

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

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DE COMPOSTOS
SEMISSINTÉTICOS**

DENISE DIEDRICH

PORTO ALEGRE, 2014

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

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DE COMPOSTOS
SEMISSINTÉTICOS**

Dissertação apresentada por
Denise Diedrich para obtenção do
GRAU DE MESTRE em
Ciências Farmacêuticas

Orientador: Profa. Dr. Simone Cristina Baggio Gnoatto

Co-orientador: Profa. Dr. Aline Rigon Zimmer

PORTO ALEGRE, 2014

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 27 de março de 2014, pela Banca Examinadora constituída por:

Dra. Cristiane Bernardes de Oliveira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Prof. Dr. Favero Reisdorfer Paula

Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA

Prof. Dr. Heitor Franco Andrade Junior

Universidade de São Paulo - USP

Profa. Dra. Tiana Tasca

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Diedrich, Denise

Avaliação da atividade antimalárica de compostos semissintéticos / Denise Diedrich. -- 2014.
126 f.

Orientadora: Simone Cristina Baggio Gnoatto.
Coorientadora: Aline Rigon Zimmer.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Atividade antimalárica in vivo. 2. Anti-plasmodium in vivo. 3. Plasmodium berghei. 4. derivados semissintéticos. 5. ácidos ursólico e betulínico. I. Gnoatto, Simone Cristina Baggio, orient. II. Zimmer, Aline Rigon, coorient. III. Título.

Agradecimentos ao CNPq e ao INCT-IF, pelo financiamento para o desenvolvimento deste trabalho. Agradecimentos ao Laboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica – LaFiS que disponibilizou equipamentos e material necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente dissertação. Agradecimentos também ao Laboratório de Protozoologia/ Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – USP e ao Laboratório 405/Centro Bioanalítico de Medicamentos da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

*Ainda que a minha mente e o meu corpo
enfraqueçam,
Deus é a minha força,
Ele é tudo o que sempre preciso.*

Salmos 73: 26

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser o criador e mantenedor da minha vida.

Aos meus pais Luci e Danilo por toda educação que me proporcionaram à custa de muito sacrifício e esforço bem como todo amor, incentivo dados por toda minha vida.

Ao meus irmãos Giovani, Paulo e Volnei, que tanto amo, por todos os incentivos e, principalmente, por acreditar em mim sempre, eu realmente, não tenho palavras para expressar o que sinto.

Ao meu noivo Maicon pelo amor, companheirismo, amizade, aconselhamento e conforto em todas as horas.

À minha tia Elvira que sempre me apoiou tanto na vida pessoal, como na minha trajetória acadêmica.

Aos meus colegas e amigos Laura, Gloria, Érica, Francine, Soraia, Cristiane, Lucimara, Cíntia, e Elenilson pelas demonstrações de coleguismo e amizade e por muito trabalho realizado para a conclusão desta dissertação.

À minha colega e bolsista Thayse, pela dedicação, companheirismo e amizade nesses quase dois anos de trabalho juntas.

Aos demais colegas do LaFiS 105 pelo carinho e atenção que sempre me dispensaram, pela amizade e paciência.

À Professora Dr. Grace Gosmann por me dar oportunidade durante meu estágio e mestrado. Sua presença sempre nos traz segurança e inspiração.

À Professora Dr. Aline R. Zimmer pela Co-orientação, colaboração e apoio durante o mestrado, sempre agregando valor com seu vasto conhecimento.

À Professora Dr. Simone C. B. Gnoatto, primeiramente, pela oportunidade que deu a mim de estar neste grupo de pesquisa, pela orientação e por toda dedicação, carinho e compreensão nesta etapa tão significativa da minha vida. Certamente uma orientadora ímpar.

Agradeço também às colaborações realizadas com os professores Dr. Luís F. S. de Oliveira (UNIPAMPA), Dr. Diogo L. Oliveira (UFRGS), Dr. Heitor F. de Andrade (USP) e Dr. Bibiana V. Araújo (UFRGS).

RESUMO

A malária é uma doença tropical antiga que continua sendo um dos principais problemas de saúde pública do mundo. Faz-se necessário, assim, desenvolver novas classes de antimaláricos que sejam eficazes e seguros contra a malária. Neste contexto, nosso grupo de pesquisa tem trabalhado, com dois triterpenos semissintéticos derivados dos ácidos ursólico (**1**) e betulínico (**2**), os compostos **1c** e **2c** respectivamente. Estes derivados (**1c** e **2c**) apresentaram elevada potência *in vitro* frente a cepas de *Plasmodium falciparum*, alcançaram índices de seletividade em relação à linhagem celular humana satisfatórios e uma rota semissintética convergente foi estabelecida facilitando sua obtenção. Com base nestes resultados e visando dar continuidade a pesquisa, estudos de avaliação da toxicidade *in vitro* e aguda e da atividade antimalárica *in vivo* foram propostos como objetivos deste trabalho. Na avaliação da toxicidade *in vitro* foram realizados ensaios de cito e genotoxicidade frente a linfócitos, ensaios de hemólise e coagulação. Já na análise da toxicidade *in vivo*, foi realizada a avaliação da toxicidade aguda por meio do protocolo 423 em camundongos BALB/c. A atividade antimalárica *in vivo* foi avaliada, utilizando o ensaio supressivo de 4 dias em camundongos BALB/c, usando a linhagem de *Plasmodium berghei* ANKA. Os resultados demonstraram que o derivado **1c** apresentou baixa genotoxicidade e efeitos citotóxicos frente a linfócitos. Porém este derivado demonstrou atividade pro-coagulante e hemolítica, com a DL₅₀ aferida entre 300 e 125 mg/kg. Já o derivado **2c** demonstrou relativa genotoxicidade e efeitos citotóxicos frente a linfócitos, apresentando também atividade pro-coagulante e hemolítica. A DL₅₀ deste derivado foi aferida entre 300 e 50 mg/kg, sendo classificado como tóxico. A ED₅₀ e o E_{max} foram calculados a partir dos resultados de parasitemia nos animais tratados apenas para o derivado **1c**. A ED₅₀ do derivado **1c** foi de 19,68 mg/kg, enquanto que o E_{max} ficou em 52,18%. A partir destes resultados podemos sugerir que embora apresente sinais de toxicidade em concentrações e doses superiores às efetivas, o derivado **1c** possui efetividade e segurança suficiente para que se de seguimento na investigação pré-clínica.

Palavras-chave: Triterpenos, ácido ursólico, ácido betulínico, semissíntese, antimaláricos, *Plasmodium berghei*, atividade toxicológica.

ABSTRACT

Malaria is an ancient tropical disease that remains a major public health problem in the world. It is necessary, therefore, to develop new classes of antimalarial drugs that are safe and effective against malaria. In this context, our research group has been working with two semisynthetic triterpene derivatives of ursolic (**1**) and betulinic (**2**) acids, compounds **1c** and **2c** respectively. Both derivatives showed high *in vitro* potency against strains of *Plasmodium falciparum*, with satisfactory index of selectivity regarding to a human cell line. A convergent semisynthetic route has been established, which facilitates its obtaining. Based on these results and in order to continue the research, this work proposed as objectives to carry evaluation studies on acute toxicity and *in vitro* and *in vivo* antimalarial activity. In the assessment of *in vitro* toxicity, assays against cyto- and genotoxicity lymphocytes were performed, as well as hemolysis and coagulation tests. In the analysis of *in vivo* toxicity, it was performed the acute toxicity evaluation by means of the protocol 423 in BALB /c mice. The *in vivo* antimalarial activity was evaluated by using the 4 days suppressive test in BALB / c mice, using a strain of *Plasmodium berghei* ANKA. The results showed that **1c** derivative had low genotoxicity and cytotoxic effects against lymphocytes. However this derivative showed pro-coagulant and hemolytic activities, with LD₅₀ between 300 and 125 mg / kg, at toxic levels. Derivative **2c** demonstrated genotoxicity and cytotoxic effects against lymphocytes, also showing pro-coagulant and hemolytic activities. Its LD₅₀ was measured between 300 and 50 mg / kg, being classified as toxic. ED₅₀ and Emax were calculated only from the results of parasitaemia of the animals treated with **1c**, being 19,68 mg/kg and 52,18%, respectively. From these results, we suggest that although showing signs of toxicity at concentrations and doses higher than the effective ones, derivative **1c** owns enough effectiveness and safety to follow to the pre-clinical investigation.

Keywords: Triterpenes, ursolic acid, betulinic acid, semi-synthesis, antimalarial, *Plasmodium berghei*, toxicological activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Triterpenos pentacíclicos, os ácidos ursólico (1) e betulínico (2).	20
Figura 2. Derivados triterpênicos que apresentaram elevada potência e segurança <i>in vitro</i> : 1c (LAFIS 10) e 2c (LAFIS 13).	21
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> spp.	27
Figura 4. Morfologia dos eritrócitos.	29
Figura 5. – Porcentagem da população em risco de infecção da malária.	30
Figura 6. - Mapa do Brasil destacando as áreas de risco para malária pelos diferentes níveis de incidência parasitária anual.	31
Figura 7. Áreas prioritárias para atividades de contenção da resistência a artemisinina. Sub-região do Grande Mekong, 2013 [38].	38
Figura 8. Complexação do derivado 1c com moléculas de heme <i>in silico</i> -primeiro mecanismo de ação proposto para o composto [3, 7].	41
Figura 9. Demonstração da ação de 1c sobre o transporte de Ca ⁺⁺ intracelular do parasito.	42
Figura 10. Fluxograma com metodologia de extração do ácido ursólico 1	47
Figura 11. Semissíntese do derivado 1a . i : piridina, t.a., 24 horas.	48
Figura 12. Obtenção do <i>t</i> -butil-3-[4-(3-aminopropil)piperazinilpropil]carbamato (BAPP-BOC).	49
Figura 13. Obtenção do derivado semissintético 1c	50
Figura 14. Fluxograma com metodologia de extração do ácido betulínico.	51
Figura 15. Semissíntese do derivado 2a . i : piridina, t.a., 24 horas.	52
Figura 16. Obtenção do derivado semissintético 2c	53
Figura 17. Estrutura química do precursor 1	63
Figura 18. Estrutura química do precursor 2	65
Figura 19. Estrutura química do 1a	66
Figura 20. Estrutura química do 2a	67
Figura 21. Estrutura química do 1c	68
Figura 22. Estrutura química do 2c	69
Figura 23. Citotoxicidade e dano ao DNA do derivado 1c	72

Figura 24. Citotoxicidade e dano ao DNA do derivado 2c	73
Figura 25. Ensaio de coagulação dos compostos 1c e 2c	74
Figura 26. Atividade hemolítica dos derivados 1c (A) e 2c (B).....	76
Figura 27. Média das parasitemias do derivado 1c	78
Figura 28. Curva dose efeito do derivado 1c e cloroquina.	79
Figura 29. Curva de sobrevivência (Kaplan-Meier) para os grupos até a 4 ^o semana de evolução.....	81

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1. Classes de fármacos antimaláricos com suas respectivas estruturas representativas.</i>	33
Tabela 2. Eficácia do derivado 1c em camundongos infectados com <i>P. berghei</i> Anka.	80
Tabela 3. Avaliação bioquímica de soro de camundongos após 14 dias da administração da dose 50 mg/kg via I.p. do derivado 2c	83
Tabela 4. Perfil hematológico de camundongos após 14 dias da administração da dose 50 mg/kg via I.p. do derivado 2c	84
Tabela 5. Efeitos do derivado 2c sobre a massa corporal (g) e o peso relativo de órgãos e tecidos viscerais (g/100 g de peso corporal) 14 dias após a administração de 50 mg/kg via i.p.	85

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	23
2.2 Objetivos específicos.....	24
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
3.1 Malária.....	26
3.1.1 Histórico da malária	26
3.1.2 Transmissão	26
3.1.3 Epidemiologia.....	29
3.1.4 Manifestações clínicas.....	31
3.1.5 Tratamento e mecanismo de ação dos principais antimaláricos atuais	32
3.1.6 Resistência	37
3.1.7 Pesquisa de novos antimaláricos	38
3.2 Produtos naturais e novos fármacos	39
3.3 Triterpenos.....	39
3.3.1 Atividade antimalárica do ácido ursólico (1) e do LAFIS 10 (1c).....	40
3.3.2 Atividade antimalárica do ácido betulínico (2) e do LAFIS 13 (2c).....	42
4. PARTE EXPERIMENTAL	45
4.1 Geral	46
4.2 Semissíntese.....	46
4.2.1 Derivados do ácido ursólico (1)	46
4.2.2 Derivados do ácido betulínico (2)	50
4.3 Ensaio Biológicos	53
4.3.1 Sangue humano	53
4.3.2 Animais.....	54
4.3.3 Avaliação da toxicidade dos derivados 1c (LAFIS 10) e 2c (LAFIS 13) <i>in vitro</i>	54
4.3.4 Avaliação da atividade biológica dos compostos 1c (LAFIS 10) e 2c (LAFIS 13) <i>in vivo</i>	58
4.4 Análise Estatística	60

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1 Extração e semissíntese dos derivados semissintéticos	62
5.2.1 Extração do precursor 1	62
5.2.1 Extração do precursor 2	63
5.2.3 Obtenção dos derivados semissintéticos 1c e 2c	67
5.2 Ensaio Biológico <i>in vitro</i>	70
5.2.1 Ensaio de geno e citotoxicidade em linfócitos	70
5.2.2 Ensaio de Coagulação.....	73
5.3 Ensaio Biológico <i>in vivo</i>	77
5.3.1 Atividade antimalárica <i>in vivo</i>	77
5.3.2 Toxicidade aguda	81
6. CONCLUSÃO.....	86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
8. ANEXO	97
8.1 Anexo 1	98

1 INTRODUÇÃO

A malária é uma doença tropical causada por parasitas do gênero *Plasmodium*. Mesmo sendo uma doença antiga, a malária continua sendo um dos principais problemas de saúde pública do mundo devido principalmente à resistência do parasito causador da doença ao atual arsenal terapêutico disponível, à toxicidade e ao alto custo apresentado pelos fármacos que ainda apresentam efetividade. Em face disso, fazem-se necessários esforços para desenvolver novas classes de antimaláricos que sejam eficazes e seguros contra as múltiplas cepas resistentes de espécies do gênero *Plasmodium*.

Os produtos naturais e seus derivados têm sido, historicamente, importantes como fonte de novos fármacos. A terapêutica moderna, constituída por um grande número de medicamentos, não teria atingido o grau de desenvolvimento atual sem os produtos de origem natural. Inúmeros são os exemplos de medicamentos que foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, incluindo entre outros, a quinina e artemisinina [1,2].

Neste contexto, nosso grupo de pesquisa tem trabalhado, com dois triterpenos pentacíclicos, os ácidos ursólico (**1**) e betulínico (**2**), extraídos das cascas de *Malus domestica* e *Platanus acerifolia*, respectivamente (Figura 1). Estes triterpenos são amplamente relatados na literatura como moléculas bioativas, destacando-se a atividade antimalárica [3-7].

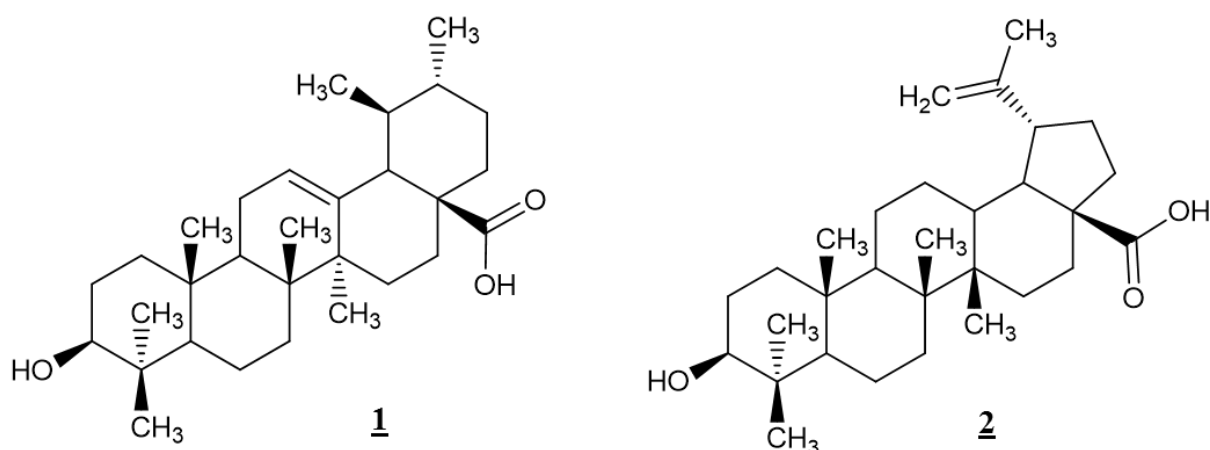


Figura 1. Triterpenos pentacíclicos, os ácidos ursólico (**1**) e betulínico (**2**).

Em um estudo preliminar, nosso grupo de pesquisa submeteu uma série de derivados semissintéticos dos ácidos ursólico e betulínico a testes de atividade

antimalárica *in vitro*. Neste estudo, dois dos derivados triterpênicos apresentaram elevada potência frente a cepas de *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina (FcB1): derivado **1c** (LAFIS 10) com $IC_{50} = 167$ nM [3,7]; e frente à cepa sensível a cloroquina 3D7: derivado **2c** (LAFIS 13) com IC_{50} de 220 nM [5]; (Figura 2). Estes compostos ainda tiveram o índice de seletividade em relação à linhagem celular humana avaliado, com resultados satisfatórios. Além disso, uma rota semissintética convergente foi estabelecida, facilitando a obtenção destes derivados. Com base nestes resultados e visando dar continuidade a pesquisa com estes derivados, estudos de avaliação da toxicidade *in vitro* e aguda e da atividade antimalárica *in vivo* e foram propostos como objetivos deste trabalho.

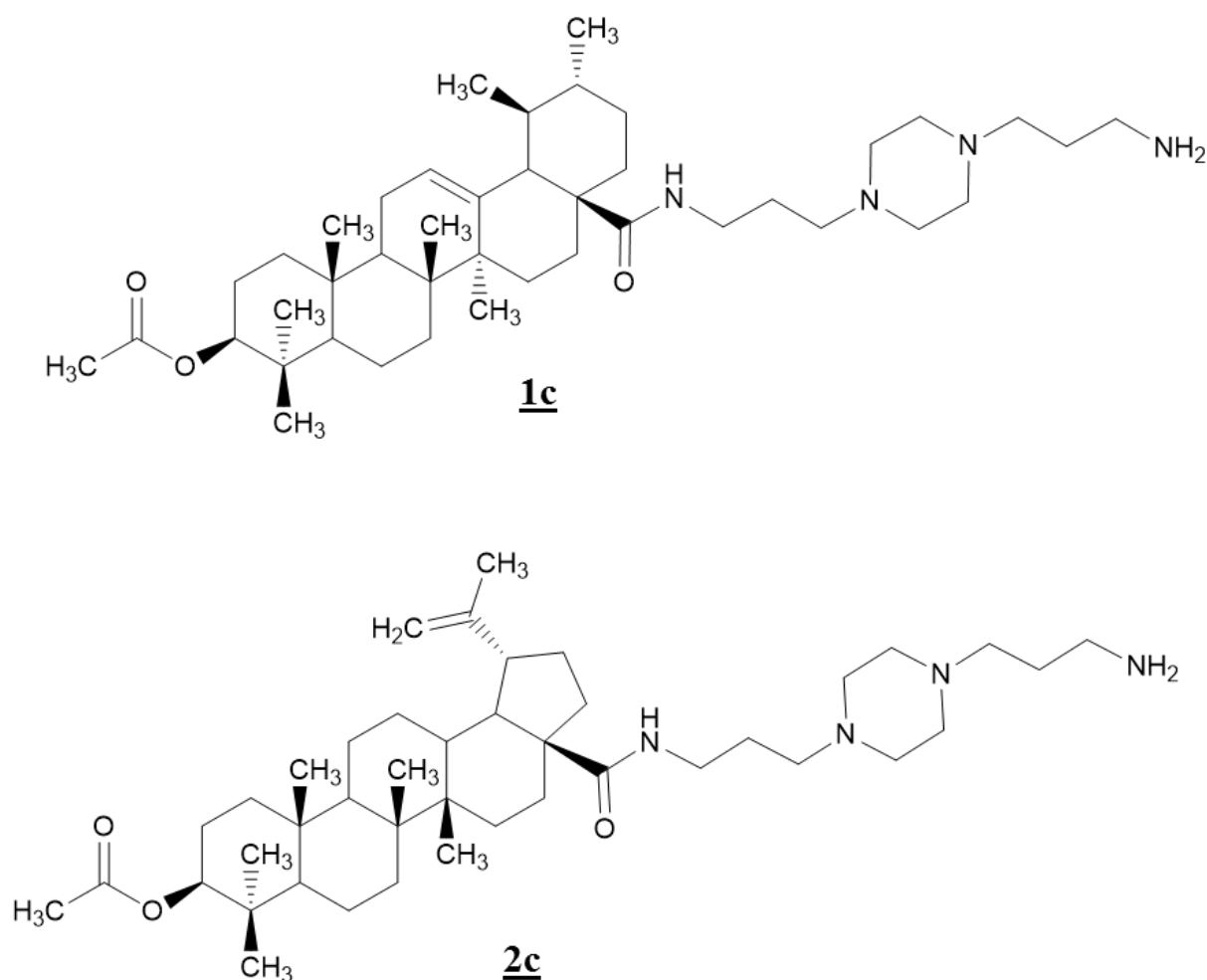


Figura 2. Derivados triterpênicos que apresentaram elevada potência e segurança *in* (LAFIS 10) e **2c** (LAFIS 13).

1. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar a avaliação farmacológica e toxicológica *in vitro* e *in vivo* de triterpenos semissintéticos obtidos a partir dos ácidos ursólico e betulínico.

2.2 Objetivos específicos

- Extrair e purificar os ácidos ursólico (**1**) e betulínico (**2**);
- Obter os derivados semissintéticos **LAFIS 10** (N-{3-[4-(3-aminopropil)piperazinil]propil}-3-*O*-acetilbetulinamida) **1c** e **LAFIS 13** (N-{3-[4-(3-aminopropil)piperazinil]propil}-3-*O*-acetilbetulinamida) **2c**;
- Realizar ensaios biológicos *in vitro* a fim de:
 - Avaliar a citotoxicidade em linfócitos dos compostos **1c** e **2c**;
 - Avaliar o dano ao DNA em linfócitos dos compostos **1c** e **2c** através do ensaio cometa.
 - Avaliar a atividade hemolítica dos compostos **1c** e **2c**;
 - Avaliar a atividade sobre a coagulação sanguínea dos compostos **1c** e **2c**;
- Realizar ensaios biológicos *in vivo* a fim de:
 - Avaliar a atividade antimalárica frente à cepa *Plasmodium berghei* Anka derivados **1c** e **2c**;
 - Avaliar a toxicidade aguda dos derivados **1c** e **2c**;

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Malária

3.1.1 Histórico da malária

Malária é uma das doenças parasitárias mais prevalentes na história da humanidade. Apesar da associação com a malária ser incerta, há várias referências na literatura antiga e das civilizações modernas que relatam febres malignas intermitentes e calafrios consistentes com os sintomas da malária [8,9].

Hipócrates foi o primeiro a fazer uma conexão entre a proximidade de corpos d'água estagnados e a ocorrência de febres na população local. Os romanos também faziam esta associação e foram os pioneiros na drenagem de pântanos. O termo malária surgiu justamente desta relação entre a doença e os pântanos. A doença passou a ser descrita como *ária cattiva* ou *mal'aria* (ar ruim) pelos italianos no século XIV e este termo entrou para a língua inglesa em torno de 200 anos depois. Da mesma forma, os franceses criaram o termo "paludismo", cuja raiz significa pântano, para se referir à malária [8,9].

Durante quase 1.500 anos pouco foi acrescentado ao conhecimento sobre a malária e seu tratamento. A partir do descobrimento da quinina, isolada de *Cinchona* spp. em 1820, diversos avanços ocorreram na compreensão da fisiopatologia da doença, no controle dos vetores, acesso ao diagnóstico e tratamento, tornando possível obter uma redução significativa da morbidade e mortalidade decorrente da malária [4]. Porém, ainda hoje a doença se faz presente em cerca de 104 países e é considerada um grave problema de saúde pública mundial [8-10].

3.1.2 Transmissão

Embora a malária possa ser transmitida através da transfusão de sangue infectado e pelo compartilhamento de agulhas, os seres humanos, habitualmente, se infectam por esporozoítos injetados pela picada das fêmeas do mosquito *Anopheles* (vetores) conforme figura 3. Existem cinco espécies de parasitas que causam a malária em seres humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* [11].

Destacam-se o *P. falciparum* e *P. vivax* como os mais comuns sendo o primeiro o maior causador de mortes e o segundo o mais prevalente no Brasil [11].

O ciclo biológico complexo dos plasmódios compreende uma fase sexuada ou esporogônica, que ocorre nas fêmeas dos mosquitos do gênero *Anopheles*, e outra assexuada ou esquizogônica que ocorre nos hospedeiros vertebrados (Figura 3) [11,12].

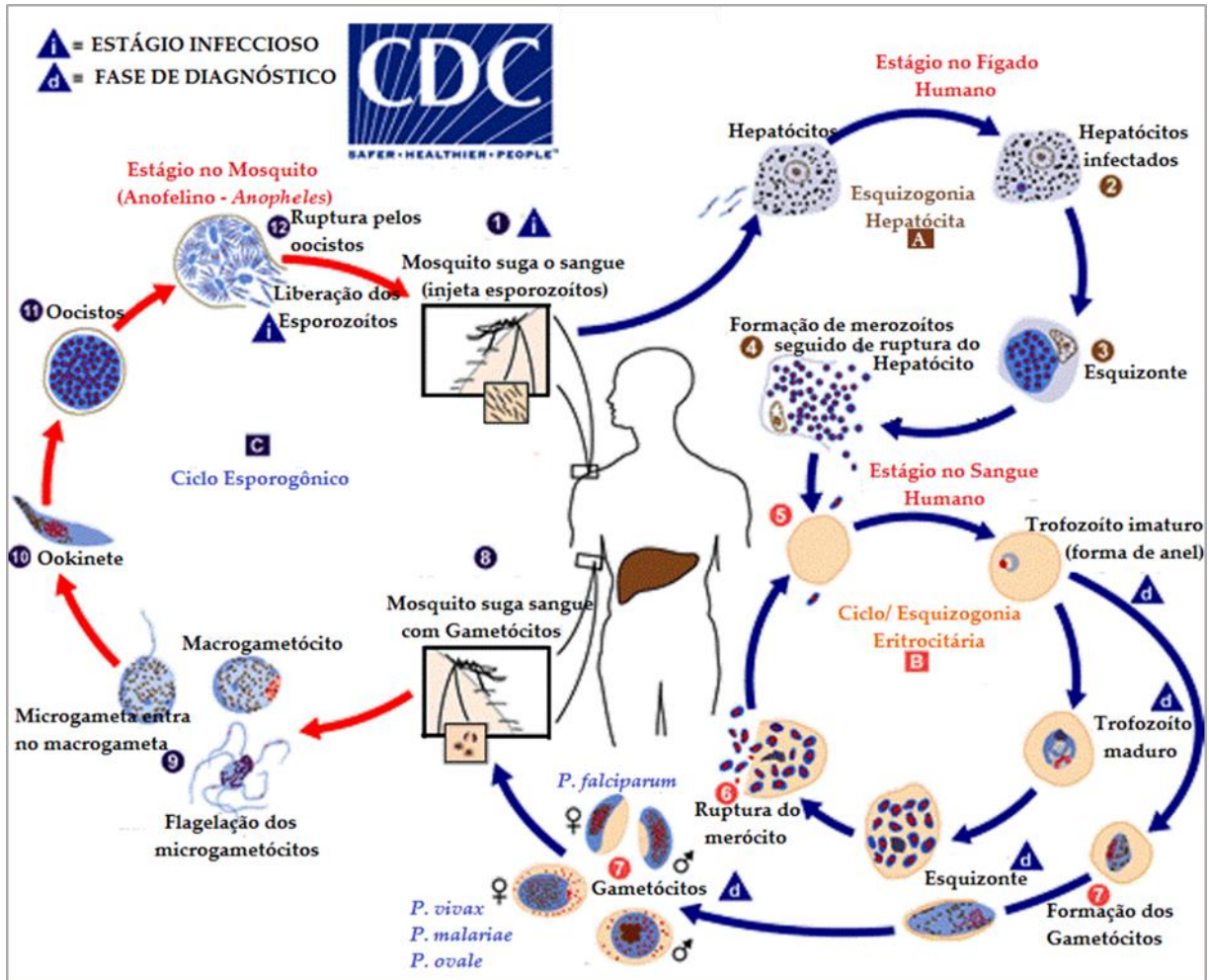


Figura 3. Ciclo de vida de *Plasmodium* spp. Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention - CDC [18].

Durante o repasto sanguíneo as fêmeas infectadas transferem, através da saliva, dezenas de esporozoítos para a epiderme do hospedeiro vertebrado os quais são capazes de atravessar várias células do hospedeiro mantendo-se íntegros [12]. Após transpor a barreira epitelial, uma parte desses esporozoítos alcança a corrente sanguínea. Uma vez dentro do sistema circulatório sanguíneo os esporozoítos atingem o fígado, infectando os hepatócitos (fase exo-eritrocitária). Na malária de mamíferos

não está claro qual via que os esporozoítos utilizam para passar dos capilares sinusóides para os hepatócitos: se através das células de Kupffer ou pelo endotélio dos capilares [12]. O processo de invasão do fígado é complexo e depende de várias interações parasito-célula hospedeira. O desenvolvimento do parasito nas células hepáticas requer aproximadamente uma semana para o *P. falciparum* e *P. vivax* e cerca de duas semanas para o *P. malariae*. Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, alguns parasitos se desenvolvem rapidamente, enquanto outros ficam em estado de latência no hepatócito, sendo por isso, denominados hipnozoítos. Essas estruturas são responsáveis pelas recaídas da doença, que ocorrem após períodos variáveis de incubação, podendo chegar a seis meses [17]. No fígado os esporozoítos invadem vários hepatócitos, culminando com a formação de um vacúolo no qual os parasitos irão se replicar e desenvolver [12]. Durante esta fase, os esporozoítos se diferenciam e passam por várias divisões esquizogônicas, formando os merozoítos. Os hepatócitos infectados liberam os merozoítos teciduais, possibilitando aos parasitos atingirem a corrente sanguínea.

Os merozoítos invadem os eritrócitos iniciando a fase eritrocitária da infecção, passando por estágios de maturação bem definidos, denominados anel, trofozoíto e esquizonte [11]. Após a ruptura da hemácia hospedeira contendo esquizontes maduros, os merozoítos liberados na corrente sanguínea invadem novos eritrócitos iniciando um novo ciclo. A periodicidade da esquizogonia sanguínea é variável, de acordo com a espécie de *Plasmodium*, sendo 48 horas para *P. vivax* e *P. ovale*, 72 horas para o *P. malariae* e 36 a 48 horas para o *P. falciparum* [17].

Essa fase esquizogônica sanguínea ou fase eritrocitária é a responsável pelo principal sintoma da malária no hospedeiro vertebrado, a febre regular e intermitente, associada ao momento da ruptura das hemácias parasitadas [17, 76].

O ciclo de maturação do parasito é responsável por inúmeras alterações bioquímicas e morfológicas nos eritrócitos, como aumento na permeabilidade da sua membrana a diversos metabólitos, fluxo intenso de lipídeos, proteínas e íons entre o citoplasma e a membrana plasmática do eritrócito e um aumento no conteúdo total de cálcio [12-14]. Muitas destas modificações comprometem a capacidade de deformação da célula (Figura 4). Tal fato é agravado na infecção por *P. falciparum* com a

ocorrência de citoaderência e seqüestro de eritrócitos infectados, nas fases de trofozoíto ou esquizonte, em pequenos capilares sanguíneos. A obstrução do fluxo sanguíneo em determinados órgãos pode gerar formas clínicas graves da malária, como a malária cerebral [15-17, 77].

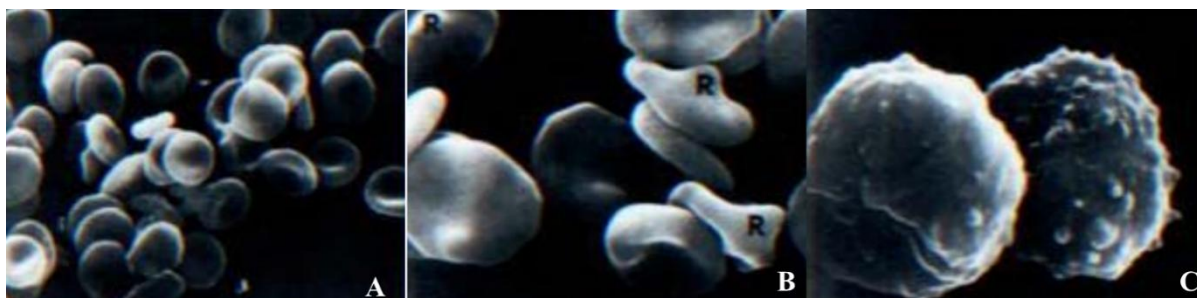


Figura 4. Morfologia dos eritrócitos. (A) células normais, (B) células infectadas com trofozoítos e (C) células parasitadas por esquizonte [77].

Após três a quinze dias do início dos sintomas clínicos, alguns merozoítos se diferenciam em gametócitos femininos, também chamados de macrogametócitos e masculinos ou microgametócitos, encontrados na circulação periférica dos hospedeiros vertebrados [17].

A fase sexuada ou esporogônica (hospedeiro invertebrado) tem início com a ingestão deste sangue contaminado contendo os gametócitos masculino e feminino pelas fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles* [11]. No intestino médio dos vetores, os gametócitos se diferenciam em gametas, os quais se fundem, formando o zigoto, que amadurece e diferencia-se em oocineto. Os oocinetos são móveis e alojam-se entre o epitélio e a lâmina basal do intestino médio dos mosquitos. Em cada oocineto ocorre um encistamento, formando o oocisto, que em, aproximadamente, duas semanas se rompe liberando esporozoítos que invadem a hemolinfa do inseto. Os esporozoítos infectantes se acumulam nos dutos das glândulas salivares sendo inoculados no vertebrado durante um novo repasto sanguíneo do mosquito [11, 12].

3.1.3 Epidemiologia

Mesmo sendo uma doença antiga, a malária continua sendo um dos principais problemas de saúde pública do mundo, uma vez que estima-se que 3,4 bilhões de

peessoas estão sob risco de contrair a doença. Dados da Organização Mundial da Saúde revelam que quase metade da população mundial está localizada em áreas de risco da doença, já que é endêmica em 104 países. Em 2012 cerca de 207 milhões de casos ocorreram no mundo, com aproximadamente 630.000 mortes. A maioria dos casos (80%) e de mortes (90%) ocorreu na África, onde 77 % das mortes foram de crianças com menos de 5 anos de idade conforme figura 5 [10,11, 19].

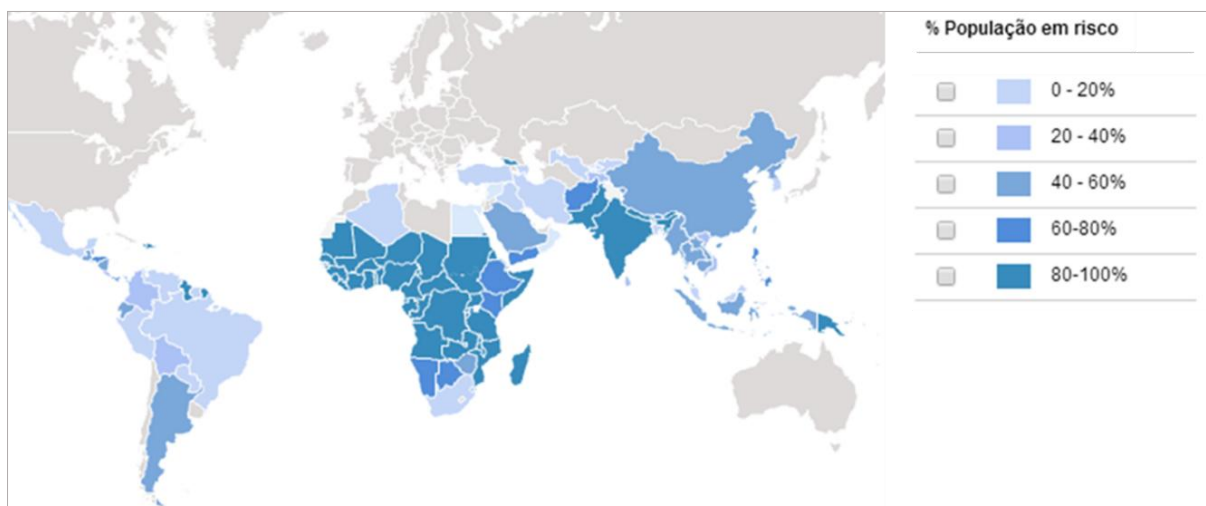


Figura 5. – Porcentagem da população em risco de infecção da malária. Adaptado de World Malaria Report [20].

Na América Latina, o maior número de casos é verificado na Amazônia legal, com registro de cerca de 300 a 400 mil casos por ano. O desenvolvimento nas décadas de 70 e 80 que acelerou o processo migratório nesta região o que elevou o número de pessoas habitando áreas de risco. Este fato, em conjunto com as precárias condições socioeconômicas da população migrante e o clima favorável para o desenvolvimento do vetor são fatores apontados como determinantes para a alta incidência de casos na região [11].

A situação atual da malária no Brasil é preocupante, embora em declínio, o número absoluto de casos no ano de 2008 ainda foi superior a 300.000 pacientes em todo o país. Desses, 99,9% foram transmitidos nos Estados da Amazônia, sendo o *P. vivax* a espécie causadora de quase 90% dos casos. Felizmente, a transmissão por *P. falciparum*, sabidamente responsável pela forma grave e letal da doença, tem apresentado redução importante nos últimos anos. Além disso, a frequência de internações por malária no Brasil também vem mostrando declínio, ficando em 1,3%

no ano de 2008, enquanto em 2003 era de 2,6%. A distribuição espacial do risco de transmissão da doença no Brasil é apresentada na figura 6 [17].

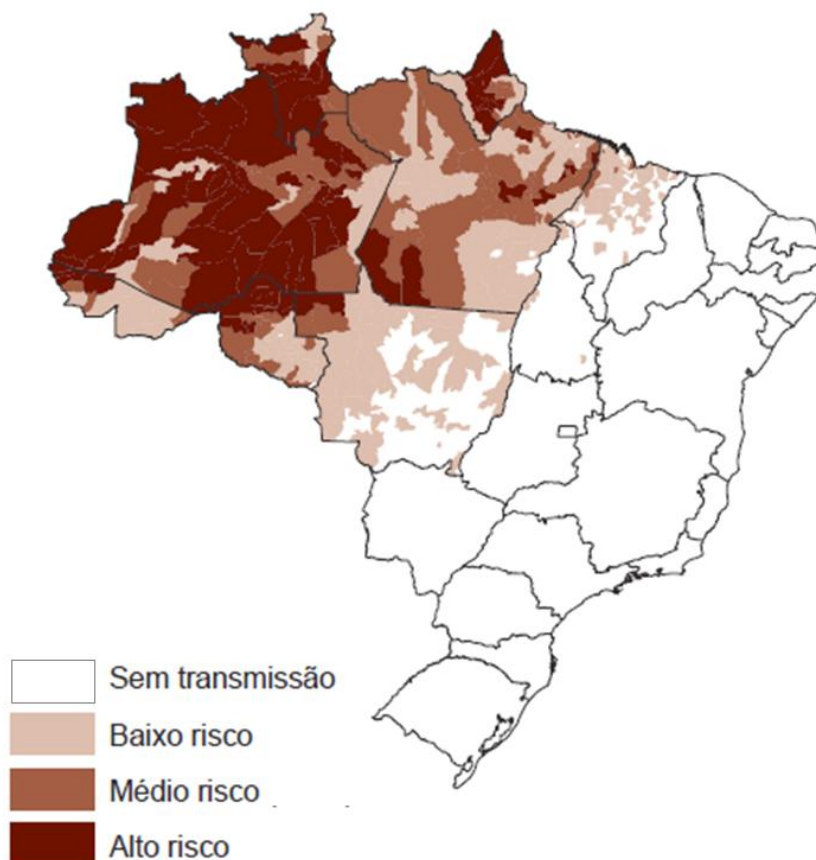


Figura 6. - Mapa do Brasil destacando as áreas de risco para malária pelos diferentes níveis de incidência parasitária anual. Adaptado do Guia prático de tratamento da malária no Brasil [17].

3.1.4 Manifestações clínicas

As alterações clínicas e a gravidade da malária dependem da relação entre hospedeiro (vulnerabilidade e estado imunológico) e o *Plasmodium* spp. (espécie infectante e densidade parasitária). Quanto ao hospedeiro, os que se encontram mais vulneráveis são os primoinfectados, as gestantes e as crianças menores de 5 anos [76].

A malária pode resultar numa ampla variedade de sintomas, variando de ausentes e leves (malária não complicada) a muito graves levando até mesmo a morte (malária severa) dependendo da espécie de *Plasmodium* e das condições basais do indivíduo infectado [9, 11, 22]

Na malária não complicada, os sintomas iniciais não são específicos, como febre, calafrios, perda de apetite, náuseas, vômitos, dores pelo corpo e mal estar. O padrão característico da febre manifesta-se por picos de febre a cada dois dias (febre terçã) para as espécies *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* ou três dias (febre quartã) para *P. malariae* [9,11, 22].

Já a malária severa está relacionada, principalmente, com *P. falciparum* e ocorre quando as infecções são complicadas por falhas nos órgãos, graves anomalias no sangue ou metabolismo do paciente. Estima-se que este estágio da malária cause, aproximadamente 20% de mortalidade em adultos infectados, 15% em crianças e 50% em mulheres grávidas. As principais manifestações clínicas são coma, convulsão generalizada (malária cerebral), anemia normocítica severa, hipoglicemia, acidose metabólica com disfunção respiratória, distúrbios hidroeletrólíticos, falência renal aguda, edema pulmonar agudo, colapso circulatório, icterícia, hemoglobinúria, febre intensa, prostração e perda da consciência [9, 11, 22].

Os sintomas clínicos associados com a malária ocorrem na fase eritrocitária na presença dos parasitas assexuados. Quando o parasita desenvolve-se nos eritrócitos, várias substâncias residuais se acumulam, como o pigmento hemozoína e outros fatores tóxicos. Com o rompimento da hemácia infectada para liberar os merozoítos, a hemozoína e outros fatores tóxicos estimulam reações imunológicas como a ativação de macrófagos e células que produzem citocinas e outros fatores solúveis. Tal fato corrobora para produção da febre, calafrios e provavelmente influencia na fisiopatologia da malária grave [9, 11, 22].

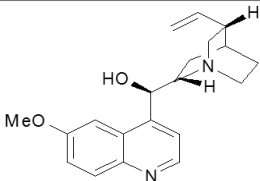
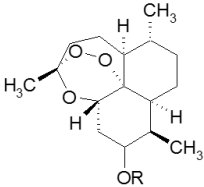
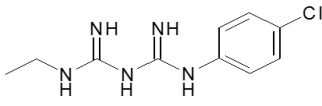
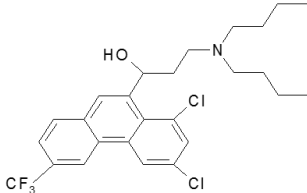
3.1.5 Tratamento e mecanismo de ação dos principais antimaláricos atuais

O tratamento adequado e precoce da malária é hoje o principal fundamento do controle da doença. O tratamento atual, embora limitado, objetiva atingir o *Plasmodium* em alguns pontos importantes do ciclo biológico. Os medicamentos antimaláricos podem interferir na esquizogonia sanguínea, fase responsável pelas manifestações clínicas da infecção; destruir as formas teciduais latentes (hipnozoítos

das espécies *P. vivax* e *P. ovale*); e interromper a transmissão, impedindo o desenvolvimento das formas sexuadas (gametócitos) [17].

Os fármacos antimaláricos disponíveis no mercado podem ser divididos em quatro classes principais: quinina e compostos relacionados, derivados da artemisinina, fármacos antifolato e uma quarta classe onde se enquadram fármacos diversos (Tabela 1) [9].

Tabela 1. Classes de fármacos antimaláricos com suas respectivas estruturas representativas.

Classes	Fármacos	Estrutura representativa
Quinina e compostos relacionados	Quinina Cloroquina Primaquina Mefloquina	
Derivados da artemisinina	Arteméter Arteéter Artesunato Dihidroartemisinina, 10-deoxoartemisinina	
Fármacos antifolato	Proguanil Pirimetamina Trimetoprima e sulfadixona Dapsona	
Fármacos diversos	Atovaquona	

3.1.5. 1 Quinina e compostos relacionados

A quinina isolada das cascas de *Cinchona* sp. em 1820, tem sido utilizada na medicina a mais de três séculos. Este fármaco apresenta ação esquizontocida, exercendo pouco efeito sobre esporozoítos ou formas exo-eritrocíticas dos parasitas da malária [22]. A quinina é utilizada para o tratamento da malária grave por *P. falciparum* resistentes à cloroquina ou multirresistentes [24].

A cloroquina é uma 4-aminoquinolina sintetizada e estudada pela primeira vez antes da 2ª Guerra Mundial [11]. A cloroquina apresenta diversas vantagens em

relação aos outros antimaláricos, como baixo custo e baixa toxicidade, sendo segura para crianças e mulheres grávidas, as vítimas mais vulneráveis da malária. Em relação à atividade antimalárica, a cloroquina é ativa contra formas eritrocíticas. A cloroquina é um fármaco antimalárico muito útil e, ao mesmo tempo, tem seu uso diminuído em regiões onde há cepas de *P. falciparum* resistente à sua ação[23].

A mefloquina teve sua estrutura elucidada nos anos 1980 como substituto promissor da cloroquina. É um 4-quinolinometanol estruturalmente semelhante à quinina, potente esquizonticida sanguíneo, sem ação contra as formas hepáticas ou os gametócitos. Tem sua utilização restrita para prevenção e tratamento da malária causada por *P. falciparum* resistente à cloroquina e multirresistente [24-26].

Já a primaquina foi desenvolvida durante a Segunda Guerra Mundial e atua destruindo os estágios hepáticos e as formas tissulares latentes de *P. vivax* e *P. ovale*, tendo relevante valor clínico na farmacoterapia da malária recidiva. Podendo ser associada a outros fármacos antimaláricos para o tratamento da malária causada por *P. vivax* e *P. ovale* [11].

Sabe-se que os parasitos assexuados se proliferam nos eritrócitos do hospedeiro vertebrado digerindo a hemoglobina, gerando radicais livres e heme, tóxico ao parasito. O grupamento heme livre se polimeriza formando o pigmento malárico ou hemozoína, produto atóxico ao parasito. Os compostos quinolínicos e correlatos são bases fracas, concentrando-se nos vacúolos digestivos dos parasitos sensíveis, elevando o pH do meio, inibindo assim a atividade peroxidativa do heme e interrompendo sua polimerização não-enzimática. Esse fato gera a morte dos parasitos por lesões oxidativas ou até ação de proteases digestivas. Esta atividade está relacionada à prévia ligação do fármaco ao heme e posterior inibição da sua polimerização [9, 11, 27].

3.1.5.2 Fármacos antifolato

Antagonistas do folato podem atuar como excelentes esquizonticidas sanguíneos. Entretanto, existem relatos de casos de resistência a esses fármacos [8]. Muitos dos antifolatos são tóxicos ao homem e apresentam pouca tolerância quando administrados por via oral e para a absorção. Esses fármacos são divididos em dois

grupos de acordo com seus mecanismos de ação. O primeiro grupo (antifolatos do tipo I) inclui compostos que são competidores do ácido para-aminobenzóico (PABA), interrompendo a formação do ácido di-hidrofólico, necessário para a síntese de ácidos nucléicos, através da inibição da enzima di-hidropteroato sintase, um exemplo inclui a sulfadoxina. O segundo grupo de antagonistas do folato (antifolatos do tipo II) liga-se preferencialmente e seletivamente à enzima di-hidrofolato redutase-timidilato sintase (DHFR-TS) do parasita. Esta inibição interfere na habilidade do *Plasmodium* em converter o ácido di-hidrofólico em tetra-hidrofolato, cofator importante no processo de síntese de ácidos nucléicos e aminoácidos. Inibidores da DHFR são potentes agentes esquizotocidas que atuam sobre formas assexuadas do parasita. Membros dessa classe de antifolatos incluem a pirimetamina e a trimetoprima que atuam contra o *P. falciparum* de forma lenta, não sendo indicada para o tratamento da fase aguda da malária [8].

As biguanidas têm um mecanismo de ação semelhante ao da pirimetamina e trimetoprima. O mais importante destes compostos, o proguanil, é um pró-fármaco que é metabolicamente ciclizado a cicloguanil. Este composto é pouco tóxico e é útil como agente profilático, destruindo parasitos durante a passagem para a corrente sanguínea antes que invadam as hemácias. Esse fármaco tem sido utilizado juntamente com a cloroquina principalmente em viajantes não-imunes à doença e em áreas onde o nível de resistência a essa última é moderado [8].

3.1.5. 3 Derivados da artemisinina

A artemisinina e seus derivados representam uma classe de medicamentos antimaláricos muito importante cuja utilização tem sido intensificada nos últimos anos. Esta classe tem como composto base uma lactona sesquiterpenica com endoperóxido obtida da *Artemisia annua*, a artemisinina. Foram sintetizados, a partir da artemisinina mais cinco derivados. São eles: a diidroartemisinina, artemeter, arteeter, artesunato e 10-deoxoartemisinina [28].

Em quase todos os países onde a malária é endêmica, as terapias combinadas da artemisinina com outros antimaláricos são primeira escolha para a farmacoterapia da

malária não complicada causada por *P. falciparum* [17, 29, 30]. Esta mudança na política da terapia da malária surgiu quando se percebeu um forte aumento no número de cepas resistentes aos antimaláricos disponíveis até então, especialmente a cloroquina [31]. A estrutura endoperóxido é necessária para a atividade antimalárica da artemisinina e seus derivados, enquanto as substituições no grupo carbonil da lactona aumentam acentuadamente sua potência. Esses compostos agem rapidamente nos estágios eritrocíticos assexuados do *P. vivax* e das cepas de *P. falciparum* sensíveis ou resistentes à cloroquina, bem como multirresistentes. A artemisinina atua mais rapidamente que outros antimaláricos, tanto na morte dos parasitos quanto na inibição de processos metabólicos importantes. Esta atividade é dependente da produção de endoperóxidos [28, 32]. Os peróxidos são uma fonte conhecida de espécies reativas de oxigênio tais como radicais hidroxil, superóxido, peróxido de hidrogênio e hidroperoxila, sendo que o radical hidroxil é um dos mais reativos, capaz de captar átomos de hidrogênio do grupo metileno de ácidos graxos, dando início a peroxidação lipídica e consequente lise da membrana celular. Esses radicais livres têm um papel importante no mecanismo de ação da artemisinina e seus derivados, pois a artemisinina é convertida em intermediários ativos após contato com o átomo de ferro, o que é seguido por rearranjo molecular que produz radicais com carbonos centrais que formam adutos covalentes com proteínas específicas do parasito [33]. Outro mecanismo de ação proposto para a artemisinina é a inibição específica do transportador de Ca^{++} do retículo sarcoplasmático do *Plasmodium*, mas não o transportador de Ca^{++} do hospedeiro [34].

3.1.5.4 Fármacos diversos

Para ilustrar esta classe composta por diversos fármacos, é possível citar a ação da atovaquona, um análogo da ubiquinona que apresenta ação muito potente contra a malária. Este fármaco interfere no transporte de elétrons mitocondrial e nos processos relacionados, como a biossíntese de ATP e pirimidina nos parasitos sensíveis. Este fármaco é utilizado em associação com uma biguanina (proguanil) para obtenção de resultados clínicos ideais e evitar o desenvolvimento de cepas resistentes [8, 17]. O sinergismo entre o proguanil e atovaquona parece ser devido à capacidade do

proguanil de aumentar a atividade de colapso da membrana mitoncodrial gerado pela atovaquona [35].

3.1.6 Resistência

A resistência dos parasitos aos fármacos antimaláricos é um fato que vem sendo estudado intensamente, especialmente no que diz respeito às cepas de *P. falciparum* e *P. vivax*. O desenvolvimento da resistência adquirida do *P. falciparum* às quinolinas antimaláricas, especialmente à cloroquina, ocorreu de forma lenta, mas hoje é bastante comum ao redor do mundo e particularmente nos lugares onde há grande utilização de fármacos antimaláricos [17, 36].

A resistência do *Plasmodium* sp. pode se desenvolver através de diversos mecanismos, incluindo alterações na permeabilidade ou transporte e inativação do fármaco, ou mudanças em alvos moleculares que geram diminuição da afinidade de ligação do inibidor. Essas alterações são geradas inicialmente através de mutações em genes ligados às moléculas-alvo dos medicamentos antimaláricos. O desenvolvimento de resistência aos fármacos antimaláricos envolve a interação de padrões de uso destes produtos, características do fármaco, fatores individuais do hospedeiro humano, características do parasito e do vetor, bem como fatores ambientais [36].

Até o momento, a resistência do parasito tem sido documentada em três das cinco espécies de malária que infectam seres humanos: *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*. O problema da resistência aos medicamentos antimaláricos é agravado pela resistência cruzada, em que a resistência a um fármaco confere resistência a outros fármacos que pertencem a uma mesma família química, ou que tenham mecanismos de ação semelhantes [37].

Diante desta situação, a OMS recomendou o uso de terapia combinada de artemisinina como tratamento de primeira linha da malária não complicada causada por *P. falciparum* [38]. No entanto, a resistência do *P. falciparum* está atingindo também a artemisinina, e foi detectada em quatro países da região do Grande Mekong: no Camboja, Mianmar, Tailândia e Vietnã conforme figura 7 [37, 38].

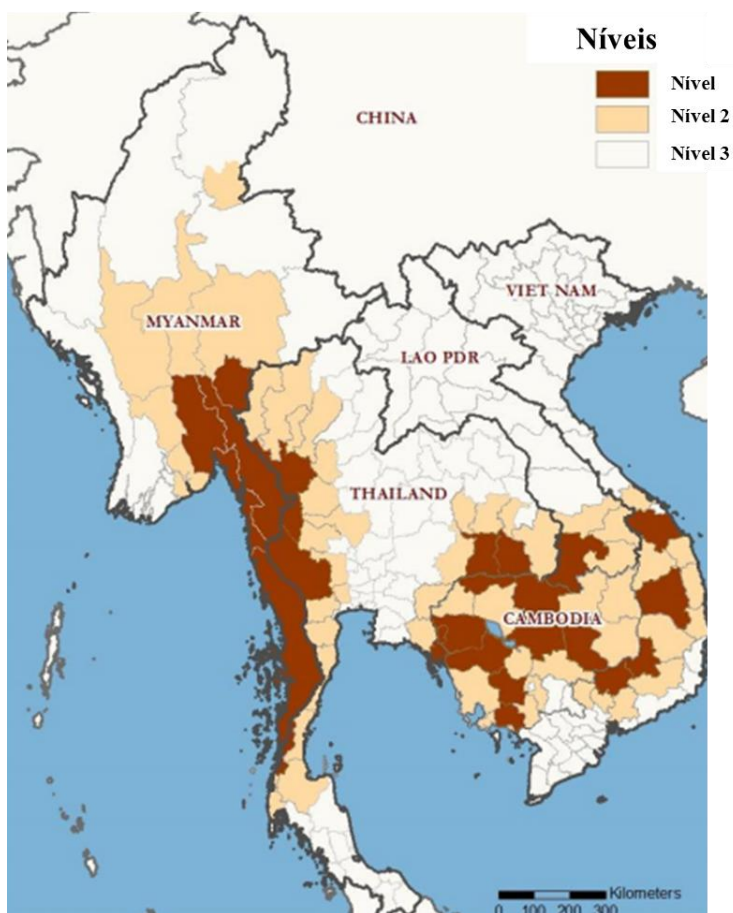


Figura 7. Áreas prioritárias para atividades de contenção da resistência a artemisinina. Sub-região do Grande Mekong, 2013 [38].

3.1.7 Pesquisa de novos antimaláricos

A malária atinge principalmente países com problemas sócio econômicos, políticos e ambientais. Os recursos financeiros aplicados em saúde nos países pobres geralmente são baixos, sendo insuficientes para o controle de doenças endêmicas. A malária representa uma séria ameaça à qualidade de vida de milhões de pessoas e constitui uma barreira para o crescimento econômico de diversos países [39].

Tratando-se de uma doença que atinge na sua maioria pessoas com baixo poder aquisitivo, a malária tem sofrido atraso no desenvolvimento de novos fármacos. Ora pela falta de investimentos públicos e privados, ora pelo desinteresse da indústria farmacêutica em desenvolver novos medicamentos para uma parte da população que não dispõe de recursos financeiros para a aquisição dos mesmos. Até 2009, eram 24 novos fármacos que se encontravam em fase final de desenvolvimento. Sete destes

fármacos estão em fase pré-clínica e, no entanto, este número ainda é bastante baixo, o que reflete bem a situação da pesquisa de antimaláricos nos últimos anos [38].

Deste modo, faz-se necessário esforços para desenvolver novas classes de antimaláricos que sejam eficazes, seguros e de baixo custo contra as múltiplas cepas resistentes de *Plasmodium* como alternativa ao arsenal terapêutico disponível [35]

3.2 Produtos naturais e novos fármacos

É inegável a contribuição dos produtos naturais como fontes de diversidades químicas que conduziram ao isolamento e descoberta de inúmeros compostos utilizados na terapêutica [40-42]. Em um estudo realizado em 2011 [39], constatou-se que entre os anos de 2005 a 2010, do total de fármacos aprovados pelos órgãos regulamentadores neste período, 7 eram produtos naturais, 10 eram derivados semissintéticos e 2 eram fármacos derivados de produtos naturais. Estes dados, mais uma vez, confirmam a importância dos produtos naturais como fontes diretas ou modelos químicos para novos fármacos.

Quinina e seus derivados, atovaquona, artemisinina e seus derivados semissintéticos são exemplos notáveis da contribuição dos produtos naturais para o desenvolvimento de fármacos antimaláricos eficazes, particularmente importantes para o tratamento de parasitos cloroquina-resistentes [43].

3.3 Triterpenos

Dentre as classes de produtos naturais utilizados na busca de novas alternativas para o tratamento de patologias encontram-se os triterpenos. Triterpenos são compostos com um esqueleto carbonado construído a partir de seis unidades de isopreno. Essas moléculas geralmente tetracíclicas ou pentacíclicas derivam biogeneticamente do esqualeno, um hidrocarboneto acíclico com trinta carbonos. Esta é uma vasta classe de produtos naturais cuja diversidade estrutural inclui uma larga disposição de grupos funcionais. Muitos compostos deste grupo possuem atividades biológicas, farmacológicas ou medicinais diversas, como por exemplo antiviral,

antifúngica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiprotozoária, vasoprotetora, antimalárica e antitumoral [44-55].

Nosso grupo de pesquisa tem trabalhado com dois triterpenos pentacíclicos: os ácidos ursólico (**1**) e betulínico (**2**). Estes triterpenos são, amplamente, relatados na literatura como moléculas bioativas frente a diversas atividades biológicas, destacando-se, aqui, a atividade antimalárica [3-7].

3.3.1 Atividade antimalárica do ácido ursólico (**1**) e do LAFIS 10 (**1c**)

Diversos estudos tem relatado a atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo* do ácido ursólico e seus derivados [3-7]. Nosso grupo de pesquisa iniciou a busca de novos antimaláricos derivados de **1** no ano de 2002 quando o composto, que era obtido das folhas de *Ilex paraguariensis*, destacou-se pela potência frente à cepa *P. falciparum ghana* com $IC_{50} = 7 \mu M$ [dados não publicados]. Neste estudo inicial os compostos que apresentaram atividade próxima a $5 \mu M$, entre eles o próprio **1**, foram submetidos a modificações estruturais visando potencializar a atividade antimalárica [7]. Assim, através de hibridação molecular de **1** com o grupamento bis-aminopropilpiperazina foi obtida uma série de mais de vinte novos compostos [3, 7]. O planejamento destes derivados baseou-se no mecanismo de ação molecular proposto para a cloroquina, ou seja, interação com resíduos de heme inibindo a formação de β -hematina [3]. Um estudo de REA (Relação Estrutura Atividade) levou a seleção de alguns compostos que apresentaram elevada potência *in vitro* frente à cepa resistente à cloroquina de *P. falciparum* FcB1, destacando-se o derivado **1c**: N-{3-[4-(3-aminopropil)piperazinil]propil}-3-O-acetilursolamida (Figura 2) (codificado como LAFIS 10) com $IC_{50} = 167 \text{ nM}$, ($IC_{50\text{cloroquina}} = 130 \text{ nM}$).

A estratégia semissintética adotada mostrou-se bastante adequada uma vez que partiu-se de um produto natural (**1**) com $IC_{50} = 53 \mu M$ (frente à cepa FcB1) e obteve-se derivados semissintéticos com atividade até 600 vezes superior ($IC_{50} = 167 \text{ nM}$). A fim de estudar o seu mecanismo de ação foram realizados testes *in vitro* de inibição da formação de β -hematina. O derivado **1c** na concentração de 20 nM apresentou 46% de inibição da formação de β -hematina. Já a cloroquina em concentração similar

apresentou 97% de inibição. A capacidade de complexação com moléculas de heme também foi caracterizada através de simulações *in silico* (Figura 8) [3, 7], porém este parecia não ser o único mecanismo de ação envolvido na atividade.

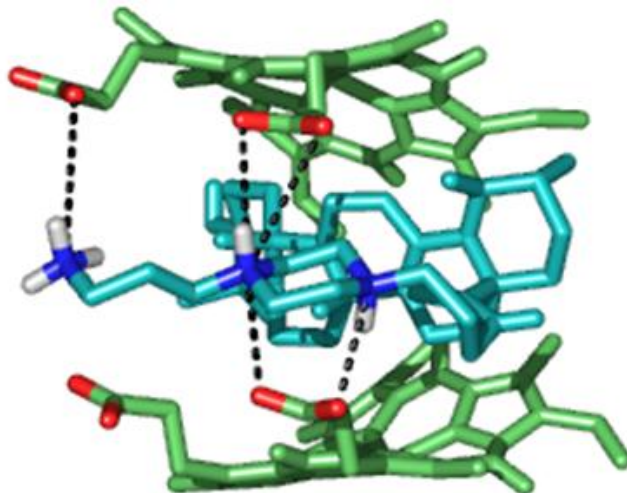


Figura 8. Complexação do derivado **1c** com moléculas de heme *in silico*-primeiro mecanismo de ação proposto para o composto [3, 7].

Assim, foi avaliado também o mecanismo de ação sobre o transporte de íons Ca^{++} . O aumento típico do cálcio intracelular em parasitas isolados após a adição do composto **1c** (100 μM) e tapsigargina (THG) (10 μM) está apresentado na figura 9 a- c. A THG é conhecida por modular o Ca^{++} através da inibição do retículo sarcoplasmático - Ca^{++} ATPase (SERCA) [5], assim a THG foi utilizada como controle positivo neste experimento. O controle negativo (metanol) mostrou claramente que o solvente não provocou aumento de cálcio dentro dos parasitos (figura 9a). Pelo contrário, quando THG foi adicionado depois de composto **1c**, o aumento de cálcio foi maior do que a mobilização de cálcio convencional, observadas com o controle (figura 9b). Estes resultados indicaram que **1c** pode modular a homeostase do cálcio do parasito e que isto também pode estar envolvido no mecanismo de ação do composto [5]

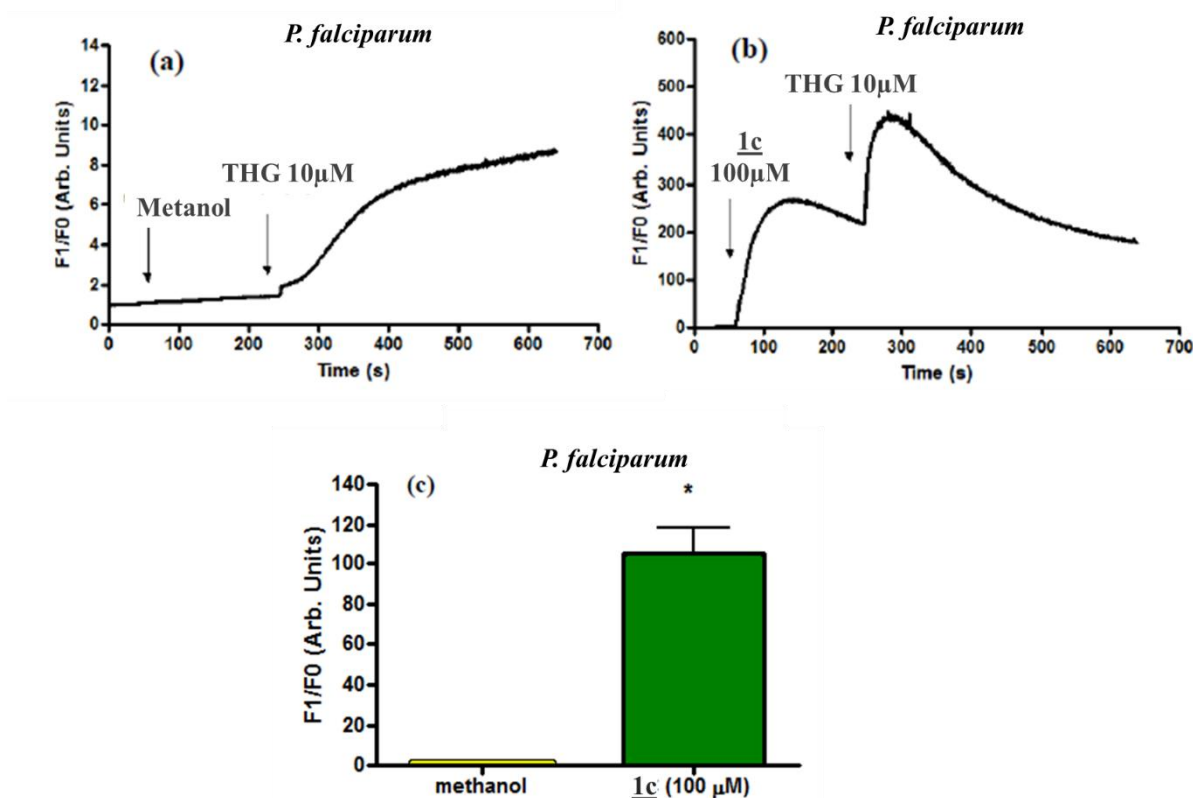


Figura 9. Demonstração da ação de **1c** sobre o transporte de Ca^{++} intracelular do parasito, adaptado de Innocente *et al* [5] segundo mecanismo de ação proposto para o composto.

A citotoxicidade foi avaliada *in vitro* frente a culturas de células de fibroblastos humanos normais do tipo MRC-5, apresentando $\text{IC}_{50} = 1,61 \mu\text{M}$, com índice de seletividade de 9,6 [3].

3.3.2 Atividade antimalárica do ácido betulínico (**2**) e do LAFIS 13 (**2c**)

A partir dos resultados obtidos com o composto **1c** nosso grupo de pesquisa iniciou o ano 2010 a busca de novos derivados triterpênicos. Assim, considerando relatos da literatura que apontavam para a atividade antimalárica do ácido betulínico e considerando a similaridade estrutural com o ácido ursólico, o composto N-{3-[4-(3-aminopropil)piperazinil]propil}-3-O-acetilbetulinamida, **2c** (figura 2), codificado como LAFIS 13, foi obtido e teve sua atividade avaliada frente a cepa sensível à cloroquina de *P. falciparum*, 3D7. A atividade encontrada correspondeu ao esperado com IC_{50} de 220 nM. Também foram realizados estudos de citotoxicidade *in vitro*

frente às células embrionárias de rim de mamíferos HEK293T, onde o **2c** apresentou a IC_{50} de 4 μ M e índice de seletividade de 18 [5].

Desta forma, com base nos dados apresentados, é possível afirmar que a necessidade da descoberta de novos fármacos antimaláricos é iminente e considerando os resultados obtidos até o momento com relação aos derivados **1c** e **2c**, este trabalho se propõe a dar continuidade aos estudos com estes dois compostos através da avaliação aprofundada de sua toxicidade *in vitro* e *in vivo* e através da avaliação da atividade antimalárica em modelo murino.

4.PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Geral

Os produtos químicos e reagentes foram adquiridos a partir de fornecedores comerciais e utilizados conforme indicação do fabricante. Os solventes foram destilados sob atmosfera de nitrogênio quando necessário. As reações que requereram condições anidras foram realizadas sob atmosfera de nitrogênio. As reações foram monitoradas por cromatografia de camada delgada (CCD) em placas 0,2 milímetro pré-revestidos de sílica gel (Merck) e visualizados, por pulverização com reagente anisaldeído sulfúrico e aquecimento. A evaporação e concentração dos solventes foi feita no evaporador rotativo padrão Büchi usando bomba de vácuo. Os espectros de ^1H e ^{13}C RMN foram medidos em Equipamento Varian[®] 400, usando SiMe_4 (TMS) como padrão interno. Os espectros da região de infravermelho (IV) foram realizados em Perkin-Elmer FT-IR System Spectrum BX. Para leitura das absorvâncias foi utilizado um leitor de placas Spectramax[®]. Os deslocamentos químicos são dados com δ (ppm). As constantes de acoplamento (J) são dadas em hertz. Solventes deuterados utilizados foram CDCl_3 ou Metanol $-d_4$. Padrões de desdobramento foram designados como segue: s = simpleto, d = duplete, dd = duplo duplete, t = tripleto, q = quarteto, m = multiplete.

4.2 Semissíntese

4.2.1 Derivados do ácido ursólico (**1**)

4.2.1.1 Extração e obtenção do composto **1**

A matéria-prima foi obtida de cascas de *Malus domestica*, resíduo obtido da indústria de sucos Tecnovin do Brasil Ltda[®] da cidade de Vacaria, do estado do Rio Grande do Sul. A torta proveniente da indústria, rica em cascas, foi seca em estufa de ar circulante por 24 horas a 50°C e após foi triturada em moinho de facas. Realizaram-se extrações com água fervente para retirada dos açúcares na proporção de 1:2 de pó de cascas moídas:água destilada. Esse processo foi repetido cinco vezes. Após, secou-se novamente o material em estufa de ar circulante por 24 horas a 50°C . Depois de

seco o material foi triturado e moído em moinho de facas, até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi pesado e submetido à extração com diclorometano seguido de acetato de etila sob refluxo por 2 horas na proporção de 1:6 (planta:solvente). As soluções extrativas orgânicas obtidas de *M. domestica* foram secas em evaporador rotatório e o resíduo submetido a um processo de cristalização com acetonitrila para a obtenção do ácido ursólico (**1**). O processo extrativo está resumido na figura 10 [4,5].

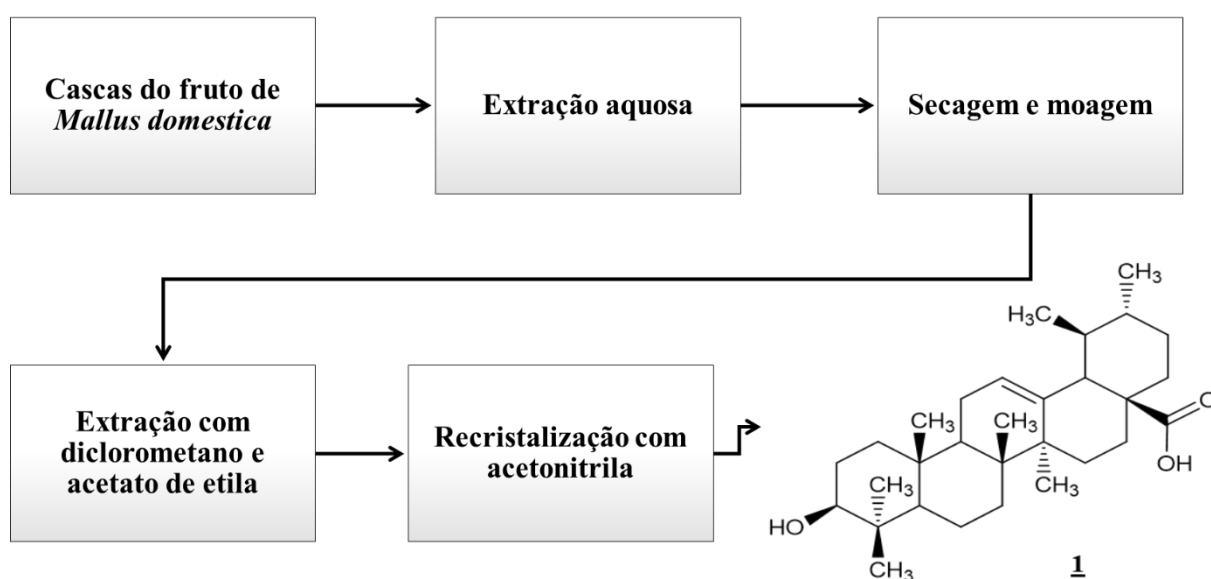


Figura 10. Fluxograma com metodologia de extração do ácido ursólico **1**.

4.2.1.2 Semissíntese do derivado ácido 3-*O*-acetilursólico (**1a**)

O derivado ácido 3-*O*-acetilursólico (**1a**) foi preparado a partir de **1** (2g, 4,39 mmol), realizando-se uma reação de acetilação no C-3 (figura 1), utilizando piridina e anidrido acético (2,04g, 20 mmol) como previamente descrito [3-5].

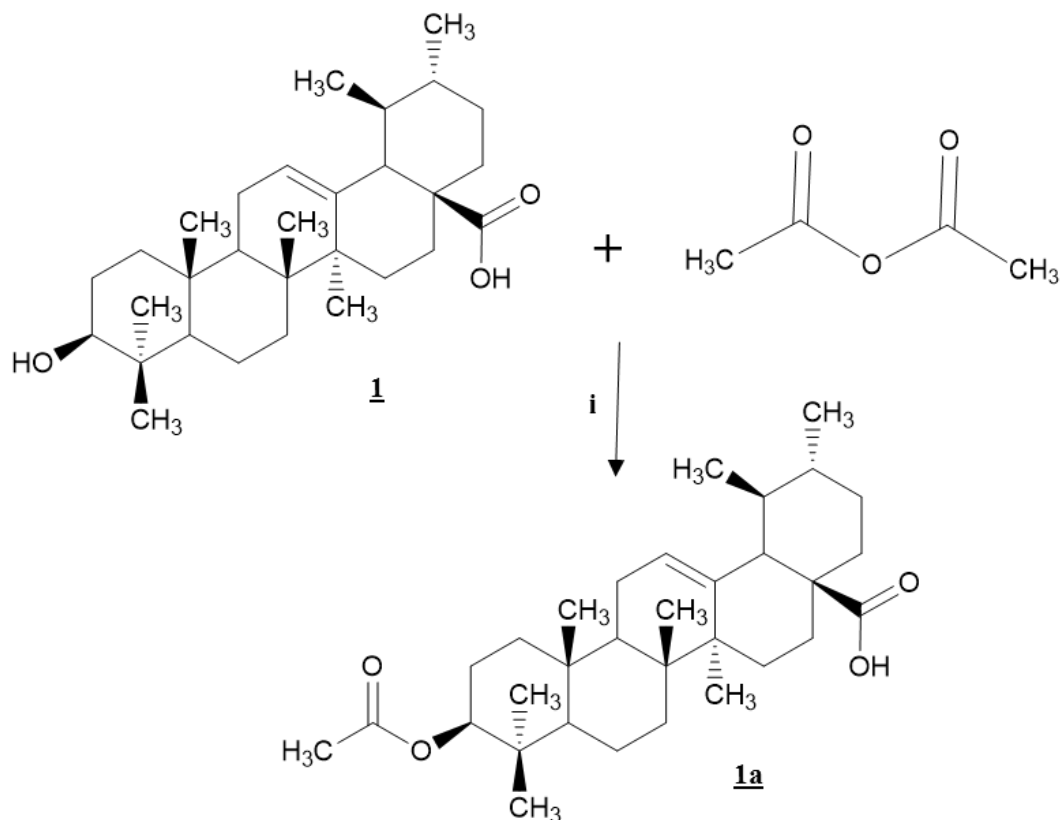


Figura 11. Semissíntese do derivado **1a**. i : piridina, t.a., 24 hs.

4.2.1.3 Obtenção do *t*-butil-3-[4-(3-aminopropil) piperazinilpropil]carbamato (BAPP-BOC)

A obtenção do *t*-butil-3-[4-(3-aminopropil) piperazinilpropil]carbamato (BAPP-BOC) foi realizada conforme a literatura, com algumas adaptações [3-5]. A partir da *N*-1,4-(3-bisaminopropil)piperazina (BAPP) (1 eq.) solubilizada em metanol, foi adicionado gota a gota o reagente di-*t*-butilcarbonato (DIBOC) (0,5 eq.) sob forte agitação à 0°C. A reação foi mantida por 2 horas sob agitação constante. Após o período transcorrido, o solvente da reação foi removido através de rotaevaporação sob pressão reduzida. O resíduo seco, foi ressuspensionado em diclorometano e extraído até a exaustão com água destilada. O produto de interesse (monoprotetido BAPP-BOC) permanece na fase orgânica que é seca sob pressão reduzida conforme descrito na figura 12. A reação e purificação foram monitoradas por CCD.

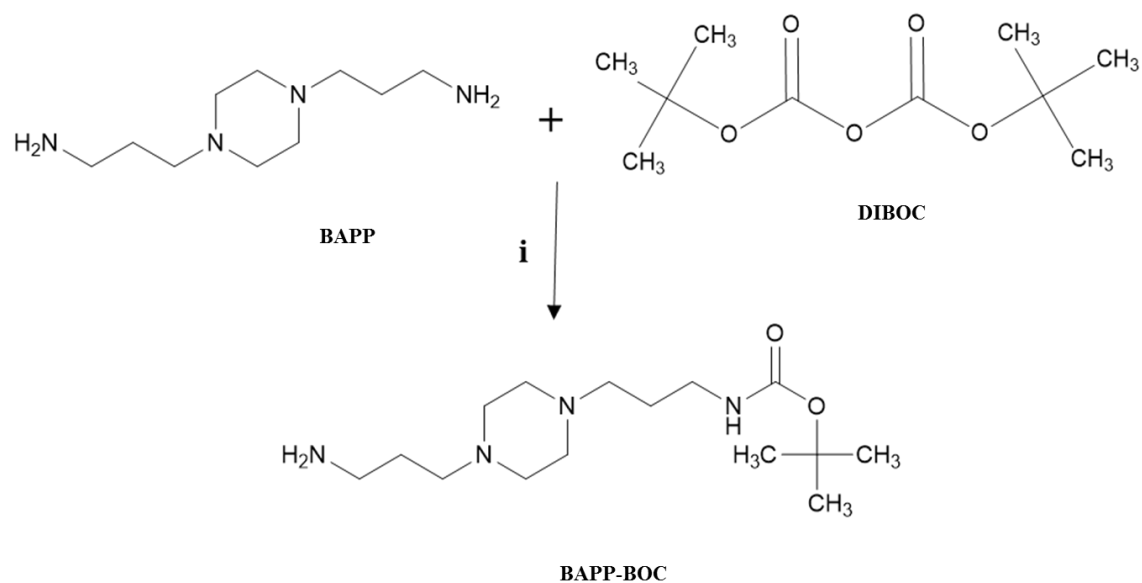


Figura 12. Obtenção do *t*-butil-3-[4-(3-aminopropil)piperazinilpropil]carbamato (BAPP-BOC). i: Metanol, BAPP, BOC, 0°C, 2h.

4.2.1.4 Semissíntese do derivado *N*-{3-[4-(3-aminopropil) piperazinil]propil}-3-*O*-acetilursolamida (**1c**)

A uma solução de **1a** (1,48 g, 3 mmol) em CH₂Cl₂ seco (30 mL) a 0 ° C foi adicionado gota a gota cloreto de oxalila (7,8 ml, 9 mmol) sob atmosfera inerte, agitando-se durante 3 horas à temperatura ambiente. A mistura reacional foi resfriada a 0 ° C, e diisopropilamina (25 mL, 18 mmol) foi adicionada. Após cerca de 30 minutos, quando a reação já estava à temperatura ambiente o *t*-butil-3-[4-(3-aminopropil) piperazinilpropil]carbamato (2,7 g , 9 mmol) foi adicionado sob atmosfera inerte. A reação foi extinta 24 horas após com adição de água destilada (10 mL), e a fase orgânica foi separada. A fase aquosa foi extraída com CH₂Cl₂ (3 x 30 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas sobre Na₂SO₄, filtradas, e evaporadas sob pressão reduzida, obtendo-se o **1b**. O resíduo bruto foi purificado e posteriormente dissolvido em CH₂Cl₂ (20 mL), acidificado com TFA a 10 % (50 ml) durante 3 horas para a reação de desproteção do grupamento BOC. A reação foi extinta pela evaporação do solvente sob vácuo, obtendo-se **1c** conforme figura 13.

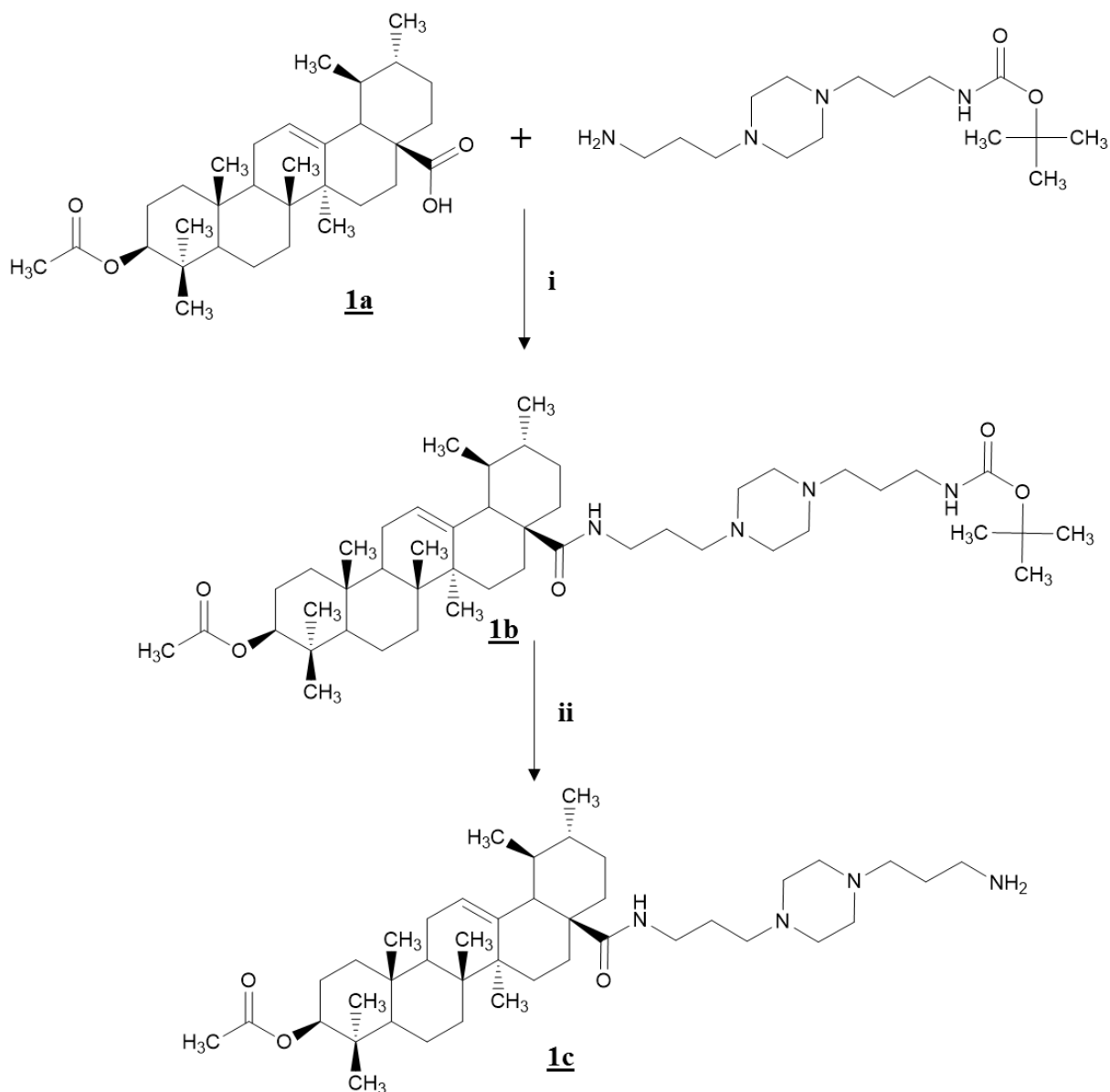


Figura 13. Obtenção do derivado semissintético **1c**: i: cloreto de oxalila, diisopropilamina, diclorometano, t. a., 24 hs, ii. ácido trifluoroacético, diclorometano, t.a., 3 hs.

4.2.2 Derivados do ácido betulínico (**2**)

4.2.2.1 Extração e obtenção do composto **2**

O material vegetal composto das cascas de *Platanus acerifolia* L. (Plátano) foi coletado na cidade de Nova Petrópolis, Rio Grande do Sul, e uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob o n° 182537. O material vegetal foi submetido à secagem em estufa de circulação forçada de ar por 72 horas à temperatura de 36 °C. Depois de seco o material foi triturado e

moído em moinho de facas, até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi pesado e submetido à extração com etanol absoluto, sob refluxo de 2 horas na proporção de 1:3 planta:solvente. A solução etanólica obtida de *P. acerifolia* foi submetida à extração sequencial utilizando diclorometano e acetato de etila. As soluções extrativas de diclorometano e acetato de etila foram submetidas a um processo de precipitação com metanol, obtendo-se o ácido betulínico (**2**) conforme figura 14 [5].

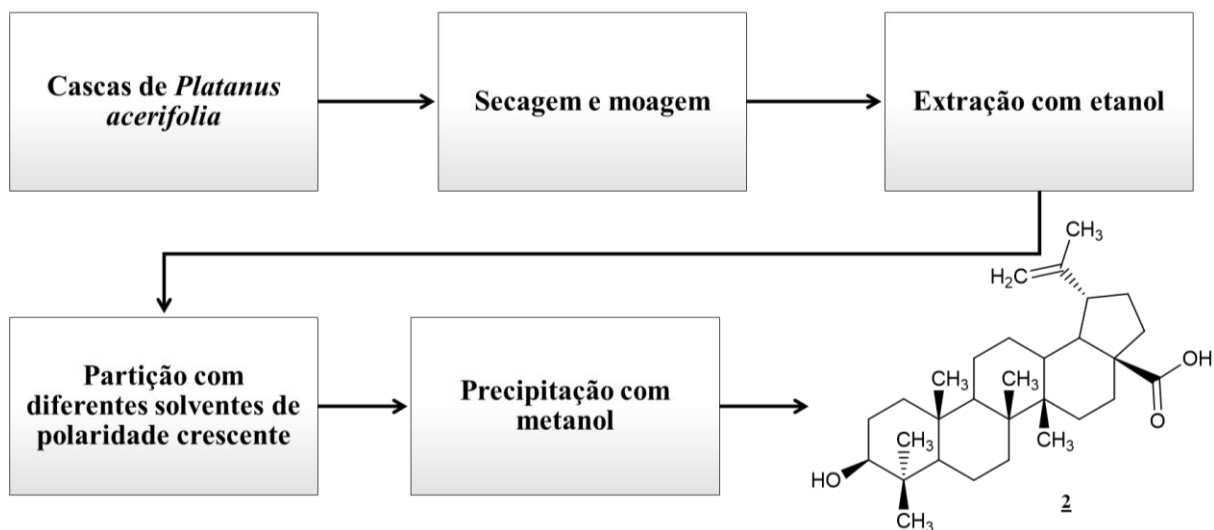


Figura 14. Fluxograma com metodologia de extração do ácido betulínico.

4.2.2.2 Semissíntese do derivado ácido 3-*O*-acetilbetulínico (**2a**)

Este derivado **2a** foi preparado a partir de **2** (2g, 4,39 mmol), realizando-se uma reação de acetilação no C-3, utilizando piridina e anidrido acético (2,04g, 20 mmol) conforme descrito na figura 15 seguindo a metodologia da literatura [5].

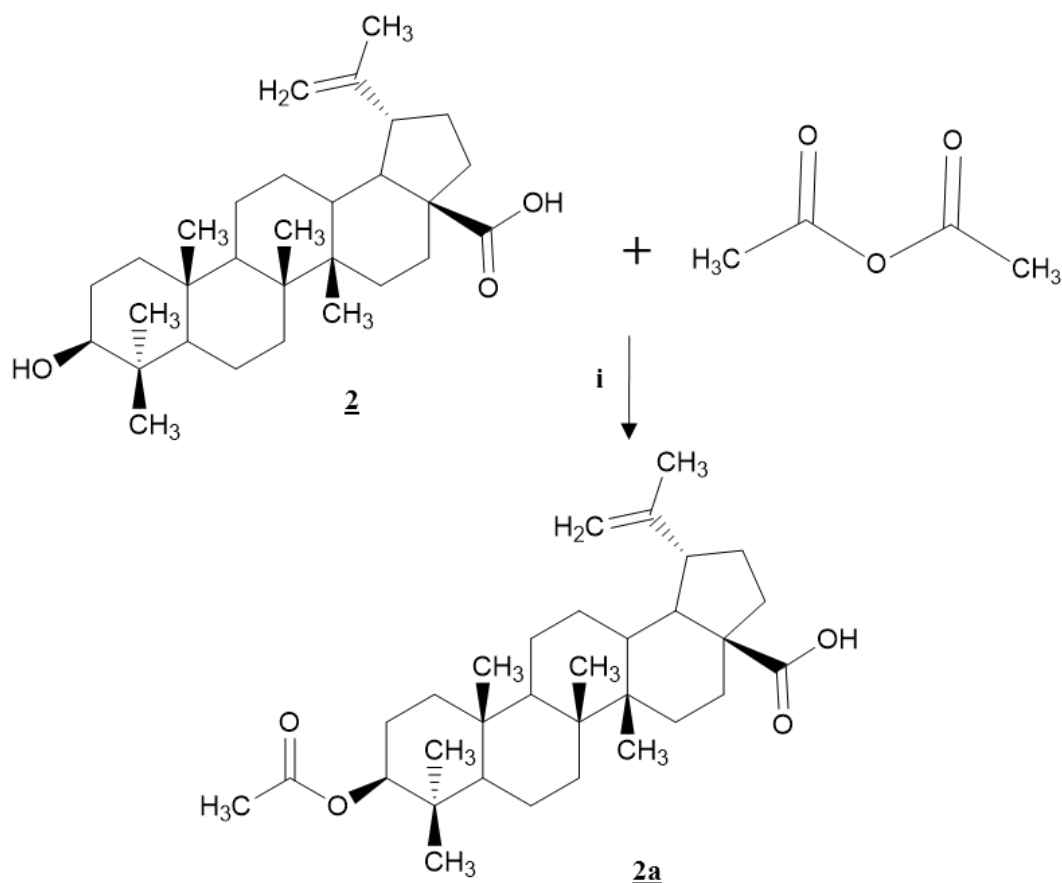


Figura 15. Semissíntese do derivado **2a**. i : piridina, t.a., 24 has.

4.2.2.3 Semissíntese do derivado *N*-{3-[4-(3-aminopropil)piperazinil]propil}-3-*O*-acetilbetulinamida (**2c**)

A uma solução de **2a** (1,48 g, 3 mmol) em CH_2Cl_2 seco (30 ml) a 0°C foi adicionado gota a gota cloreto de oxalila (7,8 ml, 9 mmol) sob atmosfera inerte, agitando-se durante 3 horas à temperatura ambiente. A mistura reacional foi resfriada a 0°C , e diisopropilamina (25 mL, 18 mmol) foi adicionada. Após cerca de 30 minutos, quando a reação já estava à temperatura ambiente o *t*-butil-3-[4-(3-aminopropil)piperazinilpropil]carbamato (2,7 g, 9 mmol) foi adicionado sob atmosfera inerte. A reação foi extinta após 24 horas com água destilada (10 mL) e a fase orgânica foi separada. A fase aquosa foi extraída com CH_2Cl_2 (3 x 30 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas sobre Na_2SO_4 , filtradas, e evaporadas sob pressão reduzida, obtendo-se **2b** que foi dissolvido em CH_2Cl_2 (20 mL), acidificado com TFA a 10 %

(50 ml) durante 3 horas para a reação de desproteção do grupamento BOC. A reação foi extinta pela evaporação do solvente sob vácuo, obtendo-se **2c** conforme figura 16.

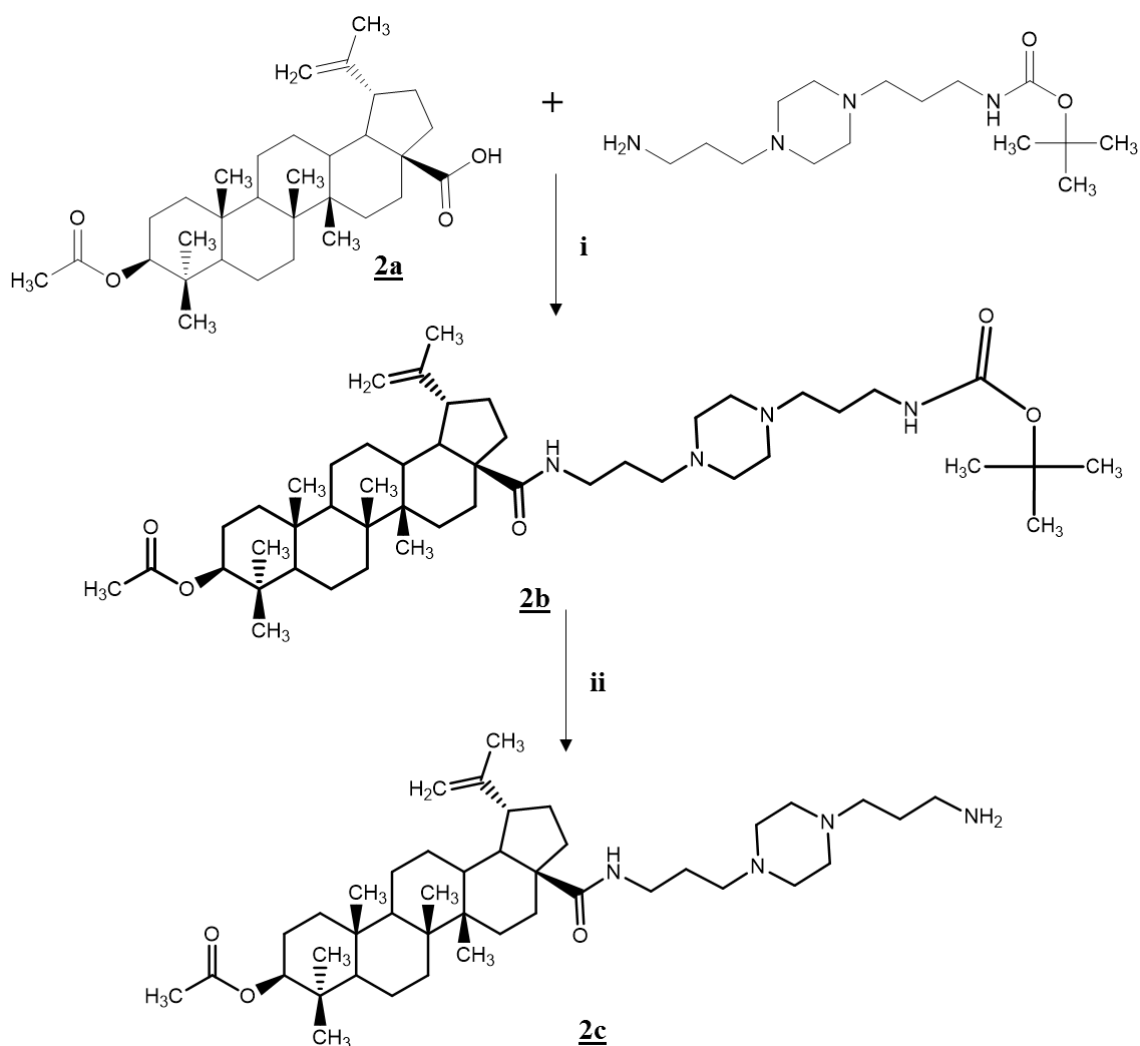


Figura 16. Obtenção do derivado semissintético **2c**. i: cloreto de oxalila, diisopilamina, diclorometano, t. a., 24 hs, ii. ácido trifluoroacético, diclorometano, t.a., 3 hs.

4.3 Ensaios Biológicos

4.3.1 Sangue humano

As amostras de sangue periférico humano foram colhidas de doadores saudáveis para os ensaios de coagulação, hemólise, citotoxicidade a linfócitos e ensaio cometa. A Comissão de Ética da UNIPAMPA aprovou o protocolo do estudo (Nº 23081) e consentiu o uso das informações obtidas de todos os indivíduos que colaboraram com este estudo.

4.3.2 Animais

Para os ensaios *in vivo* foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas com peso médio de 20-25 g. Os animais foram fornecidos pela Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) e permaneceram no biotério da Faculdade de Farmácia da UFRGS até o momento de sua utilização, por período não superior a 30 dias após seu recebimento. Os animais foram mantidos sob condições ambientais controladas como temperatura de 22 ± 2 °C, ventilação, umidade, sanitização e iluminação (ciclo 12 h claro-escuro) adequada para roedores. Os camundongos foram mantidos em caixas de polipropileno com 30 X 20 X 13 cm, ocupadas com no máximo 10 animais e receberam ração padronizada em quantidade adequada para a manutenção de sua saúde, tendo livre acesso à água potável. Os métodos utilizados nos ensaios *in vivo* visaram obter o máximo de informações utilizando um número mínimo de animais, observando a regra dos 3Rs (56-58). Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Usos de Animais (CEUA) da UFRGS, sob número 23689 (ensaios toxicológico) e 22188 (ensaios farmacológico).

4.3.3 Avaliação da toxicidade dos derivados 1c (LAFIS 10) e 2c (LAFIS 13) *in vitro*

4.3.3.1 Ensaios de genotoxicidade e citotoxicidade a leucócitos

Isolamento de leucócitos

Amostras de sangue (8ml) tiveram os leucócitos separados pela adição de 2 mL de dextran a 5%. As amostras de sangue foram então misturadas e mantidas à temperatura ambiente durante 45 minutos. O sobrenadante foi centrifugado a 3.500 rpm durante 10 min e a camada inferior foi lavada com uma solução de lise. A camada inferior foi suspensa em 2 mL de solução Hank e ajustadas a 2×10^3 leucócitos/ml com HBSS / heparina conforme metodologia de Guez e colaboradores [59].

Ensaio Cometa

As amostras de sangue foram analisadas em condições alcalinas, seguindo procedimentos de Guez e colaboradores [59]. Leucócitos periféricos foram incubados durante 3 horas com os derivados em 5 diferentes concentrações, 0,1, 1, 5, 10 e 50 μM . Água destilada e H_2O_2 (4 mM) foram utilizados como controle negativo, e positivo, respectivamente. Após incubação, os leucócitos foram misturados com agarose de baixo ponto de fusão, a qual 90 μL foi adicionada para 15 μL de solução de leucócito. Esta mistura foi colocada numa lâmina de microscópio pré-revestida com agarose a 1,0% de ponto de fusão normal. Uma lamínula e as lâminas foram colocadas em gelo por 5 minutos. Após a solidificação, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram imersas em solução de lise. As lâminas foram mantidas congeladas na solução de lise (4 °C) e ao abrigo da luz durante cerca de 14 horas. Subsequentemente, estas foram incubadas em tampão alcalino fresco por 20 minutos para desenrolamento do DNA. Eletroforese (20 minutos a 300 mA e 25 V) foi realizada no mesmo tampão, sendo cada estágio feito sob luz amarela indireta. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas em Tris 400 mM (pH 7.5), lavadas três vezes em água destilada, e deixadas secar durante a noite à temperatura ambiente. As lâminas secas foram reidratadas por 3 minutos em água destilada e então fixadas por 10 minutos, lavadas três vezes em água destilada e secadas durante pelo menos 5 horas. As lâminas secas foram reidratadas por 3 minutos em água destilada, coradas, e constantemente agitadas por 25 minutos. Posteriormente, as lâminas foram submersas em uma “solução de interrupção”, enxaguadas novamente e imediatamente identificadas para análise, sendo que as mesmas foram analisadas sob “condições cegas” por pelo menos duas pessoas. Danos ao DNA foram determinados como índices de dano ao DNA (DI), o qual foi calculado a partir de células em diferentes classes de danos (completamente sem danos: 100 células \times 0 para danificadas ao máximo: 100 células \times 4).

Citotoxicidade a Leucócitos

O ensaio de viabilidade celular foi realizado conforme Guez e colaboradores [59]. As células foram expostas às mesmas concentrações dos derivados, durante 3 horas, tal como no teste cometa. Após incubação, 40 mL de uma suspensão de células foram misturados com 30 mL de HBBS tampão e 50 mL de solução de azul de tripan a 0,4% durante 8 min. A viabilidade celular foi determinada microscopicamente (400 ×) através da coloração com azul de trypan em câmara de Neubauer.

4.3.3.2 Ensaio de Coagulação e Hemólise

As amostras de sangue foram coletadas de 3 doadores saudáveis, não portadores de doenças hepáticas ou uso de contraceptivos orais, em presença de citrato de sódio a 3,8%, na proporção de 9:1 e centrifugadas a 2500 g a 4°C por 15 minutos para a obtenção da mistura de plasmas (*pool*). Os ensaios foram realizados em tubos rigorosamente limpos, em triplicata através de técnica manual, utilizando kits comerciais da marca Labtest[®] (APTT Hemostasis Ref. 502, PT Hemostasis Ref. 501).

Tempo de Protrombina (TP)

A atividade foi realizada utilizando-se 100 µL do *pool* de plasma a ser medido incubado com diferentes concentrações dos derivados (100, 50 e 10 µM) diluídos em água Milli-Q com 1 % de DMSO. Esta mistura foi incubada por 10 minutos em banho-maria a 37°C. Em seguida, 200 µL de solução de trombina (previamente aquecida a 37°C) foi adicionada e o cronômetro disparado imediatamente. A mistura foi agitada suavemente e mantida a 37°C por 9 segundos. Na sequência, o tubo foi removido e inclinado sucessivamente em intervalos menores que 1 segundo a fim de observar a formação de um coágulo que interrompe a movimentação do líquido, momento no qual o cronômetro é parado e o tempo registrado. O período máximo de observação é de 165 segundos.

Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA)

A atividade foi realizada utilizando 100 μL do *pool* de plasma a ser medido incubado em diferentes concentrações dos derivados (100, 50 e 10 μM) diluídos em água Milli-Q com 1 % de DMSO. Esta mistura foi incubada por 10 minutos em banho-maria a 37°C. Posteriormente, 100 μL do reagente 1 do Kit de TTPA foi adicionado e incubado por 5 minutos. Em seguida, 100 μL do reagente 2 do Kit de TTPA é adicionado ao tubo a fim de observar a formação de um coágulo que interrompe a movimentação do líquido, momento no qual o cronômetro é parado e o tempo registrado. O tempo foi cronometrado por 110 segundos.

Atividade coagulante

A atividade foi avaliada utilizando-se 200 μL do *pool* de plasma humano citratado incubado em diferentes concentrações dos derivados (100, 50 e 10 μM) diluído em água Milli-Q com 1 % de DMSO. Esta mistura foi incubada por 9 segundos em banho-maria a 37°C e o tempo de formação da rede de fibrina foi cronometrado. Cada concentração foi testada em triplicata. O período máximo de observação para a formação da rede de fibrina foi de 5 minutos, se não houver formação de rede fibrina nesse tempo, a molécula é considerada sem atividade coagulante [60].

Atividade Hemolítica

O ensaio hemolítico foi realizado de acordo com Cargnin. *et al* [61] com algumas adaptações. Sangue periférico humano de voluntários saudáveis foi coletado com solução de Alsever (1:1) e centrifugado a 2000 rpm durante 5 min. A fração de eritrócitos foi lavada três vezes com PBS (pH 7,0) e ressuspensa em PBS para gerar uma suspensão com hematócrito de 1,0 %. Em microtubos os derivados foram dissolvidos em DMSO e água Milli-Q a fim de obter uma concentração final de 100, 50 e 10 μM . Os microtubos foram incubados a 37 ° C sob agitação horizontal, durante 1 hora e, em seguida, centrifugados a 3000 rpm durante 5 min. A absorbância do

sobrenadante foi medida em 540 nm. O experimento foi realizado em triplicata, e a porcentagem de hemólise foi calculada em comparação com 100 % de hemólise atribuído a ação de Triton-X100 1%.

4.3.4 Avaliação da atividade biológica dos compostos **1c** (LAFIS 10) e **2c** (LAFIS 13) *in vivo*

4.3.4.1 Atividade antimalárica *in vivo*

Ensaio supressivo de 4 dias

Conforme Fidock e colaboradores [62], os derivados **1c** e **2c** tiveram a atividade antimalárica avaliada *in vivo* frente à cepa de *Plasmodium berghei* ANKA (4^o passagem), originalmente fornecida pelo Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (USP-SP). Camundongos fêmeas BALB/c foram infectados com 200 µL de suspensão do sangue infectado através da via intraperitoneal, com um inoculo de 10⁶ hemácias parasitadas no dia 0 da infecção. Os animais foram divididos em 8 grupos de 6 animais cada. As doses utilizadas do derivado **1c** foram de 125, 60, 30 e 15 mg/kg; do derivado **2c** foram de 125 e 60 mg/kg; e do grupo cloroquina de 30 mg/kg; sendo que o grupo controle recebeu solução salina com DMSO 5%). Os fármacos foram administrados uma vez ao dia, por via intraperitoneal, durante 4 dias, após a infecção. O processo infeccioso induzido nos camundongos foi acompanhado por 14 dias pela determinação da parasitemia por hemoscopia, através de esfregaço em camada delgada de sangue coletado da porção terminal da cauda dos animais sob coloração de Giemsa. A parasitemia foi determinada pelo quociente entre o número de hemácias infectadas e totais, expresso em porcentagem de hemácias parasitadas, após contagem de 5000 eritrócitos totais ou 250 parasitados. A visualização das formas parasitadas foi realizada em microscópio ótico (imersão de óleo, 1000x). A eficácia antimalárica foi avaliada pelo nível de parasitemia, a atividade, o tempo médio de sobrevivência e a taxa de sobrevivência dos animais por até 4 semanas após a inoculação do parasito.

O percentual médio de atividade antimalárico é dado por: **100-[(média da parasitemia_{tratamento}/média da parasitemia_{controle})x100]**.

A dose efetiva para 50% do efeito máximo (ED₅₀) e a dose efetiva (E_{max}) foram calculadas através de modelo Emax hiperbólico.

4.3.4.2 Toxicidade aguda

A toxicidade aguda foi avaliada em conformidade com as diretrizes da OECD Protocolo - 423. De acordo com as diretrizes da OECD o ensaio iniciou com a dose 2000 mg/kg. Os derivados foram administrados nos animais por via intraperitoneal, e após a administração, os animais foram avaliados quanto a sinais de toxicidade, durante 72 horas. A observação foi contínua durante 14 dias. Após este período de observação, os animais sobreviventes foram anestesiados com quetamina:xilazina via intraperitoneal nas doses de 100:10 mg/kg respectivamente, com volumes administrados de 1 µl/g para quetamina 10% e 0,5 µl/g para xilazina 2 %. A eutanásia dos animais foi realizada por exanguinação, que consiste em realizar uma punção cardíaca até se obter a sangria total. O sangue coletado, os órgãos e tecidos retirados foram utilizados para análises subsequentes [63-65, 74].

Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos

A partir do sangue coletado no 14º dia dos animais submetidos ao ensaio de toxicidade foram analisados diversos parâmetros bioquímicos e hematológicos, visando a observação de possíveis danos ou toxicidade após o tratamento com as moléculas sintetizadas. Os parâmetros hematológicos avaliados foram: a contagem de eritrócitos, hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (MCH), concentração corpuscular média de hemoglobina (MCHC), variação da distribuição das hemácias (*red cell distribution width* - RDW), contagem de leucócitos totais (WBC), plaquetas (PLT), volume plaquetário médio (MPV) e variação da distribuição das plaquetas (PDW).

Na avaliação bioquímica foram medidos os níveis plasmáticos de creatinina, uréia, ácido úrico, alanina-transaminase (ALT), proteínas totais, triglicerídeos, colesterol total e a fração HDL-colesterol. Estas análises foram realizadas através de Kits comerciais em semi-automatização no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

Análise macroscópica e massa relativa dos órgãos

Os órgãos (fígado, rins, coração e cérebro) dos animais submetidos aos ensaios de toxicidade foram coletados no 14º dia após a exposição ao derivado **2c** para avaliação macroscópica de danos e da massa relativa.

4.4 Análise Estatística

As comparações entre as médias foram realizadas através da ANOVA, seguida do pós-teste de Tukey. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Nas curvas de sobrevivência (Kaplan-Meier) os resultados foram analisados por Log-rank (Mantel-Cox). Os dados foram analisados com o auxílio do software GraphPad Prism[®] versão 5.01.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão apresentados neste trabalho foram suprimidos tendo em vista que os mesmos estão em fase de submissão a periódicos.

6 CONCLUSÃO

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] F.E. Koehn e G.T. Carter, The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4 (2005) 206-220.
- [2] M.S. Butler, The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery, *J. Nat. Prod.* 67 (2004) 2141–2153.
- [3] S.C.B. Gnoatto, S. Susplugas, L.D. Vechia, T.B. Ferreira, A. Dassonville-Klimpt, K.R. Zimmer, C. Demailly, S. Nascimento, J. Guillon, P. Grellier, H. Verli, G. Gosmann, and P. Sonnet. Pharmacomodulation on the 3-acetylursolic acid skeleton: Design, synthesis, and biological evaluation of novel N-{3-[4-(3-aminopropyl)piperazinyl]propyl}-3-O-acetylursolamide derivatives as antimalarial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16 (2008)771–782.
- [4] G.N.S. Silva, N.R.G. Maria, D.C. Schuck, L.N. Cruz, M.S. Moraes, M. Nakabashi, C. Graebin, G. Gosmann, C.R.S. Garcia e S.C.B. Gnoatto, Two series of new semisynthetic triterpene derivatives: differences in anti-malarial activity, cytotoxicity and mechanism of action. *Malaria Journal* 12 (2013) 89.
- [5] A.M. Innocente, G.N.S. Silva, L.N. Cruz, M.S. Moraes, M. Nakabashi, P. Sonnet, G. Gosmann, C.R.S. Garcia and S.C.B. Gnoatto, Synthesis and Antiplasmodial Activity of Betulinic Acid and Ursolic Acid Analogues. *Molecules* 17 (2012) 12003-12014.
- [6] L. Dalla-Vechia, A. Dassonville-Klimpt, P. Grellier, P. Sonnet, G. Gosmann, S.C.B. Gnoatto, The Beckmann Rearrangement Applied to Ursolic Acid with Antimalarial Activity in Medicinal Chemistry Studies. *Letters in Organic Chemistry*, 9 (2012) 92-95.
- [7] S.C.B. Gnoatto, Planejamento e síntese de novos compostos derivados de agliconas triterpênicas de espécies de *Ilex* visando à atividade antimalárica. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- [8] T.C.C. França, M.G. Santos and J.D Figuerola-Villar, Malária: aspectos históricos e quimioterapia. *Quím. Nova* [online]. 31 (2008) 1271-1278.
- [9] A.C. Boareto, Efeitos da artemisinina (*Artemisia annua* L.) na gestação de ratas Wistar. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- [10] World Health Organization, World malaria report : 2013. Switzerland, 2011. http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/report/en/index.html. Acesso em 09/02/2014.
- [11] D.P. Neves, Parasitologia humana. 12. ed. São Paulo : Atheneu, 2011. 546 p.

- [12] M.M. Mota, G. Pradel, J.P. Vanderberg, J.C.R. Hafalla, U. Frevert, R.S. Nussenzweig, and A. Rodriguez, Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. *Science*, 291 (2001) 141-144.
- [13] K.D. Neame and C.A. Homewood, Alterations in permeability of mouse erythrocytes infected with malaria parasite, plasmodium-berghei. *International Journal for Parasitology*, 5 (1975) 537-540.
- [14] D.A. Elliott, M.T. McIntosh, H.D. Hosgood, S. Chen, G. Zhang, P. Baevova and K.A. Joiner, Four distinct pathways of hemoglobin uptake in the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (2008) 2463-2468.
- [15] F.P. Varotti, Quimioterapia antimalárica experimental e mecanismos de ação de antimaláricos envolvendo íons cálcio e prótons. Tese de doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2008.
- [16] L.H. Miller, D.I. Baruch, K. Marsh and O.K. Doumbo, The pathogenic basis of malaria. *Nature*, 415 (2002) 673-679.
- [17] Ministério da Saúde, Guia Prático de tratamento da malária no Brasil. Brasília, 2010.
- [18] Centers for Disease Control and Prevention - CDC. <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/> Acesso em 03 de março de 2014.
- [19] V.P. Memvanga, P. Bondo, Formulation design and in vivo antimalarial evaluation of lipid-based drug delivery systems for oral delivery of b-artether. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2012.
- [20] World Malaria Report. <http://worldmaliareport.org/map?color=8> Acesso em 03 de março de 2014.
- [21] Centers for Disease Control and Prevention - CDC. <http://www.cdc.gov/malaria/about/disease.html#uncomplicated> . Acesso em 03 de março de 2014.
- [22] A.R. Butler, S. Khan, E. Ferguson, A brief history of malaria chemotherapy. *J R Coll Physicians Edinb*, 40 (2010) 172-177.
- [23] S.J. Burgess, J.X. Kelly, S. Shomloo, S. Wittlin, R. Brun, K. Liebmann, D.H. Peyton, Synthesis, structure-activity relationship, and mode-of-action studies of antimalarial reversed chloroquine compounds. *Journal Med Chem*, 53 (2010) 6477-6489.

- [24] T.J. Egan, C.H. Kaschula, Strategies to reverse drug resistance in malaria. *Curr Opin Infect Dis*, 20 (2007) 598-604.
- [25] M.i. Veiga, P.E. Ferreira, B.A. Schmidt, U. Ribacke, A. Björkman, A. Tichopad, J.P. Gil, Antimalarial exposure delays *Plasmodium falciparum* intra-erythrocytic cycle and drives drug transporter genes expression. *PLoS One*, 5 (2010) e12408.
- [26] A. Nzila, L. Mwai, In vitro selection of *Plasmodium falciparum* drug-resistant parasite lines. *J Antimicrob Chemother*, 65 (2010) 390-398.
- [27] V.R. Solomon, H. Lee, Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *Eur J Pharmacol*, 625 (2009) 220-233.
- [28] S. Krishna, A.C. Uhlemann, R.K. Haynes, Artemisinins: mechanisms of action and potential for resistance. *Drug Resist Updat*, 7 (2004) 233-244.
- [29] I. Adam, M.T. Salah, H.G. Eltahir, A.H. Elhassan, K.A. Elmardi, E.M. Malik, Dihydroartemisinin-piperaquine versus artemether-lumefantrine, in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in central Sudan. *Ann Trop Med Parasitol*, 104 (2010) 319-326.
- [30] F. Smithuis, M.K. Kyaw, O. Phe, T. Win, P.P. Aung, A.P. Oo, A.L. Naing, M.Y. Nyo, N.Z. Myint, M. Imwong, E. Ashley, S.J. Lee, N.J. White, Effectiveness of five artemisinin combination regimens with or without primaquine in uncomplicated *falciparum* malaria: an open-label randomised trial. *Lancet Infect Dis*, 10 (2010) 673-681.
- [31] A.M. Dondorp, S. Yeung, L. White, C. Nguon, N.P. Day, D. Socheat, L. von Seidlein, Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment. *Nat Rev Microbiol*, 8 (2010) 272-280.
- [32] C.L. Hartwig, A.S. Rosenthal, J. D'Angelo, C.E. Griffin, G.H. Posner, R.A. Cooper, Accumulation of artemisinin trioxane derivatives within neutral lipids of *Plasmodium falciparum* malaria parasites is endoperoxide-dependent. *Biochem Pharmacol*, 77 (2008) 322-336.
- [33] U. Eckstein-Ludwig, R.J. Webb, I.D. Van Goethem, J.M. East, A.G. Lee, M. Kimura, P.M. O'Neill, P.G. Bray, S.A. Ward, S. Krishna, Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 424 (2003) 957-961.
- [34] A. Osei-Akoto, L. Orton, S.P. Owusu-Ofori, Atovaquone-proguanil for treating uncomplicated malaria. *Cochrane Database Syst Rev*, 4 (2005) CD004529.
- [35] P. Winstanley, Modern chemotherapeutic options for malaria. *Lancet Infect Dis*, 1 (2001) 242-250.

[36] Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000–2010. http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241500470_eng.pdf?ua=1. Acesso 03 de março de 2014.

[37] V. Borhade, et al. Clotrimazole nanoemulsion for malaria chemotherapy. Part II: Stability assessment, in vivo pharmacodynamic evaluations and toxicological studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 431 (2012) 149– 160.

[38] World Health Organization, [\[http://www.who.int/malaria/publications/atoz/status_rep_artemisinin_resistance_jan2014.pdf?ua=1\]](http://www.who.int/malaria/publications/atoz/status_rep_artemisinin_resistance_jan2014.pdf?ua=1). Acesso em 3 de março de 2014.

[39] A.P. Frasson, A.G. Barlette, C. Dalpizolo, I.P. Sauter, A.J. Macedo and T. Tasca, Estratégias e desafios no combate à malária. *Revista Liberato, Novo Hamburgo*, 10 (2009) 201-208.

[40] T.N. Wells et al. New medicines to improve control and contribute to the eradication of malaria. *Nat Rev Drug Discov.* 8 (2009) 879-891.

[41] B.B. Mishra, V.K. Tiwari, Natural products: an evolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46 (2011) 4769-4807.

[42] E. J. Barreiro & C.A.M Fraga, *Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos*. 2. Ed. Artmed, Porto Alegre, 2008, 536p.

[43] H. Ginsburg, E. Deharo, A call for using natural compounds in the development of new antimalarial treatments an introduction. *Malaria Journal*, 10 (2011) S1.

[44] C. Soldi, Derivados sintéticos dos triterpenos a e b-amirina e avaliação das propriedades analgésicas e antifúngicas. Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2007.

[45] K. Geisler, R.K. Hughes, F. Sainsbury, G.P. Lomonosoff, M. Rejzeka, S. Fairhurst, C.E. Olsen, M.S. Motawi, R.E. Melton, A.M. Hemmings, S. Bakb and A. Osbourne, Biochemical analysis of a multifunctional cytochrome P450 (CYP51) enzyme required for synthesis of antimicrobial triterpenes in plants. *PNAS*, 110 (2013) 35.

[46] H. Shenga e H. Sun, Synthesis, biology and clinical significance of pentacyclic triterpenes: a multi-target approach to prevention and treatment of metabolic and vascular diseases. *Nat Prod. Rep.*, 28 (2011) 543-593.

[47] G. Sun, X. Zhang, X. Xu, J. Yang, M. Zhong e J. Yuan, A New Triterpene From *Uncaria macrophylla* and Its Antitumor Activity. *Molecules*, 17 (2012) 1883-1889.

- [48] A. Mokoka, L.J. McGaw, L.L.K. Mdee, V.P. Bagla, E.O. Iwalewa e J.N. Eloff, Antimicrobial activity and cytotoxicity of triterpenes isolated from leaves of *Maytenus undata* (Celastraceae) Tsholofelo. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13 (2013).
- [49] J.A.R. Salvador, V.M. Moreira, B.M.F. Gonçalves, A.S. Lealab e Y. Jingd, Ursane-type pentacyclic triterpenoids as useful platforms to discover anticancer drugs. *Nat. Prod. Rep.*, 29 (2012) 1463.
- [50] R. Paduch, M. Kandefér-Szerszen, M. Trytek e J. Fiedurek, Terpenes: substances useful in human healthcare. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 55 (2007) 315–327.
- [51] H. Kommera, G.N. Kaluđerovic, J. Kalbitz e R. Paschke, Lupane Triterpenoids—Betulin and Betulinic acid derivatives induce apoptosis in tumor cells. *Invest New Drugs*, 29 (2011) 266–272.
- [52] Y. Ikeda, A. Murakami, e H. Ohigashi, Ursolic acid: An anti- and pro-inflammatory triterpenoid. *Mol. Nutr. Food Res.*, 52 (2008) 26–42.
- [53] R. Checker, S.K. Sandur, D. Sharma, R.S. Patwardhan, S. Jayakumar, Potent Anti-Inflammatory Activity of Ursolic Acid, a Triterpenoid Antioxidant, Is Mediated through Suppression of NF- κ B, AP-1 and NF-AT. *PLoS ONE* 7 (2012) e31318.
- [54] I.K. Wolska, A.M. Grudniak, B. Fiecek, A.K. Dowjat, A. Kurek, Antibacterial activity of oleanolic and ursolic acids and their derivatives. *Cent. Eur. J. Biol.* 5 (2010) 543-553.
- [55] L. Negundo, C. Chandramu, R.D. Manohar, D.G. Krupadanam, R.V. Dashavantha, Isolamento, caracterização e atividade biológica do ácido betulínico e ácido ursólico de *Vitex*. *Phytother Res.* 17 (2003) 129-134.
- [56] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria nº 116/MS/SNVS, de 8 de agosto de 1996. Dispõe sobre a Norma para Estudo da Toxicidade e da Eficácia de Produtos Fitoterápicos. Diário Oficial da União, 1996.
- [57] F.H.D. González, S.C. Silva, Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária. Porto Alegre: UFRGS, (2003) 179-198.
- [58] K.C.C. Cazarin, C.L. Corrêa, D.A.D.Z Zambrone, Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 40 (2004.) 3.
- [59] C.M. Güez, E.P. WaczukII, K.B. Pereira, M.V.M. Querol, J.B.T. Rocha, L.F.S. Oliveira, In vivo and in vitro genotoxicity studies of aqueous extract of *Xanthium spinosum*. *Braz. J. Pharm. Sci.* 48 (2012) 461-467.

- [60] L.C. Barros, Atividade coagulante e da toxicidade da giroxina nativa e irradiada com Cobalto-60 isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, Dissertação de mestrado, Programa de Pósgraduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2010.
- [61] S.T. Cargnin, P.B. Vieira, S. Cibulski, E. Cassel, R. M. F. Vargas, J. Montanhac, P. Roehe, T. Tasca, G.L. von Poser, Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of *Hypericum polyanthemum* extract obtained by supercritical fluid extraction and isolated compounds. *Parasitology International* 62 (2013) 112–117.
- [62] D.A. Fidock, P.J. Rosenthal, S.L. Croft, R. Brun and S. Nwaka, Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. *Nature reviews-drug Discovery*, 3 (2004) 509.
- [63] M.B. Jiménez-Díaz, S. Viera, J. Ibáñez, T. Mulet, A New In Vivo Screening Paradigm to Accelerate Antimalarial Drug Discovery. *PLoS ONE*, 8 (2013) 6.
- [64] L.M. Gama, Malária e medicina popular: efeito da *Bertholletia excelsa* H>B>K (castanha do Pará) em camundongos infectados com *Plasmodium berghei*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Pará, 2013, Belém.
- [65] W. Korte, S. Clarke, and J.B. Lefkowitz, Short Activated Partial Thromboplastin Times Are Related to Increased Thrombin Generation and an Increased Risk for Thromboembolism. *Am. J. Clin. Pathol.*, 113 (2000) 123–127.
- [66] F.T. Nicoloso, M. Lazzari e R.P. Fortunato. Propagação vegetativa de *Platanus acerifolia* Ait: (II) efeito da aplicação de zinco, boro e ácido indolbutírico no enraizamento de estacas. *Cienc. Rural* [online]. 29 (1999) 487-492.
- [67] J. Sampaio, R. Treméa, M.G. Marco, Estudo da genotoxicidade in vitro e in vivo após exposição aguda e subcrônica de extratos aquosos de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. obtidos por infusão. *R. bras. Bioci.*, 10 (2012) 462-467.
- [68] E.M. Molinaro, Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. Fundação osvaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.
- [69] W. Korte, S. Clarke, and J.B. Lefkowitz, Short Activated Partial Thromboplastin Times Are Related to Increased Thrombin Generation and an Increased Risk for Thromboembolism. *Am. J. Clin. Pathol.*, 113 (2000) 123–127.
- [70] R.McKenna, F. Bachmann, M. Miro-Quesada. Thromboembolism in patients with abnormally short activated thromboplastin time. *Thromb Haemost.* 38 (1977) 893-899.

- [71] G. Landi, A. D'Angelo, E. Boccardi, Venous thromboembolism in acute stroke: prognostic importance of hypercoagulability. *Arch. Neurol.* 49 (1992) 279-283.
- [72] E.N. Alves, Red Blood Cell (RBC) - Teste de hemólise: uma alternativa ao teste de Draize-Irritação Ocular na avaliação do poder tóxico de produtos cosméticos no controle de qualidade. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Vigilância sanitária, Fundação Osvaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2003.
- [73] Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa, Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasília, 2013, Versão 2.
- [74] OECD, 2001. Guideline 423. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. Adopted by the Council on 17th December.
- [75] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria nº 116/MS/SNVS, de 8 de agosto de 1996. Dispõe sobre a Norma para Estudo da Toxicidade e da Eficácia de Produtos Fitoterápicos. Diário Oficial da União, 1996.
- [76] A.P. Gomes, et al. Severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Rev. bras. ter. intensiva* [online]. 23 (2011) 358-369.
- [77] S.E. Hass, Avaliação da eficácia e farmacocinética de nanocápsulas poliméricas de quinina em ratos infectados com *Plasmodium berghei*. Dissertação de mestrado Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal Grande do Sul, 2007.

8 ANEXO

8.1 Anexo 1

Artigo

Atividade citotóxica frente a células C6 de glioma de derivados
triterpênicos semissintéticos

*Artigo em fase de construção, a ser submetido à revista Bioorganic & Medicinal
Chemistry*

Os dados referentes ao anexo 1 foram suprimidos tendo em vista que os mesmos estão em fase de submissão a um periódico científico.

9. Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT-if, Brasil), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brasil), Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES -Brasil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Brasil). Agradecemos também a TECNOVIN do Brasil, RS, pelo fornecimento do resíduo industrial.

10. Referências

- [1] WORLD HEALTH ORGANIZATION, Global Status Report on Non-Communicable Diseases http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report2010/en/ (2010).
- [2] F. Bray, A. Jemal, N. Grey, J. Ferlay and D. Forman, Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *Lancet Oncol.* 13(2012)790-801.
- [3] J. Ferlay, H.R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers, D.M. Parkin, Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 *Int J Cancer*, 127 (2010) 2893–2917.
- [4] A.G. Kurek, Efeitos do agente antiproliferativo de origem marinha ET-745 sobre o ciclo celular, apoptose e conteúdo de proteína Hsp70 em culturas de glioma humano. Dissertação de mestrado, Departamento de bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS, 2005, Porto Alegre.
- [5] J.A. Schwartzbaum, J.L. Fisher, K.D. Aldape, M. Wrensch, Epidemiology and molecular pathology of gliomas. *Nat Clin Pract Neurol.* 2 (2006) 494–501.
- [6] S. Sathornsumetee, Molecularly Targeted Therapy for Malignant Glioma. *Cancer*, 110(2007).
- [7] K.K. Bai, Synthesis and evaluation of ursolic acid derivatives as potent cytotoxic agents, *Bioorg Med Chem Lett*, 22 (2012) 2488-2493.
- [8] C. Martín-Cordero, M. Reyes, M.J. Ayuso, M.V. Toro, Cytotoxic triterpenoids from *Erica andevalensis*. *Z Naturforsch C.* 56(2001) 48-8.

- [9] X. Gao, D. Deeb, H. Jiang, Y. Liu, S.A. Dulchavsky, S.C. Gautam, Synthetic triterpenoids inhibit growth and induce apoptosis in human glioblastoma and neuroblastoma cells through inhibition of prosurvival Akt, NF-kappaB and Notch1 signaling. *J Neurooncol.* 84(2007)147-57.
- [10] H.C. Huang, C.Y. Huang, S.Y. Lin-Shiau, J.K. Lin, Ursolic acid inhibits IL-1beta or TNF-alpha-induced C6 glioma invasion through suppressing the association ZIP/p62 with PKC-zeta and downregulating the MMP-9 expression. *Mol Carcinog.* 48(2009)517-31.
- [11] Y.Q. Meng, D. Liu, L.L. Cai, H. Chen, B. Cao, Y.Z. Wang, The synthesis of ursolic acid derivatives with cytotoxic activity and the investigation of their preliminary mechanism of action. *Bioorg Med Chem.* 15 (2009) 848-54.
- [12] Y. Meng, Y. Song, Z. Yan, Y. Xia, Synthesis and in vitro cytotoxicity of novel ursolic acid derivatives. *Molecules.* 4;15(2010) 4033-40.
- [13] S.C.B. Gnoatto, S. Susplugas, L.D. Vechia, T.B. Ferreira, A. Dassonville-Klimpt, K.R. Zimmer, C. Demailly, S. Nascimento, J. Guillon, P. Grellier, H. Verli, G. Gosmann, and P. Sonnet. Pharmacomodulation on the 3-acetylursolic acid skeleton: Design, synthesis, and biological evaluation of novel N-{3-[4-(3-aminopropyl)piperazinyl]propyl}-3-O-acetylursolamide derivatives as antimalarial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16 (2008)771–782.
- [14] G. Gosmann, D. Guillaume, A.T.C. Taketa, E.P. Schenkel, *J. Nat. Prod.*, 58 (1995), p. 438.
- [15] A.M. Innocente, G.N.S. Silva, L.N. Cruz, M.S. Moraes, M. Nakabashi, P. Sonnet, G. Gosmann, C.R.S. Garcia and S.C.B. Gnoatto, Synthesis and Antiplasmodial Activity of Betulinic Acid and Ursolic Acid Analogues. *Molecules* 17 (2012) 12003-12014.
- [16] M.V. BERRIDGE, A.S. Tan, K.D. McCoy, R. Wang, The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica*, 4 (1996) 14-19.
- [17] V. Vichai1 & K. Kirtikara, Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols* 1 (2006) 1112 - 1116.
- [18] M.L. Silva, Obtenção de derivados químicos de produtos naturais empregando catálise convencional e enzimática. Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia, SALVADOR, 2012.
- [19] Scifinder® <https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf>
Acesso em 6 de fevereiro de 2014.

- [20] K. Mazumdera, E.R.O. Siwua, S. Nozakib, Y. Watanabeb, K. Tanakaa, K. Fukasea, Ursolic acid derivatives from Bangladeshi medicinal plant, *Saurauja roxburghii*: Isolation and cytotoxic activity against A431 and C6 glioma cell lines. *Phytochemistry Letters*, 4 (2011) 287–291.
- [21] K. Tanakaa, K. Mazumdera, E.R.O. Siwua, S. Nozaki, Y. Watanabe, K. Fukasea, Auxiliary-directed oxidation of ursolic acid by ‘Ru’-porphyrins: chemical modulation of cytotoxicity against tumor cell lines. *Tetrahedron Letters* 53 (2012) 1756–1759.
- [22] L. DALLA VECHIA, S.C.B. GNOATTO, G. GOSMANN. Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. *Química Nova*, 32 (2009) 1245-1252.
- [23] S.C.B.Gnoatto, planejamento e síntese de novos compostos derivados de agliconas triterpênicas de espécies de *Ilex* visando à atividade antimalárica. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.