolvimentos de derivados de salicilatos, de modo que em 1897, Felix Hoffman, através de uma reação de acetilação, conseguiu obter um derivado com menos efeitos colaterais e com melhor atividade, o ácido acetilsalicílico (**12**) (MONTINARI, MINELLI e CATERINA, 2019; LI, LI e SMITH, 2017).

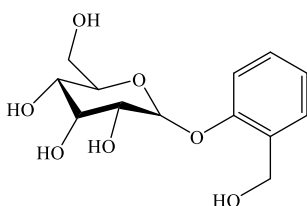
Outros exemplos importantes de derivados já lançados e utilizados como fármacos são a apomorfina, derivada da morfina (*Papaver somniferum*) (**15**), Arteether (Artemotil), derivada de Artemisinina (*Artemisia annua*) (**16**) e o Tiotrópio (**17**), derivado da atropina (*Atropa belladonna*). A apomorfina é utilizada no tratamento da doença de Parkinson e disfunção erétil (PATNAIK, HARITHA e RAO, 2017; PESSOA, *et al.*, 2018). Arteether um endoperóxido de lactona sesquiterpênica é usado no tratamento da malária e o tiotrópio é

utilizado no tratamento de doenças pulmonares obstrutivas crônicas (ZHOU *et al.*, 2017). Outros fármacos derivados de produtos naturais recentemente introduzidos no mercado incluem o carfilzomib (**18**), introduzido em 2012, e o laninamivir octanoato (**19**), introduzido em 2010, drogas anticâncer e antiviral, respectivamente (NEWMAN e CRAGG, 2016). A estrutura química da salicilina e de fármacos derivados de produtos naturais são mostradas na Figura 2.

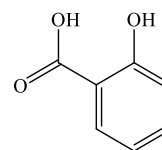
Figura 2 -Salicinina e fármacos derivados de produtos naturais.



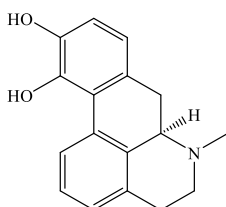
(12) Ácido acetilsalicílico



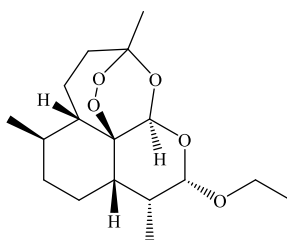
(13) Salicilina



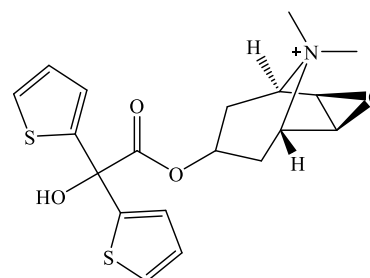
(14) Ácido salicílico



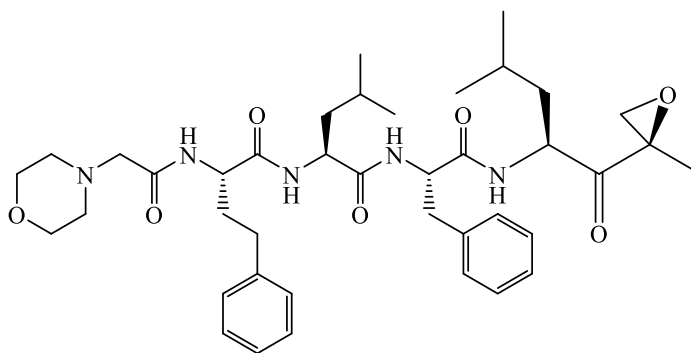
(15) Apomorfina



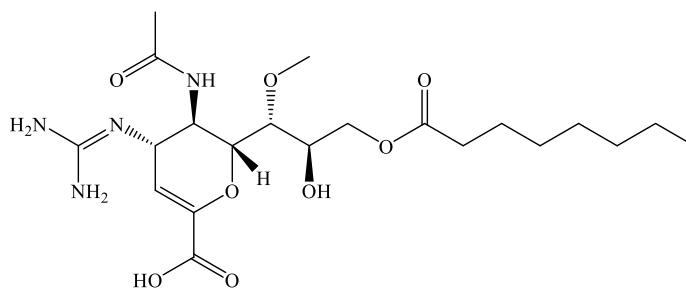
(16) Arteeterher



(17) Tiotrópio



(18) Carfilzomib



Laninamivir octanoato (**19**)

Fonte: O autor, 2020.

Dada a grande importância dos metabólitos secundários presentes em plantas e da possibilidade da melhoria de atividade biológica apresentada por estes por meio de modificações químicas e biotransformação, o presente trabalho fundamentou-se nas modificações estruturais do triterpeno $3\beta,6\beta,16\beta$ -tri-hidroxilup-20(29)-eno, isolado das folhas de *Combretum leprosum*. Tal espécie foi escolhida por apresentar amplo uso pela medicina tradicional como agente cicatrizante, no tratamento de erupções cutâneas, estancamento de hemorragias, sedativo, antidiarreico e expectorante. As atividades biológicas também já foram amplamente investigadas, onde foram evidenciadas ações anti-inflamatória, antinociceptiva (LIRA *et al.*, 2002), anti-ulcerogênica (NUNES *et al.*, 2009), antiofídica (MORS, *et al.*, 2000) e leishmanicida (TELES, *et al.*, 2015). Do mesmo modo, o triterpeno $3\beta,6\beta,16\beta$ -tri-hidroxilup-20(29)-eno também já foi amplamente estudado, onde foram evidenciadas atividades leishmanicida (TELES *et al.*, 2011), anti-inflamatória (BALBINOT-LONGHI *et al.*, 2012; PIETROVSKI *et al.*, 2006), antimicrobiana (ERIVASTO *et al.*, 2014), antinociceptiva (PIETROVSKI *et al.*, 2006; BALBINOT-LONGHI *et al.*, 2009), cicatrizante (NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2015) e anticancerígena (VIAU *et al.*, 2014), justificando seu uso neste trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Obter novos compostos orgânicos bioativos a partir da transformação química do produto natural 3 β ,6 β ,16 β -tri-hidroxilup-20(29)-eno obtido das inflorescências de *Combretum leprosum*.

2.2 Específicos

- Isolar e purificar o metabólito secundário 3 β ,6 β ,16 β -tri-hidroxilup-20(29)-eno das flores de *Combretum leprosum*;
- Obter derivados semissintéticos a partir do triterpeno 3 β ,6 β ,16 β -tri-hidroxilup-20(29)-eno;
- Avaliar as atividades citotóxica e antinociceptiva dos derivados semissintéticos preparados;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O gênero *Combretum*

O gênero *Combretum* é o maior dos 18 gêneros pertencentes à família Combretaceae, sendo constituído por aproximadamente 370 espécies. O gênero *Terminalia*, pertencente à mesma família é o segundo maior, constituído por aproximadamente 200 espécies. Tais gêneros estão principalmente distribuídos em áreas tropicais e subtropicais, tais como África e Brasil, tendo grande importância na medicina popular, onde são amplamente empregados no tratamento das mais variadas doenças. Estas incluem dores, tosse, resfriados, conjuntivite, diarreia, febre, ancilostomíase, infertilidade em mulheres, lepra, pneumonia, picadas de cobra venenosas, sífilis e fraquezas em geral (LIMA *et al.*, 2012; McGAW *et al.*, 2001).

3.1.1 Atividades biológicas encontradas em plantas do gênero *Combretum*

As atividades anti-inflamatórias, esquistossomicidas, e anti-helmínticas foram testadas para vários extratos (acetona, água e acetato de etila) de plantas do gênero *Combretum*. A fração acetato de etila das folhas de *C. apiculatum* Sond. supespécie *apiculatum* apresentou melhor atividade anti-inflamatória, com 93% de inibição, mais baixa atividade anti-helmíntica (80-90 % de nemátodos vivos para concentrações de 0,5 mg/ml e 1 mg/mL) e nenhuma atividade esquistomissida (extrato não-ativo). Resultados similares são encontrados para a fração aquosa das folhas de *C. collinum* Fresen. subespécie *suluense*, fração acetona de *C. kraussii*. *C. microphyllum*, *C. mkuzense*, *C. molle*, *C. nelsonii*, *C. paniculatum* e *C. petrophilum*. Espécies que apresentaram apenas atividade anti-inflamatória nos três tipos de extratos testados incluem *C. bracteosum*, *C. celastroides*, *C. moggii*, *C. padoides*, *C. woodii* e *C. zeyheri*. As frações aquosas das espécies *C. imberbe*, *C. kraussii* e *C. neusonii* apresentaram boa atividade esquistomissida, com concentração inibitória mínima (CIM) de 12,5 mg/mL (McGAW *et al.*, 2001). A Tabela 1 resume os resultados encontrados para as espécies descritas acima e para outras 5 espécies do gênero.

Tabela 1- Resultados para atividades anti-inflamatória, anti-helmíntica e esquistomissida para o extrato das folhas de algumas plantas do Gênero *Combretum*.

Espécies	Solvente de extração	Atividade anti-inflamatória (% inibição).	Atividade anti-helmíntica (0.5 mg/mL)	Atividade esquistomissida (MIC, mg/mL)
<i>C. apiculatum</i> Sond. supesp. <i>apiculatum</i>	água	67	1	NA
	acetona	91	4	-
	AcOEt	93	4	-
<i>C. bracteosum</i> (Hochst.)	água	53	0	NA
	acetona	79	0	-
	AcOEt	100	0	-
<i>C. celastroides</i> Welw ex Laws subesp. celastroides	água	43	0	NA
	acetona	64	0	-
	AcOEt	81	0	-
<i>C. Collinum</i> Fresen. supesp. <i>suluense</i>	água	50	0	NA
	acetona	67	1	-
	AcOEt	74	0	-
<i>C. edwardisii</i> Exell	água	58	0	NA
	acetona	50	0	-
	AcOEt	74		-
<i>C. erythrophyllum</i> (Burch.) Sond.	água	21	0	NA
	acetona	67	0	-
	AcOEt	92	0	-
<i>C. hereroense</i> Shinz	água	73	0	NA
	acetona	70	0	-
	AcOEt	81	0	-
<i>C. imberbe</i> Wawra	água	28	0	12.5
	acetona	92	0	-
	AcOEt	91	0	-
<i>C. kraussii</i> Hochst.	água	43	0	12,5
	acetona	74	1	-
	AcOEt	87	0	-
<i>C. microphyllum</i> Klotzsch	água	30	1	NA
	acetona	78	0	-
	AcOEt	79	0	-
<i>C. mkuzense</i> Carr & Retief	água	50	0	NA
	acetona	74	1	-
	AcOEt	77	0	-
<i>C. moggii</i> Exell	água	0	0	NA
	acetona	78	0	-
	AcOEt	89	0	-
<i>C. molle</i> R. Br. ex G. Don	água	54	0	25
	acetona	86	1	-
	AcOEt	80	0	-
<i>C. mossambicense</i>	água	73	0	NA
	acetona	83	0	-

(Klotzsch) Engl.	AcOEt	88	0	-
	água	75	0	12,5
<i>C. nelsonii</i> Dümmer	acetona	74	1	-
	AcOEt	76	0	-
	água	20	0	NA
<i>C. padoides</i> Engl. & Diels	acetona	75	0	-
	AcOEt	79	0	-
	água	54	0	25
<i>C. Paniculatum</i> Vent.	acetona	73	1	-
	AcOEt	76	0	-
	água	35	0	25
<i>C. petrophilum</i> Retief	acetona	70	1	-
	AcOEt	79	0	-
	água	7	0	NA
<i>C. woodii</i> Dümmer	acetona	71	0	-
	AcOEt	51	0	-
	água	28	0	NA
<i>C. zeyheri</i> Sond.	acetona	75	0	-
	AcOEt	91	0	-

Fonte: Adaptado de McGAW *et al.*, 2001.

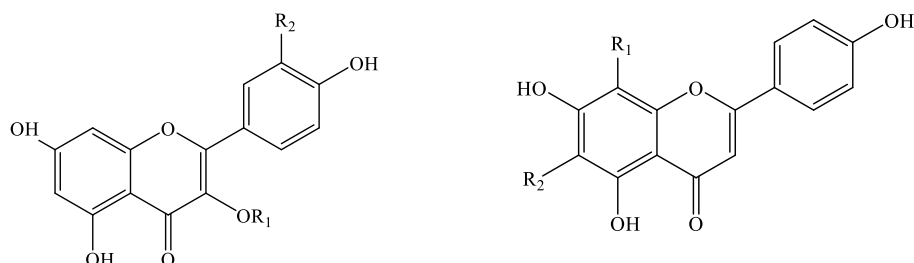
NA (Extrato Não ativo), - (extrato não testado); 1 (80-90 % de nematódeos vivos), 2 (70-80% de nematódeos vivos), 3(60-70 % de nematódeos vivos), 4 (50-60 % de nematódeos vivos).

Combretum fragrans F. Hoffm. (L) é utilizada tradicionalmente na medicina togolesa pra o tratamento de infecções fúngicas como dermatoses e alguns tipos de micose. As folhas dessa espécie foram testadas contra vários tipos de fungo do gênero *Candida*, que incluem os fungos *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. zeylanoides*, *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. guilliermondii* e outras espécies, tais como *Geotrichum candidum*, *Rhodotorula rubra* e *Cryptococcus neoformans*. Os resultados mostraram boa atividade antifúngica contra as espécies *C. zeyoanoides* e *R. rubra*, apresentando valores de concentração inibitória mínima de 0,25 mg/mL para ambas (BATAWILA *et al.*, 2005).

Combretum aculeatum é uma espécie amplamente distribuída no Sudão, Eretria, Etiópia, América do Sul e Ásia. O extrato etanólico das folhas desta espécie foi investigado por HAMAD e colaboradores quanto a sua atividade anti-inflamatória e constituição fitoquímica. O presente estudo revelou a presença de 5 compostos conhecidos isolados pela primeira vez dessa planta: quercetina (**20**), vitexina (**21**), isorhamnetina 3-O-glucosídeo (**22**), isovitexina (**23**) e rutina (**24**), bem como evidenciou significativa atividade anti-inflamatória *in vivo* do extrato etanólico administrado por via oral. O extrato etanólico (400 mg/kg) foi capaz de diminuir o peso do edema induzido em ratos em $32 \pm 1,9$ %. A indometacina, a droga padrão utilizada, apresentou valor de redução do edema induzido de 28.6 ± 2.5 % (HAMAD

et al., 2019). A estrutura química dos compostos isolados de *C. aculeatum* é mostrada na Figura 3.

Figura 3 - Compostos isolados de *C. aculeatum*.



	R	R₁	R₂		R₁	R₂
20		H	OH	21	Glicosil	H
22		Glicosil	OCH ₃	23	H	Glicosil
24		Rutinosil	OH			

Fonte: HAMAD et al., 2019.

A presença de polifenóis e de atividades anti-inflamatória e antioxidante na espécie *Combretum micranthum* conduziu à investigação da atividade nefroprotetora *in vitro* do seu extrato hidroalcoólico contra o dano renal induzido pela administração de cisplatina (CP), um agente quimioterápico potente amplamente utilizado contra diversos tipos de câncer, em células embrionárias renais HEK-293. O estudo mostrou que o co-tratamento das células HEK-293 com o extrato hidroalcoólico de *C. micranthum* em concentrações variadas resultou em um aumento do crescimento celular em comparação com o tratamento apenas com CP, o que indicou atividade citoprotetora. A concentração que produz metade da eficiência máxima (EC₅₀) encontrada foi de 8,136 µg/mL. A atividade nefroprotetiva também foi avaliada *in vivo*, onde a administração do extrato em concentrações de 200 e 400 µg/mL ocasionou normalização das funções renais (ABDELLATIEF et al., 2017; KPEMISSI et al., 2019). Outros estudos apontam ainda atividades analgésica, anti-inflamatória, bactericida e anti-hiperglicêmica de extratos das folhas desta espécie (BANFI et al., 2014; ABFULLAHI et al., 2014; CHIKA e BELLO, 2010).

Duas espécies do gênero *Combretum* são utilizadas na medicina tradicional da Namíbia no tratamento de doenças oportunistas relacionadas à SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), sendo elas a *C. hereroense* Schinz e a *C. zeyheri* Sond. Outras aplicações incluem o uso das raízes e caule cozidos de *C. hereroense* para o tratamento de tosse, diarreia, tuberculose e gonorreia, enquanto o pó das folhas de *C. zeyheri* é utilizado

para aplicação tópica contra infecções fúngicas de pele (CHINSEMBU, HIJARUNGURU e MBANGU, 2015).

Na Etiópia, plantas que apresentam atividades antimaláricas promissoras são utilizadas no tratamento desta doença, das quais se pode citar a espécie *Combretum molle*. A atividade anti-plasmodial *in vivo* do extrato bruto das sementes dessa planta foi investigada, onde se utilizaram camundongos como modelo animal. O estudo evidenciou supressão do parasita de 63,5% em camundongos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) tratados com 250 mg/kg do extrato, bem como mostrou um maior tempo de sobrevivência em comparação com o controle negativo, infectado apenas com o parasita e sem tratamento. Em comparação com a droga padrão (cloroquina), o tempo de sobrevivência dos ratos tratados com o extrato foi menor. O extrato apresentou boa atividade quimio-supressora contra o parasita PbA e melhorou alguns sintomas clínicos da malária em camundongos (ANATO e KETEMA, 2018).

Combretum dolichopetalum foi estudada quanto ao seu potencial antioxidante e cicatrizante. A atividade antioxidante foi avaliada por meio de ensaios espectrofotométricos baseando-se na inibição do radical DPPH, enquanto a atividade cicatrizante foi avaliada utilizando-se o modelo de ferida por excisão em camundongos. Três extratos diferentes (metanol, AcOEt e butanol) foram avaliados e comparados com o padrão ácido ascórbico quanto à sua atividade antioxidante. Os extratos apresentaram entre si valores próximos de inibição do radical DPPH dependentes da concentração, sendo a concentração de 800 ppm do extrato acetato de etila a mais efetiva ($93,92 \pm 0,05$ %). Na mesma concentração, o padrão ácido ascórbico apresentou valor de $99,94 \pm 0,08$ %. Animais tratados com 100 mg/mL do extrato aquoso de *C. dolichopetalum* apresentaram cicatrização mais rápida do que os animais tratados com pomada de penicilina, utilizada como padrão, o que mostrou atividade cicatrizante significativa desse extrato (BARKU *et al.*, 2016).

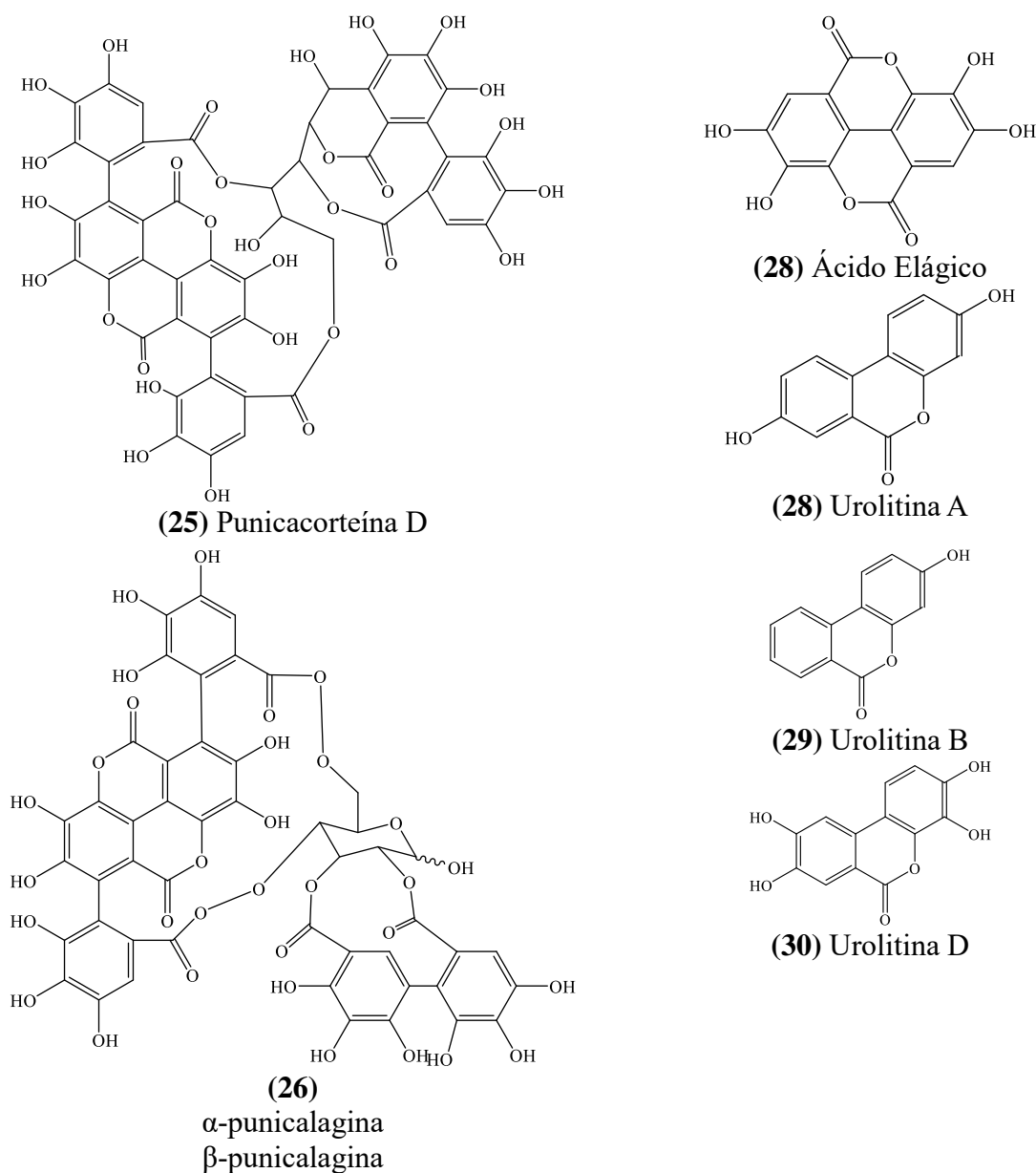
3.1.2 Compostos presentes em plantas do gênero *Combretum* e suas atividades biológicas

A investigação de espécies do gênero *Combretum* revela que estas são ricas em triterpenos, ácidos fenólicos, fenantrenos, stilbenos e taninos que, quando isolados puros ou em misturas, podem apresentar atividades biológicas, tais como atividade antibacteriana, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória e antiprotzoária (HAMAD *et al.*, 2019).

Constituintes do extrato aquoso de *Combretum aculeatum* foram recentemente isolados e investigados quanto ao seu potencial antibacteriano. Tais compostos incluem três derivados da elagitanina, a puniacorteína D (**25**), α - e β -punicalagina (**26**), ácido elágico

(27), urolitina A (28), B (29) e D (30). Os compostos isolados α - e β -punicalagina (26) exibiram atividade anti-infecciosa, com IC_{50} de 51,48 μ M. Os metabólitos urolitina A (31), urolitina B (29) e urolitina D (30) foram investigados quanto à sua atividade antimicrobacteriana, onde este último exibiu a melhor atividade, com IC_{50} de 345.50 μ M (atividade moderada em comparação com o fármaco padrão rifampicina, com IC_{50} de 6,99 μ M) (DIOP *et al.*, 2019). A estrutura química dos compostos isolados de *C. aculeatum* está mostrada na Figura 4.

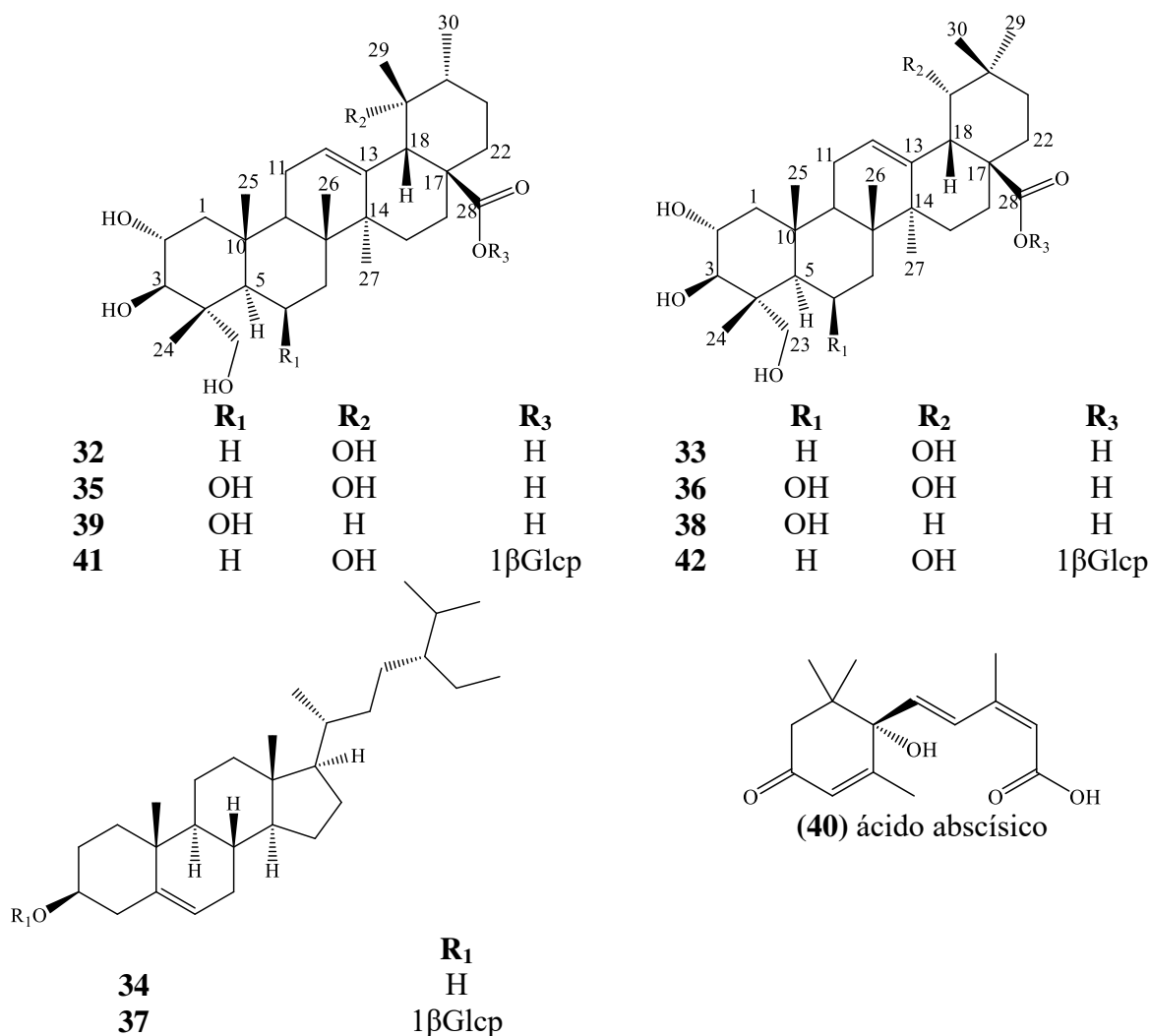
Figura 4 - Outros compostos isolados de *C. aculeatum*.



Fonte: O autor, 2020.

A investigação da fração clorofórmio do extrato metanólico das folhas de *Combretum racemosum* conduziu ao isolamento de 11 compostos, sendo estes avaliados quanto às suas atividades anti-plasmodiais. Destes, quatro são triterpenos do tipo ursano (ácido 19 α -hidroxiasiático (32), ácido 6 β ,23-di-hidroxitormentérico (35), ácido madecássico (39) e nigaichigosídeo F1 (41)) e quatro são triterpenos do tipo oleanano (arjungenina (33), combregenina (36), ácido terminólico (38) e arjunglucosídeo 1 (42)). Foram isolados também os compostos β -sitosterol (34) e seu glicosídeo (37), e ácido abscísico (40). Os compostos (34), (39) e (40) apresentaram boa atividade anti-plasmodial contra cepas resistentes de *P. falciparum*, com valores de IC₅₀ de 64 \pm 9 μ g/mL, 17 \pm 4 μ g/mL e 135 \pm 13 μ g/mL, respectivamente, em comparação com a droga padrão cloroquina, com IC₅₀ de 167 \pm 25 μ g/mL (OLUYEMI *et al.*, 2020). As estruturas químicas dos compostos isolados de *C. racemosum* são mostradas na Figura 5.

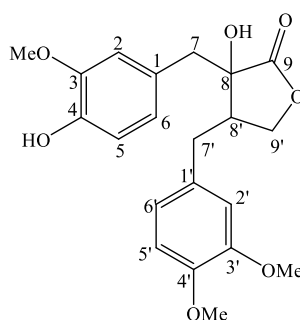
Figura 5 - Estruturas químicas dos compostos isolados de *C. racemosum*.



Fonte: OLUYEMI *et al.*, 2020.

O estudo da planta *Combretum fruticosum* levou ao isolamento e investigação do metabólito secundário (-)-trachelogenina (**44**), pertencente à classe das lignanas, que são compostos bem conhecidos por suas diversas atividades biológicas, tais como antitumorais, antivirais e hepatoprotetoras. Desta forma, Moura e colaboradores investigaram a citotoxicidade dessa substância isolada dos caules de *C. fruticosum* contra várias linhagens de células tumorais. Boas atividades citotóxicas foram evidenciadas para as linhagens de células cancerígenas de ovário (OVCAR-8), cólon (HCT-116) e cérebro (SF295), apresentando valores de IC₅₀ de 3,5 µM, 1,9 µM e 0,8 µM, respectivamente. A droga padrão doxorrubicina apresentou valores de IC₅₀ de 0,45 µM, 0,21 µM e 0,4 µM, respectivamente, para as células cancerígenas mencionadas (MOURA *et al.*, 2018). A Figura 6 mostra a estrutura química da (-)-trachelogenina.

Figura 6 - Estrutura química da (-)-trachelogenina, isolada de *C. fruticosum*.

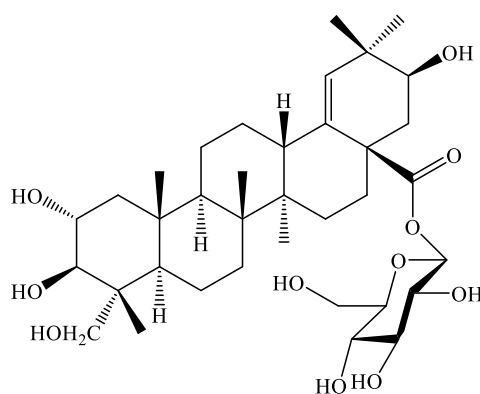


(44) (-)-Trachelogenina

Fonte: O autor, 2020.

Gossan *et al.* investigaram a fitoquímica da espécie *Combretum racemosum*, onde isolaram e caracterizam 15 compostos, sendo catorze já conhecidos e um inédito. Tal metabólito inédito trata-se de um glicosídeo de triterpeno pentacíclico, intitulado 28-O-β-D-glicopiranosil-2α,3β,21β,23-tetrahydroiolean-18-en-28-oato (**45**). A atividade contra linhagens de células cancerígenas de leucemia foi testada para todas as 15 substâncias, onde os compostos (**55**) (ácido 3-O-β-acetil-ursólico), (**58**) (ácido betulínico) e (**59**) (quadranosídeo II) exibiram boa atividade citotóxica, com valores de IC₅₀ que variaram de 13 a 50 µM. Além disso, os compostos (**45**), (**47**) (arjungenina), (**49**) (ácido terminólico) e (**55**) exibiram boa atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*, com concentrações inibitórias mínimas (CIM) entre 64 e 256 µg/mL (GOSSAN *et al.*, 2016). As estruturas químicas do triterpeno inédito (**45**) e dos compostos isolados de *C. racemosum* são mostrada nas Figuras 7 e 8.

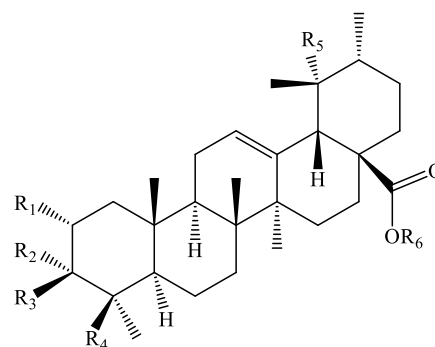
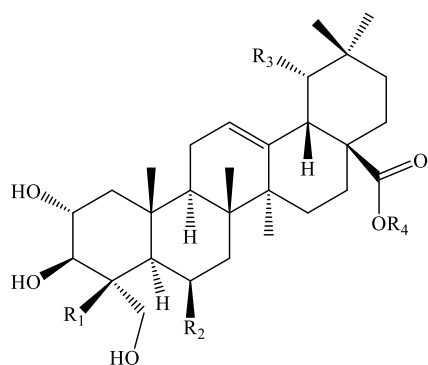
Figura 7 - Estrutura do triterpeno 28-O- β -D-glicopiranosil-2 α ,3 β ,21 β ,23-tetrahydroxiolean-18-en-28-oato isolado de *Combretum racemosum*.



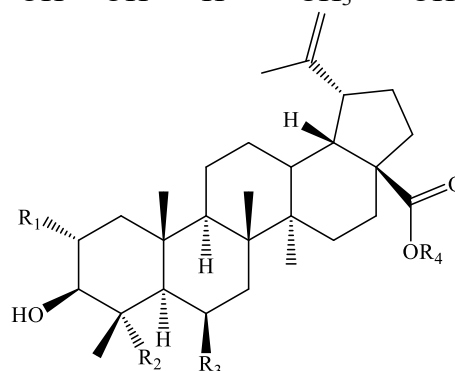
(45)

Fonte: GOSSAN *et al.*, 2016.

Figura 8 - Estruturas químicas dos compostos isolados de *Combretum racemosum*.



	R₁	R₂	R₃	R₄		R₁	R₂	R₃	R₄	R₅	R₆
46	CH ₃	H	H	H	55	H	H	OAc	CH ₃	H	H
47	CH ₃	H	OH	H	56	OH	H	OH	CH ₂ OH	OH	H
48	CH ₃	H	OH	glc	57	OH	OH	H	CH ₃	OH	glc
49	CH ₃	OH	H	H							
50	CH ₃	OH	H	glc							
51	CH ₃	OH	OH	H							
52	CH ₃	OH	OH	glc							
53	CH ₂ OH	H	OH	H							
54	CH ₂ OH	H	OH	glc							

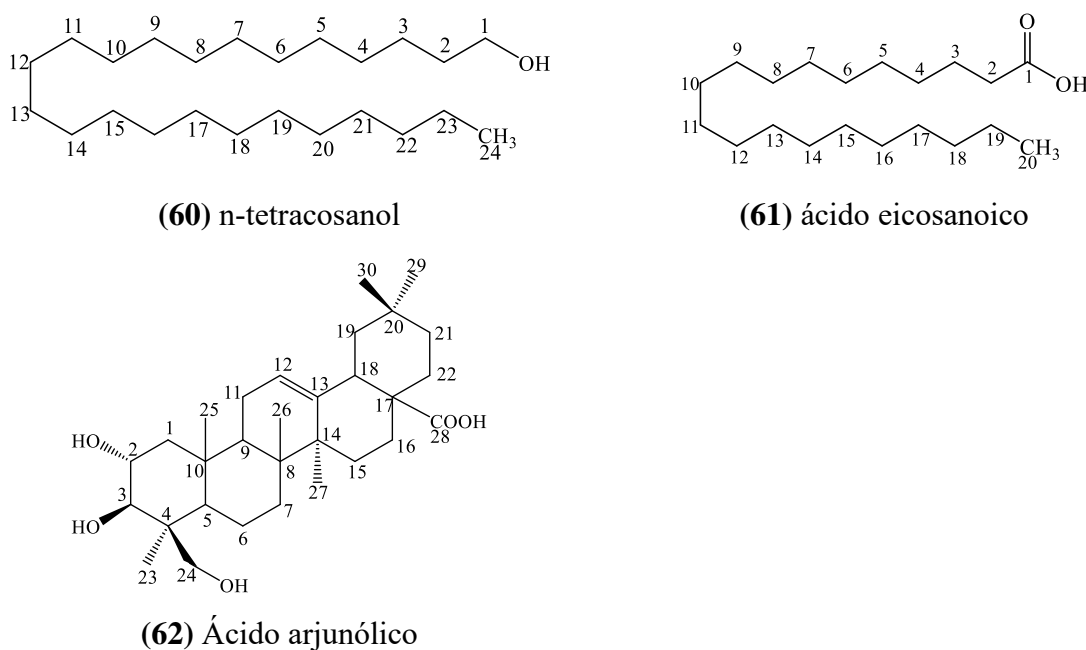


58	R₁	R₂	R₃	R₄
	H	CH ₃	H	H
59	OH	CH ₂ OH	OH	glc

Fonte: GOSSAN *et al.*, 2016.

MAKHAFOLA *et al.* investigaram o extrato metanólico das folhas de *Combretum microphyllum* com o objetivo de isolar, caracterizar e avaliar as atividades antimultagênica, antioxidante e citotóxica das substâncias presentes nesta espécie. Três compostos foram isolados, o n-tetracosanol (**60**), ácido eicosanóico (**61**) e ácido arjunólico (**62**). A atividade antimutagênica foi avaliada pelo ensaio de ames/microsoma usando 3 cepas de bactéria: *Salmonella typhimurium* TA98, *S. typhimurium* TA100 e *S. typhimurium* TA102. A atividade antioxidante foi determinada pelo método quantitativo de eliminação do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DDPH) e a citotoxicidade foi determinada pelo ensaio MTT utilizando hepatócitos humanos. O ácido arjunólico foi o mais ativo nas três cepas testadas com antimultagenicidade de $42 \pm 9,6\%$, $36 \pm 1,5\%$ e $44 \pm 0,18\%$ para as cepas TA98, TA100 e TA102, respectivamente, nas concentrações mais altas (500 $\mu\text{g/mL}$), seguidas pelo ácido eicosanóico e n-tetracosanol. Somente o ácido arjunólico apresentou atividade antioxidante pronunciada, com um valor de CE_{50} de 0,51 $\mu\text{g/mL}$. Os compostos apresentaram baixa citotoxicidade na concentração mais alta, com valores de $\text{CL}_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$ para o n-tetracosanol e ácido andeicosanóico e 106,39 $\mu\text{g/mL}$ para o ácido arjunólico (MAKHAFOLA *et al.*, 2016; MAKHAFOLA *et al.*, 2017). A Figura 9 mostra a estrutura dos compostos isolados de *C. microphyllum*.

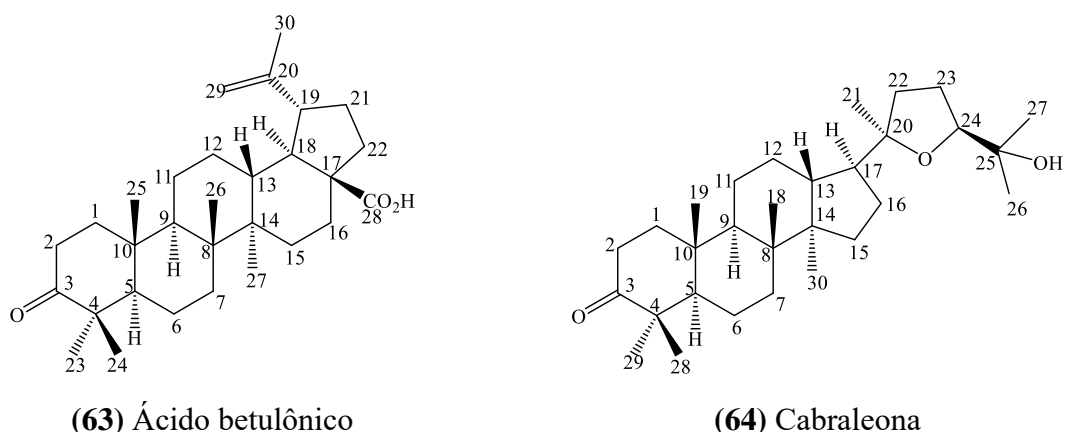
Figura 9 - Estrutura química dos compostos isolados de *Combretum microphyllum*.



Fonte: MAKHAFOLA *et al.*, 2017

Dois triterpenoides, o ácido betulônico e cabraleona, foram isolados das folhas de *Combretum gruticosum* Perr. Ex DC, e suas atividades analgésica e anti-inflamatória analisadas. As atividades analgésica e anti-inflamatória foram avaliadas pelo método das contorções induzidas em camundongos e pelo modelo do edema de pata de rato, respectivamente. Ácido betulônico (3 mg/kg) e cabraleona (3 mg/kg) inibiram significativamente as contorções em camundongos, sendo o número de contorções 30 ± 10 e 32 ± 7 contra $72,6 \pm 6,64$ do grupo de controle não tratado, respectivamente. Ácido betulônico (3 mg/kg) preveniu o aumento do edema na pata de rato, apresentando valores melhores que o ácido acetilsalicílico (10 mg/kg) utilizado no controle positivo ($31,84 \pm 6,76$ contra $92,72 \pm 6,05\%$, respectivamente), assim como a cabraleona (10 mg/kg), que apresentou valores similares ao ácido acetilsalicílico (10 mg/kg) administrado nas mesmas condições ($29,28 \pm 5,88$ contra $39,96 \pm 7,25$, respectivamente) (SENE *et al.*, 2018). As estruturas químicas dos triterpenos ácido betulônico (**63**) e cabraleona (**64**) são mostradas na Figura 10.

Figura 10 - Estrutura química dos triterpenos ácido betulônico e cabraleona isolados de *Combretum gruticosum*.

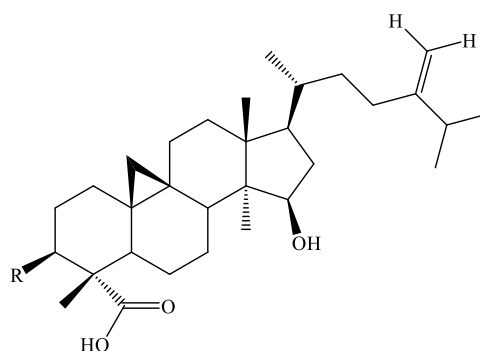


Fonte: SENE *et al.*, 2018.

Combretum fragrans F. Hoffm é uma planta medicinal camaronesa rica em metabólitos secundários ativos. Mbiantcha *et al.* conduziram estudos a fim de avaliar as atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias *in vivo* e anticancerígenas *in vitro* de dois triterpenos do tipo cicloartano presentes nesta espécie, sendo eles a combretina A (**65**) e a combretina B (**66**). As atividades anticâncer e a citotoxicidade para células saudáveis foram avaliadas utilizando células MCF-7 (câncer de mama) e ensaio MTT, respectivamente. As atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias foram analisadas utilizando o modelo de ácido acético, formalina e carregenina. Os dois triterpenos foram capazes de reduzir a viabilidade celular das linhagens MCF-7, bem como também apresentaram atividade antinociceptiva e

anti-inflamatória significativas (MBIANTCHA *et al.*, 2018). A Figura 11 apresenta as estruturas químicas destes metabólitos.

Figura 11 - Estrutura química dos triterpenos Combretina A e B isolados de *Combretum fragrans* F. Hoffm.



(65) Combretina A

(66) Combretina B

R

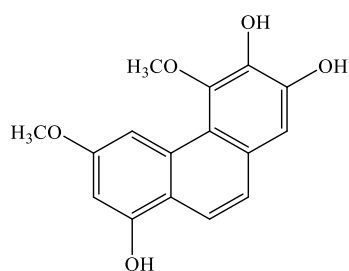
OH

O-β-D-xilopiranosídeo

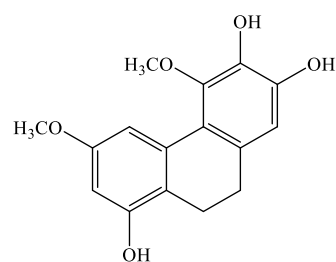
Fonte: MBIANTCHA *et al.*, 2018.

O extrato etanólico das raízes de *Combretum adenogonium* foi investigado com o intuito de isolar os compostos bioativos presentes, bem como analisar sua atividade antibacteriana. Após fracionamento, foram isolados da fração n-butanol 4 compostos, o 2,3,8-tri-hidroxi-4,6-dimetoxifenantreno (67), 2,3,8-tri-hidroxi-4,6-dimetoxi-9,10-dihydrofenantreno (68) e os compostos (69) e (70), formados a partir da condensação dos compostos 1 e 2 com acetato de metila e propanoato de metila, respectivamente. Estes apresentaram atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* com valor de concentração de inibição mínima de 0,16 mg/mL. (MUSHI, INNOCENT e KIDUKULI, 2015). A Figura 12 mostra as estruturas químicas dos metabólitos isolados de *Combretum adenogonium*.

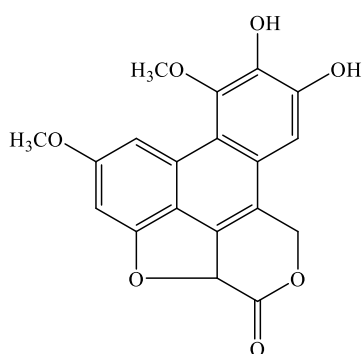
Figura 12 - Estruturas químicas dos compostos isolados de *Combretum adenogonium*.



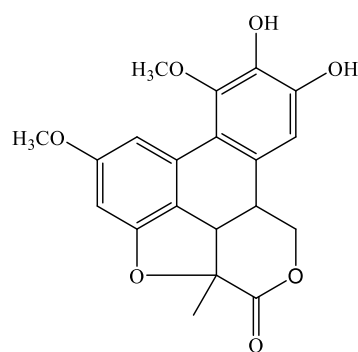
(67) 2,3,8-tri-hidroxi-4,6-dimetoxifenantreno



(68) 2,3,8-tri-hidroxi-4,6-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno



(69)

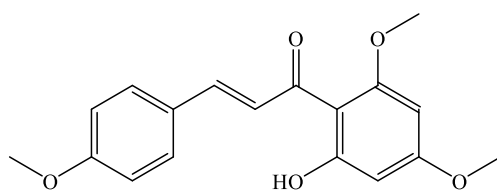


(70)

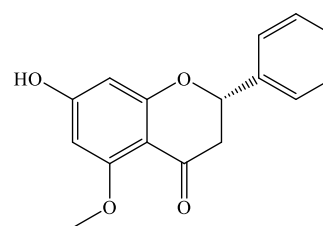
Fonte: MUSHI, INNOCENT e KIDUKULI, 2015.

Dez extratos orgânicos e aquosos das folhas de *Combretum apiculatum* foram inicialmente testados contra as espécies de bactéria: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. O extrato de acetona apresentou-se o mais potente, sendo investigado quanto à sua constituição. Deste foram isolados três flavonoides conhecidos, a saber, a flavokawaina A (71), alpinetina (72) e pinocembrina (73). Tais compostos foram moderadamente ativos contra *S. aureus* e *E. faecalis* com CIM de 40 µg/mL (KATERERE, SERAGE e ELOFF, 2018). A Figura 13 mostra as estruturas químicas destes flavonoides isolados de *C. apiculatum*.

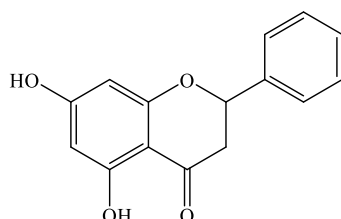
Figura 13 - Estrutura química dos compostos isolados de *Combretum apiculatum*.



(71) Flavokawaina



(72) Alpinetina

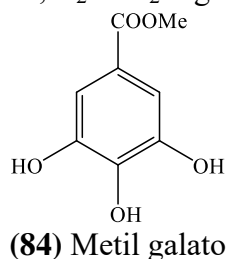
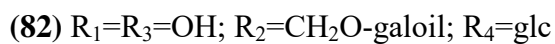
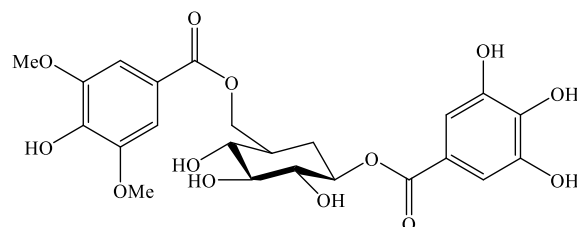
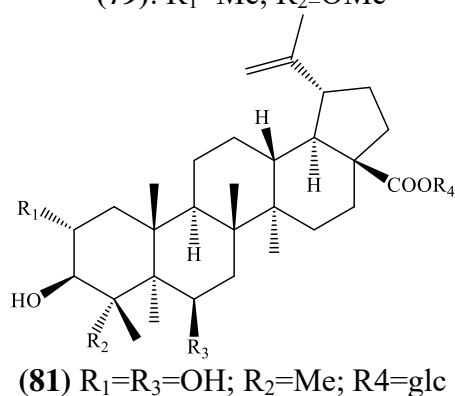
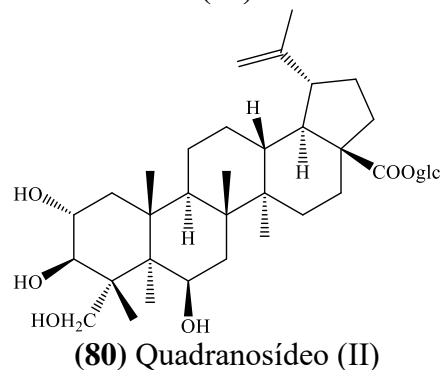
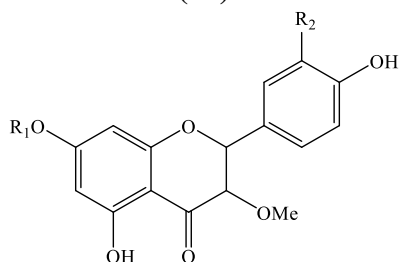
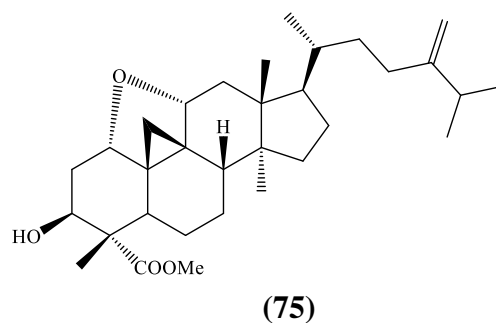
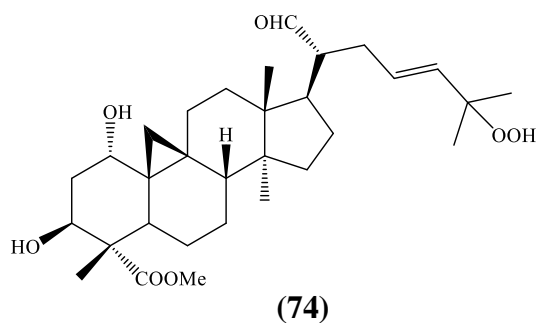


(73) Pinoembrina

KATERERE, SERAGE e ELOFF, 2018.

A maioria dos constituintes químicos isolados e identificados de *Combretum quadrangulare* pertence à classe dos triterpenos e flavonoides, sendo suas atividades citotóxica e hepatoprotetora amplamente estudadas. Os triterpenos metil quadrangutarato B (74) e D (75) exibiram forte atividade citotóxica contra células de carcinoma 26-L5 de cólon murino apresentando valores de ED₅₀ de 9,54 e 5,42 μM, respectivamente, assim como os flavonoides (76-79), com valores de IC₅₀ menores do que 6 μM. O extrato metanólico das sementes desta espécie também foi investigado quanto a sua fitoquímica por apresentar forte efeito inibitório da morte celular induzida por D-Ga1M/TNF-α (IC₅₀ 56,4 μM) em culturas primárias de hepatócitos de camundongos, o que mostra uma boa atividade hepatoprotetora. A investigação dessa fração levou ao isolamento de várias substâncias, sendo estes glicosídeos de triterpeno, lignanas e derivados de catequina. Destas, várias apresentaram excelente atividade hepatoprotetora, tais os quadranosídeos (II) (80), (I) (81) e (XI) (82) com valores de IC₅₀ de 63,1, 59,8 e 76,2 respectivamente. Outros compostos como o 1-O-galoil-6-O-(4-hidroxi-3,5-dimetoxi)benzoil-β-D-glicose (83) e metil galato (84) exibiram potentes atividades hepatoprotetivas, com IC₅₀ de 3,3 e 19,9 μM, respectivamente. A silibinina, utilizada como padrão, apresentou IC₅₀ de 39,6 μM (ROY *et. al.*, 2014). As estruturas químicas dos compostos isolados de *C. quadrangulare* são mostradas na Figura 14.

Figura 14 - Estruturas químicas dos compostos isolados de *Combretum quadrangulare*.



Fonte: ROY *et. al.*, 2014.

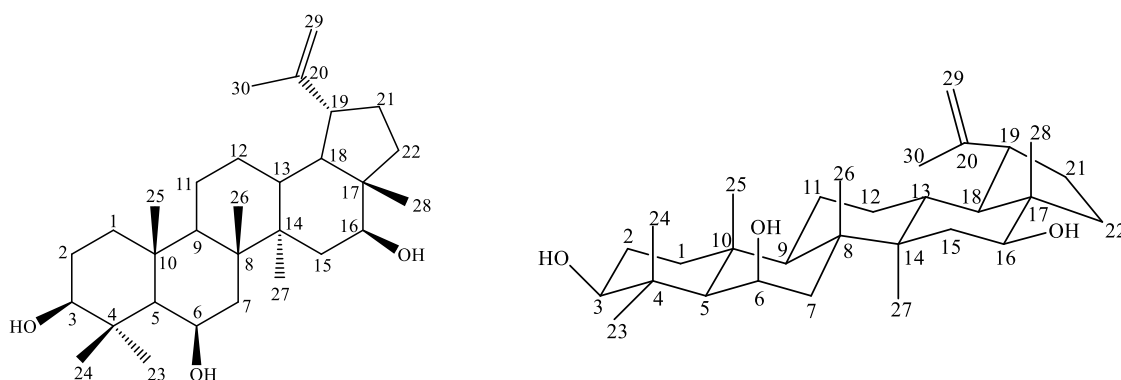
3.1.3 A espécie *Combretum leprosum* e seu potencial biológico

A espécie *Combretum leprosum*, um arbusto, popularmente conhecida como Mufumbo, Mofumbo ou Cipoaba (ALVES FILHO, 2015), é encontrada na região Nordeste do

Brasil e é amplamente utilizada pela medicina popular como agente cicatrizante, para doenças associadas à pele, como erupções cutâneas, como agente hemostático, sedativo, antidiarreico e expectorante. Várias partes da planta já foram estudadas (flores, cascas, raízes, folhas e frutos) e, a análise fitoquímica da espécie revelou que esta é rica em cicloartanos, triterpenos e flavonoides. Outros estudos de *C. leprosum* mostraram também efeitos anti-inflamatórios, antinociceptivos (LIRA *et al.*, 2002), anti-ulcerogênicos (NUNES *et al.*, 2009), antiofídicos (MORS *et al.*, 2000) e leishmanicida (TELES *et al.*, 2015).

Dentre os compostos encontrados em *C. leprosum*, o produto natural 3 β ,6 β ,16 β -tri-hidroxilup-20(29)-eno (CL-1) (**86**), representado na Figura 15, foi primeiramente isolado e descrito por FACUNDO e colaboradores (1993). Estes isolaram 800 mg deste metabólito do extrato hexânico (55 g) e mais 5 g do extrato etanólico (320 g), totalizando 5,8 gramas de material. Tal produto natural trata-se de um triterpeno pentacíclico, que possui hidroxilas secundárias ligadas aos carbonos C-3, C-6 e C-16 em posição beta e, uma dupla ligação exocíclica no carbono C-20. Sua determinação estrutural foi determinada a partir da análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (unidimensionais e bidimensionais), Infravermelho (IV) e Espectrometria de Massa de Baixa Resolução (EMBR).

Figura 15 - Estrutura química do triterpeno 3 β ,6 β ,16 β -tri-hidroxilup-20(29)-eno (CL-1).



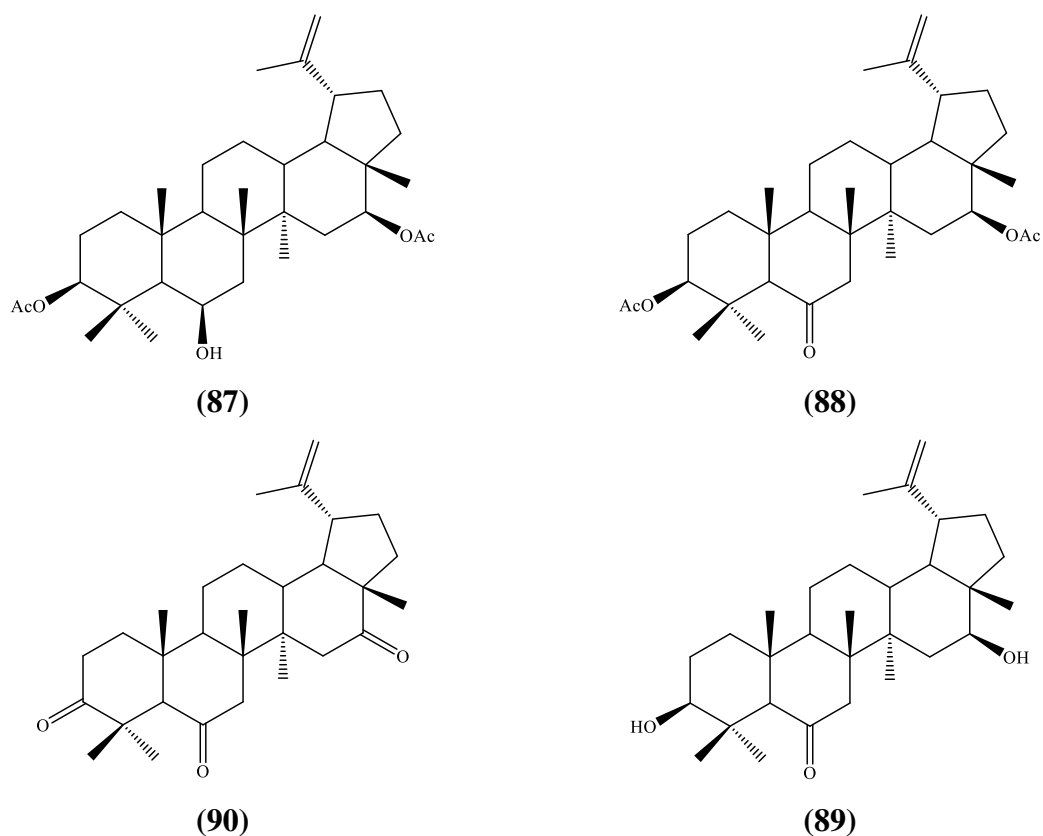
(86)

Fonte: O autor, 2020.

Várias atividades biológicas já foram relatadas para o triterpeno 3 β ,6 β ,16 β -tri-hidroxilup-20(29)-eno (CL-1), tais como atividade leishmanicida (TELES *et al.*, 2011), anti-inflamatória (BALBINOT-LONGHI *et al.*, 2012; PIETROVSKI *et al.*, 2006), antimicrobiana (ERIVASTO *et al.*, 2014), antinociceptiva (PIETROVSKI *et al.*, 2006; BALBINOT-LONGHI *et al.*, 2009), cicatrizante (NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2015) e anticancerígena (VIAU *et al.*, 2014).

Teles e colaboradores (2011) obtiveram alguns derivados sintéticos (Figura 16) de CL-1, e compararam a atividade destes com as atividades apresentadas pelo extrato etanólico dos frutos (EE) e do próprio produto natural CL-1, sobre promastigotas de *Leishmania amazonenses*. Esses autores observaram que tanto CL-1 ($CI_{50} = 3,3 \mu\text{g/mL}$), quanto os derivados **(90)** ($CI_{50} = 3,48 \mu\text{g/mL}$) e **(89)** ($CI_{50} = 5,8 \mu\text{g/mL}$) eram inibidores mais potentes de promastigotas em comparação com o extrato etanólico ($CI_{50} = 24,8 \mu\text{g/mL}$). O derivado **(87)** não apresentou atividade sobre as promastigotas de *L. amazonenses* e o derivado **(88)** não foi solúvel em etanol, de modo que não foi testado.

Figura 16 - Derivados já obtidos de CL-1 por Teles e colaboradores (2011).



Fonte: O autor, 2020.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Métodos cromatográficos

As análises cromatográficas de adsorção foram realizadas em coluna aberta utilizando sílica para cromatografia *flash* (Aldrich®). O comprimento e diâmetro das colunas utilizadas variaram de acordo com a quantidade das amostras a serem purificadas, bem como a quantidade de adsorvente necessário.

Para acompanhar o decorrer das reações e os processos de isolamento e purificação, foram feitas análises de cromatografia em camada delgada (CCD), onde se utilizaram cromatofolhas de alumínio recobertas com gel de sílica 60 ALUGRAM® SIL G/UV₂₅₄ (espessura de 0,2 mm). Após a aplicação e eluição das amostras, as cromatofolhas foram submetidas a um processo de revelação através da imersão em solução de vanilina (C₈H₈O₃, 5,0 g) e ácido perclórico (HClO₄, 0,75 mol/L, 100 mL) em etanol (C₂H₆O, 100 mL) seguida de aquecimento a 100 °C com pistola aquecedora da marca STEINEL® modelo HL 500, por aproximadamente meio minuto.

Para a eluição das amostras nas colunas e placas cromatográficas, foram utilizados os seguintes solventes puros ou em mistura entre eles de acordo com a polaridade mais adequada para a purificação e análises: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, sendo estes solventes de qualidade P.A.

Os extratos e frações provindos dos processos de isolamento e purificação foram concentrados sob pressão reduzida em rotoevaporador BUCHI Labortechnik AG modelo R-3 HB com sistema de refrigeração circulatório, sendo a temperatura do banho mantida em torno de 40 °C.

4.2 Métodos espectrométricos

4.2.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H), de Carbono-13 (RMN ¹³C), bem como os espectros unidimensionais e bidimensionais, foram obtidos em um espectrômetro Bruker, modelo Advance DRX-300, pertencente ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Ceará (CENAUREMN-UFC).

Os espectros foram obtidos na frequência do hidrogênio a 300 MHz e na frequência do carbono a 75 MHz. Para tanto, as amostras foram dissolvidas nos seguintes solventes de acordo com a solubilidade: metanol deuterado (MeOD) e Clorofórmio deuterado

(CDCl₃) e, analisadas em tubos de ressonância de 5 mm (WilmadLabglass, New Jersey, EUA).

Os deslocamentos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados da seguinte maneira para os espectros de RMN ¹H: clorofórmio (δ 7,27) e metanol (δ 3,31). Nos espectros de RMN ¹³C, os deslocamentos químicos (δ) foram referenciados pelos picos dos carbonos - ¹³C dos solventes: clorofórmio (δ 77,23) e metanol (δ 49,01).

A multiplicidade das bandas de absorção dos prótons nos espectros RMN ¹H foi indicada segundo a forma: s (singleto), d (duplete), t (triplete), q (quarteto), dd (duplete de duplete), dq (duplete de quarteto) e m (multiplete).

O padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN ¹³C foi determinado através do emprego das técnicas APT (*Attached Proton Test*), onde o tempo de atraso (*delay time*) é mantido a 1/J segundos, de modo que as linhas espectrais de CH e CH₃ apresentam-se com amplitude negativa, e os sinais de C e CH₂ com amplitude positiva e, DEPT 135° (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*). Utilizou-se a seguinte convenção para a descrição dos padrões de hidrogenação dos carbonos observados: C (carbono não hidrogenado), CH (carbono metínico), CH₂ (carbono metilênico), CH₃ (carbono metílico). Os carbonos não hidrogenados foram caracterizados ainda pelas correlações dos espectros HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Coherence*) e HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*).

4.2.2 Espectroscopia de Absorção na Região do infravermelho (IV)

Espectros de absorção na região do infravermelho dos derivados foram obtidos em espectrofotômetro SHIMADZU[®], modelo IRTracer-100, pertencente ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (DQOI/UFC).

4.2.3 Espectrometria de Massa de Alta Resolução (EMAR)

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em espectrômetro de Massas de Alta Resolução Q-Exactive, ThermoScientific, com fonte H-ESI, pertencente ao Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação de Goiânia (CRTI), Goiânia-GO.

4.3 Ponto de Fusão

Os pontos de fusão foram determinados em equipamento de Microquímica modelo MQAPF - 302, a uma taxa de 2°C/min.

4.4 Solventes e reagentes

Os reagentes utilizados para o desenvolvimento dos derivados foram: reagente de Jones ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7/\text{H}_2\text{SO}_4$), trietilamina, 2,4-dinitrofenilhidrazina, cloreto de propanoíla, 4-dimetilaminopiridina, ácido clorídrico, cloridrato de hidroxilamina, e catalisador Pd/C 5%. Quanto aos solventes, foram utilizados hexano, diclorometano, acetato de etila e álcool metílico da marca SIGMA-ALDRICH®.

4.5 Coleta de *Combretum leprosum*

As flores de *Combretum leprosum* foram coletadas no Sítio São Bento, localizado no município de Mombaça-Ce (S 5° 49' 57,10" W 39° 52' 09,40").

4.6 Isolamento do 3 β ,6 β ,16 β -tri-hidroxilup-20(29)-eno

As inflorescências de *C. leprosum* (220 g) foram trituradas e secas em estufa à temperatura de 50 °C por 24 horas para eliminação de água presente. Após, realizou-se 3 extrações com 800 mL de diclorometano, com intervalos de 24 horas entre cada extração. O solvente foi removido em rotoevaporador sob pressão reduzida, para a obtenção de 28,81 g de um extrato vítreo de coloração escura, denominado MBFD-1. Este extrato (10 g) foi adsorvido em 15 g de sílica gel e em seguida submetido à cromatografia em coluna aberta (Φ = 4,0 cm) com 28 g de gel de sílica e eluído com hexano (3 x 50 mL), seguido de CH_2Cl_2 (8 x 50 mL), AcOEt (6 x 50 mL) e MeOH (7 x 50 mL), respectivamente. Todas as amostras foram concentradas em evaporador rotativo e analisadas por CCD, onde se verificou a presença do composto 3 β ,6 β ,16 β -tri-hidroxilup-20(29)-eno na fração diclorometano com certa impureza.

A fração diclorometano (1,77 g) foi então adsorvida em 2 g de sílica gel 60 e em seguida submetida à cromatografia em coluna aberta (Φ = 2,5 cm) com 36,5 gramas de gel de sílica. Realizou-se eluição isocrática com 390 mL de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (7:3), seguido de 150 mL de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (1:1), 210 mL de AcOEt e 30 mL de MeOH.

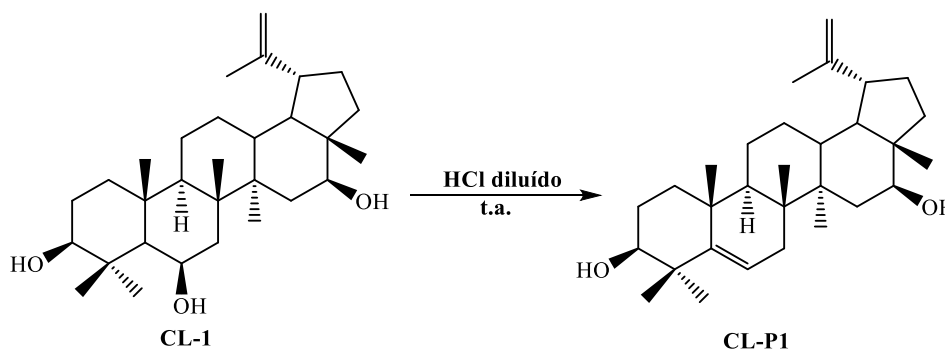
As alíquotas coletadas foram analisadas por cromatografia em camada delgada e as frações de 7-13 foram reunidas, apresentado uma massa total de 472,1 mg de CL-1 puro na forma de um sólido amorfo branco.

4.7 Preparação dos derivados do 3 β , 6 β , 16 β -tri-hidroxilup-20(29)-eno (CL-1)

4.7.1 Síntese do derivado CL-P1 (desidratado)

A reação de desidratação foi realizada em balão de fundo redondo de 50 mL contendo 0,113 mmol (51,8 mg) de CL-1 dissolvido em 10 mL de CH₂Cl₂. Em seguida, adicionou-se 5 mL de HCl concentrado. A mistura foi mantida sobre agitação magnética à temperatura ambiente e monitorada por CCD. Após 13 horas reacionais, a reação foi neutralizada com solução de NaOH e extraída 5 vezes com 5 mL de CH₂Cl₂. O solvente foi evaporado em evaporador rotativo, de modo a obter 53,6 mg de massa reacional. Esta foi submetida à cromatografia de adsorção sob 18 g de sílica flash ($\Phi = 1,5$ cm), utilizando 150 mL de diclorometano:acetato (9:1). O produto CL-P1 foi obtido na forma de sólido cristalino amarelado, com 59,48% de rendimento. A Figura 17 representa o esquema reacional da reação de desidratação de CL-1.

Figura 17 - Esquema reacional da reação de desidratação de CL-1.

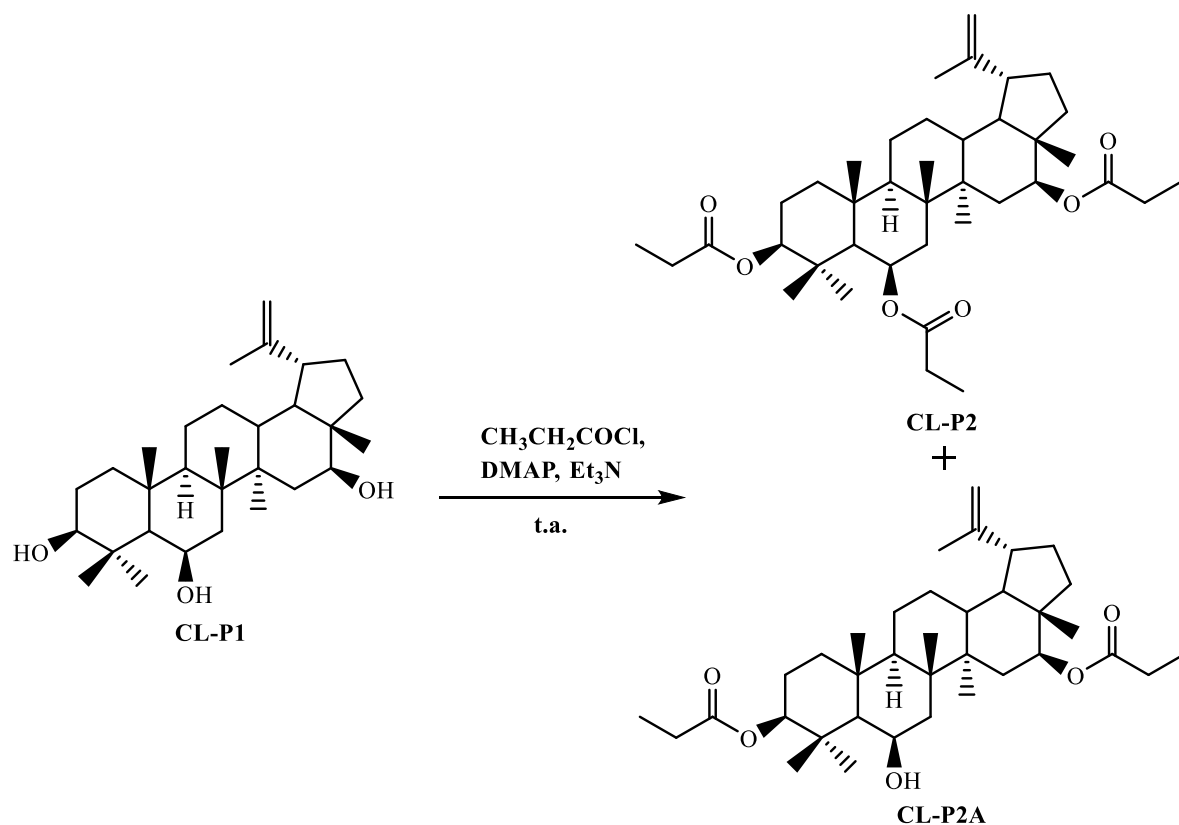


Fonte: O autor, 2020.

4.7.2 Síntese dos derivados CL-P2 e CL-P2A (triacilado e diacilado)

Dissolveram-se 0,218 mmol (100 mg) de CL-1 em 2,18 mL de CH₂Cl₂ em balão de fundo redondo de 25 mL. Após, adicionaram-se 91 μ L de C₃H₅OCl (cloreto de propanoíla), 26,59 mg de DMAP e 31 μ L de Et₃N. A mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente e monitorada por CCD. Após 72 horas, a mistura foi concentrada em rotoevaporador, de modo a obter 231 mg de massa reacional. Dois produtos foram obtidos e purificados por cromatografia em coluna aberta contendo 13 g de sílica flash ($\Phi = 1,5$ cm) e usando 400 mL do eluente hexano:acetato:metanol (9;0,5;0,5). Os produtos CL-P2 (produto triacilado) (79 mg) e CL-P2A (produto diacilado) (37,4 mg) foram obtidos com rendimentos de 57,80% e 30,05%, respectivamente. O esquema reacional desta reação é mostrado na Figura 18.

Figura 18 - Esquema reacioanal da reação de acilação de CL-1 com cloreto de propanoíla.

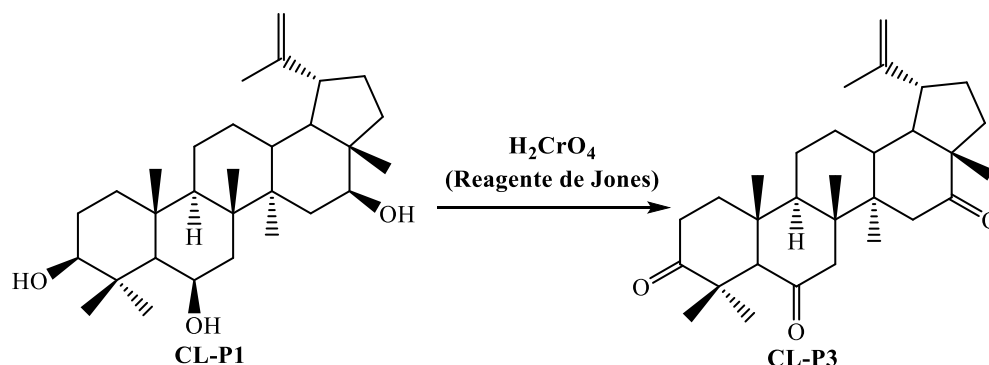


Fonte: O autor, 2020.

4.7.3 Síntese do derivado CL-P3 (oxidado)

A reação de oxidação utilizando reagente de Jones (ácido crômico) foi realizada em um balão de fundo redondo de 50 mL contendo 0,218 mmol (100 mg) de CL-1 dissolvidos em 10 mL de acetato de etila e 1,5 mL do reagente de Jones. A mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente e monitorada por CCD. Após 3 horas, a reação foi tratada através da adição de 40 mL de água destilada, seguida por extração (5x5 mL) da fase aquosa com acetato de etila. A fase acetato foi então evaporada em evaporador rotativo e o produto amarelado cristalino, intitulado CL-P3 (97,6 mg), foi obtido puro, com rendimento de 98,90 %. A Figura 19 apresenta o esquema reacional para a oxidação de CL-1.

Figura 19 - Esquema reacional da reação de oxidação de CL-1.

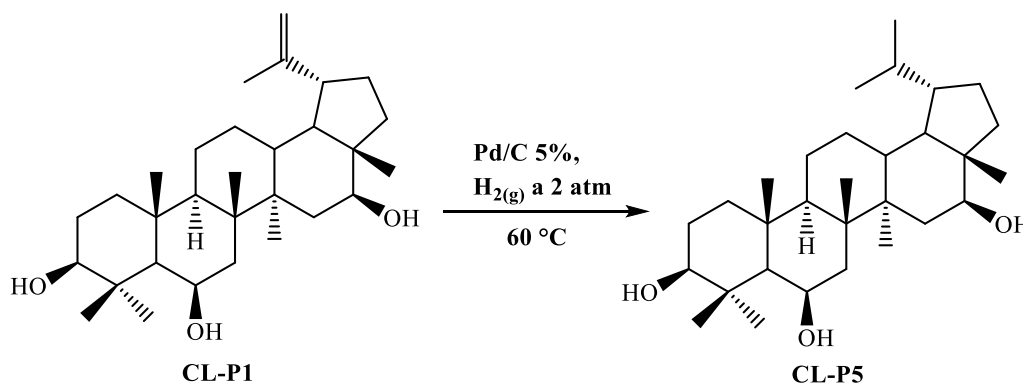


Fonte: O autor, 2020.

4.7.4 Síntese do derivado CL-P5 (hidrogenado)

A reação de hidrogenação do substrato CL-1 foi realizada através do sistema padrão de schlenk empregando como catalisador paládio em carvão ativo (Pd/C 5%) em um excesso de 4,0 (quatro) vezes a razão catalisador/substrato. Em um schlenk, foi adicionado 10,0 mL de metanol, 0,26 mmol (46,16 mg) do catalisador e 0,065 mmol (30 mg) do substrato. O sistema foi previamente desaerado empregando argônio (Ar), purgado 3 vezes com H_2 e, em seguida, mantido em atmosfera de H_2 a 2,0 atm por um intervalo de 8h a uma temperatura de 60 °C e agitação vigorosa. Após esse período o meio reacional foi centrifugado e o sobrenadante foi coletado e concentrado em rotoevaporador, de modo a obter uma massa do produto intitulado CL-P5 de 29 mg, correspondendo a um rendimento de 96,34 %. O esquema reacional para a obtenção do derivado CL-P5 está representado na Figura 20.

Figura 20 - Esquema reacional da reação de hidrogenação de CL-P1.

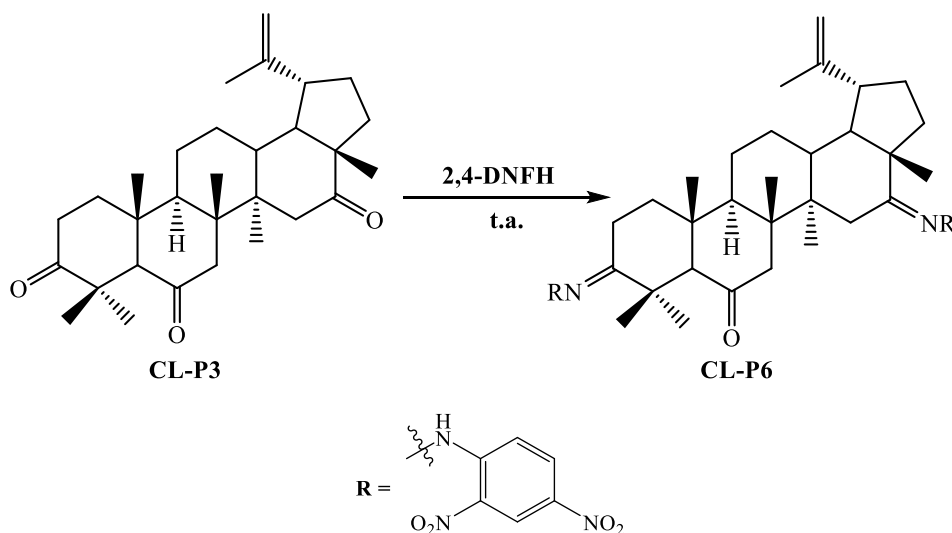


Fonte: O autor, 2020.

4.7.5 Síntese do derivado CL-P6 (hidrazona)

Dissolveram-se 0,111 mmol de CL-P3 (50 mg) em 5 mL de acetato em balão de fundo redondo de 25 mL. Adicionou-se em seguida 2,1 mL da solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina. A mistura foi deixada sob agitação magnética à temperatura ambiente e monitorada por CCD. Após 7 horas reacionais, a solução foi transferida para um funil de separação e tratada com 30 mL de água. A fase aquosa gerada foi extraída 3 vezes com 10 mL de acetato e à fase acetato final foi adicionada Na₂SO₄ anidro para a retirada de traços de água. Esta fase foi então concentrada em evaporador rotativo, de modo a obter 101 mg de massa reacional. Este material foi submetido à cromatografia em coluna aberta utilizando 16 g de sílica flash ($\Phi = 1,5$ cm) e 150 mL de diclorometano como eluente, de modo a obter 56,9 mg de um derivado sólido, alaranjado e cristalino intitulado CL-P6. O rendimento desta reação foi de 63,37%. A Figura 21 representa o esquema reacional.

Figura 21 - Esquema reacional da reação de CL-P3 com 2,4-dinitrofenilhidrazina.



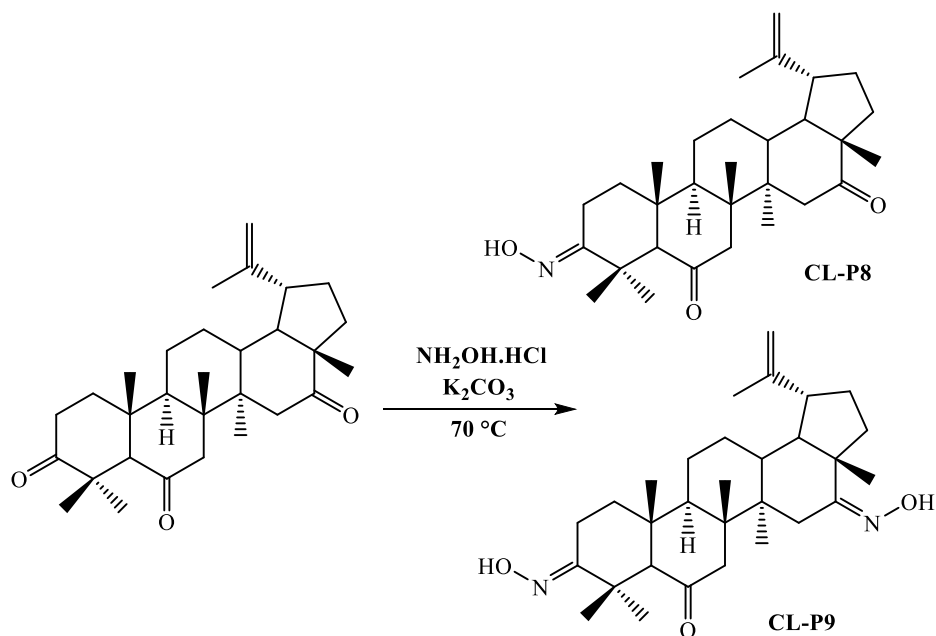
Fonte: O autor, 2020.

4.7.6 Síntese dos derivados CL-P8 e CL-P9 (oximas)

Em um balão reacional de 25 mL foram dissolvidos 0,22 mmol de CL-P3 (100 mg), 0,67 mmol de cloridrato de hidroxilamina e 0,72 mmol de K₂CO₃ em 3 mL de metanol. A reação prosseguiu sob refluxo a 70 °C durante uma hora e, após resfriamento da solução, esta foi filtrada para retirada das partícula K₂CO₃. A fase residual livre de K₂CO₃ foi então extraída com diclorometano (5x5 mL), seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada em rotoevaporador, de modo a obter uma massa reacional de 123,8 mg. Esta foi submetida à cromatografia em coluna aberta utilizando 17 gramas de sílica flash ($\Phi = 1,5$ cm) e 200 mL do eluente hexano/AcOEt 8:2. Dois produtos foram obtidos, a saber, as oximas intituladas

CL-P8 (22 mg) e CL-P9 (51 mg), com rendimentos de 21,58 % e 48,47 %, respectivamente. O esquema reacional para obtenção dos destes derivados está representado na Figura 22.

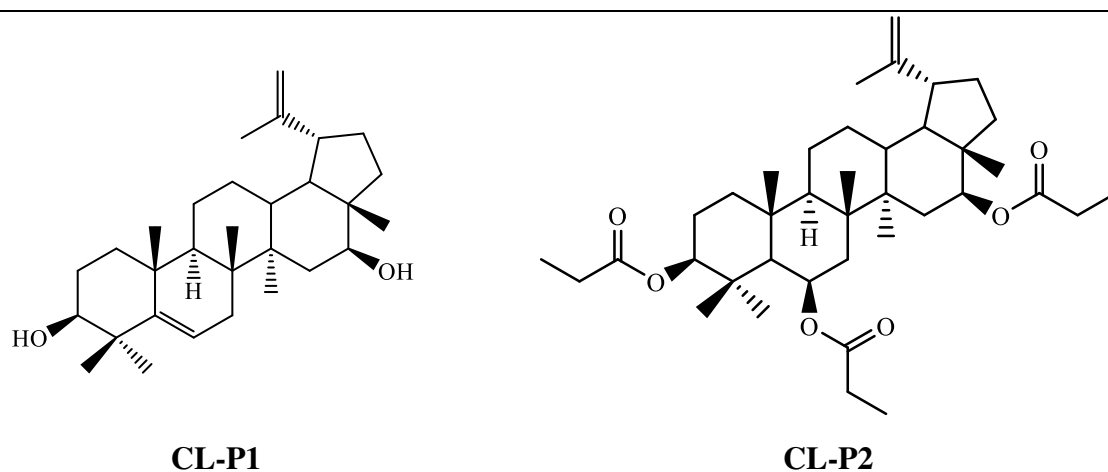
Figura 22 - Esquema reacional para a obtenção das oximas CL-P8 e CL-P9.

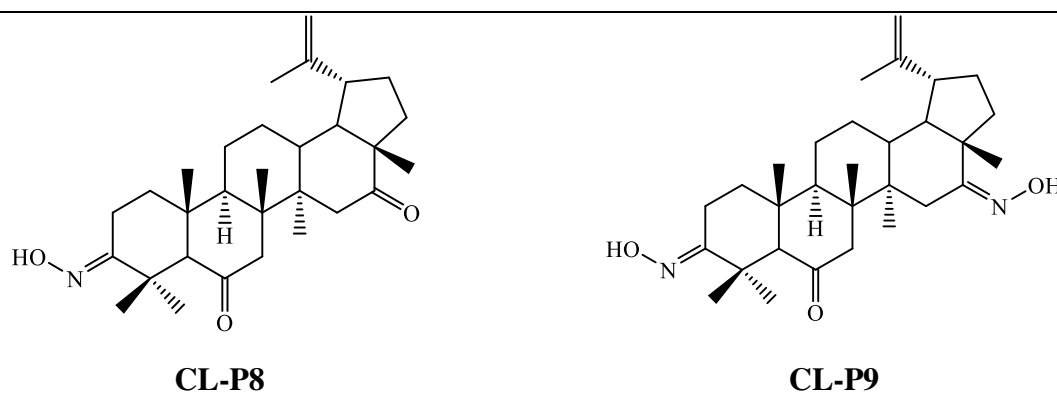
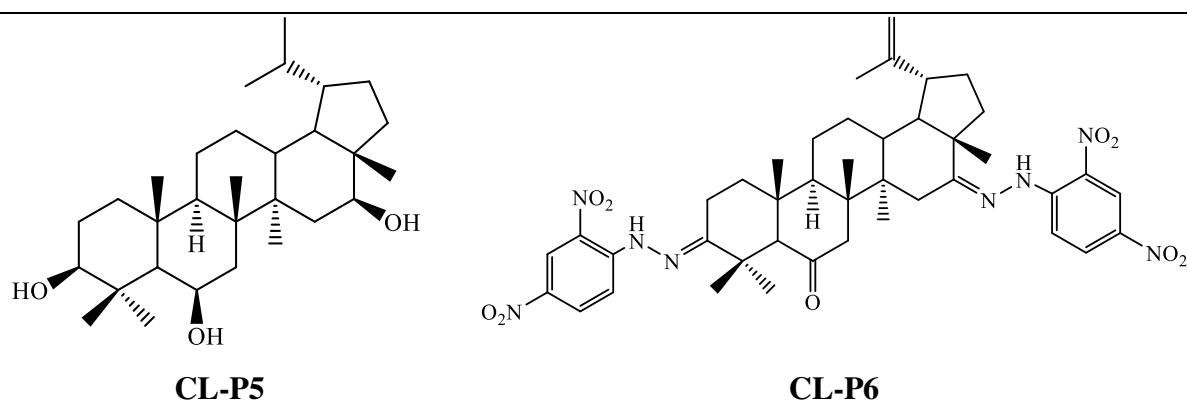
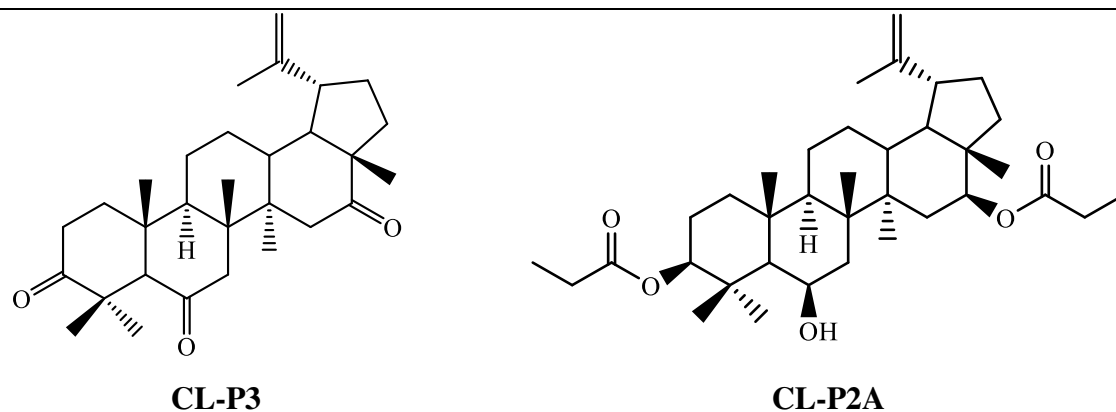


Fonte: O autor, 2020.

A Tabela 2 apresenta a estrutura química de todos os derivados obtidos através das modificações químicas de CL-1.

Tabela 2 - Estrutura química de todos os derivados obtidos de CL-1.





Fonte: O autor, 2020.

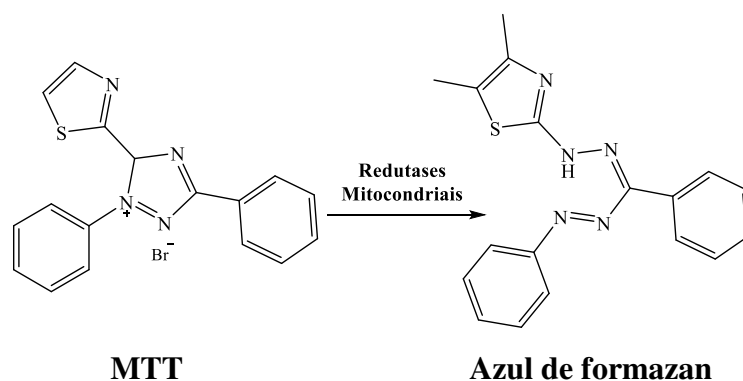
4.8 Ensaios de atividade biológica do 3 β ,6 β ,16 β -tri-hidroxilup-20(29)-eno e derivados

4.8.1 Ensaio da atividade citotóxica

Os testes de atividade citotóxica foram realizados no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. A análise de citotoxicidade foi feita por um método rápido, sensível e barato, conhecido como MTT. Este método trata-se de uma análise calorimétrica baseada na conversão do sal brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) em (E,Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazan (azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente

ativas. Desta forma, é possível analisar a viabilidade e o estado metabólico das células, e consequentemente a citotoxicidade, embora o mecanismo de ação não seja definido (BERRIDGE *et al.*, 1996). A conversão do MTT em azul de formazan está representado na Figura 23.

Figura 23 - Conversão do 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) em (E,Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazan (azul de formazan).



Fonte: O autor, 2020.

O triterpeno 3 β ,6 β ,16 β -tri-hidroxilup-20(29)-eno (CL-1) e os derivados CL-P1, CL-P3 e CL-P5 (Tabela 3) foram avaliados contra 4 linhagens de células tumorais, sendo estas HCT-116 (côlon humano), SNB-19 (Glioblastoma), PC3 (Próstata) e HL 60 (Leucemia), sendo estas cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA). Tais células foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementadas com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. As amostras foram diluídas em DMSO para concentrações de estoque de 5 mg/mL e, para o teste de concentração única, foram testadas na concentração de 25 μ g/mL.

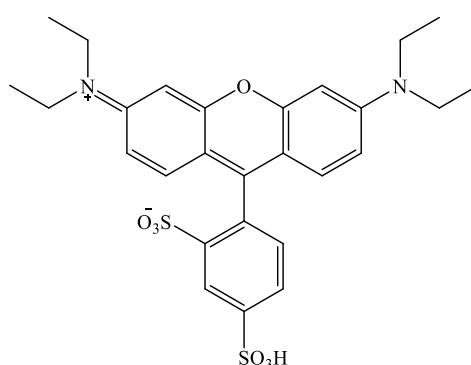
As células foram plaqueadas nas concentrações de 0,7 x 10⁵, 0,1 x 10⁶, 0,3 x 10⁶, céls/mL para as linhagens HCT-116, SNB-19/PC3 e HL 60, respectivamente. As placas foram incubadas com a substância por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida, foram adicionados 150 μ L da solução de MTT (sal de tetrazólio), e as placas foram incubadas por 3h. Após a incubação as placas foram novamente centrifugadas para retirada da solução de MTT. A absorbância foi lida após a dissolução do precipitado de formazan com 150 μ L de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas em três ensaios independentes. Os experimentos de concentração única foram analisados segundo a média \pm desvio padrão (DP) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPadPrism 6*.

4.8.2 Ensaio de atividade citotóxica de CL-P2 e CL-P3

Os ensaios de atividade citotóxica de CL-P2 e CL-P3 foram realizados no Laboratório de Farmacologia-Bioquímica e Laboratório de Farmacogenética do NPDM-UFC.

O ensaio da sulforodamina B (SRB) (Figura 24) baseia-se na ligação deste corante com os aminoácidos básicos proteicos presentes nas células, determinando a quantidade de células viáveis através de uma estimativa da massa de proteína total (PAPAZISIS *et al.*, 1997). Este método colorimétrico foi escolhido pela sua maior sensibilidade e melhor linearidade com número de células que o método do MTT (KEEPERS *et al.*, 1991).

Figura 24 - Estrutura química da sulforodamina B.



Fonte: O autor, 2020.

Fibroblastos murinos da linhagem L929 foram cultivados em meio *Dulbecco's Eagle Medium* (DMEM), suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) em incubadora a 37°C, com atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO₂. Após crescimento, as células foram removidas e dispostas em placas com 96 poços com DMEM 10% SFB (densidade = 2 x 10⁴ cel/mL; 200 µg/poço). Os compostos CL-P2 (1mg/mL) e CL-P3 (1mg/mL) foram dissolvidos em DMSO, e em seguida diluídos em DMEM 10 % para obtenção das concentrações 100, 50, 25, 10, e 5 µg/mL. Após 24 horas de plaqueamento, CL-P2 e CL-P3 foram adicionadas às células (diluição 1:10) para obtenção da concentração final de 10; 5; 2,5; 1 e 0,5 a µg/mL. O grupo DMEM não recebeu nenhum tratamento e corresponde ao grupo controle utilizado para o percentual de viabilidade celular, enquanto o grupo DMSO equivale ao grupo controle comparativo.

Após o tempo de incubação com os derivados, o meio de cultivo da placa foi removido e as células fixadas com 100 µL de ácido tricloroacético 10% (p/v). Posteriormente, estas foram coradas com 100 µL de SRB 0,4% (p/v) e lavadas com ácido acético 1%. Foram adicionados 200 µL de solução de leitura tampão Tris-base (10 mM) (HOUGHTON *et al.*, 2007) e, as absorbâncias (Abs) das placas foram lidas em leitora de microplacas no

comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram expressos como percentual de viabilidade celular, determinado através da fórmula:

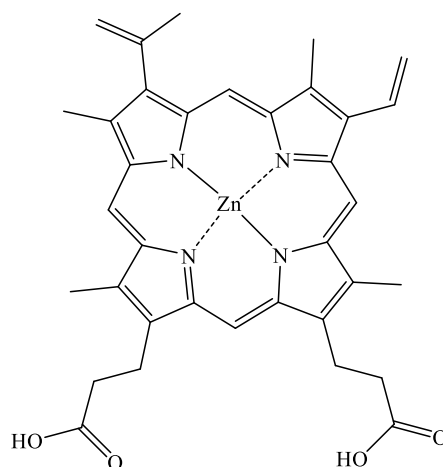
$$\text{Viabilidade (\%)} = (\text{Abs amostra} \times 100) / (\text{Abs média} | \text{grupo controle DMEM}) \text{ (I)}$$

4.8.3 Ensaio de atividade analgésica de CL-P2

Os ensaios de atividade analgésica *in vivo* de CL-P2 e CL-P3 foram realizados no Laboratório de Farmacologia (LaFS), Universidade Federal do Ceará - Sobral.

Para o teste de atividade analgésica, o derivado CL-P2 foi administrado em camundongos via oral (v.o.) nas doses de 0,1; 1 ou 10 mg/kg uma hora antes da injeção de zymosan, uma substância indutora de contorções abdominais (0,6% - 0,1 ml/10 g). Em seguida, o número de contorções abdominais foi contabilizado durante 30 min. O grupo não tratado (NT) representa animais que receberam apenas o veículo (salina 0,9%; v.o.), seguido do estímulo inflamatório. A dependência do efeito antinociceptivo de CL-P2 em relação à via HO-1 (heme oxigenase-1) foi avaliada utilizando o modelo de contorções abdominais induzido por zymosan e pela utilização de um inibidor específico da HO-1, o zinco-protoporfirina IX (ZnPP-IX, Figura 25).

Figura 25 - Estrutura química do inibidor zinco-protoporfirina (ZnPP-IX).



Fonte: O autor, 2020.

Para tanto, os animais foram divididos em grupos e tratados de acordo com os procedimentos descritos abaixo:

1. Grupo zymosan (grupo não tratado - NT): veículo salina 0,9% seguida da injeção (i.p.) de zymosan (1mg/animal; 250 250µl).
2. Grupo CL-P2 (10 mg/Kg): dose (v.o.) de CL-P2 seguida da injeção (i.p.), após 1h, de zymosan (1mg/animal; 250 250µl).

3. Grupo ZnPP-IX (3 mg/Kg) + CL-P2 (10 mg/Kg): Injeção (s.c.) de ZnPP-IX seguida da injeção, após 30 min, de CL-P2 e, após 1h, injeção (i.p.) de zymosan (1mg/animal; 250 µl).
4. Grupo ZnPP-IX (3 mg/Kg): Injeção (s.c) de ZnPP IX e, após 30 min, injeção (i.p) de zymosan (1 mg/animal; 250µl).

Para a realização dos testes estatísticos, utilizou-se o programa GraphPad Prism® (v 5.0), sendo os resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM). Para comparações múltiplas de valores numéricos entre mais de três grupos foi utilizado o teste de ANOVA, seguido por Tukey. Os resultados que representaram diferença estatística adotaram valores mínimos de $p < 0,05$.

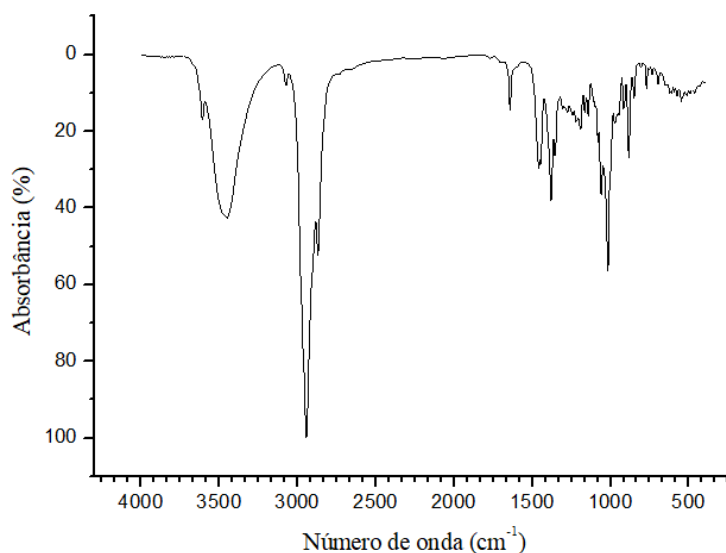
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização estrutural do triterpeno 3 β ,6 β ,16 β -tri-hidroxilup-20(29)-eno (CL-1)

Conforme item 5.5, o triterpeno CL-1 foi isolado com 26,67 % de rendimento (472,1 mg) a partir do extrato diclorometano das inflorescências de *C. leprosum* (1,77 g).

O composto CL-1 apresentou-se como um sólido branco amorfo com ponto de fusão entre 270 - 272 °C. O espectro de massa de baixa resolução de CL-1 mostrou um pico de íon molecular em m/z 458 $[M]^+$, confirmando a fórmula molecular $C_{30}H_{50}O_3$ (FACUNDO *et al.*, 1993). A Figura 26, apresenta o espectro de infravermelho de CL-1, onde se destacam as bandas em 3468 cm^{-1} (ν_{O-H}), 3072 cm^{-1} ($\nu_{C_{sp2}-H}$), 2943 cm^{-1} ($\nu_{C_{sp3}-H}$) e 1643 cm^{-1} ($\nu_{C=C}$) de alceno.

Figura 26 - Espectro de infravermelho de CL-1.

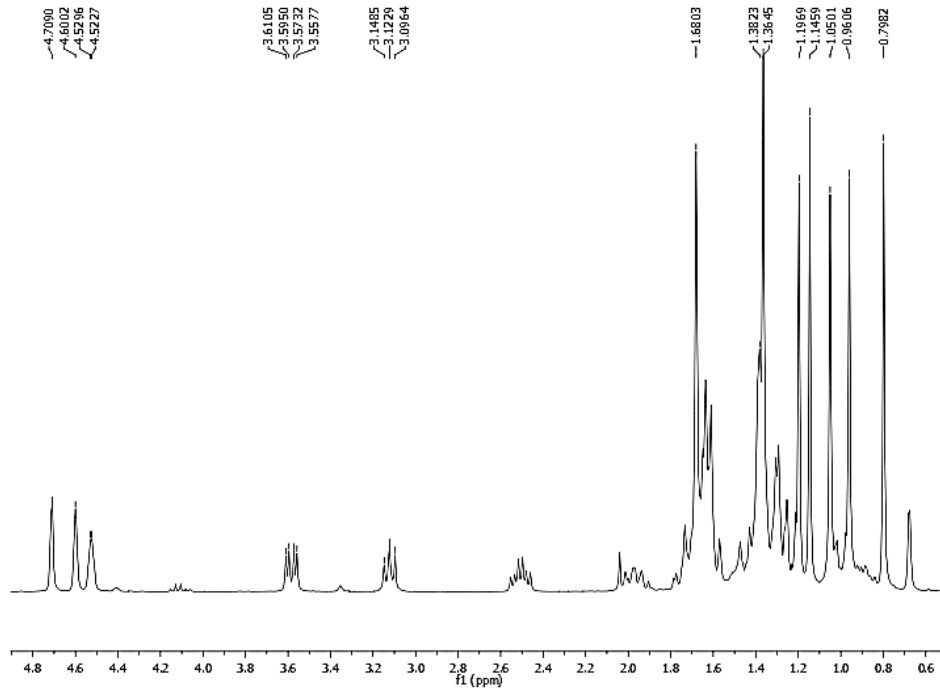


Fonte: O autor, 2020.

O espectro de RMN 1H ($CDCl_3$ /300 MHz) de CL-1, mostrado na Figura 27, apresentou sinais característicos de deslocamento em δ_H 4,72 (H-29, s) e δ_H 4,61 (H-29, s), indicando a presença de uma dupla ligação. Tal atribuição foi confirmada pelos deslocamentos δ_C 150,13 (C-20) e δ_C 110,04 (C-29) no espectro de RMN ^{13}C . O índice de deficiência de hidrogênio calculado a partir da fórmula indica 6 graus de insaturação, sendo 5 graus correspondentes aos 5 anéis da molécula e 1 grau referente à presença de uma ligação dupla. A presença dos grupos hidroxílicos secundários foi confirmada pelos deslocamentos em δ_H 3,16 (dd, H-3, $J = 11$ e 4 Hz), $\delta_H = 3,59$ (dd, H-16, $J = 16$ Hz e 4 Hz) e $\delta_H = 4,53$ (m, H-6) no espectro de RMN 1H e pelos deslocamentos δ_C 79,31 (C-3), 77,22 (C-16) e 69,05 (C-6) no espectro de RMN ^{13}C . O padrão de acoplamento dos hidrogênios de CL-1 foi confirmado

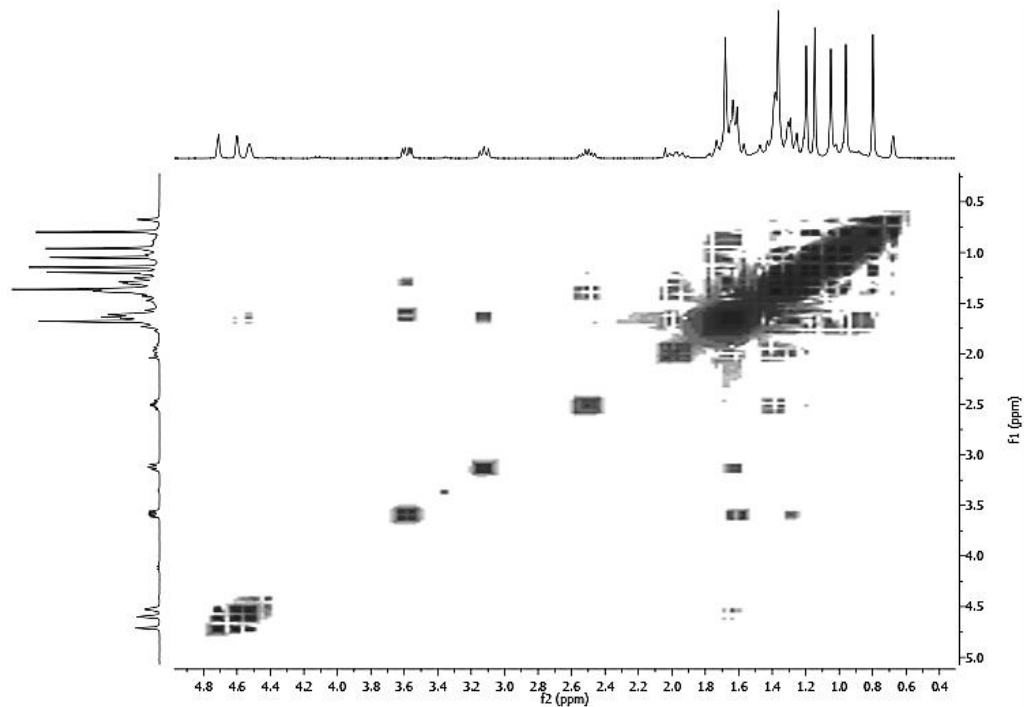
através do espectro bidimensional ^1H - ^1H -COSY (Figura 28). As principais correlações obtidas deste espectro são mostradas na Figura 29.

Figura 27 - Espectro de RMN ^1H de CL-1 ($\text{CDCl}_3/300\text{ MHz}$).



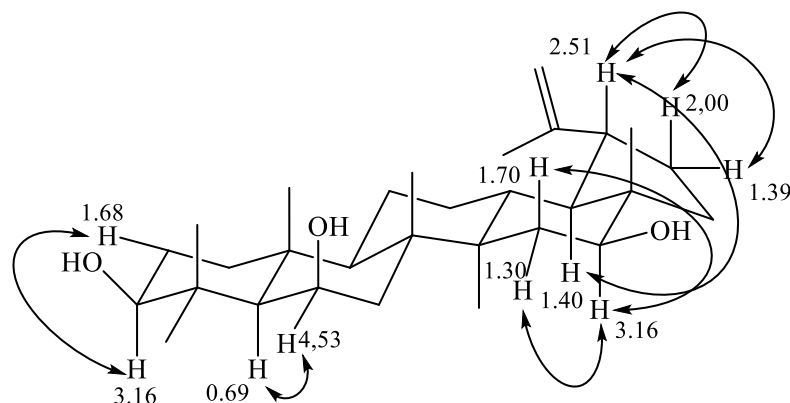
Fonte: O autor, 2020.

Figura 28 - Espectro de RMN 2D COSY ^1H - ^1H de CL-1 ($\text{CDCl}_3/500\text{ MHz}$).



Fonte: O autor, 2020.

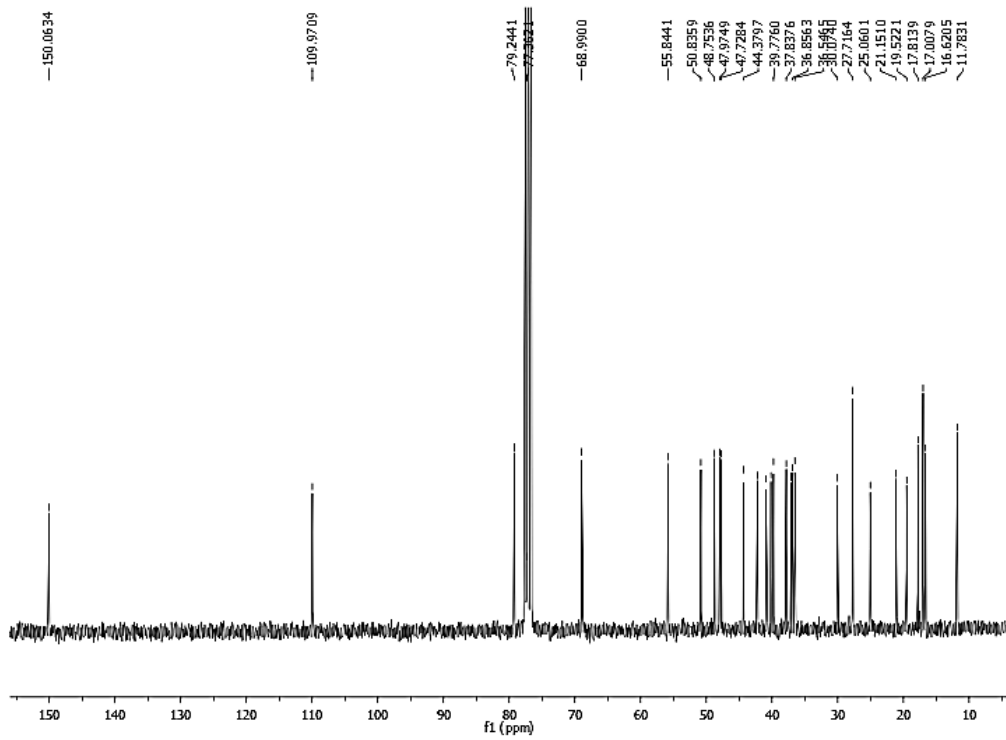
Figura 29 - Principais correlações do espectro COSY 1H-1H de CL-1 (CDCl₃/300 MHz).



Fonte: O autor, 2020.

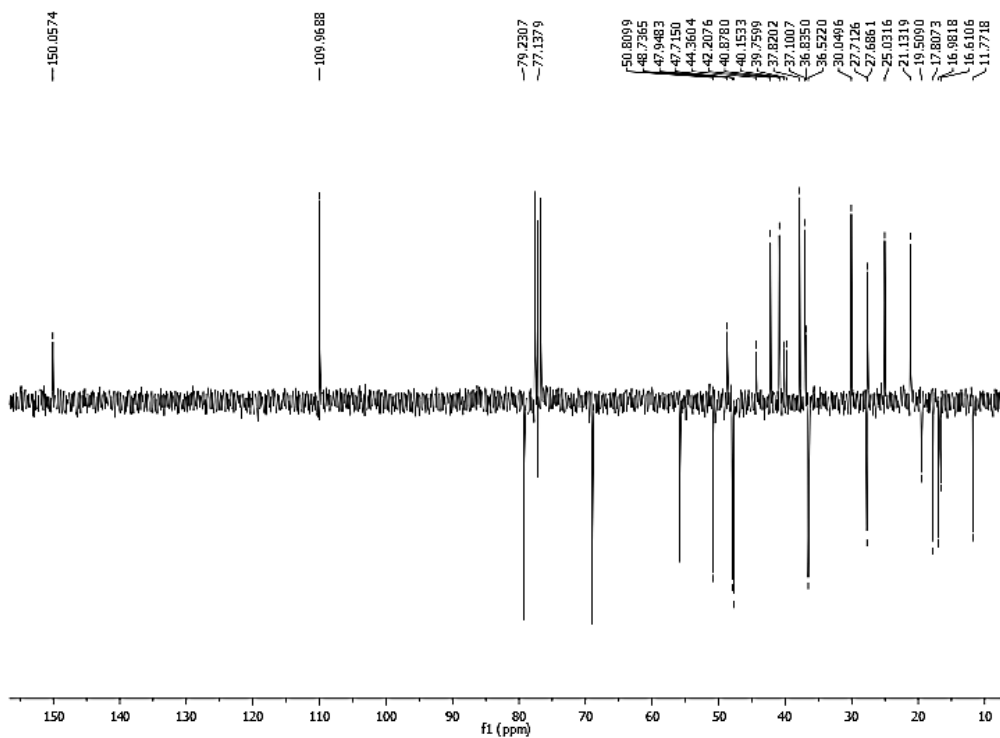
No espectro de RMN ¹³C BB-decoupled (BBD) (CDCl₃/75 MHz) de CL-1 (Figura 30) foram observados 28 linhas espectrais, sendo que duas destas apresentam-se superpostas (δ_C C-24/C-26 e δ_C C-17/C-18). Desses 28 sinais, 2 foram relacionados a carbonos sp^2 de ligação dupla e os outros 26 atribuídos a carbonos sp^3 . O espectro de RMN ¹³C-APT de CL-1, mostrado na Figura 31, permitiu observar os padrões de hidrogenação, onde se verificou a presença de 7 carbonos metílicos em $\delta_C = 27,79$ (C-23), 17,08 (C-24), 17,89 (C-25), 17,08 (C-26), 17,69 (C-27), 11,85 (C-28), 19,59 (C-30); 9 carbonos metilênicos em $\delta_C = 40,96$ (C-1), 27,76 (C-2), 42,30 (C-7), 21,21 (C-11), 25,13 (C-12), 37,20 (C-15), 30,13 (C-21), 37,90 (C-22) e 110,04 (C-29), onde este último deslocamento é referente a um grupo metilênico terminal de uma dupla ligação; 8 sinais correspondentes a carbonos metínicos em $\delta_C = 79,31$ (C-3), 55,89 (C-5), 69,05 (C-6), 50,89 (C-9), 36,91 (C-13), 77,22 (C-16), 48,81 (C-18), 48,03 (C-19) e mais 6 linhas espectrais correspondentes a carbonos não-hidrogenados em $\delta_C = 39,84$ (C-4), 40,23 (C-8), 36,92 (C-10), 44,44 (C-14), 48,81 (C-17) e 150,13 (C-20), onde este último deslocamento corresponde a um carbono não hidrogenado pertencente a uma dupla ligação e confirma a presença de um alceno dissustituído.

Figura 30 - Espectro de RMN ^{13}C - BBD de CL-1 ($\text{CDCl}_3/75\text{ MHz}$).



Fonte: O autor, 2020.

Figura 31- Espectro de RMN ^{13}C -APT de CL-1 ($\text{CDCl}_3/75\text{ MHz}$).

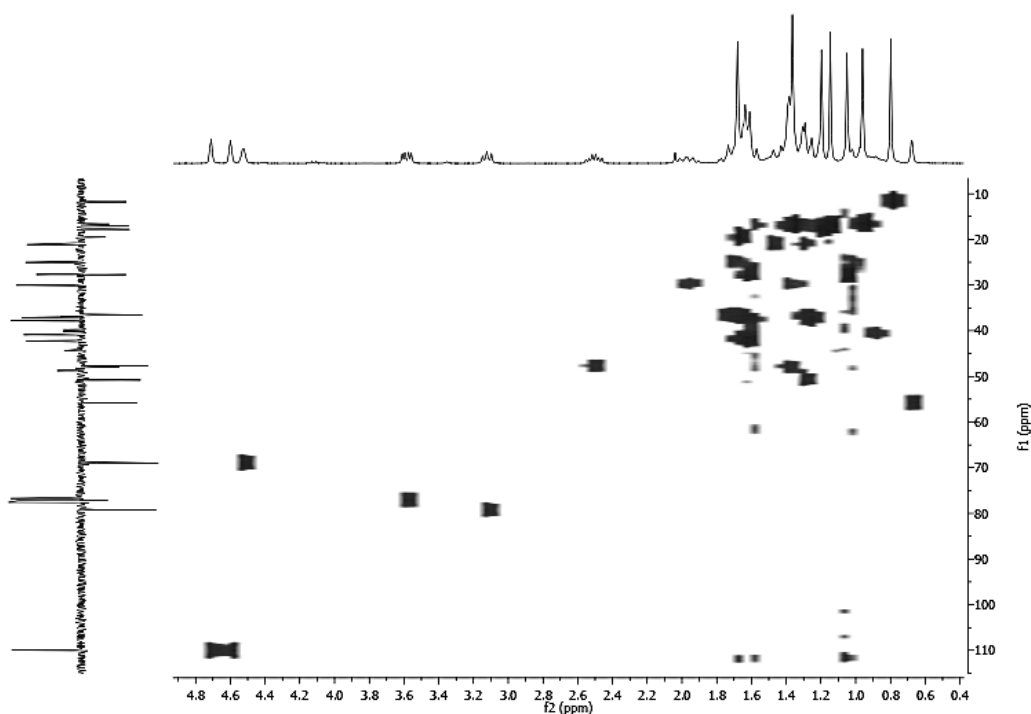


Fonte: O autor, 2020.

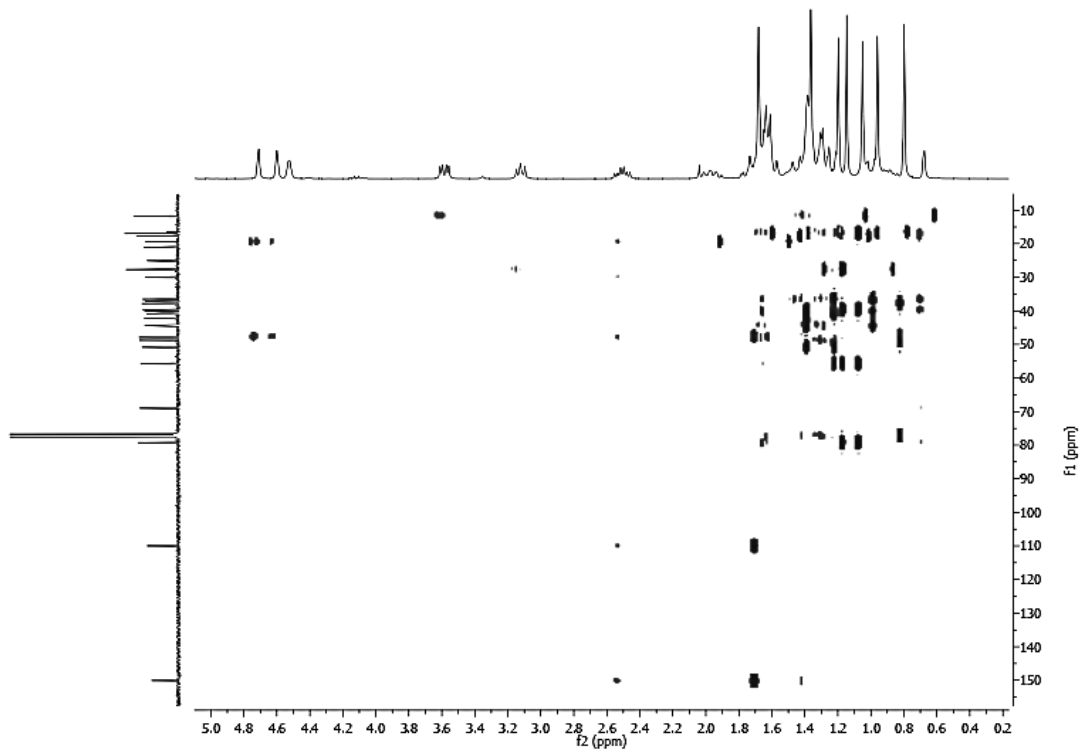
Através da análise dos espectros bidimensionais de RMN ^1H - ^{13}C -HSQC (Figura 32) e ^1H - ^{13}C -HMBC (Figura 33), correlacionou-se os sinais dos hidrogênios aos carbonos correspondentes a uma ligação (1J), em se tratando do método HSQC, e a duas (2J) e três (3J) ligações, pelo método HMBC.

A partir dos dados espectrais e com base na literatura (FACUNDO, *et al.*, 1993), foi possível caracterizar CL-1 como sendo o composto $3\beta,6\beta,16\beta$ -tri-hidroxilup-20(29)-eno, mostrado na Figura 34. As correlações feitas por HSQC e HMBC, bem como a comparação entre os valores espectrais de RMN ^1H e ^{13}C encontrados para CL-1 com os valores da literatura são mostrados Tabela 3.

Figura 32 - Espectro de RMN 2D HSQC ^1H - ^{13}C de CL-1 (CDCl_3 , 300/75 MHz).

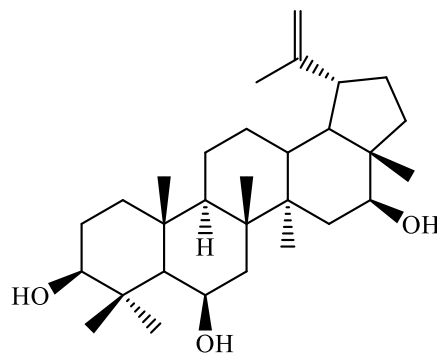


Fonte: O autor, 2020.

Figura 33 - Espectro de RMN 2D HMBC ^1H - ^{13}C de CL-1 (CDCl_3 , 300/75 MHz).

Fonte: O autor, 2020.

Figura 34 - Estrutura química do triterpeno CL-1.



Fonte: O autor, 2020.

Tabela 3 - Dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C de CL-1 (CDCl_3 , 300/75 MHz) e comparação com dados da literatura.

	CL-1, CDCl_3					
	HSQC		HMBC		FACUNDO <i>et al.</i> , 1993, piridina- d_5	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
C						
4	39,84	-	3H-23; 3H-24		40,6	-
8	40,23	-	3H-26	3H-27	40,7	-
10	36,92	-	3H-25		37,3	-
14	44,44	-	3H-27	3H-26	44,5	-
17	48,81	-	3H-28		49,4	-
20	150,13	-	3H-30		150,9	-
CH						
3	79,31	3.16 (dd) ^a		3H-23; 3H-24	78,7	3,43 (dd; 11,2; 4,0)
5	55,89	0,69 (d, 1.5)		3H-23; 3H-24; 3H-25	56,7	0,87 (s)
6	69,05	4.53 (s)			67,8	4,75 (s)
9	50,89	1.32		3H-25; 3H-26	51,4	1,4
13	36,91	1.74		3H-27	37,1	1,86
16	77,22	3,59 (dd) ^a		3H-28	76,3	3,88 (dd, 11,3; 4,8)
18	48,81	1,40		3H-28	48,4	1,52
19	48,03	2.51 (m)		2H-29; 3H-30	48,3	2,66 (td, 9,9; 3,9)
CH₂						
1	40,96	1.68, 0,90		3H-5	41,5	1,73; 1,00
2	27,76	1.68			28,9	2,15; 1,73
7	42,30	1.68		3H-26	42,6	1,9; 1,6
11	21,21	1,50; 1,32			21,6	1,5
12	25,13	1.78			25,7	1,80; 1,13
15	37,20	1,70; 1,30			37,7	1,94; 1,52
21	30,13	2,00; 1,39			30,5	1,98; 1,42
22	37,90	1,70; 1,30		3H-28	38,5	1,84; 1,45
29	110,04	4,72 (s), 4,61 (s)		3H-30	109,9	4,92 (s); 4,75 (s)
CH₃						
23	27,79	1,05 (s)		3H-24	27,9	1,37 (s)
24	17,08	1,15 (s)		3H-3	17,3	1,68 (s)
25	17,89	1,20 (s)			17,9	1,50 (s)
26	17,08	1.36 (s)			16,8	1,65 (s)
27	16,69	0,96 (s)			16,7	1,08 (s)
28	11,85	0,80 (s)			12,0	1,07 (s)
30	19,59	1.68		2H-29	19,4	1,77 (s)

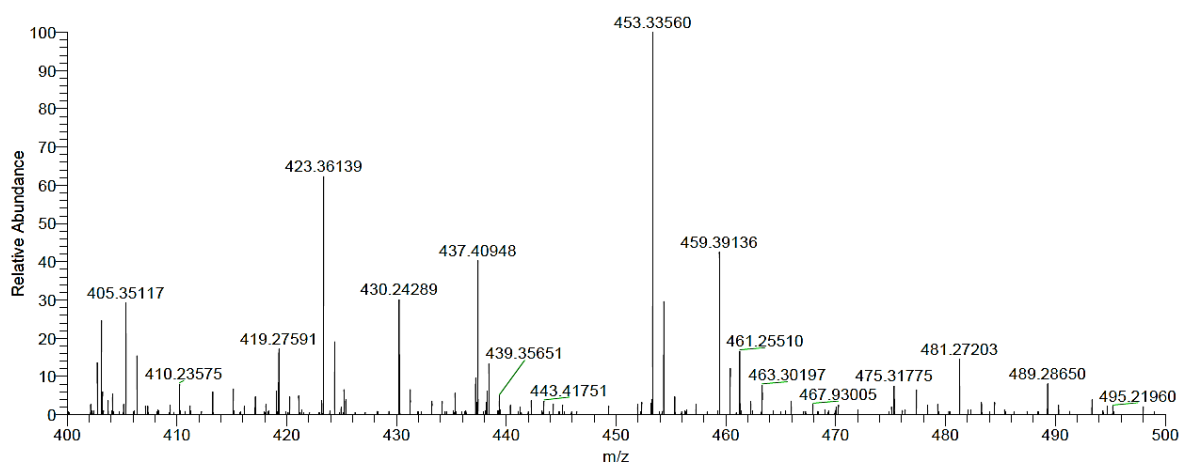
Fonte: O autor, 2020.

5.2 Determinação estrutural dos derivados reacionais de CL-1

5.2.1 Identificação estrutural de CL-P1 (desidratado)

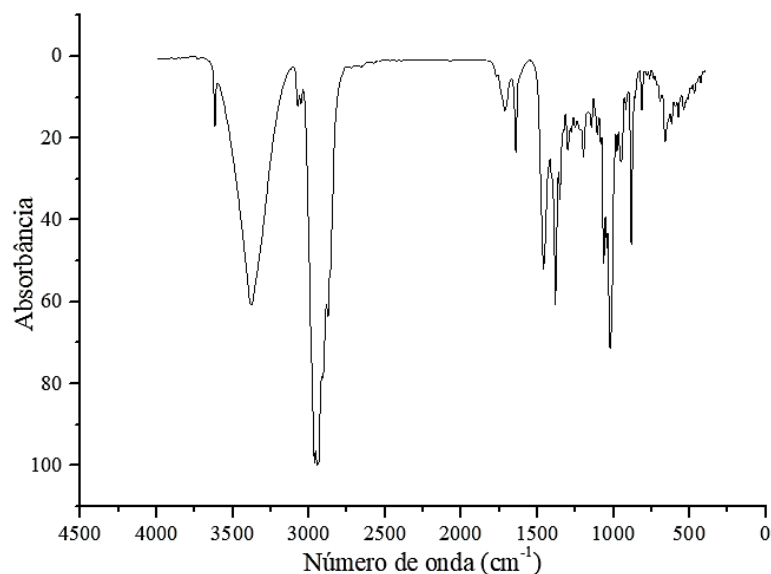
O derivado desidratado apresentou-se como um sólido amarelado cristalino e com ponto de fusão entre 104-105 °C. O espectro de massa de CL-P1 (Figura 35) exibe um pico de íon molecular em m/z 453,33560 $[M+Na]^+$ (calculado m/z 453,23266), confirmando a fórmula $C_{30}H_{48}O_2$. A Figura 36, exibe o espectro de infravermelho do derivado desidratado, que apresenta as bandas 3452 cm^{-1} (ν_{O-H}), 3071 cm^{-1} (ν_{Csp2-H}), 2950 cm^{-1} (ν_{Csp3-H}) e 1640 cm^{-1} ($\nu_{C=C}$) de ligação dupla carbono-carbono.

Figura 35 - Espectro de massa de alta resolução de CL-P1.



Fonte: O autor, 2020.

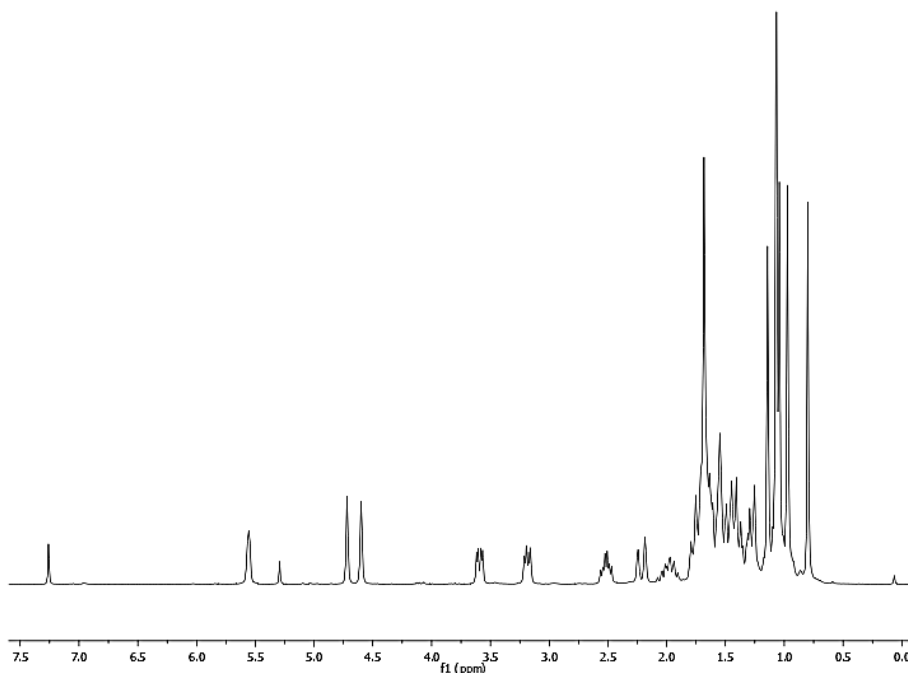
Figura 36 - Espectro de Infravermelho de CL-P1.



Fonte: O autor, 2020.

No espectro de RMN ^1H ($\text{CDCl}_3/300\text{ MHz}$) de CL-P1 (Figura 37) verificou-se a ausência dos sinais em δ_{H} 4,53 (m, H-6) e 0,88 (H-5) e o surgimento do sinal em δ_{H} 5,55 (s), característico de hidrogênio ligado a carbono de ligação dupla. O que leva a sugerir que a reação de eliminação tenha ocorrido no segundo anel do triterpeno pentacíclico.

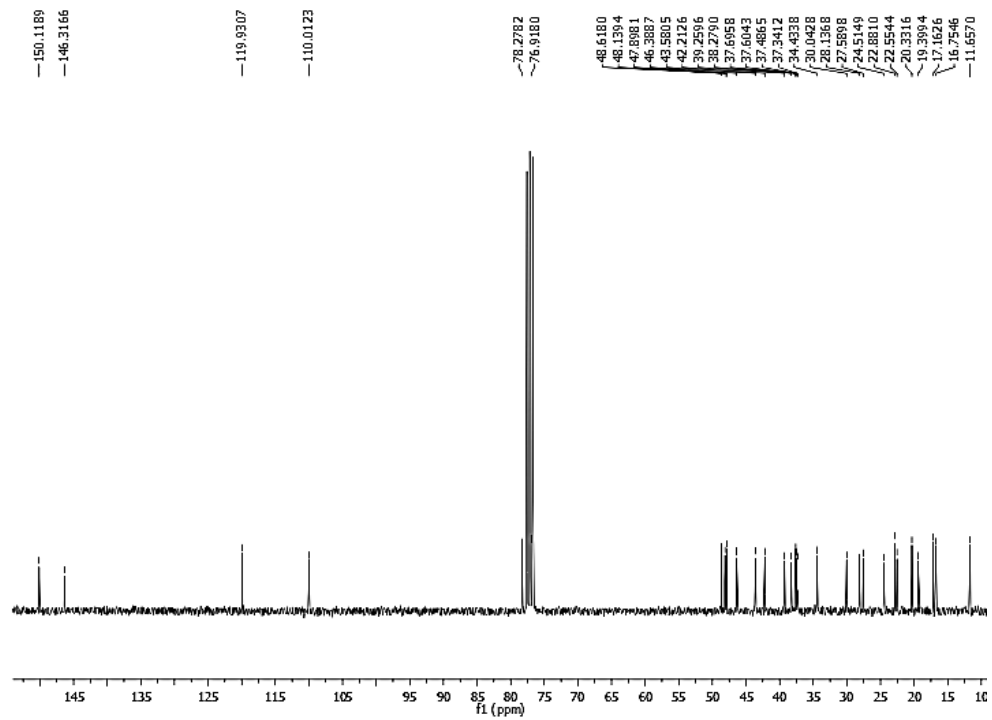
Figura 37 - Espectro de RMN ^1H de CL-P1 ($\text{CDCl}_3/300\text{ MHz}$).



Fonte: O autor, 2020.

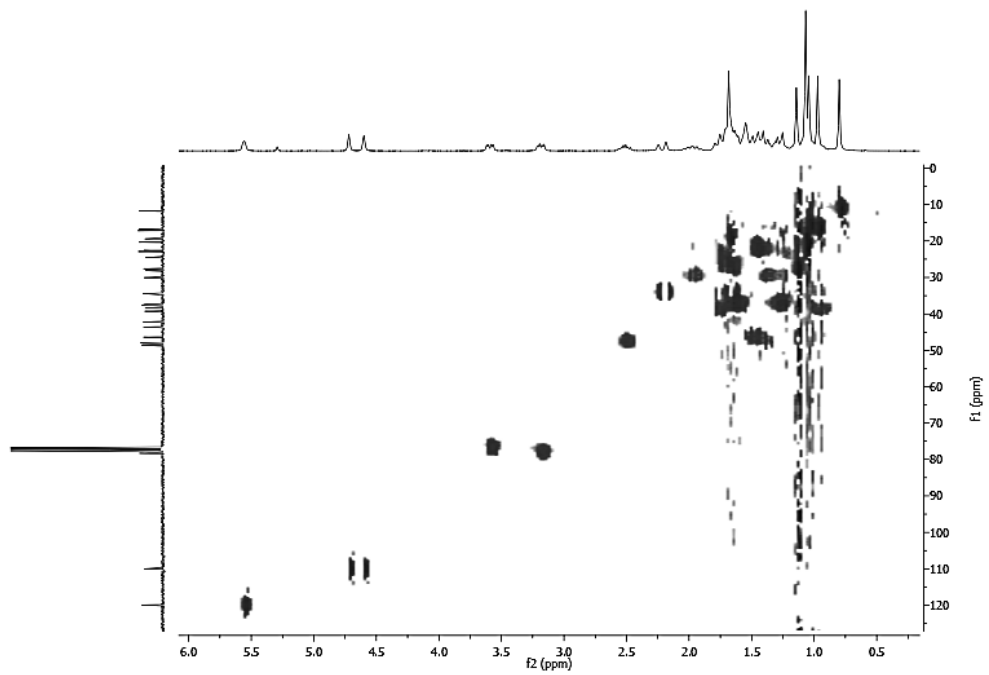
O espectro de RMN ^{13}C *BB-decoupled* (BBD) ($\text{CDCl}_3/75\text{ MHz}$) de CL-P1, mostrado na Figura 38, confirmou a reação de eliminação regioseletiva, através da ausência dos sinais de carbonos sp^3 em δ_{C} 69,05 (C-6) e 55,84 (C-5) e surgimento dos sinais em δ_{C} 119,9 (C-6) e 146,3 (C-5) relativos a carbonos sp^2 . Através da análise do espectro bidimensional de RMN ^1H - ^{13}C -HSQC (Figura 39) correlacionou-se o sinal de hidrogênio em δ_{H} 5,55 com o carbono em δ_{C} 119,9 (1J). Desta forma, pode-se concluir que a reação de eliminação (desidratação) foi regioseletiva e termodinamicamente dirigida, levando a formação do alceno mais substituído, conforme estrutura química mostrada na Figura 40.

Figura 38 - Espectro de RMN ^{13}C - BBD de CL-P1 ($\text{CDCl}_3/75\text{ MHz}$).



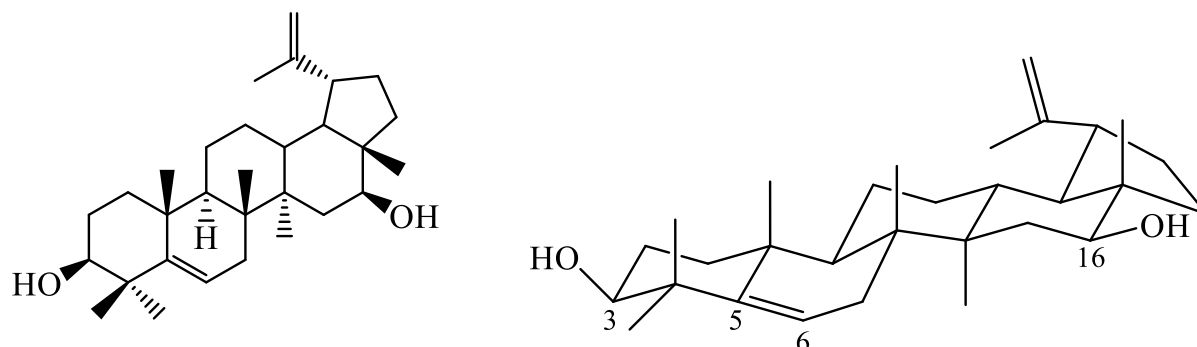
Fonte: O autor, 2020.

Figura 39 - Espectro de RMN 2D HSQC ^1H - ^{13}C de CL-P1 (CDCl_3 , 300/75 MHz).



Fonte: O autor, 2020.

Figura 40 - Estrutura química do derivado CL-P1.



Fonte: O autor, 2020.

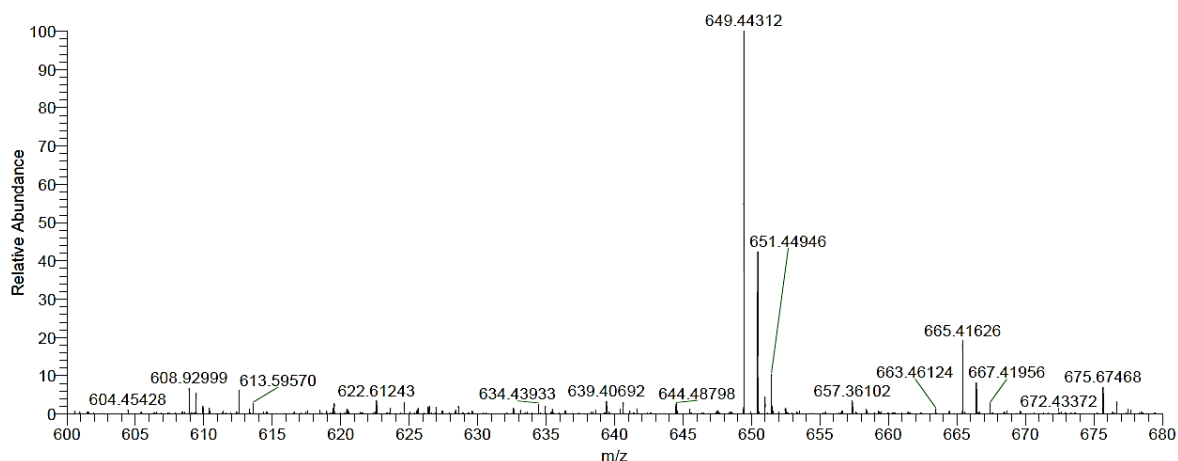
Dados de RMN ^{13}C de **3 β ,16 β -di-hidroxilup-5(6),20(29)-dieno (CL-P1)** (CDCl_3 , 75 MHz): δ 11,66 (C-28); 16,75 (C-27); 17,16 (C-24); 19,39 (C-26); 20,33 (C-25); 22,55 (C-30); 22,88 (C-11); 24,51 (C-12); 27,59 (C-2); 28,14 (C-23); 30,04 (C-21); 34,43 (C-4); 37,34 (C-10); 37,49 (C-15); 37,60 (C-22); 37,69 (C-4); 38,28 (C-8); 39,26 (C-1); 42,21 (C-7); 43,58 (C-14); 46,39 (C-19); 47,89 (C-17); 48,14 (C-18); 48,62 (C-9); 76,92 (C-16); 78,28 (C-3); 110,01 (C-29); 119,93 (C-6); 146,32 (C-5); 150,12 (C-20).

Dados de RMN ^1H de **3 β ,16 β -di-hidroxilup-5(6),20(29)-dieno (CL-P1)** (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0,79 (3H, s, H-28); 0,97 (3H, s, H-27); 1,04 (3H, s, H-23); 1,14 (3H, s, H-24); 1,68 (3H, s, H-30); 3,59 (1H, dd, $J=11$ e 4 Hz, H-16); 3,19 (1H, dd, $J=11$ e 4 Hz, H-3); 4,60 (1H, s, H-29); 4,72 (1H, s, H-29); 5,55 (1H, s, H-6).

5.2.2 Identificação estrutural de CL-P2 (triacilado)

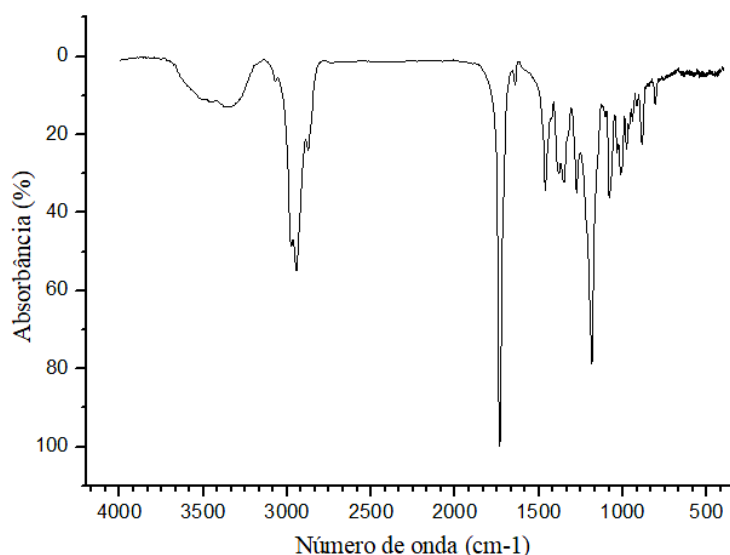
O derivado triacilado apresentou-se como um material amarelado resinoso. O espectro de massa de CL-P2 (Figura 41) exibe um pico de íon molecular em m/z 649,44312 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calculado m/z 649,89579), confirmando a fórmula molecular $\text{C}_{39}\text{H}_{62}\text{O}_6$. A Figura apresenta o espectro de infravermelho de CL-P2, que exibe as bandas 3070 cm^{-1} ($\nu_{\text{Csp}^2\text{-H}}$), 2943 cm^{-1} ($\nu_{\text{Csp}^3\text{-H}}$), 1735 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$) de éster e 1642 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=C}}$) de ligação dupla carbono-carbono.

Figura 41- Espectro de massa de alta resolução de CL-P2.



Fonte: O autor, 2020.

Figura 42 - Espectro de Infravermelho de CL-P2.

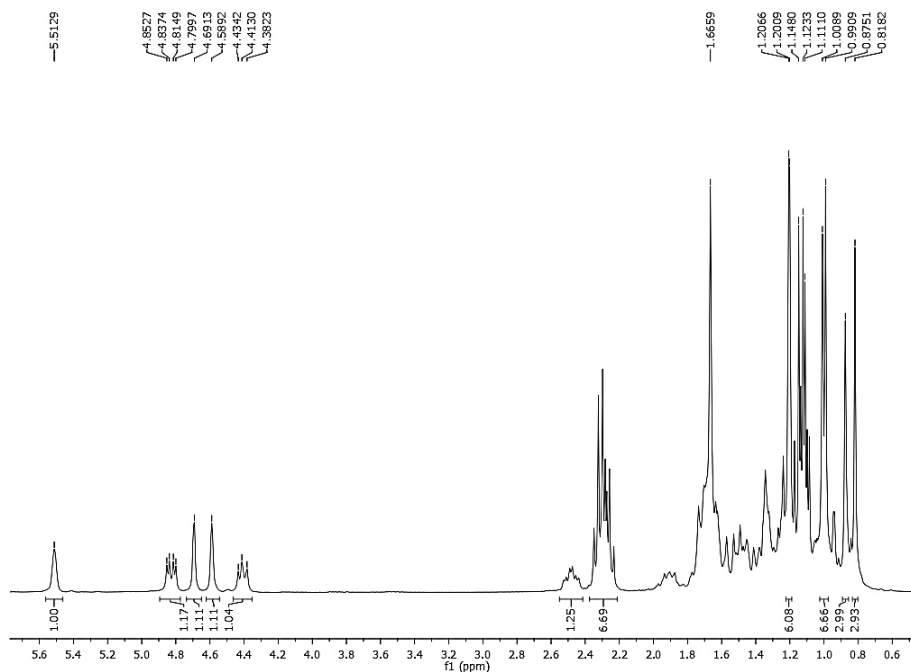


Fonte: O autor, 2020.

No espectro de RMN ^1H ($\text{CDCl}_3/300\text{ MHz}$) de CL-P2 (Figura 43) observou-se o deslocamento dos sinais em δ_{H} 3,16 (H-3), 3,59 (H-16) e 4,53 (H-6) no produto natural para δ_{H} 4,41 (H-3), 4,83 (H-16) e 5,51 (H-6) no produto acilado, devido ao efeito anisotrópico dos grupos acila, sugerindo também a triacilação do material de partida. A confirmação ocorreu através do espectro de RMN ^{13}C *BB-decoupled* (BBD) ($\text{CDCl}_3/75\text{ MHz}$) (Figura 44) de CL-P2, onde foi possível observar a presença de três sinais em δ_{C} 173,6; 174,0 e 174,2, característicos de carbonilas de ácidos carboxílicos. O espectro de RMN ^{13}C -Jmod de CL-P2 ($\text{CDCl}_3/75\text{ MHz}$) confirma a presença desses três sinais carbonílicos, onde tais linhas

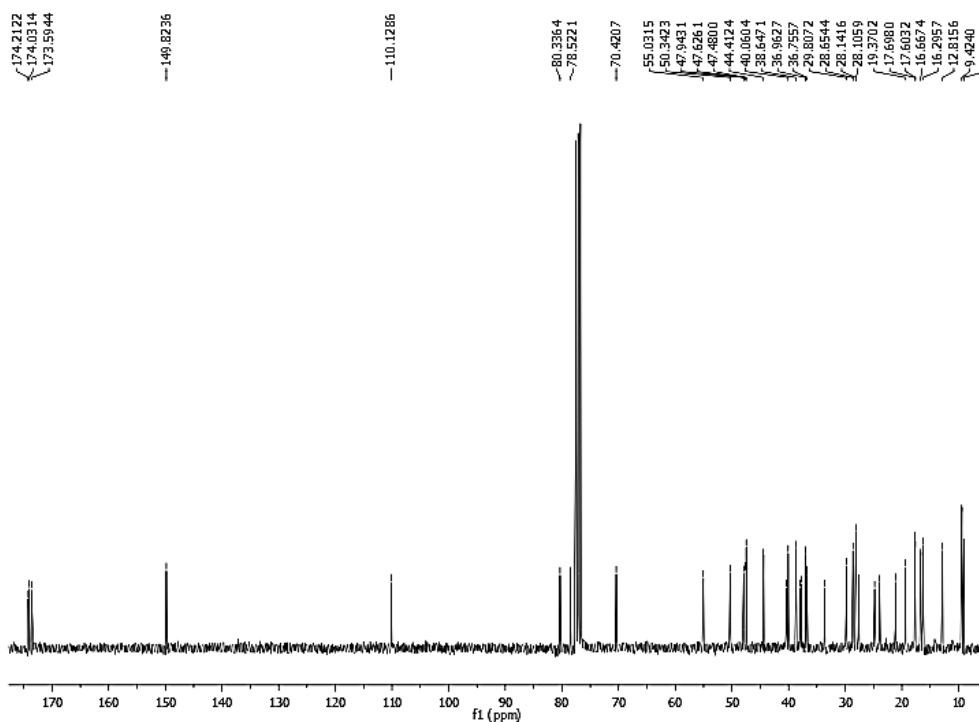
espectrais apresentam-se com amplitude positiva (Figura 45). A Figura 46, mostra a estrutura química do produto reacional CL-P2.

Figura 43 - Espectro de RMN ^1H de CL-P2 ($\text{CDCl}_3/300\text{ MHz}$).



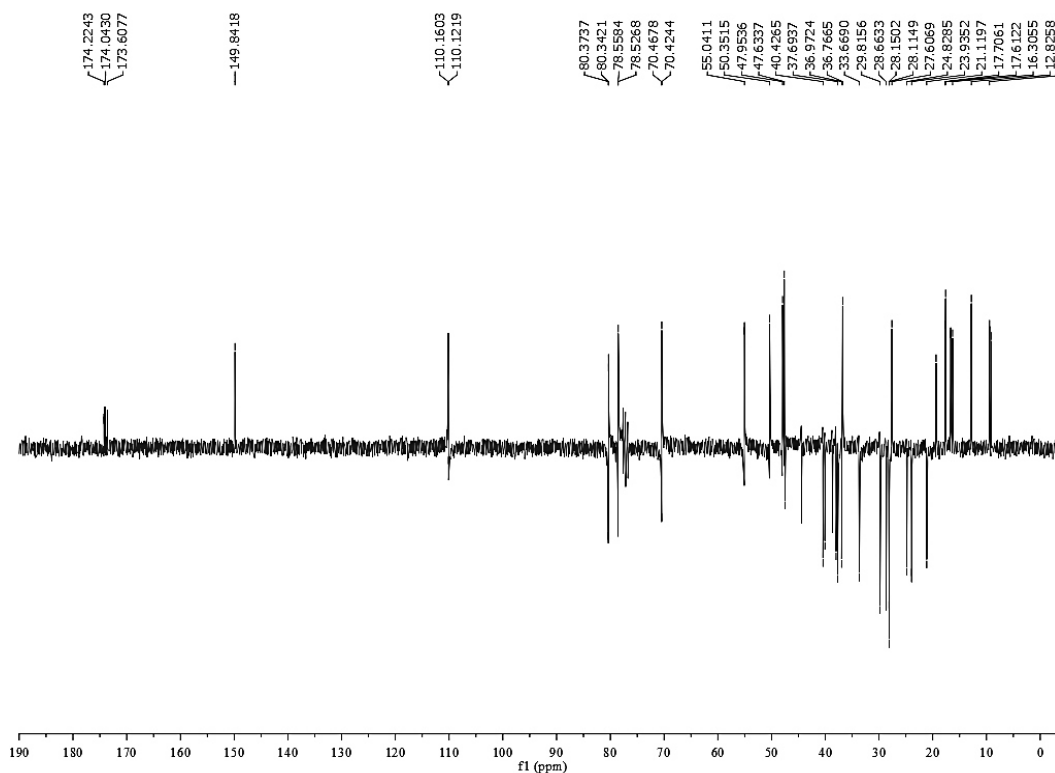
Fonte: O autor, 2020.

Figura 44 - Espectro de RMN ^{13}C - BBD de CL-P2 ($\text{CDCl}_3/75\text{ MHz}$).



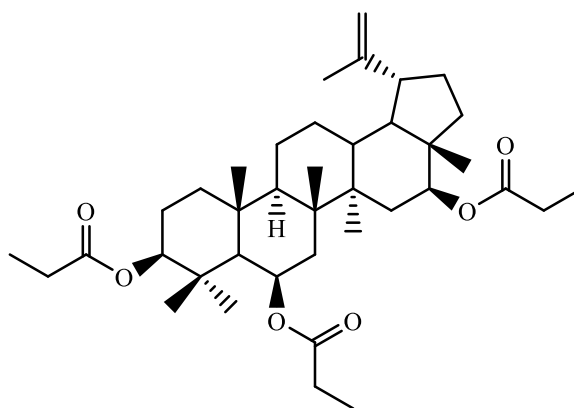
Fonte: O autor, 2020.

Figura 45 - Espectro de RMN ^{13}C -Jmod de CL-P2(CDCl_3 /75 MHz).



Fonte: O autor, 2020.

Figura 46 - Estrutura química do derivado CL-P2



Fonte: O autor, 2020.

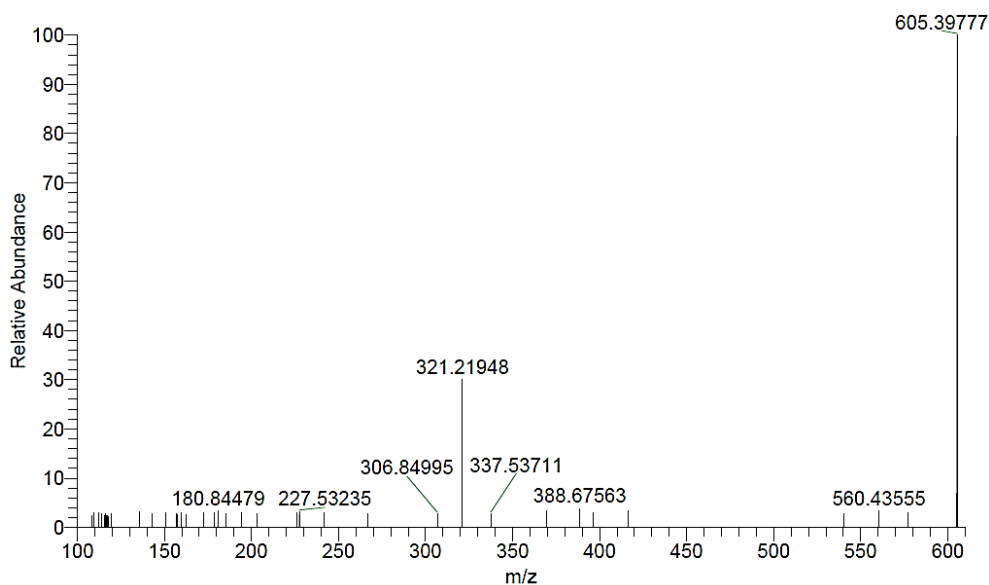
Dados de RMN ^{13}C de **3β,6β,16β-tripropioniloxilup-20(29)-eno (CL-P2)** (CDCl_3 , 75 MHz):
 δ 12,82 (C-28); 16,30 (C-27); 16,67 (C-26); 17,60 (C-24); 17,70 (C-25); 19,37 (C-30); 21,11 (C-11); 23,92 (C-12); 24,82 (C-2); 27,60 (C-23); 29,81 (C-21); 33,66 (C-10); 36,76 (C-13); 36,96 (C-15); 37,69 (C-22); 37,98 (C-4); 38,65 (C-8); 40,06 (C-1); 40,42 (C-7); 44,41 (C-14); 47,48 (C-17); 47,63 (C-18); 47,94 (C-19); 50,34 (C-9); 55,03 (C-5); 70,42 (C-6); 78,52 (C-16); 80,34 (C-3); 110,13 (C-29); 149,82 (C-20); 9,09; 28,11; 173,59 (propanoíla); 89,40; 28,14; 174,03 (propanoíla); 89,42; 28,65; 174,21 (propanoíla).

Dados de RMN ^1H de **3 β ,6 β ,16 β -tripropionilolup-20(29)-eno (CL-P2)** (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0,81 (3H, s, H-28); 0,87 (3H, s, H-27); 0,99 (3H, s, H-23); 1,00 (3H, s, H-24); 1,13 (9H, m, propanoíla); 1,20 (3H, s, H-25); 1,21 (3H, s, H-26); 1,66 (3H, s, H-30); 2,30 (6H, m, propanoíla); 4,41 (1H, dd, $J=11,3$ e $4,5$ Hz, H-16); 4,59 (1H, sl, H-29); 4,69 (1H, sl, H-29); 4,83 (1H, dd, $J=9,5$ e $4,5$ Hz, H-3), 5,51 (1H, sl, H-6).

5.2.3 Identificação estrutural de CL-P2A (diacilado)

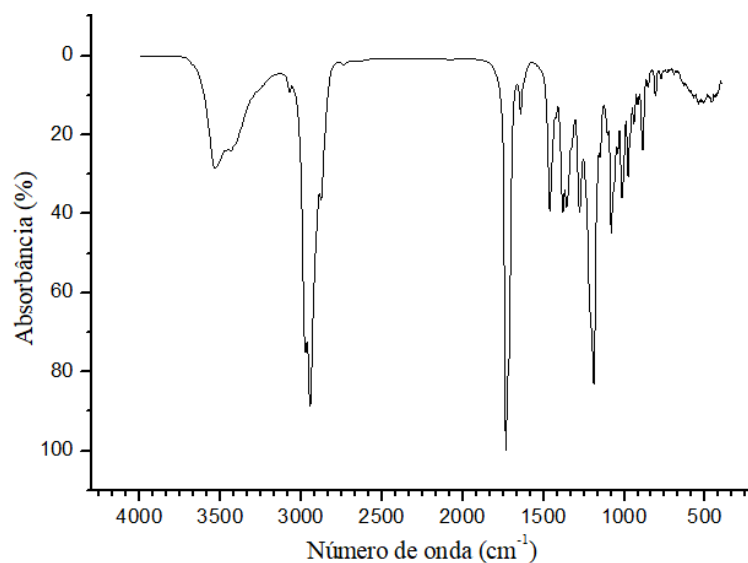
O derivado CL-P2A apresentou-se como um material amarelado resinoso. O espectro de massa de CL-P2A (Figura 47) exibe um pico de íon molecular em m/z 605,39759 $[\text{M}+\text{Cl}]^+$ (calculado m/z 605,39783), confirmando a fórmula molecular $\text{C}_{39}\text{H}_{58}\text{O}_5$. A Figura 48 apresenta o espectro de infravermelho de CL-P2A, que exibe as bandas 3470 cm^{-1} ($\nu_{\text{O-H}}$), 3072 cm^{-1} ($\nu_{\text{Csp}2\text{-H}}$), 2945 cm^{-1} ($\nu_{\text{Csp}3\text{-H}}$), 1733 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$) de éster, 1643 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=C}}$) de ligação dupla carbono-carbono e 1189 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-O}}$).

Figura 47 - Espectro de massa de alta resolução de CL-P2A.



Fonte: O autor, 2020.

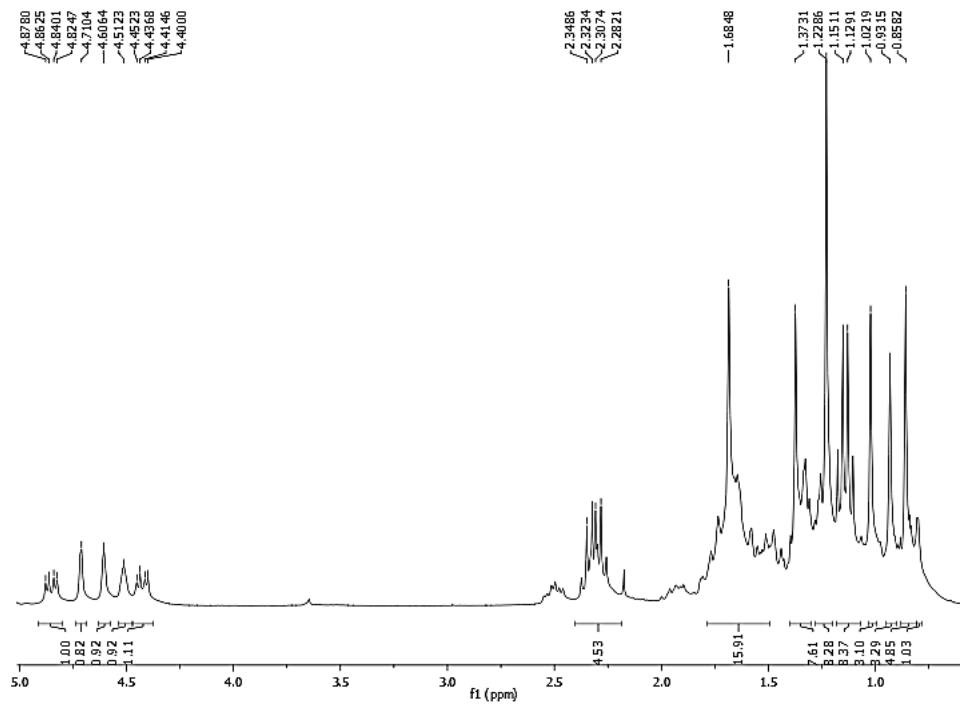
Figura 48 - Espectro de infravermelho de CL-P2A.



Fonte: O autor, 2020.

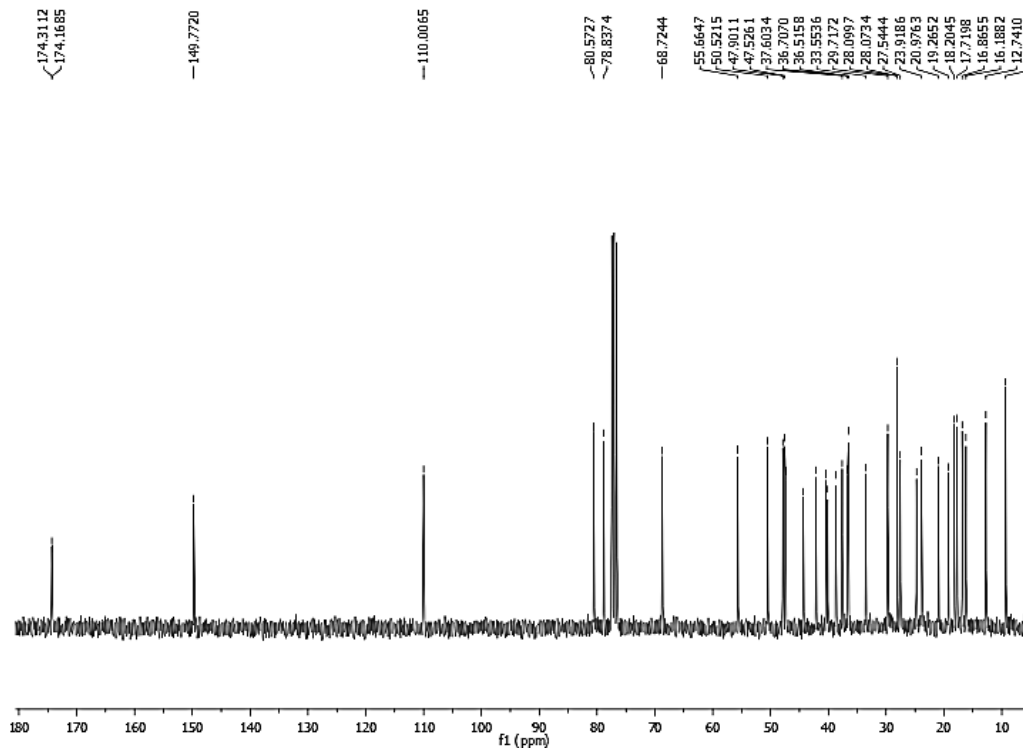
No espectro de RMN ^1H ($\text{CDCl}_3/300\text{ MHz}$) de CL-P2A (Figura 49) observou-se o deslocamento dos sinais em δ_{H} 3,16 (H-3) e 3,59 (H-16) para δ_{H} 4,42 (H-3) e 4,85 (H-16) no produto acilado, devido ao efeito anisotrópico dos grupos acila. No entanto, o sinal referente a H-6 em δ_{H} 4,51 manteve-se inalterado, sugerindo a diacilação do material de partida. A confirmação ocorreu através do espectro de RMN ^{13}C *BB-decoupled* (BBD) ($\text{CDCl}_3/75\text{ MHz}$) de CL-P2A (Figura 50), onde foi possível observar a presença de dois sinais em δ_{C} 174,2 e 174,3, característicos de carbonilas de éster. A Figura 51, mostra a estrutura química do derivado CL-P2A.

Figura 49 - Espectro de RMN ^1H de CL-P2A ($\text{CDCl}_3/300\text{ MHz}$).



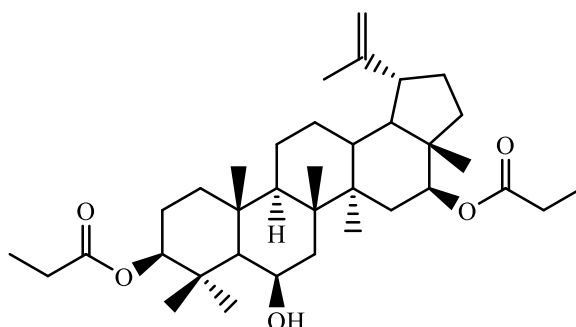
Fonte: O autor, 2020.

Figura 50 - Espectro de RMN ^{13}C - BBD de CL-P2A ($\text{CDCl}_3/75\text{ MHz}$).



Fonte: O autor, 2020.

Figura 51 - Estrutura química do derivado CL-P2A.



Fonte: O autor, 2020.

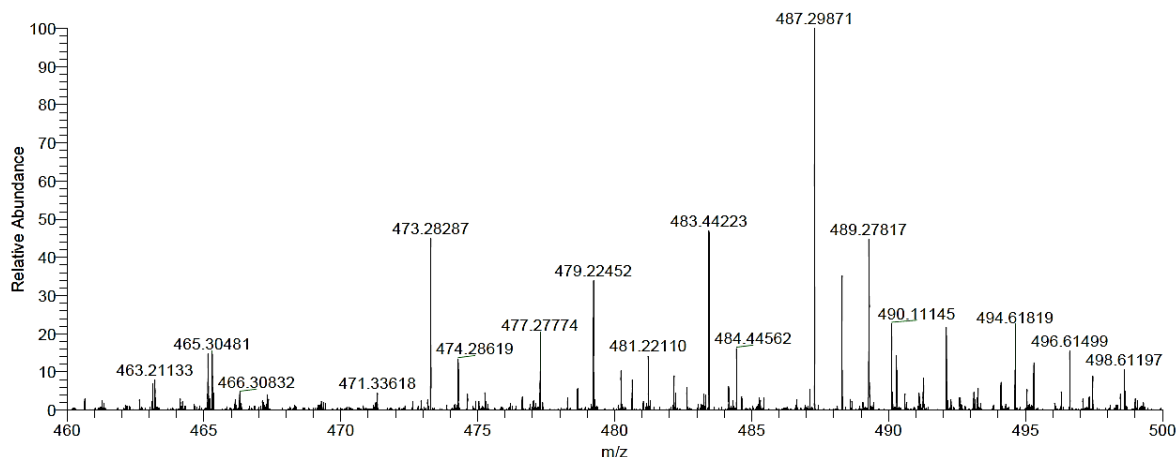
Dados de RMN ^{13}C de **6 β -hidroxi-3 β ,16 β -dipropioniloxilup-20(29)-eno (CL-P2A)** (CDCl_3 , 75 MHz): δ 12.74 (C-28); 16.19 (C-27); 16.87 (C-26); 17.72 (C-24); 18.20 (C-25); 19.27 (C-30); 20.98 (C-11); 23.92 (C-12); 24.75 (C-2); 27.54 (C-23); 29.72 (C-21); 33.55 (C-10); 36.52 (C-13); 36.71 (C-15); 37.60 (C-22); 38.75 (C-4); 40.11 (C-1); 40.40 (C-4); 42.14 (C-8); 44.32 (C-14); 47.36 (C-17); 47.53 (C-18); 47.90 (C-19); 50.52 (C-9); 55.66 (C-5); 68.72 (C-6); 78.84 (C-16); 80.57 (C-3); 110.01 (C-29); 149.77 (C-20); 9.35; 28.10; 174.31, (propanoíla); 9.34, 28.07; 174.17, (propanoíla).

Dados de RMN ^1H de **6 β -hidroxi-3 β ,16 β -dipropioniloxilup-20(29)-eno (CL-P2A)** (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0,85 (3H, s, H-28); 0,93 (3H, s, H-27); 1,02 (3H, s, H-23); 1,14 (6H, m, propanoíla); 1,22 (6H, s, H-24 e H-25); 1,37 (3H, s, H-26); 1,68 (3H, s, H-30); 2,30 (4H, m, propanoíla); 4,43 (1H, dd, $J=11,2$ e $4,5$ Hz, H-16); 4,60 (1H, sl, H-29); 4,71 (1H, sl, H-29); 4,85 (1H, dd, $J=11,2$ e $4,5$ Hz, H-3), 4,51 (1H, sl, H-6).

5.2.4 Identificação estrutural de CL-P3 (oxidado)

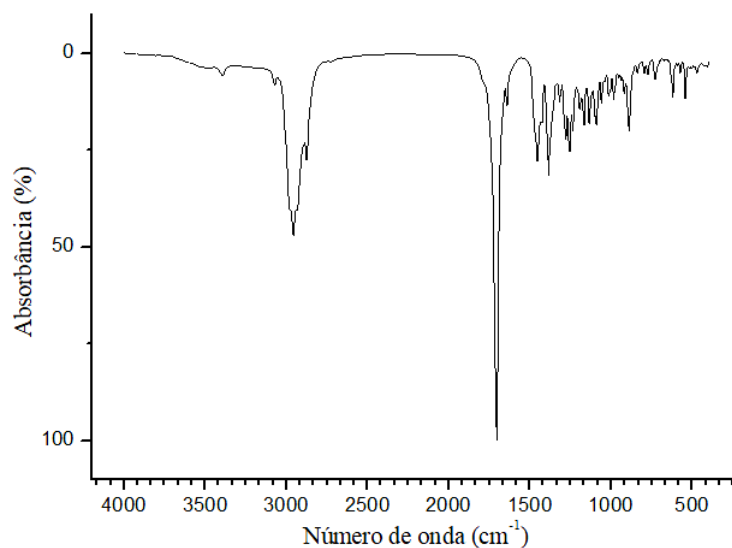
O derivado CL-P3 apresentou-se como um sólido amarelado e cristalino, com ponto de fusão entre 175 - 177 °C. O espectro de massa deste derivado (Figura 52) apresenta um pico de íon molecular em m/z 487,29871 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ (calculado m/z 487,29845), confirmando a fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_3$. A Figura 53, apresenta o espectro de infravermelho do derivado oxidado, onde são observadas bandas em 3072 cm^{-1} ($\nu_{\text{Csp}2-\text{H}}$), 2956 cm^{-1} ($\nu_{\text{Csp}3-\text{H}}$), 1706 cm^{-1} ($\nu_{\text{C}=\text{O}}$) de cetona e 1641 cm^{-1} ($\nu_{\text{C}=\text{C}}$) de ligação dupla carbono-carbono.

Figura 52 - Espectro de massa de alta resolução de CL-P3.



Fonte: O autor, 2020.

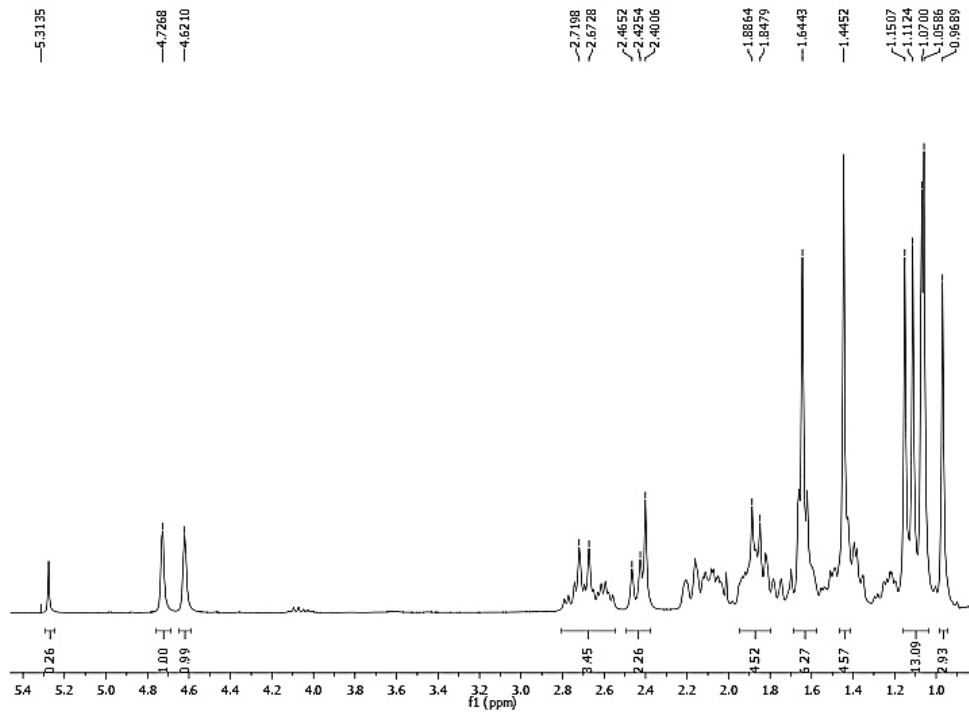
Figura 53 - Espectro de infravermelho de CL-P3.



Fonte: O autor, 2020.

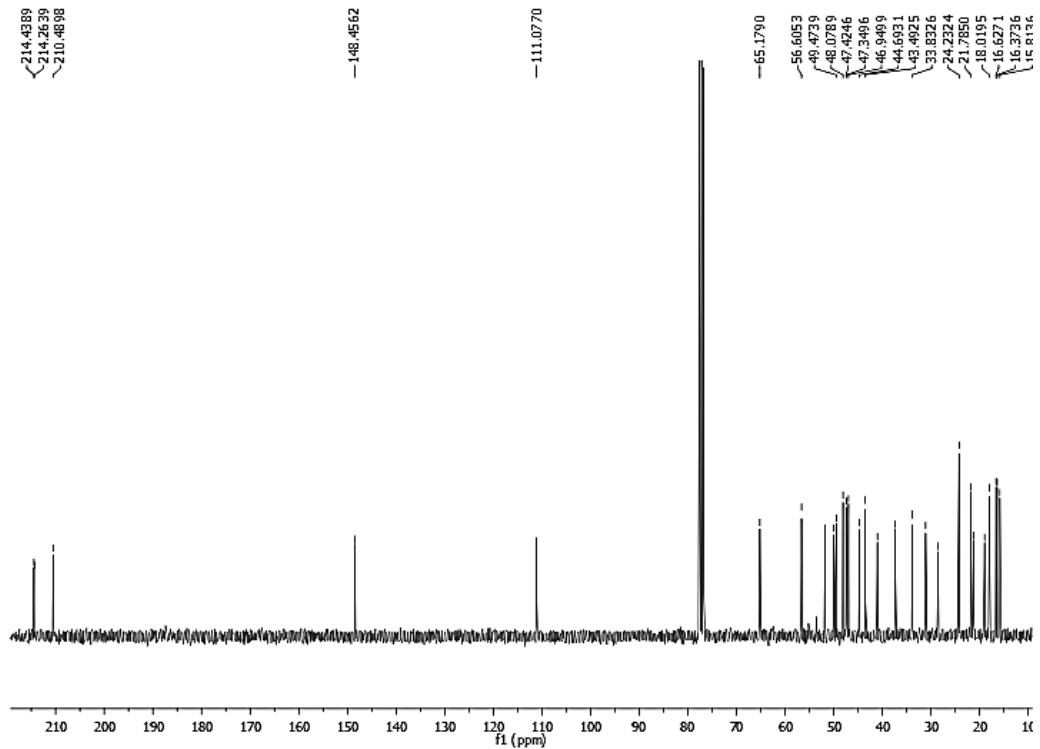
No espectro de RMN ^1H ($\text{CDCl}_3/300\text{ MHz}$) de CL-P3 (Figura 54) foi verificada a ausência dos sinais em δ_{H} 3,16 (H-3), 3,59 (H-16) e 4,53 (H-6) referentes a hidrogênios ligados a carbonos oxigenados presentes no produto natural. Este resultado sugere ter ocorrido a oxidação dos três carbonos metínicos hidroxilados do tritepeno CL-1 para carbonila. A confirmação ocorreu pela análise do espectro de RMN ^{13}C *BB-decoupled* (BBD) ($\text{CDCl}_3/75\text{ MHz}$) de CL-P3 (Figura 55), onde verificou-se a ausência dos sinais característicos de carbono sp^3 oxigenado em δ_{C} 79,31 (C-3), 77,22 (C-16) e 69,05 (C-6) e a presença dos sinais característicos de carbonos carbonílicos em δ_{C} 210,5, 214,3 e 214,4. A Figura 56 mostra a estrutura química do derivado CL-P3.

Figura 54 - Espectro de RMN ^1H de CL-P3 ($\text{CDCl}_3/300\text{ MHz}$).



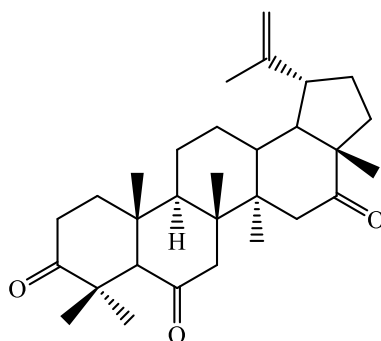
Fonte: O autor, 2020.

Figura 55 - Espectro de RMN ^{13}C - BBD de CL-P3 ($\text{CDCl}_3/75\text{ MHz}$).



Fonte: O autor, 2020.

Figura 56 - Estrutura química do derivado CL-P3.



Fonte: O autor, 2020.

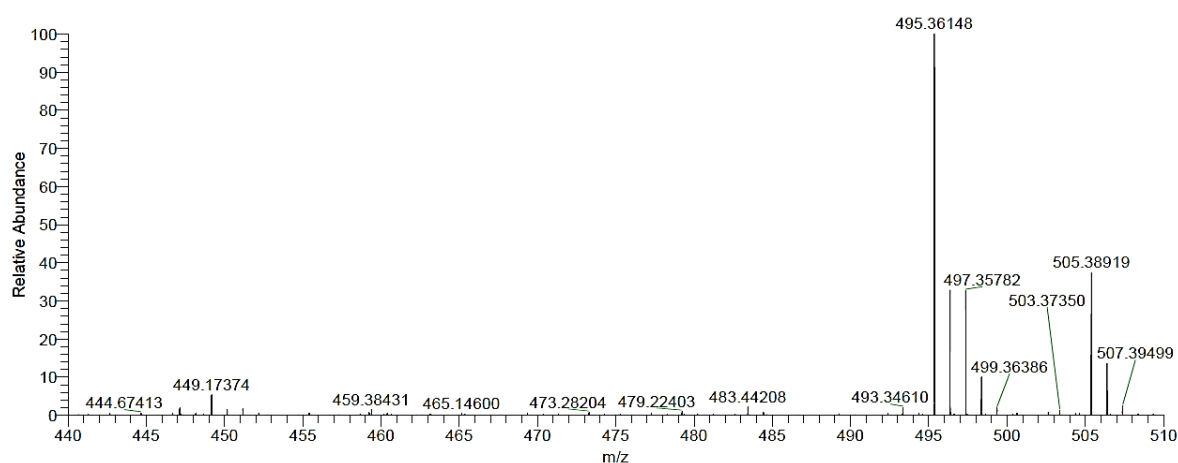
Dados de RMN ^{13}C de **3,6,16-trioxolup-20(29)-eno (CL-P3)** (CDCl_3 , 75 MHz): δ 15,81 (C-28); 16,37 (C-27); 16,63 (C-24); 16,23 (C-26); 18,10 (C-25); 18,97 (C-30); 21,26 (C-11); 21,78 (C-12); 24,23 (C-2); 28,50 (C-23); 31,09 (C-21); 33,83 (C-13); 37,31 (C-10); 41,00 (C-15); 43,49 (C-22); 44,69 (C-4); 46,95 (C-8); 47,35 (C-1); 47,42 (C-7); 48,08 (C-14); 49,47 (C-19); 49,93 (C-17); 51,79 (C-18); 56,60 (C-9); 65,18 (C-5); 111,08 (C-29); 148,46 (C-20); 210,49 (C-6); 214,26 (C-16); 214,44 (C-3).

Dados de RMN ^1H de **3,6,16-trioxolup-20(29)-eno (CL-P3)** (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0,97 (3H, s, H-28); 1,06 (3H, s, H-27); 1,07 (3H, s, H-23); 1,11 (3H, s, H-24); 1,15 (3H, s, H-25); 1,44 (3H, s, H-26); 1,64 (3H, s, H-30); 4,62 (1H, s, H-29); 4,73 (1H, s, H-29).

5.2.5 Identificação estrutural de CL-P5 (hidrogenado)

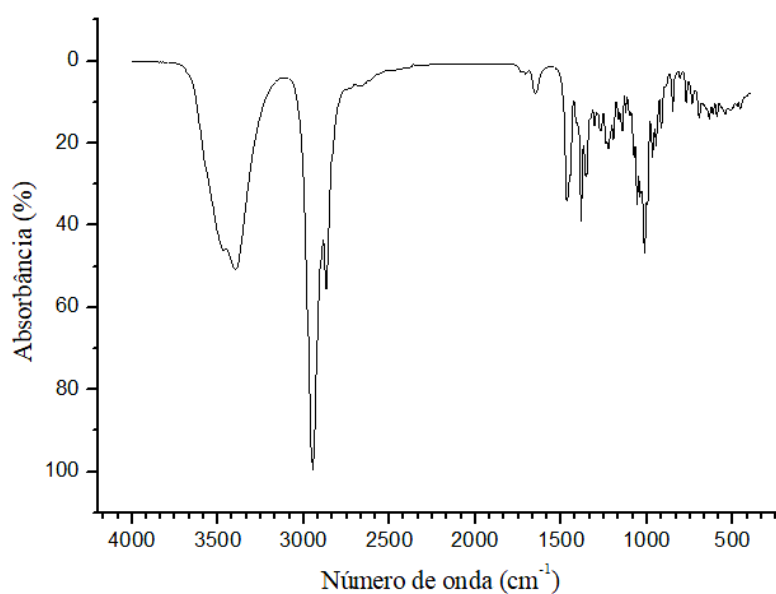
O derivado CL-P5 apresentou-se como um sólido branco e cristalino com ponto de fusão entre 221 - 223 °C. O espectro de massa deste derivado (Figura 57) apresenta um pico de íon molecular em m/z 495,36148 $[M+Cl]^-$ (calculado m/z 495,36105), confirmando a fórmula molecular $C_{30}H_{52}O_3$. A Figura 58 apresenta o espectro de infravermelho do derivado hidrogenado, onde são observadas bandas em 3406 cm^{-1} (ν_{O-H}), 2948 cm^{-1} ($\nu_{C_{sp^3-H}}$), 2854 cm^{-1} ($\nu_{C_{sp^3-H}}$) e 1650 cm^{-1} ($\nu_{C=C}$) de ligação dupla carbono-carbono.

Figura 57 - Espectro de massa de alta resolução de CL-P5.



Fonte: O autor, 2020.

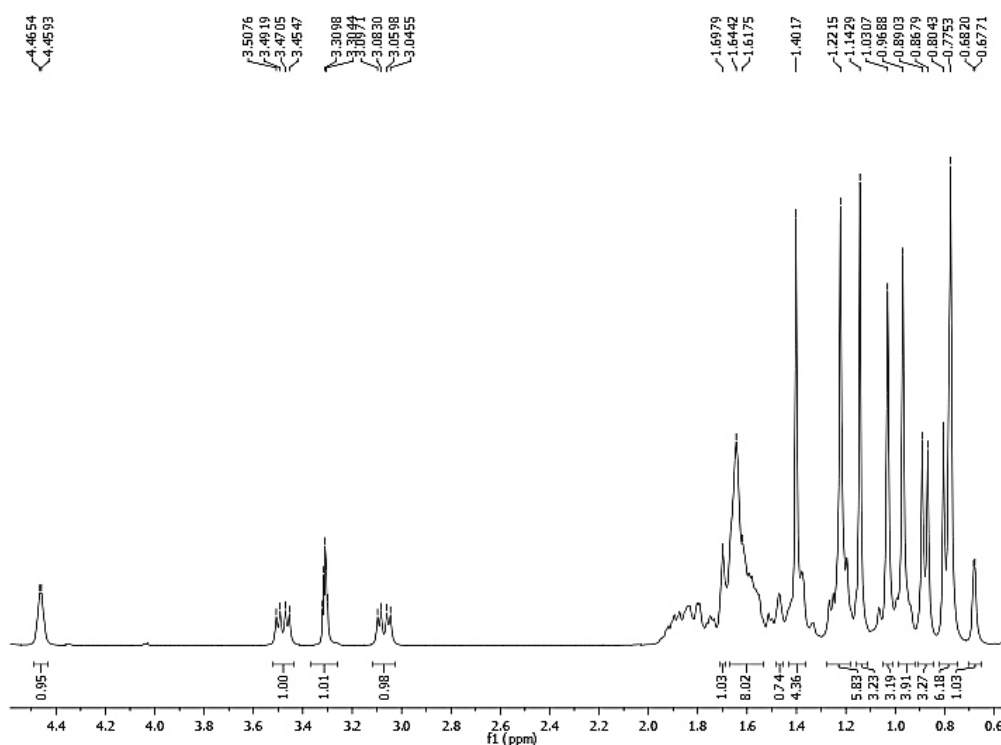
Figura 58 - Espectro de Infravermelho de CL-P5.



Fonte: O autor, 2020.

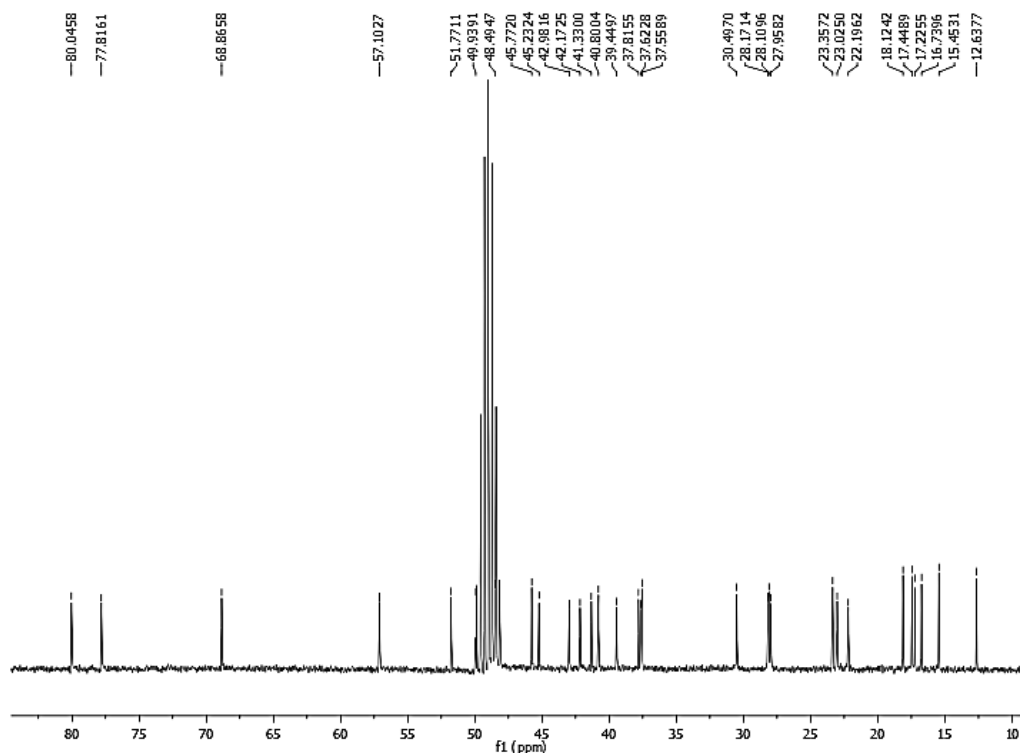
No espectro de RMN ^1H ($\text{CDCl}_3/300\text{ MHz}$) de CL-P5 (Figura 59) verificou-se a ausência dos sinais característicos de hidrogênios olefinicos em δ_{H} 4,72 e 4,61 (H-29) e a presença de dois sinais de hidrogênios metílicos em δ_{H} 0,80 (3H, d, $J=7\text{ Hz}$, H-29) e 0,88 (3H, d, $J=7\text{ Hz}$, H-30), característicos do grupo isopropila. No espectro de RMN ^{13}C *BB-decoupled* (BBD) ($\text{CDCl}_3/75\text{ MHz}$) de CL-P5 (Figura 60) pode-se confirmar a hidrogenação da ligação dupla presente no material de partida, através do desaparecimento dos sinais de carbonos olefinicos em δ_{C} 110,4 e 150,06. A Figura 61 mostra a estrutura química do derivado CL-P5.

Figura 59 - Espectro de RMN ^1H de CL-P5 ($\text{CDCl}_3/300\text{ MHz}$).



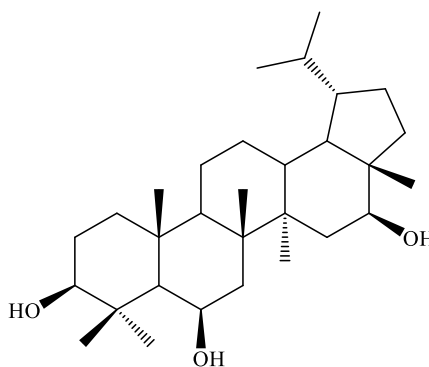
Fonte: O autor, 2020.

Figura 60 - Espectro de RMN ^{13}C - BBD de CL-P5 ($\text{CDCl}_3/75\text{ MHz}$).



Fonte: O autor, 2020.

Figura 61 - Estrutura química do derivado CL-P5.



Fonte: O autor, 2020.

Dados de RMN ^{13}C de **3 β ,6 β ,16 β -tri-hidroxilupano (CL-P5)** (CD_3OD , 75 MHz): δ 12,64 (C-28); 15,45 (C-29); 16,74 (C-27); 17,22 (C-24); 17,22 (C-26); 17,45 (C-25); 18,12 (C-30); 22,19 (C-11); 28,17 (C-23); 28,11 (C-2); 30,49 (C-21); 37,56 (C-10); 37,62 (C-15); 37,82 (C-22); 39,45 (C-4); 40,80 (C-8); 41,33 (C-1); 42,17 (C-7); 45,23 (C-14); 45,77 (C-19); 48,49 (C-17); 49,94 (C-18); 51,77 (C-9); 57,10 (C-5); 68,87 (C-6); 77,82 (C-16); 80,05 (C-3).

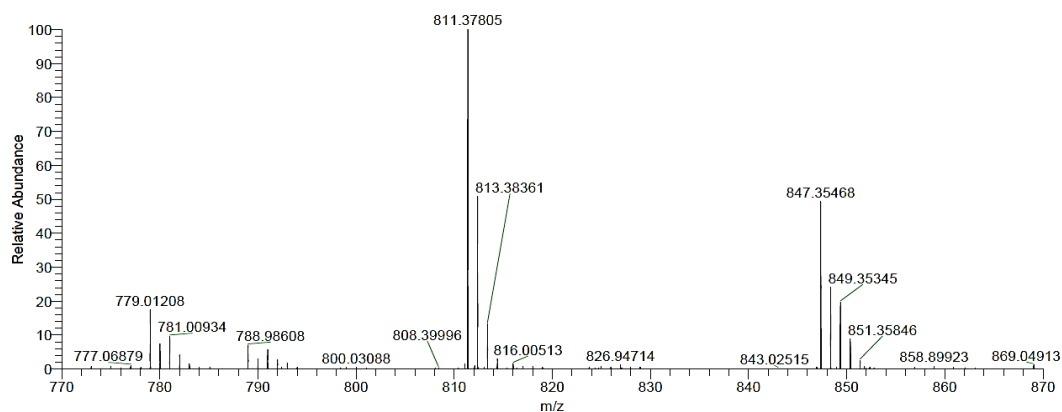
Dados de RMN ^1H de **3 β ,6 β ,16 β -tri-hidroxilupano (CL-P5)** (CD_3OD , 300 MHz): δ 0,77 (3H, d, J=7 Hz, H-29); 0,86 (3H, d, J=7 Hz, H-30); 0,94 (3H, s, H-27); 1,00 (3H, s, H-23);

1,12 (3H, s, H-24); 1,38 (3H, s, H-26); 3,05 (1H, dd, J=11 e 4 Hz, H-3); 3,29 (1H, m, H-6); 3,46 (1H, dd, J=12 e 4 Hz, H-16).

5.2.6 Identificação estrutural de CL-P6 (hidrazona)

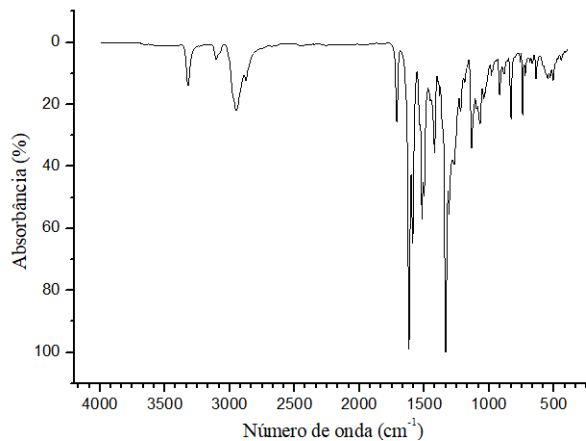
O derivado CL-P6 apresentou-se como um sólido alaranjado cristalino, com ponto de fusão entre 183 - 185 °C. O espectro de massa do derivado (Figura 62) apresenta um pico de íon molecular em m/z 811,37805 $[M-H]^-$ (calculado m/z 811,37845), confirmando a fórmula molecular $C_{42}H_{51}N_8O_9$, bem como indicando a incorporação de dois grupos 2,4-dinitrofenil-hidrazina no material de partida. A Figura 63, apresenta o espectro de infravermelho do derivado CL-P6, onde são observadas bandas em 3322 cm^{-1} (ν_{N-H}) de amina secundária, 3092 cm^{-1} ($\nu_{C_{sp^2-H}}$), 2951 cm^{-1} ($\nu_{C_{sp^3-H}}$), 1713 cm^{-1} ($\nu_{C=O}$) de cetona, 1650 cm^{-1} e 1335 cm^{-1} (ν_{NO}) do grupo nitro, 830 cm^{-1} e 920 cm^{-1} de anel aromático, indicando padrão de substituição 1,2,4.

Figura 62 - Espectro de massa de alta resolução de CL-P6.



Fonte: O autor, 2020.

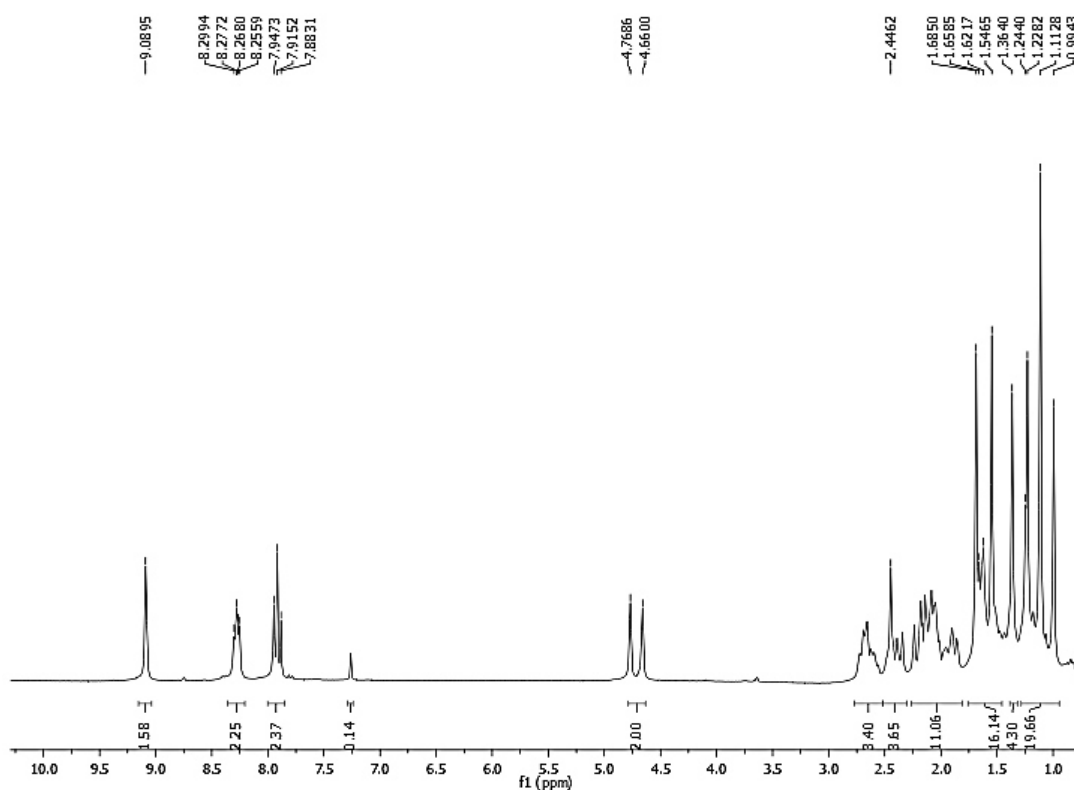
Figura 63 - Espectro de Infravermelho do derivado CL-P6.



Fonte: O autor, 2020.

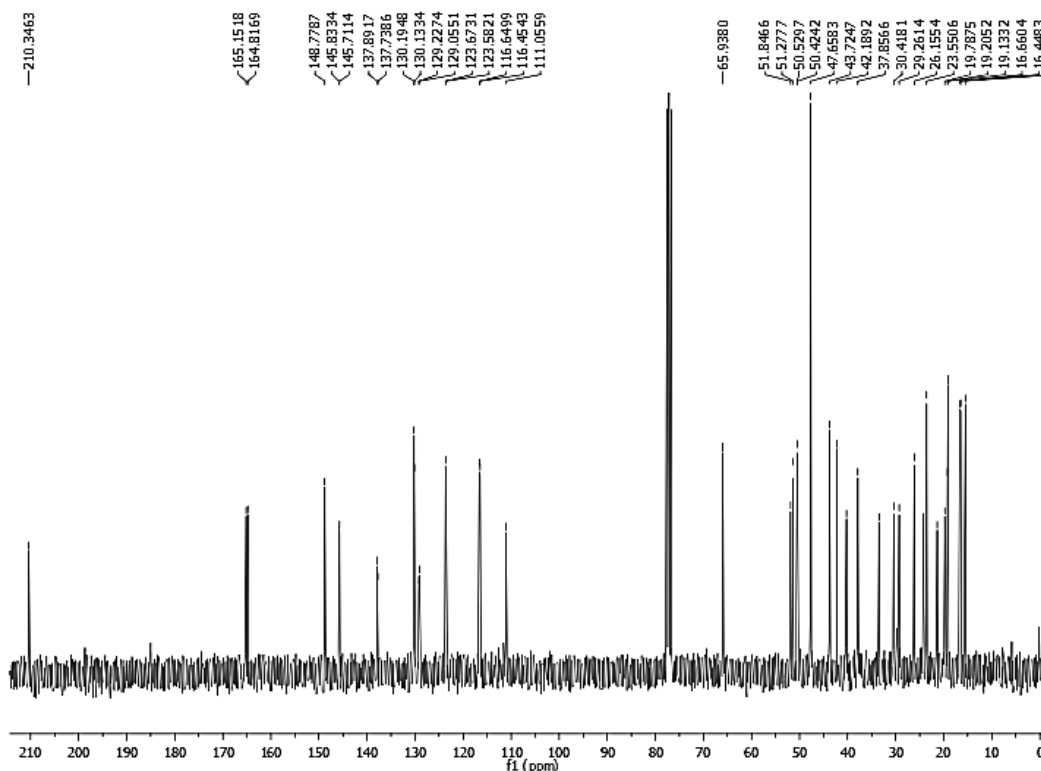
No espectro de RMN ^1H ($\text{CDCl}_3/300\text{ MHz}$) de CL-P6 (Figura 64) verificou-se a presença dos sinais com deslocamentos químicos característicos de hidrogênios para dois grupos 2,4-dinitrofenil-hidrazona em δ_{H} 9,09 (2H, s), 8,29 (2H, m) e 7,92 (2H, d, $J=9\text{ Hz}$). No espectro de RMN ^{13}C *BB-decoupled* (BBD) ($\text{CDCl}_3/75\text{ MHz}$) de CL-P6 pode-se confirmar a presença de dois grupos 2,4-dinitrofenilhidrazona, através dos sinais de carbonos hidrazônicos em δ_{C} 165,1 e 164,8, a presença do sinal de carbonila cetônica em δ_{C} 210,3, além dos carbonos do anel aromático entre δ_{C} 148,8 e 111,1 (Figura 65). A Figura 66 mostra a estrutura química do derivado CL-P6.

Figura 64 - Espectro de RMN ^1H de CL-P6 ($\text{CDCl}_3/300\text{ MHz}$).



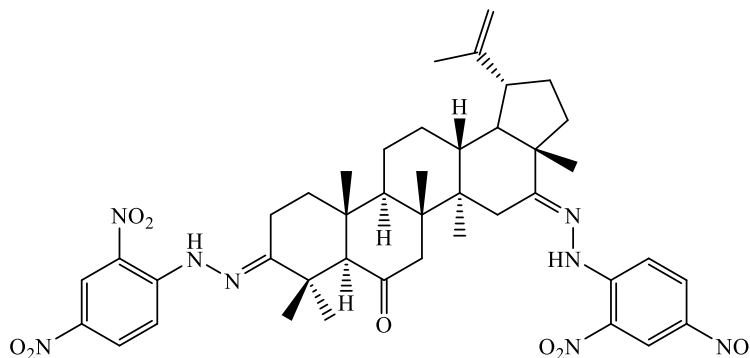
Fonte: O autor, 2020.

Figura 65 - Espectro de RMN ^{13}C - BBD de CL-P6 ($\text{CDCl}_3/75\text{ MHz}$).



Fonte: O autor, 2020.

Figura 66 - Estrutura química do derivado CL-P6.



Fonte: O autor, 2020.

Dados de RMN ^{13}C de **3,16-di(2,4-dinitrofenil-hidrazona)-6-oxolup20(29)-eno (CL-P6)** (CDCl_3 , 75 MHz): δ 16,66 (C-27); 19,79 (C-30); 21,34 (C-11); 23,55 (C-12); 30,42 (C-21); 37,86 (C-13); 40,23 (C-8); 42,19 (C-7); 43,72 (C-14); 47,72 (C-19); 111,06 (C-29); 148,78 (C-20); 210,34 (C-6).

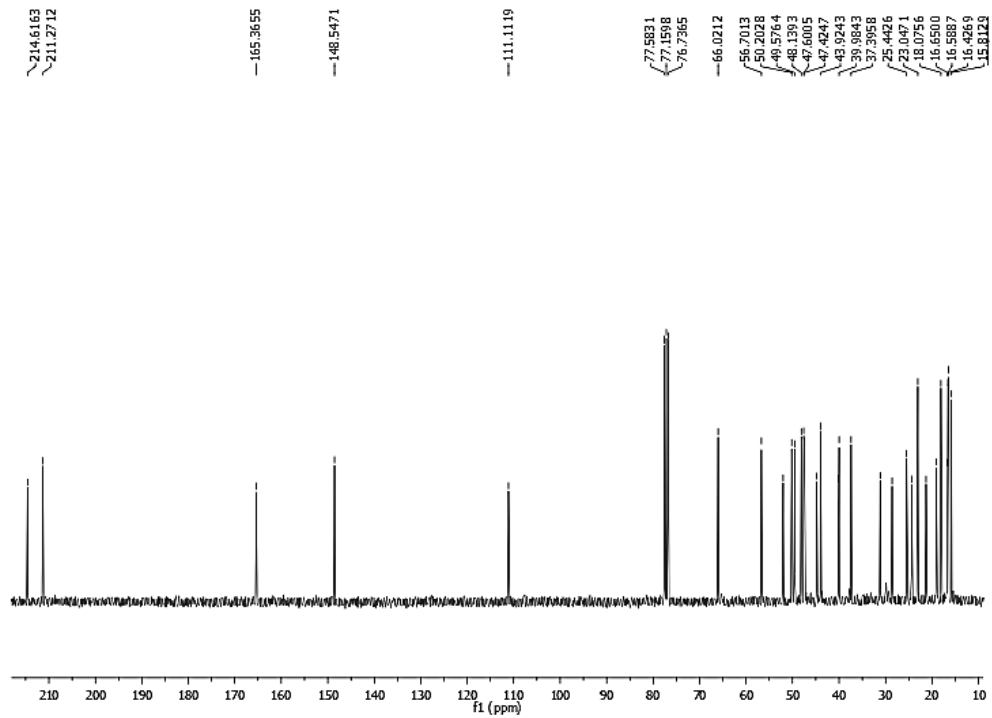
Dados de RMN ^1H de **3,16-di(2,4-dinitrofenil-hidrazona)-6-oxolup20(29)-eno (CL-P6)** (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0,99 (3H, s, H-27); 1,11 (3H, s, H-30); 1,23 (3H, s, H-25); 1,36 (3H, s,

H-26); 1,68 (3H, s, H-30); 4,66 (1H, s, H-29); 4,77 (1H, s, H-29); 7,91 (2H, d, $J=9$ Hz); 8,29 (2H, m); 9,09 (2H, m).

5.2.7 Identificação estrutural de CL-P8 (mono-oxima)

O derivado CL-P8 apresentou-se como um sólido branco amorfo. No espectro de RMN ^{13}C BB-*decoupled* (BBD) ($\text{CDCl}_3/75$ MHz) (Figura 67) de CL-P8 observou-se a ausência do sinal em δ_{C} 214,4 referente à carbonila de cetona, provavelmente na posição 3, presente no composto oxidado (CL-P3), a presença dos sinais em 211,27 (C-6) e 214,62 (C-16) referentes a carbonilas de cetona e o aparecimento do sinal em δ_{C} 165,37 relacionado ao carbono de uma oxima. A diminuição dos valores de deslocamento de C-2 e C-4 vizinhos a C-3 de δ_{C} 33,8 e 46,9 em CL-P3 para δ_{C} 16,5 e 39,8, respectivamente em CL-P8, corroborou a transformação química da carbonila em oxima na posição C-3. A diminuição dos valores de deslocamento de C-2 e C-4 em CL-P8 pode ser justificada pelo efeito de proteção da hidroxila presente na oxima. Estes resultados apontam a obtenção de uma mono-oxima localizada em C-3 para CL-P8. A Figura 68 apresenta o espectro de infravermelho do derivado CL-P8, onde são observadas bandas em 3345 cm^{-1} ($\nu_{\text{O-H}}$) referente à hidroxila de oxima, 3008 cm^{-1} ($\nu_{\text{Csp}^2\text{-H}}$), 2947 cm^{-1} ($\nu_{\text{Csp}^3\text{-H}}$), 1709 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$) de cetona, 1680 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=N}}$) referente ao estiramento C=N de oxima, 1643 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=C}}$) de dupla ligação, 1453 cm^{-1} e 1383 cm^{-1} ($\nu_{\text{N-O}}$) referente ao estiramento N-O de oxima. A confirmação da estrutura, mostrada na Figura 70, ocorreu através da análise do espectro de RMN 2D HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ de CL-P8 (CDCl_3 , 300/75 MHz) (Figura 69), o qual mostrou as correlações a longa distância (J^3) do sinal em δ_{C} 165,37 com os hidrogênios metílicos em δ_{H} 1,45 (3H, s, H-24) e 1,16 (3H, s, H-23).

Figura 67 - Espectro de RMN ^{13}C BB-decoupled (BBD) de CL-P8 ($\text{CDCl}_3/75\text{ MHz}$).



Fonte: O autor, 2020.

Figura 68 - Espectro de Infravermelho do derivado CL-P8.

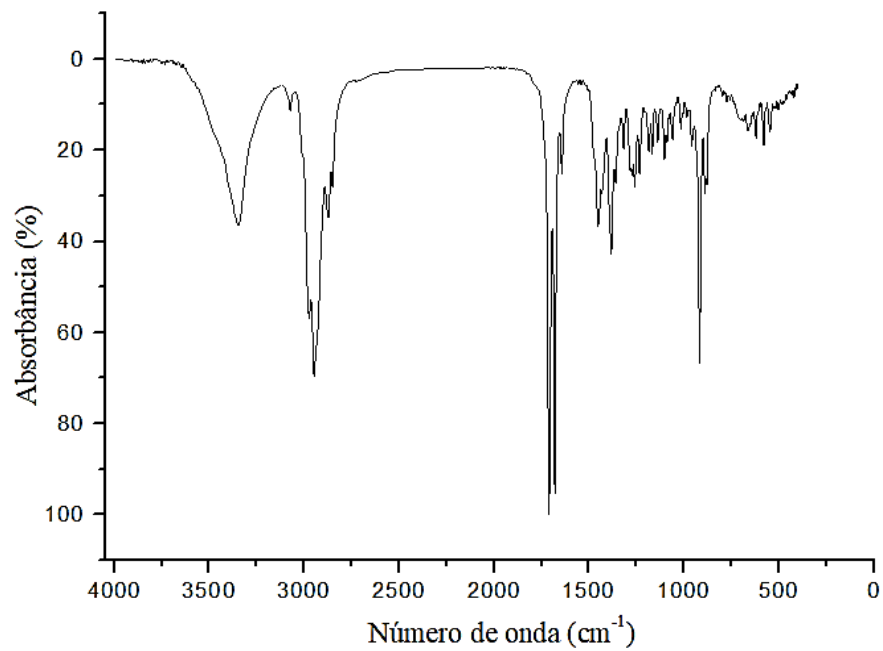
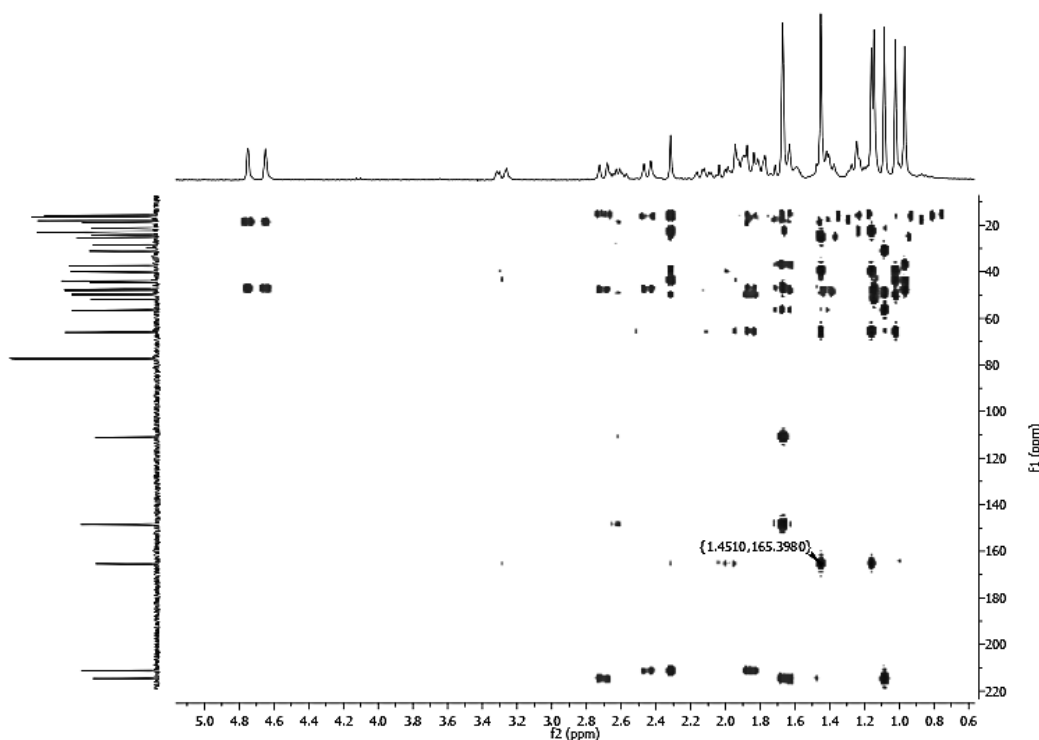
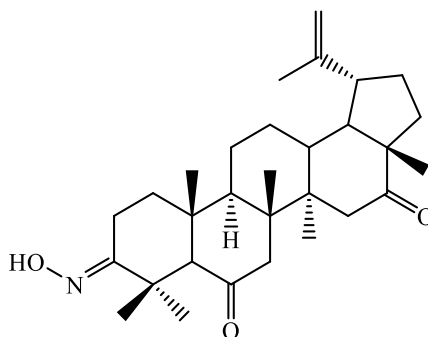


Figura 69 - Espectro de RMN 2D HMBC ^1H - ^{13}C de CL-P8 (CDCl_3 , 300/75 MHz)



Fonte: O autor, 2020.

Figura 70 - Estrutura química do derivado CL-P8.



Fonte: O autor, 2020.

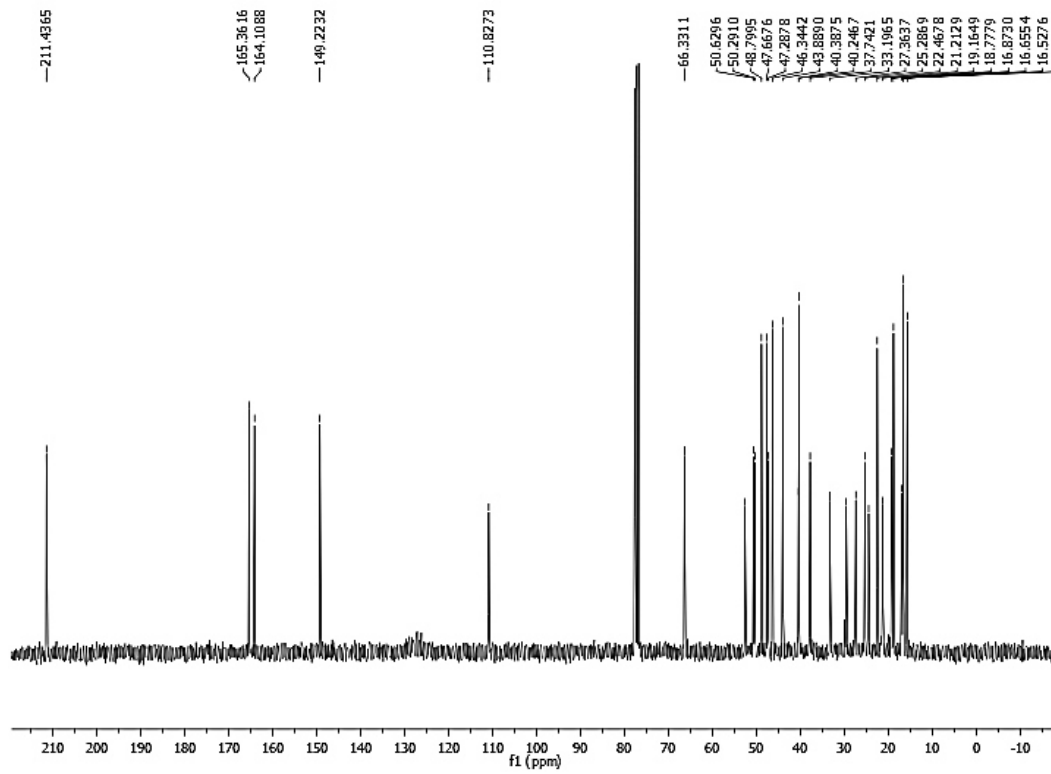
Dados de RMN ^{13}C de **3-oxima-6,16-dioxolup-20(29)-eno (CL-P8)** (CDCl_3 , 75 MHz): δ 15,81 (C-28); 16,43 (C-27); 16,59 (C-26); 16,65 (C-2); 18,08 (C-25); 19,04 (C-30); 21,28 (C-11); 23,05 (C-24); 24,35 (C-12); 25,44 (C-23); 28,58 (C-22); 31,16 (C-21); 37,40 (C-13); 39,98 (C-4); 40,12 (C-1); 43,92 (C-10); 44,75 (C-15); 47,42 (C-19); 47,60 (C-14); 48,14 (C-8); 49,58 (C-9); 50,20 (C-18); 52,02 (C-7); 56,70 (C-17); 66,02 (C-5); 111,11 (C-29); 148,55 (C-20); 165,37 (C-3); 211,27 (C-6); 214,62 (C-16).

Dados de RMN ^1H de **3-oxima-6,16-dioxolup-20(29)-eno (CL-P8)** (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0,96 (3H, s, H-28); 1,02 (3H, s, H-27); 1,09 (3H, s, H-25); 1,14 (3H, s, H-26); 1,16 (3H, s, H-23); 1,45 (3H, s, H-24); 1,67 (3H, s, H-30); 4,65 (1H, sl, H-29); 4,75 (1H, sl, H-29).

5.2.8 Identificação estrutural do derivado CL-P9 (di-oxima)

O derivado CL-P9 apresentou-se como um sólido branco amorfo. No espectro de RMN ^{13}C BB-*decoupled* (BBD) ($\text{CDCl}_3/75$ MHz) (Figura 71) de CL-P9 observou-se a ausência dos deslocamentos em δ_{C} 214,4 (C-3) e δ_{C} 214,3 (C-16) referentes a carbonilas de cetonas presentes no composto oxidado (CL-P3) e o aparecimento de dois sinais em δ_{C} 165,36 e 164,11 relacionados aos carbonos de duas oximas. A presença do sinal em δ_{C} 211,4 sugeriu a não transformação da carbonila na posição C-6. A diminuição dos valores de deslocamento químico dos carbonos em C-2 e C-4 de δ_{C} 33,8 e 46,9 para δ_{C} 16,9 e 40,2, bem como dos carbonos em C-15 e C-17 de δ_{C} 44,7 e 56,6 para δ_{C} 33,2 e 46,3, respectivamente, devido ao efeito de proteção das hidroxilas presentes nas oximas, corroboraram a transformação química das carbonilas para oximas nas posições C-3 e C-16 em CL-P9. Essas alterações nos valores de deslocamento químico não foram observadas para os carbonos em C-5 e C-7 vizinhos a C-6. A Figura 72 apresenta o espectro de infravermelho do derivado CL-P9, onde são observadas bandas em 3361 cm^{-1} ($\nu_{\text{O-H}}$) referente à hidroxila de oxima, 3080 cm^{-1} ($\nu_{\text{C}_{sp2}\text{-H}}$), 2950 cm^{-1} ($\nu_{\text{C}_{sp3}\text{-H}}$), 1710 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$) de cetona, 1642 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=C}}$) de dupla ligação, 1453 cm^{-1} e 1381 cm^{-1} ($\nu_{\text{N-O}}$) referente ao estiramento N-O de oxima. A confirmação da estrutura proposta para CL-P9, mostrada na Figura 74 ocorreu através da análise do espectro RMN 2D HMBC ^1H - ^{13}C de CL-P9 (CDCl_3 , 300/75 MHz) (Figura 73), onde foram observadas as correlações a longa distância (J^3) do sinal em δ_{C} 165,36 com os hidrogênios metílicos em δ_{H} 1,15 (3H, s, H-23) e 1,46 (3H, s, H-24), bem como do sinal em δ_{C} 164,11 com os hidrogênios metílicos em δ_{H} 0,99 (3H, s, H-28).

Figura 71 - Espectro de RMN ^{13}C BB-decoupled (BBD) ($\text{CDCl}_3/75\text{ MHz}$) de CL-P9.



Fonte: O autor, 2020.

Figura 72 - Espectro de Infravermelho do derivado CL-P9.

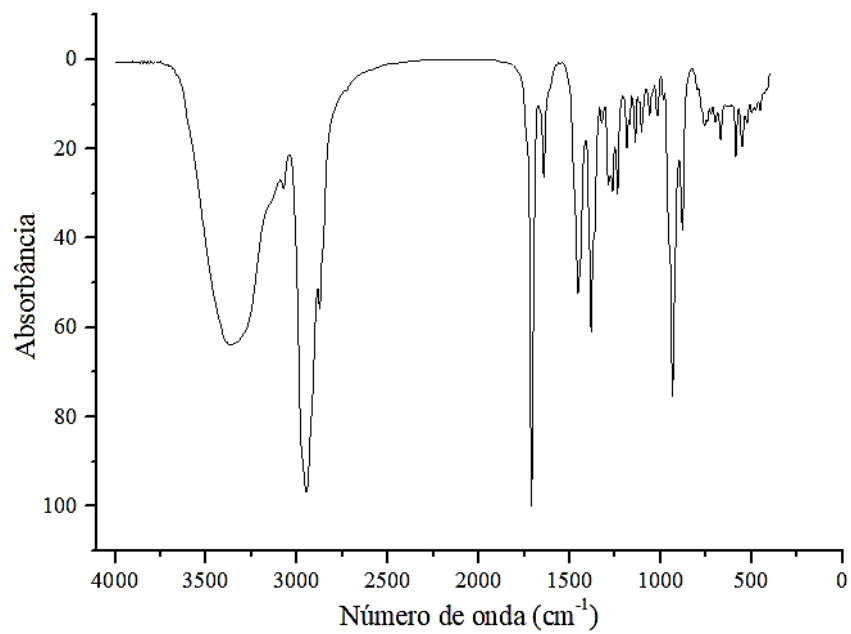
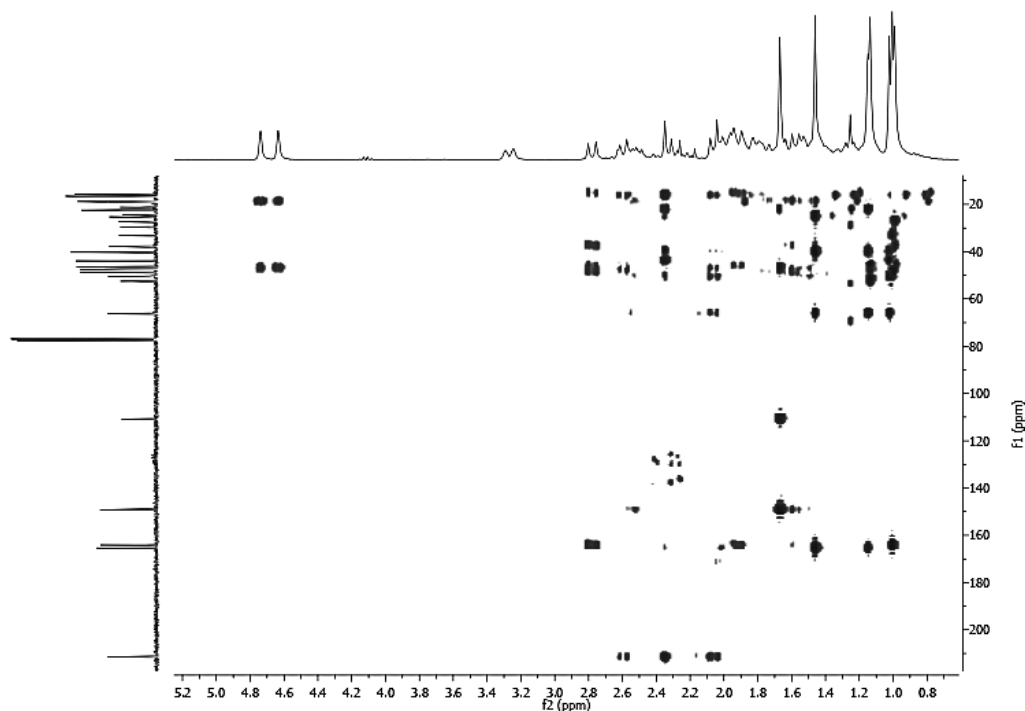
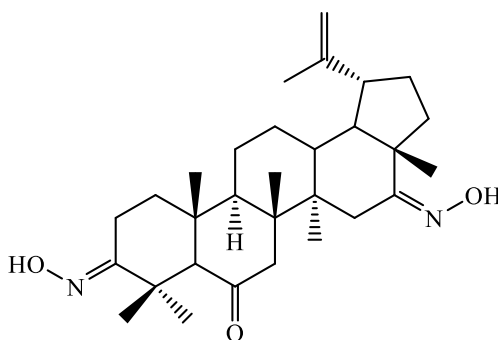


Figura 73 - Espectro RMN 2D HMBC ^1H - ^{13}C de CL-P9 (CDCl_3 , 300/75 MHz).



Fonte: O autor, 2020.

Figura 74 - Estrutura química do derivado CL-P9.



Fonte: O autor, 2020.

Dados de RMN ^{13}C de **3,16-dioxima-6-oxolup-20(29)-eno (CL-P9)** (CDCl_3 , 75 MHz): δ 15,66 (C-28); 16,53 (C-27); 16,66 (C-26); 16,87 (C-2); 18,78 (C-25); 19,16 (C-30); 21,21 (C-11); 22,47 (C-24); 24,43 (C-12); 25,29 (C-23); 27,36 (C-22); 29,51 (C-21); 33,20 (C-15); 37,74 (C-13); 40,25 (C-4); 40,39 (C-1); 43,89 (C-10); 46,34 (C-17); 47,29 (C-19); 47,67 (C-14); 48,80 (C-8); 50,29 (C-9); 50,63 (C-18); 52,53 (C-7); 66,33 (C-5); 110,83 (C-29); 149,22 (C-20); 164,11 (C-16); 165,36 (C-3); 211,44 (C-6).

Dados de RMN ^1H de **3,16-dioxima-6-oxolup-20(29)-eno (CL-P9)** (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0,99 (3H, s, H-28); 1,00 (3H, s, H-25); 1,02 (3H, s, H-26); 1,13 (3H, s, H-27); 1,15 (3H, s, H-

23); 1,46 (3H, s, H-24); 1,67 (3H, s, H-30); 4,63 (1H, sl, H-29); 4,74 (1H, sl, H-29); 10,27 (1H, sl, oxima); 10,08 (1H, sl, oxima).

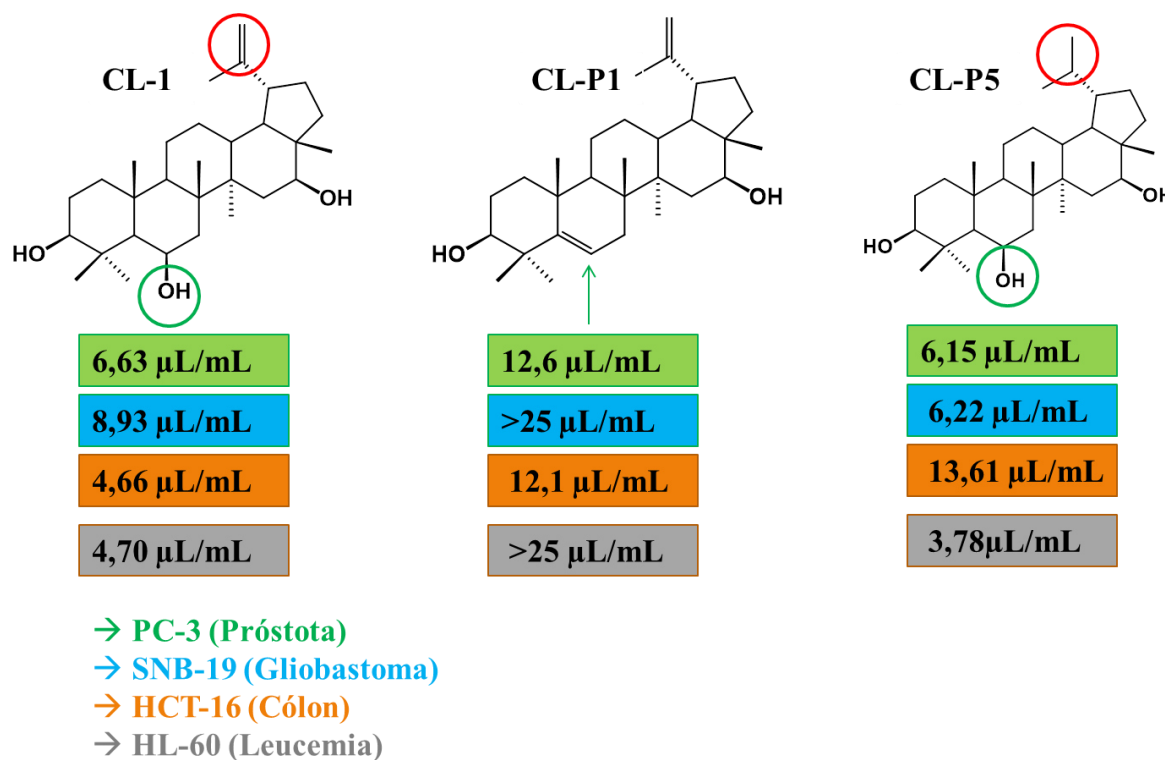
5.3 Ensaios biológicos

5.3.1 Teste de atividade citotóxica

O triterpeno 3 β ,6 β ,16 β -tri-hidroxilup-20(29)-eno (CL-1) e seus derivados foram testados na concentração de 25 μ L/mL nas linhagens HL-60, SNB-19, PC-3 e HCT-116 para avaliar a percentagem de inibição do crescimento celular. Conforme Tabela 4, somente CL-1 e o derivado CL-P5 apresentaram percentual de inibição de crescimento celular acima de 75% em todas as linhagens testadas. O derivado CL-P1 apresentou percentagem de inibição do crescimento celular de 83,92% e 74,82% para as linhagens HCT-116 e PC-3, respectivamente. O derivado CL-P3 apresentou inibição de 84,33% somente na linhagem HL-60. Desta forma, os compostos mais ativos CL-1, CL-P5 e CL-P1 tiveram o CI₅₀ (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) determinadas. Como mostrado na Tabela 5, o triterpeno CL-1 e o derivado CL-P5 apresentaram uma inibição do crescimento celular em todas as linhagens testadas, com uma variação de CI₅₀ entre 4,66 a 8,93 μ g/mL para CL-1 e entre 3,78 a 13,61 μ g/mL para CL-P5. O derivado CL-P1 apresentou CI₅₀ entre 12,1 e 12,6 μ g/mL para as linhagens HCT-116 e PC-3, estando de acordo com os dados obtidos no ensaio de inibição do crescimento celular. A doxorrubicina (controle positivo) apresentou CI₅₀ entre 0,02 e 2,06 μ g/mL. Os valores de CI₅₀ obtidos para CL-1 e CL-P5 podem ser promissores se a toxicidade para as células sadias destes dois derivados for menor do que a toxicidade apresentada pela doxorrubicina (controle positivo), pois esta apresenta graves efeitos adversos (ÁLVARES-HERNÁNDEZ, 2015).

A partir dos valores de CI₅₀ obtidos e levando-se em conta a estrutura química do produto natural e derivados ativos, pode-se especular que a presença dos grupos hidroxila, principalmente na posição 6, é importante para a manutenção da atividade citotóxica. Outro aspecto estrutural importante a ser considerado é a presença da dupla ligação no carbono 29 do produto natural, que no derivado CL-P5 encontra-se hidrogenada. Neste caso, foram observados pequenos incrementos nas atividades citotóxicas de três linhagens (SNB-19, PC-3, HL-60). Em relação a HCT-116, houve uma diminuição significativa na toxicidade (variando de 4,66 μ g/mL para 13,61 μ g/mL), o que permite supor que a presença da insaturação em C-29 é importante para esta linhagem de células tumorais. Tais análises da relação entre a estrutura atividade encontram-se resumidas na Figura 75.

Figura 75 - Análise da relação-estrutura atividade de CL-1 em dos derivados CL-P1 e CL-P5.



Os derivados CL-P2 e CL-P2A não tiveram sua atividade citotóxica investigada, apenas a avaliação da atividade analgésica. Os derivados CL-P8 e CL-P9 foram obtidos após o período de realização dos ensaios biológicos.

Tabela 4 - Média do percentual de inibição do crescimento celular (CI%) com desvio padrão (DP) das amostras na concentração única de (25 µg/mL).

Amostra	HCT 116		SNB 19		PC3		HL60	
	IC%	DP	IC%	DP	IC%	DP	IC%	DP
CL-1	100	1,38	100	0,51	100	0,66	96,19	0,55
CL-P1	83,92	2,08	35,45	3,5	74,82	5,6	34,71	3,13
CL-P3	37,68	1,08	32,35	3,62	52,61	1,27	84,33	0,26
CL-P5	86,14	1,81	100,00	0,42	88,39	0,33	99,29	0,27
CL-P6	14,64	3,01	16,75	1,31	7,11	3,56	14,74	3,54

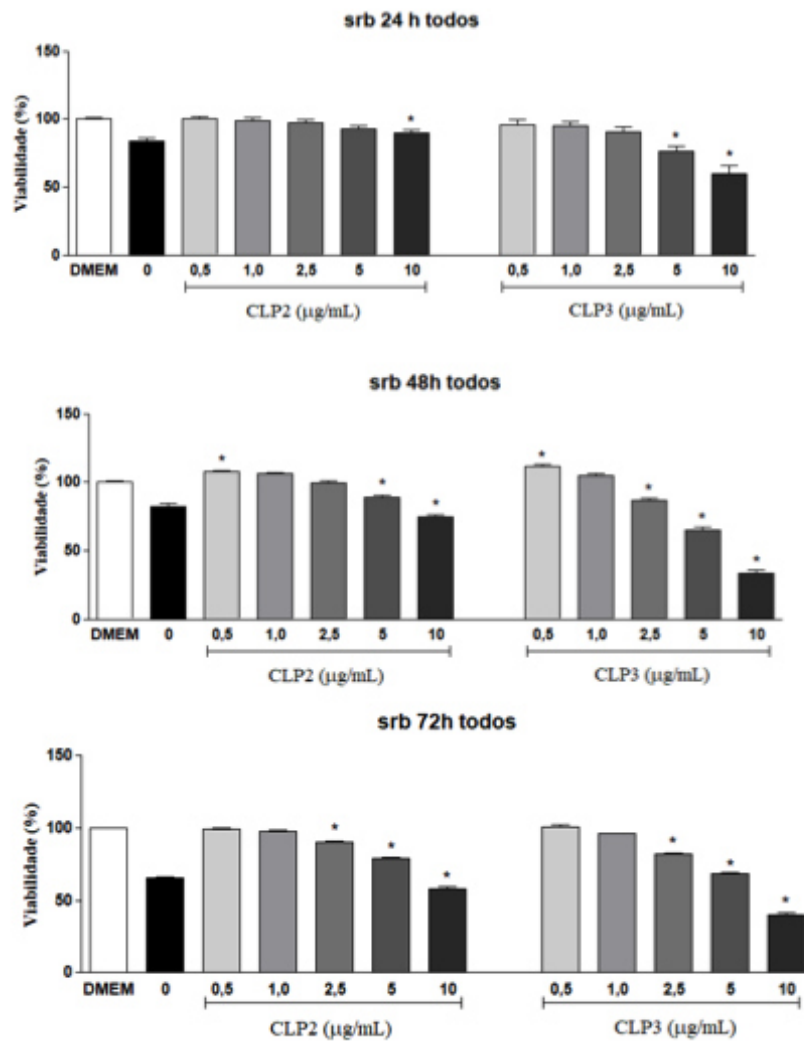
Tabela 5 - Valores de CI₅₀ com intervalo de confiança obtido por regressão não linear a partir de dois experimentos independentes, realizados em duplicata.

	MTT			
	CI ₅₀ µg/mL (Intervalo)			
	SNB-19 (Glioblastoma)	PC3 (Próstata)	HCT-116 (Cólon)	HL60 (Leucêmica)
CL-1	8,93 (8,39-9,52)	6,63 (6,12-9,52)	4,66 (4,29-5,06)	4,70 (4,45-4,98)
CL-P1	>25	12,6 (11,13-14,21)	12,1 (10,83-13,52)	>25
CL-P5	6,22 (5,64-6,87)	6,15 (5,62-6,73)	13,61 (11,16-16,59)	3,78 (2,50-5,77)
Dox	2,06 (1,73-2,45)	0,44 (0,43-0,45)	0,11 (0,08-0,14)	0,02 (0,019-0,021)

5.3.2 Ensaio de atividade citotóxica de CL-P2 e CL-P3

O ensaio da sulforadamina B (SRB) foi utilizado para avaliação da atividade citotóxica dos derivados CL-P2 e CL-P3. Após os períodos de 24 horas, 48 horas e 72 horas, CL-P2 apresentou redução da viabilidade celular apenas na maior dose de 10 µg/mL, sendo que para o período de 48 horas, um aumento discreto na viabilidade foi observado na dose de 0,5 µg/mL. Para CL-P3 foram observados redução da viabilidade já nas primeiras 24 horas para as doses de 10,0 e 5,0 µg/mL. Após 48 e 72 horas, observou-se também redução de viabilidade para as concentrações de 10,0; 5,0 e 2,5 µg/mL para este derivado. O derivado CL-P2 apresentou baixa citotoxicidade pelo método SRB e, por este motivo, foi selecionado para realização de ensaios de atividade analgésica *in vivo*, pois CL-P3 apresentou toxicidade. A Figura apresenta o efeito de CL-P2 e CL-P3 sobre a viabilidade celular de fibroblastos pelo ensaio SRB expressa após 24 h, 48 h e 72 h de incubação.

Figura 76 - Efeito de CL-P2 e CL-P3 sobre a viabilidade celular de fibroblastos pelo SRB expressa após 24 h, 48 h e 72 h de incubação. Foram realizados três experimentos independentes e os resultados foram expressos como porcentagem média \pm erro padrão da média. * $p < 0,001$ representa diferença significativa em comparação ao grupo veículo (0 $\mu\text{g/mL}$). (ANOVA – Teste de Tukey).



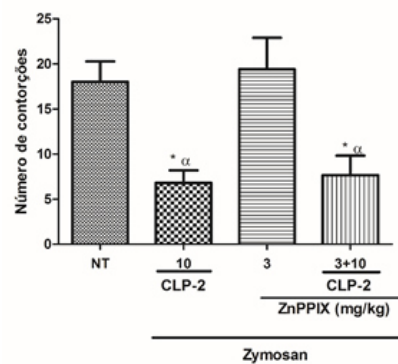
Fonte: autor, 2019.

5.3.3 Ensaio de atividade analgésica de CL-P2.

A administração de CL-P2 nas doses de 0,1; 1,0 ou 10,0 mg/Kg (v.o.) reduziu de forma significante ($p < 0,05$) o número de contorções abdominais induzidas por zymosan, quando comparado ao grupo não-tratado (NT), o que mostra que CL-P2 apresenta uma excelente atividade analgésica. Os resultados são mostrados na Figura 77. Além disso, foi estudado o efeito da coadministração de CL-P2 com ZnPP-IX, um inibidor da via HO-1, no

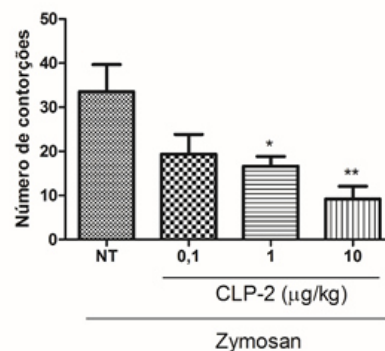
modelo de contração abdominal induzido por zymosan. Tal estudo teve como objetivo verificar a dependência do efeito nociceptivo apresentado por CL-P2 com a via HO-1, que modula a resposta inflamatória pela inibição do dano oxidativo e da apoptose celular (ALCARAZ et al., 2003). A administração de ZnPP-IX (3mg/Kg; s.c.) com zymosan promoveu um número de contorções igual ao grupo não tratado (grupo que recebeu apenas o veículo salina 0,9%, v.o./zymosan (i.p.)), demonstrando que a inibição da via HO-1 agrava o quadro nociceptivo (Figura 78). A coadministração da melhor dose (10 mg/Kg) de CL-P2 com ZnPP-IX (3 mg/Kg; s.c) não reduziu o efeito analgésico de CL-P2 no modelo de contorção induzido por zymosan, sugerindo que o efeito de CL-P2 não depende da ativação da via HO-1.

Figura 77 - Efeito da administração (i.p.) de CL-P2 sobre o número de contorções induzidas por Zymosan em camundongos.



Fonte: o autor, 2020.

Figura 78 - Efeito da coadministração sistêmica de zinco-protoporfirina IX (ZnPP-IX) (inibidor da via da HO-1) e CLP-2 sobre o número de contorções induzidas por zymosan em camundongos.



Fonte: O autor, 2020.

6 CONCLUSÕES

O triterpeno 3 β ,6 β ,16 β -tri-hidroxilup-20(29)-eno (CL-1) foi obtido em grande quantidade das flores de *C. leprosum* (Mufumbo) por técnicas simples de cromatografia, confirmando tratar-se as flores desta espécie uma fonte rica deste metabólito secundário.

O triterpeno 3 β ,6 β ,16 β -tri-hidroxilup-20(29)-eno (CL-1) por apresentar três hidroxilas e uma ligação dupla em sua estrutura química possibilita a realização de modificações estruturais específicas e regioseletivas. Essas características do ponto de vista químico, aliadas a atividades biológicas já confirmadas e a facilidade de obtenção em quantidades apreciáveis, tornam este produto natural (triterpeno da classe lupano) um excelente material de partida para estudos de semissíntese e de relação estrutura-atividade.

Foram obtidos oito derivados semissintéticos para o triterpeno CL-1: hidrogenado (CL-P5), desidratado (CL-P1), oxidado (CL-P3), diacilado (CL-P2A), triacilado (CL-P2), hidrazona (CL-P6), mono-oxima (CL-P8) e di-oxima (CL-P9). Dos 3 derivados testados contra quatro linhagens de células tumorais humanas (HL-60, HCT-116, PC-3 e SNB-19), CL-P5 inibiu todas as linhagens tumorais testadas, CL-P1 duas linhagens e CL-P3 foi seletivo a uma linhagem tumoral. A melhor atividade foi evidenciada para o derivado desidratado (CL-P1) com valores de CI₅₀ que variaram de 3,78 a 13,61 μ g/mL, em comparação com o produto natural. O derivado CL-P2 apresentou potencial atividade antinociceptiva com baixa citotoxicidade. Estes resultados evidenciam que os estudos de semissíntese em metabólitos secundários são uma importante ferramenta no desenvolvimento e na potencialização terapêutica de novos fármacos.

REFERÊNCIAS

- ABDELLATIEF, S. A.; GALAL, S. M.; FAROUK, S. M.; ABDEL-DAIM, M. M. Ameliorative effect of parsley oil on cisplatin-induced hepatocardiotoxicity: a biochemical, histopathological, and immunohistochemical study. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 86, p. 482-491, 2017.
- ABFULLAHI, M. H.; ANUKA, J. A.; YARO, A. H.; MUSA, A. Analgesic and anti-inflammatory effects of aqueous leaf extract of *Combretum micranthum* G. Don (Combretaceae). **Bajopas**, Kano, v. 7, n. 2, p. 78-82, 2014.
- ÁLVARES-HERNÁNDEZ, C.; BRUSINT, B.; VICH, P.; GARCÍA-DÍAZ, N.; CUADRADO-ROUCO, C.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, M. Actualización del cáncer de mama em atención primaria (IV/V). **Semergen**, [s.l.], v. 41, n.1, p. 34-47, 2015.
- ALVES FILHO, F. DAS C.; CAVALCANTI, P. M. DA S.; PASSAGLIA, R. DE C. A., BALEJJO G. Long-lasting endothelium-dependent relaxation of isolated arteries caused by an extract from the bark of *Combretum leprosum*. **Einstein**, São Paulo, v. 13, n.3, p. 395-403, 2015.
- AMIRKIA, V.; HEINRICH, M. Alkaloids as drug leads - a predictive structural and biodiversity-based analysis. **Phytochemistry Letters**, [s.l.], v. 10, p. 48-53, 2014.
- ANATO, M.; KETEMA, T. Anti-plasmodial activities of *Combretum molle* (Combretaceae) [Zwoo] seed extract in Swiss albino mice. **BMC Research Notes**, [s.l.], v. 11, n. 312, p. 1-5, 2018.
- ATANASOV, A. G.; WALTERBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E.; LINDER, T.; WAWROSCHE, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E. H.; ROLLINGER, J. M.; SHUSTER D.; BREUSS, J. M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M. D.; KOPP, B.; BAUER, R.; DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 33, p. 1582-1614, 2015.
- BALBINOT-LONGHI, D.T.; LANZMASTER, D.; BAGGIO, C. H.; SILVA, M. D.; CABRERA, C. H.; FACUNDO, V. A.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory effect of triterpene 3 β ,6 β ,16 β -tri-hidroxiup-20(29)-eno obtido de *Combretum leprosum* Mart & Eich in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 142, p. 59-64, 2012.
- BALBINOT-LONGHI, D. T.; PIETROVSKI, E. F.; GADOTTI, V. M.; MARTINS, D.F.; FACUNDO, V. A.; SANTOS, A. R. S. Spinal antinociception evoked by the triterpene 3 β ,6 β ,16 β -tri-hidroxiup-20(29)-eno in mice: evidence for the involvement of the glutamatergic system via NMDA and metabotropic glutamate receptors. **European Journal of Pharmacology**, [s.l.], v. 623, p. 30-36, 2009.
- BANFI, S.; CARUSO, E.; ORLANDI, V.; BARBIERI, P.; CAVALLARI, S.; VIGANÒ, P.; CLERECI, P.; CHIODAROLI, L. Antibacterial activity of leaf extracts from *Combretum micranthum* and *Guiera senegalensis* (Combretaceae). **Research Journal of Microbiology**, [s.l.], v. 9, n. 2, p. 66-81, 2014.

- BARKER, D. D.; CHU, M.; OZA, U.; RAJGARHIA, V. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Natural Products Reports**, [s.l.], v. 24, p. 1225-1244, 2007.
- BARKU, V. Y. A.; BOYE, A.; ERZAH, F.; TSAMENYI, P. *In-vitro* antioxidante and wound healing properties of *Combretum dolichopetalum* Engl. & Diels (Combretaceae). **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, [s.l.], v. 6, n. 5, p. 185-192, 2016.
- BATAWILA, K.; KOKOU, K.; KOUMAGLO, K.; GBÉASSOR, M.; FOUCAULT, B. DE; BOUCHET, PH.; AKPAGANA, K. Antifungal of five Combretaceae used in Togolese traditional medicine. **Fitoterapia**, [s.l.], v. 76, p. 264-268, 2005.
- BERNARDINI, S.; TIEZZI, A.; MASCI, V. L.; OVIDI, E. Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. **Natural Product Research**, [s.l.], v. 32, n. 16, p. 1926-1950, 2018.
- BERRIDGE, M. V., TAN, A. S., McCOY, K. D., WANG, R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use Tetrazolium salts. **Biochemica**, Berlin, v. 4, p. 14-19, 1996.
- BLAKEMORE, D. C.; CASTRO, L.; CHURCHER, I.; REES, D. C.; THOMAS, A. W.; WILSON, D. M.; WOOD, A. Organic synthesis provides opportunities to transform drug Discovery. **Nature Chemistry**, [s.l.], v. 10, p. 383-394, 2018.
- BUCAR, F.; WUBE, A.; SCHMID, M. Natural product isolation - how to get fom biological material to pure compounds. **Natural Products Reports**, [s.l.], v. 30, p. 525-545, 2013.
- CHIKA, A.; BELLO, S. O. Antihyperglycaemic activity of aqueous leaf extract of *Combretum micranthum* (Combretaceae) in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 129, n. 1, p. 34-37, 2010.
- CHINSEMBU, K. C.; HIJARUNGURU, A.; MBANGU, A. Ethnomedicinal plants used by traditional healers in the management of HIV/AIDS opportunistic diseases in Rundu, Kavango East Region, Namibia. **South African Journal of Botany**, [s.l.], v. 100, p. 33-42, 2015.
- CHTOUROU, Y.; AOUEY, B.; AROUI, S.; KEBIECHE, M.; FETOUI, H. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of naringin on cisplatin-induced renal injury in the rat. **Chemico-Biological Interactions**, [s.l.], v. 213, p. 1-9, 2016.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [s.l.], v. 1830, n. 6, 3670-3695, 2013.
- DAVID, B.; WOLFENDER, J.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, [s.l.], v. 14, p. 299-315, 2015.
- DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**, 3rd ed.; John Wiley and Sons INC: West Sussex, UK, p. 539, 2009.
- DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, [s.l.], v. 2, p. 303-336, 2012.

DIOP, E. H. A.; QUEIROZ, E. F.; MARCOURT, L.; KICKA, S.; RUDAZ, S.; DIOP, T.; SOLDATI, T.; WOLFENDER, J. Antimycobacterial activity in a single-cell infection assay of ellagitannins from *Combretum aculeatum* and their bioavailable metabolites. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 238, p. 1-9, 2019.

DUKE, J. A.; DUKE, P. A. K.; DU CELLIER, J. L. **Duke's Handbook of medicinal plants of the bible**. CRC Press Taylor and Francis Group: Boca Raton, FL, USA, 2008, p. 552.

ERIVASTO, F. F.V.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; SANTOS, H. S. DOS S.; BANDEIRA, P. N.; ÁVILA, F. DO N.; SILVA, B. R. DA; VASCONCELOS, A. A.; RABELO, E. DE M.; NASCIMENTO-NETO, L. G.; ARRUDA, F. V. S.. VASCONCELOS, M. A.; CARNEIRO, V. A.; CAVADA, B. S.; TEIXEIRA, E. H. Antimicrobial effect of the triterpene 3 β ,6 β ,16 β -trihydroxilup-20(29)-eno on planktonic cells and biofilms from gram positive and gram negative bacteria. **BioMed Research International**, [s.l.], v. 2014, ID 729358, p. 1-7, 2014.

FACUNDO, V. A.; ANDRADE, C. H. S.; BRAZ-FILHO, R.; HUFFORD, C. H. Triterpenes and flavonoids from *Combretum leprosum*. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 32, n. 2, p. 411-415, 1993.

GOSSAN, D. P. A.; MAGID, A. A.; YAO-KOUASSI, P. A.; JOSSE, J.; GANGLOFF, S. C.; MORJANI, H.; VOUTQUENNE-NAZABADIOKO, L. Antibacterial and cytotoxic triterpenoids from the roots of *Combretum racemosum*. **Fitoterapia**, [s.l.], v. 110, p. 89-95, 2016.

HAMAD, K. M.; SABRY, M. M.; ELGAYED, S. H.; SHABRAWY, A.; EL-FISHAWY, A. M.; JALEEL, G. A. A. Anti-inflammatory and phytochemical evaluation of *Combretum aculeatum* Vent growing in Sudan. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 242, p. 1-8, 2019.

HAN, N.; ZHAO, Q.; WAN, L.; WANG, Y.; GAO, Y.; WANG, P.; WANG, Z.; ZHANG, J.; JIANG, T.; WANG, S. Hybrid lipid-capped mesoporous silica for stimuli-responsive drug release and overcoming multidrug resistance. **ACS Applied Materials & Interfaces**, [s.l.], v. 7, p. 3342-3351, 2015.

HENRICH, C. J.; BEUTLER, J. A. Matching the power of high throughput screening to the chemical diversity of natural products. **Natural Product Reports**, [s.l.], v. 30, p. 1284-1298, 2013.

HICKS, S. **Desert Plants and People**, 1st ed.; Naylor Co.: San Antonio, TX, USA, p. 75, 2014.

IONOV, M.; LAZNIEWSKA, J.; DZMITRUK, V.; HALETS, I.; LOZNIKOVA, S.; NOVOPASHINA, D.; APARTSIN, E.; KRASHENININA, O.; VENYAMINOVA, A.; MILOWSKA, K.; NOWACKA, O.; GOMEZ-RAMIREZ, R.; DE LA MATA, F. J.; MAJORAL, J.; SHCHARBIN, D.; BRYZSEWSKA, M. Anticancer siRNA concktails as a novel tool to treat câncer cells. Part (A). Mechanisms of interaction. **International Journal of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 485, p. 261-269, 2015.

JEETU, G.; CHAKRABORTY, B. S. Evaluation of efficacy and safety of artemisin derivatives for treatment of severe malária: a meta-analysis approach. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, [s.l.], v. 10, n. 5, p. 394-405, 2018.

KATERERE, D. R.; SERAGE, A.; ELOFF, J. N. Isolation and characterisation of antibacterial compounds from *Combretum apiculatum* subspecies *apiculatum* (Combretaceae) leaves. **South African Journal for Science and Technology**, [s.l.], v. 37, n. 1, 2018.

KEEPERS, Y. P.; PIZAO, P. E.; PETERS, G. J.; ARK-OTTE, J. V.; WINOGRAD, B.; PINEDO, H. M. Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for *in vitro* chemosensitivity testing. **European Journal of Cancer and Clinical Oncology**, [s.l.], v. 27, n. 7, p. 897-900, 1991.

KINGHORN, A. D.; PAN, L.; FLETCHER, J. N.; CHAI, H. The relevance of higher plants in lead compound Discovery programs. **Journal of Natural Products**, [s.l.], v. 74, p. 1539-1555, 2011.

KPEMISSI, M.; EKLUGADEGBEKU, K.; VEERAPUR, V. P.; NEGRU, M.; TAULESCU, M.; CHANDRAMOHAN, V.; HIRIYAN, J.; BANAKAR, S. M.; NV, T.; SUHAS, D. S.; PUNEETH, T. A.; VIJAYAKUMAR, S.; METOWOGO, K.; AKLIKOKOU, K. Nephroprotective activity of *Combretum micranthum* G. Don in cisplatin induced nephrotoxicity in rats: In-vitro, in-vivo and in-silico experiments. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 116, p. 1-14, 2019.

KUMAR, P.; SINGH, B.; THAKUR, V.; THAKUR, A.; THAKUR, N.; PANDEY, D.; CHAND, D. Hyper-production of taxol from *Aspergillus fumigatus*, an endophytic fungus isolated from *Taxus* sp. of the Northern Himalayan region. **Biotechnology Reports**, [s.l.], v. 24, p. 1-12, 2019.

LAHLOU M. The success of natural products in drug discovery. **Pharmacology & Pharmacy**, [s.l.], v. 4, p. 17-31, 2013.

LI, J.; LI, C. SMITH, S. **Hormone Metabolism and Singnaling in Plants**: 1. ed. [S.l.]: Editora Academic Press, 2017.

LIMA, G. R. M.; SALES, I. R. P.; CALDAS FILHO, M. R. D.; JESUS, N. Z. T.; FALCÃO, H. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CABRAL, A. G. S.; SOUTO, A. L.; TAVARES, J. F.; BATISTA, L. M. Bioactivities of the Genus *Combretum* (Combretaceae): A Review. **Molecules**, [s.l.], v. 17, p. 9142-9206. 2012.

LIRA, S. R. DE S.; ALMEIDA, R. N.; ALMEIDA, F. R. DE C.; OLIVEIRA, F. DE S.; DUARTE, J. C. Preliminaru studies on the analgesic properties of the etanol extract of *Combretum leprosum*. **Pharmaceutical Biology**, [s.l.], v. 40, n. 3, p. 213- 215, 2002.

MAKHAFOLA T. J.; ELGORASHI E. E.; MCGAW L. J.; VERSCHAEVE L.; ELOFF J. N. The correlation between antimutagenic activity and total phenolic content of extract of 31 plant species with high antioxidant activity. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, [s.l.], v. 16, n. 490, 2016.

MAKHAFOLA, T. J.; ELGORASHI, E. E.; MCGAW, L. J.; AWOUAFACK, M. D.; VERSCHAEVE, L.; ELOFF, J. N. Isolation and and characterization of the compounds responsible for the antimutagenic activity of *Combretum microphyllum* (Combretaceae) leaf extracts. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, [s.l.], v. 17, n. 446, p. 1-8, 2017.

MATHUR, S.; HOSKINS, C. Drug development: Lessons from nature (Review). **Biomedical**

Reports, [s.l.], v. 6, n. 6, p. 612-614, 2017.

MBIANTCHA, M.; ALMAS, J.; DAWE, A.; FAHEEM, A.; SIDRA, Z. Analgesic, anti-inflammatory and anticancer activities of Combretin A and Combretin B isolated from *Combretum fragrans* F. HOFFM (Combretaceae) leaves. **Inflammopharmacology**, [s.l.], v. 26, n. 6, 1429-1440, 2018.

McCHESNEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: back to the future or into extinction?. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 68, p. 2015-2022, 2007.

MCGAW, L. J.; RABEM T.; SPARG, S. G.; JÄGER, A. K.; ELOFF, J. N.; STADEN, J. An investigation of the biological activity of *Combretum* species. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 75, p. 45-50, 2001.

MONTINARI, M. R.; MINELLI, S.; CATERINA, R. D. The first 3500 years of aspirin history from its roots - A concise summary. **Vascular Pharmacology**, [s.l.], v. 113, p. 1-8, 2019.

MORS, W. B.; NASCIMENTO, M. C. DO; PEREIRA, B. M. R, PEREIRA, N. A. Plant natural products active against snake bite - the molecular approach. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 55, p. 627-642, 2000.

MOURA, A. F.; LIMA, K. S. B.; SOUSA, T. S.; MARINHO-FILHO, J. D. B.; PESSOA, C.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O. ARAÚJO, A. J. In vitro antitumor effect of a lignan isolated from *Combretum fruticosum*, trachelogenin, in HCT-116 human colon cancer cells. **Toxicology in Vitro**, [s.l.], v. 47, p. 129-136, 2018.

MUSHI, N. F.; INNOCENT, E.; KIDUKULI, A. W. Cytotoxic and antimicrobial activities of substituted phenanthrenes from the roots of *Combretum adenogonium* Steud Ex A. Rich (Combretaceae). **Journal of International Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 4, n. 1, 2015.

NASCIMENTO-NETO, L. G. DO; ERIVASTO, F. F. V.; ALVES, M. F. DE A.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; SANTOS, H. S. DOS; BANDEIRA, P. N.; ARRUDA, F. V. S.; TEIXEIRA, E. H. Effect of the isolated $3\beta,6\beta,16\beta$ -trihydroxylup-20(29)-eno from leaves of *Combretum leprosum* Mart. on cutaneous wounds in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 171, p. 116-120, 2015.

NUNES, P. H. M.; CAVALCANTI, P. M. S.; GALVÃO, S. M. P.; MARTINS M. C. C. Antiulcerogenic activity of *Combretum leprosum*. **Pharmazie**, [s.l.], v. 64, p. 58-64, 2009.

OLUYEMI, W. M.; SAMUEL, B. B.; KAEHLIG, H.; ZEHL, M.; PARAPINI, S.; D'ALESSANDRO, S.; TARAMELLI, D.; KRENN, L. Antiplasmodial activity of triterpenes isolated from the methanolic leaf extract of *Combretum racemosum* P. Beauv. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 247, p. 1-7, 2020.

PASCOLUTTI, M.; QUINN, R. J. Natural products as lead structures: chemical transformations to create lead-like libraries. **Drug Discovery Today**, [s.l.], v. 19, p. 215-221, 2014.

PATNAIK, S.; HARITHA, P.; RAO P, R. Erectile dysfunction and its pharmacology: an overview. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, [s.l.], v. 10, n. 2, 2017.

PESSOA, R. R.; MORO, A.; MUNHOZ, R. P.; TEIVE, H. A. G.; LEES, A. J. Apomorphine in treatment of Parkinson's disease: a review. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, [s.l.], v. 76, n. 12, p. 840-848, 2018. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/anp/v76n12/1678-4227-anp-76-12-0840.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2020.

PIETROVSKI, E. F.; ROSA, K. A.; FACUNDO, V. A.; RIOS, K.; MARQUES, M. C. A.; SANTOS, A. R. S. Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene $3\beta,6\beta,16\beta$ -trihydroxylup-20(29)-eno obtained from flowers of *Combretum leprosum* in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, [s.l.], v. 83, p. 90-99, 2006.

ROY, R.; SINGH, R. K.; JASH, S.; SARKAR, A.; GORAI, D. *Combretum quadrangulare* (Combretaceae): phytochemical constituents and biological activity. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 4, n. 8, 2014.

SENE, M.; NDIAYE, D.; GAMASSA, A.; BARBOZA, F. S.; MBAYE, M. D.; YORO, S. Y. G. Analgesic and anti-inflammatory activities of triterpenoid molecules isolated from the leaves of *Combretum glutinosum* Perr. Ex DC (Combretaceae). **Journal of Advances in Medical and Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 19, n. 4, p. 1-8, 2018.

TELES, C. B. G.; DILL-MOREIRA, L. S.; SILVA, A. DE A.; FACUNDO, V. A.; AZEVEDO JR, W. F. DE; SILVA, L. H. P. DA; MOTTA, M. C. M.; STÁBELI, R. G.; SILVA-JARDIM, I. A lupane-triterpene isolated for *Combretum leprosum* Mart. Fruit extracts that interferes with the intracellular development of *Leishmania (L.) amazonenses* in vitro. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, [s.l.], v. 15, n. 165, p. 1-10, 2015.

TELES, C. B. G.; MOREIRA, L. S.; SILVA, A. A. E.; FACUNDO, V. A.; ZULIANI, J. P.; STÁBELI, R. G.; SILVA-JARDIM, I. Activity of the lupane from *Combretum leprosum* against *Leishmania amazonenses* promastigotes. **Journal of Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 22, n. 5, p. 936-942, 2011.

ROY, R.; RANA, C. S. Plant secondary metabolites: a review. **International Journal of Engineering Research and General Science**, [s.l.], v. 3, n. 5, p. 661-670, 2015.

VIAU, C. M.; MOURA, D. J.; FACUNDO, V. A.; SAFFI, J. The natural triterpene $3\beta,6\beta,16\beta$ -trihydroxylup-20(29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* induces apoptosis in MCF-7 breast. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, [s.l.], v. 14, n. 280, p. 1-12, 2014.

WEAVER, B. A. How Taxol/Paclitaxel kills cancer cells. **Molecular Biology of the Cell**, [s.l.], v. 25, p. 2677-2681, 2014.

ZHOU, Y.; ZHONG, N.; LI, X.; CHEN, S.; ZHENG, J.; ZHENG, J.; ZHAO, D.; YAO, W.; ZHI, R.; WEI, L.; HE, B.; ZHANG, X.; YANG, C.; LI, Y.; LI, F.; DU, J.; GUI, J.; HU, B.; BAI, C.; HUANG, P.; CHEN, G.; XU, Y.; WANG, C.; LIANG, B.; LI, Y.; HU, G.; TAN, H.; YE, X.; MA, X.; CHEN, Y.; HU, X.; TIAN, J.; ZHU, X.; SHI, Z.; DU, X.; LI, M.; LIU, S.; YU, R.; ZHAO, J.; MA, Q.; XIE, C.; LI, X.; CHEN, T.; LIN, Y.; ZENG, L.; YE, C.; YE, W.; LUO, X.; ZENG, L.; YU, S.; GUAN, W.; RAN, P. Tiotropium in early-stage chronic obstructive pulmonary disease. **The New England Journal of Medicine**, [s.l.], v. 377, p. 923-935, 2017.