

UFMG/ICEx.DQ.799^a

D.465^a

FELIPE PURISCO GOMES EUZÉBIO

**Derivados do Ácido 6alfa,7beta-di-hidroxivouacapan-17beta-óico, Isolado de
Pterodon polygalaeiflorus Benth: Obtenção, Análise Estrutural e Estudo da
Atividade Antiproliferativa Contra Células Cancerígenas**

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

BELO HORIZONTE

2010

Euzébio, Felipe Purisco Gomes.
E91d Derivados do ácido 6alfa,7beta-di-hidroxivouacapan-
2010 17beta-óico, isolado de Pterodon polygalaeflorus
D Benth: obtenção, análise estrutural e estudo da
atividade antiproliferativa contra células
cancerígenas / Felipe Purisco Gomes Euzébio. 2010.
xi, 114 f. : il.
Orientadora: Dorila Piló Veloso.
Co-orientador: Ângelo de Fátima.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais. Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1.Química orgânica - Teses 2. Pterodon
polygalaeflorus Benth - Teses 3.Furanoditerpenos -
Teses 4. Atividade antiproliferativa - Teses 5.Câncer
- Teses 6. Reações de Mannich- Teses 7.Vouacapanóides
- Teses I. Veloso, Dorila Piló, Orientadora II.
Fátima, Ângelo de, Co-orientador III. Título.

CDU 043



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



**"Derivados do Ácido 6alfa,7beta-di-hidroxivouacapan -17beta-óico, Isolado de
Pterodon polygalaeflorus Benth: Obtenção, Análise Estrutural e Estudo da
Atividade Antiproliferativa Contra Células Cancerígenas"**

Felipe Purisco Gomes Euzébio

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Dorila Piló Veloso - Orientadora
UFMG

Prof. Ângelo de Fátima - Co-Orientador
UFMG

Prof. Maria Amélia Diamantino Boaventura
UFMG

Prof. Jarbas Magalhães Resende
UFMG

Belo Horizonte, 24 de fevereiro de 2010.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
pela bolsa de mestrado;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo
auxílio financeiro do projeto.

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	viii
Lista de símbolos, abreviaturas e acrônimos	x
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1 - MATERIAIS E MÉTODOS	5
1.1. Técnicas e instrumentos	5
1.2. Isolamento do ácido $6\alpha,7\beta$ -di-hidroxiouacapan- 17β -óico (ADV, 1).....	5
1.2.1. Dados físicos e químicos do ácido	
$6\alpha,7\beta$ -di-hidroxiouacapan- 17β -óico	6
1.3. Síntese da 6α -hidroxiouacapan- $7\beta,17\beta$ -lactona (HVL, 2)	7
1.3.1. Dados físicos e químicos da	
6α -hidroxiouacapan- $7\beta,17\beta$ -lactona	7
1.4. Síntese da 6-oxouacapan- $7\beta,17\beta$ -lactona (POL, 3)	8
1.4.1. Dados físicos e químicos da 6-oxouacapan- $7\beta,17\beta$ -lactona	8
1.5. 6α -acetoxi- $7\beta,17\beta$ -lactona (AVL, 4)	9
1.6. Síntese dos derivados 16-(<i>N,N</i> -dialquilamino)metilênicos da HVL	9
1.6.1 Síntese das aminas geminais	9
1.6.1.1 Dados físicos e químicos de bis(dietilamino)metano (5.1)	10
1.6.1.2. Dados físicos e químicos de bis(dipropilamino)metano (5.2) ..	11
1.6.1.3. Dados físicos e químicos de bis(diisobutilamino)metano (5.3) .	11
1.6.1.4. Dados físicos e químicos de dipirrolidinometano (5.4)	12
1.6.1.5. Dados físicos e químicos de dipiperidinometano (5.5)	12
1.6.1.6. Dados físicos e químicos de dimorfolinometano (5.6)	13
1.6.2 Reações com sais de imínio pré-formados	13
1.6.2.1. Dados físicos e químicos de 16-(<i>N,N</i> -dietilamino)metileno-	
6α -hidroxiouacapan- $7\beta,17\beta$ -lactona (2.1)	15
1.6.2.2. Dados físicos e químicos de 16-(<i>N,N</i> -dipropilamino)metileno-	
6α -hidroxiouacapan- $7\beta,17\beta$ -lactona (2.2)	16

1.6.2.3. Dados físicos e químicos de 16-(<i>N,N</i> -diisobutilamino)metileno- 6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (2.3)	17
1.6.2.4. Dados físicos e químicos de 16-(1-pirrolidino)metileno- 6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (2.4)	18
1.6.2.5. Dados físicos e químicos de 16-(1-piperidino)metileno- 6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (2.5)	19
1.6.2.6. Dados físicos e químicos de 16-(4-morfolino)metileno- 6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (2.6)	20
1.7. Testes biológicos	21
1.8. Cálculos teóricos	22
CAPÍTULO 2 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
2.1. Isolamento do ácido 6 α ,7 β -di-hidroxivouacapan-17 β -óico (ADV, 1)	23
2.2. Síntese da 6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (HVL, 2)	23
2.3. Síntese da 6-oxovouacapan-7 β ,17 β -lactona (POL, 3)	23
2.4. Síntese dos derivados 16-(<i>N,N</i> -dialquilamino)metilênicos da HVL	24
2.5. Análise dos dados espectroscópicos	26
2.5.1. Espectroscopia no Infravermelho (IV) das substâncias 2.1 a 2.6	26
2.5.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) das substâncias 2.1 a 2.6 ..	32
2.5.2.1. Análise dos dados de RMN de 16-(<i>N,N</i> -dietilamino)metileno- 6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (2.1)	32
2.5.2.2. Análise dos dados de RMN de 16-(<i>N,N</i> -dipropilamino)metileno- 6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (2.2)	40
2.5.2.3. Análise dos dados de RMN de 16-(<i>N,N</i> -diisobutilamino)metileno- 6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (2.3)	45
2.5.2.4. Análise dos dados de RMN de 16-(1-pirrolidino)metileno- 6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (2.4)	50
2.5.2.5. Análise dos dados de RMN de 16-(1-piperidino)metileno- 6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (2.5)	55

2.5.2.6. Análise dos dados de RMN de 16-(4-morfolino)metileno- 6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (2.6)	60
2.6. Testes biológicos	65
2.7. Cálculos teóricos	77
CONCLUSÕES	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

RESUMO

Palavras-chave: furanoditerpenos, vouacapanóides, obtenção e análise estrutural, reação de Mannich, atividade antiproliferativa, câncer, *Pterodon polygalaeflorus* Benth.

Neste trabalho realizou-se o isolamento do ácido $6\alpha,7\beta$ -di-hidroxivouacapan- 17β -óico (ADV) partindo de frutos de *Pterodon polygalaeflorus* Benth, popularmente conhecida como sucupira branca. Deste ácido foram obtidos os derivados lactônicos: 6α -hidroxivouacapan- $7\beta,17\beta$ -lactona (HVL) e 6-oxovouacapan- $7\beta,17\beta$ -lactona (POL). A partir da HVL foram sintetizados seis derivados substituídos no carbono 16 do anel furânico: 16-(*N,N*-dietilamino)metileno- 6α -hidroxivouacapan- $7\beta,17\beta$ -lactona, 16-(*N,N*-dipropilamino)metileno- 6α -hidroxivouacapan- $7\beta,17\beta$ -lactona, 16-(*N,N*-diisobutilamino)metileno- 6α -hidroxivouacapan- $7\beta,17\beta$ -lactona, 16-(1-pirrolidino)metileno- 6α -hidroxivouacapan- $7\beta,17\beta$ -lactona), 16-(4-morfolino)metileno- 6α -hidroxivouacapan- $7\beta,17\beta$ -lactona, 16-(1-piperidino)metileno- 6α -hidroxivouacapan- $7\beta,17\beta$ -lactona). Destes, os cinco primeiros são substâncias novas.

Para a obtenção dessas substâncias utilizou-se a reação de Mannich da HVL com sais de imínio pré-formados. Esses sais foram obtidos a partir das aminas geminais *N,N,N',N'*-tetraalquilmetilendiamina, também sintetizadas nesse trabalho.

Todas as substâncias obtidas foram caracterizadas por espectroscopia no infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C , envolvendo técnicas uni e bidimensionais.

As substâncias sintetizadas acima citadas, bem como a 6α -acetoxivouacapan- $7\beta,17\beta$ -lactona (AVL, **4**), foram submetidas a testes biológicos contra as linhagens de células humanas cancerígenas: melanoma (UACC-62), mama (MCF-7), ovário resistente a andriamicina (NCI-ADR/RES), rim (786-0), pulmão (NCI-H460), próstata (PC-3), ovário (OVCAR-03), cólon (HT-29) e leucemia eritromieloblastóide (K562).

Os resultados obtidos da atividade biológica foram utilizados para um estudo teórico sobre a relação estrutura química-atividade biológica, empregando cálculos DFT/BLYP/6-31G* para a obtenção dos parâmetros energia dos orbitais, população orbital e densidade eletrônica.

ABSTRACT

Keywords: furanoditerpenes, vouacapanes, obtention and structural analysis, Mannich reaction, antiproliferative activity, cancer, *Pterodon polygalaeiflorus* Benth.

This work focused on the isolation of the $6\alpha,7\beta$ -dihydroxyvouacapan- 17β -oic acid from *Pterodon polygalaeiflorus* Benth fruits, a plant also referred to as *sucupira branca*. Two lactones derivatives [6α -hydroxyvouacapan- $7\beta,17\beta$ -lactone (HVL) and 6-oxovouacapan- $7\beta,17\beta$ -lactone (POL)] were prepared from such plant natural product. Modifications in HVL structure yielded the following furan ring-substituted compounds: 16-(*N,N*-diethylamino)methylen- 6α -hydroxyvouacapan- $7\beta,17\beta$ -lactone, 16-(*N,N*-dipropylamino)methylen- 6α -hydroxyvouacapan- $7\beta,17\beta$ -lactone, 16-(*N,N*-diisobutylamino)methylen- 6α -hydroxyvouacapan- $7\beta,17\beta$ -lactone, 16-(1-pyrrolydino)methylen- 6α -hydroxyvouacapan- $7\beta,17\beta$ -lactone, 16-(4-morpholino)methylen- 6α -hydroxyvouacapan- $7\beta,17\beta$ -lactone, and 16-(1-piperidino)methylen- 6α -hydroxyvouacapan- $7\beta,17\beta$ -lactone. The first five mentioned compounds are novel in the literature.

The furan C16-substitued derivatives were synthesized from Mannich reactions of HVL with iminium salts, which were obtained from also synthesized germinal amines *N,N,N',N'*-tetra alkyl methylenediamine.

All compounds were structurally characterized by Infrared (IR) and one and two dimensional Nuclear Magnetic Resonance (^1H and ^{13}C NMR) spectroscopy analyses.

All synthesized compounds, together with 6α -acetoxyvouacapan- $7\beta,17\beta$ -lactone (AVL), were evaluated for the antiproliferative activity against the human cancer cell lines UACC-62 (melanoma), MCF-7 (breast), NCI-ADR/RES (ovarian expressing the resistance phenotype for adriamycin), 786-0 (kidney), NCI-H460 (lung, non-small cells), PC-3 (prostate), OVCAR-03 (ovarian), HT-29 (colon), and K562 (erythromyeloblastoid leukemia).

The antiproliferative activities parameters (TGI = concentration of compound that elicits total inhibition of cell growth) of the synthesized compounds were then, for a better understanding of the structure-activity relationship, utilized to a theoretical study about the chemical structure-biological activity relationship by employing DFT/BLYP/6-31G* calculations to obtain orbital energy, orbital population and electronic density parameters.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Espectro no IV de 2.1 em pastilha de KBr	26
Figura 2.2: Espectro no IV de 2.2 em pastilha de KBr	27
Figura 2.3: Espectro no IV de 2.3 em pastilha de KBr	28
Figura 2.4: Espectro no IV de 2.4 em pastilha de KBr	29
Figura 2.5: Espectro no IV de 2.5 em pastilha de KBr	30
Figura 2.6: Espectro no IV de 2.6 em pastilha de KBr	31
Figura 2.7: Espectro de RMN de ^1H de 2.1 (400 MHz, CDCl_3)	32
Figura 2.8: Espectros parciais de RMN de ^1H de 2.1 (400 MHz, CDCl_3) ...	32
Figura 2.9: Mapa de contornos COSY de 2.1 (400 MHz, CDCl_3)	33
Figura 2.10: Espectro de RMN de ^1H da HVL (CDCl_3 , 400 MHz)	35
Figura 2.11: (a) Espectro de RMN de ^{13}C e (b) subespectro DEPT 135° de 2.1 (100 MHz, CDCl_3)	36
Figura 2.12: (a) Espectro de RMN de ^{13}C e (b) subespectro DEPT 135° da HVL (50 MHz, CDCl_3)	36
Figura 2.13: Mapa de contornos HSQC de 2.1 (400 MHz, CDCl_3)	38
Figura 2.14: Mapa de contornos HMBC de 2.1 (400 MHz, CDCl_3)	38
Figura 2.15: Espectro de RMN de ^1H de 2.2 (400 MHz, CDCl_3)	40
Figura 2.16: Espectros parciais de RMN de ^1H de 2.2 (400 MHz, CDCl_3) ..	40
Figura 2.17: (a) Espectro de RMN de ^{13}C e (b) subespectro DEPT 135° de 2.2 (100 MHz, CDCl_3)	42
Figura 2.18: Mapa de contornos COSY de 2.2 (400 MHz, CDCl_3)	43
Figura 2.19: Mapa de contornos HSQC de 2.2 (400 MHz, CDCl_3)	43
Figura 2.20: Mapa de contornos HMBC de 2.2 (400 MHz, CDCl_3)	44
Figura 2.21: Espectro de RMN de ^1H de 2.3 (400 MHz, CDCl_3)	45
Figura 2.22: Espectros parciais de RMN de ^1H de 2.3 (400 MHz, CDCl_3) ...	45
Figura 2.23: (a) Espectro de RMN de ^{13}C e (b) subespectro DEPT 135° de 2.3 (100 MHz, CDCl_3)	47
Figura 2.24: Mapa de contornos COSY de 2.3 (400 MHz, CDCl_3)	48
Figura 2.25: Mapa de contornos HSQC de 2.3 (400 MHz, CDCl_3)	49
Figura 2.26: Mapa de contornos HMBC de 2.3 (400 MHz, CDCl_3)	49
Figura 2.27: Espectro de RMN de ^1H de 2.4 (400 MHz, CDCl_3)	50
Figura 2.28: Espectros parciais de RMN de ^1H de 2.4 (400 MHz, CDCl_3) ...	50

Figura 2.29: (a) Espectro de RMN de ^{13}C e (b) subespectro DEPT 135° de 2.4 (100 MHz, CDCl_3)	52
Figura 2.30: Mapa de contornos COSY de 2.4 (400 MHz, CDCl_3)	53
Figura 2.31: Mapa de contornos HSQC de 2.4 (400 MHz, CDCl_3)	53
Figura 2.32: Mapa de contornos HMBC de 2.4 (400 MHz, CDCl_3)	54
Figura 2.33: Espectro de RMN de ^1H de 2.5 (400 MHz, CDCl_3)	55
Figura 2.34: Espectros parciais de RMN de ^1H de 2.5 (400 MHz, CDCl_3) ...	55
Figura 2.35: (a) Espectro de RMN de ^{13}C e (b) subespectro DEPT 135° de 2.5 (100 MHz, CDCl_3)	57
Figura 2.36: Mapa de contornos COSY de 2.5 (400 MHz, CDCl_3)	58
Figura 2.37: Mapa de contornos HSQC de 2.5 (400 MHz, CDCl_3)	58
Figura 2.38: Mapa de contornos HMBC de 2.5 (400 MHz, CDCl_3)	59
Figura 2.39: Espectro de RMN de ^1H de 2.6 (400 MHz, CDCl_3)	60
Figura 2.40: Espectros parciais de RMN de ^1H de 2.6 (400 MHz, CDCl_3) ...	60
Figura 2.41: (a) Espectro de RMN de ^{13}C e (b) subespectro DEPT 135° de 2.6 (100 MHz, CDCl_3)	62
Figura 2.42: Mapa de contornos COSY de 2.6 (400 MHz, CDCl_3)	63
Figura 2.43: Mapa de contornos HSQC de 2.6 (400 MHz, CDCl_3)	63
Figura 2.44: Mapa de contornos HMBC de 2.6 (400 MHz, CDCl_3)	64
Figura 2.45: Desenvolvimento de células normais e de células com câncer	65
Figura 2.46: Porcentagem do crescimento de células de câncer humano [melanoma (UACC-62), mama (MCF-7), ovário expressando o fenótipo resistente a andriamicina (NCI-ADR/RES), rim (786-0), pulmão, <i>non-small cells</i> (NCI-H460), próstata (PC-3), ovário (OVCAR-03), cólon (HT-29) e leucemia eritromieloblastóide (K562)] após 48 h na presença de diferentes concentrações de (a) Doxorubicina e (b) ADV (1)	67
Figura 2.47: Porcentagem do crescimento de células de câncer humano [melanoma (UACC-62), mama (MCF-7), ovário expressando o fenótipo resistente a andriamicina (NCI-ADR/RES), rim (786-0), pulmão, <i>non-small cells</i> (NCI-H460), próstata (PC-3), ovário (OVCAR-03), cólon (HT-29) e leucemia eritromieloblastóide (K562)] após 48 h na presença de diferentes concentrações de (a) HVL (2), (b) POL (3) e (c) AVL (4)	68

Figura 2.48: Porcentagem do crescimento de células de câncer humano [melanoma (UACC-62), mama (MCF-7), ovário expressando o fenótipo resistente a andriamicina (NCI-ADR/RES), rim (786-0), pulmão, <i>non-small cells</i> (NCI-H460), próstata (PC-3), ovário (OVCAR-03), cólon (HT-29) e leucemia eritromieloblastóide (K562)] após 48 h na presença de diferentes concentrações de (a) DOX e (b) 2.1	71
Figura 2.49: Porcentagem do crescimento de células de câncer humano [melanoma (UACC-62), mama (MCF-7), ovário expressando o fenótipo resistente a andriamicina (NCI-ADR/RES), rim (786-0), pulmão, <i>non-small cells</i> (NCI-H460), próstata (PC-3), ovário (OVCAR-03), cólon (HT-29) e leucemia eritromieloblastóide (K562)] após 48 h na presença de diferentes concentrações de (a) 2.2 , (b) 2.3 e (c) 2.4	72
Figura 2.50: Porcentagem do crescimento de células de câncer humano [melanoma (UACC-62), mama (MCF-7), ovário expressando o fenótipo resistente a andriamicina (NCI-ADR/RES), rim (786-0), pulmão, <i>non-small cells</i> (NCI-H460), próstata (PC-3), ovário (OVCAR-03), cólon (HT-29) e leucemia eritromieloblastóide (K562)] após 48 h na presença de diferentes concentrações de (a) 2.5 e (b) 2.6	73
Figura 2.51: Variação de atividade antiproliferativa das células de (a) melanoma, (b) mama, (c) rim, (d) próstata, (e) leucemia, (f) cólon, (g) ovário resistente a andriamicina, (h) ovário e (i) pulmão em função da estrutura química das substâncias 2.1 , 2.2 e 2.3	79
Figura 2.52: Variação da energia do HOMO-1 em função da estrutura química das substâncias 2.1 , 2.2 e 2.3	81
Figura 2.53: Variação da densidade eletrônica sobre (a) O-7, (b) C-12, (c) C-13, (d) C-15, (e) C-16, (f) C-17 e (g) N em função da estrutura química das substâncias 2.1 , 2.2 e 2.3	82
Figura 2.54: Variação da população orbital de (a) C-12 e (b) C-16 para o HOMO, de (c) C-17, (d) O-7, (e) O-17 e (f) H-14 para o LUMO, e de (g) C-8, (h) C-13, (i) C-14 e (j) H-1' para o LUMO+1 em função da estrutura química das substâncias 2.1 , 2.2 e 2.3	83
Figura 2.55: Variação de energia de (a) LUMO e (b) LUMO+1 em função da estrutura das substâncias 2.1 , 2.2 e 2.3	84

Figura 2.56: Variação de população orbital de (a) C-12 e (b) C-16 para o HOMO-1, de (c) C-8, (d) C-12 e (e) C-16 para o LUMO, de (f) C-16 e (g) C-17 para o LUMO+1 em função da estrutura química das substâncias 2.1, 2.2 e 2.3	85
Figura 2.57: Variação da densidade eletrônica de (a) O-6, (b) O-16 e (c) do hidrogênio HO-6 em função da estrutura química das substâncias 2.1, 2.2 e 2.3	86
Figura 2.58: Variação da população orbital de (a) N para o HOMO, de (b) C-13 e (c) C-14 para o LUMO, de (d) O-17 para o LUMO+1 em função da estrutura química das substâncias 2.1, 2.2 e 2.3	87
Figura 2.59: Curvas da variação da atividade antiproliferativa das células de (a) melanoma, (b) cólon, (c) pulmão, (d) ovário resistente a andriamicina, (e) rim, (f) próstata, (g) leucemia, (h) mama e (i) ovário em função da estrutura química das substâncias 2.4, 2.5 e 2.6	89
Figura 2.60: Variação de densidade eletrônica de (a) C-15, (b) O-6, (c) O-7, (d) O-17, (e) N e de população orbital de (f) C-12 para o orbital LUMO em função da estrutura química das substâncias 2.4, 2.5 e 2.6	91
Figura 2.61: Variação da população orbital de C-16 no LUMO +1 em função da estrutura química das substâncias 2.4, 2.5 e 2.6	92
Figura 2.62: Variação da população orbital de C-14 para o orbital LUMO em função da estrutura química das substâncias 2.4, 2.5 e 2.6	93
Figura 2.63: Variação e energia dos orbitais (a) HOMO-1 e (b) HOMO em função da estrutura química das substâncias 2.4, 2.5 e 2.6	94
Figura 2.64: Variação da população orbital de (a) C-12, (b) C-13 e (c) C-16 para o HOMO-1, de (d) N para o HOMO, de (e) C-17, (f) O-7 e (g) O-17 para o LUMO e de (h) C-8 e (i) H-1' para o LUMO+1 e (j) variação da densidade eletrônica no hidrogênio de OH-6 em função da estrutura química das substâncias 2.4, 2.5 e 2.6	95
Figura 2.65: Representação dos orbitais moleculares HOMO-1 de (a) 2.1 , (b) 2.2 , (c) 2.3 , (d) 2.4 , (e) 2.5 e (f) 2.6	97
Figura 2.66: Representação dos orbitais moleculares HOMO de (a) 2.1 , (b) 2.2 , (c) 2.3 , (d) 2.4 , (e) 2.5 e (f) 2.6	98
Figura 2.67: Representação dos orbitais moleculares LUMO de (a) 2.1 ,	

(b) **2.2**, (c) **2.3**, (d) **2.4**, (e) **2.5** e (f) **2.6** 99

Figura 2.68: Representação dos orbitais moleculares LUMO+1 de (a) **2.1**,

(b) **2.2**, (c) **2.3**, (d) **2.4**, (e) **2.5** e (f) **2.6** 100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Rendimentos de obtenção e temperaturas de ebulição das aminas geminais	10
Tabela 1.2: Rendimentos e tempos de reação das sínteses das substâncias 16-(<i>N,N</i> -dialquilamino)metilênicos da HVL (2)	14
Tabela 2.1: Principais atribuições às bandas observadas na região do infravermelho de 2.1	26
Tabela 2.2: Principais atribuições às bandas observadas na região do infravermelho de 2.2	27
Tabela 2.3: Principais atribuições às bandas observadas na região do infravermelho de 2.3	28
Tabela 2.4: Principais atribuições às bandas observadas na região do infravermelho de 2.4	29
Tabela 2.5: Principais atribuições às bandas observadas na região do infravermelho de 2.5	30
Tabela 2.6: Principais atribuições às bandas observadas na região do infravermelho de 2.6	31
Tabela 2.7: Deslocamentos químicos e atribuições de RMN de ^1H de 2.1 (400 MHz, CDCl_3)	34
Tabela 2.8: Deslocamentos químicos e atribuições de RMN de ^{13}C de 2.1 (100 MHz, CDCl_3)	37
Tabela 2.9: Deslocamentos químicos e atribuições de RMN de ^1H de 2.2 (400 MHz, CDCl_3)	41
Tabela 2.10: Deslocamentos químicos e atribuições de RMN de ^{13}C de 2.2 (100 MHz, CDCl_3)	42
Tabela 2.11: Deslocamentos químicos e atribuições de RMN de ^1H de 2.3 (400 MHz, CDCl_3)	46
Tabela 2.12: Deslocamentos químicos e atribuições de RMN de ^{13}C de 2.3 (100 MHz, CDCl_3)	47
Tabela 2.13: Deslocamentos químicos e atribuições de RMN de ^1H de 2.4 (400 MHz, CDCl_3)	51
Tabela 2.14: Deslocamentos químicos e atribuições de RMN de ^{13}C de 2.4 (100 MHz, CDCl_3)	52

Tabela 2.15: Deslocamentos químicos e atribuições de RMN de ^1H de 2.5 (400 MHz, CDCl_3)	56
Tabela 2.16: Deslocamentos químicos e atribuições de RMN de ^{13}C de 2.5 (100 MHz, CDCl_3)	57
Tabela 2.17: Deslocamentos químicos e atribuições de RMN de ^1H de 2.6 (400 MHz, CDCl_3)	61
Tabela 2.18: Deslocamentos químicos e atribuições de RMN de ^{13}C de 2.6 (100 MHz, CDCl_3)	62
Tabela 2.19: Valor de GI_{50} , em $\mu\text{g/mL}$, da DOX, ADV (1), HVL (2), POL (3) e AVL (4) contra linhagens de células de câncer humano	69
Tabela 2.20: Valor de TGI, em $\mu\text{g/mL}$, da DOX, ADV (1), HVL (2), POL (3) e AVL (4) contra linhagens de células de câncer humano	70
Tabela 2.21: Valor de GI_{50} , em $\mu\text{g/mL}$, da DOX, HVL e das substâncias 2.1 a 2.6 contra linhagens de células de câncer humano	74
Tabela 2.22: Valor de TGI, em $\mu\text{g/mL}$, da DOX, HVL e das substâncias 2.1 a 2.6 contra linhagens de células de câncer humano	74

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
ADV	Ácido 6 α ,7 β -di-hidroxiouacapan-17 β -óico
ax	Axial
AVL	6 α -acetoxi-7 β ,17 β -lactona
CCD	Cromatografia em camada delgada
COSY	“Correlated spectroscopy”
δ	Deslocamento Químico (RMN)
l	sinal largo
DCM	Diclorometano
d	duplete
DEPT	Aumento sem distorção por transferência de polarização com pulso de 135° (<i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>)
dd	duplete duplo
ddd	duplo duplete duplo
ddl	duplete duplo largo
dl	duplete largo
DMSO	Dimetilsulfóxido
eq	Equatorial
HMBC	Correlação heteronuclear de múltiplas ligações (<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>)
HSQC	Transferência de coerência heteronuclear via simples quantum (<i>Heteronuclear single quantum coherence</i>)
HVL	6 α -hidroxiouacapan-7 β ,17 β -lactona
IV	Espectroscopia na região do Infra-vermelho
m	Multiplete
mult.	Multiplicidade
J	Constante de acoplamento escalar
$\bar{\nu}_{\max}$	Número de onda
η_D	Índice de refração
POL	6-oxouacapan-7 β ,17 β -lactona
qui	quinteto

RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	simpleto
t	triplete
tl	triplete largo

INTRODUÇÃO

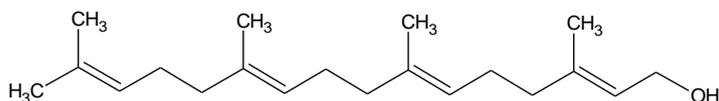
Na medicina popular, as partes de uma planta são utilizadas sob diversas formas para a prevenção e tratamento de várias doenças. Esse fato tem despertado grande interesse dos cientistas em isolar os constituintes bioativos dessas plantas e até mesmo em descobrir novos usos para elas. Dentre a vasta gama das plantas medicinais nativas utilizadas pela população brasileira apresentam-se aquelas do gênero *Pterodon*.

O gênero *Pterodon* compreende cinco espécies: *Pterodon abruptus* Benth, *Pterodon apparicioi* Pedersoli, *Pterodon emarginatus* Vog., *Pterodon pubescens* Benth e *Pterodon polygalaeflorus* Benth. Essas espécies são encontradas amplamente nas regiões de cerrado, entre os estados do Ceará e São Paulo, sendo popularmente conhecidas como faveiro ou sucupira branca (CORREA, 1978).

Os frutos da *Pterodon polygalaeflorus* Benth têm sido usados no tratamento de infecções de garganta e reumatismo, sob a forma de extratos alcoólicos, preparados comumente em vinho ou cachaça.

Estudos fitoquímicos do gênero *Pterodon* mostraram a presença de alcalóides na casca (TORRENEGRA, *et al.*, 1989), isoflavonas e alguns triterpenos na madeira (MARQUES *et al.*, 1998) e diterpenos e isoflavonas no óleo das sementes (BRAZ-FILHO e GOTTLIEB, 1971; ARRIAGA *et al.*, 2000; COELHO *et al.*, 2005).

Os óleos de frutos e de sementes da espécie *Pterodon pubescens* apresentam ação anti-cercária (SANTOS FILHO *et al.*, 1987; KATZ *et al.*, 1993), anti-artrite (SABINO *et al.*, 1999; COELHO *et al.*, 2001), anti-edematogênica (SILVA *et al.*, 2004) e antinociceptiva (COELHO *et al.*, 2005). O óleo da semente apresenta ainda atividade anti-*Trypanosoma cruzi*, sendo o geranilgeraniol o principal constituinte bioativo (MENNA-BARRETO *et al.*, 2008):

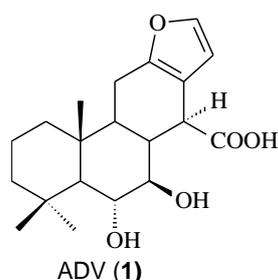


O extrato etanólico das sementes de *Pterodon pubescens* apresenta também propriedade antinociceptiva (LEAL *et al.*, 2000) e uma substância isolada de uma subfração ativa deste extrato inibe o crescimento de células de melanoma (VIEIRA *et al.*, 2008).

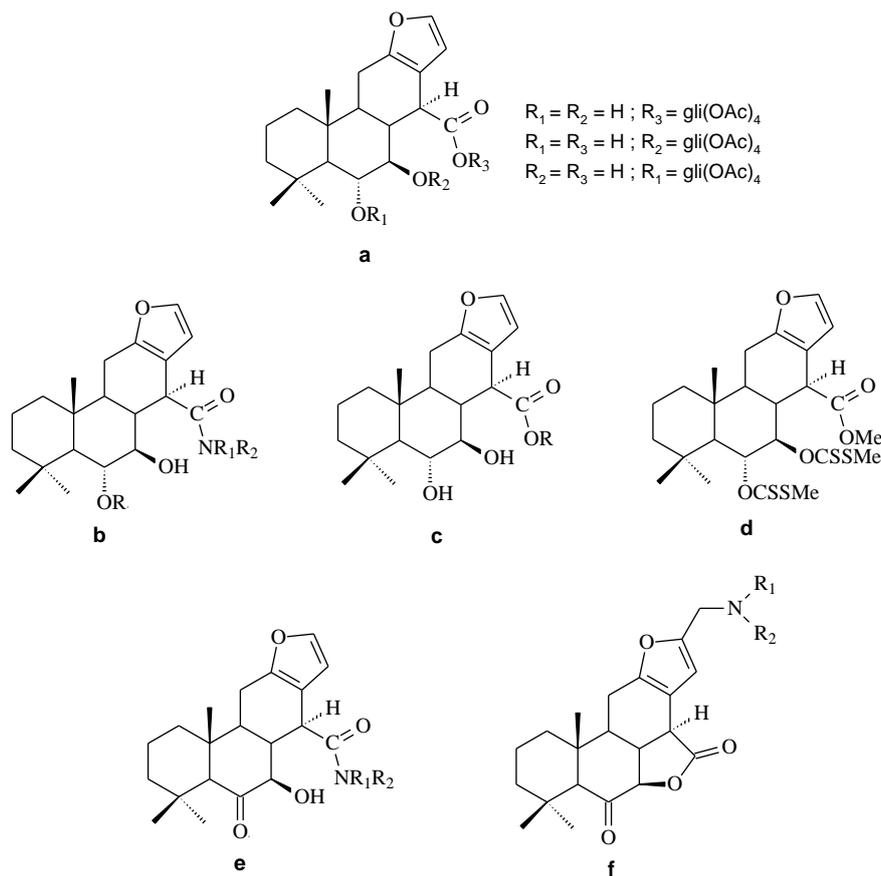
A literatura relata que o extrato hexânico bruto dos frutos de *Pterodon emarginatus* apresenta atividade anti-inflamatória (CARVALHO *et al.*, 1999).

Do óleo resultante da extração com hexano dos frutos de *Pterodon polygalaeflorus* foram isoladas substâncias que apresentaram efeito antinociceptivo (DUARTE *et al.*, 1996) e atividade larvicida sobre *Aedes aegypt* (PIMENTA *et al.*, 2006; DE OMENA *et al.*, 2006).

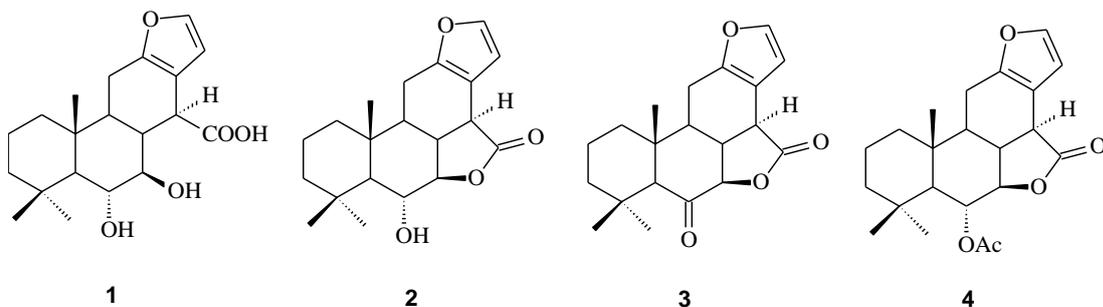
A partir do estudo do extrato hexânico dos frutos de *Pterodon polygalaeflorus* Benth, foi isolado o ácido 6 α ,7 β -di-hidroxivouacapan-17 β -óico (ADV, **1**), um furanoditerpeno que apresentou propriedade antiedematogênica em ensaios laboratoriais (NUNAN *et al.*, 1982), bem como efeitos analgésico e sedativo (NUNAN, 1985) e, ainda, atividade reguladora do crescimento de plantas (DEMUNEUR *et al.*, 1996; DEMUNER, 1996).



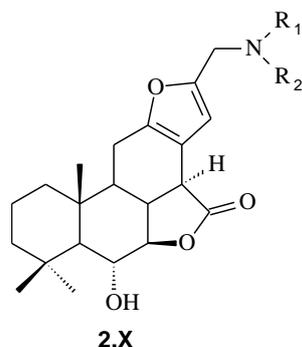
Isso motivou a síntese de alguns de seus derivados pelo nosso grupo de pesquisa (estruturas **a-f**, p. 3), para estudos comparativos quanto às suas propriedades farmacológicas (DUARTE *et al.*, 1992; NASSIF, 1996; DEMUNEUR *et al.*, 1998; BELINELO *et al.*, 2001). As atividades biológicas do ADV acima citadas foram verificadas também para diferentes derivados (NAKAMURA e FERREIRA-ALVES, 1986; CASTELO-BRANCO, 2001; BELINELO *et al.*, 2002; CASTELO-BRANCO *et al.*, 2008). Dentre esses, são apresentados na página 3 os derivados glicosilados (**a**) (MOREIRA, 1990), nitrogenados (**b**) (RUBINGER *et al.*, 1991b; RUBINGER, 1991a; MALTHA, 1994; MALTHA, *et al.*, 1997; CASTELO-BRANCO, 2001), esterificados (**c**) (SACRAMENTO, 1994; CASTELO-BRANCO *et al.*, 2006), sulfurado (**d**) (RUBINGER *et al.*, 2004), δ -ceto-amidas (**e**) (CASTELO-BRANCO, 2001; CASTELO-BRANCO *et al.*, 2006) e δ -ceto-lactonas (**f**) (SANTOS, 2003 e 2008; SANTOS *et al.*, 2007).



Considerando a atividade antitumoral relatada na literatura para o ADV (VIEIRA *et al.*, 2008), neste trabalho planejou-se estudar mais amplamente sua ação sobre células cancerígenas, bem como a de alguns de seus derivados. Para tanto, o ADV foi isolado dos frutos de *P. polygalaeiflorus* Benth e foram preparadas as lactonas derivadas **2** (6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona, HVL), **3** (6-oxovouacapan-7 β ,17 β -lactona, POL) e **4** (6-acetoxi-7 β ,17 β -lactona, AVL). Informações e discussão sobre o isolamento do ADV e sobre estas preparações encontram-se respectivamente nos Capítulos 1 (Materiais e Métodos) e 2 (Resultados e Discussão). Os resultados de testes da ação dessas substâncias sobre o crescimento de células de diferentes tipos de câncer humano estão descritos no Capítulo 2 e resultaram em publicação (EUZÉBIO *et al.*, 2009).



Como a lactona HVL (**2**) apresentou os resultados mais promissores, foram obtidos seus novos derivados, com substituição no anel furânico (**2.1** a **2.6**), cujas sínteses e caracterizações estruturais estão apresentadas nos Capítulos 1 e 2 e os resultados de testes da ação sobre células cancerígenas também são relatados no Capítulo 2.



2.1: $R_1 = R_2 = -CH_2CH_3$

2.4: R_1 e $R_2 = -CH_2CH_2CH_2CH_2-$

2.2: $R_1 = R_2 = (CH_2)_2CH_3$

2.5: R_1 e $R_2 = -CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$

2.3: $R_1 = R_2 = -CH_2CH(CH_3)_2$

2.6: R_1 e $R_2 = -CH_2CH_2OCH_2CH_2-$

Finalmente, visando relacionar as propriedades estruturais de todas as substâncias derivadas da HVL obtidas neste trabalho com os resultados de suas respectivas atividades nos testes sobre diferentes tipos de células cancerígenas, foram feitos estudos teóricos envolvendo cálculos de energia dos orbitais moleculares, cargas atômicas e densidade populacional para cada uma destas substâncias. Esses parâmetros foram analisados comparativamente aos respectivos dados da atividade antiproliferativa, conforme apresentado ao final do Capítulo 2.

CAPÍTULO 1: MATERIAIS E MÉTODOS

1.1. Técnicas e instrumentos

As pesagens foram feitas em balança analítica Mettler AE 166, com precisão de 0,0001 g. Os pontos de fusão, não corrigidos, foram determinados em aparelho Mettler FT80, com razão de aquecimento de 4 °C/min. Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro Perkin Elmer, modelo Spectrum100, com amostras incorporadas em KBr. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C foram obtidos em espectrômetros Bruker DPX 200 *AVANCE* e DRX 400 *AVANCE*. As análises elementares foram feitas em aparelho Perkin Elmer, modelo 2400 series II CHNS/O Analyser.

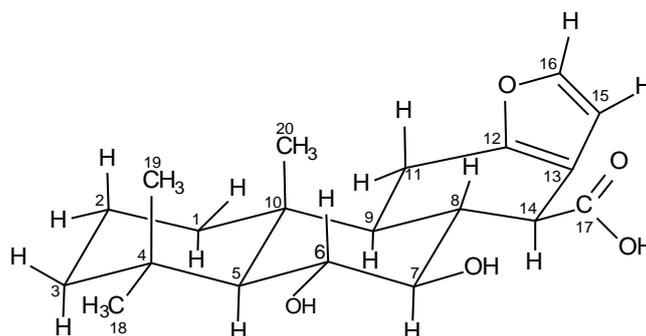
Para o acompanhamento das reações, placas de cromatografia em camada delgada (CCD) foram preparadas com uma mistura de sílica gel 60F₂₅₄ e 60G (1:3), empregando como reveladores luz UV de $\lambda = 254$ e 366 nm e iodo ressublimado. Para cromatografia em coluna (CC) foi utilizada sílica gel 60 de 70-230 mesh.

As aminas utilizadas foram tratadas com pastilhas de NaOH e destiladas. O tetra-hidrofurano (THF) foi tratado com sódio metálico sob refluxo na presença de benzofenona, até coloração azul, e destilado imediatamente antes do uso. O diclorometano (DCM) foi tratado com cloreto de cálcio e destilado. O DCM assim obtido foi agitado com pentóxido de fósforo, destilado e armazenado em peneira molecular de 4 Å. O dimetilsulfóxido (DMSO) foi mantido sob refluxo por 24 h em hidreto de cálcio, sendo destilado a pressão reduzida e armazenado em frasco contendo peneira molecular de 4 Å. Os demais solventes foram purificados segundo metodologia descrita por ARMAREGO e PERRIN (1988).

1.2. Isolamento do ácido 6 α ,7 β -di-hidroxivouacapan-17 β -óico (ADV, 1)

O ácido 6 α ,7 β -di-hidroxivouacapan-17 β -óico (ADV, 1) foi isolado em estado de pureza a partir do extrato hexânico dos frutos de *Pterodon polygalaeiflorus* Benth, conforme procedimento descrito por NUNAN (1985) e modificado por SANTOS (2008).

1.2.1. Dados físicos e químicos do ácido 6 α ,7 β -di-hidroxivouacapan-17 β -óico



Fórmula Molecular: C₂₀H₂₈O₅ (**Massa Molar:** 348,43 g/mol).

Aspecto: cristais brancos aciculares.

Solubilidade: THF, DMSO e piridina.

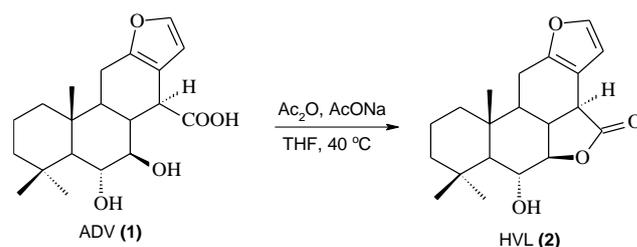
Faixa de Fusão: 266,8-267,7 °C (261 °C, NUNAN, 1985; 264,3-267,5 °C, SANTOS, 2008).

IV (KBr, cm⁻¹) $\bar{\nu}_{\max}$: 3501, 3428, 3142, 3120, 3010, 2987, 2922, 2863, 1717, 1654, 1512, 1476, 1445, 1442, 1409, 1391, 1359, 1284, 1250, 1218, 1200, 1189, 1167, 1092, 1056, 990, 981, 960, 901, 844, 834, 790, 742, 687, 649, 602 e 573.

RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆) δ_{H} (multiplicidade, número de hidrogênios, *J* (Hz); atribuição): 0,86-1,05 (m, 1H, H-1ax); 0,92 (s, 3H, H-20); 0,92-1,00 (m, 1H, H-5); 1,00 (s, 3H, H-19); 1,12-1,24 (m, 1H, H-3ax); 1,13 (s, 3H, H-18); 1,25-1,45 (m, 3H, H-2eq, H-3eq, e H-9); 1,45-1,66 (m, 2H, H-1eq e H-2ax); 2,11 (ddl, 1H, *J*₈₋₉ = 10,8 e *J*₈₋₇ = 9,3; H-8); 2,28 (m, 1H, H-11a); 2,54 (m, 1H, H-11b); 3,04 (dd, *J*₇₋₆ = 10,0 e *J*₇₋₈ = 9,3; H-7); 3,14 (dl, *J*₁₄₋₈ = 8,5; H-14); 3,36 (l, 1H, OH-7); 3,52 (m, 1H, H-6); 4,15 (l, 1H, OH-6); 6,16 (d, *J*₁₅₋₁₆ = 1,6; H-15); 7,42 (d, 1H, *J*₁₆₋₁₅ = 1,6; H-16) e 11,86 (l, 1H, OH-17).

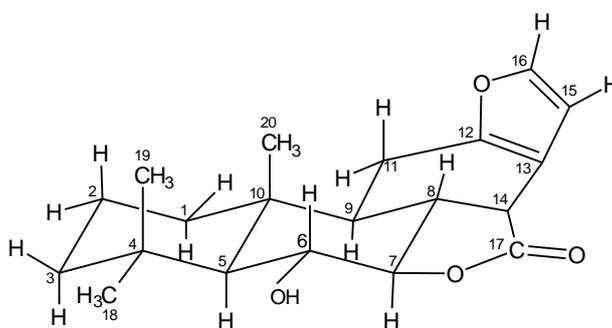
RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO-d₆) δ_{C} : 15,12 (C-20); 18,14 (C-2); 21,50 (C-11); 22,25 (C-19); 33,15 (C-4); 36,56 (C-18); 37,71 (C-10); 37,74 (C-1); 40,69 (C-8); 43,45 (C-3); 46,29 (C-14); 47,46 (C-9); 55,16 (C-5); 72,98 (C-6); 81,59 (C-7); 108,60 (C-15); 114,33 (C-13); 141,33 (C-16); 150,17 (C-12) e 175,30 (C-17).

1.3. Síntese da 6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (HVL, 2)



A 6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (HVL, 2) foi obtida a partir do ADV (1), conforme descrito por RUBINGER *et al.* (1991).

1.3.1. Dados físicos e químicos da 6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (HVL, 2)



Fórmula Molecular: C₂₀H₂₆O₄ (**Massa Molar:** 330,42 g/mol).

Aspecto: cristais brancos tabulares.

R_f: 0,20 (sílica gel/DCM).

Solubilidade: THF, DCM, DMSO, clorofórmio e acetona.

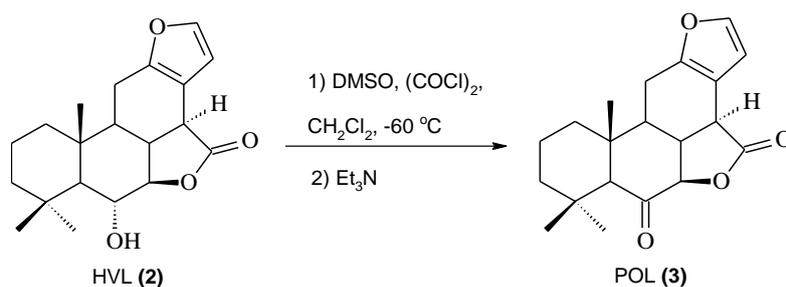
Faixa de Fusão: 225,1-226,6 °C (226,1-227,9 °C, RUBINGER *et al.*, 1991).

IV (KBr, cm⁻¹) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3498, 3017, 2982, 2954, 2930, 2913, 2863, 2823, 1768, 1626, 1600, 1499, 1459, 1439, 1387, 1385, 1364, 1348, 1305, 1286, 1255, 1208, 1181, 1165, 1131, 1120, 1092, 1064, 1036, 1020, 946, 903, 850, 828, 722, 705, 655, 641, 598 e 577.

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ_{H} (**multiplicidade, número de hidrogênios, J (Hz); atribuição**): 1,02 (s, 3H, H-20); 1,04-1,12 (m, 1H, H-1ax); 1,13 (s, 3H, H-19); 1,20-1,31 (m, 2H, H-3ax e H-5); 1,23 (s, 3H, H-18); 1,40-1,49 (m, 2H, H-2eq e H-3eq); 1,50-1,69 (m, 2H, H-1eq e H-2ax); 1,77 (ddd, 1H, $J_{9-8} = 13,4$; $J_{9-11\text{ax}} = 8,5$ e $J_{9-11\text{eq}} = 8,1$ H-9); 1,95-2,11 (m, 2H, H-8 e OH-6); 2,51 (ddl, 1H, $J_{11\text{ax}-11\text{eq}} = 17,6$ e $J_{11\text{ax}-9} = 8,5$ H-11ax); 2,66 (ddl, 1H, $J_{11\text{eq}-11\text{ax}} = 17,6$ e $J_{11\text{eq}-9} = 8,1$; H-11eq); 3,25 (dl, 1H, $J_{14-8} = 13,4$; H-14); 4,07-4,17 (m, 2H, H-6 e H-7); 6,58 (l, 1H, H-15) e 7,30 (l, 1H, H-16).

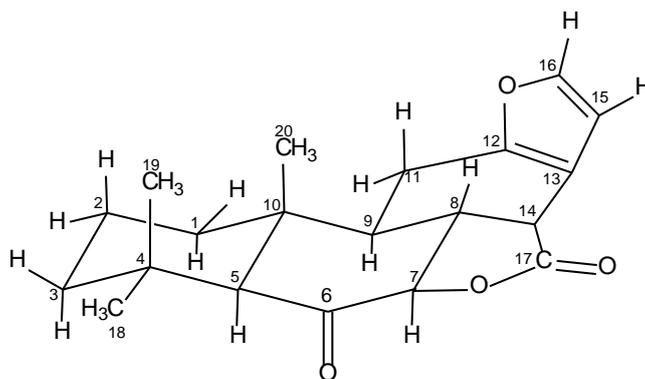
RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 15,61 (C-20); 18,07 (C-2); 21,78 (C-11); 22,89 (C-19); 34,11 (C-4); 36,89 (C-18); 39,14 (C-1); 40,59 (C-10); 41,65 (C-14); 44,06 (C-9); 44,10 (C-3); 45,47 (C-8); 57,88 (C-5); 71,95 (C-6); 87,92 (C-7); 107,71 (C-15); 113,51 (C-13); 141,63 (C-16); 152,34 (C-12) e 173,91 (C-17).

1.4. Síntese da 6-oxovouacapan-7 β ,17 β -lactona (POL, 3)



A 6-oxovouacapan-7 β ,17 β -lactona (POL, 3) foi obtida pela metodologia escrita por CASTELO-BRANCO (2001) e por KING-DÍAZ *et al.* (2006).

1.4.1. Dados físicos e químicos da 6-oxovouacapan-7 β ,17 β -lactona



Fórmula Molecular: $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_4$ (**Massa Molar:** 328,42 g/mol).

Aspecto: cristais brancos tabulares.

R_f : 0,50 (sílica gel/DCM).

Solubilidade: THF, DCM, DMSO, etanol, acetona e clorofórmio.

Faixa de Fusão: 268,3-271,3 $^\circ\text{C}$.

IV (KBr, cm^{-1}) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3531, 3440, 3127, 3011, 2983, 2935, 2915, 2854, 1791, 1731, 1598, 1580, 1498, 1468, 1462, 1440, 1391, 1365, 1341, 1337, 1293, 1237, 1193, 1187, 1159, 1127, 1114, 1091, 1038, 1031, 949, 928, 901, 884, 882, 849, 839, 831, 796, 734, 690, 670, 651, 641 e 599.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (multiplicidade, número de hidrogênios, J (Hz); atribuição): 0,99 (s, 6H, H-18 e H-20); 1,13 (tl, 1H, $J_{3\text{ax-}} = 13,5$; H-3ax); 1,24-1,35 (m, 1H, H-1ax); 1,36 (s, 3H, H-19); 1,43 (dl, 1H, $J_{3\text{eq-}} = 12,8$; H-3eq); 1,55 (quid, 1H, $J_{2\text{eq-}} = 3,6$ e $J_{2\text{eq-}} = 3,9$; H-2eq); 1,65 (tq, 1H, $J_{2\text{ax-}} = 13,5$ e $J_{2\text{ax-}} = 3,5$; H-2ax); 1,77 (dl, 1H, $J_{1\text{eq-}} = 12,9$; H-1eq); 2,17-2,34 (m, 3H, H-5, H-8 e H-9); 2,62 (ddl, 1H, $J_{11\text{ax-}} = 7,6$ e $J_{2\text{ax-}} = 7,5$; H-11ax); 2,81 (ddl, 1H, $J_{11\text{eq-}} = 17,8$ e $J_{11\text{eq-}} = 7,5$; 11-eq); 3,38-3,45 (m, 1H, H-14); 4,73 (dl, 1H, $J_{7-} = 11,3$; H-7); 6,59 (d, 1H, $J_{15-16} = 1,8$; H-15) e 7,31 (l, 1H, H-16).

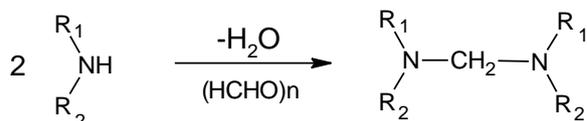
RMN de ^{13}C (200 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 15,02 (C-18); 17,94 (C-2); 21,86 (C-11); 22,09 (C-19); 32,92 (C-20); 32,94 (C-4); 38,60 (C-1); 42,02 (C-14); 42,53 (C-3); 45,00 (C-9); 46,30 (C-10); 49,90 (C-8); 63,47 (C-5); 83,49 (C-7); 107,59 (C-15); 113,17 (C-13); 142,03 (C-16); 151,78 (C-12); 171,69 (C-17) e 200,75 (C-6).

1.5. 6 α -acetoxi-7 β ,17 β -lactona (AVL, 4)

Para os estudos biológicos envolvendo a 6 α -acetoxi-7 β ,17 β -lactona (AVL, 4) foi utilizada uma amostra previamente sintetizada no laboratório e cedida gentilmente por Santos (SANTOS, 2008).

1.6. Síntese dos derivados 16-(*N,N*-dialquilamino)metilênicos da HVL

1.6.1. Síntese das aminas geminais



5.X

5.1: $\text{R}_1 = \text{R}_2 = -\text{CH}_2\text{CH}_3$

5.2: $\text{R}_1 = \text{R}_2 = (\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$

5.3: $\text{R}_1 = \text{R}_2 = -\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

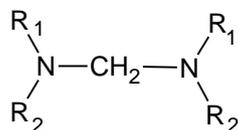
5.4: R_1 e $\text{R}_2 = -\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$

5.5: R_1 e $\text{R}_2 = -\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$

5.6: R_1 e $\text{R}_2 = -\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2-$

As amins geminais **5.1** a **5.6** foram obtidas segundo metodologia descrita por BELINELO (2002) e SANTOS (2003). A Tabela 1.1 apresenta os rendimentos dessas reações e as temperaturas de ebulição das amins obtidas.

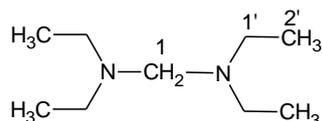
Tabela 1.1: Rendimentos de obtenção e temperaturas de ebulição das amins geminais



5.X

Amina	R ₁	R ₂	T _{eb} /pressão (mmHg)	Rendimento (%)
5.1	-CH ₂ CH ₃	-CH ₂ CH ₃	162° / 760	75,19
5.2	-(CH ₂) ₂ CH ₃	-(CH ₂) ₂ CH ₃	167° / 760	74,44
5.3	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	181-183 / 75	76,23
5.4	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ -		121-123 / 60	71,06
5.5	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ -		161-162 / 75	75,84
5.6	-CH ₂ CH ₂ OCH ₂ CH ₂ -		161-163 / 60	74,85

1.6.1.1. Dados físicos e químicos de bis(dietilamino)metano (5.1)



Fórmula Molecular: C₉H₂₂N₂ (**Massa Molar:** 158,28 g/mol).

Aspecto: líquido incolor.

Índice de refração: 1,4243 (23 °C).

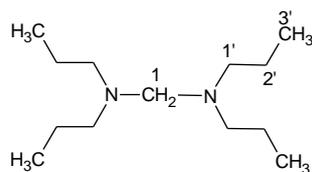
Faixa de ebulição: 162,0 °C (760 mm Hg).

IV (KBr, cm⁻¹) $\bar{\nu}_{max}$: 2962, 2929, 2870, 2794, 2572, 1472, 1450, 1394, 1376, 1345, 1295, 1201, 1180, 1105, 1060, 985, 984, 967, 894, 812 e 771.

RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) δ_H (multiplicidade, número de hidrogênios, J, atribuição): 0,83 (t, 12H, J_{2'-1'} = 7,2; H-2'); 2,40 (quart., 8H, J_{1'-2'} = 7,2; H-1') e 2,88 (s, 2H, H-1).

RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) δ_C : 11,62 (C-2'); 44,75 (C-1') e 77,13 (C-1).

1.6.1.2. Dados físicos e químicos de bis(dipropilamino)metano (5.2)



Fórmula Molecular: C₁₃H₃₀N₂ (**Massa Molar:** 214,39 g/mol).

Aspecto: líquido incolor.

Índice de refração: 1,4340 (25 °C).

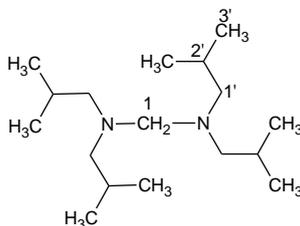
Faixa de ebulição: 167,0 °C (760 mm Hg).

IV (KBr, cm⁻¹) $\bar{\nu}_{\max}$: 2956, 2930, 2870, 2787, 2730, 2663, 1463, 1404, 1377, 1338, 1294, 1272, 1255, 1191, 1170, 1072, 1033, 990, 922, 883, 843 e 743.

RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) δ_{H} (multiplicidade, número de hidrogênios, *J* (Hz); atribuição): 0,81 (t, 12H, *J*_{3'-2'} = 7,2; H-3'); 1,36 (sex., 8H, *J*_{2'-1'} = *J*_{2'-3'} = 7,2; H-2'); 2,36 (t, 8H, *J*_{1'-2'} = 7,2; H-1') e 2,94 (s, 2H, H-1).

RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) δ_{C} : 11,87 (C-3'); 20,39 (C-2'); 54,18 (C-1') e 75,80 (C-1).

1.6.1.3. Dados físicos e químicos de bis(diisobutilamino)metano (5.3)



Fórmula Molecular: C₁₇H₃₈N₂ (**Massa Molar:** 270,50 g/mol).

Aspecto: líquido incolor.

Índice de refração: 1,4340 (29 °C).

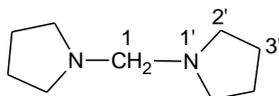
Faixa de Ebulição: 181-183 °C (75 mm Hg).

IV (KBr, cm⁻¹) $\bar{\nu}_{\max}$: 2952, 2902, 2868, 2831, 2789, 1467, 1396, 1385, 1364, 1334, 1294, 1274, 1202, 1171, 1123, 1096, 1076, 1022, 961, 957, 930, 918, 852, 846 e 822.

RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) δ_{H} (multiplicidade, número de hidrogênios, *J* (Hz); atribuição): 0,92 (d, 24H, *J*_{3'-2'} = 6,7; H-3'); 1,70-1,90 (m, 4H, H-2'); 2,19 (d, 8H, *J*_{1'-2'} = 7,3; H-1') e 2,93 (s, 2H, H-1).

RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) δ_{C} : 21,47 (C-4'); 26,61 (C-3'); 62,38 (C-2') e 78,73 (C-1).

1.6.1.4. Dados físicos e químicos de dipirrolidinometano (5.4)



Fórmula Molecular: C₉H₁₈N₂ (**Massa Molar:** 154,25 g/mol).

Aspecto: líquido incolor.

Índice de refração: 1,4755 (25 °C).

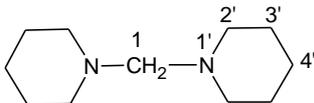
Faixa de Ebulição: 121-123 °C (60 mm Hg).

IV (KBr, cm⁻¹) $\bar{\nu}_{\max}$: 2962, 2905, 2873, 2778, 2775, 2701, 1479, 1459, 1401, 1344, 1320, 1278, 1237, 1207, 1157, 1041, 959, 940, 900 e 879.

RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) δ_{H} (multiplicidade, número de hidrogênios, atribuição): 1,09-1,16 (m, 8H, H-3'); 1,91-1,97 (m, 8H, H-2') e 2,56 (s, 2H, H-1).

RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) δ_{C} : 22,24 (C-3'); 51,59 (C-2') e 75,97 (C-1).

1.6.1.5. Dados físicos e químicos de dipiperidinometano (5.5)



Fórmula Molecular: C₁₁H₂₂N₂ (**Massa Molar:** 182,31 g/mol).

Aspecto: líquido incolor.

Índice de refração: 1,4810 (25 °C).

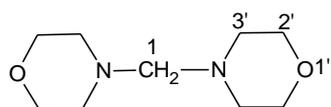
Faixa de Ebulição: 161-162 °C (75 mm Hg).

IV (KBr, cm⁻¹) $\bar{\nu}_{\max}$: 2929, 2851, 2770, 2665, 2610, 1468, 1441, 1412, 1368, 1348, 1324, 1295, 1261, 1233, 1216, 1163, 1131, 1078, 1039, 1024, 1004, 963, 864 e 782.

RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) δ_{H} (multiplicidade, número de hidrogênios, atribuição): 1,15-1,29 (m, 12H, H-3' e H-4'); 2,10-2,15 (m, 8H, H-2'; m) e 2,51 (s, 2H, H-1).

RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) δ_{C} : 24,54 (C-4'); 25,45 (C-3'); 52,38 (C-2') e 82,21 (C-1).

1.6.1.6. Dados físicos e químicos de dimorfolinometano (5.6)



Fórmula Molecular: C₉H₁₈N₂O₂ (**Massa Molar:** 186,25 g/mol).

Aspecto: líquido incolor.

Índice de refração: 1,4775 (25 °C).

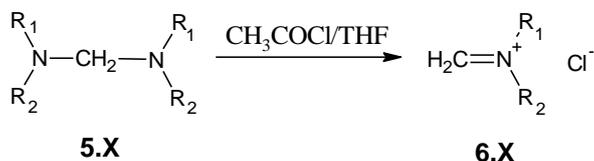
Faixa de Ebulição: 161-163 °C (60 mm Hg).

IV (KBr, cm⁻¹) $\bar{\nu}_{\max}$: 2955, 2914, 2891, 2849, 2792, 2678, 1454, 1413, 1355, 1331, 1312, 1281, 1259, 1244, 1205, 1184, 1150, 1114, 1071, 1022, 1018, 1005, 928, 905, 867 e 796.

RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) δ_H (**multiplicidade, número de hidrogênios, J (Hz); atribuição**): 2,39 (t, 8H, $J_{3'-2'} = 4,7$; H-3'); 2,80 (s, 2H, H-1) e 3,58 (t, 8H, $J_{2'-3'} = 4,7$; H-2').

RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) δ_C : 50,99 (C-3'); 65,67 (C-2') e 80,64 (C-1).

1.6.2. Reações com sais de imínio pré-formados



X = 1 - R₁ = R₂ = -CH₂CH₃

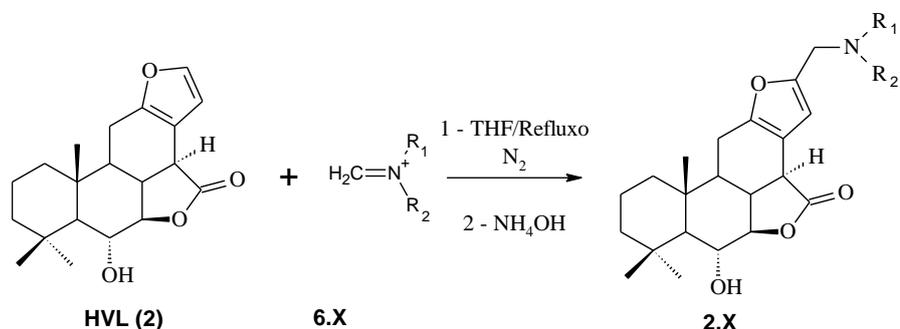
2 - R₁ = R₂ = (CH₂)₂CH₃

3 - R₁ = R₂ = -CH₂CH(CH₃)₂

4 - R₁ e R₂ = -CH₂CH₂CH₂CH₂-

5 - R₁ e R₂ = -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-

6 - R₁ e R₂ = -CH₂CH₂OCH₂CH₂-



2.1: R₁ = R₂ = -CH₂CH₃

2.2: R₁ = R₂ = (CH₂)₂CH₃

2.3: R₁ = R₂ = -CH₂CH(CH₃)₂

2.4: R₁ e R₂ = -CH₂CH₂CH₂CH₂-

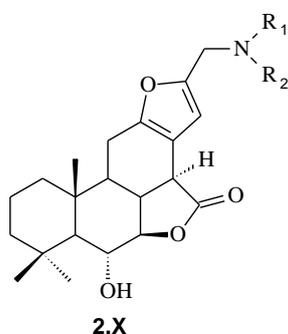
2.5: R₁ e R₂ = -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-

2.6: R₁ e R₂ = -CH₂CH₂OCH₂CH₂-

Procedimento Geral

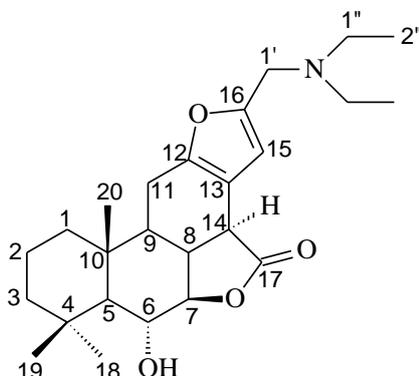
Em um balão tri-tubulado de 50,0 mL, acoplado a um funil de adição e condensador com tubo de cloreto de cálcio, foram adicionados, sob agitação magnética e atmosfera de N₂, 1 mmol do derivado bis(dialquilamino)metano (**5.1** a **5.6**) e, lentamente, solução de 1 mmol de cloreto de acetila em 10 mL de THF anidro. Após precipitação do cloreto de dialquilmetilenímínio correspondente, foi adicionado 1 mmol de HVL (**2**), mantendo a mistura de reação sob refluxo por 2,83 a 3,62 h. O consumo de HVL (**2**) foi verificado por CCD e, quando este se manteve constante, a reação foi considerada como terminada. À mistura de reação foi adicionada água e o THF foi evaporado em rotavapor. O sólido precipitado foi isolado por filtração e, posteriormente, identificado como sendo a HVL (**2**) que não reagiu. À água-mãe adicionou-se solução de hidróxido de amônio 25% até pH 8, fazendo com que o produto desejado precipitasse. A solução foi então filtrada. Os rendimentos e tempos de reação são apresentados na Tabela 1.2.

Tabela 1.2: Rendimentos e tempos de reação das sínteses das substâncias 16-(*N,N*-dialquilamino)metilênicos da HVL (**2**)



Substância	R ₁	R ₂	Rendimento (%)	Tempo de reação (h)
2.1	-CH ₂ CH ₃	-CH ₂ CH ₃	71	2,83
2.2	-(CH ₂) ₂ CH ₃	-(CH ₂) ₂ CH ₃	68	3,00
2.3	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	62	3,33
2.4	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ -		66	3,30
2.5	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ -		84	3,50
2.6	-CH ₂ CH ₂ OCH ₂ CH ₂ -		55	3,62

1.6.2.1. Dados físicos e químicos de 16-(*N,N*-dietilamino)metileno-6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (2.1)



Fórmula Molecular: C₂₅H₃₇NO₄ (**Massa Molar:** 415,57).

Análise Elementar: Experimental - C: 69,89 %; H: 8,25 %; N: 3,59 %.

Calculado - C: 72,26 %; H: 8,97 %; N: 3,37 %.

Aspecto: sólido branco.

Solubilidade: clorofórmio, DMSO e etanol.

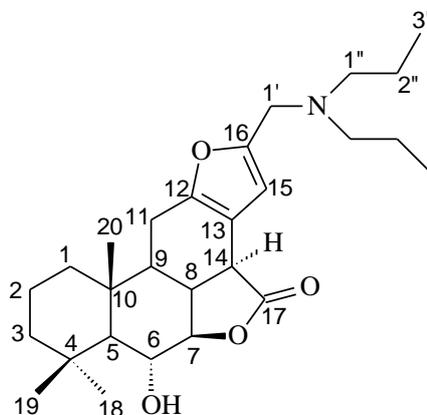
Faixa de Fusão: 159,3-162,1 °C.

IV (KBr, cm⁻¹) $\bar{\nu}_{\max}$: 3421, 2970, 2923, 2873, 2849, 1781, 1460, 1386, 1367, 1208, 1140, 1096, 1050, 978, 946, 903, 862, 840, 771, 734, 703, 642 e 580.

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ_{H} (multiplicidade, número de hidrogênios, *J* (Hz); atribuição): 1,01 (s, 3H, H-20); 1,06-1,10 (m, 1H, H-1ax); 1,08 (t, 6H, *J*_{2''-1''} = 7,0; H-2''); 1,13 (s, 3H, H-19); 1,23 (s, 3H, H-18); 1,23-1,30 (m, 2H, H-3ax e H-5); 1,45 (dl, 2H, *J*_{2eq-3eq} = *J*_{3eq-2eq} = 11,4, H-2eq e H-3eq); 1,53-1,63 (m, 2H, H-1eq e H-2ax); 1,71-1,76 (m, 1H, H-9); 1,99-2,11 (m, 1H, H-8); 2,11 (s, 1H, OH); 2,47-2,58 (m, 1H, H-11 α); 2,56 (q, 4H, *J*_{1''-2''} = 7,2; H-1''); 2,64 (dd, 1H, *J*_{11 β -11 α} = 17,8; *J*_{11 β -9} = 8,2; H-11 β); 3,21 (d, 1H, *J*₁₄₋₈ = 13,2; H-14); 3,62 (s, 2H, H-1'); 4,07-4,14 (m, 2H, H-6 e H-7) e 6,39 (s, 1H, H-15).

RMN de ¹³C (200 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 11,54 (C-2''); 15,65 (C-20); 18,11 (C-2); 21,90 (C-11); 22,92 (C-19); 34,14 (C-4); 36,93 (C-18); 39,20 (C-1); 40,62 (C-10), 41,78 (C-14); 44,17 (C-9); 44,17 (C-3); 45,44 (C-8); 46,97 (C-1'); 48,86 (C-1''); 57,95 (C-5); 71,90 (C-6); 88,05 (C-7); 106,95 (C-15); 113,96 (C-13); 151,19 (C-16); 151,89 (C-12) e 174,08 (C-17).

1.6.2.2. Dados físicos e químicos de 16-(*N,N*-dipropilamino)metileno-6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (2.2)



Fórmula Molecular: C₂₇H₄₁NO₄ (**Massa Molar:** 443,62).

Análise Elementar: Experimental - C: 73,21 %; H: 8,63 %; N: 3,47 %.

Calculado - C: 73,10 %; H: 9,32 %; N: 3,16 %.

Aspecto: sólido branco.

Solubilidade: clorofórmio, DMSO e etanol.

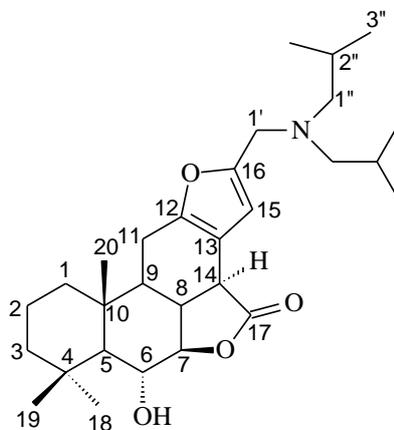
Faixa de Fusão: 166,8-169,5 °C.

IV (KBr, cm⁻¹) $\bar{\nu}_{\max}$: 3476, 2951, 2931, 2871, 2850, 2817, 1780, 1467, 1383, 1366, 1096, 975, 954, 838, 817, 729 e 581.

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ_H (multiplicidade, número de hidrogênios, *J* (Hz); atribuição): 0,87 (t, 6H, $J_{3''-2''} = 7,3$; H-3''); 1,01 (s, 3H, H-20); 1,08-1,13 (m, 1H, H-1ax); 1,13 (s, 1H, H-19); 1,23 (s, 3H, H-18); 1,23-1,31 (m, 1H, H-5); 1,25-1,31 (m, 1H, H-3ax); 1,44-1,53 (m, 6H, H-2eq, H-3eq e H-2''); 1,57-1,64 (m, 2H, H-1eq e H-2ax); 1,73-1,78 (m, 1H, H-9); (2,00-2,09 (m, 1H, H-8); 2,21 (l, 1H, OH); 2,39 (t, 4H, $J_{1''-2''} = 7,7$; H-1''); 2,50 (dd, 1H, $J_{11\alpha-11\beta} = 17,3$; $J_{11\alpha-9} = 8,6$; H-11 α); 2,64 (dd, 1H, $J_{11\beta-11\alpha} = 17,3$; $J_{11\beta-9} = 8,3$; H-11 β); 3,22 (d, 1H, $J_{14-8} = 13,3$; H-14); 3,58 (s, 2H, H-1'); 4,06-4,15 (m, 2H, H-6 e H-7) e 6,35 (s, 1H, H-15).

RMN de ¹³C (200 MHz, CDCl₃) δ_C : 12,17 (C-3''); 15,93 (C-20); 18,68 (C-2''); 18,38 (C-2); 22,15 (C-11); 23,19 (C-19); 34,40 (C-4); 37,19 (C-18); 39,44 (C-1); 40,90 (C-10); 42,10 (C-14); 44,44 (C-3 e C-9); 45,69 (C-8); 50,44 (C-1'); 56,03 (C-1''); 58,21 (C-5); 72,23 (C-6); 88,28 (C-7); 106,64 (C-15); 114,14 (C-13); 151,76 (C-12); 152,37 (C-16) e 174,35 (C-17).

1.6.2.3. Dados físicos e químicos de 16-(*N,N*-diisobutilamino)metileno-6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (2.3)



Fórmula Molecular: C₂₉H₄₅NO₄ (**Massa Molar:** 471,67).

Análise Elementar: Experimental - C: 72,36 %; H: 9,05 %; N: 3,17 %.

Calculado - C: 73,85 %; H: 9,62 %; N: 2,97 %.

Aspecto: sólido branco.

Solubilidade: clorofórmio, DMSO e etanol.

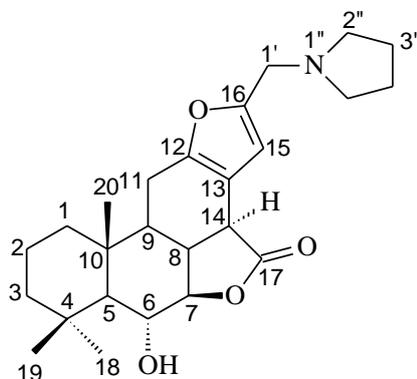
Faixa de Fusão: 160,4-162,9 °C.

IV (KBr, cm⁻¹) $\bar{\nu}_{\max}$: 3423, 3011, 2922, 2868, 2849, 1782, 1459, 1354, 1298, 1205, 1115, 1093, 1049, 1007, 950, 919, 902, 861, 705, 644 e 581.

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ_{H} (multiplicidade, número de hidrogênios, *J* (Hz); atribuição): 0,86 (d, 12H, *J*_{3''2''} = 6,6; H-3''); 1,01 (s, 3H, H-20); 1,11 (s, 3H, H-19); 1,11-1,13 (m, 1H, H-1ax); 1,23 (s, 3H, H-18); 1,23-1,26 (m, 1H, H-5); 1,27-1,31 (m, 1H, H-3ax); 1,44-1,47 (m, 2H, H-2eq e H-3eq); 1,53-1,57 (m, 1H, H-2ax); 1,61-1,64 (m, 1H, H-1eq); 1,69-1,79 (m, 3H, H-9 e H-2''); 2,00-2,07 (m, 1H, H-8); 2,12 (d, 4H, *J*_{1''2''} = 7,3; H-1''); 2,13 (l, 1H, OH); 2,48 (dd, 1H, *J*_{11 α -11 β} = 17,5; *J*_{11 α -9} = 8,8; H-11 α); 2,63 (dd, 1H, *J*_{11 β -11 α} = 8,3; *J*_{11 β -9} = 17,5; H-11 β); 3,24 (d, 1H, *J*₁₄₋₈ = 13,3; H-14); 3,53 (s, 4H, H-1'); 4,06-4,15 (m, 2H, H-6 e H-7) e 6,32 (s, 1H, H-15).

RMN de ¹³C (200 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 15,66 (C-20); 18,13 (C-2); 20,78 (C-3''); 21,87 (C-11); 22,93 (C-19); 26,45 (C-2''); 34,15 (C-4); 36,92 (C-18); 39,19 (C-1); 40,65 (C-10); 41,88 (C-14); 44,17 (C-3); 44,21 (C-9); 45,44 (C-8); 50,93 (C-1'); 57,96 (C-5); 62,97 (C-1''); 72,04 (C-6); 87,00 (C-7); 105,89 (C-15); 113,79 (C-13); 150,99 (C-12); 152,78 (C-16) e 174,09 (C-17).

1.6.2.4. Dados físicos e químicos de 16-(1-pirrolidino)metileno-6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (2.4)



Fórmula Molecular: C₂₅H₃₅NO₄ (**Massa Molar:** 413,55).

Análise Elementar: Experimental - C: 72,24 %; H: 8,11 %; N: 3,72 %.

Calculado - C: 72,61 %; H: 8,53 %; N: 3,39 %.

Aspecto: sólido branco.

Solubilidade: clorofórmio, DMSO e etanol.

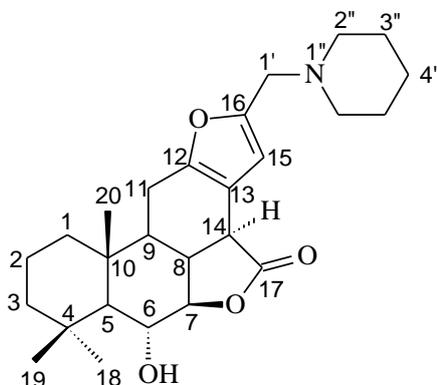
Faixa de Fusão: 110,3-112,7 °C.

IV (KBr, cm⁻¹) $\bar{\nu}_{\max}$: 3423, 2927, 2874, 2846, 2806, 1785, 1627, 1560, 1460, 1389, 1365, 1348, 1211, 1119, 1096, 1049, 944, 901, 874, 860, 839, 816, 733, 704, 670, 657, 642 e 581.

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ_{H} (multiplicidade, número de hidrogênios, *J* (Hz); atribuição): 1,00 (s, 3H, H-20); 1,07-1,12 (m, 1H, H-1ax); 1,12 (s, 3H, H-19); 1,17-1,30 (m, 1H, H-5); 1,23 (s, 3H, H-18); 1,23-1,30 (m, 1H, H-3ax); 1,43-1,46 (dl, 2H, *J*_{2eq-3eq} = *J*_{3eq-2eq} = 11,0; H-2eq e H-3eq); 1,53-1,62 (m, 2H, H-1eq e H-2ax); 1,72-1,80 (m, 5H, H-9 e H-3''); 1,94-2,05 (m, 2H, H-8 e OH); 2,47-2,67 (m, 6H, H-11 α , H-11 β e H-2''); 3,20 (d, *J*₁₄₋₈ = 13,0; H-14); 3,60 (s, 2H, H-1'); 4,10 (l, 2H, H-6 e H-7) e 6,40 (s, 1H, H-15).

RMN de ¹³C (200 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 15,93 (C-1); 18,07 (C-2); 21,81 (C-11); 22,86 (C-19); 23,37 (C-3''); 34,09 (C-4); 36,89 (C-18); 39,12 (C-1); 40,56 (C-10); 41,72 (C-14); 44,06 (C-9); 44,14 (C-3); 45,42 (C-8); 52,07 (C-1'); 53,78 (C-2''); 57,92 (C-5); 71,77 (C-6); 87,00 (C-7); 106,21 (C-15); 113,93 (C-13); 151,61 (C-16); 151,89 (C-12) e 174,04 (C-17).

1.6.2.5. Dados físicos e químicos de 16-(1-piperidino)metileno-6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (2.5)



Fórmula Molecular: C₂₆H₃₇NO₄ (**Massa Molar:** 427,58).

Análise Elementar: Experimental - C: 71,42 %; H: 8,01 %; N: 3,18 %.

Calculado - C: 73,03 %; H: 8,72 %; N: 3,28 %.

Aspecto: sólido branco.

Solubilidade: clorofórmio, DMSO e etanol.

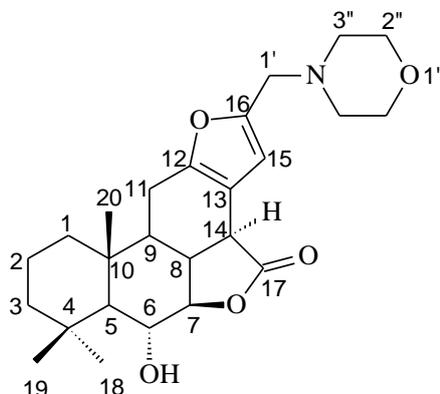
Faixa de Fusão: 117,7-118,9 °C.

IV (KBr, cm⁻¹) $\bar{\nu}_{\max}$: 3417, 3005, 2933, 2869, 2846, 2810, 2767, 1785, 1444, 1391, 1365, 1344, 1302, 1209, 1112, 1095, 1046, 977, 946, 903, 860, 786, 706, 643 e 582.

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ_{H} (multiplicidade, número de hidrogênios, *J* (Hz); atribuição): 1,01 (s, 3H, H-20); 1,08-1,13 (m, 2H, H-1ax e H-3ax); 1,13 (s, 4H, H-19 e H-3ax); 1,24 (s, 3H, H-18); 1,24-1,30 (m, 1H, H-5); 1,43-1,46 (m, 4H, H-2eq, H-3eq e H-4''); 1,53-1,56 (m, 1H, H-2ax); 1,60-1,64 (m, 5H, H-1eq e H-3''); 1,71-1,78 (m, 1H, H-9); 1,99-2,08 (m, 1H, H-8); 2,46-2,54 (m, 5H, H-11 α e H-2''); 2,66 (dd, 1H, *J*_{11 β -11 α} = 17,4; *J*_{11 β -9} = 8,0; H-11 β); 2,79 (l, 1H, OH); 3,22 (d, 1H, *J*₁₄₋₈ = 13,3; H-14); 3,51 (s, 2H, H-1'); 4,10-4,13 (m, 2H, H-6 e H-7) e 6,42 (s, 1H, H-15).

RMN de ¹³C (200 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 15,67 (C-20); 18,12 (C-2); 21,93 (C-11); 22,93 (C-19); 23,91 (C-4''); 25,45 (C-3''); 34,14 (C-4); 36,94 (C-18); 39,18 (C-1); 40,62 (C-10); 41,76 (C-14); 44,13 (C-9); 44,18 (C-3); 45,44 (C-8); 53,98 (C-2''); 55,50 (C-1'); 57,95 (C-5); 71,86 (C-6); 88,03 (C-7); 107,65 (C-15); 114,05 (C-13); 150,35 (C-16); 152,18 (C-12) e 174,04 (C-17).

1.6.2.6. Dados físicos e químicos de 16-(4-morfolino)metileno-6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (2.6)



Fórmula Molecular: C₂₅H₃₅NO₅ (**Massa Molar:** 429,55).

Análise Elementar: Experimental - C: 68,12 %; H: 7,65 %; N: 3,25 %.

Calculado - C: 69,90 %; H: 8,21 %; N: 3,26 %.

Aspecto: sólido branco.

Solubilidade: clorofórmio, DMSO e etanol.

Faixa de Fusão: 112,4-114,7 °C.

IV (KBr, cm⁻¹) $\bar{\nu}_{\max}$: 3491, 3019, 2958, 2932, 2872, 2846, 2809, 2741, 1774, 1468, 1461, 1389, 1366, 1309, 1288, 1208, 1189, 1166, 1137, 1116, 1096, 1046, 1020, 972, 946, 905, 892, 862, 837, 813, 725, 706, 664, 644, 583, 556, 521 e 485.

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ_{H} (multiplicidade, número de hidrogênios, *J* (Hz); atribuição): 1,01 (s, 3H, H-20); 1,08-1,13 (m, 1H, H-1 α); 1,13 (s, 3H, H-19); 1,23 (s, 3H, H-18; s); 1,23-1,30 (m, 2H, H-3 α e H-5); 1,45 (dl, 2H, $J_{2\text{eq}-3\text{eq}} = J_{3\text{eq}-2\text{eq}} = 11,4$; H-2 eq e H-3 eq); 1,53-1,63 (m, 2H, H-1 eq e H-2 α); 1,71-1,78 (m, 1H, H-9); 1,98-2,07 (m, 1H, H-8); 2,31 (l, 1H, OH); 2,48-2,54 (m, 5H, H-11 α e H-3''); 2,65 (dd, 1H, $J_{11\beta-11\alpha} = 18,2$; $J_{11\beta-9} = 7,8$; H-11 β); 3,21 (d, 1H, $J_{14-8} = 13,1$; H-14); 3,48 (s, 2H, H-1'); 3,73 (l, 4H, H-2''); 4,07-4,15 (m, 2H, H-6 e H-7) e 6,42 (s, 1H, H-15).

RMN de ¹³C (200 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 15,93 (C-20); 18,37 (C-2); 22,18 (C-11); 23,18 (C-19); 34,41 (C-4); 37,19 (C-18); 39,45 (C-1); 40,88 (C-10); 41,99 (C-14); 44,43 (C-3); 44,38 (C-9); 45,70 (C-8); 53,47 (C-3''); 55,66 (C-1'); 58,19 (C-5); 67,01 (C-2''); 72,12 (C-6); 88,31 (C-7); 107,68 (C-15); 114,33 (C-13); 150,46 (C-16); 152,52 (C-12) e 174,28 (C-17).

1.7. Testes biológicos

Os testes biológicos foram realizados na Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, pelo grupo do prof. Dr. João Ernesto de Carvalho (CPQBA). Para tanto, as linhagens de células de câncer humano utilizadas, UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário expressando o fenótipo resistente a adriamicina), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão, células não-pequenas), PC-3 (próstata), OVCAR-03 (ovário), HT-29 (côlon), and K562 (leucemia eritromieloblastóide), foram gentilmente fornecidas pelo *Frederick Cancer Research & Development Center - National Cancer Institute - Frederick, MA, USA*. As células foram cultivadas em 5 mL de RPMI 1640 (GIBCO BRL, Life Technologies) suplementados com soro fetal bovino 5% e gentamicina 50 µg/mL. Depois foram expostas a várias concentrações das substâncias **1 a 4** e **2.1 a 2.6** (0,25-250,00 µg/mL) em DMSO (0,1% v/v) a 37 °C e CO₂ a 5% por 48 h. Em seguida, solução 50% v/v de ácido tricloroacético foi adicionada e as placas foram incubadas a 4 °C por 30 min, lavadas e secadas. A proliferação celular foi determinada por quantificação espectrofotométrica do conteúdo de proteína celular usando teste com sulforodamina B (Monks *et al.*, 1991). Doxorrubicina (DOX; 0,25-250 µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Foram feitas três medidas, sendo uma no tempo zero (T₀), no começo da incubação, e as outras duas 48 horas depois, uma para as células não-tratadas (C) e outra para aquelas contendo a substância a ser testada (T). A proliferação celular foi determinada de acordo com a equação $100 \times [(T - T_0) / (C - T_0)]$.

O efeito citostático é observado quando $C > T \geq T_0$ enquanto que o efeito citotóxico ocorre quando $T < T_0$.

Valores de GI₅₀ (concentração da substância em teste que inibe 50% do crescimento das células) e TGI (concentração da substância em teste que inibe 100% do crescimento das células) foram determinados por regressão linear usando o programa Origin 7.5.

1.8. Cálculos Teóricos

Os estudos teóricos foram realizados com a colaboração do prof. Dr. Antônio Flávio de Carvalho Alcântara da UFMG. Para esse estudo utilizou-se os pacotes computacionais SPARTAN (SPARTAN, 1999) e GAUSSIAN 03W (GAUSSIAN 2003). As geometrias otimizadas pelo método semi-empírico AM1 (DEWAR, 1985) foram usadas como um modelo inicial para as otimizações de geometria pela Teoria da Densidade Funcional (DFT) (PARR, 1989) com a funcional BLYP (BECKE, 1988 e LEE, 1988) e o conjunto de bases 6-31G* (DITCHFIELD, 1971; HEHRE, 1972; HARIHARAN, 1973 e 1974) (BLYP/6-31G*). As geometrias obtidas pelos cálculos teóricos foram caracterizadas como energia mínima verdadeira somente quando todas as frequências associadas aos modos vibracionais da molécula foram positivas, considerando a ausência de interações intermoleculares para estruturas no estado gasoso.

Os cálculos de energia e contribuições atômicas (população orbital) dos orbitais moleculares (OM's) ocupados e virtuais foram realizados após otimização de geometria em mesmo nível de cálculo, i.e. DFT/BLYP/6-31G*. Os cálculos DFT/BLYP/6-31G* de carga atômica foram realizados pelo método de Mülliken com unidades em elétrons.

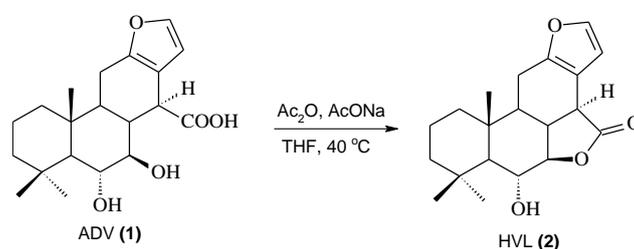
As propriedades químicas calculadas para a conformação mais estável obtida a partir de buscas conformacionais empregando o método AM1 foram consideradas nas correlações entre propriedades químicas e atividades biológicas. Assim sendo, os valores de propriedades químicas de conformeros com menores populações conformacionais foram desconsideradas. As curvas de atividades biológicas e de propriedade química foram tratadas isoladamente, dispostas na forma de gráfico de coordenadas *x* (estrutura química) versus coordenada *y* (valores de propriedade/atividade). As correlações de estrutura química – atividade biológica foram realizadas pela comparação das curvas de cada atividade biológica para as diferentes linhagens de células cancerígenas com as curvas de cada propriedade química calculada.

CAPÍTULO 2: RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. Isolamento do ácido 6 α ,7 β -di-hidroxivouacapan-17 β -óico (ADV, 1)

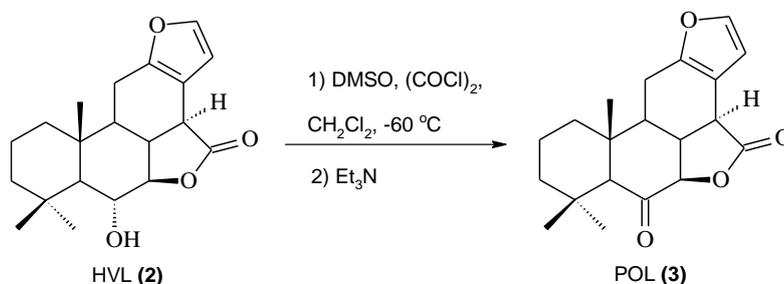
O isolamento do ácido 6 α ,7 β -dihidroxivouacapan-17 β -óico (ADV, 1) foi feito segundo metodologia descrita por NUNAM (1995), adicionando, durante a moagem, folhas do tipo Kleenex (~10 %v/v) para facilitar o fluxo de solvente entre a amostra.

2.2. Síntese da 6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (HVL, 2)



Para a obtenção da 6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona foi usado o procedimento proposto por RUBINGER (1991a), modificando-se a relação ADV:anidrido acético de 1:1,15 para 1:6,7. O aumento de anidrido acético proporcionou uma diminuição do tempo de reação sem alterar o rendimento. Fez-se necessário um rígido controle de temperatura durante a reação, uma vez que a diminuição da temperatura aumenta o tempo de reação. Por outro lado, o aumento de temperatura leva à acetilação da hidroxila da HVL (2). O rendimento obtido foi de 85%.

2.3. Síntese da 6-oxovouacapan-7 β ,17 β -lactona (POL, 3)



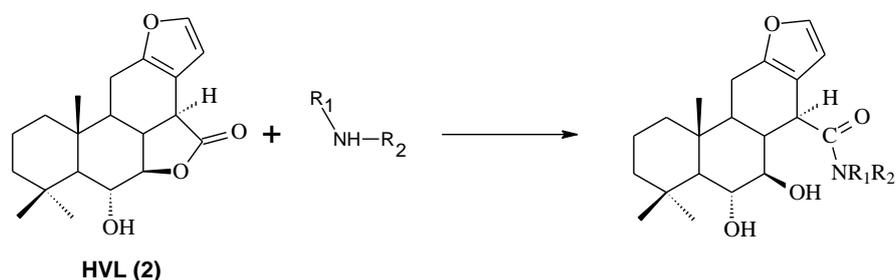
A 6-oxovouacapan-7 β ,17 β -lactona foi obtida via oxidação de Swern, segundo procedimento descrito por RUBINGER (1991a), utilizando como agente oxidante dimetilsulfóxido ativado por cloreto de oxalila.

A primeira etapa da reação consiste na formação do cloreto de cloro(dimetil)sulfônio, altamente instável a temperatura ambiente. Para evitar sua decomposição o sistema foi mantido abaixo de -60 °C. Após a formação do cloreto de cloro(dimetil)sulfônio, decorridos 5 minutos de agitação, foi adicionada lentamente, para evitar o aquecimento do sistema, a HVL dissolvida em DMSO e DCM. Nessa etapa o ataque da hidroxila ao íon sulfônio leva à formação do íon sulfoxônio, também altamente instável, exigindo um rígido controle da temperatura.

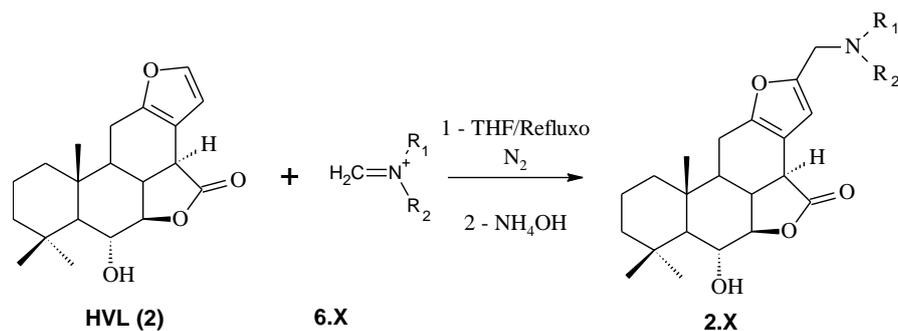
Na elaboração da reação foi acrescentada a etapa de lavagem do material bruto obtido, com pequena quantidade de etanol e exposição ao ultra-som, por cerca de três minutos. Sem essa etapa, observou-se que o produto final apresentava uma coloração amarelada e odor sulfuroso. Após a lavagem o produto tornou-se branco e inodoro. A POL (3) foi obtida na forma de cristais tabulares incolores, com 82% de rendimento.

2.4. Síntese dos derivados 16-(*N,N*-dialquilamino)metilênicos da HVL

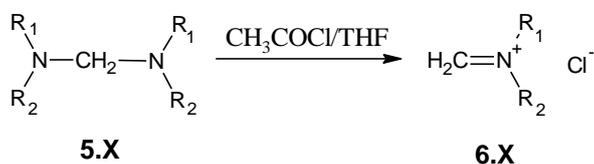
Pela reação clássica de Mannich, em que o aldeído, a amina e o ácido acético são adicionados juntamente com o substrato, observam-se a abertura do anel lactônico da HVL (2) e a formação da respectiva amida (BELINELO, 2002), como apresentado abaixo:



Utilizando-se o método não clássico de Mannich, em que se faz uso de sais de imínio pré-formados, segundo BELINELO (2002), ocorre a aminometilação do carbono C-16 do anel furânico, conforme apresentado a seguir:



Assim sendo, foi utilizada essa metodologia e, para tanto, foram obtidos os sais de imínio **6.1** a **6.6** a partir das aminas geminais preparadas **5.1** a **5.6** correspondentes, as quais estão descritas no item 1.6.1 do Capítulo 1 (p. 9-13).



X = 1 - $\text{R}_1 = \text{R}_2 = -\text{CH}_2\text{CH}_3$

4 - R_1 e $\text{R}_2 = -\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$

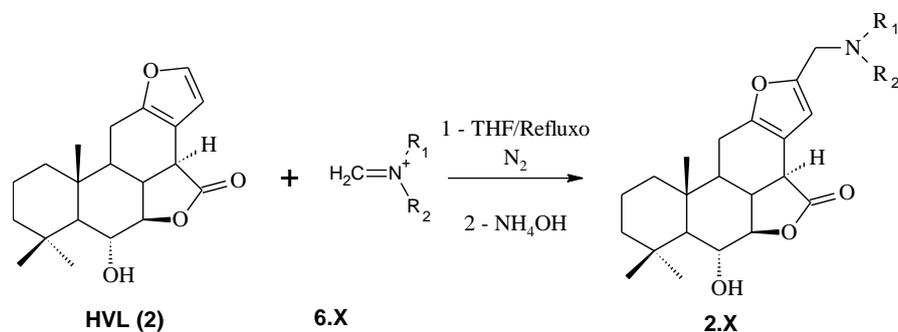
2 - $\text{R}_1 = \text{R}_2 = (\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$

5 - R_1 e $\text{R}_2 = -\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$

3 - $\text{R}_1 = \text{R}_2 = -\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

6 - R_1 e $\text{R}_2 = -\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2-$

Os sais de imínio foram obtidos através de reação, em THF anidro, das aminas geminais **5.1** a **5.6** com cloreto de acetila. A precipitação do sal ocorre quase que instantaneamente. Após a obtenção dos sais de imínio, no mesmo frasco procedeu-se à sua reação com a HVL (**2**), aquecendo a mistura sob refluxo para a obtenção dos respectivos derivados. Foram obtidos bons rendimentos, variando de 55 a 84% (p.14).



2.1: $\text{R}_1 = \text{R}_2 = -\text{CH}_2\text{CH}_3$

2.4: R_1 e $\text{R}_2 = -\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$

2.2: $\text{R}_1 = \text{R}_2 = (\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$

2.5: R_1 e $\text{R}_2 = -\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$

2.3: $\text{R}_1 = \text{R}_2 = -\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

2.6: R_1 e $\text{R}_2 = -\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2-$

2.5. Análise dos dados espectroscópicos

2.5.1. Espectroscopia no Infravermelho (IV) das substâncias 2.1 a 2.6

As Figuras 2.1 a 2.6 apresentam os espectros de absorção na região do infravermelho das substâncias 2.1 a 2.6, respectivamente. As atribuições mais significativas são apresentadas nas Tabelas 2.1 a 2.6, estando de acordo com as estruturas propostas.

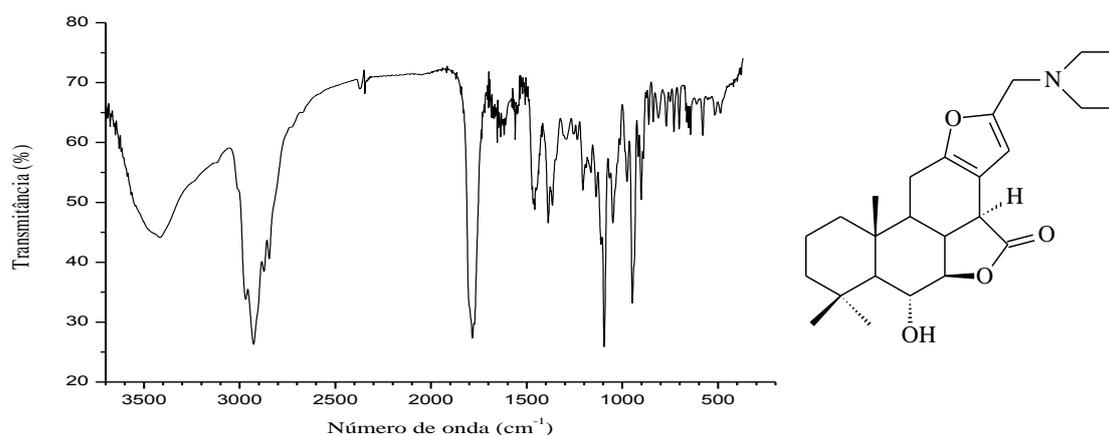


Figura 2.1: Espectro no IV de 2.1 em pastilha de KBr.

Tabela 2.1: Principais atribuições às bandas observadas na região do infravermelho de 2.1

Atribuição	Absorção (cm ⁻¹)
Estiramento O-H	3421
Estiramento C-H alifático	2970, 2923, 2873 e 2849
Estiramento C=O lactona	1781
Estiramento C=C furano	1460
Deformação assim. e sim. CH ₃ e CH ₂	1386 e 1362
Estiramento C=O e C-O lactona	1139, 1068 e 1050
Estiramento C-OH	1109 e 1095
Deformação no plano C-H furano	946 e 903
Deformação fora do plano C-H furano	734
Deformação C-N	1208, 1189 e 1165

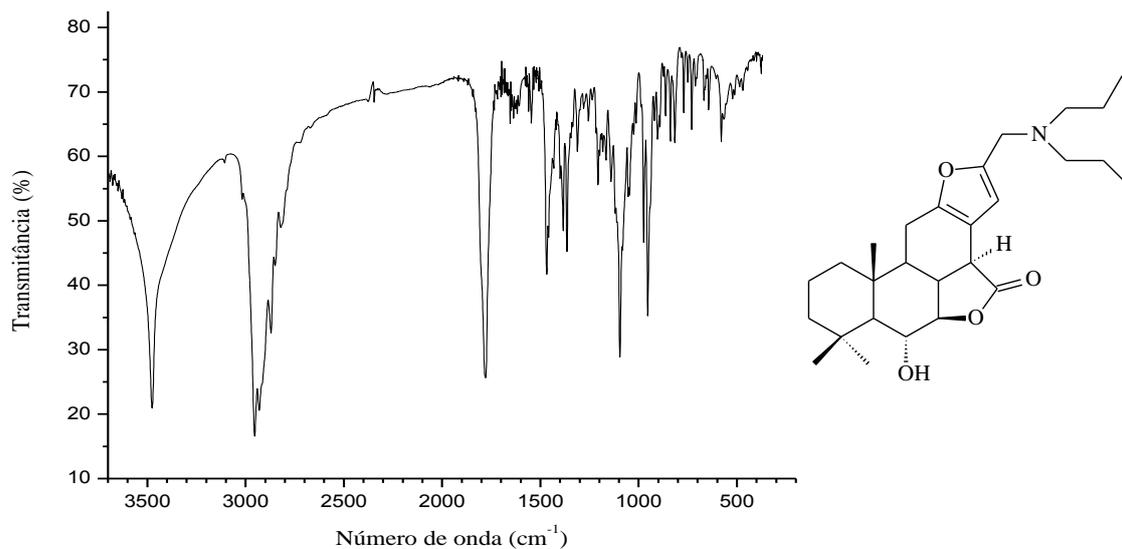


Figura 2.2: Espectro no IV de **2.2** em pastilha de KBr.

Tabela 2.2: Principais atribuições às bandas observadas na região do infravermelho de **2.2**

Atribuição	Absorção (cm ⁻¹)
Estiramento O-H	3476
Estiramento C-H alifático	2951, 2931, 2871, 2850 e 2817
Estiramento C=O lactona	1780
Estiramento C=C furano	1467
Deformação assim. e sim. CH ₃ e CH ₂	1401, 1385 e 1363
Estiramento C=O e C-O lactona	1143, 1053 e 1045
Estiramento C-OH	1121, 1095 e 1080
Deformação no plano C-H furano	975 e 954
Deformação fora do plano C-H furano	729
Deformação C-N	1210, 1185 e 1169

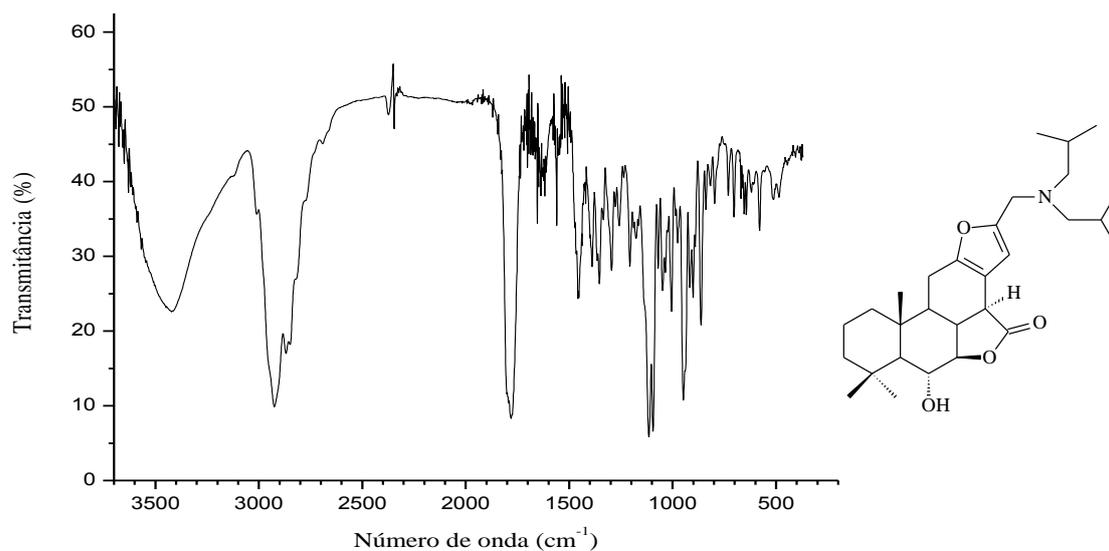


Figura 2.3: Espectro no IV de **2.3** em pastilha de KBr.

Tabela 2.3: Principais atribuições às bandas observadas na região do infravermelho de **2.3**

Atribuição	Absorção (cm ⁻¹)
Estiramento O-H	3424
Estiramento C-H alifático	3010, 2926, 2869 e 2851
Estiramento C=O lactona	1777
Estiramento C=C furano	1654 e 1560
Deformação assim. e sim. CH ₃ e CH ₂	1456, 1391, 1354 e 1334
Estiramento C=O e C-O lactona	1208, 1178 e 1070
Estiramento C-OH	1115 e 1095
Deformação no plano C-H furano	950, 919 e 901
Deformação fora do plano C-H furano	733 e 705
Deformação C-N	1295, 1275 e 1258

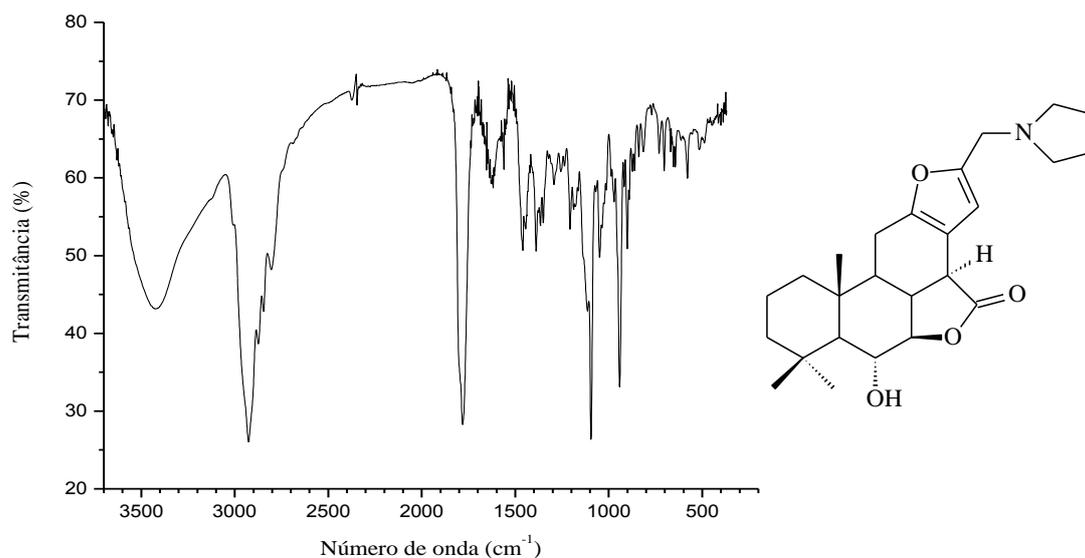


Figura 2.4: Espectro no IV de **2.4** em pastilha de KBr.

Tabela 2.4: Principais atribuições às bandas observadas na região do infravermelho de **2.4**

Atribuição	Absorção (cm ⁻¹)
Estiramento O-H	3419
Estiramento C-H alifático	2928, 2970, 2846 e 2807
Estiramento C=O lactona	1782
Estiramento C=C furano	1619 e 1561
Deformação assim. e sim. CH ₃ e CH ₂	1460, 1445, 1390, 1367 e 1348
Estiramento C=O e C-O lactona	1051 e 1036
Estiramento C-OH	1115 e 1096
Deformação no plano C-H furano	944 e 903
Deformação fora do plano C-H furano	733 e 702
Deformação C-N	1209 e 1190

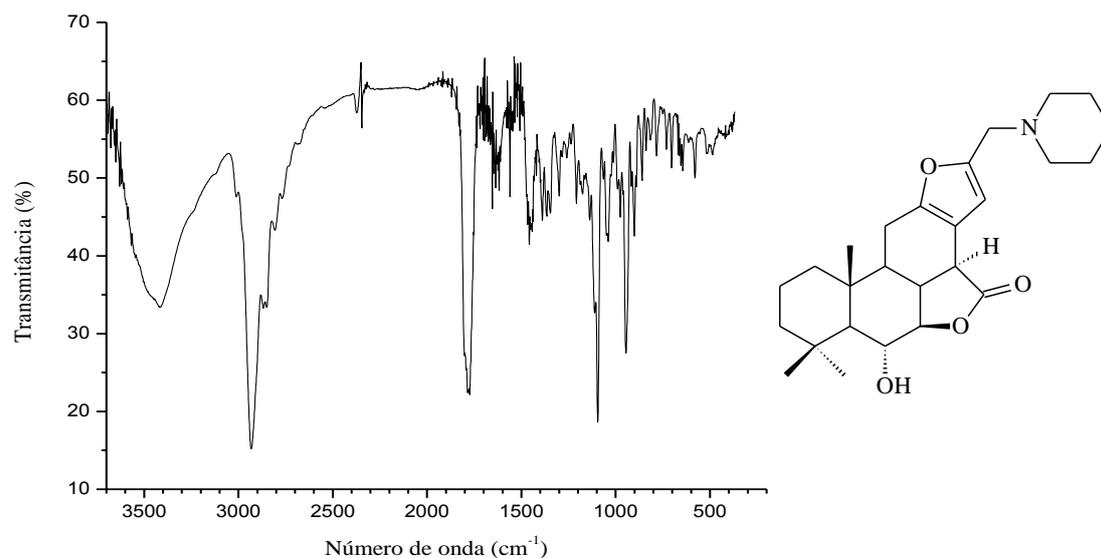


Figura 2.5: Espectro no IV de **2.5** em pastilha de KBr.

Tabela 2.5: Principais atribuições às bandas observadas na região do infravermelho de **2.5**

Atribuição	Absorção (cm ⁻¹)
Estiramento O-H	3417
Estiramento C-H alifático	2933, 2870, 2853 e 2807
Estiramento C=O lactona	1785
Estiramento C=C furano	1654 e 1560
Deformação assim. e sim. CH ₃ e CH ₂	1459, 1301, 1365 e 1346
Estiramento C=O e C-O lactona	1140, 1068 e 1040
Estiramento C-OH	1114 e 1096
Deformação no plano C-H furano	946 e 903
Deformação fora do plano C-H furano	733 e 701
Deformação C-N	1209 e 1176

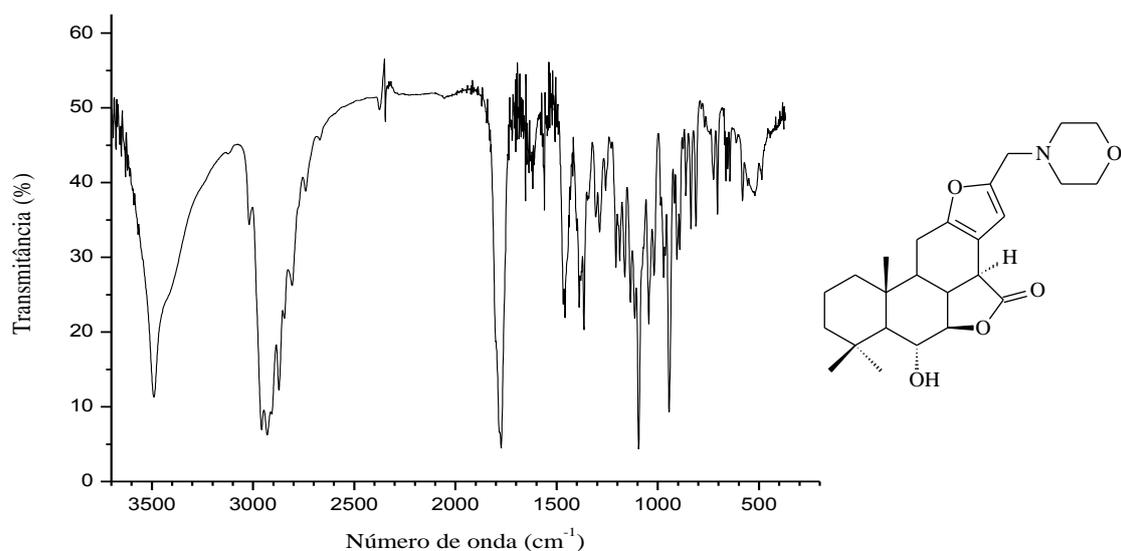


Figura 2.6: Espectro no IV de **2.6** em pastilha de KBr.

Tabela 2.6: Principais atribuições às bandas observadas na região do infravermelho de **2.6**

Atribuição	Absorção (cm ⁻¹)
Estiramento O-H	3492
Estiramento C-H alifático	2961, 2932, 2873 e 2847
Estiramento C=O lactona	1777
Estiramento C=C furano	1620 e 1560
Deformação assim. e sim. CH ₃ e CH ₂	1457, 1388 e 1366
Estiramento C=O e C-O lactona	1136, 1046 e 1018
Estiramento C-OH	1114 e 1095
Deformação no plano C-H furano	943, 906 e 890
Deformação fora do plano C-H furano	727 e 704
Deformação C-N	1208, 1187 e 1163

2.5.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) das substâncias 2.1 a 2.6

2.5.2.1. Análise dos dados de RMN de 16-(*N,N*-dietilamino)metileno-6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (2.1)

As Figuras 2.7 e 2.8 apresentam respectivamente o espectro de RMN de ^1H de 2.1 e suas expansões. Os deslocamentos químicos de RMN de ^1H e suas atribuições são apresentados na Tabela 2.7 (p. 34). Para tanto foram considerados também os dados da análise do mapa de contornos COSY (Fig. 2.9, p. 33).

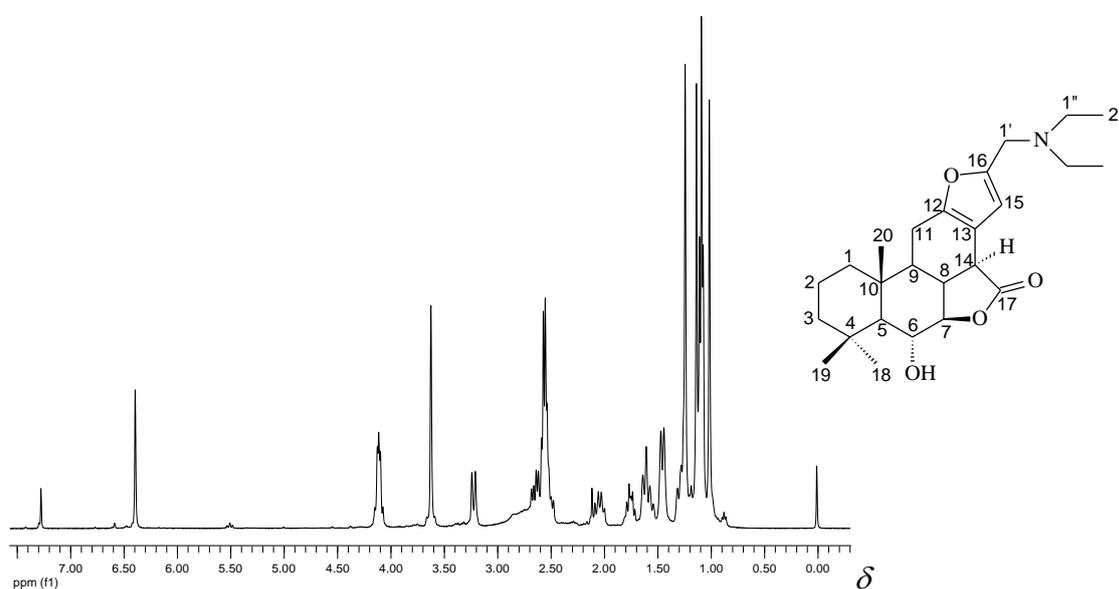


Figura 2.7: Espectro de RMN de ^1H de 2.1 (400 MHz, CDCl_3).

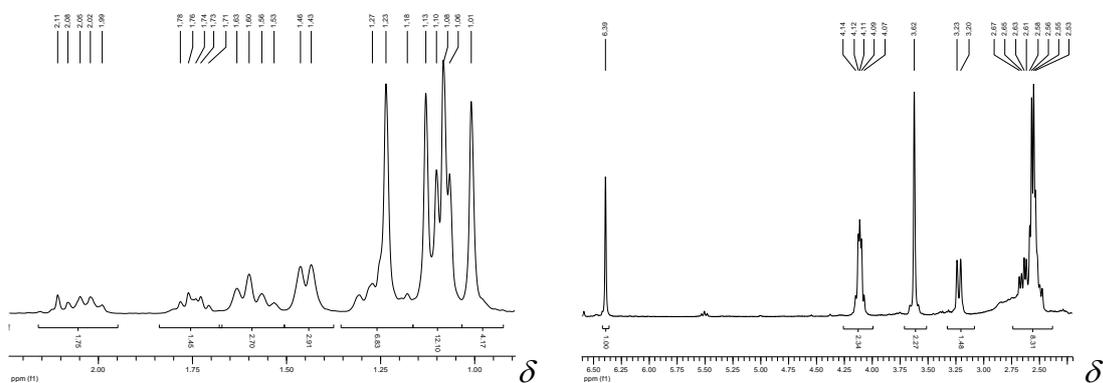


Figura 2.8: Espectros parciais de RMN de ^1H de 2.1 (400 MHz, CDCl_3).

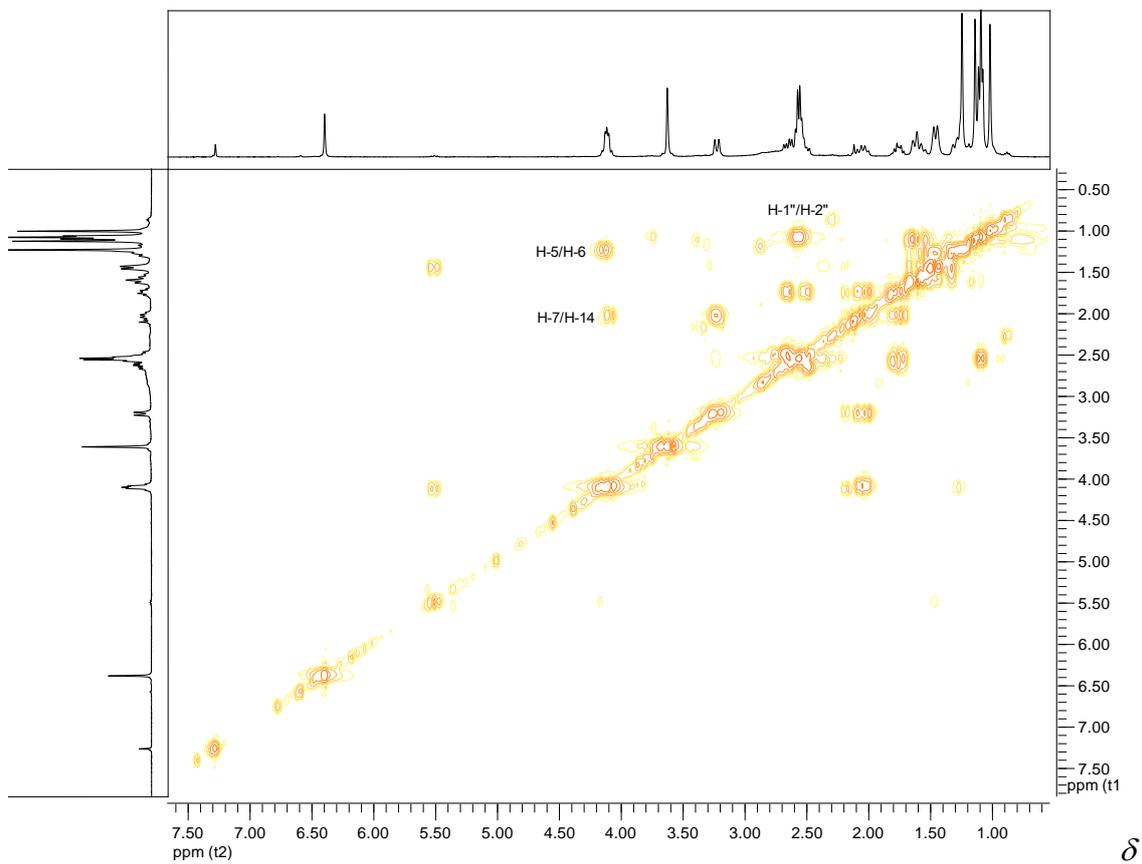
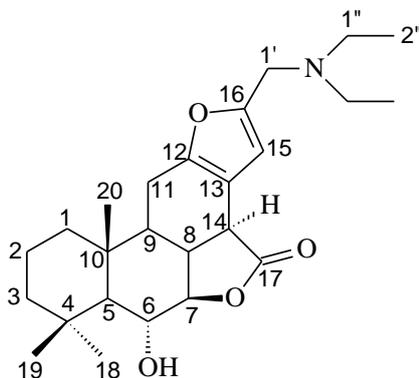


Figura 2.9: Mapa de contornos COSY de **2.1** (400 MHz, CDCl_3).

Tabela 2.7: Deslocamentos químicos e atribuições de RMN de ^1H de **2.1** (400 MHz, CDCl_3)



Hidrogênio	$^1\text{H} - \delta / \text{ppm}$	mult.	J / Hz
1ax	1,06-1,10	m	-
1eq	1,53-1,63	m	-
2ax	1,53-1,63	m	-
2eq	1,45	dl	11,4
3ax	1,23-1,30	m	-
3eq	1,45	dl	11,4
4	-	-	-
5	1,23-1,30	m	-
6	4,07-4,14	m	-
7	4,07-4,14	m	-
8	1,99-2,11	m	-
9	1,71-1,76	m	-
10	-	-	-
11α	2,47-2,58	m	-
11β	2,64	dd	8,2 ($J_{11\beta-9}$); 17,8 ($J_{11\beta-11\alpha}$)
12	-	-	-
13	-	-	-
14	3,21	d	13,2 (J_{14-8})
15	6,39	s	-
16	-	-	-
17	-	-	-
18	1,23	s	-
19	1,13	s	-
20	1,01	s	-
1'	3,62	s	-
1''	2,56	q	7,2
2''	1,08	t	7,0 ($J_{2''-1''}$)
OH	2,11	s	-

Para efeito de comparação, a Figura 2.10 apresenta o espectro de RMN de ^1H da HVL.

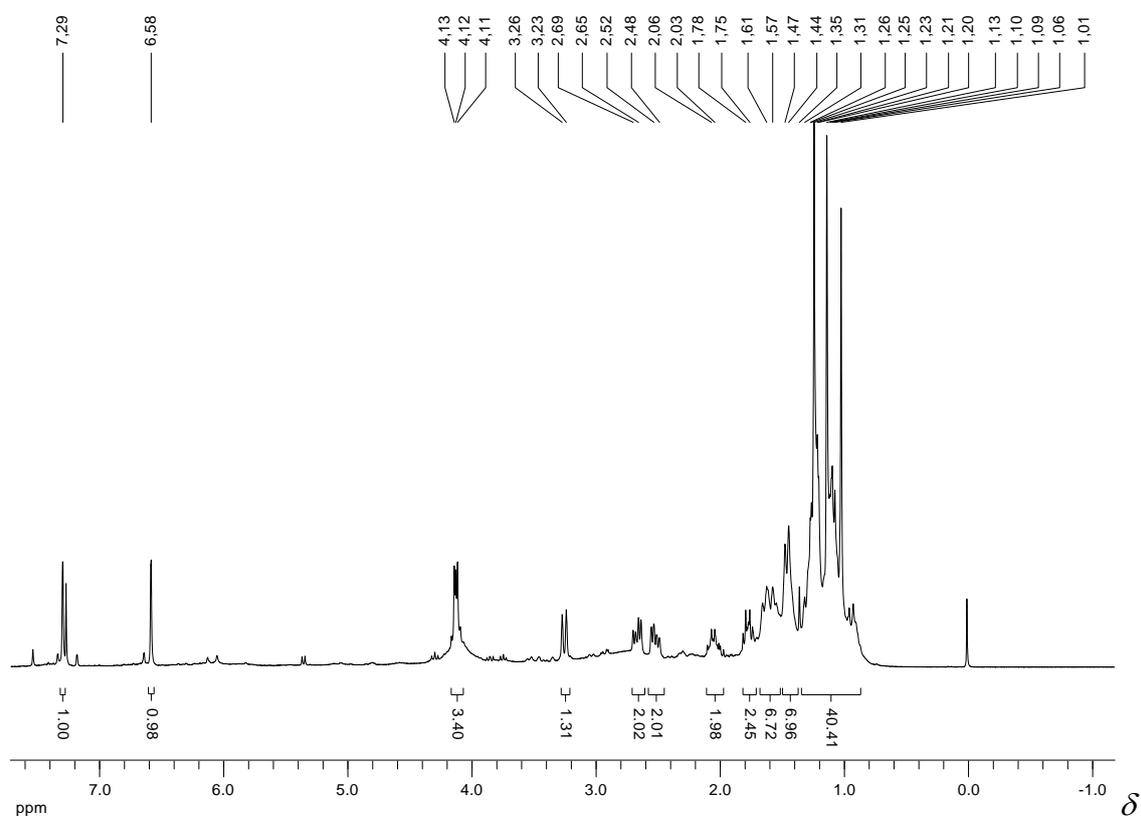


Figura 2.10: Espectro de RMN de ^1H da HVL (CDCl_3 , 400 MHz).

Comparando-se o espectro de RMN de ^1H da HVL (Fig. 2.10) com o espectro de **2.1** (Fig. 2.7 e 2.8, p. 32) é possível verificar que nesse último não é observado o sinal em 7,29 ppm referente ao H-16 da HVL. Em 7,27 ppm é observado um sinal pouco intenso, mas esse é devido ao clorofórmio utilizado no experimento, que, por coincidência, apresenta um sinal na mesma região de H-16.

Além de todos os demais sinais que são observados no espectro da HVL, o espectro de **2.1** apresenta três novos sinais, correspondentes aos átomos do grupo substituinte introduzido na molécula. Assim, em 3,62 ppm observa-se um simpleto referente a H-1'; entre 2,47 e 2,58 ppm é observado um multipletto referente a H-1'' e em 1,08 ppm observa-se um triplete correspondente a H-2''. Estes dados estão de acordo com a estrutura proposta para **2.1**.

Os espectros de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT de **2.1** são apresentados na Figura 2.11a e b, respectivamente,. As atribuições aos seus sinais estão apresentadas na Tabela 2.8 (p. 37). Para essas atribuições foram combinadas as análises dos espectros de

RMN de ^{13}C e DEPT com aquelas dos mapas de contornos HSQC (Fig. 2.13, p. 38) e HMBC (Fig.2.14, p. 38).

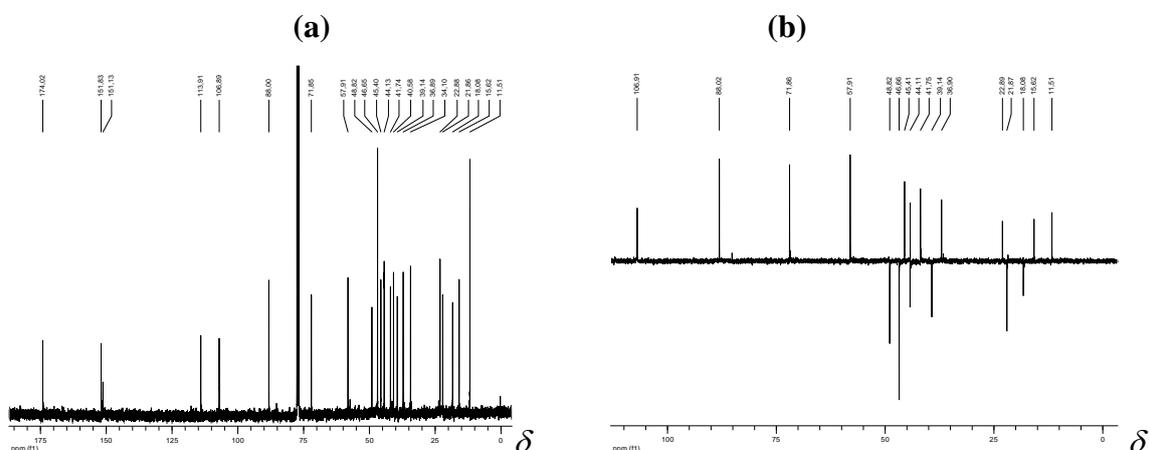


Figura 2.11: (a) Espectro de RMN de ^{13}C e (b) subespectro DEPT 135° de **2.1** (100 MHz, CDCl_3).

Para efeito de comparação, na Figura 2.12, a seguir, são apresentados o espectro de RMN de ^{13}C da HVL e o subespectro DEPT.

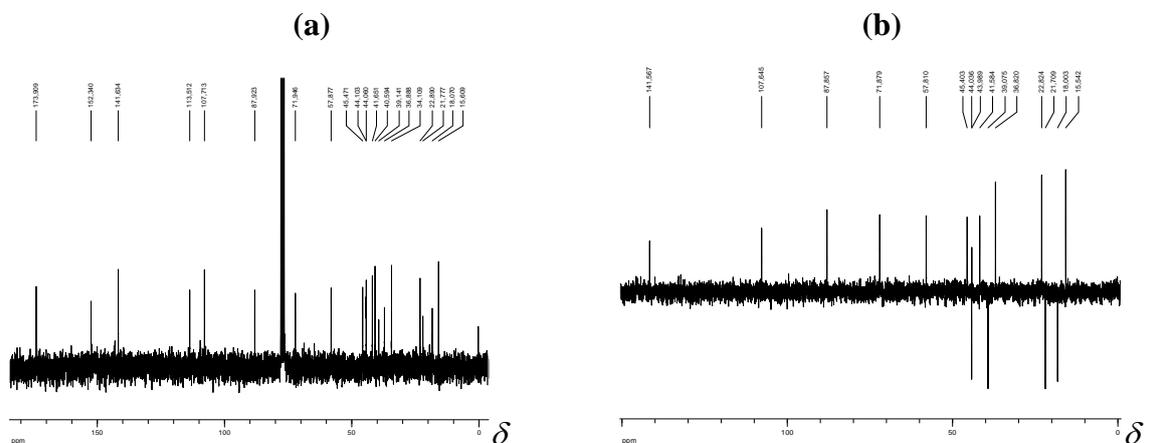
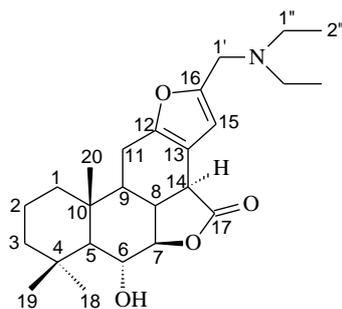


Figura 2.12: (a) Espectro de RMN de ^{13}C e (b) subespectro DEPT 135° da HVL (50 MHz, CDCl_3).

Analisando o espectro de RMN de ^{13}C de **2.1** (Fig. 2.11a) é possível perceber que ele apresenta todos os sinais observados no espectro da HVL (Fig. 2.12a). Além desses são observados também três novos sinais, devidos ao grupo substituinte: em 48,86 e em 49,97 ppm, respectivamente correspondentes a C-1' e C-1'' e em 11,54 ppm referente a C-2''.

O subspectro DEPT 135° de **2.1** (Fig. 2.11b, p. 36) permite verificar que tanto C-1' quanto C-1'' são átomos de carbono CH₂, uma vez que seus sinais de ressonância se apresentam com fase negativa, e C-2'' é um CH₃, pois seu sinal apresenta fase positiva.

Tabela 2.8: Deslocamentos químicos e atribuições de RMN de ¹³C de **2.1** (100 MHz, CDCl₃)



Carbono	¹³ C - δ(ppm)	Carbono	¹³ C - δ(ppm)
1	39,20	13	113,96
2	18,11	14	41,78
3	44,15	15	106,95
4	34,14	16	151,19
5	57,95	17	174,08
6	71,90	18	36,93
7	88,05	19	22,92
8	45,44	20	15,65
9	44,17	1'	48,86
10	40,62	1''	46,97
11	21,90	2''	11,54
12	151,89		

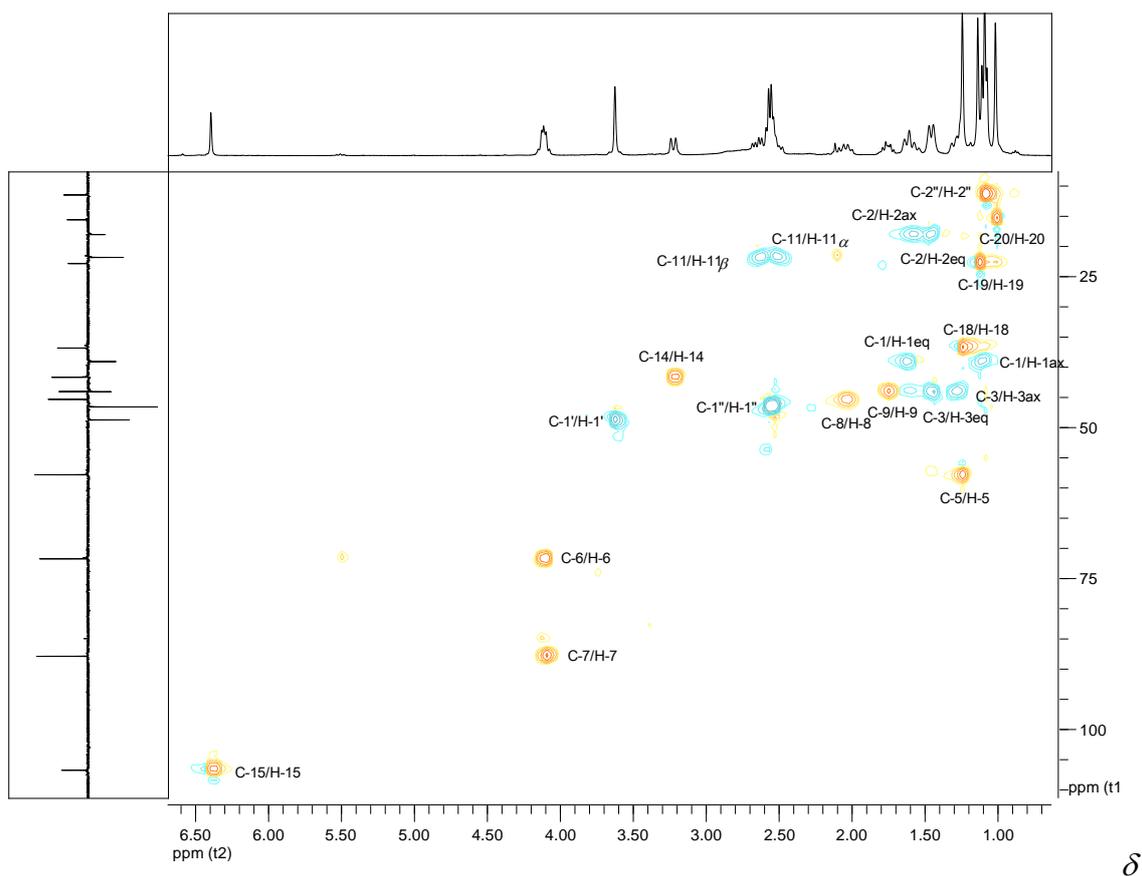


Figura 2.13: Mapa de contornos HSQC de **2.1** (400 MHz, CDCl_3).

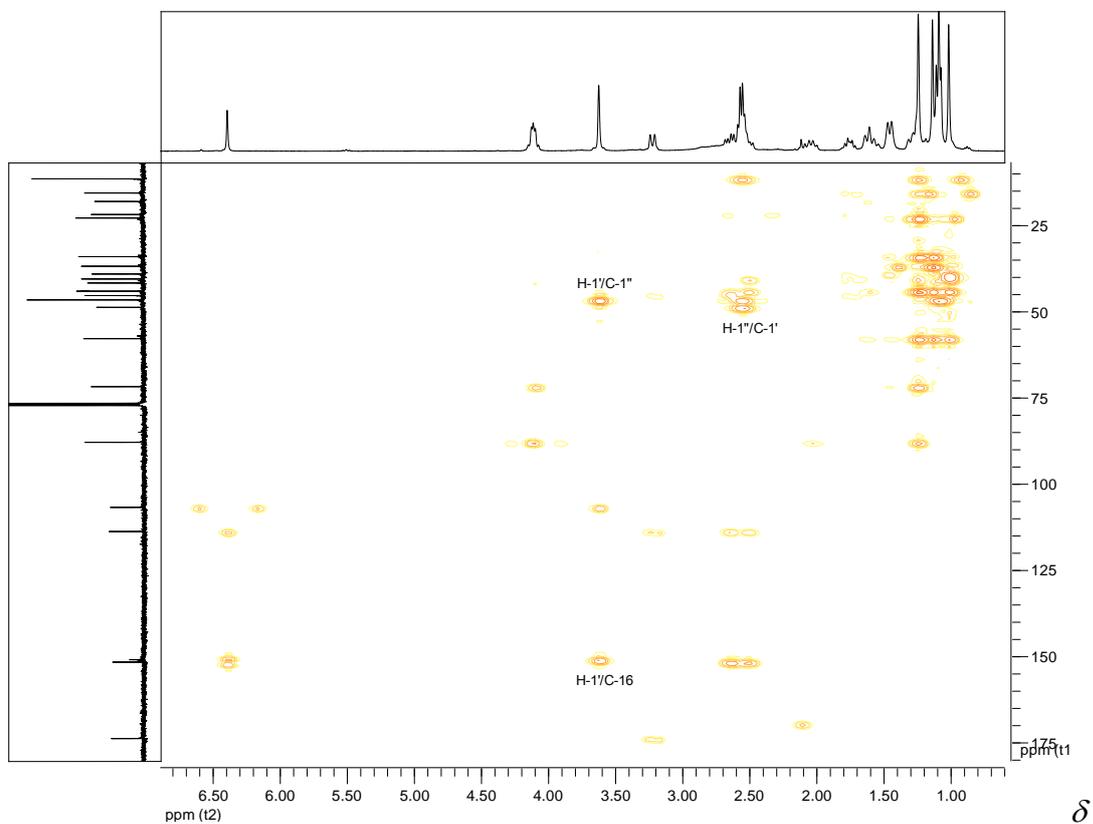


Figura 2.14: Mapa de contornos HMBC de **2.1** (400 MHz, CDCl_3).

Analisando o mapa de contornos HMBC (Fig. 2.14, p. 38) é possível observar uma correlação entre o sinal de H-1' e o sinal de C-16, uma correlação entre o sinal de H-1' e o sinal de C-1'' e uma correlação entre o sinal de H-1'' e o sinal de C-1'.

No mapa de contornos COSY (Fig. 2.9, p. 33) é possível observar as correlações entre os hidrogênios do grupo substituinte como a correlação entre H-1'' e H-2''.

Todas essas correlações indicam que o grupo substituinte está presente na molécula e que a substituição realmente ocorreu na posição planejada C-16.

A caracterização das demais substâncias **2.2** a **2.6** foi realizada de maneira semelhante, seguindo raciocínio análogo.

2.5.2.2. Análise dos dados de RMN de ^{1}H de 16-(*N,N*-dipropilamino)metileno-6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (2.2)

As Figuras 2.15 e 2.16 apresentam respectivamente o espectro de RMN de ^{1}H de **2.2** e suas expansões. Os deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H e suas atribuições são apresentados na Tabela 2.9 (p. 41). Para tanto foram considerados também os dados da análise do mapa de contornos COSY (Fig. 2.18, p. 43).

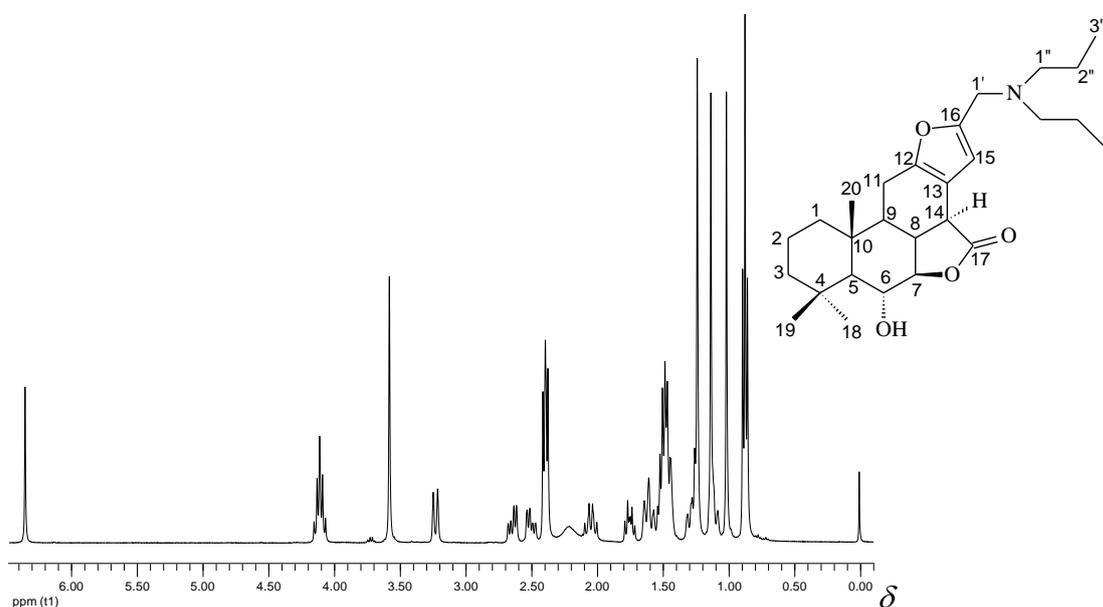


Figura 2.15: Espectro de RMN de ^{1}H de **2.2** (400 MHz, CDCl_3).

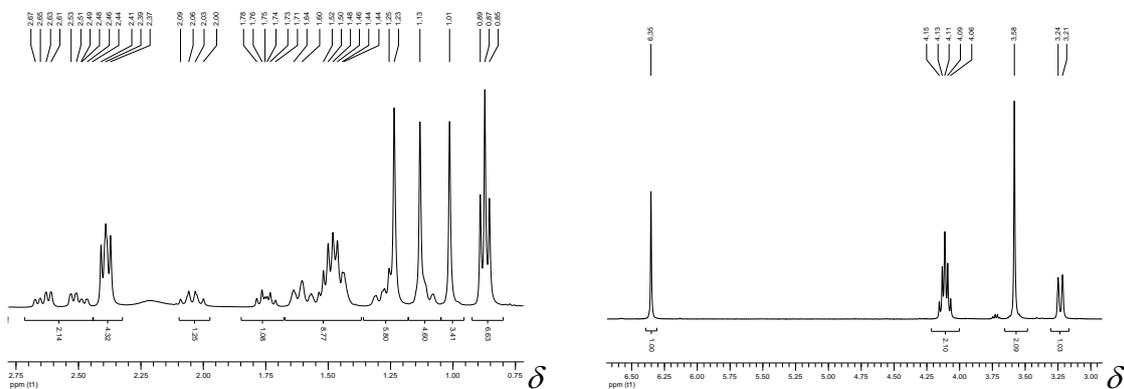
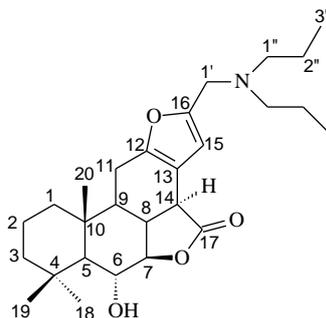


Figura 2.16: Espectros parciais de RMN de ^{1}H de **2.2** (400 MHz, CDCl_3).

Tabela 2.9: Deslocamentos químicos e atribuições de RMN de ^1H de **2.2** (400 MHz, CDCl_3)



Hidrogênio	$^1\text{H} - \delta / \text{ppm}$	mult.	J / Hz
1ax	1,08-1,13	m	-
1eq	1,57-1,64	m	-
2ax	1,57-1,64	m	-
2eq	1,44-1,53	m	-
3ax	1,25-1,31	m	-
3eq	1,44-1,53	m	-
4	-	-	-
5	1,23-1,31	m	-
6	4,06-4,15	m	-
7	4,06-4,15	m	-
8	2,00-2,09	m	-
9	1,73-1,78	m	-
10	-	-	-
11α	2,50	dd	8,6 ($J_{11\alpha-9}$); 17,3 ($J_{11\alpha-11\beta}$)
11β	2,64	dd	8,2 ($J_{11\beta-9}$); 17,3 ($J_{11\beta-11\alpha}$)
12	-	-	-
13	-	-	-
14	3,22	d	13,3 (J_{14-8})
15	6,35	s	-
16	-	-	-
17	-	-	-
18	1,23	s	-
19	1,13	s	-
20	1,01	s	-
1'	3,58	s	-
1''	2,39	t	7,7 ($J_{1''-2''}$)
2''	1,44-1,53	m	-
3''	0,87	t	7,3 ($J_{3''-2''}$)
OH	2,21	l	-

Os espectros de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT de **2.2** são apresentados na Figura 2.17a e b (p. 42), respectivamente. As atribuições aos seus sinais estão apresentadas na Tabela 2.10 (p. 42). Para essas atribuições foram combinadas as

análises dos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT com aquelas dos mapas de contornos HSQC (Fig. 2.19, p. 43) e HMBC (Fig. 2.20, p. 44).

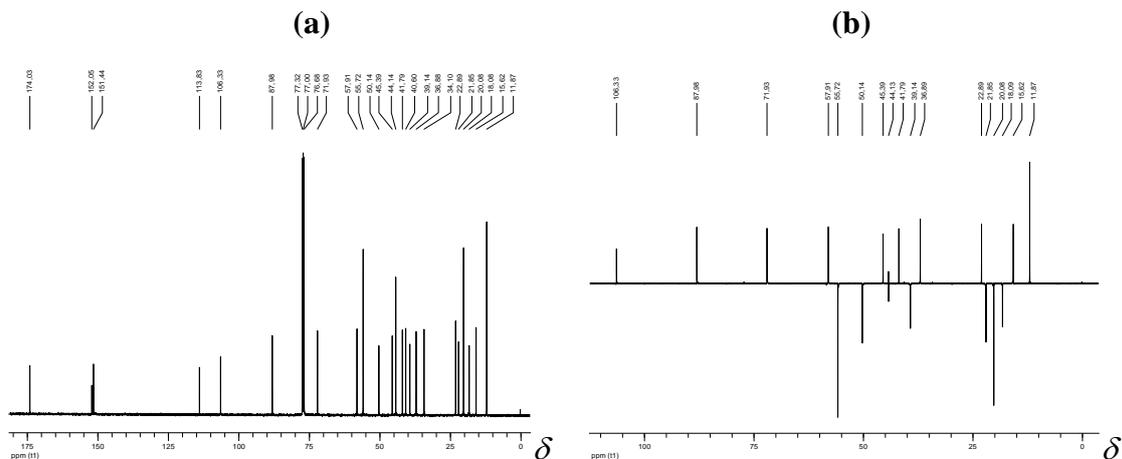
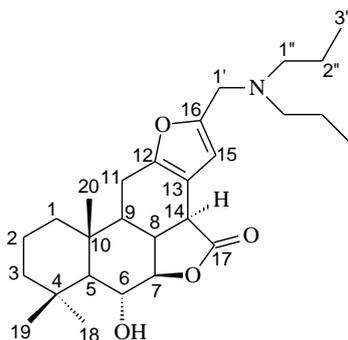


Figura 2.17: (a) Espectro de RMN de ^{13}C e (b) subspectro DEPT 135° de **2.2** (100 MHz, CDCl_3).

Tabela 2.10: Deslocamentos químicos e atribuições de RMN de ^{13}C de **2.2** (100 MHz, CDCl_3)



Carbono	$^{13}\text{C} - \delta(\text{ppm})$	Carbono	$^{13}\text{C} - \delta(\text{ppm})$
1	39,44	13	114,14
2	18,38	14	42,10
3	44,44	15	106,64
4	34,40	16	152,37
5	58,21	17	174,35
6	72,23	18	37,19
7	88,28	19	23,19
8	45,69	20	15,92
9	44,44	1'	50,44
10	40,90	1''	56,03
11	22,15	2''	18,68
12	151,76	3''	12,17

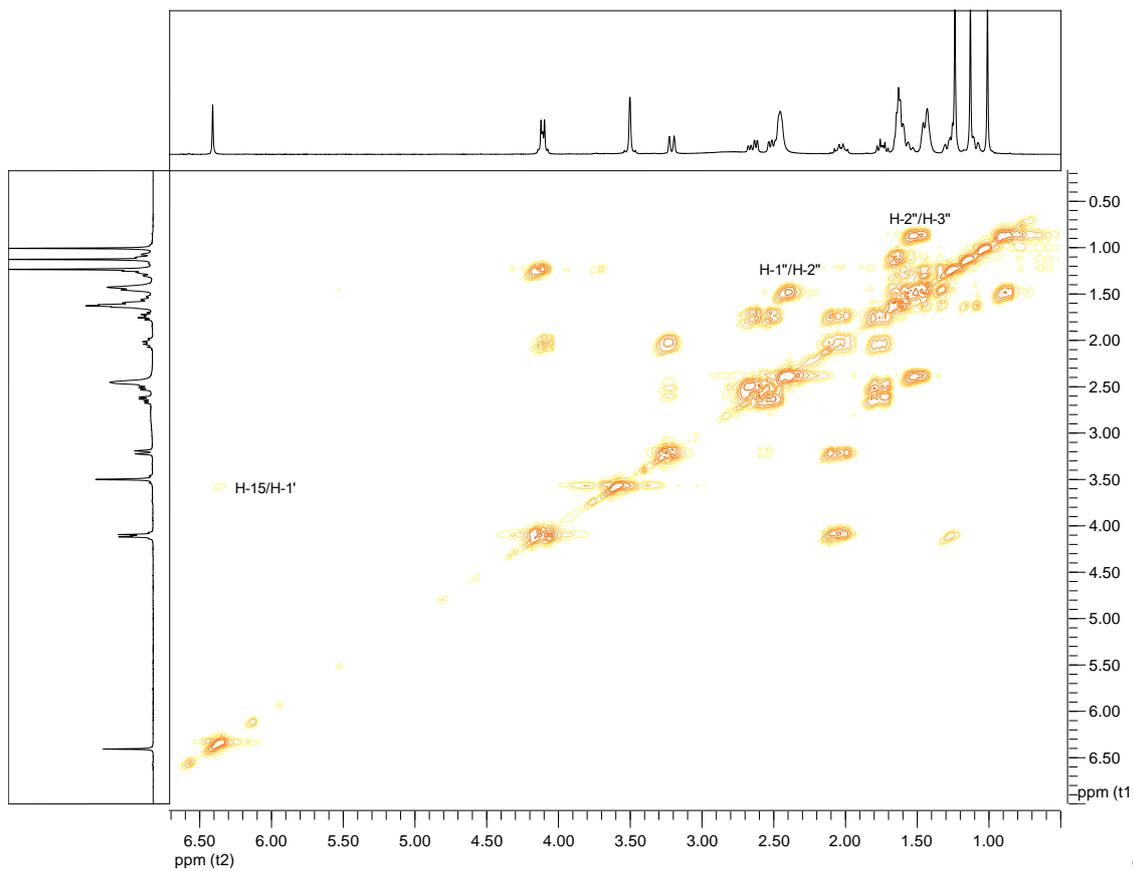


Figura 2.18: Mapa de contornos COSY de **2.2** (400 MHz, CDCl_3).

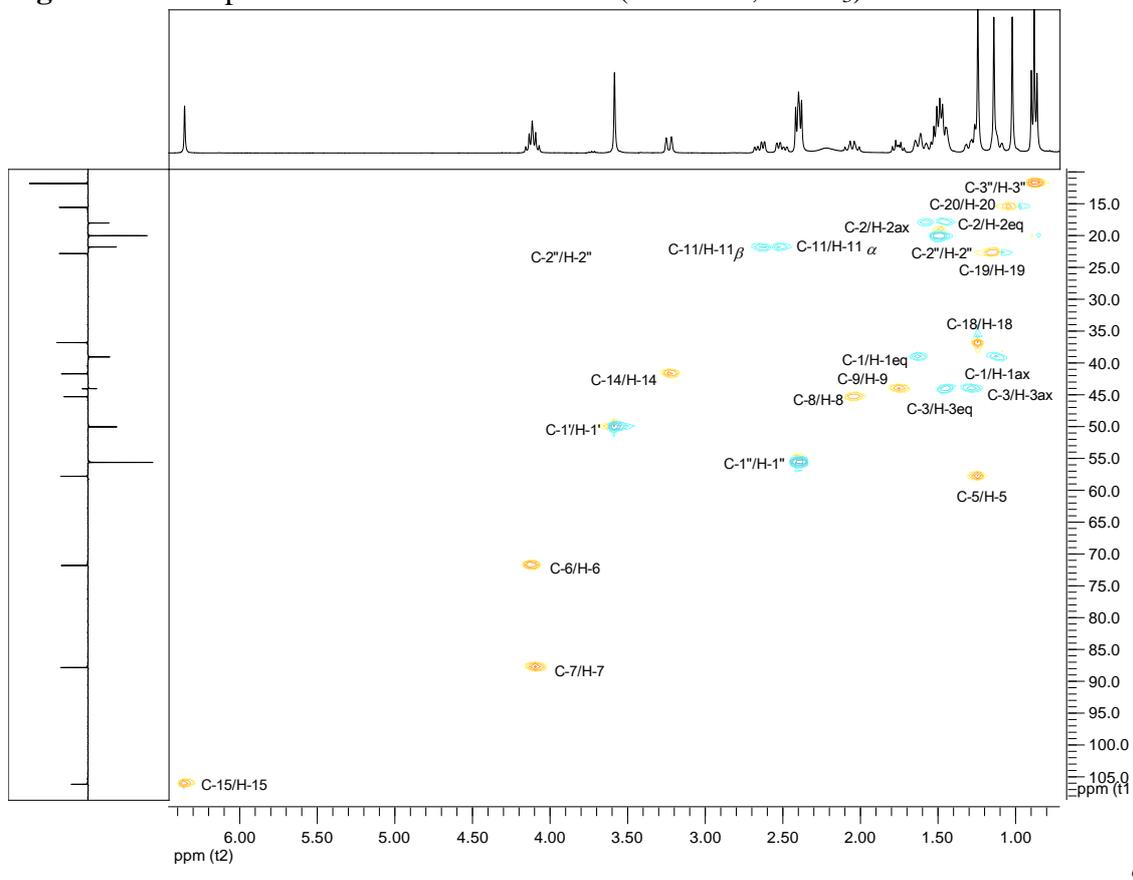
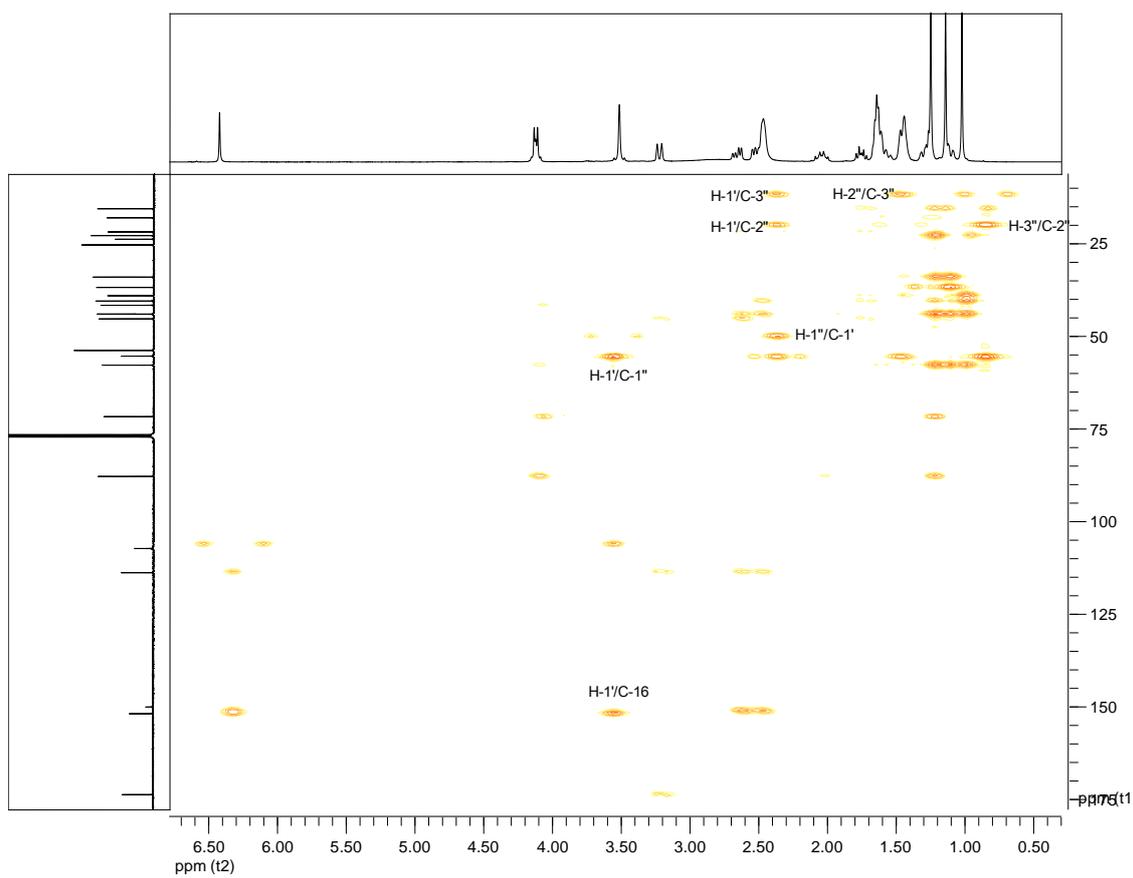


Figura 2.19: Mapa de contornos HSQC de **2.2** (400 MHz, CDCl_3).



δ

Figura 2.20: Mapa de contornos HMBC de **2.2** (400 MHz, CDCl_3).

2.5.2.3. Análise dos dados de RMN de 16-(*N,N*-diisobutilamino)metileno-6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (2.3)

As Figuras 2.21 e 2.22 apresentam respectivamente o espectro de RMN de ^1H de **2.3** e suas expansões. Os deslocamentos químicos de RMN de ^1H e suas atribuições são apresentados na Tabela 2.11 (p. 46). Para tanto foram considerados também os dados da análise do mapa de contornos COSY (Fig. 2.24, p. 48).

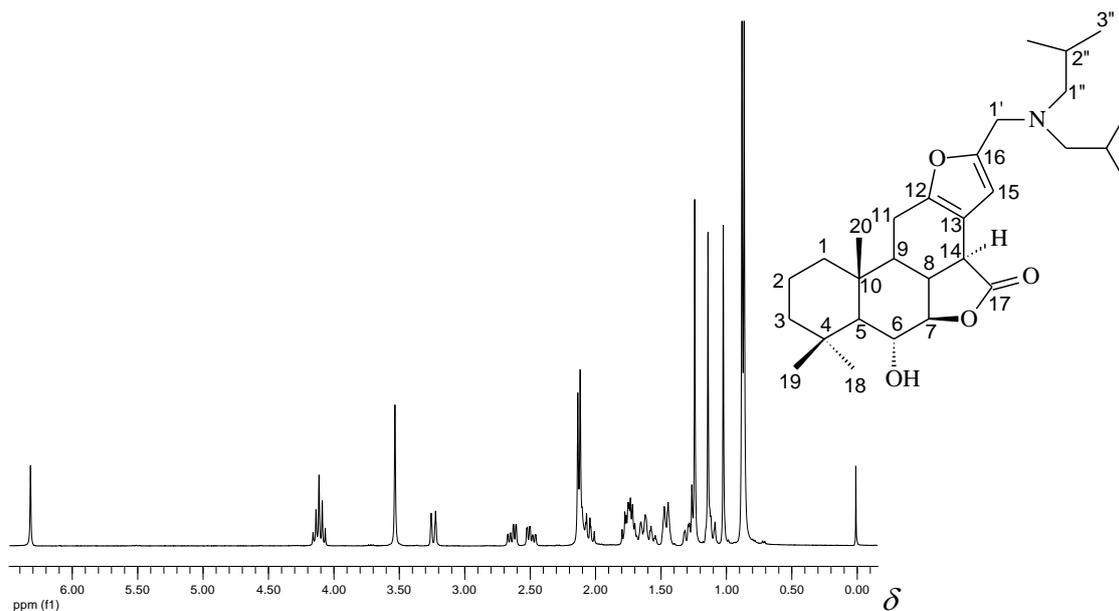


Figura 2.21: Espectro de RMN de ^1H de **2.3** (400 MHz, CDCl_3).

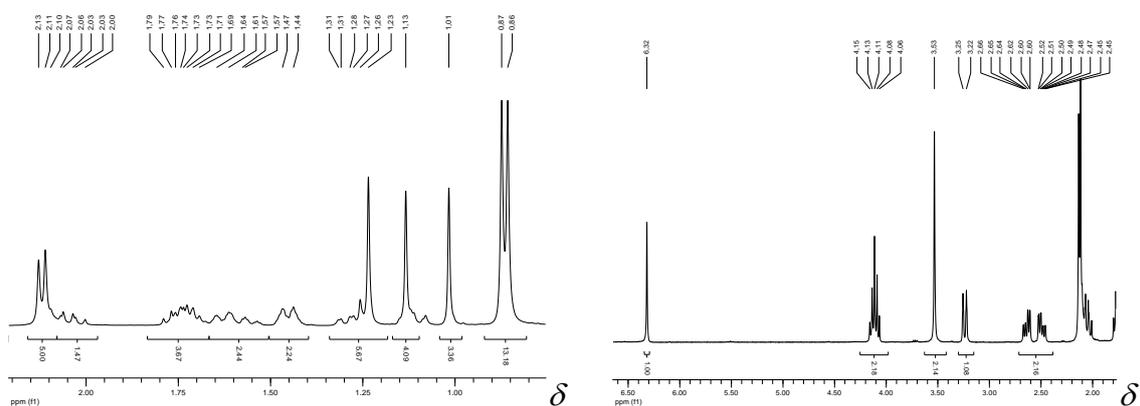
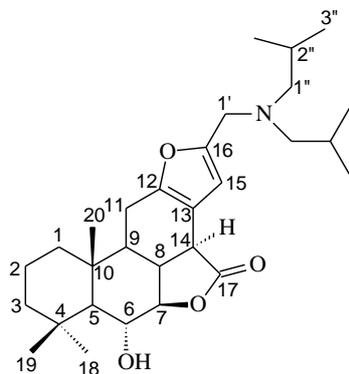


Figura 2.22: Espectros parciais de RMN de ^1H de **2.3** (400 MHz, CDCl_3).

Tabela 2.11: Deslocamentos químicos e atribuições de RMN de ^1H de **2.3** (400 MHz, CDCl_3)



Hidrogênio	$^1\text{H} - \delta / \text{ppm}$	mult.	J / Hz
1ax	1,11-1,13	m	-
1eq	1,61-1,64	m	-
2ax	1,53-1,57	m	-
2eq	1,44-1,47	m	-
3ax	1,27-1,31	m	-
3eq	1,44-1,47	m	-
4	-	-	-
5	1,23-1,26	-	-
6	4,06-4,15	m	-
7	4,06-4,15	m	-
8	2,00-2,07	m	-
9	1,69-1,79	m	-
10	-	-	-
11α	2,48	dd	8,8 ($J_{\text{H}11\alpha-9}$); 17,5 ($J_{11\alpha-11\beta}$)
11β	2,63	dd	8,3 ($J_{\text{H}11\beta-9}$); 17,5 ($J_{11\beta-11\alpha}$)
12	-	-	-
13	-	-	-
14	3,24	d	13,3 (J_{14-8})
15	6,32	s	-
16	-	-	-
17	-	-	-
18	1,23	s	-
19	1,11	s	-
20	1,01	s	-
1'	3,53	s	-
1''	2,12	d	7,3 ($J_{1'',2''}$)
2''	1,69-1,79	m	-
3''	0,86	d	6,6 ($J_{3'',2''}$)
OH	2,13	l	-

Os espectros de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT de **2.3** são apresentados na Figura 2.23a e b (p. 47), respectivamente. As atribuições a seus sinais estão apresentadas na Tabela 2.12 (p. 47). Para essas atribuições foram combinadas as

análises dos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT com aquelas dos mapas de contornos HSQC (Fig. 2.25, p. 49) e HMBC (Fig. 2.26, p. 49).

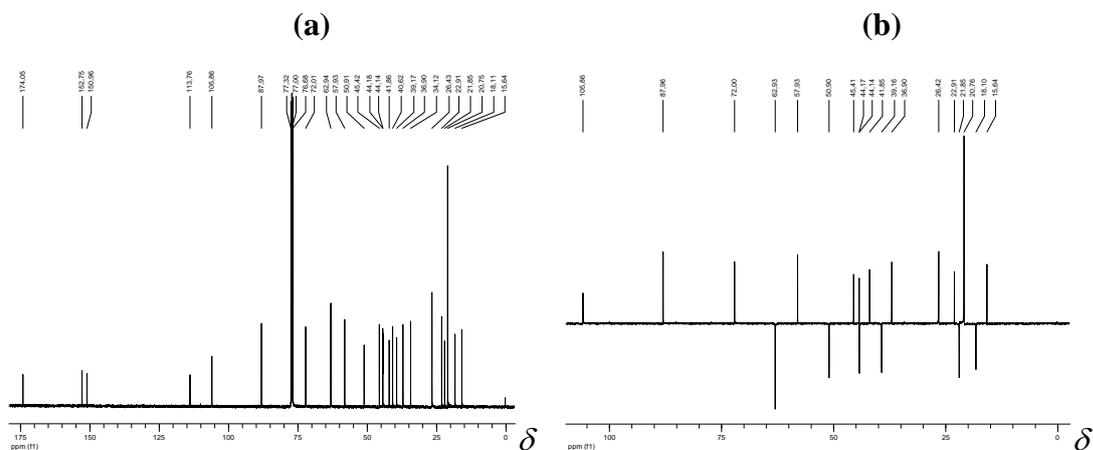
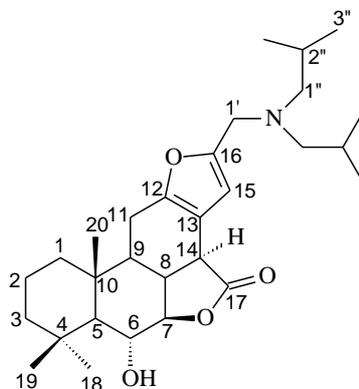


Figura 2.23: (a) Espectro de RMN de ^{13}C e (b) subespectro DEPT 135° de **2.3** (100 MHz, CDCl_3).

Tabela 2.12: Deslocamentos químicos e atribuições de RMN de ^{13}C de **2.3** (100 MHz, CDCl_3)



Carbono	$^{13}\text{C} - \delta(\text{ppm})$	Carbono	$^{13}\text{C} - \delta(\text{ppm})$
1	39,19	13	113,79
2	18,13	14	41,88
3	44,17	15	105,89
4	34,15	16	152,78
5	57,96	17	174,09
6	72,04	18	36,92
7	87,00	19	22,93
8	45,44	20	15,66
9	44,21	1'	50,93
10	40,65	1''	62,97
11	21,87	2''	26,45
12	150,99	3''	20,78

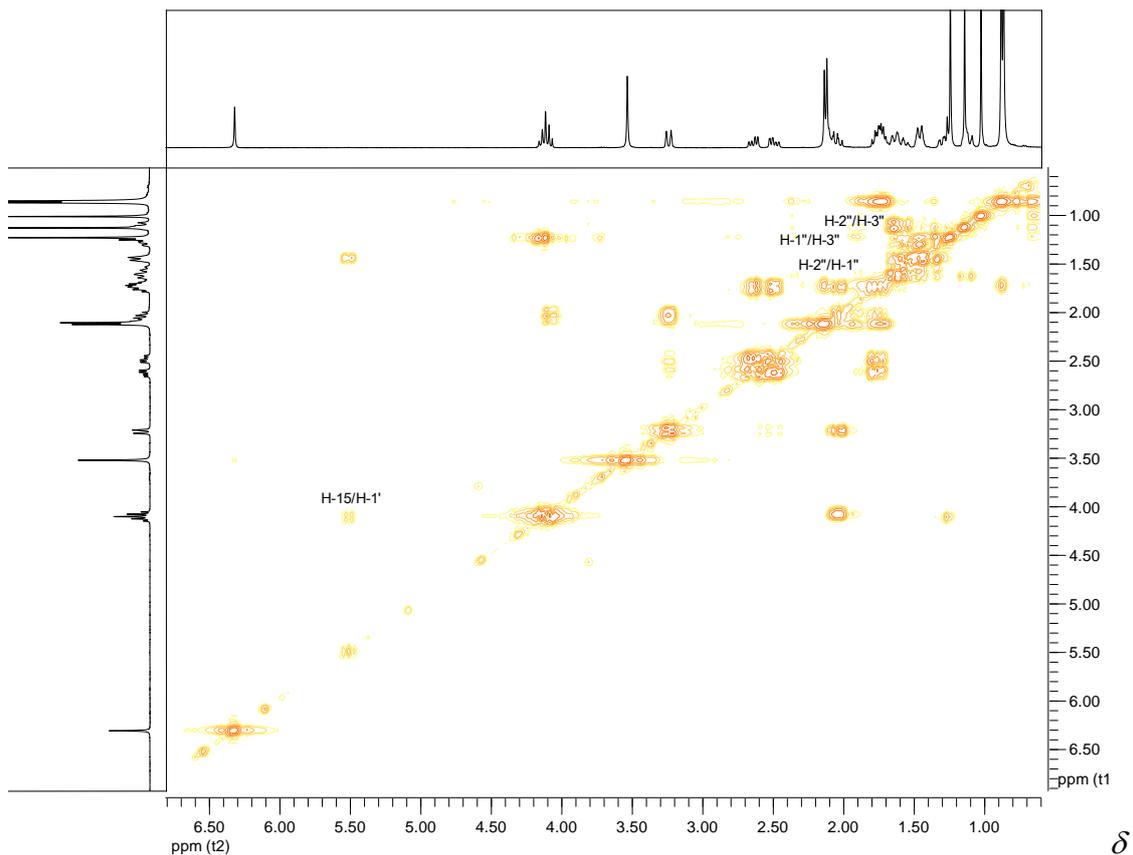


Figura 2.24: Mapa de contornos COSY de **2.3** (400 MHz, CDCl₃).

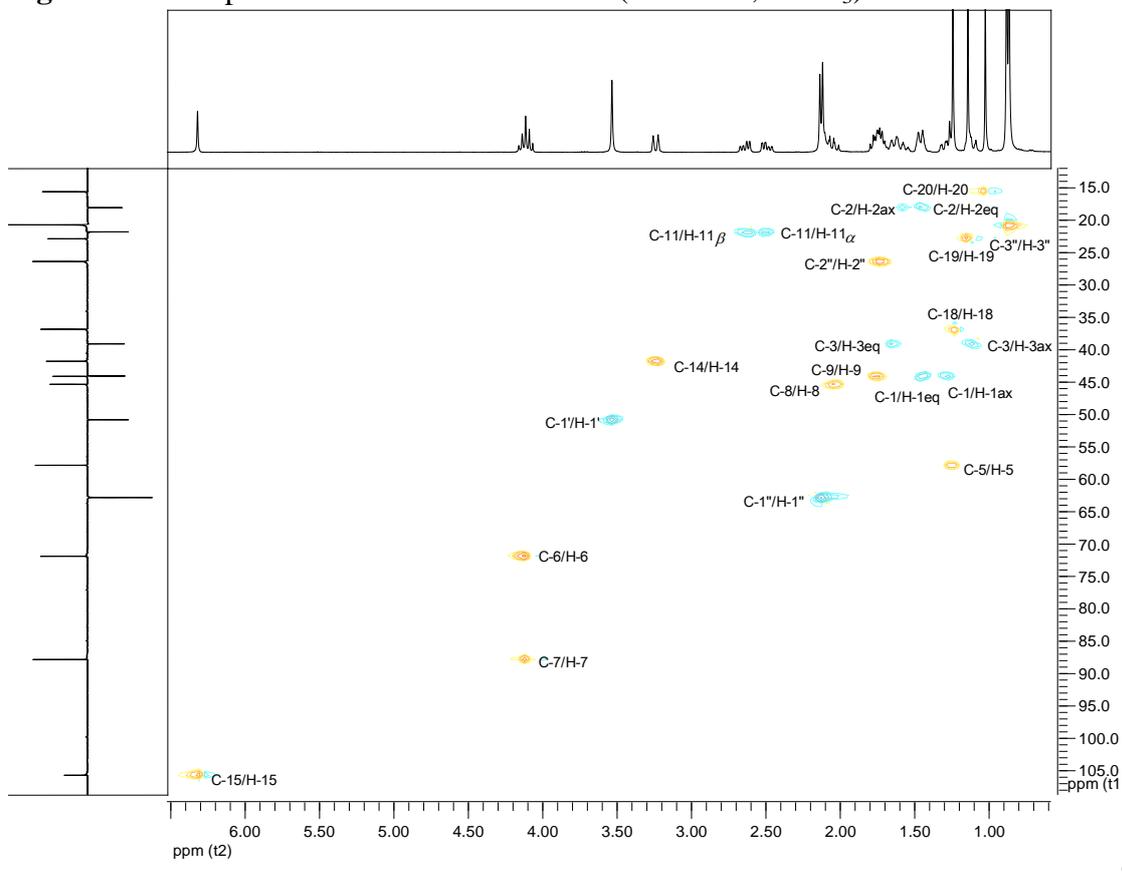


Figura 2.25: Mapa de contornos HSQC de **2.3** (400 MHz, CDCl₃).

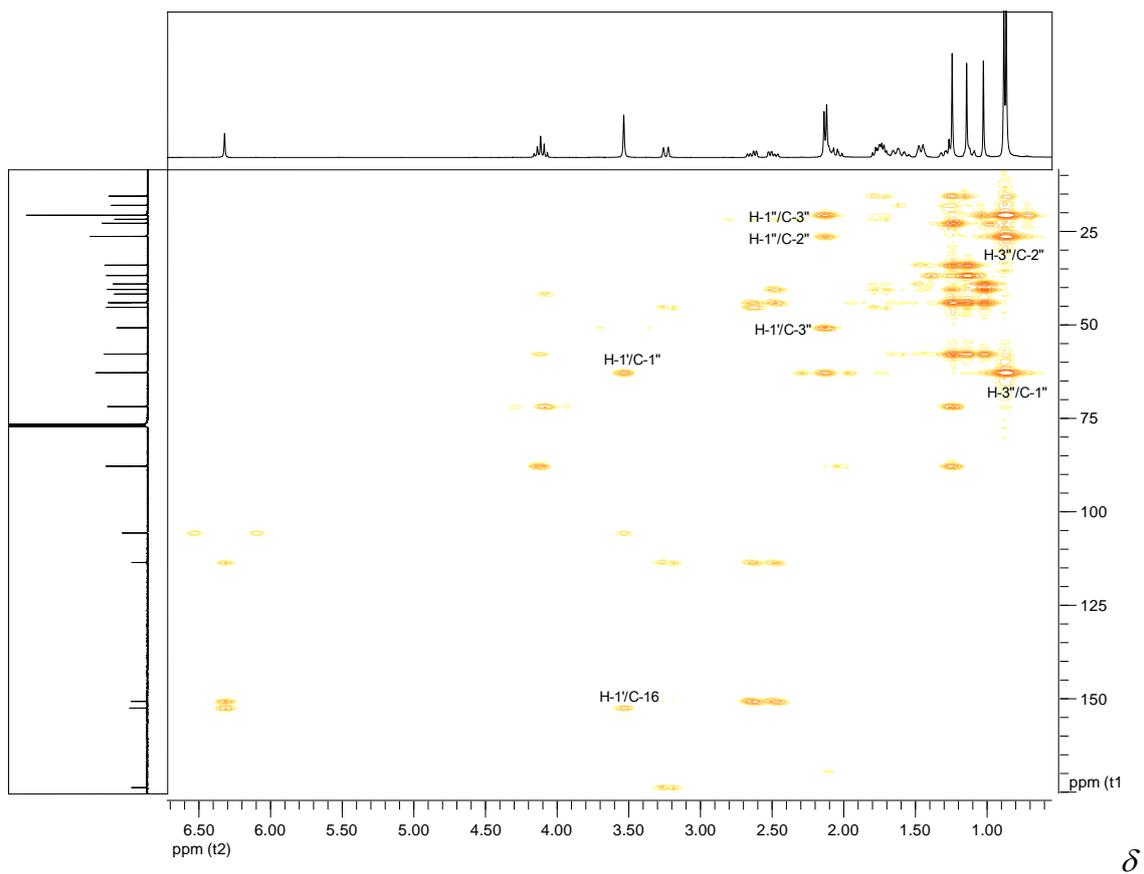


Figura 2.26: Mapa de contornos HMBC de **2.3** (400 MHz, CDCl_3).

2.5.2.4. Análise dos dados de RMN de ^1H de 16-(1-pirrolidino)metileno-6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (2.4)

As Figuras 2.27 e 2.28 apresentam respectivamente o espectro de RMN de ^1H de **2.4** e suas expansões. Os deslocamentos químicos de RMN de ^1H e suas atribuições são apresentados na Tabela 2.13 (p. 51). Para tanto foram considerados também os dados da análise do mapa de contornos COSY (Fig. 2.30, p. 53).

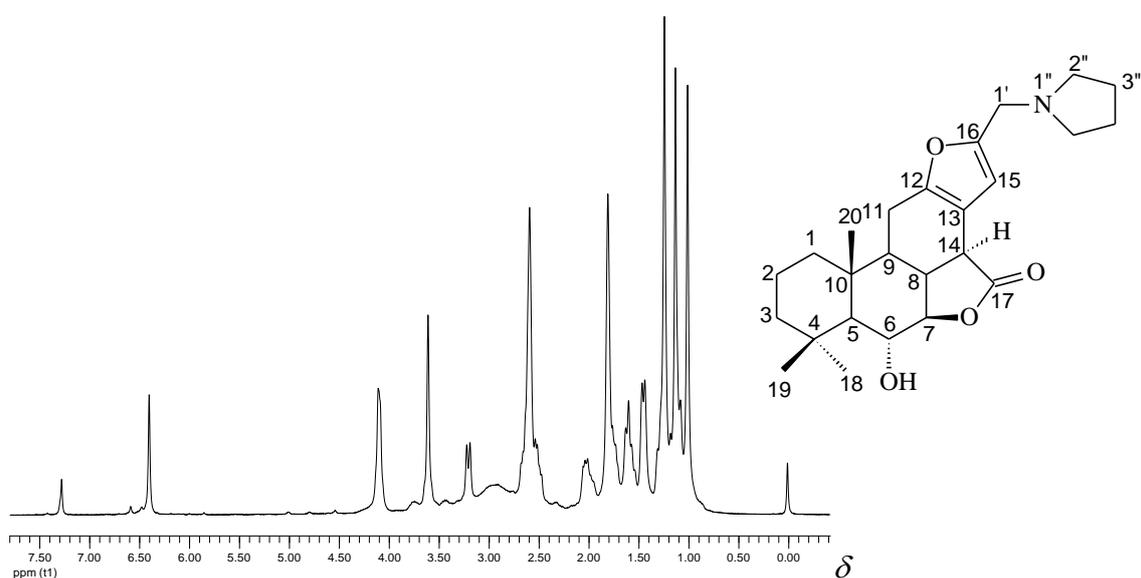


Figura 2.27: Espectro de RMN de ^1H de **2.4** (400 MHz, CDCl_3).

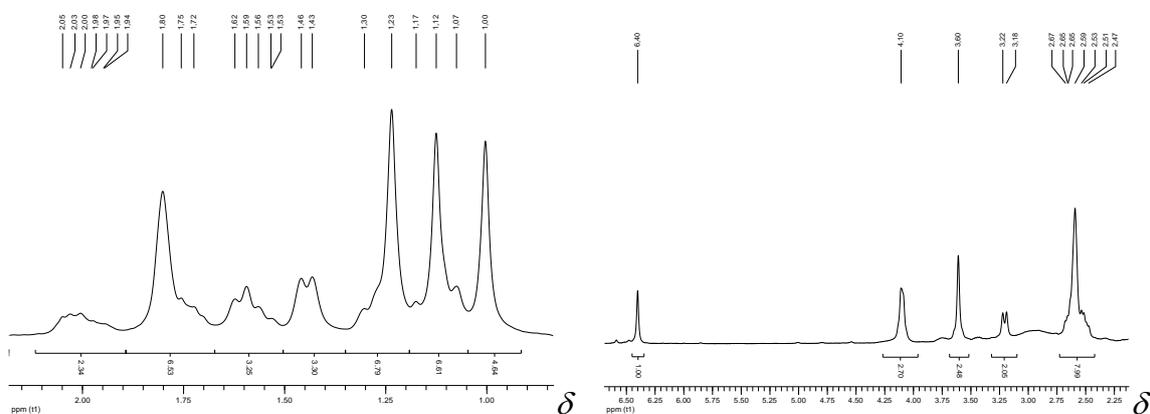
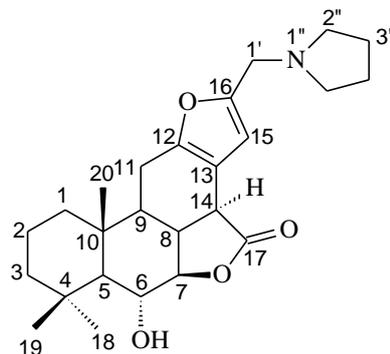


Figura 2.28: Espectros parciais de RMN de ^1H de **2.4** (400 MHz, CDCl_3).

Tabela 2.13: Deslocamentos químicos e atribuições de RMN de ^1H de **2.4** (400 MHz, CDCl_3)



Hidrogênio	$^1\text{H} - \delta / \text{ppm}$	mult.	J / Hz
1ax	1,07-1,12	m	-
1eq	1,53-1,62	m	-
2ax	1,53-1,62	m	-
2eq	1,43-1,46	dl	11,0
3ax	1,23-1,30	m	-
3eq	1,43-1,46	dl	11,0
4	-	-	-
5	1,17-1,30	m	-
6	4,10	l	-
7	4,10	l	-
8	1,94-2,05	m	-
9	1,72-1,80	m	-
10	-	-	-
11α	2,47-2,67	m	-
11β	2,47-2,67	m	-
12	-	-	-
13	-	-	-
14	3,20	d	13,0 (J_{14-8})
15	6,40	s	-
16	-	-	-
17	-	-	-
18	1,23	s	-
19	1,12	s	-
20	1,00	s	-
1'	3,60	s	-
2''	2,47-2,67	m	-
3''	1,72-1,80	m	-
OH	1,94-2,05	m	-

Os espectros de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT de **2.4** são apresentados na Figura 2.29a e b (p. 52), respectivamente,. As atribuições a seus sinais estão apresentadas na Tabela 2.14 (p. 52). Para essas atribuições foram combinadas as

análises dos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT com aquelas dos mapas de contornos HSQC (Fig. 2.31, p. 54) e HMBC (Fig. 2.32, p. 54).

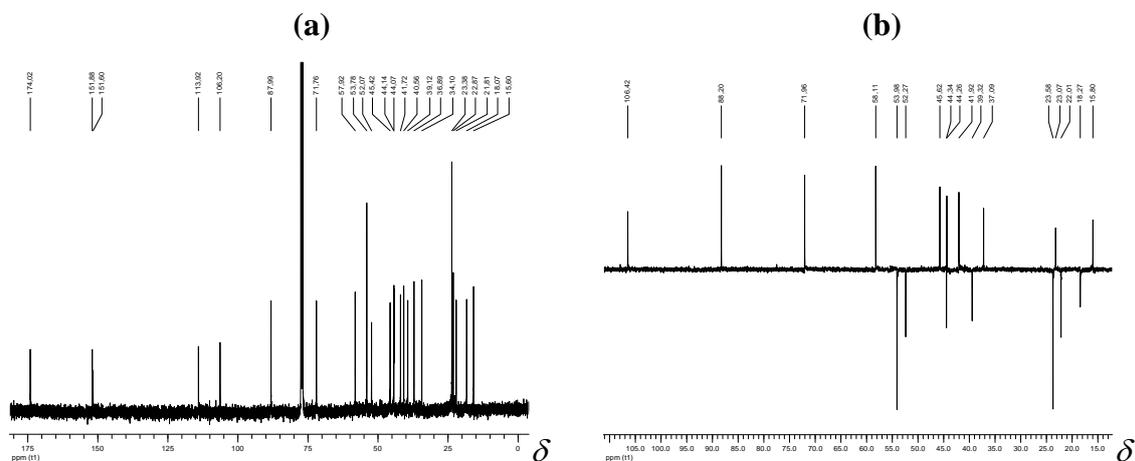
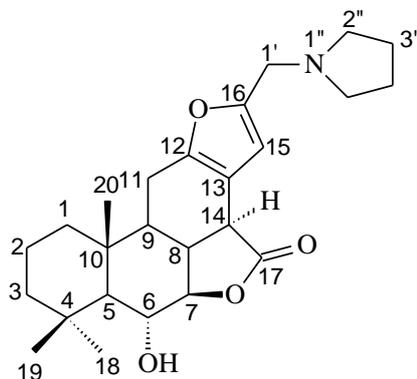


Figura 2.29: (a) Espectro de RMN de ^{13}C e (b) subspectro DEPT 135° de **2.4** (100 MHz, CDCl_3).

Tabela 2.14: Deslocamentos químicos e atribuições de RMN de ^{13}C de **2.4** (100 MHz, CDCl_3)



Carbono	$^{13}\text{C} - \delta(\text{ppm})$	Carbono	$^{13}\text{C} - \delta(\text{ppm})$
1	39,12	13	113,93
2	18,07	14	41,72
3	44,14	15	106,21
4	34,09	16	151,62
5	57,92	17	174,04
6	71,77	18	36,89
7	88,00	19	22,86
8	45,42	20	15,59
9	44,06	1'	52,07
10	40,56	2''	53,78
11	21,81	3''	23,37
12	151,89		

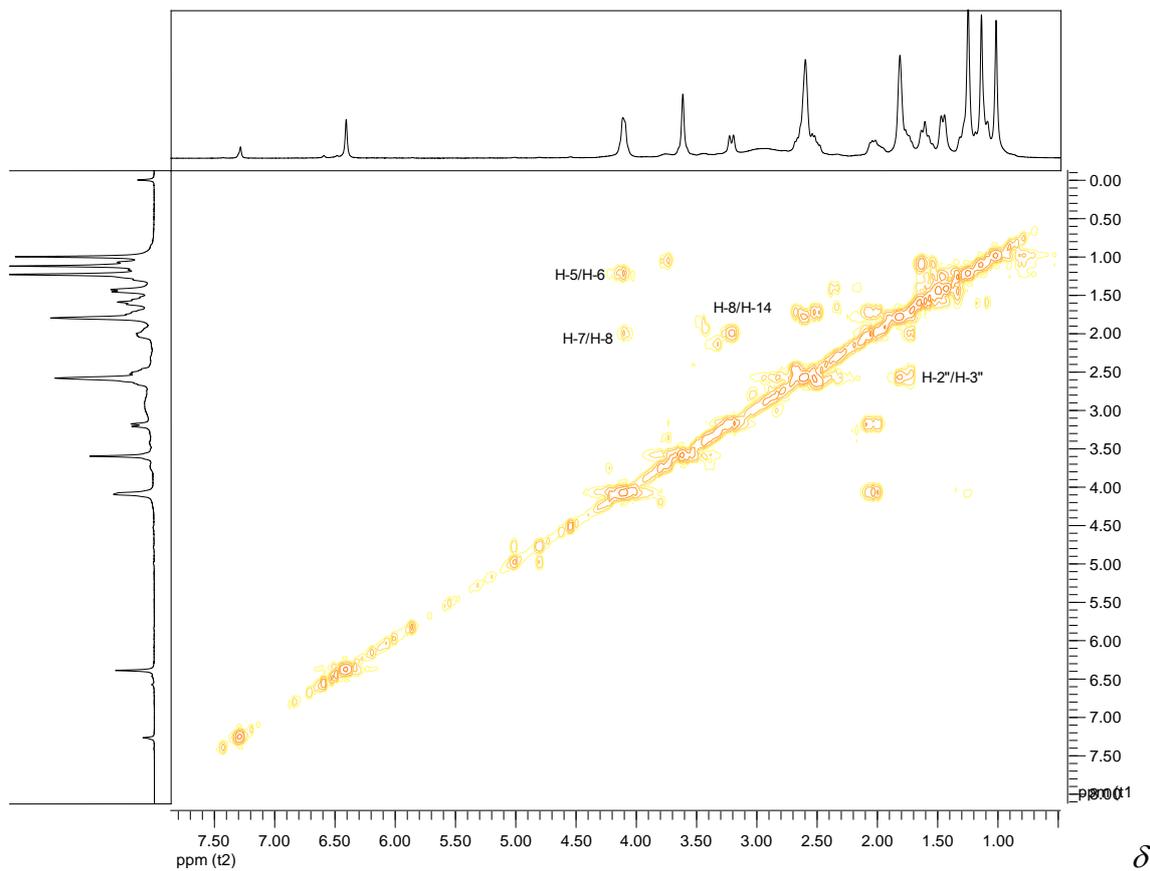


Figura 2.30: Mapa de contornos COSY de 2.4 (400 MHz, CDCl₃).

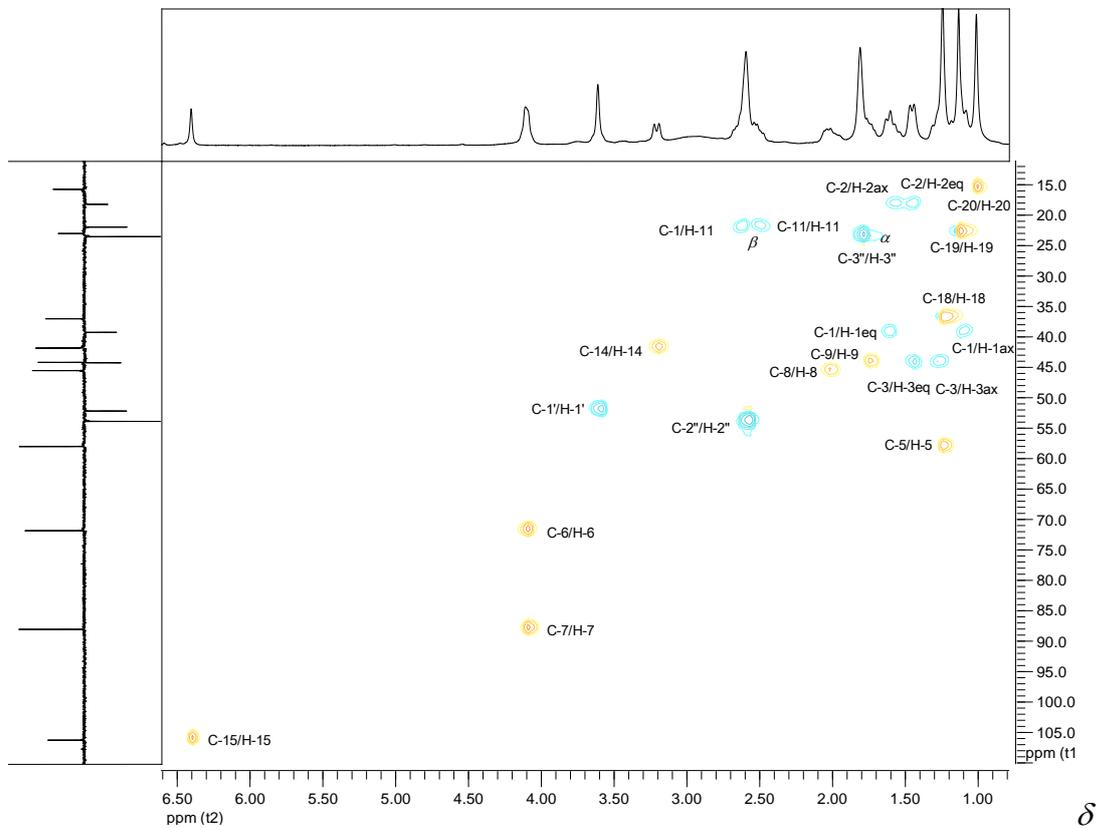


Figura 2.31: Mapa de contornos HSQC de 2.4 (400 MHz, CDCl₃).

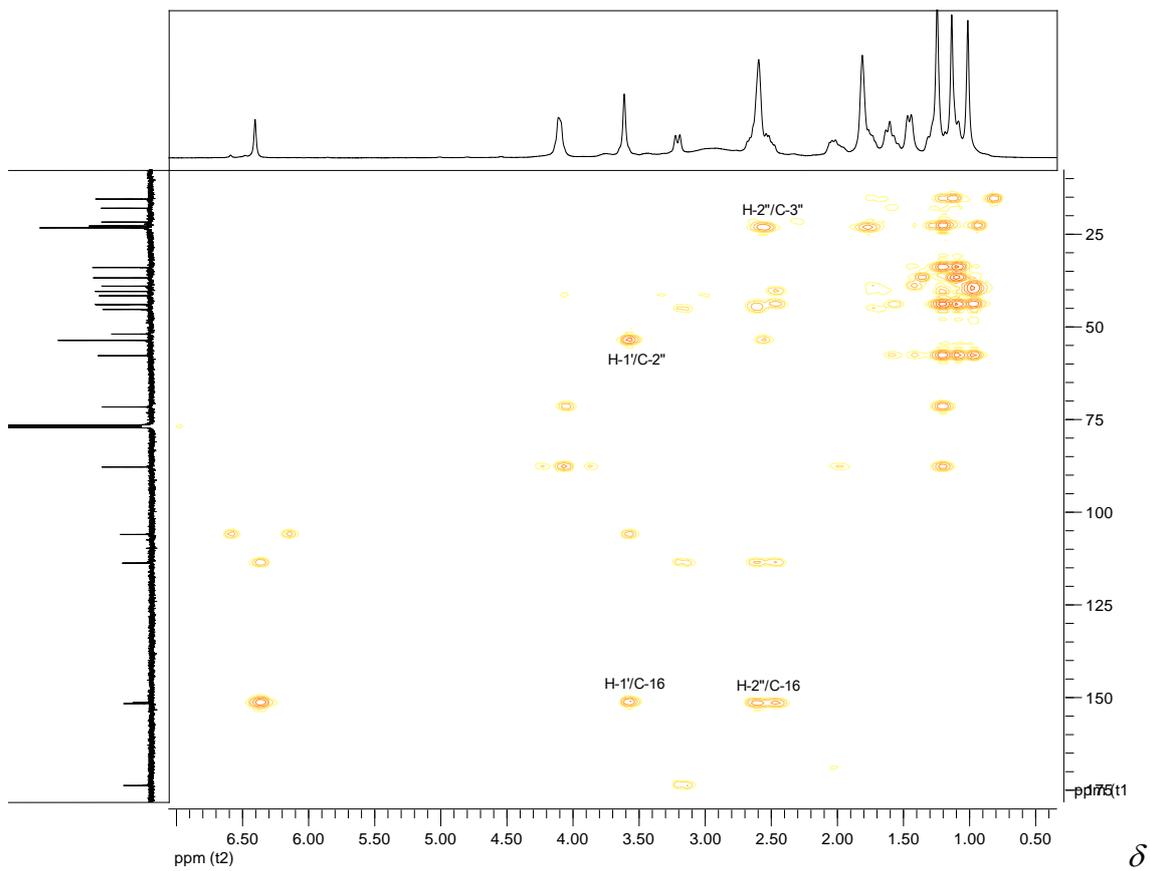


Figura 2.32: Mapa de contornos HMBC de **2.4** (400 MHz, CDCl_3).

2.5.2.5. Análise dos dados de RMN de ^{1}H de 16-(1-piperidino)metileno-6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (2.5)

As Figuras 2.33 e 2.34 apresentam respectivamente o espectro de RMN de ^{1}H de **2.5** e suas expansões. Os deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H e suas atribuições são apresentados na Tabela 2.15 (p. 56). Para tanto foram considerados também os dados da análise do mapa de contornos COSY (Fig. 2.36, p.58).

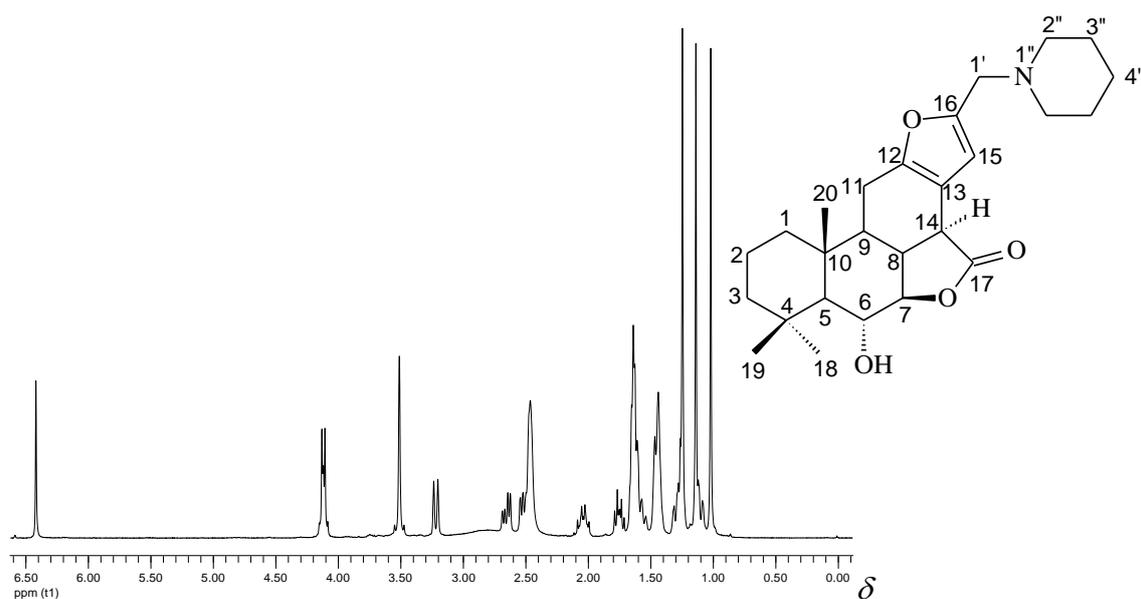


Figura 2.33: Espectro de RMN de ^{1}H de **2.5** (400 MHz, CDCl_3).

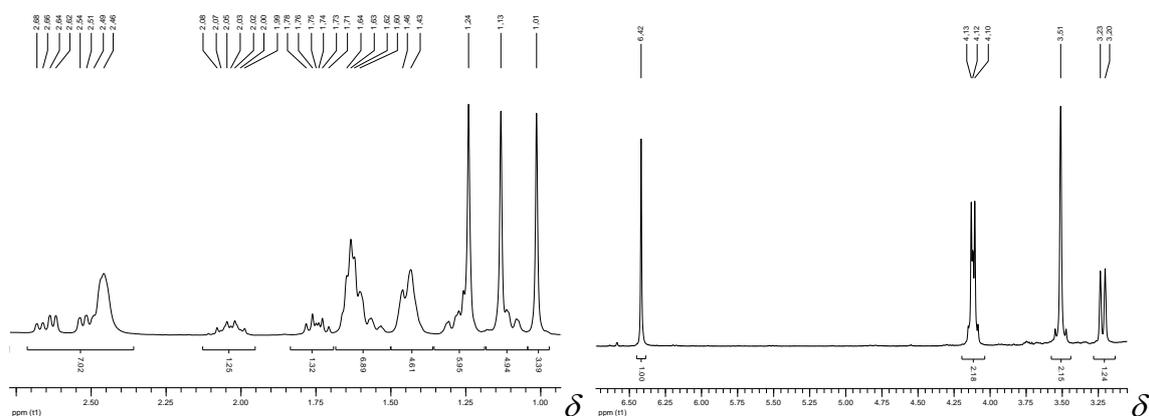
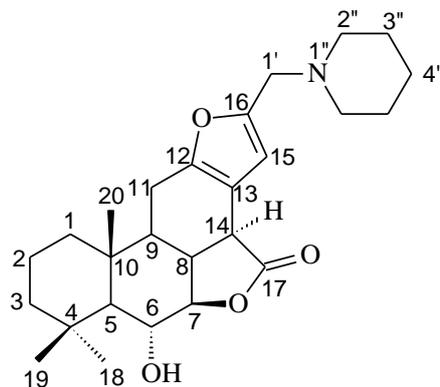


Figura 2.34: Espectros parciais de RMN de ^{1}H de **2.5** (400 MHz, CDCl_3).

Tabela 2.15: Deslocamentos químicos e atribuições de RMN de ^1H de **2.5** (400 MHz, CDCl_3)



Hidrogênio	$^1\text{H} - \delta / \text{ppm}$	mult.	J / Hz
1ax	1,08-1,13	m	-
1eq	1,60-1,64	m	-
2ax	1,53-1,56	m	-
2eq	1,43-1,46	m	-
3ax	1,08-1,13	m	-
3eq	1,43-1,46	m	-
4	-	-	-
5	1,24-1,30	m	-
6	4,10-4,13	m	-
7	4,10-4,13	m	-
8	1,99-2,08	m	-
9	1,71-1,78	m	-
10	-	-	-
11α	2,46-2,54	m	-
11β	2,66	dd	8,0 ($J_{11\beta-9}$); 17,4 ($J_{11\beta-11\alpha}$)
12	-	-	-
13	-	-	-
14	3,22	d	13,3 (J_{14-8})
15	6,42	s	-
16	-	-	-
17	-	-	-
18	1,24	s	-
19	1,13	s	-
20	1,01	s	-
1'	3,51	s	-
2''	2,46-2,54	m	-
3''	1,60-1,64	m	-
4''	1,43-1,46	m	-
OH	2,79	l	-

Os espectros de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT de **2.5** são apresentados na Figura 2.35a e b, respectivamente,. As atribuições aos seus sinais estão apresentadas na Tabela 2.16. Para essas atribuições foram combinadas as análises dos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT com aquelas dos mapas de contornos HSQC (Fig. 2.37, p. 58) e HMBC (Fig. 2.38, p. 59).

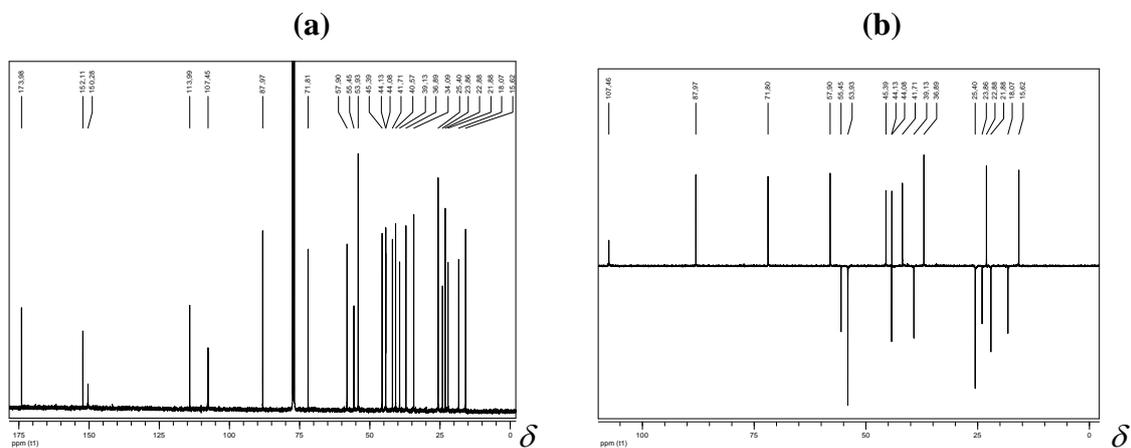
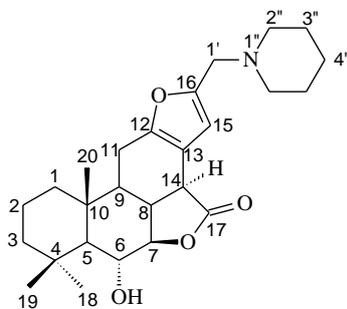


Figura 2.35: (a) Espectro de RMN de ^{13}C e (b) subspectro DEPT 135° de **2.5** (100 MHz, CDCl_3).

Tabela 2.16: Deslocamentos químicos e atribuições de RMN de ^{13}C de **2.5** (100 MHz, CDCl_3)



Carbono	$^{13}\text{C} - \delta(\text{ppm})$	Carbono	$^{13}\text{C} - \delta(\text{ppm})$
1	39,18	13	114,05
2	18,12	14	41,76
3	44,18	15	107,65
4	34,14	16	150,35
5	57,95	17	174,04
6	71,86	18	36,94
7	88,03	19	22,93
8	45,44	20	15,67
9	44,13	1'	55,50
10	40,62	2''	53,98
11	21,93	3''	25,45
12	152,18	4''	23,91

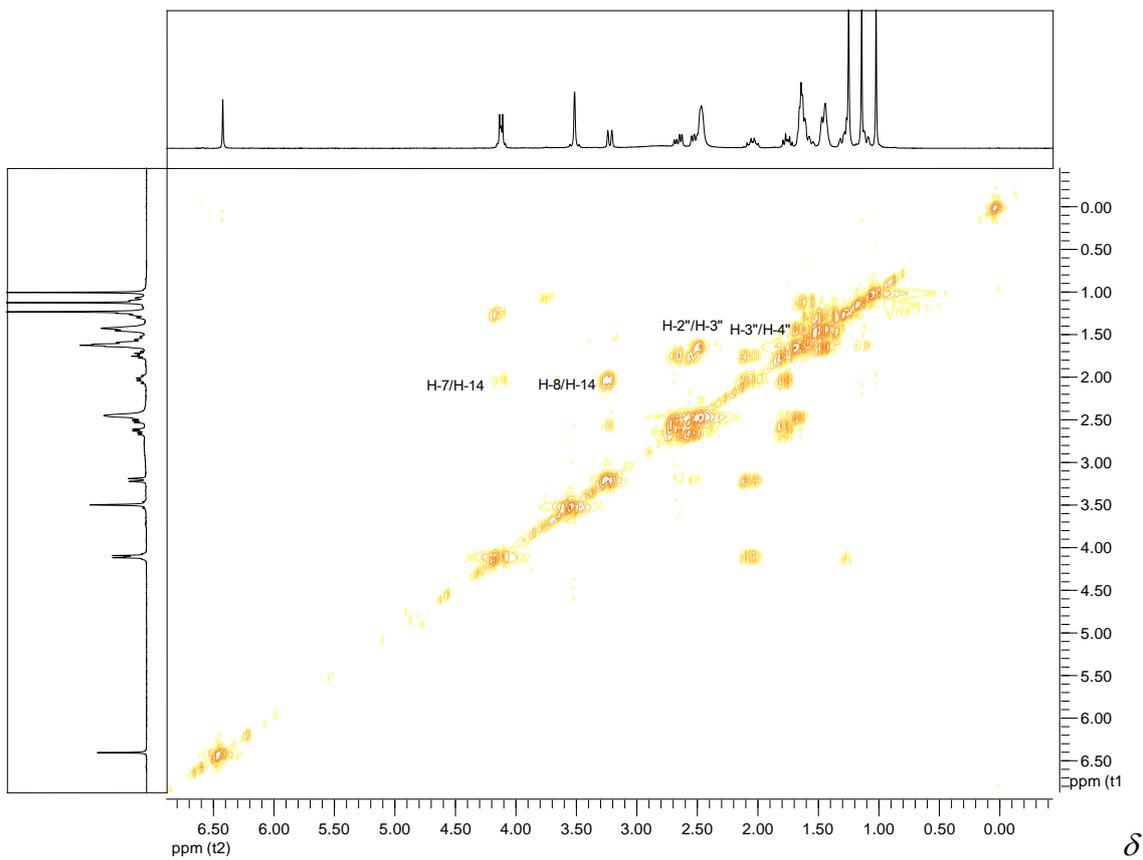


Figura 2.36: Mapa de contornos COSY de **2.5** (400 MHz, CDCl_3).

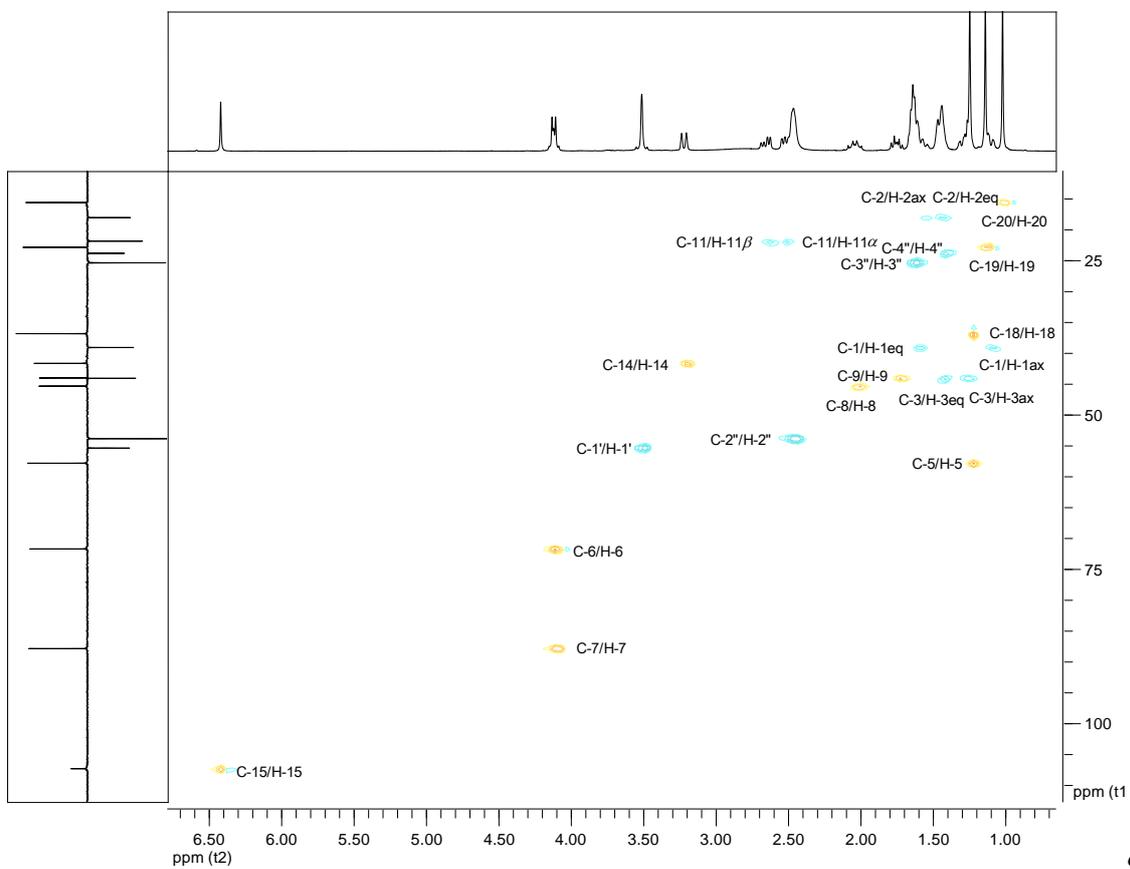


Figura 2.37: Mapa de contornos HSQC de **2.5** (400 MHz, CDCl_3).

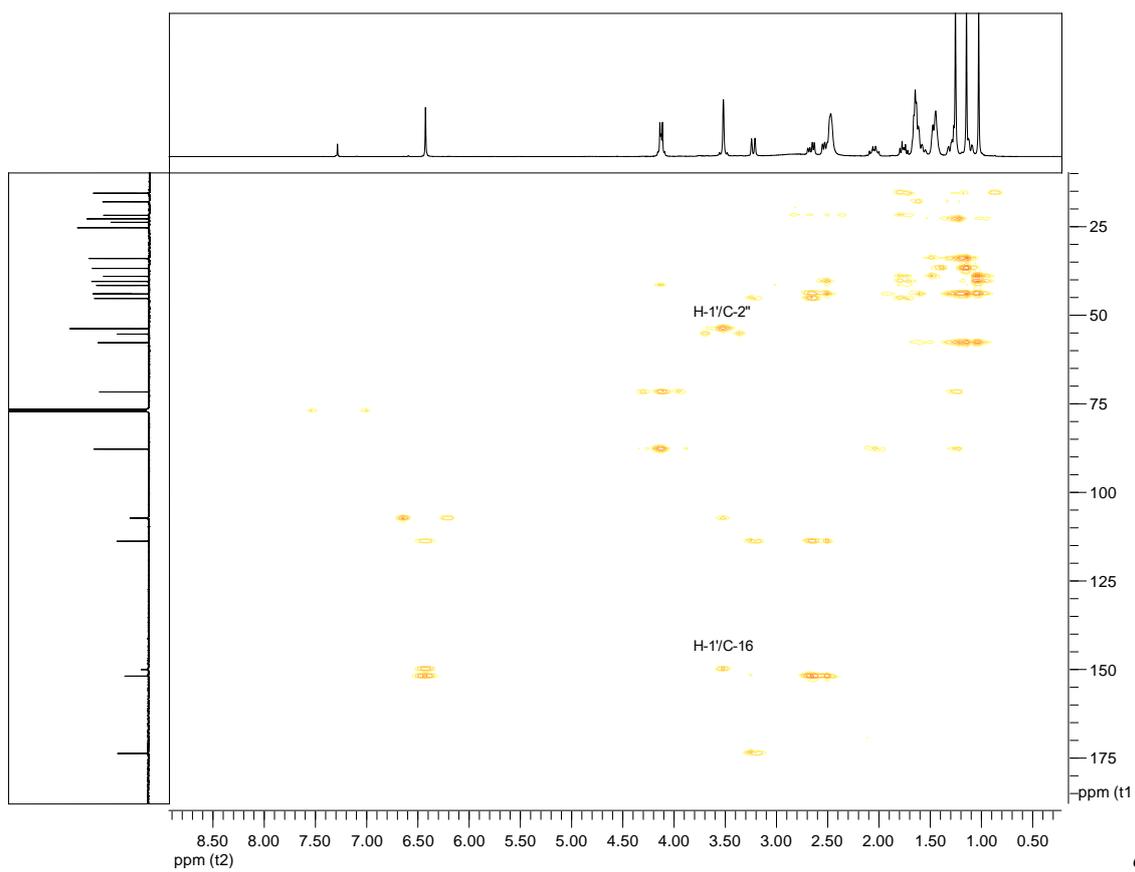


Figura 2.38: Mapa de contornos HMBC de **2.5** (400 MHz, CDCl_3).

2.5.2.6. Análise dos dados de RMN de ^{1}H de 16-(4-morfolino)metileno-6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (2.6)

As Figuras 2.39 e 2.40 apresentam respectivamente o espectro de RMN de ^{1}H de **2.6** e suas expansões. Os deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H e suas atribuições são apresentados na Tabela 2.17 (p. 61). Para tanto foram considerados também os dados da análise do mapa de contornos COSY (Fig. 2.42, p. 63).

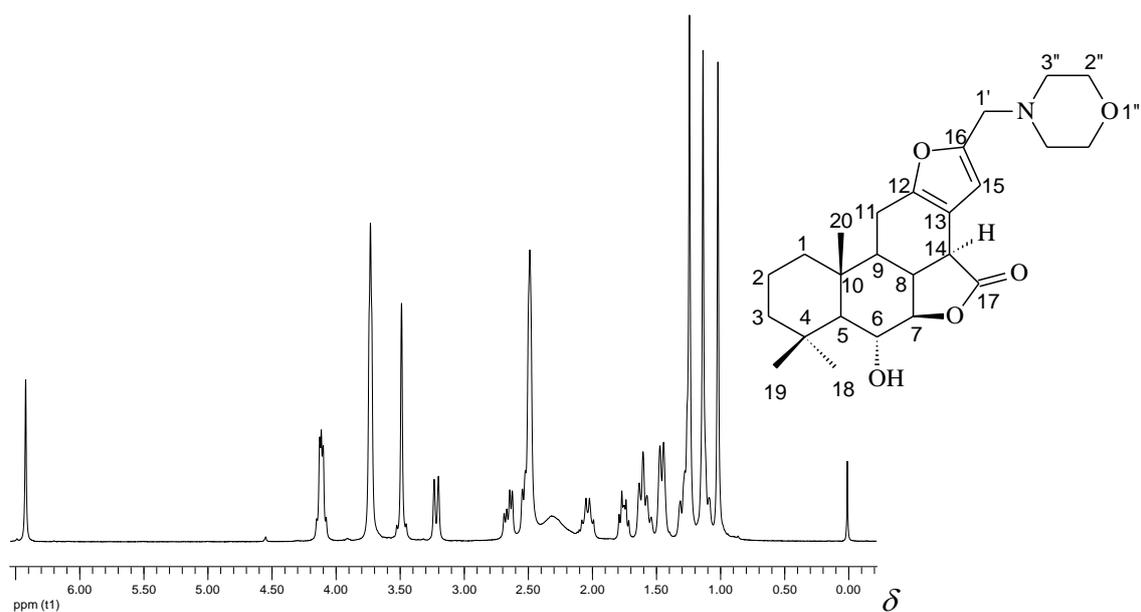


Figura 2.39: Espectro de RMN de ^{1}H de **2.6** (400 MHz, CDCl_3).

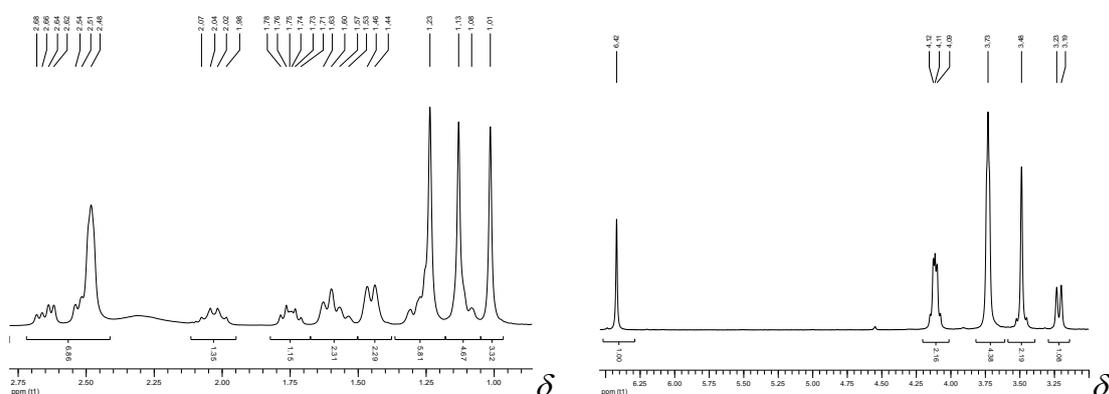
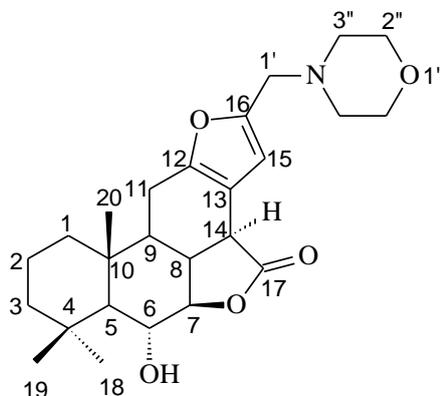


Figura 2.40: Espectros parciais de RMN de ^{1}H de **2.6** (400 MHz, CDCl_3).

Tabela 2.17: Deslocamentos químicos e atribuições de RMN de ^1H de **2.6** (400 MHz, CDCl_3)



Hidrogênio	$^1\text{H} - \delta / \text{ppm}$	Mult.	J / Hz
1ax	1,08-1,13	-	-
1eq	1,53-1,63	m	-
2ax	1,53-1,63	m	-
2eq	1,45	dl	11,4
3ax	1,23-1,30	-	-
3eq	1,45	dl	11,4
4	-	-	-
5	1,23-1,30	m	-
6	4,07-4,15	m	-
7	4,07-4,15	m	-
8	1,98-2,07	m	-
9	1,71-1,78	m	-
10	-	-	-
11α	2,48-2,54	-	-
11β	2,65	dd	7,8 ($J_{11\beta-9}$); 18,2 ($J_{11\beta-11\alpha}$)
12	-	-	-
13	-	-	-
14	3,21	d	13,1 (J_{14-8})
15	6,42	s	-
16	-	-	-
17	-	-	-
18	1,23	s	-
19	1,13	s	-
20	1,01	s	-
1'	3,48	s	-
2''	3,73	l	-
3''	2,48-2,54	m	-
OH	2,31	l	-

Os espectros de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT de **2.6** são apresentados na Figura 2.41a e b, respectivamente,. As atribuições aos seus sinais estão apresentadas na Tabela 2.18. Para essas atribuições foram combinadas as análises dos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT com aquelas dos mapas de contornos HSQC (Fig. 2.43, p. 63) e HMBC (Fig. 2.44, p. 64).

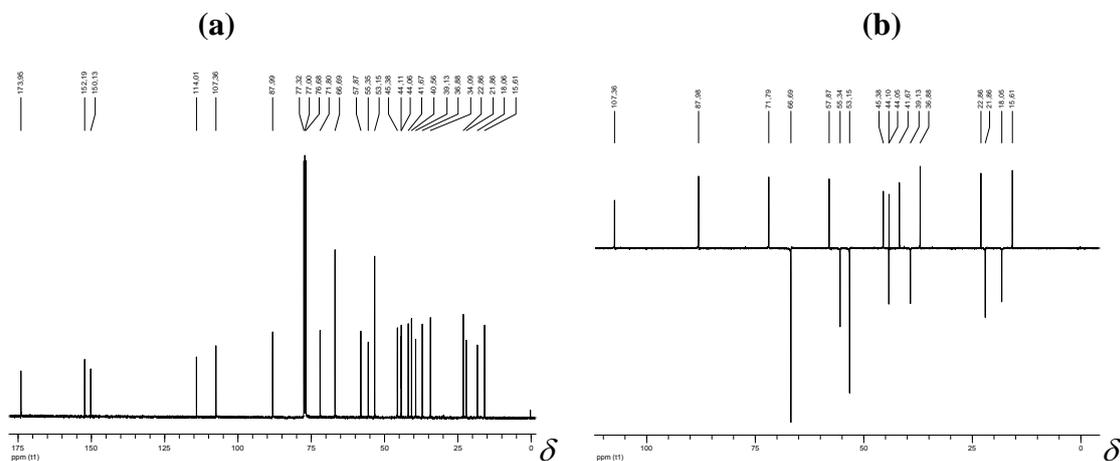
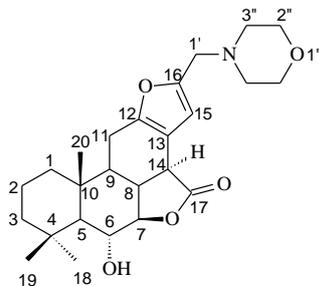


Figura 2.41: (a) Espectro de RMN de ^{13}C e (b) subspectro DEPT 135° de **2.6** (100 MHz, CDCl_3).

Tabela 2.18: Deslocamentos químicos e atribuições de RMN de ^{13}C de **2.6** (100 MHz, CDCl_3)



Carbono	$^{13}\text{C} - \delta(\text{ppm})$	Carbono	$^{13}\text{C} - \delta(\text{ppm})$
1	39,45	13	114,33
2	18,37	14	41,99
3	44,43	15	107,68
4	34,41	16	150,46
5	58,19	17	174,28
6	72,12	18	37,19
7	88,31	19	23,18
8	45,70	20	15,93
9	44,38	1'	55,66
10	40,88	2''	67,01
11	22,18	3''	53,47
12	152,52		

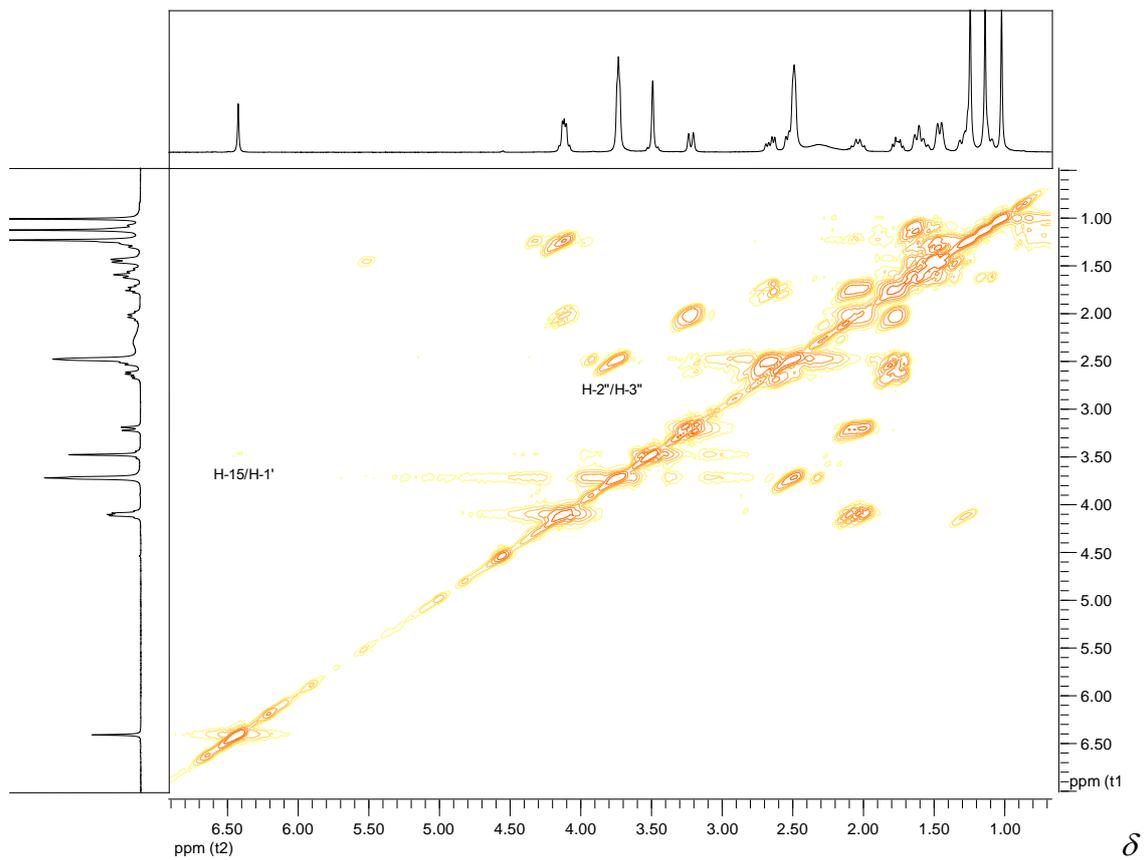


Figura 2.42: Mapa de contornos COSY de **2.6** (400 MHz, CDCl_3).

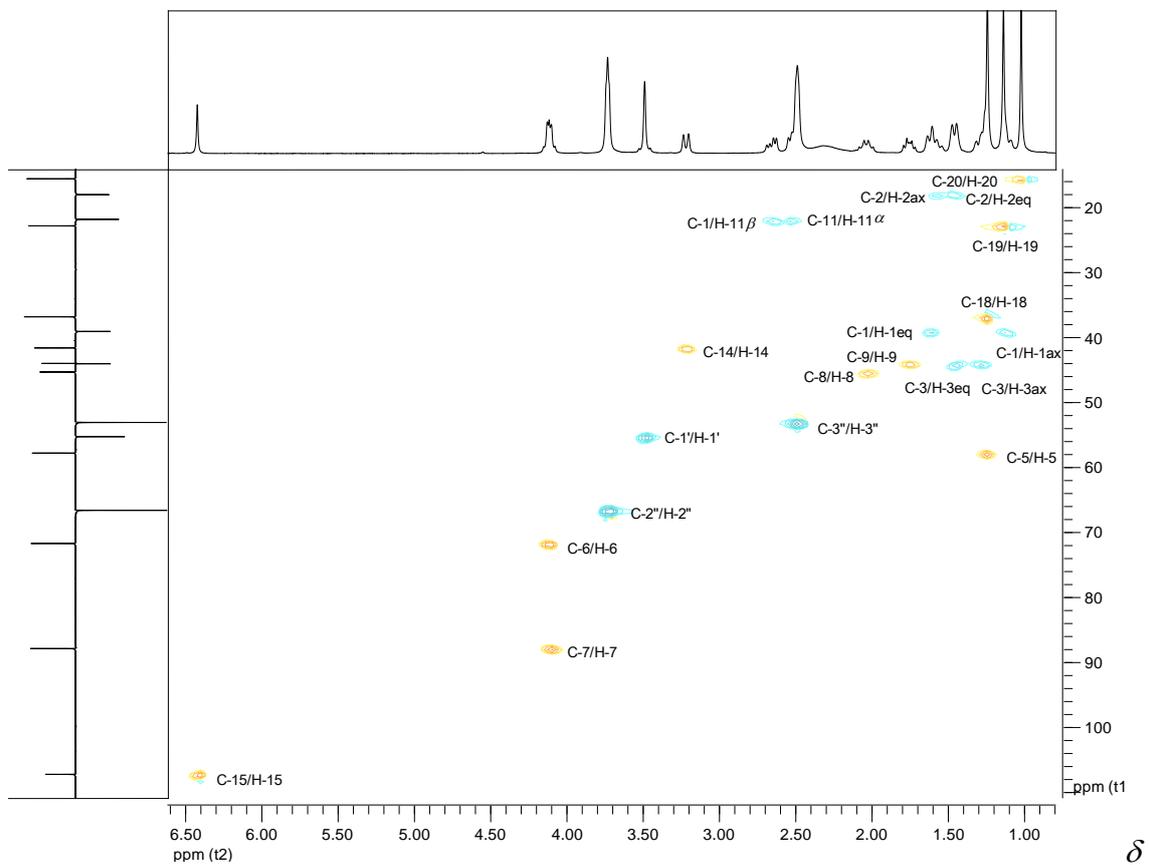


Figura 2.43: Mapa de contornos HSQC de **2.6** (400 MHz, CDCl_3).

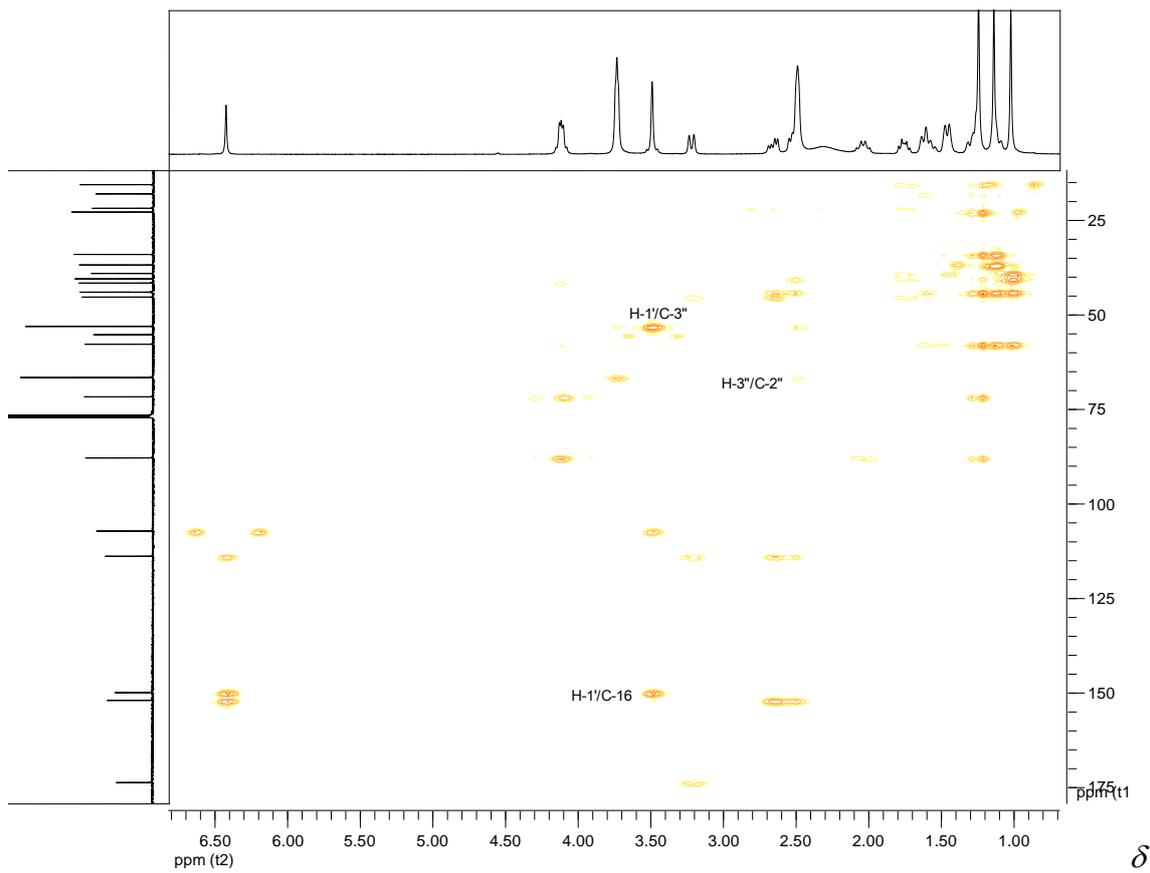


Figura 2.44: Mapa de contornos HMBC de **2.6** (400 MHz, CDCl₃).

2.6. TESTES BIOLÓGICOS

Designa-se como câncer o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo se espalhar para outras regiões do corpo, conforme mostrado na figura abaixo

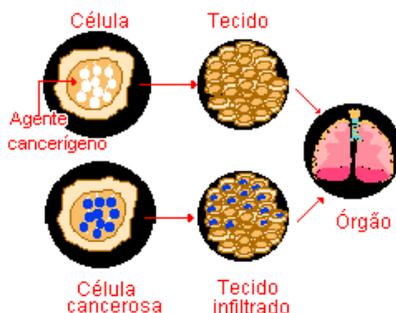


Figura 2.45: Desenvolvimento de células normais e de células com câncer. Fonte: www.inca.gov.br (acessado em 23/11/2009).

Por se dividirem rapidamente, essas células têm um caráter altamente agressivo e incontrollável, o que determina a formação de tumores ou neoplasias malignas, que nada mais são que acúmulo de células cancerosas. O tumor pode ser também benigno, significando apenas uma massa localizada de células com crescimento vagaroso e que se assemelham ao tecido original. Nesse caso o tumor não apresenta risco de vida.

Cada tipo de câncer corresponde a um tipo de célula do corpo. Os diferentes tipos de câncer se diferenciam entre si pela velocidade de multiplicação e pela capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos ou distantes.

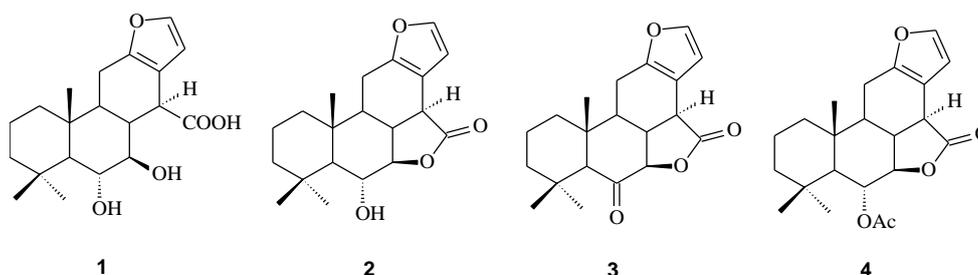
As causas do câncer são variadas, podendo ser internas ou externas ao organismo. As causas externas estão relacionadas ao meio ambiente e aos hábitos e costumes do ambiente social e cultural. Já as causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, ligadas à capacidade do organismo de se defender de agressões externas. Esses dois fatores interagem de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais.

Em 2005, de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, o que representou 13% de todas as mortes (Ministério da Saúde, 2007). Os principais tipos de câncer com maior mortalidade foram: de pulmão (1,3 milhão); de estômago (cerca de 1 milhão); de fígado (662 mil); de cólon (655 mil); e de mama (502 mil). Estima-se que, em 2020, o número de novos casos anuais seja da ordem de 15 milhões.

No Brasil, as estimativas para o ano de 2009 (MISTÉRIO DA SAÚDE, 2007) apontavam que ocorreriam 466.730 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, seriam os cânceres de próstata e de pulmão, no sexo masculino, e os cânceres de mama e de cólon do útero, no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo.

Tendo em vista a gravidade da situação devida ao avanço dos diferentes tipos de câncer na população mundial, têm sido incessantes as pesquisas na busca de substâncias para combater esta doença.

Recentemente, a literatura relatou atividade antiproliferativa do ADV (ácido 6 α ,7 β -di-hidroxivouacapan-17 β -óico, **1**) contra células de melanoma humano (VIEIRA *et al.*, 2008). Porém, é conhecido que diferentes linhagens de células apresentam sensibilidades diferentes frente a substâncias citotóxicas (DE FÁTIMA *et al.* 2005, 2006a e b, 2008 e 2009). Nesse contexto, no presente trabalho foram realizados testes com ADV (**1**) e as lactonas derivadas HVL (6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona, **2**), POL (6-oxovouacapan-7 β ,17 β -lactona, **3**) e a AVL (6 α -acetoxivouacapan-7 β ,17 β -lactone, **4**) em relação a nove linhagens de células cancerígenas: melanoma (UACC-62), mama (MCF-7), ovário resistente a adriamicina (NCI-ADR/RES), rim (786-0), pulmão, não-pequenas (NCI-H460), próstata (PC-3), ovário (OVCAR-03), cólon (HT-29) e leucemia eritromieloblastóide (K562). Estes testes foram realizados pela equipe do prof. Dr. João Ernesto de Carvalho (CPQBA) da UNICAMP.



A proliferação celular foi determinada por quantificação espectrofotométrica do conteúdo de proteína celular usando teste com sulforodamina B (MONKS *et al.*, 1991) e foi comparado com a doxorubicina (DOX) empregada como controle positivo. Em cada caso foram feitas três medidas, uma em tempo zero (T_0) no começo da incubação e outras duas 48 horas depois, sendo uma para as células não-tratadas (C) e outra para aquelas expostas à substância que estava sendo testada (T). A proliferação celular foi determinada de acordo com a equação $100 \times [(T - T_0) / (C - T_0)]$.

O efeito citostático é observado quando $C > T \geq T_0$, enquanto que o efeito citotóxico ocorre quando $T < T_0$.

As Figuras 2.46a-b a 2.47a-c apresentam os gráficos da percentagem do crescimento celular durante 48 horas dos diferentes tipos de células cancerígenas estudadas, em função da concentração das substâncias testadas. Para comparação, o resultado do efeito da concentração da DOX na proliferação de diferentes células de câncer é apresentado, inicialmente, na Figura 2.46a, enquanto os efeitos do ADV, HVL, POL e AVL são apresentados, respectivamente, nas Figuras 2.46b e 2.47a-c.

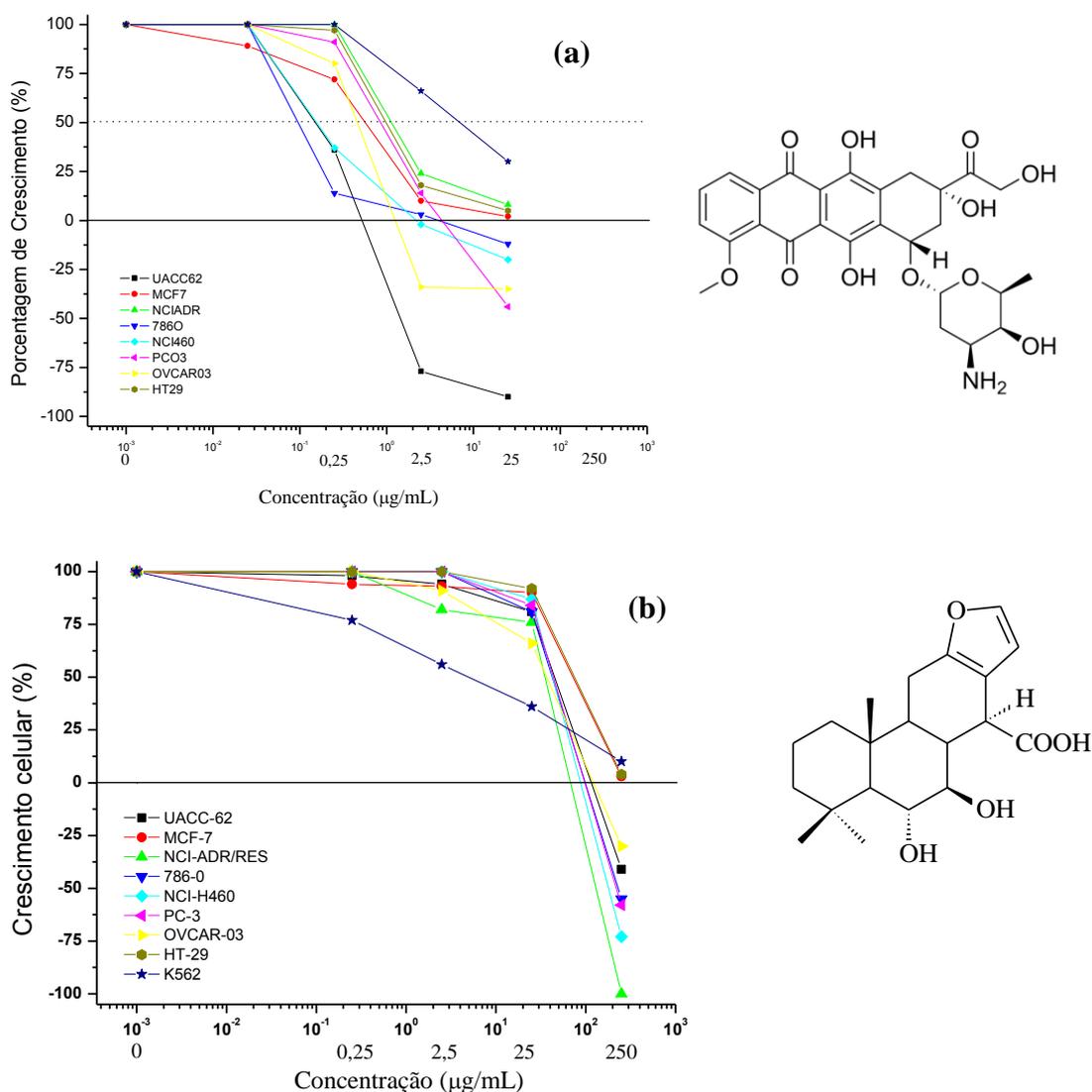


Figura 2.46: Porcentagem do crescimento de células de câncer humano [melanoma (UACC-62), mama (MCF-7), ovário resistente a adriamicina (NCI-ADR/RES), rim (786-0), pulmão (NCI-H460), próstata (PC-3), ovário (OVCAR-03), cólon (HT-29) e leucemia eritromieloblastóide (K562)] após 48 h na presença de diferentes concentrações de (a) Doxorubicina e (b) ADV (1).

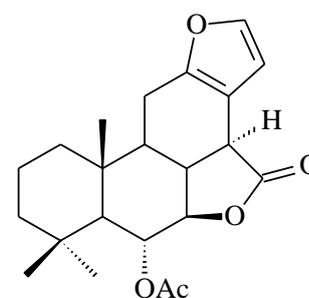
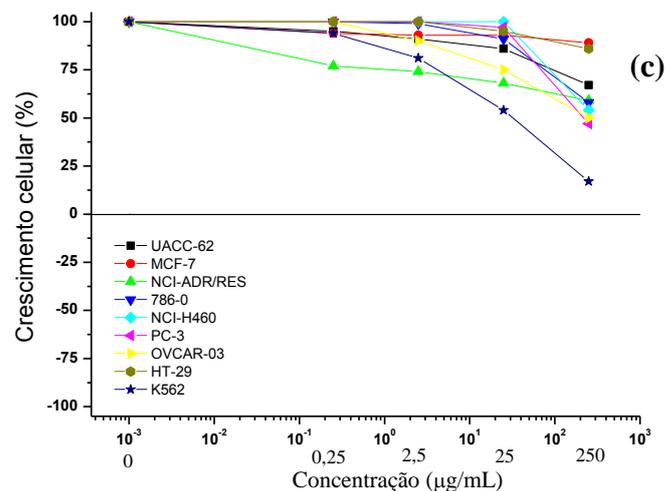
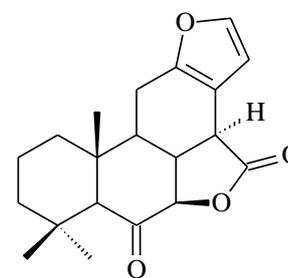
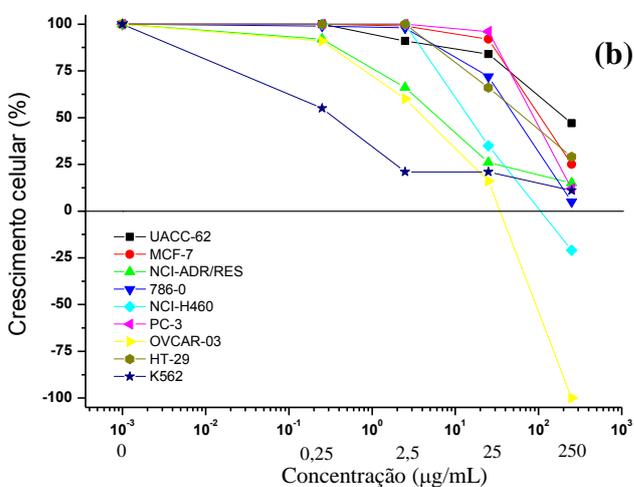
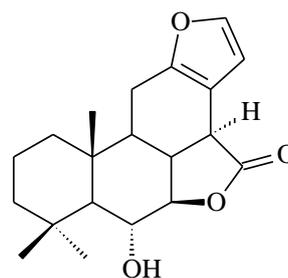
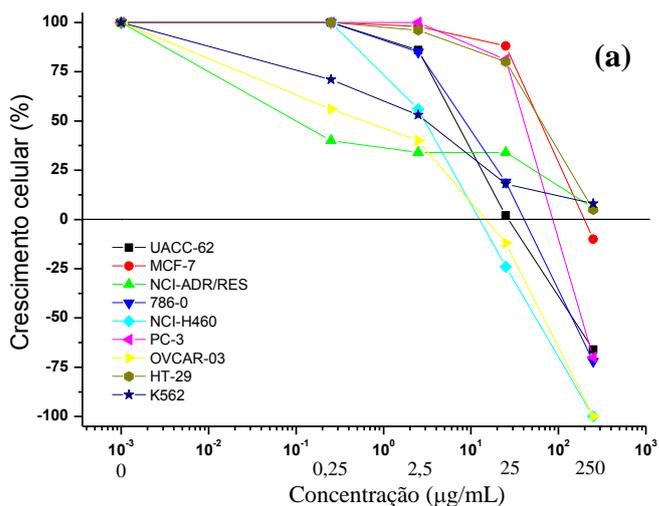


Figura 2.47: Porcentagem do crescimento de células de câncer humano [melanoma (UACC-62), mama (MCF-7), ovário resistente a adriamicina (NCI-ADR/RES), rim (786-0), pulmão (NCI-H460), próstata (PC-3), ovário (OVCAR-03), cólon (HT-29) e leucemia eritromieloblastóide (K562)] após 48 h na presença de diferentes concentrações de (a) HVL (2), (b) POL (3) e (c) AVL (4).

Nos gráficos das Figuras 2.46a-b e 2.47a-c os valores positivos de percentagem de crescimento celular referem-se ao efeito citostático das substâncias testadas, ou seja, ela inibe o crescimento das células cancerígenas. Já os valores negativos de percentagem de crescimento celular referem-se ao efeito citotóxico das substâncias testadas, ou seja, a droga mata as células cancerígenas. Uma análise geral desses gráficos mostra que, em relação à DOX, para quase todos os tipos de células, as substâncias testadas foram menos potentes. Quando comparados o ADV (1) e seus derivados lactônicos 2 a 4, observa-se que somente a AVL (4) não foi capaz de comprometer o crescimento das células cancerígenas. Já HVL (2) e POL (3) são capazes de comprometer o crescimento das células cancerígenas em maior escala que o ADV sendo que HVL parece ser a mais ativa dentre as quatro substâncias testadas.

As Tabelas 2.19 e 2.20 apresentam os valores calculados para a inibição de 50% do crescimento das células, GI₅₀, e para a inibição total do crescimento das células, TGI, da DOX, ADV (1), HVL (2), POL (3) e AVL (4) contra as diferentes linhagens de células cancerígenas.

Tabela 2.19. Valor de GI₅₀, em µg/mL, da DOX, ADV (1), HVL (2), POL (3), e AVL (4) contra linhagens de células de câncer humano

Linhagem de células	DOX	ADV (1)	HVL (2)	POL (3)	AVL (4)
	GI ₅₀				
UACC-62 ^a	0,23	30,35	5,19	218,69	>250,00
MCF-7 ^b	0,49	61,18	27,66	122,23	>250,00
NCI-ADR/Res ^c	1,60	26,80	0,35	6,74	>250,00
786-0 ^d	0,15	30,40	8,87	43,90	>250,00
NCI-H460 ^e	0,22	31,62	2,53	23,15	>250,00
PC-3 ^f	0,90	31,65	30,82	102,94	231,49
OVCAR-03 ^g	0,30	27,38	0,52	3,88	>250,00
HT-29 ^h	1,23	67,99	52,53	71,54	>250,00
K562 ⁱ	7,40	4,56	2,08	0,36	27,37

^a melanoma; ^b mama; ^c ovário resistente a adriamicina; ^d rim; ^e pulmão; ^f próstata;

^g ovário; ^h cólon; ⁱ leucemia eritromieloblastóide.

Tabela 2.20. Valor de TGI, em $\mu\text{g/mL}$, da DOX, ADV (1), HVL (2), POL (3), e AVL (4) contra linhagens de células de câncer humano

Linhagem de células	DOX	ADV (1)	HVL (2)	POL (3)	AVL (4)
	TGI	TGI	TGI	TGI	TGI
UACC-62 ^a	0,47	130,88	30,01	>250,00	>250,00
MCF-7 ^b	>25,00	>250,00	213,67	>250,00	>250,00
NCI-ADR/Res ^c	>25,00	43,21	>250,00	>250,00	>250,00
786-0 ^d	4,63	110,62	37,28	>250,00	>250,00
NCI-H460 ^e	4,25	97,12	12,45	112,69	>250,00
PC-3 ^f	5,10	111,26	91,86	>250,00	>250,00
OVCAR-03 ^g	2,31	130,07	8,82	25,35	>250,00
HT-29 ^h	>25,00	>250,00	>250,00	>250,00	>250,00
K562 ⁱ	>25,00	>250,00	>250,00	>250,00	>250,00

^a melanoma; ^b mama; ^c ovário resistente a adriamicina; ^d rim; ^e pulmão; ^f próstata;

^g ovário; ^h cólon; ⁱ leucemia eritromieloblastóide.

Conforme os dados das Tabelas 2.19 e 2.20, os testes mostraram que a substância **2** (HVL) é a mais ativa dentre os quatro furanoditerpenos. Além disso, quando são comparados os valores de GI_{50} ele é mais eficaz que a droga de referência (DOX) em inibir o crescimento das células cancerígenas de ovário resistente a adriamicina (NCI-ADR/RES) e leucemia eritromieloblastóide (K562). Comparando simultaneamente os valores de GI_{50} e TGI verifica-se ainda que essa substância inibiu o crescimento de cinco linhagens de câncer [melanoma (UACC-62), rim (786-0), pulmão (NCI-H460), próstata (PC-3) e ovário (OVCAR-03)] quando empregado em concentrações menores que $100 \mu\text{g/mL}$.

Vale ressaltar que a substância **3** (POL) foi uma inibidora de crescimento mais eficaz (GI_{50}) em relação às células de leucemia eritromieloblastoide (K562) que a DOX, sendo necessária uma concentração 19 vezes menor.

Esses resultados mostram a HVL (2), dentre os furanoditerpenos avaliados, como sendo a mais promissora para estudos futuros, especialmente em relação às células de ovário.

Considerando esses resultados, foram sintetizados os derivados **2.1 a 2.6** (p. 13) da HVL (2), os quais foram submetidos aos testes com as mesmas linhagens de células cancerígenas. Desse modo, objetivou-se obter dados para estudos da relação estrutura-atividade biológica. Cálculos teóricos relativos a esta relação serão apresentados no item 2.7 (p. 77). As Figuras 2.48a-b (p. 71) a 2.50a-b (p. 73) apresentam os gráficos da

percentagem do crescimento celular durante 48 horas dos diferentes tipos de células cancerígenas estudadas, em função da concentração das substâncias testadas **2.1** a **2.6**.

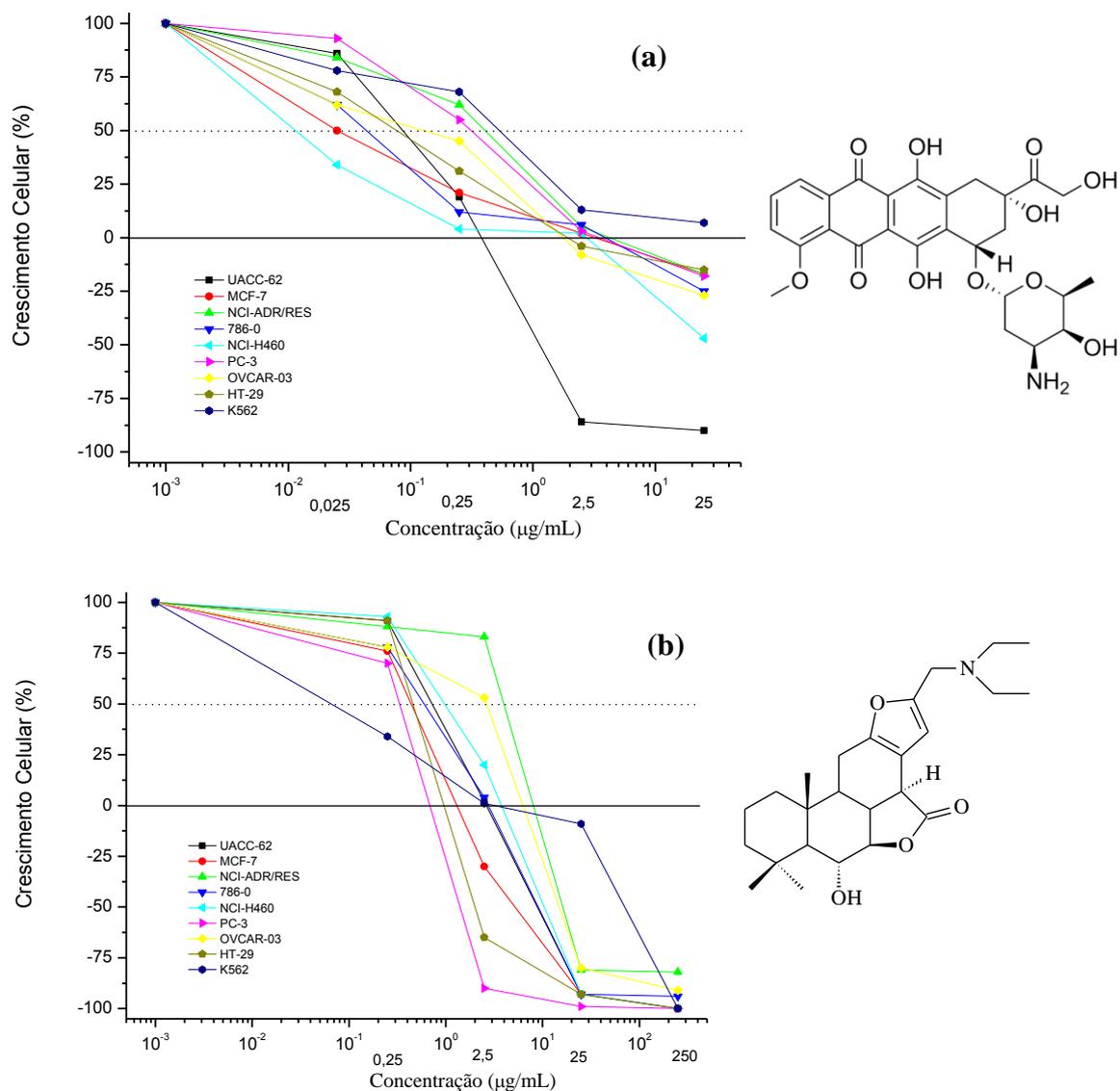


Figura 2.48: Porcentagem do crescimento de células de câncer humano [melanoma (UACC-62), mama (MCF-7), ovário resistente a adriamicina (NCI-ADR/RES), rim (786-0), pulmão (NCI-H460), próstata (PC-3), ovário (OVCAR-03), cólon (HT-29) e leucemia eritromieloblastóide (K562)] após 48 h na presença de diferentes concentrações de (a) DOX e (b) **2.1**.

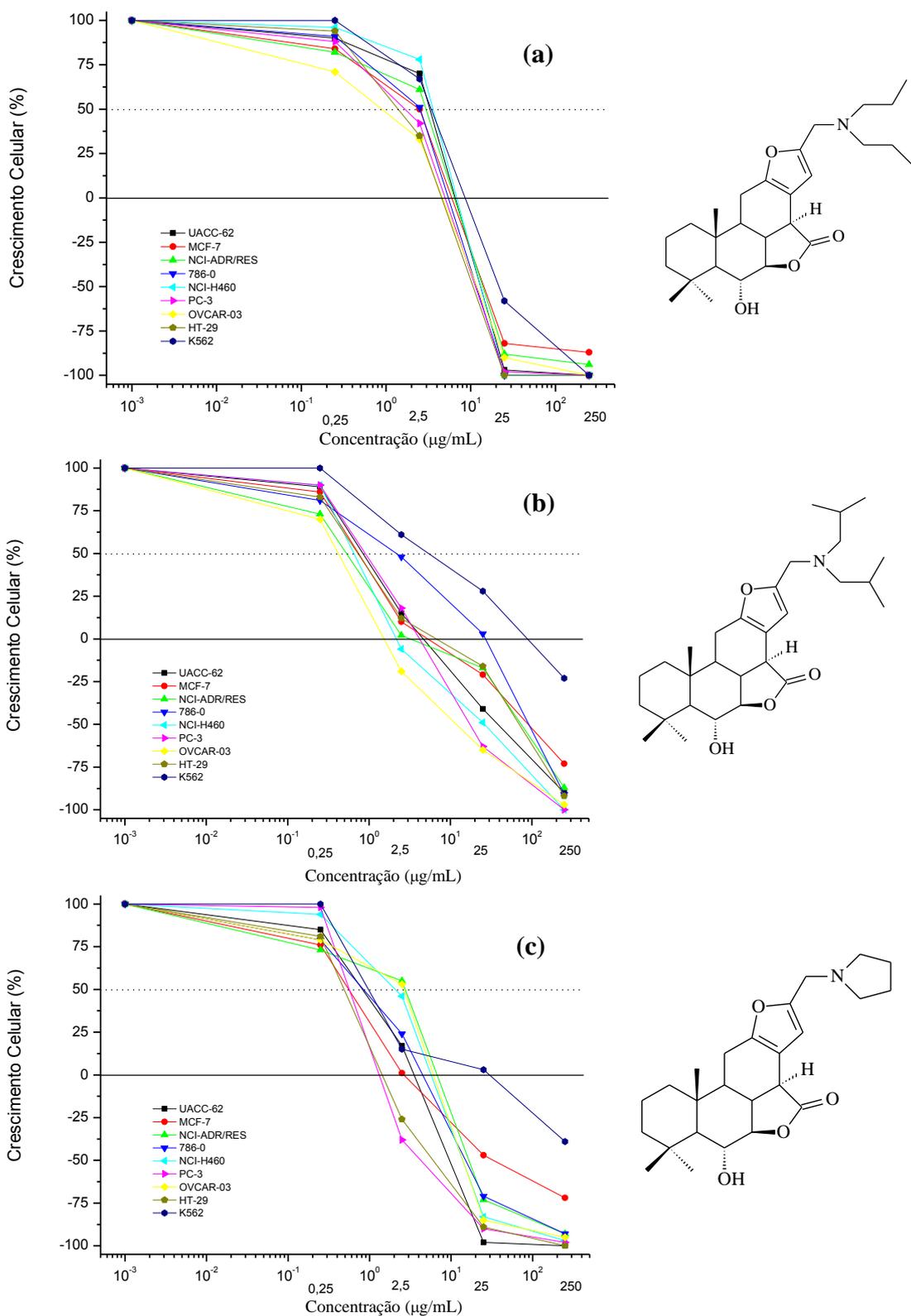


Figura 2.49: Porcentagem do crescimento de células de câncer humano [melanoma (UACC-62), mama (MCF-7), ovário resistente a adriamicina (NCI-ADR/RES), rim (786-0), pulmão (NCI-H460), próstata (PC-3), ovário (OVCAR-03), cólon (HT-29) e leucemia eritromieloblastóide (K562)] após 48 h na presença de diferentes concentrações de (a) 2.2, (b) 2.3 e (c) 2.4.

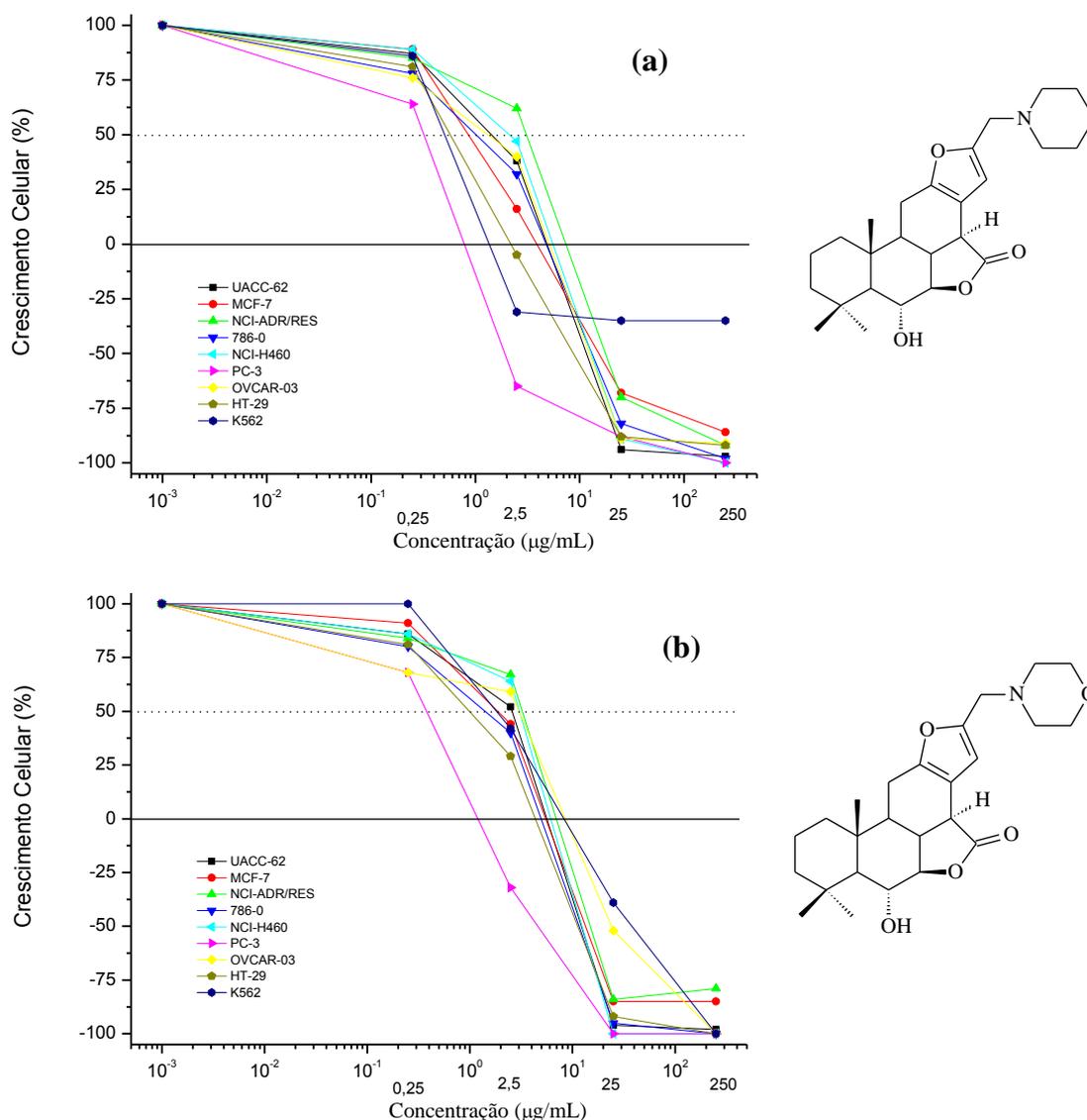


Figura 2.50: Porcentagem do crescimento de células de câncer humano [melanoma (UACC-62), mama (MCF-7), ovário resistente a adriamicina (NCI-ADR/RES), rim (786-0), pulmão (NCI-H460), próstata (PC-3), ovário (OVCAR-03), cólon (HT-29) e leucemia eritromieloblastóide (K562)] após 48 h na presença de diferentes concentrações de (a) **2.5** e (b) **2.6**.

Comparando os gráficos das Figuras 2.48a-b a 2.50a-b com aqueles da Figura 2.47a (p. 68), relativo à HVL (**2**), verifica-se que as substâncias **2.1** a **2.6** foram, no geral, mais eficazes em inibir o crescimento de células cancerígenas. Comparando a Figura 2.48a (p. 71), relativa à DOX com as Figuras 2.48b, 2.49a-c e 2.50a-b, verifica-se que, para a maioria dos tipos de células testadas, a DOX foi mais eficiente. Entretanto, em certos casos a substância testada foi mais potente. Isto pode ser melhor

verificado analisando os dados das Tabelas 2.21 e 2.22, que apresentam respectivamente os valores calculados de GI₅₀ e TGI para a DOX, HVL e as substâncias **2.1** a **2.6**.

Tabela 2.21 Valor de GI₅₀, em µg/mL, da DOX, HVL e das substâncias **2.1** a **2.6** contra linhagens de células de câncer humano.

Linhagem de células	DOX	HVL (2)	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6
UACC-62 ^a	0,09	5,20	0,57	2,76	0,86	0,78	2,44	2,5
MCF-7 ^b	0,03	27,70	0,27	2,50	0,69	1,81	0,88	2,45
NCI-ADR/Res ^c	0,33	0,30	3,12	2,64	0,39	2,50	2,65	2,73
786-0 ^d	0,04	8,80	2,23	2,50	2,50	0,76	2,31	2,37
NCI-H460 ^e	<0,03	2,50	1,35	2,96	0,29	2,50	2,50	2,69
PC-3 ^f	0,28	30,80	0,28	2,40	0,98	0,34	0,27	0,27
OVCAR-03 ^g	0,08	0,50	2,50	2,36	0,28	2,50	2,37	2,60
HT-29 ^h	0,07	52,50	0,32	2,33	0,67	0,30	1,76	1,68
K562 ⁱ	0,40	2,10	<0,25	2,77	5,06	1,58	0,32	2,39

^a melanoma; ^b mama; ^c ovário resistente a adriamicina; ^d rim; ^e pulmão; ^f próstata;

^g ovário; ^h cólon; ⁱ leucemia eritromieloblastóide.

Tabela 2.22. Valor de TGI, em µg/mL, da DOX, HVL e das substâncias **2.1** a **2.6** contra linhagens de células de câncer humano.

Linhagem de células	DOX	HVL (2)	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6
UACC-62 ^a	0,33	30,00	2,55	4,96	5,27	3,05	3,96	4,36
MCF-7 ^b	3,30	21,70	1,44	5,31	7,40	3,86	3,82	4,77
NCI-ADR/Res ^c	6,60	>250,00	8,15	5,53	5,39	6,18	7,10	6,34
786-0 ^d	2,67	37,30	2,49	3,72	16,63	3,98	4,11	4,04
NCI-H460 ^e	0,90	12,40	3,23	6,01	3,20	4,94	4,64	4,05
PC-3 ^f	5,85	91,90	0,58	3,83	4,06	1,69	0,78	1,27
OVCAR-03 ^g	2,95	8,80	5,62	3,90	1,86	5,28	4,36	8,05
HT-29 ^h	3,90	>250,00	1,14	3,35	6,91	1,61	2,23	3,68
K562 ⁱ	20,48	>250,00	3,01	8,87	86,07	23,18	4,55	8,24

^a melanoma; ^b mama; ^c ovário resistente a adriamicina; ^d rim; ^e pulmão; ^f próstata;

^g ovário; ^h cólon; ⁱ leucemia eritromieloblastoide.

Os dados apresentados nas Tabelas 2.21 e 2.22 mostram que as novas substâncias **2.1** a **2.6** foram mais eficazes em comprometer o crescimento das células cancerígenas em relação à HVL. Analisando os valores da Tabela 2.21 percebe-se que as substâncias **2.1** e **2.3** são as mais ativas dentre todas, sendo que **2.1** é mais eficaz em

inibir o crescimento das células cancerígenas de mama (MCF-7), rim (786-0), próstata (PC-3), cólon (HT-29) e leucemia eritromieloblastóide (K562) enquanto **2.3** é mais eficaz em inibir o crescimento das células de ovário resistente a adriamicina (NCI-ADR/RES), pulmão (NCI-H460) e ovário (OVCAR-03).

Quando os valores de GI_{50} (Tabela 2.21) das substâncias testadas são comparados com os da DOX percebe-se que a DOX é mais potente para quase todas as linhagens, porém a substância **2.1** apresenta a mesma resposta em relação às células de próstata (PC-3) e é mais potente em relação às células de leucemia (K562). Já a substância **2.5** é mais potente que a DOX em relação às células de leucemia (K562) e, juntamente com a substância **2.6**, é mais potente que a DOX em relação às células de próstata (PC-3).

Quando são analisados os valores de TGI (Tabela 2.22) percebe-se que a substância **2.1** é a mais ativa dentre as seis, sendo mais potente que a droga de referência DOX em inibir o crescimento das células cancerígenas de mama (MCF-7), rim (786-0), próstata (PC-3), cólon (HT-29) e leucemia eritromieloblastóide (K562).

As outras substâncias mostraram também resultados promissores. A substância **2.2** foi mais potente que a DOX em relação às células de ovário resistente a adriamicina (NCI-ADR/RES), próstata (PC-3) e cólon (HT-29). A substância **2.3** foi mais potente que a DOX em relação às células de ovário expressando o fenótipo resistente a adriamicina (NCI-ADR/RES), próstata (PC-3) e ovário (OVCAR-03). A substância **2.4** foi mais potente que a DOX em relação às células de ovário expressando o fenótipo resistente a adriamicina (NCI-ADR/RES), próstata (PC-3) e cólon (HT-29). A substância **2.5** foi mais potente que a DOX em relação às células de próstata (PC-3), cólon (HT-29) e leucemia eritromieloblastoide (K562). A substância **2.6** foi mais potente que a DOX em relação às células de ovário resistente a adriamicina (NCI-ADR/RES), próstata (PC-3), cólon (HT-29) e leucemia eritromieloblastóide (K562).

Analisando os valores da Tabela 2.21 percebe-se que, em relação às células de ovário resistente a adriamicina (NCI-ADR/RES), a HVL foi mais eficaz em inibir o crescimento das células cancerígenas que seus derivados, sendo mais potente que a DOX. A substância **2.3**, segunda substância mais ativa, é cerca de sete vezes mais eficaz em inibir o crescimento das células cancerígenas que as demais. Em relação às células cancerígenas rim (786-0) nenhuma substância apresentou resultados semelhantes ao da DOX, embora **2.3** tenha sido cerca de três vezes mais potente que os demais derivados. Quanto às células cancerígenas pulmão (NCI-H460), apesar de todas as substâncias

apresentarem resultados inferiores à DOX, somente as substâncias **2.1** e **2.3** são mais ativas que a HVL, sendo **2.1** cerca de quatro vezes mais eficaz em inibir o crescimento das células cancerígenas. Em relação às células cancerígenas de ovário (OVCAR-03), todos os derivados apresentaram resultados inferiores ao da DOX e, com exceção do derivado **2.3**, em relação à HVL. Mesmo sendo menos eficaz em inibir o crescimento de células cancerígenas de ovário que a DOX, a substância **2.3** foi cerca de oito vezes mais eficaz que as demais substâncias.

Analisando os valores da tabela 2.22 (p. 74) percebe-se que, em relação às células cancerígenas de mama (MCF-7), somente a substância **2.1** foi mais eficaz que a DOX em inibir o crescimento das células, sendo de duas a cinco vezes mais eficaz que os demais derivados. Em relação às células cancerígenas de rim (786-0), somente a substância **2.1** foi mais eficaz que a DOX em inibir o crescimento das células, sendo de duas a doze vezes mais eficaz que os demais derivados. Em relação às células cancerígenas de próstata (PC-3), todos os derivados foram mais eficazes que a DOX em inibir o crescimento das células, sendo as substâncias **2.1** e **2.5** as mais eficazes. Essas duas substâncias foram em média de duas a seis vezes mais eficazes que os demais derivados. Finalmente, em relação às células cancerígenas de ovário (OVCAR-03), somente a substância **2.3** foi mais eficaz que a DOX em inibir o crescimento das células, sendo de duas a quatro vezes mais eficaz que os demais derivados.

As sequências diferentes de atividades antiproliferativas desses derivados da HVL sugerem reuni-los em tipos distintos e específicos de respostas das células cancerígenas estudadas e que, dependendo do tipo de célula, parâmetros estruturais diferentes estariam atuando. Assim, em função dos resultados apresentados na Figura 2.51 (p. 79) podem ser propostos três grupos com diferentes tipos de respostas envolvendo **2.1** a **2.3**, denominados: G-I (frente às células de melanoma, mama, rim, próstata, leucemia e cólon), G-II (frente às células do ovário resistente e ovário) e G-III (frente às células do pulmão).

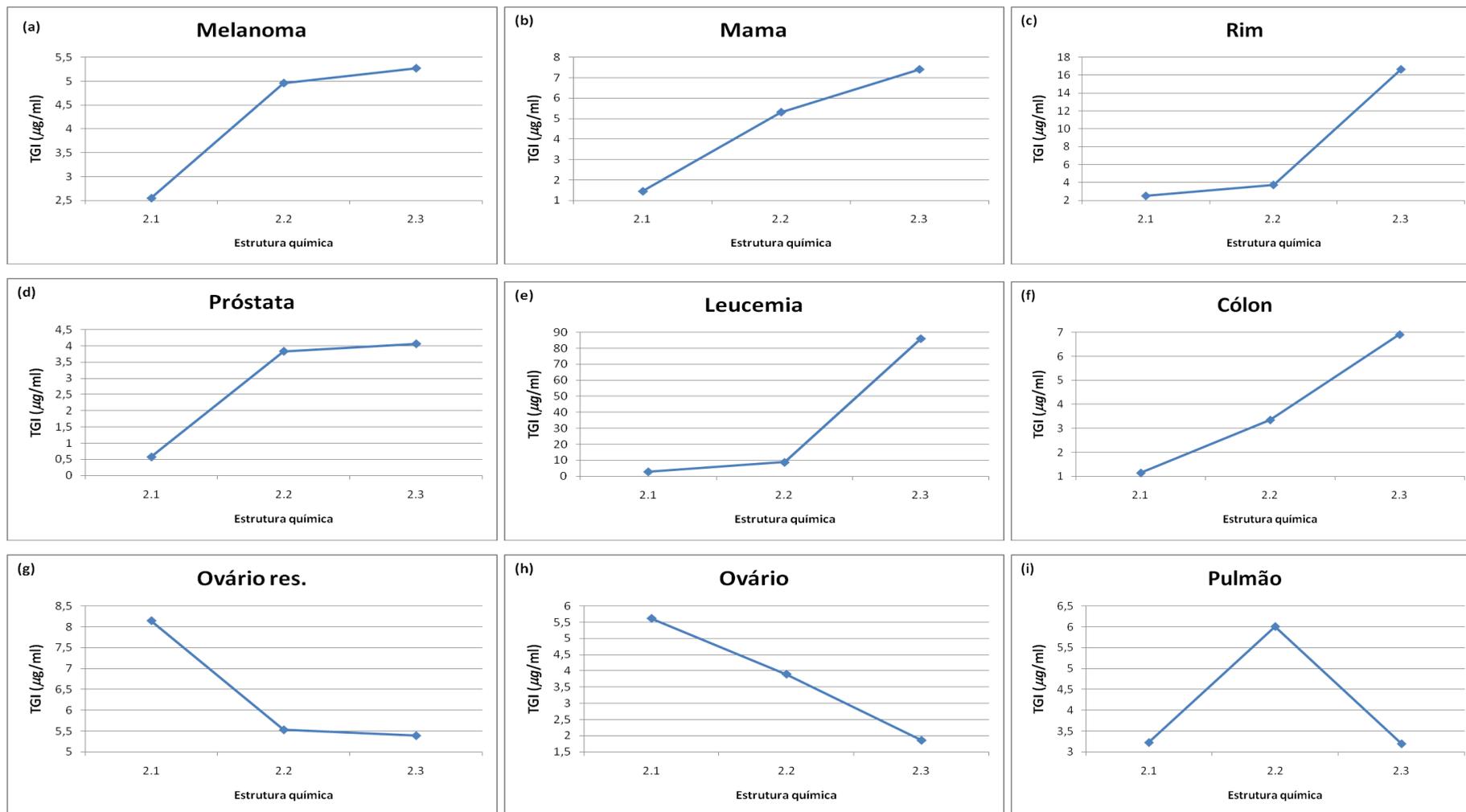


Figura 2.51: Variação de atividade antiproliferativa das células de (a) melanoma, (b) mama, (c) rim, (d) próstata, (e) leucemia, (f) cólon, (g) ovário resistente a andriamicina, (h) ovário e (i) pulmão em função da estrutura química das substâncias 2.1, 2.2 e 2.3.

Cálculos de densidade eletrônica, energia dos orbitais moleculares (OM) e população orbital das substâncias **2.1**, **2.2** e **2.3** foram realizados para investigar relações entre estrutura química e atividade antiproliferativa dessas substâncias. No estudo dessas propriedades foram consideradas contribuições dos átomos de carbono e hidrogênio funcionalizados e dos heteroátomos das três substâncias. Nas análises que seguem foram considerados apenas os parâmetros teóricos calculados que apresentaram alguma correlação com as atividades das substâncias estudadas nas sequências das atividades antiproliferativas.

As Figuras 2.52, 2.53 e 2.54 (p. 81 a 83) mostram respectivamente as variações de densidade eletrônica, energia dos OM e de população orbital. Estas foram relacionadas com as variações de TGI de células de melanoma, mama, rim, próstata, leucemia e cólon (G-I), com aumento da atividade antiproliferativa na sequência **2.3** < **2.2** < **2.1**. Analisando estas figuras verifica-se para essas substâncias que, na mesma sequência do aumento da atividade antiproliferativa, se tem também o aumento da energia do HOMO-1 (Fig. 2.52, p. 81). Assim, neste caso, um aumento da nucleofilia relativa das substâncias está correlacionado com o aumento da atividade antiproliferativa das mesmas. Na Figura 2.53 (p. 82) verifica-se o aumento das densidades eletrônicas sobre O-7 (a), C-12 (b), C-15 (d) e C-17 (f), quando comparadas à sequência do aumento da atividade antiproliferativa. Adicionalmente, a análise do resultado dos cálculos da população orbital apresentados na Figura 2.54 (p. 83) mostra o aumento da população orbital de C-12 (a) e C-16 (b) para o HOMO, indicando a maior probabilidade da participação destes átomos.

Por outro lado, foram observadas correlações entre a eletrofilia de alguns átomos e a atividade antiproliferativa para o G-I. Desse modo, na Figura 2.53, pode-se verificar a diminuição das densidades eletrônicas sobre C-13 (c), C-16 (e) e N (g), quando comparadas à sequência do aumento da atividade antiproliferativa das três substâncias, enquanto a Figura 2.54 mostra o aumento da população orbital de C-17 (c), O-7 (d), O-17 (e) e H-14 (f) para o LUMO e de C-8 (g), C-13 (h), C-14 (i) e H-1' (j) para o LUMO+1.

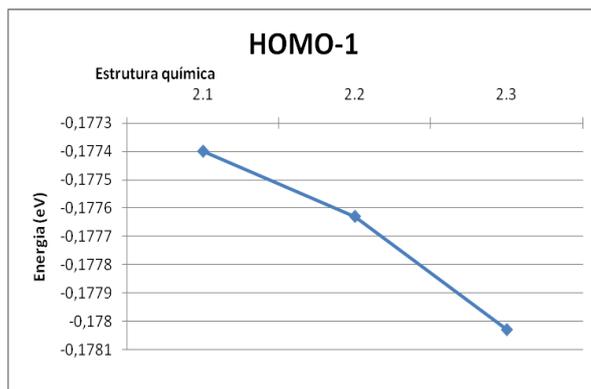


Figura 2.52: Variação da energia do HOMO-1 em função da estrutura química das substâncias **2.1**, **2.2** e **2.3**.

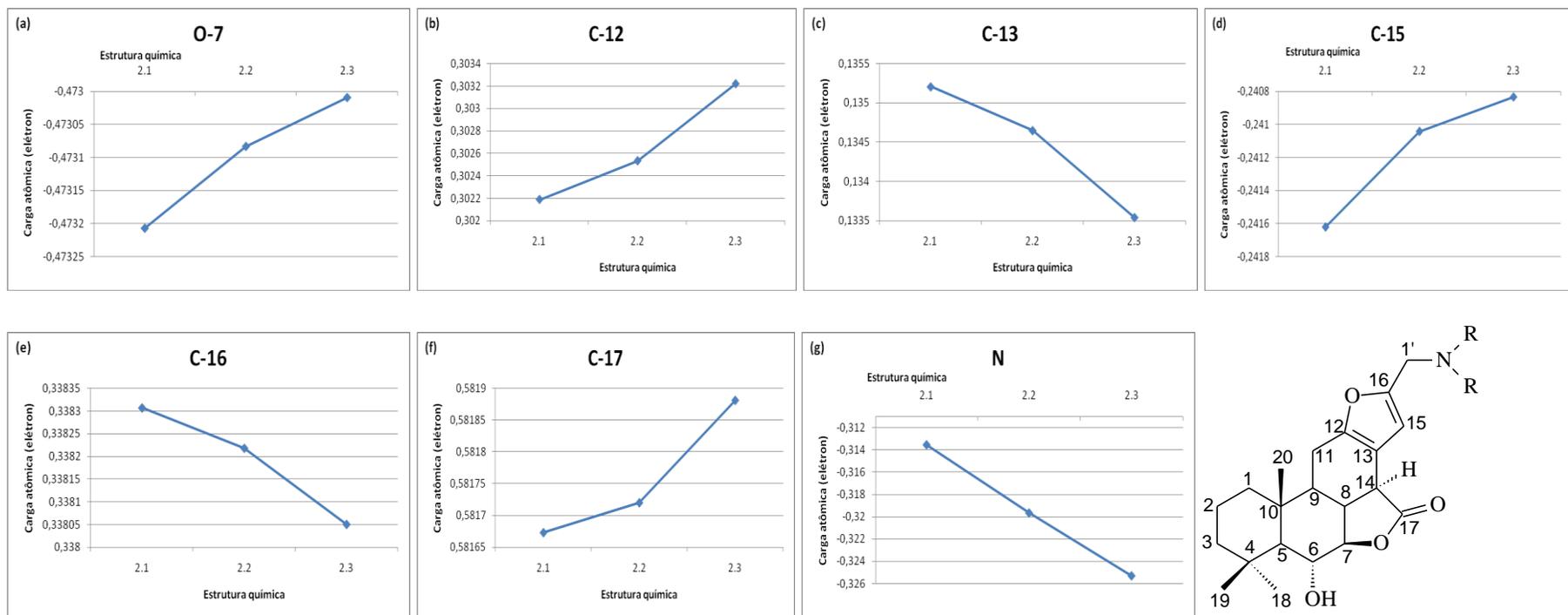


Figura 2.53: Variação da densidade eletrônica sobre (a) O-7, (b) C-12, (c) C-13, (d) C-15, (e) C-16, (f) C-17 e (g) N em função da estrutura química das substâncias 2.1, 2.2 e .2.3.

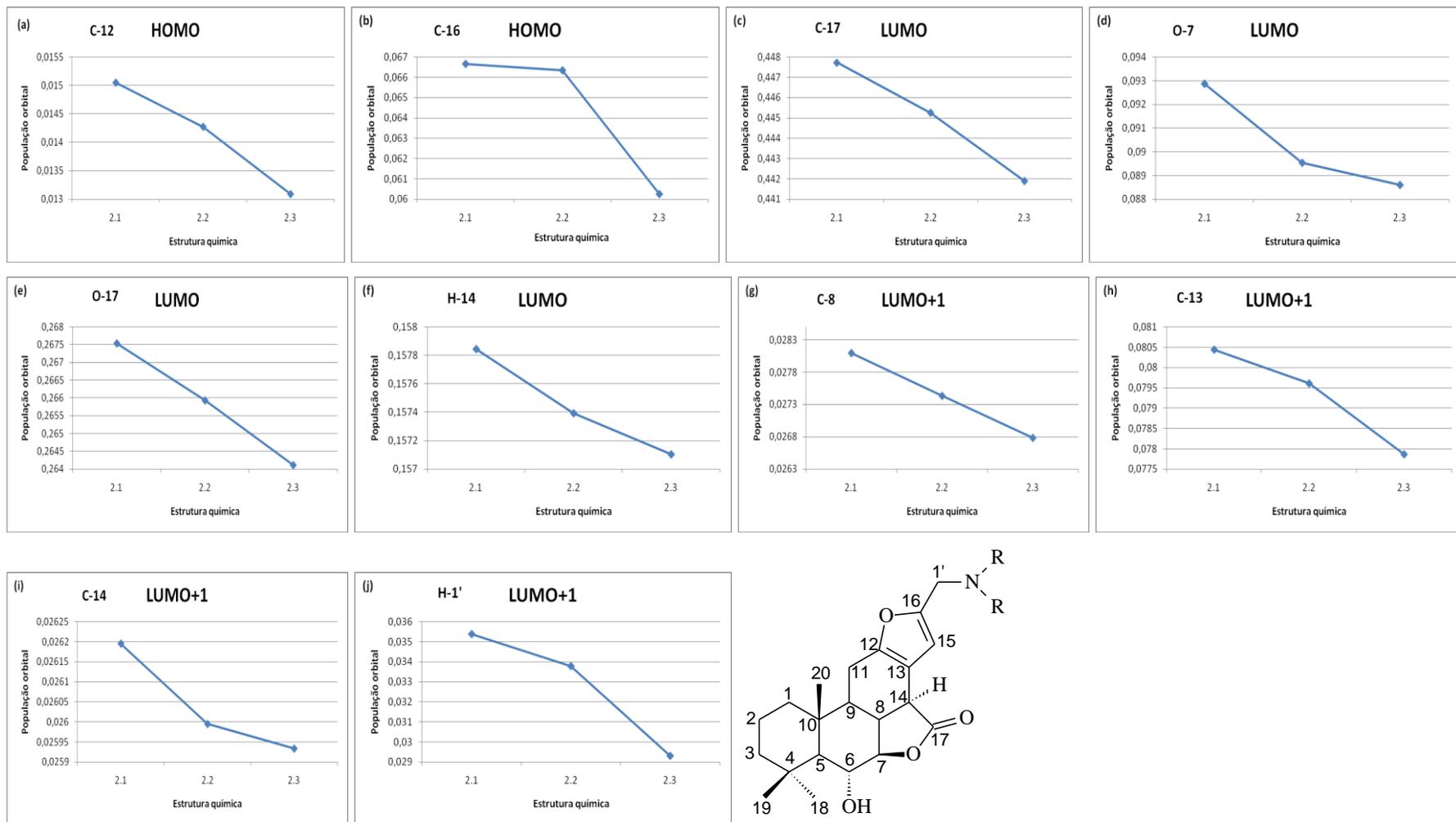


Figura 2.54: Variação da população orbital de (a) C-12 e (b) C-16 para o HOMO, de (c) C-17, (d) O-7, (e) O-17 e (f) H-14 para o LUMO, de (g) C-8, (h) C-13, (i) C-14 e (j) H-1' para o LUMO+1 em função da estrutura química das substâncias **2.1**, **2.2** e **2.3**.

As Figuras 2.53 (p. 82), 2.55 e 2.56 (p. 85) mostram respectivamente as variações de densidade eletrônica, energia dos OM's e de população orbital. Estas foram relacionadas com a variação de TGI de células do ovário resistente e do ovário (G-II), para as quais se verificou o aumento da atividade antiproliferativa na sequência **2.1** < **2.2** < **2.3**. Analisando a Figura 2.55 verifica-se para essas substâncias que, inversamente ao aumento da atividade antiproliferativa, se tem a diminuição das energias do LUMO (a) e LUMO+1 (b) na sequência de **2.1** a **2.3**. Como a diminuição da energia do LUMO implica no aumento da eletrofilia, verifica-se uma correlação desta propriedade com o aumento da atividade antiproliferativa. De fato, conforme apresentado na Figura 2.53 tem-se a diminuição das densidades eletrônicas sobre O-7 (a), C-12 (b), C-15 (d) e C-17 (f), na mesma sequência do aumento da atividade antiproliferativa. Em consonância, na Figura 2.56 verifica-se um aumento da população orbital de C-8 (c), C-12 (d) e C-16 (e) para o LUMO e de C-16 (f) e C-17 (g) para o LUMO+1.

Em contraposição, na Figura 2.53 (p. 82) verifica-se o aumento das densidades eletrônicas sobre C-13 (c), C-16 (e) e N (g), o que contribui para a maior nucleofilia destes átomos. Somando-se a isso na Figura 2.56 verifica-se aumento da população orbital de C-12 (a) e C-16 (b) para o HOMO-1.

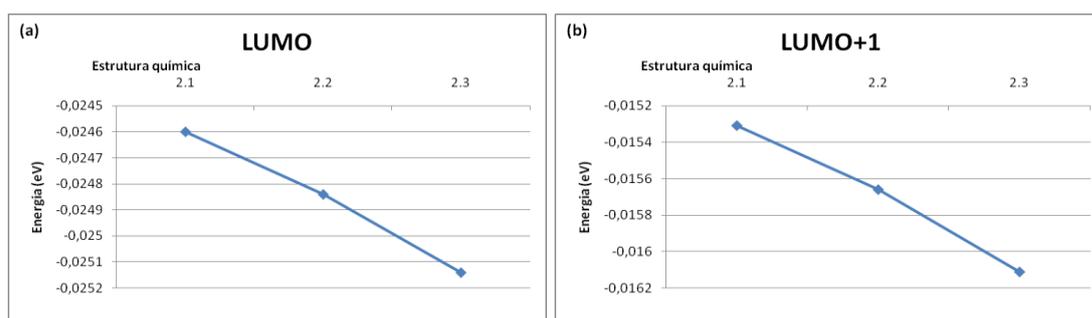


Figura 2.55: Variação de energia de (a) LUMO e (b) LUMO+1 em função da estrutura das substâncias **2.1**, **2.2** e **2.3**.

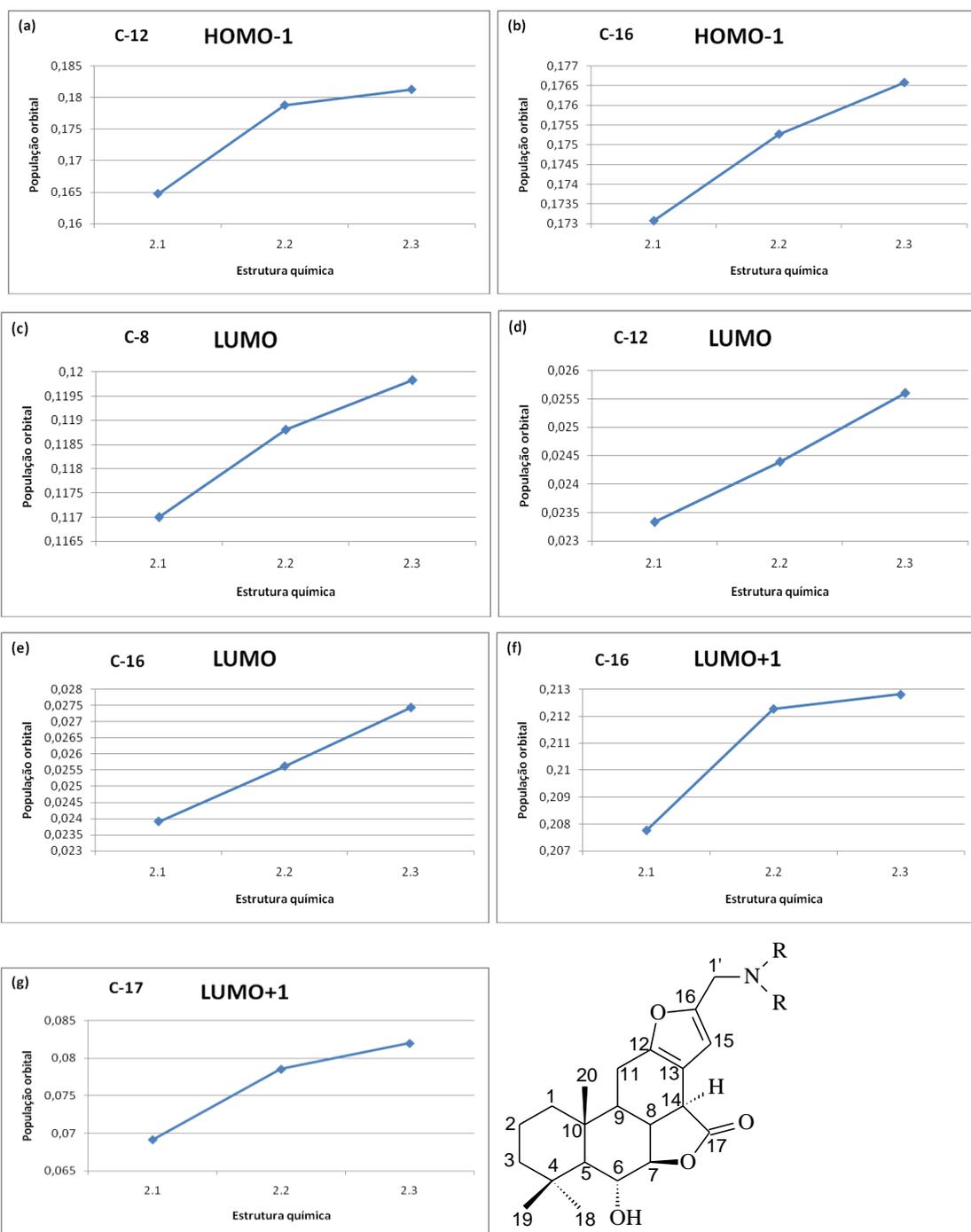


Figura 2.56: Variação de população orbital de (a) C-12 e (b) C-16 para o HOMO-1, de (c) C-8, (d) C-12 e (e) C-16 para o LUMO e de (f) C-16 e (g) C-17 para o LUMO+1 em função da estrutura química das substâncias **2.1**, **2.2** e **2.3**.

As Figuras 2.57 e 2.58 (p. 87) mostram respectivamente as variações de densidade eletrônica e de população orbital que se correlacionam com a variação de TGI de células do pulmão (G-III), para as quais foi verificado aumento da atividade antiproliferativa na sequência $2.2 < 2.1 \approx 2.3$. Assim, para este grupo, **2.1** e **2.3** têm atividades antiproliferativas similares e diferentes de **2.2**. Analisando os gráficos a-c na Figura 2.57 verifica-se que para essas substâncias, comparados na mesma sequência do aumento da atividade antiproliferativa, se tem a diminuição da densidade eletrônica sobre O-6 (a) e sobre o hidrogênio HO-6 (c). Por sua vez, na Figura 2.58 observa-se, na sequência em consideração, o aumento da população orbital de C-13 (b) e C-14 (c) para o LUMO, de O-17 para o LUMO+1 (d). Esses parâmetros em conjunto uma correlação entre a atividade antiproliferativa e o caráter eletrofílico desses átomos nessas substâncias.

Por outro lado, a Figura 2.57 mostra um aumento da densidade eletrônica sobre O-16 (b), na mesma sequência do aumento da atividade antiproliferativa, enquanto na Figura 2.58 tem-se o aumento da população orbital de N para o HOMO (a). Esses resultados mostram uma relação entre o caráter nucleofílico desses átomos e as atividades antiproliferativas dessas substâncias.

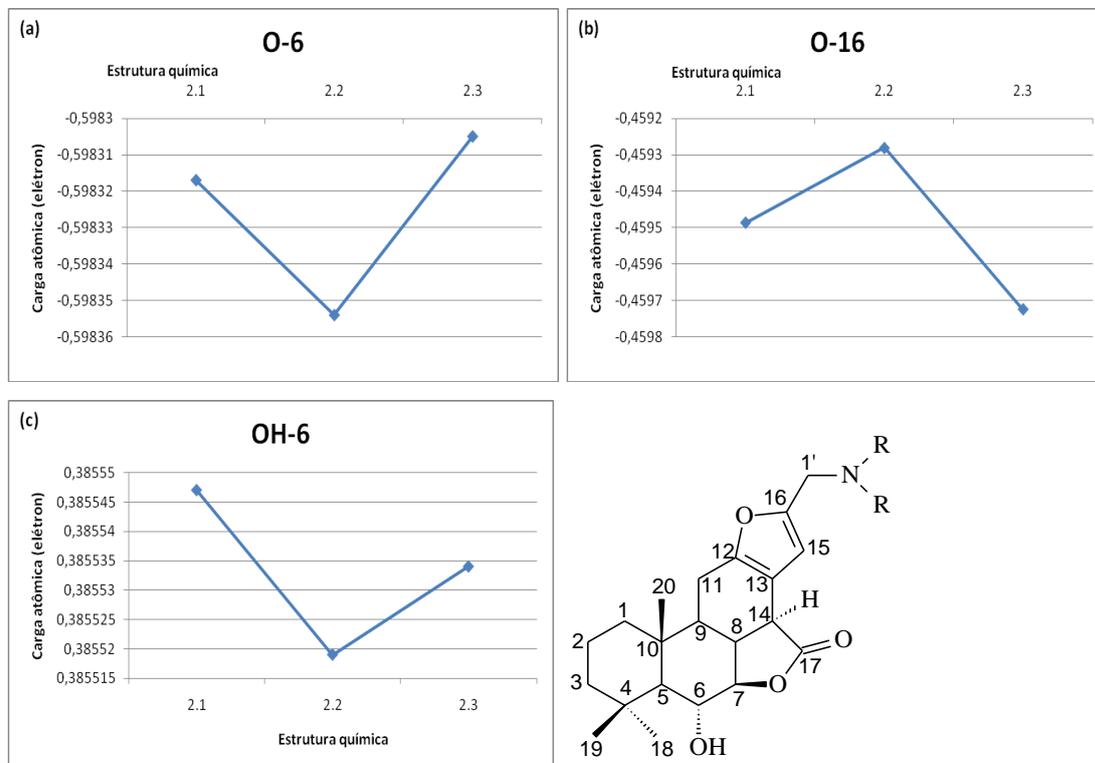


Figura 2.57: Variação da densidade eletrônica de (a) O-6, (b) O-16 e (c) do hidrogênio HO-6 em função da estrutura química das substâncias **2.1**, **2.2** e **2.3**.

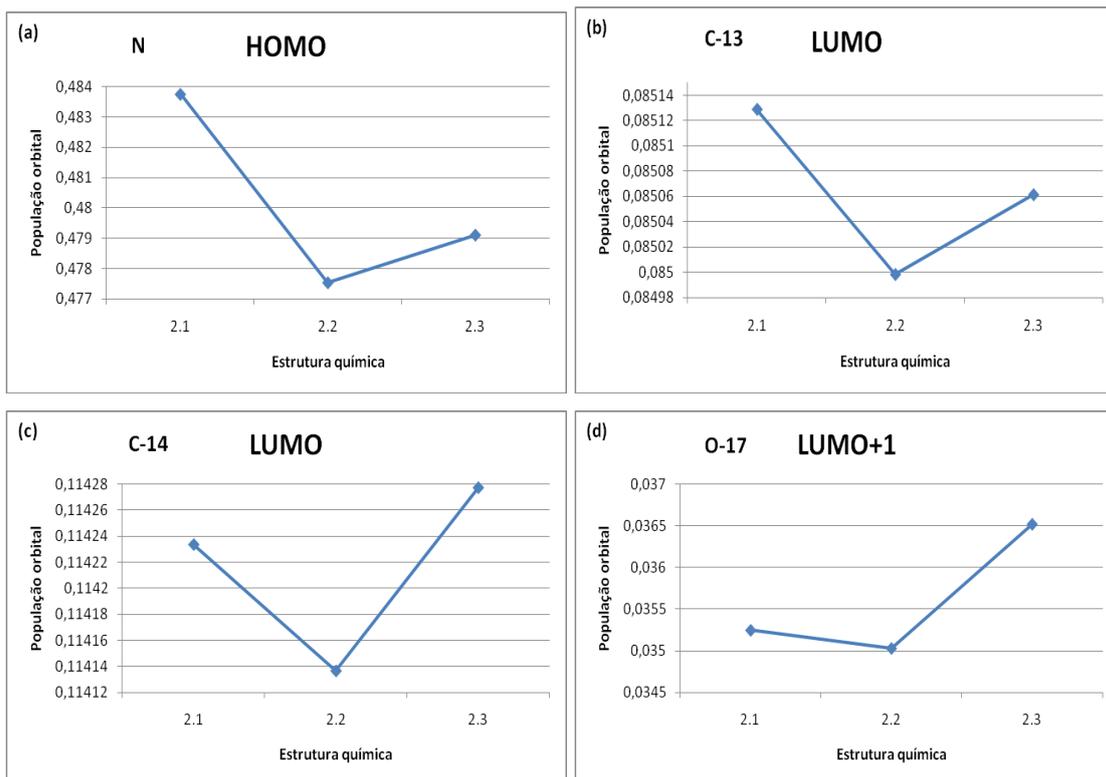
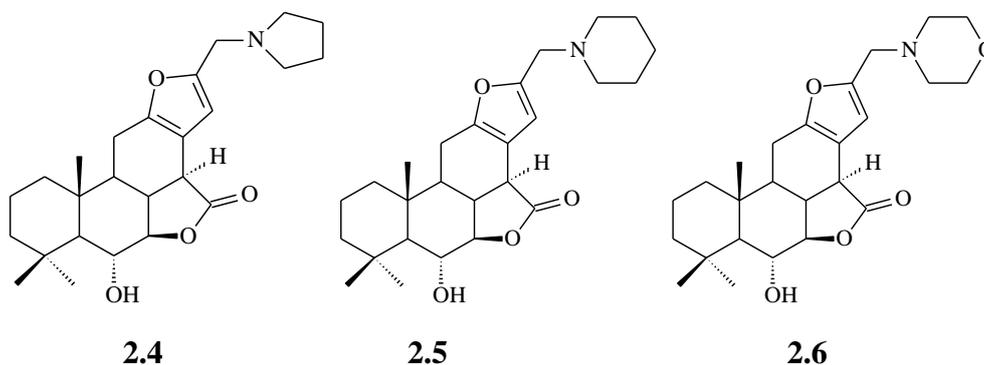


Figura 2.58: Variação da população orbital de (a) N para o HOMO, de (b) C-13 e (c) C-14 para o LUMO, de (d) O-17 para o LUMO+1 em função da estrutura química das substâncias **2.1**, **2.2** e **2.3**.

Uma vez apresentado o estudo teórico do conjunto de substâncias **2.1** a **2.3**, contendo grupos alquila *N*-substituintes acíclicos, será analisado a seguir o conjunto das substâncias **2.4** a **2.6**, que têm em suas estruturas grupos alquila *N*-substituintes cíclicos.

A Figura 2.59 (p. 89) apresenta as variações de TGI de diferentes linhagens de células cancerígenas em função da estrutura química dos derivados **2.4** (16-(1-pirrolidino)metileno-6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona), **2.5** (16-(1-piperidino)metileno-6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona) e **2.6** (16-(4-morfolino)metileno-6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona), estruturas contendo grupos *N*-substituintes de cadeias cíclicas.



Algumas similaridades podem ser observadas na Figura 2.59. As variações de TGI de células de melanoma (a) e cólon (b) mostram um aumento da atividade antiproliferativa na sequência **2.6** < **2.5** < **2.4**. Inversamente, a variação de TGI de células do pulmão (c) mostra um aumento da atividade antiproliferativa na sequência **2.4** < **2.5** < **2.6**. As variações de TGI de células de ovário resistente (d) e rim (e) mostram-se similares, com aumento da atividade antiproliferativa na sequência **2.5** < **2.6** < **2.4**. As variações de TGI de células de próstata (f) e leucemia (g) mostram um aumento de atividade na sequência **2.4** < **2.6** < **2.5**. Por sua vez, as variações de TGI de células de mama (h) e ovário (i) mostram um aumento da atividade antiproliferativa na sequência **2.6** < **2.4** < **2.5**.

Essas sequências diferentes de atividades antiproliferativas desses derivados da HVL permitem reuni-los em tipos distintos e específicos de respostas das células cancerígenas estudadas. Assim, em função dos resultados apresentados na Figura 2.59 (p. 89), podem ser propostos os seguintes grupos com diferentes tipos de respostas envolvendo **2.4** a **2.6**: G-IV (frente às células de melanoma e cólon), G-V (frente às células células do pulmão), G-VI (frente às células células de ovário resistente e rim), G-VII (frente às células de próstata e leucemia) e G-VIII (frente às células de mama e ovário).

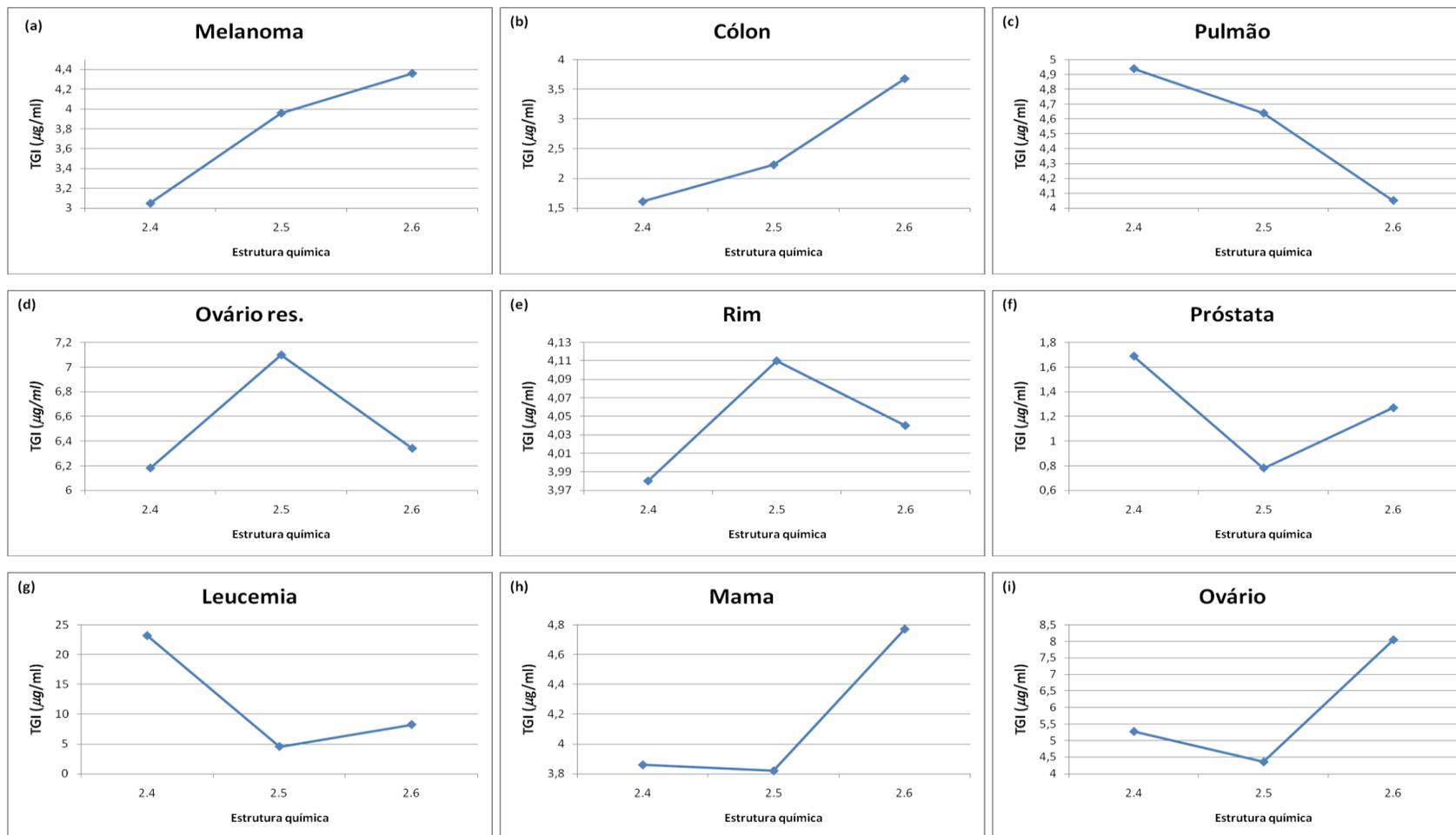


Figura 2.59: Curvas da variação da atividade antiproliferativa das células de (a) melanoma, (b) cólon, (c) pulmão, (d) ovário resistente a andriamicina, (e) rim, (f) próstata, (g) leucemia, (h) mama e (i) ovário em função da estrutura química das substâncias **2.4**, **2.5** e **2.6**.

Cálculos de densidade eletrônica, energia dos orbitais moleculares e população orbital de **2.4**, **2.5** e **2.6** foram realizados para investigar relações entre estrutura química e atividade antiproliferativa dessas substâncias. No estudo dessas propriedades foram consideradas contribuições dos átomos de carbono e hidrogênio funcionalizados e dos heteroátomos das três substâncias. Também nestas análises foram considerados apenas os parâmetros teóricos calculados que apresentaram alguma correlação com as atividades das substâncias estudadas nas sequências das atividades antiproliferativas.

A Figura 2.60 (p. 91) mostra as variações de densidade eletrônica (a-e) e de população orbital (f) de **2.6**, **2.5** e **2.4**. Estes parâmetros foram correlacionados com as variações de TGI para células cancerígenas de melanoma e cólon (G-IV), para as quais se verificou o aumento da atividade antiproliferativa na sequência **2.6** < **2.5** < **2.4**. Analisando os gráficos dessa figura verifica-se que, para essas substâncias, comparados na mesma sequência da atividade antiproliferativa, se tem o aumento da densidade eletrônica sobre O-6 (b) e O-7 (c) e, conseqüentemente, da nucleofilia desses átomos. Em contrapartida, observou-se diminuição da densidade eletrônica sobre C-15 (a), O-17 (d) e N (e) e o aumento da população orbital de C-12 no LUMO (f), relacionando o maior caráter eletrofílico desses átomos com a atividade.

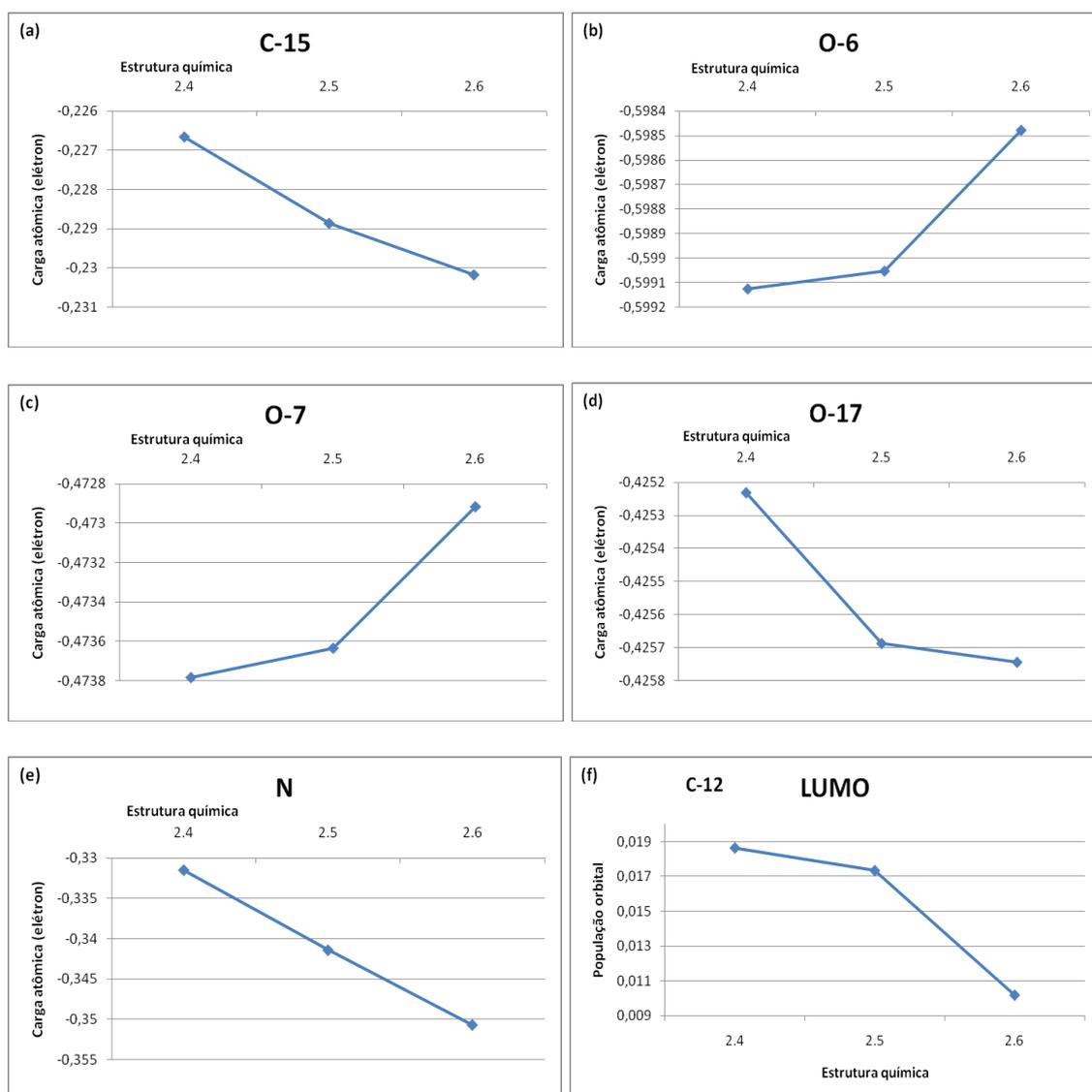
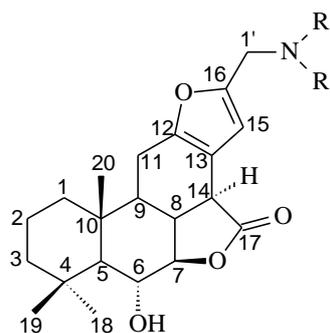


Figura 2.60: Variação de densidade eletrônica de (a) C-15, (b) O-6, (c) O-7, (d) O-17, (e) N e de população orbital de (f) C-12 para o orbital LUMO em função da estrutura química das substâncias **2.4**, **2.5** e **2.6**.

As Figuras 2.60a-e (p. 91) e 2.61 mostram, respectivamente, as variações de densidade eletrônica e de população orbital de **2.4**, **2.5** e **2.6**. Estes parâmetros foram correlacionados com a variação de TGI dessas substâncias frente às células do pulmão (G-V), com aumento da atividade antiproliferativa na sequência **2.4** < **2.5** < **2.6**. Analisando os gráficos da Figura 2.60 verifica-se que, para essas substâncias, comparadas na mesma sequência da atividade antiproliferativa, se tem a diminuição da densidade eletrônica sobre O-6 (b) e O-7 (c), acompanhada pelo aumento da população orbital de C-16 para o LUMO+1 (Fig. 2.61), sugerindo uma relação do aumento da atividade antiproliferativa com a eletrofilia desses átomos.

Por outro lado, na Figura 2.60 (p. 91), verifica-se um aumento da densidade eletrônica sobre C-15 (a), O-17 (d) e N (e), indicando que a nucleofilia destes átomos deve estar relacionada ao aumento da atividade dessas substâncias.

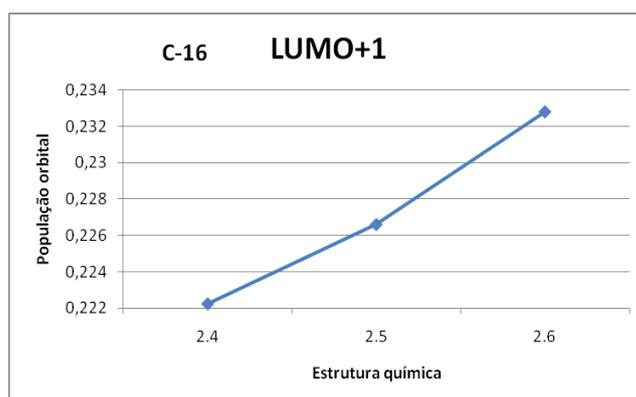


Figura 2.61: Variação de população orbital de C-16 no LUMO+1 em função da estrutura química das substâncias **2.4**, **2.5** e **2.6**.

A Figura 2.62 mostra a variação da população orbital, a qual foi correlacionada com as variações de TGI de células de ovário resistente e rim (G-VI), com aumento da atividade antiproliferativa na sequência **2.5 < 2.6 < 2.4**. Analisando os gráficos dessa figura verifica-se que para essas substâncias, comparados na mesma sequência da atividade antiproliferativa, se tem o aumento da população orbital de C-14 para o LUMO. Considerando os resultados da atividade dos substâncias **2.4 a 2.6** frente às células cancerígenas do G-VI, bem como os resultados acima analisados do parâmetro teórico calculado sugere-se que apenas a eletrofilia de C-14 esteja correlacionada com a atividade antiproliferativa dessas substâncias.

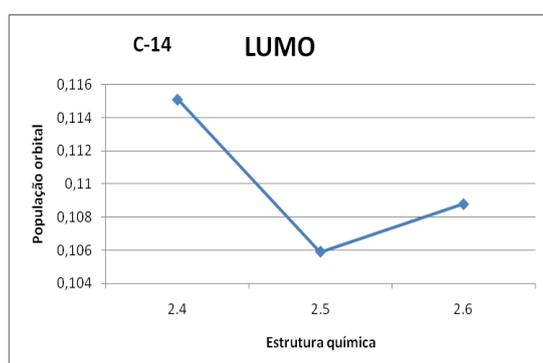


Figura 2.62: Variação da população orbital de C-14 para o orbital LUMO em função da estrutura química das substâncias **2.4, 2.5 e 2.6**.

Não se encontrou correlação para nenhum dos parâmetros teóricos calculados para as substâncias **2.4 a 2.6** na sequência de atividade antiproliferativa **2.4 < 2.6 < 2.5** frente às células cancerígenas de próstata e leucemia (G-VII).

As Figuras 2.63 e 2.64 (p. 95) mostram, respectivamente, as variações de energia dos orbitais moleculares e de população orbital e densidade eletrônica das substâncias **2.4** a **2.6**. Estes parâmetros foram então correlacionados à variação de TGI de células de mama e ovário (G-VIII), com o aumento da atividade antiproliferativa na sequência **2.6** < **2.4** < **2.5**.

Analisando os gráficos da Figura 2.63 verifica-se o aumento da energia dos orbitais HOMO-1 (a) e HOMO (b). Estes resultados de energia indicam haver correlação entre a o aumento da nucleofilia com o aumento da atividade antiproliferativa nas células do G-VIII. Da mesma forma, na Figura 2.64 (p. 95) tem-se o aumento da densidade eletrônica sobre o hidrogênio de OH-6 (j), bem como o aumento da população orbital de C-12 (a), de C-13 (b) e de C-16 (c) para o HOMO-1; de N (d) para o HOMO, indicando a maior probabilidade da participação destes átomos no caráter nucleofílico dessas substâncias.

Por outro lado, também na Figura 2.64 verifica-se um aumento da população orbital de C-17 (e), O-7 (f) e O-17 (g) para o LUMO e de C-8 (h) e H-1' (i) para LUMO+1 na mesma sequência do aumento da atividade antiproliferativa observada, sugerindo a maior participação destes átomos na eletrofilia destas substâncias.

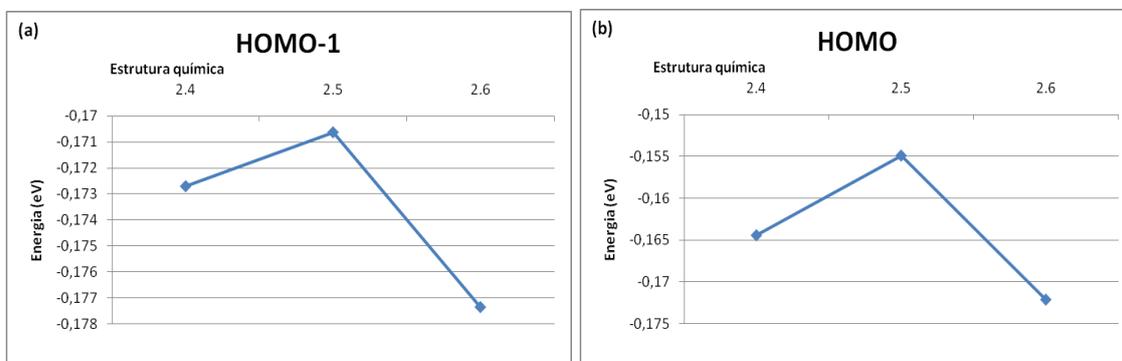


Figura 2.63: Variação de energia dos orbitais (a) HOMO-1 e (b) HOMO em função da estrutura química das substâncias **2.4**, **2.5** e **2.6**.

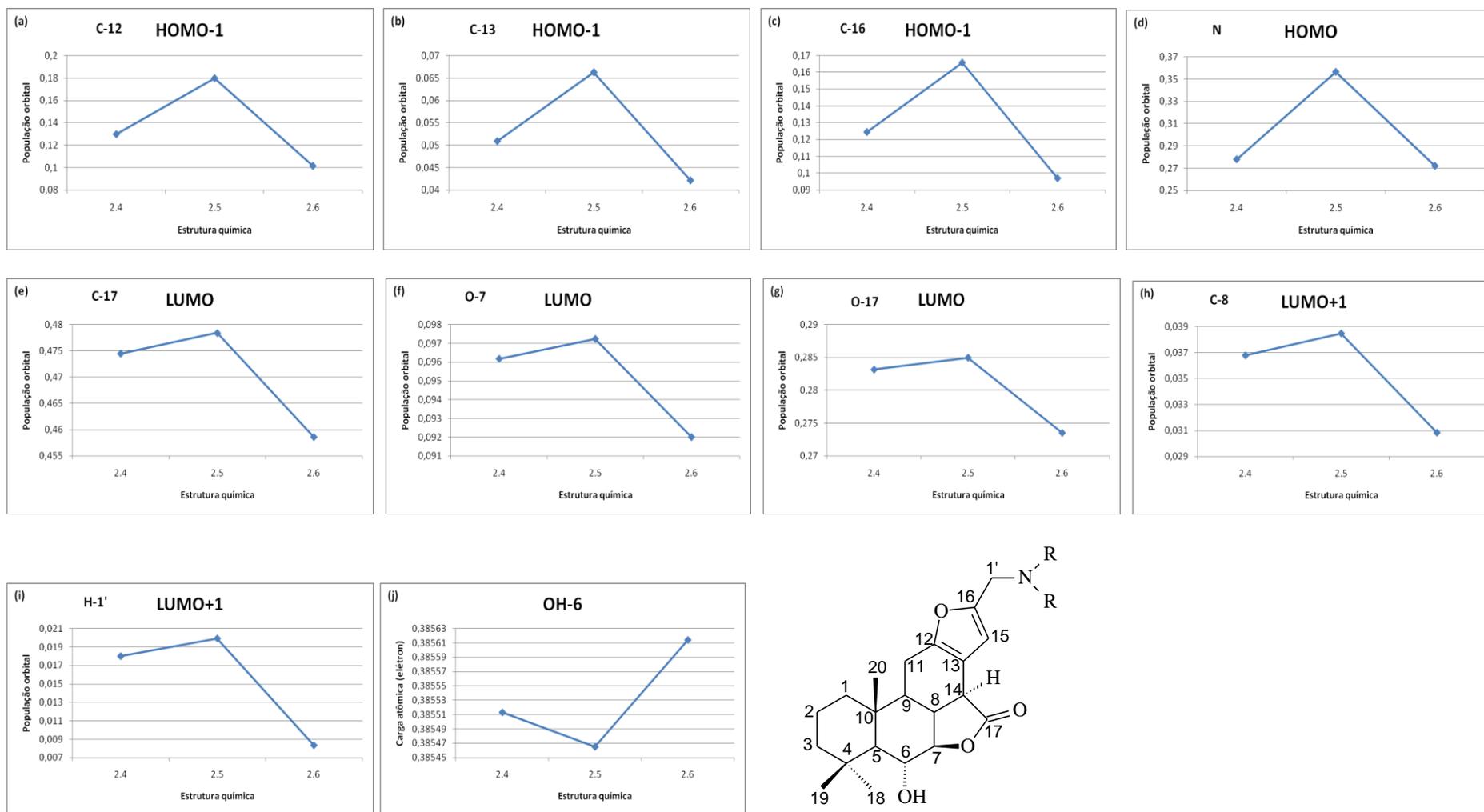


Figura 2.64: Variação da população orbital de (a) C-12, (b) C-13 e (c) C-16 para o HOMO-1, de (d) N para o HOMO, de (e) C-17, (f) O-7 e (g) O-17 para o LUMO, de (h) C-8 e (i) H-1' para o LUMO+1 e (j) variação da densidade eletrônica no hidrogênio de OH-6 em função da estrutura química das substâncias **2.4**, **2.5** e **2.6**.

O estudo teórico apresentado até aqui, para todas as substâncias **2.1** a **2.6**, mostrou que as substâncias **2.4** a **2.6** são mais seletivas que **2.1** a **2.3**, uma vez que as primeiras apresentaram maior diversidade em termos de respostas frente às mesmas células cancerígenas: **2.1** a **2.3** apresentaram somente três tipos de respostas diferentes (G-I a G-III), enquanto que **2.4** a **2.6** apresentaram cinco (G-IV a G-VIII). Esse comportamento diferente para os dois conjuntos de substâncias está em acordo com os orbitais moleculares de fronteira gerados pelos cálculos teóricos apresentados nas Figuras 2.65 (p. 97) a 2.68 (p. 100). Nessas figuras verificam-se similaridades dos OM entre os componentes de cada conjunto de substâncias (**2.1** a **2.3** e **2.4** e **2.6**) e, por outro lado, diferentes contribuições atômicas para esses OM entre os conjuntos de substâncias.

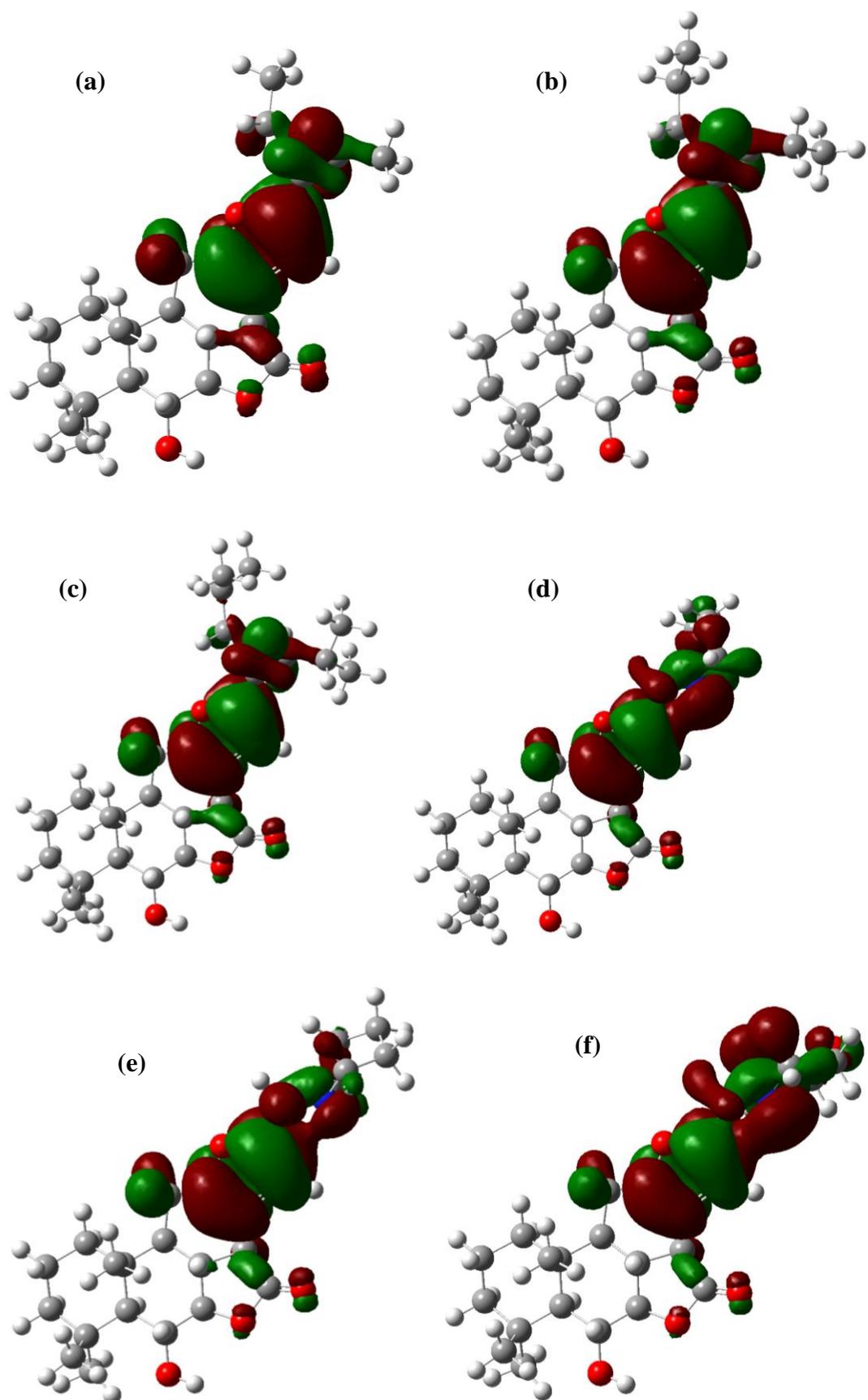


Figura 2.65: Representação dos orbitais moleculares HOMO-1 de (a) 2.1, (b) 2.2, (c) 2.3, (d) 2.4, (e) 2.5 e (f) 2.6.

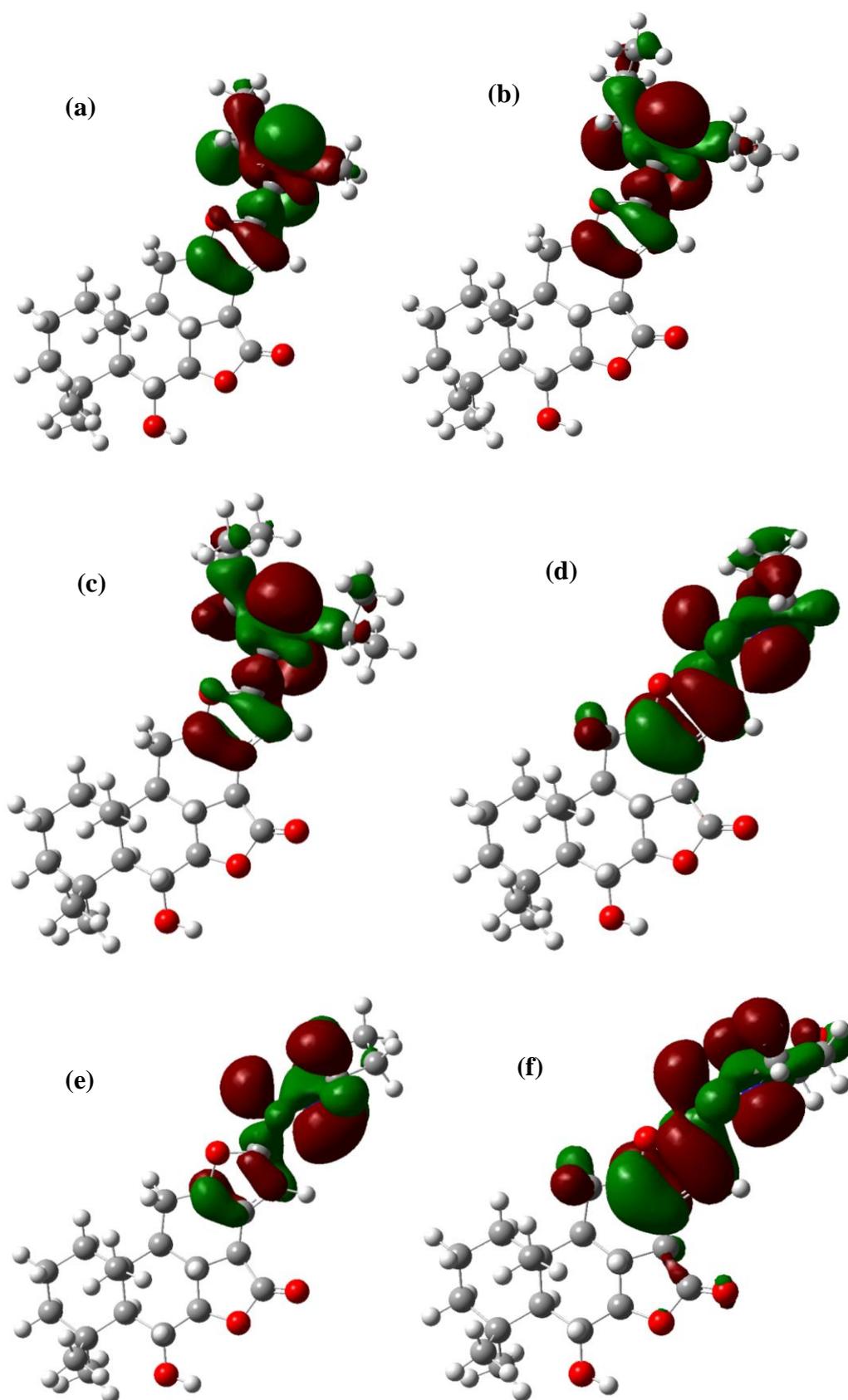


Figura 2.66: Representação dos orbitais moleculares HOMO de (a) **2.1**, (b) **2.2**, (c) **2.3**, (d) **2.4**, (e) **2.5** e (f) **2.6**.

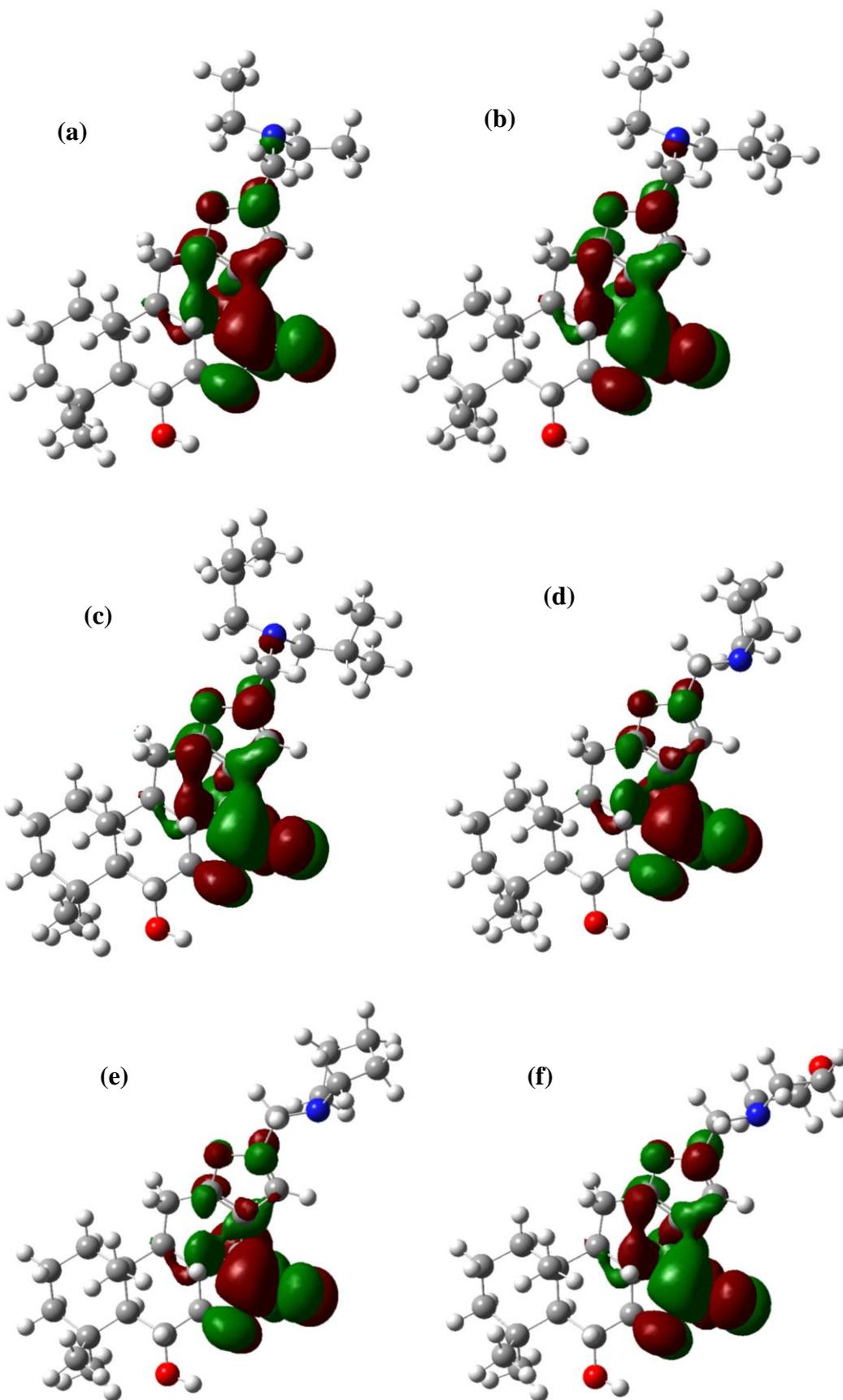


Figura 2.67: Representação dos orbitais moleculares LUMO de (a) 2.1, (b) 2.2, (c) 2.3, (d) 2.4, (e) 2.5 e (f) 2.6.

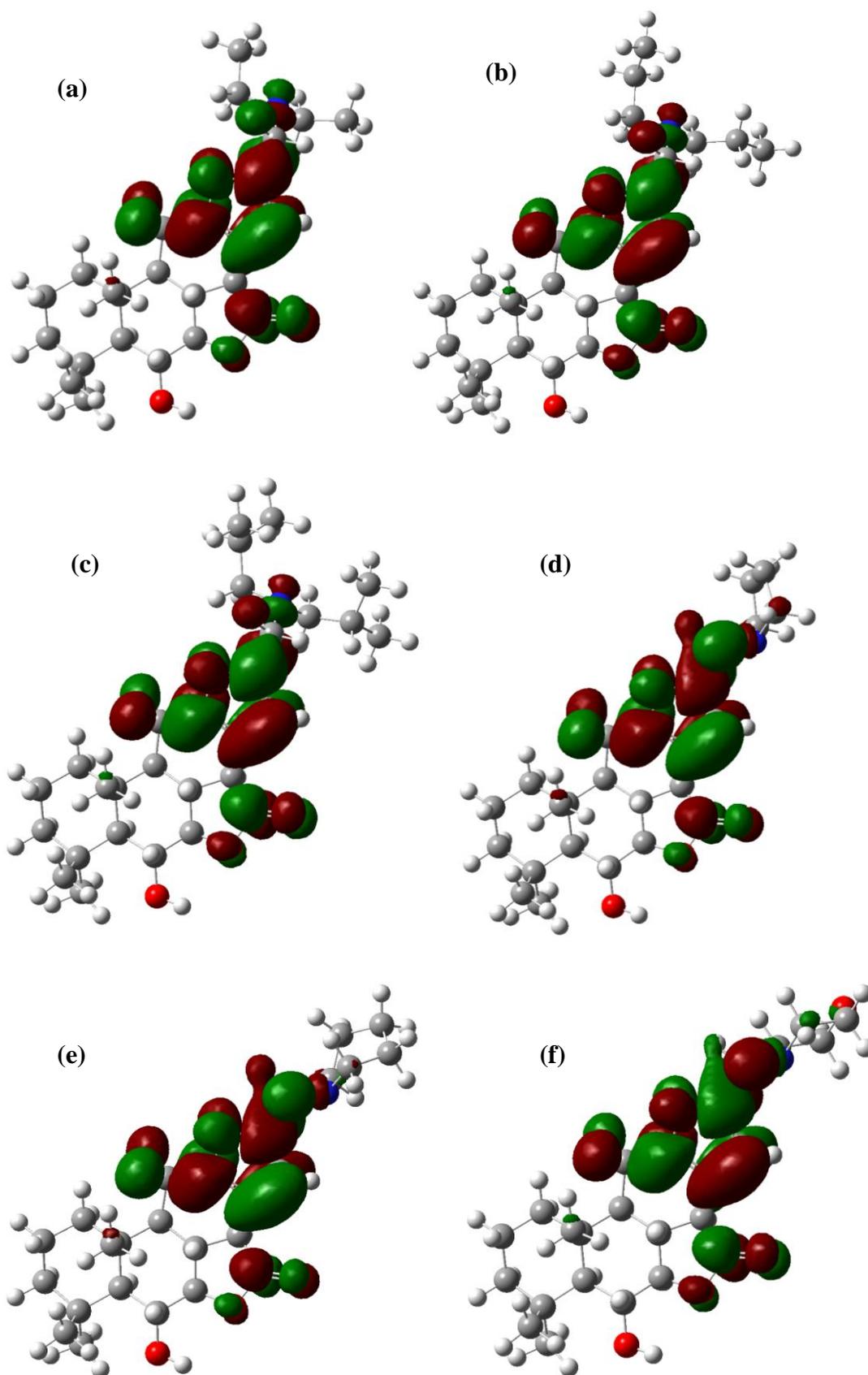
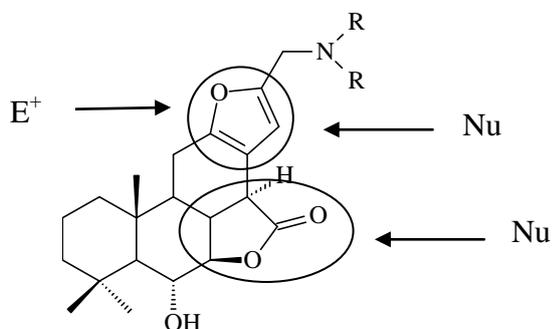
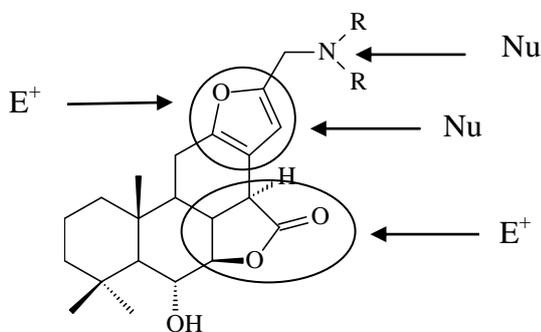


Figura 2.68: Representação dos orbitais moleculares LUMO+1 de (a) 2.1, (b) 2.2, (c) 2.3, (d) 2.4, (e) 2.5 e (f) 2.6.

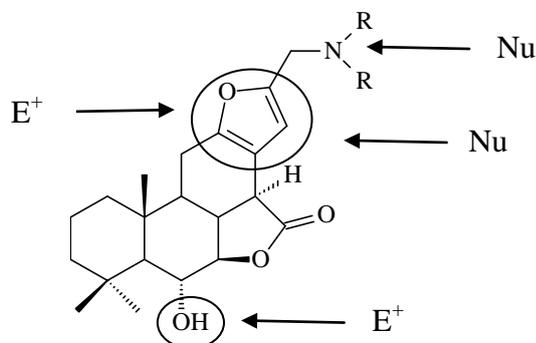
Analisando todas as correlações feitas entre a atividade antiproliferativa das substâncias testadas e as propriedades teóricas calculadas para as mesmas (energia do orbital, densidade eletrônica e população orbital), foi possível observar que determinados sítios das moléculas, por meio de determinados átomos, encontram-se relacionados com alguns grupos de respostas. Assim, para o grupo G-I (p. 80), observou-se que alguns átomos dos anéis lactônico e furânico apresentam uma relação com a atividade. Essa relação apresentou tanto características nucleofílicas (anel furânico e lactônico) quanto eletrofílicas (anel furânico). Nas estruturas apresentadas a seguir estão sinalizados os sítios ativos e a indicação de nucleofilia (Nu) e eletrofilia (E) verificados para os diferentes grupos G-I a G-VIII. Assim, em resumo, para G-I observou-se:



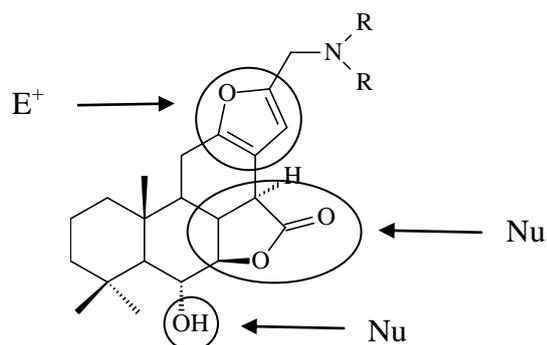
Para o grupo G-II (p. 84), o anel furânico e o átomo de nitrogênio apresentam características nucleofílicas. Por outro lado, verificou-se que os anéis lactônico e furânico apresentam características eletrofílicas:



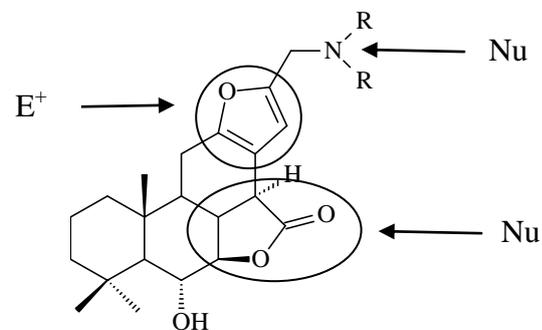
Resumindo a análise dos dados de G-III (p. 86), percebe-se que o anel furânico e o anel lactônico apresentam características nucleofílicas. Já o grupo funcional hidroxila e o anel furânico apresentam características eletrofílicas:



Para o grupo G-IV (p. 90) observou-se que o anel lactônico e a hidroxila apresentam as características nucleofílicas. Por outro lado, o anel furânico apresenta características eletrofílicas:

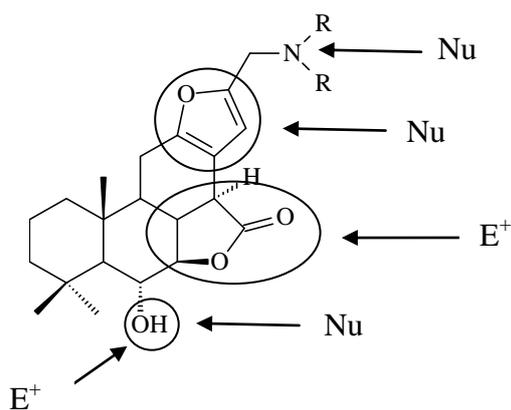


Analisando resumidamente os dados de G-V (p. 92), percebe-se que o átomo de nitrogênio e o anel lactônico apresentam características nucleofílicas, enquanto que o anel furânico, características eletrofílicas:



Pela análise resumida dos dados de G-VI (p. 93) não foi possível encontrar características eletrofílicas ou nucleofílicas condizentes com a natureza química do C-14, enquanto para G-VII não foi possível relacionar nenhum sítio das moléculas com a atividade.

Finalmente, para os dados do grupo G-VIII (p. 94) percebe-se que a hidroxila, o anel furânico e o anel lactônico apresentam características nucleofílicas. Já o anel lactônico e o grupo hidroxila apresentam características eletrofílicas:



CONCLUSÕES

Testes preliminares da atividade antiproliferativa do ADV (**1**), HVL (**2**), POL (**3**) e AVL (**4**) contra linhagens de células humanas cancerígenas mostraram que a HVL é a substância mais eficaz em inibir o crescimento dessas células. Com base nesses resultados foi proposta a síntese de derivados nitrogenados substituídos no anel furânico da HVL. A metodologia de síntese dessas substâncias (reação de Mannich com sal de imínio pré-formado) foi bastante adequada, apresentando bons rendimentos para a obtenção das substâncias **2.1** a **2.6**. Esses rendimentos variaram de 55% para **2.6** a 84% para **2.5**. As análises espectroscópicas por IV e RMN em uma e duas dimensões comprovaram adequadamente as estruturas das substâncias sintetizadas.

Os mesmos testes biológicos foram realizados para as seis substâncias **2.1** a **2.6**, dessa vez mostrando que os derivados foram mais eficazes que a HVL em inibir o crescimento das células cancerígenas. Os testes também mostraram que **2.1** é a substância mais ativa, sendo mais eficaz que a droga de referência, DOX, em inibir o crescimento de células cancerígenas de mama (MCF-7), rim (786-0), próstata (PC-3), cólon (HT-29) e leucemia eritromieloblastóide (K562). A substância **2.2** foi mais eficaz que a DOX em relação às células de ovário resistente a andriamicina (NCI-ADR/RES), PC-3 e HT-29. A substância **2.3** foi mais eficaz que a DOX em relação às células de NCI-ADR/RES, PC-3 e ovário (OVCAR-03). A substância **2.4** foi mais eficaz que a DOX em relação às células de NCI-ADR/RES, PC-3 e HT-29. A substância **2.5** foi mais eficaz que a DOX em relação às células de PC-3, HT-29 e K562. A substância **2.6** foi mais eficaz que a DOX em relação às células de NCI-ADR/RES, PC-3, HT-29 e K562.

Os resultados obtidos para a atividade antiproliferativa foram utilizados para um estudo teórico da relação estrutura química-atividade biológica das substâncias **2.1** a **2.6** e, para tal, foram empregados cálculos DFT/BLYP/6-31G*. Estes se mostraram adequados aos cálculos dos parâmetros energia dos orbitais, densidade eletrônica e população orbital, pois possibilitaram alguns resultados correlacionáveis às atividades antiproliferativas relativas das substâncias analisadas. Por outro lado, essas correlações só foram verificadas ao se agrupar as substâncias **2.1** a **2.6** em dois conjuntos distintos em função da natureza dos *N*-substituintes, respectivamente acíclicos (**2.1** a **2.3**) e cíclicos (**2.4** a **2.6**). Isto pode indicar haver uma distinção no modo de interação dessas substâncias com as diferentes células cancerígenas, dependendo da natureza da cadeia carbônica do substituinte.

Em função dos resultados da atividade antiproliferativa foram propostos três grupos com diferentes tipos de respostas envolvendo **2.1** a **2.3**, denominados: G-I (frente às células de melanoma, mama, rim, próstata, leucemia e cólon), G-II (frente às células do ovário resistente e ovário) e G-III (frente às células do pulmão). Analogamente foi possível propor cinco grupos com diferentes tipos de respostas envolvendo **2.4** a **2.6**, denominados: G-IV (frente às células de melanoma e cólon), G-V (frente às células do pulmão), G-VI (frente às células de ovário resistente e rim), G-VII (frente às células de próstata e leucemia) e G-VIII (frente às células de mama e ovário).

O fato de ter sido possível relacionar três grupos de células (G-I a G-III) com diferentes respostas para os as substâncias **2.1** a **2.3**, as quais possuem *N*-substituintes acíclicos, e cinco grupos (G-IV a G-VIII) para as substâncias **2.4** a **2.6**, as quais possuem *N*-substituintes cíclicos, indica que estes últimos conferem maior seletividade à ação antiproliferativa avaliada.

Para o grupo G-VII não foi encontrada nenhuma correlação com nenhum dos parâmetros teóricos calculados. Para os demais grupos, os estudos teóricos indicaram haver correlação entre a atividade e sítios moleculares tanto com características nucleofílicas quanto com características eletrofílicas.

Os resultados obtidos neste trabalho iniciam o caminho dos estudos de substâncias derivadas de produtos naturais vouacapânicos como agentes antitumorais. Futuramente será importante o desenvolvimento de mais estudos biológicos e teóricos desta classe de substâncias visando elucidar o mecanismo de ação dessas substâncias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMAREGO, W. L. F.; PERRIN, D. D. "Purification of Laboratory Chemicals". 4th ed. New York, Pergamon Press, **1988**.

ARRIAGA, A. M. C.; CASTRO, M. A. B.; SILVEIRA, E. R.; BRAZ-FILHO, R. "Further diterpenoids isolated from *Pterodon polygalaeflorus*". *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. **11**, p. 187, **2000**.

BECKE, A. D. "Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior". *Physical Review A: Atomic, Molecular, and Optical Physics*, v. **38**, p. 3098, **1988**.

BELINELO, V. J.; PILÓ-VELOSO, D.; BORGES, E. E. L.; FERREIRA-ALVES, D. L.; REIS, G. T. "Síntese e atividade fitotóxica de amidas derivadas do ácido 6 α ,7 β -di-hidroxivouacapan-17 β -óico". *Eclética Química*, v. **26**, p. 25, **2001**.

BELINELO, V. J.; REIS, G. T.; STEFANI, G. M.; PILÓ-VELOSO, D.; FERREIRA-ALVES, D. L. "Synthesis of 6 α ,7 β -di-hidroxivouacapan-17 β -oic acid derivates part IV: Mannich base derivates and its activities on the electrically stimulated guinea-pig ileum preparation". *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. **13**, p. 830, **2002**.

BRAZ-FILHO, R.; GOTTLIEB, O. R. "The isoflavones from *Pterodon Pubescens*". *Phytochemistry*, v. **10**, p. 2835, **1971**.

CARVALHO, J. C. T.; SERTIÉ, J. A. A.; BARBOSA, M. V. J.; PATRÍCIO, K. C. M.; CAPUTO, L. R. G.; SARTI, S. J.; FERREIRA, L. P.; BASTOS, J. K. "Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog". *Journal of Ethnopharmacology*, v. **64**, p. 127, **1999**.

CASTELO-BRANCO, P. A.; “Obtenção e estudo químico-biológico de derivados oxidados e nitrogenados de furanoditerpeno de *Pterodon polygalaeflorus* Benth”. Belo Horizonte, **2001**, 94p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Química, ICEX, Universidade Federal de Minas Gerais.

CASTELO-BRANCO, P. A.; RUBINGER, M. M. M.; RESENDE, J. M.; SILVA, A. A.; FERREIRA-ALVES, D. L.; PILÓ-VELOSO, D. “Synthesis and phytotoxic activity evaluation of novel $6\alpha,7\beta$ -dihydroxyvouacapan- 17β -oic acid derivatives”. *Journal of Chemical Research*, v. **6**, p. 351, **2006**.

CASTELO-BRANCO, P. A.; SANTOS, F. J. L.; RUBINGER, M. M. M.; FERREIRA-ALVES, D. L.; PILÓ-VELOSO, D.; KING-DIAZ, B.; LOTINA-HENNSSEN, B. “Uncoupling and inhibitors properties to photosynthesis of diterpene lactone amide derivatives”. *Zeitschrift für Naturforschung*, v. **63C**, p. 251, **2008**.

COELHO, M. G. P.; MARQUES, P. R.; GAYER, C. R.; VAZ, L. C.; NETO, J. F.; SABINO, K. C. “Subacute toxicity evaluation of a hydroalcoholic extract of *Pterodon pubescens* seeds in mice with collagen-induced arthritis”. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **77**, p. 159, **2001**.

COELHO, L. P.; REIS, P. A.; DE CASTRO, F. L.; GAYER, C. R.; LOPES, C. S.; SILVA, M. C.; SABINO, K. C.; TODESCHINI, A. R.; COELHO, M. G. P. “Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth seeds”. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **98**, p. 109, **2005**.

CORREA, M. P. “Dicionário de plantas úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas”. Rio de Janeiro, MA-IBDF, Imprensa Nacional, p. 153, **1978**.

DE FÁTIMA, A.; KOHN, L. K.; ANTÔNIO, M. A.; DE CARVALHO, J. E.; PILLI, R. A. “(R)-Goniothalamine: total syntheses and cytotoxic activity against cancer cell lines”. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. **13**, p. 2927, **2005**.

DE FÁTIMA, A.; KOHN, L. K.; DE CARVALHO, J. E.; PILLI, R. A. "Cytotoxic activity of (*S*)-goniothalamin and analogues against human cancer cells". *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. **14**, p. 622, **2006a**.

DE FÁTIMA, A.; MODOLO, L. V.; CONEGERO, L. S.; PILLI, R. A.; FERREIRA, C. V.; KOHN, L. K.; DE CARVALHO, J. E. "styryl lactones and their derivatives: biological activities, mechanisms of action and potential leads for drug design". *Current Medicinal Chemistry*, v. **13**, p. 3371, **2006b**.

DE FÁTIMA, A.; ZAMBUZZI, W. F.; MODOLO, L. V.; TARSITANO, C.A.B.; GADELHA, F. R.; HYSLOP, S.; DE CARVALHO, J. E.; SALGADO, I.; FERREIRA, C. V.; PILLI, R. A. "Cytotoxicity of goniothalamin enantiomers in renal cancer cells: Involvement of nitric oxide, apoptosis and autophagy". *Chemico-Biological Interactions*, v. **176**, p. 143, **2008**.

DEMUNER, A. J. "Síntese de derivados do ácido $6\alpha,7\beta$ -di-hidroxiouacapan- 17β -óico e de análogos do ácido helmintospórico, visando estudos de atividades analgésica e reguladora do crescimento de plantas". Belo Horizonte, **1996**, 224p. Tese de Doutorado – Departamento de Química, ICEX, Universidade Federal de Minas Gerais.

DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L. C. A.; PILÓ-VELOSO, D.; FERREIRA-ALVES, D. L.; HOWARTH, O. W. "Structure and plant growth regulatory activity of new diterpenes from *Pterodon polygalaeflorus* Benth". *Journal of Natural Products*, v. **66**, p. 770, **1996**.

DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L. C. A.; PILÓ-VELOSO, D.; FERREIRA-ALVES, D. L.; HOWARTH, O. W. "Synthesis and plant growth regulatory activity of $6\alpha,7\beta$ -dihidroxiouacapan- 17β -óico acid derivates". *Australian Journal of Chemistry*, v. **51**, p. 61, **1998**.

DE OMENA, M. C.; BENTO, E. S.; DE PAULA, J. E.; SANT'ANA, A. E. G. "Larvicidal diterpenes from *Pterodon polygalaeflorus*". *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. **6**, p. 216, **2006**.

DEWAR, M. J. S.; ZOEBISCH, E. G.; HEALY, E. F.; STEWART, J. J. P. "Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model". *Journal of the American Chemical Society*, v. **107**, p. 3902, **1985**.

DITCHFIELD, R.; HEHRE, W. J.; POPLE, J. A. "Self-consistent molecular-orbital methods. IX. Extended Gaussian-type basis for molecular-orbital studies of organic molecules". *Journal of Chemical Physics*, v. **54**, p. 724, **1971**.

DUARTE, I. D. G.; FERREIRA-ALVES, D. L.; NALBAMURA-CRAIG, M. "Possible participation of endogenous opioid peptides on the mechanism involved in analgesia induced by vouacapan". *Life Science*, v. **48**, p. 891, **1992**.

DUARTE, I. D. G.; FERREIRA-ALVES, D. L.; VELOSO, D. P.; NAKAMURA-CRAIG, M. "Evidence of the involvement of biogenic amines in the antinociceptive effect of a vouacapan extracted from *Pterodon polygalaeflorus* Benth". *Journal of Ethnopharmacology*, v. **55**, p. 13, **1996**.

EUZÉBIO, F. P. G.; SANTOS, F. J. L.; PILÓ-VELOSO, D.; RUIZ, A. L. T. G.; de CARVALHO, J. E.; FERREIRA-ALVES, D. L.; FATIMA, A. D. "Effect of 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oic acid and its lactone derivatives on the growth of human cancer cells". *Bioorganic Chemistry*, v. **37**, p. 96, **2009**.

GAUSSIAN 03; User's Reference. USA, Gaussian, Inc., **2003**.

GILBERT, B.; SOUZA, J. P.; FASCIO, M.; KITAGAWA, M.; NASCIMENTO, S. S. C.; FORTES, C. C.; SEABRA, A. P.; PELEGRINO, J. "Esquistossomose: Proteção contra infecção por terpenóides". *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. **42**, p. 397, **1970**.

HARIHARAN, P. C.; POPLE, J. A. "Influence of polarization functions on MO hydrogenation energies". *Theoretica Chimica Acta*, v. **28**, p. 213, **1973**.

HARIHARAN, P. C.; POPLE, J. A. "Accuracy of AHn equilibrium geometries by single determinant molecular orbital theory". *Molecular Physics*, v. **27**, p. 209, **1974**.

HEHRE, W. J.; DITCHFIELD, R.; POPLE, J. A. "Self-consistent molecular orbital methods. XII. Further extensions of Gaussian-type basis sets for use in molecular orbital studies of organic molecules". *Journal of Chemical Physics*, v. **56**, p. 2257, **1972**.

Instituto Nacional do Câncer. <www.inca.gov.br> acessado dia 23/11/2009.

KATZ, N.; DOS SANTOS FILHO, D.; SARTI, S. J.; MENDES, N. M.; ROCHA FILHO, P. A.; ARAUJO, N. "Chemoprophylactic activity on Schistosomiasis mansoni of soaps containing essential oil from the fruits of *Pterodon pubescens*". *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. **35**, p. 183, **1993**.

KING-DÍAZ, B.; SANTOS, F. J. L.; RUBINGER, M. M. M.; PILÓ-VELOSO, D.; LOTINA-HENNSEN, B. "A diterpene γ -lactone derivative from *Pterodon polygalaeiflorus* Benth. as a photosystem II inhibitor and uncoupler of photosynthesis". *Zeitschrift für Naturforschung*, v. **61C**, p. 227, **2006**.

LEAL, L. K. A. M.; FERREIRA, A. A. G.; BEZERRA, G. A.; MATOS, F. J. A.; VIANA, G. S. B. "Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study". *Journal of Ethnopharmacology*, v. **70**, p. 151, **2000**.

LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. "Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density". *Physical Review B: Condensed Matter and Materials Physics*, v. **37**, p. 785, **1988**.

MALTHA, C. R. A. "Estudo da síntese de aminas e amidas derivadas do ácido $6\alpha,7\beta$ -di-hidroxivouacapan- 17β -óico". Belo Horizonte, **1994**, 268p. Tese de Doutorado – Departamento de Química, ICEX, Universidade Federal de Minas Gerais.

MALTHA, C. R.; STEFANI, G. M.; PILÓ-VELOSO, D.; FERREIRA-ALVES, D. L. “Synthesis of $6\alpha,7\beta$ -dihydroxyvouacapan- 17β -oic acid derivatives. Part III: Synthesis, ^1H - and ^{13}C -NMR of amide derivatives”. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. **8**, p. 203, **1997**.

MARQUES, D. D.; MACHADO, M. I. L.; CARVALHO, M. G.; MELEIRA, L. A. C.; BRAZ-FILHO, R. “Isoflavonoids and triterpenoids isolated from *Pterodon polygalaeflorus*”. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. **9**, p. 295, **1998**.

MENNA-BARRETO, R. F. S.; LARANJA, G. A. T.; SILVA, M. C. C.; COELHO, M. G. P.; PAES, M. C.; OLIVEIRA, M. M.; DE CASTRO, S. L. “Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of *Pterodon pubescens* seed oil: geranylgeraniol as the major bioactive component”. *Parasitology Research*, v. **103**, p. 111, **2008**.

MINISTÉRIO DA SAÚDE “ESTIMATIVAS 2008: Incidência de Câncer no Brasil”. Rio de Janeiro, INCA, **2007**.

MONKS, A.; SCUDEIRO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. “Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines”. *Journal of the National Cancer Institute*, v. **83**, p. 757, **1991**.

MOREIRA, J. M. “Síntese de derivados glicosilados do ácido $6\alpha,7\beta$ -dihidroxyvouacapan- 17β -óico”. Belo Horizonte, **1990**, 183p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Química, ICEX, Universidade Federal de Minas Gerais.

NAKAMURA, M.; FERREIRA-ALVES, D. L. “Peripheral analgesic effect of an experimental substance, PpDDE-81, Inflammatory Hiperalgisia”. *Brazilian Journal of Medicinal Biology Research*, v. **19**, p. 572, **1986**.

NASSIF, W. F. “Obtenção de ésteres e cetonas derivados do ácido 6 α ,7 β -di-hidroxiouacapan-17 β -óico, isolado do *Pterodon polygalaeiflorus* Benth”. Belo Horizonte, **1996**, 138p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Química, ICEx Universidade Federal de Minas Gerais.

NUNAN, E. A.; CARVALHO, M. G.; PILÓ-VELOSO, D.; TURCHETTI-MAIA, R. M. M.; ALVES, D. L. F. “Furanoditerpenes with anti and pro-inflammatory activity”. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. **15**, p. 450, **1982**.

NUMAN, E. A. “Estudo da atividade anti-inflamatória de furanoditerpenos isolados do *Pterodon polygalaeiflorus* Benth e de alguns de seus derivados”. Belo Horizonte, **1985**, 129p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Bioquímica e Imunologia - ICB - Universidade Federal de Minas Gerais.

PARR, R. G.; YANG, W. “Density functional Theory of Atoms and Molecules”. New York, Oxford, **1989**.

PIMENTA, A. T. A.; SANTIAGO, G. M. P.; ARRIAGA, A. M. C.; MENEZES, G. H. A.; BEZERRA, S. B. “Estudo fitoquímico e avaliação da atividade larvicida de *Pterodon polygalaeiflorus* Benth (Leguminosae) sobre *Aedes aegypti*”. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. **16**, p. 501, **2006**.

RESENDE, J. M. “Estudos por ressonância magnética nuclear de derivados de furanoditerpeno extraído de *Pterodon polygalaeiflorus* Benth”. Belo Horizonte, **2003**. 88p. Monografia de Bacharelado – Departamento de Química, ICEx, Universidade Federal de Minas Gerais.

RUBINGER, M. M. M. “Síntese de derivados nitrogenados do ácido 6 α ,7 β -di-hidroxiouacapan-17 β -óico”. Belo Horizonte, **1991a**, 148p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Química, ICEx, Universidade Federal de Minas Gerais.

RUBINGER, M. M. M.; PILÓ-VELOSO, D.; STEFANI, G. M.; FERREIRA-ALVES, D. L. "Synthesis of $6\alpha,7\beta$ -dihydroxyvouacapan-17 β -oic acid derivatives. Part I: Hydroxamic acid and amide derivatives". *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. **2**, p. 124, **1991b**.

RUBINGER, M. M. M.; CASTELO-BRANCO, P. A.; GUILARD, S.; SOUZA, E. M. R.; GAMBARDELLA, M. T. P.; BORGES, E. E. L., FERREIRA-ALVES, D. L.; PILÓ-VELOSO, D. "Preparation, X-ray structural studies and plant growth regulatory activity of methyl $6\alpha,7\beta$ -thiocarbonyldioxyvouacapan-17 β -oate". *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. **15**, p. 219, **2004**.

SABINO, K. C.; GAYER, C. R.; VAZ, L. C.; SANTOS, L. R.; FELZENSZWALB, I.; COELHO, M. G. P. "In vitro and in vivo toxicological study of the *Pterodon pubescens* seed oil". *Toxicology Letters*, v. **108**, p. 27, **1999**.

SACRAMENTO, T. M. "Estudo da síntese de glicosídeos e de ésteres derivados do ácido $6\alpha,7\beta$ -di-hidroxivouacapan-17 β -óico". Belo Horizonte, **1994**, 211p. Tese de Doutorado – Departamento de Química, ICEX, Universidade Federal de Minas Gerais.

SANTOS, F. J. L. "Síntese de derivados cetona-nitrogenados do ácido $6\alpha,7\beta$ -dihidroxivouacapan-17 β -óico isolado de *Pterodon polygalaeiflorus* Benth". Belo Horizonte, **2003**, 81p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Química, ICEX, Universidade Federal de Minas Gerais.

SANTOS, F. J. L. "Síntese de derivados nitrogenados, oxidados e substituídos no anel furânico do ácido $6\alpha,7\beta$ -dihidroxivouacapan-17 β -óico (ADV), furanoditerpeno isolado de *Pterodon polygalaeiflours* Benth". Belo Horizonte, **2008**, 124p. Tese de Doutorado – Departamento de Química, ICEX, Universidade Federal de Minas Gerais.

SANTOS, F. J. L.; PILÓ-VELOSO, D.; FERREIRA-ALVES, D. L. "NMR Study of the Preparation of $6\alpha,7\beta$ -Dihydroxyvouacapan-17 β -oic Acid Mannich Base Derivatives". *Annals of Magnetic Resonance*, v. **6**, p. 34, **2007**.

SANTOS FILHO, D.; SARTI, S. J.; KATZ, N.; ARAÚJO, N.; ROCHA FILHO, P. A.; ABREU, J. E.; BORTOLIN, M. E. “Chemoprophylactic activity of soaps containing essential oil from the fruit of *Pterodon pubescens* in schistosomiasis mansoni”. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. **82**, p. 343, **1987**.

SILVA, M. C.; GAYER, C. R.; LOPES, C. S.; CALIXTO, N. O.; REIS, P. A.; PASSAES, C. P.; PAES, M. C.; DALMAU, S. R.; SABINO, K. C.; TODESCHINI, A. R.; COELHO, M. G. P. “Acute and topic anti-edematogenic fractions isolated from the seeds of *Pterodon pubescens*”. *Journal of Pharmacology*, v. **56**, p. 135, **2004**.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. “Identificação espectrométrica de compostos orgânicos”. 3^a ed., Rio de Janeiro, Ed. Guanabara, **1979**.

SPARTAN; Tutorial and User’s Guide; Wavefunction. USA, Inc.& Schrödinger, Inc., **1999**.

TORRENEGRA, R.; BAUEREIB, P.; ACHENBACH, H. “Homoormosaninetype alkaloids from *Bowdichia virgilioides*”. *Phytochemistry*, v. **28**, p. 2219, **1989**.

TURCHETTI-MAIA, R. M. M.; NUNAN, E. A.; BAREICHA DE QUEIROZ, I.; FERREIRA-ALVES, D. L. “Comparação entre atividades anti-inflamatórias e inibidora da ação de mediadores químicos sobre o músculo liso, pelos furano-diterpenos de *Pterodon polygalaeflorus* Benth”. In: 37^a REUNIÃO DA SBPC, Belo Horizonte, 1985. Belo Horizonte, *Ciência e Cultura Supl.*, v. **37**, p. 816, **1985**.

TURCHETTI-MAIA, R. M. M.; NAKAMURA, M.; FERREIRA-ALVES, D. L. “Caracterização e quantificação do efeito sedativo do PpDDe-81” II In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DAS SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL. Caxambu, 1987. Caxambu, *Resumos*. p. 418, **1987**.

VIEIRA, C. R.; MARQUES, M. F.; SOARES, P. R.; MATUDA, L.; DE OLIVEIRA, C. M. A.; KATO, L.; DA SILVA, C. C.; GUILLO, L. A. “Antiproliferative activity of *Pterodon pubescens* Benth. seed oil and its active principle on human melanoma cells”. *Phytomedicine*, v. **15**, p. 528, **2008**.