

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

Tatiane Freitas Borgati

**Síntese e Atividade Antimalárica de Derivados 1,2,3-Triazólicos
do Lupeol**

Belo Horizonte

2013

**UFMG-ICEx/DQ 971^a
D 533^a**

TATIANE FREITAS BORGATI

**SÍNTESE E ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DE DERIVADOS
1,2,3-TRIAZÓLICOS DO LUPEOL**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química- Química Orgânica.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Belo Horizonte

2013

Borgati, Tatiane Freitas
B732s Síntese e atividade antimalárica de derivados 1,2,3-
2013 triazólicos do Lupeol. / Tatiane Freitas Borgati.
2013.
D 107f. : il.

Orientador: José Dias de Souza Filho
Co-orientadora: Alaíde Braga de Oliveira

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais. Departamento de Química.
Bibliografia: 71-78

1. Química orgânica - Dissertação 2. Derivados
1,2,3- triazólicos lupeol antimaláricos - Teses I.
Souza Filho, José Dias de , Orientador. II. Oliveira,
Alaíde Braga de, Co-orientador III. Título.

CDU 043

UFMG

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEx
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3409-5732
FAX: 031 - 3409-5711
E-MAIL: pgquimic@qui.ufmg.br



"Síntese e Atividade Antimalárica de Derivados 1,2,3-Triazólicos do Lupeol"

Tatiane Freitas Borgati

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. José Dias de Souza Filho - Orientador
UFMG

Prof. Geraldo Célio Brandão
UFOP

Prof. Eufrânio Nunes da Silva Júnior
UFMG

Belo Horizonte, 19 de julho de 2013.

Este trabalho foi realizado sob a orientação do Prof. Dr. José Dias de Souza Filho, co-orientação da Profa. Dra. Alaíde Braga de Oliveira e colaboração do Prof. Dr. Guilherme Rocha Pereira.

*A Deus, por sempre estar ao meu lado me guiando e
amparando.*

À Virgem Maria, pela sua poderosa intercessão.

Aos meus pais, por fazerem dos meus sonhos os seus.

Aos meus irmãos, por todo apoio.

Agradecimentos

A Deus, que por sua misericórdia permitiu que eu chegasse até aqui. A Nossa Senhora das Graças, por mais esta graça alcançada. A Santa Rita dos Impossíveis, pela intercessão em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis.

Aos meus pais, por sempre estarem ao meu lado me incentivando. Agradeço o amor a mim dedicado em todos os momentos o que me ajudou a superar cada obstáculo.

Ao Lucas pelo apoio e carinho.

Ao Thiago, pela grande ajuda que sempre me salvou em todos os momentos.

À Universidade Federal de Minas Gerais, em especial ao Departamento de Química e a Faculdade de Farmácia pela oportunidade concedida.

Ao Prof. José Dias, pela oportunidade e confiança.

À Professora Alaíde Braga de Oliveira, que através do seu exemplo de uma profissional tão dedicada e compromissada com o ensino e com o conhecimento, contribuiu, enormemente, para o meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada Professora pela oportunidade, confiança e convívio.

Ao Fernando Silva, pela enorme contribuição na realização deste trabalho e pelo exemplo de humildade, simplicidade e sabedoria.

À Adreanne, pela ajuda durante a parte experimental, principalmente por fornecer o material vegetal.

Aos Professores Geraldo Célio, Rodrigo Pádua e Guilherme Pereira pela disponibilidade em me ajudar em todos os momentos.

À Renata e Maria Fernanda, pela realização dos testes biológicos e por sempre esclarecerem minhas dúvidas em relação a eles.

A Dayane e a Mirelinha pela grande ajuda.

À família fitoquímica, pelo convívio, companheirismo e auxílio na realização deste trabalho.

As minhas avós, pelas orações.

À CAPES, FAPEMIG e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

E a todos, que de alguma maneira contribuíram na realização deste trabalho, o meu muito obrigada.

*“Dê-me, Senhor, agudeza para entender,
capacidade para reter, método e faculdade para aprender,
sutileza para interpretar, graça e abundância para falar.
Dê-me, Senhor, acerto ao começar, direção ao progredir
e perfeição ao concluir”.*

São Tomás de Aquino

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE ESQUEMAS	iv
ÍNDICE DE TABELAS	v
LISTA ABREVIATURAS, SIGLAS DE E SÍMBOLOS	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 A situação da malária no mundo	1
1.2 A situação da malária no Brasil	2
1.3 Ciclo de vida do parasito da malária humana	3
1.4 Quimioterapia da malária	5
1.5 O uso das planta medicinais	9
1.6 Reações “click”	13
2 PROPOSTA DE TRABALHO	15
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
3.1 Obtenção do lupeol	17
3.1.1 Obtenção do material vegetal	17
3.1.2 Preparação do Extrato bruto a partir de cascas de <i>Parahancorniafasciculata</i>	17
3.1.3 Fracionamento por cromatografia em coluna do extrato bruto de cascas <i>Parahancorniafasciculata</i>	18
3.1.4 Hidrólise alcalina da mistura de lupeol e ésteres do lupeol obtida da coluna cromatográfica do extrato bruto de cascas de <i>Parahancorniafasciculata</i> .	18
3.2 Síntese dos derivados triazólicos do lupeol	19
3.2.1 Síntese do éter propargílico do luepol	19
3.2.2 Síntese das azidas orgânicas	21
3.2.3 Síntese dos derivados triazólicos do lupeol por reação click	25
3.3 Caracterização espectrométrica das substâncias obtidas	30
3.3.1 Caracterização do lupeol	30
3.3.2 Caracterização da Azida1	33
3.3.3 Caracterização do TB1	38
3.3.4 Caracterização do TB2	40
4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DOS COMPOSTOS SINTETIZADO	51
5 PARTE EXPERIMENTAL	55
5.1 Materiais e Métodos	55
5.2 Percolação do material vegetal	57
5.3 Fracionamento por cromatografia em coluna do extrato bruto de cascas de <i>Parahancorniafasciculata</i>	58
5.4 Hidrólise alcalina da mistura de lupeol e ésteres do lupeol obtida da coluna cromatográfica do extrato bruto de cascas de <i>Parahancorniafasciculata</i>	58
5.5 Síntese do éter propargílico do lupeol	59

5.6	Síntese das azidas orgânicas	60
5.7	Procedimento geral da reação “click”	64
5.8	Métodos do bioensaio da atividade antimalárica	68
5.8.1	Avaliação da atividade antimalárica <i>in vitro</i> contra o <i>P. falciparum</i> pela quantificação da pLDH	68
5.8.2	Ensaio de citotoxicidade	68
6	CONCLUSÃO	70
7	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	71
	ANEXO	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Área de prevalência da malária no mundo.	2
Figura 2	Ciclo de vida do parasita da Malária humana.	5
Figura 3	Fórmula estrutural da artemisinina.	7
Figura 4	Fórmula estrutural da quinina e da quinidina.	7
Figura 5	Fórmula estrutural da mefloquina.	8
Figura 6	Fórmulas estruturais das aminoquinolinas: cloroquina e primaquina.	9
Figura 7	Fórmulas estruturais dos antimaláricos da classe dos antifolatos: proguanil e sulfadoxina.	9
Figura 8	<i>Parahancorniafasciculata</i> (Poir) Benoist árvore, galhos e frutos.	11
Figura 9	Fórmula estrutural do lupeol.	11
Figura 10	Fórmula estrutural do 1,2,3 triazol 1,4 dissubstituído.	12
Figura 11	Fórmulas estruturais do resveratrol e análogos.	12
Figura 12	Fórmulas estruturais e rendimento do alcino (TB1) e dos dostriazóis sintetizados. (TB2 a TB6).	29
Figura 13	Espectro na região de infravermelho do lupeol (ATR).	31
Figura 14	Espectro de RMN de ^1H do lupeol (200MHz, CDCl_3).	31
Figura 15	Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT135 do lupeol (200 MHz, CDCl_3).	32
Figura 16	Espectro na região de infravermelho da azida1(ATR).	33
Figura 17	Espectro de RMN de ^1H da azida1 (200MHz, CDCl_3).	34
Figura 18	Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT135 da azida1 (200 MHz, CDCl_3).	35
Figura 19	Espectro na região de infravermelho do TB1 (ATR).	38
Figura 20	Espectro de RMN de ^1H do TB1 (400MHz, CDCl_3).	39
Figura 21	Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT135 do TB1 (400 MHz, CDCl_3).	40
Figura 22	Espectro na região de infravermelho da TB2 (ATR).	41
Figura 23	Espectro de RMN de ^1H da TB2 (400MHz, CDCl_3).	42
Figura 24	Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT 35 do TB2 (400 MHz, CDCl_3).	43
Figura 25	Espectro na região de infravermelho do lupeol (ATR).	79
Figura 26	Espectro de RMN de ^1H do lupeol (200MHz, CDCl_3).	79
Figura 27	Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT135 do lupeol (200 MHz, CDCl_3).	80
Figura 28	Espectro na região de infravermelho do TB1 (ATR).	80
Figura 29	Espectro de RMN de ^1H do TB1 (400MHz, CDCl_3).	81
Figura 30	Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT135 do TB1 (400 MHz, CDCl_3).	81
Figura 31	Espectro de Massa de Alta Resolução do TB1	82
Figura 32	Espectro na região de infravermelho da azida1(ATR).	82
Figura 33	Espectro de RMN de ^1H da azida1 (200MHz, CDCl_3).	83
Figura 34	Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT135 da azida1 (200 MHz, CDCl_3).	83
Figura 35	Espectro na região de infravermelho da azida2 (ATR).	84
Figura 36	Espectro de RMN de ^1H da azida2 (200MHz, CDCl_3).	84
Figura 37	Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT135 da	85

	azida 2 (200 MHz,CDCl ₃).	
Figura 38	Espectro na região de infravermelho da azida 3 (ATR).	85
Figura 39	Espectro de RMN de ¹ H da azida 3 (200MHz, CDCl ₃).	86
Figura 40	Espectro de RMN de ¹³ C e subespectro DEPT135 da azida 3 (200 MHz,CDCl ₃).	87
Figura 41	Espectro na região de infravermelho da azida 4 (ATR).	87
Figura 42	Espectro de RMN de ¹ H da azida 4 (200MHz, CDCl ₃).	87
Figura 43	Espectro de RMN de ¹³ C e subespectro DEPT135 da azida 4 (200 MHz,CDCl ₃).	88
Figura 44	Espectro na região de infravermelho da azida 5 (ATR).	88
Figura 45	Espectro de RMN de ¹ H da azida 5 (200MHz, CDCl ₃).	89
Figura 46	Espectro de RMN de ¹³ C e subespectro DEPT135 da azida 5 (200 MHz,CDCl ₃).	90
Figura 47	Espectro na região de infravermelho do TB2 (ATR).	90
Figura 48	Espectro de RMN de ¹ H do TB2 (400MHz, CDCl ₃).	90
Figura 49	Espectro de RMN de ¹³ C e subespectro DEPT135 do TB2 (400 MHz,CDCl ₃).	91
Figura 50	Espectro de Massa de Alta Resolução do TB2 .	92
Figura 51	Expansão do mapa de contorno COSY do TB2 na região de δ 9,4 a δ 6,8 (400 MHz, CDCl ₃).	93
Figura 52	Expansão do mapa de contornos COSY do TB2 na região de δ 5,5 a δ 0,0 (400 MHz, CDCl ₃).	93
Figura 53	Expansão do mapa de contornos HSQC do TB2 na região de δ 9,5 a δ 6,9 (400 MHz, CDCl ₃).	94
Figura 54	Expansão do mapa de contornos HSQC do TB2 na região de δ 5,5 a δ 2,5 (400 MHz, CDCl ₃).	94
Figura 55	Espectro na região de infravermelho do TB3 (ATR).	95
Figura 56	Espectro de RMN de ¹ H do TB3 (400MHz, CDCl ₃).	95
Figura 57	Espectro de RMN de ¹³ C e subespectro DEPT135 do TB3 (400 MHz,CDCl ₃).	96
Figura 58	Expansão do mapa de contornos COSY do TB3 na região de δ 9,2 a δ 7,1 (400 MHz, CDCl ₃).	96
Figura 59	Expansão do mapa de contornos COSY do TB3 na região de δ 6,0 a δ 2,0 (400 MHz, CDCl ₃).	97
Figura 60	Expansão do mapa de contornos HSQC do TB3 na região de δ 9,4 a δ 7,2 (400 MHz, CDCl ₃).	97
Figura 61	Expansão do mapa de contornos HSQC do TB3 na região de δ 5,0 a δ 2,0(400 MHz,CDCl ₃).	98
Figura 62	Espectro de Massa de Alta Resolução do TB3 .	98
Figura 63	Espectro na região de infravermelho do TB4 (ATR).	99
Figura 64	Espectro de RMN de ¹ H do TB4 (400MHz, CDCl ₃).	99
Figura 65	Espectro de RMN de ¹³ C e subespectro DEPT135 do TB4 (400 MHz,CDCl ₃).	100
Figura 66	Expansão do mapa de contornos COSY do TB4 na região de δ 9,0 a δ 3,0 (400 MHz, CDCl ₃).	100
Figura 67	Espectro de Massa de Alta Resolução do TB4 .	101
Figura 68	Espectro na região de infravermelho do TB5 (ATR).	102
Figura 69	Espectro de RMN de ¹ H do TB5 (400MHz, CDCl ₃).	103
Figura 70	Espectro de RMN de ¹³ C e subespectro DEPT135 do TB5	103

	(400 MHz, CDCl ₃)	
Figura 71	Expansão do mapa de contornos COSY do TB5 na região de δ 8,0 a δ 0,0 (400 MHz, CDCl ₃)	104
Figura 72	Expansão do mapa de contornos HSQC do TB5 na região de δ 9,5 a δ 0,5 (400 MHz, CDCl ₃)	104
Figura 73	Espectro de Massa de Alta Resolução do TB5 .	105
Figura 74	Espectro na região de infravermelho do TB6 (ATR).	105
Figura 75	Espectro de RMN de ¹ H do TB6 (400MHz, CDCl ₃).	106
Figura 76	Espectro de RMN de ¹³ C e subespectro DEPT135 do TB6 (400 MHz, CDCl ₃).	106
Figura 77	Expansão do mapa de contornos COSY do TB6 na região de δ 9,0 a δ 0,0 (400 MHz, CDCl ₃).	107
Figura 78	Espectro de Massa de Alta Resolução do TB6 .	107

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1	Síntese por reação “click” de híbridos triazólicos a partir da 4-azido-7-cloroquinolina e chalconas.	13
Esquema 2	Reação “click”.	14
Esquema 3	Proposta de síntese dos híbridos triazólicos.	15
Esquema 4	Mecanismo de hidrólise básica de um éster	18
Esquema 5	Obtenção do éter propargílico do lupeol (TB1).	19
Esquema 6	Mecanismo da reação SN_2 na síntese do éter propargílico do lupeol.	20
Esquema 7	Síntese das azidas orgânicas.	22
Esquema 8	Mecanismo SN_{ar} na síntese da 4-azido-7-cloroquinolina (1) a partir da 4,7 dicloroquinolina.	23
Esquema 9	Equação geral representando a síntese das azidas orgânicas 2 e 3 a partir das respectivas aminas.	24
Esquema 10	Síntese de híbridos triazólicos do lupeol por reação “click”.	25
Esquema 11	Mecanismo proposto para a reação “click”.	27
Esquema 12	Fundamento químico do teste biológico.	51

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Condições da reação “click” para obter os derivados triazólicos.	28
Tabela 2	Comparação dos dados de RMN ¹ H das azidas 1-5 .	36
Tabela 3	Comparação dos dados de RMN ¹³ C das azidas 1-5 .	37
Tabela 4	Comparação dos dados de RMN ¹ H dos compostos lupeol e TB1 .	45
Tabela 5	Comparação dos dados de RMN ¹³ C dos compostos lupeol e TB1 .	46
Tabela 6	Comparação dos dados de RMN ¹ H dos compostos TB2-TB6 .	48
Tabela 7	Comparação dos dados de RMN ¹³ C dos compostos TB2-TB6 .	49
Tabela 8	Porcentagem de inibição dos compostos triazólicos frente ao <i>P. falciparum</i> .	53
Tabela 9	Parâmetros para a classificação de uma substância em relação a sua atividade biológica.	53
Tabela 10	Citotoxicidade dos compostos em relação às células HEPG2.	54

SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- AIDS** Síndrome da deficiência imunológica adquirida
- APAD** 3 acetilpiridina adenina dinucleotídeo
- atm** atmosfera
- °C** graus Celsius
- CAM** molibdato cérico amoniacal (do inglês *CericAmmoniumMolybdate*)
- CC₅₀** concentração citotóxica de 50% das células
- CCD** cromatografia em camada delgada
- CCS** cromatografia em coluna de sílica
- CE₅₀** concentração efetiva 50
- cm⁻¹** centímetros recíprocos
- COSY** espectroscopia de correlação (do inglês *CorrelationSpectroscopy*)
- CuCAA** cicloadição entre alcino e azida catalisada por cobre (do inglês *Copper-CatalyzedAlkyne-AzideCycloaddition*)
- d** duplete
- DCM** diclorometano
- DDT** dicloro-difenil-tricloroetano
- DEPT** intensificação sem distorção por transferência de polarização (do inglês *DistortionlessEnhancementbyPolarizationTransfer*)
- DMF** dimetilformamida
- EDTA** ácido etilenodiamino tetra-acético
- G6PD** deficiência em glicose-6-fosfato
- GA** grupo abandonador
- HEX** hexano
- HRMS** espectrometria de massas de alta resolução (do inglês - *High Resolution Mass Spectrometry*)
- HSQC** coerência heteronuclear de simples quanta (do inglês *Heteronuclear Single Quantum Coherence*)
- Hz** Hertz
- IUPAC** *International Union of Pure and Applied Chemistry*
- IV** infravermelho
- J** constante de acoplamento escalar
- hLDH** lactato desidrogenase humana

pLDH lactato desidrogenase do *Plasmodium*

m múltiplo

NBT nitro blue tetrazolium

OMS Organização Mundial de Saúde (do inglês *World Health Organization*)

pH potencial hidrogeniônico

RMN de ¹³C ressonância magnética nuclear de carbono treze

RMN de ¹H ressonância magnética nuclear de hidrogênio

s simpleto

sl simpleto largo

SN₂ substituição nucleofílica bimolecular

SN_{ar} substituição nucleofílica aromática

t tripleto

t.a. temperatura ambiente

THF tetra-hidrofurano

TMS tetrametilsilano

RESUMO

A presente dissertação descreve o isolamento de um triterpeno pentacíclico, o lup-20(29)-en-3 β -ol (lupeol), a partir de cascas de *Parahancornia fasciculata* (Poir.) Benoist (Apocynaceae) e a utilização deste como material de partida para a síntese de híbridos triazólicos. O lupeol foi obtido por percolação exaustiva das cascas da *P. fasciculata*, coletadas no município de Moju, PA. Tendo em vista a atividade antimalárica desse triterpeno e de derivados triazólicos descritos na literatura, os produtos obtidos poderiam apresentar atividade antimalárica superior àquela descrita para o lupeol. Os híbridos triazólicos do lupeol foram sintetizados por reações de cicloadição catalisadas por Cu (I) (reação “click”), entre um alcino terminal e azidas orgânicas. Dessa forma, o lupeol foi convertido no seu éter propargílico que, por reação “click” com diferentes azidas orgânicas, levou a cinco derivados triazólicos, todos inéditos, que foram denominados **TB1** a **TB6**. Todas as substâncias foram caracterizadas pelos seus espectros no IV, HRMS e RMN de ¹H e de ¹³C. A atividade antimalárica *in vitro* dos produtos obtidos foi avaliada em culturas de *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina (clone W2) pelo método da lactato desidrogenase (*p*LDH). O éter propargílico do lupeol (**TB1**) foi a substância mais ativa apresentando redução da parasitemia de 81%, na concentração de 50 μ g/mL, enquanto que os derivados triazólicos foram menos ativos do que o lupeol, com valores de redução da parasitemia variando de 9% a 26%.

ABSTRACT

This manuscript reports on the isolation of lup-20(29)-en-3 β -ol (lupeol), a pentacyclic triterpene, from the stem bark of *Parahancornia fasciculata* (Poir.) Benoist (Apocynaceae) and its use as starting material for the synthesis of triazole hybrids. Lupeol was extracted by exhaustive percolation of *P. fasciculata* stem bark which was collected in the municipality of Moju, PA. Lupeol is known to present a moderate *in vitro* antimalarial activity while some synthetic triazole hybrid compounds are reported as good antimalarials what has motivated the present work in the hope that any lupeol triazole derivative might be more active than lupeol. The lupeol triazole hybrids were synthesized by cycloaddition reactions catalized by Cu (I) (click reaction) between a terminal alkyne and an organic azide. In a first step lupeol was converted to its propargyl ether (TB1) which was submitted to click reactions with different organic azides leading to five new triazole hybrids TB2 - TB6. All the compounds synthesized were characterized by their spectrometric analyses IR, HRMS, ¹H and ¹³C NMR. The *in vitro* antimalarial activity of the compounds was evaluated against chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* (W2 clone) by the lactate dehydrogenase methodology (ρ LDH). The lupeol propargyl ether was the most active compound causing 81% inhibition of the parasite growth in the concentration of 50 μ g/mL while the triazole derivatives were less potent than lupeol with inhibition growth ranging from 9% to 26%.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A malária no mundo

A malária, também conhecida como maleita ou paludismo, continua sendo um dos principais problemas de saúde pública mundial. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2012), foram registrados 219 milhões de casos de malária e 660.000 mortes devido a esta doença, em 2010. Cerca de 60% dos novos casos da doença ocorreram na África subsahariana, onde 90% são fatais. Ainda, segundo a OMS, em 2012, 3 mil crianças morreram de malária, por dia na África, e os custos, diretos e indiretos, dessa doença para os países são de, aproximadamente, US\$ 2 bilhões de dólares por ano. Essa enfermidade mata, anualmente, duas vezes mais que a síndrome da deficiência imunológica adquirida (do inglês AIDS) e mais que qualquer outra doença infecciosa no continente africano (OMS, 2012).

Embora com prevalência diferente, a malária está presente em mais de 90 países. As regiões mais afetadas, além da África, são América do Sul e Ásia (Figura 1) (OMS, 2005). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, em 2011, 49 milhões de pessoas viviam em área de risco e 99% dos casos da doença se concentram na região da Amazônia Legal.

A malária é tipicamente uma doença do mundo subdesenvolvido. A alta taxa de mortalidade está relacionada a países onde a população vive em extrema pobreza, com uma renda inferior a US\$ 1,25 por dia. (World Malaria Report, 2012).

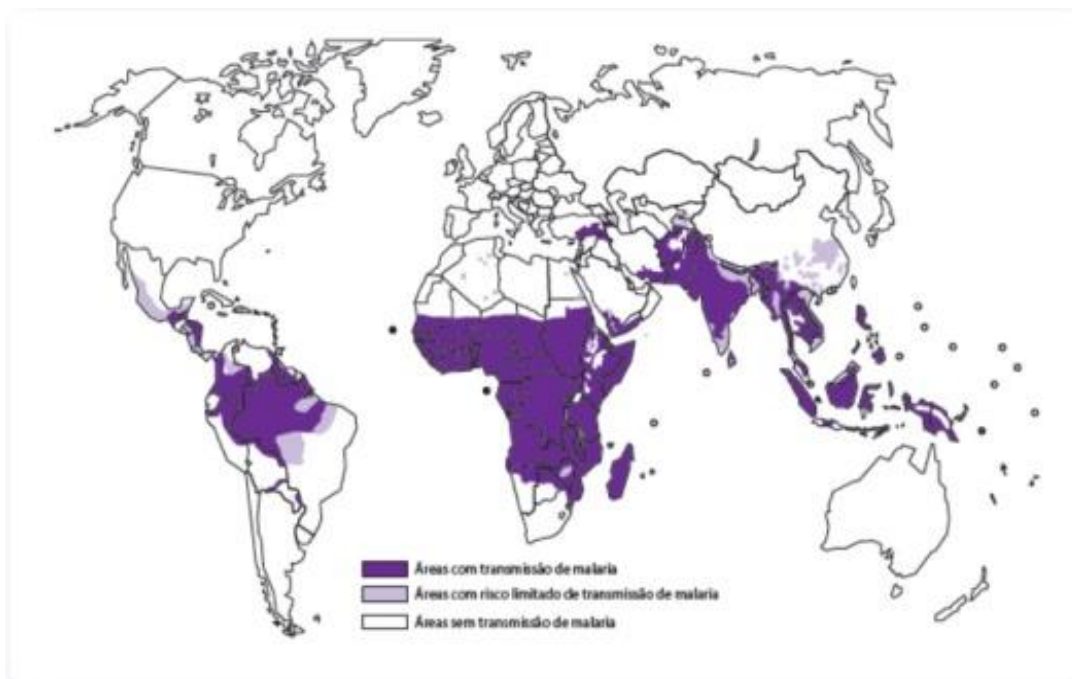


Figura 1: Área de prevalência da malária no mundo, 2005. (Adaptado de OMS, 2005)

1.2 A malária no Brasil

A história da malária no Brasil começou a ter destaque no final do século XIX, quando uma grande epidemia explodiu na região amazônica. Pelo fato da borracha ter se tornado uma matéria prima preciosa levou à Amazônia uma legião de trabalhadores que buscavam a riqueza imediata. Dessa migração maciça, originou-se a primeira grande epidemia amazônica de malária (Camargo, 2003).

A segunda grande epidemia de malária no Brasil teve origem, no final do século XIX, devido a construção de uma estrada de ferro que ligaria Santo Antônio (hoje parte de Porto Velho) a Guajará-Mirim, com o objetivo de dar vazão ao látex boliviano (Pinto, 1993). Assim, muitos brasileiros que lá foram trabalhar contraíram a doença. Dessa forma, no início do século XX, a malária era endêmica em todo o território brasileiro, presente em todas as capitais do país. E apenas, após a segunda guerra mundial, com o advento dos inseticidas de ação residual, como o DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) e juntamente com

medidas de saneamento ambiental, ocorreu uma drástica redução de novos casos da doença, ficando esta restrita apenas à região amazônica (Alves *et al.*, 2002).

Uma importante característica, que deve ser ressaltada quando se fala sobre a história da malária no Brasil, é que o controle da doença foi um sucesso em todo o território brasileiro, exceto na Amazônia. Isso pode ser explicado por vários fatores: o primeiro deles é que o combate ao mosquito vetor, como por exemplo, o *Anopheles darlingi*, é muito difícil, pois para isso seria necessário borrifar inseticidas em toda a floresta amazônica, a qual é o habitat natural do inseto. Um segundo fator que impossibilita a erradicação da doença na região, é que a floresta Amazônica, por ser uma floresta tropical, é o ambiente natural de criadouros de mosquitos, então medidas de saneamento que visam destruir tais criadouros iriam destruir a floresta como um todo. Assim, para essa população, que vive sob área de risco de contrair a doença, resta apenas à existência de medicamentos eficazes, que possibilite a redução da taxa de mortalidade e os efeitos nocivos à saúde humana ocasionados pela malária (Camargo, 2003).

1.3 Ciclo de vida do parasito da malária humana

A malária é uma doença parasitária, transmitida pela fêmea do mosquito *Anopheles* ao humano (Vale *et al.*, 2005). Há quatro espécies de parasitas responsáveis pela doença: *Plasmodium falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax*, e *P. malariae*, sendo que o *P. falciparum* é o mais virulento. (WHO, 2005).

O ciclo do *Plasmodium* (Figura 2) inicia-se quando, esporozoítos, do parasito, são transferidos para a corrente sanguínea do homem, através da picada da fêmea infectada. Após entrarem na corrente sanguínea, esses esporozoítos invadem as células hepáticas, dando início à fase assintomática do ciclo, a qual dura cerca de seis dias. Após esse período, os esporozoítos darão origem, a partir de divisão assexuada, a milhares de merozoítos. Estes irão deixar as células do fígado e infectar os eritrócitos, iniciando o estágio sanguíneo da

doença. A partir de reprodução assexuada, em ciclos de 48 a 72 horas, dependendo da espécie do *Plasmodium*, os merozoítos se desenvolverão em trofozoítos e esquizontes. Nesse estágio começa uma nova fase, na qual os esquizontes irão se dividir em merozoítos eritrocíticos, os quais ao romper os glóbulos vermelhos invadem um novo eritrócito. A ruptura das hemácias, pelos merozoítos eritrocíticos, provoca febre e calafrios, sintomas comuns da malária (White, 2004).

As fases assexuadas do ciclo são patogênicas e os indivíduos infectados podem apresentar disfunções em vários órgãos do corpo (White, 2004). Além disso, durante a fase eritrocítica, os parasitos utilizam a hemoglobina da célula hospedeira como fonte de aminoácidos para a sua reprodução (Vale, *et al.*, 2005).

Num processo induzido por *stress*, parte dos merozoítos, presentes na corrente sanguínea, não se transformam em trofozoíto nem, em esquizontes, mas sofre diferenciação em gametócitos masculinos e femininos, os quais são transmitidos ao mosquito, quando este suga o sangue de um indivíduo infectado, iniciando-se o ciclo no mosquito (Vale, *et al.*, 2005). Dessa forma, no interior do intestino, da fêmea do *Anopheles*, ocorre a fase sexuada do ciclo, na qual os gametócitos femininos se diferenciam em macrogametas e os masculinos em microgametas flagelados. Os gametas masculino e feminino fundem-se, originando um zigoto, que se transforma em oocineto móvel. Este penetra a parede do intestino do mosquito, posicionando-se entre as membranas exterior e basal, sob a forma de oocisto. No interior desses oocistos, ocorre divisão assexuada, produzindo milhares de esporozoítos, os quais rompem o oocisto e migram para as glândulas salivares do mosquito, que serão inoculados ao homem no momento da picada (Wiesner *et al.*, 2003).

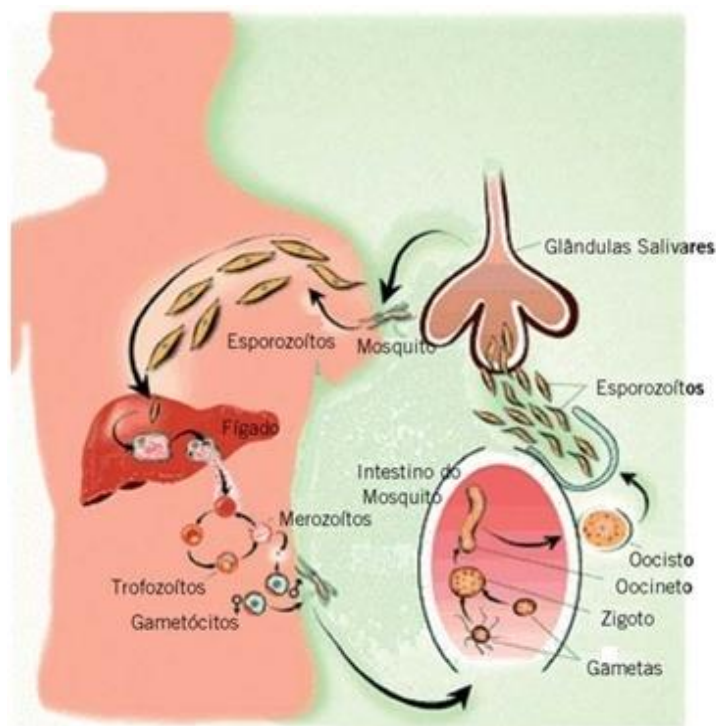


Figura 2: Ciclo de vida do *Plasmodium*, parasito da malária humana.

(Adaptado de Vale *et al.*, 2005)

1.4 Quimioterapia da malária

Devido à grande complexidade do ciclo de vida do *Plasmodium* a erradicação da malária é um caminho longo e repleto de obstáculos.

Substâncias com propriedades antimaláricas têm sido usadas desde tempos remotos. Antes da Era Cristã, o *Ch`angshan*, uma preparação que consistia na pulverização da raiz da planta *Dichroa febrifuga*, já era conhecida pelos chineses quanto a sua eficácia no tratamento da doença (Vale *et al.*, 2005). Além disso, os índios peruanos, antes mesmo da chegada dos europeus ao continente Americano, usavam a casca da quina, espécie do gênero *Cinchona* (família Rubiaceae), para o tratamento da malária e que deram origem ao primeiro fármaco antimalárico, a quinina, isolada, na França, em 1829 (Camargo, 2003).

Desde o século passado, um grande esforço vem sendo realizado na pesquisa de novos antimaláricos de origem natural ou sintética (Vale *et al.*, 2005). Porém, até o presente momento, vários fármacos antimaláricos foram inicialmente uma esperança na erradicação da doença, mas que ao longo do tempo se tornaram ineficientes, ou, de uso limitado, devido ao aparecimento de problemas como efeitos adversos graves ao homem e, em especial, a crescente seleção de parasitos resistentes (Vale *et al.*, 2005).

Os fármacos antimaláricos englobam um grande número de moléculas orgânicas, as quais são, tradicionalmente, divididas em três famílias:

- a) Derivados artemisinínicos: são os derivados da artemisinina.
- b) Aminoálcoois: que incluem os alcaloides da quina e as aminoquinolinas sintéticas.
- c) Antifolatos: antibióticos com atividade antimalárica.

1.4.1 Fármacos Artemisinínicos

A artemisinina (Figura 3) é uma lactona sesquiterpênica obtida da *Artemisia annua* L, uma planta medicinal chinesa (Wiesner *et al.*, 2003). Essa substância é o agente antimalárico de ação mais rápida, com melhoras no quadro febril em 32 horas (Giao e Vries, 2001). A artemisinina e seus derivados são esquizonticidas sanguíneo com ação mais rápida e mais potente do que a cloroquina e quinina. Uma desvantagem ao utilizar esse fármaco no tratamento da malária é o curto tempo de meia vida dessa classe, cinco a sete dias, o que implica a necessidade de um tratamento com uma frequência maior de aplicação do fármaco (Giao e Vries, 2001).

Os derivados artemisinínicos estão sendo utilizados em combinações com outros antimaláricos, com o objetivo de reduzir o tempo de tratamento e minimizar a seleção de parasitos resistentes (Wiesner *et al.*, 2003).

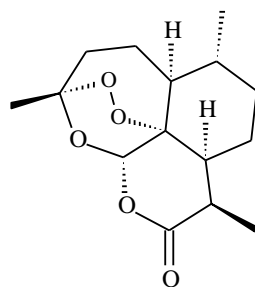


Figura 3: Fórmula estrutural da artemisinina.

1.4.2 Aminoálcoois

1.4.2.1 *Alcaloides da quina*

São alcaloides extraídos da casca da *Cinchona calysaia*, planta da família das Rubiáceas, utilizados como monoterapias no tratamento da malária. Porém, devido aos seus efeitos adversos, ao nível do sistema cardiovascular e a crescente seleção de *Plasmodium* resistente, tem se tornado necessário a combinação com outros antimaláricos (Taylor e White, 2005; Wiesner *et al.*, 2003). São exemplos de alcaloides da quina:

- a) *Quinina* e *Quinidina* (Figura 4): A grande vantagem da quinina, como antimalárico, se deve ao fato, de que ela possui uma solubilidade adequada para formulações intravenosas. Assim, é relevante para pacientes que não toleram medicação oral, porém a elevada dose requerida pode levar a arritmia cardíaca grave (Taylor e White, 2005; Wiesner *et al.*, 2003). A quinidina é o diastereoisômero da quinina, seu uso é limitado por causa dos efeitos adversos ao nível do sistema cardiovascular. Estudos constataram que a quinidina é mais eficaz contra cepas brasileiras de *P. falciparum* (Wiesner *et al.*, 2003).

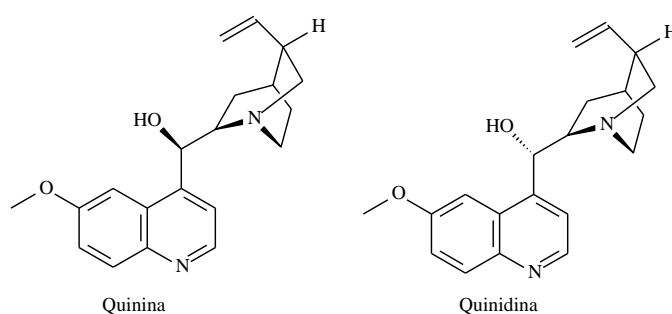


Figura 4: Fórmulas estruturais da quinina e da quinidina.

1.4.2.1.1 Mefloquina

A mefloquina (Figura 5) tem ação nas fases sanguíneas do ciclo de vida do parasito e a desvantagem do seu uso, é que este fármaco, por ser muito lipofílico, possui uma elevada variabilidade farmacocinética, o que pode conduzir a níveis subterapêuticos, além de ser muito tóxica sendo recomendado seu uso com certa cautela (Giao e Vries, 2001).

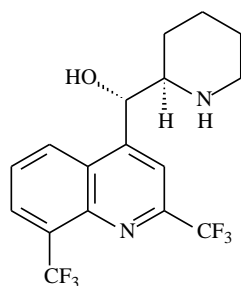


Figura 5: Fórmula estrutural da mefloquina.

1.4.2.2 Aminoquinolinas

- a) Cloroquina. É um dos antimaláricos mais importantes da história da indústria químico-farmacêutica (Figura 6). Esse fármaco é um potente esquizonticida sanguíneo, eficaz contra as formas eritrocíticas de todas as espécies do *Plasmodium*. Seu alvo terapêutico é o processo de destoxificação do grupo heme resultante da degradação da hemoglobina do hospedeiro (Neill *et al.*, 1998). A primeira vez que se detectou, a resistência do parasita à cloroquina foi em 1959, na Ásia e América do Sul. O principal mecanismo de resistência de *Plasmodium* à cloroquina envolve o transporte ativo do fármaco, mediado por transportadores, para o exterior do parasito (Ursos e Roepe, 2002). Com o objetivo de aumentar a eficácia da cloroquina, ela é utilizada em combinação com outros antimaláricos, como por exemplo, os antifolatos (Giao e Vries, 2001).
- b) Primaquina. É o único agente que atua de maneira eficaz contra as formas exoeritrocíticas (hepáticas) do parasito (Figura 6). Como possui

atividade contra gametócitos, é o único fármaco bloqueador da transmissão da doença entre o homem e o mosquito (Giao e Vries, 2001). Porém, em indivíduos com deficiência em glicose-6-fosfato (G6PD) a primaquina está associada a efeitos adversos como anemia hemolítica ou meta-hemoglobinemia (conversão da oxi-hemoglobina à meta-hemoglobina, sendo incapaz de transportar o oxigênio aos diferentes tecidos).

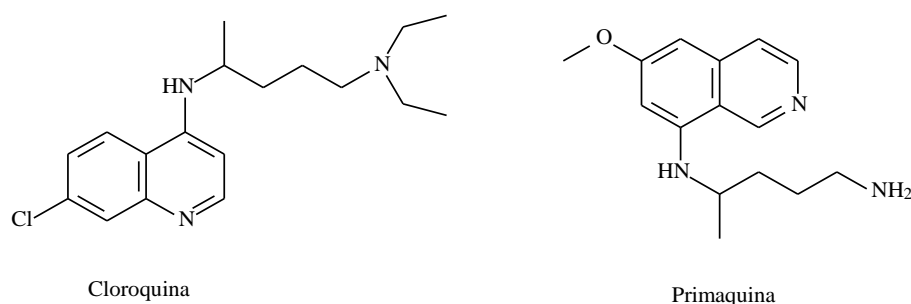


Figura 6: Fórmulas estruturais das aminoquinolinas: cloroquina e primaquina.

1.4.3 Antifolatos

Alguns antibióticos clássicos, como as biguanidinas e sulfonamidas (Figura 7), agem inibindo a biossíntese do folato, um fator de crescimento essencial para o parasito. Porém, os antimaláricos desta família são cada vez menos empregados, pelo fato da resistência generalizada de *Plasmodium* a esses medicamentos (Hyde, 2005).

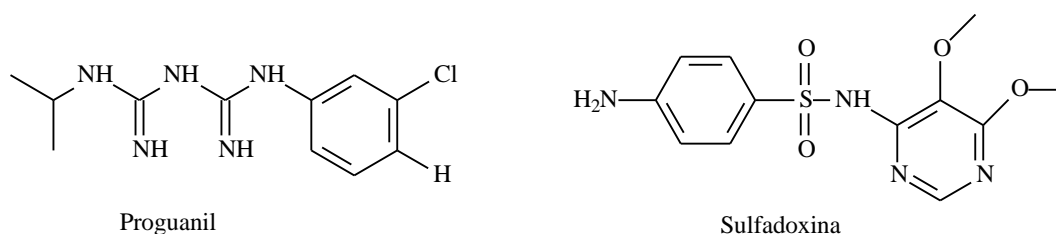


Figura 7: Fórmulas estruturais dos antimaláricos da classe dos antifolatos: proguanil, derivado biguanidínico e sulfadoxina um tipo de sulfonamida.

A luta para a erradicação da malária vem encontrando ao longo do tempo vários obstáculos. Muitos esforços foram direcionados na busca de novos fármacos, porém muitas moléculas já existentes não conseguem eliminar o *Plasmodium* sem colocar em risco a vida do hospedeiro. Dessa forma, o empenho ao combate à doença deve ser cada vez maior. Por isso, diversas estratégias são empregadas para descobrir um novo tratamento para a malária, como por exemplo, o estudo científico de plantas utilizadas pelas populações, em diferentes países, como medicamento no combate à doença.

1.5 O uso das plantas medicinais

A utilização de produtos naturais como compostos-modelo ou protótipos (“lead structures”) para o desenvolvimento de novos fármacos e agroquímicos é uma estratégia bastante antiga, mas que vem crescendo muito nos últimos anos (Copping e Duke, 2007).

A maioria das plantas medicinais da flora nativa brasileira é consumida apenas, com embasamento popular, sendo suas propriedades terapêuticas propagadas por usuários e comerciantes, muitas vezes de maneira irregular (Junior & Pinto, 2005). Um exemplo dessa situação é o caso da *Parahancornia fasciculata* (Poir.) Benoist, planta pertencente à família Apocynaceae (Figura 8), conhecida pelos nomes de amapá e amapazeiro (Van Den Berg e Silva, 1984). Trata-se de uma árvore de grande porte, chegando a alcançar 40 metros de altura, com troncos volumosos, folhas finas elípticas e sem pelos. Ocorre em clima tropical úmido, às margens dos rios e nas matas de terra firme de solo humoso e argiloso (Sampaio, 2000). Nas cascas do tronco da *P. fasciculata* há uma exsudação laticescente abundante, de sabor amargo, que é conhecida, popularmente, como leite do amapá-amargoso, e que representa um produto florestal importante para o mercado de Belém, PA (Serra *et al.*, 2010). Esse látex é utilizado pelas comunidades rurais e urbanas do estado do Pará, como um medicamento empregado em doenças inflamatórias, problemas respiratórios e no tratamento da malária (Sampaio, 2000).



Figura 8: *Parahancornia fasciculata* (Poir.) Benoist (Apocynaceae): árvore e galhos com frutos. (Fonte: IBAMA e LPF)

Estudos fitoquímicos realizados com o látex e com o pó da casca do tronco da *P. fasciculata*, evidenciaram a presença, dentre outras substâncias, de um triterpeno conhecido como lupeol e ésteres do lupeol (3-O-acil lupeol) (Carvalho *et al.*, 2001). O lup-20(29)-en-3 β -ol (Figura 9), ou simplesmente, lupeol, é um metabólito secundário do tipo triterpenopentacíclico que apresenta funções alceno e álcool secundário. Sua atividade antimalárica foi investigada experimentalmente, demonstrando que este composto age nos eritrócitos humanos, estimulando a formação de vesículas internas ao longo de toda a membrana da hemácia, provocando assim, alterações irreversíveis nesta célula. Tais mudanças impedem que os parasitas invadam os glóbulos vermelhos, impossibilitando a reprodução de *P. falciparum* e, conseqüentemente, o avanço da doença (Ziegler *et al.*, 2002).

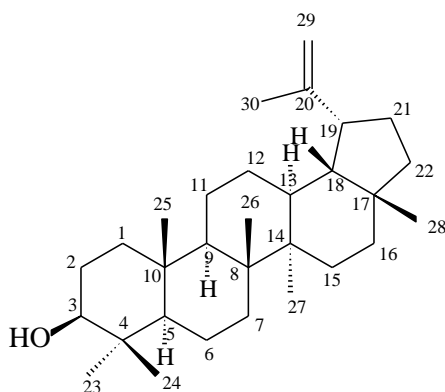


Figura 9: Fórmula estrutural do lupeol.

Outra classe de produtos naturais que são comuns na natureza e que possuem grande relevância biológica é a dos alcalóides, que contêm um heterociclo com um átomo de nitrogênio (Pholshettiwar e Varma, 2008). Representantes desta classe são os derivados da quinolina, a qual possui um amplo espectro de atividade biológica, como por exemplo, atividade herbicida (Jampileket *al.*, 2009; Musiolet *al.*, 2008), antifilariose (Chhajedet *al.*, 2010.) e antimalárica (Guantaiet *al.*, 2010).

Um sistema heterocíclico que tem despertado muito interesse ultimamente é aquele do 1,2,3-triazol (Figura 10), pois muitas vezes corresponde à parte da molécula responsável pela sua atividade biológica, ou seja, é o grupo farmacofórico (Whiting *et al.*,2006). Além disso, o anel 1,2,3-triazólico é de origem exclusivamente sintética e pode ser utilizado como estratégia de acoplamento entre duas ou mais moléculas de interesse visando a melhoria das suas características farmacológicas e farmacocinéticas (Medal e Tornøe, 2008). Um exemplo é o trabalho realizado por Pagliali e colaboradores (2006) que sintetizaram análogos do resveratrol, os quais apresentaram maior atividade citotóxica e antiproliferativa quando comparados com o protótipo natural (Figura 11).

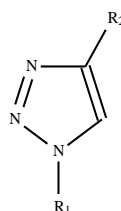


Figura 10: Fórmula estrutural do 1,2,3-triazol-1,4-dissubstituído.

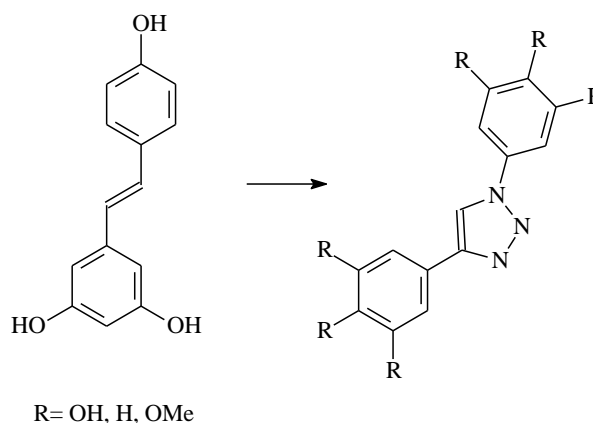
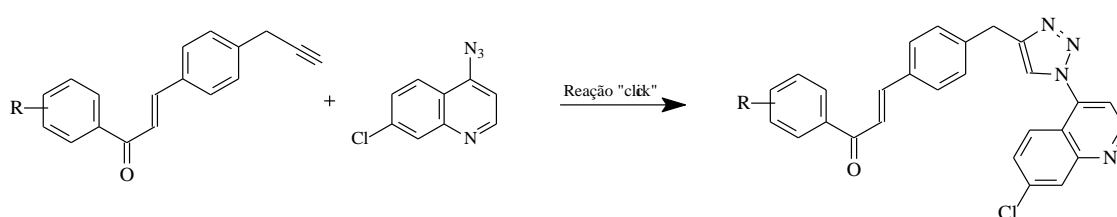


Figura 11: Fórmulas estruturais do resveratrol e análogos triazólicos.

A síntese de derivados 1,2,3-triazólicos foi utilizada para obtenção de um híbrido entre uma cloroquinolina e uma chalcona (Esquema 1). O núcleo 7-cloro-4-aminoquinolina da cloroquina, responsável pela atividade inibitória do crescimento do parasito da malária, o *P. falciparum*, foi incorporado as chalconas, que também mostraram atividade antimalárica. Essa estratégia explora a formação de fármacos híbridos, envolvendo a fusão de duas substâncias com atividade biológica, resultando num composto também ativo (Guantai *et al.*, 2010).



Esquema 1: Síntese por reação “click” de híbridos triazólicos a partir da 4-azido-7-cloroquinolina e alcinos derivados de chalconas.

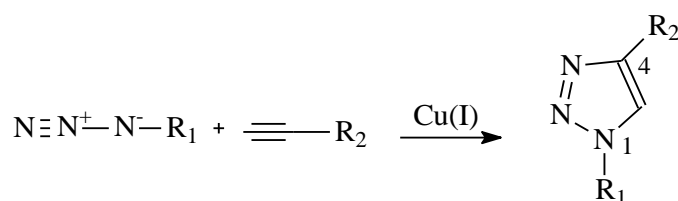
A formação de novas moléculas contendo o heterociclo 1,2,3-triazólico ocorreu a partir da cicloadição entre um alcino terminal e uma azida orgânica, numa reação catalisada por cobre. Esta reação, popularmente chamada de reação “click” (Sharpless *et al.*, 2001), tem sido amplamente explorada por apresentar características desejáveis em síntese orgânica, como por exemplo, facilidade de obtenção dos materiais de partida, condições brandas de reação e a grande estabilidade do produto (Sarachine e Gallo, 2009).

1.6 Reação “click”

O conceito de química “click” foi introduzido por Sharpless, em 2001, para descrever reações termodinamicamente favoráveis, que são capazes de conectar duas moléculas de forma simples, com altos rendimentos e fácil execução. Além disso, essas reações são regioespecíficas, os produtos são obtidos com alto grau de pureza, sem necessidade de condições especiais de

reação e os solventes são, geralmente, inofensivos ao meio ambiente, como a água, ou então, de fácil remoção (Sharpless *et al.*,2001).

Uma série de reações clássicas da química orgânica se enquadra nas reações “click” como: adições a ligações múltiplas carbono-carbono e a abertura nucleofílica de oxiranas e aziridinas (Moses e Moorhouse, 2007). Dentre as reações classificadas como reações “click” um exemplo perfeito dessa categoria é a cicloadição 1,3-dipolar entre um alcino e uma azida orgânica catalisada por Cu(I), com formação regioespecífica, do isômero 1,2,3-triazol-1,4 dissustituído, também conhecida pela sigla em inglês CuAAC (Esquema 2) (Sharpless *et al.*,2001). Pelo fato dessa reação ser muito utilizada e apresentar todas as características da química “click” passou a ser comumente chamada de reação “click”.



Esquema 2: Reação “click” entre um alcino terminal e uma azida orgânica para formação de um 1,2,3-triazol-1,4-dissustituído.

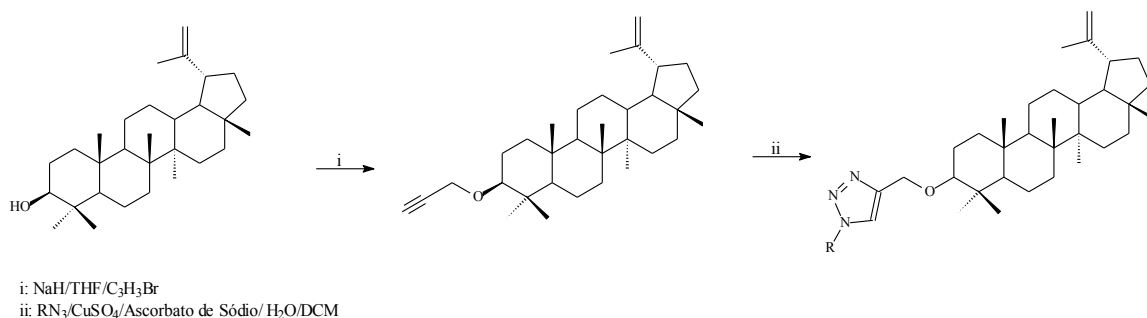
Tendo em vista a praticidade da reação “click” e explorando a atividade antimalárica do lupeol, tornou-se de interesse a obtenção de híbridos deste triterpeno com azidas orgânicas, com o objetivo de se estudar a atividade antimalárica dos compostos formados.

2. PROPOSTA DE TRABALHO

Devido à necessidade de substâncias que possuam uma atividade antimalárica relevante, sem colocar em risco a saúde do homem, explorando a atividade antimalárica do lupeol e a versatilidade da reação “click”, objetiva-se com este trabalho a síntese de novas moléculas com potencial atividade antimalárica.

Uma estratégia promissora e amplamente explorada, para o desenvolvimento de novos fármacos, consiste em efetuar a síntese de moléculas híbridas pela combinação de estruturas de substâncias conhecidas, que apresentam uma atividade antimalárica moderada ou fraca, na expectativa de que os híbridos sejam mais potentes e com a redução dos efeitos adversos, como descrito no trabalho de Viegas e colaboradores, 2007. Dessa forma, a proposta deste trabalho baseia-se nesta estratégia e tem como objetivo a síntese, através da reação “click”, de híbridos 1,2,3-triazólicos inéditos, com potencial atividade antimalárica, a partir do lupeol.

De acordo com o esquema de síntese proposto para a obtenção dos novos híbridos (Esquema 3), os triazóis serão obtidos a partir da cicloadição 1,3-dipolar catalisada por Cu(I), entre um alcino terminal, no caso, o éter propargílico do lupeol, e diferentes azidas orgânicas. O lupeol, material de partida, será obtido a partir de cascas da *P. fasciculata* (Carvalho *et al.*, 2001) e as azidas orgânicas serão sintetizadas a partir de aminas e haletos orgânicos de origem comercial.



Esquema 3: Proposta de síntese de híbridos 1,2,3-triazólicos a partir do lupeol.

Para atingir os objetivos propostos neste trabalho, foram realizadas as seguintes etapas:

- ◆ obtenção e fracionamento cromatográfico do extrato bruto de cascas de *P. fasciculata*;

- ◆ hidrólise alcalina de uma mistura de lupeol e ésteres do lupeol e purificação do lupeol obtido;

- ◆ síntese do éter propargílico do lupeol;

- ◆ síntese das azidas orgânicas;

- ◆ síntese dos 1,2,3-triazóis por reação do éter propargílico do lupeol com azidas orgânicas obtidas;

- ◆ elucidação estrutural das substâncias obtidas por métodos espectroscópicos de análise;

- ◆ realização de testes *in vitro* de atividade antimalárica e de citotoxicidade com os produtos obtidos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Obtenção do lupeol

3.1.1 Material vegetal

As cascas da *P. fasciculata* foram coletadas de um exemplar localizado no Campo Experimental da Embrapa Amazônia Oriental, situado no Km 30 da rodovia PA-150, Município de Moju, Estado do Pará, em março de 2011. O material coletado foi identificado pela Prof^a. Dra. Márlia Regina Coelho Ferreira, da Universidade Federal Rural da Amazônia. Uma exsicata deste material foi depositada no herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi, em Belém/PA, sob o número ME202701.

3.1.2 Preparação do extrato de cascas de *P. fasciculata*.

Um método usual para a extração de produtos naturais é por percolação exaustiva, utilizando vários solventes, com gradativo aumento da polaridade (Magalhães, 2012). Porém, essa metodologia não foi empregada neste trabalho, uma vez que, em estudo realizado anteriormente (Silva, 2013) foi obtido, com sucesso, o extrato de triterpenos, a partir da alcalinização do material vegetal com hidróxido de amônio e posterior extração com diclorometano. Esta metodologia é, usualmente, empregada na extração de alcalóides (Saldaña *et al.*, 1997). No entanto, constatou-se a ausência desta classe de produtos naturais em *P. fasciculata* e a predominância de triterpenos.

Assim, ao realizar o tratamento do material vegetal com uma solução de NH₄OH, formam-se sais de compostos de natureza ácida, como os fenóis, presentes na planta e a percolação com diclorometano, possibilita a extração, predominantemente, de compostos neutros de baixa polaridade, como triterpenos. Desse modo, obtém-se, no final, um extrato bruto com uma menor diversidade de componentes, o que facilitou a purificação e a obtenção do lupeol.

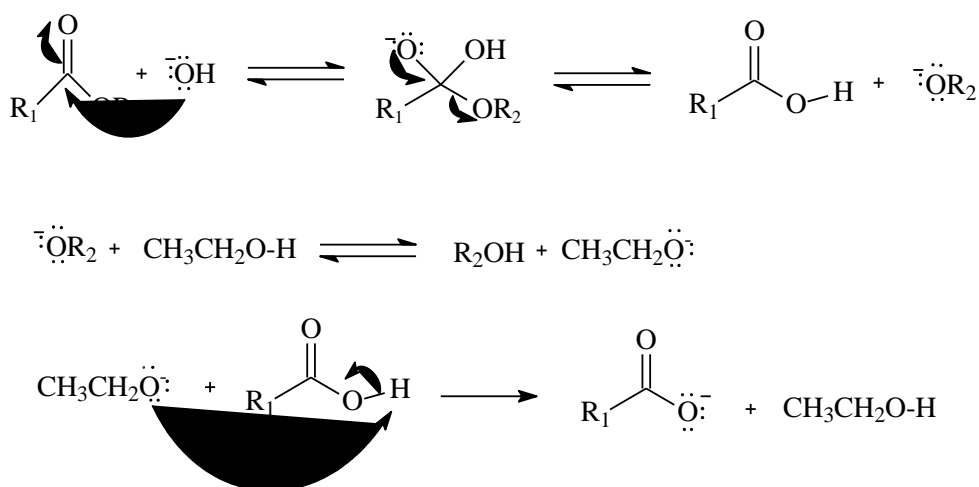
3.1.3 Fracionamento do extrato bruto de cascas de *P. fasciculata* por cromatografia em coluna.

O extrato bruto foi submetido à separação cromatográfica em coluna de sílica gel, obtendo-se, no final, uma mistura do lupeol e de éster(es) do lupeol (3-O-acyl lupeol). Esta mistura já era esperada, pois o triterpeno encontra-se na planta na sua forma livre e como ésteres do lupeol (Carvalho *et al.*, 2001).

3.1.4 Hidrólise alcalina da mistura de lupeol e ésteres do lupeol obtida da coluna cromatográfica do extrato bruto de cascas de *P. fasciculata*.

Com o objetivo de se obter apenas o lupeol, a mistura lupeol e ésteres foi submetida a uma hidrólise básica, também denominada de saponificação, a qual é uma das reações mais conhecidas da química orgânica.

O mecanismo proposto para a hidrólise básica (Esquema 4) é o ataque nucleofílico do íon hidróxido, ao carbono carbonílico do éster, formando um intermediário tetraédrico, o qual origina um ácido carboxílico e um alcóxido, que em meio básico formam o carboxilato e o álcool correspondentes (Clayden, 2008).



Esquema 4: Mecanismo de hidrólise básica de um éster.

(Fonte: Clayden, 2008)

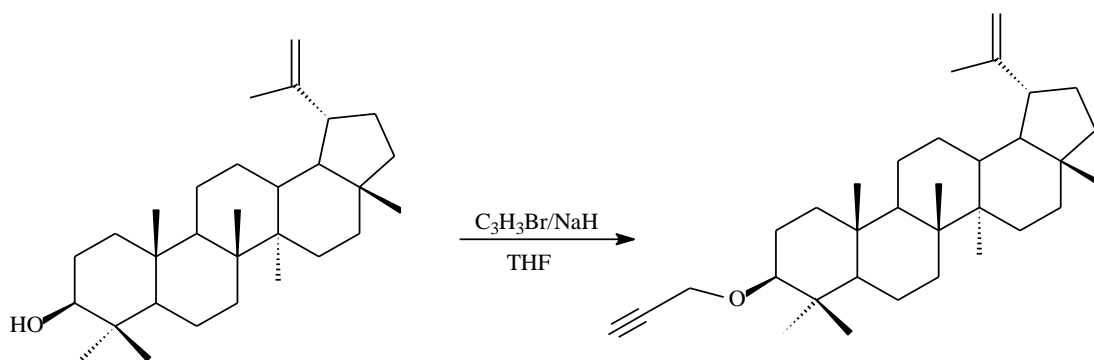
Após a elaboração da reação, obteve-se, no final, um sólido branco, o qual foi submetido à análise por espectroscopia na região do IV (Figura 13, Página 31), que evidenciou a presença de uma banda intensa e larga em 3313cm^{-1} correspondendo ao estiramento O-H de álcool e a ausência da banda de éster em torno de 1725cm^{-1} , referente ao estiramento da ligação C=O de carbonila. Esse resultado confirmou que a hidrólise dos ésteres do lupeol foi completa e a substância obtida era o lupeol.

3.2 Síntese dos derivados 1,2,3-triazólicos do lupeol

Para a obtenção dos triazóis, a etapa chave da rota de síntese, foi a reação “click”, ou, mais especificamente, a cicloadição 1,3-dipolar entre um alcino terminal e uma azida orgânica, catalisada por Cu(I).

3.2.1 Síntese do éter propargílico do lupeol

O alcino desejado foi obtido pela eterificação do lupeol com o brometo de propargila, em presença de hidreto de sódio, empregando-se como solvente o THF (Esquema 5).



Esquema 5: Obtenção do éter propargílico do lupeol (TB1).

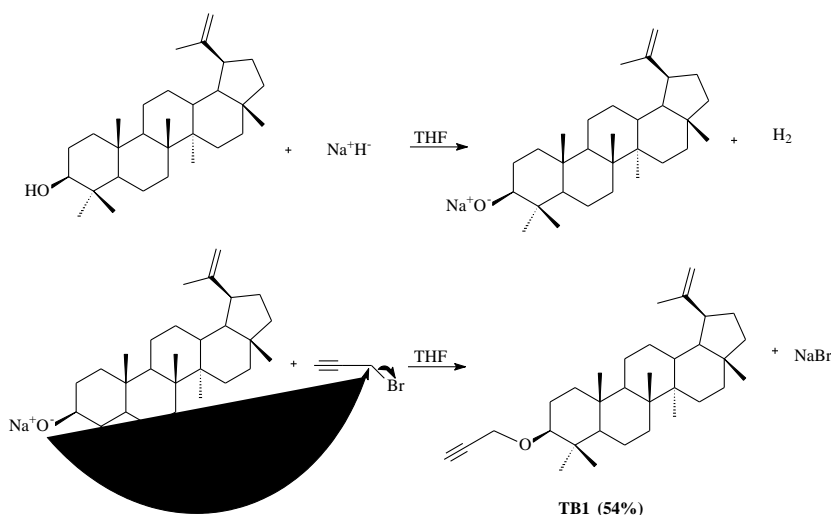
Uma metodologia muito comum para se obter um éter, a partir de um álcool, é reagir um alcóxido com um haleto de alquila. Quanto ao mecanismo da reação (Esquema 6), se o halogênio estiver ligado a um carbono primário, a reação

será do tipo substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) (Clayden *et al.*, 2008). Este é o caso da reação para obtenção do éter propargílico do lupeol.

Os álcoois geralmente não são bons nucleófilos a ponto de realizarem um ataque ao carbono eletrofílico. Para contornar esse problema, a estratégia utilizada foi o tratamento do álcool (lupeol) com o hidreto de sódio (NaH). Este, ao reagir com o lupeol, retira o hidrogênio da hidroxila, formando um alcóxido, o qual é um bom nucleófilo, capaz de promover uma reação do tipo S_N2 (Esquema 6).

O grupo abandonador (GA) é a espécie que deixa o carbono eletrofílico após o ataque do nucleófilo. Dessa forma, um bom GA é aquele que é estável como entidade livre, ou seja, é capaz de estabilizar sua carga negativa. Entre os bons GAs, está o íon brometo, pois por ser volumoso sua carga fica mais dispersa, o que estabiliza a espécie.

Ao se realizar uma S_N2 deve-se levar em conta o efeito do solvente. Inicialmente, escolhemos solventes apróticos, pois estes possuem a capacidade de estabilizar cátions, mas não ânions. Esta característica favorece a reação, uma vez que o solvente não irá solvatar o nucleófilo deixando-o, portanto disponível para o ataque nucleofílico. Para estabelecer condições ótimas de reação foram empregados como solventes DMF, DMSO e THF. Apesar do DMF e do DMSO possuírem uma capacidade superior de solvatar cátion, por questões de solubilidade o THF apresentou melhor resultado.



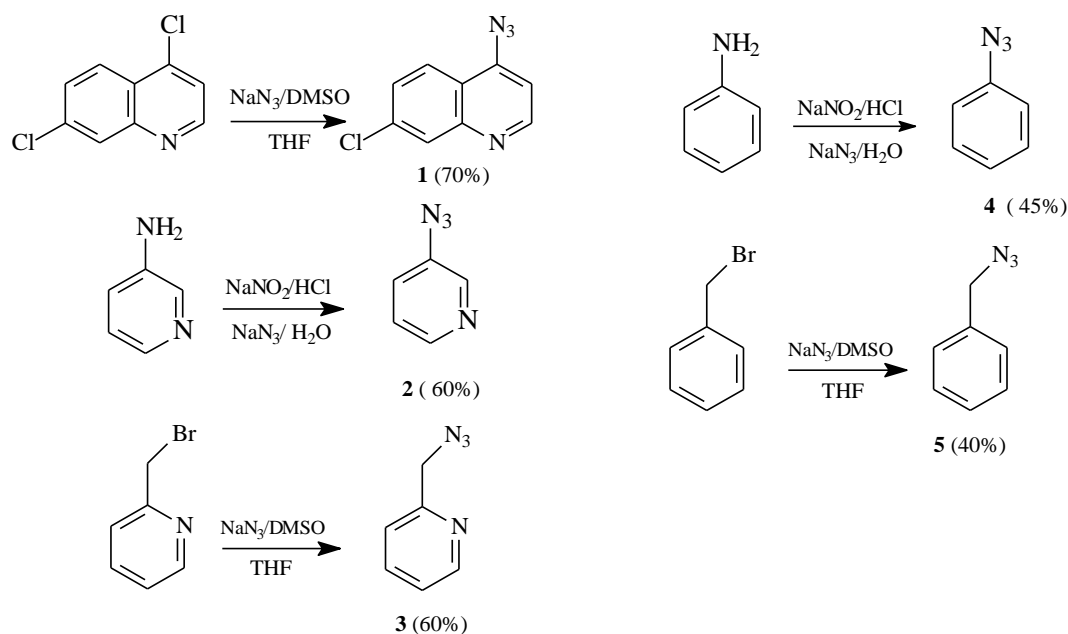
Esquema 6: Mecanismo da reação S_N2 na preparação do éter propargílico do lupeol (TB1).

Reações de eterificação exigem condições estritamente anidras, pois a presença de traços de água, no solvente utilizado, compromete os resultados. Dessa forma, o primeiro passo foi tratar o solvente, THF, momentos antes da reação. Outra providência foi empregar reagentes e vidrarias rigorosamente secos e, por fim, a reação foi realizada sob atmosfera de N₂, obtendo-se como produto um sólido branco com rendimento de 54%, após purificação em coluna de sílica gel.

3.2.2 Síntese das azidas orgânicas

Sabe-se que as azidas orgânicas e inorgânicas são muito instáveis devido à liberação de N₂ quando submetidas a aquecimento, fricção ou choque mecânico, sendo, portanto, explosivas. Além disso, as azidas são muito sensíveis à luz e a alguns compostos químicos, como por exemplo, o ácido sulfúrico, que em contato pode provocar explosão. Variação brusca e acentuada de pressão, também pode provocar a decomposição de azido-compostos. Esse comportamento é explicado pelas ligações do grupo azida, que são polarizáveis, o que pode resultar numa dissociação altamente exotérmica liberando, além de N₂, sódio metálico, no caso da azida de sódio, e nitreno (Bräse e Barnet, 2009).

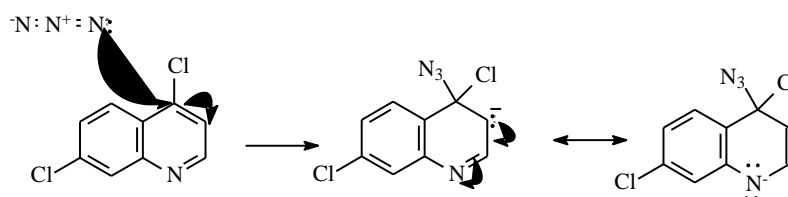
Quando um grupo azida é introduzido num composto orgânico ele aumenta o conteúdo energético deste em 290-355 kJ.mol⁻¹ (Bräse e Barnet, 2009). Devido a esta característica, esse grupo é utilizado em formulações para propelentes de foguetes, explosivos e polímeros energéticos - HEDM (*high electronic density materials*). Por outro lado, devido à instabilidade do grupo azida, seu uso na pesquisa e na aplicação prática de novos materiais que os contenham, fica limitado. Contudo, trabalhando-se com cautela e utilizando equipamentos de segurança pode-se explorar quimicamente este grupo. Dessa forma, o segundo passo para a obtenção dos 1,2,3-triazóis foi a síntese das azidas orgânicas **1-5** (Esquema 7).



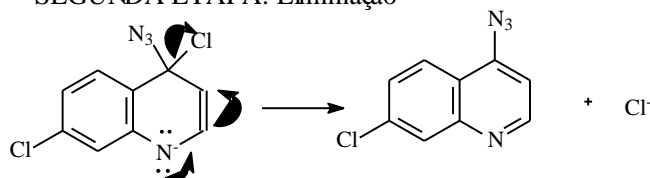
Esquema 7: Síntese das azidas orgânicas.

Primeiramente, foi sintetizada a 4-azido-7-cloroquinolina (**1**) (Esquema 7), fazendo reagir a 4,7-dicloroquinolina com a azida de sódio (NaN_3), uma reação do tipo substituição nucleofílica aromática ($\text{S}_{\text{N}}_{\text{ar}}$). O mecanismo desta reação envolve a adição de um nucleófilo a um anel aromático, seguindo-se de eliminação de um grupo abandonador, sendo este, em geral, um haleto. Outros requisitos para uma $\text{S}_{\text{N}}_{\text{ar}}$ são: a presença de um retirador de elétrons em posição *para* e/ou *orto* ao GA e bons nucleófilos. A primeira etapa da $\text{S}_{\text{N}}_{\text{ar}}$ é lenta devido à perda da aromaticidade do anel, provocada pelo ataque nucleofílico ao carbono ligado ao grupo abandonador. A segunda etapa dessa reação é rápida, pois consiste na restauração da aromaticidade do anel devido à saída do GA (Esquema 8).

PRIMEIRA ETAPA: Adição



SEGUNDA ETAPA: Eliminação



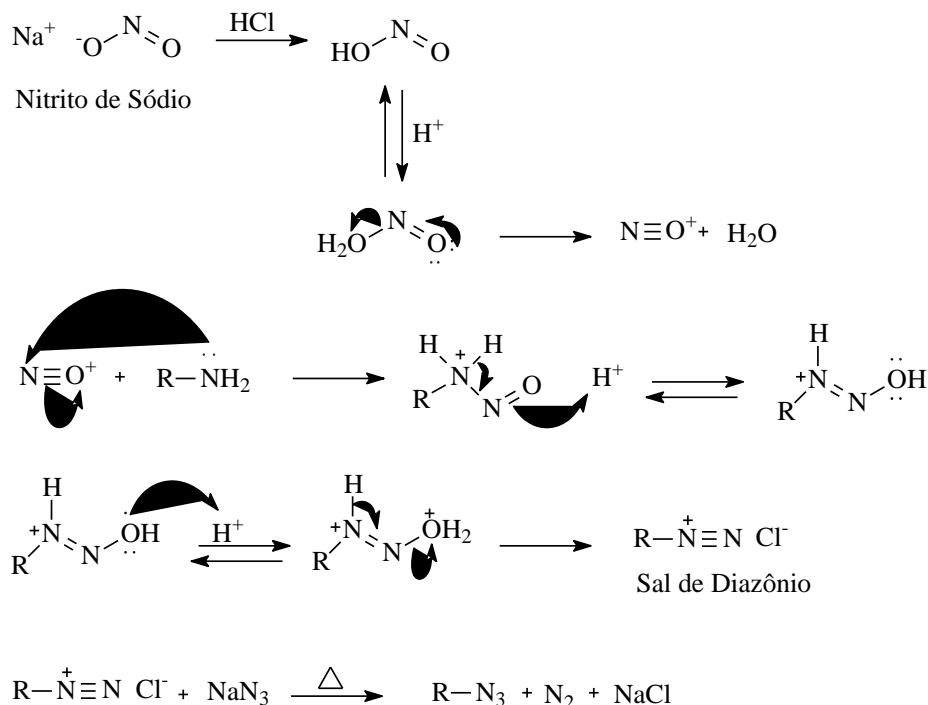
Esquema 8: Mecanismo da reação S_Nar na síntese da 4-azido-7-cloroquinolina (**1**) a partir da 4,7-dicloroquinolina.

Um fato que deve ser observado na formação dessa azida é, que a S_Nar acontece em apenas um anel, como pode ser visto no Esquema 8. Isso ocorre porque, só em um anel há um grupo retirador de elétrons *para* ao GA, que é o nitrogênio piridínico.

Ao seguir os procedimentos descritos por Guantai e colaboradores (2010), não se observou o consumo total do material de partida. Assim, elevando-se a temperatura do meio para 90 °C e com o tempo de reação igual a 18 horas, evidenciou-se por CCD (eluente: hexano/acetato de etila na proporção 1:1; reveladores: iodo e CAM) o consumo total da 4,7 dicloroquinolina. Após purificação por coluna cromatográfica, obteve-se no final o produto com 70% de rendimento.

Para a síntese das azidas de número **2** e **4** (Esquema 7), foram utilizadas como material de partida, respectivamente a 3-piridinamina e a anilina. A metodologia de síntese empregada foi a reação de substituição nucleofílica aromática, utilizando sais de diazônio, conhecida como reação de Sandmeyer (Clayden *et al.*, 2008). Esta reação consiste no tratamento de aminas primárias com nitrito de sódio em meio ácido para se obter um de sal de diazônio que, em geral, é

instável (Clayden *et al.*, 2008) e deve ser imediatamente submetido à reação com azida de sódio (Esquema 9).



Esquema 9: Equações gerais representando a síntese das azidas orgânicas **2** e **4** a partir das respectivas aminas.

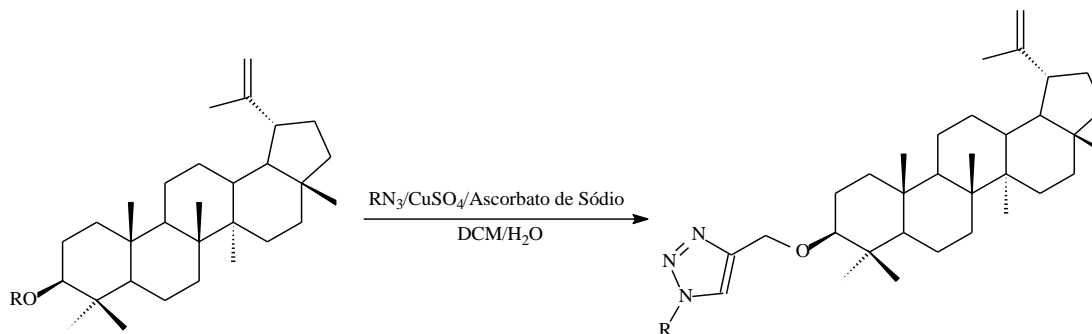
Durante a reação de formação das azidas **2** e **4**, foi necessária a redução da temperatura do meio para 0°C, com o objetivo de tornar o sal de diazônio mais estável aumentando assim, o rendimento da reação.

Após a formação do sal de diazônio, uma solução aquosa de NaN₃ foi adicionada, formando-se a azida orgânica (Esquema 9). As azidas **2** e **4** foram obtidas com rendimentos de 60% e 45%, respectivamente.

A obtenção das azidas de número **3** e **5** (Esquema 7) foi realizada a partir dos derivados bromados correspondentes e consistiu na substituição do bromo pelo grupo azida, através de uma S_N2. Os produtos foram obtidos com rendimentos de, respectivamente, 60% e 40%.

3.2.3 Síntese dos derivados triazólicos do lupeol por reação “click”.

A obtenção dos 1,2,3-triazóis consistiu na reação entre as azidas orgânicas **1-5** e o éter propagílico do lupeol, **TB1**, via reação “click”, conforme mostrado no Esquema 10.



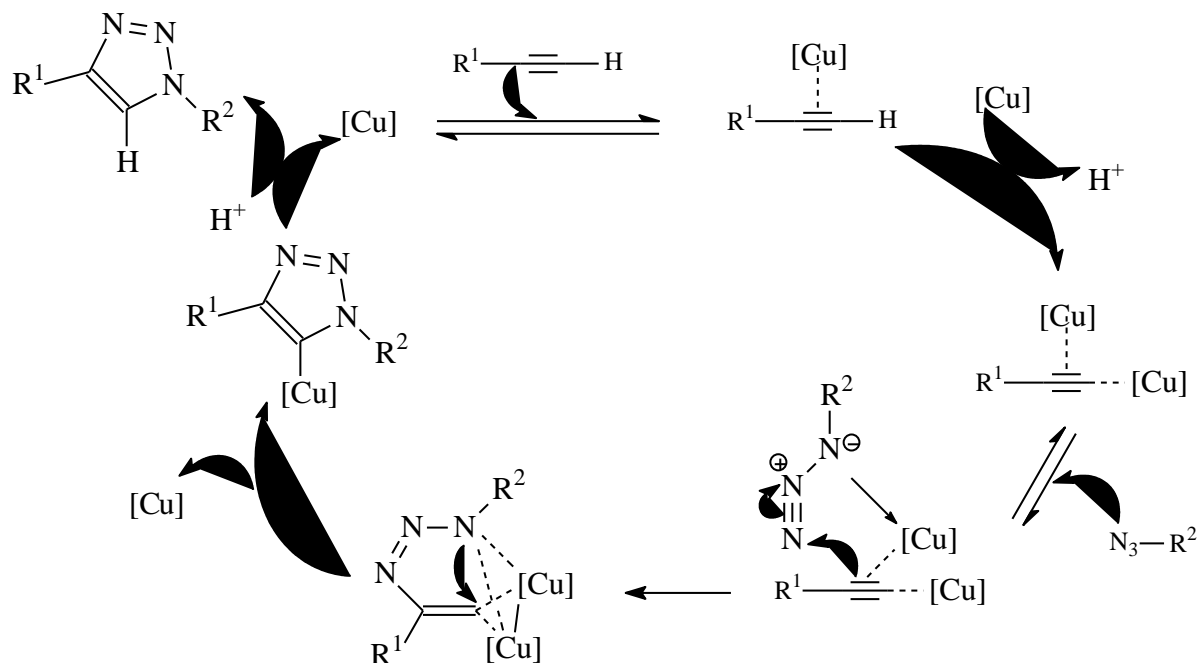
Esquema 10: Síntese de híbridos 1,2,3-triazólicos dolupeol por reação

A CuAAC é conhecida pela sua alta eficiência sem necessitar de condições especiais de reação, como por exemplo, altas temperatura e pressão, além de formar exclusivamente o regioisômero 1,4-dissubstituído. Tais fatores fizeram com que esse processo fosse explorado em várias aplicações sintéticas como na química de polímeros, na ciência de materiais e na química medicinal. Na química medicinal a reação “click” é uma estratégia importante para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, além de possibilitar modificações dos já existentes, com o objetivo de melhorar suas características farmacológicas e farmacocinéticas (Whiting, *et al.*, 2006).

A reação original de Huisgen, para a formação do heterociclo, possui uma alta energia de ativação (aproximadamente $25 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$), o que resulta numa baixa velocidade de reação, mesmo usando reagentes ativados e altas temperaturas. Além disso, essa metodologia apresenta baixos rendimentos e misturas dos regioisômeros 1,2,3-triazólicos 1,4- e 1,5-dissubstituídos (Hein *et al.*, 2009). O aumento da eficiência e da seletividade dessa reação são consequências diretas do uso de cobre como catalisador. Ao adicionar um sal de Cu(II), como por exemplo o CuSO_4 , à reação, esse sofre redução *in situ*, formando o acetileno de Cu (I). Isso faz com que o mecanismo da reação passe a ser uma

sequência rápida de etapas, as quais envolvem intermediários polares cujas estruturas definem a regioespecificidade e a energia de formação determina a velocidade de obtenção dos produtos (Hein *et al.*, 2009).

Estudos anteriores mostraram que o cobre muda drasticamente as características da reação “click” (Sharpless *et al.*, 2001), mas apenas após os experimentos realizados por Fokin e colaboradores, 2013, foi possível constatar que dois átomos de Cu(I) estão envolvidos no mecanismo concertado para a formação regioesletiva do isômero 1,2,3-triazol-1,4-dissubstituído. Dessa forma, um mecanismo proposto, onde são elucidadas as etapas elementares envolvendo a formação e a quebra de ligações está representado no Esquema 11. Inicialmente, ocorre a formação do acetileno de Cu(I), a partir da complexação do metal com os elétrons π do alcino. Com a formação deste complexo, o pka do hidrogênio terminal do alcino que era igual a 25 reduz para 9,8 o que possibilita a sua desprotonação em meio aquoso sem necessidade de adição de base, seguido por uma nova complexação com um segundo átomo de Cu(I). A próxima etapa, consiste na coordenação do átomo de Cu(I) com a azida orgânica. Neste intermediário, o cobre possui um efeito sinérgico, pois torna o carbono β -vinilidênico do alcino mais nucleofílico e o nitrogênio terminal da azida mais eletrofílico, o que favorece a formação do metalociclo na etapa seguinte. Esta etapa, que é endotérmica e define a regioespecificidade da reação, possui energia de ativação de 15 kJ.mol^{-1} , a qual é menor que a energia de ativação para a reação não catalisada, 26 kJ.mol^{-1} , o que explica o grande aumento da velocidade da reação quando comparada com o processo térmico de Huisgen (Medal e Tørnoe, 2008). A contração do metalociclo provoca a saída de um Cu(I), seguida pela formação do triazolila de cobre, o qual, ao sofrer protonólise, leva a formação do 1,2,3-triazol-1,4-dissubstituído (Fokin *et al.*, 2013).



Esquema 11: Mecanismo da reação “click” entre um alcino terminal e uma azida orgânica levando, regioseletivamente, a um 1,2,3-triazol-1,4-dissubstituído.

Com o objetivo de se aumentar a velocidade da reação, alguns pesquisadores utilizam complexos de cobre envolvendo diferentes tipos de ligantes, como por exemplo, $\text{Cu}(\text{PPh}_3)_2\text{OAc}$ (Gonda *et al.*, 2010). Ainda não se sabe, ao certo, como esse ligante provoca o aumento da velocidade, mas acredita-se que ele interfira no equilíbrio químico em que o cobre participa, além de proteger o $\text{Cu}(\text{I})$ de oxidação na presença eventual de oxigênio (Medal e Tornøe, 2008). Outro fator que aumenta a velocidade da reação é a adição de base quando se utiliza sais de $\text{Cu}(\text{I})$ como catalisadores, neste caso as bases mais usadas são as aminas (Rodinov *et al.*, 2005).

Para se obter o 1,2,3-triazol-1,5-dissubstituído utiliza-se como catalisador o rutênio coordenado ao ligante η^5 -pentametilciclopentadienila. Porém, esta reação é diferente da “click”, tanto em termos mecanísticos quanto em relação à sensibilidade a solventes e fatores estéricos (Zhang *et al.*, 2005).

Para se estabelecer as condições ótimas da reação “click” empregadas neste trabalho, consultou-se, principalmente, o trabalho de Pereira e colaboradores (2010). Assim, utilizou-se $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ como fonte de cobre e o ascorbato de sódio como agente redutor. A principal vantagem deste método é a pouca interferência causada pelo oxigênio dissolvido, que poderia reoxidar o Cu(I) a Cu(II), pois ele reage com o agente redutor, o ascorbato, o qual é utilizado em excesso. Além disso, o método foi desenvolvido em um sistema bifásico: água/DCM (Lee *et al.*, 2006). Este método favorece a reação, pois a água solubiliza sais inorgânicos e o ascorbato de sódio, além de preservar o acetilato de Cu (I) em seu estado reativo, quando este é formado. Segundo dados da literatura (Pereira *et al.*, 2010) o produto deveria ser obtido em 24 horas de reação. Dessa forma, as reações foram acompanhadas por CCD confirmando o relatado no trabalho de Pereira e colaboradores (2010). A Tabela 1 mostra as condições das reações “click” deste trabalho.

Tabela 1: Condições da reação “click” utilizadas para se obter os derivados triazólicos

Reagentes/ Proporção	Solvente	Temperatura	Tempo
Alcino (1) Azida (1) $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ (0,3) / NaHCO_3 (0,3) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,3)	DCM (5 mL)/ H_2O (5 mL)	25 °C	24 horas

Os derivados 1,2,3-triazólicos do lupeol foram obtidos sem a formação de qualquer subproduto o que facilitou a purificação. Com o objetivo de se retirar todo o cobre, que poderia estar presente, complexado com os produtos, preparou-se uma solução de EDTA, (ácido etilendiamino tetra-acético), 50% m/v, tamponada com NH_4OH a pH 9,5. Esse tampão tem por finalidade provocar a desprotonação dos grupos acetato do EDTA, aumentando assim, sua capacidade complexante devido ao efeito quelatogênico, favorecendo a liberação do Cu (II) que estaria complexado com o produto. Além disso, o Cu(II) também forma vários complexos solúveis com a amônia, o que favorece ainda

mais a completa remoção do cobre eventualmente complexado com o produto. Esse tratamento é necessário, pois o Cu (II) é paramagnético e, por isso, qualquer traço desse contaminante poderia alargar os sinais dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C dos produtos, o que dificultaria, ou mesmo inviabilizaria a caracterização dos compostos. Após realizar as extrações das soluções contendo o produto, com a solução de EDTA, observou-se uma coloração azulada da fase aquosa, revelando a presença de cobre como contaminante nos derivados 1,2,3-triazólicos.

Neste trabalho foram obtidas cinco substâncias contendo o núcleo 1,2,3-triazólico, sendo todas inéditas, as quais foram denominadas de **TB2** a **TB6** enquanto que o éter propargílico do lupeol recebeu o código **TB1**. As fórmulas estruturais e os rendimentos dos produtos estão mostrados na Figura 12.

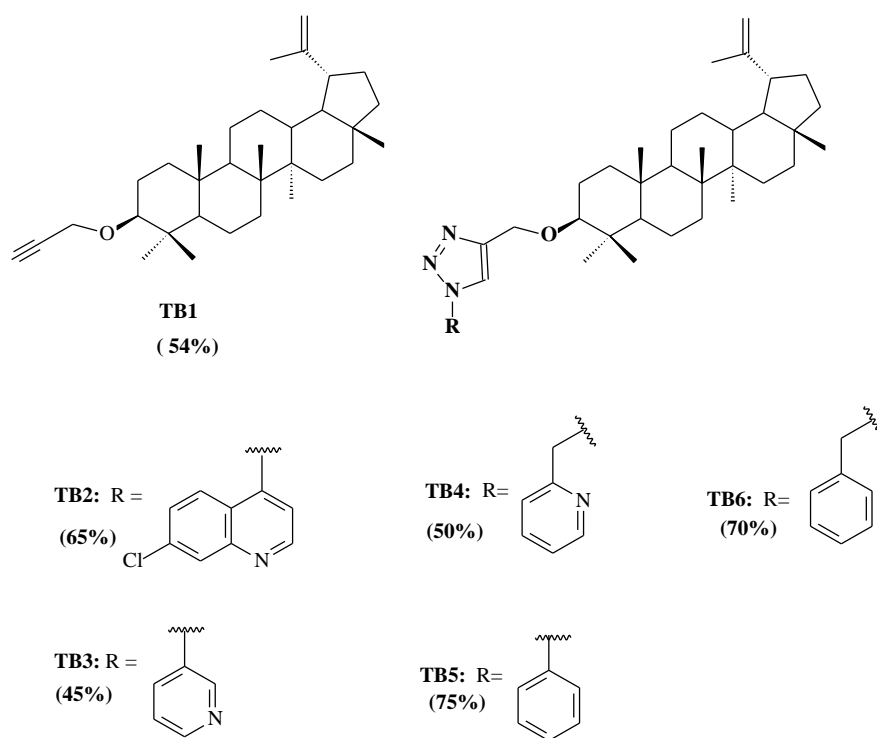


Figura12: Fórmulas estruturais e rendimentos do éter propargílico do lupeol (alcino, **TB-1**) e dos híbridos 1,2,3-triazólicos do lupeol

mais a completa remoção do cobre eventualmente complexado com o produto. Esse tratamento é necessário, pois o Cu (II) é paramagnético e, por isso, qualquer traço desse contaminante poderia alargar os sinais dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C dos produtos, o que dificultaria, ou mesmo inviabilizaria a caracterização dos compostos. Após realizar as extrações das soluções contendo o produto, com a solução de EDTA, observou-se uma coloração azulada da fase aquosa, revelando a presença de cobre como contaminante nos derivados 1,2,3-triazólicos.

Neste trabalho foram obtidas cinco substâncias contendo o núcleo 1,2,3-triazólico, sendo todas inéditas, as quais foram denominadas de **TB2** a **TB6** enquanto que o éter propargílico do lupeol recebeu o código **TB1**. As fórmulas estruturais e os rendimentos dos produtos estão mostrados na Figura 12.

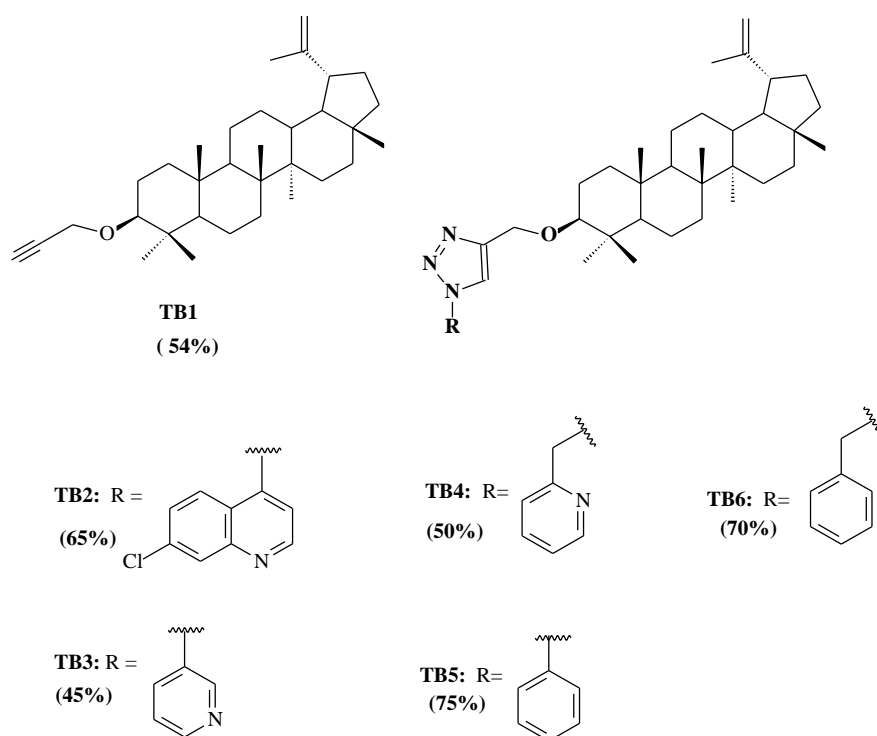
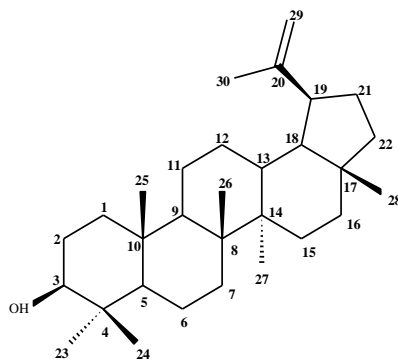


Figura12: Fórmulas estruturais e rendimentos do éter propargílico do lupeol (alcino, **TB-1**) e dos híbridos 1,2,3-triazólicos do lupeol

3.3 Caracterização espectrométrica das substâncias obtidas

Os produtos obtidos foram caracterizados utilizando as técnicas de espectroscopia na região do infravermelho (IV), de RMN de ^1H e de ^{13}C e espectrometria de Massa. O lupeol, por ser um produto natural vastamente conhecido, e as azidas orgânicas, por possuírem uma alta simplicidade estrutural, foram caracterizados apenas pelas técnicas de espectroscopia na região do IV e de RMN de ^1H e de ^{13}C .

3.3.1 Caracterização do lupeol



O lupeol apresentou-se como um sólido cristalino branco, em forma de agulhas, e com a faixa de fusão de 218,4-220,3°C. Seu espectro no IV (Figura 15) mostra diversas bandas esperadas para a estrutura, sendo que a principal delas é a banda larga e intensa em 3313 cm^{-1} , referente ao estiramento da ligação O-H de álcool. Além dessa, foram observadas também bandas em torno 3060 cm^{-1} referentes aos estiramentos das ligações C-C de grupo de alceno; em 2943 cm^{-1} e 2872 cm^{-1} referentes ao estiramento da ligação C-H de metila; em 1452 cm^{-1} e 1379 cm^{-1} referentes a deformação das ligações C-H de grupos metileno e de metila, respectivamente. Em 1638 cm^{-1} observa-se uma banda referente ao estiramento assimétrico de C=C, em 1042 cm^{-1} devido ao estiramento da ligação C-O e em 878 cm^{-1} referente ao dobramento fora do plano da ligação C-H de vinila (Pavia, 2012).

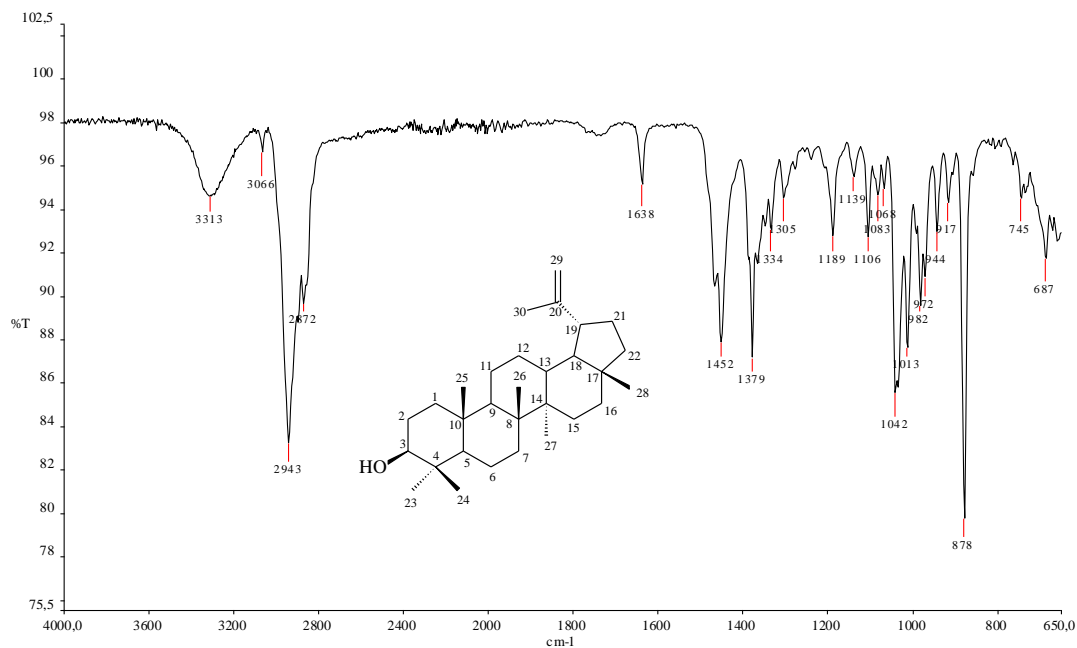


Figura 13: Espectro na região de infravermelho do lupeol.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 14) observam-se dois simpletos largos em δ 4,68 e δ 4,56 referentes aos dois hidrogênios da ligação dupla terminal (H-29). Outra característica desse espectro é o duplete duplo em δ 3,18 ($J= 5,8$ e $8,6$), atribuído ao H-3 (MIRANDA, 2007).

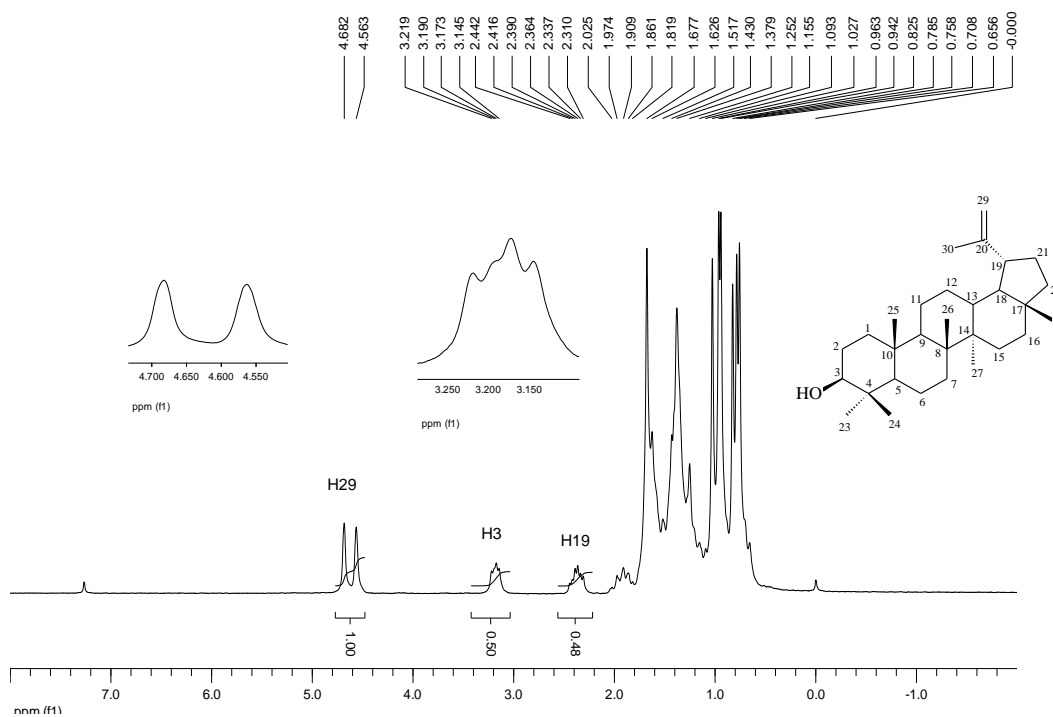


Figura 14: Espectro de RMN de ^1H do lupeol (200 MHz, CDCl_3).

No espectro de RMN de ^{13}C e com o auxílio do subespectro DEPT135 (Figura 15) foram observados 30 sinais correspondentes a sete grupos CH_3 , onze CH_2 , seis grupos CH e seis átomos de carbono não hidrogenados. Uma característica peculiar desse espectro é a presença de dois sinais com deslocamento químico em δ 109,54 e em δ 151,13 referentes aos carbonos olefínicos C-29 e C-20, respectivamente, e um sinal em δ 78,17 relacionado ao carbono C-3. Esses dados, somados aos outros sinais visualizados no espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 5) permitiram confirmar que a substância, obtida após hidrólise alcalina de frações da coluna cromatográfica do extrato bruto em diclorometano de cascas de *P. fasciculata*, tratava-se do lupeol (Mahato e Kundu, 1994).

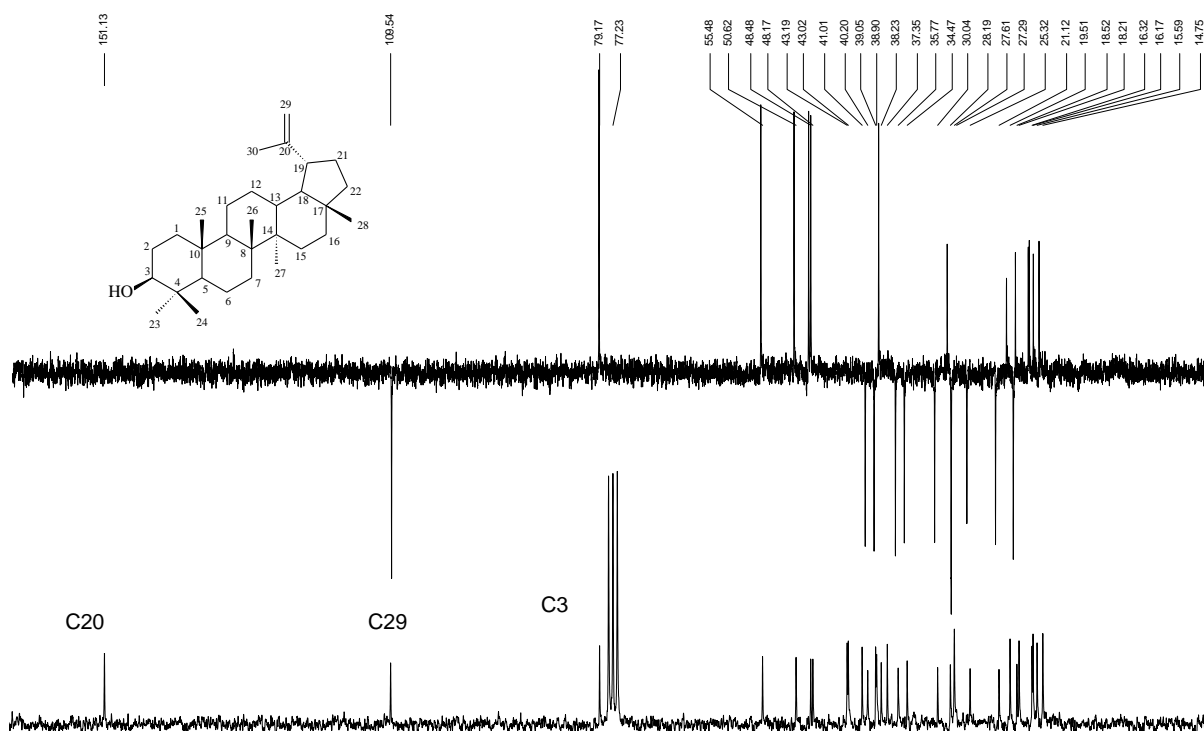


Figura 15: Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT135 do lupeol (200 MHz, CDCl_3).

3.3.2 Caracterização da 4-azido-7-cloroquinolina (1)

No espectro da região do IV da azida **1**, Figura 16, foram observadas as principais bandas características desse composto, sendo que a mais significativa, a que diferencia a azida do seu precursor 4,7-dicloroquinolina, é a banda em 2124 cm^{-1} , referente ao estiramento da ligação $-\text{N}=\text{N}^+=\text{N}^-$. Além dessa, observa-se bandas em: 3036 cm^{-1} devido ao estiramento C-H de aromático; em 1566 cm^{-1} e 1557 cm^{-1} referentes ao estiramento da ligação C=C de aromático e as em 1301 cm^{-1} e 1071 cm^{-1} devido aos estiramentos C-N e C-Cl respectivamente.

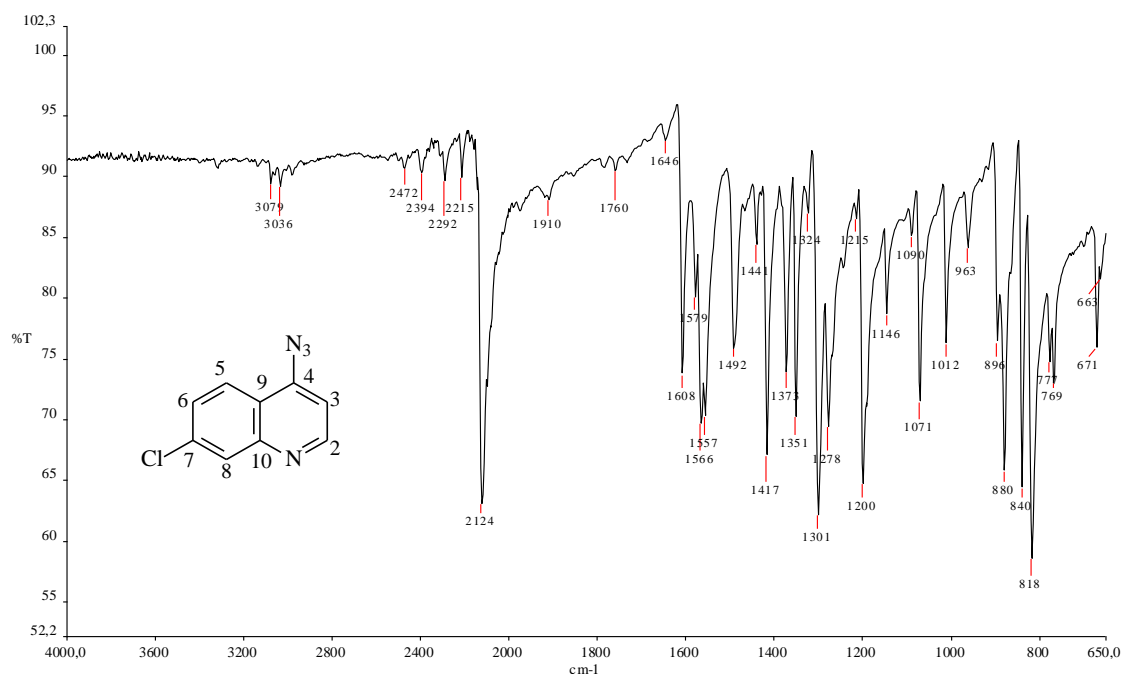


Figura 16: Espectro na região de infravermelho da azida **1**.

No espectro de RMN de ^1H da azida **1** (Figura 17), observam-se cinco sinais aromáticos, referentes aos hidrogênios do núcleo quinolínico. Assim, os dupletos em δ 8,76 ($J_{\text{H}2-\text{H}3}$ 4,9) e em δ 7,04 ($J_{\text{H}3-\text{H}2}$ 4,9) referem-se, respectivamente, aos hidrogênios H-2 e H-3 que acoplam entre si. Além desses, observam-se também um duplete duplo em δ 7,40 ($J_{\text{H}6-\text{H}5}$ 8,92 e $J_{\text{H}6-\text{H}8}$ 1,8) devido ao H-6, o qual acopla com H-5 em *orto* e com H-8 em *meta*, e dois dupletos em δ 7,88 ($J_{\text{H}5-\text{H}6}$ 8,92) e em δ 7,99 ($J_{\text{H}8-\text{H}6}$ 1,8) referentes aos hidrogênios H-5 e H-8, respectivamente.

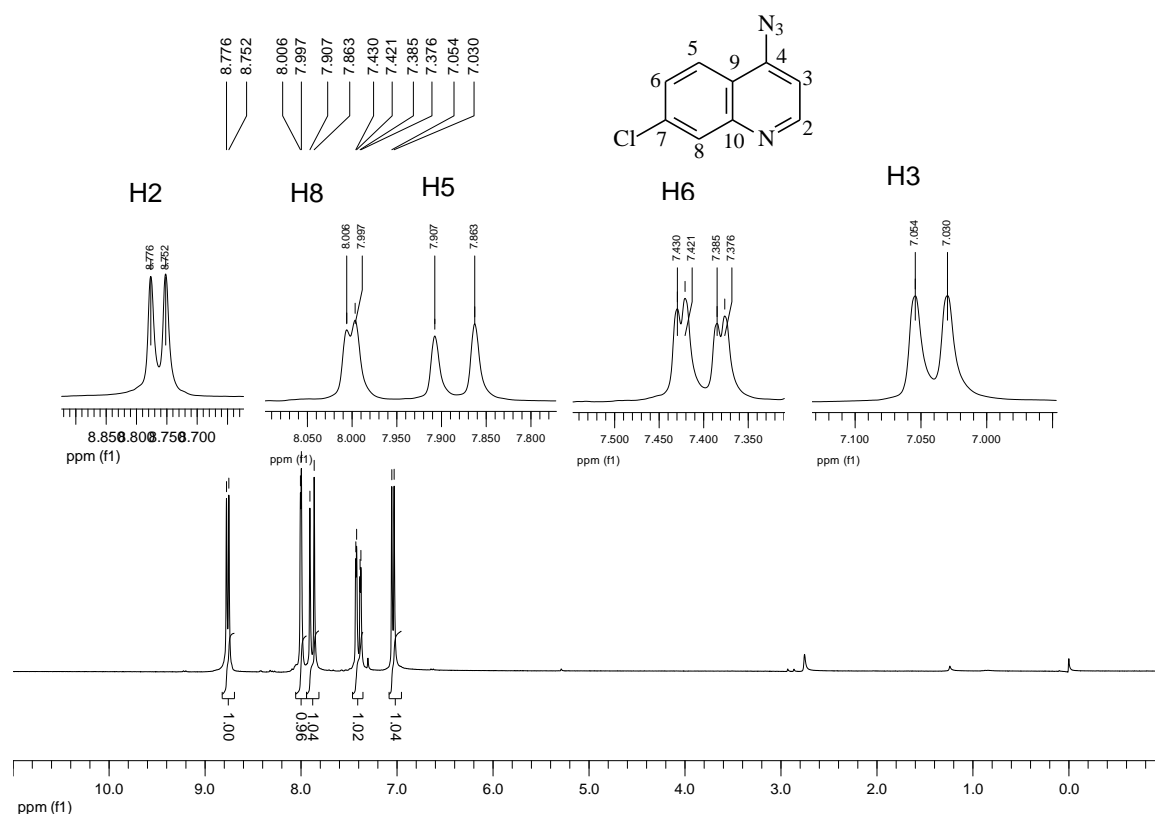


Figura 17: Espectro de RMN de ^1H da azida **1** (200 MHz, CDCl_3).

No espectro de RMN de ^{13}C e com o auxílio do subespectro DEPT135 da azida **1** (Figura 18) observam-se os nove sinais referentes aos carbonos da molécula em: δ 151,35 referente ao C-2, em δ 149,61 devido ao C-10, em δ 136,59 referente ao C-4, em δ 146,33, em δ 128,26 e o em δ 127,55 referentes aos carbonos C-7, C-8, C-5, respectivamente. São observados também os sinais em δ 123,80, δ 119,95 e em δ 108,75 devido aos C-6, C-9, e C-3, respectivamente.

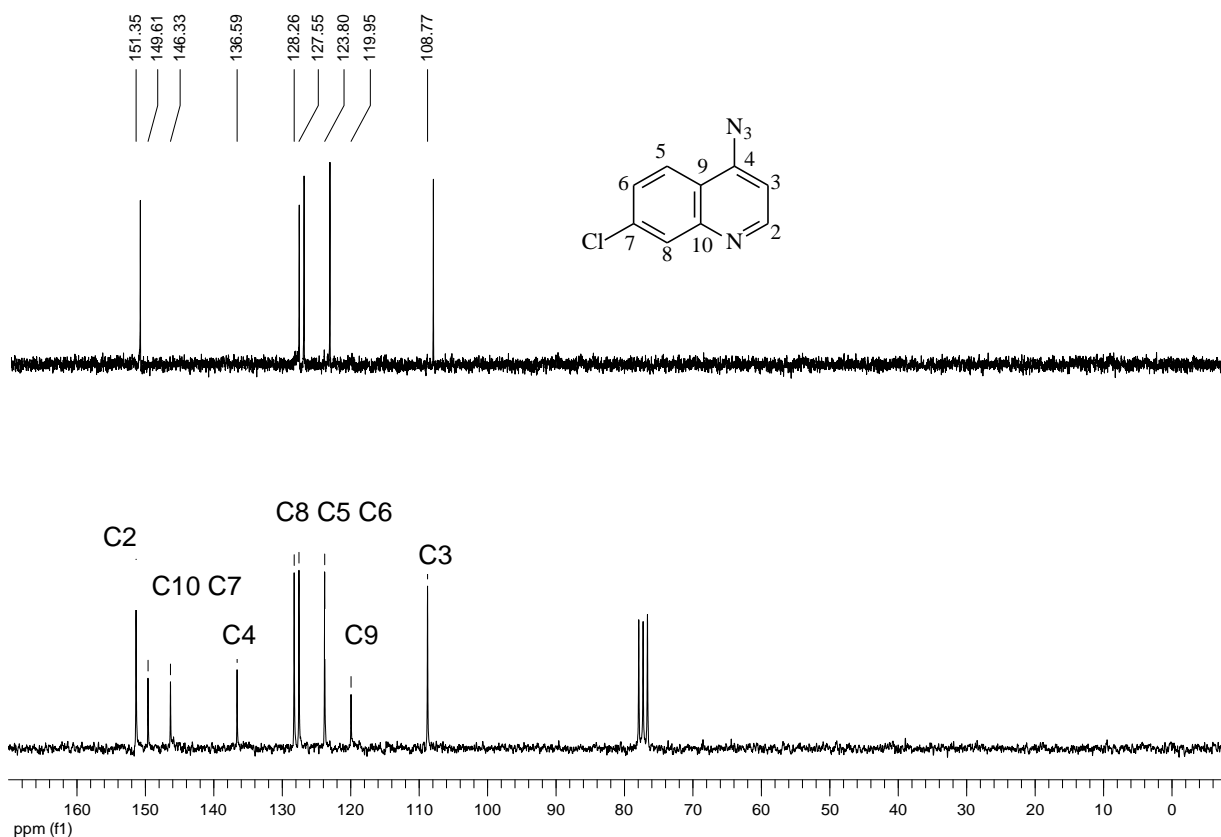
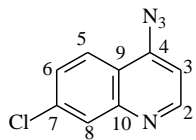
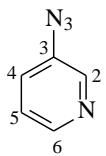
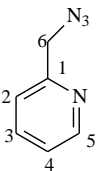
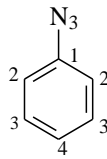
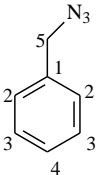


Figura 18: Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT135 da azida **1** (200 MHz, CDCl_3).

As demais azidas foram caracterizadas de maneira análoga, sendo que os deslocamentos químicos (δ em ppm) a multiplicidade dos sinais (**Multi.**) e os valores das constantes de acoplamento (J , em Hz) observados nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C das azidas estão mostrados nas tabelas 2 e 3. Os espectros no IV, e de RMN de ^1H e de ^{13}C são apresentados no Anexo I.

Tabela 2: Comparação dos dados de RMN ^1H das azidas **1**, **2**, **3**, **4** e **5**.

Hidrogênio																
	δ	Multi	J	δ	Multi	J	δ	Multi	J	δ	Multi	J	δ	Multi	J	
H1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H2	8,76	D	4,9	8,3-8,4	*	*	-	-	-	7,01	d	7,5	Em δ 7,32 a 7,35 multipletto para 5 hidrogênios referentes aos			
H3	7,04	D	4,9	-	-	-	8,6	d	10,3	7,33	t	7,5 7,5				
H4	-	-	-	7,26- 7,34	*	*	7	d,d,d	1,8 7,6 10,3	7,08	d	7,5				
H5	7,88	D	8,92		*	*	7,34	d	7,6					4,32	s	-
H6	7,40	d,d	8,92 1,80	8,3-8,4	*	*	8,6	d	2,8							
H7	-	-	-				4,5	s	-							
H8	7,99	D	1,80													

*Em δ 8,3 a 8,4 multipletto para dois hidrogênios referentes ao H2 e H6

*Em δ 7,26 a 7,34 multipletto para dois hidrogênios referentes ao H4 e H5

Tabela 3: Comparação dos dados de RMN ^{13}C das azidas **1, 2, 3, 4 e 5**.

Carbônio															
	δ	DEPT-135	δ_c	δ	DEPT-135	δ_c	δ	DEPT-135	δ_c	δ	DEPT-135	δ_c	δ	DEPT-135	δ_c
C1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	140,21	C	-	136,6	C	-
C2	151,35	CH	151,4	146,05	CH	146,05	155,88	C	-	119,23	CH	119,0	129,05	CH	129,0
C3	108,75	C	-	137,13	C	137,17	123,09	CH	123,08	129,96	CH	129,96	128,43	CH	128,40
C4	136,6	C	-	126,0	CH	126,0	137,17	CH	137,17	125,08	CH	125,0	128,51	CH	128,51
C5	127,55	CH	127,5	124,0	CH	124,0	122,14	CH	122,14				55,02	CH ₂	55,01
C6	123,80	CH	123,8	141,34	CH	141,34	149,83	CH	149,83						
C7	146,33	CH	128,27	-	-	-	56,82	CH ₂	56,82						
C8	128,26	CH	129,37	-	-	-									
C9	119,95	C	119,98	-	-	-									
C10	108,75	C	108,77	-	-										

3.3.3 Caracterização do 3 β -3'-(prop-2'-in-1'-iloxi)lup-20(29)-eno (2) (TB1)

O espectro no IV de **TB1** (Figura 19) mostra bandas características dessa substância em 3253 cm⁻¹ e em 2112 cm⁻¹ referentes aos estiramentos das ligações de C-H de carbono sp e de C \equiv C, respectivamente e uma banda intensa em 1071 cm⁻¹ característica do estiramento da ligação C-O de éter. As demais bandas são semelhantes às apresentadas no espectro no IV do lupeol (Figura 15) já discutidas anteriormente.

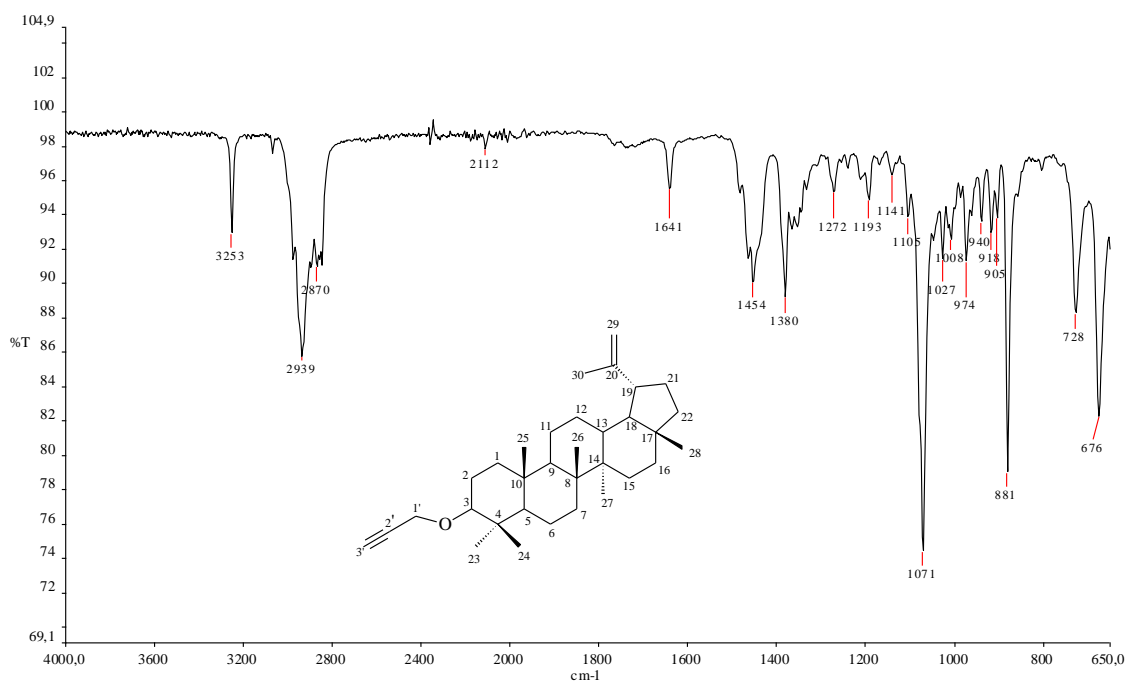


Figura 19: Espectro na região de infravermelho do 3 β -3'-(prop-2'-in-1'-iloxi)lup-20(29)-eno (**TB1**).

No espectro de RMN de ¹H de **TB1** (Figura 20), observam-se os sinais referentes aos H-29 como dois simpletos em δ 4,69 e δ 4,57. Além disso, pode-se observar neste espectro um duplete duplo em δ 2,99 (J_{dixial} 11,6 e $J_{\text{equatorial-axial}}$ 4,0) devido aos acoplamentos dos tipos diaxial e equatorial-axial de H-3 (axial) com os dois hidrogênios em C-2. Ainda neste espectro há dois dupletos duplos em δ 4,22 e δ 4,14 referentes aos dois hidrogênios H-1' da unidade propargila (J 2,4 e 16). A multiplicidade de H-1' pode ser explicada pelo fato de que os dois hidrogênios não são quimicamente equivalentes devido à sua

proximidade do C-3 que é um carbono quiral. Dessa forma, os H-1' acoplam-se entre si e com o H-3 resultando em dois dupletos duplos. Pelo fato dos deslocamentos químicos dos H-1' serem muito próximos os sinais se aproximam, aumentando a intensidade das linhas internas, fazendo com que a multiplicidade do sinal fique semelhante a um duplete quádruplo. Outro sinal que também se destaca nesse espectro é o triplo aparente em δ 2,35 (J 2,4) referente ao H-3', o qual está acoplado com os H-1'.

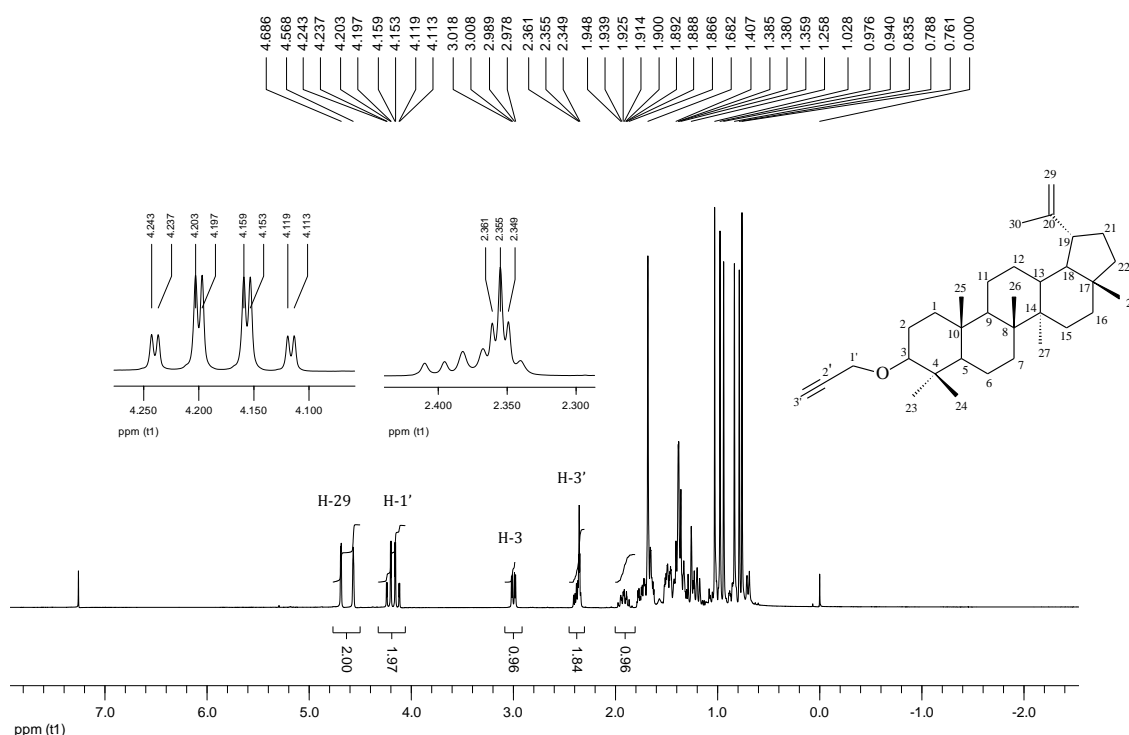


Figura 20: Espectro de RMN de ^1H do 3β - $3'$ -(prop-2'-in-1'-iloxi)lup-20(29)-eno (**TB1**) (400 MHz, CDCl_3).

No espectro de RMN de ^{13}C e com o auxílio do subspectro DEPT135 do **TB1** (Figura 21) os sinais que se destacam são os referentes aos carbonos do núcleo propargila em δ 63 devido ao C-1', em δ 48,12 devido ao C-3' e o em δ 43,07 referente ao C-2'. Os demais sinais são semelhantes aos sinais do lúpulo (Figura 15) já descritos anteriormente.

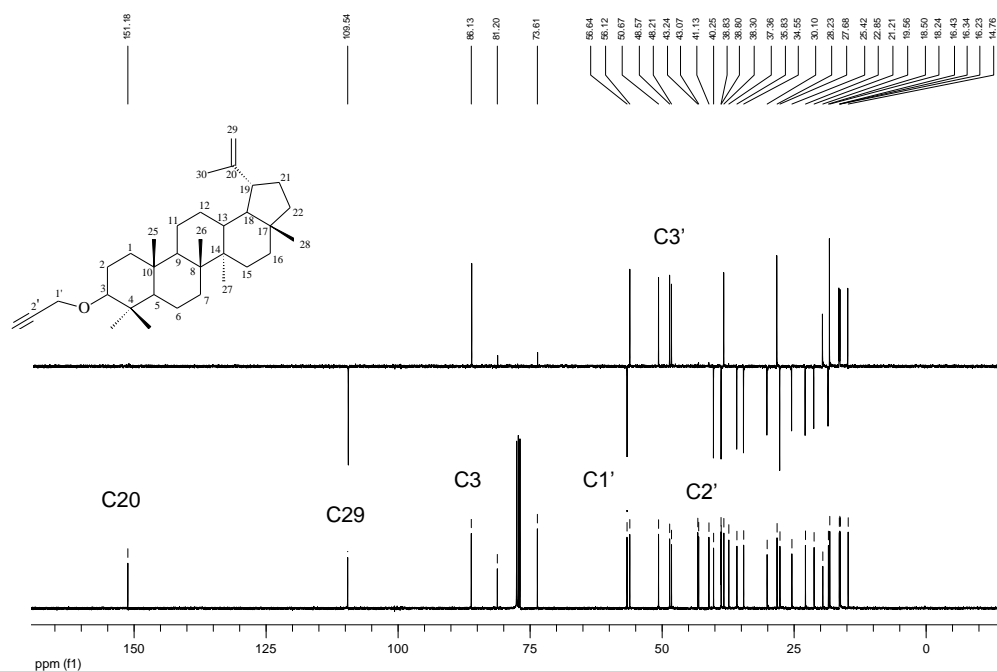


Figura 21: Espectro de RMN de ^{13}C e sub-espectro DEPT 135 do 3β -3'-(prop-2'-in-1'-iloxi)lup-20(29)-eno (**TB1**) (400 MHz, CDCl_3).

3.3.4 Caracterização do 3β -{[1'-(7''-cloroquinolin-4''-il)-1H-1',2',3'-triazol]4 metil} lup20 (29)-eno (**TB2**)

No espectro na região do IV de **TB2** (Figura 23) por comparação com aquele da azida orgânica **1**, foi observada a ausência de banda na região de 2100 cm^{-1} , a qual é característica de azidas, o que implica na inexistência do grupo azido no produto. Além disso, ao se comparar o espectro da Figura 22 com o espectro da Figura 19, do **TB1**, constatou-se que a banda referente ao estiramento da ligação $\text{C}\equiv\text{C}$ na região de 2112 cm^{-1} estava ausente, o que demonstra que o material de partida foi totalmente consumido. Outras bandas que se destacam são em 1600 cm^{-1} referente à deformação fora do plano da ligação C-H de aromático e em 822 cm^{-1} devido à deformação fora do plano da ligação C-H de aromático, as quais correspondem ao núcleo quinólico adicionado à molécula.

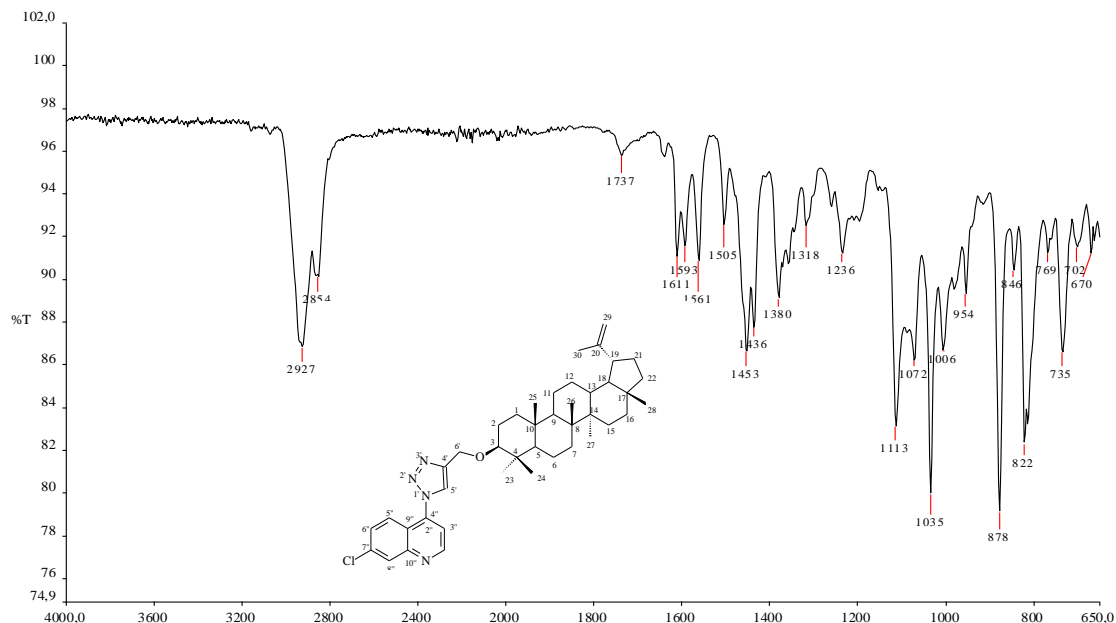


Figura 22: Espectro na região do infravermelho do 3 β -[[1'-(7''-cloroquinolin-4''-il)-1H-1',2',3'-triazol-4'il] metil} lup20 (29)-eno (**TB2**).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 23) do **TB2** destacam-se os seis sinais na região de hidrogênios aromáticos sendo que, cinco são referentes aos hidrogênios aromáticos da unidade quinolínica, os quais se apresentam como um duplete em δ 9,06 ($J_{2''-3''}$ 4,8) referente ao H-2'', um duplete em δ 8,27 ($J_{8''-6''}$ 1,6) devido ao H-8'', um duplete em δ 8,01 ($J_{5''-6''}$ 9,0) referente ao H-5'', um duplete duplo em δ 7,61 ($J_{6''-8''}$ 1,6 e $J_{6''-5''}$ 9,0) devido ao H-6'' e um duplete em δ 7,51 ($J_{3''-2''}$ 4,8) devido ao H-3''. O sexto sinal é um tripleto aparente em δ 8,00 ($J_{5'-6'}$ 2,9), devido ao único hidrogênio presente no anel triazólico, o H-5', o qual está acoplado com os hidrogênios H-6'.

Os demais sinais são semelhantes àqueles discutidos anteriormente no espectro de RMN de ^1H do lupeol (Figura 14).

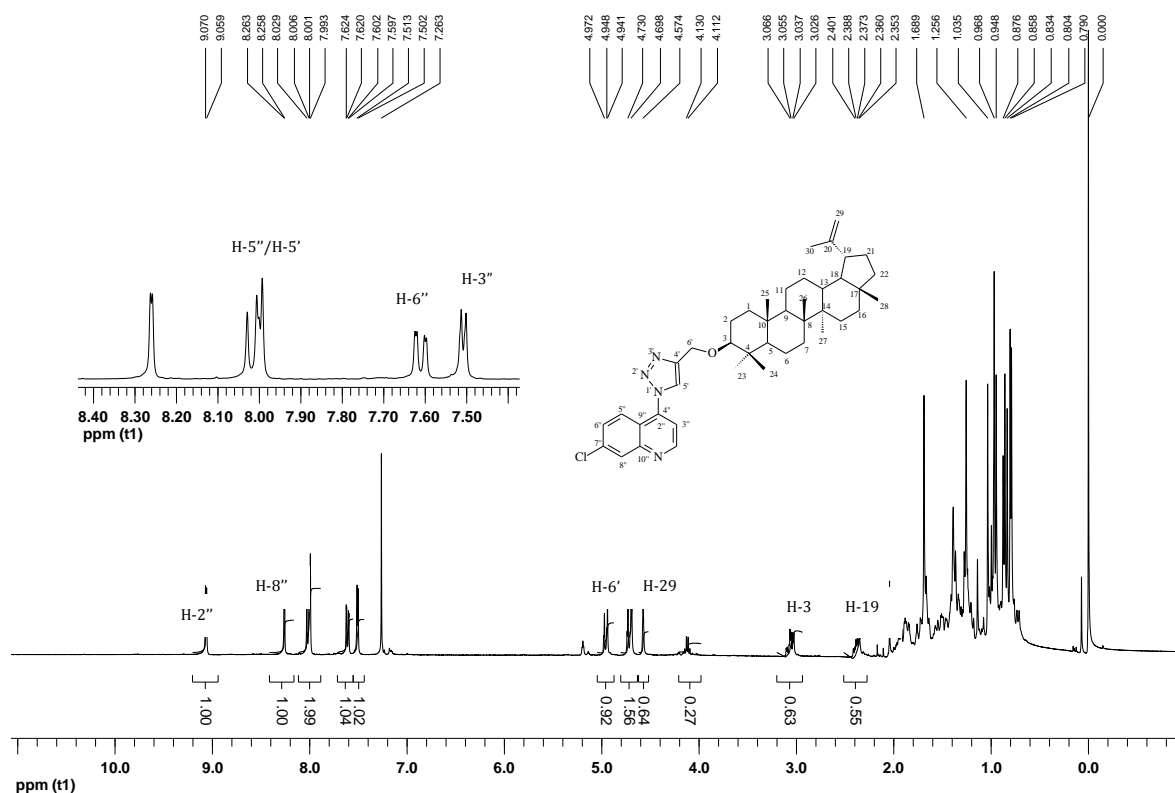


Figura 23: Espectro de RMN de ^1H do $\beta\text{-}\{[1'-(7''\text{-cloroquinolin-4''-il})-1\text{H}-1',2',3'\text{-triazol-4' il}] \text{metili}\}$ lup20 (29)-eno (**TB2**) (400 MHz, CDCl_3).

No espectro de RMN de ^{13}C sobreposto com o subspectro DEPT135 (Figura 24), observam-se os sinais de carbonos aromáticos provenientes da azida precursora. Assim, o sinal em δ 120,74 é devido ao C-3'', o em δ 128,84 ao C-5'', em δ 124,73 ao C-6'', em δ 129,50 ao C-8'', em δ 119,95 ao C-9'', em δ 147,62 ao C-4'', em δ 150,97 ao C-10'', em δ 151,25 C-2'' e o em δ 141,25 devido ao C-7''. Além desses, observa-se também os sinais dos carbonos referentes ao outro material de partida, o alcino, em δ 63,21 devido ao C-6', em δ 123,89 referente ao C-5', em 145,24 devido ao C-4', em δ 109,33 devido ao C-29, e o em δ 87,29 devido ao C-3. Na Tabela 4 encontra-se a relação de todos os sinais de carbono da estrutura.

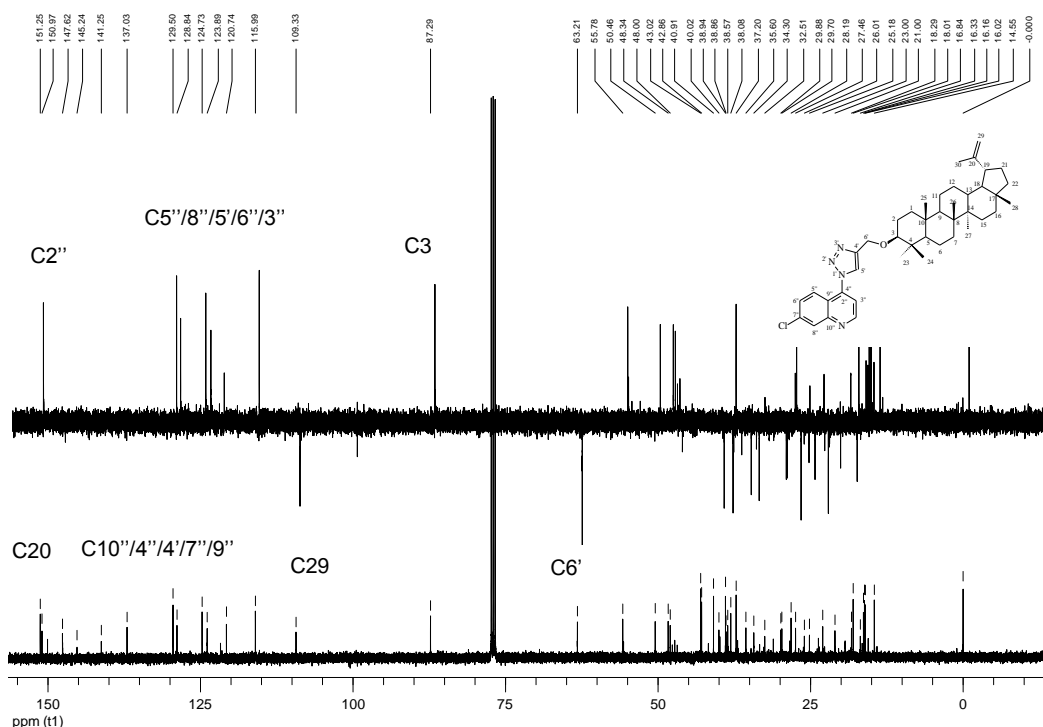


Figura 24: Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135 do 3β -{[1'-(7''-cloroquinolina-4''-il)-1*H*-1',2',3'-triazol-4'il] metil} lup20 (29)-eno (**TB2**) (400MHz, CDCl_3).

Nos mapas de contornos COSY (Figuras 51 e 52 Página 96), foram observadas as correlações de δ 9,08 (H-2'') com δ 7,51 (H-3''), de δ 8,27 (H-8'') com δ 7,61 (H-6'') e de δ 8,0 (H-5'') com δ 7,61 (H-6''), correspondentes aos hidrogênios do núcleo quinolínico do **TB2**. Através do COSY, pode-se confirmar também, as atribuições do espectro de RMN de ^1H do **TB2** referentes aos hidrogênios do núcleo propargílico.

Por meio do mapa de contorno HSQC (Figuras 53 e 54 Página 97) foi possível confirmar as atribuições dos espectros de RMN ^1H e de ^{13}C do **TB2**, como por exemplo, em δ 9,06 (H-2'') com δ 151,25 (C-2'') referentes ao núcleo quinolínico e em δ 3,05 (H-3) com δ 87,29 (C-3), devido ao lupeol.

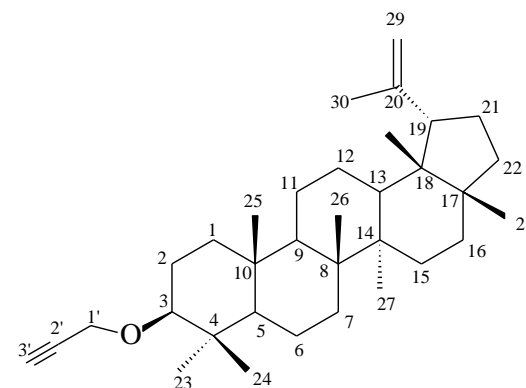
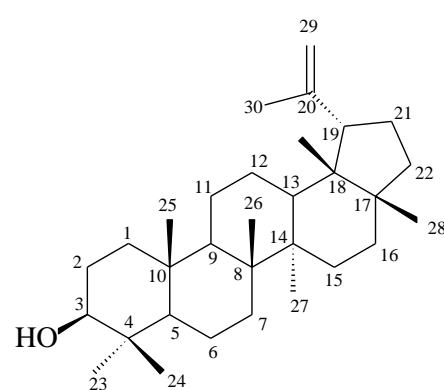
O espectro de massa de alta resolução por ionização em elétron-spray (Figura 50, Página 95) permitiu deduzir a fórmula molecular $C_{42}H_{57}ClN_4O$ (MM $668,5g.mol^{-1}$), uma vez que foi observado o pico em m/z 669,4 [M+H].

A atribuição referente aos demais produtos, contendo o anel triazol, foi feita de maneira análoga. Os sinais referentes ao H-5', único hidrogênio presente no anel triazólico, teve o seu δ variando de 7,0 a 8,0. Os sinais devido ao H-6' variaram entre δ 4,5 e δ 4,8 e apresentaram-se como um d,d nos derivados triazólicos, exceto no TB6, o qual teve como multiplicidade um duplete largo devido a superposição desse sinal com os sinais de H-29. O sinal de H-3 nos derivados triazólicos apresentou-se como um duplete duplo, devido aos acoplamentos axial-axial e axial-equatorial de H-3 com os H-2, com δ variando de 2,8 a 3,0. Os sinais devidos aos H-29 tiveram seus δ variando entre 4,5 a 4,8.

Os deslocamentos químicos (δ em ppm) a multiplicidade dos sinais (Multi.) e os valores das constantes de acoplamento (J , em Hz) observados nos espectros de RMN de 1H e de ^{13}C dos produtos estão mostrados nas tabelas 4, 5, 6 e 7. Os espectros no IV, de Massas e de RMN de 1H e de ^{13}C e os mapas de contorno COSY e HSQC são apresentados no Anexo I.

Tabela 4: Comparação dos dados de RMN ^1H do lupeol e do TB1.

Hidrogênio	δ	Multi.	J	δ	Multi.	J
H1'	-	-	-	4,22	d,d	2,4 e 16
H1'	-	-	-	4,14	d,d	2,4 e 16
H3'	-	-	-	2,35	t	2,4
H3	3,18	d,d	8,6 e 5,8	2,99	d,d	11,6 e 4,0
H19	2,35	M	-	2,36	m	-
H23	0,76	s	-	0,76	s	-
H24	0,78	s	-	0,79	s	-
H25	0,82	s	-	0,83	s	-
H26	0,94	s	-	0,94	s	-
H27	0,96	s	-	0,97	s	-
H28	1,25	s	-	1,03	s	-
H29	4,68	s,l	-	4,69	s	-
H29	4,56	s,l	-	4,57	s	-
H30	1,67	s	-	1,69	s	-

Tabela 5: Comparação dos dados de RMN ^{13}C do lupeol e do TB1.

Carbono	δ	DEPT-135	δ_c	δ	DEPT-135	δ_c
C1	38,89	CH ₂	38,83	38,80	CH ₂	38,84
C2	27,4	CH ₂	27,57	27,68	CH ₂	27,69
C3	78,17	CH	79,10	86,13	CH	86,26
C4	39,04	C	39,04	38,83	C	-
C5	55,47	CH ₂	55,41	56,12	CH ₂	56,08
C6	19,5	CH ₂	19,44	18,24	CH ₂	18,34
C7	34,45	CH ₂	34,45	34,55	CH ₂	34,65
C8	40,18	C	-	41,13	C	-
C9	50,6	CH	50,55	50,67	CH	50,90
C10	37,37	C	37,37	37,36	C	-

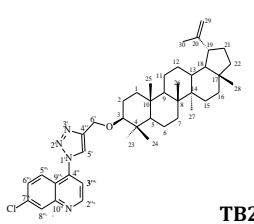
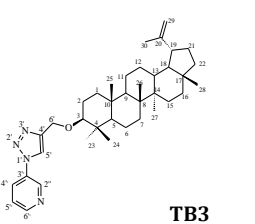
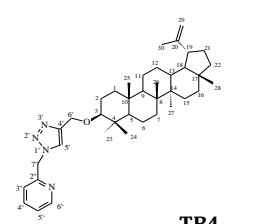
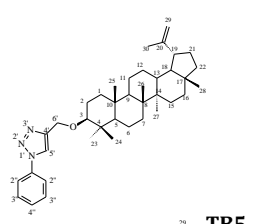
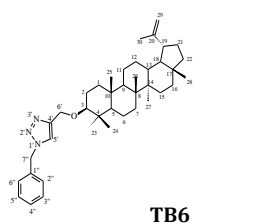
Continuação da Tabela 5

C11	21,11	CH ₂	21,05	21,21	CH ₂	21,03
C12	25,31	CH ₂	25,25	25,42	CH ₂	25,43
C13	38,22	CH	38,16	38,30	CH	38,31
C14	41,00	C	-	43,24	C	-
C15	27,6	CH ₂	27,6	28,23	CH ₂	28,24
C16	35,76	CH ₂	35,71	35,83	CH ₂	35,98
C17	43,01	C	-	43,24	C	-
C18	48,47	CH	48,41	50,65	CH	50,90
C19	48,16	CH	48,11	48,21	CH	48,26
C20	151,13	C	-	151,18	C	-
C21	30,02	CH ₂	29,97	30,10	CH ₂	30,17
C22	40,18	CH ₂	40,13	40,25	CH ₂	40,23
C23	28,18	CH ₃	28,18	28,85	CH ₃	28,65
C24	15,57	CH ₃	15,52	16,34	CH ₃	16,36
C25	16,31	CH ₃	16,26	16,43	CH ₃	16,45
C26	16,16	CH ₃	16,10	16,23	CH ₃	16,24
C27	14,74	CH ₃	14,69	14,76	CH ₃	14,77
C28	18,5	CH ₃	18,45	18,50	CH ₃	18,62
C29	109,54	CH ₂	109,50	109,54	CH ₂	109,69
C30	19,5	CH ₃	19,44	19,56	CH ₃	19,52
C1'	-	-	-	56,64	CH ₂	56,79
C3'	-	-	-	48,57	CH	48,56
C2'	-	-	-	43,07	C	-

Tabela 6: Comparação dos dados de RMN de ^1H dos híbridos triazólicos do lupeol TB2-TB6.

Hidrogênio	TB2			TB3			TB4			TB5			TB6		
	δ	Multi.	J	δ	Multi.	J	δ	Multi.	J	δ	Multi.	J	δ	Multi.	J
1''	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2''	9,06	d	4,8	9,01	d	2,4	7,60	S	-	7,74	D	7,6	7,23	d,d	7,2 e 2,8
3''	7,51	d	4,8	-	-	-	-	-	-	7,52	T	7,6 e 7,4	7,36	d,l	7,2
4''	-	-	-	8,142	d,d,d	8,4; 4,6; 2,4	7,09	D	7,8	7,43	T	7,6 e 7,4	7,36	d,l	7,2
5''	8,01	d	9,0	7,5	d,d,d	8,4; 4,6; 0,8	7,18	T	7,08 e 5,88	-	-	-	5,51	s	-
6''	7,61	d,d	9,0 e 1,6	8,7	d,d	4,6 e 1,4	8,51	D	4,52	-	-	-	-	-	-
7''	-	-	-	-	-	-	5,6	S	-	-	-	-	-	-	-
8''	8,27	d	1,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5'	8,00	t	2,9	8,00	t	0,8	7,60	d,d	2,64	7,96	d,l	3,0	7,43	s,l	-
6'	4,95	d,d	2,6 e 11,2	4,88	d,d	0,8 e 12	4,7	d,d	12,5 e 2,52	4,87	d,d	11,8 e 3,0	4,74	d	12,4
6'	4,73	d,d	2,6 e 11,2	4,65	d,d	0,8 e 12	4,5	d,d	12,3 e 4,2	4,65	d,d	11,8 e 3,0	4,54	d	12,4
3	3,05	d,d	11,6 e 4,4	3,00	d,d	12 e 4,4	3,00	m	-	3,02	d,d	4,4; 12 e 3,6	2,92	d,d	4,16; 11,64
19	2,38	m	-	2,38	m	-	2,3	m	-	2,4	M	-	1,91	m	-
23	0,79	s	-	-	S	-	0,76	s	-	0,75	S	-	0,73	s	-
24	0,80	s	-	-	s	-	0,79	s	-	0,79	S	-	0,78	s	-
25	0,83	s	-	-	s	-	0,82	s	-	0,83	S	-	0,82	s	-
26	0,95	s	-	-	s	-	0,95	s	-	0,95	S	-	0,94	s	-
27	0,97	s	-	-	s	-	0,99	s	-	0,97	S	-	0,97	s	-
28	1,26	s	-	-	s	-	1,01	s	-	1,01	S	-	1,01	s	-
29	4,73	s,l	-	4,69	d	2,4	4,61	s,l	-	4,69	s,l	-	4,67	s,l	-
29	4,57	s	-	4,57	s	-	4,5	s,l	-	4,57	s,l	-	4,56	s,l	-
30	1,69	-	-	1,67	s	-	1,68	s	-	1,78	S	-	1,05	s	-

Tabela 7: Comparação dos dados de RMN ¹³ C dos híbridos triazólicos do lupeol **TB2-TB6**.

Carbano															
	δ	DEPT-135	δ_C	Carbano	δ	DEPT-135	δ	DEPT-135	δ_C	δ	DEPT-135	δ_C	δ	DEPT-135	δ_C
1	38,79	CH ₂	38,79	38,76	CH ₂	38,76	38,75	CH ₂	38,75	38,77	CH ₂	38,61	38,75	CH ₂	38,74
2	27,67	CH ₂	27,67	25,36	CH ₂	25,36	27,14	CH ₂	27,14	27,14	CH ₂	27,11	27,64	CH ₂	27,63
3	87,51	CH	87,51	87,30	CH	87,31	86,75	CH	86,75	87,04	CH	86,93	86,69	CH	86,68
4	39,07	C	-	39,10	C	-	38,91	C	-	39,08	C	-	38,89	C	-
5	56,00	CH ₂	56,00	55,95	CH ₂	55,95	55,79	CH ₂	55,92	55,94	CH ₂	55,95	55,91	CH ₂	55,90
6	19,55	CH ₂	19,55	19,52	CH ₂	19,52	18,45	CH ₂	18,45	18,21	CH ₂	18,21	18,25	CH ₂	18,44
7	34,52	CH ₂	34,52	34,49	CH ₂	34,49	34,49	CH ₂	34,49	34,5	CH ₂	34,56	34,50	CH ₂	34,49
8	41,12	C	-	40,20	C	-	40,03	C	-	40,21	C	-	41,07	C	-
8	50,67	CH	50,67	50,63	CH	50,63	50,60	CH	50,60	50,62	CH	50,60	50,59	CH	50,59
10	37,41	C	-	37,36	C	-	37,33	C	-	37,12	C	-	37,33	C	-
11	21,21	CH ₂	21,21	21,17	CH ₂	21,18	21,15	CH ₂	21,15	19,52	CH ₂	19,59	21,16	CH ₂	21,15
12	25,39	CH ₂	25,32	23,15	CH ₂	23,15	26,18	CH ₂	26,18	25,36	CH ₂	25,38	25,36	CH ₂	25,35
13	38,29	CH	38,29	38,25	CH	38,26	38,25	CH	38,26	38,26	CH	38,29	38,26	CH	38,25
14	43,07	C	-	43,03	C	-	43,02	C	-	43,03	C	-	43,02	C	-
15	28,62	CH ₂	28,61	27,64	CH ₂	27,64	27,63	CH ₂	27,63	27,64	CH ₂	27,64	27,64	CH ₂	27,63
16	35,81	CH ₂	35,81	35,78	CH ₂	35,79	35,79	CH ₂	35,79	35,79	CH ₂	35,79	35,79	CH ₂	35,78
17	43,23	C	-	43,19	C	-	43,20	C	-	43,03	C	-	43,20	C	-
18	48,22	CH	48,22	48,52	CH	48,52	48,51	CH	48,52	48,52	CH	48,44	48,52	CH	48,51
19	48,55	CH	48,55	48,18	CH	48,19	48,19	CH	48,19	48,19	CH	48,18	48,18	CH	48,19
20	150,29	C	-	151,14	C	-	151,14	C	-	151,13	C	-	151,13	C	-
21	29,91	CH ₂	29,91	30,05	CH ₂	30,06	31,27	CH ₂	30,06	30,06	CH ₂	30,13	30,06	CH ₂	30,05
22	40,21	CH ₂	40,23	41,08	CH ₂	40,21	40,21	CH ₂	40,21	40,04	CH ₂	40,15	40,21	CH ₂	40,20
23	28,51	CH ₃	28,51	28,34	CH ₃	28,34	28,59	CH ₃	28,59	28,60	CH ₃	28,59	28,19	CH ₃	28,18
24	16,22	CH ₃	16,22	15,57	CH ₃	16,35	15,70	CH ₃	15,70	16,45	CH ₃	16,20	14,72	CH ₃	14,71

Continuação da Tabela 7

25	16,37	CH ₃	16,37	16,34	CH ₃	16,51	16,32	CH ₃	16,32	17,03	CH ₃	17,02	16,32	CH ₃	16,31
26	16,54	CH ₃	16,54	16,19	CH ₃	16,34	16,18	CH ₃	16,18	16,77	CH ₃	16,77	16,19	CH ₃	16,18
27	14,7	CH ₃	14,7	14,72	CH ₃	14,73	14,71	CH ₃	14,71	15,67	CH ₃	15,67	14,72	CH ₃	14,71
28	18,51	CH ₃	18,50	18,20	CH ₃	18,20	18,20	CH ₃	18,20	18,24	CH ₃	19,52	18,21	CH ₃	18,20
29	109,55	CH ₂	109,55	109,53	CH ₂	109,53	109,52	CH ₂	109,52	109,54	CH ₂	109,51	109,52	CH ₂	109,52
30	19,55	CH ₃	19,55	18,46	CH ₃	18,47	18,50	CH ₃	18,50	19,52	CH ₃	19,59	19,52	CH ₃	19,51
C6'	63,42	CH ₂	63,42	63,49	CH ₂	63,42	63,40	CH ₂	63,40	63,45	CH ₂	63,71	63,40	CH ₂	63,39
C5'	124,95	CH	124,96	120,40	CH	120,46	122,51	CH	122,52	120,76	CH	120,64	122,35	CH	122,35
C4'	145,45	C	-	148,22	C	-	154,20	C	-	137,0	C	-	147,00	C	-
C1''	-	-	-	-	-	-	-	-	-	145	C	145	135,00	C	135
C2''	151,25	CH	151,48	141,78	CH	141,84	137,51	CH		121,95	CH	121,93	128,13	CH	128,13
C3''	120,74	C			C		123,08	C	123,08	129,90	C		128,84	C	128,84
C4''	147,62	C	-	124,49	CH	124,41	121,95	CH	121,95	128,83	CH	128,87	129,24	CH	129,24
C5''	128,84	CH	129,07	127,30	CH	127,30	123,55	CH	123,55	-		-	-		-
C6''	124,73	CH	124,12	128,28	CH	128,29	149,88	CH	149,88	-		-	-		-
C7''	141,25	C		-	-	-	55,79	C		-	-	-	-	-	-
C8''	129,50	CH	129,79	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-
C9''	137,03	C	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-
C10''	150,97	C	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-

4 Avaliação da atividade antimalárica e da citotoxicidade dos compostos obtidos

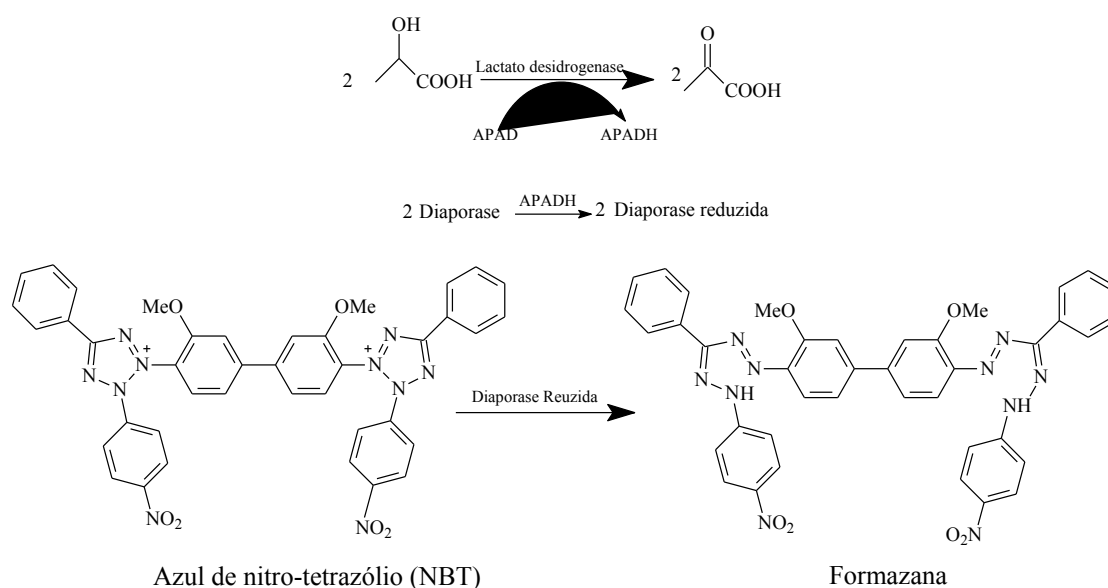
A avaliação da atividade antimalárica e da citotoxicidade das substâncias obtidas foi realizada por testes *in vitro* em culturas de *P. falciparum* (W2) e células HepG2, respectivamente.

Testes *in vitro* são importantes para avaliar a atividade antimalárica de extratos e substâncias naturais ou sintéticas. Ao longo dos anos, várias metodologias foram desenvolvidas com o objetivo de se determinar a susceptibilidade de parasitos da malária humana. No caso da malária, testes *in vitro* só se tornaram possíveis após o trabalho realizado por Trager e Jensen, em 1976 que estabeleceu as condições para o cultivo do *P. falciparum*.

Um dos primeiros métodos utilizado para a avaliação do efeito inibitório *in vitro* de compostos/extratos no crescimento do *P. falciparum* no seu desenvolvimento no interior dos eritrócitos foi o chamado teste tradicional ou microscópico. Este teste emprega culturas do parasito que são tratadas com as amostras teste e se determina a presença de parasitos viáveis, via microscópio óptico, a partir da aferição do percentual de parasitemia (Riechmann *et al.*, 1978).

Outro bioensaio muito utilizado é conhecido como teste de incorporação da hipoxantina tritiada [³H-hipoxantina], o qual se baseia na utilização da [³H-hipoxantina] pelos parasitos, na síntese de DNA e, com o auxílio de um leitor de radioatividade, é possível quantificar o nível de parasitos viáveis, através da taxa de produção de DNA. Este método é considerado como referência por possuir uma alta taxa de reprodutibilidade, porém tem como desvantagem o emprego de equipamentos de alto custo, necessidade de um ambiente adequado para manuseio de material radioativo e geração de resíduos radioativos (Desjardins *et al.*, 1979).

Uma metodologia que é utilizada para avaliar a atividade antimalárica de substâncias e extratos, tem como princípio a quantificação da lactato desidrogenase (*p*LDH), enzima produzida pelo *P. falciparum* (Makler *et al.*, 1993). Dessa forma, a concentração desta enzima, ao final do teste, é proporcional à população de parasitos viáveis após o contato com as amostras teste. A *p*LDH possui um papel importante no metabolismo de carboidratos dos parasitos da malária humana (Basco *et al.*, 1995). Este teste baseia-se no fato de que na presença de uma co-enzima, a 3-acetilpiridina adenina dinucleotídeo (APAD) e de um substrato contendo o L-lactato (reagente Malstat), a *p*LDH converte o lactato em piruvato, gerando a APADH. Em seguida, a APADH irá reduzir a diaporase, uma enzima presente no meio, originando a diaporase redutase. Esta reagirá com o sal de tetrazólio (NBT - nitro blue tetrazolium), também presente no meio, abrindo os anéis tetrazólicos do NBT e dando origem à formazana, de coloração azul (Nkhoma *et al.*, 2007) (Esquema 12). A coloração desenvolvida neste teste é diretamente proporcional a presença de *p*LDH, ou seja, de parasitos viáveis. A reação colorimétrica é medida por espectrofotômetro a 540 nm. O resultado das leituras é comparado com um valor padrão referente à inibição dos parasitos pela cloroquina.



Esquema 12: Fundamento químico do teste pelo método da *p*LDH: reação do NBT para formar a formazana.

Devido à reprodutibilidade, fácil aplicabilidade, rapidez do procedimento e a disponibilidade deste teste no Laboratório de Fitoquímica da Faculdade de Farmácia da UFMG, o método da *p*LDH foi escolhido para avaliar a atividade antimalárica dos compostos obtidos no presente trabalho. As porcentagens de inibição do crescimento do *P. falciparum* (clone W2) frente a estas substâncias, nas concentrações de 50 e 25 µg/ml, estão mostradas na Tabela 8.

Tabela 8: Porcentagem de redução do crescimento do *P. falciparum* (W2) pelo método da *p*LDH frente ao lupeol e derivados triazólicos **TB1** a **TB6**, nas concentrações de 50 µg/mL e 25 µg/mL.

Substância	Redução (%)		Classificação da atividade
	Conc. 50 µg/MI	Conc. 25 µg/mL	
Lupeol	49% (0,12 µM)	28%(0,06 µM)	Pouco ativo
TB1	81%(0,10 µM)	43%(0,054 µM)	Ativo
TB2	17%(0,075 µM)	9%(0,037 µM)	Muito Pouco ativo
TB3	26 %(0,085 µM)	19%(0,043 µM)	Muito Pouco ativo
TB4	17%(0,083 µM)	9%(0,042 µM)	Muito Pouco ativo
TB5	16% (0,085 µM)	9%(0,043 µM)	Muito Pouco ativo
TB6	13% (0,084 µM)	12%(0,042 µM)	Muito Pouco ativo

Neste teste os resultados observados são classificados de acordo com os critérios que constam da Tabela 9 para então se definir se a substância é muito ativa, ativa ou pouco ativa.

Tabela 9: Parâmetros para a classificação de uma substância em relação à sua atividade antimalárica *in vitro*

Porcentagem de redução da parasitemia	Classificação da amostra
≥ 50% na concentração de 25 µg/ml	Muito ativa
>25 e <50% na concentração de 25 µg/ml	Ativa
≤ 50% na concentração de 50 µg/ml -	Pouco ativa
50% ≥Redução ≥ 10% na concentração de 50 µg/ml - ≤ 10%	Muito pouco ativa. Inativa

Pelos resultados obtidos no teste de atividade antimalárica, mostrados na Tabela 8, constatou-se que a formação dos derivados 1,2,3-triazólicos, a partir do lupeol, não conduziu a substâncias mais ativas do que este triterpeno. Porém, o alcino intermediário **TB1**, formado a partir da incorporação de um grupo propargila ao lupeol, se destacou nos resultados dos testes antimaláricos, pois causou uma redução de 81% na parasitemia na concentração de 50 µg/ml, superior aos produtos finais e até mesmo à do lupeol que foi de 49% (Tabela 8).

Com o objetivo de determinar se a ação dos compostos sintetizados foi seletiva contra o parasito ou se foi devida à sua alta citotoxicidade, as substâncias **TB1**a**TB6** foram submetidas a teste de citotoxicidade *in vitro* contra células HepG2.

Os resultados obtidos no teste de citotoxicidade constam da Tabela 10. As substâncias cujas citotoxicidades foram avaliadas, apresentaram valores de CC_{50} superiores ao do lupeol e a do antimalárico cloroquina (CQ), ou seja, estas substâncias apresentaram uma citotoxicidade inferior ao lupeol e à cloroquina frente a células HepG2.

Tabela 10: Resultado do teste de citotoxicidade do lupeol e dos híbridos 1,2,3-triazólicos sintetizados (**TB1-TB6**) em culturas de células HepG2.

Substâncias	CC_{50}
Lupeol	303,49
TB1	ND
TB2	>1000
TB3	>1000
TB4	ND
TB5	ND
TB6	>1000
CQ	221,95

ND não determinado

CC_{50} concentração citotóxica para 50% das células.

CQ cloroquina

5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Materiais e Métodos

5.1.1 Ponto de Fusão

Os pontos de fusão foram determinadas no aparelho Microquímica MQAPF-307 do Laboratório de Fitoquímica da Faculdade de Farmácia da UFMG.

5.1.2 Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros na região do IV foram obtidos no espectrômetro FT-IR, Spectrum One, Perkin-Elmer com sistema ATR no laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG.

5.1.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de H^1 , de C^{13} , DEPT 135, e os mapas de contorno COSY e HSQC foram obtidos no equipamento BRUKER AVANCE DPX200 e DRX400 do Departamento de Química da UFMG. O solvente utilizado na solubilização das amostras foi $oCDCl_3$. Os deslocamentos químicos (δ) foram medidos em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

5.1.4 Espectrometria de Massas.

Os espectros de Massas foram obtidos no equipamento Shimadzu LCMS-IT-TOF equipado com fonte de ionização por electrospray do Departamento de Química da UFMG.

5.1.5 Cromatografia em camada delgada de sílica (CCD)

Para a CCD foi utilizada sílica gel 60G Merck sobre lâmina de vidro, com a espessura da camada de sílica de 0,25 mm e placas de sílica gel 60 F254 cromatoplaca 20x20 da Merck.

5.1.6 Cromatografia em coluna

As purificações em coluna cromatográfica foram realizadas com sílica gel 60 Merck (tamanho de partícula 0,063-0,200 mm; 70-230 mesh ASTM). Em cada experimento estão descritos os sistemas eluotrópicos e de revelação utilizados.

5.1.7 Purificação e secagem dos solventes, materiais e reagentes (Chai e Armarego, 2003)

Alguns dos solventes utilizados, como o n-hexano, diclorometano e acetato de etila foram tratados a fim de eliminar impurezas. A purificação consistiu numa destilação simples. Para o tratamento do tetra-hidrofurano utilizou-se o método de tratamento com sódio metálico, como descrito abaixo.

5.1.7.1 Tetra-hidrofurano

Um frasco âmbar contendo tetra-hidrofurano (THF) e cloreto de cálcio foi vedado e mantido a temperatura ambiente por 24 horas. Após este tempo, o THF foi refluxado na presença de sódio metálico e benzofenona até o aparecimento da coloração azul, em seguida o solvente foi recolhido e utilizado nas reações.

5.1.7.2 Secagem de vidraria

As vidrarias utilizadas nas reações anidras foram lavadas com água e acetona e secas em estufa a 100°C.

5.1.8 Reveladores

5.1.8.1 Iodo sublimado

O iodo sólido foi colocado em uma cuba e esta foi fechada para obter uma

atmosfera de vapor de iodo.

5.1.8.2 Solução ácida de CAM (Molibdato Cérico Amoniacal ou revelador de Hanessian) (Wagner, H.; Zgainski, E.M., 1993)

A um Erlenmeyer contendo 5,00 g de sulfato cérico e 25,00 g de molibdato de amônio, foram adicionados, sob agitação, 50 mL de ácido sulfúrico concentrado seguido de 450 mL de água destilada. A solução final foi agitada por 1 hora e estocada na ausência de luz. Para revelação, borrifou-se essa solução nas placas cromatográficas seguido de aquecimento a 100°C.

5.1.8.3 Solução metanólica de Anisaldeído Sulfúrico(Wagner, H.; Zgainski, E.M., 1993)

A um erlenmeyer contendo 0,5 mL de anisaldeído sulfúrico foram adicionados, nesta ordem, 10 mL de ácido acético glacial, 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico, os componentes foram misturados. Para revelação, a solução foi borrifada nas placas cromatográficas seguido de aquecimento a 100 °C.

5.1.8.4 Solução de verde de bromocresol (Morita e Assumpção, 1968)

Em um béquer contendo 0,1g de verde de bromocresol foram adicionados 100 mL de álcool etílico. A mistura foi agitada, a temperatura ambiente, por cerca de 10 minutos. Para revelação, a solução foi borrifada nas placas cromatográficas seguido de aquecimento a 100 °C.

5.2 Percolação do material vegetal

Em um béquer contendo 370 g de pó da casca da *P. fasciculata*, foram adicionados

20 mL de uma solução concentrada de NH₄OH e misturou-se com um bastão de vidro obtendo-se uma massa de pó umedecida homogeneamente. Em seguida, essa mistura foi transferida para um percolador de aço inoxidável, onde foram adicionados 4L de DCM. Após 24 horas de percolação, a

presença do lupeol foi comprovada por CCD (eluente Hex/DCM 1:1; revelador solução metanólica de anisaldeído sulfúrico). O percolato recolhido foi seco com Na₂SO₄ e o solvente removido em evaporador rotatório sob pressão reduzida. Esse procedimento foi repetido 12 vezes, até a extração de todo o lupeol presente no material vegetal. Obteve-se 2,2 g de extrato bruto.

5.3 Fracionamento do extrato bruto de cascas de *P. fasciculata* por cromatografia em coluna.

O extrato bruto foi purificado por coluna cromatográfica utilizando como eluentes hexano e diclorometano nas seguintes proporções e volumes: Hex (300 mL); Hex/DCM 8:2 (300 mL); Hex/DCM 7:3 (300 mL); Hex/DCM 6:4 (300 mL) e Hex/DCM 1:1 (1200 mL). As frações que continham o lupeol foram reunidas e o solvente removido sob pressão reduzida em rotavapor rotatório. Obteve-se 800 mg de um sólido branco que por CCD (eluente: Hex/DCM 1:1; revelador: solução metanólica de anisaldeído sulfúrico) e análise de IV (Figura 13, Página 31) constatou-se que se tratava da mistura do lupeol com o éster 3-O-acil lupeol.

5.4 Hidrólise alcalina da mistura de lupeol e ésteres do lupeol obtida da coluna cromatográfica do extrato bruto de cascas de *P. fasciculata*.

A um balão contendo o extrato bruto de cascas *P. fasciculata* (800 mg) foram adicionados 50 mL de uma solução etanólica de KOH a 10%. A reação foi deixada sob agitação e refluxo por 3 horas. O consumo do material de partida foi evidenciado por CCD (eluente: Hex/DCM 1:1; revelador: solução metanólica de anisaldeído sulfúrico). Finalizada a reação, o solvente foi removido em evaporador rotatório. Em seguida, foram adicionados 100 mL de DCM ao resíduo, o qual foi extraído com água destilada. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e o solvente removido sob pressão reduzida em evaporador rotatório. O resíduo resultante foi purificado utilizando uma coluna cromatográfica (eluente: Hex/DCM: 9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 5:5). Obteve-se, no final, 400 mg de um sólido branco referente ao lupeol.

Fórmula Molecular: C₃₀H₅₀O

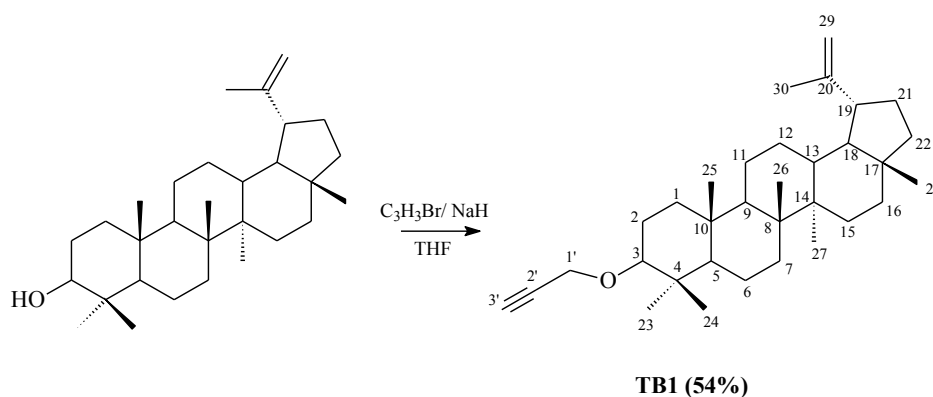
Massa Molar: 426,73 g.mol⁻¹

Aspecto: sólido branco

Faixa de Fusão: 218,4-220,3°C

IV (ATR, cm⁻¹) ν_{\max} : 3313 (ν_{ax} da ligação O-H de álcool), 3066 (ν_{ax} das ligações C-H sp²); 2943 e 2872 (ν_{ax} das ligações C-H sp³); 1638 (ν_{axass} das ligações C=C); 1452 (δ_{ang} das ligações C-H sp²); 1379 (δ_{ang} das ligações C-H sp³); 1042 e 878 (δ_{ang} fora do plano das ligações C-H sp²)

5.5 Síntese do 3 β -3'-(prop-2'-in-1'-iloxi)lup-20(29)-eno-(TB-1) a partir do lupeol



A um balão contendo NaH (56 mg; 2,34 mmol), vedado com uma rolha de borracha e sob atmosfera de N₂, foi adicionado, com o auxílio de uma seringa e sob agitação magnética, o lupeol (200,0 mg; 0,469 mmol) solubilizado em THF (10mL), previamente tratado. Após 30 min. de reação, foi adicionado, também com o auxílio de uma seringa, o brometo de propargila (278 mg; 2,34mmol). Após 24 horas de reação, foi evidenciado por meio de CCD (Hex/DCM 1:1; revelador: solução metanólica de anisaldeído sulfúrico), o consumo do material de partida. Em seguida, adicionou-se à reação 150 mL de acetato de etila e prosseguiu-se com uma extração utilizando solução de NaOH 0,5 mol/L e solução saturada de NaCl. As fases orgânicas foram reunidas e secas com Na₂SO₄. O solvente foi removido sob pressão reduzida em rotavapor, o resíduo foi purificado por meio de uma coluna cromatográfica (eluente: Hex/DCM. 100:0; 90:10; 80:20; 70:30; 60:40). Obteve-se como

produto um sólido amarelo (117,6 mg; 54% de rendimento).

Fórmula Molecular: C₃₃H₅₂O

Massa Molar: 464,7 g.mol⁻¹

Rendimento: 54%

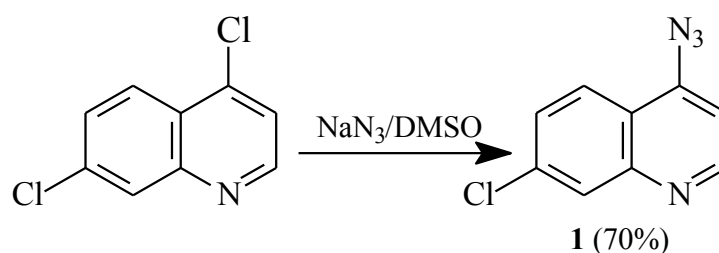
Aspecto: sólido amarelo

Faixa de Fusão: 159,9-161,7°C

IV (ATR, cm⁻¹)v_{max}: 3253 (v_{ax} da ligação C-H sp), 2939-2870 (v_{ax} das ligações C-H sp³); 2112 (v_{ax} das ligações C=Csp); 1641 (v_{axass} das ligações C=C); 1454 (δ_{ang} das ligações C-H sp²); 1380 (δ_{ang} das ligações C-H sp³); 1017 (v_{ax} da ligação C-O de álcool); 881 (δ_{ang} fora do plano das ligações C-H sp²).

5.6 Síntese das azidas orgânicas 1 a 5

5.6.1 Síntese da 4-azido-7-cloroquinolína (1)



A um balão contendo a 4,7-dicloroquinolína (300 mg, 1,5mmol) solubilizada em DMSO (30 mL) adicionou-se, sob agitação e aquecimento a 90°C, NaN₃ (295 mg; 4,5 mmol). A reação prosseguiu por 18 horas, após esse tempo evidenciou-se por CCD (elute: hexano/acetato de etila 1:1; reveladores: iodo e CAM), o consumo do material de partida. Adicionou-se à reação acetato de etila e extraiu com uma solução aquosa de NaCl. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e o solvente removido sob pressão reduzida em rotavapor. O resíduo foi purificado numa coluna cromatográfica (elute: hexano/acetato de etila 90:10, 80:20, 70:30, 60:40), obteve-se como produto um sólido amarelo (214,0 g; 70% de rendimento).

Fórmula Molecular: C₉H₅N₄Cl

Aspecto: Sólido amarelo

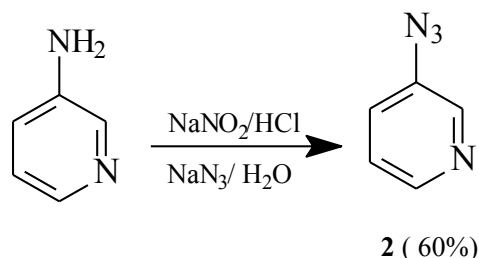
Massa Molar: 204,5 g.mol⁻¹

Rendimento: 70%

Faixa de Fusão: 112-113 °C

IV (ATR, cm⁻¹) ν_{\max} : 3036 (ν_{ax} da ligação C-H sp²), 2090 (ν_{ax} da ligação N=N⁺=N⁻); 1572,1474,1421 (ν_{ax} das ligações C=C aromático); 1285,1237 (δ_{ang} fora do plano das ligações C-H aromático); 1140 (δ_{ang} das ligações C-H de aromático); 798 (ν_{ax} da ligação C-Cl de); 700 e 680 (δ_{ang} fora do plano das ligações C-H de aromático monossustituído).

5.6.2 Síntese da 3-azidopiridina(2)(Adaptado de Ito *et al.*, 2008)



A um balão contendo uma solução ácida (10% de HCl) de 3-aminopiridina (5g; 0,053 mol), foi adicionado gota a gota nitrito de sódio (NaNO₂) (4,4 g; 0,064 mol) em água (10 mL). Em seguida, gotejou-se nesse balão, sob agitação e a 0°C, NaN₃ (4,16 g; 0,064 mol) em água (10 mL). A reação prosseguiu sob agitação e temperatura ambiente, por 45 minutos. Após este período, a reação foi alcalinizada com uma solução de Na₂CO₃ e extraída com diclorometano. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e o solvente foi removido sob pressão reduzida em rotavapor. Obteve-se como produto um óleo marrom (6,36 g; 60% de rendimento).

Fórmula Molecular: C₅H₄N₄

Massa Molar: 120,0 g.mol⁻¹

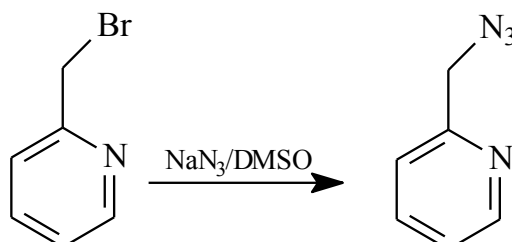
Rendimento: 60%

Aspecto: óleo marrom

IV (ATR, cm⁻¹) ν_{\max} : 3408 e 3034 (ν_{ax} da ligação C-H sp²), 2090 (ν_{ax} da ligação N⁻=N⁺=N⁻); 1571, 1474, 1421 (ν_{ax} das ligações C=C aromático);

1285,1237 (δ_{ang} fora do plano das ligações C-H aromático); 1140 (δ_{ang} das ligações C-H de aromático); 798(ν_{ax} da ligação C-Cl de); 700 e 687 (δ_{ang} fora do plano das ligações C-H de aromático monossustituído).

5.6.3 Síntese da piridina-2-metanoazida(3)



A um balão contendo o bromidrato de 2-bromometil-piridina (1,0 g, 5,81 mmol) solubilizado em DMSO (20 mL) adicionou-se, sob agitação e temperatura ambiente, CaCO₃ (1,86 g; 0,023 mol) e NaN₃ (1,51g; 0,023 mol). Após 16 horas de reação, evidenciou-se por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 7:3; reveladores: iodo, CAM e verde de bromocresol), o consumo do material de partida. Adicionou-se à mistura acetato de etila e extraiu com uma solução aquosa de NaCl. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e o solvente foi removido sob pressão reduzida em rotavapor. O resíduo obtido foi purificado em uma coluna cromatográfica (eluente: hexano/acetato de etila 90:10, 80:20, 70:30, 60:40) e obteve-se um óleo amarelo (467,0 mg; 60% de rendimento).

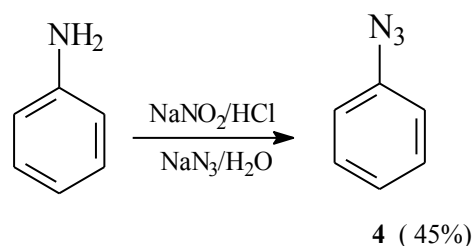
Fórmula Molecular: C₆H₆N₄

Massa Molar: 134,0 g.mol⁻¹

Rendimento: 60%

Aspecto: óleo amarelo

IV (ATR, cm⁻¹) ν_{max} : 3371, 3055 e 3015 (ν_{ax} da ligação C-H sp²), 2093 (ν_{ax} da ligação -N⁻=N⁺=N⁻); 1591, 1571, 1474 e 1435 (ν_{ax} das ligações C=C aromático); 1269 e 1250 (δ_{ang} fora do plano das ligações C-H aromático); 1149 (δ_{ang} das ligações C-H de aromático); 750 e 663 (δ_{ang} fora do plano das ligações C-H de aromático monossustituído).

5.6.4 Síntese da azidobenzeno(4) (Adaptado de Ito *et al.*, 2008)

A um balão de 100 ml, contendo HCl/H₂O: 1:1, foi adicionado sob agitação e a 0°C, anilina (1 g; 0,010 mol). Em seguida, verteu-se, lentamente, ao balão, nitrito de sódio (NaNO₂) (800 mg; 0,013 mol) em água (10 mL), sob agitação e a 0°C. Após 20 minutos de reação, adicionou-se NaN₃ (0,845 g; 0,013 mol) em H₂O (10 mL), à temperatura ambiente e agitação por 40 minutos. Após este período, a reação foi alcalinizada com solução de Na₂CO₃ e extraída com acetato de etila. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e o solvente foi removido sob pressão reduzida em rotavapor. Obteve-se como produto um óleo marrom (575 mg; 45% de rendimento).

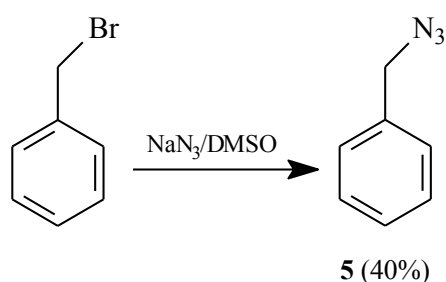
Fórmula Molecular: C₆H₅N₃

Massa Molar: 119,0 g.mol⁻¹

Rendimento: 45%

Aspecto: óleo marrom

IV (ATR, cm⁻¹) v_{max}: 3247, 3065 e 3036 (v_{ax} da ligação C-H sp), 2090 (v_{ax} da ligação -N=N⁺=N⁻); ,1593, 1506, 1491 e 1455 (v_{ax} das ligações C=C aromático); 1293 e 1279 (δ_{ang} fora do plano das ligações C-H aromático); 745 e 685 (δ_{ang} fora do plano das ligações C-H de aromático monossustituído).

5.6.5 Síntese da benzilazida(5)

A um balão contendo brometo de benzila (300 mg; 1,75 mmol) solubilizado em DMSO (20 mL) adicionou-se, sob agitação e temperatura ambiente, NaN₃ (456 mg; 7,0mmol). A reação prosseguiu por 24 horas, após esse tempo evidenciou-se por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 7:3; reveladores: iodo e CAM), o consumo do material de partida. Adicionou-se à reação acetato de etila e extraiu com uma solução aquosa de NaCl. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e o solvente removido sob pressão reduzida em rotavapor. O resíduo foi purificado em uma coluna cromatográfica (eluente: hexano/acetato de etila: 90:10, 80:20, 70:30, 60:40). Obteve-se como produto um óleo amarelo (93,0 mg; 40 % de rendimento).

Fórmula Molecular: C₇H₇N₃

Massa Molar: 133,0 g.mol⁻¹

Rendimento: 40%

Aspecto: óleo amarelo

IV (ATR, cm⁻¹) ν_{\max} : 3066, 3032 (ν_{ax} da ligação C-H sp²), 2089 (ν_{ax} da ligação N=N=N⁻); 1496 e 1455 (ν_{ax} das ligações C=C aromático); 1252 e 1201 (δ_{ang} fora do plano das ligações C-H aromático); 1078 (δ_{ang} das ligações C-H de aromático); 734 e 695 (δ_{ang} fora do plano das ligações C-H de aromático monossustituído).

5.7 Procedimento geral da Cicloadição Catalisada por Cobre usando Alcino terminal e Azida orgânica (CuAAC ou reação “click) (Adaptado de Himo *et al.* , 2005).

Em um balão de fundo redondo, contendo o alcino (0,11 mmol) e a azida orgânica (0,11mmol) solubilizados em DCM (2mL), adicionou-se CuSO₄.5H₂O (0,004 mmol) e uma solução aquosa de ascorbato de sódio (2mL), recentemente preparada a partir do ácido ascórbico (0,033 mmol) e do bicarbonato de sódio (0,033 mmol). A reação foi mantida sob agitação magnética e temperatura ambiente por 24 horas. Após o consumo do material de partida, evidenciado por CCD (eluente: hexano/acetato de

etila1:1; reveladores: iodo e solução metanólica de anisaldeído sulfúrico), adicionou-se à reação DCM (30 mL) e prosseguiu-se com uma extração utilizando solução de EDTA (50% m/v e NH₄OH concentrado misturados na proporção de 1:1) e água. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e o solvente eliminado sob pressão reduzida em rotavapor. O resíduo foi purificado em coluna de sílica (eluente: hexano/ diclorometano 100:0, 80:20, 60:40 e 50:50) fornecendo o produto da reação.

5.7.1 3β-{[1'-(7''-cloroquinolina-4''-il)-1H-1',2',3'-triazol]4'-metil}lup20(29)-eno(TB-2)

Fórmula Molecular: C₄₂H₅₇OCIN₄

Massa Molar: 668,5 g.mol⁻¹

Aspecto: Sólido amarelo

Faixa de Fusão: 96-98 °C

Rendimento: 65%

IV (ATR, cm⁻¹) ν_{max}: 2927-2854

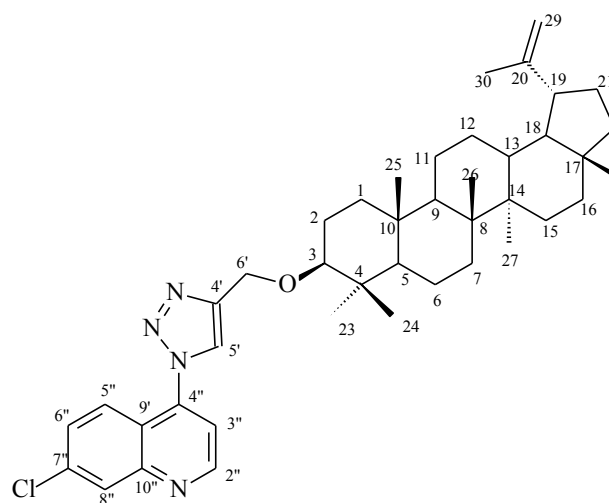
(ν_{ax} das ligações C-H sp³); 1737

(ν_{axass} das ligações C=C); 1593 e 1591

(ν_{ax} das ligações C=C aromático); 1436 (δ_{ang} das ligações C-H sp²);

1380 (δ_{ang} das ligações C-H sp³); 1113 (ν_{ax} da ligação C-O de éter); 1035

(δ_{ang} fora do plano C-H de aromático) 878 (δ_{ang} fora do plano das ligações C-H sp²); 822 (δ_{ang} fora do plano das ligações C=C de aromático).



TB2

5.7.23β-[[1'-(3''piridina)-1H-1',2',3'-triazol]4'-metil]lup-20(29)-eno(TB-3)

Fórmula Molecular: C₃₈H₅₆ON₄

Massa Molar: 584 g.mol⁻¹

Aspecto: Sólido branco

Faixa Fusão: 240,2-242,7 °C

Rendimento: 45%

IV (ATR, cm⁻¹) v_{max}: 2936-2867

(v_{ax} das ligações C-H sp³);

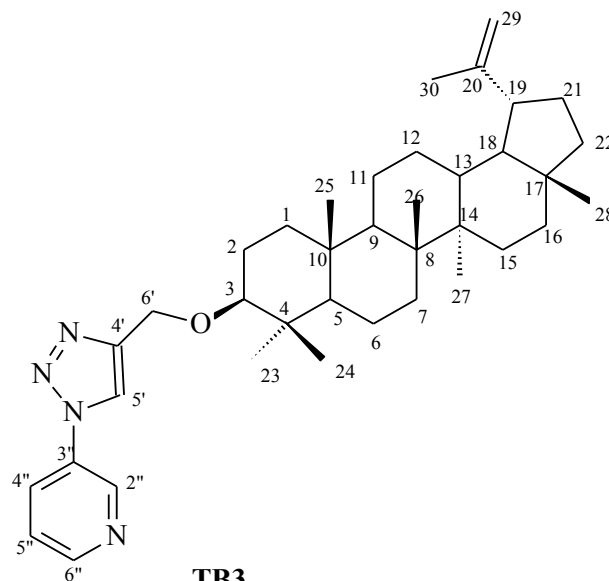
1642 (v_{axass} das ligações C=C); 1585 e

1499 (v_{ax} das ligações C=C aromático);

1437 (δ_{ang} das ligações C-H sp²);

1380 (δ_{ang} das ligações C-H sp³); 1110 e 1096 (v_{ax} da ligação C-O de éter);

1043 (δ_{ang} fora do plano C-H de aromático) 881 (δ_{ang} fora do plano das ligações C-H sp²); 699 (δ_{ang} de C-H de aromático monossustituído).



5.7.3 β-[[1'-(2''metilpiridina)-1H1',2',3'-triazol]-4metil]lup-20(29)-eno(TB-4)

Fórmula Molecular: C₃₉H₅₈ON₄

Massa Molar: 598 g.mol⁻¹

Aspecto: Sólido amarelo

Faixa de Fusão: 81,2-82,9 °C

Rendimento: 45%

IV (ATR, cm⁻¹)v_{max}: 2941-2853

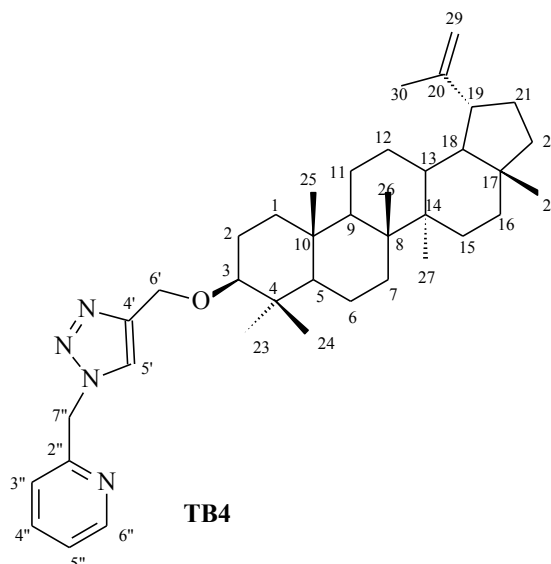
(v_{ax} das ligações C-H sp³); 1640

(v_{axass} das ligações C=C); 1593 e 1573

(v_{ax} das ligações C=C aromático);

1438 (δ_{ang} das ligações C-H sp²); 1380 (δ_{ang} das ligações C-H sp³); 1075 (v_{ax}

da ligação C-O de éter); 1047 (δ_{ang} fora do plano C-H de aromático); 882



(δ_{ang} fora do plano das ligações C-H sp^2); 752 (δ_{ang} fora do plano de C-H de aromático monossustituído).

5.7.4 3β -{[1'-(1''fenil)1H 1',2',3'-triazol]-4metil}lup-20(29)-eno(TB-5)

Fórmula Molecular: $\text{C}_{39}\text{H}_{57}\text{ON}_3$

Massa Molar: $583 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Aspecto: Sólido amarelo

Faixa de Fusão: $223\text{-}225 \text{ }^\circ\text{C}$

Rendimento: 76%

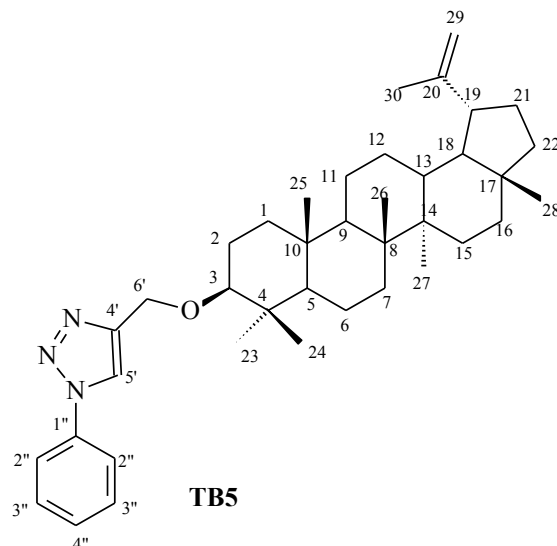
IV (ATR, cm^{-1}) ν_{max} : 2939-

2830 (ν_{ax} das ligações C-H sp^3);

1641 (ν_{axass} das ligações C=C);

1599 (ν_{ax} das ligações C=C aromático);

1463 (δ_{ang} das ligações C-H sp^2); 1381 (δ_{ang} das ligações C-H sp^3); 1073 (ν_{ax} da ligação C-O de éter); 1039 (δ_{ang} fora do plano C-H de aromático); 882 (δ_{ang} fora do plano das ligações C-H sp^2); 752 (δ_{ang} fora do plano de C=C de aromático monossustituído).



5.7.5 Síntese da 3β -{[1'-(1''benzill)-1H 1',2',3'-triazol]-4metil}lup-20(29)-eno(TB-6)

Fórmula Molecular: $\text{C}_{40}\text{H}_{59}\text{ON}_3$

Massa Molar: $597 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Aspecto: Sólido branco

Faixa de Fusão: $198,5\text{-}199,9^\circ\text{C}$

Rendimento: 75 %

IV (ATR, cm^{-1}) ν_{max} : 2936-2860

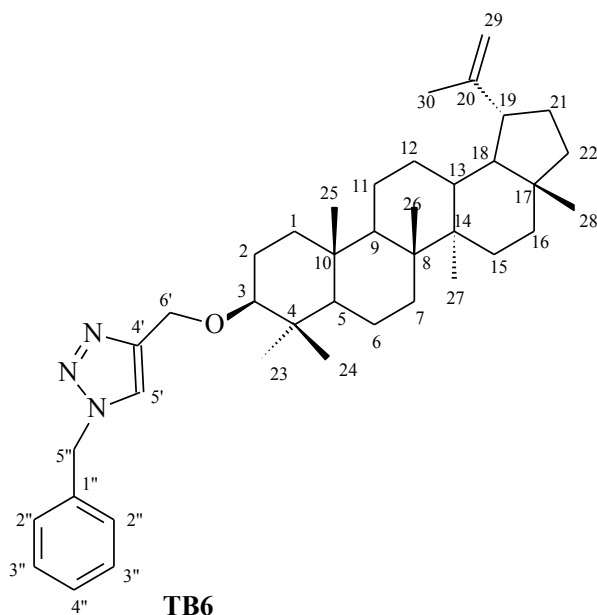
(ν_{ax} das ligações C-H sp^3); 1644

(ν_{axass} das ligações C=C); 1499

(ν_{ax} das ligações C=C aromático);

1455 (δ_{ang} das ligações C-H sp^2);

1380 (δ_{ang} das ligações C-H sp^3); 1098 (ν_{ax} da ligação C-O de éter); 1046



(δ_{ang} fora do plano C-H de aromático); 893 (δ_{ang} fora do plano das ligações C-H sp^2); 742 e 697 (δ_{ang} fora do plano de C=C de aromático monossustituído).

5.8 Método do bioensaio de avaliação da atividade antimalárica

5.8.1 Avaliação da atividade antimalárica *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* pela quantificação da enzima LDH (pLDH)

A avaliação da atividade antimalárica dos produtos sintetizados foi realizada utilizando o método enzimático da lactato desidrogenase do *Plasmodium* (pLDH). Como já foi descrito anteriormente, na parte de resultado e discussão, esse método colorimétrico baseia-se na quantificação da pLDH, a qual é diretamente proporcional a quantidade de parasitos viáveis. Os ensaios biológicos foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Makler e colaboradores (1993) para cepas de *P. falciparum*.

Inicialmente, foram preparadas soluções estoque dos compostos sintetizados, na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Adicionou-se 10 μL de cada uma dessas soluções a 990 μL de uma solução de meio de cultura de células (RPMI e plasma). Em seguida, 20 μL destas novas soluções foram transferidos para uma placa de 96 poços e o volume completado com 180 μL de uma solução contendo o parasito e o RPMI. Essa placa foi encubada por 48 horas, a 37°C, em atmosfera rica em CO_2 . Este experimento foi feito em triplicata, utilizando dois valores de concentração das substâncias obtidas (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Na mesma placa, onde foram colocados os parasitos em contato com as substâncias teste, foi feito o controle do teste (meio sem parasito e sem a substância teste), o branco (meio com parasito, mas sem a substância teste) e o padrão (meio com parasito e a cloroquina)

Após o período de 48 horas, as placas foram congeladas e descongeladas três vezes, com o objetivo de provocar a lise das hemácias, liberando assim os parasitos que ainda estavam viáveis. De cada poço dessa placa foi retirado um volume de 15 μ L, os quais foram transferidos para outra placa de 96 poços, onde foram adicionados os reagentes Malstat (100 μ L) e NBT/PES (25 μ l). Esta placa foi encubada por uma hora, a 37°C, na ausência de luz, após este período as placas foram lidas em espectrofotômetro com filtro de 540nm.

5.8.2 Ensaio de citotoxicidade

À uma linhagem celular de HepG2A16, derivada de um hepatoblastoma primário humano, adicionou-se 1 mL de tripsina e em seguida foi incubada a 37°C por 5 min, ressuspensas em 10 mL de meio completo (RPMI e com 10 % de plasma) e centrifugadas a 1500 rpm por 5 min. Após descartar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em RPMI completo, as células foram distribuídas em microplacas (100 μ l/poço) e incubadas por 24 horas, à 37°C, em atmosfera rica em CO₂. Após esse período, adicionou-se 100 μ L de RPMI e plasma contendo as substâncias sintetizadas em diferentes concentrações, em triplicata. Em seguida, o sobrenadante foi removido e adicionado 18 μ L/poço de uma solução de brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ila)-2,5-difeniltetrazol (MTT), na concentração de 6 mg/mL em água. Após 1h 30 min. de incubação com o MTT adicionou-se o DMSO a cada poço(180 μ L/L). As microplacas foram lidas em espectrofotômetro com filtro de 570nm.

6 CONCLUSÃO

Cascas da *P. fasciculata* foram utilizadas para obtenção do lupeol, o rendimento da extração foi de 0,6%. O processo de obtenção do lupeol, a partir da percolação exaustiva do pó das cascas da *P. fasciculata*, previamente tratado com uma solução de NH_4OH , pode ser considerado um método eficiente. A alcalinização do material vegetal, antes da extração, leva à formação de sais de compostos de natureza ácida, presentes na planta, tais como fenóis. Assim, ao se realizar a percolação desse material com diclorometano, foram extraídos, predominantemente, compostos neutros, de baixa polaridade, como os triterpenos. Dessa forma, o extrato bruto continha uma menor variedade de componentes, o que facilitou o isolamento do lupeol.

Foram obtidos 6 produtos inéditos: o éter propargílico do lupeol (**TB1**) e 5 híbridos triazólicos do lupeol (**TB2-TB6**). Os híbridos triazólicos foram obtidos por reação “click” entre um alcino terminal e uma azida orgânica. Essa metodologia foi eficiente, fornecendo os produtos desejados em bons rendimentos.

Por fim, os 6 produtos obtidos foram submetidos a teste de atividade antimalárica pelo método enzimático da quantificação da $p\text{LDH}$. O éter propargílico do lupeol, **TB1**, foi a substância que apresentou um maior valor de redução da parasitemia, quando comparado com os valores do lupeol e dos híbridos triazólicos deste. Além disso, os híbridos triazólicos **TB1** a **TB6** foram submetidos a testes de citotoxicidade *in vitro* contra células HepG2. A partir dos valores de CC_{50} conclui-se que, apesar das substâncias (**TB1-TB6**) não apresentarem uma atividade antimalárica relevante elas possuem uma citotoxicidade inferior a do lupeol e a da cloroquina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves, F.F.; Durlacher, R.R.; Menezes, M.J.; Krieger, H.; Pereira da Silva, L.H.; Camargo, E.P. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native amazonian populations. American J. Trop. Med. Hyg., 66: 641-648, **2002**.

Basco, L. K.; Marquet, F.; Makler, M. M.; Lebras, J. *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*: Lactate-Dehydrogenase Activity and Its Application for in Vitro Drug Susceptibility Assay. Experimental Parasitology, 80: 260-271, **1995**.

Bock, V. D.; Hiemstra, H.; Maarseveen, J. H. Cu(I)-catalyzed alkyne-azide “click” cycloadditions from a mechanistic and synthetic perspective. Eur. J. Org. Chem.1: 51-68, **2006**.

Bräse, S.; Barnet, K. Organic azides synthesis and applications, **2009**.

Camargo, E. P. Malária, maleita, paludismo. Cienc. Cult. São Paulo, 55 (1): 26-29, **2003**.

Carvalho, M. G.; Velloso, C. R. X.; Braz-Filho, R.; Costa, W. F. Acyl-lupeol esters from *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). J. Braz. Chem. Soc. São Paulo, 12(4): 556-559, **2001**.

Chagas, C. Notas sobre a epidemiologia do Amazonas. Brasil Médico, 42: **1913**.

Chai, C.; Armarego, W. L. F.; Purification of Laboratory Chemicals. Butterworth-Heinemann, **2003**.

Chhajed, S. S.; Manicha, P.; Bastikar, V.A.; Animeshchandra, H.; Ingle, V. N.; Upasani, C. D.; Wazalmar, S. S. Synthesis and molecular modeling studies of 3-chloro-4-substituted-1-(8-hydroxy-quinolin-5-yl)-azetidín-2-ones as novel

antifilarial agentes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20: 3640-3644, **2010**.

Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P. *Organic Chemistry*, **2008**.

Cook, D. Protonation site in organic bases from infrared X-H deformation modes. *Canadian Journal of Chemistry*, 42: 2292-2299, **1964**.

Copping, L. G.; Duke, S. O. Natural products that have been used commercially as crop protection agents. *Pest. Man. Sci.*, 63: 524-554, **2007**.

Desjardins, R. E. Canfield, C. J.; Haynes, J. D.; Chulay, J. D. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 16(6): 710-718, **1979**.

Eicher, T.; Hauptmann, S.; Speicher, A. *The Chemistry of Heterocycles*, **2012**.

Fokin, V. V.; Worrell, B. T.; Malik, J. A. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. *Science*, 340: 457-460, **2013**.

Freitas, L. B. de O.; Ruela, F. A.; Pereira, G. R.; Alves, R. B.; Freitas, R. P.; Santos, L. J. A reação "click" na síntese de 1,2,3-triazóis: aspectos químicos e aplicações. *Quím. Nova*, 34(10): 1791-1804, **2011**.

Giao, P. T.; Vries, P. J. Artemisinins. *Clin. Pharmacokinet*; 40(5): 343-373, **2001**.

Gonda, Z.; Novák, Z. Highly active copper-catalysts for azide-alkyne cycloaddition. *Dalton Trans*, 39: 726-729, **2010**.

Greenhill, J. V. *The chemistry of heterocyclic compounds*, **2009**.

Guantai, E. M.; Ncokazi, K.; Egan, T.J.; Gut, J.; Rosenthal, P.J.; Smith, P. J.; Chibale, K. Design, synthesis and *in vitro* antimalarial evaluation of triazole linked chalcone and dienonehybrid compounds. *Bio. & Med. Chem.*,18: 8243-8256, **2010**.

Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. Copper(I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates. *J. Am. Chem. Soc.*,127(1): 210-216, **2005**.

Huisgen, R.; Szeimeis, G.; Moebius, 1,3-Dipolare Cycloadditionen, XXXII. Kinetik der Additionen organischer Azide an CC-Mehrfachbindungen. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 100: 2494-2507, **1967**.

Hyde, J. M. Exploring the folate pathway in *Plasmodium falciparum*. *Acta Trop.*, 94(3):191-206, **2005**.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA e Laboratório de Produtos Florestais – LPF, “Amapá-amargoso” in “Madeiras Brasileiras”. Publicação eletrônica.

Ito, S.; Satoh, A.; Nagatomi, Y.; Hirata, Y.; Suzuki, G.; Kimura, A. S.; Maehara, S.; Hikichi, H.; Hata, M.; Kawamoto, H.; Ohta, H. Discovery and biological profile of 4-(1-aryltriazol-4-yl)-tetrahydropyridines as an orally active new class of metabotropic glutamate receptor 1 antagonist. *Bioor. Med. Chem.*, 16(22): 9817-9829, **2008**.

Jampilek, J.; Musiol, R.; Pesko, M.; Kralova, K.; Vejsova, M.; Carroll, J.; Coffey, A.; Finster, J.; Tabak, D.; Niedbala, H.; Kozik, V.; Polanski, J.; Csollei, J.; Dohnal, J. Ring-substituted 4-hydroxy-1 H-quinolin-2-ones: preparation and biological activity. *Molec.*, 14(3): 1145-1159, **2009**.

Junior, V. F. V.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura. *Quím. Nova*, 28

(3): 519-528, **2005**.

Le Bras, J.; Deloron, P.; *In vitro* study of drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*: evaluation of a new semi-micro test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 32: 447-451, **1983**.

Lee, B. Y.; Park, S. R.; Jeon, H. B.; Kim, K. S. A new solvent system for efficient synthesis of 1,2,3-triazoles. *Tetrahedron Lett.*, 47: 5105-5109, **2006**.

Magalhães, C.G. Estudo fitoquímico do tronco e raiz de *Maytenus salicifolia Reissek* Celastraceae e avaliação da atividade biológica de seus constituintes e de ésteres derivados do lupeol. 2012. p.186 Tese (Doutorado em Ciências-Química)-Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, **2012**.

Mahato, S. B.; Kundu, A. P. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids- a compilation and some salient features. *Phytochemistry*, 37 (6): 517-1575, **1994**.

Makler, M.T.; Ries, J.M; Williams, J.A.; Bancroft, J.E.; Piper, R.C.; Gibbons, B.L.; Hinrichs, D.J. Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 48: 739-741, **1993**.

Meldal, M.; Tornøe, C. W. Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Chem. Rev.*, 108(8): 2952-3015, **2008**.

Melo, J.O.F.; Donnici, C.L.; Augusti, R.; Ferreira, V.F.; Souza, M.C.B.V.; Ferreira, M.L.G.; Cunha, A.C. Heterociclos 1,2,3-triazólicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. *Quím.Nova*, 29(3); 569-579, **2006**.

Morita, T.; Assumpção, R. M. V. Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização-preparação-purificação. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, EDUSP, 72-73, **1968**

Moses, J.E.; Moorhouse, A. D. The growing applications of “click” chemistry, Chem. Soc. Rev., 36: 1249-1262, **2007**.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immun. Met., 65 (1-2): 55-63, **1983**.

Musiol, R.; Tabak, D.; Niedbala, H.; Podeswa, B.; Jampilek, J.; Kralova, K.; Dohnal, J.; Finster, J.; Mencil, A.; Polanski, J. Investigations biological activity spectrum for novel quinoline analogues 2: hydroxyquinolinecarboxamides with photosynthesis-inhibiting activity. Bioorg. Med. Chem., 16: 4490-4499, **2008**.

Nakanishi, K. Infrared Absorption Spectroscopy, **1962**.

Nkhoma, S.; Molyneux, M.; Ward, S. *In Vitro* antimalarial susceptibility profile and PRCRT0PFMDR-1 genotypes of *Plasmodium falciparum* field isolates from Malawi. Am. J. Trop. Med. Hyg., 76(6): 1107-1112, **2007**.

Pagliali, F.; Pirali, T.; Del Grosso, E.; Brisco, R. D.; Tron, G. C.; Sorba, G.; Genazzani, A. A. Rapid synthesis of triazole-modified resveratrol analogues via click chemistry. J. Med. Chem., 49(2):467-470, **2006**.

Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. M.; Vyvyan, J.R. Introdução à Espectroscopia, **2012**.

Pereira, G. R.; Santos, L. J.; Ludovico, I.; Alves, R. B.; Freitas R. P. “Click” chemistry as a tool for the facile synthesis of fullerene glycoconjugate derivatives. Tetrah. Lett., 51: 1022-1025, **2010**.

Pholshettiwar, V.; Varma, R. S.; Greener and expeditious synthesis of bioactive heterocycles using microwave irradiation. *Pure and Applied Chemistry*, 80(4): 777-790, **2008**.

Pinto, E.P. Rondônia, evolução histórica: criação do território federal do Guaporé, fator de integração nacional. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, **1993**.

Riechmann, K. H. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An *in-vitro* microtechnique. *Lancet*, 1: 22-23, **1978**.

Rodinov, V. O.; Fokin, V.V.; Finn, M. G. Mechanism of the ligand-free Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction. *Ang. Chem.*, 44: 2210-2215, **2005**.

Rostovtsev, V.V.; Green, L.G.; Fokin, V.V.; Sharpless, K.B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective Ligation of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem.*, 41: 2596-2599, **2002**.

Saldaña, M. D. A; Mazzafera, P.; Rahoma, S. M. Extração de alcalóides: cafeína e trigonelina dos grãos de café. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 17(4): 371-376, **1997**.

Sampaio, P.T.B.; Clement, C.R. Biodiversidade amazônica: exemplos e estratégias de utilização. Manaus: Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico, 151-157, **2000**.

Sarachine, M. J.; Gallo M. B. C. Biological Activities of Lupeol. *Intern. J. Biom. Pharm. Sci.*, (3)1: 46-66, **2009**.

Serra, M.; Shanley, P.; Melo, T.; Fantini, A.; Medina, G.; Vieira, P. From the forest to the consumer: the ecology, local management and trade of amapá amargoso *Parahancornia fasciculata* (Poir) Benoist in the state of Pará. In:

ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. (Eds.). Recent developments and case studies in ethnobotany. Recife: Sociedade Brasileira de Etnobiologia/Núcleo de Publicações em Ecologia e Etnobotânica Aplicada, 1: 213-231, **2010**.

Sharpless, K. B.; Finn, M. G.; Kolb, H. C. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem.*, 113(11): 2056-2075, **2001**.

Taylor, W.R.J.; White, N. J. Antimalarial Drug Toxicity: A Review. *Drug Safety*, 27 (1): 25-61, **2004**.

Ursos, L.M.; Roepe, P.D. Chloroquine resistance in the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*. *Med. Res. Rev.*, 22(5): 465-491, **2002**.

Vale, N. F. S; Moreira, R.; Gomes, P. "Quimioterapia da malária: um século no desenvolvimento de antimaláricos". *Quím.*, 99: 61-73, **2005**.

Van Den Berg, M. E.; Silva, M.H.L. Plantas medicinais do Amazonas. In: Simpósio do Trópico Úmido. Belém. Brasília: Departamento de Difusão de Tecnologia, **1984**.

Varotti, F. P. Synthesis, antimalarial activity, and intracellular targets of MEFAS, a new hybrid compound derived from mefloquine and artesunate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(11): 3868-3874, **2008**.

Trager, W.; Jensen, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193: 673-675, 1976.

Wagner, H.; Zgainski, E. M. *Plant drug Analysis*. Springer, **1993**.

White, N.J. Antimalarial drug resistance. *J. Clin. Invest.*, 113(8):1084-1092, **2004**.

WHO (2005) 'World MalariaReport**2005**, disponível em <http://www.rbm.who.int/wmr2005/html/exsummary_en.htm>, acesso em 31 de janeiro de 2013.

WHO (2012) World MalariaReport**2012**, disponível em www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/w, acesso em 31 de janeiro de 2013.

Whiting, M.;Muldoon, J.;Lin, Y. C.;Silverman, S. M.;Lindstrom, W.;Olson, A. J.;Kolb, H. C.;Finn, M. G.;Sharpless, K. B.;Elder, J. H.;Fokin, V. V.; Inhibitors of HIV-1 protease by using in situ click chemistry. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, 45(9):1435-1439, **2006**.

Wiesner, J.; Ortmann, R.; Jomaa, H.; Schlitzer, M. New antimalarial drugs. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, 42(43): 5274-5293, **2003**.

Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H. H. Y.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. J. *Am. Chem. Soc.*,127: 15998-15999, **2005**.

Ziegler H. L.; Staerk, D.; Christensen J.; Rviid L.; Hägerstrand, H.; Jaroszewski, J. W. The Antiparasitic Compound Licochalcone A Is a Potent Echinocytogenic Agent That Modifies the Erythrocyte Membrane in the Concentration Range Where Antiplasmodial Activity is Observed. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46(5): 1441-1446, **2002**.

ANEXO 1- Espectros

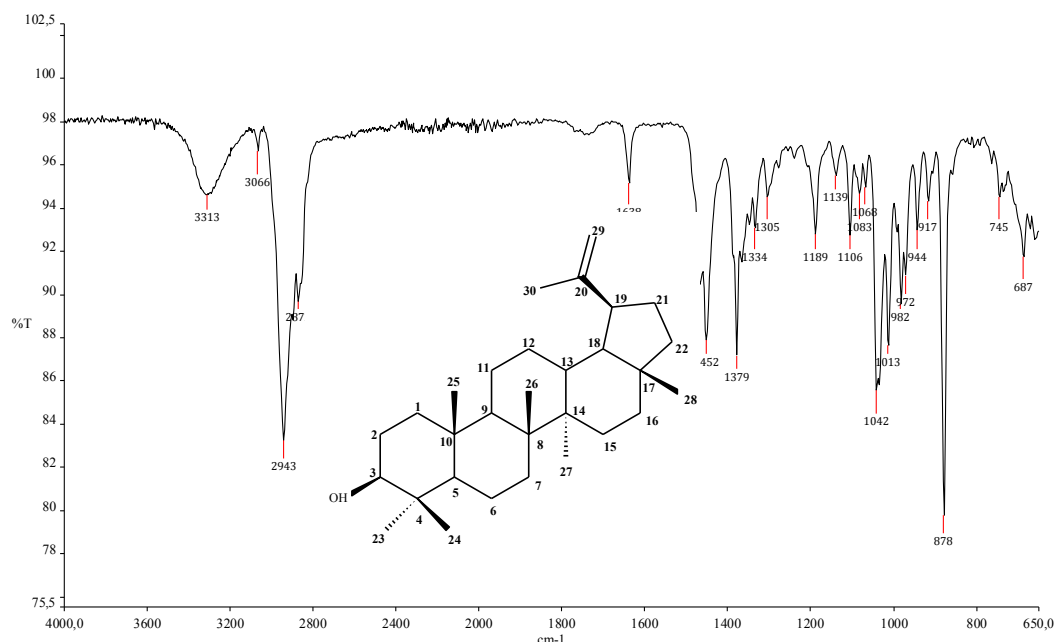
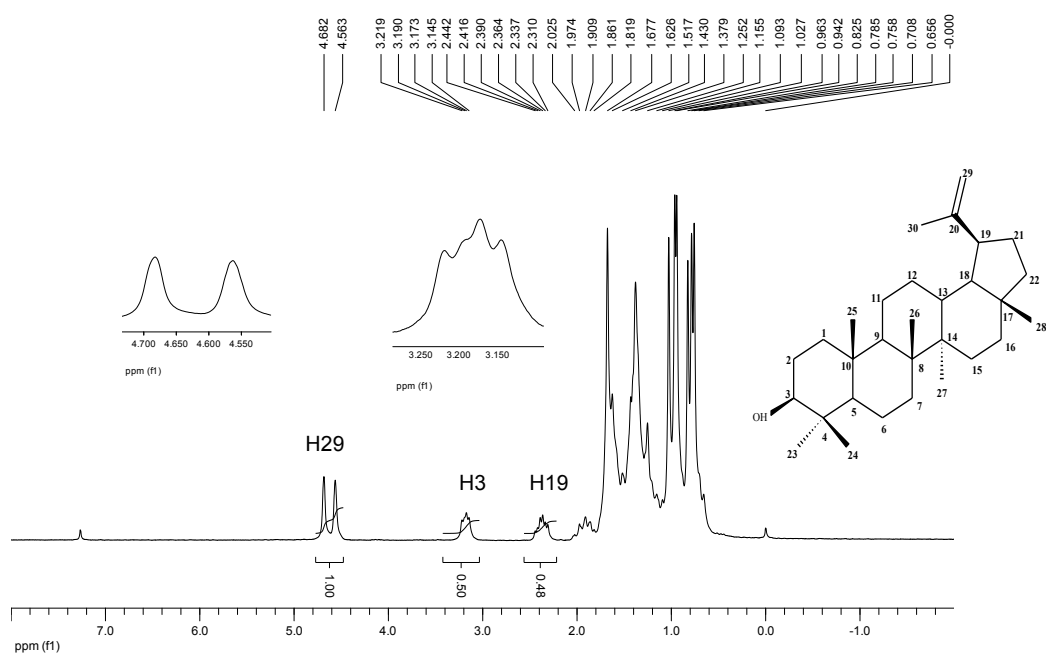


Figura 25: Espectro na região do IV do lupeol

Figura 26: Espectro de RMN de ^1H do lupeol (CDCl_3 , 200MHz).

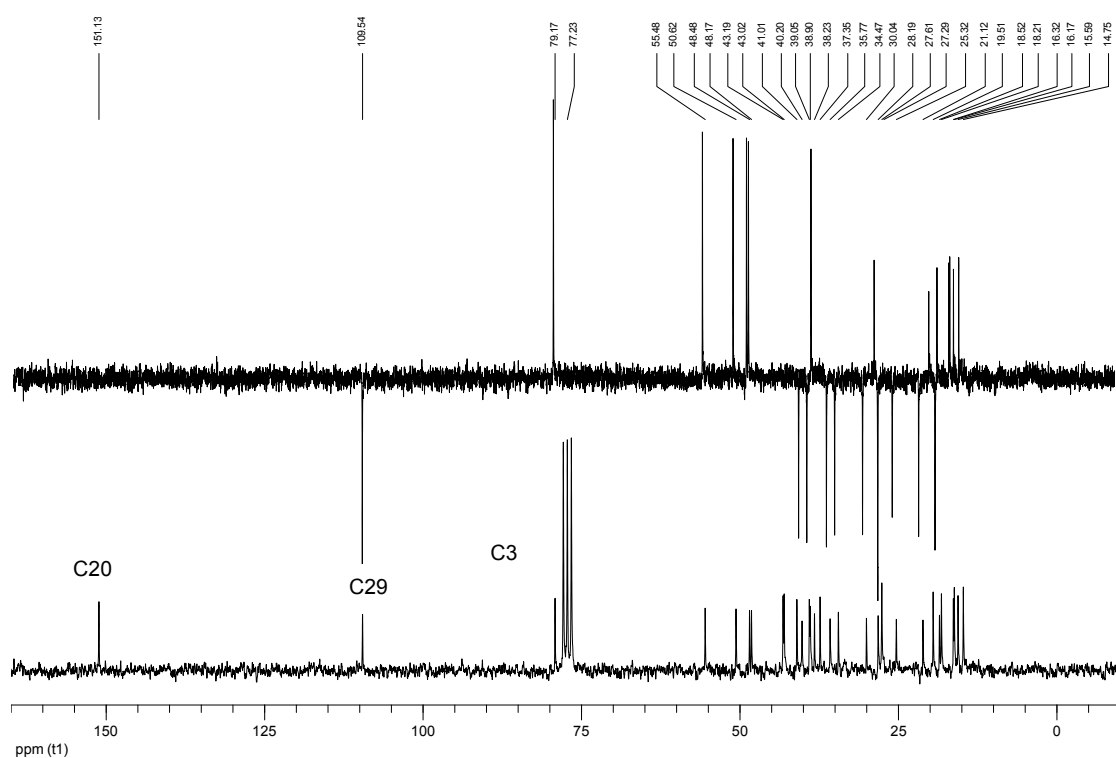


Figura 27: Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135 do lupeol (200 MHz, CDCl_3).

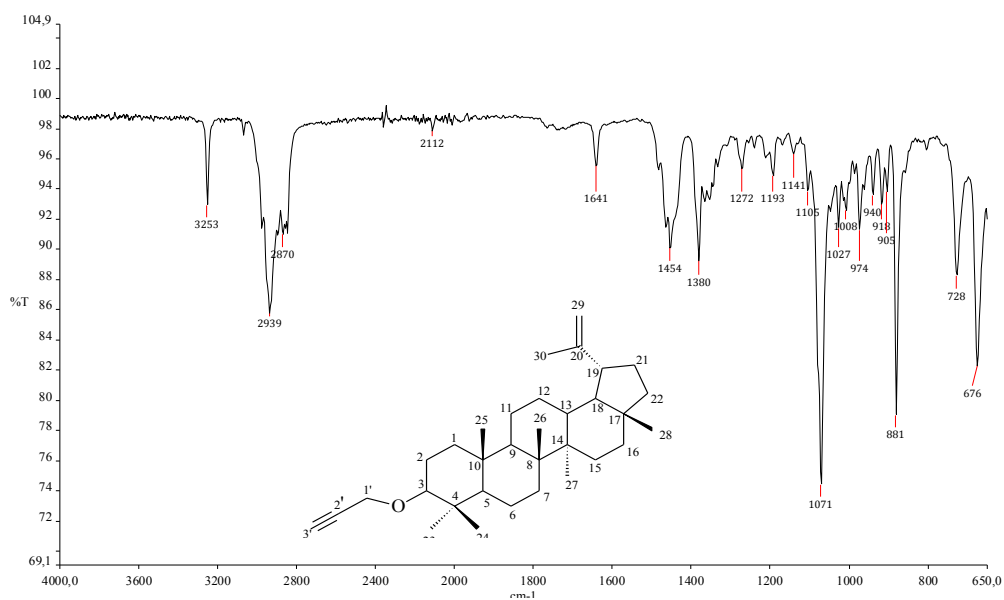


Figura 28: Espectro na região do IV do TB1

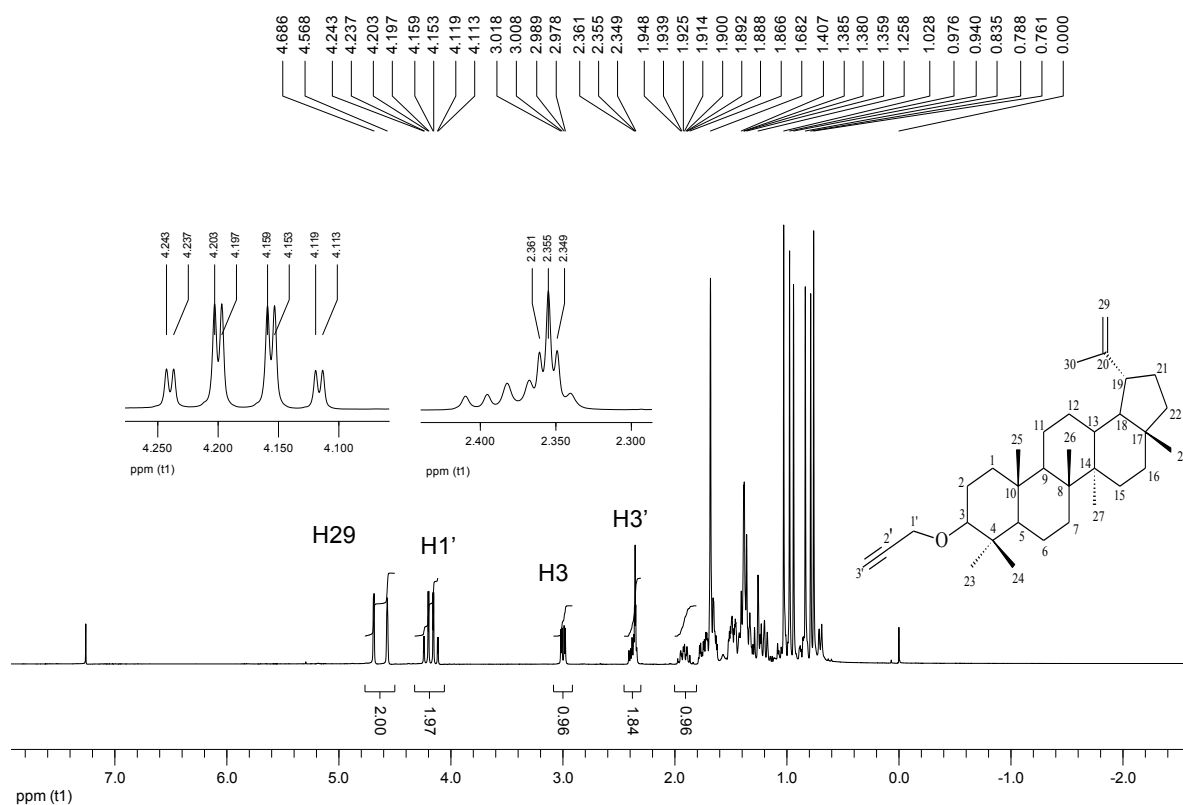


Figura 29: Espectro de RMN de ^1H do TB1 (400 MHz, CDCl_3).

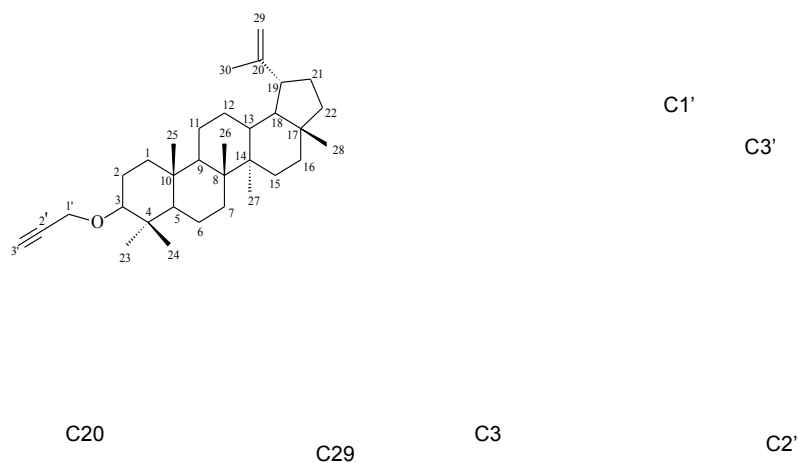


Figura 30: Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135 de TB1 (400 MHz, CDCl_3).

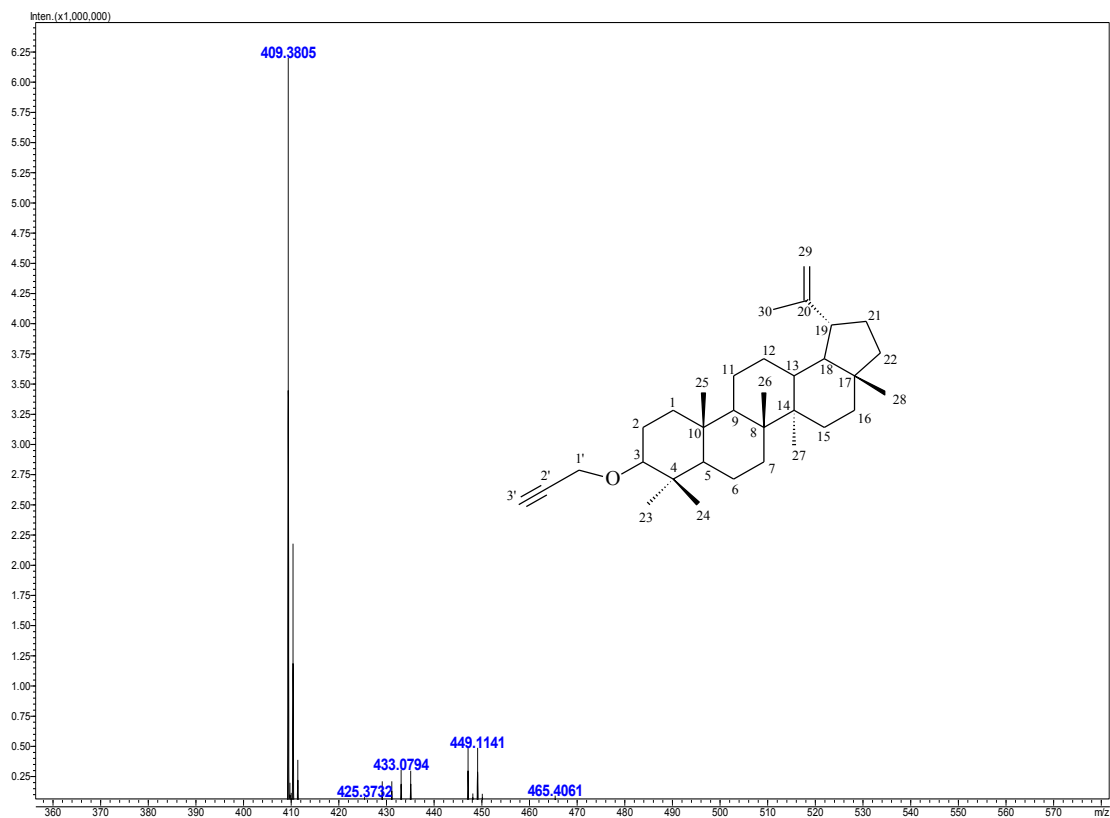


Figura 31: Espectro de Massa de Alta Resolução de TB1

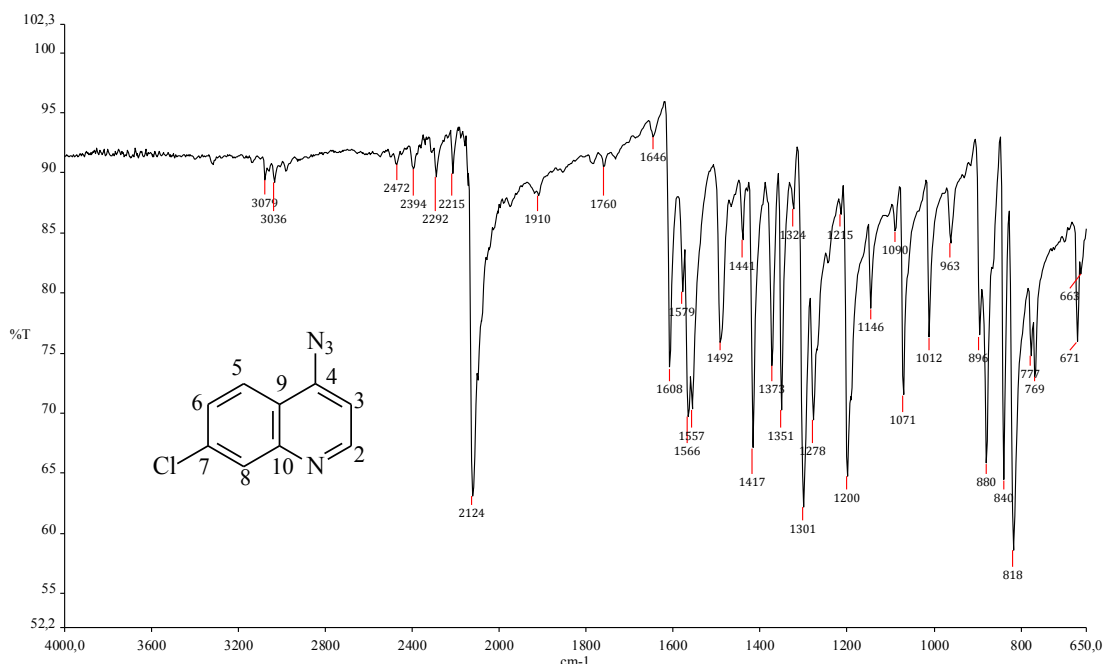


Figura 32: Espectro na região do IV da azida 1.

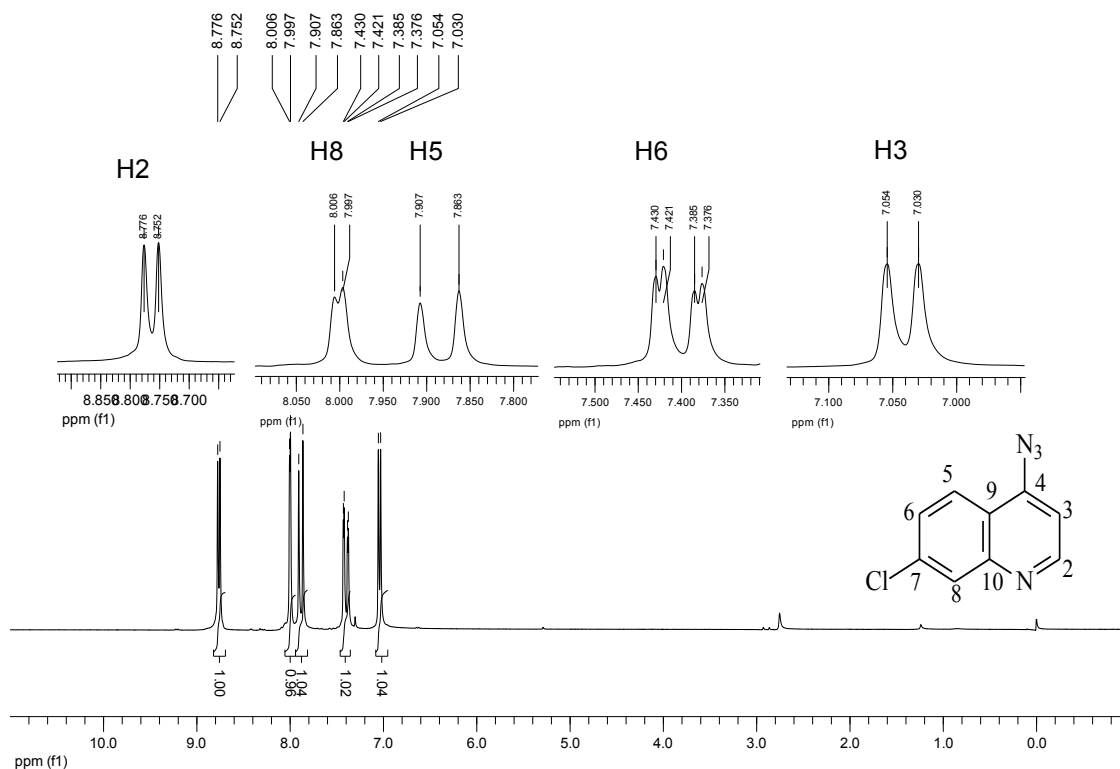


Figura 33: Espectro de RMN de ^1H da azida 1 (200 MHz, CDCl_3).

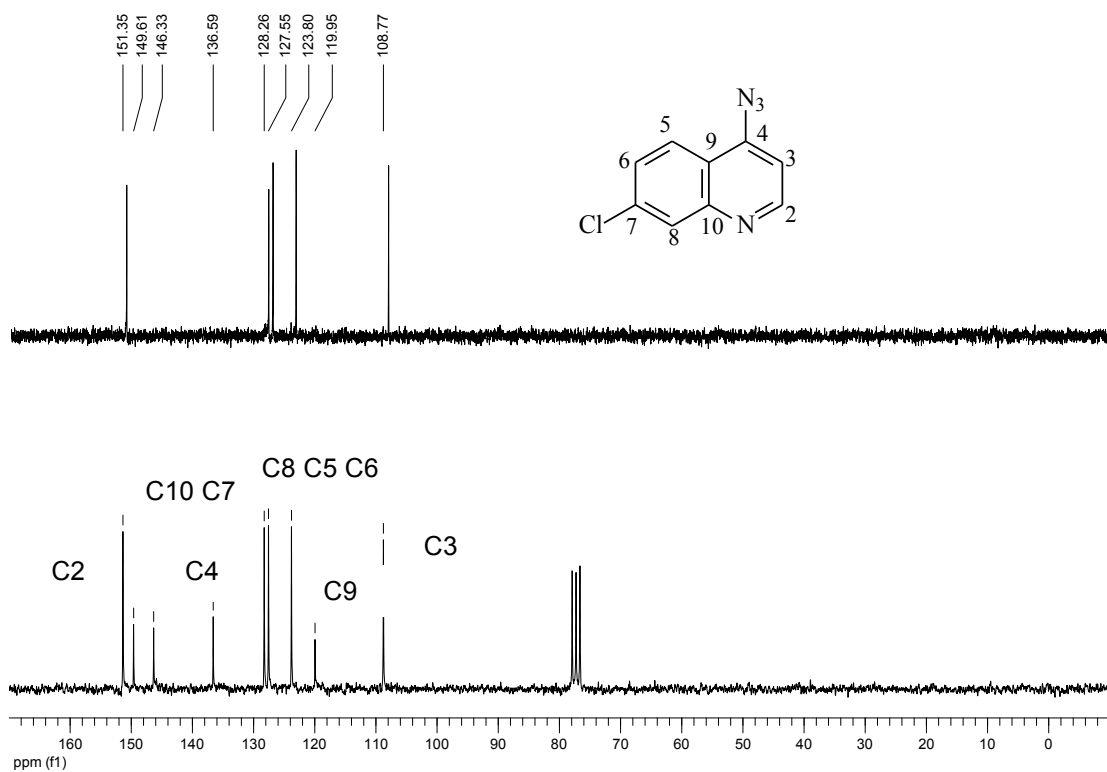


Figura 34: Espectro de RMN de ^{13}C da azida 1 (200 MHz, CDCl_3).

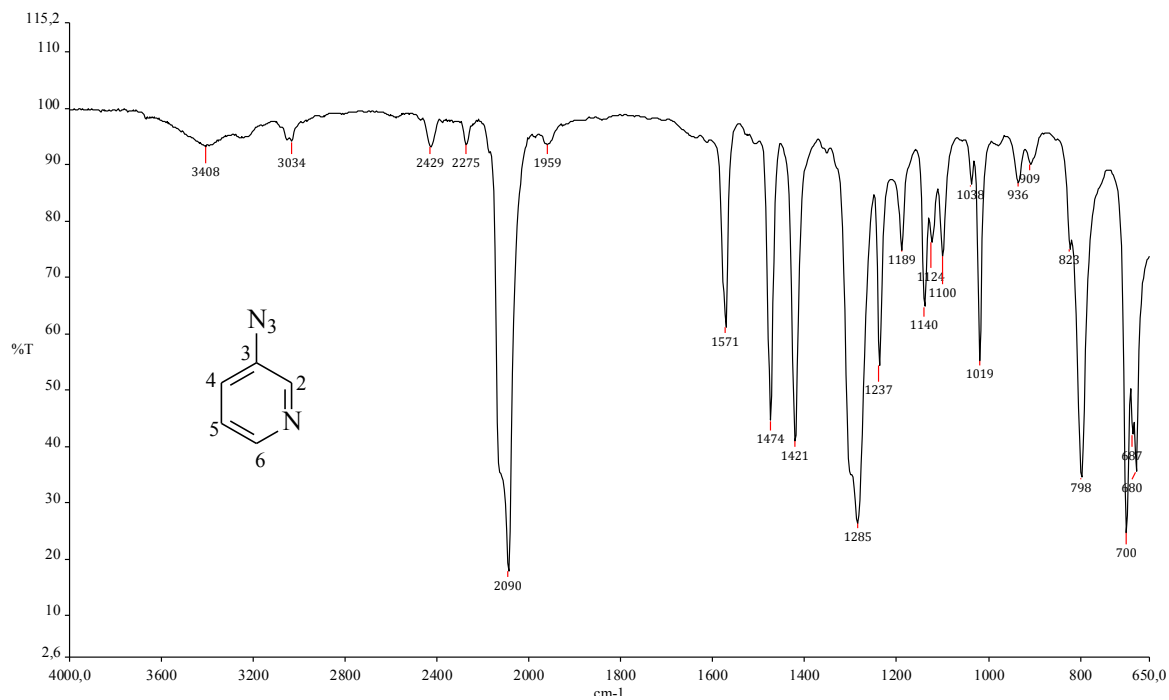


Figura 35: Espectro na região do IV da azida **2**.

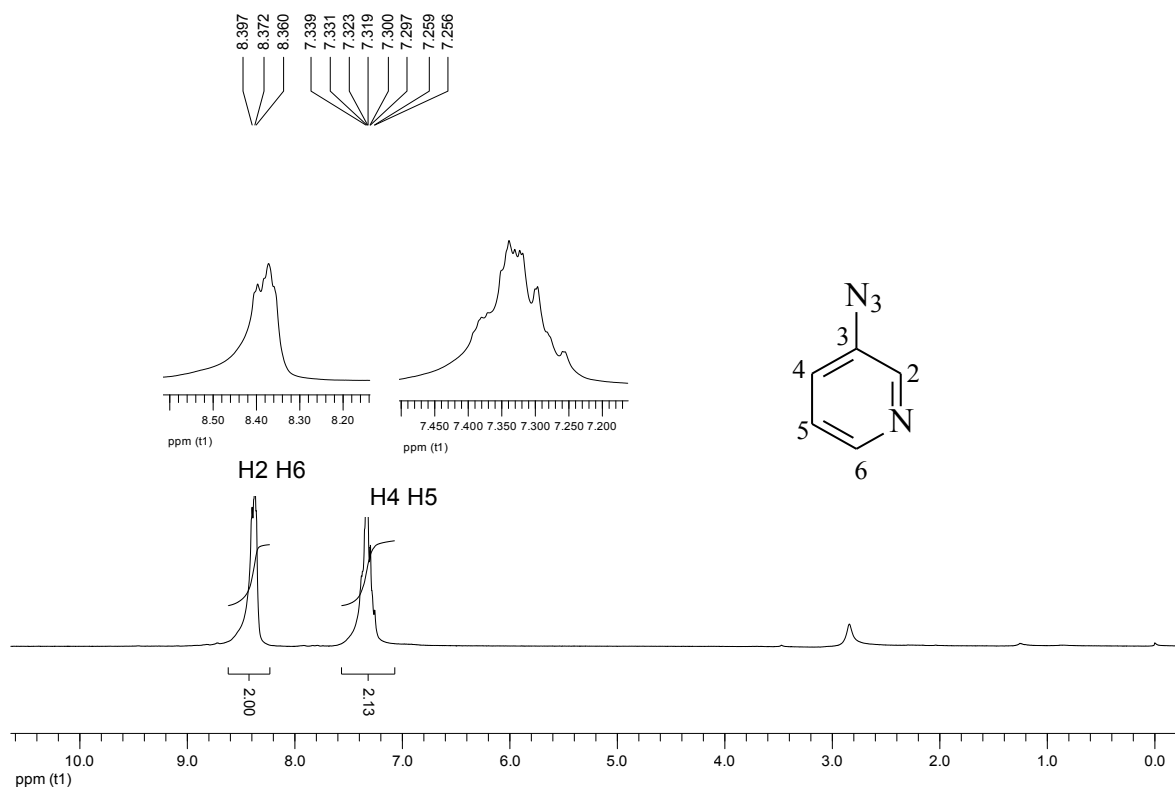


Figura 36: Espectro de RMN de ¹H da azida **2**. (200 MHz, CDCl₃).

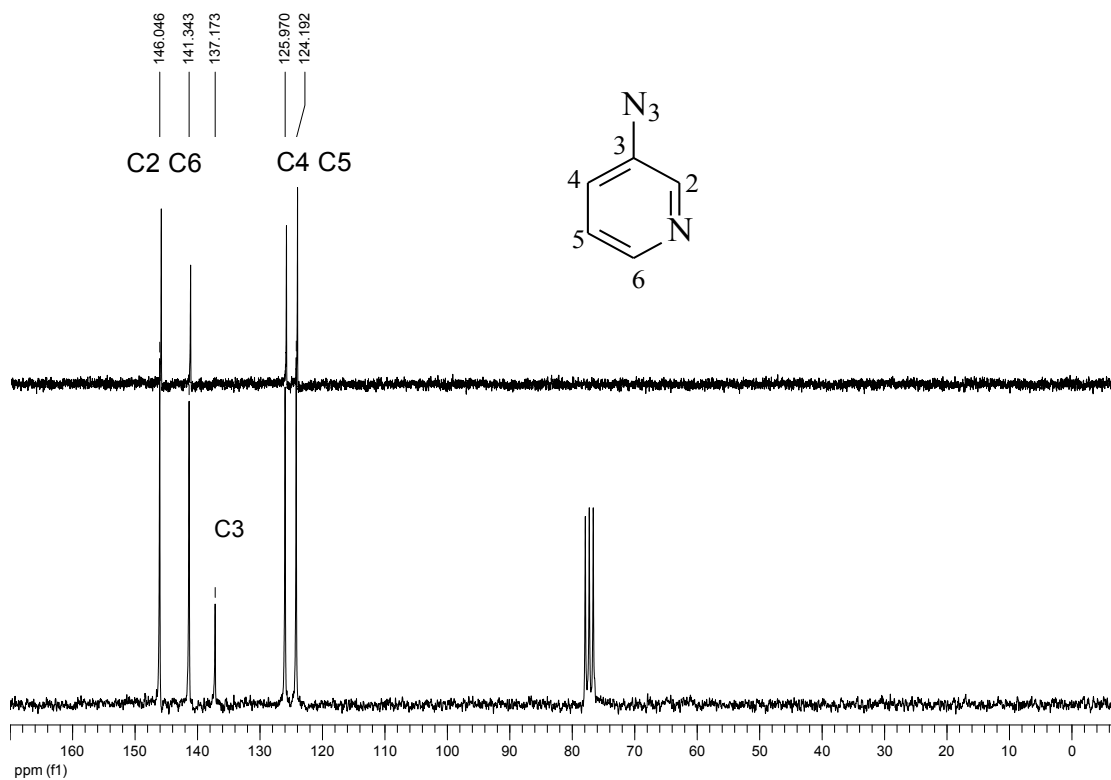


Figura 37: Espectro de RMN de ^{13}C da azida 2. (200 MHz, CDCl_3).

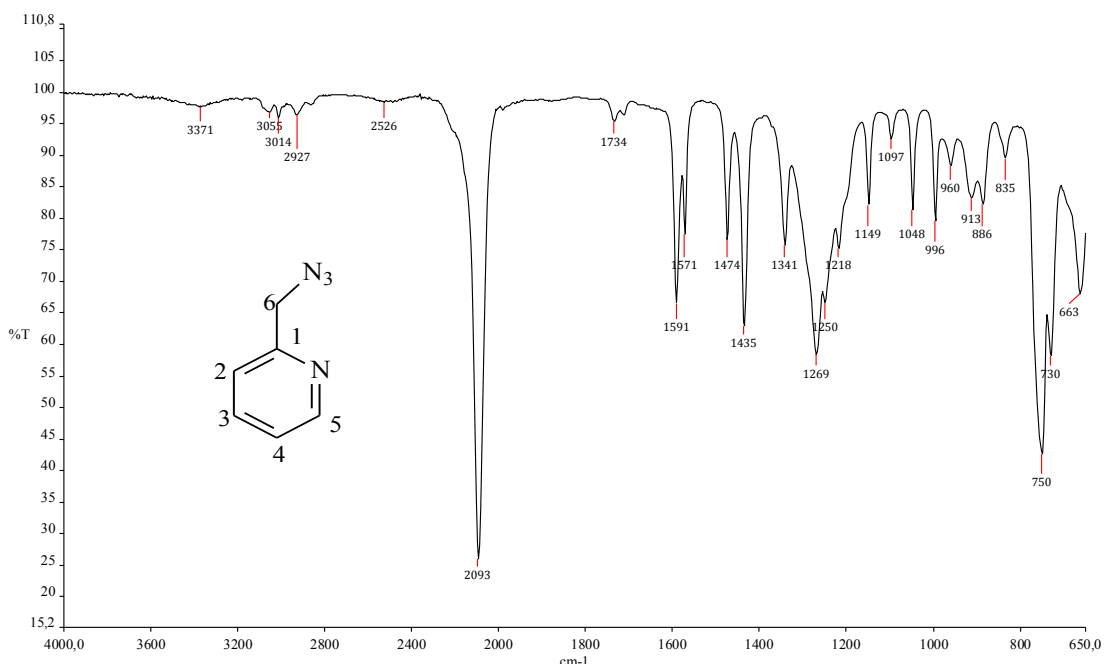


Figura 38: Espectro na região do IV da azida 3.

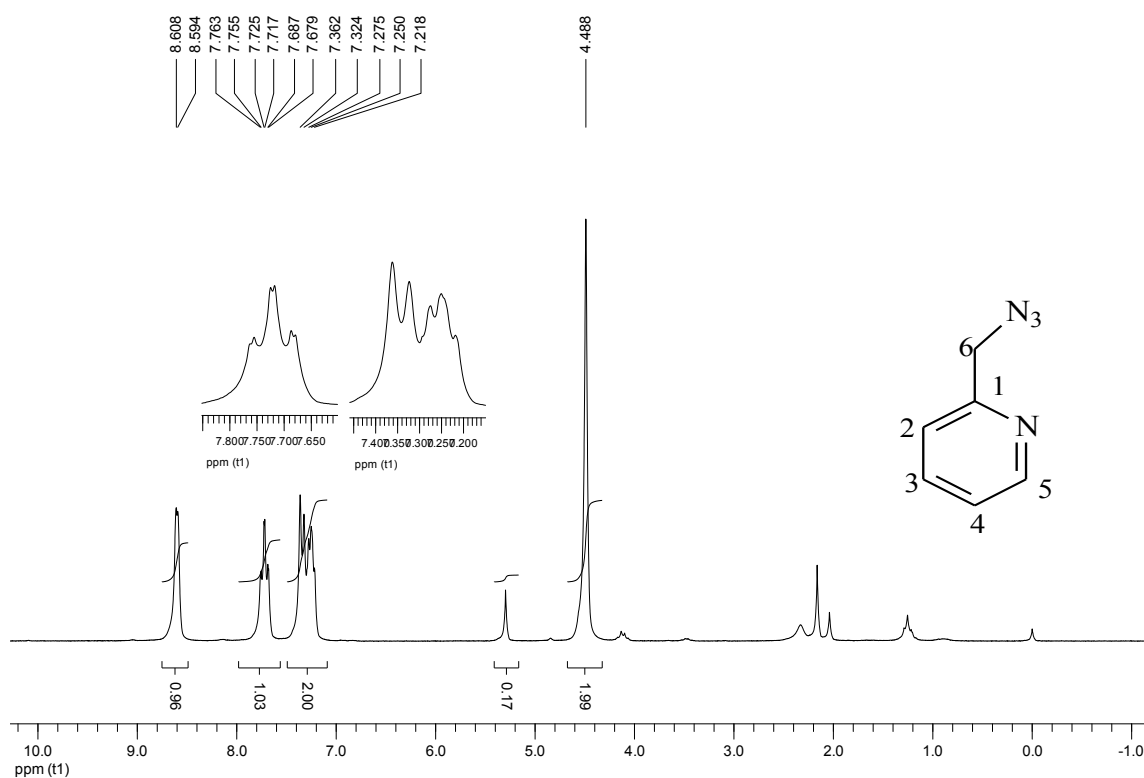


Figura 39: Espectro de RMN de ^1H da azida **3** (200 MHz, CDCl_3)

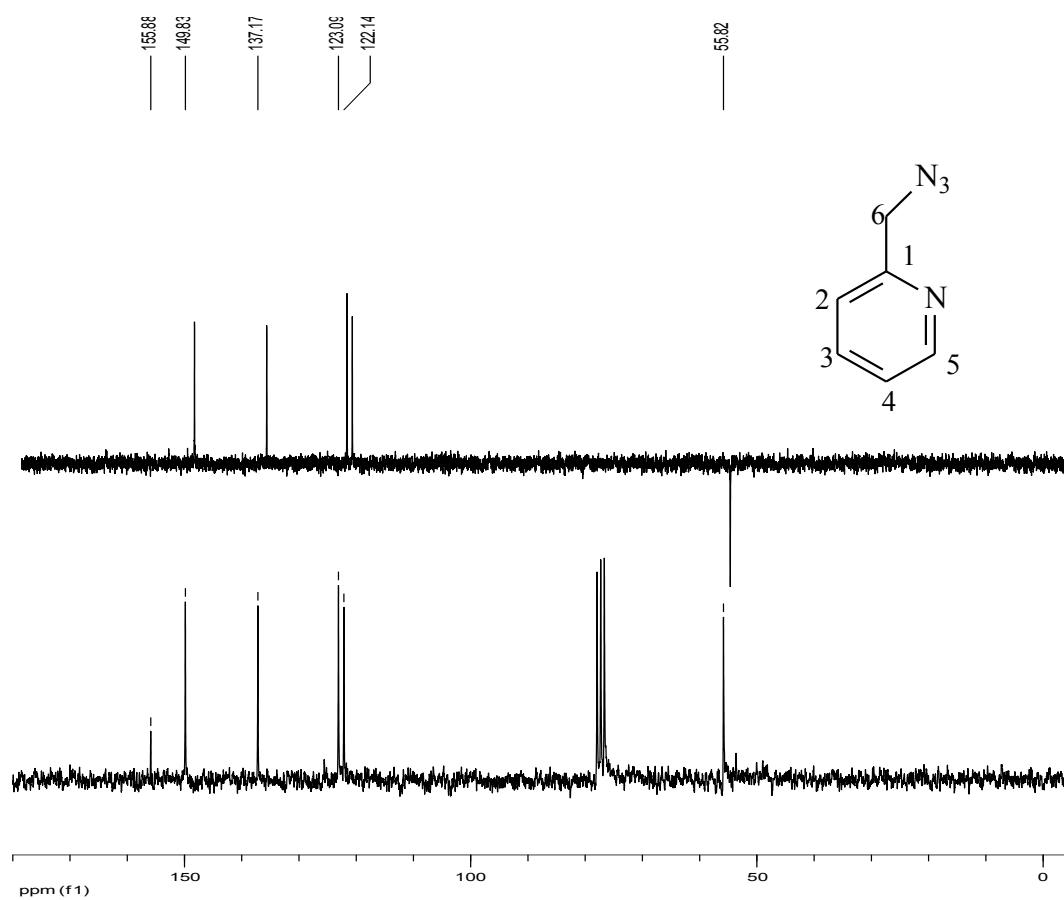


Figura 40: Espectro de RMN de ^{13}C da azida **3** (200 MHz, CDCl_3)

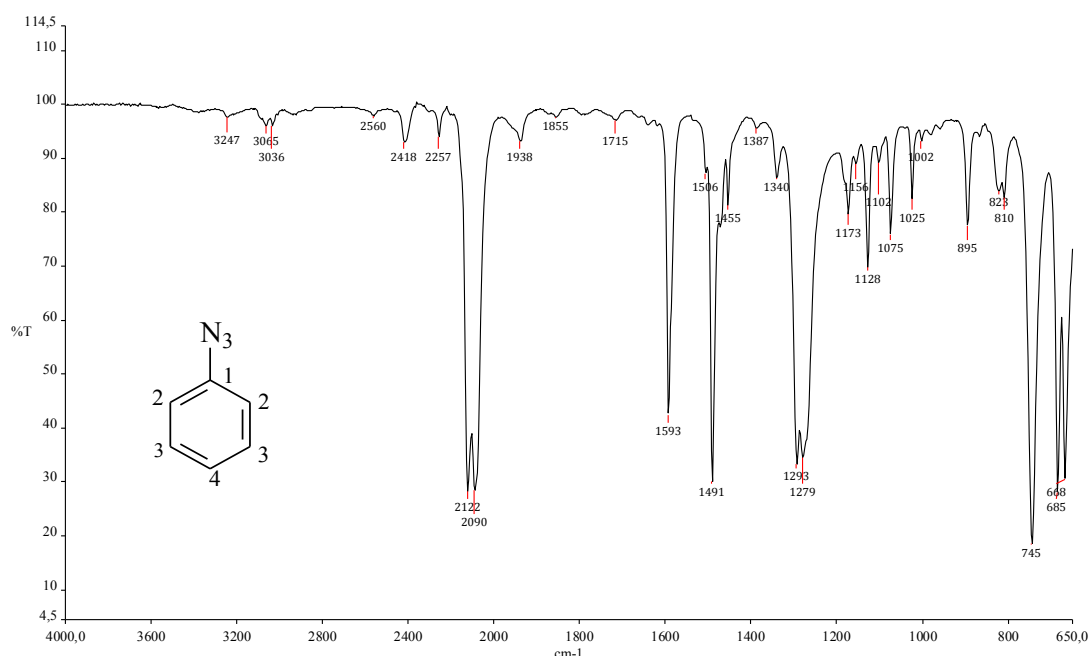


Figura 41: Espectro na região do IV da azida 4..

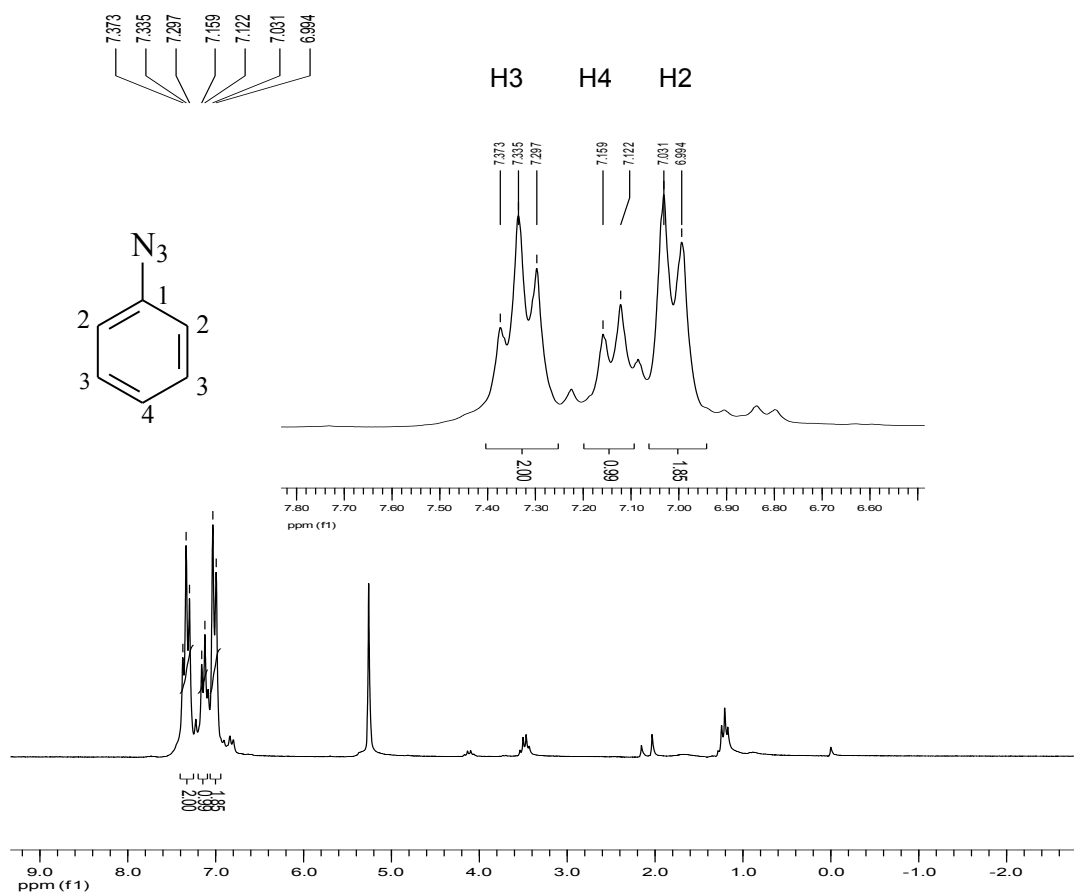


Figura 42: Espectro de RMN de ¹H da azida 4.(200MHz, CDCl₃).

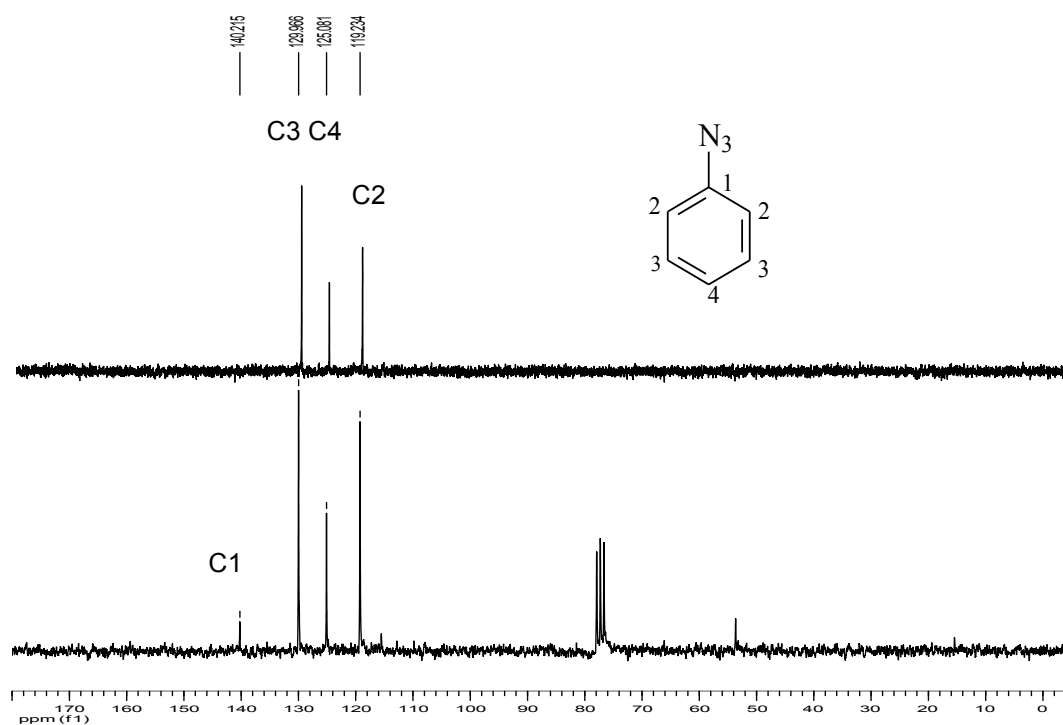


Figura 43: Espectro de RMN de ^{13}C da azida **4** (200 MHz, CDCl₃).

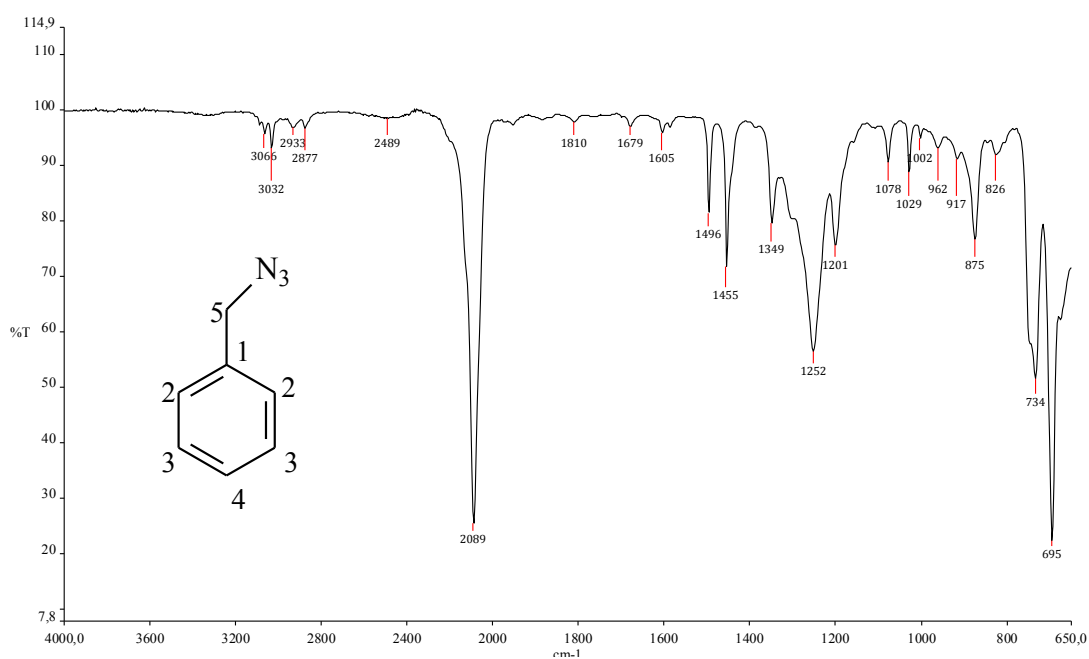


Figura 44: Espectro na região do IV da azida **5**.

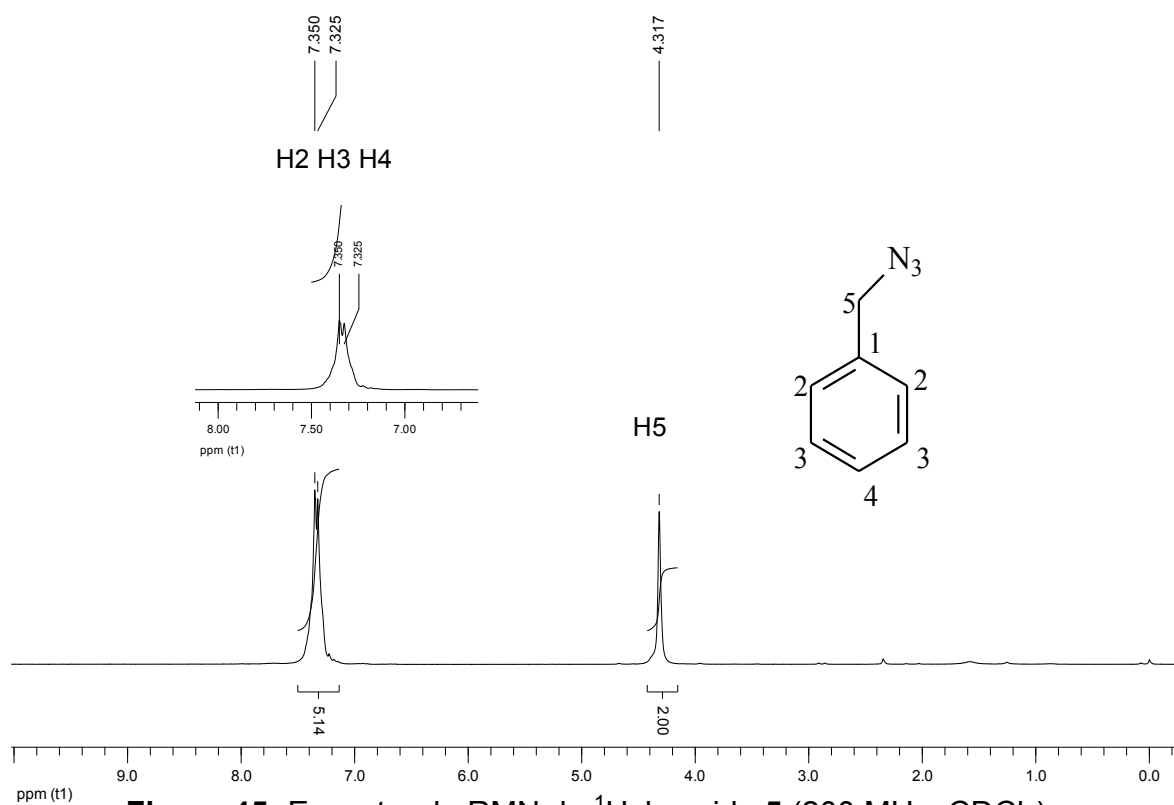


Figura 45: Espectro de RMN de ^1H da azida **5**. (200 MHz, CDCl_3).

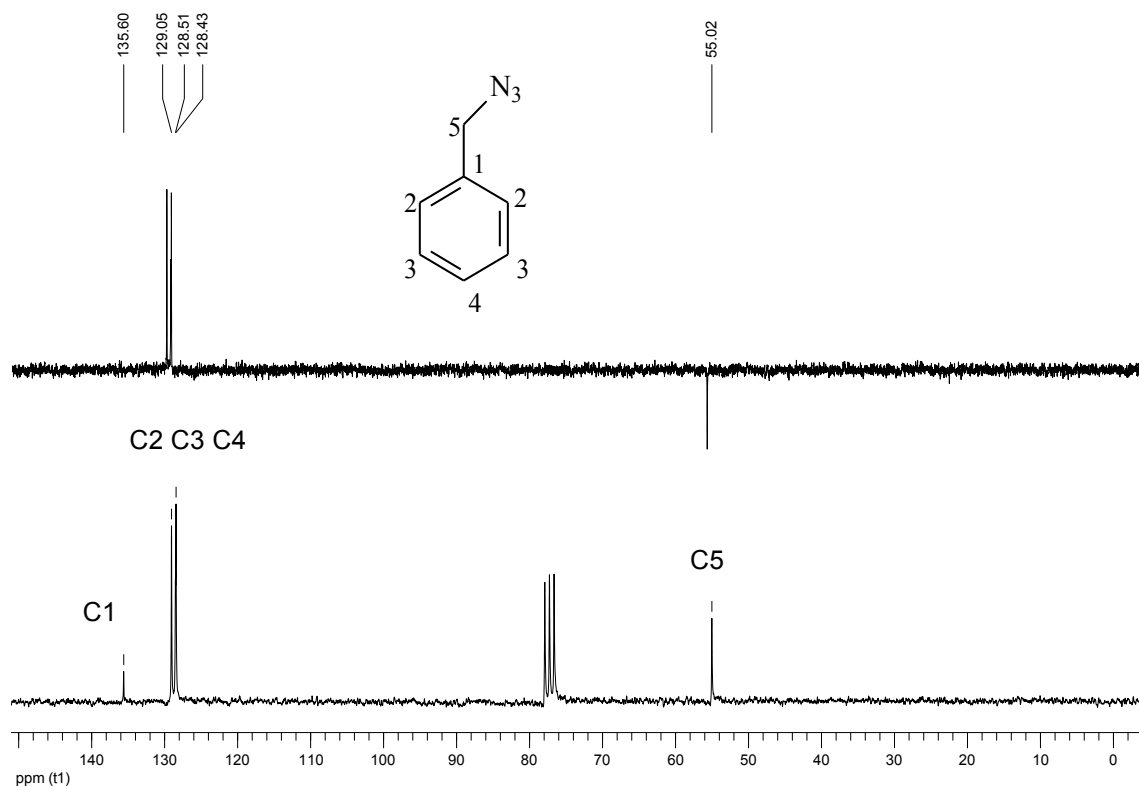


Figura 46: Espectro de RMN de ^{13}C da azida **5**. (200 MHz, CDCl_3).

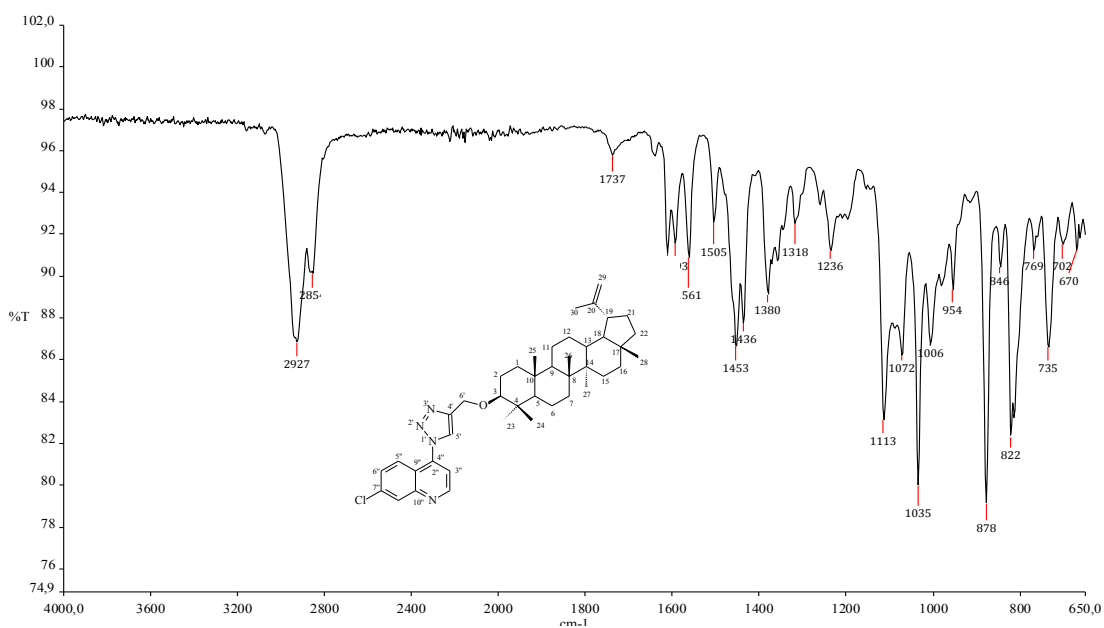


Figura 47: Espectro na região do IV do TB2.

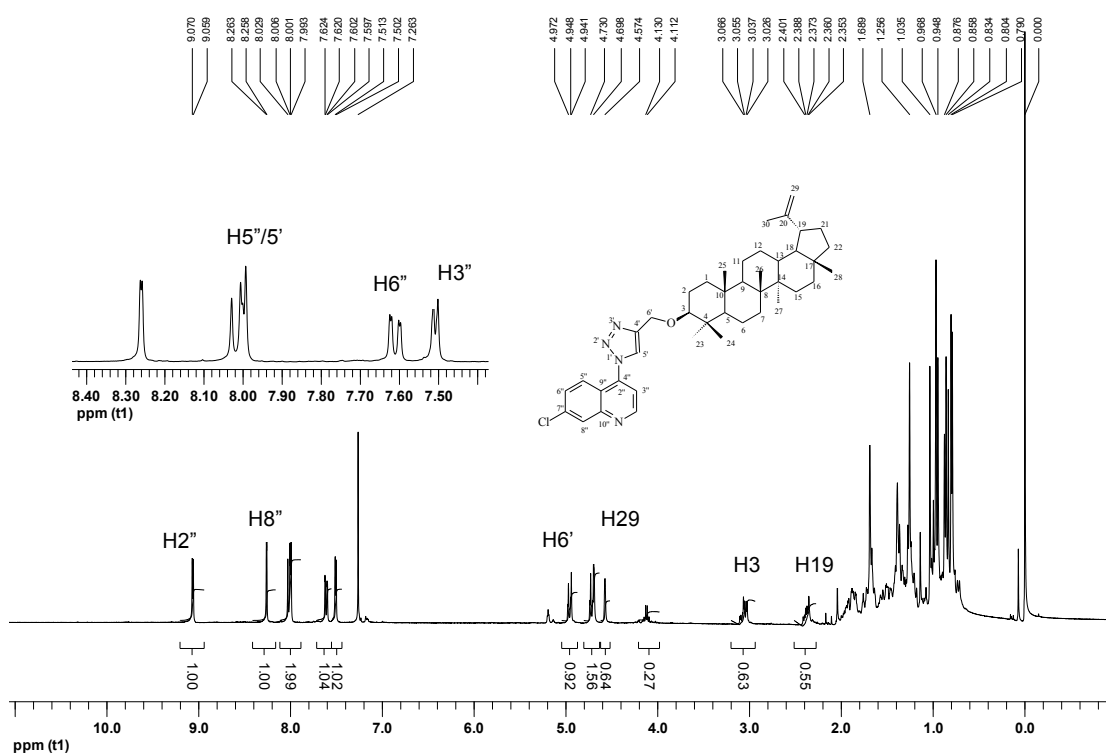


Figura 48: Espectro de RMN de ^1H do TB2 (400 MHz, CDCl_3)

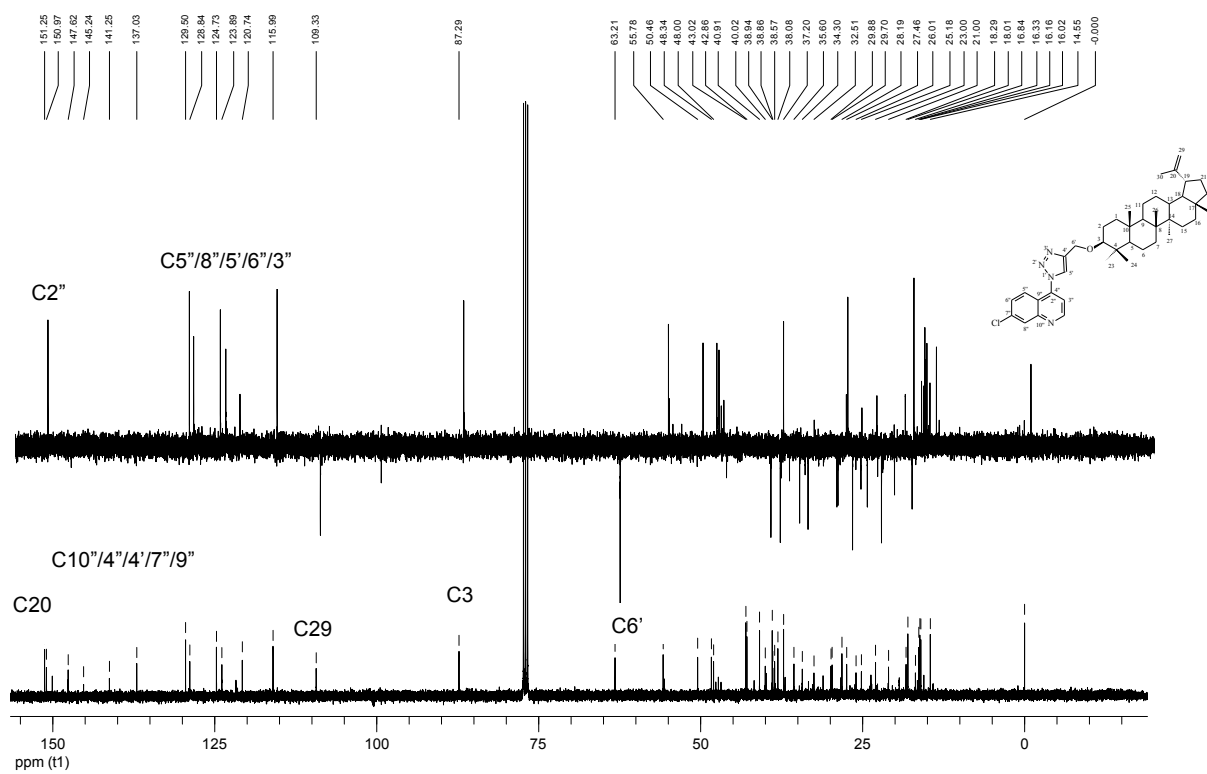


Figura 49: Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135 de TB2 (400 MHz, CDCl_3).

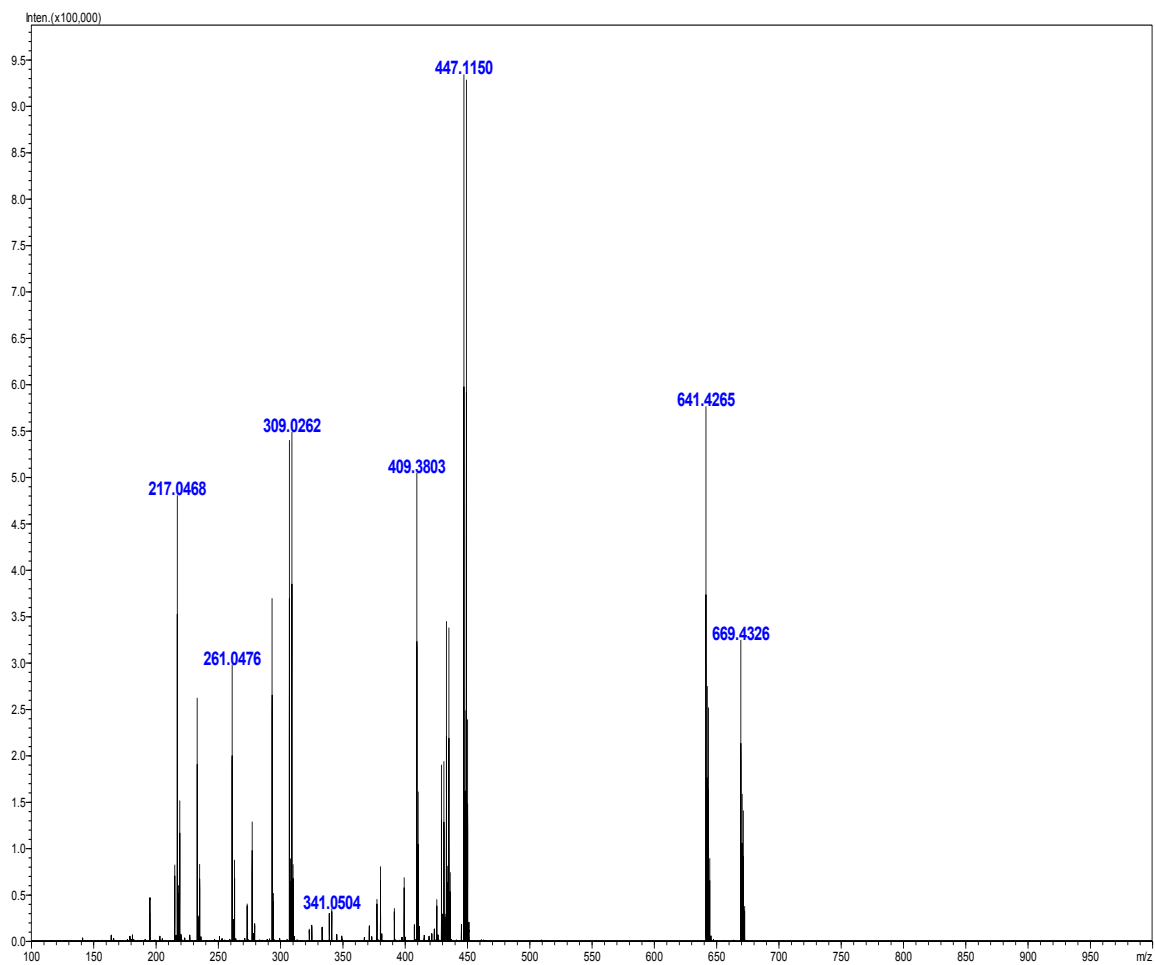


Figura 50: Espectro de Massa de Alta Resolução do TB2.

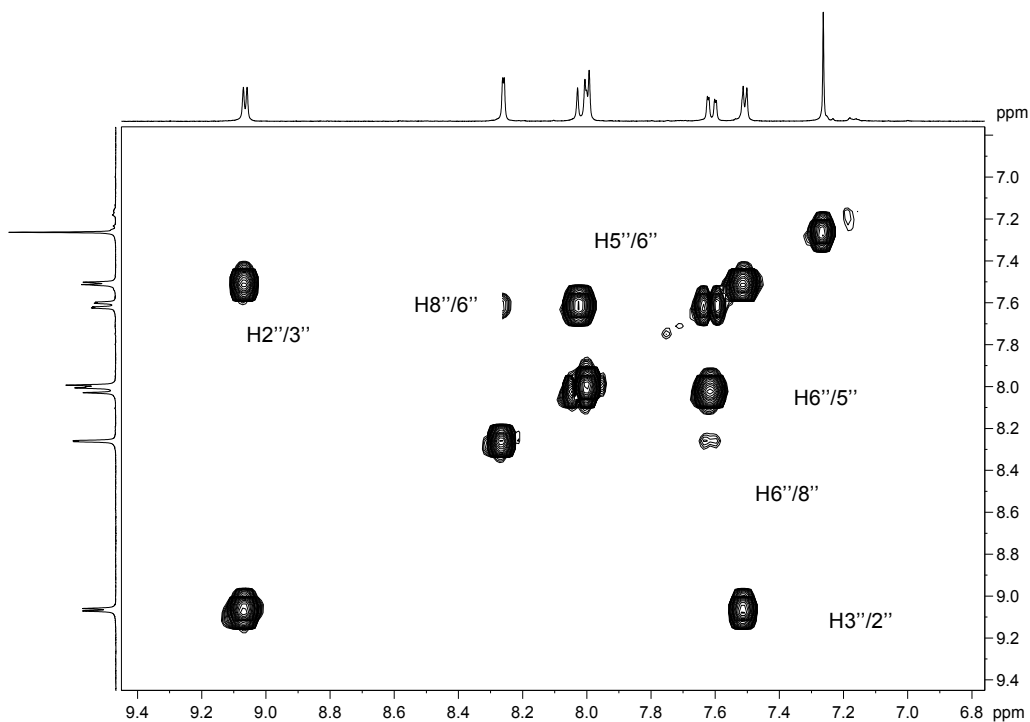


Figura 51: Expansão do mapa de contorno COSY do **TB2** na região de δ 9,4 a δ 6,8 (CDCl_3 , 400 MHz).

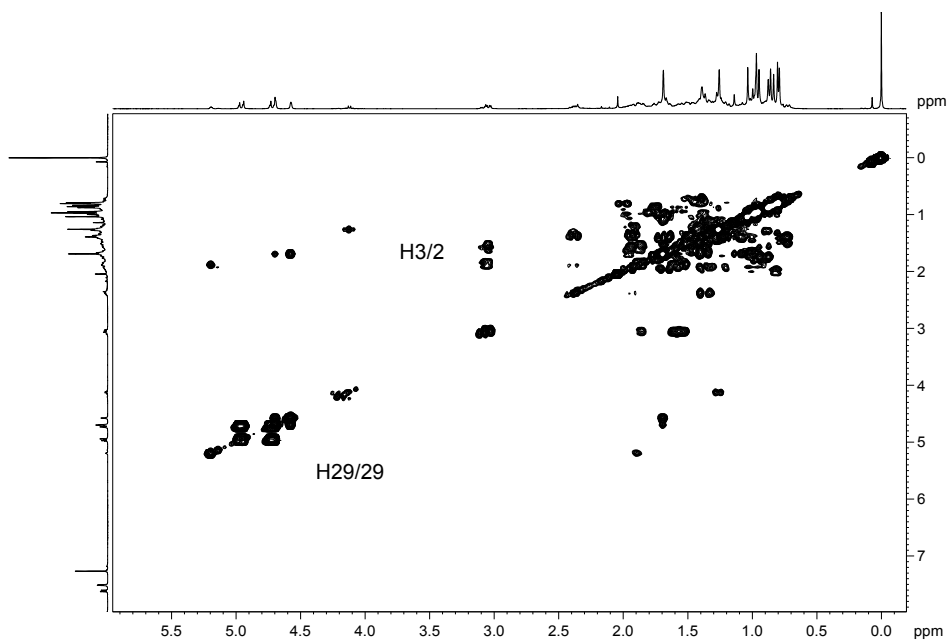


Figura 52: Expansão do mapa de contorno COSY de **TB2** na região de δ 5,5 a δ 0 (CDCl_3 , 400 MHz).

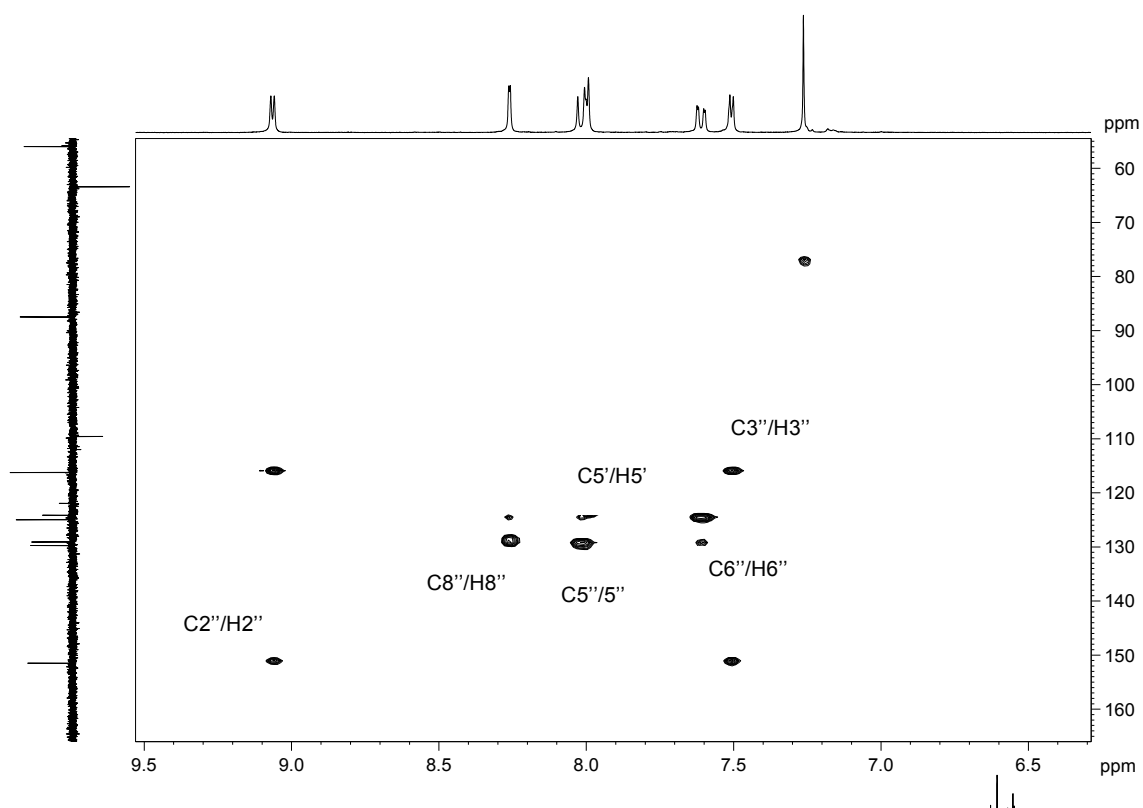


Figura 53: Expansão do mapa de contorno HSQC de **TB2** na região de δ 9,5 a δ 6,5 (CDCl_3 , 400 MHz).

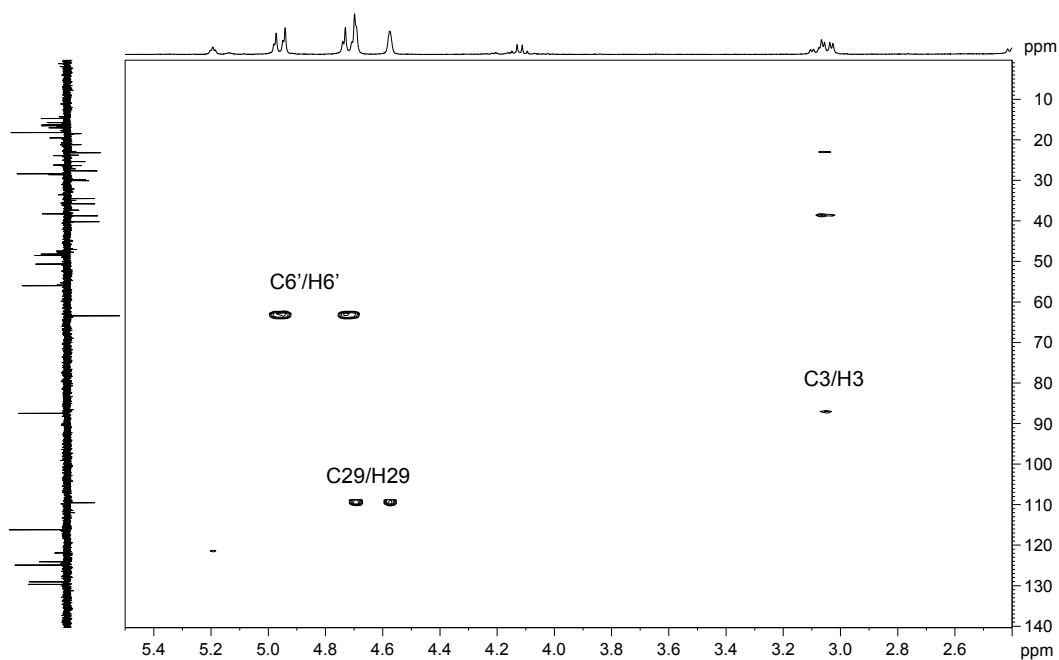


Figura 54: Expansão do mapa de contorno HSQC de **TB2** na região de δ 5,5 a δ 2,5 (CDCl_3 , 400 MHz).

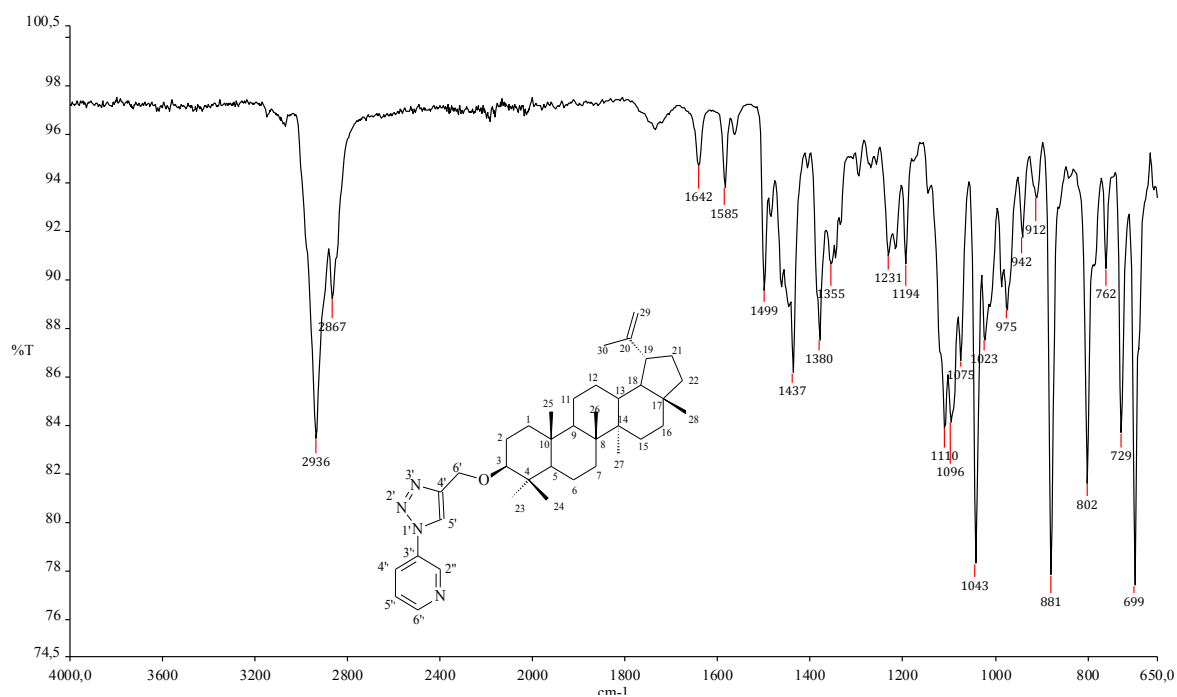


Figura 55: Espectro na região do IV do TB3.

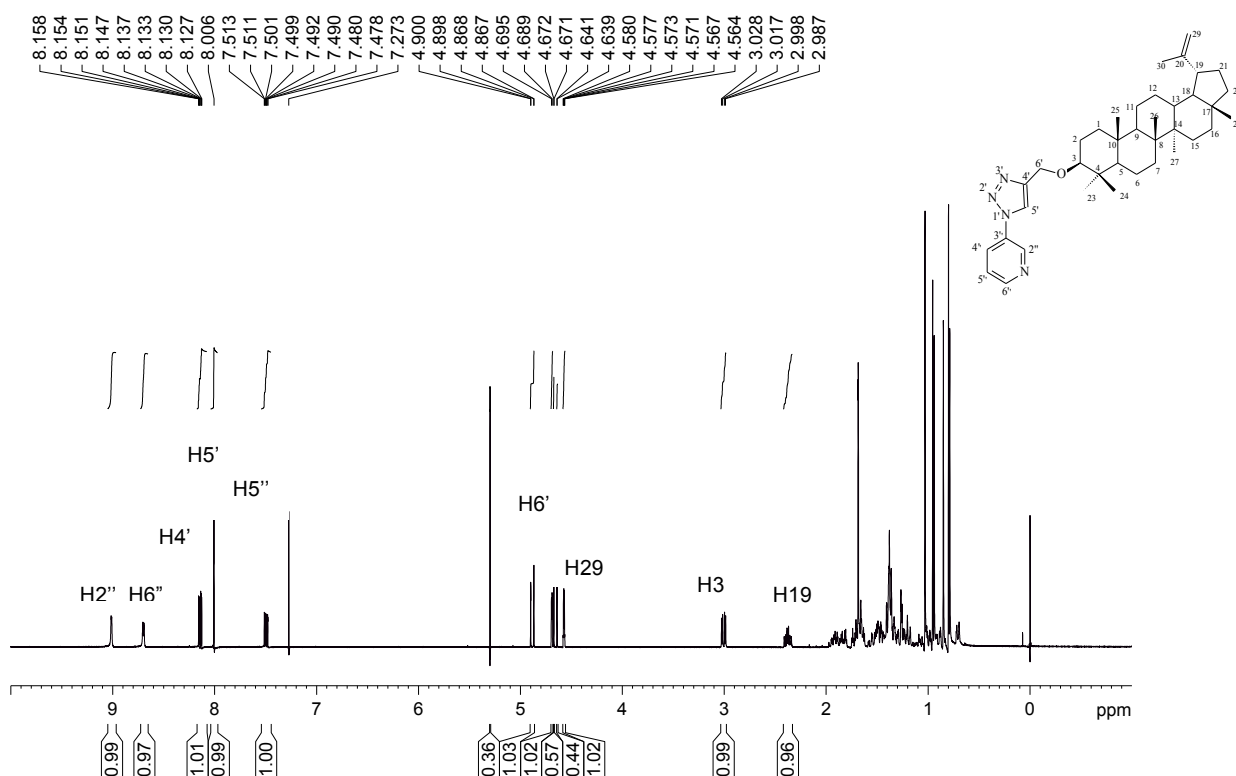


Figura 56: Espectro de RMN de ^1H do TB3 (CDCl_3 , 400 MHz)

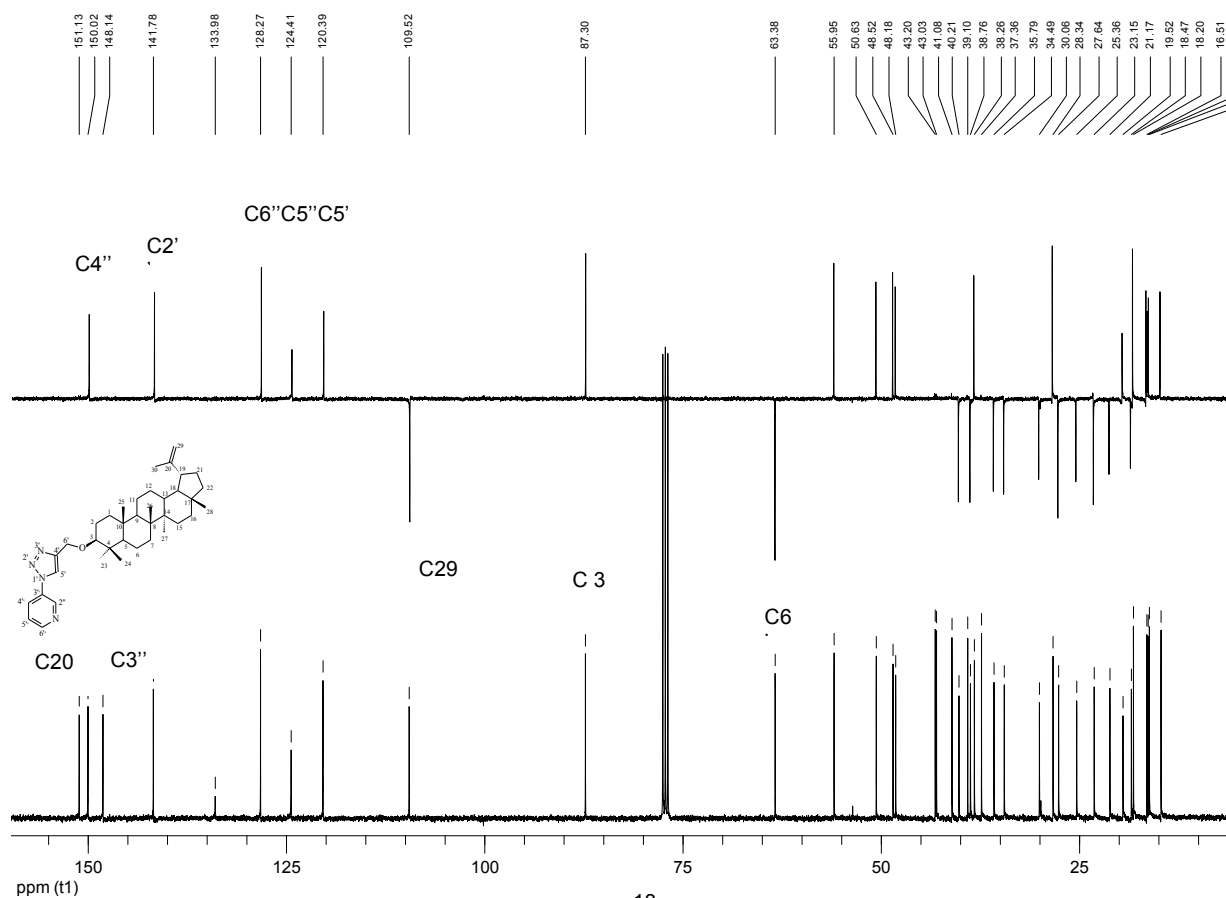


Figura 57: Espectro de RMN de ^{13}C e sub-espectro DEPT35 de **TB3** (400 MHz; CDCl_3).

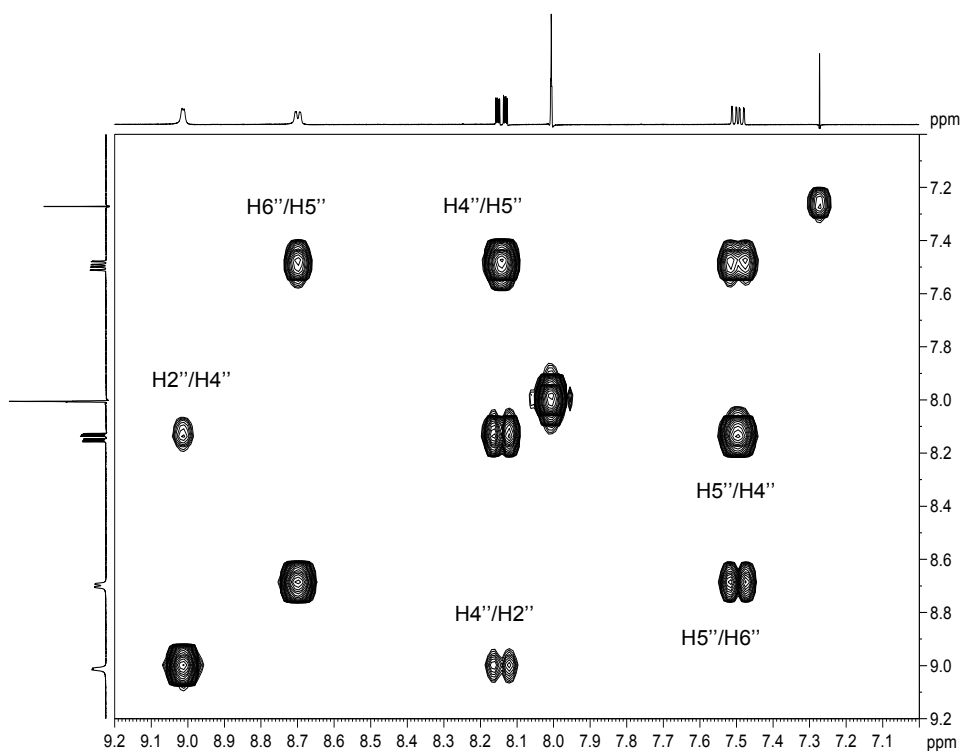


Figura 58: Expansão do mapa de contorno COSY do **TB3** na região de δ 9,2 a δ 7,1 (400 MHz; CDCl_3).

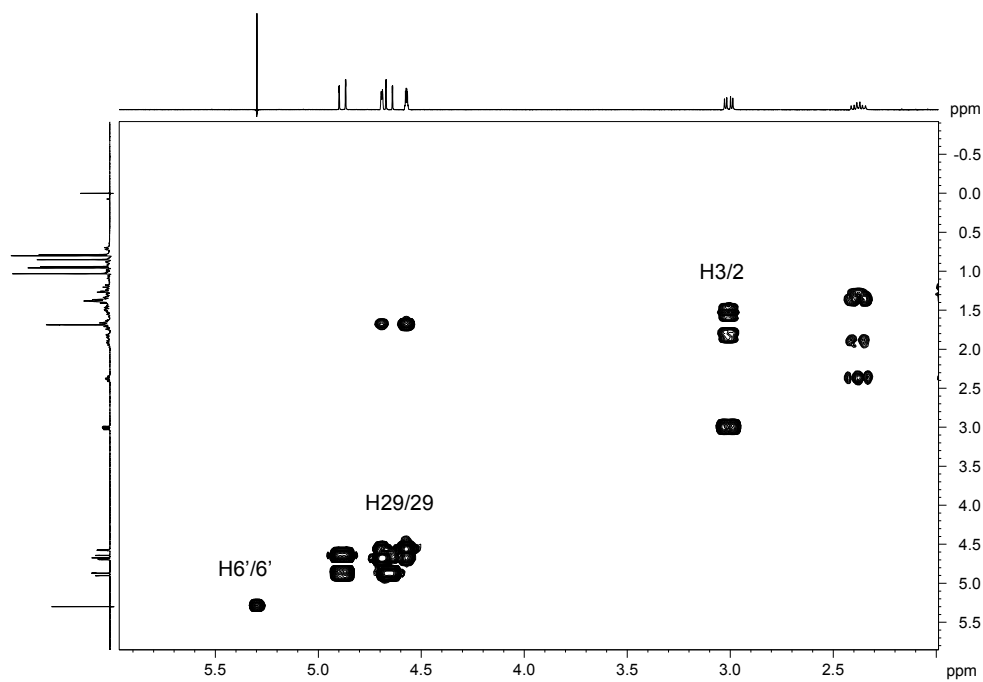


Figura 59: Expansão do mapa de contorno COSY do **TB3** na região de δ 6,0 a δ 2,0 (400 MHz; CDCl₃).

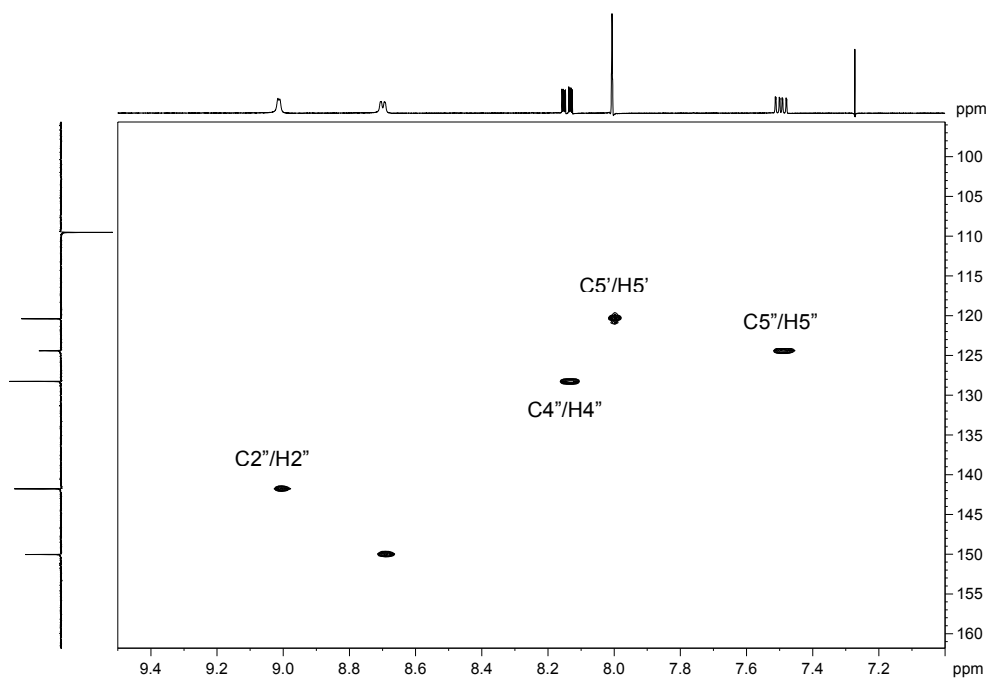


Figura 60: Expansão do mapa de contorno HSQC do **TB3** na região de δ 9,4 a δ 7,2 (400 MHz; CDCl₃).

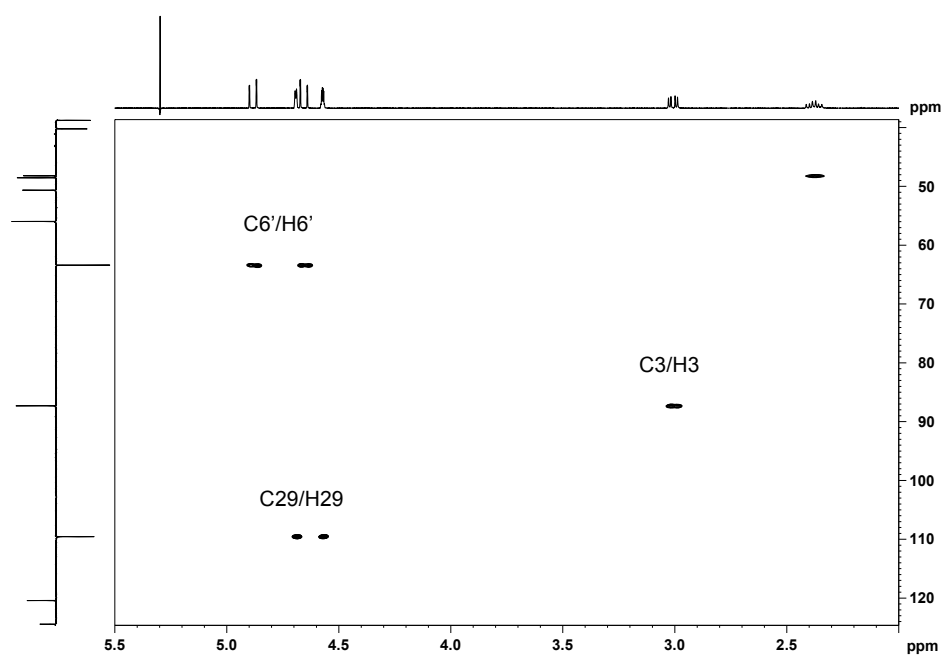


Figura 61: Expansão do mapa de contorno HSQC do **TB3** na região de δ 5,5 a δ 2,0 (400 MHz CDCl_3).

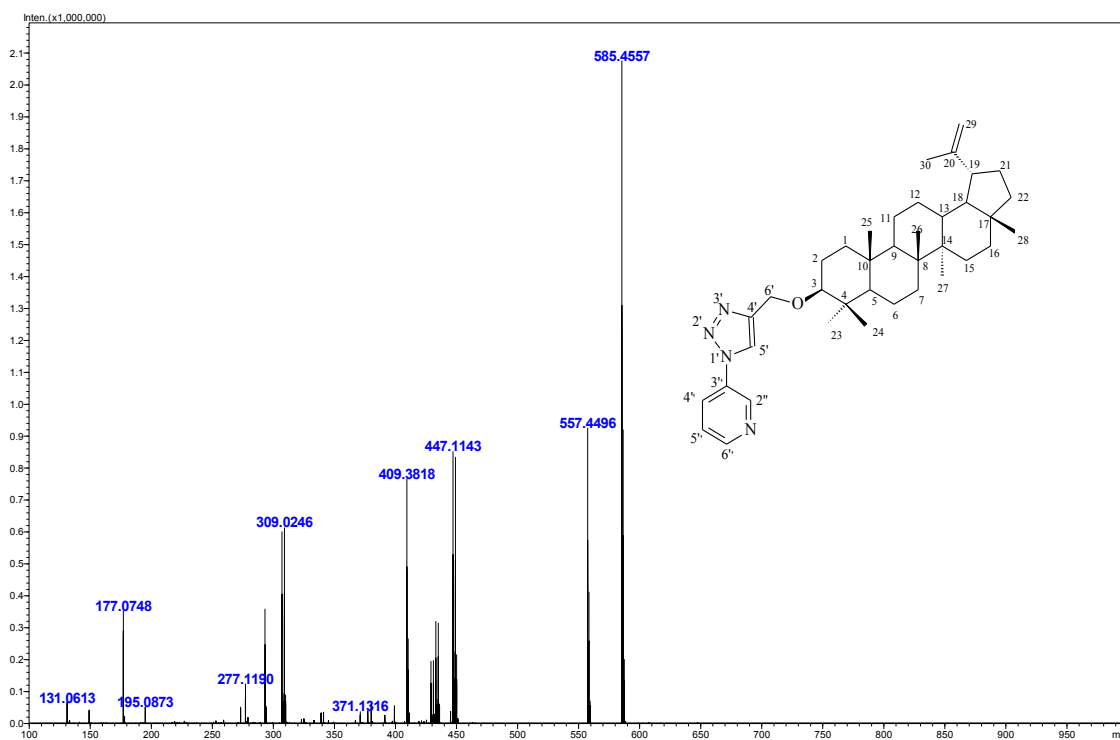


Figura 62: Espectro de Massas de Alta Resolução do **TB3**.

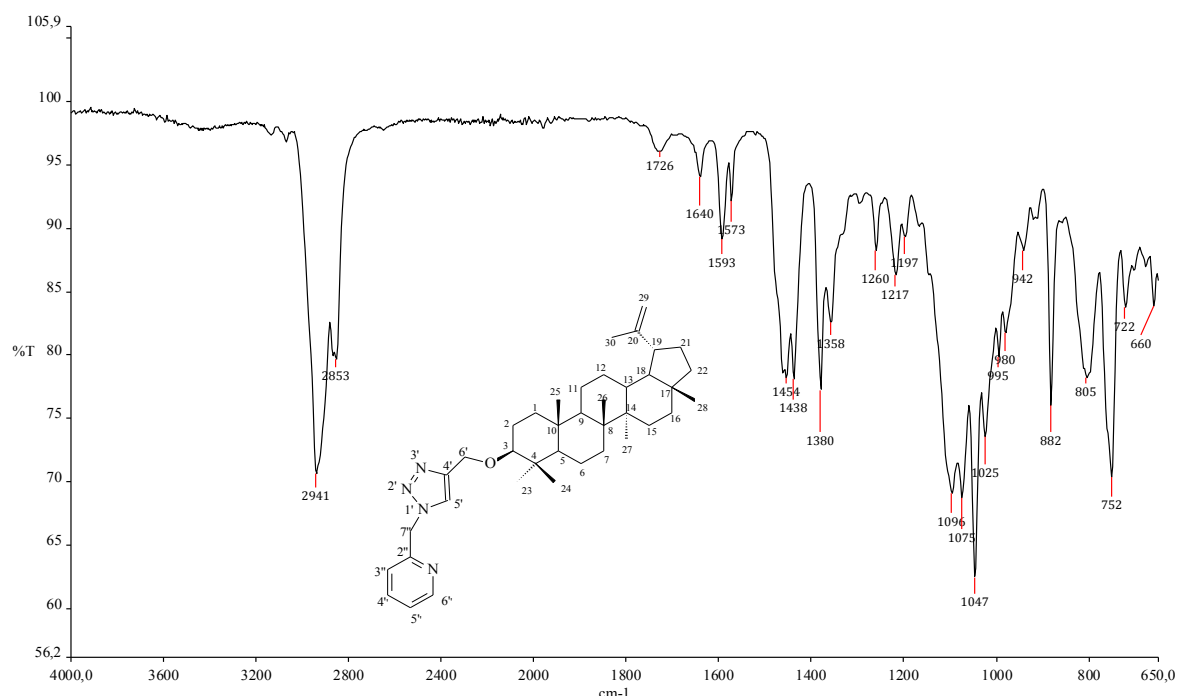


Figura 63: Espectro na região do IV do TB4

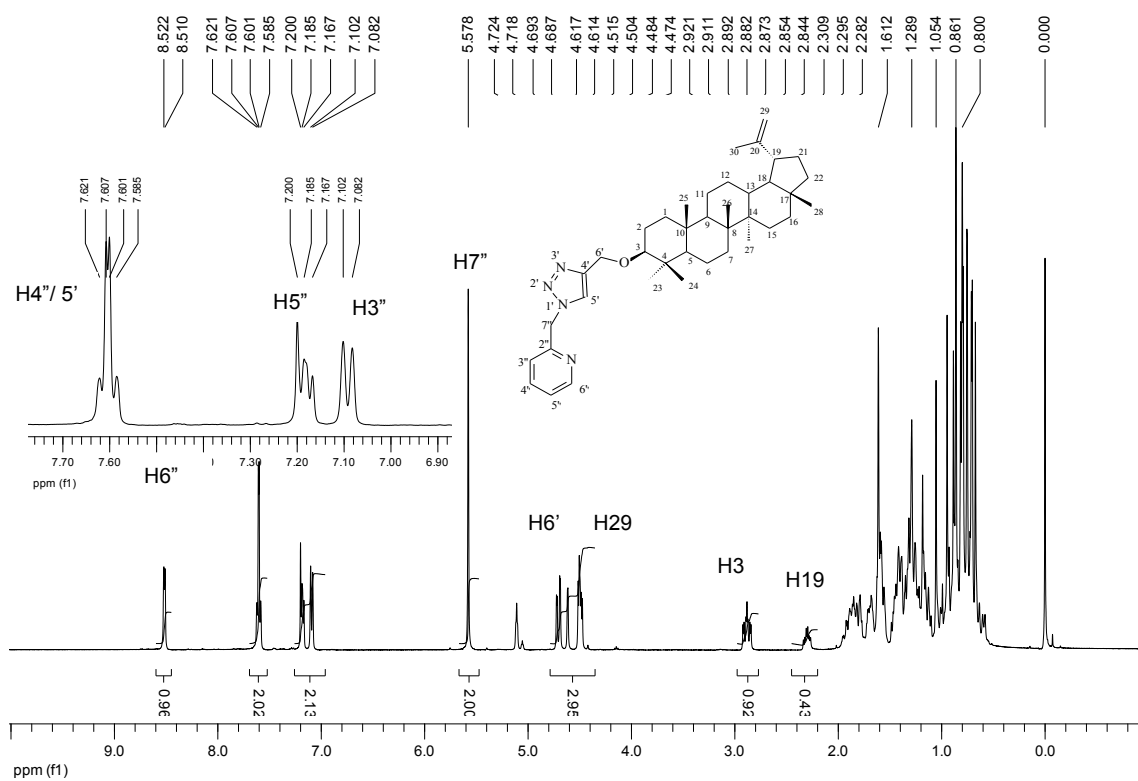


Figura 64: Espectro de RMN de ¹H do TB4 (400MHz, CDCl₃).

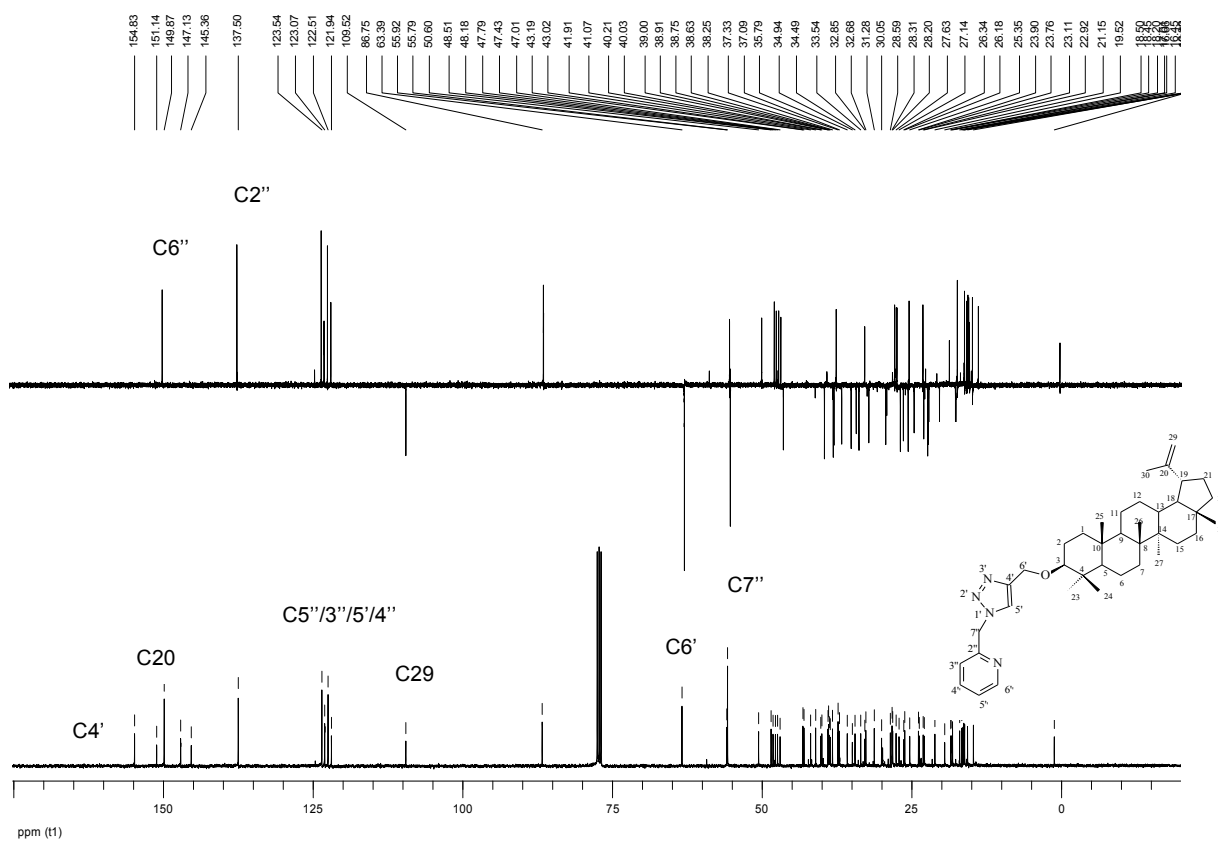


Figura 65: Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135 de TB4 (400MHz; CDCl_3).

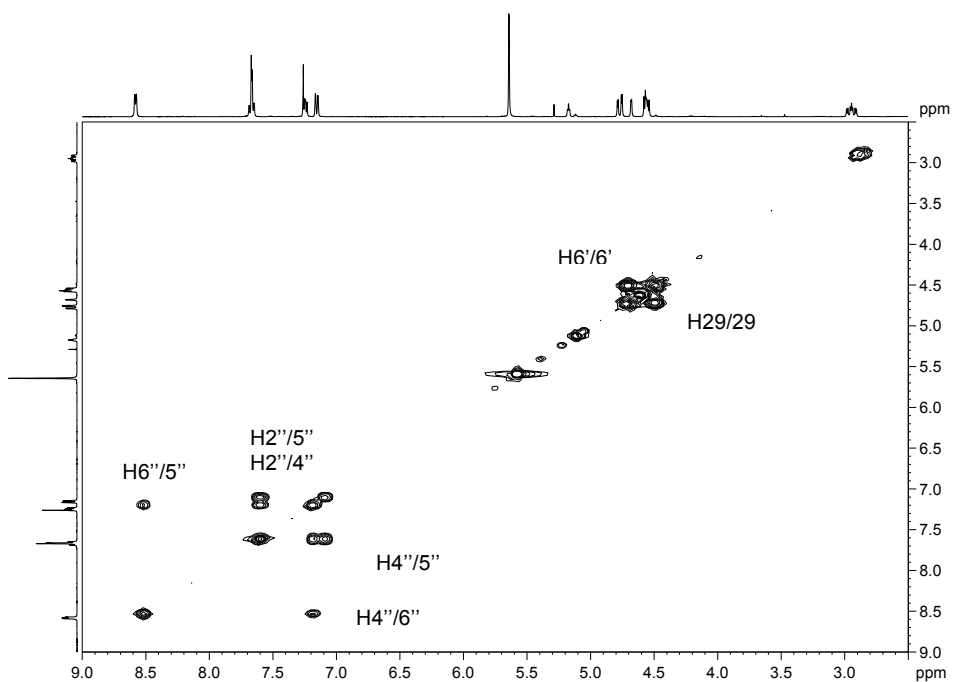


Figura 66: Expansão do mapa de contorno COSY do TB4 na região δ 9,0 a δ 3,0 (400MHz; CDCl_3).

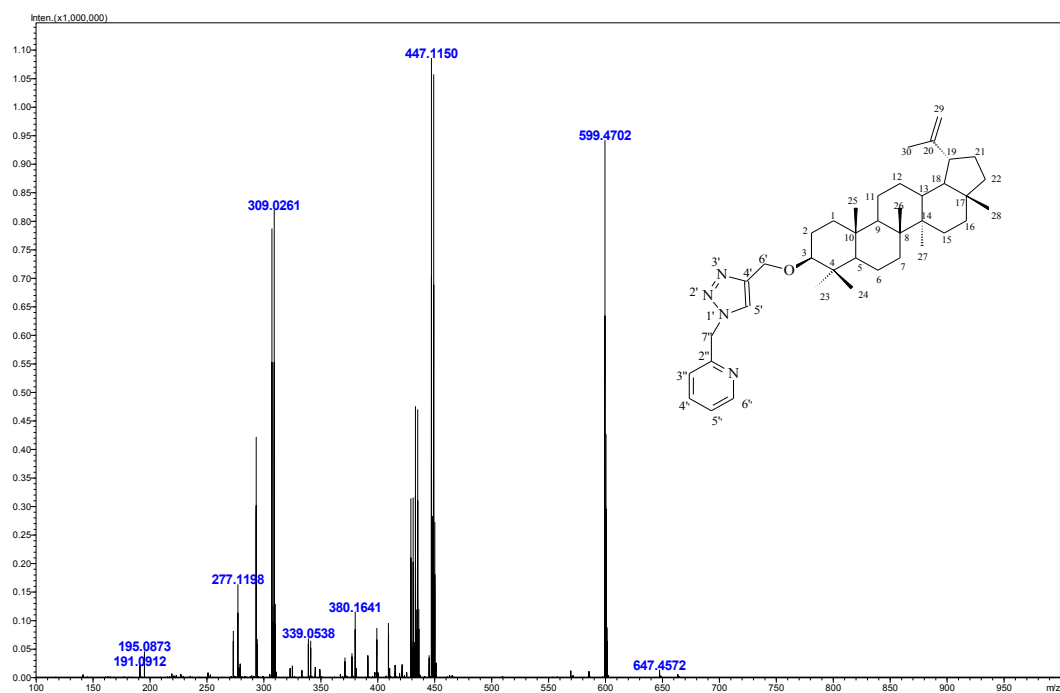


Figura 67: Espectro de Massa de Alta Resolução do TB4.

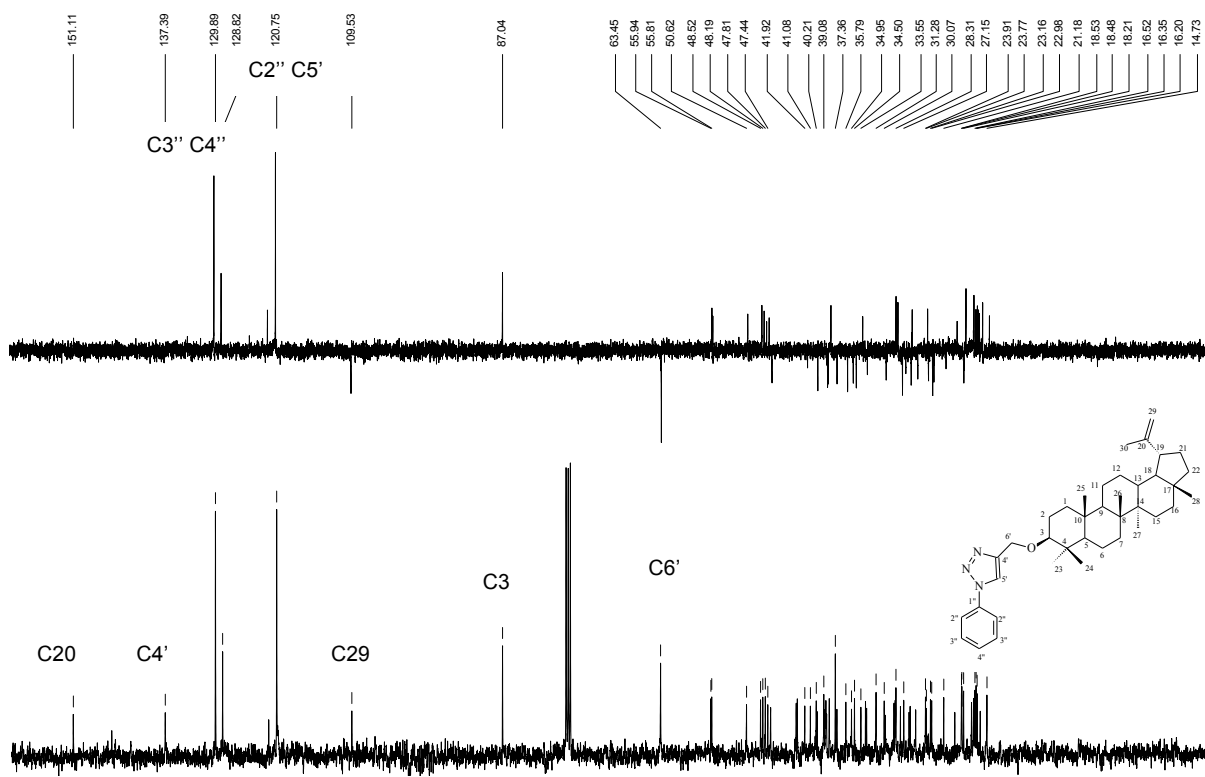


Figura 70: Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT135 de **TB5** (400 MHz; CDCl_3).

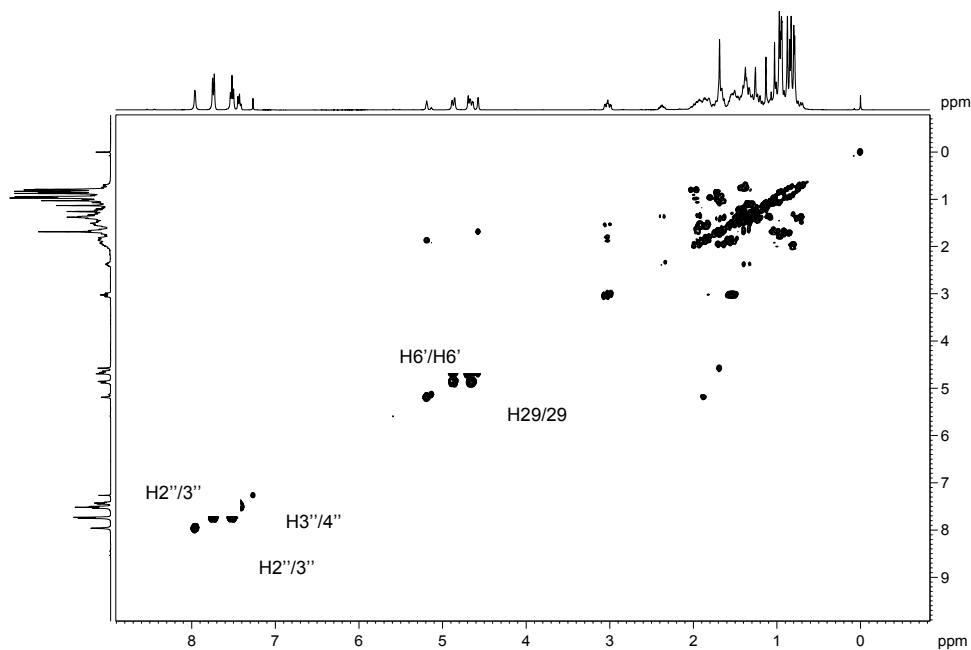


Figura 71: Expansão do mapa de contorno COSY do **TB5** na região de δ 8,0 a δ 0 (CDCl_3 , 400 MHz).

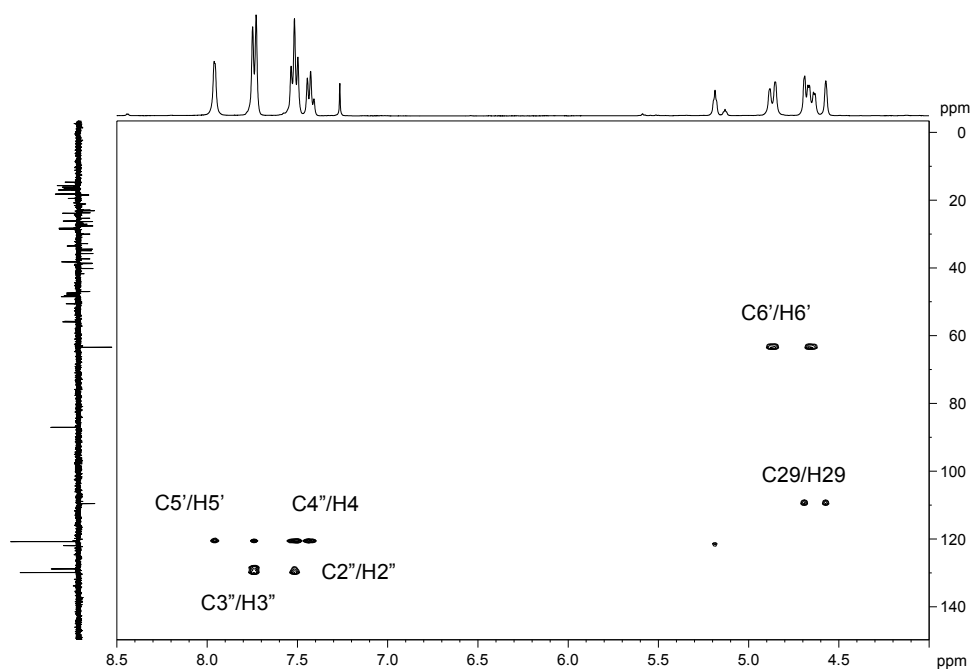


Figura:72 Extensão do mapa de contorno HSQC do **TB5** na região de δ 8,5 a δ 5,0 (400MHz; CDCl_3).

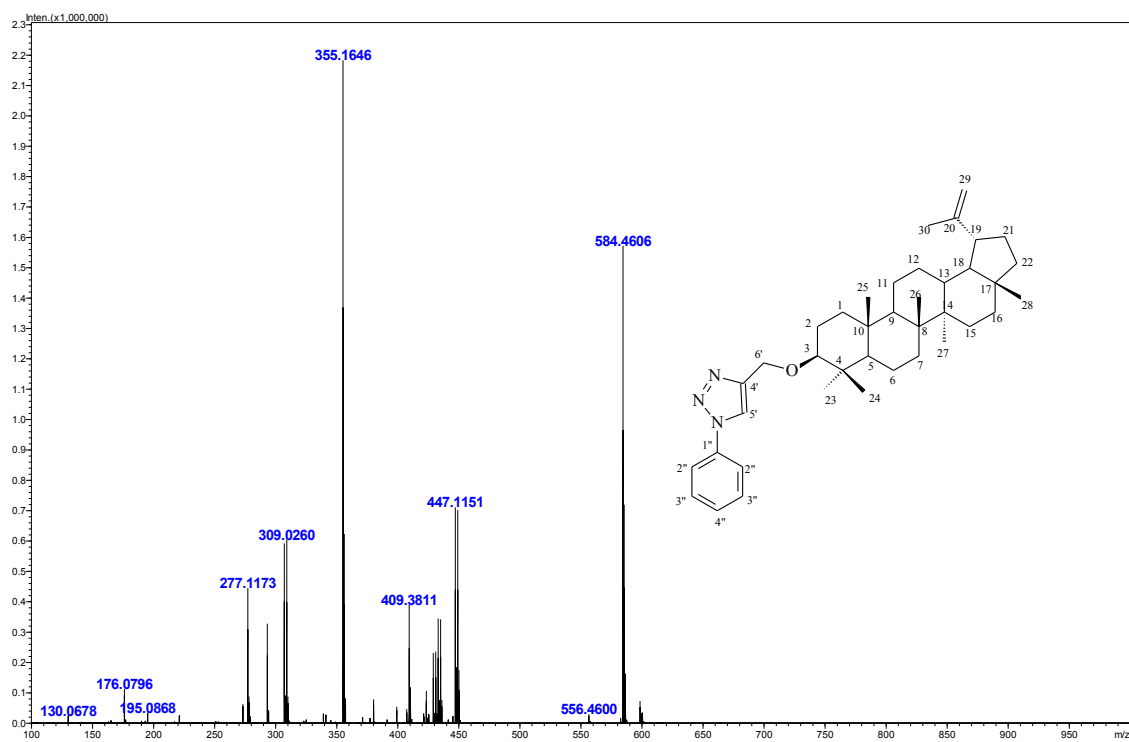


Figura 73: Espectro de Massa de Alta Resolução do **TB5**.

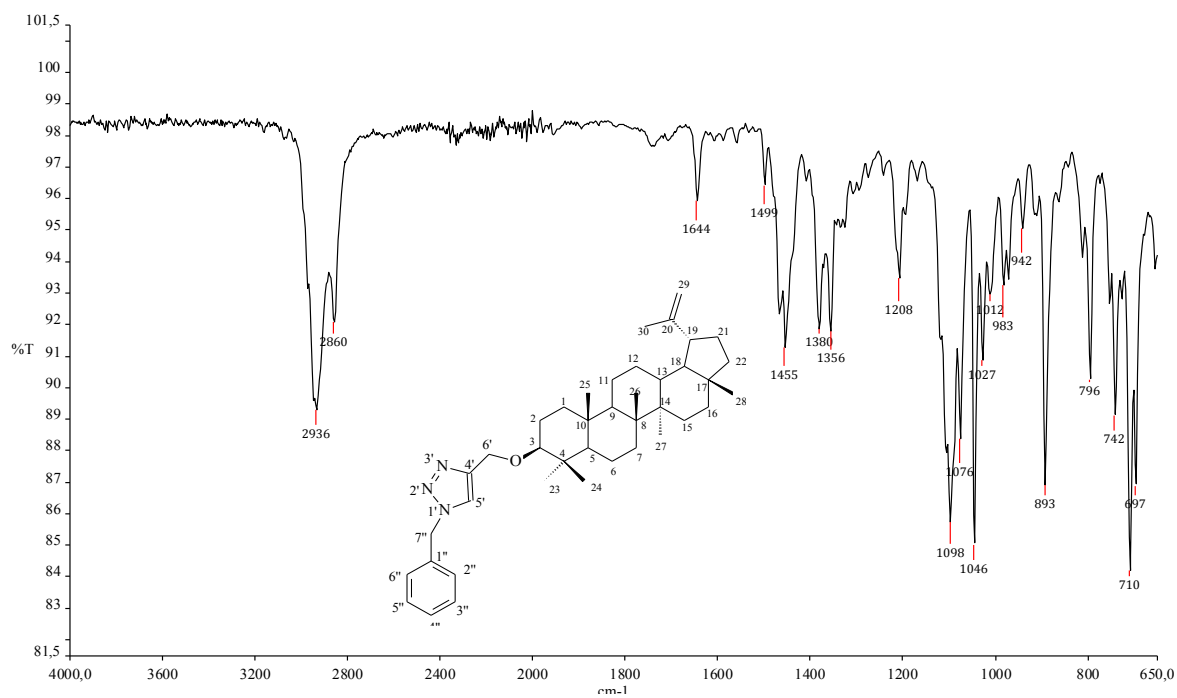


Figura 74: Espectro na região do IV do TB6

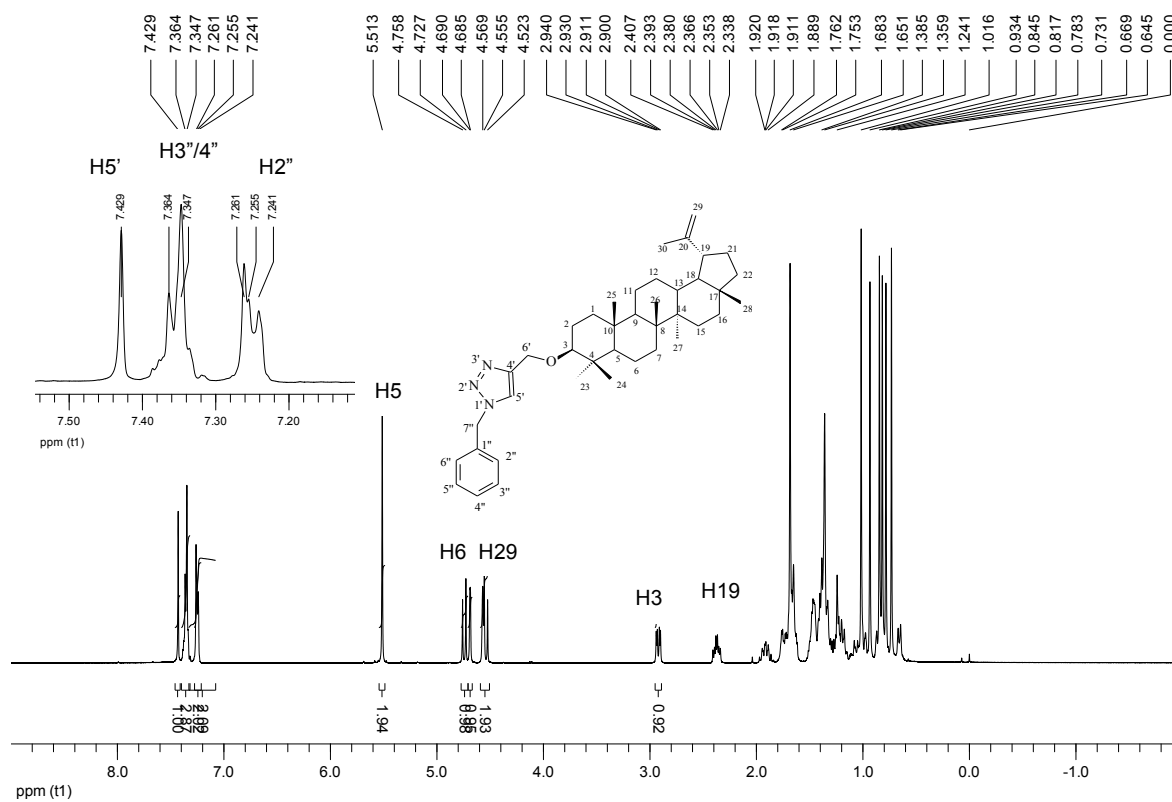


Figura 75: Espectro de RMN de ^1H do TB6 (400 MHz; CDCl_3).

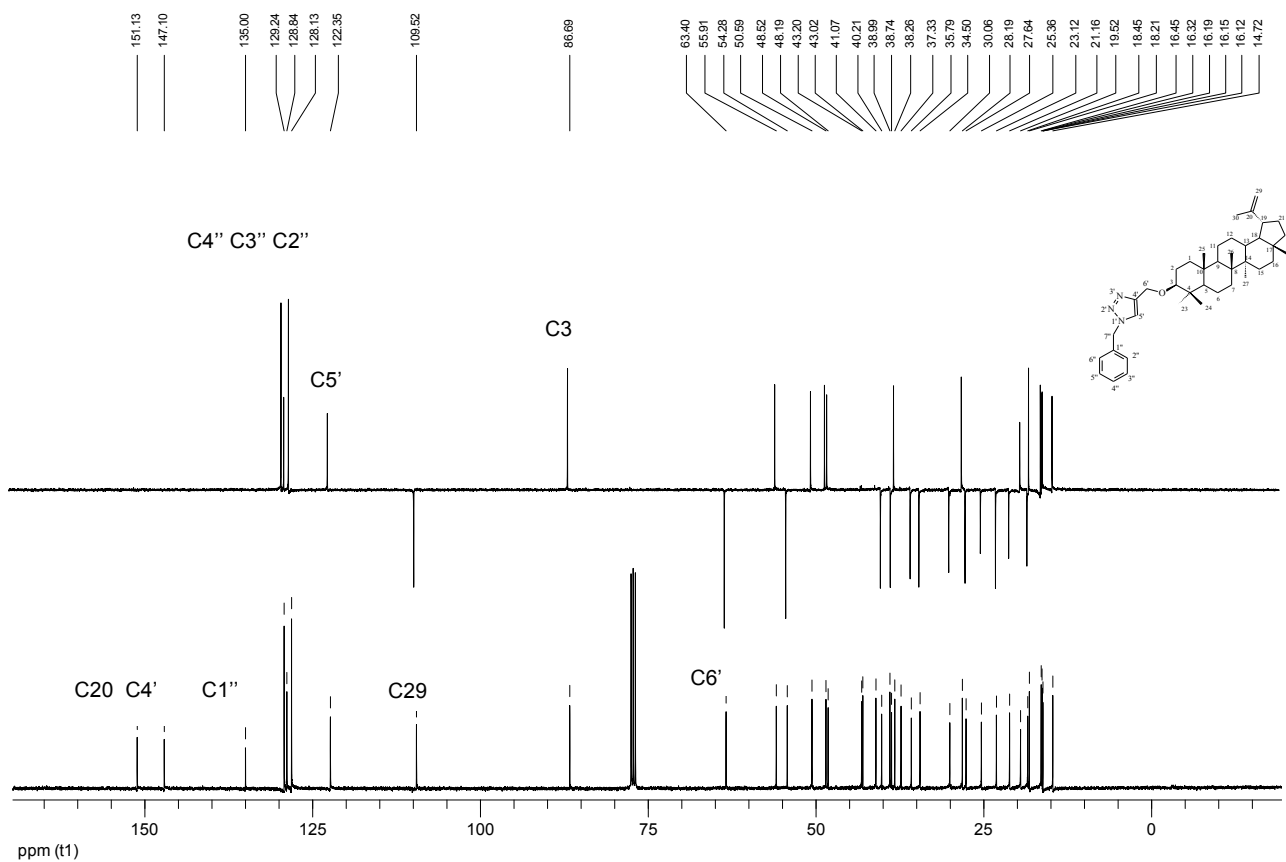


Figura 76: Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135 de **TB6** (CDCl_3 , 400 MHz).

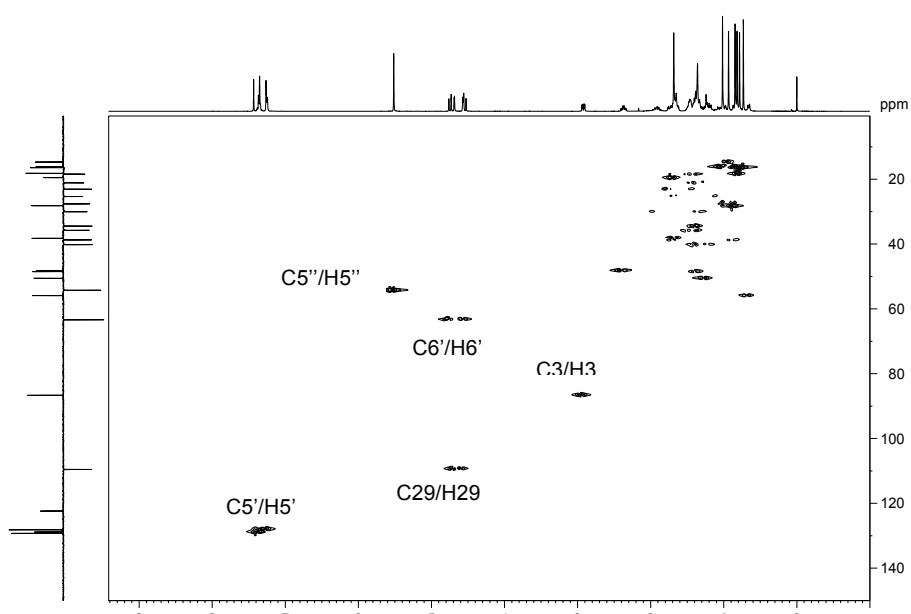


Figura 77: Expansão do mapa de contorno HSQC do **TB6** na região de δ 9 a δ 0 (400MHz; CDCl_3 .)

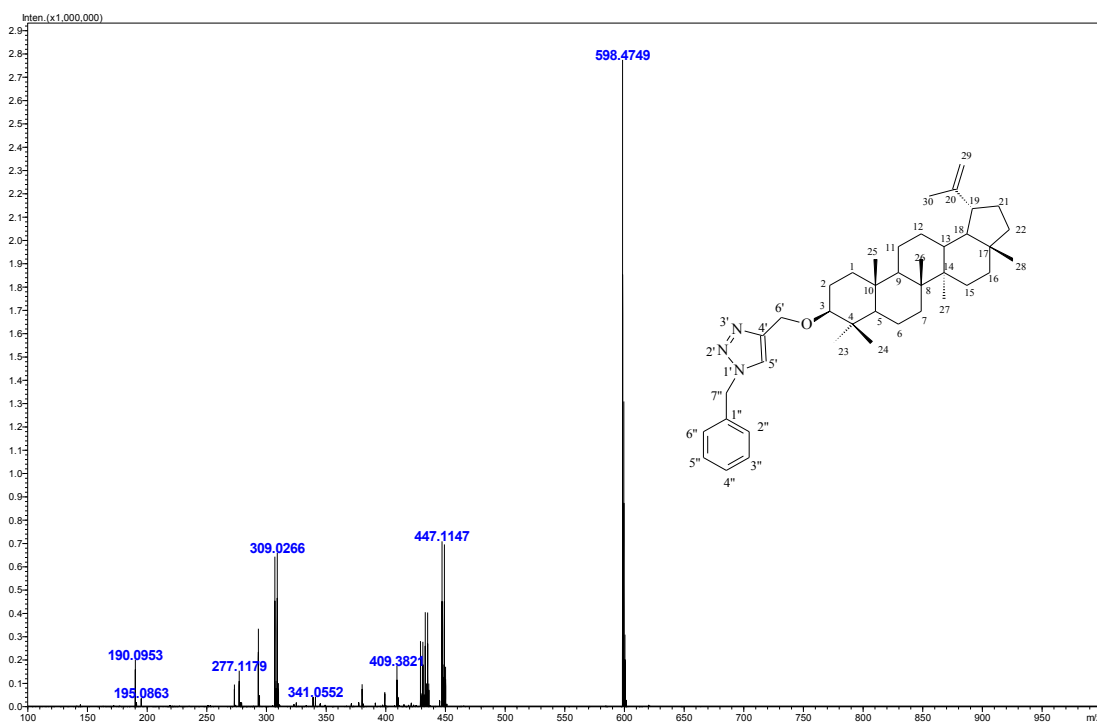


Figura 80: Espectro de Massa de Alta Resolução do TB6.

