



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**SÍNTESE DE DERIVADOS DO ESTIGMASTEROL  
E DO ÁCIDO URSÓLICO E AVALIAÇÃO  
DE SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Nalin de Seixas Borges**

**SANTA MARIA, RS, BRASIL**

**2014**

# **SÍNTESE DE DERIVADOS DO ESTIGMASTEROL E DO ÁCIDO URSÓLICO E AVALIAÇÃO DE SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

Por

**Nalin de Seixas Borges**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química,  
área de concentração Química Orgânica, da Universidade Federal de  
Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para a obtenção do grau  
de **Mestre em Química**.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ionara Irion Dalcol**

Santa Maria, RS – Brasil

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Química**

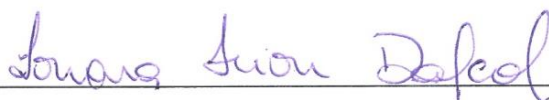
A comissão examinadora, abaixo assinada,  
aprova a dissertação de Mestrado

**Síntese de derivados do estigmasterol e do ácido ursólico e avaliação de  
suas atividades biológicas**

Elaborada por  
**Nalin de Seixas Borges**

Como requisito parcial para obtenção do grau de MESTRE em QUÍMICA

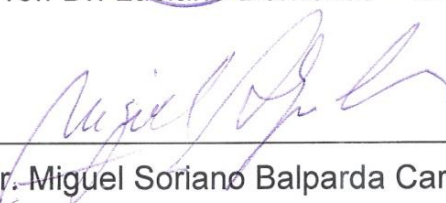
Comissão examinadora:



Prof.ª. Dr.ª. Ionara Irion Dalcol – UFSM



Prof. Dr. Luciano Dornelles – UFSM



Prof. Dr. Miguel Soriano Balparda Caro – UFSC

Santa Maria – RS, Fevereiro de 2014

*“Se enxerguei mais longe, foi porque estava sobre os ombros de gigantes.”*

*- Isaac Newton –*

*À minha mãe Anna Consuelo por tudo... pelo carinho, apoio, dedicação, ajuda e amor incondicional. Obrigada por acreditar e confiar sempre em mim... A ti meu mais profundo reconhecimento e admiração.*

*À minha avó Anna Alice por jamais duvidar da minha capacidade e fazer de tudo ao seu alcance para me ajudar sempre. Meus agradecimentos pelos ensinamentos de vida transmitidos, pelo carinho, apoio e confiança.*

*À minha família, meu muito obrigada... Sou resultado da força e da confiança de cada um de vocês.*

*“O amor é a asa veloz que Deus deu à alma para  
que ela voe até o céu”*

*- Michelangelo Buonarroti -*

*Ao Bruno Brisólla Ravello, meu namorado, meu amigo, meu  
colega, meu amor... meu eterno agradecimento por estar sempre  
ao meu lado e por nunca medir esforços para me ajudar .  
Palavras jamais serão suficientes para expressar minha gratidão  
por tudo. Essa conquista, com toda a certeza também é tua.*

*À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Ionara Irion Dalcol, meus sinceros agradecimentos pela orientação e confiança depositada desde a Iniciação Científica. Muito obrigada pelo apoio incondicional que, sem dúvida, muito estimularam o meu desejo de aprender e a minha vontade constante de querer fazer sempre melhor. Obrigada, acima de tudo, pelo carinho e pela grande amizade.*

*À todas as pessoas que conheci e convivi no Lab. 2014, meus sinceros agradecimentos, principalmente às minhas amigas Vanessa B., Alessandra P., Maura Z., Janaína A., Alessandra R., Daniele M. e Luciana A., que sem dúvida foram indispensáveis no meu dia-a-dia, no meu conhecimento e na realização deste trabalho. Certamente ficará para sempre no meu coração as boas lembranças, os lanchinhos, as músicas, as idas ao “almox”, os risos... Certamente ficará a saudade.*

## AGRADECIMENTOS

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Ionara Irion Dalcol pela oportunidade, amizade, orientação e incentivo na busca do conhecimento.

Aos Professores. Dr. Ademir Farias Morel e Dr. Luciano Dornelles pela disponibilidade e colaboração no exame de qualificação.

Aos Professores Dr. Luciano Dornelles e Dr. Miguel Soriano Balparda Caro por aceitarem ser banca na defesa de dissertação de mestrado e pelas colaborações realizadas.

À aluna de iniciação científica Vanessa Bender, por toda a ajuda na realização deste trabalho e, principalmente, pela confiança, carinho e amizade sempre demonstrados.

Aos colegas e amigos dos laboratórios 2123 e 2123B, Marcelo, Vini, Lu, Alexandre, Tanise, Janice, Pati, Gabriele, Liziane, Adriana, Mateus e Eveline, pela ajuda e convivência durante todos estes anos.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Ivana B. M. da Cruz, e seus orientandos Clarice e Francine, do Laboratório de Biogenômica-UFSM, pela realização da atividade antitumoral.

Ao colega Alexandre pela realização das atividades antimicrobianas e aos colegas Marcelo e Vini pelos RMNs e pela ajuda para encontrar os reagentes.

À colega Denise pelas conversas e risadas.

Às minhas amigas Bruna Kuhn, Géssica Silveira e Débora Steinhorst pelas risadas, apoio e companheirismo.

Aos colegas dos laboratórios vizinhos, principalmente o pessoal do LabSelen-Nanobio, pelo convívio e pelos reagentes emprestados.

À Coordenação de Pós-Graduação em Química pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.



*“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade e a energia atômica: a vontade.”*

*- Albert Einstein -*

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Química  
Universidade Federal de Santa Maria

### **Síntese de derivados do estigmasterol e do ácido ursólico e avaliação de suas atividades biológicas**

AUTORA: NALIN DE SEIXAS BORGES

ORIENTADORA: IONARA IRION DALCOL

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 28 de fevereiro de 2014

O presente trabalho descreve a síntese de vinte e dois novos derivados (**4 - 25**) do estigmasterol (**1**) e sete novos derivados (**26 - 32**) do ácido ursólico (**2**) através de reações de esterificação e de acoplamento com diferentes aminoácidos. Todas as estruturas dos compostos foram confirmadas por RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C. Os derivados foram testados quanto à sua atividade antimicrobiana, atividade antitumoral frente à célula cancerígena HT-29 (colorretal) e de inibição das enzimas POP, AChE e BChE. Na atividade antimicrobiana, dentre os compostos testados, o ácido ursólico (**1**) demonstrou o maior potencial de inibição. Os resultados obtidos nos ensaios de inibição enzimática foram satisfatórios, geralmente ocorrendo um aumento da atividade dos compostos de partida **1** e **2** após a introdução dos aminoácidos. Dentre os derivados avaliados, o ácido ursólico-prolina-prolina-OH (**32**) apresentou a maior capacidade inibitória das enzimas AChE e BChE, podendo ser considerado um inibidor colinesterásico dual, o que pode proporcionar maior eficácia no tratamento da doença de Alzheimer. Na avaliação do efeito antitumoral, após as primeiras 24 h, a maioria dos derivados do ácido ursólico demonstrou efeito de inibição da viabilidade celular entre 33,7 e 70 %. Após 72 h, o derivado **32** foi o que apresentou melhor desempenho, pois não aumentou o número de células viáveis em nenhuma concentração testada, o que indica que este composto pode ser um candidato a fármaco antitumoral.

**Palavras chave:** Estigmasterol, ácido ursólico, atividades biológicas.

## ABSTRACT

Master Dissertation  
Graduate Program in Chemistry  
Universidade Federal de Santa Maria

### **Synthesis of derivatives of stigmasterol and ursolic acid and evaluation of their biological activities**

AUTHOR: NALIN DE SEIXAS BORGES

ADVISOR: IONARA IRION DALCOL

Date and Place of Defense: Santa Maria, February 28<sup>th</sup>, 2014

The present work describes the synthesis of twenty-two new derivatives (**4-25**) from stigmasterol (**1**) and seven new derivatives (**26-32**) from ursolic acid (**2**) via esterification and coupling reactions with different amino acids. All the structures of the compounds were confirmed by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR. The derivatives were tested for their antimicrobial activity, antitumor activity against cancer cells HT -29 (colorectal) and inhibition of POP, AChE and BChE enzymes. In antimicrobial activity among the compounds tested, ursolic acid (**1**) showed the greatest potential for inhibition. The results obtained from enzyme inhibition tests were satisfactory, generally the activities of the starting compounds **1** and **2** were increased after the introduction of the amino acids. Among the derivatives evaluated, ursolic-proline-proline-OH acid (**32**) showed the highest inhibitory capacity of AChE and BChE enzymes and may be considered a dual cholinesterase inhibitor, which can provide greater efficacy in the treatment of Alzheimer's disease. In the evaluation of the antitumor effect, after the first 24 h, most of ursolic acid derivatives showed inhibition effect in cell viability between 33.7 and 70%. After 72 h, the derivative **32** showed the best performance because it did not increase the number of viable cells at any concentration tested, indicating that this compound may be a candidate for antitumor drug.

**Key words:** Stigmasterol, ursolic acid, biological activity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estruturas do estigmasterol (1) e do ácido ursólico (2).....	3
<b>Figura 2:</b> Estrutura básica dos esteróis com a numeração proposta pela IUPAC em 1989 e estrutura do estigmasterol numerado (1).....	8
<b>Figura 3:</b> Derivados esteróis 35 – 40.....	10
<b>Figura 4:</b> Derivados esteróis 41 – 55.....	11
<b>Figura 5:</b> Derivados esteróis 56 – 63.....	11
<b>Figura 6:</b> Estruturas do ácido ursólico (2) e do ácido oleanóico (70).....	13
<b>Figura 7:</b> Derivados 71 – 79 do ácido ursólico (2).....	15
<b>Figura 8:</b> Estrutura tridimensional da prolil oligopeptidase com o inibidor Z-Pro-Prolinal (141), adaptado de Horsman <i>et al.</i> (2007).....	26
<b>Figura 9:</b> Inibidores 141 – 153 da prolil oligopeptidase (POP).....	27
<b>Figura 10:</b> (a) Estrutura tridimensional da acetilcolinesterase (AChE), (b) Estrutura tridimensional da butirilcolinesterase (BChE), retirado do banco de dados de proteínas PDB (Protein Data Bank).....	29
<b>Figura 11:</b> Inibidores 154 – 158 da AChE e BChE.....	31
<b>Figura 12:</b> Estágios do desenvolvimento de uma carcinogênese, adaptado de INCA.....	36
<b>Figura 13:</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H do estigmasterol (1) em CDCl <sub>3</sub> .....	91
<b>Figura 14:</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C do estigmasterol (1) em CDCl <sub>3</sub> .....	92
<b>Figura 15:</b> Espectro de DEPT 135 do estigmasterol (1) em CDCl <sub>3</sub> .....	93
<b>Figura 16:</b> Espectro de COSY do estigmasterol (1) em CDCl <sub>3</sub> .....	94
<b>Figura 17:</b> Espectro de HSQC do estigmasterol (1) em CDCl <sub>3</sub> .....	94
<b>Figura 18:</b> Espectro de HSQC expandindo do estigmasterol (1) em CDCl <sub>3</sub> .....	95
<b>Figura 19:</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H do acetil estigmasterol (4) em CDCl <sub>3</sub> .....	96
<b>Figura 20:</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C do acetil estigmasterol (4) em CDCl <sub>3</sub> .....	97
<b>Figura 21:</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H do benzoil estigmasterol (5) em CDCl <sub>3</sub> .....	98
<b>Figura 22:</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C do benzoil estigmasterol (5) em CDCl <sub>3</sub> .....	99
<b>Figura 23:</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H do Boc-L-prolina-estigmasterol (6) em CDCl <sub>3</sub> .....	100

<b>Figura 24:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do Boc- <i>L</i> -prolina-estigmasterol ( <b>6</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	101
<b>Figura 25:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do Fmoc- <i>L</i> -prolina-estigmasterol ( <b>7</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	102
<b>Figura 26:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do Fmoc- <i>L</i> -prolina-estigmasterol ( <b>7</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	103
<b>Figura 27:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do H-prolina-estigmasterol ( <b>8</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	104
<b>Figura 28:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do H-prolina-estigmasterol ( <b>8</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	105
<b>Figura 29:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do Boc-prolina-prolina-estigmasterol ( <b>9</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	106
<b>Figura 30:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do Boc-prolina-prolina-estigmasterol ( <b>9</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	107
<b>Figura 31:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do H-prolina-prolina-estigmasterol ( <b>10</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ ).....	108
<b>Figura 32:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do H-prolina-prolina-estigmasterol ( <b>10</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ ).....	109
<b>Figura 33:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do estigmasterol-prolina-OMe ( <b>11</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	110
<b>Figura 34:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do estigmasterol-prolina-OMe ( <b>11</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	111
<b>Figura 35:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do estigmasterol-prolina-CN ( <b>12</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	112
<b>Figura 36:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do estigmasterol-prolina-CN ( <b>12</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	113
<b>Figura 37:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do estigmasterol-prolina-prolina-OMe ( <b>13</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	114
<b>Figura 38:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do estigmasterol-prolina-prolina-OMe ( <b>13</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	115
<b>Figura 39:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do N-Boc-4-N-Fmoc-amino- <i>L</i> -prolina-estigmasterol ( <b>14</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	117
<b>Figura 40:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do N-Boc-4-N-Fmoc-amino- <i>L</i> -prolina-estigmasterol ( <b>14</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	117

<b>Figura 41:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do N-4-N-Fmoc-amino- <i>L</i> -prolina-estigmasterol ( <b>15</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	119
<b>Figura 42:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do N-4-N-Fmoc-amino- <i>L</i> -prolina-estigmasterol ( <b>15</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	120
<b>Figura 43:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do N-Boc-4-N-amino- <i>L</i> -prolina-estigmasterol ( <b>16</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	122
<b>Figura 44:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do N-Boc-4-N-amino- <i>L</i> -prolina-estigmasterol ( <b>16</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	122
<b>Figura 45:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do N-4-N-amino- <i>L</i> -prolina-estigmasterol ( <b>17</b> ) em piridina deuterada.....	124
<b>Figura 46:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do N-4-N-amino- <i>L</i> -prolina-estigmasterol ( <b>17</b> ) em piridina deuterada.....	124
<b>Figura 47:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do Fmoc- <i>L</i> -alanina-estigmasterol ( <b>18</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	126
<b>Figura 48:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do Fmoc- <i>L</i> -alanina-estigmasterol ( <b>18</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	126
<b>Figura 49:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do H- <i>L</i> -alanina-estigmasterol ( <b>19</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	128
<b>Figura 50:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do H- <i>L</i> -alanina-estigmasterol ( <b>19</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	128
<b>Figura 51:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do Fmoc- <i>L</i> -glicina-estigmasterol ( <b>20</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	130
<b>Figura 52:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do Fmoc- <i>L</i> -glicina-estigmasterol ( <b>20</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	130
<b>Figura 53:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do H- <i>L</i> -glicina-estigmasterol ( <b>21</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	132
<b>Figura 54:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do H- <i>L</i> -glicina-estigmasterol ( <b>21</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	132
<b>Figura 55:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do Fmoc- <i>L</i> -cisteína(tBu)-estigmasterol ( <b>22</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	134
<b>Figura 56:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do Fmoc- <i>L</i> -cisteína(tBu)-estigmasterol ( <b>22</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	134

<b>Figura 57:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do H-L-cisteína(tBu)-estigmasterol ( <b>23</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	136
<b>Figura 58:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do H-L-cisteína(tBu)-estigmasterol ( <b>23</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	136
<b>Figura 59:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do Boc-L-glutâmico(OBz)-estigmasterol ( <b>24</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	138
<b>Figura 60:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do Boc-L-glutâmico(OBz)-estigmasterol ( <b>24</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	138
<b>Figura 61:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do H-L-glutâmico(OBz)-estigmasterol ( <b>25</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	140
<b>Figura 62:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do H-L-glutâmico(OBz)-estigmasterol ( <b>25</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	140
<b>Figura 63:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do ácido ursólico ( <b>2</b> ) em DMSO.....	148
<b>Figura 64:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do ácido ursólico ( <b>2</b> ) em DMSO.....	149
<b>Figura 65:</b> (a) Espectro de COSY do ácido ursólico ( <b>2</b> ) em DMSO (b) Espectro de HSQC do ácido ursólico ( <b>2</b> ) em DMSO.....	150
<b>Figura 66:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do ácido acetil ursólico ( <b>26</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	152
<b>Figura 67:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do ácido acetil ursólico ( <b>26</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	152
<b>Figura 68:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do acetil ursólico-prolina-OMe ( <b>27</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	154
<b>Figura 69:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do acetil ursólico-prolina-OMe ( <b>27</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	154
<b>Figura 70:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do acetil ursólico-prolina-CN ( <b>28</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	156
<b>Figura 71:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do acetil ursólico-prolina-CN ( <b>28</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	156
<b>Figura 72:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do acetil ursólico-prolina-prolina-OMe ( <b>29</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	158
<b>Figura 73:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do acetil ursólico-prolina-prolina-OMe ( <b>29</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	158
<b>Figura 74:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do ácido ursólico-prolina-OH ( <b>30</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	160

<b>Figura 75:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do ácido ursólico-prolina-OH ( <b>30</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	160
<b>Figura 76:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do ácido ursólico-prolina-CN ( <b>31</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	162
<b>Figura 77:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do ácido ursólico-prolina-CN ( <b>31</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	162
<b>Figura 78:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do ácido ursólico-prolina-prolina-OH ( <b>32</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	164
<b>Figura 79:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do ácido ursólico-prolina-prolina-OH ( <b>32</b> ) em $\text{CDCl}_3$ .....	164
<b>Figura 80:</b> Substrato ZGP-AMC e esquema da hidrólise da ligação entre prolina e 7-amino-4-metilcumarina.....	170
<b>Figura 81:</b> Percentual de inibição frente à enzima POP dos derivados do estigmasterol na concentração de 200 $\mu\text{M}$ .....	170
<b>Figura 82:</b> Percentual de inibição frente à enzima POP dos derivados do ácido ursólico na concentração de 200 $\mu\text{M}$ .....	171
<b>Figura 83:</b> Estrutura da Terminalina A ( <b>159</b> ).....	173
<b>Figura 84:</b> Percentual de inibição frente à enzima AChE dos derivados do estigmasterol na concentração de 200 $\mu\text{M}$ .....	174
<b>Figura 85:</b> Percentual de inibição frente à enzima AChE dos derivados do ácido ursólico na concentração de 200 $\mu\text{M}$ .....	175
<b>Figura 86:</b> Percentual de inibição frente à enzima BChE dos derivados do estigmasterol na concentração de 200 $\mu\text{M}$ .....	177
<b>Figura 87:</b> Percentual de inibição frente à enzima BChE dos derivados do ácido ursólico na concentração de 200 $\mu\text{M}$ .....	178
<b>Figura 88:</b> Estruturas dos compostos <b>160</b> – <b>165</b> .....	179
<b>Figura 89:</b> Estrutura do ácido maslínico ( <b>166</b> ).....	181
<b>Figura 90:</b> Efeito antitumoral do ácido ursólico ( <b>2</b> ) na viabilidade e na taxa de proliferação celular da linhagem de câncer colorretal HT-29.....	183
<b>Figura 91:</b> Efeito antitumoral do ácido acetil ursólico ( <b>26</b> ) e acetil ursólico-prolina-CN ( <b>28</b> ) na viabilidade e na taxa de proliferação celular da linhagem de câncer colorretal HT-29.....	184



- Figura 92:** Efeito antitumoral do ácido ursólico-prolina-OH (**30**) e ácido ursólico-prolina-CN (**31**) na viabilidade e na taxa de proliferação celular da linhagem de câncer colorretal HT-29..... 185
- Figura 93:** Efeito antitumoral do ácido ursólico-prolina-prolina-OH (**32**) na viabilidade e na taxa de proliferação celular da linhagem de câncer colorretal HT-29..... 186

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Micro-organismos indicadores.....	80
<b>Tabela 2:</b> Atividade antimicrobiana de alguns derivados do estigmasterol e ácido ursólico - <b>CIM (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b> .....	167
<b>Tabela 3:</b> Atividade antifúngica de alguns derivados do estigmasterol e ácido ursólico - <b>CIM (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b> .....	168
<b>Tabela 4:</b> Atividade inibitória dos compostos com maior porcentagem de inibição frente à POP, na concentração de 200 $\mu\text{M}$ , e os seus respectivos $\text{IC}_{50}$ .....	172
<b>Tabela 5:</b> Atividade inibitória dos compostos com maior porcentagem de inibição frente à AChE, na concentração de 200 $\mu\text{M}$ , e os seus respectivos $\text{IC}_{50}$ .....	176
<b>Tabela 6:</b> Atividade inibitória do composto com maior porcentagem de inibição frente à BChE, na concentração de 200 $\mu\text{M}$ , e o seu respectivo $\text{IC}_{50}$ .....	178

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1:</b> Síntese dos derivados (4 - 10 e 14 - 25) do estigmasterol (1).....	5
<b>Esquema 2:</b> Síntese dos derivados (11 - 13) do estigmasterol (1) a partir do cloroformato de estigmasterila (3).....	6
<b>Esquema 3:</b> Síntese dos derivados (26 - 32) do ácido ursólico (2).....	6
<b>Esquema 4:</b> Síntese da esqualamina 24R (33) e 24S (34) a partir do 1.....	9
<b>Esquema 5:</b> Síntese dos derivados 64-66 do estigmasterol (1).....	12
<b>Esquema 6:</b> Síntese das Poliaminas 67-69 conjugadas ao estigmasterol (1)..	12
<b>Esquema 7:</b> Síntese dos derivados 80 - 83 do ácido ursólico (2).....	16
<b>Esquema 8:</b> Síntese dos derivados 84 – 87 do ácido ursólico (2).....	16
<b>Esquema 9:</b> Síntese dos derivados 88-95 do ácido ursólico (2).....	17
<b>Esquema 10:</b> Síntese de derivados 96-101 do ácido ursólico (2).....	18
<b>Esquema 11:</b> Síntese de derivados 102 - 103 do ácido ursólico (2).....	19
<b>Esquema 12:</b> Síntese dos derivados 104-109 do ácido ursólico (2).....	19
<b>Esquema 13:</b> Síntese dos derivados 110-126 do ácido ursólico (2).....	20
<b>Esquema 14:</b> Síntese dos derivados 127-136 do ácido ursólico (2).....	21
<b>Esquema 15:</b> Síntese dos derivados 137a-137w do ácido ursólico (2).....	22
<b>Esquema 16:</b> Síntese dos derivados 138-140a-r do ácido ursólico (2).....	23
<b>Esquema 17:</b> Síntese dos derivados (4-10) do estigmasterol (1).....	88
<b>Esquema 18:</b> Síntese dos derivados do cloroformato de estigmasterila (3)....	89
<b>Esquema 19:</b> Síntese dos derivados (14-25) do estigmasterol (1).....	90
<b>Esquema 20:</b> Mecanismo das reações de acoplamento com estigmasterol usando como reagente de acoplamento o DCC.....	142
<b>Esquema 21:</b> Mecanismo das reações de acoplamento com estigmasterol usando como agente de acoplamento o BOP-Cl.....	143
<b>Esquema 22:</b> Mecanismo de remoção do grupo protetor Boc.....	144
<b>Esquema 23:</b> Mecanismo de remoção do grupo protetor Fmoc.....	145
<b>Esquema 24:</b> Sínteses dos derivados (26-32) do ácido ursólico (2).....	147
<b>Esquema 25:</b> Mecanismo das reações de acoplamento com ácido acetil ursólico usando cloreto de oxalila.....	165
<b>Esquema 26:</b> Reação colorimétrica do substrato ACTI, DTNB e AChE.....	174
<b>Esquema 27:</b> Redução do MTT (amarelo) em formazan (roxo-azulado).....	182

**LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

$\delta$	Deslocamento químico
$\lambda$	Comprimento de onda
$J$	Constante de acoplamento
$[\alpha]_D$	Rotação óptica
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromolar
<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>AChE</b>	Acetilcolinesterase
<b>AcOEt</b>	Acetato de etila
<b>ACTI</b>	Iodeto de Acetilcolina
<b>AIDS</b>	Síndrome da imunodeficiência adquirida
<b>AMC</b>	7-amino-4-metilcumarina
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>BCh</b>	Butirilcolina
<b>BChE</b>	Butirilcolinesterase
<b>BCTI</b>	Iodeto de Butiriltocolina
<b>BOC</b>	<i>t</i> -butiloxicarbonil
<b>BOP-Cl</b>	Cloreto de Bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfônico
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
<b>CC</b>	Cromatografia em coluna
<b>CCD</b>	Cromatografia em camada delgada
<b>CCDP</b>	Cromatografia em camada delgada preparativa
<b>CBM</b>	Concentração Bactericida Mínima
<b>CFM</b>	Concentração Fungicida Mínima
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CLM</b>	Concentração Letal Mínima
<b>COSY</b>	Correlated Spectroscopy (Espectroscopia correlacionada)
<b>DA</b>	Doença de Alzheimer
<b>DCC</b>	N,N'-Diciclohexilcarbodiimida

<b>DCU</b>	Dicicloexiluréia
<b>DCM</b>	Diclorometano
<b>DEPT</b>	Distorsionless Enhancement by Polarizations Transfer (Aperfeiçoamento sem distorção por transferência de polarização)
<b>DIEA</b>	N,N-Diisopropiletilamina
<b>DMAP</b>	4-Dimetilaminopiridina
<b>DMF</b>	Dimetilformamida
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Meio de Eagle modificado por Dulbecco)
<b>DTNB</b>	5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico)
<b>d</b>	Dubleto
<b>dd</b>	Duplo dubleto
<b>FDA</b>	Food and Drugs Administration (Administração de Comidas e Remédios)
<b>Fmoc</b>	9-fluorenilmetoxicarbonila
<b>g</b>	grama
<b>HEX</b>	Hexano
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana
<b>Hz</b>	Hertz
<b>HSQC</b>	Heteronuclear Single Quantum Correlation (Correlação Heteronuclear de Quantum Único)
<b>HT-29</b>	Adenocarcinoma colorretal humano
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração necessária para inibir 50%
<b>IC<sub>80</sub></b>	Concentração necessária para inibir 80%
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>IUPAC</b>	International Union of Pure and Applied Chemistry (União Internacional de Química Pura e Aplicada)
<b>kDa</b>	kiloDalton
<b>MTT</b>	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolina
<b>m</b>	Multiplete
<b>mg</b>	Miligrama
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mmol</b>	Milimol
<b>NCCLS</b>	National Committee for Clinical Laboratory Standards (Comitê Nacional para Padrões de Laboratórios Clínicos)

<b>NPPN</b>	Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais
<b>nd</b>	Não determinado
<b>ng</b>	nano gramas
<b>nm</b>	nanômetro
<b>p.a.</b>	Padrão Analítico
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline (Tampão fosfato salino)
<b>PDB</b>	Protein Data Bank (Banco de dados de proteínas)
<b>PF</b>	Ponto de Fusão
<b>ppm</b>	Partes por milhão
<b>POP</b>	Prolil oligopeptidase
<b>Py</b>	Piridina
<b>RJCB</b>	Rio de Janeiro Cell Bank (Banco de células do Rio de Janeiro)
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>s</b>	Singleto
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SNP</b>	Sistema Nervoso Periférico
<b>t</b>	Tripleto
<b>TEA</b>	Trietilamina
<b>TFA</b>	Ácido Trifluoracético
<b>TMS</b>	Tetrametilsilano
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colônias
<b>UFSM</b>	Universidade Federal de Santa Maria
<b>ZGP-AMC</b>	N-benziloxycarbonil-Gli-Pro-metilcumarinil-7-amida

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	4
<b>2.1 Objetivos gerais</b> .....	4
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	4
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	7
<b>3.1 Estigmasterol</b> .....	7
<b>3.2 Ácido Ursólico</b> .....	13
<b>3.3 Atividades biológicas</b> .....	24
3.3.1 Atividade inibitória enzimática.....	24
3.3.1.1 Prolil oligopeptidase (POP).....	24
3.3.1.2 Acetilcolinesterase (AChE) e Butirilcolinesterase (BChE).....	28
3.3.2. Atividade Antimicrobiana.....	32
3.3.2.1 Micro-organismos patogênicos.....	33
3.3.3 Atividade Antitumoral.....	35
3.3.3.1 Câncer colorretal.....	37
3.3.3.2 Ensaio de citotoxicidade.....	38
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	40
<b>4.1 Equipamentos utilizados</b> .....	40
4.1.1 Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	40
4.1.2 Aparelho de Ponto de Fusão.....	40
4.1.3 Aparelho de Rotação Óptica Específica, Polarímetro.....	41
4.1.4 Espectrofotômetro.....	41
<b>4.2 Reagentes e solventes utilizados</b> .....	41
<b>4.3 Métodos Cromatográficos Utilizados</b> .....	42
4.3.1 Cromatografia em coluna (CC).....	42
4.3.2 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP).....	42
4.3.3 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	42
<b>4.4 Procedimentos de Síntese</b> .....	43
4.4.1 Síntese dos aminoácidos protegidos.....	43
4.4.1.1 <i>terc</i> -Butiloxicarbonil- <i>L</i> -aminoácido (Boc-aa).....	43
4.4.1.2 9-Fluorenilmetiloxicarbonil- <i>L</i> -aminoácido (Fmoc-aa).....	44

4.4.2 Síntese do dipeptídeo H-prolina-prolina-OMe.....	44
4.4.3 Síntese dos derivados do estigmasterol (1).....	45
4.4.3.1 Acetil estigmasterol (4).....	45
4.4.3.2 Benzoil estigmasterol (5).....	46
4.4.3.3 Boc- <i>L</i> -prolina-estigmasterol (6).....	47
4.4.3.4 Fmoc- <i>L</i> -prolina-estigmasterol (7).....	49
4.4.3.5 H-prolina-estigmasterol (8).....	50
4.4.3.6 Boc-prolina-prolina-estigmasterol (9).....	51
4.4.3.7 H-prolina-prolina-estigmasterol (10).....	52
4.4.3.8 Estigmasterol-prolina-OMe (11).....	53
4.4.3.9 Estigmasterol-prolina-CN (12).....	54
4.4.3.10 Estigmasterol-prolina-prolina-OMe (13).....	55
4.4.3.11 N-Boc-4-N-Fmoc-amino- <i>L</i> -prolina-estigmasterol (14).....	56
4.4.3.12 N-4-N-Fmoc-amino- <i>L</i> -prolina-estigmasterol (15).....	58
4.4.3.13 N-Boc-4-N-amino- <i>L</i> -prolina-estigmasterol (16).....	59
4.4.3.14 N-4-N-amino- <i>L</i> -prolina-estigmasterol (17).....	60
4.4.3.15 Fmoc- <i>L</i> -alanina-estigmasterol (18).....	61
4.4.3.16 H- <i>L</i> -alanina-estigmasterol (19).....	63
4.4.3.17 Fmoc- <i>L</i> -glicina-estigmasterol (20).....	64
4.4.3.18 H- <i>L</i> -glicina-estigmasterol (21).....	65
4.4.3.19 Fmoc- <i>L</i> -cisteína(tBu)-estigmasterol (22).....	66
4.4.3.20 H- <i>L</i> -cisteína(tBu)-estigmasterol (23).....	67
4.4.3.21 Boc- <i>L</i> -glutâmico(OBz)-estigmasterol (24).....	68
4.4.3.22 H- <i>L</i> -glutâmico(OBz)-estigmasterol (25).....	69
4.4.4 Síntese dos derivados do ácido ursólico (2).....	70
4.4.4.1 Ácido acetil ursólico (26).....	70
4.4.4.2 Acetil ursólico-prolina-OMe (27).....	71
4.4.4.3 Acetil ursólico-prolina-CN (28).....	73
4.4.4.4 Acetil ursólico-prolina-prolina-OMe (29).....	74
4.4.4.5 Ácido ursólico-prolina-OH (30).....	75
4.4.4.6 Ácido ursólico-prolina-CN (31).....	76
4.4.4.7 Ácido ursólico-prolina-prolina-OH (32).....	77
<b>4.5 Atividades Biológicas.....</b>	<b>79</b>



4.5.1 Atividade Antimicrobiana <i>in vitro</i> .....	79
4.5.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de Microdiluição em caldo.....	79
4.5.1.2 Método para a determinação da CIM.....	80
4.5.1.3 Método da Concentração Letal Mínima (CLM).....	81
4.5.2 Atividades enzimáticas.....	81
4.5.2.1 Enzimas e reagentes utilizados nos ensaios de inibição enzimática....	81
4.5.2.2 Ensaio de inibição da prolil oligopeptidase (POP).....	82
4.5.2.3 Ensaio de inibição da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase.....	83
4.5.3 Atividade Antitumoral <i>in vitro</i> .....	84
4.5.3.1 Cultura de células.....	84
4.5.3.2 Ensaio de atividade antitumoral pela medição da viabilidade celular e do efeito antiproliferativo.....	85
4.4.3.3 Técnica de quantificação MTT.....	85
<b>5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....</b>	<b>87</b>
<b>5.1 Obtenção dos derivados do estigmasterol (1).....</b>	<b>87</b>
5.1.1 Dados de RMN <sup>1</sup> H e RMN <sup>13</sup> C referentes ao estigmasterol (1).....	91
5.1.2 Obtenção do Acetil estigmasterol (4).....	96
5.1.3 Obtenção do benzoil estigmasterol (5).....	97
5.1.4 Obtenção do Boc-L-prolina-estigmasterol (6).....	99
5.1.5 Obtenção do Fmoc-L-prolina-estigmasterol (7).....	101
5.1.6 Obtenção do H-prolina-estigmasterol (8).....	103
5.1.7 Obtenção do Boc-prolina-prolina-estigmasterol (9).....	105
5.1.8 Obtenção do H-prolina-prolina-estigmasterol (10).....	107
5.1.9 Obtenção do estigmasterol-prolina-OMe (11).....	109
5.1.10 Obtenção do estigmasterol-prolina-CN (12).....	111
5.1.11 Obtenção do estigmasterol-prolina-prolina-OMe (13).....	113
5.1.12 Obtenção do N-Boc-4-N-Fmoc-amino-L-prolina-estigmasterol (14).....	115
5.1.13 Obtenção do N-4-N-Fmoc-amino-L-prolina-estigmasterol (15).....	118
5.1.14 Obtenção do N-Boc-4-N-amino-L-prolina-estigmasterol (16).....	120
5.1.15 Obtenção do N-4-N-amino-L-prolina-estigmasterol (17).....	123
5.1.16 Obtenção do Fmoc-L-alanina-estigmasterol (18).....	125
5.1.17 Obtenção do H-L-alanina-estigmasterol (19).....	127

5.1.18 Obtenção do Fmoc- <i>L</i> -glicina-estigmasterol (20).....	129
5.1.19 Obtenção do H- <i>L</i> -glicina-estigmasterol (21).....	131
5.1.20 Obtenção do Fmoc- <i>L</i> -cisteína(tBu)-estigmasterol (22).....	133
5.1.21 Obtenção do H- <i>L</i> -cisteína(tBu)-estigmasterol (23).....	135
5.1.22 Obtenção do Boc- <i>L</i> -glutâmico(OBz)-estigmasterol (24).....	137
5.1.23 Obtenção do H- <i>L</i> -glutâmico(OBz)-estigmasterol (25).....	139
5.1.24 Mecanismo proposto para as reações de acoplamento entre o estigmasterol e os Boc-aminoácidos com DCC.....	141
5.1.25 Mecanismo proposto para as reações de acoplamento entre o estigmasterol e os Fmoc-aminoácidos com BOP-Cl.....	143
5.1.26 Mecanismo de remoção do grupo protetor Boc.....	144
5.1.27 Mecanismo de remoção do grupo protetor Fmoc.....	145
<b>5.2 Obtenção dos derivados do ácido ursólico (2).....</b>	<b>146</b>
5.2.1 Dados de RMN <sup>1</sup> H e RMN <sup>13</sup> C referentes ao ácido ursólico (2).....	147
5.2.2 Obtenção do ácido acetil ursólico (26).....	151
5.2.3 Obtenção do acetil ursólico-prolina-OMe (27).....	153
5.2.4 Obtenção do acetil ursólico-prolina-CN (28).....	155
5.2.5 Obtenção do acetil ursólico-prolina-prolina-OMe (29).....	157
5.2.6 Obtenção do ácido ursólico-prolina-OH (30).....	159
5.2.7 Obtenção do ácido ursólico-prolina-CN (31).....	161
5.2.8 Obtenção do ácido ursólico-prolina-prolina-OH (32).....	163
5.2.9 Mecanismo proposto para as reações de acoplamento entre o ácido acetil ursólico e os aminoácidos com cloreto de oxalila.....	165
<b>5.3 Ensaios Biológicos.....</b>	<b>166</b>
5.3.1 Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> .....	166
5.3.2 Ensaios de inibição enzimática.....	169
5.3.3 Atividade Antitumoral <i>in vitro</i> .....	180
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>187</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>190</b>

# 1. INTRODUÇÃO

Até o início do século XIX, em razão do desenvolvimento da química analítica e da existência de uma sólida medicina tradicional fundamentada em farmacopéias estabelecidas ao longo de muito tempo, os fármacos eram obtidos quase que exclusivamente a partir de plantas medicinais e outras fontes naturais.<sup>1</sup>

Após o século XIX, os pesquisadores perceberam que era praticamente inviável produzir fármacos em escala industrial somente a partir de plantas medicinais. Em 1898, Félix Hoffman realizou a síntese do ácido acetil salicílico através da acetilação do grupo hidroxila do ácido salicílico, composto derivado da salicina, isolada por sua vez da *Salix Alba*. Este fato marcou de forma significativa a maneira de obtenção de fármacos.<sup>1,2</sup>

Seguindo este modelo, foi sintetizado em 1903 o barbital, usado como agente hipnótico; a epinefrina em 1904, um importante broncodilatador; a amilocaína e procaína em 1905, substâncias orgânicas empregadas como anestésicos; o fenobarbital em 1912; e o prontossil em 1932 como agente anti-infeccioso.<sup>1,2</sup>

Os primeiros estudos sobre a relação estrutura-atividade para o planejamento racional de fármacos ocorreram durante a II Guerra Mundial. A pesquisa militar foi responsável por grandes avanços na síntese orgânica, motivada principalmente pela necessidade da descoberta de novos compostos para o tratamento de infecções, dor, processos alérgicos e depressão.<sup>2</sup>

O período pós-guerra foi de prosperidade para a síntese de fármacos, surgindo compostos tais como a mepirazina, um anti-histamínico, clorpromazina, um antipsicótico, imipramina, um antidepressivo e a indometacina, um importante anti-inflamatório não-esteroidal.<sup>2</sup>

Desta forma, os avanços da síntese orgânica, farmacologia e biologia molecular, aliados à introdução de novos ensaios bioquímicos, metodologias sintéticas e reagentes para a modificação estrutural de produtos naturais ativos relevantes para o uso, conduziram ao desenvolvimento de química medicinal moderna, com planejamento racional de fármacos baseado na abordagem fisiológica.<sup>1,3</sup>

Dados indicam que aproximadamente 85% dos medicamentos utilizados em todo o mundo são de origem exclusivamente sintética e que, os demais 15%, são de

origem vegetal, animal, microbiológica ou mineral, isolados ou produzidos por semi-síntese.<sup>4</sup>

Um dos grandes desafios enfrentados pela medicina moderna é o tratamento de doenças infecciosas, causadas por vírus e micro-organismos patogênicos e oportunistas, tais como bactérias e fungos, que cada vez mais se tornam resistentes aos tradicionais antivirais e antimicrobianos. Outra preocupação são as doenças neurodegenerativas do Sistema Nervoso Central (SNC), tais como esquizofrenia, amnésia, ansiedade, depressão, bulimia, anorexia e transtorno afetivo bipolar, cujo completo entendimento do mecanismo de ação e tratamento permanecem desconhecidos.<sup>1,5,6</sup>

Muitos estudos têm sido realizados a respeito das interações proteína-proteína que ocorrem quando um determinado substrato se liga a enzima protease prolil oligopeptidase (POP) ou as enzimas colinesterases acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE). Isto tem dado lugar ao surgimento de inibidores enzimáticos com capacidade de modulação de atividades biológicas tais como a síntese de neuropeptídios no SNC, que favorecem o tratamento de doenças neurodegenerativas.<sup>7,8,9</sup>

Outra patologia de extrema importância na medicina moderna é o câncer, responsável por 12% do total de óbitos em todo o mundo, e que atualmente não possui tratamento 100% eficaz, seguro e com poucos efeitos colaterais. Vários estudos têm sido realizados a respeito de fármacos que inibam o crescimento das células tumorais e esta, vem se tornando cada vez mais, uma importante estratégia de defesa contra o câncer.<sup>1,10</sup>

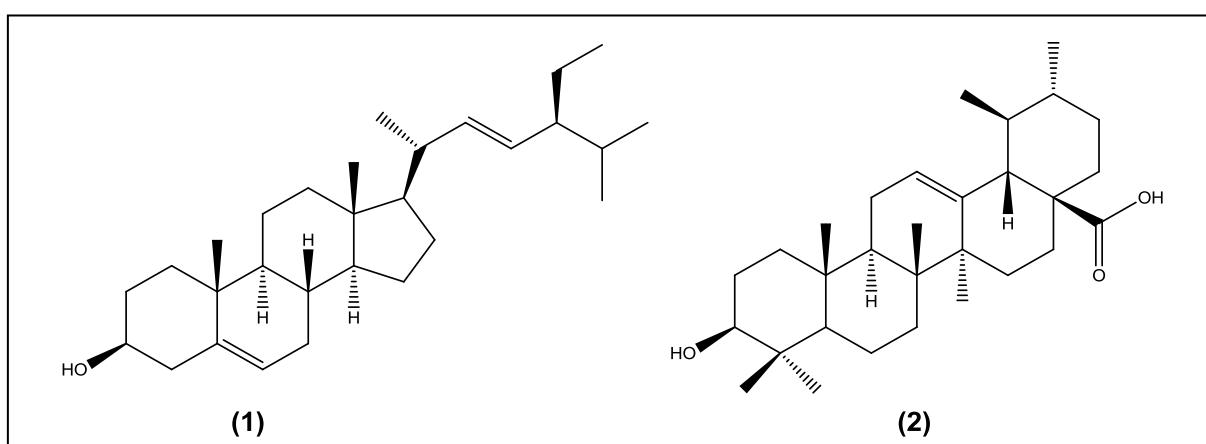
Portanto, dentro deste contexto de importância da descoberta de novos compostos biologicamente ativos para o tratamento de doenças neurodegenerativas, câncer e infecções, duas classes de compostos que vem atraindo a atenção dos pesquisadores nos últimos anos são os esteróis e os triterpenos pentacíclicos, como o estigmasterol (**1**) e o ácido ursólico (**2**), respectivamente, e seus derivados sintéticos (Figura 1).<sup>6,10,11</sup>

Dentre as principais características destes compostos que os torna importantes é o fato de que ambos são abundantes na natureza, podendo ser encontrados na dieta humana e em várias plantas medicinais, tais como *Buddleja brasiliensis* e *Ilex paraguariensis*, espécies vegetais estudadas anteriormente pelo Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais (NPPN). Outra característica é que ambos

os compostos apresentam um amplo espectro de atividades biológicas, tais como anti-HIV, anti-inflamatória, antitumoral, antimicrobiana, antioxidante, anti-alérgica, citotóxica contra células tumorais, hepatoprotetora e neuroprotetora, além da inibição de algumas enzimas.<sup>6,10,11</sup>

O estigmasterol (**1**) e o ácido ursólico (**2**) também são importantes devido as suas características lipossolúveis, o que favorece a permeabilidade dos mesmos na membrana plasmática ou a participação no transporte de substâncias biologicamente ativas através da membrana, fator indispensável para a eficácia de fármacos que atuam no interior das células.<sup>6,10,11</sup>

Considerando que um dos inibidores mais conhecidos e eficazes da POP, o composto benziloxycarbonil-prolil-prolinal (Z-Pro-Prolinal), possui em sua estrutura dois resíduos de prolina e que esta enzima reconhece especificamente peptídeos contendo este aminoácido, a obtenção de novos derivados que permitam combinar a presença de resíduos de prolina com as características lipossolúveis dos compostos **1** e **2** torna-se importante na busca por inibidores que possam ser reconhecidos pela POP e, ao mesmo tempo, possam atravessar membranas celulares, principalmente a barreira hematoencefálica para atuar diretamente no SNC. A lipossolubilidade dos compostos inibidores é importante não somente para a atuação no SNC frente à enzima POP, mas frente a qualquer enzima relacionada a transtornos neurológicos como as colinesterases. Assim, a obtenção de derivados dos compostos naturais estigmasterol (**1**) e ácido ursólico (**2**) através do acoplamento com resíduos de prolina poderia garantir sua atuação como inibidores efetivos e lipossolúveis das enzimas POP, AChE e BChE.<sup>6-11</sup>



**Figura 1:** Estruturas do estigmasterol (**1**) e do ácido ursólico (**2**).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

O presente trabalho tem como objetivo a obtenção de derivados dos compostos estigmasterol (1) e ácido ursólico (2) através de reações de esterificação e acoplamentos com aminoácidos, bem como a avaliação das atividades biológicas dos mesmos.

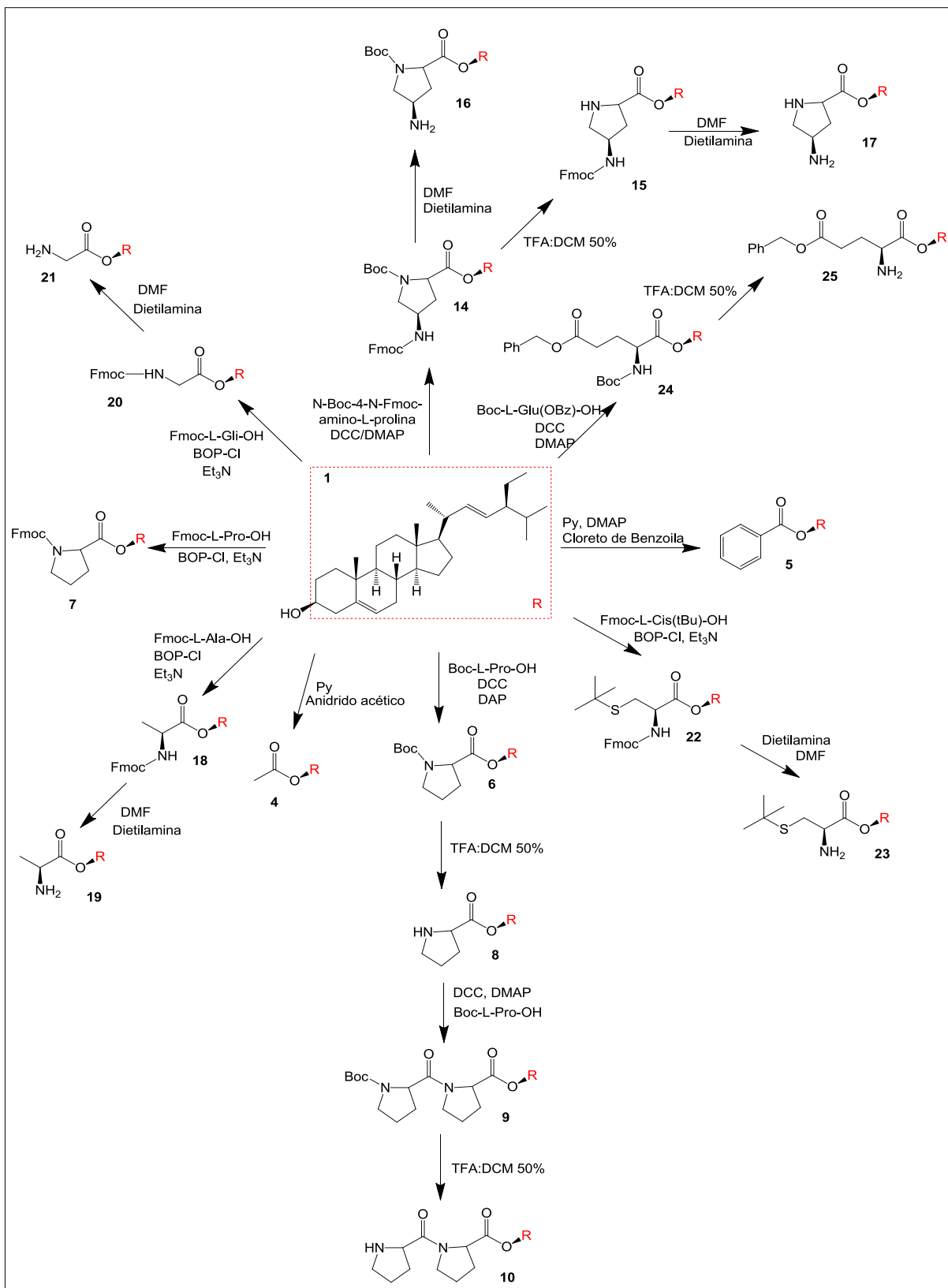
### 2.2 Objetivos específicos

- Realizar a derivatização do estigmasterol (1) mediante reações de esterificação e acoplamento com o aminoácido *L*-prolina na forma de seus derivados Boc-*L*-prolina-OH, Fmoc-*L*-prolina-OH, H-prolina-CN, H-prolina-OMe, H-prolina-prolina-OMe e N-Boc-4-N-Fmoc-amino-*L*-prolina, assim como com os aminoácidos *L*-alanina, *L*-cisteína(tBu)-OH, *L*-glicina e *L*-glutâmico(OBz)-OH, e realizar as respectivas reações de remoção dos grupos protetores (Esquemas 1 e 2).

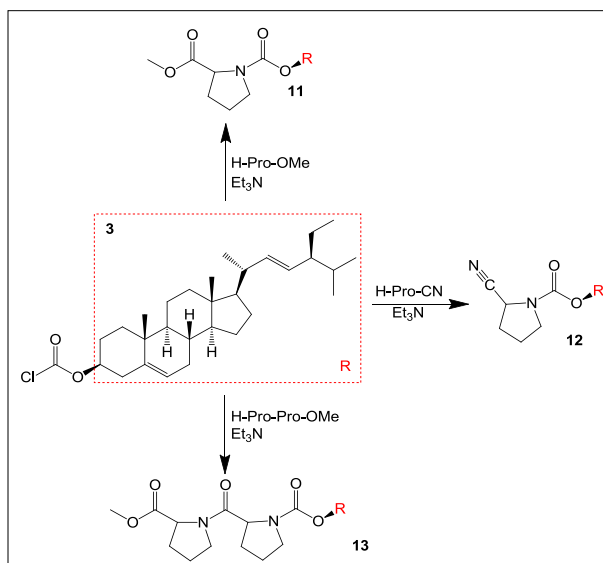
- Realizar a derivatização do ácido ursólico (2) mediante reações de esterificação e acoplamento com H-prolina-OMe, H-prolina-CN e H-prolina-prolina-OMe, assim como as respectivas reações de hidrólises (Esquema 3).

- Realizar testes *in vitro* para a determinação da atividade antimicrobiana e de inibição enzimática frente às enzimas POP, AChE e BChE dos compostos sintetizados.

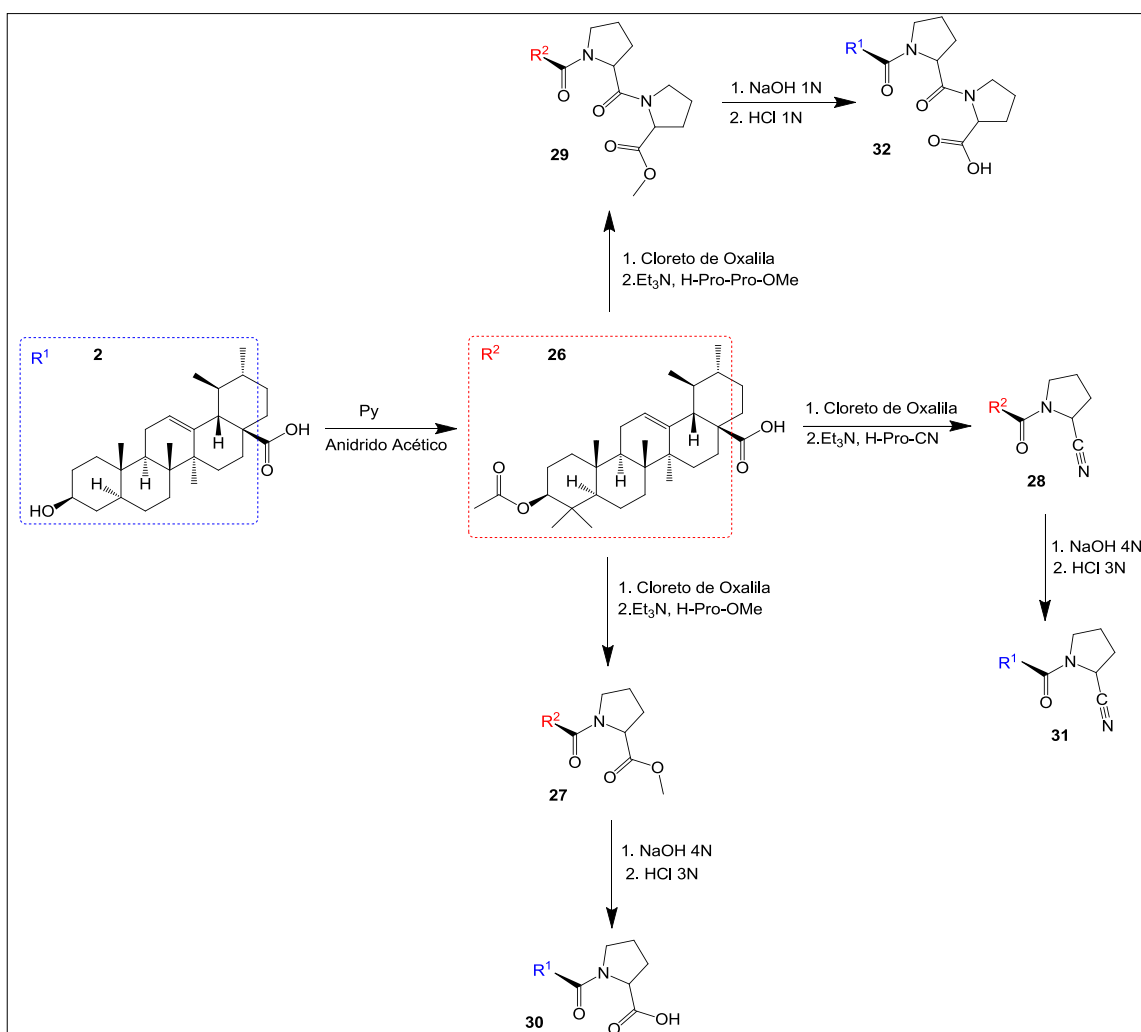
- Realizar o teste de inibição da linhagem de célula cancerígena HT-29 (colorretal) para verificar o potencial de alguns compostos como antitumoral.



Esquema 1: Síntese dos derivados (4 - 10 e 14 - 25) do estigmasterol (1).



**Esquema 2:** Síntese dos derivados (11 - 13) do estigmasterol (1) a partir do clorofornato de estigmasterila (3).



**Esquema 3:** Síntese dos derivados (26 - 32) do ácido ursólico (2).



### 3. REVISÃO DA LITERATURA

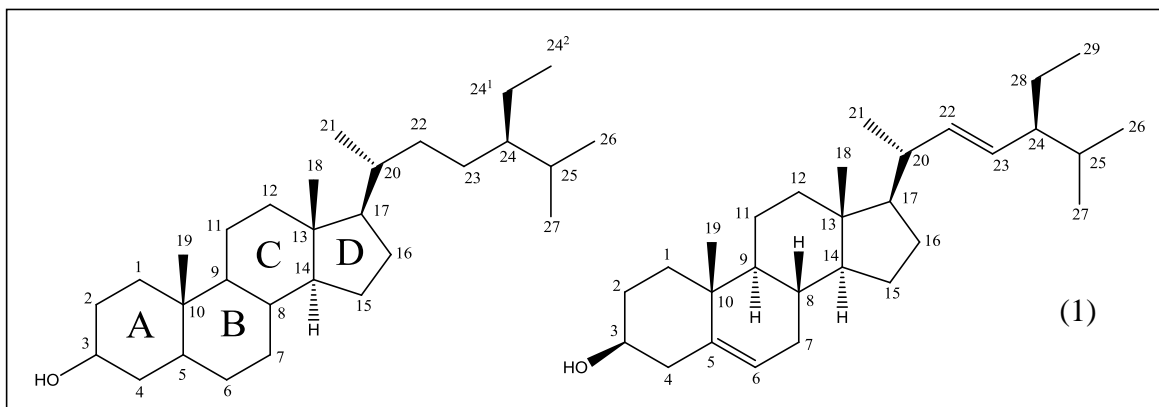
#### 3.1 Estigmasterol

O composto estigmasterol (**1**), também conhecido como estigmasterin, é um esterol insaturado presente em vários tipos de plantas sendo que, juntamente com o campesterol e o  $\beta$ -sitosterol, é o mais importante e mais abundante esterol presente nas plantas superiores. Pelo fato destes compostos serem encontrados em plantas, eles são mais corretamente chamados de fitoesteróis.<sup>11,12,13</sup>

Esteróis fazem parte da família dos isoprenóides e são conhecidos por serem essenciais para todos os organismos eucarióticos. Os esteróis fazem parte da membrana de muitas células animais e vegetais, tal como o colesterol (esterol predominante em células de mamíferos) e o ergosterol (esterol presente em células de fungos), e como tais regulam a permeabilidade, fluidez e rigidez da membrana. Eles também modulam a atividade e distribuição de proteínas sinalizadoras enzimáticas e receptoras, ligadas à membrana, e estão relacionados com a síntese de alguns hormônios, tais como andrógeno, estrógeno e corticóides.<sup>11,14,15,16,17</sup>

Esteróis são compostos orgânicos que possuem um esqueleto básico peridrociclopentanofenantreno com uma  $\beta$ -hidroxila na posição C-3, duas metilas nas posições C-10 e C-13 e uma cadeia lateral contendo de 8 a 10 átomos de carbono na posição C-17. A diferença entre os esteróis se dá principalmente no número de carbonos da cadeia lateral e na presença ou ausência de uma dupla ligação no C-22. Todos os fitoesteróis contêm uma dupla ligação no C-5 (Figura 2).<sup>14,18</sup>

De acordo com a recomendação da IUPAC de 1989, os esteróis são numerados conforme a Figura 2. Os carbonos C-24<sup>1</sup> e C-24<sup>2</sup> são, atualmente, mais frequentemente numerados como C-28 e C-29, respectivamente. A notação  $\beta$  é utilizada para as ligações que estão para frente em relação ao plano e a notação  $\alpha$  é utilizada para as ligações que estão para trás em relação a plano do papel. Assim, o nome IUPAC do estigmasterol é (24S)-24-etilcolesta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol.<sup>13,14,18,19</sup>



**Figura 2:** Estrutura básica dos esteróis com a numeração proposta pela IUPAC em 1989 e estrutura do estigmasterol numerado **(1)**.

Os fitoesteróis podem ser encontrados na natureza conjugados com açúcares, usualmente glicose, que por sua vez podem ser acilados por ácidos graxos, para formar esteril glicosídeos e acil-esteril glicosídeos, respectivamente. Eles também podem ser encontrados esterificados ou na forma de álcool livre, como é o caso do estigmasterol.<sup>16,20</sup>

O estigmasterol, campesterol e  $\beta$ -sitosterol estão presentes na dieta humana, alimentos tais como amendoins, nozes, gergelim, amêndoa, óleo de soja e óleo de oliva, possuem quantidades significativas destes compostos (1 - 500 mg/100 g).<sup>13,21</sup>

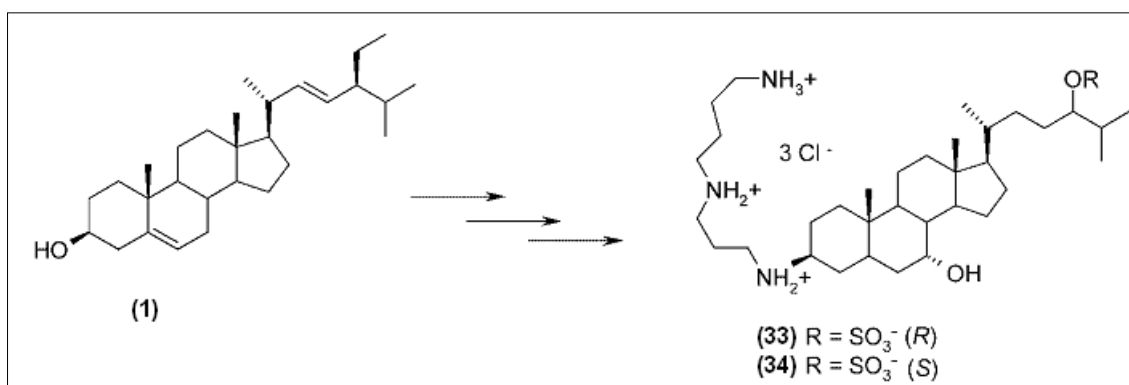
O estigmasterol pode ser encontrado em várias plantas medicinais, tais como *Buddleja brasiliensis*, *Erythrina crista-galli*, *Mucuna cinerea*, *Rubus suavissimus*, *Spilanthes acmella murr*, *Phyllanthus columnaris*, *Butea monosperma*, *Bacopa monnieri* Linn e etc.<sup>22-29</sup>

Este composto também tem sido bastante investigado devido as suas propriedades farmacológicas já relatadas na literatura, tais como anti-osteoartrite, antitumor, anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, atividade citotóxica contra células tumorais, nematocida, hipoglicêmica e inibitório da tireóide.<sup>11,13,20,28,29,30</sup>

Devido a esta grande gama de atividades farmacológicas, as características dos esteróis e ao fato de que o número de fitoesteróis é limitado, a busca por novos compostos derivados do estigmasterol é bastante grande.

Em 1995, Moriarty *et al.* sintetizaram a esqualamina (24R) **(33)** e seu epímero não natural (24S) **(34)** a partir do estigmasterol **(1)**. A síntese ocorreu em várias etapas reacionais e o produto final foi obtido com 50% de rendimento. A esqualamina é um esterol conjugado com a poliamina biogênica espermina

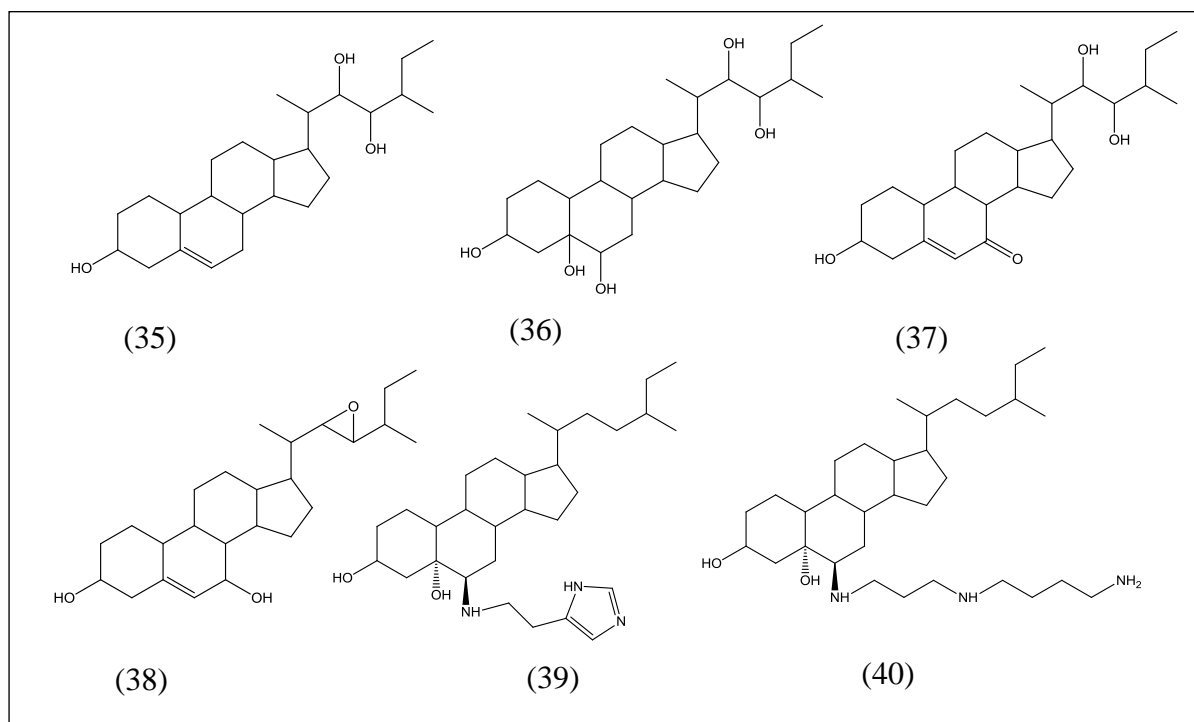
[NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>], sendo que foi primeiramente isolada da espécie de tubarão *Squalus acanthiase* e apresentou potente atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos, assim como também inibição da angiogênese (proliferação de vasos capilares para o crescimento de tumores), condição indispensável para o tratamento anticâncer (Esquema 4).<sup>15,31</sup>



**Esquema 4:** Síntese da esqualamina 24R (**33**) e 24S (**34**) a partir do **1**.

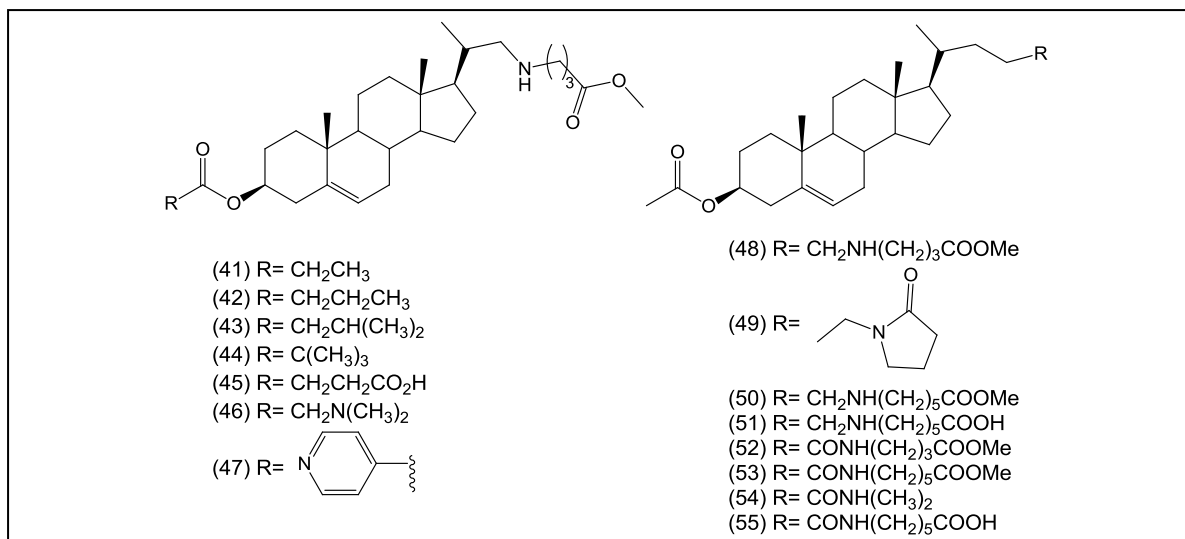
Em 2008, Misharin *et al.* propuseram a síntese de derivados 22,23-oxigenados do estigmasterol (**35** - **38**) e avaliaram o potencial citotóxico destes compostos frente à várias linhas de células de câncer. Eles justificaram a realização deste teste devido ao fato de que o aumento do número de cadeias laterais oxigenadas nos esteróis naturais aumenta a toxicidade destes em células, principalmente células cancerígenas. Os resultados obtidos confirmaram a alta toxicidade destes compostos frente às linhas de células de hepatoma humano e carcinoma de mama.<sup>32</sup>

Em 2009, Medina *et al.* propuseram a síntese de novos alquilaminoxí esteróis e a avaliação da atividade anticâncer e contra doenças neurodegenerativas. Entre os derivados obtidos, destacam-se a dendrogenina A (**39**) e a dendrogenina B (**40**), sendo que a primeira induziu diferenciação e morte celular em teste com diferentes linhas de tumor, e a segunda induziu a formação de neuritos (prolongamento dos neurônios) em diferentes linhas de células neuronais.<sup>33</sup>



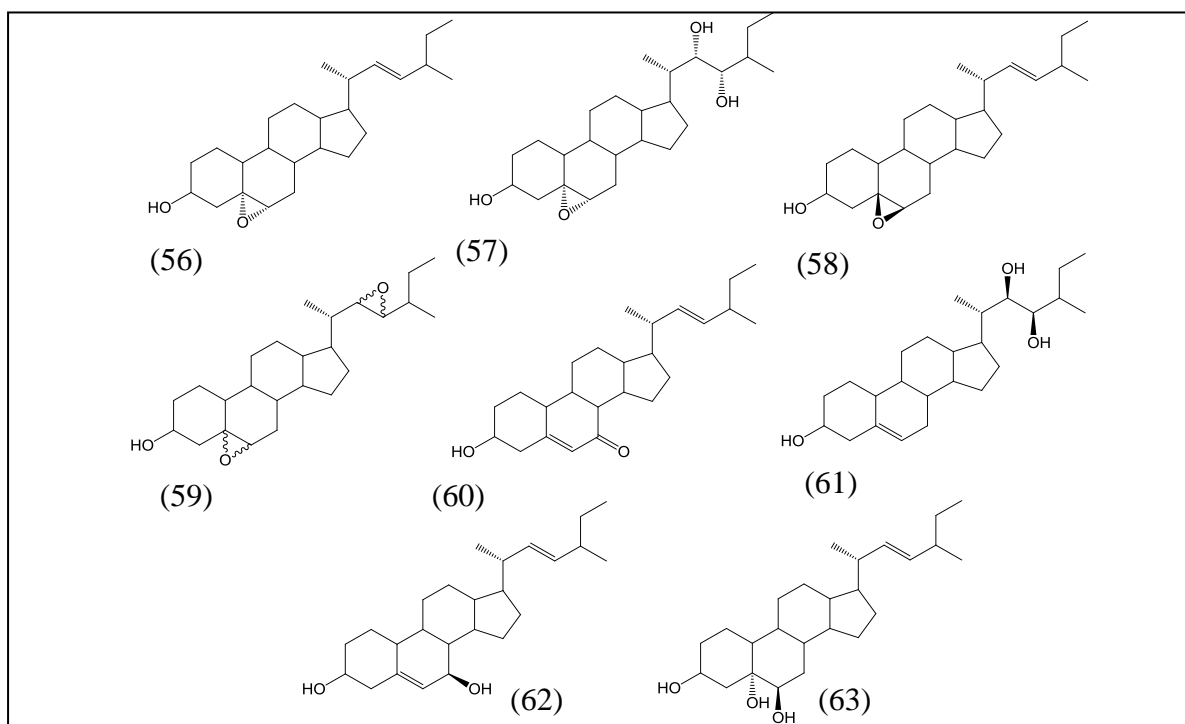
**Figura 3:** Derivados esteróis **35 – 40**.

Também em 2009, Gigante *et al.* propuseram a síntese de azasteróis (**41-55**), esteróis contendo nitrogênio, e destacaram o fato de que geralmente esteróis-amino conjugados apresentam atividade antimicrobiana, tal como a esqualamina relatada anteriormente por Moriarty *et al.*<sup>31</sup> Por este motivo, os pesquisadores realizaram a síntese e avaliação do potencial antitripanosomal e antileishmanial destes compostos. Eles observaram que os compostos obtidos apresentavam atividade contra *T. brucei rhodesiense*, particularmente os compostos **41**, **47**, **48** e **50**. Os compostos **52**, **53** e **55** mostraram-se promissores contra *L. donovani*.<sup>34</sup>



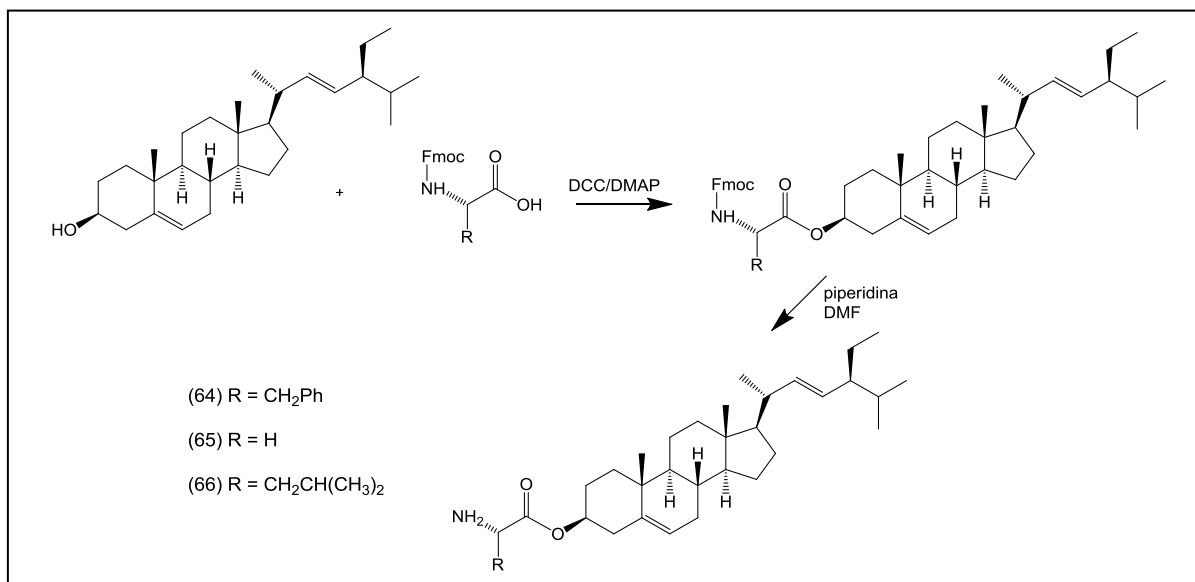
**Figura 4:** Derivados esteróis 41 – 55.

Em 2010, O'Callaghan *et al.* propuseram a síntese de oito derivados oxidados do estigmasterol (**56 – 63**) e a avaliação da citotoxicidade e efeito apoptótico, ambas em células U937 de leucemia monocítica humana. Os pesquisadores concluíram que os compostos **57**, **59**, **61** e **62** são citotóxicos e causam apoptose na célula U937.<sup>35</sup>



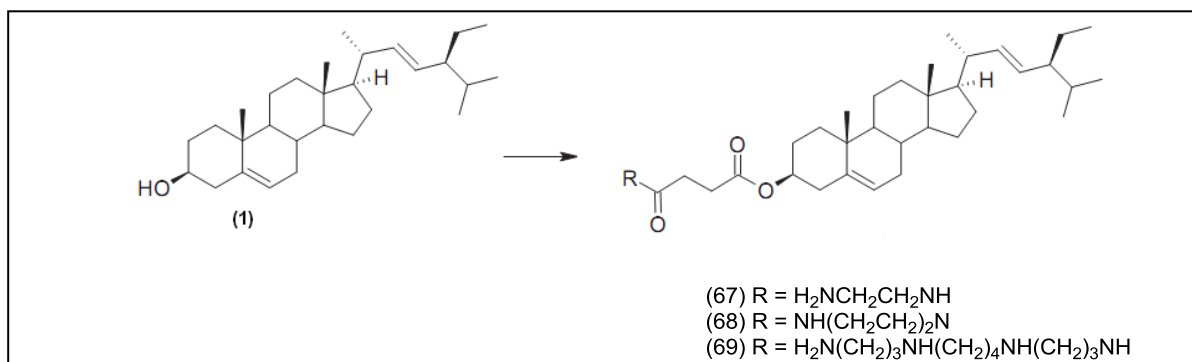
**Figura 5:** Derivados esteróis 56 – 63.

Em 2011, Svobodová *et al.* propuseram a síntese de três novos compostos através do acoplamento dos aminoácidos *L*-Fenilalanina, Glicina e *L*-Leucina com o estigmasterol (**64** - **66**). Os pesquisadores também avaliaram o grau de gelificação destes compostos frente a 22 solventes orgânicos.<sup>36</sup>



**Esquema 5:** Síntese dos derivados **64-66** do estigmasterol (**1**).

Em 2012, Vida *et al.* propuseram a síntese de poliaminas conjugadas com o estigmasterol (**67–69**) e destacaram a importância destes compostos no transporte de substâncias biologicamente ativas através da membrana. Além da síntese, eles também realizaram testes antimicrobianos e citotóxicos contra células normais dos produtos obtidos. O composto **69** mostrou-se um promissor candidato antimicrobiano, uma vez que causou a inibição seletiva da bactéria *S. aureus*. A citotoxicidade apresentada pelos compostos foi baixa ou quase inexistente.<sup>15</sup>



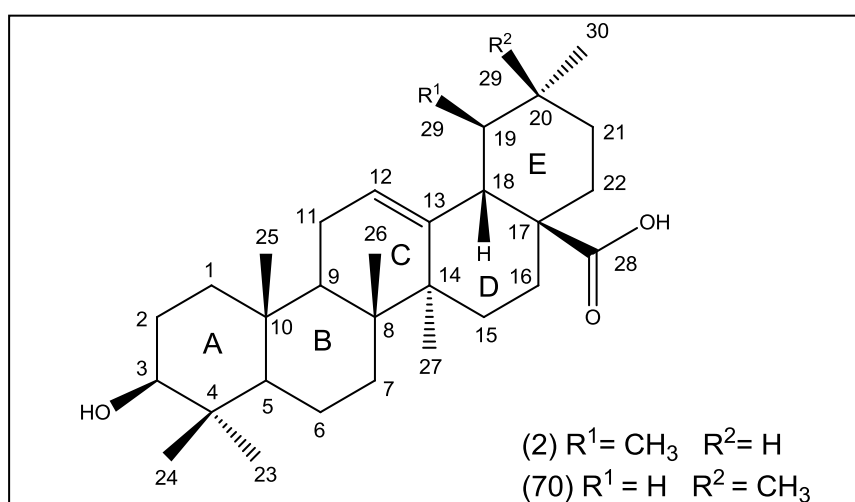
**Esquema 6:** Síntese das Poliaminas **67-69** conjugadas ao estigmasterol (**1**).

### 3.2 Ácido Ursólico

O composto ácido ursólico (**2**) é um triterpeno pentacíclico, isômero do ácido oleanólico (**70**), encontrado em várias plantas superiores, vegetais e frutas. Este composto faz parte do grupo dos isoprenóides e sua estrutura contém 30 átomos de carbono e 3 átomos de oxigênio (Figura 6).<sup>37,38,39</sup>

Os terpenos são metabólitos secundários das plantas e são caracterizados por possuírem duas ou mais unidades de isopreno ( $C_5H_8$ ). Os terpenos são classificados de acordo com o número de átomos de carbono e aqueles que possuem 30 átomos de carbono ( $C_{30}H_{48}$ ) são classificados como triterpenos, podendo ser acíclicos ou conter estruturas mono-, bi-, tri-, tetra- e pentacíclicas.<sup>40</sup>

Os triterpenos pentacíclicos, por sua vez, podem ser divididos em três grupos: oleananos, ursanos e lupanos. Os dois primeiros apresentam cinco anéis hexagonais, com uma estereoquímica dos anéis D/E cis, diferenciando-se entre si apenas na posição de seus grupos metilas: nos oleananos situam-se ambos no C-20, enquanto nos ursanos uma das metilas encontra-se no C-20 e a outra no C-19. Os lupanos, por outro lado, possuem uma estereoquímica trans dos anéis D/E e o quinto anel é pentagonal (Figura 6).<sup>40</sup>



**Figura 6:** Estruturas do ácido ursólico (**2**) e do ácido oleanólico (**70**).

O ácido ursólico está presente na dieta humana, podendo ser encontrado em alguns temperos e frutas, tais como maçãs, ameixas, amoras, peras, sálvia, alecrim

e orégano. Este composto também pode ser encontrado em várias espécies medicinais na forma de aglicona ou glicosilado. Entre algumas plantas de uso na medicina tradicional que contém ácido ursólico encontram-se: *Ilex paraguariensis*, *Saurauja roxburghii*, *Satureja khuzistanica*, *Micromeria cilicica*, *Pterocephalus hookeri*, *Salvia officinalis* L, entre outras.<sup>41-47</sup>

O ácido ursólico tem sido bastante investigado devido as suas várias propriedades farmacológicas já relatadas na literatura, entre as quais podemos citar atividade antitumoral, antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, anti-HIV, hepatoprotetora, neuroprotetora, anti-alérgica e citotóxica contra células tumorais.<sup>39,48,49,50,51,52</sup>

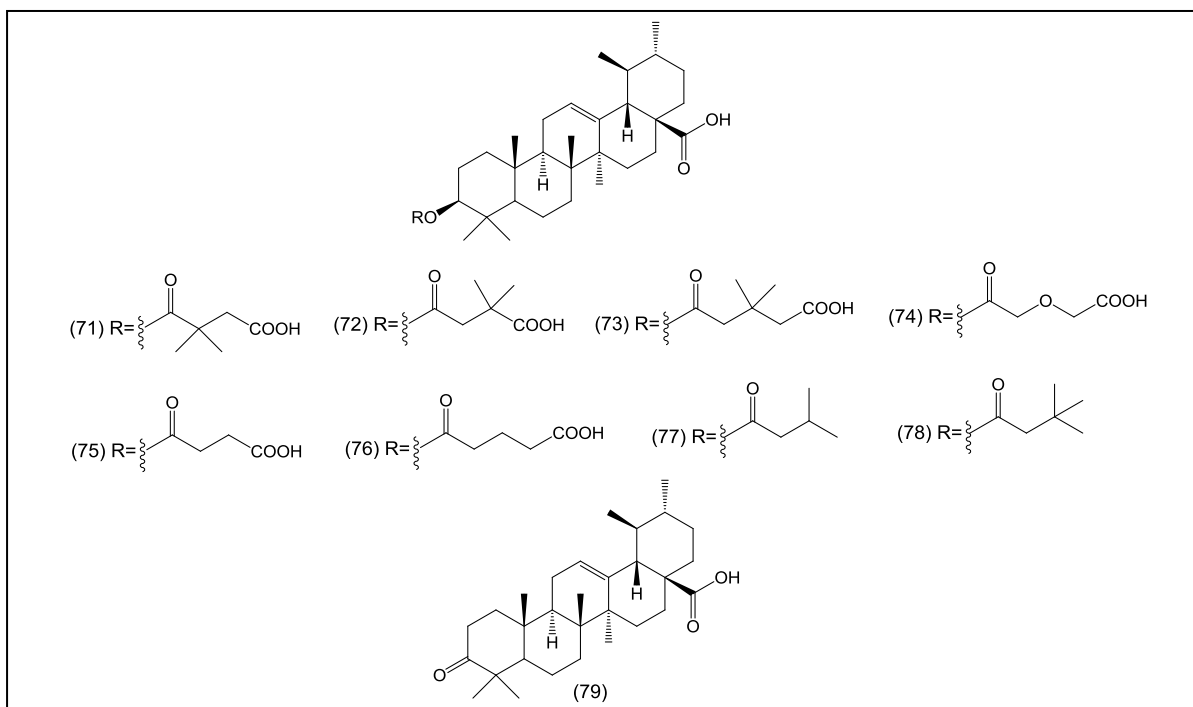
Entre as atividades farmacológicas mais estudadas destaca-se a atividade antitumoral contra diversos tipos de células, tais como células de leucemia, hepatoma humano, carcinoma gástrico, carcinoma colorretal, carcinoma prostático, carcinoma cervical escamoso, carcinoma de mama e carcinoma pancreático. Entre essas células, uma que se destaca é o carcinoma colorretal (HT-29) uma vez que vários autores relatam o ácido ursólico como sendo um forte agente antitumoral e antiproliferativo, causando a morte celular por apoptose, com IC<sub>50</sub> em torno de 25 µM.<sup>37,38,48,52,53,54</sup>

Na literatura também se encontram vários estudos sobre a relação estrutura-atividade, uma ferramenta fundamental no planejamento de novos protótipos de fármacos. Vechia *et al.* relataram, em uma revisão sobre derivados de oleananos e ursanos publicada em 2009, que um grupo doador de ligações de hidrogênio na posição C-3 ou C-28, assim como uma carbonila na posição C-17 é essencial para que o ácido ursólico apresente atividade citotóxica e que a presença de um grupo amina tanto no C-3 quanto no C-28 aumenta significativamente a atividade citotóxica, além da orientação β do substituinte no C-3. Também é relatado por Mazumber *et al.* que a presença de um grupo ciano ou trifluormetil no C-2 do ácido ursólico aumenta seu potencial citotóxico. Além destas observações, estudos de Shao *et al.* e Meng *et al.* revelaram que aqueles derivados do ácido ursólico com éster na posição C-3 e amina na posição C-28 resultam em derivados com forte inibição de tumores.<sup>37,43,52,55</sup>

Em 2000, Kashiwada *et al.* propuseram a síntese de alguns derivados do ácido ursólico (**71-79**) e a avaliação do potencial anti-HIV destes compostos. Como resultados os pesquisadores obtiveram que o composto **72** apresenta uma fraca

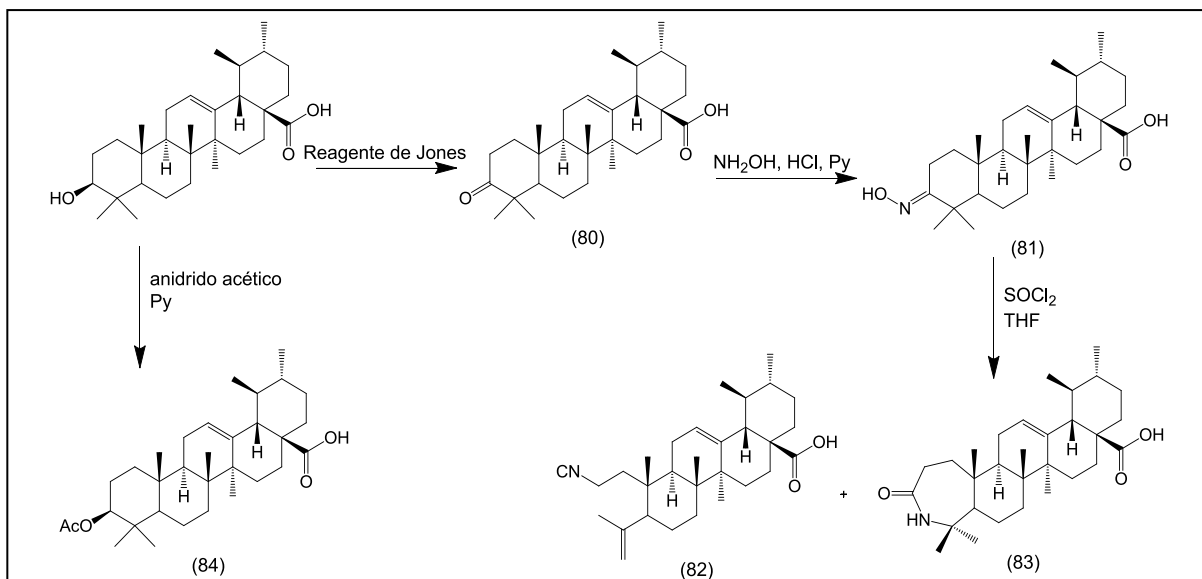


atividade anti-HIV e é pouco tóxico, já o composto **74** apresentou um relativo potencial anti-HIV e o composto **79** apresentou alta toxicidade. Os demais compostos apresentaram baixa ou inexistente atividade.<sup>50</sup>

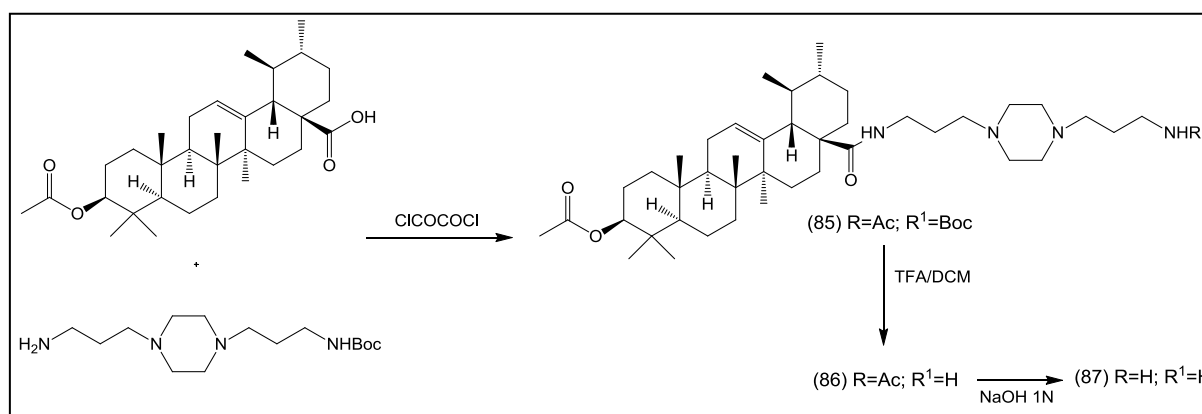


**Figura 7:** Derivados **71 – 79** do ácido ursólico (**2**).

Em 2008, Gnoatto *et al.* realizaram o isolamento do ácido ursólico (**2**) a partir da *Ilex paraguariensis* e a síntese de derivados deste composto (**80-87**), assim como a avaliação do potencial de inibição da aromatase, uma enzima responsável pela conversão irreversível do andrógeno em estrógeno e relacionada com tumores de próstata e mama. Após os testes, os autores concluíram que apenas o ácido ursólico inibiu efetivamente a atividade da aromatase *in vitro* e que a introdução de um metaloceno não aumentou a atividade inibitória (Esquemas 7 e 8).<sup>42</sup>

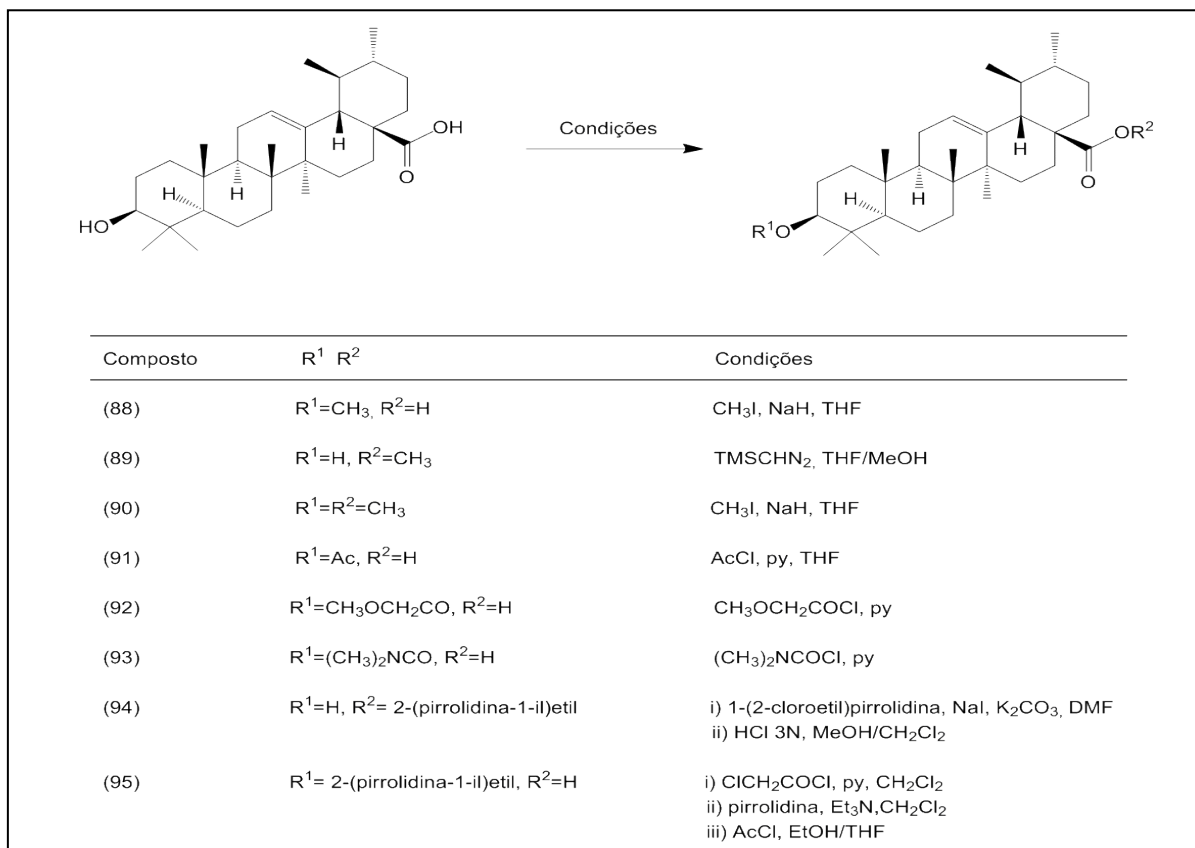


**Esquema 7:** Síntese dos derivados **80 - 83** do ácido ursólico (**2**).



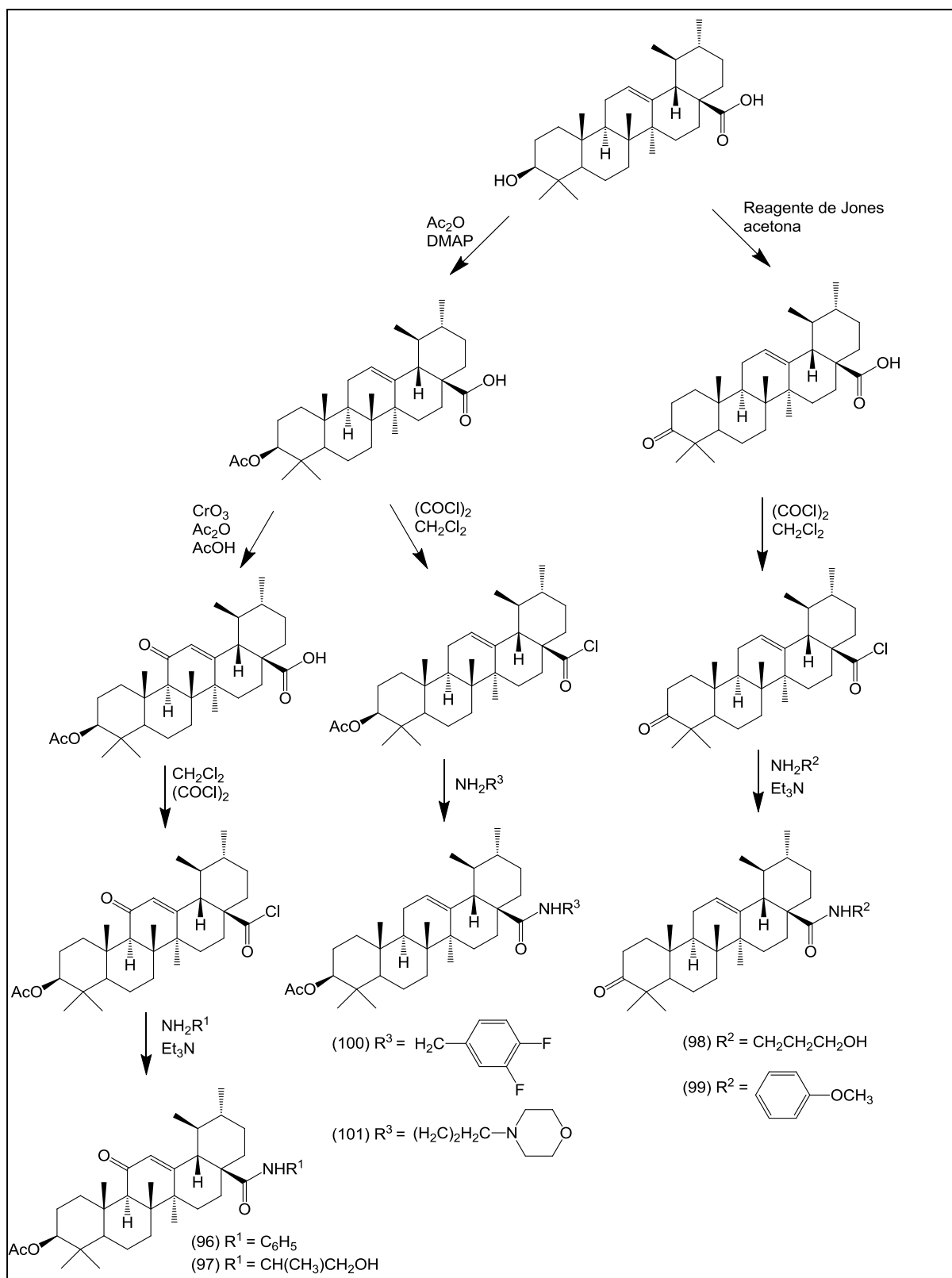
**Esquema 8:** Síntese dos derivados **84 - 87** do ácido ursólico (**2**).

Em 2009, Kwon *et al.* propuseram a síntese de derivados do ácido ursólico (**2**) através de modificações no C-3 e C-28 (**88-95**), e a avaliação da atividade anti-inflamatória através da análise do poder inibitório dos compostos contra a produção de óxido nítrico (NO) induzido por lipopolissacarídeos. Os pesquisadores concluíram que o composto **94** foi o mais potente inibidor do NO, com 93,7% de inibição a 20  $\mu\text{M}$ , porém apresentou forte citotoxicidade contra células normais. Já os compostos **88**, **89**, **91**, **92** e **93** foram três vezes mais potentes na inibição do NO que o ácido ursólico, sendo que o composto **88** apresentou baixa citotoxicidade. O composto **90** também aumentou o potencial de inibição, porém não muito significativamente (Esquema 9).<sup>49</sup>

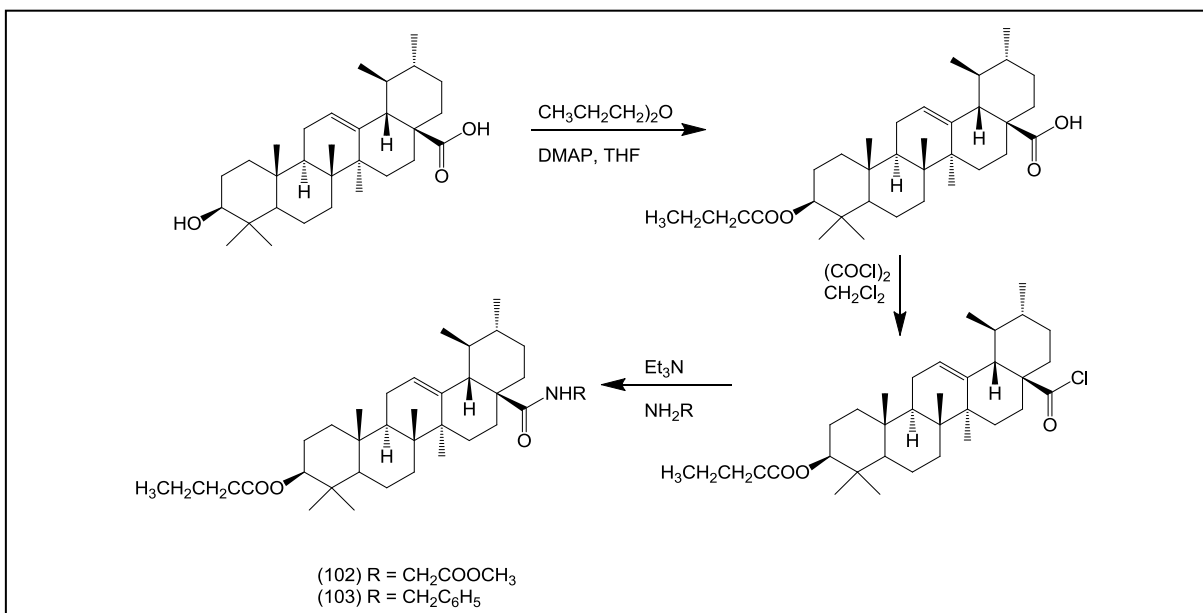


**Esquema 9:** Síntese dos derivados **88-95** do ácido ursólico (**2**).

Em 2010, Meng *et al.* propuseram a síntese de novos derivados do ácido ursólico (**96-103**) através de modificações nas posições C-3, C-11 e C-28 e a realização da atividade citotóxica contra várias células de câncer (HeLa - carcinoma cervical humano, SKOV3 – carcinoma ovariano e BGC-823 – carcinoma gástrico humano). Após os testes, os autores concluíram que os compostos que sofreram esterificação no 3-OH e acoplamento no C-28 com aminoácidos metil ésteres apresentaram maior inibição que o ácido ursólico com as três linhas de células. O composto **101** foi o mais potente inibidor de ambas as células, com IC<sub>50</sub> de 2,71, 7,40 e 4,46 μM, respectivamente para HeLa, SKOV3 e BGC-823. Os autores também concluíram que a acetilação do C-3 é mais eficiente na inibição dos tumores do que a butilação e que um grupo carbonil na posição C-3 ou C-11 é extremamente importante para a atividade (Esquemas 10 e 11).<sup>55</sup>

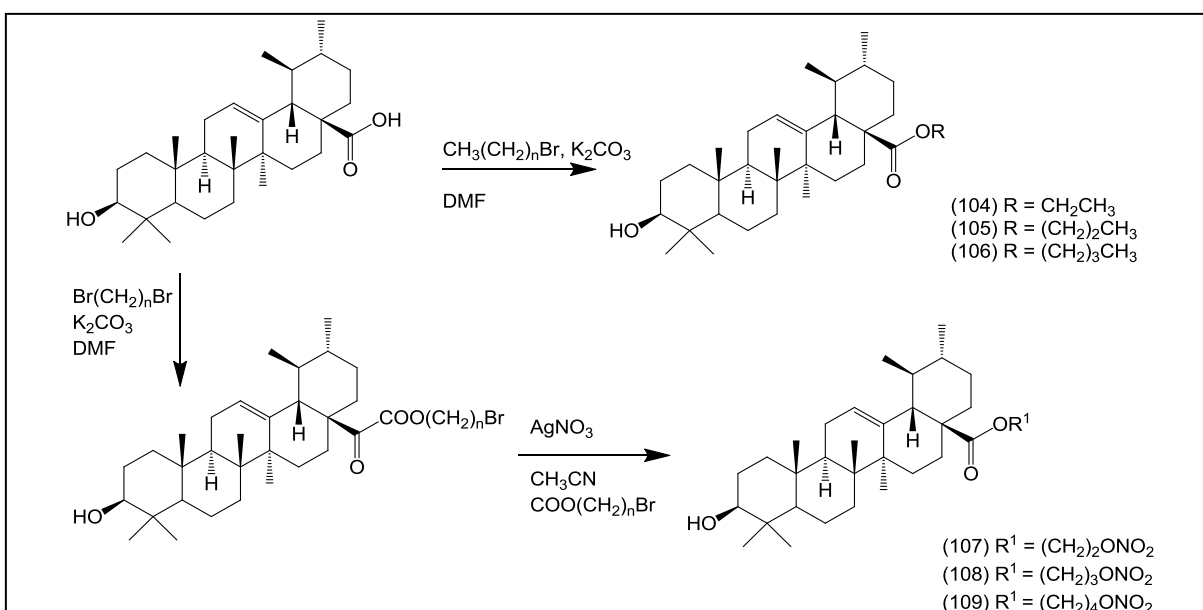


**Esquema 10: Síntese de derivados 96-101 do ácido ursólico (2).**

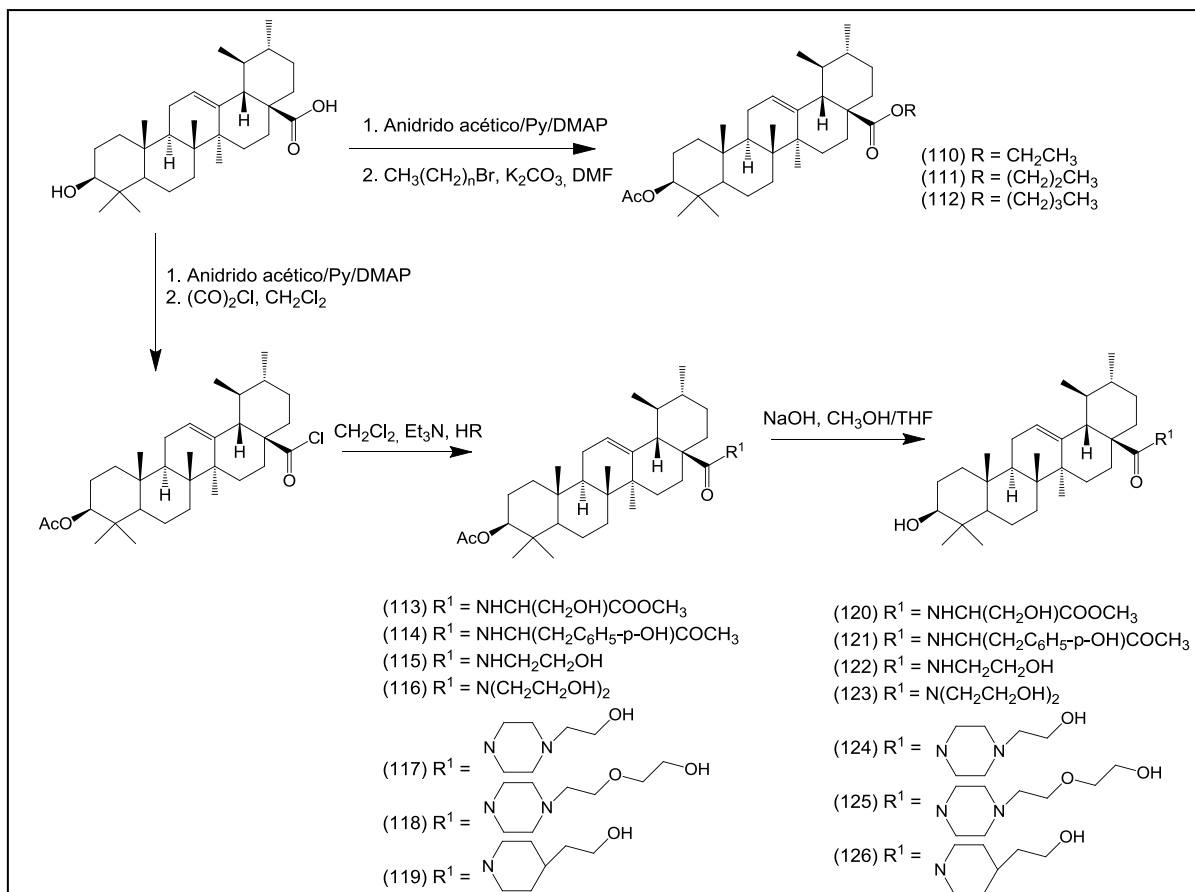


**Esquema 11:** Síntese de derivados **102 - 103** do ácido ursólico (**2**).

Em 2011, Shao *et al.* propuseram a síntese de 23 derivados do ácido ursólico (**104-126**) e a realização da atividade anticâncer *in vitro* e *in vivo* contra vários tipos de carcinomas. Os compostos **116-119** mostraram significativa atividade antiproliferativa contra as células de câncer e baixa citotoxicidade. Os composto **113**, **116-118**, **123** e **125** foram particularmente ativos contra a linha de célula HepG2 (célula de hepatoma humano), sendo que o composto **116** inibe a célula por apoptose, morte celular (Esquemas 12 e 13).<sup>52</sup>

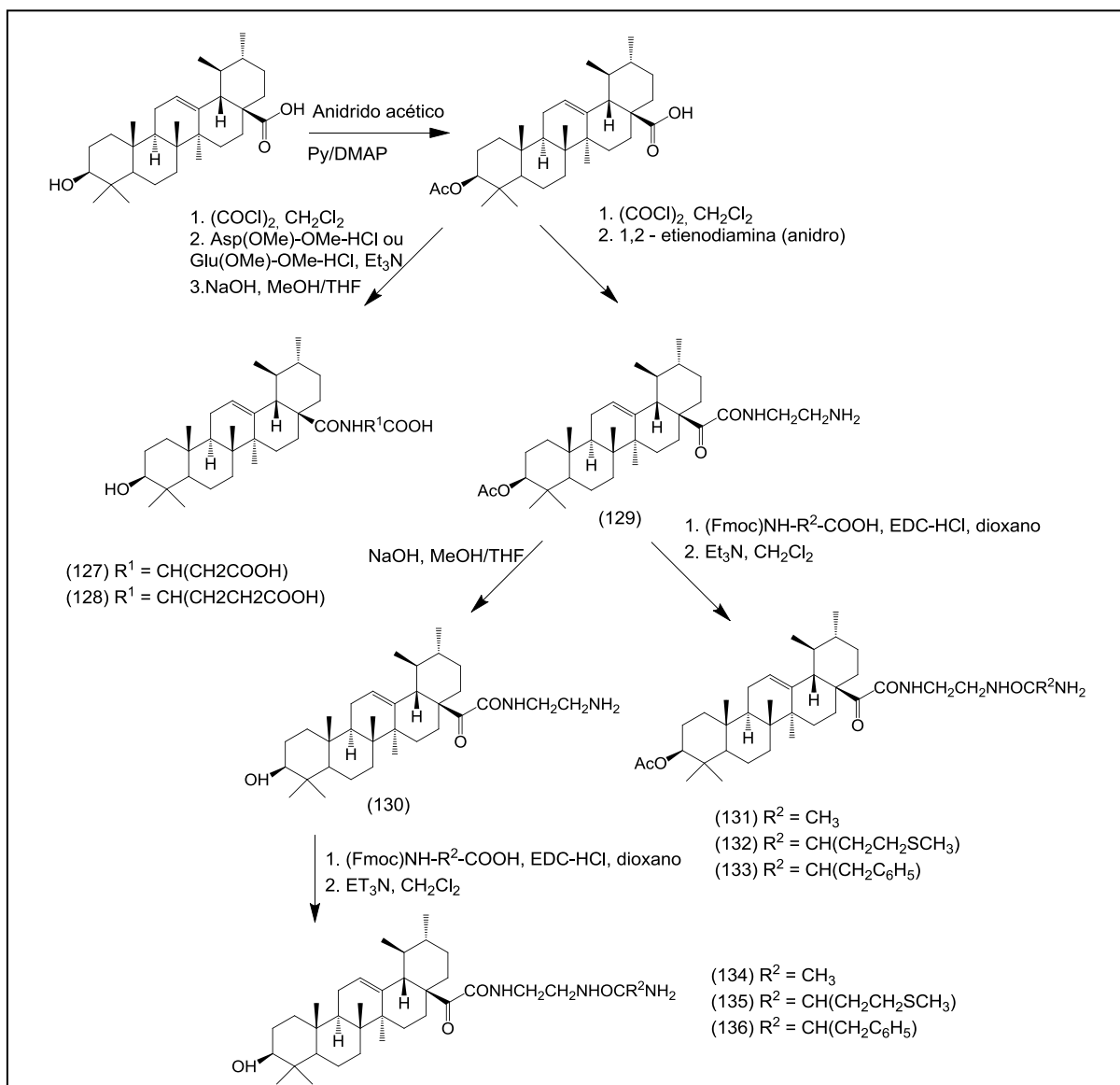


**Esquema 12:** Síntese dos derivados **104-109** do ácido ursólico (**2**).



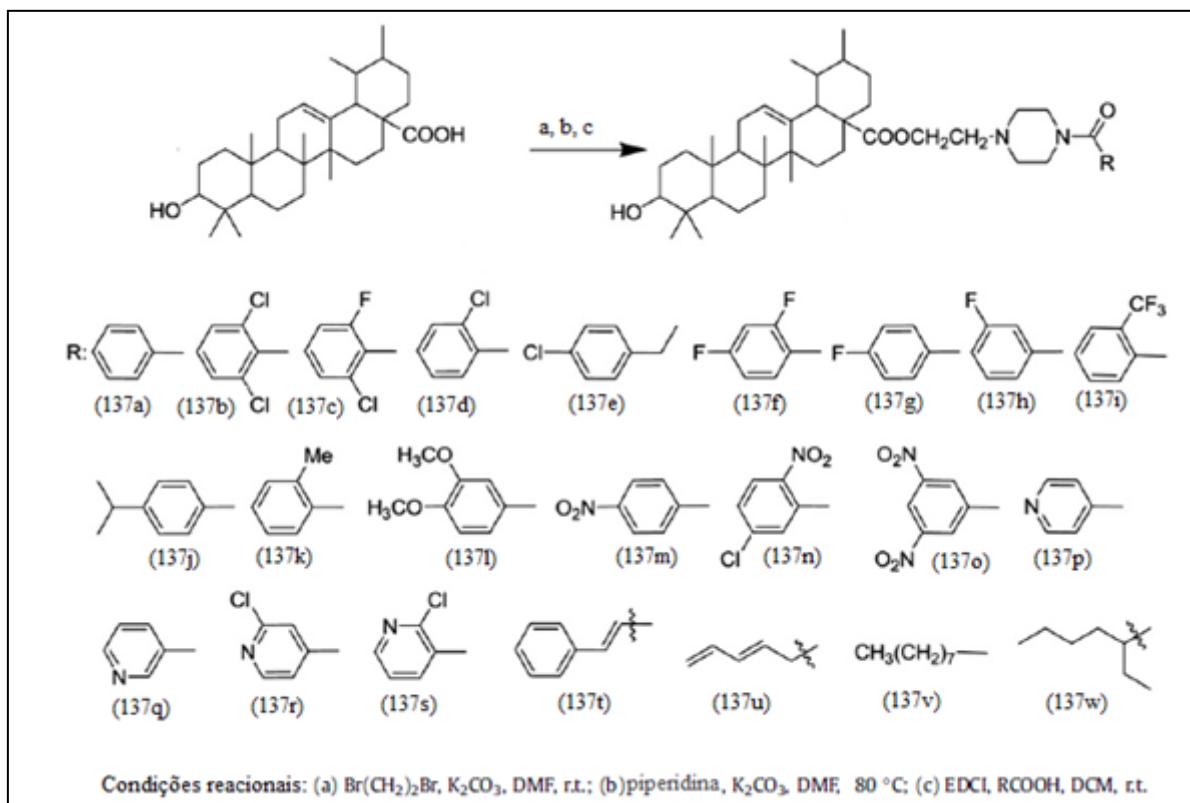
**Esquema 13: Síntese dos derivados 110-126 do ácido ursólico (2).**

Em 2012, Bai *et al.* realizaram a síntese de 10 derivados do ácido ursólico e avaliação do potencial citotóxico destes compostos frente à várias linhas de células tumorais, tais como HT-29, PC-3 e HepG2, através do ensaio MTT. Eles dividiram os compostos sintetizados em dois grupos, o grupo 1 (**127-128**) são aqueles com carga negativa e o grupo 2 (**129-136**) aqueles com carga positiva. Os resultados mostraram que o grupo 1 possui uma menor capacidade citotóxica que o ácido ursólico e este, por sua vez, possui uma menor capacidade citotóxica que o grupo 2. Eles justificaram estes resultados com base na lipossolubilidade dos compostos, ou seja, a melhor lipofilicidade levou a melhor permeabilidade na membrana e, portanto, melhores resultados. O composto **130** possui um potencial terapêutico para o tratamento de carcinoma gástrico devido à solubilidade em água e a habilidade de induzir apoptose nas células testadas (Esquema 14).<sup>48</sup>



**Esquema 14:** Síntese dos derivados **127-136** do ácido ursólico (**2**).

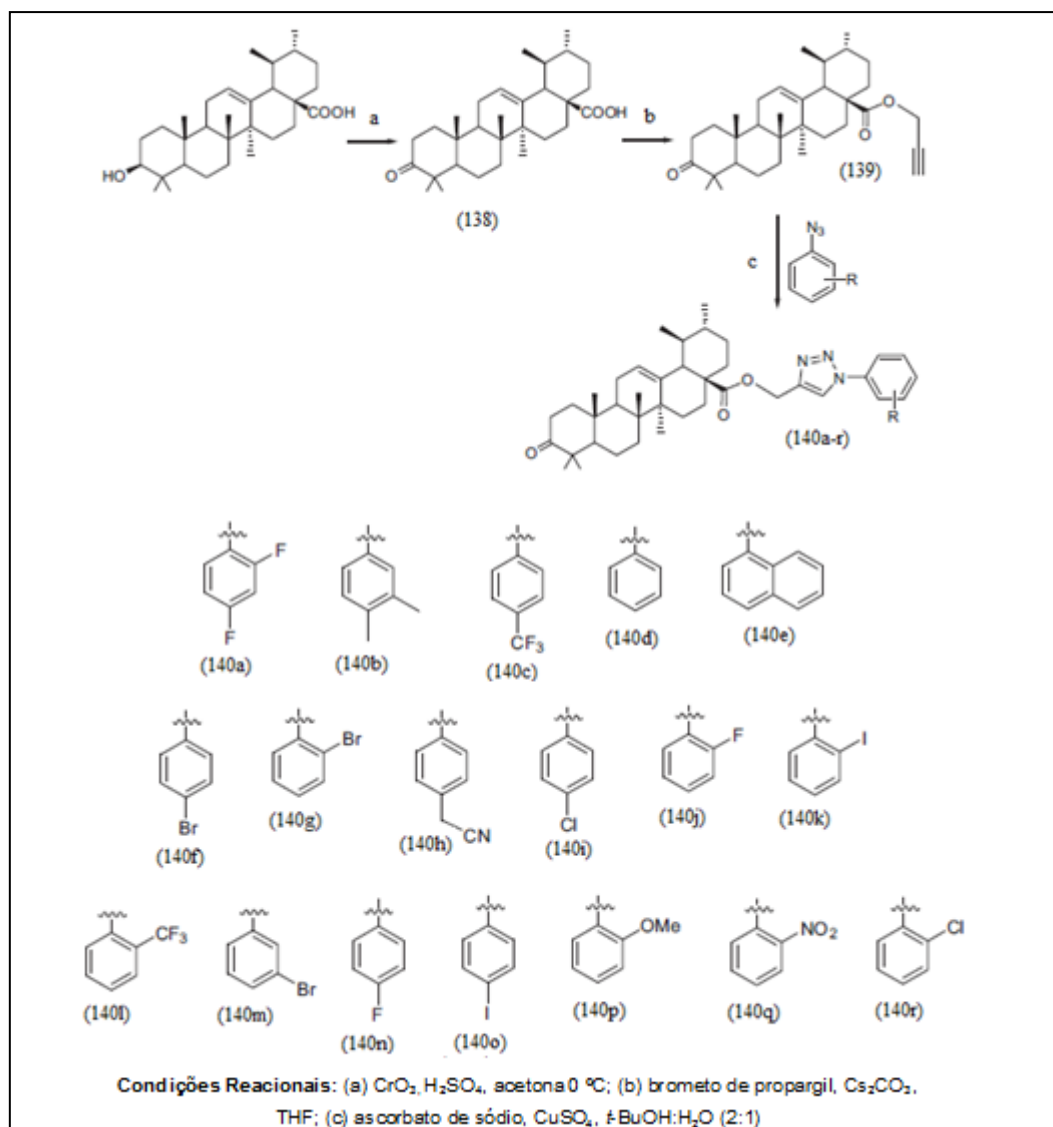
Também em 2012, Liu *et al.* propuseram e síntese de novos derivados do ácido ursólico (**137a-137w**) contendo acil piperazinas e a avaliação da atividade citotóxica contra MGC-803 (célula de carcinoma gástrico) e Bcap-37 (célula de câncer de mama). Os pesquisadores concluíram que a incorporação de uma acil piperazina no C-28 juntamente com um grupo polar no C-3 aumenta significativamente a atividade antitumoral dos compostos. O composto **137b** induziu apoptose em MCG-803 (Esquema 15).<sup>56</sup>



**Esquema 15:** Síntese dos derivados **137a-137w** do ácido ursólico (**2**).

Em 2013, Rachid *et al.* propuseram a síntese de derivados triazolil do ácido ursólico (**138-140a-r**) e a avaliação do potencial anticâncer contra várias linhas de células tumorais. Os compostos **139**, **140a**, **140b**, **140d-h**, **140k**, **140p-r** apresentaram melhores resultados quando comparados com **140c**, **140i** e **140j**, sendo que os compostos **140b**, **140g**, **140p** e **140r** foram os mais potentes neste estudo (Esquema 16).<sup>57</sup>





**Esquema 16:** Síntese dos derivados **138-140a-r** do ácido ursólico (**2**).

### 3.3 Atividades biológicas

#### 3.3.1 Atividade inibitória enzimática

##### 3.3.1.1 Prolil oligopeptidase (POP)

A enzima prolil oligopeptidase (EC 3.4.21.26), abreviada como POP, PREP ou PO, é um enzima considerada grande, com massa molecular de 80 kDa e 710 aminoácidos, foi descoberta em 1971 em um útero humano como degradadora da oxitocina e inicialmente chamada de prolil endopeptidase (PEP) ou enzima de clivagem pós-prolina.<sup>58,59</sup>

O nome enzima de clivagem pós-prolina foi inicialmente recomendado devido ao fato da POP preferencialmente hidrolisar pequenos peptídeos na porção carboxílica de resíduos de prolina. O nome prolil endopeptidase foi inicialmente recomendado pela “Enzyme Nomenclature”, porém, mais tarde, em 1992, devido as suas características, passou a denominação prolil oligopeptidase.<sup>58,60</sup>

A POP pertence à classe das serinas proteases (Clã SC, família S9), que também inclui a dipeptidilpeptidase IV (EC 3.4.14.5), oligopeptidase B (EC 3.4.21.83) e acilaminoacil peptidase (EC 3.4.19.1). Esta família é caracterizada por hidrolisar apenas peptídeos com menos de 30 resíduos de aminoácidos.<sup>58,61</sup>

Esta enzima geralmente é encontrada no citoplasma das células, mas também pode ocorrer ligada a membrana plasmática, e é amplamente distribuída em vários tipos de tecidos e órgãos. O cérebro é uma das fontes mais ricas nesta enzima, e dentro dele, ela pode ser encontrada em todas as regiões, córtex, hipotálamo, ponte, medula e etc. Por este motivo, a POP está amplamente envolvida com diversos distúrbios que afetam o sistema nervoso central.<sup>58,62,63</sup>

A diminuição da atividade da prolil oligopeptidase no soro tem sido observada em pacientes com diferentes estágios de depressão ou bulimia nervosa e anorexia. Alguns hormônios e neuropeptídios envolvidos na fisiopatologia de depressão e transtorno bipolar, como B-endorfina, substância P, arginina e vasopressina, são conhecidos por serem substratos da enzima POP. Em contraste, pacientes que

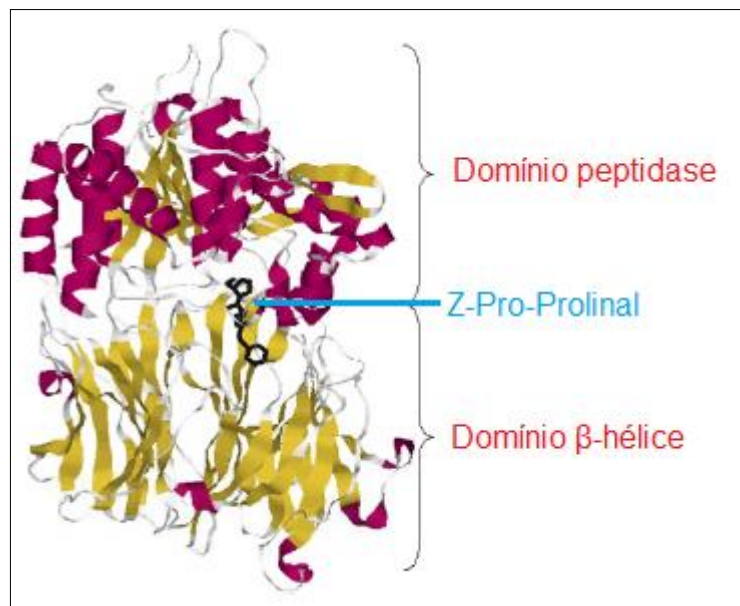
sofrem de esquizofrenia ou outras doenças psicóticas apresentam os níveis séricos de prolil oligopeptidase superiores aos pacientes não afetados. Os medicamentos receitados hoje em dia para o tratamento de ambas as patologias tentam restaurar os níveis da POP no soro do paciente, por exemplo, o antidepressivo fluoxetina e o fármaco anti-mania valproato são utilizados hoje para restaurar a atividade da enzima POP a níveis normais.<sup>60,62,64,65,66</sup>

Além disso, baixos níveis da substância P são comumente encontrados em pacientes que sofrem da doença de Alzheimer, e a administração da substância P tem sido relatada para bloquear  $\beta$ -amilóides, pequenos fragmentos de proteínas que podem bloquear a sinalização entre as células nas sinapses e podem induzir neurotoxicidade.<sup>60</sup>

Por isso, tem sido postulado que inibidores da POP podem trazer benefícios para pacientes com distúrbios cognitivos. Na verdade, inibidores da POP foram utilizados para reverter amnésia em ratos e melhorar a cognição em ratos idosos. Além disso, inibidores da POP têm sido utilizados para evitar a deposição de  $\beta$ -amilóides no cérebro de ratos.<sup>60,67,68</sup>

Devido às várias doenças às quais a POP está intimamente relacionada, a busca por inibidores desta enzima é extremamente importante. Vários inibidores, principalmente baseados no aminoácido prolina, têm sido desenvolvidos sinteticamente, como, por exemplo, o Z-Pro-Prolinal (**141**), S-17092-1 (**142**), JTP-4819 (**143**) e Y-29794 (**144**). A presença da prolina nestes inibidores é importante devido ao fato de que a POP reconhece especificamente peptídeos contendo este aminoácido.<sup>58,63,66</sup>

Através da utilização da cristalografia e estrutura resolvida de alta resolução, foi possível determinar os princípios gerais de inibição. Concluiu-se que os 710 aminoácidos estão complexados com o inibidor benziloxycarbonil-Prolil-Prolinal (Z-Pro-Prolinal ou ZPP, **141**), que a POP tem uma forma cilíndrica, altura de 60 Å, diâmetro de 50 Å e consiste em dois domínios. O domínio peptidase é formado por N e C terminal (resíduos 1-72 e 428-710) contendo a tríade catalítica e organizado da maneira dobra  $\alpha/\beta$ -hidrolase. O domínio sete-lâminas  $\beta$ -hélice (resíduos 73-427) está disposta radicalmente em torno do túnel central, onde o sítio ativo está localizado (Figura 8).<sup>58</sup>



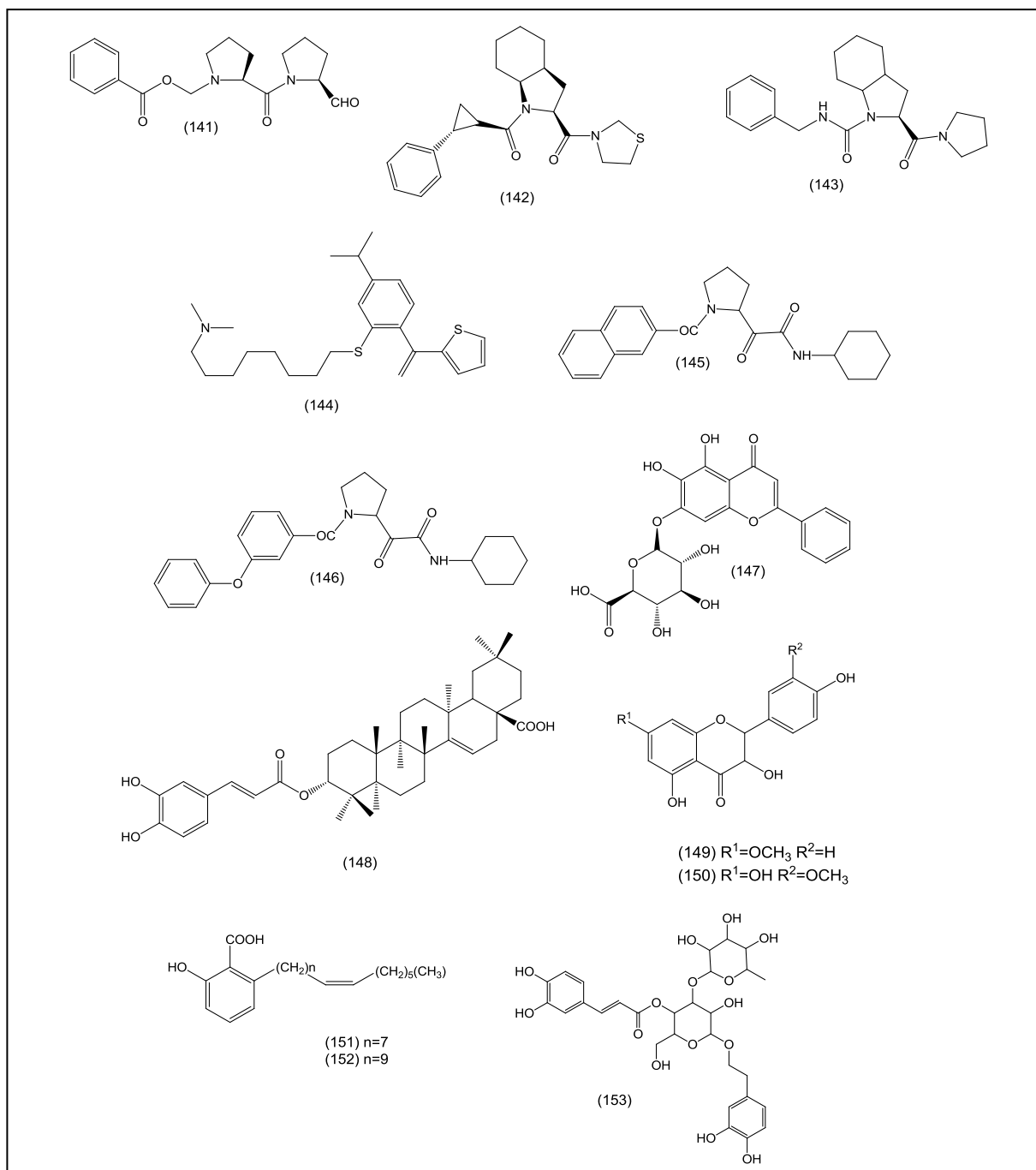
**Figura 8:** Estrutura tridimensional da prolil oligopeptidase com o inibidor Z-Pro-Prolinal (**141**), adaptado de Horsman *et al.* (2007).<sup>58</sup>

Vários inibidores naturais têm sido encontrados para a POP. Em 1991, estudo *in vivo* e *in vitro* relataram que a bactéria *Streptomyces viridochromogenes* produz um potente inibidor da POP, com IC<sub>50</sub> de 0,03 µg/mL, o postadin. Em 1996, Tsuda *et al.* propuseram a síntese de análogos do postadin e dois destes compostos (**145-146**) apresentaram IC<sub>50</sub> na razão de ng/mL.<sup>69,70</sup>

Em 2008, Tarragó *et al.* isolaram o flavonóide baicalina (**147**) das raízes da *Scutellaria baicalensis*, e este composto se mostrou um potente inibidor da POP. Em 2010, Marques *et al.* relataram o isolamento de alguns flavonóides da planta *Scutellaria racemosa* Pers, a hispidulina (4',5,7-tri-hidroxi-6-metoxiflavona) e o oroxilosídeo (oroxilina A 7-O-glucuronida), que apresentaram atividade inibitória seletiva da POP.<sup>71,72</sup>

Recentemente, foram isolados inibidores extraídos do vinho, queijo, peixe, folhas da *Gingko biloba* e partes aéreas de *Tamarix hispida* Wild, tais como o terpeno pentacíclico ácido 3α-(3'',4''-diidroxil-*trans*-cinamoiloxi)-D-friedolan-14-en-28-oico (**148**), a rhamnocitrina (**149**) e a isorhmetina (**150**), isolados da *Tamarix hispida* Wild; e os ácidos 6-(8'Z-pentadecenil)salicílico (**151**) e o 6-(10'Z-heptadecenil)salicílico (**152**) isolados da *Gingko biloba*.<sup>22</sup>

Em 2012, Filho *et al.* isolaram o fenilpropanoide verbascosídeo (**153**) da planta *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng e relataram que este composto inibiu significativamente a POP de maneira dose-dependente.<sup>73</sup>



**Figura 9:** Inibidores **141 – 153** da prolil oligopeptidase (POP).

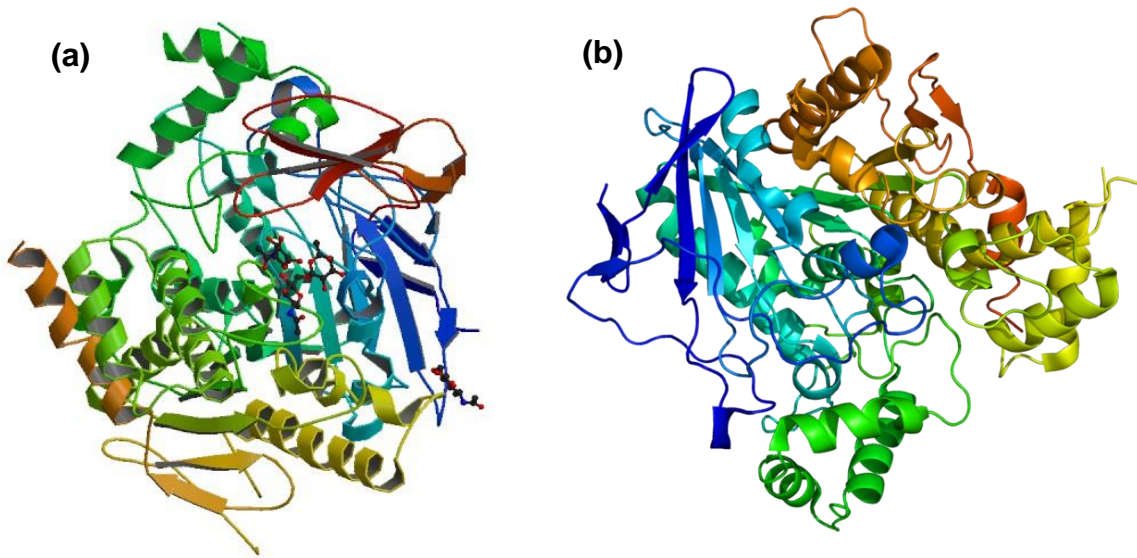
### 3.3.1.2 Acetilcolinesterase (AChE) e Butirilcolinesterase (BChE)

Colinesterases são enzimas presentes em vários tecidos colinérgicos e não colinérgicos, no plasma e em outros fluidos corporais. Eles são divididos em duas classes de acordo com o tipo de substrato, o comportamento em excesso do substrato, órgãos de origem e a sensibilidade na presença de determinados inibidores: acetilcolinesterase ou "colinesterase verdadeira" (AChE, EC 3.1.1.7) e butirilcolinesterase (BChE ou BuChE, EC 3.1.1.8), também conhecida como pseudocolinesterases, colinesterase não específica ou simplesmente colinesterase.<sup>74,75,76</sup>

Ambas as enzimas são classificadas como serinas hidrolases, sendo que a AChE é responsável pela rápida catálise da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) restante no espaço sináptico em colina e ácido acético e pela ligeira diminuição da taxa de hidrólise da propionilcolina. Em contraste, a BChE mostra-se pouco eficiente na catálise da hidrólise destas acilcolinas, porém é bastante eficiente na catálise da hidrólise de substratos com grupos acil maiores, como a butirilcolina (liberando tiocolina e butirato), a benzoilcolina e a succinilcolina.<sup>74,75,77</sup>

A AChE é conhecida por ser abundante no sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP), cérebro, músculo e membrana dos eritrócitos, enquanto que a BChE é encontrado no SNC durante o desenvolvimento e apresenta uma alta atividade no fígado (onde é sintetizada), intestino, coração, rins e pulmões. Ambas as enzimas são encontradas no plasma em maior ou menor quantidade.<sup>74,75,78</sup>

A BChE e a AChE possuem uma homologia de 65% em sua sequência de aminoácidos, e seus sítios ativos são bastante semelhantes, o sítio ativo da AChE é composto pela tríade catalítica de aminoácidos Ser 200, His 440 e Glu 327 e o sítio ativo da BChE é composto por Ser 198, His 438 e Glu 325. Essa ampla homologia sugere que os genes dessas enzimas possam ter surgido da evolução de um mesmo precursor. Ambas são glicoproteínas e possuem um resíduo de aminoácido Serina no sítio ativo que é essencial para suas atividades catalíticas, pois realiza a hidrólise do substrato (Figura 10).<sup>74,76,79,80</sup>



**Figura 10:** (a) Estrutura tridimensional da acetilcolinesterase (AChE), (b) Estrutura tridimensional da butirilcolinesterase (BChE), retirado do banco de dados de proteínas PDB (Protein Data Bank).<sup>81</sup>

O Substrato da AChE, a acetilcolina (ACh), é um dos neurotransmissores mais estudados no SNC e no SNP, sendo sintetizado a partir de acetil coenzima A (acetil CoA), formado durante a respiração celular, e da colina, um importante produto do metabolismo dos lipídeos. É importante nas funções desempenhadas pelo SNC e tem sido associada com as funções cognitivas, processamento de informações sensoriais, organização cortical do movimento e controle do fluxo sanguíneo cerebral. A hidrólise deste neurotransmissor pela AChE na fenda sináptica é necessária para interromper a transmissão de impulsos nervosos e evitar a transmissão excessiva de ACh, que produziria uma sobre-estimulação do músculo e, como consequência, debilidade e cansaço.<sup>77,80,82</sup>

Já as funções fisiológicas da BChE durante muito tempo foram incertas, porém, estudos recentes sugerem que ela tenha uma participação nos mais diversos processos fisiológicos. A BChE está presente em regiões do cérebro onde a AChE não é encontrada, como por exemplo nas células endoteliais dos capilares, nas células da glia e nos neurônios, o que sugere que a BChE atua como um substituto da AChE, mantendo e regulando a transmissão colinérgica quando esta enzima está ausente ou com sua atividade comprometida. A BChE possui ainda uma importância toxicológica e farmacológica, como por exemplo na hidrólise do relaxante muscular

usado em cirurgias, a succinilcolina, que quando não é eliminado do organismo pode causar apneia e levar a morte do paciente.<sup>74,76,83,84</sup>

Existem evidências de que a disfunção cognitiva devido à perda ou diminuição da atividade colinérgica nas áreas principais do cérebro é um processo biológico normal associado ao envelhecimento, bem como algumas formas de doenças neurodegenerativas progressivas, tal como a doença de Alzheimer (DA). Diversos estudos demonstram que o declínio da atividade colinérgica pode ser melhorado por agentes que restaurem ou melhorem a transmissão colinérgica na fenda sináptica. Estratégias terapêuticas atuais para o tratamento sintomático da doença de Alzheimer e de outras doenças relacionadas se destinam a reforçar o déficit colinérgico associado pela inibição da AChE, resultando no aumento do nível de acetilcolina no cérebro, e uma melhoria da função cognitiva. Embora a BChE ainda não tenha sido diretamente relacionada com estas desordens neurodegenerativas, observou-se que o nível desta enzima em pacientes com DA encontra-se aumentado, o que sugere que ambas as enzimas podem ser importantes para o tratamento de déficit cognitivo.<sup>85</sup>

A doença de Alzheimer é uma desordem neurodegenerativa que afeta a memória e outras funções cognitivas, como a comunicação. Hoje, a DA afeta cerca de 13 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo responsável por cerca de 60% do número total de casos de demência entre pessoas acima dos 65 anos.<sup>86,87</sup>

Atualmente, existem alguns inibidores anticolinesterásicos para o tratamento da DA: a donepezila (**154**) e a galantamina (**155**), inibidores altamente seletivos para AChE, e a rivastigmina (**156**), a tacrina (**157**) e a fisostigmina/eserina (**158**) inibidores duais da AChE e BChE. Destes, apenas a fisostigmina (**158**), alcalóide primeiramente isolado da espécie *Physostigma venenosum*, não é mais utilizada clinicamente devido ao seu curto tempo de meia vida, de aproximadamente 30 minutos.<sup>88,89</sup>

O cloridrato de donepezila (**154**) (Aricept®) é uma droga com uma atividade anticolinesterásica potente e seletiva, foi aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration) em 1996 e tornou-se o inibidor de AChE mais prescrito. O donepezila é uma piperidina inibidora reversível e seletiva da AChE, demonstrou ser 1000 vezes mais seletivo para a AChE do que BChE.<sup>90</sup>

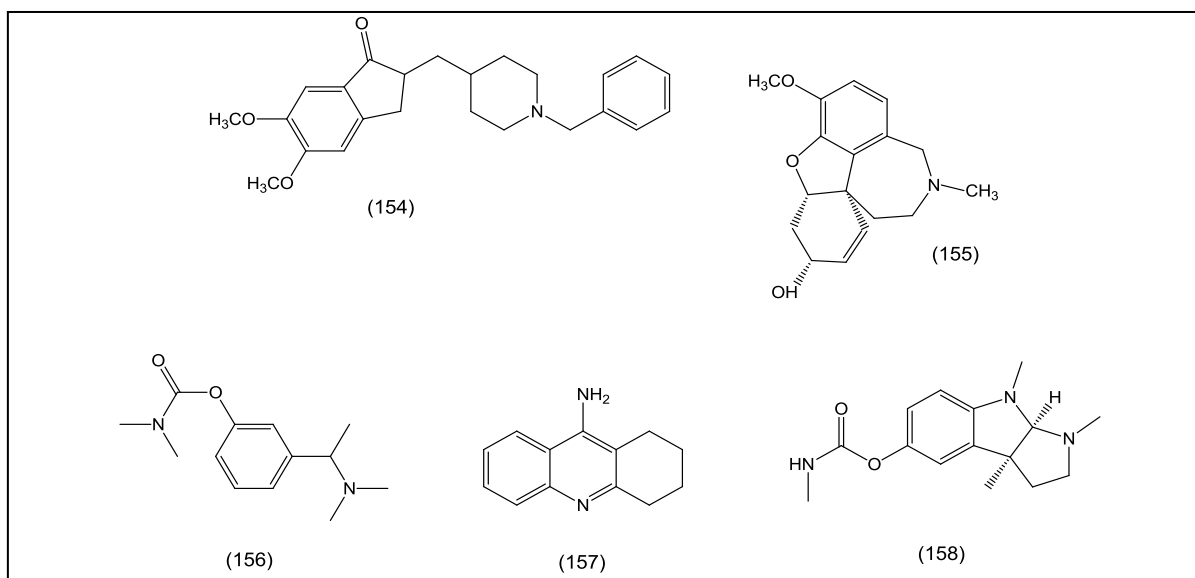
A galantamina (**155**) é um alcalóide terciário e uma das mais novas drogas anticolinesterásicas no mercado. Foi primeiramente isolada de espécies de



*Galanthus nivalis*. Em 1996, foi lançada no mercado com o nome comercial de Nivalin® para o tratamento de DA e, posteriormente, renomeada como Reminyl®.<sup>90</sup>

O tartarato de rivastigmina (**156**) (Exelon®) é um derivado de carbamatos, inibidor pseudo-irreversível da AChE. A droga foi aprovada pelo FDA para o tratamento sintomático dos níveis leve e moderado da DA em 2000.<sup>90</sup>

A tacrina (**157**) (Cognex®) foi a primeira droga aprovada pela FDA para o tratamento dos níveis leve a moderado da DA em 1993. Este fármaco é uma aminoacridina ativa e um inibidor reversível de AChE. Apresenta o mesmo tipo de inibição contra BChE.<sup>90</sup>



**Figura 11:** Inibidores **154 – 158** da AChE e BChE.

Estimativas apontam que em 2050, uma em cada 85 pessoas sofrerá da doença de Alzheimer e uma vez que todos os fármacos hoje no mercado apresentarem efeitos colaterais, tais como náuseas, vômitos, cólicas abdominais, sudoreses e hepatotoxicidade significativa, fica evidente a necessidade de novos fármacos mais potentes, menos tóxicos e mais seletivos para cura desta enfermidade.<sup>91</sup>

### 3.3.2 Atividade Antimicrobiana

O consumo de mais de uma tonelada diária de antibióticos em alguns países tem resultado na resistência de populações de bactérias e fungos, causando assim um sério problema de saúde pública em todo o mundo. A resistência as drogas é um dos casos mais bem documentados de evolução biológica e é um fenômeno ecológico que ocorre como resposta da bactéria e do fungo frente ao amplo uso de antibióticos e a presença descontrolada destes no meio ambiente.<sup>92,93</sup>

As bactérias são consideradas micro-organismos de alta capacidade de adaptação, uma vez que se multiplicam rapidamente e sofrem mutações, podendo trocar de material genético entre linhagens da mesma espécie ou de espécies diferentes, ocorrendo, muitas vezes, trocas de materiais entre organismos patogênicos e não patogênicos.<sup>93,94</sup>

A busca por novos fármacos antimicrobianos é de extrema importância devido ao fato de que doenças infecciosas são a segunda maior causa de mortalidade no mundo, sendo responsável por 98% da mortalidade infantil em países em desenvolvimento. Outro fator é o surgimento de micro-organismos patogênicos cada vez mais resistentes e de infecções oportunistas fatais associadas à AIDS, quimioterapia antineoplásica e transplantes.<sup>95,96</sup>

Atualmente, existem várias técnicas para determinar a atividade antimicrobiana e antifúngica de compostos, os mais conhecidos são método de difusão e diluição. Os ensaios de difusão incluem difusão em ágar ou difusão em placa, difusão em disco e bioautografia, já os ensaios de diluição incluem em ágar, microdiluição em caldo (utilizando microplacas) ou macrodiluição (utilizando tubo de ensaio), sendo estes dois últimos utilizados para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração letal mínima (CLM).<sup>96,97</sup>

O método de CIM representa a menor concentração testada do composto que inibe o crescimento de micro-organismos em um determinado período de tempo, ou seja, é bacteriostático ou fungistático. O método CLM é a menor concentração da substância que alcança uma redução maior que 99,9% do número de unidades formadoras de colônia (UFC), ou seja, é a menor concentração de uma substância capaz de matar os micro-organismos, é bactericida ou fungicida.<sup>96,97</sup>

As técnicas de microdiluição utilizadas hoje em dia através do uso de microplacas de 96 poços são relativamente baratas e possuem alta reprodutibilidade, sendo 30 vezes mais sensíveis que outros métodos encontrados na literatura. Estas técnicas também possibilitam a utilização de uma pequena quantidade de amostra permitindo assim, testar um grande número de compostos em um único ensaio. Estes testes *in vitro* são basicamente utilizados para dar a correlação da dose de um determinado bactericida ou fungicida capaz de trazer a cura de doenças infecciosas *in vivo*.<sup>96,97,98</sup>

### 3.3.2.1 Micro-organismos Patogênicos

Um dos principais motivos para estudar os micro-organismos é compreender as doenças que eles causam e a maneira como podemos controlá-las. Infelizmente, a relação entre muitos micro-organismos e as doenças causadas por eles não é simples. A maioria dos micro-organismos não causa uma única doença bem definida, em vez disso é mais comum um determinado micro-organismo produzir muitos tipos de doença, tal como o *Staphylococcus aureus* que causa endocardite, pneumonia, infecções de feridas, intoxicação alimentar, entre outras. Muitos organismos também podem produzir a mesma doença como, por exemplo, a meningite que é causada por vírus, bactérias, fungos e parasitas.<sup>97</sup>

Além disso, relativamente poucas bactérias podem ser classificadas sempre como patogênicas, embora algumas pertençam a esta categoria, em vez disso, a maioria dos micro-organismos é capaz de estabelecer doença somente sob circunstâncias bem definidas, assim como os sintomas também podem variar de suaves até a morte, dependendo das condições.<sup>97</sup>

*Staphylococcus aureus* pertence ao gênero *Staphylococcus* e é uma bactéria Gram-positiva considerada oportunista, sendo uma das causas mais comuns de infecções que acometem o homem, principalmente após cirurgias.<sup>97,99</sup>

*Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* são bactérias Gram-positivas pertencentes ao gênero *Bacillus* que é encontrado basicamente no solo, água, matéria orgânica animal e vegetal nas condições mais variadas de temperatura, umidade e pH. A *Bacillus subtilis* causa intoxicação alimentar, bacteremia, endocardite e infecções

respiratórias e a *Bacillus cereus* é responsável pelas mesmas patologias além de necrose ou gangrena em partes moles, meningite, pneumonia, osteomielite e endoftalmite.<sup>97,100</sup>

*Enterococcus spp.* é também uma bactéria Gram-positiva que pode ser encontrada no intestino e trato genital feminino, sendo relacionada com doenças como meningite, endocardite, infecção do trato urinário e intra-abdominais, infecção pélvica e peritonite.<sup>94,97</sup>

O gênero *Enterobacter* compreende o maior e mais homogêneo gênero de bactérias Gram-negativas de importância médica. Estão presentes no trato gastrointestinal de humanos e animal, na água, solo e vegetais. Alguns também são considerados enteropatógenos por causarem preferencialmente infecções gastrointestinais como a *Salmonella typhi*. Fazem parte deste gênero a *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii*, *Shingella sonnei* e *Escherichia coli*, sendo a última uma bactéria anaeróbica facultativa comum na flora intestinal, porém pode causar infecções principalmente no sistema urinário, aparelho digestivo e meningites.<sup>97,101</sup>

Os bacilos Gram-negativos *Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas aeruginosa* fazem parte de um grupo de bactérias muito grande e que são classificadas como não fermentadores. São de grande importância nos casos de infecções hospitalares, pois apresentam resistência frente a vários antibióticos e são capazes de causar graves infecções.<sup>97</sup>

Os fungos são, nas últimas décadas, os principais causadores de doenças humanas, especialmente entre aqueles indivíduos que estão imunocomprometidos ou hospitalizados com graves doenças, como câncer e diabetes. Entre esses grupos de pacientes, os fungos atuam como patógenos oportunistas, causando considerável morbidade e mortalidade. Desta forma, ao contrário das bactérias, os fungos sempre podem ser considerados como micro-organismos patogênicos.<sup>97,102</sup>

*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* e *Candida parapslosis* pertencem ao gênero *Candida* que é o gênero mais comum de fungos que ataca o corpo humano. A *Candida albicans* faz parte da microbiota normal do trato intestinal, mas pode ser um patógeno oportunista das regiões mucocutâneas, trato intestinal e genital, principalmente em mulheres.<sup>97,102,103</sup>

*Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gatti* são leveduras basidiomicéticas causadoras da criptococose, que é uma infecção fúngica sistêmica

oportunista comum em pacientes imunocomprometidos e que acaba gerando lesões principalmente no SNC, em particular nas meninges.<sup>97</sup>

*Saccharomyces cerevisiae* pertence ao gênero *Saccharomyces* e é comumente utilizada na fermentação alcoólica. Este gênero pode colonizar mucosas gastrointestinais, respiratórias e urinárias em pacientes com doenças subjacentes. Contudo, infecções fúngicas raras são incomuns embora tenham aumentado ao longo do tempo. Sua associação com outras leveduras (especialmente *Candida*) está também descrita na literatura, apresentando desta forma, altas taxas de mortalidade.<sup>97,104</sup>

### 3.3.3 Atividade Antitumoral

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), câncer é um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se por metástase para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas que podem se espalhar para todo o organismo do paciente.<sup>105</sup>

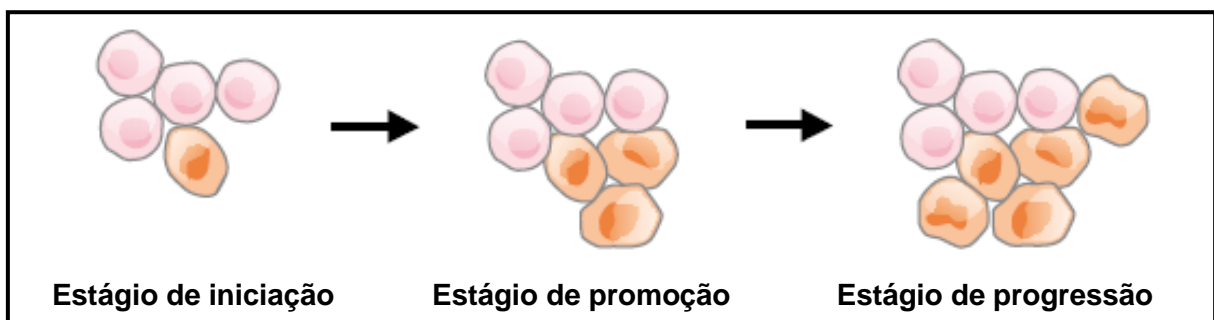
Atualmente, o câncer é um problema de saúde pública tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, uma vez que esta patologia é responsável por 12% das mortes anuais em todo o mundo. As maiores taxas de incidência de câncer ainda encontram-se nos países desenvolvidos, onde uma a cada cinco pessoas morrem de câncer. Pesquisas apontam que o número de novos casos de câncer chegará em 27 milhões no ano de 2030.<sup>106,107</sup>

No Brasil, o câncer é a segunda maior causa de mortalidade, sendo que em 2011 foi responsável por 15,1% da taxa de mortalidade no país. Em relação ao tipo de câncer, o mais comum no Brasil é o câncer de pele do tipo não-melanoma, seguido de próstata, pulmão, colón e reto e de estômago para homens e cânceres de colo do útero, mama, colón e reto e da glândula tireóide para as mulheres.<sup>105,108</sup>

A neoplasia, nome científico do câncer ou tumor maligno que significa “novo crescimento”, diferencia-se das células normais devido ao fato de que o crescimento

ou proliferação persiste mesmo em condições desfavoráveis ao crescimento. Porém, para que as células se tornem malignas não basta elas crescerem em excesso, elas devem invadir outros tecidos e formar novos tumores. Por isso, considera-se que uma célula tumoral deve ter certas características, tais como perda do controle de proliferação e da divisão celular; imortalização celular, devido à ativação da enzima telomerase; presença de alterações nos cromossomos; perda de função e da capacidade de diferenciação ou especialização; capacidade para invadir o tecido vizinho e formar metástase e capacidade de induzir a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese).<sup>105,109</sup>

A carcinogênese, processo de formação do câncer, é um processo lento, podendo levar de um ano até 30 anos para que uma célula cancerosa prolifere e dê origem a um tumor maligno visível. O processo de carcinogênese passa por três estágios: estágio de iniciação, onde as células encontram-se alteradas geneticamente (mutação genética) devido aos agentes cancerígenos; estágio de promoção, onde as células tornam-se malignas devido aos agentes oncopromotores; e estágio de progressão, onde as células multiplicam-se descontroladamente e invadem outras células (Figura 12).<sup>105,109</sup>



**Figura 12:** Estágios do desenvolvimento de uma carcinogênese, adaptado de INCA.<sup>105</sup>

Embora não se saiba ao certo as causas destas mutações que geram a carcinogênese, fatores externos e internos ao organismo são capazes de influenciar no processo de formação. As causas externas estão relacionadas com o meio-ambiente e os hábitos e costumes próprios, tais como hábitos alimentares, tabagismo, alcoolismo e radiação solar. As causas internas estão principalmente ligadas à capacidade do organismo de se defender destas agressões externas.<sup>105</sup>

Os tratamentos hoje em dia receitados para pacientes com câncer baseiam-se em cirurgias, radioterapias e quimioterapias, porém nenhum destes traz 100% de cura para o paciente e os efeitos colaterais são bastante nocivos ao organismo. Portanto, torna-se urgente a necessidade de encontrar, desenvolver e introduzir novos fármacos e novas modalidades terapêuticas que possam oferecer ao paciente um tratamento mais seguro e eficiente contra essa patologia de graves implicações mundiais.<sup>110</sup>

### 3.3.3.1 Câncer colorretal

O câncer colorretal abrange tumores que acometem um segmento do intestino grosso (cólon) e reto, sendo dividido em aproximadamente 70% no cólon e 30% no reto. Em uma escala global, o câncer colorretal ocupa a terceira posição entre todas as neoplasias malignas mais comumente encontradas, com aproximadamente 500.000 mortes em todo o mundo a cada ano, sendo que as maiores incidências encontram-se na América do Norte, Europa, Austrália e Nova Zelândia, e as menores incidências encontram-se em países menos desenvolvidos na África e América do Sul.<sup>54,105,111,112</sup>

O câncer colorretal é o único câncer que ocorre com igual frequência em homens e mulheres. No Brasil, em 2010 foram registrados 13.344 casos de mortalidade por este tipo de câncer, sendo 6.452 casos em homens e 6.892 em mulheres.<sup>99,113</sup>

Acredita-se que o câncer colorretal esteja relacionado a diversos fatores ambientais, principalmente dietéticos, à predisposição genética e à obesidade. Quando detectado precocemente, antes de se espalhar para outros órgãos, é tratável e na maioria dos casos, curável. Grande parte desses tumores se inicia a partir de pólipos, lesões benignas que podem crescer na parede interna do intestino grosso. Uma maneira de prevenir o aparecimento dos tumores seria a detecção e a remoção dos pólipos antes de eles se tornarem malignos.<sup>105,106</sup>

Quando o tumor já está em estado mais avançado, as principais modalidades terapêuticas adotadas são cirurgias, radioterapias e quimioterapias antineoplásicas. Esta terapia baseada em quimioterapia, inicialmente, foi constituída por um único

antineoplásico, o 5-fluorouracil (5-FU), porém, com o passar dos anos, modificou-se pela adição de outros compostos antitumorais, melhorando assim a resposta clínica dos pacientes e a sobrevida. Nos últimos anos, com o objetivo de melhorar o tratamento do câncer colorretal, foram descobertos dois anticorpos monoclonais (AM) derivados de biotecnologia, o Cetuximabe (Erbix®) e o Bevacizumabe (Avastin®). Estes compostos são imunoproteínas capazes de reconhecer e ligar-se a antígenos tumorais específicos e desencadear respostas imunológicas, poupando células não afetadas e provocando efeitos menos tóxicos ao organismo que a quimioterapia tradicional anteriormente aplicada.<sup>114</sup>

Porém, os fármacos e os tratamentos hoje disponíveis para o tratamento do câncer colorretal ainda não são totalmente satisfatórios devido a pouca eficácia e aos efeitos colaterais. Por isso, vários estudos têm sido feitos a respeito de fármacos que inibam o crescimento das células tumorais pela indução da apoptose (morte celular programada) e esta vem se tornando cada vez mais uma importante estratégia de defesa contra a progressão deste tipo de câncer.<sup>115</sup>

### 3.3.3.2 Ensaio de citotoxicidade

Para o desenvolvimento de fármacos anticâncer, o potencial de citotoxicidade dos compostos de interesse é avaliado frente a diferentes linhagens de células tumorais, sendo seus efeitos avaliados por parâmetros que incluem desde a morte celular até a alteração de seu metabolismo. O teste de citotoxicidade *in vitro* em linhagens de células tumorais tem se tornado cada vez mais importante para a avaliação de fármacos anticâncer, sendo também muito utilizados como um método alternativo aos testes farmacológicos *in vivo* em que se utilizam órgãos isolados ou animais vivos, como camundongos.<sup>116,117</sup>

Dentro deste contexto de análise citotóxica *in vitro*, existem os métodos colorimétricos que quantificam indiretamente a proliferação celular de células em cultura através do aparecimento ou mudança de coloração e são considerados rápidos e baratos para a avaliação de atividade antitumoral. Dos quimioterápicos utilizados hoje nos tratamentos contra o câncer, a maioria foi selecionada por sua capacidade de controlar a proliferação celular.<sup>110,118,119</sup>



Um destes métodos colorimétricos mais comumente utilizado na avaliação da proliferação e citotoxicidade ( $IC_{50}$ ) é o teste chamado MTT, descrito por Mosmamm em 1983.<sup>120,121</sup>

O teste MTT é baseado na redução do sal de tetrazolium (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), hidrossolúvel e de coloração amarelada, por enzimas mitocondriais em um composto de coloração roxo-azulado, o formazan, insolúvel em água, e que fica armazenado no citoplasma celular. Desta forma, a reação apenas irá ocorrer com células vivas e que estejam com suas mitocôndrias ativas, sendo a formação de formazan proporcional a estas células.<sup>120,121,122</sup>

A proliferação celular também pode ser quantificada através da medição do teor de DNA dupla-fita com o corante DNA PicoGreen, um reagente fluorescente e estável que quantifica indiretamente a quantidade de células tumorais. Outras opções de testes utilizados para a avaliação da citotoxicidade e proliferação baseados em corantes são Cristal violeta, Alamar Blue, SRB (sulforrodamina B), azul de tripan (baseia-se na perda de integridade da membrana celular das células não viáveis causando a captação do corante) e CyQuant, sendo este último conhecido como corante cianina.<sup>119,122</sup>

A citometria de fluxo também pode ser utilizada como método para a contagem de células e pode ser realizada juntamente com os ensaios anteriores para a obtenção de resultados mais precisos. Outro ensaio de quantificação é utilizando a enzima intracelular lactato desidrogenase (LDH), que serve para quantificar dados com relação à morte ou inibição do crescimento celular.<sup>119,123</sup>

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 Equipamentos Utilizados

#### 4.1.1 Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram obtidos em espectrômetro da marca Bruker DPX-400 (operando a 400,13 MHz para  $^1\text{H}$  e 100,62 MHz para  $^{13}\text{C}$ ) e Bruker DPX-200 (operando a 200,13 MHz para  $^1\text{H}$  e 50,32 MHz para  $^{13}\text{C}$ ), ambos no Departamento de Química – UFSM. As amostras foram preparadas em tubos de 5 mm de diâmetro usando como solvente clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) ou dimetilsulfóxido deuterado ( $\text{DMSO}-d_6$ ), adquiridos pela Sigma-Aldrich.

Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) nos espectros de hidrogênio foram medidos em ppm (parte por milhão), em relação a um padrão interno de TMS (tetrametilsilano,  $\delta = 0$  ppm), colocando-se entre parênteses a multiplicidade (s = singlete, d = dubleto, t = tripleto, dd = duplo dubleto, m = multiplete), o número de hidrogênios deduzidos da integral relativa e a constante de acoplamento ( $J$ ) expressa em Hertz (Hz). Nos espectros de carbono o próprio solvente foi o padrão ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta = 77,0$  ppm;  $\text{DMSO}-d_6$ ,  $\delta = 39,5$  ppm).

Os espectros de RMN 2D Homonuclear (COSY) e Heteronuclear (HSQC) foram realizados conforme parâmetros de aquisições fornecidos pelo aparelho Bruker e processados pelo *software* Top Spin 1,3 da Bruker.

#### 4.1.2 Aparelho de Ponto de Fusão

Para a determinação do ponto de fusão das substâncias sintetizadas foi utilizado o aparelho MQAPF-302 Digital da marca MicroQuímica (NPPN - UFSM).

#### 4.1.3 Aparelho de Rotação Óptica Específica, Polarímetro

Para realizar o estudo de rotação óptica das substâncias foi utilizado um polarímetro da marca Perkin Elmer, modelo 343 com lâmpada de sódio de 589 nm, tubo de 100 mm e temperatura de 20 °C. As análises foram realizadas no LAQIA-UFSM.

#### 4.1.4 Espectrofotômetro

As leituras de fluorescência e absorbância nas atividades com as enzimas prolil oligopeptidase, acetilcolinesterase e butirilcolinesterase foram realizadas em um espectrofotômetro com leitor de microplacas da marca SpectraMax M2 (Molecular Devices Inc., USA) utilizando os comprimento de onda de excitação e emissão 360/40 e 485/20 nm para as leituras de fluorescência da POP, respectivamente. Para as leituras de absorbância da AChE o comprimento de onda foi 405 nm. O programa utilizado para a análise dos resultados obtidos foi o SoftMaxPro 5.4.1. Todos os ensaios foram feitos no NPPN – UFSM.

### 4.2 Reagentes e solventes utilizados

Os compostos estigmasterol, cloroformato de estigmasterila e ácido ursólico, assim como o aminoácido *L*-Prolina e seus derivados, H-prolina-OMe, N-Boc-4-N-Fmoc-amino-*L*-prolina e H-prolina-CN (Pirrolidina-2-carbonitrila), foram obtidos comercialmente pela Sigma-Aldrich.

Os aminoácidos protegidos, Fmoc-*L*-alanina, Fmoc-*L*-glicina, Fmoc-*L*-cisteína(tBu)-OH e Boc-*L*-glutâmico(OBz)-OH também foram obtidos comercialmente da Sigma-Aldrich.

Os reagentes de síntese como trietilamina (TEA), N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), N,N'-diisopropiletilamina (DIEA), Cloreto de Bis(2-

oxo-3-oxazolidinil)fosfônico (BOP-Cl), cloreto de 9-fluorenilmetiloxycarbonil (Fmoc), dicarbonato de di-*terc*-butila (Boc<sub>2</sub>O), 4-dimetilaminopiridina (DMAP) e cloreto de oxalila, foram adquiridos pela Sigma-Aldrich, Merck ou Fluka, e não foram purificados.

Os demais solventes e reagentes foram de qualidade p.a. ou de nível técnico com tratamento para remoção de possíveis contaminantes e umidade.<sup>124</sup>

### **4.3 Métodos Cromatográficos Utilizados**

#### **4.3.1 Cromatografia em coluna (CC)**

A maioria das substâncias sintetizadas foi purificada em cromatografia em coluna. As dimensões das colunas utilizadas foram de acordo com a quantidade de amostra, os solventes para eluição foram puros ou em gradiente de polaridade e a sílica gel utilizada como suporte sólido foi sílica-gel F60 (Silicycle) 230-400 mesh.

#### **4.3.2 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)**

A cromatografia em camada delgada preparativa foi realizada para a purificação de compostos em pequena quantidade (< 100 mg). As placas preparativas foram realizadas no laboratório pela deposição de uma camada de sílica gel SilicaFlash C60 (Silicycle) 5-40 µm em placas de vidro de 20cm<sup>2</sup>.

#### **4.3.3 Cromatografia em camada delgada (CCD)**

A cromatografia em camada delgada foi utilizada para o acompanhamento das reações e avaliação do grau de pureza dos compostos. A técnica foi realizada

em cromatofolhas de alumínio como suporte e sílica gel 60 F<sub>254</sub> (MERCK e Sorbent Technologies) como adsorvente.

A identificação dos compostos foi realizada através da irradiação de luz UV ( $\lambda$  = 254 e 365 nm) e utilização de reveladores como: anisaldeído, ninidrina e *orto*-toluidina.

## 4.4 Procedimentos de Síntese

### 4.4.1 Síntese dos aminoácidos protegidos

#### 4.4.1.1 *terc*-Butiloxicarbonil-*L*-aminoácido (Boc-aa)

A proteção do aminoácido com Boc (*terc*-butiloxicarbonil) foi realizada seguindo a metodologia descrita por Bodanszky.<sup>125</sup> Em um balão de 100 mL contendo 0,01 mol do aminoácido dissolvidos em 20 mL de dioxano, 10 mL de água e 10 mL de NaOH 1N, sob agitação e temperatura de aproximadamente 0 °C, adicionou-se 2,4 g (11 mmol) de dicarbonato de di-*terc*-butila. Posteriormente, a reação foi agitada à temperatura ambiente por 3 h.

A reação foi acompanhada por CCD com clorofórmio:metanol (9:1) como eluentes.

Após, a mistura reacional foi concentrada à vácuo até um volume de aproximadamente 10 – 15 mL, resfriada em banho de gelo, adicionado 30 mL de acetato de etila e acidificada com solução diluída de KHSO<sub>4</sub> até pH 2-3. Então, a fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 x 15 mL) e a fase orgânica resultante lavada com água (2 x 30 mL) e seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. O solvente foi evaporado em evaporador rotatório e o óleo formado foi cristalizado com acetato de etila:hexano (1:1). O produto foi obtido na forma de um sólido branco com aproximadamente 70% de rendimento (PF = 128,6 – 130,1 °C).

#### 4.4.1.2 9-Fluorenilmetiloxycarbonil-*L*-aminoácido (Fmoc-aa)

A proteção do aminoácido com Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonil) foi realizada seguindo a metodologia descrita por Bodanszky.<sup>125</sup> Inicialmente, 8,69 mmol do aminoácido e 50 mL de diclorometano foram adicionados a um balão de 100 mL acoplado com condensador de refluxo e manta de aquecimento. Sob agitação vigorosa, adicionou-se 2,206 mL (17,38 mmol) de TMS-Cl. A mistura reacional foi refluxada por aproximadamente 1 h e posteriormente, resfriada em banho de gelo. Após, adicionou-se 2,620 mL (15,06 mmol) de DIEA e 1,49 g (5,79 mmol) de Fmoc-Cl. A agitação permaneceu com resfriamento por 20 minutos e, após este período, a reação foi deixada em repouso à temperatura ambiente por 24 h.

A reação foi acompanhada por CCD com clorofórmio:metanol (9:1) como eluentes.

Após, o solvente foi eliminado e adicionou-se ao resíduo 50 mL de éter etílico e 75 mL de solução de NaHCO<sub>3</sub> 2,5%. As fases foram separadas e a fase aquosa extraída com éter etílico, acidificada e extraída com acetato de etila. A fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, evaporada em evaporador rotatório e o óleo formado foi cristalizado com diclorometano:hexano (1:1). O produto foi obtido na forma de um sólido branco com aproximadamente 60% de rendimento (PF = 84 – 86 °C).

#### 4.4.2 Síntese do dipeptídeo H-prolina-prolina-OMe

A obtenção do dipeptídeo foi realizada em 2 etapas:

1ª Etapa: Em um balão de 100 mL contendo uma solução de 600 mg (2,784 mmol) de Boc-prolina-OH (obtido no item 4.4.1.1) em diclorometano seco, sob agitação e temperatura ambiente, foi adicionado 462 mg (2,784 mmol) de H-prolina-OMe. Posteriormente, a temperatura foi reduzida a aproximadamente 0 °C e foram adicionados 484 µL (2,784 mmol; 0,742 g/mL) de DIEA e 846 mg (3,336 mmol) de BOP-Cl. Após, a mistura reacional foi agitada por 72 h à temperatura ambiente.

A reação foi acompanhada por CCD tendo como eluentes clorofórmio:metanol (9:1).

Após, a reação foi extraída com solução saturada de NaCl (3 x 30 mL). A fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, evaporada a pressão reduzida e purificada em coluna cromatográfica tendo como eluente inicial diclorometano e eluente final metanol (gradiente de polaridade). O produto foi obtido na forma de um óleo amarelado com rendimento de 75,6%.

2ª Etapa: Em um balão de 100 mL, 200 mg (0,551 mmol) do óleo obtido anteriormente foi submetido a reação de remoção do grupo *tert*-butiloxicarbonil com uma solução de 17 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:TFA (1:1). A mistura reacional permaneceu sob agitação à temperatura ambiente por 3,5 h e após, o solvente foi evaporado. Adicionou-se éter etílico ao resíduo e ocorreu a formação de um óleo amarelado que foi purificado por CCDP utilizando diclorometano:metanol (9:1) como eluentes. O produto obtido foi um óleo amarelado com rendimento de 95%.

#### 4.4.3 Síntese dos derivados do estigmasterol (1)

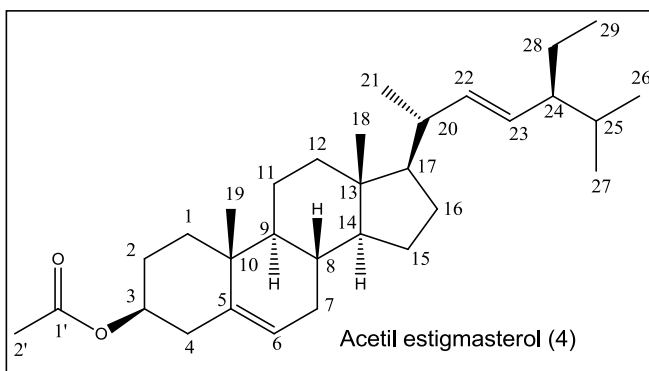
##### 4.4.3.1 Acetil estigmasterol (4)

A acetilação do estigmasterol (1) foi realizada segundo o método descrito por Foley *et al.* (2010).<sup>126</sup> Em um balão de 100 mL, contendo uma solução de 11,45 mL (121,15 mmol) de anidrido acético e 9,75 mL (121,15 mmol) de piridina, adicionou-se lentamente 1,0 g (2,42 mmol) de estigmasterol. A reação permaneceu em agitação, à temperatura ambiente, por cinco dias, sob atmosfera de nitrogênio, e foi acompanhada por CCD com hexano:acetato de etila (5:1) como eluentes.

Após o término da reação, adicionou-se à mistura reacional 200 mL de uma solução de HCl 10% e 50 mL (4x) de acetato de etila. As fases foram separadas e a fase orgânica lavada com 100 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio e 100 mL de solução saturada de cloreto de sódio, seca com sulfato de magnésio, filtrada e evaporada em evaporador rotatório até *secura* para obtenção de um sólido branco cristalino. O rendimento da reação foi de 84,5%.

Dados físicos: Acetil estigmasterol (4): C<sub>31</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub>; 454,73 g/mol; Sólido branco; PF: 138,1 – 139,2; [α]<sub>D</sub> = -54 (c 0,05; CHCl<sub>3</sub>); RMN <sup>1</sup>H (200,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5,36-5,38

(m, 1H, H-6); 5,16 (dd,  $J = 15,2$  e  $8,5$  Hz, 1H, H-22); 5,01 (dd,  $J = 15,2$  e  $8,5$  Hz, 1H,



H-23); 4,52-4,68 (m, 1H, H-3); 2,30-2,34 (m, 2H, H-4a, H-4b); 2,08-2,10 (m, 2H, H-12b, H-20); 2,02 (s; 3H, CH<sub>3</sub>CO); 1,83-1,95 (m, 3H, H-7b, H-1b, H-2a); 1,41-1,67 (m, 10H, H-16a, H-15a, H-25, H-24, H-2b, CH<sub>2</sub>-11, H-7a, H-8, H-28); 1,07-1,25 (m, 6H, H-

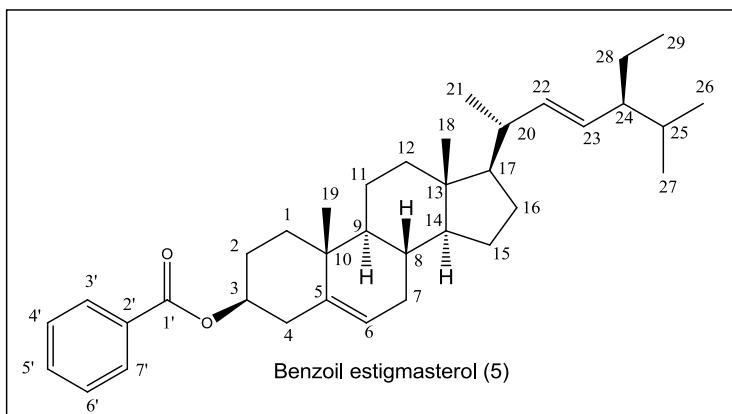
16b, H-12a, H-28, H-17, H-15b, H-1a); 1,03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-21); 1,02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0,93-1,00 (m, 2H, H-14, H-9); 0,86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-26); 0,83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-29); 0,80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-27); 0,69 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18). RMN <sup>13</sup>C (50,32 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 170,24 (C=O); 139,71 (C-5); 138,11 (C-22); 129,41 (C-23); 122,49 (C-6); 73,93 (C-3); 56,81 (C-14); 56,07 (C-17); 51,19 (C-9); 50,17 (C-24); 42,24 (C-4); 42,24 (C-13); 40,23 (C-20); 39,66 (C-12); 38,12 (C-1); 37,01 (C-10); 31,91 (C-8); 31,86 (C-7); 31,79 (C-25); 28,70 (C-2); 27,77 (C-16); 25,25 (C-28); 24,28 (C-15); 21,18 (C-21); 21,10 (CH<sub>3</sub>COO); 21,00 (C-11); 20,85 (C-26); 19,19 (C-27); 18,91 (C-19); 12,03 (C-18); 11,98 (C-29).

#### 4.4.3.2 Benzoil estigmasterol (5)

Em um balão de 50 mL contendo uma solução de 50 mg (0,121 mmol) de estigmasterol (1) e 70 mg (0,57 mmol) de DMAP em 8 mL de piridina seca, adicionou-se 4 mL (34,43 mmol; 1,21 g/mL) de cloreto de benzoíla. A mistura reacional permaneceu sob agitação, à temperatura de aproximadamente 0 °C, por 20 h. Decorrido o tempo reacional, a mistura foi evaporada até aproximadamente metade do volume inicial e resfriada em banho de gelo. Após, adicionou-se 100 mL de etanol e 12 mL de água destilada para que ocorresse a formação de um precipitado que foi, então, filtrado e novamente solubilizado em metanol. Esta mistura permaneceu sob agitação por aproximadamente 1 h a 40 °C. Decorrido este tempo, adicionou-se mais 20 mL de água destilada e filtrou-se o precipitado branco que, por CCD, identificou-se como o produto com rendimento de 64%.



**Dados físicos:** Benzoil estigmasterol (**5**):  $C_{39}H_{52}O_2$ ; 516,8 g/mol; Sólido branco; PF:



154,9 - 157,4 °C;  $[\alpha]_D = -30$  (c 0,05;  $CHCl_3$ ); RMN  $^1H$  (400,13 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 8,04 (d,  $J = 1,3$  Hz, 2H, H-3', H-7'); 7,54 (t,  $J = 14,8$  e 6,2 Hz, 1H, H-5'); 7,42 (t,  $J = 15,2$  e 7,8 Hz, 2H, H-4', H-6'); 5,41-5,42 (m, 1H, H-6); 5,17 (dd,  $J = 15,2$  e 8,5 Hz, 1H,

H-22); 5,03 (dd,  $J = 15,2$  e 8,5 Hz, 1H, H-23); 4,82-4,90 (m, 1H, H-3); 2,46-2,48 (m, 2H, H-4a, H-4b); 1,90-2,06 (m, 4H, H-12b, H-20, H-7b, H-1b); 1,69-1,76 (m, 2H, H-2a, H-16a); 1,41-1,57 (m, 9H, H-15a, H-25, H-24, H-2b,  $CH_2$ -11, H-7a, H-8, H-28); 1,08-1,26 (m, 6H, H-16b, H-12a, H-28, H-17, H-15b, H-1a); 1,04 (s, 3H,  $CH_3$ -21); 1,03 (s, 3H,  $CH_3$ -19); 0,94-1,02 (m, 2H, H-14, H-9); 0,85 (s, 3H,  $CH_3$ -26); 0,82 (s, 3H,  $CH_3$ -29); 0,80 (s, 3H,  $CH_3$ -27); 0,72 (s, 3H,  $CH_3$ -18). RMN  $^{13}C$  (100,62 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 165,97 (C=O); 139,69 (C-5); 138,28 (C-22); 132,66 (C-5'); 130,91 (C-2'); 129,53 (C-3' e C-7'); 129,34 (C-23); 128,23 (C-4' e C-6'); 122,75 (C-6); 74,59 (C-3); 56,83 (C-14); 56,00 (C-17); 51,25 (C-9); 50,13 (C-24); 42,25 (C-4); 40,45 (C-13); 39,67 (C-20); 38,25 (C-12); 37,07 (C-1); 36,69 (C-10); 31,93 (C-8); 31,93 (C-7); 31,88 (C-25); 28,89 (C-2); 27,91 (C-16); 25,39 (C-28); 24,37 (C-15); 21,22 (C-21); 21,05 (C-11); 21,05 (C-26); 19,37 (C-27); 19,00 (C-19); 12,20 (C-18); 12,06 (C-29).

#### 4.4.3.3 Boc-L-prolina-estigmasterol (**6**)

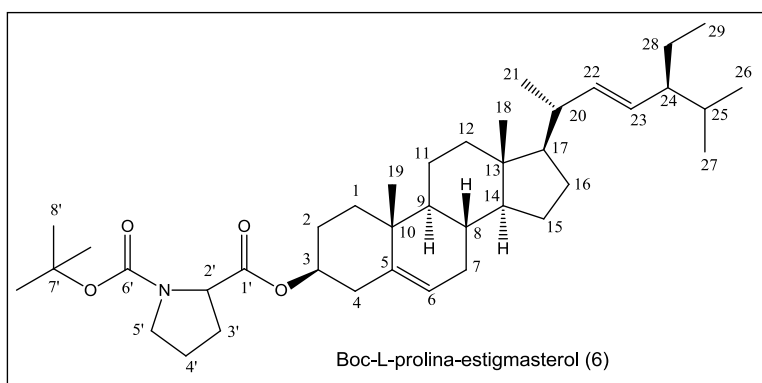
Em um balão de 100 mL, à temperatura ambiente, foram adicionados 200 mg (0,484 mmol) de estigmasterol (**1**), 156 mg (0,726 mmol) de Boc-L-Prolina-OH, 2 mg (0,0163 mmol) de DMAP e 15 mL de diclorometano anidro. A temperatura reacional foi reduzida a 0 °C e uma solução de 198 mg (0,956 mmol) de DCC em diclorometano (2 mL) foi lentamente adicionada.

Após, a mistura foi agitada por 24 h à temperatura ambiente. Durante este período, a reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada tendo como eluentes hexano:acetato de etila (5:1).

Ocorreu a precipitação de um sólido branco (DCU) que foi removido por filtração. O filtrado foi lavado com soluções saturadas de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (30 mL),  $\text{NaHCO}_3$  (30 mL) e  $\text{NaCl}$  (30 mL). A fase orgânica foi seca com  $\text{MgSO}_4$  e evaporada a pressão reduzida, ocorrendo a formação de um precipitado branco impuro.

O produto foi purificado em coluna cromatográfica tendo como eluente inicial hexano e eluente final acetato de etila (gradiente de polaridade). O produto foi obtido com rendimento de 65,1%.

**Dados físicos:** Boc-L-prolina-estigmasterol (**6**):  $\text{C}_{29}\text{H}_{63}\text{NO}_4$ ; 609,92 g/mol; Sólido



branco; PF: 137,2–138,5 °C;  $[\alpha]_D = -66$  (c 0,05;  $\text{CHCl}_3$ ); RMN  $^1\text{H}$  (200,13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 5,35-5,37 (m, 1H, H-6); 5,14 (dd,  $J = 15,2$  e 8,5 Hz, 1H, H-22); 4,99 (dd,  $J = 15,2$  e 8,5 Hz, 1H, H-23); 4,54-4,70 (m, 1H, H-3);

4,14-4,28 (m, 1H, H-2'); 3,33-3,61 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -5'); 2,28-2,31 (m, 2H, H-4a, H-4b); 2,16-2,21 (m, 2H, H-12b, H-20); 1,85-2,00 (m, 7H,  $\text{CH}_2$ -3', H-7b, H-1b, H-2a,  $\text{CH}_2$ -4'); 1,45-1,69 (m, 9H, H-16a, H-15a, H-25, H-24, H-2b,  $\text{CH}_2$ -11, H-7a, H-8); 1,41 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ -8'); 1,11-1,34 (m, 7H, H-28, H-16b, H-12a, H-28, H-17, H-15b, H-1a); 1,02 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -21); 1,01 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -19); 0,92-1,01 (m, 2H, H-14, H-9); 0,84 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -26); 0,81 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -29); 0,79 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -27); 0,68 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -18). RMN  $^{13}\text{C}$  (50,32 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 171,53 (C=O, C-1'); 154,03 (C=O, C-6'); 139,46 (C-5); 138,25 (C-22); 129,35 (C-23); 122,80 (C-6); 79,76 (C-7'); 74,45 (C-3); 59,28 (C-2'); 56,79 (C-14); 55,99 (C-17); 51,24 (C-9); 50,09 (C-24); 46,33 (C-5'); 42,23 (C-4); 40,43 (C-13); 39,65 (C-20); 38,11 (C-12); 36,98 (C-1); 36,63 (C-10); 31,89 (C-8); 31,87 (C-7); 30,97 (C-25); 28,86 (C-2); 28,44 (C-3'); 28,39 (C-8'); 27,85 (C-16); 25,38 (C-28); 24,35 (C-15); 24,27 (C-4'); 23,52 (C-21); 21,21 (C-11); 21,04 (C-26); 19,30 (C-27); 18,99 (C-19); 12,20 (C-18); 12,04 (C-29).

#### 4.4.3.4 Fmoc-L-prolina-estigmasterol (7)

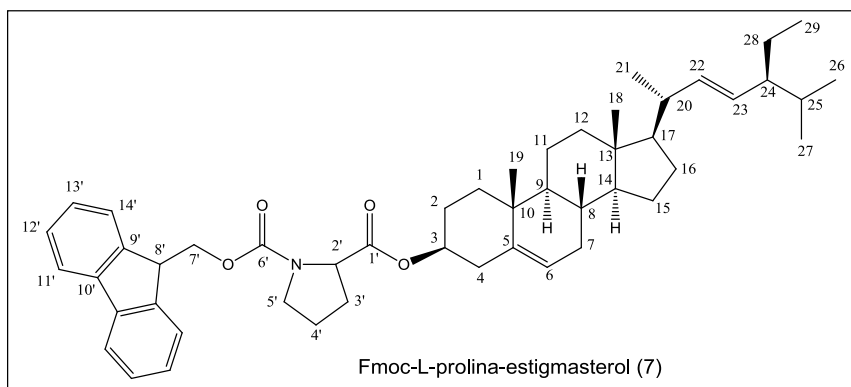
Em um balão de 50 mL contendo uma solução sob agitação de 200 mg (0,484 mmol) de estigmasterol (1) e 5 mL de diclorometano anidro, à temperatura ambiente, foi adicionado 198 mg (0,588 mmol) de Fmoc-L-prolina-OH. A temperatura da reação foi reduzida a 0 °C e 180 µL (1 mmol; 0,742 g/mL) de DIEA e 150 mg (0,588 mmol) de BOP-Cl foram adicionados.

A reação foi agitada por 72 h a aproximadamente 0 °C e após, lavada com solução saturada de NaCl (2 x 30 mL). A fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e evaporada a pressão reduzida. O sólido obtido foi purificado em coluna cromatográfica tendo como eluente inicial hexano e eluente final acetato de etila (gradiente de polaridade).

Todo o procedimento reacional foi acompanhado por CCD com hexano:acetato de etila (5:1) como eluentes.

O produto foi obtido com 44,2% de rendimento.

**Dados físicos:** Fmoc-L-prolina-estigmasterol (7): C<sub>49</sub>H<sub>65</sub>NO<sub>4</sub>; 732,04 g/mol; Sólido



branco; PF: 76,0 – 83,5 °C;  $[\alpha]_D = -82$  (c 0,05; CHCl<sub>3</sub>); RMN <sup>1</sup>H (200,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7,30-7,77 (m, 8H, Ph); 5,29-5,37 (m, 1H, H-6); 5,15 (dd,  $J = 15,2$  e

8,5 Hz, 1H, H-22); 5,00 (dd,  $J = 15,2$  e 8,5 Hz, 1H, H-23); 4,61-4,74 (m, 1H, H-3); 4,13-4,49 (m, 3H, H-7', H-8', H-2'); 3,47-3,74 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-5'); 2,23-2,33 (m, 3H, H-4a, H-4b, H-12b); 1,69-2,01 (m, 7H, H-20, H-7b, H-1b, CH<sub>2</sub>-3', H-2a, H-16a); 1,47-1,58 (m, 9H, H-15a, CH<sub>2</sub>-4', H-25, H-24, H-2b, CH<sub>2</sub>-11, H-7a); 1,08-1,30 (m, 8H, H-8, H-28, H-16b, H-12a, H-28, H-17, H-15b, H-1a); 1,03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-21); 0,99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0,92-0,97 (m, 2H, H-14, H-9); 0,86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-26); 0,83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-29); 0,80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-27); 0,68 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18). RMN <sup>13</sup>C (50,32 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 172,44 (C=O, C-1'); 154,98 (C=O, C-6'); 144,20 (C-9'); 141,28 (C-10'); 139,51 (C-5); 138,23 (C-22); 129,31 (C-23); 127,62 (C-12'); 126,97 (C-11'); 125,09 (C-13'); 122,87 (C-6);

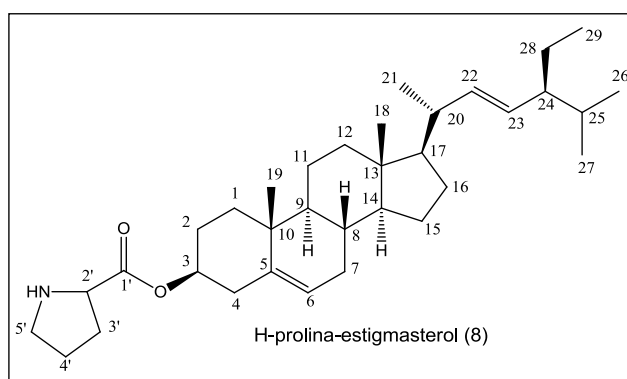
119,90 (C-14'); 74,78 (C-3); 67,63 (C-2'); 67,41 (C-7'); 59,09 (C-5'); 56,77 (C-14); 55,96 (C-17); 51,22 (C-9); 50,02 (C-8'); 47,25 (C-24); 46,47 (C-4); 42,20 (C-13); 40,42 (C-20); 39,61 (C-12); 37,95 (C-1); 36,90 (C-10); 36,57 (C-8); 31,86 (C-7); 31,16 (C-25); 29,95 (C-2); 28,85 (C-16); 27,69 (C-3'); 25,37 (C-28); 24,33 (C-15); 23,33 (C-4'); 21,19 (C-21); 21,03 (C-11); 21,00 (C-26); 19,26 (C-27); 18,98 (C-19); 12,20 (C-18); 12,02 (C-29).

#### 4.4.3.5 H-prolina-estigmasterol (**8**)

Em um balão de 10 mL à temperatura ambiente, 20 mg (0,0319 mmol) do produto **6** (obtido no item 4.4.3.3) foi submetido à reação de desproteção do grupamento amino com uma solução de 542  $\mu$ L de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :TFA (1:1).

A reação permaneceu sob agitação à temperatura ambiente por 1,5 h e após, o solvente foi evaporado. Adicionou-se 5 mL de éter etílico (3x) ao resíduo, evaporou-se o solvente e adicionou-se metanol, ocorrendo a formação de um precipitado amarelado. Todo o procedimento reacional foi acompanhado por CCD com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH (95:5) como eluentes. O rendimento reacional foi quantitativo.

Dados físicos: H-prolina-estigmasterol (**8**):  $\text{C}_{34}\text{H}_{55}\text{NO}_2$ ; 509,81 g/mol; Sólido amarelado; PF: 116,7 – 118,5  $^\circ\text{C}$ ;  $[\alpha]_D = -58$  (c 0,05;  $\text{CHCl}_3$ ); RMN  $^1\text{H}$  (200,13 MHz,



$\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 5,36-5,38 (m, 1H, H-6); 5,14 (dd,  $J = 15,2$  e  $8,5$  Hz, 1H, H-22); 5,00 (dd,  $J = 15,2$  e  $8,5$  Hz, 1H, H-23); 4,65-4,68 (m, 1H, H-3); 4,39-4,42 (m, 1H, H-2'); 3,44-3,46 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -5'); 2,29-2,43 (m, 3H, H-4a, H-4b, H-12b); 1,85-2,06 (m, 6H, H-20,  $\text{CH}_2$ -3', H-7b,

H-1b, H-2a); 1,35-1,65 (m, 12H, H-16a, H-15a, H-25, H-24, H-2b,  $\text{CH}_2$ -4',  $\text{CH}_2$ -11, H-7a, H-8, H-28); 1,11-1,28 (m, 6H, H-16b, H-12a, H-28, H-17, H-15b, H-1a); 1,03 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -21); 1,01 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -19); 0,92-1,01 (m, 2H, H-14, H-9); 0,85 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -26); 0,82 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -29); 0,79 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -27); 0,69 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -18). RMN  $^{13}\text{C}$  (50,32 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 168,67 (C=O, C-1'); 138,85 (C-5); 138,20 (C-22); 129,42 (C-

23); 123,31 (C-6); 77,20 (C-3); 59,16 (C-2'); 56,78 (C-14); 55,97 (C-17); 51,24 (C-9); 50,03 (C-24); 45,88 (C-5'); 42,23 (C-4); 40,48 (C-13); 39,62 (C-20); 37,68 (C-12); 36,88 (C-1); 36,56 (C-10); 31,90 (C-8); 31,87 (C-7); 31,84 (C-25); 28,96 (C-2); 28,87 (C-3'); 27,40 (C-16); 25,38 (C-28); 24,35 (C-15); 23,77 (C-4'); 21,31 (C-21); 21,06 (C-11); 21,03 (C-26); 19,21 (C-27); 19,01 (C-19); 12,21 (C-18); 12,05 (C-29).

#### 4.4.3.6 Boc-prolina-prolina-estigmasterol (9)

O derivado Boc-prolina-prolina-estigmasterol foi obtido pelo acoplamento do produto **8** (obtido no item 4.4.3.5) com o aminoácido protegido Boc-Prolina-OH conforme procedimento descrito no item 4.4.3.3.

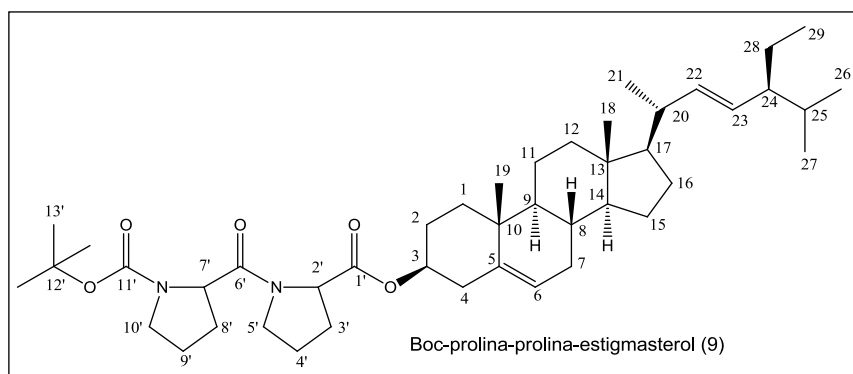
Em um balão de 100 mL foram adicionados 400 mg (0,830 mmol) de H-prolina-estigmasterol (**8**), 268 mg (1,245 mmol) de Boc-L-Prolina-OH, 2 mg (0,0163 mmol) de DMAP, 342 mg (1,660 mmol) de DCC e 50 mL de diclorometano. A mistura reacional foi agitada por 6 h à temperatura ambiente. Durante este período a reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada tendo como eluentes hexano:acetato de etila (5:1).

O precipitado de DCU foi removido por filtração e o resíduo líquido foi lavado com soluções saturadas de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (70 mL), NaHCO<sub>3</sub> (70 mL) e NaCl (70 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO<sub>4</sub> e evaporada a pressão reduzida, ocorrendo a formação de um precipitado branco impuro.

O produto foi purificado em coluna cromatográfica tendo como eluente inicial hexano e eluente final acetato de etila (gradiente de polaridade). O produto foi obtido com rendimento de 43,4%.

Dados físicos: Boc-prolina-prolina-estigmasterol (**9**): C<sub>44</sub>H<sub>70</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; 707,04 g/mol; Sólido branco; PF: 138 – 141 °C; [α]<sub>D</sub> = nd; RMN <sup>1</sup>H (400,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5,34 (m, 1H, H-6); 5,15 (dd, J = 15,2 e 8,5 Hz, 1H, H-22); 5,01 (dd, J = 15,2 e 8,5 Hz, 1H, H-23); 4,50-4,60 (m, 2H, H-3, H-7'); 4,36-4,38 (m, 1H, H-2'); 3,72-3,78 (m, 1H, H-5'a); 3,53-3,63 (m, 1H, H-5'b); 3,38-3,45 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-10'); 1,82-2,31 (m, 13H, H-4a, H-4b, H-3'a, H-12b, H-20, H-3'b, H-4'a, H-8'a, H-4'b, H-7b, H-8'b, H-1b, H-2a); 1,64-1,72 (m, 1H, H-16a); 1,45-1,60 (m, 10H, CH<sub>2</sub>-9', H-15a, H-25, H-24, H-2b, CH<sub>2</sub>-11, H-7a, H-8); 1,43 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-8'); 1,06-1,38 (m, 7H, H-28, H-16b, H-12a, H-28, H-17, H-15b,

H-1a); 1,02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-21); 1,00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0,94-0,99 (m, 2H, H-14, H-9); 0,84



(s, 3H, CH<sub>3</sub>-26); 0,83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-29); 0,80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-27); 0,68 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18). RMN <sup>13</sup>C (100,62 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 171,72 (C=O, C-1'); 170,98

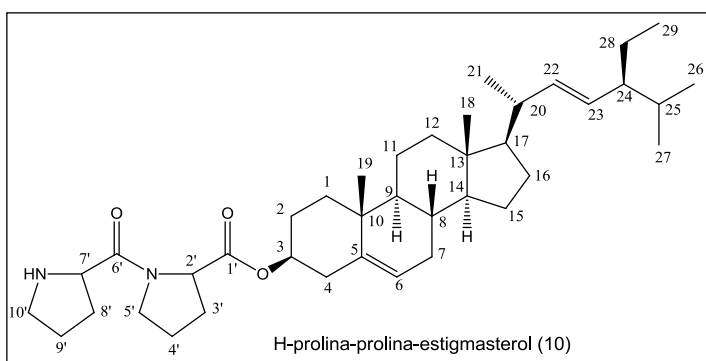
(C=O, C-6'); 154,55 (C=O, C-11'); 139,52 (C-5); 138,26 (C-22); 129,32 (C-23); 122,67 (C-6); 79,40 (C-12'); 74,55 (C-3); 58,94 (C-7'); 57,70 (C-2'); 56,77 (C-14); 55,97 (C-17); 51,22 (C-9); 50,05 (C-24); 46,85 (C-5'); 46,47 (C-10'); 42,21 (C-4); 40,42 (C-13); 39,62 (C-20); 37,94 (C-12); 36,63 (C-1); 36,60 (C-10); 31,87 (C-8); 31,87 (C-7); 31,86 (C-25); 29,05 (C-8'); 28,85 (C-2); 28,50 (C-13'); 28,36 (C-3'); 27,65 (C-16); 25,36 (C-28); 24,87 (C-4'); 24,34 (C-15); 24,03 (C-9'); 21,19 (C-21); 21,02 (C-11); 21,02 (C-26); 19,28 (C-27); 18,97 (C-19); 12,19 (C-18); 12,02 (C-29).

#### 4.4.3.7 H-prolina-prolina-estigmasterol (10)

O derivado **10** foi obtido conforme procedimento descrito no item 4.4.3.5. Em um balão de 10 mL, adicionou-se 190 mg (0,279 mmol) do produto **9** (obtido no item 4.4.3.6) e 4,6 mL de uma solução de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:TFA (1:1). A reação permaneceu sob agitação por 24 h à temperatura ambiente. Após, o solvente foi evaporado e adicionou-se éter etílico ao resíduo (3 x 15 mL), ocorrendo a formação de um precipitado branco puro. Todo o processo reacional foi acompanhado por CCD tendo como eluente hexano:acetato de etila (3:2). O rendimento reacional foi de 74,3%.

**Dados físicos:** H-prolina-prolina-estigmasterol (**10**): C<sub>39</sub>H<sub>62</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; 606,92 g/mol; Sólido branco; PF: 85,5 – 90 °C; [α]<sub>D</sub> = nd; RMN <sup>1</sup>H 400,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5,35-5,37 (m, 1H, H-6); 5,15 (dd, *J* = 15,2 e 8,5 Hz, 1H, H-22); 5,02 (dd, *J* = 15,2 e 8,5 Hz, 1H, H-23); 4,76-4,77 (m, 1H, NH); 4,58-4,65 (m, 1H, H-3); 4,52-4,55 (m, 1H, H-2'); 3,65-3,68 (m, 2H, H-7', H-5'a); 3,44-3,54 (m, 2H, H-5'b, H-10'a); 2,50-2,55 (m, 1H, H-10'b); 2,24-2,32 (m, 4H, H-4a, H-4b, H-3', H-12b); 1,82-2,17 (m, 9H, H-20, H-3', H-4', H-7b, H-8', H-4', H-8', H-1b, H-2a); 1,40-1,69 (m, 12H, H-16a, CH<sub>2</sub>-9', H-15a, H-25,

H-24, H-2b, CH<sub>2</sub>-11, H-7a, H-8, H-28); 1,07-1,25 (m, 6H, H-16b, H-12a, H-28, H-17, H-15b, H-1a); 1,02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-21); 1,01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0,95-1,01 (m, 2H, H-14, H-



9); 0,85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-26); 0,83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-29); 0,80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-27); 0,69 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18). RMN <sup>13</sup>C (100,62 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:

170,51 (C=O, C-6'); 167,24 (C=O, C-1'); 139,15 (C-5); 138,22 (C-22); 129,39 (C-23); 123,09 (C-6); 75,41 (C-3); 59,59 (C-2'); 58,59 (C-7'); 56,79 (C-14); 56,00 (C-17); 51,24 (C-9); 50,06 (C-24); 46,99 (C-5'); 46,85 (C-10'); 42,23 (C-4); 40,43 (C-13); 39,62 (C-20); 38,11 (C-12); 37,94 (C-8'); 36,89 (C-1); 36,61 (C-10); 31,86 (C-8); 31,86 (C-7); 31,56 (C-25); 28,97 (C-3'); 28,86 (C-2); 27,66 (C-16); 25,37 (C-28); 24,80 (C-9'); 24,66 (C-4'); 24,34 (C-15); 21,21 (C-21); 21,04 (C-11); 21,04 (C-26); 19,27 (C-27); 18,98 (C-19); 12,20 (C-18); 12,04 (C-29).

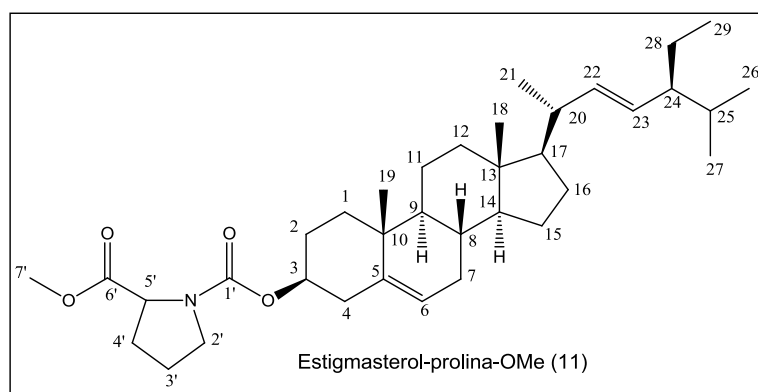
#### 4.4.3.8 Estigmasterol-prolina-OMe (11)

Em um balão de 50 mL contendo uma solução de 28,8 mg (0,175 mmol) de H-prolina-OMe em 10 mL de diclorometano e 88 μL (0,630 mmol; 0,726 g/mL) de trietilamina, foram adicionados lentamente, à temperatura de 0 °C, 100 mg (0,210 mmol) de clorofornato de estigmasterila (**3**). Após, a mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente por 24 h.

A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada tendo como eluentes hexano:acetato de etila (5:1). Após o final da reação, o solvente foi evaporado em evaporador rotatório e o resíduo purificado em coluna cromatográfica com clorofórmio como eluente. O produto foi obtido com 57,1% de rendimento.

Dados físicos: Estigmasterol-prolina-OMe (**11**): C<sub>36</sub>H<sub>57</sub>NO<sub>4</sub>; 567,84 g/mol; Sólido branco; PF: 123,7 – 125,7 °C; [α]<sub>D</sub> = -32 (c 0,05; CHCl<sub>3</sub>); RMN <sup>1</sup>H (200,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5,34-5,36 (m, 1H, H-6); 5,15 (dd, J = 15,2 e 8,5 Hz, 1H, H-22); 5,00 (dd, J = 15,2 e 8,5 Hz, 1H, H-23); 4,40-4,57 (m, 1H, H-3); 4,25-4,38 (m, 1H, H-5'); 3,72 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O-7'); 3,40-3,60 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-2'); 2,19-2,34 (m, 4H, H-4a, H-4b, H-12b, H-

20); 1,81-2,02 (m, 7H, CH<sub>2</sub>-4', H-7b, CH<sub>2</sub>-3', H-1b, H-2a); 1,42-1,68 (m, 10H, H-16a, H-15a, H-25, H-24, H-2b, CH<sub>2</sub>-11, H-7a, H-8, H-28); 1,09-1,28 (m, 6H, H-16b, H-12a, H-28, H-17, H-15b, H-1a); 1,03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-21); 1,02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0,92-1,00 (m, 2H, H-14, H-9); 0,86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-26); 0,82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-29); 0,80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-27); 0,69 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18). RMN <sup>13</sup>C (50,32 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 173,52 (C=O, C-6'); 154,05 (C=O, C-1');



C-1'); 139,76 (C-5); 138,30 (C-22); 129,28 (C-23); 122,57 (C-6); 74,68 (C-3); 58,87 (C-5'); 56,79 (C-14); 55,96 (C-17); 52,05 (C-7'); 51,23 (C-9); 50,04 (C-2'); 46,64 (C-24); 42,22 (C-4); 40,46 (C-13); 39,65 (C-20);

38,42 (C-12); 36,88 (C-1); 36,56 (C-10); 31,87 (C-8); 30,85 (C-7); 29,90 (C-25); 29,68 (C-2); 28,88 (C-16); 28,27 (C-4'); 25,39 (C-28); 24,35 (C-15); 23,61 (C-3'); 21,21 (C-21); 21,05 (C-11); 21,03 (C-26); 19,33 (C-27); 18,98 (C-19); 12,22 (C-18); 12,04 (C-29).

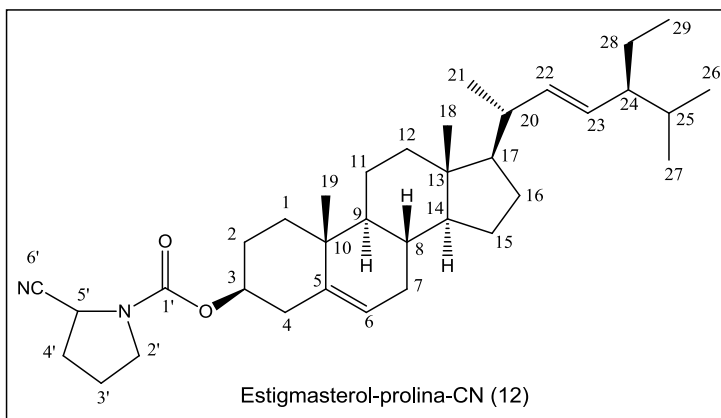
#### 4.4.3.9 Estigmasterol-prolina-CN (12)

Em um balão de 50 mL contendo uma solução de 31 mg (0,350 mmol) de H-prolina-CN em 5 mL de clorofórmio e 176 μL (1,260 mmol; 0,726 g/mL) de trietilamina, foram adicionados lentamente, à temperatura de 0 °C, 200 mg (0,210 mmol) de cloroformato de estigmasterila (**3**). A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente por 22 h e após, foi aquecida a 45 °C por 2h.

A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada tendo como eluente clorofórmio. Após o final da reação, o solvente foi evaporado a pressão reduzida e o resíduo purificado em coluna cromatográfica com hexano como eluente inicial e diclorometano:acetato de etila (9:1) como eluentes finais (gradiente de polaridade). O produto foi obtido com 79,5% de rendimento.



**Dados físicos:** Estigmasterol-prolina-CN (**12**): C<sub>35</sub>H<sub>54</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 534,82 g/mol; Sólido



branco; PF: 159,5 – 161,0 °C; [α]<sub>D</sub> = -80 (c 0,05; CHCl<sub>3</sub>); RMN <sup>1</sup>H (400,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5,37 (m, 1H, H-6); 5,15 (dd, J = 15,2 e 8,5 Hz, 1H, H-22); 5,02 (dd, J = 15,2 e 8,5 Hz, 1H, H-23); 4,53-4,57 (m, 2H, H-3, H-5'); 3,39-3,52 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-2');

2,15-2,43 (m, 4H, H-4a, H-4b, H-12b, H-20); 1,84-2,03 (m, 7H, CH<sub>2</sub>-4', H-7b, CH<sub>2</sub>-3', H-1b, H-2a); 1,41-1,68 (m, 10H, H-16a, H-15a, H-25, H-24, H-2b, CH<sub>2</sub>-11, H-7a, H-8, H-28); 1,09-1,25 (m, 6H, H-16b, H-12a, H-28, H-17, H-15b, H-1a); 1,02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-21); 1,01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0,95-1,01 (m, 2H, H-14, H-9); 0,85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-26); 0,82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-29); 0,80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-27); 0,69 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18). RMN <sup>13</sup>C (100,62 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 153,29 (C=O, C-1'); 139,57 (C-5); 138,27 (C-22); 129,32 (C-23); 122,69 (C-6); 118,86 (C≡N, C-6'); 75,93 (C-3); 56,80 (C-14); 55,98 (C-17); 51,23 (C-9); 50,06 (C-5'); 47,28 (C-2'); 46,02 (C-24); 42,23 (C-4); 40,43 (C-13); 39,65 (C-20); 38,37 (C-12); 36,99 (C-1); 36,57 (C-10); 31,89 (C-8); 31,87 (C-7); 31,73 (C-25); 31,69 (C-2); 28,87 (C-16); 28,22 (C-4'); 25,37 (C-28); 24,35 (C-15); 23,78 (C-3'); 21,20 (C-21); 21,03 (C-11); 21,03 (C-26); 19,32 (C-27); 18,98 (C-19); 12,20 (C-18); 12,04 (C-29).

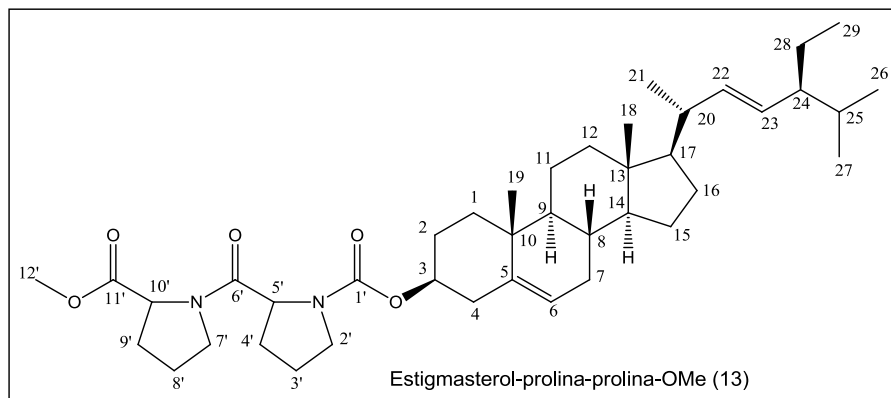
#### 4.4.3.10 Estigmasterol-prolina-prolina-OMe (**13**)

Em um balão de 50 mL contendo uma solução de 22,9 mg (0,0875 mmol) do dipeptídeo H-prolina-prolina-OMe (obtido no item 4.4.2) em 5 mL de diclorometano e 438 μL (3,15 mmol; 0,726 g/mL) de trietilamina, foram adicionados lentamente, à temperatura de 0 °C, 50 mg (0,105 mmol) de cloroformato de estigmasterila (**3**). A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente por 72 h.

A reação foi acompanhada por CCD tendo como eluentes diclorometano:metanol (95:5). Após o final da reação, o solvente foi evaporado a

pressão reduzida e o resíduo purificado em CCDP com hexano:acetato (5:1). O rendimento da reação foi de 67,6%.

**Dados físicos:** Estigmasterol-prolina-prolina-OMe (**13**): Sólido branco; P.F: 121,9 – 123,4 °C;  $[\alpha]_D = -80$  (c 0,05; CHCl<sub>3</sub>); RMN <sup>1</sup>H (200,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 5,32-5,34 (m,



1H, H-6); 5,15 (dd,  $J = 15,2$  e  $8,5$  Hz, 1H, H-22); 4,99 (dd,  $J = 15,2$  e  $8,5$  Hz, 1H, H-23); 4,44-4,54 (m, 3H, H-3, H-5', H-10'); 3,78-3,83 (m, 1H,

H-7'a); 3,69 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O-12'); 3,45-3,58 (m, 3H, H-7'b, CH<sub>2</sub>-2'); 1,79-2,35 (m, 13H, CH<sub>2</sub>-9', H-4a, H-4b, H-12b, H-20, CH<sub>2</sub>-8', H-7b, H-1b, H-2a, CH<sub>2</sub>-4'); 1,40-1,67 (m, 12H, H-16a, CH<sub>2</sub>-3', H-15a, H-25, H-24, H-2b, CH<sub>2</sub>-11, H-7a, H-8, H-28); 1,07-1,24 (m, 6H, H-16b, H-12a, H-28, H-17, H-15b, H-1a); 1,02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-21); 0,99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0,91-0,97 (m, 2H, H-14, H-9); 0,84 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-26); 0,81 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-29); 0,79 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-27); 0,67 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18). RMN <sup>13</sup>C (50,32 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 172,85 (C=O, C-11'); 171,21 (C=O, C-6'); 154,85 (C=O, C-1'); 140,08 (C-5); 138,31 (C-22); 129,29 (C-23); 122,24 (C-6); 74,84 (C-3); 58,71 (C-10'); 57,90 (C-5'); 56,80 (C-14); 55,98 (C-17); 52,06 (C-12'); 51,23 (C-9); 50,06 (C-7'); 50,01 (C-2'); 46,59 (C-24); 42,22 (C-4); 40,44 (C-13); 39,65 (C-20); 38,83 (C-12); 37,07 (C-1); 36,61 (C-10); 31,91 (C-8); 31,87 (C-7); 30,08 (C-25); 29,67 (C-2); 28,87 (C-16); 28,77 (C-4'); 28,21 (C-9'); 25,37 (C-28); 24,35 (C-15); 24,22 (C-8'); 23,58 (C-3'); 21,20 (C-21); 21,03 (C-11); 21,03 (C-26); 19,34 (C-27); 18,98 (C-19); 12,20 (C-18); 12,03 (C-29).

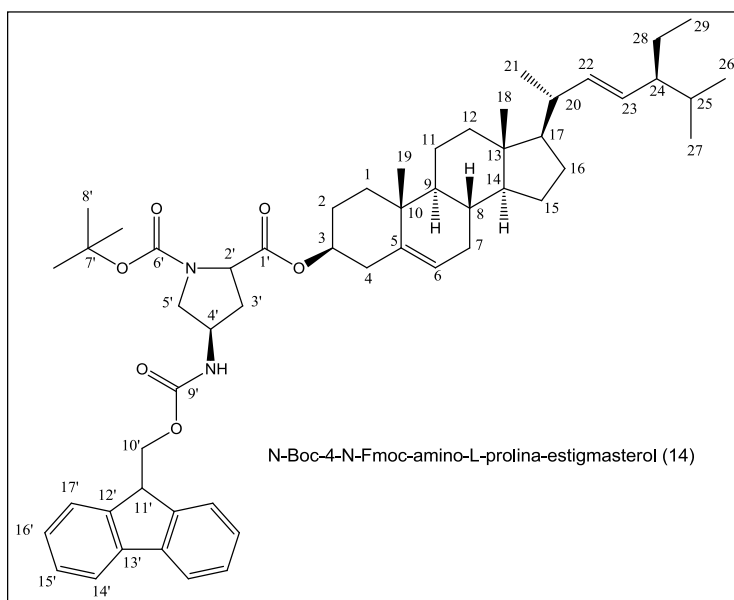
#### 4.4.3.11 N-Boc-4-N-Fmoc-amino-L-prolina-estigmasterol (**14**)

Para obtenção do derivado **14** utilizou-se o procedimento reacional descrito no item 4.4.3.3. Em um balão de 100 mL, adicionou-se 300 mg (0,726 mmol) de estigmasterol (**1**), 492,7 mg (1,082 mmol) de N-Boc-4-N-Fmoc-amino-L-prolina, 2 mg

(0,0163 mmol) de DMAP, 299,5 mg (1,452 mmol) de DCC e 50 mL de diclorometano. A mistura reacional foi agitada por 20 h à temperatura ambiente. Durante este período, a reação foi acompanhada por CCD tendo como eluentes clorofórmio:metanol (95:5).

O precipitado de DCU foi filtrado e o resíduo extraído com água/clorofórmio. A fase orgânica foi seca, evaporada e purificada em coluna cromatográfica tendo como eluente inicial clorofórmio e eluente final acetato de etila (gradiente de polaridade). O produto foi obtido com rendimento de 92,6%.

**Dados físicos:** N-Boc-4-N-Fmoc-amino-L-prolina-estigmasterol (**14**):  $C_{54}H_{74}N_2O_6$ ; 847,18 g/mol; Sólido branco; PF: 99,0 – 102,5 °C;  $[\alpha]_D = -20$  (c 0,05;  $CHCl_3$ ); RMN  $^1H$



(400,13 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 7,74 (d,  $J = 7,5$  Hz, 2H, H-14'); 7,57 (d,  $J = 7,1$  Hz, 2H, H-17'); 7,39 (t,  $J = 14,5$  e 7,4 Hz, 2H, H-15'); 7,29-7,33 (m, 2H, H-16'); 5,77-5,80 (m, 1H, H-4'); 5,29-5,30 (m, 1H, H-6); 5,16 (dd,  $J = 15,2$  e 8,5 Hz, 1H, H-22); 5,02 (dd,  $J = 15,2$  e 8,5 Hz, 1H, H-23); 4,69-4,70 (m, 1H, H-3); 4,19-4,34 (m, 3H,  $CH_2$ -10', H-11'); 3,58-3,67 (m, 3H,

$CH_2$ -5', H-2'); 2,46-2,48 (m, 1H, H-3'a); 2,31-2,34 (m, 2H, H-4a, H-4b); 1,85-2,09 (m, 6H, H-12b, H-20, H-3'b, H-7b, H-1b, H-2a); 1,67-1,72 (m, 1H, H-16a); 1,47-1,56 (m, 8H, H-15a, H-25, H-24, H-2b,  $CH_2$ -1, H-7a, H-8); 1,45 (s, 9H,  $CH_3$ -8'); 1,39-1,40 (m, 1H, H-28); 1,07-1,26 (m, 6H, H-16b, H-12a, H-28, H-17, H-15b, H-1a); 1,03 (s, 3H,  $CH_3$ -21); 1,01 (s, 3H,  $CH_3$ -19); 0,94-1,01 (m, 2H, H-14, H-9); 0,86 (s, 3H,  $CH_3$ -26); 0,83 (s, 3H,  $CH_3$ -29); 0,81 (s, 3H,  $CH_3$ -27); 0,69 (s, 3H,  $CH_3$ -18). RMN  $^{13}C$  (100,62 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 173,40 (C=O, C-1'); 155,80 (C=O, C-6'); 154,69 (C=O, C-9'); 143,91 (C-12'); 143,89 (C-13'); 141,28 (C-5); 138,24 (C-22); 129,35 (C-23); 127,68 (C-15'); 127,08 (C-14'); 125,12 (C-16'); 122,92 (C-6); 119,94 (C-17'); 80,49 (C-7'); 75,36 (C-3); 67,00 (C-10'); 58,11 (C-2'); 58,02 (C-5'); 56,79 (C-14); 55,99 (C-17); 51,23 (C-9); 50,07 (C-24); 47,24 (C-11'); 47,17 (C-4'); 42,22 (C-4); 40,42 (C-13); 40,34 (C-20); 39,63 (C-12); 36,93 (C-1); 36,60 (C-10); 31,85 (C-3'); 31,85 (C-8); 29,68 (C-7); 28,86

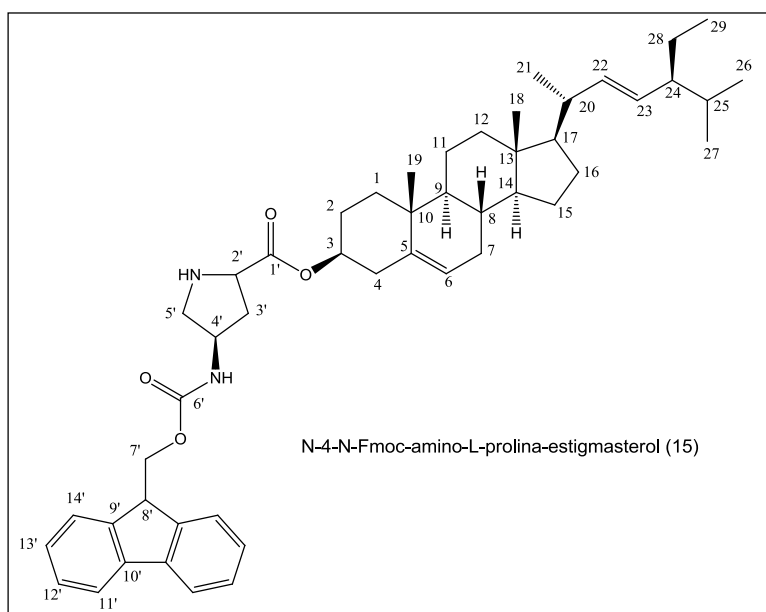
(C-25); 28,35 (C-8'); 28,78 (C-2); 27,58 (C-16); 25,37 (C-28); 24,33 (C-15); 21,20 (C-21); 21,04 (C-11); 21,03 (C-26); 19,27 (C-27); 18,98 (C-19); 12,21 (C-18); 12,03 (C-29).

#### 4.4.3.12 N-4-N-Fmoc-amino-L-prolina-estigmasterol (**15**)

Para obtenção do derivado N-4-N-Fmoc-amino-L-prolina-estigmasterol utilizou-se o procedimento descrito no item 4.4.3.5. Em um balão de 10 mL, adicionou-se 100 mg (0,118 mmol) do produto **14** (obtido no item 4.4.3.11) e 2 mL de uma solução de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:TFA (1:1). A reação permaneceu sob agitação, à temperatura ambiente, por 3 h e após, o solvente foi evaporado. Adicionou-se éter etílico ao resíduo (3 x 10 mL), evaporou-se o solvente e adicionou-se metanol, ocorrendo a formação de um precipitado branco. O sólido obtido foi purificado em CCDP com acetato de etila como eluente.

Todo o procedimento reacional foi acompanhado por CCD com hexano:acetato de etila (3:2) como eluentes. O produto foi obtido com 79,5% de rendimento.

**Dados físicos:** N-4-N-Fmoc-amino-L-prolina-estigmasterol (**15**): C<sub>49</sub>H<sub>66</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>; 747,06



g/mol; Sólido branco; PF: 109,5 – 113,0 °C; [α]<sub>D</sub> = -33,3 (c 0,03; CHCl<sub>3</sub>); RMN <sup>1</sup>H (400,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,73 (d, J = 7,5 Hz, 2H, H-11'); 7,60 (d, J = 7,1 Hz, 2H, H-14'); 7,38 (t, J = 14,5 e 7,4 Hz, 2H, H-12'); 7,29-7,31 (m, 2H, H-13'); 5,18-5,20 (m, 1H, H-6); 5,14 (dd, J = 15,2 e 8,5 Hz, 1H, H-22); 5,02 (dd, J = 15,2 e 8,5 Hz, 1H, H-23);

4,79-4,80 (m, 1H, H-4'); 4,60-4,68 (m, 1H, H-3); 4,52-4,53 (m, 1H, H-8'); 4,28-4,33 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-7'); 4,15-4,19 (m, 1H, H-2'); 3,63-3,67 (m, 1H, H-5'); 3,48-3,50 (m, 1H,

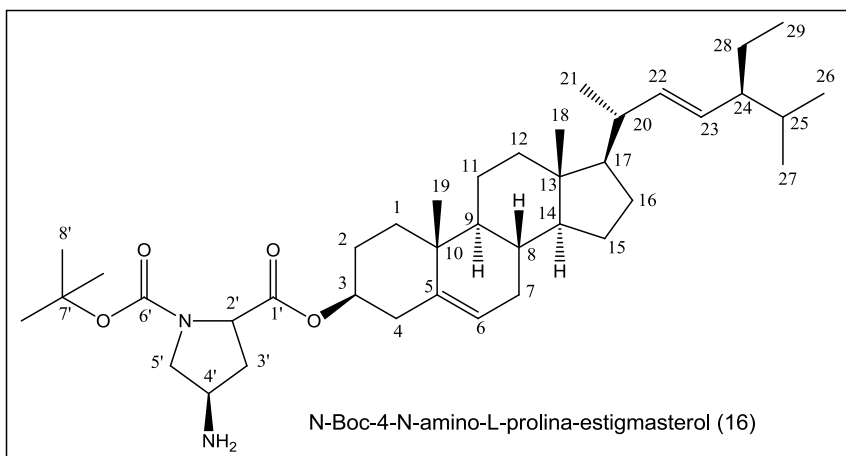
H-5'); 2,42-2,43 (m, 1H, H-3'a); 2,26-2,33 (m, 3H, H-4a, H-4b, H-12b); 1,96-2,07 (m, 3H, H-20, H-3'b, H-7b); 1,82-1,85 (m, 2H, H-1b, H-2a); 1,40-1,67 (m, 10H, H-16a, H-15a, H-25, H-24, H-2b, CH<sub>2</sub>-11, H-7a, H-8, H-28); 1,06-1,26 (m, 6H, H-16b, H-12a, H-28, H-17, H-15b, H-1a); 1,02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-21); 1,01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0,94-0,98 (m, 2H, H-14, H-9); 0,84 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-26); 0,83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-29); 0,81 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-27); 0,67 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18). RMN <sup>13</sup>C (100,62 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 168,05 (C=O, C-1'); 155,99 (C=O, C-6'); 143,75 (C-9'); 141,26 (C-10'); 138,56 (C-5); 138,21 (C-22); 129,42 (C-23); 127,73 (C-11'); 127,09 (C-12'); 125,24 (C-13'); 123,46 (C-6); 119,92 (C-14'); 77,20 (C-3); 67,34 (C-7'); 58,72 (C-2'); 56,74 (C-14); 55,97 (C-17); 51,25 (C-9); 51,14 (C-5'); 49,97 (C-24); 49,92 (C-4'); 47,09 (C-8'); 42,20 (C-4); 40,45 (C-13); 39,60 (C-12); 37,56 (C-20); 36,81 (C-1); 35,34 (C-10); 31,88 (C-3'); 31,79 (C-8); 31,75 (C-7); 29,69 (C-25); 28,85 (C-2); 27,36 (C-16); 25,39 (C-28); 24,30 (C-15); 21,27 (C-21); 21,05 (C-11); 21,01 (C-26); 19,18 (C-27); 19,00 (C-19); 12,21 (C-18); 12,02 (C-29).

#### 4.4.3.13 N-Boc-4-N-amino-L-prolina-estigmasterol (**16**)

Para obtenção do derivado **16**, em um balão de 10 mL à temperatura ambiente, 100 mg (0,118 mmol) do produto **14** (obtido no item 4.4.3.11) foi submetido à reação de desproteção do grupamento amino com 1,180 mL de DMF e 118 µL de dietilamina. A mistura reacional permaneceu sob agitação, à temperatura ambiente, por 3 h. Durante este período a reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada tendo como eluentes clorofórmio:metanol (85:15).

A dietilamina e o DMF foram evaporados a pressão reduzida com a temperatura não excedendo 30 °C. Após, adicionou-se éter etílico (3 x 5 mL) ao resíduo seguido da evaporação do solvente em evaporador rotatório. O sólido obtido foi purificado em coluna cromatográfica tendo CHCl<sub>3</sub> como eluente inicial e AcOEt como eluente final (gradiente de polaridade). O rendimento reacional foi de 91,8%.

**Dados físicos:** N-Boc-4-N-amino-L-prolina-estigmasterol (**16**): C<sub>39</sub>H<sub>64</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>; 624,94



g/mol; Sólido branco; PF: 123,5 - 127,5 °C; [α]<sub>D</sub> = -54 (c 0,05; CHCl<sub>3</sub>); RMN <sup>1</sup>H (200,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5,36-5,38 (m, 1H, H-6); 5,14 (dd, J = 15,2 e 8,5 Hz, 1H, H-22); 4,98 (dd, J = 15,2

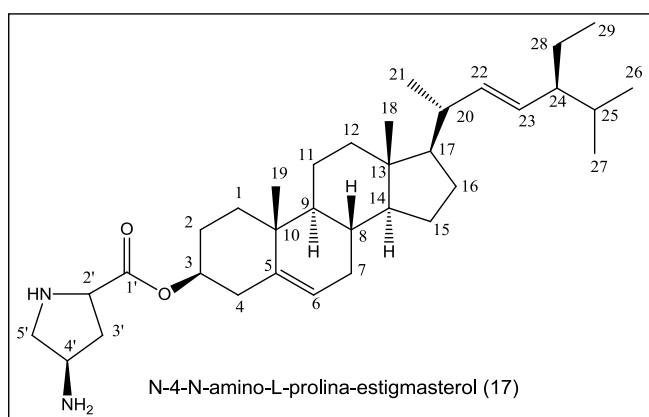
e 8,5 Hz, 1H, H-23); 4,63-4,66 (m, 1H, H-3); 4,17-4,27 (m, 1H, H-2'); 3,27-3,73 (m, 3H, H-5'a, H-5'b, H-4'); 2,29-2,45 (m, 3H, H-3'a, H-4a, H-4b); 1,83-2,07 (m, 6H, H-12b, H-20, H-3'b, H-7b, H-1b, H-2a); 1,44-1,62 (m, 10H, H-16a, H-15a, H-25, H-24, H-2b, CH<sub>2</sub>-11, H-7a, H-8, H-28); 1,40 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-8'); 1,09-1,23 (m, 6H, H-16b, H-12a, H-28, H-17, H-15b, H-1a); 1,02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-21); 1,00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0,92-0,99 (m, 2H, H-14, H-9); 0,84 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-26); 0,81 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-29); 0,78 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-27); 0,67 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18). RMN <sup>13</sup>C (50,32 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 172,86 (C=O, C-1'); 153,77 (C=O, C-6'); 139,36 (C-5); 138,23 (C-22); 129,39 (C-23); 122,92 (C-6); 80,07 (C-7'); 74,92 (C-3); 58,46 (C-2'); 56,82 (C-5'); 56,04 (C-14); 55,16 (C-17); 51,24 (C-9); 50,33 (C-4'); 50,12 (C-24); 42,25 (C-4); 40,39 (C-13); 39,67 (C-12); 39,46 (C-20); 38,06 (C-3'); 36,99 (C-1); 36,64 (C-10); 31,91 (C-8); 31,87 (C-7); 28,84 (C-25); 28,36 (C-8'); 28,36 (C-2); 27,79 (C-16); 25,36 (C-28); 24,35 (C-15); 21,20 (C-21); 21,04 (C-11); 21,01 (C-26); 19,29 (C-27); 18,99 (C-19); 12,18 (C-18); 12,04 (C-29).

#### 4.4.3.14 N-4-N-amino-L-prolina-estigmasterol (**17**)

Para obtenção do derivado **17**, em um balão de 10 mL à temperatura ambiente, 100 mg (0,201 mmol) do produto **15** (obtido no item 4.4.3.12) foi submetido à reação de remoção do grupamento 9-fluorenilmetiloxicarbonil com 2 mL de DMF e 200 μL de dietilamina. A reação permaneceu sob agitação por 20 h à temperatura ambiente. Durante este período a reação foi acompanhada por CCD tendo como eluentes acetato de etila:metanol (95:5).

A dietilamina e o DMF foram evaporados a pressão reduzida com a temperatura não excedendo 30 °C. Após, adicionou-se éter etílico (3 x 15 mL) ao resíduo seguido da evaporação do solvente em evaporador rotatório. O sólido obtido foi purificado em coluna cromatográfica tendo com eluente inicial CHCl<sub>3</sub> e eluente final MeOH (gradiente de polaridade). O produto foi obtido com 98% de rendimento.

**Dados físicos:** N-4-N-amino-L-prolina-estigmasterol (**17**): C<sub>34</sub>H<sub>56</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 524,82 g/mol; Sólido amarelado; PF: 128,6 - 130,9 °C; [α]<sub>D</sub> = nd; RMN <sup>1</sup>H (400,13 MHz, piridina deuterada) δ: 5,34-5,35 (m, 1H, H-6); 5,24 (dd, *J* = 15,2 e 8,5 Hz, 1H, H-22); 5,09



(dd, *J* = 15,2 e 8,5 Hz, 1H, H-23); 4,76-4,84 (m, 1H, H-3); 4,37-4,39 (m, 1H, H-2'); 3,77-3,78 (m, 1H, H-5'); 3,60-3,65 (m, 1H, H-5'); 2,86-2,91 (m, 1H, H-4'); 2,67-2,70 (m, 1H, H-3'a); 2,38-2,42 (m, 2H, H-4a, H-4b); 2,07-2,11 (m, 1H, H-12b); 1,74-1,98 (m, 5H, H-20, H-3'b, H-7b, H-

1b, H-2a); 1,10-1,65 (m, 15H, H-16a, H-15a, H-25, H-24, H-2b, CH<sub>2</sub>-11, H-7a, H-8, H-16b, H-12a, H-28, H-17, H-15b, H-1a); 1,09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-21); 0,97-1,02 (m, 2H, H-14 H-9); 0,93 (m, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0,92 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-26); 0,89 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-29); 0,87 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-27); 0,70 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18). RMN <sup>13</sup>C (100,62 MHz, piridina) δ: 172,20 (C=O, C-1'); 139,46 (C-5); 138,51 (C-22); 129,29 (C-23); 122,72 (C-6); 75,19 (C-3); 59,40 (C-14); 56,62 (C-2'); 55,85 (C-17); 51,41 (C-5'); 51,17 (C-9); 50,80 (C-4'); 49,95 (C-24); 42,11 (C-4); 40,46 (C-13); 39,54 (C-12); 37,87 (C-20); 36,84 (C-1); 35,50 (C-10); 34,85 (C-3'); 31,90 (C-8); 31,83 (C-7); 31,74 (C-25); 29,01 (C-2); 27,55 (C-16); 25,42 (C-28); 24,27 (C-15); 21,21 (C-21); 21,00 (C-11); 20,98 (C-26); 19,03 (C-27); 18,93 (C-19); 12,23 (C-18); 11,89 (C-29).

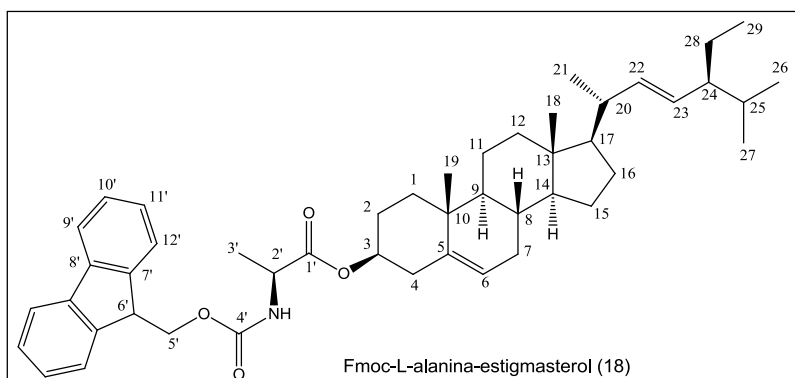
#### 4.4.3.15 Fmoc-L-alanina-estigmasterol (**18**)

O derivado **18** foi obtido conforme procedimento descrito no item 4.4.3.4. Em um balão de 100 mL, adicionou-se 200 mg (0,484 mmol) de estigmasterol (**1**), 183 mg (0,588 mmol) de Fmoc-alanina-OH, 180 μL (1 mmol; 0,742 g/mL) de DIEA, 150

mg (0,588 mmol) de BOP-Cl e 50 mL de diclorometano. A reação permaneceu sob agitação por 72 h a aproximadamente 0 °C e após, foi lavada com solução saturada de NaCl (2 x 30 mL). A fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e evaporada a pressão reduzida. O sólido obtido foi purificado em CCDP tendo como eluentes hexano:acetato (5:1).

Todo o procedimento reacional foi acompanhado por CCD com hexano:acetato de etila (5:1) como eluentes. O produto foi obtido com 25,8% de rendimento.

**Dados físicos:** Fmoc-L-alanina-estigmasterol (**18**): C<sub>47</sub>H<sub>63</sub>NO<sub>3</sub>; 706,61 g/mol; Sólido branco; PF: 95,5 – 97,8 °C; [α]<sub>D</sub> = -36 (c 0,05; CHCl<sub>3</sub>); RMN <sup>1</sup>H (200,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,74 (d, J = 7,0 Hz, 2H, H-9'); 7,58 (d, J = 7,2 Hz, 2H, H-12'); 7,31-7,40 (m, 4H, H-10', H-11'); 5,43-5,44 (m, 1H, H-2'); 5,35-5,39 (m, 1H, H-6); 5,15 (dd, J = 15,2 e 8,5 Hz, 1H, H-22); 5,00 (dd, J = 15,2 e 8,5 Hz, 1H, H-23); 4,65-4,67 (m, 1H, H-3); 4,22-4,40 (m, 3H, H-6', CH<sub>2</sub>-5'); 2,29-2,33 (m, 2H, H-4a, H-4b); 1,85-2,08 (m, 5H, H-12b,



H-20, H-7b, H-1b, H-2a); 1,44-1,65 (m, 10H, H-16a, H-15a, H-25, H-24, H-2b, CH<sub>2</sub>-11, H-7a, H-8, H-28); 1,42 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-3'); 1,09-1,25 (m, 6H, H-16b, H-12a, H-28, H-17, H-15b, H-1a); 1,03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-

21); 1,01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0,95-1,01 (m, 2H, H-14, H-9); 0,86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-26); 0,83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-29); 0,80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-27); 0,69 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18). RMN <sup>13</sup>C (50,32 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 172,47 (C=O, C-1'); 155,60 (C=O, C-4'); 143,85 (C-7'); 141,32 (C-8'); 139,33 (C-5); 138,26 (C-22); 129,36 (C-23); 127,69 (C-10'); 127,05 (C-9'); 125,07 (C-11'); 122,94 (C-6); 119,96 (C-12'); 75,26 (C-3); 66,97 (C-5'); 56,80 (C-14); 55,99 (C-17); 51,24 (C-9); 50,07 (C-24); 49,78 (C-2'); 47,22 (C-6'); 42,23 (C-4); 40,43 (C-13); 39,64 (C-20); 37,94 (C-12); 36,92 (C-1); 36,60 (C-10); 31,90 (C-8); 31,87 (C-7); 31,87 (C-25); 28,87 (C-2); 27,69 (C-16); 25,38 (C-28); 24,35 (C-15); 21,21 (C-21); 21,21 (C-11); 21,04 (C-26); 19,29 (C-27); 18,99 (C-3'); 18,86 (C-19); 12,21 (C-18); 12,04 (C-29).

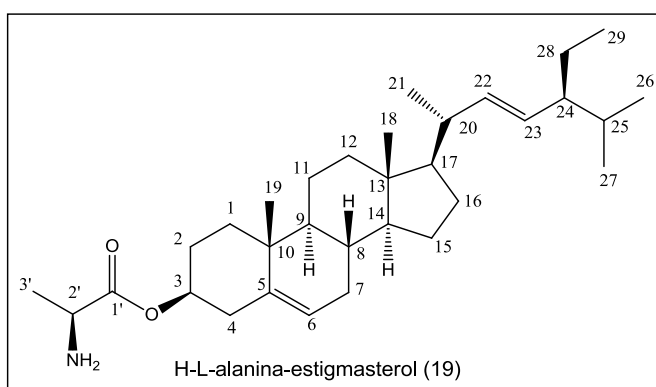


4.4.3.16 H-L-alanina-estigmasterol (**19**)

O derivado H-L-alanina-estigmasterol foi obtido conforme procedimento descrito no item 4.4.3.13. Em um balão de 10 mL, adicionou-se 200 mg (0,276 mmol) do produto **18** (obtido no item 4.4.3.15), 2,768 mL de DMF e 276  $\mu$ L de dietilamina. A reação permaneceu sob agitação por 1,5 h à temperatura ambiente. Durante este período a reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada tendo como eluentes hexano:acetato de etila (5:1).

A dietilamina e o solvente foram evaporados e após, adicionou-se éter etílico ao resíduo seguido de evaporação a pressão reduzida. O sólido obtido foi purificado em CCDP com hexano:acetato de etila (5:1) como eluentes. O rendimento reacional foi de 58,8%.

Dados físicos: H-L-alanina-estigmasterol (**19**): C<sub>32</sub>H<sub>53</sub>NO<sub>2</sub>; 483,77 g/mol; Sólido



branco; PF: 83,3 – 87 °C;  $[\alpha]_D = +40$  (c 0,05; CHCl<sub>3</sub>); RMN <sup>1</sup>H (200,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 5,36-5,38 (m, 1H, H-6); 5,15 (dd,  $J = 15,2$  e  $8,5$  Hz, 1H, H-22); 4,99 (dd,  $J = 15,2$  e  $8,5$  Hz, 1H, H-23); 4,60-4,64 (m, 1H, H-3); 3,50-3,54 (m, 1H, H-2'); 2,28-2,32 (m, 2H, H-4a, H-4b); 1,83-1,98 (m,

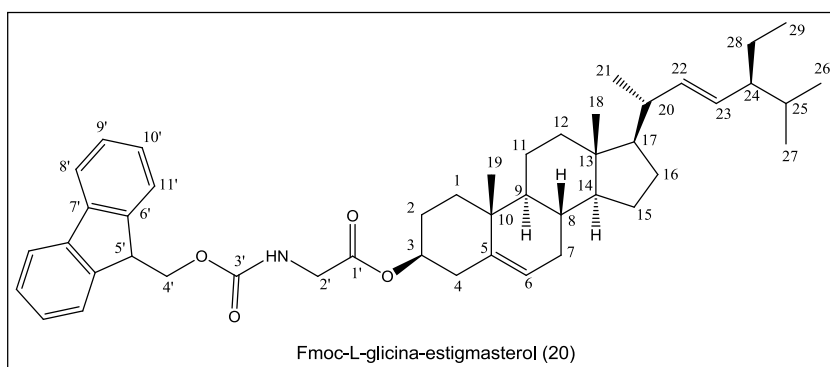
5H, H-12b, H-20, H-7b, H-1b, H-2a); 1,40-1,63 (m, 10H, H-16a, H-15a, H-25, H-24, H-2b, CH<sub>2</sub>-11, H-7a, H-8, H-28); 1,35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-3'); 1,12-1,24 (m, 6H, H-16b, H-12a, H-28, H-17, H-15b, H-1a); 1,01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-21); 1,01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0,93-0,99 (m, 2H, H-14, H-9); 0,85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-26); 0,82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-29); 0,79 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-27); 0,69 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18). RMN <sup>13</sup>C (50,32 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 175,75 (C=O, C-1'); 139,54 (C-5); 138,24 (C-22); 129,41 (C-23); 122,77 (C-6); 74,54 (C-3); 56,84 (C-14); 56,04 (C-17); 51,26 (C-9); 50,17 (C-24); 50,14 (C-2'); 42,27 (C-4); 40,41 (C-13); 39,68 (C-20); 38,08 (C-12); 37,01 (C-1); 36,64 (C-10); 31,92 (C-8); 31,92 (C-7); 31,88 (C-25); 28,85 (C-2); 27,77 (C-16); 25,37 (C-28); 24,36 (C-15); 21,22 (C-21); 21,06 (C-11); 21,02 (C-26); 20,58 (C-3'); 19,30 (C-27); 19,00 (C-19); 12,19 (C-18); 12,06 (C-29).

4.4.3.17 Fmoc-L-glicina-estigmasterol (**20**)

O derivado **20** foi obtido conforme procedimento descrito no item 4.4.3.4. Em um balão de 100 mL, adicionou-se 200 mg (0,484 mmol) de estigmasterol (**1**), 174,8 mg (0,588 mmol) de Fmoc-L-glicina-OH, 180  $\mu$ L (1 mmol; 0,742 g/mL) de DIEA, 150 mg (0,588 mmol) de BOP-Cl e 50 mL de diclorometano. A reação permaneceu sob agitação por 72 h a aproximadamente 0 °C e após, foi lavada com solução saturada de NaCl (2 x 30 mL). A fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e evaporada a pressão reduzida. O sólido obtido foi purificado em coluna cromatográfica com hexano como eluente inicial e acetato de etila como eluente final (gradiente de polaridade).

Todo o procedimento reacional foi acompanhado por CCD com hexano:acetato de etila (5:1) como eluentes. O produto foi obtido com 56,3% de rendimento.

Dados físicos: Fmoc-L-glicina-estigmasterol (**20**): C<sub>46</sub>H<sub>61</sub>NO<sub>4</sub>; 691,98 g/mol; Sólido



branco; PF: 68,4 – 70,5;  $[\alpha]_D = -40$  (*c* 0,05; CHCl<sub>3</sub>); RMN <sup>1</sup>H (200,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7,76 (d, *J* = 7,0 Hz, 2H, H-8'); 7,60 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H, H-11'); 7,26-

7,34 (m, 4H, H-9', H-10'); 5,37-5,39 (m, 1H, H-6); 5,14 (dd, *J* = 15,2 e 8,5 Hz, 1H, H-22); 5,10 (dd, *J* = 15,2 e 8,5 Hz, 1H, H-23); 4,69-4,72 (m, 1H, H-3); 4,38 (d, *J* = 6,9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-4'); 4,06-4,17 (m, 1H, H-5'); 3,96 (d, *J* = 5,3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-2'); 2,32-2,36 (m, 2H, H-4a, H-4b); 1,70-2,07 (m, 6H, H-12b, H-20, H-7b, H-1b, H-2a, H-16a); 1,41-1,60 (m, 9H, H-15a, H-25, H-24, H-2b, CH<sub>2</sub>-11, H-7a, H-8, H-28); 1,12-1,29 (m, 6H, H-16b, H-12a, H-28, H-17, H-15b, H-1a); 1,03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-21); 1,01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0,93-1,00 (m, 2H, H-14, H-9); 0,86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-26); 0,83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-29); 0,80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-27); 0,69 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18). RMN <sup>13</sup>C (50,32 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 169,33 (C=O, C-1'); 156,24 (C=O, C-3'); 143,90 (C-6'); 141,36 (C-7'); 139,36 (C-5); 138,23 (C-22); 129,44 (C-23); 127,71 (C-9'); 127,08 (C-8'); 125,08 (C-10'); 122,99 (C-6); 119,98 (C-11'); 75,49 (C-3); 67,26 (C-4'); 56,85 (C-14); 56,07 (C-17); 51,27 (C-9); 50,15 (C-24); 47,24 (C-5'); 43,08 (C-4); 42,28 (C-13); 40,39 (C-20); 39,69 (C-12); 38,07 (C-2');

36,97 (C-1); 36,63 (C-10); 31,92 (C-8); 31,92 (C-7); 31,88 (C-25); 28,85 (C-2); 27,76 (C-16); 25,37 (C-28); 24,37 (C-15); 21,22 (C-21); 21,07 (C-11); 21,02 (C-26); 19,28 (C-27); 19,01 (C-19); 12,19 (C-18); 12,07 (C-29).

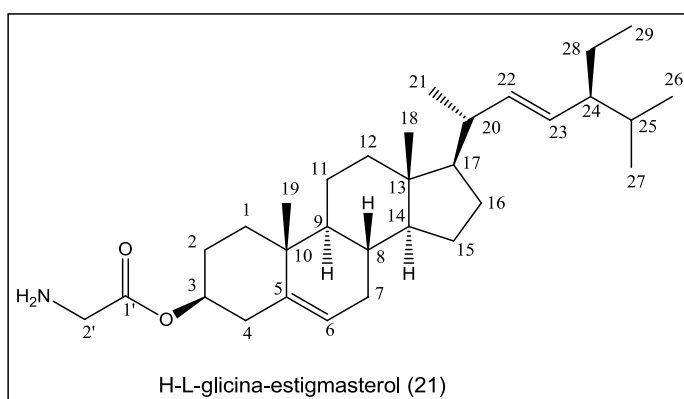
#### 4.4.3.18 H-L-glicina-estigmasterol (**21**)

O derivado H-L-glicina-estigmasterol foi obtido conforme procedimento descrito no item 4.4.3.13. Em um balão de 10 mL, adicionou-se 100 mg (0,144 mmol) do produto **20** (obtido no item 4.4.3.17), 1,44 mL de DMF e 144  $\mu$ L de dietilamina. A mistura reacional permaneceu sob agitação por 1,5 h à temperatura ambiente.

A dietilamina e o solvente foram evaporados e após, adicionou-se éter etílico ao resíduo seguido de evaporação em evaporador rotatório. O sólido obtido foi purificado em CCDP tendo como eluentes acetato de etila:metanol (85:5).

Todo o procedimento reacional foi acompanhado por CCD com hexano:acetato de etila (3:2) como eluentes. O rendimento reacional foi de 66,1%.

**Dados físicos:** H-L-glicina-estigmasterol (**21**): C<sub>31</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>2</sub>; 469,74 g/mol; Sólido



branco; PF: 107,5 – 112 °C;  $[\alpha]_D = -17,5$  (c 0,04; CHCl<sub>3</sub>); RMN <sup>1</sup>H (400,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 5,36-5,37 (m, 1H, H-6); 5,16 (dd, *J* = 15,2 e 8,5 Hz, 1H, H-22); 5,02 (dd, *J* = 15,2 e 8,5 Hz, 1H, H-23); 4,64-4,66 (m, 1H, H-3); 3,47 (s, 1H, H-2'b); 3,40 (s, 1H, H-2'a); 2,31-2,33

(m, 2H, H-4a, H-4b); 1,95-2,05 (m, 3H, H-12b, H-20, H-7b); 1,42-1,87 (m, 12H, H-1b, H-2a, H-16a, H-15a, H-25, H-24, H-2b, CH<sub>2</sub>-11, H-7a, H-8, H-28); 1,11-1,28 (m, 6H, H-16b, H-12a, H-28, H-17, H-15b, H-1a); 1,02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-21); 1,01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0,95-1,01 (m, 2H, H-14, H-9); 0,85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-26); 0,83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-29); 0,80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-27); 0,69 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18). RMN <sup>13</sup>C (100,62 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 173,39 (C=O, C-1'); 139,50 (C-5); 138,26 (C-22); 129,37 (C-23); 122,82 (C-6); 74,70 (C-3); 56,82 (C-14); 56,00 (C-17); 51,24 (C-9); 50,10 (C-24); 44,03 (C-4); 42,24 (C-13); 40,44 (C-20);

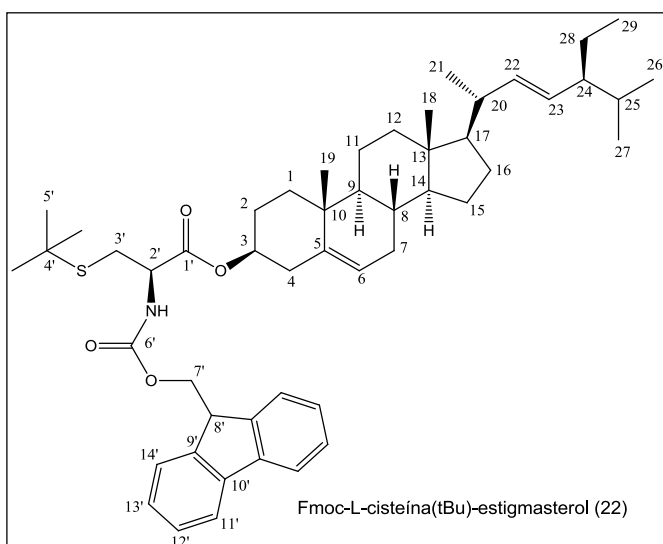
39,66 (C-12); 38,14 (C-2'); 36,98 (C-1); 36,62 (C-10); 31,89 (C-8); 31,89 (C-7); 31,88 (C-25); 28,87 (C-2); 27,80 (C-16); 25,38 (C-28); 24,36 (C-15); 21,21 (C-21); 21,04 (C-11); 21,04 (C-26); 19,29 (C-27); 18,99 (C-19); 12,21 (C-18); 12,05 (C-29).

#### 4.4.3.19 Fmoc-L-cisteína(tBu)-estigmasterol (**22**)

O derivado **22** foi obtido conforme procedimento descrito no item 4.4.3.4. Em um balão de 100 mL, adicionou-se 200 mg (0,484 mmol) de estigmasterol (**1**), 234 mg (0,588 mmol) de Fmoc-L-cisteína(tBu)-OH, 180  $\mu$ L (1 mmol; 0,742 g/mL) de DIEA, 150 mg (0,588 mmol) de BOP-Cl e 50 mL de diclorometano. A reação permaneceu sob agitação por 24 h a aproximadamente 0 °C e após, foi lavada com solução saturada de NaCl (2 x 30 mL). A fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e evaporada a pressão reduzida. O sólido obtido foi purificado em CCDP tendo como eluentes hexano:acetato de etila (5:1).

Todo o procedimento reacional foi acompanhado por CCD com hexano:acetato de etila (5:1) como eluentes. O produto foi obtido com 26,6% de rendimento.

**Dados físicos:** Fmoc-L-cisteína(tBu)-estigmasterol (**22**): C<sub>51</sub>H<sub>71</sub>NO<sub>4</sub>S; 794,18 g/mol;



Sólido branco; PF: 138,7 – 140,8 °C;  $[\alpha]_D = -34$  (c 0,05; CHCl<sub>3</sub>); RMN <sup>1</sup>H (200,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7,74 (d,  $J = 7,3$  Hz, 2H, H-11'); 7,59 (d,  $J = 7,1$  Hz, 2H, H-14'); 7,31-7,40 (m, 4H, H-12', H-13'); 5,66 (d,  $J = 7,9$  Hz, 1H, NH); 5,37-5,40 (m, 1H, H-6); 5,15 (dd,  $J = 15,2$  e 8,5 Hz, 1H, H-22); 5,00 (dd,  $J = 15,2$  e 8,5 Hz, 1H, H-23); 4,67-4,72 (m, 1H, H-3);

4,60-4,64 (m, 1H, H-2'); 4,37 (d,  $J = 7,6$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-7'); 4,20-4,27 (m, 1H, H-8'); 3,01-3,03 (m, 1H, H-3'a); 2,33-2,37 (m, 3H, H-3'b, H-4a, H-4b); 1,85-2,10 (m, 5H, H-12b, H-20, H-7b, H-1b, H-2a); 1,41-1,64 (m, 10H, H-16a, H-15a, H-25, H-24, H-2b, CH<sub>2</sub>-11, H-7a, H-8, H-28); 1,31 (m, 9H, CH<sub>3</sub>-5'); 1,08-1,25 (m, 6H, H-16b, H-12a, H-

28, H-17, H-15b, H-1a); 1,03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-21); 1,01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0,92-1,01 (m, 2H, H-14, H-9); 0,86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-26); 0,83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-29); 0,80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-27); 0,69 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18). RMN <sup>13</sup>C (100,62 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 169,90 (C=O, C-1'); 152,89 (C=O, C-6'); 143,83 (C-9'); 141,31 (C-10'); 141,25 (C-5); 138,26 (C-22); 129,36 (C-23); 127,69 (C-11'); 127,07 (C-12'); 125,11 (C-13'); 122,99 (C-6); 119,95 (C-14'); 75,77 (C-3); 67,24 (C-7'); 57,01 (C-2'); 56,81 (C-14); 56,00 (C-17); 51,25 (C-9); 50,08 (C-24); 47,16 (C-8'); 42,46 (C-4'); 42,24 (C-4); 40,44 (C-13); 39,65 (C-20); 37,96 (C-12); 36,94 (C-1); 36,61 (C-10); 31,98 (C-8); 31,98 (C-7); 31,88 (C-25); 30,91 (C-5'); 28,91 (C-3'); 28,87 (C-2); 27,74 (C-16); 25,38 (C-28); 24,36 (C-15); 21,22 (C-21); 21,04 (C-11); 21,04 (C-26); 19,31 (C-27); 18,99 (C-19); 12,21 (C-18); 12,05 (C-29).

#### 4.4.3.20 H-L-cisteína(tBu)-estigmasterol (**23**)

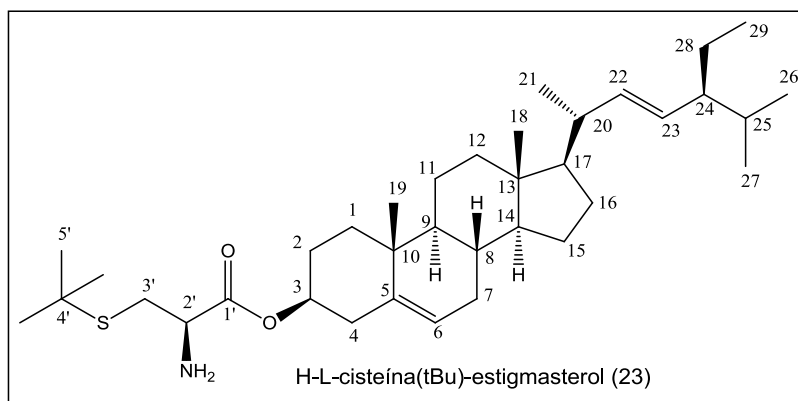
O derivado H-L-cisteína(tBu)-estigmasterol foi obtido conforme procedimento descrito no item 4.4.3.13. Em um balão de 10 mL, adicionou-se 200 mg (0,251 mmol) do produto **22** (obtido no item 4.4.3.19), 2,51 mL de DMF e 251 µL de dietilamina. A reação permaneceu sob agitação por 1,5 h à temperatura ambiente.

A dietilamina e o solvente foram evaporados e após, adicionou-se éter etílico ao resíduo seguido de evaporação a pressão reduzida. O sólido obtido foi purificado em CCDP com hexano:acetato de etila (3:2) como eluentes.

Todo o procedimento reacional foi acompanhado por CCD com hexano:acetato de etila (3:2) como eluentes. O rendimento reacional foi de 23,1%.

Dados físicos: H-L-cisteína(tBu)-estigmasterol (**23**): C<sub>36</sub>H<sub>61</sub>NO<sub>2</sub>S; 571,94 g/mol; Sólido amarelado; PF: 71,5 – 74,5 °C; [α]<sub>D</sub> = -36 (c 0,05; CHCl<sub>3</sub>); RMN <sup>1</sup>H (200,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5,36-5,38 (m, 1H, H-6); 5,15 (dd, J = 15,2 e 8,5 Hz, 1H, H-22); 5,00 (dd, J = 15,2 e 8,5 Hz, 1H, H-23); 4,64-4,68 (m, 1H, H-3); 3,60-3,66 (m, 1H, H-2'); 2,94 (dd, J = 12,4 e 7,8 Hz, 1H, H-3'a); 2,78 (dd, J = 12,3 e 7,3 Hz, 1H, H-3'b); 2,32-2,35 (m, 2H, H-4a, H-4b); 1,84-2,02 (m, 5H, H-12b, H-20, H-7b, H-1b, H-2a); 1,40-1,64 (m, 10H, H-16a, H-15a, H-25, H-24, H-2b, CH<sub>2</sub>-11, H-7a, H-8, H-28); 1,32 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-5'); 1,11-1,24 (m, 6H, H-16b, H-12a, H-28, H-17, H-15b, H-1a); 1,01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-21); 1,01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0,93-0,99 (m, 2H, H-14, H-9); 0,85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-26);

0,82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-29); 0,79 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-27); 0,68 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18). RMN <sup>13</sup>C (50,32



MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 173,23 (C=O, C-1'); 139,46 (C-5); 138,25 (C-22); 129,34 (C-23); 122,83 (C-6); 74,99 (C-3); 56,80 (C-14); 55,98 (C-17); 54,57 (C-2'); 51,23 (C-9); 50,08 (C-24); 42,39 (C-4'); 42,23 (C-4); 40,42

(C-13); 39,64 (C-20); 38,05 (C-12); 36,96 (C-1); 36,60 (C-10); 33,43 (C-3'); 31,86 (C-8); 31,86 (C-7); 31,86 (C-25); 30,99 (C-5'); 28,86 (C-2); 27,74 (C-16); 25,37 (C-28); 24,34 (C-15); 21,20 (C-21); 21,03 (C-11); 21,03 (C-26); 19,30 (C-27); 18,98 (C-19); 12,20 (C-18); 12,04 (C-29).

#### 4.4.3.21 Boc-L-glutâmico(OBz)-estigmasterol (24)

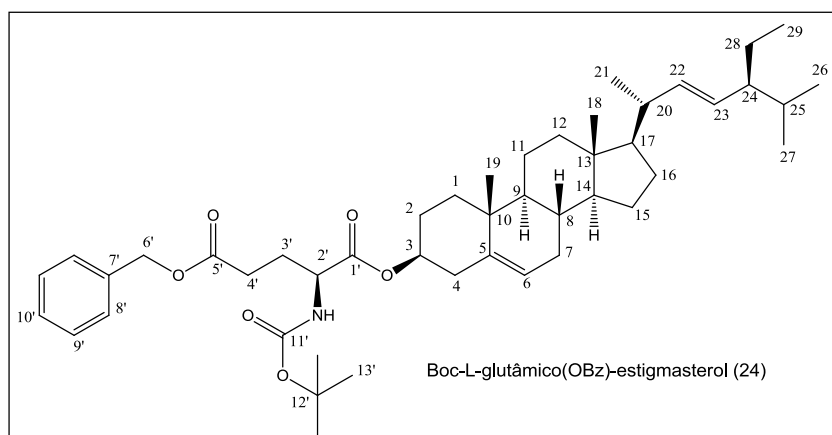
O derivado **24** foi obtido conforme procedimento descrito no item 4.4.3.3. Em um balão de 100 mL, adicionou-se 200 mg (0,484 mmol) de estigmasterol (**1**), 220 mg (0,652 mmol) de Boc-L-glutâmico(OBz)-OH, 2 mg (0,0163 mmol) de DMAP, 199,7 mg (0,968 mmol) de DCC e 50 mL de diclorometano. A mistura reacional foi agitada por 24 h à temperatura ambiente. Durante este período, a reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada tendo como eluentes hexano:acetato de etila (5:1).

O precipitado de DCU foi filtrado e o resíduo líquido extraído conforme procedimento descrito no item 4.4.3.3, seco e evaporado a pressão reduzida.

O produto foi purificado em CCDP com hexano:acetato de etila (5:1). O produto foi obtido com rendimento de 38,1%.

**Dados físicos:** Boc-L-glutâmico(OBz)-estigmasterol (**24**): C<sub>49</sub>H<sub>69</sub>NO<sub>6</sub>; 732,04 g/mol; Sólido branco; PF: 99,0 – 100,5 °C; [α]<sub>D</sub> = -30 (c 0,05; CHCl<sub>3</sub>); RMN <sup>1</sup>H (200,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,35 (s, 5H-aromáticos), 5,35-5,37 (m, 1H, H-6); 5,17 (dd, J = 15,2 e 8,5 Hz, 1H, H-22); 5,12 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-6'); 5,09 (dd, J = 15,2 e 8,5 Hz, 1H, H-23); 4,94-4,98 (m, 1H, H-2'); 4,62-4,66 (m, 1H, H-3); 4,27-4,30 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-3'); 2,41-2,50 (m, 2H,

CH<sub>2</sub>-4'); 2,28-2,32 (m, 2H, H-4a, H-4b); 2,17-2,21 (m, 2H, H-12b, H-20); 1,83-2,01 (m, 3H, H-7b, H-1b, H-2a); 1,46-1,64 (m, 9H, H-16a, H-15a, H-25, H-24, H-2b, CH<sub>2</sub>-



11, H-7a, H-8); 1,43 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-13'); 1,12-1,28 (m, 7H, H-28, H-16b, H-12a, H-28, H-17, H-15b, H-1a); 1,03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-21); 1,00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0,92-1,00 (m, 2H, H-14, H-9); 0,85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-26); 0,82 (s,

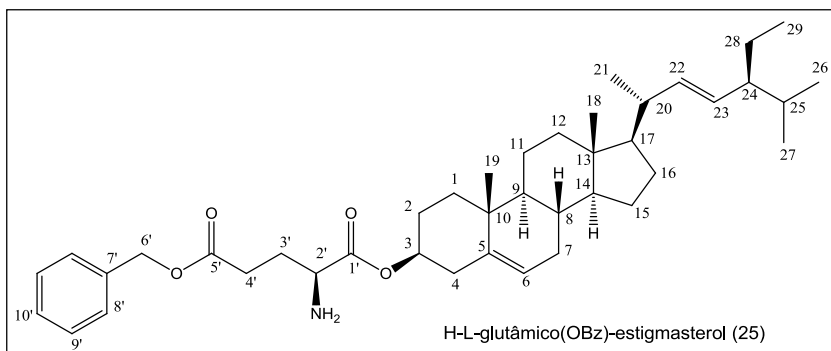
3H, CH<sub>3</sub>-29); 0,80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-27); 0,69 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18). RMN <sup>13</sup>C (50,32 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 172,53 (C=O, C-5'); 171,51 (C=O, C-1'); 155,35 (C=O, C-11'); 139,30 (C-5); 138,25 (C-22); 135,84 (C-7'); 129,35 (C-23); 128,55 (C-9'); 128,24 (C-10'); 128,20 (C-8'); 122,93 (C-6); 79,90 (C-12'); 75,34 (C-3); 66,45 (C-6'); 56,80 (C-14); 55,99 (C-17); 53,08 (C-2'); 51,24 (C-9); 50,07 (C-24); 42,23 (C-4); 40,43 (C-13); 39,64 (C-20); 37,97 (C-12); 36,92 (C-1); 36,59 (C-10); 31,87 (C-8); 31,87 (C-7); 30,33 (C-25); 29,68 (C-4'); 28,86 (C-2); 28,31 (C-13'); 27,98 (C-16); 27,69 (C-3'); 25,38 (C-28); 24,35 (C-15); 21,20 (C-21); 21,04 (C-11); 21,04 (C-26); 19,28 (C-27); 18,98 (C-19); 12,20 (C-18); 12,04 (C-29).

#### 4.4.3.22 H-L-glutâmico(OBz)-estigmasterol (25)

O derivado H-L-glutâmico(OBz)-estigmasterol foi obtido conforme procedimento descrito no item 4.4.3.5. Em um balão de 10 mL, adicionou-se 50 mg (0,0716 mmol) do produto **24** (obtido no item 4.4.3.21) e 1200 µL de uma solução de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:TFA (1:1). A reação permaneceu sob agitação à temperatura ambiente por 1,5 h. Após, o solvente foi evaporado, adicionou-se 5 mL de éter etílico (3x) ao resíduo e evaporou-se novamente o solvente, ocorrendo a formação de um precipitado branco puro.

Todo o procedimento reacional foi acompanhado por CCD com hexano:acetato de etila (3:2) como eluentes. O rendimento reacional foi quantitativo.

Dados físicos: H-L-glutâmico(OBz)-estigmasterol (**25**): C<sub>41</sub>H<sub>61</sub>NO<sub>4</sub>; 631,93 g/mol; Sólido branco; PF: 64 - 69,5 °C; [α]<sub>D</sub> = -32 (c 0,05; CHCl<sub>3</sub>); RMN <sup>1</sup>H (200,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,33 (s, 5H-aromáticos), 5,34-5,36 (m, 1H, H-6); 5,15 (dd, J = 15,2 e 8,5 Hz, 1H, H-22); 5,10 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-6'); 4,96 (dd, J = 15,2 e 8,5 Hz, 1H, H-23); 4,62-4,66 (m, 1H, H-3); 4,13-4,14 (m, 1H, H-2'); 2,60-2,62 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-4'); 2,23-2,32 (m, 3H, H-4a, H-4b, H-12b); 1,81-2,17 (m, 6H, H-20, H-7b, CH<sub>2</sub>-3', H-1b, H-2a); 1,46-



1,67 (m, 9H, H-16a, H-15a, H-25, H-24, H-2b, CH<sub>2</sub>-11, H-7a, H-8); 1,08-1,29 (m, 7H, H-28, H-16b, H-12a, H-28, H-17, H-15b, H-1a); 1,03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-21);

1,00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0,93-0,98 (m, 2H, H-14, H-9); 0,86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-26); 0,83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-29); 0,80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-27); 0,69 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18). RMN <sup>13</sup>C (50,32 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 172,92 (C=O, C-5'); 168,39 (C=O, C-1'); 138,84 (C-5); 138,23 (C-22); 135,27 (C-7'); 129,44 (C-23); 128,61 (C-9'); 128,44 (C-10'); 128,30 (C-8'); 123,34 (C-6); 77,38 (C-3); 67,19 (C-6'); 56,80 (C-14); 56,00 (C-17); 52,54 (C-2'); 51,25 (C-9); 50,04 (C-24); 42,23 (C-4); 40,46 (C-13); 39,64 (C-20); 37,69 (C-12); 36,81 (C-1); 36,52 (C-10); 31,87 (C-8); 31,83 (C-7); 31,73 (C-25); 29,88 (C-4'); 28,86 (C-2); 27,30 (C-16); 25,38 (C-28); 25,21 (C-3'); 24,34 (C-15); 21,29 (C-21); 21,04 (C-11); 21,04 (C-26); 19,19 (C-27); 19,01 (C-19); 12,20 (C-18); 12,05 (C-29).

#### 4.4.4 Síntese dos derivados do ácido ursólico (**2**)

##### 4.4.4.1 Ácido acetil ursólico (**26**)

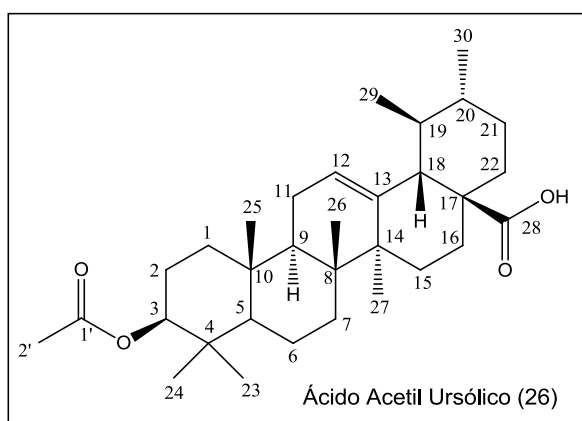
A Acetilação do ácido ursólico foi realizada segundo o método descrito por Gnoatto *et al.* (2008).<sup>42</sup> Em um balão de 50 mL contendo uma solução de 300 mg (0,659 mmol) de ácido ursólico (**2**) em 2,5 mL de piridina seca, à temperatura ambiente, foi adicionado lentamente 8,24 mL de anidrido acético. A mistura reacional



permaneceu sob agitação por 24 h à temperatura ambiente. Durante este período, a reação foi acompanhada por CCD com hexano:acetato de etila (5:1) como eluentes.

Após, adicionou-se à mistura reacional 50 mL de uma solução de HCl 10% e extraiu-se com acetato de etila (4 x 25 mL). A fase orgânica foi lavada com 50 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio e 50 mL de solução saturada de cloreto de sódio, seca com sulfato de magnésio, filtrada e evaporada a pressão reduzida até seca para a obtenção de um sólido branco. O produto foi purificado por CCDP utilizando como eluentes hexano:acetato de etila (5:1) e o rendimento foi de 91,7%.

**Dados físicos:** Ácido acetil ursólico (**26**):  $C_{32}H_{50}O_4$ ; 498,74 g/mol; Sólido branco; PF:



275,0 – 276,2 °C;  $[\alpha]_D = nd$ ; RMN  $^1H$  (200,13 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 5,23 (t,  $J = 6,8$  e 3,3 Hz, 1H, H-12); 4,96 (t,  $J = 15,4$  e 7,8 Hz, 1H, H-3); 2,15 (d,  $J = 11,1$  Hz, 1H, H-18); 2,04 (s, 3H,  $CH_3$ -2'); 1,93 (dd,  $J = 13,7$  e 3,5 Hz, 2H, H-11); 1,86-1,89 (m, 2H, H-16a, H-15b); 1,66 (s, 1H, H-9); 1,25-1,62 (m, 13H, H-22b, H-16b, H-1a,

H-21b, H-7b, H-6a,  $CH_2$ -2, H-22a, H-6b, H-21a, H-7a, H-19); 1,12 (s, 3H,  $CH_3$ -27); 1,04-1,06 (m, 3H, H-15a, H-20, H-1a); 0,95 (d,  $J = 6,8$  Hz, 3H,  $CH_3$ -30); 0,86 (s, 3H,  $CH_3$ -23); 0,86 (s, 3H,  $CH_3$ -25); 0,84 (d,  $J = 5,9$  Hz, 3H,  $CH_3$ -29); 0,76 (s, 3H,  $CH_3$ -26); 0,74 (s, 3H,  $CH_3$ -24); 0,74 (s, 1H, H-5); RMN  $^{13}C$  (50,32 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 182,98 (C=O, C-28); 170,90 (C=O, C-1'); 138,05 (C-13); 125,82 (C-12); 81,01 (C-3); 55,43 (C-5); 52,69 (C-18); 48,04 (C-9); 47,59 (C-17); 42,03 (C-14); 39,64 (C-8); 39,11 (C-20); 38,91 (C-19); 38,40 (C-4); 37,77 (C-1); 37,01 (C-10); 36,78 (C-22); 32,97 (C-21); 30,67 (C-7); 28,13 (C-23); 28,09 (C-15); 24,17 (C-2); 23,64 (C-16); 23,61 (C-27); 23,36 (C-11); 21,21 (C-30); 21,14 (C-2'); 18,25 (C-6); 17,18 (C-29); 17,01 (C-24); 16,72 (C-25); 15,56 (C-26).

#### 4.4.4.2 Acetil ursólico-prolina-OMe (**27**)

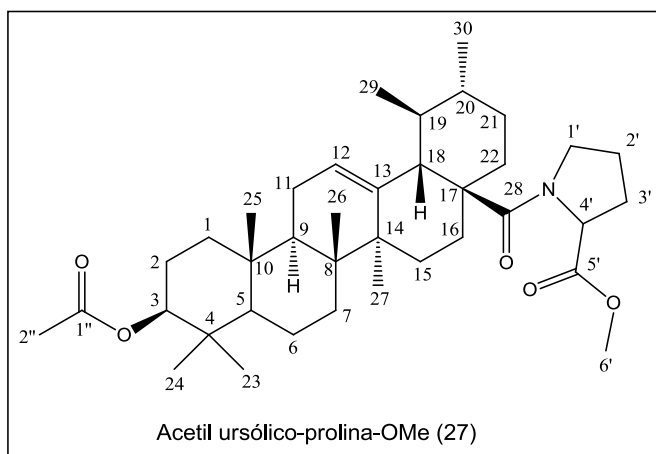
O derivado acetil ursólico-prolina-OMe foi obtido em 2 etapas segundo o método descrito por Gnoatto *et al.* (2008).<sup>42</sup>

Etapa 1: Em um balão de 50 mL contendo uma solução de 50 mg (0,1 mmol) de ácido acetil ursólico (obtido no item 4.4.4.1) em 10 mL de clorofórmio, foi adicionado lentamente, à temperatura de 0 °C, 24,7 µL (0,3 mmol; 1,5 g/mL) de cloreto de oxalila. Após a adição, a reação foi agitada à temperatura ambiente por 24h.

Etapa 2: Decorrido o tempo reacional, 83,5 µL (0,6 mmol; 0,726 g/mL) de trietilamina e 49,6 mg (0,3 mmol) do aminoácido H-prolina-OMe foram adicionados. A mistura reacional permaneceu sob agitação à temperatura ambiente por 24h e após, H<sub>2</sub>O (10 mL) e clorofórmio (10 mL x 3) foram adicionados. As fases foram separadas e a fase orgânica seca e purificada em coluna cromatográfica com hexano:acetato de etila (9:1) como eluentes iniciais e hexano:acetato de etila (1:1) como eluentes finais (gradiente de polaridade).

Todo o procedimento reacional foi acompanhado por CCD com hexano:acetato de etila (5:1) como eluentes. O produto foi obtido com 72,8% de rendimento.

**Dados físicos:** Acetil ursólico-prolina-OMe (**27**): C<sub>38</sub>H<sub>59</sub>NO<sub>5</sub>; 609,88 g/mol; Sólido branco; PF: 279,0 – 281,5 °C; [α]<sub>D</sub> = nd; RMN <sup>1</sup>H (200,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5,16 (t, *J* = 6,8 e 3,3 Hz, 1H, H-12); 4,43-4,46 (m, 1H, H-3); 4,35-4,38 (m, 1H, H-4'); 3,75-3,84



(m, 1H, H-1'a); 3,60 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-6'); 3,38-3,46 (m, 1H, H-1'b); 2,38 (d, *J* = 11,1 Hz, 1H, H-18); 2,07-2,14 (m, 2H, H-3'a, H-3'b); 1,97 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-2''); 1,92 (dd, *J* = 13,7 e 3,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-11); 1,69-1,86 (m, 5H, H-16a, H-15b, CH<sub>2</sub>-2', H-9); 1,09-1,62 (m, 16H, H-22b, H-16b, H-1b, H-21b, H-7b, H-6a, CH<sub>2</sub>-2, H-22a, H-6b, H-

21a, H-7a, H-19, H-20, H-15a, H-1a); 1,00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-27); 0,98 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-30); 0,87 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-23); 0,86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-25); 0,81 (d, *J* = 5,9 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-29); 0,78 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-26); 0,78 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-24); 0,67 (s, 1H, H-5); RMN <sup>13</sup>C (50,32 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 175,49 (C=O, C-28); 173,23 (C=O, C-5'); 170,91 (C=O, C-1'); 138,28 (C-13); 125,44 (C-12); 80,95 (C-3); 61,20 (C-4'); 55,39 (C-5); 53,97 (C-18); 51,85 (C-6'); 48,35 (C-9); 47,65 (C-1'); 47,61 (C-17); 42,29 (C-14); 39,44 (C-8); 39,18 (C-20); 38,53 (C-19); 38,25 (C-4); 37,69 (C-1); 36,94 (C-10); 36,90 (C-22); 33,43 (C-3');

33,10 (C-21); 30,45 (C-7); 28,06 (C-23); 28,00 (C-15); 27,42 (C-2'); 25,58 (C-2); 23,68 (C-16); 23,55 (C-27); 23,22 (C-11); 21,23 (C-30); 21,23 (C-2''); 18,19 (C-6); 17,23 (C-29); 16,84 (C-24); 16,69 (C-25); 15,47 (C-26).

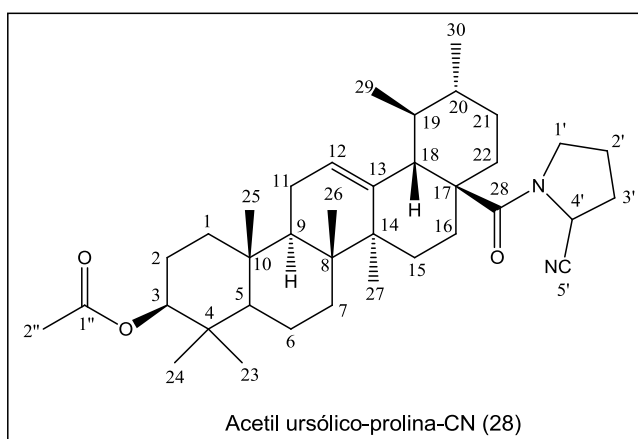
#### 4.4.4.3 Acetil ursólico-prolina-CN (**28**)

O derivado **28** foi obtido conforme procedimento descrito no item 4.4.4.2. Foram utilizados na primeira etapa reacional um balão de 50 mL, 50 mg (0,1 mmol) de ácido acetil ursólico (obtido no item 4.4.4.1), 10 mL de diclorometano e 24,7  $\mu$ L (0,3 mmol; 1,5 g/L) de cloreto de oxalila. A reação foi agitada à temperatura ambiente por 24 h.

Na segunda etapa reacional foram utilizados 83,5  $\mu$ L (0,6 mmol; 0,726 g/mL) de trietilamina e 39,7 mg (0,3 mmol) do aminoácido H-prolina-CN. A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente por 24h e após, extraída com água/clorofórmio. A fase orgânica foi seca e purificada em coluna cromatográfica com hexano como eluente inicial e hexano:acetato de etila (5:1) como eluentes finais (gradiente de polaridade).

Todo o procedimento reacional foi acompanhado por CCD com hexano:acetato de etila (5:1) como eluentes. O produto foi obtido com 27,8% de rendimento.

Dados físicos: Acetil ursólico-prolina-CN (**28**): C<sub>37</sub>H<sub>56</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; 576,85 g/mol; Sólido branco; PF: 261,5 – 264,5 °C;  $[\alpha]_D = \text{nd}$ ; RMN <sup>1</sup>H (400,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 5,20 (t, *J* =



6,8 e 3,3 Hz, 1H, H-12); 4,59-4,61 (m, 1H, H-4'); 4,41-4,45 (m, 1H, H-3); 3,66-3,71 (m, 1H, H-1'a); 3,44-3,47 (m, 1H, H-1'b); 2,41 (d, *J* = 11,1 Hz, 1H, H-18); 2,07-2,14 (m, 2H, H-3'a, H-3'b); 1,97 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-2''); 1,92 (dd, *J* = 13,7 e 3,5 Hz, 2H, H-11); 1,85-1,87 (m, 5H, H-16a, H-15b, CH<sub>2</sub>-2', H-9); 1,19-1,71 (m, 13H, H-

22b, H-16b, H-1b, H-21b, H-7b, H-6a, CH<sub>2</sub>-2, H-22a, H-6b, H-21a, H-7a, H-19); 1,02

(s, 3H, CH<sub>3</sub>-27); 0,89-1,01 (m, 3H, H-15a, H-20, H-1a); 0,89 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-30); 0,88 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-23); 0,87 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-25); 0,81 (d, *J* = 5,9 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-29); 0,79 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-26); 0,78 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-24); 0,67 (s, 1H, H-5); RMN <sup>13</sup>C (100,62 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 175,81 (C=O, C-28); 170,91 (C=O, C-1''); 138,23 (C-13); 125,57 (C-12); 118,77 (C≡N, C-5'); 80,89 (C-3); 55,36 (C-5); 53,71 (C-18); 49,33 (C-4'); 48,82 (C-9); 47,54 (C-1'); 47,29 (C-17); 42,22 (C-14); 39,47 (C-8); 39,29 (C-20); 38,67 (C-19); 38,26 (C-4); 37,67 (C-1); 36,91 (C-10); 36,91 (C-22); 33,80 (C-3'); 32,97 (C-21); 30,35 (C-7); 28,05 (C-23); 28,00 (C-15); 27,95 (C-2'); 26,16 (C-2); 23,74 (C-16); 23,54 (C-27); 23,26 (C-11); 21,23 (C-30); 21,13 (C-2''); 18,15 (C-6); 17,21 (C-29); 16,94 (C-24); 16,67 (C-25); 15,46 (C-26).

#### 4.4.4.4 Acetil ursólico-prolina-prolina-OMe (**29**)

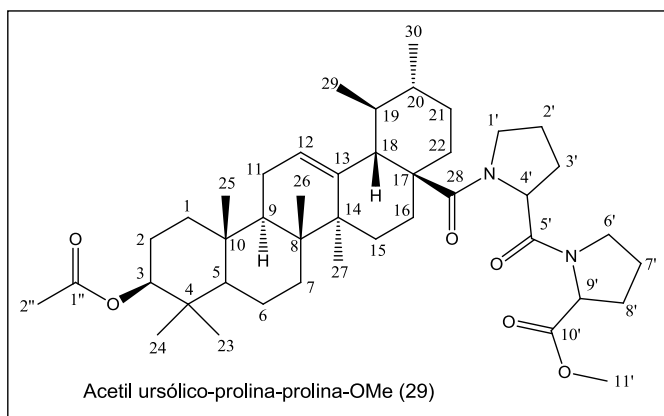
O derivado **29** foi obtido conforme procedimento descrito no item 4.4.4.2. Foram utilizados na primeira etapa reacional um balão de 50 mL, 50 mg (0,1 mmol) de ácido acetil ursólico (obtido no item 4.4.4.1), 10 mL de diclorometano e 24,7 µL (0,3 mmol; 1,5 g/L) de cloreto de oxalila. A reação foi agitada à temperatura ambiente por 24 h.

Na segunda etapa reacional foram utilizados 83,5 µL (0,6 mmol; 0,726 g/mL) de trietilamina e 78,7 mg (0,3 mmol) do aminoácido H-prolina-prolina-OMe. A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente por 24h e após, extraída com água/clorofórmio. A fase orgânica foi seca e purificada em coluna cromatográfica com hexano:acetato de etila (95:5) como eluentes iniciais e hexano:acetato de etila (1:1) como eluentes finais (gradiente de polaridade).

Todo o procedimento reacional foi acompanhado por CCD com hexano:acetato de etila (5:1) como eluentes. O produto foi obtido com 82,2% de rendimento.

Dados físicos: Acetil ursólico-prolina-prolina-OMe (**29**): C<sub>43</sub>H<sub>66</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>; 706,99 g/mol; Sólido amarelado; PF: 153,9 – 157 °C; [α]<sub>D</sub> = nd; RMN <sup>1</sup>H (200,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5,14 (t, *J* = 6,8 e 3,3 Hz, 1H, H-12); 4,53-4,55 (m, 1H, H-3); 4,40-4,48 (m, 2H, H-9', H-4'); 3,71-3,77 (m, 2H, H-1'a, H-6'a); 3,59 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-11'); 3,47-3,48 (m, 2H, H-1'b,

H-6'b); 2,38 (d,  $J = 11,1$  Hz, 1H, H-18); 2,05-2,15 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-8', CH<sub>2</sub>-3'); 1,95 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-2''); 1,92 (dd,  $J = 13,7$  e  $3,5$  Hz, 2H, H-11); 1,24-1,86 (m, 20H, H-16a, H-15b, CH<sub>2</sub>-7', CH<sub>2</sub>-2', H-9, H-22b, H-16b, H-1b, H-21b, H-7b, H-6a, CH<sub>2</sub>-2, H-22a, H-6b, H-21a, H-7a, H-19); 1,18 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-27); 1,01 (d,  $J = 6,8$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-30); 1,01 (m, 1H, H-20); 0,90 (m, 1H, H-1a); 0,90 (m, 1H, H-15a); 0,88 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-23); 0,85 (s,



3H, CH<sub>3</sub>-25); 0,84 (d,  $J = 5,9$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-29); 0,79 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-26); 0,78 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-24); 0,69 (s, 1H, H-5); RMN <sup>13</sup>C (50,32 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 175,12 (C=O, C-28); 173,03 (C=O, C-10'); 170,88 (C=O, C-1''); 170,85 (C=O, C-5'); 138,57 (C-13); 125,07 (C-12); 80,91 (C-3); 60,27

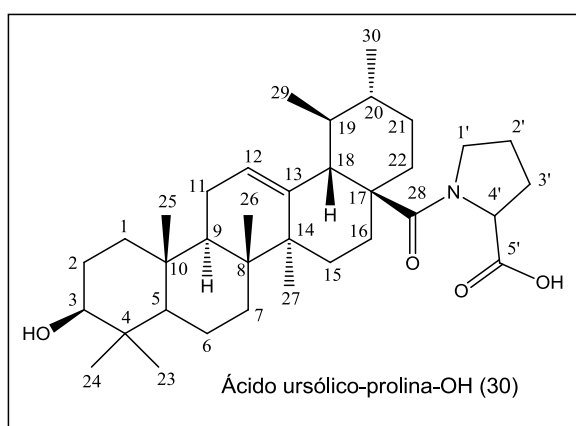
(C-4'); 58,43 (C-9'); 55,34 (C-5); 53,92 (C-18); 51,95 (C-11'); 48,24 (C-9); 47,86 (C-1'); 47,58 (C-17); 46,31 (C-6'); 42,28 (C-14); 39,44 (C-8); 39,18 (C-20); 38,49 (C-19); 38,22 (C-4); 37,66 (C-1); 36,91 (C-10); 36,91 (C-22); 33,43 (C-3'); 33,08 (C-21); 31,52 (C-8'); 30,41 (C-7); 28,68 (C-23); 28,03 (C-15); 26,56 (C-7'); 25,23 (C-2'); 24,77 (C-2); 23,71 (C-16); 23,53 (C-27); 23,18 (C-11); 21,22 (C-30); 21,22 (C-2''); 18,18 (C-6); 17,24 (C-29); 16,69 (C-24); 16,68 (C-25); 15,47 (C-26).

#### 4.4.4.5 Ácido ursólico-prolina-OH (30)

Em um balão de 50 mL contendo 50 mg (0,0819 mmol) do composto **27** (obtido no item 4.4.4.2) solubilizado em 5 mL de uma mistura de metanol:THF (2:3), sob agitação à temperatura ambiente, foi adicionado lentamente 1,2 mL de NaOH 4N. Após 20 horas, o solvente foi concentrado em rota evaporador, uma solução de HCl 3M foi adicionado até pH 2-3 e a mistura foi extraída com acetato de etila (20 mL x 3). A fase orgânica foi seca com MgSO<sub>4</sub> e evaporada. O resíduo obtido foi purificado em coluna cromatográfica com CHCl<sub>3</sub> como eluente inicial e MeOH como eluente final (gradiente de polaridade).

Todo o procedimento reacional foi acompanhado por CCDP com CHCl<sub>3</sub>:MeOH (95:5) como eluentes. O produto foi obtido com 55,1% de rendimento.

**Dados físicos:** Ácido ursólico-prolina-OH (**30**):  $C_{35}H_{55}NO_4$ ; 553,82 g/mol; Sólido branco; PF: 168,5 - 171,1 °C;  $[\alpha]_D = nd$ ; RMN  $^1H$  (400,13 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 5,17 (t,  $J = 6,8$  e  $3,3$  Hz, 1H, H-12); 4,48-4,50 (m, 1H, H-4'); 3,60-3,69 (m, 1H, H-1'a); 3,43-3,50 (m, 1H, H-1'b); 3,12-3,16 (m, 1H, H-3); 2,41 (d,  $J = 11,1$  Hz, 1H, H-18); 2,27-2,31 (m, 1H, H-3'a); 2,13-2,09 (m, 1H, H-3'b); 1,96 (dd,  $J = 13,7$  e  $3,5$  Hz, 2H,  $CH_2$ -11); 1,19-1,86 (m, 19H, H-16a, H-15b,  $CH_2$ -2', H-9, H-22b, H-16b, H-1b, H-21b, H-7b, H-6a,  $CH_2$ -2, H-22a, H-6b, H-21a, H-7a, H-19, H-15a); 1,07 (s, 3H,  $CH_3$ -27); 0,91-1,03 (m, 2H, H-20, H-1a); 0,91 (d,  $J = 6,8$  Hz, 3H,  $CH_3$ -30); 0,89 (s, 3H,  $CH_3$ -23); 0,85 (s, 3H,  $CH_3$ -25); 0,82 (d,  $J = 5,9$  Hz, 3H,  $CH_3$ -29); 0,81 (s, 3H,  $CH_3$ -26); 0,71 (s, 3H,  $CH_3$ -



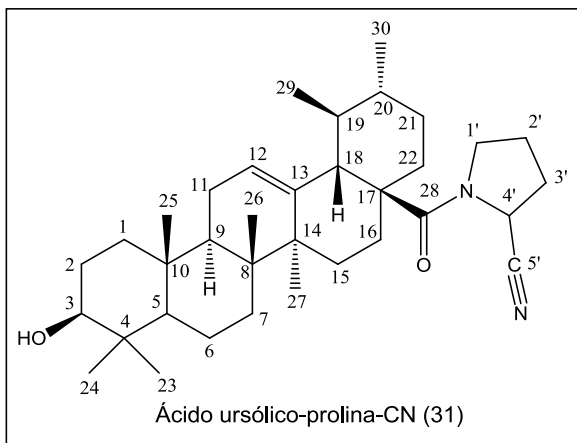
24); 0,67 (s, 1H, H-5); RMN  $^{13}C$  (100,62 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 178,92 (C=O, C-28); 173,98 (C=O, C-5'); 139,01 (C-13); 125,81 (C-12); 79,00 (C-3); 62,36 (C-4'); 55,19 (C-5); 53,92 (C-18); 49,06 (C-1'); 48,21 (C-9); 47,49 (C-17); 42,27 (C-14); 39,32 (C-8); 39,09 (C-20); 38,69 (C-19); 38,53 (C-4); 38,46 (C-1); 36,96 (C-10); 34,63 (C-22); 33,62 (C-3'); 33,04 (C-21); 30,25 (C-7); 28,08 (C-23); 28,02 (C-15); 27,11 (C-2'); 25,89 (C-2); 23,78 (C-16); 23,20 (C-27); 22,65 (C-11); 21,18 (C-30); 18,21 (C-6); 17,19 (C-29); 16,80 (C-24); 15,60 (C-25); 15,42 (C-26).

#### 4.4.4.6 Ácido ursólico-prolina-CN (**31**)

O composto **31** foi obtido conforme procedimento experimental descrito no item 4.4.4.5. Em um balão de 50 mL, à temperatura ambiente, contendo 50 mg (0,0866 mmol) do produto **28** (obtido no item 4.4.4.3) solubilizado em 5 mL de uma solução de MeOH:THF (2:3), foi adicionado lentamente 1,5 mL de NaOH 4N. Após 20 horas, o solvente foi concentrado em rota evaporador, uma solução de HCl 3M foi adicionado até pH 2-3 e a mistura foi extraída com acetato de etila (20 mL x 3). A fase orgânica foi seca com  $MgSO_4$  e evaporada. O resíduo obtido foi purificado em coluna cromatográfica com  $CHCl_3$  como eluente.

Todo o procedimento reacional foi acompanhado com CCD tendo como eluentes  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (95:5). O produto foi obtido com 54% de rendimento.

**Dados físicos:** Ácido ursólico-prolina-CN (**31**):  $\text{C}_{35}\text{H}_{54}\text{N}_2\text{O}_2$ ; 534,82 g/mol; Sólido



branco; PF: 149,8 - 154 °C;  $[\alpha]_D = \text{nd}$ ; RMN  $^1\text{H}$  (400,13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 5,20 (t,  $J = 6,8$  e  $3,3$  Hz, 1H, H-12); 4,58-4,60 (m, 1H, H-4'); 3,69-3,73 (m, 1H, H-1'a); 3,44-3,46 (m, 1H, H-1'b); 3,11-3,15 (m, 1H, H-3); 2,41 (d,  $J = 11,1$  Hz, 1H, H-18); 2,07-2,15 (m, 2H, H-3'a, H-3'b); 1,92 (dd,  $J = 13,7$  e  $3,5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -11); 1,19-1,86 (m, 19H, H-16a, H-15b,  $\text{CH}_2$ -2', H-9, H-22b,

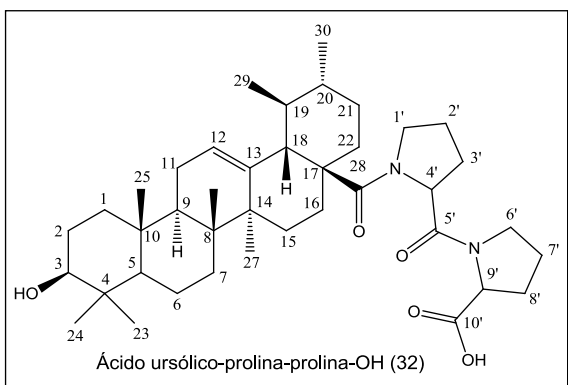
H-16b, H-1b, H-21b, H-7b, H-6a,  $\text{CH}_2$ -2, H-22a, H-6b, H-21a, H-7a, H-15a); 1,04 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -27); 1,02-1,03 (m, 2H, H-20, H-1a); 0,91 (d,  $J = 6,8$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ -30); 0,89 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -23); 0,87 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -25); 0,82 (d,  $J = 5,9$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ -29); 0,80 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -26); 0,70 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -24); 0,67 (s, 1H, H-5); RMN  $^{13}\text{C}$  (100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 175,82 (C=O, C-28); 138,20 (C-13); 125,71 (C-12); 118,80 (C $\equiv$ N, C-5'); 79,04 (C-3); 55,32 (C-5); 53,75 (C-18); 49,37 (C-4'); 48,85 (C-9); 47,63 (C-1'); 47,30 (C-17); 42,26 (C-14); 39,49 (C-8); 39,32 (C-20); 38,76 (C-19); 38,68 (C-4); 38,60 (C-1); 37,04 (C-10); 37,04 (C-22); 33,83 (C-3'); 33,08 (C-21); 30,38 (C-7); 28,83 (C-23); 28,13 (C-15); 27,26 (C-2'); 26,19 (C-2); 23,80 (C-16); 23,29 (C-27); 22,62 (C-11); 21,16 (C-30); 18,29 (C-6); 17,21 (C-29); 16,97 (C-24); 15,58 (C-25); 15,43 (C-26).

#### 4.4.4.7 Ácido ursólico-prolina-prolina-OH (**32**)

Para obtenção do derivado **32**, em um balão de 50 mL, uma solução contendo 50 mg (0,07 mmol) do produto **29** (obtido no item 4.4.4.4) em 5 mL de MeOH foi resfriada em banho de gelo, enquanto 300  $\mu\text{L}$  de NaOH 1N foi adicionado. A mistura reacional permaneceu sob agitação à temperatura ambiente por 20 h. Após, uma solução de HCl 1N foi adicionado, ocorrendo a precipitação de um sólido branco que foi filtrado à vácuo. O sólido obtido foi recristalizado com hexano:acetato de etila (1:1).

Todo o procedimento reacional foi acompanhado por CCD tendo como eluentes hexano:acetato de etila (1:1). O rendimento reacional foi de 40,8%.

**Dados físicos:** Ácido ursólico-prolina-prolina-OH (**32**):  $C_{40}H_{62}N_2O_5$ ; 650,93 g/mol; Sólido branco; PF: 196,5 – 199,5 °C;  $[\alpha]_D = nd$ ; RMN  $^1H$  (400,13 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 5,15



(t,  $J = 6,8$  e  $3,3$  Hz, 1H, H-12); 4,51 (t,  $J = 16,2$  e  $6,6$  Hz, 2H, H-9', H-4'); 3,79-3,82 (m, 1H, H-1'a); 3,69-3,70 (m, 1H, H-6'a); 3,44-3,49 (m, 2H, H-1'b, H-6'b); 3,14-3,16 (m, 1H, H-3); 2,37 (d,  $J = 11,1$  Hz, 1H, H-18); 1,96-2,24 (m, 4H, H-3'a, H-3'b, H-8'a, H-8'b); 1,89 (dd,  $J = 13,7$  e  $3,5$  Hz, 1H, H-11); 1,20-1,83 (m, 22H, H-16a, H-15b,

$CH_2-7'$ ,  $CH_2-2'$ , H-9, H-22b, H-16b, H-1b, H-21b, H-7b, H-6a,  $CH_2-2$ , H-22a, H-6b, H-21a, H-7a, H-20, H-1a, H-15a); 1,01 (s, 3H,  $CH_3-27$ ); 0,91 (d,  $J = 6,8$  Hz, 3H,  $CH_3-30$ ); 0,87 (s, 3H,  $CH_3-23$ ); 0,85 (s, 3H,  $CH_3-25$ ); 0,80 (d,  $J = 5,9$  Hz, 3H,  $CH_3-29$ ); 0,78 (s, 3H,  $CH_3-26$ ); 0,71 (s, 3H,  $CH_3-24$ ); 0,67 (s, 1H, H-5); RMN  $^{13}C$  (50,32 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 175,60 (C=O, C-28); 174,12 (C=O, C-10'); 172,44 (C=O, C-5'); 138,44 (C-13); 125,40 (C-12); 79,05 (C-3); 60,18 (C-4'); 59,79 (C-9'); 55,36 (C-5); 53,98 (C-18); 48,39 (C-9); 48,02 (C-1'); 47,71 (C-17); 47,25 (C-6'); 42,35 (C-14); 39,56 (C-8); 39,28 (C-20); 38,76 (C-19); 38,65 (C-4); 38,62 (C-1); 37,08 (C-10); 34,67 (C-22); 33,48 (C-3'); 33,21 (C-21); 31,53 (C-8'); 30,47 (C-7); 28,15 (C-23); 28,04 (C-15); 27,27 (C-7'); 27,08 (C-2'); 25,54 (C-2); 24,96 (C-16); 23,82 (C-27); 23,27 (C-11); 21,19 (C-30); 18,35 (C-6); 17,20 (C-29); 16,78 (C-24); 15,59 (C-25); 15,46 (C-26).



## 4.5 Atividades Biológicas

### 4.5.1 Atividade Antimicrobiana *in vitro*

#### 4.5.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de Microdiluição em caldo

A concentração inibitória mínima é a menor concentração de um composto testado capaz de inibir o crescimento de micro-organismos, sob condições de cultura adequadas e padronizadas. Este método trata-se de um ensaio quantitativo aplicado a avaliação do potencial das substâncias puras sintetizadas.

Para as análises foram utilizados cepas padrão da American Type Culture Collection (ATCC), composta de micro-organismos Gram-positivos, Gram-negativos e fungos, conforme a Tabela 1.

As substâncias utilizadas como padrões foram Ampicilina, Azitromicina e Levofloxacina para bactérias e Nistatina para fungos, preparadas conforme as normas da FDA.<sup>127</sup>

Os meios de cultura utilizados foram o Caldo de caseína de soja (5 g de cloreto de sódio, 2,5 g de dextrose, 2,5 g de fosfato dibásico de potássio, 17 g de peptona de caseína, 3 g de peptona de soja e 1 L de água destilada) para bactérias e o Caldo Sabouraud dextrosado (40 g de dextrose, 5 g de peptona de carne, 5 g de peptona de caseína e 1 L de água destilada) para os fungos.

**Tabela 1:** Micro-organismos indicadores.

<b>Micro-organismos (ATCC)</b>		
<b>Gram-positivos</b>	<b>Gram-Negativos</b>	<b>Fungos</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> (25923)	<i>Escherichia coli</i> (25922)	<i>Candida albicans</i> (10231)
<i>Bacillus subtilis</i> (6633)	<i>Enterobacter cloacae</i> (1304)	<i>Candida tropicalis</i> (18803)
<i>Bacillus cereus</i> (33019)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (9027)	<i>Candida krusei</i> (6258)
<i>Enterococcus spp.</i> (6589)	<i>Burkholderia cepacia</i> (17759)	<i>Candida parapslosis</i> (22018)
<i>Enterobacter aerogenes</i> (13048)	<i>Shigella sonnei</i> (25931)	<i>Cryptococcus neoformans</i> (28952)
	<i>Salmonella tryphimurium</i> (14028)	<i>Cryptococcus Gatti</i> (2601)
		<i>Sacharomyces cervisae</i> (2601)

#### 4.5.1.2 Método para a determinação da CIM

A determinação da CIM foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, conforme descrito pela *National Committee for Clinical Laboratories Standards (NCCLS)*<sup>128</sup>. Este teste foi realizado em placas de cultura estéreis de 96 poços. Nesta técnica, cada poço foi inoculado com os micro-organismos na concentração de  $1 \times 10^6$  células viáveis e, posteriormente, as amostras a serem testadas foram adicionadas no primeiro poço seguindo-se a diluição em série das mesmas, de 100 µg/mL até 3,12 µg/mL. As placas foram incubadas por 24 horas a 35 °C para as bactérias e, por 48 horas a 25 °C para os fungos. Após a incubação, determinou-se o crescimento microbiano através da leitura da microplaca em espectrofotômetro SpectraMax M2 e SoftMax Pro 5.4.1 (Molecular Devices Inc., USA) no comprimento de onda de 420 nm.

Todos os testes foram realizados em triplicata e comparados com os padrões. Utilizou-se também um controle positivo e um negativo para cada substância testada, de forma a garantir a reprodutibilidade do ensaio.

#### 4.5.1.3 Método da Concentração Letal Mínima (CLM)

A concentração letal mínima (CLM) é a menor concentração da substância capaz de alcançar uma redução maior que 99% do número das unidades formadoras de colônia (UFC), segundo Hammer.<sup>129</sup>

Neste método, as culturas de micro-organismos que não apresentaram crescimento ou foram inibidas no método CIM, foram inoculadas novamente utilizando 10 µL de cada uma das soluções presentes nos poços do teste anterior e 100 µL de um novo meio de cultura líquido apropriado para cada classe de micro-organismo.

Após a incubação, cumprindo-se o tempo necessário para o crescimento de cada micro-organismo (24 h, 35-37 °C para bactérias; 48 h, 25-27 °C para fungos) determinou-se a CLM que foi dividida em concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM) para cada substância pura testada, nos poços onde não houve crescimento microbiano.

#### 4.5.2 Atividades enzimáticas

##### 4.5.2.1 Enzimas e reagentes utilizados nas atividades enzimáticas

A enzima POP foi cedida pelo grupo do Prof. Ernest Giralt do Instituto de Pesquisa Biomédica de Barcelona (IRB-Espanha). O substrato o ZGP-AMC (N-benziloxicarbonil-Gli-Pro-metilcumarinil-7-amida) foi obtido comercialmente de Bachem (Bubendorf, Switzerland).

As enzimas AChE e BChE foram adquirida da Sigma Aldrich, assim como os substratos de cada enzima, respectivamente o ACTI (Iodeto de Acetilcolina) e o BCTI (Iodeto de Butirilcolina); a albumina de soro bovino e o DTNB [5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico)].

#### 4.5.2.2 Ensaio de inibição da prolil oligopeptidase (POP)

A atividade inibitória da POP foi determinada segundo o método descrito por Toide *et al.* (1995).<sup>130</sup> As reações foram realizadas em placa de 96 micropoços, o que permite seguir um monitoramento simultâneo das múltiplas reações. Para cada reação (cada poço), 135 µL do tampão fosfato Na/K (100 mM, pH 8.0) foi pré incubado por 15 minutos a 37 °C com 2 µL da enzima POP (7 nM) e 3 µL da solução do composto a ser testado. As amostras puras a serem testadas foram preparadas anteriormente em DMSO com uma concentração de 10 mM, de maneira que a concentração final no poço seja de 200 µM em um volume final de 150 µL.

Depois da pré-incubação, 10 µL do substrato ZGP-AMC (3 mM; 40 % de 1,4-dioxano em H<sub>2</sub>O mili-Q) foi adicionado a cada poço e a reação foi incubada por 1 hora a 37 °C. Após, a formação de N-aminometilcumarina (AMC) foi medida fluorometricamente nos comprimentos de onda de excitação e a emissão 360/40 e 485/20 nm, respectivamente.

Foram realizados controles negativos de cada substância a ser testada, contendo 3 µL de amostra, 137 µL de tampão fosfato Na/K e 10 µL do substrato ZGP-AMC. Estes controles são realizados a fim de observar se as amostras por si só não geram nenhuma fluorescência que possa interferir no resultado.

Também foram feitos controles positivos da enzima e seu respectivo controle negativo, o primeiro contendo 3 µL de DMSO, 135 µL de tampão fosfato Na/K, 2 µL de enzima e 10 µL de substrato (sem nenhum inibidor/amostra); e o segundo contendo apenas 3 µL de DMSO, 137 µL de tampão fosfato Na/K e 10 µL de substrato.

O ensaio foi realizado em triplicata e o ácido clorogênico foi utilizado como referência na inibição da POP por já ser um inibidor conhecido, nas mesmas condições experimentais.

A porcentagem de inibição foi calculada pela fluorescência da amostra utilizando-se a seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = 100 - [(I-N)/E] \times 100 \quad \text{eq. 1}$$

Sendo,

I: Fluorescência da inibição da amostra

N: Fluorescência do controle negativo da amostra

E: Fluorescência do controle positivo da enzima

#### 4.5.2.3 Ensaio de inibição da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase

As avaliações das atividades inibitórias das enzimas AChE e BChE foram realizadas através de um ensaio colorimétrico quantitativo, baseado no método adaptado de Ellman (Mohamed e Rao, 2010).<sup>131</sup>

Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados e incubados a 25°C por 5 min, 160 µL de reagente de Ellman's - DTNB (1,5 mM) em tampão B (50 mM Tris-HCl, pH 7,9 contendo NaCl 0,1 M e 0,02 M MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O), 50 µL da enzima AChE (0,22 U/mL) ou BChE (0,12 U/mL) em tampão A (50 mM Tris-HCl, pH 7,9 contendo 0,1% de albumina de soro bovino) e 10 µL da amostra. As amostras puras a serem testadas foram preparadas em uma solução estoque com DMSO a uma concentração de 5 mM, de tal forma que a concentração final no poço foi de 200 µM.

Após o tempo de incubação, 30 µL de ACTI ou BCTI (15 mM) em H<sub>2</sub>O milli-Q foi adicionado em cada poço e a microplaca foi novamente incubada a 25 °C. As leituras de absorbância em 405 nm foram realizadas a cada 60 segundos e o tempo considerado para o cálculo de inibição foi de 3 minutos após adição do ACTI ou BCTI.

Foram realizados controles negativos de cada substância a ser testada. Estes controles negativos foram feitos adicionando-se ao poço, conforme descrito anteriormente, todos os reagentes, porém sem a adição da enzima. Este controle é

realizado a fim de observar se o composto por si só não gera nenhum tipo de absorvância que possa interferir no resultado.

Também foram feitos controles positivo da enzima e seu respectivo controle negativo, o primeiro contendo 160 µL de DTNB, 50 µL da enzima, 10 µL de DMSO e 30µL de ACTI/BCTI (sem nenhum inibidor/amostra); e o segundo contendo apenas contendo 160 µL de DTNB, 50 µL de tampão A, 10 µL de DMSO e 30 µL de ACTI/BCTI.

O ensaio foi realizado em triplicata e a eserina (fisostigmina) foi utilizada como referência na inibição da AChE e BChE por já ser um inibidor conhecido de ambas, nas mesmas condições experimentais.

A porcentagem de inibição foi calculada pela absorvância da amostra conforme a equação 1, onde ao invés de fluorescência utiliza-se absorvância.

#### 4.5.3 Atividade Antitumoral *in vitro*

O ensaio da atividade antitumoral foi realizado no Laboratório de Biogenômica - UFSM sob a responsabilidade da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivana B. M. da Cruz.

##### 4.5.3.1 Cultura de células

As células neoplásicas utilizadas foram de um carcinoma colorretal HT-29 (ATCC HTB-38) adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro, RJ (RJCB 0111). Estas células são oriundas de um adenocarcinoma colorretal de uma mulher caucasiana, 44 anos, apresentando uma citomorfologia epitelial com propriedades de aderência. É um câncer hipertriplóide com 71 cromossomos, apresentando os seguintes oncogenes: myc +; ras +; myb +; fos +; sis +; p53 +; abl -; ros -; src -. Em termos citológicos as células HT-29 apresentam microvilosidades, microfilamentos, são grandes, as mitocôndrias apresentam vacúolos com grânulos negros, gotículas de gordura, e alguns lisossomos.<sup>132</sup>

Estas células foram cultivadas sob condições ideais de cultura celular, conforme foi estabelecido por Peres e Curi (2005)<sup>133</sup>, sendo utilizado o meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e suplementado com 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina e antifúngico anfotericina B. As células são mantidas em incubadora de CO<sub>2</sub>, a 37°C e saturação de 5% de CO<sub>2</sub>.

Durante a cultura de células, as mesmas passaram por um período de expansão celular até a obtenção da quantidade e tamanho ideal para a realização dos devidos experimentos.

#### 4.5.3.2 Ensaio de atividade antitumoral pela medição da viabilidade celular e do efeito antiproliferativo

Para avaliar o potencial antitumoral dos derivados sintetizados neste trabalho, as células neoplásicas HT-29 com confluência elevada e já expandidas, foram colocadas em placas estéreis de Elisa de 96 poços em uma concentração de  $1 \times 10^6$  células viáveis e tratadas com as amostras a serem testadas em quatro concentrações diferentes, 3, 10, 30 e 100  $\mu\text{M}$ .

Após, as placas foram incubadas sob atmosfera de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 24 horas para determinar a viabilidade celular e 72 horas para determinar o seu efeito antiproliferativo. Decorridos os períodos de incubação, foi realizada a técnica de quantificação através do método colorimétrico MTT (Microtetrazolium).<sup>134</sup>

#### 4.4.3.3 Técnica de quantificação MTT

Então, após 24 e 72 h de incubação como descrito no item 4.4.3.2, as amostras foram centrifugadas a 1200 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em 200  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato (PBS, pH 7,4) e foi adicionado 20  $\mu\text{L}$  da solução de MTT também em PBS pH 7,4. Após, as amostras foram incubadas durante 45 minutos a 37 °C. Após este período, 180  $\mu\text{L}$

do sobrenadante foram removidos com o auxílio de uma pipeta, 200 µL de DMSO foi adicionado e as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 2000 rpm a fim de solubilizar o formazan formado anteriormente.<sup>134</sup>

Após, 100 µL de cada uma das soluções contendo as amostras a serem testadas foram removidas para uma placa de 96 poços e a absorbância foi medida no comprimento de onda de 560 nm utilizando o equipamento SpectraMax M2 e SoftMax Pro 5.4.1 (Molecular Devices Inc., USA).<sup>134</sup>

Os resultados foram todos calculados conforme a Equação 1 e a análise de variância segundo o teste *post hoc* de Tukey. O programa utilizado foi o GraphPad Prisma e foram consideradas significativas todas as comparações com  $p < 0,05$ .



## 5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos durante a realização deste trabalho, desde a metodologia adotada até a obtenção e identificação dos produtos desejados, bem como a avaliação das atividades biológicas destes compostos.

A maioria dos compostos sintetizados foi obtida por reações de acoplamento entre os produtos de partida, estigmasterol (**1**) e ácido ursólico (**2**), e os aminoácidos protegidos, seguido de reações de remoção dos grupamentos protetores. As numerações dos carbonos nos compostos foram feitas de acordo com as recomendações da IUPAC.<sup>18,40</sup>

As estruturas de todos os compostos obtidos foram confirmadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear, RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C uni e bidimensional. Uma vez que todos os compostos sintetizados são inéditos, a comparação dos dados obtidos com os da literatura não pode ser realizada.

Da mesma forma, os resultados obtidos nas atividades antimicrobiana, antitumoral e de inibição das enzimas POP, AChE e BChE são inéditos e não poderão ser comparados com dados da literatura.

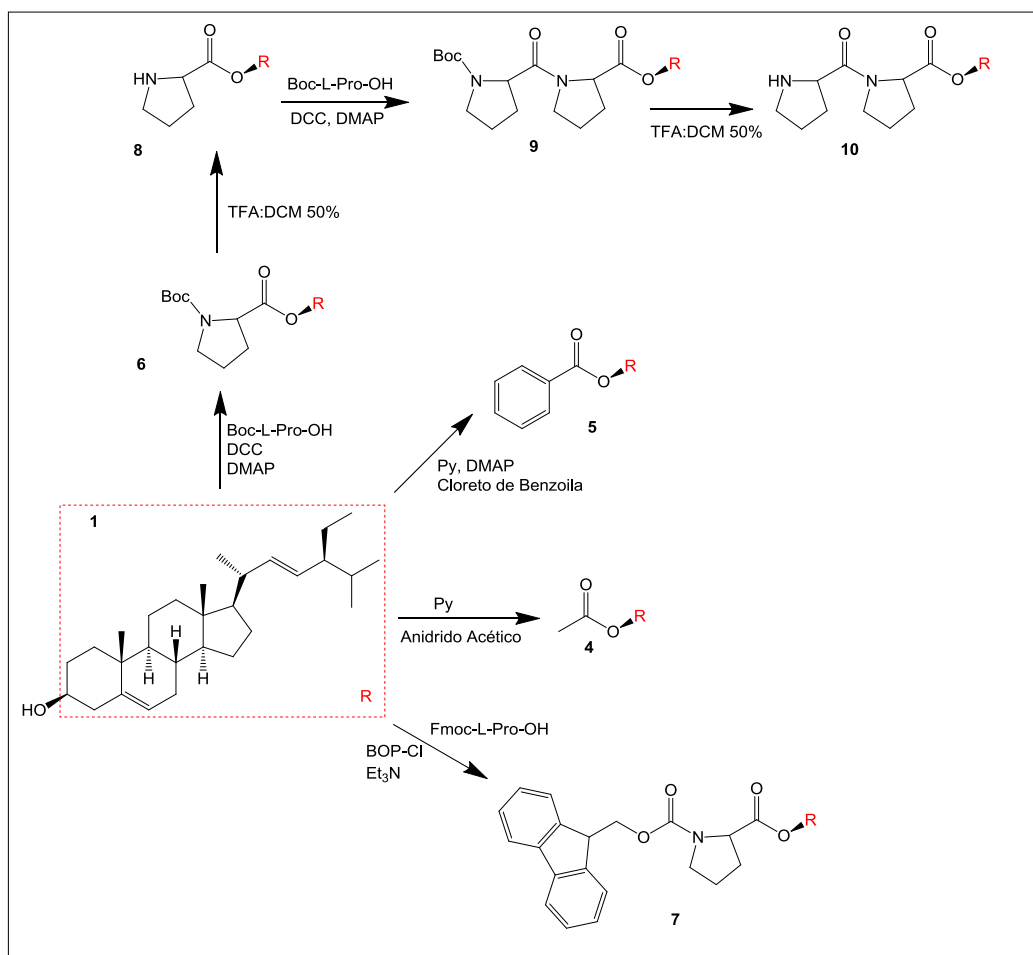
### 5.1 Obtenção dos derivados do estigmasterol (**1**)

As reações de derivatização do estigmasterol foram realizadas utilizando estigmasterol (**1**) e cloroformato de estigmasterila (**3**), ambos obtidos comercialmente pela Sigma-Aldrich.

O composto acetil estigmasterol (**4**) foi obtido através da reação do estigmasterol com anidrido acético em piridina seca, sob atmosfera de nitrogênio, conforme descrito por Foley *et al.* (2010),<sup>126</sup> com 84,5% de rendimento. O benzoil estigmasterol (**5**) foi obtido através da reação do estigmasterol com cloreto de benzoíla, na presença de DMAP e piridina, com rendimento de 64% (Esquema 17).

Boc-L-prolina-estigmasterol (**6**) foi sintetizado através da reação de acoplamento com DCC em diclorometano/DMAP, com rendimento de 65,1%,

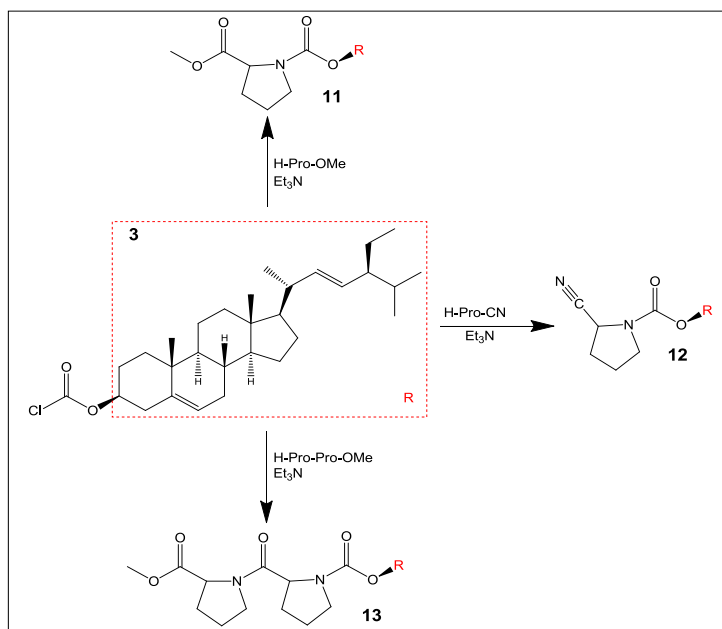
enquanto que Fmoc-L-prolina-estigmasterol (**7**) foi obtido através da reação de acoplamento com BOP-Cl em diclorometano/DIEA, com rendimento de 44,2%. A partir da desproteção do grupo amino do composto **6** utilizando-se CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:TFA (1:1) obteve-se o produto H-L-prolina-estigmasterol (**8**) com rendimento quantitativo. O composto Boc-prolina-prolina-estigmasterol (**9**) foi obtido através da reação de acoplamento entre **8** e Boc-L-prolina-OH com DCC em diclorometano/DMAP, com rendimento de 43,4%. O composto H-prolina-prolina-estigmasterol (**10**) foi obtido através da reação de desproteção do grupo amino de **9** com uma solução de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:TFA (1:1) e rendimento de 74,3% (Esquema 17).



**Esquema 17:** Síntese dos derivados (**4-10**) do estigmasterol (**1**).

O composto estigmasterol-prolina-OMe (**11**) foi obtido através da reação de acoplamento entre clorofornato de estigmasterila (**3**) e H-prolina-OMe, em diclorometano e meio básico de trietilamina, com rendimento de 57,1%. Os compostos estigmasterol-prolina-CN (**12**) e estigmasterol-prolina-prolina-OMe (**13**)

foram obtidos conforme a reação citada anteriormente, porém com H-prolina-CN e H-prolina-prolina-OMe, respectivamente, com rendimentos de 79,5% e 67,6% (Esquema 18).

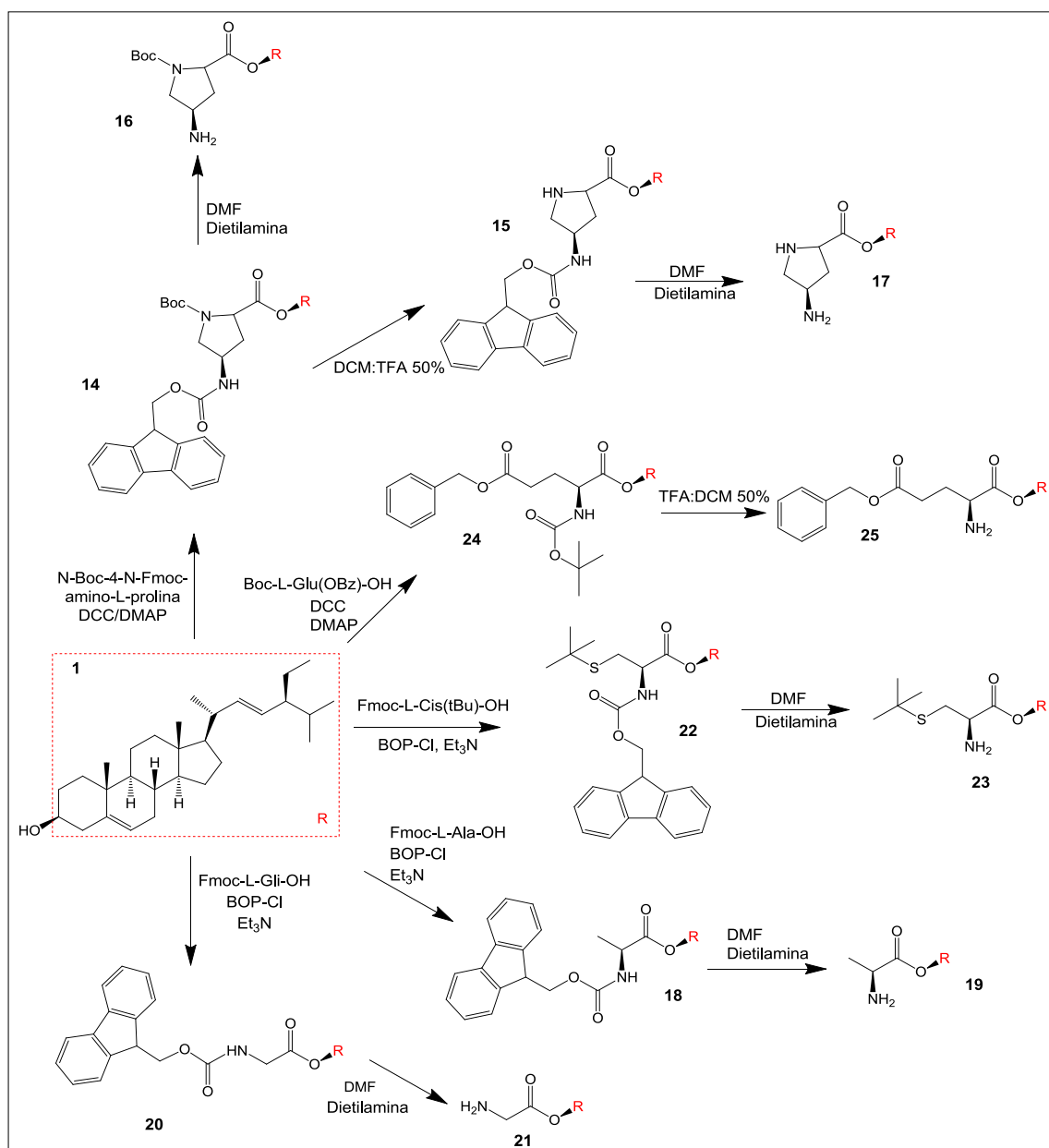


**Esquema 18:** Síntese dos derivados do cloroformato de estigmasterila (**3**).

N-Boc-4-N-Fmoc-amino-*L*-prolina-estigmasterol (**14**) foi obtido através da reação de acoplamento com DCC em diclorometano/DMAP, com rendimento de 92,6%. O composto N-4-N-Fmoc-amino-*L*-prolina-estigmasterol (**15**) foi obtido através da reação de remoção do grupo protetor *tert*-butiloxicarbonil (Boc) do composto **14** com uma solução de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:TFA (1:1), com rendimento de 79,5%. Já o composto N-Boc-4-N-amino-*L*-prolina-estigmasterol (**16**) foi obtido pela remoção do grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonil (Fmoc) também do composto **14** com DMF/dietilamina, com rendimento de 91,8%. Da mesma forma, N-4-N-amino-*L*-prolina-estigmasterol (**17**) foi obtido através da reação de remoção do grupo Fmoc do composto **15** com DMF/dietilamina, com 98% de rendimento (Esquema 19).

Fmoc-*L*-alanina-estigmasterol (**18**) foi obtido através da reação de acoplamento com BOP-Cl em diclorometano/DIEA, com rendimento de 25,8%. O composto H-*L*-alanina-estigmasterol (**19**) foi obtido através da reação de remoção do grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonil (Fmoc) do composto **18** com DMF/dietilamina e rendimento de 58,8%. Os compostos Fmoc-*L*-glicina-estigmasterol (**20**) e Fmoc-*L*-cisteína(*t*Bu)-estigmasterol (**22**) foram obtidos conforme reação de acoplamento

citada anteriormente, com 56,3% e 26,6% de rendimentos, respectivamente. Os compostos H-L-glicina-estigmasterol (**21**) e H-L-cisteína(tBu)-estigmasterol (**23**) também foram sintetizado conforme reação citada anteriormente através da desproteção dos respectivos grupos aminos com DMF/dietilamina, com rendimentos de 66,1% e 23,1%, respectivamente. O Boc-L-glutâmico(OBz)-estigmasterol (**24**) foi obtido através da reação de acoplamento com DCC em diclorometano/DMAP, com rendimento de 38,1% e o composto H-L-glutâmico(OBz)-estigmasterol (**25**) foi obtido através da reação de remoção do grupo *tert*-butiloxicarbonil (Boc) com uma solução de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:TFA (1:1) e rendimento quantitativo (Esquema 19).



**Esquema 19:** Síntese dos derivados (**14-25**) do estigmasterol (**1**).

### 5.1.1 Dados de RMN $^1\text{H}$ e RMN $^{13}\text{C}$ referentes ao estigmasterol (1)

Em todos os derivados obtidos permanece a estrutura básica do estigmasterol (1), por isso os dados de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensionais referentes a esta estrutura serão discutidos neste item.

A Figura 13 mostra o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto comercial estigmasterol (1), em  $\text{CDCl}_3$  a 400,13 MHz, onde se observa a presença característica de um multipletto entre 5,33-5,35 ppm referente ao hidrogênio olefínico ligado ao C-6 e de dois duplo dubletos referentes aos hidrogênios olefínicos ligados aos carbonos C-22 e C-23 em 5,15 ppm ( $J = 15,2$  e  $8,5\text{Hz}$ , 1H) e 5,02 ppm ( $J = 15,2$  e  $8,5$  Hz, 1H), respectivamente, além de um multipletto entre 3,47-3,55 ppm referente ao hidrogênio ligado ao carbono C-3. Também se observa a presença de vários outros sinais (multipletos e singletos) na região de campo alto, entre 0,70–2,31 ppm, relativos aos hidrogênios dos grupos metínicos, metilênicos e metílicos presentes no estigmasterol.

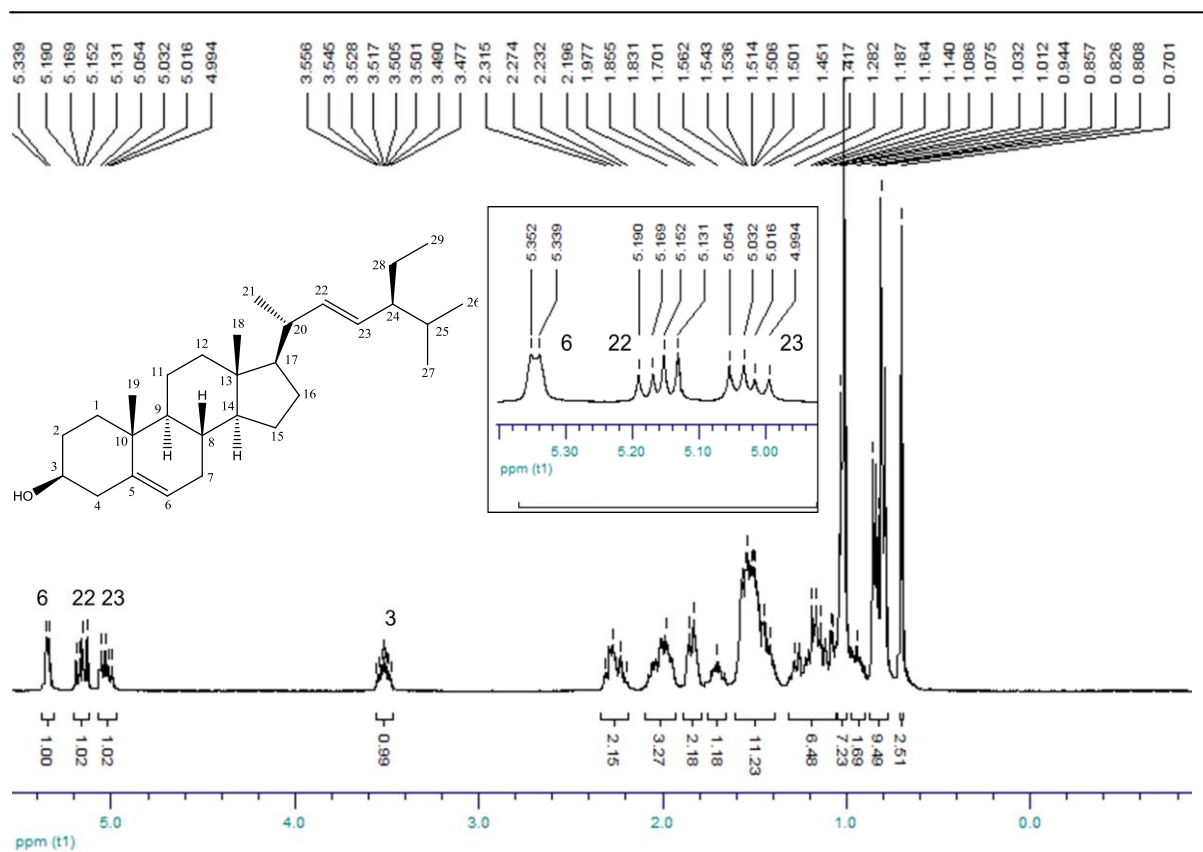
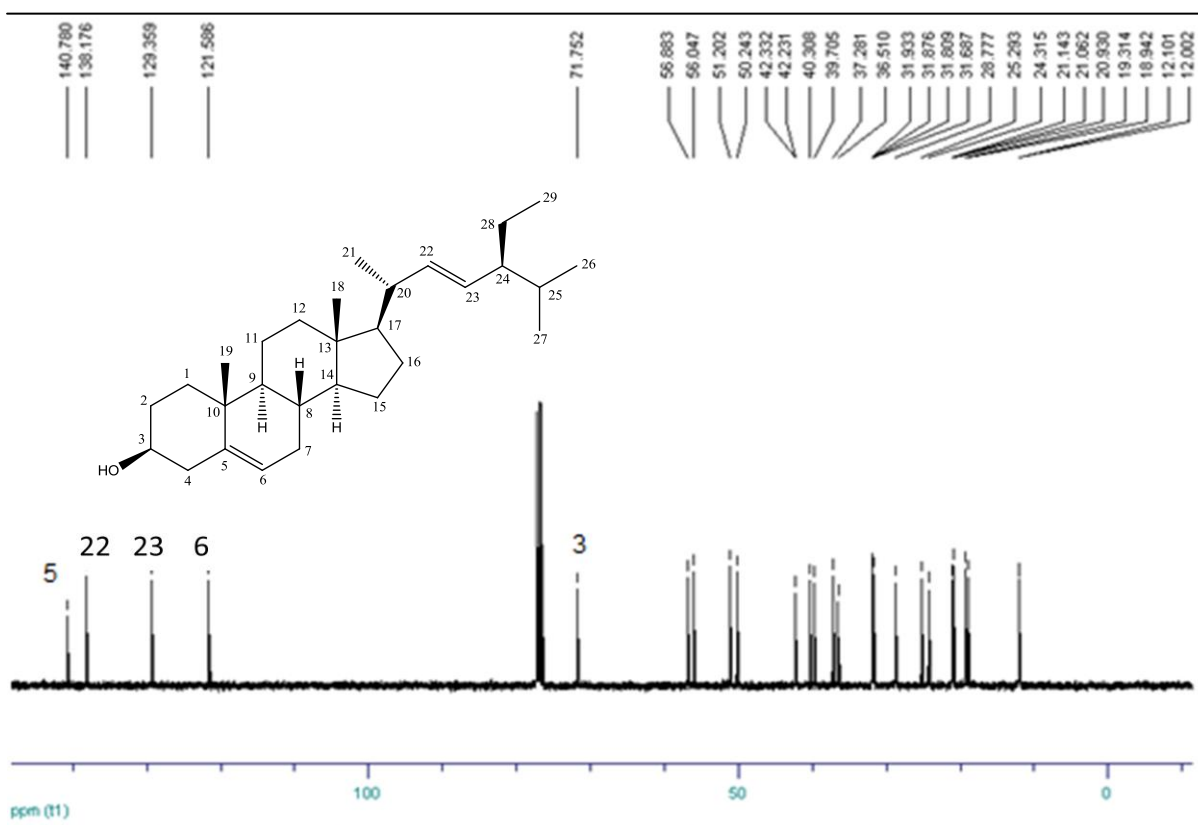


Figura 13: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do estigmasterol (1) em  $\text{CDCl}_3$ .

A Figura 14 mostra o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  desacoplado do estigmasterol, em  $\text{CDCl}_3$  a 100,62 MHz, onde se observa a presença dos sinais dos carbonos olefínicos C-5, C-6, C-22 e C-23 em 140,78; 121,58; 138,17 e 129,35 ppm, respectivamente, além de um sinal em 71,75 ppm referente ao C-3. Observam-se vários outros sinais entre 12,00–56,88 ppm referentes aos carbonos metínicos, metilênicos, metílicos e quaternários presentes no estigmasterol.



**Figura 14:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do estigmasterol (**1**) em  $\text{CDCl}_3$ .

Através do espectro de DEPT 135 e os espectros bidimensionais de COSY e HSQC, foi possível realizar todas as atribuições referentes aos hidrogênios e carbonos nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  do estigmasterol. No espectro de DEPT 135 (Figura 15) foi possível identificar os carbonos secundários, C-11, C-15, C-28, C-16, C-2, C-7, C-1, C-12, C-4 em 21,06; 24,31; 25,29; 28,77; 31,68; 31,87; 37,28; 39,70 e 42,33 ppm, respectivamente.

No espectro bidimensional RMN COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Figura 16) foi possível observar todos os acoplamentos entre os hidrogênios, possibilitando a realização da maioria das atribuições. Aquelas atribuições que não puderam ser realizadas com o

COSY foram feitas através do espectro bidimensional RMN HSQC  $^1J_{H-C}$  (Figuras 17 e 18 – com expansão), onde se observa os acoplamentos carbono-hidrogênio a uma ligação.

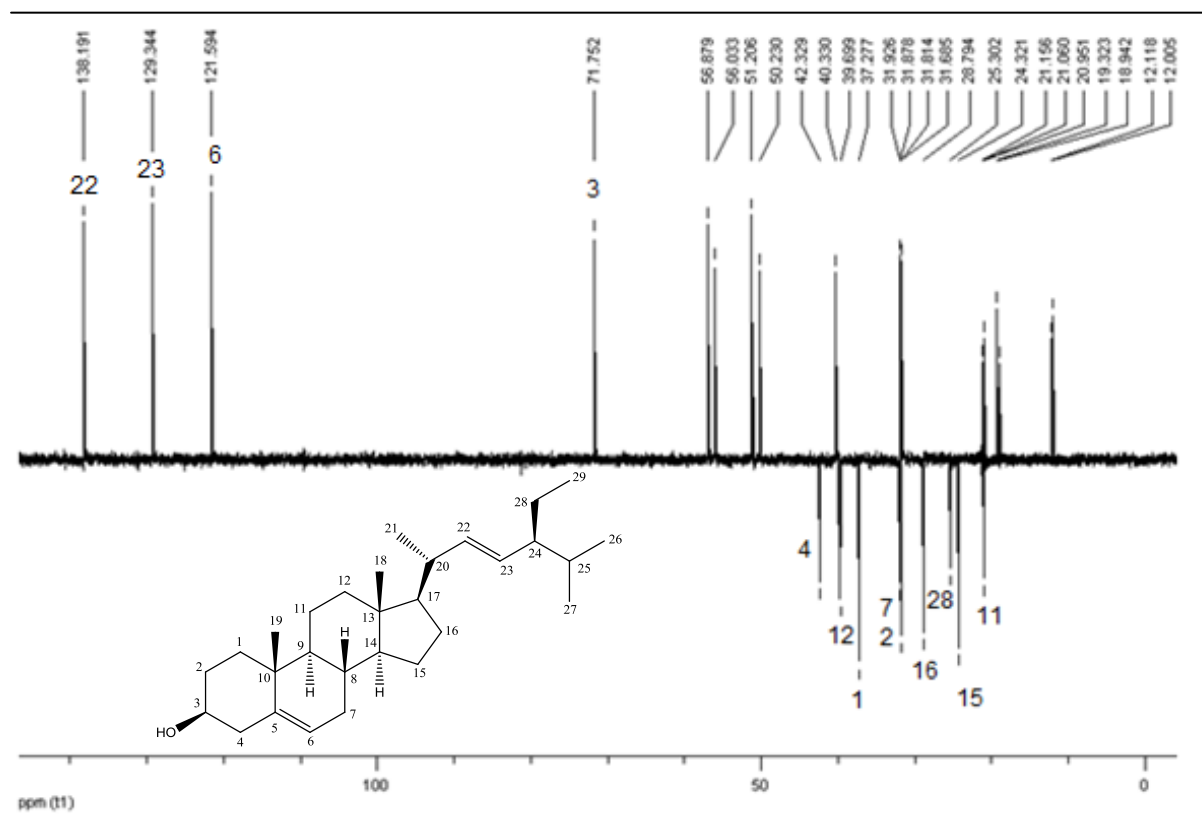


Figura 15: Espectro de DEPT 135 do estigmasterol (1) em CDCl<sub>3</sub>.

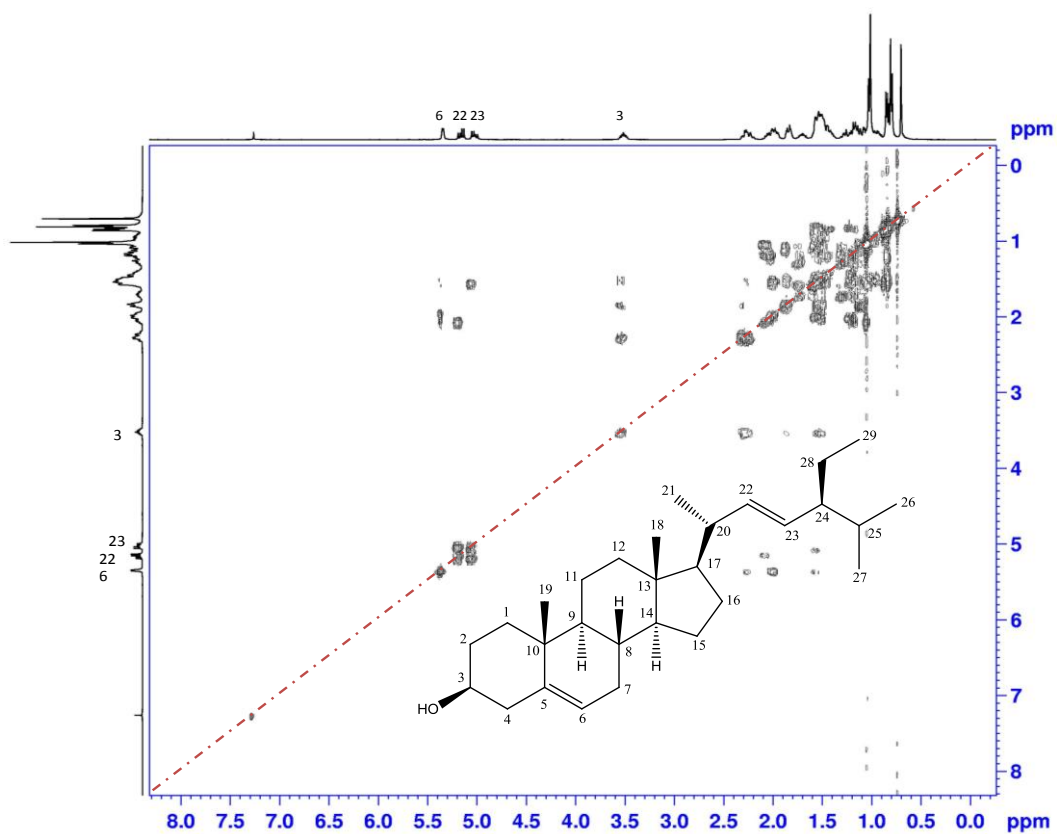


Figura 16: Espectro de COSY do estigmasterol (1) em CDCl<sub>3</sub>.

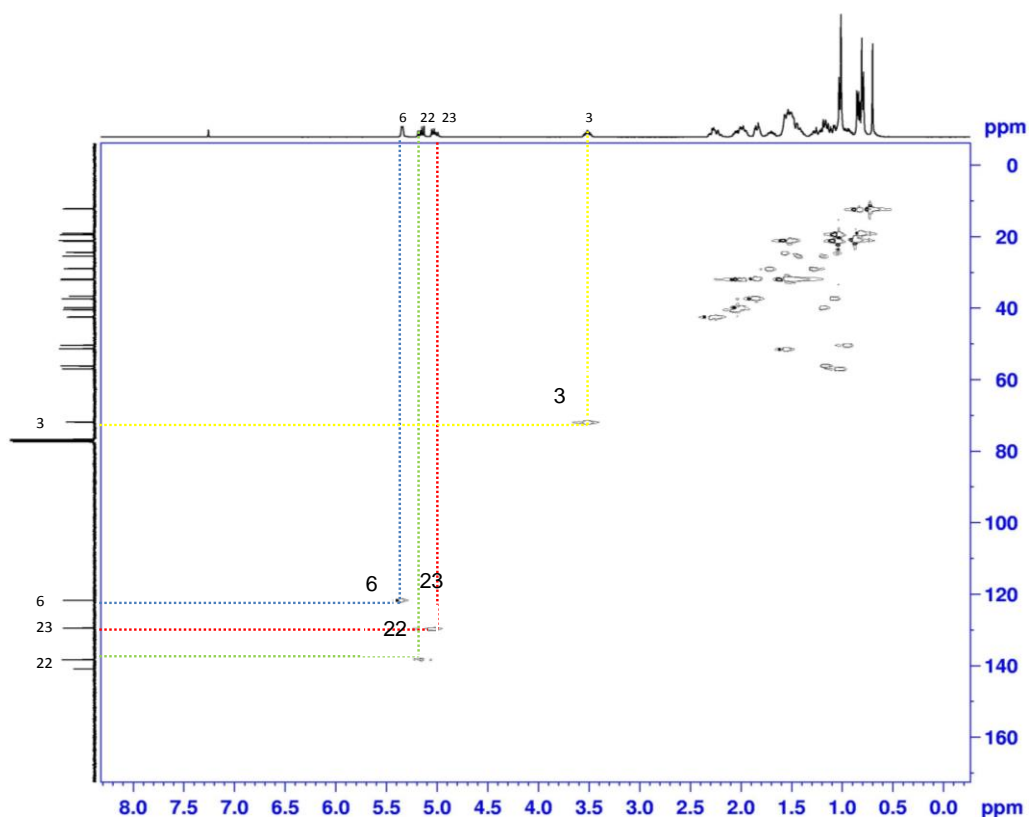


Figura 17: Espectro de HSQC do estigmasterol (1) em CDCl<sub>3</sub>.



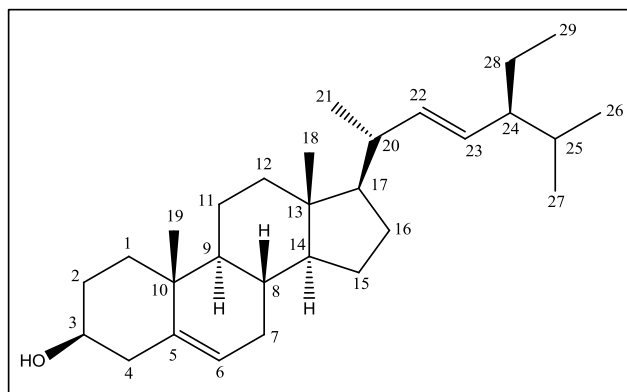
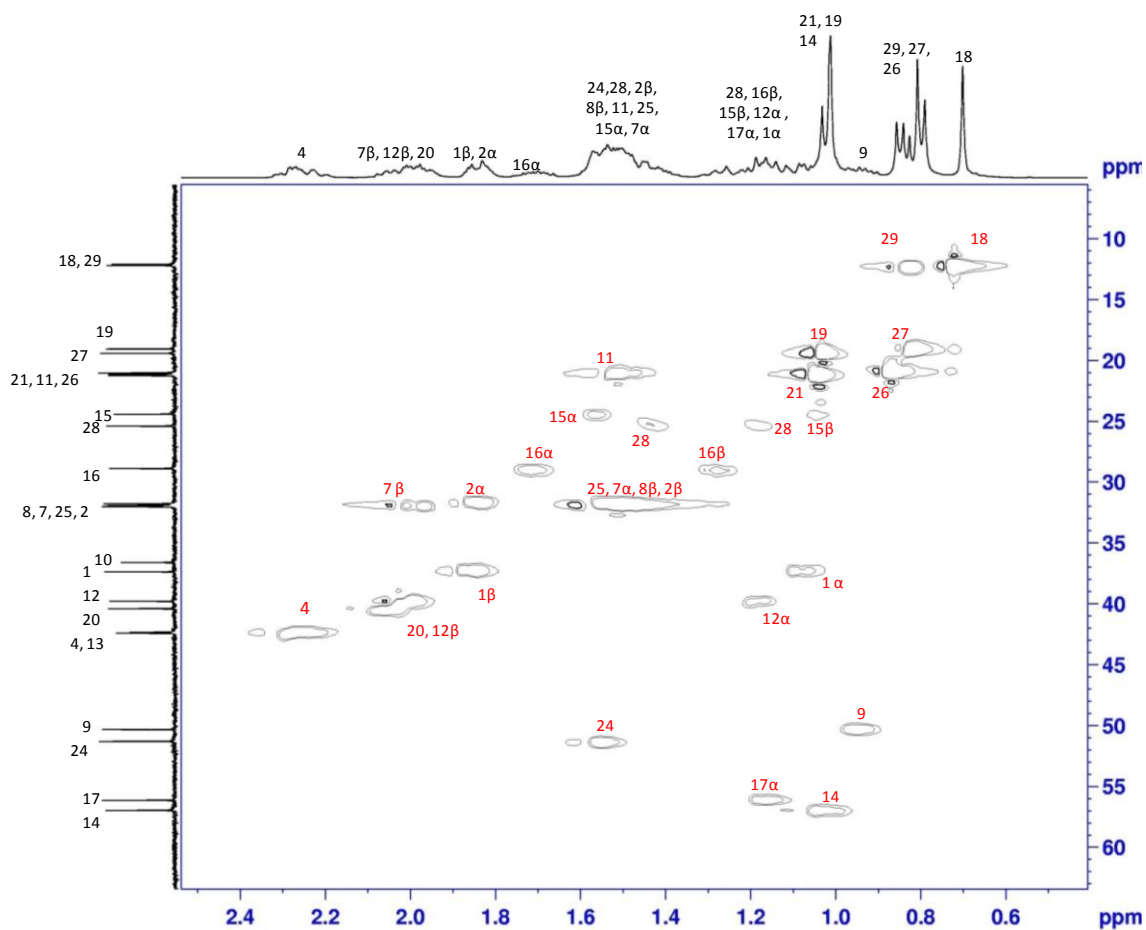
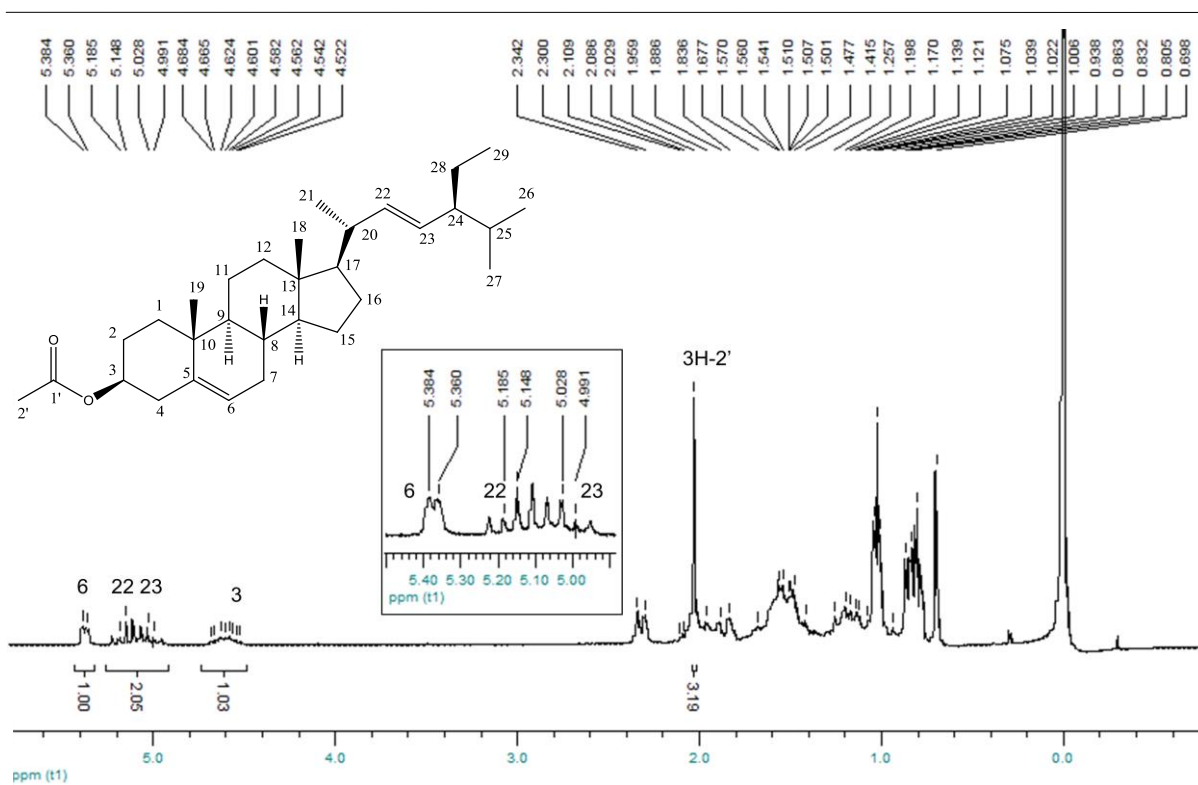


Figura 18: Espectro de HSQC expandindo do stigmasterol (**1**) em  $\text{CDCl}_3$ .

### 5.1.2 Obtenção do acetil estigmasterol (4)

A estrutura do composto acetil estigmasterol (4), sintetizado conforme item 5.1, foi confirmada por RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

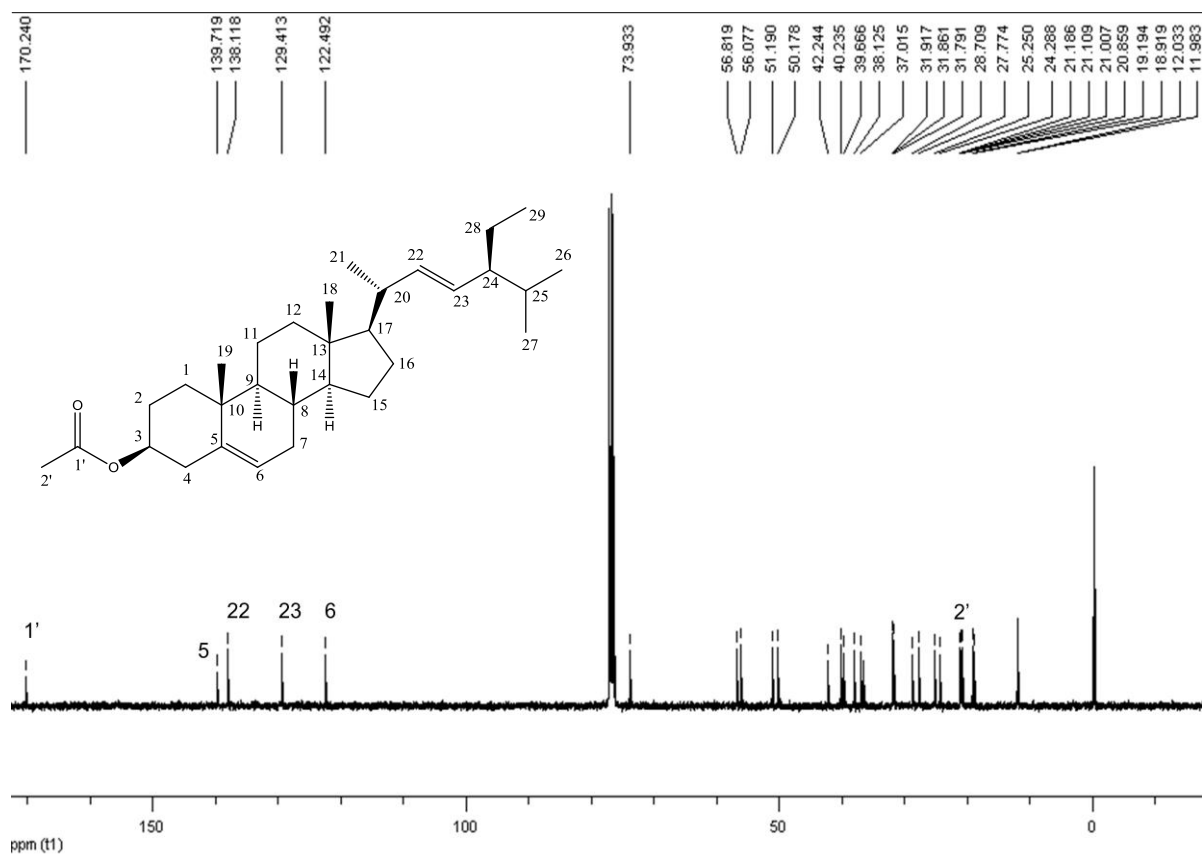
A Figura 19 mostra o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 4, em  $\text{CDCl}_3$  a 200,13 MHz, onde se observa a presença de um multipletto entre 4,52-4,68 ppm referente ao hidrogênio ligado no carbono C-3 e um singlete em 2,02 ppm referente aos três hidrogênios metílicos do grupo acetil, confirmando a obtenção do composto 4. Observam-se ainda vários outros sinais relativos aos hidrogênios dos grupos olefínicos, metínicos, metilênicos e metílicos presentes na porção estigmasterol (R) e mostrados anteriormente no item 5.1.1.



**Figura 19:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do acetil estigmasterol (4) em  $\text{CDCl}_3$ .

A Figura 20 apresenta o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto 4, em  $\text{CDCl}_3$  a 50,32 MHz, onde se observa a presença de um sinal em 73,93 ppm referente ao C-3 e um sinal em 170,24 ppm referente ao carbono quaternário C=O. Observa-se

também um sinal em 21,10 ppm referente ao CH<sub>3</sub> ligado ao grupo acetil, confirmando a obtenção do composto **4**. Observam-se vários outros sinais referentes aos carbonos olefínicos, metínicos, metilênicos, metílicos e quaternários presentes na porção estigmasterol (R) e mostrados anteriormente no item 5.1.1.



**Figura 20:** Espectro de RMN <sup>13</sup>C do acetil estigmasterol (**4**) em CDCl<sub>3</sub>.

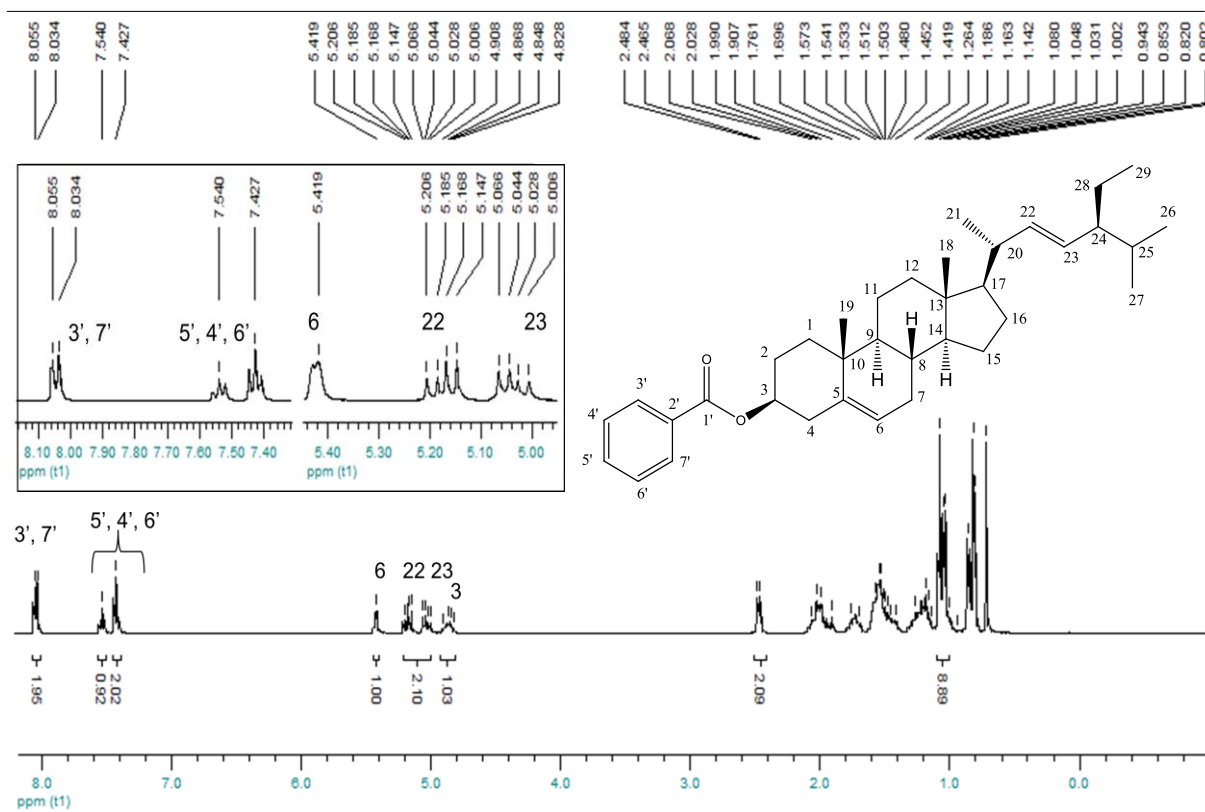
### 5.1.3 Obtenção do benzoil estigmasterol (**5**)

A estrutura do composto benzoil estigmasterol (**5**), sintetizado conforme item 5.1, foi confirmada por RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C.

A Figura 21 mostra o espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto **5**, em CDCl<sub>3</sub> a 400,13 MHz, onde se observa a presença característica de um dubleto em 8,04 ppm ( $J = 1,3$  Hz; 2H) e dois tripletos em 7,54 ppm ( $J = 6,2$  e 14,8 Hz; 1H) e 7,42 ppm ( $J = 7,8$  e 15,2 Hz; 2H) referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos aromáticos C-3' e C-

7', C-5', C-4' e C-6', respectivamente, além de multipletto entre 4,82-4,90 ppm referente ao hidrogênio ligado no C-3, confirmando a obtenção do composto **5**.

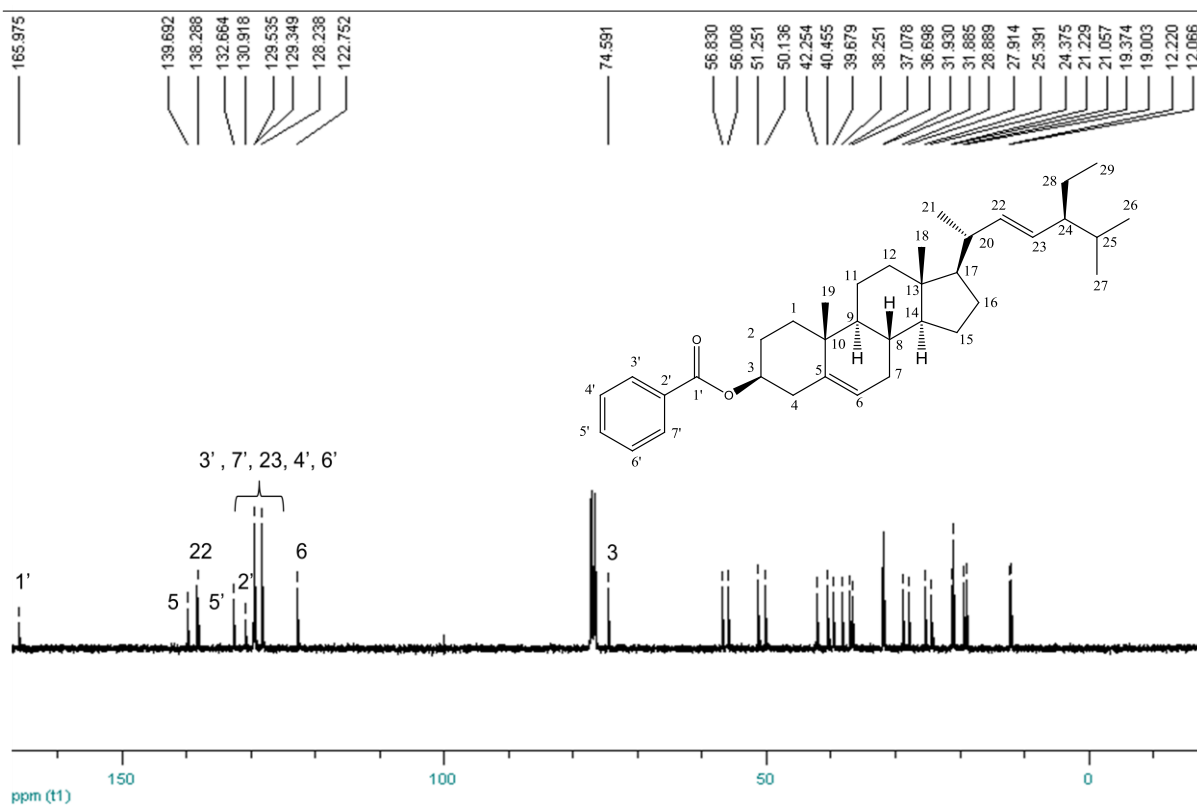
Observam-se ainda vários outros sinais relativos aos hidrogênios dos grupos olefínicos, metínicos, metilênicos e metílicos presentes na porção estigmasterol (R) e mostrados anteriormente no item 5.1.1.



**Figura 21:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do benzoil estigmasterol (**5**) em  $\text{CDCl}_3$ .

A Figura 22 mostra o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **5**, em  $\text{CDCl}_3$  a 100,62 MHz, onde se observa a presença do sinal em 165,97 ppm referente à carbonila C-1'. Também se observa os sinais em 132,66, 130,91, 129,53 e 128,23 ppm correspondentes aos carbonos aromáticos C-5', C-2', C-3' e C-7', C-4' e C-6', respectivamente, e o sinal em 74,59 ppm referente ao C-3.

Os demais sinais são relativos aos carbonos dos grupos olefínicos, metínicos, metilênicos, metílicos e quaternários presentes na porção estigmasterol (R) e mostrados anteriormente no item 5.1.1.



**Figura 22:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do benzoil estigmasterol (**5**) em  $\text{CDCl}_3$ .

#### 5.1.4 Obtenção do Boc-*L*-prolina-estigmasterol (**6**)

A estrutura do composto Boc-*L*-prolina-estigmasterol (**6**), obtido conforme item 5.1, foi confirmada por RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

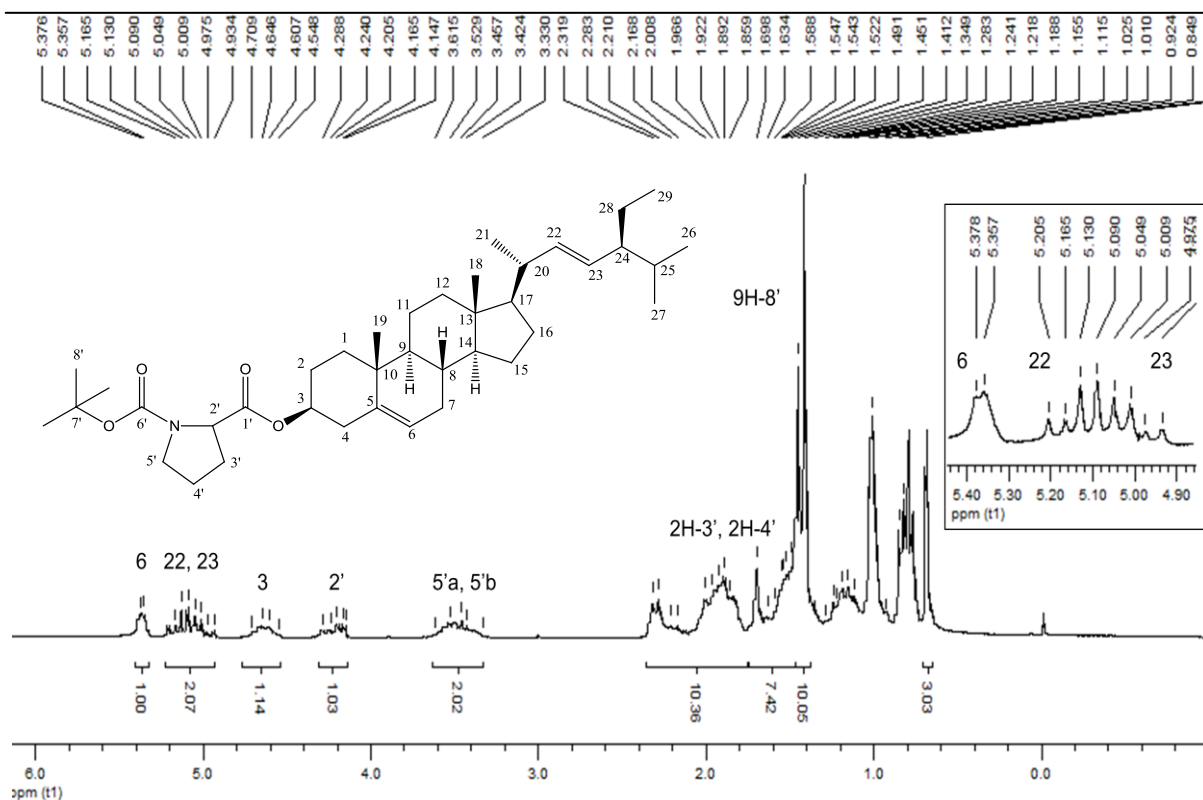
A Figura 23 mostra o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **6**, em  $\text{CDCl}_3$  a 200,13 MHz, onde se observa a presença de um multipeto entre 4,54-4,70 ppm referente ao hidrogênio ligado no carbono C-3, de um multipeto entre 4,14-4,28 ppm referente ao H-2' e de um multipeto entre 3,33-3,61 ppm referente aos dois hidrogênios H-5' da porção Boc-*L*-prolina.

O multipeto entre 1,85-2,00 ppm é referente aos demais hidrogênios metilênicos da porção Boc-*L*-Prolina ( $\text{CH}_2$ -3' e  $\text{CH}_2$ -4') e a três hidrogênios da porção estigmasterol (H-7b, H-1b, H-2a). O singleto em 1,41 ppm é referente aos nove hidrogênios metílicos da porção *terc*-butil, 9H-8'.

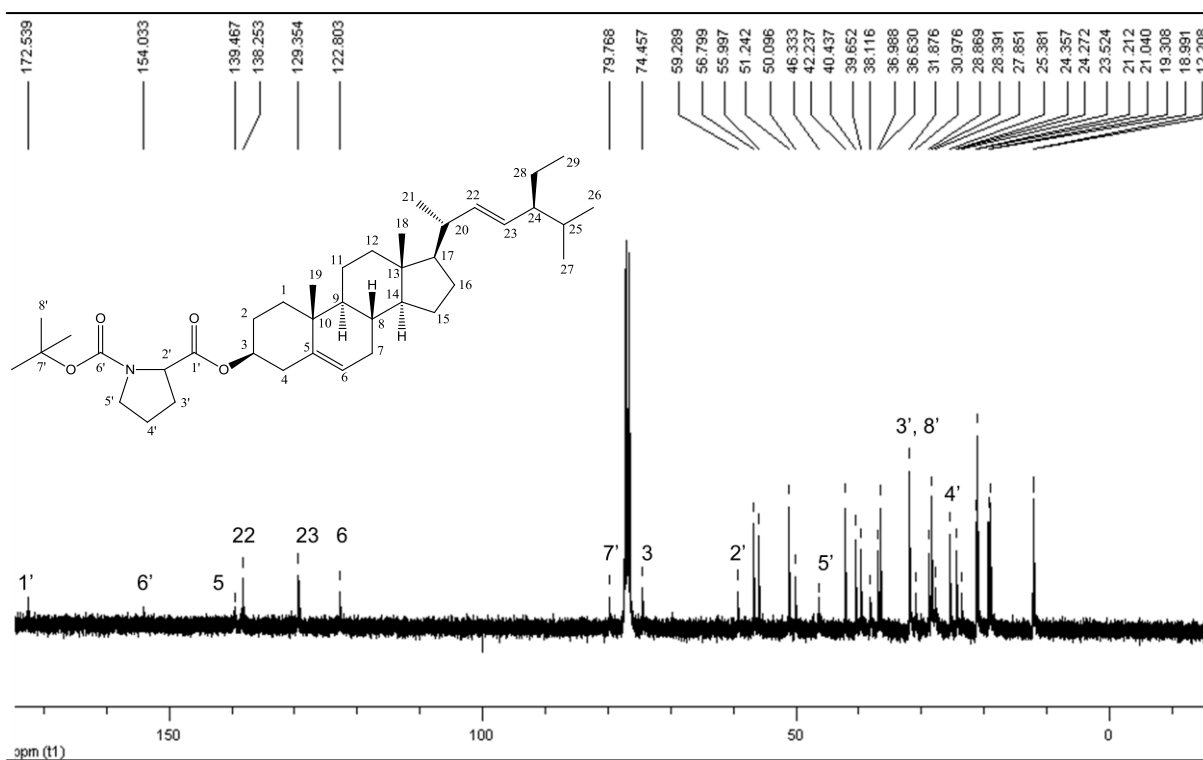
Observam-se ainda vários outros sinais relativos aos hidrogênios dos grupos olefínicos, metínicos, metilênicos e metílicos presentes na porção estigmasterol (R) e mostrados anteriormente no item 5.1.1.

A Figura 24 apresenta o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **6**, em  $\text{CDCl}_3$  a 50,32 MHz, onde se observa a presença de dois sinais em 171,53 e 154,03 ppm referentes às carbonilas do C-1' e C-6', respectivamente. Observa-se também um sinal em 79,76 ppm referente ao carbono quaternário C-7' do grupo *tert*-butil e um sinal em 74,45 ppm referente ao C-3.

Os sinais em 59,28; 46,33; 28,44; 28,39 e 24,27 ppm são referentes aos carbonos presentes na porção Boc-*L*-Prolina, C-2', C-5', C-3', C-8' e C-4', respectivamente. Os demais sinais são referentes aos carbonos olefínicos, metílicos, metilênicos, metínicos e quaternários presentes na porção estigmasterol (R) e mostrados anteriormente no item 5.1.1.



**Figura 23:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do Boc-*L*-prolina-estigmasterol (**6**) em  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura 24:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do Boc-*L*-prolina-estigmasterol (**6**) em  $\text{CDCl}_3$ .

### 5.1.5 Obtenção do Fmoc-*L*-prolina-estigmasterol (**7**)

A estrutura do composto Fmoc-*L*-prolina-estigmasterol (**7**), sintetizado conforme item 5.1, foi confirmada por RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

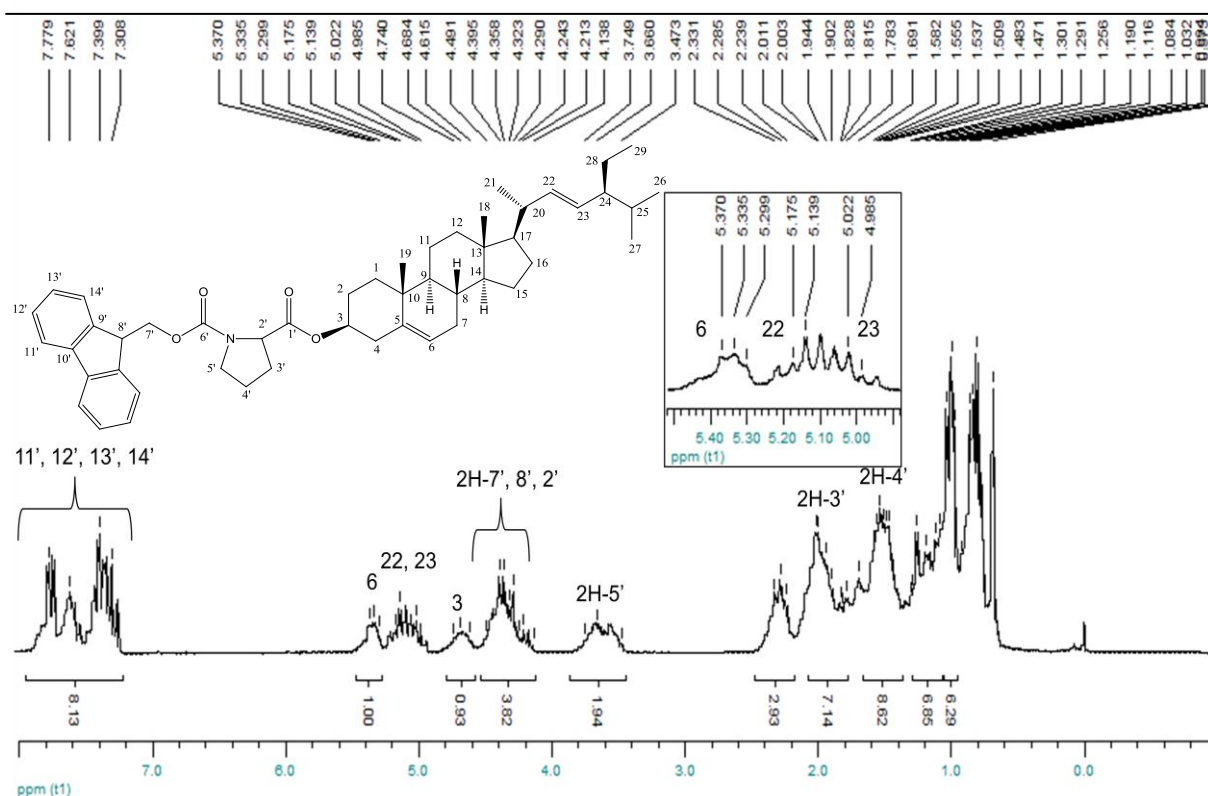
A Figura 25 mostra o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **7**, em  $\text{CDCl}_3$  a 200,13 MHz, onde se observa a presença de multipletos entre 7,30-7,77 ppm relativos aos hidrogênios ligados aos carbonos aromáticos, C-11', C-12', C-13' e C-14', da porção Fmoc-*L*-prolina. Observa-se também a presença de um multipletos entre 4,13-4,49 ppm referente aos hidrogênios 2H-7', H-8' e H-2' e outro multipletos entre 3,47-3,79 ppm referente aos 2H-5', da porção Fmoc-*L*-prolina.

O multipletos entre 1,69-2,01 ppm é referente aos 2H-3' da porção Fmoc-*L*-prolina e a cinco hidrogênios da porção estigmasterol (H-20, H-7b, H-1b, H-2a, H-16a). O multipletos entre 1,47-1,58 ppm é referente aos 2H-4', da porção Fmoc-*L*-prolina, e a sete hidrogênios da porção estigmasterol (H-15a, H-25, H-24, H-2b, 2H-11, H-7a). O multipletos entre 4,61-4,74 ppm é referente ao hidrogênio ligado no carbono C-3 e os demais sinais são referentes aos hidrogênios olefínicos, metínicos,

metilênicos e metílicos presentes na porção estigmasterol (R) e mostrados no item 5.1.1.

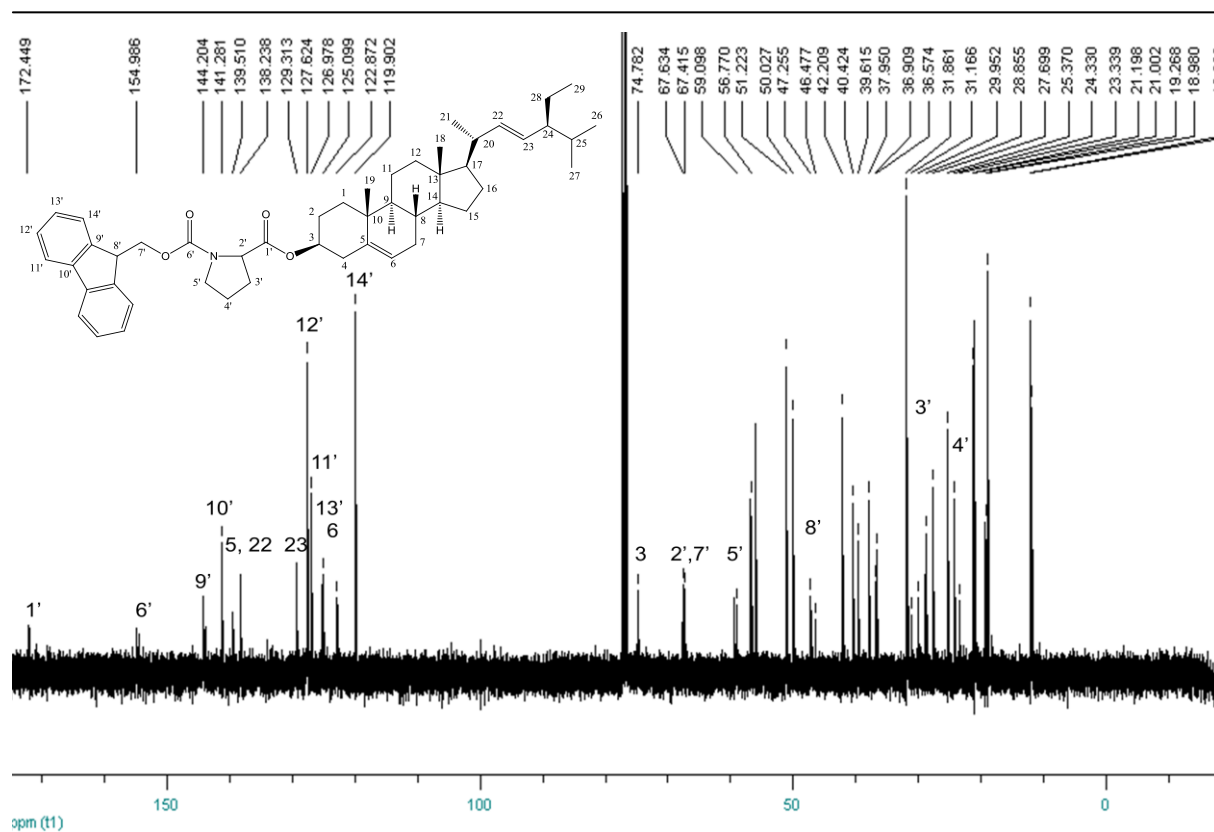
A Figura 26 apresenta o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **7**, em  $\text{CDCl}_3$  a 50,32 MHz, onde se observa a presença de dois sinais em 172,44 e 154,98 ppm referentes às carbonilas do C-1' e C-6', respectivamente. Observa-se também um sinal em 74,78 ppm referente ao C-3.

Os sinais em 144,20; 141,28; 127,62; 126,97; 125,09 e 119,90 ppm são referentes aos carbonos aromáticos C-9', C-10', C-12', C-11', C-13' e C-14', ambos da porção Fmoc-L-Prolina, respectivamente. Os sinais em 67,63; 67,41; 59,09; 50,02; 27,69 e 23,33 ppm são referentes aos demais carbonos na porção Fmoc-L-prolina, respectivamente C- 2', C-7', C-5', C-8', C-3' e C-4'. Os demais sinais são referentes aos carbonos olefínicos, metínicos, metilênicos, metílicos e quaternários presentes na porção estigmasterol (R) e mostrados anteriormente no item 5.1.1.



**Figura 25:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do Fmoc-L-prolina-estigmasterol (**7**) em  $\text{CDCl}_3$ .



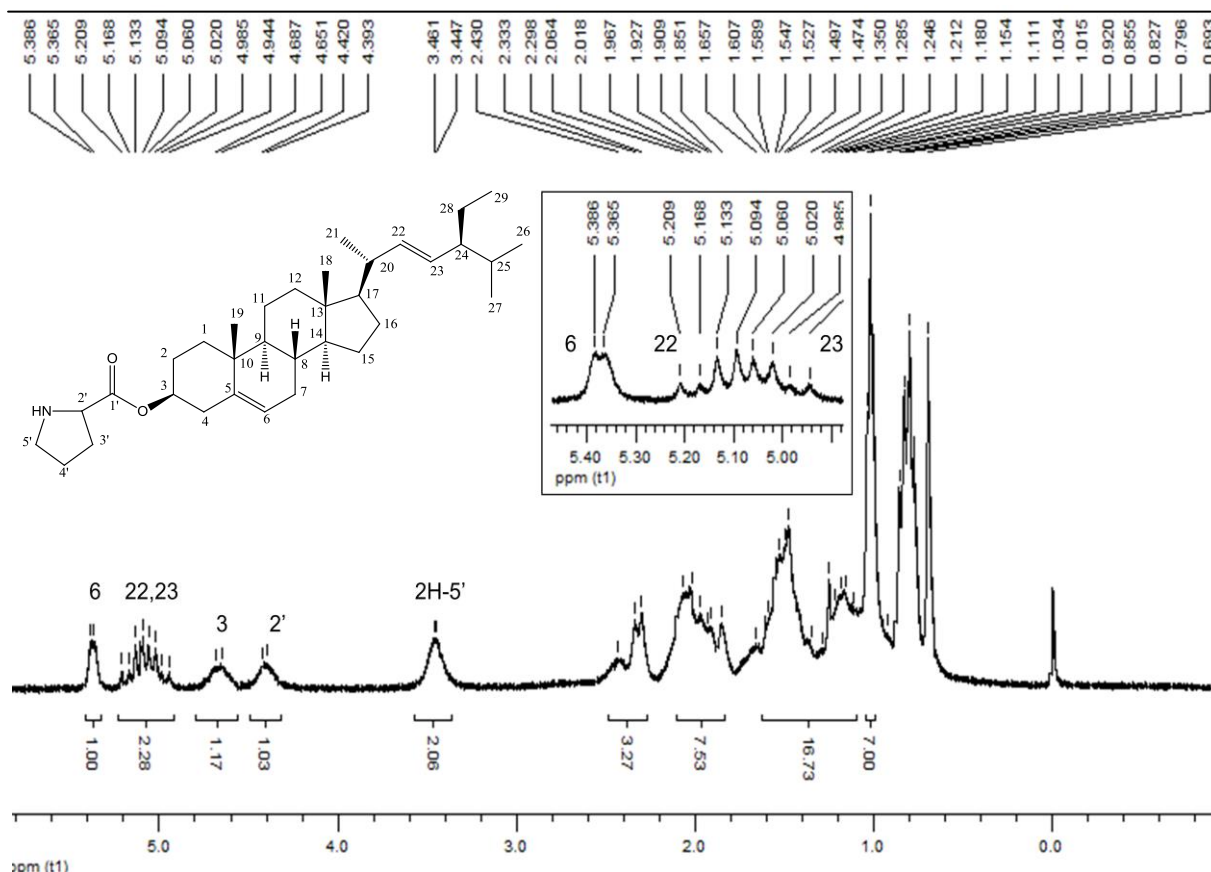


**Figura 26:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do Fmoc-*L*-prolina-estigmasterol (**7**) em  $\text{CDCl}_3$ .

### 5.1.6 Obtenção do H-prolina-estigmasterol (**8**)

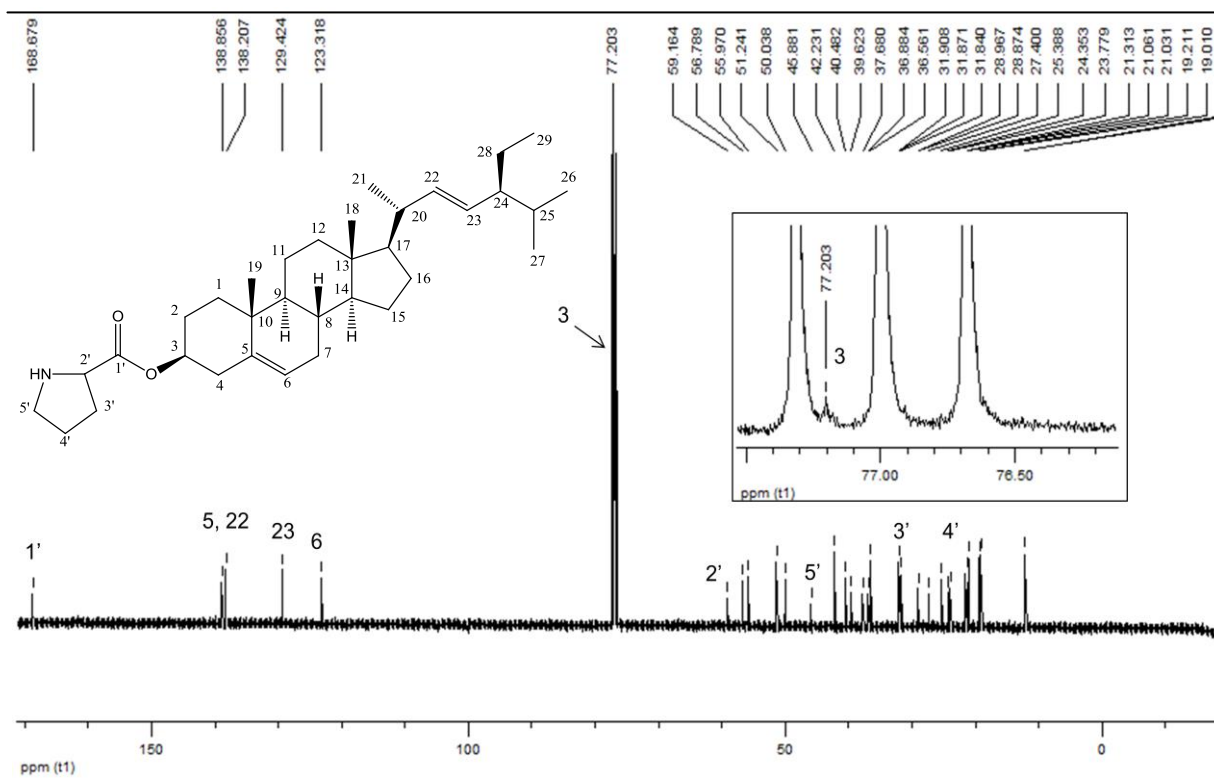
A estrutura do composto H-prolina-estigmasterol (**8**), obtido conforme item 5.1, foi confirmada por RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

A Figura 27 mostra o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **8**, em  $\text{CDCl}_3$  a 200,13 MHz, onde se observa o desaparecimento do singlete em 1,41 ppm referente aos 9 hidrogênios do grupo *tert*-butil presente no composto Boc-*L*-prolina-estigmasterol (**6**). Isto indica que ocorreu a remoção do grupamento protetor *tert*-butiloxicarbonil. Os demais sinais observados foram discutidos nos itens 5.1.1 e 5.1.4.



**Figura 27:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do H-prolina-estigmasterol (**8**) em  $\text{CDCl}_3$ .

A Figura 28 apresenta o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **8**, em  $\text{CDCl}_3$  a 50,32 MHz, onde se observa o desaparecimento dos sinais em 154,03; 79,76 e 28,39 ppm referentes aos carbonos do grupo protetor *tert*-butiloxicarbonil presente no composto Boc-L-prolina-estigmasterol (**6**), isto indica que ocorreu a remoção do grupamento. O sinal em 168,67 ppm é referente à carbonila do C-1' e o sinal em 77,20 ppm é referente ao C-3. Os demais sinais observados já foram discutidos nos itens 5.1.1 e 5.1.4.



**Figura 28:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do H-prolina-estigmaterol (**8**) em  $\text{CDCl}_3$ .

### 5.1.7 Obtenção do Boc-prolina-prolina-estigmaterol (**9**)

A estrutura do composto Boc-prolina-prolina-estigmaterol (**9**), sintetizado conforme item 5.1, foi confirmada por RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

A Figura 29 mostra o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **9**, em  $\text{CDCl}_3$  a 400,13 MHz, onde se observa a presença de um multipeto entre 4,50-4,60 ppm referente aos hidrogênios ligado no carbono C-3 e C-7' e de vários outros multipetos entre 4,36-4,38; 3,72-3,78; 3,53-3,63 e 3,38-3,45 ppm referentes aos hidrogênios ligados nos carbonos, C-2', C-5'a, C-5'b, C-10'a e C-10'b, respectivamente.

Observa-se um multipeto entre 1,82-2,31 ppm referente aos hidrogênios H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-8'b, H-4'b, H-8'b, da porção Boc-L-prolina, e a sete hidrogênios da porção estigmaterol (H-4a, H-4b, H-12b, H-20, H-7b, H-1b, H-2a). O multipeto entre 1,45-1,60 ppm é referente aos 2H-9' da porção Boc-L-prolina e a oito hidrogênios da porção estigmaterol (H-15a, H-25, H-24, H-2b, 2H-11, H-7a, H-8). O

singleto em 1,43 ppm é referente aos nove hidrogênios metílicos presente na porção *terc*-butil, 9H-13'.

Os demais sinais são referentes aos hidrogênios olefínicos, metínicos, metilênicos e metílicos presentes na porção estigmasterol (R) e mostrados anteriormente nos itens 5.1.1 e 5.1.6.

A Figura 30 apresenta o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **9**, em  $\text{CDCl}_3$  a 100,62 MHz, onde se observa a presença de três sinais em 171,72; 170,98 e 154,55 ppm referentes às carbonilas do C-1', C-6' e C-11', respectivamente. Observa-se também um sinal em 79,40 ppm referente ao carbono quaternário C-12' do grupo *terc*-butil e um sinal em 74,55 ppm referente ao C-3.

Os sinais em 58,94; 57,70; 46,85; 46,47; 29,05; 28,50; 28,36; 24,87 e 24,03 ppm são referentes aos carbonos presentes na porção Boc-prolina-prolina-OH, C-7', C-2', C-5', C-10', C-8', C-13', C-3', C-4' e C-9', respectivamente.

Os demais sinais são referentes aos carbonos olefínicos, metínicos, metilênicos, metílicos e quaternários presentes na porção estigmasterol (R) e mostrados anteriormente no item 5.1.1 e 5.1.6.

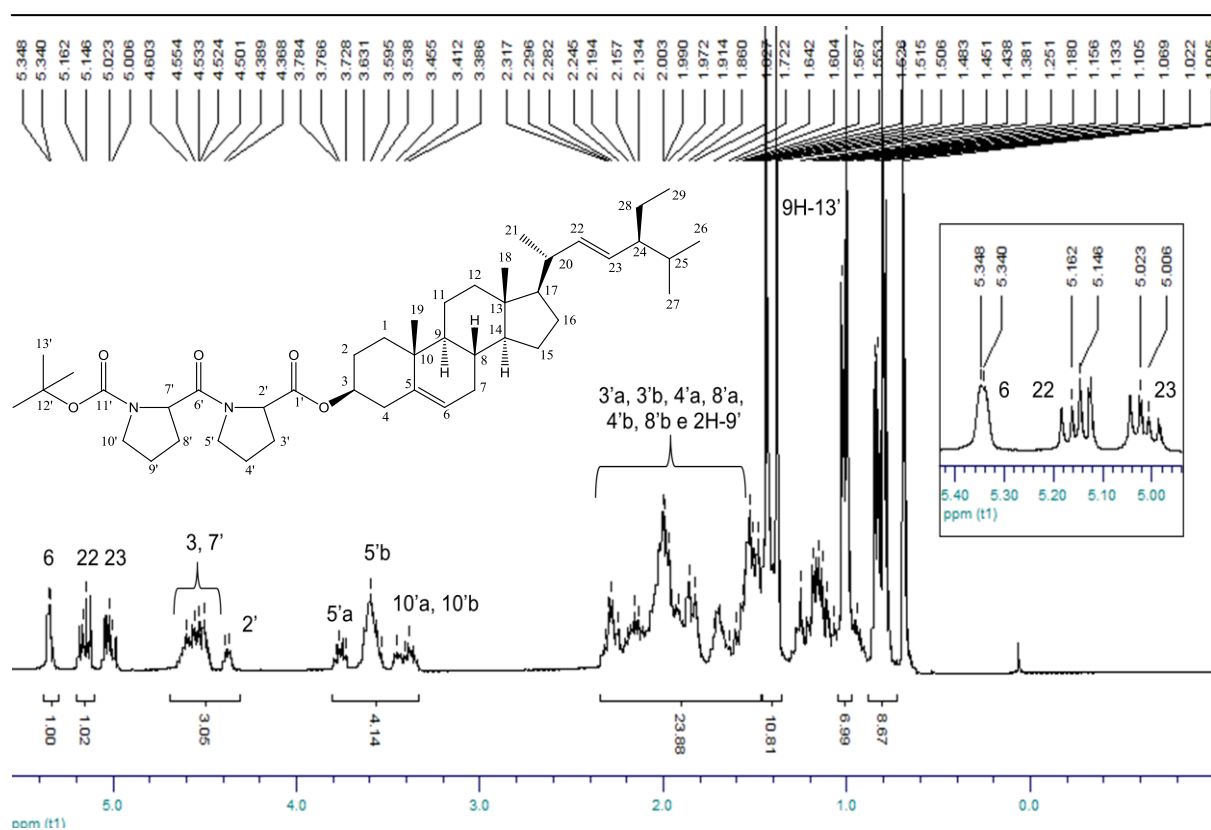
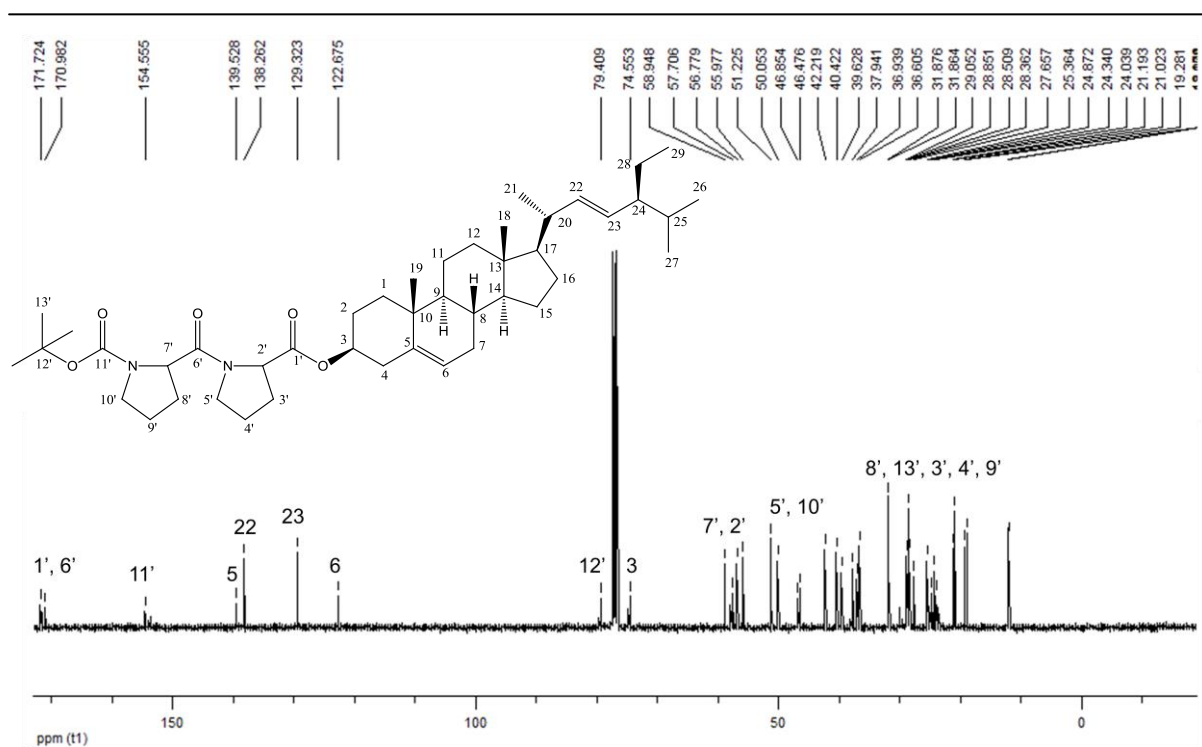


Figura 29: Espectro RMN  $^1\text{H}$  do Boc-prolina-prolina-estigmasterol (**9**) em  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura 30:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do Boc-prolina-prolina-estigmasterol (**9**) em  $\text{CDCl}_3$ .

### 5.1.8 Obtenção do H-prolina-prolina-estigmasterol (**10**)

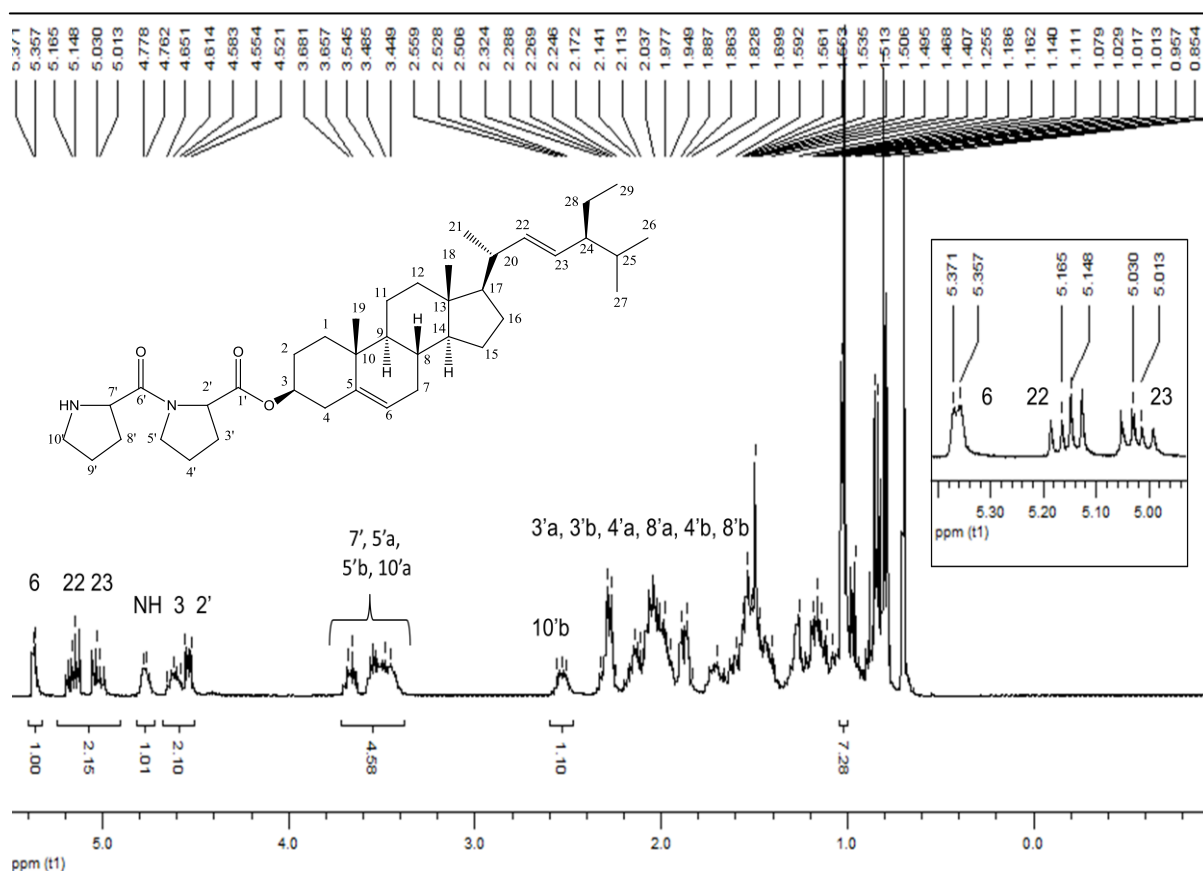
A estrutura do composto H-prolina-prolina-estigmasterol (**10**), obtido conforme item 5.1, foi confirmada por RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

A Figura 31 mostra o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **10**, em  $\text{CDCl}_3$  a 400,13 MHz, onde se observa o desaparecimento do singlete em 1,43 ppm referente aos nove hidrogênios metílicos do grupo *tert*-butil presente no Boc-prolina-prolina-estigmasterol (**9**). O multiplete entre 4,58-4,65 ppm é referente ao H-3, os multipletos entre 3,44-3,54 e 2,50-2,55 ppm são referentes aos hidrogênios 2H-5', H-10'a e H-10'b, e o multiplete entre 4,76-4,77 ppm é referente ao hidrogênio ligado ao nitrogênio. Neste caso o sinal do NH apareceu, pois o espectro foi realizado em DPX-400 e o número de aquisições foi maior. Os demais sinais já foram mostrados e discutidos anteriormente nos itens 5.1.1 e 5.1.7.

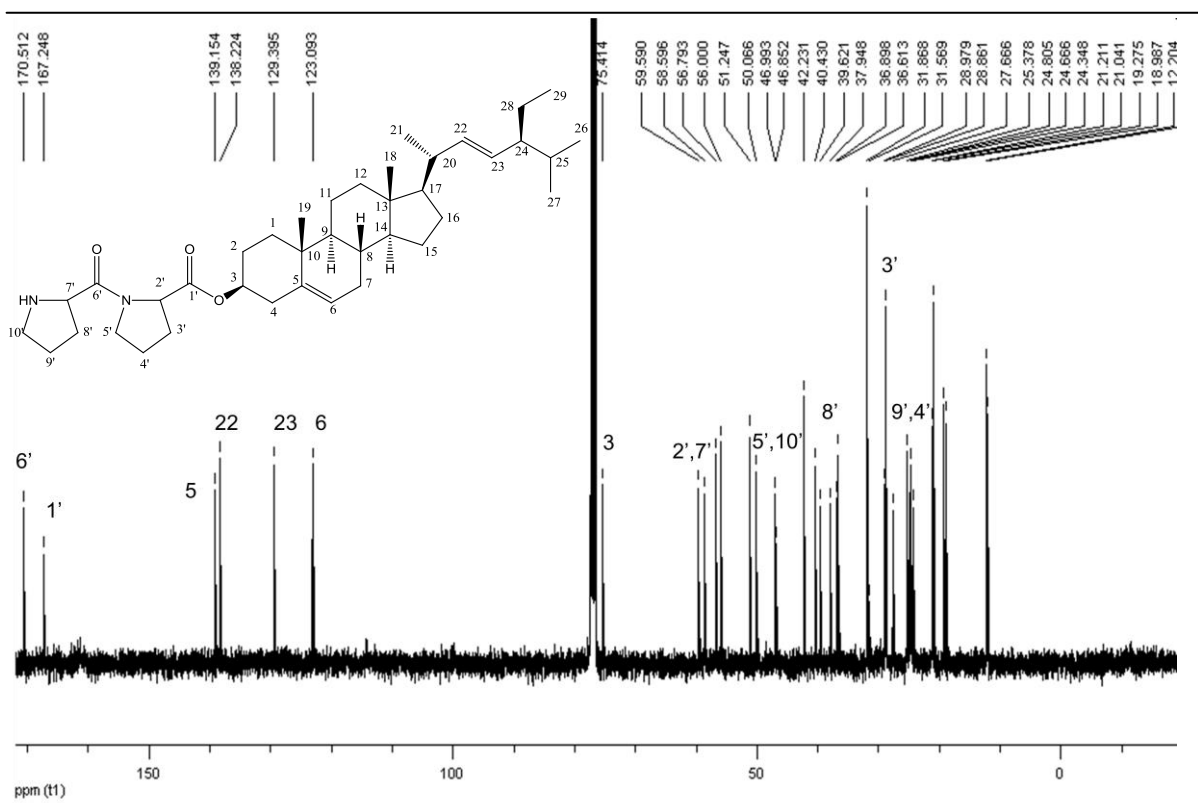
A Figura 32 apresenta o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **10**, em  $\text{CDCl}_3$  a 100,62 MHz, onde se observa a presença de dois sinais em 170,51 e 167,24 ppm referentes às carbonilas do C-6' e C-1', respectivamente. Observa-se também o sinal

em 75,41 ppm referente ao C-3. Observa-se o desaparecimento dos sinais referentes à porção *terc*-butiloxicarbonil (Boc), confirmando a remoção deste grupo protetor.

Os sinais em 59,59; 58,59; 46,99; 46,85; 37,94; 28,97; 24,80 e 24,66 ppm são referentes aos carbonos C-2', C-7', C-5', C-10', C-8', C-3', C-9' e C-4', respectivamente. Os demais sinais são referentes aos carbonos olefínicos, metílicos, metilênicos, metínicos e quaternários presentes na porção estigmasterol (R) e mostrados anteriormente no item 5.1.1.



**Figura 31:** Espectro de RMN <sup>1</sup>H do H-prolina-prolina-estigmasterol (**10**) (CDCl<sub>3</sub>).



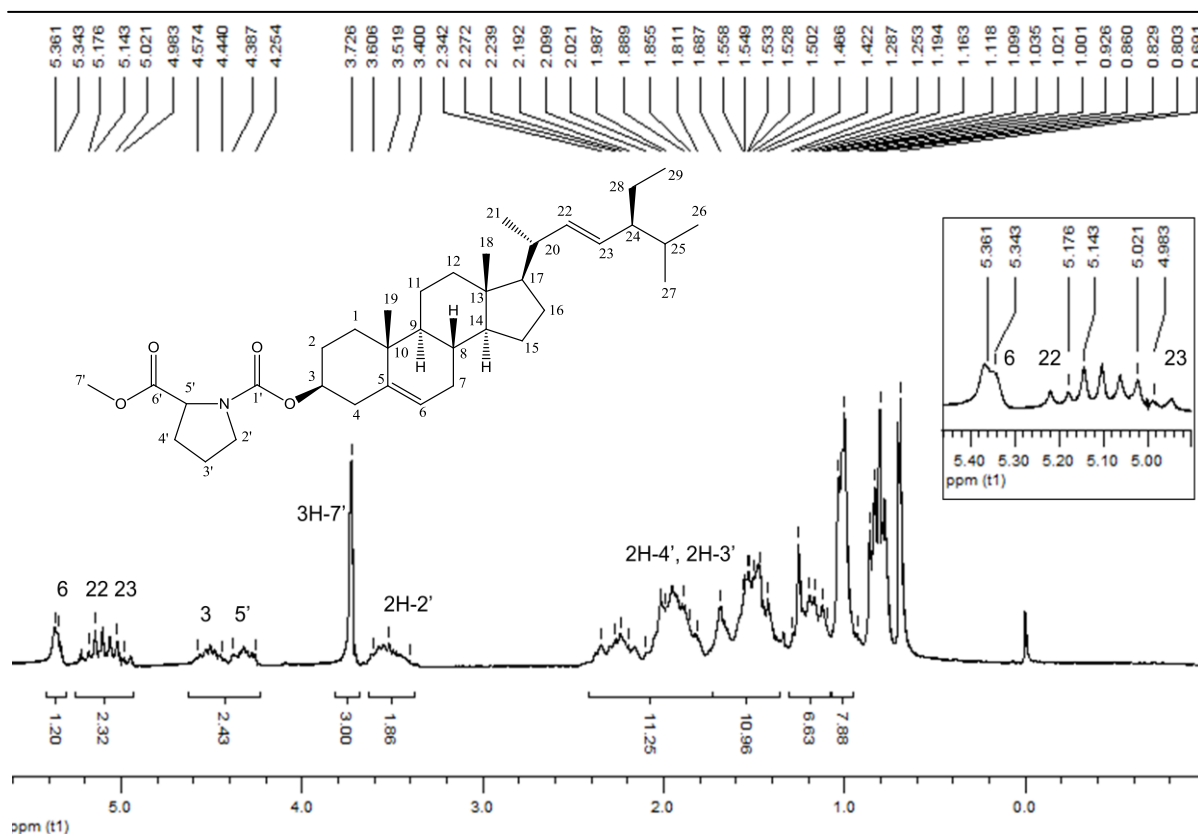
**Figura 32:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do H-prolina-prolina-estigmaterol (**10**) ( $\text{CDCl}_3$ ).

### 5.1.9 Obtenção do estigmaterol-prolina-OMe (**11**)

A estrutura do composto estigmaterol-prolina-OMe (**11**), sintetizado conforme item 5.1, foi confirmada por RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

A Figura 33 mostra o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **11**, em  $\text{CDCl}_3$  a 200,13 MHz, onde se observa a presença de um singlete em 3,72 ppm referente aos três hidrogênios da metoxila presente na porção H-prolina-OMe. Os multipletos entre 4,25-4,38 e 3,40-3,60 ppm são referentes aos hidrogênios da porção H-prolina-OMe, respectivamente H-5' e 2H-2'. O multipletos entre 1,81-2,02 ppm é referente aos hidrogênios 2H-4' e 2H-3' e a três hidrogênios da porção estigmaterol (H-7b, H-1b, H-2a).

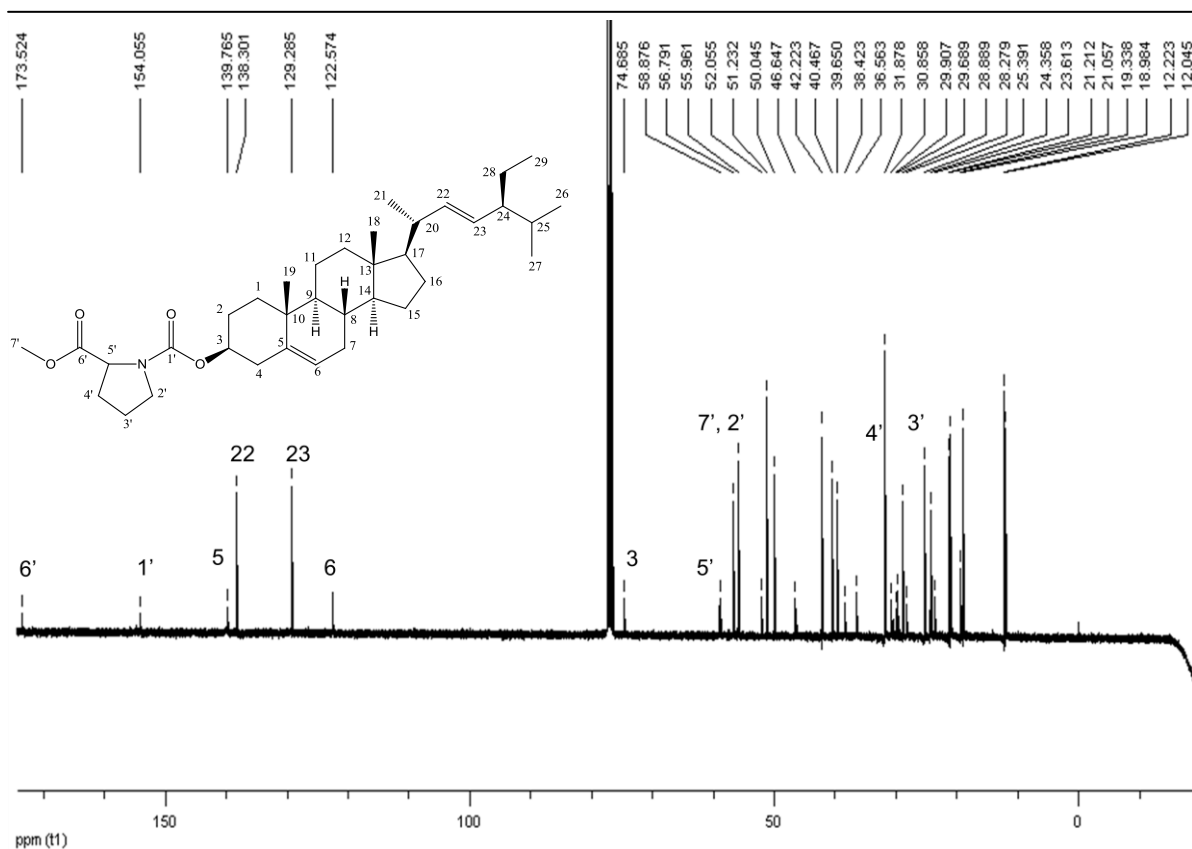
Os demais sinais são relativos aos hidrogênios dos grupos olefínicos, metínicos, metilênicos e metílicos presentes na porção estigmaterol (R) e mostrados anteriormente no item 5.1.1.



**Figura 33:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do estigmasterol-prolina-OMe (**11**) em  $\text{CDCl}_3$ .

A Figura 34 apresenta o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **11**, em  $\text{CDCl}_3$  a 50,32 MHz, onde se observa a presença dos sinais em 58,87; 52,05; 50,04; 28,27 e 23,61 ppm referentes aos carbonos da porção H-prolina-OMe, respectivamente C-5', C-7', C-2', C-4' e C-3'. Os sinais em 173,52 e 154,05 ppm são referentes às carbonilas C-6' e C-1', respectivamente. Observa-se um sinal em 74,68 ppm referente ao C-3. Os demais sinais são referentes aos carbonos olefínicos, metínicos, metilênicos, metílicos e quaternários da porção estigmasterol (R) e já foram mostrados e discutidos no item 5.1.1.



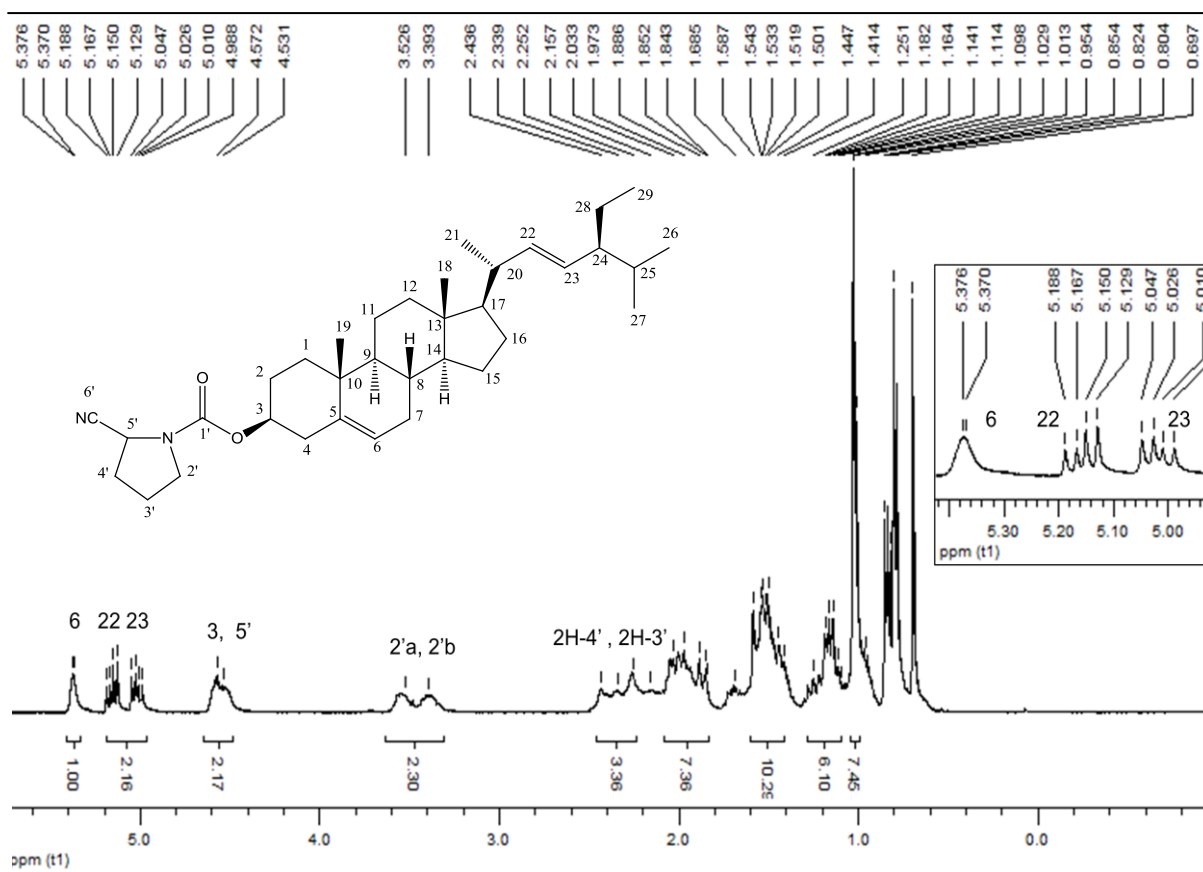


**Figura 34:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do estigmasterol-prolina-OMe (**11**) em  $\text{CDCl}_3$ .

#### 5.1.10 Obtenção do estigmasterol-prolina-CN (**12**)

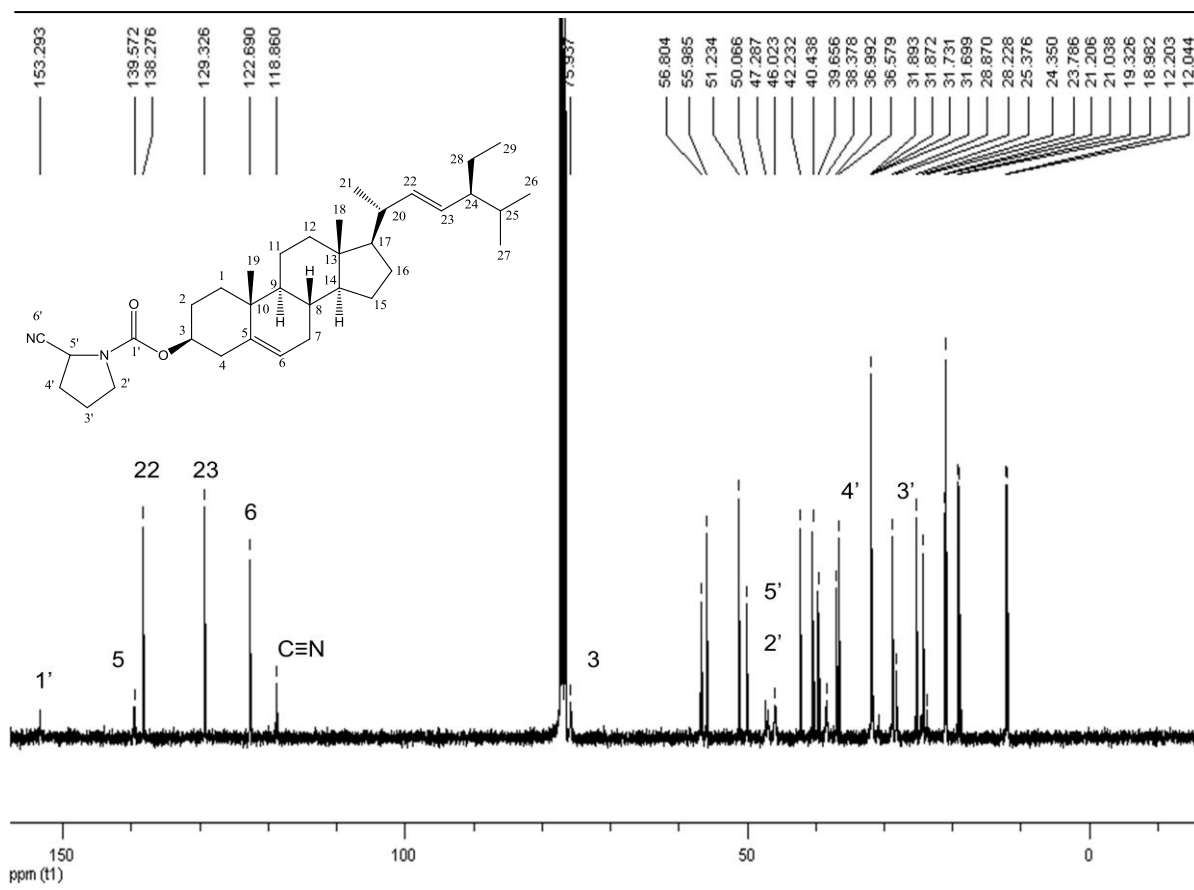
A estrutura do composto estigmasterol-prolina-CN (**12**), sintetizado conforme item 5.1, foi confirmada por RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

A Figura 35 mostra o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **12**, em  $\text{CDCl}_3$  a 400,13 MHz, onde se observa a presença de um multipeto entre 4,53-4,57 ppm referente aos hidrogênios H-3 e H-5'. O multipeto entre 3,39-3,52 ppm é referente aos dois hidrogênios ligados no carbono C-2' da porção H-prolina-CN e o multipeto entre 1,84-2,03 ppm é referente aos hidrogênios 2H-4' e 2H-3' da porção H-prolina-CN e a três hidrogênios da porção estigmasterol (H-7b, H-1b, H-2a). Os demais sinais são referentes à porção estigmasterol (R) e já foram mostrados e discutidos no item 5.1.1.



**Figura 35:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do estigmasterol-prolina-CN (**12**) em  $\text{CDCl}_3$ .

A Figura 36 apresenta o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **12**, em  $\text{CDCl}_3$  a 100,62 MHz, onde se observa a presença de um sinal em 118,86 ppm referente ao carbono do grupamento ciano ( $\text{C}\equiv\text{N}$ ). Observam-se também os sinais em 50,06; 47,28; 28,22 e 23,78 ppm referentes aos carbonos da porção H-prolina-CN, respectivamente C-5', C-2', C-4' e C-3'. O sinal em 153,29 ppm é referente à carbonila C-1' e o sinal em 75,93 ppm é referente ao C-3. Os demais sinais são referentes aos demais carbonos da porção estigmasterol (R) e já foram mostrados e discutidos no item 5.1.1.



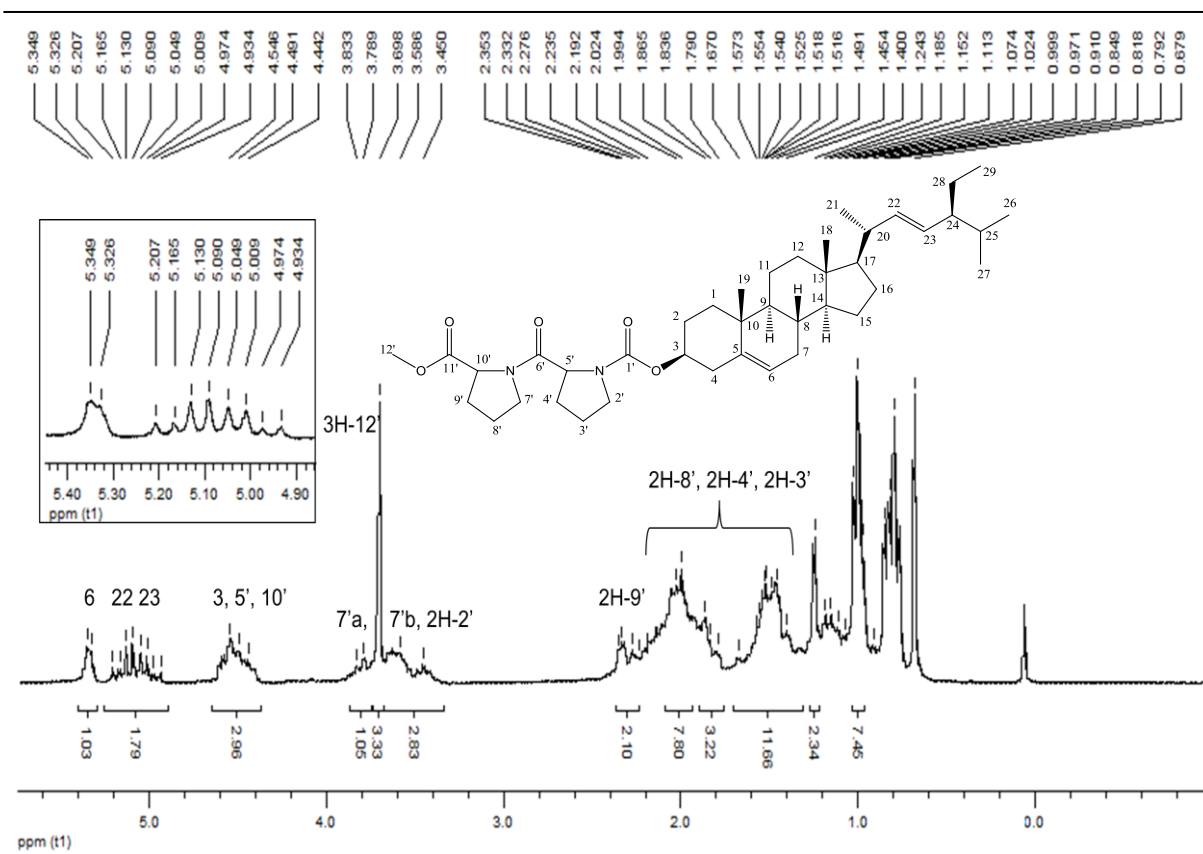
**Figura 36:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do estigmasterol-prolina-CN (**12**) em  $\text{CDCl}_3$ .

#### 5.1.11 Obtenção do estigmasterol-prolina-prolina-OMe (**13**)

A estrutura do composto estigmasterol-prolina-prolina-OMe (**13**), obtido conforme item 5.1, foi confirmada por RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

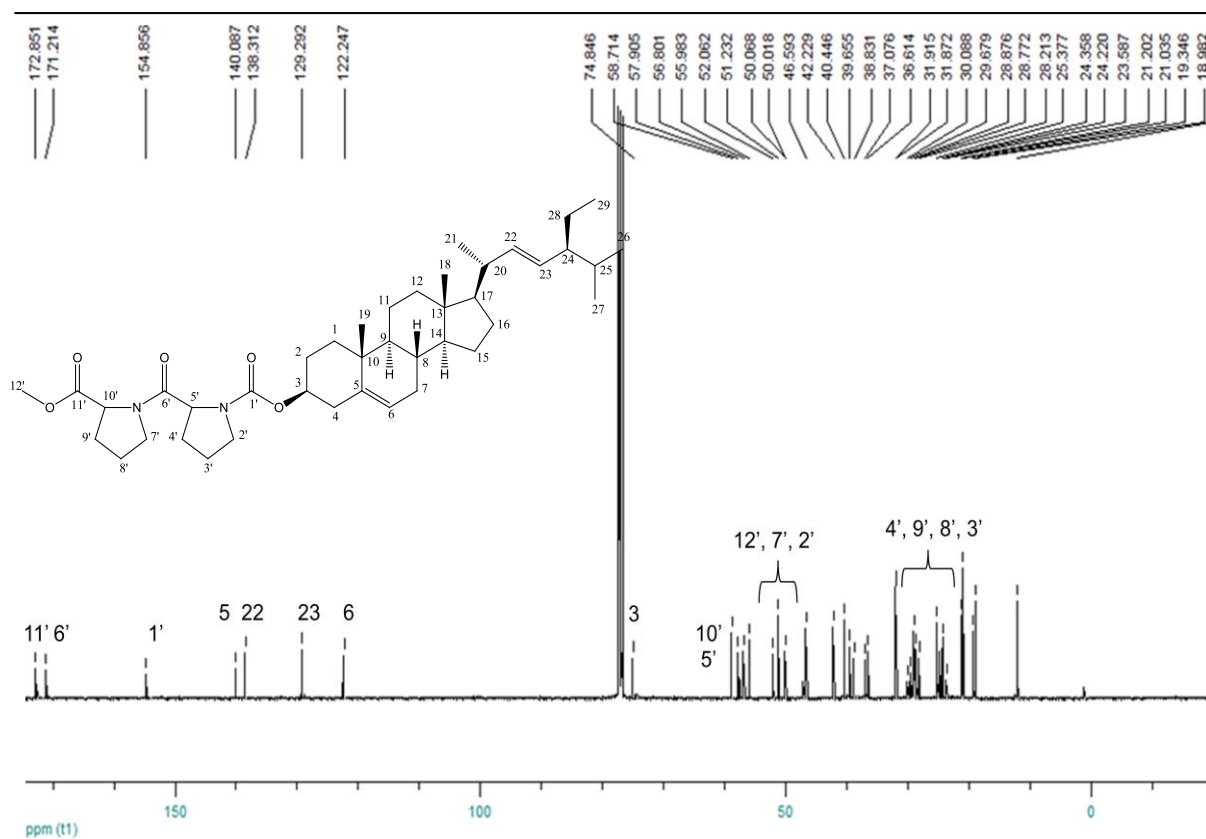
A Figura 37 mostra o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **13**, em  $\text{CDCl}_3$  a 200,13 MHz, onde se observa a presença de um singlete em 3,69 ppm referente aos três hidrogênios da metoxila presente na porção H-prolina-prolina-OMe. Os multipletos entre 4,44-4,54; 3,78-3,83 e 3,45-3,58 ppm são referentes aos hidrogênios H-3, H-5', H-10', H-7'a, H-7'b e 2H-2', respectivamente. O multipletto entre 1,79-2,35 ppm é referente aos hidrogênios 2H-9', 2H-8' e 2H-4', da porção H-prolina-prolina-OMe, e a sete hidrogênios da porção estigmasterol (H-4a, H-4b, H-12b, H-20, H-7b, H-1b, H-2a). O multipletto entre 1,40-1,67 ppm é referente aos 2H-3' e a dez hidrogênios da porção estigmasterol (H-16a, H-15a, H-25, H-24, H-2b, 2H-

11, H-7a, H-8, H-28). Os demais sinais são referentes aos hidrogênios da porção estigmasterol (R) e já foram mostrados e discutidos no item 5.1.1.



**Figura 37:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do estigmasterol-prolina-prolina-OMe (**13**) em  $\text{CDCl}_3$ .

A Figura 38 apresenta o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **13**, em  $\text{CDCl}_3$  a 50,32 MHz, onde se observa a presença dos sinais em 58,71; 57,90; 52,06; 50,07; 50,01; 28,77; 28,21; 24,22 e 23,58 ppm referentes aos carbonos da porção H-prolina-prolina-OMe, respectivamente C-10', C-5', C-12', C-7', C-2', C-4', C-9', C-8' e C-3'. Os sinais em 172,85; 171,21 e 154,85 ppm são referentes às carbonilas C-11', C-6' e C-1', respectivamente. Observa-se também um sinal em 74,84 ppm referente ao C-3. Os demais sinais são referentes aos demais carbonos da porção estigmasterol (R) e já foram mostrados e discutidos no item 5.1.1.



**Figura 38:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do estigmasterol-prolina-prolina-OMe (**13**) em  $\text{CDCl}_3$ .

#### 5.1.12 Obtenção do N-Boc-4-N-Fmoc-amino-*L*-prolina-estigmasterol (**14**)

A estrutura do composto N-Boc-4-N-Fmoc-amino-*L*-prolina-estigmasterol (**14**), obtido conforme item 5.1, foi confirmada por RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

A Figura 39 mostra o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **14**, em  $\text{CDCl}_3$  a 400,13 MHz, onde se observa a presença de dois dubletos em 7,74 ppm ( $J = 7,5$  Hz; 2H) e 7,57 ppm ( $J = 7,1$  Hz; 2H) referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos aromáticos C-14' e C-17', respectivamente. Também se observa um tripleto em 7,39 ppm ( $J = 14,5$  e 7,4 Hz; 2H) e um multipletto entre 7,29-7,33 ppm referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos aromáticos C-15' e C-16', respectivamente.

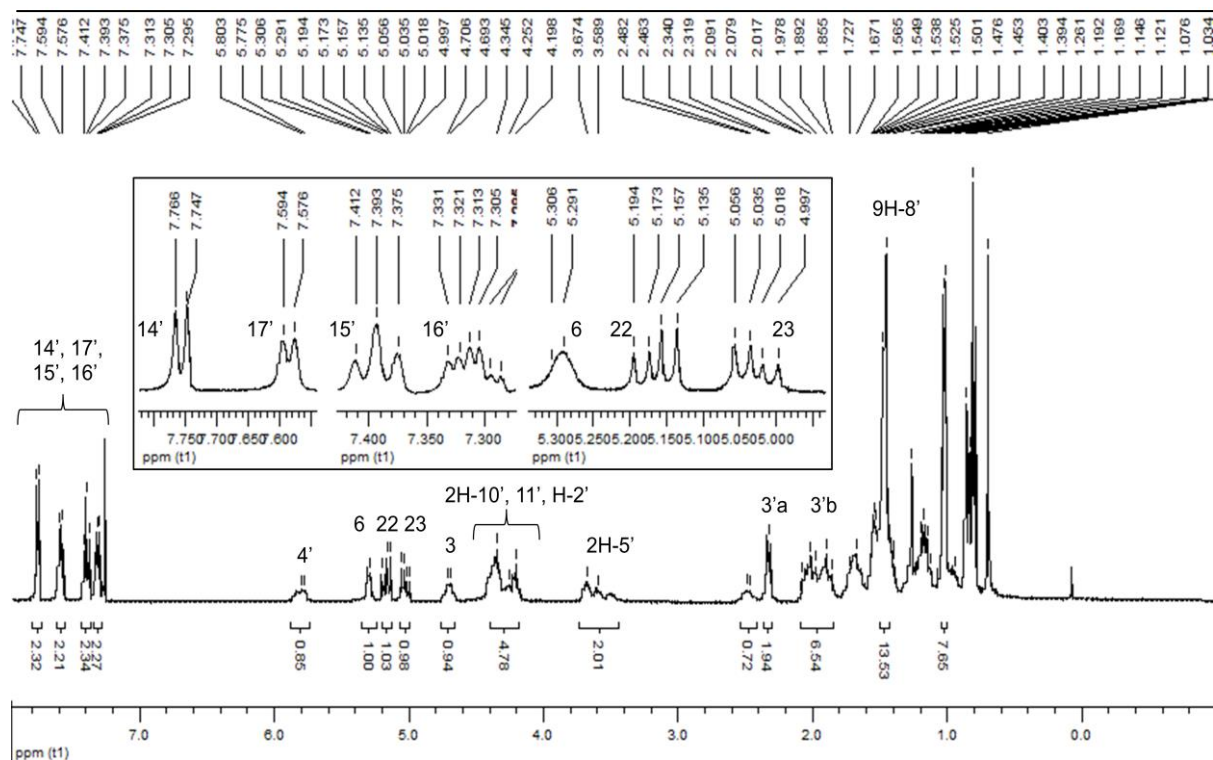
O multipletto entre 5,77-5,80 ppm é referente ao H-4' e o multipletto entre 4,19-4,34 ppm é referente aos dois hidrogênios ligados no C-10' e ao hidrogênio ligado no C-11'. Os multiplettos entre 3,58-3,67 e 2,46-2,48 ppm são referentes ao H-2', aos

dois hidrogênios diastereotópicos ligados ao C-5' e ao H-3'a, respectivamente. O multiplete entre 1,85-2,09 ppm é referente ao H-3'b e a cinco hidrogênios da porção estigmasterol (H-12b, H-20, H-7b, H-1b, H-2a). O singlete em 1,45 ppm é referente aos nove hidrogênios do grupo *terc*-butil do grupo protetor *terc*-butiloxicarbonil.

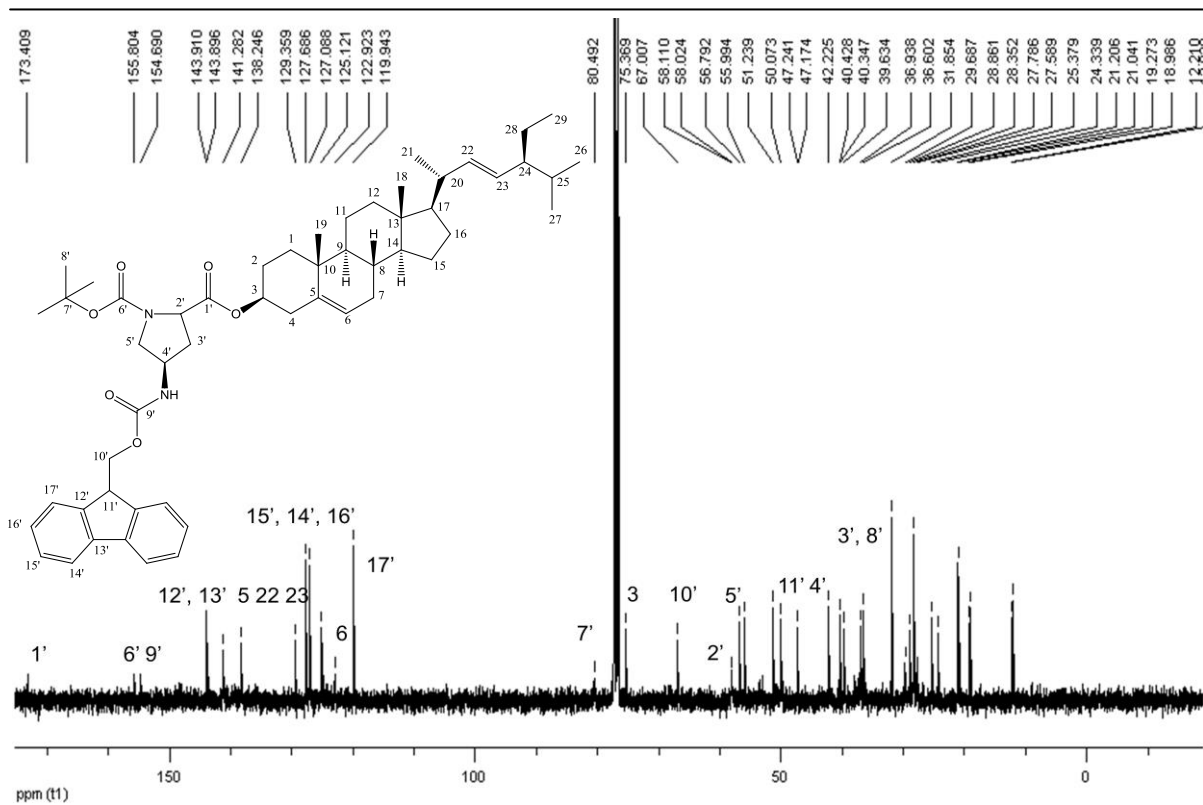
O multiplete entre 4,69-4,70 ppm é referente ao H-3 e os demais sinais são referentes aos hidrogênios olefínicos, metílicos, metilênicos e metínicos presentes na porção estigmasterol (R) e mostrados anteriormente no item 5.1.1.

A Figura 40 apresenta o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **14**, em  $\text{CDCl}_3$  a 100,62 MHz, onde se observa a presença dos sinais em 173,40; 155,80 e 154,69 ppm referentes às carbonilas C-1', C-6' e C-9', respectivamente. Também se observa a presença dos sinais em 143,91; 143,89; 127,68; 127,08; 125,12 e 119,94 ppm referentes aos carbonos aromáticos C-12', C-13', C-15', C-14', C-16' e C-17', respectivamente. Os sinais em 80,49; 67,00; 58,11; 58,02; 47,24; 47,17; 31,85 e 28,35 ppm são referentes aos C-7', C-10', C-2', C-5', C-11', C-4', C-3' e C-8' da porção N-Boc-4-N-Fmoc-amino-*L*-prolina, respectivamente.

O sinal em 75,36 ppm é referente ao C-3 e os demais sinais são referentes aos carbonos olefínicos, metínicos, metilênicos, metílicos e quaternários presentes na porção estigmasterol (R) e mostrados anteriormente no item 5.1.1.



**Figura 39:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do N-Boc-4-N-Fmoc-amino-*L*-prolina-estigmasterol (14) em  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura 40:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do N-Boc-4-N-Fmoc-amino-*L*-prolina-estigmasterol (14) em  $\text{CDCl}_3$ .

### 5.1.13 Obtenção do N-4-N-Fmoc-amino-L-prolina-estigmasterol (**15**)

A estrutura do composto N-4-N-Fmoc-amino-L-prolina-estigmasterol (**15**), sintetizado conforme item 5.1, foi confirmada por RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

A Figura 41 mostra o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **15**, em  $\text{CDCl}_3$  a 400,13 MHz, onde se observa a presença de dois dubletos em 7,73 ppm ( $J = 7,5$  Hz, 2H) e 7,60 ppm ( $J = 7,1$  Hz, 2H) referentes aos hidrogênios ligados nos carbonos aromáticos C-11' e C-14', respectivamente. Observa-se também um tripleto em 7,38 ppm ( $J = 14,5$  e 7,4 Hz, 2H) e um multipletto entre 7,29-7,31 ppm referentes aos hidrogênios ligados nos carbonos aromáticos C-12' e C-13', respectivamente.

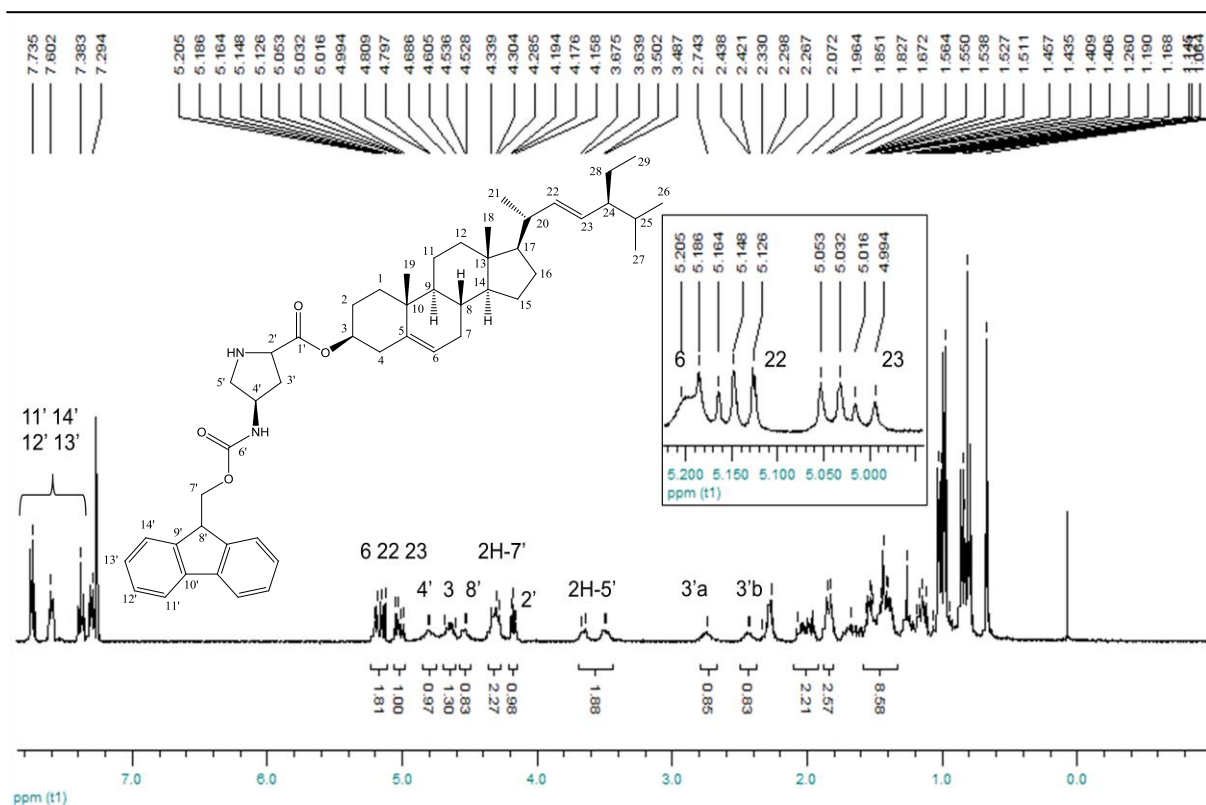
O multipletto entre 4,79-4,80 ppm é referente ao H-4' e os multiplettos entre 4,52-4,53; 4,28-4,33 e 4,15-4,19 ppm são referentes ao hidrogênio ligado no C-8', aos dois hidrogênios ligados ao C-7' e ao hidrogênio ligado ao C-2', respectivamente. Os multiplettos entre 3,63-3,67 e 3,48-3,50 ppm são referentes aos dois hidrogênios diastereotópicos ligados ao C-5'. O multipletto entre 2,42-2,43 ppm é referente ao H-3'a e o multipletto entre 1,96-2,07 ppm é referente ao H-3'b e a dois hidrogênios da porção estigmasterol (H-20, H-7b).

Pode-se perceber o desaparecimento do singletto em 1,45 ppm referente aos nove hidrogênios do grupo *tert*-butil do grupo protetor *tert*-butiloxicarbonil. O multipletto entre 4,60-4,68 ppm é referente ao H-3 e os demais sinais são referentes aos hidrogênios olefínicos, metínicos, metilênicos e metílicos presentes na porção estigmasterol (R) e mostrados anteriormente no item 5.1.1.

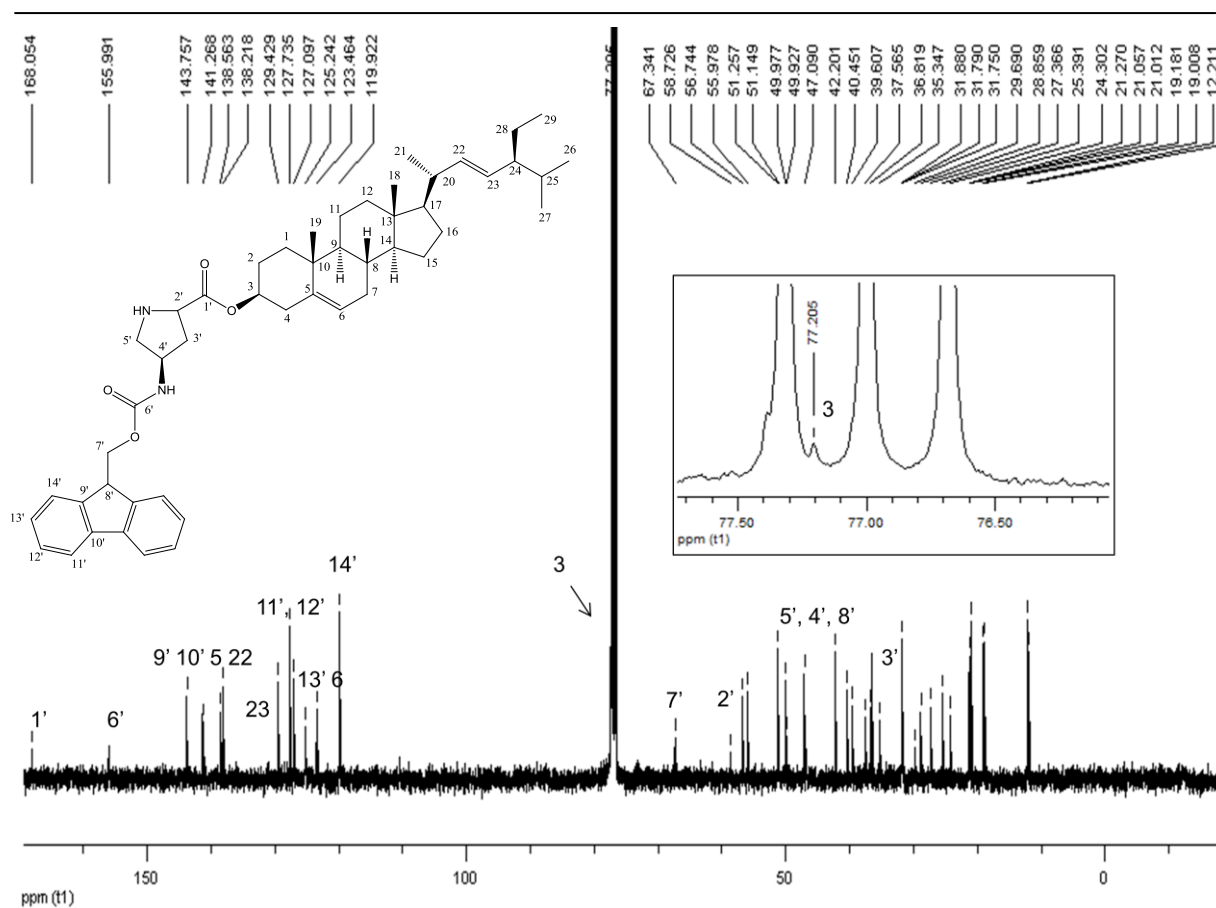
A Figura 42 apresenta o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **15**, em  $\text{CDCl}_3$  a 100,62 MHz, onde se observa a presença dos sinais em 168,05 e 155,99 ppm referentes às carbonilas C-1' e C-6', respectivamente. Também se observa a presença dos sinais em 143,75; 141,26; 127,73; 127,09; 125,24 e 119,92 ppm referentes aos carbonos aromáticos C-9', C-10', C-11', C-12', C-13' e C-14', respectivamente. Os sinais em 67,34; 58,72; 51,14; 49,92; 47,09 e 31,88 ppm são referentes aos carbonos C-7', C-2', C-5', C-4', C-8' e C-3' da porção N-4-N-Fmoc-amino-L-prolina, respectivamente. Observa-se o desaparecimento do sinal em 31,85 ppm referente ao grupamento *tert*-butil do grupo protetor *tert*-butiloxicarbonil, confirmando a remoção deste grupamento.



O sinal em 77,20 ppm é referente ao C-3 e os demais sinais são referentes aos carbonos olefínicos, metínicos, metilênicos, metílicos e quaternários presentes na porção estigmasterol (R) e mostrados anteriormente no item 5.1.1.



**Figura 41:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do N-4-N-Fmoc-amino-L-prolina-estigmasterol (15) em  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura 42:** Espectro de RMN <sup>13</sup>C do N-4-N-Fmoc-amino-L-prolina-estigmasterol (**15**) em CDCl<sub>3</sub>.

#### 5.1.14 Obtenção do N-Boc-4-N-amino-L-prolina-estigmasterol (**16**)

A estrutura do composto N-Boc-4-N-amino-L-prolina-estigmasterol (**16**), sintetizado conforme item 5.1, foi confirmada por RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C.

A Figura 43 mostra o espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto **16**, em CDCl<sub>3</sub> a 200,13 MHz, onde se observa a presença de um singleto em 1,40 ppm referente aos nove hidrogênios metílicos do grupamento *tert*-butil do grupo protetor *tert*-butiloxicarbonil. Observam-se também os multipletos entre 4,17-4,27 e 3,27-3,73 ppm referentes ao hidrogênio ligado no C-2', aos dois hidrogênios diastereotópicos ligados no C-5' e ao hidrogênio ligado no C-4', respectivamente. O multipletos entre 2,29-2,45 ppm é referente ao hidrogênio H-3'a e a dois hidrogênios da porção

estigmasterol (H-4a, H-4b). O multiplete entre 1,83-2,07 ppm é referente ao H-3'b e a cinco hidrogênios da porção estigmasterol (H-12b, H-20, H-7b, H-1b, H-2a).

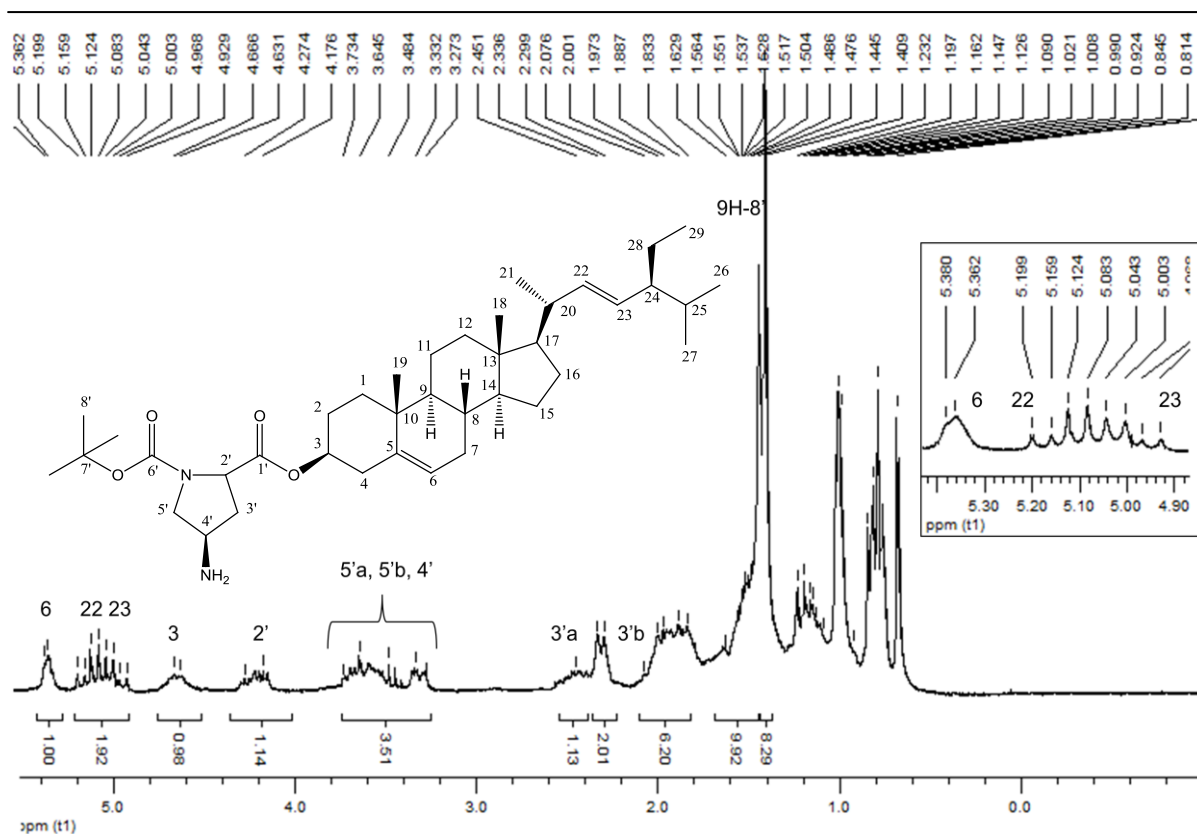
Pode-se perceber o desaparecimento dos sinais dos hidrogênios ligados aos carbonos aromáticos e dos multipletos entre 4,69-4,70 e 4,19-4,34 ppm da porção 9-fluorenilmetiloxicarbonil, confirmando a remoção do grupo protetor Fmoc.

O multiplete entre 4,63-4,66 ppm é referente ao H-3 e os demais sinais são referentes aos hidrogênios olefínicos, metílicos, metilênicos e metínicos presentes na porção estigmasterol (R) e mostrados anteriormente no item 5.1.1.

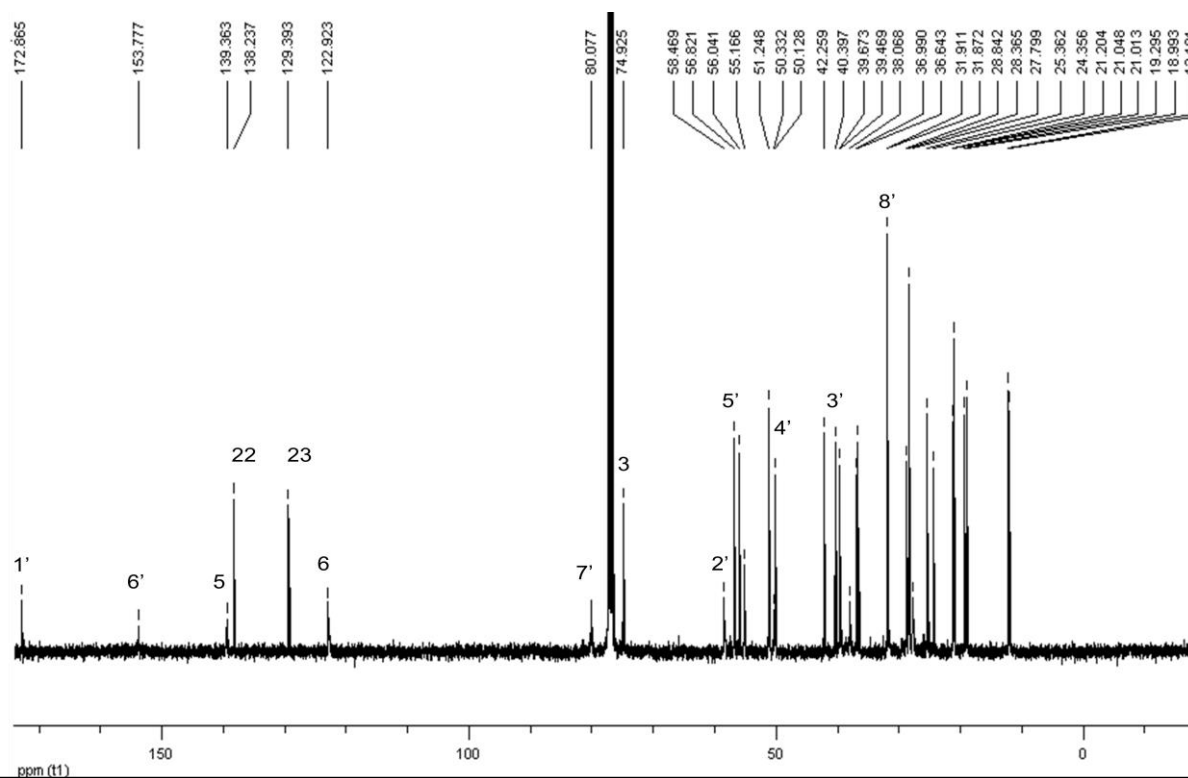
A Figura 44 mostra o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **16**, em  $\text{CDCl}_3$  a 50,32 MHz, onde se observa a presença dos sinais em 28,36 e 80,07 ppm referentes aos carbonos C-8' e C-7', respectivamente, do grupamento *terc*-butil. Observam-se também os sinais em 172,86 e 153,77 ppm referente às carbonilas C-1' e C-6', respectivamente. Os sinais a 58,46, 56,82, 50,33 e 38,06 ppm são referentes aos carbonos C-2', C-5', C-4' e C-3', respectivamente.

Observa-se o desaparecimento dos sinais dos carbonos aromáticos e dos sinais em 67,00 e 47,24 ppm, respectivamente os carbonos C-10' e C-11', da porção 9-fluorenilmetiloxicarbonil, confirmando a remoção do grupo protetor Fmoc.

O sinal em 74,92 ppm é referente ao C-3 e os demais sinais são referentes aos carbonos olefínicos, metínicos, metilênicos, metílicos e quaternários presentes na porção estigmasterol (R) e mostrados anteriormente no item 5.1.1.



**Figura 43:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do N-Boc-4-N-amino-L-prolina-estigmasterol (16) em  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura 44:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do N-Boc-4-N-amino-L-prolina-estigmasterol (16) em  $\text{CDCl}_3$ .

### 5.1.15 Obtenção do N-4-N-amino-L-prolina-estigmasterol (**17**)

A estrutura do composto N-4-N-amino-L-prolina-estigmasterol (**17**), obtido conforme item 5.1, foi confirmada por RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ . A amostra foi preparada em piridina deuterada devido à solubilidade.

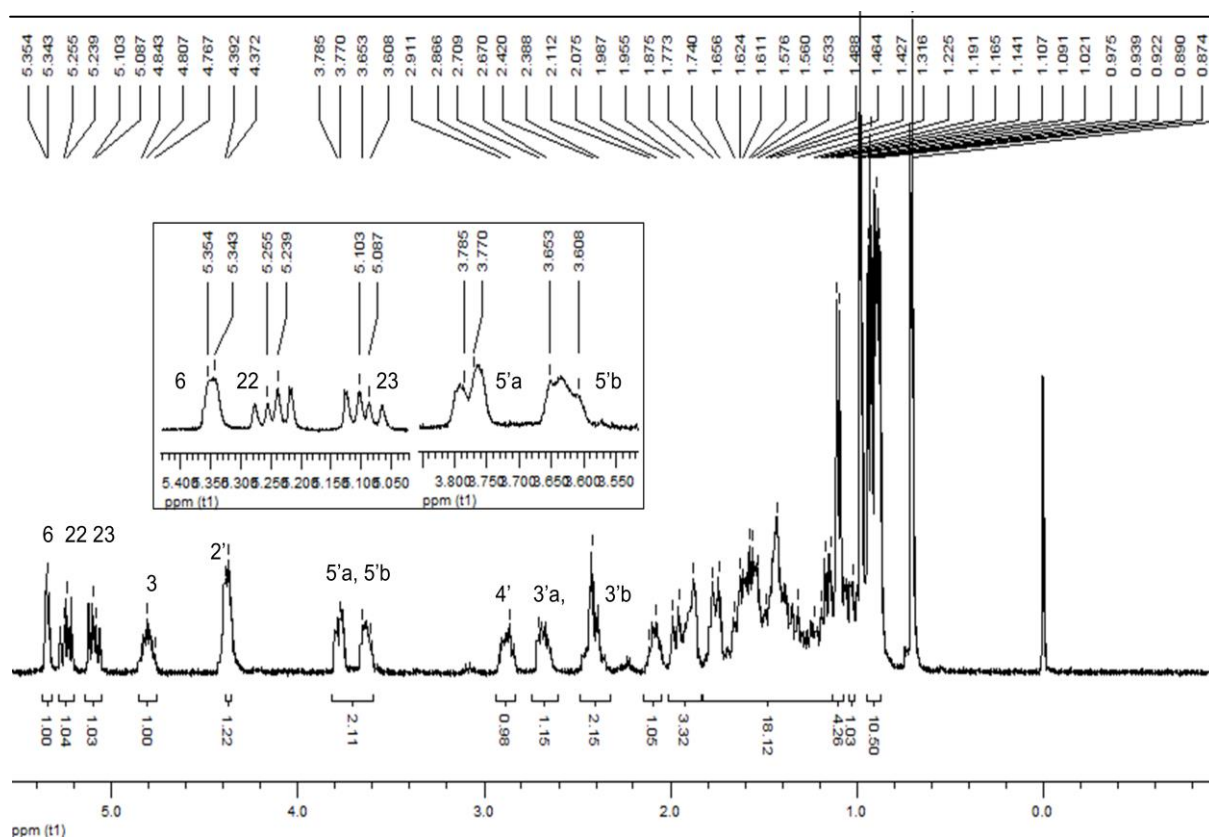
A Figura 45 mostra o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **17**, em piridina deuterada a 400,13 MHz, onde se observa o desaparecimento dos sinais referentes aos grupos protetores 9-fluorenilmetiloxicarbonil (Fmoc) e *terc*-butiloxicarbonil (Boc), confirmando a perda destes dois grupos protetores do composto N-Boc-4-N-Fmoc-amino-L-prolina-estigmasterol (**14**).

Os multipletos entre 4,37-4,39; 3,77-3,78; 3,63-3,64; 2,86-2,91 e 2,67-2,70 ppm são referentes ao hidrogênio ligado no carbono C-2', aos dois hidrogênios diastereotópicos ligados no C-5', ao hidrogênio ligado no C-4' e ao hidrogênio ligado no C-3'a, respectivamente. O multipletos entre 1,74-1,98 ppm é referente ao hidrogênio H-3'b e a quatro hidrogênios da porção estigmasterol (H-20, H-7b, H-1b, H-2a).

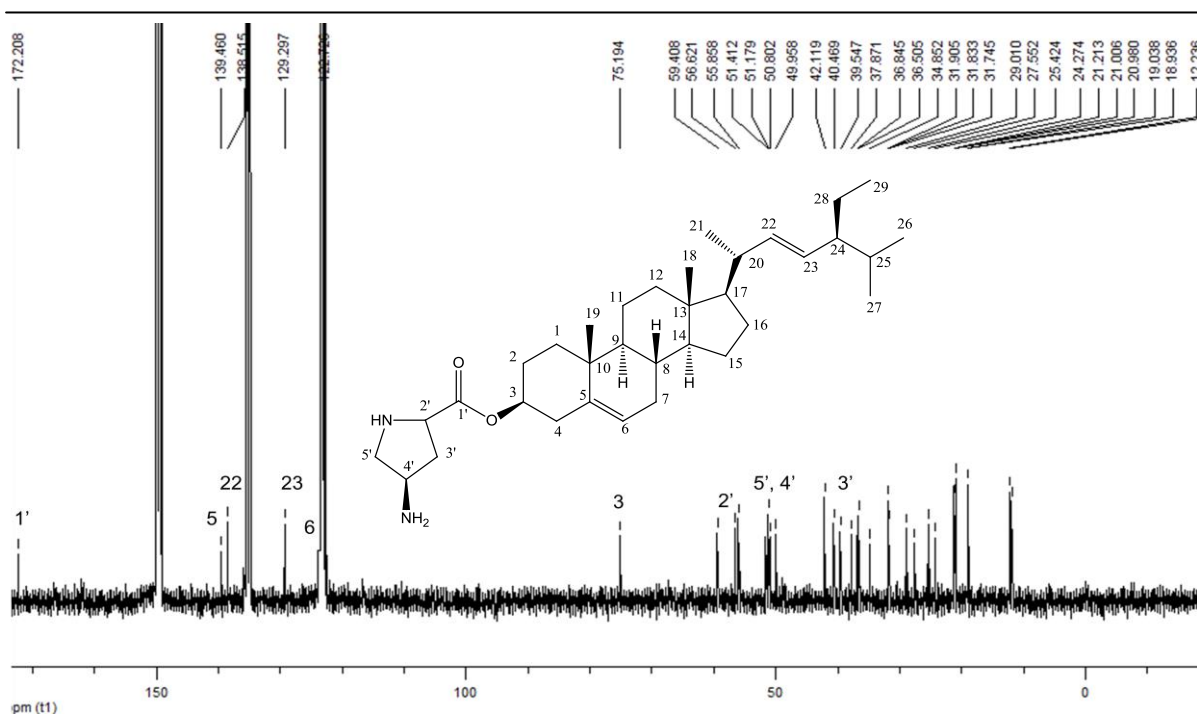
Os demais sinais são referentes aos hidrogênios olefínicos, metínicos, metilênicos e metílicos presentes na porção estigmasterol (R) e mostrados anteriormente no item 5.1.1. (Os deslocamentos químicos nos espectros do composto **17** apresentam valores ligeiramente diferentes devido ao uso de piridina deuterada ao invés de clorofórmio deuterado).

A Figura 46 mostra o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **17**, em piridina deuterada a 100,62 MHz, onde se observa o desaparecimento dos sinais referentes aos grupos protetores 9-fluorenilmetiloxicarbonil (Fmoc) e *terc*-butiloxicarbonil (Boc), confirmando a remoção destes grupos protetores do composto **14**.

Os sinais em 172,20; 56,62; 51,41; 50,80 e 34,85 ppm são referentes aos carbonos C-1' (carbonila), C-2', C-5', C-4' e C-3', respectivamente. Os demais sinais são referentes aos carbonos presentes na porção estigmasterol (R) e mostrados anteriormente no item 5.1.1.



**Figura 45:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do N-4-N-amino-L-prolina-estigmasterol (**17**) em piridina deuterada.



**Figura 46:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do N-4-N-amino-L-prolina-estigmasterol (**17**) em piridina deuterada.

### 5.1.16 Obtenção do Fmoc-*L*-alanina-estigmasterol (**18**)

A estrutura do composto Fmoc-*L*-alanina-estigmasterol (**18**), obtido conforme item 5.1, foi confirmada por RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

A Figura 47 mostra o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **18**, em  $\text{CDCl}_3$  a 200,13 MHz, onde se observa a presença de dois dubletos em 7,74 ppm ( $J = 7,0$  Hz; 2H) e 7,58 ppm ( $J = 7,2$  Hz; 2H) relativos aos hidrogênios ligados aos carbonos aromáticos C-9' e C-12', respectivamente. Também se observa um multipletto entre 7,31-7,40 ppm referente aos hidrogênios ligados aos carbonos aromáticos C-10' e C-11' da porção Fmoc-*L*-alanina.

Observa-se a presença de um multipletto entre 4,22-4,40 ppm referente aos dois hidrogênios ligados no C-5' e ao hidrogênio ligado no C-6'. Observa-se também um multipletto entre 5,43-5,44 ppm referente ao hidrogênio ligado no C-2'. O singletto em 1,42 ppm é referente aos 3H metílicos ligados no C-3'.

O multipletto entre 4,65-4,67 ppm é referente ao H-3 e os demais sinais são referentes aos hidrogênios presentes na porção estigmasterol (R) e mostrados no item 5.1.1.

A Figura 48 apresenta o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **18**, em  $\text{CDCl}_3$  a 50,32 MHz, onde se observa a presença de dois sinais em 172,47 e 155,60 ppm referentes às carbonilas do C-1' e C-4', respectivamente. Observam-se também os sinais dos carbonos aromáticos C-7', C-8', C-10', C-9', C-11' e C-12', respectivamente em 143,85; 141,32; 127,69; 127,05; 125,07 e 119,96 ppm. Além destes sinais, observam-se quatro sinais em 66,97; 49,78; 47,22 e 18,99 ppm referentes aos C-5', C-2', C-6' e C-3' da porção Fmoc-*L*-alanina, respectivamente.

Os demais sinais são referentes aos carbonos olefínicos, metínicos, metilênicos, metílicos e quaternários presentes na porção estigmasterol (R) e mostrados anteriormente no item 5.1.1.

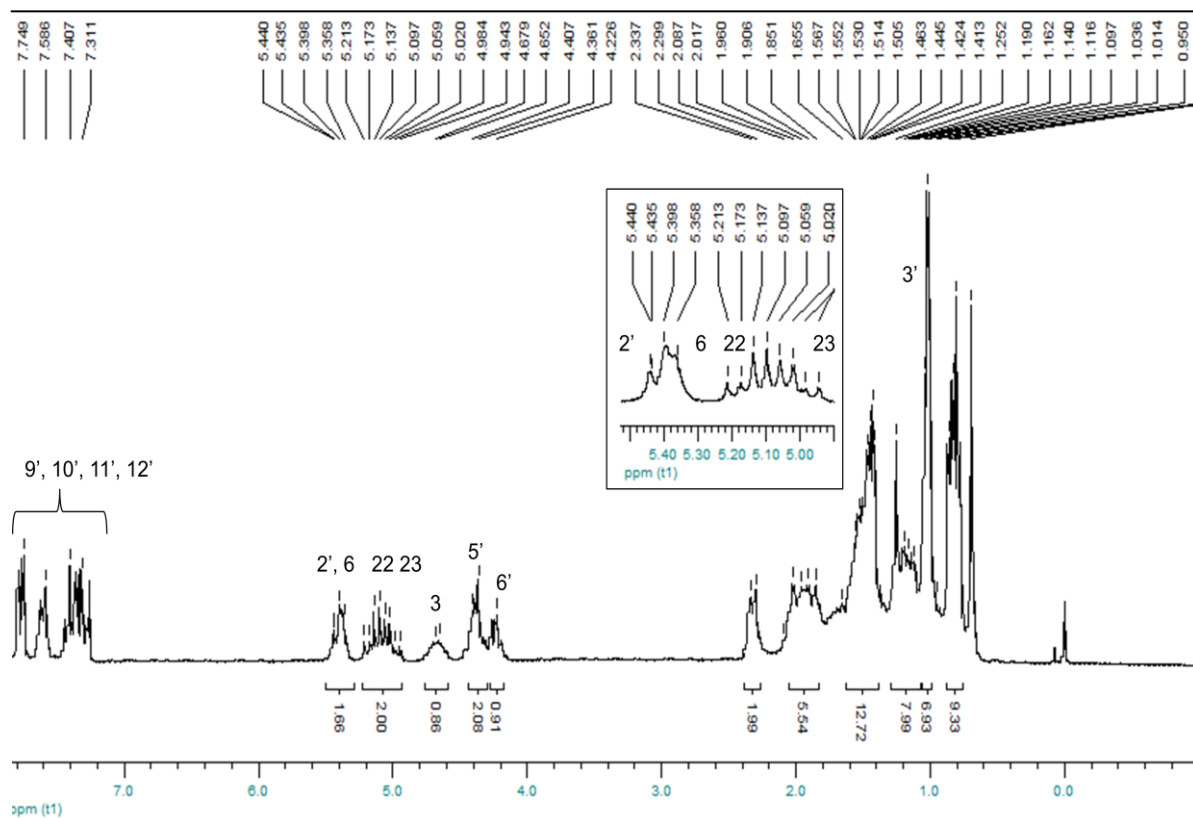


Figura 47: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do Fmoc-*L*-alanina-estigmasterol (**18**) em  $\text{CDCl}_3$ .

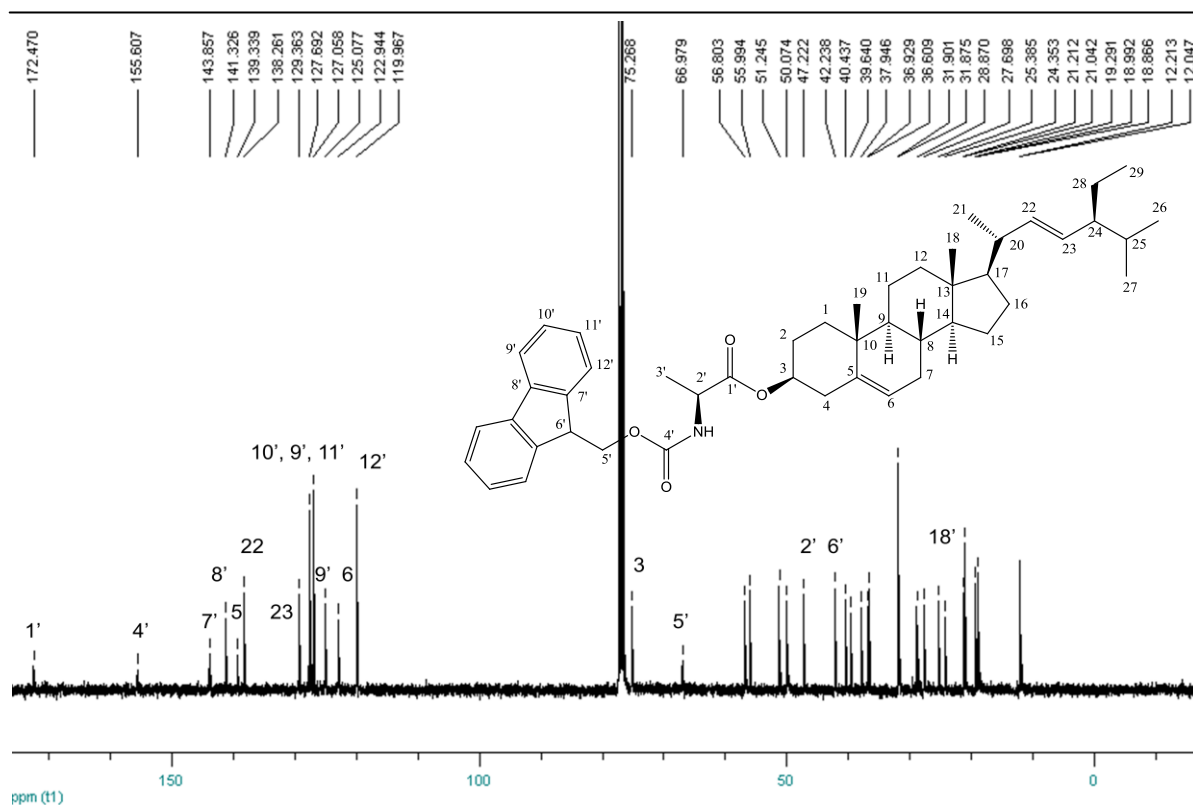


Figura 48: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do Fmoc-*L*-alanina-estigmasterol (**18**) em  $\text{CDCl}_3$ .



### 5.1.17 Obtenção do H-*L*-alanina-estigmasterol (**19**)

A estrutura do composto H-*L*-alanina-estigmasterol (**19**), obtido conforme item 5.1, foi confirmada por RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

A Figura 49 mostra o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **19**, em  $\text{CDCl}_3$  a 200,13 MHz, onde se observa o desaparecimento dos sinais relativos aos hidrogênios ligados aos carbonos aromáticos da porção Fmoc-*L*-alanina, além do desaparecimento do multiplete entre 4,22-4,40 ppm referente aos hidrogênios ligados no C-5' e ao hidrogênio ligado no C-6'. Observa-se também que o multiplete referente ao H-2' passou de um campo baixo (5,43-5,44 ppm) para um campo alto, entre 3,50-3,54 ppm, devido a remoção do grupo protetor Fmoc (efeito de blindagem).

O singlete em 1,35 ppm é referente aos três hidrogênios ligados no C-3'. O multiplete entre 4,60-4,64 ppm é referente ao H-3 e os demais sinais são referentes aos hidrogênios presentes na porção estigmasterol (R) e mostrados no item 5.1.1.

A Figura 50 apresenta o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **19**, em  $\text{CDCl}_3$  a 50,32 MHz, onde se observa o desaparecimento dos sinais referentes aos carbonos aromáticos da porção Fmoc-*L*-alanina, além do desaparecimento dos sinais em 155,60; 66,97 e 47,22 ppm referentes aos carbonos C-4', C-5' e C-6', também da porção Fmoc-*L*-alanina. Observam-se os sinais em 175,75; 50,14 e 20,58 ppm referentes aos carbonos C-1' (carbonila), C-2' e C-3', respectivamente. Estes dados confirmando a remoção do grupo protetor 9-fluorenilmetiloxycarbonil (Fmoc).

Os demais sinais são referentes aos carbonos olefínicos, metínicos, metilênicos, metílicos e quaternários presentes na porção estigmasterol (R) e mostrados anteriormente no item 5.1.1.

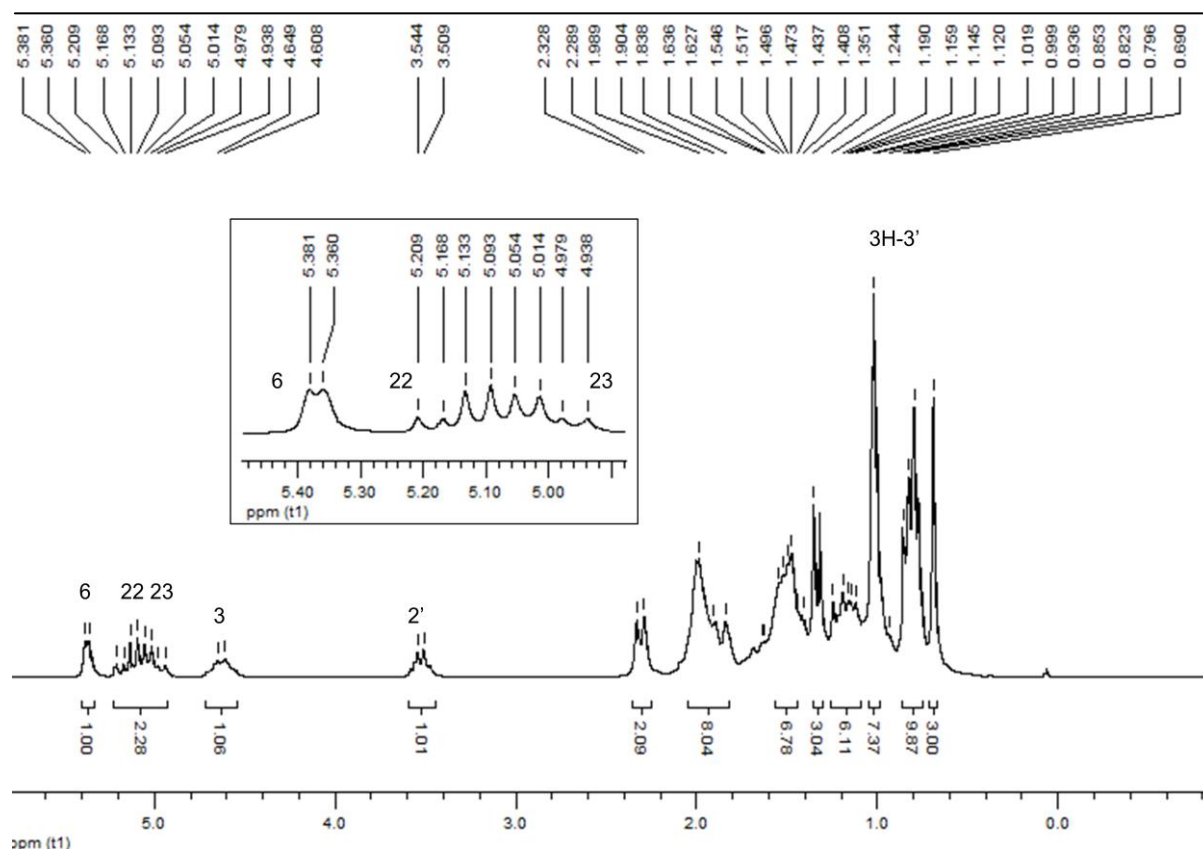


Figura 49: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do H-L-alanina-estigmasterol (**19**) em  $\text{CDCl}_3$ .

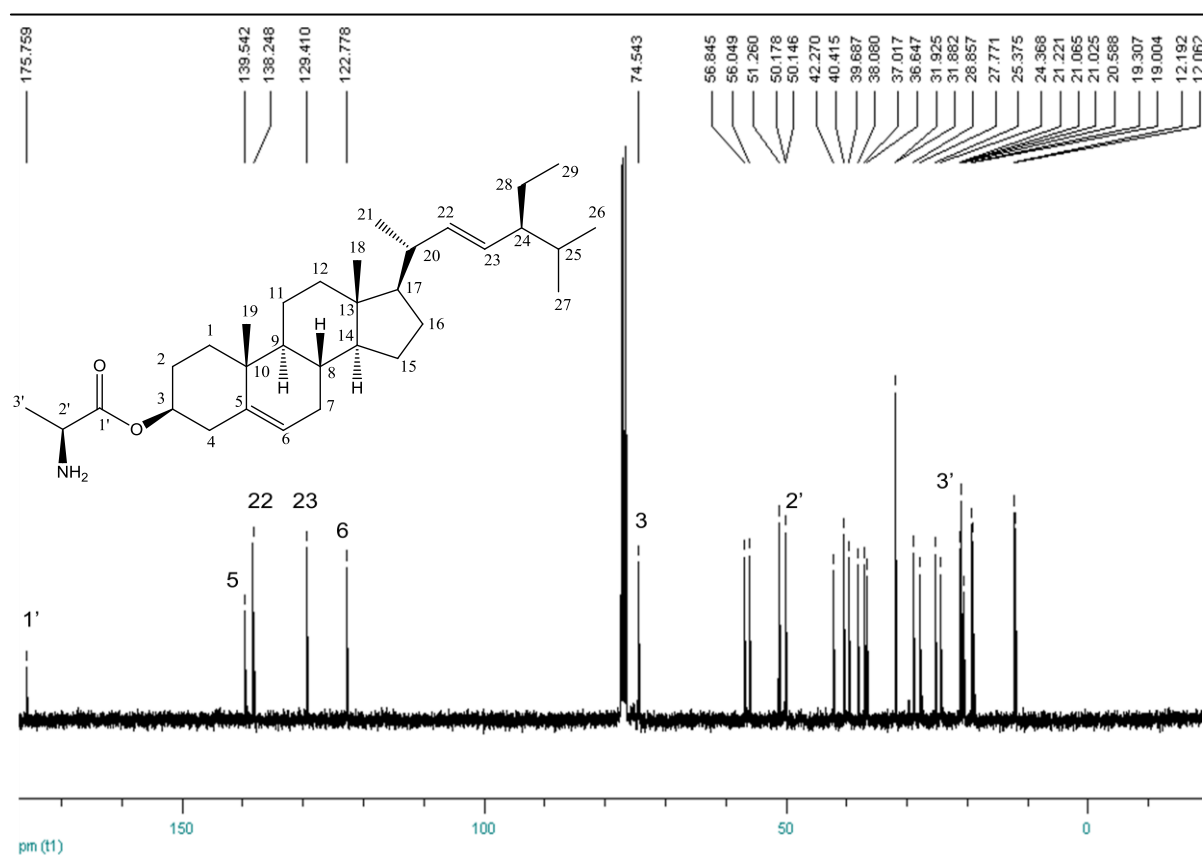


Figura 50: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do H-L-alanina-estigmasterol (**19**) em  $\text{CDCl}_3$ .

### 5.1.18 Obtenção do Fmoc-*L*-glicina-estigmasterol (**20**)

A estrutura do composto Fmoc-*L*-glicina-estigmasterol (**20**), sintetizado conforme item 5.1, foi confirmada por RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

A Figura 51 mostra o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **20**, em  $\text{CDCl}_3$  a 200,13 MHz, onde se observa a presença de dois dubletos em 7,76 ppm ( $J = 7,0$  Hz; 2H) e 7,60 ppm ( $J = 7,6$  Hz; 2H) relativos aos hidrogênios aromáticos H-8' e H-11', respectivamente. Observa-se também um multiplete entre 7,26-7,34 ppm relativo aos hidrogênios aromáticos H-9' e H-10', da porção Fmoc-*L*-glicina. Observa-se a presença de um multiplete entre 4,06-4,17 ppm referente ao hidrogênio ligado ao C-5' e dois dubletos em 4,38 ppm ( $J = 6,9$  Hz; 2H) e 3,96 ppm ( $J = 5,3$  Hz; 2H) referentes aos dois hidrogênios ligados ao C-4' e aos dois hidrogênios ligados no C-2', respectivamente.

Os demais sinais são referentes aos hidrogênios olefínicos, metínicos, metilênicos e metílicos presentes na porção estigmasterol (R) e mostrados no item 5.1.1.

A Figura 52 apresenta o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **20**, em  $\text{CDCl}_3$  a 50,32 MHz, onde se observa a presença de dois sinais em 169,33 e 156,24 ppm referentes às carbonilas do C-1' e C-3', respectivamente. Observam-se também os sinais dos carbonos aromáticos C-6', C-7', C-9', C-8', C-10' e C-11', respectivamente em 143,90; 141,36; 127,71; 127,08; 125,08 e 119,98 ppm. Além destes sinais observam-se ainda três sinais em 67,26; 47,24 e 38,07 ppm referentes aos C-4', C-5' e C-2' da porção Fmoc-*L*-glicina, respectivamente.

Os demais sinais são referentes aos carbonos olefínicos, metínicos, metilênicos, metílicos e quaternários presentes na porção estigmasterol (R) e mostrados anteriormente no item 5.1.1.

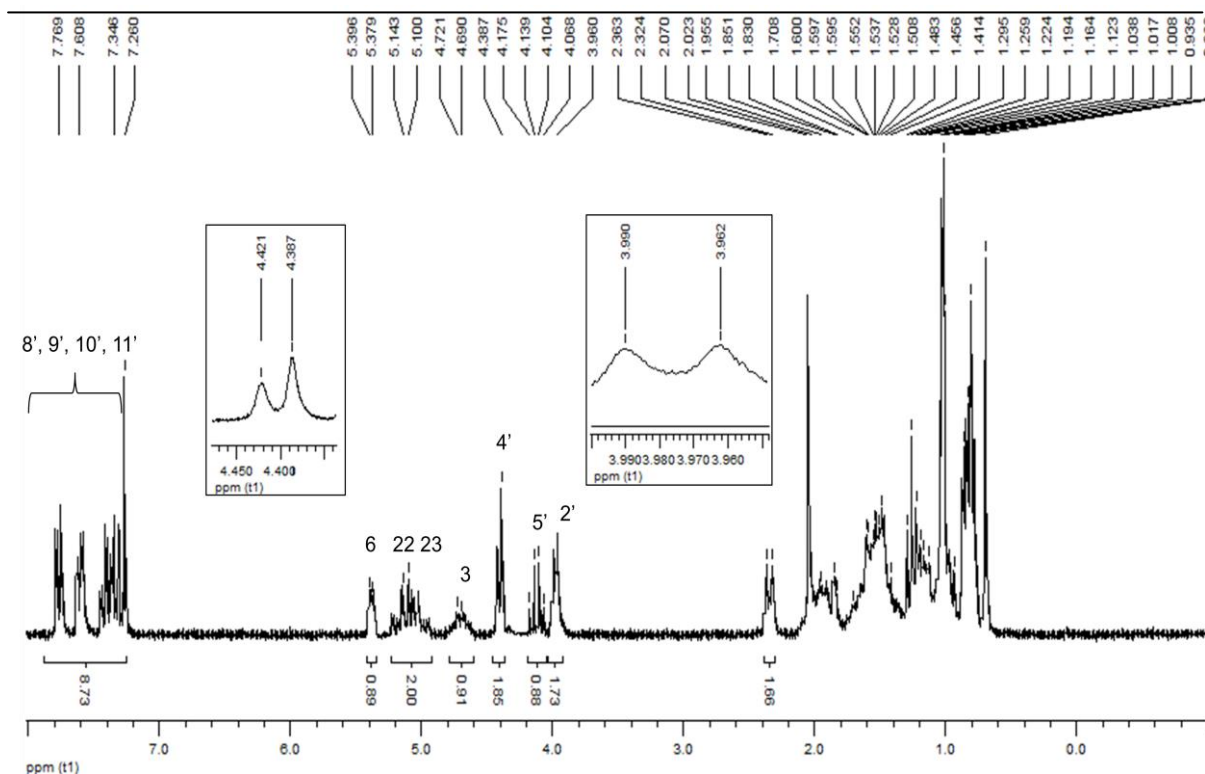


Figura 51: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do Fmoc-*L*-glicina-estigmasterol (20) em  $\text{CDCl}_3$ .

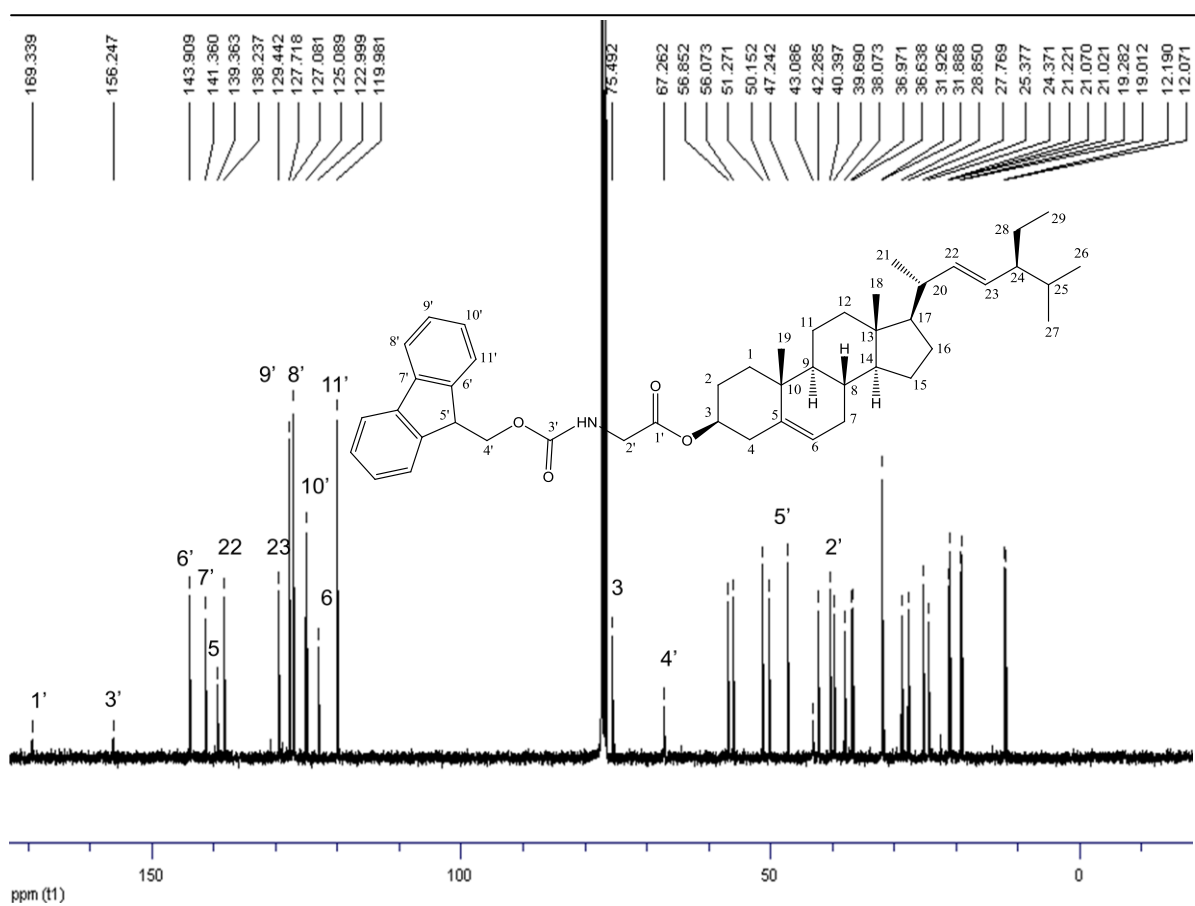


Figura 52: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do Fmoc-*L*-glicina-estigmasterol (20) em  $\text{CDCl}_3$ .

### 5.1.19 Obtenção do H-*L*-glicina-estigmasterol (**21**)

A estrutura do composto H-*L*-glicina-estigmasterol (**21**), obtido conforme item 5.1, foi confirmada por RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

A Figura 53 mostra o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **21**, em  $\text{CDCl}_3$  a 400,13 MHz, onde se observa o desaparecimento dos sinais relativos aos hidrogênios aromáticos da porção Fmoc-*L*-glicina, além do desaparecimento do dubleto em 4,38 ppm e do multiplete entre 4,06-4,17 ppm referentes aos dois hidrogênios ligados no C-4' e ao hidrogênio ligado no C-5', respectivamente. Os singletos em 3,47 e 3,40 ppm são referentes aos dois hidrogênios ligados no C-2'. Estes dados comprovam a remoção do grupo protetor 9-fluorenilmetiloxicarbonil (Fmoc).

O multiplete em 4,64-4,66 ppm é referente ao H-3 e os demais sinais são referentes aos hidrogênios presentes na porção estigmasterol (R) e mostrados anteriormente no item 5.1.1.

A Figura 54 apresenta o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **21**, em  $\text{CDCl}_3$  a 100,62 MHz, onde se observa o desaparecimento dos sinais relativos aos carbonos aromáticos da porção Fmoc-*L*-glicina, além do desaparecimento dos sinais em 156,24; 67,26 e 47,24 ppm referentes aos carbonos C-3' (carbonila), C-4' e C-5', também da porção Fmoc-*L*-glicina. Observam-se os sinais em 173,39 e 38,14 ppm referentes aos carbonos C-1' (carbonila) e C-2', respectivamente. Estes dados confirmando a remoção do grupo protetor 9-fluorenilmetiloxicarbonil (Fmoc).

Os demais sinais são referentes aos carbonos presentes na porção estigmasterol (R) e mostrados anteriormente no item 5.1.1.

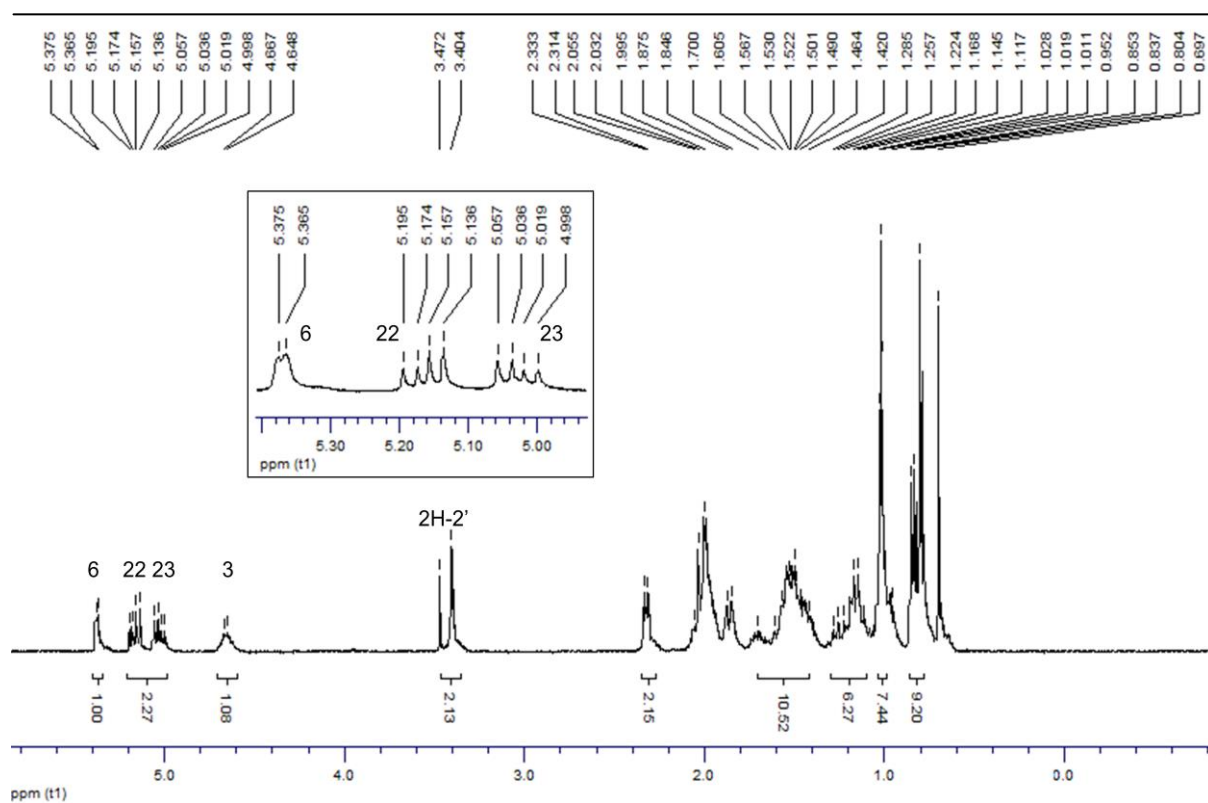


Figura 53: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do H-L-glicina-estigmasterol (**21**) em  $\text{CDCl}_3$ .

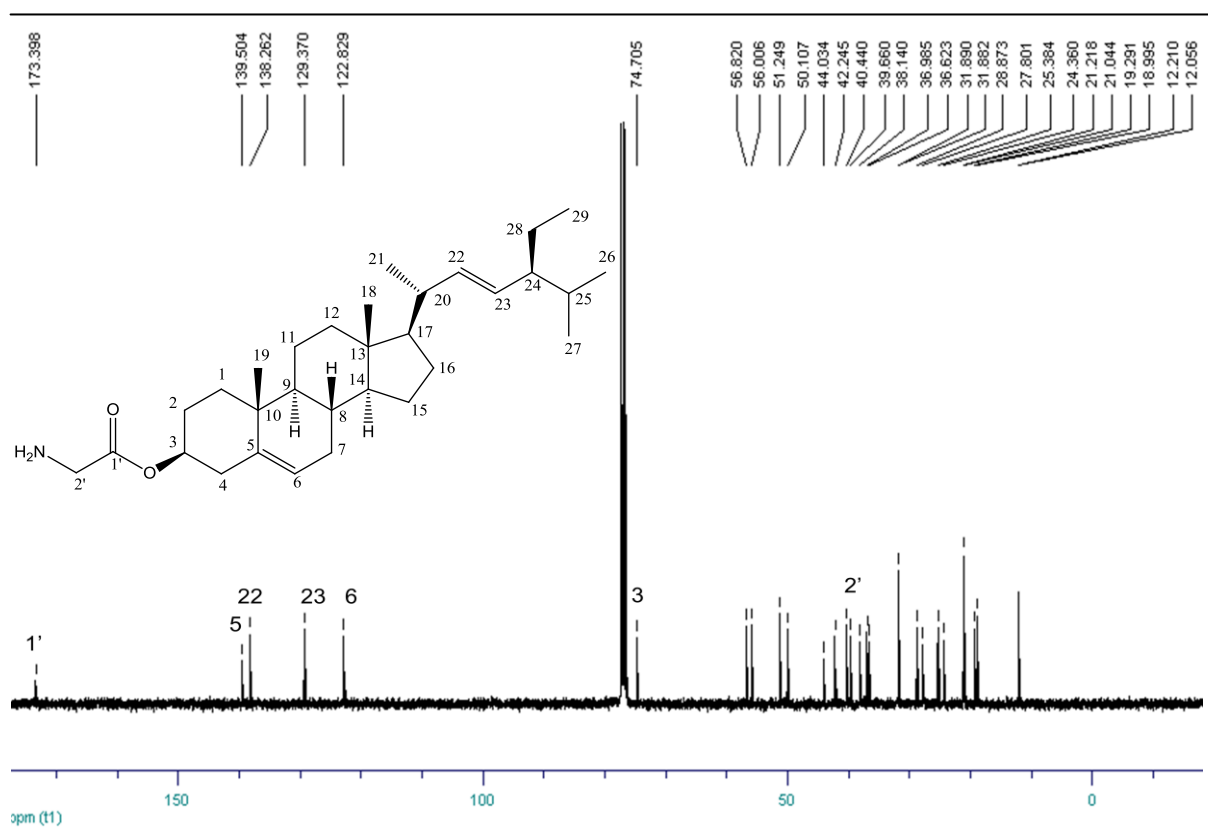


Figura 54: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do H-L-glicina-estigmasterol (**21**) em  $\text{CDCl}_3$ .

### 5.1.20 Obtenção do Fmoc-*L*-cisteína(tBu)-estigmasterol (**22**)

A estrutura do composto Fmoc-*L*-cisteína(tBu)-estigmasterol (**22**), sintetizado conforme item 5.1, foi confirmada por RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

A Figura 55 mostra o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **22**, em  $\text{CDCl}_3$  a 200,13 MHz, onde se observa a presença dos dois dubletos em 7,74 ppm ( $J = 7,3$  Hz; 2H) e 7,59 ppm ( $J = 7,1$  Hz; 2H) relativos aos hidrogênios aromáticos H-11' e H-14', respectivamente. Observa-se também um multipletto entre 7,31-7,40 ppm relativo aos hidrogênios aromáticos H-12' e H-13', da porção Fmoc-*L*-cisteína(tBu)-OH.

Observa-se a presença de dois multipletos entre 3,01-3,03 e 2,33-2,37 ppm referentes aos hidrogênios diastereotópicos ligados no C-3' e de um dubleto em 4,37 ppm ( $J = 7,6$  Hz, 2H) referente aos dois hidrogênios ligados ao C-7'. O multipletto entre 4,20-4,27 ppm é referente ao hidrogênio ligado no C-8'.

O multipletto entre 4,60-4,64 ppm é referente ao H-2', o dubleto em 5,65 ppm ( $J = 7,9$  Hz; 1H) é referente ao hidrogênio ligado no NH (neste caso o NH apareceu pois não ocorreu sobreposição de sinais) e o singletto em 1,31 ppm é referente aos nove hidrogênios metílicos da porção *terc*-butil.

Os demais sinais são referentes aos hidrogênios presentes na porção estigmasterol (R) e mostrados anteriormente no item 5.1.1.

A Figura 56 apresenta o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **22**, em  $\text{CDCl}_3$  a 100,62 MHz, onde se observa a presença de dois sinais em 169,90 e 152,89 ppm referentes às carbonilas do C-1' e C-6', respectivamente. Observam-se também os sinais dos carbonos aromáticos C-9', C-10', C-11', C-12', C-13' e C-14', respectivamente em 143,83; 141,31; 127,69; 127,07; 125,11 e 119,95 ppm. Além destes observam-se outros sinais em 67,24; 57,01; 47,16; 42,46; 30,91 e 28,91 ppm referentes aos carbonos C-7', C-2', C-8', C-4', C-5' e C-3', respectivamente, da porção Fmoc-cisteína(tBu)-OH.

O sinal em 75,77 é referente ao carbono C-3 e os demais sinais são referentes aos carbonos olefínicos, metínicos, metilênicos e metílicos presentes na porção estigmasterol (R) e mostrados anteriormente no item 5.1.1.

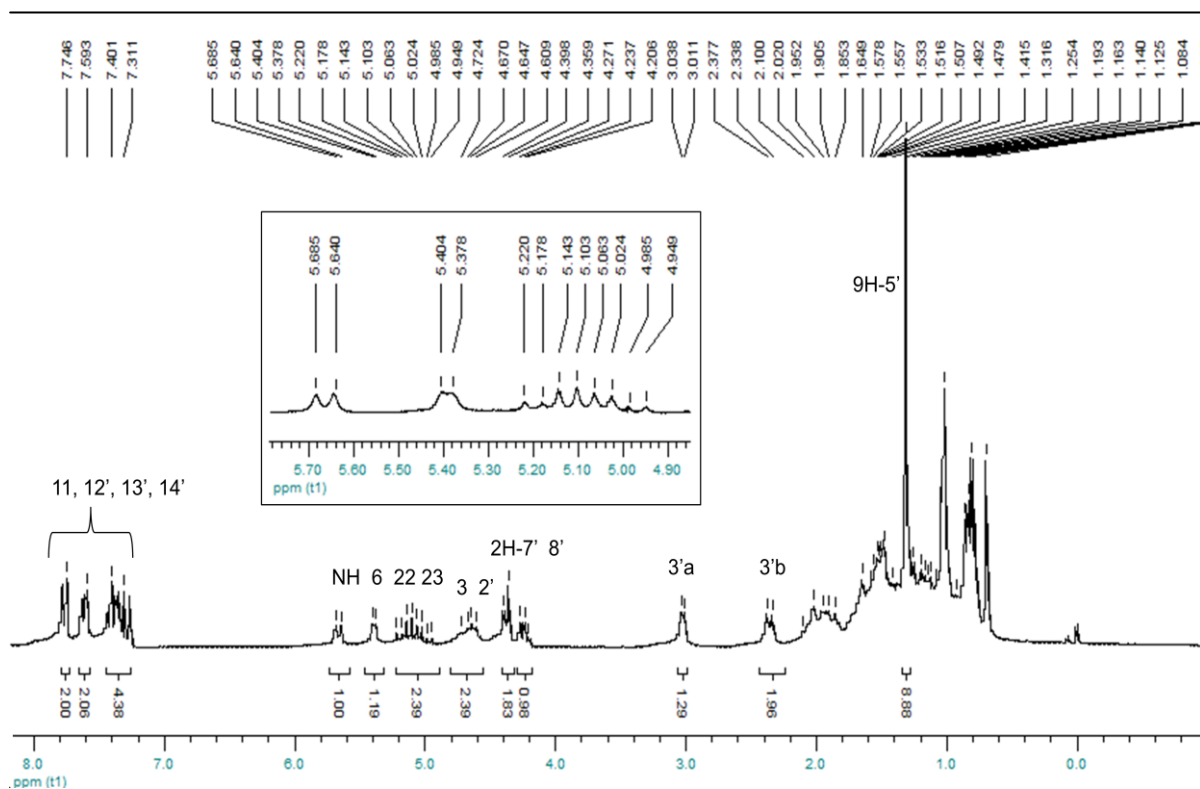


Figura 55: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do Fmoc-*L*-cisteína(tBu)-estigmasterol (**22**) em  $\text{CDCl}_3$ .

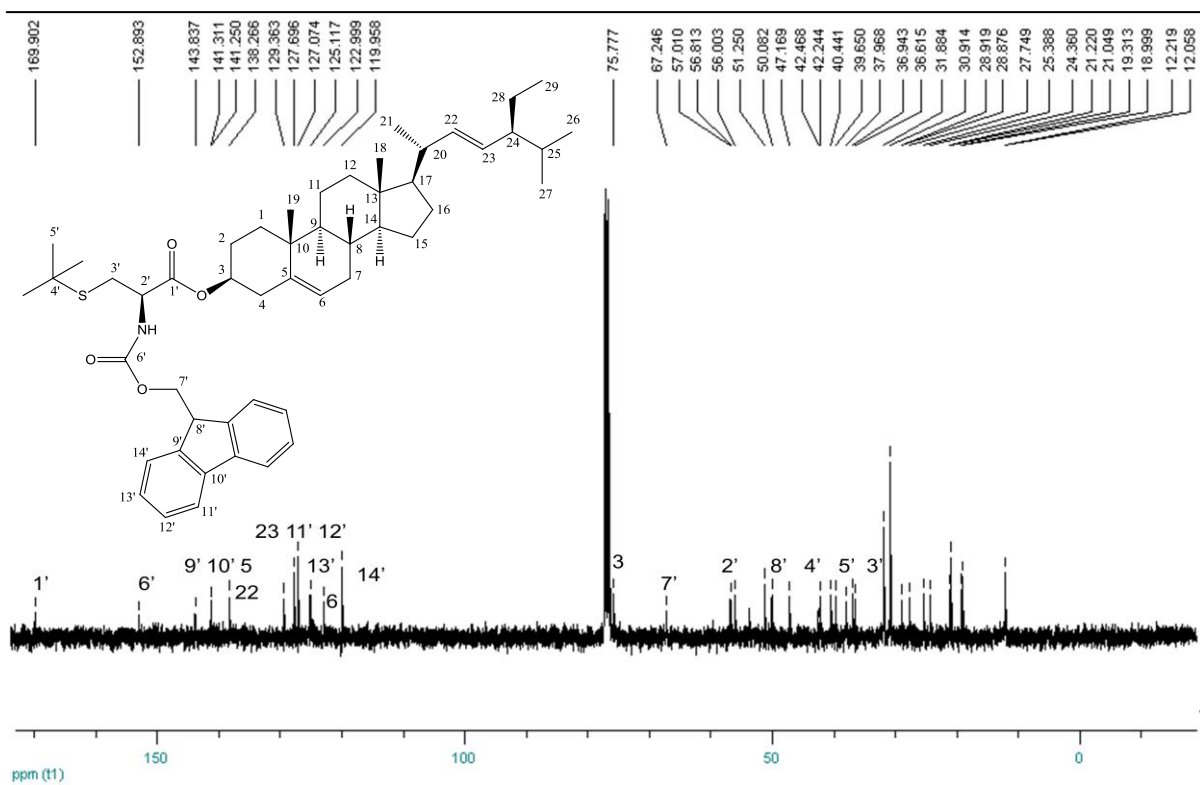


Figura 56: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do Fmoc-*L*-cisteína(tBu)-estigmasterol (**22**) em  $\text{CDCl}_3$ .



### 5.1.21 Obtenção do H-*L*-cisteína(tBu)-estigmasterol (**23**)

A estrutura do composto H-*L*-cisteína(tBu)-estigmasterol (**23**), obtido conforme item 5.1, foi confirmada por RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

A Figura 57 mostra o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **23**, em  $\text{CDCl}_3$  a 200,13 MHz, onde se observa o desaparecimento dos sinais relativos aos hidrogênios aromáticos da porção Fmoc-*L*-cisteína(tBu)-OH, além do desaparecimento do dubleto em 4,37 ppm e do multiplete entre 4,20-4,27 ppm referentes aos dois hidrogênios ligados no C-7' e ao hidrogênio ligado no C-8'. Observa-se também que o multiplete referente ao H-2' passou de um campo baixo (4,60-4,64 ppm) para um campo alto, entre 3,60-3,66 ppm, devido a remoção do grupo protetor Fmoc (efeito de blindagem). Observa-se também dois duplo dubletos em 2,94 ppm ( $J = 12,4$  e  $7,8$  Hz; 1H) e 2,78 ppm ( $J = 12,3$  e  $7,3$  Hz; 1H) referentes aos dois hidrogênios diastereotópicos ligados no C-3'.

O multiplete em 4,64-4,68 ppm é referente ao H-3. Os demais sinais são referentes aos hidrogênios presentes na porção estigmasterol (R) e mostrados anteriormente no item 5.1.1.

A Figura 58 apresenta o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **23**, em  $\text{CDCl}_3$  a 50,32 MHz, onde se observa o desaparecimento dos sinais relativos aos carbonos aromáticos da porção Fmoc-*L*-cisteína(tBu)-OH, além do desaparecimento dos sinais em 152,89; 67,24 e 47,16 ppm referentes aos carbonos C-6' (carbonila), C-7' e C-8', respectivamente, também da porção Fmoc-*L*-cisteína(tBu)-OH. Observam-se os sinais a 173,23; 54,57; 42,39; 33,43 e 30,99 ppm referentes aos carbonos C-1' (carbonila), C-2', C-4', C-3' e C-5', respectivamente. Estes dados confirmando a remoção do grupo protetor 9-fluorenilmetiloxicarbonil (Fmoc). Os demais sinais são referentes aos carbonos presentes na porção estigmasterol (R) e mostrados no item 5.1.1.

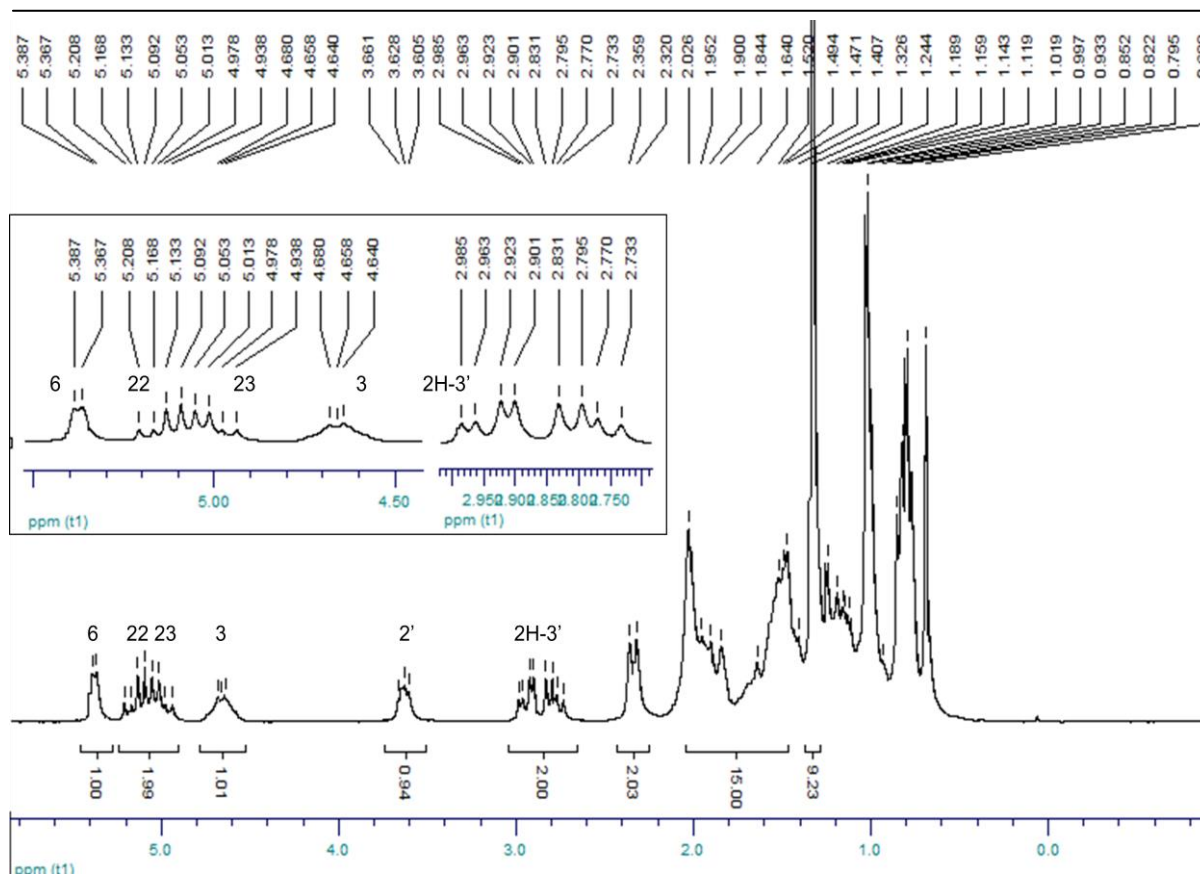


Figura 57: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do H-L-cisteína(tBu)-estigmasterol (**23**) em  $\text{CDCl}_3$ .

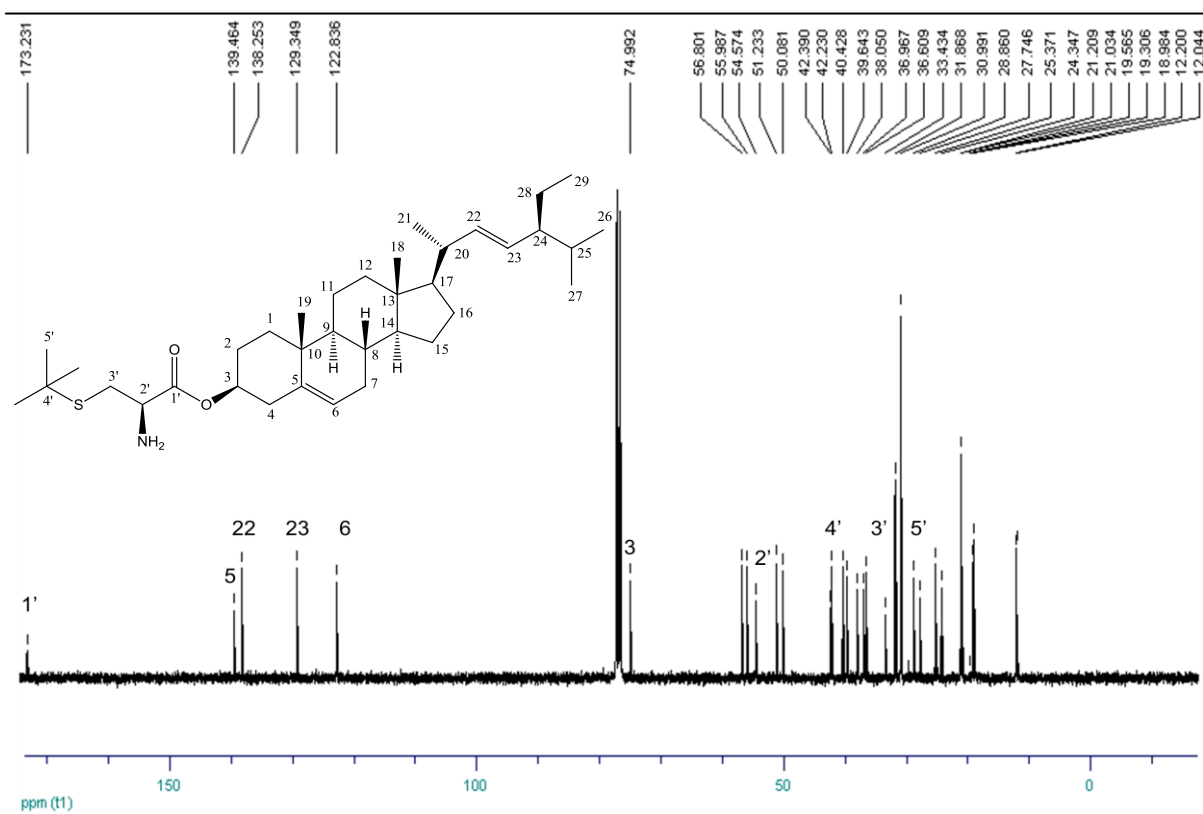


Figura 58: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do H-L-cisteína(tBu)-estigmasterol (**23**) em  $\text{CDCl}_3$ .

### 5.1.22 Obtenção do Boc-*L*-glutâmico(OBz)-estigmasterol (**24**)

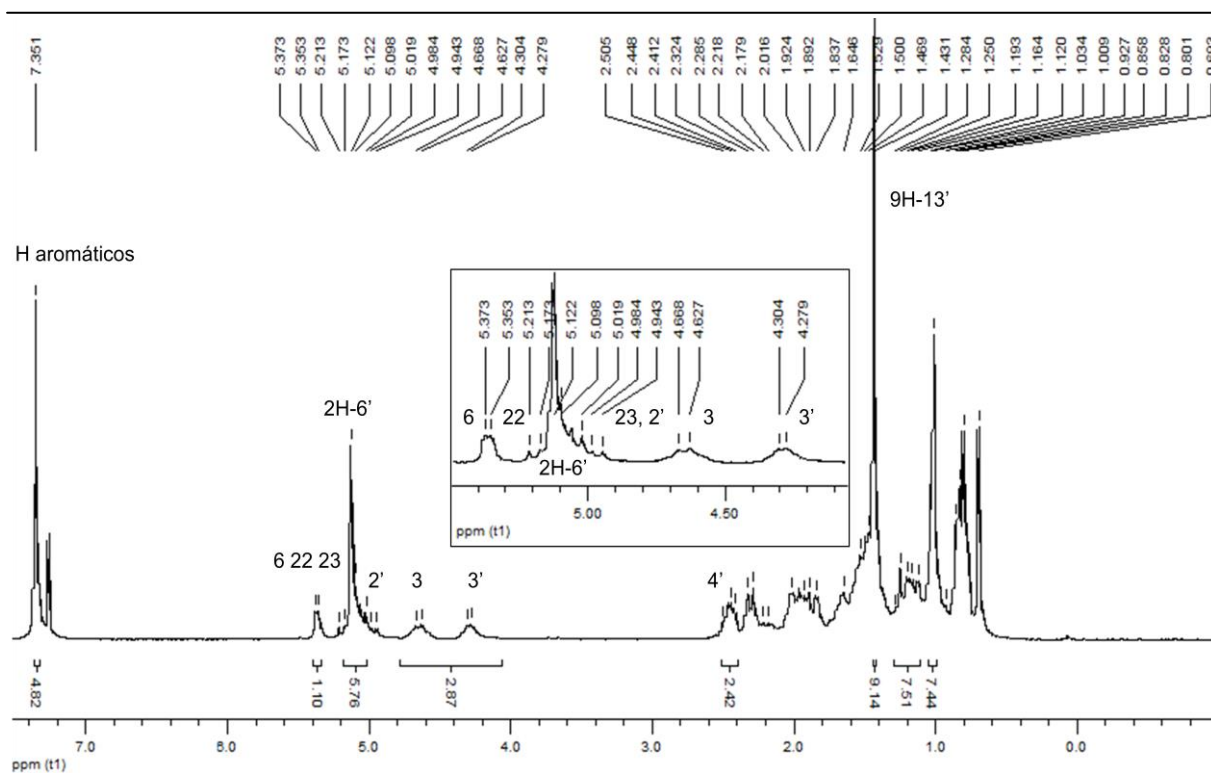
A estrutura do composto Boc-*L*-glutâmico(OBz)-estigmasterol (**24**), obtido conforme item 5.1, foi confirmada por RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

A Figura 59 mostra o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **24**, em  $\text{CDCl}_3$  a 200,13 MHz, onde se observa a presença de um singlete em 7,35 ppm relativo aos cinco hidrogênios aromáticos da porção Boc-*L*-glutâmico(OBz)-OH. Observa-se também a presença de um singlete em 5,12 ppm referente aos dois hidrogênios ligados no C-6', além de um multipletto entre 4,94-4,98 ppm referente ao H-2'. O singlete em 1,43 ppm é referente aos nove hidrogênios metílicos da porção *terc*-butil. Os multipletos entre 4,27-4,30 e 2,41-2,50 ppm são referentes aos hidrogênios ligados aos C-3' e C-4', respectivamente.

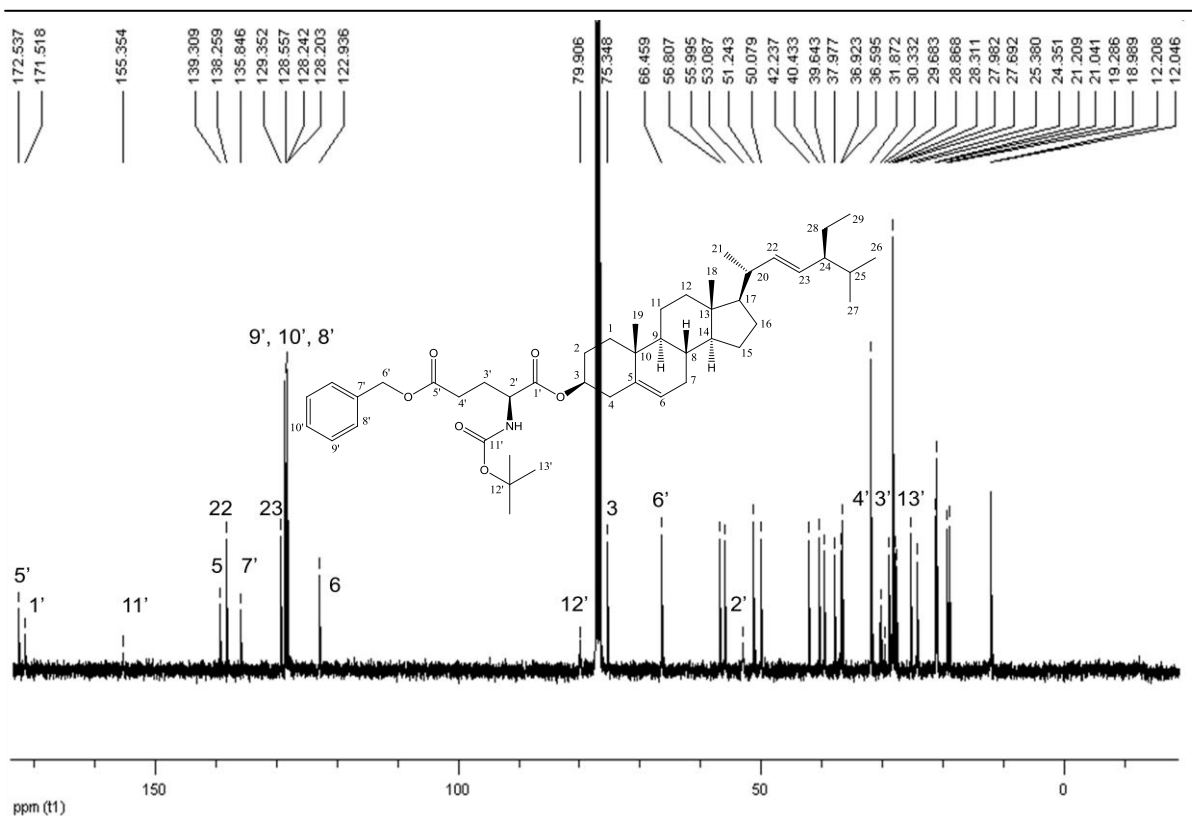
Os demais sinais são referentes aos hidrogênios olefínicos, metínicos, metilênicos e metílicos presentes na porção estigmasterol (R) e mostrados no item 5.1.1.

A Figura 60 apresenta o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **24**, em  $\text{CDCl}_3$  a 50,32 MHz, onde se observa a presença de três sinais em 172,53; 171,51 e 155,35 ppm referentes às carbonilas do C-5', C-1' e C-11', respectivamente. Observam-se também os sinais dos carbonos aromáticos C-7', C-9', C-10' e C-8', respectivamente em 135,84; 128,55; 128,24 e 128,20 ppm. Além destes observam-se outros sinais em 79,90; 66,45; 53,08; 29,68; 28,31 e 27,69 ppm referentes aos C-12', C-6', C-2', C-4', C-13' e C-3' da porção Boc-*L*-glutâmico(OBz)-OH, respectivamente.

O sinal em 75,34 ppm é referente ao C-3. Os demais sinais são referentes aos carbonos olefínicos, metílicos, metilênicos, metínicos e quaternários presentes na porção estigmasterol (R) e mostrados anteriormente no item 5.1.1.



**Figura 59:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do Boc-L-glutâmico(OBz)-estigmasterol (**24**) em  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura 60:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do Boc-L-glutâmico(OBz)-estigmasterol (**24**) em  $\text{CDCl}_3$ .

### 5.1.23 Obtenção do H-L-glutâmico(OBz)-estigmasterol (**25**)

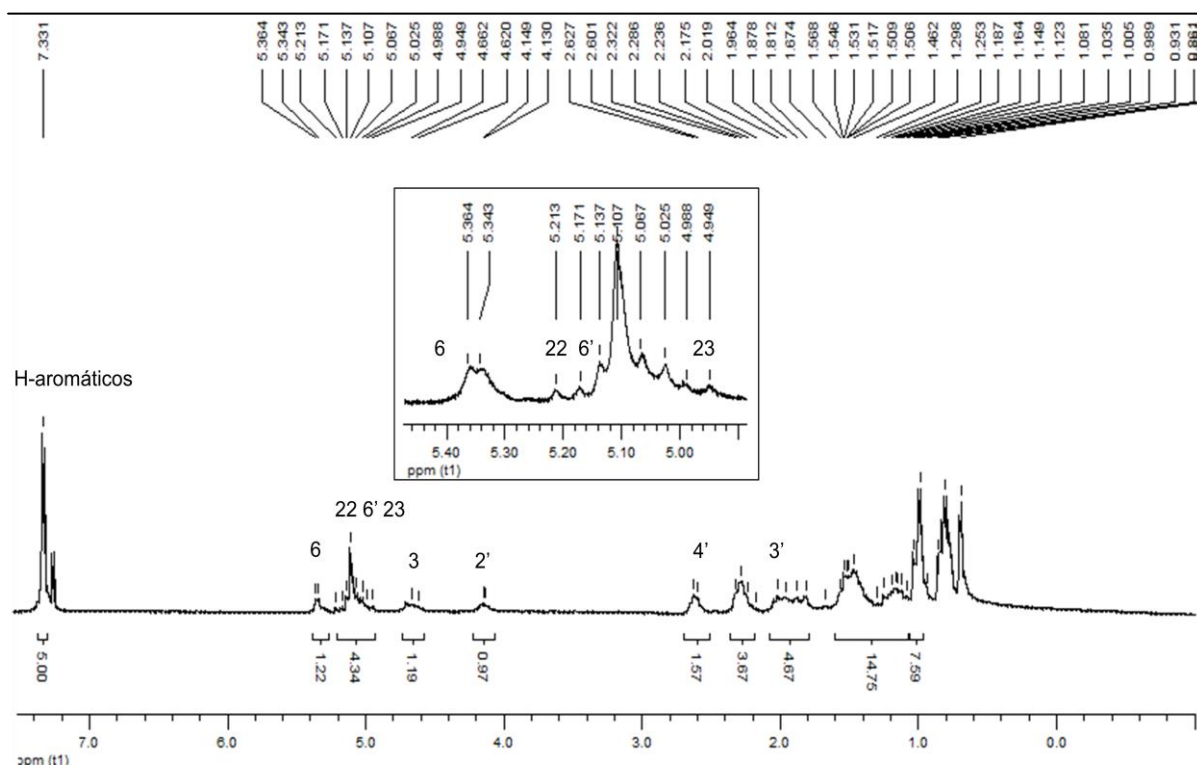
A estrutura do composto H-L-glutâmico(OBz)-estigmasterol (**25**), sintetizado conforme item 5.1, foi confirmada por RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

A Figura 61 mostra o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **25**, em  $\text{CDCl}_3$  a 200,13 MHz, onde se observa a presença de um singlete em 7,33 ppm referente aos cinco hidrogênios aromáticos da porção H-L-glutâmico(OBz)-OH e a presença de outro singlete em 5,10 ppm referente aos dois hidrogênios ligados no C-6'. Observa-se também que o multiplete referente ao H-2' passou de um campo baixo (4,94-4,98 ppm) para um campo alto, entre 4,13-4,14 ppm, devido a remoção do grupo protetor Boc (efeito de blindagem). O desaparecimento do singlete em 1,43 ppm referente aos nove hidrogênios da porção *tert*-butil confirma a perda do grupo protetor *tert*-butiloxicarbonil.

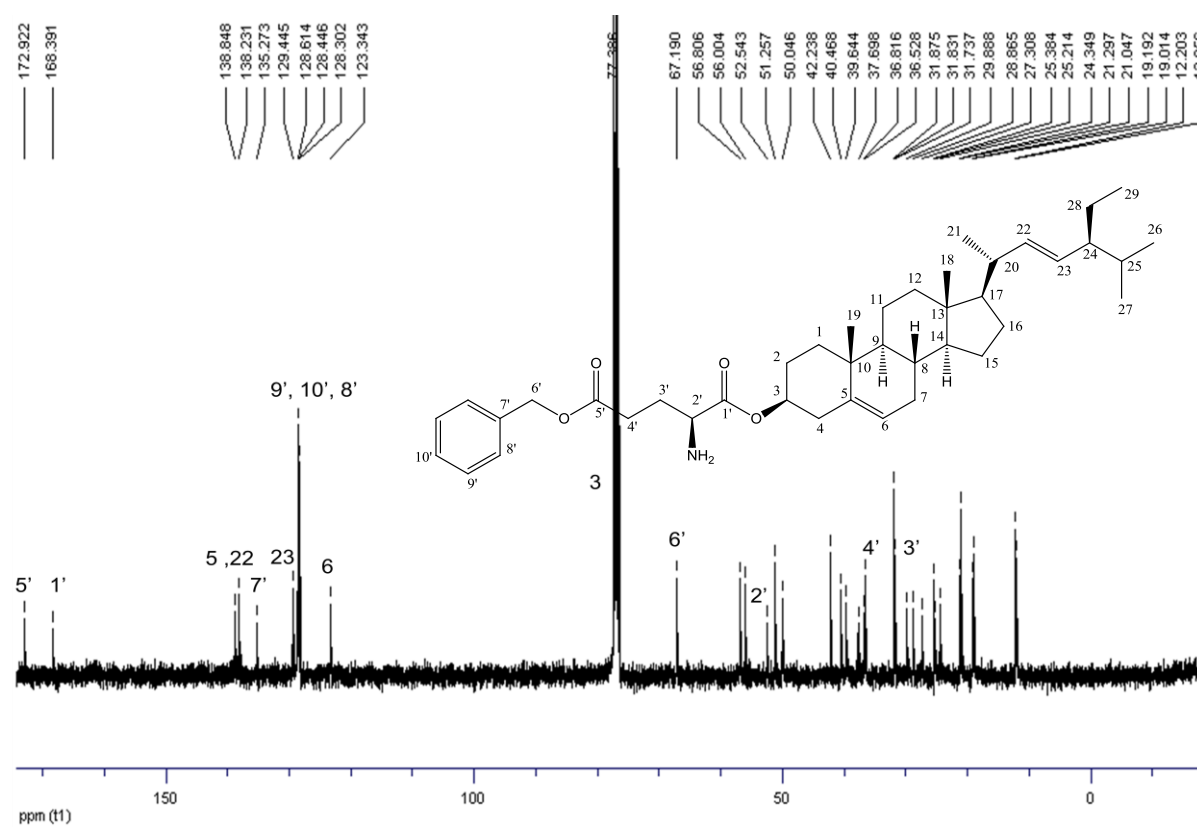
Os demais sinais são referentes aos hidrogênios presentes na porção do estigmasterol (R) e na porção H-L-glutâmico(OBz)-OH e já foram mostrados e discutidos nos itens 5.1.1 e 5.1.22.

A Figura 62 apresenta o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **25**, em  $\text{CDCl}_3$  a 50,32 MHz, onde se observa a presença de dois sinais em 172,92 e 168,39 ppm referentes às carbonilas do C-5' e C-1', respectivamente. Observam-se também os sinais dos carbonos aromáticos C-7', C-9', C-10' e C-8', respectivamente em 135,27; 128,61; 128,44 e 128,30 ppm. Observa-se o desaparecimento dos sinais em 79,90 e 28,31 ppm referentes aos carbonos do *tert*-butil, o que indica a remoção do grupo protetor. Além destes observam-se outros sinais em 67,19; 52,54; 29,88 e 25,21 ppm referentes aos C-6', C-2', C-4' e C-3' da porção H-L-glutâmico(OBz), respectivamente.

O sinal em 77,38 ppm é referente ao C-3. Os demais sinais são referentes aos carbonos olefínicos, metínicos, metilênicos, metílicos e quaternários presentes na porção estigmasterol (R) e mostrados anteriormente no item 5.1.1.



**Figura 61:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do H-L-glutâmico(OBz)-estigmasterol (**25**) em  $\text{CDCl}_3$ .

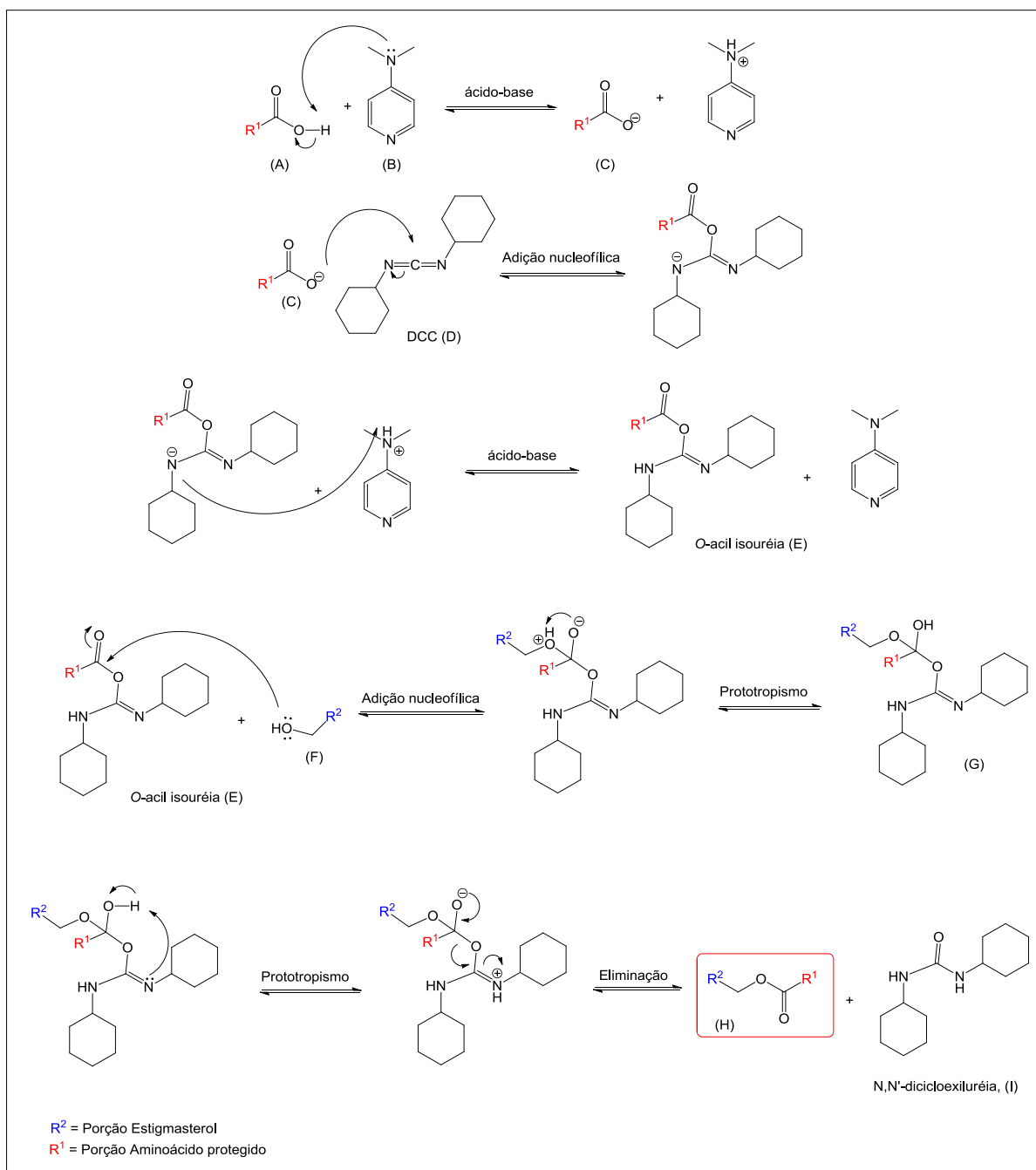


**Figura 62:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do H-L-glutâmico(OBz)-estigmasterol (**25**) em  $\text{CDCl}_3$ .

#### 5.1.24 Mecanismo proposto para as reações de acoplamento entre o estigmasterol e os Boc-aminoácidos com DCC

Nas reações de acoplamento entre o estigmasterol e os Boc-aminoácidos utilizou-se o reagente de acoplamento DCC (dicicloexilcarbodiimida) para ativação da porção ácido carboxílico, em meio básico.<sup>135</sup>

De acordo com o mecanismo proposto, na primeira etapa reacional ocorre a desprotonação do ácido carboxílico da porção aminoácido protegido (A) pelo nitrogênio da base DMAP (dimetilaminopiridina, B). O oxigênio do íon carboxilato (C), formado anteriormente, atua como nucleófilo e adiciona-se à dupla ligação da DCC (D) formando a *o*-acil isouréia (E) que por sua vez, através do ataque do par de elétrons presente no oxigênio do álcool da porção estigmasterol (F), forma um intermediário tetraédrico (G). Na última etapa reacional o intermediário tetraédrico (G) se desfaz formando o produto principal (H) e a N,N'-dicicloexiluréia (DCU, I), que por ser insolúvel em clorofórmio ou diclorometano, é filtrada do meio reacional (Esquema 20).<sup>135</sup>



**Esquema 20:** Mecanismo das reações de acoplamento com estigmasterol usando como reagente de acoplamento o DCC.

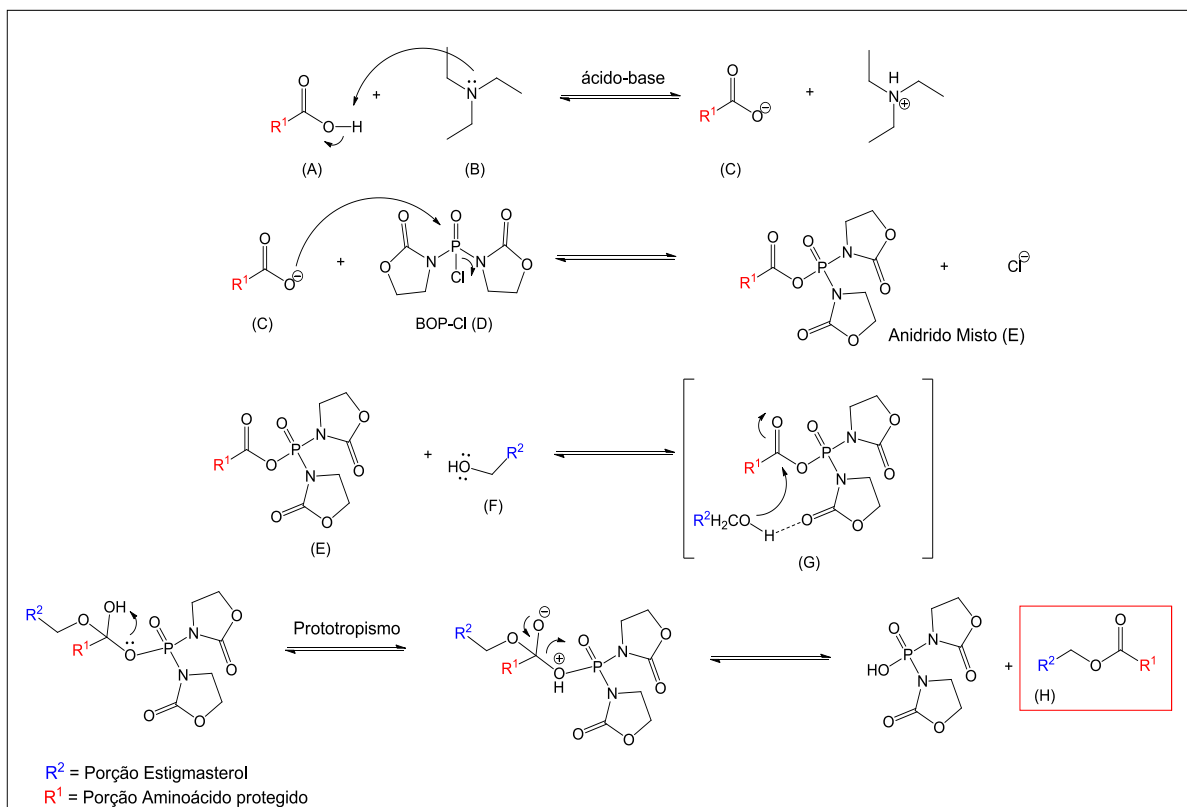


### 5.1.25 Mecanismo proposto para as reações de acoplamento entre o estigmasterol e os Fmoc-aminoácidos com BOP-Cl

Nas reações de acoplamento entre o estigmasterol e os Fmoc-aminoácidos utilizou-se o reagente de acoplamento BOP-Cl (cloreto de bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfônico).<sup>136</sup>

Na primeira etapa reacional ocorre uma reação ácido-base entre a porção aminoácido protegido (A) e a base, neste caso a trietilamina (B), formando o íon carboxilato (C). Após, ocorre a reação do íon carboxilato (C) com o BOP-Cl (D) e a formação do anidrido misto intermediário (E), que é bastante reativo devido à possibilidade de catálise básica intramolecular pela espécie carbonil oxazolidinona do anidrido misto.<sup>136</sup>

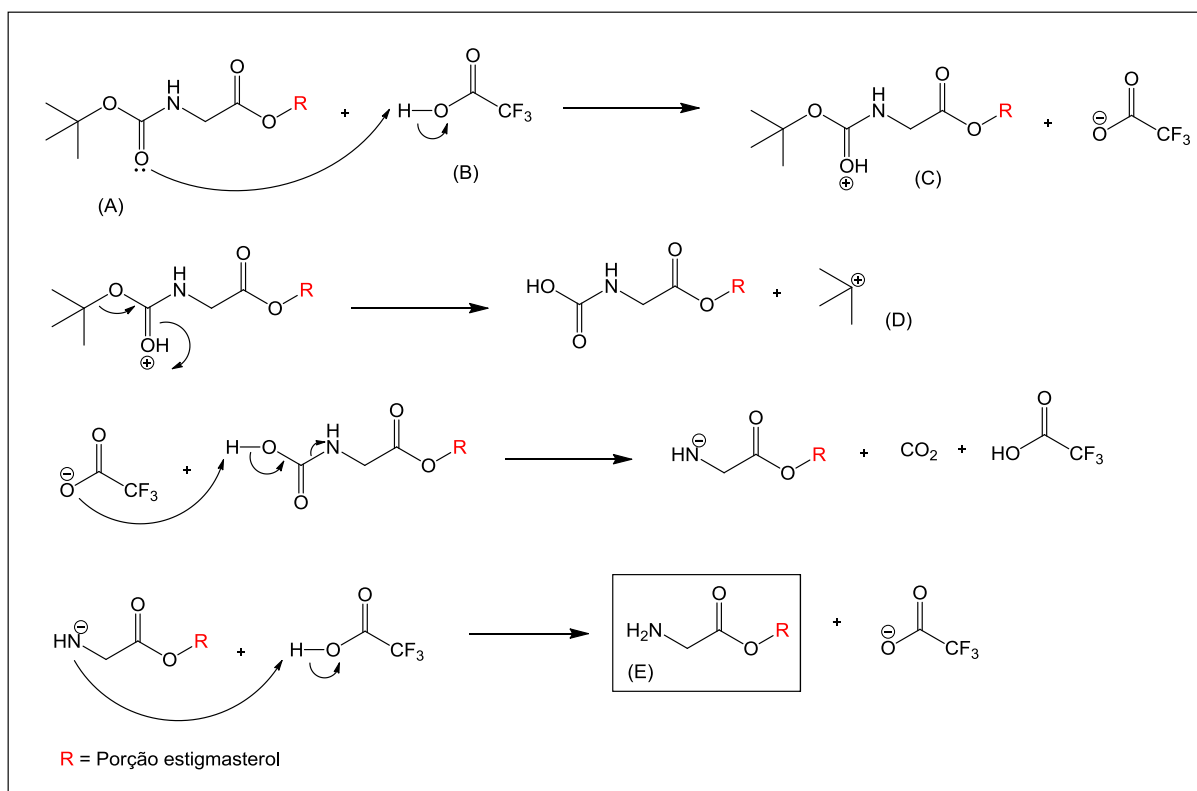
Então, o anidrido misto (E) reage com o álcool da porção estigmasterol (F) formando um intermediário tetraédrico (G) que, através de prototropismo, forma o produto de acoplamento desejado (H) (Esquema 21).<sup>136</sup>



**Esquema 21:** Mecanismo das reações de acoplamento com estigmasterol usando como agente de acoplamento o BOP-Cl.

## 5.1.26 Mecanismo de remoção do grupo protetor Boc

A remoção do grupo protetor Boc (*tert*-butiloxicarbonil) ocorre na presença de meio ácido, neste caso uma solução de 50% de TFA em diclorometano. Na primeira etapa reacional, o par de elétrons do oxigênio da carbonila do Boc-aminoácido-estigmasterol (A) abstrai o hidrogênio do ácido trifluoracético (B), tornando-se protonado (C). Após, ocorre a eliminação do cátion *tert*-butil (D) e a liberação de CO<sub>2</sub>, formando o produto desejado (E) (Esquema 22).<sup>137</sup>

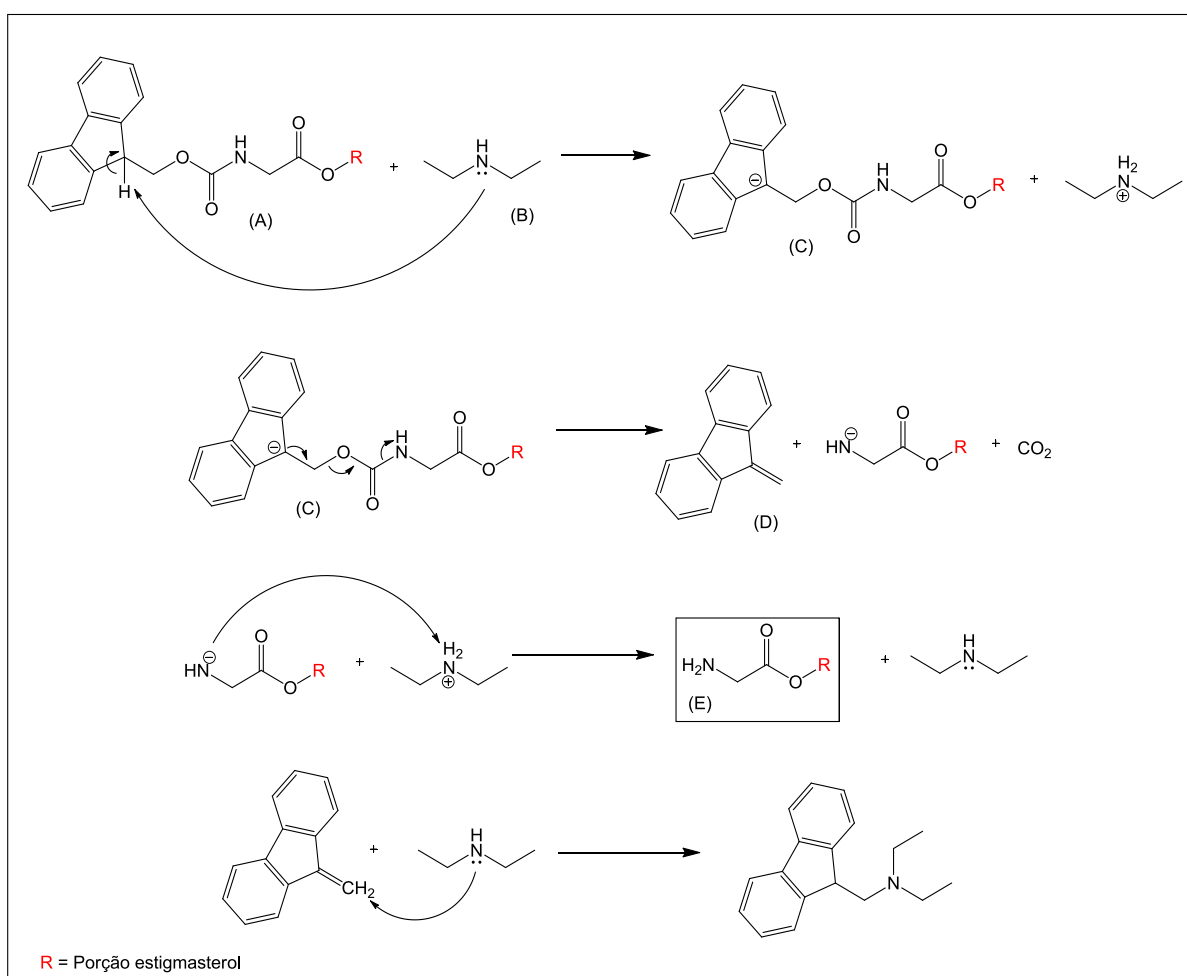


**Esquema 22:** Mecanismo de remoção do grupo protetor Boc.

## 5.1.27 Mecanismo de remoção do grupo protetor Fmoc

A remoção do grupo protetor Fmoc (9-fluorenilmetiloxicarbonil) ocorre na presença de meio básico, neste caso uma solução de 10% de dietilamina em DMF. O mecanismo de remoção ocorre através de uma reação de eliminação  $\beta$  do tipo  $E1_{cb}$  conforme Esquema 23. Na primeira etapa reacional ocorre a abstração do hidrogênio relativamente ácido do anel da porção Fmoc-aminoácido-estigmasterol (A) pela base dietilamina (B) formando um carbânion (C). Após, ocorre a formação do composto dibenzofulveno (D) e do produto desejado (E).<sup>137</sup>

Aminas secundárias adicionam-se ao dibenzofulveno (D) formado anteriormente para evitar reações secundárias com o produto desprotegido (E).<sup>137</sup>



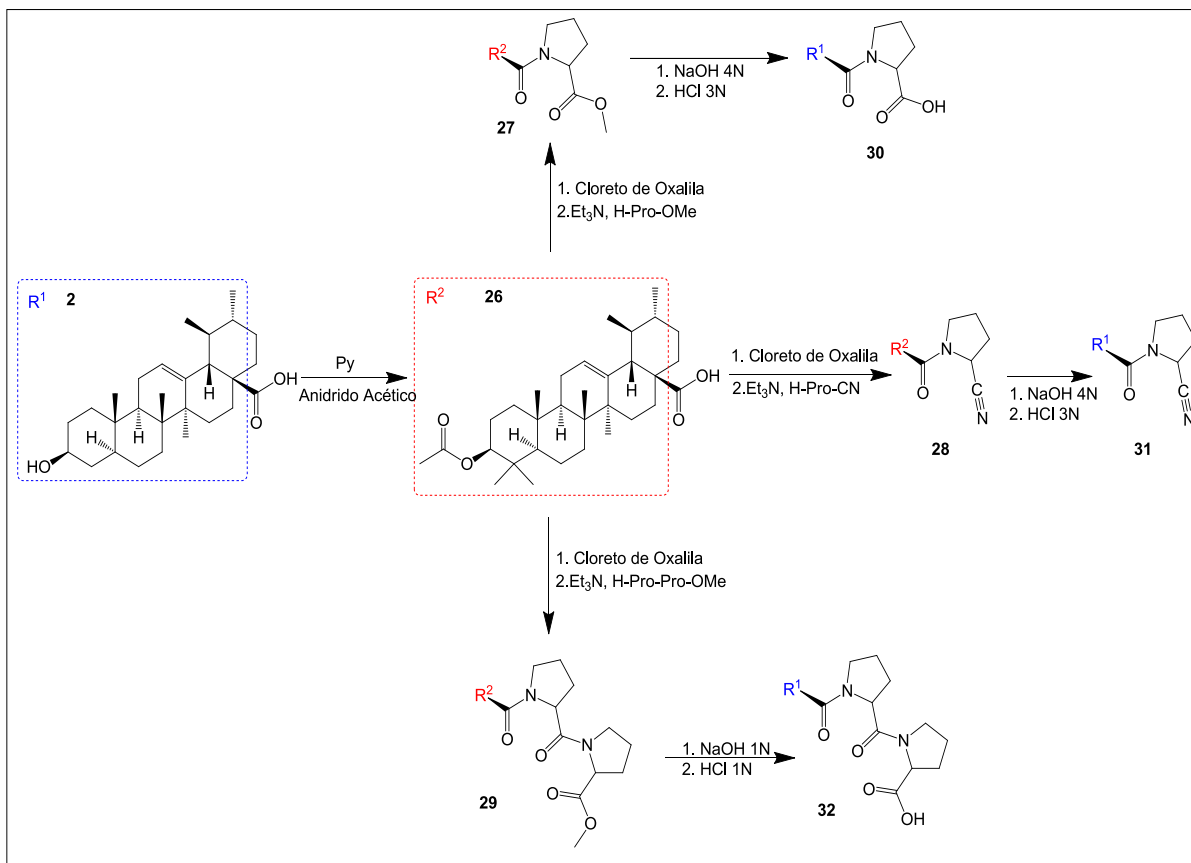
**Esquema 23:** Mecanismo de remoção do grupo protetor Fmoc.

## 5.2 Obtenção dos derivados do ácido ursólico (2)

As reações de derivatização do ácido ursólico (**2**) foram realizadas utilizando ácido ursólico comercial obtido pelo Sigma-Aldrich.

O composto ácido acetil ursólico (**26**) foi obtido através da reação do ácido ursólico (**2**) com anidrido acético em piridina seca conforme descrito por Gnoatto *et al.* (2008), com rendimento de 91,7%. Os compostos acetil ursólico-prolina-OMe (**27**), acetil ursólico-prolina-CN (**28**) e acetil ursólico-prolina-prolina-OMe (**29**) foram obtidos através de duas etapas reacionais conforme método descrito por Gnoatto *et al.* (2008). Na primeira etapa, o ácido acetil ursólico reage com cloreto de oxalila para gerar um cloreto ácido bastante reativo que então, em uma segunda etapa, reage com o aminoácido H-prolina-OMe, H-prolina-CN ou H-prolina-prolina-OMe, respectivamente, em meio básico de trietilamina. Os rendimentos foram de 72,8%, 27,8% e 82,2%, respectivamente (Esquema 24).<sup>42</sup>

Os compostos ácido ursólico-prolina-OH (**30**) e ácido ursólico-prolina-CN (**31**) foram obtidos através das reações de hidrólises dos compostos **27** e **28**, respectivamente, com NaOH 4N em uma mistura de metanol:THF (2:3), com rendimentos de 55,1% e 54%, respectivamente. O composto ácido ursólico-prolina-prolina-OH (**32**) foi obtido através da reação de hidrólise do composto **29** com NaOH 1N, com rendimento de 40,8% (Esquema 24).

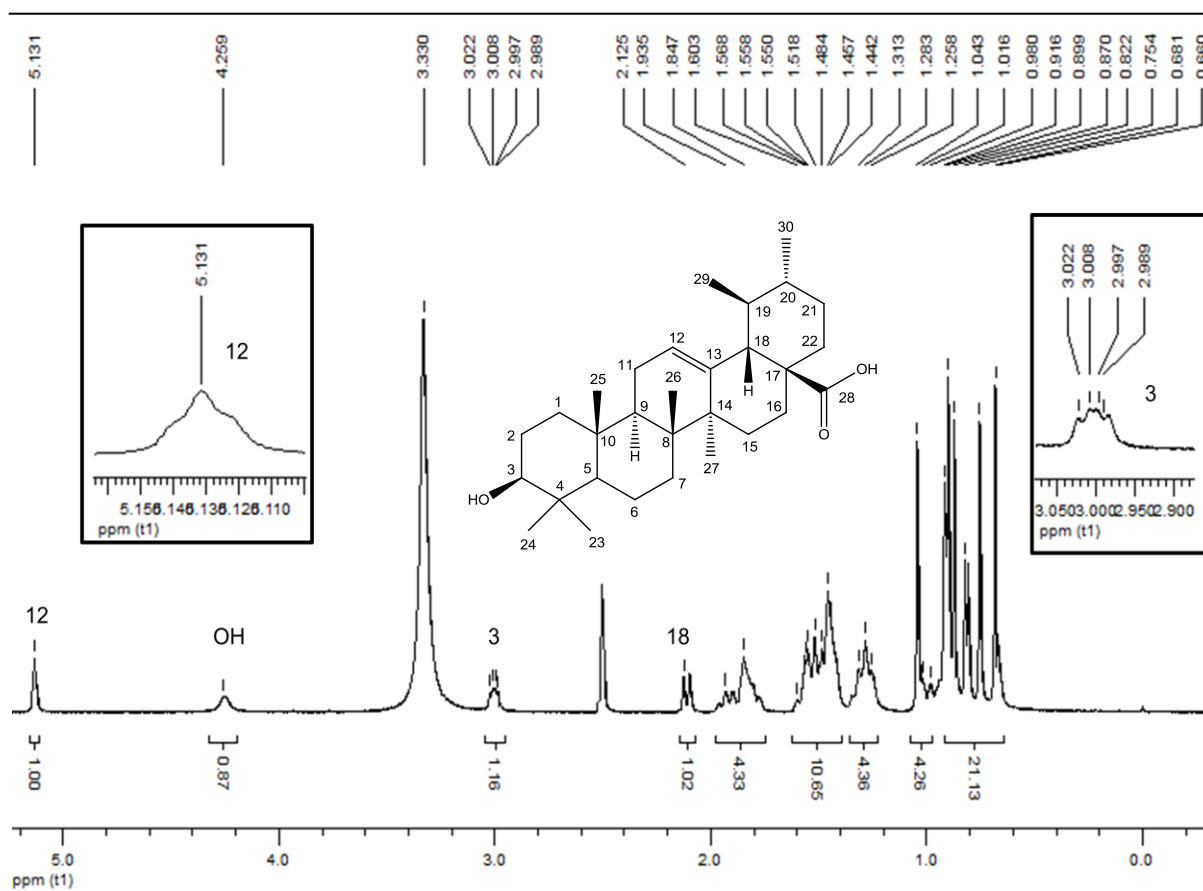


**Esquema 24:** Sínteses dos derivados (26-32) do ácido ursólico (2).

### 5.2.1 Dados de RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C referentes ao ácido ursólico (2)

Em todos os derivados obtidos permanece a estrutura básica do ácido ursólico (2), por isso os dados de RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C uni e bidimensionais referentes a esta estrutura serão mostrados neste item.

A Figura 63 mostra o espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto comercial ácido ursólico (2), em DMSO a 400,13 MHz, onde se observa a presença de um tripleto referente ao hidrogênio olefínico ligado ao carbono C-12 em 5,13 ppm ( $J = 6,8$  e  $3,3$  Hz, 1H). Também se observa a presença de um multipletto entre 2,98-3,02 ppm referente ao hidrogênio ligado ao carbono C-3. O singletto em 4,25 ppm é referente ao H da hidroxila (o solvente DMSO favorece o aparecimento dos sinais dos hidrogênios de troca lenta). Na região de campo alto, entre 0,66–2,12 ppm observa-se a presença de vários outros sinais relativos aos hidrogênios dos grupos metínicos, metilênicos e metílicos presentes no ácido ursólico.



**Figura 63:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do ácido ursólico (**2**) em DMSO.

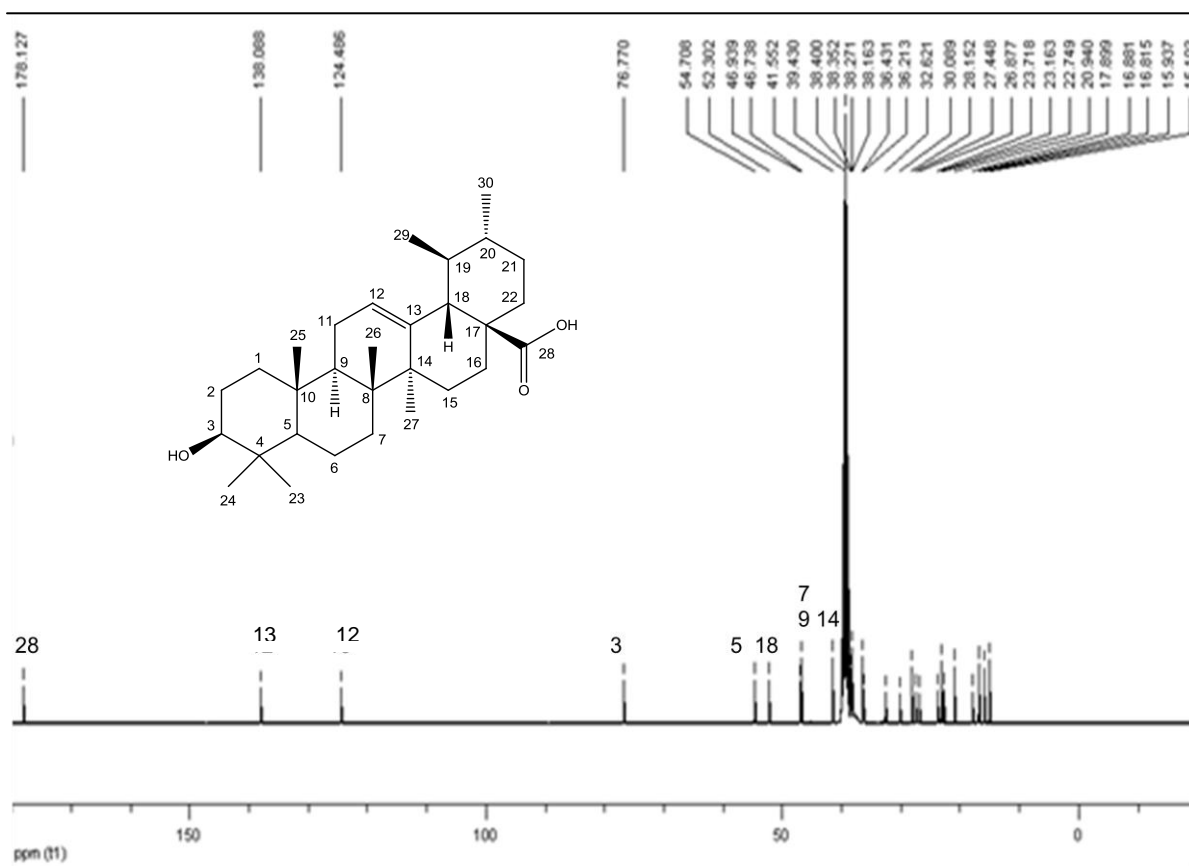
A Figura 64 mostra o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  desacoplado do ácido ursólico (**2**), em DMSO a 100,62 MHz, onde se observa a presença de um sinal em 178,12 ppm referente ao carbono da carboxila e os sinais dos carbonos olefínicos C-12 e C-13 em 124,48 e 138,08 ppm, respectivamente, além de um sinal em 76,77 ppm referente ao C-3. Observam-se também vários outros sinais entre 15,10–54,70 ppm referentes aos carbonos metínicos, metilênicos, metílicos e quaternários presentes no ácido ursólico.

Através dos espectros bidimensionais, COSY e HSQC, foi possível realizar todas as atribuições referentes aos hidrogênios e carbonos nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  do ácido ursólico.

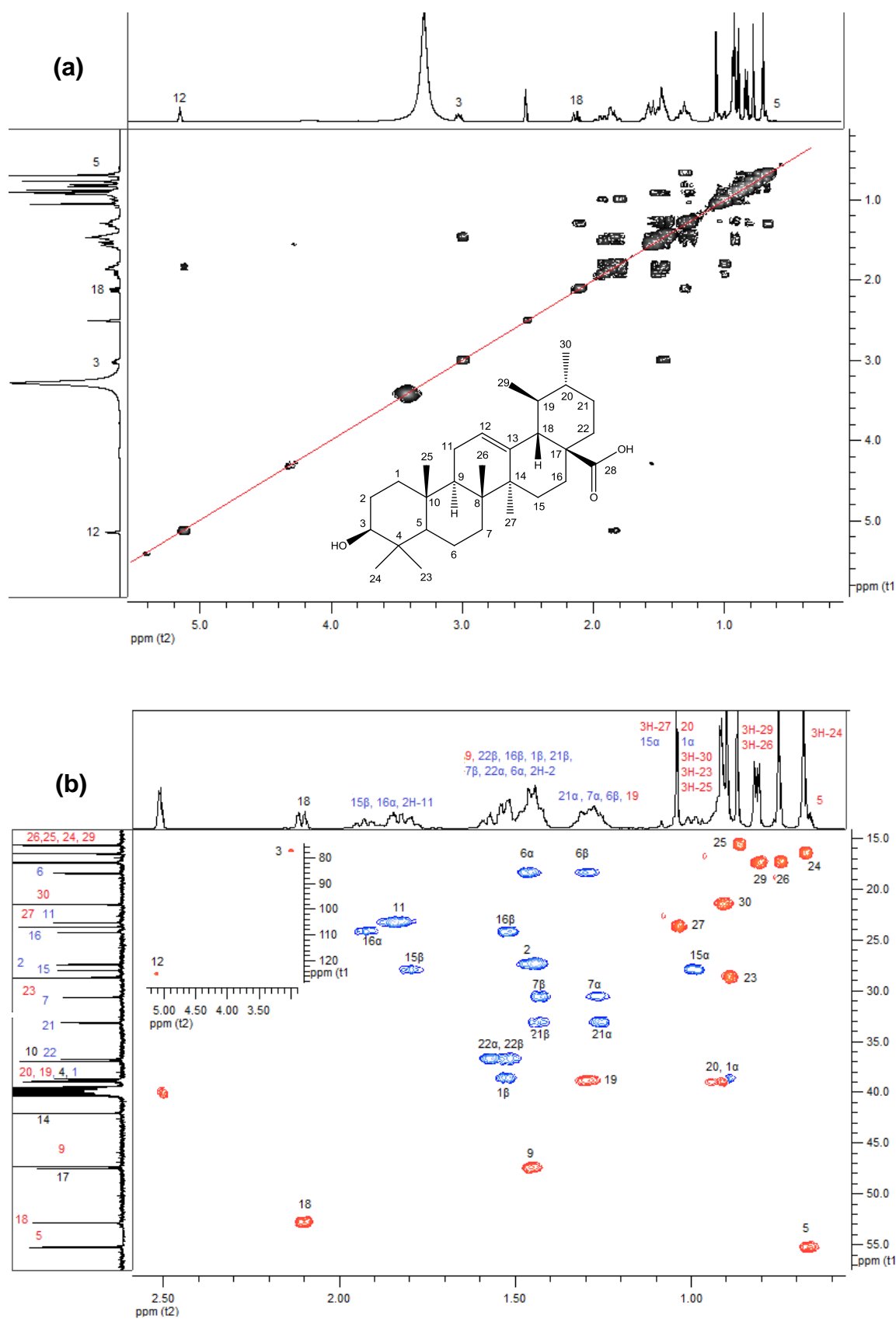
No espectro bidimensional RMN COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Figura 65) foi possível observar todos os acoplamentos entre os hidrogênios, possibilitando a realização da maioria das atribuições. Aquelas atribuições que não puderam ser realizadas com o

COSY foram feitas através do espectro bidimensional RMN HSQC  $^1J_{H-C}$  (Figura 65) onde se observa os acoplamentos carbono-hidrogênio a uma ligação.

O espectro de DEPT 135 encontra-se juntamente com o espectro de HSQC, onde se observa que os sinais referentes aos carbonos secundários (C-1, C-2, C-6, C-7, C-11, C-15, C-16, C-21 e C-22) encontram-se em azul e os sinais referentes aos carbonos primários e terciários encontram-se em vermelho. Os carbonos quaternários, uma vez que não acoplam com nenhum hidrogênio a uma ligação, não aparecem neste espectro (Figura 65).



**Figura 64:** Espectro de RMN  $^{13}C$  do ácido ursólico (**2**) em DMSO.



**Figura 65:** (a) Espectro de COSY do ácido ursólico (2) em DMSO (b) Espectro de HSQC do ácido ursólico (2) em DMSO.



### 5.2.2 Obtenção do ácido acetil ursólico (**26**)

A estrutura do composto ácido acetil ursólico (**26**), sintetizado conforme item 5.2, foi confirmada por RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

A Figura 66 mostra o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **26**, em  $\text{CDCl}_3$  a 200,13 MHz, onde se observa a presença de um tripleto em 4,96 ppm ( $J = 15,4$  e  $7,8$  Hz; 1H) referente ao H-3 e um singlete em 2,04 ppm referente ao  $\text{CH}_3$  do grupo acetil, confirmando a obtenção do composto **26**. Os demais sinais são relativos aos hidrogênios dos grupos olefínicos, metínicos, metilênicos e metílicos presentes na porção ácido ursólico ( $\text{R}^1$ ) e mostrados anteriormente no item 5.2.1.

A Figura 67 mostra o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **26**, em  $\text{CDCl}_3$  a 50,32 MHz, onde se observa os sinais em 182,98 e 170,90 ppm referentes às carbonilas C-28 e C-1', respectivamente. Também se observa um sinal em 81,01 ppm referente ao C-3. O sinal em 21,14 ppm é referente ao  $\text{CH}_3$  do grupo acetil.

Os demais sinais são relativos aos carbonos olefínicos, metínicos, metilênicos, metílicos e quaternários presentes na porção ácido ursólico ( $\text{R}^1$ ) e mostrados anteriormente no item 5.2.1.

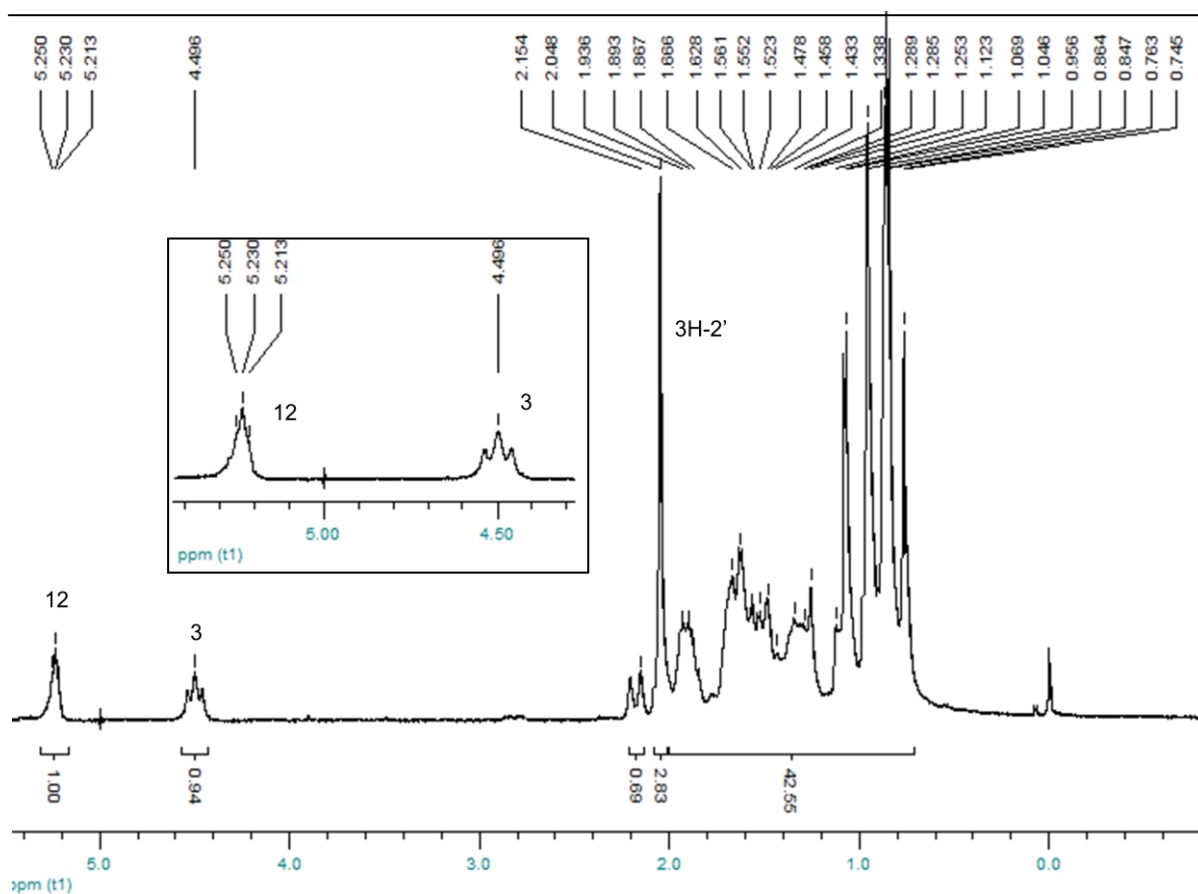


Figura 66: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do ácido acetil ursólico (**26**) em  $\text{CDCl}_3$ .

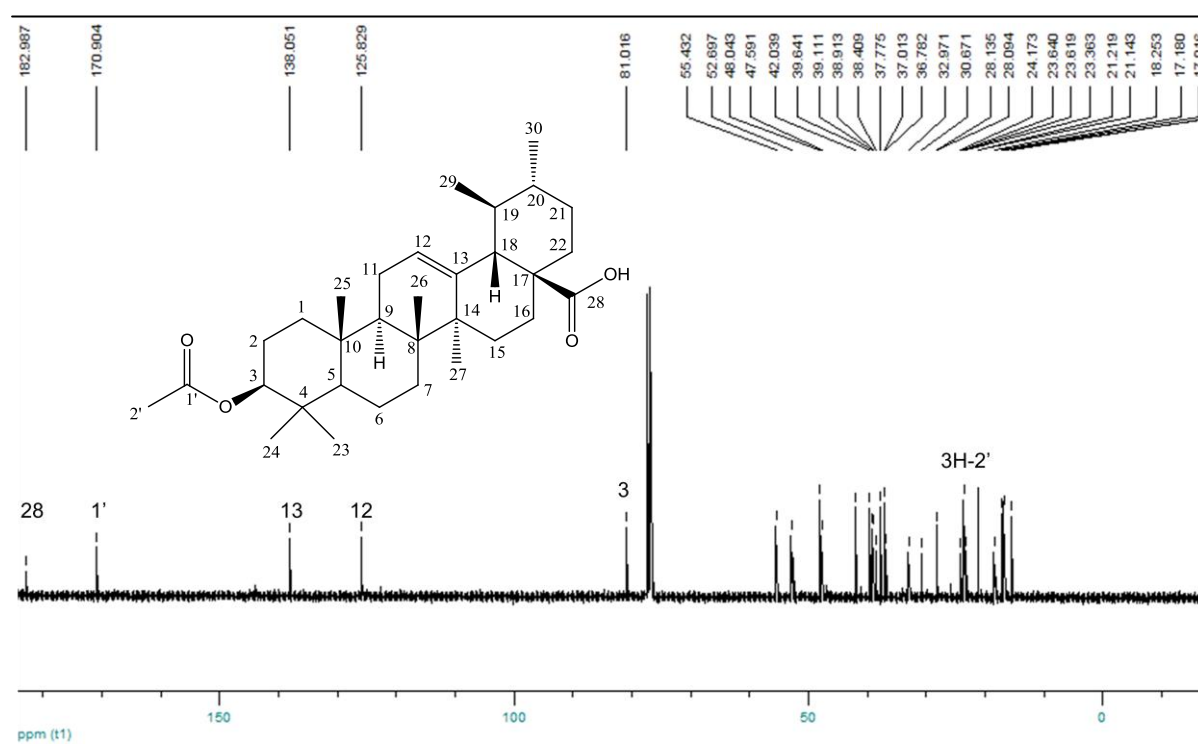


Figura 67: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do ácido acetil ursólico (**26**) em  $\text{CDCl}_3$ .

### 5.2.3 Obtenção do acetil ursólico-prolina-OMe (**27**)

A estrutura do composto acetil ursólico-prolina-OMe (**27**), sintetizado conforme item 5.2, foi confirmada por RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

A Figura 68 mostra o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **27**, em  $\text{CDCl}_3$  a 200,13 MHz, onde se observa a presença de dois singletos em 3,60 e 1,97 ppm referentes aos 3 hidrogênios ligados no C-6' da porção H-prolina-OMe e aos 3 hidrogênios do grupo acetil, respectivamente. Observa-se também um multipletto entre 4,35-4,38 ppm referente ao H-4' e dois multipletos entre 3,75-3,84 e 3,38-3,46 ppm referentes aos dois hidrogênios ligados no C-1'. Os multipletos entre 2,07-2,14 e 1,81-1,86 ppm são referentes aos H-3'a, H-3'b e 2H-2', respectivamente. Os demais sinais são referentes aos hidrogênios olefínicos, metínicos, metilênicos e metílicos presentes na porção ácido ursólico ( $\text{R}^1$ ) e mostrados e discutidos anteriormente no item 5.2.2.

A Figura 69 mostra o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **27**, em  $\text{CDCl}_3$  a 50,32 MHz, onde se observa a presença de três sinais em 175,49; 173,23 e 170,91 ppm referentes às carbonilas C-28 e C-5' da porção H-prolina-OMe e referente à carbonila do grupo acetil, respectivamente. Também se observa os sinais em 61,20; 51,85; 47,65; 33,43 e 27,42 ppm referentes aos carbonos C-4', C-6', C-1', C-3' e C-2' da porção H-prolina-OMe, respectivamente. O sinal em 21,23 ppm é referente ao  $\text{CH}_3$  do grupo acetil.

O sinal em 80,95 ppm é referente ao C-3 e os demais sinais são referentes aos carbonos presentes na porção ácido ursólico ( $\text{R}^1$ ) e já mostrados anteriormente no item 5.2.1.

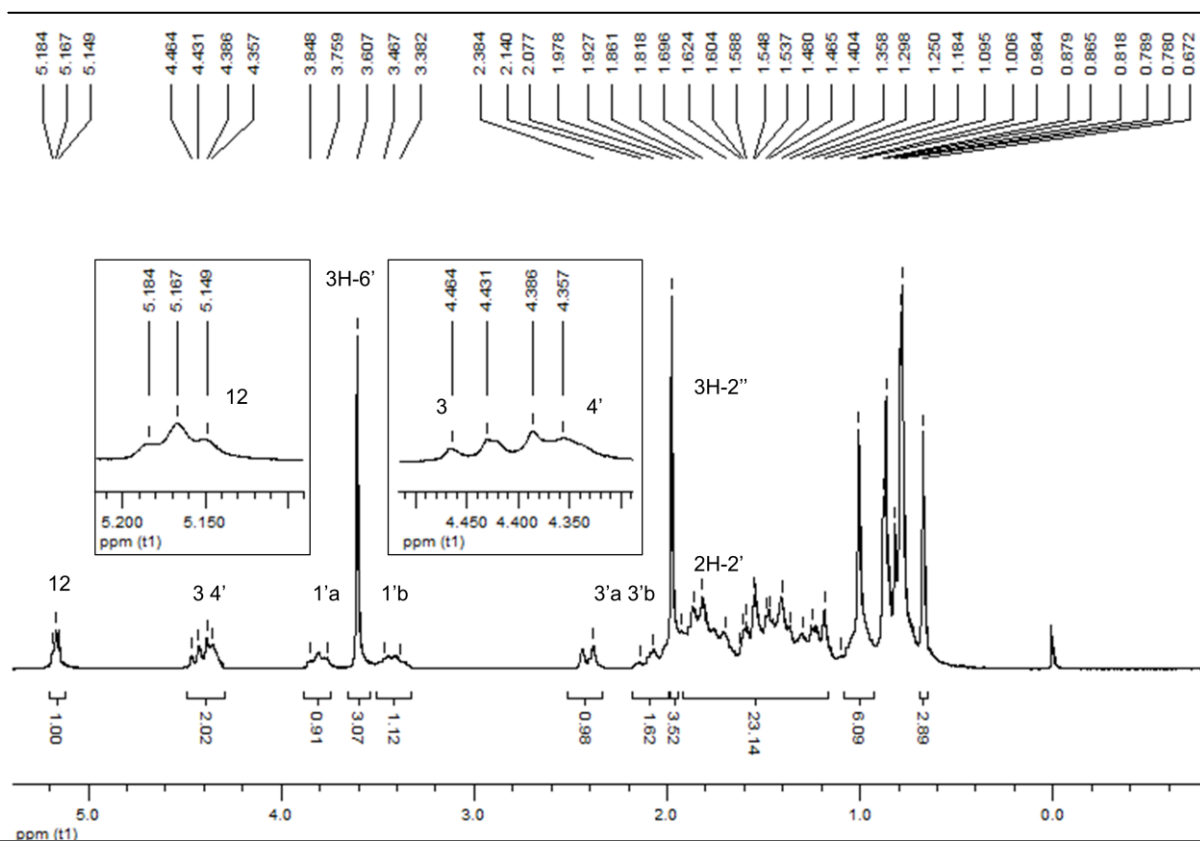


Figura 68: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do acetil ursólico-prolina-OMe (27) em  $\text{CDCl}_3$ .

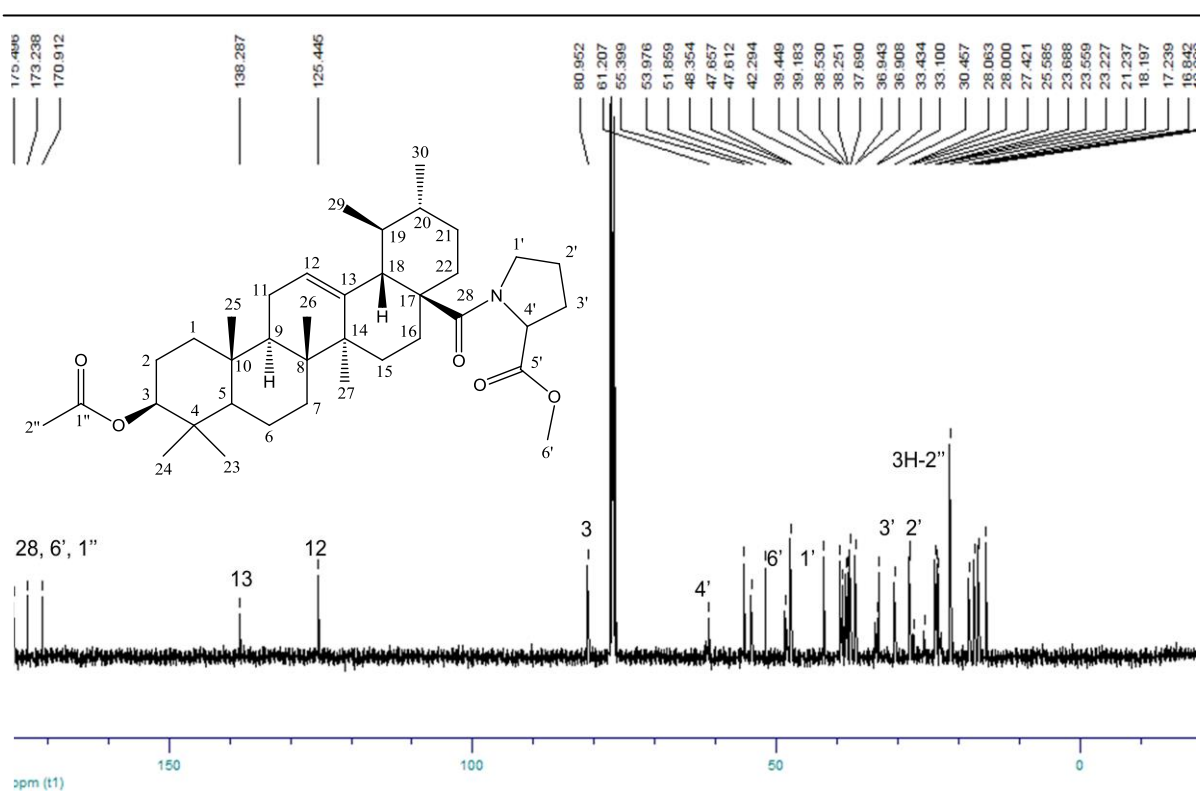


Figura 69: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do acetil ursólico-prolina-OMe (27) em  $\text{CDCl}_3$ .

#### 5.2.4 Obtenção do acetil ursólico-prolina-CN (**28**)

A estrutura do composto acetil ursólico-prolina-CN (**28**), obtido conforme item 5.2, foi confirmada por RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

A Figura 70 mostra o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **28**, em  $\text{CDCl}_3$  a 400,13 MHz, onde se observa a presença de um multipletto entre 4,59-4,61 ppm referente ao H-4' e de dois multipltos entre 3,66-3,71 e 3,44-3,47 ppm referentes aos dois hidrogênios ligados no C-1'. Os multipltos entre 2,07-2,14 e 1,85-1,87 ppm são referentes aos hidrogênios H-3'a, H-3'b e 2H-2', respectivamente, ambos da porção H-prolina-CN. O singletto em 1,97 ppm é referente aos 3 hidrogênios do grupo acetil.

Os demais sinais são referentes aos hidrogênios olefínicos, metínicos, metilênicos e metílicos presentes na porção ácido ursólico ( $\text{R}^1$ ) e discutidos anteriormente no item 5.2.1.

A Figura 71 mostra o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **28**, em  $\text{CDCl}_3$  a 100,62 MHz, onde se observa a presença de dois sinais em 175,81 e 170,91 ppm referentes às carbonilas C-28 e C-1'', respectivamente. Também se observa um sinal em 118,77 ppm referente ao carbono do grupo ciano ( $\text{C}\equiv\text{N}$ ). Os sinais em 49,33; 47,54; 33,80 e 27,95 ppm referentes aos carbonos C-4', C-1', C-3' e C-2' da porção H-prolina-CN, respectivamente. O sinal em 21,13 ppm é referente ao  $\text{CH}_3$  do grupo acetil.

O sinal em 80,89 ppm é referente ao C-3 e os demais sinais são referentes aos carbonos olefínicos, metínicos, metilênicos, metílicos e quaternários presentes na porção ácido ursólico ( $\text{R}^1$ ) e já mostrados anteriormente no item 5.2.1.

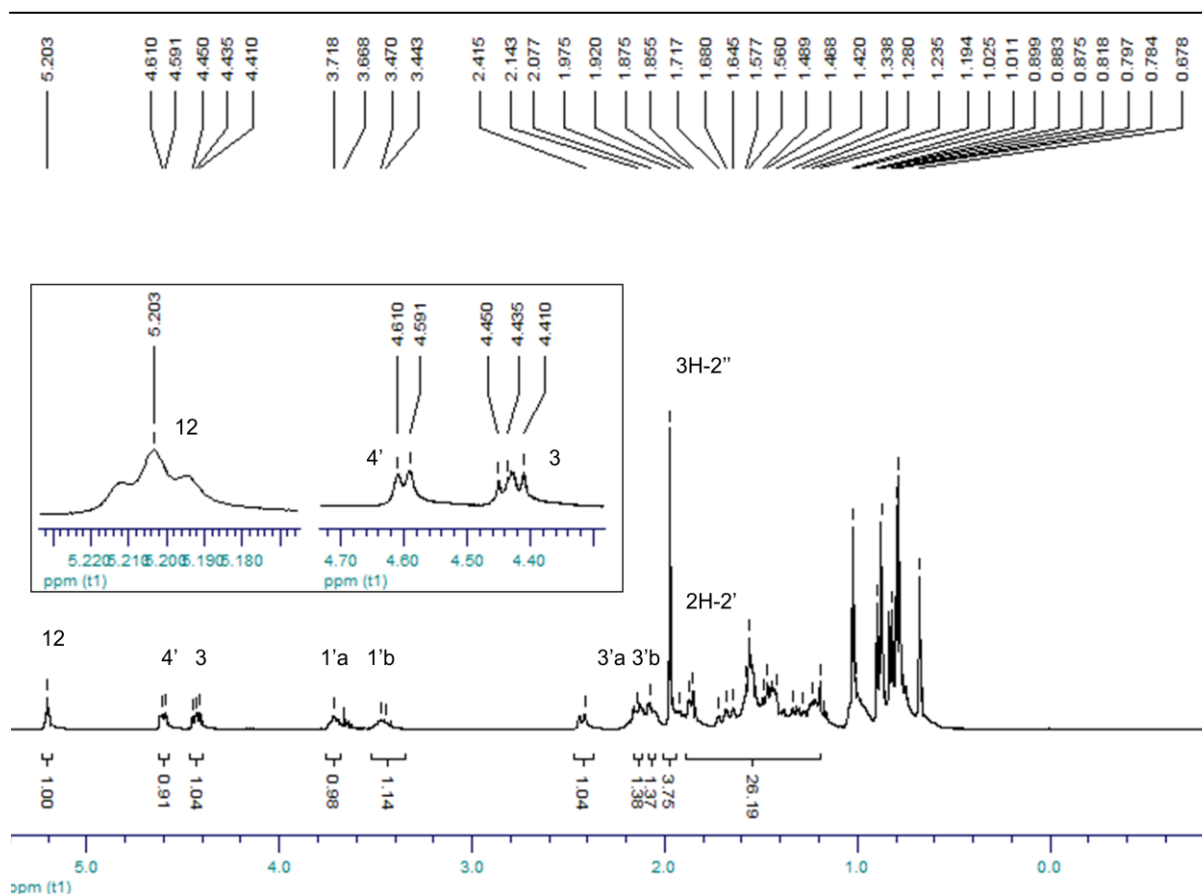


Figura 70: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do acetil ursólico-prolina-CN (**28**) em  $\text{CDCl}_3$ .

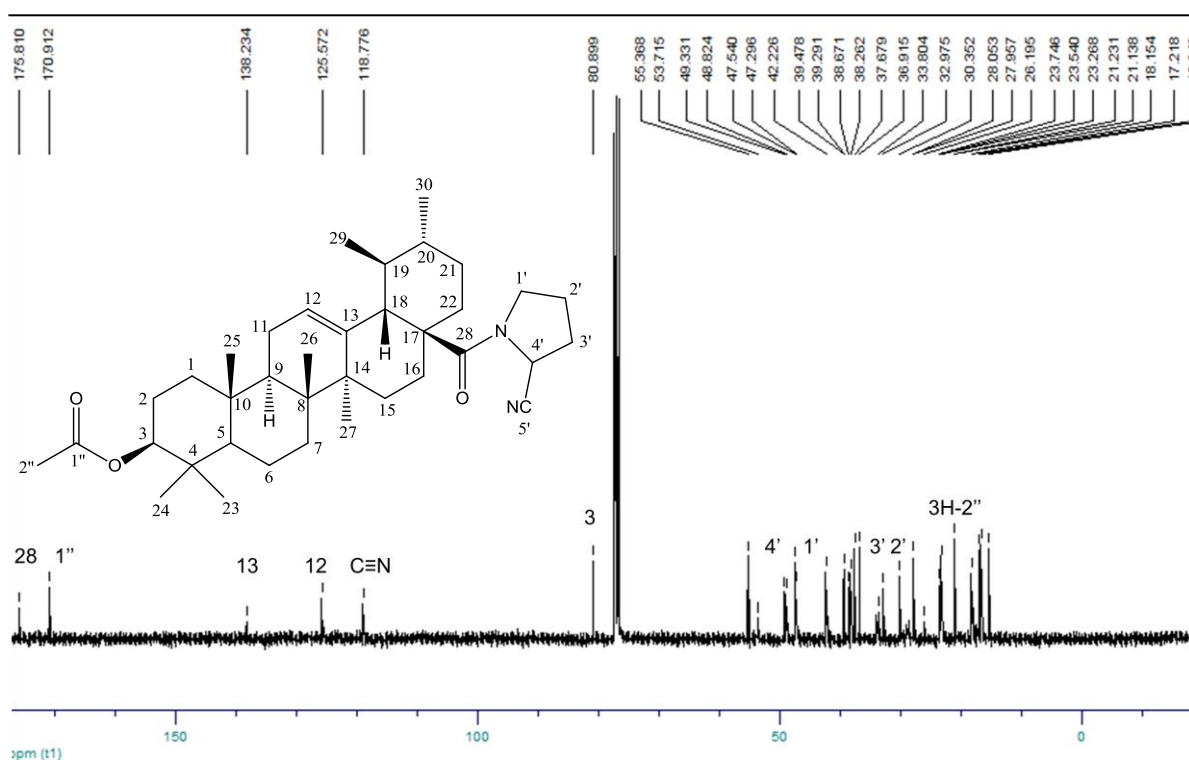


Figura 71: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do acetil ursólico-prolina-CN (**28**) em  $\text{CDCl}_3$ .

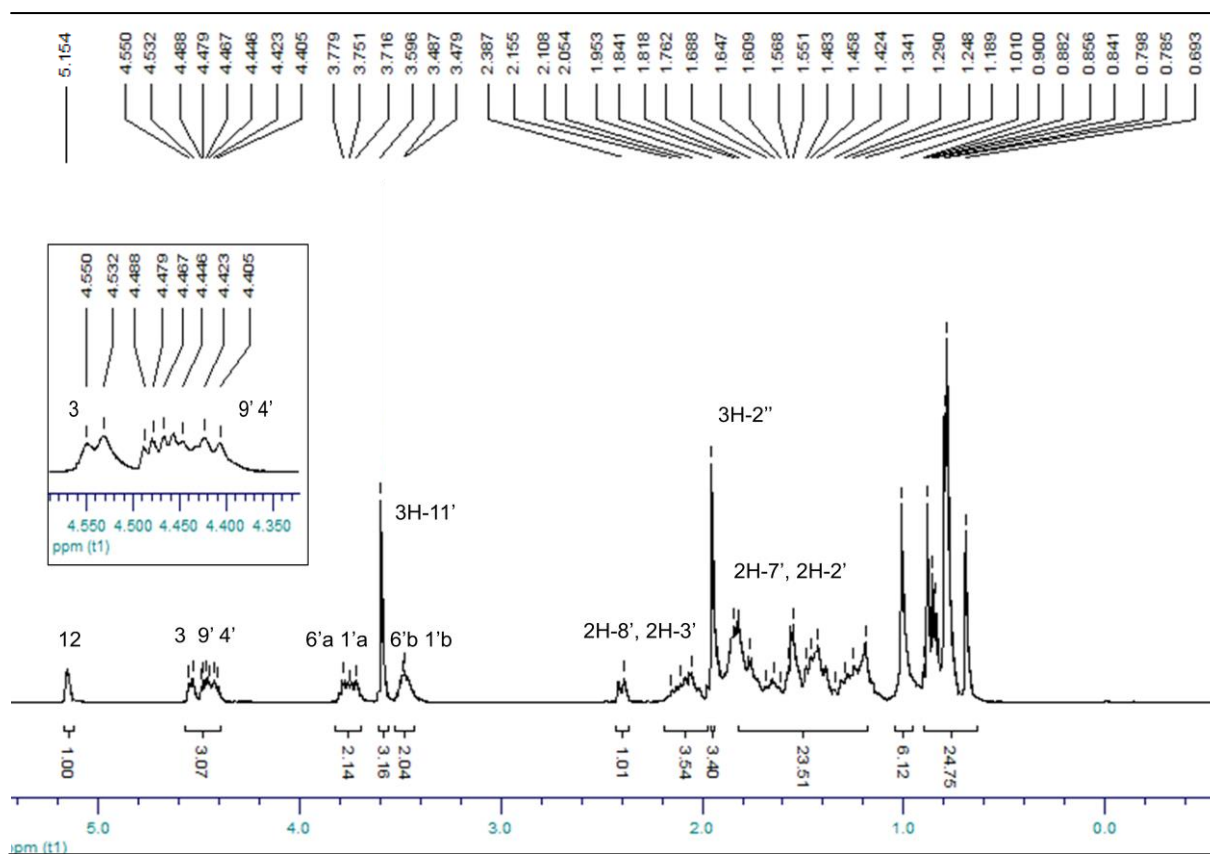
### 5.2.5 Obtenção do acetil ursólico-prolina-prolina-OMe (**29**)

A estrutura do composto acetil ursólico-prolina-prolina-OMe (**29**), obtido conforme item 5.2, foi confirmada por RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

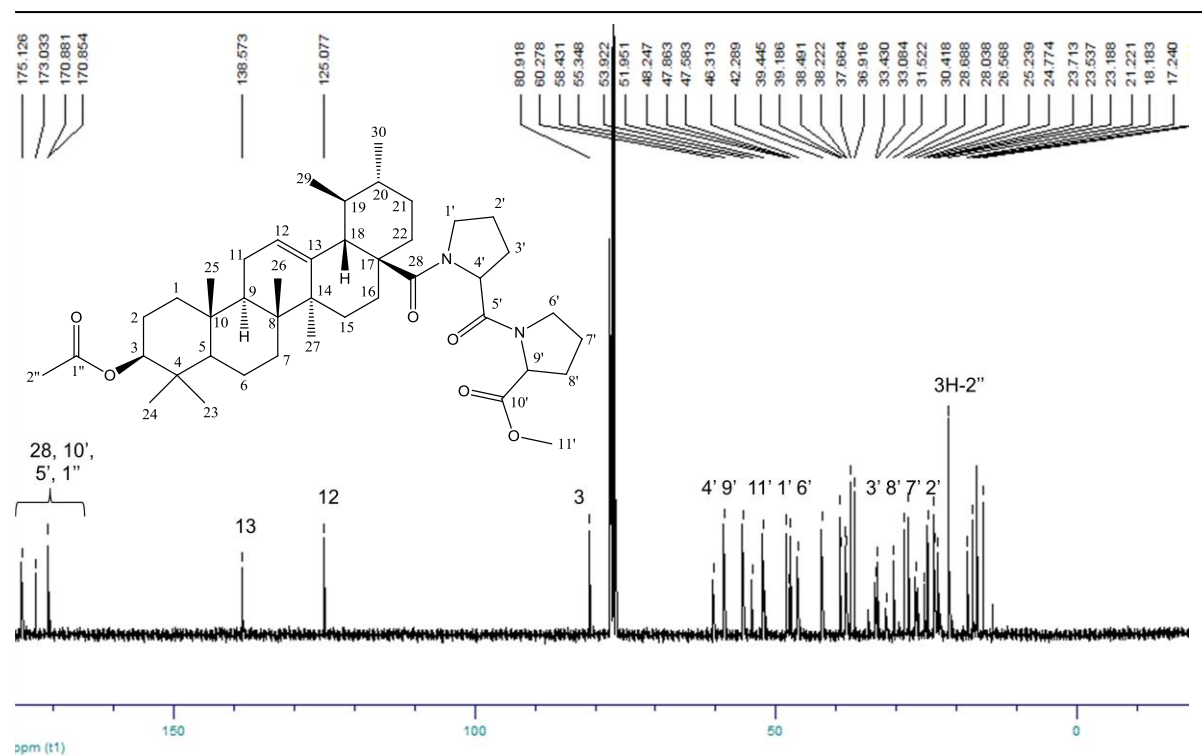
A Figura 72 mostra o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **29**, em  $\text{CDCl}_3$  a 200,13 MHz, onde se observa a presença de dois singletos em 3,59 e 1,95 ppm referente aos 3 hidrogênios ligados no C-11' da porção H-prolina-prolina-OMe e aos 3 hidrogênios do grupo acetil, respectivamente. Observa-se também um multipletto entre 4,40-4,48 ppm referente aos hidrogênios ligados no C-9' e C-4'. O multipletto entre 3,71-3,77 ppm é referente aos hidrogênios H-6'a e H-1'a e o multipletto entre 3,47-3,48 ppm é referente aos hidrogênios H-6'b e H-1'b. O multipletto entre 2,05-2,15 ppm é referente aos hidrogênios 2H-8' e 2H-3'. O multipletto entre 1,24-1,86 ppm é referente aos hidrogênios 2H-7' e 2H-2' da porção H-prolina-prolina-OMe e a dezesseis hidrogênios da porção ácido ursólico. Os demais sinais são referentes aos hidrogênios da porção ácido ursólico ( $\text{R}^1$ ) e já foram mostrados e discutidos anteriormente no item 5.2.1.

A Figura 73 mostra o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **29**, em  $\text{CDCl}_3$  a 50,32 MHz, onde se observa a presença de quatro sinais em 175,12; 173,03; 170,85 e 170,88 ppm referentes às carbonilas C-28, C-10' e C-5' da porção H-prolina-prolina-OMe e referente à carbonila do grupo acetil, respectivamente. Também se observa os sinais em 60,27; 58,43; 51,95; 47,86; 46,31; 33,43; 31,52; 26,56 e 25,23 ppm referentes aos carbonos C-4', C-9', C-11', C-1', C-6', C-3', C-8', C-7' e C-2' da porção H-prolina-prolina-OMe, respectivamente. O sinal em 21,22 ppm é referente ao  $\text{CH}_3$  do grupo acetil.

Os demais sinais são referentes aos carbonos presentes na porção ácido ursólico ( $\text{R}^1$ ) e já mostrados anteriormente no item 5.2.1.



**Figura 72:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do acetil ursólico-prolina-prolina-OMe (**29**) em  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura 73:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do acetil ursólico-prolina-prolina-OMe (**29**) em  $\text{CDCl}_3$ .



### 5.2.6 Obtenção do ácido ursólico-prolina-OH (**30**)

A estrutura do composto ácido ursólico-prolina-OH (**30**), sintetizado conforme item 5.2, foi confirmada por RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

A Figura 74 mostra o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **30**, em  $\text{CDCl}_3$  a 400,13 MHz, onde se observa o desaparecimento dos dois singletos em 1,97 e 3,60 ppm correspondentes as metilas do grupo acetil e da metoxila, respectivamente, confirmando a hidrólise do composto **27**.

Observa-se um multipeto referente ao H-3 entre 3,12-3,16 ppm (deslocamento químico diferente daquele apresentado para o ácido ursólico (**2**) devido ao uso de  $\text{CDCl}_3$  ao invés de DMSO). Os demais sinais são referentes aos hidrogênios da porção ácido ursólico ( $\text{R}^1$ ) e da porção H-L-prolina e já foram mostrados e discutidos anteriormente nos itens 5.2.1 e 5.2.3.

A Figura 75 mostra o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **30**, em  $\text{CDCl}_3$  a 100,62 MHz, onde se observa o desaparecimento dos sinais em 51,85 e 21,23 ppm referentes as metilas da metoxila e do grupo acetil do composto **27**, respectivamente, confirmando a hidrólise destes grupos. Observam-se também os sinais em 178,92 e 173,98 ppm referentes às carbonilas C-28 e C-5', respectivamente. Os sinais em 62,36; 49,06; 33,62 e 27,11 ppm são referentes aos carbonos C-4', C-1', C-3' e C-2', respectivamente.

O sinal em 79,00 ppm é referente ao C-3 e os demais sinais são referentes aos carbonos olefínicos, metínicos, metilênicos, metílicos e quaternários presentes na porção ácido ursólico ( $\text{R}^1$ ) e já mostrados anteriormente no item 5.2.1.

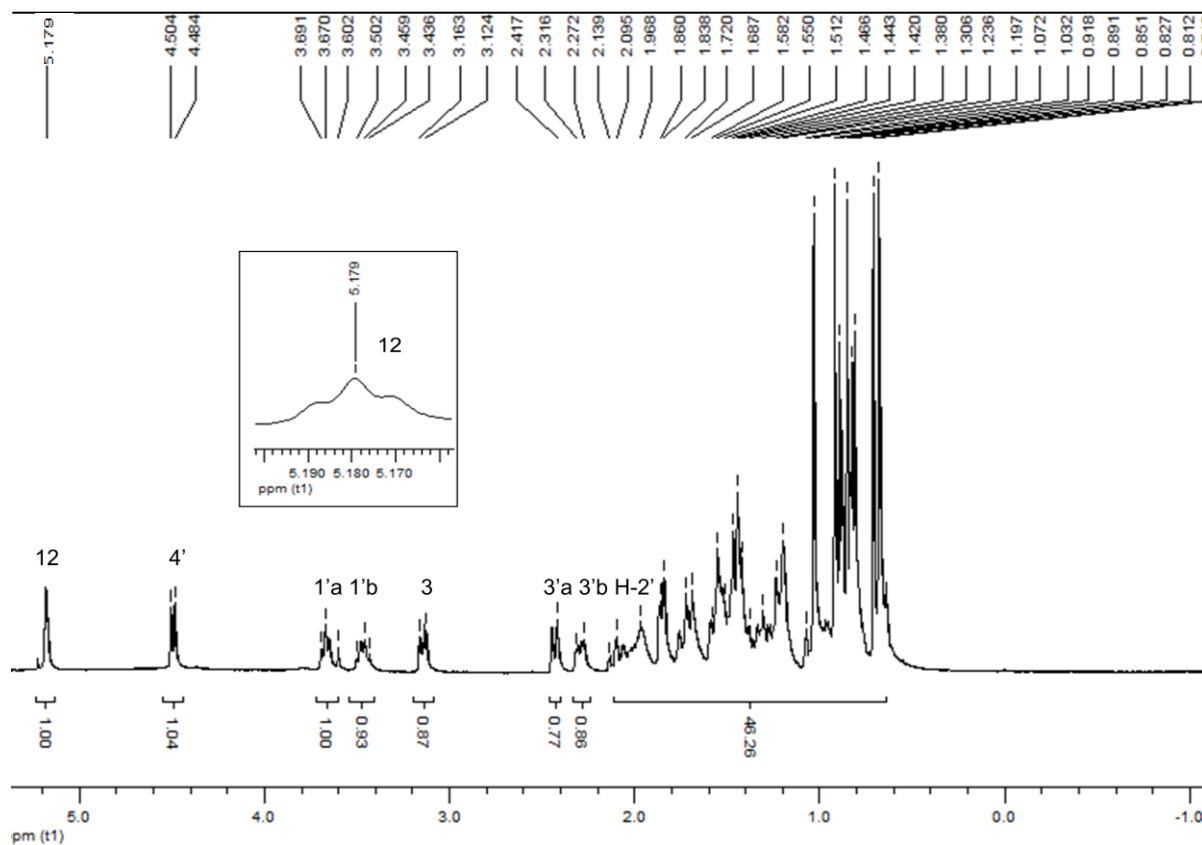


Figura 74: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do ácido ursólico-prolina-OH (**30**) em  $\text{CDCl}_3$ .

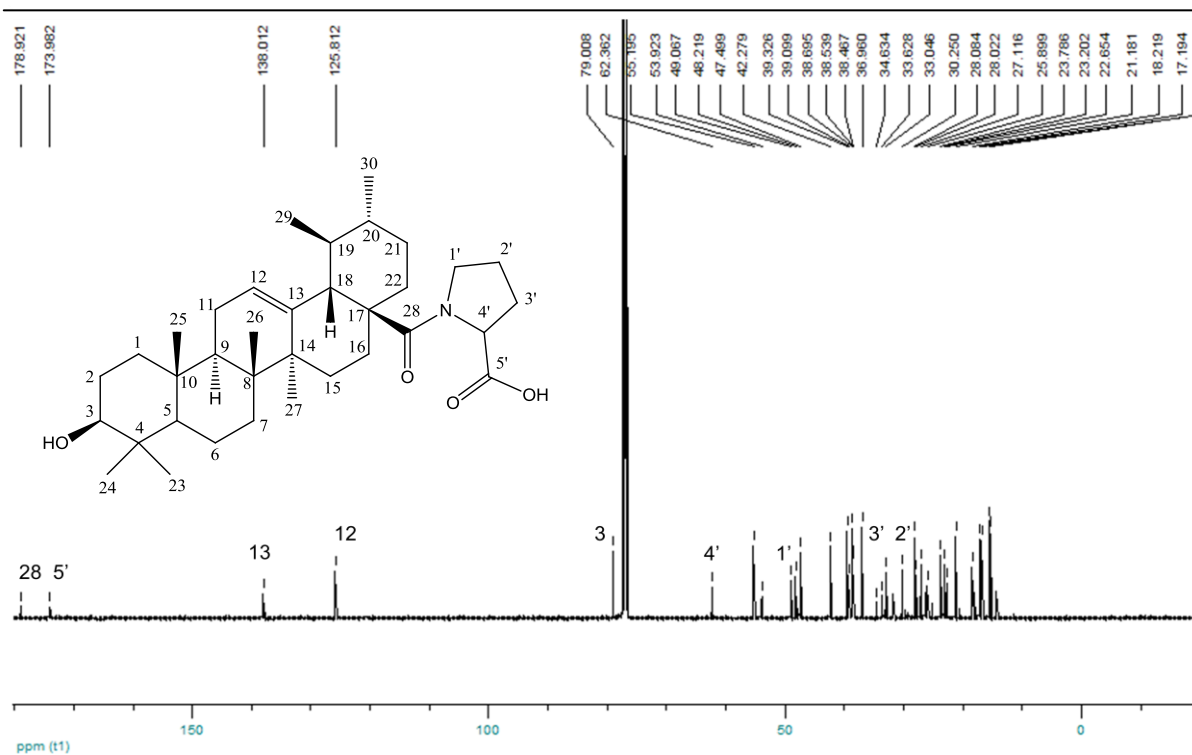


Figura 75: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do ácido ursólico-prolina-OH (**30**) em  $\text{CDCl}_3$ .

### 5.2.7 Obtenção do ácido ursólico-prolina-CN (**31**)

A estrutura do composto ácido ursólico-prolina-CN (**31**), sintetizado conforme item 5.2, foi confirmada por RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

A Figura 76 mostra o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **31**, em  $\text{CDCl}_3$  a 400,13 MHz, onde se observa o desaparecimento do singlete em 1,97 ppm referente ao  $\text{CH}_3$  do grupo acetil, confirmando a hidrólise deste grupo. Observa-se também que o multiplete referente ao H-3 encontra-se entre 3,11-3,15 ppm (deslocamento químico diferente daquele apresentado para o ácido ursólico (**2**) devido ao uso de  $\text{CDCl}_3$  ao invés de DMSO). Os demais sinais são referentes aos hidrogênios olefínicos, metínicos, metilênicos e metílicos presentes nas porções H-prolina-CN e ácido ursólico ( $\text{R}^1$ ) e já foram discutidos anteriormente nos itens 5.2.1 e 5.2.4.

A Figura 77 mostra o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **31**, em  $\text{CDCl}_3$  a 100,62 MHz, onde se observa o desaparecimento dos sinais em 170,91 e 21,13 ppm referentes ao grupo acetil, confirmando a hidrólise do mesmo. O sinal em 79,04 ppm é referente ao C-3 e os demais sinais são referentes às porções do ácido ursólico ( $\text{R}^1$ ) e H-prolina-CN e já foram mostrados e discutidos nos itens 5.2.1 e 5.2.4.

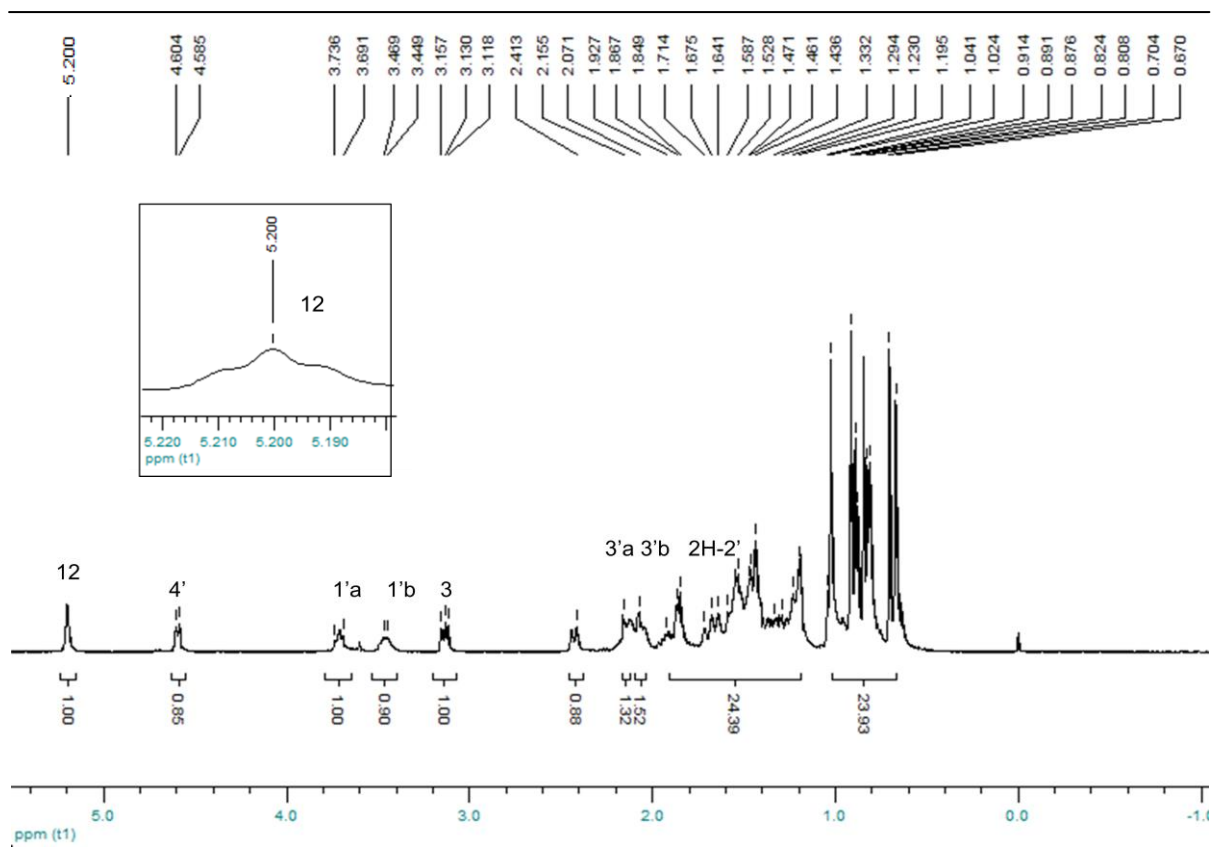


Figura 76: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do ácido ursólico-prolina-CN (**31**) em  $\text{CDCl}_3$ .

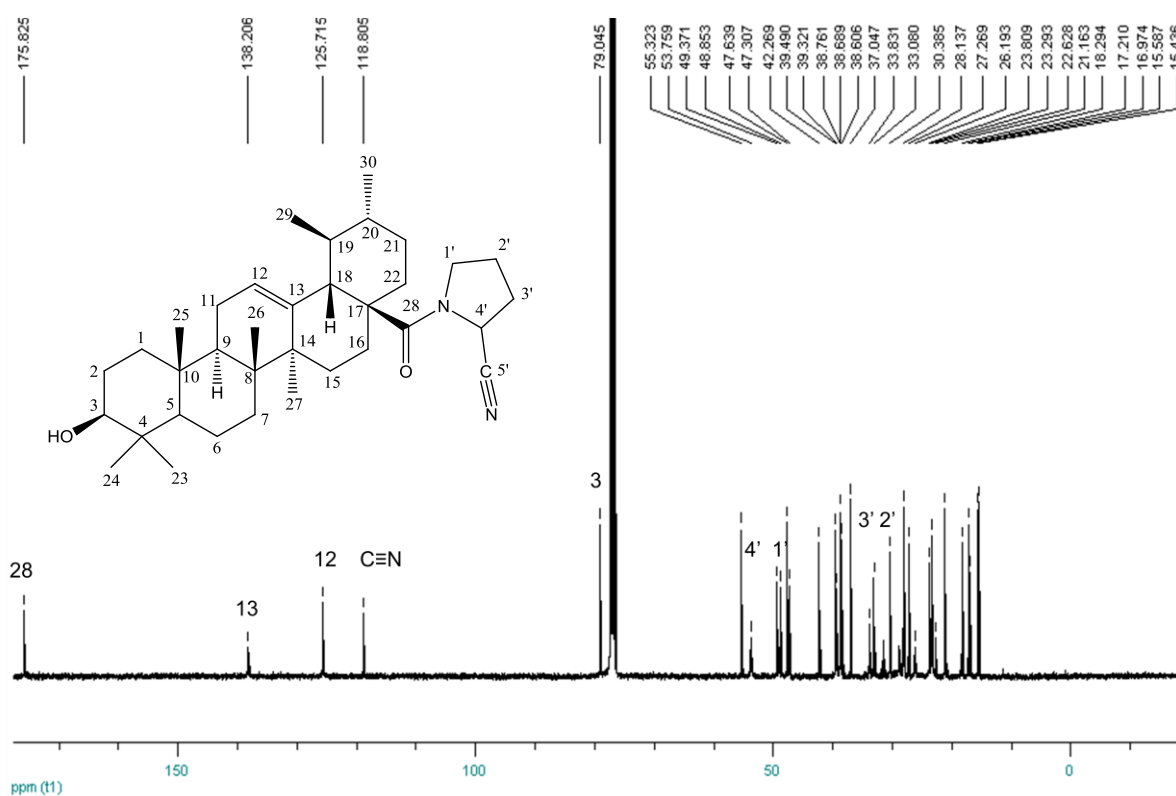


Figura 77: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do ácido ursólico-prolina-CN (**31**) em  $\text{CDCl}_3$ .

### 5.2.8 Obtenção do ácido ursólico-prolina-prolina-OH (**32**)

A estrutura do composto ácido ursólico-prolina-prolina-OH (**32**), obtido conforme item 5.2, foi confirmada por RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

A Figura 78 mostra o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **32**, em  $\text{CDCl}_3$  a 400,13 MHz, onde se observa o desaparecimento dos singletos em 3,59 e 1,95 ppm referentes as metoxila da porção H-prolina-prolina-OMe e do grupo acetil, respectivamente. Isto comprova a hidrólise destes grupamentos.

O multiplete referente ao H-3 encontra-se entre 3,14-3,16 ppm (deslocamento químico diferente daquele apresentado para o ácido ursólico (**2**) devido ao uso de  $\text{CDCl}_3$  ao invés de DMSO). Os demais sinais são referentes aos hidrogênios da porção ácido ursólico ( $\text{R}^1$ ) e da porção H-prolina-prolina e já foram mostrados e discutidos anteriormente nos itens 5.2.1. e 5.2.5.

A Figura 79 mostra o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **32**, em  $\text{CDCl}_3$  a 100,62 MHz, onde se observa o desaparecimento dos sinais em 170,88; 51,95 e 21,22 ppm referentes à carbonila do grupo acetil, à metila do grupo metoxila e à metila do grupo acetil, confirmando a hidrólise destes grupos a partir do composto **29**. Os sinais em 175,60; 174,12 e 172,44 ppm são referentes às carbonilas C-28, C-10' e C-5'. Os sinais em 60,18; 59,79; 48,02; 47,25; 33,48; 31,53; 27,27 e 27,08 ppm são referentes aos carbonos da porção H-prolina-prolina-OH, respectivamente C-4', C-9', C-1', C-6', C-3', C-8', C-7' e C-2'.

O sinal em 79,05 ppm é referente ao C-3 e os demais sinais são referentes aos carbonos presentes na porção ácido ursólico ( $\text{R}^1$ ) e já mostrados anteriormente no item 5.2.1.

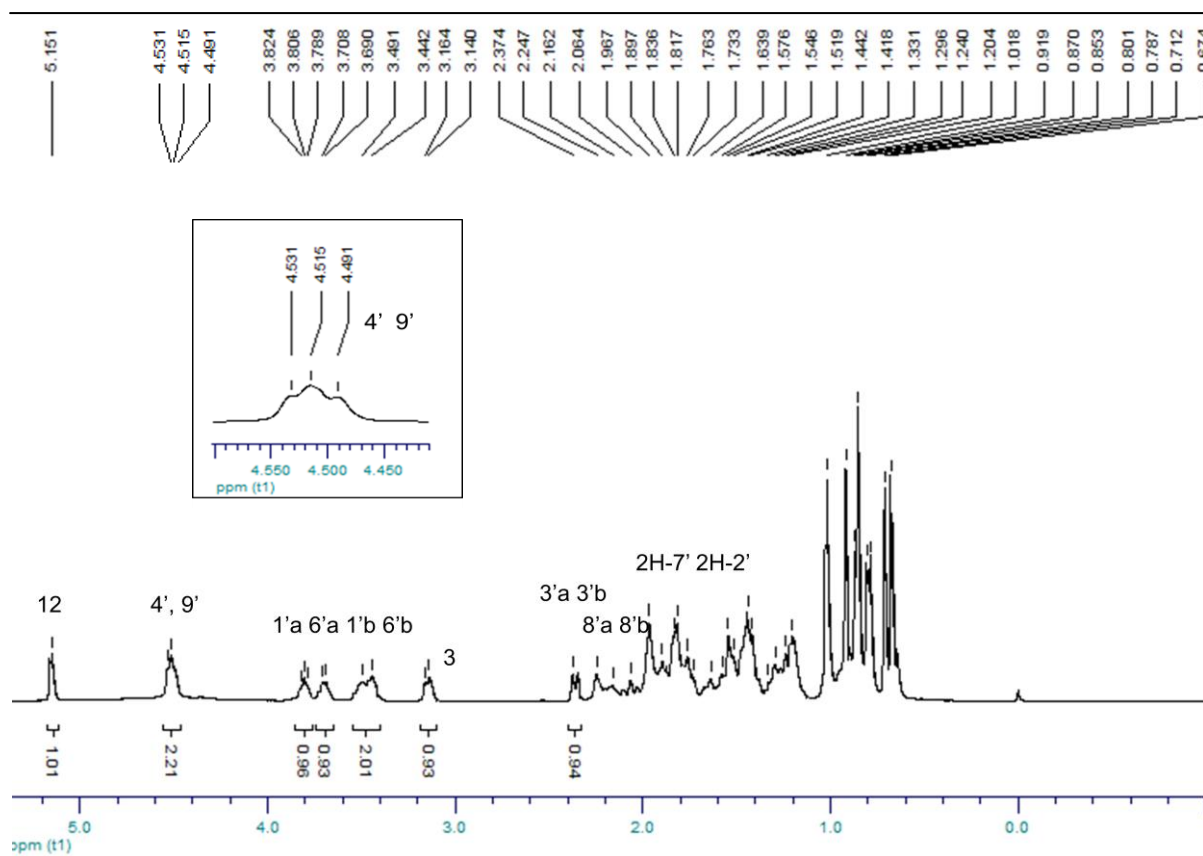


Figura 78: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do ácido ursólico-prolina-prolina-OH (**32**) em  $\text{CDCl}_3$ .

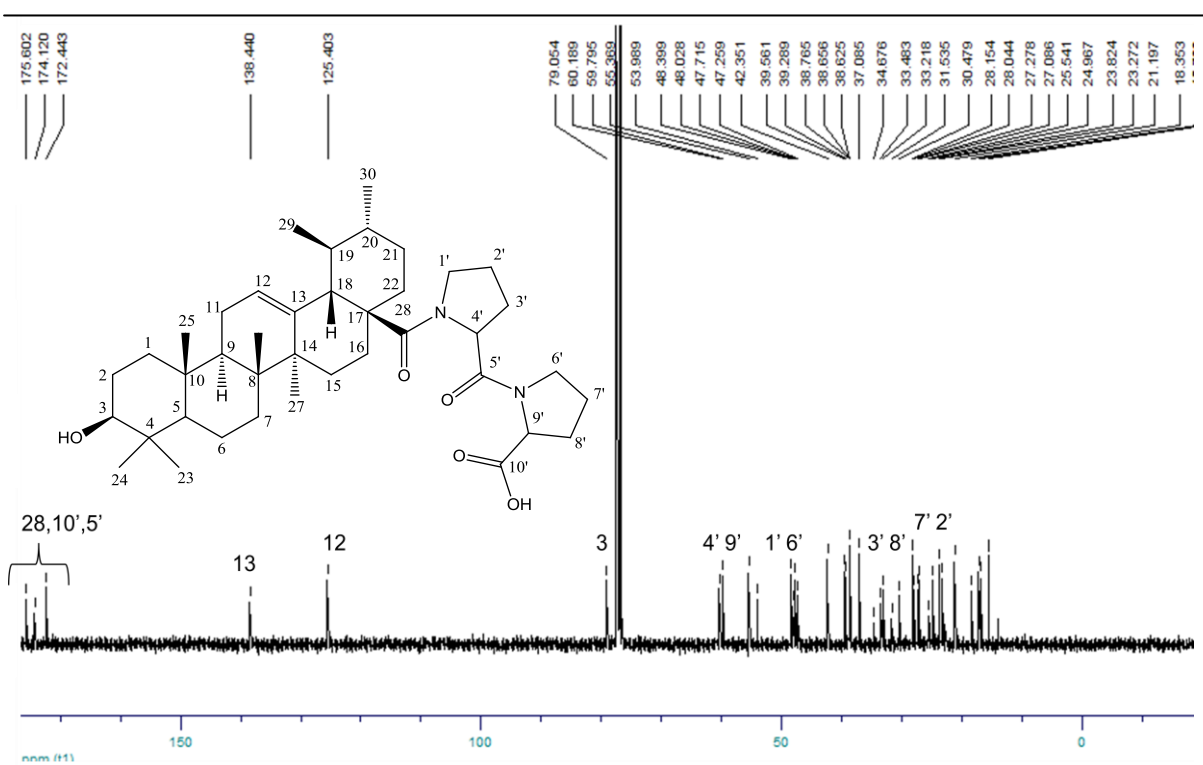
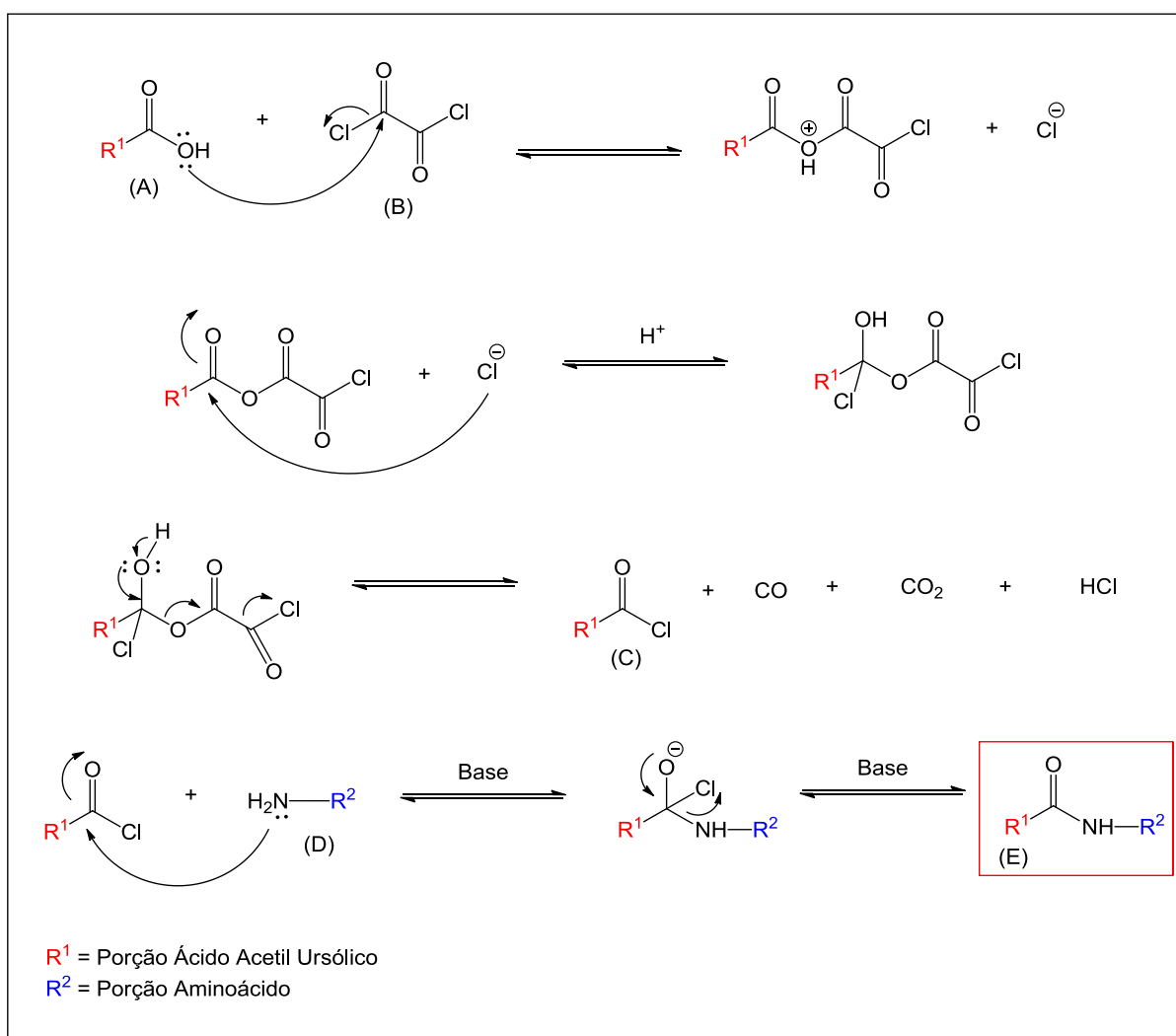


Figura 79: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do ácido ursólico-prolina-prolina-OH (**32**) em  $\text{CDCl}_3$ .

### 5.2.9 Mecanismo proposto para as reações de acoplamento entre o ácido acetil ursólico e os aminoácidos com cloreto de oxalila

As reações de derivatização do ácido acetil ursólico foram feitas inicialmente a partir da ativação do ácido carboxílico (A) com cloreto de oxalila (B), gerando um cloreto ácido (C). Após, em uma segunda etapa reacional, ocorreu a reação de acoplamento com o aminoácido (D) na presença da base trietilamina (geralmente utilizadas para neutralizar o HCl formado na etapa anterior e evitar a formação da amina em seu sal não reativo) e a formação do produto desejado (E) (Esquema 25).<sup>137</sup>



**Esquema 25:** Mecanismo das reações de acoplamento com ácido acetil ursólico usando cloreto de oxalila.

## 5.3 Ensaios Biológicos

### 5.3.1 Atividade antimicrobiana *in vitro*

Os compostos de partida utilizados neste trabalho, estigmasterol (**1**) e ácido ursólico (**2**), e vários de seus derivados já relatados na literatura, são conhecidos por apresentarem diferentes atividades biológicas, incluindo atividade antimicrobiana, conforme demonstraram Moriarty *et al.* (1995), Gigante *et al.* (2009), Wolska *et al.* (2010) e Vida *et al.* (2012), sendo que os dois primeiros estudos destacam o fato de que geralmente esteróis-amino conjugados apresentam atividade antimicrobiana.<sup>31,34,39,15</sup>

Assim, considerando-se estes relatos, no presente trabalho foram avaliadas as atividades antimicrobianas dos derivados sintetizados frente a uma coleção de micro-organismos patogênicos através do método de microdiluição em caldo.

Nestes ensaios de atividade antimicrobiana foram medidas a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração letal mínima (CLM), sendo a primeira relacionada com a mínima concentração do composto capaz de inibir o crescimento de um determinado micro-organismo, e a segunda associada à capacidade letal mínima que, este mesmo composto, é capaz de exercer sobre os micro-organismos testados.

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos nos testes de atividade frente às bactérias Gram-negativas e Gram-positivas realizados com alguns dos derivados do estigmasterol e com alguns dos derivados do ácido ursólico. Realizou-se também os testes de atividade antimicrobiana do estigmasterol (**1**) e do ácido ursólico (**2**) a fim de verificar se houve incremento do potencial antimicrobiano dos compostos sintetizados.

Da mesma forma, testou-se a atividade antifúngica de todas as amostras frente a sete fungos patogênicos. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 3.



Tabela 2: Atividade antimicrobiana de alguns derivados do estigmasterol e ácido ursólico - CIM (µg/mL).														
Amostras	Bactérias Gram-Positivas						Bactérias Gram-Negativas							
	Sa CIM/CLM	Bs CIM/CLM	Bc CIM/CLM	Es CIM/CLM	Ea CIM/CLM	Ec CIM/CLM	Etc CIM/CLM	Pa CIM/CLM	Bkc CIM/CLM	Ss CIM/CLM	St CIM/CLM	Mm CIM/CLM		
<b>Estigmasterol</b>	100 >100	100 >100	100 >100	12,5 100	50 >100	100 >100	50 >100	50 >100	25 >100	100 >100	100 >100	100 >100	100 >100	100 >100
<b>6</b>	NT NT	NT NT	NT NT	NT NT	100 >100	NT NT	NT NT	NT NT	NT NT	NT NT	100 >100	NT NT	100 >100	NT NT
<b>7</b>	NT NT	NT NT	NT NT	NT NT	100 >100	NT NT	NT NT	NT NT	NT NT	NT NT	100 >100	NT NT	100 >100	NT NT
<b>10</b>	NT NT	NT NT	NT NT	NT NT	50 >100	NT NT	NT NT	NT NT	NT NT	NT NT	100 >100	NT NT	100 >100	NT NT
<b>11</b>	>100 >100	100 >100	100 >100	50 >100	50 100	50 >100	50 100	100 >100	100 100	100 >100	50 >100	100 >100	100 >100	100 >100
<b>12</b>	100 >100	100 >100	100 >100	50 >100	100 >100	100 >100	100 >100	>100 -	100 100	100 >100	100 >100	100 >100	100 >100	100 >100
<b>13</b>	100 >100	100 >100	100 >100	100 >100	100 >100	100 >100	100 >100	- >100	100 >100	>100 >100	>100 100	>100 100	>100 100	>100 100
<b>14</b>	NT NT	NT NT	NT NT	NT NT	100 >100	NT NT	NT NT	NT NT	NT NT	NT NT	100 >100	NT NT	100 >100	NT NT
<b>17</b>	50 >100	50 100	50 >100	50 100	50 >100	50 100	50 >100	50 100	50 >100	50 >100	50 >100	50 >100	50 100	100 100
<b>18</b>	100 >100	100 >100	100 >100	25 >100	50 >100	100 >100	50 >100	50 >100	25 >100	100 >100	100 >100	100 >100	100 >100	100 >100
<b>21</b>	100 >100	100 >100	100 >100	50 100	100 >100	100 >100	100 >100	100 >100	100 >100	100 >100	100 >100	100 >100	100 >100	100 >100
<b>23</b>	100 >100	100 >100	100 >100	50 100	100 >100	100 >100	100 >100	- >100	100 100	100 >100	100 >100	100 >100	100 >100	100 >100
<b>Ácido Ursólico</b>	12,5 50	6,2 25	25 100	12,5 50	50 >100	50 >100	12,5 50	100 >100	100 >100	50 100	50 >100	25 100	50 >100	25 100
<b>26</b>	25 100	25 100	50 >100	100 >100	50 >100	50 100	50 >100	100 >100	50 >100	100 >100	100 >100	100 >100	100 >100	50 100
<b>Ampicilina</b>	0,77 50	0,77 50	50 50	25 50	50 50	3,1 25	50 50	25 50	50 50	25 50	50 50	25 50	0,77 0,77	0,77 0,62
<b>Azitromicina</b>	0,77 50	0,77 0,77	1,55 1,55	1,55 6,2	12,5 12,5	1,55 3,1	0,77 1,55	12,5 25	1,55 3,1	3,1 3,1	3,1 6,2	3,1 6,2	3,1 6,2	3,1 6,2
<b>Levoflaxina</b>	0,77 0,77	0,77 0,77	0,77 0,77	0,77 0,77	0,77 0,77	0,77 0,77	0,77 0,77	0,77 0,77	0,77 0,77	0,77 0,77	0,77 0,77	0,77 0,77	0,77 0,77	0,77 0,77

<sup>a</sup>ATCC (American Type Culture Collection): Sa-*Staphylococcus aureus*; Bs-*Bacillus subtilis*; Bc-*Bacillus cereus*; Es-*Enterococcus spp.*; Ea-*Enterobacter aerogenes*; Ec-*Escherichia coli*; Etc-*Enterobacter cloacae*; Pa-*Pseudomonas aeruginosa*; Bkc-*Burkholderia cepacia*; Ss-*Shigella sonnei*; St-*Salmonella typhimurium*; Mm-*Morganella morganii*.

<b>Tabela 3:</b> Atividade antifúngica de alguns derivados do estigmasterol e ácido ursólico - CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ).														
Amostras	Fungos													
	Ca		Ct		Ck		Cp		Cn		Cg		Sc	
	CIM/CLM		CIM/CLM		CIM/CLM		CIM/CLM		CIM/CLM		CIM/CLM		CIM/CLM	
<b>Estigmasterol</b>	100	>100	100	>100	25	>100	50	>100	50	100	>100	-	100	>100
<b>6</b>	100	>100	50	>100	25	50	50	>100	25	100	25	100	50	>100
<b>7</b>	100	>100	100	>100	25	100	100	>100	50	>100	50	>100	100	>100
<b>10</b>	100	>100	100	>100	25	50	50	>100	50	>100	25	100	100	>100
<b>11</b>	50	>100	50	>100	25	50	100	>100	25	50	50	100	100	>100
<b>12</b>	100	>100	100	>100	25	50	100	>100	50	100	50	100	100	>100
<b>13</b>	100	>100	100	>100	50	>100	50	>100	50	100	50	100	100	>100
<b>14</b>	100	>100	100	>100	25	100	50	100	50	100	50	100	50	>100
<b>17</b>	100	>100	100	>100	50	>100	50	>100	50	>100	50	>100	100	>100
<b>18</b>	100	>100	100	>100	25	>100	100	>100	50	>100	50	>100	100	>100
<b>21</b>	100	>100	100	>100	50	100	100	>100	50	100	50	100	100	>100
<b>23</b>	100	>100	100	>100	50	>100	100	>100	100	>100	>100	-	100	>100
<b>Ácido Ursólico</b>	100	>100	100	>100	50	100	50	>100	50	100	50	100	100	>100
<b>26</b>	100	>100	100	>100	25	50	100	>100	50	>100	100	>100	100	>100
<b>Nistatina</b>	0,77	3,1	1,52	3,1	0,77	0,77	0,77	0,77	1,52	3,1	3,1	3,1	1,52	3,1

<sup>a</sup>ATCC (American Type Culture Collection): Ca-Cândida albicans, Ct-Cândida tropicalis; Ck-Cândida krusei; Cp-Cândida parapslosis; Cn-Cryptococcus neoformans; Cg-Cryptococcus gatti; Sc-Sacharomces cerevisiae

O único composto que demonstrou capacidade antimicrobiana frente à quase todas as cepas de bactérias testadas, principalmente *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus spp.* e *Enterobacter cloacae*, foi o ácido ursólico (2). Na atividade antifúngica, o ácido ursólico demonstrou baixa capacidade de inibição.

O estigmasterol (1) e os demais derivados testados apresentaram baixa capacidade antimicrobiana frente as mais diversas cepas de bactérias e fungos. Os resultados obtidos podem estar relacionados à baixa solubilidade que a maioria dos compostos apresentou no DMSO, utilizado como solvente no teste, o que impossibilitou a real análise dos mesmos frente aos micro-organismos.

Alguns dos compostos sintetizados não puderam ser analisados devido a este fator de solubilidade, sendo observada inclusive a precipitação de alguns destes compostos no decorrer dos experimentos.

### 5.3.2 Ensaio de inibição enzimática

Apesar de não haver um completo entendimento na literatura sobre a natureza e a extensão do sistema colinérgico, as observações gerais dos pesquisadores quanto ao déficit colinérgico, principalmente em pacientes com DA, levou à estratégia de aumento colinérgico para o tratamento sintomático da doença, sendo a melhor abordagem aquela que inibe a enzima AChE e aumenta ou restaura os níveis de ACh no espaço sináptico e como consequência melhora a transmissão colinérgica. Este fato é facilmente observado devido ao fato de que todos os fármacos aprovados hoje para o tratamento da doença de Alzheimer são fortes inibidores da enzima AChE.<sup>86,85,87</sup>

Também existem vários indícios na literatura da participação da enzima BChE nesta desordem neurodegenerativa que afeta cerca de 13 milhões de pessoas no mundo, principalmente quando a enzima AChE está ausente ou com sua atividade comprometida.<sup>85,86,87</sup>

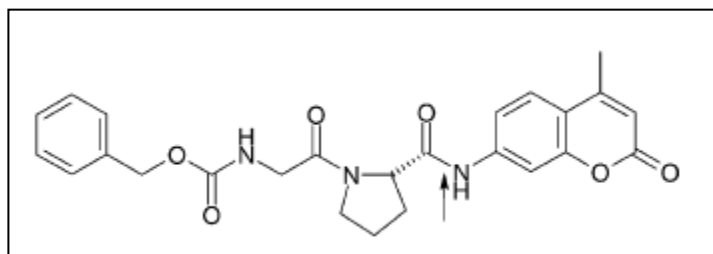
A POP é outra enzima com diversos relatos na literatura que demonstram seu envolvimento em doenças neurodegenerativas e psiquiátricas. Vários estudos relatam que pacientes com estes tipos de desordem apresentam os níveis séricos da POP alterados e, atualmente, os fármacos aprovados para o tratamento destes transtornos tentam restaurar os níveis de POP no soro dos pacientes.<sup>68,71,72</sup>

Por este motivo, o Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais (NPPN) têm procurado, a partir de plantas medicinais, compostos isolados ou produtos de síntese ou semi-síntese, encontrar novos inibidores destas enzimas através de teste *in vitro* baseados na absorbância e fluorescência dos respectivos substratos.<sup>22,23</sup>

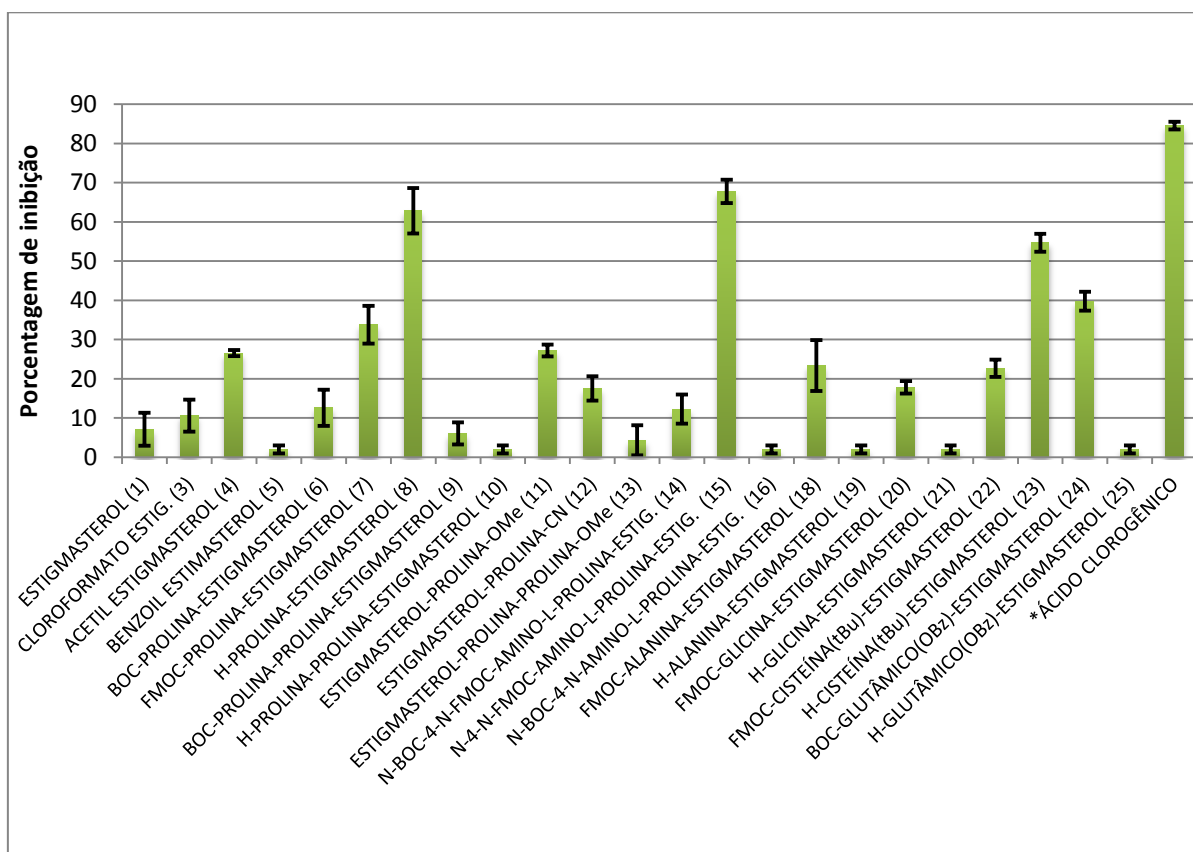
Neste contexto, o estigmasterol (**1**) e o ácido ursólico (**2**), assim como todos os seus derivados (**4** - **32**), foram submetidos aos testes de inibição enzimática frente à estas três enzimas. Os resultados são apresentados na forma de gráficos de barras, para melhor comparação dos resultados obtidos.

Na atividade de inibição da POP ocorre a formação da 7-amino-4-metilcumarina (AMC) através da reação de hidrólise do substrato ZGP-AMC (N-benziloxicarbonil-Gli-Pro-metilcumarinil-7-amida) entre a porção prolina e a AMC (Figura 80), sendo este ensaio baseado na medida de fluorescência da quantidade de AMC formado.<sup>138</sup>

A Figura 81 mostra as atividades de inibição dos compostos derivados do estigmasterol frente à enzima POP e a Figura 82 mostra as atividades dos compostos derivados do ácido ursólico.

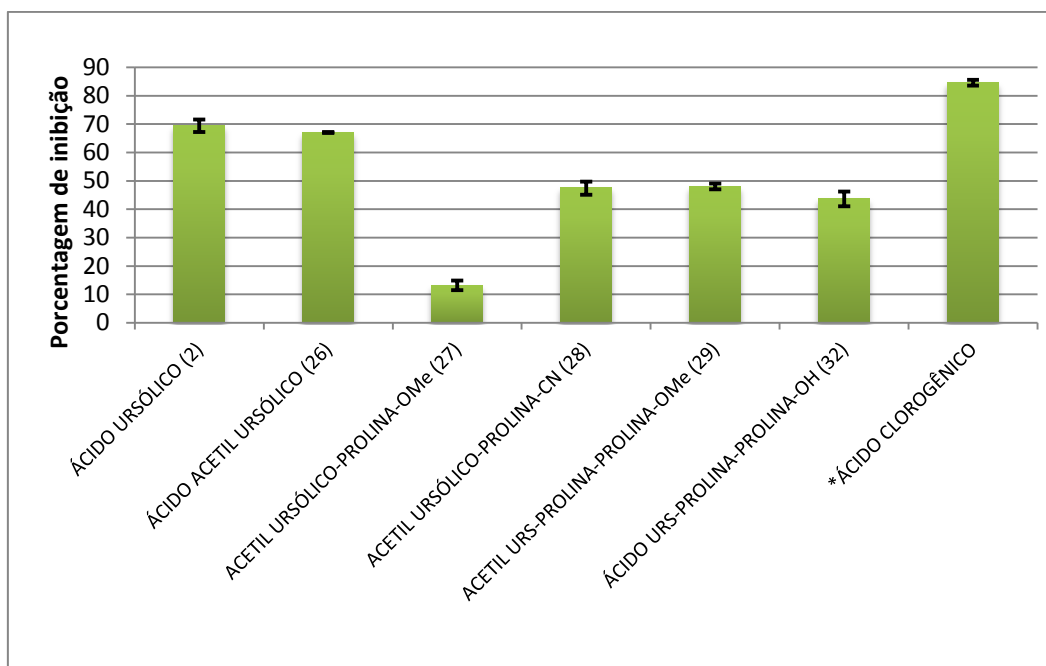


**Figura 80:** Substrato ZGP-AMC e esquema da hidrólise da ligação entre prolina e 7-amino-4-metilcumarina.



\*Controle positivo.

**Figura 81:** Percentual de inibição frente à enzima POP dos derivados do estigmasterol na concentração de 200 µM.



\*Controle positivo.

**Figura 82:** Percentual de inibição frente à enzima POP dos derivados do ácido ursólico na concentração de 200  $\mu\text{M}$ .

Nos ensaios de inibição da POP também foi observada uma baixa solubilidade da maioria dos compostos no solvente utilizado para o teste, o DMSO. Apesar disto, os compostos H-L-prolina-estigmasterol (**8**), N-4-N-Fmoc-amino-L-prolina-estigmasterol (**15**), ácido ursólico (**2**) e ácido acetil ursólico (**26**) apresentaram porcentagens de inibição de 62,83%, 67,79%, 69,36% e 67,03%, respectivamente. Após este ensaio de prospecção preliminar de inibição na concentração de 200  $\mu\text{M}$ , foi determinada a  $\text{IC}_{50}$  frente à POP dos quatro compostos que apresentaram as melhores taxas de inibição. Os resultados obtidos de  $\text{IC}_{50}$ , em  $\mu\text{M}$ , encontram-se na Tabela 4.

**Tabela 4:** Atividade inibitória dos compostos com maior porcentagem de inibição frente à POP, na concentração de 200  $\mu\text{M}$ , e os seus respectivos  $\text{IC}_{50}$ .

COMPOSTOS	% DE INIBIÇÃO POP (200 $\mu\text{M}$ )	$\text{IC}_{50}$ POP ( $\mu\text{M}$ )
H-L-PROLINA-ESTIGMASTEROL (8)	62,83 $\pm$ 5,8	164,8 $\pm$ 8,5
N-4-N-FMOC-AMINO-L-PROLINA-ESTIG. (15)	67,79 $\pm$ 3,0	75,66 $\pm$ 6,3
ÁCIDO URSÓLICO (2)	69,36 $\pm$ 2,2	0,55 $\pm$ 6,4
ÁCIDO ACETIL URSÓLICO (26)	67,03 $\pm$ 0,2	97,78 $\pm$ 0,4
ÁCIDO CLOROGÊNICO*	84,55 $\pm$ 0,3	-

\* Controle Positivo

A Figura 81 indica que, em relação ao estigmasterol (**1**) propriamente dito, a maioria de seus derivados apresentou atividade inibitória da POP aumentada após a introdução dos aminoácidos em sua estrutura, sendo que os três compostos mais ativos (**8**, **15**, **23**) são aqueles onde os grupos protetores Boc ou Fmoc foram removidos. Os compostos **8** e **15**, com porcentagem de inibição acima de 60% e  $\text{IC}_{50}$  de 164,8  $\mu\text{M}$  e 75,66  $\mu\text{M}$ , respectivamente, possuem a estrutura prolina/pirrolidina (amina cíclica com anel de 5 membros contendo quatro átomos de carbono e um átomo de nitrogênio) com seu grupo amino livre, o que pode indicar uma possível relação estrutura-atividade, pois este fato não é tão pronunciado quando ocorre a remoção do grupo protetor do  $\text{NH}_2$  ligado ao anel pirrolidina (**16**), onde a porcentagem de inibição é menor que 5%.

Alguns compostos tiveram a atividade diminuída quando comparados com o estigmasterol, são eles benzoil estigmasterol (**5**), estigmasterol-prolina-prolina-OMe (**13**), H-L-alanina-estigmasterol (**19**), H-L-glicina-estigmasterol (**21**) e H-L-glutâmico(OBz)-estigmasterol (**25**). Neste caso podemos notar que, com exceção do H-L-cisteína(tBu)-estigmasterol (**23**), a presença do  $\text{NH}_2$  desprotegido desfavorece a atividade de inibição da POP. O composto **23** possui uma porcentagem de inibição 54,68% de inibição e provavelmente isto se deve a algum efeito sinérgico do  $\text{NH}_2$  na presença do enxofre, pois quando o  $\text{NH}_2$  está protegido com o grupo protetor Fmoc a atividade é reduzida à 22,69%.

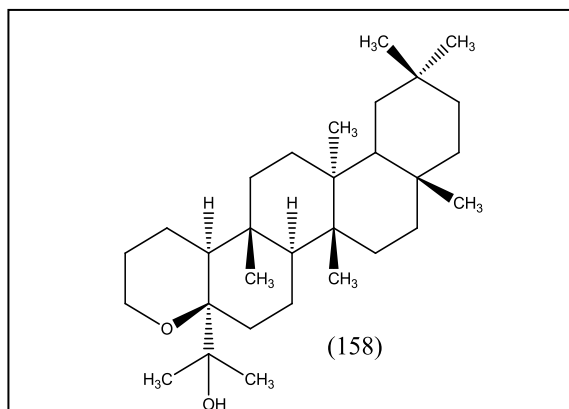
Todos os demais compostos tiveram as porcentagens de inibição frente à POP inferiores a 40%.

A Figura 82 mostra que, ao contrário dos derivados do estigmasterol, os derivados do ácido ursólico (**2**) não apresentaram um aumento da capacidade de

inibição da POP após a introdução dos aminoácidos em sua estrutura, sendo que o único derivado com atividade inibitória semelhante ao composto **2** é o ácido acetil ursólico (**26**), com porcentagem de inibição de 67,03% e  $IC_{50}$  de 97,78  $\mu$ M.

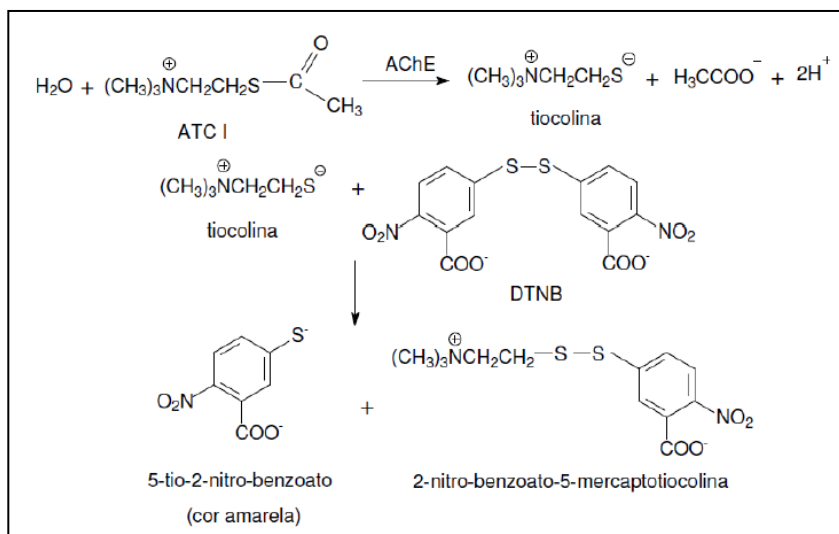
De forma geral, observa-se que os valores de inibição da POP dos derivados do ácido ursólico foram superiores aos obtidos com os derivados do estigmasterol. Todos os derivados, com exceção do acetil ursólico-prolina-OMe (**27**), possuem porcentagens de inibição acima de 40%. Os valores obtidos foram 47,46%, 48,03% e 43,64%, respectivamente para acetil ursólico-prolina-CN (**28**), acetil ursólico-prolina-prolina-OMe (**29**) e acetil ursólico-prolina-prolina-HO (**32**).

Quando comparamos estes resultados obtidos com estudos feitos por Rahman *et al.* (2002) e Park *et al.* (2005), onde o primeiro relata que um triterpeno pentacíclico denominado Terminalina A (**159**) inibe a POP com  $IC_{50}$  de 72,23  $\mu$ M, e o segundo que relata que o ácido ursólico e seu isômero ácido oleanóico inibem a POP de uma maneira dose-dependente com  $IC_{50}$  de 17,2 e 22,5  $\mu$ M, respectivamente, constatamos que os valores obtidos, apesar de não serem extraordinários, aproximam-se daqueles encontrados na literatura (Figura 83).<sup>139,140</sup>

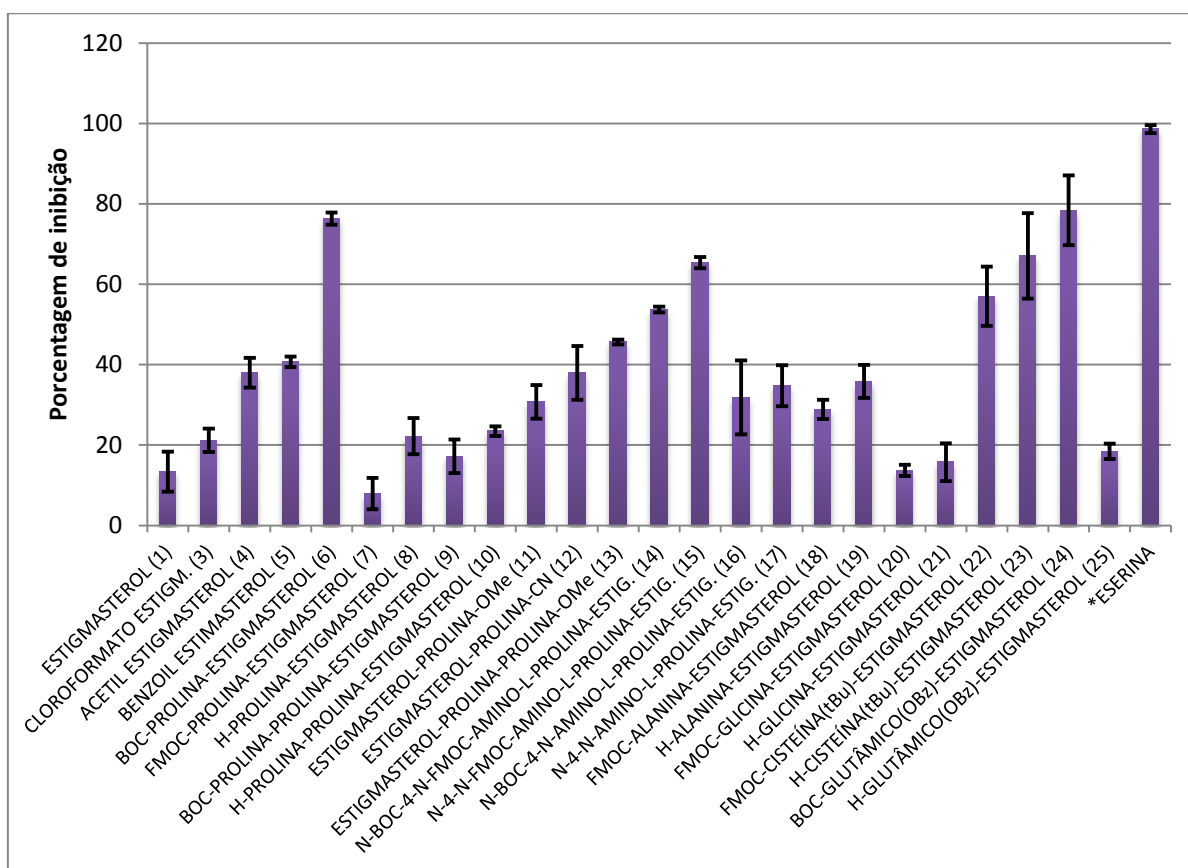


**Figura 83:** Estrutura da Terminalina A (**159**).

Nas atividades de inibição das enzimas AChE e BChE, as respectivas enzimas hidrolisam os substratos ACTI ou BCTI que reagem com o DTNB para produzir o composto 2-nitrobenzoato-5-mercaptotocolina e 5-tio-2-nitro-benzoato de coloração amarela, que é medido no comprimento de onda de 405 nm (Esquema 26). A Figura 84 mostra as atividades dos compostos derivados do estigmasterol frente à AChE e a Figura 85 as atividades dos derivados do ácido ursólico.<sup>141</sup>



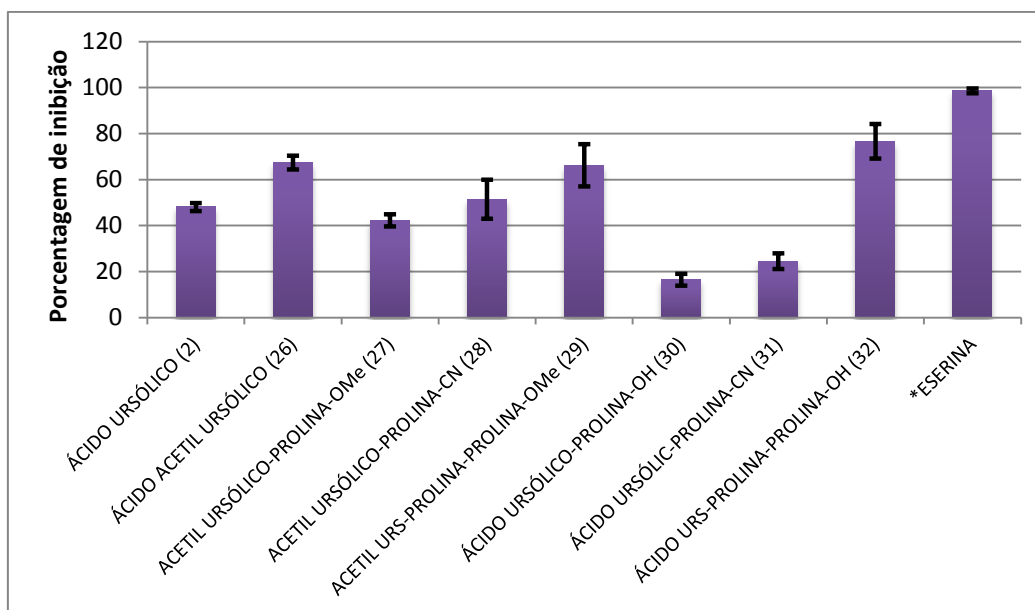
**Esquema 26:** Reação colorimétrica do substrato ACTI, DTNB e AChE.



\*Controle positivo.

**Figura 84:** Percentual de inibição frente à enzima AChE dos derivados do estigmasterol na concentração de 200 µM.





\*Controle positivo

**Figura 85:** Percentual de inibição frente à enzima AChE dos derivados do ácido ursólico na concentração de 200  $\mu\text{M}$ .

Os resultados de inibição da enzima AChE dos derivados sintetizados a 200  $\mu\text{M}$  são apresentados nas Figuras 84 e 85. Novamente nestes ensaios foi observado que muitos dos derivados obtidos apresentaram-se pouco solúveis no solvente de trabalho, o DMSO, sendo este um dos fatores que mais afeta os resultados obtidos nestes ensaios *in vitro*. Apesar disto, dez dos novos compostos testados - seis derivados do estigmasterol e quatro derivados do ácido ursólico - apresentaram porcentagens de inibição da AChE acima de 50% na concentração de 200  $\mu\text{M}$  e foram submetidos à determinação da  $\text{IC}_{50}$  (concentração responsável pela inibição de 50% da enzima). Os resultados obtidos de  $\text{IC}_{50}$ , em  $\mu\text{M}$ , e as respectivas porcentagens de inibição encontram-se na Tabela 5.

**Tabela 5:** Atividade inibitória dos compostos com maior porcentagem de inibição frente à AChE, na concentração de 200  $\mu\text{M}$ , e os seus respectivos  $\text{IC}_{50}$ .

COMPOSTOS	% DE INIBIÇÃO AChE (200 $\mu\text{M}$ )	$\text{IC}_{50}$ AChE ( $\mu\text{M}$ )
BOC- <i>L</i> -PROLINA-ESTIGMASTEROL (6)	76,30 $\pm$ 1,5	99,0 $\pm$ 8,8
FMOC- <i>L</i> -CISTEÍNA(tBu)-ESTIGMASTEROL (22)	57,01 $\pm$ 7,4	126,5 $\pm$ 1,7
H- <i>L</i> -CISTEÍNA(tBu)-ESTIGMASTEROL (23)	67,05 $\pm$ 10,6	123,5 $\pm$ 5,1
BOC- <i>L</i> -GLUTÂMICO(OBz)-ESTIGMASTEROL (24)	78,38 $\pm$ 8,7	97,49 $\pm$ 5,0
N-BOC-4-N-FMOC-AMINO- <i>L</i> -PROLINA-ESTIG. (14)	53,72 $\pm$ 0,7	172,5 $\pm$ 6,6
N-4-N-FMOC-AMINO- <i>L</i> -PROLINA-ESTIG. (15)	65,39 $\pm$ 1,4	165,4 $\pm$ 14,6
ÁCIDO URSÓLICO (2)	48,09 $\pm$ 1,7	225,8 $\pm$ 8,3
ÁCIDO ACETIL URSÓLICO (26)	67,39 $\pm$ 3,0	156,2 $\pm$ 1,1
ACETIL URSÓLICO-PROLINA-CN (28)	51,42 $\pm$ 8,5	189,9 $\pm$ 0,7
ACETIL URSÓLICO-PROLINA-PROLINA-OMe (29)	66,27 $\pm$ 9,2	144,0 $\pm$ 3,3
ÁCIDO URSÓLICO-PROLINA-PROLINA-OH (32)	76,63 $\pm$ 7,5	98,33 $\pm$ 1,1
ESERINA*	98,58 $\pm$ 0,8	10,61 $\pm$ 1,6

\*Controle positivo

Observando-se a Figura 84 e a Tabela 5, nota-se que dois compostos derivados do estigmasterol destacam-se pelo valor de inibição da AChE superior a 70% e  $\text{IC}_{50}$  inferior a 100  $\mu\text{M}$ , são eles o Boc-*L*-prolina-estigmasterol (**6**) e o Boc-*L*-glutâmico(OBz)-estigmasterol (**24**) com 76,30% e 78,38% de inibição e  $\text{IC}_{50}$  de 99,0  $\mu\text{M}$  e 97,49  $\mu\text{M}$ , respectivamente, o que sugere que a presença do grupo protetor Boc pode aumentar a atividade de inibição da enzima AChE.

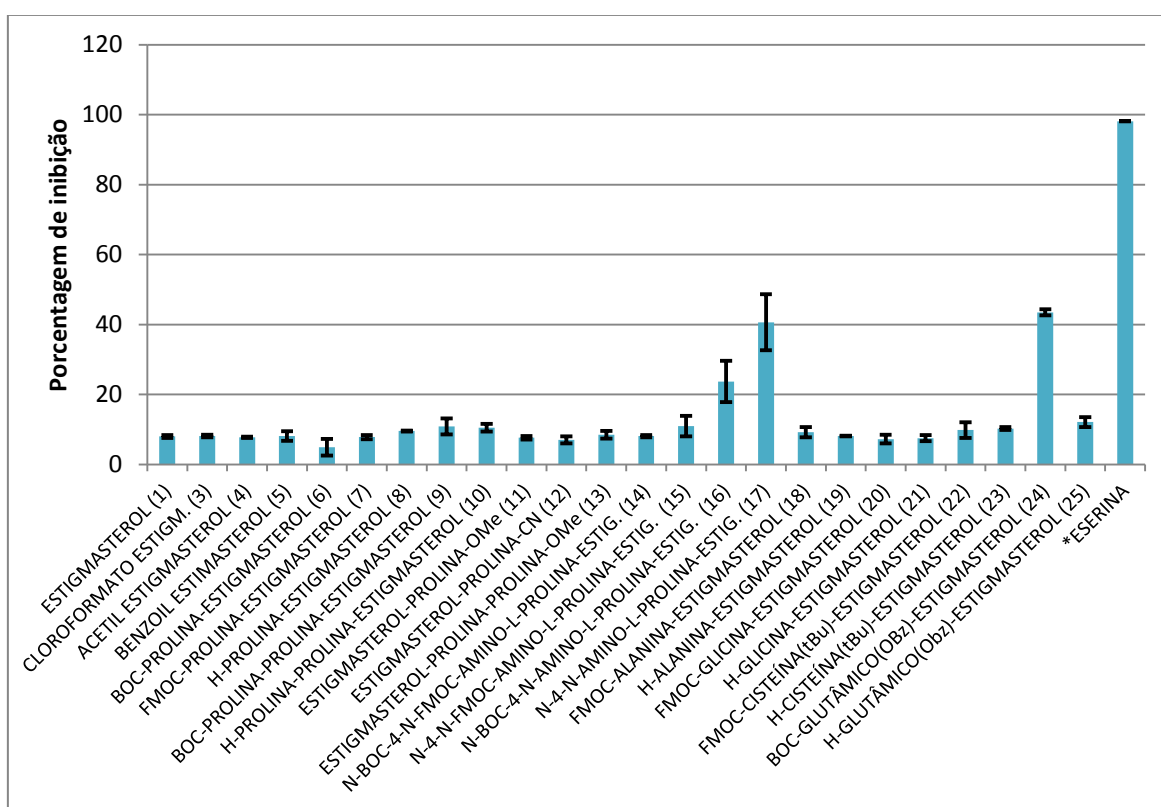
Outros dois compostos que também possuem atividade significativa frente à esta enzima são o composto Fmoc-*L*-cisteína(tBu)-estigmasterol (**22**) e seu análogo desprotegido H-*L*-cisteína(tBu)-estigmasterol (**23**), com 57,01% e 67,05% de inibição e 126,5  $\mu\text{M}$  e 123,5  $\mu\text{M}$  de  $\text{IC}_{50}$ , respectivamente. A partir destes resultados, pode-se constatar que a presença do enxofre no aminoácido cisteína pode influenciar na atividade e que a remoção do Fmoc aumenta a atividade de inibição.

Os compostos N-Boc-4-N-Fmoc-amino-*L*-prolina-estigmasterol (**14**), N-4-N-Fmoc-amino-*L*-prolina-estigmasterol (**15**) e N-Boc-4-N-amino-*L*-prolina-estigmasterol (**16**) possuem porcentagens de inibição de 53,72%, 65,39% e 31,85%, respectivamente, o que sugere que, neste caso, a remoção do grupo protetor Boc e a presença do grupo protetor Fmoc aumentam a atividade e que a ausência do Fmoc e a presença do Boc diminui a atividade de inibição da AChE.

Os demais derivados do estigmasterol também se mostraram mais ativos na inibição da AChE quando comparados com o estigmasterol (13,38%), com exceção do composto Fmoc-L-prolina-estigmasterol (**7**) com 7,9% de inibição, o que mostra que a presença dos aminoácidos, protegidos ou não, melhoram a atividade inibitória do estigmasterol frente à enzima AChE.

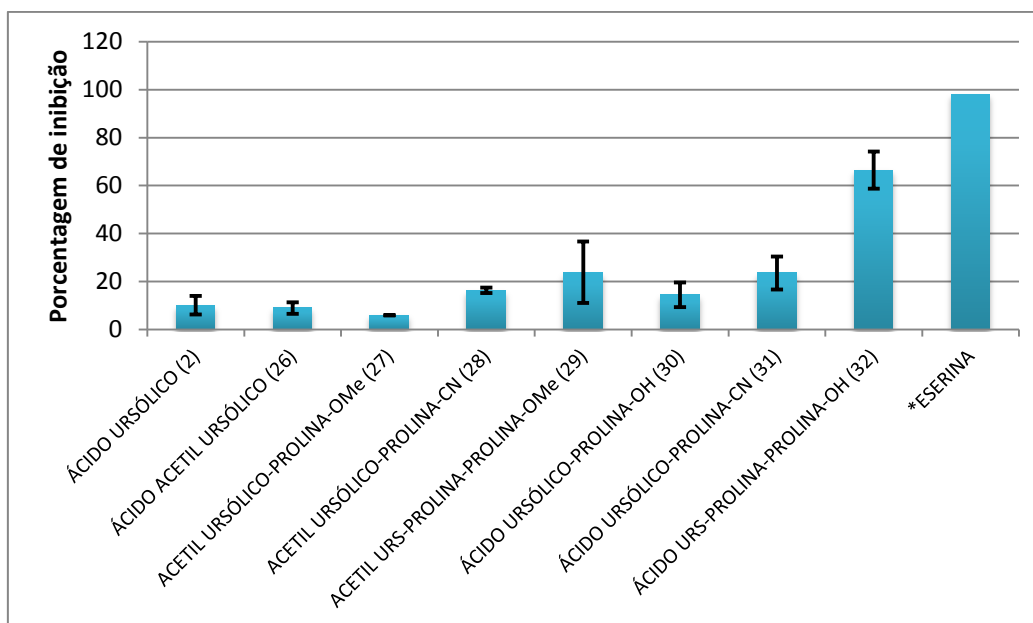
A Figura 85 e a Tabela 5 mostram que, com exceção dos compostos acetil ursólico-prolina-OMe (**27**), ácido ursólico-prolina-OH (**30**) e ácido ursólico-prolina-CN (**31**), todos os demais derivados do ácido ursólico (**2**) se mostraram mais ativo quando comparados com o composto **2**, com porcentagens de inibição e IC<sub>50</sub> superiores a este. Estes resultados mostram que o ácido ursólico e todos os seus derivados são potenciais inibidores da enzima AChE.

A Figura 86 mostra as atividades dos compostos derivados do estigmasterol frente à BChE e a Figura 87 as atividades dos derivados do ácido ursólico.



\*Controle positivo.

**Figura 86:** Potencial de inibição frente à enzima BChE dos derivados do estigmasterol na concentração de 200  $\mu$ M.



\*Controle Positivo.

**Figura 87:** Potencial de inibição frente à enzima BChE dos derivados do ácido ursólico na concentração de 200 µM.

Os resultados obtidos nos ensaios de inibição da enzima BChE foram insatisfatórios, uma vez que apenas três compostos apresentaram porcentagem de inibição acima de 40%, o N-4-N-amino-*L*-prolina-estigmasterol (**17**), o Boc-*L*-glutâmico(OBz)-estigmasterol (**24**) e o ácido ursólico-prolina-prolina-OH (**32**) com 40,64%, 43,48% e 66,42%, respectivamente. A avaliação da  $IC_{50}$  foi realizada apenas do composto **32**. O resultado obtido de  $IC_{50}$  encontra-se na Tabela 6.

Os demais compostos apresentaram porcentagens de inibição em torno de 10%, tendo apenas dois compostos que mostraram atividade superior a 23%, o N-Boc-4-N-amino-*L*-prolina-estigmasterol (**16**) e o acetil ursólico-prolina-prolina-OMe (**29**).

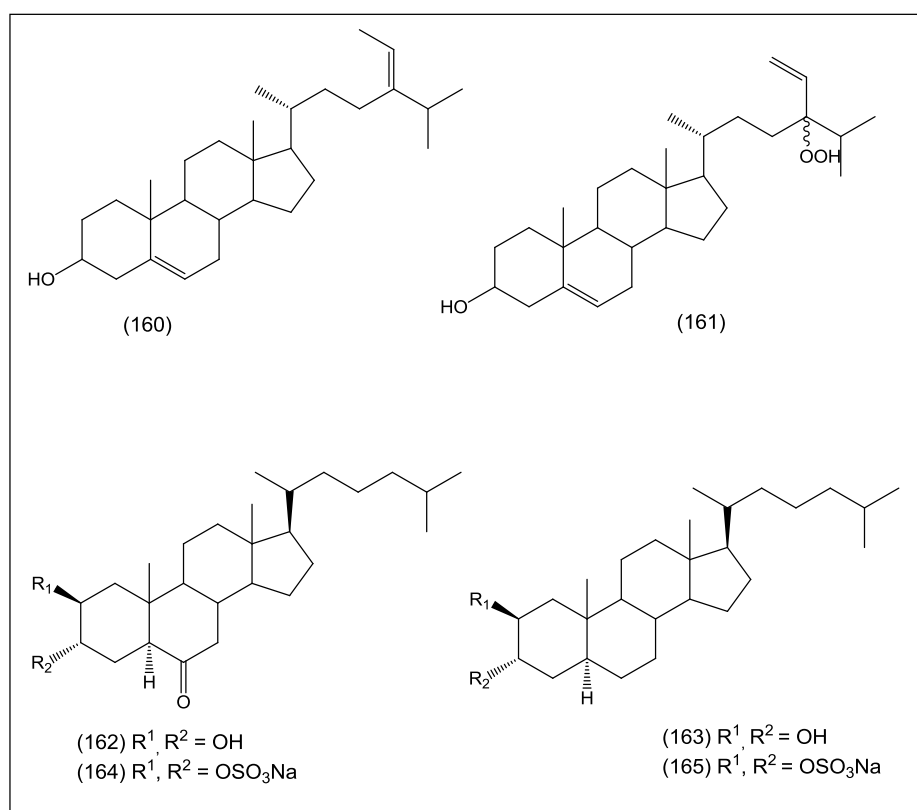
**Tabela 6:** Atividade inibitória do composto com maior porcentagem de inibição frente à BChE, na concentração de 200 µM, e o seu respectivo  $IC_{50}$ .

COMPOSTOS	% DE INIBIÇÃO BChE (200 µM)	$IC_{50}$ BChE (µM)
ÁCIDO URSÓLICO-PROLINA-PROLINA-OH (32)	66,42 ± 7,7	177,1
ESERINA*	98,12 ± 0,1	-

\*Controle positivo

Estudos feitos por Sauvaître *et al.* (2007) com diversos triterpenos tetracíclicos mostram que, tanto frente à enzima AChE como BChE, os resultados de  $IC_{50}$  variam entre 18 nm até valores superiores a 10  $\mu$ m. No estudo feito por Yoon *et al.* (2008) com dois esteróis, Fucoesterol (**160**) e 24-hidroperoxi 24-vinilcolesterol (**161**), os valores de  $IC_{50}$  obtidos frente à AChE foram de 500 e 389,1  $\mu$ M e frente à BChE de 421,72 e 176,46  $\mu$ M, respectivamente. Em outro estudo feito por Richmond *et al.* (2011) com esteróis é possível observar que os derivados dióis (**162-163**) apresentam  $IC_{50}$  frente à AChE maior que 500  $\mu$ M e que os derivados sulfatados (**164-165**) apresentam  $IC_{50}$  entre 15 e 60  $\mu$ M. Estudos de Öztürk *et al.* (2011) relatam o isolamento do ácido ursólico e avaliação da atividade frente à AChE com  $IC_{50}$  de 93,8  $\mu$ M. Portanto, comparando os valores obtidos para a inibição da AChE e BChE com valores da literatura, observa-se que os compostos sintetizados neste trabalho encontram-se próximos daqueles compostos encontrados na literatura (Figura 88).

9,142,143,144



**Figura 88:** Estruturas dos compostos **160 – 165**.

Analisando em conjunto os resultados obtidos nos testes de inibição enzimática observa-se que, de maneira geral, os compostos foram mais ativos frente à enzima AChE, principalmente os derivados do ácido ursólico. Na atividade de inibição da POP, quatro compostos apresentaram melhor atividade, sendo que a introdução dos aminoácidos na estrutura básica do estigmasterol aumenta a atividade do mesmo, fato que não ocorre nos derivados do ácido ursólico. Na atividade da AChE, dez derivados apresentaram atividade inibitória significativa, ocorrendo geralmente a melhoria da atividade tanto nos análogos do estigmasterol quanto do ácido ursólico. Já na atividade da BChE os resultados foram insatisfatórios, apenas o composto ácido ursólico-prolina-prolina-OH (**32**) apresentou atividade superior a 50%.

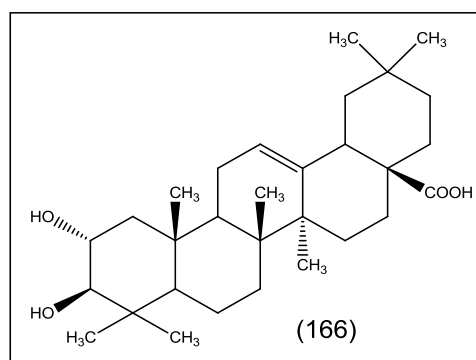
Observa-se também que o composto **32** apresentou eficiente capacidade inibitória tanto da enzima AChE (76,63%) quanto da BChE (66,42%) e, portanto, pode ser considerado um inibidor colinesterásico dual o que, de acordo com estudos feitos por Ballard (2002), pode proporcionar maior eficácia no tratamento de doenças, tal como a doença de Alzheimer.<sup>145</sup>

### 5.3.3 Atividade Antitumoral *in vitro*

Os tumores malignos são responsáveis por um número expressivo e crescente de pacientes em todo o mundo e representam a segunda causa de morte no Brasil sendo, no ano de 2011, responsável por 15,1% da taxa de mortalidade no país. Dentro deste contexto, o câncer colorretal ocupa a terceira posição mundial entre todas as neoplasias malignas, sendo responsável por 13.344 mortes no Brasil em 2010.<sup>105,110</sup>

Apesar da introdução de novos fármacos no arsenal terapêutico contra o câncer, vários tumores ainda não possuem um tratamento adequado e eficaz. Portanto, torna-se imperativo encontrar e desenvolver novos quimioterápicos mais eficientes. Neste contexto, a linhagem comercial HT-29 vem sendo utilizada como modelo experimental para averiguar o efeito anticancerígeno de novos compostos contra o câncer colorretal.<sup>110,146</sup>

Em 2005 Chiang *et al.* relataram que o ácido ursólico e o ácido acetil ursólico possuem  $IC_{50}$  de 4,7  $\mu M$  e  $\sim 10 \mu M$ , respectivamente, referente a citotoxicidade frente à célula HT-29. Em 2009, Reyes-Zurita *et al.* realizaram a avaliação da atividade antiproliferativa do ácido maslínico (**166**), composto estruturalmente relacionado ao ácido ursólico, frente à linhagem de célula HT-29 e obtiveram um  $IC_{50}$  de 28,8  $\mu g/mL$  e  $IC_{80}$  de 37,5  $\mu g/mL$ . Em 2011, Limami *et al.* relataram que o ácido ursólico inibe a proliferação celular e induz apoptose na linhagem de célula HT-29 de uma maneira dose e tempo-dependente, com  $IC_{50}$  de aproximadamente 25  $\mu M$  em 48h (Figura 89).<sup>53,147,54</sup>



**Figura 89:** Estrutura do ácido maslínico (**166**).

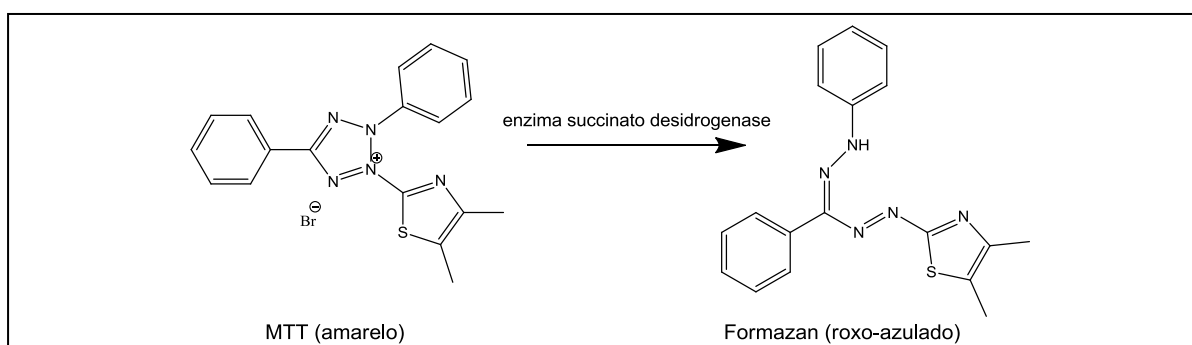
Existem na literatura vários estudos sobre a relação estrutura-atividade de derivados do ácido ursólico relatando o fato de que um grupo doador de ligações de hidrogênio na posição C-3 ou C-28 e uma carbonila na posição C-17 aumenta a atividade citotóxica, assim como a presença de um grupo amino tanto no C-3 quanto no C-28 e a orientação  $\beta$  do substituinte no C-3. Alguns estudos também revelaram que aqueles derivados do ácido ursólico com éster na posição C-3 e amina na posição C-28 resultam em derivados com forte inibição de tumores.<sup>37,43,52,55</sup>

Por esse motivo, realizou-se a avaliação das atividades antitumorais *in vitro* dos derivados do ácido ursólico (**2**), compostos que, de maneira geral, apresentam as condições necessárias para a atividade citotóxica. As atividades antitumorais foram feitas através de duas análises consecutivas, a primeira realizada após 24 horas e que mediu a concentração das células vivas, fornecendo dados sobre o efeito de viabilidade celular, ou seja, o quanto da amostra testada matou ou induziu a morte das células por apoptose; e a segunda análise, realizada após 72 horas, que

forneceu dados sobre o efeito antiproliferativo das amostras testadas, ou seja, o quanto a amostra inibiu o crescimento das células tumorais.

Para a quantificação das células viáveis, foi utilizado o método colorimétrico MTT. No ensaio do MTT, o sal de tetrazolium (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), hidrossolúvel e de coloração amarelada, é facilmente incorporado por células viáveis, que reduzem este composto em suas mitocôndrias pela atividade da enzima succinato desidrogenase. Ao ser reduzido, o MTT é convertido em um composto de coloração roxo-azulado, o formazan, insolúvel em água, e que fica armazenado no citoplasma celular. Após o ensaio, o formazan é solubilizado em DMSO e quantificado colorimetricamente. A quantidade de formazan formado é proporcional ao número de células metabolicamente ativas (Esquema 27).

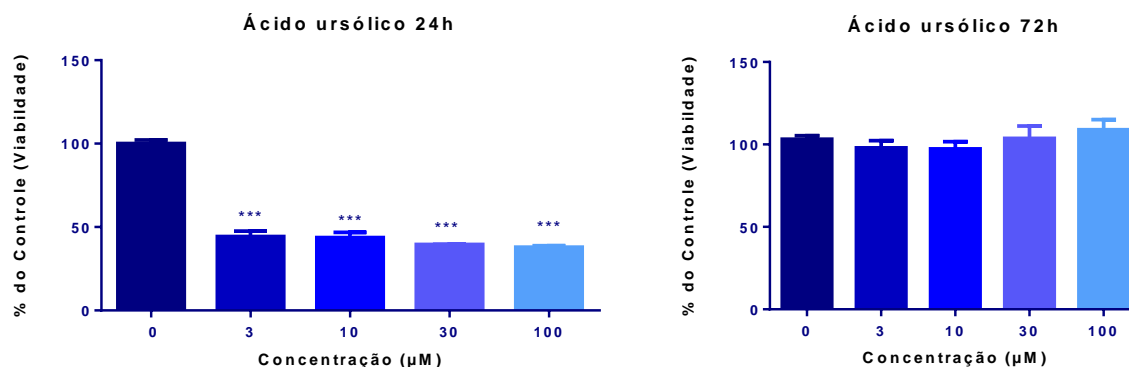
120,121,122



**Esquema 27:** Redução do MTT (amarelo) em formazan (roxo-azulado).

Portanto, inicialmente, avaliou-se a atividade antitumoral do ácido ursólico (**2**) frente à linhagem de célula HT-29. Como pode ser observado na Figura 90, após as primeiras 24 horas, o ácido ursólico inibe a linhagem celular HT-29 em mais de 50% tanto na concentração mais baixa (3  $\mu$ M) quanto na concentração mais alta (100  $\mu$ M), sendo esta última responsável por inibir 62,12% das células tumorais. Entretanto, foi observado que, após 72 horas, todas as concentrações testadas inibiram menos que 2% das células ou ainda, nas duas concentrações mais altas, apresentaram atividade pró-carcinogênica, ou seja, aumentaram o número de células tumorais quando comparados com o controle – concentração zero. Estes resultados indicam que a atividade antitumoral do ácido ursólico está relacionada a um mecanismo de apoptose (morte celular) e não a um efeito antiproliferativo do mesmo.



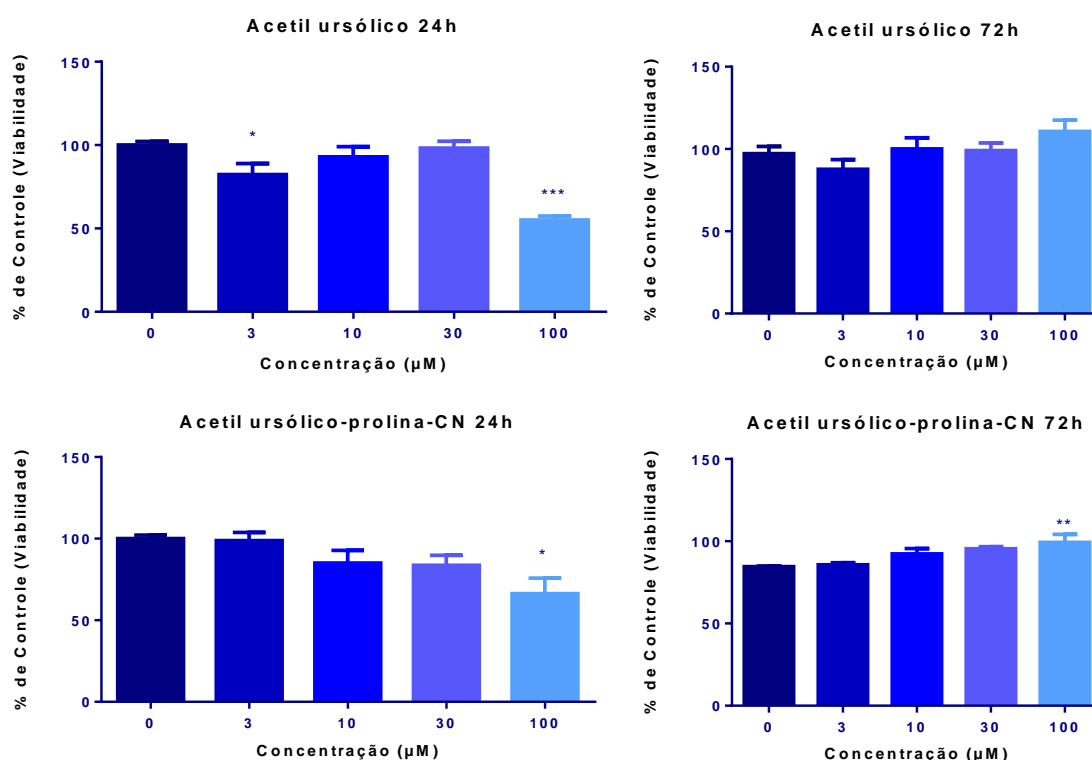


As diferenças foram comparadas por análise de variância seguida de teste *post hoc* de Tukey. \*\*\* p<0,001.

**Figura 90:** Efeito antitumoral do ácido ursólico (**2**) na viabilidade e na taxa de proliferação celular da linhagem de câncer colorretal HT-29.

A avaliação do potencial de inibição do ácido acetil ursólico (**26**) frente à célula HT-29 também foi realizada e, como pode ser observado na Figura 91, após 24 horas de ensaio, apenas a concentração mais alta causou um efeito significativo de inibição, com 44,92%. Após 72 horas, os resultados foram semelhantes aos encontrados para o ácido ursólico (**2**), ou seja, a maioria dos compostos inibiu menos que 10% das células, sendo a última concentração pró-carcinogênica.

O composto acetil ursólico-prolina-CN (**28**), após 24 horas, inibiu a linhagem de célula HT-29, sendo a última concentração responsável pelo maior efeito de inibição da viabilidade celular, de 33,75%. Após 72 horas, o composto **28** apresentou um pequeno efeito pró-carcinogênico em todas as concentrações testadas, com exceção da concentração de 3 µM (Figura 91).

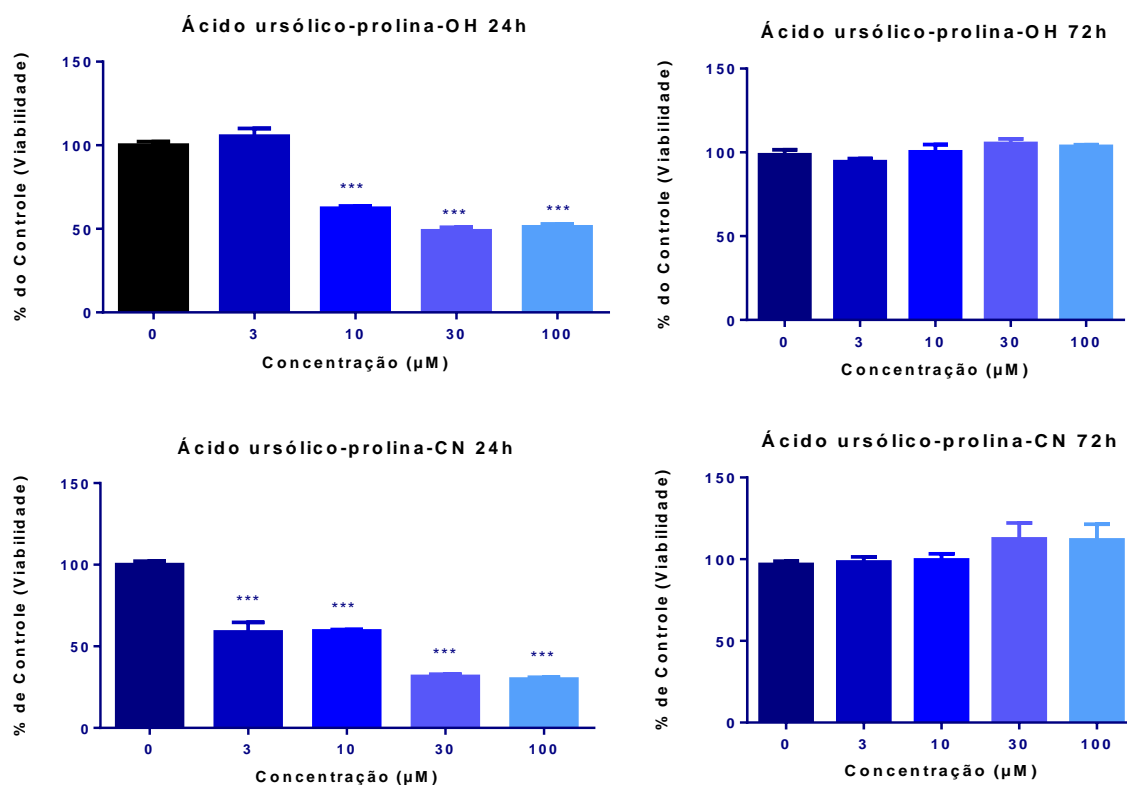


As diferenças foram comparadas por análise de variância seguida de teste *post hoc* de Tukey. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ .

**Figura 91:** Efeito antitumoral do ácido acetil ursólico (**26**) e acetil ursólico-prolina-CN (**28**) na viabilidade e na taxa de proliferação celular da linhagem de câncer colorretal HT-29.

Conforme Figura 92, o composto ácido ursólico-prolina-OH (**30**) inibe as células tumorais em quase 50% em todas as concentrações após 24 horas, com exceção da concentração mais baixa (3 µM). Este resultado varia após 72 horas onde, com exceção da concentração de 3 µM, todas as demais apresentaram um pequeno efeito pró-carcinogênico.

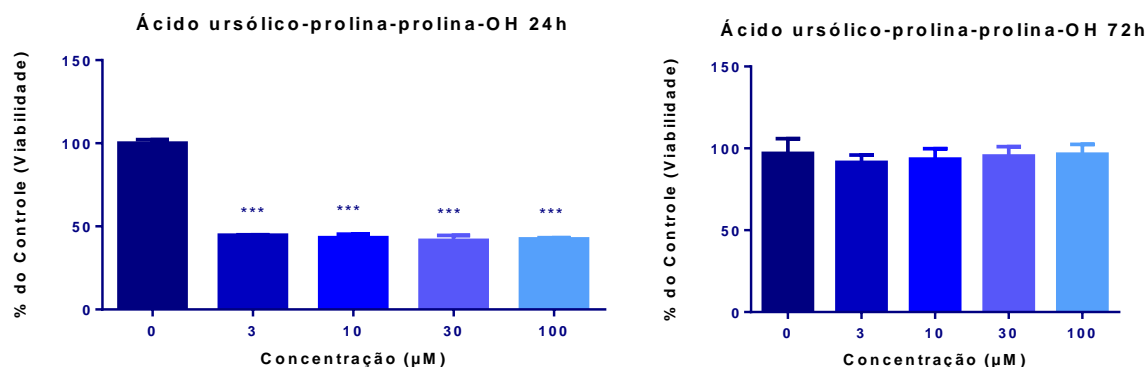
A atividade do ácido ursólico-prolina-CN (**31**) pode ser observada na Figura 92. Após 24 horas, o composto **31** foi eficiente, inibindo as células tumorais de 41,25% até 74,6%. Já após 72 horas, todas as concentrações testadas deste composto apresentaram um pequeno efeito pró-carcinogênico.



As diferenças foram comparadas por análise de variância seguida de teste *post hoc* de Tukey. \*\*\*  $p < 0,001$ .

**Figura 92:** Efeito antitumoral do ácido ursólico-prolina-OH (30) e ácido ursólico-prolina-CN (31) na viabilidade e na taxa de proliferação celular da linhagem de câncer colorretal HT-29.

Conforme Figura 93, o composto ácido ursólico-prolina-prolina-OH (32) inibe aproximadamente 56% do crescimento tumoral em todas as concentrações testadas após 24 horas. No tempo de 72 horas, apesar da inibição não passar de 12%, nenhuma concentração mostrou ser pró-carcinogênica, o que torna este novo derivado do ácido ursólico o composto mais interessante obtido neste trabalho do ponto de vista de potencial antitumoral, superando em termos de atividade anticancerígena inclusive o próprio ácido ursólico, o qual apresentou efeito pró-carcinogênico após 72 horas nas concentrações mais altas testadas.



As diferenças foram comparadas por análise de variância seguida de teste *post hoc* de Tukey. \*\*\* p<0,001.

**Figura 93:** Efeito antitumoral do ácido ursólico-prolina-prolina-OH (**32**) na viabilidade e na taxa de proliferação celular da linhagem de câncer colorretal HT-29.

Portanto, de uma maneira geral, os resultados obtidos nos testes antitumorais frente à linhagem de célula HT-29, mostraram-se relativamente bons após as primeiras 24 horas, com inibição superior a 70% em alguns casos. Já no tempo de 72 horas, apenas o composto ácido ursólico-prolina-prolina-OH (**32**) não mostrou ser pró-carcinogênico em nenhuma concentração testada e pode ser considerado um melhor antitumoral que o próprio ácido ursólico (**2**). Os resultados obtidos foram um pouco diferentes daqueles encontrados na literatura, porém isto se deve ao fato de que há poucos relatos de atividade antitumoral com compostos semelhantes a estes, com a mesma cultura de célula e o mesmo método de quantificação (MTT), o que pode influenciar nos resultados obtidos.<sup>53,54,147</sup>

## 6. CONCLUSÃO

Conforme os objetivos propostos para este trabalho de síntese de derivados do estigmasterol e do ácido ursólico, bem como a avaliação de suas atividades biológicas, pode-se concluir que:

- As reações de derivatização do estigmasterol (**1**) mediante esterificação e acoplamento com diversos aminoácidos foram efetivas, uma vez que em todos os casos os produtos desejados foram obtidos com rendimentos entre 20% e 99%.

- As reações de derivatização do ácido ursólico (**2**) mediante esterificação e acoplamento com o aminoácido prolina e derivados foram, da mesma forma, bem sucedidas, com rendimentos entre 20% e 95%.

- A avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* de alguns dos derivados do estigmasterol (**1**) e do ácido ursólico (**2**) mostrou que, com exceção do próprio ácido ursólico, todos os demais compostos apresentam baixa capacidade inibitória frente as mais diversas cepas de bactérias e fungos. Este resultado pode estar associado à baixa solubilidade que a maioria dos compostos apresenta no solvente utilizado no teste, o DMSO.

- O potencial de inibição dos compostos sintetizados frente à enzima prolil oligopeptidase (POP) mostrou que, de maneira geral, os derivados do estigmasterol apresentaram atividade inibitória aumentada após a introdução dos aminoácidos em sua estrutura, sendo os melhores inibidores o H-*L*-prolina-estigmasterol (**8**) e o N-4-N-Fmoc-amino-*L*-prolina-estigmasterol (**15**) com inibição de 62,83% e 67,79% e IC<sub>50</sub> de 164,8 µM e 75,66 µM, respectivamente. Já os derivados do ácido ursólico não apresentaram um aumento da capacidade de inibição da POP após a introdução dos aminoácidos em sua estrutura, sendo que o único derivado com atividade inibitória semelhante ao composto **2** (69,36% de inibição e IC<sub>50</sub> de 0,55 µM) foi o ácido acetil ursólico (**26**), com porcentagem de inibição de 67,03% e IC<sub>50</sub> de 97,78 µM. Entretanto, a maioria dos derivados do ácido ursólico apresentou porcentagem de inibição superior a 40%.

- Na análise do potencial de inibição frente à acetilcolinesterase (AChE) os resultados obtidos foram mais satisfatórios, com porcentagens de inibição superiores a 70% em alguns casos. Dentro deste contexto, dois derivados do estigmasterol e

um derivado do ácido ursólico destacam-se, o Boc-*L*-prolina-estigmasterol (**6**), o Boc-*L*-glutâmico(OBz)-estigmasterol (**24**) e o ácido ursólico-prolina-prolina-OH (**32**) com 76,30%, 78,38% e 76,63% de inibição e IC<sub>50</sub> de 99,0 µM, 97,49 µM e 98,33 µM, respectivamente. Os demais derivados do estigmasterol e do ácido ursólico também demonstram ser mais ativos que os próprios compostos de partida, com porcentagens de inibição entre 67% e 13%.

- Na atividade de inibição da butirilcolinesterase (BChE), apenas três compostos apresentaram valores superior a 40%, o N-4-N-amino-*L*-prolina-estigmasterol (**17**), o Boc-*L*-glutâmico(OBz)-estigmasterol (**24**) e o ácido ursólico-prolina-prolina-OH (**32**) com 40,64%, 43,48% e 66,42%, respectivamente, e IC<sub>50</sub> de 177,1 µM no último caso.

- O composto **32** apresentou eficiente capacidade inibitória tanto da enzima AChE quanto da BChE e, portanto, pode ser considerado um inibidor colinesterásico dual. A pesquisa por inibidores duais das colinesterases é de grande interesse, uma vez que estes inibidores podem proporcionar maior eficácia no tratamento de doenças, tal como a doença de Alzheimer.

- Na análise da atividade antitumoral frente à linhagem de célula HT-29 (colorretal) os resultados demonstram que, após as primeiras 24 horas, os derivados do ácido ursólico possuem um considerado efeito de inibição da viabilidade celular, com valores chegando a 70%. Após 72 horas, as porcentagens de proliferação celular foram reduzidas e alguns compostos, em determinadas concentrações, demonstraram efeito pró-carcinogênico. O único composto que após 72 horas não aumentou o número de células viáveis em nenhuma concentração testada foi o ácido ursólico-prolina-prolina-OH (**32**) e este pode ser considerado um candidato a fármaco antitumoral. Estes resultados indicam que a atividade antitumoral do ácido ursólico e seus derivados está mais relacionada a um mecanismo de apoptose (morte celular) do que a um efeito antiproliferativo.

- Analisando todos os resultados obtidos, conclui-se que a maioria dos derivados sintetizados contendo uma porção aminoácido aumentou o potencial de inibição enzimática, principalmente frente à POP e à AChE, e manteve ou melhorou a capacidade antitumoral dos derivados do ácido ursólico. Apenas na atividade antimicrobiana não ocorreu melhoria do potencial de inibição.

- Os resultados das atividades biológicas indicam à necessidade de que seja encontrada uma nova estratégia para a realização dos ensaios que favoreça a solubilidade dos compostos sintetizados. Uma possível estratégia a ser testada é a mudança do solvente dos testes, o DMSO, por solventes como o Tween 80. Outra estratégia que nosso grupo de pesquisa adotará para aumentar a solubilidade de alguns dos compostos obtidos é, quando possível, a sua transformação em sais (como sais de fosfato e sais de sódio) mais solúveis, o que tornará os resultados dos ensaios biológicos mais reprodutíveis.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. YUNES, R. A.; FILHO, V. C. Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. 2ª Ed., Itajaí, Santa Catarina: Editora Univali, 2009.
2. VIEGAS, C. Jr.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os Produtos Naturais e a química medicinal moderna. **Quim. Nova.** v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
3. COSTA, P. R. R. Produtos naturais como ponto de partida para a descoberta de novas substâncias bioativas: Candidatos a fármacos com ação antiofídica, anticâncer e antiparasitária. **Rev. Virtual Quím.**, v. 1, p. 58 – 66, 2009.
4. COSTA, D. A.; OLIVEIRA, G. A. L.; COSTA, J. P.; SOUZA, G. F.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Avaliação da Toxicidade Aguda e do Efeito Ansiolítico de um Derivado Sintético da Carvona. **Rev. Bras. de Ciências da Saúde.** v. 16, p.303-310, 2012.
5. GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados.** v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010.
6. KUREK, A.; NADKOWSKA, P.; PLISZKA, S.; WOLSKA, K. I. Modulation of antibiotic resistance in bacterial pathogens by oleanoic acid and ursolic acid. **Phytomedicine.** v. 19, p. 515-519, 2012.
7. TARRAGÓ, T.; FRUTOS, S.; RODRIGUEZ-MIAS, R. A.; GIRALT, E. Identification of F-19 NMR of tradicional chinese medicinal plants processing prolyl oligopeptidase inhibitory activity. **ChemBiochem**, v.2, p.827-833, 2006.
8. DECLERCK, Y. A.; MERCURIO, A. M.; STACK, M. S.; CHAPMAN, H. A.; ZUTTER, M. M.; MUSCHER, R. J.; RAZ, A.; MATRISIAN, L. M.; SLOANE, B. F.; NOEL, A.; HENDRIX, M. J.; COUSSENS, L.; PADARATHSINGH, M. Proteases, Extracellular Matrix, and cancer. **Am. J. Pathol.**, v. 164, n. 4, 2004.
9. SAUVAÎTRE, T.; BARLIER, M.; HERLEM, D.; GUENARD, D.; GUILLOU, C. New Potent Acetylcholinesterase Inhibitors in the Tetracyclic Triterpene Series. **J. Med. Chem.** v. 50, p. 5311-5323, 2007.
10. LIU, J. Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. **J. Ethnopharmacol.** v. 100, p. 92–94, 2005.



11. KAUR, N.; CHAUDHARY, J.; JAIN, A.; KISHORE, L. Stigmasterol: a comprehensive review. **Int. J. Pharm. Sci. Res.** v. 2, n. 9, p. 2259-2265, 2011.
12. OLIVEIRA, B. H.; BUENO, D. D. Biotransformação de esteróis. **Quím. Nova**, v. 19, n. 3, p. 233-236, 1996.
13. BRADFORD, P. G.; AWAD, A. B. Phytosterols as anticancer compounds. **Mol. Nutr. Food Res.** v. 51, p. 161-170, 2007.
14. HARTMANN, M. A. Plant sterols and the membrane environment. **Trends Plant Sci. Rev.** v. 3, n. 5, p. 170-175, 1998.
15. VIDA, N.; SVOBODOVÁ, H.; RÁROVÁ, L.; DRASAR, P.; SAMAN, D.; CVACKA, J.; WIMMER, Z. Polyamine conjugates of stigmasterol. **Steroids**. v. 77, p. 1212-1218, 2012.
16. VALITOVA, J. N.; MINIBAYEVA, F. V.; KOTLOVA, E. R.; NOVIKOV, A. V.; SHAVARDA, A. L.; MURTANIZA, L. I.; RYZHKINA, I. S. Effects of sterol-binding agent nystatin on wheat roots: The changes in membrane permeability, sterols and glycoceramides. **Phytochemistry**. v. 72, p. 1751-1759, 2011.
17. HAC-WYDRO, K.; WYDRO, P.; JAGODA, A.; KAPUSTA, J. The study on the interaction between phytosterols and phospholipids in model membranes. **Chem. Phys. Lipids**. v. 150, p. 22-34, 2007.
18. MOSS, G. P.; Nomenclature of steroids (Recommendation 1989). **IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature**. v. 61, n. 10, p. 1783-1822, 1989.
19. FORGO, P.; KÖVER, K. E. Gradient enhanced selective experiments in the  $^1\text{H}$  NMR chemical shift assignment of the skeleton and side-chain resonances of stigmasterol, a phytosterol derivative. **Steroids**. v. 69, p. 43-50, 2004.
20. BATTA, A. K.; XU, G.; HANDA, A.; MIYAZAKI, Y.; SALEN, G. Stigmasterol reduces plasma cholesterol levels and inhibits hepatic synthesis and intestinal absorption in the rat. **Metab. Clin. Exp.** v. 55, p. 292-299, 2006.
21. BARTOLOMEAZZI, R.; CORDARO, F.; PIZZALE, L.; CONTE, L. S. Presence of Phytosterol Oxides in Crude Vegetable Oils and Their Fate during Refining. **J. Agric. Food Chem.** v. 51, p. 2394-2401, 2003.

22. GITZEL F., A. Atividade Biológica de Metabólitos Secundários de *Buddleja brasiliensis* e *Artemisia verlotorum*. Dissertação de Mestrado em Farmacologia - Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2011.
23. ÁVILA, J. M. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades antimicrobiana, de inibição enzimática e antitumoral de *Erythrina crista-galli* nativa do RS. Dissertação de Mestrado em Química - Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2013.
24. DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L. C. A.; NASCIMENTO, J. C.; VIEIRA, J. J.; SANTOS, M. A. Isolamento e avaliação da atividade nematicida de constituintes químicos de *Mucuna cinerea* contra *Meloidogyne incognita* e *Heterodera glycines*. **Quím. Nova**. v. 26, n. 3, p. 335-339, 2003.
25. CHATURVEDULA, V. S. P.; PRAKASH, I. Isolation of Stigmasterol and  $\beta$ -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. **Int. Curr. Pharm. J.** v. 1, n. 9, p. 239-242, 2012.
26. ISAH, Y.; NDUKWE, I. G.; AMUPITAN, J. O. Isolation of Stigmasterol from Aerial Plant Part of *Spilanthes Acmella Murr*. **World J. Life Sci. Med. Res.** v. 2, n. 2, p. 77-81, 2012.
27. JAMAL, A. K.; YAACOB, W. A.; LAILY, B. D. A Chemical Study on *Phyllanthus Columnaris*. **Eur. J. Sci. Res.** v. 28, n. 1, p. 76-81, 2009.
28. PANDA, S.; JAFRI, M.; KARK, A.; MEHETA, B. K. Thyroid inhibitory, antiperoxidative and hypoglycemic effects of stigmasterol isolated from *Butea monosperma*. **Fitoterapia**. v. 80, p. 123-126, 2009.
29. GHOSH, T.; MAITY, T. K.; SINGH, J. Evaluation of antitumor activity of stigmasterol, a constituent isolated from *Bacopa monnieri* Linn aerial parts against Ehrlich Ascites Carcinoma in mice. **Orient Pharm. Exp. Med.** v. 11, p. 41-49, 2011.
30. GABAY, O.; SANCHEZ, C.; SALVAT, C.; CHEVY, F.; BRETON, M.; NOURISSAT, G.; WOLF, C.; JACQUES, C.; BERENBAUM, F. Stigmasterol: a phytosterol with potential anti-osteoarthritic properties. **Osteoarthr. Cartil.** v. 18, p. 106-116, 2010.
31. MORIARTY, R. M.; ENACHE, L. A.; KINNEY, W. A.; ALLEN, C. S.; CANARY, J. W.; TULADHAR, S. M.; GUO, L. Stereoselective synthesis of squalamine dessulfate. **Tetrahedron Lett.** v. 16, p. 5139-5142, 1995.

32. MISHARIN, A. Y.; MEHTIEV, A. R.; MOROZEVICH, G. E.; TKACHEV, Y. V.; TIMOFEEV, V. P. Synthesis and cytotoxicity evaluation of 22,23-oxygenated stigmastane derivatives. **Bioorg. Med. Chem.** v. 16, p. 1460-1473, 2008.
33. MEDINA, P.; PAILLASSE, M. R.; PAYRÉ, B.; SILVENTE-POIROT, S.; POIROT, M. Synthesis of New Alkylaminooxysterols with Potent Cell Differentiating Activities: Identification of Leads for the Treatment of Cancer and Neurodegenerative Diseases. **J. Med. Chem.** v. 52, p. 7765-777, 2009.
34. GIGANTE, F.; KAISER, M.; BRUN, R.; GILBERT, I. H. SAR studies on azasterols as potencial anti-trypanosomal and anti-leishmanial agents. **Bioorg. Med. Chem.** v. 17, p. 5950-5961, 2009.
35. O'CALLAGHAN, Y. C.; FOLEY, D. A.; O'CONNELL, N. M.; MCCARTHY, F. O.; MAGUIRE, A. R.; O'BRIEN, N. M. Cytotoxic and Apoptotic Effects of the Oxidized Derivatives of Stigmasterol in the U937 Human Monocytic Cell Line. **J. Agric. Food Chem.** v. 58, p. 10793-10798, 2010.
36. SVOBODOVÁ, H.; NONAPPA; WIMMER, Z.; KOLEHMAINEN, E. Design, synthesis and stimuli responsive gelation of novel stigmasterol–amino acid conjugates. **J. Colloid Interface Sci.** v. 361, p. 587–593, 2011.
37. VECHIA, L. D.; GNOATTO, S. C. B.; GOSMANN, G. Derivados Oleanos e Ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. **Quím. Nova.** v. 32, n. 5, p. 1245-1252, 2009.
38. LEAL, A. S.; WANG, R.; SALVADOR, J. A. R.; JING, Y. Synthesis of novel ursolic acid heterocyclic derivatives with improved ability of antiproliferation and induction of p53, p21<sup>waf1</sup> and NOXA in pancreatic cancer cells. **Bioorg. Med. Chem.** v. 20, p. 5774-5786, 2012.
39. WOLSKA, K. I.; GRUDNIAK, A. M.; FIECEK, B.; KRACZKIEWICZ-DOWJAT, A.; KUREK, A. Antibacterial activity of oleanolic and ursolic acids and their derivatives. **Cent. Eur. J. Biol.** v. 5, n. 5, p. 543-553, 2010.
40. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento, 6 ed., UFSC, 2007.
41. VENUGOPAL, R.; LIU, R. H. Phytochemicals in diets for breast cancer prevention: The importance of resveratrol and ursolic acid. **Food Sci. Human Wellness.** v. 1, p. 1-13, 2012.

42. GNOATTO, S. C. B.; DASSONVILLE-KLIMPT, A.; NASCIMENTO, S.; GALÉRA, P.; BOUMEDIENE, K.; GOSMANN, G.; SONNET, P.; MOSLEMI, S. Evaluation of ursolic acid isolated from *Ilex paraguariensis* and derivatives on aromatase inhibition. **Eur. J. Med. Chem.** v. 43, p. 1865-1877, 2008.
43. MAZUMDER, K.; TANAKA, K.; FUKASE, K. Cytotoxic Activity of Ursolic Acid Derivatives Obtained by Isolation and Oxidative Derivatization. **Molecules.** v. 18, p. 8929-8944, 2013.
44. MOGHADDAM, F. M.; FARIMANI, M. M.; SALAHVARZI, S.; AMIN, G. Chemical Constituents of Dichloromethane Extract of Cultivated *Satureja khuzistanica*. **eCAM.** v. 4, p. 95-98, 2007.
45. ÖZTÜRK, M.; KOLAK, U.; TOPÇU, G.; ÖKSÜZ, S.; CHOUDHARY, M. I. Antioxidant and anticholinesterase active constituents from *Micromeria cilicica* by radical-scavenging activity-guided fractionation. **Food Chem.** v. 126, p. 31-38, 2011.
46. YANG, C.; LI, Y.; LIU, X.; JIANG, S. Determination of free isomeric oleanolic acid and ursolic acid in *Pterocephalus hookeri* by capillary zone electrophoresis. **J. Pharm. Biomed. Anal.** v. 43, p. 1331-1334, 2007.
47. SILVA, M G. V.; VIEIRA, I. G. P.; MENDES, F. N. P.; ALBUQUERQUE, I. L.; SANTOS, R. N.; SILVA, F. O.; MORAIS, S. M. Variation of Ursolic Acid Content in Eight *Ocimum* Species from Northeastern Brazil. **Molecules.** v. 13, p. 2482-2487, 2008.
48. BAI, K.; YU, Z.; CHEN, F.; LI, F.; LI, W.; GUO, Y. Synthesis and evaluation of ursolic acid derivatives as potent cytotoxic agents. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 22, p. 2488-2493, 2012.
49. KWON, T. H.; LEE, B.; CHUNG, S. H.; KIM, D.; LEE, Y. S. Synthesis and NO Production Inhibitory Activities of Ursolic Acid and Oleanolic Acid Derivatives. **Bull. Korean Chem. Soc.** v. 30, n. 1, p. 119-123, 2009.
50. KASHIWADA, Y.; NAGAO, T.; HASHIMOTO, A.; IKESHIRO, Y.; OKABE, H.; COSENTINO, L. M.; LEE, K. Anti-AIDS Agents 38. Anti-HIV Activity of 3-O-Acyl Ursolic Acid Derivatives. **J. Nat. Prod.** v. 63, p. 1619-1622, 2000.
51. TAPONDJOU, L. A.; LONTSI, D.; SONDEGAM, B. L.; CHOI, J.; LEE, K.; JUNG, H.; PARK, H. In Vivo Anti-Nociceptive and Anti-Inflammatory Effect of the Two Triterpenes, Ursolic Acid and 23-Hydroxyursolic Acid, from *Cussonia bancoensis*. **Arch. Pharm. Res.** v. 26, n. 2, p. 143-146, 2003.

52. SHAO, J.; DAI, Y.; XUE, J.; WANG, J.; LIN, F.; GUO, Y. *In vitro* and *in vivo* anticancer activity evaluation of ursolic acid derivatives. **Eur. J. Med. Chem.** v. 46, p. 2652-2661, 2011.
53. CHIANG, Y.; CHANG, J.; KUO, C.; CHANG, C.; KUO, Y. Cytotoxic triterpenes from the aerial roots of *Ficus microcarpa*. **Phytochemistry**. v. 66, p. 495–50, 2005.
54. LIMAMI, Y.; PINON, A.; LEGER, D. Y.; MOUSSEAU, Y.; COOK-MOREAU, J.; BENEYTOU, J.; DELAGE, C.; LIAGRE, B.; SIMON, A. HT-29 colorectal cancer cells undergoing apoptosis overexpress COX-2 to delay ursolic acid-induced cell death. **Biochimie**. v. 93, p. 749 - 757, 2011.
55. MENG, Y.; SONG, Y.; YAN, Z.; XIA, Y. Synthesis and *in vitro* Cytotoxicity of Novel Ursolic Acid Derivatives. **Molecules**. v. 15, p. 4033-4040, 2010.
56. LIU, M.; YANG, S.; JIN, L.; HU, D.; XUE, W.; SONG, B.; YANG, S. Synthesis and cytotoxicity of novel ursolic acid derivatives containing an acyl piperazina moiety. **Eur. J. Med. Chem.** v. 58, p. 128-135, 2012.
57. RACHID, S.; DAR, B. A.; MAJEED, R.; HAMID, A.; BHAT, B. A. Synthesis and biological evaluation of ursolic acid-triazolyl derivatives as potential anti-cancer agents. **Eur. J. Med. Chem.** v. 66, p. 238-245, 2013.
58. GARCÍA-HORSMAN, J. A.; MÄNNISTÖ, P.T.; VENÄLÄINEN, J. I. On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease. **Neuropeptides**. v. 41, p. 1–24, 2007.
59. JALKANEN, A. J.; PIEPPONEN, T. P.; HAKKARAINEN, J. J.; MEESTER, I.; LAMBEIR, A.; FORSBERG, M. M. The effect of prolyl oligopeptidase inhibition on extracellular acetylcholine and dopamine levels in the rat striatum. **Neurochem. Int.** v. 60, p. 301–309, 2012.
60. POLGÁR, L. The prolyl oligopeptidase family. **Cell. Mol. Life Sci.** v. 59, p. 349–362, 2002.
61. FÜLÖP, V.; SZELTNER, Z.; RENNER, V.; POLGÁR, L. Structures of Prolyl Oligopeptidase Substrate/Inhibitor Complexes. **J. Biol. Chem.** v. 276, n. 2, p. 1262-1266, 2001.
62. MAES M.; GOOSSENS F.; SCHARPE S.; CALABRESE J.; DESNYDER R.; MELTZER H. Y. Alteration in Plasma Prolyl Endopeptidase Activity in Depression, Mania, and Schizophrenia: Effects of Antidepressants, Mood Stabilizers and Antipsychotic Drugs. **Psychiatry Res.** v. 58, p. 217-225, 1995.

63. JALKANEN, A. The Potential of Prolyl Oligopeptidase as a Drug Target. Dissertation in Health Sciences - University of Eastern Finland, Kuopio, 2012.
64. ROSENBLUM, J. S.; KOZARICH, J. W. Prolylpeptidases: a Serine Protease sub Family with High Potential for Drug Discovery. **Curr. Opin. Chem. Biol.** v. 7, p. 496-504, 2003.
65. MAES M.; MONTELEONE P.; BENCIVENGA R.; GOOSSENS F.; MAJ, M.; VAN WES D.; BOSMANSF, E.; SCHARPEE, S. Lower Serum Activity of Prolyl Oligopeptidase in Anorexia and Bulimia Nervosa. **Psychoneuroendocrinology**, v. 26, n. 1, p. 17-26, 2001.
66. HAFFNER, C. D.; DIAZ, C. J.; MILLER, A. B.; REID, R. A.; MADAUSS, K. P.; HASSELL, A.; HANLON, M. H.; PORTER, D. J. T.; BECHERER, J. D.; CARTER, L. H. Pyrrolidinyl pyridone and pyrazinone analogues as potent inhibitors of prolyl oligopeptidase (POP). **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 18, p. 4360–4363, 2008.
67. SHINODA, M.; TOIDE, K.; OHSAWA, I.; KOHSAKA, S. Specific Inhibitor for Prolyl Endopeptidase Suppresses the Generation of Amyloid Protein in NG108-15 Cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 235, n. 3, p. 641-645, 1997.
68. LAWANDI, J.; TOUMIEUX, S.; SEYER, V.; CAMPBELL, P.; THIELGES, S.; JUILLERAT-JEANNERET, L.; MOITESSIER, N. Constrained Peptidomimetics Reveal Detailed Geometric Requirements of Covalent Prolyl Oligopeptidase Inhibitors. **J. Med. Chem.** v. 52, p. 6672–6684, 2009.
69. BIRNEY, Y. A. The Purification And Characterisation Of A Z-Pro-Prolinal Insensitive Z-Glypro-Mca Degrading Peptidase From Bovine Serum. Tese da Escola Superior de Biotecnologia, Dublin City University, Irlanda, 2000.
70. TSUDA, M.; MURAOKA, Y.; NAGAI, M.; AOYAGI, T.; TAKEUCHI, T. Poststatin, a New Inhibitor of Prolyl Endopeptidase VIII. Endopeptidase Inhibitory Activity of Non-peptidyl Poststatin Analogues. **J. Antibiot.** v. 49, n. 10, p. 1022-1030, 1996.
71. TARRAGÓ, T.; KICHIK, N.; CLAASEN, B.; PRADES, R.; TEIXIDÓ, M.; GIRALTA, E. Baicalin, a Prodrug Able to Reach the CNS, is a Prolyl Oligopeptidase Inhibitor. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 16, p. 7516-7524, 2008.
72. MARQUES, M. R.; STÜKER, C.; KICHIK, N.; TARRAGÓ, T.; GIRALT, E.; MOREL, A.F.; DALCOL, I. I. Flavonoids with Prolyl Oligopeptidase Inhibitory Activity Isolated from *Scutellaria racemosa* Pers. **Fitoterapia**. v. 81, n. 6, p. 552–556, 2010.

73. FILHO, A.G.; MOREL, A.F.; ADOLPHO, L.; ILHA, V.; GIRALT, E.; TARRAGÓ, T.; DALCOL, I. I. Inhibitory Effect of Verbascoside Isolated from *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng on Prolyl Oligopeptidase Activity. **Phytother. Res.**, v. 26, p. 1472-1475, 2012.
74. ÇOKUĞRAŞ, A. N. Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance. **Turk. J. Biochem.** v. 28, p. 54-61, 2003.
75. RADIE, Z.; PICKERING, N. A.; VELLOM, D. C.; CAMP, S.; TAYLOR, P. Three Distinct Domains in the Cholinesterase Molecule Confer Selectivity for Acetyl- and Butyrylcholinesterase Inhibitors. **Biochem.** v. 32, p. 12074-12084, 1993.
76. CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, A. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. **Biochem. J.** v. 260, p. 625-634, 1989.
77. MAZZANTI, C. M.; SCHOSSLER, D. R.; FILAPPI, A.; PRESTES, D.; SILVA, A. C.; CORREA, M.; SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M.; LUNKES, G.; GONZAGA, W. A.; CECIM, M. Efeito do extrato da casca de *Syzygium cumini* sobre a atividade da acetilcolinesterase em ratos normais e diabéticos. **Ciência Rural.** v. 34, n.3, p.803-807, 2004.
78. ORHAN, I.; KARTAL, M.; NAZ, Q.; EJAZ, A.; YILMAZ, G.; KAN, Y.; KONUKLUGIL, B.; SENER, B.; CHOUDHARY, M. I. Antioxidant and anticholinesterase evaluation of selected Turkish *Salvia* species. **Food Chem.** v. 103, p. 1247–1254, 2007.
79. LANE, R. M.; POTKIN, S. G.; ENZ, A. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. **Int. J. Neuropsychopharmacol.** v. 9, p. 101–124, 2006.
80. HOUGHTON, P. J.; REN, Y.; HOWES, M. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. **Nat. Prod. Rep.** v. 23, p. 181–199, 2006.
81. Protein Data Bank (PDB). Disponível em: <http://www ww pdb.org/>. Acesso em 10 de dezembro de 2013.
82. PETRONILHO, E. C.; PINTO, A. C.; VILLAR, J. D. F. A Acetilcolinesterase: Alzheimer E Guerra Química. **Revista Militar de Artigos Ciência e Tecnologia.** p. 3–14, 3º trimestre, 2011.

83. GRAYBIEL, A. M.; RAGSDALE JR., C. W. Pseudocholinesterase staining in the primary visual pathway of the macaque monkey. **Nature**. v. 299, p. 439-442, 1982.
84. DARVESH, S.; HOPKINS, D. A.; GEULA, C. Neurobiology of Butyrylcholinesterase. **Nature Reviews**. v. 4, p. 131-138, 2003.
85. ELUFIOYE, T. O.; OBUOTOR, E. M.; SENNUGA, A. T.; AGBEDAHUNSI, J. M.; ADESANYA, S. A. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some selected Nigerian medicinal plants. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 20, p. 472-477, 2010.
86. JÚNIOR, C. V.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. B. Produtos Naturais como Candidatos a Fármacos Úteis no Tratamento do Mal de Alzheimer. **Quim. Nova**. v. 27, p. 655-660, 2004.
87. ORHAN, I. E.; BELHATTAB, R.; SENOL, F. S.; GÜLPINAR, A. R.; HOSBAS, S.; KARTAL, M. Profiling of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of *Artemisia absinthium*, *A. herba-alba*, *A. fragrans*, *Marrubium vulgare*, *M. astranicum*, *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* and essential oil analysis of two *Artemisia* species. **Ind. Crop. Prod.** v. 32, p. 566–571, 2010.
88. MOHAMED, T.; ZHAO, X.; HABIB, L. K.; YANG, J.; RAO, P. P. N. Design, synthesis and structure–activity relationship (SAR) studies of 2,4-disubstituted pyrimidine derivatives: Dual activity as cholinesterase and Ab-aggregation inhibitors. **Bioorg. Med. Chem.** v. 19, p. 2269–2281, 2011.
89. BARBOSA FILHO, J. M. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Rev. Bras. Farmacogn.** v.16, p. 158-285, 2006.
90. LIRA, A. F. Estudo da cinética de inibição anticolinesterásica por Dialquilfosforamidatos. Dissertação de Mestrado em Química - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 2010.
91. BROOKMEYER, R.; JOHNSON, E.; ZIEGLER-GRAHAM, K.; ARRIGHI, H. M. Forecasting the Global Burden of Alzheimer's Disease. *Alzheimers Dement.* 3, 186-191, 2007.
92. DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **Multiciências: contruindo a história dos produtos naturais**. v. 7, 2006.



93. GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância Terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quím. Nova**. v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.
94. TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.
95. HART, C. A.; KARIUKI, S. Antimicrobial resistance in developing countries. **BMJ**. v. 317, p. 647-650, 1998.
96. OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para Avaliação da Atividade Antimicrobiana e Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de Plantas Medicinais. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 18, 301-307, 2008.
97. MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Microbiologia Médica. 6ª Edição. Ed. Mosby Elsevier, 2009.
98. PANDA, S. K. Screening Methods in the Study of Antimicrobial Properties of Medicinal Plants. **Int. J. Biotechnol. Res.** v. 2, n. 1, p. 1-35, 2012.
99. SMITH, T. L.; PEARSON, M. L.; WILCOX, K. R.; CRUZ, C.; LANCASTER, M. V.; ROBINSON-DUNN, B.; TENOVER, F. C.; ZERVOS, M. J.; BAND, J. D.; WHITE, E.; JARVIS, W. R. Emergency of Vancomycin Resistance in *Staphylococcus Aureus*. **N. Eng. J. Med.** v. 340, n. 7, p. 493-501, 1999.
100. STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structure, synthesis and specific functions. **Mol. Microbiol.** v. 56, p. 845-857, 2005.
101. NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheogenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.
102. MACÊDO, D. P. C.; FARIAS, A. M. A.; NETO, R. G. L.; SILVA, V. K. A.; LEAL, A. F. G.; NEVES, R. P. Infecções Oportunistas por Leveduras e Perfil Enzimático dos Agentes Etiológicos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 42, n. 2, p. 188-191, 2009.
103. FERREIRO, L.; MOREIRA JR., J. P. R.; APPELT, C. E.; BERG, V.; OLIVEIRA, I. A.; MUSCHNER, A. C.; REISCHAK, D.; CHERMETTE, R. Associações entre o isolamento de *Candida albicans* com a infecção pelo vírus da leucemia felina (FELV), tratamentos com corticosteróides ou antimicrobianos em gatos. **Acta Sci. Vet.** v. 30, n. 3, p. 179-183, 2002.

104. SILVA, F. H. A.; PAÇO, F. R.; REIS, E.; AMARAL, V. *Saccharomyces cerevisiae* Infection – an unusual pathogen in the ICU. **Rev. Bras. Ter. Intensiva**. v. 23, n. 1, p. 108-111, 2011.
105. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>. Acesso em 12 de novembro de 2013.
106. GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. M.; AZEVEDO, G.; MENDONÇA, S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Rev. Bras. Cancerol.** v. 51, n. 3, p. 227-234, 2005.
107. FILHO, V. W.; MONCAU, J. E. Mortalidade por câncer no Brasil 1980-1995: Padrões regionais e tendências temporais. **Rev. Assoc. Med. Bras.** v. 48, n. 3, p. 250-257, 2002
108. ARAÚJO, A. P. S.; GALVÃO, D. C. A. Câncer Ósseo: enfoque sobre a biologia do câncer. **Rev. Saúde Pesq.**, v. 3, n. 3, p. 359-363, 2010.
109. BELIZÁRIO, J. E. O próximo desafio reverter o câncer. **Ciência Hoje**. v. 31, n. 184, p. 50-57, 2002.
110. COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Rev. Virtual Quim.** v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.
111. QIAO, L.; WONG B. Colon Cancer Experimental Therapy. In: SCHWAB, M. (Ed.) **Encyclopedia of Cancer**, 2009. Disponível em: <http://www.springerreference.com/docs/html/chapterdbid/178245.html>. Acesso em 14 de dezembro de 2013.
112. JOHNSON, J. J.; MUKHTAR, H. Curcumin for chemoprevention of colon cancer. **Cancer Lett.** v. 255, p. 170–181, 2005.
113. POTTER, J. D. Colorectal Cancer: Molecules and Populations. **J. Natl. Cancer Inst.** v. 91, n. 11, p. 916-932, 1999.
114. TONON, L. M.; SECOLI, S. R.; CAPONERO, R. Câncer Colorretal: uma Revisão da Abordagem Terapêutica com Bevacizumabe. **Rev. Bras. Cancerol.** v. 53, p.173-182, 2007.

115. TANG, Y. J.; YANG, J. S.; LIN, C. F.; SHYU, W. C.; TSUZUKI, M.; LU, C. C.; CHEN, Y. F.; LAI, K. C. Houttuynia Cordata Thunb Extract Induces Apoptosis Through Mitochondrial-Dependent Pathway In Ht-29 Human Colon Adenocarcinoma Cells. **Oncol. Rep.** v. 22, p. 1051-1056, 2009.
116. CINGI, M. R.; DE ANGELIST, I.; FORTUNATI, E.; REGGIANI, D.; BIANCHI, V.; TIOZZO, R.; ZUCCOT, F. Choice and Standardization Of Test Protocols In Cytotoxicology: A Multicentre Approach. **Toxicol. in Vitro.** v. 5, p. 119-125, 1991.
117. HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in Plants: the Link Between Phytochemistry and Medicine. **Phytochemistry.** v. 30, p. 3864 3874, 1991.
118. BETANCUR-GALVIS, L. A.; SAEZ,J.; GRANADOS,H.; SALAZAR, A.; OSSA, J. E. Antitumor and antiviral activity of colombian medicinal plant extracts. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 94, p.531-535, 1999.
119. QUENT, V. M.C.; LOESSNER, D.; FRIIS, T.; REICHERT, J. C.; HUTMACHER, D. W. Discrepancies Between Metabolic Activity and DNA Content as Tool to Assess Cell Proliferation in Cancer Research. **J. Cell Mol. Med.** v. 14, p. 1003-1013, 2010.
120. MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v.65, p.55-63, 1983.
121. YOUNG, F. M.; PHUNGTAMDET, W.; SANDERSON, B. J. S. Modification of MTT assay conditions to examine the cytotoxic effects of amitraz on the human lymphoblastoid cell line, WIL2NS. **Toxicol. in Vitro.** v. 19, p. 1051–1059, 2005.
122. HAMID, R.; ROTSHTEYN, Y.; RABADI, L.; PARIKH, R.; BULLOCK, P. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. **Toxicol. in Vitro.** v. 18, p. 703–710, 2004.
123. ZHAO, D.; XIONG, Y.; LEI, Q. Y.; GUAN, K. L. LDH-A Acetylation: implication in Cancer. **Oncotarget.** v. 4, p. 802-803, 2013.
124. PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. Purification of Laboratory Chemicals. 4<sup>th</sup> Edition. Ed. Pergamon Press, New York, 1996.
125. BODANSZKY, M. Peptide Chemistry: a practical textbook. 2<sup>nd</sup> Edition. Ed. Springer-Verlag, 1993.

126. FOLEY, D. A.; O'CALLAGHAN, Y.; O'BRIEN, N. M.; McCARTHY, F. O.; MAGUIRE, A. R; Synthesis and Characterization of Stigmasterol Oxidation Products. **J. Agric. Food Chem.** v. 58, p. 1165 – 1173, 2010.
127. Food and Drugs Administration (FDA): Code of Federal Regulations, Cap. 21, 300, 1991.
128. NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. Approved Standard, 5th Ed, NCCLS Document M7-A4, 2000.
129. HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial Activity of Essential Oils and Plants Extracts. **J. Appl. Food Microbiol.** v. 94, p. 223-253, 2004.
130. TOIDE, K.; IWAMOTO, Y.; FUJIWARA, T.; ABE, H. JTP-4819: a Novel Prolyl Endopeptidase Inhibitor with Potential as a Cognitive Enhancer. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 274, p. 1370-1378, 1995.
131. MOHAMED, T.; RAO, P. P. N. Design, synthesis and evaluation of 2,4-disubstituted pyrimidines as cholinesterase inhibitors. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 20, p. 3606–3609, 2010.
132. TRAINER, D. L.; KLINE, T.; MCCABE, F. L.; FAUCETTE, L. F.; FIELD, J.; CHAIKIN, M.; ANZANO, M.; RIEMAN, D.; HOFFSTEIN, S.; LI, D. J.; GENNARO, D.; BUSCARINO, C.; LYNCH, M.; POSTE, G.; GREIG, R. Biological Characterization and Oncogene Expression in Human Colorectal Carcinoma Cell Lines. **Int. J. Cancer.** v. 41, 287-296, 1988.
133. PERES, C. M.; CURI, R. Como Cultivar Células. Ed. Guanabara, Koogan, v. 1, p. 3-4, 2005.
134. FUKUI M, YAMABE N, ZHU B T. Resveratrol Attenuates the Anticancer Efficacy of Paclitaxel in Human Breast Cancer Cells *In Vitro* and *In Vivo*. **Eur. J. Cancer.** v. 46, n. 10, p. 1882–1891, 2010.
135. VALEUR, E.; BRADLEY, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. **Chem. Soc. Rev.** v. 38, p. 606–631, 2009.
136. ZHU, M.; CHA, C.; DENG, W.; SHI, X. A mild and efficient catalyst for the Beckmann rearrangement, BOP-Cl. **Tetrahedron Lett.** v. 47, p. 4861–4863, 2006.

137. WILLIAMS, P. L.; ALBERICIO, F.; GIRALT, E. Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins. Ed. CRC Press LLC, Barcelona, 1997.
138. VENÄLÄINEN, J. I.; JUVONEN, R. O.; FORSBERG, M. M.; HORSMAN, A. G.; POSSO, A.; WALLEN, E. A.; GYNTHNER, J.; MÄNNISTÖ, P. T. Substrate-dependent, non-hyperbolic kinetics of pig brain prolil oligopeptidase and its tight binding inhibitors by JTP-4819. **Biochem. Pharmacol.** v. 64, p. 463-471, 2002.
139. RAHMAN, A.; ZAREEN, S.; CHOUDHARY, M. I.; NGOUNOU, F. N.; YASIN, A.; PARVEZ, M. Terminalin A, a novel triterpenoid from *Terminalia glaucescens*. **Tetrahedron Lett.** v. 43, p. 6233–6236, 2002.
140. PARK, Y.; JANG, H.; PAIK, Y. Prolyl Endopeptidase Inhibitory Activity of Ursolic and Oleanolic Acids from Corni Fructus. **Agric. Chem. Biotechnol.** v. 48, n. 4, p. 207-212, 2005.
141. SOUZA, P. M. Atividade de inibição enzimática por espécies vegetais do bioma cerrado. Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde – Universidade de Brasília Faculdade de Ciências da Saúde, Brasília, 2011.
142. YOON, Y. N.; CHUNG, H. Y.; KIM, H. R.; CHOI, J. S. Acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitory activities of sterols and phlorotannins from *Ecklonia stolonifera*. **Fisheries sci.** v. 74, p. 200–207, 2008.
143. RICHMOND, V.; SANTOS, G. A. G.; MURRAY, A. P.; MAIER, M. S. Synthesis and acetylcholinesterase inhibitory activity of 2 $\beta$ ,3 $\alpha$ -disulfoxy-5 $\alpha$ -cholestan-6-one. **Steroids.** v. 76, p. 1160– 1165, 2011.
144. ÖZTÜRK, M.; KOLAK, U.; TOPCU, G.; OKSUZ, S.; CHOUDHARY, M. I. Antioxidant and anticholinesterase active constituents from *Micromeria cilicica* by radical-scavenging activity-guided fractionation. **Food Chem.** v. 126, p. 31–38, 2011.
145. BALLARD, C. G. Advances in the treatment of Alzheimer's disease: benefits of dual cholinesterase inhibition. **Eur. Neurol.** v. 47, p. 64–70, 2002.
146. SAKULNARMRAT, K.; FENECH, M.; THOMAS, P.; KONCZAK I. Cytoprotective and Pro-apoptotic Activities of Native Australian Herbs Polyphenolic-rich Extracts. **Food Chem.** v. 136, n. 1, p. 9-17, 2013.
147. REYES-ZURITA, F. J.; RUFINO-PALOMARES, E. E.; LUPIÁÑEZ, J. A.; CASCANTE, M. Maslinic acid, a natural triterpene from *Olea europaea* L., induces apoptosis in HT29 human colon-cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway. **Cancer Lett.** v. 273, p. 44–54, 2009.