

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Obtenção de derivados triterpênicos semissintéticos visando às
atividades antiparasitária e antifúngica**

ADRINE MARIA INNOCENTE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Obtenção de derivados triterpenos semissintéticos visando às
atividades antiparasitária e antifúngica**

Dissertação apresentada por
Adrine Maria Innocente para
obtenção do GRAU DE MESTRE
em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Profa. Dr. Simone Baggio Gnoatto

Co-orientador: Profa. Dr. Tiana Tasca

Porto Alegre, 2012

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 29.03.2012, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Ana Cristina Aramburu da Silva
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Ana Maria Bergold
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Claiton Leonetti Lencina
Universidade Federal de Pelotas

Innocente, Adrine Maria
Obtenção de derivados triterpênicos
semissintéticos visando às atividades antiparasitária
e antifúngica / Adrine Maria Innocente. -- 2012.
159 f.

Orientadora: Simone Baggio Gnoatto.
Coorientadora: Tiana Tasca.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2012.

1. Semissíntese a partir de produtos naturais. 2.
Elucidação estrutural de produtos semissintéticos. 3.
Atividades antifúngica e antiparasitária. I.
Gnoatto, Simone Baggio, orient. II. Tasca, Tiana,
coorient. III. Título.

Agradecimentos ao INCT-IF e NANOBIOTEC-Brasil, que financiaram recursos para o desenvolvimento deste trabalho. Ao Laboratório de Pesquisa em Parasitologia, Faculdade de Farmácia, UFRGS; ao Laboratório de Micologia Aplicada, Faculdade de Farmácia, UFRGS; à central de RMN da UFRGS e ao Instituto de Biociências do Departamento de Fisiologia da USP, que disponibilizaram todos equipamentos e materiais necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente dissertação.

Agradecimentos

À Professora Simone C. Baggio Gnoatto, pela orientação, apoio, ensinamentos e por me apresentar ao mundo da Química Medicinal de uma forma encantadora e essencial para o sucesso deste trabalho. Agradeço por todas as oportunidades e confiança, pelos bons momentos dentro e fora do laboratório.

À Professora Dr. Tiana Tasca pela co-orientação, pela atenção, pelos ensinamentos e discussões científicas sempre entusiasmantes e animadores. Agradeço, pelo exemplo de pesquisadora, que me anima e encoraja seguir esta carreira.

À Professora Dr. Grace Gosmann, pela confiança, apoio e ensinamentos, e por me apresentar também ao mundo da Síntese e Química Medicinal.

Ao Professor Dr. Alexandre Fuentefria, pelo apoio, oportunidade e atenção muito importantes para o sucesso deste trabalho.

Às técnica Joyce Spíndola (UFRGS) e Maristela Cabral da Silva Piedade pela colaboração nos espectros de RMN e Infravermelho.

Ao Professor Dr. Alex Flores (UFSM), pela atenção e colaboração nas análises dos espectros de RMN.

Ao Professor. Dr. Norberto Peporine Lopes (USP), pela colaboração nas análises de espectrometria de massas.

Aos meus familiares, pelo carinho e apoio incondicionais. Ao meu irmão, pelo companheirismo, atenção e carinho.

Ao Giovani pelo incentivo, carinho, pelas palavras animadoras de sempre e por me proporcionar todo o suporte emocional e familiar que é essencial em minha vida.

Às colegas do Laboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica, pela amizade, pelo carinho e todo apoio necessário para realização deste estudo.

Às colegas do Laboratório de Pesquisa em Parasitologia pelo apoio e momentos realizadores que passei, fruto de uma equipe de trabalho dedicada e indescritível.

À colega Glória pelos momentos descontraídos e ajuda sempre incondicional, pela cumplicidade e dedicação, pelo amparo em diversos momentos e pela preciosa amizade.

A todos os colegas e colaboradores que de alguma forma puderam contribuir para o sucesso e realização deste trabalho.

RESUMO

Triterpenos destacam-se na literatura por apresentar diversas atividades biológicas relacionadas. Neste contexto, a semissíntese a partir de produtos naturais é de grande importância, pois compostos provenientes de plantas podem ser estruturalmente modificados resultando em moléculas com melhores propriedades farmacológicas. As micoses cutâneas e mucocutâneas estão entre as doenças fúngicas superficiais e cutâneas mais comuns nos humanos. *Trichomonas vaginalis* é um protozoário parasito do trato urogenital humano, causador da tricomonose, uma doença sexualmente transmissível. A malária figura entre uma das dez doenças infecciosas mais predominantes no mundo, e é causada por parasitos do gênero *Plasmodium*. Os fármacos de escolha para tratamento destas doenças já possuem resistência relatada na literatura. Desta forma, a obtenção de novos derivados triterpênicos semissintéticos com vistas às atividades antifúngica e antiprotozoária foi realizada neste estudo. O planejamento racional resultou na obtenção de seis derivados semissintéticos a partir dos ácidos ursólico e betulínico, através de modificações nas posições C-3 e C-28 dos esqueletos triterpênicos. A atividade destes frente cepas causadoras de micoses cutânea e mucocutânea, bem como isolados de *T. vaginalis* e cepa de *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina, foi investigada. O composto piperazínico, derivado do ácido betulínico, demonstrou ser ativo resultando em concentração inibitória mínima para todas as espécies de fungos, *T. vaginalis* e atividade em concentração nanomolar contra *P. falciparum*. O mesmo composto, foi hemolítico e provocou 83% de liberação da enzima citosólica lactato desidrogenase láctica (LDH) de *T. vaginalis*. Estes resultados nos indicaram que o composto poderia estar agindo na membrana do parasito, rompendo-o e levando-o conseqüentemente à morte. Estudos de mecanismo de ação na homeostase do cálcio em *P. falciparum* foram realizados, demonstrando que o composto piperazínico derivado de ácido ursólico pode atuar interferindo na homeostase do cálcio intracelular parasitário.

Palavras-chave: Triterpenos, ácido ursólico, ácido betulínico, semissíntese, micoses cutâneas, micoses mucocutâneas, *T. vaginalis*, *P. falciparum*.

Obtainment of triterpene semisynthetic derivatives aiming antiprotozoal and antifungal activities

ABSTRACT

Triterpenes highlights in literature by presenting several biological activities reported. In this context, semisynthesis from natural products is relevant, since compounds obtained from plants can be structurally modified resulting in molecules with improved pharmacological properties. Cutaneous and mucocutaneous mycoses are among the most widespread and common superficial and cutaneous fungal infections in humans. *Trichomonas vaginalis* is a protozoan parasite of the human urogenital tract, causing trichomonosis, sexually transmitted disease. Malaria is one of the ten most prevalent infectious diseases worldwide, and is caused by *Plasmodium* parasites. The drugs of choice for treatment of these diseases have resistance report. Thus, the obtainment of new semisynthesized triterpene derivatives aiming antifungal and antiprotozoal activities were performed in this study. The rational design resulted in six derivatives from betulinic and ursolic acid, through changes at positions C-3 and C-28 of the triterpene skeleton. The activity against fungal strains that causing cutaneous and mucocutaneous mycoses, as well as isolates of *T. vaginalis* and strain of *P. falciparum* resistant to chloroquine were investigated. The piperazinic compound, betulinic acid derivative, has proved to be active, resulting in minimal inhibitory concentration for all fungi species, *T. vaginalis* and against *P. falciparum* presented activity at nanomolar concentrations. The same compound was hemolytic and caused 83% release of lactate cytosolic enzyme lactate dehydrogenase (LDH) from *T. vaginalis*. These results showed that the compound could be acting on parasite membrane, disrupting it and leading to death. Studies for mechanism of action on calcium homeostasis in *P. falciparum* were performed, showing that the piperazinic ursolic acid derivative can act interfering with the parasite intracellular calcium homeostasis.

Keywords: Triterpenes, ursolic acid, betulinic acid, semisynthesis, cutaneous mycoses, mucocutaneous mycoses, *T. vaginalis*, *P. falciparum*.

ÍNDICE DE FIGURAS

I. INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1. Estruturas do ácido ursólico (1) e ácido betulínico (2)	4
Figura 2. Fármacos antifúngicos pertencentes às classes das alilaminas e benzofuranos	5
Figura 3. Fármacos antifúngicos pertencentes às classes das equinocandinas	6
Figura 4. Fármacos antifúngicos pertencentes à classe dos azóis	8
Figura 5. Fármacos antifúngicos pertencentes às classes das hidroxipironas e morfolinás	9
Figura 6. Fármacos antifúngicos pertencentes às classes dos polienos e derivados halogenados da pirimidina	10
Figura 7. Fármacos antiprotozoários pertencentes à classe dos nitroimidazólicos	12
Figura 8. Fármacos antimaláricos pertencentes às classes diversas	15
Figura 9. Semissíntese do Paclitaxel, realizada por Holton e colaboradores.	18
Figura 10. Árvore de <i>P. acerifolia</i> , no destaque as cascas do caule.....	21

CAPÍTULO 1.

Scheme 1. Synthesis of ursolic acid derivatives and betulinic acid derivatives	42
Figure 1. Esteric vision of isosteres ursolic acid (1) and betulinic acid (2)	44

CAPÍTULO 2.

Figure 1. Structure of betulinic acid (1) and ursolic acid (2)	51
Scheme 1. Retrosynthesis of compound 7	55
Scheme 2. Retrosynthesis of compound 8	55
Figure 2. Anti- <i>T. vaginalis</i> activity (MIC) of semisynthesized derivatives.....	56
Figure 3. Anti- <i>T. vaginalis</i> activity of compound 7 (at MIC) against fresh clinical isolates.....	58
Figure 4. Kinetic growth curve of compound 7 (62.50 µM).....	59
Figure 5. LDH release from <i>T. vaginalis</i> trophozoites	60

CAPÍTULO 3.

Scheme 1. Synthesis of betulinic (1a) and ursolic (2a) acid derivatives	70
Scheme 2. Synthesis of coupled derivatives with <i>tert</i> -butyl-carbamate (1b-2b) and uncoupled derivatives (1c-2c).....	71
Figure 1. Drug concentration response curve of betulinic (1) and ursolic acid (2) and acetylated derivatives (1a and 2a).....	71

Figure 2. Drug concentration response curve of coupled (**1b** and **2b**) and uncoupled piperazinyl derivatives (**1c** and **2c**)..... 73

Figure 3. Modulation of *P. falciparum* calcium pathways is involved in the mechanism of action for compound **2c** 75

CAPÍTULO III

Figura 11. Biossíntese simplificada dos triterpenos 83

Figura 12. Espectro de infravermelho do ácido ursólico acetilado e do intermediário da reação de acoplamento 88

Figura 13. Representação das posições C-3 e C-28 na estrutura dos triterpenos pentacíclicos 91

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO GERAL	1
I. 1. Doenças Infecciosas.....	4
I.1.1. Micoses cutâneas e mucocutâneas.....	4
I.1.2 Tricomonose	11
I.1.3. Malária	13
I.2. Descoberta de fármacos através da semissíntese	17
I.3. Triterpenos naturais e semissintéticos.....	19
I.3.1. Ácido ursólico e ácido betulínico.....	19
I.4. Outros Triterpenos e atividade antiprotozoária	25
I.5. OBJETIVOS GERAIS	29
I.6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
II. ARTIGOS CIENTÍFICOS	31
II. I. CAPÍTULO 1. Adrine Innocente, Fernanda Klein, Aline Dalla Lana, Dariane Pereira, Mauro N. Muniz, Pascal Sonnet, Grace Gosmann, Alexandre M. Fuentefria, Simone C. B. Gnoatto. Hemisynthesis of Isosteric Triterpenoid Derivatives and Antifungal Activity.....	32
II. II. CAPÍTULO 2. Adrine Maria Innocente, Patrícia de Brum Vieira, Bruna Bento Casanova, Grace Gosmann, Simone Cristina Baggio Gnoatto, Tiana Tasca. Anti- <i>Trichomonas vaginalis</i> Activity From New Triterpenoids Derivatives.....	48
II. III. CAPÍTULO 3. Adrine Maria Innocente; Glória Narjara Santos da Silva, Laura Nogueira da Cruz, Miriam Santos de Moraes, Pascal Sonnet, Grace Gosmann, Célia Regina da Silva Garcia, Simone Cristina Baggio Gnoatto. Betulinic and ursolic acid: Obtainment, structural modifications, antimalarial activity, cytotoxicity and mechanism of action involved.....	67
III. DISCUSSÃO GERAL	81
IV. CONCLUSÕES GERAIS	101
V. PERSPECTIVAS	103
VI. REFERÊNCIAS	105
VII. ANEXOS	117
Anexo 1. Estruturas numeradas	118

I. INTRODUÇÃO GERAL

O uso de plantas para tratamento de diversas enfermidades vem sendo difundido através dos séculos. Há aproximadamente 200 anos isolou-se o primeiro composto ativo derivado de planta: a morfina, originado do ópio provindo de *Papaver somniferum* (HAMILTON *et al.*, 2000). Desde então, deu-se início a uma nova era onde substâncias originadas de plantas puderam ser purificadas, estudadas e administradas farmacologicamente (JESSE e VEDERAS, 2009).

Por volta dos anos 90, cerca de 80% dos fármacos comercializados eram derivados de produtos naturais ou análogos inspirados nos mesmos (JESSE e VEDERAS, 2009). Com o passar dos anos, este número alterou significativamente e recentemente Harvey (2008) demonstrou em um estudo de revisão de 2001 a 2008, que entre 100 fármacos em estudo clínico no período, apenas cerca de 30 representam derivados de produtos naturais.

Na literatura podemos encontrar uma ampla gama de fármacos obtidos a partir de produtos naturais (JESSE e VEDERAS, 2009; HARVEY, 2008) e que são utilizados para tratamento de variadas doenças como neuro-farmacológicas, cardiovasculares, oncológicas, inflamatórias, distúrbios metabólicos, hormonais e imunossupressores, porém poucos dados se encontram sobre o desenvolvimento de novos fármacos para doenças infecciosas, como micoses cutâneas e mucocutâneas, tricomonose e malária.

A importância da descoberta e busca por novos fármacos está baseada no fato de que muitos medicamentos utilizados no mercado para tratar diversas doenças infecciosas, e principalmente, as abordadas neste estudo, já enfrentam a resistência dos microrganismos, causando falha terapêutica, efeitos adversos indesejáveis, além de relatos de casos em que há toxicidade associada.

As micoses cutâneas e mucocutâneas, doenças causadas por fungos patogênicos, têm grande importância epidemiológica. A resistência a antifúngicos ainda está pouco esclarecida, principalmente quando o agente é considerado patogênico ao homem e emergente. Entretanto, devido ao escasso número de medicamentos utilizados para o tratamento e das evidências clínicas cada vez mais corriqueiras de resistência, a comunidade científica vem preocupando-se com os rumos que segue essa problemática de saúde pública (LASS-FLÖRL *et al.*, 2010)

A tricomonose, doença sexualmente transmissível (DST) não viral mais comum no mundo (WEINSTOCK *et al.* 2004), vem causando grande impacto na saúde global. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou uma prevalência anual de 174 milhões de casos novos de tricomonose no mundo em pessoas entre 15 e 49 anos, com a maioria (92%) ocorrendo em mulheres (WHO, 2001). O metronidazol, fármaco de escolha utilizado para o tratamento desta doença, já possui relatos de resistência e estima-se que 2,5 a 5% das infecções sejam causadas por isolados de *T. vaginalis* resistentes (SCHWEBKE *et al.*, 2006). O tratamento nestes casos é problemático, podendo necessitar de altas concentrações do fármaco, aumentando o risco de toxicidade (PETRIN *et al.*, 1998).

Outra parasitose onde a descoberta de fármacos a partir de produtos naturais foi um avanço para o tratamento é a malária, que se destaca por ser uma das mais sérias doenças infecciosas. São registrados anualmente no mundo 300 a 500 milhões de novos casos e mais de dois milhões de óbitos dentre estes. Segundo a OMS, de 2000 a 2009 foram registrados cerca de 43% de casos entre a população das Américas, sendo a maioria dos casos relatados no Brasil e Colômbia e, dentre estes, 50-60% somente no Brasil (WHO, 2011). O uso extensivo de cloroquina para o tratamento da malária levou ao aparecimento de casos de resistência no Brasil (ALECRIM *et al.*, 1999). Além disso, já se encontra também na literatura resistência à sulfadoxina-pirimetamina e à artemisinina (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2002).

Uma alternativa visando a melhorar o quadro descrito acima é a inserção de novos fármacos no mercado, mais ativos, que produzam menos efeitos adversos, com mais seletividade e de fácil obtenção. A semissíntese a partir de produtos naturais pode ter grande importância dentro deste contexto. Através desta, compostos ativos ou com moderada atividade biológica podem ser estruturalmente modificados resultando em compostos inovadores e com melhores propriedades farmacológicas (KENNEDY, 2008).

Dentro deste contexto a farmacomodulação, uma metodologia utilizada visando à obtenção de novos fármacos, pode ser de muita utilidade. Através deste método uma substância protótipo de estrutura química estabelecida tomada como origem conduz a preparação de análogos (GORDALIZA, 2007). Os principais objetivos desta ferramenta são estabelecer relações entre a estrutura e atividade

farmacológica dos compostos e obter fármacos melhores que os de origem. Para obtenção de derivados de produtos naturais, a farmacomodulação através de semissíntese vem proporcionando resultados muito satisfatórios no que diz respeito tanto à atividade farmacológica quanto às propriedades farmacocinéticas de variadas moléculas (ALTMAN *et al.*, 2011).

O uso de triterpenos para investigação de novos compostos semissintéticos pode ser uma alternativa valiosa, já que estes compostos encontram-se distribuídos em diversas fontes naturais (SCHENKEL *et al.*, 2003), facilitando o seu acesso e obtenção. Os triterpenos da espécie *Ilex paraguayensis*, já vêm sendo estudados por nosso grupo de pesquisa há algum tempo (GOSMANN *et al.*, 1995; GNOATTO *et al.*, 2005) e demonstraram ser muito promissores na busca por fármacos antimaláricos (GNOATTO *et al.*, 2008a).

Tendo em vista que as doenças parasitárias necessitam de uma atenção especial na procura por novos fármacos e que os antifúngicos utilizados no mercado já possuem relatos de resistência, este estudo poderá contribuir para uma nova abordagem na busca por compostos antifúngicos, bem como tricomonocidas e antimaláricos.

Esta dissertação descreve a obtenção, avaliação farmacológica e proposta de relação estrutura-atividade (REA) de novos derivados semissintéticos dos triterpenos ácido ursólico 1 e ácido betulínico 2. O planejamento racional baseou-se nos resultados prévios obtidos pelo grupo com derivados do ácido ursólico (descritos no item 1.3). Considerando a semelhança estrutural e de parâmetros físico-químicos entre 1 e 2 objetivamos neste trabalho a substituição isostérica do esqueleto ursano pelo esqueleto lupano visando a avaliar o impacto desta alteração na atividade biológica dos derivados obtidos. Foram avaliadas as atividades antifúngica, anti-*Trichomonas vaginalis* e antimalárica.

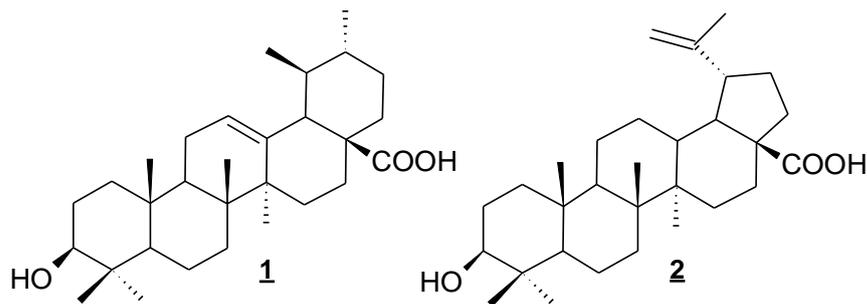


Figura 1. Estruturas do ácido ursólico (1) e ácido betulínico (2)

I.1. Doenças Infecciosas

I.1.1. Micoses cutâneas e mucocutâneas

As dermatofitoses são micoses cutâneas causadas por fungos dermatófitos, também chamados queratinofílicos. Podem se localizar na pele e seus anexos (cabelos e unhas) e ser provocadas por fungos dos gêneros *Trycophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporum* (MEZZARI, 1998). Muita atenção tem sido destinada ao uso de antifúngicos para tratar dermatofitoses, visto que a terapia pode incluir formulações tópicas, orais ou ambas em associações, levando ao aparecimento de efeitos adversos indesejáveis, bem como tratamentos prolongados e doses medicamentosas relativamente altas (GUPTA e COOPER, 2008).

Por outro lado, as leveduras do gênero *Candida* spp. estão entre as maiores causas de micoses em pacientes imunodeprimidos, portadores de HIV (do inglês *Human Immunodeficiency Virus*), indivíduos transplantados e que fazem uso de medicação imunossupresora (NADAGIR *et al.*, 2008). O desenvolvimento desta levedura em micoses se deve ao fato de diversificados fatores de virulência na colonização de mucosas como do trato gastrointestinal, oral e epitélio vaginal. A virulência de *Candida* spp. é atribuída à sua capacidade de formar biofilmes, alternar formas morfológicas e produzir respostas em função das condições ambientais onde se encontra (COLEMAN *et al.*, 2010). Mais de 90% dos pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana sofrem de candidíase mucocutânea (OLLERT *et al.*, 1995).

O arsenal terapêutico disponível para tratamento pode ser dividido em dez classes de fármacos: as alilaminas, benzofuranos, equinocandinas, hidroxipiridinonas, imidazóis, morfolinás, polienos, pirimidinas, tiocarbamatos e triazóis. O alvo da maioria destes fármacos é a biossíntese de ergosterol. Outros alvos estão diretamente relacionados com a membrana celular, a síntese de aminoácidos e da parede celular.

Terbinafina (figura 2) é um fármaco da classe das alilaminas que age sobre uma vasta gama de dermatófitos, mas apresenta fraca atividade sobre leveduras. Atua sobre a biossíntese do ergosterol fúngico por específica e seletiva inibição da enzima esqualeno epoxidase. Isso leva à acumulação intracelular de esqualeno e impede a síntese de lanosterol (BORELLI *et al.*, 2008).

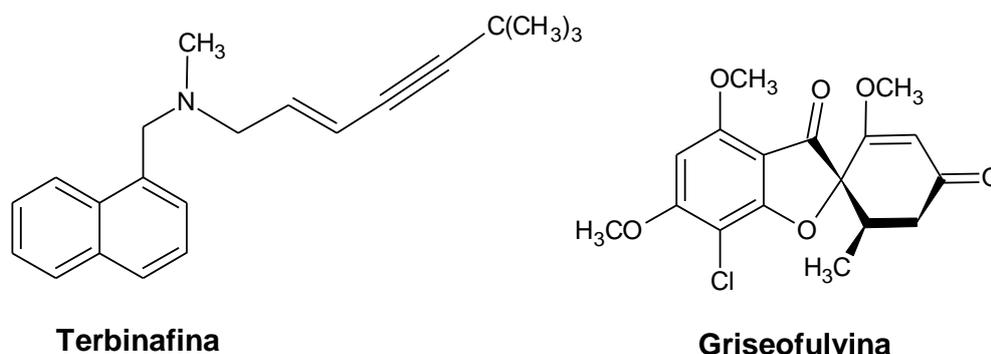


Figura 2. Fármacos antifúngicos pertencentes às classes das alilaminas e benzofuranos.

Griseofulvina (figura 2) pertence à classe dos benzofuranos e é um dos mais antigos antifúngicos sistêmicos sendo utilizado desde 1959; porém sua atividade é limitada a dermatófitos. Griseofulvina é sintetizado por *Penicillium griseofulvum* e outras espécies de *Penicillium*. Interage com a microtubulina e inibe a mitose da célula fúngica, porém as taxas de cura para onicomicoses são de apenas 40% (GAUWERKY *et al.*, 2009).

As equinocandinas (figura 3), que incluem a caspofungina, micafungina e anidulafungina, são novos antifúngicos introduzidos no mercado há 10 anos. Atuam interrompendo a biossíntese da parede celular fúngica por inibir a síntese de 1,3-β-D-glicano (BUTLER, 2005; SPITZER *et al.*, 2011).

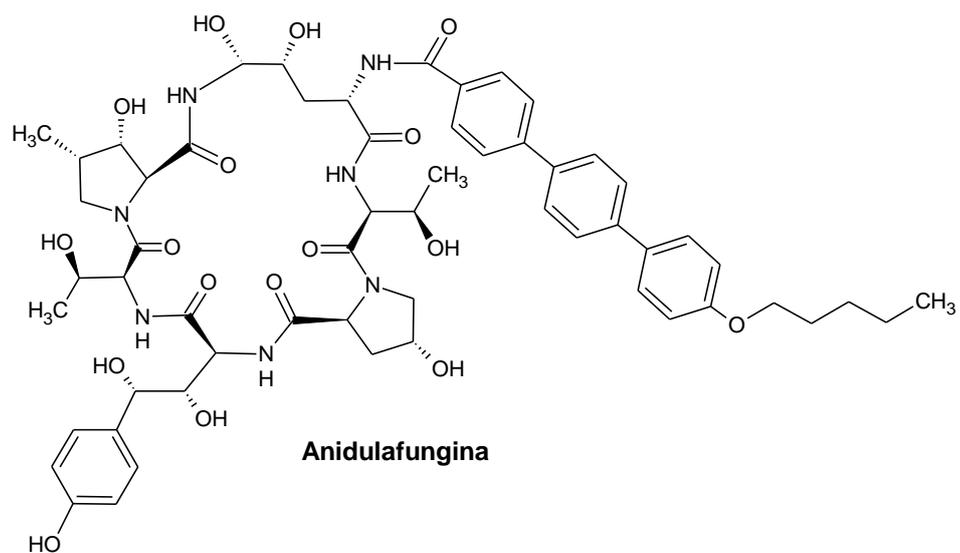
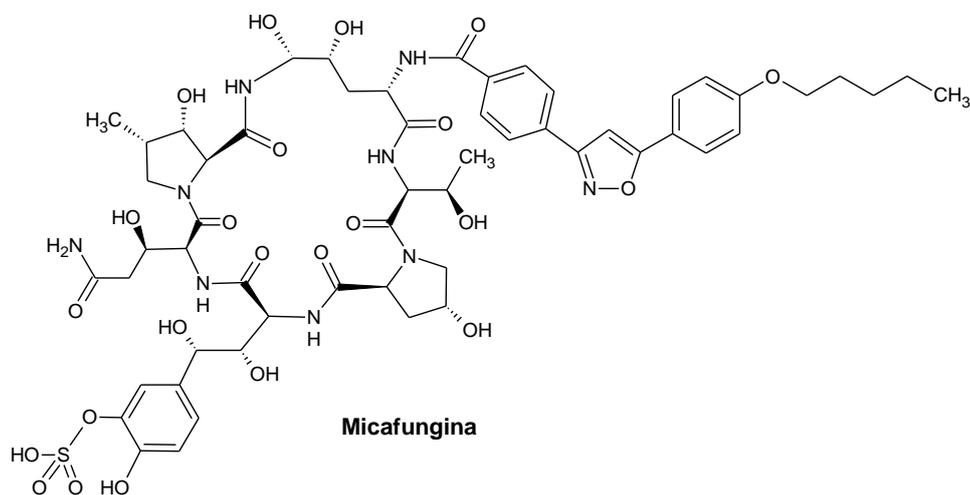
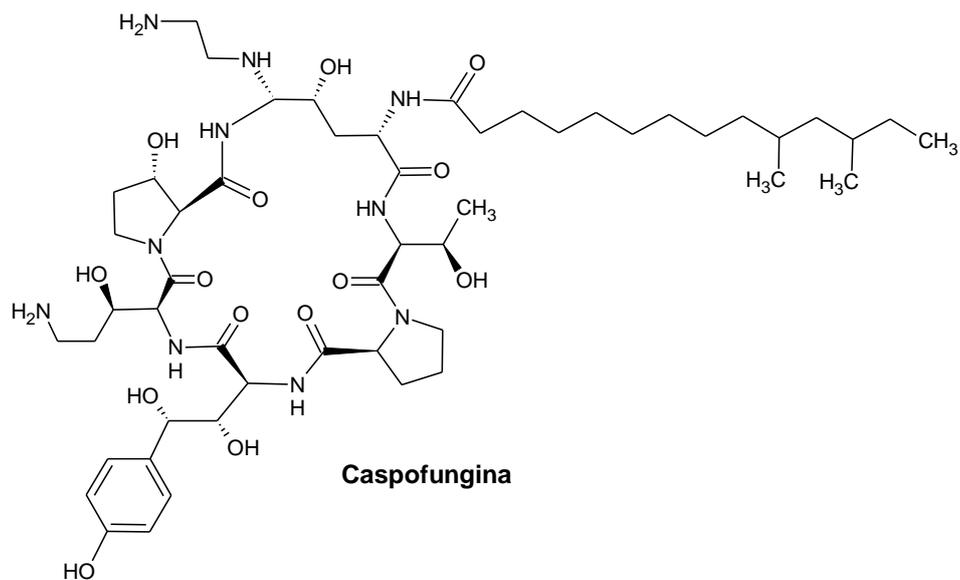


Figura 3. Fármacos antifúngicos pertencentes à classe das equinocandinas.

Os fármacos azóis (figura 4) foram introduzidos no mercado há 40 anos e são muito utilizados na terapia para micoses cutâneas e mucocutâneas (SPITZER *et al.*, 2011). São compostos com anéis de cinco membros, que contém dois (imidazóis) ou três (triazóis) átomos de nitrogênio. Os principais representantes da classe dos imidazóis são clotrimazol, miconazol e cetoconazol. Como exemplos de triazóis podemos citar itraconazol, fluconazol e voriconazol. O mecanismo de ação está ligado à inibição de uma desmetilase do complexo citocromo P-450 responsável pela conversão de lanosterol a ergosterol, levando à depleção do mesmo e consequente ruptura da membrana celular fúngica (BUTLER, 2005; SPITZER *et al.*, 2011). Uma desvantagem do uso destes antifúngicos é a reatividade cruzada com as enzimas CIP-450 humanas, que pode resultar em toxicidade, além da possibilidade de resistência associada (CANNON *et al.*, 2009).

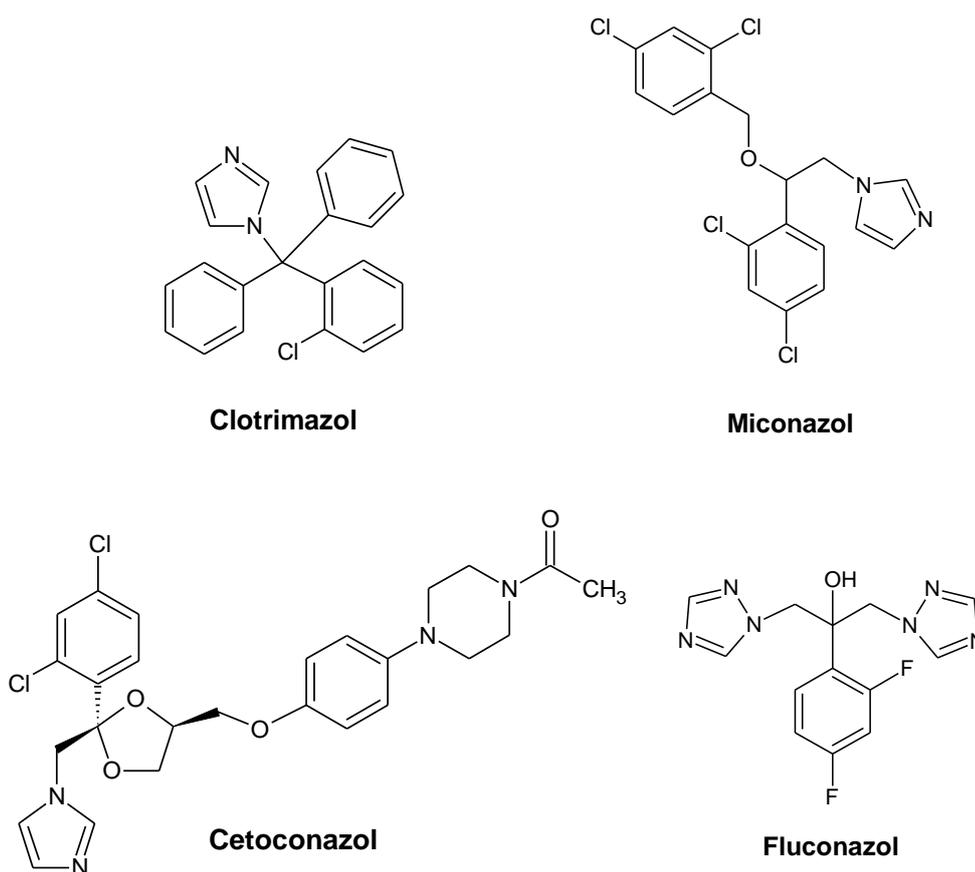
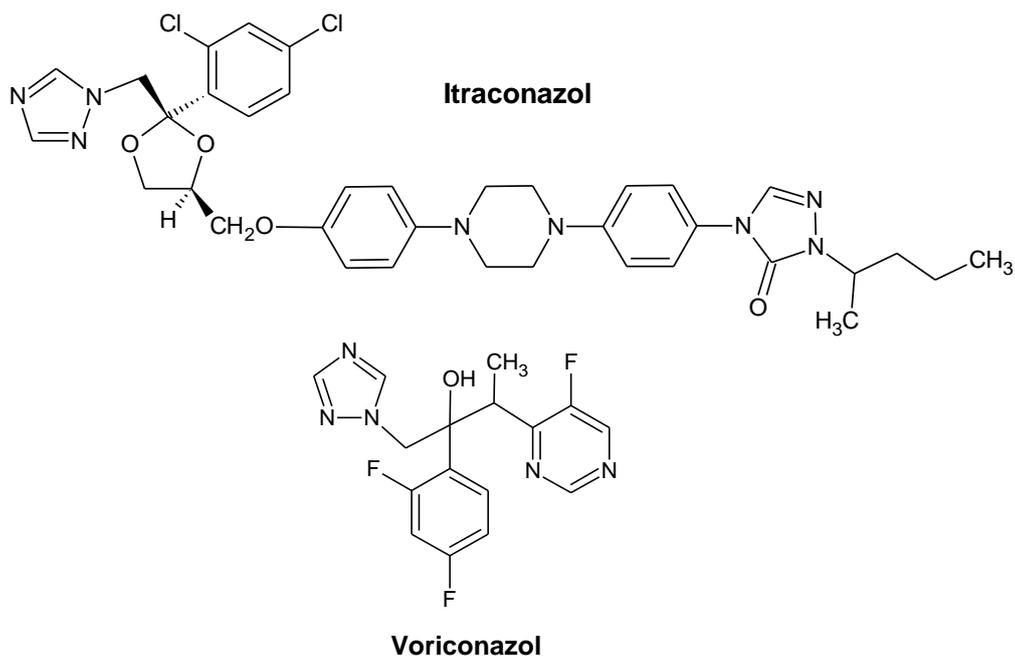


Figura 4. Fármacos antifúngicos pertencentes à classe dos azóis.



Continuação da figura 4. Fármacos antifúngicos pertencentes à classe dos azóis.

Ciclopirox olamina (figura 5, pág. 9) é uma hidroxipiridona, de uso tópico, que quelata íons di e trivalentes necessários para as atividades enzimáticas e da cadeia respiratória das células fúngicas, que assim deixam de captar aminoácidos e nutrientes, inibe a síntese de parede e estaciona seu ciclo celular na fase G1 e S. É indicada para o tratamento de micoses cutâneas causadas por dermatófitos e leveduras, com relatos de taxas de cura de até 90% (BORELLI *et al.*, 2008).

Amorolfina (figura 5, pág. 9) é o principal fármaco da classe das morfolininas. Ela age em duas etapas sucessivas da biossíntese do ergosterol, mediadas pelas enzimas Δ^{14} -redutase (*ERG24*) e Δ^7 - Δ^8 -isomerase (*ERG2*), de forma não competitiva e reversível. Tem efeito fungistático sobre dermatófitos e leveduras do gênero *Candida*, sem relatos de resistência até o momento (BORELLI *et al.*, 2008).

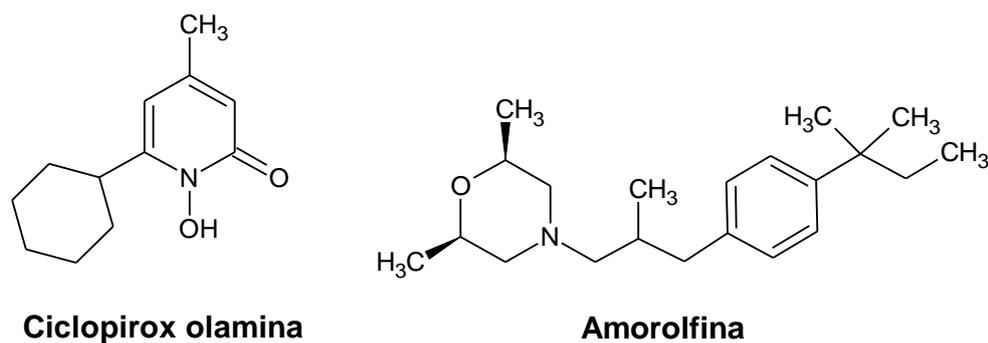
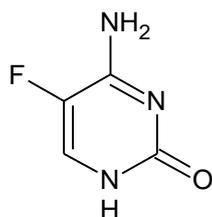


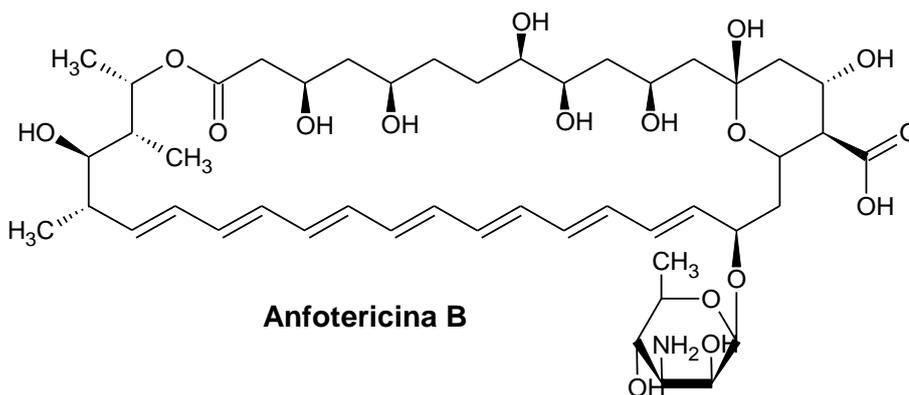
Figura 5. Fármacos antifúngicos pertencentes à classe das hidroxipiridonas e morfolinas.

Anfotericina B (figura 6, pág. 10), um fármaco descoberto em 1955, e nistatina fazem parte da classe dos poliênicos. Estes fármacos caracterizam-se por formarem complexos com ergosterol, resultando em desorganização da membrana da célula fúngica e formação de poro. O aumento da permeabilidade da membrana conduz à despolarização e perda de proteínas, nucleotídeos e outros compostos. Anfotericina B também se liga ao colesterol, fato responsável por grande parte de sua toxicidade (SPITZER *et al.*, 2011). Preparações contendo a forma lipossomal do fármaco podem atuar diminuindo este grave efeito adverso (BUTLER, 2005).

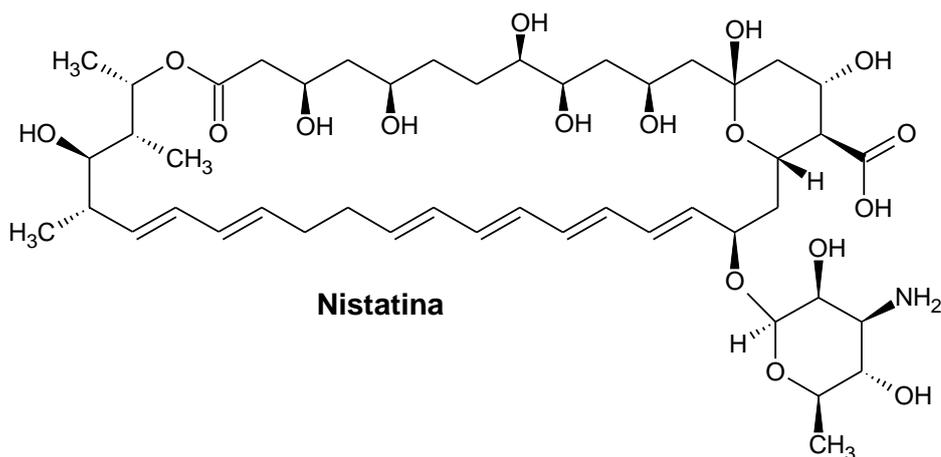
Flucitosina (figura 6, pág. 10) é um derivado halogenado de pirimidina, antimetabólito da citosina. É seletivamente absorvida por uma citosina permease, enzima ausente ou presente em pequena quantidade em mamíferos. Intracelularmente, é desaminada à 5-fluorouracila (5-FU). 5-FU é fosforilada e forma RNAs anômalos, incapazes de formar ribossomas ou serem traduzidos em proteínas. Além disso, 5-FU é convertida no seu desoxinucleósido, que inibe timidilato sintetase e, assim, a síntese de DNA. Devido a uma geração rápida de resistência a flucitosina não é utilizada em monoterapia (BORELLI *et al.*, 2008).



Flucitosina



Anfotericina B



Nistatina

Figura 6. Fármacos antifúngicos pertencentes às classes dos derivados halogenados da pirimidina e polienos.

Entretanto, devido às evidências clínicas cada vez mais corriqueiras de resistência, a comunidade científica vem preocupando-se com os rumos que segue essa problemática de saúde pública (LASS-FLÖRL *et al.*, 2010). Além disso, há relatos de resistência em que leveduras isoladas de um mesmo indivíduo possuem susceptibilidade distinta aos antifúngicos azóis, demonstrando a presença de resistência a diversos antifúngicos utilizados na terapia atual (NADAGIR *et al.*, 2008) e a importância de utilizar uma terapia que possa ser extremamente eficaz. O

mecanismo de resistência a antifúngicos ainda está pouco esclarecido, principalmente quando o agente é considerado patogênico ao homem e emergente.

Paralelo a essa situação nos defronta também uma nova origem de linhagens fúngicas patogênicas ao homem e muitas vezes também já resistentes: os fungos emergentes do campo. O uso de fungicidas, no controle de doenças de plantas, devido a sua facilidade de aplicação e seus resultados imediatos, se tornou amplamente difundido. Porém, o uso contínuo pode promover a seleção de fungos fitopatogênicos resistentes, bem como o surgimento de cepas mutantes agora também virulentas ao homem, muitas vezes também resistentes, caracterizando um novo segmento de geofilismo das micoses humanas (FISCHBACH e WALSH, 2009).

I.1.2. Tricomonose

Trichomonas vaginalis é um protozoário flagelado parasito do trato urogenital humano, causador da tricomonose (KASSAI *et al.*, 1988), a doença sexualmente transmissível (DST) não viral mais comum no mundo (WEINSTOCK *et al.*, 2004). A OMS estima cerca de 174 milhões de novos casos da doença a cada ano, prevalência esta superior àquelas relacionadas a infecções por *Chlamydia trachomatis* (92 milhões) e *Neisseria gonorrhoeae* (62 milhões) (WHO, 2001). Dados do Ministério da Saúde mostram que a prevalência dessa DST varia de acordo com a época e a região do Brasil. Na cidade de Porto Alegre, RS, um estudo realizado demonstrou uma taxa de prevalência da tricomonose em 37,5% entre as mulheres gaúchas (BRASIL, 2009). Em outro estudo local, em uma vila na cidade de Porto Alegre, dentre 75 mulheres residentes analisadas, 20% estavam infectadas por *T. vaginalis*. A prevalência é alta entre os grupos de nível socioeconômico baixo, entre as pacientes de clínicas ginecológicas, pré-natais e em serviços de DSTs (PETRIN *et al.*, 1998; MACIEL *et al.*, 2004; MICHEL *et al.*, 2006).

A tricomonose está associada também ao aumento da transmissão do HIV (SORVILLO *et al.*, 2001; MASON *et al.*, 2005). Homens infectados com HIV e *T. vaginalis* apresentam alto número de partículas virais no sêmen, facilitando a transmissão do vírus (HOBBS *et al.*, 1999). Estima-se que 24% das infecções pelo HIV são diretamente atribuídas à tricomonose. A cada ano nos Estados Unidos, um número estimado de 746 novos casos de infecção pelo HIV entre mulheres pode ser

atribuído aos efeitos facilitatórios da tricomonose na transmissão do vírus (CHESSON *et al.*, 2004). No Brasil, um estudo feito pelo Ministério da Saúde pelo Programa Nacional de DST e AIDS (do inglês *Acquired Immunodeficiency Syndrome*), em 2005, estimou que entre 2.274 mulheres que procuraram o serviço médico em clínicas de DST, 16,7% estavam contaminadas por *T. vaginalis* (Ministério da Saúde, SVS, 2008). Portanto, o controle desta DST pode ser um dos meios mais eficazes para o manejo do risco de transmissão do HIV mundialmente.

As manifestações clínicas da tricomonose podem variar desde a apresentação assintomática até um estado de severa inflamação (PETRIN *et al.*, 1998; LEHKER e ALDERETE, 2000). Na mulher, a infecção pelo *T. vaginalis* pode causar sérias consequências, como doença inflamatória pélvica, câncer cervical (GRODSTEIN *et al.*, 1993; VIIKKI *et al.*, 2000), parto prematuro e baixo peso de bebês nascidos de mães infectadas (COTCH *et al.*, 1997). Nos homens a infecção pode ser classificada em três estágios: estado assintomático, estado agudo caracterizado pela presença de uretrite e doença assintomática leve, que clinicamente pode ser indistinguível de outras causas de uretrite (MACIEL *et al.*, 2004).

Metronidazol e tinidazol (figura 7), ambos pertencentes ao mesmo grupo, 5-nitroimidazóis, são os únicos fármacos recomendados pelo *Food and Drug Administration* (FDA, EUA) para o tratamento da tricomonose; entretanto, a resistência dos isolados de *T. vaginalis* a esses fármacos é um problema existente (DUNNE *et al.*, 2003).

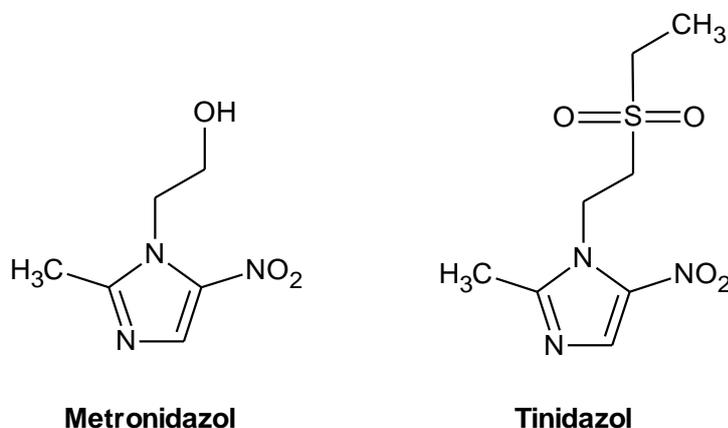


Figura 7. Fármacos antiprotozoários pertencentes à classe dos nitroimidazólicos.

Considerando o sério impacto da tricomonose na saúde pública, estudos sobre a atividade anti-*Trichomonas* de novos compostos são fundamentais para o controle da doença. O uso clínico do metronidazol teve seu início na Europa desde 1960 e nos Estados Unidos desde 1963 (MORENO e DO CAMPO, 1985). O mecanismo de ação dos fármacos nitroimidazólicos é atribuído à redução do grupamento nitro contido na molécula pelo parasito gerando radicais tóxicos e conseqüentemente sua morte. A ação dos produtos da nitrorredução ou dos subprodutos de oxigênio-redução vai depender de vários fatores, entre eles a presença de nitroredutases apropriadas, presença de mecanismos de defesa do parasito e habitat celular (MORENO e DO CAMPO, 1985; EDWARDS, 1993).

Muita atenção tem sido destinada aos relatos sobre um potencial carcinogênico deste fármaco, devido ao fato de que o tratamento a longo prazo com altas doses de metronidazol possa induzir tumores nos pulmões de animais. Além disso, estima-se que 2,5 a 5% de todos os casos de tricomonose sejam causados por isolados de *T. vaginalis* resistentes (SCHWEBKE *et al.*, 2006). O tratamento nestes casos é problemático, podendo necessitar de altas concentrações de metronidazol, aumentando o risco de toxicidade (PETRIN *et al.*, 1998). Devido à frequência da infecção na gravidez, à toxicidade do metronidazol e ao desenvolvimento de isolados resistentes, alternativas terapêuticas aos 5-nitroimidazóis são necessárias e vêm sendo pesquisadas (LEHKER e ALDERETE, 2000).

I.1.3. Malária

A malária é uma das dez doenças infecciosas mais predominantes no mundo, é considerada endêmica em pelo menos 108 países, onde cerca de 40% da população mundial corre risco de contrair a doença (WHO, 2011). A malária figura como uma doença negligenciada, principalmente pela posição geográfica que ocupa (países ditos em desenvolvimento). Somente no Brasil, cerca de 300 mil pessoas foram infectadas em 2009 (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010). Malária é causada por protozoários do gênero *Plasmodium*. No Brasil predominam três espécies: *P. malariae*, *P. vivax* e *P. falciparum*. A área endêmica brasileira é conhecida como Amazônia Legal, composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão,

Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (WHO, 2011).

Os sintomas que os pacientes infectados podem apresentar na infecção por *Plasmodium* são: episódios de febre elevada com tremores musculares acentuados, que ocorrem a cada 3 ou 4 dias (conforme a espécie do parasito), dor de cabeça, fadiga, anorexia, náusea, vômito e diarreia. Infecções severas por *P. falciparum* podem causar sintomas neurológicos devido ao bloqueio de fluxo de sangue para o cérebro pela obstrução de pequenos vasos sanguíneos podendo levar até mesmo à morte (FIDOCK *et al.*, 2004; OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010).

Os antimaláricos disponíveis no mercado podem ser divididos em quatro classes principais: quinina e compostos relacionados (cloroquina, primaquina e mefloquina), derivados da artemisina (arteméter, arteéter e artesunato), combinação de fármacos antifolato (proguanil, pirimetamina, trimetoprima e sulfadoxima) e uma quarta classe onde se enquadram fármacos diversos (halofantrina e atovaquona). Muitos destes fármacos foram obtidos e desenvolvidos a partir de *screening* de produtos naturais como a quinina e a artemisina, também os seus derivados cloroquina e artesunato. Compostos ativos contra outras patologias, como o caso dos fármacos antifolato, são também usados como antimaláricos (LEMKE, 2008).

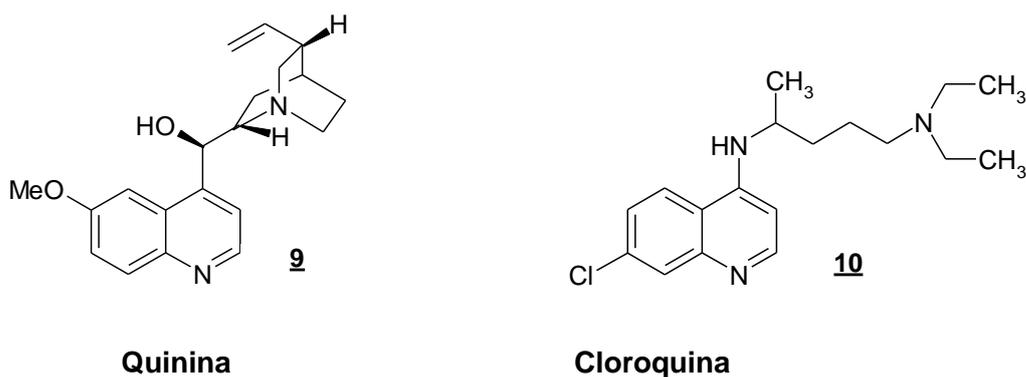
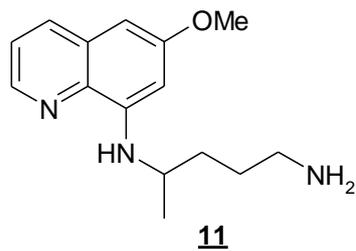
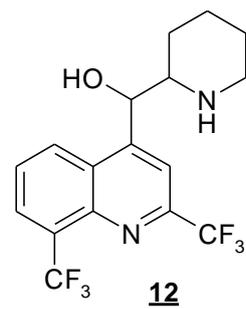


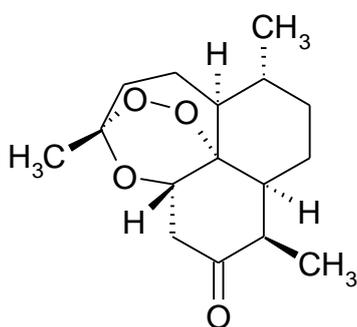
Figura 8. Fármacos antimaláricos pertencentes às classes diversas.



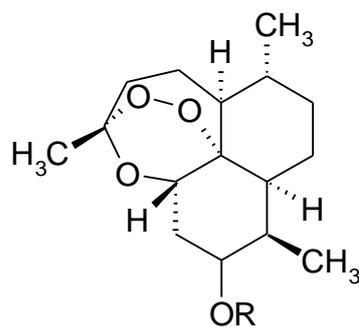
Primaquina



Mefloquina

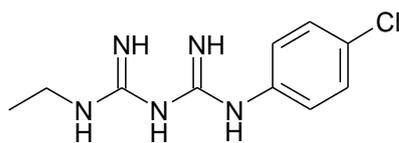


Artemisinina

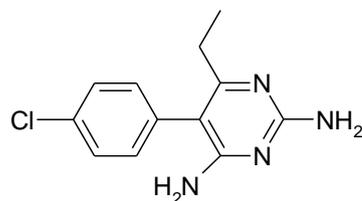


**R=CH₃(Arteméter);
R=CH₂CH₃(Arteéter).**

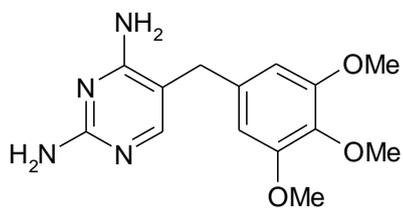
R=COCH₂COO⁻Na⁺(Artesunato)



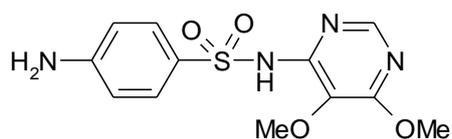
Proguanil



Pirimetamina



Trimetoprima



Sulfadoxina

Continuação da figura 8. Fármacos antimaláricos pertencentes às classes diversas.

membrana específico (FIDOCK *et al.*, 2000; DJIMDE *et al.*, 2001; BASCO, 2002; DURRAND *et al.*, 2004); iv. Gene *pfmdr1* –*P. falciparum* multidrug resistance gene – caracterizado como importante na resistência à cloroquina (NAGESHA *et al.*, 2001; TINTO *et al.*, 2003), à quinina, à artemisinina, à mefloquina e à halofantrina (ZALIS *et al.*, 1998; REED *et al.*, 2000; DURAISINGH *et al.*, 2000a; DURAISINGH *et al.*, 2000b; PILLAI *et al.*, 2003); v. resistência à atovaquona está relacionada à mutação na posição 268 do gene do citocromo b (FIVELMAN *et al.*, 2002; GIL *et al.*, 2003).

Mais recentemente, o conhecimento da bioquímica do parasito tornou possível identificar potenciais alvos para o desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas (SOLDATI *et al.*, 2004; GARCIA *et al.*, 2008; KOYAMA *et al.*, 2009;) Atualmente 24 novos fármacos encontram-se em fase final do fluxo para obtenção de um novo medicamento antimalárico. Sete fármacos estão em fase pré-clínica e, no entanto, este número ainda é bastante baixo, o que reflete bem a situação da pesquisa de antimaláricos nos últimos anos (WELLS *et al.*, 2009).

I.2. Descoberta de fármacos através da Semissíntese

A prospecção de fármacos através de produtos naturais é uma forma muito vantajosa para obtenção de novas moléculas. Em química medicinal, a obtenção de um novo medicamento a partir de produtos naturais está baseada em três possibilidades, o emprego direto do produto natural (isolado ou não) (PN), o emprego de semissíntese obtendo-se o produto natural modificado (PNMD) e o uso de PN como inspiração para a síntese de novas moléculas (SPN). Em ambos, primeiro e segundo casos, o material natural tem sido obtido na sua maioria do isolamento a partir de espécies de plantas abundantes ou por fermentação microbiana (CARTER, 2011). De modo geral os processos envolvendo a semissíntese são bastante eficazes, devido ao emprego de modificações estruturais relativamente simples que resultam em produtos com propriedades físico-químicas e farmacológicas desejadas (GORDALIZA, 2007; ALTMAN *et al.*, 2011).

Um exemplo importante e clássico da utilização de semissíntese é a obtenção do paclitaxel, o primeiro antineoplásico capaz de inibir a divisão celular pela

despolimerização dos microtúbulos, um mecanismo antitumoral até então desconhecido. Junto com a descoberta do composto gerou-se um grande problema, a extração do paclitaxel de *Taxus brevifolia*. Para obtenção de 1 kg do paclitaxel, são necessários aproximadamente 10.000 kg da casca da *T. brevifolia*, sendo para isto necessário a derrubada de cerca de 3.000 árvores (SOUZA, 2004). Uma solução para o problema foi extrair das folhas da árvore *Taxus baccata*, a molécula 10-desacetilbacatina-III que apresenta o esqueleto básico do paclitaxel. A partir de 10-desacetilbacatina-III obteve-se o paclitaxel por via semissintética (HOLTON, 1994) e em poucas etapas, pela acetilação da posição 10 da 10-desacetilbacatina-III e pela introdução da cadeia lateral em posição C-13 (Figura 9). Uma vantagem neste método, demonstrando a importância da semissíntese para a obtenção do paclitaxel, é que não foi mais necessário derrubar as árvores. Para obter 1 kg de 10-desacetilbacatina-III são necessários cerca de 3.000 kg das folhas de *T. baccata*, sendo esta uma fonte renovável (KINGSTON, 2000).

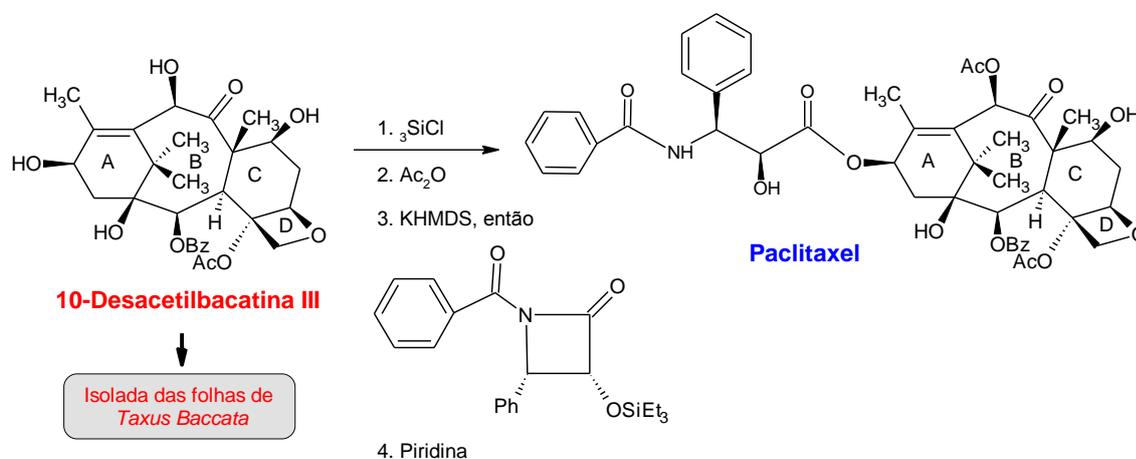


Figura 9. Adaptado de SOUZA, 2004. Semissíntese do Paclitaxel realizada por Holton e colaboradores.

Um avanço na química medicinal foi a obtenção de derivados semissintéticos da artemisinina para tratamento da malária. O arteeéter e artemeter, são opções frente à associação de fármacos e nos casos de resistência à artemisinina, além de produzirem depuração mais rápida da parasitemia que a quinina, cloroquina ou mefloquina no tratamento da malária por *P. falciparum* (WELLS *et al.*, 2009).

Segundo Ramalhete e colaboradores (2011), no que se trata da descoberta de novos fármacos para tratamento da malária, dos quinze medicamentos escolhidos dentro do esquema terapêutico da OMS, onze são produtos naturais ou estão relacionados com produtos naturais. Destes os semissintéticos ou sintéticos de produtos naturais são: artemeter e artesunato da artemisinina; atovaquona do lapachol, doxiciclina e tetraciclina derivados de espécies de *Streptomyces* (BOURDY *et al.*, 2008).

Alguns antifúngicos recentes introduzidos na terapêutica podem ser citados como exemplos de produtos semissintéticos, entre eles a caspofungina, derivado de pneumocandina B, anidulafungina e aminocandina (BUTLER, 2005). Estes antifúngicos são relativamente seguros e, além disso, em relação aos outros fármacos utilizados para infecções por *Candida* sp. podem ser administrados intravenosamente, constituindo uma alternativa valiosa aos azóis e poliênicos utilizados para tratar diversas infecções invasivas (OBRECHT *et al.*, 2009).

Segundo Butler (2005), foram lançados no mercado dos Estados Unidos, Europa e Japão de 1998 a 2005, 10 derivados de produtos naturais semissintéticos. Dentre estes um antiobesidade (lipstatina), dois antibacterianos (estreptogamina A e B) e eritromicina, um cardiotônico (forskolina), um antimalárico (artemesinina), dois antifúngicos (pneumocandina B e FR901379), um para doença de Gaucher tipo 1 (1-deoxinojirimicina) e um imunossupressor (sirolimus).

I.3. Triterpenos Naturais e Semissintéticos

I.3.1. Ácido ursólico e ácido betulínico

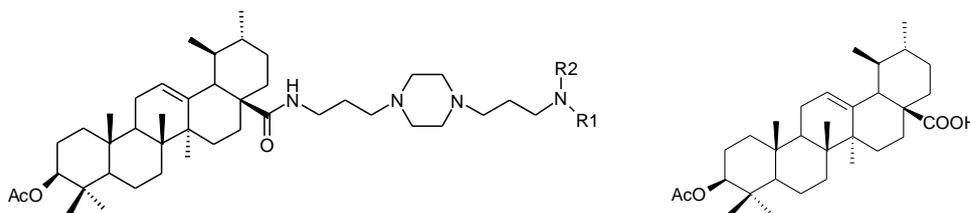
Os triterpenos são produtos naturais pertencentes à classe dos terpenos, moléculas constituídas de 30 átomos de carbono e seis unidades isoprenoides (com cinco átomos de carbonos) que vêm demonstrando uma larga gama de atividades biológicas (LIU, 1995; LIU, 2005; GNOATTO *et al.*, 2008a; GNOATTO *et al.*, 2008b; DOMINGUEZ-CARMONA *et al.*, 2009). Normalmente os triterpenos são obtidos de fontes naturais por diferentes técnicas de extração e posteriormente separados por técnicas de separação como a cromatografia (OLEA e ROQUE, 1990; GALLO e

SARACHINE, 2009). Entre os que possuem atividades marcantes, podemos destacar dois triterpenos pentacíclicos, ácido betulínico e ácido ursólico. No entanto, poucos são os estudos envolvendo as atividades antifúngica, anti-*Trichomonas* e antimalárica. Os principais relatos serão descritos a seguir.

Nosso grupo de pesquisa vem trabalhando com ácido ursólico obtido através da extração de folhas de *Ilex paraguariensis* (erva-mate, família aquifoliaceae) há alguns anos. O ácido ursólico serviu de base para o desenvolvimento de novas moléculas através de modificações estruturais. As modificações estruturais foram realizadas nas posições C-3 e C-28:

1) A hibridação molecular do ácido ursólico **1** com o grupamento bis-aminopropilpiperazina na posição C-28 e a acetilação em C-3 conduziu a obtenção de uma série de mais de 20 novos compostos. Estes compostos foram testados quanto à sua atividade antimalárica frente à cepa FcB1 de *P. falciparum*, resistente à cloroquina (CQ). As modificações estruturais levaram à obtenção de compostos ativos na ordem de nanomolar frente à cepa resistente à CQ ($IC_{50CQ} = 130$ nM) como os compostos **3**, **4** e **5** ($IC_{50} = 167, 161$ e 78 nM, respectivamente). Testados frente à *P. falciparum* cepa Thai, sensível à CQ, apresentaram baixos índices de resistência cruzada à CQ (GNOATTO *et al.*, 2008a).

2) Uma segunda série de derivados de **1** também sintetizada pelo nosso grupo (compostos **6** a **11**) foi testada *in vitro* em cepas de *Leishmania amazonensis* e *L. infantum* (GNOATTO *et al.*, 2008b). Alguns destes compostos mostraram atividade contra a forma promastigota de *L. amazonensis* e *L. infantum* com IC_{50} entre 5 e 12 μ M, enquanto que o padrão utilizado, anfotericina B, apresentou $IC_{50} = 1$ μ M. Sob o ponto de vista de REA, assim como para a atividade antimalárica, constatou-se a importância da acetilação da hidroxila em posição 3 e de grupamento aminado ligado à carbonila na posição C-28.

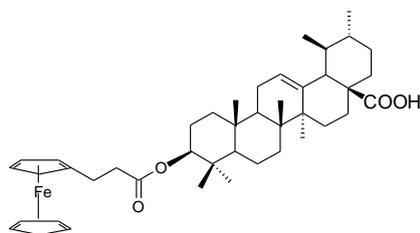


3 R₁=R₂=H

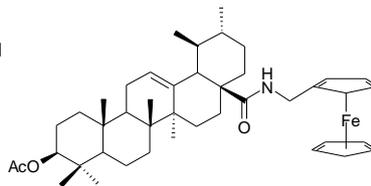
6

4 R₁= R₂= -CH₂-C₆H₄-OH

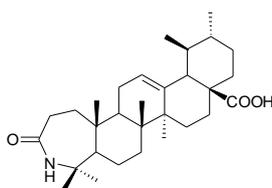
5 R₁=H, R₂= -CH₂-C₆H₄-OH



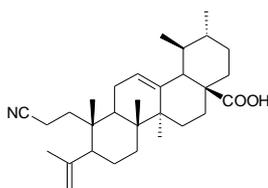
7



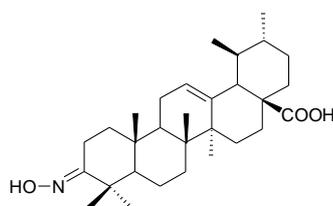
8



9



10



11

O ácido betulínico 2 é um triterpeno obtido de diversas plantas, entre elas *Platanus acerifolia* (Figura 10), uma planta exótica da família Platanaceae que é bastante empregada no Rio Grande do Sul para ornamentação.

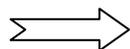
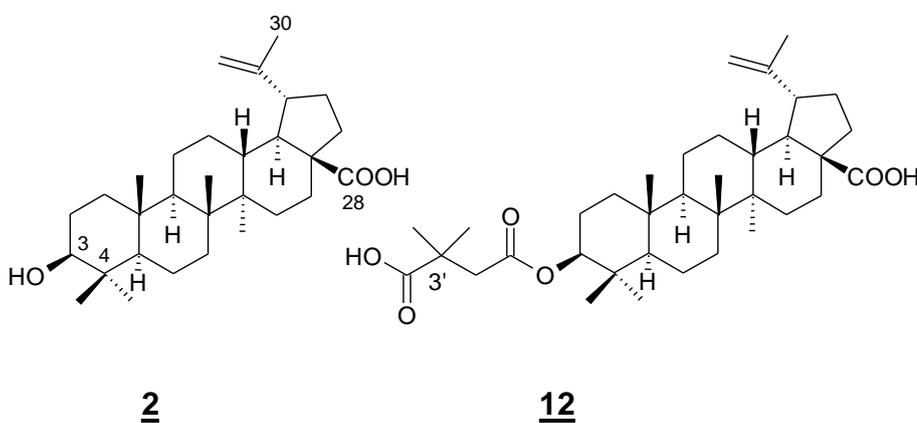


Figura 10. Árvore de *P. acerifolia*, no destaque cascas do caule.

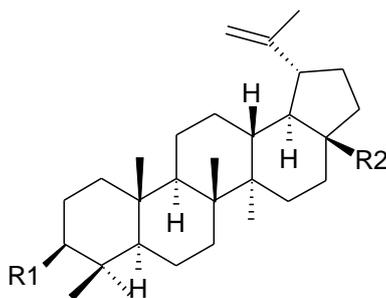
Há muitos relatos na literatura de estudos da atividade biológica do ácido betulínico, entre estes, e talvez o mais promissor até o momento, é a avaliação da atividade antiviral. Este composto apresentou destacadamente atividade frente a HIV-1 ($EC_{50}=1,4 \mu\text{M}$) *in vitro* (FUJIOKA *et al.*, 1994; CICHEWICZ e KOUZI, 2004; YOGEE SWARI e SRIRAM, 2005). Em estudos subsequentes o mesmo grupo de pesquisa obteve através de semissíntese o composto **12** identificado como bevirimat[®]. O bevirimat mostrou-se altamente potente, com $EC_{50}<0,00035 \mu\text{M}$ frente a HIV-1 e $IT > 20.000$ (índice terapêutico) (KASHIWADA *et al.*, 1996; HASHIMOTO *et al.*, 1997).



Os promissores resultados *in vitro* impulsionaram a pesquisa com bevirimat e este se encontra, atualmente, com a fase IIb de estudos clínicos finalizada e iniciando os estudos clínicos de fase III pela Panacos Pharmaceuticals (QIAN *et al.*, 2009; PANACOS, 2012)

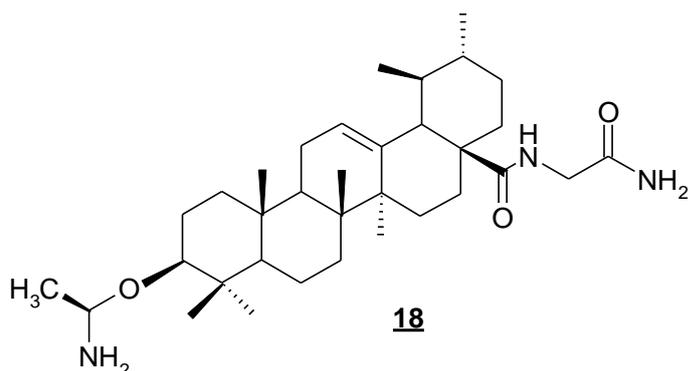
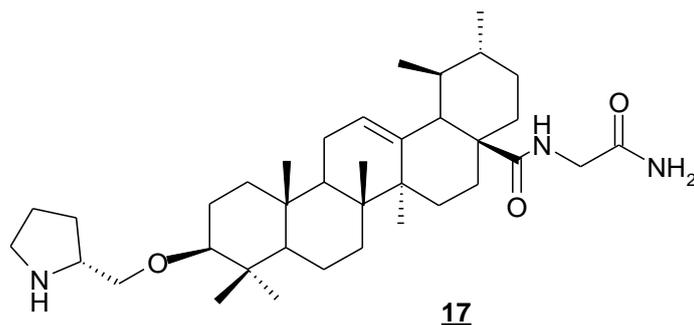
Dentre os poucos relatos de emprego do ácido betulínico e derivados em ensaios de atividade antiprotozoária destaca-se o estudo realizado por Dominguez-Carmona e colaboradores (2009). Neste estudo o ácido betulínico foi obtido através de purificação da fração menos polar do extrato de folhas de *Pentalinon andrieuxii*. A partir de **2** foram produzidos quatro derivados semissintéticos: ácido acetilbetulínico (**13**), ácido betulônico (**14**), éster metílico do ácido betulínico (**15**) e betulina (**16**). As moléculas foram testadas quanto à atividade *in vitro* para *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania sp.* e *Plasmodium falciparum*. De acordo com os testes, o metabólito puro obteve fraca atividade anti-*Leishmania* ($IC_{50}>200\mu\text{M}$), moderada atividade anti-

Trypanosoma (IC₅₀=50μM) e uma boa atividade antiplasmódica (IC₅₀=22,5μM). Os resultados demonstram que a modificação no grupamento hidroxila C-3 por esterificação ou oxidação, levou a um aumento significativo na atividade leishmanicida contra a espécie *L. amazonensis*, respectivamente para 69,9μM e 51,2μM (DOMINGUEZ-CARMONA *et al*, 2009).



	α	R1	R2
		β	
<u>2</u>	H	OH	COOH
<u>13</u>	H	OCOCH ₃	COOH
<u>14</u>	O	-	COOH
<u>15</u>	H	OH	COOCH ₃
<u>16</u>	H	OH	CH ₂ OH

Síntese em fase sólida e prospecção de novas bibliotecas para atividade antimalárica, baseadas em derivados dos ácidos betulínico e ursólico, foram descritas por Pathak e colaboradores (2002). O *Screening* contra *P. falciparum* NF-54 levou à identificação de compostos com uma atividade biológica mais importante em comparação aos protótipos. Por exemplo, os compostos **17/18** apresentaram CIM = 10 μg/ml, enquanto que o ácido ursólico (**1**) apresentou CIM de 50 μg/ml, e cloroquina 0,04 μg/ml.



Dentre os estudos realizados para verificar a atividade antifúngica de triterpenos podemos encontrar diversas fontes naturais utilizadas.

Becker e colaboradores (2005) obtiveram através do extrato de *Lythrum salicaria*, uma planta encontrada na região de Saarland na Alemanha, o triterpeno ácido ursólico (**1**). As partes aéreas da planta tradicionalmente são utilizadas pela população local para tratamento oral da diarreia. O composto foi isolado através do extrato diclorometano da planta. O mesmo extrato quando testado frente *C. albicans*, apresentou CIM = 1,00 mg/mL, além de ser ativo contra bactérias Gram positivas e Gram negativas.

Curtisia dentata é uma planta de origem do sul da África, utilizada tradicionalmente pela população local para tratar várias doenças de origem bacteriana e fúngica. Shai e colaboradores (2008), isolaram 5 triterpenos pentacíclicos desta planta, dentre eles, ácido betulínico (**2**) e ácido ursólico (**1**). A atividade antifúngica destes compostos foi avaliada contra espécies de *Cryptococcus neoformans*, *Sporothrix schenckii*, *Aspergillus fumigatus*, *Microsporium canis* e *Candida albicans* (ATCC 10231). Os resultados encontrados para atividade contra *C.*

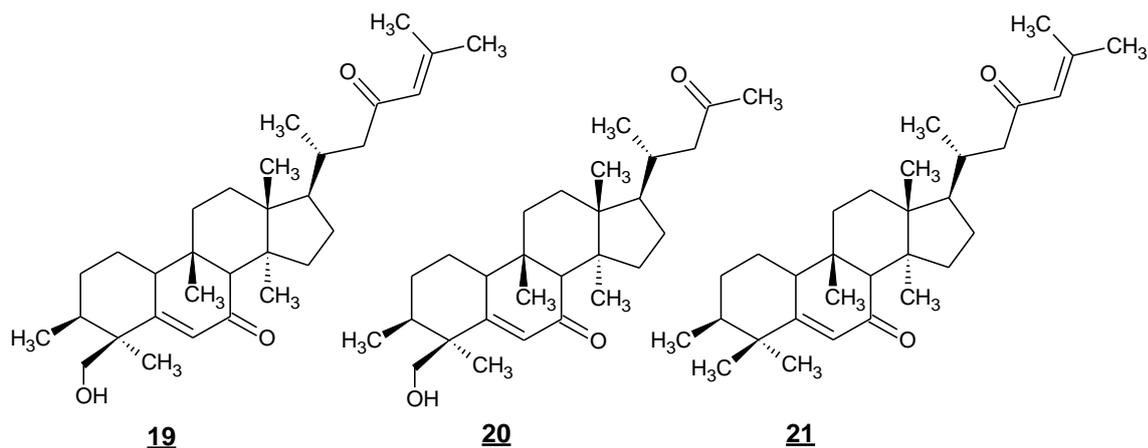
albicans, foram para ácido betulínico CIM = 16 µg/mL e para ácido ursólico CIM = 63 µg/mL.

Liu e colaboradores (2009) utilizaram espécies da planta *Terminalia* (da família Combretaceae), para realizar a investigação química e identificação de compostos com atividade antifúngica. Dentre os triterpenos obtidos, podemos destacar os ácidos ursólico e betulínico com resultados de concentração inibitória mínima contra cepas de *Candida krusei*, *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*, maior que 200 µg/mL, quando comparados ao controle itraconazol (CIM = 0,06 a 0,12 µg/mL).

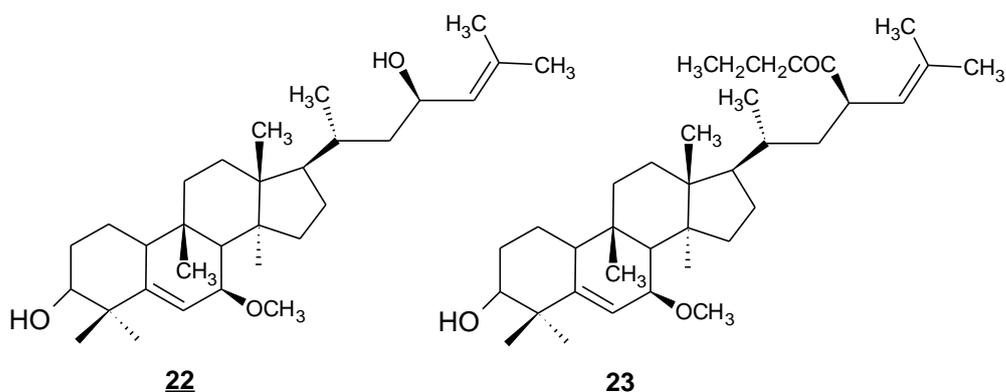
Poucos estudos sobre triterpenos semissintéticos e atividade antifúngica foram encontrados na literatura. A atividade antifúngica de 49 triterpenóides pentacíclicos e seus glicosídeos da planta e de origem semissintética, foram relatados por Anisimov e colaboradores (1979). Diversos compostos inibiram a multiplicação da levedura *Saccharomyces carlsbergensis*. A maior atividade antifúngica foi atribuída aos triterpenos ácido oleanólico e hederaginina (**24**), os quais possuem um grupamento carboxila livre em C28. Os triterpenos dos tipos lupano não apresentaram atividade fungistática em concentrações de 100 µg/mL.

I.4. Outros Triterpenos e atividade antiprotozoária

Dentre os estudos que vêm demonstrando a atividade anti-*Plasmodium* de triterpenos e seus derivados, Ramalhete e colaboradores (2010) publicaram um trabalho utilizando derivados triterpênicos de *Momordica balsamina*, da família Cucurbitaceae, contra duas diferentes cepas de *P. falciparum*. Esta planta é utilizada na medicina tradicional sul africana para o tratamento de febre e malária. Neste estudo, foi relatada a descoberta de três novos triterpenos tipo cucurbitanos: balsaminol C (**19**), balsaminol D (**20**) e balsaminol E (**21**) onde as atividades encontradas variaram entre 4,6 a 30,6 µM, para cepa sensível à cloroquina e 4,0 a 50,1 µM para cepa resistente à cloroquina.



Em outro estudo recente, Ramalhete e colaboradores (2011), isolaram através de fracionamento bioguiado, triterpenoides presentes no extrato metanólico de outras plantas da família Cucurbitaceae. Com o objetivo de avaliar suas atividades biológicas e estabelecer uma relação entre a estrutura e a atividade, o triterpenóide karavilagenina C (**22**) foi submetido à esterificação e posterior acilação, obtendo-se assim diversos derivados semissintéticos.



Os compostos obtidos foram testados frente a cepas de *P. falciparum*. O composto que obteve maior atividade foi denominado karavaoato E (**23**), com IC₅₀ de 3,5 µM para cepas sensíveis à cloroquina, e 0,6 µM para cepas resistentes à cloroquina. Os resultados promissores sugerem que o triterpenóide karavilagenina C, pode ser muito valioso na descoberta e desenvolvimento de novos antimaláricos (RAMALHETE *et al.*, 2011).

Triterpenos derivados da planta *Cimicifuga* spp. foram obtidos e testados frente a *P. falciparum* por Takahira e colaboradores (1998). Os valores de concentração efetiva (EC₅₀) de 25 triterpenoides encontrados foram entre 1,0 e 3,0

nessas patologias justifica-se pela escassez de novas terapias farmacológicas e à preocupante resistência a vários fármacos utilizados no tratamento destas doenças.

Assim sendo, foi realizada a obtenção dos triterpenos ácido ursólico e betulínico a partir de fontes naturais e realizadas modificações estruturais visando a potencializar a atividade destes triterpenos. Foi feita a elucidação estrutural e a avaliação biológica frente a cepas de *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* e *Scytalidium dimidiatum*; isolados de *Trichomonas vaginalis* e de *Plasmodium falciparum* resistentes à cloroquina.

I.5. OBJETIVOS GERAIS

I.5.1. Planejar e obter de novos derivados semissintéticos do ácido ursólico e ácido betulínico visando às atividades antiprotozoária e antifúngica.

I.5.2. Avaliar os compostos obtidos frente à, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Scytalidium dimidiatum*; *Trichomonas vaginalis* e *Plasmodium falciparum*.

I.6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I.6.1. Obter os triterpenos naturais ácido ursólico a partir de cascas de *Malus domestica* e ácido betulínico a partir de *Platanus acerifolia*.

I.6.2. Obter derivados semissintéticos dos triterpenos através de modificações nas posições C-3 e C-28.

I.6.2.1. Ressintetizar os compostos derivados do ácido ursólico, previamente descritos na literatura para avaliação biológica frente a novos alvos.

I.6.2.2. Sintetizar análogos aos derivados de ácido ursólico tendo o ácido betulínico como material de partida.

I.6.3. Elucidar as estruturas dos compostos obtidos com técnicas espectroscópicas de Infravermelho, RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e espectrometria de massas.

I.6.4. Testar os compostos obtidos frente as espécies de leveduras: *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e espécies de dermatófitos: *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Scytalidium dimidiatum*.

I.6.5. Testar os compostos obtidos frente a *Trichomonas vaginalis*, isolado padrão e isolados clínicos; desenvolver ensaios biológicos de cinética de crescimento, hemólise e liberação de Lactato Desidrogenase Láctica (LDH).

I.6.6. Testar os compostos obtidos frente a *Plasmodium falciparum*; desenvolver ensaios de citotoxicidade e avaliação na homeostase do cálcio parasitário.

Esta dissertação está estruturada em capítulos, sendo que o Capítulo I trata da atividade antifúngica dos derivados triterpênicos frente às cepas causadoras de micoses cutâneas e mucocutâneas acima citadas e apresenta-se na forma de manuscrito a ser submetido para publicação. O capítulo II trata da atividade anti-*Trichomonas vaginalis* dos derivados semissintéticos, estruturado na forma de manuscrito para publicação e por fim o Capítulo III, na forma de manuscrito a ser submetido para a publicação, onde foi desenvolvida a pesquisa de atividade anti-*Plasmodium falciparum* dos derivados semissintéticos obtidos, bem como a avaliação citotóxica dos mesmos e a investigação do envolvimento do composto mais ativo no mecanismo de ação da homeostase do cálcio parasitário.

II. ARTIGOS CIENTÍFICOS

II.I. CAPÍTULO 1 - Adrine Innocente, Fernanda Klein, Aline Dalla Lana, Dariane Pereira, Mauro N. Muniz, Pascal Sonnet, Grace Gosmann, Alexandre M. Fuentefria, Simone C. B. Gnoatto. Hemisynthesis of Isosteric Triterpenoid Derivatives and Antifungal Activity.

Manuscrito submetido ao periódico *European Journal of Medicinal Chemistry*.

Hemisynthesis of Isosteric Triterpenoid Derivatives and Antifungal Activity

Adrine Innocente^a; Fernanda Klein^b; Aline Dalla Lana^b; Dariane Pereira^{b,c}; Mauro N. Muniz^a; Pascal Sonnet^d; Grace Gosmann^a; Alexandre M. Fuentefria^b; Simone C. B. Gnoatto^{a*}

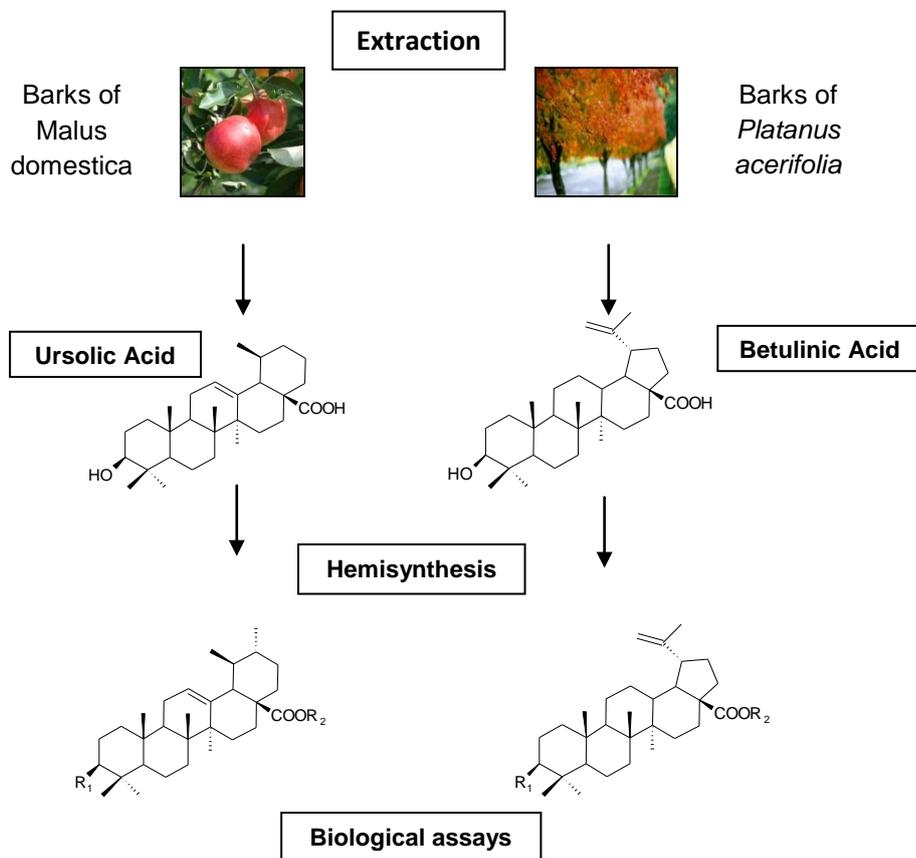
^aLaboratório de Fitoquímica e Síntese, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre 90610-000, RS, Brazil.

^bLaboratório de Micologia Aplicada, Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre 90610-000, RS, Brazil.

^cLaboratório de Doenças Infecciosas e auto-imunes. Hospital de Clínicas de Porto Alegre - RS. Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre 90035-000, RS, Brazil.

^dEA 3901 DMAG Facultés de Médecine et de Pharmacie, Université de Picardie Jules Verne, 1 rue des Louvels, 80037 Amiens, Cedex 1, France.

GRAPHICAL ABSTRACT



ABSTRACT

Dermatomycoses are among the most widespread and common superficial and cutaneous fungal infections in humans. The development of resistant fungal strains in response to the extensive use of current antifungal drugs in the past decades is likely to cause serious problem in future. Consequently there is an urgent need to develop efficient and non-toxic antimycotic agents with a specific spectrum of activity. Triterpenes are natural products that have demonstrated a wide range of biological activities, included antifungal. In this study, we aim, through hemisynthesis, obtaining triterpenes-isosteric molecules from betulinic and ursolic acids to improve their antifungal activity and the spectrum of action. Six compounds were synthesized and tested against eleven mucocutaneous and cutaneous mycosis agents. The results of susceptibility assays were expressed as MIC and showed two active compounds. The MIC values of piperazinyl derivatives from ursolic and betulinic acids active to pathogenic yeasts were in the ranged of 16 to 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 4 to 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively while the fungicidal effects were observed at concentrations ranged from 16 to 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 8 to 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. The piperazinyl derivative from betulinic acid presented an antifungal profile similar to terbinafine and it was the most effective derivative against dermatophytes. This strategy led to a promising candidate to develop new antifungal agent.

Keywords: antifungal activity, mucocutaneous and cutaneous mycosis agents, triterpenes, betulinic acid, ursolic acid, synthesis.

*Address correspondence to this author at Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre 90610-000, RS, Brazil; Tel.: +5551 33085451. Fax: +5551 33085313. E-mail: simone.gnoatto@ufrgs.br

II.II. CAPÍTULO 2 – Adrine Maria Innocente, Patrícia de Brum Vieira, Bruna Bento Casanova, Grace Gosmann, Simone Cristina Baggio Gnoatto, Tiana Tasca. Anti-*Trichomonas vaginalis* Activity From New Triterpenoids Derivatives

Manuscrito a ser submetido ao periódico *International Journal of Antimicrobial Agents*

Anti-*Trichomonas vaginalis* Activity from New Triterpenoids Derivatives

Innocente, A.M.¹; Vieira, P.D.B²; Casanova, B.B.¹; Gosmann, G.¹; Gnoatto, S.C.B.¹; Tasca, T.^{2,*}

¹Laboratório de Fitoquímica, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752. ²Laboratório de Pesquisa em Parasitologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752.

***Corresponding author:** Av. Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail address: tiana.tasca@ufrgs.br

ABSTRACT

Trichomonas vaginalis is a flagellated parasite that causes trichomonosis, the most common non-viral sexually transmitted disease (STD) in the world. Trichomonosis is also associated to increased transmission of HIV. Due to high frequency of the infection during pregnancy and the development of metronidazole-resistant isolates, therapeutic alternatives to 5-nitroimidazole are being researched. Triterpenes are natural products possessing many biological activities such as anti-protozoal activity. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* anti-*T. vaginalis* activity from betulinic and ursolic acids, as well as semisynthetic derivatives obtained. Compounds obtained from betulinic acid presented better activity than those from ursolic acid. Piperazine derivative from betulinic acid presented MIC value of 62.50 µM. The same compound promoted total erythrocyte lysis and LDH liberation of 83%. This is the first report of semisynthetic triterpenoids derivatives with anti-*T. vaginalis* activity, demonstrating high potential of these compounds as trichomonocidal agents.

Keywords: Triterpenes, anti-*Trichomonas vaginalis* activity, natural products, ursolic acid, betulinic acid, semisynthetic derivatives.

II.III - CAPÍTULO 3. Adrine Maria Innocente; Glória Narjara Santos da Silva, Laura Nogueira da Cruz, Miriam Santos de Moraes, Pascal Sonnet, Grace Gosmann, Célia Regina da Silva Garcia, Simone Cristina Baggio Gnoatto. Betulinic and ursolic acid: Obtainment, structural modifications, antimalarial activity, citotoxicity and mechanism of action involved.

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*.

Betulinic and ursolic acid: Obtainment, structural modifications, antimalarial activity, cytotoxicity and mechanism of action involved.

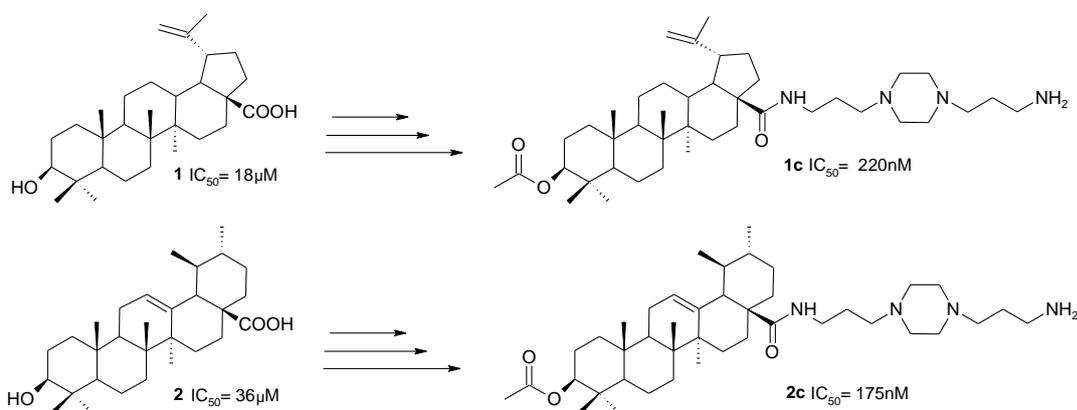
Innocente, A.M.¹; Silva, G.N.S.¹; Cruz, L.N.²; Moraes, M.S.²; Sonnet, P.³; Gosmann, G.¹; Garcia, C.R.S.²; Gnoatto, S.C.B.^{1*}.

¹Laboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre 90610-000, RS, Brasil.

²Laboratório de Biologia Celular e Molecular de *Plasmodium*, Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, USP. Rua do Matão, travessa 14, 321, São Paulo 05508-900, SP, Brasil.

³EA 3901 DMAG Facultés de Médecine et de Pharmacie, Université de Picardie Jules Verne, 1 rue des Louvels, 80037 Amiens, Cedex 1, France.

Graphical abstract



Abstract:

More than 40% of the world population is at malaria contamination risk, which affects primarily poor populations in tropical and subtropical areas. It is caused by a parasite of genus *Plasmodium* and your continued spread of resistance to antimalarial drugs increases the need for development of new drugs. In this study, we aim to isolate new antimalarials from natural sources, obtaining betulinic (**1**) and ursolic (**2**) acids. The *in vitro* antiplasmodial IC_{50} values, obtained from triterpenes **1** and **2** against *Plasmodium falciparum* chloroquine sensitive (3D7) were found to be 18 and 36 μ M, respectively. A series of six derivatives of these natural products was synthesized and also tested against *P. falciparum* (3D7 strain).

The analogues named as **1c** and **2c** showed excellent activity in the nanomolar range (IC_{50} 220 and 175 nM, respectively). The compounds **1a** and **1b** had significant antimalarial activity with IC_{50} 4 and 5 μ M, respectively. The other two derivatives (**2a**, and **2b**) showed moderate activity. The cytotoxicity was indeed evaluated for compounds with excellent (**1c** and **2c**) and good (**1a** and **1b**) antimalarial activity. Importantly, compound **1a** was not toxic although the other compound, (**1b**, **1c** and **2c**) showed toxicity after 24 and 48 h (IC_{50} = 4 μ M). The compounds **1c** and **2c** had Selectivity Index (SI) value 18 and 23, respectively, *reason* to follow the studies for mechanism of action. The homeostasis of calcium was then verified, indicating that a calcium regulated pathways is involved in compound **2c** mechanism of action.

Keywords: Betulinic acid, Ursolic acid, malaria, *Plasmodium falciparum*, cytotoxicity, calcium.

Na química orgânica os produtos naturais apresentam um papel inspirador na obtenção de novos compostos (HARVEY, 2008) levando a avanços em metodologias sintéticas e semissintéticas, e possibilitando a produção de análogos ao composto inicial com melhores propriedades farmacológicas e farmacêuticas (KENEDDY, 2008). “*Scaffolds*” de produtos naturais são reconhecidos por sua habilidade em servir de base para o desenvolvimento de fármacos de sucesso, bem como por serem usados como núcleos de bibliotecas de compostos geradas por técnicas combinatórias (HARVEY, 2008). Podemos encontrar na literatura vários exemplos de bibliotecas baseadas em alcaloides, polipeptídeos (YAO *et al.*, 2007), terpenoides (BOLDI, 2004) e flavonoides.

A classe de compostos triterpenoides vem se tornando uma fonte muito importante de compostos bioativos. Como foi apresentado nesta dissertação, destacam-se muitos estudos relatando as propriedades químicas e biológicas dos triterpenos do tipo lupano e ursano, tais como o ácido betulínico e ácido ursólico e seus derivados. Os efeitos antitumorais, hepatoprotetores, cardiovasculares, antiparasitários, antiinflamatórios e antioxidantes já são descritos para estes compostos (LIU, 1995; TAKETA *et al.*, 2004; LIU, 2005; GNOATTO *et al.*, 2008a; GNOATTO *et al.*, 2008b; DALLA-VECHIA *et al.*, 2009; DOMINGUEZ-CARMONA *et al.*, 2009).

Estudos na utilização do ácido ursólico como protótipo para a obtenção de novos derivados semissintéticos com resultados extremamente satisfatórios já haviam sido descritos previamente pelo nosso grupo de pesquisa (GNOATTO *et al.*, 2008a; GNOATTO *et al.*, 2008b; DALLA VECHIA *et al.*, 2009) e direcionaram o desenvolvimento deste trabalho. Considerando a similaridade estrutural entre o ácido ursólico e o ácido betulínico, partiu-se para o desenvolvimento de novos análogos, com a pretensão de obter atividades farmacológicas semelhantes ou potencializar as mesmas frente a *Trichomonas vaginalis*, *Plasmodium falciparum* e agentes causadores de micoses mucocutâneas e cutâneas. Além disso, estes triterpenos possuem uma rota biossintética comum, com envolvimento de enzimas e reações em comum que levam à obtenção dos esqueletos triterpênicos, reforçando o fundamento de que existem muitas semelhanças entre os compostos (Figura 11). Além da obtenção dos novos derivados do ácido betulínico, foram resintetizados os

compostos derivados do ácido ursólico para serem testados frente às mesmas espécies de agentes infecciosos.

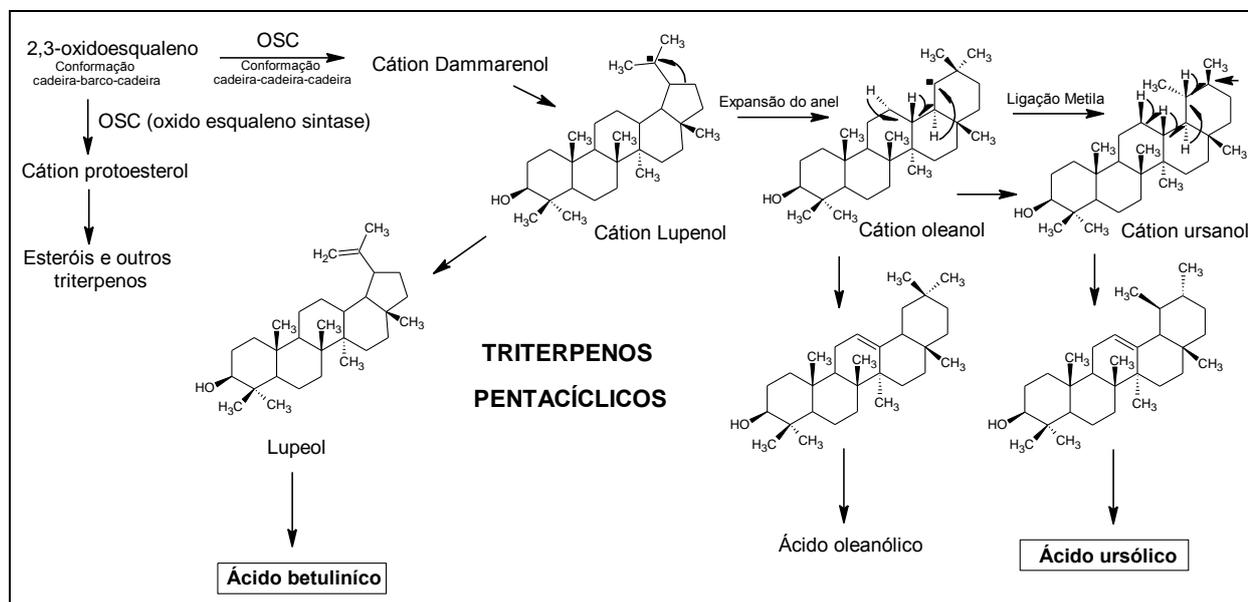


Figura 11. Biossíntese simplificada dos triterpenos, demonstrando as reações em sequência para a produção através da oxido esqualeno sintase (OSC) dos triterpenos pentacíclicos, ácido oleanólico, ácido betulínico (em destaque) e ácido ursólico (em destaque). Adaptado de Brendolise e colaboradores, 2011.

Como descrito nos Capítulos I, II e III, para a realização da semissíntese previamente planejada, nosso estudo iniciou com o isolamento e obtenção dos compostos triterpenóides primários almeçados.

Inicialmente foi realizada a extração de ácido betulínico através das cascas de *Platanus acerifolia*. A utilização de cascas de *Platanus* spp. para a obtenção de ácido betulínico já está previamente descrita na literatura, embora com rendimentos não superiores a 1% (GALGON *et al.*, 1999; BASTOS *et al.*, 2007). O material da planta na forma de pó (150 g) foi submetido à extração sequencial por refluxo com diclorometano e acetato de etila, por tempo determinado. Após filtração e evaporação a vácuo em evaporador rotatório a baixa pressão, os resíduos foram submetidos separadamente à cristalização, resultando em um rendimento de 1g de ácido betulínico do extrato diclorometanólico e 1,3 g do extrato orgânico de acetato de etila.

O ácido ursólico foi obtido através da extração das cascas de *Malus domestica* (popularmente conhecida como maçã gala). A presença de ácido ursólico nas cascas de *Malus domestica* e *Malus* sp. também já foi extensivamente relatada na literatura (JIU-HE e LIU, 2007; FRIGHETTO *et al.*, 2008; JÄGER *et al.*, 2009; BRENOLIZE *et al.*, 2011). A realização da extração aquosa primária relatada no Capítulo I se faz necessária para retirada dos açúcares em excesso. Após a secagem, o material ($\approx 150\text{g}$) foi submetido à extração por refluxo com etanol por tempo determinado, filtrado e evaporado a vácuo, posteriormente levado à cristalização com AcOEt:MeOH (70:30) resultando em 2,6g de ácido ursólico.

Assim, conforme descrito no Capítulo I, a extração de ácido betulínico e ácido ursólico através da utilização de solventes orgânicos e sucessivos passos foi realizada com sucesso, obtendo rendimentos totais de 1,5% e 1,7%, respectivamente. Após isolamento e identificação dos triterpenos por técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD), ressonância magnética nuclear (RMN) de H^1 e C^{13} , espectroscopia no infravermelho (IV) e espectrometria de massas de alta resolução (ERMS), deu-se seguimento às rotas semissintéticas planejadas.

Foram resintetizados no total quatro derivados do ácido ursólico, descritos nos Capítulos I, II e III, bem como quatro derivados ao ácido betulínico (Esquema 1, Capítulo I; Esquemas 1 e 2, Capítulo II; Esquemas 1 e 2; Capítulo III). A obtenção dos compostos testados neste trabalho foi de fácil realização e baixo custo, visto que as cascas de *M. domestica* foram obtidas como subprodutos da indústria e as árvores de *P. acerifolia*, apesar de exóticas, têm ampla distribuição no Rio Grande do Sul. Além disso, a matéria-prima de origem vegetal também favorece a obtenção de compostos com custo reduzido. O reduzido número de passos conduziu à obtenção dos produtos finais com bons rendimentos; o rendimento das etapas da rota sintética variaram desde 70% para os derivados piperazínicos, 80% para os derivados protegidos e 98% para os derivados acetilados como descrito no Capítulo I. O rendimento global obtido foi de 67%.

Os derivados acetilados (Derivados 3 e 4, Capítulo I) foram obtidos em uma primeira etapa com a utilização de anidrido acético como agente de acilação, o qual é amplamente utilizado em reações de síntese e reage rapidamente com álcoois em condições básicas, utilizando piridina e solvente (Esquema 1, Capítulo I).

Os compostos acetilados foram então convertidos em seus cloretos de ácido pelo tratamento com cloreto de oxalila seguido de reação de acoplamento peptídico com a bisaminopropilpiperazina previamente protegida por um grupamento Boc (Derivados 7 e 8, Capítulo I), como descrito por Zeng e colaboradores (Esquema 1, Capítulo I). Após esta etapa os compostos protegidos sofreram purificação através de eluição em coluna cromatográfica com gel de sílica. Os compostos obtidos (Derivados 7 e 8, Capítulo I) foram então submetidos à reação com ácido trifluoroacético para obtenção dos derivados desprotegidos *N*-{3-[4-(3-aminopropil)piperazinil]propil}-3-*O*-acetilursolamida e *N*-{3-[4-(3-aminopropil)piperazinil]propil}-3-*O*-acetilbetulinamida (Derivados 9 e 10, respectivamente, Capítulo I); (Esquema 1, Capítulo I).

Todos os compostos tiveram sua estrutura elucidada através de técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H e de ^{13}C , espectroscopia de IV e espectrometria de massas (Capítulo I).

Ácido ursólico (**1**, Capítulo I) foi obtido como um sólido amorfo branco na forma de pó e com fórmula molecular de $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{O}_3$ como deduzido pelo ERMS (Observado m/z 457,3637 $[\text{M}+\text{H}]^+$). O espectro de infravermelho mostrou bandas de absorção características de grupamento hidroxila em 3417 cm^{-1} e de carbonila em 1682 cm^{-1} . Dados dos espectros de RMN de **1** mostraram sinais correspondentes ao esqueleto triterpênico. O espectro RMN de ^1H exibiu sinais para seis grupamentos metila (δ 0,69, 0,73, 0,84, 0,87, 0,90 e 1,01) junto com sinais correspondentes aos prótons metílicos de H-30 (δ 0,92, 3H) e H-29 (δ 1,05 3H, d). O sinal em δ 2,20 foi atribuído ao H-18 (1H) enquanto o sinal do H-3 foi observado em δ 3,09 (1H, dd). Finalmente em δ 5,16 foi observado um largo tripleto atribuído ao H-12.

As atribuições das ressonâncias no espectro de RMN de ^{13}C do ácido ursólico foram comparadas com dados da literatura (MENDIVE, 1940, GOSMANN *et al.*, 1989, MAHATO e KUNDU, 1994; TKACHEV *et al.*, 1994) onde se destacam os sinais observados para o carbono C-28 do grupamento COOH em δ 180,87 e o carbono C-3 em δ 125,42 e C-13 em δ 138,09.

Ácido betulínico (**2**, capítulo I) foi obtido como um sólido amorfo amarelado. A massa molecular obtida por ERMS m/z 457,3658 $[\text{M}+\text{H}]^+$ e está de acordo com a

massa molecular do composto. O espectro de infravermelho mostrou bandas de absorção características de grupamento hidroxila em 3417 cm^{-1} e de carbonila em 1681 cm^{-1} . Dados dos espectros de RMN do composto também mostraram sinais correspondentes ao esqueleto triterpênico. O espectro RMN de ^1H exibiu sinais para seis grupamentos metila (δ 0,70, 0,82, 0,84, 0,86, 1,14 e 1,57). Os sinais em δ 4,47 (s/, 1H, H-29a) e δ 4.61 (s/, 1H, H-29b) foram correspondentes aos prótons isoprenílicos. O sinal em δ 3,04 (1H, dd) foi atribuído ao H-3 enquanto que o sinal em δ 1,39 foi atribuído ao H-9 juntamente com H-7 (1H, 2H, m).

As atribuições das ressonâncias no espectro RMN de ^{13}C do ácido betulínico foram comparadas com dados da literatura (GALGON *et al.*, 1999; BASTOS *et al.*, 2007), onde se destacam os sinais observados em δ 82,65 correspondente ao C-3, δ 113,30 correspondendo ao C-29; δ 154,64 atribuído ao C-20 e em δ 183,05 que corresponde ao C-28.

Para o ácido ursólico acetilado (composto **3**, Capítulo I) encontramos em ERMS o pico do íon molecular como m/z 497.3636 consistente com a fórmula molecular $\text{C}_{32}\text{H}_{49}\text{O}_4$. No espectro de infravermelho foi observada uma banda adicional em 1733 cm^{-1} referente à carbonila. O espectro RMN de ^1H mostrou a presença de uma metila adicional com um sinal singlete em δ 2,03 sugerindo que a acetilação havia ocorrido. Também, como esperado o sinal de H-3 foi observado em δ 4,50. Evidências para os grupamentos metila e carbonila foram observados no espectro RMN de ^{13}C em δ 21,10 e δ 170,85, respectivamente.

Já para o ácido betulínico acetilado (composto **4**, Capítulo I), foi atribuído no ERMS o pico do íon molecular em m/z 521,3592, consistente com a fórmula molecular $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_4\text{Na}$: 521,7529. No espectro de infravermelho foi observada uma banda adicional em 1733 cm^{-1} referente à carbonila. O espectro RMN de ^1H mostrou a presença de uma metila adicional como um sinal singlete em δ 2,03 sugerindo que a acetilação deste composto também havia ocorrido. Como esperado, o sinal de H-3 foi observado em δ 3,03 e os prótons isoprenílicos em δ 4,60 (1H, H-29a) e δ 4,72 (1H, H-29b), deslocados para campo mais alto se comparado ao espectro do composto **2**. Evidências para os grupamentos metila e carbonila foram observados no espectro RMN de ^{13}C em δ 21,15 e δ 170,88, respectivamente.

A importância do grupamento *N*-1,4-bis(3-aminopropil)piperazina, já é relatada na literatura, devido à sua atividade antimalárica, também descrita para os derivados bisquinolinícos (RYCKEBUSCH *et al.*, 2003; GUILLON *et al.*, 2004). Os pesquisadores relatam atribuir a esta molécula e aos derivados da mesma, um acúmulo no vacúolo ácido do parasito. Em nosso trabalho prévio e outros relatos da literatura foi proposto que o grupamento *N*-1,4-bis(3-aminopropil)piperazina interfere na formação da hemozoína (VENNERSTROM *et al.*, 1992; RAYNES *et al.*, 1995; GNOATTO *et al.*, 2008a). Dentro deste contexto e com vistas à semissíntese de novos derivados com atividade antimalárica, bem como anti-*Trichomonas* e antifúngica, optou-se por utilizar o mesmo substituinte na semissíntese de derivados piperazínicos a partir do ácido betulínico.

Para obtenção dos derivados piperazínicos dos triterpenos foi necessário a proteção prévia de uma das aminas do grupamento *N*-1,4-bis (3-aminopropil)piperazina. Gnoatto e colaboradores (2008) utilizaram condições de síntese para a proteção *N*-Boc relatadas por Zheng e colaboradores (2005) obtendo a piperazina monoprottegida desejada com um rendimento de 28%. No presente estudo seguiu-se as mesmas condições de reação, onde di-*tert*-butil dicarbonato (0.5 equiv.) em metanol (MeOH) foi lentamente adicionada à solução de *N*-1,4-bis(3-aminopropil)piperazina (1 equiv) em MeOH a 0 °C por 24hs, resultando em rendimentos melhores, de 32%. Diferentemente da descrição de Gnoatto et al. 2008, neste trabalho realizou-se uma outra forma de extração, onde após 24 hs de reação o solvente foi removido a vácuo e o resíduo sólido dissolvido em clorofórmio e extraído com água. A separação foi acompanhada por CCD e as extrações se repetiram até que a mancha correspondente à amina que não reagiu desaparecesse. Para análise utilizou-se como eluente sistema acetato de etila:MeOH (60:40) e revelação em cuba de iodo. Esta extração se faz necessária pelo fato de ter sido utilizado apenas 0,5 equivalentes de di-*tert*-butil dicarbonato para cada equivalente de *N*-1,4-bis(3-aminopropyl)piperazina, a fim de evitar a formação do produto protegido em ambos os NH₂. As fases orgânicas depois de evaporadas a vácuo levaram à obtenção de um composto semi-sólido amarelado. O espectro de ERMS apresentou *m/z* 301.2622 [M+H]⁺ consistente com a fórmula molecular C₁₅H₃₃N₄O₂. Análises de infravermelho apresentaram bandas características da absorção N-H em 3365 cm⁻¹ e características de amida (C-O) em

1685 cm^{-1} . O espectro RMN de ^1H mostrou um singleto em δ 1,48 (9H) atribuído aos prótons metílicos do grupamento boc. Em δ 1,72 (4H), foi observado um multiplete, o qual foi atribuído ao CH_2 -c and c' na cadeia lateral da piperazina. Em δ 2,50 (12 H), um multiplete largo foi atribuído aos hidrogênios da piperazina e ao CH_2 -b and b'. Finalmente, em δ 2,81 e 3,12 foram observados sinais atribuídos ao CH_2 -d and d', respectivamente.

Em uma segunda etapa, uma reação de acoplamento peptídico foi realizada (Capítulo I, Esquema I). Para esta proposta, os compostos acetilados (**3** e **4**, Capítulo I) foram primeiramente tratados com cloreto de oxalila em CH_2Cl_2 , levando à formação dos cloretos de acila dos compostos. Esta reação foi monitorada através de espectroscopia de IV, pois em geral, os grupamentos carbonila dos cloretos de ácidos apresentam absorções características em aproximadamente 1770 cm^{-1} . A reação foi finalizada quando a banda de 1688 cm^{-1} desapareceu completamente, e por sua vez a banda em 1777 cm^{-1} teve sua maior intensidade, após 3 hs de reação (Figura 11). Subsequentemente, a reação de acoplamento foi realizada com a adição de trietilamina e a piperazina previamente protegida (composto 6, Capítulo I).

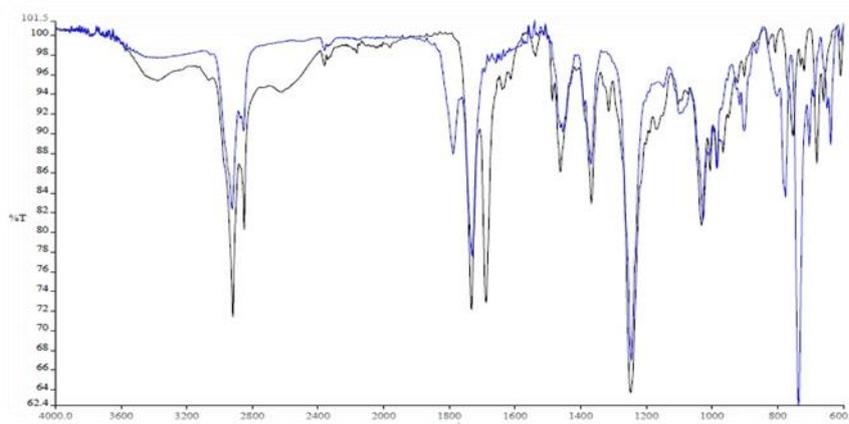


Figura 12. Espectro de infravermelho do ácido ursólico acetilado e do intermediário da reação de acoplamento, demonstrando as bandas de absorção: para o composto acetilado (1688 cm^{-1}) em preto e o desaparecimento da banda do ácido carboxílico e formação da banda carboxílica do cloreto característica do produto da reação (1777 cm^{-1}) em azul.

O composto piperazínico protegido por grupamento boc derivado de ácido ursólico (composto **7**, Capítulo I), gerou um pico no espectro ERMS de m/z 782,5074 $[(M + H)^+]$ consistente com a fórmula molecular $C_{42}H_{73}N_4O_3$. O espectro do IV mostrou bandas de absorção características de carbonila de amida (C-28) em 1667 cm^{-1} e de carbonila da acetila (C-3) em 1734 cm^{-1} . O espectro RMN de ^1H mostrou a presença de seis singletos (3H cada) em δ 2,07 (acetila), 1,15 (CH_3 -27), 1,04 (CH_3 -26), 1,00 (CH_3 -23), 0,97 (CH_3 -24), e 0,94 (CH_3 -25), e dois dupletos (3H cada) em δ 0,80 (CH_3 -30) e 0,90 (CH_3 -29). Foi observado um singleto (9H) característico das metilas do grupamento boc em δ 2,10. Também foi observado sinal em δ 4,50 (dd), atribuído ao H-3. Evidências do grupamento bis-aminopropilpiperazina foram observadas em δ 1,74 por um multipletto atribuído ao CH_2 -c e c'; em δ 2,48 foi observado um multipletto largo (13H) atribuído aos hidrogênios da piperazina CH_2 -b e b' e H-18; e em δ 2,90 e 3,44 foram observados dois multipletos atribuídos a CH_2 -d e d'. Finalmente, em δ 6,42 foi observado um singleto largo atribuído ao NH da amida em C-28. O espectro RMN de ^{13}C mostrou sinais atribuídos aos grupamentos metila, em δ 14,9 (C-25), 16,0 (C-23), 17,1 (C-24), 17,5 (C-25), 21,0 (C-29), 23,5 (C-30 sobreposto ao sinal da metila do grupamento acetila) e em 28,0 (C-27). Os sinais atribuídos aos CH_2 da piperazina foram observados em δ 54,7 com sobreposição. O sinal de 21,80 foi atribuído aos carbonos das três metilas do grupamento boc em sobreposição. Foi observada também, a presença de carbonos quaternários dos grupamentos amida e acetila em δ 179,28 e 171,59, respectivamente.

O composto piperazínico protegido derivado de ácido betulínico (composto **8**, Capítulo I), gerou um pico no espectro ERMS de m/z 781,1619 $(M + H)^+$ consistente com a fórmula molecular $C_{47}H_{80}N_4O_5$. O espectro do IV mostrou bandas de absorção características de carbonila de amida em (C-28) em 1687 cm^{-1} e de carbonila acetila (C-3) em 1777 cm^{-1} . O espectro RMN de ^1H mostrou a presença de sete singletos (3H cada) em δ 2,04 (CH_3 -acetila), 0,84 (CH_3 -26); 0,85 (CH_3 -27); 0,87 (CH_3 -25); 0,95 (CH_3 -23); 0,97 (CH_3 -24) e 1,69 (CH_3 -30). Foi observado um singleto único (9H) característico das metilas do grupamento boc em δ 1,45. Também foi observado sinal em δ 4,48 (dd), atribuído ao H-3. Evidências do grupamento bis-aminopropilpiperazina foram observadas em δ 1,65 atribuído ao CH_2 -c; em δ 2,47 foi observado um multipletto largo (15H) atribuído aos hidrogênios da piperazina CH_2 -a1,

CH₂-a1', CH₂-a2, CH₂-a2', CH₂-b e CH₂-b', H-22 e H-1. Em δ 3.19 foi observado um multipletto (2H) atribuído ao CH₂-d' e em δ 3.32 um mutipletto (4H) atribuído a CH₂-d, CH₂-c'. Os hidrogênios do grupamento isoprenila foram observados em 4,59 (1H, H-29a) e 4,75 (1H, H-29b). Finalmente em δ 6.86 foi observado um singletto largo atribuído ao NH da amida em C-28. O espectro RMN de ¹³C mostrou sete sinais atribuídos aos grupamentos metila, em δ 14,55 (C-24); 16,14 (C-25); 16,22 (C-30); 16,43 (C-26); 18,17(C-27); 14,9 (C-25) e 21,22 (metila do grupamento acetila). O sinal em 28,41 foi atribuído aos carbonos das três metilas do grupamento boc em sobreposição. Os sinais atribuídos aos CH₂ da piperazina foram observados em δ 55,48 em sobreposição. Foi observada também, a presença de carbonos quaternários dos grupamentos amida e acetila em δ 176,14 e 170,90, respectivamente.

Por fim, a reação de desproteção do composto derivado do ácido ursólico (**7**, Capítulo I) e do derivado do ácido betulínico (composto **8**, Capítulo I), utilizando ácido trifluoroacético, levou à obtenção dos derivados (**9** e **10**, Capítulo I). As análises de IV revelaram para ambos os compostos bandas do grupamento NH₂ de amina livre em aproximadamente 3406 cm⁻¹, da carbonila da amida em 1683 cm⁻¹ e da carbonila da acetila em 1777cm⁻¹. Os espectros de RMN de ¹H apresentaram os mesmos sinais diagnósticos das metilas para ambos os compostos, destacando o sinal da metila da acetila em δ 2,02 no mesmo valor para ambos os compostos, além de um sinal em δ 4,47 atribuído ao H-3 do derivado ursólico e δ 3,78 atribuído ao H-3 do derivado betulínico. Um largo tripleto em δ 5,34 do espectro do derivado ursólico foi atribuído ao H-12. Já os prótons isoprenílicos do derivado betulínico foram observados em 4,42 (1H, H-29a) e 4,57 (1H, H-29b). Os sinais característicos dos prótons metílicos do grupamento boc não foram mais vizualizados, confirmando a desproteção dos compostos. Além disso, o RMN de ¹³C também não apresentou mais o sinal dos carbonos das metilas deste grupamento protetor.

Sendo assim, nossas estratégias sintéticas foram realizadas visando à otimização do potencial antimalárico já constatado para esses triterpenos, além de possibilitar a realização de testes frente a outros agentes infecciosos, neste caso agentes que causam infecções fúngicas cutâneas e mucocutâneas e *T. vaginalis*. Para isto destacam-se as modificações realizadas nas posições C-3 e C-28 dos

compostos triterpênicos pentacíclicos ácido ursólico e ácido betulínico (Figura 13). O grupamento hidroxila foi avaliado quanto à sua importância pela inserção de um grupamento acetila (aumentando a lipofilia da molécula). O grupamento carboxílico em C-28 foi substituído por uma cadeia lateral piperazínica (reconhecido farmacóforo quanto à atividade antimalárica). Além disto, buscamos saber se apesar das diferenças estruturais (na presença de ligação dupla na posição C-12, do ácido ursólico, na presença de um radical isoprenila na posição C-29, do ácido betulínico, e no ciclo E do esqueleto triterpênico) o esqueleto lupano poderia ser considerado bioisóstero do ursano.

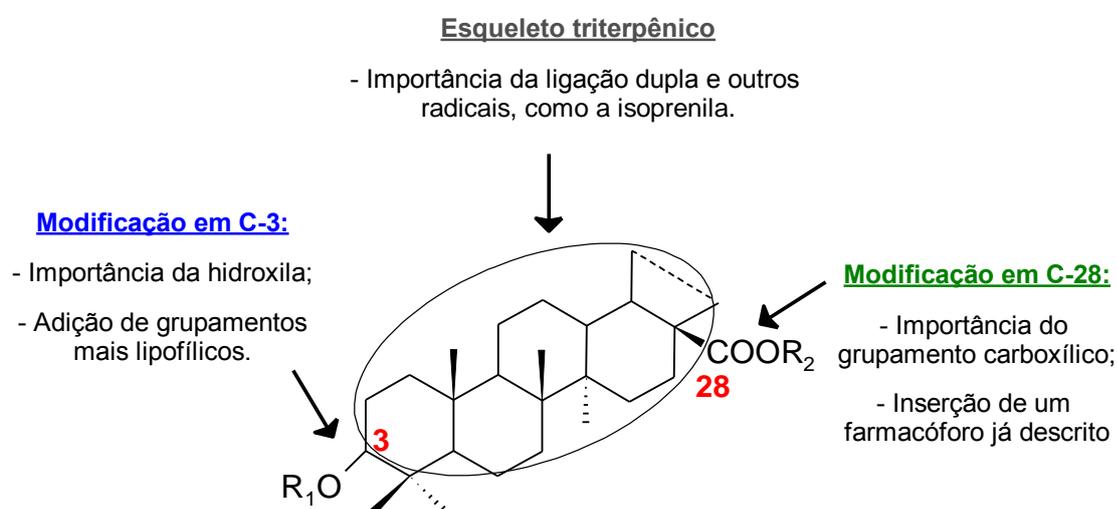


Figura 13. Representação das posições C-3 e C-28 na estrutura dos triterpenos pentacíclicos e a importância das modificações feitas pela adição de grupamentos nestas posições, além da representação da importância do esqueleto triterpênico.

Os compostos obtidos tiveram então suas atividades testadas frente a uma série de agentes causadores de micoses cutânea e mucocutânea: *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Epidermophyton floccosum*, *Tricophyton mentagrophytes*, *Tricophyton rubrum*, *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum* e *Scytalidium dimidiatum*, *T. vaginalis* e *P. falciparum*.

No Capítulo I estão descritos os resultados obtidos nos ensaios antifúngicos, utilizando para isto o método de difusão em ágar e confirmação através da técnica de microdiluição em caldo. Dentre os compostos testados, o único que apresentou

atividade contra os fungos filamentosos e leveduras foi o composto **10**, com CIM (concentração inibitória mínima) de 16 a 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 4 a 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. O composto **9** apresentou atividade antifúngica somente contra leveduras, apresentando CIM no valor de 16 a 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Nenhum dos triterpenos na forma de aglicona (**1** e **2**) ou acetilados (**3** e **4**) na posição C-3 apresentou atividade antifúngica. Por esta razão, verifica-se a importância da substituição na posição C-28 para a atividade antifúngica. Além disto, o reagente *N*-1,4-bis(3-aminopropil)piperazina foi também testado contra os agentes infecciosos, não apresentando propriedades antifúngicas. Sendo assim, podemos concluir que o composto **10** apresentou o maior espectro de ação, visto que possuiu atividade contra leveduras e dermatófitos, demonstrando um ótimo potencial antifúngico, podendo ser comparado com a terbinafina (CIM entre 0,25 a 16 $\mu\text{g/ml}$). Estes resultados são muito importantes, pois um número crescente de casos de infecção hospitalar devido à *Candida* spp. vem sendo relatado nos últimos tempos.

A atividade dos mesmos derivados foi avaliada contra *Trichomonas vaginalis*, ATCC 30236 e isolados frescos obtidos de urina de pacientes do sexo feminino e masculino e está descrita no Capítulo II. Muitos produtos naturais estão descritos na literatura por apresentarem atividade anti-*Trichomonas*, com destaque para as saponinas e alcaloides (GIORDANI *et al.*, 2010; ROCHA *et al.*, 2012; TIWARI *et al.*, 2008). Poucos estudos são encontrados na literatura sobre a atividade anti-*Trichomonas* de triterpenos bem como de seus derivados semissintéticos.

Os seis compostos semissintetizados a partir dos ácidos ursólico e betulínico (Esquemas 1 e 2, Capítulo II) foram testados quanto à atividade anti-*Trichomonas*. Como podemos observar dentre os compostos acetilados (**3** e **4**), o derivado de ácido betulínico (**3**) mostrou ser capaz de reduzir a viabilidade dos trofozoítos nas concentrações de 1000 a 600 μM (Figura 2. G, Capítulo II). O composto **8** também foi responsável pela diminuição da viabilidade somente em altas concentrações, 1000 e 500 μM (Figura 2. E, Capítulo II). O derivado **5** apresentou diminuição de 80% na viabilidade dos trofozoítos, nas concentrações de 1000 a 125 μM (Figura 2. H, Capítulo II). O único composto capaz de reduzir completamente a viabilidade dos parasitos, resultando em CIM de 62,50 μM , foi o composto **7** (Figura 2. I).

Dessa forma, prosseguiram-se os ensaios biológicos com o composto mais ativo, testando-o contra isolados frescos de *T. Vaginalis*, ensaio de cinética de crescimento e ensaios para verificar possíveis mecanismos de ação envolvidos como atividade hemolítica e liberação de lactato desidrogenase láctica (LDH). Os resultados demonstraram que o composto **7** apresentou diminuição de 25% da viabilidade dos trofozoítos para os isolados TV-LACM1 e TV-LACM2, ambos de pacientes do sexo feminino (Figura 3. A e 3. B, capítulo II). Já os isolados TV-LACH1 e TV-LACH2, ambos de pacientes do sexo masculino, apresentaram diminuição da viabilidade em concentrações mais altas do composto (Figura 3. C e 3. D, Capítulo II). Estes resultados sugerem que as culturas de isolados frescos mantidas por menor tempo em cultivo *in vitro*, possuem a capacidade de manter as características biológicas dos parasitos como se estivessem no sítio de infecção (PETRIN *et al.*, 1998; LEHKER e ALDERETE, 2000; TASCA *et al.*, 2003) diminuindo assim a capacidade tricomonocida do composto testado. Somando-se a isso, estudos comprovam que isolados de *T. vaginalis* que são mantidos em cultura por longos períodos são menos virulentos que isolados frescos (MIDDLEJ e BENCHIMOL, 2010).

Além disso, a comparação da atividade obtida entre os isolados, é uma importante característica para avaliar a atividade tricomonocida obtida devido à citotoxicidade do composto, bem como entender alguns mecanismos que possam estar envolvidos na interação parasito-hospedeiro.

Os resultados de atividade anti-*Trichomonas* frente aos isolados provenientes de pacientes do sexo feminino foram melhores que aos isolados de pacientes do sexo masculino, (Figura 2, Capítulo II). No homem a próstata possui um papel muito importante no acúmulo de zinco e na distribuição do mesmo em tecidos adjacentes e no trato urogenital masculino. Sabe-se que o zinco possui propriedades bacteriolíticas já descritas, dificultando a habilidade de patógenos em se estabelecer no trato urogenital masculino (LEISSNER *et al.*, 1980). Desta forma, Langley e colaboradores (1987) comprovaram que culturas de *T. vaginalis* podem ser afetadas por líquido seminal prostático e estabeleceram a partir disso, a hipótese de que a apresentação clínica da tricomonose em homens é dependente de um balanço entre a sensibilidade de isolados de *T. vaginalis* ao zinco e de fatores zinco dependentes contidos no fluido prostático. Sendo assim, estes fatores poderiam estar envolvidos

em mecanismos de defesa presentes nos isolados clínicos provenientes do sexo masculino, levando ao aumento da concentração em que o composto diminui a viabilidade dos parasitos (250 a 100µM para TVLAC1; 125 a 1000µM para TVLACH2) e a ausência da CIM. Para os isolados clínicos femininos, a CIM também não foi obtida, porém a diminuição da viabilidade ocorreu entre concentrações de 62,5 a 1000 µM, demonstrando que outros fatores podem estar envolvidos na patogenicidade e sensibilidade destes isolados ao composto **7**, como habitat do trato urogenital diferente, facilidade de adesão às células epiteliais vaginais, já que no homem o canal uretral é fisiologicamente diferente, entre outros fatores.

A cinética de crescimento avalia a capacidade do composto em reduzir a viabilidade dos trofozoítos em relação ao tempo de cultivo. O composto **7** demonstrou ser ativo após 24 hs em contato com os parasitos, reduzindo a quantidade viável dos mesmos a zero (Figura 3, Capítulo II). Já os controles apresentaram crescimento normal dos parasitos com o pico máximo atingido em 24 hs, de $1,0 \times 10^6$ trofozoítos/mL.

Com o intuito de avaliar os possíveis mecanismos de ação envolvidos na atividade do composto **7** em *T. vaginalis*, foram realizados ensaios de atividade hemolítica e da quantificação de LDH liberada pelos trofozoítos. A capacidade de hemólise do composto foi avaliada, obtendo-se como resultado 100% quando comparado ao controle positivo. Já a capacidade de liberação de LDH promovida pelo composto foi de 83% (Figura 5, Capítulo II).

Estes resultados nos indicam que o composto poderia estar agindo na membrana do parasito, rompendo-o e levando-o conseqüentemente à morte. Dentro deste contexto, compostos anfifílicos possuem capacidade de se inserir na camada lipídica da membrana celular e promover ruptura, como verificado nos eritrócitos e em estudos que utilizam saponinas como agentes citolíticos (ROCHA *et al.*, 2012; TIWARI *et al.*, 2008). Tiwari e colaboradores, desenvolveram estudos da atividade anti-*Trichomonas* de saponinas provenientes de *Sapindus* e concluíram que estes compostos possuem ação detergente, possivelmente afetando a membrana bilipídica do parasito e prejudicando a citoaderência do mesmo. Além disso, os resultados dos ensaios de liberação de LDH, demonstrando que a enzima citosólica é liberada para o meio extracelular, corroboram com os resultados de hemólise e

nos levam a concluir que um mecanismo de dano à membrana celular possa estar envolvido na ação do composto **7**.

Em adição, estudos anteriormente publicados por Gauthier e colaboradores (2009) avaliam a capacidade hemolítica do ácido betulínico, sendo esta similar ao controle negativo, o que nos leva a concluir que a capacidade hemolítica total do composto **7** possa estar sendo atribuída aos grupamentos acetila ou piperazínico, adicionados na molécula.

Experimentos complementares da atividade do composto **7** em células epiteliais vaginais serão desenvolvidos, para avaliar seu potencial citotóxico. Além disso, será realizada a avaliação microscópica das alterações ultraestruturais no *T. vaginalis* em contato com o composto **7** através de microscopia de transmissão eletrônica e de varredura, a fim de adicionar mais detalhes para o entendimento dos efeitos gerados pelo composto no parasito.

A atividade anti-*Plasmodium falciparum* foi avaliada para os derivados semissintéticos obtidos e está descrita no Capítulo III (esquemas 1 e 2, Capítulo III). Os melhores resultados, na faixa de nanomolar, foram encontrados para os derivados piperazínicos dos ácidos betulínico e ursólico **1c** (220nM) e **2c** (175 nM) (Figura 2, Capítulo III), respectivamente. Os derivados acetilados e protegidos por um grupamento boc apresentaram resultados na faixa de 4 a 15 µM (Figuras 1 e 2, Capítulo III). Testes de citotoxicidade contra células humanas embrionárias HEK 293T foram realizados e demonstraram que o composto **1a** não é citotóxico, ao contrário de **1b**, **1c** e **2c** que demonstraram citotoxicidade na concentração de 4µM mas com índice de seletividade de 0,8; 18 e 23, respectivamente. Estes resultados deram prosseguimento para o próximo teste, onde o composto **2c**, sendo o mais ativo, foi avaliado na manutenção da homeostase do cálcio para o parasito, um mecanismo celular de sinalização essencial na regulação de processos de maturação, invasão e divisão celular (VAROTTI *et al.*, 2003). O composto **2c** foi capaz de modular a via de homeostase do cálcio no parasito; através da adição de 100 µM do composto, o cálcio é mobilizado dos vacúolos internos e liberado, como mostra a Figura 3, Capítulo III. Assim, os triterpenos semissintéticos apresentaram atividades extremamente satisfatórias contra *P. falciparum* e estão de acordo com os dados já relatados na literatura por Gnoatto e colaboradores (2008).

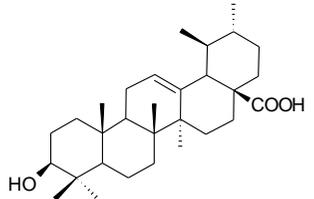
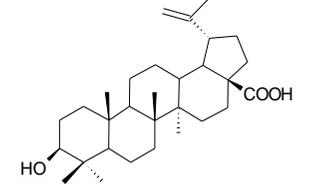
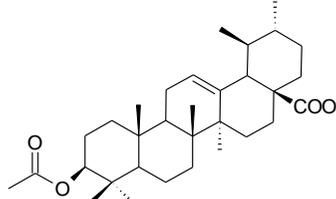
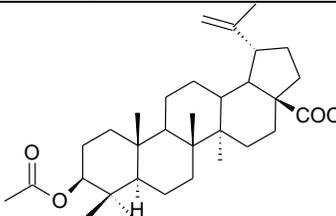
Dentro do contexto das atividades farmacológicas descritas neste estudo, algumas inferências são feitas em relação aos agentes infecciosos descritos e suas similaridades, bem como suas propriedades fisiológicas. Comumente a malária e a tricomonose são infecções causadas por protozoários parasitos, o que pôde direcionar a prospecção, síntese e avaliação biológica de moléculas de interesse farmacêutico, com vistas à atividade antiprotozoária. Considerando essas parasitoses, estabeleceu-se o foco em dois principais filos: Apicomplexa, compreendendo o gênero *Plasmodium*, causador da malária, e Sarcomastigophora, incluindo o subfilo Mastigophora, que alberga os protozoários flagelados do gênero *Trichomonas*. Excetuando-se algumas diferenças morfológicas e de habitat - *T. vaginalis* um patógeno de mucosa, extracelular e *Plasmodium* spp. intracelular - a localização evolutiva e as rotas metabólicas desenvolvidas por esses protozoários são semelhantes, possibilitando a busca de novas opções terapêuticas para essas severas infecções.

Já as leveduras diferentemente dos protozoários, são células simples, com uma parede celular rígida, pertencentes a uma classe de organismos predominantemente unicelulares, que diferem morfológicamente e fisiologicamente entre si (BERGOLD e GEORGIADIS, 2004), porém comumente aos protozoários podem parasitar o organismo humano. Os dermatófitos são fungos filamentosos queratinofílicos pertencentes a um único gênero: *Arthroderma* e divididos em três espécies: *Tricophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyllum*, capazes de invadir tecidos humanos como a pele e anexos (pêlo, unhas e cabelo), causando dermatites, conhecidas por dermatofitoses (MEZZARI, 1998). Estes agentes infecciosos emergentes direcionaram a busca por novos alvos terapêuticos e nos levaram a pesquisa de compostos que possam ter uma atividade fungicida eficiente.

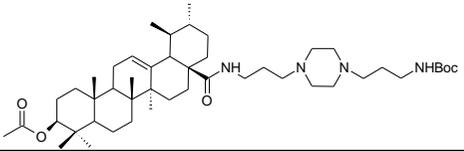
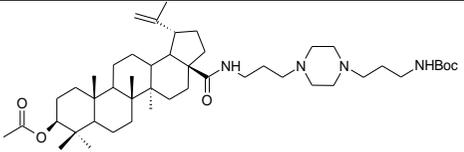
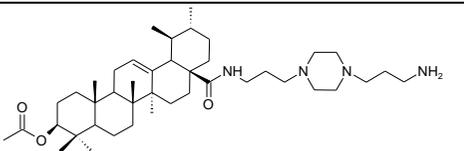
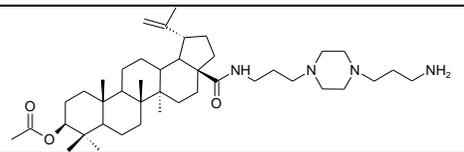
Encontramos neste estudo compostos capazes de atuar nos diferentes agentes infecciosos envolvidos. A tabela 1 apresenta o resumo da atividade farmacológica de todos os compostos sintetizados frente aos agentes infecciosos selecionados, destacando um composto ativo em todos os ensaios biológicos: *N*-{3-[4-(3-aminopropil)piperazinil]propil}-3-acetilbetulinamida. Esta molécula foi capaz de inibir o crescimento dos fungos causadores de micoses cutâneas e mucocutâneas, bem como de *T. vaginalis* e *P. falciparum*. Esses agentes infecciosos diferem

estruturalmente e na localização no sistema hospedeiro. *P. falciparum* é um protozoário parasito intracelular, já *T. vaginalis*, bem como as leveduras e dermatófitos, é extracelular. Desta maneira, o mecanismo de ação do composto provavelmente poderia ser diferenciado nos três gêneros. Mais estudos serão necessários para entender de que forma o composto atua fisiologicamente nos microrganismos testados e dessa forma elucidar o completo mecanismo de ação desenvolvido por esta molécula triterpênica.

Tabela 1. Resumo das atividades farmacológicas dos compostos obtidos.

COMPOSTOS	<i>T. vaginalis</i>	<i>P. falciparum</i> (IC ₅₀)	Agentes causadores de micoses cutâneas e mucocutâneas (CIM µg/ml)											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
	na	36 µM	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
	na	18 µM	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
	na	14 µM	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
	dv (500- 1000 µM)	4 µM	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na

na: não ativo; dv: diminuição da viabilidade; 1) *C. albicans*; 2) *C. krusei*; 3) *C. glabrata*; 4) *C. tropicalis*; 5) *C. parapsilosis*; 6) *E. floccosum*; 7) *T. mentagrophytes*; 8) *T. rubrum*; 9) *M. canis*; 10) *M. gypseum*; 11) *S. dimidiatum*.

COMPOSTOS	<i>T. vaginalis</i>	<i>P. falciparum</i> (IC ₅₀)	Agentes causadores de micoses cutâneas e mucocutâneas (CIM µg/ml)											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
	na	5 µM	na	Na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
	dv (125-1000 µM)	15 µM	na	Na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
	dv (500-1000 µM)	175 nM	16	32	16	16	16	na	na	na	na	na	na	na
	IC₅₀ 62,5 µM	220 nM	4	16	4	4	4	32	16	64	64	32	64	

na: não ativo; dv: diminuição da viabilidade; 1) *C. albicans*; 2) *C. krusei*; 3) *C. glabrata*; 4) *C. tropicalis*; 5) *C. parapsilosis*; 6) *E. floccosum*; 7) *T. mentagrophytes*; 8) *T. rubrum*; 9) *M. canis*; 10) *M. gypseum*; 11) *S. dimidiatum*.

Em estudos que comparam as atividades dos fármacos de escolha para tratar as doenças infecciosas anteriormente discutidas, a CIM para anfotericina B é relatada em torno de 0,16 a 0,31 µg/mL (SHAI *et al.*, 2008). Já para fluconazol há relatos da obtenção de CIM em concentrações de 0,5 a 2 µg/mL (KUMAR *et al.*, 2010). Um estudo relata o uso de metronidazol, comparando-o com a atividade anti-*Trichomonas* frente extratos de saponinas, utilizando concentrações de 1 a 12 µM, obtendo a CIM após 24h na concentração de 12 µM (TIWARI *et al.*, 2009). Já para *P. falciparum* estudos relatam CIM no valor de 16 nM para cepa sensível a cloroquina (3D7) e para cepa resistente a cloroquina 200 µM (Dd2) (RAMALHETE *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos nesta dissertação, a partir da avaliação bioquimicofarmacológica dos compostos, em um contexto multidisciplinar, envolvendo distintos métodos e áreas de conhecimento, são de suma importância para o estabelecimento de novos rumos para a pesquisa de potenciais compostos com atividade antifúngica, anti-*Trichomonas* e antimalárica a partir de derivados triterpênicos semissintéticos.

IV. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados deste estudo demonstram o sucesso do planejamento racional empregado para a obtenção de derivados dos ácidos ursólico e betulínico. Além disso, os ensaios biológicos apontam estes compostos como potenciais protótipos para o desenvolvimento de novos agentes contra micoses mucocutâneas e cutâneas, tricomonose e malária.

IV.1 O método de extração empregado levou a obtenção dos triterpenos ácido ursólico, de *Malus domestica*, e ácido betulínico, de *Platanus acerifolia*, com excelentes rendimentos.

IV.2 A inserção de grupamentos via semissíntese nas posições C-3 e C-28 do esqueleto triterpênico, foi realizada com sucesso.

IV.3 Foram obtidos no total seis derivados semissintéticos.

IV.5 N-{3-[4-(3-aminopropil)piperazinil]propil}-3-acetilbetulinamida demonstrou ser o composto mais ativo contra as espécies de leveduras: *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e espécies de dermatófitos: *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Scytalidium dimidiatum* testados.

IV.6 N-{3-[4-(3-aminopropil)piperazinil]propil}-3-acetilbetulinamida foi o composto mais ativo frente isolado padrão ATCC 30236 de *T. vaginalis*; apresentou inibição da viabilidade em todos os isolados clínicos; foi hemolítico e causou a liberação de LDH na CIM.

I.V.7 Frente a *Plasmodium falciparum*, resultados na faixa de nanomolar foram encontrados para N-{3-[4-(3-aminopropil)piperazinil]propil}-3-acetilbetulinamida e N-{3-[4-(3-aminopropil)piperazinil]propil}-3-acetilursolamida com índice de seletividade, de 18 e 23, respectivamente. O composto N-{3-[4-(3-aminopropil)piperazinil]propil}-3-acetilursolamida demonstrou interferir na homeostase do cálcio parasitário intracelular.

V. PERSPECTIVAS

A multidisciplinaridade e os resultados obtidos neste estudo nos levam à uma série de perspectivas:

V.1 Investigar o mecanismo de ação antifúngica;

V.2 Testar o composto N-{3-[4-(3-aminopropil)piperazinil]propil}-3-acetilbetulinamida frente a um número maior de isolados de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, pesquisando CIM₅₀, CIM₉₀ e sinergismo com antifúngicos;

V.3 Realizar experimentos complementares da atividade do composto N-{3-[4-(3-aminopropil)piperazinil]propil}-3-acetilbetulinamida em células epiteliais vaginais, para avaliar seu potencial citotóxico. Realizar a avaliação microscópica das alterações ultraestruturais no *T. vaginalis* em contato com o composto, através de microscopia de transmissão eletrônica e de varredura, a fim de adicionar mais detalhes para o entendimento dos efeitos gerados pelo composto no parasito;

V.4. Avaliar os parâmetros farmacocinéticos dos composto N-{3-[4-(3-aminopropil)piperazinil]propil}-3-acetilursolamida e N-{3-[4-(3-aminopropil)piperazinil]propil}-3-acetilbetulinamida;

V.5 Investigar outros mecanismos de ação envolvidos na atividade antimalárica, como determinação de mudanças no potencial da membrana mitocondrial parasitária.

VI. REFERÊNCIAS

ALECRIM, M. G. C.; ALECRIM, W. M.; MACEDO, V. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon region. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 32, p. 67-68, 1999.

ALTMAN, K. H.; GAUGAZ, F. Z.; SCHIESS, R. Diversity through semisynthesis: the chemical and biological activity of semisynthetic epothilone derivatives. *Molecular Diversity*, v. 15, p.383-399, 2011.

ANISIMOV, M. M.; SHCHEGLOV, V. V.; STRIGINA, L. I.; CHETYRINA, N. S.; UVAROVA, N. I.; OSHITOK, G. I.; ALAD'INA, N.G., VECHERKO, L. P., ZORINA, A. D.; MATYUKHINA, L. G.; SALTYSKOVA, I. A. Chemical structure and antifungal activity of a number of triterpenoids. *Biology Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR*, v. 6, p. 464-468, 1979.

BASCO, L. K.; RINGWALD, P. *pfmdr1* gene mutation and clinical response to chloroquine in Yaounde, Cameroon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 91, p. 210-211, 1997.

BASCO, L. K. Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XIII. Analysis of *pfcr1* mutations and *in vitro* chloroquine resistance. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 67, p. 388-391, 2002.

BASTOS, D. Z. L.; PIMENTEL, I. C.; DE JESUS, D. A.; DE OLIVEIRA, B. H. Biotransformation of betulinic and betulonic acids by fungi. *Phytochemistry*, v. 68, p. 834-839, 2007.

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: Uma Revisão. *Visão acadêmica*, v. 5, p. 159-172, 2004.

BOLDI, A. M. Libraries from natural product-like scaffolds. *Current Opinion. In Chemical Biology*. V. 8, p. 281-286, 2004.

BORELLI, C.; SCHALLER, M.; NIEWERTH, M.; NOCKER, K.; BAASNER, B.; BERG, D.; TIEMANN, R.; TIETJEN, K.; FUGMANN, B.; LANG-FUGMANN, S.; KORTING, H. C. Modes of Action of the New Arylguanidine Abafungin beyond Interference with Ergosterol Biosynthesis and *in vitro* Activity against Medically Important Fungi. *Chemotherapy*, v. 54, p. 245-259, 2008.

BOURDY, G.; WILLCOX, M. L.; GINSBURG, H.; RASOANAIVO, P. H.; GRAZ, B., DEHARO, E. Ethnopharmacology and malaria: New hypothetical leads or old efficient antimalarials? *International Journal of Parasitology*, v. 38, p. 33-41, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em saúde. Disponível em www.saude.gov.br, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. Prevalências e freqüências relativas de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) em populações selecionadas de seis capitais brasileiras, 2005 / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids. – Brasília : Ministério da Saúde, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Disponível em www.saude.gov.br, 2009.

BRENDOLISE, C.; YAU, Y-G.; EBERHARD, E. D.; WANG, M.; CHAGNE, D.; ANDRE, C.; GREENWOOD, D. R.; BEUNING, L. L. An unusual plant triterpene synthase with predominant α -amyrin-producing activity identified by characterizing oxidosqualene cyclases from *Malus x Domestica*. *The FEBS Journal*, v. 278, p. 2485–2499, 2011.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural products derived compounds in clinical trials. *Natural Products Reports*, v. 22, p. 162-195, 2005.

CANNON, R. D.; LAMPING, E.; HOLMES, A. R.; NIIMI, K.; BARET, P. V.; KENIYA, M. V.; TANABE, K.; NIIMI, M.; GOFFEAU, A.; MONK, B. C. Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 22, p. 291–321, 2009.

CARTER, G. T. Natural Products and Pharma 2011: Strategic changes spur new opportunities. *Natural Products Reports*, v. 28, p. 1783-1789, 2011.

CHESSON, H. W., BLANDFORD, J. M., PINKERTON, S. D. Estimates of the annual number and cost of new HIV infections among women attributable to trichomoniasis in the United States. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 31, p. 547-551, 2004.

CICHEWICZ, R. H.; KOUZI, S. A. Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. *Medicinal Research Review*, v.24, p. 90-114, 2004.

COLEMAN, J. J.; IKECHUKWU, O.; TEGOS, G. P.; HOLSON, E. B.; WAGNER, F. F.; HAMBLIN, M. R.; MYLONAKIS, E. Characterization of Plant-Derived Saponin Natural Products against *Candida albicans*. *ACS Chemical Biology*, v. 5, p. 321-332, 2010.

DJIMDE, A.; DUOMBO, O. K.; STEKETEE, R. W.; PLOWE, C. V. Application of a molecular marker for surveillance of chloroquine-resistant malaria. *Lancet*, v. 358, p. 890-891, 2001.

DUNNE, R. L., DUNN, L. A., UPCROFT, P., O'DONOGHUE, P. J., UPCROFT, J. A. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Cell Research*, v. 13, p. 239-249, 2003.

DURASINGH, M. T.; ROPER, C.; WALLIKER, D.; WARHURST, D. C. Increased sensitivity to the antimalarials mefloquine and artemisinin is conferred by mutations in the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology*, v. 36, p. 955-961, 2000a.

DURASINGH, M. T.; JONES, P.; SAMBOU, I.; VON SEIDLEIN, L.; PINDER, M.; WARHURST, D. C. The tyrosine-86 allele of the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* is associated with increased sensitivity to the anti-malarials mefloquine and artemisinin. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 108, p. 13-23, 2000b.

DURRAND, V.; BERRY, A.; SEM, R.; GLAZIOU, P.; BEAUDOU, J.; FANDEUR, T. Variations in the sequence and expression of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (*Pfcr1*) and their relationship to chloroquine resistance *in vitro*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 136, p. 273-285, 2004.

EDWARDS, D. I. Nitroimidazole drugs- action and resistance mechanisms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 31, p. 9-21, 1993.

FIDOCK, D. A.; NOMURA, T.; TALLEY, A. T.; COOPER, R. A.; DZEKUNOV, S. M.; FERDIG, M. T.; URSOS, L. M.; SIDHU, A. S.; NAUDE, B.; DEITSCH, K. W.; SU, X. Z.; WOOTTON, J. C.; ROEPE, P. D.; WELLEMS, P. D. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein *pfcr1* and evidence for their role in chloroquine resistance. *Molecular Cell*, v. 6, p. 861-871, 2000.

FIDOCK, D. A.; ROSENTHAL, P. J.; CROFT, S. L.; BRUN, R.; NWAKA, S. Atimalarial drug discovery: Efficacy Models For Compound Screening. *Nature Reviews*, v. 3, p. 509-520, 2004.

FISCHBACH, M. A.; WALSH, C. T. Antibiotics for emerging pathogens. *Science*, v. 325, p. 1089-1093, 2009.

FIVELMAN, Q. L.; BUTCHER, G. A.; ADAGU, I. S.; WARHURST, D. C.; PASVOL, G. Malarone treatment failure and in vitro confirmation of resistance of *Plasmodium falciparum* isolate from Lagos, Nigeria. *Malaria Journal*, v. 1, p. 1, 2002.

FRASSON, A. P.; SANTOS, O.; DUARTE, M.; TRENTIN, D.S; GIORDANI, R. B.; SILVA, A. G.; SILVA, M. V.; TASCA, T.; MACEDO , A. J. First report of anti-*Trichomonas vaginalis* activity of the medicinal plant *Polygala decumbens* from the Brazilian semi-arid region, Caatinga. *Parasitology Research*, v. 109, p. 2011.

FRIGHETTO, R. T. S.; WELENDORF, R. M.; NIGRO, E. N.; FRIGHETTO, N.; SIANI, A. C. Isolation of ursolic acid from apple peels by high speed counter-current chromatography. *Food Chemistry*, v. 106, p. 767–771, 2008.

FUJIOKA, T.; KASHIWADA, Y.; KILKUSKIE, R. E.; COSENTINO, L. M.; BALLAS, L. M.; JIANG, J. B.; JANZEN, W. P.; CHEN, I. S.; LEE, K. H. Anti-AIDS agents, 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzygium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. *Journal of Natural Products*, v. 57, p. 243-247, 1994.

GALGON, T.; HÖKE, D.; DRÄGER, B. Identification and Quantification of Betulinic Acid. *Phytochemical Analysis*, v.10, p. 187–190, 1999.

GALLO, M. B. C.; SARACHINE, M. J. Biological activities of lupeol. *International journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, v. 1, p. 46-66, 2009.

GARCIA , C. R. S.; AZEVEDO, F. M.; WUNDERLICH, G.; BUDU, A.; YOUNG, A. J.; BANNISTER, L. Plasmodium in the Postgenomic Era: New insights into the Molecular Cell Biology of Malaria Parasites. *International Review of Cell and Molecular Biology*, v. 266, p. 85-156, 2008.

GAUWERKY, K.; BORELLI, C.; KORTING, H. C. Targeting Virulence: A new paradigm for antifungals. *Drug Discovery Today*, v. 14, p. 214-222, 2009.

GIL, J. P.; NOGUEIRA, F.; STROMBERG-NORKLIT, J.; LINDBERG, J.; CARROLO, M.; CASIMIRO, C.; LOPES, D.; AREZ, A. P.; CRAVO, P. V.; ROSARIO, V. E. Detection of atovaquone and Malarone resistance conferring mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome *b* gene (*cytb*). *Molecular and Cellular Probes*, v. 17, p. 85-89, 2003.

GIORDANI, R. B.; BRUM VIEIRA, P. B.; WEIZENMANN, M.; ROSEMBERG, D. B.; SOUZA, A. P.; BONORINO, C.; DE CARLI, G. A.; BOGO, M. R.; ZUANAZZI, J. A.; TASCA, T. Candimine-Induced Cell Death of the Amitochondriate Parasite *Trichomonas Vaginalis*. *Journal of Natural Products*, v.76, 2019-2023, 2010.

GNOATTO, S.C.B.; SUSPLUGAS, S.; DALLA VECHIA, L.; FERREIRA, T.B.; DASSONVILLE-KLIMPT, A.; ZIMMER, K.R.; DEMAILLY, C.; NASCIMENTO, S.D.; GUILLON, J.; GRELLIER, P.; VERLI, H.; GOSMANN, G.; SONNET, P. Pharmacomodulation on the 3-acetylursolic acid skeleton: Design, synthesis, and biological evaluation of novel *N*-{3-[4-(3-aminopropyl)piperazinyl]propyl}-3-*O*-acetylursolamide derivatives as antimalarial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.16, p. 771-782, 2008a.

GNOATTO, S.C.B., DALLA VECHIA, L., LENCINA, C. L., DASSONVILLE-KLIMPT, A., DA NASCIMENTO, S., MOSSALAYI, D., GUILLON, J., GOSMANN, G., SONNET, P. Synthesis and preliminary evaluation of new ursolic and oleanolic acids derivatives as antileishmanial. *Agents Journal of enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 23, p. 604-610, 2008b.

GORDALIZA, M. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clinical and Translational Oncology*, v. 9, p.767-776, 2007.

GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P.; SELIGMANN, O. A new saponin from Maté, *Ilex paraguariensis*. *Journal of Natural Products*, v. 52, p. 1367-1370, 1989.

GOSMANN, G.; GUILLAUME, D.; TAKETA, A. T. C.; SCHENKEL, E. P. Triterpenoids saponins from *Ilex paraguariensis*. *Journal of Natural Products*, v. 58, p. 438-441, 1995.

GUILLON, J.; GRELLIER, P.; LABAIED, M.; SONNET, P.; LEGER, J. M.; DEPRez-POULAIN, R.; FORFAR-BARES, I.; DALLEMAGNE, P.; LEMAITRE, N.; PEHOURCQ, F.; ROCHETTE, J.; SERGHERAERT, C.; JARRY, C. Synthesis, antimalarial activity, and molecular modeling of new pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines, bispyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines, bispyrido[3,2-*e*]pyrrolo[1,2-*a*]pyrazines, and

bispyrrolo[1,2-a]thieno[3,2-e]pyrazines. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 47, p.1997-2009, 2004.

GUPTA, A. K.; COOPER, E. A.; Update in Antifungal Therapy of Dermatophytosis. *Mycopathologia*, v.166, p. 353–367, 2008.

HAMILTON, G. R.; BASKETT, T. F.; HAMILTON, G. R.; BASKETT, T. F.; In the arms of Morpheus the development of morphine for postoperative pain relief. *Canadian Journal of Anesthesia*. v. 47, p. 367-74, 2000.

HANKINS, E. G.; WARHURST, D. C.; SIBLEY, C. H. Novel alleles of the *Plasmodium falciparum dhfr* highly resistant to pyrimethamine and chlorcycloguanil, but not WR99210. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 117, p. 91-102, 2001.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, v. 13, p. 894-901, 2008.

HASHIMOTO, F.; KASHIWADA, Y.; COSENTINO, L. M.; CHEN, C. H.; GARRETT, P. E.; LEE, K. H. Anti-AIDS agents--XXVII. Synthesis and anti-HIV activity of betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 5, 2133-2143, 1997.

HOBBS, M. M., KZEMBE, P., REED, A. W., MILLER, W. C., NKATA, E., ZIMBA, D., DALY, C. C., CHAKRABORTY, H., COHEN, M. S., HOFFMAN, I. *Trichomonas vaginalis* as a cause of urethritis in Malawian men. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 26, p.381-387, 1999.

HOLTON, R. A.; SOMOZA, C.; KIM, H. B.; LIANG, F.; BIEDIGER, R. J.; BOATMAN, P. D.; SHINDO, M.; SMITH, C. C.; KIM, S. First total synthesis of taxol. 1. Functionalization of the B ring. *Journal of the American Chemical Society*, v.116, p. 1597–1598, 1994.

JÄGER, S.; TROJAN, H.; KOPP, T.; LASZCZYK, M. N.; SCHEFFLER, A.; Pentacyclic Triterpene Distribution in Various Plants – Rich Sources for a New Group of Multi-Potent Plant Extracts. *Molecules*, v. 14, p. 2016-2031, 2009.

JESSE, W.; LI, H.; VEDERAS, J. C.; Drug Discovery and Natural Products: End of an era or an Endless Frontier? *Science*, v. 325, p. 161-165, 2009.

JIU-HE, X.; LIU, R. H. Triterpenoids Isolated from Apple Peels Have Potent Antiproliferative Activity and May Be Partially Responsible for Apple's Anticancer Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 4366-4370, 2007.

KASHIWADA, Y., HASHIMOTO, F., COSENTINO, L. M., CHEN, C. H., GARRETT, P. E., LEE, K.H. Betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives as potent anti-HIV agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 39, 1016-1017, 1996.

KENNEDY, J. Mutasynthesis, chemobiosynthesis and back to semi-synthesis: combining synthetic chemistry and biosynthetic engineering for diversifying natural products. *Natural products Report*, v. 25, p. 25-34, 2008.

KINGSTON, D. G. I. Recent Advances in the Chemistry of Taxol. *Journal of Natural Products*, v. 63, p. 726-734, 2000.

KRUDSOOD, S.; IMWONG, M.; WILAIRATANA, P.; PUKRITTAYA-KAMEE, S.; NONPRASERT, A.; SNOUNOU, G.; WHITE, N.J.; LOOAREESUWAN, S. Artesunate-dapsone-proguanil treatment of falciparum malaria: genotypic determinants of therapeutic response. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 99, p. 142-149, 2005.

KUMAR, L.; SARWAST, A.; LAL, N.; SHARMA, V. L.; JAIN, A.; KUMAR, R.; VERMA, V.; MIHHURI, J. P.; KUMAR, A.; SHUKLA, P. K.; GUPTA, G. Imidazole derivatives as possible microbicides with dual protection. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, p. 817-824, 2010.

LANGLEY, J. G.; GOLDSMID, J. M.; DAVIEST, N. Venereal trichomoniasis: role of men. *Genitourinary Medicine*, v. 63, p. 264-267, 1987.

LASS-FLÖRL, C.; PERKHOFER, S.; MAYR, A. *In vitro* susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods. *Mycoses*, v. 53, p. 1-11, 2010.

LEMKE, T. L. Antiparasitic Agents, In: LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. Foye's Principles of Medicinal Chemistry. 6^a ed, United States of America, Editora Wolters Kluwer Health/Linpicott Williams & Wilkins, 2008, cap. 39, p. 1084-1111.

LEISSNER, K-H; FJELKEGARD, B. ; TISELL, L-E. Concentration and content of zinc in the human prostate. *Investigative Urology*, v. 18, p. 32-35, 1980.

LIU, M.; KATERERE, D. R.; GRAY, A. I.; SEIDEL, V. Phytochemical and antifungal studies on *Terminalia mollis* and *Terminalia brachystemma*. *Fitoterapia*, v. 80, 369-373, 2009

MACIEL, G. P.; TASCA T.; DE CARLI, G. A. Aspectos clínicos, patogenese e diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 40, p. 152-160, 2004.

MAHATO, S.; KUNDU, A.P. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids– A compilation and some salient features. *Phytochemistry*, v. 37, p. 1517-1575, 1994.

MBERU, E. K.; NZILA, A. M.; NDUATI, E.; ROSS, A.; MONKS, S. M.; KOKWARO, G. O.; WATKINS, W. M.; HOPKINS SIBLEY, C. *Plasmodium falciparum*: *in vitro* activity of sulfadoxine and dapson in field isolates from Kenya: point mutations in dihydropteroate synthase may not be the only determinants in sulfa resistance. *Experimental Parasitology*, v. 101, p. 90-96, 2002.

MENDIVE, J.R. The occurrence of α -amyrin and ursolic acid in the leaves of *Ilex paraguariensis*. *Journal of Organic Chemistry*, v. 5, p. 235-237, 1940.

MEZZARI, A. Frequency of Dermatophytes in the Metropolitan Area of Porto Alegre, Rs, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 40, p. 71-76, 1998.

MICHEL, R. V.; BORGES, F. P.; WILTUSCHNIG, R. C. M.; NEVES, F. G.; RIBEIRO, J.; VIEIRO, R. C.; VIEIRA, P. B.; BOHNS, G. R.; TASCA, T.; DE CARL, G. A. Prevalência da tricomonose em mulheres residentes na Vila dos Papeleiros em Porto Alegre, RS. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 38, p. 127-130, 2006.

MIDDLEJ, V.; BENCHIMOL, M.; *Trichomonas vaginalis* kills and eats- evidence for phagocytic activity as a cytopathic effect. *Parasitology*, v. 137, p. 65-76, 2010.

NADAGIR, S. D.; CHUNCHANUR, S. K.; HALES, L. H.; YASMEEN, K.; CHANDRASEKHAR M, R.; PATIL, B. S.. Significance of isolation and drug susceptibility testing of non-*Candida albicans* species causing oropharyngeal candidiasis in HIV patients. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. v. 39, p. 492-5, 2008.

NAGESHA, H. S.; DIN-SYAFRUDDIN; CASEY, G.J.; SUSANTI, A. I.; FRYAUFF, D. J.; REEDER, J. C.; COWMAN, A. F. Mutations in the *pfmdr1*, *dhfr* and *dhps* genes of *Plasmodium falciparum* are associated with in vivo drug resistance in West Papua, Indonesia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, p. 43-49, 2001.

NDOUNGA, M.; BASCO, L. K.; RINGWALD, P. Evaluation of a new sulfadoxine sensitivity assay *in vitro* for field isolates of *Plasmodium falciparum*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, p. 55-57, 2001.

OBRECHT, D.; ROBINSON, J. A.; BERNARDINI, F.; BISANG, C.; DEMARCO, S. J.; MOEHLE, K.; GOMBERT, F. O. Recent Progress in the Discovery of Macrocyclic Compounds as Potential Anti-Infective Therapeutics. *Current Medicinal Chemistry*, v. 16, p. 42-65, 2009.

OLEA, R. S. G.; ROQUE, N. F. Análise de misturas de triterpenos por RMN de ^{13}C . *Química nova*, v. 13, p. 278-281, 1990.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M. V. G.; BRASIL, P.; LADISLAU, J. L. B.; TAUIL, P. L.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Malaria in Brazil: an overview. *Malaria Journal*, v. 9, p. 1-15, 2010.

OLLERT, M. W.; WENDE, C.; GÖRLICH, M.; MCMULLAN-VOGEL C. G.; BORG-VON, Z. M.; VOGEL, C. W.; KORTING, H. C. Increased expression of *Candida albicans* secretory proteinase, a virulence factor, in isolates from human immunodeficiency virus positive patients. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, 2543–2549, 1995.

PANACOS PHARMACEUTICALS INC. http://www.panacos.com/ne_press_releases.html, acesso em 01/02/2012.

PATHAK, A.; SINGH, S. K.; BIABANI, M. A. F.; KULSHRESHTHA, D. K.; PURI, S. K.; SRIVASTAVA, S.; KUNDU, B. Synthesis of combinatorial libraries based on triterpenoid scaffolds. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, v. 5, p. 241-248, 2002.

PILLAI, D. R.; HIJAR, G.; MONTOYA, Y.; MAROUINO, W.; RUEBUSH, T. K.; WONGSRICHANALAI, C.; KAIN, K. C. Lack of prediction of mefloquine and mefloquine-artesunate treatment outcome by mutations in the *Plasmodium falciparum* multidrug resistance 1 (*pfmdr1*) gene for *P. falciparum* malaria in Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 68, p. 107-110, 2003.

QIAN, K., YU, D., CHEN, C. H., HUANG, L., MORRIS-NATSCHKE, S.L., SALZWEDEL, T., REDDICK, M., ALLAWAY, G. P., LEE, K. S. Anti-AIDS agents. 78. Design, synthesis, metabolic stability assessment, and antiviral evaluation of novel betulinic acid derivatives as potent anti-human immunodeficiency virus (HIV) agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 52, p. 3248-3258, 2009.

RAYNES, K.; GALATIS, D.; COWMAN, A. F.; TILLEY, L.; DEADY, L. W. Synthesis and activity of some antimalarial bisquinolines. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 6, p. 204-206, 1995.

REED, M.B.; SALIBA, K.J.; CARUANA, S.R.; KIRK, K.; COWMAN, A.F. *Pgh1* modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature*, v. 403, p. 906-909, 2000.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L, Saponinas. In: SIMÕES *et al.* Farmacognosia Da Planta Ao Medicamento. 5ªed, Porto Alegre/Florianópolis, Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003, cap. 27, p. 711-740.

SOUZA, M. V. N. Novos produtos Naturais Capazes de atuar na estabilização de Microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. *Química Nova*, v. 27, p. 308-312, 2004.

SPITZER, M.; GRIFFITHS, E.; BLAKELY, K. M.; WILDENHAIN, J.; EJIM, L.; ROSSI, L.; DE PASCALE, G.; CURAK, J.; BROWN, E.; TYERS, M.; WRIGHT, G. D. Cross-species discovery of syncretic drug combinations that potentiate the antifungal fluconazole. *Molecular Systems Biology*, v. 7, p. 1-14, 2011.

TINTO, H.; OUEDRAOGO, J. B.; ERHART, A.; VAN OVERMEIR, C.; DUJARDIN, J. C.; VAN MARCK, E.; GUIGUEMDE, T. R.; D'ALESSANDRO, U. Relationship between the *Pfcr1* T76 and the *Pfmdr-1* Y86 mutations in *Plasmodium falciparum* and *in vitro/in vivo* chloroquine resistance in Burkina Faso, West Africa. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 3, p. 287-292, 2003.

TIWARI, P.; SINGH, D.; SINGH, M. M. Anti-*Trichomonas* activity of *Sapindus* saponins, a candidate for development as microbicidal contraceptive. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 62, p. 526-534, 2008.

TKACHEV, A. V.; DENISON, A. Y.; GATILOV, Y. V.; BAGRYANSKAYA, I. Y.; SHEVTSOV, S. A.; RYBALOVA, T. V. Stereochemistry of hydrogen peroxide - acetic acid oxidation of ursolic acid and related compounds. *Tetrahedron*, v. 50, p. 11459-11465, 1994.

VANGAPANDU, S.; JAIN, M.; KAUR, K.; PATIL, P.; PATEL, S. R.; JAIN, R. Recent advances in antimalarial drug development. *Medicinal Research Reviews*, v. 27, p. 65-107, 2007.

VAROTTI, F. P.; BERALDO F. H.; GAZARINI, M. L.; GARCIA, C. R. S. *Plasmodium falciparum* malaria parasites display a THG-sensitive Ca²⁺ pool. *Cell calcium*, v. 33, p. 137-144, 2003.

VENNERSTROM, J. L.; FU, H. N.; ELLIS, W. Y.; AGER, A. L.; WOOD, J. K.; ANDERSEN, S. L.; GERENA, L.; MILHOUS, W. K. Dispiro-1,2,4,5-tetraoxanes: a new class of antimalarial peroxides. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 7, p. 3023-3027, 1992.

WONGSRICHANALAI, C.; PICKARD, A. L.; WERNSDORFER, W. H.; MESHNICK, S. R. Epidemiology of drug-resistant malaria. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 2, p. 209-218, 2002.

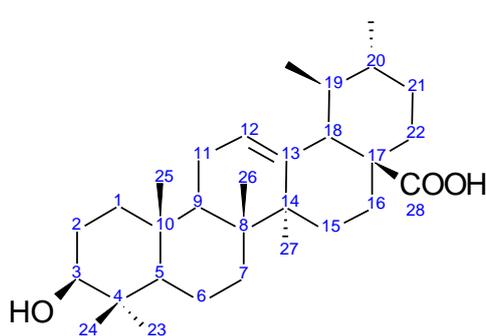
YAO, N.; SONG, A.; WAG, X.; DIXON, S.; LAM, K. S. Synthesis of flavonoid analogues as scaffolds for natural product-based combinatorial libraries. *Journal of Combinatorial Chemistry*, v. 9, p. 668-676, 2007.

YOGESHWARI, P.; SRIRAM, D. Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties. *Current Medicinal Chemistry*, v. 12, p. 657-666, 2005.

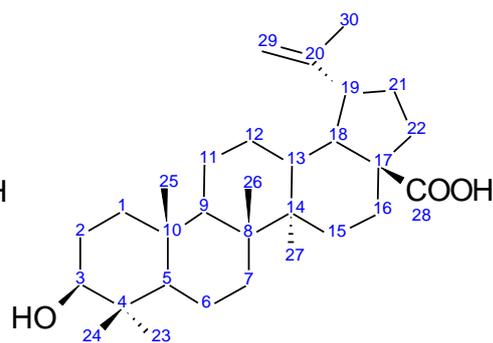
ZALIS, M. G.; PANG, L.; SILVEIRA, M. S.; MILHOUS, W. K.; WIRTH, D. F. Characterization of *Plasmodium falciparum* isolated from the Amazon region of Brazil: evidence for quinine resistance. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 58, p. 630-637, 1998.

ZHENG, Q.; YIN, Q.; ZHAO, Y. The study on the interaction between seryl-histidine dipeptide and proteins by circular dichroism and molecular modeling. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.13, p. 2679-2689, 2005.

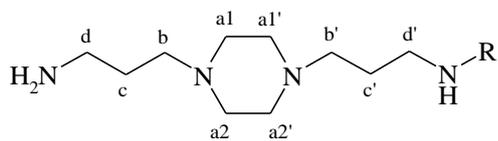
Anexo I. Estruturas numeradas:



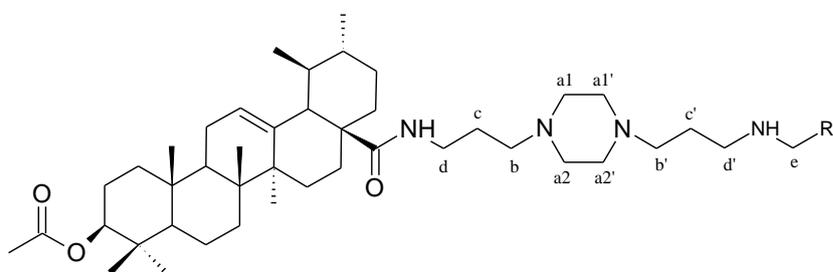
Ácido ursólico



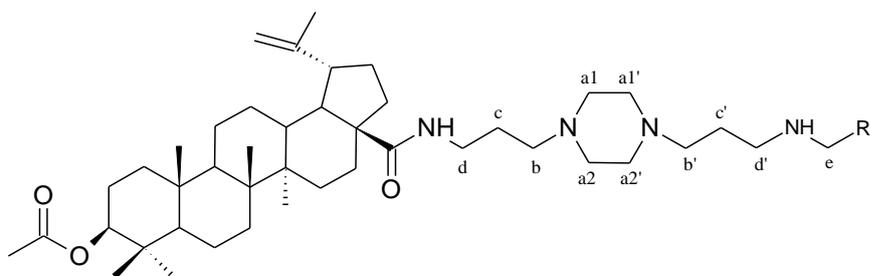
Ácido betulínico



1,4-bis-(3-aminopropil)piperazinil



Derivado piperazínico do ácido ursólico



Derivado piperazínico do ácido betulínico