

DIEGO CARLOS RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

**ESTUDO FITOQUÍMICO DO FRUTO DE *Sapindus saponaria*, PREPARO DE
DERIVADOS DA HEDERAGENINA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DESSES
DERIVADOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2016**

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

R696e
2016

Rodriguez Hernández, Diego Carlos, 1982-

Estudo fitoquímico do fruto de *Sapindus saponaria*, preparo de derivados da hederagenina e avaliação da atividade biológica desses derivados / Diego Carlos Rodríguez Hernández. – Viçosa, MG, 2016.

xxiv, 277f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Antônio Jacinto Demuner.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Sapindaceae*. 2. *Sapindus saponaria* L. 3. Fruto - Sabão-de-soldado. 4. Sementes - Fisiologia. 5. Sementes - Óleo. 6. Substâncias perigosas. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química. Programa de Pós-graduação em Agroquímica. II. Título.

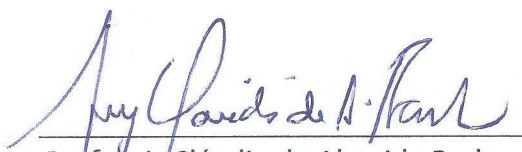
CDD. 22 ed. 583.78|

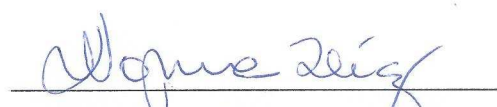
DIEGO CARLOS RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

ESTUDO FITOQUÍMICO DO FRUTO DE *Sapindus saponaria*, PREPARO DE
DERIVADOS DA HEDERAGENINA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DESSES
DERIVADOS

Tese apresentada à Universidade Federal de
Viçosa, como parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do
título de *Doctor Scientiae*.

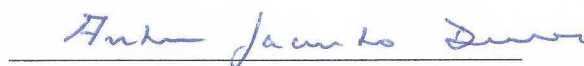
APROVADA: 15 de agosto de 2016.


Prof. Luiz Cláudio de Almeida Barbosa
(Coorientador)


Profa. Marisa Alves Nogueira Diaz


Prof. Róbson Ricardo Teixeira


Prof. Gaspar Diaz Muñoz


Prof. Antônio Jacinto Demuner
(Orientador)

***"A felicidade não é fazer o que você
quer, mas querer o que você faz"
Jean Paul Sartre.***

AGRADECIMENTOS

A Deus por seu imenso amor.

Aos meus pais Diego Rodríguez Taño e Elvia Hernández de Rodríguez, pelo amor, carinho e apoio incondicional.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Química pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo concedida.

A Universidade Federal de Minas Gerais e ao Departamento de Química pela oportunidade de complementar minha tese.

Ao professor Antônio Jacinto Demuner pela orientação, confiança e amizade.

Ao professor Luiz Cláudio de Almeida Barbosa pela coorientação, confiança, conselhos e amizade.

Ao Dr. Carlos Zani e o Dr. Markus Kohlhoff do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) – Fiocruz-MG-Brasil pelos análises de espectrometria de massas de alta resolução.

Ao Professor René Csuk da Martin-Luther-University-Alemanha pelos ensaios antitumorais e Análise Elementar.

Ao professor Ricardo T. Fujiwara e ao Dr. Sebastião R. Ferreira do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais pelos ensaios leishmanicida.

Ao professor Alberto Oliveros-Bastida da Universidad de Los Andes-Venezuela por ter aberto o caminho para realizar meu doutorado no Brasil.

Aos técnicos: José Luiz, Cristiane e Márcio, pela realização dos espectros.

A todos os professores, funcionários, amigos e colegas que participaram da minha formação pessoal e profissional.

A todos os colegas do LASA da UFV e do Laboratório 220 da UFMG pelo convívio, amizade e pelas contribuições no desenvolvimento de meu trabalho.

À minha esposa e amada Amalyn Nain pelo incentivo, paciência, compreensão e grande contribuição profissional.

Aos demais familiares e amigos pelo apoio e carinho.

CONTEÚDO

	Páginas
Lista de Abreviaturas	xiv
Lista de Figuras	xvi
Lista de Tabelas	xix
Resumo	xxi
Abstract	xxiii
 1. Introdução Geral	
<i>Sapindus saponaria</i> L.	
 1.1. <i>Sapindus saponaria</i> L.	2
1.2. Objetivos	4
1.3. Referências bibliográficas	7
 2. Capítulo 1	
Cianolípídeo presentes no óleo da semente de <i>S. saponaria</i> L.	
 2.1. Introdução	9
2.2. Material e Métodos	10
2.2.1. Material vegetal	10
2.2.2. Análises e purificação do óleo	10
2.2.3. Transesterificação dos componentes do óleo	11
2.2.4. Dados referentes aos ésteres graxos encontrados na fração 2	12
2.2.5. Dados referentes aos cianolípídeo tipo III encontrados na fração 3	13
2.3. Resultados e Discussão	14
2.4. Conclusão	21
2.5. Referências bibliográficas	22
2.6. Anexos	24
2.6.1. Espectros da fração rica em triacilglicerídeos	24
2.6.2. Espectros da fração rica em cianolípídeo tipo III	25
 3. Capítulo 2	
Isolamento dos compostos majoritários do pericarpo do fruto de <i>S. saponaria</i> L.	
 3.1. Introdução	28
3.2. Material e Métodos	29
3.2.1. Material vegetal	29
3.2.2. Extração	29
3.2.3. Hidrólise das saponinas	29
3.2.4. Fracionamento do extrato hidrolisado	30

3.2.5. Análises dos constituintes das frações 1-3	30
3.2.6. Isolamento das sapogeninas 3a e 3b	31
3.2.7. Isolamento do composto 3c	31
3.2.8. Dados referentes ao ácido (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oico (hederagenina, 3a)	32
3.2.9. Dados referentes ao ácido (3 β)3-hidroxiolean-12-en-28-oico (ácido oleanólico, 3b)	33
3.2.10. Dados referentes ao 1-metoxi-5-metiltetrahidro-1 <i>H</i> -piran-2,3,4-triol (3c)	34
3.3. Resultados e Discussão	35
3.4. Conclusões	39
3.5. Referências bibliográficas	40
3.6. Anexos	42
3.6.1. Cromatograma e espectros de massas das sapogeninas identificadas no extrato etanólico hidrolisado do pericarpo do fruto de <i>S. saponaria</i> L.	42
3.6.2. Dados referentes ao ácido (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oico (hederagenina, 3a)	44
3.6.3. Dados referentes ao ácido (3 β)3-hidroxiolean-12-en-28-oico (ácido oleanólico, 3b)	46
3.6.4. Dados referentes ao 1-metoxi-5-metiltetrahidro-1 <i>H</i> -piran-2,3,4-triol (3c)	48
 4. Capítulo 3	
 Derivatização da hederagenina para a formação de ésteres e amidas substituídas no carbono-28 e sua atividade citotóxica.	
4.1. Introdução	51
4.1.1. O mecanismo antitumoral dos triterpenos	52
4.2. Material e Métodos	54
4.2.1. Obtenção da Hederagenina	54
4.2.2. Sínteses	54
4.2.3. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de benzila (4a)	65
4.2.4. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de <i>o</i> -nitrobenzila (4b)	65
4.2.5. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de <i>o</i> -bromobenzila (4c)	67
4.2.6. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de pentafluorobenzila (4d)	68
4.2.7. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de <i>o</i> -clorobenzila (4e)	69
4.2.8. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de <i>o</i> -metilbenzila (4f)	70
4.2.9. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de 2,6-diclorobenzila (4g)	71

4.2.10. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de <i>o</i> -fluorobenzila (4h)	72
4.2.11. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de 2,4-difluorobenzila (4i)	73
4.2.12. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de 2,6-difluorobenzila (4j)	74
4.2.13. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de <i>m</i> -nitrobenzila (4k)	75
4.2.14. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de <i>m</i> -clorobenzila (4l)	76
4.2.15. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de <i>m</i> -metilbenzila (4m)	77
4.2.16. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de <i>m</i> -bromobenzila (4n)	78
4.2.17. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de <i>p</i> -fluorobenzila (4o)	79
4.2.18. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de <i>p</i> -bromobenzila (4p)	80
4.2.19. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de <i>p</i> -clorobenzila (4q)	81
4.2.20. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato <i>p</i> -nitrobenzila (4r)	82
4.2.21. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de <i>p</i> -metilbenzila (4s)	83
4.2.22. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de 3,5-dimetoxibenzila (4t)	84
4.2.23. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de benzotriazol (4u)	85
4.2.24. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de 2-etil-1,3-dioxano (4v)	86
4.2.25. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de 3-(<i>N</i> -propilftalimida) (4w)	87
4.2.26. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de propinila (4x)	88
4.2.27. Dados referente ao Benzil-(3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-amida (5a)	89
4.2.28. Dados referente ao 1-etilpiridinil-(3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-amida (5b)	90
4.2.29. Dados referente ao 1-etilpirimidinil-(3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-amida (5c)	91
4.2.30. Dados referente ao 1-etilmorfolinil-(3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-amida (5d)	92
4.2.31. Dados referente ao 1-Propinil-(3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-amida (5e)	93
4.2.32. Dados referente ao 1-etilpiperidinil-(3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-amida (5f)	94

4.2.33. Dados referente ao glicinil-metil-ester-(3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-amida (5g)	95
4.2.34. Dados referente ao 2-fenilglicil-metil-ester-(3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-amida (5h)	96
4.2.35. Dados referente ao triptofanil-(3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-amida (5i)	97
4.2.36. Ensaios Biológicos	98
4.3. Resultados e Discussão	99
4.3.1. Sínteses de ésteres derivados da hederagenina	99
4.3.2. Sínteses de amidas derivados da hederagenina	102
4.3.3. Caracterização	105
4.3.4. Ensaios biológicos	116
4.4. Conclusões	120
4.5. Referências bibliográficas	121
4.6. Anexos	125
4.6.1. Espectros do (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de benzila (4a)	125
4.6.2. Espectros do (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de <i>o</i> -nitrobenzila (4b)	126
4.6.3. Espectros do (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de <i>o</i> -bromobenzila (4c)	127
4.6.4. Espectros do (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de pentafluorobenzila (4d)	128
4.6.5. Espectros do (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de <i>o</i> -clorobenzila (4e)	129
4.6.6. Espectros do (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de <i>o</i> -metilbenzila (4f)	130
4.6.7. Espectros do (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de 2,6-diclorobenzila (4g)	131
4.6.8. Espectros do (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de <i>o</i> -fluorobenzila (4h)	132
4.6.9. Espectros do 3 β ,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de 2,4-difluorobenzila (4i)	133
4.6.10. Espectros do (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de 2,6-difluorobenzila (4j)	134
4.6.11. Espectros do (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de <i>m</i> -nitrobenzila (4k)	135
4.6.12. Espectros do (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de <i>m</i> -clorobenzila (4l)	136
4.6.13. Espectros do (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de <i>m</i> -metilbenzila (4m)	137
4.6.14. Espectros do (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de <i>m</i> -bromobenzila (4n)	138
4.6.15. Espectros do (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de <i>p</i> -fluorobenzila (4o)	139
4.6.16. Espectros do (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de <i>p</i> -bromobenzila (4p)	140

4.6.17. Espectros do (3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de <i>p</i> -clorobenzila (4q)	141
4.6.18. Espectros do (3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato <i>p</i> -nitrobenzila (4r)	142
4.6.19. Espectros do (3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de <i>p</i> -metilbenzila (4s)	143
4.6.20. Espectros do (3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de 3,5-dimetoxibenzila (4t)	144
4.6.21. Espectros do (3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de benzotriazol (4u)	145
4.6.22. Espectros do (3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de 2-etil-1,3-dioxano (4v)	146
4.6.23. Espectros do (3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de 3-(<i>N</i> -propilftalimida) (4w)	147
4.6.24. Espectros do (3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de propinila (4x)	148
4.6.25. Espectros do Benzil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (5a)	149
4.6.26. Espectros do 1-etilpiridinil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (5b)	150
4.6.27. Espectros do 1-etilpirimidinil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (5c)	151
4.6.28. Espectros do 1-etilmorfolinil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (5d)	152
4.6.29. Espectros do 1-Propinil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (5e)	153
4.6.30. Espectros do 1-etilpiperidinil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (5f)	154
4.6.31. Espectros do glicinil-metil-ester-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (5g)	155
4.6.32. Espectros do 2-fenilglicil-metil-ester-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (5h)	156
4.6.33. Espectros do triptofanil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (5i)	157

5. Capítulo 4

Derivatização da hederagenina para a formação de triazóis com grupos éster e amida no carbono-28 e sua atividade citotóxica.

5.1. Introdução	159
5.2. Material e Métodos	161
5.2.1. Obtenção da Hederagenina	161
5.2.2. Sínteses	161
5.2.3. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de (1-benzil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)-metila (6a)	170

5.2.4. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de (1-(2-bromobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3- triazol-4-il)-metila (6b)	171
5.2.5. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de (1-(3-bromobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3- triazol-4-il)-metila (6c)	172
5.2.6. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de (1-(4-bromobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3- triazol-4-il)-metila (6d)	173
5.2.7. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de (1-(2,6-diclorobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3- triazol-4-il)-metila (6e)	174
5.2.8. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de (1-(4-clorobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3- triazol-4-il)-metila (6f)	175
5.2.9. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de (1-(3-clorobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3- triazol-4-il)-metila (6g)	176
5.2.10. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de (1-(2-clorobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3- triazol-4-il)-metila (6h)	177
5.2.11. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de (1-(2,4-difluorobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3 triazol-4-il)-metila (6i)	178
5.2.12. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de (1-(2-fluorobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3- triazol-4-il)-metila (6j)	179
5.2.13. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de (1-(2,6-difluorobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3- triazol-4-il)-metila (6k)	180
5.2.14. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de (1-(4-fluorobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3- triazol-4-il)-metila (6l)	181
5.2.15. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de (1-(4-nitrobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3- triazol-4-il)-metila (6m)	182
5.2.16. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de (1-(3-nitrobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3- triazol-4-il)-metila (6n)	183
5.2.17. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de (1-(2-nitrobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3- triazol-4-il)-metila (6o)	184
5.2.18. Dados referente ao (benzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-amida (7a)	185
5.2.19. Dados referente ao (2-bromobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-amida (7b)	186
5.2.20. Dados referente ao (3-bromobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-amida (7c)	187
5.2.21. Dados referente ao (4-bromobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-amida (7d)	188
5.2.22. Dados referente ao (2,6-diclorobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-amida (7e)	189
5.2.23. Dados referente ao (4-clorobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-amida (7f)	190
5.2.24. Dados referente ao (3-clorobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-amida (7g)	191
5.2.25. Dados referente ao (2-clorobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-amida (7h)	192
5.2.26. Dados referente ao (2,4-difluorobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-amida (7i)	193

5.2.27. Dados referente ao (2-fluorobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-amida (7j)	194
5.2.28. Dados referente ao (2,6-difluorobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-amida (7k)	195
5.2.29. Dados referente ao (4-fluorobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-amida (7l)	196
5.2.30. Dados referente ao (4-nitrobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-amida (7m)	197
5.2.31. Dados referente ao (3-nitrobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-amida (7n)	198
5.2.32. Dados referente ao (2-nitrobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-amida (7o)	199
5.2.33. Ensaios Biológicos	200
5.3. Resultados e Discussão	201
5.3.1. Sínteses de triazóis derivados da hedergenina	201
5.3.2. Caracterização	205
5.3.3. Ensaios biológicos	215
5.4. Conclusões	222
5.5. Referências bibliográficas	223
5.6. Anexos	227
5.6.1. Espectros do (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de (1-benzil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)-metila (6a)	227
5.6.2. Espectros do (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de (1-(2-bromobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)-metila (6b)	228
5.6.3. Espectros do (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de (1-(3-bromobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)-metila (6c)	229
5.6.4. Espectros do (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de (1-(4-bromobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)-metila (6d)	230
5.6.5. Espectros do (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de (1-(2,6-diclorobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)-metila (6e)	231
5.6.6. Espectros do (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de (1-(4-clorobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)-metila (6f)	232
5.6.7. Espectros do (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de (1-(3-clorobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)-metila (6g)	233
5.6.8. Espectros do (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de (1-(2-clorobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)-metila (6h)	234
5.6.9. Espectros do (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de (1-(2,4-difluorobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)-metila (6i)	235
5.6.10. Espectros do (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de (1-(2-fluorobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)-metila (6j)	236
5.6.11. Espectros do (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de (1-(2,6-difluorobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)-metila (6k)	237
5.6.12. Espectros do (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de (1-(4-fluorobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)-metila (6l)	238
5.6.13. Espectros do (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de (1-(4-nitrobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)-metila (6m)	239

5.6.14. Espectros do (3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de (1-(3-nitrobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)-metila (6n)	240
5.6.15. Espectros do (3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de (1-(2-nitrobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)-metila (6o)	241
5.6.16. Espectros do (benzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7a)	242
5.6.17. Espectros do (2-bromobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7b)	243
5.6.18. Espectros do (3-bromobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7c)	244
5.6.19. Espectros do (4-bromobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7d)	245
5.6.20. Espectros do (2,6-diclorobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7e)	246
5.6.21. Espectros do (4-clorobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7f)	247
5.6.22. Espectros do (3-clorobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7g)	248
5.6.23. Espectros do (2-clorobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7h)	249
5.6.24. Espectros do (2,4-difluorobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7i)	250
5.6.25. Espectros do (2-fluorobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7j)	251
5.6.26. Espectros do (2,6-difluorobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7k)	252
5.6.27. Espectros do (4-fluorobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7l)	253
5.6.28. Espectros do (4-nitrobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7m)	254
5.6.29. Espectros do (3-nitrobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7n)	255
5.6.30. Espectros do (2-nitrobenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7o)	256

6. Capítulo 5

Ensaios *in vitro* de diferentes derivados da hederagenina na procura de potenciais compostos com atividade anti-leishmania.

6.1. Introdução	258
6.2. Material e Métodos	261
6.2.1. Sínteses dos derivados de Hederagenina	261
6.2.2. Avaliação dos compostos sobre o crescimento <i>in vitro</i> de formas amastigotas intracelulares de <i>L. infantum</i>	261
6.2.3. Ensaio de viabilidade metabólica	262
6.2.4. Análise estatística	263

6.3. Resultados e Discussão	263
6.3.1. Derivados da Hederagenina	263
6.3.2. Ensaio biológico	264
6.4. Conclusões	269
6.5. Referências bibliográficas	270
7. Conclusão Geral	
7.1. Capítulo 1	274
7.2. Capítulo 2	274
7.3. Capítulo 3	275
7.4. Capítulo 4	275
7.5. Capítulo 5	276

LISTA DE ABREVIATURAS

BSTFA	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamida
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de massas
COSY	Correlated Spectroscopy
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
d	duplete
dd	duplete duplo
δ	Deslocamento químico
ESI-HRMS	Ionização de eletrospray- Espectrometria de massa de alta resolução
HeLa	Células de câncer cervical
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
R_f	fator de retenção
m	multiplete
<i>m/z</i>	massa/carga
μM	Micromolar
MHz	Megahertz
NF- κB	fator nuclear kappa B
ppm	Partes por milhão
t	triplete
THF	Tetraidrofurano
TBTU	Tetrafluoroborato de <i>O</i> -(Benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronio
T_f	Temperatura de fusão
td	Triplete duplo
s	Simpleto

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
1. Introdução Geral	
<i>Sapindus saponaria</i> L.	
1.1.1 - A) Árvore; B) frutos; C) sementes de <i>S. saponaria</i> L.	2
1.1.2 - Estruturas da hederagenina e de algumas saponinas isoladas de <i>S. saponaria</i> L.	3
1.2.1 - Extração e isolamento de cianolípídeo e triacilglicerídeos.	4
1.2.2 - Extração, hidrólise e isolamento dos compostos majoritários.	5
1.2.3 - Reação para a obtenção de ésteres da hederagenina.	5
1.2.4 - Reação para a obtenção de amidas da hederagenina.	5
1.2.5 - Reações para a obtenção de ésteres de triazóis da hederagenina.	6
1.2.6 - Reações para a obtenção de amidas de triazóis da hederagenina.	6
2. Capítulo 1	
Cianolípídeo presentes no óleo da semente de <i>S. saponaria</i> L.	
2.1.1 - Estrutura química dos cianolípídeo I-IV.	9
2.3.1 - Procedimento geral para a obtenção dos compostos das sementes de <i>S. saponaria</i> L.	14
2.3.2 - Ampliação de parte do espectro de RMN de hidrogênio (CDCl ₃ , 300 MHz) da fração 2 rica em triacilglicerídeos (TAG).	15
2.3.3 - Ampliação de parte do espectro de RMN de carbono (CDCl ₃ , 75 MHz) da fração 2 rica em triacilglicerídeos (TAG).	16
2.3.4 - Cromatograma de CG-EM da fração transesterificada rica em TAG.	16
2.3.5 - Ampliação dos espectros de RMN, da fração 3 rica em cianolípídeo. a) parte do espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz). b) parte do espectro de RMN de ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz).	17
2.3.6 - Expansão do espectro COSY ¹ H - ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) para os cianolípídeo do tipo III a partir de óleo de sementes de <i>S. saponaria</i> L.	18
2.3.7 - Cromatograma de CG-EM da transesterificação do extrato rico em cianolípídeo do óleo da semente de <i>S. saponaria</i> L.	19
2.3.8 - Espectro de massas (CG-EM), a) espectro do pico 1 do cromatograma da transesterificação do extrato rico em cianolípídeo. b) Espectro de massa do padrão 11-octadecenoato de metila.	19
2.3.9 - Espectro de massas (CG-EM), a) espectro do pico 2 do cromatograma da transesterificação do extrato rico em cianolípídeo. b) espectro de massa do padrão 11-icosenoato de metila.	20

2.3.10 - Espectro de massas (CG-EM), a) espectro do pico 3 do cromatograma da transesterificação do extrato rico em cianolípido. b) Espectro de massa do padrão icosanoato de metila.	20
3. Capítulo 2	
Isolamento dos compostos majoritários do pericarpo do fruto de <i>S. saponaria</i> L.	
3.1.1 - Ácido (3 β)-3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oico (Hederagenina).	28
3.3.1 - Esquema de isolamento dos compostos majoritário do extrato etanólico hidrolisado.	35
3.3.2 - Fragmentação retro Diels-Alder característica para triterpenos pentacíclico.	36
3.3.3 - Sapogeninas isoladas do extrato etanólico hidrolisado.	36
3.3.4 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 300 MHz) do composto 3c .	37
3.3.5 - Ampliação do espectro COSY ^1H - ^1H do composto 3c .	38
3.3.6 - 1-metoxi-5-metiltetrahydro-1H-piran-2,3,4-triol (3c) isolado do extrato etanólico hidrolisado de <i>S. saponaria</i> L.	39
4. Capítulo 3	
Derivatização da hederagenina para a formação de ésteres e amidas substituídas no carbono-28 e sua atividade citotóxica.	
4.1.1 - Estruturas de terpenoides usados na medicina chinesa.	54
4.1.2. Estrutura do ácido maslínico (R =H) e ésteres citotóxicos contra da linhagem tumoral A2789.	55
4.3.1 - Proposta mecanística para a reação de derivatização da hederagenina utilizada na obtenção dos ésteres (4a-x).	101
4.3.2 - Proposta mecanística para a reação de derivatização da hederagenina utilizada na obtenção do composto 4u .	102
4.3.3 - Proposta mecanística para obtenção de amidas em presença de TBTU.	104
4.3.4 - Ésteres derivados da hederagenina.	105
4.3.5 - Multiplicidade e desdobramentos de diferentes hidrogênios aromáticos dos derivados da hederagenina. Ampliação de parte do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) dos compostos: 4r ; 4c e 4u .	106
4.3.6 - Ampliação de parte do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do composto 4c .	107

4.3.7 - Ampliação de parte do espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) para os compostos: 4h , 4o , 4i e 4j .	108
4.3.8 - Ampliação de parte do espectro de RMN de ^{13}C para os compostos: 4x e 4u .	108
4.3.9 - Amidas derivadas da hederagenina.	112
4.3.10 - Ampliação de parte do espectro de RMN de ^1H das amidas 5a , 5b e 5h .	113
4.3.11 - Ampliação dos espectros de RMN de ^{13}C para os derivados 5c , 5d e 5f .	114
4.3.12 - Ampliação dos espectros de RMN de ^{13}C para o derivado 5e .	114
4.3.13 - Comparação dos valores de EC_{50} (a partir de ensaios de SRB, após 96 h de incubações com várias linhagens de células tumorais com um intervalo de confiança = 95/).	116
4.3.14 - Citotoxicidade (valores de EC_{50} em μM com erro padrão (EP), a partir dos ensaios de SRB) da hederagenina (He) e os análogos ésteres 4a , 4r e amidas 5f , 5c testadas para todas as linhagens celulares.	118
4.3.15 - Comparação da citotoxicidade da hederagenina (He) e alguns ésteres e amidas (EC_{50} em μM de SRB com intervalo de confiança (95/) para várias linhagens celulares tumorais humanas).	119
4.3.16 - Imagem de microscopia de fluorescência das células de câncer de ovário (A2780) tratadas com uma concentração de EC_{50} de 5c , durante 48 horas.	120

5. Capítulo 4

Derivatização da hederagenina para a formação de triazóis com grupos éster e amida no carbono-28 e sua atividade citotóxica.

5.1.1 - A reação “click” ou CuAAC.	160
5.3.1 - Reação geral na obtenção das azidas.	203
5.3.2 - Reação geral para a obtenção dos triazóis com grupo éster.	203
5.3.3 - Reação geral para a obtenção dos triazóis com grupo amida.	203
5.3.4 - Proposta mecanística para a reação “click”.	204
5.3.5 - Substituintes dos triazóis com grupo éster (6a-p).	206
5.3.6 - Ampliação de parte do espectro de RMN de ^1H do composto 6f .	206
5.3.7 - Ampliação de parte do espectro de RMN de ^1H dos compostos 6f e 6o .	207
5.3.8 - Ampliação de parte do espectro de RMN de ^{13}C do composto 6l .	208

5.3.9 - Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do composto 6c .	208
5.3.10 - Substituintes dos triazóis com grupo amida (7a-7o).	211
5.3.11 - Ampliação de parte do espectro de RMN de ^1H do composto 7n .	212
5.3.12 - Comparação dos valores de EC_{50} (a partir de ensaios de SRB, após 96 h de incubações com várias linhagens de células tumorais com um intervalo de confiança = 95/).	214
5.3.13 - Comparação dos valores de EC_{50} (a partir de ensaios de SRB, após 96 h de incubações com várias linhagens de células tumorais com um intervalo de confiança = 95/).	214
5.3.14 - Citotoxicidade (valores de EC_{50} em μM com erro padrão (EP), a partir dos ensaios de SRB) para a hederagenina (He) e os derivados 6a-o e 7a-o usando a linhagem de células humanas HT29 (adenocarcinoma do cólon).	220
5.3.15 - Citotoxicidade (valores de EC_{50} em μM com erro padrão (EP), a partir dos ensaios de SRB) da hederagenina (He) e os análogos 6c , 6g e 6n contra todas as linhagens celulares.	220
5.3.16 - Ensaio de exclusão de corante AO/PI empregando células de câncer de mama MCF-7, tratada com 6j (10 μM) ou 6g (10 μM) durante 72 h: esquerda: controle; Média: células tratadas com 6j ; direita: células tratadas com 6g .	221

6. Capítulo 5

Ensaio *in vitro* de diferentes derivados da hederagenina na procura de potenciais compostos com atividade anti-leishmania.

6.1.1 - Estruturas de alguns fármacos comerciais utilizados para tratar diferentes formas de leishmaniose.	260
6.3.1 - Estruturas dos derivados da hederagenina (1-60).	264
6.3.2 - Experiência representativa da atividade <i>in vitro</i> da hederagenina (He) e seus derivados (3 , 4 , 22 , 32 , 44 , 34 , 49 , 52). A curva de dose-resposta comparada com a inibição amastigota intracelular de <i>L. infantum</i> (BH46) foi realizada em quatro repetições.	267

LISTA DE TABELAS

	Páginas
2. Capítulo 1	
Cianolípídeo presentes no óleo da semente de <i>S. saponaria</i> L.	
2.2.1 - Fracionamento do extrato hexânico das sementes de <i>S. saponaria</i> L.	11
3. Capítulo 2	
Isolamento dos compostos majoritários do pericarpo do fruto de <i>S. saponaria</i> L.	
3.2.1 - Fracionamento do extrato etanólico hidrolisado.	30
3.2.2 - Fracionamento por cromatografia de coluna da fração 1 do extrato etanólico hidrolisado.	31
3.2.3 - Fracionamento por cromatografia de coluna das frações 2 e 3 do extrato etanólico hidrolisado.	31
4. Capítulo 3	
Derivatização da hederagenina para a formação de ésteres e amidas substituídas no carbono-28 e sua atividade citotóxica.	
4.2.1 - Reagentes e condições para o preparo dos derivados 4a-x a temperatura ambiente.	58
4.2.2 - Reagentes e condições para o preparo dos derivados 5a-i a temperatura ambiente em atmosfera de Nitrogênio.	63
4.3.1 - Ésteres derivados da hederagenina.	100
4.3.2 - Amidas derivadas da hederagenina.	103
4.3.3 - Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C (δ/ppm , CDCl_3) dos derivados (4a-x) e hederagenina (3a).	107
4.3.4 - Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C (δ/ppm) dos derivados (5a-i) e hederagenina (3a).	115
4.3.5 - Citotoxicidade da hederagenina (He) e seus análogos 4a-x e 5a-f empregando linhagens celulares tumorais humanas (518A2, A2780, HT29, MCF7, A549, 8505C).	117
5. Capítulo 4	
Derivatização da hederagenina para a formação de triazóis com grupos éster e amida no carbono-28 e sua atividade citotóxica.	
5.2.1 - Reagentes e condições para o preparo dos derivados 6a-o a temperatura ambiente por 24 h.	164
5.2.2 - Reagentes e condições para o preparo dos derivados 7a-o a temperatura ambiente por 24 h.	167
5.3.1 - Triazóis derivados da hederagenina com grupo éster.	201
5.3.2 - Triazóis derivados da hederagenina com grupo amida.	202
5.3.3 - Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3) dos derivados de triazóis com grupo éster no carbono-28 (6a-o) e hederagenina (3a).	209
5.3.4 - Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3) dos derivados de triazóis com grupo amida no carbono-28 (7a-o) e hederagenina (3a).	213

5.3.5 - Citotoxicidade da hederagenina (He) e seus análogos 6a-o e 7a-o empregando linhagens celulares tumorais humanas (518A2, A2780, HT29, MCF7, A549, 8505C) e fibroblastos não-malignas de ratos NIH 3T3.	217
5.3.6 - Índice de seletividade (IS) dos derivados triazolicos da hederagenina.	219
 6. Capítulo 5	
Ensaio <i>in vitro</i> de diferentes derivados da hederagenina na procura de potenciais compostos com atividade anti-leishmania.	
6.3.1 - Porcentagem de inibição da atividade <i>in vitro</i> sobre <i>L. infantum</i> , de hederagenina (He) e os seus derivados (1-60) testado a uma concentração de 1000 µM.	265
6.3.2 - Atividade leishmanicida <i>in vitro</i> de hederagenina (He), seus derivados (3, 4, 18, 19, 20, 22, 32, 34, 44, 49 e 52) e controle positivo, contra os amastigotas intracelulares de <i>L. infantum</i> parasita de macrófagos.	266
6.3.3 - Dose mínima letal e índice seletividade para hederagenina (He), seus derivados (3, 4, 22, 32, 34, 44, 49 e 52) e controle positivo contra células BGM e HepG2.	268

RESUMO

RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ, Diego Carlos, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2016. **ESTUDO FITOQUÍMICO DO FRUTO DE *Sapindus saponaria*, PREPARO DE DERIVADOS DA HEDERAGENINA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DESSES DERIVADOS.** Orientador: Antônio Jacinto Demuner. Coorientadores: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa e Carlos Leomar Zani.

Sapindus saponaria L. (Sapindaceae), popularmente conhecida no Brasil como "Sabão-de-soldado" e saboneteira é uma árvore nativa e produz anualmente grande quantidade de pequenos frutos. Neste trabalho foram estudados a composição química das sementes e de seu frutos e realizadas transformações química da hederagnina, aglicona mais abundante localizada no pericarpo do fruto. Em primeiro lugar, para saber a composição química da semente, estas foram separadas do pericarpo dos frutos quebradas e sumetida a extraída com hexano. Da fração hexânica foi isolado e identificado cianolípídeo tipo III (o **1-ciano-2-hidroxi metilprop-1-en-3-ol**) que representa 5% da composição do óleo. A parte graxa desta fração é formada pelos ácidos graxos: ácido *cis*-11-octadecenóico (ácido *cis*-vacênico), ácido *cis*-11-icosenóico e o ácido icosanóico (ácido araquídico). Este é o primeiro estudo de composição detalhada do óleo de semente de *S. saponaria*, confirmando a quimiotaxonomia da família cuja presença de metabólitos secundários tipo cianolípídeo em suas sementes é característica. Posteriormente, do pericarpo do fruto foi obtido o extrato etanólico, tendo sido isolados o glicosídeo 2-metoxi-6-metiltetrahidro-2*H*-piran-3,4,5-triol (**3c**), até agora não reportado na literatura para esta espécie de planta. Também desses extratos foram isolados o ácido oleanólico (**3b**) e a hederagenina (**3a**). Em seguida, a hederagenina foi derivatizada em diferentes ésteres e amidas na posição-28. Inicialmente foram preparados 24 ésteres da hederagenina (**4a-x**) com rendimentos entre 35-90% e 9 amidas da hederagenina (**5a-i**) com rendimentos na faixa de 70-96%, todos inéditos. Esta primeira série de análogos foi submetida a ensaios de atividade citotóxica frente a seis linhagens de células tumorais [518A2 (células de melanoma), células A2780 (carcinoma do ovário), HT29 (adenocarcinoma de cólon), MCF7 (adenocarcinoma de mama), A549 (câncer de pulmão), 8505C (carcinoma de tireóide)], utilizando o ensaio de sulforodamina-B (SRB). Embora a maior parte dos compostos apresentasse níveis moderados a elevados de citotoxicidade todos foram mais potentes do que o produto natural hederagenina. Os compostos mais ativos foram às amidas que tinham como substituinte o grupo etilpirimidinil (**5f**) e etilpirrolidinil (**5c**), mostrando um EC₅₀ variando

entre 1,1-6,5 μM , para todas as linhagens avaliadas. Além disso, por meios de ensaio de coloração AO/PI adicional usando células de adenocarcinoma de ovário (A2780), verificou-se que o composto **5c** atua principalmente por apoptose. Posteriormente uma série de novos aril-1*H*-1,2,3-triazol-4-il-metil éster (**6a-o**) e amida (**7a-o**) derivados da hederagenina foi sintetizada a partir dos alcinos **4x** (éster) e **5e** (amida) com diferentes azidas de benzila (**a-o**) por meio da reação “click” ou reação de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen, com rendimentos de 35% a 95%. As atividades citotóxicas de todos os compostos foram testadas contra as mesmas linhagens celulares de câncer humano acima mencionado além, do fibroblasto não-malignas de ratos (NIH 3T3) usando o mesmo ensaio de sulforodamina-B (SRB). Em comparação com a hederagenina a maioria dos compostos exibiu maior citotoxicidade contra todas as linhagens celulares de câncer testadas. Os derivados de éster foram mais ativos que as amidas. Além disso, os ésteres com grupo *meta*-substituídos tais como **6c** (*m*-Br), **6g** (*m*-Cl) e **6n** (*m*-NO₂) foram os derivados mais ativos contra todas as linhagens celulares testadas, mostrando um EC₅₀ na faixa de 3,0-4,1 μM . Por outro lado, os análogos **6a** (benzil) e **6j** (*o*-F), foram os mais citotóxicos contra células do câncer do cólon (HT29) com um EC₅₀ = 2,8 μM e 1,6 μM , respectivamente. O composto **6j** mostrou índice de seletividade de 5,4. Adicionalmente um experimento de exclusão de corante de laranja de acridina/iodeto de propídio (AO/PI) empregando células de câncer de mama (MCF7) dos análogos **6g** e **6j**, mostrou que os dois compostos atuam principalmente por morte celular programada. Por outro lado, alguns derivados da hederagenina (**1-60**) foram avaliados *in vitro* sobre a proliferação intracelulares de formas amastigotas de *Leishmania infantum*. Alguns derivados (**3**, **4**, **44**, **49** e **52**) mostraram atividade a nível micromolar e baixa toxicidade contra células BGM e HepG2. Além disso, a capacidade dos derivados da hederagenina **3** (IC₅₀ = 9,7 μM), **4** (12 μM), **44** (11 μM) e **49** (2 μM), para impedir a proliferação intracelular de formas amastigotas de *L. infantum* e o seu maior índice de seletividade e baixa toxicidade em relação com a droga comercial usada como controle positivo (**tri-hidrato de tartarato de potássio e antimonio**) (IC₅₀ = 80,0 $\pm$ 0,13 μM , IS = 0,1), fazem estes compostos promissores candidatos para o tratamento da leishmaniose.

ABSTRACT

RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ Diego Carlos, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, August 2016. **PHYTOCHEMICAL STUDY OF FRUIT OF *Sapindus saponaria*, PREPARATION OF HEDERAGENIN DERIVATIVES AND EVALUATION OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF THESE PRODUCTS..** Adviser: Antonio Jacinto Demuner. Co-advisers: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa and Carlos Leomar Zani.

Sapindus saponaria L. (Sapindaceae) popularly known in Brazil as "soap-de-soldier" and soap is a native tree and annually produces great quantities of small fruits. In this work we studied the chemical composition of the seeds and their fruits and chemical transformations of hederagnina, most abundant aglycone located in the pericarp of the fruit. Firstly, to know the chemical composition of the seeds, were collected and separated from the fruit pericarp, broken and extracted with hexane. The hexane fraction was isolated and identified cyanolipid type III (**1-cyano-2-hydroxymethylprop-1-en-3-ol**) which represents 5% of the oil composition. The grease of this fraction is formed by the fatty acids: *cis*-11-octadecenoic acid (*cis*-vaccenic acid), *cis*-11-icosenóico acid and icosanoic acid (arachidic acid). This is the first study in detail the composition of the oil of the *S. saponaria* seed, confirming the family chemotaxonomy, whose presence cyanolipids groups in its seeds is characteristic. From the fruit pericarp was obtained an ethanol extract and was isolated the glycoside 2-methoxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol (**3c**), so far not reported in the literature for this kind of plant. Also these extracts, were isolated the oleanolic acid (**3b**) and hederagenin (**3a**). Then, the hederagenin was transformed into different esters and amides at position-28. Initially, hederagenin was transformed in 24 esters (**4a-x**) with yields between 35-90% and 9 amide (**5a-i**) with revenues in the range of 70-96%, all unpublished. This first series of analogues was tested for cytotoxic activity against six tumor cell lines [518A2 (melanoma cells), A2780 cells (ovarian carcinoma), HT29 (colon adenocarcinoma), MCF7 (breast adenocarcinoma), A549 (lung cancer), 8505c (thyroid carcinoma)] using the SRB assay. Although most of the compounds presented moderately to high levels of cytotoxicity were all more potent than the natural product hederagenin. The most active compounds are the amides carrying substituted the ethylpyrimidinyl group (**5f**) and ethylpyrrolidinyl (**5c**), showing an EC₅₀ ranging from 1.1 to 6.5 µM for all tested tumor cells. Moreover, by an additional AO/PI staining experiment, using additional ovarian adenocarcinoma cells (A2780), it was found that compound **5c** acts mainly by apoptose. Subsequently a series of new aryl-1H-1,2,3-triazol-4-yl-methyl ester (**6a-o**) and

amide (**7a-o**) of hederagenin derivative was synthesized from alkynes **4x** (ester) and **5e** (amide) with different benzyl azides (**a-o**) by reacting "click" or reaction of 1,3-dipolar cycloaddition Huisgen, with yields between 35% and 95%. The cytotoxic activities of all the compounds were tested against the same cell lines of human cancer aforementioned. In addition, was employing a non-malignant fibroblast mice (NIH 3T3) using the same SRB assay. Compared with hederagenin the most compounds exhibit greater cytotoxicity against all tested cancer cell lines. The ester derivatives were more active than amides. In addition, esters with group *meta*-substituted such as **6c** (*m*-Br) **6g** (*m*-Cl) and **6n** (*m*-NO₂) were the most active derivatives against all the cell lines tested, showing an EC₅₀ in the range of 3.0 to 4.1 μM. Moreover, the analogues **6a** (benzyl) and **6j** (*o*-F), were more cytotoxic against colon cancer cells (HT29) with an EC₅₀ = 2.8 μM and 1.6 μM, respectively. The compound **6j** showed selectivity index of 5.4. Besides, an experiment of dye exclusion orange acridine/propidium iodide (AO/PI) using breast cancer cells (MCF-7) and analogues **6g** and **6j** showed that both compounds act primarily by programmed cell death. On the other hand, some derivatives of hederagenin (**1-60**) were evaluated *in vitro* on the proliferation of intracellular amastigote forms of *Leishmania infantum*. Some derivatives (**3**, **4**, **44**, **49** and **52**), showed activity at micromolar level and low toxicity against BGM and HepG2 cells. Moreover, the ability of hederagenin derivatives **3** (IC₅₀ = 9.7 μM), **4** (12 μM), **44** (11 μM) and **49** (2 μM), to prevent proliferation of intracellular amastigote forms of *L. infantum* and their higher selectivity index and low toxicity compared to commercial positive drug control of choice (potassium antimonyl tartrate trihydrate) (IC₅₀ = 80.0 ± 0.13 μM, SI = 0.1), make these compounds promising candidates for the treatment of leishmaniasis.

1. Introdução Geral

***Sapindus saponaria* L.**

1.1. *Sapindus saponaria* L.

S. saponaria L. pertence à família Sapindaceae e é conhecida popularmente como saboneteira, sabão-de-macaco, fruta-de-sabão e sabão-de-soldado. É uma árvore perenifolia, de pequeno porte (até 8 m) utilizado em paisagismo e em modelo de recuperação de áreas degradadas (ALBEIRO *et al.*, 2002). No Brasil, ocorre desde o Pará até o Rio Grande do Sul, com distribuição regular nos estados das regiões Norte, Nordeste e Centro Oeste. Encontra-se habitualmente em locais úmidos, nas florestas pluviais e semidecídua. Apresenta copa densa e perfeitamente globosa. As folhas são compostas, imparipenadas, com sete folíolos glabros de 10-16 cm de comprimento por 3-4 cm de largura. Suas flores são brancas e dispostas em panículas. Os frutos são multiglobosos, amarelados quando maduros e com sementes globulosas não ariladas, pretas e duras. A dispersão é barocórica e zoocórica por marcegos frugívoros (LORENZI, 2000) (Figura 1.1.1).

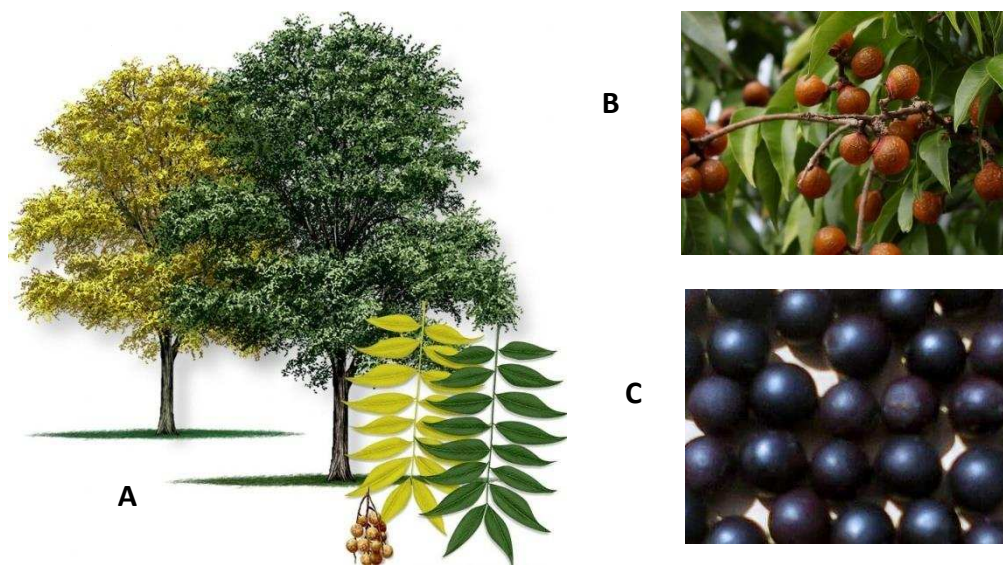


Figura 1.1.1 - A) Árvore; B) frutos; C) sementes de *S. saponaria* L.

A espécie é conhecida não apenas pela utilização da madeira mais também por seu elevado teor de saponinas, um surfactante natural encontrado nas sementes e nos frutos. A madeira é moderadamente pesada, dura, compacta, de baixa durabilidade natural, sendo empregada na construção civil. Os seus frutos são utilizados pela população como sabão no

banho e no combate de úlcera, feridas na pele e inflamações (ALBEIRO *et al.*, 2002; PELEGRINI *et al.*, 2008).

S. saponaria tem sido muito pesquisada pela presença de saponinas apresentando propriedades tensoativas. É utilizada para uso farmacológico, estes compostos possui diferentes atividades biológicas tais como anti-ulcerativa, anti-neoplásica, anti-inflamatório, antimicrobiana entre outras (ALBEIRO *et al.*, 2002; LORENZI, 2000; SPARG *et al.*, 2004). Por outro lado, o óleo das sementes é utilizado como inseticida (GUARIN *et al.*, 2000; PORRAS e LOPEZ-AVILA, 2009). Uma das teorias mais aceitas para explicar as altas concentrações de saponinas em muitas espécies de plantas é que estas funcionariam como proteção ao ataque de patógenos, como fungos, bactérias e vírus sendo assim de grande importância ecológica (SPARG *et al.*, 2004).

Estudos fitoquímicos utilizando frutos de *S. saponaria* coletados no Brasil levaram a identificação de várias saponinas, com um bloco glicosilado, derivadas da hederagenina (ácido 23-hidroxioleanólico) (Figura 1.1.2). A composição glicosídica é semelhante a outras espécies de *Sapindus*. MURGU e RODRIGUES-FILHO em 2006 descobriram que *S. saponaria* produz grande quantidade e variedade de glicosídeos naturalmente acetilados.

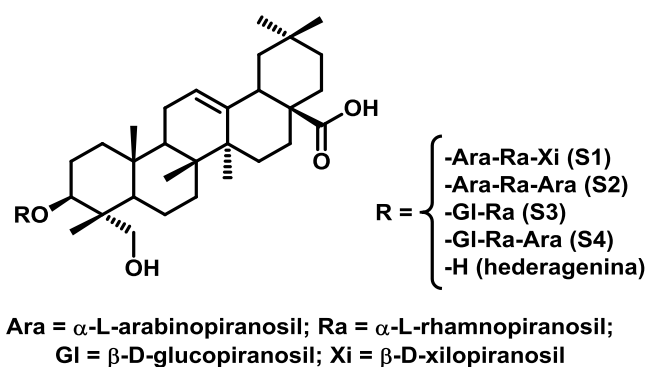


Figura 1.1.2 - Estruturas da hederagenina e de algumas saponinas isoladas de *S. saponaria* L. (MURGU e RODRIGUES-FILHO, 2006).

Nos frutos foram identificados ácidos graxos e ésteres metilados, utilizando cromatografia gasosa, onde foi verificada a presença de palmitato de metila (11,4/), estearato de metila (1,0/), oleato de metila (67,0/), linoleato de metila (3,9/), araquidoato de metila (5,0/) e ésteres C₂₀ insaturados (10,7/) (ABDEL-WAHAB e SELIM, 1985).

1.2. Objetivos

Este trabalho apresenta como objetivo principal o isolamento e derivatização da hederagenina isolada de *S. saponaria* L. e suas implicações biológicas. Assim, nesta tese os objetivos específicos são:

1. Identificar os compostos químicos do extrato hexânico das sementes de *S. saponaria* L.
2. Isolar os compostos majoritários do extrato etanólico do pericarpo do fruto de *S. saponaria* L.
3. Derivatizar diferentes análogos da hederagenina para a formação de ésteres e amidas na carboxila-28.
4. Obter diferentes derivados da hederagenina para a formação de triazóis com grupos ésteres e amida na carboxila-28.
5. Testar o potencial citotóxico e anti-leishmanicida dos derivados da hederagenina.

Assim, para atingir estes objetivos o trabalho foi dividido nos seguintes capítulos:

O **Capítulo 1** descreve a extração e isolamento de cianolípido tipo III das sementes de *S. saponaria* (Figura 1.2.1). Os compostos majoritários isolados foram caracterizados por métodos espectroscópicos e espectrométricos (RMN de ^1H e de ^{13}C , IV e CG-EM).

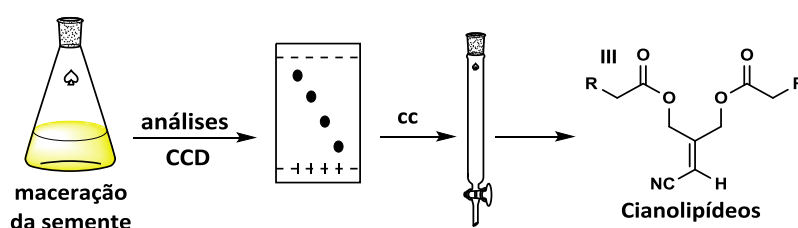


Figura 1.2.1 - Extração e isolamento de cianolípido e triacilglicerídeos.

O **Capítulo 2** descreve extração, hidrólise e isolamento dos compostos majoritários do pericarpo do fruto de *S. saponaria* L. (Figura 1.2.2). Os compostos majoritários isolados foram caracterizados por métodos espectroscópicos e espectrométricos (RMN de ^1H e de ^{13}C , IV e ESI-HRMS).

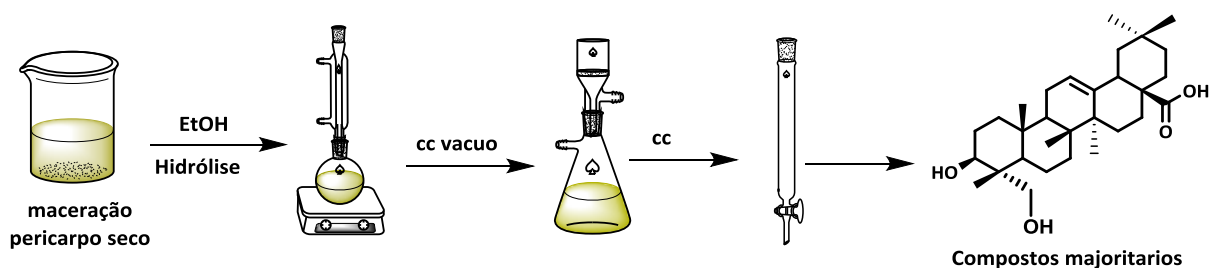


Figura 1.2.2 - Extração, hidrólise e isolamento dos compostos majoritários.

O **Capítulo 3** descreve a derivatização da hederagenina, que é a aglicona mais abundante presente no pericarpo de *S. saponaria* L. para a formação de ésteres e amidas substituídas na carboxila-28, por meios de grupos volumosos (Figura 1.2.3; Figura 1.2.4) e avaliar sua atividade anti-tumoral. Todos os derivados foram caracterizados por métodos espectroscópicos, espectrométricos (RMN de ^1H e de ^{13}C , IV e ESI-HRMS) entre outros.

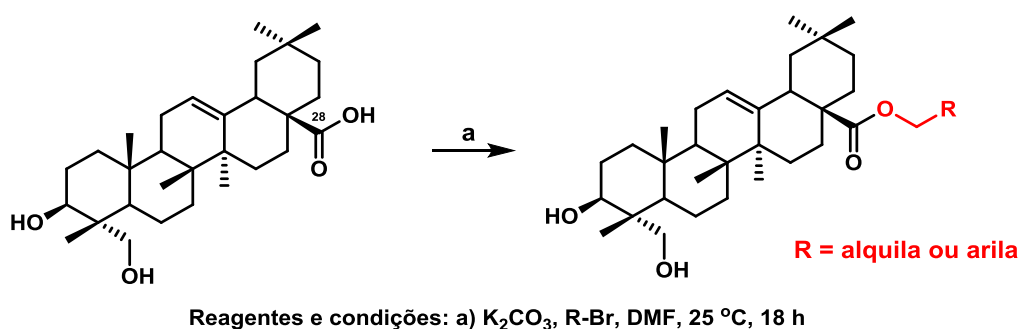


Figura 1.2.3 - Reação para a obtenção de ésteres da hederagenina.

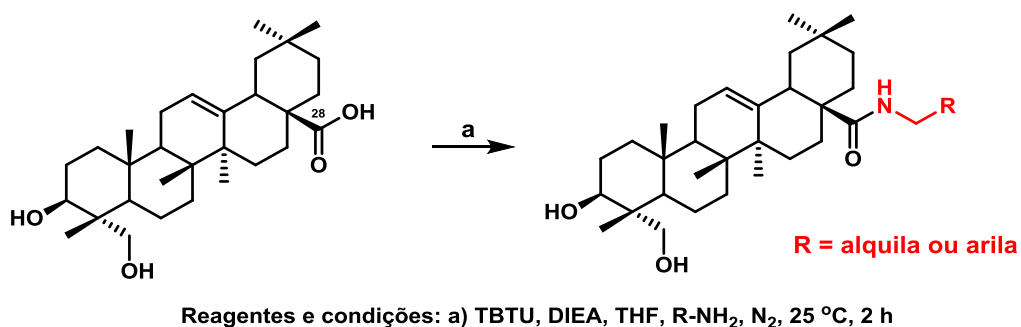


Figura 1.2.4 - Reação para a obtenção de amidas da hederagenina.

O **Capítulo 4** descreve a derivatização da hederagenina para a formação de triazóis com grupo amida ou éster na carboxila-28 (Figura 1.2.5 e 1.2.6) e avaliar sua atividade anti-tumoral. Os derivados foram caracterizados por métodos espectroscópicos, espectrométricos (RMN de ^1H e de ^{13}C , IV, ESI-HRMS e Análise Elemental) entre outros.

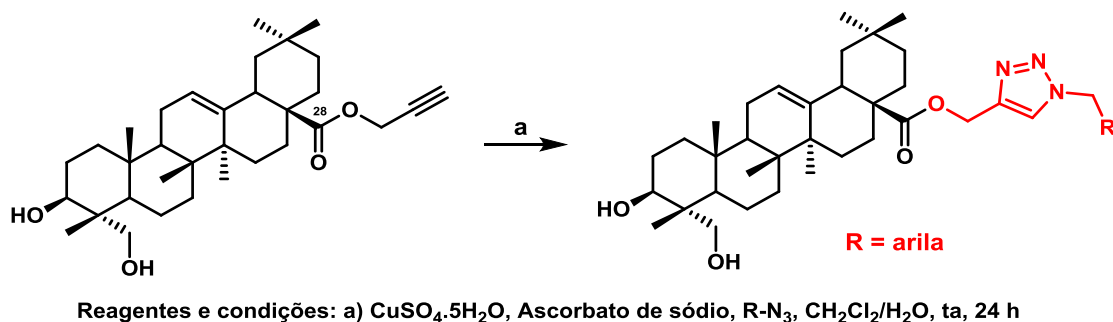


Figura 1.2.5 - Reações para a obtenção de ésteres de triazóis da hederagenina.

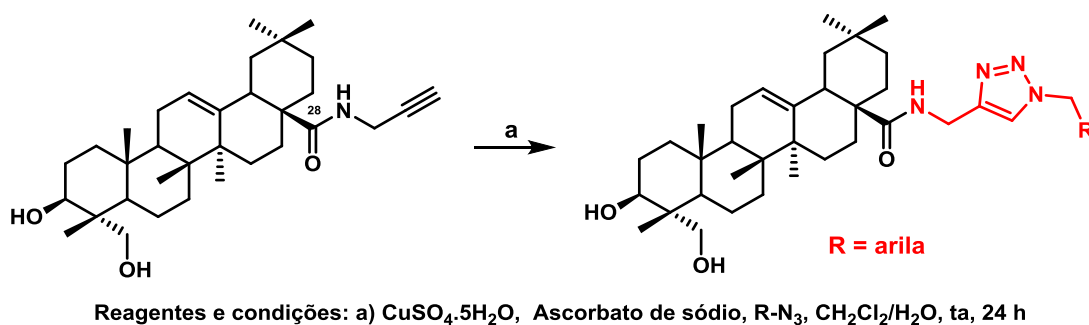


Figura 1.2.6 - Reações para a obtenção de amidas de triazóis da hederagenina.

O **Capítulo 5** descreve a avaliação da atividade anti-leishmaniose dos derivados da hederageninas.

1.3. Referências bibliográficas

ABDEL-WAHAB, A., SELIM, M. Lipids and flavonoids of *Sapindus saponaria*. Fitoterapia, v. 56, p. 167-168, 1985.

ALBEIRO, A.L.M., SERTIÉ, J.A.A., BACCHI, E. M. Antiulcer activity of *Sapindus saponaria* L. in the rat. J. Ethnopharmacol, v. 82, p. 41-44. 2002.

GUARIN NETO, G., SANTANA, S.R., SILVA, J. Notas etnobotânicas de espécies de sapindaceae jussieu. Acta Botânica Brasílica, v. 14, p. 327, 2000.

LORENZI, H. Planta daninha do Brasil. 3 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de estudos da flora. 2000.

MURGU, M., RODRIGUES-FILHO, E. Dereplication of glycosides from *Sapindus saponaria* using liquid chromatography-mass spectrometry. J. Braz. Chem. Soc., v. 17, p. 1281-1290, 2006.

PELEGRINI, D.D., TSUZUKI, J.K., AMADO, C.A.B., CORTEZ D.A.G., FERREIRA, I.C.P. Biological activity and isolated compounds in *Sapindus saponaria* L. and other plants of the genus *Sapindus*. Latin American Journal of Pharmacy, v. 27, p. 922-927, 2008.

PORRAS, M., LOPEZ-AVILA, A. Effect of extracts from *Sapindus saponaria* on the glasshouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae) Revista Colombiana de Entomologia, v. 35, p. 7-11, 2009,

SPARG, S., LIGHT, M., VAN STANDER, J. Biological activities and distribution of plant saponins. Journal of Ethnopharmacology, v. 94, p. 219-243, 2004.

2. CAPÍTULO 1

**Cianolipídeo presentes no óleo da semente de *S.*
saponaria L.**

2.1. Introdução

Os cianolípídeo (**CL**), derivados do metabolismo do amino ácidos (MØLLER e SEIGLER, 1999), estão presentes, juntamente com acilglicerídeos (AG), em óleos de sementes de plantas pertencentes à família Sapindaceae (MIKOLAJCZAK, 1977). Eles baseiam-se em um núcleo central formados por cinco carbonos onde compreende um grupo nitrila em conjunto com um grupo metileno ou uma ligação dupla e um ou dois grupos hidroxilas. O último é esterificado com ácido graxo de cadeia longa. Quatro tipos de estruturas de cianolípídeo têm sido relatados até agora nesta família de planta. Assim, os cianolípídeo do tipo I e III são diésteres de 1-ciano-2-hidroximetilprop-2-en-1-ol e 1-ciano-2-hidroximetilprop-1-en-3-ol, respectivamente. Por outro lado, os cianolípídeo do tipo II e IV são os monoésteres de 1-ciano-2-metilprop-1-en-3-ol e 1-ciano-2-metilprop-2-en-1-ol (MIKOLAJCZAK et al., 1970a e 1970b) (Figura 2.1.1; I-IV).

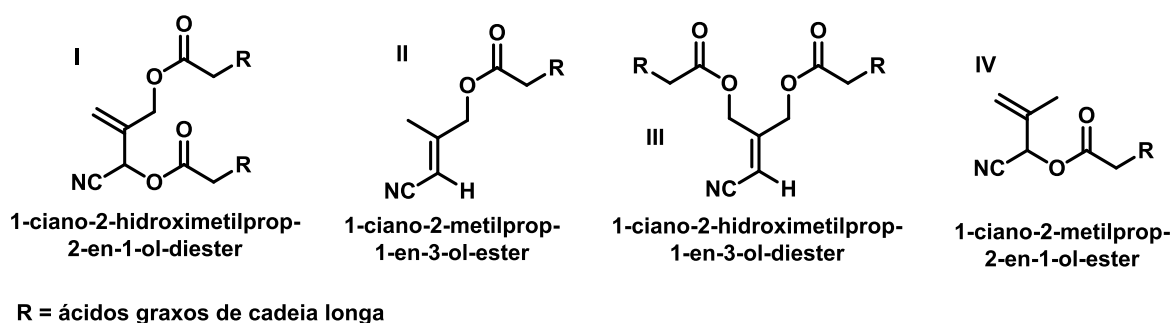


Figura 2.1.1 - Estrutura química dos cianolípídeos I-IV.

Estudos da composição de óleo de sementes têm mostrado que os cianolípídeo isolados a partir de plantas da família Sapindaceae apresentam um elevado teor de ácido *cis*-11-icosenóico, ácido icosanóico (ácido araquídico) e o ácido *cis*-11-octadecenóico (ácido vacênico), sendo estes constituintes dominantes, responsáveis por até 50% de cianolípídeo totais em algumas espécies desta família (SPITZER, 1995; HOPKINS e SWINGLE, 1967; SPITZER, 1996; LAGO et al., 2000).

O papel fisiológico dos cianolípídeo em plantas ainda não é completamente compreendido. Estes fitoquímicos podem servir *in vivo* como uma importante fonte de nitrogênio para o desenvolvimento das mudas (SELMAR et al., 1990). Não obstante apresenta

co-ocorrência com glicosídeos de hidroxinitrila em algumas espécies (BJARNHOLT e MØLLER, 2008). Eles representam uma variação da biossíntese de glicosídeos de hidroxinitrila com esterificação para a formação de lipídeos, possivelmente servindo com funções específicas relacionadas com o armazenamento e transporte (TAVA e AVATO, 2008).

De *S. saponaria* L., vulgarmente conhecida como "Saboneteira", foi investigada a composição dos óleos das sementes, em vista dos estudos fitoquímicos de outras espécies que fazem parte da família Sapindaceae, apresentando produtos naturais em suas sementes com as características de cianolípídeo (Figura 2.1.1). Pela quimiotaxonomia, a *S. saponaria* L. deveria ter em suas sementes este tipo de compostos naturais, sendo abordado neste capítulo o estudo da fração hexânica das sementes na busca do tipo de cianolípídeo presente nesta espécie.

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Material vegetal

Os frutos de *S. saponaria* L. foram coletados em outubro 2014 no município Tocantins (21° 10'30"S e 43° 01'04"W), Minas Gerais, Brasil. Amostras de comprovação foram secas e colocados na coleção da VIC Herbário do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), com o código VIC 35403.

Extração do óleo

Após a retirada do pericarpo as sementes foram quebradas e os grãos foram separados das conchas. O material foi moído (30 g) e extraído com hexano (100 mL) sob agitação por 24 h (IUPAC, 1987). A extração foi feita em triplicata e foram obtidos 10 g (33/) de óleo amarelo.

2.2.2. Análise e purificação do óleo

Em primeiro lugar, a composição do óleo foi investigada por CCD, usado como eluente a mistura Hex/Et₂O (9:1, v/v). A visualização dos componentes foi feito com o revelador ácido fosfomolibdico seguido de aquecimento da placa a 110 °C.

O óleo amarelado foi submetido à cromatografia em coluna, usado como eluente a mistura Hex:Et₂O em gradiente, fornecendo 30 frações de 25 mL. Pela análise por CCD foram reunidas em 4 frações principais (Tabela 2.2.1 e Figura 2.3.1).

Tabela 2.2.1 - Fracionamento do extrato hexânico das sementes de *S. saponaria* L.

Frações	Eluente	Massa (g)
1 (1-4)	Hex:Et ₂ O (95:5)	0,025
2 (5-14)	Hex:Et ₂ O (90:10)	8,850
3 (17-23)	Hex:Et ₂ O (80:20)	0,195
4 (26-30)	Hex:Et ₂ O (70:30)	0,100

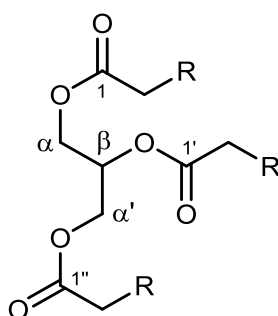
2.2.3. Transesterificação dos componentes do óleo

As frações 2 e 3 foram transesterificadas seguindo o método IUPAC (OLIVEROS-BASTIDAS et al., 2013) com algumas modificações. Aproximadamente 20 mg do óleo, 2 mL de hexano e uma solução de 0,2 mL de KOH/MeOH (2M) foram adicionados em um tubo selado. O tubo foi agitado por 5 minutos com um agitador Maelstrom. Em seguida, 2 mL de solução saturada de NaCl foram adicionados e a fase orgânica separada. As frações foram analisadas, pela injeção de 1 µL da fase orgânica em um aparelho de cromatografia a gás acoplado a um espectrômetro de massas.

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos por meio de filme de NaCl, em espectrômetro Perkin Elmer Spectrum 1000. As absorções foram relatadas em número de ondas $\bar{\nu}$ (cm⁻¹). Os espectros de ressonância magnética nuclear de ¹H e de ¹³C foram obtidos em aparelho Varian, Mercury 300 MHz e 75 MHz, respectivamente. Os espectros de massas foram obtidos em aparelho Shimadzu (modelo PQ5050), equipado com um auto injetor Shimadzu AOC-5000 e coluna capilar de sílica (DB-5, 30 m × 0,25 mm ID, 0,25 µm de espessura de filme). As condições operacionais foram as seguintes: hélio como gás de arraste com um fluxo de 1,6 mL/min; temperatura da coluna a 80 °C por 5 min, logo aumentando 24,4 °C/min de 80 até 285 °C; a temperatura do injetor foi 290 °C; 1 µL foi o volume injetado. EM foram registrados em modo de ionização de elétrons (EI), com uma energia de 70 eV. A temperatura da fonte iônica foi de 200 °C; com o tempo de corte de solvente de 5 minutos. Os compostos foram identificados por comparação com os dados da biblioteca da Wiley 7.0 e NIST. A evolução das reações foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD), em

placas de sílica gel 60 F₂₅₄ 0,2 mm de espessura (Merck). As placas de cromatografia em camada delgada foram visualizadas sob luz ultravioleta ou por pulverização com solução de ácido fosfomolibdico 10% de EtOH, seguido de aquecimento. A cromatografia flash em coluna (20 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro) foi realizada usando gel de sílica de 230-400 mesh (Merck).

2.2.4. Dados referentes aos ésteres graxos encontrados na fração 2



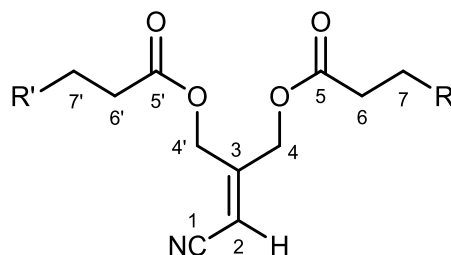
Aspecto físico: óleo incolor.

IV (Filme de NaCl, $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3004, 2924, 2852, 1746, 1462, 1162, 722.

RMN de ^1H (CDCl_3/ppm ; 300 MHz) δ : 5,33 (m, H); 5,23 (m, CH- β -glicerol); 4,27 (dd, $J = 11,9$, 4,1 Hz, CH_2 - α' -glicerol); 4,10 (dd, $J = 11,7$, 5,8 Hz, CH_2 - α -glicerol); 2,73 (m, $\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}$); 2,27 (m, CH_2 -2, CH_2 -2' e CH_2 -2''); 1,97 (m, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{cis}$); 1,57 (m, CH_2 -3 e CH_2 -4); 1,25 (n- CH_2); 0,84 (CH_3).

RMN de ^{13}C (CDCl_3/ppm ; 75 MHz) δ : 173,12 ($\text{O}=\text{C}$ -1-éster do ácido graxo); 173,09 ($\text{O}=\text{C}$ -1''-éster do ácido graxo); 172,70 ($\text{O}=\text{C}$ -1'-éster do ácido graxo); 130,14 ($=\text{CH}-$ do ácido graxo); 129,98 ($=\text{CH}-$ do ácido graxo); 129,90 ($=\text{CH}-$ do ácido graxo); 129,79 ($=\text{CH}-$ do ácido graxo); 129,68 ($=\text{CH}-$ do ácido graxo); 129,66 ($=\text{CH}-$ do ácido graxo); 128,11 ($=\text{CH}-$ do ácido graxo); 127,93 ($=\text{CH}-$ do ácido graxo); 68,95 ($\text{O}-\text{CH}-\beta$); 62,09 ($\text{O}-\text{CH}_2-\alpha$ e $\text{O}-\text{CH}_2-\alpha'$); 34,19 (CH_2 -2); 34,03 (CH_2 -2'); 31,58 (CH_2 - ω 3); 31,97 (CH_2 - ω 3); 29,82-29,09 (n- CH_2); 27,26 ($\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2$); 27,21 ($\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2$); 24,89 ($\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}$); 22,74 (CH_2 ; ω 2); 22,63 (CH_2 ; ω 2); 14,14 (CH_3 - ω 1); 14,10 (CH_3 - ω 1).

2.2.5. Dados referentes ao cianolípídeo tipo III encontrado na fração 3



Aspecto físico: óleo amarelo.

IV (Filme de NaCl, $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3004, 2922, 2852, 2224, 1746, 1462, 1156, 722.

RMN de ^1H (CDCl_3/ppm ; 300 MHz) δ : 5,57 (s, 1H, H-2); 5,33 (m, 3H, H); 4,88 (s, 2H, H-4'); 4,70 (s, 2H, H-4); 2,36 (t, 4H, $J = 7,4$ Hz, H-6, H-6'); 2,00 (m, =CH-CH₂); 1,63 (m, 4H, H-7, H-7'); 1,25 (m, n-CH₂); 0,87 (s, 3H, $J = 6,8$ Hz, CH₃).

RMN de ^{13}C (CDCl_3/ppm ; 75 MHz) δ : 173,04 (O=C-5-éster do ácido graxo); 172,66 (O=C-5'-éster do ácido graxo); 155,03 (=C-3); 130,18 (=CH- do ácido graxo); 130,05 (=CH- do ácido graxo); 129,95 (=CH- do ácido graxo); 129,77 (=CH- do ácido graxo); 114,78 (NC-1); 98,72 (=CH-2); 62,77 (O-CH₂-4'); 61,71 (O-CH₂-4); 34,06 (CH₂-6'); 33,91 (CH₂-6); 32,05 (CH₂- ω 3); 32,03 (CH₂- ω 3); 29,89-29,20 (n-CH₂); 27,34 (CH₂-CH=CH-CH₂); 27,27 (CH₂-CH=CH-CH₂); 24,92 (CH₂-7'); 24,88 (CH₂-7); 22,81 (CH₂- ω 2); 14,24 (CH₃- ω 1).

2.3. Resultados e Discussão

Da parte interna das sementes de *S. saponaria* L., uma massa amarelada (30 g) foi macerada em hexano por 24h em agitação, fornecendo, após eliminação do solvente, 10 g de um óleo amarelo (33/).

O óleo amarelo foi primeiramente investigado por CCD. Após a eluição com a mistura de solvente Hx/Et₂O (9:1, v/v), observou-se a presença de quatro componentes, que foram separados por meio de cromatografia em coluna usando Hx/Et₂O como eluente em gradiente, obtendo-se 30 frações. Pela análise por CCD foram reunidas em 4 frações principais (Tabela 2.2.1). A fração 2 rica em ácidos graxos representa um total de 90/ e a fração 3 é rica em cianolípideo do tipo III (diéster de 1-ciano-2-hidroximetilprop-1-en-3-ol), representando 5/ . O procedimento geral está ilustrado na Figura 2.3.1.

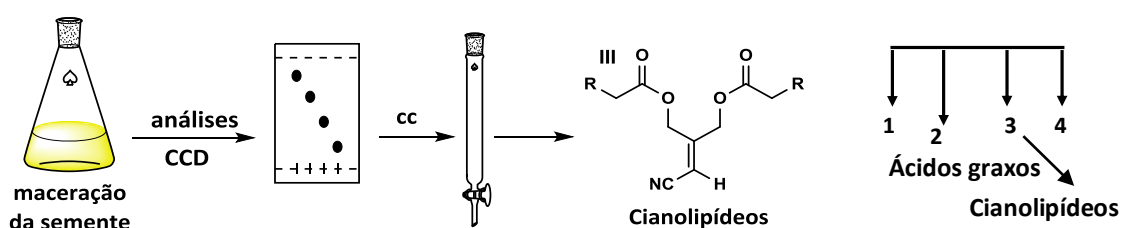


Figura 2.3.1 - Procedimento geral para a obtenção dos compostos das sementes de *S. saponaria* L.

As frações 2 e 3 obtidas da cromatografia em coluna foram transesterificadas para identificar os ácidos graxos presentes nas diferentes frações por meio de análises por CG-EM.

O espectro no infravermelho da fração 2 mostrou banda de absorção característica 3004 cm⁻¹ de alqueno. Em 2924 e 2852 cm⁻¹ foram observados bandas de C_{sp3} para grupos CH₂ e CH₃. Uma banda característica de grupo carbonílico de éster foi observada em 1746 cm⁻¹. Em 1162 cm⁻¹ a banda de C-O e a 722 cm⁻¹ banda característica de cadeia alifática para o ácido graxo. Não obstante, os espectros no infravermelho dos cianolípideo são diferentes para cada tipo de estrutura I-IV (MIKOLAJCZAK *et al.*, 1979b). O constituinte de cianolípideo (fração 3) mostrou os máximos de absorção característicos encontrados no espectro de acilglicerídeos, isto é, a 3004 cm⁻¹ (C-H alqueno), da mesma forma os grupos CH₂ e CH₃, com bandas a 2922 e

2852 cm^{-1} . A banda em 1746 foi atribuído ao grupo carbonila de éster, a banda em 1156 cm^{-1} ao estiramento da ligação C-O e a banda a 722 cm^{-1} a banda característica de cadeia alifática. A primeira tentativa de identificar o tipo de cianolípido contido na fração 3 foi apoiado pela observação da banda de absorção estreita em 2224 cm^{-1} atribuída a um grupo ciano conjugado com uma ligação dupla, que é normalmente encontrado nos espectros de acilglicerídeos e são relatados como diagnóstico para cianolípido do tipo II e III (Figura 2.1.1) (MIKOLAJCZAK *et al.*, 1979b; AVATO *et al.*, 2005).

As análises dos espectros de RMN indicaram claramente que os lípidos isolados eram triacilglicerídeos (TAG). Os sinais relativos aos hidrogênios α e β do glicerol estavam presente no RMN de hidrogênio como dois duplo duplete em $\delta_{\text{H}} = 4,10$ e 4,27 para o $\alpha\text{-CH}_2$ e $\alpha'\text{-CH}_2$ do glicerol, respectivamente. O multiplete em $\delta_{\text{H}} = 5,23$ indica a presença do hidrogênio $\beta\text{-CH}$ do glicerol. Além disso, em $\delta_{\text{H}} = 5,33$ aparece um sinal característico de sistemas de dupla ligação dissustituído com conjugação *cis* (Figura 2.3.2).

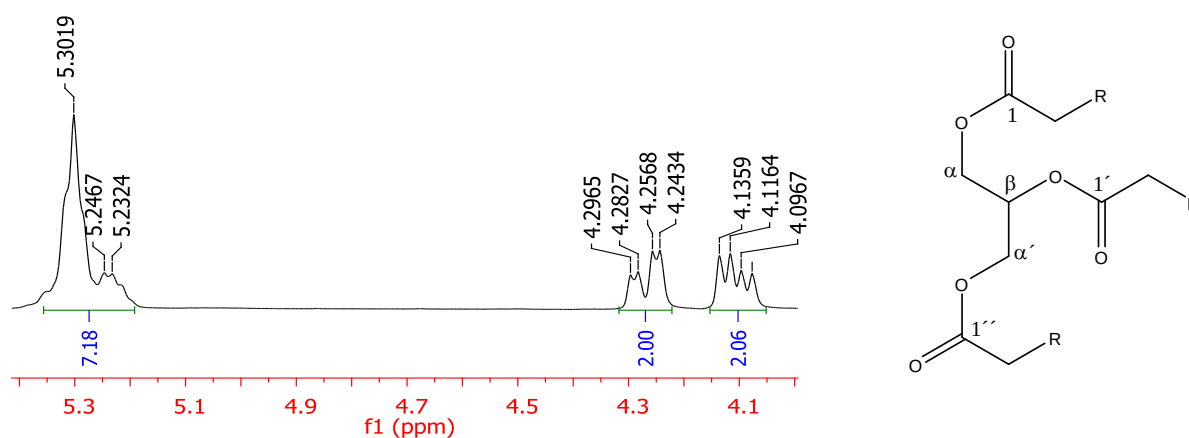


Figura 2.3.2 - Ampliação de parte do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) da fração 2 rica em triacilglicerídeos (TAG).

No espectro de RMN de ^{13}C observou-se em $\delta_{\text{C}} = 62,09$ um sinal correspondente ao $\alpha\text{-CH}_2$ e $\alpha'\text{-CH}_2$ do grupo glicerol. Além a $\delta_{\text{C}} = 68,95$ observou-se a sinal do carbono metínico- β também do glicerol. A presença dos sinais com os deslocamentos químicos das carbonilas de éster em $\delta_{\text{C}} = 173,12$ (C-1), $\delta_{\text{C}} = 173,09$ (C1'') e $\delta_{\text{C}} = 172,70$ (C-1') também confirmaram que os

lipídeos isolados foram do tipo triacilglicerídeos TAG (Figura 2.3.3) (AVATO *et al.*, 2003; GUSTONE, 1990).

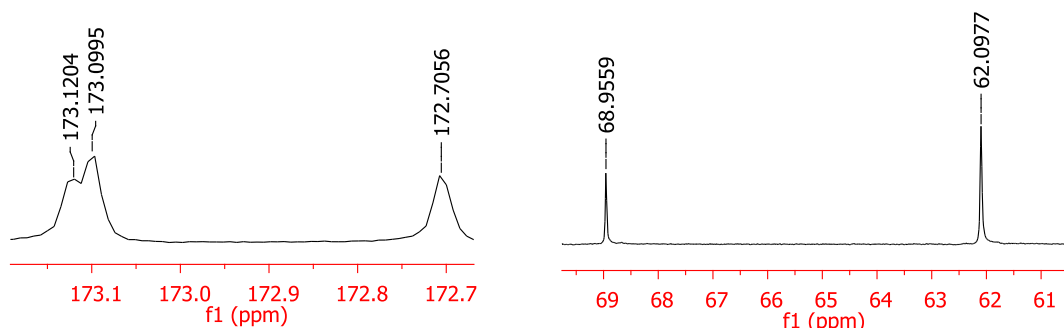


Figura 2.3.3 - Ampliação de parte do espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) da fração 2 rica em triacilglicerídeos (TAG).

Por outro lado, a transesterificação da fração 2 rica em triacilglicerídeos permitiu identificar em parte as cadeias dos ácidos graxos presente nesta fração. Ao injetar a amostra transesterificada no CG-EM, os resultados obtidos indicam a presença de diferentes ácidos com cadeias insaturadas e saturadas. Na Figura 2.3.4 o cromatograma da fração transesterificada, pode-se observar ao menos seis sinais de compostos majoritários. Ao comparar com a biblioteca de Wiley 7 e NIST os ácidos graxos presentes foram identificados como os isômeros monoinsaturados: ácido *cis*-1-octadecenóico (*cis*-vacênico (**1**)), ácido *cis*-9-octadecenóico (*cis*-oleico (**2**)), ácido linoléico (**3**), ácido icosanóico (**4**), ácido *cis*-11-icosenóico (**5**), e o ácido araquídico (**6**).

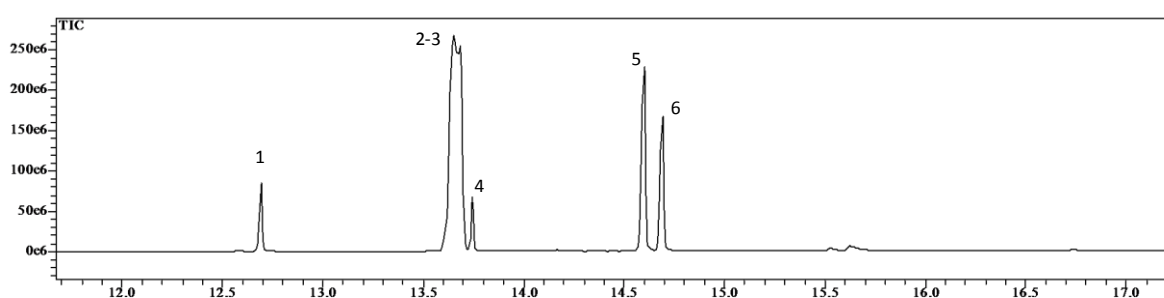


Figura 2.3.4 - Cromatograma de CG-EM da fração transesterificada rica em TAG.

A informação sobre a estrutura do cianolípídeo extraído do óleo das sementes da *S. saponaria* L. foi obtida nos experimentos de RMN uni e bi-dimencional, que permitiram as atribuições dos sinais referentes aos cianolípídeo do tipo III. No espectro de RMN de ^{13}C , o

sinal em $\delta_c = 114,78$ indicou a presença do grupo nitrila (C-1), isto é confirmado pelo simpleto no espectro de RMN de ^1H , em $\delta_H = 5,57$ a sinal correspondente ao hidrogênio (H-2) do metino do alqueno adjacente ao grupo nitrila. Os dados sugerem que os compostos isolados são derivados do cianolípido. Esta hipótese é confirmada pela presença do sinal em $\delta_c = 98,72$ atribuído a um carbono-2 vinílico ao grupo ciano e pelo carbono quaternário a (C-3) a $\delta_c = 155,03$, confirmado o alqueno trissubstituído (Figura 2.3.5).

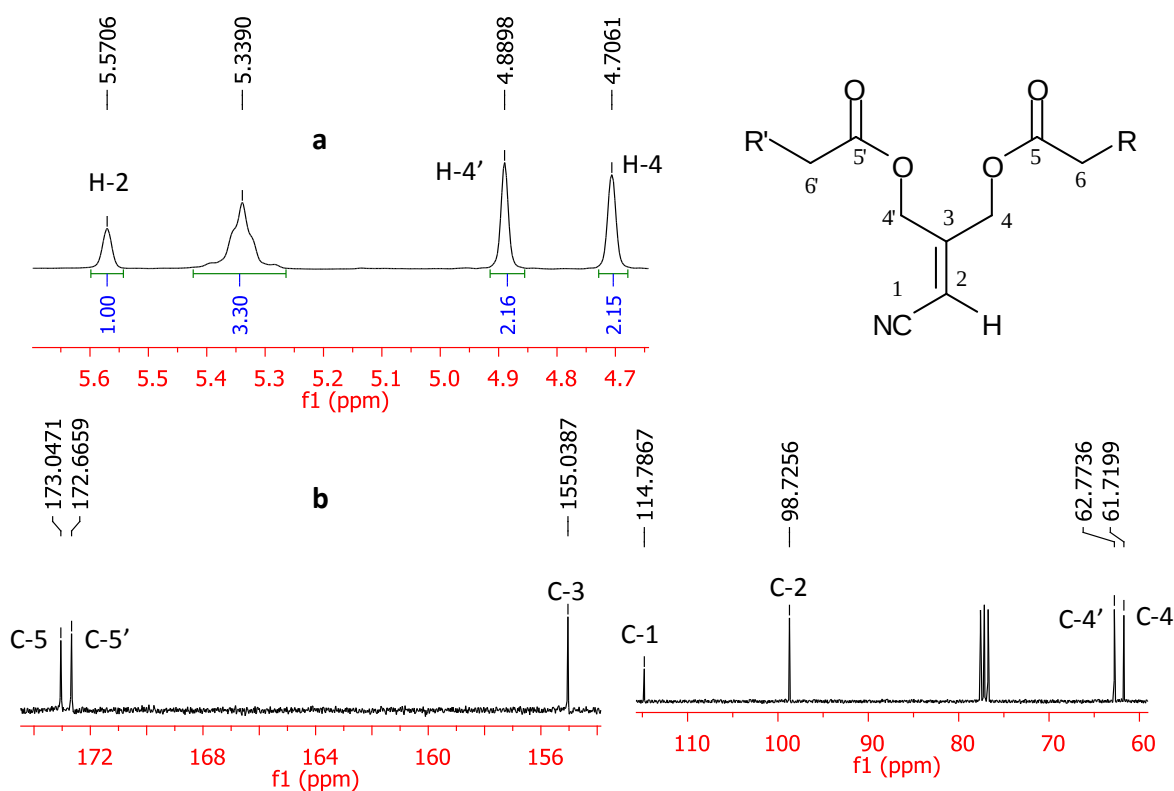


Figura 2.3.5 - Ampliação dos espectros de RMN, da fração 3 rica em cianolípido. a) parte do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz). b) parte do espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz).

Os sinais com deslocamentos em $\delta_H = 4,88$ e $\delta_H = 4,70$ são atribuídos, aos hidrogênios dos metilenos $\text{CH}_2\text{-4'}$ e $\text{CH}_2\text{-4}$ (Figura 2.3.5) (MIKOLAJCZAK *et al.*, 1979b; AVATO *et al.*, 2005).

Para confirmar a presença do cianolípido do tipo III foi realizado o experimento bidimensional COSY ^1H - ^1H . Neste espectro foram observados acoplamentos alílicos para os hidrogênios metilenos H-4' e H-4. Em primeiro lugar, observou-se um acoplamento mais forte entre o sinal dos hidrogênios do metileno H-4 e o hidrogênio do grupo vinílico (H-2), em comparação com o mesmo acoplamento, porém mais fraco entre os hidrogênios do metileno

H-4' com o hidrogênio vinílico-2 (Figura 2.3.6). A identificação desta fração de cianolípido com o diéster de 1-ciano-2-hidroxi-3-metilprop-1-en-3-ol foi confirmado no espectro de RMN de ^{13}C pela presença dos sinais de carbonos em $\delta_{\text{C}} = 62,77$ e $\delta_{\text{C}} = 61,71$, que foram atribuídos aos dois grupos metilênicos C-4' e C-4 da parte do dihidroxibutenil nitrila (AVATO *et al.*, 2005). Além desses sinais, foram observados os sinais dos grupos carbonilas de ésteres em $\delta_{\text{C}} = 173,04$ e $\delta_{\text{C}} = 172,69$, respectivamente (Figura 2.3.5).

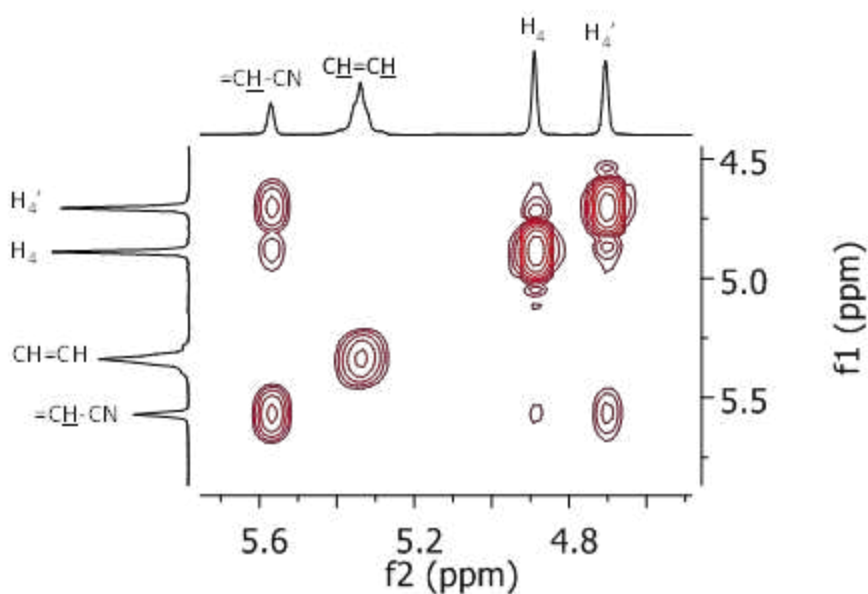


Figura 2.3.6 - Expansão do espectro COSY ^1H - ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) para os cianolípido do tipo III a partir de óleo de sementes de *S. saponaria* L.

Adicionalmente, o cromatograma no CG-EM da amostra rica em cianolípido transesterificada, mostrou três sinais principais no cromatograma (Figura 2.3.7). Em comparação com os dados da biblioteca Wiley 7 e NIST permitem detectar a presença dos ácidos graxos: *cis*-11-octadecenóico (*cis*-vacênico-(**1**)), *cis*-11-icosenóico (**2**) e o ácido saturado icosanóico (ácido araquídico-(**3**)). Nas Figuras 2.3.8, 2.3.9 e 2.3.10 observaram-se os espectros de massas dos diferentes sinais do cromatograma com seu respectivo espectro do composto padrão ou espectro teórico, confirmado desta forma os ácidos graxos ligados ao cianolípido.

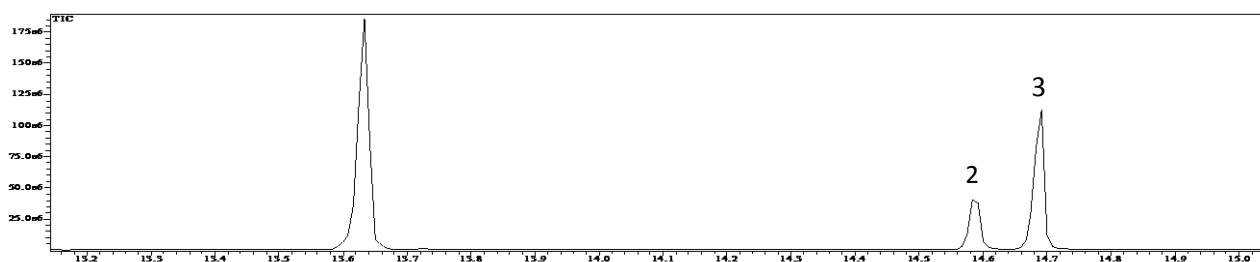


Figura 2.3.7 - Cromatograma de CG-EM da transesterificação do extrato rico em cianolipídeos do óleo da semente de *S. saponaria* L.

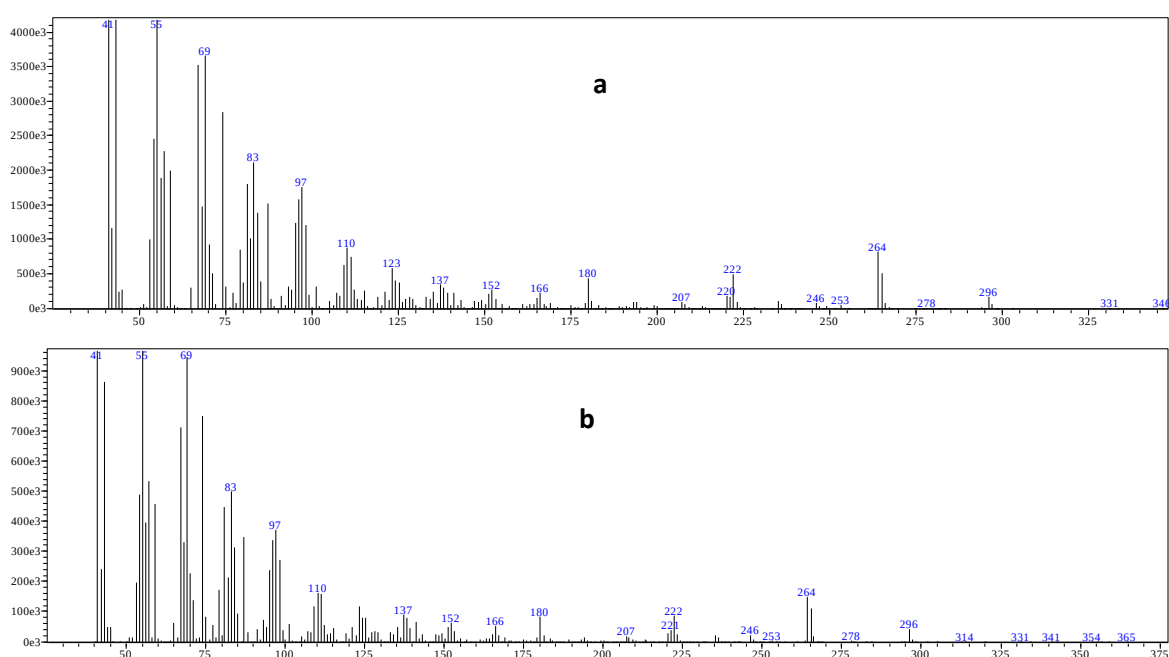


Figura 2.3.8 - Espectro de massas (CG-EM), a) espectro do pico 1 do cromatograma da transesterificação do extrato rico em cianolipídeo. b) espectro de massa do padrão 11-octadecenoato de metila.

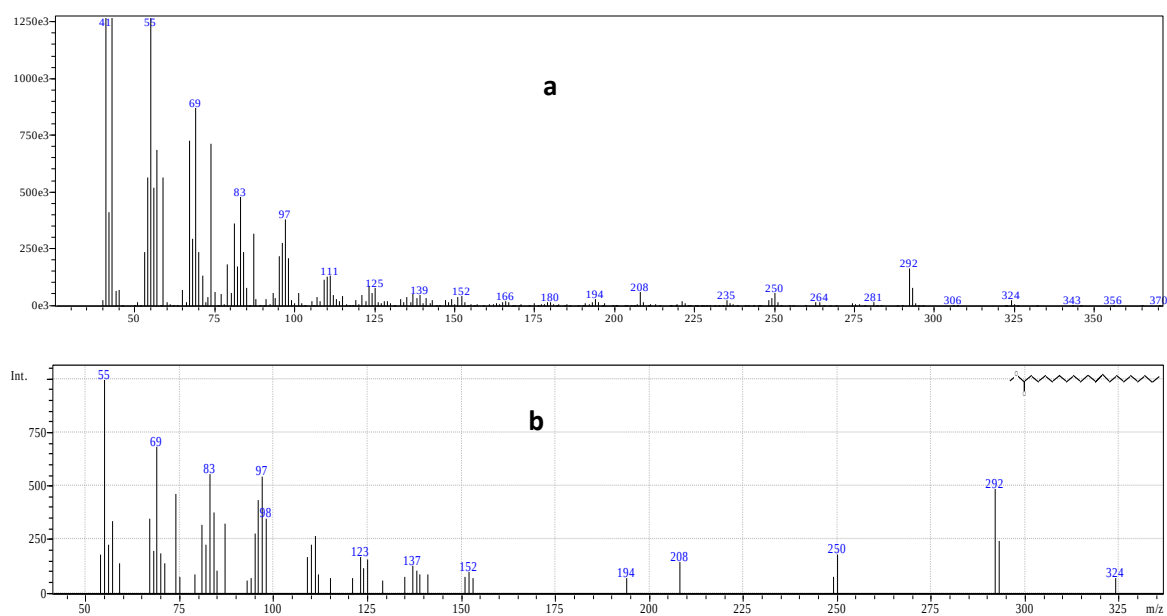


Figura 2.3.9 - Espectro de massas (CG-EM), a) espectro do pico 2 do cromatograma da transesterificação do extrato rico em cianolípideo. b) espectro de massa do padrão 11-icosenoato de metila.

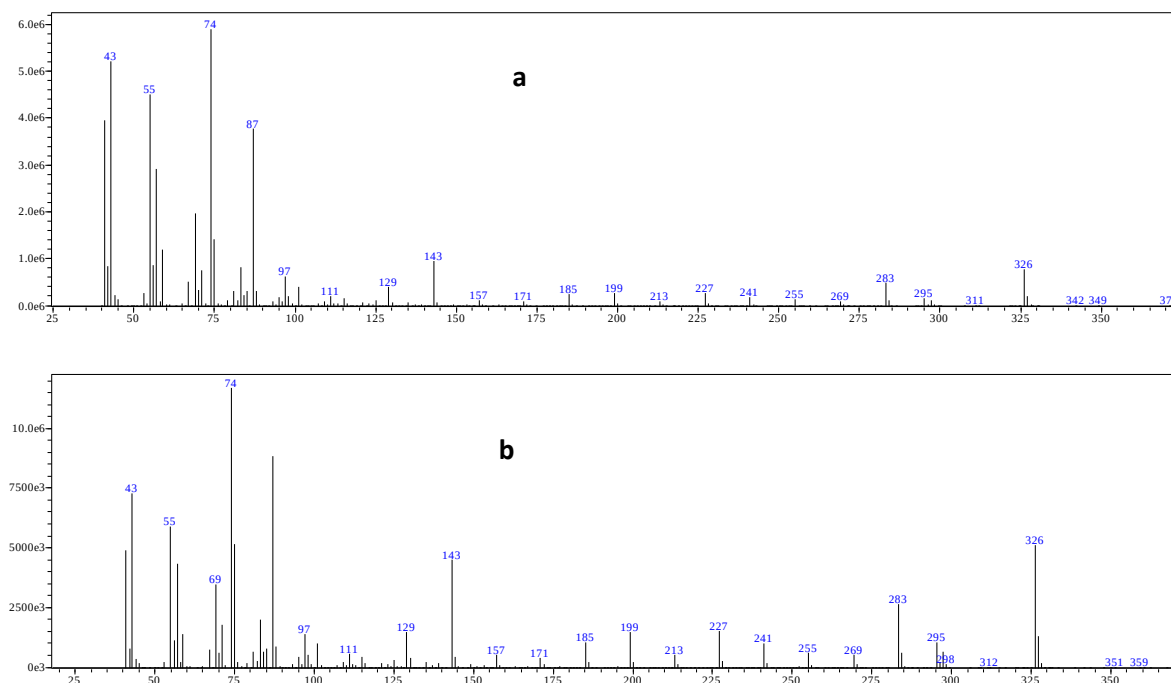


Figura 2.3.10 - Espectro de massas (CG-EM), a) espectro do pico 3 do cromatograma da transesterificação do extrato rico em cianolípideo. b) espectro de massa do padrão icosanoato de metila.

Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo da composição detalhada do óleo da parte interna da semente de *S. saponaria* L. Os resultados são muito importantes por que revela a presença do grupo cianolípídeo, especificamente do tipo III, o diéster de 1-ciano-2-hidroximetilprop-1-en-3-ol (Figura 2.1.1 (III)), ligado aos grupos acilglicerídeos em misturas.

Investigações anteriores (MIKOLAJCZAK, 1977 e UCCIANI *et al.*, 1994) revelaram que as composições totais de ácidos graxos de óleos de sementes de outros membros da família Sapindaceae eram muito semelhantes e que os ácidos *cis*-vacênico e araquídico foram os componentes principais; e que são propostos como marcadores quimiotaxonomicos para esta família (MIKOLAJCZAK, 1977; GUSTONE, 1991). Na verdade, o ácido *cis*-vacênico normalmente ocorre em óleos de sementes em pequenas quantidades, e o ácido araquídico, está intimamente relacionado com cianolípídeo (UCCIANI *et al.*, 1994). Ambos ácidos estão presentes nas sementes da *S. saponaria* L. confirmando a informação quimiotaxonômica relacionada para esta família de planta.

2.4. Conclusão

O estudo da fração hexânica da parte interna das sementes de *S. saponaria* L., permitiu identificar os triacilglicerídeos (**TAG**) como os isômeros monoinsaturados: ácido *cis*-11-octadecenóico (*cis*-vacênico), ácido *cis*-9-octadecenóico (*cis*-oleico), ácido *cis*-11-icosenóico, ácido linoleico, ácido icosanóico e o ácido araquídico. Os cianolípídeo (**CL**) foram representados por isômeros monoinsaturados como o ácido *cis*-11-octadecenóico (ácido *cis*-vacênico), ácido *cis*-11-icosenóico e o ácido araquídico.

Com relação à quimiotaxonomia pode-se dizer que a espécie *S. saponaria* L. apresenta a mesma composição de produtos naturais que seus parentes da família Sapindaceae, especificamente nas sementes, destacando para esta espécie a presença do cianolípídeo tipo III o **diéster de 1-ciano-2-hidroximetilprop-1-en-3-ol** que representa 5/ da composição do óleo. Por outro lado, os triacilglicerídeos estão presente em maior proporção com uma composição de 90/ do óleo das sementes de *S. saponaria* L.

Este é o primeiro relatorio da presença de cianolípídeo obtendo especificamente a estrutura correspondente ao tipo III para a espécie *S. saponaria* L.

2.5. Referências bibliográficas

- AVATO, P., PESANTE, M.A., FANIZZI, F.P., AIMBIRÉ DE MORAES, S. C. Seed oil composition of *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke. *Lipids*, v. 38, p. 773-780. 2003.
- AVATO, P., ROSITOA, I., PAPADIA, P., FANIZZI, F.P. Cyanolipid-rich seed oils from *Allophylus natalensis* and *A. dregeanus*. *Lipids*, v. 40, p. 1051-1056, 2005.
- BJARNHOLT, N., MØLLER, B.L. Hydroxynitrile glucosides. *Phytochemistry*, v. 69, p. 1947-1961, 2008.
- GUNSTONE, F.D. Carbon-13-NMR spectra of some synthetic glycerol esters alone and as mixtures. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 56, p. 195-199, 1990.
- GUNSTONE, FD. Carbon-13 NMR studies of mono-, di-and tri-acylglycerols leading to qualitative and semiquantitative information about mixtures of these glycerol esters. *Chem. Phys. Lipids*, v. 58, p. 219-224, 1991.
- HOPKINS, CY., SWINGLE, R. Eicosenoic acid and other fatty acids of Sapindaceae seed oils. *Lipids*, v. 2, p. 258-260, 1967.
- IUPAC *Standard Methods for Analysis of Oils, Fats and Derivatives*, Blackwell Scientific Publications: Oxford, 7th ed, 1987.
- LAGO, R.C.A., SIMONE, M.P.S.C., PINTO, A. Cyanolipids in *Paullinia carpopodea* Cambess and *P. cupana* Kunth seed oils. *Acta Amazonica*, v. 30, p. 101-105, 2000.
- MIKOLAJCZAK, K.L. Cyanolipids. *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids*, v. 15, p. 97-130, 1977.
- MIKOLAJCZAK, K.L., SMITH, C.R. Jr., TJARKS, L.W. *Cyanolipids of Cardiospermum halicacabum* and other sapindaceous seed oils. *Lipids*, v. 5, p. 812-817, 1970b.
- MIKOLAJCZAK, K.L., SMITH, C.R., TJARKS, L.W. Cyanolipids of *Koelreuteria paniculata* seed oil. *Lipids*, v. 5, p. 672-677, 1970a.

MØLLER, B.L., SEIGLER, D.S. Biosynthesis of Cyanogenic Glycosides, Cyanolipids, and Related Compounds, in Plant Amino Acids. Biochemistry and Biotechnology (Singh, B.K., ed.), Marcel Dekker, New York. 1999

OLIVEROS-BASTIDAS, A., DEMUNER, A.J., BARBOSA, L.C.A. Chemical characterization by GC-MS and phytotoxic potential of non-polar and polar fractions of seeds of *Dioteryx odorata* (Aubl.) Willd. from Venezuelan regions. Quim. Nova, v. 36, p. 502-506, 2013.

SELMAR, D., GROCHOLEWSKY, S., SIEGLER, D.S. Cyanogenic lipids. Utilization during seedling development of *Ungnadia speciosa*. Plant Physiol., v. 93, p. 631-636, 1990.

SPITZER, V. Fatty acid composition of some seed oils of the Sapindaceae. Phytochemistry, v. 42, p. 1357-1360, 1996.

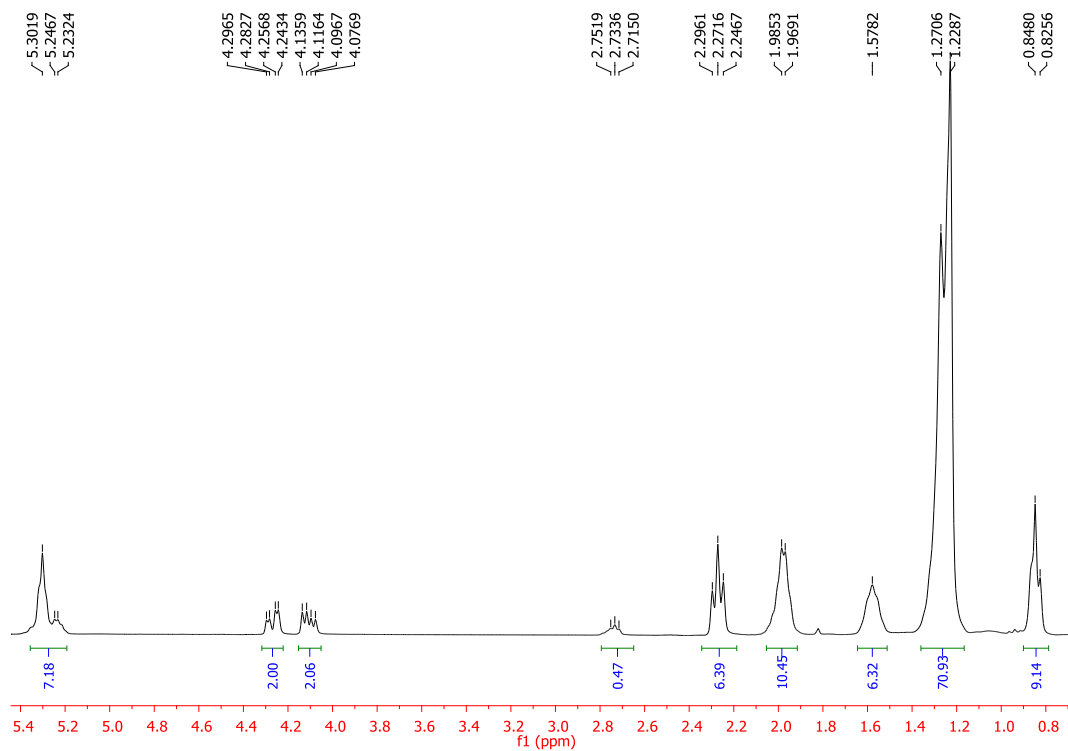
SPITZER, V. J. GLC-MS analysis of the fatty acids of the seed oil, triglycerides, and cyanolipid of *Paullinia elegans* (Sapindaceae). A rich source of *cis*-13-eicosenoic acid (Paullinic Acid). J. High. Resolut. Chromatogr., v. 18, p. 413-416, 1995.

TAVA, A., AVATO, P. Analysis of Cyanolipids from Sapindaceae Seed Oils by Gas Chromatography-El-Mass Spectrometry. Lipids, v. 49, p. 335-345, 2014.

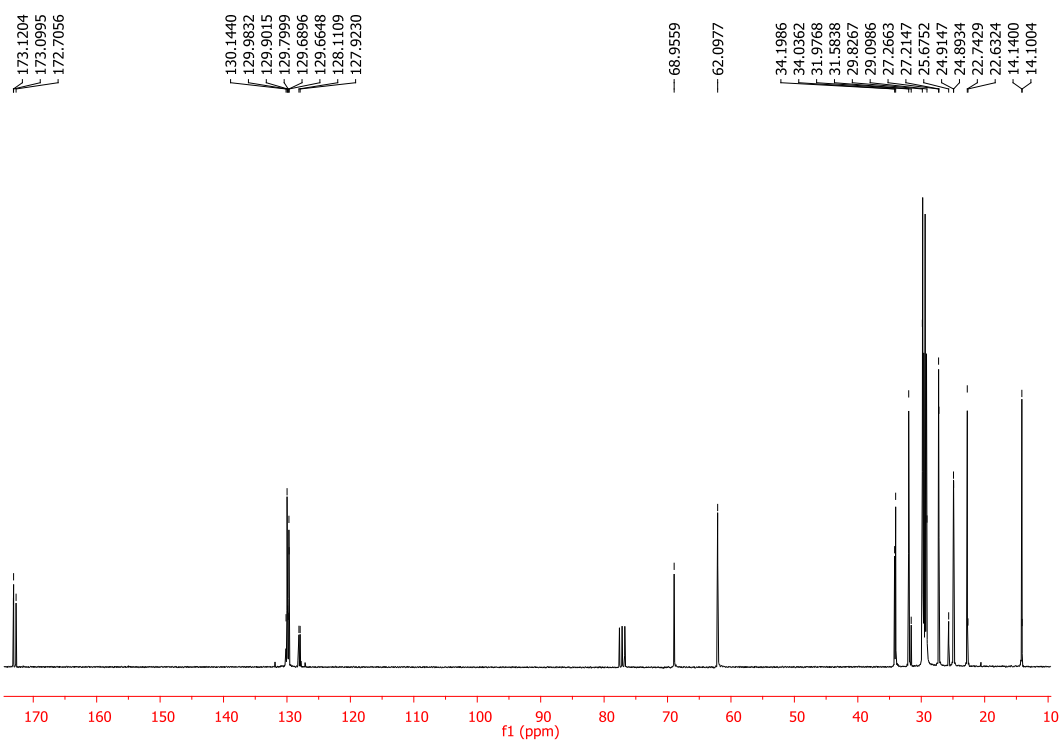
UCCIANI, E., MALLET, F., ZAHRA, J.P. Cyanolipids and fatty acids of *Sapindus trifoliatus* (Sapindaceae) seed oil. Fett Wiss. Technol., v. 96, p. 69-71, 1994.

2.6. Anexos

2.6.1. Espectros da fração rica em triacilglicerídeos

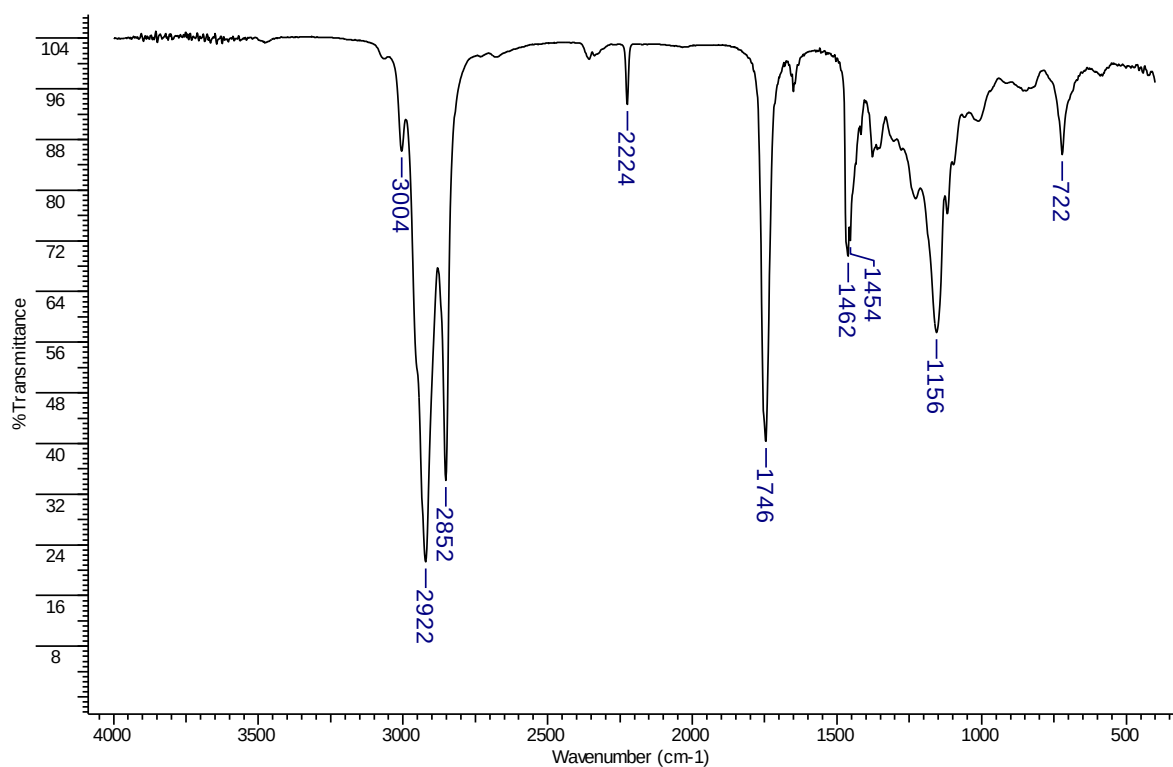


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz)

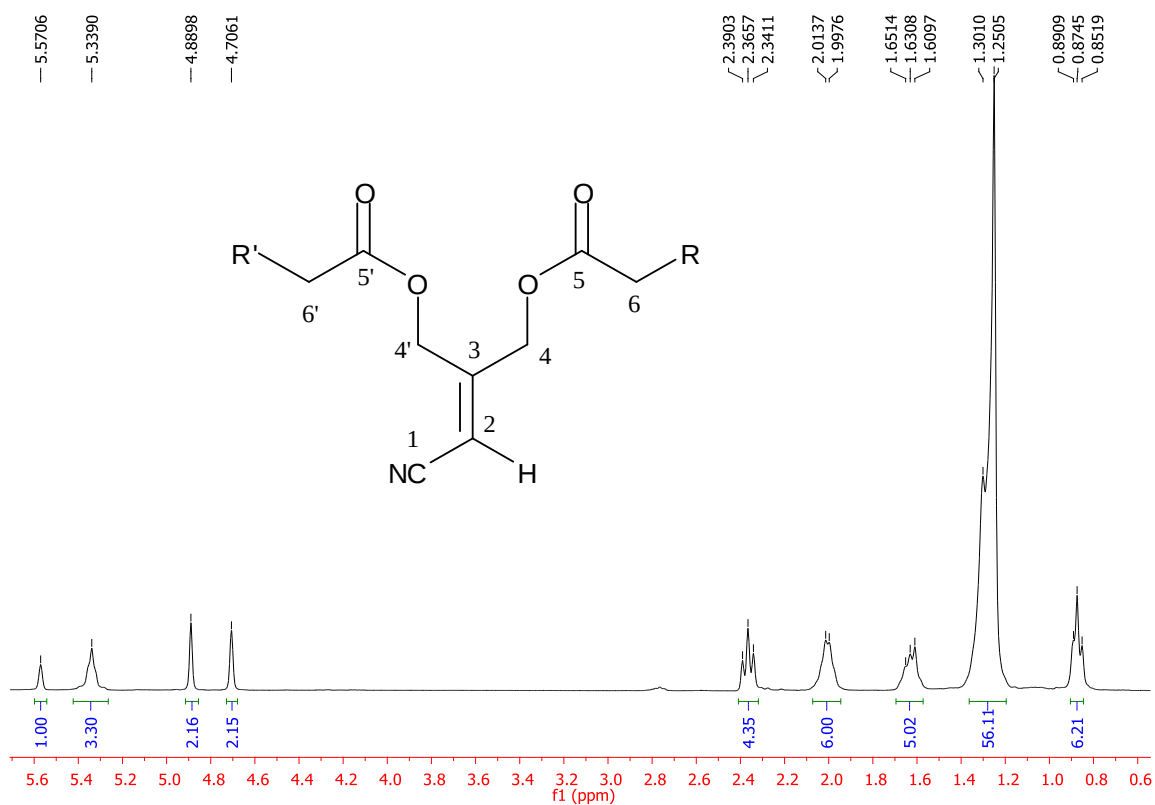


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz)

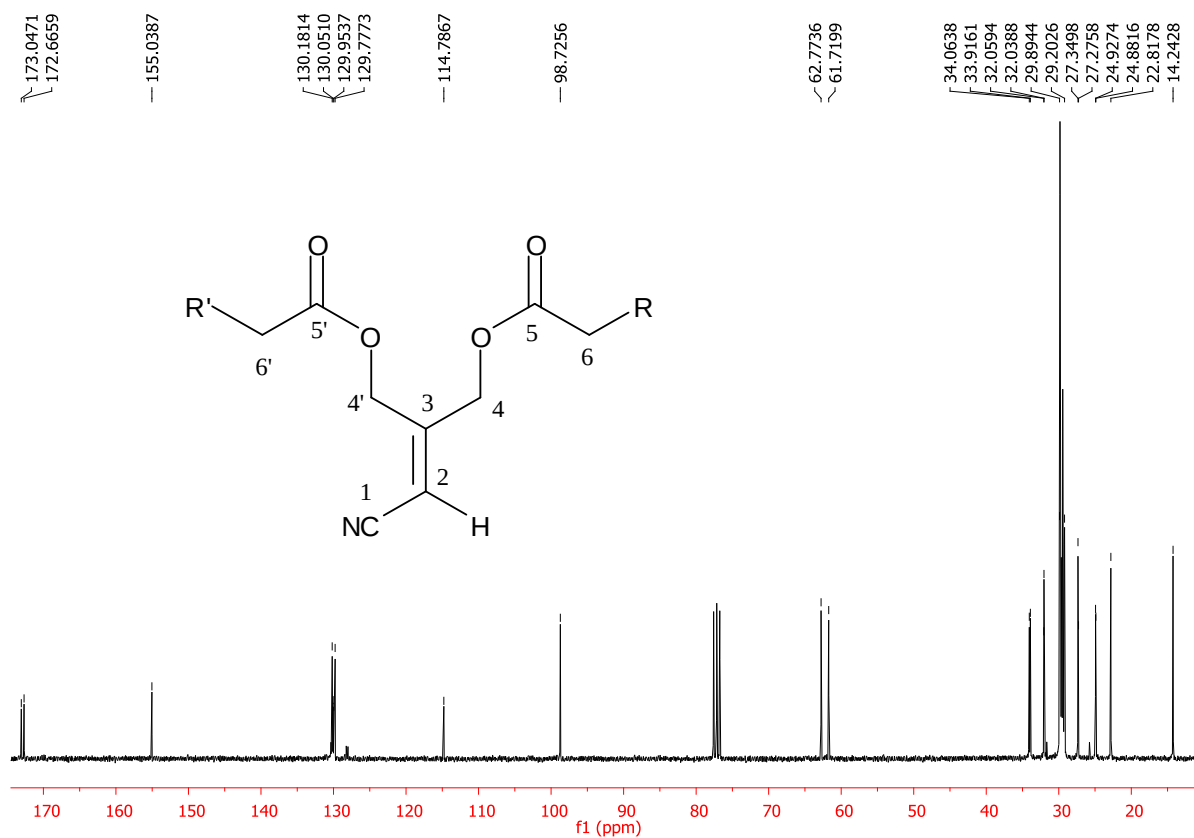
2.6.2. Espectros da fração rica em cianolipídeo tipo III



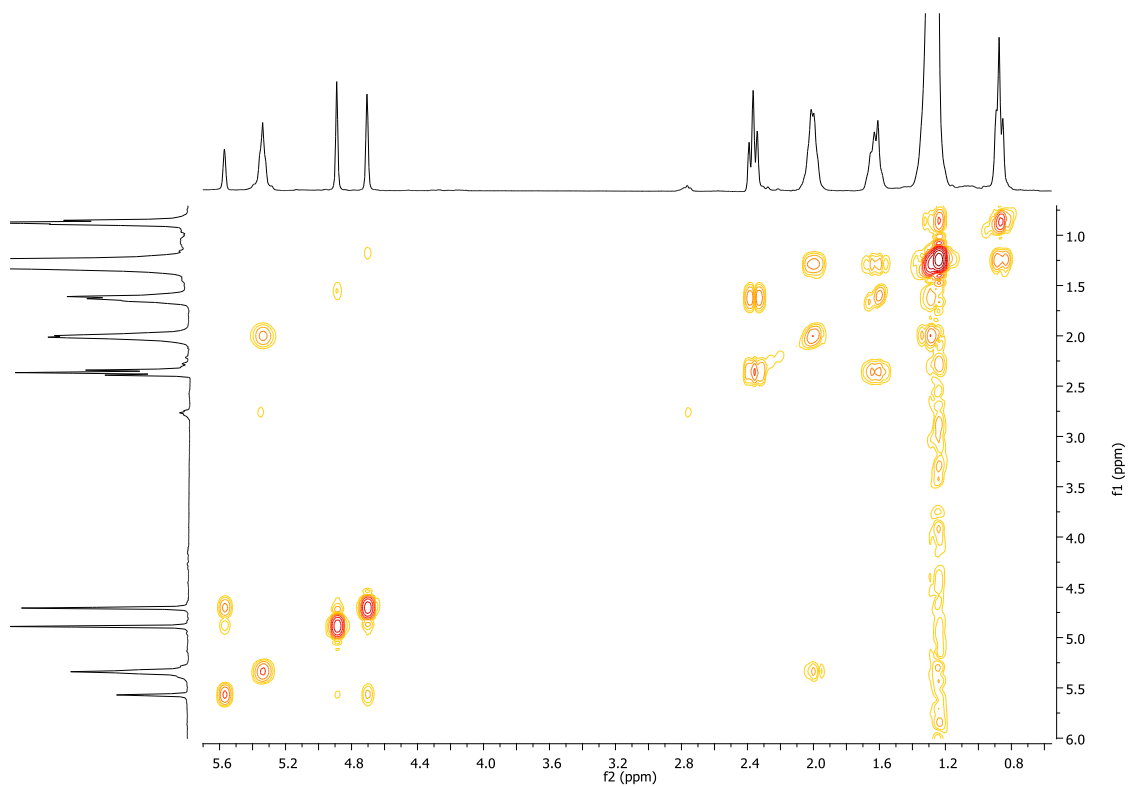
Espectro no IV (Filme de NaCl)



Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz)



Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz)



Espectro COSY ¹H-¹H (CDCl₃)

3. CAPÍTULO 2

**Isolamento dos compostos majoritários do
pericarpo do fruto de *S. saponaria* L.**

3.1. Introdução

Os frutos de *S. saponaria* L. acumulam grandes quantidades de saponinas com a hederagenina como aglicona mais abundante (MURGU e RODRIGUES-FILHO, 2006). Este triterpeno pentacíclico se caracteriza por ter dois grupos hidroxila no anel A, uma dupla ligação no anel C e um grupo carboxílico na posição C-28 (Figura 3.1.1). Além disso, é conhecido que os ácidos de triterpeno tipo oleano apresentam múltiplas atividades biológicas (SUN et al., 2006).

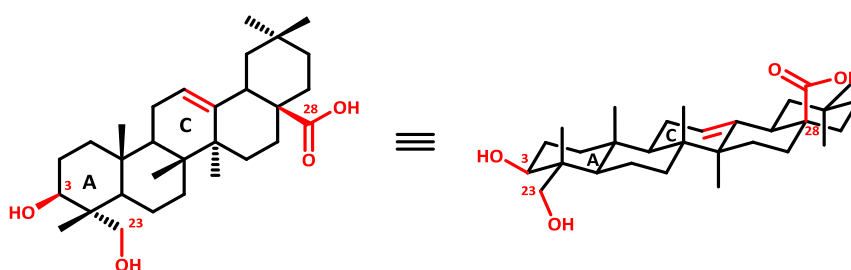


Figura 3.1.1 - Ácido (3β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-oico (Hederagenina).

Do ponto de vista agroquímico, a hederagenina apresenta moderada atividade contra fungos fitopatogênicos tais como: *Rhizoctonia bataticola* ($ED_{50} = 1636 \mu\text{g mL}^{-1}$) e *Sclerotium rolfsii* ($ED_{50} = 412,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) (SAHA et al., 2010a e 2010b). Também apresentam atividade moderada no crescimento e desenvolvimento de lagarta *Spodoptera littoralis* (ADEL et al., 2000). Adicionalmente, apresenta múltiplas atividades farmacológicas como: anti-inflamatória (TAKAGI et al., 1980), anti-microbiana (TIMON et al., 1980), hipotensora e anti-espasmódico (TROTIN et al., 1972), anti-leishmania (MAJESTER-SAVORNIN et al., 1991), além de apresentar atividade moderada contra a linhagem de célula tumoral A549 com $IC_{50} = 39 \pm 6 \mu\text{g mL}^{-1}$ (GATHIER et al., 2009).

Devido ao amplo espectro de atividade que apresenta este produto natural, neste capítulo descreve-se o isolamento da hederagenina, aglicona mais abundante do pericarpo do fruto de *S. saponaria* L., para ser usado em futuras derivatizações, além de outros compostos majoritários do extrato etanólico hidrolisado.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Material vegetal

Os frutos de *S. saponaria* L. foram coletados em outubro de 2013 e 2014 no município Tocantins (21°10'30"S e 43°01'04"W), Minas Gerais, Brasil. Amostras de comprovação foram secos e colocados na coleção da VIC Herbário do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), sob o número VIC 35403. As sementes foram separadas dos frutos e o pericarpo foi seco em estufa a 40 °C com ventilação durante 48 horas.

3.2.2. Extração

500 g do pericarpo seco e moído foi submetido à extração com etanol por 72 h. Após eliminar o solvente foram obtidos 150 g de uma pasta de cor castanha

3.2.3. Hidrólise das saponinas

Foram feitas dois tipos de hidrólise. O primeiro, em que 50 g de extrato etanólico foram hidrolisados com solução de 5% de H₂SO₄ em MeOH-sob refluxo por 4 horas. O resíduo foi extraído com AcOEt (3 x 300 mL) e concentrado a pressão reduzida, fornecendo 15 gramas de uma pasta de cor castanha.

Para comprovar que o extrato foi hidrolisado uma alíquota desse extrato foi derivatizado com BSTFA nas seguintes condições: A 3 mg de extrato hidrolisado foram adicionado 60 µL de piridina anidra e 100 µL de BSTFA e aquecida a 70 °C por 30 min. Uma alicuota dessa solução foi injetado no CG-EM.

A segunda hidrólise foi feita exclusivamente para obter hederagenina utilizando a metodologia de Ohgi et al. (OHGI *et al.*, 1999). Nesta, 100 g do extrato etanólico foram hidrolisados com solução de 2,5% de H₂SO₄ em MeOH (500 mL) sob refluxo por 2 horas. Depois da hidrólise o pH foi ajustado entre 6-7 com adição de solução de KOH 5% em MeOH. Em seguida foi adicionado carvão ativado (50 g) e o material foi submetido a refluxo por 30 minutos. A suspensão resultante foi filtrada sob celite (1 g) e concentrada a pressão reduzida a 1/10 de seu volume inicial, gerando um precipitado que foi filtrado e lavado com água quente,

forneendo a hederagenina impura. A seguir, o composto foi lavado com acetonitrila (2 x 500 mL) e com EtOH (3 x 80 mL), fornecendo em torno de 8,5 g de hederagenina (**3a**).

3.2.4. Fracionamento do extrato hidrolisado

O extrato cor castanha (15 g) obtida na primeira hidrólise foi fracionada em coluna cromatográfica sob pressão usando sílica gel como fase estacionária e como fase móvel Hex-AcOEt-MeOH com gradiente, obtendo 10 frações de 250 mL cada (Tabela 3.2.1).

Tabela 3.2.1 - Fracionamento do extrato etanólico hidrolisado.

Frações	Solvente	Massa (g)
1	Hex: AcOEt 4:1	1,5
2	Hex: AcOEt 4:1	2,8
3	Hex: AcOEt 7:3	1,6
4	Hex: AcOEt 3:2	1,5
5	Hex: AcOEt 1:1	0,6
6	Hex: AcOEt 2:3	0,8
7	Hex: AcOEt 1:4	1,2
8	AcOEt	2,3
9	AcOEt:MeOH 1:1	1,7
10	MeOH	0,7

3.2.5. Análises dos constituintes das frações 1-3

As frações 1-3 (Tabela 3.2.1) oleosas de coloração amarelada e aroma agradável foram submetidas a diferentes colunas cromatográficas usando sílica gel como fase estacionária para separar seus compostos. Na fração 1 foi utilizada como fase móvel Hex-éter dietílico em gradiente, obtendo 6 frações (**y**) de 100 mL (Tabela 3.2.2). Para as frações 2 e 3 se utilizou Hex-Et₂O em gradiente como fase móvel, obtendo 12 frações (**z**) de 100 mL (Tabela 3.2.3). Posteriormente todas as frações (**y** e **z**) foram injetadas em um CG-EM, para identificar os constituintes presentes nas misturas.

Tabela 3.2.2 - Fracionamento por cromatografia de coluna da fração 1 do extrato etanólico hidrolisado.

Fração y	1	2	3	4	5	6
Massa (mg)	150	220	280	326	170	110

Tabela 3.2.3 - Fracionamento por cromatografia de coluna das frações 2 e 3 do extrato etanólico hidrolisado.

Fração z	1	2	3	4	5	6
Massa (mg)	240	370	420	570	600	450
Fração z	7	8	9	10	11	12
Massa (mg)	500	370	280	220	160	120

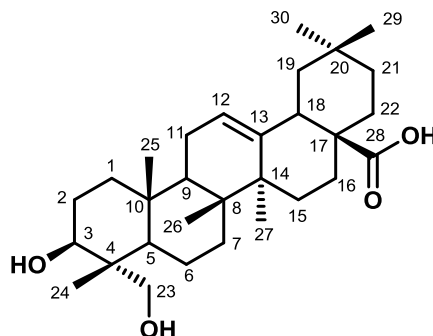
3.2.6. Isolamento das sapogeninas 3a e 3b

As frações **5-6** e **8-10** (Tabela 3.2.1) foram reunidos e submetidas à cromatografia de coluna utilizando como fase móvel Hex-AcOEt 4:1 (v/v), fornecendo a hederagenina (**3a**, 2,5 g) e o ácido oleanólico (**3b**, 600 mg) como sólidos brancos, (Figura 3.3.3) que foram caracterizados por meio de métodos espectroscópicos e seus dados foram confirmados com os relatados na literatura (PAWAN e DHARA, 1992; KHALIL *et al.*, 2000; BOKE, 2014).

3.2.7. Isolamento do composto 3c

A fração **7**, obtida da cromatografia sob pressão (Tabela 3.2.1), foi submetida a coluna cromatográfica de sílica gel usando como fase móvel Hex-AcOEt 4:1 com gradiente. Foi isolado o glicosídeo 1-metoxi-5-metiltetrahidro-1*H*-piran-2,3,4-triol (**3c**, 120 mg) (Figura 3.3.6) e caracterizado por meio de métodos espectroscópicos. O composto **3c** está sendo relatado pela primeira vez em esta espécie de planta.

3.2.8. Dados referentes ao ácido (3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-oico (hederagenina 3a)



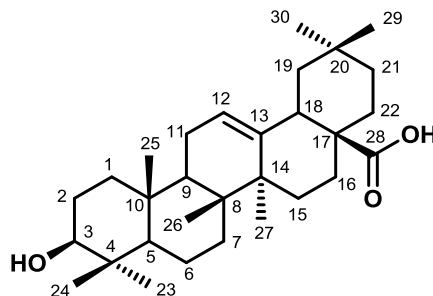
Aspecto físico: sólido branco; T_f 317-319 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3442, 1694, 1462, 1030.

RMN de 1H (C_5D_5N/ppm ; 300 MHz) δ : 5,52 (t, 1H, $J = 3,0$ Hz, H-12); 4,23 (m, 2H, H-3, H-23_a); 3,74 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz, H-23_b); 3,32 (dd, 1H, $J = 3,0, 15,0$ Hz, H-18); 1,25 (s, 3H, CH_3); 1,07 (s, 3H, CH_3); 1,06 (s, 3H, CH_3); 1,01 (s, 3H, CH_3); 0,98 (s, 3H, CH_3); 0,94 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C (C_5D_5N/ppm ; 75 MHz) δ : 180,53 (O=C-28); 145,18 (=C-13); 122,96 (=CH-12); 73,76 (HO-CH-3); 68,25 (HO-CH₂-23); 48,96 (CH-9); 48,51 (CH-17); 47,01 (CH-5); 46,80 (CH₂-19); 43,24 (C-4); 42,54 (C-14); 42,35 (CH-18); 40,12 (C-8); 39,14 (CH₂-1); 37,59 (C-10); 34,56 (CH₂-21); 33,60 (CH₃-29); 33,56 (CH₂-7); 33,33 (CH₂-22); 31,30 (C-20); 28,69 (CH₂-15); 28,02 (CH₃-27); 26,52 (CH₂-2); 24,20 (CH₃-30); 24,13 (CH₂-11); 24,05 (CH₂-16); 18,94 (CH₂-6); 17,85 (CH₃-26); 16,32 (CH₃-25); 13,48 (CH₃-24).

3.2.9. Dados referentes ao ácido (3 β)3-hidroiolean-12-en-28-oico (ácido oleanólico 3b)



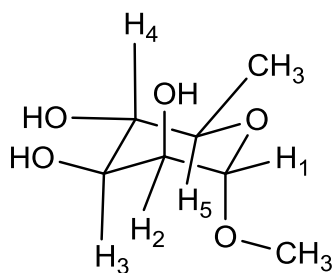
Aspecto físico: sólido branco; T_f 300-303 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{\text{max}}$ /cm⁻¹): 3444, 1694, 1030.

RMN de ¹H (C₅D₅N/ppm; 300 MHz) δ : 5,52 (t, 1H, *J* = 3,0 Hz, H-12); 3,46 (m, 1H, H-3); 3,32 (dd, 1H, *J* = 3,1 Hz, H-18); 1,29 (s, 3H, CH₃); 1,25 (s, 3H, CH₃); 1,03 (s, 6H, 2xCH₃); 1,02 (s, 3H, CH₃); 0,96 (s, 3H, CH₃); 0,90 (s, 3H, CH₃).

RMN de ¹³C (C₅D₅N/ppm; 75 MHz) δ : 180,76 (O=C-28); 145,11 (=C-13); 122,89 (=CH-12); 78,39 (HO-CH-3); 55,12 (CH-5); 48,44 (CH-9); 46,99 (CH-17); 46,80 (CH₂-19); 42,48 (CH-18); 42,32 (C-14); 40,08 (C-8); 39,71 (CH₂-1); 39,25 (C-4); 37,70 (C-10); 34,53 (CH₂-21); 33,62 (CH₃-29); 33,59 (CH₂-7); 33,51 (CH₂-22); 31,30 (C-20); 29,11 (CH₃-23); 28,63 (CH₂-15); 28,41 (CH₂-2); 26,50 (CH₃-27); 24,14 (CH₃-30); 24,10 (CH₂-16); 24,01 (CH₂-11); 19,12 (CH₂-6); 17,75 (CH₃-26); 16,90 (CH₃-25); 15,88 (CH₃-24).

3.2.10. Dados do 1-metoxi-5-metiltetrahidro-1H-piran-2,3,4-triol (3c)



Aspecto físico: Óleo amarelo claro;

IV (filme de NaCl, $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3402, 1250, 1132, 1054.

RMN de ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/\text{ppm}$; 300 MHz) δ : 5,10 (sl, 1H, H-1); 4,51 (m, 1H, H-2); 4,44 (dd, 1H, $J = 3,3$ e 9,3 Hz, H-3); 4,27 (t, 1H, $J = 9,3$ Hz, H-4); 4,06 (m, 1H, H-5); 3,37 (s, 3H, O-CH₃); 1,54 (d, 3H, $J = 6,2$ Hz, CH₃).

RMN de ^{13}C ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/\text{ppm}$; 75 MHz) δ : 103,26 (O-CH-O); 74,46 (HO-CH); 73,29 (HO-CH); 72,78 (HO-CH); 70,30 (O-CH); 55,42 (O-CH₃); 19,32 (CH₃).

HRMS (ESI TOF-MS) : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculado para $[\text{C}_7\text{H}_{14}\text{NaO}_5]^+$: $m/z = 201,0728$, encontrado: $m/z = 201,0734$.

3.3. Resultados e Discussão

Os pericarpos dos frutos de *S. saponaria* L. foram secos, pulverizado e macerados obtendo uma pasta de cor castanha, que posteriormente foi submetida a hidrólise ácida. O esquema de isolamento dos compostos majoritários do extrato hidrolisado está representado na Figura 3.3.1.

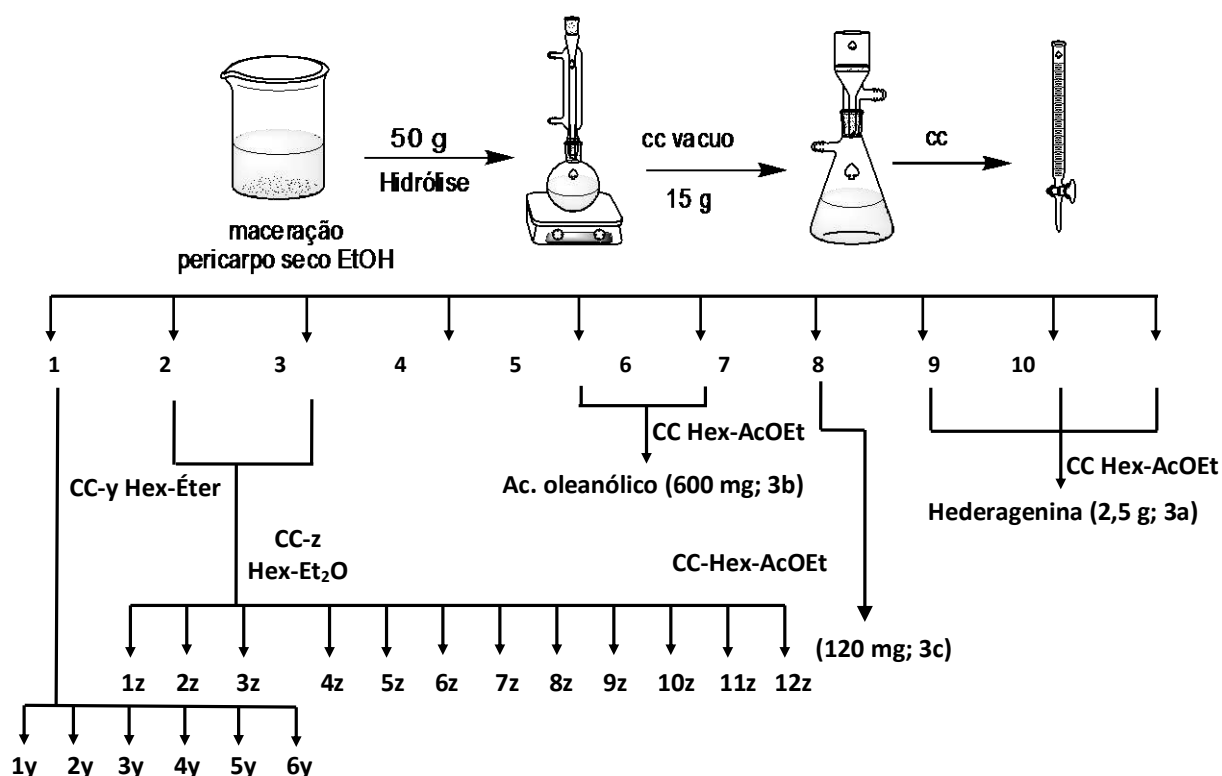


Figura 3.3.1 - Esquema de isolamento dos compostos majoritários do extrato etanólico hidrolisado.

No total foram obtidos três produtos naturais. Do extrato etanólico hidrolisado, foram isolados as agliconas hederagenina (**3a**) e o ácido oleanólico (**3b**), e da fração 7 foi obtida o glicosídeo 1-metoxi-5-metiltetrahydro-1H-piran-2,3,4-triol (**3c**). Adicionalmente, foi obtida uma série de frações contendo constituintes ainda não identificadas. No entanto a quimiotaxonomia desta espécie sugere que poderiam ser sesquiterpenos e triterpenos ligados a ácidos graxos (MURGU e RODRIGUES-FILHO, 2006).

Na segunda hidrólise utilizando a metodologia de Ohgi e colaboradores (1999), foi obtida a hederagenina (**3a**), como sólido branco amorfo (3/ do pericarpo), que foi utilizada para a obtenção de derivados, relatados nos capítulos posteriores.

Uma alíquota do extrato hidrolisado foi derivatizado com BSTFA em piridina a 70 °C por 30 minutos, e o produto dessa reação foi analisado por CG-EM, confirmando a presença da diferentes sapogeninas. A hederagenina (**3a**), aglicona mais abundante, o ácido oleanólico (**3b**) e o eridotriol foram identificados por meio de seus espectros de massas. A fragmentação retro Diels-Alder características para estes triterpenos pentacíclicos (mostrada na Figura 3.3.2) coincidiu com os dados reportados na literatura para triterpenos derivatizados com BSTFA (BURNOUNF-RADOSEVICH *et al.*, 1985) (ver anexos 3.7.1).

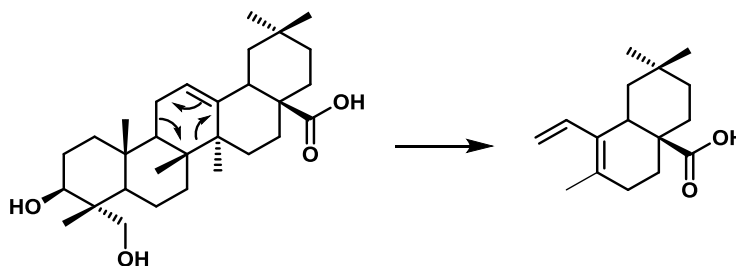


Figura 3.3.2 - Fragmentação retro Diels-Alder característica para triterpenos pentacíclicos.

Os dados espectroscópicos da hederagenina (**3a**) e do ácido oleanólico (**3b**) (Figura 3.3.3) isolados do extrato etanólico hidrolisado, coincidem com os relatados na literatura confirmando o isolamento destas agliconas (PAWAN e DHARA, 1992; KHALIL *et al.*, 2000; BOKE, 2014).

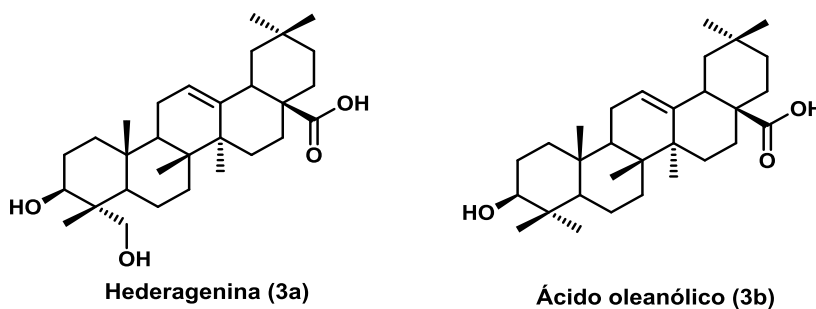


Figura 3.3.3 - Sapogeninas isoladas do extrato etanólico hidrolisado.

O composto 1-metoxi-5-metiltetrahidro-1*H*-piran-2,3,4-triol (**3c**, 120 mg) (Figura 3.3.6) foi isolado da fração 7 do extrato etanólico hidrolisado. O espectro de massa de alta resolução ESI-HRMS (MeOH, $[M+Na]^+$) apresentou $m/z = 201,0734$ com fórmula molecular de $C_7H_{14}NaO_5$. Seu espectro no infravermelho apresenta uma banda correspondente ao grupo hidroxila em 3402 cm^{-1} , bandas correspondentes a C-O de grupos hidroxila e éter em 1250, 1132 e 1054 cm^{-1} . O espectro de RMN de 1H apresentou sinais que integram para 11 hidrogênios: seis atribuídos a dois metila, um duplete a $\delta_H = 1,54$ com uma constante de acoplamento de $J = 6,3\text{ Hz}$ atribuído ao grupo metila ligada ao carbono metínico-5 e um singleto pertencente ao grupo metoxila em $\delta_H = 3,37$. Na região $\delta_H = 4,60\text{--}4,00$ foram observado sinais com diferentes desdobramentos pertencentes a grupos metínicos, todos ligados a oxigênios de hidroxila ou de éteres. O sinal do metino-2 corresponde a um multiplete. O sinal do metino-3 se apresenta como um duplo duplete com constante de acoplamento axial-equatorial $J_{H3-H2} = 3,3\text{ Hz}$ e outra constante axial-axial $J_{H3-H4} = 9,3\text{ Hz}$. O sinal do metino-4 tem um desdobramento de tripleto com constante axial-axial de $J_{H4-H3} = J_{H4-H5} = 9,3\text{ Hz}$. O metino-5 aparece como um multiplete. Em $\delta_H = 5,10$ observou-se o singleto largo correspondente ao hidrogênio-1 anomérico (Figura 3.3.4).

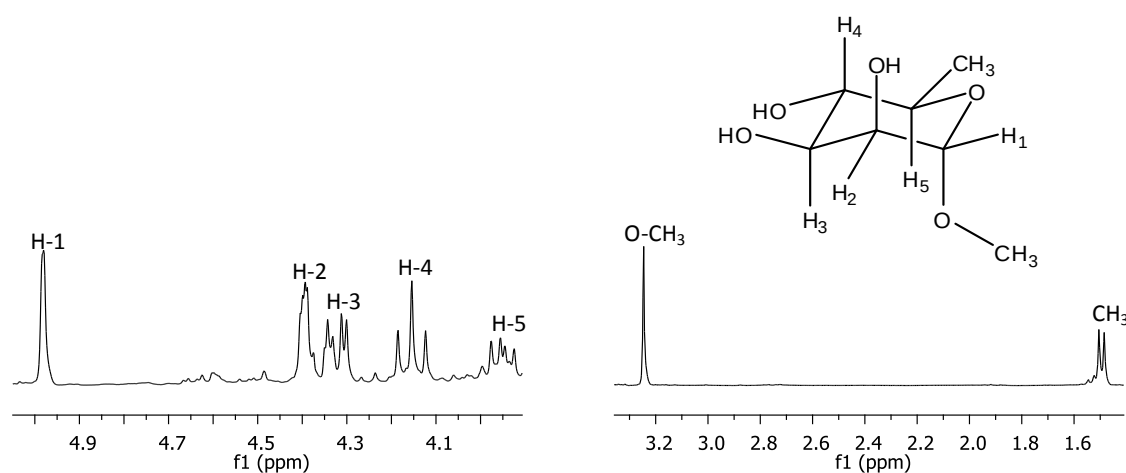


Figura 3.3.4 - Ampliação do espectro de RMN de 1H (C_5D_5N , 300 MHz) do composto **3c**.

O espectro de RMN de ^{13}C apresenta sete sinais de carbonos, duas metilas em $\delta_C = 19,32$ e outro mais desblindado a $\delta_C = 55,42$ ligado a um oxigênio pertencente ao grupo metoxila. Na faixa entre $\delta_C = 75\text{--}70$ observam-se quatro sinais cada um para grupos metínicos ligados a oxigênios e a $\delta_C = 103,26$ o sinal correspondente ao carbono-1 anomérico.

O espectro bidimensional COSY ^1H - ^1H , revela interações relevantes sendo a mais importante a correlações a três ligações dos hidrogênios H-1 com H-2; H-2 com H-3; H-3 com H-4, o hidrogênio-4 com H-5 e os hidrogênios do grupo metila-6 com H-5, (Figura 3.3.5).

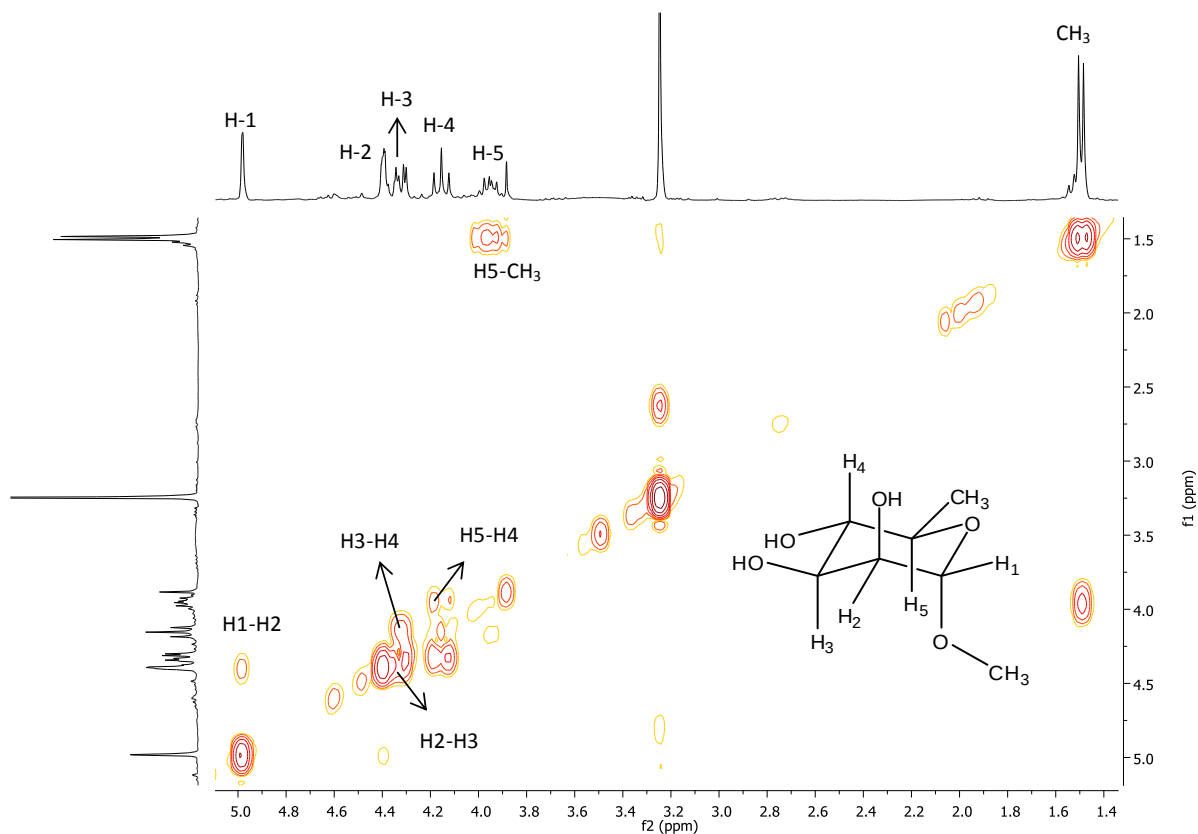


Figura 3.3.5 - Ampliação do espectro COSY ^1H - ^1H do composto **3c**.

As correlações observadas no espectro COSY ^1H - ^1H , e as constantes de acoplamento observada no RMN de ^1H confirmam informações estruturais que, junto com os dados do ESI-HRMS, permitem propor uma estrutura para este produto natural denominado 1-metoxi-5-metiltetrahidro-1*H*-piran-2,3,4-triol (**3c**), (Figura 3.3.6, anexo 3.6.4).

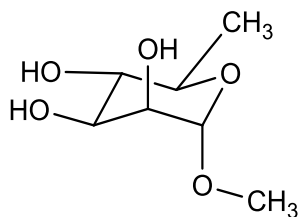


Figura 3.3.6 - 1-metoxi-5-metiltetrahidro-1*H*-piran-2,3,4-triol (**3c**) isolado do extrato etanólico hidrolisado de *S. saponaria* L.

3.4. Conclusões

Por meio da sililação do extrato etanólico hidrolisado do pericarpo do fruto de *S. saponaria* L. foram identificados através de análises de CG-EM as agliconas hederagenina, ácido oleanólico e eridotriol.

Do extrato hidrolisado foram isolados as agliconas hederagenina (**3a**) e ácido oleanólico (**3b**).

Da fração 7 do extrato hidrolisado foi isolado o composto 1-metoxi-5-metiltetrahidro-1*H*-piran-2,3,4-triol (**3c**) até agora não relatado na literatura para esta espécie de planta.

O extrato hidrolisado apresentou material oleoso com aroma agradável cujos constituintes ainda não foram identificados. No entanto, as análises dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C apresentam características de esqueletos sesquiterpenos e triterpenos ligados a ácidos graxos.

A hederagenina é a aglicona mais abundante presente no pericarpo de *S. saponaria* L., que foi utilizada como material de partida para obtenção de diferentes derivados, relatados nos próximos capítulos.

3.5. Referências bibliográficas

- ADEL, M.; SEHNAL, F.; JURZYSTA, M. Effects of alfalfa saponins on the moth *Spodoptera littoralis*. Journal of Chemical Ecology, v. 26, p. 1065-1078, 2000.
- BOKE, N., Aristatosides A-C, hederagenin-type triterpene saponins from *Cephalaria aristata*. Phytochemistry Letters, v. 8, p. 149–155, 2014.
- BURNOUF-RADOSEVICH, M., DELFEL N.E., ENGLAND R. Gas chromatography-mass spectrometry of oleanane and ursane-type triterpenes-application to *chenopodium quinoa* triterpenes Phytochemistry v. 24, p. 2063-2066, 1985.
- GAUTHIER, C., LEGAULT, J., GIRARD-LALANCETTE, K., MSHVILDADZE, V., PICHETTE, A. Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 17, p. 2002-2008, 2009.
- KHALIK, A., MIYASE, T., EL-ASHAAL, H., MELEK, F.R. Triterpenoid saponins from *Fagonia cretica*. Phytochemistry, v. 54, p. 853-859, 2000.
- MAJESTER-SAVORNIN, B., ELIAS, R., DIAZ-LANZA, A.M., BALANSARD, G., GASQUET, M., DELRNAS, F., Saponins of the Ivy Plant, *Hedera helix*, and their Leishmanicidal Activity Planta med. V. 57, p. 260-262, 1991.
- MURGU, M., RODRIGUES-FILHO, E. Dereplication of glycosides from *Sapindus saponaria* using liquid chromatography-mass spectrometry. J. Braz. Chem. Soc., v. 17, p. 1281-1290, 2006.
- OHGI, T., YOSHIFUSA, H., KANDORI, K. Preparation of triterpene derivatives and medicinal compositions for treatment of nephritis. US 5885992. 1999.
- PAWAN, A., DHARA M, C. ¹³C NMR spectroscopy of oleanane triterpenoids. Progress in NMR Spectroscopy, v. 24, p. 1-90, 1992.

SAHA, S., WALIA, S., KUMAR, J., BALRAJ, P. Structure-biological activity relationships in triterpenic saponins: the relative activity of protobassic acid and its derivatives against plant pathogenic fungi. *Pest Manag Sci.*, v. 66, p. 825–831, 2010a.

SAHA, S., WALIA, S., KUMAR, J., DHINGRA, S., PARMAR, S. Screening for Feeding Deterrent and Insect Growth Regulatory Activity of Triterpenic Saponins from *Diploknema butyracea* and *Sapindus mukorossi*. *J. Agric. Food Chem.*, v. 58, p. 434–440, 2010b.

SUN, H., FANG, S., WANG, W., HU, C. Structure-activity relationships of oleanane- and ursane type triterpenoids. *Botanical Studies*, v. 47, p. 339-368, 2006.

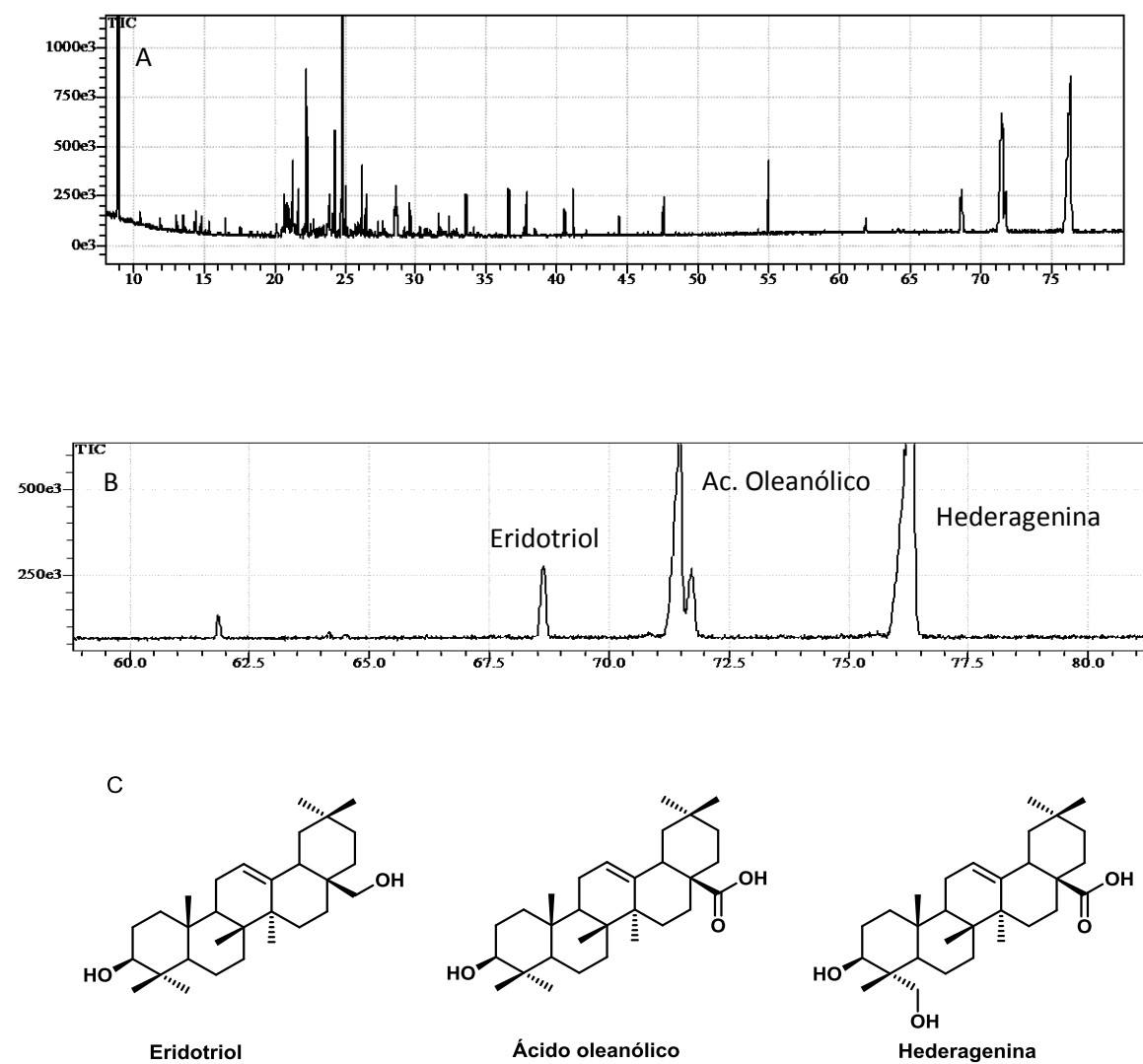
TAKAGI, K., PARK, K., KATO, H. Antiinflammatory activities of hederagenin and crude saponin isolated from *Sapindus mukorossi* Gaertn. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 28, p. 1183-1188, 1980.

TIMON-DAVID, P., JULIEN, J., GASQUET, M., BALANSARD, G., BERNARD, P. Research of antifungal activity from several active principle extracts from climbing-ivy: *Hedera helix* L. *Ann Pharm Fr.*, v. 38, p. 545-52, 1980.

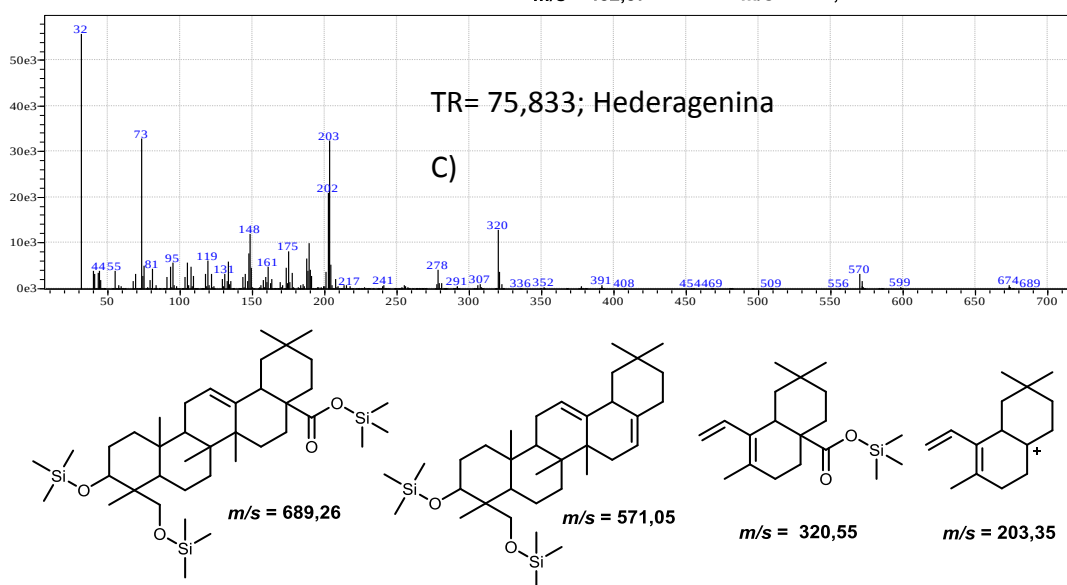
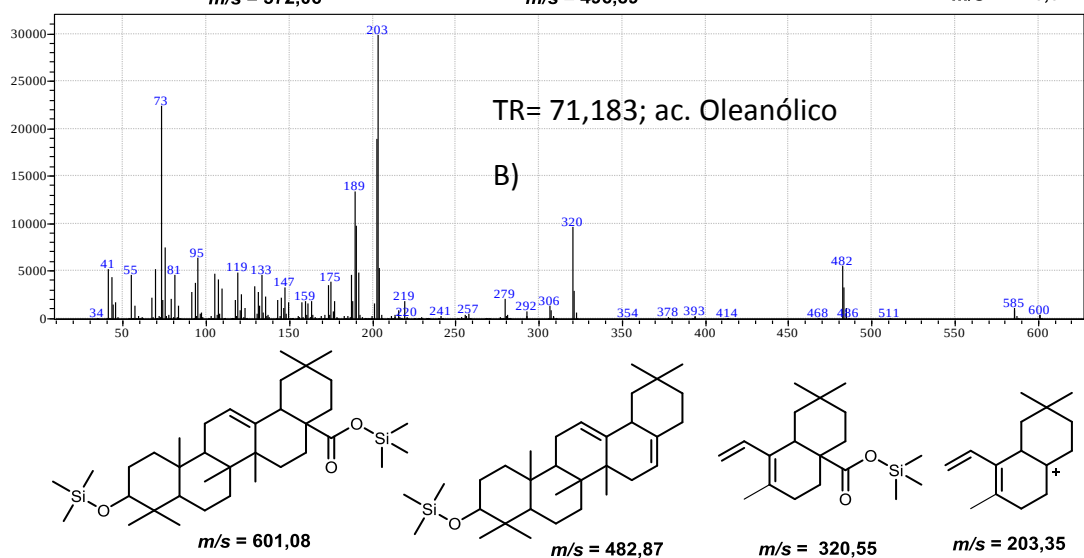
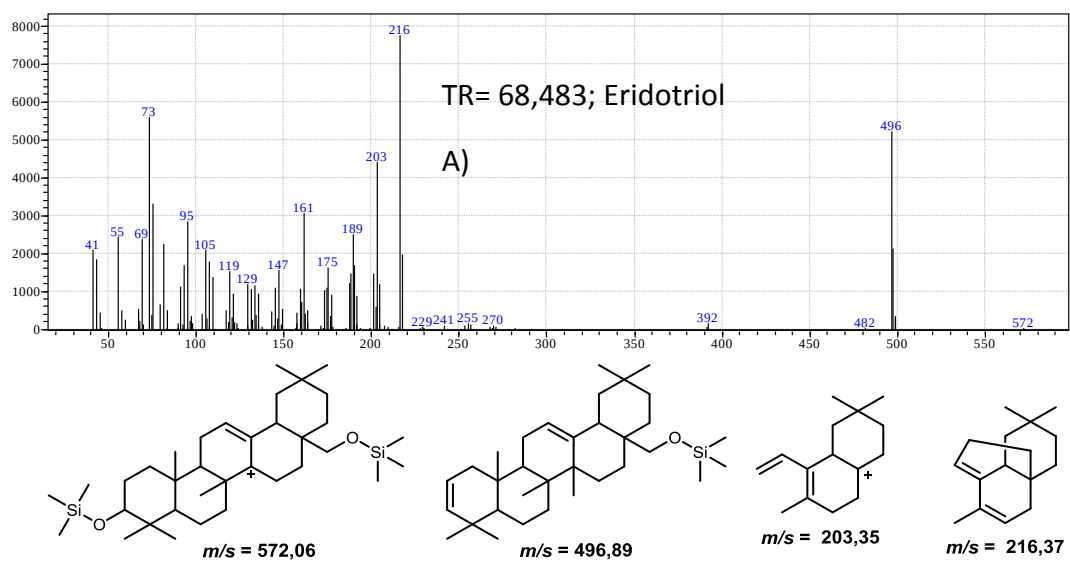
TROTIN, F., BÉZANGER-BEAUQUESNE, L., PINKAS, M., ROBELET, A. Research concerning two plants of Malagasy folk medicine. *Cussonia bojeri* (Araliacees), *Dodonaea madagascariensis* (Sapindacees). *Ann Pharm Fr.*, v. 30, p. 555-560, 1972.

3.6. Anexos

3.6.1. Cromatograma e espectros de massas das sapogeninas identificadas no extrato etanólico hidrolisado do pericarpo do fruto de *S. saponaria* L.

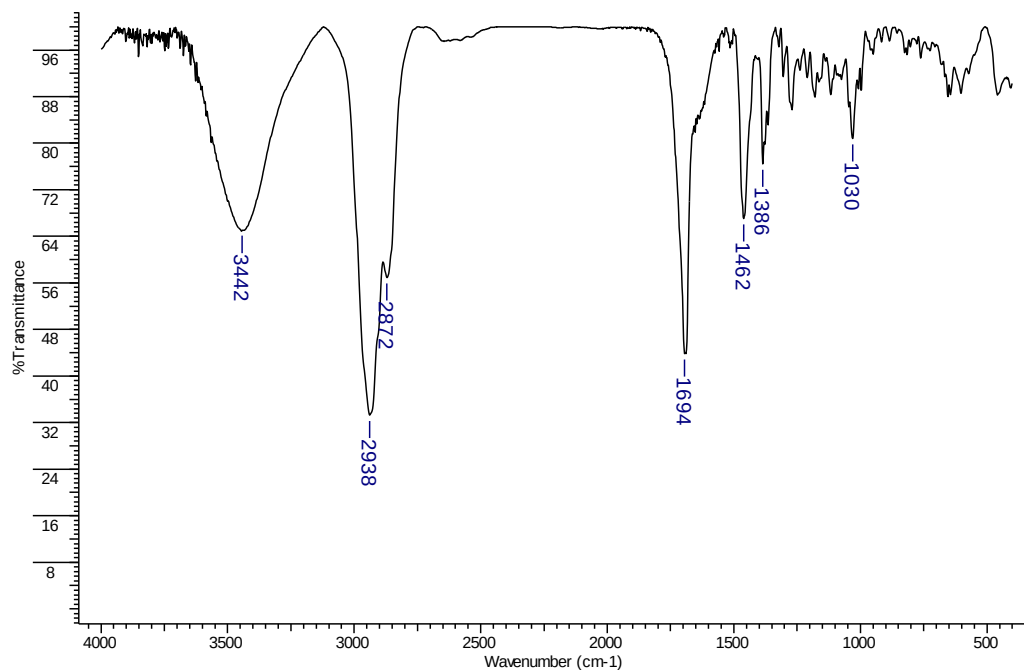


A) Cromatograma do extrato etanólico hidrolisado e derivatizado com BSTFA, B) Ampliação do cromatograma, C) Estrutura dos compostos identificados.

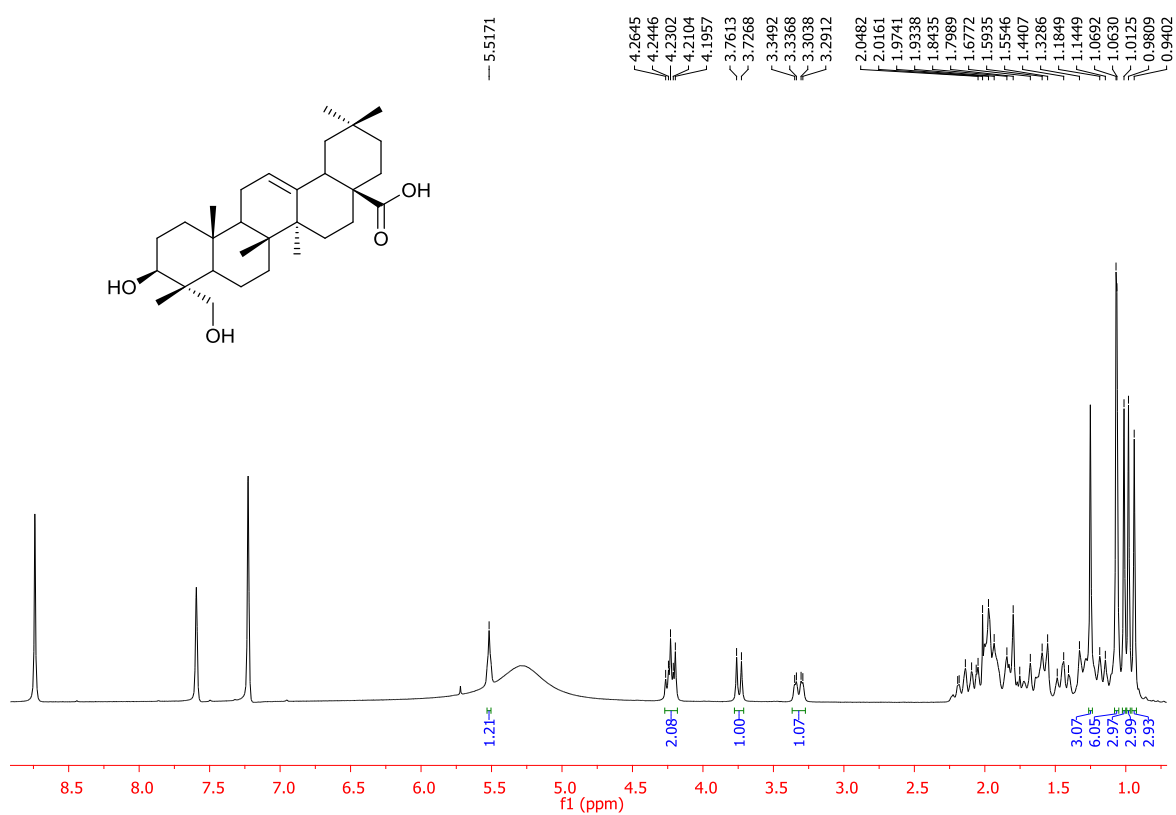


Espectros de massas dos sinais majoritários do cromatograma do extrato etanólico hidrolisado e derivatizado com BSTFA: A) Eridotriol; B) Ac. Oleanólico; C) Hederagenina.

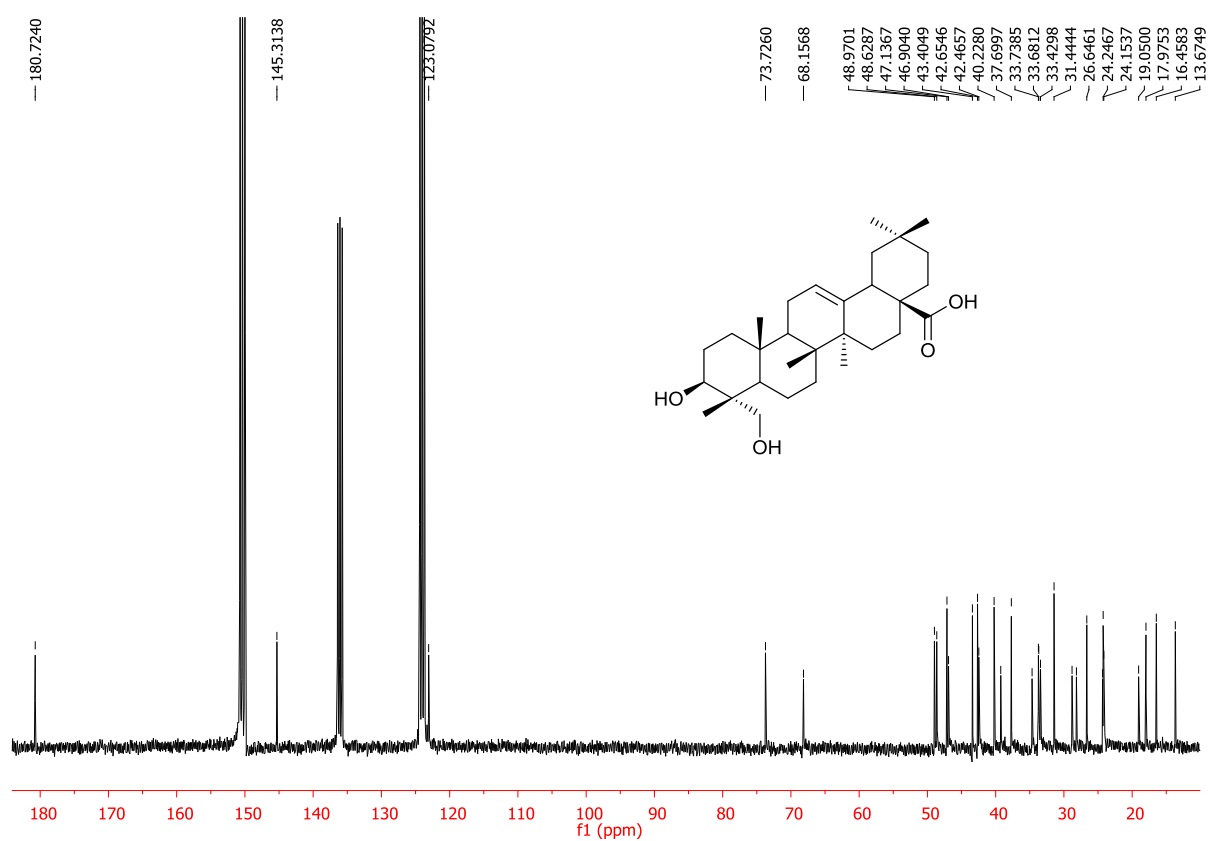
3.6.2. Dados referentes ao ácido (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oico (hederagenina, 3a)



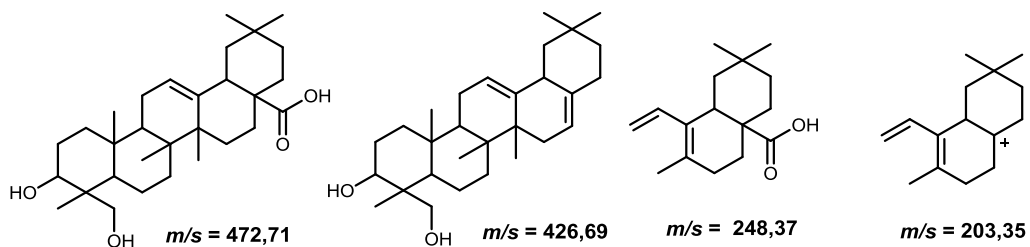
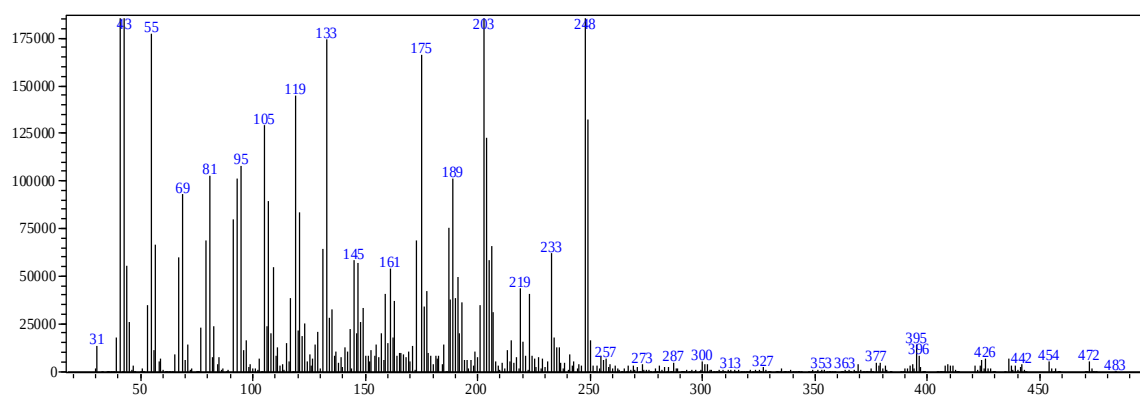
Espectro no Infravermelho (filme KBr)



Espectro de RMN de ¹H (C₅D₅N, 300 MHz)

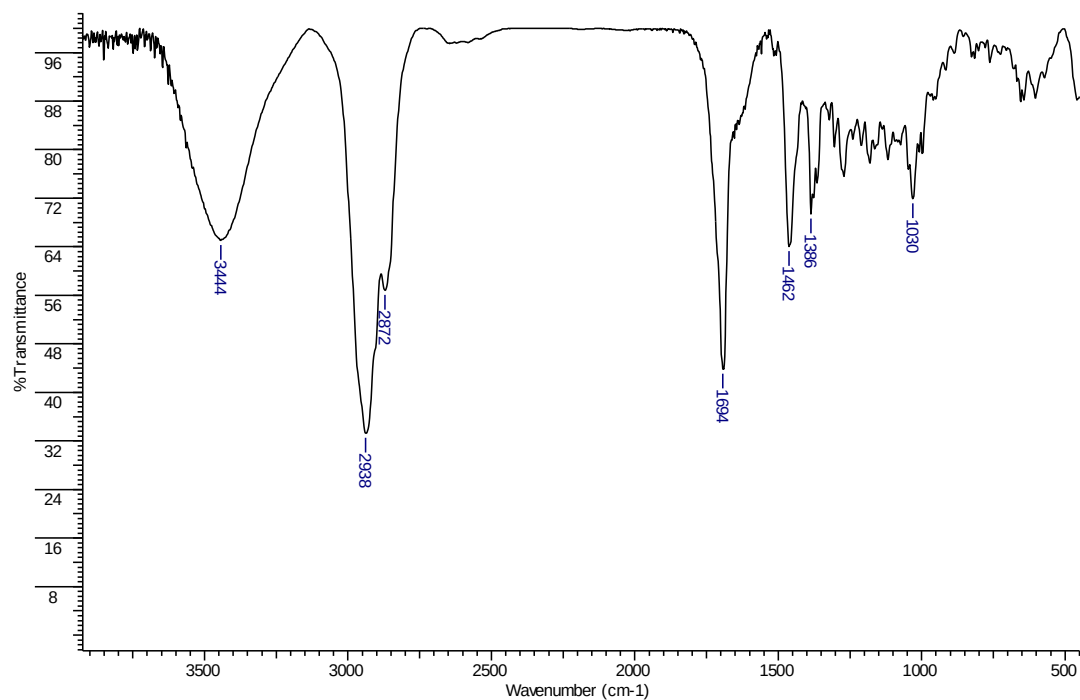


Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 75 MHz)

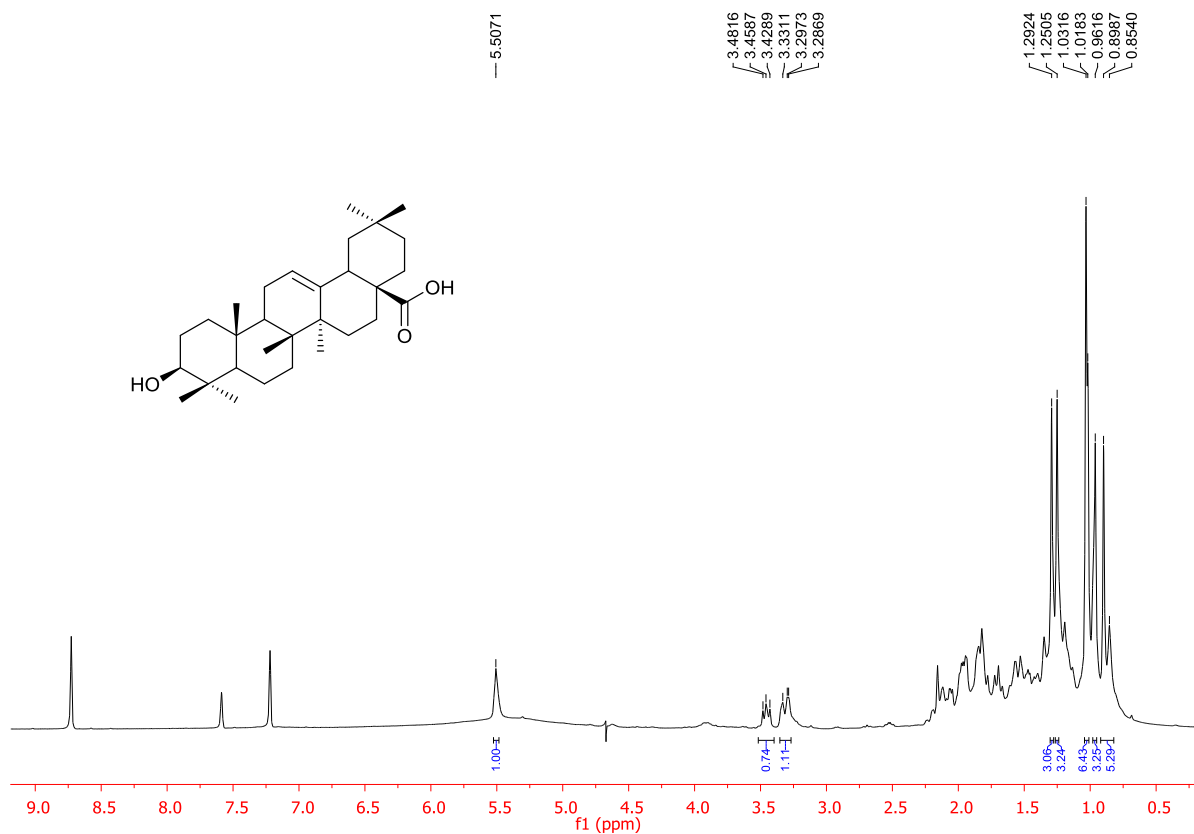


Espectro de massas IE (70 mv), inserção direta CG-EM

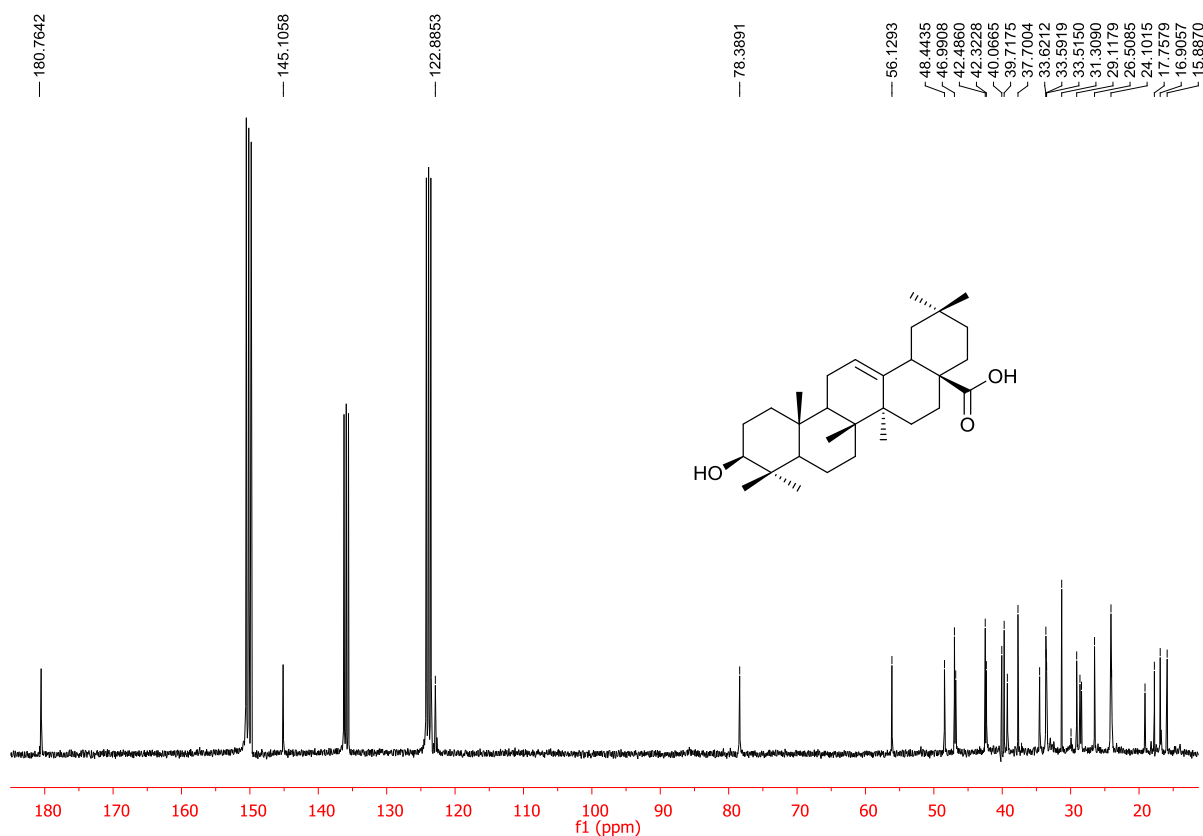
3.6.3. Dados referente ao ácido (3 β)3-hidroxiolean-12-en-28-oico (ácido oleanólico 3b)



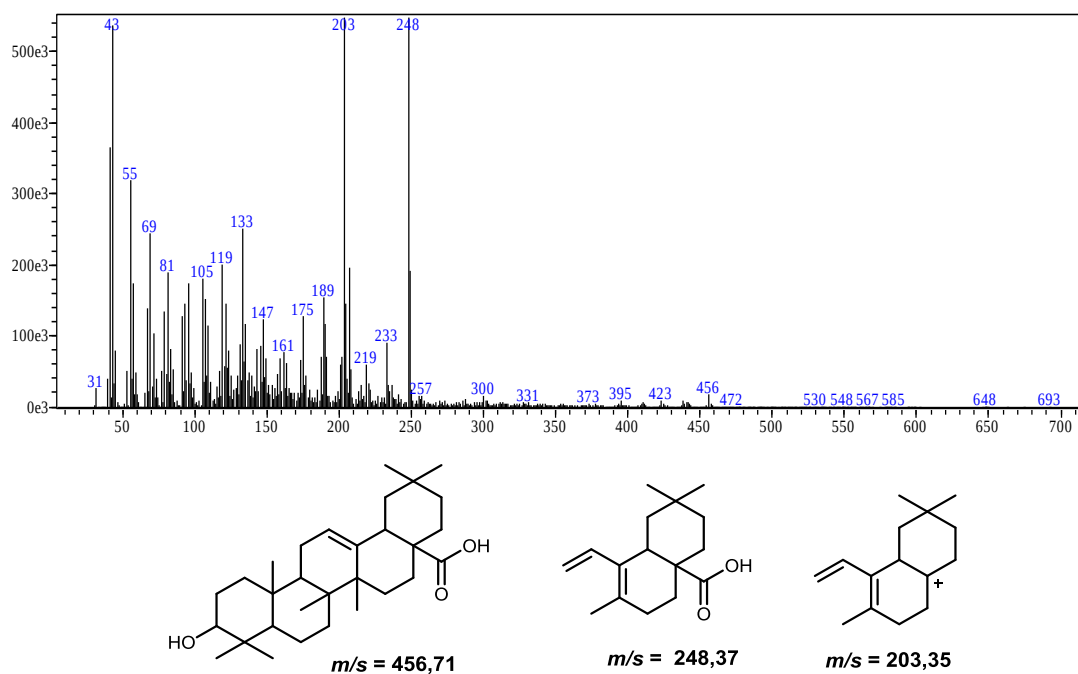
Espectro no Infravermelho (filme KBr)



Espectro de RMN de ¹H (C₅D₅N, 300 MHz)

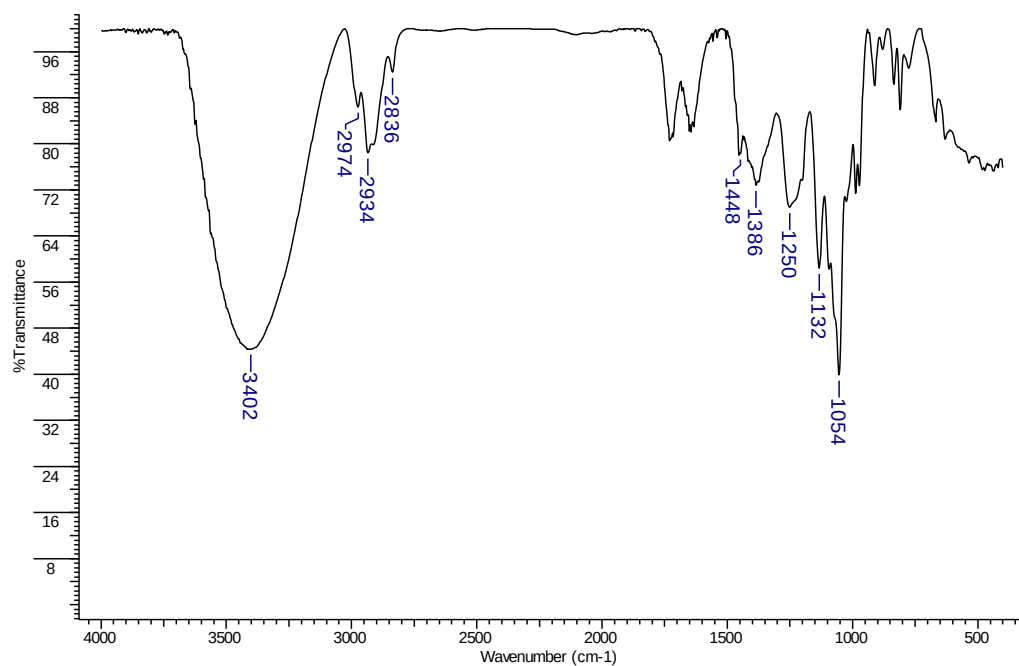


Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 75 MHz)

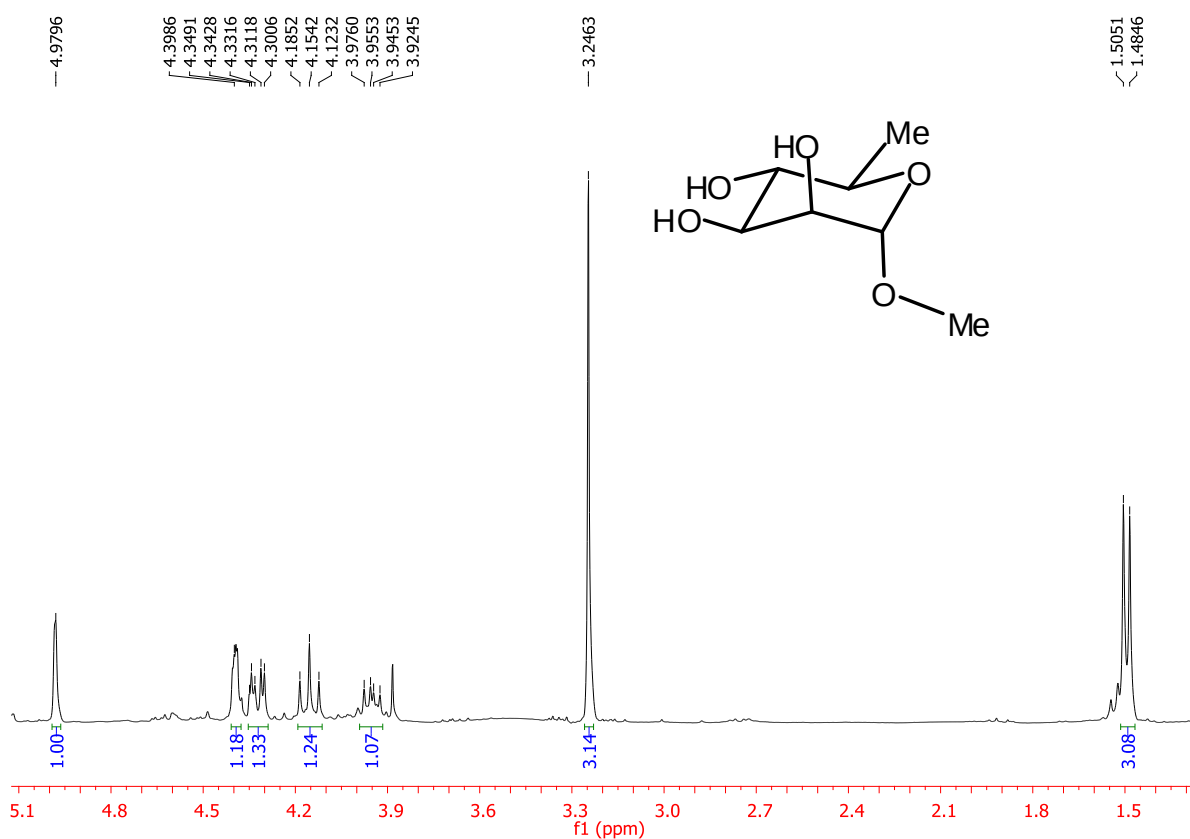


Espectro de massas IE (70 mv), inserção direta CG-EM

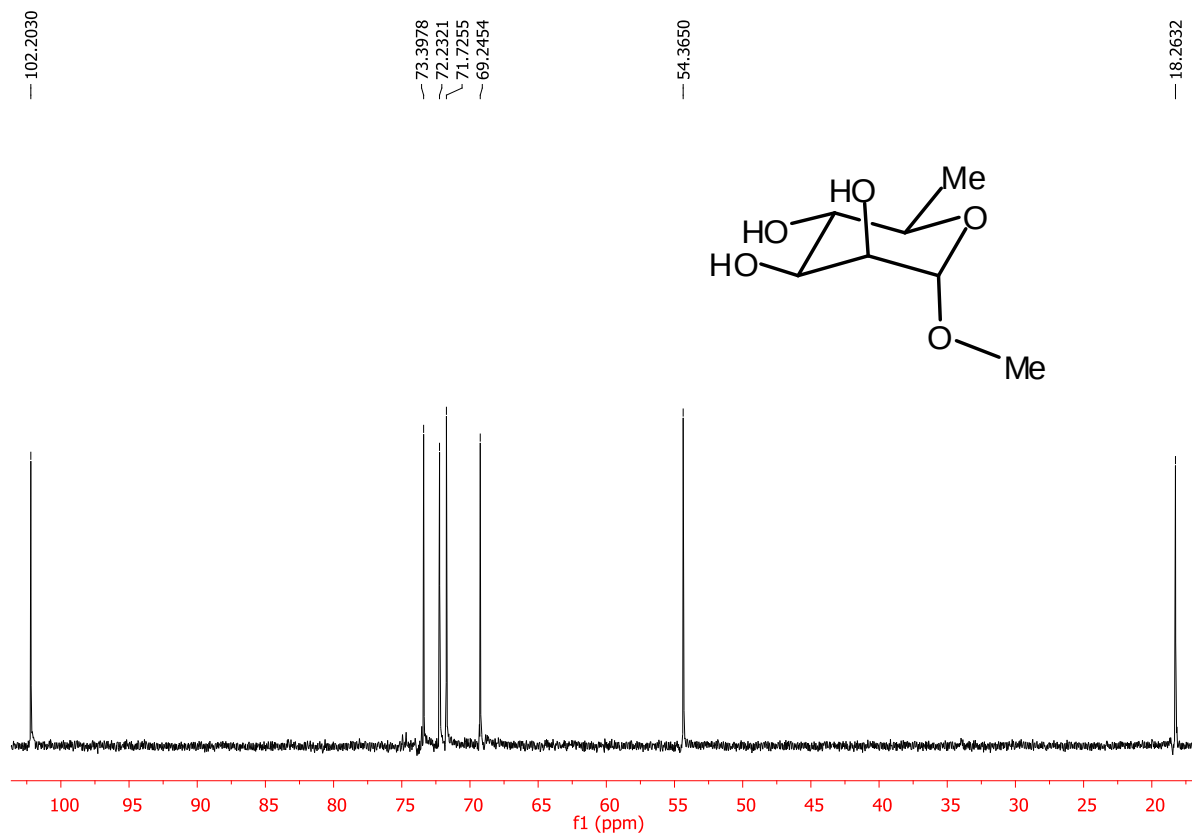
3.6.4. Dados referentes ao 1-metoxi-5-metiltetrahidro-1H-piran-2,3,4-triol (3c)



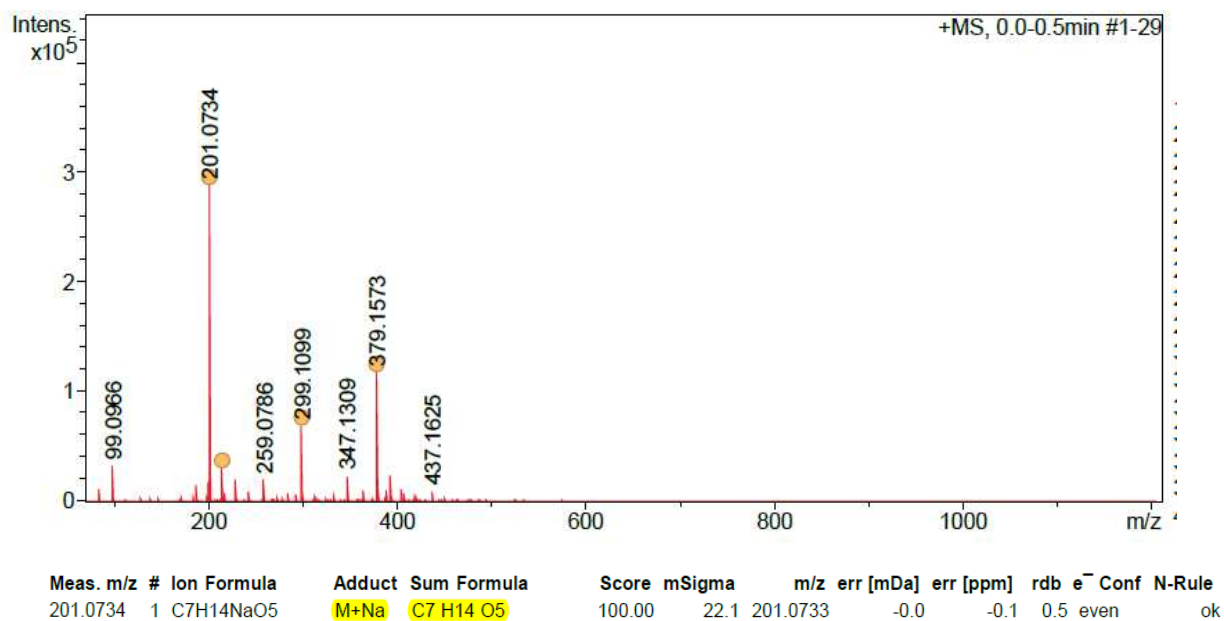
Espectro no infravermelho (Filme de NaCl)



Espectro de RMN de ¹H (C₅D₅N, 300 MHz)



Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 75 MHz)



Espectro HRMS-ESI (MeOH, $[\text{M}+\text{Na}]^+$)

4. CAPÍTULO 3

Derivatização da hederagenina para a formação de ésteres e amidas substituídas no carbono-28 e sua atividade citotóxica.

4.1. Introdução

Sapindus saponaria L. tem sido muito pesquisada pela presença de saponinas em seus frutos e apresentam a hederagenina, um triterpeno pentacíclico do tipo oleanico, como a aglicona mais abundante.

Os triterpenoides são metabólitos de oligômeros de pirofosfato isopentenila e representam o maior grupo de compostos fitoquímicos. Estima-se que mais de 20.000 triterpenoides existam na natureza (LIBY *et al.*, 2007). São amplamente encontrados em frutos, legumes e plantas medicinais (SALVADOR, 2010).

Os triterpenoides são biossintetizados nas plantas pela ciclização do esqualeno, um triterpeno tipo hidrocarboneto e precursor de todos os esteróides (PHILLIPS *et al.*, 2006). Eles podem ainda ser subclassificados em diversos grupos, incluindo cucurbitanos, cicloartanos, dammaranos, friedelanos, holostanos, hopanos, isomalabaricanos, lanostanos, limonoides, lupanos, oleanos, protostanos, esqualeno, tirucallanos, ursanos e compostos diversos (SETZER e SETZER, 2009; PETRONELLI *et al.*, 2009; MULLAUER *et al.*, 2010).

Alguns triterpenoides são usados para fins medicinais em muitos países como: anti-inflamatórios, analgésicos, anti-piréticos, hepatoprotetivo, cardiotônico, e por seus efeitos sedativos e tônicos (OVENSNA *et al.*, 2004; BISHAYEE *et al.*, 2011). Estudos recentes não só confirmaram algumas das propriedades farmacológicas já citadas de vários triterpenoides, mas também uma variedade de atividades biológicas adicionais, incluindo anti-oxidante, anti-microbiana, anti-viral, anti-alérgica, anti-prurítica, anti-angiogênica, entre outras (SULTANA e ATA, 2008; SHAH *et al.*, 2009). Um número crescente de triterpenoide exibe citotoxicidade contra uma variedade de células cancerosas sem manifestar qualquer toxicidade em células normais (SETZER e SETZER, 2003; PETRONELLI *et al.*, 2009; LASZCZYK, 2009). Eles também demonstram a eficácia antitumoral em modelos animais pré-clínicos de câncer (SETZER e SETZER, 2009; LASZCZYK, 2009).

Um grande número de triterpenoides foram derivatizados por modificação estrutural de compostos naturais para a otimização de bioatividade, e alguns destes análogos semi-sintéticos são usados como potentes anti-inflamatórios e anti-cancerígenos (LASZCZYK, 2009). A eficácia antitumoral de vários triterpenos está atualmente sendo avaliado em ensaios clínicos de fase I (BISHAYEE *et al.*, 2011).

Estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que os triterpenos pentacíclicos causam inibição sobre a proliferação celular e o crescimento do tumor em uma variedade de cânceres humanos (SALVADOR, 2010). Estruturalmente, alguns dos terpenoides são semelhantes aos hormônios humanos e, portanto, têm despertado interesse no desenvolvimento de medicamentos que tenham como alvo os cânceres hormônio-dependentes, tais como câncer da mama e da próstata (YANG e DOU, 2010). Os mecanismos pelos quais estes compostos exibem a sua atividade anti-câncer incluem a inibição do proteassoma, o NF- κ B, e a proteína anti-apoptótica Bcl-2 (YANG e DOU, 2010; WANG *et al.*, 2009).

4.1.1. O mecanismo antitumoral dos triterpenos

Inibição da proliferação de células tumorais

A base citológica do crescimento do tumor é a proliferação descontrolada de células tumorais. O motivo para a proliferação descontrolada de células tumorais é principalmente devido ao seu potencial relativo de crescimento de forma independente. Portanto, matar as células tumorais com potencial capacidade de crescimento descontrolado é imprescindível durante a terapia. Enquanto isso, o requisito básico de drogas antitumorais é efetivamente inibir a capacidade de proliferação de células tumorais (ZHANG *et al.*, 2014).

Os triterpenos tipo oleano e ursano apresentam forte efeito inibidor sobre a proliferação de linhagens de células HeLa (WANG *et al.*, 2008; YOSHIKAWA *et al.*, 2005).

Indução do apoptose de células tumorais

O apoptose é o processo que provoca a morte celular através da ativação de uma série de sinais de morte, ao mesmo tempo, é bastante diferente da necrose celular. Apoptose de células tumorais com defeito induz constantemente a proliferação do tumor além do tempo

de vida normal, enquanto isso ajuda as células tumorais evitando a morte celular por isquemia ou estresse oxidativo. Portanto, uma das estratégias importantes para inibir o crescimento do tumor é o de induzir apoptose de células tumorais (ZHANG *et al.*, 2014).

O ácido oleanólico, pode induzir apoptose das células NB4. O mecanismo molecular é o aumento da expressão de mRNA-Bax e diminuição da expressão de Bcl-2 mRNA, ativando a cisteína-proteinase, especificamente no caspase-3 do ácido aspártico e caspase-9 (LI *et al.*, 2013). Além disso, o ácido oleanólico pode inibir a proliferação de células tumorais através da inibição da sinalização de Akt/mTOR (WANG *et al.*, 2013).

O bloqueio do ciclo da célula tumoral

A ocorrência de tumor está associada à regulação anormal do ciclo celular. A mutação de genes supressores tumorais e oncogênicos levam à proliferação do ciclo celular fora de controle e conduz a uma proliferação infinita de células, levando à formação de tumores. Regulação do crescimento e diferenciação celular está intimamente relacionada com o ciclo celular. Portanto, com o entendimento aprofundado do ciclo celular, a visão de que "o câncer pode ser uma classe de doenças do ciclo celular" é levantada e a regulação do ciclo celular tornou-se um ponto extremamente importante na investigação de tumores (ZHANG *et al.*, 2014).

Em experimentos *in vivo* e *in vitro* foi revelado que o ácido oleanólico não só pode desencadear a apoptose de células HepG2, mas também o bloqueio do ciclo celular na fase G2/M por meio de diminuição da atividade da ciclina Bi/cdc2 (KESSLER *et al.*, 2007).

A prevenção da invasão das células tumorais e metástases

A invasão e metástase das células tumorais são símbolos de malignidade que também são as fases mais perigosas do processo de ocorrência, desenvolvimento e evolução do tumor. O objetivo principal na prevenção da invasão tumoral e metástase é bloquear especificamente uma ou mais etapas do processo tumoral (ZHANG *et al.*, 2014).

A glicirrizina, o ácido 18- β -glicirretínico, o ácido ursolínico e o ácido oleanólico (Figura 4.1.1) são terpenoides de uso comum na medicina chinesa.

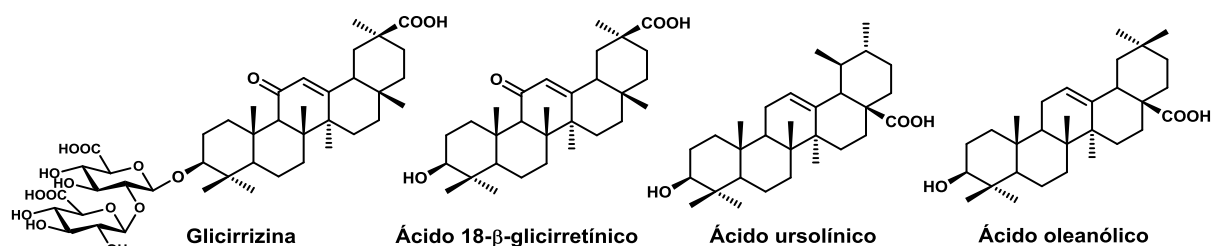


Figura 4.1.1 - Estruturas de terpenoides usados na medicina chinesa.

Alguns estudos evidenciaram que todas as quatro substâncias têm efeitos múltiplos em linhagem de células de câncer do pulmão altamente metastático (PGCL3). O número de formação de colônias de células-PGCL3 em ágar, a adesão das células de laminina, a capacidade de migração e da secreção de catepsina B foram todas significativamente reduzidas (HUANG *et al.*, 2003).

A inibição da angiogênese tumoral

O irrestrito crescimento invasivo e metástase de um tumor maligno são dependentes de angiogênese vascular. Novos vasos sanguíneos formados fornecem alimento e oxigênio para o tumor. Os capilares parácrino das células endoteliais também afetam o crescimento do tumor. Por sua vez, as células tumorais produzem fatores angiogênicos que estimulam a proliferação de células endoteliais. Com base nestes fatos, a inibição da angiogênese tumoral pode prevenir eficazmente o crescimento do tumor e cortar a forma de metástase tumoral, induzindo a regressão ou latência do tumor (ZHANG *et al.*, 2014). O ácido ursolínico (Figura 4.1.1) pode reduzir a densidade microvascular intratumoral em camundongos com câncer colorretal. Por conseguinte, os triterpenos podem inibir a angiogênese do tumor através da inibição da expressão do fator de crescimento endotelial vascular, desta forma podem alcançar a meta de antitumoral (LIN *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2014).

Até o momento, os tumores tornaram-se muito comuns no ser humano. Desenvolvimento de drogas anti-câncer eficientes e de baixa toxicidade é um dos objetivos mais urgentes no campo da medicina. Compostos derivados de triterpeno possuem as características de baixa toxicidade natural, de alta eficiência, o que permite que seja uma droga antitumoral promissora (WANG *et al.*, 2013).

Um estudo QSAR realizado por SIEWERT e colaboradores (2014), usando vários ésteres alifáticos e amidas na posição C-28 do ácido maslínico (tritepeno oleanólico) revelou que a presença de um grupo doador de prótons na posição C-28 parece desfavorável para a obtenção de uma boa citotoxicidade. A presença de um resíduo lipofílico, contudo, melhorou a atividade anti-câncer dos compostos, mantendo ainda a capacidade de desencadear a apoptose. Tal como mostrado na Figura 4.1.2, os grupos volumosos parecem ser capazes de interagir muito bem, com o até agora desconhecido intracelular alvo/receptor (SIEWERT *et al.*, 2014).

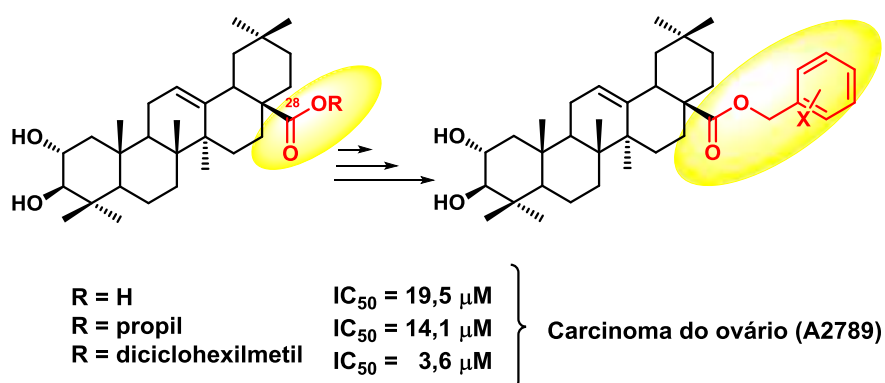


Figura 4.1.2 - Estrutura do ácido maslínico (R =H) e ésteres citotóxicos usados contra a linhagem tumoral A2789 (SIEWERT *et al.*, 2014).

Assim, neste capítulo descreve-se a síntese e avaliação da atividade antitumoral de alguns ésteres benzílicos substituídos e amidas substituídas no carbono-28 da hederagenina (**3a**), sapogenina mais abundante no pericarpo do fruto de *S. saponaria* L.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Obtenção da Hederagenina

A Obtenção da hederagenina esta descrita no capítulo 2.

4.2.2. Sínteses

Os reagentes empregados na obtenção dos produtos, a exceção de hederagenina, foram de grau analítico e não passaram por purificação prévia.

A determinação das faixas de fusão foi realizada em aparelho MQAPF-302 os valores não foram corrigidos. Os espectros na região do infravermelho foram obtidos por meio de pastilha de KBr contendo 1/ (m/m) do composto, em espectrômetro Perkin Elmer Spectrum 1000. As absorções foram relatadas em número de ondas $\bar{\nu}$ (cm^{-1}). Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C foram obtidos em aparelho Varian, Mercury 300 MHz e 75 MHz, respectivamente. As análises massa de alta resolução foram realizadas num equipamento ESI-QTOF, maXisETD, Bruker. A Análise Elemental foram medidas numa unidade de Foss-Heraeus Vario EL. A evolução das reações foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD), em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ 0,2 mm de espessura (Merck). O desenvolvimento da cromatografia em camada delgada foi visualizado sob luz ultravioleta ou por pulverização com ácido fosfomolibdico 10/ de EtOH, seguido de aquecimento. A cromatografia flash em coluna (20 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro) foi realizada usando gel de sílica de 230-400 mesh (Merck).

Síntese dos ésteres da hederagenina

Procedimento geral

A um balão bitubulado de fundo redondo (25 mL), adicionam-se hederagenina (1 equiv.) em 5 mL de DMF, 5 equiv. de K_2CO_3 e brometo de benzila substituído (2 equiv.). O sistema foi colocado sob agitação magnética a temperatura ambiente por 18 horas. A mistura foi lavada com solução aquosa de HCl (5/), água e solução saturada de cloreto de sódio por (2x50 mL) e extraído com AcOEt. Em seguida a solução foi seca com Na_2SO_4 anidro e filtrada. O filtrado foi concentrado num evaporador rotativo, sob pressão reduzida. O resíduo foi

purificado por cromatografia em coluna (sílica gel; Hex-AcOEt) e os compostos obtidos foram caracterizados por meio de métodos espectroscópicos.

Procedimento para a formação de (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de benzotriazol (4u).

A um balão bitubulado de fundo redondo (25 mL), adicionaram hederagenina (120 mg) e TBTU (115 mg) em THF (10 mL). Em seguida foram adicionados 70 μ L de DIPEA, e o sistema foi colocada sob agitação magnética por 3 horas a temperatura ambiente. Terminada a reação, o precipitado foi separado por filtração. A fase orgânica foi lavada com água e solução saturada de NaCl (2x50 mL) e extraído com AcOEt. Em seguida foi seca com Na₂SO₄ anidro e filtrada. O filtrado foi concentrado num evaporador rotativo, sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (sílica gel; Hex-AcOEt).

Na Tabela 4.2.1 são apresentadas as quantidades de reagentes empregadas na formação de ésteres da hederagenina (4a-x).

Tabela 4.2.1 - Reagentes e condições para o preparo dos derivados **4a-x** a temperatura ambiente.

R-Br Massa (mg; mmol)	Hederagenina Massa (mg; mmol)	Tempo de reação (h)	Mistura de eluente (cromatografia em coluna)	Produto	Rendimento mg; mmol; /
Brometo de benzila (80; 0,46)	(100; 0,23)	18	Hex:AcOEt (2:1)	4a	66; 0,11; 56
Brometo de <i>o</i> - nitrobenzila (100; 0,46)	(100; 0,23)	18	Hex: AcOEt (3:1)	4b	56; 0,09; 43
Brometo de <i>o</i> - bromobenzila (115; 0,46)	(100; 0,23)	18	Hex: AcOEt (3:1)	4c	74; 0,11; 55
Brometo de pentafluorobenzila (115; 0,46)	(100; 0,23)	18	Hex: AcOEt (2:1)	4d	26; 0,04; 18
Brometo de <i>o</i> - clorobenzila (95; 0,46)	(100; 0,23)	18	Hex: AcOEt (2:1)	4e	96; 0,16; 76
Brometo de <i>o</i> - metilbenzila (85; 0,46)	(100; 0,23)	18	Hex: AcOEt (2:1)	4f	105; 0,18; 86

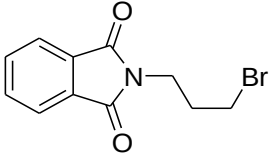
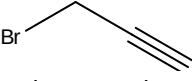
Tabela continua..

R-Br Massa (mg; mmol)	Hederagenina Massa (mg; mmol)	Tempo de reação (h)	Mistura de eluente (cromatografia em coluna)	Produto	Rendimento mg; mmol; /
Brometo de 2,6- diclorobenzila (110; 0,46)	(100; 0,23)	18	Hex: AcOEt (2:1)	4g	100; 0,15; 75
Brometo de <i>o</i> - flurobenzila (90; 0,47)	(100; 0,23)	18	Hex: AcOEt (2,5:1)	4h	70; 0,12; 57
Brometo de 2,4- difluorobenzila (100; 0,48)	(100; 0,23)	18	Hex: AcOEt (2:1)	4i	48; 0,08; 38
Brometo de 2,6- difluorobenzila (100; 0,48)	(100; 0,23)	18	Hex: AcOEt (2:1)	4j	100; 0,16; 79
Brometo de <i>m</i> - nitrobenzila (100; 0,46)	(100; 0,23)	18	Hex: AcOEt (2:1)	4k	61; 0,10; 47
Brometo de <i>m</i> - clorobenzila (95; 0,46)	(100; 0,23)	18	Hex: AcOEt (2,5:1)	4l	45; 0,07; 35

Tabela continua..

R-Br Massa (mg; mmol)	Hederagenina Massa (mg; mmol)	Tempo de reação (h)	Mistura de eluente (cromatografia em coluna)	Produto	Rendimento mg; mmol;/
Brometo de <i>m</i> - metilbenzila (85; 0,46)	(100; 0,23)	18	Hex: AcOEt (2:1)	4m	65; 0,11; 53
Brometo de <i>m</i> - bromobenzila (115; 0,46)	(100; 0,23)	18	Hex: AcOEt (2:1)	4n	75; 0,11; 55
Brometo de <i>p</i> - fluorobenzila (90; 0,47)	(100; 0,23)	18	Hex: AcOEt (1:1)	4o	110; 0,19; 90
Brometo de <i>p</i> - bromobenzila (115; 0,46)	(100; 0,23)	18	Hex: AcOEt (2:1)	4p	110; 0,17; 81
Brometo de <i>p</i> - clorobenzila (95; 0,46)	(100; 0,23)	18	Hex: AcOEt (2:1)	4q	118; 0,19; 93
Brometo de <i>p</i> - nitrobenzila (100; 0,46)	(100; 0,23)	18	Hex: AcOEt (2:1)	4r	75; 0,12; 58

Tabela continua..

R-Br Massa (mg; mmol)	Hederagenina Massa (mg; mmol)	Tempo de reação (h)	Mistura de eluente (cromatografia em coluna)	Produto	Rendimento mg; mmol;/
Brometo de <i>p</i> - metilbenzila (85; 0,46)	(100; 0,23)	18	Hex: AcOEt (2:1)	4s	40; 0,07; 32
Brometo de 3,5- dimetoxibenzila (110; 0,47)	(100; 0,23)	18	Hex: AcOEt (2:1)	4t	90; 0,14; 68
TBTU (115; 0,35)	(100; 0,23)	3	Hex: AcOEt (2:1,5)	4u	115; 0,19; 92
1(2-bromoetil)1,3- dioxano (90; 0,46)	(100; 0,23)	18	Hex: AcOEt (2:1)	4v	105; 0,17; 84
 (125; 0,46)	(100; 0,23)	18	Hex: AcOEt (2:1)	4w	107; 0,16; 76
 (55; 0,46)	(100; 0,23)	18	Hex: AcOEt (2:1)	4x	100; 0,19; 92

Síntese das amidas da hederagenina

Procedimento geral

A um balão bitubulado de fundo redondo (25 mL), adicionou-se 0,25 mmol de TBTU e 0,45 mmol de DIPEA, e uma mistura 0,23 mmol de hederagenina e 0,50 mmol da amina em 8 mL de THF. O sistema foi colocado sob agitação vigorosa por 4 horas a temperatura ambiente e atmosfera de nitrogênio. A seguir, a mistura foi filtrada e o resíduo lavado com água e com solução saturada de NaCl (2x50 mL) e extraído com AcOEt. Em seguida foi secada em Na₂SO₄ anidro e filtrada. O filtrado foi concentrado em evaporador rotativo, sob pressão reduzida, logo o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (sílica gel; Hex-AcOEt) e os produtos obtidos foram caracterizados por meio de métodos espectroscópicos e espectrométricos.

Procedimento para a formação do composto 5i

A um balão bitubulado de fundo redondo (25 mL), adicionou-se 0,23 mmol do composto **4u**, 0,24 mmol de Na₂CO₃ e 0,50 mmol do aminoácido em 8 mL de THF. O sistema foi colocado sob agitação vigorosa por 2 horas a temperatura ambiente sob atmosfera de nitrogênio. Logo a mistura foi filtrada e o resíduo lavado com água e solução saturada de NaCl (2x50 mL) e extraído com AcOEt. Em seguida foi secada em Na₂SO₄ anidro e filtrada. O filtrado foi concentrado em evaporador rotativo, sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (sílica gel; Hex-AcOEt).

Na Tabela 4.2.2 são apresentadas as quantidades de reagentes empregadas na formação de amidas derivados da hederagenina (**5a-i**).

Tabela 4.2.2 - Reagentes e condições para o preparo dos derivados **5a-i** a temperatura ambiente em atmosfera de Nitrogênio.

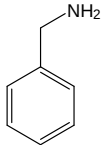
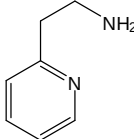
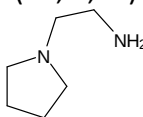
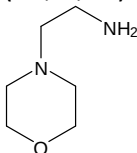
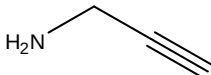
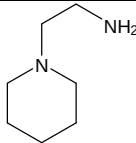
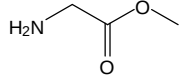
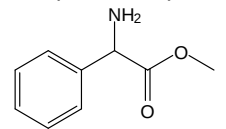
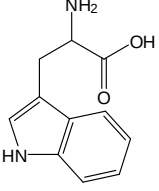
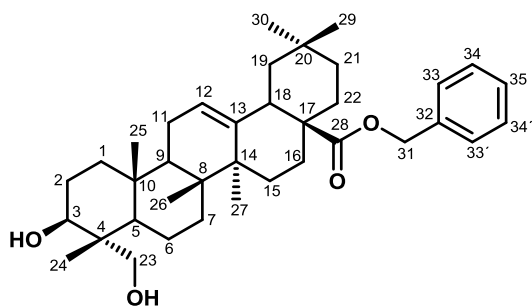
Amina Massa (mg; mmol)	Hederagenina Massa (mg; mmol)	TBTU/DIEA Massa (mg; mmol)	Tempo de reação (h)	Mistura de eluente (cromatografia em coluna)	Produto	Rendimento mg; mmol; /
 (53; 0,50)	(100; 0,23)	(80; 0,25)/ (59; 0,45)	4	Hex:AcOEt (1:2)	5a	114; 0,20; 96
 (61; 0,50)	(100; 0,23)	(80; 0,25)/ (59; 0,45)	4	Hex: AcOEt (1:2)	5b	97; 0,17; 79
 (56; 0,50)	(100; 0,23)	(80; 0,25)/ (59; 0,45)	4	Hex: AcOEt (1:2)	5c	91; 0,16; 76
 (65; 0,50)	(100; 0,23)	(80; 0,25)/ (59; 0,45)	4	Hex: AcOEt (1:2)	5d	90; 0,15; 72
 (30; 0,50)	(100; 0,23)	(80; 0,25)/ (59; 0,45)	4	Hex: AcOEt (1:2)	5e	101; 0,20; 93

Tabela continua..

Amina Massa (mg; mmol)	Hederagenina Massa (mg; mmol)	TBTU/DIEA Massa (mg; mmol)	Tempo de reação (h)	Mistura de eluente (cromatografia em coluna)	Produto	Rendimento mg; mmol; /
 (64; 0,50)	(100; 0,23)	(80; 0,25)/ (59; 0,45)	4	Hex:AcOEt (1:3)	5f	87; 0,15; 70
 (79; 0,50)	(100; 0,23)	(80; 0,25)/ (59; 0,45)	4	Hex:AcOEt (1:3)	5g	105; 0,19; 91
 (82; 0,50)	(100; 0,23)	(80; 0,25)/ (59; 0,45)	4	Hex:AcOEt (1:3)	5h	116; 0,18; 88
 (102; 0,50)	(100; 0,23)	(80; 0,25)/ (59; 0,45)	3	Hex: AcOEt (1:5)	5i	99; 0,15; 71

4.2.3. Dados referente ao (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de benzila (4a)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 160-162 °C

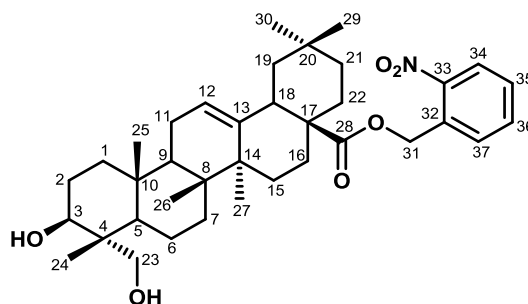
IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3410, 3032, 1722, 1158, 1044, 746, 696.

RMN de 1H ($CDCl_3$ /ppm; 300 MHz) δ : 7,34-7,31 (m, 5H, H); 5,27 (t, 1H, J = 3,6 Hz, H-12); 5,09 (d, 1H, J = 12,5 Hz, H-31_a); 5,03 (d, 1H, J = 12,5 Hz, H-31_b); 3,69 (d, 1H, J = 10,3 Hz, H-23_a); 3,61 (dd, 1H, J = 8,7, 7,0 Hz, H-3); 3,40 (d, 1H, J = 10,3 Hz, H-23_b); 2,89 (dd, 1H, J = 13,7, 4,5 Hz, H-18); 1,11 (s, 3H, CH_3); 0,91 (s, 6H, $2 \times CH_3$); 0,89 (s, 3H, CH_3); 0,87 (s, 3H, CH_3); 0,59 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$ /ppm; 75 MHz) δ : 177,45 (O=C-28); 143,62 (=C-13); 136,37 (C-32); 128,38 (C-33, 33'); 127,94 (C-34, 34'); 127,89 (C-35); 122,40 (=CH-12); 76,85 (HO-CH-3); 72,09 (HO-CH₂-23); 65,92 (O-CH₂-31); 49,79 (CH-9); 47,57 (C-17); 46,71 (C-5); 45,80 (CH₂-19); 41,74 (C-4); 41,68 (C-14); 41,34 (CH-18); 39,25 (C-8); 38,08 (CH₂-1); 36,86 (C-10); 33,83 (CH₂-21); 33,07 (CH₃-29); 32,47 (CH₂-7); 33,34 (CH₂-22); 30,67 (C-20); 27,58 (CH₂-15); 26,68 (CH₃-27); 25,87 (CH₂-2); 23,61 (CH₃-30); 23,34 (CH₂-11); 23,01 (CH₂-16); 18,45 (CH₂-6); 16,87 (CH₃-26); 15,64 (CH₃-25); 11,38 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{37}H_{55}O_4]^+$: m/z = 563,4104, encontrado: m/z = 563,4100.

4.2.4. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de *o*-nitrobenzila (4b)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 168-170 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3418, 1724, 1528, 1160, 1046, 730.

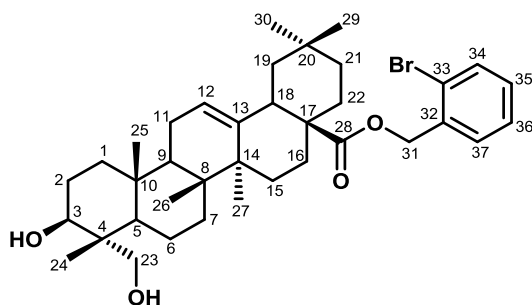
RMN de 1H ($CDCl_3/ppm$; 300 MHz) δ : 8,06 (dl, 1H, $J = 7,8$ Hz, H-34); 7,63 (d, 1H, $J = 1,1$ Hz, H-36); 7,61 (d, 1H, $J = 0,7$ Hz, H-37); 7,48 (m, 1H, H-35); 5,48 (d, 1H, $J = 14,4$ Hz, H-31_a); 5,40 (d, 1H, $J = 14,4$ Hz, H-31_b); 5,27 (t, 1H, $J = 3,5$ Hz, H-12); 3,70 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_a); 3,61 (dd, 1H, $J = 7,1, 6,9$ Hz, H-3); 3,40 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_b); 2,87 (dd, 1H, $J = 14,2, 4,0$ Hz, H-18); 1,11 (s, 3H, CH_3); 0,92 (s, 3H, CH_3); 0,90 (s, 6H, $2 \times CH_3$); 0,87 (s, 3H, CH_3); 0,55 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3/ppm$; 75 MHz) δ : 177,20 (O=C-28); 148,02 (C-33); 143,68 (=C-13); 133,59 (C-32); 132,38 (C-36); 129,83 (C-37); 128,89 (C-35); 125,08 (C-34); 122,70 (=CH-12); 76,99 (HO-CH-3); 72,25 (HO-CH₂-23); 62,97 (O-CH₂-31); 49,91 (CH-9); 47,69 (C-17); 47,15 (C-5); 45,98 (CH₂-19); 41,91 (C-4); 41,83 (C-14); 41,49 (CH-18); 39,40 (C-8); 38,22 (CH₂-1); 37,01 (C-10); 33,95 (CH₂-21); 33,19 (CH₃-29); 32,57 (CH₂-7); 32,53 (CH₂-22); 30,81 (C-20); 27,72 (CH₂-15); 26,86 (CH₃-27); 26,03 (CH₂-2); 23,72 (CH₃-30); 23,50 (CH₂-11); 23,28 (CH₂-16); 18,59 (CH₂-6); 16,99 (CH₃-26); 15,78 (CH₃-25); 11,51 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{37}H_{53}NO_6]^+$: $m/z = 608,3951$, encontrado: $m/z = 608,8198$.

CHN: calculado: C, 73,11; H, 8,79; encontrado: C, 72,87; H, 8,93.

4.2.5. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de *o*-bromobenzila (4c)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 171,3-173 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3414, 3078, 1722, 1158, 1032, 748.

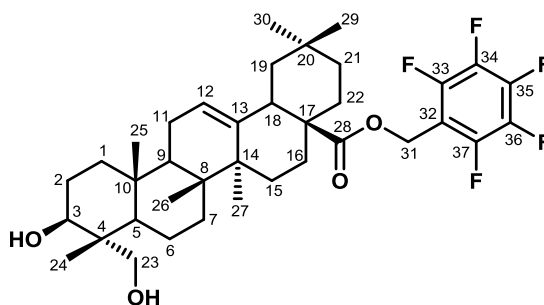
RMN de ^1H (CDCl_3/ppm ; 300 MHz) δ : 7,56 (dd, 1H, $J = 7,9, 1,3$ Hz, H-34); 7,42 (dd, 1H, $J = 7,6, 1,7$ Hz, H-37); 7,29 (td, 1H, $J = 7,4, 1,3$ Hz, H-36); 7,17 (td, 1H, $J = 7,8, 1,8$ Hz, H-35); 5,28 (t, 1H, $J = 3,6$ Hz, H-12); 5,16 (d, 1H, $J = 13,1$ Hz, H-31_a); 5,09 (d, 1H, $J = 13,1$ Hz, H-31_b); 3,71 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_a); 3,62 (dd, 1H, $J = 8,9, 6,9$ Hz, H-3); 3,41 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_b); 2,91 (dd, 1H, $J = 13,7, 4,0$ Hz, H-18); 1,11 (s, 3H, CH_3); 0,92 (s, 3H, CH_3); 0,91 (s, 3H, CH_3); 0,89 (s, 3H, CH_3); 0,87 (s, 3H, CH_3); 0,57 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C (CDCl_3/ppm ; 75 MHz) δ : 177,44 (O=C-28); 143,71 (=C-13); 135,84 (C-32); 132,89 (C-34); 130,33 (C-37); 129,66 (C-35); 127,49 (C-36); 123,74 (C-33); 122,66 (=CH-12); 77,05 (HO-CH-3); 72,32 (HO-CH₂-23); 65,78 (O-CH₂-31); 49,94 (CH-9); 47,73 (C-17); 47,06 (CH-5); 46,01 (CH-19); 41,93 (C-4); 41,83 (C-14); 41,48 (CH-18); 39,41 (C-8); 38,24 (CH₂-1); 37,02 (C-10); 34,00 (CH₂-21); 33,23 (CH₃-29); 32,63 (CH₂-7); 32,57 (CH₂-22); 30,84 (C-20); 27,77 (CH₂-15); 26,91 (CH₃-27); 26,02 (CH₂-2); 23,76 (CH₃-30); 23,51 (CH₂-11); 23,22 (CH₂-16); 18,62 (CH₂-6); 17,03 (CH₃-26); 15,80 (CH₃-25); 11,51 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $[\text{C}_{37}\text{H}_{53}\text{BrO}_4]^+$: $m/z = 641,7183$, encontrado: $m/z = 643,3204$, $[\text{M}+2+\text{H}]^+$: $m/z = 643,3204$.

CHN: calculado: C, 69,25; H, 8,32; encontrado: C, 69,01; H, 8,43.

4.2.6. Dados referente ao (3 β),23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de pentafluorobenzila (4d)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 143,4-145,2 °C

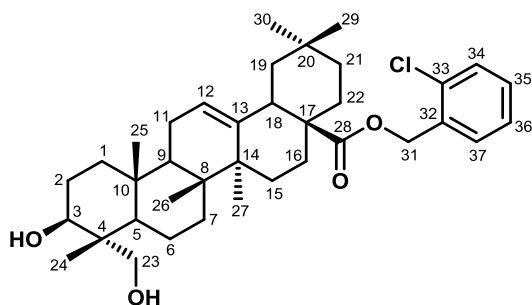
IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3430, 1734, 1508, 1150, 1130, 1052, 942.

RMN de 1H ($CDCl_3$ /ppm; 300 MHz) δ : 5,24 (t, 1H, $J = 3,4$ Hz, H-12); 5,19 (dt, 1H, $J = 12,0, 1,0$ Hz, H-31_a); 5,07 (dt, 1H, $J = 12,0, 1,0$ Hz, H-31_b); 3,70 (d, 1H, $J = 10,4$ Hz, H-23_a); 3,62 (tl, 1H, $J = 7,5$ Hz, H-3); 3,41 (d, 1H, $J = 10,4$ Hz, H-23_b); 2,82 (dd, 1H, $J = 12,9, 4,5$ Hz, H-18); 1,09 (s, 3H, CH_3); 0,92 (s, 3H, CH_3); 0,90 (s, 3H, CH_3); 0,88 (s, 6H, 2x CH_3); 0,54 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$ /ppm; 75 MHz) δ : 177,15 (O=C-28); 143,34 (=C-13); 122,79 (=CH-12); 76,89 (HO-CH-3); 72,22 (HO-CH₂-23); 49,91 (CH-9); 47,65 (C-17); 47,03 (CH-5); 45,81 (CH₂-19); 41,92 (C-4); 41,79 (C-14); 41,52 (CH-18); 39,33 (C-8); 38,23 (CH₂-1); 37,00 (C-10); 33,86 (CH₂-21); 33,18 (CH₃-29); 32,62 (CH₂-7); 32,35 (CH₂-22); 30,80 (C-20); 27,60 (CH₂-15); 26,87 (CH₃-27); 25,97 (CH₂-2); 23,70 (CH₃-30); 23,47 (CH₂-11); 23,01 (CH₂-16); 18,56 (CH₂-6); 16,66 (CH₃-26); 15,70 (CH₃-25); 11,53 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[H_2O-M+H]^+$ calculado para $[C_{37}H_{47}F_5O_3]^+$: $m/z = 635,3525$, encontrado: $m/z = 635,3524$.

4.2.7. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de *o*-clorobenzila (4e)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 176,2-177,3 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3408, 3064, 1724, 1250, 1160, 1042, 1010, 752.

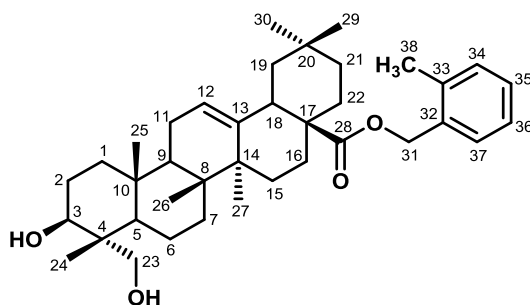
RMN de 1H ($CDCl_3$ /ppm; 300 MHz) δ : 7,42 (m, 1H, H-34); 7,37 (m, 1H, H-37); 7,24 (m, 2H, H-35, H-36); 5,27 (t, 1H, $J = 3,4$ Hz, H-12); 5,17 (d, 1H, $J = 13,0$ Hz, H-31_a); 5,12 (d, 1H, $J = 13,0$ Hz, H-31_b); 3,70 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_a); 3,61 (dd, 1H, $J = 8,4, 7,0$ Hz, H-3); 3,40 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_b); 2,90 (dd, 1H, $J = 13,6, 4,2$ Hz, H-18); 1,10 (s, 3H, CH_3); 0,91 (s, 3H, CH_3); 0,90 (s, 3H, CH_3); 0,89 (s, 3H, CH_3); 0,87 (s, 3H, CH_3); 0,57 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$ /ppm; 75 MHz) δ : 177,48 (O=C-28); 143,69 (=C-13); 134,16 (C-32); 133,91 (C-33); 130,19 (C-37); 129,59 (C-34); 129,86 (C-35); 126,86 (C-36); 122,63 (=CH-12); 77,02 (HO-CH-3); 72,27 (HO-CH₂-23); 63,64 (O-CH₂-31); 49,93 (CH-9); 47,72 (C-17); 47,04 (CH-5); 46,00 (CH-19); 41,90 (C-4); 41,82 (C-14); 41,48 (CH-18); 39,39 (C-8); 38,23 (CH₂-1); 37,01 (C-10); 33,99 (CH₂-21); 33,22 (CH₃-29); 32,63 (CH₂-7); 32,57 (CH₂-22); 30,84 (C-20); 27,77 (CH₂-15); 26,91 (CH₃-27); 26,02 (CH₂-2); 23,75 (CH₃-30); 23,50 (CH₂-11); 23,20 (CH₂-16); 18,61 (CH₂-6); 17,00 (CH₃-26); 15,79 (CH₃-25); 11,52 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{37}H_{53}ClO_4]^+$: $m/z = 597,2670$, encontrado: $m/z = 598,3711$.

CHN: calculado: C, 74,40; H, 8,94; encontrado: C, 73,95; H, 9,03.

4.2.8. Dados referente ao (3 β),23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de *o*-metilbenzila (4f)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 165,3-166,8 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3420, 1718, 1160, 1040, 740.

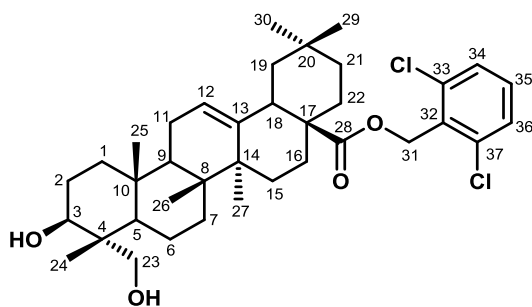
RMN de 1H ($CDCl_3/ppm$; 300 MHz) δ : 7,32 (m, 1H); 7,17 (m, 3H); 5,25 (t, 1H, $J = 3,4$ Hz, H-12); 5,10 (d, 1H, $J = 12,6$ Hz, H-31_a); 5,03 (d, 1H, $J = 12,6$ Hz, H-31_b); 3,70 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_a); 3,61 (tl, 1H, $J = 8,3$ Hz, H-3); 3,41 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_b); 2,88 (dd, 1H, $J = 13,9, 4,2$ Hz, H-18); 2,34 (s, 3H, CH_3); 1,10 (s, 3H, CH_3); 0,91 (s, 6H, $2 \times CH_3$); 0,88 (s, 6H, $2 \times CH_3$); 0,56 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3/ppm$; 75 MHz) δ : 177,62 (O=C-28); 143,74 (=C-13); 137,00 (C-32); 134,43 (C-33); 130,30 (C-34); 129,32 (C-37); 128,35 (C-35); 126,00 (C-36); 122,57 (=CH-12); 77,05 (HO-CH-3); 72,31 (HO-CH₂-23); 64,60 (O-CH₂-31); 49,95 (CH-9); 47,73 (C-17); 47,00 (CH-5); 46,01 (CH-19); 41,92 (C-4); 41,83 (C-14); 41,50 (CH-18); 39,38 (C-8); 38,24 (CH₂-1); 37,02 (C-10); 33,99 (CH₂-21); 33,23 (CH₃-29); 32,63 (CH₂-7); 32,56 (CH₂-22); 30,80 (C-20); 27,73 (CH₂-15); 26,90 (CH₃-27); 26,02 (CH₂-2); 23,75 (CH₃-30); 23,49 (CH₂-11); 23,20 (CH₂-16); 19,06 (CH₂-38); 18,61 (CH₂-6); 16,99 (CH₃-26); 15,79 (CH₃-25); 11,51 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M + H]^+$ calculado para $[C_{38}H_{56}O_4]^+$: $m/z = 576,8488$, encontrado: $m/z = 577,4266$.

CHN: calculado: C, 79,12; H, 9,79; encontrado: C, 79,00; H, 9,98.

4.2.9. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de 2,6-diclorobenzila (4g)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 148,6-150,2 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3440, 1730, 1158, 1032, 768.

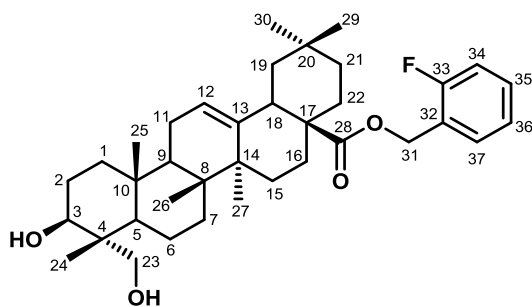
RMN de 1H ($CDCl_3$ /ppm; 300 MHz) δ : 7,32 (d; 1H, J = 8,4 Hz, H-34); 7,32 (d, 1H, J = 7,5 Hz, H-36); 7,21 (dd, 1H, J = 8,9, 7,0 Hz, H-35); 5,32 (d, 1H, J = 11,7 Hz, H-31_a); 5,26 (d, 1H, J = 11,8 Hz, H-31_b); 5,24 (t, 1H, J = 3,3 Hz, H-12); 3,70 (d, 1H, J = 10,3 Hz, H-23_a); 3,62 (tl, 1H, J = 7,9 Hz, H-3); 3,41 (d, 1H, J = 10,3 Hz, H-23_b); 2,86 (dd, 1H, J = 14,0, 4,0 Hz, H-18); 1,09 (s, 3H, CH_3); 0,93 (s, 3H, CH_3); 0,89 (s, 3H, CH_3); 0,88 (s, 3H, CH_3); 0,87 (s, 3H, CH_3); 0,68 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$ /ppm; 75 MHz) δ : 177,45 (O=C-28); 143,57 (=C-13); 137,14 (C-32); 131,99 (C-35); 130,38 (C-33); 130,38 (C-37); 128,47 (C-34); 128,47 (C-36); 122,63 (=CH-12); 77,06 (HO-CH-3); 72,32 (HO-CH₂-23); 61,29 (O-CH₂-31); 49,97 (CH-9); 47,74 (C-17); 47,15 (CH-5); 45,93 (CH-19); 41,91 (C-4); 41,83 (C-14); 41,45 (CH-18); 39,37 (C-8); 38,25 (CH₂-1); 37,03 (C-10); 33,99 (CH₂-21); 33,23 (CH₃-29); 32,68 (CH₂-7); 32,46 (CH₂-22); 30,83 (C-20); 27,81 (CH₂-15); 26,88 (CH₃-27); 25,98 (CH₂-2); 23,74 (CH₃-30); 23,53 (CH₂-11); 23,06 (CH₂-16); 18,66 (CH₂-6); 17,15 (CH₃-26); 15,82 (CH₃-25); 11,52 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M + H]^+$ calculado para $[C_{37}H_{52}Cl_2O_4]^+$: m/z = 631,7117, encontrado: m/z = 631,3308.

CHN: calculado: C, 70,35; H, 8,30; encontrado: C, 70,11; H, 8,52.

4.2.10. Dados referente ao (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de *o*-fluorobenzila (4h)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 161,7-163,2 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3422, 1724, 1158, 1031, 756.

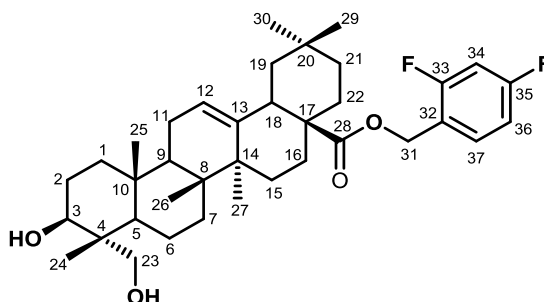
RMN de 1H ($CDCl_3/ppm$; 300 MHz) δ : 7,37 (td, 1H, $J = 7,6, 1,8$ Hz, H-37); 7,30 (tdd, 1H, $J = 7,5, 5,6, 1,9$ Hz, H-35); 7,11 (td, 1H, $J = 7,5, 1,2$ Hz, H-36); 7,05 (ddd, 1H, $J = 9,3, 8,2, 1,2$ Hz, H-34); 5,26 (t, 1H, $J = 3,5$ Hz, H-12); 5,11 (tl, 2H, $J = 13,3$ Hz, H-31); 3,70 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_a); 3,62 (dd, 1H, $J = 8,8, 6,9$ Hz, H-3); 3,41 (d, 1H, $J = 10,4$ Hz, H-23_b); 2,88 (dd, 1H, $J = 13,6, 3,9$ Hz, H-18); 1,10 (s, 3H, CH_3); 0,91 (s, 6H, $2 \times CH_3$); 0,88 (s, 3H, CH_3); 0,87 (s, 3H, CH_3); 0,57 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3/ppm$; 75 MHz) δ : 177,52 (C=O-28); 161,13 (d, $J = 246,9$ Hz, C-33); 143,68 (=C-13); 130,73 (d, $J = 3,7$ Hz, C-37); 130,05 (d, $J = 8,0$ Hz, C-35); 124,13 (d, $J = 3,8$ Hz, C-32); 123,67 (d, $J = 14,8$ Hz, C-36); 122,59 (=CH-12); 115,48 (d, $J = 21,0$ Hz, C-34); 77,04 (HO-CH-3); 72,30 (HO-CH₂-23); 61,20 (d, $J = 3,9$ Hz, O-CH₂-31); 49,95 (CH-9); 47,73 (C-17); 46,94 (CH-5); 45,97 (CH-19); 41,92 (C-4); 41,82 (C-14); 41,50 (CH-18); 39,38 (C-8); 38,24 (CH₂-1); 37,02 (C-10); 33,98 (CH₂-21); 33,23 (CH₃-29); 32,63 (CH₂-7); 32,46 (CH₂-22); 30,83 (C-20); 27,70 (CH₂-15); 26,89 (CH₃-27); 26,01 (CH₂-2); 23,75 (CH₃-30); 23,51 (CH₂-11); 23,15 (CH₂-16); 18,62 (CH₂-6); 16,94 (CH₃-26); 15,80 (CH₃-25); 11,52 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{37}H_{53}FO_4]^+$: $m/z = 580,8127$, encontrado: $m/z = 581,4003$.

CHN: calculado: C, 76,51; H, 9,20; encontrado: C, 76,41; H, 9,33.

4.2.11. Dados referente ao (3 β),23,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de 2,4-difluorobenzila (4i)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 164,6-166 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3410, 1726, 1156, 1100, 1032, 962, 850.

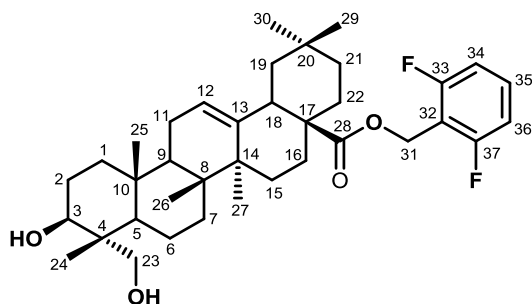
RMN de ^1H (CDCl_3/ppm ; 300 MHz) δ : 7,35 (m, 1H, H-37); 6,82 (m, 2H, H-34, H-36); 5,25 (t, 1H, $J = 3,5$ Hz, H-12); 5,06 (tl, 2H, $J = 13,3$ Hz, H-31); 3,70 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_a); 3,61 (dd, 1H, $J = 8,7, 7,1$ Hz, H-3); 3,41 (d, 1H, $J = 10,4$ Hz, H-23_b); 2,85 (dd, 1H, $J = 14,3, 4,7$ Hz, H-18); 1,10 (s, 3H, CH_3); 0,92 (s, 3H, CH_3); 0,90 (s, 3H, CH_3); 0,88 (s, 3H, CH_3); 0,87 (s, 3H, CH_3); 0,55 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C (CDCl_3/ppm ; 75 MHz) δ : 177,50 (C=O-28); 163,09 (dd, $J = 247,9, 12,0$ Hz; C-35); 161,40 (dd, $J = 249,9, 14,1$ Hz, C-33); 143,64 (=C-13); 131,99 (dd, $J = 9,8, 5,4$ Hz, C-37); 122,59 (=CH-12); 119,74 (dd, $J = 14,9, 3,6$ Hz, C-32); 111,29 (dd, $J = 21,0, 3,6$ Hz, C-36); 104,00 (t, $J = 25,6$ Hz, C-34); 77,00 (HO-CH-3); 72,25 (HO-CH₂-23); 59,64 (d; $J = 3,4$ Hz; O-CH₂-31); 49,92 (CH-9); 47,70 (C-17); 46,92 (CH-5); 45,94 (CH-19); 41,92 (C-4); 41,82 (C-14); 41,50 (CH-18); 39,37 (C-8); 38,24 (CH₂-1); 37,01 (C-10); 33,95 (CH₂-21); 33,21 (CH₃-29); 32,63 (CH₂-7); 32,45 (CH₂-22); 30,81 (C-20); 27,67 (CH₂-15); 26,88 (CH₃-27); 25,98 (CH₂-2); 23,73 (CH₃-30); 23,50 (CH₂-11); 23,12 (CH₂-16); 18,60 (CH₂-6); 16,92 (CH₃-26); 15,77 (CH₃-25); 11,52 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $[\text{C}_{37}\text{H}_{52}\text{F}_2\text{O}_4]^+$: $m/z = 598,8031$, encontrado: $m/z = 599,3900$.

CHN: calculado: C, 74,21; H, 8,75; encontrado: C, 73,95; H, 8,98.

4.2.12. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de 2,6-difluorobenzila (4j)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 120-122 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3402, 1732, 1236, 1158, 1056, 1038, 784.

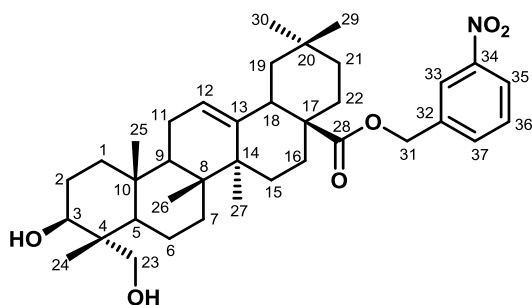
RMN de ^1H (CDCl_3/ppm ; 300 MHz) δ : 7,29 (m, 1H, H-35); 6,88 (m, 2H, H-34, H-36); 5,23 (t, 1H, $J = 3,3$ Hz, H-12); 5,16 (d, 1H, $J = 11,9$ Hz, H-31_a); 5,10 (d, 1H, $J = 11,9$ Hz, H-31_b); 3,70 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_a); 3,61 (tl, 1H, $J = 7,9$ Hz, H-3); 3,41 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_b); 2,84 (dd, 1H, $J = 13,9, 4,1$ Hz, H-18); 1,09 (s, 3H, CH_3); 0,92 (s, 3H, CH_3); 0,89 (s, 3H, CH_3); 0,88 (s, 3H, CH_3); 0,87 (s, 3H, CH_3); 0,59 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C (CDCl_3/ppm ; 75 MHz) δ : 177,36 (C=O-28); 162,04 (dd, $J = 250,0, 7,5$ Hz, C-33, C-37); 143,52 (=C-13); 130,63 (t, $J = 25,6$ Hz, C-35); 122,59 (=CH-12); 112,42 (t, $J = 18,8$ Hz, C-32); 111,41 (m, C-34, C-36); 77,06 (HO-CH-3); 72,06 (HO-CH₂-23); 54,07 (t, $J = 3,9$ Hz, O-CH₂-31); 49,96 (CH-9); 47,73 (C-17); 46,92 (CH-5); 45,92 (CH-19); 41,92 (C-4); 41,79 (C-14); 41,52 (CH-18); 39,32 (C-8); 38,25 (CH₂-1); 37,02 (C-10); 33,96 (CH₂-21); 33,23 (CH₃-29); 32,64 (CH₂-7); 32,33 (CH₂-22); 30,81 (C-20); 27,66 (CH₂-15); 26,87 (CH₃-27); 25,98 (CH₂-2); 23,73 (CH₃-30); 23,50 (CH₂-11); 23,04 (CH₂-16); 18,64 (CH₂-6); 16,79 (CH₃-26); 15,80 (CH₃-25); 11,52 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $[\text{C}_{37}\text{H}_{52}\text{F}_2\text{O}_4]^+$: $m/z = 598,8031$, encontrado: $m/z = 599,3920$.

CHN: calculado: C, 74,21; H, 8,75; encontrado: C, 74,04; H, 8,91.

4.2.13. Dados referente ao (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de *m*-nitrobenzila (4k)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 173,6-175,2 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3394, 3080, 1720,1532, 1160, 1032, 804, 730.

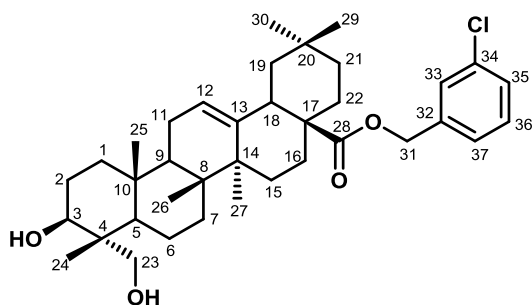
RMN de 1H ($CDCl_3$ /ppm; 300 MHz) δ : 8,22 (t, 1H, $J = 1,8$ Hz, H-33); 8,16 (ddd, 1H, $J = 8,2, 2,3, 1,1$ Hz, H-35); 7,66 (dt, 1H, $J = 7,6, 1,4$ Hz, H-37); 7,52 (t, 1H, $J = 7,9$ Hz, H-36); 5,30 (t, 1H, $J = 3,6$ Hz, H-12); 5,19 (d, 1H, $J = 13,1$ Hz, H-31_a); 5,09 (d, 1H, $J = 13,1$ Hz, H-31_b); 3,70 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_a); 3,61 (dd, 1H, $J = 8,7, 7,1$ Hz, H-3); 3,40 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_b); 2,89 (dd, 1H, $J = 13,4, 3,7$ Hz, H-18); 1,11 (s, 3H, CH_3); 0,91 (s, 3H, CH_3); 0,89 (s, 6H, $2 \times CH_3$); 0,86 (s, 3H, CH_3); 0,52 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$ /ppm; 75 MHz) δ : 177,46 (O=C-28); 148,52 (C-34); 143,63 (=C-13); 138,64 (C-32); 134,04 (C-37); 129,59 (C-36); 123,10 (C-33); 122,98 (C-35); 122,78 (=CH-12); 76,98 (HO-CH-3); 72,22 (HO-CH₂-23); 64,74 (O-CH₂-31); 49,88 (CH-9); 47,62 (C-17); 47,00 (C-5); 45,94 (CH₂-19); 41,91 (C-4); 41,83 (C-14); 41,50 (CH-18); 39,41 (C-8); 38,19 (CH₂-1); 37,00 (C-10); 33,92 (CH₂-21); 33,18 (CH₃-29); 32,57 (CH₂-7); 32,53 (CH₂-22); 30,81 (C-20); 27,72 (CH₂-15); 26,86 (CH₃-27); 26,02 (CH₂-2); 23,74 (CH₃-30); 23,45 (CH₂-11); 23,23 (CH₂-16); 18,57 (CH₂-6); 16,97 (CH₃-26); 15,72 (CH₃-25); 11,51 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M + H]^+$ calculado para $[C_{37}H_{53}NO_6]^+$: $m/z = 608,8198$, encontrado: $m/z = 608,0032$.

CHN: calculado: C, 73,11; H, 8,79; encontrado: C, 73,02; H, 8,89.

4.2.14. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de *m*-clorobenzila (4I)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 171,9-173,4 °C

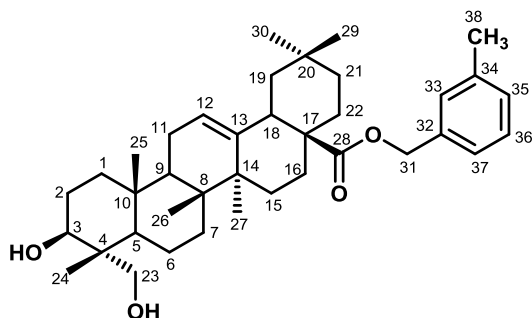
IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3394, 1720, 1250, 1210, 1160, 1032, 784.

RMN de 1H ($CDCl_3/ppm$; 300 MHz) δ : 7,34 (sl, 1H, H-33); 7,27 (m, 2H, H-36, H-35); 7,21 (m, 1H, H-37); 5,29 (t, 1H, $J = 3,4$ Hz, H-12); 5,08 (d, 1H, $J = 12,9$ Hz, H-31_a); 4,97 (d, 1H, $J = 12,8$ Hz, H-31_b); 3,71 (d, H, $J = 10,3$ Hz, H-23_a); 3,62 (tl, 1H, $J = 7,2$ Hz, H-3); 3,41 (d, H, $J = 10,3$ Hz, H-23_b); 2,88 (dd, 1H, $J = 14,1, 4,3$ Hz, H-18); 1,11 (s, 3H, CH_3); 0,92 (s, 6H, $2 \times CH_3$); 0,89 (s, 3H, CH_3); 0,88 (s, 3H, CH_3); 0,56 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3/ppm$; 75 MHz) δ : 177,51 (O=C-28); 143,74 (=C-13); 138,53 (C-32); 134,47 (C-34); 129,83 (C-36); 128,33 (C-33); 128,22 (C-35); 126,18 (C-37); 122,69 (=CH-12); 77,03 (HO-CH-3); 72,29 (HO-CH₂-23); 65,20 (O-CH₂-31); 49,93 (CH-9); 47,73 (C-17); 46,93 (CH-5); 46,00 (CH-19); 41,94 (C-4); 41,85 (C-14); 41,49 (CH-18); 39,42 (C-8); 38,23 (CH₂-1); 37,04 (C-10); 33,97 (CH₂-21); 33,22 (CH₃-29); 32,63 (CH₂-7); 32,54 (CH₂-22); 30,83 (C-20); 27,70 (CH₂-15); 26,91 (CH₃-27); 26,03 (CH₂-2); 23,77 (CH₃-30); 23,48 (CH₂-11); 23,22 (CH₂-16); 18,60 (CH₂-6); 17,00 (CH₃-26); 15,76 (CH₃-25); 11,51 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[H_2O-M+H]^+$ calculado para $[C_{37}H_{51}ClO_3]^+$: $m/z = 579,3605$, encontrado: $m/z = 579,3594$.

4.2.15. Dados referente ao (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de *m*-metilbenzila (4m)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 164,9-166,1 °C

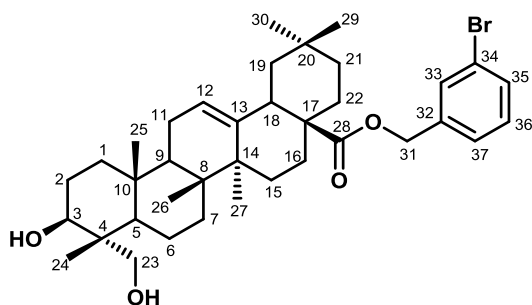
IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3416, 1720, 1162, 1042, 1018, 780. 719.

RMN de 1H ($CDCl_3/ppm$; 300 MHz) δ : 7,21 (d, 1H, $J = 7,3$ Hz); 7,12 (m, 3H); 5,28 (t, 1H, $J = 3,7$ Hz, H-12); 5,06 (d, 1H, $J = 12,6$ Hz, H-31_a); 4,99 (d, 1H, $J = 12,5$ Hz, H-31_b); 3,71 (d, H, $J = 10,3$ Hz, H-23_a); 3,62 (dd, 1H, $J = 8,3, 6,9$ Hz, H-3); 3,41 (d, H, $J = 10,3$ Hz, H-23_b); 2,90 (dd, 1H, $J = 13,6, 5,0$ Hz, H-18); 2,34 (s, 3H, CH₃); 1,11 (s, 3H, CH₃); 0,92 (s, 3H, CH₃); 0,91 (s, 3H, CH₃); 0,89 (s, 3H, CH₃); 0,88 (s, 3H, CH₃); 0,60 (s, 3H, CH₃).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3/ppm$; 75 MHz) δ : 177,65 (O=C-28); 143,86 (=C-13); 138,14 (C-34); 136,46 (C-32); 128,87 (C-33); 128,76 (C-35); 128,45 (C-36); 125,14 (C-37); 122,40 (=CH-12); 77,05 (HO-CH-3); 72,31 (HO-CH₂-23); 66,13 (O-CH₂-31); 49,95 (CH-9); 47,74 (C-17); 46,87 (CH-5); 46,03 (CH-19); 41,93 (C-4); 41,84 (C-14); 41,48 (CH-18); 39,42 (C-8); 38,24 (CH₂-1); 37,03 (C-10); 34,00 (CH₂-21); 33,24 (CH₃-29); 32,63 (CH₂-7); 32,56 (CH₂-22); 30,80 (C-20); 27,73 (CH₂-15); 26,90 (CH₃-27); 26,03 (CH₂-2); 23,78 (CH₃-30); 23,50 (CH₂-11); 23,18 (CH₂-16); 21,54 (CH₂-38); 18,61 (CH₂-6); 17,03 (CH₃-26); 15,78 (CH₃-25); 11,51 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{38}H_{57}O_4]^+$: $m/z = 577,4257$, encontrado: $m/z = 577,4253$.

4.2.16. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de *m*-bromobenzila (4n)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 170,6-172,2°C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{\text{max}}$ /cm⁻¹): 3400, 1722, 1210, 1160, 1023, 1014, 782.

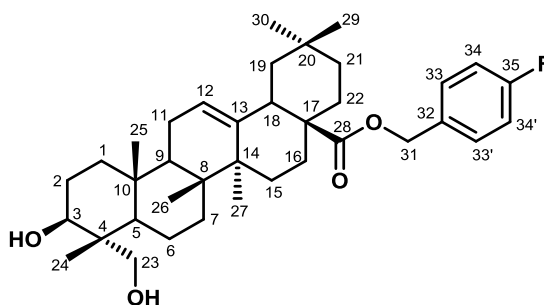
RMN de ¹H (CDCl₃/ppm; 300 MHz) δ : 7,49 (sl, 1H, H-33); 7,42 (dt, 1H, *J* = 7,5, 1,6 Hz, H-35); 7,22 (m, 2H, H-36, H-37); 5,28 (t, 1H, *J* = 3,7 Hz, H-12); 5,07 (d, 1H, *J* = 12,8 Hz, H-31_a); 4,96 (d, 1H, *J* = 12,8 Hz, H-31_b); 3,69 (d, 1H, *J* = 10,4 Hz, H-23_a); 3,61 (tl, 1H, *J* = 7,6 Hz, H-3); 3,40 (d, 1H, *J* = 10,4 Hz, H-23_b); 2,88 (dd, 1H, *J* = 13,6, 4,2 Hz, H-18); 1,11 (s, 3H, CH₃); 0,91 (s, 6H, 2xCH₃); 0,89 (s, 3H, CH₃); 0,87 (s, 3H, CH₃); 0,55 (s, 3H, CH₃).

RMN de ¹³C (CDCl₃/ppm; 75 MHz) δ : 177,51 (O=C-28); 143,72 (=C-13); 138,76 (C-32); 131,15 (C-33); 131,15 (C-35); 130,10 (C-36); 126,22 (C-37); 122,67 (=CH-12); 122,63 (C-34); 76,99 (HO-CH-3); 72,23 (HO-CH₂-23); 65,14 (O-CH₂-31); 49,92 (CH-9); 47,71 (C-17); 46,92 (CH-5); 45,99 (CH-19); 41,89 (C-4); 41,82 (C-14); 41,46 (CH-18); 39,40 (C-8); 38,22 (CH₂-1); 37,02 (C-10); 33,96 (CH₂-21); 33,20 (CH₃-29); 32,60 (CH₂-7); 32,53 (CH₂-22); 30,82 (C-20); 27,68 (CH₂-15); 26,84 (CH₃-27); 26,02 (CH₂-2); 23,76 (CH₃-30); 23,48 (CH₂-11); 23,21 (CH₂-16); 18,58 (CH₂-6); 16,98 (CH₃-26); 15,77 (CH₃-25); 11,53 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): [M+H]⁺ calculado para [C₃₇H₅₃BrO₄]⁺: *m/z* = 641,7183, encontrado: *m/z* = 641,3205.

CHN: calculado: C, 69,25; H, 8,32; encontrado: C, 69,02; H, 8,60.

4.2.17. Dados referente ao (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de *p*-fluorobenzila (4o)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 175,6-177,4 °C

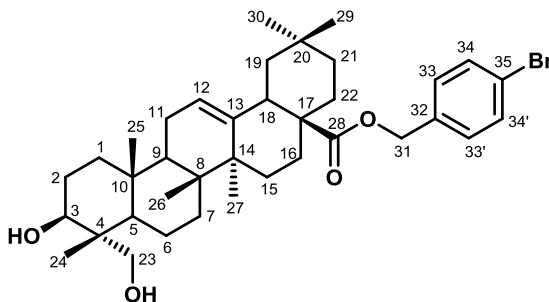
IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3382, 1724, 1512, 1226, 1154, 1032, 1010, 824.

RMN de 1H ($CDCl_3/ppm$; 300 MHz) δ : 7,30 (m, 2H, H-33, H-33'); 7,01 (m, 2H, H-34, H-34'); 5,26 (t, 1H, $J = 3,7$ Hz, H-12); 5,05 (d, 1H, $J = 12,4$ Hz, H-31_a); 4,99 (d, 1H, $J = 12,4$ Hz, H-31_b); 3,70 (d, 1H, $J = 10,4$ Hz, H-23_a); 3,61 (tl, 1H, $J = 7,9$ Hz, H-3); 3,40 (d, 1H, $J = 10,4$ Hz, H-23_b); 2,86 (dd, 1H, $J = 13,8, 4,1$ Hz, H-18); 1,10 (s, 3H, CH_3); 0,91 (s, 3H, CH_3); 0,90 (s, 3H, CH_3); 0,88 (s, 3H, CH_3); 0,87 (s, 3H, CH_3); 0,56 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3/ppm$; 75 MHz) δ : 177,54 (C=O-28); 162,63 (d, $J = 244,8$ Hz, C-35); 143,73 (=C-13); 132,35 (d, $J = 3,2$ Hz, C-32); 130,19 (d, $J = 8,4$ Hz, C-33); 130,19 (d, $J = 8,4$ Hz, C-33'); 122,55 (=CH-12); 115,44 (d, $J = 21,3$ Hz, C-34'); 115,44 (d, $J = 21,3$ Hz, C-34); 76,98 (HO-CH-3); 72,22 (HO-CH₂-23); 65,36 (O-CH₂-31); 49,92 (CH-9); 47,70 (C-17); 46,83 (CH-5); 45,96 (CH-19); 41,91 (C-4); 41,83 (C-14); 41,50 (CH-18); 39,39 (C-8); 38,24 (CH₂-1); 37,01 (C-10); 33,96 (CH₂-21); 33,21 (CH₃-29); 32,63 (CH₂-7); 32,48 (CH₂-22); 30,82 (C-20); 27,70 (CH₂-15); 26,85 (CH₃-27); 26,00 (CH₂-2); 23,75 (CH₃-30); 23,49 (CH₂-11); 23,16 (CH₂-16); 18,59 (CH₂-6); 17,00 (CH₃-26); 15,78 (CH₃-25); 11,53 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{37}H_{53}FO_4]^+$: $m/z = 580,4006$, encontrado: $m/z = 581,4000$.

4.2.18. Dados referente ao (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de *p*-bromobenzila (4p)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 184-185,7°C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{\text{max}}$ /cm⁻¹): 3394, 1724, 1158, 1032, 808.

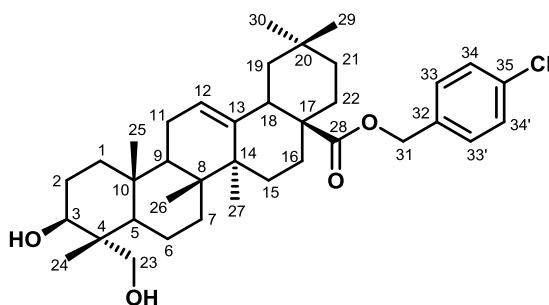
RMN de ¹H (CDCl₃/ppm; 300 MHz) δ : 7,46 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz, H-34, H-34'); 7,20 (d, 2H, *J* = 8,3 Hz, H-33, H-33'); 5,26 (t, 1H, *J* = 3,3 Hz, H-12); 5,04 (d, 1H, *J* = 12,6 Hz, H-31_a); 4,96 (d, 1H, *J* = 12,6 Hz, H-31_b); 3,70 (d, 1H, *J* = 10,3 Hz, H-23_a); 3,61 (tl, 1H, *J* = 7,9 Hz, H-3); 3,40 (d, 1H, *J* = 10,3 Hz, H-23_b); 2,86 (dd, 1H, *J* = 13,9, 4,2 Hz, H-18); 1,10 (s, 3H, CH₃); 0,92 (s, 3H, CH₃); 0,90 (s, 3H, CH₃); 0,89 (s, 3H, CH₃); 0,89 (s, 3H, CH₃); 0,53 (s, 3H, CH₃).

RMN de ¹³C (CDCl₃/ppm; 75 MHz) δ : 177,49 (O=C-28); 143,72 (=C-13); 135,51 (C-32); 131,69 (C-34, C-34'); 130,00 (C-33, C-33'); 122,59 (=CH-12); 122,13 (C-35); 76,99 (HO-CH-3); 72,22 (HO-CH₂-23); 65,29 (O-CH₂-31); 49,91 (CH-9); 47,70 (C-17); 46,85 (CH-5); 45,96 (CH-19); 41,91 (C-4); 41,82 (C-14); 41,51 (CH-18); 39,39 (C-8); 38,23 (CH₂-1); 37,01 (C-10); 33,82 (CH₂-21); 33,20 (CH₃-29); 32,61 (CH₂-7); 32,50 (CH₂-22); 30,82 (C-20); 27,69 (CH₂-15); 26,86 (CH₃-27); 26,02 (CH₂-2); 23,75 (CH₃-30); 23,49 (CH₂-11); 23,16 (CH₂-16); 18,58 (CH₂-6); 16,97 (CH₃-26); 15,81 (CH₃-25); 11,53 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): [M+H]⁺ calculado para [C₃₇H₅₃BrO₄]⁺: *m/z* = 641,7183, encontrado: *m/z* = 641,3212;

CHN: calculado: C, 69,25; H, 8,32; encontrado: C, 68,93; H, 8,50.

4.2.19. Dados referente ao (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de *p*-clorobenzila (4q)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 183,6-185,2 °C

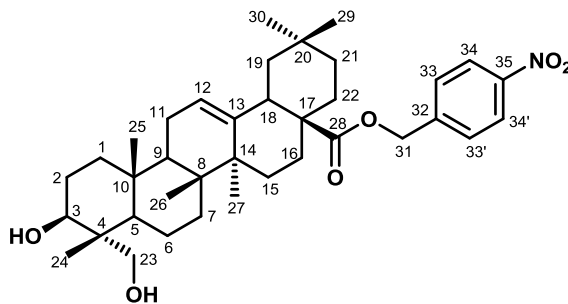
IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3402, 1724, 1158, 1032, 812.

RMN de 1H ($CDCl_3/ppm$; 300 MHz) δ : 7,28 (m, 4H, H-33, H-33', H-34, H-34'); 5,26 (t, 1H, $J = 3,3$ Hz, H-12); 5,06 (d, 1H, $J = 12,5$ Hz, H-31_a); 4,97 (d, 1H, $J = 12,5$ Hz, H-31_b); 3,70 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_a); 3,62 (tl, 1H, $J = 7,8$ Hz, H-3); 3,41 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_b); 2,87 (dd, 1H, $J = 13,8, 4,1$ Hz, H-18); 1,10 (s, 3H, CH_3); 0,92 (s, 3H, CH_3); 0,90 (s, 3H, CH_3); 0,89 (s, 3H, CH_3); 0,87 (s, 3H, CH_3); 0,55 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3/ppm$; 75 MHz) δ : 177,50 (O=C-28); 143,73 (=C-13); 135,01 (C-32); 133,99 (C-35); 129,69 (C-33 e C-33'); 128,73 (C-34 e C-34'); 122,59 (=CH-12); 77,00 (HO-CH-3); 72,24 (HO-CH₂-23); 65,27 (O-CH₂-31); 49,92 (CH-9); 47,71 (C-17); 46,86 (CH-5); 45,96 (CH-19); 41,92 (C-4); 41,83 (C-14); 41,52 (CH-18); 39,40 (C-8); 38,24 (CH₂-1); 37,01 (C-10); 33,95 (CH₂-21); 33,21 (CH₃-29); 32,62 (CH₂-7); 32,50 (CH₂-22); 30,82 (C-20); 27,70 (CH₂-15); 26,88 (CH₃-27); 26,01 (CH₂-2); 23,75 (CH₃-30); 23,49 (CH₂-11); 23,17 (CH₂-16); 18,58 (CH₂-6); 16,99 (CH₃-26); 15,79 (CH₃-25); 11,52 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{37}H_{53}ClO_4]^+$: $m/z = 597,2673$, encontrado: $m/z = 598,3731$.

4.2.20. Dados referente ao (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de *p*-nitrobenzila (4r)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 164,3-166,8 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3470, 3088, 1728, 1524, 1158, 1034, 1014, 736.

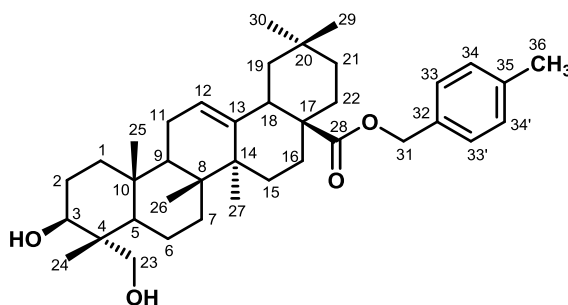
RMN de 1H ($CDCl_3/ppm$; 300 MHz) δ : 8,20 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, H-34, H-34'); 7,50 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, H-33, H-33'); 5,28 (t, 1H, $J = 3,5$ Hz, H-12); 5,19 (d, 1H, $J = 13,5$ Hz, H-31_a); 5,09 (d, 1H, $J = 13,5$ Hz, H-31_b); 3,69 (d, 1H, $J = 10,4$ Hz, H-23_a); 3,61 (dd, 1H, $J = 8,4, 7,3$ Hz, H-3); 3,40 (d, 1H, $J = 10,4$ Hz, H-23_b); 2,88 (dd, 1H, $J = 14,0, 4,0$ Hz, H-18); 1,11 (s, 3H, CH_3); 0,91 (s, 3H, CH_3); 0,90 (s, 3H, CH_3); 0,89 (s, 3H, CH_3); 0,86 (s, 3H, CH_3); 0,55 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3/ppm$; 75 MHz) δ : 177,35 (O=C-28); 147,73 (C-35); 143,80 (C-32); 143,66 (=C-13); 128,55 (C-33, C-33'); 123,84 (C-34, C-34'); 122,72 (=CH-12); 76,90 (HO-CH-3); 72,12 (HO-CH₂-23); 64,69 (O-CH₂-31); 49,85 (CH-9); 47,65 (C-17); 47,00 (C-5); 45,90 (CH₂-19); 41,91 (C-4); 41,84 (C-14); 41,55 (CH-18); 39,41 (C-8); 38,22 (CH₂-1); 36,99 (C-10); 33,90 (CH₂-21); 33,17 (CH₃-29); 32,60 (CH₂-7); 32,55 (CH₂-22); 30,81 (C-20); 27,70 (CH₂-15); 26,85 (CH₃-27); 26,02 (CH₂-2); 23,73 (CH₃-30); 23,49 (CH₂-11); 23,22 (CH₂-16); 18,55 (CH₂-6); 17,02 (CH₃-26); 15,74 (CH₃-25); 11,52 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{37}H_{54}NO_6]^+$: $m/z = 608,8278$, encontrado: $m/z = 608,3951$.

CHN: calculado: C, 72,99; H, 8,94; encontrado: C, 72,74; H, 9,03.

4.2.21. Dados referente ao (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de *p*-metilbenzila (4s)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 146-147,3 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3390, 1726, 1158, 1032, 1008, 804.

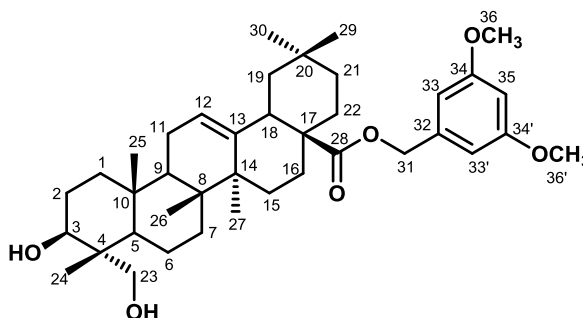
RMN de 1H ($CDCl_3$ /ppm; 300 MHz) δ : 7,12 (d, 2H, J = 8,0 Hz, H-33, H-33'); 7,14 (d, 2H, J = 8,0 Hz, H-34, H-34'); 5,27 (t, 1H, J = 3,3 Hz, H-12); 5,05 (d, 1H, J = 12,4 Hz, H-31_a); 4,98 (d, 1H, J = 12,4 Hz, H-31_b); 3,70 (d, 1H, J = 10,4 Hz, H-23_a); 3,62 (tl, 1H, J = 7,8 Hz, H-3); 3,40 (d, 1H, J = 10,4 Hz, H-23_b); 2,88 (dd, 1H, J = 14,0, 4,1 Hz, H-18); 2,34 (s, 3H, CH_3); 1,10 (s, 3H, CH_3); 0,92 (s, 3H, CH_3); 0,90 (s, 3H, CH_3); 0,88 (s, 3H, CH_3); 0,87 (s, 3H, CH_3); 0,59 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$ /ppm; 75 MHz) δ : 177,64 (O=C-28); 143,79 (=C-13); 137,79 (C-35); 133,50 (C-32); 129,19 (C-34, C-34'); 128,23 (C-33, C-33'); 122,51 (=CH-12); 77,00 (HO-CH-3); 72,23 (HO-CH₂-23); 66,02 (O-CH₂-31); 49,94 (CH-9); 47,72 (C-17); 46,81 (CH-5); 45,98 (CH-19); 41,88 (C-4); 41,81 (C-14); 41,49 (CH-18); 39,40 (C-8); 38,24 (CH₂-1); 37,01 (C-10); 33,97 (CH₂-21); 33,23 (CH₃-29); 32,63 (CH₂-7); 32,56 (CH₂-22); 30,80 (C-20); 27,73 (CH₂-15); 26,90 (CH₃-27); 26,02 (CH₂-2); 23,77 (CH₃-30); 23,49 (CH₂-11); 23,13 (CH₂-16); 21,31 (CH₃-36); 18,59 (CH₂-6); 17,02 (CH₃-26); 15,78 (CH₃-25); 11,54 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{38}H_{56}O_4]^+$: m/z = 576,8488, encontrado: m/z = 577,4248.

CHN: calculado: C, 79,12; H, 9,79; encontrado: C, 78,97; H, 9,94.

4.2.22. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de 3,5-dimetoxibenzila (4t)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 96-97 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3418, 1724, 1598, 1206, 1158, 1031, 1010, 832.

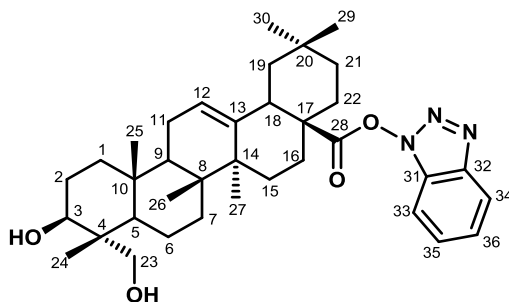
RMN de 1H ($CDCl_3/ppm$; 300 MHz) δ : 6,48 (d, 2H, $J = 2,3$ Hz, H-33, H-33'); 6,39 (t, 1H, $J = 2,3$ Hz, H-35); 5,28 (t, 1H, $J = 2,4$ Hz, H-12); 5,02 (d, 1H, $J = 12,7$ Hz, H-31_a); 4,96 (d, 1H, $J = 12,7$ Hz, H-31_b); 3,77 (s, 6H, 2xCH₃-O); 3,70 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_a); 3,62 (tl, 1H, $J = 6,9$ Hz, H-3); 3,41 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_b); 2,90 (dd, 1H, $J = 13,7, 4,2$ Hz, H-18); 1,11 (s, 3H, CH₃); 0,91 (s, 6H, 2xCH₃); 0,89 (s, 3H, CH₃); 0,87 (s, 3H, CH₃); 0,62 (s, 3H, CH₃).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3/ppm$; 75 MHz) δ : 177,53 (O=C-28); 160,96 (C-34, C-34'); 143,80 (=C-13); 138,81 (C-32); 122,58 (=CH-12); 105,75 (C-33, C-33'); 99,98 (C-35); 77,01 (HO-CH-3); 72,24 (HO-CH₂-23); 65,93 (O-CH₂-31); 55,46 (2xO-CH₃-36, 36'); 49,93 (CH-9); 47,73 (C-17); 46,90 (CH-5); 46,01 (CH-19); 41,91 (C-4); 41,83 (C-14); 41,49 (CH-18); 39,42 (C-8); 38,23 (CH₂-1); 37,02 (C-10); 33,98 (CH₂-21); 33,22 (CH₃-29); 32,62 (CH₂-7); 32,54 (CH₂-22); 30,84 (C-20); 27,75 (CH₂-15); 26,85 (CH₃-27); 26,04 (CH₂-2); 23,77 (CH₃-30); 23,47 (CH₂-11); 23,19 (CH₂-16); 18,60 (CH₂-6); 17,01 (CH₃-26); 15,76 (CH₃-25); 11,53 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{39}H_{58}O_6]^+$: $m/z = 622,8742$, encontrado: $m/z = 623,4304$.

CHN: calculado: C, 75,20; H, 8,39; encontrado: C, 74,97; H, 8,51.

4.2.23. Dados referente ao (3 β),23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de benzotriazol (4u)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 232-234 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{\text{max}}$ /cm⁻¹): 3400, 1806, 1088, 1050, 998, 738.

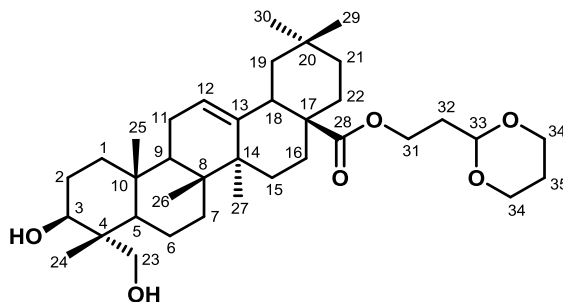
RMN de ¹H (CDCl₃/ppm; 300 MHz) δ : 8,03 (dt, 1H, *J* = 8,4, 0,8 Hz, H-34); 7,51 (ddd, 1H, *J* = 9,0, 7,6, 0,8 Hz, H-33); 7,40 (m, 1H, H-35); 7,35 (m, 1H, H-36); 5,36 (t, 1H, *J* = 3,5 Hz, H-12); 3,73 (d, 1H, *J* = 10,4 Hz, H-23_a); 3,64 (tl, 1H, *J* = 7,6 Hz, H-3); 3,42 (d, 1H, *J* = 10,4 Hz, H-23_b); 2,96 (dd, 1H, *J* = 13,4, 4,2 Hz, H-18); 1,20 (s, 3H, CH₃); 0,98 (s, 3H, CH₃); 0,96 (s, 3H, CH₃); 0,94 (s, 3H, CH₃); 0,88 (s, 3H, CH₃); 0,84 (s, 3H, CH₃).

RMN de ¹³C (CDCl₃/ppm; 75 MHz) δ : 173,75 (O=C-28); 143,64 (=C-13); 142,19 (C-31); 122,88 (C-32); 128,61 (C-36); 124,79 (C-35); 123,98 (=CH-12); 120,59 (C-34); 108,27 (C-33); 76,79 (HO-CH-3); 72,02 (HO-CH₂-23); 49,90 (CH-9); 47,73 (C-17); 47,67 (CH-5); 45,58 (CH-19); 42,06 (C-4); 41,92 (C-14); 41,72 (CH-18); 39,60 (C-8); 38,34 (CH₂-1); 37,03 (C-10); 33,80 (CH₂-21); 33,04 (CH₃-29); 32,75 (CH₂-7); 32,56 (CH₂-22); 30,77 (C-20); 28,17 (CH₂-15); 26,74 (CH₃-27); 25,90 (CH₂-2); 23,65 (CH₃-30); 23,57 (CH₂-11); 23,25 (CH₂-16); 18,58 (CH₂-6); 17,42 (CH₃-26); 15,88 (CH₃-25); 11,61 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): [M+H]⁺ calculado para [C₃₆H₅₁N₃O₄]⁺: *m/z* = 589,8079, encontrado: *m/z* = 590,3959.

CHN: calculado: C, 73,31; H, 8,71; encontrado: C, 73,07; H, 8,95.

4.2.24. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de 2-etil-1,3-dioxano (4v)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 110-111 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3440, 1724, 1142, 1042.

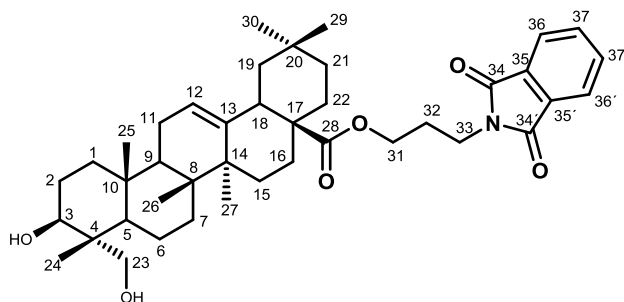
RMN de 1H ($CDCl_3$ /ppm; 300 MHz) δ : 5,27 (t, 1H, $J = 3,3$ Hz, H-12); 4,62 (t, 1H, $J = 5,3$ Hz, H-33); 4,09 (td, 4H, $J = 6,6, 1,6$ Hz, H-34, H-34'); 3,73 (m, 3H, H-23_a, H-31); 3,62 (tl, 1H, $J = 7,6$ Hz, H-3); 3,41 (d, H, $J = 10,3$ Hz, H-23_b); 2,85 (dd, 1H, $J = 13,9, 4,2$ Hz, H-18); 1,11 (s, 3H, CH_3); 0,94 (s, 3H, CH_3); 0,91 (s, 3H, CH_3); 0,89 (s, 3H, CH_3); 0,87 (s, 3H, CH_3); 0,72 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$ /ppm; 75 MHz) δ : 177,67 (O=C-28); 143,97 (=C-13); 122,37 (=CH-12); 99,75 (-O-CH-O-33); 77,02 (HO-CH-3); 72,26 (HO-CH₂-23); 67,05 (O-CH₂-34'); 67,04 (O-CH₂-34); 60,04 (O-CH₂-31); 49,96 (CH-9); 47,74 (C-17); 46,78 (CH-5); 46,01 (CH-19); 41,91 (C-4); 41,84 (C-14); 41,40 (CH-18); 39,45 (C-8); 38,24 (CH₂-1); 37,06 (C-10); 34,57 (CH₂-32); 34,00 (CH₂-21); 33,23 (CH₃-29); 32,66 (CH₂-7); 32,54 (CH₂-22); 30,84 (C-20); 27,73 (CH₂-15); 26,00 (CH₂-35); 26,86 (CH₃-27); 25,90 (CH₂-2); 23,74 (CH₃-30); 23,55 (CH₂-11); 23,13 (CH₂-16); 18,62 (CH₂-6); 17,14 (CH₃-26); 15,81 (CH₃-25); 11,54 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{36}H_{58}O_6]^+$: $m/z = 586,8421$, encontrado: $m/z = 587,4307$.

CHN calculado: C, 73,68; H, 9,96; encontrado: C, 73,47; H, 10,09.

4.2.25. Dados referentes ao (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de 3-*N*-propilftalimida (4w)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 121,3-123 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3458, 3228, 1772, 1715, 1176, 1158, 1050, 1006, 720.

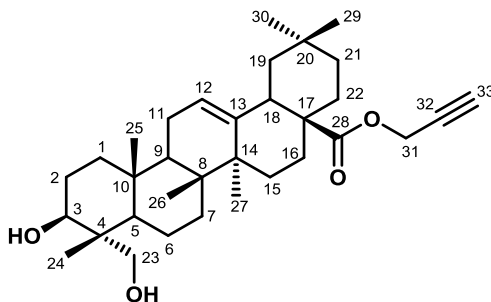
RMN de ^1H (CDCl_3/ppm ; 300 MHz) δ : 7,83 (m, 2H, H-36, H-36'); 7,71 (m, 2H, H-37, H-37'); 5,29 (t, 1H, $J = 3,3$ Hz, H-12); 4,06 (t, 1H, $J = 6,2$ Hz, H-31); 3,77 (m, 3H, H-33, H-23_a); 3,62 (tl, 1H, $J = 7,7$ Hz, H-3); 3,41 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_b); 2,87 (dd, 1H, $J = 13,9, 4,0$ Hz, H-18); 1,10 (s, 3H, CH_3); 0,92 (s, 6H, 2x CH_3); 0,88 (s, 3H, CH_3); 0,87 (s, 3H, CH_3); 0,70 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C (CDCl_3/ppm ; 75 MHz) δ : 177,70 ($\text{O}=\text{C}-28$); 166,34 ($\text{O}=\text{C}-34$); 166,34 ($\text{O}=\text{C}-34'$); 143,83 ($=\text{C}-13$); 134,11 (C-37); 134,11 (C-37'); 132,21 (C-35, C-35'); 123,39 (C-36, C-36'); 122,48 ($=\text{CH}-12$); 77,05 ($\text{HO}-\underline{\text{CH}}-3$); 72,28 ($\text{HO}-\underline{\text{CH}}_2-23$); 61,68 (C-31); 49,94 (CH-9); 47,73 (C-17); 46,83 (CH-5); 45,99 (CH-19); 41,91 (C-4); 41,84 (C-14); 41,43 (CH-18); 39,44 (C-8); 38,23 (CH_2-1); 37,03 (C-10); 35,31 (CH_2-33); 33,99 (CH_2-21); 33,23 (CH_3-29); 32,61 (CH_2-7); 32,47 (CH_2-22); 30,82 (C-20); 28,00 (CH_2-32); 27,80 (CH_2-15); 26,86 (CH_3-27); 26,00 (CH_2-2); 23,72 (CH_3-30); 23,51 (CH_2-11); 23,11 (CH_2-16); 18,61 (CH_2-6); 17,13 (CH_3-26); 15,80 (CH_3-25); 11,52 (CH_3-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $[\text{C}_{41}\text{H}_{59}\text{NO}_6]^+$: $m/z = 660,9103$, encontrado: $m/z = 660,4263$.

CHN: calculado: C, 74,40; H, 8,98; encontrado: C, 74,15; H, 9,13.

4.2.26. Dados referente ao (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de propinila (4x)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 196-197 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3396, 3310, 2128, 1730, 1158, 1034, 1010, 668.

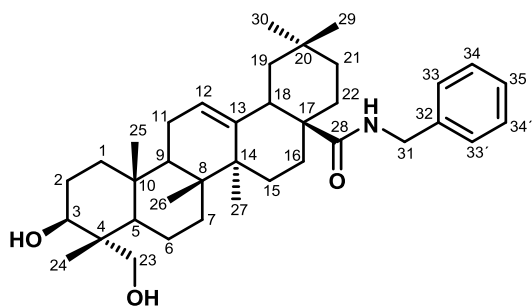
RMN de 1H ($CDCl_3$ /ppm; 300 MHz) δ : 5,28 (t, 1H, $J = 3,6$ Hz, H-12); 4,67 (dd, 1H, $J = 15,6, 2,7$ Hz, H-31_a); 4,55 (dd, 1H, $J = 15,6, 2,7$ Hz, H-31_b); 3,69 (d, 1H, $J = 10,4$ Hz, H-23_a); 3,61 (tl, 1H, $J = 7,9$ Hz, H-3); 3,40 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_b); 2,84 (dd, 1H, $J = 14,0, 4,7$ Hz, H-18); 2,40 (t, 1H, $J = 2,7$ Hz, H-33); 1,11 (s, 3H, CH_3); 0,93 (s, 3H, CH_3); 0,91 (s, 3H, CH_3); 0,88 (s, 3H, CH_3); 0,86 (s, 3H, CH_3); 0,73 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$ /ppm; 75 MHz) δ : 176,99 (O=C-28); 143,47 (=C-13); 122,67 (=CH-12); 78,21 (C-32); 76,96 (HO-CH-3); 74,54 (CH-33); 72,14 (HO-CH₂-23); 51,77 (O-CH₂-31); 49,92 (CH-9); 47,72 (C-17); 46,89 (CH-5); 45,95 (CH-19); 41,88 (C-4); 41,84 (C-14); 41,39 (CH-18); 39,50 (C-8); 38,25 (CH₂-1); 37,02 (C-10); 33,94 (CH₂-21); 33,19 (CH₃-29); 32,65 (CH₂-7); 32,30 (CH₂-22); 30,78 (C-20); 27,78 (CH₂-15); 26,79 (CH₃-27); 25,98 (CH₂-2); 23,73 (CH₃-30); 23,51 (CH₂-11); 23,12 (CH₂-16); 18,60 (CH₂-6); 17,23 (CH₃-26); 15,83 (CH₃-25); 11,55 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{33}H_{50}O_4]^+$: $m/z = 510,7477$, encontrado: $m/z = 511,3779$.

CHN: calculado: C, 77,60; H, 9,87; encontrado: C, 77,50; H, 9,99.

4.2.27. Dados referente ao Benzil-(3 β)3, 23-dihidroiolean-12-en-28-amida (5a)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 135-136,8 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{\text{max}}$ /cm⁻¹): 3388, 1636, 1522, 1048, 1004, 732.

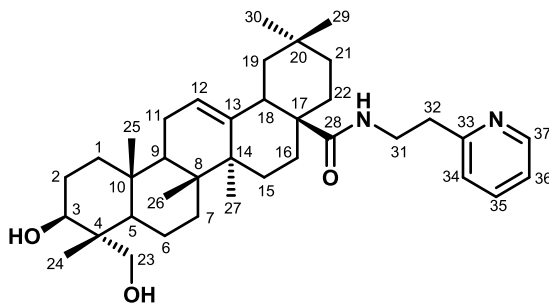
RMN de ¹H (CDCl₃/ppm; 300 MHz) δ : 7,31 (m, 3H, H-34, H-34', H-35); 7,23 (m, 2H, H-33, H-33'); 6,21 (t, 1H, *J* = 5,5 Hz, N-H); 5,28 (sl, 1H, H-12); 4,61 (dd, 1H, *J* = 14,7, 6,3 Hz, H-31_a); 4,12 (m, 1H, H-31_b); 3,69 (d, 1H, *J* = 10,3 Hz, H-23_a); 3,61 (tl, 1H, *J* = 8,4 Hz, H-3); 3,39 (d, 1H, *J* = 10,3 Hz, H-23_b); 2,52 (dd, 1H, *J* = 13,1, 3,6 Hz, H-18); 1,13 (s, 3H, CH₃); 0,89 (s, 9H, 3xCH₃); 0,87 (s, 3H, CH₃); 0,65 (s, 3H, CH₃).

RMN de ¹³C (CDCl₃/ppm; 75 MHz) δ : 178,33 (O=C-28); 144,86 (=C-13); 138,40 (C-32); 128,78 (C-34); 128,78 (C-34'); 127,84 (C-33'); 127,84 (C-33); 127,50 (C-35); 123,03 (=CH-12); 76,70 (HO-CH-3); 72,00 (HO-CH₂-23); 49,77 (CH-9); 47,59 (C-17); 46,76 (CH-5); 46,47 (CH-19); 43,71 (HN-CH₂-31); 42,45 (C-4); 41,17 (C-14); 41,88 (CH-18); 39,45 (C-8); 38,26 (CH₂-1); 36,92 (C-10); 34,23 (CH₂-21); 33,10 (CH₃-29); 32,70 (CH₂-7); 32,27 (CH₂-22); 30,84 (C-20); 27,43 (CH₂-15); 26,64 (CH₃-27); 25,87 (CH₂-2); 23,91 (CH₃-30); 23,73 (CH₂-11); 23,53 (CH₂-16); 18,52 (CH₂-6); 17,04 (CH₃-26); 15,89 (CH₃-25); 11,59 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): [M+H]⁺ calculado para [C₃₇H₅₅NO₃]⁺: *m/z* = 561,8375, encontrado: *m/z* = 562,4260.

CHN: calculado: C, 79,10; H, 9,87; encontrado: C, 78,95; H, 9,98.

4.2.28. Dados referente ao 1-etilpiridinil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (5b)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 255,8-257,4 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3402, 1730, 1636, 1522, 1242, 1048, 1004, 730.

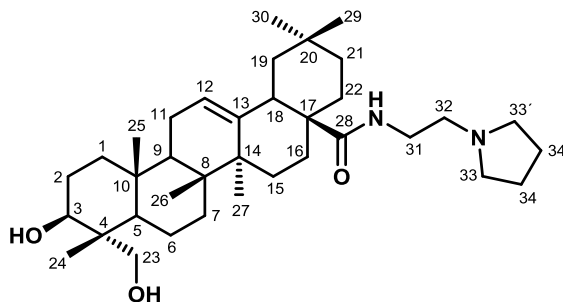
RMN de 1H ($CDCl_3/ppm$; 300 MHz) δ : 8,51 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz, H-37); 7,61 (t, 1H, $J = 7,5$ Hz, H-35); 7,15 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz, H-34, H-36); 6,73 (sl, 1H, N-H); 5,19 (sl, 1H, H-12); 3,69 (m, 3H, H-23_a, H-3 e H-31_a); 3,42 (m, 2H, H-23_b, H-31_b); 2,96 (t, 2H, $J = 6,1$ Hz, H-32); 2,43 (ddl, 1H, $J = 11,3$ Hz, H-18); 1,09 (s, 3H, CH_3); 0,86 (s, 9H, $3 \times CH_3$); 0,87 (s, 3H, CH_3); 0,58 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3/ppm$; 75 MHz) δ : 178,24 (O=C-28); 159,94 (N=C-33); 149,18 (N-C-37); 144,43 (=C-13); 136,72 (C-35); 123,70 (=CH-12); 122,82 (C-34); 121,66 (C-36); 76,82 (HO-CH-3); 72,15 (HO-CH₂-23); 49,83 (CH-9); 47,62 (C-17); 46,92 (CH-5); 46,42 (CH-19); 42,10 (C-4); 42,00 (C-14); 41,87 (CH-18); 39,41 (C-8); 38,67 (NH-CH₂-31); 38,24 (CH₂-1); 36,97 (CH₂-32); 36,94 (C-10); 34,25 (CH₂-21); 33,12 (CH₃-29); 32,74 (CH₂-7); 32,22 (CH₂-22); 30,82 (C-20); 27,40 (CH₂-15); 26,66 (CH₃-27); 25,91 (CH₂-2); 23,69 (CH₃-30); 23,65 (CH₂-11); 23,47 (CH₂-16); 18,55 (CH₂-6); 16,94 (CH₃-26); 15,79 (CH₃-25); 11,59 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{37}H_{56}N_2O_3]^+$: $m/z = 576,8522$, encontrado: $m/z = 577,4366$.

CHN: calculado: C, 77,04; H, 9,78; encontrado: C, 76,81; H, 9,88.

4.2.29. Dados referente ao 1-etilpirrolidinil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (5c)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 240,8-242,3 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3424, 1630, 1610, 1532, 1058, 1044.

RMN de 1H ($CDCl_3/ppm$; 300 MHz) δ : 6,61 (t, 1H, $J = 4,8$ Hz, N-H); 5,31 (t, 1H, $J = 3,2$ Hz, H-12); 3,69 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_a); 3,62 (tl, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-3); 3,42 (m, 1H, H-31_a); 3,40 (d, 1H, $J = 10,0$ Hz, H-23_b); 3,19 (m, 1H, H-31_b); 2,53 (m, 7H, H-32, H-33, H-33', H-18); 1,13 (s, 3H, CH_3); 0,94 (s, 3H, CH_3); 0,88 (s, 6H, $2 \times CH_3$); 0,86 (s, 3H, CH_3); 0,76 (s, 3H, CH_3).

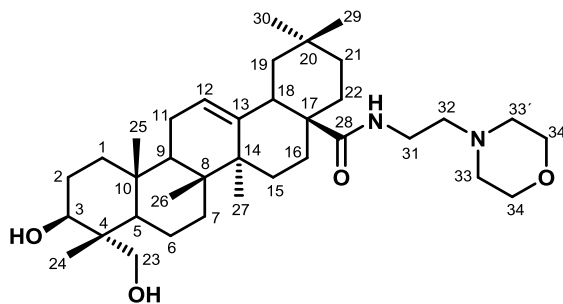
RMN de ^{13}C ($CDCl_3/ppm$; 75 MHz) δ : 178,46 (O=C-28); 144,53 (=C-13); 122,89 (=CH-12); 76,73 (HO-CH-3); 72,07 (HO-CH₂-23); 54,39 (N-CH₂-32); 54,04 (N-CH₂-33, N-CH₂-33'); 49,85 (CH-9); 47,64 (C-17); 46,85 (CH-5); 46,46 (CH-19); 42,37 (C-4); 41,14 (C-14); 41,88 (CH-18); 39,49 (C-8); 38,30 (CH₂-1); 37,99 (HN-CH₂-31); 36,97 (C-10); 34,29 (CH₂-21); 33,13 (CH₃-29); 32,71 (CH₂-7); 32,36 (CH₂-22); 30,82 (C-20); 27,46 (CH₂-15); 26,62 (CH₃-27); 25,84 (CH₂-2); 23,74 (CH₃-30); 23,74 (CH₂-34 e CH₂-34'); 23,69 (CH₂-11); 23,66 (CH₂-16); 18,58 (CH₂-6); 17,03 (CH₃-26); 15,88 (CH₃-25); 11,64 (CH₃-24).

ESI-HRMS: (MeOH, $C_{36}H_{61}N_2O_3$, $m/z = 569,4675$ $[M+H]^+$); calculado $C_{36}H_{61}N_2O_3$, $m/z = 569,4682$.

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{36}H_{60}N_2O_3]^+$: $m/z = 568,8732$, encontrado: $m/z = 569,4675$.

CHN: calculado: C, 76,01; H, 10,63; encontrado: C, 75,85; H, 10,93.

4.2.30. Dados referente ao 1-etilmorfolinil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (5d)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 245,3-246,8 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3404, 1630, 1522, 1118, 1048.

RMN de 1H (CD_3OD/ppm ; 300 MHz) δ : 5,39 (sl, 1H, H-12); 3,71 (tl, 4H, $J = 4,5$ Hz, H-34, H-34'); 3,61 (dd, 1H, $J = 10,9, 5,1$ Hz, H-3); 3,53 (d, 1H, $J = 10,9$ Hz, H-23_a); 3,31 (m, 3H, H-31, H-23_b); 2,71 (dd, 1H, $J = 12,6, 2,8$ Hz, H-18); 2,48 (m, 6H, H-32, H-33, H-33'); 1,20 (s, 3H, CH₃); 0,97 (s, 3H, CH₃); 0,95 (s, 3H, CH₃); 0,92 (s, 3H, CH₃); 0,80 (s, 3H, CH₃); 0,70 (s, 3H, CH₃).

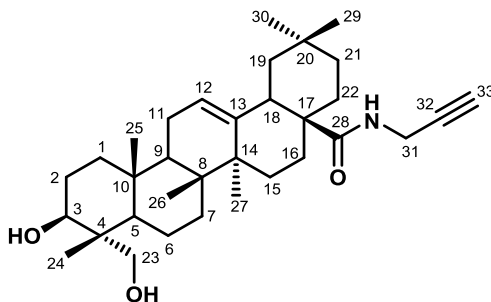
RMN de ^{13}C (CD_3OD/ppm ; 75 MHz) δ : 180,29 (O=C-28); 145,44 (=C-13); 124,06 (=CH-12); 73,77 (HO-CH-3); 67,89 (O-CH₂-34, O-CH₂-34'); 67,27 (HO-CH₂-23); 58,09 (N-CH₂-32); 54,62 (N-CH₂-33 e N-CH₂-33'); 48,91 (CH-9); 48,66 (C-17); 47,76 (CH-5); 47,61 (CH-19); 43,28 (C-4); 43,07 (C-14); 42,88 (CH-18); 40,62 (C-8); 39,45 (CH₂-1); 37,89 (HN-CH₂-31); 37,08 (C-10); 35,08 (CH₂-21); 34,15 (CH₃-29); 33,49 (CH₂-7); 33,21 (CH₂-22); 31,60 (C-20); 28,46 (CH₂-15); 27,39 (CH₃-27); 26,44 (CH₂-2); 24,61 (CH₃-30); 24,17 (CH₂-11); 23,95 (CH₂-16); 19,08 (CH₂-6); 17,96 (CH₃-26); 16,31 (CH₃-25); 12,74 (CH₃-24).

ESI-HRMS: (MeOH, C₃₆H₆₁N₂O₄, $m/z = 585,4624$ [M+H]⁺); calculado C₃₆H₆₁N₂O₄, $m/z = 585,4631$.

HRMS (ESI TOF-MS): [M+H]⁺ calculado para [C₃₆H₆₀N₂O₄]⁺: $m/z = 584,8726$, encontrado: $m/z = 585,4624$.

CHN: calculado: C, 73,93; H, 10,34; encontrado: C, 73,68; H, 10,62.

4.2.31. Dados referente ao 1-Propinil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (5e)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 141,8-143,2 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3384, 2120, 1732, 1654, 1520, 1046, 1002.

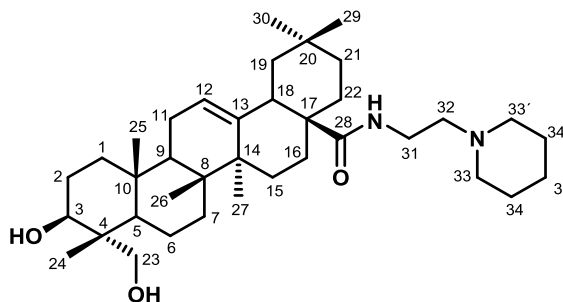
RMN de 1H ($CDCl_3$ /ppm; 300 MHz) δ : 6,09 (sl, 1H, N-H); 5,39 (sl, 1H, H-12); 3,95 (m, 2H, H-31); 3,69 (d, 1H, $J = 10,2$ Hz, H-23_a); 3,62 (tl, 1H, $J = 7,8$ Hz, H-3); 3,39 (d, 1H, $J = 10,2$ Hz, H-23_b); 2,51 (ddl, 1H, $J = 11,4$ Hz, H-18); 2,19 (sl, 1H, H-33); 1,14 (s, 3H, CH_3); 0,94 (s, 3H, CH_3); 0,89 (s, 6H, 2x CH_3); 0,87 (s, 3H, CH_3); 0,77 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$ /ppm; 75 MHz) δ : 178,23 (O=C-28); 144,77 (=C-13); 123,26 (=CH-12); 79,70 (C-32); 76,73 (HO-CH-3); 72,01 (HO-CH₂-23); 71,75 (CH-33); 49,78 (CH-9); 47,62 (C-17); 46,74 (CH-5); 46,42 (CH-19); 42,23 (C-4); 42,15 (C-14); 41,89 (CH-18); 39,50 (C-8); 38,31 (CH₂-1); 36,94 (C-10); 34,17 (CH₂-21); 33,08 (CH₃-29); 32,36 (CH₂-7); 32,21 (CH₂-22); 30,82 (C-20); 29,47 (HN-CH₂-31); 27,35 (CH₂-15); 26,66 (CH₃-27); 25,89 (CH₂-2); 23,98 (CH₃-30); 23,68 (CH₂-11); 23,62 (CH₂-16); 18,53 (CH₂-6); 17,10 (CH₃-26); 15,86 (CH₃-25); 11,58 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{33}H_{51}NO_3]^+$: $m/z = 509,7629$, encontrado: $m/z = 510,3944$.

CHN: calculado: C, 77,75; H, 10,08; encontrado: C, 77,51; H, 10,33.

4.2.32. Dados referente ao 1-etilpiperidinil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (5f)



Aspecto físico: sólido amarelo cl; T_f 246,9-247,8 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{\text{max}}$ /cm⁻¹): 3420, 3374, 1624, 1604, 1540, 1042, 1006.

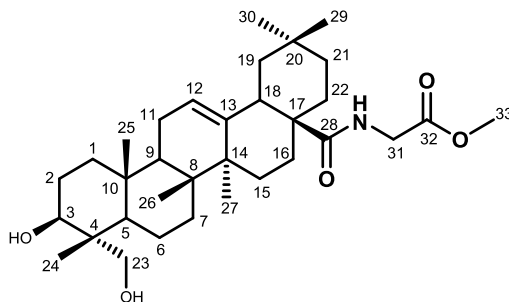
RMN de ¹H (C₅D₅N/ppm; 300 MHz) δ : 5,51 (sl, 1H, H-12); 4,22 (m, 2H, H-23_a, H-3); 3,73 (d, 1H, *J* = 10,3 Hz, H-23_b); 3,65 (m, 1H, H-31_a); 3,46 (m, 1H, H-31_b); 2,94 (ddl, 1H, *J* = 10,8 Hz, H-18); 2,44 (m, 2H, H-32); 2,31 (sl, 4H, H-33, H-33'); 1,21 (s, 3H, CH₃); 1,08 (s, 3H, CH₃); 1,03 (s, 3H, CH₃); 0,96 (s, 3H, CH₃); 0,93 (s, 3H, CH₃); 0,90 (s, 3H, CH₃).

RMN de ¹³C (C₅D₅N/ppm; 75 MHz) δ : 177,76 (O=C-28); 145,16 (=C-13); 123,29 (=CH-12); 73,51 (HO-CH-3); 67,93 (HO-CH₂-23); 58,04 (N-CH₂-32); 54,86 (N-CH₂-33, N-CH₂-33'); 48,73 (CH-9); 47,38 (C-17); 47,26 (CH-5); 46,81 (CH-19); 43,25 (C-4); 42,53 (C-14); 42,53 (CH-18); 40,07 (C-8); 39,10 (CH₂-1); 37,51 (HN-CH₂-31); 37,14 (C-10); 34,70 (CH₂-21); 33,90 (CH₃-29); 32,45 (CH₂-7); 32,98 (CH₂-22); 31,20 (C-20); 28,16 (CH₂-15); 27,97 (CH₃-27); 26,78 (CH₂-34, CH₂-34'); 26,34 (CH₂-2); 25,04 (CH₂-35); 24,22 (CH₃-30); 24,18 (CH₂-11); 23,94 (CH₂-16); 18,86 (CH₂-6); 17,73 (CH₃-26); 16,34 (CH₃-25); 13,52 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): [M+H]⁺ calculado para [C₃₇H₆₂N₂O₃]⁺: *m/z* = 582.8998, encontrado: *m/z* = 583.4838;

CHN: calculado: C, 76.24; H, 10.72; encontrado: C, 76.04; H, 10.94.

4.2.33. Dados referente ao glicinil-metil-éster-(3 β)3, 23-dihidroiolean-12-en-28-amida (5g)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 139,8-141,3 °C

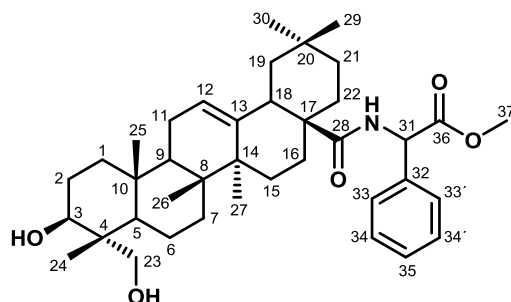
IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{\text{max}}$ /cm⁻¹): 3396, 1744, 1638, 1530, 1212 1048, 1004.

RMN de ¹H (CD₃OD/ppm; 300 MHz) δ : 5,37 (sl, 1H, H-12); 3,99 (d, 1H, *J* = 14,4 Hz, H-31_a); 3,78 (d, 1H, *J* = 17,4 Hz, H-31_b); 3,72 (s, 3H, O-CH₃); 3,62 (dd, 1H, *J* = 10,9, 4,9 Hz, H-3); 3,54 (d, 1H, *J* = 10,9 Hz, H-23_a); 3,31 (d, 1H, *J* = 10,8 Hz, H-23_b); 2,80 (ddl, 1H, *J* = 13,1 Hz, H-18); 1,20 (s, 3H, CH₃); 0,99 (s, 3H, CH₃); 0,97 (s, 3H, CH₃); 0,93 (s, 3H, CH₃); 0,78 (s, 3H, CH₃); 0,72 (s, 3H, CH₃).

RMN de ¹³C (CD₃OD/ppm; 75 MHz) δ : 180,78 (O=C-28); 171,85 (O=C-28); 145,11 (=C-13); 124,12 (=CH-12); 73,87 (HO-CH-3); 67,33 (HO-CH₂-23); 52,51 (O-CH₃-33); 48,99 (CH-9); 48,71 (C-17); 47,62 (CH-5); 47,49 (CH-19); 43,27 (C-4); 42,97 (C-14); 42,57 (CH-18); 42,16 (HN-CH₂-31); 40,59 (C-8); 39,48 (CH₂-1); 37,88 (C-10); 35,09 (CH₂-21); 34,02 (CH₃-29); 33,53 (CH₂-7); 33,28 (CH₂-22); 31,60 (C-20); 28,43 (CH₂-15); 27,41 (CH₃-27); 26,48 (CH₂-2); 24,55 (CH₃-30); 24,20 (CH₂-11); 24,00 (CH₂-16); 19,11 (CH₂-6); 17,55 (CH₃-26); 16,28 (CH₃-25); 12,71 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): [M+H]⁺ calculado para [C₃₃H₅₄NO₅]⁺: *m/z* = 544,4002, encontrado: *m/z* = 544,3999.

4.2.34. Dados referente ao 2-fenilglicil-metil-éster-(3 β),23-dihidroxiolean-12-en-28-amida (5h)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 113,1-114,3 °C

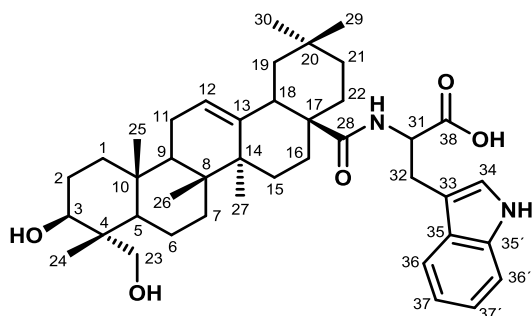
IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3420, 3062, 1742, 1650, 1508, 1210, 1172, 1046, 1004, 698.

RMN de 1H ($CDCl_3$ /ppm; 300 MHz) δ : 7,31 (s, 5H); 6,66 (d, 1H, J = 6,2 Hz, N-H); 5,45 (d, 1H, J = 6,2 Hz, H-31); 5,27 (sl, 1H, H-12); 3,69 (s, 3H, O-CH₃-37); 3,65 (m, 1H, H-23_a); 3,57 (tl, 1H, J = 7,2 Hz, H-3); 3,35 (d, 1H, J = 10,3 Hz, H-23_b); 2,62 (ddl, 1H, J = 12,7 Hz, H-18); 1,09 (s, 3H, CH₃); 0,94 (s, 3H, CH₃); 0,89 (s, 3H, CH₃); 0,83 (s, 3H, CH₃); 0,76 (s, 3H, CH₃); 0,26 (s, 3H, CH₃).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$ /ppm; 75 MHz) δ : 177,76 (O=C-28); 171,62 (O=C-36); 145,35 (=C-13); 136,19 (C-32); 129,19 (C-33); 129,19 (C-33'); 128,94 (C-35); 127,71 (C-34); 127,71 (C-34'); 123,01 (=CH-12); 76,73 (HO-CH-3); 72,07 (HO-CH₂-23); 56,57 (HN-CH-31); 52,75 (O-CH₃-37); 48,80 (CH-9); 47,54 (C-17); 46,54 (CH-5); 46,36 (CH-19); 42,62 (C-4); 42,07 (C-14); 41,80 (CH-18); 39,34 (C-8); 38,23 (CH₂-1); 36,82 (C-10); 34,19 (CH₂-21); 33,10 (CH₃-29); 32,59 (CH₂-7); 32,37 (CH₂-22); 31,83 (C-20); 27,35 (CH₂-15); 26,63 (CH₃-27); 25,68 (CH₂-2); 23,79 (CH₃-30); 23,76 (CH₂-11); 23,38 (CH₂-16); 18,45 (CH₂-6); 16,84 (CH₃-26); 15,66 (CH₃-25); 11,55 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{39}H_{58}NO_5]^+$: m/z = 620,4315, encontrado: m/z = 620,4306.

4.2.35. Dados referente ao triptofanil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (5i)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 280,1-281,3 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3404, 3056, 1756, 1634, 1508, 1046, 1008, 740.

RMN de 1H (CD_3OD/ppm ; 300 MHz) δ : 7,70 (dd, 1H, $J = 7,7, 19,0$ Hz, H-36); 7,58 (d, 1H, 7,7 Hz, N-H); 7,32 (m, 2H, H-36', NH); 7,10 (s, 1H, H-34); 7,06 (t, 1H, $J = 7,7$ Hz, H-37); 6,97 (t, 1H, $J = 7,4$ Hz, H-37'); 5,05 (sl, 1H, H-12); 4,50 (sl, 1H, H-31); 3,53 (m, 2H, H-23_a, H-32_a); 3,41 (ddl, 1H, $J = 13,7$ Hz, H-3); 3,33 (m, 1H, H-23_b); 3,17 (dd, 1H, $J = 7,6$ e 14,3 Hz, H-32_b); 2,52 (ddl, 1H, $J = 11,4$ Hz, H-18); 1,01 (s, 3H, CH₃); 0,82 (s, 6H, 2xCH₃); 0,75 (s, 3H, CH₃); 0,68 (s, 3H, CH₃); 0,19 (s, 3H, CH₃).

RMN de ^{13}C (CD_3OD/ppm ; 75 MHz) δ : (O=C-NH-28); (O=C-38); 144,65 (=C-13); 138,07 (C-35'); 129,10 (C-35); 124,15 (=C-34); 124,59 (=CH-12); 122,5 (C-37'); 119,75 (C-37); 119,49 (C-36); 112,37 (C-36'); 111,20 (=CH-33); 74,04 (HO-CH-3); 67,56 (HO-CH₂-23); 56,76 (HN-CH-31); 48,89 (CH-9); 48,78 (C-17); 47,54 (CH-5); 47,22 (CH-19); 43,21 (C-4); 42,72 (C-14); 41,49 (CH-18); 40,24 (C-8); 39,41 (CH₂-1); 37,77 (C-10); 35,10 (CH₂-21); 33,72 (CH₃-29); 33,50 (CH₂-7); 32,82 (CH₂-22); 31,47 (C-20); 28,03 (CH₂-15); 27,37 (CH₃-27); 26,34 (CH₂-2); 24,41 (CH₃-30); 24,22 (CH₂-11); 23,98 (CH₂-16); 19,16 (CH₂-6); 16,78 (CH₃-26); 16,24 (CH₃-25); 12,71 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{41}H_{59}N_2O_5]^+$: $m/z = 659,4424$, encontrado: $m/z = 659,4412$.

4.2.36 Ensaios Biológicos

Ensaios citotóxicos

A citotoxicidade dos compostos foi avaliada utilizando o ensaio colorimétrico de microcultura sulforodamina-B (SKEHAN *et al.*, 1990) (SRB, adquiridos de Sigma-Aldrich). As células foram semeadas numa placa de 96 cavidades no dia 0 com as densidades celulares adequadas para evitar confluência das células durante o período de experiência. Após 24 horas, as células foram tratadas com diluições em série dos compostos **4a-x** e **5a-e** (0-30 μ M) durante 96 horas. A concentração final de DMSO nunca excedeu os 0,5%. As percentagens das células sobreviventes em relação aos controles não tratados foram determinadas 96 h após do início da exposição dos compostos a avaliar. O meio sobrenadante foi e as células foram fixadas com 10% de TCA. Para uma fixação completa, as placas foram deixadas repousar a 4 °C. Após da fixação, as células foram lavadas quatro vezes com água destilada, utilizando procedimentos de distribuição e aspiração alternadas. As placas foram coradas com 100 μ l de 0,4% de SRB durante 20 minutos. Depois as placas foram lavadas com ácido acético ao 1% (v/v) para remover o excesso de corante foi deixado secar no ar durante a noite. Seguidamente uma solução de base Tris (100 μ l, 10 mM) foi adicionada a cada cavidade e a absorbância foi medida a λ = 570 nm (utilizando um leitor de placas de 96 cavidades, Tecan Spectra, Crailsheim, Germany). Os valores de EC₅₀ foram calculados a partir da curvas de dose resposta semi-logarítmicas por meio de regressão não-linear, aplicando dois parâmetros da equação de Hill-slope. Os valores são apresentados com um intervalo de confiança de 95%, geralmente foram usadas 7-13 pontos de dosagem.

Ensaio de exclusão com corante Laranja de acridina/iodeto de propídio (AO/PI)

Aproximadamente 500 mil células (A2780) foram semeadas em frascos de cultura de células e foram deixadas em crescimento durante 1 dia. Após desse período foi adicionada a substância a ser avaliada, e incubados durante 24 e 48 h. O meio sobrenadante foi recolhido e centrifugado; O sedimento celular foi suspenso em PBS e centrifugou-se novamente. Quantidades iguais de uma solução de AO/PI (1:1, 100 mg/ml) e uma suspensão da sedimento da células em PBS (w/o Ca²⁺ e Mg²⁺) foram suavemente misturados. A análise visual foi realizada sob um microscópio de fluorescência (Axioskop II (Carl Zeiss, Jena) e analisadas em

função da coloração. Fluorescência verde mostra a apoptose. Um núcleo profundo colorido indica células necróticas; pontos alaranjados suaves indicam lisossomos (DARZYNKIEWICZ *et al.*, 2004).

4.3. Resultados e Discussão

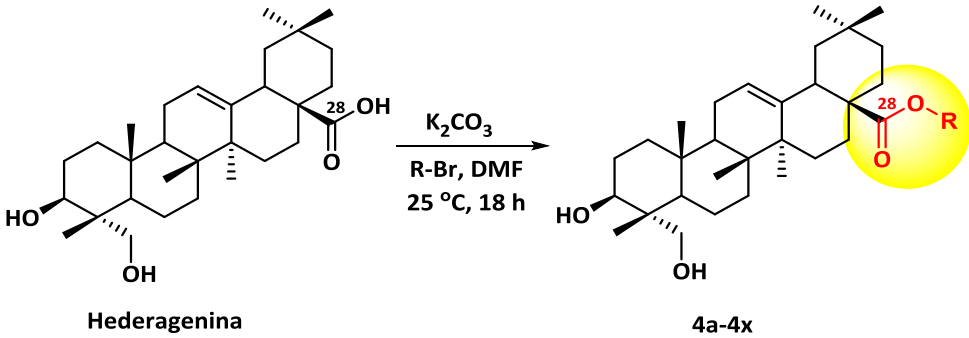
Em primeiro lugar para a obtenção dos ésteres e amidas derivados de hederagenina iniciou-se com o isolamento da aglicona do extrato etanólico rico em saponinas, obtido via maceração do pericarpo do fruto de *S. saponaria* L. Depois de realizar hidrólise ácida com uma mistura de MeOH-H₂SO₄ 5/ , seguindo a metodologia de Ohgi e colaboradores em 1999, obteve-se a hederagenina (**3a**) como um sólido amorfo branco (PAIWAN e DHARA, 1992; KHALIK *et al.*, 2000; BOKE, 2014) (ver metodologia no capítulo 2).

4.3.1. Sínteses de ésteres derivados da hederagenina

Para as sínteses dos ésteres da hederagenina, uma reação de substituição nucleofílica bimolecular S_N2 utilizando-se diferentes brometos benzila substituída foi empregada. A metodologia utilizada foi semelhante aquela de SIEWERT e colaboradores (2014).

A hederagenina foi transformada na formação de ésteres no carbono 28, com brometo de benzila substituída na presença de carbonato de potássio (K₂CO₃), em *N,N*-dimetilformamida (DMF) a temperatura ambiente por 18 horas. Através de CCD observou-se o consumo dos materiais de partida e o surgimento do produto desejado, que foi lavado com uma solução aquosa de HCl ao 5/ , água e solução saturada de NaCl, e secado com Na₂SO₄ anidro. Os compostos foram purificados por cromatografia em coluna (SIEWERT *et al.*, 2014), obtendo-se 24 ésteres desejados como sólidos brancos denominados (3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de R-benzila substituída (**4a-x**) (Tabela 4.3.1).

Tabela 4.3.1 - Ésteres derivados da hederagenina.

		
Composto	R	Rendimento (%)
4a	benzil	56
4b	<i>o</i> -nitrobenzil	43
4c	<i>o</i> -bromobenzil	55
4d	pentafluorobenzil	18
4e	<i>o</i> -clorobenzil	76
4f	<i>o</i> -metilbenzil	86
4g	2,6-diclorobenzil	75
4h	<i>o</i> -fluorobenzil	57
4i	2,4-difluorobenzil	38
4j	2,6-difluorobenzil	79
4k	<i>m</i> -nitrobenzil	47
4l	<i>m</i> -clorobenzil	35
4m	<i>m</i> -metilbenzil	53
4n	<i>m</i> -bromobenzil	55
4o	<i>p</i> -fluorobenzil	90
4p	<i>p</i> -bromobenzil	81
4q	<i>p</i> -clorobenzil	93
4r	<i>p</i> -nitrobenzil	58
4s	<i>p</i> -metilbenzil	32
4t	3,5-dimetoxibenzil	68
4u	benzotriazol	92
4v	etildioxano	84
4w	<i>N</i> -propilftalamida	76
4x	propinil	92

Uma proposta mecanística para a reação de substituição nucleofílica bimolecular é mostrada na Figura 4.3.1. Os produtos formados apresentam-se na forma de ésteres, e ocorre em uma etapa sincronizada. Inicialmente a base K_2CO_3 extrai o hidrogênio do ácido carboxílico na posição 28 (I), formando o nucleófilo, imediatamente o íon carboxilato formado é estabilizado por ressonância (II). A DMF é usada para manter o meio aprótico favorecendo o ataque do nucleófilo via S_N2 substituindo ao átomo de bromo, dos brometos de benzila substituída (III) formando o respectivo éster (Figura 4.3.1).

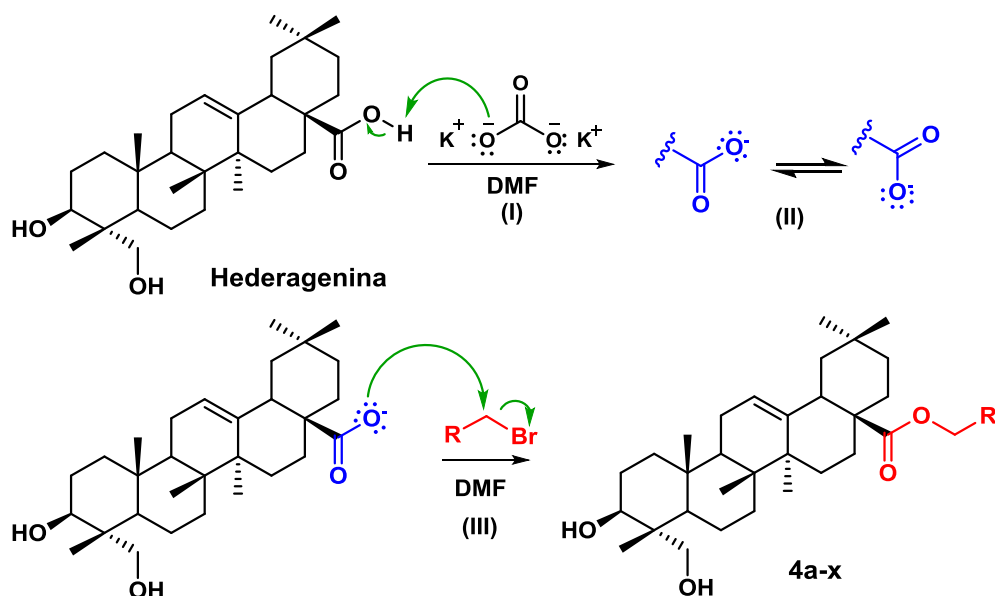


Figura 4.3.1 - Proposta mecanística para a reação de derivatização da hederagenina utilizada na obtenção dos ésteres (4a-x).

Para a formação do composto 4u, foi usada a metodologia de YU e colaboradores (2013). A hederagenina foi derivatizada por meio do reagentes de acoplamento TBTU na presença de DIPEA e THF a temperatura ambiente em atmosfera de nitrogênio por 3 horas. Pelo monitoramento da reação por CCD observou-se o consumo dos materiais de partida e o surgimento do produto desejado, o resíduo foi lavado com água e solução saturada de NaCl e extraído com AcOEt. Em seguida, foi secado com NaSO_4 anidro. O composto foi purificado por cromatografia em coluna (YU *et al.*, 2013), obtendo-se um sólido branco chamado (3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de benzotriazol (Tabela 4.3.1).

Uma proposta mecanística para a reação de acoplamento usando TBTU ocorre em duas etapas. Na primeira etapa a base DIPEA abstrai o hidrogênio do ácido carboxílico na posição 28 (I). Ao mesmo tempo o TBTU que se encontra em equilíbrio estabiliza o íon carboxilato. Em seguida, o mesmo TBTU em equilíbrio ataca ao carbono carbonílico (II) formando o respectivo éster (Figura 4.3.2).

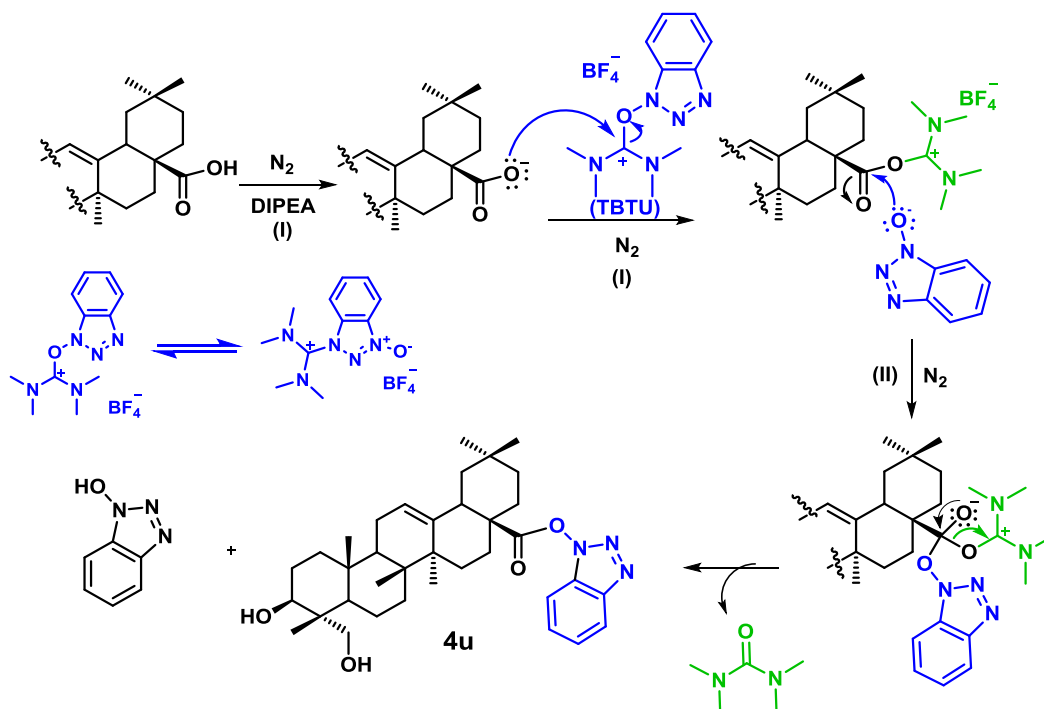


Figura 4.3.2 - Proposta mecanística para a reação de derivatização da hederagenina utilizada na obtenção do composto **4u**.

Todos os vinte e quatro derivados de éster (**4a-x**) são inéditos.

Todos os compostos foram caracterizados pelas espectroscopias no IV, RMN de ^1H e de ^{13}C , espectrometria de massa de alta resolução ESI-HRMS.

4.3.2. Sínteses de amidas derivadas da hederagenina

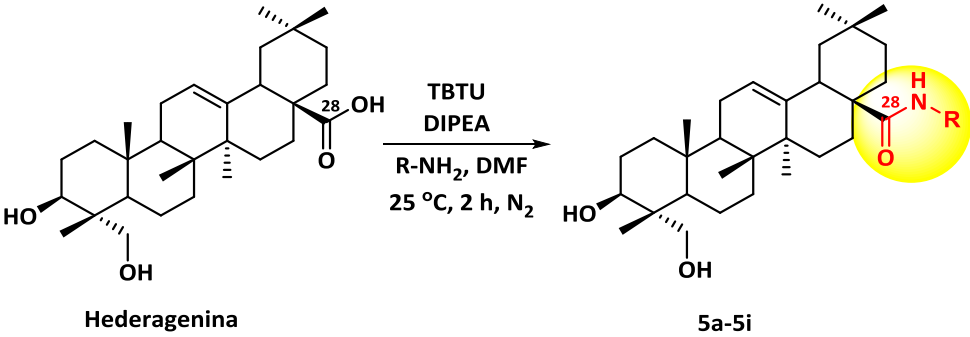
Para o preparo dos derivados de hederagenina em forma de amida, foi empregada uma reação de acoplamento usando TBTU como catalisador, DIPEA como uma base e diferentes aminas primárias. A metodologia utilizada foi semelhante aquela de PRABAKARAN e colaboradores (2012).

A hederagenina foi transformada na formação de 9 amidas no carbono 28 por meio do reagente de acoplamento TBTU na presença de DIPEA e THF com a apropriada amina primaria a temperatura ambiente em atmosfera de nitrogênio por 4 horas. As reações foram monitoradas por CCD onde foi observado o consumo dos materiais de partida e o surgimento do produto desejado, a mistura reacional foi diluída com AcOEt e filtrado. A solução orgânica

foi tratada com água destilada e solução saturada de NaCl (2 x 30mL), e secada com Na₂SO₄ anidro. Os compostos foram purificados por cromatografia em coluna ^[30], obtendo-se sólidos brancos em altos rendimentos.

Nesse processo os análogos sintetizados são denominados R-aril/benzil-(3β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (**5a-i**). Na Tabela 4.3.2 estão relacionadas às amidas preparadas e os respectivos rendimentos.

Tabela 4.3.2 - Amidas derivadas da hederagenina.

		
Composto	R	Rendimento (%)
5a	benzil	96
5b	2-etil-piridinil	79
5c	1-etil-pirimidinil	76
5d	4-etil-morfolinil	72
5e	Propin-1-il	93
5f	1-etil-piperidinil	70
5g	glicinil-metil-éster	91
5h	2-fenilglicil-metil-éster	88
5i	triptofanil	71

A formação das amidas (**5a-h**) pode ser explicada pelas sequências de reações apresentadas na Figura 4.3.3 (PRABAKARAN *et al.*, 2012). Inicialmente, o DIPEA captura o hidrogênio do ácido carboxílico na posição 28 (I) e ao mesmo tempo o TBTU estabiliza o íon carboxilato. O TBTU que se encontra em equilíbrio ataca o carbono carbonílico formando o intermediário (II). Na sequência, a amina primária ataca o carbono carbonílico (III) formando a respectiva amida.

Por outro lado, para a formação do composto **5i** o produto de partida foi o composto **4u** (ver sessão 4.2.2). O mecanismo para a formação do composto **5i** é mesmo ao da etapa

três da Figura 4.3.3, onde a amina primária ataca o carbono carbonílico do composto **4u** em presença de carbonato de sódio (Na_2CO_3) formando a respectiva amida **5i**.

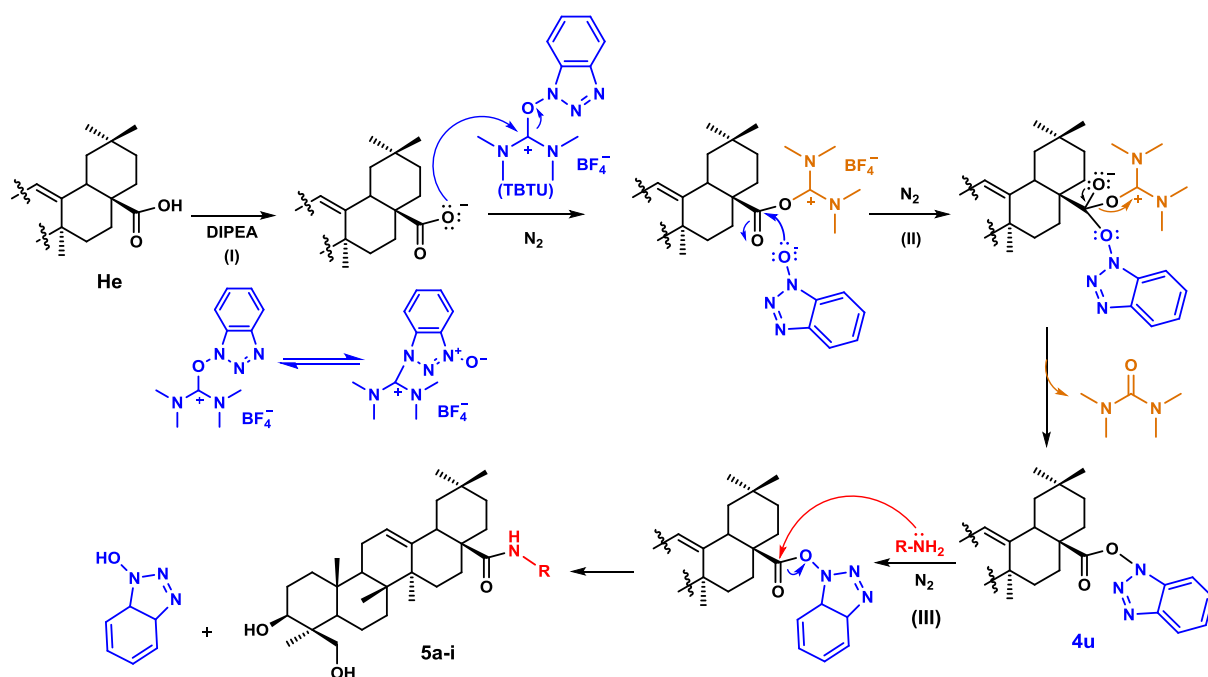


Figura 4.3.3 - Proposta mecanística para obtenção de amidas em presença de TBTU.

As vantagens destas reações para a formação de amidas por esta metodologia incluem a baixa toxicidade dos subprodutos, fácil elaboração e separação do composto desejado. Os rendimentos de todas as amidas obtidas estão mostrados na Tabela 4.3.2.

Os nove derivados de amidas (**5a-i**) são inéditos.

Todos os compostos foram caracterizados pelas espectroscopias no IV, RMN de ^1H e de ^{13}C , espectrometria de massa de alta resolução ESI-HRMS, Análise Elemental (CHN).

4.3.3. Caracterização

Ésteres derivados da hederagenina

Foram formados 24 ésteres derivados da hederagenina (Figura 4.3.4). Os derivados de ésteres mostraram no espectro IV os sinais típicos esperados para esta classe de compostos. A banda característica de grupo carbonila de éster na faixa de $1740\text{--}1720\text{ cm}^{-1}$, os sinais dos grupos hidroxilas em $3450\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$. No caso do composto **4x** observou-se também banda característica de grupo alcino a 2118 cm^{-1} . Por outro lado, os espectros de RMN de ^1H mostraram os sinais correspondentes aos derivados sintetizados, observando-se hidrogênios aromáticos, na faixa de $\delta_{\text{H}} = 8,20$ e $6,90$. Por exemplo, o composto **4r**, que tem um grupo nitro em posição *para* (Figura 4.3.5), os sinais dos hidrogênios aromáticos foram encontrados a $\delta_{\text{H}} = 8,20$ (H-34 e H-34') e $7,50$ (H-33 e H-33') cada um como um duplete integrando para dois hidrogênios exibindo uma constante de acoplamento de $J = 8,7\text{ Hz}$, respectivamente (Figura 4.3.5).

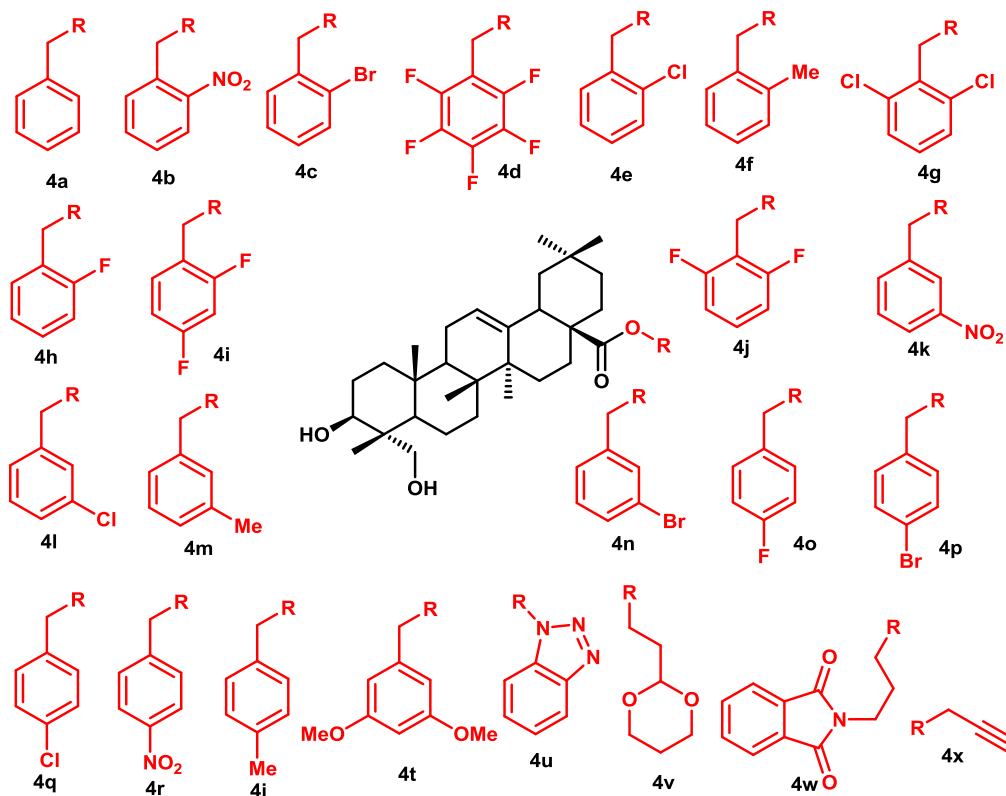


Figura 4.3.4 - Ésteres derivados da hederagenina.

No espectro de RMN de ^1H do composto **4c** foram observados sinais atribuídos aos quatro hidrogênios aromáticos, dois deles como duplo duplo para H-34 em $\delta_{\text{H}} = 7,56$ e H-37 em $\delta_{\text{H}} = 7,42$ com $J = 7,9, 1,3$ Hz e $7,6, 1,7$ Hz, respectivamente. Os outros dois hidrogênios H-36 ($\delta_{\text{H}} = 7,29$) e H-35 ($\delta_{\text{H}} = 7,17$) apresentam multiplicidade de triplo duplo com $J = 7,4, 1,3$ Hz para H-36 e $7,8, 1,8$ Hz para H-35 confirmando o sistema aromático 1,2-dissubstituído (Figura 4.3.5). No entanto, para o composto **4u** foi observado o hidrogênio aromático H-34 na região de $\delta_{\text{H}} = 8,03$ como um duplo triplete com constantes de acoplamentos de $J = 8,4$ e $0,8$ Hz, e H-33 como um duplo duplo duplo a $\delta_{\text{H}} = 7,51$ apresentando constantes de acoplamentos de $J = 7,6$ e $0,9$ Hz. Ainda foram observado dois multipletos a $\delta_{\text{H}} = 7,40$ (H-35) e $\delta_{\text{H}} = 7,35$ (H-36) respectivamente, confirmando a presença do grupo benzotriazol (Figura 4.3.5).

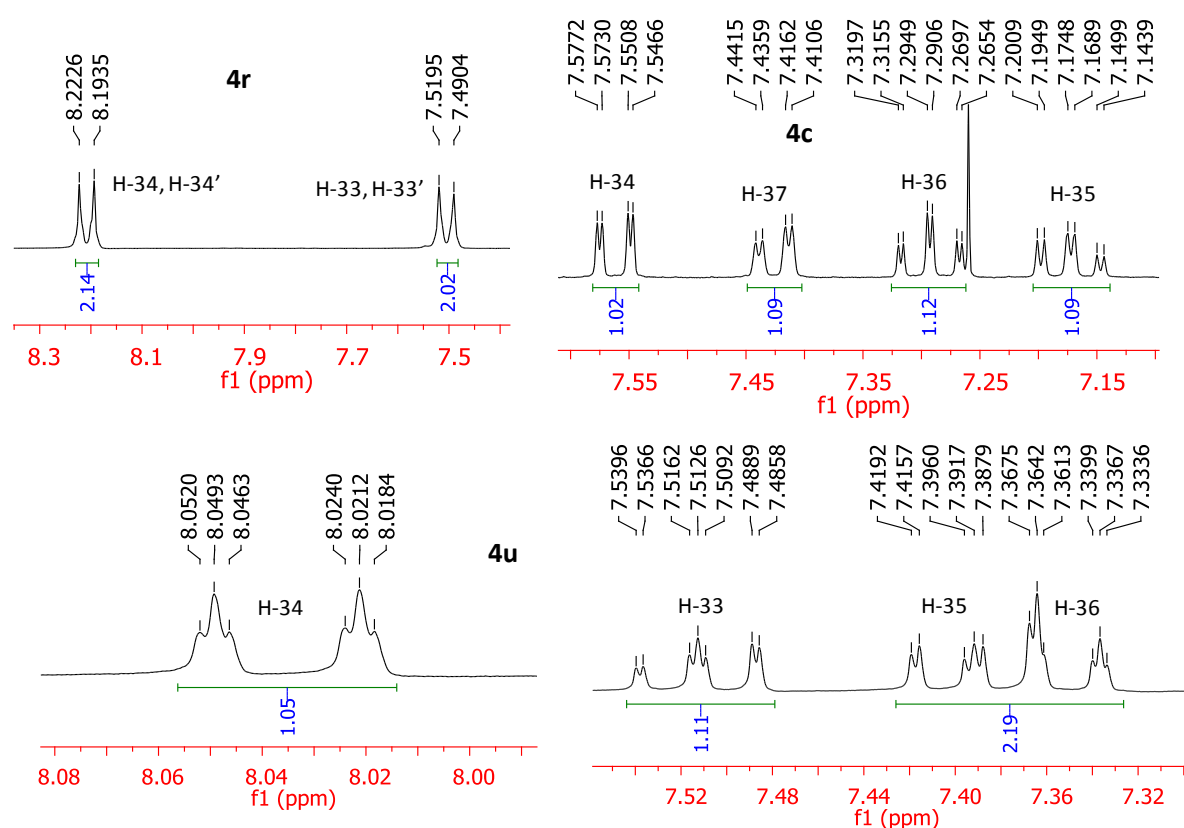


Figura 4.3.5 - Multiplicidade e desdobramentos de diferentes hidrogênios aromáticos dos derivados da hederagenina. Ampliação de parte do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) dos compostos: **4r**; **4c** e **4u**.

Da mesma forma, no espectro de RMN de ^1H observou-se para todos os compostos substituídos com um anel aromático (**4a-t**), um sinal na faixa $\delta_{\text{H}} = 5,20$ - $4,90$ com multiplicidade

de duplo duplete correspondente ao hidrogênios benzílicos CH₂-31 ligado ao anel aromático e ao oxigênio do grupo éster, e um tripleto característico correspondente ao hidrogênio-12 do sistema olefínico trissubstituído da hederagenina próximo a $\delta_H = 5,28$ (Figura 4.3.6).

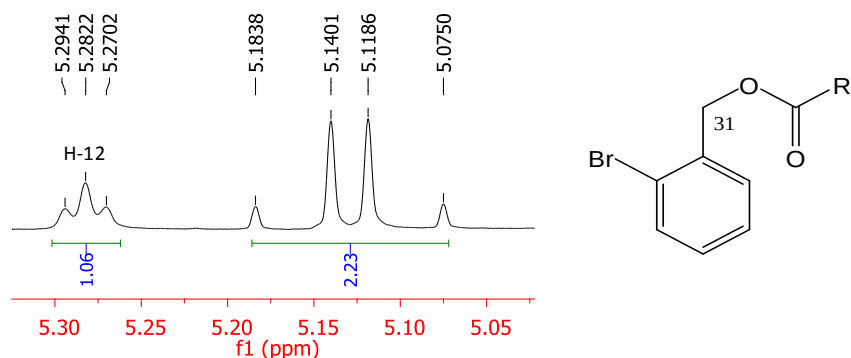


Figura 4.3.6 - Ampliação de parte do espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) do composto **4c**.

Não obstante, todos os sinais dos espectros de RMN de ¹³C para o esqueleto triterpeno nesta série de compostos foram semelhantes com os dados apresentados na literatura para a aglicona hederagenina (BOKE, 2014), com exceção do sinal do C-28 (e os sinais adicionais para os substituintes do éster) (Tabela 4.3.3). Com relação ao carbono-28 foi observado um deslocamento mais blindado em comparação com a carboxila da hederagenina ($\delta_C = 180,72$). A carbonila dos grupos ésteres se apresentam próximo a $\delta_C = 177,5 \pm 0,50$, confirmando a presença do grupo funcional desejado. Por outro lado, vale ressaltar que os compostos substituído com flúor no anel aromático fornecem os desdobramentos típicos devidos aos acoplamentos com os carbonos (Figura 4.3.7 e Tabela 4.3.3). Por exemplo, o composto **4h**, o carbono ligado ao flúor apresenta um sinal a $\delta_C = 161,13$ como um duplete mostrando uma constante de acoplamento de $J = 246,9$ Hz. Do mesmo modo, o composto **4i** e **4j** apresentam dois átomos de flúor ligado a carbonos diferentes com sinais a $\delta_C = 163,09, 161,40$ para **4i** e $\delta_C = 162,04$ para **4j**. Todos os sinais como duplo duplete com constantes de acoplamento de $J = 247,9, 12,0$ e $249,9, 14,1$ Hz para **4i** e $J = 250,0, 7,5$ Hz para **4j**, respectivamente. Assim como o composto **4o** apresenta um flúor ligado em posição *para* do anel aromático em $\delta_C = 162,63$ aparece como duplete com uma constante de acoplamento de $J = 244,8$ Hz, confirmado a presença do halogênio (Figura 4.3.7, Tabela 4.3.3).

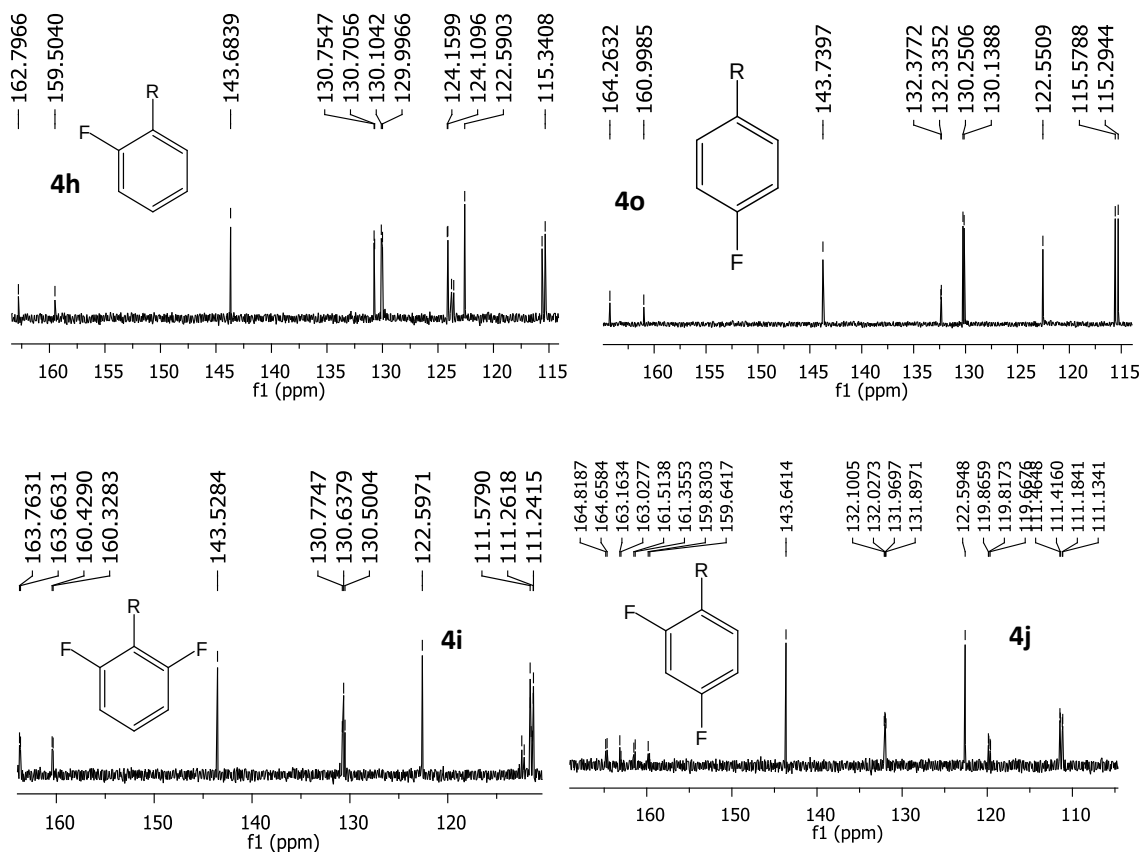


Figura 4.3.7 - Ampliação de parte do espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) para os compostos: **4h**, **4o**, **4i** e **4j**.

No entanto, o composto **4u** possui um átomo de nitrogênio do grupo benzotriazol ligado ao oxigênio do carboxilato gerando um blindagem para o carbono carbonílico em $\delta_{\text{C}} = 173,75$. Por outro lado, o composto **4x** apresenta deslocamentos em $\delta_{\text{C}} = 78,21$, $74,54$ e $51,77$ atribuídos ao grupo propinil ligado ao oxigênio do éster (Figura 4.3.8 e Tabela 4.3.3).

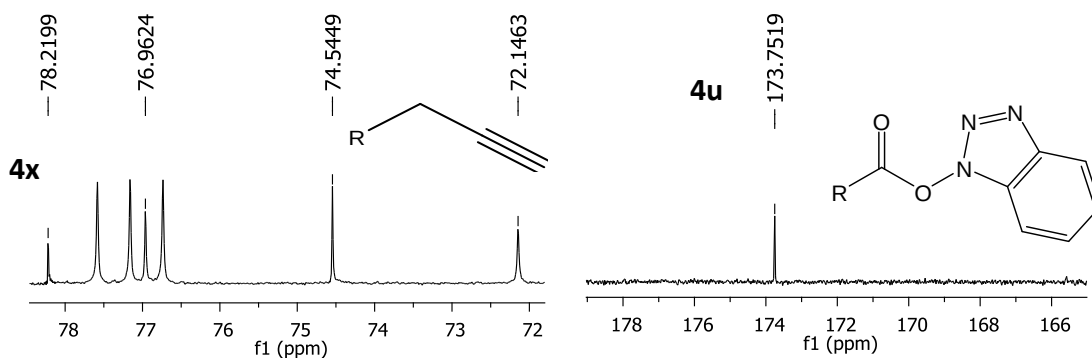


Figura 4.3.8 - Ampliação de parte do espectro de RMN de ^{13}C para os compostos: **4x** e **4u**.

Todos os experimentos de ESI-HRMS e Análise Elementar (CHN) confirmaram as massas moleculares e pureza dos compostos sintetizados (ver sessão 4.2.3 e 4.7.1-24).

Tabela 4.3.3 - Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C (δ /ppm, CDCl_3) dos derivados (**4a-x**) e hederagenina (**3a**).

Nº	3a ^a	4a ^b	4b ^b	4c ^b	4d ^b	4e ^b	4f ^b	4g ^b
C-1	39,14	38,08	38,22	38,24	38,23	38,23	38,24	38,25
C-2	26,52	25,87	26,03	26,02	25,97	26,02	26,02	25,98
C-3	73,76	76,80	76,99	77,04	76,97	77,02	77,05	77,06
C-4	43,24	41,74	41,91	41,93	41,92	41,90	41,92	41,91
C-5	47,01	46,71	47,15	47,06	47,03	47,04	47,00	47,15
C-6	18,94	18,45	18,59	18,62	18,56	18,61	18,61	18,66
C-7	33,56	32,47	32,57	32,63	32,62	32,60	32,63	32,68
C-8	40,12	39,25	39,40	39,41	39,33	39,39	39,38	39,37
C-9	48,96	49,78	49,91	49,94	49,91	49,93	49,95	49,97
C-10	37,59	36,86	37,01	37,02	37,00	37,01	37,02	37,03
C-11	24,13	23,34	23,50	23,51	23,47	23,50	23,49	23,53
C-12	122,96	122,40	122,69	122,65	122,79	122,63	122,57	122,63
C-13	145,18	143,62	143,68	143,70	143,74	143,69	143,74	143,57
C-14	42,54	41,68	41,83	41,83	41,79	41,82	41,83	41,83
C-15	28,69	27,58	27,72	27,77	27,60	27,74	27,73	27,81
C-16	24,05	23,01	23,28	23,22	23,01	23,20	23,20	23,06
C-17	48,51	47,57	47,69	47,73	47,65	47,72	47,73	47,74
C-18	42,35	41,34	41,49	41,48	41,52	41,48	41,50	41,45
C-19	46,80	45,80	45,98	46,01	45,81	46,00	46,01	45,93
C-20	31,30	30,67	30,81	30,84	30,80	30,83	30,80	30,83
C-21	34,56	33,83	33,95	34,00	33,86	33,99	33,99	33,99
C-22	33,33	32,34	32,53	32,57	32,35	32,54	32,56	32,46
C-23	68,25	72,08	72,24	72,31	72,22	72,27	72,31	72,32
C-24	13,48	11,38	11,51	11,50	11,52	11,52	11,51	11,52
C-25	16,32	15,64	15,78	15,80	15,70	15,79	15,79	15,82
C-26	17,85	16,87	16,99	17,03	16,66	17,00	16,99	17,15
C-27	28,02	26,68	26,86	26,91	26,87	26,86	26,90	26,88
C-28	180,53	177,48	177,19	177,43	177,15	177,48	177,62	177,45
C-29	33,60	33,07	33,19	33,23	33,18	33,22	33,23	33,23
C-30	24,20	23,61	23,72	23,76	23,70	23,75	23,75	23,74
Carbonos substituintes do grupo éster (δ , multiplicidade, J Hz)								
C-31	-	65,92	62,97	65,78	-	63,64	64,60	61,29
C-32	-	136,37	133,59	135,84	-	134,16	137,00	137,14
C-33	-	128,38	148,02 (NO ₂)	123,74 (Br)	F	133,91 (Cl)	134,43 (Me)	130,38 (Cl)
C-33'	-	128,38	129,83	130,33	F	130,19	129,32	130,38 (Cl)
C-34	-	127,94	125,07	132,89	F	129,59	130,30	128,47
C-34'	-	127,94	132,38	127,49	F	126,86	126,00	128,47
C-35	-	127,89	128,88	129,66	F	129,42	128,35	131,99
C-36	-	-	-	-	-	-	19,06	-

^aPiridina-d₅, ^bCDCl₃,

Tabela continua

Nº	4h ^b	4i ^b	4j ^b	4k ^b	4l ^b	4m ^b	4n ^b	4o ^b
C-1	38,24	38,24	38,25	38,19	38,23	38,24	38,22	38,24
C-2	26,01	25,98	25,98	26,02	26,03	26,03	26,02	26,00
C-3	77,04	77,00	77,06	76,98	77,03	77,05	76,99	76,98
C-4	41,92	41,92	41,92	41,91	41,94	41,93	41,89	41,91
C-5	46,94	46,92	46,92	47,00	46,93	46,87	46,92	46,83
C-6	18,62	18,60	18,64	18,57	18,60	18,61	18,58	18,59
C-7	32,63	32,63	32,64	33,18	32,63	32,64	32,60	32,63
C-8	39,38	39,37	39,32	39,41	39,42	39,42	39,40	39,39
C-9	49,95	49,92	49,96	49,88	49,93	49,95	49,92	49,92
C-10	37,02	37,01	37,02	37,00	37,04	37,03	37,02	37,01
C-11	23,51	23,50	23,50	23,45	23,48	23,50	23,48	23,49
C-12	122,59	122,59	122,59	122,78	122,69	122,40	122,67	122,55
C-13	143,68	143,64	143,52	143,63	143,74	143,86	143,72	143,73
C-14	41,82	41,82	41,79	41,83	41,85	41,84	41,82	41,83
C-15	27,70	27,67	27,66	27,69	27,70	27,74	27,68	27,70
C-16	23,15	23,12	23,04	23,23	23,22	23,18	23,21	23,16
C-17	47,73	47,70	47,73	47,62	47,73	47,74	47,71	47,70
C-18	41,50	41,50	41,52	41,50	41,49	41,48	41,46	41,50
C-19	45,97	45,94	45,92	45,94	46,00	46,03	45,99	45,96
C-20	30,83	30,81	30,81	30,82	30,83	30,84	30,82	30,82
C-21	33,98	33,95	33,96	33,92	33,97	34,00	33,96	33,96
C-22	32,46	32,45	32,33	32,57	32,54	32,51	32,53	32,48
C-23	72,30	72,25	77,06	72,22	72,29	72,31	72,23	72,22
C-24	11,52	11,52	11,52	11,51	11,51	11,51	11,53	11,53
C-25	15,80	15,77	15,80	15,72	15,76	15,78	15,77	15,78
C-26	16,94	16,92	16,79	16,97	17,00	17,03	16,98	17,00
C-27	26,89	26,88	26,87	26,87	26,91	26,90	26,84	26,85
C-28	177,52	177,50	177,36	177,46	177,51	177,65	177,51	177,54
C-29	33,23	33,21	33,23	33,18	33,22	33,24	33,20	33,21
C-30	23,75	23,73	23,73	23,74	23,77	23,78	23,76	23,75
Carbonos substituintes do grupo éster (δ , multiplicidade, J Hz)								
C-31	60,20, d, 3,9	59,64, d, 3,4	54,07, t, 3,9	64,74	65,20	66,13	65,14	65,36
C-32	124,13, d, 3,8	119,74, dd, 14,9, 3,6	112,42 t, 18,8	138,64	138,53	136,46	138,76	132,35, d, 3,2
C-33	161,13, d, 246,9 (F)	161,40, dd, 249,9, 14,1 (F)	162,04, dd, 250,0, 7,5 (F)	123,10	128,33	128,87	131,15	130,19, d, 8,4
C-33'	130,73, d, 3,7	131,99, dd, 9,8, 5,4	162,04 dd, 250,0, 7,5 (F)	134,04	126,18	125,14	126,66	130,19, d, 8,4
C-34	115,48, d,21,0	104,00, t, 25,6	111,41, m	148,52 (NO ₂)	134,47 (Cl)	138,14 (Me)	122,63 (Br)	115,44 d, 21,3
C-34'	123,67, d, 14,8	111,29, dd, 21,0, 3,6	111,41, m	129,59	129,83	128,45	130,10	115,44 d, 21,3
C-35	130,05, d, 8,0	163,09 dd, 247,9, 12,0 (F)	130,63, t, 25,6	122,98	128,22	128,76	131,15	162,63 d, 244,8 (F)
C-36	-	-	-	-	-	21,54	-	-

^bCDCl₃

Tabela continua

Nº	4p ^b	4q ^b	4r ^b	4s ^b	4t ^b	4u ^b	4v ^b	4w ^b	4x ^b
C-1	38,23	38,24	38,22	38,24	38,23	38,34	38,24	38,23	38,25
C-2	26,02	26,01	26,02	26,02	26,04	25,90	25,90	26,00	25,98
C-3	76,99	77,00	76,90	77,00	77,01	76,79	77,02	77,05	76,96
C-4	41,91	41,92	41,91	41,88	41,91	42,06	41,91	41,91	41,88
C-5	46,85	46,86	47,00	46,81	46,90	47,67	46,78	46,83	46,89
C-6	18,58	18,58	18,55	18,59	18,60	18,58	18,62	18,61	18,60
C-7	32,61	32,62	32,60	32,62	32,62	32,75	32,66	32,61	32,65
C-8	39,39	39,40	39,41	39,40	39,42	39,60	39,45	39,44	39,50
C-9	49,91	49,92	49,85	49,94	49,93	49,90	49,96	49,94	49,92
C-10	37,01	37,01	36,99	37,01	37,02	37,03	37,06	37,03	37,02
C-11	23,49	23,49	23,49	23,49	23,47	23,57	23,55	23,51	23,51
C-12	122,59	122,59	122,72	122,51	122,58	123,98	122,37	122,48	122,67
C-13	143,72	143,73	143,66	143,79	143,80	143,64	143,97	143,83	143,47
C-14	41,82	41,83	41,84	41,81	41,83	41,92	41,84	41,84	41,84
C-15	27,69	27,70	27,70	27,73	27,75	28,17	27,73	27,80	27,78
C-16	23,16	23,17	23,22	23,13	23,19	23,25	23,13	23,11	23,12
C-17	47,70	47,71	47,65	47,72	47,73	47,73	47,74	47,73	47,72
C-18	41,51	41,52	41,55	41,49	41,49	41,72	41,40	41,43	41,39
C-19	45,96	45,96	45,90	45,98	46,01	45,58	46,01	45,99	45,95
C-20	30,82	30,82	30,81	30,82	30,84	30,77	30,84	30,82	30,78
C-21	33,94	33,95	33,90	33,97	33,98	33,80	34,00	33,99	33,94
C-22	32,50	32,50	32,55	32,48	32,54	32,56	32,54	32,47	32,30
C-23	72,22	72,24	72,12	72,23	72,24	72,02	72,26	72,28	72,14
C-24	11,53	11,52	11,52	11,54	11,53	11,61	11,54	11,52	11,55
C-25	15,81	15,79	15,74	15,78	15,76	15,88	15,81	15,80	15,83
C-26	16,97	16,99	17,02	17,02	17,01	17,42	17,14	17,13	17,23
C-27	26,86	26,88	26,85	26,81	26,85	26,74	26,86	26,86	26,79
C-28	177,49	177,50	177,35	177,64	177,53	173,75	177,67	177,70	176,99
C-29	33,20	33,21	33,17	33,23	33,22	33,04	33,23	33,23	33,19
C-30	23,75	23,75	23,73	23,77	23,77	23,65	23,74	23,72	23,73
Carbonos substituintes do grupo éster (δ , multiplicidade, J Hz)									
C-31	65,29	65,27	64,69	66,02	65,93	142,19	60,04	61,68	51,77
C-32	135,51	135,01	143,80	133,50	138,81	128,88	34,57	28,00	78,21
C-33	130,00	129,69	128,55	128,23	105,75	108,27	99,75	35,31	74,54
C-33'	130,00	129,69	128,55	128,23	105,75	-	-	-	-
C-34	131,69	128,73	123,84	129,19	160,96	120,59	67,04	166,34	-
					(OCH ₃)				
C-34'	131,69	128,73	123,84	129,19	160,96	-	67,05	166,34	-
					(OCH ₃)				
C-35	122,13	133,99	147,73	137,79	99,98	124,79	26,00	132,21	-
					(Br)	(Cl)	(NO ₂)	(Me)	
C-35'	-	-	-	-	-	-	-	132,21	-
C-36	-	-	-	21,31	55,46	128,61	-	123,39	-
C-36'	-	-	-	-	-	-	-	123,39	-
C-37	-	-	-	-	55,46	-	-	134,11	-
C-37'	-	-	-	-	-	-	-	134,11	-

^bCDCl₃

Amidas derivadas da hederagenina

Na Figura 4.3.9 são apresentados as amidas derivadas da hederagenina com seus respectivos substituintes. As amidas derivadas mostraram no respectivo espectro no IV os sinais típicos esperados para esta classe de compostos: a banda característica de grupo amida na faixa de $1660-1630\text{ cm}^{-1}$, e o grupo carbonila de éster na faixa de $1745-1735\text{ cm}^{-1}$. Adicionalmente alguns compostos apresentam um sinal na faixa de $1720-1710\text{ cm}^{-1}$, correspondente a uma ressonância de Fermi da carbonila da amida. Por outro lado, todos os derivados apresentam um sinal na faixa $1540-1515\text{ cm}^{-1}$, correspondente à vibração de tensão do NH da amida. Além os sinais dos grupos hidroxilas observaram-se para o composto **5e** a banda característica de grupo alquino em 2120 cm^{-1} .

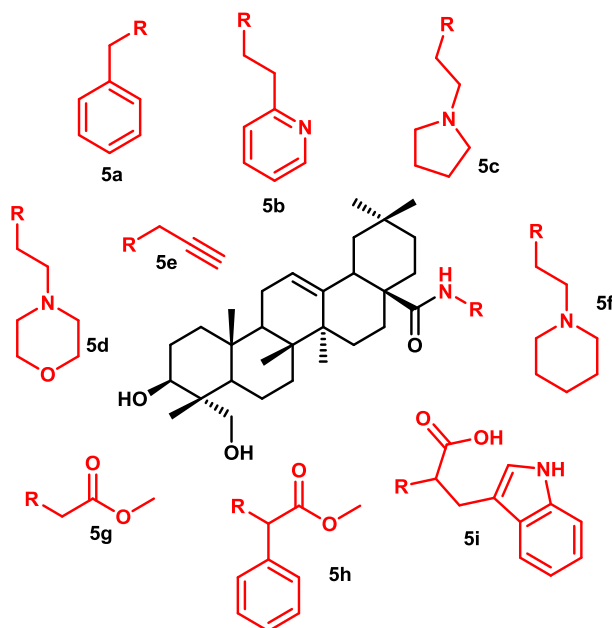


Figura 4.3.9 - Amidas derivadas da hederagenina.

Os espectros de RMN de ^1H mostraram os sinais dos hidrogênios correspondentes aos derivados sintetizados. Observa-se que os espectros obtidos em CDCl_3 apresentam a sinal do hidrogênio da amida secundária na faixa de $\delta_{\text{H}} = 6,30$ a $6,20$. Também se observou o simpleto em $\delta_{\text{H}} = \pm 5,30$ correspondente ao hidrogênio-12 do alqueno, e a sinais na faixa $\delta_{\text{H}} = 3,80-3,30$ dos hidrogênios metilênicos-23 e metínicos-3 da sapogenina. Não obstante, dependendo do grupo ligado na amida o espectro de RMN de hidrogênio apresenta diferenças. Para o composto **5a**, foram observados os sinais dos hidrogênios aromáticos do anel benzílico a $\delta_{\text{H}} =$

7,35-7,20. Em $\delta_H = 7,31$ foi observado um multipeto correspondente ao anel aromático monossustituído do composto **5h**. Para o composto **5b** foram localizados as sinais de quatro hidrogênios aromáticos, pertencente ao anel piridínico, entre $\delta_H = 8,51$ (H-37) e 7,15 (H-34 e H-36) como duplete integrando para um e dois hidrogênios respectivamente, exibindo constantes de acoplamento de $J = 4,0$ e $7,5$ Hz. Em $\delta_H = 7,61$ (H-35) observou-se um triplete que integra para um hidrogênio com um $J = 7,5$ Hz (Figura 4.3.10).

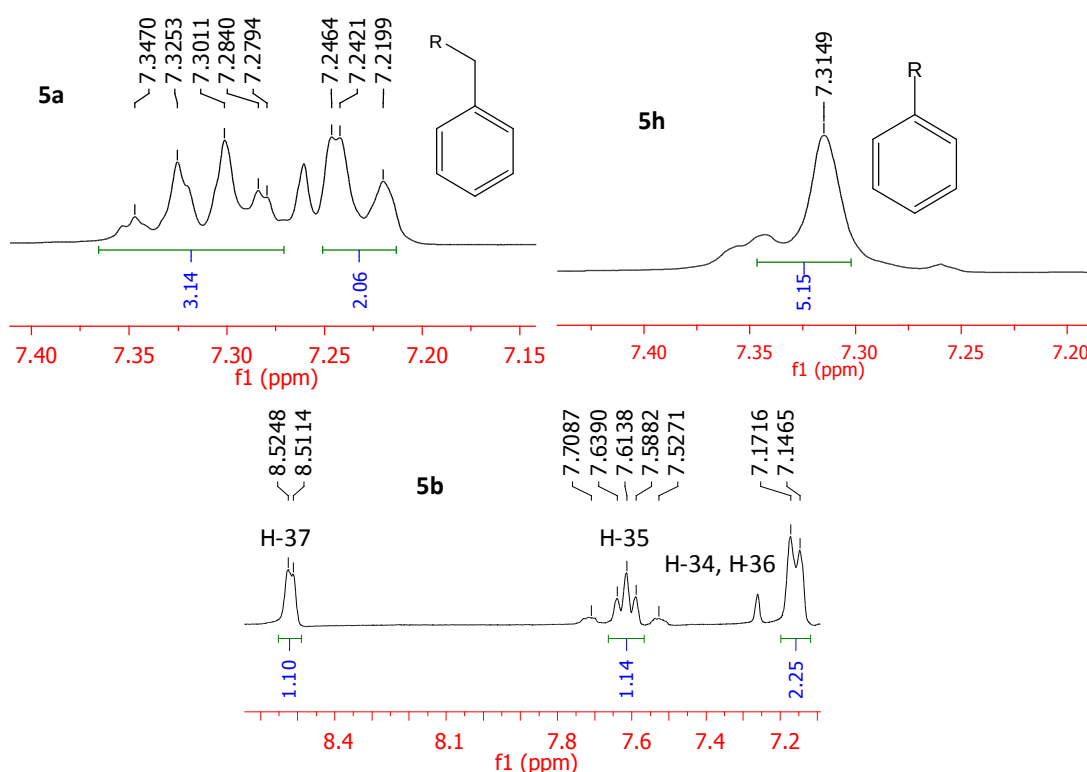


Figura 4.3.10 - Ampliação de parte do espectro de RMN de 1H das amidas **5a**, **5b**, e **5h**.

Todos os sinais dos espectros de RMN de ^{13}C para o esqueleto triterpeno nesta série de compostos foram semelhantes com os dados apresentados na literatura para a aglicona hederagenina (BOKE, 2014), com exceção do sinal do C-28 (e os sinais adicionais para os substituintes da amida) (Tabela 4.3.4). O carbono carboxílico-28 apresenta um deslocamento a $\delta_C = 180,72$ para a hederagenina. Nos derivados, as carbonilas dos grupos amidas apresentaram deslocamento em $\delta_C = 178 \pm 0,50$, confirmando a presença da amida. Adicionalmente, os compostos **5g** e **5h** apresentam a sinal do carbonila de éster em $\delta_C = 171,85$ e $171,62$. Para o composto **5i** o sinal correspondente a carbonila do ácido do grupo triptofano como também da carbonila da amida não aparecem, devido ao menor tempo de relaxação

(R_d). Por outro lado vários análogos apresentam núcleo de etil-pirimidinil (**5c**), etil-morfolinil (**5d**) e etil-piperidinil (**5f**), que apresentaram em comum os sinais correspondente aos metilenos ligados ao nitrogênio do anel na faixa de $\delta_c = 55$ -54 (Figura 4.3.11, Tabela 4.3.2). Os carbonos metileno-32 ligado ao nitrogênio se apresentaram para os compostos **5d** e **5f** em $\delta_c = 58,09$ e $58,04$ e para o composto **5c** em $\delta_c = 54,39$. Adicionalmente os metilenos ligados ao oxigênio do anel morfolínico aparecem em $\delta_c = 67,89$ (Figura 4.3.11, Tabela 4.3.4), confirmando a presença dos grupos heterocíclicos.

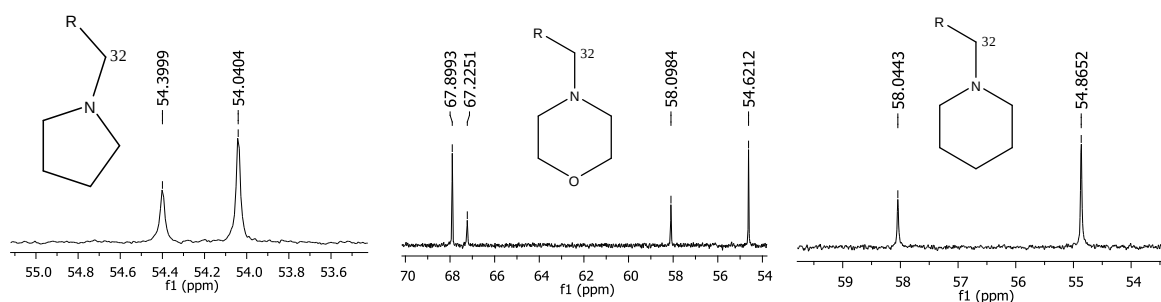


Figura 4.3.11 - Ampliação dos espectros de RMN de ^{13}C para os derivados **5c**, **5d** e **5f**.

Igualmente, o composto **5e** apresenta deslocamentos a $\delta_c = 78,21$ e $74,54$ atribuídos ao grupo propinila ligado ao nitrogênio da amida. Os sinais características dos carbonos metínico-3 ($\delta_c = 76,73$) e metilênico-23 ($\delta_c = 72,01$), ambos ligados á hidroxila no triterpeno pentacíclico, destacam que todos os derivados apresentam os dois sinais na mesma faixa (Figura 4.3.12 e Tabela 4.3.4).

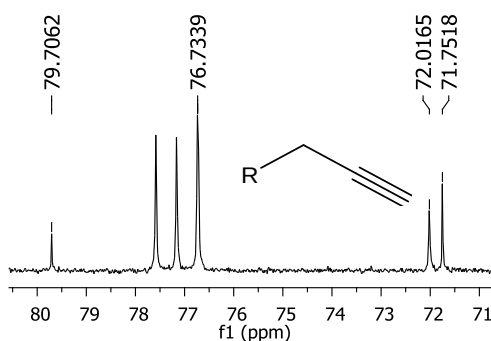


Figura 4.3.12 - Ampliação dos espectros de RMN de ^{13}C para o derivado **5e**.

Todos os experimentos de espectrometria de massa de alta resolução (ESI-HRMS) e Análise Elemental (CHN) confirmaram as massas moleculares e pureza dos compostos obtidos (ver sessão 4.2.3 e 4.7.25-33).

Tabela 4.3.4 - Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C (δ /ppm) dos derivado (5a-i) e hederagenina (3a).

Nº	3a ^a	5a ^b	5b ^b	5c ^b	5d ^c	5e ^b	5f ^a	5g ^c	5h ^b	5i ^c
1	39,14	38,26	38,24	38,30	39,45	38,31	39,10	39,48	38,23	39,41
2	26,52	25,87	25,91	25,84	26,44	25,89	26,34	26,48	25,68	26,34
3	73,76	76,70	76,82	76,73	73,77	76,73	73,51	73,87	76,73	74,04
4	43,24	42,45	42,10	42,37	43,28	42,23	43,25	43,27	42,62	43,21
5	47,01	46,76	46,92	46,85	47,76	46,74	47,26	47,62	46,54	47,54
6	18,94	18,52	18,55	18,58	19,08	18,53	18,86	19,11	18,45	19,16
7	33,56	32,70	32,74	32,71	33,49	32,36	33,45	33,53	32,59	33,50
8	40,12	39,45	39,41	39,49	40,62	39,50	40,07	40,59	39,34	40,24
9	48,96	49,77	49,83	49,85	48,91	49,78	48,73	48,99	49,80	48,89
10	37,59	36,92	36,94	36,97	37,08	36,94	37,14	37,88	36,82	37,77
11	24,13	23,73	23,65	23,69	24,17	23,68	24,18	24,20	23,76	24,22
12	122,96	123,03	123,70	122,89	124,06	123,26	123,29	124,12	123,01	124,59
13	145,18	144,86	144,43	144,53	145,44	144,77	145,16	145,11	144,35	144,65
14	42,54	42,17	42,00	42,14	43,07	42,15	42,53	42,97	42,07	42,72
15	28,69	27,43	27,40	27,46	28,46	27,35	28,16	28,43	27,35	28,03
16	24,05	23,53	23,47	23,66	23,95	23,62	23,94	24,00	23,38	23,98
17	48,51	47,59	47,62	47,64	48,66	47,62	48,38	48,71	47,54	48,78
18	42,35	41,88	41,87	41,88	42,88	41,89	42,53	42,57	41,80	42,49
19	46,80	46,47	46,42	46,46	47,61	46,42	46,81	47,49	46,36	47,22
20	31,30	30,84	30,82	30,82	31,60	30,82	31,20	31,60	30,83	31,47
21	34,56	34,23	34,25	34,29	35,08	34,17	34,70	35,09	34,19	35,10
22	33,33	32,27	32,22	32,36	33,21	32,21	32,98	33,28	32,37	32,82
23	68,25	72,00	72,15	72,07	67,22	72,01	67,93	67,33	72,07	67,56
24	13,48	11,59	11,59	11,64	12,74	11,58	13,52	12,71	11,55	12,71
25	16,32	15,89	15,79	15,88	16,31	15,86	16,34	16,28	15,66	16,24
26	17,85	17,04	16,94	17,03	17,96	17,10	17,73	17,55	16,84	16,78
27	28,02	26,64	26,66	26,62	27,39	26,66	27,97	27,41	26,63	27,37
28	180,53	178,33	178,24	178,46	180,29	178,23	177,76	180,78	177,76	C=O
29	33,60	33,10	33,12	33,13	34,15	33,08	33,90	34,02	33,10	33,72
30	24,20	23,91	23,69	23,74	24,61	23,98	24,22	24,55	23,79	24,41
Carbonos substituintes do grupo amida (δ , multiplicidade, J Hz)										
31	-	43,71	38,67	37,99	37,89	29,47	37,51	42,16	56,67	55,76
32	-	138,40	36,97	54,39	58,09	79,70	58,04	171,85	136,19	28,14
33	-	127,84	159,94	54,04	54,62	71,75	54,86	52,51	129,07	111,20
33'	-	127,84	-	54,04	54,62	-	54,86	-	129,07	-
34	-	128,78	122,82	23,74	67,89	-	26,78	-	127,71	124,15
34'	-	128,78	-	23,74	67,89	-	26,78	-	127,71	-
35	-	127,50	136,72	-	-	-	25,04	-	128,94	129,10
36	-	-	121,66	-	-	-	-	-	-	138,07
37	-	-	149,18	-	-	-	-	-	171,62	119,49

^aPiridina-d₅, ^bCDCl₃, ^cCD₃OD

4.3.4. Ensaios biológicos

Ensaio citotóxico

Os derivados de ésteres (**4a-x**) e amidas (**5e-f**) da hederagenina foram submetidos a testes de atividade antitumoral utilizando um ensaio de sulforodamina-B (SRB) (SKEHAN *et al.*, 1990). Os valores de EC₅₀ foram determinados para seis linhagens diferentes de células de câncer humano [518A2 (células de melanoma), células A2780 (carcinoma do ovário), HT29 (adenocarcinoma de cólon), MCF7 (adenocarcinoma de mama), A549 (câncer de pulmão), 8505C (carcinoma de tireóide)]. Os valores de EC₅₀ mostrados na Tabela 4.3.5, foram calculados a partir da curvas de dose resposta semi-logarítmicas por meio de regressão não-linear, aplicando dois parâmetros da equação de Hill-slope.

A conversão geral da hereganina (**He**) nos ésteres e amidas respectivas, resultou em um aumento da citotoxicidade. Tal como mostrado em todas as linhagens celulares de câncer humano diferentes, os ésteres (**4a-x**) e as amidas (**5a-c, e-f**) possuem uma citotoxicidade superior a hederagenina (Figura 4.3.13). No entanto, a atividade é diminuída no análogo com o grupo etilmorfolinil (**5d**). Estes resultados suportam a hipótese de que um grupo volumoso ligado na carbonila-28 de derivados de triterpenos é capaz de modular as atividades citotóxicas para esta classe de compostos para diferentes linhagens de células tumorais (SIEWERT *et al.*, 2014).

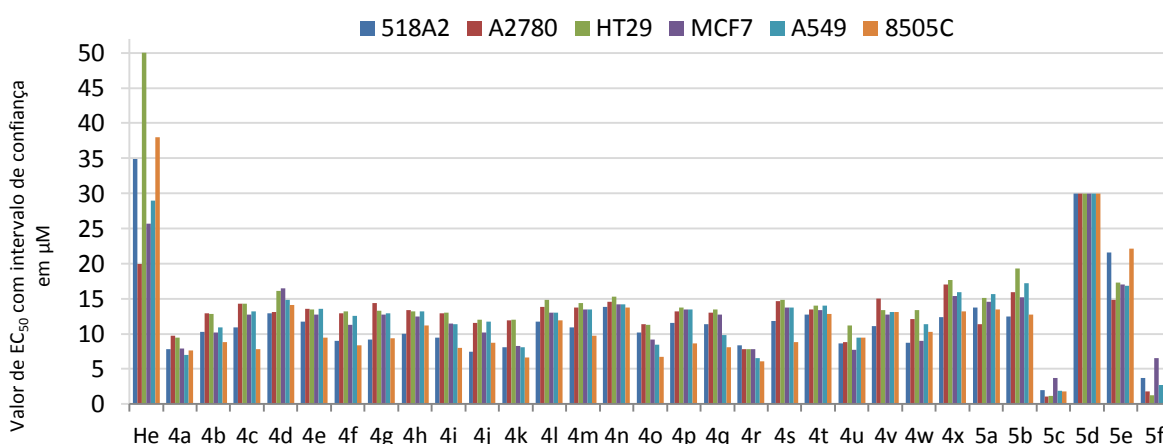


Figura 4.3.13 - Comparação dos valores de EC₅₀ (a partir de ensaios de SRB, após 96 h de incubações com várias linhagens de células tumorais com um intervalo de confiança = 95/).

Tabela 4.3.5 - Citotoxicidade da hederagenina (**He**) e seus análogos **4a-x** e **5a-f** empregando linhagens celulares tumorais humanas (518A2, A2780, HT29, MCF7, A549, 8505C).

EC ₅₀ *	518A2	A2780	HT29	MCF7	A549	8505C
He	34,9	19,9	50,0	25,7	29,0	38,0
4a	7,8	9,7	9,5	7,9	7,0	7,6
4b	10,3	12,9	12,8	10,2	10,9	8,8
4c	10,9	14,3	14,3	12,7	13,2	7,8
4d	12,9	13,1	16,1	16,5	14,8	14,1
4e	11,7	13,6	13,5	12,7	13,6	9,5
4f	9,0	12,9	13,2	11,3	12,6	8,4
4g	9,2	14,4	13,3	12,7	12,9	9,4
4h	10,0	13,4	13,2	12,5	13,2	11,2
4i	9,5	12,9	13,0	11,5	11,4	8,0
4j	7,5	11,6	12,0	10,2	11,7	8,7
4k	8,1	11,9	12,0	8,3	8,1	6,6
4l	11,7	13,8	14,8	13,0	13,0	11,9
4m	10,9	13,7	14,4	13,5	13,5	9,7
4n	13,8	14,6	15,3	14,2	14,2	13,7
4o	10,2	11,4	11,3	9,2	8,5	6,7
4p	11,6	13,2	13,7	13,5	13,5	8,6
4q	11,4	13,0	13,5	12,7	9,8	8,1
4r	8,4	7,8	7,8	7,8	6,5	6,1
4s	11,8	14,7	14,8	13,7	13,7	8,8
4t	12,7	13,5	14,0	13,4	14,0	12,8
4u	8,6	8,8	11,2	7,7	9,5	9,5
4v	11,1	15,0	13,4	12,7	13,1	13,1
4w	8,7	12,1	13,4	9,0	11,4	10,3
4x	12,4	17,0	17,7	15,4	15,9	13,2
5a	13,7	11,4	15,1	14,6	15,7	13,5
5b	12,5	15,9	19,3	15,2	17,2	12,7
5c	2,0	1,1	1,2	3,7	1,9	1,8
5d	>30	>30	>30	>30	>30	>30
5e	21,6	14,8	17,3	17,0	16,8	22,1
5f	3,7	1,8	1,3	6,5	2,7	3,6

*valores de EC₅₀ em µM para os ensaios SRB após 96 h de tratamento; os valores são media de pelo menos três experiências independentes realizadas em triplicado cada; IC = intervalo de confiança de 95/

Resultados similares foram observados para o ácido glicirretínico que em sua forma natural (ácido livre) apresentou citotoxicidade três vezes inferior aos correspondentes ésteres (SCHWARZ e CSUK, 2010; CSUK *et al.*, 2010).

As amidas com os grupos etilpiperidinil (**5f**) e etilpirrolidinil (**5c**) são os mais ativos para todas as células tumorais testadas, mostrando valores de EC₅₀ que variam entre 1,3-6,5 µM para o análogo **5f** e valores entre 1,1-3,9 µM para **5c**. Isto corresponde a uma citotoxicidade de aproximadamente 30 vezes maior que a hederagenina (Figura 4.3.14). Além disso, os análogos de ésteres com o grupo benzil (**4a**) e *orto*-nitrobenzil (**4r**) foram os mais ativos entre todos os derivados de ésteres para as linhagens de células testadas, mostrando valores de EC₅₀ entre 7,0-9,7 µM para **4a** e 6,1-8,4 µM para o análogo **4r**. Estes resultados mostram que os derivados **4a** e **4r** são aproximadamente 20 vezes mais citotóxicos que a hederagenina (Figura 4.3.14).

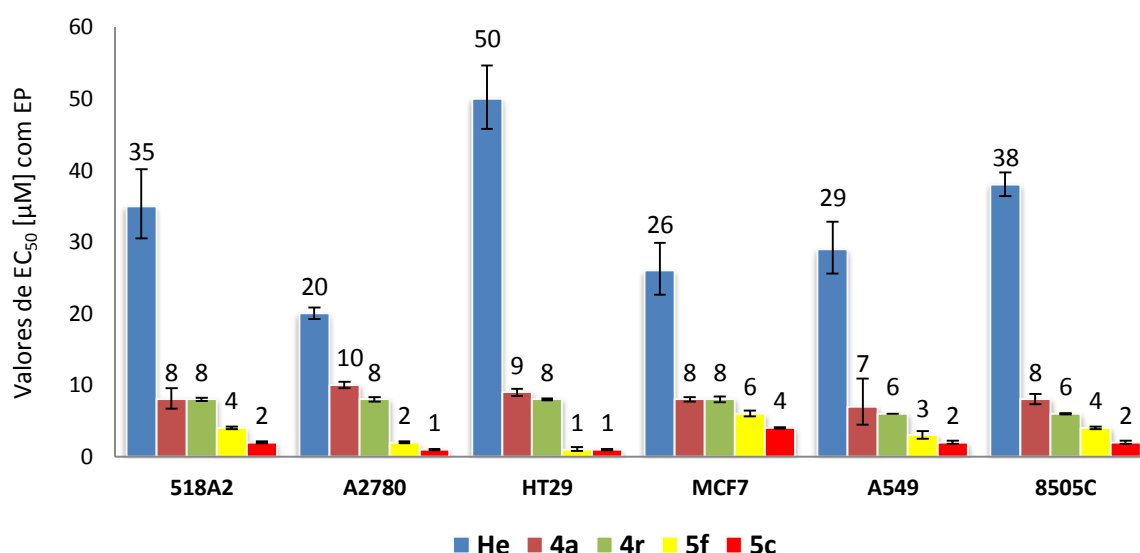


Figura 4.3.14 - Citotoxicidade (valores de EC₅₀ em µM com erro padrão (EP), a partir dos ensaios de SRB) da hederagenina (**He**) e os análogos ésteres **4a**, **4r** e amidas **5f**, **5c** testadas para todas as linhagens celulares.

Para todas as linhagens de células testadas (Figura 4.3.15) as atividades dos ésteres *para* substituído (**4o**, **4q** e **4p**) diminuem com o raio atômico do halogênio substituinte. Por outro lado, o análogo *p*-nitro substituído (**4r**) apresenta maior atividade citotóxica que os análogos *orto* e *meta* nitro substituído (**4b**, **4k**). Ao contrário, o análogo *para* metil substituído (**4s**) apresenta uma diminuição na atividade citotóxica que os análogos *orto* e *meta* metil substituídos (**4f**, **4l**).

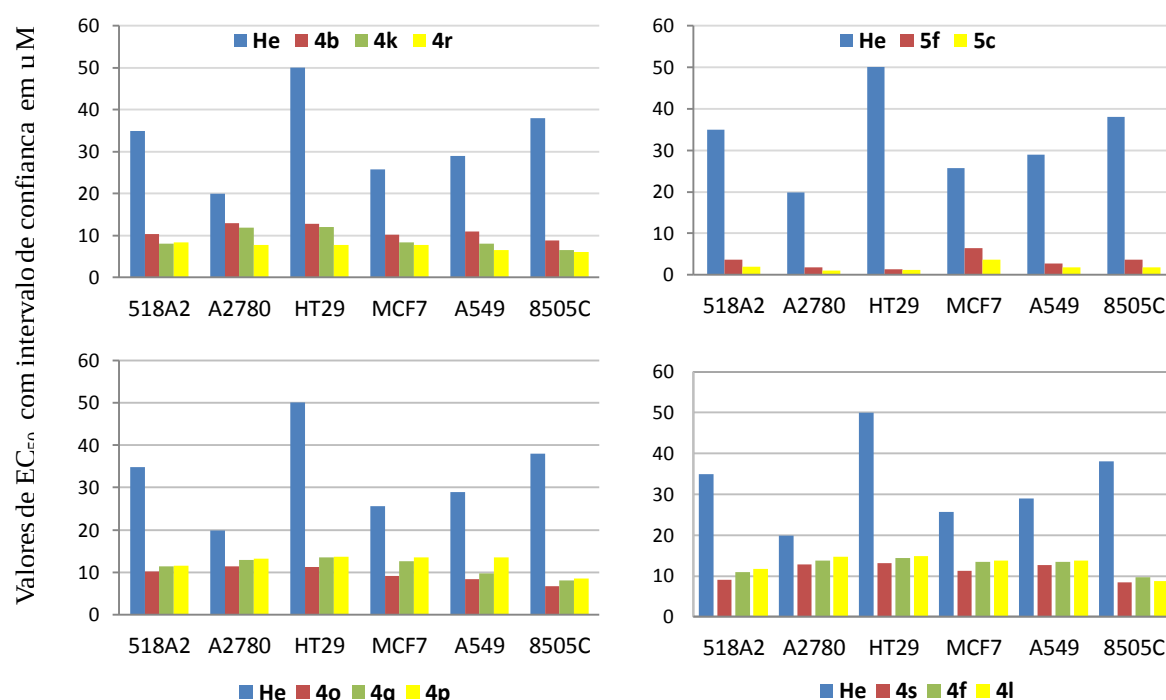


Figura 4.3.15 - Comparação da citotoxicidade da hederagenina (**He**) e alguns ésteres e amidas (EC₅₀ em μM de SRB com intervalo de confiança (95/) para várias linhagens de celulares tumorais humanas).

Para obter uma visão mais profunda sobre o modo de ação, para o composto mais ativo desta série, o derivado **5c**, alguns experimentos adicionais foram realizados. A morte de células de câncer de ovário humano A2780 foi investigada utilizando um ensaio de iodeto de laranja de acridina/iodeto de propídio (AO/PI) e microscopia de fluorescência (Figura 4.3.16). Assim, as células foram tratadas durante 48 h com uma concentração de EC₅₀ de **5c**. Os resultados deste ensaio indicam que a morte celular controlada ocorreu, evidenciado pela presença de células A2780 verdes fluorescentes. Ademais, várias células mostraram uma cor laranja; estas células morreram por necrose (secundário). Este ensaio permitiu conferir que o derivado **5c** actua, principalmente, via apoptose.

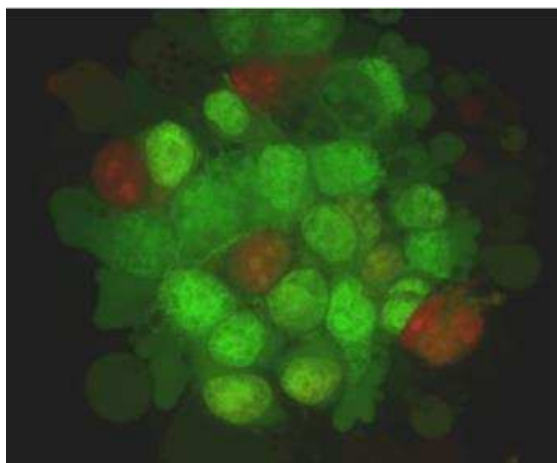


Figura 4.3.16 - Imagem de microscopia de fluorescência das células de câncer de ovário (A2780) tratadas com uma concentração de EC_{50} de **5c**, durante 48 horas.

4.4. Conclusões

Através de uma reação S_N2 foram obtidos 23 ésteres derivados da hederagenina, com rendimentos na faixa 40-80%. Por meio de uma ativação da carboxila com TBTU foram obtido o éster com o grupo benzotriazol e 9 amidas derivadas da hederagenina, com rendimentos na faixa 50-80%.

Todos os análogos de éster e amida da hederagenina preparados são inéditos.

Os derivados **4a-x** e **5a-e** foram submetidos a testes de atividade citotóxica contra seis linhagens celulares de câncer humano, incluindo 518A2 (células de melanoma), A2780 (carcinoma de ovário), HT29 (adenocarcinoma do cólon), MCF7 (adenocarcinoma de mama), A549 (câncer do pulmão), 8505c (carcinoma da tireóide) utilizando o ensaio sulforrodamina-B (SRB). A partir dos análises, ficou evidente que todos os análogos exibiram melhor atividade anti-câncer contra as linhagens celulares tumorais testadas quando é comparados com a hederagenina.

As amidas com etilpiperidinil (**5f**) e etilpirrolidinil (**5c**) como substituinte foram os derivados mais promissores apresentando valores de EC_{50} variando entre 1,1-6,5 μM .

Tal como é mostrado pela coloração do experimento adicional de AO/PI, com células de A2780 (carcinoma de ovário), o composto **5c** pode atuar por apoptose.

4.5. Referências bibliográficas

BISHAYEE, A., AHMED, S., BRANKOV, N., PERLOFF, M. Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer. *Front Biosci.*, v. 16, p. 980-996, 2011.

BOKE, N. Aristatosides A-C, hederagenin-type triterpene saponins from *Cephalaria aristata*. *Phytochemistry Letters*, v. 8, p. 149-155, 2014.

CSUK, R., SCHWARZ, S., KLUGE, R., STRÖHL, D. Synthesis and biological activity of some antitumor active derivatives from glycyrrhetic acid *Eur. J. Med. Chem.*, v. 45, p. 5718-5723, 2010.

DARZYNKIEWICZ, Z., HUANG, X., OKAFUJI, M., KING, M.A. Cytometric methods to detect apoptosis, *Methods Cell. Biol.*, v. 75, p. 307-341, 2004.

HUANG, W., HUANG, J., ZHANG, D., ZHANG, R., LIAO, Z. Study on anti-invasive effect and apoptosis induction of pentacyclic triterpenoid in human lung cancer cells. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, v. 6, p. 254-257, 2003.

KESSLER, J.H., MULLAUER, F.B., DE ROO, G.M., MEDEMA, J.P. Broad in vitro efficacy of plant-derived betulinic acid against cell lines derived from the most prevalent human cancer types. *Cancer Lett.*, v. 251, p. 132-145, 2007.

KHALIK, A., MIYASE, T., EL-ASHAAL, H., MELEK, F.R. Triterpenoid saponins from *Fagonia cretica*. *Phytochemistry*, v. 54, p. 853-859, 2000.

LASZCZYK, M.N. Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. *Planta Med.*, v. 75, p. 1549-1560, 2009.

LI, H., HE, N., LI, X., ZHOU, L., ZHAO, M., JIANG, H. Oleanolic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in NB4 cells by targeting PML/RAR α . *Oncol Lett.*, v. 6, p. 885-890, 2013.

LIBY, K.T., YORE, M.M., SPORN, M.B. Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer. *Nat Rev Cancer*, v. 7, p. 357-369, 2007.

LIN, J., CHEN, Y., WEI, L., HONG, Z., SFERRA, T.J., PENG, J. Ursolic acid inhibits colorectal cancer angiogenesis through suppression of multiple signaling pathways J. Int J Oncol., v. 43, p. 1666-1674, 2013.

MULLAUER, F. B., KESSLER, J. H., MADEMA, J. P. Betulinic acid, a natural compound with potent anticancer effects Anti-Cancer Drugs, v. 21, p. 215-227, 2010.

OHGI, T., YOSHIFUSA, H., KANDORI, K. Preparation of triterpene derivatives and medicinal compositions for treatment of nephritis. US 5885992. 1999.

OVENSNÁ, Z., VACHALCOVÁ, A., HORVÁTHOVÁ, K., TÁTHOVÁ, D. Pentacyclic triterpenoic acids: New chemoprotective compounds. Neoplasma, v. 51, p. 327-333. 2004.

PAWAN, A.; DHARA M, C. ¹³C NMR spectroscopy of oleanane triterpenoids. Progress in NMR Spectroscopy, v. 24, p. 1-90, 1992.

PETRONELLI, A., PANNITTERI, G., TESTA, U. Triterpenoids as new promising anticancer drugs. Anti-Cancer Drugs, v. 20, p. 880-892, 2009.

PHILLIPS, D.R., RASBERY, J.M., BARTE, L.B., MASUDA, S.P. Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. Curr Opin Plant Biol., v. 9, p. 305-314, 2006.

PRABAKARAN, K., KHAN, F., JIM, J.S. An efficient 2-(1*H*-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TBTU)-mediated synthesis of 5-(trifluoromethyl)-*N*-alkyl-1-(3-phenylisoquinoline-1-yl)-1*H*-pyrazole-4-carboxamides. Res Chem Interned., v. 38, p. 615-627, 2012.

SALVADOR, J.A.R. Pentacyclic triterpenes as promising agents in câncer, Nova Science Publishers, New York, USA, 2010.

SCHWARZ, S., CSUK, R. Synthesis and biological activity of some antitumor active derivatives from glycyrrhetic acid Bioorg. Med. Chem., v. 18, p. 7458-7474, 2010.

SETZER, W.N., SETZER, M.C. Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. Mini Rev Med Chem., v. 3, p. 540-556, 2003.

SHAH, B.A., QAZI, G.N., TANEJA, S.C. Boswellic acids: a group of medicinally important compounds. *Nat Prod Rep.*, v. 26, p. 72-89, 2009.

SIEWERT, B., PIANOWSKI, E., OBERNAUER, A., CSUK, R. Towards cytotoxic and selective derivatives of maslinic acid. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 22, p. 594-615, 2014.

SKEHAN, P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J.T., BOKESCH, H., KENNEY, S., BOYD, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening, *J. Natl. Cancer Ints.*, v. 82, p. 1107-1112, 1990.

SULTANA, N., ATA, A. Oleanolic acid and related derivatives as medicinally important compounds. *J Enzyme Inhibition Med Chem.*, v. 23, p. 739-756, 2008.

WANG, N., LI, Z., SONG, D., LI, W., FU, H., KOIKE, K. Lanostane-type triterpenoids from the roots of *Kadsura coccinea*. *J Nat Prod.*, v. 71, p. 990-994, 2008.

WANG, S.R., FANG, W.S. Pentacyclic triterpenoids and their saponins with apoptose-inducing activity. *Curr. Topics Med. Chem.*, v. 9, p. 1581-1596, 2009.

WANG, X., BAI, H., ZHANG, X., LIU, J., CAO, P., LIAO, N. Inhibitory effect of oleanolic acid on hepatocellular carcinoma via ERK-p53-mediated cell cycle arrest and mitochondrial-dependent apoptose. *Carcinogenesis*, v. 34, p. 1323-1330, 2013.

YANG, H.J., DOU, Q.P. Targeting apoptose pathway with natural terpenoids: implications for treatment of breast and prostate cancer. *Curr. Drug Targets*, v. 11, p. 733-744, 2010.

YOSHIKAWA, K., KOUSO, K., TAKAHASHI, J., MATSUDA, A., OKAZOE, M., UMEYAMA, A. Cytotoxic constituents of the fruit body of *Daedalea dickinsii*. *J Nat Prod.*, v. 68, p. 911-914, 2005.

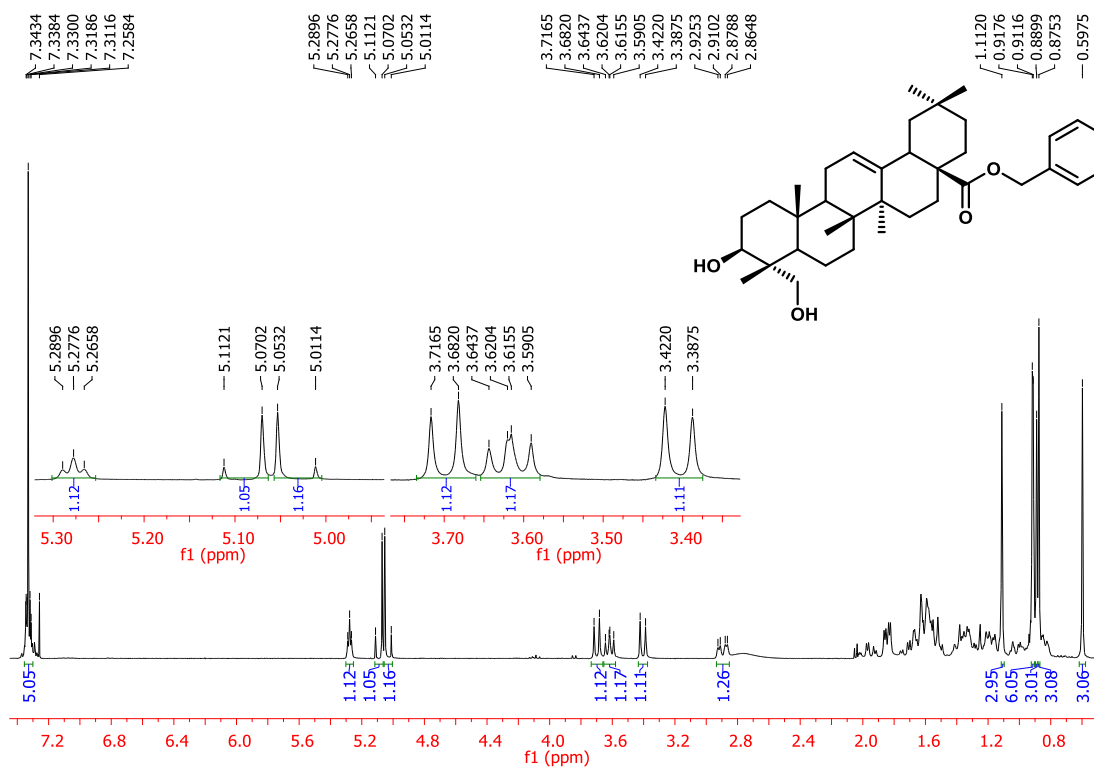
YU, F., WANG, Q., ZHANG, Z., PENG, Y., QUI, Y., SHI, Y. Development of Oleanane-Type Triterpenes as a New Class of HCV Entry Inhibitors. *J. Med. Chem.*, v. 56, p. 4300-4319, 2013,

ZHANG, H.Y., LI, H. M., YU, Z., YU, X.Y., GUO, K. Expression and significance of squalene epoxidase in squamous lung cancerous tissues and pericarcinoma tissues Thoracic Cancer, v. 5, p. 275-280, 2014.

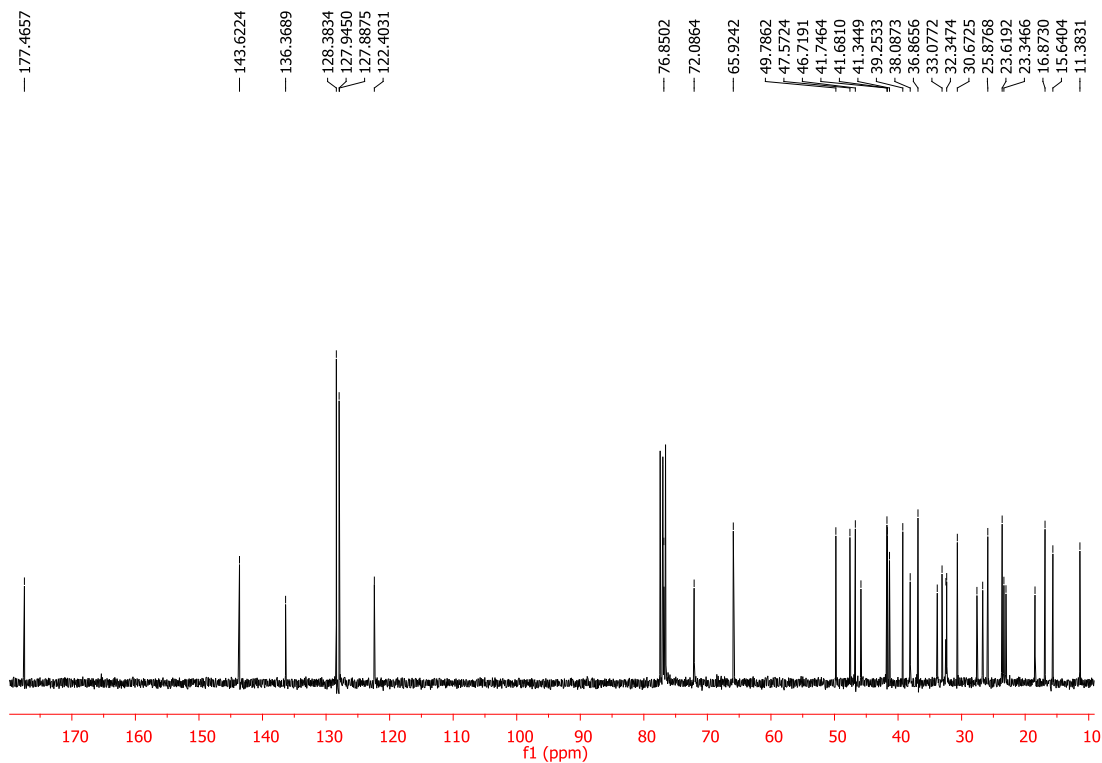
ZHANG, W., MEN, X., LEI, P. Review on anti-tumor effect of triterpene acid compounds. J Can Res Ther., v. 10, p. 14-19, 2014.

4.6. Anexos

4.6.1. Espectros do (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de benzila (4a)

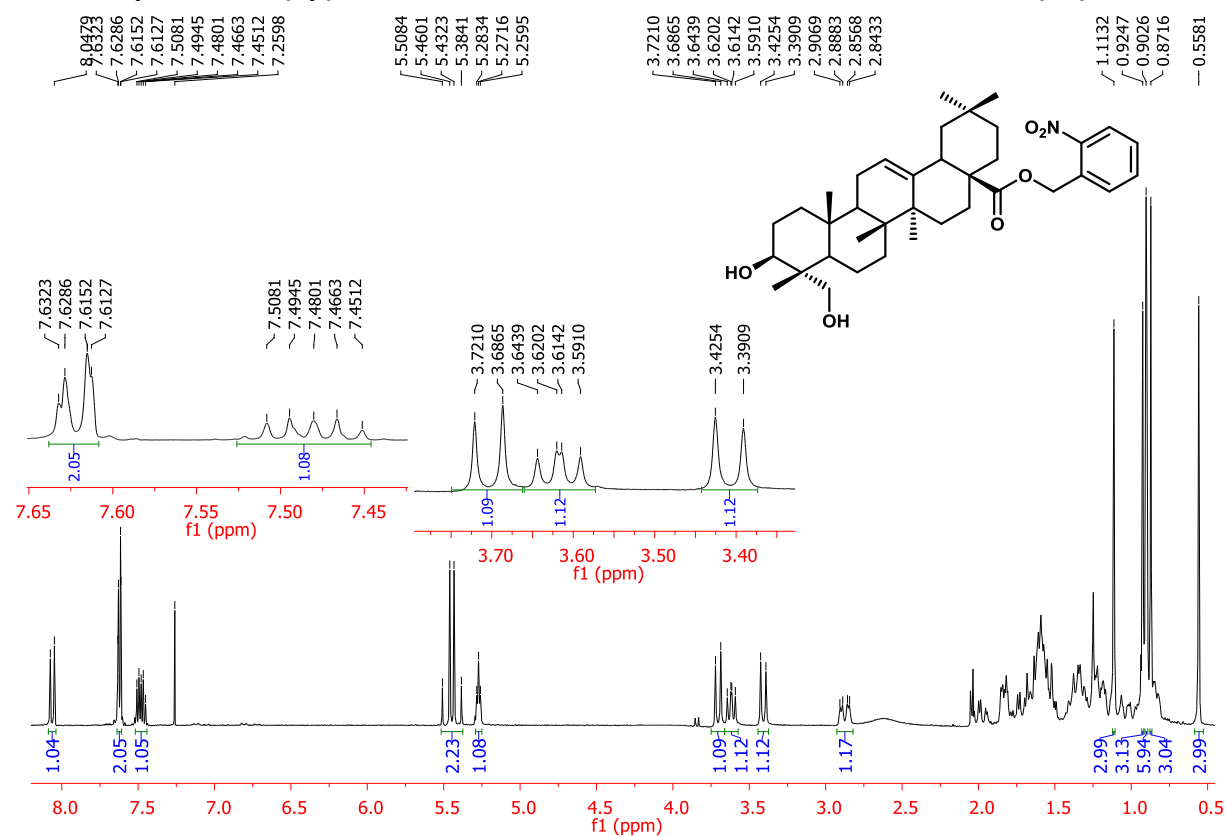


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃; 300 MHz)

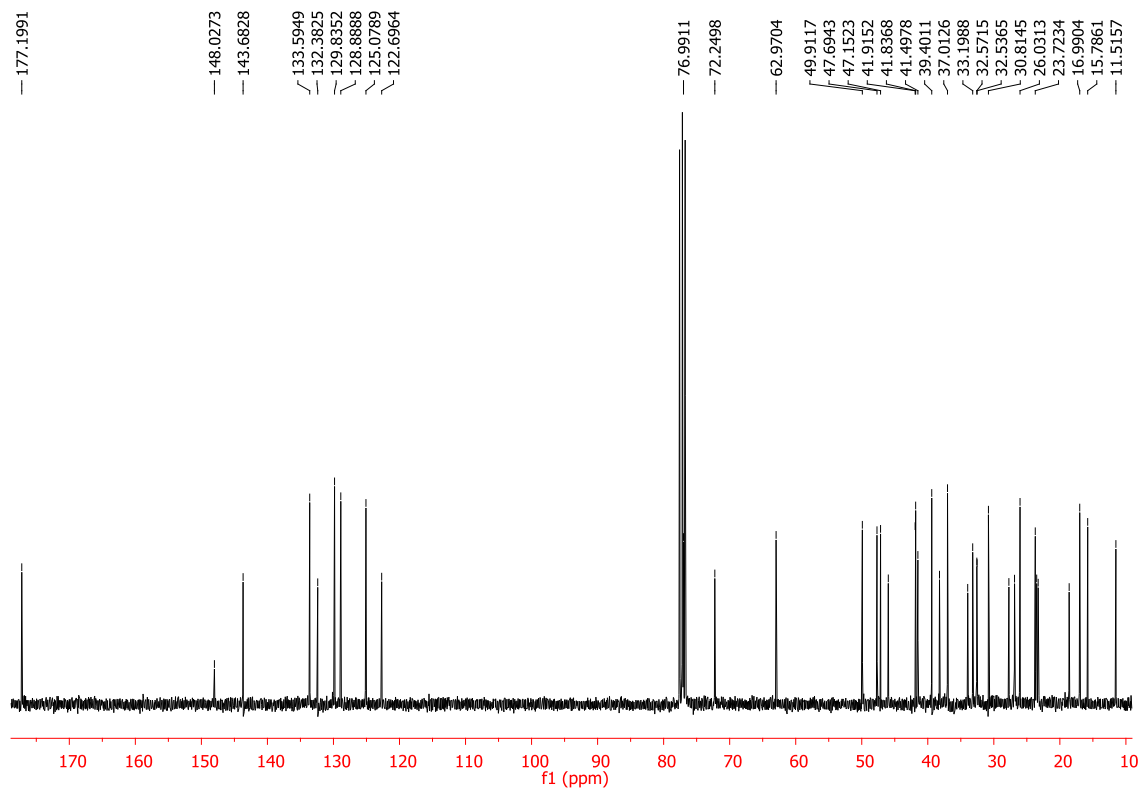


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃; 75 MHz)

4.6.2. Espectros do (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de *o*-nitrobenzila (4b)

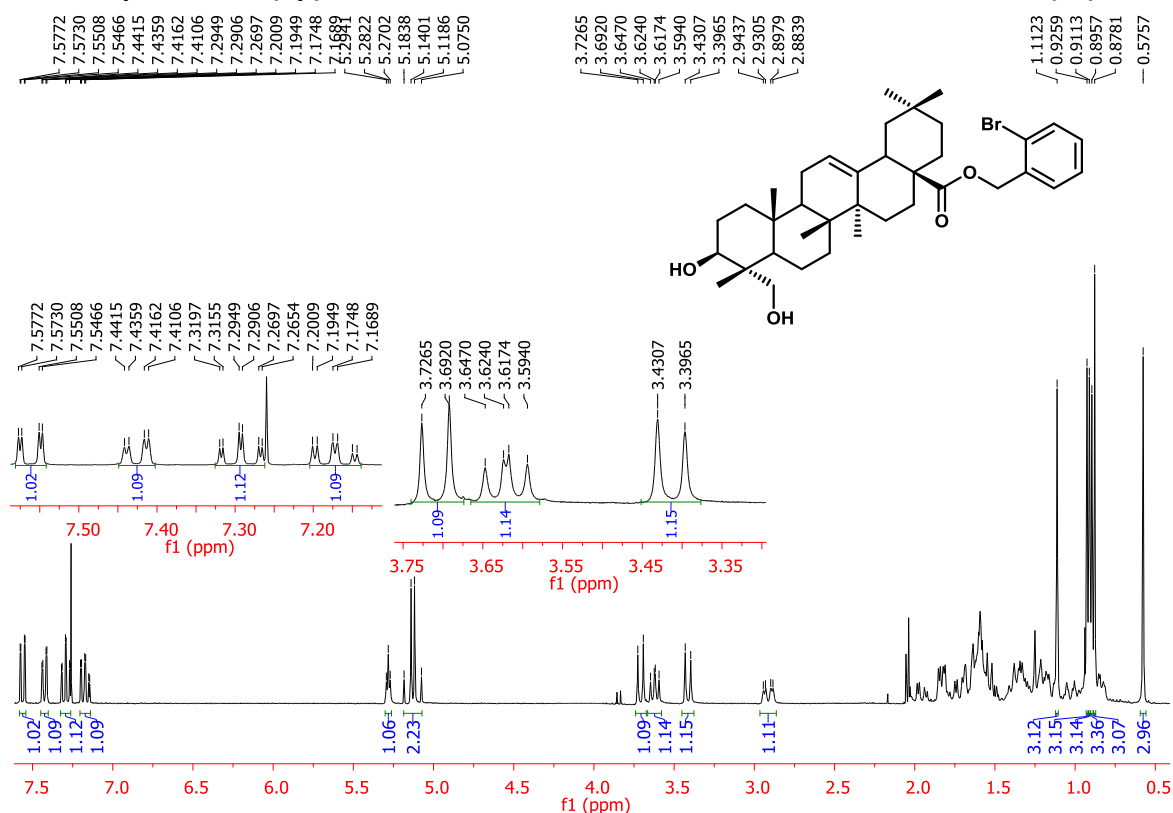


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃; 300 MHz)

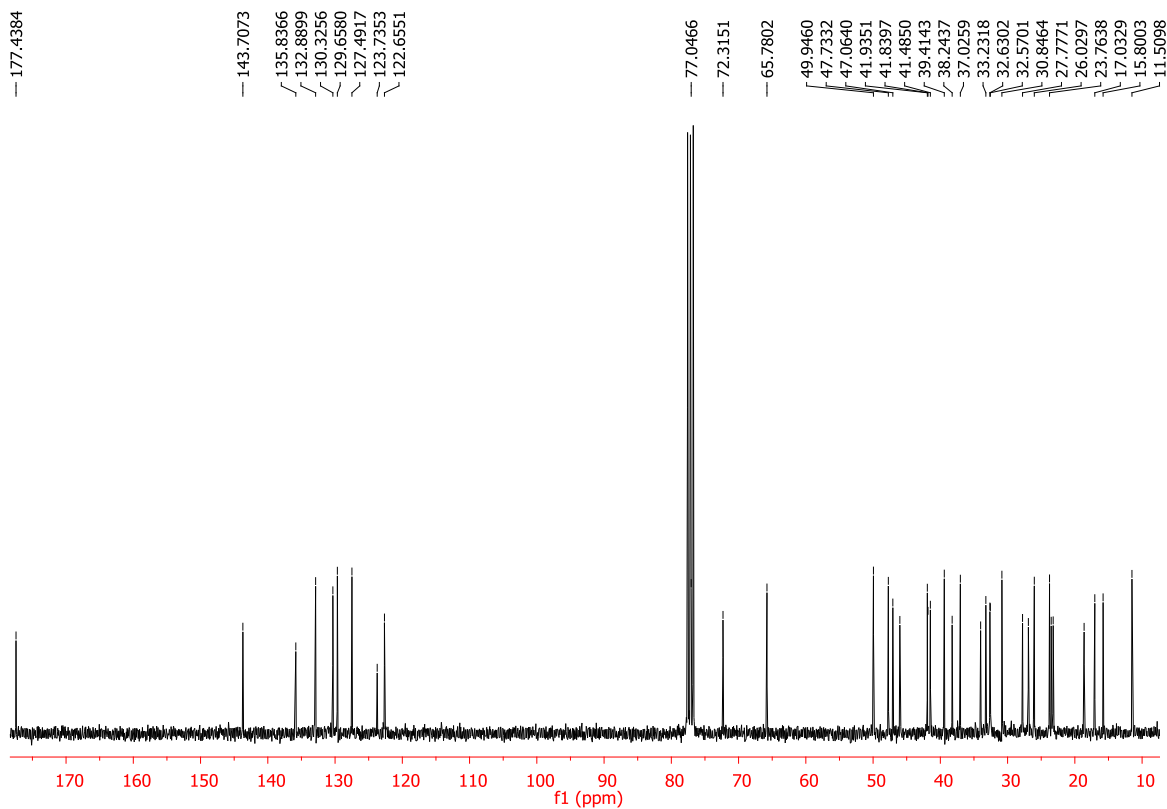


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃; 75 MHz)

4.6.3. Espectros do (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de *o*-bromobenzila (4c)

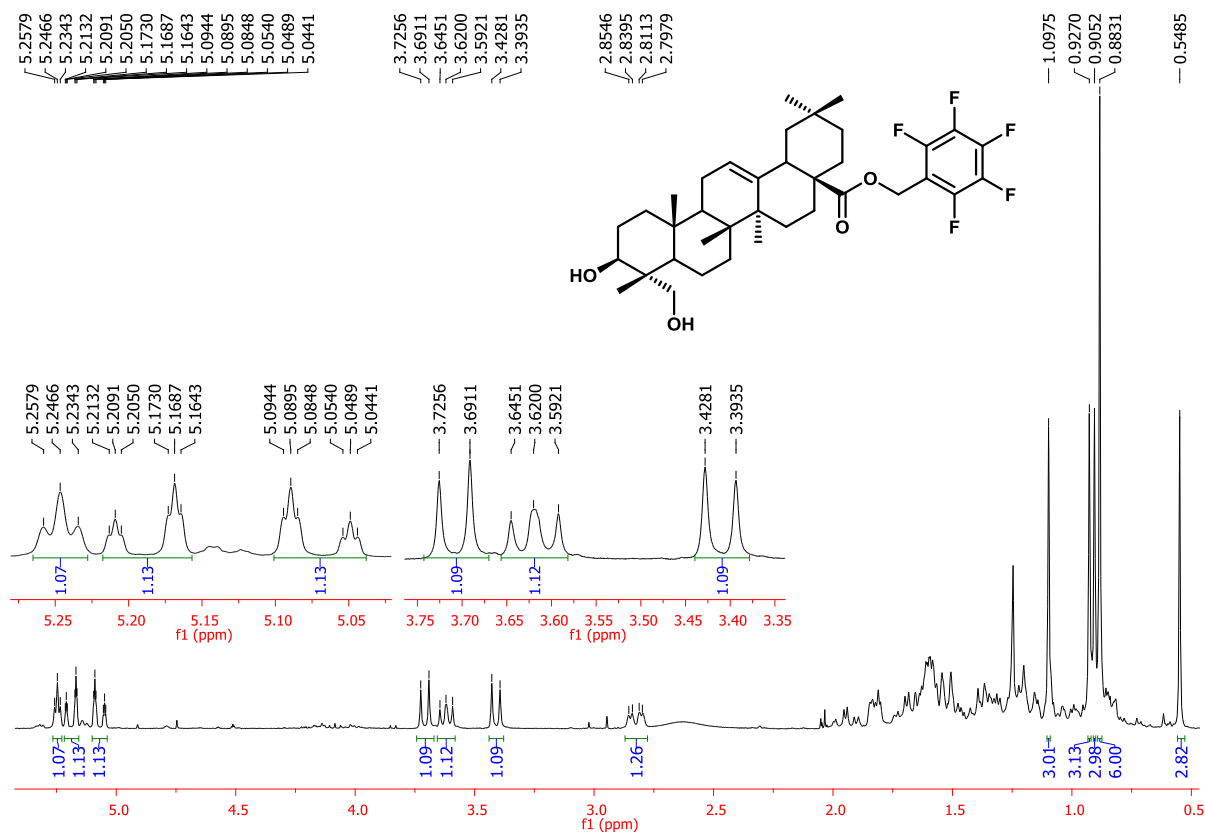


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃; 300 MHz)

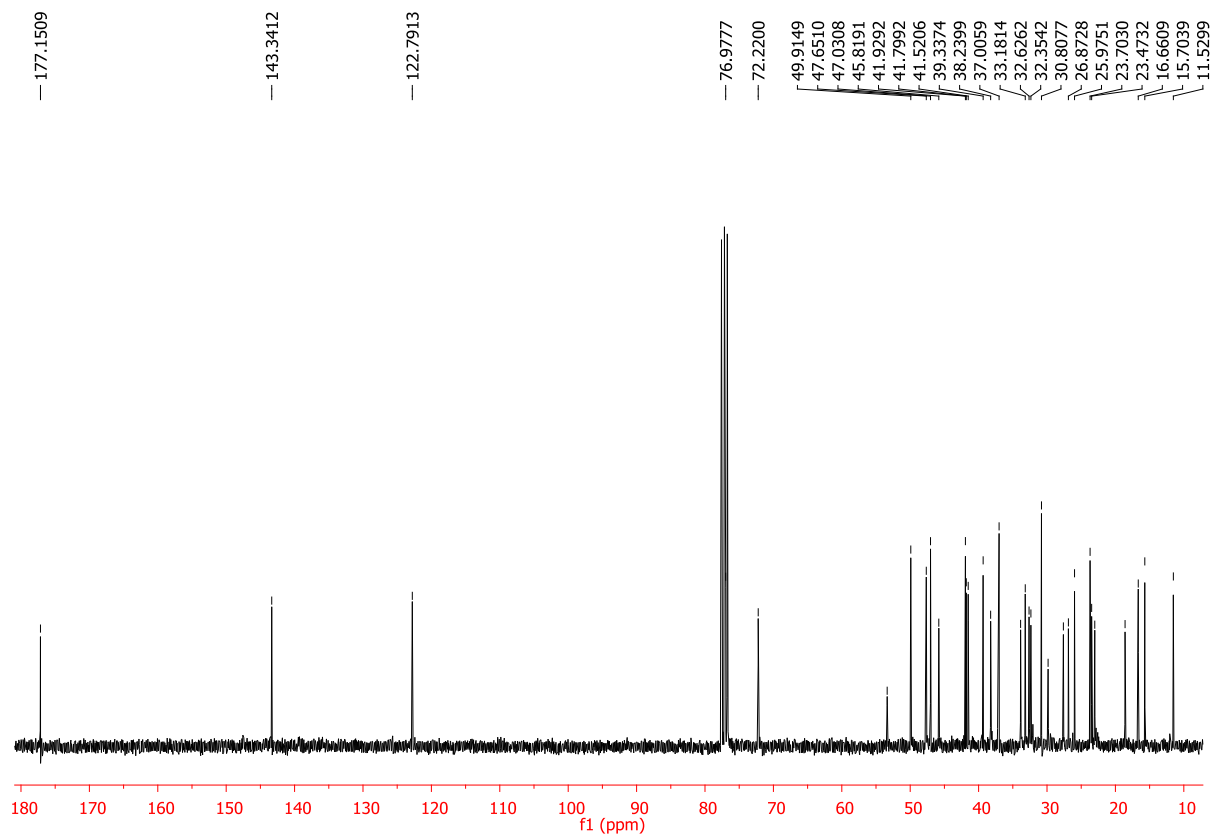


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃; 75 MHz)

4.6.4. Espectro do (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de pentafluorobenzila (4d)

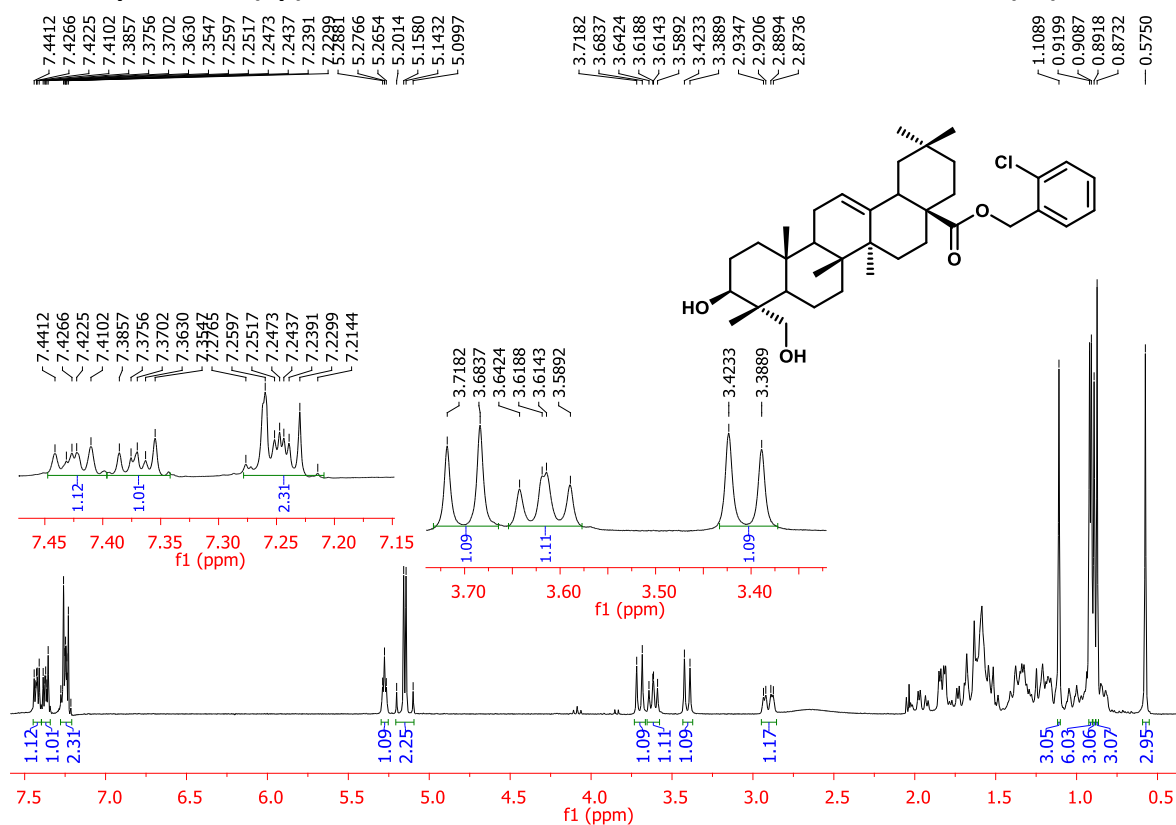


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃; 300 MHz)

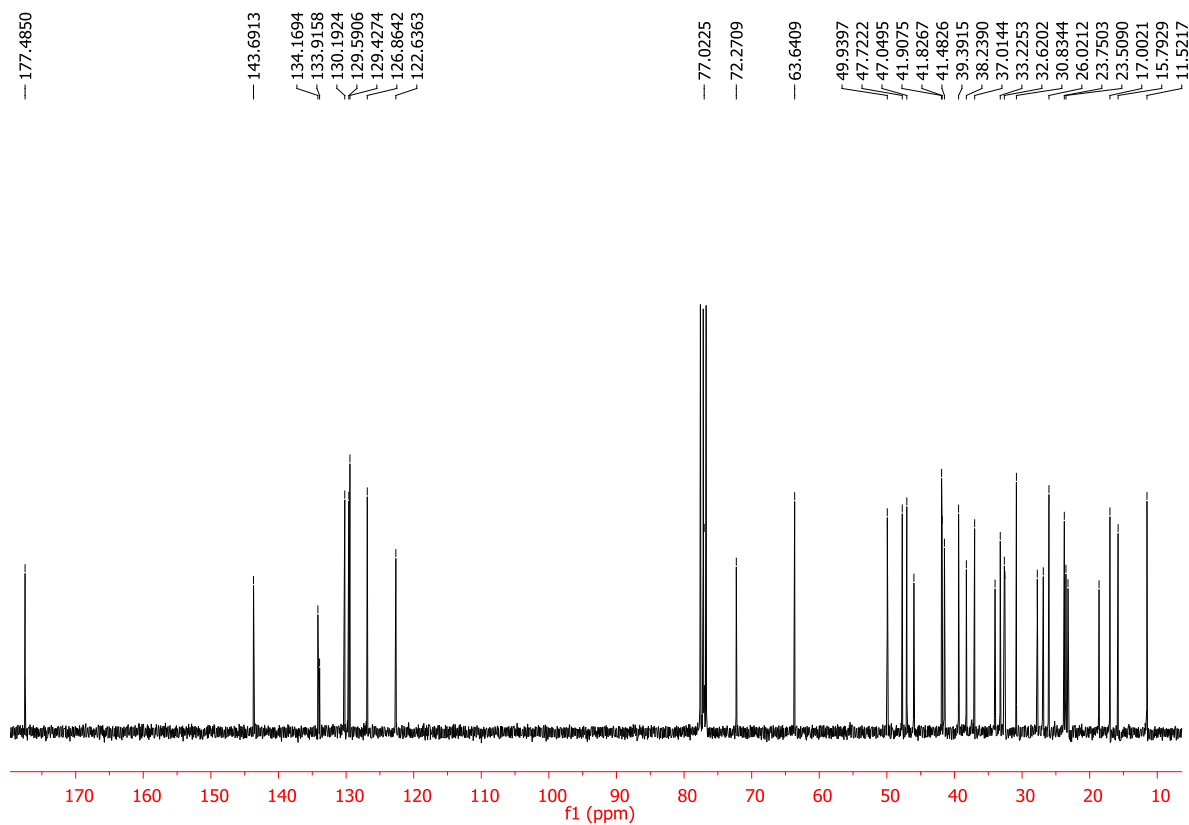


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃; 75 MHz)

4.6.5. Espectro do (3 β),3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de *o*-clorobenzila (4e)

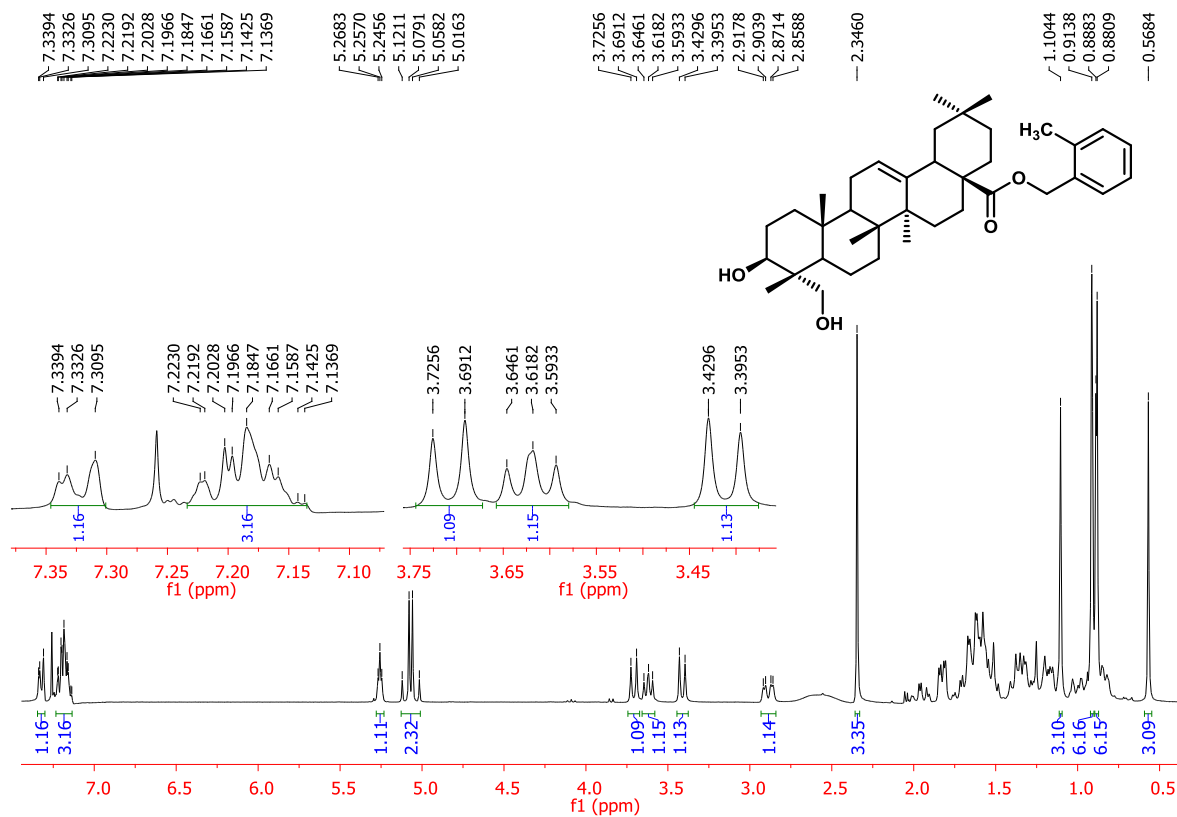


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃; 300 MHz)

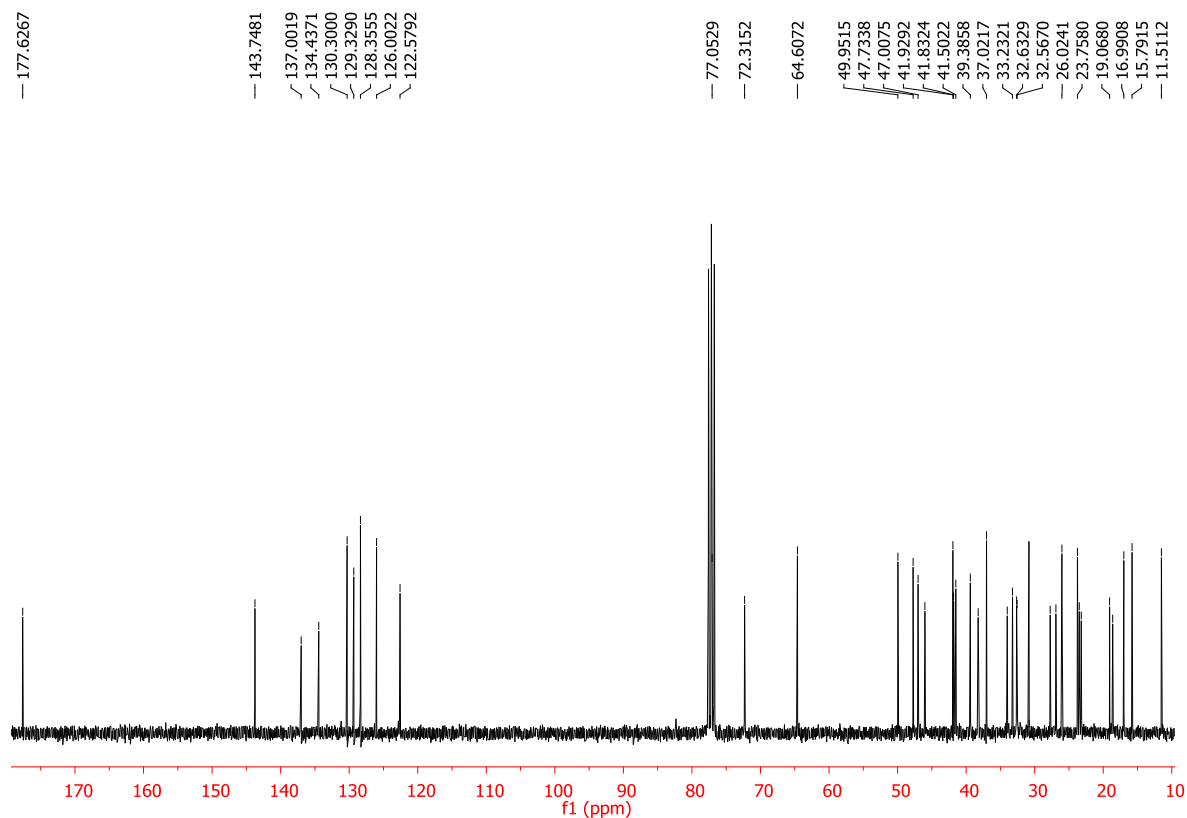


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃; 75 MHz)

4.6.6. Espectro do (3β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de *o*-metilbenzila (4f)

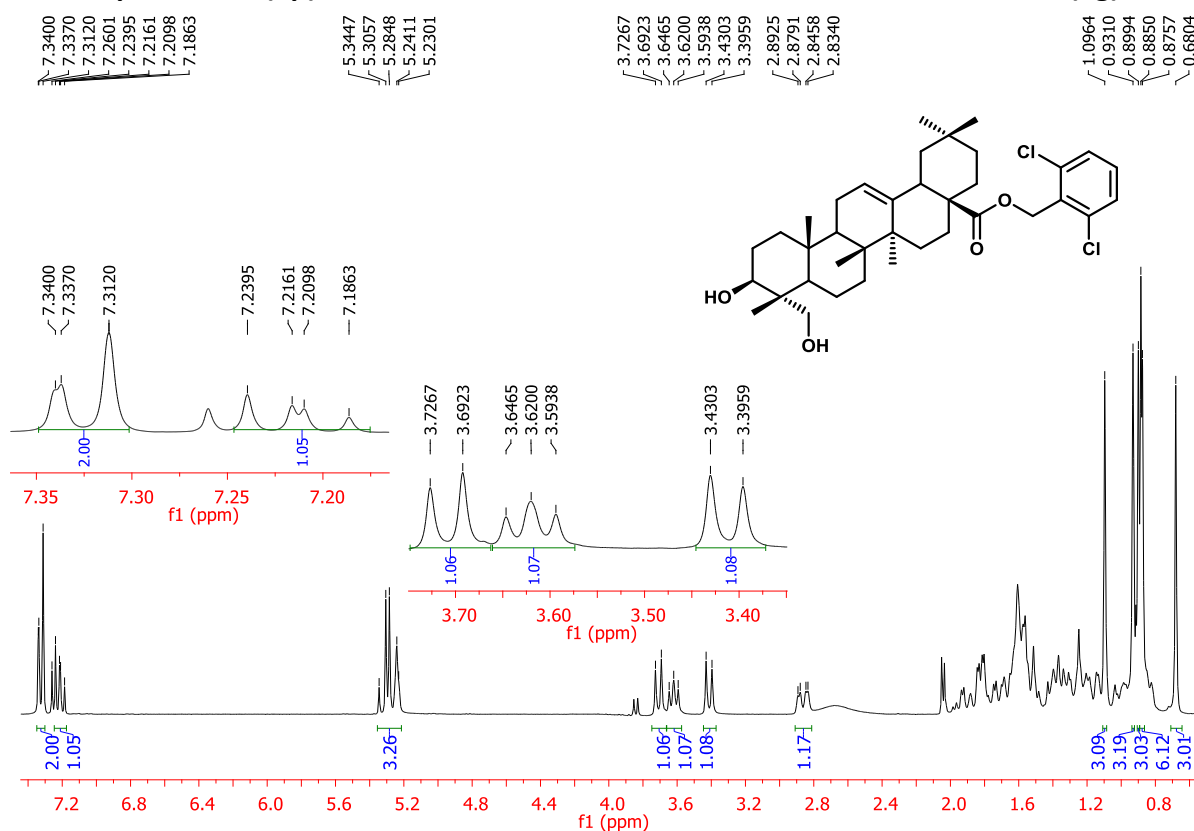


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃; 300 MHz)

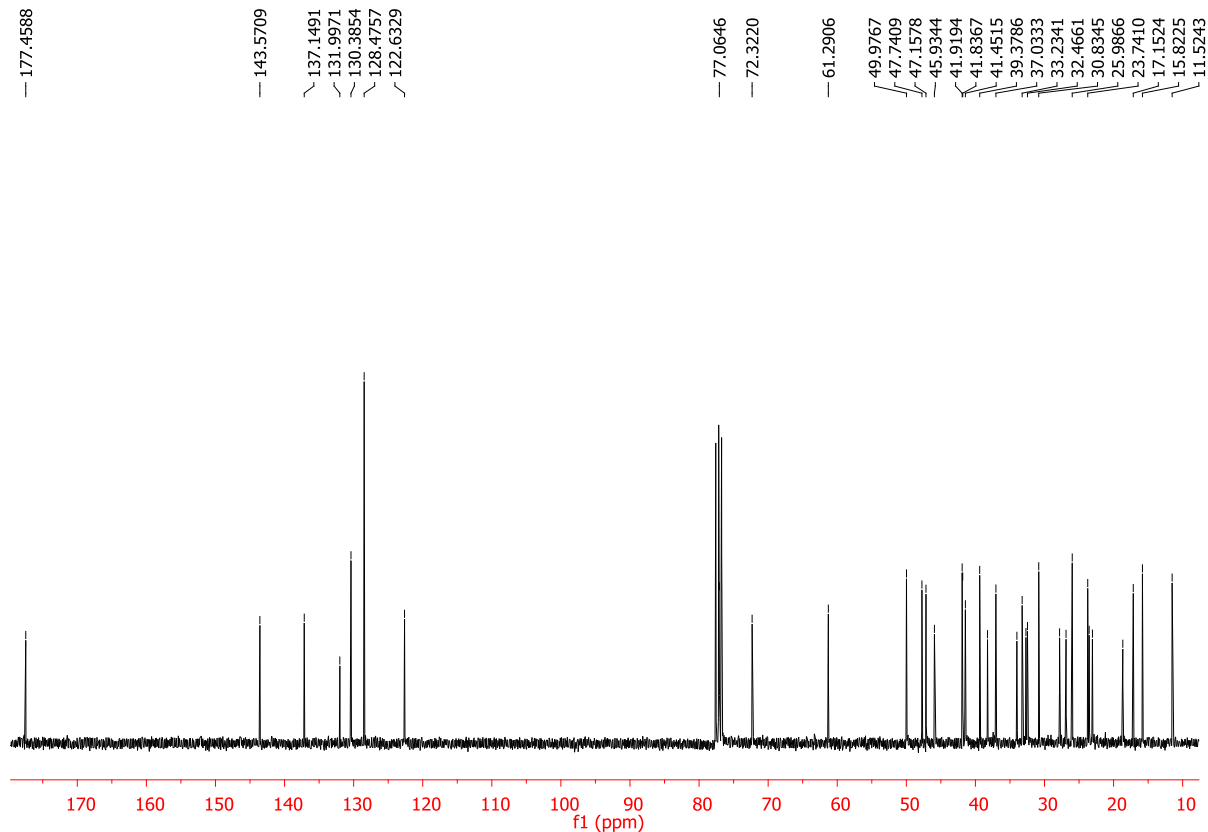


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃; 75 MHz)

4.6.7. Espectros do (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de 2,6-diclorobenzila (4g)

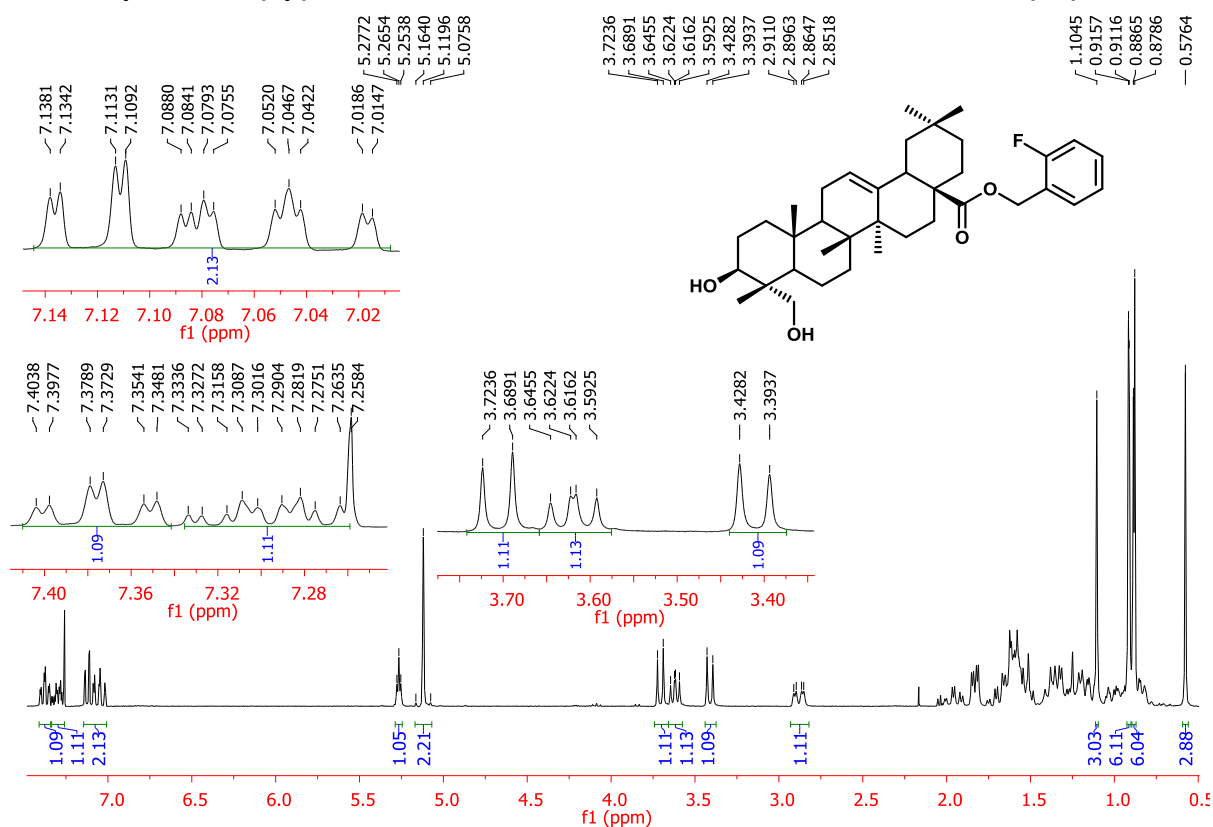


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃; 300 MHz)

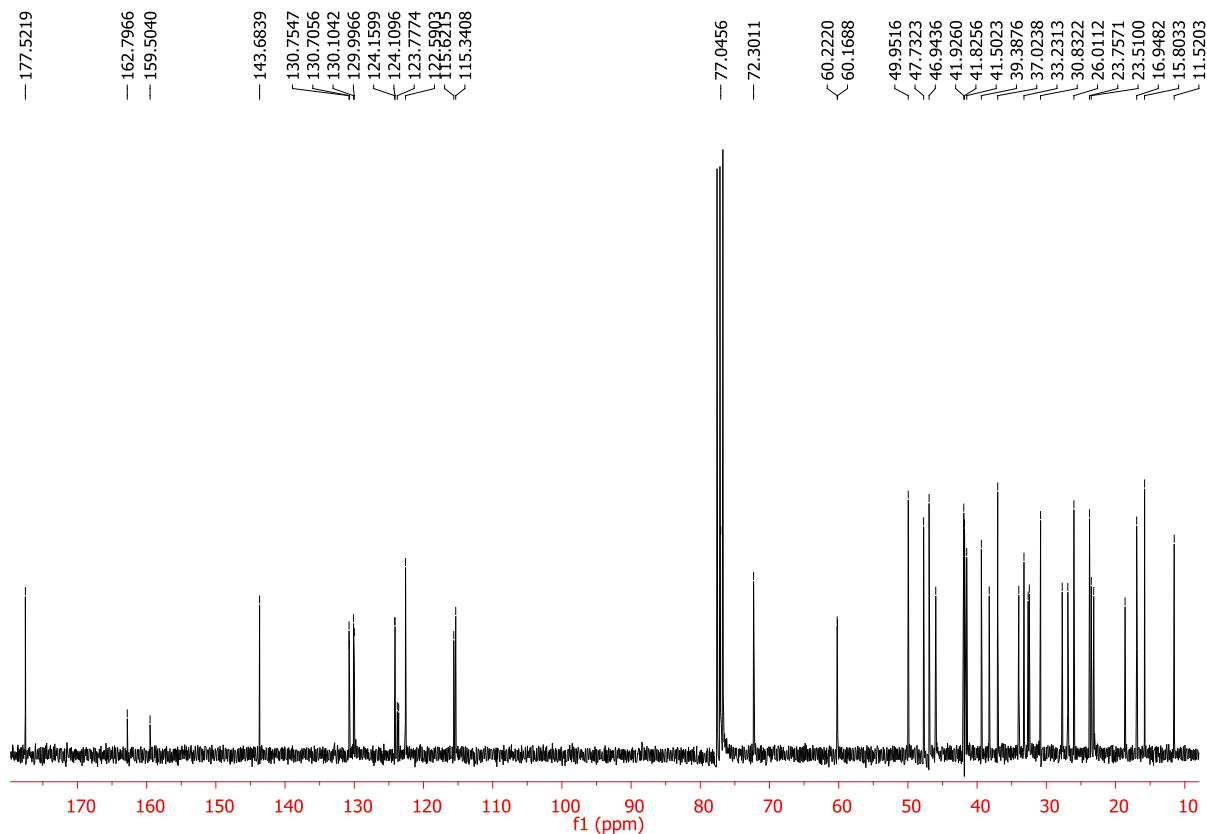


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃; 75 MHz)

4.6.8. Espectro do (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de *o*-fluorobenzila (4h)

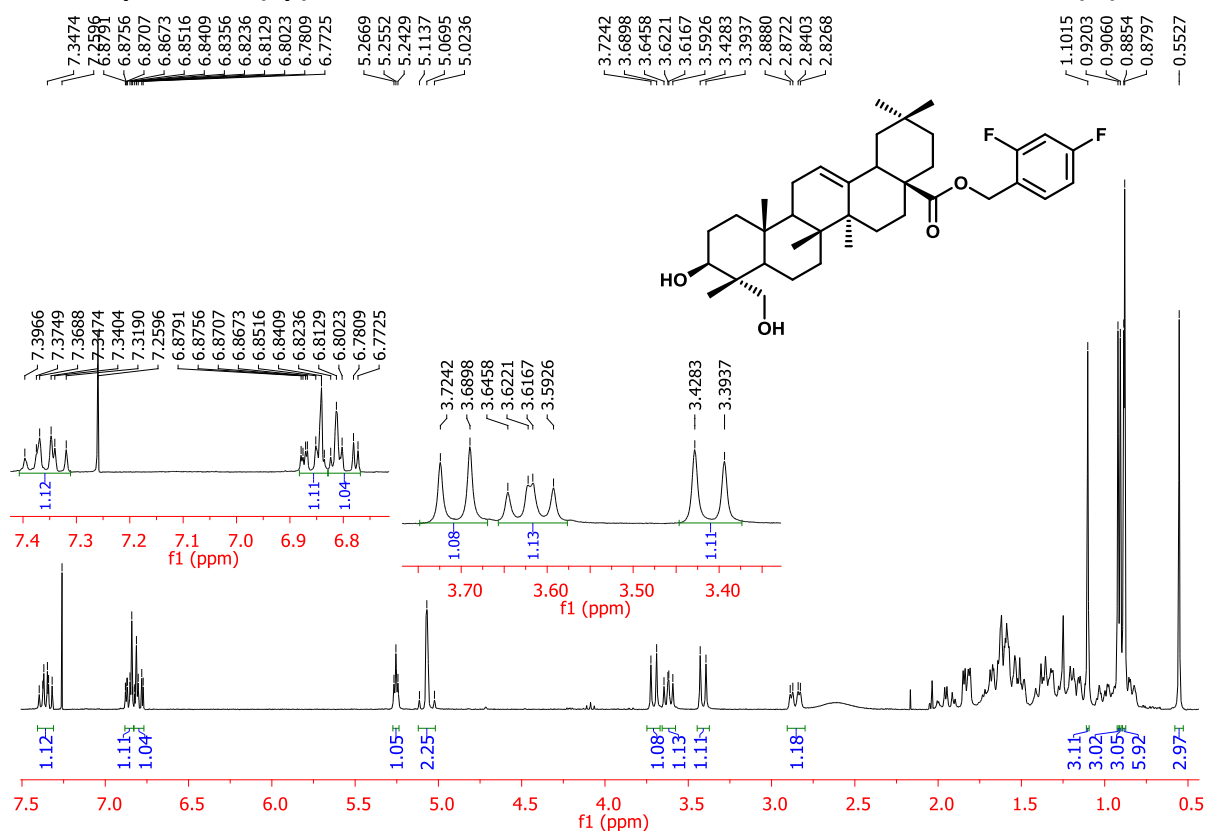


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃; 300 MHz)

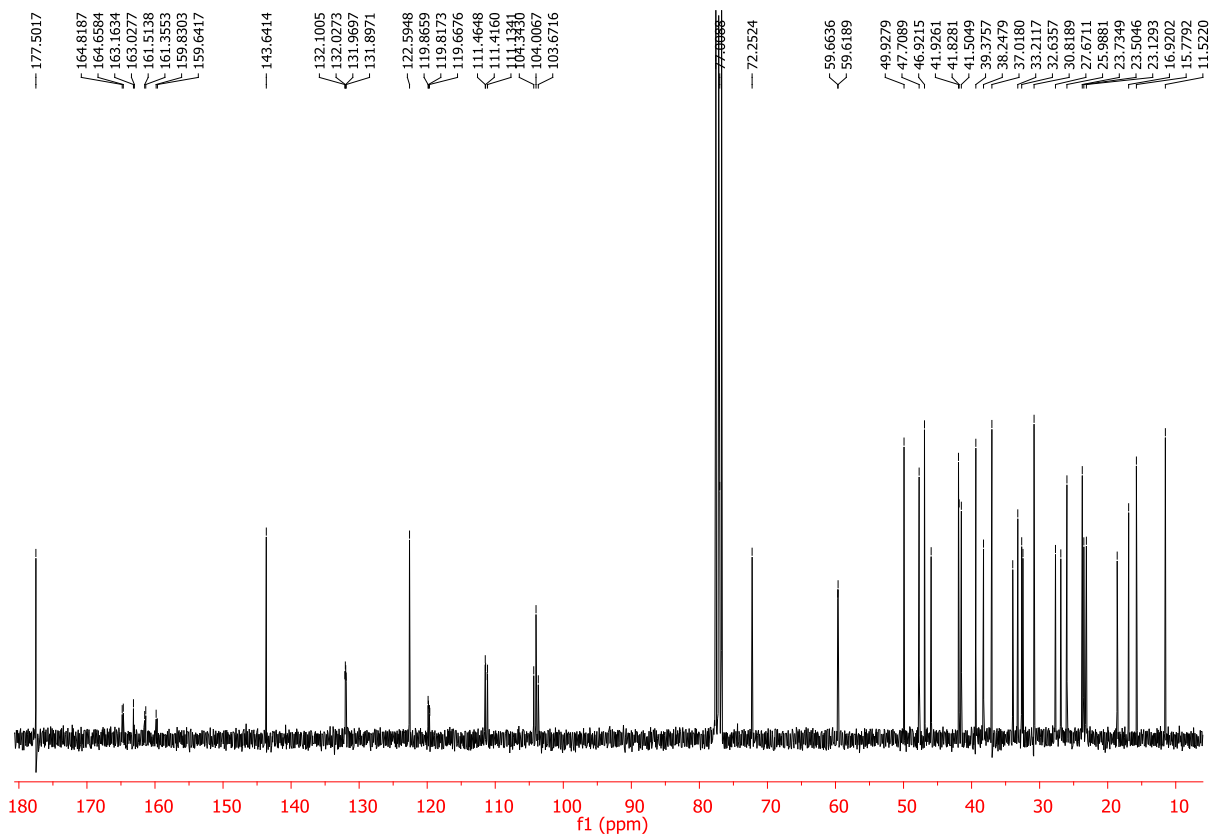


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃; 75 MHz)

4.6.9. Espectro do (3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de 2,4-difluorobenzila (4i)

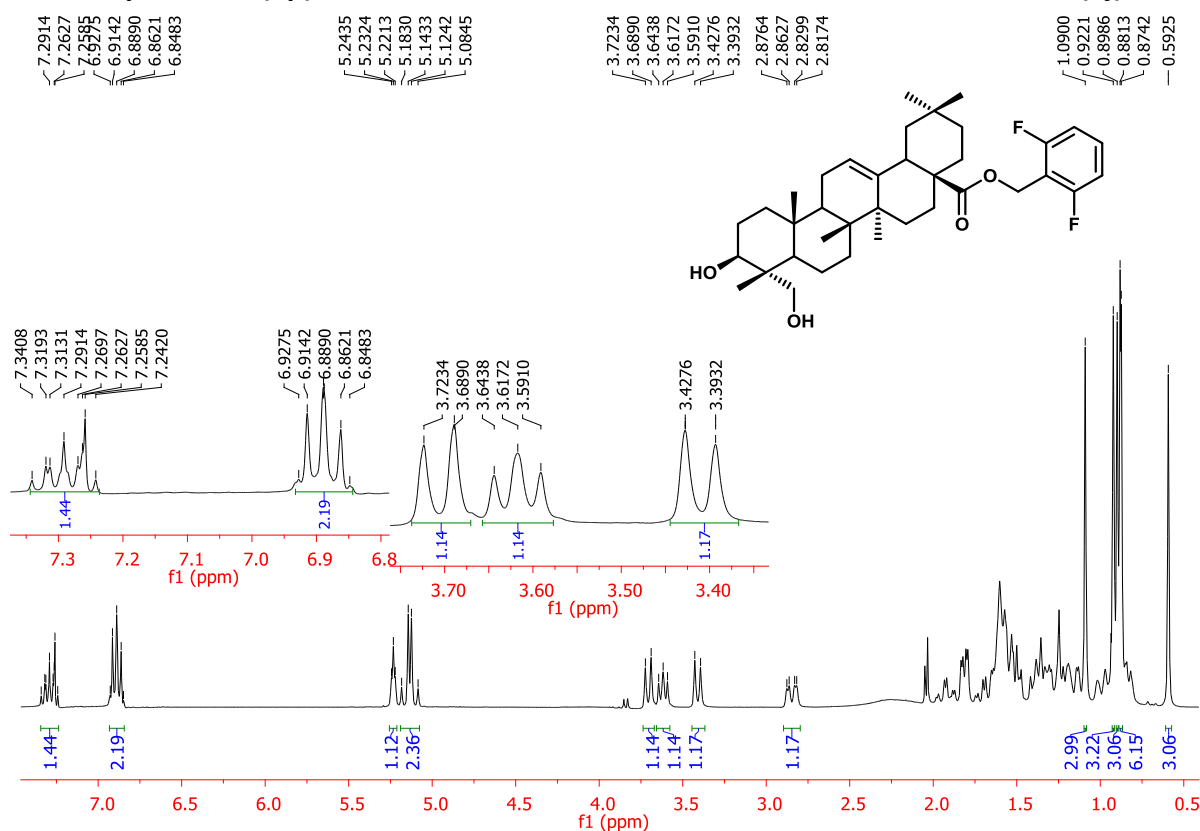


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃; 300 MHz)

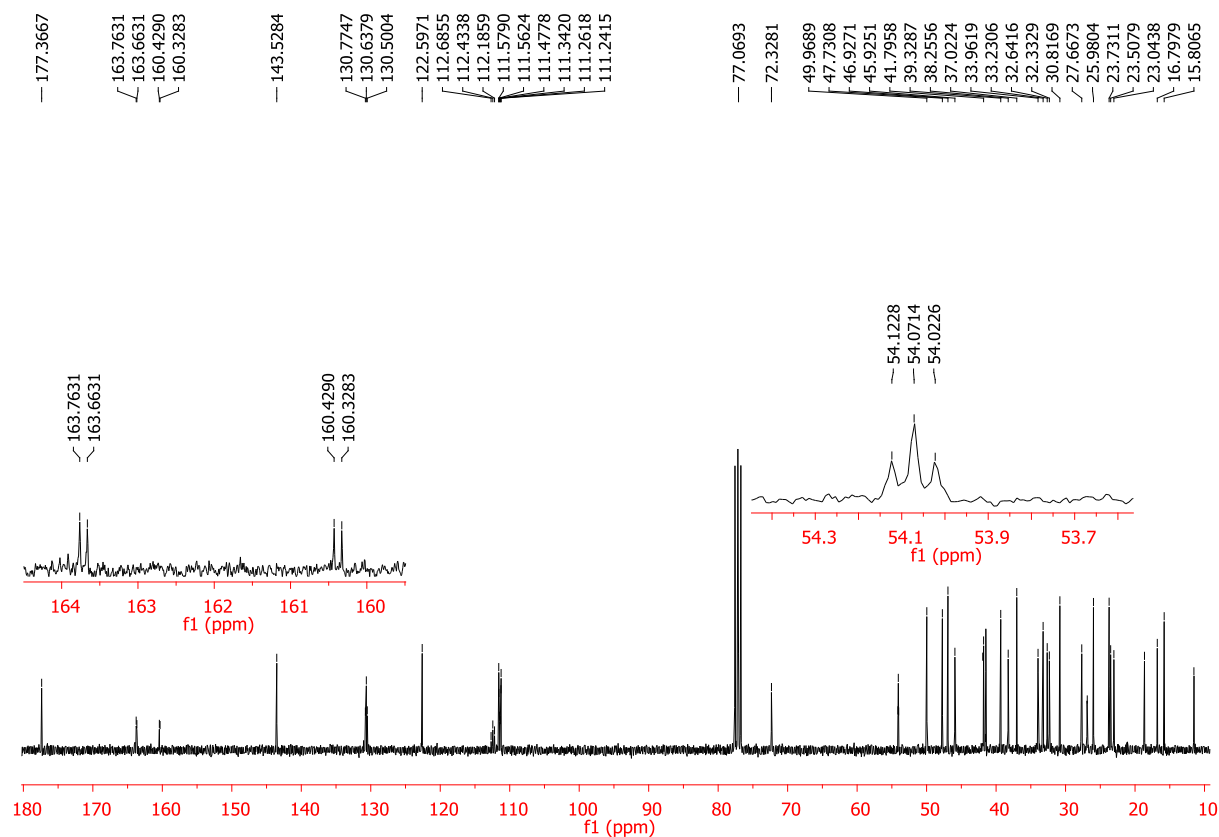


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃; 75 MHz)

4.6.10. Espectro do (3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de 2,6-difluorobenzila (4j)

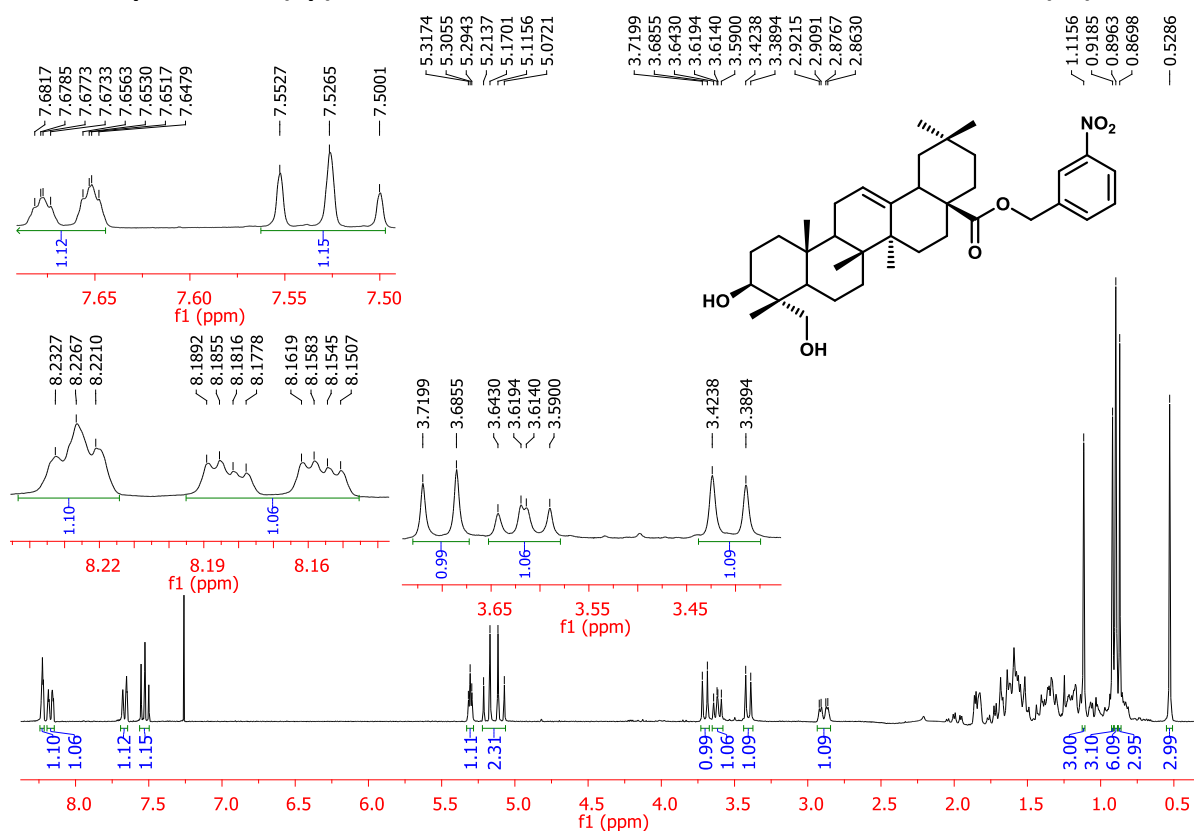


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃; 300 MHz)

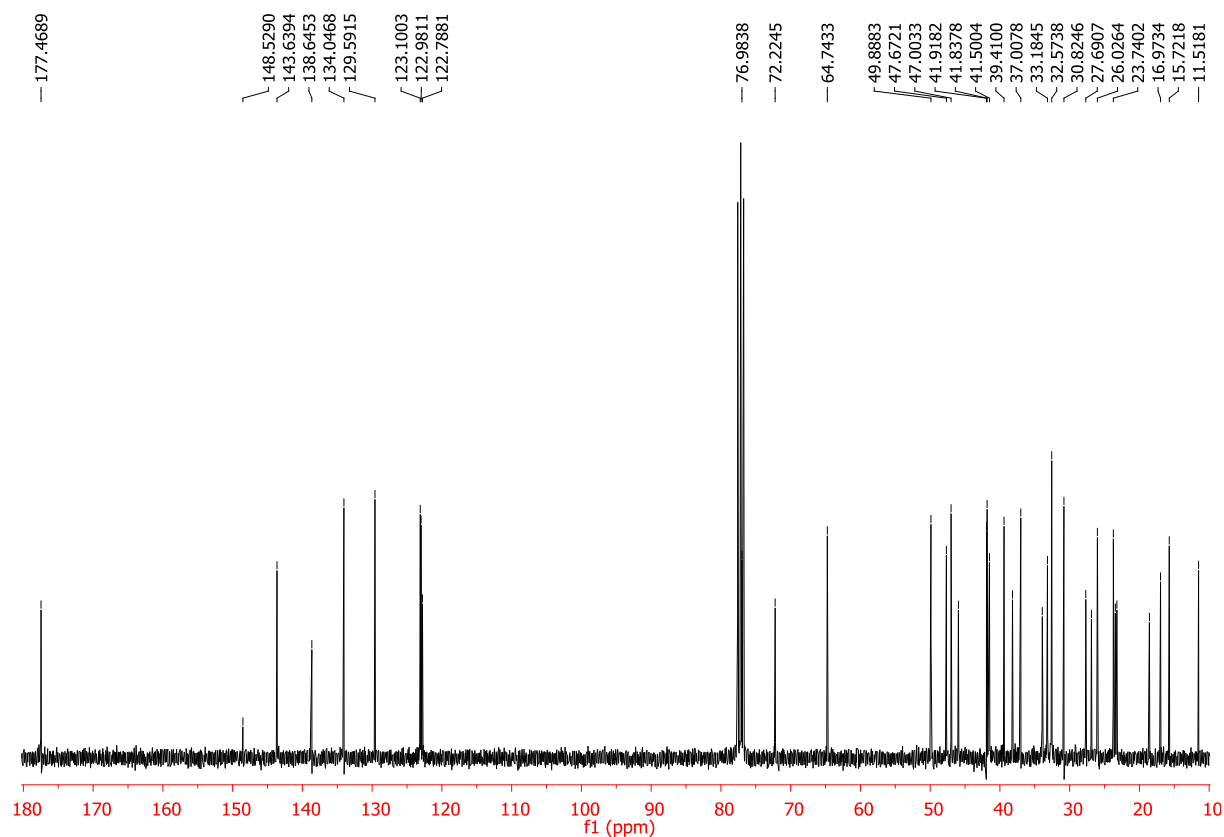


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃; 75 MHz)

4.6.11. Espectros do (3 β),23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de *m*-nitrobenzila (4k)

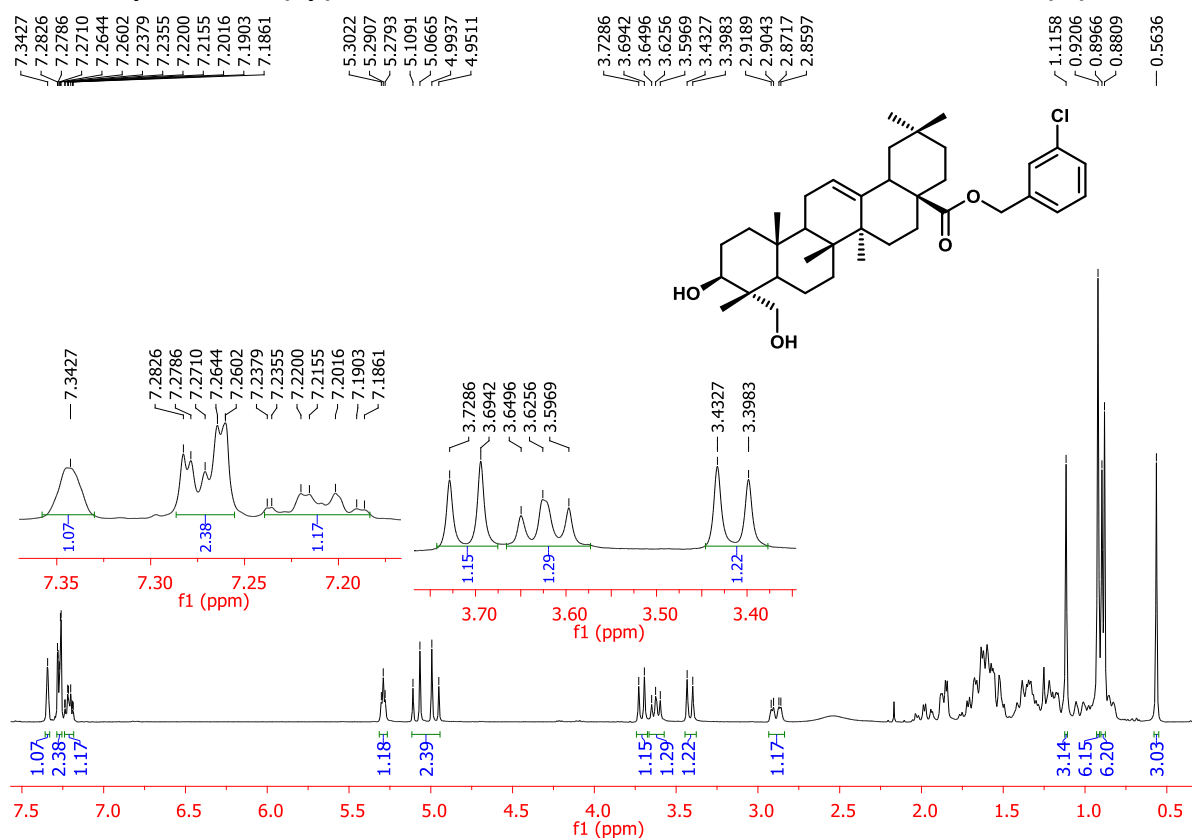


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃; 300 MHz)

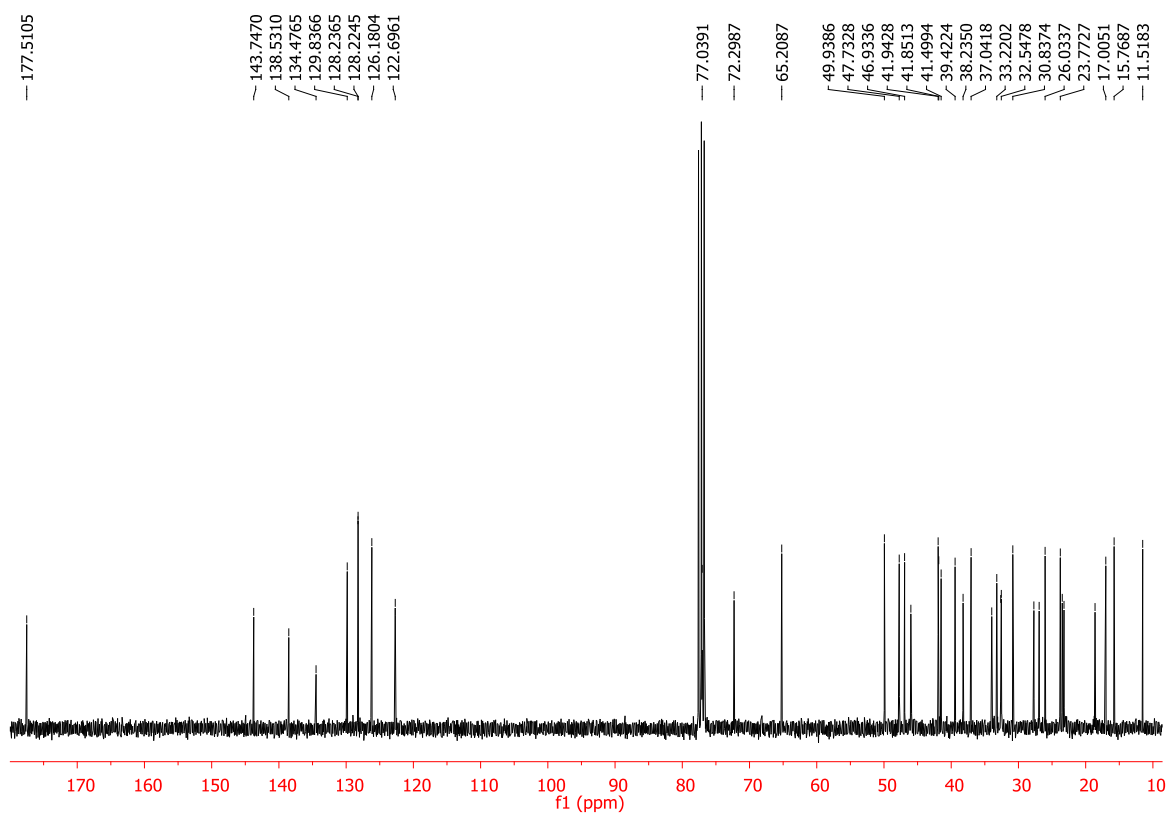


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃; 75 MHz)

4.6.12. Espectros do (3 β),3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de *m*-clorobenzila (41)

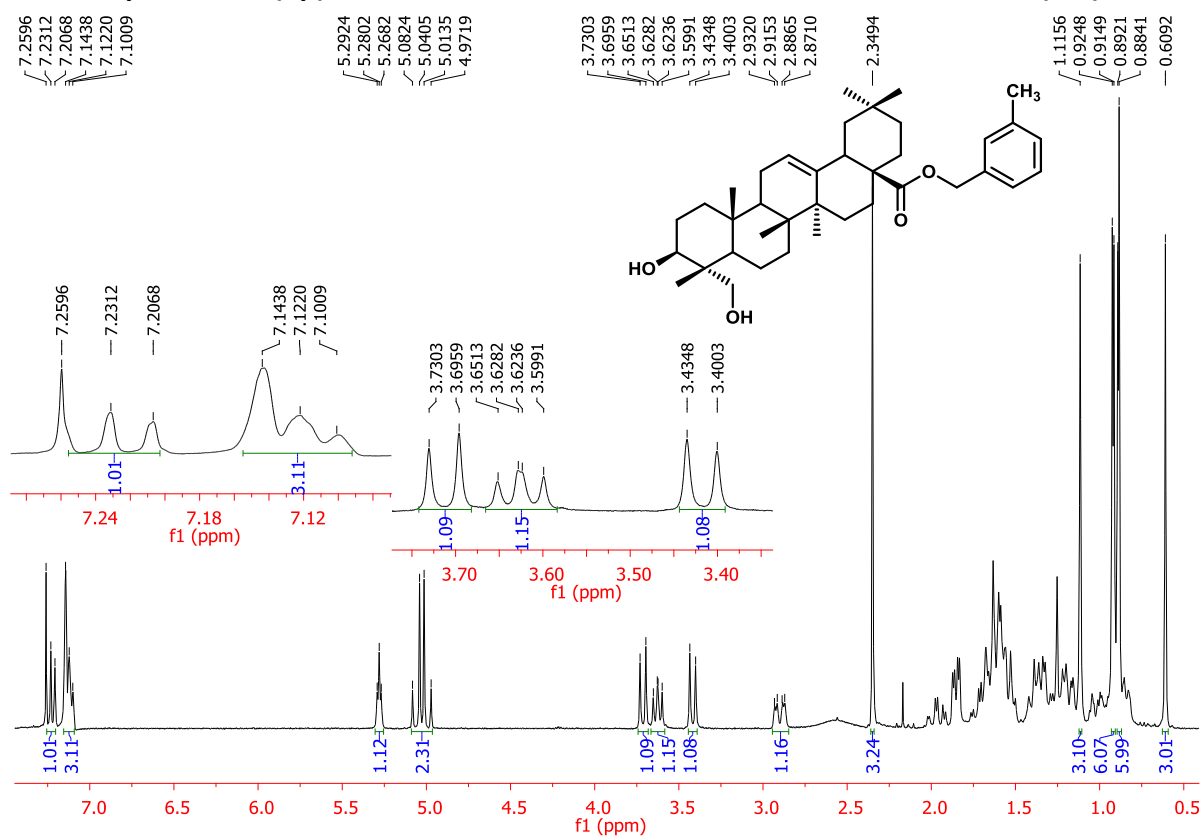


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃; 300 MHz)

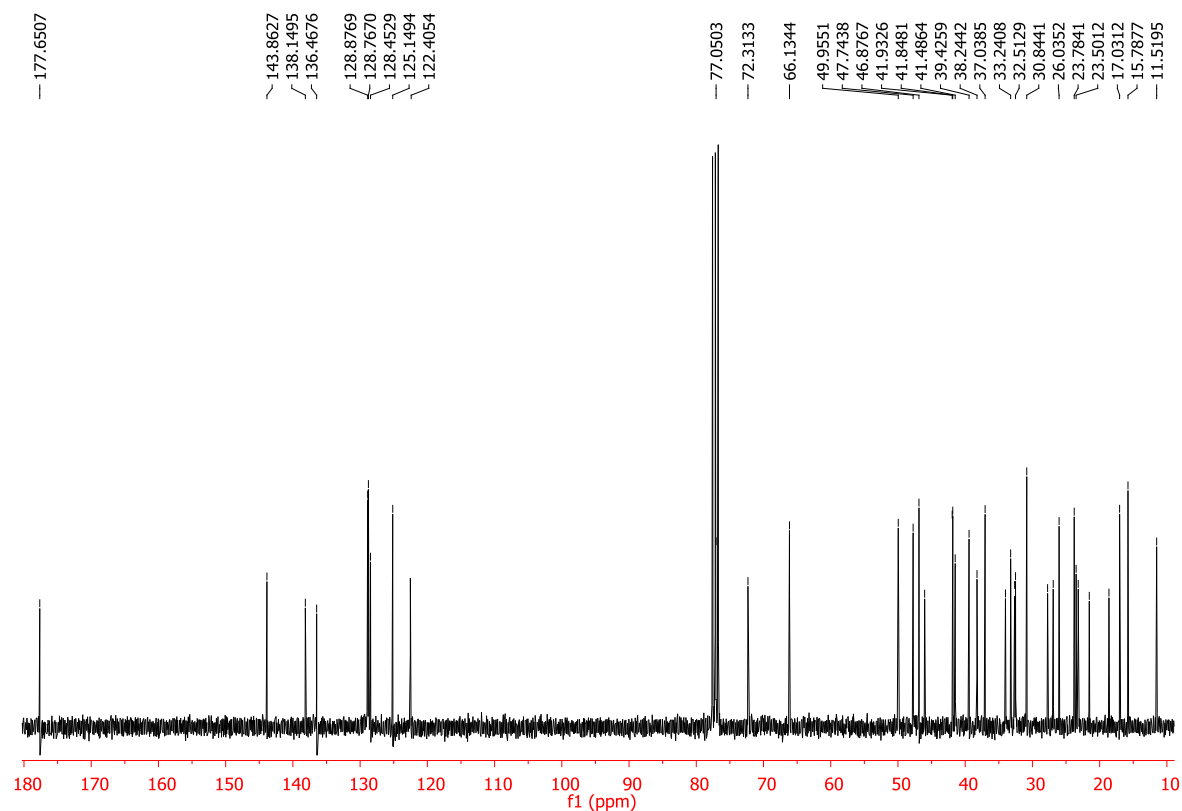


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃; 75 MHz)

4.6.13. Espectros do (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de *m*-metilbenzila (4m)

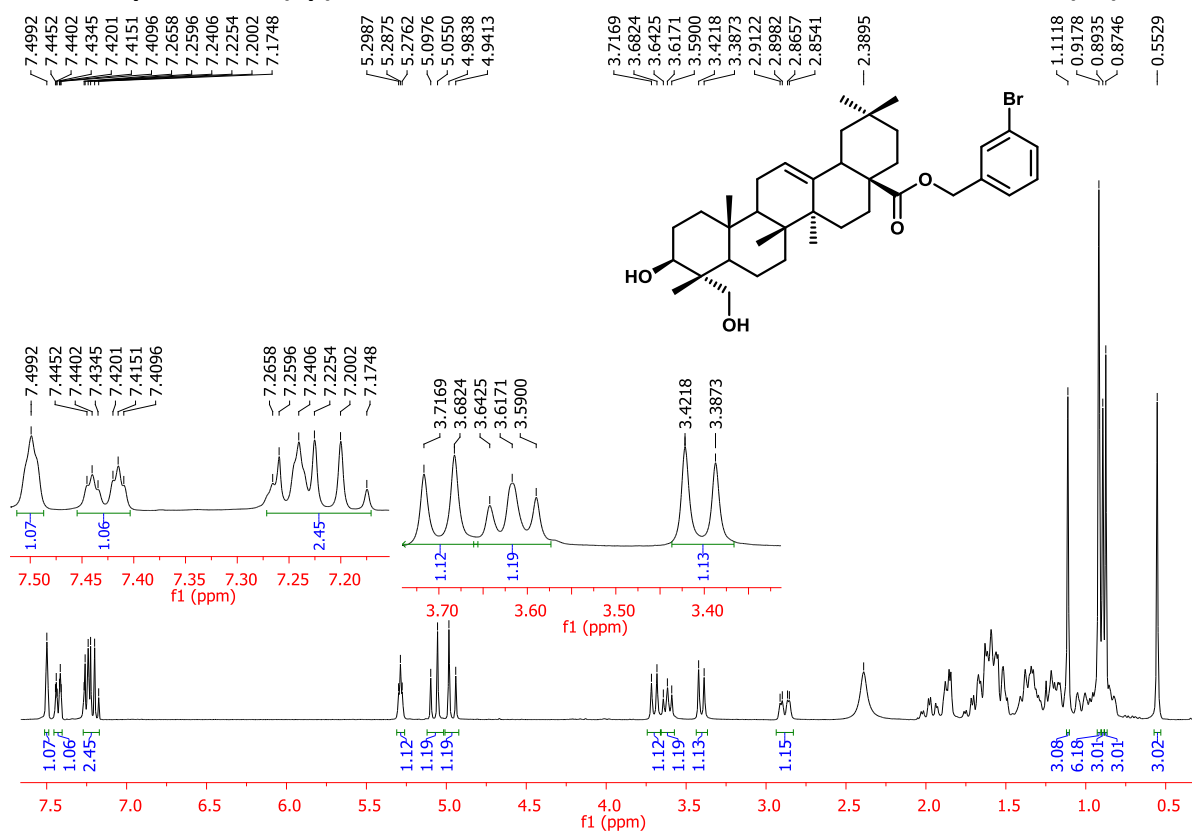


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃; 300 MHz)

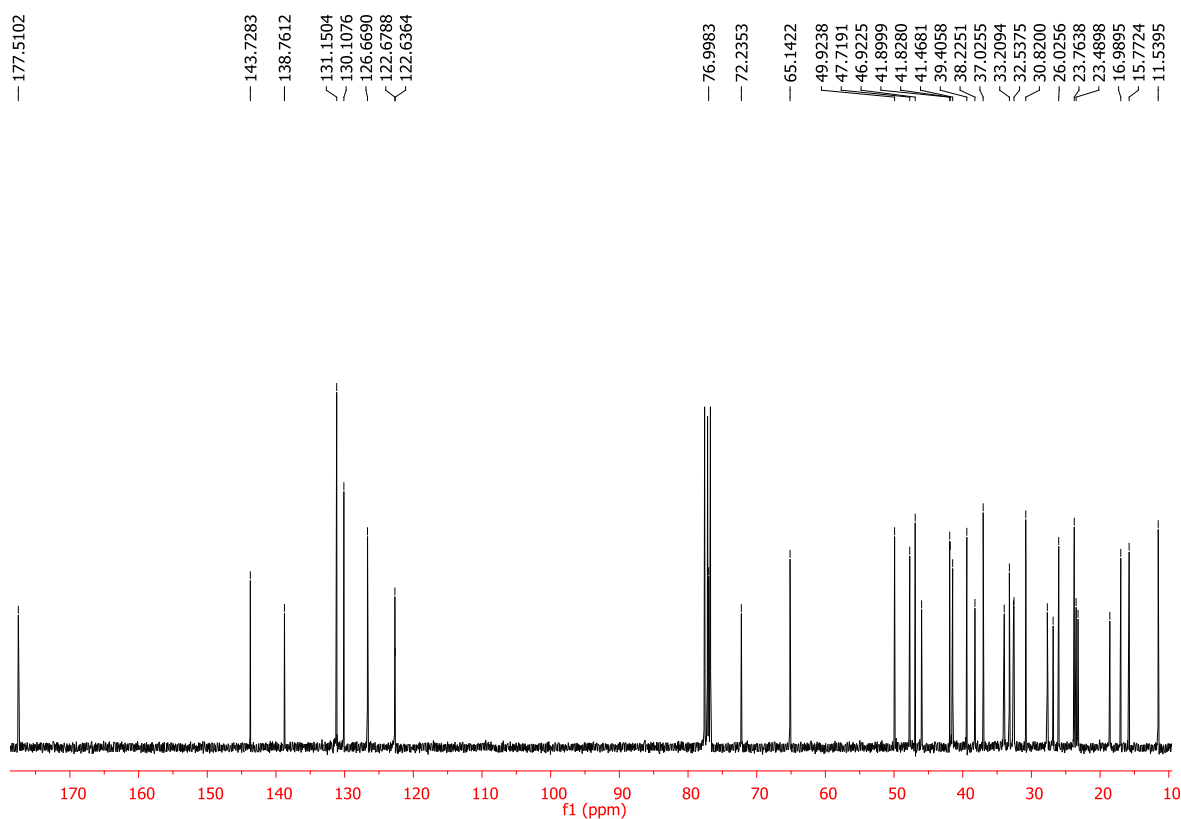


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃; 75 MHz)

4.6.14. Espectros do (3 β),3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de *m*-bromobenzila (4n)

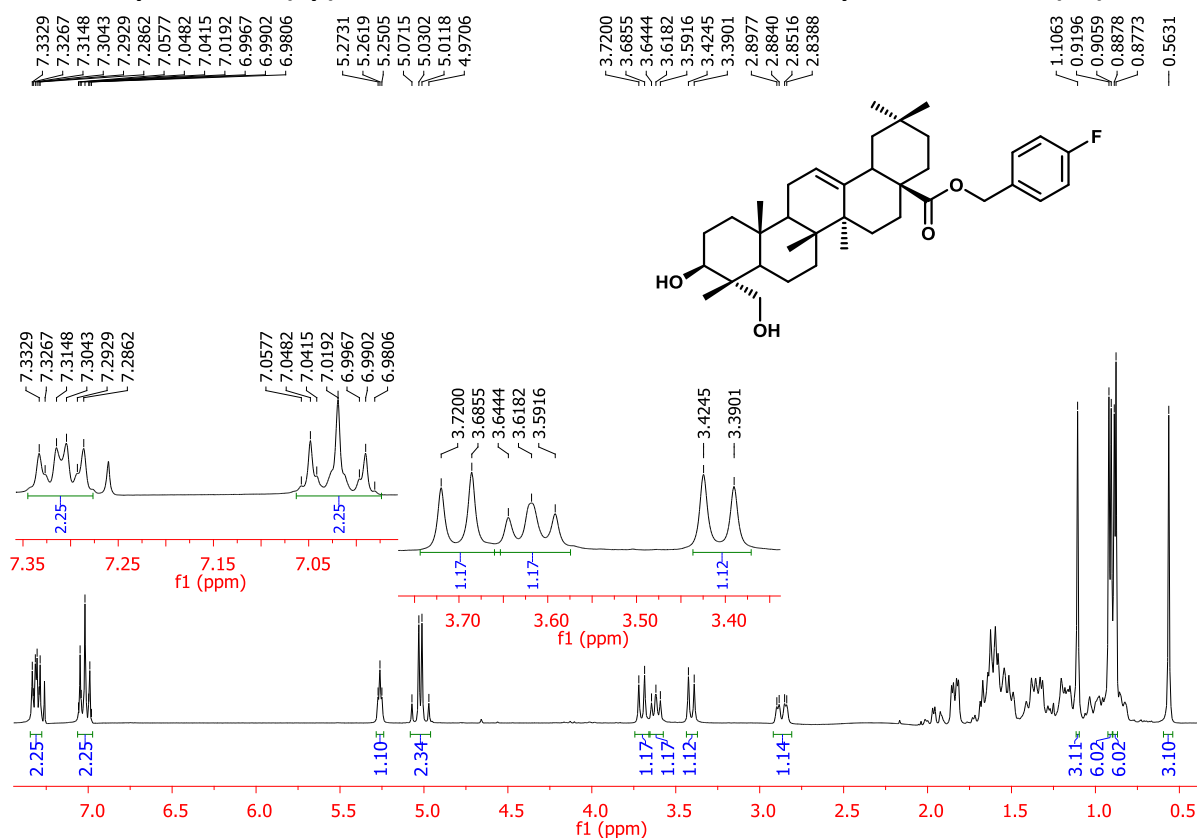


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃; 300 MHz)

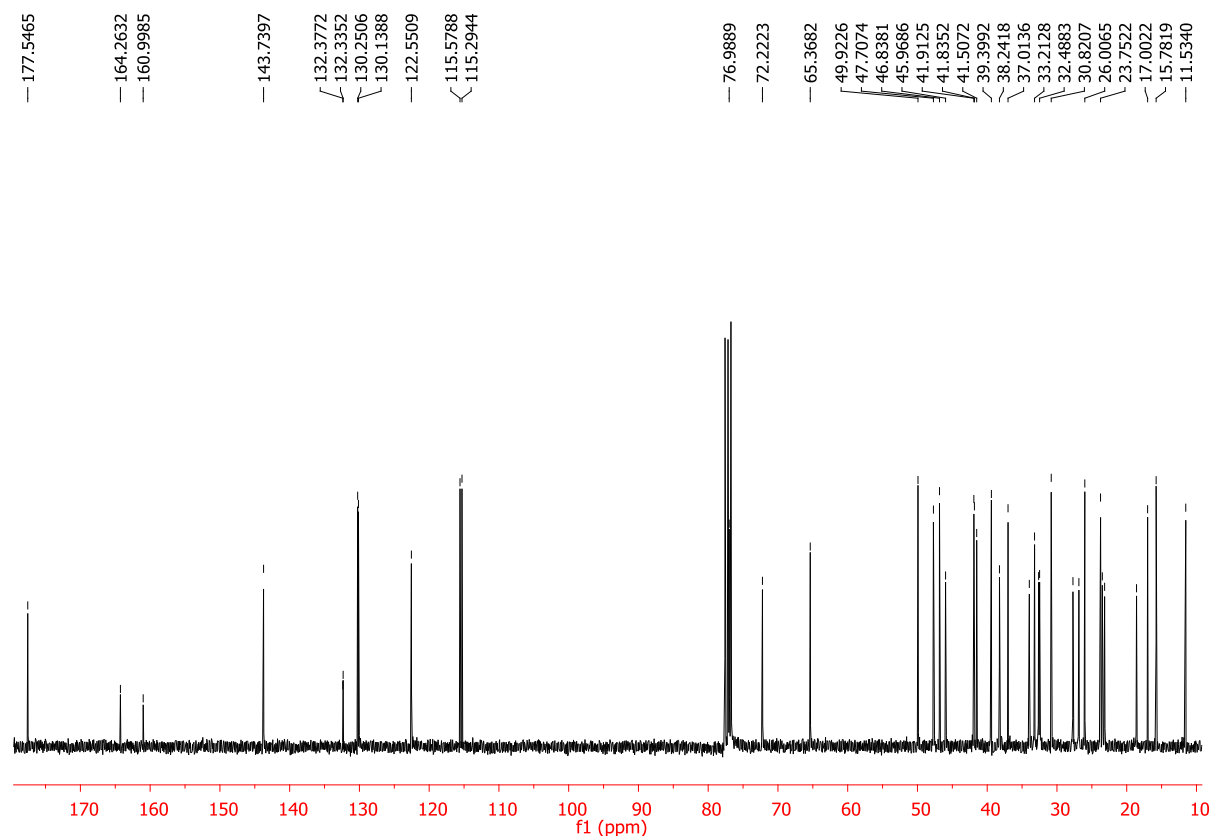


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃; 75 MHz)

4.6.15. Espectros do (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de *p*-fluorobenzila (4o)

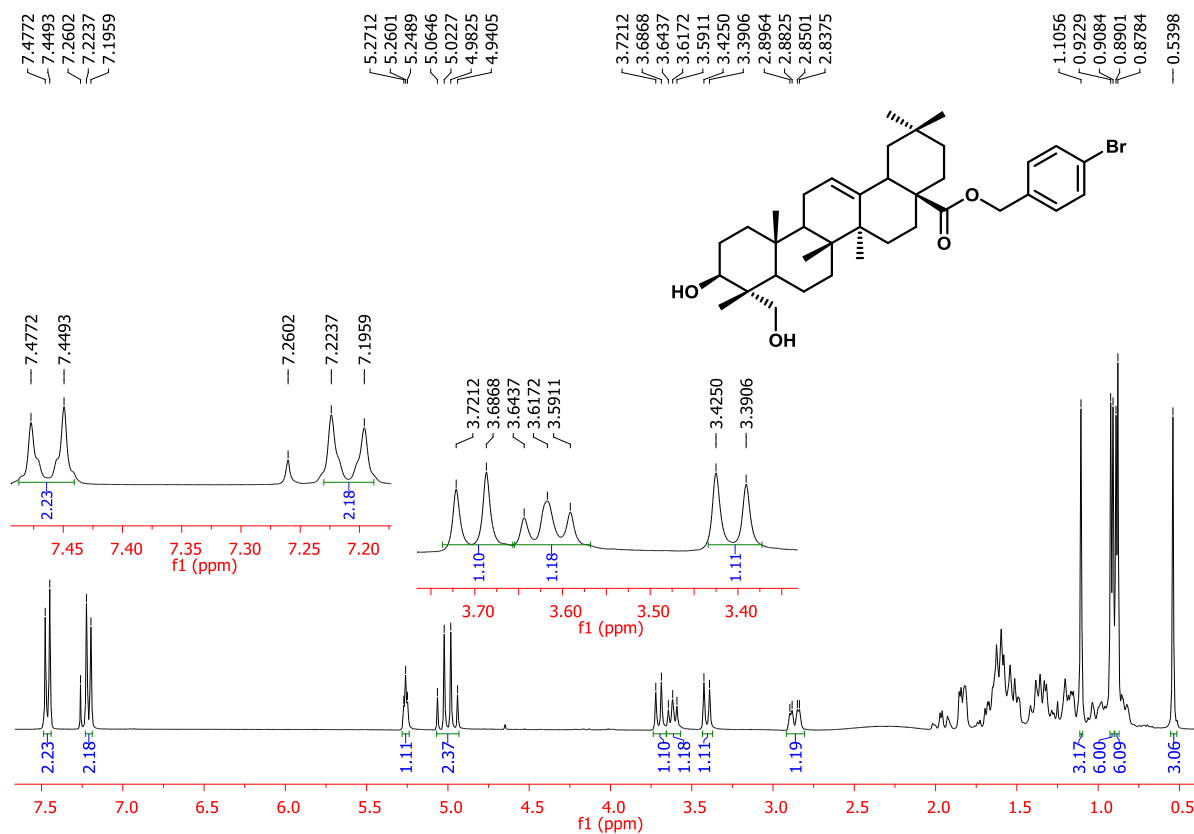


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃; 300 MHz)

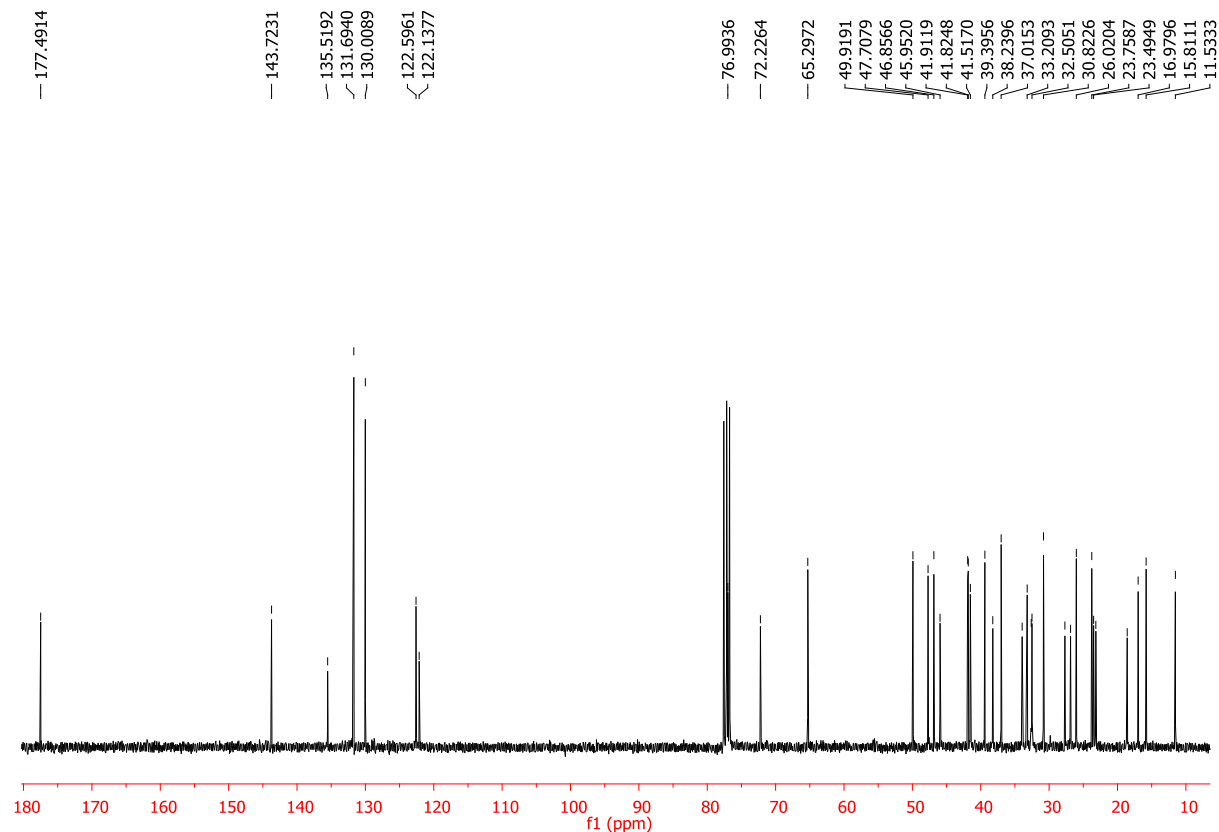


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃; 75 MHz)

4.6.16. Espectros do (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de *p*-bromobenzila (4p)

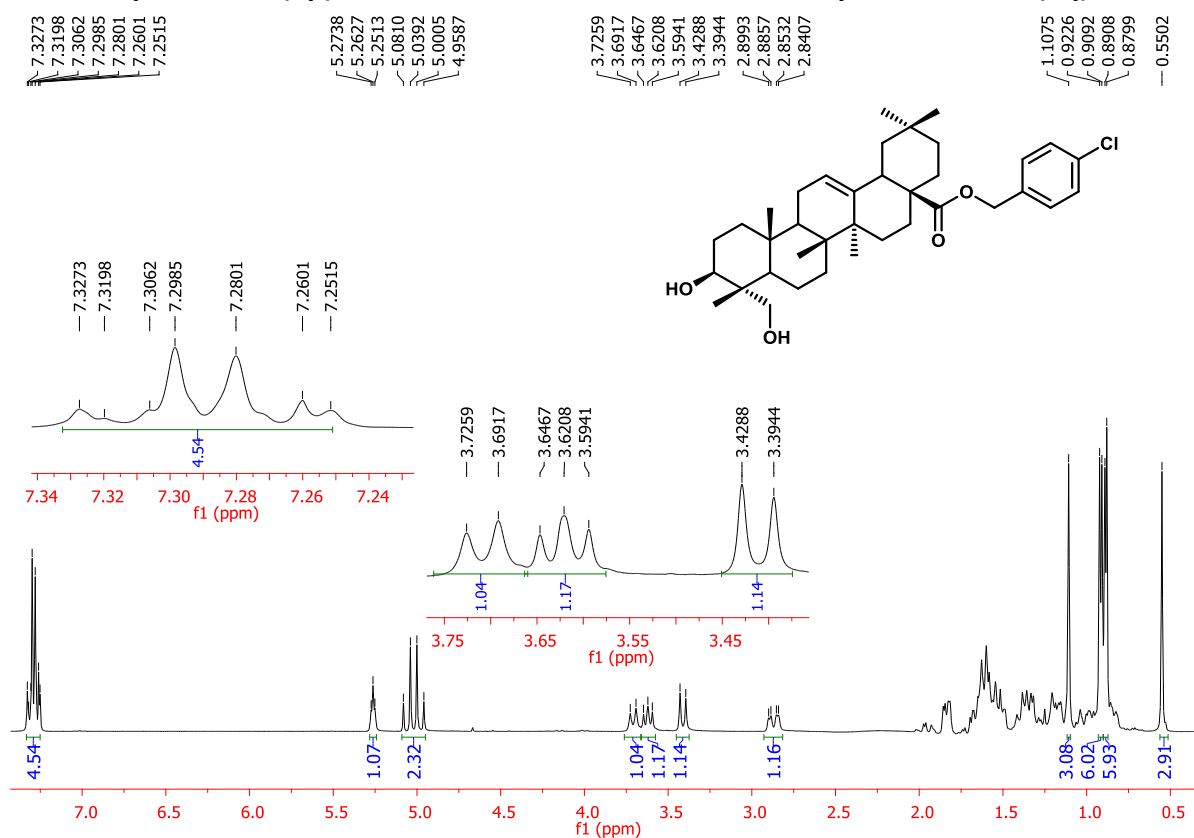


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃; 300 MHz)

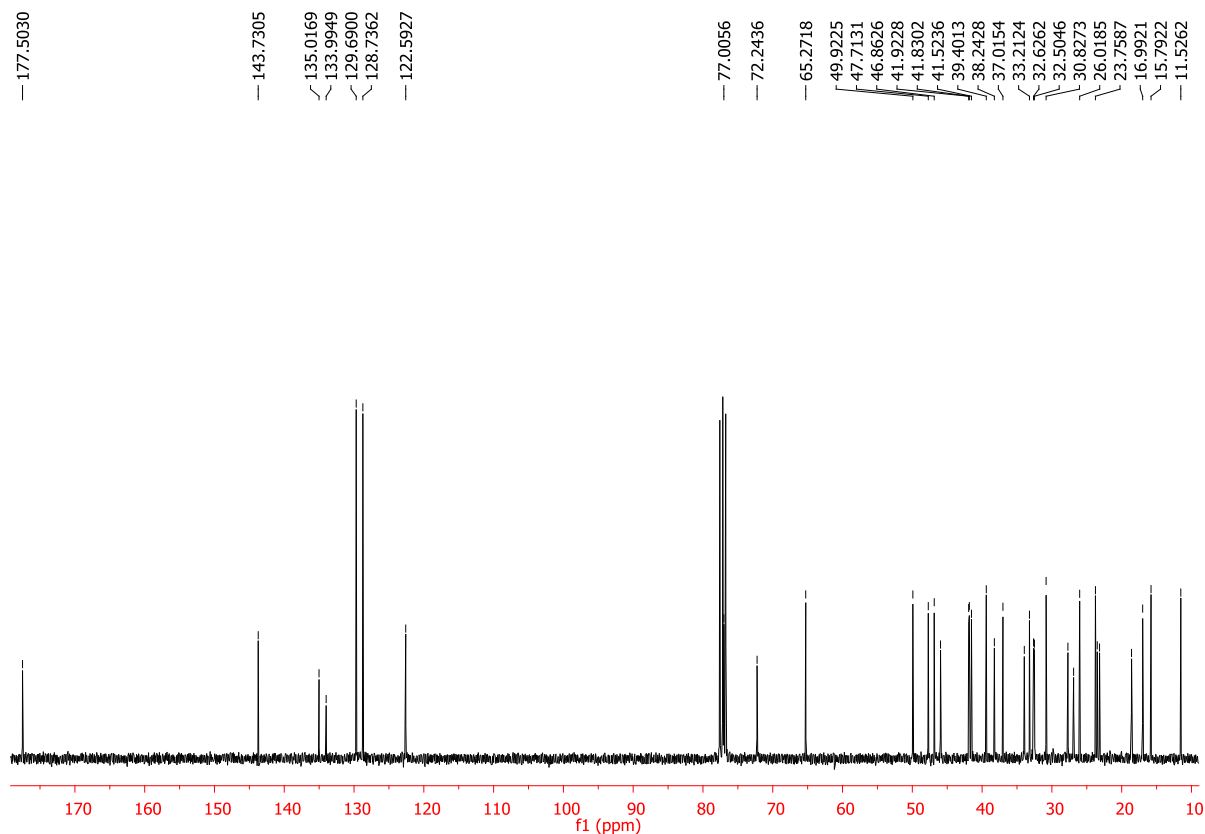


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃; 75 MHz)

4.6.17. Espectros do (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de *p*-clorobenzila (4q)

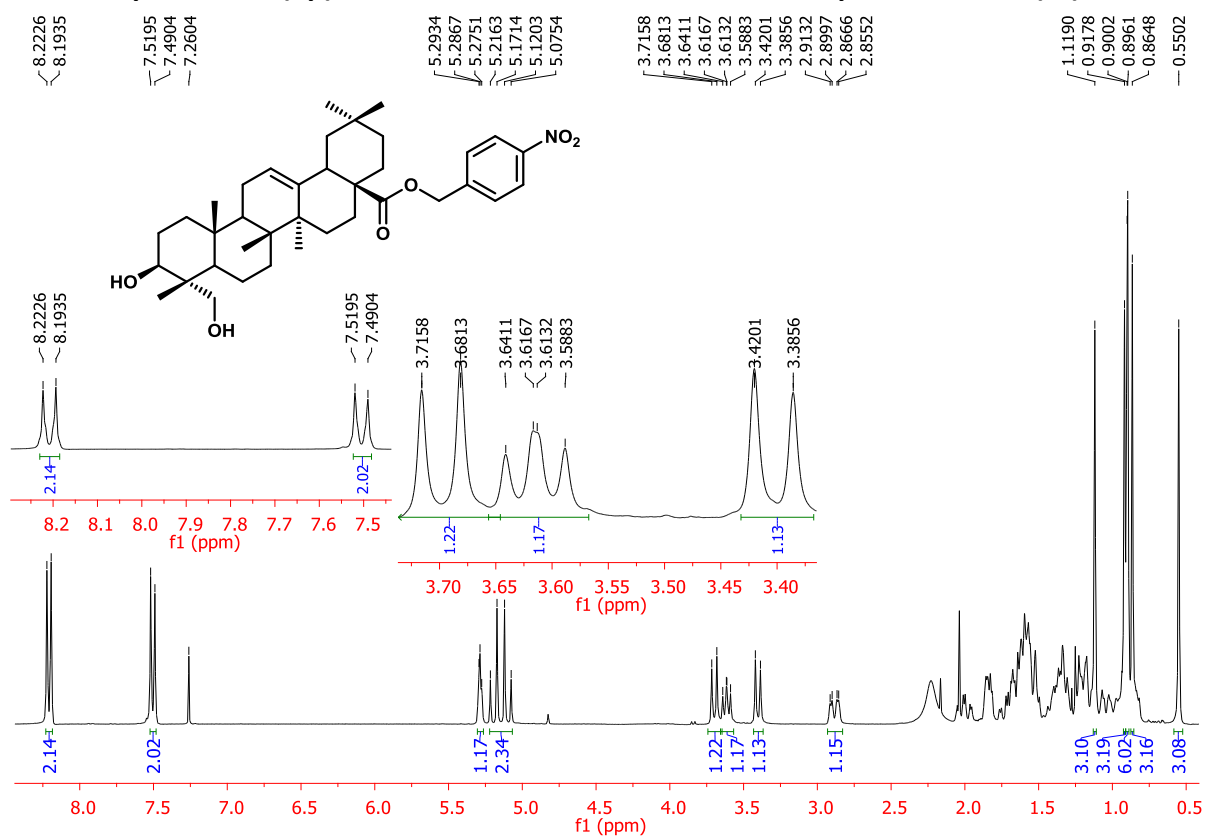


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃; 300 MHz)

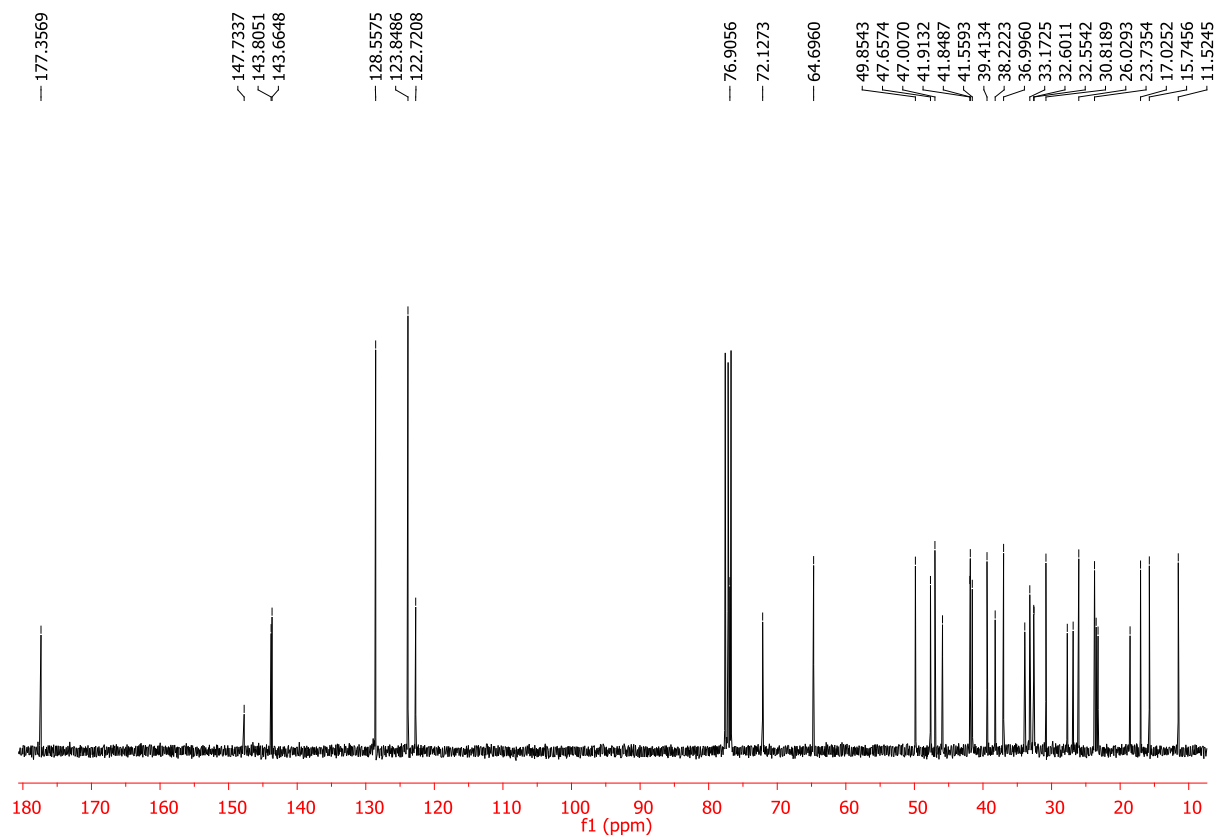


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃; 75 MHz)

4.6.18. Espectros do (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de *p*-nitrobenzila (4r)

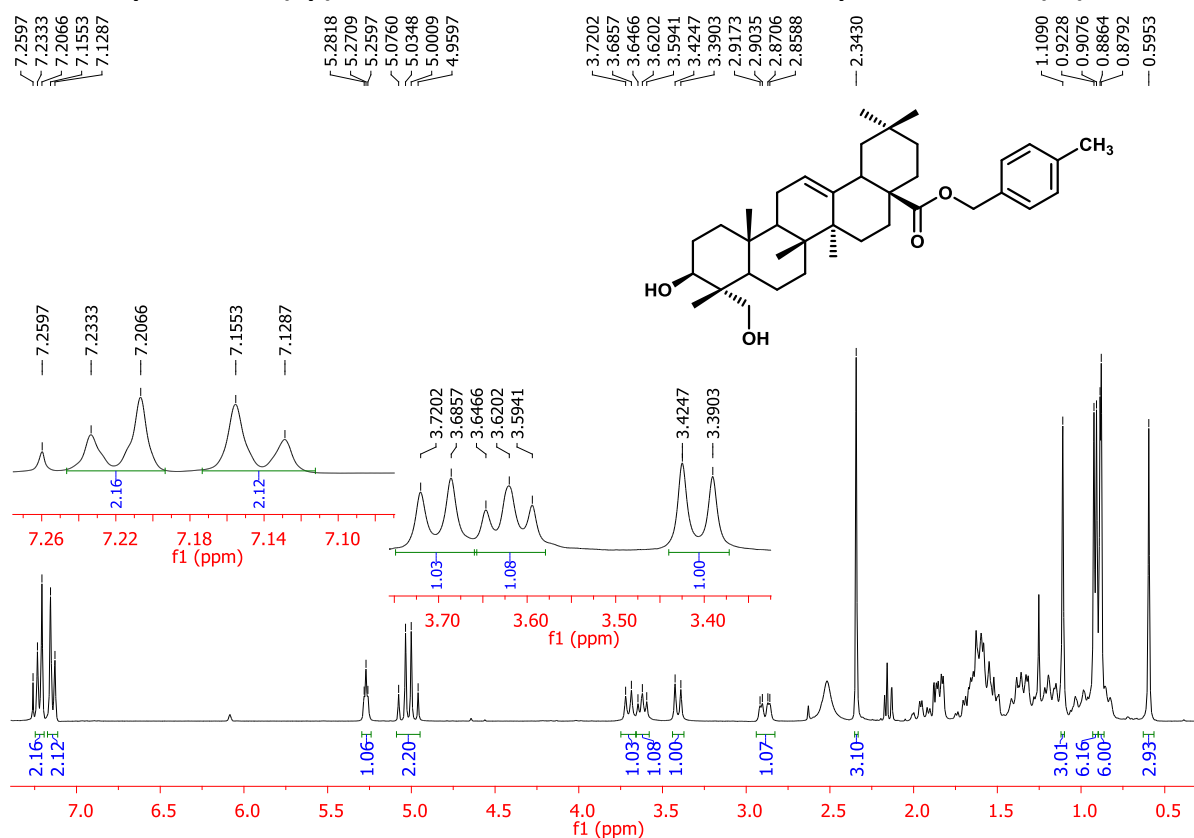


Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300 MHz)

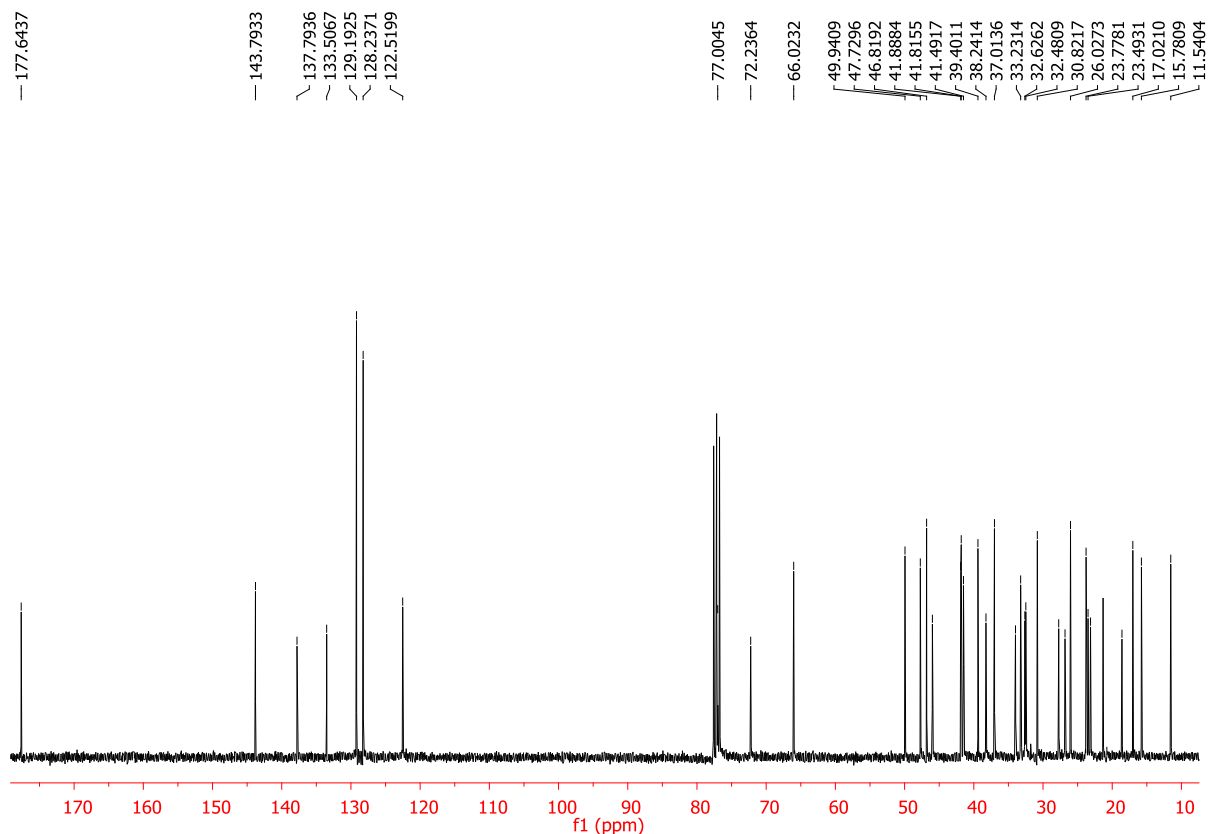


Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 75 MHz)

4.6.19. Espectros do (3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de *p*-metilbenzila (4s)

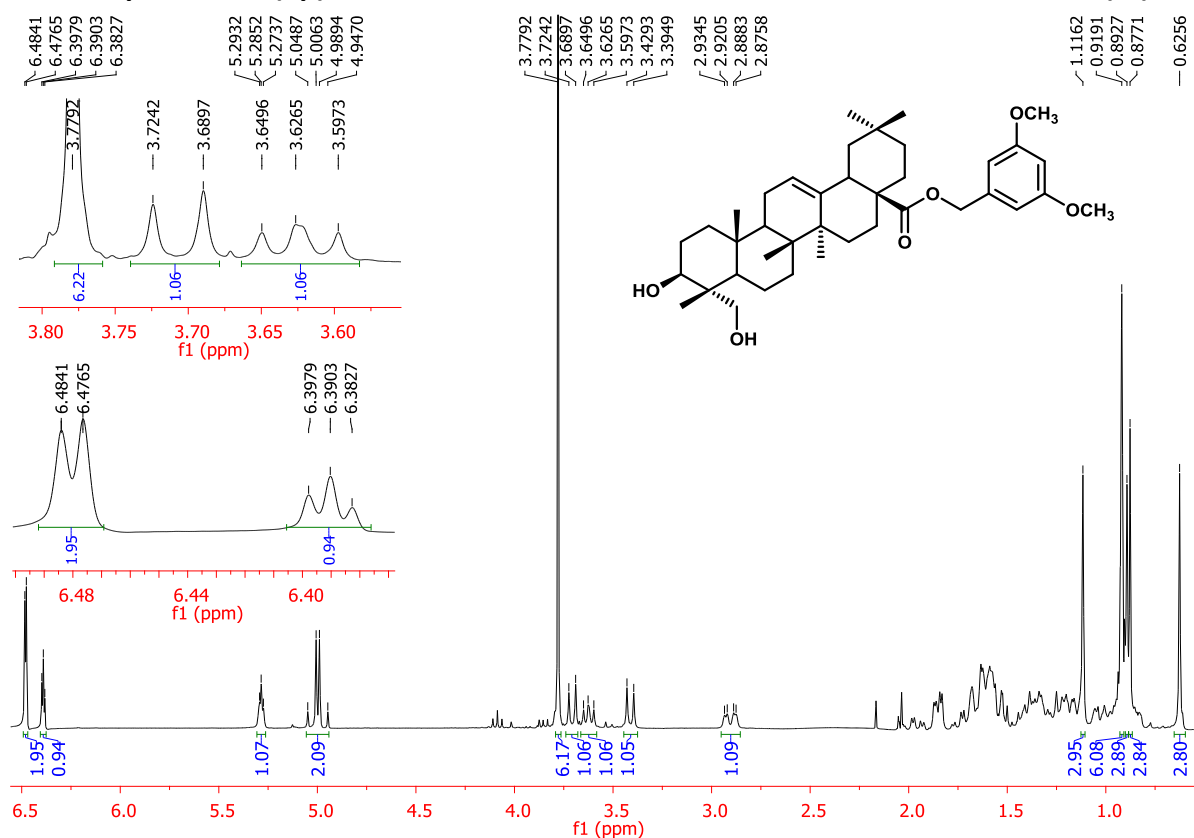


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃; 300 MHz)

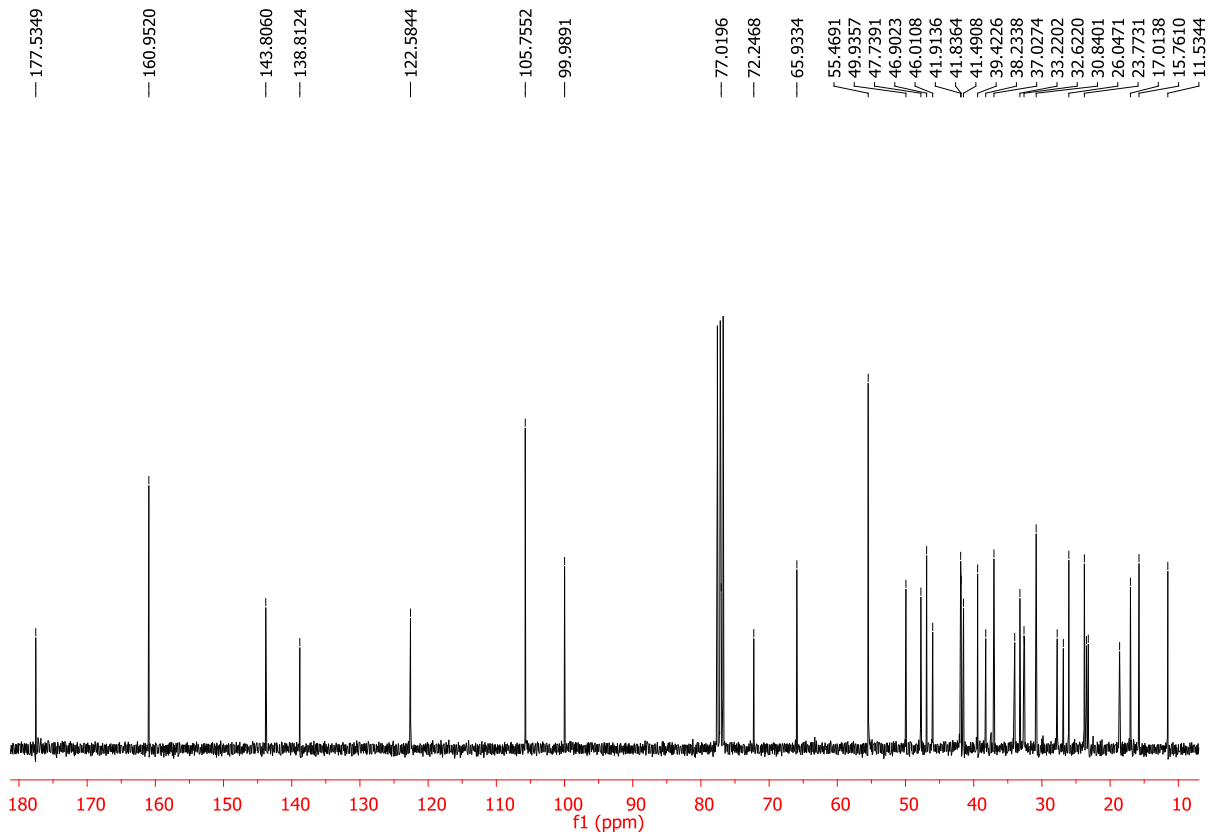


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃; 75 MHz)

4.6.20. Espectros do (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de 3,5-dimetoxibenzila (4t)

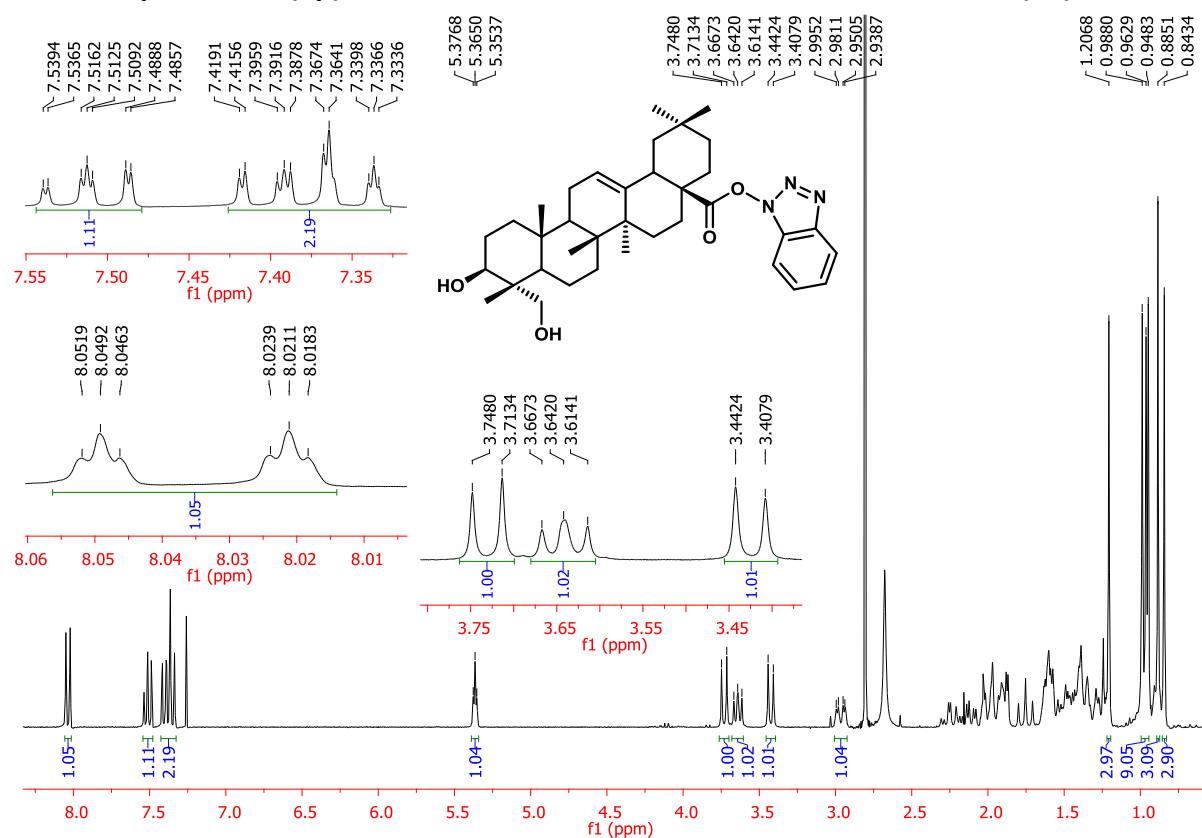


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃; 300 MHz)

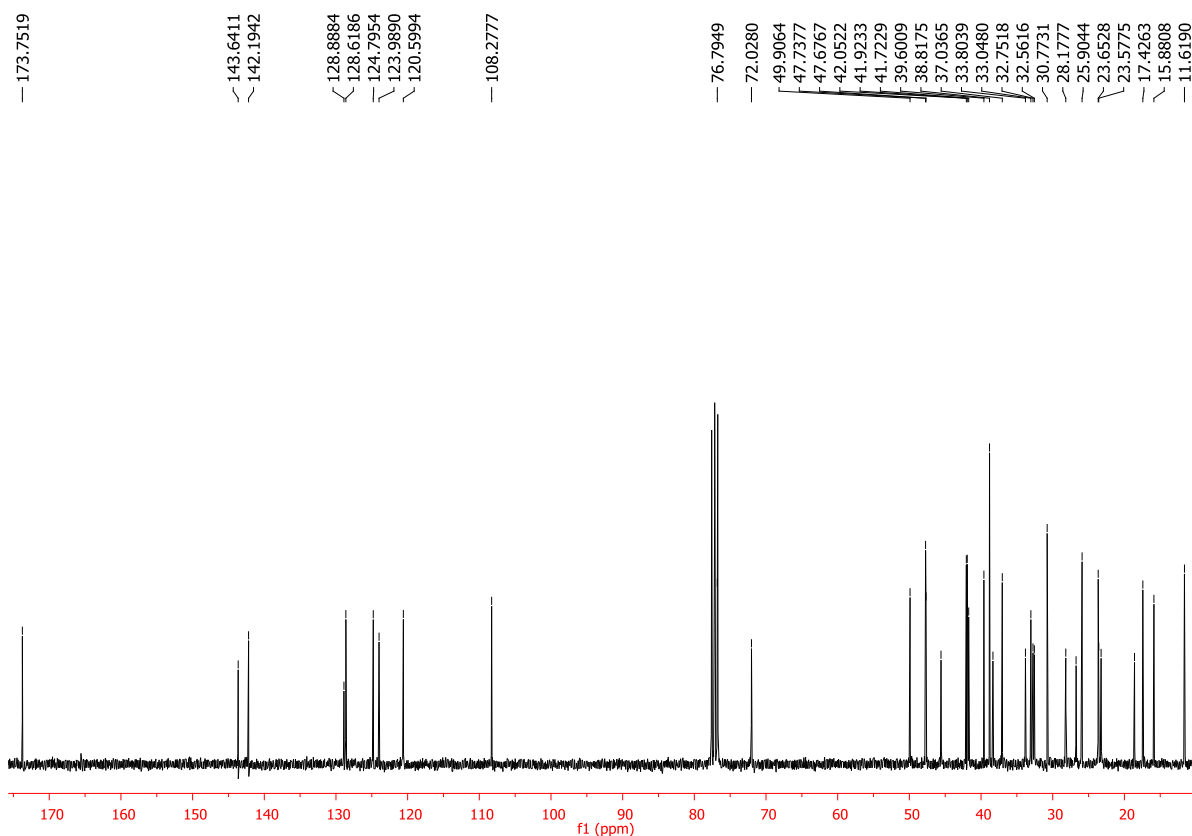


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃; 75 MHz)

4.6.21. Espectros do (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de benzotriazol (4u)

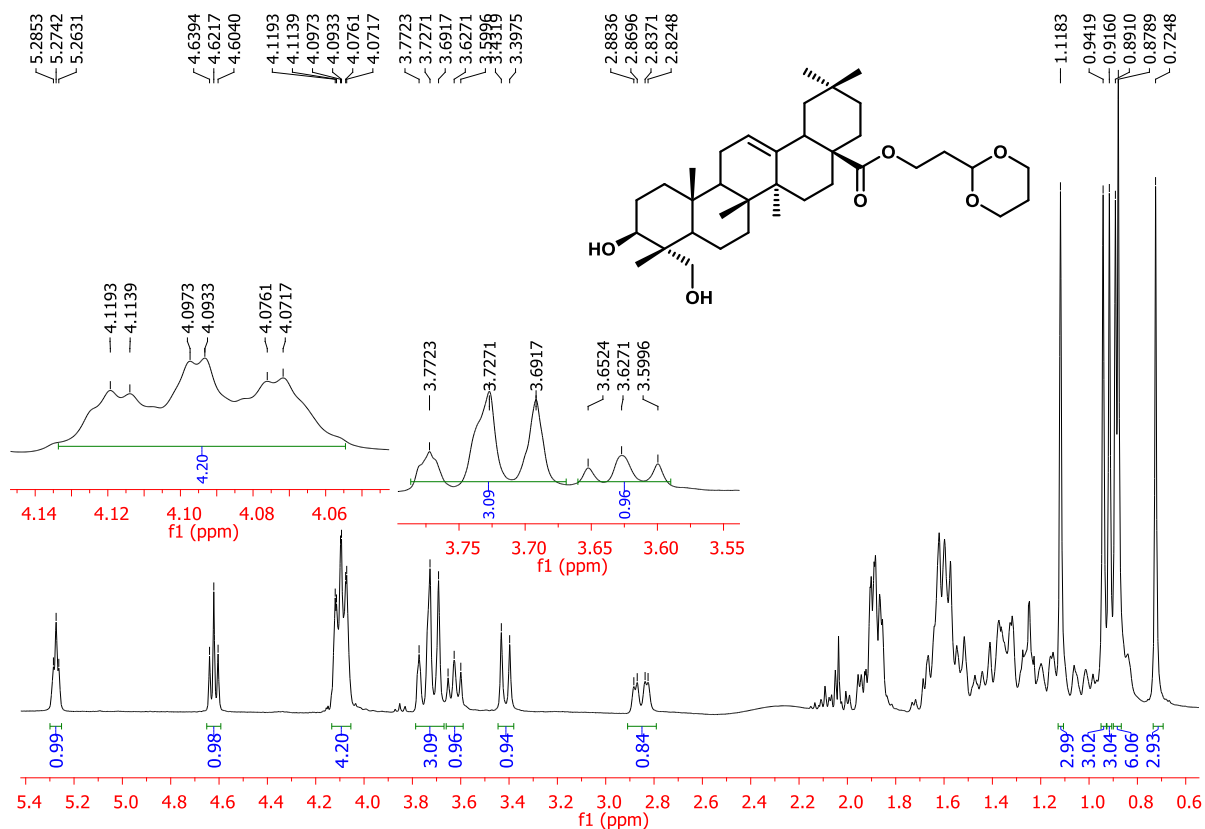


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃; 300 MHz)

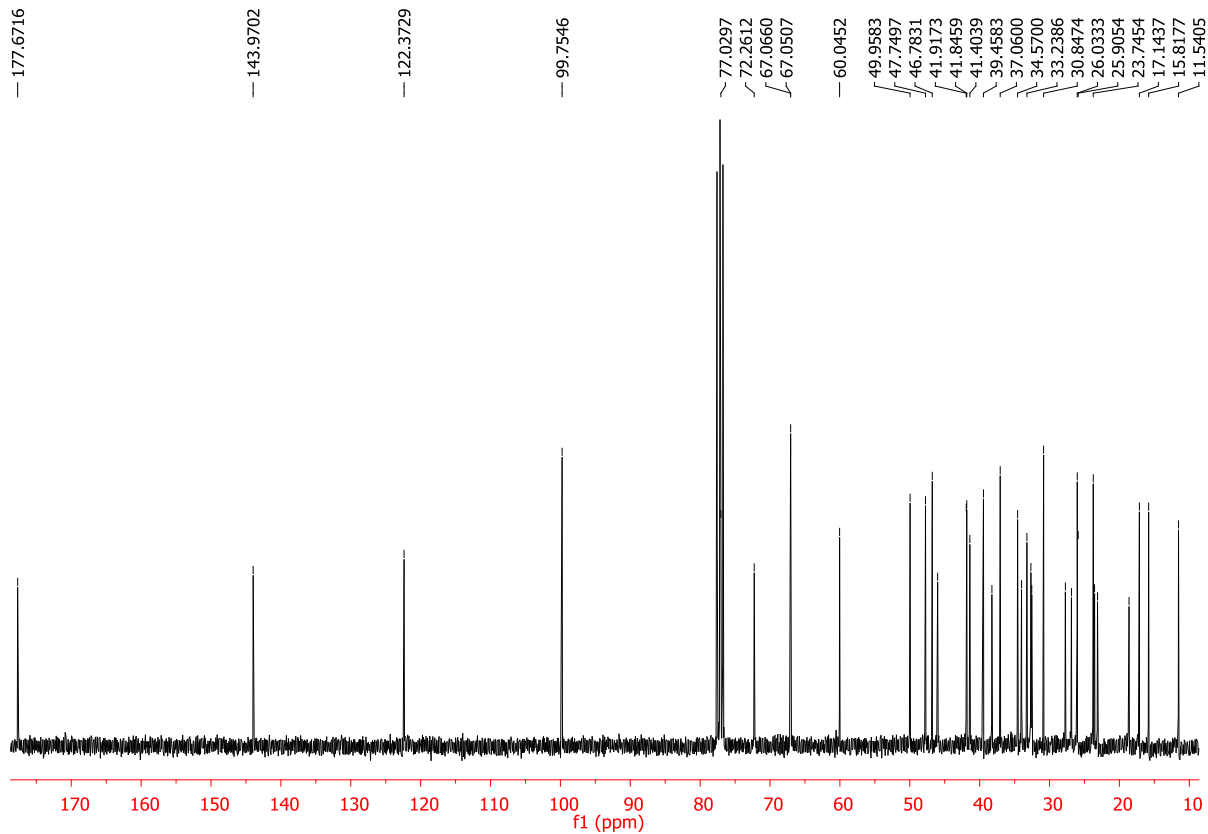


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃; 75 MHz)

4.6.22. Espectros do (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de 2-etil-1,3-dioxano (4v)



Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃; 300 MHz)



Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃; 75 MHz)

Chemical structure of compound 10 is shown above the spectrum. The structure is a steroid with a 3-hydroxy group, a 14-methyl group, and a 17-oxo group. The 17-oxo group is part of a 17-(2-oxo-2-phenylethyl) ester.

¹H NMR spectrum (CDCl₃) of compound 10. The spectrum shows peaks from 0.7 to 7.9 ppm. The chemical structure of compound 10 is shown above the spectrum.

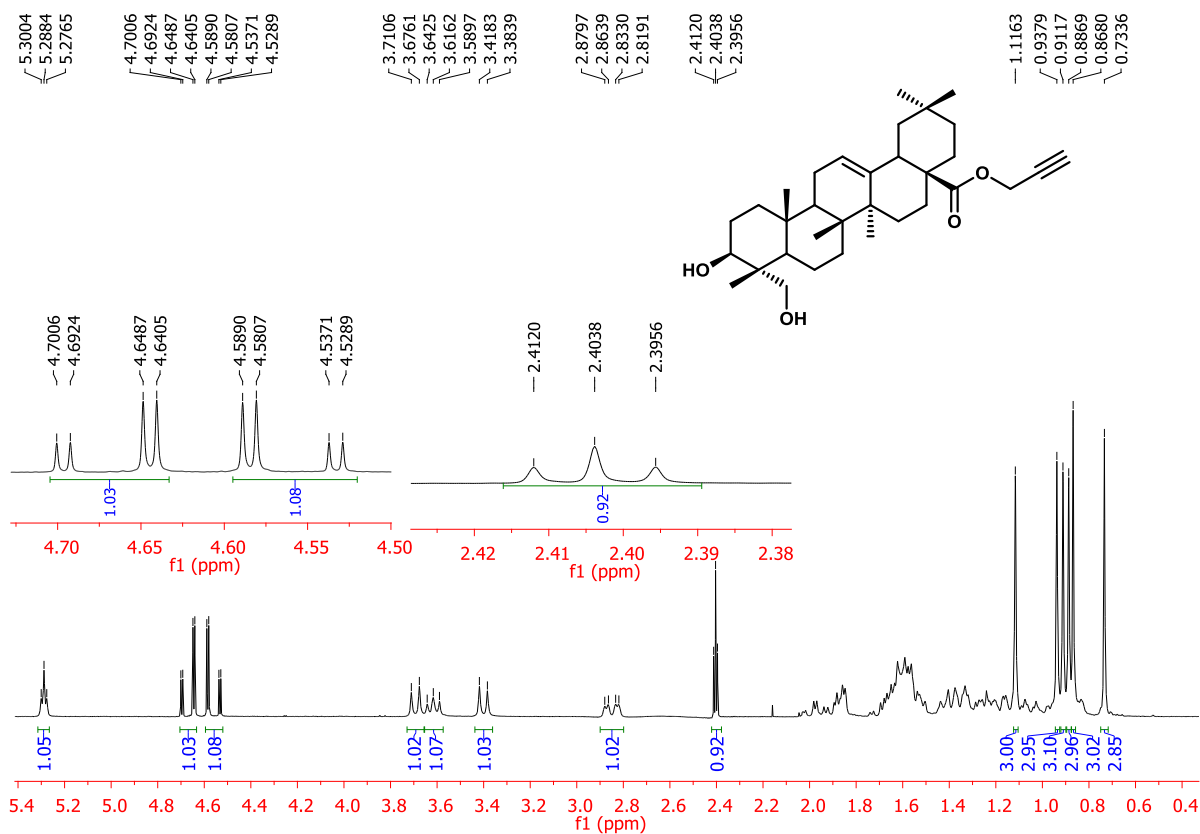
Chemical structure of compound 10 is shown above the spectrum. The structure is a steroid with a 3-hydroxy group, a 14-methyl group, and a 17-oxo group. The 17-oxo group is part of a 17-(2-oxo-2-phenylethyl) ester.

¹H NMR spectrum (CDCl₃) of compound 10. The spectrum shows peaks from 0.7 to 7.9 ppm. The chemical structure of compound 10 is shown above the spectrum.

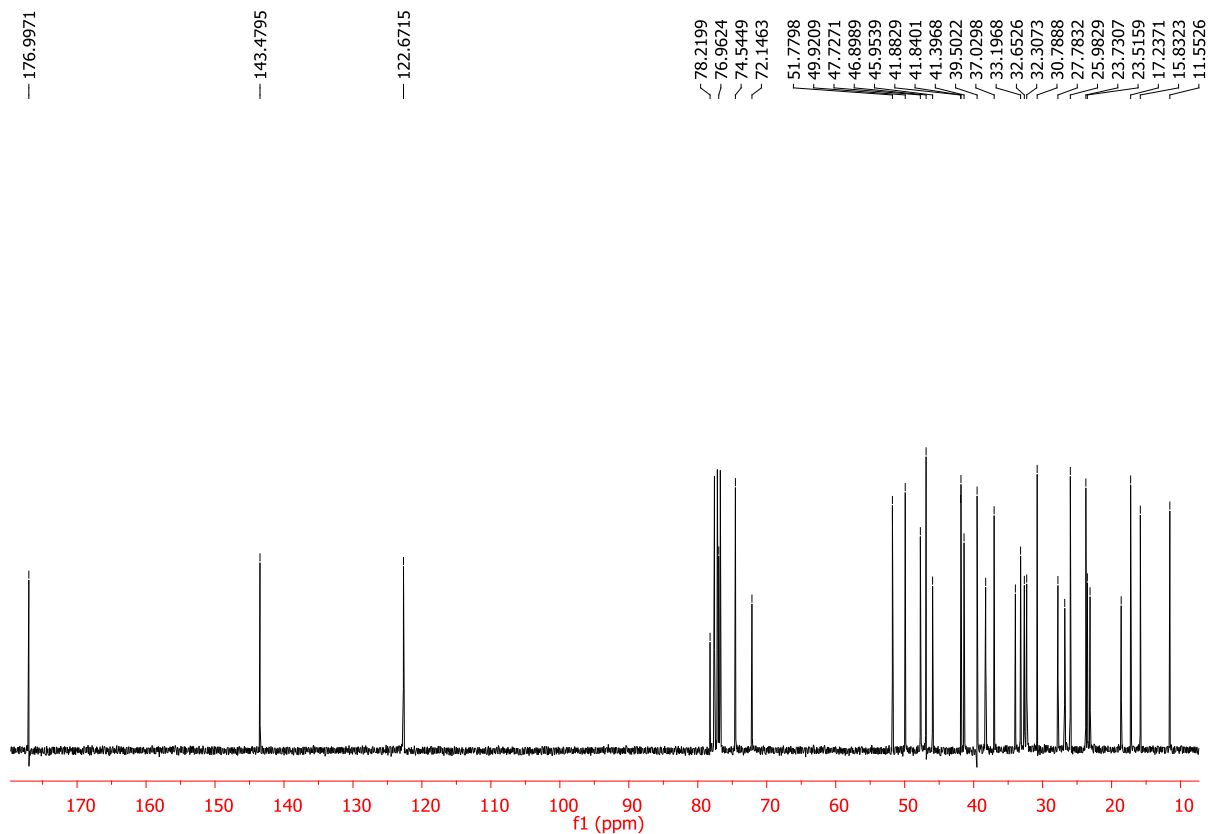
177.7039
168.3435
143.8306
134.1114
132.2189
123.3958
122.4886
77.0252
72.2864
61.6899
49.9476
47.7375
46.8342
41.9120
41.8445
41.4330
39.4425
37.0379
35.3127
33.2320
30.8211
28.0027
26.0088
23.7279
23.5153
17.1356
15.8034
11.5213

f1 (ppm)

4.6.24. Espectros do (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de propinila (4x)

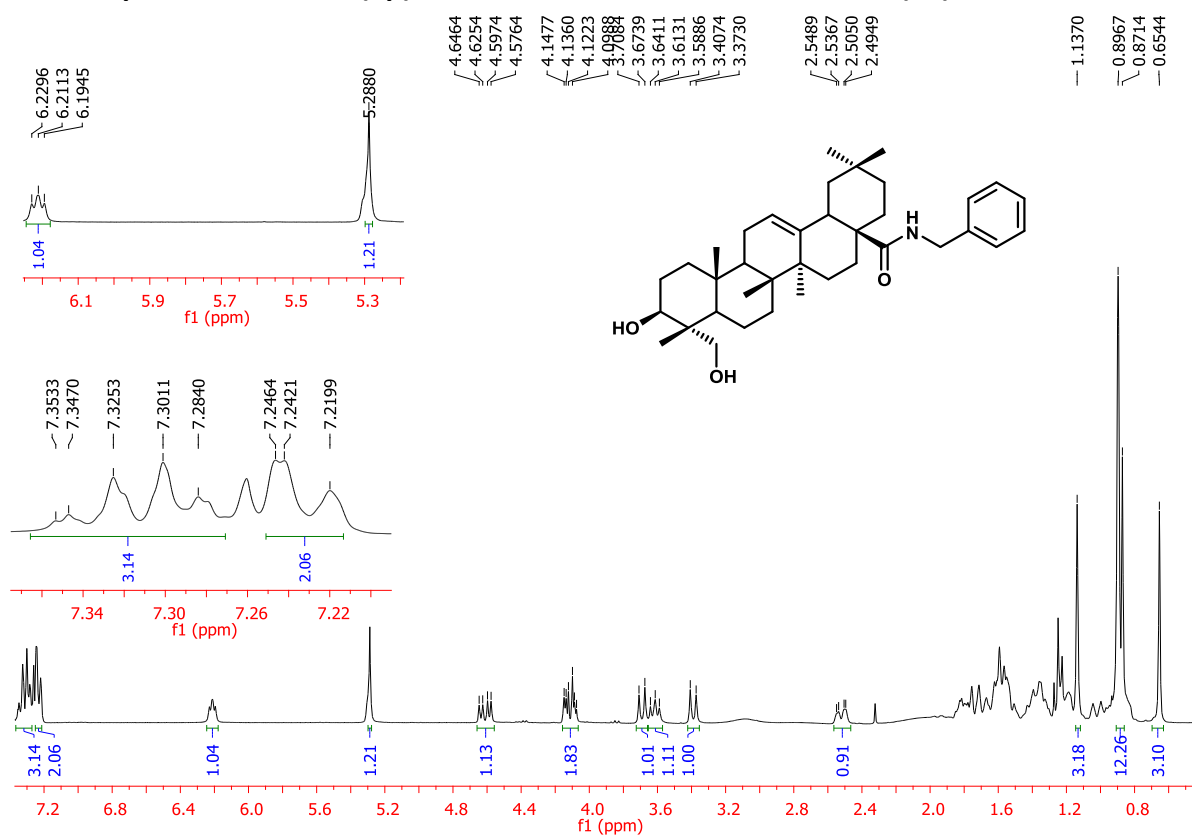


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃; 300 MHz)

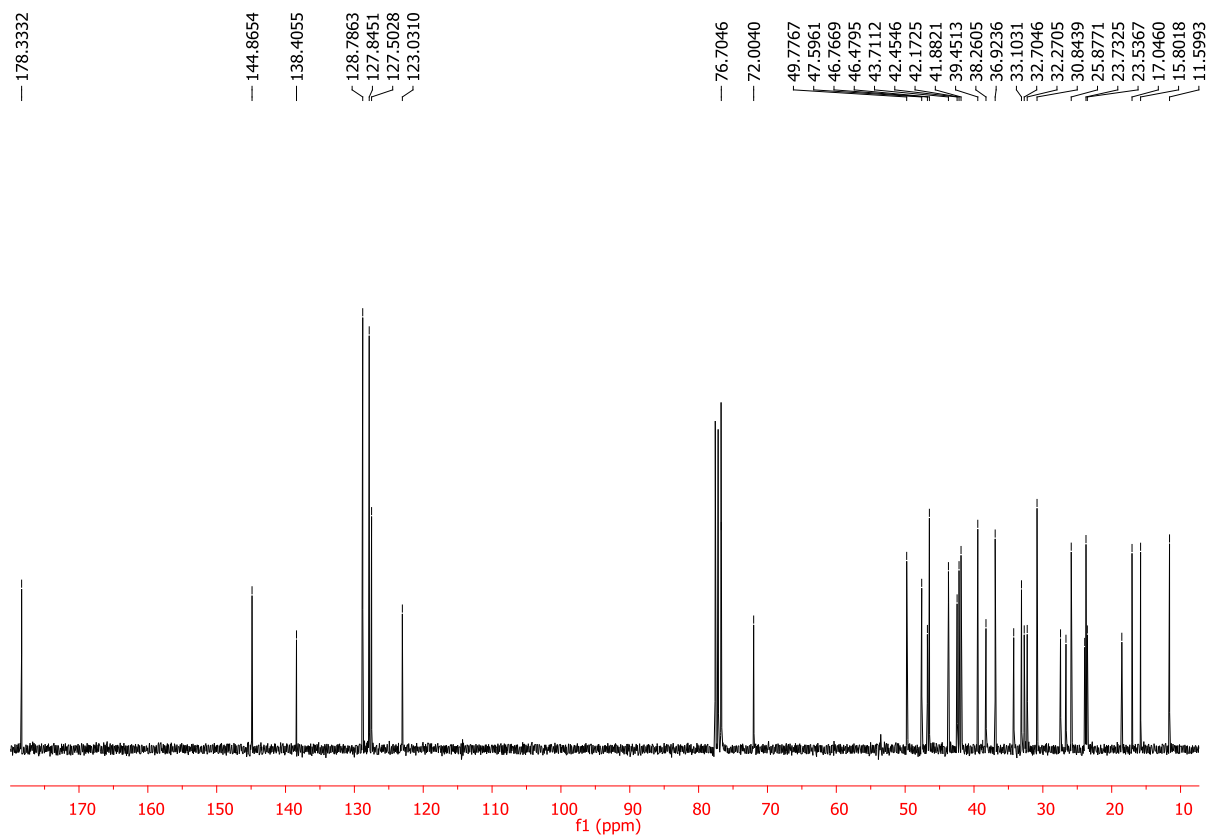


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃; 75 MHz)

4.6.25. Espectros do Benzil-(3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-amida (5a)

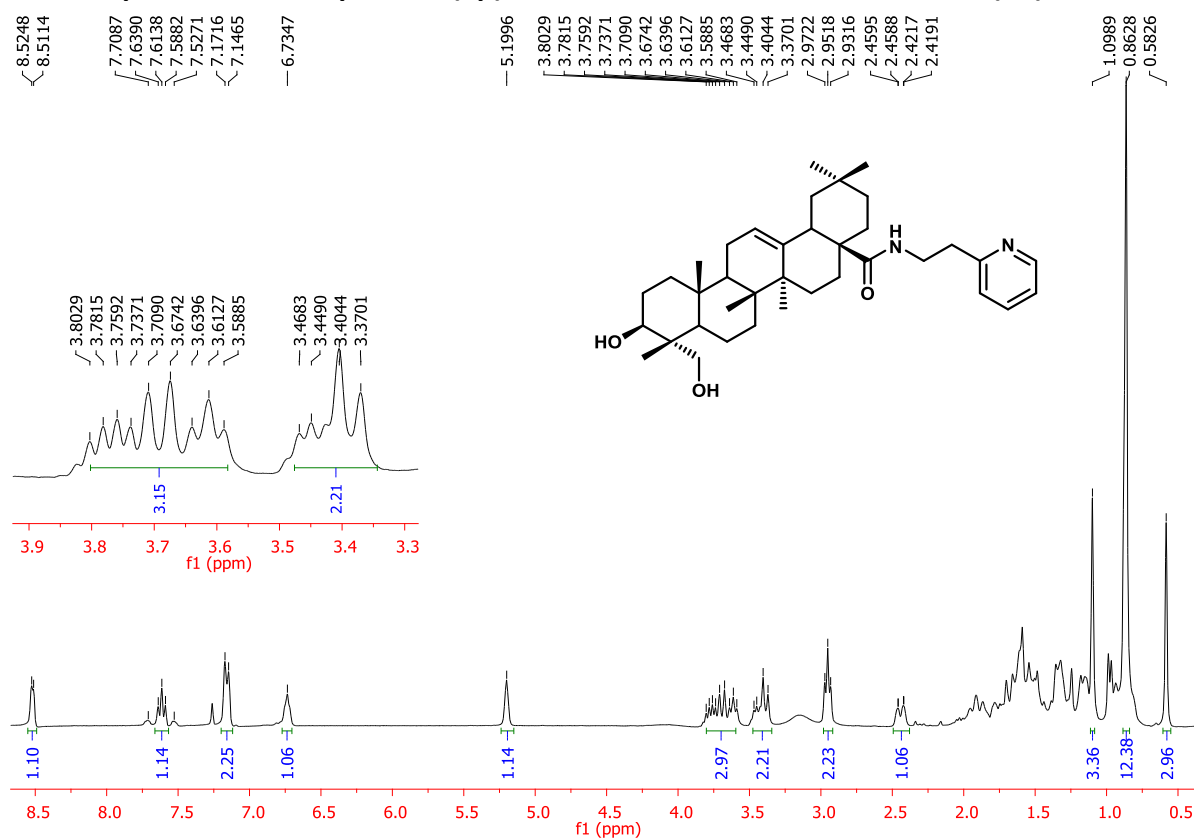


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃; 300 MHz)

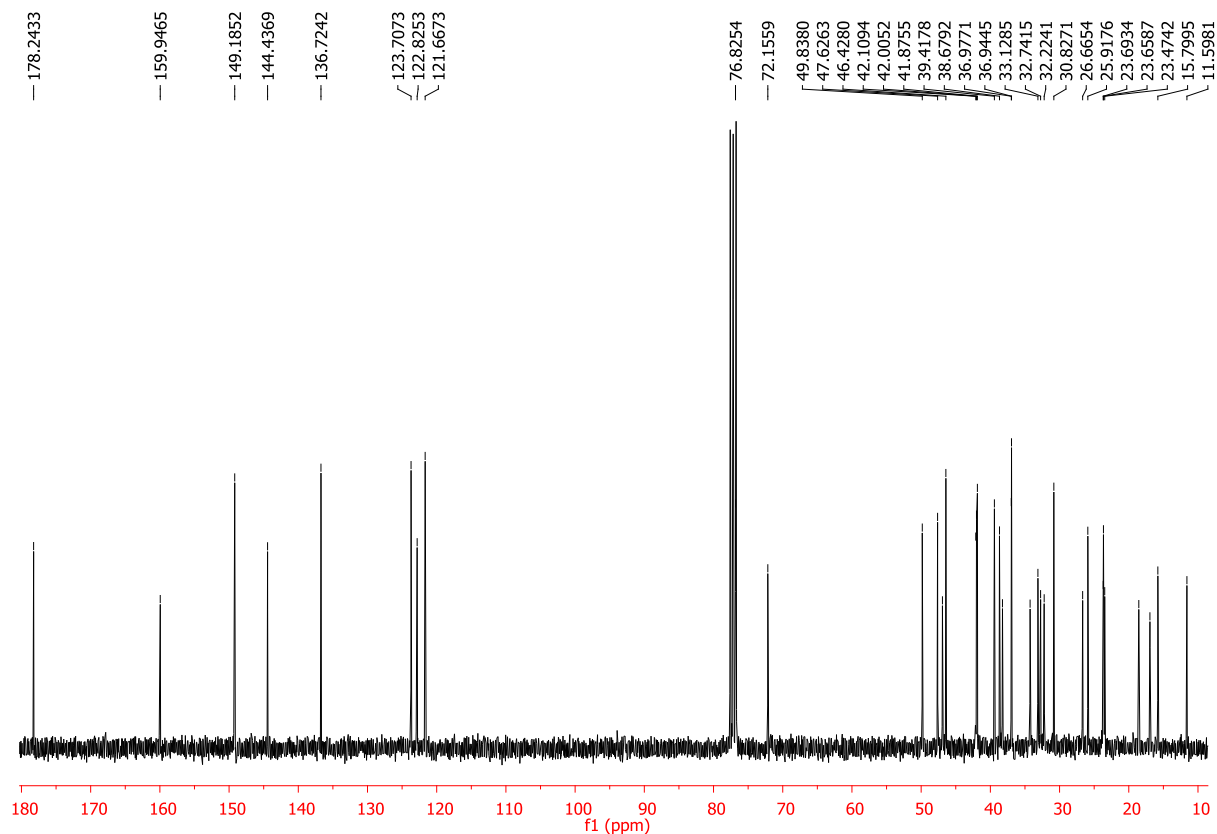


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃; 75 MHz)

4.6.26. Espectros do 1-etilpiridinil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (5b)

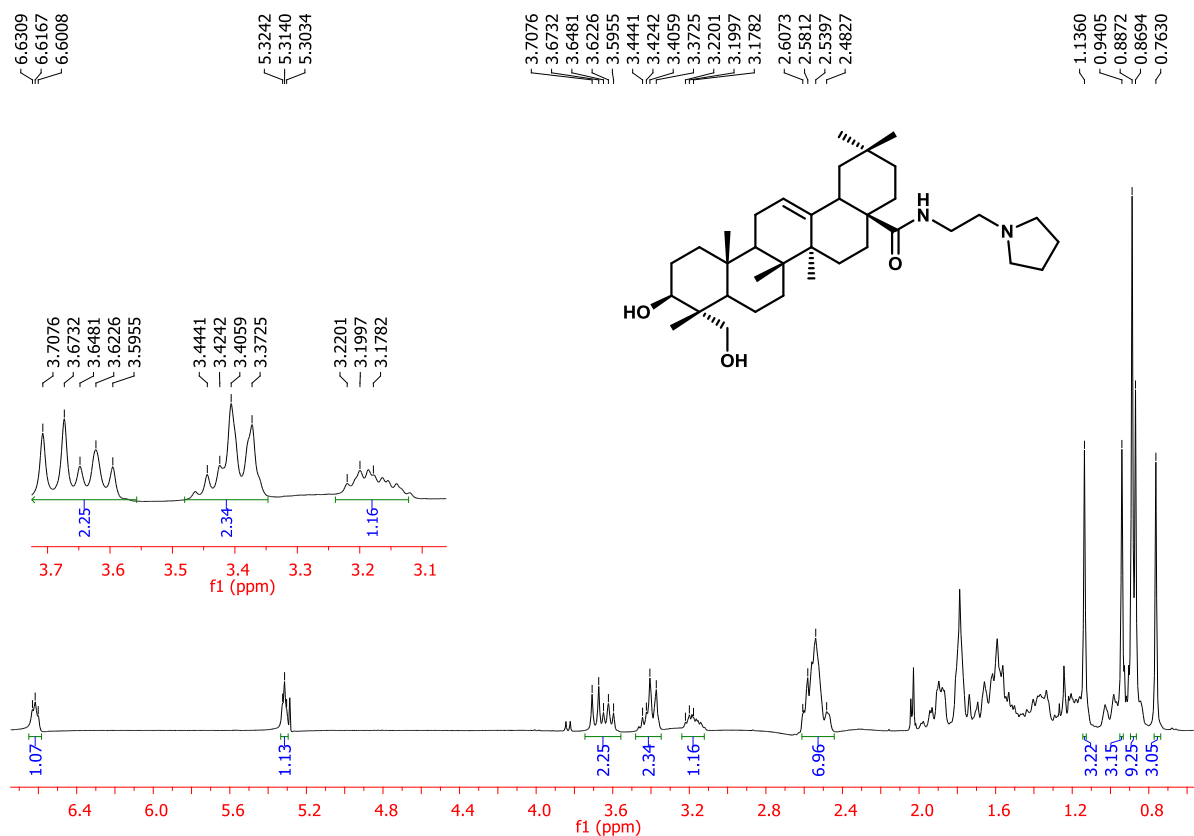


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃; 300 MHz)

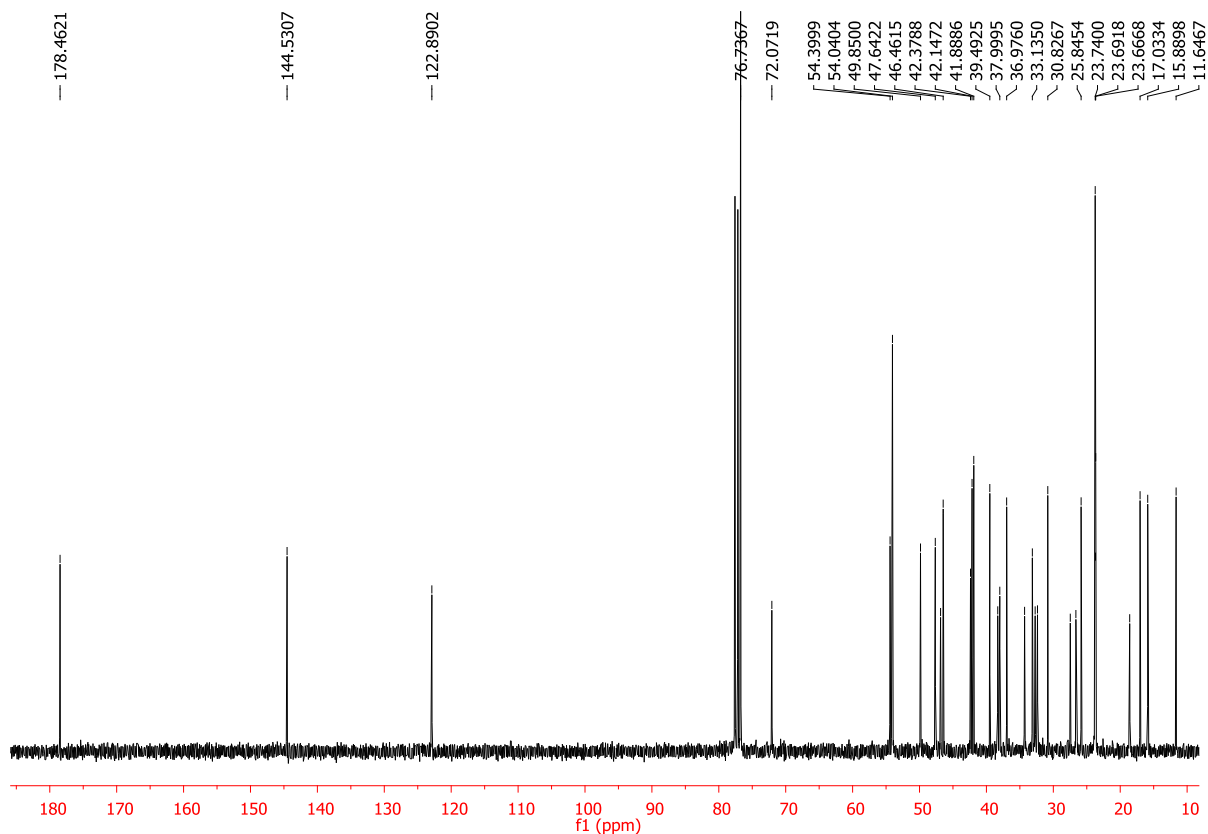


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃; 75 MHz)

4.6.27. Espectros do 1-etilpirrolidinil-(3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-amida (5c)

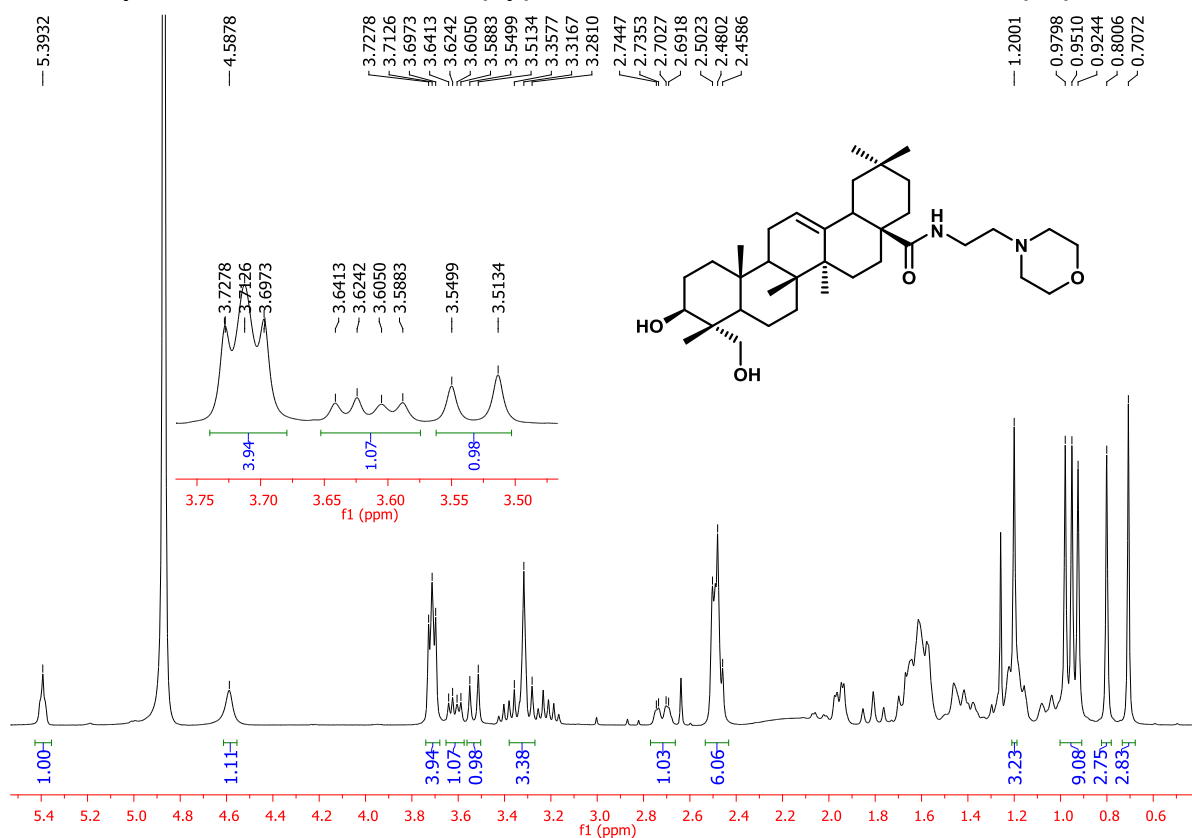


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃; 300 MHz)

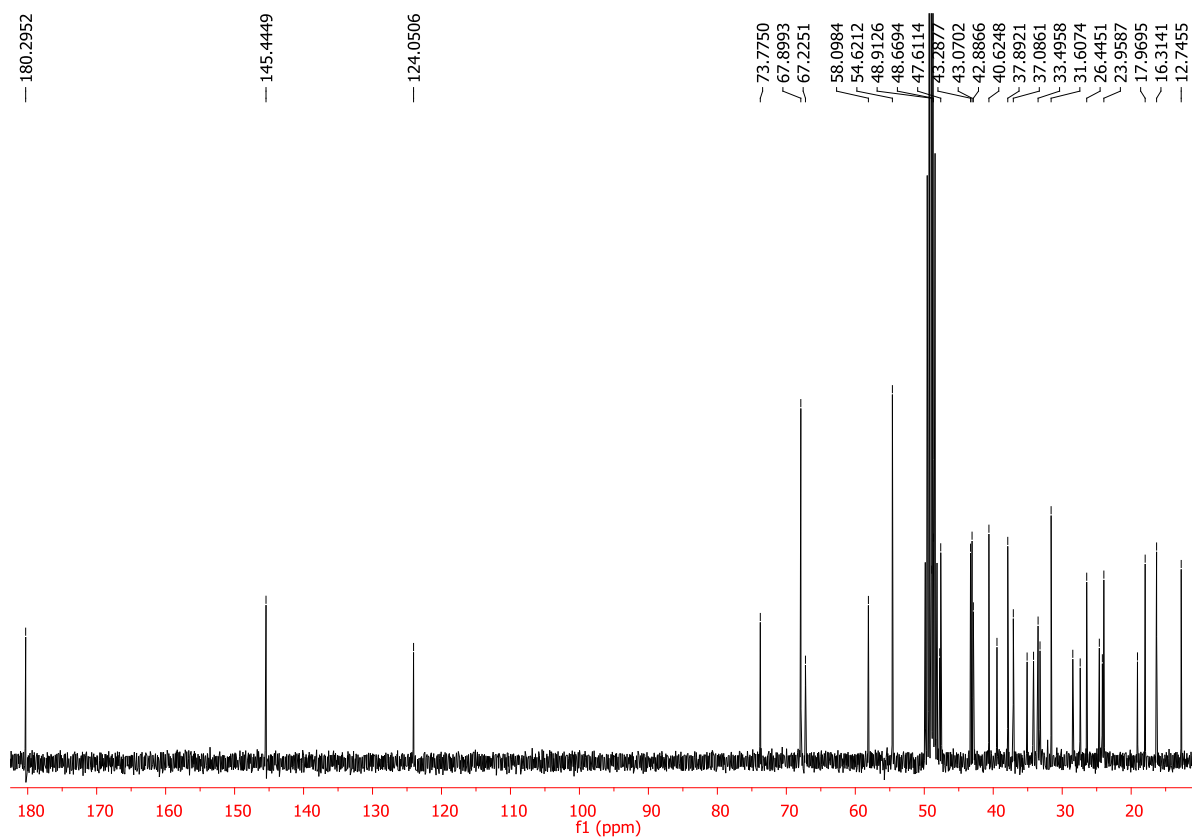


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃; 75 MHz)

4.6.28. Espectros do 1-etilmorfolinil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (5d)

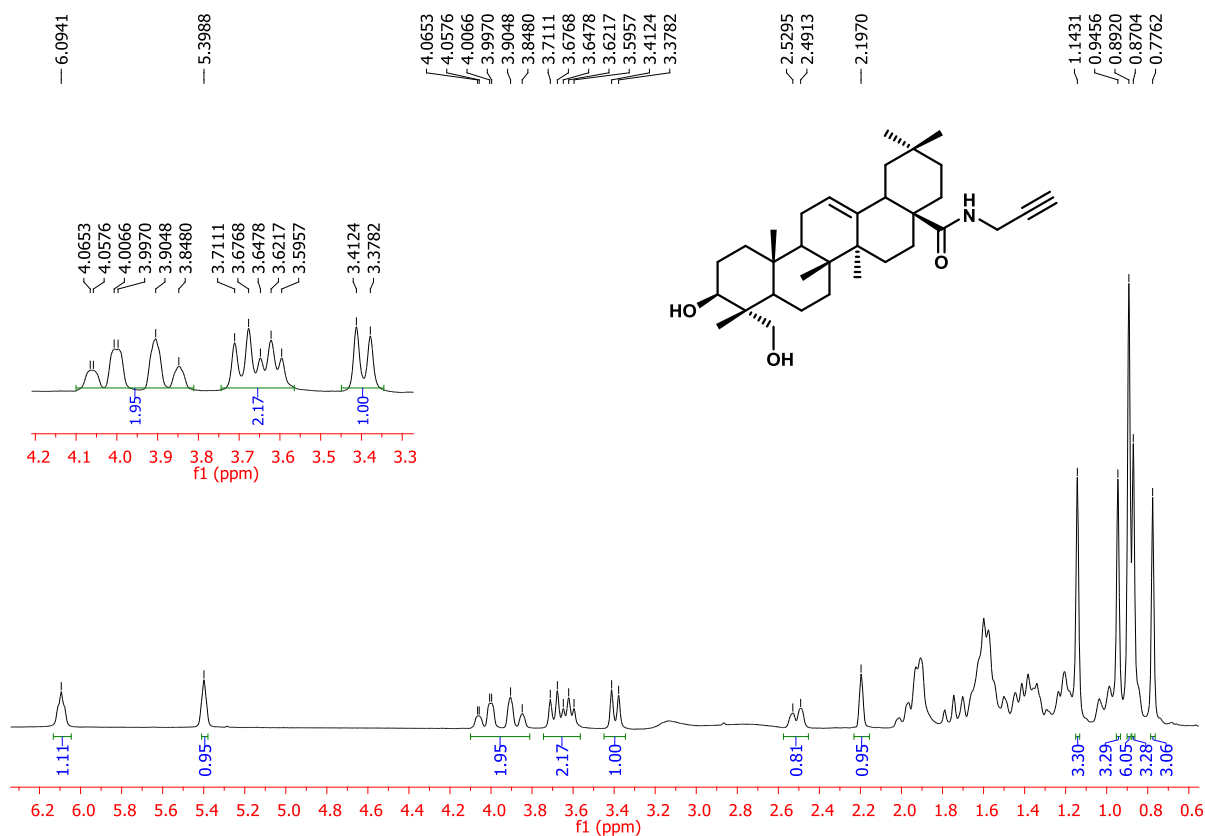


Espectro de RMN de ¹H (CD₃OD; 300 MHz)

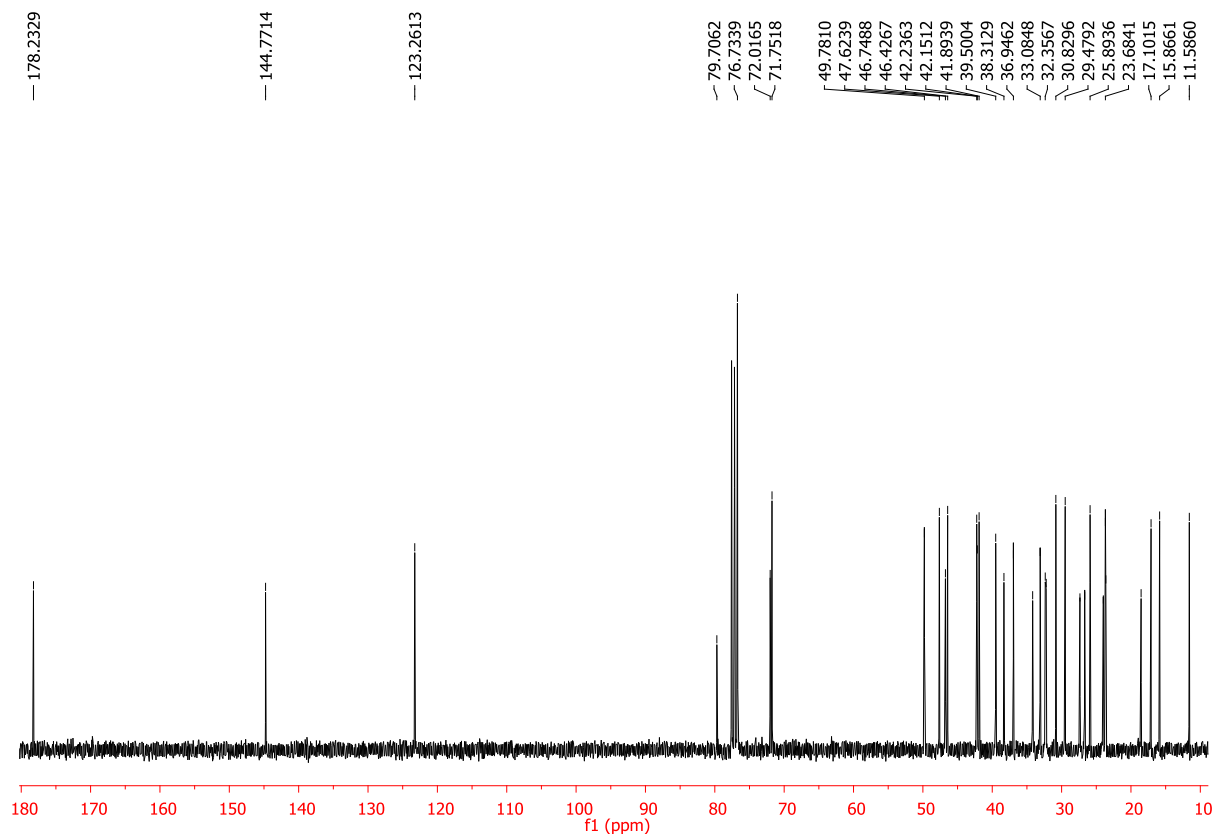


Espectro de RMN de ¹³C (CD₃OD; 75 MHz)

4.6.29. Espectros do 1-Propinil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (5e)

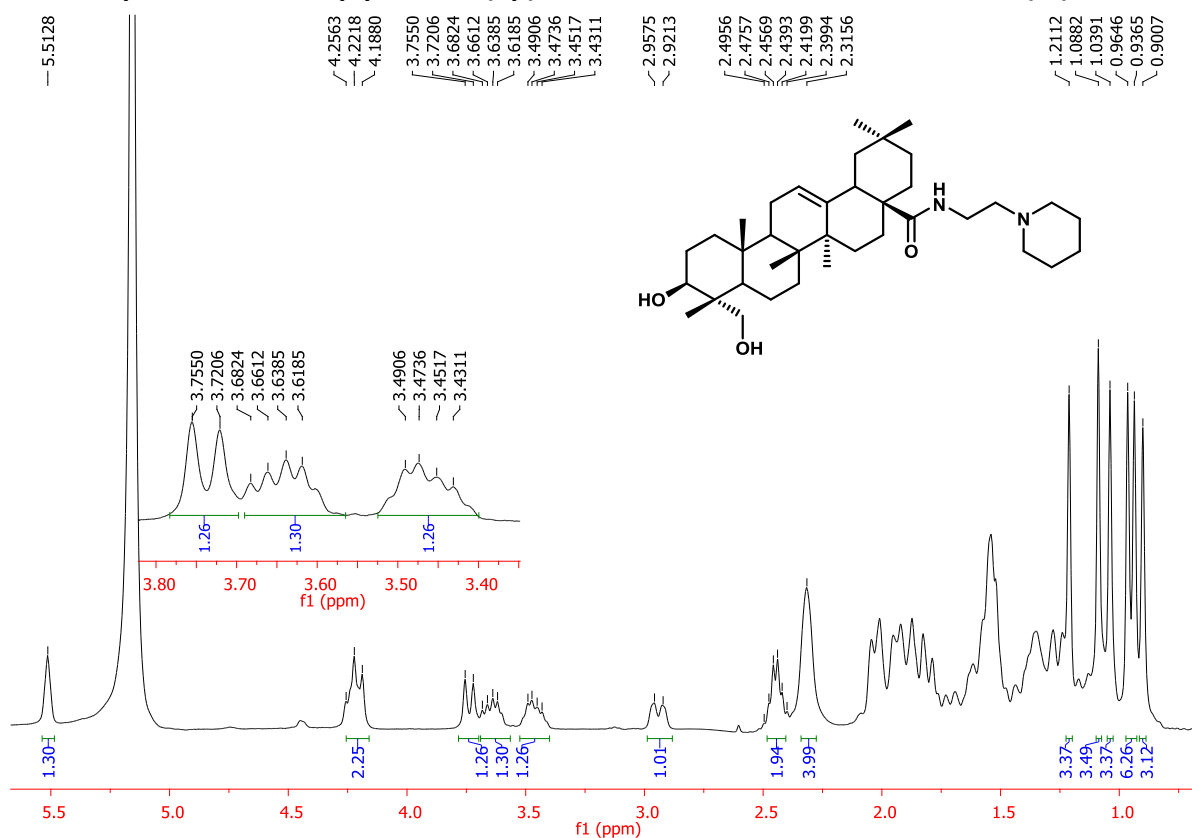


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃; 300 MHz)

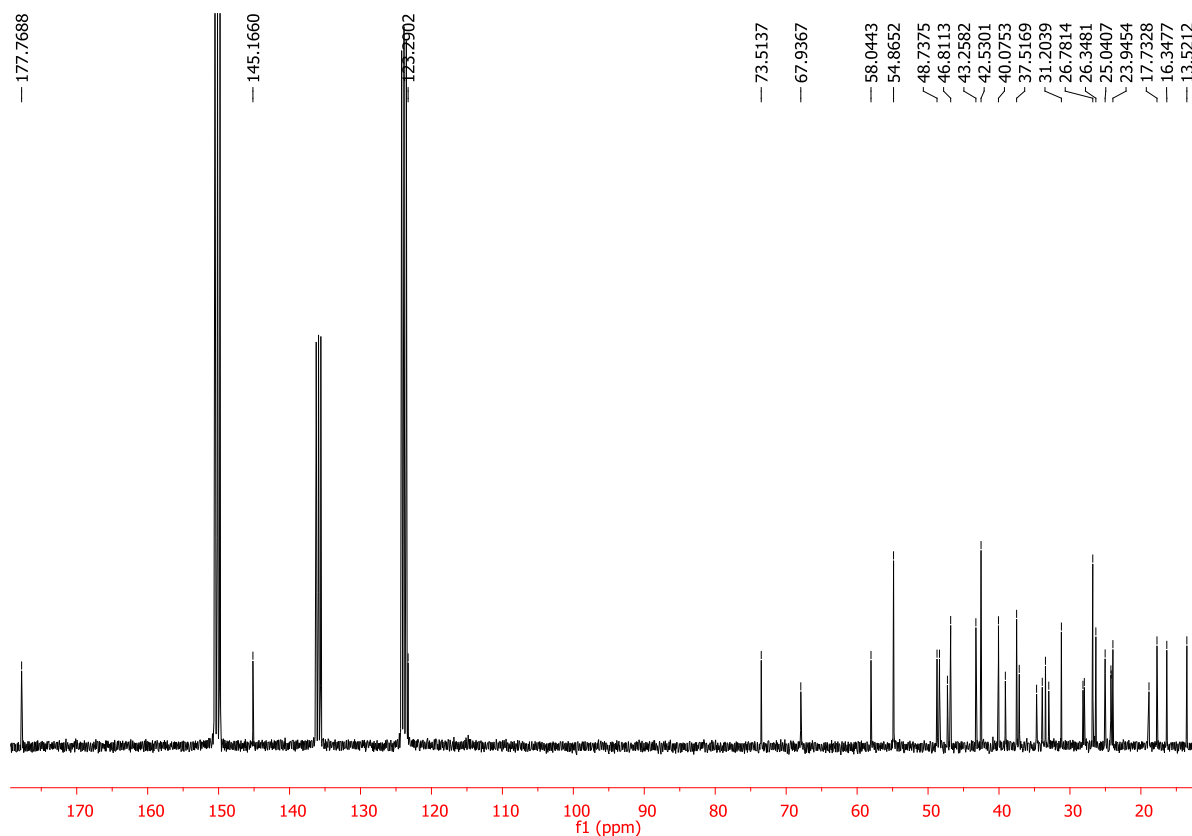


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃; 75 MHz)

4.6.30. Espectros do 1-etilpiperidinil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (5f)

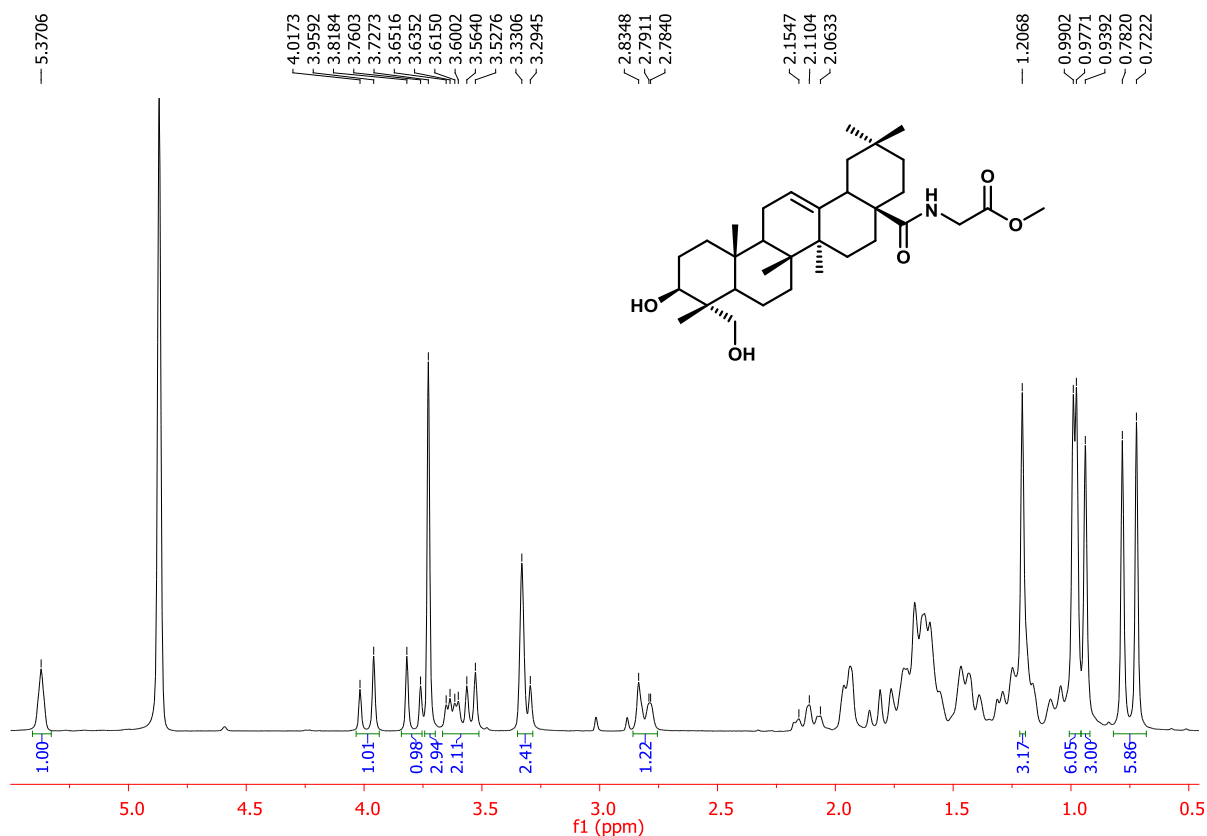


Espectro de RMN de ¹³C (C₅D₅N; 300 MHz)

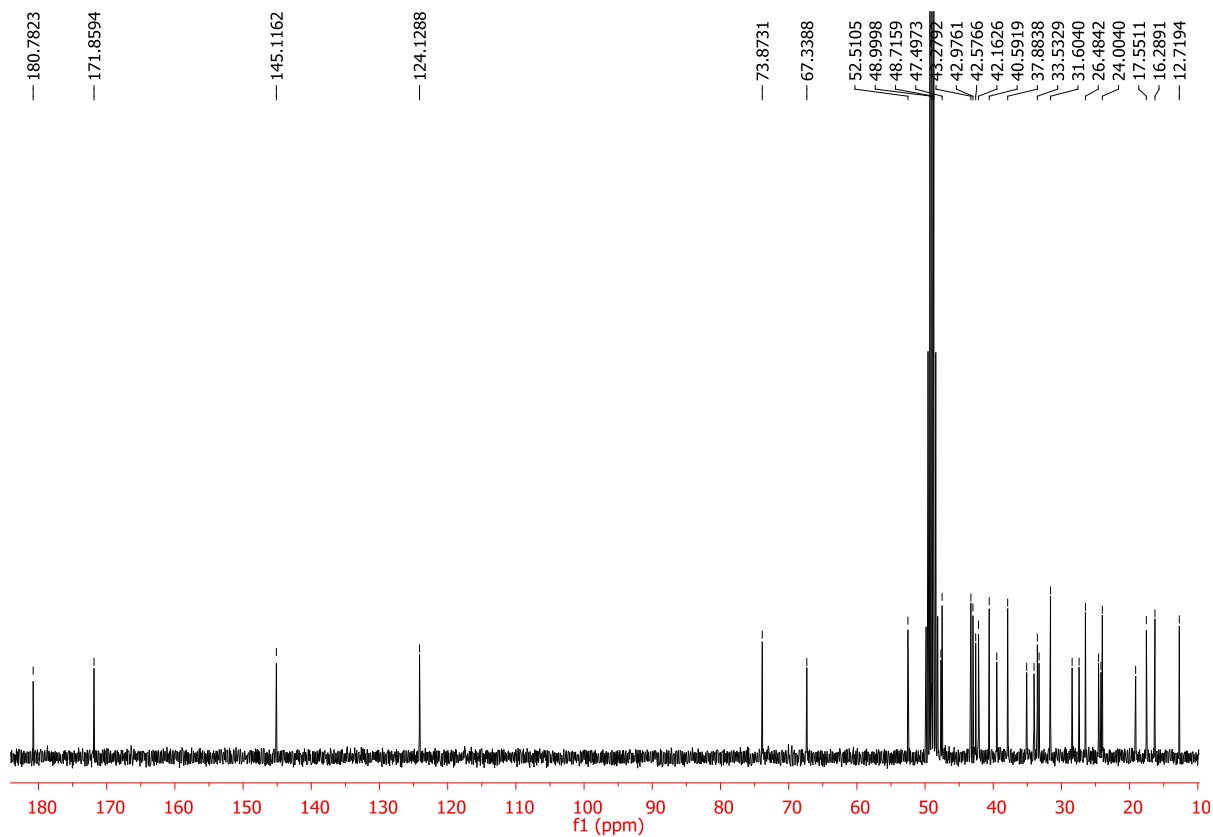


Espectro de RMN de ¹³C (C₅D₅N; 75 MHz)

4.6.31. Espectros do glicinil-metil-éster-(3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-amida (5g)



Espectro de RMN de ^1H (CD₃OD; 300 MHz)



Espectro de RMN de ^{13}C (CD₃OD; 75 MHz)

— 7.3149 —

$\begin{array}{c} \diagup 6.6724 \\ \diagdown 6.6515 \end{array}$

$\begin{array}{c} \diagup 5.4629 \\ \diagdown 5.4420 \end{array}$

$\begin{array}{c} \diagup 5.2768 \\ \diagdown \end{array}$

$\begin{array}{c} \diagup 3.6933 \\ \diagdown 3.6360 \end{array}$

$\begin{array}{c} \diagup 3.6020 \\ \diagdown 3.5742 \end{array}$

$\begin{array}{c} \diagup 3.5499 \\ \diagdown 3.3685 \end{array}$

$\begin{array}{c} \diagup 3.3343 \\ \diagdown \end{array}$

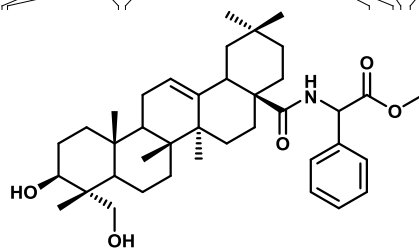
$\begin{array}{c} \diagup 2.6463 \\ \diagdown 2.6028 \end{array}$

$\begin{array}{c} \diagup 1.0902 \\ \diagdown 0.9431 \end{array}$

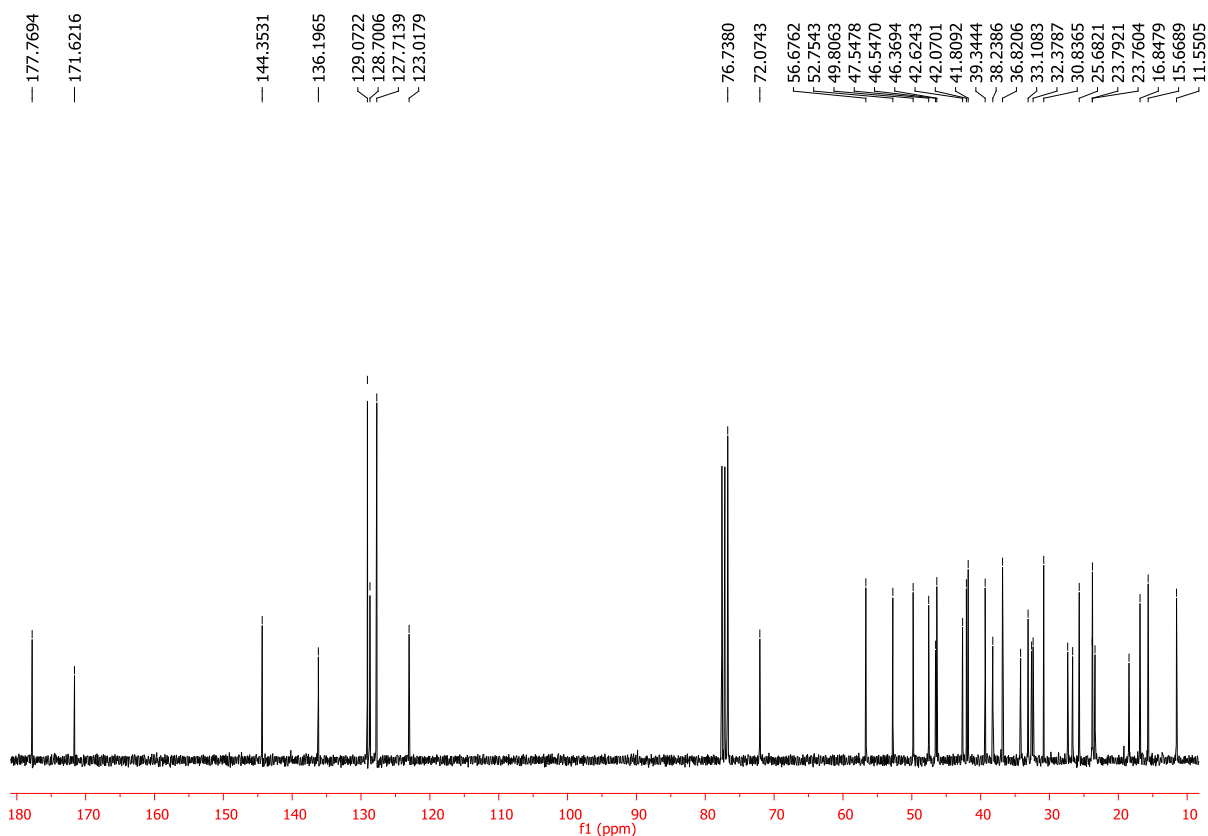
$\begin{array}{c} \diagup 0.8952 \\ \diagdown 0.8362 \end{array}$

$\begin{array}{c} \diagup 0.7612 \\ \diagdown \end{array}$

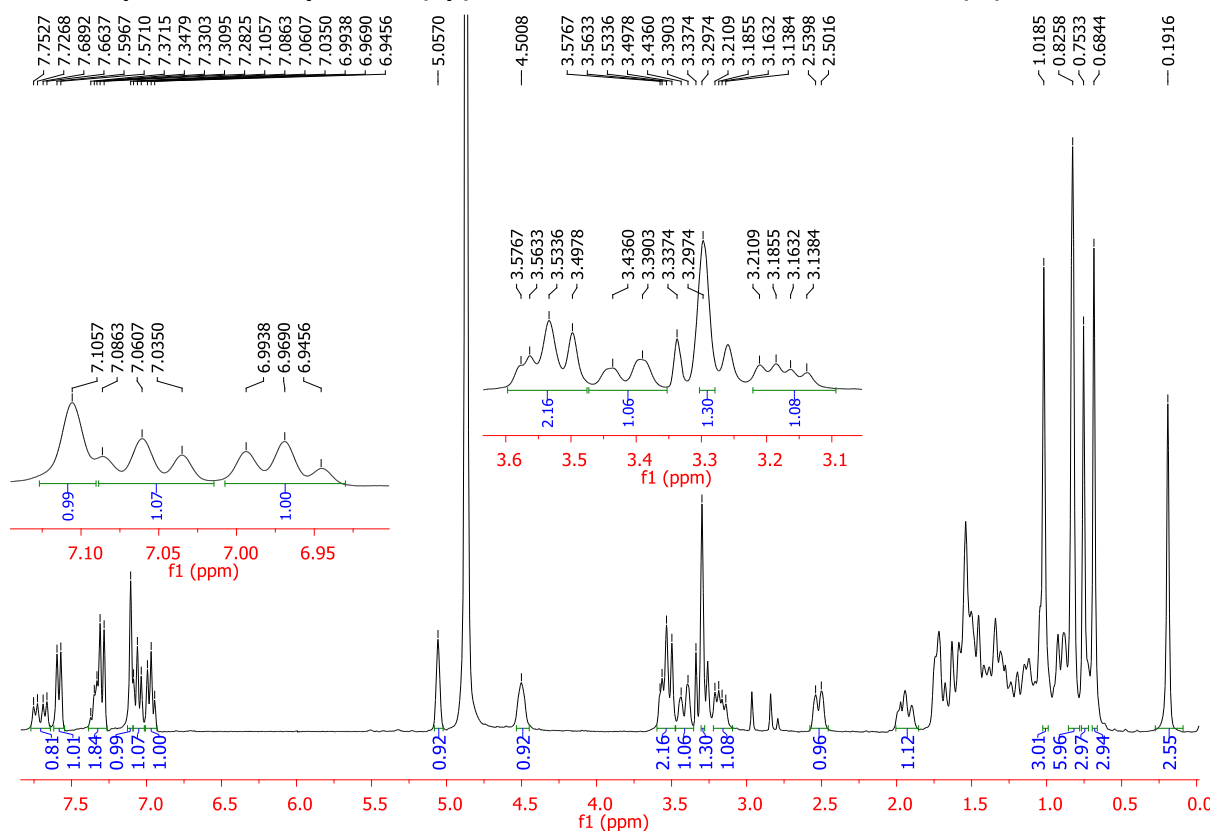
— 0.2624 —



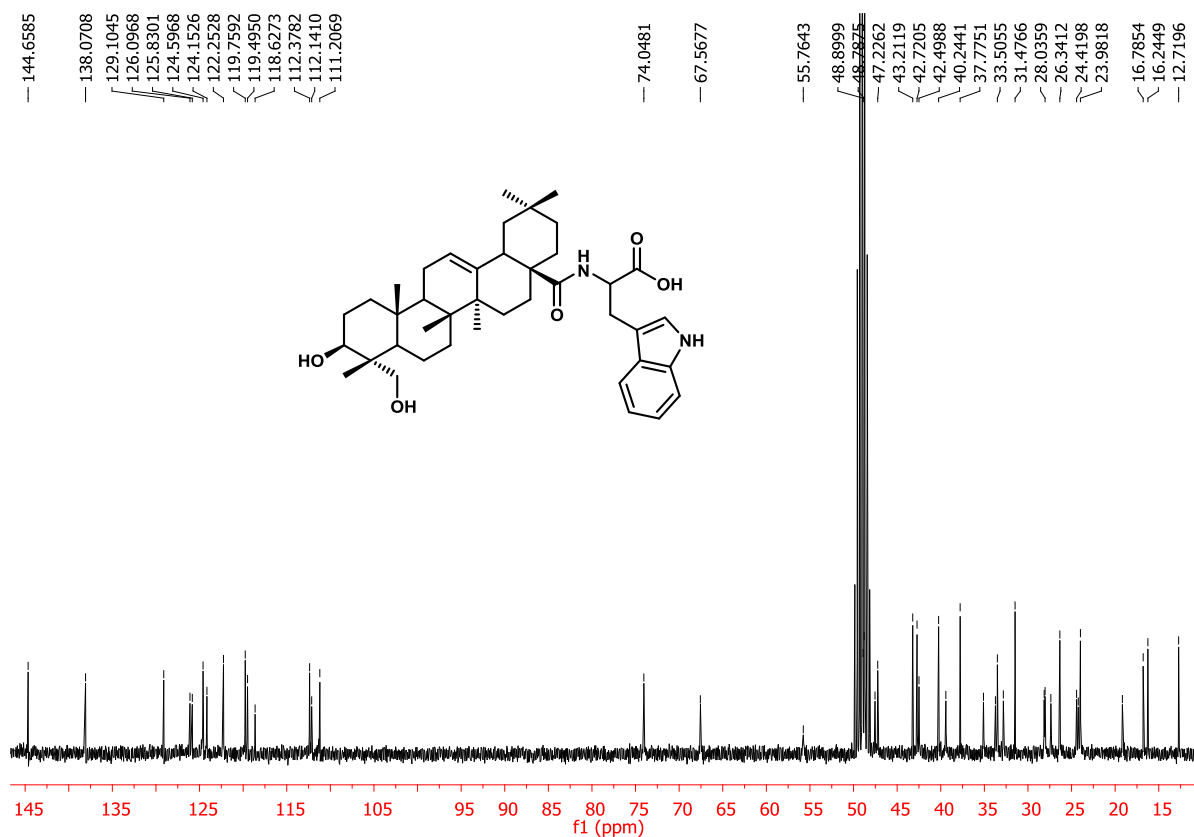
— 177.7694
— 171.6216
— 144.3531
— 136.1965
129.0722
128.7006
127.7139
123.0179



4.6.33. Espectros do Triptofanil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (5i)



Espectro de RMN de ¹H (CD₃OD; 300 MHz)



Espectro de RMN de ¹³C (CD₃OD; 75 MHz)

5. Capítulo 4

Derivatização da hederagenina para a formação de triazóis com grupos éster e amida no carbono-28 e sua atividade citotóxica.

5.1. Introdução

Heterociclos contendo um átomo de nitrogênio são abundantes na natureza além de serem de grande relevância biológica já que são subunidades estruturais em diversos produtos naturais como vitaminas, hormônios, antibióticos, alcaloides e também estão presentes em fármacos, herbicidas, corantes, dentre outros compostos (PHOLSHETTIWAR e VARMA, 2008).

Muitas vezes os anéis heterocíclicos presentes em substâncias bioativas constituem parte do grupo farmacofórico, ou seja, a parte da substância responsável pela atividade biológica (LEDNICER e MITSCHER, 2004).

Dentre os sistemas heterocíclicos mais estudados encontram-se os triazóis, que têm despertado muito interesse pelo fato de possuírem um vasto campo de aplicações que vão desde usos como explosivos até como fármacos e agroquímicos. Como exemplo de atividades biológicas relatadas para os compostos que apresentam o anel 1,2,4-triazólico, tem-se: antibacteriana, antifúngica, antitumoral, sedativa e estimulante do sistema nervoso central (PHOLSHETTIWAR e VARMA, 2008).

Compostos contendo o anel o farmacoforo 1,2,3-triazólico (MANETSCH *et al.*, 2004; WHITING *et al.*, 2006), são também utilizados em estratégias de acoplamento de duas ou mais substâncias de interesse. Outra característica do núcleo 1,2,3-triazólico é o fato de apresentar propriedades físico-químicas semelhantes ao grupo amida sendo um bioisótero deste (KOLB e SHARPLESS, 2003). Algumas das atividades biológicas relatadas para os derivados 1,2,3-triazólicos são: antibacteriana (THOMAS *et al.*, 2010; GALLARDO *et al.*, 2007; BOECHAT *et al.*, 2011), citotóxica (ANJOS *et al.*, 2009), antitumoral (CAFICI *et al.*, 2008; KAMAL *et al.*, 2008), antiprotozoária (BAKUNOV *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2010), antifúngica (PORE *et al.*, 2006; AHER *et al.*, 2009), antimalárica (GUANTAI *et al.*, 2010), e tripanossomicida (SILVA *et al.*, 2008). Todos os triazóis são de origem sintética e não há indicações, até o momento, de que estes heterociclos possam ser encontrados na natureza (MELO *et al.*, 2006).

Em um universo com uma infinidade de moléculas com potencial atividade biológica, o que tem se buscado atualmente é a obtenção de compostos fáceis de serem sintetizados e com eficiência biológica à dos produtos já utilizados. É neste contexto que se introduz o conceito de química “click” com o propósito de acelerar descobertas de novas substâncias com propriedades úteis, principalmente com aplicações farmacológicas e na área de materiais. Barry Sharpless foi quem propôs este conceito, em 2001, para descrever reações termodinamicamente favoráveis, de fácil execução e que forneçam os produtos com altos rendimentos, sendo, portanto, de grande aplicabilidade. Outros requisitos dessas reações são: serem modulares, fornecerem produtos secundários inofensivos e facilmente removíveis por métodos não cromatográficos. Além de serem estéreo-específicas, mas não necessariamente enantio-específicas, as condições do meio e os reagentes devem ser simples, o solvente a ser utilizado deve ser benigno ao meio ambiente, como a água, ou ser de fácil remoção e o produto deve ser de fácil isolamento (SHARPLESS *et al.*, 2004).

A cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen (reação entre um alcino e uma azida gerando triazóis, catalisada por Cu(I)), é considerada o exemplo perfeito de reação “click”, (Figura 5.1.1). Além de obedecer aos pré-requisitos de uma reação “click”, citados anteriormente, esta reação apresenta a conveniência de se utilizar, como reagentes, alcinos e azidas funcionalizados. Ela é regio-específica gerando exclusivamente o isômero 1,2,3-triazol-1,4-dissubstituído. Esta síntese, de tão usual, ficou conhecida como a reação “click” ou CuAAC (reação de cicloadição (C) entre um alcino (A) e uma azida (A), catalisada por cobre (Cu)).

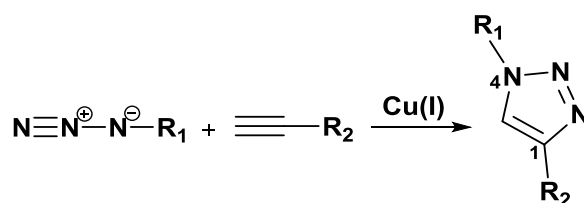


Figura 5.1.1 - A reação “click” ou CuAAC.

Assim, neste capítulo será descrita a síntese e avaliação antitumoral de derivados de triazóis com grupo éster e amidas substituídas no carbono-28 da hederagenina (**3a**).

5.2. Material e Métodos

5.2.1. Obtenção da Hederagenina

A obtenção da hederagenina foi descrita no capítulo 2.

5.2.2. Sínteses

Os reagentes empregados na obtenção dos produtos, a exceção de hederagenina, foram de grau analítico e não passaram por purificação prévia.

A determinação das faixas de fusão foi realizada em aparelho MQAPF-302 os valores não foram corrigidos. Os espectros na região do infravermelho foram obtidos por meio de pastilha de KBr contendo 1/ (m/m) do composto, em espectrômetro Perkin Elmer Spectrum 1000. As absorções foram relatadas em número de ondas $\bar{\nu}$ (cm^{-1}). Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C foram obtidos em aparelho Varian, Mercury 300 MHz e 75 MHz, respectivamente. As análises de massa de alta resolução foram realizadas num equipamento ESI-QTOF, maXisETD, Bruker. A Análise Elementar foram medidas numa unidade de Foss-Heraeus Vario EL. A evolução das reações foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD), em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ 0,2 mm de espessura (Merck). O desenvolvimento da cromatografia em camada delgada foi visualizados sob luz ultravioleta ou por pulverização com ácido fosfomolibdico 10/ de EtOH, seguido de aquecimento. A cromatografia flash em coluna (20 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro) foi realizada usando gel de sílica de 230-400 mesh (Merck).

Síntese do (3 β),23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de propinila (4x)

Procedimento geral

A um balão bitubulado de fundo redondo (25 mL), adicionou-se 1 equiv de hederagenina dissolvido em 5 mL de DMF, 5 equiv de K₂CO₃ e 2 equiv de brometo de propargila. O sistema foi colocado sob agitação magnética por 18 horas e mantido á temperatura ambiente. A seguir foi adicionado AcOEt (50 mL) e a mistura foi lavada com solução aquosa de HCl (5 /), água e solução saturada de NaCl (2x50 mL). A fase orgânica foi secada em Na₂SO₄ anidro e filtrada. O filtrado foi concentrado em evaporador rotativo, sob

pressão reduzida e o composto foi purificado por cromatografia em coluna (sílica gel; Hex-AcOEt) e caracterizado por meio de métodos espectroscópicos (ver capítulo 3).

Síntese do 31-Propin-1-il-(3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-amida (5e)

Procedimento geral

A um balão bitubulado de fundo redondo (25 mL), adicionam-se 0,25 mmol de TBTU, 0,45 mmol de DIPEA, 0,23 mmol de hederagenina e 0,50 mmol da propinilamina em 8 mL de THF. O sistema foi colocado sob agitação vigorosa por 4 horas e mantido a temperatura ambiente e atmosfera de nitrogênio. A seguir foi adicionado AcOEt (50 mL). A fase orgânica foi lavada com água, solução saturada de NaCl (2x50 mL) e secada com Na₂SO₄ anidro e filtrada. O filtrado foi concentrado em evaporador rotativo, sob pressão reduzida. O composto foi purificado por cromatografia em coluna (sílica gel; Hex-AcOEt) e caracterizado por meio de métodos espectroscópicos, (ver capítulo 3).

Sínteses do R-N₃

Procedimento geral

A um balão bitubulado de fundo redondo (25 mL), adicionam-se azida de sódio (NaN₃) (1 equiv.) e brometo de arila (1,5 equiv.) em DMF (10 mL). O sistema foi colocado sob agitação magnética por 2 horas e mantido a temperatura ambiente. A reação foi monitorada por CCD. Terminada a reação, a mistura foi extraída com dietileter. A fase orgânica foi lavada com água e solução saturada de NaCl (2x50 mL), em seguida foi secada em Na₂SO₄ anidro e filtrada. O filtrado foi concentrado num evaporador rotativo, sob pressão reduzida, para se obter as azidas benzílicas. Uma vez que a análise por CCD dos produtos em bruto revelou uma única mancha, as azidas foram utilizadas sem purificação adicional.

Síntese dos derivados de triazóis da hederagenina

Procedimento geral

A um balão bitubulado de fundo redondo (25 mL), adicionam-se 0,15 mmol do alcino, seguidamente 0,25 mmol de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ascorbato de sódio (0,5 mmol) e 0,3 mmol da R-N_3 em 10 mL de $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1 v/v). Em seguida o sistema foi colocado sob agitação vigorosa por 24 horas a temperatura ambiente. A mistura foi extraída com DCM e lavada com água e solução saturada de NaCl (2x50 mL), logo foi secada em Na_2SO_4 anidro e filtrada. O filtrado foi concentrado num evaporador rotativo, sob pressão reduzida e o composto foi purificado por cromatografia em coluna (sílica gel; Hex-AcOEt), e caracterizado por meio de métodos espectroscópicos, (Anexos 5.8.1-32).

Nas Tabelas 5.2.1 e 5.2.2 são apresentadas as quantidades dos reagentes empregadas para as formações dos derivados de triazóis com grupo éster (**6a-o**) e amida (**7a-7o**) no carbono-28 da hederagenina.

Tabela 5.2.1 - Reagentes e condições para o preparo dos derivados **6a-o** a temperatura ambiente por 24 h.

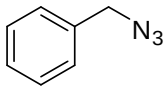
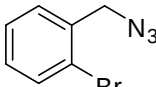
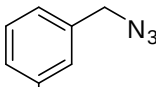
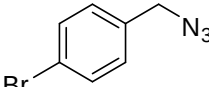
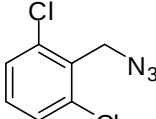
R-N₃ Massa (mg; mmol)	4x Massa (mg; mmol)	CuSO₄.H₂O/ Na-L-asc Massa (mg; mmol)	Mistura de eluente (cromatografia em coluna)	Produto	Rendimento mg; mmol; /
 (40; 0,30)	(85; 0,15)	(40; 0,25)/ (100; 0,5)	Hex:AcOEt (2:1)	6a	65; 0,10; 60
 (63; 0,30)	(85; 0,15)	(40; 0,25)/ (100; 0,5)	Hex: AcOEt (2:1)	6b	110; 0,15; 91
 (63; 0,30)	(85; 0,15)	(40; 0,25)/ (100; 0,5)	Hex: AcOEt (2:1)	6c	78; 0,11; 65
 (63; 0,30)	(85; 0,15)	(40; 0,25)/ (100; 0,5)	Hex: AcOEt (2:1)	6d	109; 0,15; 91
 (61; 0,30)	(85; 0,15)	(40; 0,25)/ (100; 0,5)	Hex: AcOEt (2:1)	6e	100; 0,14; 84

Tabela continua..

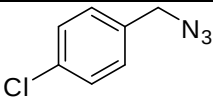
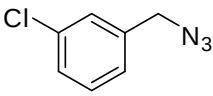
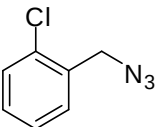
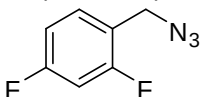
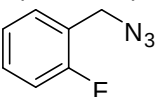
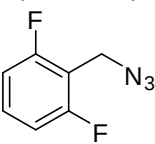
R-Br Massa (mg; mmol)	4x Massa (mg; mmol)	CuSO ₄ .H ₂ O/ Na-L-asc Massa (mg; mmol)	Mistura de eluente (cromatografia em coluna)	Produto	Rendimento mg; mmol; /
 (50; 0,30)	(85; 0,15)	(40; 0,25)/ (100; 0,5)	Hex: AcOEt (2:1)	6f	39; 0,05; 33
 (50; 0,30)	(85; 0,15)	(40; 0,25)/ (100; 0,5)	Hex: AcOEt (2:1)	6g	106; 0,15; 90
 (50; 0,30)	(85; 0,15)	(40; 0,25)/ (100; 0,5)	Hex: AcOEt (2:1)	6h	64; 0,09; 54
 (51; 0,30)	(85; 0,15)	(40; 0,25)/ (100; 0,5)	Hex: AcOEt (2:1)	6i	101; 0,15; 89
 (45; 0,30)	(85; 0,15)	(40; 0,25)/ (100; 0,5)	Hex: AcOEt (2:1)	6j	94; 0,14; 85
 (51; 0,30)	(85; 0,15)	(40; 0,25)/ (100; 0,5)	Hex: AcOEt (2:1)	6k	76; 0,12; 67

Tabela continua...

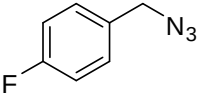
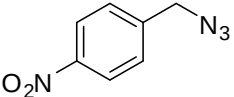
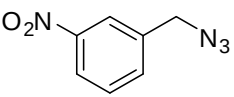
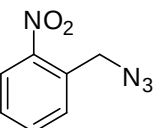
R-Br Massa (mg; mmol)	4x Massa (mg; mmol)	CuSO ₄ .H ₂ O/ Na-L-asc Massa (mg; mmol)	Mistura de eluente (cromatografia em coluna)	Produto	Rendimento mg; mmol; /
 (45; 0,30)	(85; 0,15)	(40; 0,25)/ (100; 0,5)	Hex: AcOEt (2:1)	6l	85; 0,13; 77
 (54; 0,30)	(85; 0,15)	(40; 0,25)/ (100; 0,5)	Hex: AcOEt (2:1)	6m	50; 0,07; 44
 (54; 0,30)	(85; 0,15)	(40; 0,25)/ (100; 0,5)	Hex: AcOEt (2:1)	6n	60; 0,08; 52
 (54; 0,30)	(85; 0,15)	(40; 0,25)/ (100; 0,5)	Hex: AcOEt (2:1)	6o	87; 0,12; 76

Tabela 5.2.2 - Reagentes e condições para o preparo dos derivados **7a-o** a temperatura ambiente por 24 h.

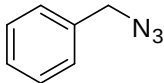
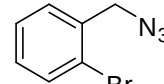
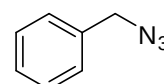
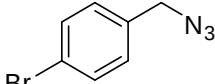
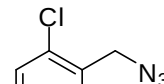
R-N ₃ Massa (mg; mmol)	5e Massa (mg; mmol)	CuSO ₄ .H ₂ O/ Na-L-asc Massa (mg; mmol)	Mistura de eluente (cromatografia em coluna)	Produto	Rendimento mg; mmol; /
 (40; 0,30)	(85; 0,15)	(40; 0,25)/ (100; 0,5)	Hex:AcOEt (1:2)	7a	97; 0,15; 90
 (63; 0,30)	(85; 0,15)	(40; 0,25)/ (100; 0,5)	Hex: AcOEt (1:2)	7b	102; 0,14; 85
 (63; 0,30)	(85; 0,15)	(40; 0,25)/ (100; 0,5)	Hex: AcOEt (1:2)	7c	108; 0,15; 90
 (63; 0,30)	(85; 0,15)	(40; 0,25)/ (100; 0,5)	Hex: AcOEt (1:2)	7d	114; 0,16; 95
 (61; 0,30)	(85; 0,15)	(40; 0,25)/ (100; 0,5)	Hex: AcOEt (1:2)	7e	89; 0,12; 75

Tabela continua..

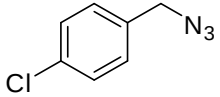
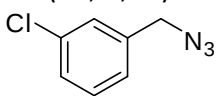
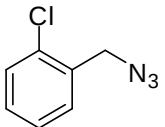
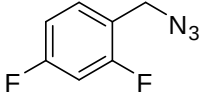
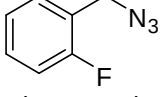
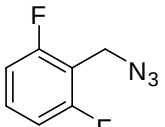
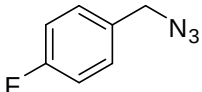
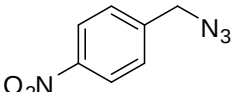
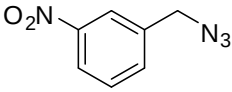
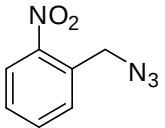
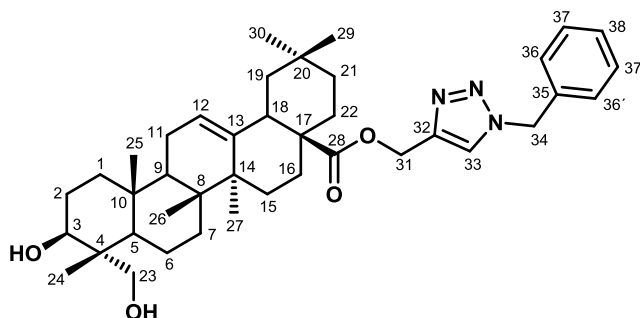
R-Br Massa (mg; mmol)	5e Massa (mg; mmol)	CuSO ₄ .H ₂ O/ Na-L-asc Massa (mg; mmol)	Mistura de eluente (cromatografia em coluna)	Produto	Rendimento mg; mmol; /
 (50; 0,30)	(85; 0,15)	(40; 0,25)/ (100; 0,5)	Hex: AcOEt (1:2)	7f	92; 0,13; 81
 (50; 0,30)	(85; 0,15)	(40; 0,25)/ (100; 0,5)	Hex: AcOEt (1:2)	7g	89; 0,13; 78
 (50; 0,30)	(85; 0,15)	(40; 0,25)/ (100; 0,5)	Hex: AcOEt (1:2)	7h	90; 0,13; 79
 (51; 0,30)	(85; 0,15)	(40; 0,25)/ (100; 0,5)	Hex: AcOEt (1:2)	7i	95; 0,14; 84
 (45; 0,30)	(85; 0,15)	(40; 0,25)/ (100; 0,5)	Hex: AcOEt (1:2)	7j	78; 0,11; 70
 (51; 0,30)	(85; 0,15)	(40; 0,25)/ (100; 0,5)	Hex: AcOEt (1:2)	7k	113; 0,17; 97

Tabela continua...

R-Br Massa (mg; mmol)	5e Massa (mg; mmol)	CuSO ₄ .H ₂ O/ Na-L-asc Massa (mg; mmol)	Mistura de eluente (cromatografia em coluna)	Produto	Rendimento mg; mmol; /
 (45; 0,30)	(85; 0,15)	(40; 0,25)/ (100; 0,5)	Hex: AcOEt (1:2)	7l	77; 0,11; 70
 (54; 0,30)	(85; 0,15)	(40; 0,25)/ (100; 0,5)	Hex: AcOEt (1:2)	7m	77; 0,11; 66
 (54; 0,30)	(85; 0,15)	(40; 0,25)/ (100; 0,5)	Hex: AcOEt (1:2)	7n	91; 0,13; 79
 (54; 0,30)	(85; 0,15)	(40; 0,25)/ (100; 0,5)	Hex: AcOEt (1:2)	7o	87; 0,12; 76

5.2.3. Dados referente ao (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de (1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-metila (6a)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 101-102,8 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3420, 3148, 3064, 1724, 1160, 1048, 1008, 722.

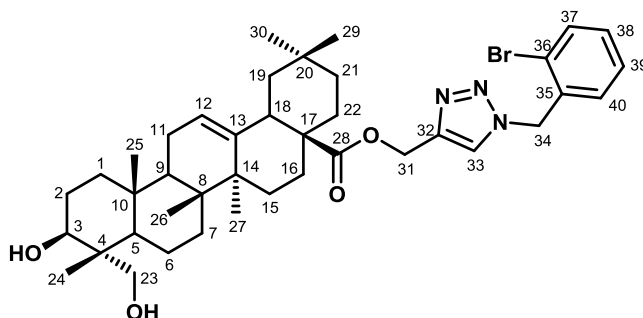
RMN de 1H ($CDCl_3$ /ppm; 300 MHz) δ : 7,47 (s, 1H, H-33); 7,35 (sl, 3H, 3xH); 7,26 (sl, 2H, 2xH); 5,51 (d, 1H, $J = 15,0$ Hz, H-34_a); 5,45 (d, 1H, $J = 15,0$ Hz, H-34_b); 5,21 (sl, 1H, H-12); 5,13 (sl, 2H, H-31); 3,71 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_a); 3,62 (tl, 1H, $J = 8,0$ Hz, H-3); 3,40 (d, 1H, $J = 9,6$ Hz, H-23_b); 2,78 (ddl, 1H, $J = 13,3$ Hz, H-18); 1,08 (s, 3H, CH₃); 0,90 (s, 3H, CH₃); 0,88 (s, 3H, CH₃); 0,86 (s, 6H, 2xCH₃); 0,50 (s, 3H, CH₃).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$ /ppm; 75 MHz) δ : 177,81 (O=C-28); 143,71 (=C-13); 134,32 (=C-32); 131,04 (C-35); 129,26 (C-37); 129,26 (C-37'); 128,97 (C-38); 128,22 (C-36'); 128,22 (C-36); 123,03 (=CH-12); 122,44 (=CH-33); 76,91 (HO-CH-3); 72,18 (HO-CH₂-23); 57,61 (O-CH₂-31); 54,31 (CH₂-34); 49,88 (CH-9); 47,64 (C-17); 46,81 (CH-5); 45,96 (CH-19); 41,90 (C-4); 41,83 (C-14); 41,37 (CH-18); 39,38 (C-8); 38,22 (CH₂-1); 37,01 (C-10); 33,92 (CH₂-21); 33,17 (CH₃-29); 32,55 (CH₂-7); 32,41 (CH₂-22); 30,76 (C-20); 27,72 (CH₂-15); 26,82 (CH₃-27); 25,93 (CH₂-2); 23,71 (CH₃-30); 23,45 (CH₂-11); 23,06 (CH₂-16); 18,61 (CH₂-6); 16,84 (CH₃-26); 15,85 (CH₃-25); 11,57 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{40}H_{58}N_3O_4]^+$: $m/z = 644,4427$, encontrado: $m/z = 644,4424$.

CHN: calculado: C, 74,61; H, 8,92; N, 6,52; encontrado: C, 74,48; H, 9,07; N, 6,39.

5.2.4. Dados referente ao (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de (1-(2-bromobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-metila (6b)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 94,8-96,3 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3408, 3154, 3068, 1722, 1160, 1046, 1030, 1008, 750, 732.

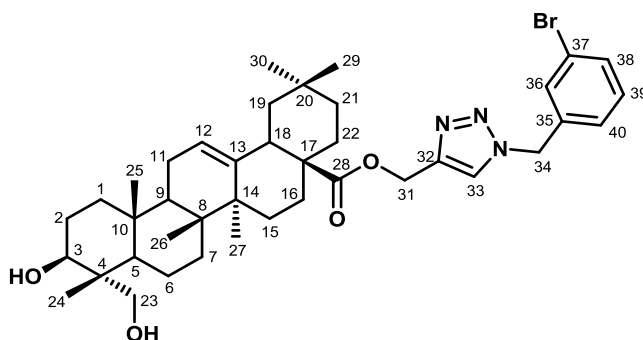
RMN de 1H ($CDCl_3$ /ppm; 300 MHz) δ : 7,60 (d, 1H, J = 7,8 Hz, H-37); 7,57 (s, 1H, H-33); 7,23 (m, 3H, H-38, H-39 e H-40); 5,62 (t, 2H, J = 16,3 Hz H-34); 5,22 (sl, 1H, H-12); 5,14 (s, 2H, H-31); 3,70 (d, 1H, J = 10,2 Hz, H-23_a); 3,61 (tl, 1H, J = 8,0 Hz, H-3); 3,39 (d, 1H, J = 10,2 Hz, H-23_b); 2,79 (ddl, 1H, J = 11,2 Hz, H-18); 1,08 (s, 3H, CH₃); 0,90 (s, 3H, CH₃); 0,87 (s, 9H, 3xCH₃); 0,52 (s, 3H, CH₃).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$ /ppm; 75 MHz) δ : 177,77 (O=C-28); 143,68 (=C-13); 143,62 (=C-32); 134,00 (C-35); 133,39 (C-37); 130,63 (C-40); 130,58 (C-39); 128,30 (C-38); 124,68 (=CH-12); 123,69 (C-36); 122,45 (=CH-33); 76,85 (HO-CH-3); 72,10 (HO-CH₂-23); 57,58 (O-CH₂-31); 53,95 (CH₂-34); 49,86 (CH-9); 47,63 (C-17); 46,80 (CH-5); 45,93 (CH-19); 41,87 (C-4); 41,81 (C-14); 41,36 (CH-18); 39,37 (C-8); 38,21 (CH₂-1); 36,99 (C-10); 33,91 (CH₂-21); 33,15 (CH₃-29); 32,53 (CH₂-7); 32,41 (CH₂-22); 30,75 (C-20); 27,71 (CH₂-15); 26,75 (CH₃-27); 25,92 (CH₂-2); 23,70 (CH₃-30); 23,46 (CH₂-11); 23,04 (CH₂-16); 18,60 (CH₂-6); 16,86 (CH₃-26); 15,83 (CH₃-25); 11,58 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{40}H_{57}BrN_3O_4]^+$: m/z = 722,3532, encontrado: m/z = 722,3520.

CHN: calculado: C, 66,47; H, 7,81; N, 5,81; encontrado: C, 66,30; H, 7,98; N, 5,62.

5.2.5. Dados referente ao (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de (1-(3-bromobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-metila (6c)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 125,4-125,6 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3414, 3148, 3094, 1718, 1160, 1048, 1008, 772, 734.

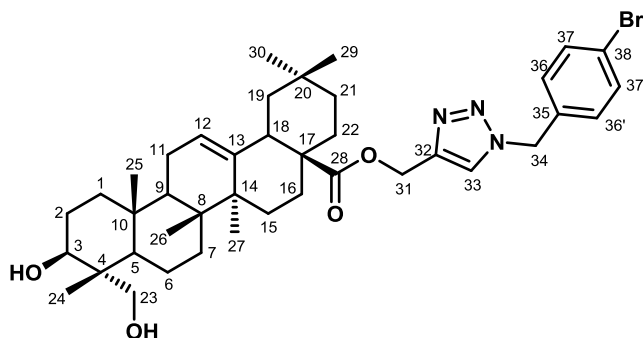
RMN de ^1H (CDCl_3/ppm ; 300 MHz) δ : 7,51 (s, 1H, H-33); 7,47 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz, H-38); 7,39 (s, 1H, H-36); 7,24 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz, H-40); 7,18 (t, 1H, $J = 7,5$ Hz, H-39); 5,45 (t, 2H, $J = 17,7$ Hz, H-34); 5,21 (sl, 1H, H-12); 5,14 (s, 2H, H-31); 3,70 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_a); 3,61 (tl, 1H, $J = 8,0$ Hz, H-3); 3,40 (d, 1H, $J = 10,2$ Hz, H-23_b); 2,79 (ddl, 1H, $J = 11,0$ Hz, H-18); 1,08 (s, 3H, CH_3); 0,89 (s, 3H, CH_3); 0,87 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$); 0,50 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C (CDCl_3/ppm ; 75 MHz) δ : 177,85 (O=C-28); 143,89 (=C-13); 143,66 (=C-32); 136,69 (C-35); 131,13 (C-38); 131,12 (C-36); 130,79 (C-39); 126,66 (C-40); 124,11 (=CH-12); 123,25 (C-37); 122,45 (=CH-33); 76,89 (HO-CH-3); 72,15 (HO-CH₂-23); 57,56 (O-CH₂-31); 53,47 (CH₂-34); 49,87 (CH-9); 47,62 (C-17); 46,82 (CH-5); 45,94 (CH-19); 41,88 (C-4); 41,83 (C-14); 41,38 (CH-18); 39,38 (C-8); 38,21 (CH₂-1); 36,99 (C-10); 33,91 (CH₂-21); 33,16 (CH₃-29); 32,55 (CH₂-7); 32,41 (CH₂-22); 30,75 (C-20); 27,71 (CH₂-15); 26,73 (CH₃-27); 25,92 (CH₂-2); 23,71 (CH₃-30); 23,44 (CH₂-11); 23,07 (CH₂-16); 18,60 (CH₂-6); 16,84 (CH₃-26); 15,84 (CH₃-25); 11,59 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $[\text{C}_{40}\text{H}_{57}\text{BrN}_3\text{O}_4]^+$: $m/z = 722,3532$, encontrado: $m/z = 722,3522$.

CHN: calculado: C, 66,47; H, 7,81; N, 5,81; encontrado: C, 66,32; H, 8,02; N, 5,61.

5.2.6. Dados referente ao (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de (1-(4-bromobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-metila (6d)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 111,6-112,3 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3420, 3150, 3056, 1722, 1160, 1048, 1012, 732.

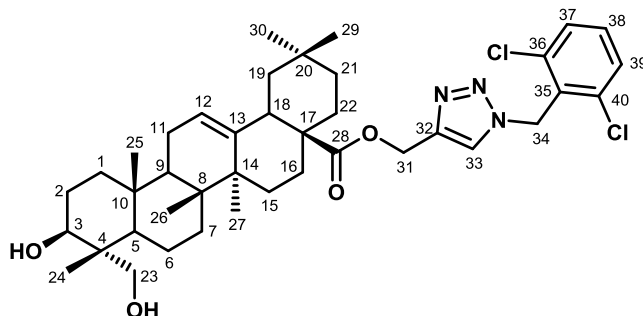
RMN de 1H ($CDCl_3$ /ppm; 300 MHz) δ : 7,48 (m, 3H, H-33, H-37, H-37'), 7,12 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz, H-36 e H-36'), 5,43 (t, 2H, $J = 13,4$ Hz, H-34), 5,21 (sl, 1H, H-12), 5,13 (s, 2H, H-31), 3,70 (d, 1H, $J = 10,2$ Hz, H-23_a), 3,61 (tl, 1H, $J = 7,9$ Hz, H-3), 3,40 (d, 1H, $J = 10,2$ Hz, H-23_b), 2,79 (ddl, 1H, $J = 13,0$ e 2,3 Hz, H-18), 1,08 (s, 3H, CH_3), 0,87 (s, 12H, 4x CH_3), 0,49 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$ /ppm; 75 MHz) δ : 177,84 (O=C-28), 143,91 (=C-13), 143,68 (=C-32), 133,53 (C-35), 132,43 (C-37), 132,43 (C-37'), 129,77 (C-36), 129,77 (C-36'), 123,96 (=CH-12), 123,16 (C-38), 122,43 (=CH-33), 76,87 (HO-CH-3), 72,12 (HO-CH₂-23), 57,57 (O-CH₂-31), 53,56 (CH₂-34), 49,86 (CH-9), 47,61 (C-17), 46,82 (CH-5), 45,93 (CH-19), 41,88 (C-4), 41,82 (C-14), 41,36 (CH-18), 39,37 (C-8), 38,20 (CH₂-1), 36,98 (C-10), 33,90 (CH₂-21), 33,15 (CH₃-29), 32,54 (CH₂-7), 32,41 (CH₂-22), 30,75 (C-20), 27,70 (CH₂-15), 26,78 (CH₃-27), 25,92 (CH₂-2), 23,69 (CH₃-30), 23,42 (CH₂-11), 23,07 (CH₂-16), 18,57 (CH₂-6), 16,85 (CH₃-26), 15,81 (CH₃-25), 11,59 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{40}H_{57}BrN_3O_4]^+$: $m/z = 722,3532$, encontrado: $m/z = 722,3526$.

CHN: calculado: C, 66,47; H, 7,81; N, 5,81; encontrado: C, 66,29; H, 7,92; N, 5,69.

5.2.7. Dados referente ao (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de (1-(2,6-diclorobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-metila (6e)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 113-114,6 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3420, 3154, 3086, 1718, 1160, 1046, 764, 732.

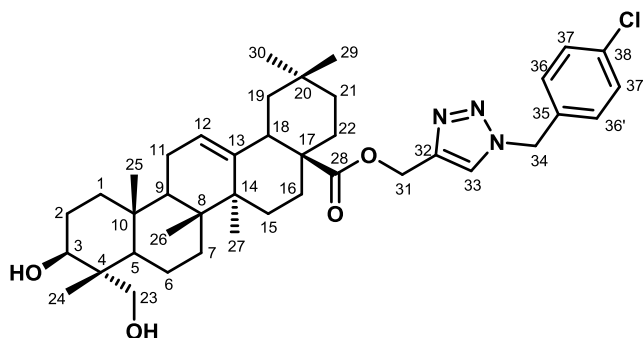
RMN de 1H ($CDCl_3$ /ppm; 300 MHz) δ : 7,49 (s, 1H, H-33), 7,38 (d, 2H, J = 7,5 Hz, H-37 e H-39); 7,30 (dl, 1H, J = 8,3 Hz, H-38); 5,81 (s, 2H, H-31); 5,20 (sl, 1H, H-12); 5,14 (d, 1H, J = 12,8 Hz, H-34_a); 5,08 (d, 1H, J = 12,6 Hz, H-34_b); 3,69 (d, 1H, J = 10,2 Hz, H-23_a); 3,61 (tl, 1H, J = 7,9 Hz, H-3); 3,38 (d, 1H, J = 10,2 Hz, H-23_b); 2,78 (ddl, 1H, J = 11,0 Hz, H-18); 1,07 (s, 3H, CH_3); 0,89 (s, 3H, CH_3); 0,86 (s, 9H, $3 \times CH_3$); 0,48 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$ /ppm; 75 MHz) δ : 177,77 (O=C-28); 143,71 (=C-13); 143,20 (=C-32); 136,91 (C-35); 131,26 (C-36); 129,96 (C-40); 129,02 (C-37); 129,02 (C-39); 129,02 (C-38); 123,77 (=CH-12); 122,41 (=CH-33); 76,83 (HO-CH-3); 72,08 (HO-CH₂-23); 57,53 (O-CH₂-31); 49,86 (CH-9); 49,16 (CH₂-34); 47,62 (C-17); 46,78 (CH-5); 45,92 (CH-19); 41,84 (C-4); 41,79 (C-14); 41,34 (CH-18); 39,34 (C-8); 38,21 (CH₂-1); 36,98 (C-10); 33,90 (CH₂-21); 33,14 (CH₃-29); 32,51 (CH₂-7); 32,40 (CH₂-22); 30,74 (C-20); 27,68 (CH₂-15); 26,70 (CH₃-27); 25,92 (CH₂-2); 23,66 (CH₃-30); 23,45 (CH₂-11); 22,99 (CH₂-16); 18,58 (CH₂-6); 16,73 (CH₃-26); 15,82 (CH₃-25); 11,59 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{40}H_{55}Cl_2N_3O_5]^+$: m/z = 712,3648, encontrado: m/z = 712,3632.

CHN: calculado para: C, 65,92; H, 7,61; N, 5,77; encontrado: C, 65,77; H, 7,81; N, 5,54.

5.2.8. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de (1-(4-clorobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-metila (6f)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 169,3-170,2 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3412, 3150, 3100, 1722, 1160, 1048, 1016.

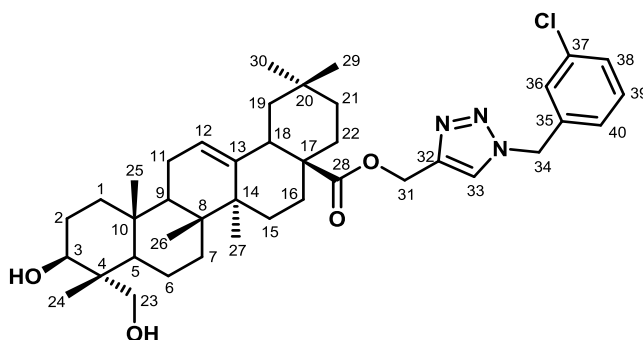
RMN de 1H ($CDCl_3/ppm$; 300 MHz) δ : 7,48 (s, 1H, H-33); 7,33 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, H-37 e H-37'); 7,19 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, H-36 e H-36'); 5,45 (t, 2H, $J = 16,6$ Hz, H-34); 5,21 (sl, 1H, H-12); 5,13 (s, 2H, H-31); 3,71 (d, 1H, $J = 10,2$ Hz, H-23a); 3,61 (tl, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-3); 3,40 (d, 1H, $J = 10,1$ Hz, H-23b); 2,78 (ddl, 1H, $J = 13,0$ Hz, H-18); 1,08 (s, 3H, CH_3); 0,87 (s, 12H, 4x CH_3); 0,49 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3/ppm$; 75 MHz) δ : 177,86 (O=C-28); 143,92 (=C-13); 143,70 (=C-32); 135,06 (C-35); 133,04 (C-38); 129,52 (C-36, C-36'); 129,49 (C-37, C-37'); 129,49 (C-37'); 123,98 (=CH-12); 122,44 (=CH-33); 76,91 (HO-CH-3); 72,18 (HO-CH₂-23); 57,60 (O-CH₂-31); 53,53 (CH₂-34); 49,87 (CH-9); 47,63 (C-17); 46,83 (CH-5); 45,95 (CH-19); 41,91 (C-4); 41,84 (C-14); 41,38 (CH-18); 39,38 (C-8); 38,21 (CH₂-1); 36,99 (C-10); 33,92 (CH₂-21); 33,16 (CH₃-29); 32,56 (CH₂-7); 32,43 (CH₂-22); 30,77 (C-20); 27,72 (CH₂-15); 26,84 (CH₃-27); 25,93 (CH₂-2); 23,69 (CH₃-30); 23,44 (CH₂-11); 23,08 (CH₂-16); 18,58 (CH₂-6); 16,85 (CH₃-26); 15,81 (CH₃-25); 11,52 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{40}H_{56}ClN_3O_4]^+$: $m/z = 678,4038$, encontrado: $m/z = 678,4029$.

CHN: calculado: C, 70,82; H, 8,32; N, 6,19; encontrado: C, 70,59; H, 8,42; N, 6,07.

5.2.9. Dados referente ao (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de (1-(3-clorobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-metila (6g)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 111,9-113,3 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3412, 3148, 3083, 1722, 1160, 1048, 1008, 772, 734.

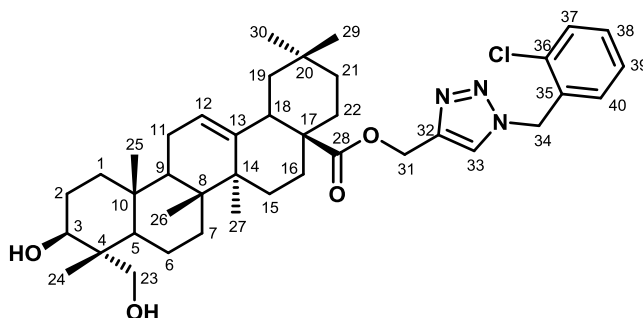
RMN de ^1H (CDCl_3/ppm ; 300 MHz) δ : 7,51 (s, 1H, H-33); 7,27 (m, 3H, H-36, H-38, H-39); 7,12 (d, 1H, $J = 6,6$ Hz, H-40); 5,45 (t, 2H, $J = 16,2$ Hz, H-34); 5,21 (sl, 1H, H-12); 5,13 (s, 2H, H-31); 3,70 (d, 1H, $J = 10,5$ Hz, H-23a); 3,61 (tl, 1H, $J = 7,6$ Hz, H-3); 3,39 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23b); 2,79 (ddl, 1H, $J = 13,7$ Hz, H-18); 1,08 (s, 3H, CH_3); 0,89 (s, 3H, CH_3); 0,86 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$); 0,50 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C (CDCl_3/ppm ; 75 MHz) δ : 177,84 ($\text{O}=\text{C}-28$); 143,92 ($=\text{C}-13$); 143,65 ($=\text{C}-32$); 136,44 ($\text{C}-35$); 135,17 ($\text{C}-37$); 130,52 ($\text{C}-39$); 129,18 ($\text{C}-36$); 128,20 ($\text{C}-38$); 126,18 ($\text{C}-40$); 124,12 ($=\text{CH}-12$); 122,44 ($=\text{CH}-33$); 76,85 ($\text{HO}-\text{CH}-3$); 72,09 ($\text{HO}-\text{CH}_2-23$); 57,54 ($\text{O}-\text{CH}_2-31$); 53,85 (CH_2-34); 49,85 ($\text{CH}-9$); 47,60 ($\text{C}-17$); 46,81 ($\text{CH}-5$); 45,92 ($\text{CH}-19$); 41,86 ($\text{C}-4$); 41,82 ($\text{C}-14$); 41,36 ($\text{CH}-18$); 39,37 ($\text{C}-8$); 38,20 (CH_2-1); 36,98 ($\text{C}-10$); 33,89 (CH_2-21); 33,14 (CH_3-29); 32,54 (CH_2-7); 32,40 (CH_2-22); 30,74 ($\text{C}-20$); 27,69 (CH_2-15); 26,74 (CH_3-27); 25,91 (CH_2-2); 23,69 (CH_3-30); 23,42 (CH_2-11); 23,05 (CH_2-16); 18,58 (CH_2-6); 16,82 (CH_3-26); 15,82 (CH_3-25); 11,58 (CH_3-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $[\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{ClN}_3\text{O}_4]^+$: $m/z = 678,4038$, encontrado: $m/z = 678,4033$.

CHN: calculado: C, 70,82; H, 8,32; N, 6,19; encontrado: C, 70,64; H, 8,47; N, 6,03.

5.2.10. Dados referente ao (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de (1-(2-clorobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-metila (6h)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 108,6-110,2 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3410, 3156, 3072, 1724, 1160, 1048, 1008, 752.

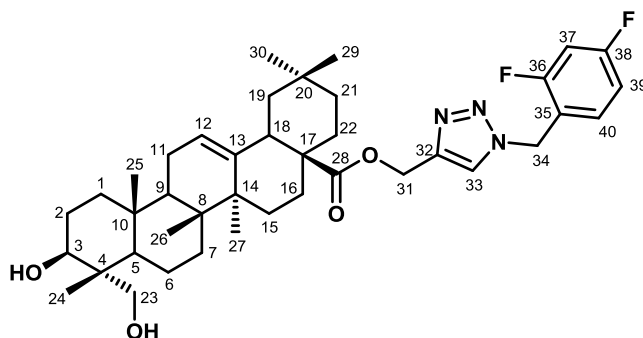
RMN de 1H ($CDCl_3$ /ppm; 300 MHz) δ : 7,56 (s, 1H, H-33); 7,42 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz, H-37); 7,25 (m, 3H, H-38, H-39 e H-40); 5,62 (t, 2H, $J = 16,0$ Hz H-34); 5,22 (sl, 1H, H-12); 5,14 (s, 2H, H-31); 3,71 (d, 1H, $J = 10,1$ Hz, H-23_a); 3,62 (tl, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-3); 3,40 (d, 1H, $J = 10,2$ Hz, H-23_b); 2,80 (ddl, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-18); 1,08 (s, 3H, CH_3); 0,90 (s, H, CH_3); 0,87 (s, 9H, $3 \times CH_3$); 0,53 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$ /ppm; 75 MHz) δ : 177,79 (O=C-28); 143,70 (=C-13); 143,64 (=C-32); 133,71 (C-35); 132,33 (C-36); 130,59 (C-40); 130,48 (C-37); 130,11 (C-38); 127,72 (C-39); 124,27 (=CH-12); 122,46 (=CH-33); 76,92 (HO-CH-3); 72,19 (HO-CH₂-23); 57,61 (O-CH₂-31); 51,56 (CH₂-34); 49,88 (CH-9); 47,65 (C-17); 46,82 (CH-5); 45,96 (CH-19); 41,91 (C-4); 41,83 (C-14); 41,38 (CH-18); 39,39 (C-8); 38,22 (CH₂-1); 37,01 (C-10); 33,93 (CH₂-21); 33,17 (CH₃-29); 32,55 (CH₂-7); 32,42 (CH₂-22); 30,77 (C-20); 27,73 (CH₂-15); 26,83 (CH₃-27); 25,94 (CH₂-2); 23,71 (CH₃-30); 23,47 (CH₂-11); 23,06 (CH₂-16); 18,61 (CH₂-6); 16,86 (CH₃-26); 15,83 (CH₃-25); 11,56 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{40}H_{56}ClN_3O_4]^+$: $m/z = 678,4038$, encontrado: $m/z = 678,4026$.

CHN: calculado: C, 70,82; H, 8,32; N, 6,19; encontrado: C, 70,69; H, 8,58; N, 6,09.

5.2.11. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de (1-(2,4 difluorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-metila (6i)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 104,5-106,2 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3420, 3154, 3084, 1724, 1508, 1160, 1048, 972, 732.

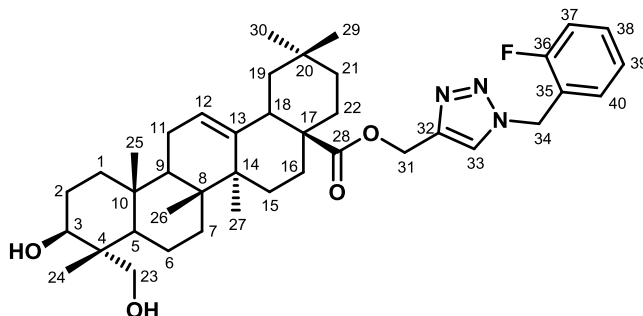
RMN de ^1H (CDCl_3/ppm ; 300 MHz) δ : 7,56 (s, 1H, H-33); 7,28 (m, 1H, H-40); 6,87 (m, 2H, H-37, H-39); 5,49 (t, 2H, $J=15,1$ Hz, H-34); 5,22 (sl, 1H, H-12); 5,12 (s, 2H, H-31); 3,69 (d, 1H, $J=10,2$ Hz, H-23_a); 3,61 (tl, 1H, $J=7,9$ Hz, H-3); 3,39 (d, 1H, $J=10,2$ Hz, H-23_b); 2,79 (ddl, 1H, $J=13,1$ Hz, H-18); 1,08 (s, 3H, CH_3); 0,89 (s, 3H, CH_3); 0,86 (s, 9H, $3\times\text{CH}_3$); 0,48 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C (CDCl_3/ppm ; 75 MHz) δ : 177,82 ($\text{O}=\text{C}-28$); 163,47 (dd, $J=250,3, 11,9$ Hz, C-38); 160,85 (dd, $J=248,9, 11,7$ Hz, C-36); 143,81 ($=\text{C}-13$); 143,66 ($=\text{C}-32$); 131,83 (dd, $J=9,8$ e $4,7$ Hz, C-40); 124,08 ($=\text{CH}-12$); 122,46 ($=\text{CH}-33$); 117,92 (dd, $J=15,0, 4,0$ Hz, C-35); 112,31 (dd, $J=21,2, 3,6$ Hz, C-39); 104,54 (t, $J=25,2$ Hz, C-37); 76,81 ($\text{HO}-\text{CH}-3$); 72,04 ($\text{HO}-\text{CH}_2-23$); 57,51 ($\text{O}-\text{CH}_2-31$); 49,84 (CH-9); 47,61 (C-17); 47,23 (d, $J=3,6$ Hz, CH_2-34); 46,81 (CH-5); 45,93 (CH-19); 41,86 (C-4); 41,81 (C-14); 41,36 (CH-18); 39,35 (C-8); 38,21 (CH_2-1); 36,97 (C-10); 33,91 (CH_2-21); 33,14 (CH_3-29); 32,54 (CH_2-7); 32,41 (CH_2-22); 30,74 (C-20); 27,69 (CH_2-15); 26,72 (CH_3-27); 25,92 (CH_2-2); 23,67 (CH_3-30); 23,43 (CH_2-11); 23,05 (CH_2-16); 18,55 (CH_2-6); 16,75 (CH_3-26); 15,78 (CH_3-25); 11,57 (CH_3-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $[\text{C}_{40}\text{H}_{55}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_4]^+$: $m/z = 680,4239$, encontrado: $m/z = 680,4233$.

CHN: calculado: C, 76,03; H, 8,77; N, 6,65; encontrado: C, 75,85; H, 8,91; N, 6,47.

5.2.12. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de (1-(2-fluorobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-metila (6j)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 142,3-143,6 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{\text{max}}$ /cm⁻¹): 3412, 3150, 3098, 1732, 1234, 1158, 758.

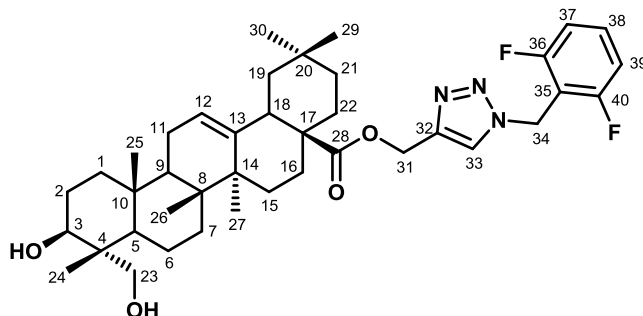
RMN de ¹H (CDCl₃/ppm; 300 MHz) δ : 7,56 (s, 1H, H-33); 7,35 (m, 1H, H-40); 7,26 (m, 1H, H-38); 7,11 (m, 2H, H-37 e H-39); 5,54 (t, 2H, *J* = 15,5 Hz, H-34); 5,22 (sl, 1H, H-12); 5,13 (s, 2H, H-31); 3,70 (d, 1H, *J* = 10,3 Hz, H-23_a); 3,61 (tl, 1H, *J* = 7,9 Hz, H-3); 3,39 (d, 1H, *J* = 10,2 Hz, H-23_b); 2,79 (ddl, 1H, *J* = 12,6 Hz, H-18); 1,08 (s, 3H, CH₃); 0,90 (s, 3H, CH₃); 0,87 (s, 9H, 3xCH₃); 0,50 (s, 3H, CH₃).

RMN de ¹³C (CDCl₃/ppm; 75 MHz) δ : 177,79 (O=C-28); 160,67 (d, *J* = 246,6 Hz, C-36); 143,70 (=C-13); 143,67 (=C-32); 131,14 (d, *J* = 32,6 Hz, C-40); 130,74 (d, *J* = 3,8 Hz, C-38); 124,69 (d, *J* = 3,6 Hz, C-35); 124,12 (=CH-12); 122,46 (=CH-33); 121,76 (d, *J* = 14,5 Hz, C-39); 115,98 (d, *J* = 20,9 Hz, C-37); 76,86 (HO-CH-3); 72,10 (HO-CH₂-23); 57,51 (O-CH₂-31); 49,86 (CH-9); 47,63 (C-17); 47,23 (d, *J* = 3,6 Hz, CH₂-34); 46,80 (CH-5); 45,93 (CH-19); 41,87 (C-4); 41,87 (C-14); 41,36 (CH-18); 39,36 (C-8); 38,22 (CH₂-1); 36,98 (C-10); 33,91 (CH₂-21); 33,15 (CH₃-29); 32,53 (CH₂-7); 32,39 (CH₂-22); 30,75 (C-20); 27,69 (CH₂-15); 26,75 (CH₃-27); 25,92 (CH₂-2); 23,60 (CH₃-30); 23,43 (CH₂-11); 23,05 (CH₂-16); 18,58 (CH₂-6); 16,77 (CH₃-26); 15,80 (CH₃-25); 11,58 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): [M+H]⁺ calculado para [C₄₀H₅₆FN₃O₄]⁺: *m/z* = 662,4333, encontrado: *m/z* = 662,4325.

CHN: calculado: C, 72,58; H, 8,53; N, 6,35; encontrado: C, 70,46; H, 8,60; N, 6,03.

5.2.13. Dados referente ao (3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de (1-(2,6-difluorobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-metila (6k)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 108,6-110,1 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3418, 3150, 3074, 1724, 1628, 1160, 1036, 802, 734.

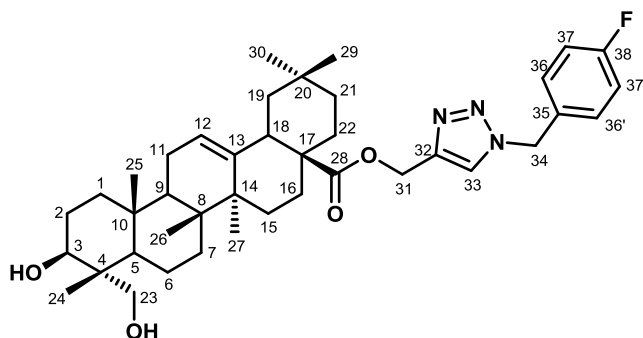
RMN de 1H ($CDCl_3$ /ppm; 300 MHz) δ : 7,57 (s, 1H, H-33); 7,36 (m, 1H, H-38); 6,96 (tl, 2H, J = 7,7 Hz, H-37, H-39); 5,58 (t, 2H, J = 15,6 Hz, H-34); 5,22 (sl, 1H, H-12); 5,12 (s, 2H, H-31); 3,70 (d, 1H, J = 10,1 Hz, H-23_a); 3,61 (tl, 1H, J = 7,8 Hz, H-3); 3,39 (d, 1H, J = 10,2 Hz, H-23_b); 2,80 (ddl, 1H, J = 12,7 Hz, H-18); 1,08 (s, 3H, CH_3); 0,90 (s, 3H, CH_3); 0,87 (s, 9H, 3x CH_3); 0,49 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$ /ppm; 75 MHz) δ : 177,80 (O=C-28 éster); 161,48 (dd, J = 249,2 e 6,8 Hz, C-36 e C-40); 143,69 (=C-13); 143,56 (=C-32); 131,64 (t, J = 10,1 Hz, C-38); 124,01 (=CH-12); 122,46 (=CH-33); 111,96 (m, C-37, C-39); 110,67 (t, J = 18,5 Hz, C-35); 76,91 (HO-CH-3); 72,17 (HO-CH₂-23); 57,52 (O-CH₂-31); 49,89 (CH-9); 47,64 (C-17); 46,80 (CH-5); 45,96 (CH-19); 41,87 (C-4); 41,81 (C-14); 41,49 (t, J = 4 Hz, CH₂-34); 41,37 (CH-18); 39,36 (C-8); 38,22 (CH₂-1); 36,99 (C-10); 33,92 (CH₂-21); 33,16 (CH₃-29); 32,54 (CH₂-7); 32,41 (CH₂-22); 30,76 (C-20); 27,69 (CH₂-15); 26,77 (CH₃-27); 25,93 (CH₂-2); 23,69 (CH₃-30); 23,44 (CH₂-11); 23,05 (CH₂-16); 18,58 (CH₂-6); 16,67 (CH₃-26); 15,79 (CH₃-25); 11,57 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{40}H_{55}F_2N_3O_4]^+$: m/z = 680,4239 encontrado: m/z = 680,4232.

CHN: calculado: C, 76,03; H, 8,77; N, 6,65; encontrado: C, 75,87; H, 8,91; N, 6,50.

5.2.14. Dados referente ao (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de (1-(4-fluorobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-metila (6I)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 111,3-112,6 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3420, 3152, 3080, 1722, 1512, 1228, 1160, 1048, 732.

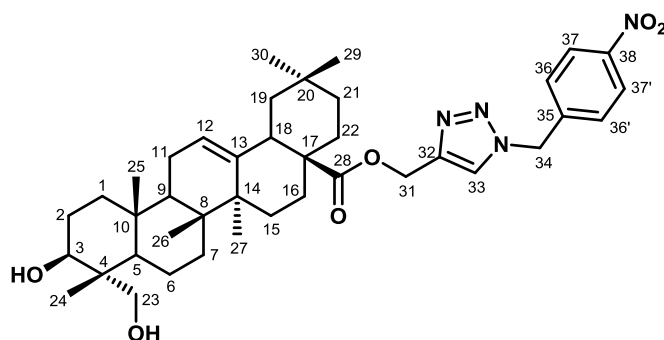
RMN de ^1H (CDCl_3/ppm ; 300 MHz) δ : 7,47 (s, 1H, H-33); 7,25 (m, 2H, H-36, H-36'); 7,04 (m, 2H, H-37, H-37'); 5,48 (d, 1H, $J = 15,0$ Hz, H-34_a); 5,42 (d, 1H, $J = 15,0$ Hz, H-34_b); 5,21 (t, 1H, $J = 2,9$ Hz, H-12); 5,12 (s, 2H, H-31); 3,70 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_a); 3,61 (tl, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-3); 3,39 (d, 1H, $J = 10,2$ Hz, H-23_b); 2,78 (dd, 1H, $J = 13,8$ e 3,8 Hz, H-18); 1,07 (s, 3H, CH₃); 0,89 (s, 3H, CH₃); 0,87 (s, 3H, CH₃); 0,86 (s, 6H, 2xCH₃); 0,48 (s, 3H, CH₃).

RMN de ^{13}C (CDCl_3/ppm ; 75 MHz) δ : 177,85 (O=C-28); 162,99 (d, $J = 246,8$ Hz, C-38); 144,26 (=C-13); 143,65 (=C-32); 130,38 (d, $J = 3,0$ Hz, C-35); 130,11 (d, $J = 8,1$ Hz, C-36, C-36'); 124,42 (=CH-12); 122,47 (=CH-33); 116,28 (d, $J = 21,7$ Hz, C-37, C-37'); 76,85 (HO-CH-3); 72,12 (HO-CH₂-23); 57,50 (O-CH₂-31); 53,20 (CH₂-34); 49,85 (CH-9); 47,61 (C-17); 46,81 (CH-5); 45,93 (CH-19); 41,88 (C-4); 41,82 (C-14); 41,36 (CH-18); 39,36 (C-8); 38,20 (CH₂-1); 36,98 (C-10); 33,91 (CH₂-21); 33,14 (CH₃-29); 32,54 (CH₂-7); 32,41 (CH₂-22); 30,70 (C-20); 27,70 (CH₂-15); 26,77 (CH₃-27); 25,91 (CH₂-2); 23,67 (CH₃-30); 23,43 (CH₂-11); 23,06 (CH₂-16); 18,56 (CH₂-6); 16,81 (CH₃-26); 15,81 (CH₃-25); 11,55 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $[\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{FN}_3\text{O}_4]^+$: $m/z = 662,4333$, encontrado: $m/z = 662,4327$.

CHN: calculado: C, 72,58; H, 8,53; N, 6,35; encontrado: C, 72,40; H, 8,68; N, 6,09.

5.2.15. Dados referente ao (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de (1-(4-nitrobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-metila (6m)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 183,6-184,8 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{\text{max}}$ /cm⁻¹): 3404, 3152, 3086, 1720, 1526, 1162, 1054, 1038 802.

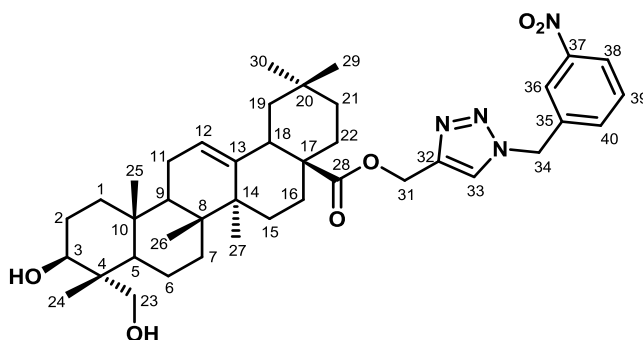
RMN de ¹H (CDCl₃/ppm; 300 MHz) δ : 8,22 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz, H-37, H-37'); 7,58 (s, 1H, H-33); 7,39 (d, 2H, *J* = 8,3 Hz, H-36, H-36'); 5,61 (t, 2H, *J* = 16,6 Hz, H-34); 5,23 (sl, 1H, H-12); 5,16 (s, 2H, H-31); 3,70 (d, 1H, *J* = 10,3 Hz, H-23_a); 3,61 (tl, 1H, *J* = 8,1 Hz, H-3); 3,40 (d, 1H, *J* = 10,2 Hz, H-23_b); 2,79 (ddl, 1H, *J* = 13,4 Hz, H-18); 1,08 (s, 3H, CH₃); 0,87 (s, 12H, 4xCH₃); 0,50 (s, 3H, CH₃).

RMN de ¹³C (CDCl₃/ppm; 75 MHz) δ : 177,92 (O=C-28); 148,23 (C-38); 144,26 (=C-13); 143,65 (=C-32); 141,59 (C-35); 128,72 (C-36 e C-36'); 124,44 (C-37); 124,42 (C-37'); 124,42 (=CH-12); 122,47 (=CH-33); 76,85 (HO-CH-3); 72,12 (HO-CH₂-23); 57,50 (O-CH₂-31); 53,20 (CH₂-34); 49,81 (CH-9); 47,61 (C-17); 46,86 (CH-5); 45,93 (CH-19); 41,89 (C-4); 41,85 (C-14); 41,39 (CH-18); 39,39 (C-8); 38,20 (CH₂-1); 36,98 (C-10); 33,92 (CH₂-21); 33,16 (CH₃-29); 32,57 (CH₂-7); 32,46 (CH₂-22); 30,76 (C-20); 27,72 (CH₂-15); 26,81 (CH₃-27); 25,91 (CH₂-2); 23,67 (CH₃-30); 23,45 (CH₂-11); 23,10 (CH₂-16); 18,56 (CH₂-6); 16,88 (CH₃-26); 15,82 (CH₃-25); 11,53 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): [M+H]⁺ calculado para [C₄₀H₅₆N₄O₆]⁺: *m/z* = 689,4278, encontrado: *m/z* = 689,4269.

CHN: calculado: C, 69,74; H, 8,19; N, 8,13; encontrado: C, 69,51; H, 8,35; N, 8,00.

5.2.16. Dados referente ao (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de (1-(3-nitrobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-metila (6n)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 152,7-153,9 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3404, 3156, 3092, 1718, 1534, 1174, 1158, 1048, 728.

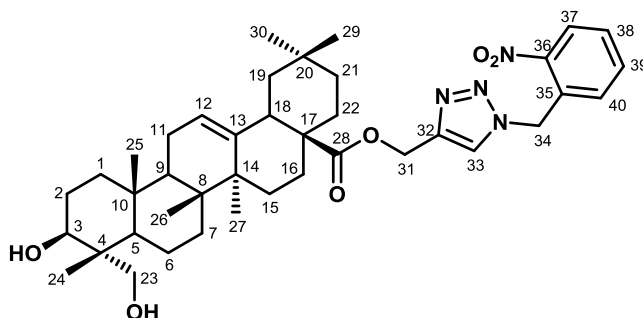
RMN de 1H ($CDCl_3/ppm$; 300 MHz) δ : 8,21 (m, 1H, H-38); 8,13 (sl, 1H, H-36); 7,59 (s, 1H, H-33); 7,56 (m, 2H, H-39, H-40); 5,63 (d, 1H, $J = 15,3$ Hz, H-34_a); 5,57 (d, 1H, $J = 15,3$ Hz, H-34_b); 5,22 (t, 1H, $J = 3,0$ Hz, H-12); 5,15 (s, 2H, H-31); 3,69 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_a); 3,60 (tl, 1H, $J = 8,6$ Hz, H-3); 3,39 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_b); 2,79 (dd, 1H, $J = 13,6$ e $3,7$ Hz, H-18); 1,08 (s, 3H, CH_3); 0,88 (s, 3H, CH_3); 0,86 (s, 9H, $3 \times CH_3$); 0,50 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3/ppm$; 75 MHz) δ : 177,89 (O=C-28); 148,67 (C-37); 144,19 (=C-13); 142,63 (=C-32); 136,66 (C-35); 133,96 (C-40); 130,42 (C-39); 124,31 (=CH-12); 123,94 (C-36); 122,95 (C-38); 122,46 (=CH-33); 76,86 (HO-CH-3); 72,10 (HO-CH₂-23); 57,49 (O-CH₂-31); 53,20 (CH₂-34); 49,83 (CH-9); 47,59 (C-17); 46,83 (CH-5); 45,91 (CH-19); 41,87 (C-4); 41,82 (C-14); 41,38 (CH-18); 39,37 (C-8); 38,19 (CH₂-1); 36,97 (C-10); 33,89 (CH₂-21); 33,13 (CH₃-29); 32,55 (CH₂-7); 32,42 (CH₂-22); 30,74 (C-20); 27,70 (CH₂-15); 26,77 (CH₃-27); 25,91 (CH₂-2); 23,66 (CH₃-30); 23,42 (CH₂-11); 23,07 (CH₂-16); 18,56 (CH₂-6); 16,85 (CH₃-26); 15,80 (CH₃-25); 11,56 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{40}H_{56}N_4O_6]^+$: $m/z = 689,4278$, encontrado: $m/z = 689,4269$.

CHN: calculado: C, 69,74; H, 8,19; N, 8,13; encontrado: C, 69,54; H, 8,33; N, 8,04.

5.2.17. Dados referente ao (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de (1-(2-nitrobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-metila (6o)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 123,8-125,3 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3046, 3158, 3060, 1722, 1530, 1160, 1048, 1004, 728.

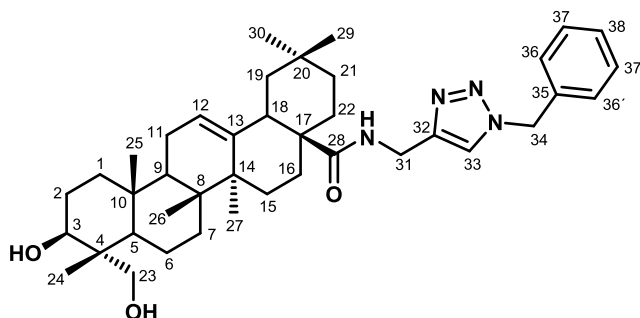
RMN de 1H ($CDCl_3$ /ppm; 300 MHz) δ : 8,14 (dd, 1H, $J = 7,9, 1,3$ Hz, H-37); 7,71 (s, 1H, H-33); 7,60 (td, 2H, $J = 7,4$ e $1,3$ Hz, H-38); 7,53 (td, 2H, $J = 7,4, 1,3$ Hz, H-39); 7,07 (dd, 1H, $J = 7,6, 1,3$ Hz, H-40); 5,90 (s, 2H, H-34); 5,24 (t, 1H, $J = 3,1$ Hz, H-12); 5,17 (s, 2H, H-31); 3,70 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_a); 3,61 (tl, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-3); 3,40 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_b); 2,81 (dd, 1H, $J = 13,8$ e $3,8$ Hz, H-18); 1,09 (s, 3H, CH_3); 0,90 (s, 3H, CH_3); 0,87 (s, 9H, $3 \times CH_3$); 0,55 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$ /ppm; 75 MHz) δ : 177,77 (O=C-28); 147,59 (C-36); 143,90 (=C-13); 143,64 (=C-32); 134,43 (C-35); 130,53 (C-39); 130,51 (C-40); 129,88 (C-38); 125,55 (C-37); 125,04 (=CH-12); 122,52 (=CH-33); 76,89 (HO-CH-3); 72,13 (HO-CH₂-23); 57,55 (O-CH₂-31); 50,94 (CH₂-34); 49,86 (CH-9); 47,64 (C-17); 46,84 (CH-5); 45,92 (CH-19); 41,89 (C-4); 41,83 (C-14); 41,39 (CH-18); 39,40 (C-8); 38,21 (CH₂-1); 37,00 (C-10); 33,92 (CH₂-21); 33,16 (CH₃-29); 32,55 (CH₂-7); 32,44 (CH₂-22); 30,77 (C-20); 27,73 (CH₂-15); 26,80 (CH₃-27); 25,94 (CH₂-2); 23,71 (CH₃-30); 23,45 (CH₂-11); 23,07 (CH₂-16); 18,59 (CH₂-6); 16,92 (CH₃-26); 15,81 (CH₃-25); 11,56 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{40}H_{56}N_4O_6]^+$: $m/z = 689,4278$, encontrado: $m/z = 689,4270$.

CHN: calculado: C, 69,74; H, 8,19; N, 8,13; encontrado: C, 69,63; H, 8,40; N, 8,02.

5.2.18. Dados referente ao (benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7a)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 124,8-126,3 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3402, 3150, 3066, 1722, 1636, 1520, 1048, 724.

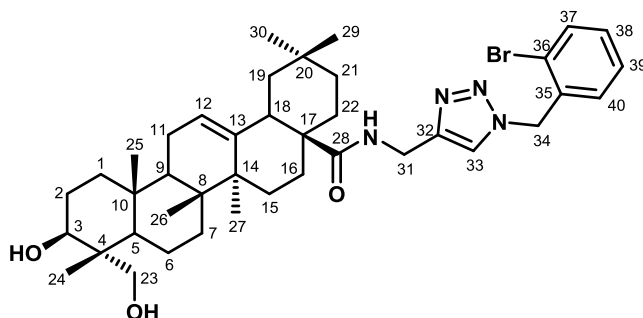
RMN de 1H ($CDCl_3$ /ppm; 300 MHz) δ : 7,46 (s, 1H, H-33); 7,33 (m, 3H); 7,26 (m, 2H); 6,61 (t, 1H, $J = 4,7$ Hz, N-H); 5,49 (d, 1H, $J = 14,8$ Hz, H-34_a); 5,42 (d, 1H, $J = 14,8$ Hz, H-34_b); 5,35 (sl, 1H, H-12); 4,45 (dd, 1H, $J = 5,3, 15,0$ Hz, H-31_a); 4,31 (dd, 1H, $J = 5,1, 14,9$ Hz, H-31_b); 3,68 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_a); 3,61 (tl, 1H, $J = 7,9$ Hz, H-3); 3,38 (d, 1H, $J = 10,2$ Hz, H-23_b); 2,51 (ddl, 1H, $J = 11,1$ Hz, H-18); 1,10 (s, 3H, CH_3); 0,87 (s, 6H, $2 \times CH_3$); 0,86 (s, 6H, $2 \times CH_3$); 0,44 (s, H, CH_3).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$ /ppm; 75 MHz) δ : 178,56 (O=C-28); 145,17 (=C-13); 144,28 (=C-32); 134,60 (C-35); 129,19 (C-37); 129,19 (C-37'); 128,89 (C-38); 128,19 (C-36'); 128,19 (C-36); 123,27 (=CH-12); 122,55 (=CH-33); 76,63 (HO-CH-3); 71,84 (HO-CH₂-23); 54,28 (CH₂-34); 49,68 (CH-9); 47,59 (C-17); 46,72 (CH-5); 46,32 (CH-19); 42,08 (C-4); 42,06 (C-14); 41,89 (CH-18); 39,37 (C-8); 38,26 (CH₂-1); 36,91 (C-10); 35,14 (NH-CH₂-31); 34,19 (CH₂-21); 33,08 (CH₃-29); 32,55 (CH₂-7); 32,20 (CH₂-22); 30,80 (C-20); 27,30 (CH₂-15); 26,69 (CH₃-27); 25,85 (CH₂-2); 23,92 (CH₃-30); 23,68 (CH₂-11); 23,52 (CH₂-16); 18,52 (CH₂-6); 16,61 (CH₃-26); 15,87 (CH₃-25); 11,62 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{40}H_{58}N_4O_3]^+$: $m/z = 643,4587$, encontrado: $m/z = 643,4578$.

CHN: calculado: C, 74,73; H, 9,09; N, 8,71; encontrado: C, 74,51; H, 9,23; N, 8,55.

5.2.19. Dados referente ao (2-bromobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7b)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 128,3-130,2 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3386, 3150, 3070, 1720, 1636, 1522, 1046, 1030, 748, 732.

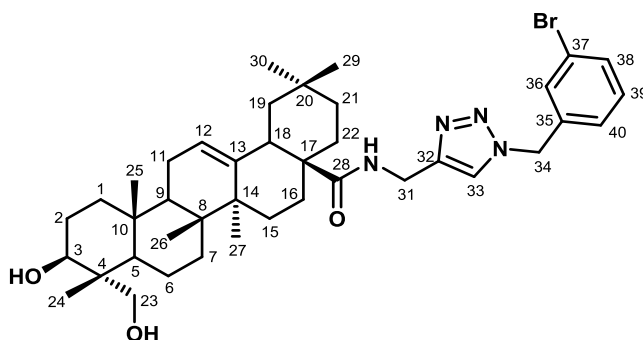
RMN de 1H ($CDCl_3$ /ppm; 300 MHz) δ : 7,58 (d, 1H, J = 8,0 Hz, H-37); 7,56 (sl, 1H, H-33); 7,22 (m, 3H, H-38, H-39, H-40); 6,62 (t, 1H, J = 6,3 Hz, N-H); 5,59 (s, 2H, H-34); 5,36 (sl, 1H, H-12); 4,47 (dd, 1H, J = 5,3, 14,8 Hz, H-31_a); 4,32 (dd, 1H, J = 4,8 e 14,7 Hz, H-31_b); 3,68 (d, 1H, J = 9,9 Hz, H-23_a); 3,60 (tl, 1H, J = 7,9 Hz, H-3); 3,37 (d, 1H, J = 10,2 Hz, H-23_b); 2,51 (ddl, 1H, J = 11,2 Hz, H-18); 1,10 (s, 3H, CH_3); 0,86 (s, 6H, $2 \times CH_3$); 0,85 (s, 6H, $2 \times CH_3$); 0,46 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$ /ppm; 75 MHz) δ : 178,55 (O=C-28); 145,05 (=C-13); 144,29 (=C-32); 134,10 (C-35); 133,36 (C-37); 130,56 (C-40); 130,56 (C-39); 128,25 (C-38); 123,68 (C-36); 123,26 (=CH-12); 122,97 (=CH-33); 76,60 (HO-CH-3); 71,80 (HO-CH₂-23); 53,93 (CH₂-34); 49,67 (CH-9); 47,58 (C-17); 46,71 (CH-5); 46,32 (CH-19); 42,06 (C-4); 42,06 (C-14); 41,88 (CH-18); 39,37 (C-8); 38,25 (CH₂-1); 36,90 (C-10); 35,12 (NH-CH₂-31); 34,20 (CH₂-21); 33,08 (CH₃-29); 32,56 (CH₂-7); 32,20 (CH₂-22); 30,79 (C-20); 27,32 (CH₂-15); 26,66 (CH₃-27); 25,85 (CH₂-2); 23,91 (CH₃-30); 23,68 (CH₂-11); 23,53 (CH₂-16); 18,53 (CH₂-6); 16,62 (CH₃-26); 15,87 (CH₃-25); 11,63 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{40}H_{57}BrN_4O_3]^+$: m/z = 721,3672, encontrado: m/z = 721,3679.

CHN: calculado: C, 66,56; H, 7,96; N, 7,76; encontrado: C, 66,39; H, 8,11; N, 7,59.

5.2.20. Dados referente ao (3-bromobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7c)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 123,6-125,2 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3394, 3148, 3064, 1730, 1636, 1519, 1240, 1048, 770, 734.

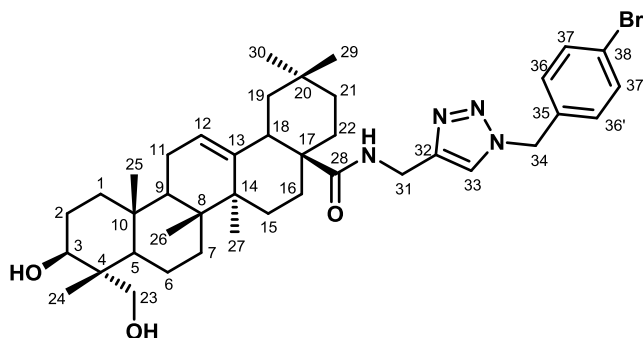
RMN de ^1H (CDCl_3/ppm ; 300 MHz) δ : 7,51 (s, 1H, H-33); 7,46 (d, 1H, $J = 7,3$ Hz, H-38); 7,40 (s, 1H, H-36); 7,22 (m, 2H, H-39, H-40); 6,61 (t, 1H, $J = 4,7$ Hz, N-H); 5,47 (d, 1H, $J = 15,0$ Hz, H-34_a); 5,39 (d, 1H, $J = 16,3$ Hz, H-34_b); 5,36 (sl, 1H, H-12); 4,46 (dd, 1H, $J = 5,1$ e $15,0$ Hz, H-31_a); 4,33 (dd, 1H, $J = 5,1$ e 15 Hz, H-31_b); 3,69 (d, 1H, $J = 10,1$ Hz, H-23_a); 3,61 (tl, 1H, $J = 8,0$ Hz, H-3); 3,39 (d, 1H, $J = 10,2$ Hz, H-23_b); 2,52 (ddl, 1H, $J = 11,6$ Hz, H-18); 1,11 (s, 3H, CH_3); 0,86 (s, 12H, 4x CH_3); 0,44 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C (CDCl_3/ppm ; 75 MHz) δ : 178,65 (O=C-28); 145,44 (=C-13); 144,31 (=C-32); 136,83 (C-35); 132,06 (C-38); 131,15 (C-36); 130,72 (C-39); 126,71 (C-40); 123,20 (C-37); 123,27 (=CH-12); 122,72 (=CH-33); 76,73 (HO-CH-3); 71,93 (HO-CH₂-23); 53,47 (CH₂-34); 49,71 (CH-9); 47,59 (C-17); 46,73 (CH-5); 46,34 (CH-19); 42,12 (C-4); 42,08 (C-14); 41,90 (CH-18); 39,38 (C-8); 38,25 (CH₂-1); 36,91 (C-10); 35,16 (NH-CH₂-31); 34,20 (CH₂-21); 33,09 (CH₃-29); 32,57 (CH₂-7); 32,24 (CH₂-22); 30,81 (C-20); 27,32 (CH₂-15); 26,74 (CH₃-27); 25,86 (CH₂-2); 23,96 (CH₃-30); 23,69 (CH₂-11); 23,53 (CH₂-16); 18,56 (CH₂-6); 16,63 (CH₃-26); 15,87 (CH₃-25); 11,61 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $[\text{C}_{40}\text{H}_{57}\text{BrN}_4\text{O}_3]^+$: $m/z = 721,3672$, encontrado: $m/z = 721,3686$.

CHN: calculado: C, 66,56; H, 7,96; N, 7,76; encontrado: C, 66,44; H, 8,14; N, 7,51.

5.2.21. Dados referente ao (4-bromobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7d)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 143,6-145,2 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3414, 3150, 1636, 1048, 1012.

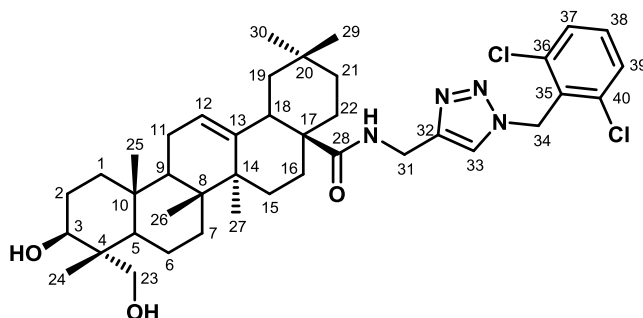
RMN de 1H ($CDCl_3$ /ppm; 300 MHz) δ : 7,50 (s, 1H, H-33); 7,47 (d, 2H, J = 8,2 Hz, H-37, H-37'); 7,13 (d, 2H, J = 8,1 Hz, H-36 e H-36'); 6,60 (t, 1H, J = 5,1 Hz, N-H); 5,45 (d, 1H, J = 15 Hz, H-34_a); 5,37 (d, 1H, J = 14,3 Hz, H-34_b); 5,34 (sl, 1H, H-12); 4,44 (dd, 1H, J = 5,3, 15,0 Hz, H-31_a); 4,32 (dd, 1H, J = 5,2, 15 Hz, H-31_b); 3,69 (d, 1H, J = 10,2 Hz, H-23_a); 3,61 (tl, 1H, J = 7,0 Hz, H-3); 3,38 (d, 1H, J = 10,3 Hz, H-23_b); 2,50 (ddl, 1H, J = 11,0 Hz, H-18); 1,10 (s, 3H, CH_3); 0,86 (s, 12H, 4x CH_3); 0,41 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$ /ppm; 75 MHz) δ : 178,67 (O=C-NH-28); 145,39 (=C-13); 144,31 (=C-32); 133,69 (C-35); 132,36 (C-37); 132,36 (C-37'); 129,82 (C-36); 129,82 (C-36'); 123,26 (=CH-12); 123,08 (C-38); 122,68 (=CH-33); 76,68 (HO-CH-3); 71,90 (HO-CH₂-23); 53,55 (CH₂-34); 49,69 (CH-9); 47,57 (C-17); 46,73 (CH-5); 46,33 (CH-19); 42,09 (C-4); 42,06 (C-14); 41,90 (CH-18); 39,35 (C-8); 38,25 (CH₂-1); 36,90 (C-10); 35,16 (NH-CH₂-31); 34,19 (CH₂-21); 33,07 (CH₃-29); 32,56 (CH₂-7); 32,21 (CH₂-22); 30,80 (C-20); 27,29 (CH₂-15); 26,72 (CH₃-27); 25,84 (CH₂-2); 23,95 (CH₃-30); 23,66 (CH₂-11); 23,52 (CH₂-16); 18,49 (CH₂-6); 16,62 (CH₃-26); 15,86 (CH₃-25); 11,63 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{40}H_{58}BrN_4O_3]^+$: m/z = 721,3672, encontrado: m/z = 721,3689.

CHN: calculado: C, 66,56; H, 7,96; N, 7,76; encontrado: C, 66,31; H, 8,10; N, 7,61.

5.2.22. Dados referente ao (2,6-diclorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7e)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 144,8-146,3 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3404, 3150, 3078, 1636, 1520, 1048, 764, 732.

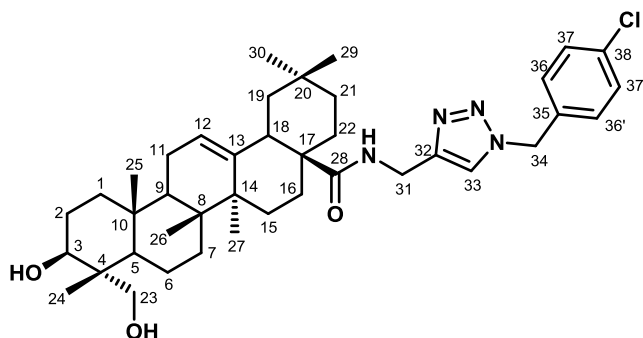
RMN de 1H ($CDCl_3$ /ppm; 300 MHz) δ : 7,47 (s, 1H, H-33); 7,37 (d, 2H, $J = 7,2$ Hz, H-37, H-40); 7,29 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz, H-38); 6,59 (t, 1H, $J = 4,9$ Hz, N-H); 5,79 (t, 2H, $J = 15,6$ Hz, H-34); 5,34 (sl, 1H, H-12); 4,45 (dd, 1H, $J = 5,3, 15,0$ Hz, H-31_a); 4,31 (dd, 1H, $J = 5,0, 15,0$ Hz, H-31_b); 3,67 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_a); 3,60 (tl, 1H, $J = 7,9$ Hz, H-3); 3,37 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_b); 2,51 (ddl, 1H, $J = 11,5$ Hz, H-18); 1,09 (s, 3H, CH_3); 0,86 (s, 6H, $2 \times CH_3$); 0,85 (s, 6H, $2 \times CH_3$); 0,42 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$ /ppm; 75 MHz) δ : 178,43 (O=C-28); 144,65 (=C-13); 144,23 (=C-32); 136,88 (C-35); 131,20 (C-36); 130,04 (C-40); 128,99 (C-37); 128,99 (C-39); 128,99 (C-38); 123,24 (=CH-12); 122,23 (=CH-33); 76,61 (HO-CH-3); 71,81 (HO-CH₂-23); 49,10 (CH₂-34); 49,68 (CH-9); 47,58 (C-17); 46,70 (CH-5); 46,30 (CH-19); 42,02 (C-4); 42,02 (C-14); 41,87 (CH-18); 39,35 (C-8); 38,25 (CH₂-1); 36,89 (C-10); 35,02 (NH-CH₂-31); 34,20 (CH₂-21); 33,08 (CH₃-29); 32,57 (CH₂-7); 32,21 (CH₂-22); 30,79 (C-20); 27,29 (CH₂-15); 26,66 (CH₃-27); 25,85 (CH₂-2); 23,88 (CH₃-30); 23,66 (CH₂-11); 23,51 (CH₂-16); 18,52 (CH₂-6); 16,52 (CH₃-26); 15,85 (CH₃-25); 11,63 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{40}H_{56}Cl_2N_4O_3]^+$: $m/z = 711,3808$, encontrado: $m/z = 711,3799$.

CHN: calculado: C, 67,59; H, 7,80; N, 7,88; encontrado: C, 67,41; H, 7,99; N, 7,67.

5.2.23. Dados referente ao (4-clorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7f)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 139,3-141 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3402, 3152, 3068, 1718, 1636, 1520, 1048, 1016, 732.

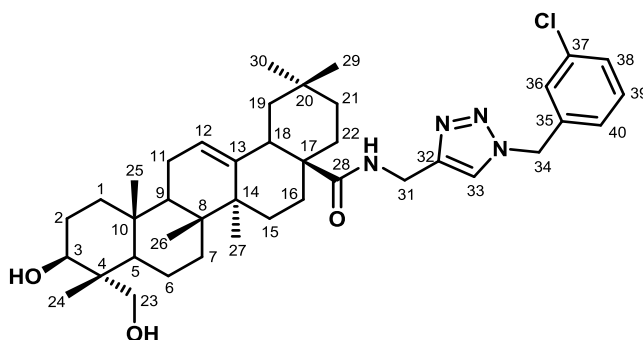
RMN de ^1H (CDCl_3/ppm ; 300 MHz) δ : 7,50 (s, 1H, H-33); 7,31 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, H-37, H-37'); 7,19 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, H-36, H-36'); 6,60 (t, 1H, $J = 4,4$ Hz, N-H); 5,47 (d, 1H, $J = 14,9$ Hz, H-34_a); 5,38 (d, 1H, $J = 17,9$ Hz, H-34_b); 5,35 (sl, 1H, H-12); 4,44 (dd, 1H, $J = 5,3, 15,0$ Hz, H-31_a); 4,32 (dd, 1H, $J = 5,1, 14,8$ Hz, H-31_b); 3,68 (d, 1H, $J = 10,2$ Hz, H-23_a); 3,60 (tl, 1H, $J = 8,0$ Hz, H-3); 3,38 (d, 1H, $J = 10,2$ Hz, H-23_b); 2,50 (ddl, 1H, $J = 11,8$ Hz, H-18); 1,10 (s, 3H, CH_3); 0,85 (s, 12H, $4 \times \text{CH}_3$); 0,41 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C (CDCl_3/ppm ; 75 MHz) δ : 178,68 (O=C-28); 145,38 (=C-13); 144,29 (=C-32); 134,95 (C-35); 133,17 (C-38); 129,54 (C-36); 129,54 (C-36'); 129,39 (C-37); 129,39 (C-37'); 123,25 (=CH-12); 122,67 (=CH-33); 76,64 (HO-CH-3); 71,85 (HO-CH₂-23); 53,50 (CH₂-34); 49,68 (CH-9); 47,56 (C-17); 46,72 (CH-5); 46,33 (CH-19); 42,08 (C-4); 42,06 (C-14); 41,88 (CH-18); 39,35 (C-8); 38,24 (CH₂-1); 36,89 (C-10); 35,15 (NH-CH₂-31); 34,19 (CH₂-21); 33,07 (CH₃-29); 32,56 (CH₂-7); 32,20 (CH₂-22); 30,80 (C-20); 27,28 (CH₂-15); 26,69 (CH₃-27); 25,84 (CH₂-2); 23,93 (CH₃-30); 23,65 (CH₂-11); 23,51 (CH₂-16); 18,47 (CH₂-6); 16,61 (CH₃-26); 15,84 (CH₃-25); 11,61 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $[\text{C}_{40}\text{H}_{57}\text{ClN}_4\text{O}_3]^+$: $m/z = 677,4197$, encontrado: $m/z = 677,4191$.

CHN: calculado: C, 70,93; H, 8,48; N, 8,27; encontrado: C, 70,19; H, 8,57; N, 8,03.

5.2.24. Dados referente ao (3-clorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7g)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 143,4-144,8 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3404, 3150, 3086, 1636, 1520, 1048, 772, 732.

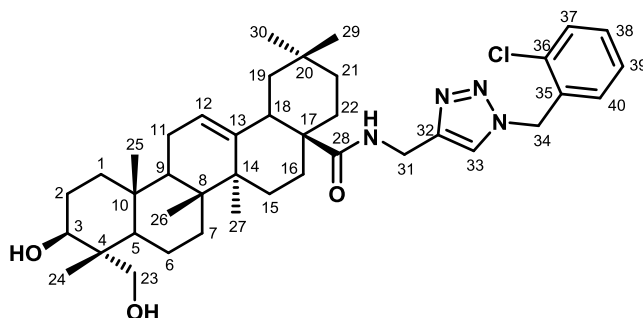
RMN de ^1H (CDCl_3/ppm ; 300 MHz) δ : 7,52 (s, 1H, H-33); 7,26 (m, 3H, H-36, H-38, H-39); 7,13 (d, 1H, $J = 6,7$ Hz H-40); 6,63 (t, 1H, $J = 5,6$ Hz, N-H); 5,47 (d, 1H, $J = 14,8$ Hz, H-34_a); 5,39 (d, 1H, $J = 15,5$ Hz, H-34_b); 5,36 (sl, 1H, H-12); 4,45 (dd, 1H, $J = 5,2, 15,3$ Hz, H-31_a); 4,32 (dd, 1H, $J = 5,0, 14,7$ Hz, H-31_b); 3,68 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_a); 3,61 (tl, 1H, $J = 7,5$ Hz, H-3); 3,38 (d, 1H, $J = 10,0$ Hz, H-23_b); 2,51 (ddl, 1H, $J = 13,2$ Hz, H-18); 1,10 (s, 3H, CH_3); 0,85 (s, 12H, 4x CH_3); 0,44 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C (CDCl_3/ppm ; 75 MHz) δ : 178,67 (O=C-28); 145,41 (=C-13); 144,28 (=C-32); 136,57 (C-35); 135,11 (C-37); 130,46 (C-39); 129,11 (C-36); 128,23 (C-38); 126,22 (C-40); 123,27 (=CH-12); 122,75 (=CH-33); 76,65 (HO-CH-3); 71,85 (HO-CH₂-23); 53,53 (CH₂-34); 49,69 (CH-9); 47,57 (C-17); 46,71 (CH-5); 46,33 (CH-19); 42,09 (C-4); 42,06 (C-14); 41,88 (CH-18); 39,37 (C-8); 38,24 (CH₂-1); 36,89 (C-10); 35,14 (NH-CH₂-31); 34,18 (CH₂-21); 33,07 (CH₃-29); 32,55 (CH₂-7); 32,22 (CH₂-22); 30,79 (C-20); 27,29 (CH₂-15); 26,68 (CH₃-27); 25,84 (CH₂-2); 23,92 (CH₃-30); 23,67 (CH₂-11); 23,51 (CH₂-16); 18,52 (CH₂-6); 16,61 (CH₃-26); 15,84 (CH₃-25); 11,61 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $[\text{C}_{40}\text{H}_{57}\text{ClN}_4\text{O}_3]^+$: $m/z = 677,4197$, encontrado: $m/z = 677,4191$.

CHN: calculado: C, 70,93; H, 8,48; N, 8,27; encontrado: C, 70,76; H, 8,51; N, 8,19.

5.2.25. Dados referente ao (2-clorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7h)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 133-134,1 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3400, 3150, 3072, 1722, 1636, 1520, 1048, 752, 732.

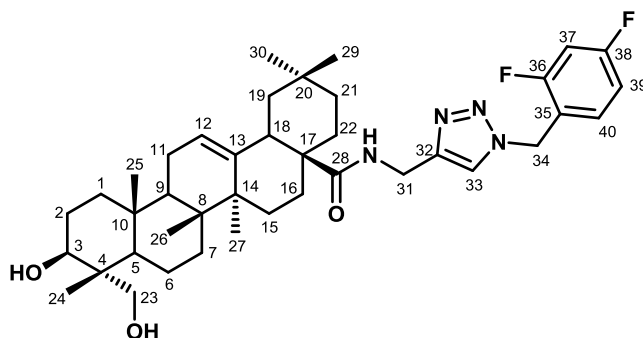
RMN de 1H ($CDCl_3$ /ppm; 300 MHz) δ : 7,55 (s, 1H, H-33); 7,41 (d, 1H, H-37); 7,25 (m, 3H, H-38, H-39, H-40); 6,59 (t, 1H, $J = 4,3$ Hz, N-H); 5,60 (t, 2H, $J = 15,2$ Hz, H-34); 5,36 (sl, 1H, H-12); 4,48 (dd, 1H, $J = 5,1$ e $15,0$ Hz, H-31_a); 4,34 (dd, 1H, $J = 4,9$ e $15,0$ Hz, H-31_b); 3,70 (d, 1H, $J = 10,4$ Hz, H-23_a); 3,61 (tl, 1H, $J = 7,7$ Hz, H-3); 3,39 (d, 1H, $J = 10,2$ Hz, H-23_b); 2,52 (ddl, 1H, $J = 11,8$ Hz, H-18); 1,11 (s, 3H, CH_3); 0,87 (s, 12H, $4 \times CH_3$); 0,47 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$ /ppm; 75 MHz) δ : 178,54 (O=C-28); 145,10 (=C-13); 144,34 (=C-32); 133,72 (C-35); 132,44 (C-36); 130,58 (C-40); 130,41 (C-37); 130,09 (C-38); 127,65 (C-39); 123,27 (=CH-12); 122,91 (=CH-33); 76,63 (HO-CH-3); 71,98 (HO-CH₂-23); 51,55 (CH₂-34); 49,72 (CH-9); 47,62 (C-17); 46,75 (CH-5); 46,35 (CH-19); 42,12 (C-4); 42,08 (C-14); 41,92 (CH-18); 39,40 (C-8); 38,26 (CH₂-1); 36,93 (C-10); 35,15 (NH-CH₂-31); 34,22 (CH₂-21); 33,16 (CH₃-29); 32,57 (CH₂-7); 32,22 (CH₂-22); 30,82 (C-20); 27,33 (CH₂-15); 26,78 (CH₃-27); 25,87 (CH₂-2); 23,96 (CH₃-30); 23,69 (CH₂-11); 23,55 (CH₂-16); 18,57 (CH₂-6); 16,63 (CH₃-26); 15,87 (CH₃-25); 11,58 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{40}H_{57}ClN_4O_3]^+$: $m/z = 677,4197$, encontrado: $m/z = 677,4190$.

CHN: calculado: C, 70,93; H, 8,48; N, 8,27; encontrado: C, 70,77; H, 8,63; N, 8,19.

5.2.26. Dados referente ao (2,4-difluorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7i)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 119,3-120,8 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3404, 3150, 3080, 1636, 1508, 1276, 1048, 1004, 732.

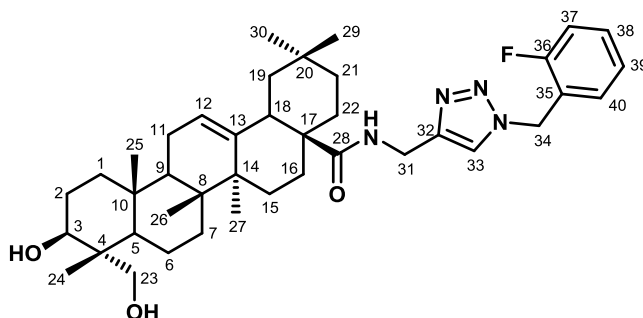
RMN de ^1H (CDCl_3/ppm ; 300 MHz) δ : 7,55 (s, 1H, H-33); 7,27 (m, 1H, H-40); 6,84 (m, 2H, H-37, H-39); 6,61 (t, 1H, $J = 4,5$ Hz, N-H); 5,47 (t, 2H, $J = 15,4$ Hz, H-34); 5,34 (sl, 1H, H-12); 4,44 (dd, 1H, $J = 5,1, 15,1$ Hz, H-31_a); 4,32 (dd, 1H, $J = 5,0, 14,8$ Hz, H-31_b); 3,67 (d, 1H, $J = 10,2$ Hz, H-23_a); 3,60 (tl, 1H, $J = 8,0$ Hz, H-3); 3,37 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_b); 2,50 (ddl, 1H, $J = 11,5$ Hz, H-18); 1,09 (s, 3H, CH_3); 0,85 (s, 12H, 4x CH_3); 0,40 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C (CDCl_3/ppm ; 75 MHz) δ : 178,63 (O=C-28); 163,42 (dd, $J = 249,9, 11,6$ Hz, C-38); 160,85 (dd, $J = 249,3, 11,8$ Hz, C-36); 145,28 (=C-13); 144,26 (=C-32); 131,80 (dd, $J = 9,8, 4,6$ Hz, C-40); 123,26 (=CH-12); 122,74 (=CH-33); 118,05 (dd, $J = 14,6, 3,7$ Hz, C-35); 112,20 (dd, $J = 21,5, 3,8$ Hz, C-39); 104,51 (t, $J = 25,2$ Hz, C-37); 76,57 (HO-CH-3); 71,76 (HO-CH₂-23); 49,65 (CH-9); 47,56 (C-17); 47,22 (d, $J = 3,5$ Hz, CH₂-34); 46,70 (CH-5); 46,33 (CH-19); 42,07 (C-4); 42,04 (C-14); 41,86 (CH-18); 39,34 (C-8); 38,24 (CH₂-1); 36,88 (C-10); 35,07 (NH-CH₂-31); 34,18 (CH₂-21); 33,06 (CH₃-29); 32,56 (CH₂-7); 32,20 (CH₂-22); 30,78 (C-20); 27,27 (CH₂-15); 26,64 (CH₃-27); 25,83 (CH₂-2); 23,91 (CH₃-30); 23,64 (CH₂-11); 23,50 (CH₂-16); 18,46 (CH₂-6); 16,51 (CH₃-26); 15,81 (CH₃-25); 11,60 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $[\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_3]^+$: $m/z = 679,4399$, encontrado: $m/z = 679,4390$.

CHN: calculado: C, 70,77; H, 8,31; N, 8,25; encontrado: C, 70,51; H, 8,52; N, 8,13.

5.2.27. Dados referente ao (2-fluorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7j)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 122,3-123,8 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3404, 3150, 3052, 1636, 1522, 1236, 1048, 1004, 758.

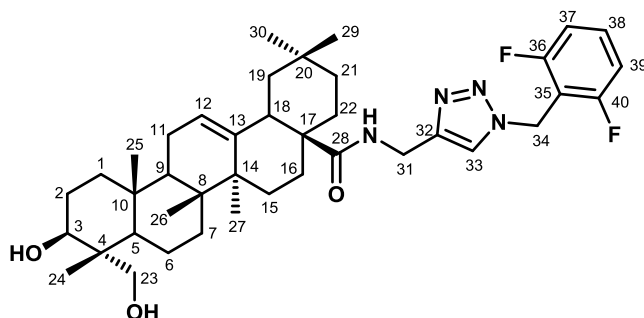
RMN de 1H ($CDCl_3$ /ppm; 300 MHz) δ : 7,54 (s, 1H, H-33); 7,33 (m, 1H, H-40); 7,25 (m, 1H, H-38); 7,10 (m, 2H, H-37, H-39); 6,61 (t, 1H, $J = 3,9$ Hz, N-H); 5,52 (t, 2H, $J = 15,4$ Hz, H-34); 5,35 (sl, 1H, H-12); 4,45 (dd, 1H, $J = 5,4, 15,1$ Hz, H-31_a); 4,33 (dd, 1H, $J = 5,1, 15,0$ Hz, H-31_b); 3,68 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_a); 3,61 (tl, 1H, $J = 8,0$ Hz, H-3); 3,38 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_b); 2,51 (ddl, 1H, $J = 12,1$ Hz, H-18); 1,10 (s, 3H, CH_3); 0,86 (s, 12H, $4 \times CH_3$); 0,43 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$ /ppm; 75 MHz) δ : 178,54 ($O=C-28$); 160,66 (d, $J = 246,7$ Hz, C-36); 145,15 ($=C-13$); 144,27 ($=C-32$); 131,06 (d, $J = 8,1$ Hz, C-40); 130,71 (d, $J = 3,2$ Hz, C-38); 124,88 (d, $J = 3,7$ Hz, C-35); 123,27 ($=CH-12$); 122,71 ($=CH-33$); 121,89 (d, $J = 14,5$ Hz, C-39); 115,97 (d, $J = 20,9$ Hz, C-37); 76,64 ($HO-\underline{CH}-3$); 71,84 ($HO-\underline{CH}_2-23$); 49,69 ($CH-9$); 47,58 (C-17); 47,80 (d, $J = 4,2$ Hz, CH_2-34); 46,72 ($CH-5$); 46,33 ($CH-19$); 42,08 (C-4); 42,05 (C-14); 41,88 ($CH-18$); 39,37 (C-8); 38,25 (CH_2-1); 36,90 (C-10); 35,08 ($NH-\underline{CH}_2-31$); 34,20 (CH_2-21); 33,08 (CH_3-29); 32,55 (CH_2-7); 32,20 (CH_2-22); 30,80 (C-20); 27,30 (CH_2-15); 26,68 (CH_3-27); 25,85 (CH_2-2); 23,91 (CH_3-30); 23,67 (CH_2-11); 23,52 (CH_2-16); 18,52 (CH_2-6); 16,54 (CH_3-26); 15,84 (CH_3-25); 11,62 (CH_3-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{40}H_{57}FN_4O_3]^+$: $m/z = 661,4493$, encontrado: $m/z = 661,4488$.

CHN: calculado: C, 72,69; H, 8,69; N, 8,48; encontrado: C, 72,48; H, 8,85; N, 8,22.

5.2.28. Dados referente ao (2,6-difluorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7k)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 139,8-140,9 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3404, 3150, 3094, 1628, 1522, 1238, 1048, 1032, 802, 732.

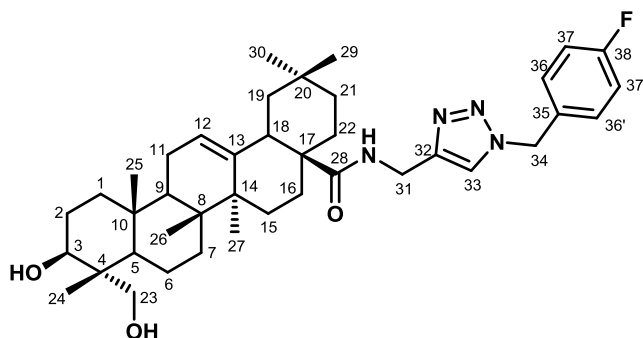
RMN de 1H ($CDCl_3$ /ppm; 300 MHz) δ : 7,55 (s, 1H, H-33); 7,34 (m, 1H, H-38); 6,93 (m, 2H, H-37, H-39); 6,63 (t, 1H, $J = 4,7$ Hz, N-H); 5,58 (d, 1H, $J = 14,6$ Hz, H-34_a); 5,51 (d, 1H, $J = 14,7$ Hz, H-34_b); 5,33 (sl, 1H, H-12); 4,42 (dd, 1H, $J = 5,2, 15,0$ Hz, H-31_a); 4,31 (dd, 1H, $J = 5,9$ e $14,9$ Hz, H-31_b); 3,66 (d, 1H, $J = 10,1$ Hz, H-23_a); 3,59 (tl, 1H, $J = 7,7$ Hz, H-3); 3,37 (d, 1H, $J = 10,0$ Hz, H-23_b); 2,50 (ddl, 1H, $J = 11,8$ Hz, H-18); 1,08 (s, 3H, CH_3); 0,84 (s, 12H, $4 \times CH_3$); 0,39 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$ /ppm; 75 MHz) δ : 178,52 (O=C-28); 161,42 (dd, $J = 250,0, 6,8$ Hz, C-36, C-40); 144,96 (=C-13); 144,16 (=C-32); 131,53 (t, $J = 10,2$ Hz, C-38); 123,26 (=CH-12); 122,59 (=CH-33); 111,89 (m, C-37, C-39); 110,73 (t, $J = 18,9$ Hz, C-35); 76,52 (HO-CH-3); 71,68 (HO-CH₂-23); 49,64 (CH-9); 47,54 (C-17); 46,67 (CH-5); 46,29 (CH-19); 42,00 (C-4); 42,00 (C-14); 41,83 (CH-18); 41,41 (t, $J = 3,9$ Hz, CH₂-34); 39,31 (C-8); 38,23 (CH₂-1); 36,85 (C-10); 34,94 (NH-CH₂-31); 34,17 (CH₂-21); 33,06 (CH₃-29); 32,54 (CH₂-7); 32,17 (CH₂-22); 30,76 (C-20); 27,25 (CH₂-15); 26,57 (CH₃-27); 25,82 (CH₂-2); 23,85 (CH₃-30); 23,63 (CH₂-11); 23,47 (CH₂-16); 18,46 (CH₂-6); 16,39 (CH₃-26); 15,77 (CH₃-25); 11,64 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{40}H_{56}F_2N_4O_3]^+$: $m/z = 679,4391$, encontrado: $m/z = 678,8946$.

CHN: calculado: C, 70,77; H, 8,31; N, 8,25; encontrado: C, 70,61; H, 8,54; N, 8,01.

5.2.29. Dados referente ao (4-fluorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7I)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 139,3-140,9 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3404, 3150, 3074, 1636, 1512, 1226, 1048, 1004, 776, 732.

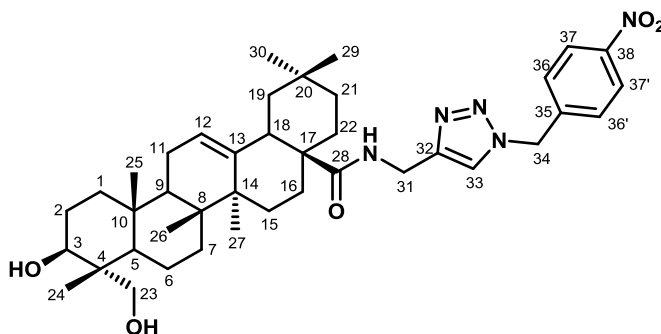
RMN de 1H ($CDCl_3$ /ppm; 300 MHz) δ : 7,48 (s, 1H, H-33); 7,25 (m, 2H, H-36, H-36'); 7,02 (m, 2H, H-37, H-37'); 6,60 (t, 1H, $J = 5,4$ Hz, N-H); 5,47 (d, 1H, $J = 14,8$ Hz, H-34_a); 5,39 (d, 1H, $J = 15,0$ Hz, H-34_b); 5,35 (sl, 1H, H-12); 4,44 (dd, 1H, $J = 5,4, 15,0$ Hz, H-31_a); 4,32 (dd, 1H, $J = 5,4$ e 15,0 Hz, H-31_b); 3,69 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_a); 3,61 (tl, 1H, $J = 7,3$ Hz, H-3); 3,38 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_b); 2,51 (dd, 1H, $J = 12,6$ e 3,0 Hz, H-18); 1,10 (s, 3H, CH_3); 0,86 (s, 9H, 3x CH_3); 0,85 (s, 3H, CH_3); 0,41 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$ /ppm; 75 MHz) δ : 178,64 (O=C-28); 160,95 (d, $J = 246,6$ Hz, C-38); 145,34 (=C-13); 144,29 (=C-32); 130,55 (d, $J = 3,3$ Hz, C-35); 130,11 (d, $J = 8,4$ Hz, C-36, C-36'); 123,26 (=CH-12); 122,58 (=CH-33); 116,20 (d, $J = 21,6$ Hz, C-37, C-37'); 76,65 (HO-CH-3); 71,87 (HO-CH₂-23); 53,51 (CH₂-34); 49,68 (CH-9); 47,57 (C-17); 46,72 (CH-5); 46,34 (CH-19); 42,08 (C-4); 42,06 (C-14); 41,89 (CH-18); 39,36 (C-8); 38,25 (CH₂-1); 36,90 (C-10); 35,14 (NH-CH₂-31); 34,19 (CH₂-21); 33,07 (CH₃-29); 32,57 (CH₂-7); 32,21 (CH₂-22); 30,80 (C-20); 27,29 (CH₂-15); 26,70 (CH₃-27); 25,84 (CH₂-2); 23,94 (CH₃-30); 23,65 (CH₂-11); 23,52 (CH₂-16); 18,48 (CH₂-6); 16,59 (CH₃-26); 15,85 (CH₃-25); 11,59 (CH₃-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{40}H_{57}FN_4O_3]^+$: $m/z = 661,4493$, encontrado: $m/z = 661,4490$.

CHN: calculado: C, 72,69; H, 8,69; N, 8,48; encontrado: C, 72,51; H, 8,75; N, 8,22.

5.2.30. Dados referente ao (4-nitrobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7m)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 158,4-159,7 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3404, 3150, 3080, 1636, 1524, 1048, 732.

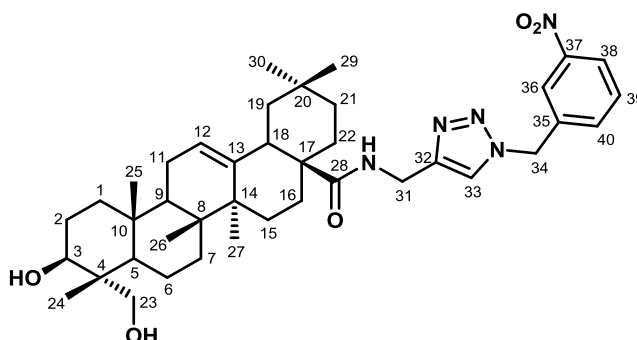
RMN de 1H ($CDCl_3$ /ppm; 300 MHz) δ : 8,20 (d, 2H, , J = 8,6 Hz, H-37, H-37'); 7,60 (s, 1H, H-33); 7,40 (d, 2H, J = 8,5 Hz, H-36, H-36'); 6,61 (t, 1H, J = 4,8 Hz, N-H); 5,62 (d, 1H, J = 15,4 Hz, H-34_a); 5,54 (d, 1H, J = 15,3 Hz, H-34_b); 5,36 (sl, 1H, H-12); 4,46 (dd, 1H, J = 5,4 e 15,0 Hz, H-31_a); 4,34 (dd, 1H, J = 5,3 e 14,9 Hz, H-31_b); 3,69 (d, 1H, J = 10,0 Hz, H-23_a); 3,61 (tl, 1H, J = 8,3 Hz, H-3); 3,38 (d, 1H, J = 10,3 Hz, H-23_b); 2,51 (ddl, 1H, J = 12,2 Hz, H-18); 1,10 (s, 3H, CH_3); 0,85 (s, 12H, 4x CH_3); 0,43 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$ /ppm; 75 MHz) δ : 178,82 (O=C-28); 148,73 (C-38); 145,77 (=C-13); 144,34 (=C-32); 141,74 (C-35); 128,80 (C-36, C-36'); 124,38 (C-37, C-37'); 123,28 (=CH-12); 122,19 (=CH-33); 76,68 (HO- $\underline{CH}$ -3); 71,93 (HO- $\underline{CH}_2$ -23); 53,19 (CH_2 -34); 49,66 (CH-9); 47,55 (C-17); 46,73 (CH-5); 46,36 (CH-19); 42,08 (C-4); 42,08 (C-14); 41,83 (CH-18); 39,36 (C-8); 38,24 (CH_2 -1); 36,90 (C-10); 35,19 (NH- $\underline{CH}_2$ -31); 34,19 (CH_2 -21); 33,06 (CH_3 -29); 32,58 (CH_2 -7); 32,23 (CH_2 -22); 30,80 (C-20); 27,28 (CH_2 -15); 26,71 (CH_3 -27); 25,84 (CH_2 -2); 23,99 (CH_3 -30); 23,64 (CH_2 -11); 23,53 (CH_2 -16); 18,47 (CH_2 -6); 16,68 (CH_3 -26); 15,86 (CH_3 -25); 11,56 (CH_3 -24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{40}H_{57}N_5O_5]^+$: m/z = 688,4438, encontrado: m/z = 688,4430.

CHN: calculado: C, 69,84; H, 8,35; N, 10,18; encontrado: C, 69,79; H, 8,49; N, 10,02.

5.2.31. Dados referente ao (3-nitrobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7n)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 149,3-150,8 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3404, 3140, 3092, 1636, 1532, 1048, 722.

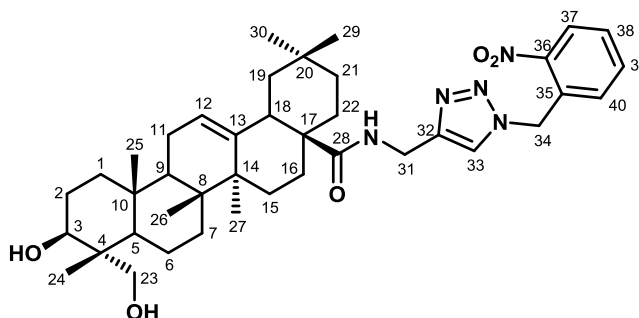
RMN de ^1H (CDCl_3/ppm ; 300 MHz) δ : 8,20 (dt, 1H, $J = 1,7, 7,7$ Hz, H-38); 8,14 (sl, 1H, H-36); 7,60 (sl, 1H, H-33); 7,56 (m, 2H, H-39 e H-40); 6,63 (t, 1H, $J = 5,4$ Hz, N-H); 5,61 (d, 1H, $J = 15,2$ Hz, H-34_a); 5,55 (d, 1H, $J = 15,2$ Hz, H-34_b); 5,36 (sl, 1H, H-12); 4,47 (dd, 1H, $J = 5,4$ e 15,0 Hz, H-31_a); 4,33 (dd, 1H, $J = 5,4, 15,0$ Hz, H-31_b); 3,68 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_a); 3,60 (tl, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-3); 3,38 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_b); 2,51 (dd, 1H, $J = 2,6$ e 12,3 Hz, H-18); 1,10 (s, 3H, CH_3); 0,87 (s, 3H, CH_3); 0,85 (s, 9H, $3\times\text{CH}_3$); 0,44 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C (CDCl_3/ppm ; 75 MHz) δ : 178,76 ($\text{O}=\text{C}-28$); 148,65 (C-37); 145,71 ($=\text{C}-13$); 144,30 ($=\text{C}-32$); 136,79 (C-35); 134,01 (C-40); 130,33 (C-39); 123,87 (C-36); 123,26 ($=\text{CH}-12$); 123,02 (C-38); 123,02 ($=\text{CH}-33$); 76,67 ($\text{HO}-\underline{\text{CH}}-3$); 71,89 ($\text{HO}-\underline{\text{CH}}_2-23$); 53,18 (CH_2-34); 49,67 (CH-9); 47,55 (C-17); 46,70 (CH-5); 46,34 (CH-19); 42,08 (C-4); 42,06 (C-14); 41,87 (CH-18); 39,37 (C-8); 38,23 (CH_2-1); 36,90 (C-10); 35,14 ($\text{NH}-\underline{\text{CH}}_2-31$); 34,17 (CH_2-21); 33,06 (CH_3-29); 32,57 (CH_2-7); 32,23 (CH_2-22); 30,79 (C-20); 27,29 (CH_2-15); 26,69 (CH_3-27); 25,84 (CH_2-2); 23,94 (CH_3-30); 23,64 (CH_2-11); 23,51 (CH_2-16); 18,48 (CH_2-6); 16,65 (CH_3-26); 15,82 (CH_3-25); 11,58 (CH_3-24).

HRMS (ESI TOF-MS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $[\text{C}_{40}\text{H}_{57}\text{N}_5\text{O}_5]^+$: $m/z = 688,4438$, encontrado: $m/z = 688,4429$.

CHN: calculado: C, 69,84; H, 8,35; N, 10,18; encontrado: C, 69,84; H, 8,57; N, 10,07.

5.2.32. Dados referente ao (2-nitrobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7o)



Aspecto físico: sólido branco; T_f 145,6-147,2 °C

IV (filme KBr, $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$): 3398, 3150, 3080, 1636, 1530, 1048, 728.

RMN de 1H ($CDCl_3$ /ppm; 300 MHz) δ : 8,13 (dd, 1H, $J = 7,9, 1,3$ Hz, H-37); 7,67 (s, 1H, H-33); 7,58 (td, 1H, $J = 1,4, 7,4$ Hz, H-38); 7,52 (td, 1H, $J = 1,6, 7,9$ Hz, H-37); 7,04 (dd, 1H, $J = 1,3, 7,7$ Hz, H-36); 6,64 (t, 1H, $J = 5,3$ Hz, N-H); 5,88 (s, 2H, H-34); 5,37 (sl, 1H, H-12); 4,52 (dd, 1H, $J = 5,6$ e 15,0 Hz, H-31_a); 4,34 (dd, 1H, $J = 5,1$ e 15,0 Hz, H-31_b); 3,68 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_a); 3,60 (tl, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-3); 3,38 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz, H-23_b); 2,53 (dd, 1H, $J = 2,3$ e 12,3 Hz, H-18); 1,11 (s, 3H, CH_3); 0,87 (s, 6H, $2 \times CH_3$); 0,86 (s, 3H, CH_3); 0,85 (s, 3H, CH_3); 0,52 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$ /ppm; 75 MHz) δ : 178,64 (O=C-28); 147,58 (C-36); 145,35 (=C-13); 144,33 (=C-32); 134,37 (C-35); 130,60 (C-39); 130,41 (C-40); 129,80 (C-38); 125,53 (C-37); 123,74 (=CH-12); 123,28 (=CH-33); 76,66 (HO-CH-3); 71,86 (HO-CH₂-23); 50,96 (CH₂-34); 49,69 (CH-9); 47,59 (C-17); 46,71 (CH-5); 46,35 (CH-19); 42,09 (C-4); 42,06 (C-14); 41,88 (CH-18); 39,40 (C-8); 38,24 (CH₂-1); 36,91 (C-10); 35,15 (NH-CH₂-31); 34,19 (CH₂-21); 33,08 (CH₃-29); 32,57 (CH₂-7); 32,22 (CH₂-22); 30,80 (C-20); 27,33 (CH₂-15); 26,68 (CH₃-27); 25,87 (CH₂-2); 23,92 (CH₃-30); 23,68 (CH₂-11); 23,54 (CH₂-16); 18,52 (CH₂-6); 16,70 (CH₃-26); 15,84 (CH₃-25); 11,60 (CH₃-24).

MS (ESI TOF-MS): $[M+H]^+$ calculado para $[C_{40}H_{57}N_5O_5]^+$: $m/z = 688,4438$, encontrado: $m/z = 688,4434$.

CHN: calculado: C, 69,84; H, 8,35; N, 10,18; encontrado: C, 69,84; H, 8,55; N, 9,97.

5.2.33 Ensaios Biológicos

Ensaios citotóxicos

A citotoxicidade dos compostos foi avaliada utilizando o ensaio colorimétrico de micro-cultura sulforodamina-B (SKEHAN *et al.*, 1990) (SRB, adquiridos de Sigma-Aldrich). As células foram semeadas numa placa de 96 cavidades no dia 0 com as densidades celulares adequadas para evitar confluência das células durante o período de experiência. Após 24 horas, as células foram tratadas com diluições em série dos compostos **6a-o** e **7a-o** (0-30 μ M) durante 96 horas. A concentração final de DMSO nunca excedeu os 0,5%. As percentagens das células sobreviventes em relação aos controles não tratados foram determinadas 96 h após do início da exposição dos compostos a avaliar. O meio sobrenadante foi e as células foram fixadas com 10% de TCA. Para uma fixação completa, as placas foram deixadas repousar a 4 °C. Após da fixação, as células foram lavadas quatro vezes com água destilada, utilizando procedimentos de distribuição e aspiração alternadas. As placas foram coradas com 100 μ L de 0,4% de SRB durante 20 minutos. Depois as placas foram lavadas com ácido acético ao 1% (v/v) para remover o excesso de corante foi deixado secar no ar durante a noite. A seguir, uma solução de base Tris (100 μ L, 10 mM) foi adicionada a cada cavidade e a absorbância foi medida a λ = 570 nm (utilizando um leitor de placas de 96 cavidades, Tecan Spectra, Crailsheim, Germany). Os valores de EC₅₀ foram calculados a partir da curvas de dose resposta semi-logarítmicas por meio de regressão não-linear, aplicando dois parâmetros da equação de Hill-slope. Os valores são apresentados com um intervalo de confiança de 95%, geralmente foram usadas 7-13 pontos de dosagem.

Teste apoptose - laranja de acridina/iodeto de propídio (AO/PI).

A morte celular apoptótica foi analisada por laranja de acridina/iodeto de propídio, corante usando microscopia de fluorescência em células MCF7. Aproximadamente, 500.000 células foram semeadas em frascos de cultura de células e foi deixado crescer durante 24 horas. O meio foi removido e o meio-carregado com a substância a avaliar foi adicionada. Após 72 h, o meio sobrenadante foi recolhido e centrifugado; o sedimento foi suspenso em solução salina de fosfato tampão (PBS) e centrifugado outra vez. O líquido foi removido e o sedimento foi suspenso em PBS. Depois de se misturar a suspensão com uma solução de AO/PI, a análise

foi realizada sob um microscópio de fluorescência. Enquanto uma fluorescência verde mostra a apoptose, um núcleo de cor vermelha indica células necróticas.

5.3. Resultados e Discussão

5.3.1. Sínteses de triazóis derivados da hederagenina

A rota de síntese proposta para a obtenção dos triazóis teve como etapa chave a reação “click”, mais especificamente, a cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen, catalisada por Cu(I), entre alcinos e azidas (CuAAC) (YU *et al.*, 2013).

Nesse processo, os derivados de triazóis denominados (3 β),23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de (R-(benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-metila para os ésteres (**6a-o**), e (R-(benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-metil-(3 β),23-dihidroxiolean-12-en-28-amida para as amidas (**7a-o**), preparados nesse trabalho, além, dos rendimentos em que foram obtidos são apresentados nas Tabelas 5.3.1 e 5.3.2.

Tabela 5.3.1 - Triazóis derivados da hederagenina com grupo éster.

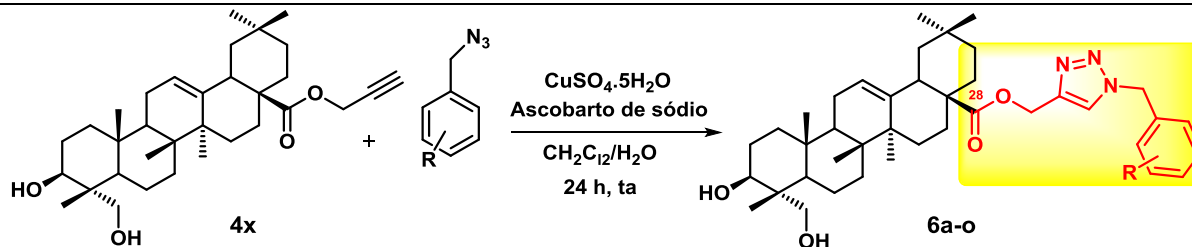
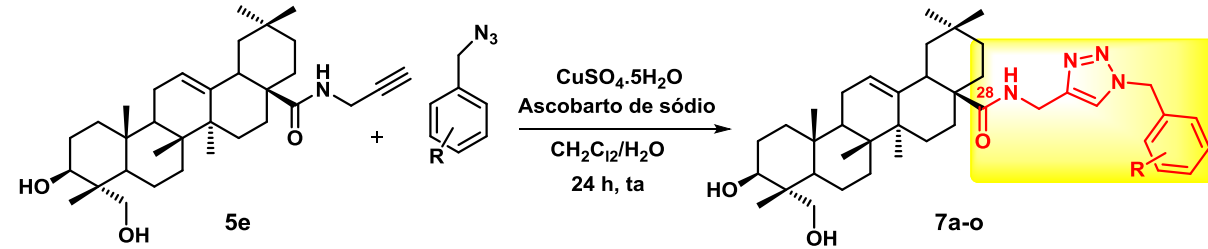
		
Composto	R	Rendimento (%)
6a	H	60
6b	<i>o</i> -bromo	91
6c	<i>m</i> -bromo	65
6d	<i>p</i> -bromo	91
6e	2,6-dicloro	84
6f	<i>p</i> -cloro	33
6g	<i>m</i> -cloro	90
6h	<i>o</i> -cloro	54
6i	2,4-difluoro	89
6j	<i>p</i> -fluoro	85
6k	2,6-difluoro	67
6l	<i>o</i> -fluoro	77
6m	<i>p</i> -nitro	44
6n	<i>m</i> -nitro	52
6o	<i>o</i> -nitro	76

Tabela 5.3.2 - Triazóis derivados da hederagenina com grupo amida.

		
Composto	R	Rendimento (/)
7a	H	90
7b	<i>o</i> -bromo	85
7c	<i>m</i> -bromo	90
7d	<i>p</i> -bromo	95
7e	2,6-dicloro	75
7f	<i>p</i> -cloro	81
7g	<i>m</i> -cloro	78
7h	<i>o</i> -cloro	79
7i	2,4-difluoro	84
7j	<i>p</i> -fluoro	70
7k	2,6-difluoro	97
7l	<i>o</i> -fluoro	70
7m	<i>p</i> -nitro	66
7n	<i>m</i> -nitro	79
7o	<i>o</i> -nitro	76

A partir da reação da hederagenina com brometo de propargila, carbonato de potássio (K_2CO_3) em DMF obteve-se o alcino correspondente (**4x**) por meio de uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) (SIEWERT *et al.*, 2014). Por outro lado, ao usar propinilamina, carbonato de sódio, DIPEA e o reagente de acoplamento TBTU em THF, foi obtido o alcino com grupo amida (**5e**) (YU *et al.*, 2013). Ambos, os grupos éster e amida são localizados no carbono-28 da hederagenina. Uma proposta mecanística se encontra na Figura 4.3.1 e 4.3.3 do capítulo 3.

Posteriormente foram obtidas as azidas orgânicas a partir dos brometos de benzila comerciais por meio da reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) clássica (LECLERC *et al.*, 2011), conforme representado na Figura 5.3.1. O material obtido foi usado sem previa purificação na obtenção dos triazóis.

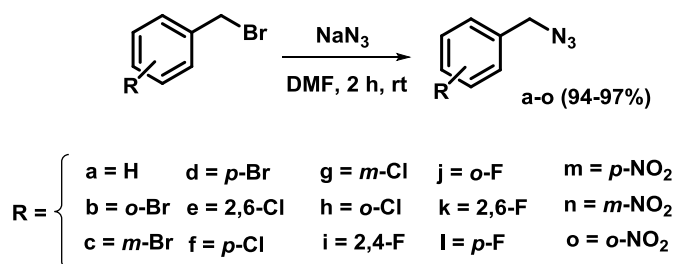


Figura 5.3.1 - Reação geral na obtenção das azidas.

A última etapa consistiu na obtenção dos triazóis pela reação entre as azidas orgânicas e os alcinos, via reação “click”, seguindo a metodologia de Yu e colaboradores (2013) (Figuras 5.3.2 e 5.3.3).

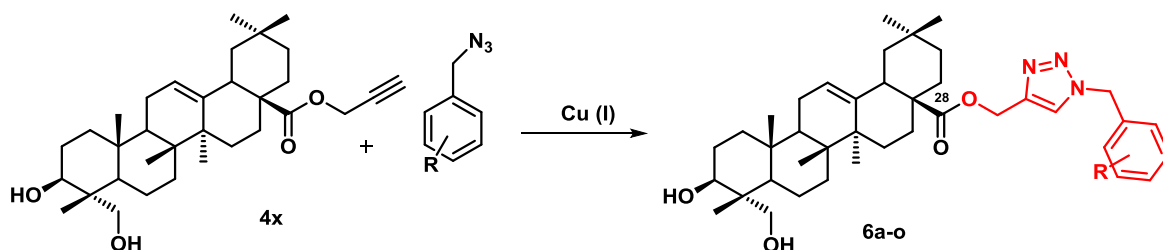


Figura 5.3.2 - Reação geral para a obtenção dos triazóis com grupo éster.

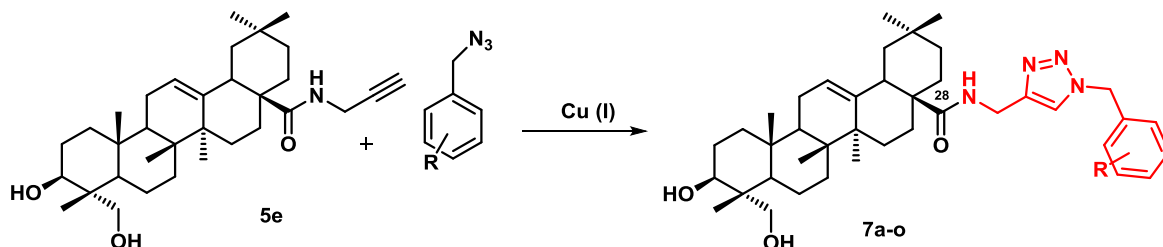


Figura 5.3.3 - Reação geral para a obtenção dos triazóis com grupo amida.

De fato, a ciclo-adição 1,3-dipolar de Huisgen foi aprimorada por alguns grupos de pesquisa (SHARPLESS *et al.*, 2004; MELDAL *et al.*, 2002) sendo a principal contribuição para sua melhoria a adição de cobre como catalisador. A partir de então ela foi denominada CuAAC, sigla do inglês para *copper-catalyzed azide-alkyne cyclo addition*. Além da elevada regioseletividade, formando principalmente o isômero triazol 1,4-disubstituído. Outra vantagem desta reação é a robustez em relação aos grupos presentes nos reagentes, já que a reação “click” não é influenciada pelos efeitos eletrônicos ou estéricos dos substituintes presentes nesses compostos (WU e FOKIN, 2007). Em relação à utilização de catalisador, podem ser utilizados Cu(0), Cu(I) e Cu(II), sendo este último o mais utilizado já que ele é

facilmente reduzido *in situ* na presença de agentes redutores. O agente redutor ascorbato de sódio é o mais utilizado em reações em que a água é o solvente (ROSTOVTSEV et al., 2002).

Em relação ao mecanismo da reação “click”, não há ainda um consenso. Alguns aspectos envolvendo a complexação do Cu(I) e a origem da regioseletividade ainda permanecem desconhecido. A proposta mecanística mais aceita está mostrada na Figura 5.3.4.

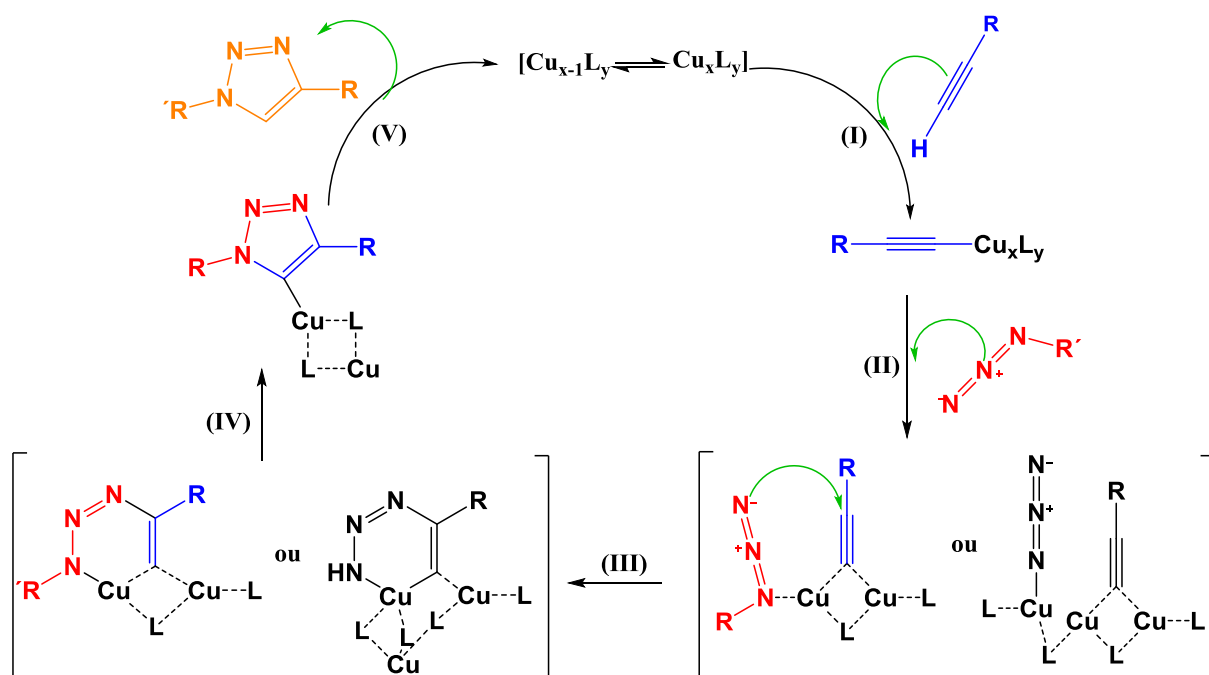


Figura 5.3.4 - Proposta mecanística para a reação “click”.

A primeira etapa é a formação de um complexo de Cu(I) com o Alcino (RODIONOV et al., 2005). Com a formação deste complexo o pKa do alcino terminal reduz para 9,8 o que possibilita a desprotonação em um meio aquoso sem a necessidade de adicionar base (HIMO et al., 2005). A segunda etapa é a coordenação do Cu(I) com a azida orgânica. Esse novo complexo pode ser representado pela coordenação de um ou mais átomos de cobre entre o acetileto e a azida (RODIONOV et al., 2005). Neste intermediário o cobre tem um efeito sinérgico, pois torna o nitrogênio terminal da azida mais eletrofílico e o carbono β -vinilidênico do alcino mais nucleofílico o que favorece a formação do intermediário cíclico contendo um átomo de cobre (um metalociclo). Esta etapa é endotérmica e define a regioseletividade da reação, já que possui uma energia de ativação de 15 kJ mol^{-1} , que é menor que a energia de ativação para a reação não catalisada, 26 kJ mol^{-1} . Esta diferença entre

as energias de ativação também explica o grande aumento da velocidade em relação à reação não catalisada (MEDAL e TORNøE, 2008). Em seguida estabelece-se uma ligação efetiva entre o nitrogênio terminal da azida e o acetileto formando o triazóisídio. Este é hidrolisado formando o triazol 1,4-dissubstituído e regenerando o catalisador (HIMO *et al.*, 2005).

Nesta reação não foi observada a formação de qualquer subproduto o que facilitou muito a purificação, uma vez que os reagentes e o produto possuem polaridades diferentes. Os rendimentos de todos os derivados de triazóis obtidos estão mostrados nas Tabelas 5.3.1 e 5.3.2.

Os 30 derivados de triazóis com grupo éster (**6a-o**) e amida (**7a-o**) são inéditos.

Para todos os compostos foi realizada a determinação da temperatura de fusão e foram caracterizados pelas espectroscopias no IV, RMN de ^1H e de ^{13}C e espectrometria de massas de alta resolução ESI-HRMS e Análise Elementar (CHN).

5.3.2. Caracterização

Derivados triazólicos com grupo éster da hederagenina.

Na Figura 5.3.5 apresenta-se os substituintes dos 15 triazóis com grupo éster da hederagenina. Os derivados triazólicos com grupo éster mostraram no espectro de IV sinais típicos esperados para esta classe de compostos: em 3404 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação O-H, na faixa $3160\text{-}3140$ e $3080\text{-}3040\text{ cm}^{-1}$ referentes ao estiramento das ligações C-H aromático. Por outro lado observou-se a banda característica da carbonila de éster na faixa $1740\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$. Em 1048 cm^{-1} a banda correspondente ao estiramento C-O (BARBOSA, 2011).

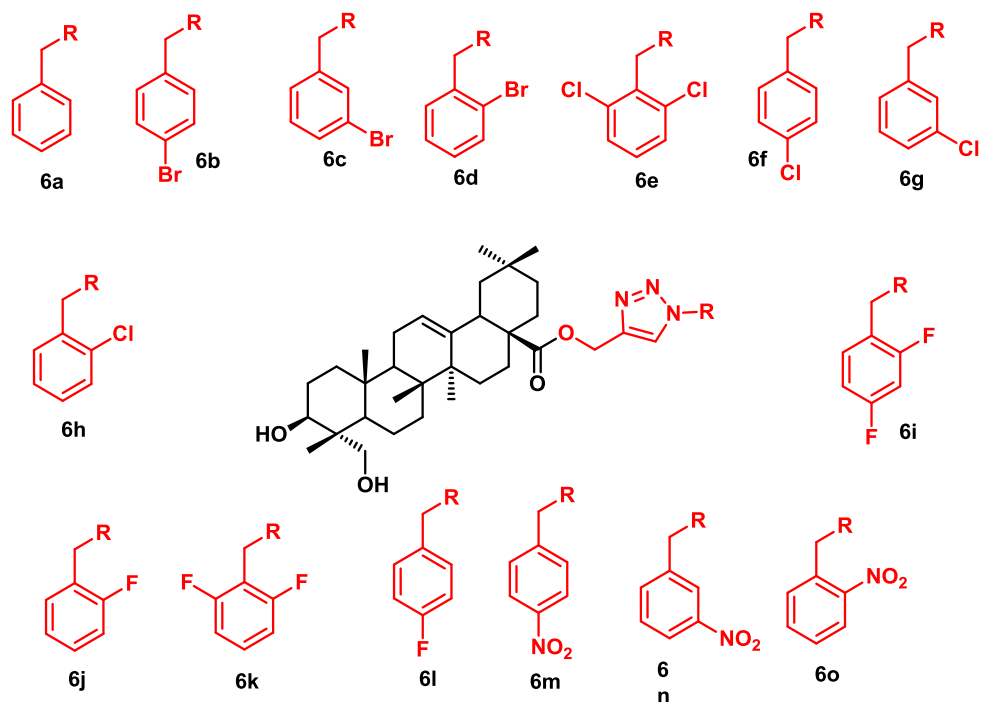


Figura 5.3.5 - Substituintes dos triazóis com grupo éster (**6a-o**).

Os espectros de RMN de ^1H dos derivados triazólicos com grupos éster exibem um sinal como singlete característico do hidrogênio-33 do anel triazol em $\delta_{\text{H}} = 7,50 \pm 0,20$. Adicionalmente, todos os derivados apresentaram três sinais que integram para cinco hidrogênios. O primeiro sinal aparece na faixa de $\delta_{\text{H}} = 5,50$ - $5,35$ pertencente aos hidrogênios metilênicos-34. Em $\delta_{\text{H}} = 5,30 \pm 0,20$ aparece o sinal característico do alqueno trissubstituído da hederagenina e em $\delta_{\text{H}} = 5,10 \pm 0,10$ o singlete correspondente aos hidrogênios metilênicos-31, sendo ambos ligados ao anel triazólico (Figura 5.3.6).

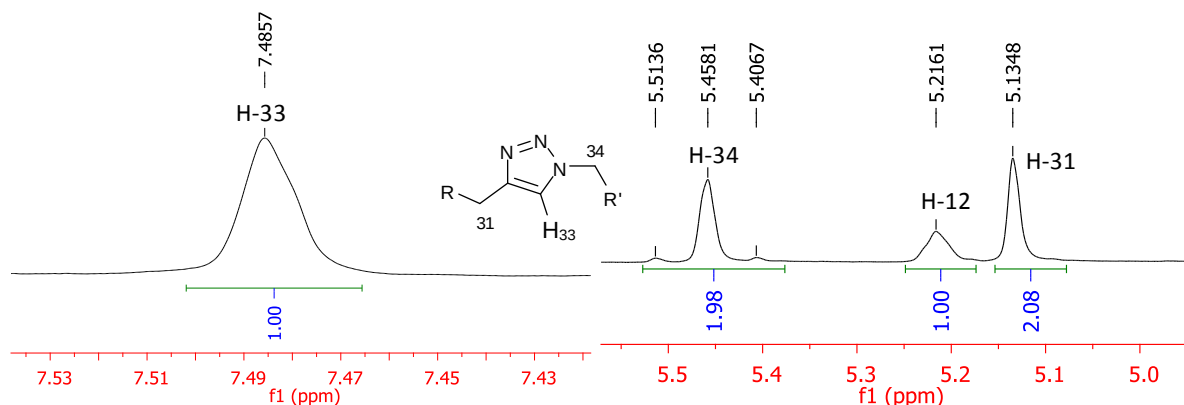


Figura 5.3.6 - Ampliação de parte do espectro de RMN de ^1H do composto **6f**.

Por outro lado observam-se os sinais dos hidrogênios aromáticos para os compostos (**6a-o**) (Figura 5.4.1), dependendo dos grupos substituintes do anel, na faixa de $\delta_H = 8,20$ e 6,90. O composto **6f** que tem um cloro na posição *para* apresentou as sinais de dois hidrogênios aromáticos a $\delta_H = 7,33$ (H-37, H-37') e $\delta_H = 7,18$ (H-36, H-36') cada um como duplete integrando para dois hidrogênios com constante de acoplamento de $J = 8,2$ Hz característica da substituição 1-4 do anel aromático (Figura 5.4.3). O composto **6o** que contém um grupo nitro na posição *orto*, apresenta um hidrogênio aromático na região de $\delta_H = 8,14$ como um duplo duplete com $J = 7,9$ e 1,3 Hz correspondente ao hidrogênio-37, além dois triplo duplete em $\delta_H = 7,60$ (H-38) e $\delta_H = 7,53$ (H-39) ambos com $J = 7,4$ e 1,3 Hz. Um duplo duplete a $\delta_H = 7,07$ (H-40) com $J = 7,6$ e 1,3 Hz, confirmando a presença do um anel *orto* substituído (Figura 5.3.7).

Todos os sinais dos espectros de RMN de ^{13}C para o esqueleto triterpeno nesta série de compostos foram semelhantes com os dados apresentados na literatura para a aglicona hederagenina (BOKE, 2014), com exceção do sinal do C-28 (e os sinais adicionais para os substituintes do éster) (Tabela 5.3.3).

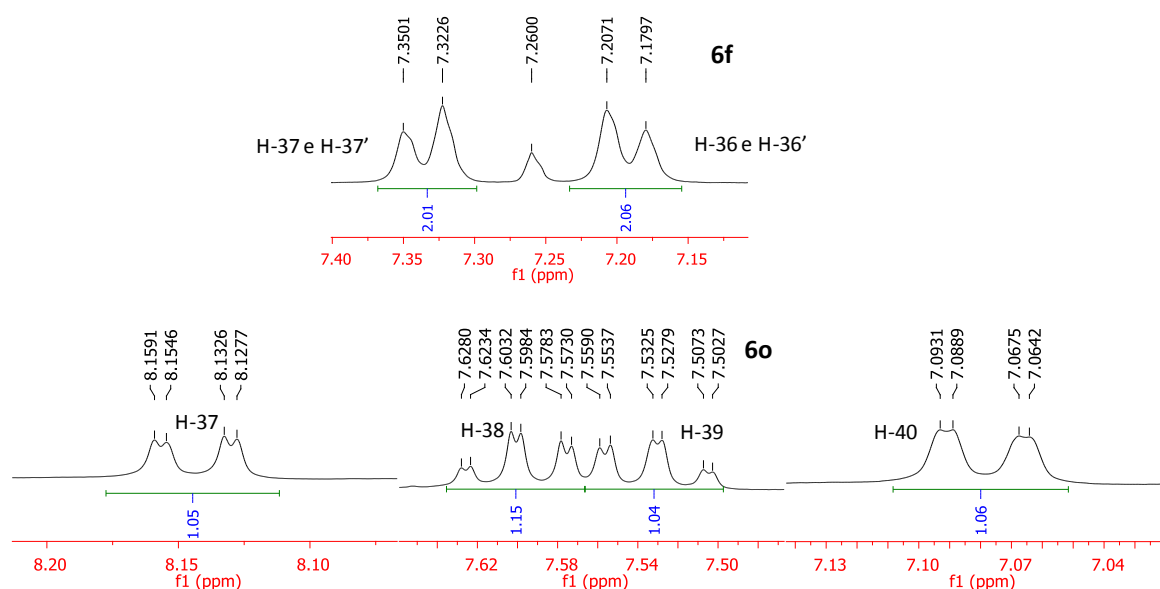


Figura 5.3.7 - Ampliação de parte do espectro de RMN de ^1H dos compostos **6f** e **6o**.

Para o carbono-28 foi observado um deslocamento para campo mais alto em comparação com a carbonila da hederagenina, que apresenta deslocamento em $\delta_C = 180,72$. Nos derivados a carbonila dos grupos ésteres ficam mais blindadas a $\delta_C = 177,5 \pm 0,50$;

confirmando aos dados do espectro no IV. Os compostos contendo flúor como substituintes no anel aromático fornecem os desdobramentos e constante de acoplamento típica de acordo com a posição do halogênio (Tabela 5.3.3). Todos os espectros apresentaram os sinais correspondentes ao alqueno (C-13 em $\delta_c = 143,83$ e C-12 em $\delta_c = 123,92$) como também do anel triazólico (C-32 em $\delta_c = 143,67$ e C-33 em $\delta_c = 122,43$) (Figura 5.3.8).

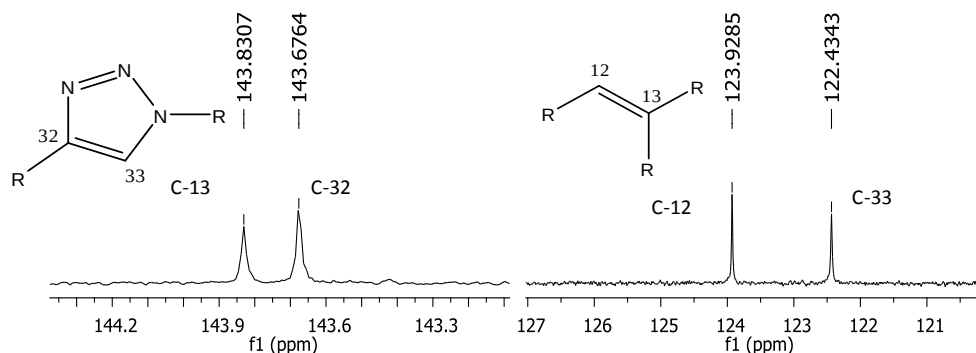


Figura 5.3.8 - Ampliação de parte do espectro de RMN de ^{13}C do composto **6I**.

Na Figura 5.3.9 observou-se sinais característicos dos carbonos metínico-3 ($\delta_c = 76,89 \pm 0,30$) e metilénico-23 ($\delta_c = 72,15 \pm 0,30$), ambos ligados a hidroxila no triterpeno pentacíclico, além dos metilenos-31 e metileno-34 ligados ao triazol ($\delta_c = 57,56 \pm 0,20$ e em $\delta_c = 53,47 \pm 0,20$).

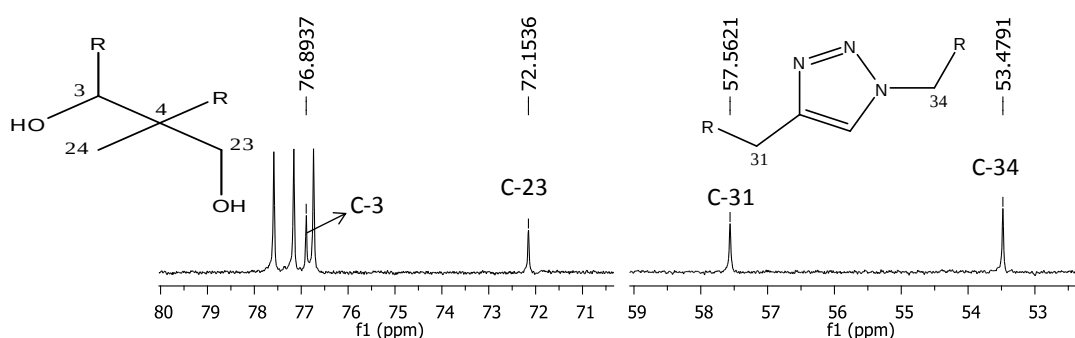


Figura 5.3.9 - Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do composto **6c**.

Todos os experimentos de espectrometria de massa de alta resolução (ESI-HRMS) e Análise Elemental (CHN) confirmaram as massas, fórmulas moleculares e pureza dos derivados triazólicos de éster da hederagenina (ver sessão 5.2.3 e 5.8.1-17).

Tabela 5.3.3 - Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3) dos derivados de triazóis com grupo éster no carbono-28 (**6a-o**) e hederagenina (**3a**).

Nº	3a	6a	6b	6c	6d	6e	6f	6g	6h
C-1	39,14	38,22	38,21	38,21	38,20	38,21	38,21	38,20	38,22
C-2	26,52	25,93	25,92	25,92	25,92	25,92	25,93	25,91	25,94
C-3	73,76	76,91	76,85	76,89	76,87	76,83	76,91	76,85	76,92
C-4	43,24	41,90	41,87	41,88	41,88	41,84	41,91	41,86	41,91
C-5	47,01	46,81	46,80	46,82	46,82	46,78	46,83	46,81	46,82
C-6	18,94	18,61	18,60	18,60	18,57	18,58	18,58	18,58	18,61
C-7	33,56	32,55	32,53	32,55	32,54	32,51	32,56	32,54	32,55
C-8	40,12	39,38	39,37	39,38	39,37	39,34	39,38	39,37	39,39
C-9	48,96	49,88	49,86	49,87	49,86	49,86	49,87	49,85	49,88
C-10	37,59	37,01	36,99	36,99	36,98	36,98	36,99	36,98	37,01
C-11	24,13	23,45	23,46	23,44	23,42	23,45	23,44	23,42	23,47
C-12	122,96	124,00	124,68	124,11	123,96	123,77	123,98	124,12	124,27
C-13	145,18	143,71	143,68	143,89	143,91	143,71	143,92	143,92	143,70
C-14	42,54	41,83	41,81	41,83	41,82	41,79	41,84	41,82	41,83
C-15	28,69	27,72	27,71	27,71	27,70	27,68	27,72	27,69	27,73
C-16	24,05	23,06	23,04	23,07	23,07	22,99	23,08	23,05	23,06
C-17	48,51	47,64	47,63	47,62	47,61	47,62	47,63	47,60	47,65
C-18	42,35	41,37	41,36	41,38	41,36	41,34	41,38	41,36	41,38
C-19	46,80	45,96	45,93	45,94	45,93	45,92	45,95	45,92	45,96
C-20	31,30	30,76	30,75	30,75	30,75	30,74	30,77	30,74	30,77
C-21	34,56	33,92	33,91	33,91	33,90	33,90	33,92	33,89	33,93
C-22	33,33	32,41	32,41	32,41	32,41	32,40	32,43	32,40	32,42
C-23	68,25	72,18	72,10	72,15	72,12	72,08	72,18	72,09	72,19
C-24	13,48	11,57	11,58	11,59	11,59	11,59	11,52	11,58	11,56
C-25	16,32	15,85	15,83	15,84	15,81	15,82	15,81	15,82	15,83
C-26	17,85	16,84	16,86	16,84	16,85	16,73	16,85	16,82	16,86
C-27	28,02	26,82	26,75	26,73	26,78	26,70	26,84	26,74	26,83
C-28	180,53	177,81	177,77	177,85	177,84	177,77	177,86	177,84	177,79
C-29	33,60	33,17	33,15	33,16	33,15	33,14	32,16	33,14	33,17
C-30	24,20	23,71	23,70	23,71	23,69	23,66	23,69	23,69	23,71
Carbonos substituintes do grupo éster (δ , multiplicidade, J Hz)									
C-31	-	57,61	57,58	57,56	57,57	57,53	57,60	57,54	57,61
C-32	-	134,48	143,62	143,66	143,68	143,20	143,70	143,65	143,64
C-33	-	122,44	122,45	122,45	122,43	122,41	122,44	122,44	122,46
C-34	-	54,31	53,95	53,47	53,56	49,16	53,53	53,85	51,56
C-35	-	131,04	134,00	136,69	133,53	136,91	135,06	136,44	133,71
C-36	-	128,22	123,69(Br)	131,12	129,77	131,26(Cl)	129,52	129,18	132,33(Cl)
C36'	-	128,22	130,63	126,66	129,77	129,96(Cl)	129,52	126,18	130,59
C-37	-	129,26	133,39	123,25(Br)	132,43	129,02	129,49	135,17(Cl)	130,48
C37'	-	129,26	130,58	130,79	132,43	129,02	129,49	130,52	127,72
C-38	-	128,97	128,30	132,13	123,16(Br)	129,02	133,04	128,20	130,11
(Cl)									

Tabela continua...

Nº	6i	6j	6k	6l	6m	6n	6o
C-1	38,21	38,22	38,22	38,20	38,20	38,19	38,21
C-2	25,92	25,92	25,93	25,91	25,91	25,91	25,94
C-3	76,81	76,86	76,91	76,85	76,85	76,86	76,89
C-4	41,86	41,87	41,87	41,88	41,89	41,87	41,89
C-5	46,81	46,80	46,80	46,81	46,86	46,83	46,84
C-6	18,55	18,58	18,58	18,56	18,56	18,56	18,59
C-7	32,54	32,53	32,54	32,54	32,57	32,55	32,55
C-8	39,35	39,36	39,36	39,36	39,39	39,37	39,40
C-9	49,84	49,86	49,89	49,85	49,81	49,83	49,86
C-10	36,97	36,98	36,99	36,98	36,98	36,97	37,00
C-11	23,43	23,43	23,44	23,43	23,45	23,42	23,45
C-12	124,08	124,12	124,01	123,92	124,42	124,31	125,04
C-13	143,81	143,70	143,69	143,83	144,26	144,19	143,90
C-14	41,81	41,81	41,81	41,82	41,85	41,82	41,83
C-15	27,69	27,69	27,69	27,70	27,72	27,70	27,73
C-16	23,05	23,05	23,05	23,06	23,10	23,07	23,07
C-17	47,61	47,63	47,64	47,61	47,61	47,59	47,64
C-18	41,36	41,36	41,37	41,36	41,39	41,38	41,39
C-19	45,93	45,93	45,96	45,93	45,93	45,91	45,92
C-20	30,74	30,75	30,76	30,70	30,76	30,74	30,77
C-21	33,91	33,91	33,92	33,91	33,92	33,89	33,92
C-22	32,41	32,39	32,41	32,41	32,46	32,42	32,44
C-23	72,04	72,10	72,17	72,10	72,12	72,10	72,13
C-24	11,57	11,58	11,57	11,55	11,53	11,56	11,56
C-25	15,78	15,80	15,79	15,81	15,82	15,80	15,81
C-26	16,75	16,77	16,67	16,81	16,88	16,85	16,92
C-27	26,72	26,75	26,77	26,77	26,81	26,77	26,80
C-28	177,82	177,79	177,80	177,85	177,92	177,89	177,77
C-29	33,14	33,15	33,16	33,14	33,14	33,13	33,16
C-30	23,67	23,60	23,69	23,67	23,67	23,66	23,71
Carbonos substituintes do grupo éster (δ , multiplicidade, J Hz)							
C-31	57,51	57,51	57,52	57,57	57,50	57,49	57,558
C-32	143,66	143,67	143,56	143,67	143,65	142,63	143,64
C-33	122,46	122,46	122,46	122,43	122,47	122,46	122,52
C-34	47,23	47,80	41,49	53,52	53,20	53,20	50,94
	(d, 3,6)	(d, 4,3)	(t, 4,0)				
C-35	117,92	124,69	110,67	130,38	141,59	136,66	134,43
	(dd, 4,0, 15,0)	(d, 3,6)	(t, 18,5)	(d, 3,0)			
C-36	160,85 (dd, 11,7, 248,9) (F)	160,67 (d, 246,6) (F)	161,48 (d, 6,8, 249,2) (F)	130,11 (d, 8,1)	128,72	123,94	147,59 (NO ₂)
C-36'	131,83 (dd, 4,7, 9,8)	131,14 (d, 32,6)	161,48 (d, 6,8, 249,2) (F)	130,11 (d, 8,1)	128,72	133,96	130,51
C-37	104,54 (t, 25,2)	115,98 (d, 20,9)	111,96 (m)	116,28 (d, 21,7)	124,44	148,67 (NO ₂)	130,53
C-37'	112,31 (dd, 3,6, 21,2)	121,76 (d, 14,5)	111,96 (m)	116,28 (d, 21,7)	124,44	130,42	125,55
C-38	163,47(dd, 11,9, 250,3) (F)	130,74 (d, 3,8)	131,64 (t, 10,1)	162,99 (d, 246,8) (F)	148,23 (NO ₂)	122,95	129,88

Derivados triazólicos com grupo amida da hederagenina.

Na Figura 5.3.10 apresenta-se os substituintes dos triazóis com grupo amida da hederagenina.

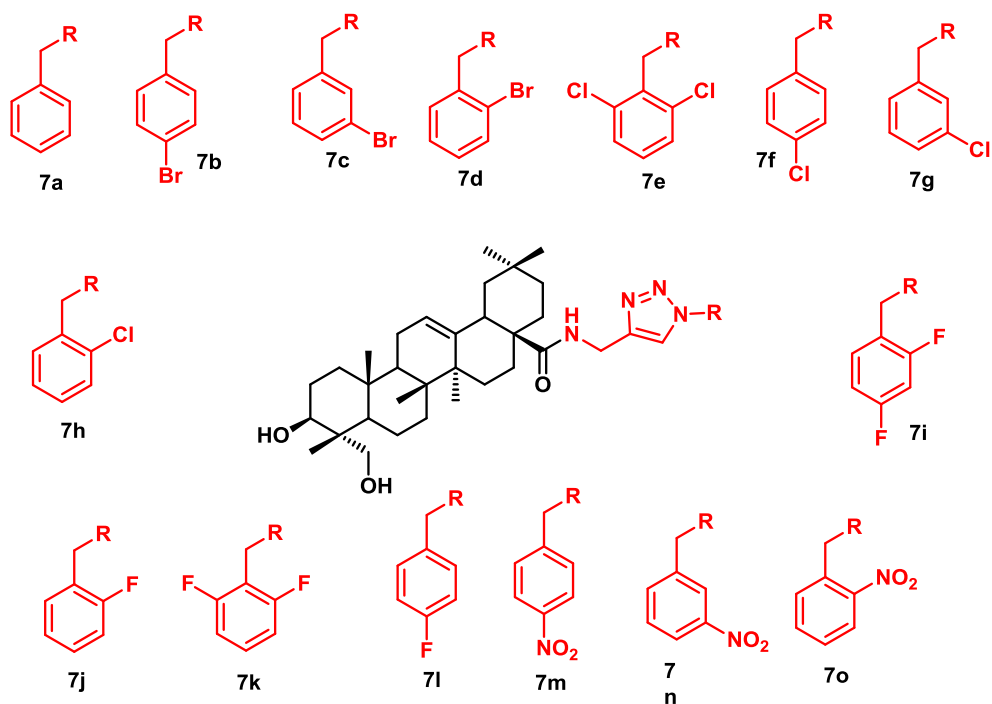


Figura 5.3.10 - Substituintes dos triazóis com grupo amida (**7a-7o**).

No espectro no IV os derivados triazólicos com grupo amida apareceram os sinais esperados: em 3404 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação O-H, na faixa $3160\text{-}3140$ e $3080\text{-}3030\text{ cm}^{-1}$ indicativos ao estiramento das ligações C-H aromático. Na faixa $1660\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$ observou-se a banda característica do grupo carbonila de amida. Todos os derivados apresentam um sinal na faixa $1540\text{-}1515\text{ cm}^{-1}$, correspondente à vibração de tensão do NH da amida. Também a 1048 cm^{-1} a banda correspondente ao estiramento C-O dos grupos hidroxila (BARBOSA, 2011).

Os espectros de RMN de ^1H para os derivados triazólicos com grupo amida (**7a-o**) foram muito similares aos espectros de RMN de ^1H dos derivados triazólicos com grupos éster, com a diferença que a $\delta_{\text{H}} = 6,25 \pm 0,20$ observou-se um tripleto correspondente ao hidrogênio da amida com constante de acoplamento de $J = \pm 5,3\text{ Hz}$, além o duplo duplete correspondente

aos hidrogênios do metileno-31 a $\delta_H = 4,40 \pm 0,40$ com constante de acoplamento de $J = \pm 5,3$ e 15,0 Hz, (Figura 5.3.11).

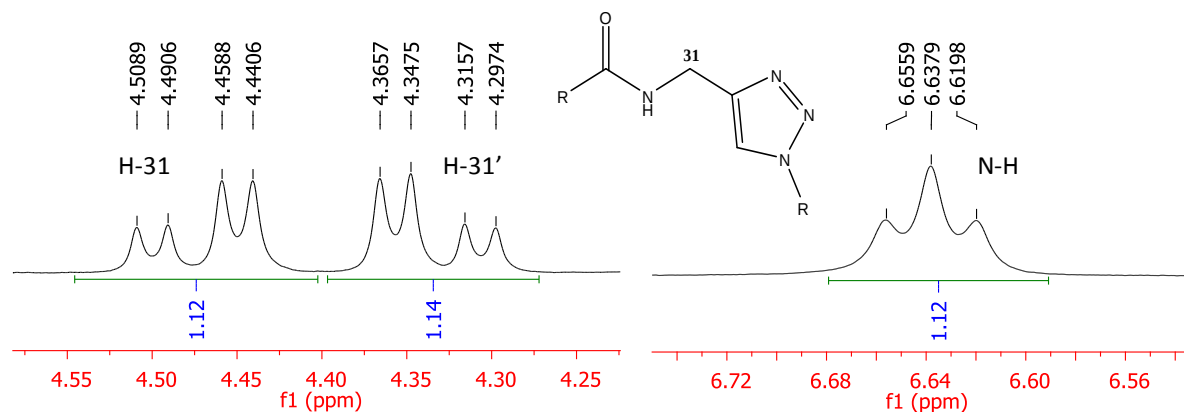


Figura 5.3.11 - Ampliação de parte do espectro de RMN de ^1H do composto **7n**.

Todos os sinais dos espectros de RMN de ^{13}C para o esqueleto triterpeno nesta série de compostos foram semelhantes como os dados apresentados na literatura para a hederagenina (BOKE, 2014), com exceção do sinal do C-28 (e os sinais adicionais para os substituintes da amida) (Tabela 5.3.4). No sinal do carbono-28 foi observado um deslocamento para campo mais alto em comparação com a hederagenina, que apresenta um sinal em $\delta_C = 180,72$ para a carbonila do ácido, os derivados da amida apresentam a carbonila em $\delta_C = 178,5 \pm 0,50$ confirmando a presença do grupo funcional. No entanto, todos os espectros de RMN de ^{13}C apresentam muitas similaridades com os espectros dos derivados triazólicos com grupo éster, com a diferença do carbono metilênico-31 que aparecem mais blindados devido à ligação do nitrogênio do grupo amida (Tabela 5.3.4).

Todos os experimentos de espectrometria de massa de alta resolução (ESI-HRMS) e Análise Elementar (CHN) confirmaram as massas, fórmulas moleculares e pureza dos derivados triazólico das amidas da hederagenina (ver sessão 5.2.18 e 5.8.7-32).

Tabela 5.3.4 - Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3) dos derivados de triazóis com grupo amida no carbono-28 (**7a-o**) e hederagenina (**3a**).

Nº	3a	7a	7b	7c	7d	7e	7f	7g	7h
C-1	39,14	38,26	38,25	38,25	38,25	38,25	38,24	38,24	38,26
C-2	26,52	25,85	25,85	25,86	25,84	25,85	25,84	25,84	25,87
C-3	73,76	76,63	76,60	76,73	76,68	76,61	76,64	76,65	76,73
C-4	43,24	42,08	42,06	42,12	42,09	42,02	42,08	42,09	42,12
C-5	47,01	46,72	46,71	46,73	46,73	46,70	46,72	46,71	46,75
C-6	18,94	18,52	18,53	18,56	18,49	18,52	18,47	18,52	18,57
C-7	33,56	32,55	32,56	32,57	32,56	32,57	32,56	32,55	32,57
C-8	40,12	39,37	39,37	39,38	39,35	39,35	39,35	39,37	39,40
C-9	48,96	49,68	49,67	49,71	49,69	49,68	49,68	49,69	49,72
C-10	37,59	36,91	36,90	36,91	36,90	36,89	36,89	36,89	36,93
C-11	24,13	23,68	23,68	23,69	23,66	23,66	23,65	23,67	23,69
C-12	122,96	123,27	123,26	123,27	123,26	123,24	123,25	123,27	123,27
C-13	145,18	145,17	145,05	145,44	145,39	144,65	145,38	145,41	145,10
C-14	42,54	42,06	42,06	42,08	42,06	42,02	42,06	42,06	42,08
C-15	28,69	27,30	27,32	27,32	27,29	27,29	27,28	27,29	27,33
C-16	24,05	23,52	23,53	23,53	23,52	23,51	23,51	23,51	23,55
C-17	48,51	47,59	47,58	47,59	47,57	47,58	47,56	47,57	47,62
C-18	42,35	41,89	41,88	41,90	41,90	41,87	41,88	41,88	41,92
C-19	46,80	46,32	46,32	46,34	46,33	46,30	46,33	46,33	46,35
C-20	31,30	30,80	30,79	30,81	30,80	30,79	30,80	30,79	30,82
C-21	34,56	34,19	34,20	34,20	34,19	34,20	34,19	34,18	34,22
C-22	33,33	32,20	32,20	32,24	32,21	32,21	32,20	32,22	32,22
C-23	68,25	71,84	71,80	71,93	71,90	71,81	71,85	71,85	71,98
C-24	13,48	11,62	11,63	11,61	11,63	11,63	11,61	11,61	11,58
C-25	16,32	15,87	15,87	15,87	15,86	15,85	15,84	15,84	15,87
C-26	17,85	16,61	16,62	16,63	16,62	16,52	16,61	16,61	16,63
C-27	28,02	26,69	26,66	26,74	26,72	26,66	26,69	26,68	26,78
C-28	180,53	178,56	178,55	178,65	178,67	178,43	178,68	178,67	178,54
C-29	33,60	33,08	33,08	33,09	33,07	33,08	33,07	33,07	33,16
C-30	24,20	23,92	23,91	23,96	23,95	23,88	23,93	23,92	23,96
Carbonos substituintes do grupo amida (δ , multiplicidade, J Hz)									
C-31	-	35,14	35,12	35,16	35,16	35,02	35,15	35,14	35,15
C-32	-	144,28	144,29	144,31	144,31	144,23	144,29	144,28	144,34
C-33	-	122,55	122,97	122,72	122,68	122,37	122,67	122,75	122,91
C-34	-	53,93	53,93	53,47	53,55	49,10	53,50	53,53	51,55
C-35	-	134,60	134,10	136,83	133,69	136,88	134,95	136,57	133,72
C-36	-	128,19	123,68	131,15	129,82	131,20	129,54	129,11	132,44
			(Br)			(Cl)			(Cl)
C-36'	-	128,19	130,56	126,71	129,82	130,04	129,54	126,22	130,58
						(Cl)			
C-37	-	129,19	133,36	123,20	132,36	128,99	129,39	135,11	130,41
				(Br)				(Cl)	
C-37'	-	129,19	130,56	130,72	132,36	128,99	129,39	130,46	127,65
C-38	-	128,89	128,25	132,06	123,08	128,99	133,17	128,23	130,09
					(Br)		(Cl)		

Tabela continua...

Nº	7i	7j	7k	7l	7m	7n	7o
C-1	38,24	38,25	38,23	38,25	38,24	38,23	38,24
C-2	25,83	25,85	25,82	25,84	25,84	25,84	25,87
C-3	76,57	76,64	76,52	76,65	76,68	76,67	76,66
C-4	42,07	42,08	42,00	42,08	42,08	42,08	42,09
C-5	46,70	46,72	46,67	46,72	46,73	46,70	46,71
C-6	18,46	18,52	18,46	18,48	18,47	18,48	18,52
C-7	32,56	32,55	32,54	32,57	32,58	32,57	32,57
C-8	39,34	39,37	39,31	39,36	39,36	39,37	39,40
C-9	49,65	49,69	49,64	49,68	49,66	49,67	49,69
C-10	36,88	36,90	36,85	36,90	36,90	36,90	36,91
C-11	23,64	23,67	23,63	23,65	23,64	23,64	23,68
C-12	123,26	123,27	123,26	123,26	123,28	123,26	123,74
C-13	145,28	145,15	144,96	145,34	145,77	145,71	145,35
C-14	42,04	42,05	42,00	42,06	42,08	42,06	42,06
C-15	27,27	27,30	27,25	27,29	27,28	27,29	27,33
C-16	23,50	23,52	23,47	23,52	23,53	23,51	23,54
C-17	47,56	47,58	47,54	47,57	47,55	47,55	47,59
C-18	41,86	41,88	41,83	41,89	41,83	41,87	41,88
C-19	46,33	46,33	46,29	46,34	46,36	46,34	46,35
C-20	30,78	30,80	30,76	30,80	30,80	30,79	30,80
C-21	34,18	34,20	34,17	34,19	34,19	34,17	34,19
C-22	32,20	32,20	32,17	32,21	32,23	32,23	32,22
C-23	71,76	71,84	71,68	71,87	71,93	71,89	71,86
C-24	11,60	11,62	11,64	11,59	11,56	11,58	11,60
C-25	15,81	15,84	15,77	15,85	15,86	15,82	15,84
C-26	16,51	16,54	16,39	16,59	16,68	16,65	16,70
C-27	26,64	26,68	26,57	26,70	26,71	26,69	26,68
C-28	178,63	178,54	178,52	178,64	178,82	178,76	178,64
C-29	33,06	33,08	33,06	33,07	33,06	33,06	33,08
C-30	23,91	23,91	23,85	23,94	23,99	23,94	23,92
Carbonos substituintes do grupo amida (δ , multiplicidade, J Hz)							
C-31	35,07	35,08	34,94	35,14	35,19	35,14	35,15
C-32	144,26	144,27	144,16	144,29	143,34	144,30	144,33
C-33	122,74	122,71	122,59	122,58	123,19	123,02	123,28
C-34	47,22 (d, 3,5)	47,80 (d, 4,2)	41,30 (t, 3,9)	53,51	53,19	53,18	50,96
C-35	118,05 (dd, 3,7, 14,6)	124,88 (d, 3,7)	110,73 (t, 18,9)	130,55 (d, 3,3)	141,74	136,79	134,37
C-36	160,85 (dd, 11,8, 249,3) (F)	160,66 (d, 246,7) (F)	161,42 (dd, 6,8, 250,0) (F)	130,11 (d, 8,4)	128,80	123,87	147,58 (NO ₂)
C-36'	131,80 (dd, 4,6, 9,8)	131,06 (d, 8,1)	161,42 (dd, 6,8, 250,0) (F)	130,11 (d, 8,4)	128,80	134,01	130,41
C-37	104,51 (t, 25,2)	115,97 (d, 20,9)	111,89 (m)	116,20 (d, 21,6)	124,38	148,65 (NO ₂)	125,53
C-37'	112,20 (dd, 3,8, 21,5)	121,89 (d, 14,5)	111,89 (m)	116,20 (d, 21,6)	124,38	130,33	130,60
C-38	163,42(dd, 11,6, 249,9) (F)	130,71 (d, 3,2)	131,53 (t, 10,2)	162,95 (d, 246,61) (F)	148,73 (NO ₂)	123,02	129,80

5.3.3. Ensaios biológicos

Ensaios citotóxicos

Os derivados triazólicos com ésteres (**6a-o**) e amidas (**7a-o**) da hederagenina foram submetidas a teste de atividade antitumoral utilizando um ensaio de sulforodamina-B (SRB) (SKEHAN *et al.*, 1990). Os valores de EC₅₀ foram determinados por seis diferentes linhagens diferentes de células de câncer humanas [518A2 (células de melanoma), células A2780 (carcinoma do ovário), HT29 (adenocarcinoma de cólon), MCF7 (adenocarcinoma de mama), A549 (câncer de pulmão), 8505C (carcinoma de tireóide)] e fibroblastos não-malignas de ratos (NIH 3T3). Os valores de EC₅₀ mostrados na Tabela 5.3.5, foram calculados a partir da curvas de dose resposta semi-logarítmicas por meio de regressão não-linear, aplicando dois parâmetros da equação de Hill-slope.

Em geral, a conversão da hederagenina (**He**) em ésteres e amidas que ostentam uma unidade de 1,2,3-triazol resultou em um aumento da citotoxicidade. Tal como mostrado em todas as linhagens celulares de câncer humano. Éster substituído com um grupo 1,2,3-triazol apresentaram maior citotoxicidade do que hederagenina (Figura 5.3.12). No entanto, alguns derivados de amida com o grupo 1,2,3-triazol foram menos ativos do que hederagenina para linhagens de células A549 (câncer de pulmão) e 8505C (carcinoma da tireóide) (Figura 5.3.13). Estes resultados indicam que a presença de um grupo volumoso ligado a carbonil-28 do esqueleto triterpeno modula a sua atividade citotóxica. Resultados semelhantes foram observados previamente para a o ácido 23-hidroxioleanólico (**He**) quando na sua forma natural (ácido livre) foi observada citotoxicidade 20-vezes mais baixa, em comparação com os derivados éster e amida correspondentes (ver capítulo 3). Os compostos 1,2,3-triazólicos que possuem um grupo éster são geralmente mais citotóxica do que as amidas na posição-28. Por isso, assumiu-se que as melhorias podem ser o resultado de diferentes mecanismos no transporte dos compostos através da membrana ou o a traves de diferentes tipos de integração na membrana celular (SIEWERT *et al.*, 2013; PRADES *et al.*, 2011).

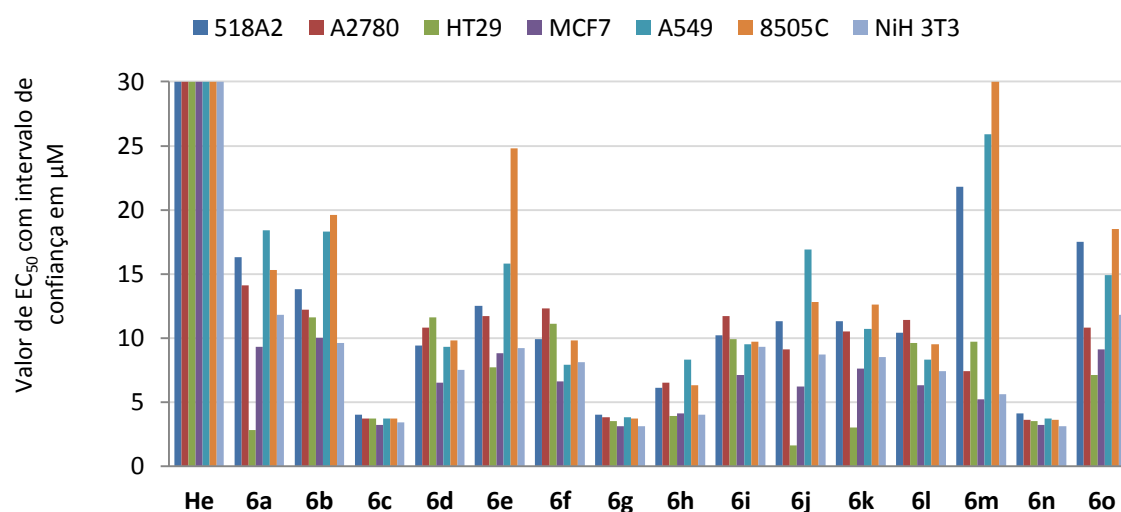


Figura 5.3.12 - Comparação dos valores de EC_{50} (a partir de ensaios de SRB, após 96 h de incubações com várias linhagens de células tumorais com um intervalo de confiança = 95/).

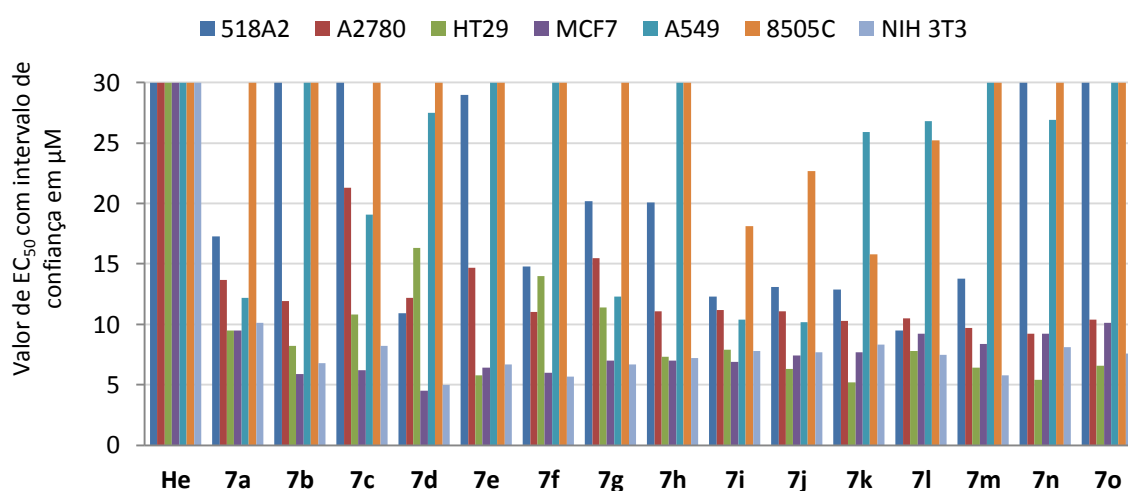


Figura 5.3.13 - Comparação dos valores de EC_{50} (a partir de ensaios de SRB, após 96 h de incubações com várias linhagens de células tumorais com um intervalo de confiança = 95/).

Na linhagem celular MCF-7 (adenocarcinoma da mama) todos os derivados **6a-o** e **7a-o** mostraram uma atividade citotóxica igual ou menor a 10 μ M (Tabela 5.3.5).

Tabela 5.3.5 - Citotoxicidade da hederagenina (**He**) e seus análogos **6a-o** e **7a-o** empregando linhagens celulares tumorais humanas (518A2, A2780, HT29, MCF7, A549, 8505C) e fibroblastos não-malignas de ratos NIH 3T3.

EC ₅₀ *	518A2	A2780	A549	HT29	MCF7	8505C	NIH 3T3
He	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30
6a	16,3	14,1	18,4	2,8	9,3	15,3	11,8
6b	13,8	12,2	18,3	11,6	10,0	19,6	9,6
6c	4,0	3,7	3,7	3,7	3,2	3,7	3,4
6d	9,4	10,8	9,3	11,6	6,5	9,8	7,5
6e	12,5	11,7	15,8	7,7	8,8	24,8	9,2
6f	9,9	12,3	7,9	11,1	6,6	9,8	8,1
6g	4,0	3,8	3,8	3,5	3,1	3,7	3,1
6h	6,1	6,5	8,3	3,9	4,1	6,3	4,0
6i	10,2	11,7	9,5	9,9	7,1	9,7	9,3
6j	11,3	9,1	16,9	1,6	6,2	12,8	8,7
6k	11,3	10,5	10,7	3,0	7,6	12,6	8,5
6l	10,4	11,4	8,3	9,6	6,3	9,5	7,4
6m	21,8	7,4	25,9	9,7	5,2	>30	5,6
6n	4,1	3,6	3,7	3,5	3,2	3,6	3,1
6o	17,5	10,8	14,9	7,1	9,1	18,5	11,8
7a	17,3	13,7	12,2	9,5	9,5	>30	10,1
7b	>30	11,9	>30	8,2	5,9	>30	6,8
7c	>30	21,3	19,1	10,8	6,2	>30	8,2
7d	10,9	12,2	27,5	16,3	4,5	>30	5,0
7e	29,0	14,7	>30	5,8	6,4	>30	6,7
7f	14,8	11,0	>30	14,0	6,0	>30	5,7
7g	20,2	15,5	12,3	11,4	7,0	>30	6,7
7h	20,1	11,1	>30	7,3	7,0	>30	7,2
7i	12,3	11,2	10,4	7,9	6,9	18,1	7,8
7j	13,1	11,1	10,2	6,3	7,4	22,7	7,7
7k	12,9	10,3	25,9	5,2	7,7	15,8	8,3
7l	9,5	10,5	26,8	7,8	9,2	25,2	7,5
7m	>30	9,2	26,9	5,4	9,2	>30	8,1
7n	>30	9,2	26,9	5,4	9,2	>30	8,1
7o	>30	10,4	>30	6,6	10,1	>30	7,6

*Valores de EC₅₀ em µM para os ensaios SRB após 96 h de tratamento; os valores são media de pelo menos três experiências independentes realizadas em triplicado cada; IC = intervalo de confiança de 95/

Para a linhagem de células humanas HT29 (adenocarcinoma do cólon), a atividade dos compostos substituídos em *orto* (**6b**, **7b**, **6n**, **7n**, **6j** e **7j**) diminuiu com o raio atômico do halogênio (Figura 5.3.14).

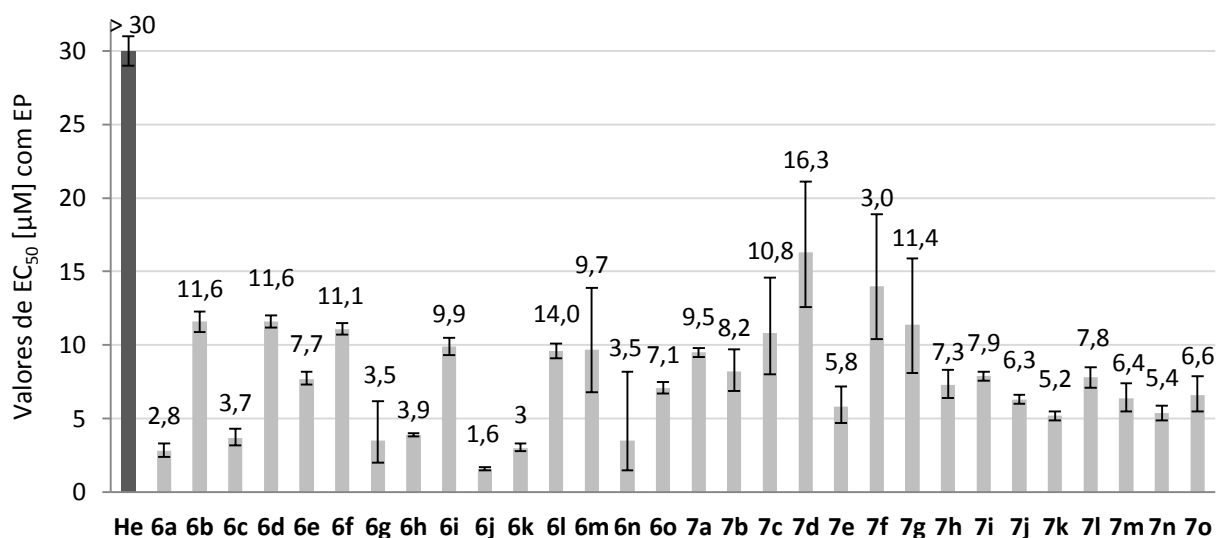


Figura 5.3.14 - Citotoxicidade (valores de EC₅₀ em μM com erro padrão (EP), a partir dos ensaios de SRB) para a hederagenina (**He**) e os derivados **6a-o** e **7a-o** usando a linhagem de células humanas HT29 (adenocarcinoma do cólon).

Além disso, o éster da hederagenina com o substituinte *orto*-fluorobenzil-1,2,3-triazol **6j** foi o composto mais ativo contra a linhagem de células humanas HT29 com um EC₅₀ = 1,6 μM. Este composto também exibiu alguma seletividade (SI é definido como o quociente dos valores de EC₅₀ de acordo com a EC₅₀[NIH 3T3]/EC₅₀[linhagem de células tumorais]) na citotoxicidade discriminar entre a linhagem celular de câncer HT29 e fibroblastos não-malignas de ratos NIH 3T3. Para este composto **6j**, verificou-se que o índice de seletividade (IS) é = 5,4. Além disso, o éster da hederagenina ligado ao benzil-1,2,3-triazol **6a** (EC₅₀ = 2,8 μM) também derum uma boa seletividade IS = 4,2 (Tabela 5.3.6).

Tabela 5.3.6 - Índice de seletividade (IS) dos derivados triazólicos da hederagenina.

IS*	518A2	A2780	A549	HT29	MCF7	8505C
He	-	-	-	-	-	-
6a	0,7	0,8	0,6	4,2	1,2	0,7
6b	0,7	0,8	0,5	0,8	0,9	0,5
6c	0,8	0,9	1,0	1,0	1,0	1,1
6d	0,8	0,7	0,8	0,6	1,1	0,8
6e	0,7	0,8	0,6	1,0	1,2	0,3
6f	0,8	0,6	1,0	0,7	1,2	0,8
6g	0,8	0,8	0,8	0,9	1,0	0,8
6h	0,7	0,6	0,5	1,0	1,0	0,6
6i	0,9	0,8	1,0	0,9	1,3	0,9
6j	0,7	0,9	0,5	5,4	1,4	0,7
6k	0,7	0,8	0,8	2,8	1,1	0,7
6l	0,7	0,6	0,9	0,8	1,2	0,8
6m	0,3	0,7	0,2	0,6	1,0	-
6n	0,7	0,9	0,8	0,9	1,0	0,9
6o	0,7	1,1	0,8	1,7	1,3	0,6
7a	0,6	0,7	0,8	1,0	1,0	-
7b	-	0,6	-	0,8	1,1	-
7c	-	0,4	0,4	0,8	1,3	-
7d	0,4	0,4	0,2	0,3	1,1	-
7e	0,2	0,4	-	1,1	1,0	-
7f	0,4	0,5	-	0,4	1,0	-
7g	0,3	0,4	0,5	0,6	0,9	-
7h	0,3	0,6	-	1,0	1,0	-
7i	0,6	0,7	0,7	1,0	1,1	0,4
7j	0,6	0,7	0,7	1,2	1,0	0,3
7k	0,6	0,8	0,3	1,6	1,1	0,5
7l	0,8	0,7	0,3	1,0	0,8	0,3
7m	-	0,9	0,3	1,5	0,9	-
7n	-	0,9	0,3	1,5	0,9	-
7o	-	0,7	-	1,1	0,7	-

*IS é definido como o quociente dos valores de EC₅₀ de acordo com o EC₅₀[NIH 3T3]/EC₅₀ [linhagem de células tumorais]).

Os derivados de éster da hederagenina que possuem um substituinte *m*-bromo (**6c**), *m*-cloro (**6g**) e *m*-nitro (**6n**) foram os compostos mais ativos contra todas as linhagens de células humanas testadas até agora, mostrando valores de EC₅₀ variando entre 3,2-4,0 µM para **6c**, entre 3,1-4,0 µM para **6g** e entre 3,2-4,1 µM para **6m** (Figura 5.3.15). Estes resultados revelaram que estes compostos (**6c**, **6g** e **6n**) são aproximadamente 30 vezes mais ativo do que a hederagenina (Tabela 5.3.5, Figura 5.3.15). No entanto, eles mostraram a seletividade mais baixa entre as células malignas e não malignas (Tabela 5.3.6).

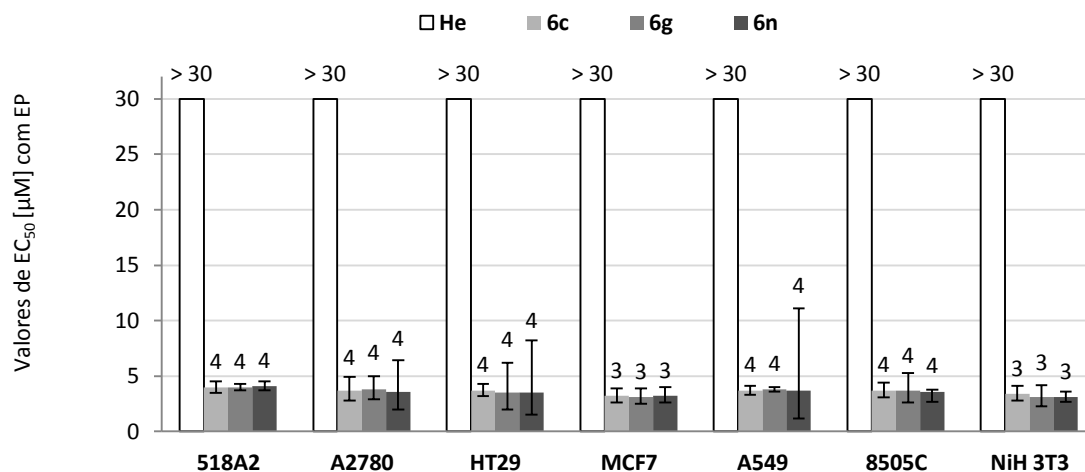


Figura 5.3.15 - Citotoxicidade a partir dos ensaios de SRB da hederagenina (**He**) e os análogos **6c**, **6g** e **6n** contra todas as linhagens celulares.

Para obter uma visão mais profunda sobre seu modo de ação, os compostos **6g** e **6j** foram submetidos a experimentos adicionais usando o ensaio de exclusão de corante de laranja de acridina/iodeto de propídio (AO/PI). A Figura 5.3.16 mostra os resultados da análise de fluorescência espectroscópica de células de câncer de mama (MCF7) após o tratamento com **6g** (10 μM) ou **6j** (10 μM) durante 72 h.

Geralmente, a morte celular por necrose é descrita por uma perda da integridade da membrana celular e a integridade da membrana da célula pode ser investigada por um ensaio de fluorescência microscópica com corante de exclusão (AO/PI). Neste ensaio de laranja de acridina (AO), como corante de fluorescência verde, permeia a membrana celular e manchas de células mortas possuindo uma membrana intacta. Assim, as células tendo morto pela ativação de um programado evento de morte celular mostraram fluorescência verde. Iodeto de propídio (PI), no entanto, apenas manchas as células mortas com uma membrana de células partidas; Assim, uma cor vermelha escuro é observada. A ocorrência de pontos vermelhos (compartimentos ácidos) indica um processo de apoptose dependente da autofagia.

Na Figura 5.3.16 observou-se células tingidas com fluorescência verde, elas são típicas de uma morte programada, não necrosante. A setas de cor verde claro, indica a formação típica de bolhas de membrana; setas roxas clara indicam a formação típica de membrana de

vesículas na membrana do núcleo, e as setas azuis clara apontam para pontos de cor laranja que poderiam ser autofagossomas e indicar uma autofagia.

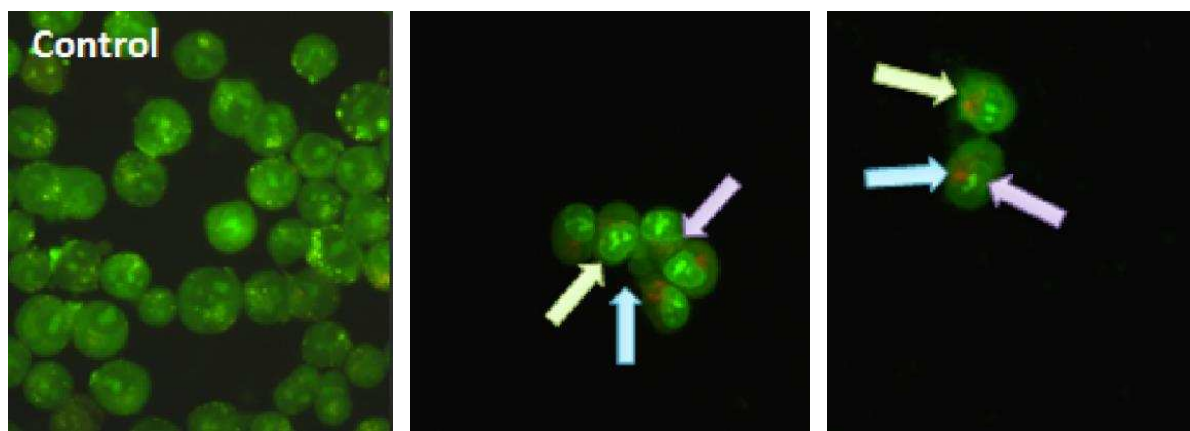


Figura 5.3.16 - Ensaio de exclusão com corante AO/PI empregando células de câncer de mama MCF-7, tratada com **6g** (10 μ M) ou **6j** (10 μ M) durante 72 h: Esquerda: controle; Média: células tratadas com **6g**; direito: células tratadas com **6j**; As células de células flutuantes (mortas) foram coletadas, lavadas com PBS e submetidas a uma investigação microscópica de fluorescência.

5.4. Conclusões

Em resumo, uma série de 16 triazóis com grupo éster (**6a-o**) e 16 triazóis com grupo amida (**7a-o**) da hederagenina foram sintetizados através do emprego de Cu (I) em reações cicloadição 1,3-dipolar de alcino terminal derivados da Hederagenina (**4x** e **5e**) com diversas azidas benzílicas (**a-o**) com rendimentos na faixa 60-90%.

Todos os análogos triazólicos de éster e amida da hederagenina preparados são inéditos.

Em comparação com a hederagenina a maioria dos análogos exibiu maior citotoxicidade contra todas as linhagens celulares de câncer testadas. Os derivados de éster tiveram maior citotoxicidade do que as amidas. Além disso, os ésteres de **6c**, **6g** e **6n** foram os derivados mais ativos contra todas as linhagens celulares testadas, mostrando valores EC_{50} na faixa de 3,0-4,1 μ M.

Por outro lado, os derivados **6a** e **6j** foram os mais citotóxicos contra a linhagem de células de câncer do cólon (HT29) com EC_{50} = 2,8 μ M e 1,6 μ M, respectivamente. Além disso, o composto **6j** mostrou alguma seletividade para a linhagem celular de câncer HT29, sendo menos tóxico para o fibroblasto não-maligno de ratos NIH 3T3 com índice de seletividade IS = 5,4. Mas também, o composto **6a** apresentou boa seletividade IS = 4,2 entre a linhagem celular de câncer de cólon (HT29) e fibroblastos de rato não-malignos (NIH 3T3).

Por meio de um ensaio de exclusão de corante acridina AO/PI, empregando células MCF-7, (adenocarcinoma de mama), os compostos **6g** e **6j**, atuam, principalmente, por um mecanismo de morte celular programada.

5.5. Referências bibliográficas

AHER, N.G., PORE, V.S., MISHRA, N.N., KUMAR, A., SHUKLA, P.K., SHARMA, A., BHAT, M.K. Synthesis and antifungal activity of 1,2,3-triazole containing fluconazole analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 19, p. 759-763, 2009.

ANJOS, J.V., FILHO, R., NASCIMENTO, S.C., SRIVASTAVA, R.M., MELO, S.J., SINOUE, D. Synthesis and cytotoxic profile of glycosyl-triazole linked to 1,2,4-oxadiazole moiety at C-5 through a straight-chain carbon and oxygen atoms. *Eur. J. Med. Chem.*, v. 44, p. 3571-3576, 2009.

BAKUNOV, S.A., BAKUNOVA, S.M., WENZLER, T., GHEBRU, M., WERBOVETZ, K. A., BRUN, R., TIDWELL, R.R. Synthesis and Antiprotozoal Activity of Cationic 1,4-Diphenyl-1H-1,2,3-triazoles. *J. Med. Chem.*, v. 53, p. 254-272, 2010.

BARBOSA, L.C.A. Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos, Editora UFV, Viçosa, 2011.

BOECHAT, N., FERREIRA, V.F., FERREIRA, S.B., FERREIRA, M.L.G., SILVA, F.C., BASTOS, M.M., COSTA, M.S., *et al.* Novel 1,2,3-Triazole Derivatives for Use against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) Strain. *J. Med. Chem.*, v. 54, p. 5988-5999, 2011.

BOKE, N. Aristatosides A-C, hederagenin-type triterpene saponins from *Cephalaria aristata*. *Phytochemistry Letters*, v. 8, p. 149-155, 2014.

CAFICI, L., PIRALI, T., CONDORELLI, F., GROSSO, E.D., MASSTI, A., SORBA, G., CANONICO, P.L., TRON, G.C., GENAZZANI, A.A. Solution-Phase Parallel Synthesis and Biological Evaluation of Combretatriazoles. *Journal of Combinatorial Chemistry*, v. 10, p. 732-740, 2008.

CARVALHO, I., ANDRADE, P., CAMPO, V.L., GUEDES, P.M.M., SESTI-COSTA, R., SILVA, J.S., SCHENKMAN, S., DEDOLA, S., HILL, L., REJZEK, M., NEPOGODIEV, S.A., FIELD, R.A. Click chemistry' synthesis of a library of 1,2,3-triazole-substituted galactose derivatives and their evaluation against *Trypanosoma cruzi* and its cell surface trans-sialidase. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 18, p. 2412-2427, 2010.

GALLARDO, H., CONTE, G., BRYK, F., LOURENÇO, M.C.S., COSTA, M.S., FERREIRA, V.F. Synthesis and evaluation of 1-alkyl-4-phenyl-[1,2,3]-triazole derivatives as antimycobacterial agent. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 6, p. 1285-1291, 2007.

GUANTAI, E.M., NCOKAZI, K., EGAN, T.J., GUT, J., ROSENTHAL, P.J., SMITH, P.J., CHIBALE, K. Design, synthesis and in vitro antimalarial evaluation of triazole-linked chalcone and dienone hybrid compounds. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 18, p. 8243-8256, 2010.

HIMO, F., LOVELL, T., HILGRAF, R., ROSTOVTSEV, V.V., NOODLEMAN, L., SHARPLESS, K.B., FOKIN, V.V. Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. *Journal of the American Chemical Society*, v. 127, p. 210-216, 2005.

KAMAL, A., SHANKARAIAH, N., DEVAIAH, V., REDDY, K. L., JUVEKAR, A., SEN, S., KURIAN, N., ZINGDE, S. Synthesis of 1,2,3-triazole-linked pyrrolobenzodiazepine conjugates employing 'click' chemistry: DNA-binding affinity and anticancer activity. *Bioorg. Med. Chem Lett.*, v. 18, p. 1468-1473, 2008.

KOLB, H.C., SHARPLESS, K.B. The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discovery Today*, v. 8, p. 1128-1137, 2003.

LECLERC, J.P., LI, C.S., RAMTOHUL, Y. Heteromatic compounds as inhibitors of Steyl-coenzyme a delta-9 desaturase. US 0166152A1. 2011.

LEDNICER, D., MITSCHER, L. A. *The Organic Chemistry of Drug Synthesis*, Vol. 2., USA, 1980.

MANETSCH, R., KRASINSKI, A., RADIC, Z., RAUSHEL, J., TAYLOR, P., SHARPLESS, K.B., KOLB, H.C. In Situ Click Chemistry: Enzyme Inhibitors Made to Their Own Specifications. *Journal of the America Chemical Society*, v. 126, p. 12809-12818, 2004.

MELDAL, M., TORNØE, C.W. Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition. *Chemical Review*, v. 108, p. 2952-3015, 2008.

MELDAL, M., TORNØE, C.W., CHRISTENSEN C. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *Journal of Organic Chemistry*, v. 67, p. 3057-3064, 2002.

MELO, J.O.F., DONNICI, C.L., AUGUSTI, R., FERREIRA, V.F., SOUZA, M.C.B.V., FERREIRA, M.L.G., CUNHA, A.C. Heterociclos 1,2,3-triazólicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. *Química Nova*, v. 29, p. 569-579, 2006.

PHOLSHETTIWAR, V., VARMA, R. S. Greener and expeditious synthesis of bioactive heterocycles using microwave irradiation. *Pure and Applied Chemistry*, v. 80, p. 777-790, 2008.

PORE, V.S., AHER, N.G., KUMAR, M., SHUKLA, P.K. Design and synthesis of fluconazole/bile acid conjugate using click reaction. *Tetrahedron*, v. 62, p. 11178-11186, 2006.

PRADES, J. VOGLER, O. ALEMANY, R. GOMEZ-FLORIT, M. FUNARI, S.S RUIZ-GUTIERREZ, V. BARCELO, F. Plant pentacyclitriterpenic acids as modulators of lipid membran physical properties *Biochim. Biophys. Acta*. v. 1808, p. 752-760, 2011.

RODIONOV, V.O., FOKIN, V.V., FINN, M.G. Mechanism of the ligand-free CuI-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 44, p. 2210-2215, 2005.

ROSTOVTSEV, V.V., GREEN, L.G., FOKIN, V.V., SHARPLESS, K.B. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 41, p. 2596-2599, 2002.

SHARPLESS, K.B., FINN, M.G., KOLB, H.C. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 40, p. 2004-2021, 2004.

SIEWERT, B. PIANOWSKI, E. CSUK, R. Éster and amide of maslinic acid trigger apoptosis in human tumor cells and alter their mode of action with respect to the substitution pattern at C-28, *Eur. J. Med. Chem.* v. 70, p. 259-272, 2013.

SIEWERT, B., PIANOWSKI, E., OBERNAUER, A.; CSUK, R. Towards cytotoxic and selective derivatives of maslinic acid. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 22, p. 594–615, 2014.

SILVA, J.R., BARRETO, R.F.S.M., PINTO, M.C.F.R., SILVA, R.S., TEIXEIRA, D.V., SOUZA, M., SIMONE, C.A., CASTRO, S.L., FERREIRA, V.F., PINTO, A.V. Naphthoquinoidal [1,2,3]-triazole, a new structural moiety active against *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Med. Chem.*, v. 43, p. 1774-1780, 2008.

SKEHAN, P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J.T., BOKESCH, H., KENNEY, S., BOYD, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening, *J. Natl. Cancer Ints.*, v. 82, p. 1107-1112, 1990.

THOMAS, K.D., ADHIKARI, A.V., SHETTY, N.S. Design, synthesis and antimicrobial activities of some new quinoline derivatives carrying 1,2,3-triazole moiety. *Eur. J. Med. Chem.*, v. 45, p. 3803-3810, 2010.

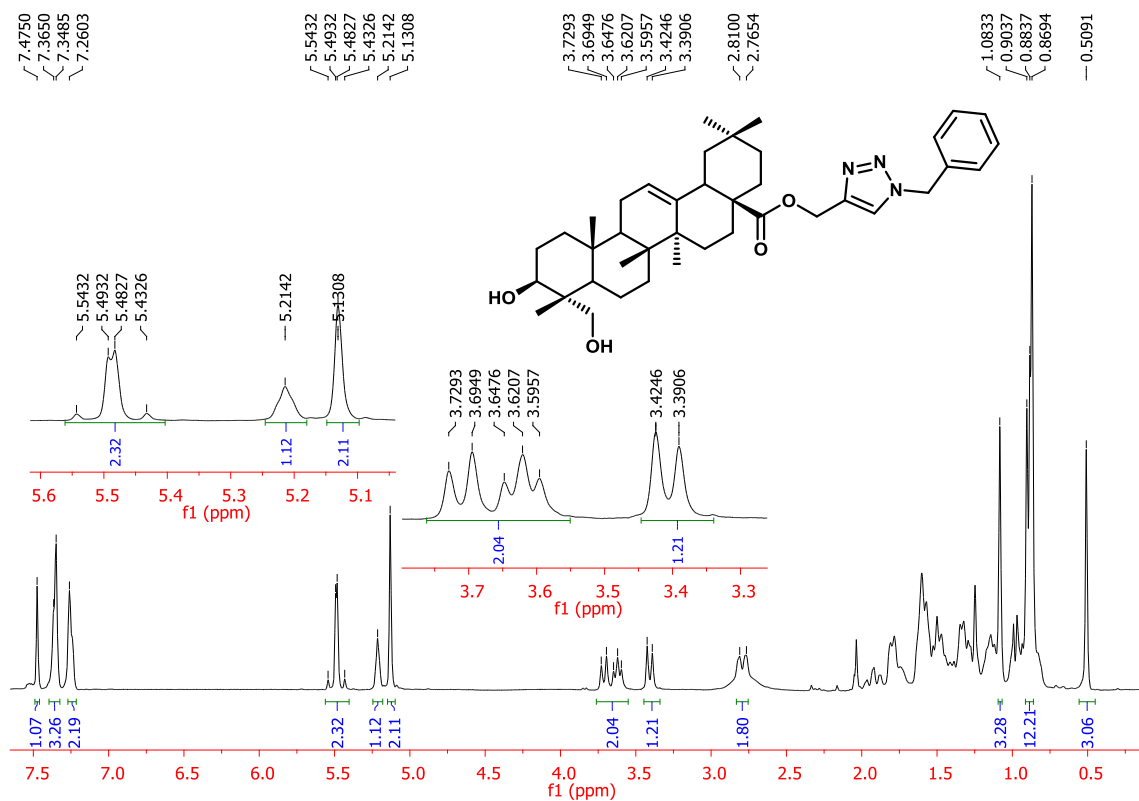
WHITING, M., TRIPP, J.C., LIN, Y. C., LINDSTROM, W., OLSON, A.J., ELDER, J.H., SHARPLESS, K.N., FOKIN, V.V. Rapid Discovery and Structure-Activity Profiling of Novel Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Enabled by the Copper(I)-Catalyzed Synthesis of 1,2,3-Triazoles and Their Further Functionalization. *J. Med. Chem.*, v. 49, p. 7697-7710, 2006.

WU, P., FOKIN, V.V. Catalytic azide-alkyne cycloaddition: reactivity and applications. *Aldrichimica Acta*, v. 40, p. 7-17, 2007.

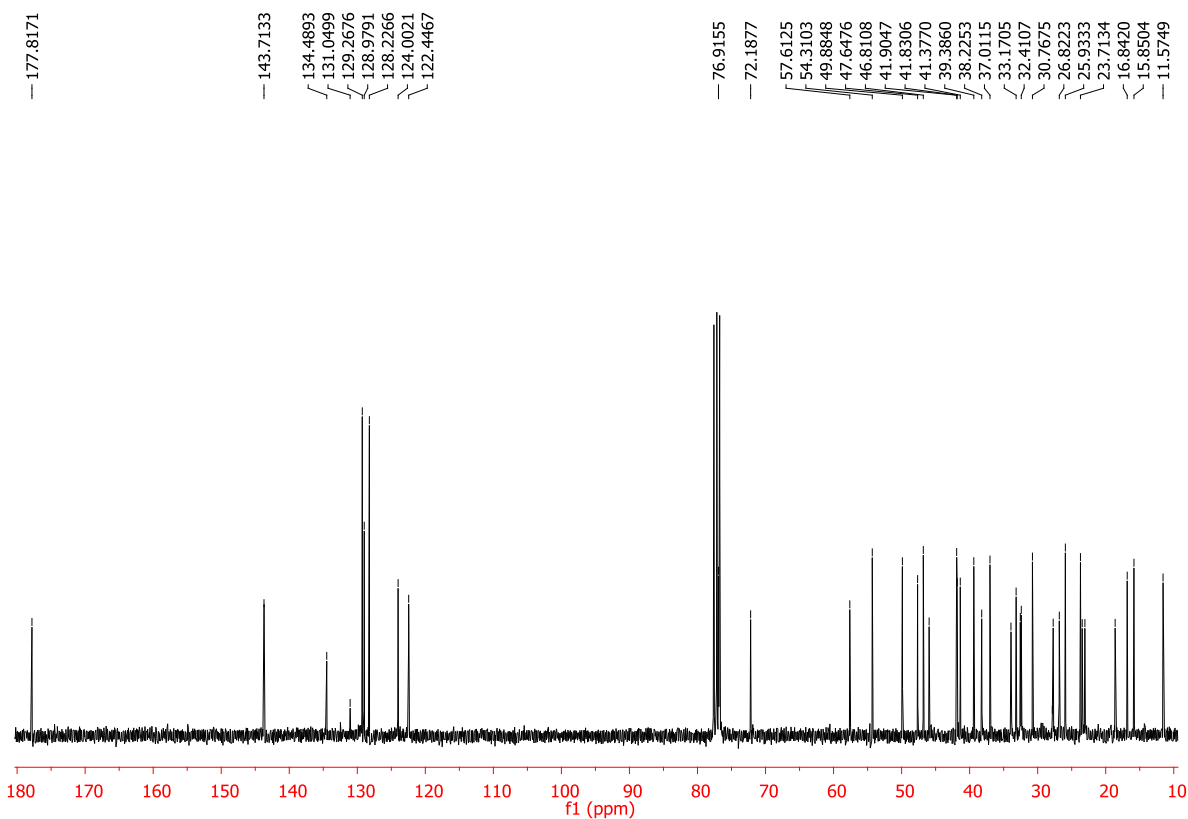
YU, F., WANG, Q., ZHANG, Z., PENG, Y., QUI, Y., SHI, Y. Development of Oleanane-Type Triterpenes as a New Class of HCV Entry Inhibitors. *J. Med. Chem.*, v. 56, p. 4300-4319, 2013.

5.6. Anexos

5.6.1. Espectros do (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de (1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-metila (6a)

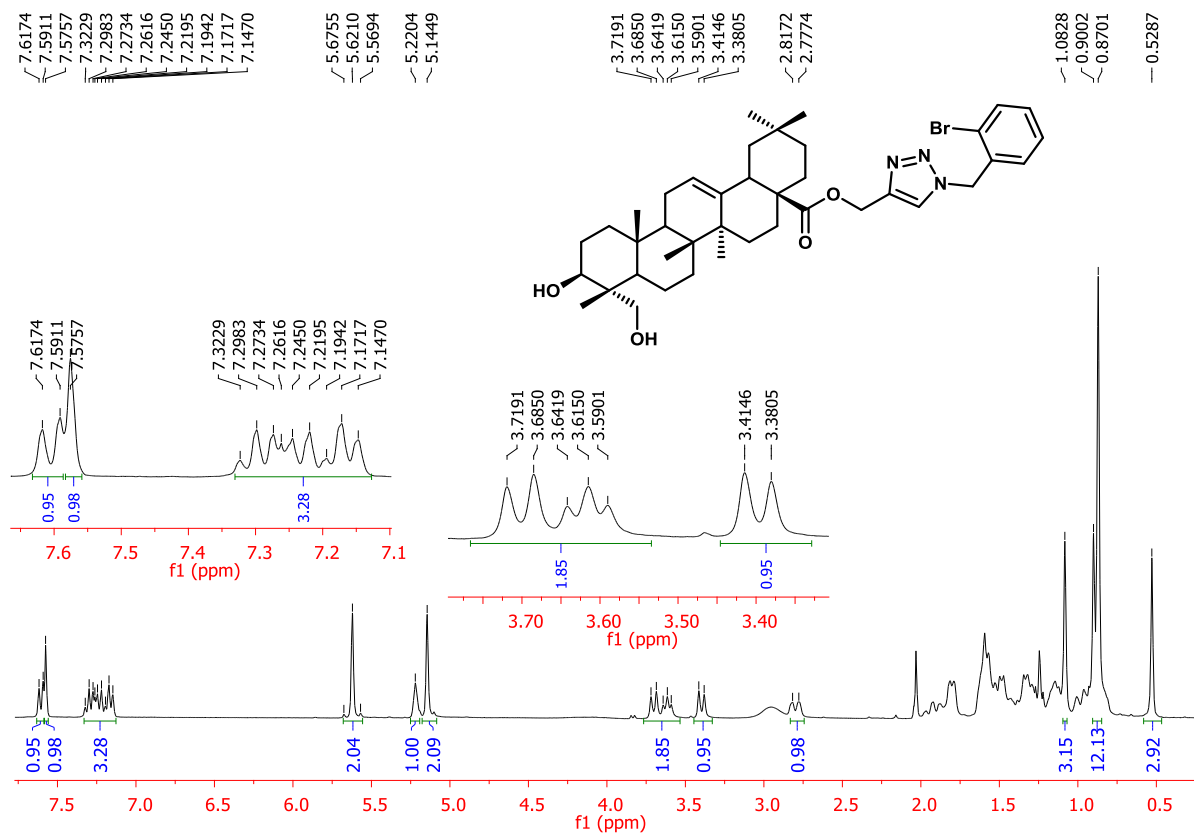


Espectro de RMN de ^1H (CDCl₃, 300 MHz)

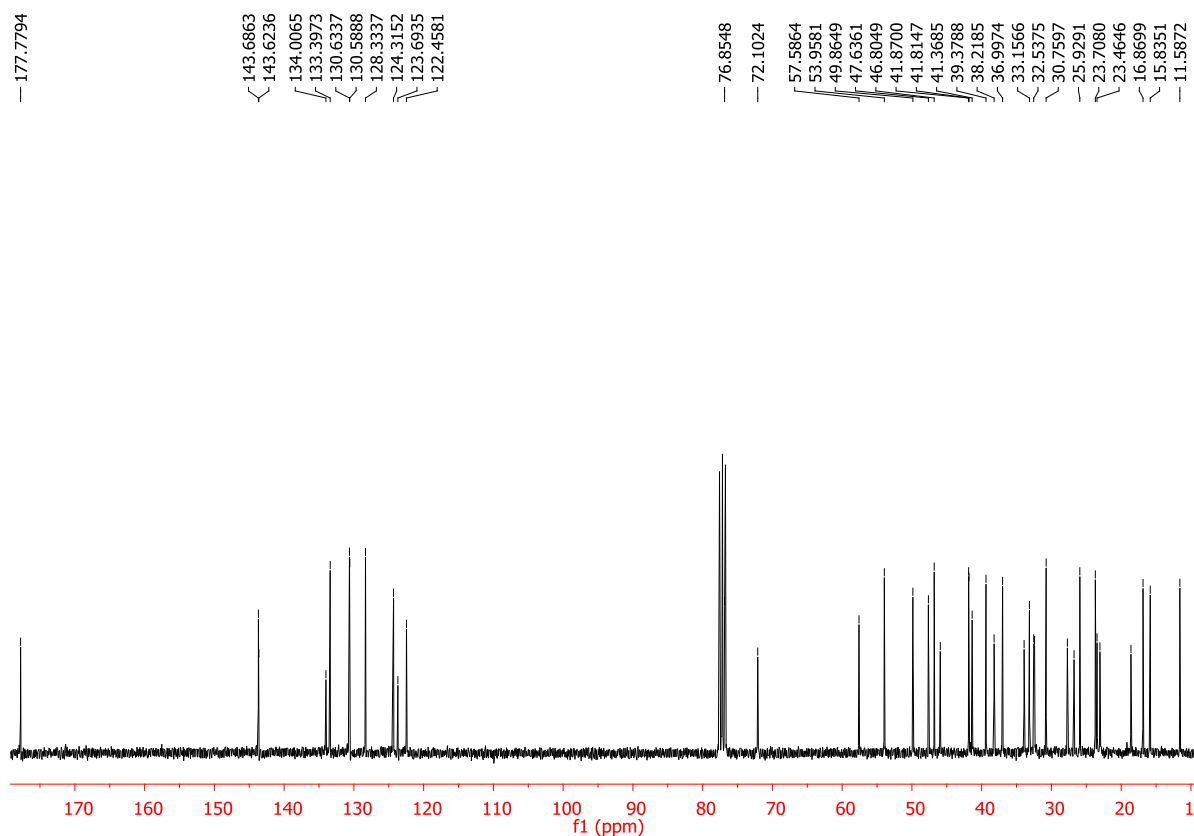


Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl₃, 75 MHz)

5.6.2. Espectros do (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de (1-(2-bromobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-metila (6b)

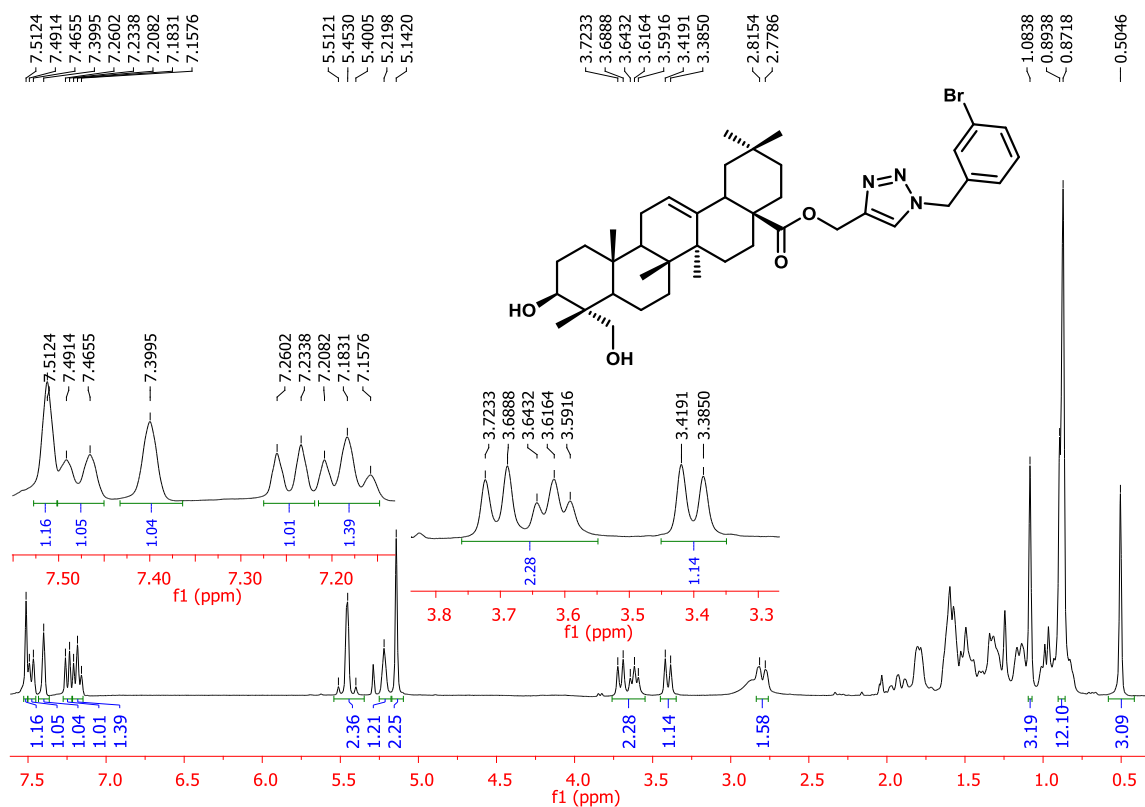


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz)

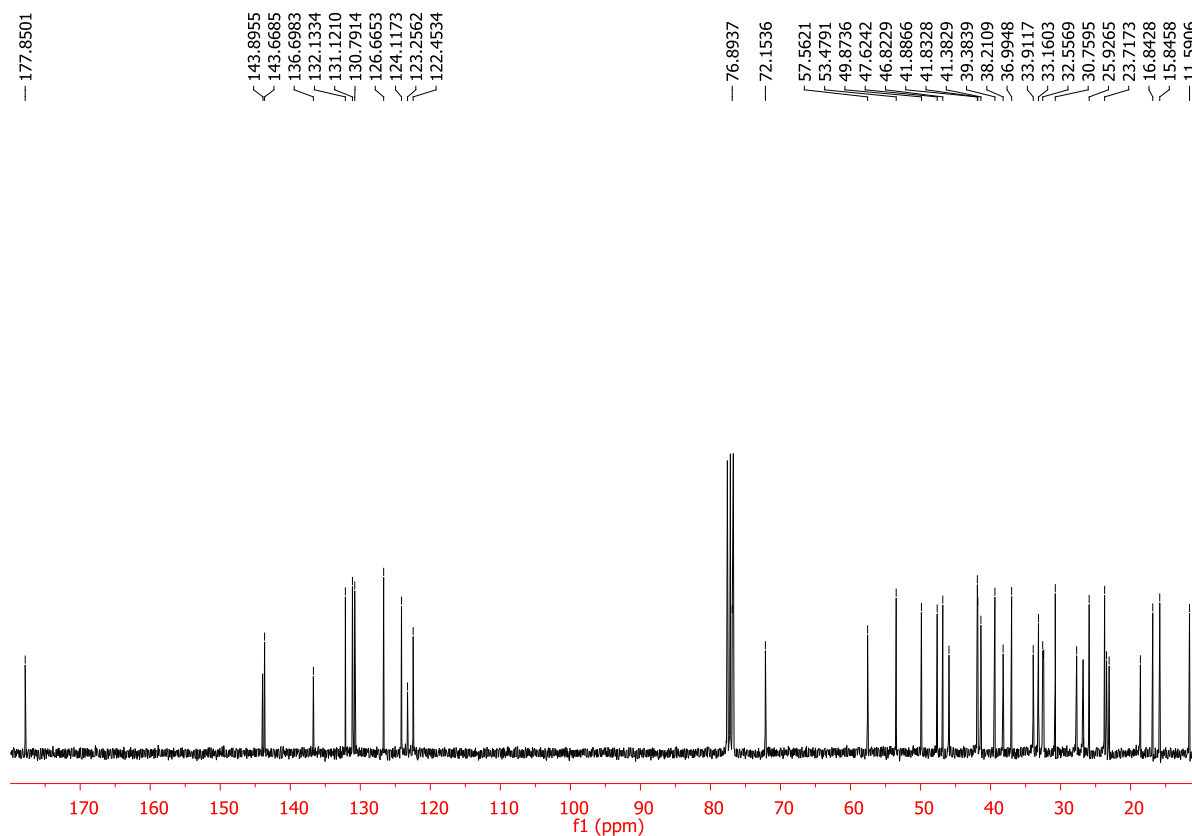


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz)

5.6.3. Espectros do (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de (1-(3-bromobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-metila (6c)

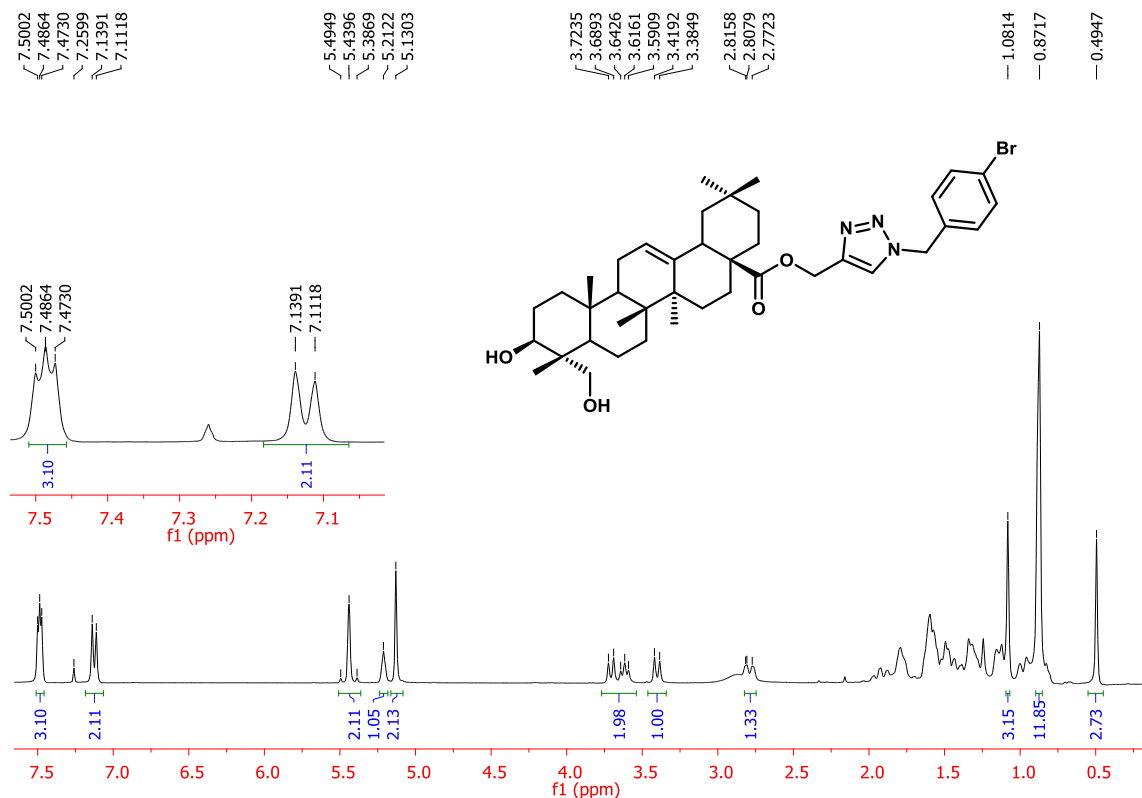


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 300 MHz)

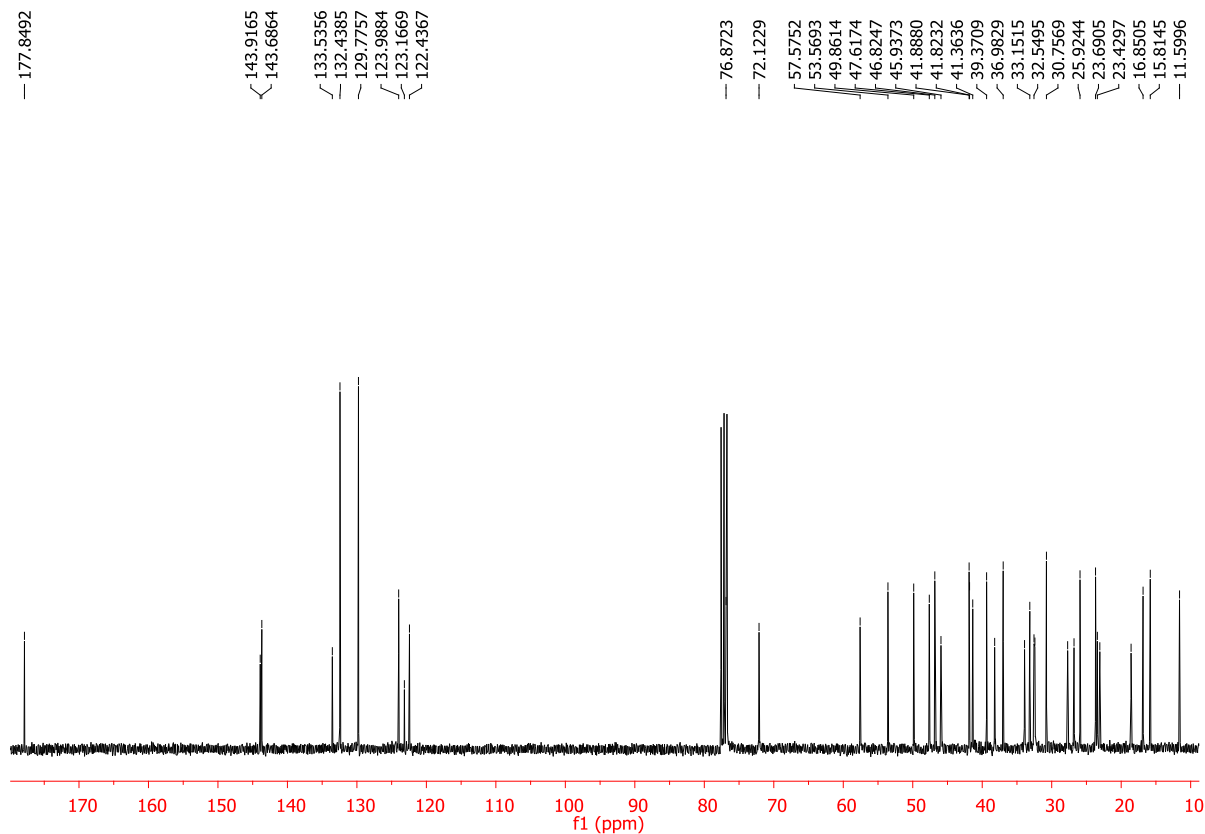


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz)

5.6.4. Espectros do (3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de (1-(4-bromobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-metila (6d)

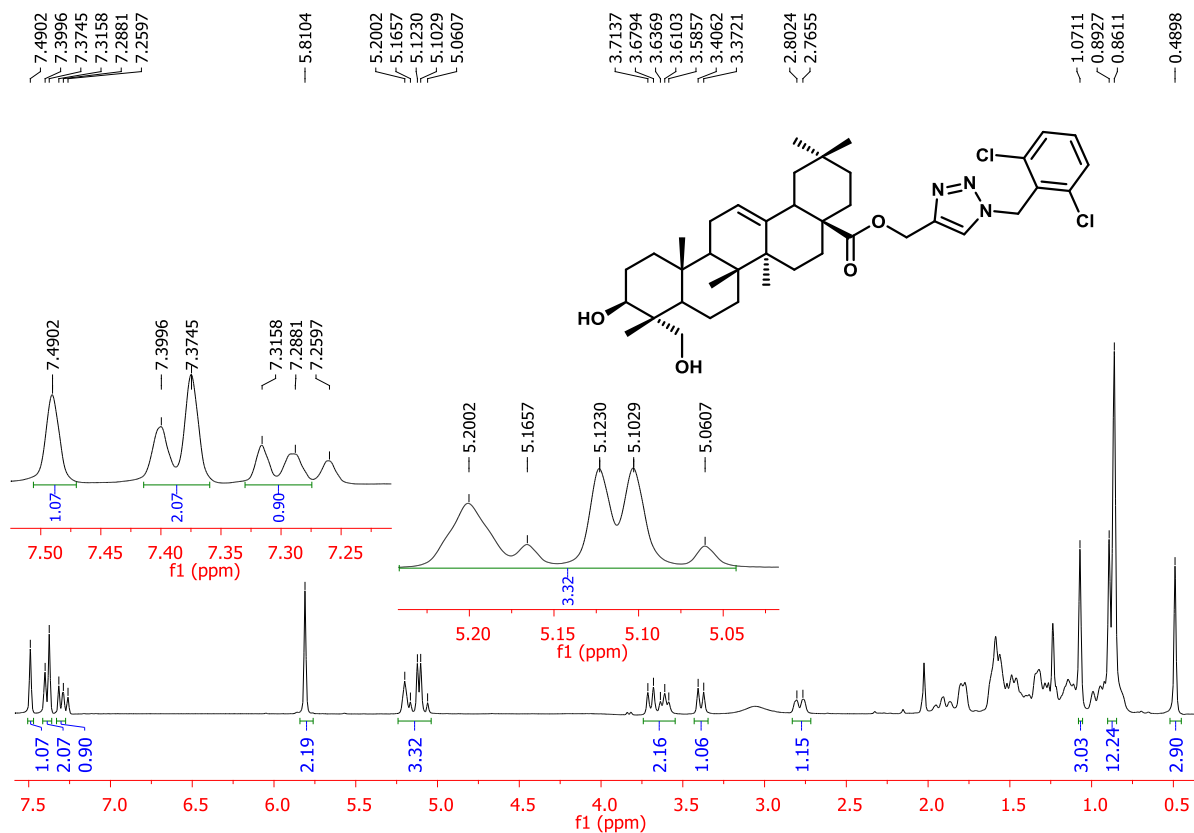


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz)

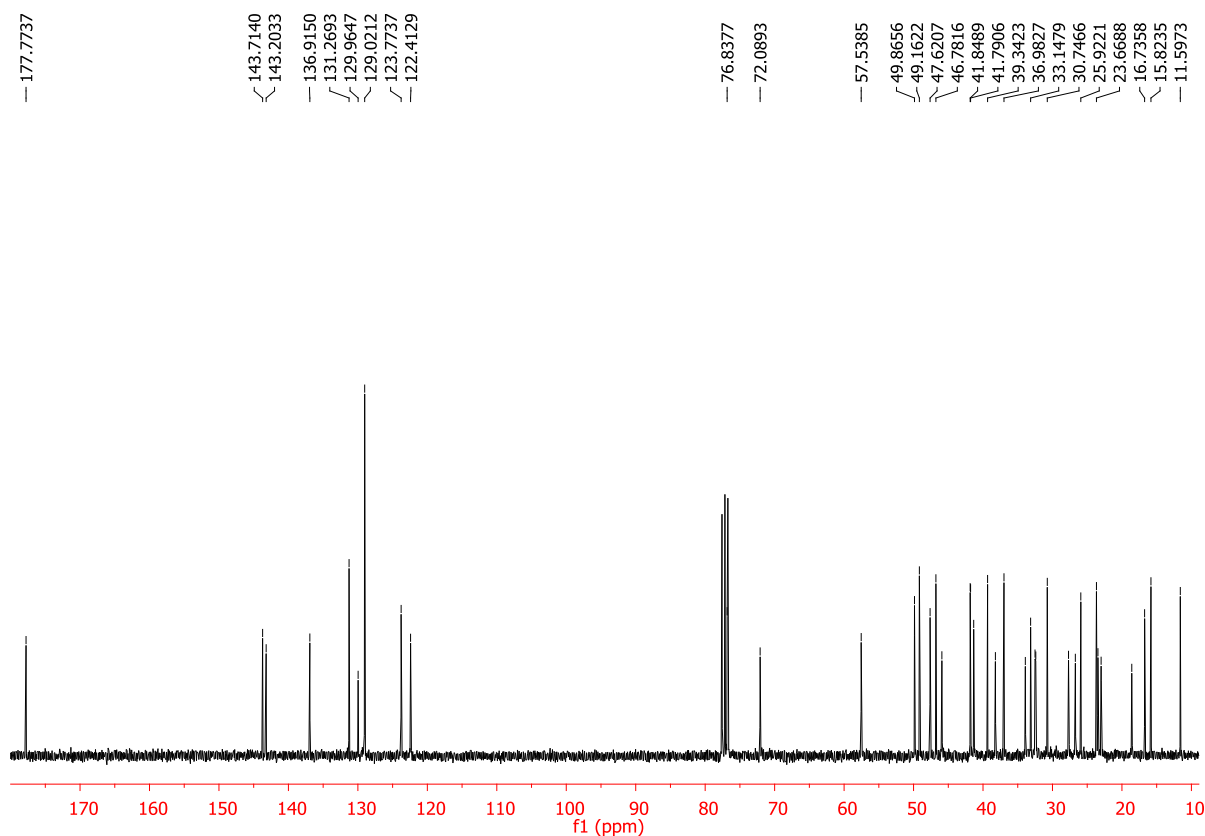


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz)

5.6.5. Espectros do (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de (1-(2,6-diclorobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-metila (6e)

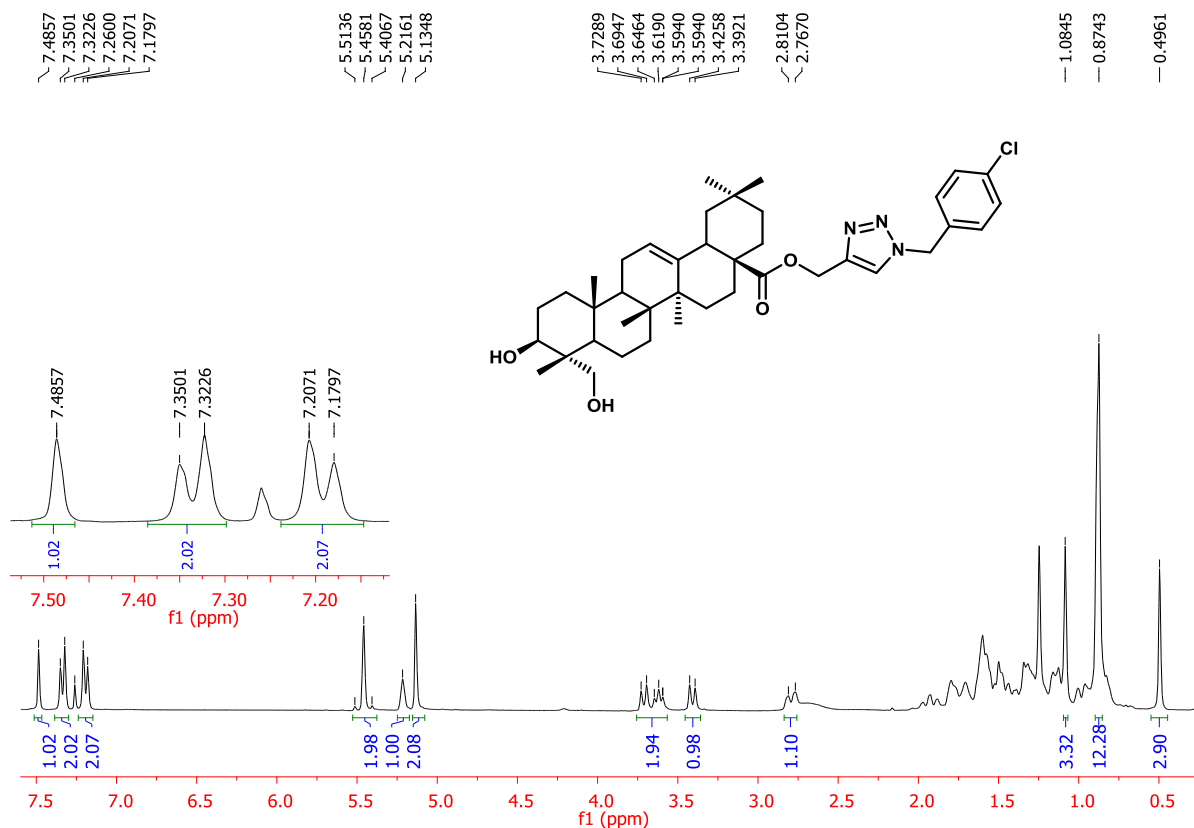


Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl₃, 300 MHz)

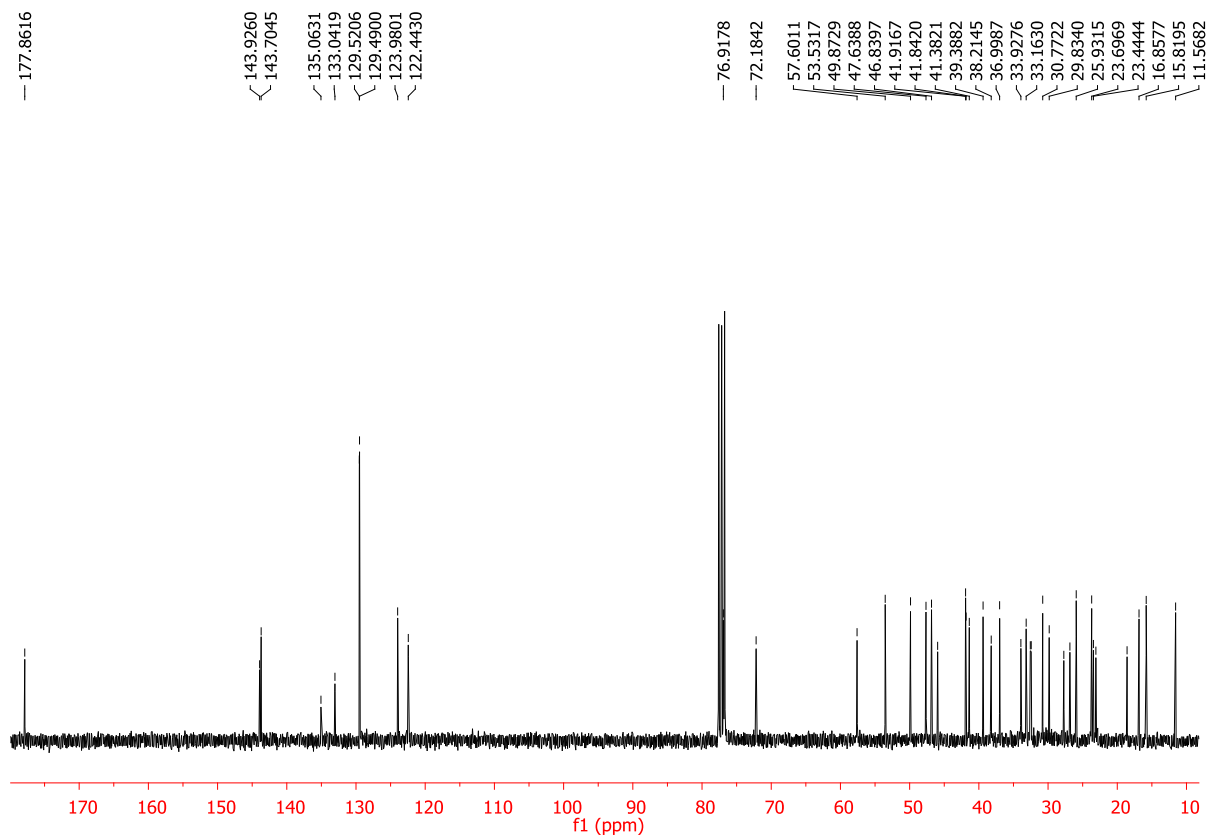


Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl₃, 75 MHz)

5.6.6. Espectros do (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de (1-(4-clorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-metila (6f)

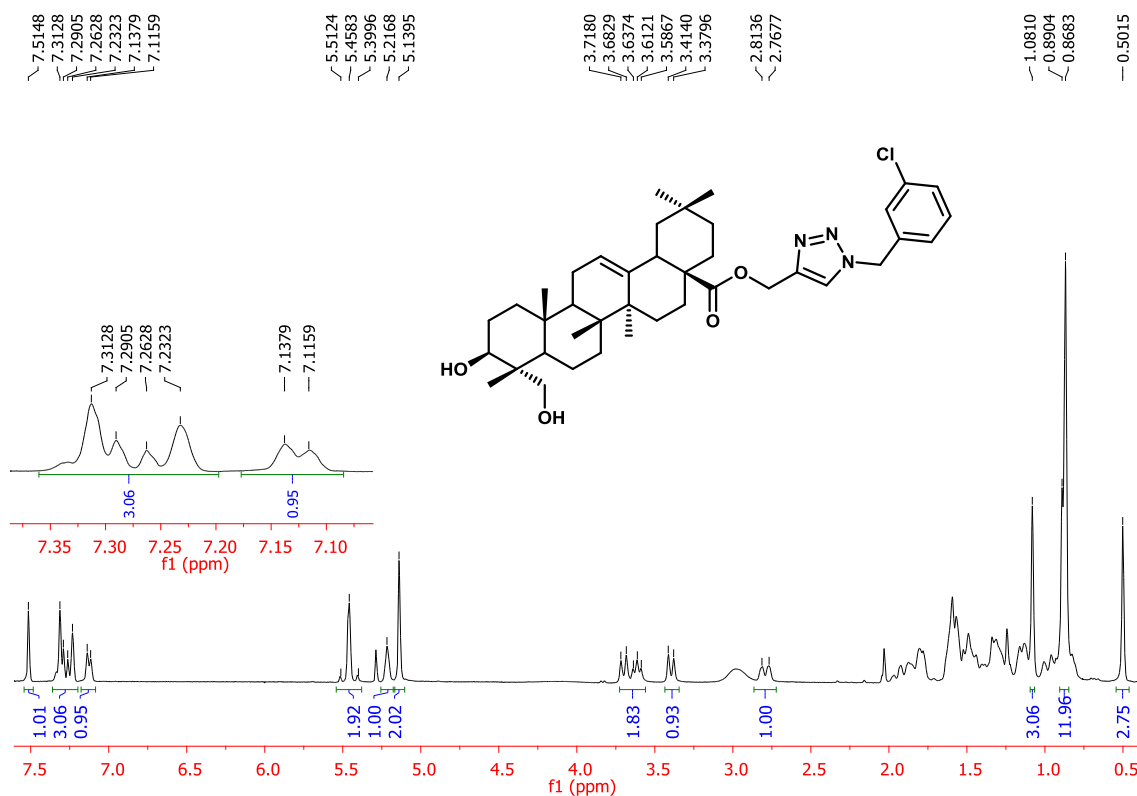


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz)

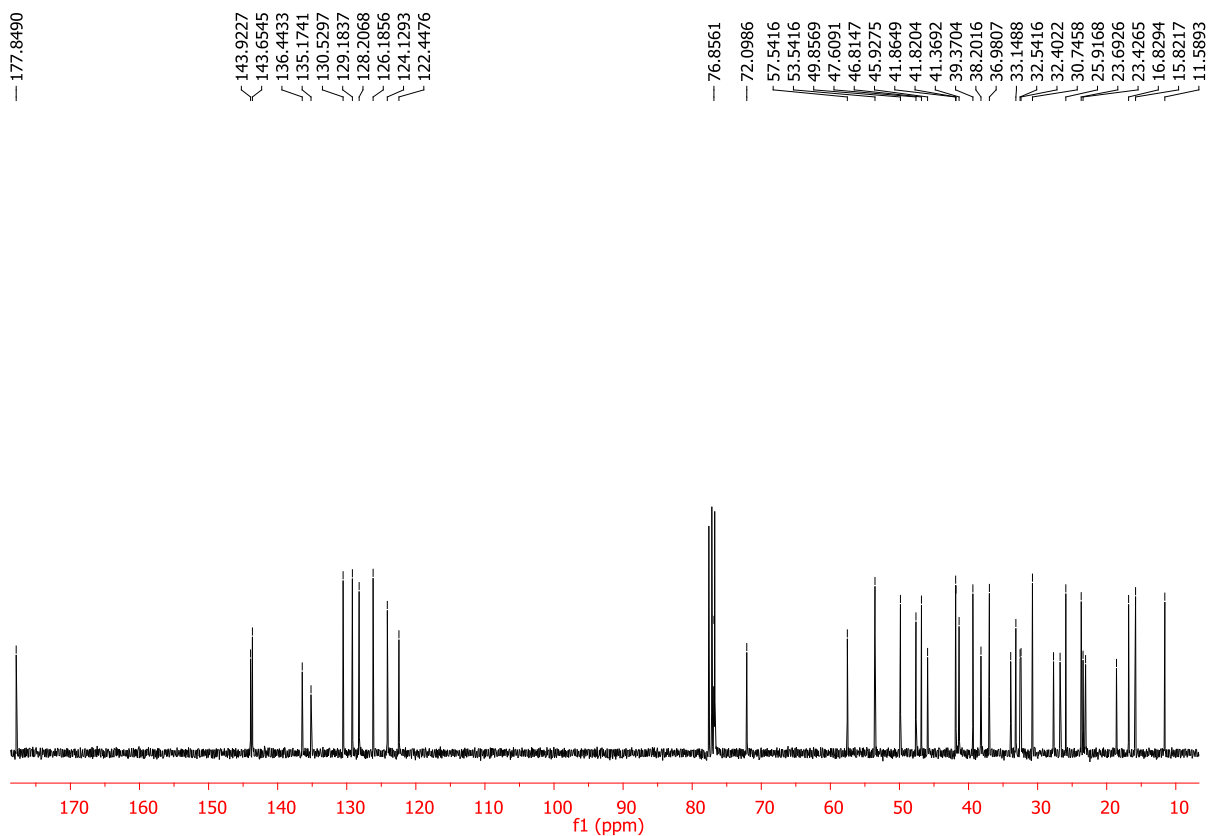


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz)

5.6.7. Espectros do (3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de (1-(3-clorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-metila (6g)

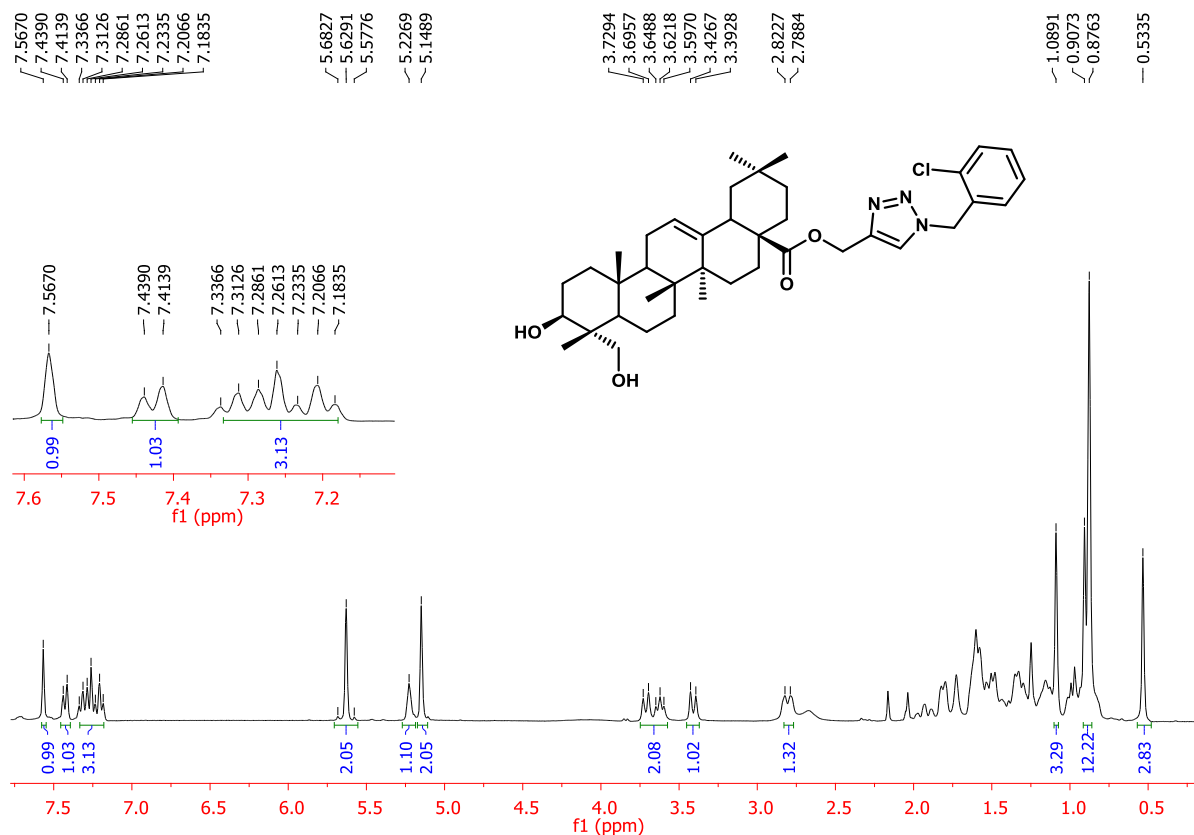


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz)

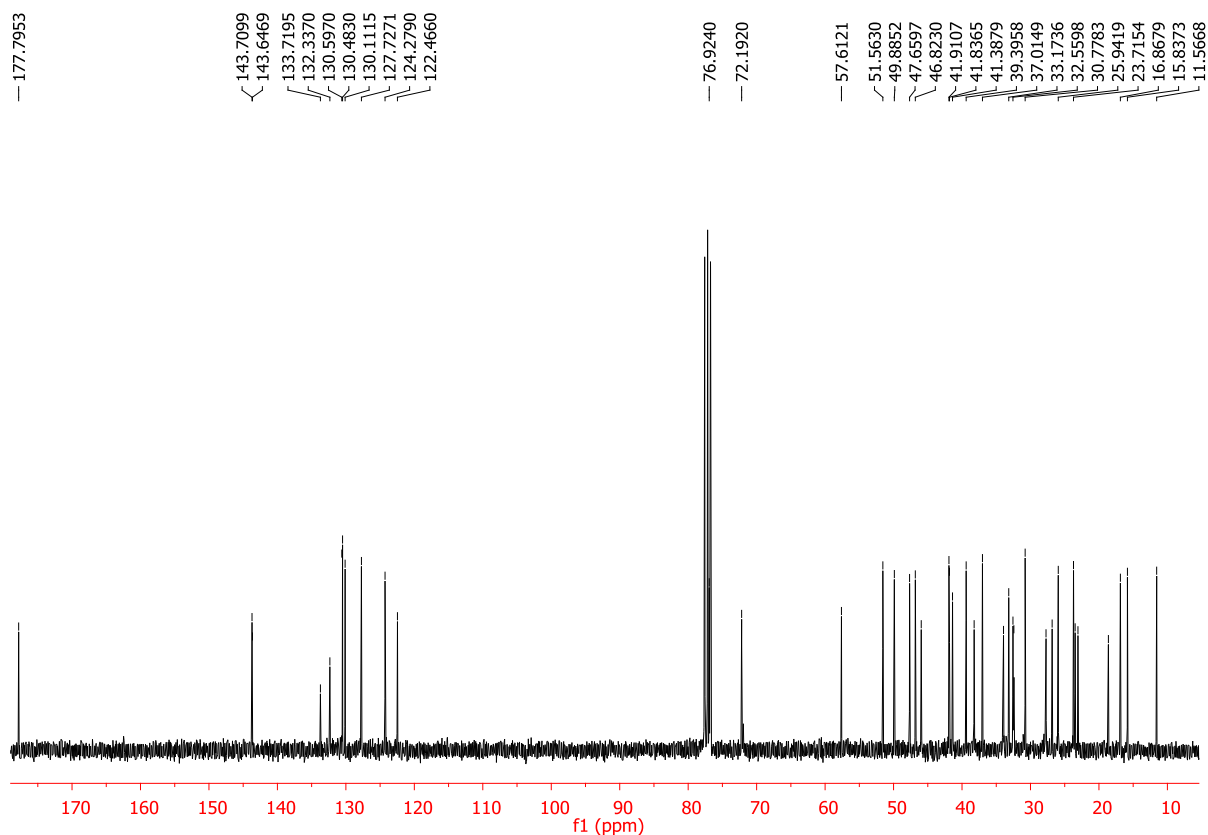


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz)

5.6.8. Espectros do (3 β)-3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oato de (1-(2-clorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-metila (6h)

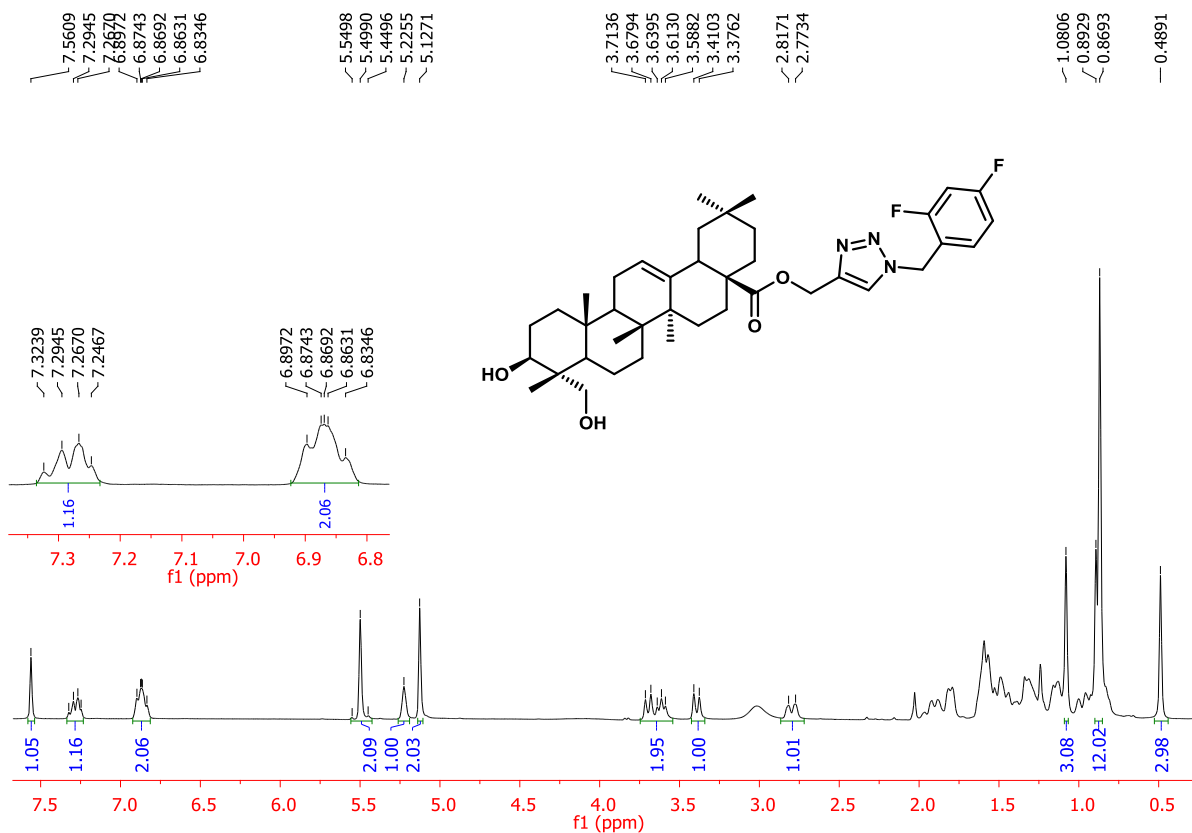


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz)

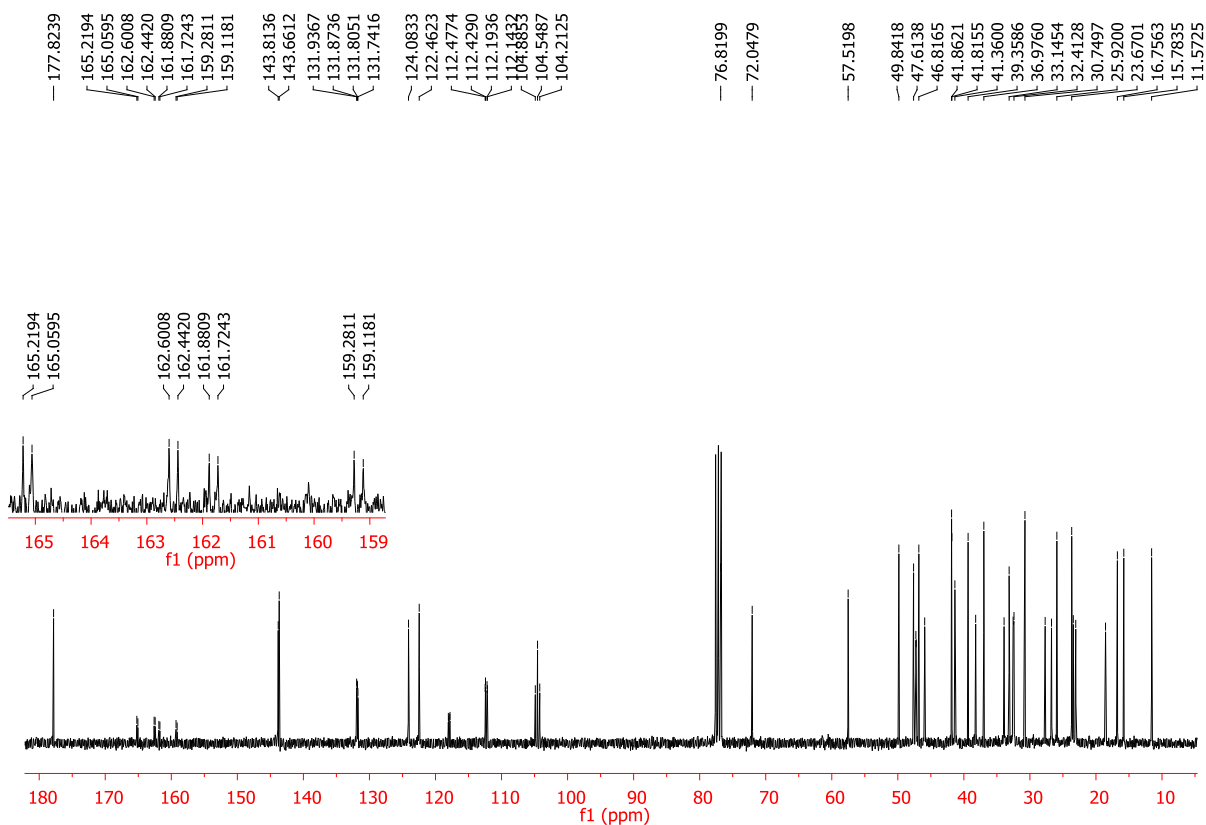


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz)

5.6.9. Espectros do (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de (1-(2,4-difluorobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-metila (6i)

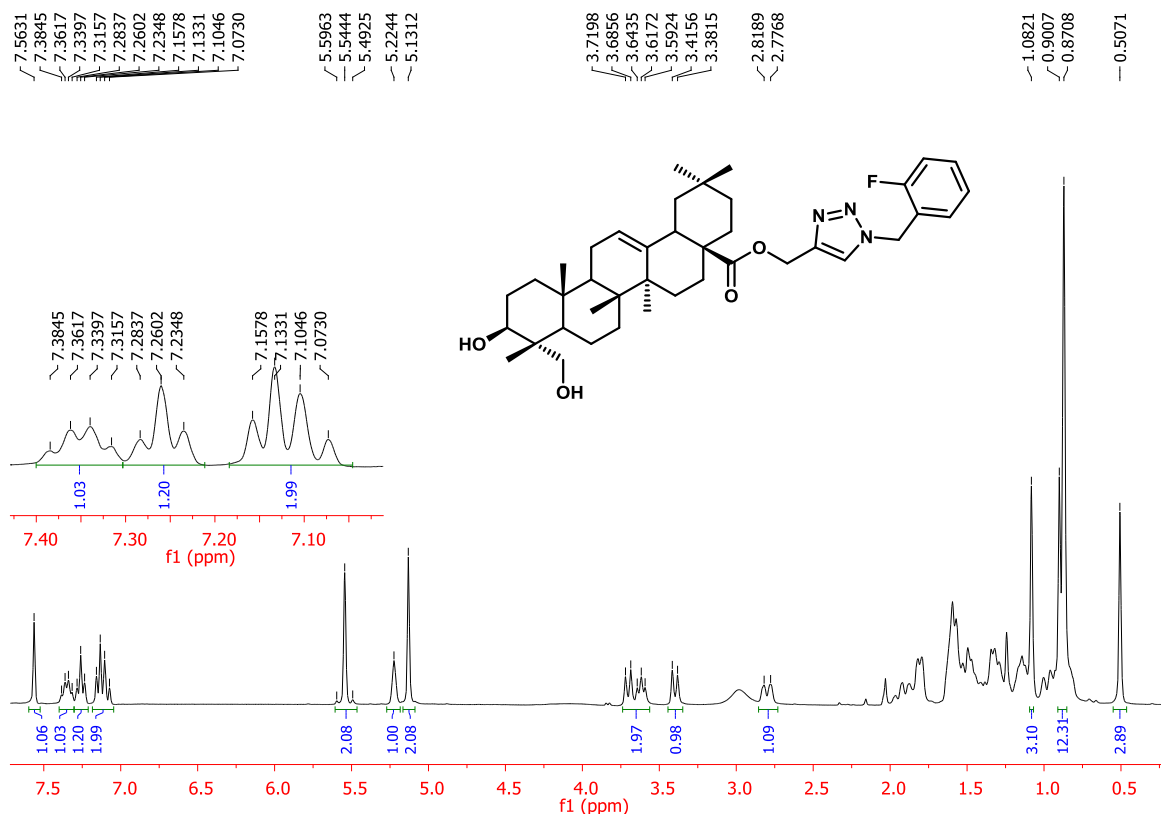


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz)

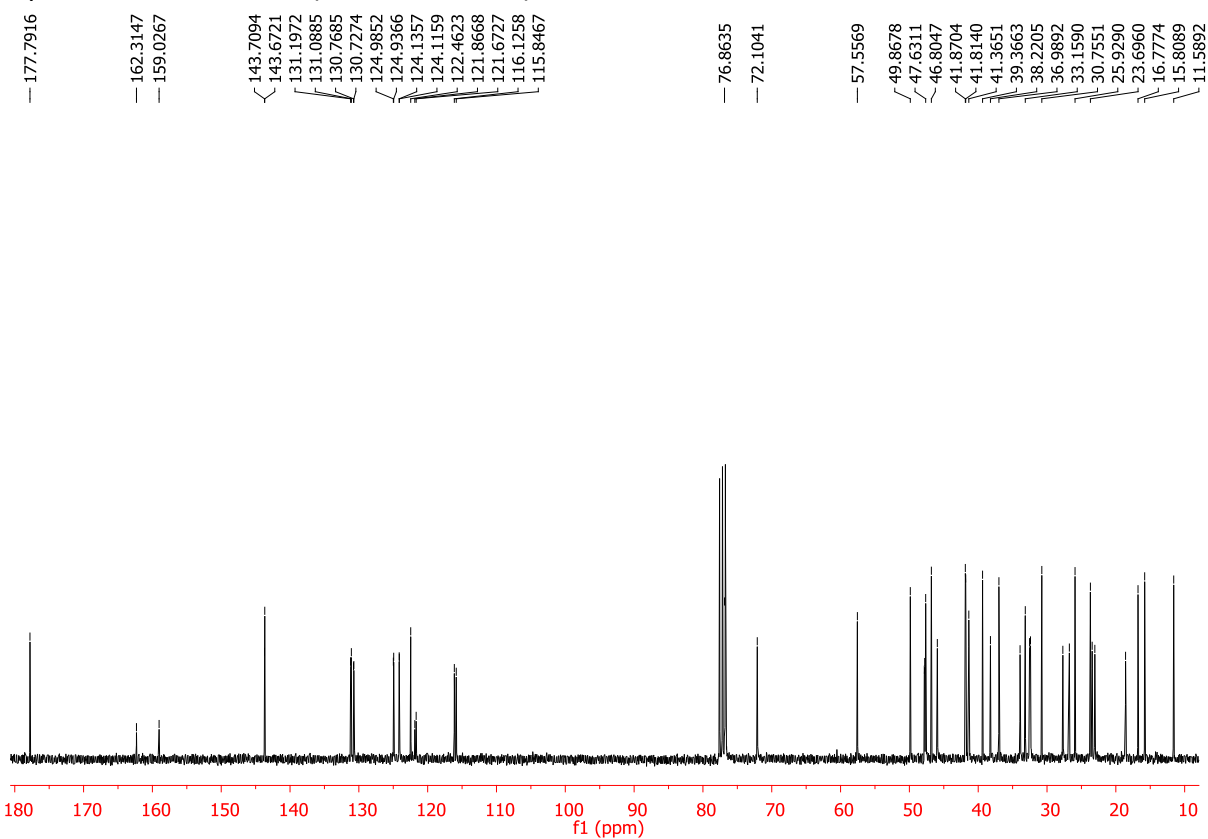


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz)

5.6.10. Espectros do (3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de (1-(2-fluorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-metila (6j)

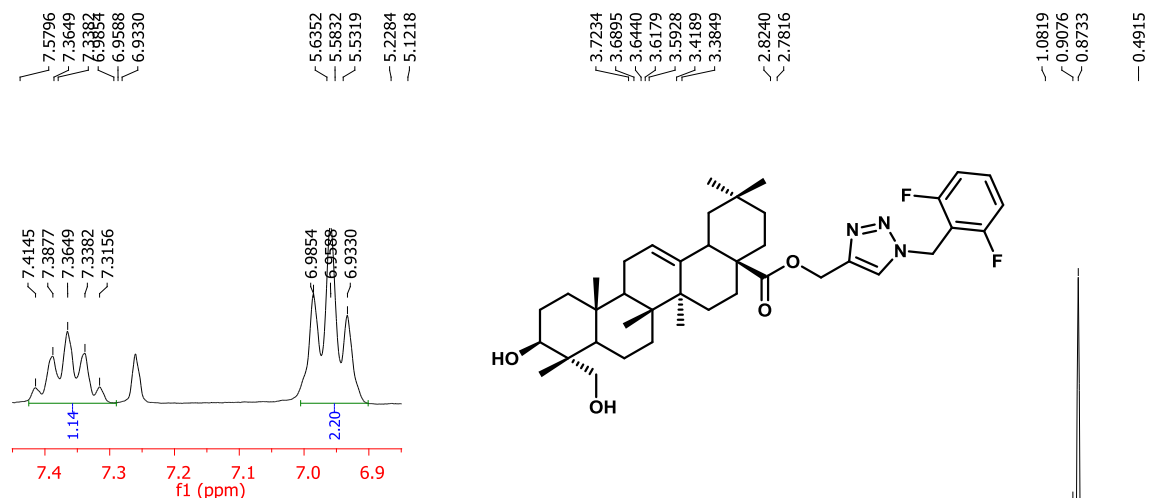


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz)

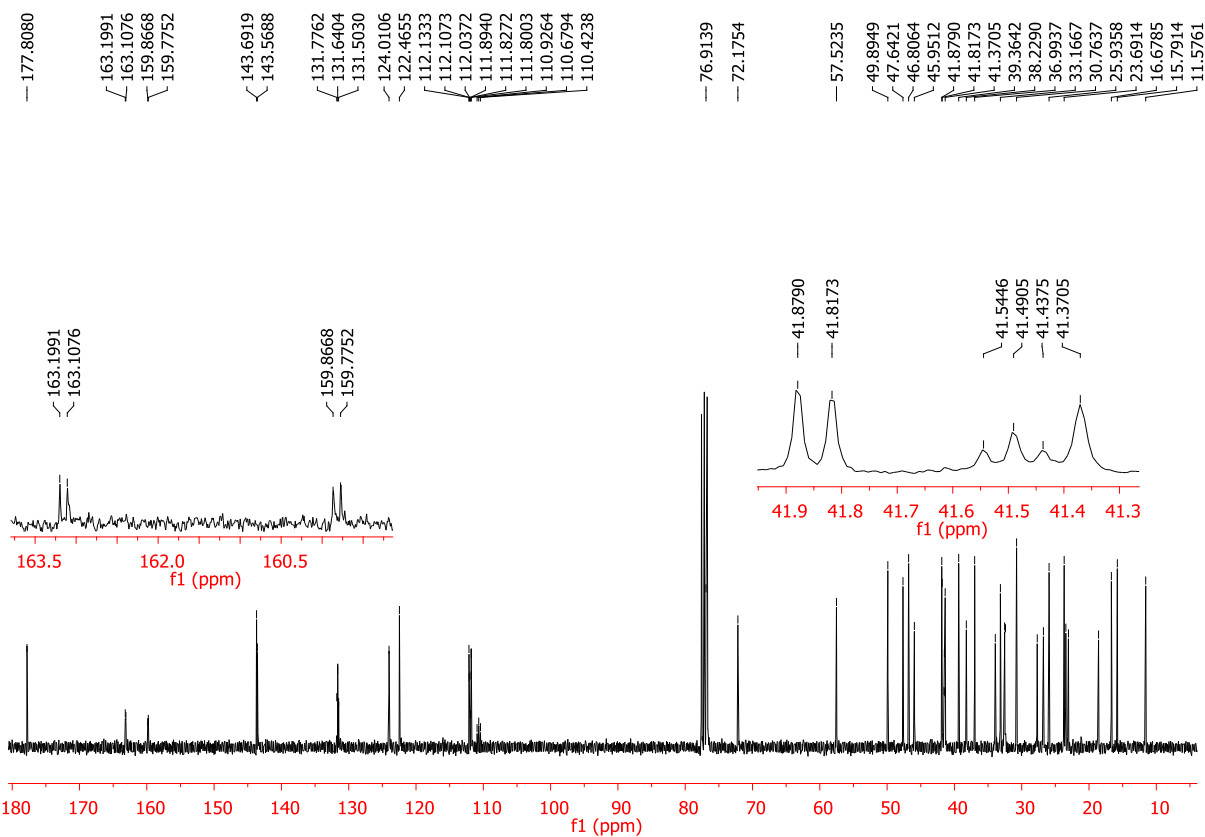


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz)

5.6.11. Espectros do (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de (1-(2,6-difluorobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-metila (6k)

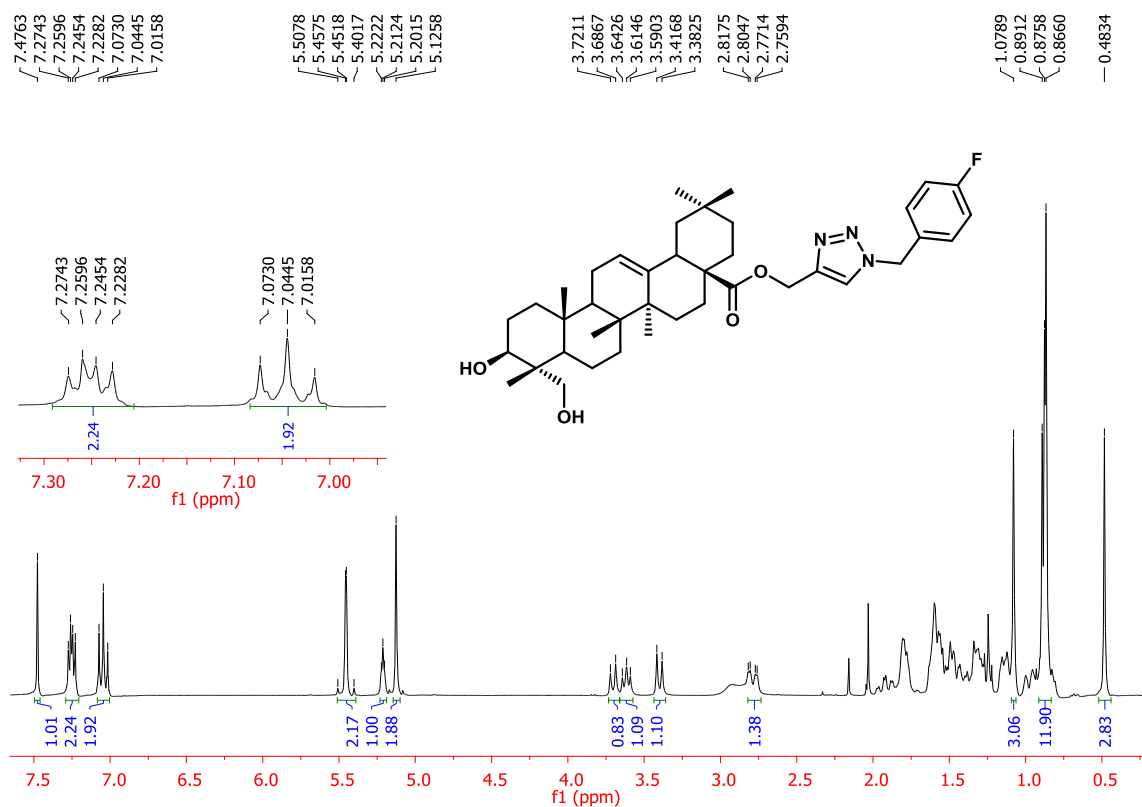


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz)

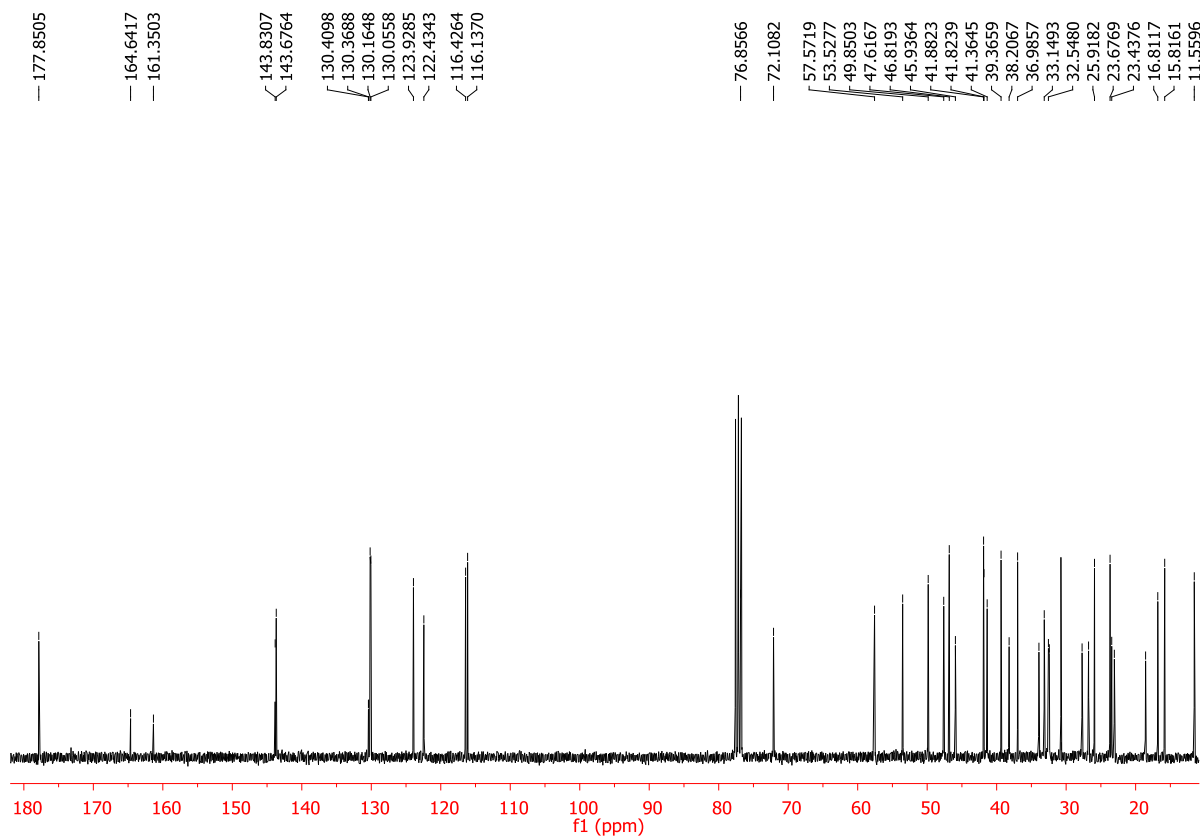


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz)

5.6.12. Espectros do (3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de (1-(4-fluorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-metila (6I)

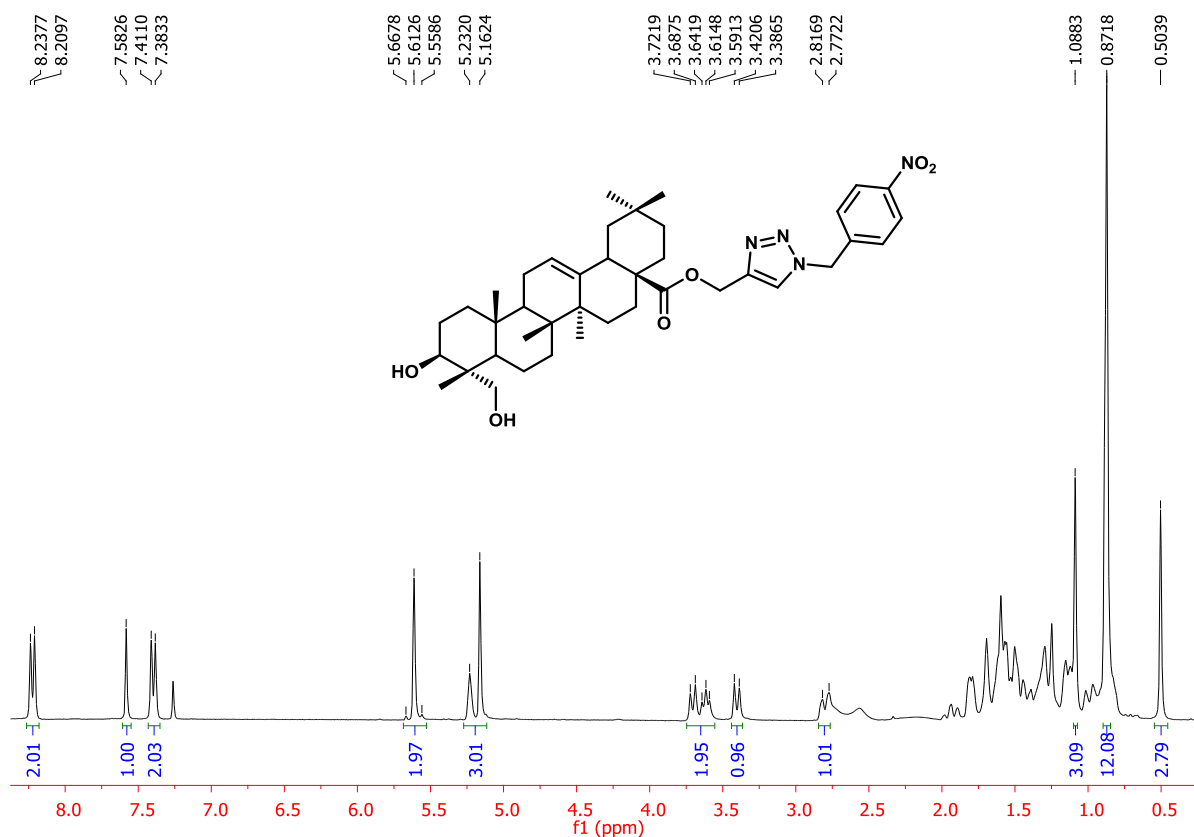


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz)

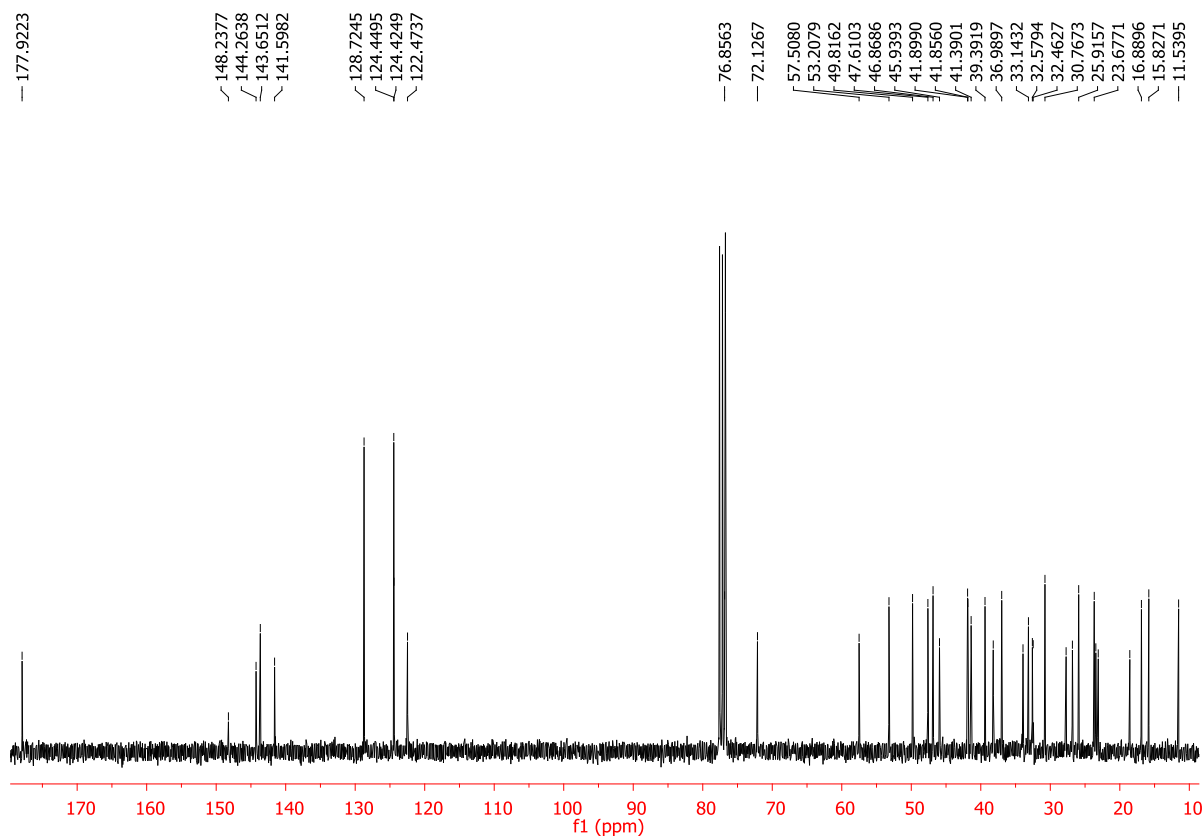


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz)

5.6.13. Espectros do (3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-oato de (1-(4-nitrobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-metila (6m)

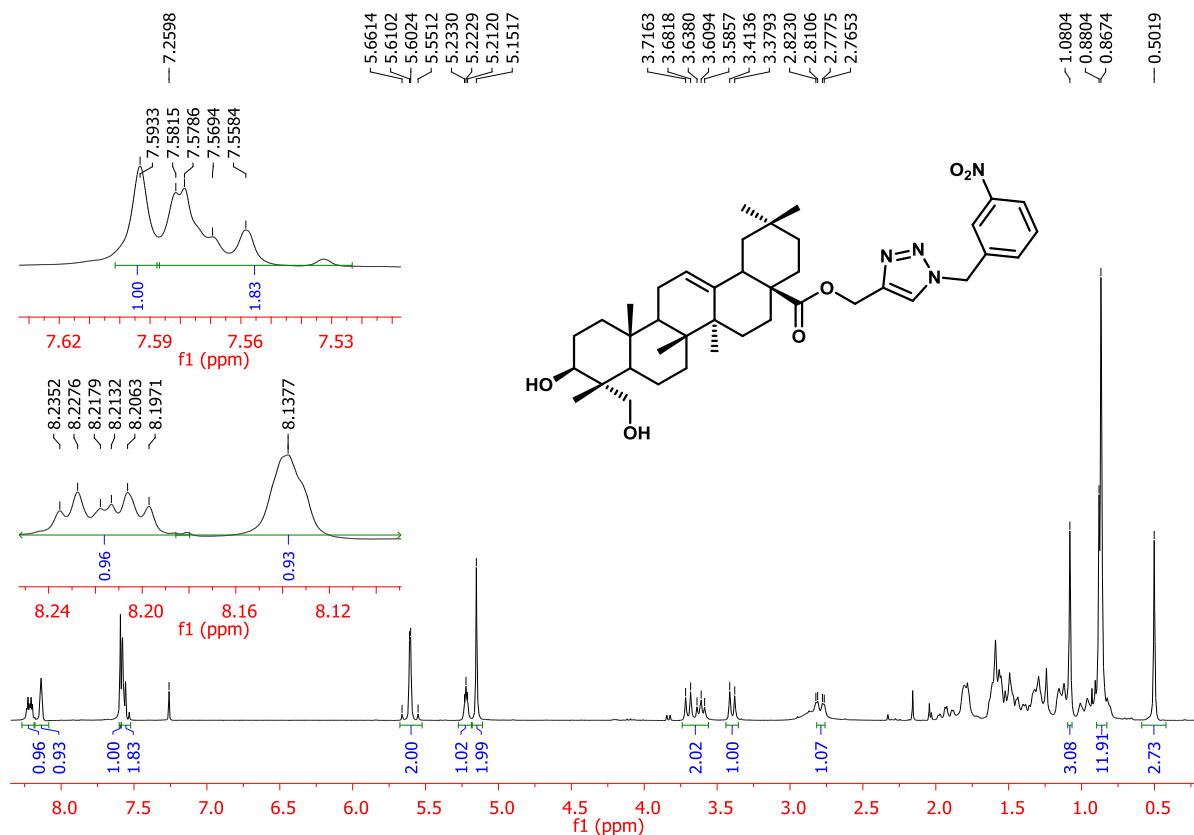


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz)

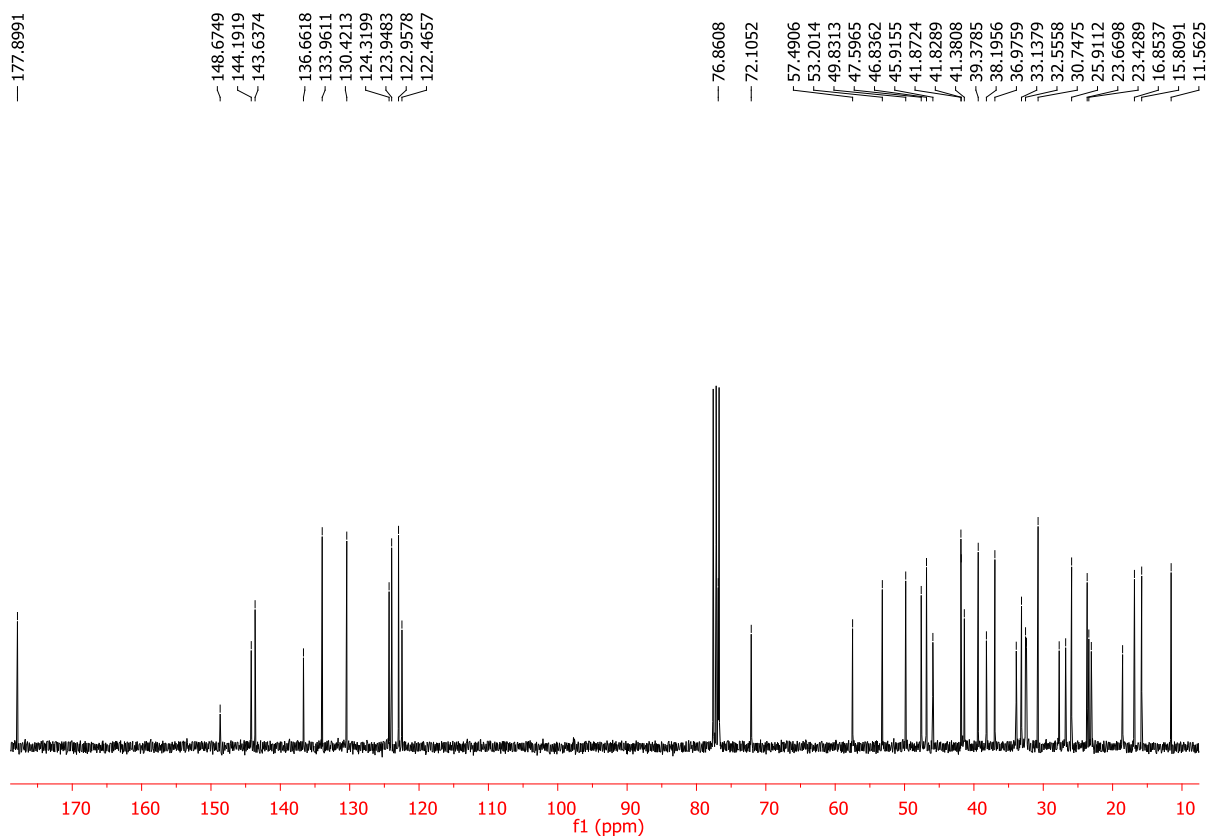


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz)

5.6.14. Espectros do (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de (1-(3-nitrobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-metila (6n)

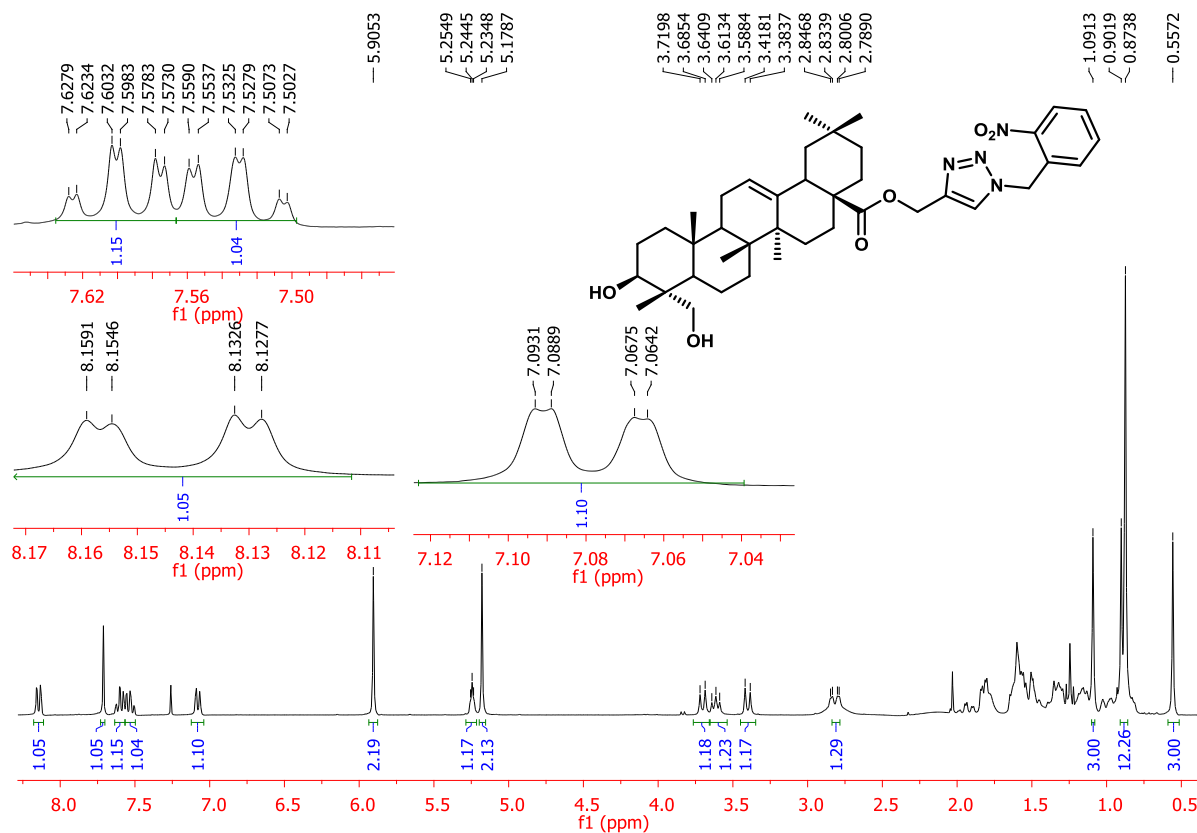


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz)

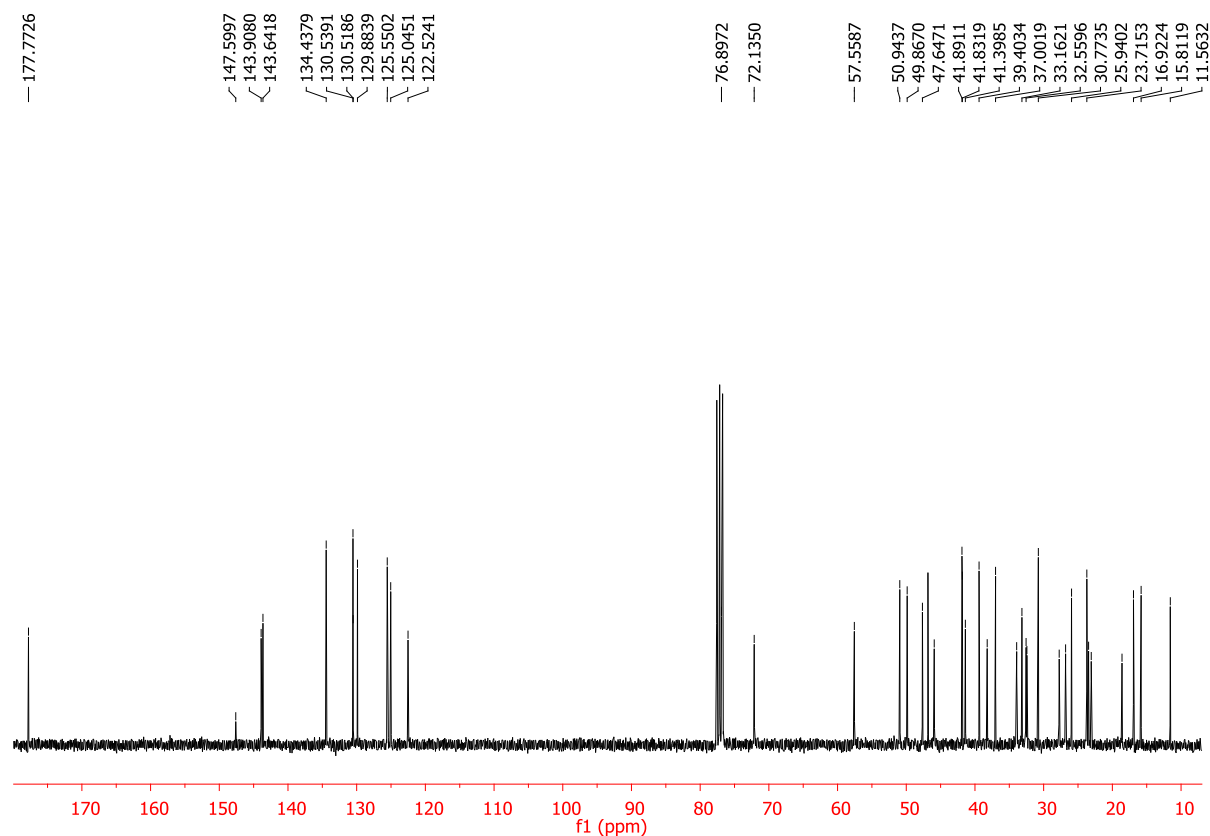


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz)

5.6.15. Espectros do (3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-oato de (1-(2-nitrobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-metila (6o)

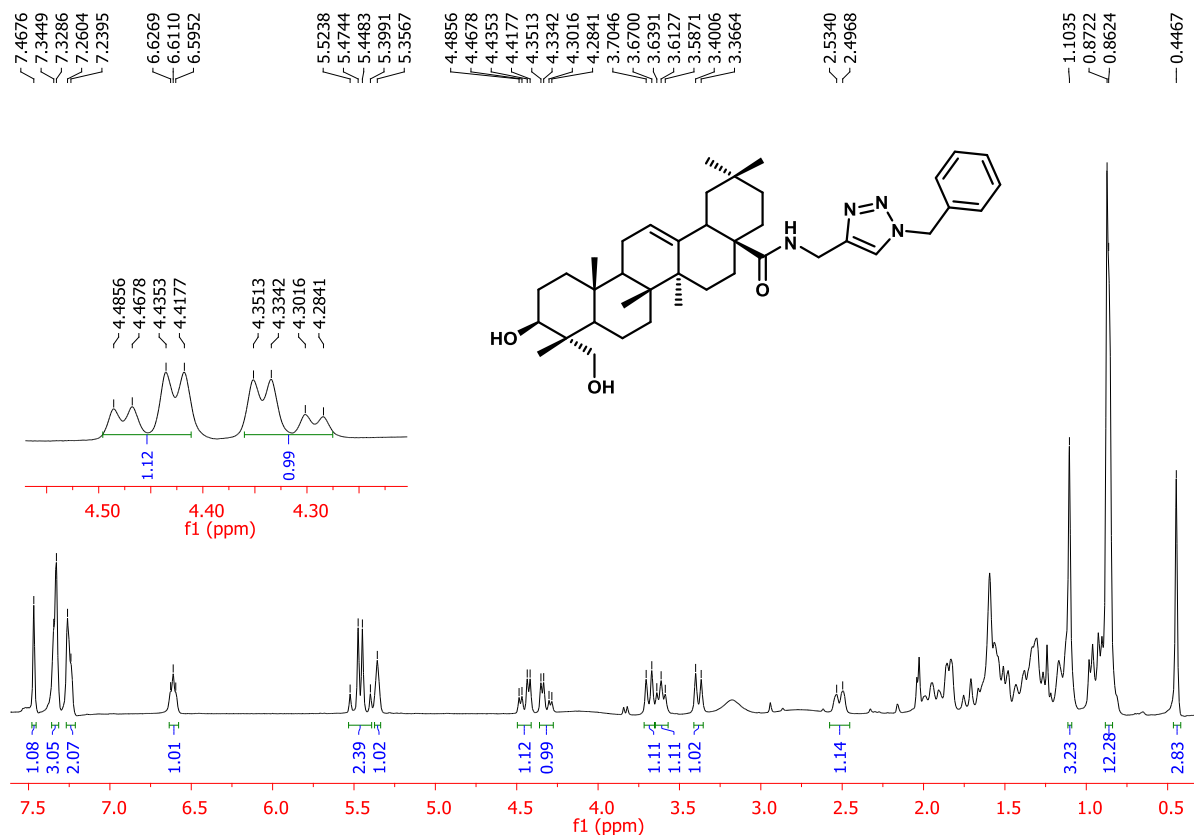


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz)

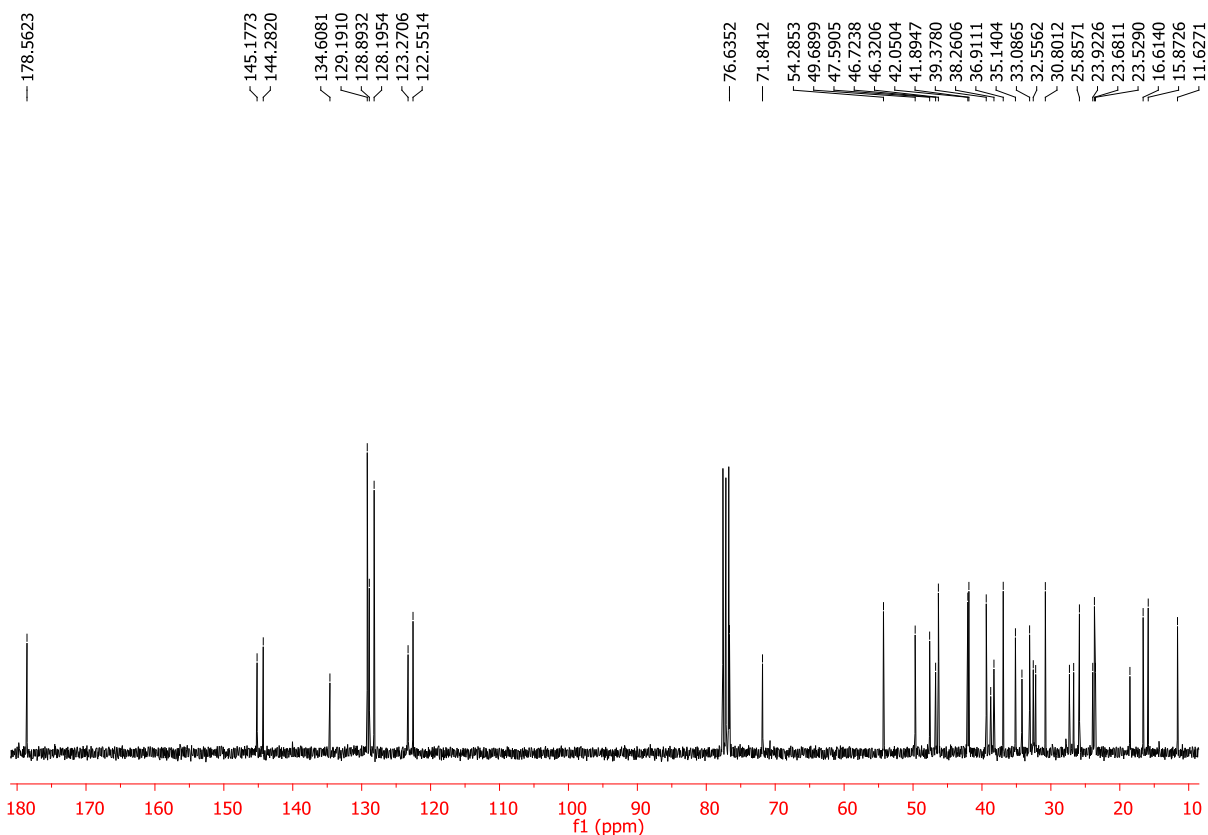


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz)

5.6.16. Espectros do (benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroxiolean-12-en-28-amida (7a)

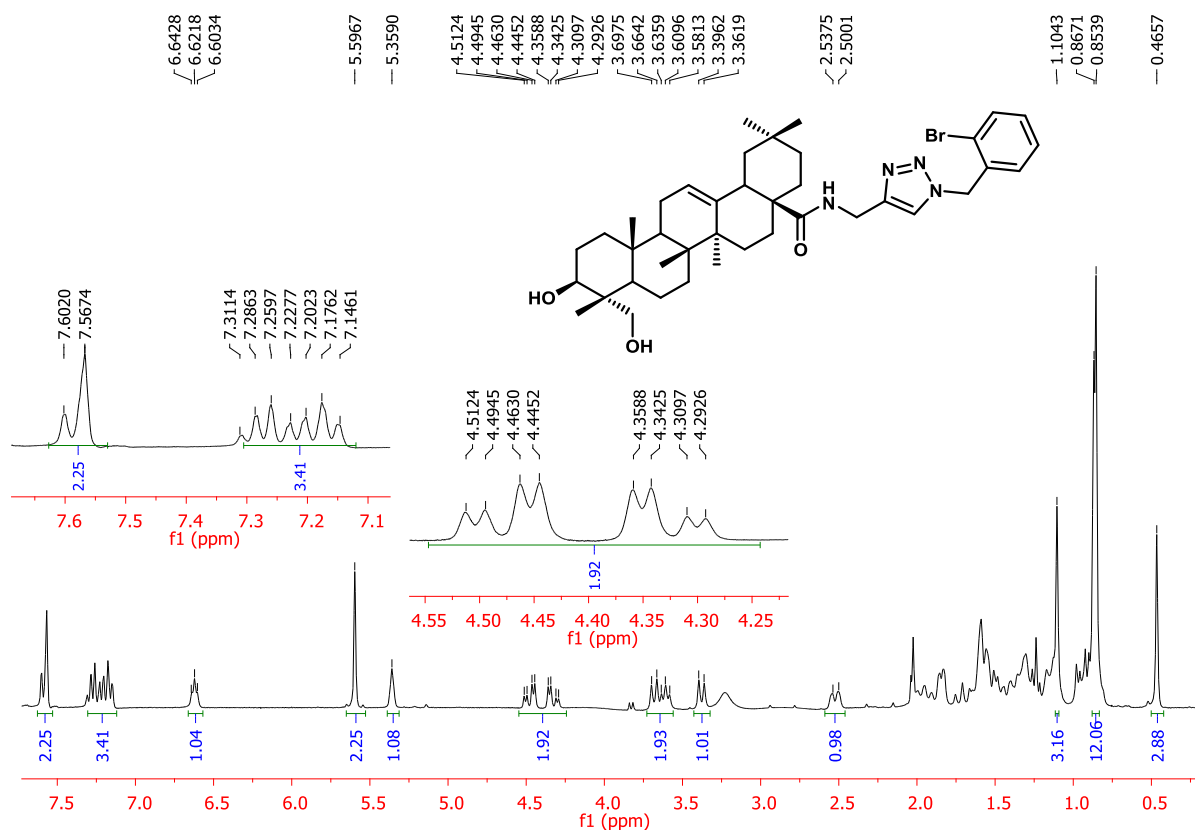


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz)

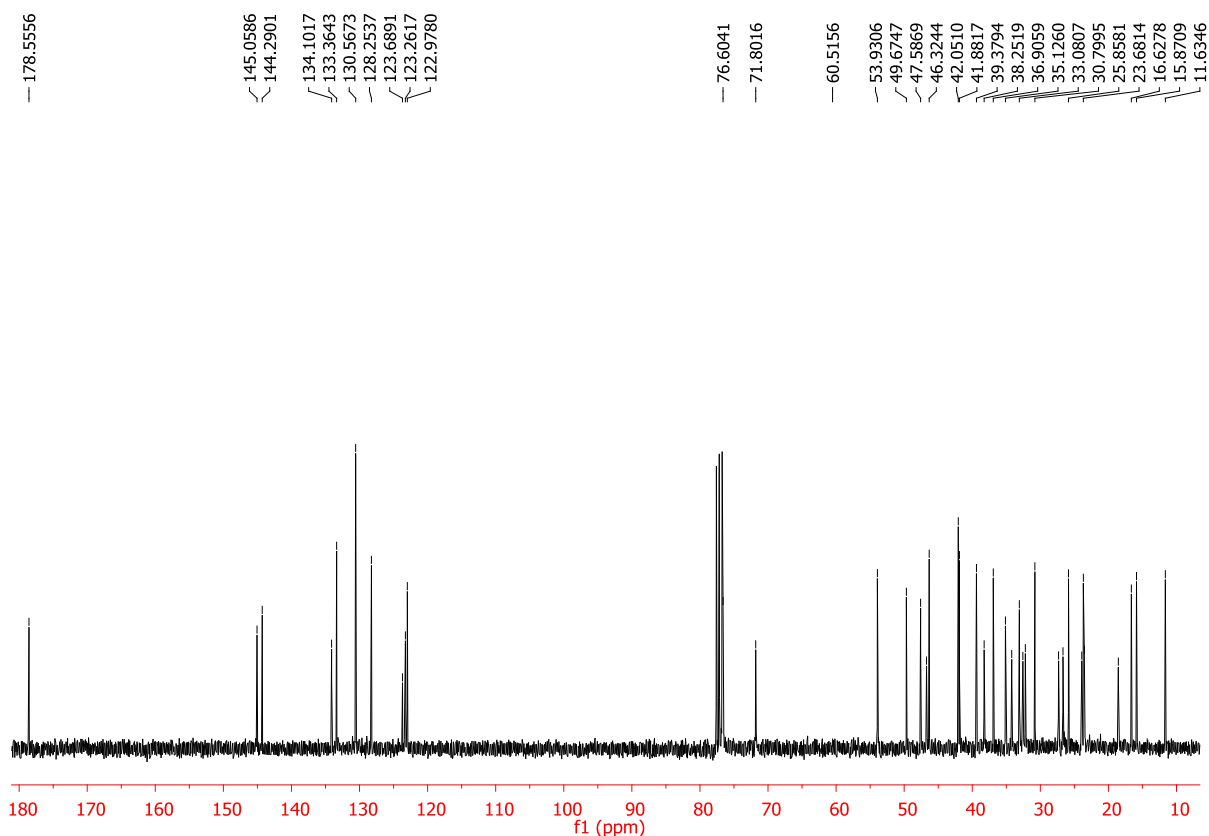


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz)

5.6.17. Espectros do (2-bromobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7b)



Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz)



Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz)

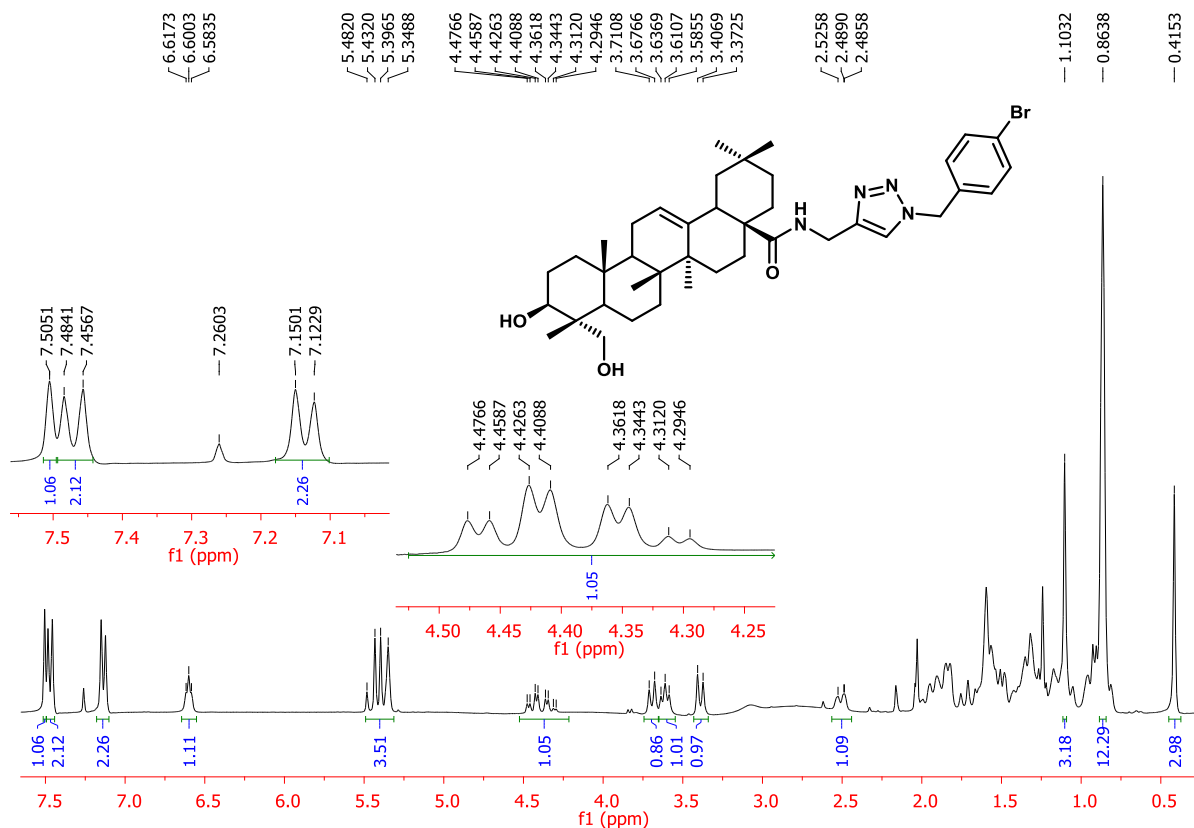
Chemical structure of compound 10 is shown above the spectrum. The structure is a complex steroid derivative with a bromophenyl group attached to the side chain.

¹H NMR spectrum (CDCl₃) of compound 10. The spectrum shows peaks from 0.4 to 7.6 ppm. Key peaks are labeled with chemical shifts: 7.5174, 7.4771, 7.4527, 7.4073, 7.2608, 7.2474, 7.2216, 7.1931, 4.4989, 4.4817, 4.4489, 4.4314, 4.3689, 4.3515, 4.3189, 4.3014, 4.37104, 3.6765, 3.6397, 3.6130, 3.5883, 3.4079, 3.3739, 2.5417, 2.5028, 1.1104, 0.8669, 0.4471. Integration values are shown below the peaks: 1.27, 1.09, 0.97, 0.97, 2.04, 2.30, 2.09, 0.99, 1.11, 3.28, 12.37, 2.95.

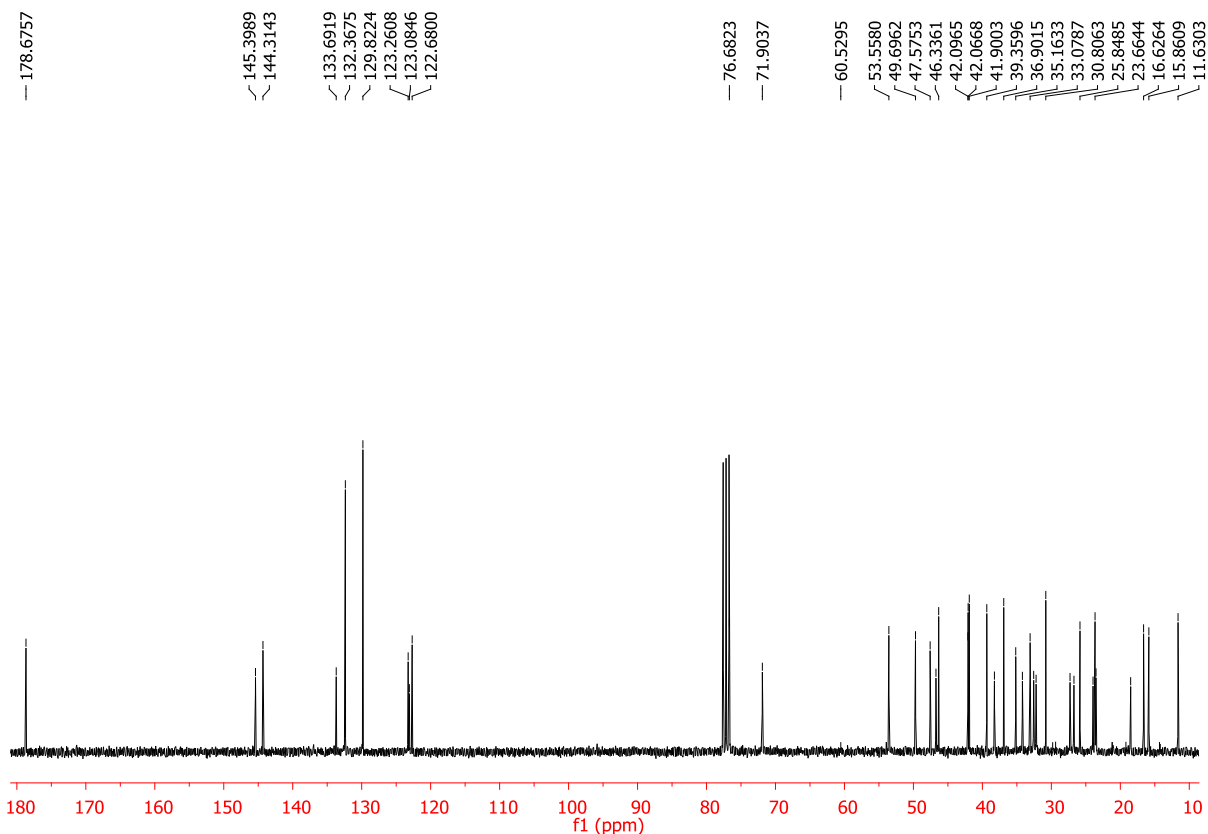
Chemical shifts (ppm): 178.6500, 145.4450, 144.3137, 136.8304, 132.0694, 131.1573, 130.7288, 126.7127, 123.2788, 123.2092, 122.7242, 76.7351, 71.9350, 53.4776, 49.7182, 47.5940, 46.7320, 46.3474, 42.1268, 42.0809, 41.9036, 39.3872, 38.2577, 36.9140, 35.1676, 33.0915, 32.5717, 30.8138, 25.8604, 23.6984, 23.5356, 16.6330, 15.8707, 11.6160.

244

5.6.19. Espectros do (4-bromobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7d)

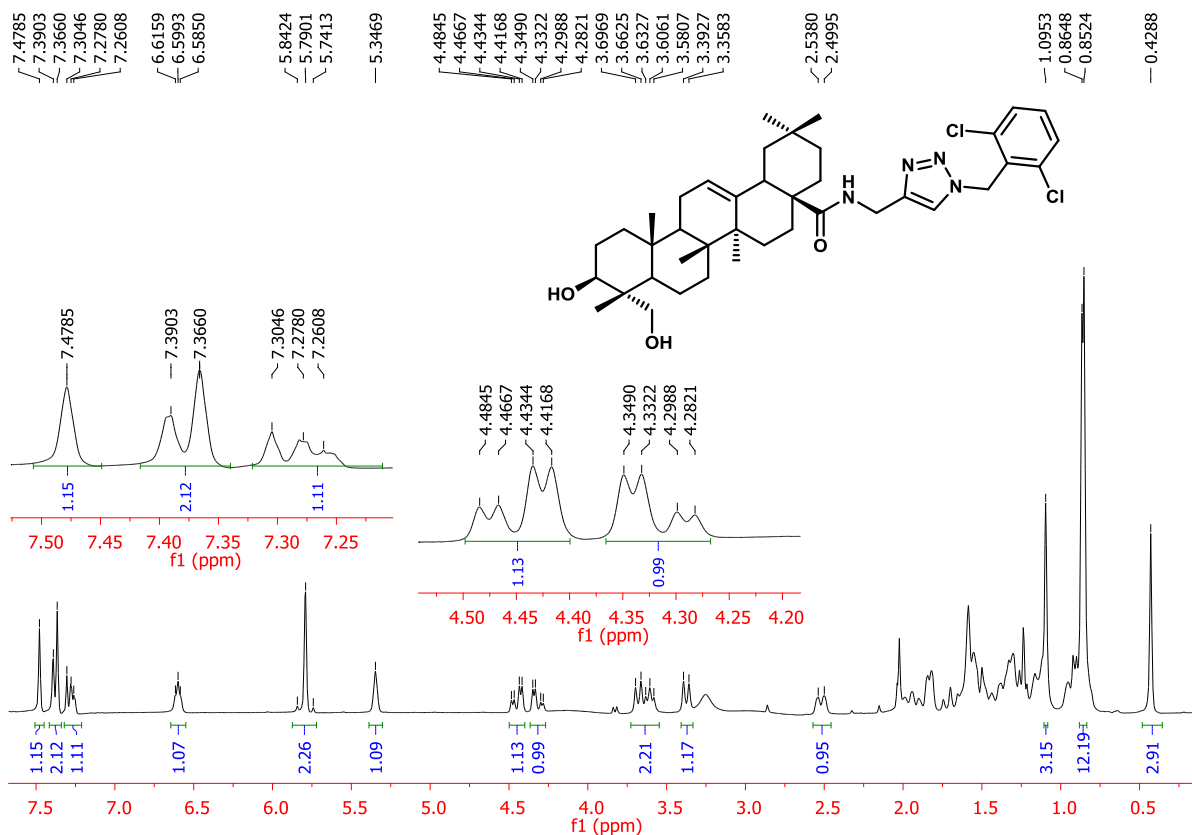


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz)

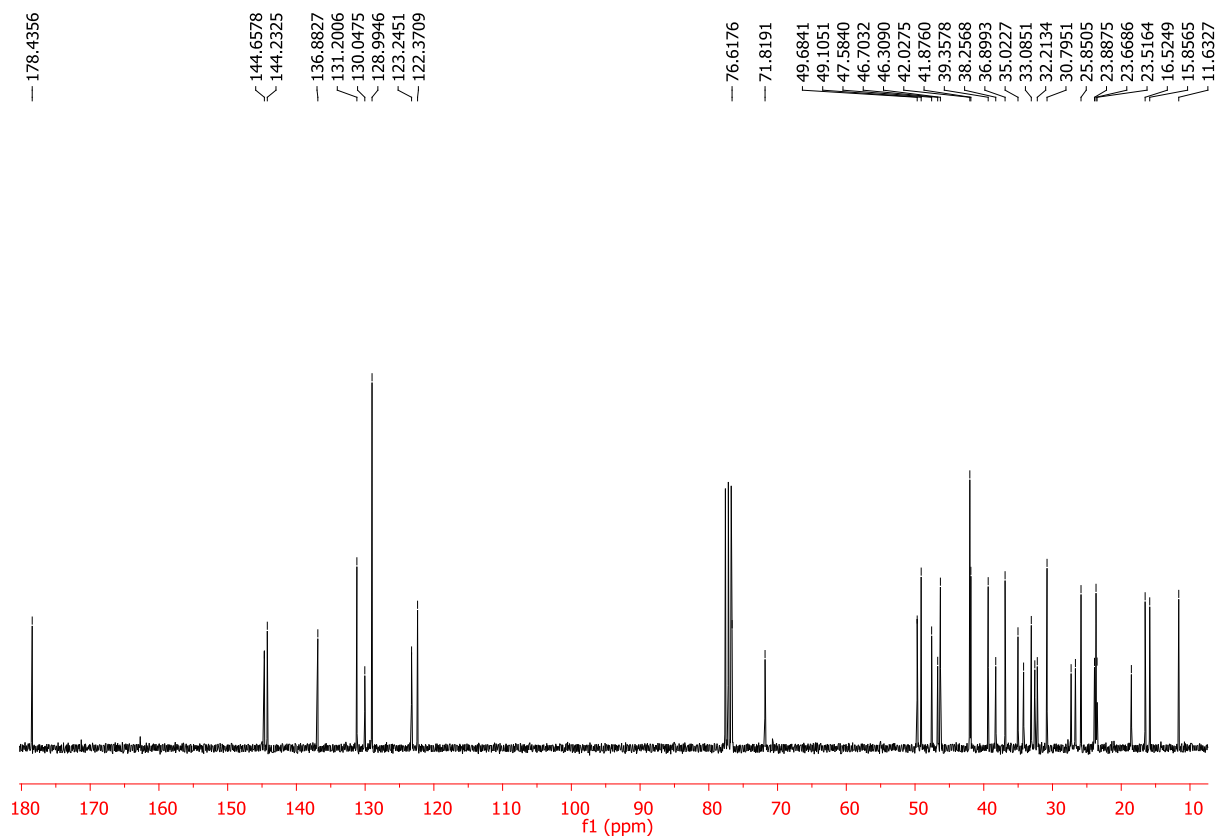


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz)

5.6.20. Espectros do (2,6-diclorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7e)

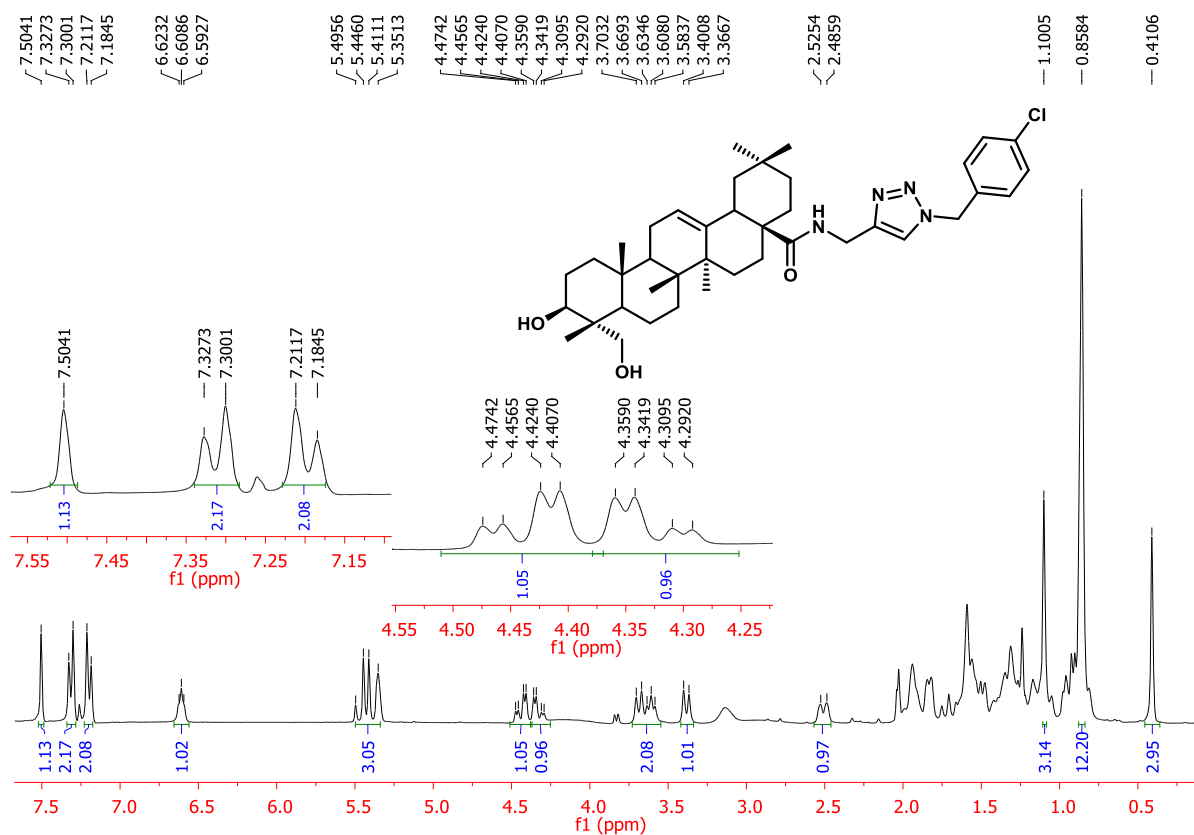


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 300 MHz)

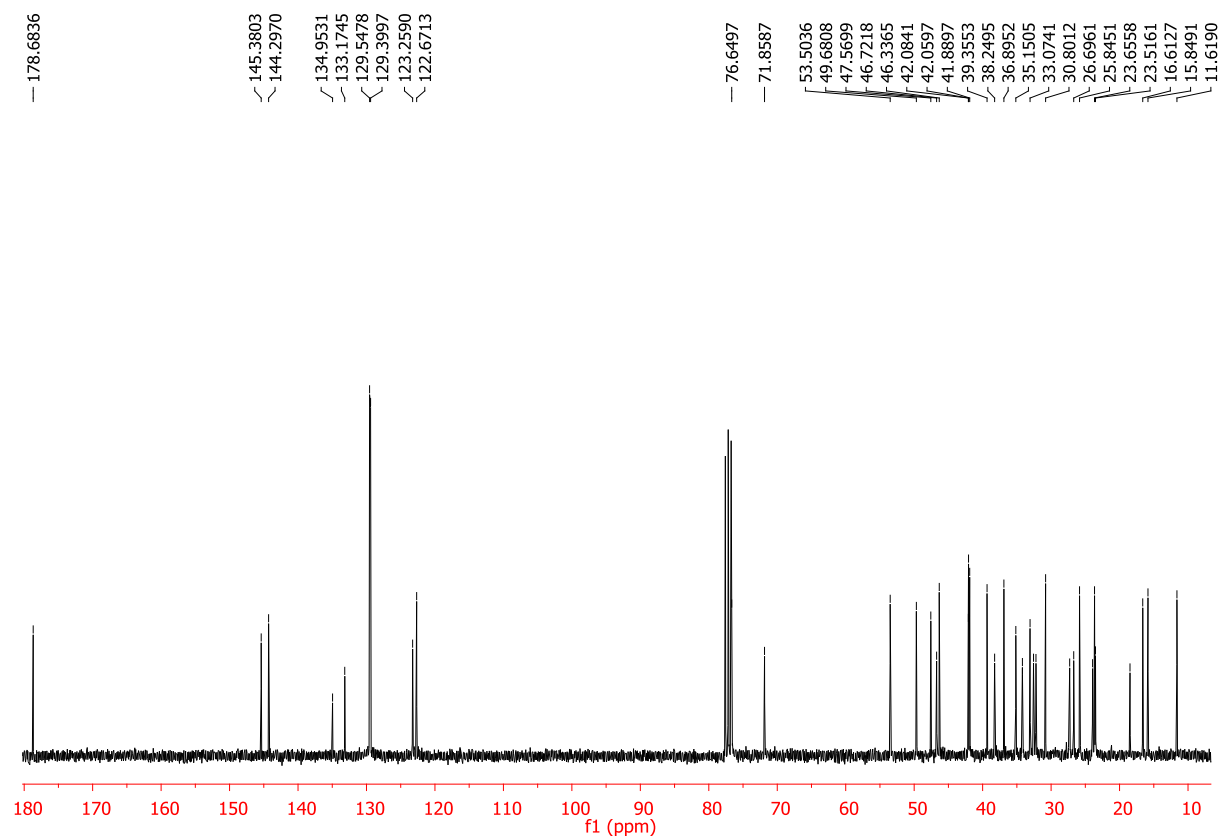


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz)

5.6.21. Espectros do (4-clorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7f)

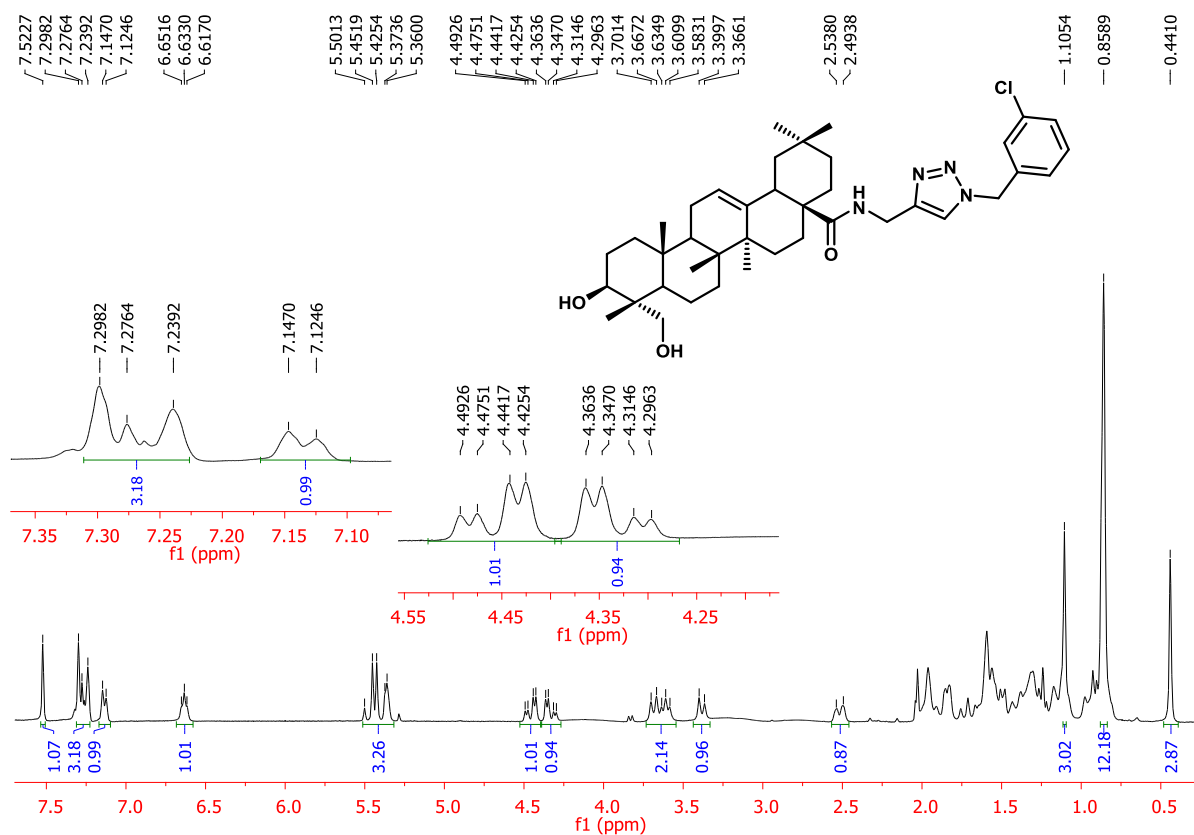


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz)

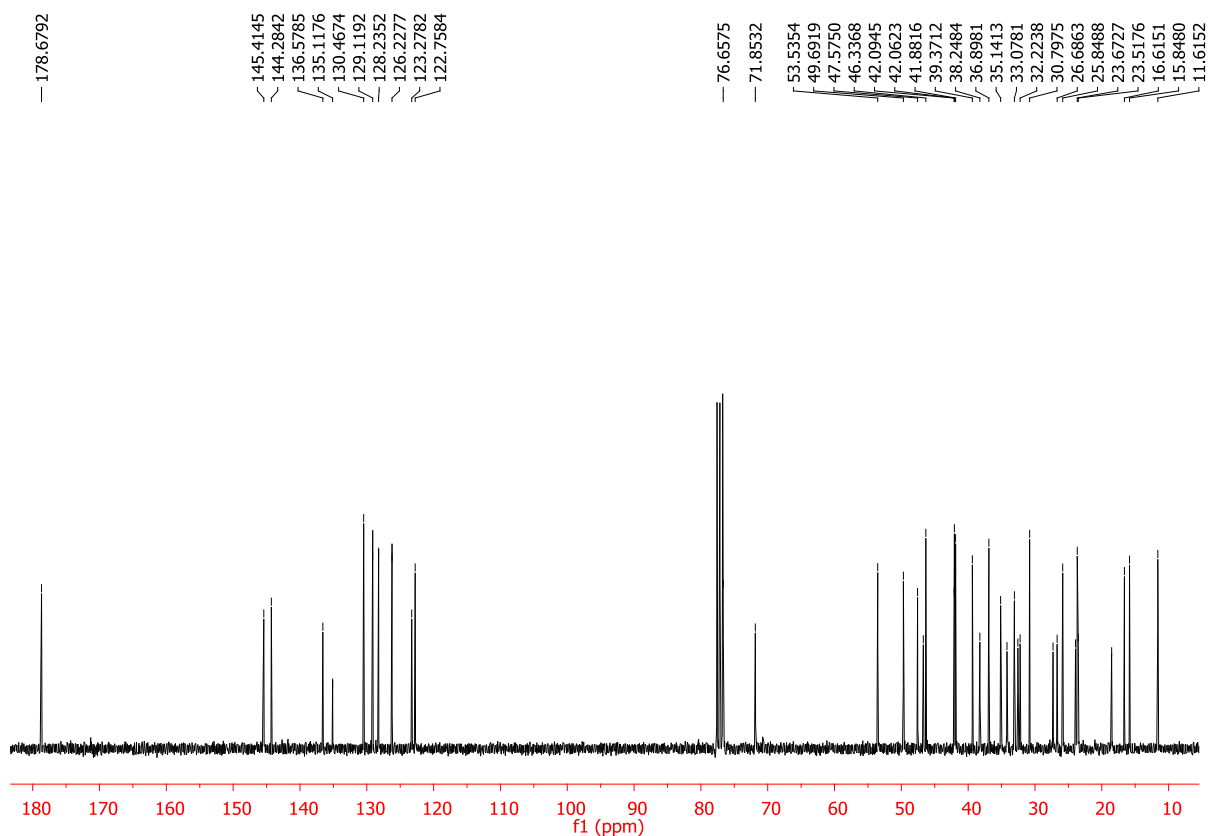


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz)

5.6.22. Espectros do (3-clorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7g)

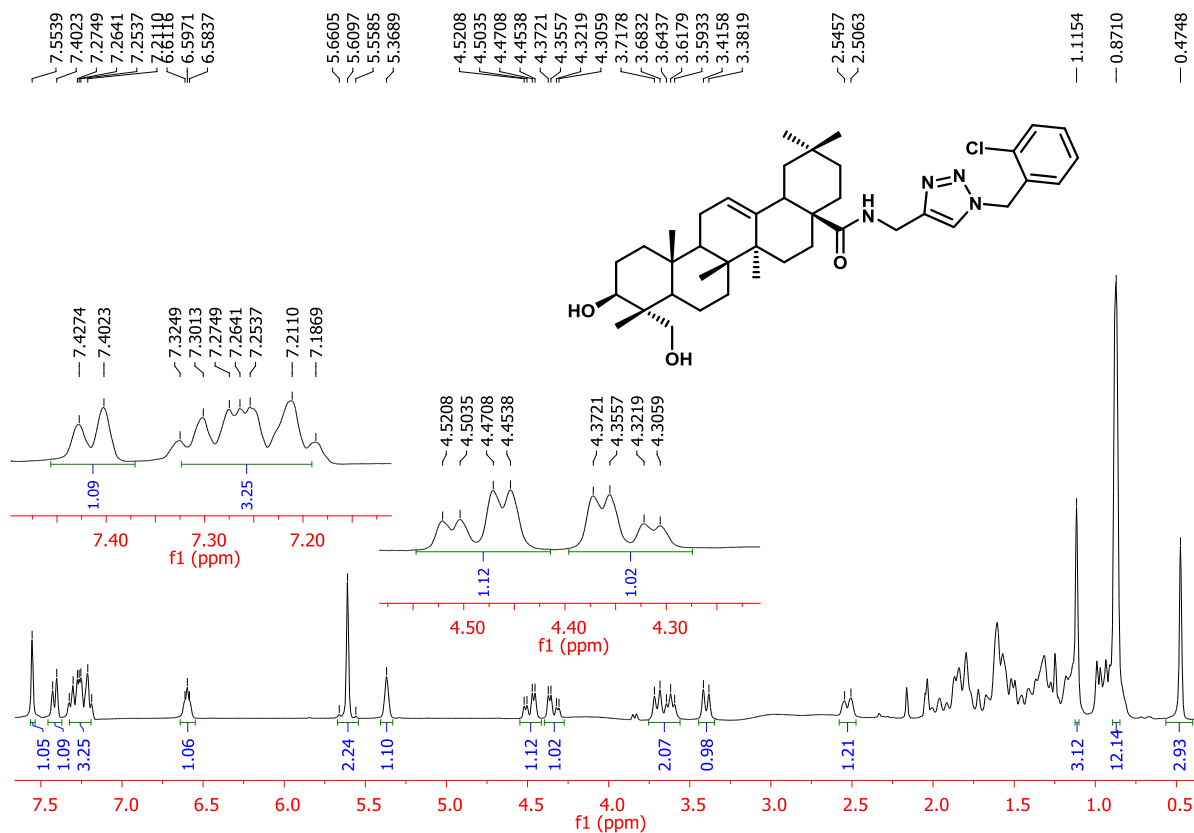


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz)

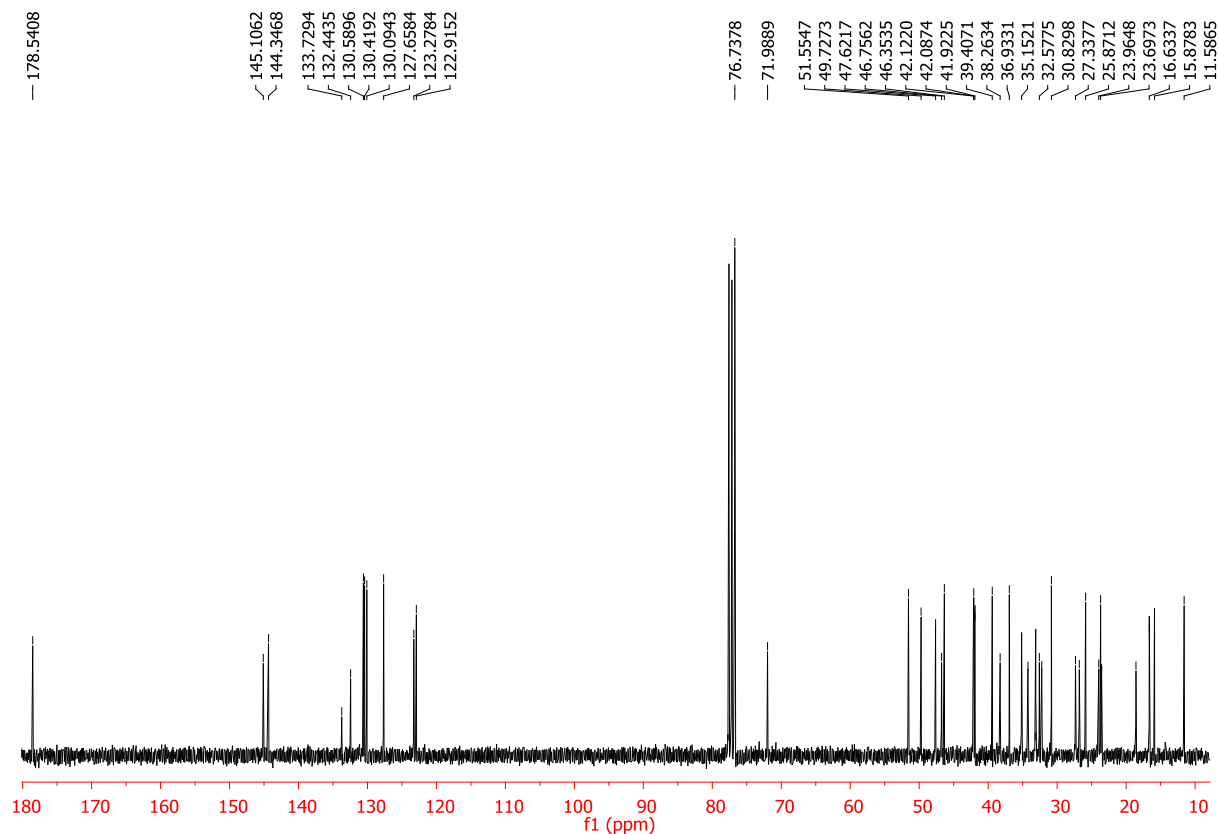


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz)

5.6.23. Espectros do (2-clorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7h)

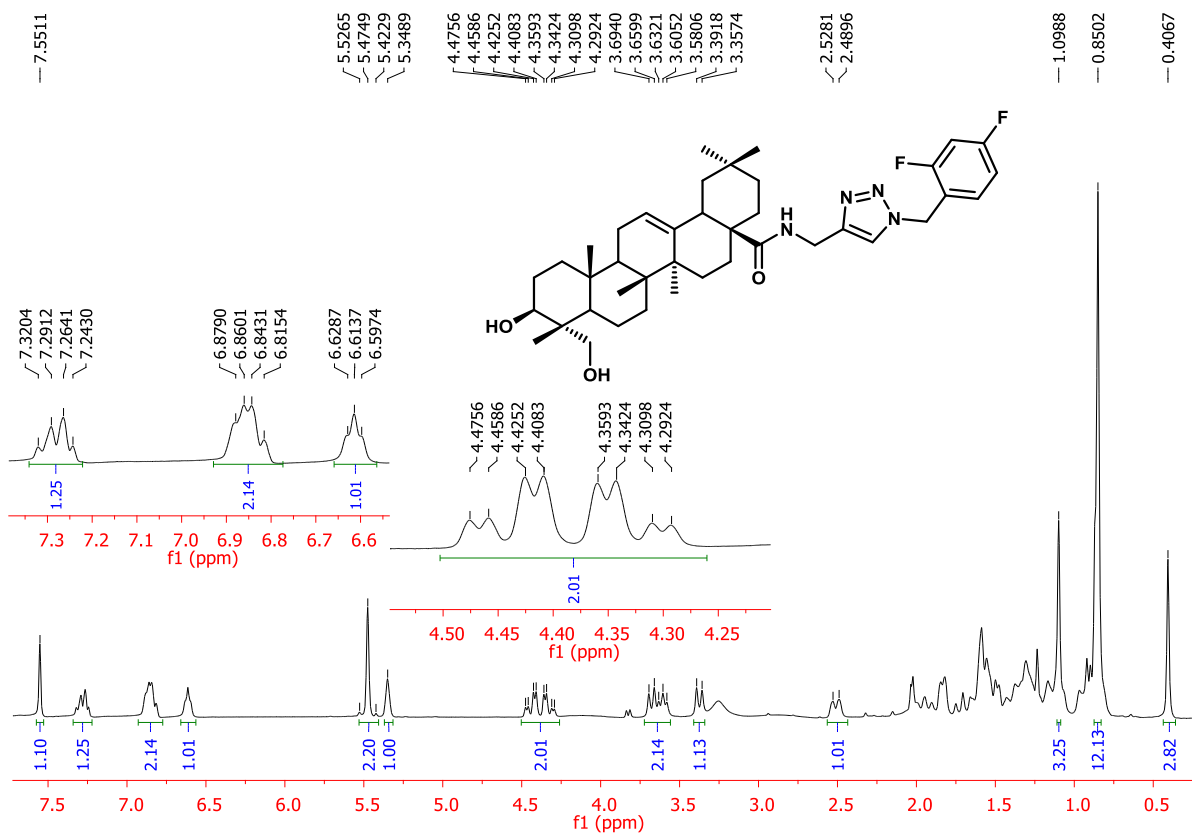


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz)

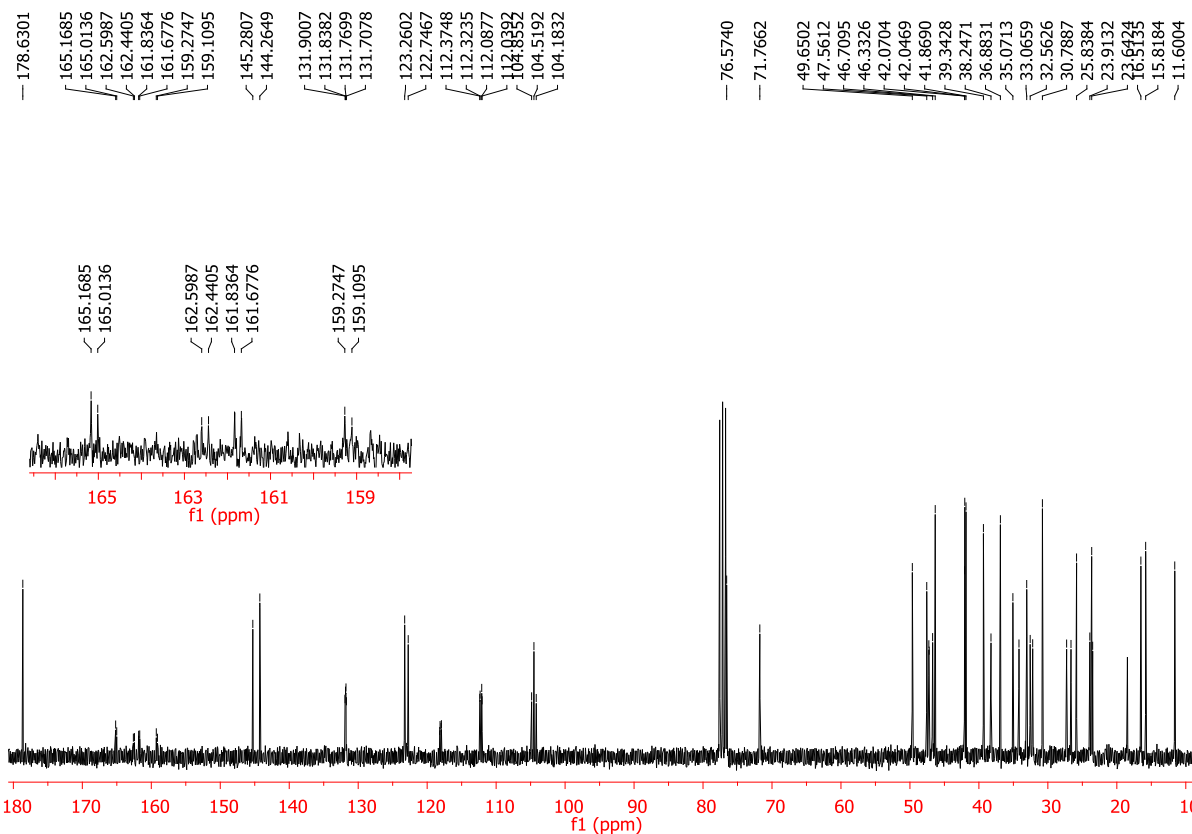


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz)

5.6.24. Espectros do (2,4-difluorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7i)

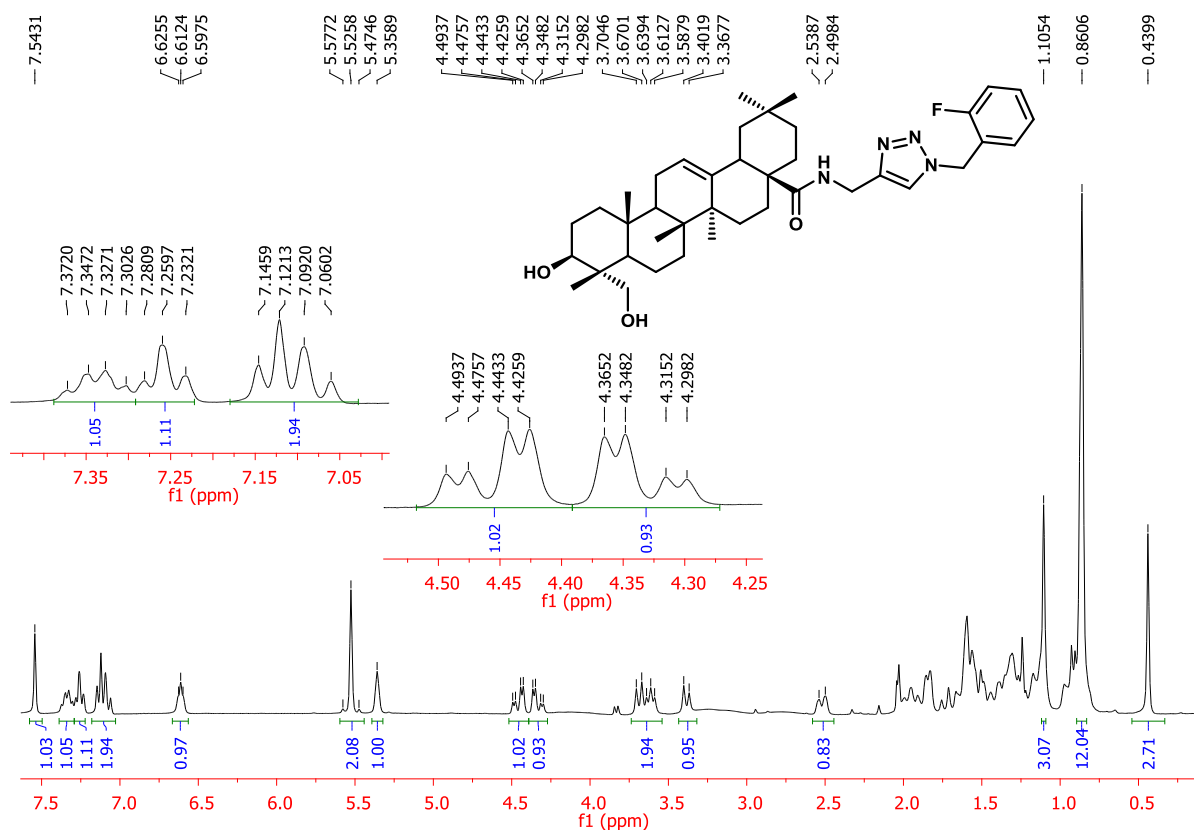


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz)

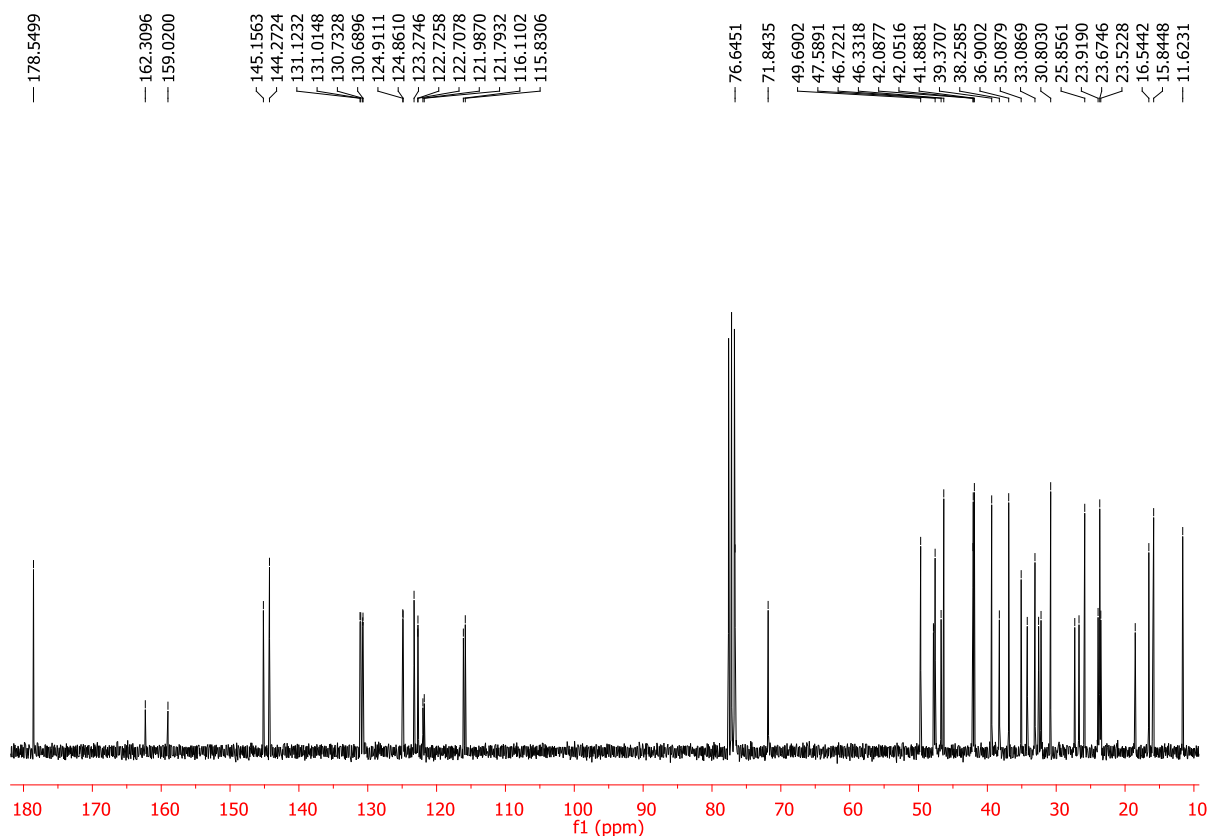


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz)

5.6.25. Espectros do (2-fluorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7j)

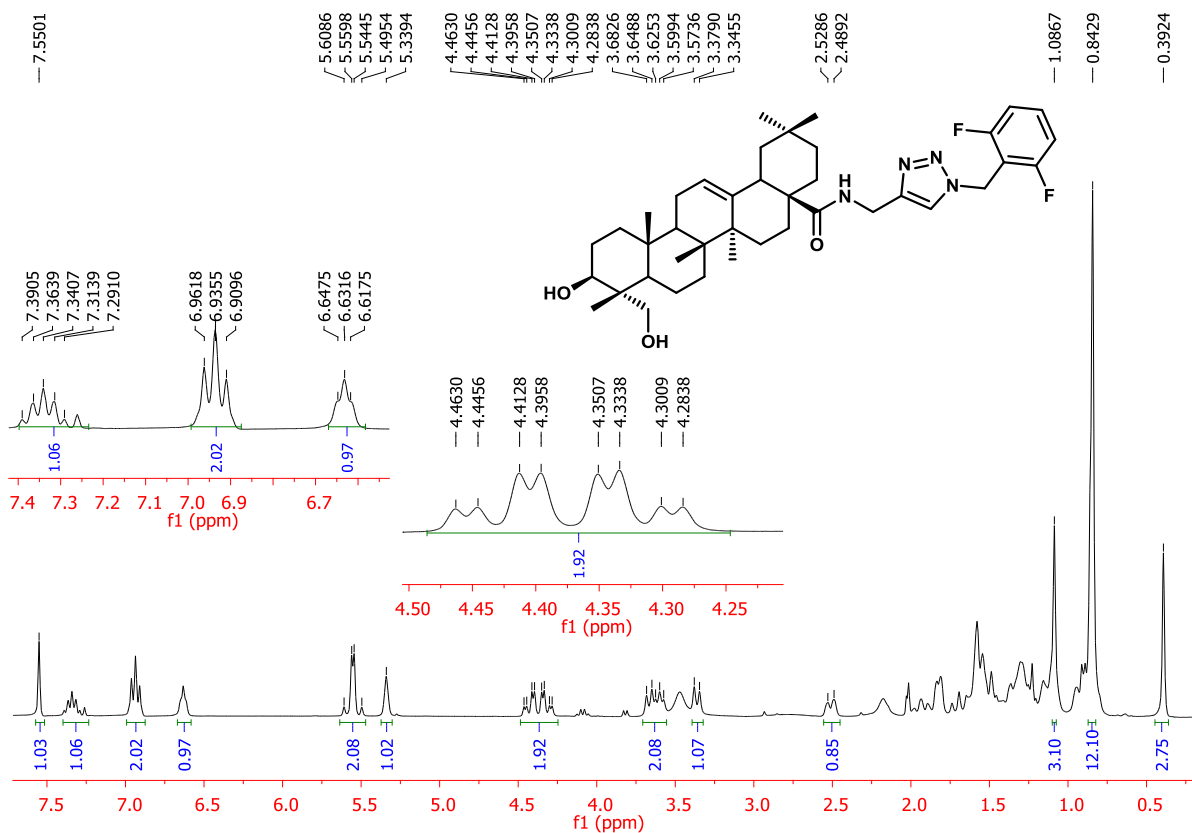


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz)

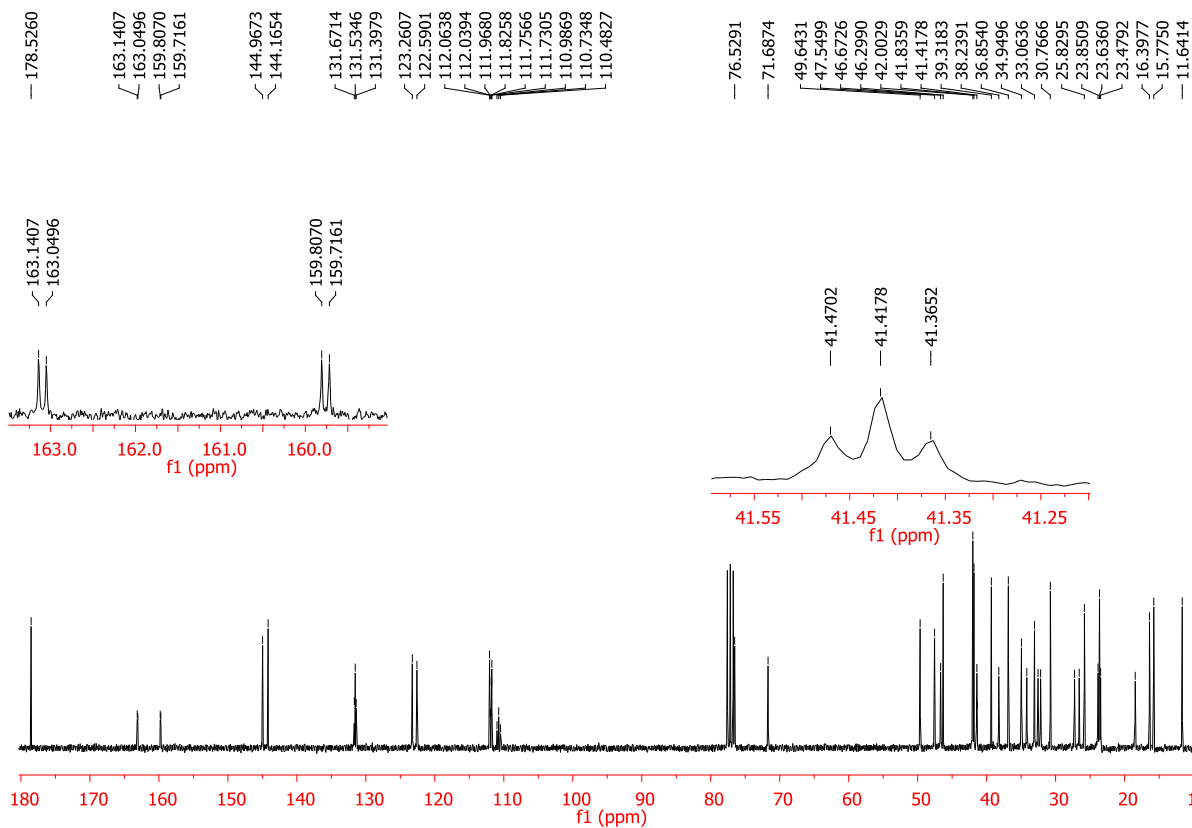


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz)

5.6.26. Espectros do (2,6-difluorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7k)

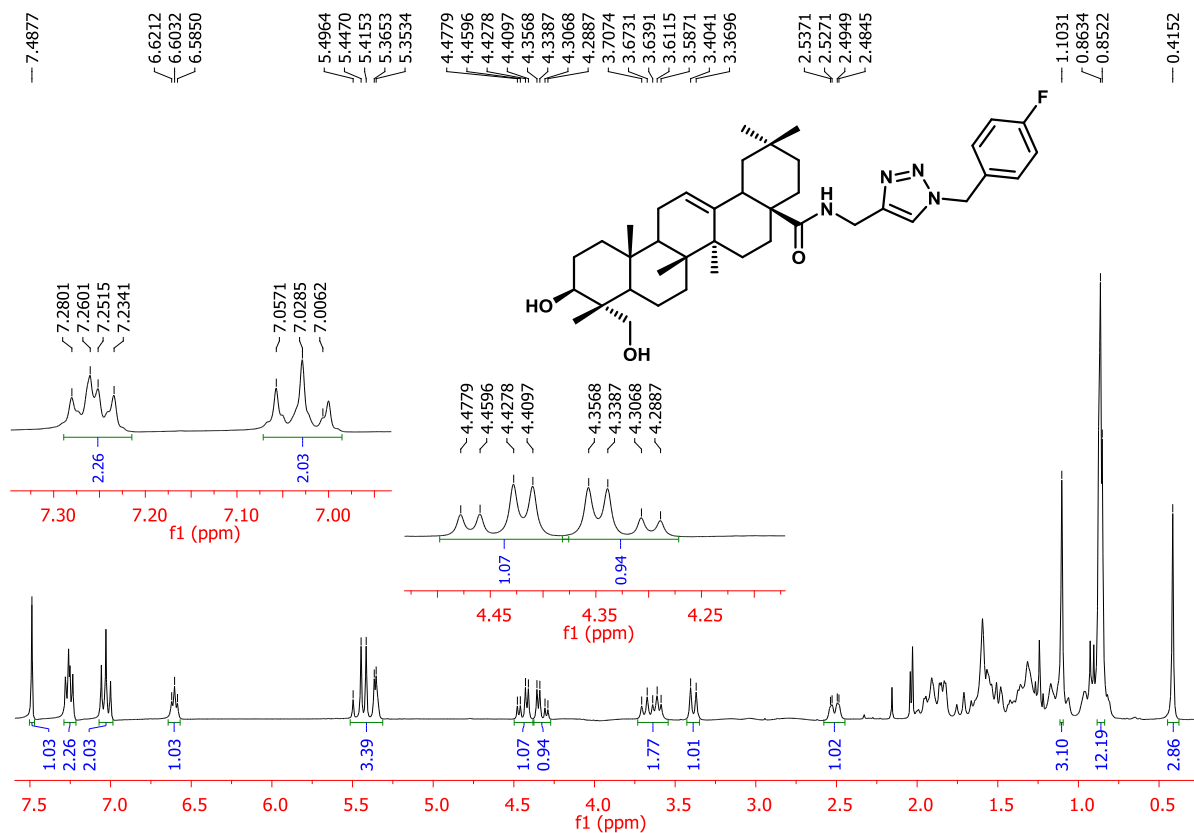


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz)

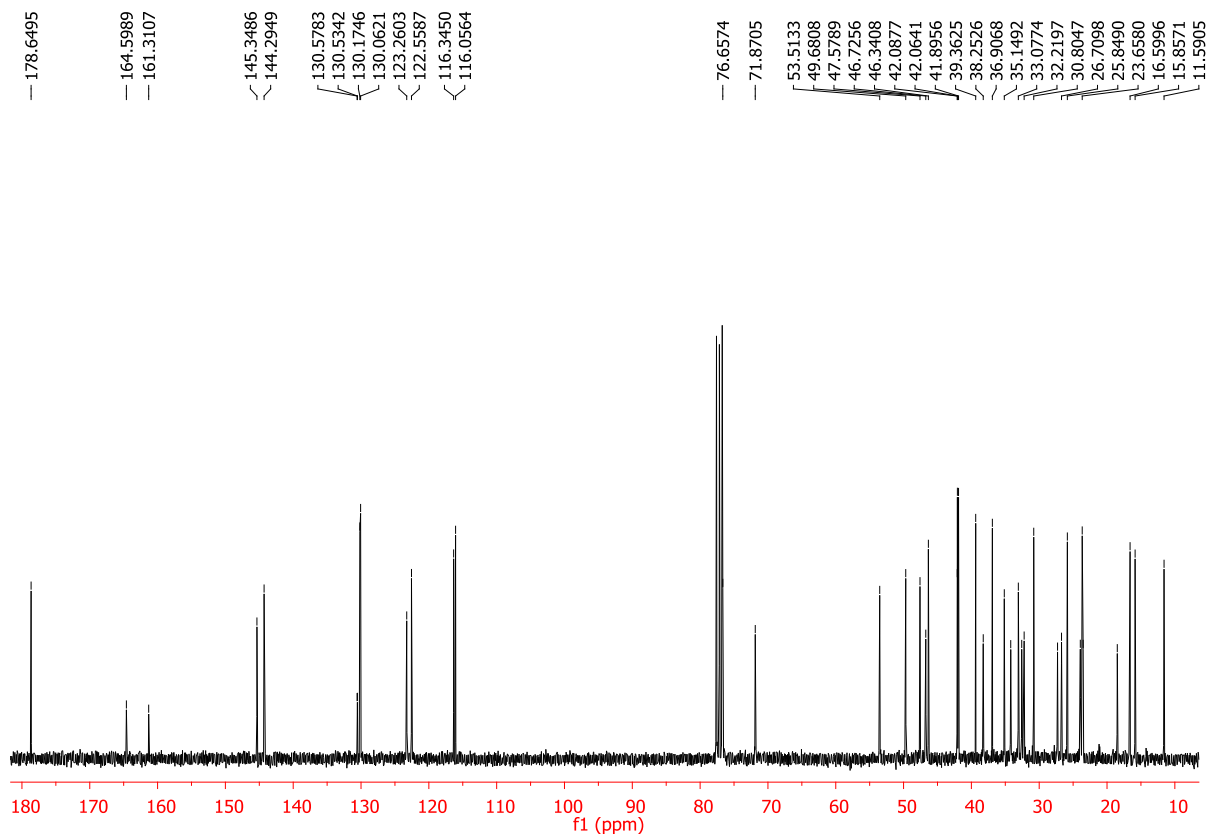


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz)

5.6.27. Espectros do (4-fluorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7l)

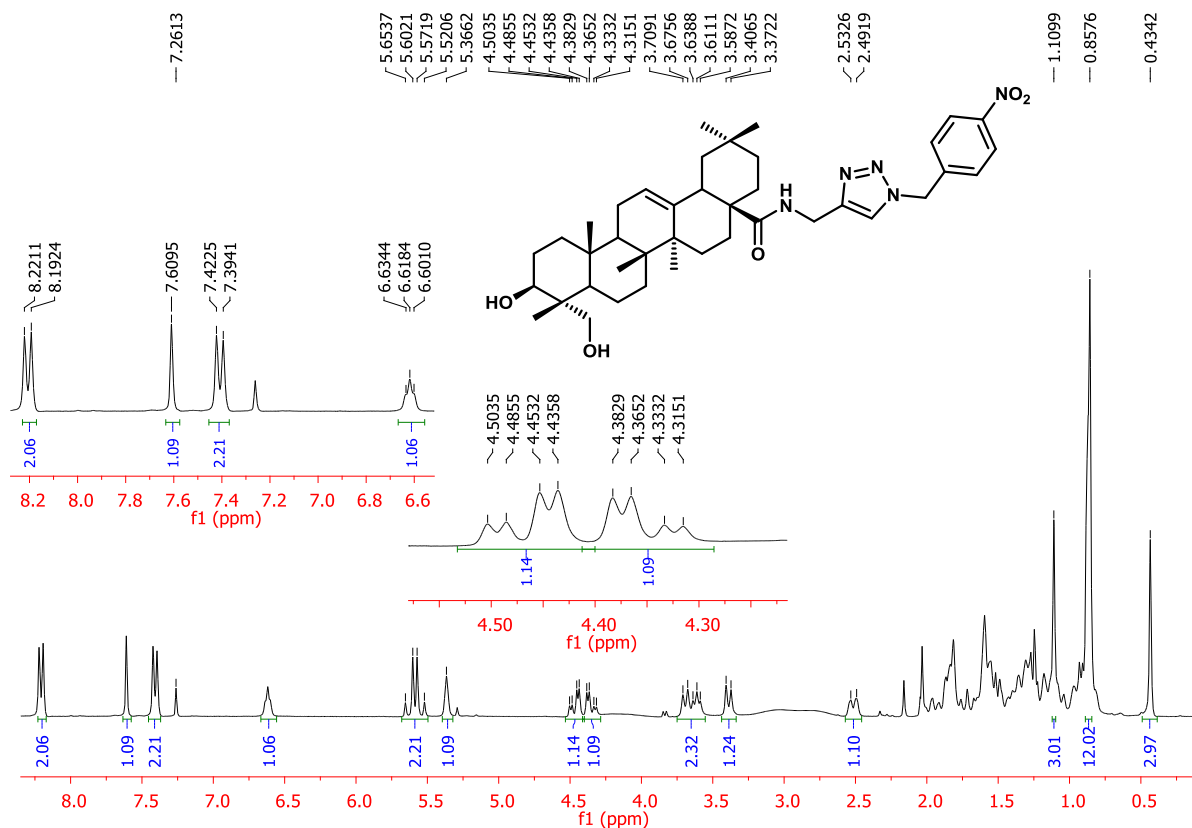


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz)

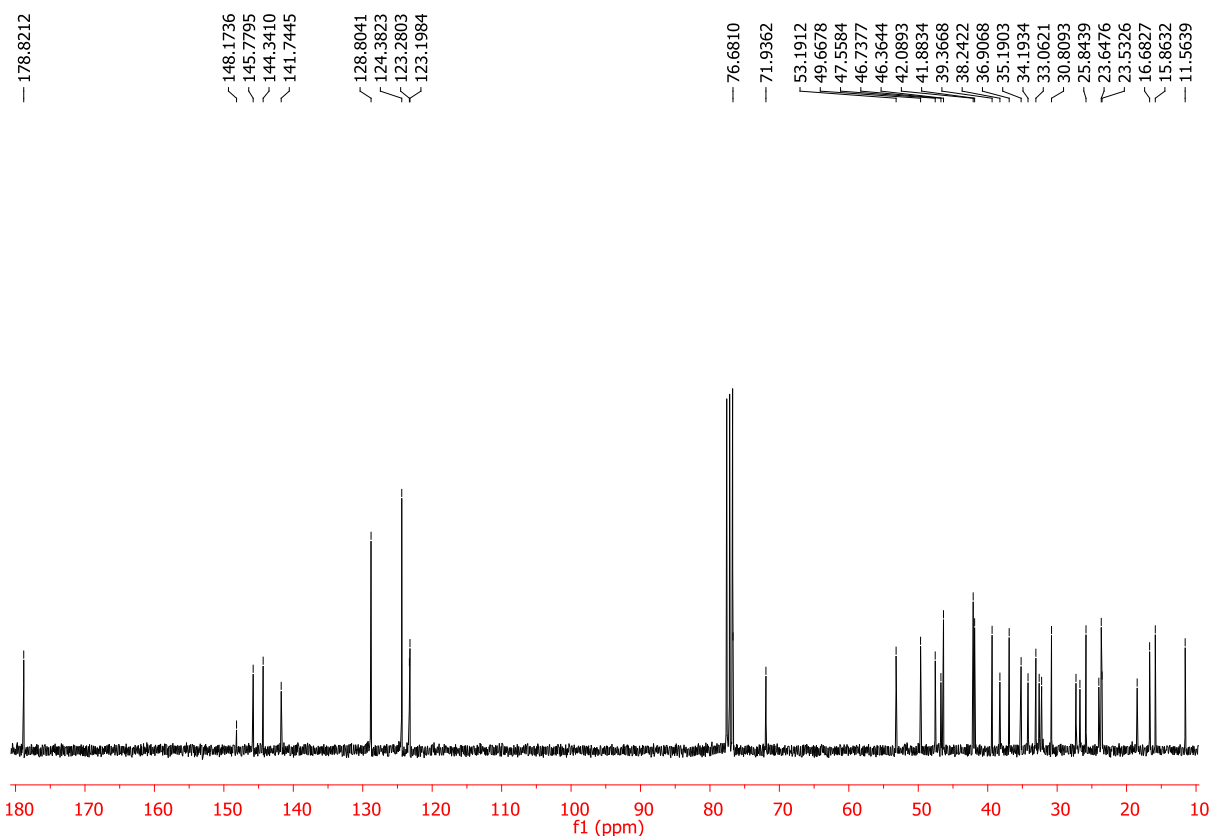


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz)

5.6.28. Espectros do (4-nitrobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7m)

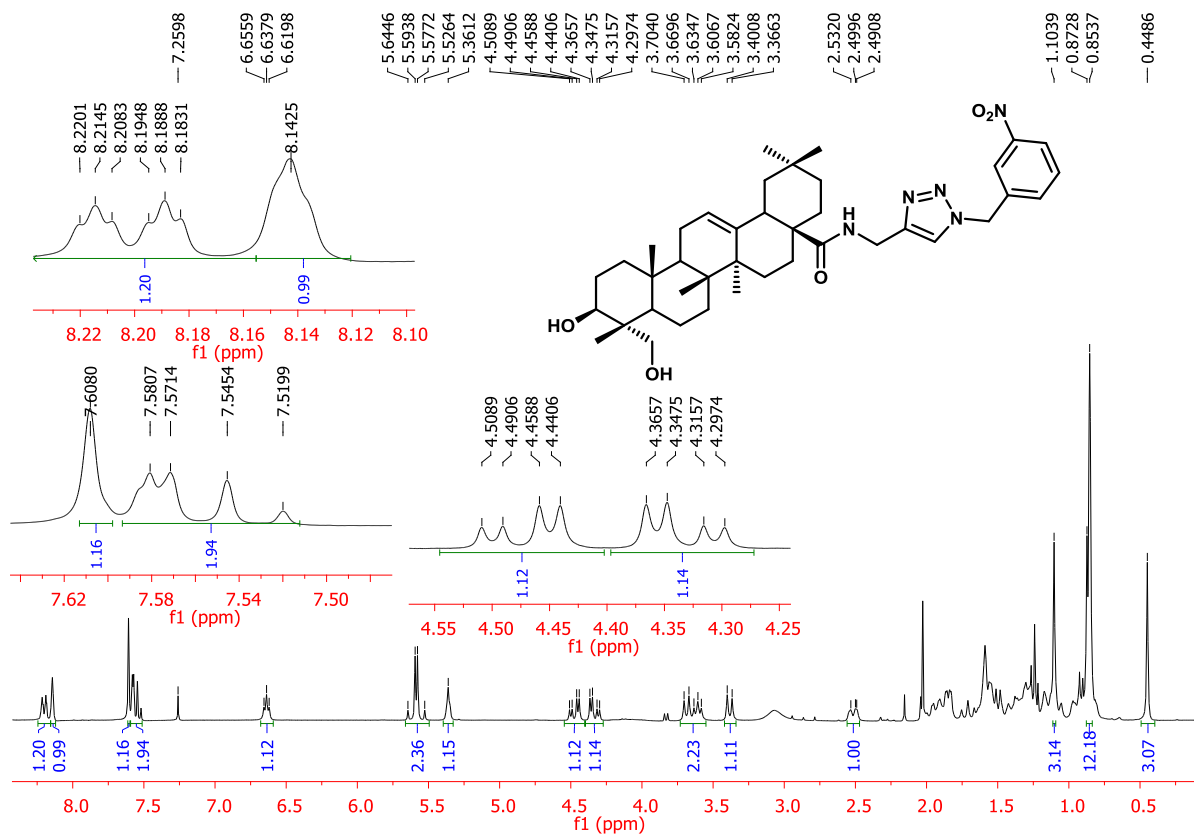


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz)

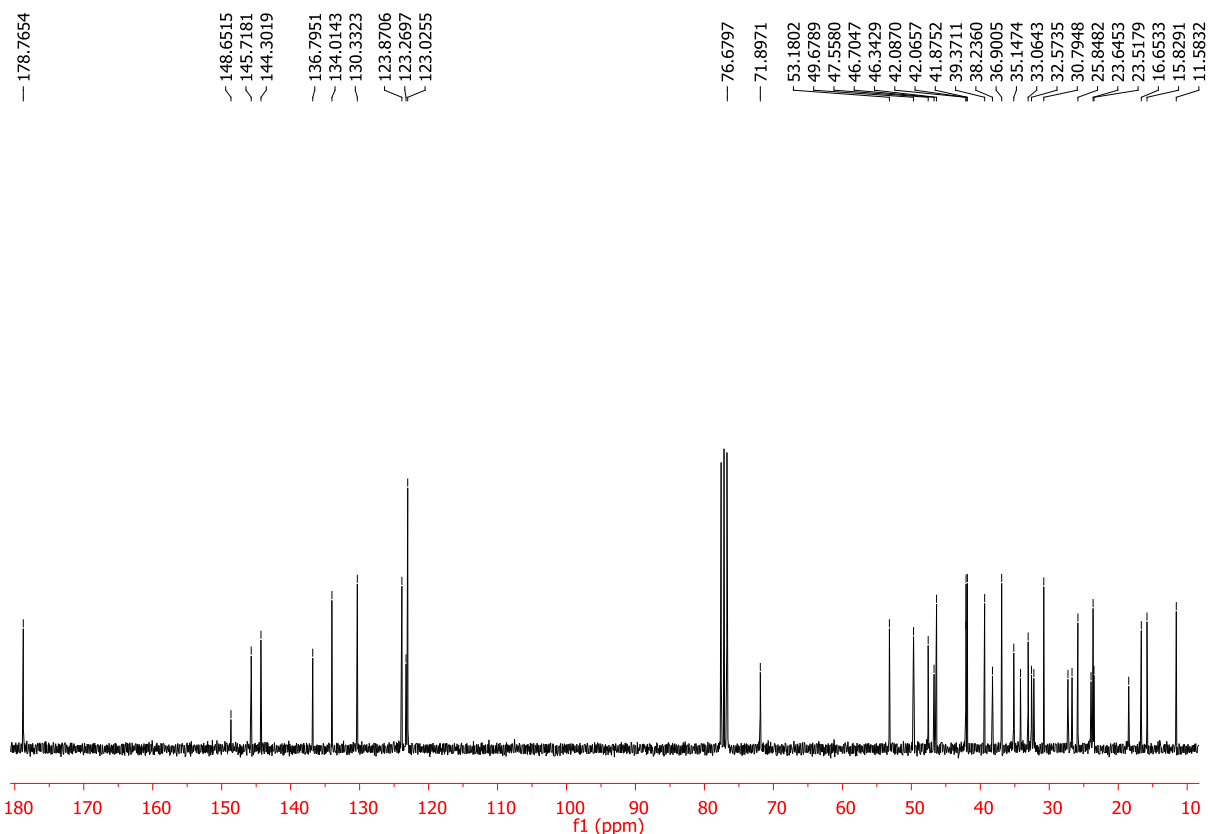


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz)

5.6.29. Espectros do (3-nitrobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β),23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7n)

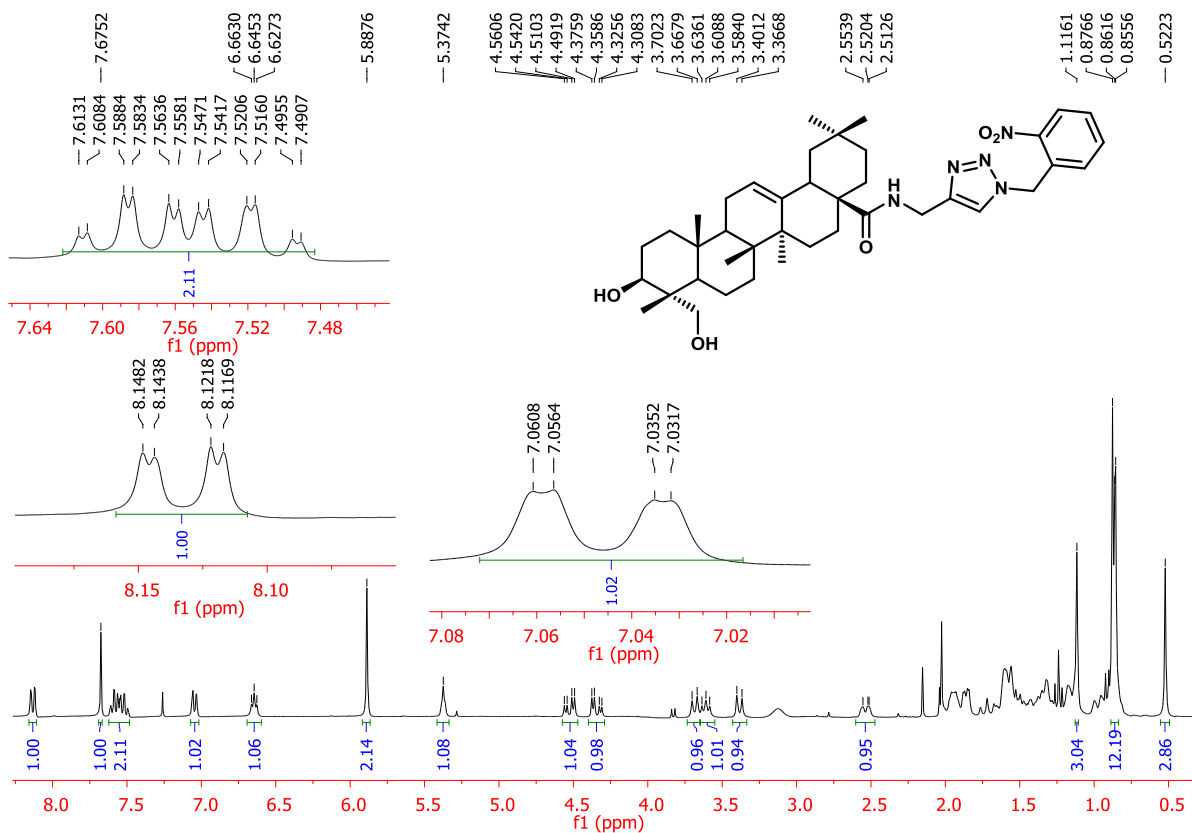


Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz)

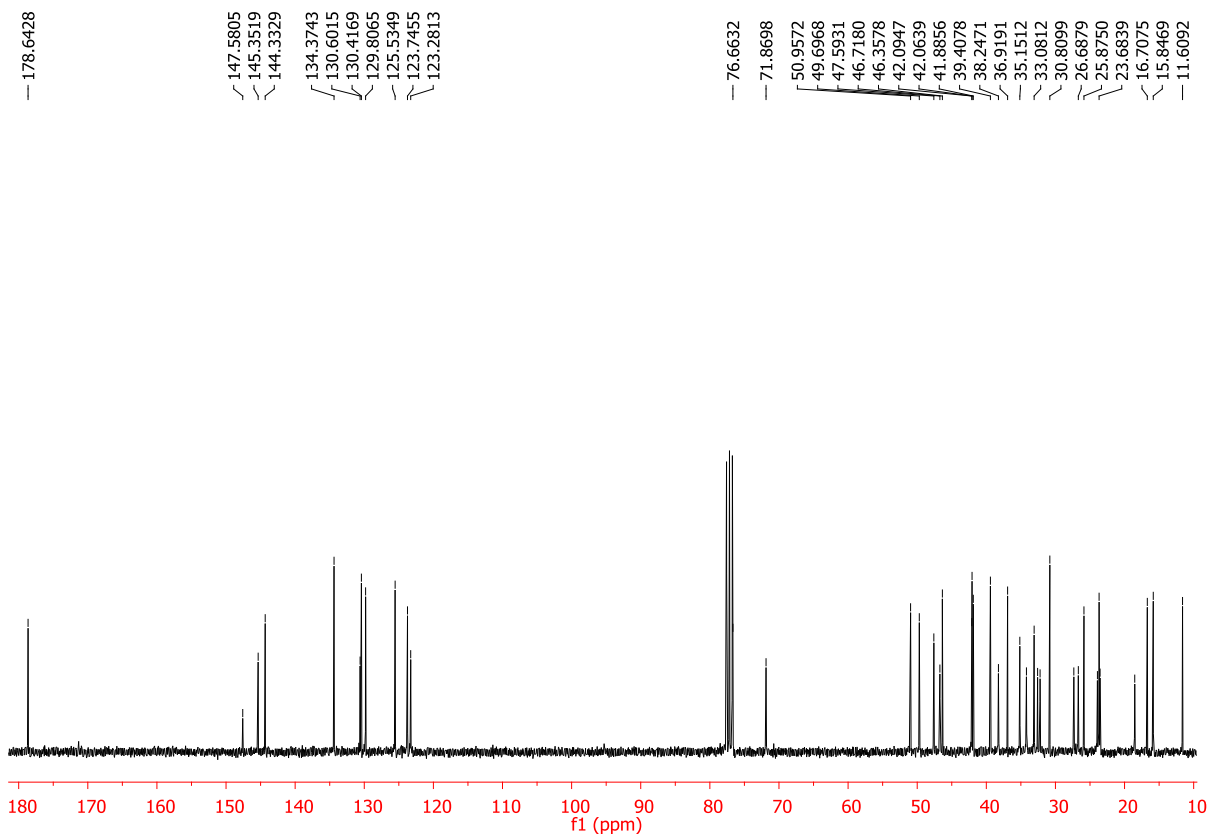


Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz)

5.6.30. Espectros do (2-nitrobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il-metil-(3 β)3,23-dihidroiolean-12-en-28-amida (7o)



Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz)



Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz)

6. Capítulo 5

Ensaio *in vitro* de diferentes derivados da hederagenina na procura de potenciais compostos com atividade anti-leishmania.

6.1. Introdução

A leishmaniose é uma doença associada à pobreza causada por mais de 20 espécies de parasitas protozoários que pertencem à família Kinetoplastida e ao gênero *Leishmania*. Possui um amplo espectro de vetores de doenças com grande diversidade epidemiológica e clínica. A doença é propagada no mundo por mais de 30 espécies de flebotomíneos dos gêneros *Phlebotomus* e *Leucemia* (KAMHAWI, 2006). As espécies de *Leishmania* são geralmente zoonóticas e é transportada por roedores e canídeos que são os principais hospedeiros reservatórios. Os seres humanos são infectados por picadas de flebótomos onde os parasitas invadem as células hospedeiras fagocíticas (GUTIÉRREZ *et al.*, 2016). A epidemiologia da infecção depende das características das espécies de parasitas, as características ecológicas locais e dos lugares de transmissão como também do comportamento humano (WHO, 2014). Três principais formas de leishmaniose são comumente observadas: (1) a leishmaniose visceral, uma doença fatal, onde parasitas invadem o fígado, baço e medula óssea; (2) a leishmaniose mucocutânea, uma doença altamente desfigurante, crônica do tecido facial e da mucosa da nasofaringe e (3) a leishmaniose cutânea, uma doença auto-limitante, resultando na formação de cicatrizes no local da lesão da pele (SINGH *et al.*, 2014).

Infecções por leishmania são predominantes em mais de 98 países, a maioria dos quais estão mal desenvolvidos ou em desenvolvimento. Em um relatório recente, estima-se que 0,2-0,4 milhões de novos casos de leishmaniose visceral (LV) e 0,7-1,2 milhões de forma cutânea (LC) da doença ocorrem a cada ano em todo o mundo (DEN BOE *et al.*, 2011; ALVAR *et al.*, 2012). Mais de 90% dos casos de LV resultam em cinco países: Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão, Brasil, e 90% dos casos de LC ocorrem em sete países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (WHO, 2010).

Leishmania infantum é considerado o principal agente etiológico da leishmaniose visceral no sul da Europa além, a leishmaniose canina devido a *L. infantum* é uma das principais zoonoses mundiais potencialmente fatais para os humanos e cães, que compõem o principal reservatório de infecção para os seres humanos (WHO, 2014; SOLANO-GALLEGU *et al.*, 2011).

No mundo inteiro, pesquisas são realizadas com o objetivo de desenvolver um tratamento mais eficiente para leishmaniose. Uma droga leishmanicida segura, eficaz, barato e verdadeiro ainda está em demanda. Devido à falta de melhores terapias alternativas, identificação de novas drogas e novos alvos biológicos, para resolver este problema ainda é uma tarefa importante para químicos, bioquímicos e médicos em todo o mundo. Os produtos naturais são uma fonte potencial de novos compostos que podem ser utilizados como um medicamento ou como uma estrutura principal para o desenvolvimento de novos agentes para o tratamento de várias doenças (MISHRA e TIWARI, 2011; NEWMAN e CRAGG, 2016), incluindo algumas doenças tropicais negligenciadas como a leishmaniose (SINGH *et al.*, 2014; HUSSAIN *et al.*, 2014).

Embora alguns produtos naturais têm sido relatados possuindo atividade contra *L. infantum*, até os dias de hoje, poucos fármacos, incluindo alguns baseados em produtos naturais estão disponíveis para o tratamento da leishmaniose (SINGH *et al.*, 2014). Entre as várias classes de produtos naturais com atividade anti-leishmaniose, alguns triterpenos pentacíclicos, tais como o ácido betulínico, ácido ursólico e seus derivados mostraram alguma atividade (SINGH *et al.*, 2014; HAAVIKKO *et al.*, 2014; SOUSA *et al.*, 2014; LOPES *et al.*, 2011). Recentemente, o ácido oleanólico e lanosterol mostraram ser agentes leishmanicidas potentes contra espécies de três tipos de *Leishmania* (SOUSA MELO *et al.*, 2016). Por outro lado, a hederagenina demonstrou ter uma actividade significativa, em comparação com a droga comercial de antimonato de *N*-metilglucamina contra *Leishmania infantum* e *Leishmania tropica* (MAJESTER-SAVORNIN *et al.*, 1991).

Entre os medicamentos comerciais utilizados para tratar as diferentes formas de leishmaniose, cada um tem desvantagens significativas em termos de custo (Anfotericina B lipossômica), toxicidade (Antimoniais, Miltefosina, e Anfotericina B lipossômica), teratogenicidade (Miltetofosina) ou no desenvolvimento de resistência (Antimoniais, Miltefosina, Paromomicina) (Figura 6.1.1). Diante deste cenário e o crescente número de casos de leishmaniose notificados, especialmente nos países menos desenvolvidos (WHO, 2015), a descoberta de novos medicamentos é essencial para controlar esta doença.

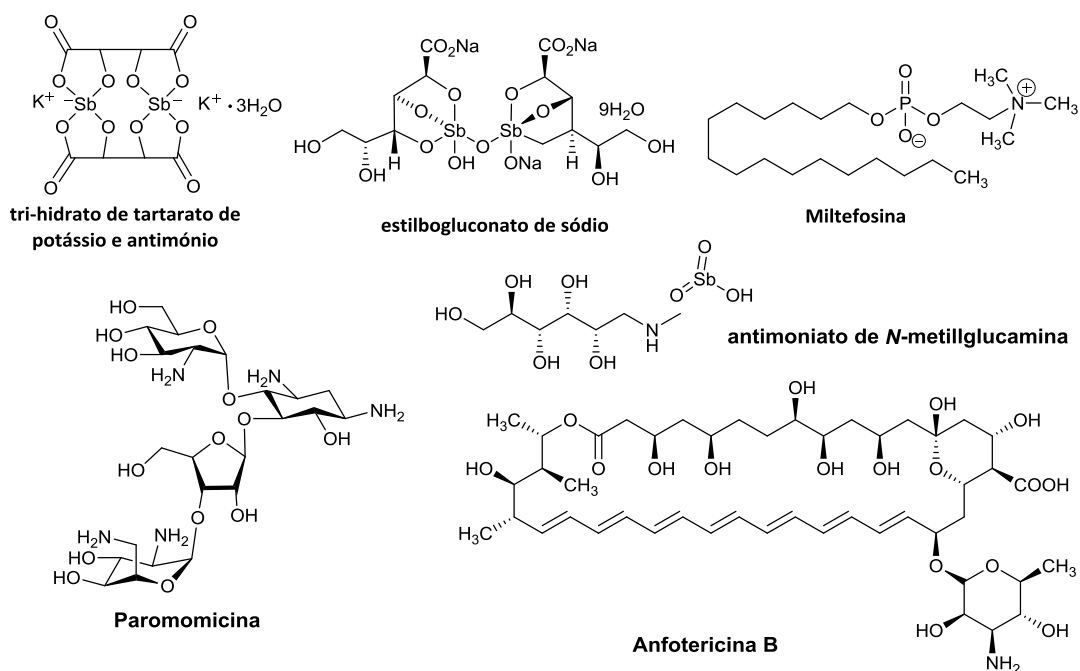


Figura 6.1.1 - Estruturas de alguns fármacos comerciais utilizados para tratar diferentes formas de leishmaniose.

Nos capítulos 3 e 4 relatamos que a presença de grupos volumosos ligados à carbonila-28 da hederagenina potencializam a atividade citotóxica. Considerando que nenhuma investigação detalhada sobre os efeitos de derivados hederagenina contra formas amastigotas de leishmania está disponível, neste capítulo, descrevemos os resultados da nossa investigação para essa doença. Um total de 60 derivados de hederagenina foram avaliados *in vitro* sobre a proliferação intracelulares de formas amastigotas de *L. infantum*.

6.2. Material e Métodos

6.2.1. Sínteses dos derivados de Hederagenina

A sínteses dos derivados da hederagenina (**1-60**) está descrita em detalhe nos capítulos 3 e 4.

6.2.2. Avaliação dos compostos sobre o crescimento *in vitro* de formas amastigotas intracelulares de *L. infantum*

A atividade *in vitro* dos compostos contra amastigotas intracelulares de *L. infantum* (BH46) foi realizada usando macrófago canino (DH82). Estas células foram plaqueadas a uma concentração 5×10^4 macrófagos por poço em placas de poliestireno de 96 poços (Cell Wells, Corning Glass Works) e incubou-se a 37 °C, ambiente com 5% de CO₂ em estufa (MAIA *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2012; DIAS *et al.*, 2015). Após 24 h, os macrófagos aderidos foram infectados com promastigotas de *L. infantum* em fase estacionária, em uma proporção de 50 parasitos para cada célula hospedeira. Quatro horas após da infecção, as culturas foram lavadas três vezes com PBS gelado (Tampão fosfato-salino), para remover os parasitas extracelulares. Logo em seguida, os compostos diluídos em RPMI foram adicionados nos poços nas seguintes concentrações: 0,1; 1, 10, 100 e 1000 µM. Quatro replicatas foram realizadas para cada concentração. Após 48 h, as culturas foram fixadas com metanol gelado, durante 15 min e secas com ar quente. Para o desenvolvimento do teste de ELISA, as placas de cultura fixadas foram lavadas três vezes com 100 mL de PBS contendo 5% de BSA (albumina de soro de bovino); e para bloquear a ligações não específicas, incubou-se durante 1 h a 37 °C com esta mesma solução. Após este período, foi retirada a solução de bloqueio e adicionado soro de paciente infectado com *Leishmania* sp (diluição 1:100) e incubou-se as placas durante 1 h a 37 °C. Após este período, as placas foram lavadas quatro vezes com PBS contendo 0,05% de Tween-20 (pH 7.4). Logo em seguida, 100 µl de IgG anti-cão conjugados com HPR (diluição 1:2000) foram adicionados nos poços. As placas foram incubadas durante 1 h a 37 °C, e em seguida lavou-se quatro vezes com PBS contendo 0.05% de Tween-20 (pH 7,4) antes de desenvolver a reação. Para desenvolvimento, 100 µL de solução de substrato (10 ml de tampão de citrato, 10 mg de OPD, *orto*-fenilenodiamina, 2.0 mL de H₂O₂) foi adicionado a cada poço. Após 15 min, a reação foi parada pela adição de 30 µl da solução aquosa de ácido

sulfúrico 2M (H₂SO₄). A leitura da densidade óptica foi medida a 492 nm em um leitor de ELISA (Molecular Devices, EUA). O tri-hidrato de tartarato de potássio e antimônio foi utilizado como controle positivo, nas mesmas concentrações dos compostos testados. O IC₅₀ (concentração inibitória de 50% da multiplicação das amastigotas) foi calculado como se segue: primeiro, a influência do fundo placa e da ligação de anticorpos não específicos para amastigotas de *Leishmania* foram corrigidos, subtraindo o (densidade óptica) OD_{492nm} de macrófagos não infectados. Os resultados *in vitro* de atividade foram expressos como índice de inibição de crescimento em relação aos controles de macrófagos infectados com amastigotas e não-tratados, metodologia adaptada de (NILUBOL *et al.*, 2012). Como segue: INDEX = (OD_{492nm} poços experimentais/OD_{492nm} controles não tratados) x 100. Para determinar a atividade do composto, os dados de resposta de índice foram representados graficamente e modelados por uma curva de dose-resposta com base em quatro parâmetros ajuste logística (NILUBOL *et al.*, 2012). A concentração inibidora de 50% do crescimento do parasita (IC₅₀) foi determinada como a concentração do composto capaz de reduzir o INDEX em 50% (AULNER *et al.*, 2013; HANSEM e BROSS, 2010), utilizando o programa estatístico software Graph Pad Prism 5.0.

6.2.3. Ensaio de viabilidade metabólica

Com intuito de avaliar o citotoxicidade das substâncias que foram ativas sobre as formas amastigotas de *L. infantum*, foi realizado o teste de metabolismo celular MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolio). Esse método se baseia na dosagem da atividade metabólica de células viáveis utilizando o ensaio colorimétrico. O protocolo é adaptado a partir de métodos da literatura (MAIA *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2012; DIAS *et al.*, 2015; NILUBOL *et al.*, 2012; AULNER *et al.*, 2013; HANSEM e BROSS, 2010). Linhagens celulares de epitelial spleenlike (BGM), hepatócito humano do tipo (HepG2) e macrófagos de cão DH82 foram cultivadas em RPMI (Sigma) contendo 100 µg/mL de penicilina; 100 µg/mL de estreptomicina e 10% de soro fetal de bovino inativado. BGM, HepG2 foram plaqueadas a 1x 10⁴ células por poço e DH82 foram plaqueadas a 5 x10⁴ células por poço. Seis poços sem células foram utilizados como controles em branco. O ensaio de citotoxicidade de células BGM e HepG2 foram testados para todos os compostos que foram ativos. Em seguida, 100 µL das soluções dos compostos foram adicionados a cada poço e foram incubadas durante 48 h, a 37 °C em estufa contendo 5% de CO₂. Os compostos foram testados nas seguintes concentrações

0,1, 1, 10, 100 e 1000 μM . Após o período de incubação, 10 μL de MTT 5 mg mL^{-1} de solução foram adicionados a cada poço e incubado durante mais 4 h. Em seguida, o sobrenadante foi removido e Formazan, o produto metabólico de MTT, foi ressuspenso em 20 mL de DMSO. A intensidade colorimétrica foi medida por densidade óptica a 560 nm num leitor de ELISA (Molecular Devices, EUA). As células em branco e os poços não tratados foram usados como controlos negativos. Os valores de metade das doses letais (DL_{50}) foram calculados para cada composto.

6.2.4. Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão (DP) de quatro repetições. Estes dados foram analisados utilizando o software Graph Pad Prism 6.0. Valores de metade das concentrações máximas de parasitas inibidoras (IC_{50}) e macrófagos doses letais (DL_{50}) foram obtidos a partir de análise de regressão não linear das curvas de dose-resposta. O índice de seletividade foi calculado pela razão entre DL_{50} e IC_{50} para cada composto.

6.3. Resultados e Discussão

6.3.1. Derivados da Hederagenina

Na realização dos ensaios de atividade leishmanicida foram usados vinte e um ésteres derivados da hederagenina (**1-21**), nove amidas derivadas da hederagenina (**22-30**), trinta derivados triazólicos da hederagenina (**31-60**). Todos os compostos foram obtidos com um rendimento de 35-97% (Figura 6.3.1); A sínteses desses derivados estão descritas em detalhe nos capítulos 3 e 4.

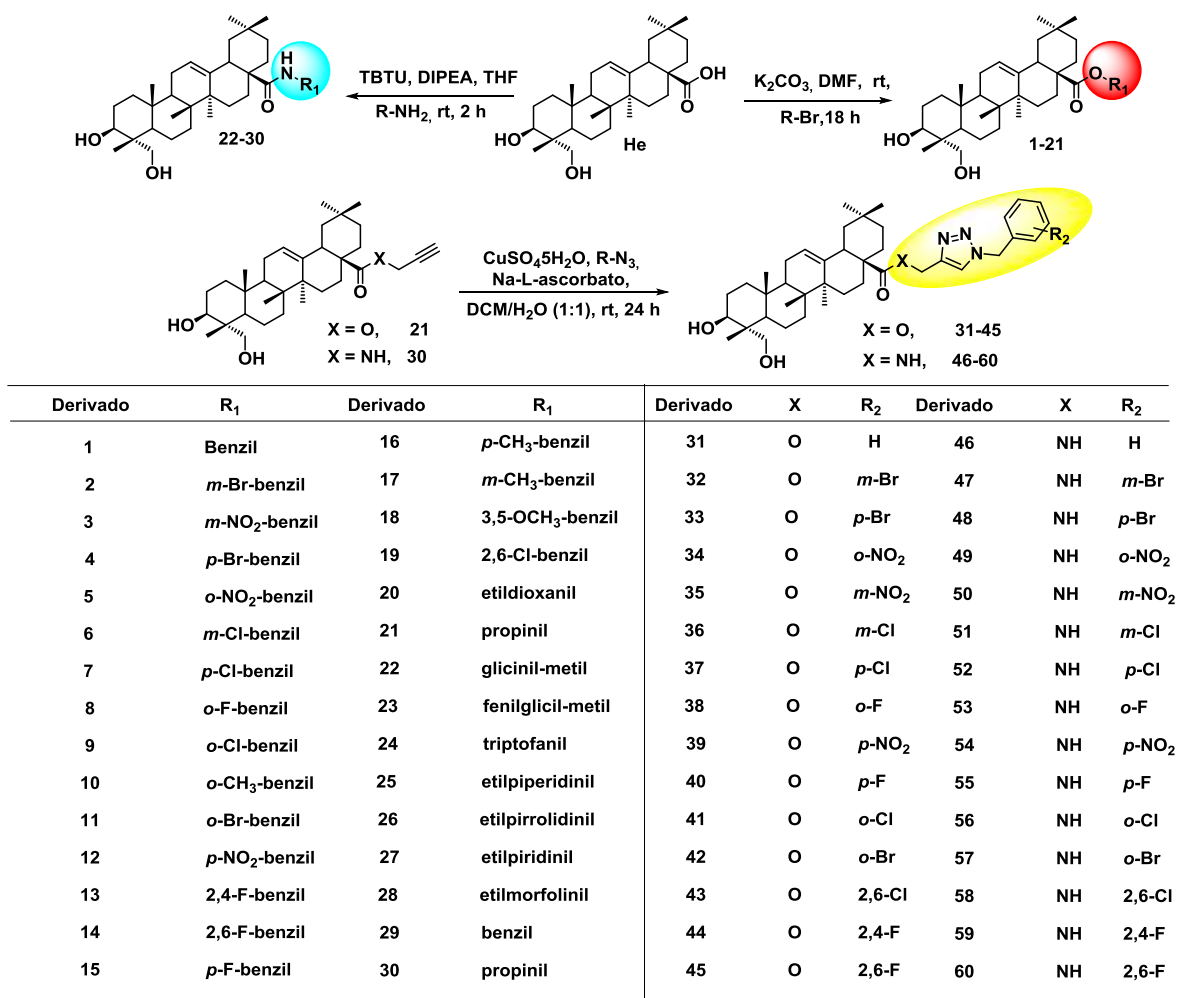


Figura 6.3.1 - Estruturas dos derivados da hederagenina (1-60).

6.3.2. Ensaios Biológicos

A atividade *in vitro* de hederagenina (He) e seus derivados (1-60) foi avaliada em formas amastigotas de *L. infantum* (BH46) macrófagos parasitados (DH82). Inicialmente, todos os compostos foram testados a 1000 µM a fim de selecionar aqueles com a atividade mais promissora e os resultados são resumidos na Tabela 6.3.1.

A partir desse ensaio e dos resultados obtidos foi verificado que a hederagenina e 11 derivados (3, 4, 18, 19, 20, 22, 32, 34, 44, 49 e 52) apresentaram redução de 50% na multiplicação de amastigotas de *L. infantum*. Estes 11 compostos foram então sujeitos ao mesmo teste em concentrações mais baixas de 0,1, 1,0, 10 e 100 µM. Junto com estes testes, a viabilidade metabólica de nove compostos e o controle positivo da droga foram testados

com as células da linhagens epitelial BGM e hepatócitos de baço humano HepG2, monitorando microscopicamente utilizando o ensaio colorimétrico sal de tetrazólio (MTT).

Tabela 6.3.1 - Porcentagem de inibição da atividade *in vitro* sobre *L. infantum*, de hederagenina (**He**) e os seus derivados (**1-60**) testado a uma concentração de 1000 µM.

Composto	Inibição (/)	Composto	Inibição (/)
He	55,5	31	23,5
1	30,2	32	70,5
2	20,0	33	27,7
3	60,5	34	51,0
4	64,5	35	26,3
5	71,7	36	51,3
6	23,0	27	35,0
7	53,0	38	48,3
8	26,0	39	17,0
9	15,8	40	33,3
10	39,0	41	0
11	40,0	42	34,6
12	28,0	43	44,5
13	16,0	44	87,7
14	25,2	45	34,0
15	57,0	46	11,0
16	44,0	47	33,3
17	66,0	48	27,0
18	89,0	49	93,0
19	53,0	50	25,4
20	56,3	51	31,1
21	19,0	52	85,4
22	79,5	53	31,0
23	60,0	54	14,0
24	50,0	55	10,2
25	0	56	0
26	0	57	4,2
27	31,5	58	41,7
28	7,0	59	41,8
29	8,2	60	45,0
30	15,0		

A hederagenina (**He**) e os onze derivados selecionados (**3, 4, 18, 19, 20, 22, 32, 34, 44, 49 e 52**) apresentaram bons resultados, evitando a proliferação de formas amastigotas intracelulares de *L. infantum* (BH46), apresentando IC₅₀ entre 2 e 307 µM (Tabela 6.3.2).

Tabela 6.3.2 - Atividade leishmanicida *in vitro* de hederagenina (**He**), seus derivados (**3**, **4**, **18**, **19**, **20**, **22**, **32**, **34**, **44**, **49** e **52**) e controle positivo, contra os amastigotas intracelulares de *L. infantum* parasita de macrófagos.

Compostos	IC ₅₀ ^a (μM)	Toxicidade DH82	IS ^c
		Macrófagos LD ₅₀ ^b (μM)	forma amastigota Intracelular
He	61,6 ± 0,25	<1000	10
3	9,7 ± 0,12	63,0 ± 0,17	6,4
4	12,0 ± 0,12	83,0 ± 0,21	6,9
18	110 ± 0,14	-	-
19	307 ± 0,12	202 ± 0,10	0,6
20	161 ± 0,15	555 ± 0,11	3,4
22	18,0 ± 0,13	32,5 ± 0,18	1,8
32	38,0 ± 0,08	21,0 ± 0,12	0,5
34	32,0 ± 0,13	212 ± 0,12	6,6
44	11,0 ± 0,09	66,0 ± 0,09	6,0
49	2,0 ± 0,16	45,0 ± 0,15	22,5
52	6,0 ± 0,06	16,0 ± 0,15	2,6
tri-hidrato de tartarato de potássio e antimonio	80,0 ± 0,13	8,0 ± 0,07	0,1

^a IC₅₀ = Dose referente a metade da concentração máxima do fármaco para inibir 50% da multiplicação das amastigotas.

^b LD₅₀ = Dose letal mínima que inibe 50% do metabolismo dos macrófagos (DH86).

^c IS (índice de seletividade) = correspondente à razão de entre o valor de LD₅₀ e IC₅₀.

Todos estes valores de IC₅₀ foram calculados a partir de quatro repetições. O registro de curvas de dose-resposta sigmoidal [substância] versus percentagem de inibição de formas amastigotas intracelulares de *L. infantum* foi inicialmente construído e calculados os IC₅₀, tal como ilustrado para alguns dos compostos avaliados (Figura. 6.3.2).

Entre estes, os compostos **18-20** foram menos ativos (com IC₅₀ > 110 μ M) em comparação com o a droga comercial à base de sal de antimônio (III) utilizado como um controle positivo (IC₅₀ = 80 μ M). Os derivados **3**, **4**, **22**, **32**, **34**, **44**, **49** e **52** foram mais ativos que o produto natural (**He**) em si, mostrando que modificações estruturais nesta pode resultar em melhorias na bioatividade. Os derivados selecionados podem ser divididos em duas classes principais que incluem ésteres e amidas. Cada uma destas classes foi dividido em dois grupos, tendo ou não uma unidade de triazol. Por conseguinte, entre os ésteres que não tem o grupo triazol, o mais ativo foram os derivados **3** que possui o grupo *m*-nitrobenzil com IC₅₀ = 9,7 μ M e o derivado **4** com o grupo *p*-bromobenzil com IC₅₀ = 12,0 μ M, respectivamente.

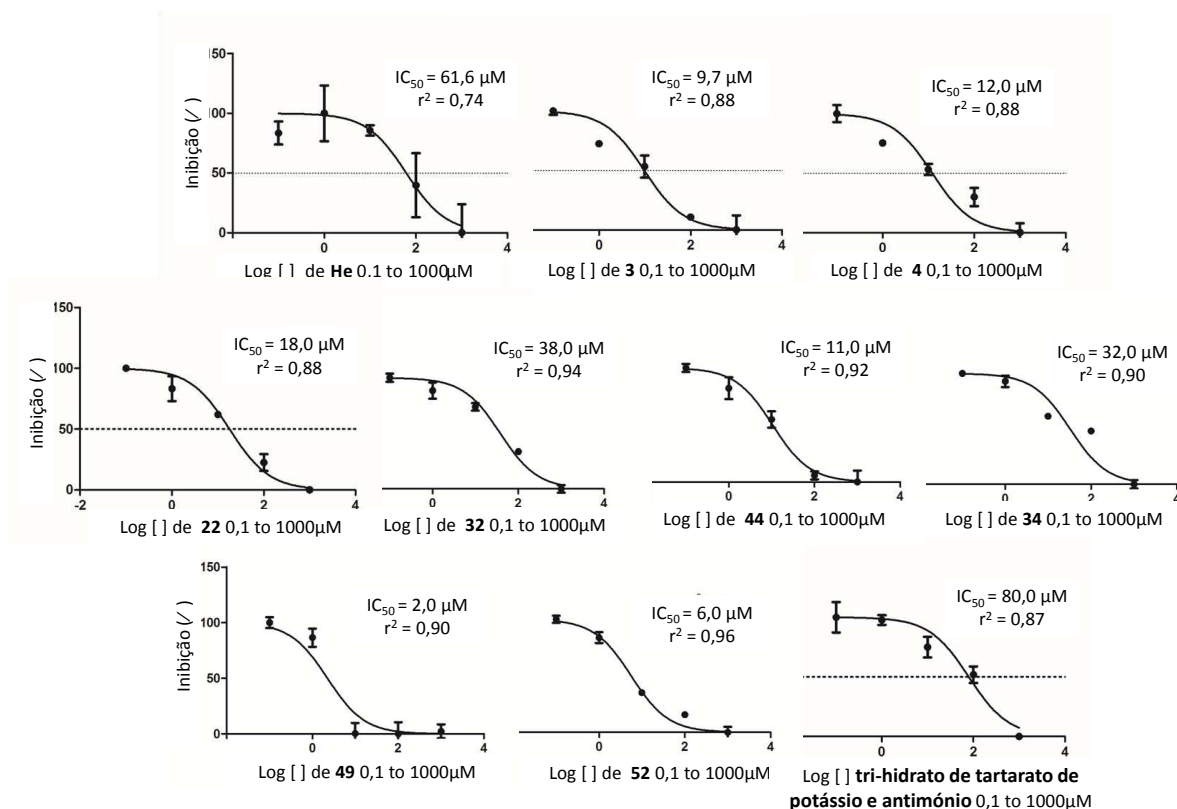


Figura 6.3.2 - Experiência representativa da atividade *in vitro* da hederagenina (**He**) e seus derivados (**3**, **4**, **22**, **32**, **44**, **34**, **49**, **52**). A curva de dose-resposta comparada com a inibição amastigota intracelular de *L. infantum* (BH46) foi realizada em quatro repetições.

O composto **22** foi o único derivado de amida ativo sem a unidade de triazol, com IC₅₀ = 18,0 μM. Entre os derivados de triazólicos, os ésteres **32** e **34** apresentaram IC₅₀ = 38 e 32 μM, enquanto que o derivado **44** com o grupo 2,4-difluorobenzil ligado ao anel triazólico foi quase quatro vezes mais ativo (IC₅₀ = 11,0 μM). Por outro lado, entre os derivados de triazol de amida, os compostos mais potentes foi o derivado com o grupo *o*-nitrobenzil **49** com IC₅₀ = 2,0 μM e o derivado **52** com o grupo *p*-clorobenzil ligado ao anel triazólico com IC₅₀ = 6,0 μM.

Tendo selecionado os compostos mais ativos, foram depois submetidas a um ensaio de MTT e os resultados da dose letal para macrófagos (DH82) são apresentados na Tabela 6.3.2. A partir destes dados, observou-se que a droga de referência o antimônio (III) apresentou índice de seletividade igual a 0,1, que confirma a sua alta toxicidade, como já foi descrito por (FRÉZARD *et al.*, 2009; HALDAR *et al.*, 2011) e que também a hederagenina (IS =

10) e todos os derivados apresentados têm maior Índice de seletividade variando de 0,5 a 22,5. De acordo com BADISA et al., 2009 e BÉZIVIN et al., 2003, um índice de seletividade ≥ 3 é necessário para o potencial candidato a fármaco. Como pode ser observado pelos resultados da Tabela 6.3.2, a hederagenina e os derivados **3**, **4**, **34**, **44** e **49** têm $IS > 3$, destacando ser potenciais para testes *in vivo*.

Na sequência deste estudo de seletividade, a hederagenina e oito derivados foram testadas para a citotoxicidade contra as duas estirpes do fígado (HepG2) e células do baço (BGM), a fim de avaliar os seus efeitos sobre diferentes partes dos organismos. Os resultados são mostrados na Tabela 6.3.3.

Tabela 6.3.3 - Dose mínima letal e índice seletividade para hederagenina (**He**), seus derivados (**3**, **4**, **22**, **32**, **34**, **44**, **49** e **52**) e controle positivo contra células BGM e HepG2.

Composto	Células do baço (BGM)	IS ^b	Estirpes do fígado (HepG2)	IS ^b
	LD ₅₀ ^a (μM)		LD ₅₀ ^a (μM)	
He	57 ± 0,33	0,9	<1000	16,2
3	314 ± 0,18	32	70 ± 0,86	5,2
4	116 ± 0,09	10	260 ± 0,13	21,6
22	20 ± 0,35	1	60,6 ± 0,13	3,5
32	78 ± 0,10	2,0	19 ± 0,11	0,5
34	15 ± 0,13	1,3	57 ± 0,99	5,1
44	158 ± 0,10	4,9	>1000	>31,2
49	111 ± 0,08	55,5	>1000	>500
52	50 ± 0,11	8,3	2,5 ± 0,09	0,4
tri-hidrato de tartarato de potássio e antimônio	131 ± 0,09	1,6	31 ± 0,07	0,3

^a LD₅₀ = Dose letal mínima que inibe 50% do metabolismo das células BGM e HepG2.

^b IS = IS (índice de seletividade) = correspondente à razão de entre o valor de LD₅₀ e valores de IC₅₀ apresentados na Tabela 6.3.2.

Como pode ser observado a partir dos dados da Tabela 6.3.3, o composto usado como a droga referência o antimônio (III) apresenta DL₅₀ de 131 μM e 31 μM contra as células do baço e do fígado, respectivamente, e o índice de seletividade foi de 1,6 e 0,31. Estes resultados confirmam mais uma vez que o medicamento utilizado como agente leishmanicida é altamente tóxico.

Considerando-se as células do baço, os derivados **3** e **44** apresentaram DL_{50} maior do que o valor correspondente para a droga de controle positivo, o antimônio (III). Apesar disso, a informação mais relevante considerando-se um candidato a fármaco é o índice de seletividade, e neste caso só a hederagenina e os derivados **22**, **32** e **34** apresentaram $IS < 2,0$. De acordo com este parâmetro os melhores compostos foram **3** ($IS = 32$) e **49** ($IS = 55,5$). Eles foram entre 20 e 34 vezes menos tóxico para as células do baço em comparação com o fármaco de referência ($IS = 0,3$).

Para as células de fígado, unicamente os derivados **32** e **52** apresentam DL_{50} mais baixa do que o controle de antimônio (III). No entanto, em termos de seletividade todos os compostos apresentam $IS > 0,3$, o valor encontrado para o controle positivo o antimônio (III). Com base nos dados apresentados na Tabela 6.3.3, os compostos **3**, **4**, **44** e **49** parecem ser os candidatos mais promissores para desenvolvimento adicional, uma vez que foram menos tóxicos para as duas linhagens celulares.

6.4. Conclusão

Foram utilizados sessenta derivados da hederagenina (**1-60**) para serem avaliados sobre leishmania nas formas amastigotas intracelulares de *L. infantum* (BH46) parasitados com macrófagos (DH82). Também foram realizados ensaios da viabilidade metabólica utilizando as células da linhagem BGM e HepG2, em comparação com uma droga como controle positivo (a droga tri-hidrato de tartarato de potássio e antimônio). Os resultados revelaram boa atividade leishmanicida para alguns derivados da hederagenina, além de ter boa seletividade e baixa toxicidade contra células BGM e HepG2. No entanto, a capacidade de inibir o crescimento de *Leishmania infantum* foi dos derivados hederagenina **3**, **4**, **44** e **49**. O seu bom índice de seletividade e baixa toxicidade indica que estes compostos podem servir como novos candidatos para o tratamento da leishmaniose.

6.5. Referências bibliográficas

ALVAR, J., VELEZ, I.D., BERN, C., HERRERO, M., DESJEUX, P., CANO, J., JANNIN, J., DEN BOER, M. The WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence, PLoS ONE. v. 7, p. e35671, 2012.

AULNER, N., DANCKAERT, A., ROUAULT-HARDOIN, E., DESRIVOT, J., HELYNCK, O., COMMERE, P.H., MUNIER-LEHMANN, H., SPÄTH, G.F., SHORTE, S.L., MILON, G., PRINA, E. High content analysis of primary macrophages hosting proliferating *Leishmania* amastigotes: application to anti-leishmanial drug discovery, PLoS Negl. Trop. Dis. v. 7, p. e2154, 2013.

BADISA, R.B., DARLING-REED, S.F., JOSEPH, P., COOPERWOOD, J.S., LATINWO, L.M., GOODMAN, C.B. Selective Cytotoxic Activities of Two Novel Synthetic Drugs on Human Breast Carcinoma MCF-7 Cells, Anticancer Research. v. 29, p. 2993-2996, 2009.

BÉZIVIN, C., TOMASI, S., LOHÉZIC-LE, F.D., BOUSTIE, J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines, Phytomedicine. v. 10, p. 499-503, 2003.

DEN BOER, M., ARGAW, D., JANNIN, J., ALVAR, J. Leishmaniasis impact and treatment access, Clin. Microbiol. Infect. v. 17, p. 1471-1477, 2011.

DIAS, L.C., DE LIMA, G.M., PINHEIRO, C.B., RODRIGUES, B.L., DONNICI, C.L., FUJIWARA, R.T., BARTHOLOMEU, D.C., FERREIRA, R.A., FERREIRA, S.R., MENDES, T.AO., DA SILVA, J.G., ALVES, M.R.A. Desing structural and spectroscopic elucidation of new nitro aromatic carbaoxylic acids and semicarbazones for the in vitro screening of anti-leishmanial activity, J. Mol. Struct. v. 1079, p. 298-306, 2015.

FERREIRA, R.A., OLIVEIRA, A.B., GUALBERTO, S.A., FUJIWARA, R.T., CORRAL, J.M.M., GUIMARÃES, P.H.G., VITOR, R.W.A. New naphthoquinones and an alkaloid with *in vitro* activity against *Toxoplasma gondii* RH and EGS strains, Exp. Parasitol. v. 132, p. 450-457, 2012.

GORSKI, S., WIERCIŃSKA-DRAPAŁOA. Visceral leishmaniasis as a threat for non-endemic countries, *Wiad Parazytol.* v. 55, p. 195-200, 2009.

GUTIÉRREZ, V., SEABRA, A.B., REGUERA, R.M., KHANDARE, J., CALDERÓN, M. New approaches from nanomedicine for treating leishmaniasis, *Chem. Soc. Rev.* v. 45, p. 152-168, 2016.

HAAVIKKO, R., NASEREDDIN, A., SACERDOTI-SIERRA, N., KOPELYANSKIY, D., ALAKURTTI, S., TIKKA, M., JAFFE, C.L., YLI-KAUHALUOMA, J. Heterocycle-fused lupine triterpenoids inhibit *Leishmania donovani* amastigotes, *Med. Chem. Commun.* v. 5, p. 445-451, 2014.

HANSEN, J., BROSS, P. A cellular viability assay to monitor drug toxicity, *Methods Mol. Biol.* v. 648, p. 303-311, 2010.

HUSSAIN, H., AL-HARRASI, A., AL-RAWAHI, A., GREEN, I.R., GIBBONS, S. Fruitful decade for antileishmanial compounds from 2002 to late 2011, *Chem. Rev.* v. 114, p.10369-10428, 2014.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol.* v. 22, p.439-445, 2006.

LOPES, M.S., PIETRA, R.C.C.S., BORGATI, T.F., ROMEIRO, C.F.D., JÚNIOR, P.A.S., ROMANHA, A.J., ALVES, R.J., SOUZA-FAGUNDES, E.M., FERNANDES, A.P.S.M., DE OLIVEIRA, R.B. Synthesis and evaluation of the anti parasitic activity of aromatic nitro compounds, *Eur. J. Med. Chem.* v. 46, p. 5443-5447, 2011.

MAIA, C., ROLÃO, N., NUNES, M., GONÇALVES, L., CAMPINO, L. Infectivity of five different types of macrophages by *Leishmania infantum*, *Acta Trop.* v. 103, p. 150-155, 2007.

MAJESTER-SAVORNIN, B., ELIAS, R., DIAZ-LANZA, A.M., BALANSARD, G., GASQUET, M., DELRNAS, F. Saponins of the Ivy Plant. *Hedera helix* and their Leishmanicidal Activity, *Planta med.* 57 (1991) 260-262.

MISHRA, B.B., TIWARI, V.K. Natural products: an evolving role in future drug discovery, *Eur. J. Med. Chem.* v. 46, p. 4769-4087, 2011.

NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M. Natural products as source of new drugs from 1981 to 2014, *J. Nat. Prod.* v. 79, p. 629-661, 2016.

NILUBOL, N., ZHANG, L., SHEN, M., ZHANG, Y.Q., HE, M., AUSTIN, C.P., KEBEBEW, E. Four clinically utilized drugs were identified and validated for treatment of adrenocortical cancer using quantitative high-throughput screening, *J. Transl. Med.* v. 10, p. 198, 2012.

SINGH, N., MISHRA, B.B., BAJPAI, S., SINGH, R.K., TIWARI, V.K. Natural product based leads to fight against leishmaniasis, *Bioorg. Med. Chem.* v. 22, p. 18-45, 2014.

SOLANO-GALLEGO, L., MIRÓ, G., KOUTINAS, A., CARDOSO, L., PENNISI, M.G., FERRERO, L., BOURDEAU, P., OLIVA, G., BANETH, G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis, *Parasite Vector.* v. 4, p. 1-16, 2011.

SOUSA MELO, T., ROCHA GATTASS, C., COSTA SOARES, D., RODRIGUES CUNHA, M., FERREIRA, C., TEMOTHEO TAVARES, M., SARAIVA, E., PARISE-FILHO, R., BRADEN, H., DELORENZI, J.C. Oleanolic acid (OA) as antileishmanial agent: Biological evaluation and in silico mechanistic insights, *Parasitology Internacional* v. 65, p. 227-237, 2016.

SOUSA, M.C., VARANDAS, R., SANTOS, R.C., SANTOS-ROSA, M., ALVES, V., SALVADOR, J.A.R. Antileishmanial Activity of Semisynthetic Lupane Triterpenoids Betulin and Betulinic Acid Derivatives: Synergistic Effects with Miltefosine, *PLoS ONE.* v. 9, p. e89939, 2014.

WHO Control of the leishmaniasis. World Health Organization technical report series, v. 949: xii–xiii, p. 1-186, 2010.

WHO Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases, Third WHO report on neglected tropical diseases p. 1-190, 2015.

WHO. Leishmaniasis control programme: World: Endemicity of visceral leishmaniasis. Annual Country Reports. 2014.

7. Conclusão Geral

7.1 Capítulo 1

O estudo da fração hexânica das sementes de *S. saponaria* L., permitiu verificar a presença de triacilglicerídeos (**TAG**) com composição de 90/ do óleo. Além disso, foi reportado pela primeira vez, nesta planta, metabólitos secundários do tipo Cianolípídeo (**CL**), especificamente do tipo III denominado **diéster de 1-ciano-2-hidroximetilprop-1-en-3-ol** com o 5/ da composição do óleo. Desta maneira, confirma-se a quimiotaxonomia que apresenta a família Sapindaceae, onde em seus parentes apresentam metabólitos secundários do tipo cianolípídeo especificamente em suas sementes.

Os resultados deste capítulo permitiu a publicação de um artigo em maio de 2016 no *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* (BLACPMA) para serem publicado no volume de novembro 15(6). Além disso, foi apresentado um resumo em forma de painel na “39ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química” 2016, Goiânia - Brasil.

7.2 Capítulo 2

Por meio de análises de CG-EM foi identificado, a partir do extrato etanólico hidrolizado o eridotriol e as sapogeninas hederagenina e o ácido oleanólico.

Do extrato hidrolizado foram isolados as agliconas hederagenina (**3a**), ácido oleanólico (**3b**) e o glicosídeo 1-metoxi-5-metiltetrahidro-1*H*-piran-2,3,4-triol (**3c**). Esse último composto está sendo reportado pela primeira vez nesta espécie de planta. Por outro lado, o extrato hidrolizado apresentou óleos essenciais com aroma agradável, que ainda não foram identificados, embora a partir da quimiotaxonomia desta planta, os compostos presentes nessas frações poderiam ser sesquiterpenos e triterpenos ligados a ácidos graxos.

Os resultados deste capítulo foram apresentado num painel na “37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química” 2014, Natal - Brasil.

7.3 Capítulo 3

A hederagenina foi a aglicona mais abundante no pericarpo da *S. saponaria*. Este triterpeno pentacíclico foi derivatizado na posição-28 formando um total de 23 ésteres com rendimentos na faixa 40-80%. Também, usando reagentes de acoplamento, foram obtidos 1 éster e 9 amidas derivadas da hederagenina, com rendimentos na faixa 50-80%.

Para todos os derivados (**4a-x** e **5a-e**) foram testada sua atividade anti-tumoral contra seis linhagens celulares de câncer humano, incluindo 518A2 (células de melanoma), A2780 (carcinoma de ovário), HT29 (adenocarcinoma do cólon), MCF7 (adenocarcinoma de mama), A549 (câncer do pulmão), 8505c (carcinoma da tireóide) utilizando o ensaio sulforrodamina-B (SRB). Todos os análogos exibiram melhor citotoxicidade contra as linhagens celulares tumorais testadas comparados com a hederagenina.

As amidas com substituintes etilpiperidinil (**5f**) e etilpirrolidinil (**5c**) foram os derivados mais promissores apresentando valores de EC₅₀ variando entre 1,1-6,5 µM. Para ter uma idéia de seu modo de ação, foi realizado um experimento adicional AO/PI com células de A2780 (carcinoma de ovário), usando microscopia de fluorescência onde revelou que o composto **5c** atua, principalmente, por apoptose.

Os resultados deste capítulo permitiu a publicação de um artigo em 2015 na *European Journal of Medicinal Chemistry* Vol.: 105, pg 57-62. Além disso, foi apresentado um resumo em forma de painel no “5th Brazilian Conference on Natural Products - BCNP and XXXI Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology - RESEM” (5th BCNP) 2015, Atibaia - Brasil.

7.4 Capítulo 4

Continuando com a derivatização da hederagenina na posição 28, uma série de 16 novos triazoles com grupo éster (**6a-o**) e 16 com grupo amida (**7a-o**) da hederagenina foram sintetizados por meio da reação “click” partindo dos alcinos terminal derivados da hederagenina (**4x** e **5e**) com diversas azidas benzílicas (**a-o**) com rendimentos na faixa 60-90%.

Os resultados anti-tumoral revelaram que, em comparação com a hederagenina, a maioria dos análogos exibiu maior citotoxicidade contra todas as linhagens celulares de câncer testadas, destacando que os derivados de éster eram mais citotóxicos do que as amidas. Além disso, os ésteres de **6c**, **6g** e **6n** foram os derivados mais ativos contra todas as linhagens celulares testadas, mostrando valores EC_{50} na gama de 3,0-4,1 μ M.

Por outro lado, os derivados **6a** e **6j** foram os mais citotóxicos contra a linhagem de células de câncer do cólon (HT29) com EC_{50} = 2,8 μ M e 1,6 μ M, respectivamente. Além disso, os compostos **6a** e **6j** mostraram alguma seletividade para a linhagem celular de câncer HT29, sendo menos tóxico para o fibroblasto não-malignas de ratos NIH 3T3 com índice de seletividade IS = 4,2 para **6a** e IS = 5,4 para **6j**.

O modo de ação dos compostos mais ativos foi avaliado por meio de um ensaio de exclusão de corante acridina AO/PI, empregando células MCF7 (adenocarcinoma de mama). Por esse teste foi verificado que os compostos **6g** e **6j**, atuam, principalmente, por um mecanismo de morte celular programada.

Os resultados deste capítulo permitiu a publicação de um artigo em 2016 na *European Journal of Medicinal Chemistry* Vol.: 115, pg 257-267. Também, foi apresentado como painel no "16th Brazilian Meeting on Organic Synthesis" (16th BMOS) 2015, Búzios - Brasil.

7.5 Capítulo 5

Nos capítulos 3 e 4 mostramos que a presença de grupos volumosos ligados na carbonila-28 da hederagenina modula a actividade anti-tumoral. Considerando que nenhuma investigação detalhada sobre os efeitos de derivados de hederagenina sobre formas amastigota de leishmania está disponível, 60 derivados de hederagenina relatados nos capítulos 3 e 4, foram avaliado seu efeito *in vitro* sobre a proliferação intracelular de formas amastigotas de *Leishmania infantum*.

Alguns derivados (**3**, **4**, **44**, **49** e **52**), mostrarem actividade a nível micromolar e baixa toxicidade contra as duas estirpes do fígado (HepG2) e células do baço (BGM). Além disso, a capacidade dos derivados hederagenina **3** (IC_{50} = 9,7 μ M), **4** (12 μ M), **44** (11 μ M) e **49** (2 μ M),

para impedir a proliferação intracelulares de formas amastigotas de *L. infantum* e o seu maior índice de selectividade e baixa toxicidade em relação ao controle positivo droga comercial de escolha (tri-hidrato de tartarato de potássio e antimônio) ($IC_{50} = 80.0 \pm 0,13 \mu M$, IS = 0.1), fazem estes compostos promissores candidatos para o tratamento da leishmaniose.

Os resultados deste capítulo permitiu a publicação de um artigo em 2016 na *European Journal of Medicinal Chemistry* Vol.: 124, pg 153-159. Também, foi obtida uma patente com os compostos mais ativos, depósito # BR1020160193370 (INPI).